

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790624

研究課題名（和文） LRRK2 の機能解析

研究課題名（英文） LRRK2 associates with the membrane trafficking system.

研究代表者

波田野 琢 (HATANO TAKU)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：60338390

研究成果の概要（和文）：本研究では LRRK2 の過剰発現もしくは iRNA による LRRK2 をノックダウンした培養細胞系で growth hormone の放出に変化があるかを検討した。LRRK2 の病的変異である I2020T と G2019S についての検討では明らかな放出に有意差は認めなかった。しかしながら、iRNA でノックダウンした場合は有意差をもって放出能が低下した。さらに、iRNA でノックダウンした細胞に wild type の LRRK2 を発現させたところ放出能は改善した。病的変異体を発現させた場合は放出能の改善は wild type よりは低い傾向があったが有意差は認めなかった。以上から、LRRK2 は膜輸送に関する機能を持つ事が示されたが、病的変異体が放出能に影響を与えるかどうかは今後の検討していく必要がある。

研究成果の概要（英文）：Leucin-rich repeat kinase 2 (LRRK2) is causative protein of PARK8-linked familial Parkinson's disease and associates with the membrane trafficking system. In this study, we have explored whether LRRK2 influences the exocytosis in cultured cells. We revealed that knocking down LRRK2 expression disrupted the exocytosis of growth hormone in PC12 cells, which are rat adrenal pheochromocytoma cell line. However, pathogenic LRRK2 mutants could not influence the exocytosis, compared to wild LRRK2. Therefore, LRRK2 might participate in the membrane trafficking system, but we need further investigations to understand whether pathogenic LRRK2 mutants may affect the functions of exocytosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：LRRK2 PARK8、家族性パーキンソン病、膜輸送、Exocytosis

1. 研究開始当初の背景

LRRK2 は常染色体優性型の家族性パーキンソン病のなかで、最も頻度が多いとされている原因遺伝子であり、症状は孤発型のパーキンソン病に類似している。そのため、この遺伝子がコードする蛋白の機能を解明する事で病気の解明につながる事が期待されている。我々はLRRK2の細胞内局在を詳細に検討し、Golgi装置およびシナプス小胞に局在し、さらに脂質ラフトに結合する事を示し、2007年 Human Molecular Genetics 誌より報告した。さらに、我々は以前よりLRRK2以外にも家族性パーキンソン病の原因蛋白である、 α -synuclein, parkin はいずれも放出能に関係している事を報告された。さらに、ノックアウトマウスを用いた検討では、 α -synuclein, parkin, DJ-1, PINK1, いずれもシナプス終末の神経伝達に変化が有る事が報告されている。

2. 研究の目的

LRRK2はMAPKKKドメインおよびRab類似ドメインを持つことが構造解析より明らかにされている。さらにLRRK2がシナプス小胞に局在し、膜機能ドメインである脂質ラフトに結合する事はLRRK2がシナプス終末で膜輸送に関連する事が示唆される。今回LRRK2が放出能に関連するかどうかを焦点を当てて検討した。

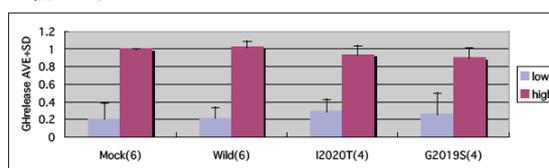
3. 研究の方法

ラットのpheochromocytoma由来のPC12細胞に人成長ホルモンのvectorであるpxGH5とcontrol vector, LRRK2の野生体、

G2019S, I2020T, rat LRRK2 siRNAをそれぞれ同時にtransfectionした。Transfectionから48時間後、4.7mM KCl (low-K⁺ buffer) および41.4mM KCl (high-K⁺ buffer)でincubationし、放出された成長ホルモンと細胞内の成長ホルモンをELISAで確認した。そして放出量(% of total content)=(外液に放出された量)/(放出量の総和+細胞内)を計算し放出量に差があるかどうかを検討した。

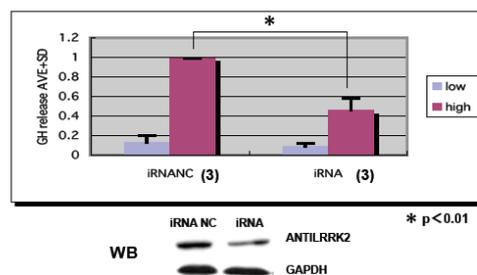
4. 研究成果

(1)PC12神経細胞において、成長ホルモンの放出能を検討したが、野生体とI2020T, G2019S共に明らかな差は認めなかった。また、kinaseの機能を落とすと報告されているK1906Mについても検討したが明らかな変化は認めなかった。



