

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：32607
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23790809
研究課題名（和文） 消化管粘膜防御機構からみた神経細胞における新規プロテインキナーゼ LRRK2 の役割
研究課題名（英文） Characterization of LRRK2 in enteric nervous system
研究代表者 川上 文貴（KAWAKAMI FUMITAKA） 北里大学・医療衛生学部・助教 研究者番号：50511896

研究成果の概要（和文）：

本研究において LRRK2 はチューブリン依存的に微小管結合タンパク質の 1 つであるタウタンパク質と相互作用し、チューブリン存在下でタウタンパク質の Thr181 をリン酸化することが明らかとなった。さらに、LRRK2 過剰発現細胞をレチノイン酸処理したところ、神経様突起の伸長が抑制された。以上の結果から、LRRK2 は Tau をリン酸化しその微小管結合能を阻害することで、軸索伸長を抑制することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we demonstrated that (i) LRRK2 interacts with tau in a tubulin-dependent manner; (ii) LRRK2 directly phosphorylates tubulin-associated tau, but not free tau. Furthermore, we revealed that LRRK2 overexpressing cells exhibited significantly shorter neurites than control cells. Our results suggest that LRRK2 plays an important role as a physiological regulator for phosphorylation-mediated dissociation of tau from microtubules, which is an integral aspect of microtubule dynamics essential for neurite outgrowth and axonal transport.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：食道、胃、十二指腸

1. 研究開始当初の背景

LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2) は、2004 年にパーキンソン病 (PD) の新規原因分子として同定されたプロテインキナーゼ (タンパク質リン酸化酵素) であり、4 つの異なる機能性ドメインを有する (図 1)。PD の発症には、遺伝子変異による LRRK2 のキナーゼ活性の低下や細胞内の量的変化が関与するとされている。

申請者らは、これまでに脳神経細胞における正常型 LRRK2 の機能を研究し、LRRK2 が酸化ストレスに対して細胞保護作用を有することを明らかにしてきた (Biochem. Biophys. Res. Commun., 390, 710-715, 2009)。その後の解析により、LRRK2 は p53 経路を介する酸化ストレス応答シグナルを誘導することで脳神経細胞保護作用を発揮することを確認している。

LRRK2 の発現は、中枢神経のみならず末梢の神経細胞にも認められることが知られている。特に、消化管は第二の脳と呼ばれるように、脳に次いで多くの神経細胞が存在する臓器である。常に、細菌やウイルスあるいは食品由来の酸化ストレスにさらされる消化管粘膜には特別な防御機構が存在し、その機能や恒常性を維持する機構の解明が進められている。

2. 研究の目的

消化管粘膜防御機構に関する検討の多くは粘膜上皮細胞を中心としたものであるが、消化管粘膜組織内には粘膜下組織から伸ばされた神経線維が広く分布しているため、上皮細胞のみならず神経細胞にも酸化ストレスに対する防御機構が存在することが想定される。しかしながら、消化管に分布する神経細胞における酸化ストレス防御機構についての詳細な分子メカニズムは十分に解明されていない。そこで本研究は、LRRK2 による p53 経路を介する酸化ストレス応答機構に着目し、消化管に分布する神経細胞における LRRK2 の生理的役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 消化管組織における LRRK2 の発現領域の検討

正常マウスやラットの消化管（食道から大腸まで）をカルノア固定し組織標本を作成する。抗 LRRK2 抗体による免疫組織化学染色により、消化管における LRRK2 の発現を調べる。LRRK2 の詳細な局在を検討するため、LRRK2 と共に神経細胞マーカー（neurofilament, protein G product9.5 を使用予定）や粘液細胞マーカー（RGM21, HIK1083, HCM31, PGM34 を使用予定）を用いた二重蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により解析する。さらに、初代培養した脳神経細胞と消化管神経細胞における LRRK2 の細胞内局在の違いを比較する。同様の方法を用いて、LRRK2 ノックアウトと野生型マウスにおける消化管神経細胞の分布や粘膜性状の違いを比較検討する。

(2) 消化管神経細胞に対する酸化ストレスの影響の比較検討

消化管神経細胞と脳神経細胞に対する酸化ストレスの影響を比較するため、正常のマウスやラットを用いてそれぞれの初代培養神経細胞を得る。これらの細胞にそれぞれ酸化ストレスを誘導（過酸化水素やスーパーオキシドジスムターゼ阻害剤などの添加を予定）し ROS（活性酸素種）の産生量を測定することで酸化ストレス度を比較する。同様にして、細胞生存率を MTT アッセイにより測定し比較する。さらに、培養神経細胞に対する非ス

