

細胞内情報伝達の活性強度を加減調節する タンパク質リン酸化酵素 NLK

1. はじめに

私たちヒトを含む多細胞生物のからだは、様々な機能と構造を持つ複雑な構造体である。これまでの遺伝学的研究や発生生物学的研究により、多細胞生物のからだの構築と維持には Wnt/ β カテニンシグナルや Notch シグナル、受容体チロシンキナーゼシグナルなどの情報伝達経路（シグナル伝達経路）の活性が必須であることがわかっている。しかしながら、情報伝達経路は数えられるほどしか存在しておらず、これらの単純なオン・オフ制御のみで複雑精緻な構造体を作り上げ、維持することができるとは考えにくい。一つの考え方として、情報伝達経路の活性強度の加減調節（ファインチューニング）が情報伝達経路の出力を多様化させ、これが多細胞体の構造の複雑化をもたらしている、と考えることができる。本稿では、このような情報伝達強度の加減調節を担う分子として注目されている Nemo-like kinase (NLK) について、著者らの研究成果を中心に解説させて頂きたい。

2. Wnt/ β カテニンシグナル活性調節因子としての NLK の発見

NLK 遺伝子は、1994年にショウジョウバエの個眼形成に関わる遺伝子 *nemo* として最初に発見された¹⁾。通常、ショウジョウバエの個眼は六角形の形状をしているが、*nemo* 遺伝子の機能欠損個体では個眼の形状が四角形になる。このため、朝鮮語（韓国語）で“四角形”を意味する *nemo* がこの遺伝子の名前として付けられた¹⁾。その後、1998年にマウス *nemo* 遺伝子ホモログとして Nemo-like kinase (NLK) がクローニングされた²⁾。しかしながら、NLK ファミリーの分子群の分子レベルの機能は全くわかっていなかった。そのような中で、オレゴン大学の Bowerman 博士らを中心とした我々の研究グループは、内胚葉形成に異常を持つ線虫 *C. elegans* 突然変異株群の解析を行い、その一つである *lit-1* 変異株の原因遺伝子が *nemo*/NLK のホモログであることを発見し、さらに *lit-1* 遺伝子産物が Wnt/ β カテニンシグナルの転写因子 POP-1 の核局在を阻害することにより細胞の内胚葉への運命選択を促進することを見いだした³⁾。Wnt/ β カテニンシグナルは、脊椎動物においては組織や器官の構築・維持、幹細胞性の維持、がん発生など様々な局面で重要な役割を担っており、このシグナルの活性強度調整機構の解明は、動物の個体発生機構の理解のみならず、様々な医療技術の発展に貢献しうると期待できる。そこで我々は、哺乳動物における NLK と Wnt/ β カテニンシグナルの関係の検討も行い、

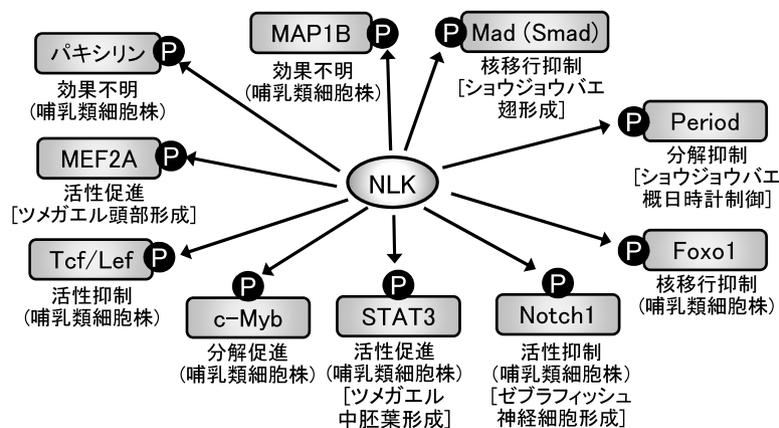


図1 NLKの基質群

NLKによってリン酸化を受けるタンパク質群を示した。各タンパク質の下に、リン酸化の効果によって引き起こされる効果を示した。また、さらにその下に、そのリン酸化が観察された細胞を括弧で、そのリン酸化によって制御される生命現象を大括弧で示した。

