OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Cofilin Phosphorylation and Actin Cytoskeletal Dynamics Regulated by Rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2
Author(s)	角, 智行
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44399
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏名	角（すみ）　智行（ともゆき）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第　17333　号
学位授与年月日	平成14年10月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Cofilin Phosphorylation and Actin Cytoskeletal Dynamics Regulated by Rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2 （Rho及びCdc42によって活性化されるLIMキナーゼ2によるコフィリンのリン酸化とアクチン細胞骨格の再構築）
論文審査委員	（主査） 教授　中村　敏一 （副査） 教授　高井　義美　　教授　谷口　直之

論文内容の要旨

【目　的】

LIMキナーゼ（LIMK）は、1994年、c-Met/HGFレセプターのファミリー分子c-Seaの哺乳類ホモログをクローニングする過程で同定されたLIMドメインを有する新規プロテインキナーゼである。LIMドメインを有する分子としては、それまでLin-11、Isl-1、Mec-3などの転写因子やザイキシン、パキシリンなどの細胞骨格結合蛋白質が知られていたが、LIMドメインを有するプロテインキナーゼとしてはLIMKが最初であった。LIMKには、相同性を有する2つのタイプ、LIMK1およびLIMK2が存在し、LIMK1は主に脳・神経系に強く発現しているのに対してLIMK2は幅広い組織で発現しており、両者は組織・細胞特異的に異なった生理機能を担っていることが予想された。一方、LIMKの生理機能に関しては不明であったが、1998年、LIMK1がアクチン線維脱重合蛋白質の一つであるコフィリンのリン酸化を介してアクチン細胞骨格を制御し、さらにその活性は低分子量G蛋白質Rhoファミリー（Rho、Rac、Cdc42）の一つRacによって制御されていることが明らかにされた。しかしながら、Rhoファミリーの下流におけるLIMK1とLIMK2それぞれの機能ならびにRhoファミリーからLIMKの活性化に至るシグナル伝達系は不明であった。本研究では、Rhoファミリーを介したアクチン細胞骨格制御におけるLIMK1とLIMK2の機能と活性制御機構を明らかにすることを目的とした。

【方法ならびに成績】

1．Rhoファミリーによる LIMK1とLIMK2の活性化：COS-7細胞にLIMKを発現させ免疫沈降後コフィリンを基質にLIMKのキナーゼ活性を測定した結果、LIMK1のコフィリンリン酸化活性は活性化型Cdc42およびRacによって活性化されたが、Cdc42によるLIMK1の活性化は主にRacを介したものであった。これに対して、LIMK2のコフィリンリン酸化活性はRacではなく活性化型Rho及びCdc42によって特異的に活性化された。したがって、LIMK1はRacにより、LIMK2はRhoとCdc42により活性化され、LIMK1とLIMK2はそれぞれ異なったRhoファミリー分子によって制御されていることが明らかになった。

2．Rhoファミリーによるアクチン細胞骨格制御における LIMK1、LIMK2の機能的役割：LIMK1、LIMK2はそ

れぞれ異なるRhoファミリーによってその活性が制御されることから、Rhoファミリーが制御するアクチン細胞骨格に対しても機能的に異なるかを検討した。キナーゼ不活性化型のLIMK（LIMK/KD）を活性化型Rhoファミリーそれぞれと共にHeLa細胞にマイクロインジェクションし、免役染色によりアクチン細胞骨格への影響を観察した。その結果、活性化型Racが誘導するlamellipodiaの形成はLIMK1/KDが特異的に阻害するのに対して、活性化型Rho、Cdc42が誘導するstress fiber、filopodiaの形成はLIMK2/KDが特異的に阻害することが確認された。この結果は、キナーゼ不活性化型のLIMK1、LIMK2がRhoファミリーが制御するアクチン細胞骨格の再構築においてそれぞれ特異的にドミナントネガティブ体として作用したことを示している。すなわち、LIMK1はRacが制御するlamellipodiaの形成に関与し、LIMK2はRhoが制御するstress fiberとCdc42が制御するfilopodiaの形成に関与することが示され、アクチン細胞骨格制御におけるLIMK1とLIMK2の機能はそれぞれ異なっていることが明らかになった。

