

令和元年6月12日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04697

研究課題名(和文) LRRK1-Dynein複合体による逆行輸送制御機構

研究課題名(英文) Regulation of retrograde transport mediated by LRRK1-Dynein complex

研究代表者

花房 洋 (Hanafusa, Hiroshi)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：00345844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究から、(1) LRRK1が微小管プラス端結合因子CLIP-170をリン酸化し、p150Gluedとの結合を促進することで、EGFRを含むエンドソムの微小管上の輸送開始に機能することが明らかとなった。さらに(2) LRRK1はRab7のSwitchII領域に存在するSer-72をリン酸化し、Rab7とRILPとの結合を選択的に促進することを明らかにした。また(3) LRRK1はM期中心体で活性化し、中心体構成因子CDK5RAP2をリン酸化し、g-tubulin依存的な微小管nucleationを促進することで紡錘体配向制御に機能することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ある種の癌細胞では、EGFRシグナルが過剰になっている。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シグナルを負に制御することを明らかにした。このことは、過剰なEGFRシグナルが引き起こす細胞癌化に対し、それを防ぐ手立てを開発するのに役立つ可能性がある。さらにLRRK1のファミリー分子LRRK2は、家族性パーキンソン病原因遺伝子(Park8)であるが、その作用機序や生理的役割・パーキンソン病発症機構は依然として不明なままである。LRRK1とLRRK2は一部共通の機構で機能しており、LRRK1の機能解析はLRRK2の作用機構解明に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：From this study, we revealed that (1) LRRK1 functions to initiate the transport of EGFR-containing endosome along microtubules through the phosphorylation of a microtubule plus end-binding factor CLIP-170 and the promotion of its binding to p150Glued. Furthermore, we revealed that (2) LRRK1 phosphorylates Ser-72 located in the SwitchII region of Rab7 and selectively promotes the binding between Rab7 and RILP. In addition, we revealed that (3) LRRK1 was activated in the M-phase centrosome and phosphorylates the centrosome component CDK5RAP2. This functions in the regulation of spindle orientation by promoting g-tubulin-dependent microtubule nucleation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：LRRK1 EGFR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Dynein モーター蛋白質は様々な Cargo (積み荷) を輸送することで、多様な細胞機能 (シグナル応答や細胞恒常性維持、細胞分裂制御など) に機能している。しかし、Dynein がどのように Cargo (積み荷) を選別し、その輸送を制御しているのか、未だ不明な点が多い。最近の研究から、Dynein による輸送システムの破綻は、神経変性疾患など重篤な疾患を引き起こすことがわかってきた。申請者はこれまで、ROCO ファミリーキナーゼ LRRK1 の機能に注目し研究を行ってきた。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 であることから、臨床的にも注目を集めている。しかしこれまで、LRRK1 及び LRRK2 の作用機序や生理的役割はあまり明らかになっていない。我々は LRRK1 が、Dynein と複合体を形成し、上皮成長因子受容体 (EGFR) の細胞内輸送を制御することを明らかにした (Nature Commun., 2011; Mol. Biol. Cell, 2012)。LRRK1 はアダプター分子 Grb2 を介して、活性化した EGFR と複合体を形成し、共に初期エンドソームへとエンドサイトーシスされる。ここで LRRK1 は、ESCRT 複合体とともに EGFR のエンドソーム内腔への取り込みを促進するとともに、Dynein による微小管上の輸送に重要な働きをしていることを明らかにしてきた。LRRK1 による EGFR を含むエンドソームの輸送には、LRRK1 のキナーゼ活性が重要であり、基質の同定が当面の課題である。さらに LRRK1 は、EGFR のリソソーム分解キネティクスをコントロールすることで、細胞増殖に重要な EGFR シグナルを時間的・空間的に制御していることがわかってきた。また一連の研究過程で、LRRK1 がオートファゴソームの輸送・成熟に重要な予備的データや、Dynein とともに M 期中心体の成熟に關与する予備的データを得た。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに得られた予備的データをもとに、LRRK1 による (1) EGFR 細胞内輸送・成熟制御機構の解明、(2) オートファゴソーム輸送・成熟機構の解明、(3) 逆行輸送による M 期中心体成熟の制御機構の解明、に焦点を当て、Dynein による輸送制御機構の解析と Cargo 選別機構について解析を行なう。特に LRRK1 はキナーゼであることから、それぞれの細胞機能における特異的な基質を同定し、リン酸化を介した作用機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) LRRK1 による EGFR 細胞内輸送・成熟制御機構の解明

