

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08265

研究課題名(和文) LRRK2-Rab経路の理解に基づくパーキンソン病分子病態の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular pathogenesis of Parkinson disease by uncovering the LRRK2-Rab pathway

研究代表者

伊藤 弦太 (Ito, Genta)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・特任講師

研究者番号：10431892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病の原因遺伝子であるLRRK2は細胞や組織の中でRabと呼ばれるタンパク質をリン酸化するが、その機能はよくわかっていなかった。本研究において、LRRK2がRab10をリン酸化すると、小胞体からリソソームに局在が変化することを見出した。また、同時にリソソームの細胞内局在が変化することも見出した。

さらに、LRRK2の活性化因子であるRab29の近傍タンパク質を網羅的に同定した。また、Rab10リン酸化やリソソームの局在を制御する遺伝子の網羅的スクリーニング系を確立した。これらの研究成果から、LRRK2-Rab経路の制御異常がパーキンソン病の原因となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病はアルツハイマー病に次いで頻度の高い神経変性疾患であるが、現在その根本治療法は存在しない。主として高齢者に発症することから、超高齢社会を迎えた本邦において、その発症機序に基づく治療法の開発は急務である。私たちは、その変異により遺伝性のパーキンソン病の原因となるLRRK2タンパク質がRab10タンパク質をリン酸化(リン酸を付与する)ことを発見したが、本研究ではそのリン酸化がリソソームと呼ばれる細胞内小器官の恒常性維持に関与する可能性を提示した。リソソームは細胞内の老廃物の分解や細胞外への放出などを担当する器官であり、その異常がパーキンソン病の原因となる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although LRRK2, a causative gene product for Parkinson disease, has been shown to phosphorylate Rab proteins, its functional significance remains unknown. In this study, we found that Rab10 changes its subcellular localization from endoplasmic reticulum to lysosome. Interestingly, we also found that lysosomes change the localization if cells overexpressing LRRK2 were treated with LRRK2 inhibitors. Moreover, we systematically identified proximal proteins of Rab29, an activation factor for LRRK2. We also established a genome-wide screening system that enables us to screen genes involved in the regulation of Rab10 phosphorylation as well as lysosomal positioning by LRRK2. Taken together, we propose the involvement of dysregulation of the LRRK2-Rab pathway in the pathogenesis of Parkinson disease.

研究分野：疾患生化学

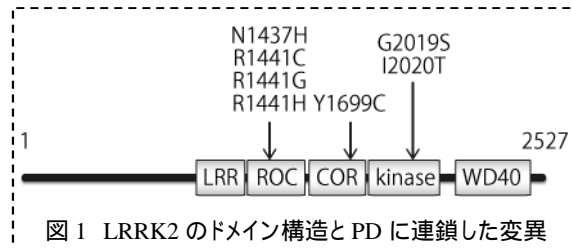
キーワード：LRRK2 パーキンソン病 キナーゼ GTPase Rab リソソーム

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (Parkinson disease; PD) は、アルツハイマー病に次いで頻度の高い神経変性疾患であり、高齢期に多く発症する。臨床症状は、安静時振戦、筋固縮、寡動、姿勢反射障害などの運動機能障害を主徴とし、病理学的には、中脳黒質ドーパミン神経細胞などの選択的変性、脱落と、残存する神経細胞における Lewy 小体と呼ばれる封入体の形成を特徴とする。現在利用可能な PD の治療法は対症療法に限られており、高齢化が急速に進行する現代において、PD の分子病態に即した根本療法の開発が急務となっている。

PD の大半は遺伝的背景の少ない孤発例であるが、一部に遺伝子変異をともなう家族性パーキンソン病 (familial Parkinson disease; FPD) が存在し、2004 年にその責任遺伝子のひとつとして LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2) が同定された (Paisán-Ruiz et al., *Neuron*, 2004; Zimprich et al., *Neuron*, 2004)。LRRK2 変異による FPD は、孤発性 PD とよく似た臨床症状や病理像を呈することから、LRRK2 の研究により、孤発性も含めた PD の分子病態の本質を究明することが可能と考えられている。

LRRK2 タンパク質は 2527 アミノ酸からなる巨大タンパク質であり、GTP 結合活性を有する ROC (Ras of complex proteins) ドメインやキナーゼドメインなど、複数の機能ドメインを同一分子内に有する (図 1)。現在までに、図 1 に示す 7 種類のアミノ酸置換が PD に連鎖する変異として同定されている。神経細胞に FPD 変異型 LRRK2 を過剰発現すると、キナーゼ活性依存的に神経細胞死や神経突起の退縮が生じることが報告され (Smith et al., *Nat. Neurosci.*, 2006; MacLeod et al., *Neuron*, 2006)、LRRK2 の基質タンパク質の異常リン酸化が神経変性を惹起する可能性が示唆されたが、生理的環境下において LRRK2 によりリン酸化される基質タンパク質は、長らく知られていなかった。そこで私たちは英国留学中にリン酸化プロテオミクス解析を行い、低分子量 GTP 結合タンパク質 Rab ファミリーに属する Rab10 など複数の Rab タンパク質が、LRRK2 の生理的基質であることを初めて明らかにした (Steger et al., *eLife*, 2016)。



また、内因性 Rab10 のリン酸化を検出する実験系を確立し、LRRK2 の FPD 変異ノックインマウスにおいて内因性 Rab10 のリン酸化が顕著に亢進することを世界に先駆けて示した (Ito et al., *Biochem. J.*, 2016)。しかしながら、LRRK2 による Rab10 リン酸化の機能的意義、その亢進と神経変性の因果関係、PD 患者における Rab10 リン酸化の変化については全く明らかになっていなかった。

## 2. 研究の目的

前項でも述べたように、私たちはごく最近、細胞内小胞輸送の制御に関与する低分子量 GTP 結合タンパク質 Rab ファミリーに属するタンパク質が LRRK2 の生理的基質であり、LRRK2 の遺伝子変異により Rab のリン酸化が異常に亢進することを見出した。しかしながら、Rab リン酸化の生理的な制御機構、機能的意義、パーキンソン病患者における変化などは全く知られていない。本研究は、LRRK2 による Rab リン酸化、小胞輸送への影響と神経変性の因果関係を解析し、パーキンソン病の新たな創薬標的を提示することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) LRRK2 の活性制御機構

孤発性 PD 患者のゲノムワイド関連解析 (GWAS) から同定された PD 発症リスクと関連する遺伝子座のひとつに *RAB29* がある。本研究の開始後に、Rab29 タンパク質が LRRK2 を活性化することが報告され (Purlyte et al., *EMBO J.*, 2018) 私たちも再現することができた。そこで、Rab29 による LRRK2 の活性制御機構を詳細に明らかにするべく、Rab29 近傍タンパク質の同定を行った。具体的には、TurboID と呼ばれる人工的に改変された非特異的ビオチンリガーゼを融合した Rab29 を U2-OS 細胞に恒常発現させ、培地にビオチンを添加することでビオチン化されたタンパク質をストレプトアビジンビーズによりプルダウンし、LC-MS/MS により同定した。

LRRK2 の FPD 変異体 (Y1699C 変異) を培養細胞に恒常発現させ、内因性 Rab10 のリン酸化を蛍光免疫染色により検出する実験系を確立した。これを 384 ウェルプレートを用いたハイスループットスクリーニングに適合する条件へと最適化を行った。

### (2) Rab リン酸化の機能的意義

前項で述べたように、LRRK2 の FPD 変異体を培養細胞に恒常発現すると、内因性 Rab10 のリン酸化が検出できるが、これがどのオルガネラマーカールと一致するか蛍光免疫染色により検討した。また、total Rab10 の局在についても、LRRK2 の発現の有無や、LRRK2 特異的阻害剤処理により変化するか同様に検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) LRRK2 の活性制御機構

