

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23687030

研究課題名(和文) LRRK1によるEGFRシグナルの時空間的制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the spatiotemporal regulation of EGFR signal by LRRK1

研究代表者

花房 洋(Hiroshi, Hanafusa)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00345844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円、(間接経費) 5,550,000円

研究成果の概要(和文)：過剰なEGFRシグナルは細胞の癌化につながる。我々はLRRK1が、EGFRの細胞内トラフィックを制御することで、EGFRシグナルを時空間的に制御していることを明らかにした。LRRK1は、(1)EGFRの早期エンドソームから後期エンドソームへの移行を制御すること、(2)ESCRT-0構成因子STAM1と結合し、EGFRのエンドソーム内腔への取り込みを制御すること、を明らかにした。またLRRK1は、CLIP-170をリン酸化することで、EGFRの輸送開始に重要なことも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Excess signal from EGFR leads to tumorigenesis. We reveal that LRRK1 regulates EGFR signal spatiotemporally through the regulation of intracellular trafficking of EGFR. Our findings indicate that (1) LRRK1 regulates EGFR transport from early to late endosomes, and (2) LRRK1 regulates efficient sorting of EGFR to the inner vesicles of endosome by interacting with STAM1, a component of ESCRT-0 complex. Furthermore, LRRK1 plays an important role in the initiation of EGFR trafficking by phosphorylating CLIP-170.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：シグナル伝達 メンブレントラフィック LRRK1

1. 研究開始当初の背景

これまで申請者は Ras/MAP キナーゼ経路のネガティブフィードバック因子 Sprouty の解析から、細胞の増殖/分化には MAP キナーゼ活性の ON/OFF だけでなく、活性化時間が重要であることを明らかにしてきた (Hanafusa et al., *Nature Cell Biology*, 4 2002; Hanafusa et al., *J.Biol.Chem.*, 279 2004; Hanafusa et al., *Nature Cell Biology*, 11 2009)。Ras/MAP キナーゼ経路の活性化異常は、細胞の癌化を引き起こす事が知られている。上皮成長因子受容体 (EGFR) シグナルは、Ras/MAP キナーゼを活性化させる主要なシグナルの 1 つである。最近我々は、ROCO ファミリーキナーゼ LRRK1 が、EGFR の細胞内トラフィックを制御することで EGFR シグナルを時空間的に制御していることを見いだした。

LRRK1 は 1 分子内に Ras 様 GTPase ドメインと MAPKKK 様キナーゼドメインをもつユニークな蛋白質である。LRRK1 のファミリー分子 LRRK2 が、家族性パーキンソン病原因遺伝子 Park8 であることが明らかになり、臨床的にも非常に注目を集めている。しかしこれまで LRRK1 及び LRRK2 の機能や生理的役割に関してはほとんど明らかになっていなかった。我々は液層クロマトグラフィー質量分析法を用いて LRRK1 と相互作用する分子を探索した。その結果、EGFR シグナル経路においてアダプター分子として機能する Grb2 や微小管 + 端結合分子 CLIP170 などを同定した。これらの分子は EGFR 細胞内トラフィックに関与することから、EGFR シグナルに注目し LRRK1 の機能解析を行った。

2. 研究の目的

本研究課題では、以下の 3 点について解析を進め、LRRK1 による EGFR 細胞内トラフィック制御機構の分子機構の解明を目指した。

(i) LRRK1 キナーゼ活性の制御機構の解明
パーキンソン病患者で見つかった LRRK2 の変異の多くがキナーゼ活性を亢進させていることから、臨床的にも LRRK1、LRRK2 のキナーゼ活性制御機構の解明は重要であると考えられる。

(ii) LRRK1 による EGFR 輸送 (ダイニンモーター蛋白質に依存) の制御機構の解明
LRRK1 はキナーゼ活性依存的に EGFR の早期エンドソームから後期エンドソームへの移行を制御していることを明らかにしていた。またこの移行は、微小管上を Dynein モーター蛋白質依存的に行われている。そこで LRRK1 と相互作用する分子 Grb2 及び微小管 + 端結合分子 CLIP170 に注目し、LRRK1 による EGFR 輸送の機構の解明を目指した。

(iii) LRRK1 の基質の探索

LRRK1 はキナーゼ活性依存的に EGFR の細胞内輸送を制御しているため、基質の同定は

重要な課題であった。CLIP170 は細胞内でリン酸化により制御されていることが知られていたことから、LRRK1 が CLIP170 をリン酸化し、EGFR 輸送制御に機能していないか検討した。

3. 研究の方法

目的の 3 点について以下の計画をたてた。

(1) LRRK1 キナーゼ活性制御機構の解明

LRRK1 は 1 分子内に Ras 様 GTPase ドメインと MAPKKK 様キナーゼドメインをもつ。このことから、GTPase ドメインが自身のキナーゼドメインを制御している可能性を検討した。まず Ras などで知られている GTP 結合型変異および GDP 結合型変異と相同なアミノ酸に変異を導入し、GTPase 活性を固定したさい、LRRK1 のキナーゼ活性が変化するか *in vitro* キナーゼアッセイを行い検討した。LRRK1 の基質は不明であったため、LRRK1 の自己リン酸化能を指標に、キナーゼ活性を検討した。さらに、GTPase 活性を変化させる分子、翻訳後修飾について検討を行った。

