

平成22年 6 月 7 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005 ～ 2009

課題番号：17025009

研究課題名（和文）パーキンソン病発症の分子機構に関する研究

研究課題名（英文）Molecular pathogenesis of Parkinson' s disease

研究代表者

岩坪 威（IWATSUBO TAKESHI）

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50223409

研究成果の概要（和文）：ヒト α -synuclein を全神経系に過剰発現する線虫を用い、ゲノムワイドな手法により α -synuclein 神経障害性を修飾する遺伝子を探索し、 α -synuclein は endocytosis 機能の低下を増悪させることを明らかにした。この結果は、PD における神経細胞変性に、細胞内に蓄積した異常な構造を持つ α -synuclein による endocytosis の阻害が関与している可能性を示唆する。PARK8 病因遺伝子産物キナーゼ LRRK2 の ROC ドメインへの GTP 結合がキナーゼ活性の発揮に必要であること、LRRK2 の Thr1410 および Thr1967 の自己リン酸化はキナーゼ活性の調節、維持にそれぞれ重要な役割をもつことを示した。本研究で見出した LRRK2 の活性制御機構に関する知見は、LRRK2 の異常活性化と PD の関係を解明するにあたり重要な情報をもたらす。

研究成果の概要（英文）：Using transgenic *C. elegans* that pan-neuronally overexpress human alpha-synuclein in neurons, we searched for genes that modify the neurotoxicity of alpha-synuclein, and identified endocytosis-related genes as modifiers. These results suggest that impairment in endocytotic function is involved in the mechanism of neurodegeneration of PD. We also found that GTP binding is essential to the kinase activity of LRRK2, a responsible gene product of PARK8. We also found that autophosphorylation of Thr1410 and Thr1967 of LRRK2 is important for the regulation of its kinase activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	32,700,000	0	32,700,000
2006年度	31,000,000	0	31,000,000
2007年度	31,000,000	0	31,000,000
2008年度	33,000,000	0	33,000,000
2009年度	33,400,000	0	33,400,000
総計	161,100,000	0	161,100,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：パーキンソン病、 α シヌクレイン、LRRK2、神経変性

1. 研究開始当初の背景

PD は錐体外路性運動症状を主徴とし、変性ニューロンに Lewy 小体(LB)の出現する、頻度の高い神経変性疾患であり、ドパミン補充療法の限界からも、病態解明に基づく根本治療法開発の必要性が高い神経疾患である。PD の大多数は孤発性であるが、稀な優性遺伝性家族性 PD の病因遺伝子として α -synuclein が同定され、孤発性 PD 及び Lewy 小体型認知症脳に蓄積する LB が α -synuclein 蛋白を主要成分として含むことが判明し、 α -synuclein の PD 病因分子としての意義が確立された。近年さらに多種類の家族性 PD 病因遺伝子が同定されたが、特に park8 で同定された GTP 結合部位を含む巨大プロテインキナーゼ leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)は、最も頻度の高い優性遺伝性 PD 遺伝子であり、変異により成人発症の孤発例に酷似した PD を生じ、病理学的にも LB を高頻度に伴うことから、孤発例を含む PD の病態解明の鍵分子として注目されている。このような背景から、 α -synuclein と LRRK2 を主要な標的として研究を行った。

2. 研究の目的

本研究は、パーキンソン病(PD)発症機構の分子病態解明を、とくに PD の病因蛋白 α -synuclein ならびに優性遺伝性家族性 PD の主要な病因遺伝子 LRRK2 に焦点を当てて行うことを目的とするものである。

特に、両分子の神経細胞変性機構への関与の解明を通じて、PD の根本的治療法開発への道を開くことを最終的な目標とする。

3. 研究の方法

α -synuclein による神経障害機構を個体レベルで解明するため、まずヒト α -synuclein をドパミン神経に過剰発現するトランスジェニック (Tg) 線虫を作出した。線虫のニューロンにおいて α -synuclein が引き起こす神経障害の分子機構を解明するため、神経系に α -synuclein を過剰発現する

Tg 線虫に対して RNAi スクリーニングを適用し、 α -synuclein による神経障害性を修飾する遺伝子を探索した。LRRK2 は 2527 アミノ酸からなる可溶性蛋白質で、同一分子内に低分子量 GTP 結合蛋白質 Ras 様の ROC (Ras of complex proteins) ドメインとキナーゼドメインを併せ持つユニークな構造を有している。

現在までに、FPD 患者に最も高頻度に同定される G2019S 変異体はキナーゼ活性を異常に上昇させること、G2019S 変異型 LRRK2 を神経系細胞に過剰発現するとキナーゼ活性依存的に細胞毒性が生じることが知られており、PARK8 では LRRK2 のキナーゼ活性の異常な上昇による基質蛋白質の過剰リン酸化が神経変性を引き起こすという仮説が想定された。そこで LRRK2 の GTP 結合活性と自己リン酸化に着目して研究を行った。