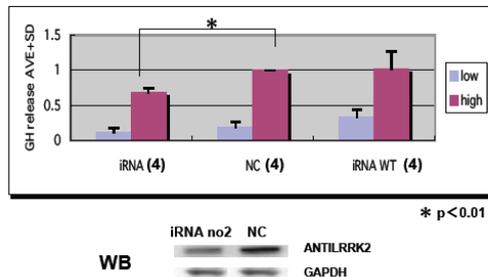
WB
258
238
Mock Wild I2020T G2019S LRRK2
GAPDH

(2)Rat LRRK2 siRNAを用いて、PC12の内源性LRRK2をノックダウンし過剰発現系の実験と同様に放出能を検討したところLRRK2の発現を低下させると有意に放出能が影響を受ける事が示された。

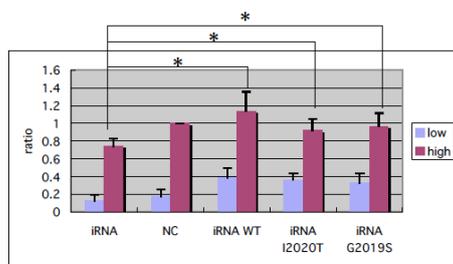


irNANC siRNA ANTILRRK2
WB
GAPDH

(3) さらに、siRNA で内在性 LRRK2 をノックダウンしそこに野生体の LRRK2 を transfection し放出能が回復するかどうか検討した。結果、WT では siRNA でノックダウンする前より回復した。つまり、LRRK2 の機能低下は放出能に影響する事が示された。



(4) 同様に LRRK2 をノックダウンした細胞に I2020T, G2019S を transfection し回復するかどうかを検討した。病的変異体は放出能の回復は低下している傾向はあるものの有意差は認めなかった。



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 6 件)

1. Hatano T, Kubo S-I, Sato S, Hattori N. Pathogenesis of familial Parkinson's disease: New insights based on monogenic forms of Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2009, in press. 査読有り
2. Okuma Y, Kamei S, Morita A, Yoshii F, Yamamoto T, Hashimoto S, Utsumi H, Hatano T, Hattori N, Matsumura M, Takahashi K, Nogawa S, Watanabe Y, Miyamoto T, Miyamoto M, Hirata K. Fatigue in Japanese patients with Parkinson's disease: A study using Parkinson fatigue scale. *Mov Disord*. 2009, in press. 査読あり
3. Hatano T, Kubo S-I, Shimo Y, Nishioka K, Hattori N. Unmet needs of patients with Parkinson's disease: interview

survey of patients and caregivers. *J Int Med Res*. 2009; 37(3):717-726 査読あり

4. Mizuno Y, Hattori N, Kubo S-I, Sato S, Nishioka K, Hatano T, Tomiyama H, Funayama M, Machida Y, Mochizuki H. Progress in the pathogenesis and genetics of Parkinson's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2008; 363(1500): 2215-2227. 査読あり
5. Shin N, Jeong H, Know J, Heo HY, Know JJ, Yun HJ, Kim CH, Tong Y, Shen J, Hatano T, Hattori N, Kim KS, Chang S, Seol W. LRRK2 regulates synaptic vesicle endocytosis. *Exp Cell Res*. 2008; 314(10):2055-2065. 査読あり
6. Yamashiro K, Komine-Kobayashi M, Hatano T, Urabe T, Mochiuki H, Hattori N, Iwama Y, Daida H, Sakai M, Nakayama T, Mizuno Y. The frequency of cardiac valvular regurgitation in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2008; 23(7):935-941. 査読あり

[学会発表] (計 5 件)

波田野琢, 他 パーキンソン病患者の服薬状況と治療費用について 第 50 回日本神経学会総会 仙台 2009 年 5 月

今井哲司, 波田野琢, 他 Parkin knockout mouse 脳を用いた蛋白質プロファイリング解析 第 50 回日本神経学会総会 仙台 2009 年 5 月

江口博人, 今泉美佳, 近岡洋子, 佐藤栄人, 波田野琢, 他 Parkin の放出機構への影響の検討 第 50 回日本神経学会総会 仙台 2009 年 5 月

波田野琢, 他 DJ-1 蛋白の細胞膜組織における局在に関する検討 第 27 回日本認知症学会 前橋 2008 年 11 月

波田野琢, 他 パーキンソン病の unmet needs 第 49 回日本神経学会総会 横浜 2008 年 5 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

波田野琢 (HATANO TAKU)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：60338390

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし