

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07816

研究課題名(和文) リソソームストレスにより誘導されるLRRK2活性化機構の解明と創薬への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of LRRK2 activation induced by lysosomal stress and its application to drug development

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)・講師

研究者番号：10533903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：LRRK2はパーキンソン病(PD)の主要な病因タンパク質であり、細胞内でRab8やRab10などのRab GTPaseをリン酸化するキナーゼである。PDにおいてLRRK2の異常活性化が示唆されていることから、その活性調節機構について解明を試みた。本研究において、LRRK2のRabリン酸化活性は細胞へのリソソームストレス負荷により上昇すること、その活性化にRab29など複数の調節因子が関わること、LRRK2の活性化がPD脳内に蓄積する病因タンパク質 シヌクレインの細胞外放出を促すことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LRRK2の異常活性化の抑制はパーキンソン病の新規治療戦略として有望と考えられるが、本研究から、LRRK2活性化に関わる制御因子や経路が明らかになったことで、それらの因子も創薬標的になりうると考えられた。学術的には、LRRK2を中心とした新規のリソソームストレス応答機構とその制御メカニズムを見出したことで、細胞の恒常性維持機構に対する新たな理解が得られた。

研究成果の概要(英文)：LRRK2 is a major causative protein for Parkinson's disease (PD), and is a kinase that phosphorylates Rab GTPases such as Rab8 and Rab10 in cells. Since hyperactivation of LRRK2 has been implicated in PD, we sought to elucidate the regulatory mechanism of LRRK2 activation. In this study, we found that LRRK2 activity to phosphorylate Rab is enhanced by lysosomal stress loading to cells, that multiple regulatory factors including Rab29 are involved in the activation process, and that LRRK2 activation causes the extracellular release of alpha-synuclein, another PD-causative protein accumulated in PD brains.

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 シヌクレイン

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) は加齢とともに発症する代表的な神経変性疾患であり、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。PD は病理学的に中脳黒質のドパミンニューロンを主体とする神経細胞の変性・脱落と、シヌクレインを主成分とする神経細胞内封入体 Lewy 小体の形成を特徴とする。PD の多くは孤発性であるが一部に遺伝性が存在し、シヌクレイン遺伝子のほか、Leucine-rich repeat kinase 2 (*LRRK2*) が顕性遺伝性 PD における主要な病因遺伝子として同定された。また、*LRRK2* の一塩基多型は孤発性 PD の主要なリスク因子としても報告されている。

LRRK2 は細胞内小胞輸送に関わる Rab GTPase ファミリーの一部 (Rab8, Rab10 など) を細胞内でリン酸化するセリンスレオニンキナーゼである。家族性 PD に連鎖する *LRRK2* の 7 つのミスセンス変異はいずれも *LRRK2* の Rab リン酸化活性を顕著に亢進させることが示されており (Steger et al, *Elife* 2016、Fujimoto et al, *BBRC* 2018) さらに *LRRK2* の活性化は孤発性 PD の黒質においても示唆されている (Di Maio et al, *Sci Transl Med* 2018)。従って、*LRRK2* の活性化をもたらす分子機構の解明は、*LRRK2* 活性阻害を指向した PD 治療薬開発の鍵になるものと考えられる (Abe and Kuwahara, *Front Neurol* 2021、文献①)。

我々はこれまでに、細胞にリソソーム過積載ストレスを加えると *LRRK2* が肥大化したリソソーム膜上に集積し、同時に活性化することを見出した (Eguchi et al, *PNAS* 2018、文献②)。さらに、*LRRK2* のリソソーム膜上への集積には上流の Rab29 が介在すること、*LRRK2* の基質である Rab8, Rab10 がリソソーム膜上で *LRRK2* によりリン酸化を受けてリソソームの肥大化抑制と内容物の放出に働くことを明らかにした。これらの発見は、リソソームがストレスに应答する新たな機構が存在することを示すと同時に、ストレス依存的な *LRRK2* の活性化機構が存在することを示唆するものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では以上の背景から、主に次の点を明らかにすることを目的とした。

- (1) リソソームストレス負荷時に *LRRK2* が Rab リン酸化を引き起こすメカニズムの解明
- (2) *LRRK2* およびその上流因子 Rab29 のリソソーム膜への局在化機構の解明
- (3) リソソームストレス負荷による *LRRK2* 活性化が PD 病態の形成に与える影響の解明

