

- 16) Rigbolt, K.T.G., Prokhorova, T.A., Akimov, V., Henningsen, J., Johansen, P.T., Kratchmarova, I., Kassem, M., Mann, M., Olsen, J.V., & Blagoev, B. (2011) *Sci. Signal.*, 4, rs3.

小迫 英尊  
(徳島大学疾患酵素学研究センター  
疾患プロテオミクス研究部門)

Global analysis of protein kinase substrates using phospho-proteomic techniques

Hidetaka Kosako (Division of Disease Proteomics, Institute for Enzyme Research, The University of Tokushima, 3-18-15 Kuramoto-cho, Tokushima 770-8503, Japan)

## ROCO ファミリーキナーゼ LRRK1 による EGFR 細胞内トラフィックの制御

### 1. はじめに

ROCO ファミリーキナーゼ LRRK1 (leucine-rich repeat kinase 1) は, Ras に似た GTPase ドメインと MAPKK キナーゼに似たキナーゼドメインを持つユニークなタンパク質である. 近年 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となり, ROCO ファミリーキナーゼは臨床的にも非常に注目を集めている<sup>1,2)</sup>. しかし, 現在のところ LRRK1, LRRK2 の細胞内における機能は, ほとんど明らかにされていない. 我々は LRRK1 の機能を明らかにする目的で, LRRK1 と相互作用する因子の探索を行った. その結果, LRRK1 は上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) の下流で機能するアダプター分子 Grb2 (growth factor receptor binding protein 2) と相互作用することを見出した. その後の解析から, LRRK1 が Grb2 を介して活性化した EGFR と複合体を形成し, EGFR の細胞内トラフィックの制御に関与することが明らかになった<sup>3)</sup>. 本稿では, LRRK1 による EGFR 細胞内トラフィックの制御機構について概説する.

### 2. EGFR 細胞内トラフィック

細胞膜上の EGFR はリガンドによって活性化すると, MAP キナーゼ経路など下流シグナル伝達経路を活性化するとともに, 自身はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる. 細胞内に取り込まれた EGFR は早期エンドソームに集められ, ここで細胞膜に戻されリサイクルさ

れるか, 多胞体 (multivesicular body, MVB) / 後期エンドソームに運ばれリソソームによって分解されるか, 選別される. この選別には, ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) 複合体と呼ばれる一群のタンパク質が重要な役割を果たしている<sup>4)</sup>. ESCRT 複合体は ESCRT-0, I, II, III の四つの複合体から成り, 主に早期エンドソーム膜上で EGFR をリソソーム分解経路に選別している (MVB sorting). この選別にはユビキチンがタグとして機能しており, ユビキチン化された EGFR は, ESCRT 複合体によって認識されるとエンドソーム内腔へと取り込まれる. 早期エンドソームは, 細胞内を移動しながら内腔小胞を形成していき, MVB / 後期エンドソームへと成熟していく<sup>5)</sup>. リソソーム分解経路に選別された EGFR は, エンドソームの成熟とともにどんどん内腔小胞に取り込まれていき, 最終的にリソソームと融合して分解される (図 1). 我々は, LRRK1 が EGFR とともに早期エンドソームに局在することを見出したことをきっかけに, EGFR 細胞内トラフィックにおける役割について解析を行った.

### 3. EGFR 細胞内輸送における LRRK1 の機能

LRRK1 は Grb2 と常に結合しており, EGF 刺激依存的に Grb2 を介して EGFR と複合体を形成する. その後 LRRK1 は, EGFR とともにエンドサイトーシスされ早期エンドソームに局在する. LRRK1 の機能を検討するため, siRNA を用いて内在性 LRRK1 をノックダウンしたところ, EGFR は早期エンドソームに蓄積し MVB / 後期エンドソームへ移行できないことが明らかとなった (図 2). LRRK1 をノックダウンした細胞に野生型 LRRK1 を戻すと, EGFR は MVB / 後期エンドソームへ移行できるようになるのに対し, キナーゼ活性を欠失した LRRK1 変異体を戻しても EGFR の MVB / 後期エンドソーム移行の回復は見られなかった. このことから, LRRK1 はキナーゼ活性依存的に EGFR の早期エンドソームから MVB / 後期エンドソームへの移行を制御していることが明らかとなった.

EGFR の早期エンドソームから MVB / 後期エンドソームへの移行には, 二つの重要なステップが存在する. 一つ目のステップは, 細胞膜近傍から核付近への空間的な移動である. ほとんどの細胞では, 早期エンドソームは細胞膜近傍あるいは細胞質全体に散在し, MVB / 後期エンドソーム及びリソソームは核付近に存在している. つまり, 細胞膜から取り込まれ早期エンドソームに局在した EGFR がリソソームで分解されるためには, 細胞膜近傍から核付

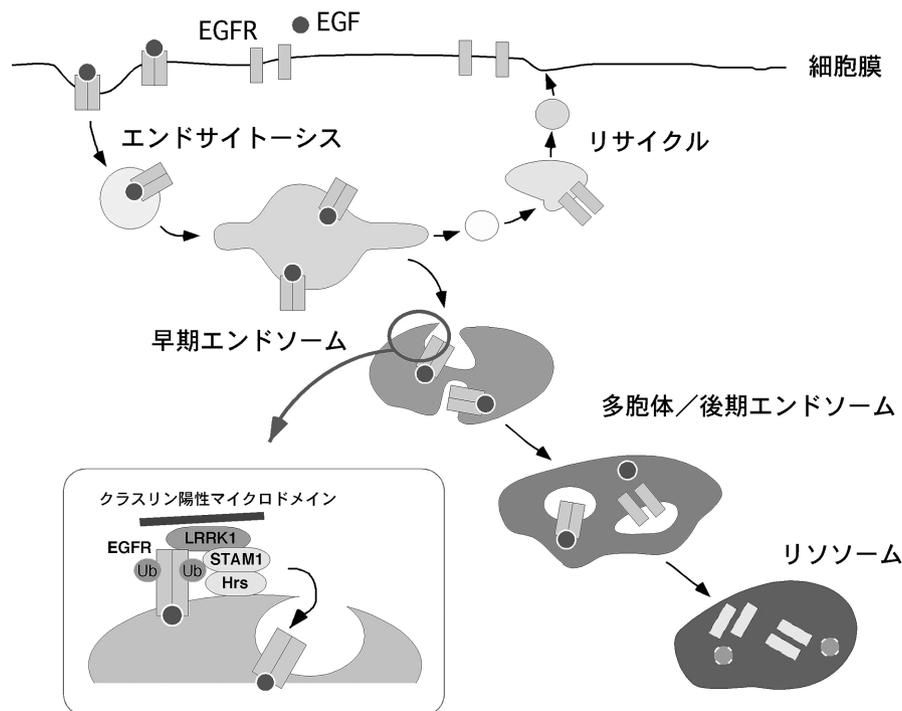


図1 EGFR細胞内トラフィックとLRRK1による制御

細胞膜上で活性化したEGFRはエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、早期エンドソーム、多胞体/後期エンドソームを経てリソソームで分解される。このとき、リサイクルされるEGFRは細胞膜に戻され、分解されるEGFRはESCRT複合体によってエンドソーム内腔へと取り込まれる。LRRK1はEGFRを含む早期エンドソームの細胞膜近傍から核付近への移動と、EGFRのエンドソーム内腔への取り込みに重要な役割を果たしている。

近へと移動しなければならない。最近の研究から、EGFRを含む早期エンドソームは、微小管上をDyneinモータータンパク質によって運ばれると考えられている<sup>6)</sup>。次に、二つ目のステップは、ESCRT複合体によるリソソーム分解経路への選別のステップである。先に述べたように、リソソームによって分解されるEGFRは、ESCRT複合体によって認識されMVB内腔へと取り込まれていく。一方、再利用されるEGFRは、早期エンドソームがMVB/後期エンドソームへと成熟していく過程で分離し、細胞膜へとリサイクルされていく。LRRK1がEGFRの早期エンドソームからMVB/後期エンドソームへの移行に重要なことから、これら二つのステップに関与するか解析を行った。