EGFR 細胞内輸送における LRRK1 の基質として微小管プラス端結合因子 CLIP-170 を同定していた。そこで (a) LRRK1 による CLIP-170 のリン酸化部位の同定、(b) LRRK1 による CLIP-170 リン酸化の EGFR 細胞内トラフィックにおける役割、に注目し解析を行う。

(a) に関しては、GST-CLIP-170 リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* キナーゼアッセイを行い、質量分析によってリン酸化部位の同定を進める。

(b) に関しては、同定したリン酸化部位に、アラニンまたはアスパラギン酸・グルタミン酸の変異を導入し、非リン酸化型またはリン酸化模倣型変異体を作成し、それらの EGFR 細胞内トラフィックに与える影響を検討する。またリン酸化抗体を作製し、LRRK1 による CLIP-170 のリン酸化がいつ、どこで起きているのか解析する。

(2) LRRK1 によるオートファゴソーム輸送・成熟制御機構の解明

オートファジーにおける LRRK1 の機能に関し以下の予備的な実験結果を得ている。(a) 細胞を Triton で刺激 (オートファジーを誘導する) 後タイムコースをとると、コントロールの細胞ではオートファゴソームの核付近への蓄積と、リソソームマーカー LAMP1 との共局在がみられたのに対し、LRRK1 をノックダウンした細胞では、オートファゴソームは細胞質に散在したままで、LAMP1 との共局在もみられなかった。このことは LRRK1 をノックダウンすることで、オートファゴソームの輸送及びオートリソソームへの成熟が阻害されていることを示している。

(b) さらに LRRK1 がどのようにオートファゴソームの輸送 / 成熟を制御しているのか検討したところ、LRRK1 の基質として低分子量 G 蛋白質 Rab7 を同定した。Rab7 はオートファゴソームに局在し、オートファゴソームの輸送及び、リソソームとの融合に重要なことが知られている。

そこでこれらの知見を踏まえ、LRRK1 による Rab7 のリン酸化部位の同定および、Rab7 のリン酸化が、(i) Rab7 のオートファゴソーム局在に重要か、(ii) Rab7 の活性化に重要か、(iii) Rab7 のエフェクター分子選別に重要か、解明する。(i) に関して、Rab7 のエンドソームへの局在には Mon1/Ccz1 複合体が重要であることが知られている。そこでオートファゴソームへの局在にも同様の機構が存在し、LRRK1 によるリン酸化で相互作用が制御されているか検討する。(ii) に関しては、Rab7 の活性状態 (GTP 結合型または GDP 結合型) を、エフェクター分子 RILP の結合ドメイン (220-299 a. a.) を用いた GST-pull down により検討する。Rab7 はラパマイシン依存的に活性化 (GTP 結合型) することが知られているが、LRRK1 をノックダウンした細胞で活性化が抑制されるか検討する。(iii) に関しては、Rab7 はその機能に応じて多数のエフェクター分子を持つことが知られている。例えば Rab7 陽性エンドソーム (またはオートファゴソーム) の輸送には、RILP や FYCO1、Retromer が、リソソームとの融合には HOPS 複合体などが機能している。そこで LRRK1 が Rab7 をリン酸化することで、これらエフェクター分子との相互作用の選別に機能していないか検討する。また Rab7 のリン酸化部位に対するリン酸化抗体を作製して、

LRRK1 による Rab7 のリン酸化がいつ、どこで生じているのか検討する。

(3) LRRK1 による M 期中心体成熟制御機構の解明

これまで M 期中心体で LRRK1 が活性化していることを明らかにした。また M 期キナーゼである CDK1 および PLK1 が、LRRK1 をリン酸化し活性化させていることも明らかにしていた。さらに LRRK1 をノックダウンした細胞では、中心体成熟が阻害され、紡錘体配向がランダムになることを明らかにしていた。そこで LRRK1 の中心体における基質を同定し、活性化した LRRK1 がどのように中心体成熟および紡錘体配向制御に機能しているのか解析する。

4. 研究成果

(1) LRRK1 による EGFR 細胞内輸送・成熟制御機構について、LRRK1 が CLIP-170 の C 末端 zinc-knuckle ドメインに存在する Thr1384 をリン酸化していることを明らかにした。さらにこの部位をリン酸化された CLIP-170 は、Dynactin 構成因子 p150Glued との結合が増大し、Dynein/Dynactin 複合体を微小管プラス端にリクルートすることが明らかとなった。その結果、LRRK1/EGFR を含むエンドソームは、微小管上をプラス端からマイナス端に向かって輸送されていくことがわかった。これらの結果は、*Journal of Cell Science* に発表済みである (Kedashiro et al., *JCS* 2015)。