その結果、ヒト培養細胞 HEK293 及び HeLa において NLK が Wnt シグナルの転写因子 Tcf/Lef (POP-1 ホモログ) をリン酸化し、これにより Tcf/Lef の DNA 結合能を低下させ、Wnt シグナル標的遺伝子発現を低下させることを発見した (図 1)^{4,5)}。

3. NLK による転写因子群の活性制御

この我々による最初の NLK の分子機能の報告を皮切りに、この十数年余りで数多くの新たな NLK の分子機能が報告された。まず、理化学研究所の石井俊輔先生を中心とした研究グループにより、造血細胞の増殖と死を制御する転写因子である c-Myb が NLK の新たな基質であること、そして、CV-1 細胞において NLK が c-Myb をリン酸化すると c-Myb のタンパク質としての安定性が低下することが報告された⁶⁾ (図 1)。続いて、東京医科歯科大学の澁谷浩司先生らのグループにより、アフリカツメガエル初期胚において NLK ホモログが転写因子 STAT3 をリン酸化してその転写活性を促進することにより中胚葉形成に貢献すること⁷⁾や、転写因子 MEF2A のリン酸化を介して頭部前方領域の形成に貢献すること⁸⁾が発見された (図 1)。また最近、韓国のグループが、ストレス応答や代謝、寿命制御など様々な現象に関わる転写因子である Foxo1 が NLK によってリン酸化され、このリン酸化により Foxo1 が核から排出され、Foxo1 依存的な遺伝子発現が低下することを報告している⁹⁾。一方で我々も、NLK が様々な哺乳動物細胞 (HEK293, HeLa, Sw480, neuro-2a, PC12 など) において Notch1 をリン酸化して Notch1 転写複合体の形成を阻害し、Notch1 による転写活性化を抑制すること、この制御による Notch シグナル強度の加減調節が脊椎動物の神経板における適切な数の神経細胞の形成に必須であることを見いだしている¹⁰⁾ (図 1)。

ショウジョウバエにおいても *nemo* 遺伝子産物 (Nemo) の機能解析が積極的に行われており、Nemo が Bone morphogenetic protein (BMP) シグナルの転写因子 Smad のホモログ Mad をリン酸化してその核移行を抑制することにより BMP シグナルを弱めること¹¹⁾ (図 1) や、概日時計を制御する転写因子である Period をリン酸化してそのタンパク質安定性を促進することにより概日時計制御に貢献するなど¹²⁾ (図 1)、驚くべき機能が明らかにされている。

4. NLK は細胞膜付近でも機能する

NLK は過剰発現すると大部分が核に局在し²⁾、またこれまでに発見された基質が全て転写因子であったことから、

NLK は核でしか機能しないと信じられてきた。しかしながら、我々は抗 NLK 抗体を用いた PC12 細胞及び neuro-2a 細胞の染色により、これらの細胞株の内在性の NLK の大部分が核周辺領域、特にゴルジ体周辺に強く局在することを見いだした^{13,14)}。さらに、神経成長因子 NGF で刺激した PC12 細胞では、内在性の NLK が核内と細胞膜周辺の双方へ局在変化し、同時に内在性 NLK の酵素活性も上昇することを発見した^{13,14)}。このことは、NLK が核内と細胞膜周辺の双方において機能することを示唆している。我々は NLK の細胞膜における基質を探索し、その結果、NGF シグナルの下流で NLK が接着斑裏打ちタンパク質パキシリンの Ser-126 残基と微小管結合タンパク質 MAP1B をリン酸化することを見いだした¹³⁾ (図 1)。NLK によるこれらのリン酸化の意義は不明であるが、PC12 細胞において NLK を RNAi により機能阻害すると、NGF によって誘導される MAP1B とパキシリン Ser-126 のリン酸化だけでなく、NGF によって PC12 細胞の細胞辺縁部に誘導されるアクチンネットワーク形成と細胞突起伸長も阻害される¹³⁾ことから、おそらく NLK は *in vivo* においてこれらの基質のリン酸化を介して神経突起の形成、伸展に貢献しているものと予測している。また最近、ショウジョウバエ Nemo が接着タンパク質 E カドヘリンをリン酸化することが報告されており¹⁵⁾、今後も NLK/Nemo の核外におけるさらなる新機能の発見が期待される。

