

令和元年5月23日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07039

研究課題名(和文) LRRK2によるリソソーム恒常性維持機構およびパーキンソン病との関連

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of lysosomal homeostasis by LRRK2 and its relevance to Parkinson's disease

研究代表者

桑原 知樹 (Kawahara, Tomoki)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任助教

研究者番号：10533903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病病因遺伝子産物LRRK2は低分子量Gタンパク質Rabを細胞内でリン酸化するキナーゼであり、またリソソームの形態制御に関与することが示唆されている。本研究ではLRRK2と基質Rabの役割について特にリソソームに着目して解析し、LRRK2によるRab8、Rab10のリン酸化が新規のリソソームストレス応答経路において重要な役割を果たすことを明らかにした。また、LRRK2によるRab7L1のリン酸化はゴルジ体の形態を制御することも見出した。パーキンソン病に連鎖するLRRK2の変異は細胞内においてこれらの経路を異常亢進させる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LRRK2の生理的基質として近年になりRabが同定され、その役割が注目されていたが、我々は世界に先駆けてリソソームの恒常性維持に働くことを明らかにした。また、細胞内輸送の重要な制御因子であるRabがストレス依存的なリン酸化により新たな機能を獲得することを示した点で、学術的意義も大きい。LRRK2はパーキンソン病発症の鍵となる分子と考えられ、その詳細な機能の解明により、疾患発症機構の理解および治療薬開発にもつながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Parkinson's disease-related protein LRRK2 is a kinase that phosphorylates Rab family small G proteins, and has been implicated in the regulation of lysosome morphology. In this study, we investigated the role of LRRK2 and its substrate Rab especially on lysosomal regulation, and found that LRRK2-mediated phosphorylation of Rab8 and Rab10 plays an important role in a novel lysosomal stress-responsive pathway. We additionally found that LRRK2-mediated phosphorylation of Rab7L1 regulates the morphology of Golgi apparatus. Our data support the notion that Parkinson-linked mutations in LRRK2 may abnormally enhance these regulatory pathways in cells.

研究分野：分子神経病理学

キーワード：LRRK2 リソソーム Rab リン酸化 パーキンソン病

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) はアルツハイマー病に次いで頻度の高い神経変性疾患であり、65 歳以上のおよそ 100 人に 1 人がふるえや動作の鈍さなどの運動症状を発症する。現在のところドパミン補充療法などの対症療法が普及しているが、神経細胞の変性・脱落そのものを止める根本的な治療法は存在せず、高齢化社会を迎えた今日において根本治療法の開発は急務である。病理学的には中脳黒質のドパミン作動性ニューロンを中心とした神経細胞内に シヌクレインなどの病因タンパク質が蓄積し、細胞死が認められるが、発症に至る分子レベルでのメカニズムは明らかではない。一方、PD の一部には遺伝性を示す症例が存在し、本邦の相模原で最初に発見された優性遺伝性の家族性 PD (PARK8) の病因遺伝子として、2004 年に *LRRK2* (leucine-rich repeat kinase 2) 遺伝子が報告された。*LRRK2* はキナーゼ活性を有し、PD に連鎖する *LRRK2* の変異はそのキナーゼ活性を上昇させることが報告されているが、*LRRK2* によってリン酸化される真の基質やそのリン酸化を含めた生理的機能、さらにその機能異常とパーキンソン病発症との関連については不明であった。

LRRK2 の生理的機能を示唆する報告として、*LRRK2* 遺伝子を欠損 (ノックアウト) したマウス・ラットや *LRRK2* キナーゼ活性阻害剤を投与された動物の腎臓や肺において、細胞内の分解器官であるリソソームが肥大化し、未消化の内容物を含有した 2 次リソソームが蓄積することが報告された (Tong et al, *PNAS* 2010, Fuji RN et al, *Sci Transl Med* 2015、他複数)。従って、*LRRK2* とリソソームの機能との間に何らかの関連があることが予想された。また、我々を含めた研究グループは、*LRRK2* が Rab ファミリー低分子量 G タンパク質の 1 つ Rab7L1 と相互作用して神経細胞内輸送を調節することを報告し (MacLeod et al, *Neuron* 2013)、また、*Rab7L1-LRRK2* 遺伝子経路が線虫からマウスまで存在すること、線虫における神経軸索の伸長やマウス腎臓における 2 次リソソームの蓄積を制御することを見出していた (本研究遂行中に発表: Kuwahara et al, *Sci Rep* 2016)。他のグループからも *LRRK2* と Rab の間の機能的関係を示唆する方向が相次ぎ、*LRRK2*、Rab そしてリソソームとの関連が注目されるようになったが、それらの関係や、PD 発症メカニズムとの関連については不明であった。