(2) LRRK1 による EGFR 輸送 (ダイニンモーター蛋白質に依存) の制御機構の解明と (3) LRRK1 の基質の探索

LRRK1 と結合する分子として Grb2 及び CLIP170 を同定していた。そこで LRRK1 がこれらの分子を介して EGFR 輸送を制御していないか検討した。また CLIP170 に関しては、LRRK1 の基質として機能していないか検討した。具体的には、CLIP170 を断片化したリコンビナントタンパク質を作製し、LRRK1 によるリン酸化の有無を *in vitro* キナーゼアッセイにより検討した。さらにリン酸化がみられた場合は、質量分析によってリン酸化部位の同定を試みた。また LRRK1 による EGFR 輸送の制御機構解明には、蛍光ラベルした EGF を用いたタイムラプス観察や、siRNA を用いた内在性 LRRK1、CLIP170 のノックダウンによる効果、GST-pull down 法によるダイニン / ダイナクチン構成因子との結合の変化などの手法を組み合わせ、検討を行った。

4. 研究成果

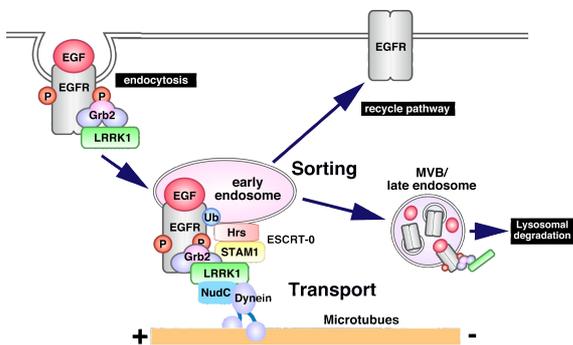
本研究から、LRRK1 は (1) アダプター分子 Grb2 を介し、活性化した EGFR と複合体を形成すること、(2) LRRK1 はキナーゼ活性依存的に EGFR の微小管上の輸送を制御し、EGFR の早期エンドソームから後期エンドソームへの移行を制御すること、(3) LRRK1 は ESCRT-0 複合体構成因子 STAM1 と結合し、EGFR のエンドソーム内腔への取り込みを制御すること、(4) LRRK1 は CLIP170 をリン酸化し、CLIP170 とダイナクチンとの結合を促進することで、EGFR 輸送の開始に機能していることを明らかにした。

(1) LRRK1 は Grb2 を介して EGFR と、EGF 刺激依存的に結合することを明らかにした。その後、細胞膜からとりこまれた EGFR-LRRK1

複合体は early endosome に共局在し、細胞膜へとリサイクルされるか、リソソームへと運ばれ分解されるか選別される (Nature Commun. 2011)。

(2) early endosome に局在した EGFR-LRRK1 はダイニンモータータンパク質依存的に微小管上を輸送され、late endosome へと運ばれて行く。この過程で、EGFR は LRRK1 の 944 番目のチロシンをリン酸化し、LRRK1 のキナーゼ活性を抑制していることを明らかにした (MBC 2013)。恒常的に活性化した LRRK1 を発現させると、EGFR を含むエンドソームの輸送が過剰に生じ、核近傍に肥大化した未成熟なエンドソームを形成してしまう。また EGFR のリソソームでの分解も阻害される。

(3) LRRK1 はエンドソーム膜上で ESCRT-0 複合体構成因子 STAM1 と相互作用し、ユビキチン化された EGFR をエンドソーム内腔に取



り込むのに機能していることを明らかにした (Nature Commun. 2011)。エンドソーム内腔への取り込みは、リソソーム分解経路への選別に必須の過程であり、LRRK1 はスキャホールドタンパク質としてこの過程に重要な役割を果たしていた。

(4) LRRK1 はキナーゼ活性依存的に EGFR の微小管上の輸送を制御している。また LRRK1 のキナーゼ活性は、自身の GTPase ドメインが制御していることを明らかにした (MBC 2013)。GTP 結合型 LRRK1 はキナーゼ活性が亢進しており、GDP 結合型 LRRK1 ではキナーゼ活性はみられなかった。さらに LRRK1 の基質を探索したところ、LRRK1 は in vitro で CLIP170 の C 末を強くリン酸化することがわかった。質量分析を用いてリン酸化候補部位を探索したところ、CLIP170 C 末の zinc knuckle ドメイン内にリン酸化部位が存在することが明らかとなった。Zinc knuckle ドメインは、CLIP170 と p150 Glued (ダイナクチン) との結合に重要なことが知られている。LRRK1 による CLIP170 のリン酸化は、この結合を促進し、EGFR のダイニン依存的な輸送に重要なことを明らかにした。LRRK1 は EGFR とともにダイニン/ダイナクチンと複合体を形成している。タイムラプス観察を用いた解析から、微小管の伸長にともなって伸びてきた微小管のプラス端に局在する CLIP170 が、

