

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04705

研究課題名(和文)オートファジー制御におけるLRRKの機能解明とパーキンソン病治療への応用

研究課題名(英文)The role of LRRK on autophagy and its therapeutic application to Parkinsonism

研究代表者

豊福 利彦 (Toyofuku, Toshihiko)

大阪大学・医学系研究科・特任教授(常勤)

研究者番号：60322179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子であるLRRK2のミトコンドリア代謝機能について検討した。変異型LRRK2導入細胞はミトコンドリア代謝機能が低下しミトコンドリア・カルシウム調節機能低下を示した。LRRK2はミトコンドリア膜に存在するユビキチン・リガーゼの機能調節することにより、小胞体ミトコンドリアのカルシウム流入を制御する。変異型LRRK2は、この酵素群への調節障害により、小胞体ストレスを増強し、ミトコンドリア代謝障害とともに細胞死を誘導することも発見した。さらに小胞体膜に存在する小胞体ストレスたんぱく質であるPERKを活性化する薬剤は変異型LRRK2により生じた一連の代謝障害が軽減した。

研究成果の概要(英文)：Parkinson disease is genetically caused by mutations in LRRK2. We found that neurons expressing mutant LRRK2 decreased the mitochondrial energetics and mitochondrial calcium signaling. Mitochondrial calcium is introduced through the contact site between endoplasm (ER) and mitochondria and regulates mitochondrial energetics. LRRK2 interacted with mitochondrial ubiquitin ligases, which regulated components in the ER-mitochondrial interaction. Neuron expressing mutant LRRK2 inhibited the activities of these ligases, and then accumulated components disturbed the ER-mitochondrial interaction and ER stress response, resulting in the increased ER stress and apoptotic death of neurons. The treatment with activators for PERK, one of the ER stress inducers, rescued these defects in neuron expressing mutant LRRK2. Thus, our result provides new insight for the treatment for Parkinson disease.

研究分野：細胞生物学

キーワード：パーキンソン病 ミトコンドリア LRRK2

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は運動制御を行う中脳黒質のドーパミン神経細胞の変性疾患であり、LRRK2 の遺伝子変異を認めるが病態および根治的治療法は不明である。哺乳動物では LRRK2 とともに構造的に類似した LRRK1 を発現している。オートファジーにおいてミトコンドリア傷害に対して動員された PINK1-Parkin シグナルを介するユビキチン化を起点として、ミトコンドリア膜より形成されたオートファゴソームが Rab7-GTP 依存的にリソソームと融合することによりその内容物がリソソーム酵素により分解される。最終分解産物は細胞質において再利用される。パーキンソン病ではオートファジーの処理機構に異常が生じ、異常たんぱく質( $\alpha$ -synuclein)の蓄積が病態の増悪に関わることが報告されるようになった (Matsuda-N, **J.Cell.Biol.**2010, 189:211, Okatsu-K, **Nat. Commun.** 2012, 3:1016, Narendra-D, **J.Cell.Biol.**2008, 183:795)。家族性パーキンソン病の原因遺伝子として  $\alpha$ -synuclein および LRRK2 の遺伝子変異が報告されているが、パーキンソン病患者と非患者のゲノムワイド関連解析によって両者が白人と日本人に共通な感受性遺伝子であることも判明している。特に興味深い点は、変異 LRRK2 がキナーゼ活性を亢進している点であり、LRRK2 遺伝子変異によるパーキンソン病の治療方法として正常 LRRK2 の補充療法は有効でないと予想される。

## 2. 研究の目的

LRRK2 の遺伝子異常を原因とするパーキンソン病のオートファジー処理機能低下に対して活性化型 LRRK1 によるパーキンソン病治療の可能性についても検討を行う。さらにミトコンドリア代謝についても解析し、パーキンソン病の病態と治療法について明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 分子レベルでの解析

LRRK1 によって制御される Rab7 GAP 分子と LRRK2 によって制御される Rab7 GEF 分子の同定

(1) Yeast two-hybrid 法による LRRK1, LRRK2 結合分子の探索。

GAL4 タンパク質の DNA 結合ドメイン (DNA-BD) に“bait (おとり)”遺伝子として LRRK のキナーゼドメインを融合し、転写活性化ドメイン(AD)に“prey (獲物)”遺伝子として Brain cDNA library を融合した遺伝子となるようにベクター構築して酵母を形質転換する。bait タンパク質と prey タンパク質の 2

つのタンパク質間で相互作用が見られる場合のみ、GAL4 タンパク質の機能が回復し、酵母ゲノム中にコードされたレポーター遺伝子の転写が活性化されるシステムである。このシステムを利用して、LRRK1, LRRK2 の結合タンパク質を同定する。

(2) LRRK 結合分子の Rab7 活性化能を検討する。

GEF 活性は反応液中の蛍光 (N-methylanthraniloyl (mant)) ラベル GDP を結合した Rab7 が結合分子と非蛍光 GDP 存在下での減衰効率を測定することにより検討する。GAP 活性は反応液中の mant ラベル GTP を結合した Rab7 が結合分子存在下での減衰効率を測定することにより検討する。

### 細胞レベルでの解析

パーキンソン病の原因遺伝子変異を導入した LRRK2 の作成と機能解析  
パーキンソン病の原因として LRRK2 の R1441C, G2019S の 2 種類のアミノ酸変異が代表的な変異である。

細胞は MEF を用いる。LRRK1 欠損 MEF は LRRK1 欠損マウスの胎児より分離精製する。LRRK2 欠損 MEF は Cysper 法にて作成する。

