

機関番号：32607

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21790848

研究課題名 (和文) 遺伝性パーキンソン病の原因分子 LRRK2 による細胞死機構の解明

研究課題名 (英文) Elucidation of cell death mechanism by mutant LRRK2,  
the causative molecule of familial Parkinson's disease

研究代表者

太田 悦朗 (OHTA ETSURO)

北里大学・医療衛生学部・助教

研究者番号：60508042

研究成果の概要 (和文)：

アミノ酸に変異を持つ LRRK2 は、遺伝性パーキンソン病を引き起こす。本研究において、正常型 LRRK2 がアポトーシス抑制能を有するのに対し、I2020T 変異型ではその機能が低下していることがわかった。また、パルスチェイス実験から、正常型と G2019S 変異型 LRRK2 に比べて I2020T 変異型 LRRK2 は、細胞内半減期が短いことが明らかになった。I2020T 変異型 LRRK2 は、ユビキチンプロテアソーム系とオートファジー系の蛋白質分解阻害剤で細胞内分解を止めることによって、アポトーシス抑制能の回復が認められた。さらに、LRRK2 siRNA 導入による正常型 LRRK2 の蛋白質レベルの低下は、アポトーシス抑制能の低下をもたらした。

研究成果の概要 (英文)：

Mutant LRRK2 is the causal molecule for autosomal dominant familial Parkinson's disease. In the present study, we demonstrated that the protective effect of I2020T LRRK2 against hydrogen peroxide-induced apoptosis was impaired in comparison with the wild-type (WT) molecule. Also, Pulse-chase experiments proved that the I2020T LRRK2 molecule has a higher degradation rate than WT or G2019S LRRK2. Upon addition of proteasome and lysosome inhibitors, the protein level of I2020T mutant LRRK2 reached that of WT LRRK2, and simultaneously the mutant LRRK2 exhibited an elevated protective effect against apoptosis. We further confirmed that a decrease in the intracellular protein level of WT LRRK2 by knocking down resulted in a reduction of protectivity against apoptosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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：パーキンソン病、LRRK2、細胞内分解、蛋白質安定性、アポトーシス抑制能

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) は、日本の高齢化社会への移行に伴ってさらなる患者数増加が予想される神経変性疾患である。PD の本態は中脳黒質のドーパミンニューロン変性によ

って運動障害や自律神経障害などが引き起こされるが、その発症機構は未だ解明されていない。患者の 10%は遺伝的要因が関係しており、近年同定された遺伝性 PD 原因分子の機能解析から発症機序の一因が明らかにな

りつつある。

### Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2)

は北里大学免疫学研究室が世界で最初に報告した常染色体優性遺伝 PD の原因遺伝子領域 (第 12 番染色体上の *PARK8*) に存在する新規の遺伝性 PD 原因遺伝子である。当研究室では、*PARK8* の original family である相模原家系の発症原因が LRRK2 の I<sup>2020</sup>T 変異であることを明らかにした。

LRRK2 は分子量約 280kDa の巨大な新規蛋白質であり、LRR (leucine-rich repeat)、ROC (Ras of complex)、COR (C-terminal of ROC)、Kinase、WD40 ドメインを持つことから多様な機能が予想される。最近の研究から、LRRK2 は神経伸長やシナプス小胞の極性選択への関与、また、myelin basic protein を用いた実験からキナーゼ活性の確認および一部の変異体でのリン酸化機能の亢進が報告されている。一方、変異 LRRK2 による発症機序を考える上で、LRRK2 蛋白質の安定性に関する情報は極めて重要であるが、その報告はまだ無い。

## 2. 研究の目的

我々は相模原家系 PD 患者における発症メカニズムを明らかにするための研究を進めており、現在までに作製した相模原家系の正常型および I<sup>2020</sup>T 変異型の全長 LRRK2 発現プラスミドをヒト培養細胞に導入した研究によって、I<sup>2020</sup>T 変異型 LRRK2 の細胞内存在量が正常型 LRRK2 よりも低いことを確認している。さらに、トランスフェクションを時間依存的に調べた結果、変異型 LRRK2 分子が細胞内において分解されやすいことを明らかにした。そこで本研究では、これらの知見を踏まえて、I<sup>2020</sup>T 変異型 LRRK2 の細胞内分解と細胞死との関連を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) I<sup>2020</sup>T 変異型 LRRK2 分子の細胞内分解機構に関する解析

ヒト腎臓細胞株 HEK293、ヒト神経芽細胞株 SH-SY5Y に相模原家系由来の正常型と I<sup>2020</sup>T 変異型の LRRK2 発現プラスミド (V5 タグ付き) を導入して一過性に共発現させた。遺伝子導入後、ユビキチンプロテアソーム系蛋白質分解阻害剤 (MG132、lactacystin) またはオートファジー系蛋白質分解阻害剤 (chloroquine、ammonium chloride) を添加して培養した。得られた各細胞抽出液を電気泳動およびウェスタンブロッティングした後、抗 V5 抗体を用いて LRRK2 分子を検出した。

### (2) LRRK2 分子の細胞内半減期に関する解析

正常型、I<sup>2020</sup>T 変異型、G<sup>2019</sup>S 変異型 LRRK2 発現プラスミド (FLAG タグ付き) を一過性に

発現させた HEK293 に放射性同位元素 [<sup>35</sup>S]-Met, -Cys を取り込ませたパルスチェイス実験を行い、正常型、変異型における細胞内半減期の差異を調べた。

### (3) LRRK2 分子のアポトーシス誘導実験

正常型、I<sup>2020</sup>T 変異型 LRRK2 発現プラスミドを一過性に発現させた HEK293、SH-SY5Y に過酸化水素を添加してアポトーシス誘導させた後、アネキシン V を用いてアポトーシス陽性細胞数を測定した。同様に、Cell Counting Kit-8 を用いて、細胞生存率を調べた。また、各細胞抽出液についてアポトーシス関連分子である活性化 caspase-9 を検出した。さらに、LRRK2 siRNA 導入による LRRK2 ノックダウン条件下におけるアポトーシス誘導を行い、細胞生存率を調べた。

### (4) 正常型および I<sup>2020</sup>T 変異型 LRRK2 安定発現 SH-SY5Y 細胞株の樹立

SH-SY5Y に正常型、変異型 LRRK2 発現プラスミド、pCI-neo 発現プラスミドを同時に遺伝子導入して一過性に共発現させ、G-418 を用いたネオマイシン選択によって生存する細胞をクローニングした。樹立した細胞株について、同様に、蛋白質分解阻害剤添加とアポトーシス誘導実験を行った。

## 4. 研究成果

### (1) I<sup>2020</sup>T 変異型 LRRK2 分子の細胞内分解機構

V5 タグ融合 LRRK2 を一過性に発現させた HEK293 に各蛋白質分解阻害剤を添加した実験から、I<sup>2020</sup>T 変異型 LRRK2 は、ユビキチンプロテアソーム系、オートファジー系の両方の蛋白質分解経路によって分解されていることがわかった (図 1)。

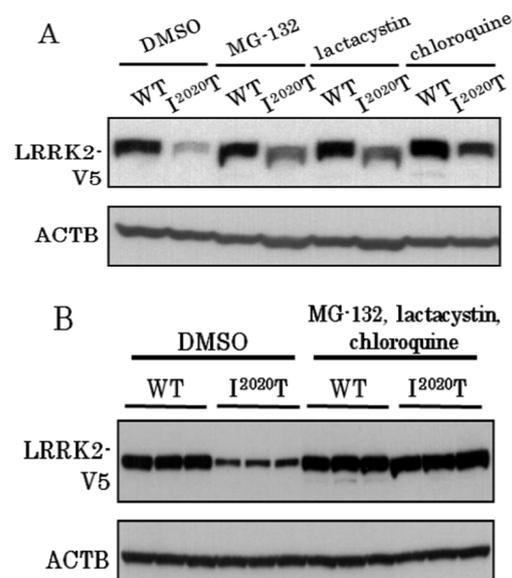


図 1. 蛋白質分解阻害剤添加実験

(2) LRRK2 分子の細胞内半減期

パルスチェイス実験後、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降および SDS-PAGE を行い、LRRK2 の細胞内半減期を調べた。その結果、正常型と G<sup>2019</sup>S 変異型 LRRK2 に比べて I<sup>2020</sup>T 変異型 LRRK2 は、早い段階で分解されやすく、細胞内半減期が短いことが明らかになった (図 2)。