5. NLK の活性制御機構

前述のように、NLK は重要なシグナル伝達経路の主要分子をリン酸化しその活性を制御することがわかってきており、その活性制御機構の解明は非常に重要な課題となっている。現在までに、NLK の活性化を促す細胞外シグナル分子としては Wnt, Activin, IL-6, NGF などが報告されている^{6,7,13,16,17)}。さらに、Wnt, Activin, IL-6 による NLK の活性化には Ser/Thr キナーゼ TAK1 が関与し^{7,16,17)}、NGF による NLK の活性化には低分子量 G タンパク質 Ras が関与することもわかっている¹³⁾ものの、これらの分子群がどのような分子機構で NLK を活性化するのは全くわかっていない。また一方で、NLK は mitogen activated protein kinase (MAPK) ファミリーの Ser/Thr キナーゼに構造的に類似していること²⁾が知られており、MAPK と同様の機構で活性化するのではないかと考えられてきた。しかしながら、NLK と MAPK の一次構造を詳細に比較すると、NLK の活性化機構が MAPK とは大きく異なる可能性が見えてくる。一般的な MAPK は、その活性化ループに存在

する Thr-Xxx-Tyr (TXY) モチーフの Thr と Tyr を上流の MAPK キナーゼによってリン酸化されることによってそのキナーゼ活性を活性化し、さらにホモダイマーを形成して核内に移行する (図 2)¹⁸⁾。興味深いことに、MAPK の TXY モチーフに該当する部位が NLK では Thr(286)-Gln(287)-Glu(288)となっており²⁾、Tyr に相当する残基が酸性アミノ酸、つまりリン酸化状態をミミックした状態になっている。また、一般的な MAPK は単独で細胞に過剰発現しても上流からの活性化シグナルなしには活性化しないが、NLK はこれとは異なり、単独で過剰発現しただけでそのキナーゼとして活性化状態となり、核へも移行することができる^{2,14)}。私たちはこの NLK と MAPK の類似と相違に注目し、NLK の活性化機構を解析した。その結果、細胞に過剰発現した NLK はホモダイマーを形成し、ホモダイマー内で Thr-286 を分子間で互いにリン酸化して活性化することが明らかになった (図 2)¹⁴⁾。また、ホモダイマー形成は NLK の細胞内局在にも関与しており、ホモダイマー形成能を持つ NLK は核内や細胞質、細胞膜周辺へ局在するのに対し、ホモダイマー形成能を持たない NLK 変異体は核周辺領域に限定的に局在した¹⁴⁾。このように、ホモダイマー形成は一般的な MAPK では主に核への局在のみに必要であるのに対し、NLK ではその活性化と核局

在の双方に必要なことがわかった。我々はさらに、細胞内在性の NLK も同様の機構で活性化するかの検討を行った。その結果、内在性 NLK も NGF などの上流シグナルに応答してホモダイマーとなり、核周辺領域から核内へ局在変化するとともに、Thr-286 を自己リン酸化して活性化することも明らかになった¹⁴⁾。このように、「NLK 活性化の起動スイッチがそのホモダイマー形成にある」ことが明らかになった。今後は、このホモダイマー形成の制御機構を解明する必要がある。非常に興味深いことに、ゲル濾過クロマトグラフィーを使った解析により、不活性化状態の内在性 NLK やホモダイマー形成能を欠く変異体 NLK は巨大なヘテロ複合体を形成していることが明らかになっている (図 2)¹⁴⁾。このことから、このヘテロ複合体の実体を解明することが NLK ホモダイマー形成制御機構解明の近道となると期待している。またこれまでに、MAPK ファミリーの Ser/Thr キナーゼ p38 が NLK の Ser-510 のリン酸化を介して NLK のキナーゼ活性を活性化すること¹⁹⁾や、Ser/Thr キナーゼ Homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) が Thr-286 ではない未知の残基のリン酸化を介して NLK のキナーゼ活性の上昇を導くことが報告されており⁶⁾、これらのリン酸化とホモダイマー形成の関係を検討することも一つのアプローチと考えられる。