まず一つ目のステップについて、生細胞を用いたタイムラプス解析により、LRRK1がEGFRを含む早期エンドソームの輸送に機能しているか検討した。コントロールの細胞では、EGFRを含む早期エンドソームは微小管上を長

距離移動と短距離移動をある頻度で行うことが観察される。一方、LRRK1をノックダウンした細胞では、EGFRを含む早期エンドソームの核方向への長距離移動はほとんど見られなくなった。Dyneinが細胞膜近傍から核付近への長距離移動を担っていると考えられることから、LRRK1はDyneinとともにEGFRを含む早期エンドソームの微小管マイナス端方向(核方向)への輸送を制御している可能性が考えられる。興味深いことに、EGFRを含まない早期エンドソームの運動性はLRRK1をノックダウンした細胞でも正常であった。このことは、EGFRを含む早期エンドソームでのみLRRK1が機能し、EGFRを含まない早期エンドソームでは別の制御機構が存在することを示唆している。

#### 4. LRRK1はEGFRのエンドソーム内腔への取り込みを促進している

次に、LRRK1がESCRT複合体によるEGFRリソソーム

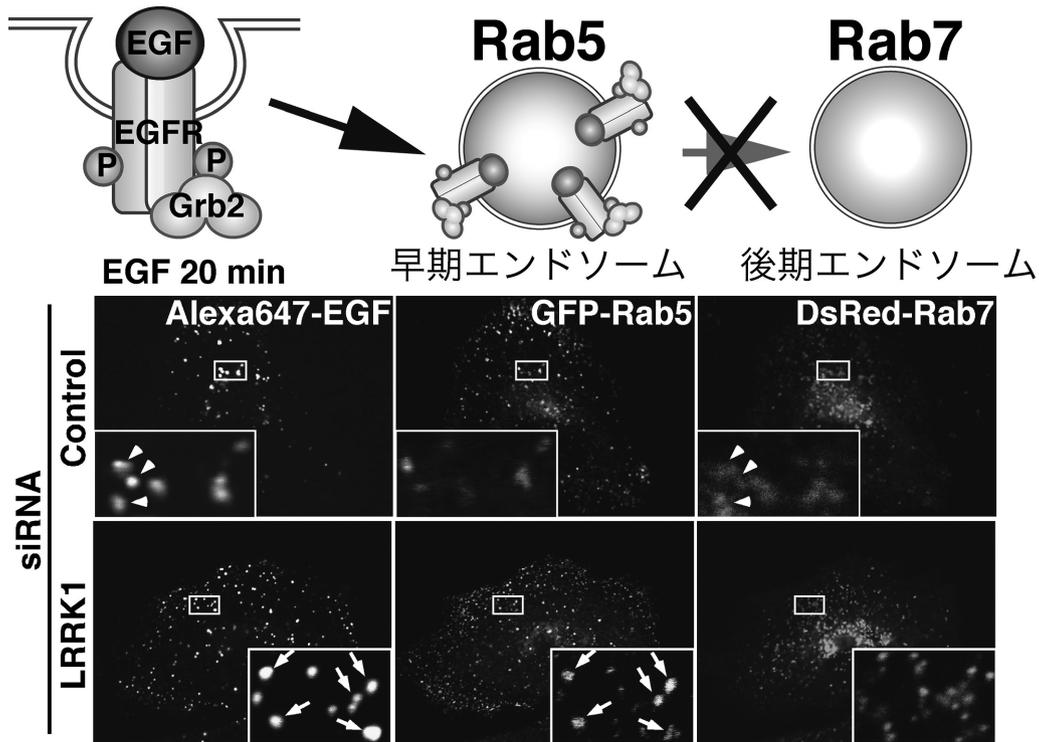


図2 LRRK1はEGFRの早期エンドソームから後期エンドソームへの移行を制御する  
HeLa S3細胞にGFP-Rab5(早期エンドソームマーカー), DsRed-Rab7(後期エンドソームマーカー)を発現させ、蛍光標識したEGFで刺激した。写真は上段がControl siRNAで処理した細胞を、下段がLRRK1 siRNAで処理した細胞を示している。コントロールでは刺激後20分でEGFはRab7と共局在する(矢尻)のに対し、LRRK1をノックダウンした細胞ではRab5と共局在したまま(矢印)である。

