

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590331

研究課題名(和文)線虫をモデルとしたパーキンソン原因遺伝子LRRK2の周辺因子の解析

研究課題名(英文)Analyses of factors acting with Parkinson's disease gene LRRK2 using nematode as a model organism

研究代表者

久本 直毅 (Hisamoto, Naoki)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80283456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：LRRK2変異はヒトにおいて孤発性および家族性のパーキンソン病と関連することが知られている。我々はLRRK2結合蛋白質として、シャペロン複合体を形成することが知られているBAG-2とHSC70を同定した。それに加えて、我々はそれらのC. elegansホモログであるUNC-23とHSP-1が、LRRKホモログLRK-1のゴルジ体への局在を決定することにより、シナプス小胞タンパク質の極性的輸送を制御することを明らかにした。また我々はLRK-1がp38 MAPキナーゼ経路と共に6-OHDAの毒性からドーパミン神経を守るように働くことを示した。

研究成果の概要(英文)：It is known that mutations in LRRK2 are linked to both sporadic and familial Parkinson's disease in human. We identified two human proteins that bind to LRRK2: BAG-2 and HSC70, which are known to form a chaperone complex. In addition, we characterized that their C. elegans homologs, UNC-23 and HSP-1, regulate polarized sorting of synaptic vesicle proteins by determining Golgi localization of LRK-1, the sole homolog of human LRRK. Furthermore, we demonstrated that LRK-1 acts with p38 MAP kinase pathway to protect C. elegans dopaminergic neurons from 6-OHDA toxicity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医科学一般

キーワード：細胞内シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は高齢者に多い運動障害を特徴とする神経変性疾患であり、日本国内だけで推定10万人を超える患者がいるとされる、最も患者数が多い神経難病である。2004年に同定された *LRRK2* (*PARK8*) 遺伝子は家族性パーキンソン病だけでなく孤発性パーキンソン病にも関与することから、パーキンソン病発症におけるキーファクターとして注目されている。しかし、その本来の役割については不明の点が多い。*LRRK2* 遺伝子はロイシンリッチリピート、Roc-COR ドメイン、キナーゼドメインおよび WD40 リピートをもつマルチドメイン蛋白質をコードしており、多細胞生物において線虫からヒトまで種を越えて保存されている。申請者は線虫 *C. elegans* をモデル動物として用いることにより、*LRRK2* の線虫ホモログ *LRK-1* が、神経細胞においてシナプス小胞蛋白質の軸索特異的な局在を制御することを世界に先駆けて報告した (*Curr. Biol.*, 2007)。さらに Wolozin 博士らとの共同研究により、*LRK-1* がミトコンドリアで機能することにより酸化ストレスに関与することも見いだしていた (*J. Neurosci.*, 2009)。しかし、その上下流で機能する因子についてはあまりよく分かっていなかった。

2. 研究の目的

我々は、「ヒト *LRRK2* と線虫 *LRK-1* は種を越えて保存された機能を担い、かつ共通の因子と複合体を形成して機能する」という仮定のもとに、ヒト *LRRK2* を用いた生化学的解析と線虫 *LRK-1* を用いた分子遺伝学的解析を有機的に連携させた研究を行うことにより、*LRRK2/LRK-1* の上下流で機能する因子とその役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト *LRRK2* タンパク質に結合するタンパク

質を同定する目的で、TOF-MS 解析による結合因子の同定を行った。同定された因子については、免疫沈降法を用いて実際にそれらの因子が結合するのか再検討した。さらに、それらの因子の線虫ホモログを同定し、その機能について解析した。一方、*lrk-1* 変異体と同様の表現型を示す変異体のスクリーニングを行うことにより、*LRK-1* と同一の経路で機能する因子の同定を行った。単離した変異体は、SNP 法による遺伝子マッピングと全ゲノムシーケンス法により、遺伝子の同定を行った。さらに、ドーパミン神経を GFP で可視化した線虫を用いて、6-OHDA のドーパミン神経に対する毒性も検討した。

4. 研究成果

(1) *LRRK2* と結合する因子の解析

ヒト *LRRK2* と結合する蛋白質を同定する目的で、HEK293 細胞でタグを付けた *LRRK2* を発現させ、これを免疫沈降後に共沈降した蛋白質を TOF-MS 解析により同定した。その結果、シャペロンタンパク質 HSC70 と HSC70/HSP70 結合タンパク質 BAG-2 を同定した。Cos7 細胞でそれぞれのタンパク質にタグを付けて発現させたものを用いた生化学的解析から、*LRRK2* は HSC70 と、HSC70 は BAG-2 とそれぞれ強く結合すること、また BAG-2 は HSC70 存在下で *LRRK2* と弱く結合することが判明した。これらのことから、BAG-2 は HSC70 を介して *LRRK2* に結合すると考えられる。

(2) 線虫を用いた BAG-2/HSC70 の解析

in vivo での BAG-2/HSC70 と *LRRK* との関係性を明らかにするために、線虫をモデルとした解析を行った。まず、線虫の BAG-2 ホモログをゲノム配列から検索したところ、H14N18.1 ORF が BAG-2 と相同性を示すタンパク質をコードしていることを見出した。次にこの遺伝子を破壊した系統を作成したところ、この変異系統は *unc-23* 変異体と類似した頭部形態異常の表現型を示すことを見出した。さらに

既存の *unc-23* 変異体の変異部位について調べたところ、H14N18.1 ORF 内にミスセンス変異があることを見出し、さらにこの変異体で見られる頭部形態異常の表現型が H14N18.1 遺伝子の導入により相補されることを確認した。これらの結果から、線虫 UNC-23 遺伝子が BAG-2 をコードすることが示唆された。一方、線虫の HSC70 のホモログが HSP-1 であることは既に報告されていた。そこで UNC-23、HSP-1 および LRK-1 が結合するかどうかについて、培養細胞を用いた生化学的解析により検討した。Cos7 細胞でそれぞれの因子にタグを付けたものを発現させて免疫沈降することで、それらの結合をそれぞれ検討したところ、LRK-1 は HSP-1 と、HSP-1 は UNC-23 とそれぞれ強く結合すること、さらに UNC-23 が HSP-1 存在下で LRK-1 と弱く結合することを見出した。これらのことから、線虫のホモログも哺乳動物と同様な結合パターンを示すことを確認できた。

これまでの研究から、*lrk-1* 変異体ではシナプス小胞タンパク質 SNB-1 の樹状突起への異常局在を示すことが分かっていた。そこで、*unc-23* 変異体について SNB-1 の局在パターンを調べたところ、*lrk-1* 変異体と類似した局在異常の表現型を示した。またこの表現型は *lrk-1* 変異体の場合と同様に、クラスリンアダプタータンパク質 AP1 の線虫ホモログ UNC-101 の変異により抑圧された。さらに、*unc-23* 変異体の SNB-1 局在異常の表現型は、*unc-23* 遺伝子の導入により相補されるだけでなく、LRK-1 の大量発現によっても抑圧された。これらの結果から、UNC-23 は LRK-1 の上流で機能することにより、SNB-1 の局在を制御することが示唆された。

さらに、*unc-23* 変異を抑圧するサプレッサー変異のスクリーニングも行った。その結果、3つのサプレッサー変異を同定したが、これらの変異はいずれも優性変異であり、さらに *hsp-1* のミスセンス変異であることが判明し

た。*HSP-1* は N 端側からヌクレオチド結合ドメイン (NBD)、リンカーおよび基質結合部位 (SBD) の 3 つのドメインから成るが、今回単離された *hsp-1* 変異のうち 2 つは *HSP-1* のリンカー部位あるいはその直前に位置しており、ホモで維持可能であった。一方、残り一つは NBD 内に存在していたが、この変異はホモで幼虫致死あるいは不稔の表現型を示した。これらの *hsp-1* 変異は、*unc-23* の欠損変異もミスセンス変異も抑圧できたが、*lrk-1* 変異は全く抑圧できなかった。以上のことから、*HSP-1* は UNC-23 の下流および LRK-1 の上流で機能すると考えられる。

UNC-23 および *HSP-1* の LRK-1 に対する効果を調べるために、線虫内での LRK-1 の動態について検討した。まず *unc-23* 変異体で LRK-1 タンパク量を調べたが、これについては野生型と差はなかった。これまでの解析から LRK-1 が主にゴルジ体に局在することがわかっていたので、次に LRK-1 のゴルジ体局在に対する UNC-23 および *HSP-1* の関与について、LRK-1::VENUS 融合タンパク質を用いて検討した。その結果、*unc-23* 変異により LRK-1::VENUS のゴルジ体への局在が減少すること、また、この減少は *hsp-1* 変異により抑圧されることがわかった。以上の結果から、UNC-23 は *HSP-1* を介して LRK-1 に結合し、そのゴルジ体への局在を正に制御することにより、SNB-1 の極性的輸送を制御することが示唆された。

(3) *lrk-1* 変異体と同様の表現型を示す変異体の探索

LRRK2/LRK-1 の周辺で機能する因子を更に同定する目的で、*lrk-1* 変異体と同様の表現型を示す変異体のスクリーニングを行った。その結果、複数の変異体の単離に成功した。これらの変異体のうち、*km75* 変異に着目して更なる解析を行った。*km75* 変異は、*lrk-1* 変異体や *unc-23* 変異体と同様に SNB-1 局在の異常を示し、さらにその表現型が UNC-101 依存的であ

った。*km75*変異の原因遺伝子をSNPおよびゲノムシーケンスにより同定したところ、キネシン結合タンパク質JIP3の線虫ホモログ*unc-16*の新しい変異であることが判明した。これまでの解析から、既存の*unc-16*変異体で見られる局在異常はUNC-101に依存しないことが分かってきた。しかし、今回単離された*unc-16(km75)*変異は、UNC-101に依存した局在以上の表現型を示した。*km75*変異は、これまで単離された*unc-16*変異とは異なり、C端の一部のみが欠損するタイプの変異であったことから、おそらくUNC-16はそのN端領域を介した機能とは別に、C端領域を介してUNC-101依存的なシナプス小胞タンパク質の局在制御に関わると考えられる。哺乳動物LRRK2はJIP3と結合してこれを安定化させるという報告もあることから、線虫ではLRK-1がUNC-16を介してSNB-1の局在制御を行っている可能性が考えられる。

(4)LRK-1のドーパミン神経変性への関与

LRK-1の機能を更に明らかにするために、我々はFeng博士との共同研究により、LRK-1のドーパミン神経変性への関与を検討した。ドーパミン神経の変性を誘導する薬剤である6-OHDAを線虫に投与した場合、野生型ではドーパミン神経の変性はほとんど観察されない。しかし、*lrk-1*変異体に投与した場合、ドーパミン神経の変性が有意に観察された。さらにこの表現型は、MAPキナーゼ経路の因子である*sek-1*および*pmk-1*の変異によっても有意に観察された。ちなみに遺伝学的な解析から、これらの因子が同一経路で機能することも示唆された。更なる解析から、6-OHDAを線虫に投与するとPMK-1の活性化ドメインがリン酸化されること、またそのリン酸化は*lrk-1*変異体では起こらないことを見出した。さらに、*lrk-1*、*sek-1*および*pmk-1*変異体では、ヒト変異型-シヌクレイン発現によるドーパミン神経の変性が野生型よりも強く起こることも見出した。これらの結

果から、線虫ではLRK-1、SEK-1およびPMK-1が同一経路上で共にドーパミン神経の変性に対して抑制的に働くことが示唆された。なお、同様な関係はヒト神経芽細胞腫でもみられたことから、この経路が種を越えて保存されたLRRK2/LRK-1のシグナル経路のひとつだと推測される。

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 8件)

Inoue A, Sawatari E, Hisamoto N, Kitazono T, Teramoto T, Fujiwara M, Matsumoto K, Ishihara T.

Forgetting in *C. elegans* is accelerated by neuronal communication via the TIR-1/JNK-1 pathway.

Cell reports 3, 808-816 (2013).

doi: 10.1016/j.celrep.2013.02.019.

Hattori A, Mizuno T, Akamatsu M, Hisamoto N, Matsumoto K.

The *C. elegans* JNK signaling pathway activates expression of stress response genes by derepressing the Fos/HDAC repressor complex.

PLoS Genetics 9, e1003315 (2013).

doi: 10.1371/journal.pgen.1003315.

Pastuhov SI, Fujiki K, Nix P, Kanao S, Bastiani M, Matsumoto K, Hisamoto N.

Endocannabinoid-G α signalling inhibits axon regeneration in *Caenorhabditis elegans* by antagonizing the G α -PKC-JNK signalling.

Nature Commun. 3, 1136 (2012).

doi: 10.1038/ncomms2136.

Li C, [Hisamoto N](#), Nix P, Kanao S, Mizuno T, Bastiani M, Matsumoto K.

The growth factor SVH-1 regulates axon regeneration in *C. elegans* via the JNK MAPK cascade.

Nature Neurosci. **15**, 551-557 (2012).

doi: 10.1038/nn.3052.

Nix P, [Hisamoto N](#), Matsumoto K and Bastiani M.

Axon regeneration requires coordinate activation of p38 and JNK MAPK pathways.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **108**,10738-10743 (2011).

doi: 10.1073/pnas.1104830108.

Yuan Y, Cao P, Smith MA, Kramp K, Huang Y, [Hisamoto N](#), Matsumoto K, Hatzoglou M, Jin H, Feng Z.

Dysregulated LRRK2 signaling in response to endoplasmic reticulum stress leads to dopaminergic neuron degeneration in *C. elegans*.

PLoS One **6**, e22354 (2011).

doi: 10.1371/journal.pone.0022354.

Hayakawa T, Kato K, Hayakawa R, [Hisamoto N](#), Matsumoto K, Takeda K, Ichijo H.

Regulation of Anoxic Death in *Caenorhabditis elegans* by Mammalian Apoptosis Signal-Regulating Kinase (ASK) Family Proteins.

Genetics **187**, 785-792 (2011).

doi: 10.1534/genetics.110.124883.

Arimoto M, Koushika SP, Choudhary B, Li C, Matsumoto K, [Hisamoto N](#).

The *C. elegans* JIP3 protein UNC-16 functions as an adaptor to link kinesin-1 with cytoplasmic dynein.

J. Neurosci. **31**, 2216-2224 (2011).

doi: 10.1523/JNEUROSCI.2653-10.2011.

〔学会発表〕(計 2件)
第84回日本生化学会大会(2011年9月21-24、京都)招待講演

第35回日本神経科学大会(2012年9月18-21、名古屋)口頭発表

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
久本 直毅 (Hisamoto Naoki)
名古屋大学大学院理学研究科・准教授
研究者番号：80283456

(2)研究分担者 ()
研究者番号：

(3)連携研究者 ()
研究者番号：