HEK293A 細胞に 3xFLAG-LRRK2 と HA-Rab29 を一過性に共発現させると、発現した LRRK2 の自己リン酸化が Rab29 の共発現により顕著に増加した (図 2)。この結果は、Rab29 が LRRK2 を活性化することを示している。

Rab29 による LRRK2 活性化の分子メカニズムを明らかにするため、Rab29 の近傍タンパク質を TurboID を用いて探索した。U2-OS 細胞に V5-TurboID-Rab29 を恒常発現させ、ビオチン化タンパク質をプルダウンした。V5-TurboID-empty を発現する U2-OS 細胞をコントロールとして、プルダウン量を非標識プロテオミクス解析により定量した。その結果、Rab29 近傍タンパク質として、トランスゴルジ網 (trans-Golgi network; TGN) に局在する Golgin ファミリータンパク質や、小胞輸送に關与するタンパク質が主に同定された (図 3)。この結果は Rab29 が TGN に局在することと一致しており、結果の信頼性を裏付けている。これまでに、Rab29 結合タンパク質や近傍タンパク質を網羅的に同定した報告はなく、本結果の新規性は高い。また、Golgin ファミリータンパク質は Rab を膜上に繫留する機能が示唆されているものも存在することから (Jones R et al., *J. Cell Biol.*, 2008)、Rab29 の TGN 局在様式を解明する手がかりになる期待が高い。今後、これらのタンパク質が Rab29 のエフェクターとなるかなどを解析することで、Rab29 が LRRK2 を活性化する分子メカニズムの詳細が明らかになると期待される。

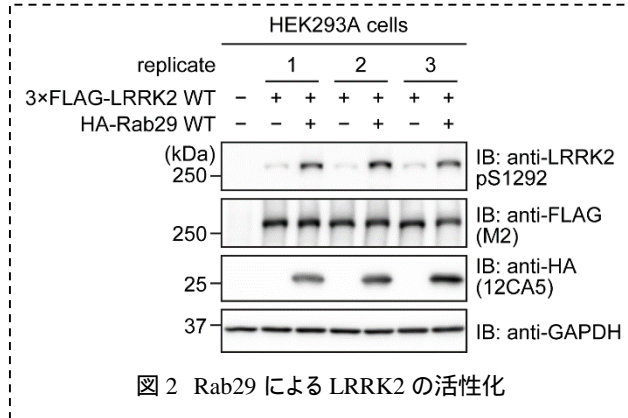


図 2 Rab29 による LRRK2 の活性化

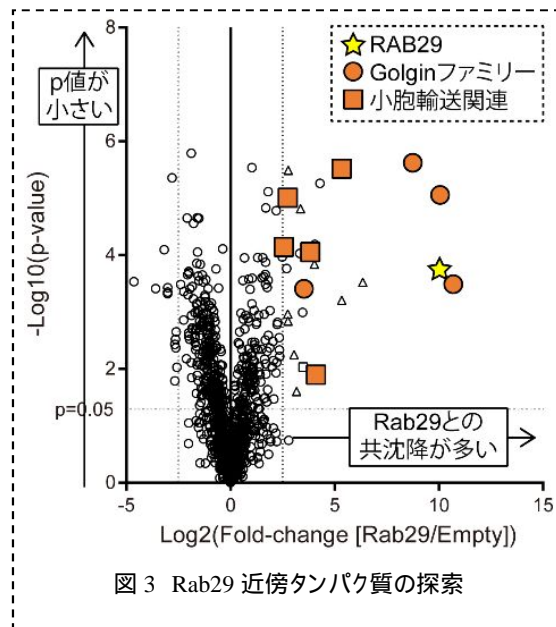


図 3 Rab29 近傍タンパク質の探索

##### (2) Rab リン酸化の機能的意義

HEK293A 細胞に Y1699C 変異型 3xFLAG-LRRK2 と HA-Rab10 を恒常的に共発現させ、免疫染色したところ、Rab10 およびリン酸化 Rab10 は LAMP1 陽性のリソソームと一致する局在を示した (図 4)。このとき、細胞を LRRK2 阻害剤で処理すると、Rab10 は小胞体マーカーと一致する局在を示し、LRRK2 によるリン酸化依存的に細胞内局在が変化する可能性が示唆された。