A) オートファジー機能の検討

(1) オートファジー誘導について  
LC3-II 形成をウエスタンブロットにて検討する

Tunicamycin, または飢餓状態 (FCS、グルコース不含培地) により 4 時間培養後、細胞融解液として SDS-PAGE に展開し、抗 LC3-II 抗体にてウエスタンブロット法を行い LC3-I からの変換量を算出する。この量がオートファジー誘導の程度を示す。

(2) オートファジー処理について  
Rab7-GTP 量の測定

Tunicamycin, または飢餓状態 (FCS、グルコース不含培地) により 4 時間培養後、細胞融解液として、抗 Rab7-GTP 抗体を用いて免疫沈降を行い、沈降物を SDS-PAGE にて展開し、抗 Rab7 抗体によりウエスタンブロット法を行い Rab7-GTP 量を算出する。

(3) 共焦点レーザー顕微鏡によるオートファゴソーム形成とリソソーム融合を検討する。

培養細胞に FITC/mCherry ラベルした LC3 を導入した細胞をボトム・ディッシュに培養する。実験当日に Tunicamycin, または飢餓状態 (FCS、グルコース不含培地) により 4 時間培養後、リソソームは Lysotracker にて染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて LC3 で染色されたオートファゴソームの形態とリソソームの位置関係と融合の有無を検討する。

## B) ミトコンドリア代謝能の検討

(1) 生化学的解析: 培養細胞よりミトコンドリアを分離精製し、電子伝達系を構成する complex I, IV 活性を測定する。

(2) 生細胞を用いた代謝解析: 細胞外フラックスアナライザー(プライムテック社製)を使用して培養細胞の酸素消費量を計測し基礎酸素消費量および予備酸素消費能から、細胞のミトコンドリア代謝機能を評価する。

## C) リソソームの酵素活性を測定する

(1) 生化学的解析: 培養細胞よりリソソームを分離精製し、リソソーム酵素である hexosaminidase 活性および cathepsin D/E 活性を測定する。

以上の実験結果より変異型 LRRK2 の機能に拮抗する LRRK1 ドメイン・コンストラクトを同定する。

## (2) 小胞体 ミトコンドリア関連の検討

ミトコンドリアに局在するカルシウム・インジケーター・プラスミド: mt-Camereone を MEF 細胞に遺伝子導入し、共焦点顕微鏡を使用して 2 波長励起による FRET 信号より、ミトコンドリア内カルシウム濃度を計測した。

## 4. 研究成果

パーキンソン病の原因遺伝子である LRRK2 と LRRK1 がオートファジー処理機構の活性化において相反する作用を有することを発見している。2015 年度は LRRK1 が細胞のオートファジー経路において形成されたオートファゴゾームがリソゾームに融合し処理されるステップにおいて重要な Rab7 の機能を抑制することにより、オートファジーの進行を抑制することを見出した。2016 年度は LRRK1 の免疫システムにおける役割を検討した。LRRK1 欠損マウスは B 細胞の発生を抑制し、抗体産生が低下していることを明らかにした。LRRK1 が B 細胞内で CARMA1 と結合して B 細胞の発生を制御する NF- $\kappa$ B の活性化を起こすことを見出した。2017 年度は変異型 LRRK2 を導入した神経細胞を用いてミトコンドリア代謝機能を検討した。変異型 LRRK2 導入細胞はミトコンドリア代謝機能が低下し、ミトコンドリア・カルシウム調節機能低下がその原因と考えられた。ミトコンドリア・カルシウム調節機構は小胞体 ミトコンドリアのカルシウム流入により制御されるため、その制御タンパク質発現の検討を行った結果、発現調節異常を見出した。LRRK2 はミトコンドリア膜に存在するウビキチン・リガーゼの機能調節することにより、ミトコンドリア膜たんぱく質、特に mitofusin2 の発現量を調節することを見出した。変異型 LRRK2 は、この酵素群への調節障害により、ミトコンドリア

の融合、分裂及び小胞体 ミトコンドリア結合に重大な欠損を生じることを発見した。さらにこの異常が小胞体ストレスを増強し、ミトコンドリア代謝障害とともに細胞死を誘導することも発見した。これら知見より機能異常を修正する目的で小胞体膜に存在する小胞体ストレスたんぱく質である PERK を活性化する薬剤をしようすると変異型 LRRK2 により生じた一連の代謝障害が軽減された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

1. Morimoto K, <この間に 20 名>, Toyofuku T (corresponding author), <以下 1 名>. LRRK1 is critical in the regulation of B-cell responses and CARMA1-dependent NF- $\kappa$ B activation. **Sci Rep.** 6:25738. doi: 10.1038/srep25738. 2016 (査読あり)

2. Ito D, <この間に 10 名> Toyofuku T, <以下 8 名>. mTOR Complex Signaling through the SEMA4A-Plexin B2 Axis Is Required for Optimal Activation and Differentiation of CD8+ T Cells. **J Immunol.** 195(3):934-43. 2015 (査読あり)

3. Toyofuku T (corresponding author), <以下 4 名>. Leucine-Rich Repeat Kinase 1 Regulates Autophagy through Turning On TBC1D2-Dependent Rab7 Inactivation. **Mol Cell Biol.** 35(17):3044-58. 2015 (査読あり)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 1件)

特願 2017-179130

パーキンソン病の処置用医薬、及びパーキンソン病の処置用医薬のスクリーニング方法  
主発明者: 豊福利彦

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊福利彦 (Toyofuku Toshihiko)

大阪大学大学院医学系研究科特任教授(常勤)

研究者番号：  
60322179