ム分解経路選別に機能しているか解析を行った。LRRK1とESCRT複合体構成因子との相互作用を検討した結果、LRRK1はESCRT-0構成因子STAM1(signal transducing adaptor molecule 1)及びHrs(hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate)と特異的に結合することが明らかとなった。STAM1及びHrsはユビキチン結合ドメインをもち、ユビキチン化されたEGFRと相互作用することでEGFRをリソソーム分解経路へと選別している。この選別は早期エンドソーム膜上の特定のマイクロドメイン(クラスリン陽性マイクロドメイン)で行われ、このマイクロドメインにユビキチン化されたEGFRとESCRT-0, I, II, III複合体が局在し、EGFRはエンドソーム内腔へと取り込まれる(図3)<sup>7)</sup>。我々は、LRRK1がEGFR及びSTAM1と3者複合体を形成すること、LRRK1をノックダウンした細胞ではEGFRとSTAM1との結合が減少することを明らかにした。このことは、LRRK1がスキャホールドタンパク質としてEGFRとESCRT-0との相互作用を促進していることを示唆している。さらに、LRRK1ノック

ダウンによるEGFRのマイクロドメイン局在及びエンドソーム内腔への取り込みに対する影響について、検討を行った。細胞に恒常的活性型Rab5を発現させるとエンドソームの融合が促進され、蛍光顕微鏡下レベルでマイクロドメイン及び内腔小胞の観察が可能となる(図3)。この細胞を用いて解析を行った結果、LRRK1をノックダウンした細胞ではEGFRのクラスリン陽性マイクロドメインへの局在が減少し、エンドソーム内腔への取り込みも阻害されることが明らかとなった(図3)。このように、LRRK1はEGFRとESCRT-0との結合を促進することで、EGFRのエンドソーム内腔への取り込み(リソソーム分解経路への選別)に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

これまで、リソソーム分解経路に選別される膜タンパク質とESCRT複合体との相互作用は、膜タンパク質のユビキチンとESCRT複合体構成因子のユビキチン結合ドメインとの相互作用で説明されてきた<sup>8)</sup>。しかし、ユビキチンとユビキチン結合ドメインとの結合は非常に弱いことか