さらに興味深いことに、LRRK2 阻害剤処理の有無によりリソソームの細胞内局在が変化するを見出した (図 4)。HEK293A 細胞ははがれやすくハイスループットの蛍光免疫染色に適さなかったことから、Y1699C 変異型 LRRK2 を恒常発現する U2-OS 細胞を作出した。この細胞においても、LRRK2 阻害剤処理により内因性 Rab10 のリン酸化が消失し、リソソームの細胞内局在が変化したことから、この細胞を用いて LRRK2 によるリソソーム局在制御に關与する遺伝子を網羅的にスクリーニングできると考えられた。

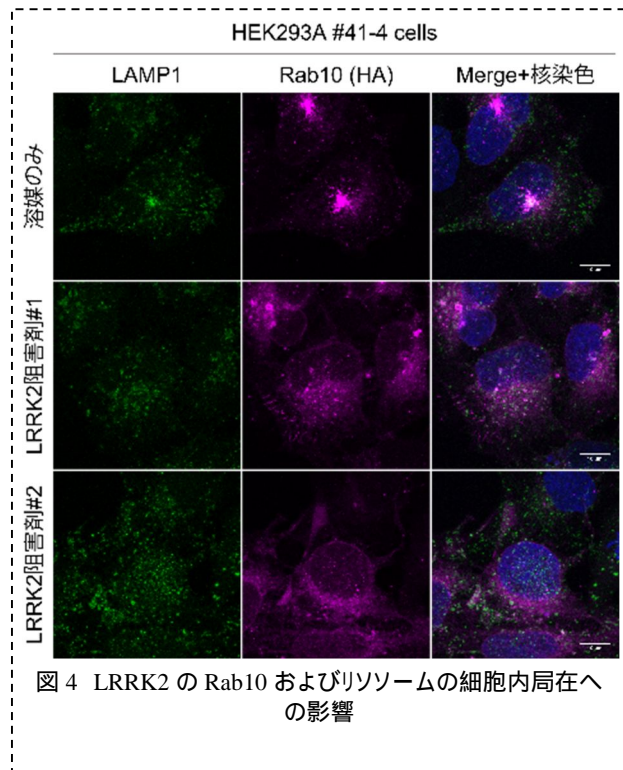


図 4 LRRK2 の Rab10 およびリソソームの細胞内局在への影響

HEK293A 細胞においてリソソームの輸送や細胞内局在に関与する遺伝子を CRISPR-Cas9 ノックアウトしたところ、RILP をはじめとするいくつかの遺伝子のノックアウトによりリソソームの核近傍への集積がキャンセルされた。これらのタンパク質は Rab のエフェクター分子であることから、LRRK2 によりリン酸化された Rab タンパク質が、これらのエフェクタータンパク質を介してリソソームの微小管依存的輸送を制御する可能性が示唆された。

### (3) 得られた成果の位置づけとインパクト

LRRK2 の生理的基質同定は大きなマイルストーンであるが、基質である Rab タンパク質のリン酸化がどのような生物学的意義を有するか、あるいはその過剰リン酸化が PD 発症において果たす役割は全く明らかになっていない。本研究では、リン酸化 Rab10 特異抗体を作出することでリン酸化 Rab10 がリソソームに局在することを見出した。また、リソソームの細胞内局在が LRRK2 のキナーゼ活性依存的に変化することを見出した。

リソソームの細胞内局在は、リソソームの分解活性やオートファジーにおける機能の調節に寄与することが近年明らかになりつつあり、LRRK2 がその一部を担う可能性を提示したことは基礎生物学的に大きなインパクトがある。また、リソソーム分解酵素である glucocerebrosidase のヘテロ機能欠損が PD 発症リスクを大きく上昇させることなどから、PD の発症にはリソソームの機能異常が関与することも示唆されており、PD の病態解明という点でも大きな意義を有すると考えられる。