3．Rhoファミリーを介したLIMK1ならびにLIMK2活性化分子の同定：LIMK1、LIMK2はRhoファミリーにより直接活性化されなかったことから、LIMKの活性制御はRhoファミリーの下流に位置する特異的な分子を介していることが示唆された。そこで、Rhoファミリーの下流に位置するLIMK活性化分子の同定を行った。まずRhoに特異的なエフェクターキナーゼであるROCKに注目し、これがLIMK2を特異的に活性化するかを検討した。ROCKとLIMK2を細胞に共発現させたところ、LIMK2のリン酸化活性がROCKによって特異的に上昇することが確認された。一方、LIMK1とROCKを共発現させてもLIMK1のキナーゼ活性に変化は認められなかった。さらにROCKによるLIMK2活性化機構を調べたところ、ROCKはLIMK2のキナーゼドメインに位置するThr-505のリン酸化を介してLIMK2のキナーゼ活性を制御していることが明らかになった。したがって、ROCKはRhoの下流でLIMK2の活性を特異的に制御する分子であることが明らかになった。

次にCdc42の下流におけるLIMK活性化分子の同定を行った。Cdc42が誘導するfilopodia形成に寄与するエフェクターキナーゼとしてMRCKが知られていた。そこでLIMKの活性化におけるMRCKの関与を検討したところ、MRCKはLIMK1、LIMK2のキナーゼドメインを直接リン酸化し活性化することが確認され、またMRCKによるLIMK2の活性化は、ROCK同様にLIMK2のThr-505のリン酸化を介していた。したがって、Cdc42の下流ではMRCKがLIMKの活性を制御する上流キナーゼであることが明らかになった。

【総　括】

これまで、Rhoファミリーを介したアクチン細胞骨格の再構築制御に関して、アクチンの重合やアクチン線維の拘束化の分子機構が解明されていた一方、アクチン線維脱重合の制御機構はほとんど解明されていなかった。本研究により、それぞれのRhoファミリーがLIMK1とLIMK2の活性を特異的に制御し、コフィリンのリン酸化を介してアクチン線維の脱重合過程をも制御していることが初めて明らかになった。また最近、Racの下流でLIMK1はPakにより制御されていることが他のグループによって明らかにされた。したがって、LIMK1ならびにLIMK2はRhoファミリーの下流で、Rho-ROCK-LIMK2経路、Cdc42-MRCK-LIMK1/2経路、Rac-Pak-LIMK1経路という異なる制御機構を介してそれぞれ特異的なアクチン細胞骨格の制御を担っている。Rhoファミリーを介したアクチン細胞骨格制御においてLIMK1、LIMK2が異なる制御を受けることに加え、LIMK1とLIMK2では組織・細胞レベルでの発現分布が異なることも考慮すると、LIMK1とLIMK2は細胞の運動や分裂、極性形成などのアクチン細胞骨格の関与する細胞機能において異なる生理機能を担っていると考えられる。

論文審査の結果の要旨

LIMキナーゼ（LIMK）は、N末にLIMドメインと呼ばれるユニークなモチーフ構造を有する新しいプロテインキナーゼである。LIMKは低分子量Gタンパク質Rhoファミリーの下流で、アクチン脱重合因子のコフィリンをリン酸化するアクチン細胞骨格の再構成を行う重要な制御因子の一つである。LIMKはLIMK1とLIMK2の二つのフ

ファミリーから構成されるが、それぞれの Rho ファミリー下流での特異性及びその活性化メカニズムは不明であった。学位申請者はこの点に着目し、より詳細な LIM キナーゼの活性制御機構を解析した結果、LIMK1 と LIMK2 はそれぞれ異なる Rho ファミリーの下流で機能的に使い分けられていること、さらにその活性化は LIMK1、LIMK2 それぞれに特異的な上流キナーゼによるリン酸化を介していることを初めて明らかにした。すなわち、Rho-ROCK-LIMK2 および Cdc42-MRCK-LIMK2、Rac-Pak/MRCK-LIMK1 といった特異的なシグナル伝達経路を明らかにした。本研究は学位申請者によってなされた研究であり、LIMK1、LIMK2 のコフィリンを介したアクチン細胞骨格制御におけるシグナル伝達の特異性ならびにその活性化メカニズムを初めて明らかにした点で極めてオリジナリティーの高い研究成果である。

以上の理由により角　智行氏の論文は博士の学位授与に値するものである。