3. 研究の方法

- (1) リソソーム過積載をもたらすと予想される様々なリソソーム指向性薬剤を細胞に投与し、*LRRK2* の活性化状態の変化について、基質である Rab10 のリン酸化を指標に解析するとともに、活性化の背景にある分子あるいは細胞レベルでの変化を明らかにする。
- (2) *LRRK2* やその上流因子 Rab29 がリソソームストレス負荷時にリソソーム膜上に局在化するメカニズムを解明するとともに、リソソームストレスによって生じる Rab29 リン酸化の役割やメカニズムについて解析する。
- (3) リソソームストレス負荷時における *LRRK2* の活性化が PD 病態形成に果たす役割として、不溶性シヌクレインの細胞外放出に与える影響に着目して検討する。

4. 研究成果

(1) リソソームストレスがもたらす *LRRK2* 活性化と Rab10 リン酸化についての解析

クロロキン (chloroquine) に代表されるリソソーム指向性薬剤 (lysosomotropic agent) は一般に弱塩基かつ脂溶性の高い低分子化合物であり、酸性オルガネラであるリソソーム内に入ったのちにプロトンを受け取ることで膜透過性を失い内部に蓄積する。そのような薬剤として、クロロキンのほか、抗うつ薬や抗がん剤、局所麻酔薬など臨床応用されている薬剤のセットを選別し、*LRRK2* 活性化に与える効果を解析した。*LRRK2* を内因性に高発現する RAW264.7 細胞にこれらの薬剤を投与した結果、Chlorpromazine, Lidocaine などの複数の薬剤の投与が Rab10 リン酸化の顕著な上昇をもたらすことを見出した。また、Rab10 リン酸化上昇とともに、リソソーム内容物の細胞外への放出が強く誘導された。これらの効果はいずれも *LRRK2* キナーゼ活性阻害剤で抑制されたことから、*LRRK2* 依存的であることが確かめられた。

一方、LRRK2 のキナーゼ活性そのものの指標となる LRRK2 の pSer1292 自己リン酸化については、これらのリソソーム指向性薬剤の投与時にも上昇しないことが判明した。また、近接ライゲーション法による検討から、リソソーム指向性薬剤の投与時には LRRK2 と基質 Rab のリソソーム上での近接度が上昇していることを見出した。従って、リソソーム指向性薬剤は、LRRK2 と Rab の近接度を上げることで Rab10 リン酸化を誘導するものと考えられた(図 1)。これらの結果は LRRK2 の Rab リン酸化活性の新たな制御機構を示すものであり、2020 年に *Neurobiology of Disease* 誌に発表した (Kawahara et al, *Neurobiol Dis* 2020, 文献③)。

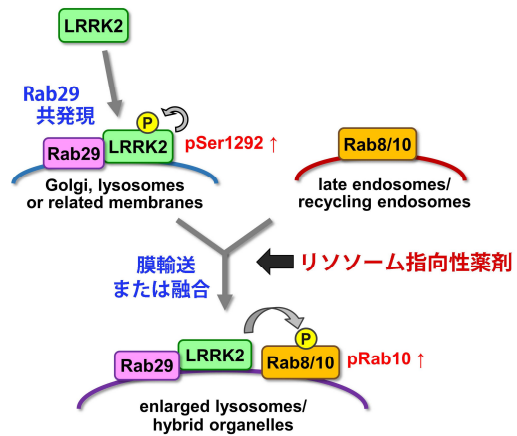


図 1. リソソーム指向性薬剤による LRRK2 活性化と Rab リン酸化のメカニズム

(2) リソソームストレス負荷時における LRRK2 と Rab29 の局在制御についての解析

リソソームストレス負荷により肥大化したリソソーム膜上に局在化した LRRK2 は、オートファジーマーカー LC3 と共局在することを見出していた。この時、LC3 はオートファゴソーム二重膜ではなくリソソーム一重膜に局在していると考えられ、そのような一重膜への局在化は non-canonical autophagy と呼称されている。我々は、LRRK2 のリソソーム局在化も LC3 と同様のメカニズムで制御される可能性を検討した。その結果、LC3 conjugation に関わる ATG5 や ATG16L1 が LRRK2 の局在化を制御していること、オートファジーの上流で働くオートファジー始動複合体構成因子は関わらないことを見出した。従って、LRRK2 の局在変化も non-canonical autophagy の機構で制御されているものと考えられた。

LRRK2 の別の上流因子 Rab29 の局在化機構についても解析した。Rab29 は、LRRK2 と同様に肥大化したリソソームに局在化し、同時に LRRK2 を活性化させることを見出している (Eguchi et al, *PNAS* 2018)。そこで我々はリソソームストレス下での Rab29 分子の変化について、翻訳後修飾に着目して解析した。Phos-tag SDS-PAGE による解析から、Rab29 はクロロキン処理時に顕著にリン酸化を受けることを見出した。また、質量分析による解析から、リン酸化を受けるアミノ酸残基を同定した。リン酸化を模倣した Rab29 を細胞に発現させたところ、クロロキン処理時のリソソームの肥大化が強く抑制された。さらに in vitro において Rab29 リン酸化を担うキナーゼを探索し、キナーゼ X を同定した。細胞においてキナーゼ X を活性化させると Rab29 がクロロキン非投与下においてもリソソームに強く局在化した。さらにキナーゼ X の活性化のみで、Rab29 を介して LRRK2 のリソソーム局在化と活性化が誘導された。従って、Rab29 のリン酸化も LRRK2 活性化を制御する上流因子の 1 つであると考えられた。

(3) LRRK2 活性化機構が シヌクレインの細胞間伝播に果たす役割の解析

リソソームストレスがもたらす LRRK2 活性化と PD 病態形成との関連を解析するため、シヌクレインの細胞間伝播、とりわけ細胞外放出現象に着目した。リソソームストレス下ではリソソーム内容物が LRRK2 を介して細胞外に放出されるが、我々は、凝集させた シヌクレインを取り込んだ細胞にリソソームストレスを加えると、細胞内の不溶性 シヌクレインがやはり LRRK2 依存的に放出されることを見出した。この時、凝集 シヌクレインはリソソームにまで到達しており、その後リソソーム酵素とともに細胞外に放出されていると考えられた。また、この LRRK2 依存的な シヌクレイン分泌は神経細胞よりもミクログリアやマクロファージで顕著であることを見出した。

一方、凝集させた α シヌクレインの細胞内取り込みにより、LRRK2 の活性化が生じることを発見した。この時、リソソーム指向性薬剤と同様に LRRK2 と基質 Rab のリソソーム膜上への局在化が誘導されたことから、取り込まれた凝集 α シヌ

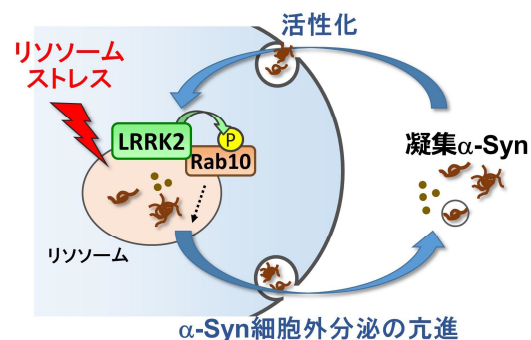


図 2. PD 病態形成における LRRK2 と凝集 α シヌクレインの相互活性化のモデル

クレインはリソソームストレスを与えることで LRRK2 活性化をもたらしたものと考えられた。従って、LRRK2 が凝集 シヌクレイン分泌をもたらすとともに凝集 シヌクレインが LRRK2 を活性化する、という、相互活性化のメカニズムが存在することが示唆された(図 2)。これは、PD 病態形成における LRRK2 と シヌクレインの新たな機能的関係を示すものと考えられる(論文投稿中)。