2. 研究の目的

以上の背景をふまえ、本研究では以下の点を主要な目的とした。

- (1) 細胞内における *LRRK2* と Rab7L1 の機能的関係の解明
- (2) *LRRK2* と Rab が関わるリソソームストレス制御機構の解明

3. 研究の方法

(1) *LRRK2* はキナーゼであることから、HEK293 細胞に発現させた Rab7L1 が細胞内における基質になりうる可能性について、細胞内リン酸化を簡便に検出できる Phos-tag SDS-PAGE 法を用いて解析した。また、*LRRK2* と Rab7L1 は細胞内輸送を制御することから、Rab7L1 が定常状態において局在するゴルジ体を含めた細胞内オルガネラの形態について、免疫細胞化学的に詳細に解析した。

(2) *LRRK2* とリソソームとの関連解明のため、まず、内因性 *LRRK2* を高発現するマウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞を用いて、内因性 *LRRK2* とリソソームとの局在関係を検討した。次に、リソソームに選択的に蓄積する化合物であるクロロキンを細胞に投与した際に形成される肥大化したリソソームと内因性 *LRRK2* との局在関係についても検討した。さらに、クロロキン投与によりリソソームストレス負荷を与えた際に *LRRK2* が果たす役割について、Rab との関係に着目しつつ解析した。

4. 研究成果

- (1) 細胞内における *LRRK2* と Rab7L1 の機能的関係の解明

HEK293 細胞に 3xFLAG-*LRRK2* (野生型、家族性 PD 変異型) と GFP-Rab7L1 を共発現させ、細胞ライセートを調製後、Rab7L1 のリン酸化状態を Phos-tag SDS-PAGE および抗 GFP 抗体によるウエスタンブロットにより解析した。その結果、*LRRK2* の発現により Rab7L1 のリン酸化が認められた。ゴルジ体膜に結合できない変異型 Rab7L1 はリン酸化されないことから、*LRRK2* はゴルジ膜上において Rab7L1 をリン酸化するものと考えられた。また、リン酸化部位の候補と考えられる Ser/Thr 残基のアラニン置換体を用いた解析から、リン酸化部位として Ser72 を同定した。興味深いことに、家族性 PD 変異型 *LRRK2* はいずれも野生型に比して Rab7L1 の Ser72 リン酸化能が顕著に高いことが判明した。さらに *LRRK2* による Rab7L1 リン酸化の役割を解析するため、ゴルジ体の形態に注目して解析したところ、Ser72 リン酸化模倣体 (S72E) の発現や、野生型 Rab7L1 と家族性 PD 変異型 *LRRK2* の共発現によりトランスゴルジの断片化が認められた。従って、*LRRK2* は Rab7L1 の Ser72 リン酸化を介してトラ

ンスゴルジの形態を制御するものと考えられた (図 1)。以上の結果は 2018 年 1 月に *Biochemical and Biophysical Research Communications* (*BBRC*) 誌にて発表した。

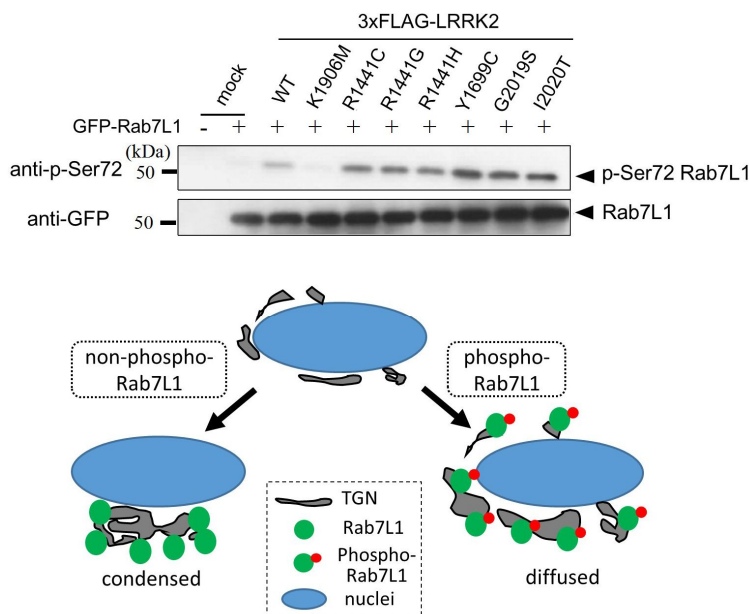


図 1 . LRRK2 による Rab7L1 リン酸化とその役割。上段 : LRRK2 は Rab7L1 の Ser72 残基をリン酸化する。家族性 PD 変異型 LRRK2 はリン酸化能が亢進している。下段 : Rab7L1 の Ser72 リン酸化は、トランスゴルジ (TGN) の断片化を引き起こす。Fujimoto T, Kuwahara T et al, *BBRC* 2018 より改変。