4. 研究成果

α -synuclein は優性遺伝性家族性 PD の病因遺伝子であり、ミスセンス変異 (A53T、A30P、E46K) や遺伝子重複が報告されているが、孤発性 PD でも Lewy 小体の主要構成成分であることが知られている。これらの知見から、構造異常をきたした α -synuclein の細胞内蓄積が神経細胞死を招くことが示唆されるが、その詳細な分子機構は不明である。

RNAi により α -synuclein Tg 線虫の表現型を増悪させる 10 種の遺伝子、及び表現型を抑制する 1 種の遺伝子を同定した。

興味深いことに表現型を増悪させる 10 種のうち 4 種が endocytosis 関連遺伝子 (apa-2, aps-2, eps-8, rab-7) であり、中でも apa-2 と aps-2 は各種クラスリン被覆小胞の回収に関与するアダプター蛋白 AP-2 complex のサブユニットであった (図 2)。これらの結果から、 α -synuclein の過剰発現は endocytosis 機能の抑制による神経系機能低下の表現型を増悪させることがわかった。

従って α -synuclein の過剰発現は何らかの機序により、神経細胞における

endocytosis を抑制的に制御している可能性を考えた。

LRRK2は2527アミノ酸からなる可溶性蛋白質で、同一分子内に低分子量GTP結合蛋白質Ras様のROC (Ras of complex proteins) ドメインとキナーゼドメインを併せ持つユニークな構造を有している。現在までに、FPD患者に最も高頻度に同定されるG2019S変異体はキナーゼ活性を異常に上昇させること、G2019S変異型LRRK2を神経系細胞に過剰発現するとキナーゼ活性依存的に細胞毒性が生じることが知られており、PARK8ではLRRK2のキナーゼ活性の異常な上昇による基質蛋白質の過剰リン酸化が神経変性を引き起こすという仮説が想定された。そこでLRRK2のGTP結合活性と自己リン酸化に着目して研究を行った。

ROCドメインはLRRK2以外にもROC protein familyと呼ばれる一群のファミリー蛋白質において保存されているが、ROCドメインがGTP結合活性を有しているか否かはこれまで明らかでなかった。そこで、まずin vitroにおけるLRRK2のGTP結合活性を検討した。アミノ末端に3xFLAGタグを付加した全長LRRK2をHEK293細胞に過剰発現させ、抗FLAG抗体で免疫沈降した3xFLAG-LRRK2を $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ とインキュベートした後、LRRK2に結合した $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ を溶出し、薄層クロマトグラフィーにより解析したところ、野生型LRRK2では $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ の結合が見られた。一方、多くのGTP結合蛋白質において結合活性喪失変異に相当するT1348N変異をROCドメイン内に導入した変異体では、結合が見られなかった。これらの結果から、LRRK2のROCドメインはGTP結合活性を有することが示された。

次に $[\text{}^{32}\text{P}]\text{リン酸}$ による代謝ラベリングにより、LRRK2の培養細胞内におけるGTP結合活性について検討した。HEK293細胞あるいはNeuro-2a細胞に3xFLAG-LRRK2を過剰発現させ、 $[\text{}^{32}\text{P}]\text{リン酸}$ で代謝ラベリングした。抗FLAG抗体で免疫沈降されたLRRK2からヌクレオチドを溶出し、TLCにより解析したところ、野生型LRRK2からは主にGTPのシグナルが観察された。また、in vitroにおいてGTP結合活性を喪失したT1348N変異体は、培養細胞

内においてもGTP結合活性が見られなかった。さらに、キナーゼ活性喪失型であるK1906M変異体は、野生型と同等のGTP結合活性を有していた。これらの結果から、LRRK2は培養細胞内においてもGTP結合活性を有し、その活性にキナーゼ活性は必要でないことが明らかになった。

次にGTP結合活性とキナーゼ活性の関係を調べた。MAPKKKであるRaf-1は、低分子量GTP結合蛋白質であるRasのGTP結合型と特異的に相互作用し、活性化される。LRRK2は1分子内にROCドメインとキナーゼドメインを併せ持つことから、ROCドメインのGTP結合状態がキナーゼ活性の制御に関与している可能性を考えた。野生型、キナーゼ活性喪失型(K1906M)、GTP結合活性喪失型(T1348N)LRRK2をHEK293細胞にそれぞれ過剰発現させ、抗FLAG抗体で免疫沈降した後、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いたin vitro kinase assayによりキナーゼ活性を測定した。その結果、野生型LRRK2が自己リン酸化活性および人工基質であるミエリン塩基性蛋白質(myelin basic protein; MBP)に対するリン酸化活性を示したのに対し、T1348N変異体はK1906M変異体と同様にキナーゼ活性を示さなかった。以上の結果から、LRRK2のROCドメインへのGTP結合は、キナーゼ活性に必要であることが示された。

