

# CLIP170 による EGFR 輸送制御

名古屋大学大学院 理学研究科 生命理学専攻  
花房 洋

## 1. 背景

ROCOキナーゼファミリーLRRK1はRas様GTPaseドメインとMAPKKK様キナーゼドメインを持つユニークで巨大な分子(約250kDa)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、臨床的にも注目されている。しかしその機能に関してはほとんど明らかになっていない。我々は最近、LRRK1がEGFRの細胞内トラフィックを制御していることを明らかにした(文献1、2)。LRRK1をノックダウンした細胞では、EGFRの早期エンドソームから後期エンドソームへの移行が阻害されていた。またLRRK1は、EGFRのダイニンモーター蛋白質依存的な輸送に必須であることも明らかとなってきた。LRRK1はEGFRを含む早期エンドソームの微小管上の運動を、キナーゼ活性依存的に制御していた。そこでLC-MS/MS解析を用いて、LRRK1キナーゼの標的蛋白質の同定を試みたところ、微小管プラス端結合分子CLIP-170を同定した。In vitro キナーゼアッセイから、LRRK1はCLIP-170を直接リン酸化することが明らかとなった。CLIP-170は微小管ダイナミクスの制御とともに、Cargoを微小管にローディングさせ小胞輸送に機能していると考えられている。そこで、LRRK1によるCLIP-170のリン酸化の意義と、CLIP-170によるEGFRを含む早期エンドソームの微小管へのローディング&輸送制御機構の解明を目指す。

## 2. 方法

### (1) リン酸化部位の同定

LRRK1によるCLIP-170のリン酸化部位は、MS解析によって同定した。具体的には、GST-CLIP-170リコンビナント蛋白質(N末及びC末フラグメント)を大腸菌から精製し、in vitroでcold ATPを用いたキナーゼアッセイを行った(LRRK1キナーゼ活性型および不活性型を使用)。その後、GSTプルダウンによりGST-CLIP-170を回収し、さらにリン酸化された蛋白質を、リン酸化蛋白質に特異的に結合する14-3-3蛋白質カラムを用いて濃縮した。濃縮したサンプルを用いてMS解析を行い、活性型LRRK1でのみリン酸化がみられた部位を同定した。

### (2) タイムラプス観察

コントロールsiRNAまたはLRRK1、CLIP-170 siRNAで処理したHeLa細胞を、プラスチックボトムガラス上で72時間培養し、ローダミンでラベルされたEGFで刺激後、タイムラプス観察を行った。観察はOlympus FV1000共焦点顕微鏡を用い、刺激後約10分から60秒間隔で行った。

### (3) 免疫沈降実験

HEK293細胞及びHeLa細胞を用い、GFP-LRRK1またはGFP-CLIP-170をトランスフェクション後、GFP抗体を用いて免疫沈降し、抗p150Glued抗体または抗Dynein intermediate chain抗体を用いて内在性ダイナクチン、ダイニンの共沈を検討した。

### (4) 免疫染色実験

HeLa細胞を用い、免疫染色実験を行った。微小管上へのEGFRのローディングは、HeLa細胞をEGF

で10分刺激後、界面活性剤ジギトニンで5分処理しセミインタクト細胞を作製し検討した。ジギトニン処理により細胞膜が一部破壊され、細胞質中のEGFRが洗い流される。一方ジギトニンはエンドソーム膜にはほとんど影響しないため、EGFRを含むエンドソームの微小管上のローディングを精度よく観察できる。

### 3. 研究成果

#### (1) LRRK1によるCLIP-170リン酸化部位の同定

CLIP-170はN末のCAP-Glyドメインで微小管と、C末のZinc-knuckleドメインでCargoやダイニン結合分子ダイナクチンと結合することが知られている。またCLIP-170はリン酸化依存的に構造変化を引き起こし、微小管及びCargoからリリースされることが知られている。そこでまず、LRRK1によるリン酸化部位の同定と、リン酸化の意義について検討を行った。MS解析によってリン酸化部位の同定を試みたところ、CLIP-170のC末Zinc-knuckleドメイン内にリン酸化候補部位が存在することが明らかとなった。またこの部位にアラニン置換型変異を導入し、*in vitro*キナーゼアッセイを行ったところ、LRRK1によるリン酸化が顕著に減少することが明らかとなった。これらの結果から、LRRK1はCLIP-170のC末Zinc-knuckleドメインをリン酸化することが明らかとなった。