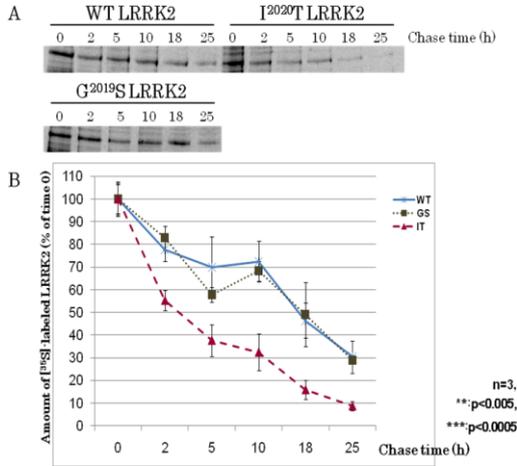


図 2. パルスチェイス実験

(3) LRRK2 分子のアポトーシス誘導実験

アネキシン V を用いたアポトーシス陽性細胞数と細胞生存率の測定から、正常型 LRRK2 がアポトーシス抑制能を有するのに対し、I<sup>2020</sup>T 変異型ではその機能が低下していることがわかった (図 3)。

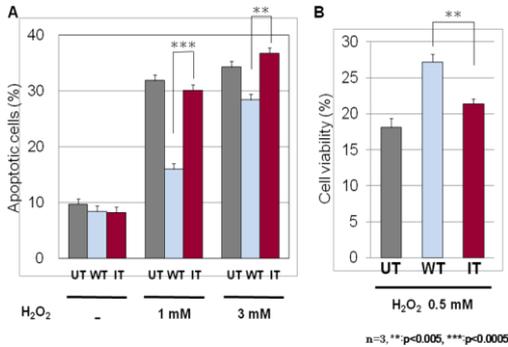


図 3. アポトーシス誘導実験

さらに、I<sup>2020</sup>T 変異型 LRRK2 は、蛋白質分解阻害剤で細胞内分解を止めることによって、アポトーシス抑制能の回復が認められた (図 4)。活性化 caspase-9 においても同様の結果が確認された。

また、LRRK2 siRNA 導入による LRRK2 ノックダウン条件下におけるアポトーシス誘導実験から、正常型 LRRK2 の量的不足が、細胞生存率の低下すなわち細胞死を引き起こすことがわかった (図 5)。