### (4) 今後の展望

本研究で同定された Rab29 近傍タンパク質が Rab29-LRRK2 経路において果たす役割を明らかにすること、LRRK2-Rab10 経路の制御因子の網羅的スクリーニング、LRRK2 によるリソソーム局在制御に関与する遺伝子の網羅的スクリーニングを進めていくことで、TGN からリソソームへとつながる小胞輸送の異常がどのようにして PD 発症をもたらすのかを明らかにする。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Eguchi Tomoya, Kuwahara Tomoki, Sakurai Maria, Komori Tadayuki, Fujimoto Tetta, Ito Genta, Yoshimura Shin-ichiro, Harada Akihiro, Fukuda Mitsunori, Koike Masato, Iwatsubo Takeshi	4. 巻 115
2. 論文標題 LRRK2 and its substrate Rab GTPases are sequentially targeted onto stressed lysosomes and maintain their homeostasis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 E9115 ~ E9124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1812196115	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 Araki Miho, Ito Genta, Tomita Taisuke	4. 巻 2
2. 論文標題 Physiological and pathological functions of LRRK2: implications from substrate proteins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuronal Signaling	6. 最初と最後の頁 NS20180005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/NS20180005	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 Genta Ito, Taisuke Tomita	4. 巻 -
2. 論文標題 Rab10 Phosphorylation Detection by LRRK2 Activity Using SDS-PAGE with a Phosphate-binding Tag	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/56688	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 Ying Fan, Andrew J.M. Howden, Adil R. Sarhan, Pawel Lis, Genta Ito, Terina N. Martinez, Kathrin Brockmann, Thomas Gasser, Dario R. Alessi, Esther M. Sammler	4. 巻 475
2. 論文標題 Interrogating Parkinson's disease LRRK2 kinase pathway activity by assessing Rab10 phosphorylation in human neutrophils	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 23-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20170803	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

〔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 Miho Araki, Sho Takatori, Genta Ito, Taisuke Tomita
2. 発表標題 Physiological role of LRRK2 in lamellar body homeostasis
3. 学会等名 2018年度日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miho Araki, Sho Takatori, Genta Ito, Taisuke Tomita
2. 発表標題 Physiological role of LRRK2 in lamellar body homeostasis
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Genta Ito, Miho Araki, Kyohei Ito, Taisuke Tomita
2. 発表標題 Characterization of Rab phosphorylation by LRRK2 kinases
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Genta Ito
2. 発表標題 Phos-tag SDS-PAGEを用いたRabリン酸化の解析
3. 学会等名 第69回日本電気泳動学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Genta Ito, Kyohei Ito, Miho Araki, Taisuke Tomita
2. 発表標題 Characterization of Rab phosphorylation by LRRK2 kinases
3. 学会等名 World Parkinson Congress 2019 ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Genta Ito
2. 発表標題 Phos-tag analysis of Rab10 phosphorylation by LRRK2
3. 学会等名 第39回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Genta Ito, Miho Araki, Sho Takatori, Taisuke Tomita
2. 発表標題 Physiological role of LRRK2 in lamellar body homeostasis
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 Miho Araki, Sho Takatori, Genta Ito, Taisuke Tomita
2. 発表標題 Proteomic analysis of lamellar bodies in Lrrk2 knockout mice
3. 学会等名 Neuroscience 2019 ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ning Xu, Genta Ito, Airi Tarutani, Taisuke Tomita
2. 発表標題 Systematic analysis on the seeding activity of familial mutant forms of $\alpha$ -synuclein
3. 学会等名 The 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taisuke Tomita, Ning Xu, Airi Tarutani, Genta Ito
2. 発表標題 Systematic analysis on the seeding activity of familial mutant forms of $\alpha$ -synuclein
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 自閉症発症機構に関連する接着分子	発明者 富田泰輔、伊藤弦太、高鳥翔、長友亮太、吉田文明	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、US62/800601	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

東京大学大学院薬学系研究科機能病態学教室 <a href="http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~neurops/tomita/">http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~neurops/tomita/</a>
---

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