

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06646

研究課題名(和文)ドーパミン作動性ニューロンのリソソームを介した新規細胞外分泌機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of a novel exocytosis mechanisms via lysosome in Dopaminergic neurons

研究代表者

鳥居 知宏 (Torii, Tomohiro)

同志社大学・脳科学研究科・准教授

研究者番号：00515603

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)：Coiled coil domain containing protein 120 (CCDC120)は、小胞輸送・分泌を制御するArf6の活性化因子(ArfGEF)であるcytohesin-2と相互作用して細胞内Arf6の活性を制御する。またCCDC120がcytohesin-2とリソソーム(またはオートファゴリソソーム)で共局在を示し、それらを制御するCCDC120のドメインを同定した。以上から、LRRK2によってCCDC120がリン酸化され、cytohesin-2/Arf6活性化によりリソソームを経由する細胞外分泌機構やリソソームの動態を制御する新規メカニズムの解明に繋がる成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病原因分子LRRK2は、国内外の多くの研究者の関心の的であるため、LRRK2の機能解析を報告している論文は多い。特にLRRK2は、Rab35(Bae et al., 2018)やRab10(Eguchi et al., 2018)などRabファミリー蛋白質を標的としたパーキンソン病の発症機構やストレス応答機構に関する論文は、それぞれ高く評価されている。これら分子機構にArf6が関与する可能性が高いため、本研究の学術的意義うあ社会的意義が十分あると考えている。

研究成果の概要(英文)：We previously have reported Arf6 activator cytohesin-2 interacted with a novel protein Coiled coil domain containing protein 120 (CCDC120) and the complex was transported along neuronal axons. Also we observed the complex localized in lysosome and endosomes of cells. We also observed large size vesicles existed in CCDC120 deletion mutant expressing cells. Taken together with these results, we suggest the complex including Arf6/cytohesin-2/CCDC120 might regulate fusion of vesicle and cellular transport. Also these molecular mechanisms might associate with molecular pathogenesis of Parkinson disease.

研究分野：細胞生物学、神経化学

キーワード：ドーパミン作動性ニューロン Arf6 エキソサイトーシス cytohesin-2

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) CCDC120/cytohesin-2 の相互作用が、Arf6 の活性を正に制御する。

低分子量 GTP 結合蛋白質 Arf6 は、細胞膜蛋白質のエンドサイトーシスや細胞接着因子のリサイクリング、FGF2 などの細胞外分泌を司る非常に重要な蛋白質である。申請者は、新規蛋白質 CCDC120 が活性化因子 cytohesin-2 と相互作用し、Arf6 の活性化を介して N1E-115 細胞の神経突起伸長を制御する蛋白質であると報告したが(Torii et al., JBC, 2014)、CCDC120 の機能的ドメインは、まだ同定されていない。

(2) CCDC120 は、リソソームに局在し、CCDC120 の変異体はリソソームの肥大化を誘引する

申請者は、リソソームを視覚化できる LysoTracker を用いた実験により遺伝子導入した蛍光標識 CCDC120 がリソソームに局在することを見出した。さらに、CCDC120 が cytohesin-2 をリソソームに引き寄せる機能があることを突き止めた。この結果とこれまでの知見を組み合わせると、CCDC120 依存的に活性化される Arf6 が、リソソーム膜からの小胞輸送に不可欠であると考えられる。

一方、CCDC120 の変異体(1-350 アミノ酸残基)を発現させた HEK293 細胞において、野生型(1-611 アミノ酸残基)を発現させた細胞と比較して著しく肥大したリソソームが認められた。以上より、CCDC120 がリソソームの機能、特に輸送小胞のリソソームからの発芽からエキソサイトーシスまでの経路(分泌)に寄与している可能性が高いと考えている。

(3) CCDC120 は、パーキンソン病原因分子 LRRK2 の基質候補である。

パーキンソン病原因分子 LRRK2 は、リソソームに局在しストレス応答機構を制御することが知られている(Eguchi et al. 2019)。多くの研究者によってパーキンソン病患者における LRRK2 遺伝子変異[(キナーゼ活性の亢進:G2019S)や(キナーゼ不活性型:K1906M)]が同定されている一方で、LRRK2 のキナーゼ活性の異常がパーキンソン病を発症させるか否かは未だ議論の最中である。先行研究において網羅的な LRRK2 の基質の同定実験が行われ、CCDC120 が LRRK2 の基質として 302 番目のセリン残基[SVPATPVLTR]のリン酸化を受けることを証明した(未発表データ)。これらの解析は、iPS 細胞由来ドーパミン作動性神経細胞を用いており、再現性良く信憑性も高い。「CCDC120 と LRRK2 は同じリソソーム膜上に局在している」、「CCDC120 変異体の表現型が、(セラミドの蓄積)リソソームの肥大化 神経変性というパーキンソン病の病態メカニズムと類似している」ため、CCDC120 が LRRK2 の基質となりリン酸化される可能性は高いと考えている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、既知のパーキンソン病原因分子 LRRK2 と細胞内小胞輸送および分泌を制御する Cytohesin-2/Arf6 シグナル伝達経路がクロストークすることを証明することである。ドーパミン作動性神経細胞におけるリソソームを経由する分泌機構を解明する。

### 3. 研究の方法

(1) CCDC120 のドーパミン作動性神経細胞および HEK293T 細胞における局在解析

内在性 CCDC120 の局在が確認された細胞は、初代培養海馬神経細胞、N1E-115 神経芽細胞および骨肉腫由来 U2OS 細胞のみである。先述のように申請者が行った予備実験で、外因性蛍光標識 CCDC120 が海馬神経細胞のリソソームに局在していることを確認している。本研究では、抗 CCDC120 抗体を用いて iPS 細胞由来およびマウス大脳基底核のドーパミン作動性神経細胞における内在性 CCDC120 の局在を種々のマーカーとともに免疫染色を行い共焦点顕微鏡・高解像度顕微鏡(STED)や電子顕微鏡で観察し、CCDC120 が新たなリソソームのマーカーとして使用できるか否か検討した。

(2) CCDC120 の欠損・変異体によるコレステロール蓄積の観察

Arf6 は、エンドサイトーシス・細胞内小胞輸送・細胞外分泌機構を制御する蛋白質である。また、Arf6 の不活性変異体(Kuglin et al. 2008)や Arf6 のノックダウン(Marquer et al. 2016)によって、リソソームにおけるコレステロールの蓄積が報告されている。さらにコレステロールの蓄積はリソソームの運動能(motility)を低下させる(Li et al. 2016)ことから、申請者は CCDC120/cytohesin-2 による Arf6 活性依存的にリソソームの動態を制御するのではないかという仮説を立てた。具体的には、CCDC120 欠損あるいは shRNA によるノックダウン・変異体を導入した細胞においてコレステロールが蓄積されているか否かを観察するために Filipin 蛍光染色法を行った。

(3) CCDC120 欠損細胞におけるリソソームの動態解析

申請者は、蛍光標識した CCDC120 の神経細胞の軸索内輸送および成長円錐内の移動の様子をライブイメージングで観察した(Torii et al. JBC, 2014)が、その際にリソソームの動態観察は実施しな

かった。本研究では、CCDC120 欠損細胞および変異体発現細胞において蛍光標識したリソソームの構造および動態を共焦点顕微鏡で観察・解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1)CCDC120(1-350)変異体は、細胞構造体の肥大化を誘引する