ステロイド性抗炎症薬（インドメタシン）を添加し、細胞生存率やアポトーシスの有無を WST-8 アッセイ等により検討する。また、IND が細胞の酸化ストレスに対する抵抗性を減少させることを想定し、IND の存在下・非存在下での過酸化水素による細胞の生存率を検討する。上記同様、培養神経細胞に IND を添加し、各種ストレス応答因子（Nrf2、Hsp70 および α -synuclein 等）およびアポトーシス関連分子（p53、caspase および Akt など）の発現量やリン酸化の変化についてウェスタンブロッティングにより解析する。

LRRK2 発現による p53 のリン酸化レベルの上昇、p53 の下流分子（p21 や Nrf2 など）の発現量の変化をそれぞれウェスタンブロッティング法により比較検討する。消化管神経細胞において LRRK2 による p53 経路の活性化が認められなかった場合は、消化管神経細胞特異的な LRRK2 のシグナル経路の存在が想定される。その場合、初代培養マウス消化管神経細胞の細胞ライセートを用いて、免疫沈降および質量分析法により消化管特異的な LRRK2 のターゲット分子を同定する。さらに、これらの分子を介する LRRK2 のシグナル経路を特定するため、LRRK2 シグナル関連分子の発現量およびリン酸化レベルをウェスタンブロッティング法により解析する。

(3) 粘膜傷害が消化管神経細胞に与える影響の検討

正常マウスやラットに薬剤（非ステロイド性抗炎症薬あるいは 5-FU などの抗がん剤）を投与し、消化管の部位特異的な粘膜傷害モデルを作成する。消化管各部位の組織標本を作成し、神経細胞マーカーや粘液細胞マーカーを用いた免疫組織化学染色を行い、粘膜傷害の程度とそれに伴う神経分布の変化を詳細に比較検討する。同様に、LRRK2 の免疫組織化学染色を行い、粘膜障害による LRRK2 の発現量および局在の変化を検討する。さらに、細胞レベルで特定した LRRK2 のシグナル経路の変動を実験動物レベルで実証するため、LRRK2 シグナル経路に関連する分子の量的変化およびリン酸化レベルの変動を免疫組織化学染色およびウェスタンブロッティングにより解析する。予防薬探求の観点から上記実験モデルにおける病変が既存の酸分泌抑制剤や粘膜防御系薬剤の投与によりどのように変化し消化管神経細胞に影響を与えるかについても調べる。

(4) 粘膜傷害が LRRK2 ノックアウトマウスの消化管神経細胞に与える影響の検討

LRRK2 ノックアウトマウスおよび野生型マウスに粘膜傷害を誘導し、神経細胞や粘膜上皮細胞の性状を免疫組織化学染色により解析する。さらに、粘膜の修復過程における LRRK2 の役割を明らかにするため、傷害後

の各段階の組織標本を作成し、粘膜修復の程度を経時的に LRRK2 ノックアウトマウスと野生型マウスとで比較解析する。同様の組織標本を用いて、各種粘液細胞マーカーによる免疫組織化学染色を行い粘膜修復時の粘液産生における LRRK2 の役割を解析する。以上の解析により、LRRK2 の消化管粘膜に対する保護作用を有するのみならず粘膜の修復過程における作用を明らかにする予定である。

4. 研究成果

(1) 消化管組織における LRRK2 の発現分布を調べるために、マウスの全消化管（食道、胃、空腸、回腸、大腸）の組織切片を作成し、抗 LRRK2 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。その結果、空腸において、粘膜固有層と筋層の領域に抗 LRRK2 抗体に陽性反応を示す細胞が観察された。これまでの研究により、LRRK2 はマクロファージに発現していることが報告されていることから、粘膜固有層にて観察された LRRK2 陽性細胞はマクロファージである可能性が高いと考えられる。しかしながら、本研究においては、LRRK2 細胞の同定には至っていない。今後、各種細胞マーカーを用いた蛍光免疫染色により、細胞の同定を行う予定である。一方、筋層領域にはアUELバッハ神経叢が存在することから、筋層領域にて観察された LRRK2 陽性細胞はアUELバッハ神経叢を形成する神経細胞であると考えられるが、これに関しても、今後細胞の同定が必要である。

(2) 消化管神経細胞と脳神経細胞に対する酸化ストレスの影響の比較検討するため、消化管組織からの神経細胞の初代培養を試みたが、本研究においては初代培養の消化管神経細胞を得ることができなかった。そこで、神経系細胞と腸管粘膜上皮系細胞に対する酸化ストレスおよびインドメタシンの影響の比較ヒト神経芽腫細胞 (SH-SY5Y) と大腸癌由来細胞 (Colo201) を各濃度のインドメタシンで 48 時間処理し細胞生存率を測定した。その結果、インドメタシンは、Colo201 よりも SH-SY5Y 細胞に対して強い細胞毒性を示した (図 1)。このことから、インドメタシンは腸管粘膜上皮細胞よりも神経細胞に対して強い細胞障害作用を示すことが考えられた。

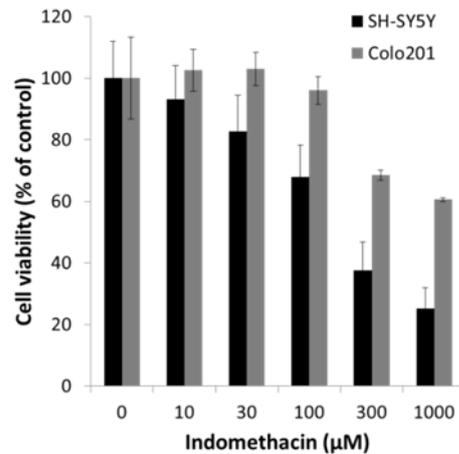


図 1. SH-SY5Y 細胞と Colo201 細胞に対するインドメタシンの影響

インドメタシンの SH-SY5Y における p53 の転写活性に対する影響を調べるために、p53 のレポーターアッセイを行った。SH-SY5Y 細胞に p53 レポーターベクターとインナーコントロールベクターをトランスフェクションし 24 時間培養後、各濃度のインドメタシンで 24 時間処理した。その結果、インドメタシンの濃度依存的に p53 の転写活性が上昇することが分かった (図 2)。さらに、p53 のタンパク質量も上昇することが分かった。このことから、インドメタシンは p53 経路を活性化させることが考えられた。

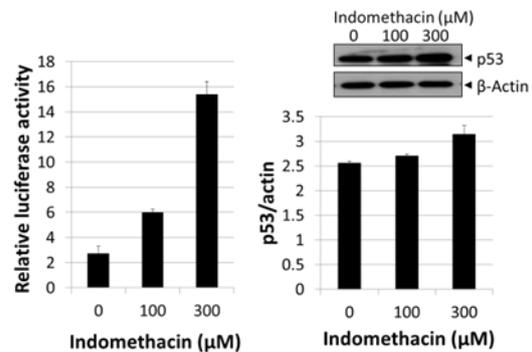


図 2. インドメタシンの SH-SY5Y 細胞における p53 転写活性に対する影響

各濃度のインドメタシンで処理した SH-SY5Y 細胞を用いて、p21 あるいは Bax の発現量の変化を解析した。その結果、Bax には変化がなかったものの、100 μM のインドメタシン処理により p21 の発現量は上昇することが分かった (図 3)。p21 は細胞周期の停止やアポトーシスに関わることから、インドメタシンは、SH-SY5Y 細胞に対してアポトーシスを誘導することが考えられた。

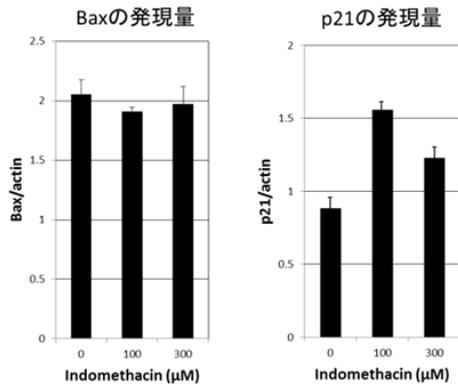


図 3. SH-SY5Y 細胞における p53 標的分子のインドメタシンによる誘導

(3) LRRK2 を介するシグナル伝達経路を明らかにするため、LRRK2 と相互作用する分子の同定を行った。培養神経細胞ライセートを作成し、抗 LRRK2 抗体を用いた免疫沈降を行った。その結果、微小管結合タンパク質のタウタンパク質を LRRK2 の相互作用分子として同定された。また、タウは LRRK2 と直接相互作用するのではなく、チューブリンを介して LRRK2 と 3 者複合体を形成することが分かった (図 4)。