#### (2) LRRK1によるCLIP-170リン酸化の意義

上述したようにCLIP-170のZinc-knuckleドメインは、CLIP-170とダイナクチンとの結合に重要なドメインであることが知られている。そこでLRRK1によるリン酸化が、この相互作用に影響しないか、変異体を作製し検討した。HEK293細胞にリン酸化模倣型GFP-CLIP-170変異体及び、非リン酸化型CLIP-170変異体を発現させ、CLIP-170を免疫沈降し、ダイナクチンが共沈降してくるか検討した。その結果、リン酸化模倣型CLIP-170変異体はダイナクチンとの結合が増加し、非リン酸化型CLIP-170ではダイナクチンとの結合が減少していることを見いだした。このことから、LRRK1によるCLIP-170 C末Zinc-knuckleドメインのリン酸化は、CLIP-170とダイナクチンとの結合を促進することが明らかとなった。

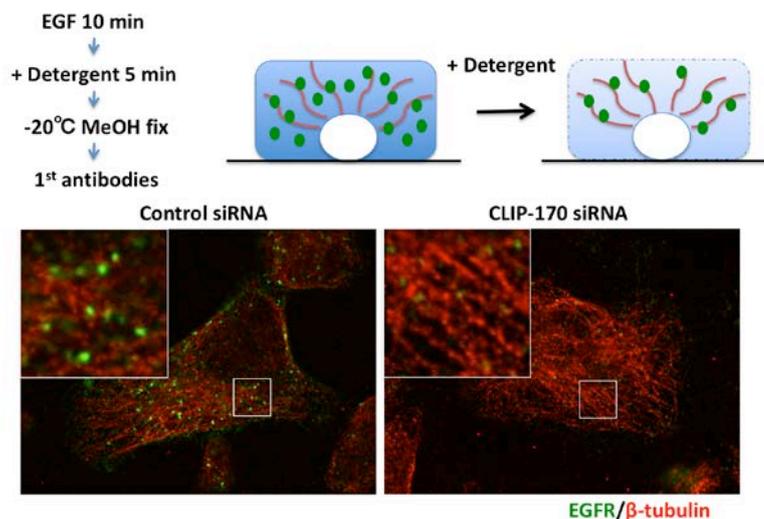


図1 CLIP-170はEGFRの微小管上へのローディングに必要である。

#### (3) EGFR細胞内トラフィックにおけるCLIP-170の役割

これまで我々は予備的実験から、CLIP-170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微小管上の運動が阻害されることを見いだしていた。そこでLRRK1によるCLIP-170のリン酸化が、CLIP-170による

EGFRの輸送に重要か検討した。CLIP-170をノックダウンした細胞に、野生型CLIP-170を戻してやる

と、EGFRの輸送は回復した。またリン酸化模倣型CLIP-170もEGFRの輸送をレスキューできた。一方、非リン酸化型CLIP-170変異体を戻しても、EGFRの輸送は回復しなかった。このことから、LRRK1によるリン酸化はCLIP-170のEGFR輸送制御に必須であることが明らかとなった。

#### 4. 考察

本研究で我々は、LRRK1によるCLIP-170のリン酸化部位の同定及び、リン酸化の意義を明らかにできた。LRRK1はCLIP-170のC末Zinc-knuckleドメインをリン酸化し、CLIP-170とダイナクチン構成分子p150Gluedとの結合を促進していた。CLIP-170は微小管プラス端に局在し、EGFRを含むエンドソームの微小管上へのローディングに重要な役割を果たしている(図1)。微小管プラス端にローディングされたEGFR-LRRK1複合体は、ここでLRRK1がCLIP-170をリン酸化し、ダイニン-ダイナクチン複合体を微小管プラス端にリクルートするのではないかと考えている。実際免疫染色実験の結果から、我々はリン酸化模倣型CLIP-170を発現させた細胞では、微小管プラス端でのp150Gluedの染色が増加することを見いだしている。またこのとき、非リン酸化型CLIP-170変異体では、反対にp150Gluedの局在が減少していた。今後は、同定した部位に対するリン酸化抗体を作製し、実際に細胞内でこの部位のリン酸化依存的にダイナクチンのリクルートが生じているか検討していく予定である。

#### 5. 発表論文

##### 参考文献

(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).

##### 発表文献

(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).