(2) LRRK1 によるオートファゴソーム輸送・成熟制御機構については、LRRK1 が Rab7 の SwitchII 領域に存在する Ser-72 をリン酸化することを明らかにした。Switch II 領域は、エフェクター分子と結合する領域であり、リン酸化依存的にエフェクターとの結合が制御されているか検討したところ、LRRK1 による Rab7 のリン酸化は、Rab7 と RILP との結合を選択的に促進することを明らかにした。また LRRK1 による Rab7 のリン酸化は、Rab7 の膜局在を促進することも見出している。現在、オートファゴソームの輸送・成熟におけるリン酸化の役割について解析を進めている。

(3) LRRK1 による M 期中心体成熟制御機構については、LRRK1 の基質として中心体構成因子 CDK5RAP2 を同定した。また M 期における LRRK1 の活性化機構について解析を進めたところ、LRRK1 は PLK1 によって Ser1790 がリン酸化され、このリン酸化依存的に CDK1 によりキナーゼドメイン内の activation loop に存在する Thr-1400 がリン酸化され活性化することを明らかにした。このように M 期キナーゼによる連続的な LRRK1 のリン酸化が、M 期中心体における LRRK1 の活性化に必須であった。さらに中心体で活性化した LRRK1 は、CDK5RAP2 の N 末 Ser-140 をリン酸化し、CDK5RAP2 と g-tubulin との結合を促進することを見出した。その結果 CDK5RAP2 は、g-tubulin 依存的な微小管 nucleation を促進し、中心体からの星状体微小管形成に機能していることがわかった。これら星状体微小管の形成は、紡錘体配向制御に必須であった。以上の成果は、*Nature Cell Biology* に発表済みである (Hanafusa et al., *Nat. Cell Biol.* 2015)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

(1) Hanafusa, H. * et al.

LRRK1 phosphorylation of Rab7 at S72 links trafficking of EGFR-containing endosomes to its effector RILP. *J. Cell Sci.*, in press (査読有)

(2) Hanafusa, H. *, Matsumoto, K. *

LRRK1 regulates spindle orientation by phosphorylating CDK5RAP2. *Cell cycle*, 14:3349-3350 (2015) (査読有)

DOI: [10.1080/15384101.2015.1093446](https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1093446)

(3) Hanafusa, H. *, Kedashiro, S., Tezuka, M., Funatsu, M., Usami, S., Toyoshima, F., and Matsumoto, K. *

PLK1-dependent activation of LRRK1 regulates spindle orientation by phosphorylating CDK5RAP2. *Nat. Cell Biol.* 17:1024-1035 (2015) (査読有)

DOI: [10.1038/ncb3204](https://doi.org/10.1038/ncb3204)

(4) Kedashiro, S., Pastuhov, S.I., Nishioka, T., Watanabe, T., Kaibuchi, K., Matsumoto, K. *, and Hanafusa, H. *

LRRK1-phosphorylated CLIP-170 regulates EGFR trafficking by recruiting p150Glued to microtubule plus ends. *J. Cell Sci.*, 128:385-396 (2015) (査読有)

DOI: [10.1242/jcs.161547](https://doi.org/10.1242/jcs.161547)

〔学会発表〕(計 5件)

1 花房洋

ROCO family kinase LRRK1 regulates the transport and maturation of EGFR-containing endosomes.

BIT's 8th Annual Congress of Molecular & Cell Biology-2018 2018年10月15日 福岡

2 花房洋

LRRK1によるエンドソームから発信されるEGFRシグナルの制御

日本生化学会年次大会 2018年9月26日 京都

3 花房洋

LRRK1による細胞内トラフィックを介したEGFRシグナル制御

生命科学系学会合同年次大会 2017年12月6日(ワークショップ:オーガナイザー)

神戸ポートアイランド

4 花房洋、松本邦弘

ROCOファミリーキナーゼLRRK1によるシリア退縮制御

第39回日本分子生物学会 2016年11月30日(招待講演) 横浜

5 花房洋、松本邦弘

ROCO family kinase LRRK1 regulates the transport and maturation of autophagosomes phosphorylation

第68回細胞生物学会 2016年6月15日(招待講演) 京都

〔図書〕(計 1件)

花房洋、松本邦弘

ROCOファミリーキナーゼLRRK1の基質依存的な細胞機能

生化学 89, 286-289 (2017)

〔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:

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:

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/index.html

6. 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。