次にリン酸化によるLRRK2の活性制御について調べた。 $[\text{}^{32}\text{P}]\text{リン酸}$ による代謝ラベリングにより、全長LRRK2が細胞内においてリン酸化を受けることが示された。キナーゼ活性喪失型K1906M変異体でも野生型と同程度のリン酸化が見られることから、この細胞内リン酸化はLRRK2以外のキナーゼにより生じる可能性が示唆された。GTP結合活性喪失型T1348N変異体の細胞内リン酸化を検討したところ、全くリン酸化を受けなかった。この結果から、LRRK2がGTP結合依存的にリン酸化を受け、活性化される可能性が示唆された。そこで、LRRK2のリン酸化部位を同定し、その機能的意義を解析することにした。とくに多くのキナーゼが自己リン酸化によって活性調節を受けることから、自己リン酸化部位の同定を目指した。全長LRRK2は、細胞内において他のキナーゼにより高度にリン酸化

されることから、自己リン酸化部位の同定は適さないと考え、これまでに同定したアミノ末端側のリン酸化残基を欠く変異体 Δ N-LRRK2 (1326-2527 aa) を用いた。 Δ N-LRRK2 を GST 融合蛋白質として HEK293 細胞に発現させ、代謝ラベリングにより細胞内リン酸化を解析すると、野生型 Δ N-LRRK2 は細胞内でリン酸化を受けるのに対し、キナーゼ活性喪失型 K1906M, D1994A 変異体はリン酸化を受けなかった。この結果から、 Δ N-LRRK2 は細胞内において他のキナーゼによるリン酸化を受けず、自己リン酸化のみを生じるものと考えられた。

次に、baculovirus を用いて GST- Δ N-LRRK2 を Sf9 細胞に発現させ、大量精製した。精製した Δ N-LRRK2 を *in vitro* において自己リン酸化させた標品を用いて、全長 LRRK2 と同様に MALDI-TOF 質量分析を行った。その結果、 Δ N-LRRK2 の自己リン酸化部位として、ROC ドメイン内に Ser1403, Thr1404, Thr1410, Thr1491 を、キナーゼドメイン内に Thr1967, Thr1969 を同定した (図 4) (4)。Thr1967 に関してリン酸化特異抗体を作出し、全長 LRRK2 においても Thr1967 が自己リン酸化されることを確認した。

同定した自己リン酸化の機能的意義を明らかにするために、それぞれのアミノ酸置換体を作製した。まず、ROC ドメイン内の Thr1410 および Thr1491 の置換体について、代謝ラベリングを用いて細胞内における GTP 結合活性を解析した。恒常的な自己リン酸化状態を模倣する T1410D および T1491D 変異体について解析を行ったところ、T1491D 変異体において GTP 結合型の減少が認められた。さらに、自己リン酸化活性および人工基質である GST-Moesin550-564 のリン酸化活性を指標として *in vitro* キナーゼ活性を測定したところ、T1491D 変異体において野生型に比して有意な活性低下が見られた。これらの結果から、Thr1491 の自己リン酸化は GTP 結合活性を低下させ、その結果キナーゼ活性が低下するというネガティブフィードバック機構を形成する可能性が示唆された。

次に、キナーゼドメイン内の Thr1967, Thr1969 について、T1967A および T1969A 変異体のキナーゼ活性を解析したところ、

T1967A 変異体で野生型に比して有意な活性の低下が見られた。T1967D 変異体のキナーゼ活性が野生型と同程度であったことから、Thr1967 の自己リン酸化がキナーゼ活性の維持に重要である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Kamikawaji, S., Ito, G. & Iwatsubo, T. Identification of the autophosphorylation sites of LRRK2 linked to familial Parkinson's disease. *Biochemistry* 48, 10963-10975 (2009). (査読有)
2. Kuwahara, T., Koyama A., Koyama, S., Yoshina, S., Ren, C.-H., Kato, T., Mitani, S. & Iwatsubo, T. A large-scale RNA interference screen identifies endocytic pathway genes as modifiers of α -synuclein toxicity in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Human Molecular Genetics* 17, 2997-3009 (2008). (査読有)
3. Ito, G., Okai, T., Fujino, G., Takeda, K., Ichijo, H., Katada, T. & Iwatsubo, T. GTP binding is essential to the protein kinase activity of LRRK2, a causative gene product for familial Parkinson's disease. *Biochemistry* 46, 1380-1388 (2007). (査読有)
4. Kuwahara, T., Koyama, A., Gengyo-Ando, K., Masuda, M., Kowa, H., Tsunoda, M., Mitani, S. & Iwatsubo, T. Familial Parkinson mutant α -synuclein causes dopamine neuron dysfunction in transgenic *C. elegans*. *J. Biol. Chem.* 281, 334-340 (2006) (査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩坪 威 (IWATSUBO TAKESHI)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50223409

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし