



|              |   |
|--------------|---|
| 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          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/44399">https://hdl.handle.net/11094/44399</a>   |
| 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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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 智 行   |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)   |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 7 3 3 3 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<br>(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)<br>教 授 中村 敏一<br><br>(副査)<br>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、免疫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。