6. NLK はリチウム感受性キナーゼである

上述のように、我々は「PC12 細胞において NGF によって誘導されるパキシリン Ser-126 のリン酸化は NLK が担っている」ことを明らかにしている¹³⁾が、その一方で PC12 細胞を塩化リチウムで処理すると NGF によるパキシリン Ser-126 リン酸化の誘導が抑制されることがこれまでに報告されており²⁰⁾、このため塩化リチウム感受性キナーゼとしてよく知られている Glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) が NGF シグナルによるパキシリン Ser-126 のリン酸化を担っていると信じられていた²⁰⁾。しかしながら我々は、NGF によるパキシリン Ser-126 リン酸化誘導が NLK の RNAi によっては阻害されるが、GSK-3 β の特異的阻害剤の添加では阻害されないことを確認しており¹³⁾、これらのことから「塩化リチウムが NLK に作用している可能性」があることに気付いた。そこでこの可能性を検討した。その結果、NLK の *in vitro* におけるキナーゼ活性と PC12 細胞における NLK の自己リン酸化活性が塩化リチウム存在下で抑制されることが明らかになった¹³⁾。加えて、塩化ナトリウムは *in vivo* においても *in vitro* においても NLK の活性に全く影響しないことも明らかになった (未

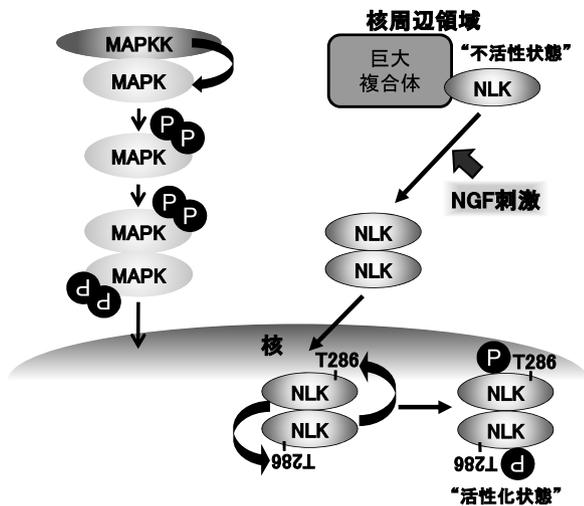


図 2 MAPK と NLK の活性化機構

一般的な MAPK は、MAPK キナーゼ (MAPKK) によってリン酸化されることによってそのキナーゼ活性を活性化し、さらにホモダイマーを形成して核内に移行する。一方で NLK は、不活性化状態のときは核周辺領域において巨大なヘテロ複合体を形成しており、NGF 刺激を受けるとホモダイマーを形成し、核内へ局在変化するとともに、ホモダイマー内で Thr-286 を分子間で互いにリン酸化して活性化する。

発表データ)。これらの結果から、NLK がリチウム感受性キナーゼであることが示唆された。リチウムは躁鬱病の治療薬としてよく知られているが、どのような分子機構で躁鬱病治療に貢献しているかは未だに良くわかっておらず、リチウムの分子・細胞レベルにおける効果の解析が精力的になされている。これまでにわかっているリチウムの分子レベルの効果としては、GSK-3 β の活性抑制、タンパク質リン酸化酵素 Akt の活性促進、イノシトールリン脂質経路の抑制が知られている。今回我々は、新たなリチウムの標的として NLK を再発見した。非常に興味深いことに、リチウムには Wnt/ β カテニンシグナル及び Notch シグナルの双方の活性を促進する効果がある。これらの効果は、これまでは GSK-3 β の活性抑制を介したのものであると信じられてきた。しかしながら、NLK が Wnt シグナル抑制能と Notch シグナル抑制能の双方を持つこと^{4,10)}から、リチウムの Wnt・Notch シグナル促進効果の一部は NLK を介したものである可能性が期待できる。

7. おわりに

近年の研究により、NLK が細胞の増殖、分化、運動を担う複数の重要なシグナル経路の活性強度を制御することがわかってきており、基礎生物学研究者だけでなく多くの医学研究者が NLK の研究に参加するようになってきている。しかしながら、脊椎動物個体における NLK の機能と制御は未だに解析が十分に進んでいない。その原因として、抗-活性化 NLK 抗体などの細胞内在性の NLK の活性状態をモニタリングするシステムと、NLK 阻害剤などの NLK の機能阻害を容易に行うシステムが確立されていないことを挙げることができる。今後、私はこれらのシステムの開発を進め、NLK 研究推進に努めたい。また、NLK は複数の細胞機能制御分子の活性を制御する能力を持つので、「NLK が動物個体内の同一細胞において複数シグナルを同時に制御し、シグナルの統合を担っている可能性」が大いに期待できる。この可能性を追究する研究も積極的に進めていきたい。