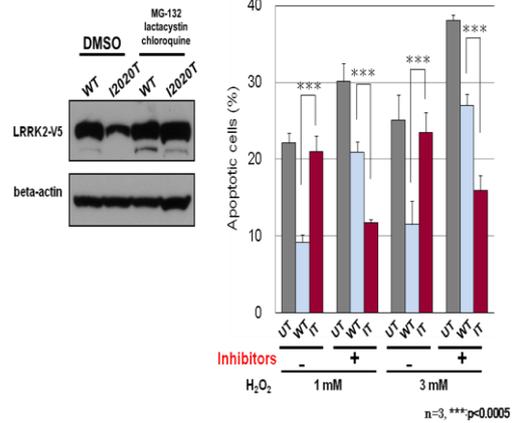


図 4. 蛋白質分解阻害剤添加時におけるアポトーシス誘導実験

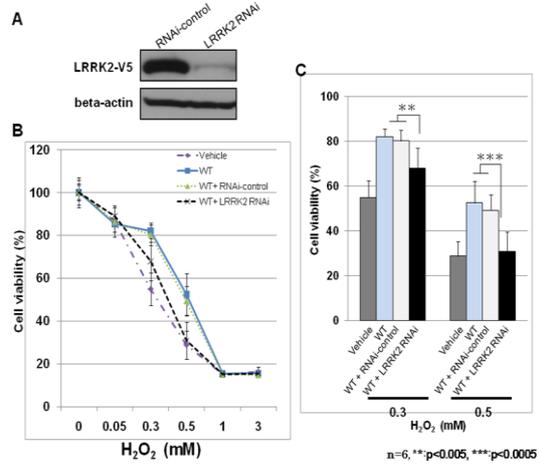


図 5. LRRK2 ノックダウン条件下におけるアポトーシス誘導実験

(4) 正常型および I<sup>2020</sup>T 変異型 LRRK2 安定発現 SH-SY5Y 細胞株の樹立

数クローンの正常型、I<sup>2020</sup>T 変異型 LRRK2 安定発現 SH-SY5Y 細胞株を樹立した。樹立した正常型 LRRK2 安定発現株は、SH-SY5Y に比べて、アポトーシス抑制能を有していた。樹立した I<sup>2020</sup>T 変異型 LRRK2 安定発現株は、アポトーシス抑制能が低下しており、蛋白質分解阻害剤で細胞内分解を止めることによって、アポトーシス抑制能の回復がみられた。これらの結果は、上述した研究成果を裏付けるものであり、この細胞株が、機能解析ツールとして有用であると示唆された。機能解析ツールとして有用であると考えられた。

本研究において、I<sup>2020</sup>T 変異型 LRRK2 の細胞内半減期、細胞内分解およびその分解経路を明らかにすることができた。さらに、アポトーシス誘導実験と LRRK2 siRNA による実験か

ら、細胞内分解と細胞死との関連性を明らかにすることができた。

LRRK2 が関与するパーキンソン病発症メカニズムの概念は、優性遺伝であることと、一部の変異体のキナーゼ活性亢進の報告から gain of toxic function が主流である。しかし、I<sup>2020T</sup> 変異型を含むその他の変異体 LRRK2 ではキナーゼ活性が変化しないことも報告されている。今後、樹立した LRRK2 安定発現 SH-SY5Y 細胞株を用いて、I<sup>2020T</sup> 変異型 LRRK2 分子が、dominant negative effect もしくは haploinsufficiency という神経細胞死を引き起こすかどうかを機能解析によるアプローチから検討していきたい。

#### 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 2 件)

- ① Ohta E, Kubo M, Obata F. Prevention of intracellular degradation of I2020T mutant LRRK2 restores its protectivity against apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 391 (1), 242–247. 査読有り
- ② Ohta E, Katayama Y, Kawakami F, Yamamoto M, Tajima K, Maekawa T, Iida N, Hattori S, Obata F. I<sup>2020T</sup> leucine-rich repeat kinase 2, the causative mutant molecule of familial Parkinson's disease, has a higher intracellular degradation rate than the wild-type molecule. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 390 (3), 710–715. 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

- ① 太田悦朗、川上文貴、飯田直幸、山元茉莉、前川達則、服部成介、小幡文弥. LRRK2 の細胞内半減期がアポトーシス抑制能に及ぼす影響—ノックダウンによる解析—第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010 年 12 月 8 日 神戸国際展示場(兵庫県)
- ② 太田悦朗、川上文貴、飯田直幸、山元茉莉、前川達則、服部成介、小幡文弥. LRRK2 の細胞内半減期および LRRK2 ノックダウンにおける細胞生存率の解析 第 51 回日本神経学会総会 2010 年 5 月 20 日 東京国際フォーラム(東京都)
- ③ Ohta E, Katayama Y, Tajima K, Maekawa T, Yamamoto M, Obata F. Mutant (I<sup>2020T</sup>) LRRK2 has a higher susceptibility to

ploteolysis and impaired protectivity against apoptosis. XVIII WFN World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders 2009 年 12 月 16 日 Miami Beach convention center (Florida, USA)

- ④ 太田悦朗、山元茉莉、前川達則、小幡文弥. LRRK2 安定発現 SH-SY5Y 細胞株の樹立およびアポトーシス抑制能の解析 第 50 回日本神経学会総会 2009 年 5 月 20 日 仙台国際センター (宮城県)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

太田 悦朗 (OHTA ETSURO)  
北里大学・医療衛生学部・助教  
研究者番号：60508042