<引用文献>

- ① Abe T., Kuwahara T. Targeting of Lysosomal Pathway Genes for Parkinson's Disease Modification: Insights from Cellular and Animal Models. *Frontiers in Neurology*. 12:681369, 2021
- ② Eguchi T.*, Kuwahara T.* (*co-first), 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
- ③ Kuwahara T., Funakawa K., Komori T., Sakurai M., Yoshii G., Eguchi T., Fukuda M., Iwatsubo T. Roles of lysosomotropic agents on LRRK2 activation and Rab10 phosphorylation. *Neurobiology of Disease*. 145: 105081, 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kuwahara T., Funakawa K., Komori T., Sakurai M., Yoshii G., Eguchi T., Fukuda M., Iwatsubo T.	4. 巻 145
2. 論文標題 Roles of lysosomotropic agents on LRRK2 activation and Rab10 phosphorylation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 105081
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nbd.2020.105081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tomoki Kuwahara, Takeshi Iwatsubo	4. 巻 14
2. 論文標題 The Emerging Functions of LRRK2 and Rab GTPases in the Endolysosomal System	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2020.00227	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yuki Tanaka, Kaoru Yamada, Kyoko Satake, Itaru Nishida, Matthias Heuberger, Tomoki Kuwahara, Takeshi Iwatsubo	4. 巻 13
2. 論文標題 Seeding Activity-Based Detection Uncovers the Different Release Mechanisms of Seed-Competent Tau Versus Inert Tau via Lysosomal Exocytosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1258
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2019.01258	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Tetsuro Abe, Tomoki Kuwahara	4. 巻 12
2. 論文標題 Targeting of Lysosomal Pathway Genes for Parkinson's Disease Modification: Insights from Cellular and Animal Models.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 681369
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fneur.2021.681369	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tomoki Kuwahara	4. 巻 2322
2. 論文標題 The Functional Assessment of LRRK2 in Caenorhabditis elegans Mechanosensory Neurons.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 175-184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1495-2_17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maria Sakurai, Tomoki Kuwahara	4. 巻 2322
2. 論文標題 Two methods to analyze LRRK2 functions under lysosomal stress: the measurements of cathepsin release and lysosomal enlargement.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 63-72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1495-2_7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Tomoki Kuwahara, Tadayuki Komori, Kai Funakawa, Maria Sakurai, Takeshi Iwatsubo
2. 発表標題 Analysis of Rab29 phosphorylation under lysosomal overload stress
3. 学会等名 AD/PD 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Maria Sakurai, Tomoki Kuwahara, Tomoya Eguchi, Takeshi Iwatsubo
2. 発表標題 Involvement of LRRK2 in the lysosomal and exosomal release
3. 学会等名 AD/PD 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名	Tomoki Kuwahara, Tomoya Eguchi, Maria Sakurai, Tadayuki Komori, Kai Funakawa, Takeshi Iwatsubo
2. 発表標題	Maintenance of lysosomal homeostasis by LRRK2 and Rab GTPases: Implications for the pathomechanism of Parkinson's disease.
3. 学会等名	World Parkinson Congress (WPC) 2019 (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	桑原知樹、江口智也、櫻井まりあ、小森禎之、舟川開、岩坪威
2. 発表標題	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
3. 学会等名	第92回 日本生化学会大会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	櫻井まりあ、桑原知樹、江口智也、岩坪威
2. 発表標題	パーキンソン病病因遺伝子産物LRRK2がリソソーム恒常性維持に果たす役割の解析
3. 学会等名	第92回 日本生化学会大会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	小森禎之、桑原知樹、藤本哲太、舟川開、櫻井まりあ、岩坪威
2. 発表標題	パーキンソン病関連因子Rab7L1のリソソームにおける機能の解析
3. 学会等名	第38回 日本認知症学会学術集会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名 桑原知樹
2. 発表標題 パーキンソン病における新規リソソームストレス応答機構
3. 学会等名 第40回 日本認知症学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoki Kuwahara
2. 発表標題 Regulation of stressed lysosomes by LRRK2 in macrophage lineage cells
3. 学会等名 International Research Conference on Neurodegenerative Diseases (IRCND) 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 櫻井まりあ、桑原知樹、岩坪威
2. 発表標題 リソソームストレス下におけるLRRK2依存的なリソソーム分泌経路の同定
3. 学会等名 第40回 日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阿部哲郎、桑原知樹、末長祥一、櫻井まりあ、岩坪威
2. 発表標題 LRRK2とリソソームを介した シヌクレイン細胞外放出機構の解析
3. 学会等名 第40回 日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 桑原知樹	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版(株)	5. 総ページ数 2
3. 書名 医学のあゆみ	

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学大学院医学系研究科神経病理学分野ホームページ http://www.neuropathology.m.u-tokyo.ac.jp/

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Memorial Sloan Kettering Cancer Center		
英国	University of East Anglia		