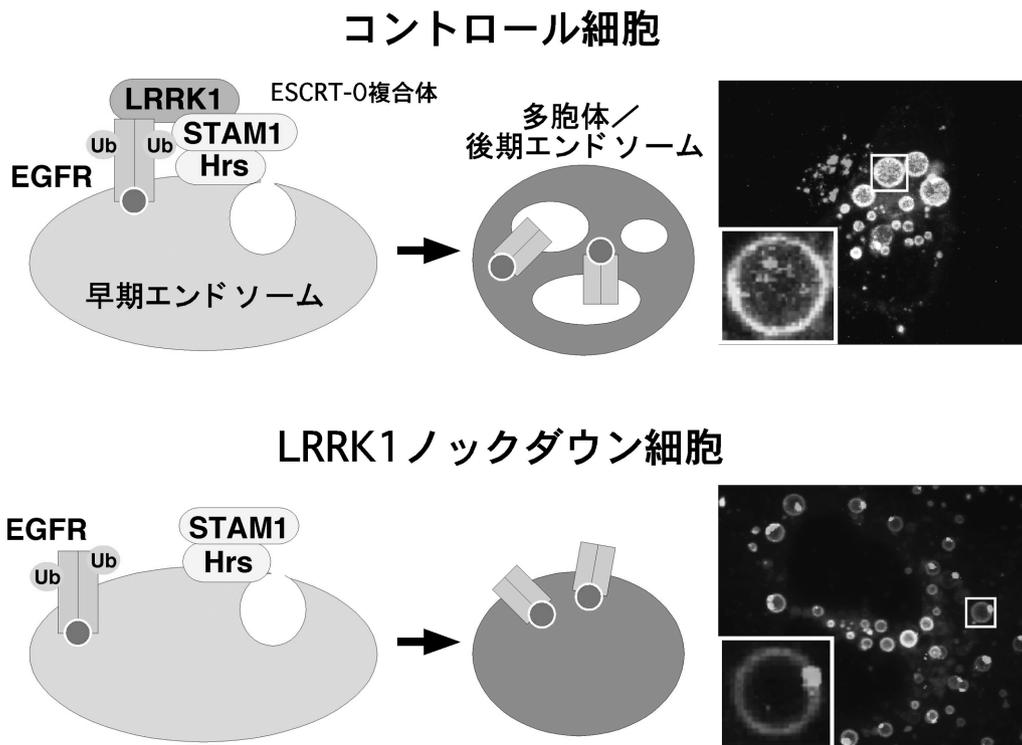


図3 LRRK1はEGFRのエンドソーム内腔への取り込みを制御する  
HeLa S3細胞にGFP-Rab5(Q79L)を発現させ、Control siRNA(上段)またはLRRK1 siRNA(下段)で処理した。写真で緑は肥大化したエンドソームを紫はEGFを示している。LRRK1をノックダウンした細胞ではEGFのエンドソーム内腔への取り込みが阻害され、膜上に残ったままになっている。

ら、EGFRのような迅速にリソソームで分解されなければならない膜タンパク質では、LRRK1がESCRT複合体による認識を促進するco-factorとして機能していると考えられる。

### 5. 活性化したEGFRの時空間制御と細胞癌化

最近の研究から、細胞膜に局在したEGFRとエンドソームに局在したEGFRは、異なる下流シグナル経路を活性化することが明らかとなった。このことは、EGFRの細胞内トラフィック制御がEGFRシグナルの強度、活性化時間の制御だけでなく、質的に異なる下流経路の活性化にも重要であることを意味している<sup>9,10</sup>。LRRK1をノックダウンした細胞では、EGFRが早期エンドソームに蓄積する結果、タンパク質レベルでの分解が顕著に遅延する。この時、下流シグナル経路の活性化状態を検討した結果、ERK/MAPキナーゼ経路の活性化は弱く持続するものの顕著な変化はみられなかった。これに対しAkt経路の活性化は非常に強く活性化されることが明らかになった。この結

果から、早期エンドソーム上のEGFRは、ERK/MAPキナーゼ経路よりむしろAkt経路を活性化させていることが予想される。活性化したEGFRがリソソームで分解されない細胞では、EGFRシグナルが過剰になり癌化することが知られている<sup>11</sup>。活性化したEGFRの下流でどのシグナル経路が癌化に寄与しているのか、興味深いところである。

### 6. 今後の展望

我々の研究から、LRRK1はキナーゼ活性依存的にEGFRの早期エンドソームからMVB/後期エンドソームへの移行(輸送)を制御することが明らかとなった。また、このときLRRK1はESCRT-0複合体と相互作用することで、EGFRのエンドソーム内腔小胞への取り込みにも寄与している。先にも述べたように、早期エンドソームは細胞膜近傍から核付近へと移動しながら、MVB/後期エンドソームへと成熟していく。このエンドソームの成熟には、早期エンドソームの空間的な移動が、リソソームで分解さ

れる膜タンパク質とリサイクルされる膜タンパク質との選別と協調して行われることが必要である。LRRK1はEGFRを含む早期エンドソームの核方向への輸送と、ESCRT複合体によるEGFRのリソソーム分解経路選別の両方に機能することから、これらの二つのイベントを協調させるキーファクターとして機能していることが期待される。さらに、LRRK1はキナーゼ活性依存的にEGFRの細胞内トラフィックを制御している。この制御に参与するLRRK1キナーゼの基質の同定と、EGFRの細胞内トラフィックにおけるLRRK1キナーゼ活性の制御機構の解明が、今後の重要な研究課題である。

- 1) Paisan-Ruiz, C., *et al.* (2004) *Neuron*, 44, 595–600.
- 2) Zimprich, A., *et al.* (2004) *Neuron*, 44, 601–607.
- 3) Hanafusa, H., Ishikawa, K., Kedashiro, S., Saigo, T., Iemura, S., Natsume, T., Komada, M., Shibuya, H., Nara, A., & Matsumoto, K. (2011) *Nature Commun.*, 2, 158.
- 4) Raiborg, C. & Stenmark, H. (2009) *Nature*, 458, 445–452.
- 5) Woodman, P.G. & Futter, C.E. (2008) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 20, 408–414.
- 6) Driskell, O.J., Mironov, A., Allan, V.J., & Woodman, P.G. (2007) *Nature Cell Biol.*, 9, 113–120.
- 7) Raiborg, C., Wesche, J., Malerod, L., & Stenmark, H. (2006) *J. Cell Sci.*, 119, 2414–2424.
- 8) Hoeller, D., Crosetto, N., Blagoev, B., Raiborg, C., Tikkanen, R., Wagner, S., Kowanetz, K., Breitling, R., Mann, M., Stenmark, H., & Dikic, I. (2006) *Nat. Cell Biol.*, 8, 163–169.
- 9) Miaczynska, M., Pelkmans, L., & Zerial, M. (2004) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 16, 400–406.
- 10) von Zastrow, M. & Sorkin, A. (2007) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 19, 436–445.
- 11) Pines, G., Kostler, W.J., & Yarden, Y. (2010) *FEBS Lett.*, 584, 2699–2706.

花房 洋, 松本 邦弘

(名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻)

Regulation of intracellular trafficking of the EGF receptor by ROCO family kinase LRRK1

Hiroshi Hanafusa and Kunihiko Matsumoto (Department of Molecular Biology, Graduate School of Science, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464-8602, Japan)

## 尿酸排出トランスポーター ABCG2/BCRP と痛風発症リスク

### 1. はじめに

ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2)/breast cancer resistance protein (BCRP) は, multidrug resistance gene 1 (MDR1/ABCB1)・multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1) 非依存的に抗がん剤耐性を示したヒト乳がん細胞から発見されたトランスポーターであり<sup>1)</sup>, さまざまな組織の頂端膜において細胞内から細胞外への基質化合物の排出を担っている。発見の経緯もあり, 当初は抗がん剤耐性に関する研究が中心であったが, ABCG2が広範な組織分布と広い基質認識性を有することが次第に明らかとなり, 現在では多様な視点から研究が進められている<sup>2)</sup>. 本稿においては, ABCG2の生理的役割, 遺伝子多型に伴う薬物動態変動に加え, 最近見出されたABCG2による尿酸輸送および痛風発症リスクとの関連性について紹介する<sup>3)</sup>.

### 2. ABCG2の生理的役割

ABCG2はATP結合部位を一つしか持たないハーフトランスポーターであり, 分子間ジスルフィド結合により形成されるホモ二量体として機能している。肝臓, 腎臓, 小腸, 脳など多くの組織に発現しており, 基質化合物の胆汁中・尿中への排泄促進, 消化管吸収の抑制, 血液脳関門・胎盤・精巣におけるバリア機能などを担っていることが示されている。

輸送基質についても数多くの研究がなされており, ゲフィチニブなどの抗がん剤, ロスバスタチンなどのHMG-CoA還元酵素阻害薬, シプロフロキサシンなどのニューキノロン系抗菌薬をはじめとする薬物に加え, ステロイドホルモン・薬物の硫酸抱合体や植物エストロゲン, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP) に代表されるがん原性物質, 尿酸 (詳細は後述)<sup>3,4)</sup>などを輸送することが報告されている。

PhIPなどのABCG2基質化合物は母乳中/血漿中濃度比が大きく, Abcg2ノックアウトマウスでその比が大幅に低下することは, 化合物の乳汁分泌におけるAbcg2の関与を示していると考えられる<sup>5)</sup>. マウスと同様, ヒトにおいても授乳期には乳腺におけるABCG2発現量が上昇するこ