CCDC120 の細胞内局在を検討するために、RFP 蛍光標識 CCDC120 変異体プラスミドを作製し(図参照)、HEK293T 細胞に遺伝子導入した。RFP-CCDC120 野生型(1-661 アミノ酸残基)は、多くの小胞体を示し(図 ①)、市販の抗 CCDC120 抗体で検出すると小胞の膜に局在していることが明らかとなった(図 ②)。また、小胞の融合部(接合部)にその局在が集中している像を観察することが出来たため、小胞同士やリソソームなどの融合に CCDC120 が関与する可能性を示唆された。さらに、種々の変異体を導入したところ、CCDC120 の後半領域と cytohesin-2 結合領域を含む N 末端領域は、小胞での局在を示さなかったことから、93 番目から 175 番目のアミノ酸残基に CCDC120 の小胞局在シグナル領域が存在するのではないかと考えている。また、CCDC120(1-350)変異体では、小胞の肥大化や小胞融合する瞬間の映像を得ることができたことから(図 ③、④)、CCDC120(1-350)変異体にこれらを制御する領域が存在する可能性を示唆する結果を得ることができた。今後は、さらに解析を進めこれら領域が制御する分子機構を明らかにする。

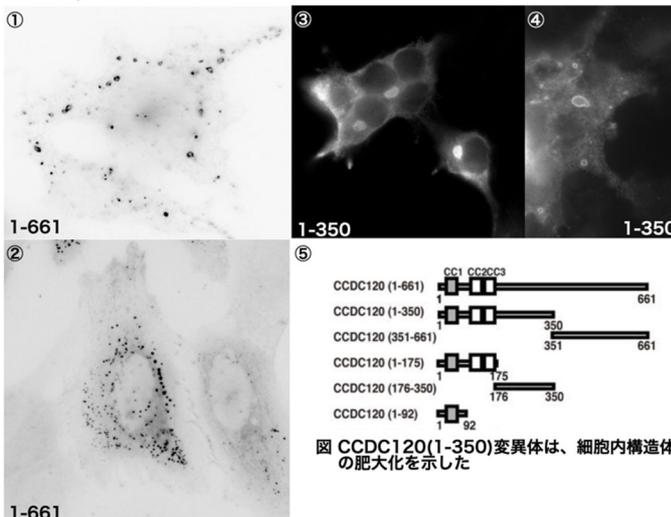


図 CCDC120(1-350)変異体は、細胞内構造体の肥大化を示した

##### (2)神経細胞における CCDC120 の局在

ドーパミン作動性神経細胞で検討する前に海馬神経細胞における内在性の CCDC120 の局在を解析した。CCDC120 局在解析をするために市販の CCDC120 抗体を用いて免疫染色を行い、細胞体、軸索、樹状突起などあらゆる領域に局在していることを確認した。さらにより良い抗体を得るため CCDC120 のポリクローナル抗体の作製を試みたが、特異的な抗体を得ることができなかった。今後は、超解像顕微鏡などで解析を予定しているので、より良い抗体を得るために CCDC120 抗体の作製を継続していく予定である。

##### (3)CCDC120-cytohesin-2 複合体はコレステロール蓄積に関与しない

先述したように CCDC120 は、リソソームや小胞の融合や輸送などに関与する。また先行研究で、Arf6 のノックアウト細胞で、リソソームにおけるコレステロールの蓄積が確認・報告されている。これらの結果などから、CCDC120-Arf6 シグナル伝達経路を阻害するとリソソームからの細胞外分泌に影響し、リソソームの肥大化やコレステロールが蓄積するという仮説を検証するために、種々の変異体や CCDC120、cytohesin-2 のノックダウン(KD)がコレステロール蓄積を促進するか否か検討した。結果として、いずれの CCDC120 変異体や KD によって、コレステロールの蓄積に影響を及ぼさなかった。

##### (4)LRRK2 活性依存的な CCDC120 のリン酸化の検討

先述のように網羅的なデータサイエンス解析によって、パーキンソン病原因分子 LRRK2 が CCDC120 をリン酸化する可能性があることが示唆されている。これを検証するために、野生型および活性型 LRRK2 を発現するプラスミドを addgene から購入し、CCDC120 と共発現させその抽出液を使用して種々の解析を行ったが、現在まで CCDC120 のリン酸化は確認できていない。活性型 LRRK2 を用いての検討など、まだ解析すべき事が残っているため、今後も継続してこれらの検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------