(2) LRRK2 と Rab が関わるリソソームストレス制御機構の解明

RAW264.7 細胞における内因性 LRRK2 の免疫染色による解析から、LRRK2 がしばしば肥大化したリソソームの膜上に局在していることを見出していた。そこで、リソソーム内に蓄積し肥大化を誘導する薬剤であるクロロキンを細胞に投与したところ、LRRK2 が速やかに肥大化したリソソーム上に局在化した。他の複数のリソソーム阻害剤を用いた検討との比較から、LRRK2 は肥大化そのものよりも過積載となったリソソーム上に特異的に局在化すると考えられた。さらに、この局在化は Rab7L1 により担われること、局在化に伴い LRRK2 が顕著に活性化することも見出した。

次に、LRRK2 の基質になりうる Rab ファミリー分子群のリソソーム上への局在化について、ファミリーワイドな解析を行い、Rab8a、Rab10 が LRRK2 によるリン酸化依存的に過積載リソソーム上にリクルートされることを見出した。リン酸化された Rab8a、Rab10 は GDI (グアニンヌクレオチド解離阻害因子) による膜からの引き抜きに抵抗性を示したことから、リン酸化を受けるとリソソーム膜上に安定的に留まるものと考えられた。

さらに LRRK2 やこれらの Rab のリソソーム膜上への局在化が果たす役割について検討するため、各分子のノックダウン実験を行った。その結果、LRRK2、Rab7L1、Rab8 のノックダウンにより、クロロキン処理時におけるリソソーム肥大化が亢進した。一方、リソソーム内腔に存在する代表的な加水分解酵素であるカテプシン B/D はクロロキン処理により速やかに細胞外に放出されるが、LRRK2、Rab7L1、Rab10 のノックダウンによりカテプシンの細胞外放出が顕著に抑制されることを見出した。

Rab8a や Rab10 が如何にしてリソソームの肥大化抑制や内容物放出を引き起こすのかを明らかにするため、これらの表現型の発現に関わる Rab8a や Rab10 のエフェクター分子について、既知因子のノックダウンスクリーニングにより探索した。その結果、そのような分子として EHBP1 と EHBP1L1 を同定した。内因性 EHBP1、EHBP1L1 はいずれもクロロキン処理時に LRRK2 や Rab8a/10 と同様、過積載となったリソソーム上に集積したことから、確かに下流因子として働くものと考えられた。

さらに生体内においても LRRK2 が同様の役割を果たす可能性について検討するため、若齢の野生型マウスおよび LRRK2 ノックアウトマウスにクロロキンを 2 週間にわたり腹腔内に投与し、病理学的解析を行った。その結果、LRRK2 ノックアウトマウスの腎近位尿管において特異的に空胞変性を認めた。また、リソソームに蓄積するリポフスチン顆粒に由来する自家蛍光の増大やリソソームマーカー LAMP1 の染色性増大を認めた。これらの表現型は老齢 (10 ヶ月齢以上) の LRRK2 ノックアウトマウスにおいても同様に認められることから、LRRK2 は生体内において老化等に伴い生理的に発生するリソソームストレスに抵抗する役割を有するものと考えられた。

以上より、LRRK2 とその基質 Rab はリソソームストレス負荷時に順にリソソーム上に集積することでリソソームの恒常性を維持すること、また、その機能はストレス依存的な LRRK2 による Rab リン酸化により調節されることを明らかにした (図 2)。以上の結果は 2018 年 9 月に *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (*PNAS*) 誌にて発表した。

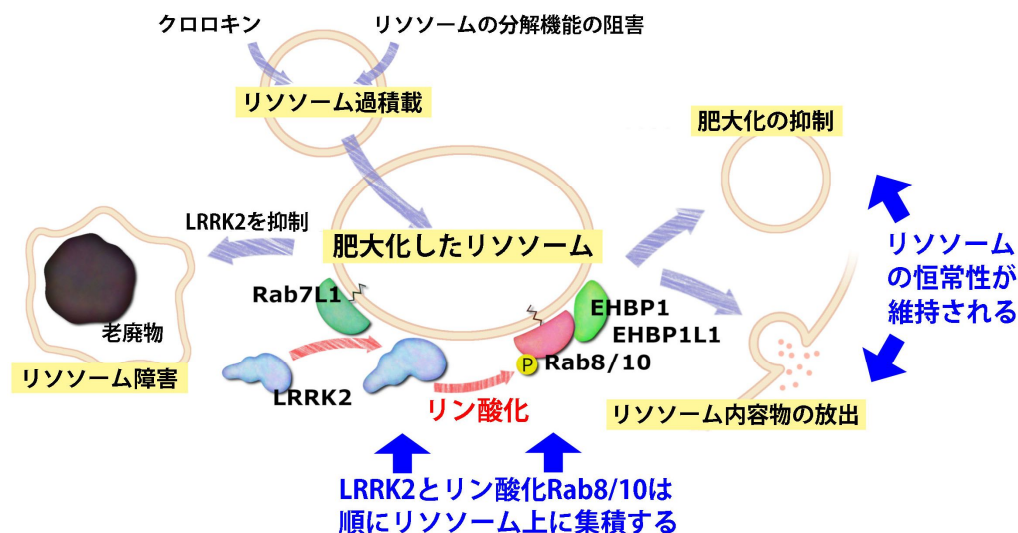


図 2 LRRK2 と基質 Rab によるリソソームストレス制御のメカニズム。Eguchi T, Kuwahara T, Sakurai M et al, *PNAS* 2018 より改変。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Eguchi T, Kuwahara T, Sakurai M., Komori T., Fujimoto T., Ito G., Yoshimura S., Harada A., Fukuda M., Koike M., Iwatsubo T. LRRK2 and its substrate Rab GTPases are sequentially targeted onto stressed lysosomes and maintain their homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 115: E9115-E9124. 2018. (査読有) DOI: 10.1073/pnas.1812196115
2. Fujimoto T, Kuwahara T, Eguchi T., Sakurai M., Komori T., Iwatsubo T. Parkinson's disease-associated mutant LRRK2 phosphorylates Rab7L1 and modifies trans-Golgi morphology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 495: 1708-1715, 2018. (査読有) DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.12.024
3. Kuwahara T, Inoue K., D'Agati V.D., Fujimoto T., Eguchi T., Saha S., Wolozin B., Iwatsubo T., *Abeliovich A. LRRK2 and RAB7L1 coordinately regulate axonal morphology and lysosome integrity in diverse cellular contexts. *Scientific Reports*. 6: 29945, 2016. (査読有) DOI: 10.1038/srep29945

[学会発表] (計 8 件)

1. Tomoki Kuwahara, Tomoya Eguchi, Maria Sakurai, Takeshi Iwatsubo. Maintenance of lysosomal homeostasis by LRRK2 and its substrate Rab GTPases. The 14th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases (AD/PD 2019) 2019 年 3 月 (査読有)
2. 桑原知樹、小森禎之、藤本哲太、江口智也、櫻井まりあ、岩坪威 Rab7L1 による LRRK2 の活性化と細胞内局在化機構の解析 第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 11 月 (査読有)
3. 櫻井まりあ、江口智也、桑原知樹、岩坪威 LRRK2 と基質 Rab GTPase によるリソソーム恒常性維持機構の解析 第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 11 月 (査読有)
4. 藤本哲太、桑原知樹、岩坪威 パーキンソン病病因遺伝子産物 LRRK2 が Rab7L1 リン酸化に果たす役割 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017 年 12 月 (査読有)

5. 江口智也、桑原知樹、櫻井まりあ、伊藤弦太、岩坪威 パーキンソン病病因遺伝子産物 LRRK2 のリソソーム恒常性維持に果たす役割 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017 年 12 月 (査読有)
6. Tomoki Kuwahara, Tetta Fujimoto, Tomoya Eguchi, Maria Sakurai, Tadayuki Komori, Takeshi Iwatsubo. Analyses of molecular and functional relationship between LRRK2 and RAB7L1, The 13th International conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases (AD/PD 2017) 2017 年 3 月 (査読有)
7. Tomoya Eguchi, Tomoki Kuwahara, Genta Ito, Takeshi Iwatsubo. The dynamic changes in the localization of LRRK2 in macrophage cells. Society for Neuroscience 2016 Annual Meeting (SfN2016) San Diego, USA, 2016 年 11 月 (査読有)
8. Tetta Fujimoto, Tomoki Kuwahara, Tadayuki Komori, Takeshi Iwatsubo. The relationship between LRRK2 and Rab GTPase family. Society for Neuroscience 2016 Annual Meeting (SfN2016) San Diego, USA, 2016 年 11 月 (査読有)

〔図書〕(計 1 件)

1. 桑原知樹 医歯薬出版 医学のあゆみ、Vol 269, No.6, 2019 年、2 頁

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.neuropathology.m.u-tokyo.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：岩坪 威

ローマ字氏名：(IWATSUBO, Takeshi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。