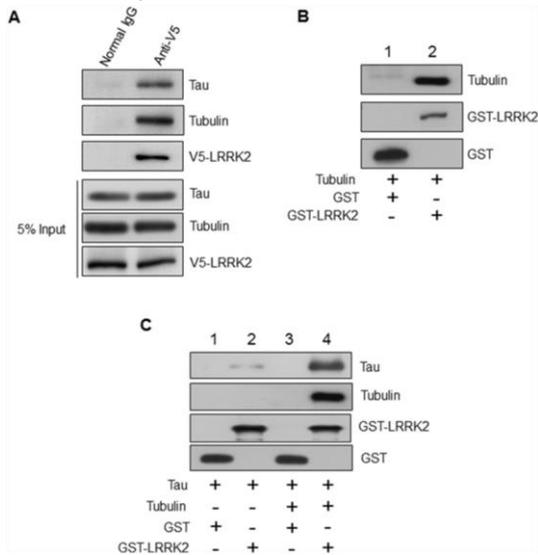


図 4. LRRK2 とタウタンパク質の相互作用の解析

また、LRRK2 はチューブリン依存的にタウをリン酸化することも分かった。このことからタウは LRRK2 のターゲット分子であることが分かった。

さらに、LRRK2 過剰発現細胞をレチノイン酸処理したところ、LRRK2 は神経様突起の伸長を抑制することが分かった (図 5)。このことから LRRK2 は神経突起の形成を調節役割を

有することが分かった。

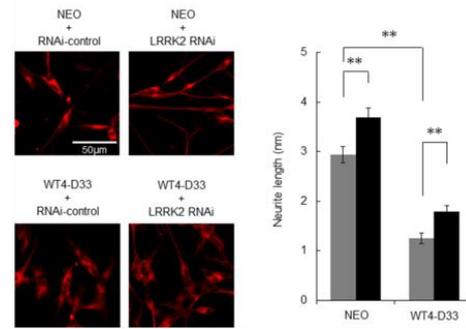


図 5. 神経突起伸長に対する LRRK2 の抑制効果

以上のことから、LRRK2 は神経細胞の形態形成において重要な役割を演じていることが分かった。今後、さらに、LRRK2 による軸索輸送の調節などを解析していく予定である。

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 3 件)

① Kawakami F., Yabata T., Ohta E., Maekawa T., Shimada N., Suzuki M., Maruyama H., Ichikawa T. and Obata F.: LRRK2 phosphorylates tubulin-associated tau but not the free molecule: LRRK2-mediated regulation of the tau-tubulin association and neurite outgrowth. PLoS ONE, 7, e30834 (2012).

② Kawakami F., Suzuki M., Shimada N., Kagiya G., Ohta E., Tamura K., Maruyama H. and Ichikawa T.: Stimulatory effect of α -Synuclein on the tau-phosphorylation by GSK-3 β . FEBS J., 278, 4895-4904 (2011).

③ Ohta E., Kawakami F., Kubo M., Obata F.: LRRK2 directly phosphorylates Akt1 as a possible physiological substrate: impairment of the kinase activity by Parkinson's disease-associated mutations. FEBS Lett., 585, 2165-2170 (2011).

[学会発表] (計 5 件)

① Fumitaka Kawakami, Minori Suzuki, Yuki Yamada, Rei Kawashima, Takafumi Ichikawa Biochemical characterization of α -synuclein as a stimulator for the gsk-3 β -mediated phosphorylation of tau protein. 37th FEBS congress, Sevilla, 7, Sept, 2012

② 川上文貴, 山田雄基, 川島 麗, 石原和彦, 市川尊文: 神経軸索伸長制御における

LRRK2 によるタウのリン酸化の生理的役割
第 85 回日本生化学会, 福岡市, 平成 24 年 12
月 10 日

③ 山田雄基、川上文貴, 川島 麗、市川尊
文: LRRK2 による p53 のリン酸化とその生
理的役割に関する解析. 第 85 回日本生化学
会, 神戸市, 福岡市, 平成 24 年 12 月 10 日

④ 川上文貴, 山田雄基, 川島麗, 市川尊文、
GSK-3B による Tau のリン酸化に対する
 α -Synuclein の促進効果、第 132 年会日本
薬学会、2012 年 3 月札幌市

⑤ 川上文貴、鈴木美乃里、山田雄基、川島麗、
市川尊文: GSK-3 β による tau のリン酸化に
対する Hsp70 の抑制作用、
第 84 回日本生化学会、2011 年 9 月 23
日、京都市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上文貴 (KAWAKAMI FUMITAKA)

研究者番号: 50511896