LRRK1 複合体と相互作用したさい、LRRK1 が CLIP170 をリン酸化すると、ダイナクチンと CLIP170 との結合が促進され、EGFR-LRRK1-ダイニン/ダイナクチン複合体が微小管プラス端にローディングされる。その後、ダイニン依存的に EGFR-LRRK1 を含むエンドソームが、微小管上をマイナス端方向に輸送が開始されていくことがあきらかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

(1) Hanafusa, H., Ishikawa, K., Kedashiro, S., 以下省略 (10人中1番目)
Leucine-rich repeat kinase LRRK1 regulates endosomal trafficking of the EGF receptor. *Nature Commun.*, 2:158 (2011).

(2) Ishikawa, K., Nara, A., Matsumoto K., and Hanafusa, H.
EGFR-dependent phosphorylation of leucine-rich repeat kinase LRRK1 is important for proper endosomal trafficking of EGFR. *Mol. Biol. Cell*, 23:1294-1306 (2012).

[学会発表](計12件)

花房洋、慶田城迅、渡辺崇、貝淵弘三、松本邦弘

The regulation of the intracellular trafficking of EGFR by ROCO family kinase LRRK1

第65回日本細胞生物学会年会

2013年6月19日~21日

ウインク愛知

Haruka Ikeda, Hiroshi Hanafusa, Tomoki Nishioka, Kozo Kaibuchi, Kunihiro Matsumoto, Kyoko Shirakabe

LRRK1 regulates the maturation of autolysosome by phosphorylating Rab7

第36回日本分子生物学会年会

2013年12月3日~6日

神戸ポートアイランド

Shin Kedashiro, Hiroshi Hanafusa, Takashi Watanabe, Kozo Kaibuchi, Kunihiro Matsumoto

LRRK1 regulates EGFR intracellular trafficking by phosphorylating CLIP-170

第36回日本分子生物学会年会

2013年12月3日~6日

神戸ポートアイランド

小松日菜子、花房洋、松本邦弘

LRRK1 は M 期中心体の integrity 維持に必要である

第 35 回日本分子生物学会年会
2012 年 12 月 11 日～14 日
福岡国際会議場

佐井和人、花房洋、松本邦弘
PP5 は LRRK1 キナーゼ活性を負に制御することで紡錘体の多極化を防いでいる
第 35 回日本分子生物学会年会
2012 年 12 月 11 日～14 日
福岡国際会議場

伊藤裕志、花房洋、松本邦弘
LRRK1 はキネトコアとスピンドル微小管との接着を安定化する
第 35 回日本分子生物学会年会
2012 年 12 月 11 日～14 日
福岡国際会議場

慶田城迅、花房洋、高島成二、松本邦弘
LRRK1 は CLIP170 をリン酸化することにより EGFR の微小管上の輸送を制御する
第 35 回日本分子生物学会年会
2012 年 12 月 11 日～14 日
福岡国際会議場

花房洋、手塚基弘、豊島文子、松本邦弘
PLK1-LRRK1 経路による M 期紡錘体配向の制御機構
第 34 回日本分子生物学会年会
2012 年 12 月 13 日～16 日
パシフィコ横浜

石川光紀、花房洋、奈良篤樹、松本邦弘
EGFR 依存的な LRRK1 のリン酸化は適切な EGFR 細胞内トラフィックに重要である
第 34 回日本分子生物学会年会
2012 年 12 月 13 日～16 日
パシフィコ横浜

宇佐美学史、花房洋、松本邦弘
LRRK1 は Prefoldin 複合体と相互作用することで星状体微小管の形成に機能している
第 34 回日本分子生物学会年会
2012 年 12 月 13 日～16 日
パシフィコ横浜

佐井和人、花房洋、松本邦弘
セリンスレオニンフォスファターゼ PP5 による LRRK1 キナーゼ活性の制御機構
第 34 回日本分子生物学会年会
2012 年 12 月 13 日～16 日
パシフィコ横浜

崔恵蘭、花房洋、松本邦弘
LRRK1 は aggregates の輸送を介して aggresome 形成を制御する
第 34 回日本分子生物学会年会
2012 年 12 月 13 日～16 日
パシフィコ横浜

〔図書〕(計 1 件)
Hanafusa H., Matsumoto K.
Regulation of intracellular trafficking of the EGF receptor by ROCO family kinase LRRK1.
Seikagaku 83, 1127-1131 (2011)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
http://bunshi3.bio.nagoya-u.ac.jp/~bunshi6/matsumoto_japanese/

6. 研究組織
(1) 研究代表者
花房 洋 (Hanafusa Hiroshi)
名古屋大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：00345844