- 1) Choi, K.W. & Benzer, S. (1994) *Cell*, 78, 125–136.
- 2) Brott, B.K., Pinsky, B.A., & Erikson, R.L. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 963–968.
- 3) Meneghini, M.D., Ishitani, T., Carter, J.C., Hisamoto, N., Ninomiya-Tsuji, J., Thorpe, C.J., Hamill, D.R., Matsumoto, K., & Bowerman, B. (1999) *Nature*, 399, 793–797.
- 4) Ishitani, T., Ninomiya-Tsuji, J., Nagai, S., Nishita, M., Meneghini, M., Barker, N., Waterman, M., Bowerman, B., Clevers, H., Shibuya, H., & Matsumoto, K. (1999) *Nature*,

- 399, 798–802.
- 5) Ishitani, T., Ninomiya-Tsuji, J., & Matsumoto, K. (2003) *Mol. Cell Biol.*, 23, 1379–1389.
- 6) Kanai-Ishii, C., Ninomiya-Tsuji, J., Tanikawa, J., Nomura, T., Ishitani, T., Kishida, S., Kokura, K., Kurahashi, T., Ichikawa-Iwata, E., Kim, Y., Matsumoto, K., & Ishii, S. (2004) *Genes Dev.*, 18, 816–829.
- 7) Ohkawara, B., Shirakabe, K., Hyodo-Miura, J., Matsuo, R., Ueno, N., Matsumoto, K., & Shibuya, H. (2004) *Genes Dev.*, 18, 381–386.
- 8) Satoh, K., Ohnishi, J., Sato, A., Takeyama, M., Iemura, S., Natsume, T., & Shibuya, H. (2007) *Mol. Cell Biol.*, 27, 7623–7630.
- 9) Kim, S., Kim, Y., Lee, J., & Chung, J. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 8122–8129.
- 10) Ishitani, T., Hirao, T., Suzuki, M., Isoda, M., Ishitani, S., Horigaya, K., Kitagawa, M., Matsumoto, K., & Itoh, M. (2010) *Nature Cell Biol.*, 12, 278–285.
- 11) Zeng, Y.A., Rahnema, M., Wang, S., Sosu-Sedzorme, W., & Verheyen, E.M. (2007) *Development*, 134, 2061–2071.
- 12) Chiu, J.C., Ko, H.W., & Edery, I. (2011) *Cell*, 145, 357–370.
- 13) Ishitani, T., Ishitani, S., Matsumoto, K., & Itoh, M. (2009) *J. Neurochem.*, 111, 1104–1118.
- 14) Ishitani, S., Inaba, K., Matsumoto, K., & Ishitani, T. (2011) *Mol. Biol. Cell*, 22, 266–277.
- 15) Mirkovic, I., Gault, W.J., Rahnema, M., Jenny, A., Gaengel, K., Bessette, D., Gottardi, C.J., Verheyen, E.M., & Mlodzik, M. (2011) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 18, 665–672.
- 16) Ishitani, T., Kishida, S., Hyodo-Miura, J., Ueno, N., Yasuda, J., Waterman, M., Shibuya, H., Moon, R.T., Ninomiya-Tsuji, J., & Matsumoto, K. (2003) *Mol. Cell Biol.*, 23, 131–139.
- 17) Kojima, H., Sasaki, T., Ishitani, T., Iemura, S., Zhao, H., Kaneko, S., Kunimoto, H., Natsume, T., Matsumoto, K., & Nakajima, K. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 4524–4529.
- 18) Miyata, Y. & Nishida, E. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 266, 291–295.
- 19) Ohnishi, E., Goto, T., Sato, A., Kim, M.S., Iemura, S., Ishitani, T., Natsume, T., Ohishi, J., & Shibuya, H. (2010) *Mol. Cell Biol.*, 30, 675–683.
- 20) Cai, X., Li, M., Vrana, J., & Schaller, M.D. (2006) *Mol. Cell Biol.*, 26, 2857–2868.

石谷 太

(九州大学生体防御医学研究所細胞統御システム)

Protein kinase NLK, that fine-tunes the activity of multiple intracellular signaling pathways
Tohru Ishitani (Cell Regulation Systems, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, 3–1–1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, Fukuoka 812–8582, Japan)