

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月9日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790058

研究課題名（和文） 家族性パーキンソン病病因遺伝子産物LRRK2の生理・病理学的基質の探索

研究課題名（英文） Characterization of pathophysiological substrates of LRRK2, a causative gene product for familial Parkinson's disease

研究代表者

伊藤 弦太 (ITO GENTA)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10431892

研究成果の概要（和文）：LRRK2によりリン酸化されるタンパク質はこれまでにいくつか報告されているが、いずれも細胞内でのリン酸化は確認されていなかった。本研究において、LRRK2の基質配列特異性をもとにデータベース検索を行い、LRRK2の基質候補タンパク質を複数選出した。そのうち、Synaptotagmin-1などについて、LRRK2により *in vitro* においてリン酸化を受けることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Several proteins have been reported to be phosphorylated by LRRK2 *in vitro*. However, they are not phosphorylated by LRRK2 in cells. In this study, we searched the database using the consensus phosphorylation sequence of LRRK2 as a query and selected a number of proteins as candidates. We examined whether they are phosphorylated by LRRK2 and found that several proteins including Synaptotagmin-1 were phosphorylated by LRRK2 *in vitro*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：病態生化学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：パーキンソン病、LRRK2、キナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (Parkinson's disease; PD) は、主に高齢期に発症し、筋固縮や姿勢反射障害などの運動症状を呈する進行性の神経変性疾患である。運動症状の原因は、中脳黒質に存在し、随意運動の調節に関与するドーパミン神経細胞などが選択的に脱落す

ることによると考えられている。しかしながら、この選択的な神経変性の原因はほとんど明らかになっていない。PDのほとんどは孤発性だが、まれに遺伝性に発症する家族性PD (FPD) が知られており、複数の責任遺伝子が報告されている。これらの遺伝子の変異により発症する FPD のうち、LRRK2 (Leucine-rich repeat kinase 2) 変異によ

る PARK8 は、臨床症状や病理像が孤発性 PD に類似していることから、PARK8 の発症機序を明らかにすることで、孤発性 PD の分子病態の一端をも明らかにすることができると期待されている。

LRRK2 は 2,527 アミノ酸からなり、1 分子中に GTP 結合活性を有する ROC ドメインとキナーゼドメインを併せ持つユニークなドメイン構造を有するタンパク質である。FPD 変異のうち最も頻度が高く、キナーゼドメイン中に存在する G2019S 変異体は、*in vitro* におけるキナーゼ活性が野生型に比して上昇していることが明らかになっていた。また、FPD 変異型 LRRK2 を培養神経細胞に過剰発現させると、アポトーシスや神経突起の退縮が生じることが報告されている。これらの結果から、キナーゼ活性の異常な上昇が神経変性の原因である可能性が示唆されていた。

LRRK2 によりリン酸化されるタンパク質としては、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP)、Ezrin/Radixin/Moesin ファミリータンパク質などが知られている。それらは *in vitro* においては LRRK2 によりリン酸化されるが、細胞内においては LRRK2 によるリン酸化は確認されていなかった。キナーゼ活性の異常な上昇が神経変性を招くとすれば、それにより過剰リン酸化を受けると想定される基質の同定は、神経変性の分子機構を理解するうえで必須であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、LRRK2 の生理的基質を同定し、その LRRK2 によるリン酸化と PD における神経細胞変性の関連を明らかにし、創薬標的を同定することである。また、LRRK2 の基質配列を FRET プローブに応用し、細胞内において LRRK2 のキナーゼ活性を可視化することを試みる。これにより、これまで明かできなかった、LRRK2 が活性化される細胞内コンパートメントや、LRRK2 の活性化を惹起する刺激の探索が可能になると考えられる。

## 3. 研究の方法

基質の同定には、固相リン酸化スクリーニング法を用いた。この方法では、cDNA ライブラリーを組み込んだファージを用い、cDNA ライブラリーを GST 融合タンパク質として大腸菌に発現させた。大腸菌のプラークをニトロセルロース膜に転写したものと精製 LRRK2 を、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  存在下で混和し、インキュベーションした。

スクリーニングと並行して、基質配列特異性からの candidate approach も試みた。

LRRK2 は、リン酸化部位である Thr から 2 残基 C 末端側にアルギニンが存在する配列を効率よくリン酸化することが知られている。この基質配列特異性の情報を利用し、Swiss-Prot データベースの検索を行なった。

同定された基質候補タンパク質について、リン酸化部位周辺のアミノ酸配列を GST 融合ポリペプチドとして大腸菌に発現し、精製した。これらと LRRK2 を *in vitro* で混和し、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  存在下でリン酸化されるか検討した。さらに、リン酸化部位が存在するドメインや全長タンパク質を用いて同様の検討を行った。また、リン酸化部位と予想される Thr を Ala に置換し、LRRK2 によるリン酸化が消失するか検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 固相リン酸化スクリーニング

ERM ファミリーに属するタンパク質であり、LRRK2 によりリン酸化されることが知られている Moesin の部分配列 (LRRKtide) を GST 下流に組み込んだ  $\lambda$  ファージを作製した ( $\lambda$ GEX5-LRRKtide)。インサートのないファージで適切に希釈して大腸菌に感染させ、プラークをうつしとったメンブレンを  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  存在下でリコンビナント LRRK2 とインキュベートした。その結果、メンブレン上で LRRK2 によりリン酸化されるプラークが確認できた。しかしながら、GST-LRRKtide を発現するプラークの全てがリン酸化されたわけではなく、その効率は著しく低かった。また、用いたリコンビナント LRRK2 がメンブレンに吸着される性質を有しており、バックグラウンドが非常に高かった。ブロッキングなどアッセイ条件の変更では改善されなかった。このため、cDNA ライブラリーを用いたスクリーニングは困難だった。

### (2) データベース検索による candidate approach

そこで、既知の LRRK2 基質のリン酸化部位や、degenerate peptide library を用いた解析から明らかになった LRRK2 の基質配列特異性の情報に着目した。LRRK2 は、 $[\text{WRFK}] - \text{X} - [\text{RKW}] - [\text{DE 以外}] - [\text{DE 以外}] - \text{pT} - [\text{DE 以外}] - [\text{RK}] - [\text{RK}]$  という配列中に存在する Thr を効率よくリン酸化することから、この配列を有するタンパク質を、Swiss-prot データベースから検索した。その結果、127 種類のタンパク質が基質候補タンパク質として選出された。

それらのうち、Atg4B, BAG1, Dock180, ErbB2, Pyk2, RIM1, Synaptotagmin-1, Synaptotagmin-7 について、詳細な検討を行った。GST 融合ポリペプチドを用いた *in vitro* アッセイでは、Synaptotagmin-7, RIM1

がLRRK2によりリン酸化されないことが明らかになった。この結果から、コンセンサス配列を有していても、必ずしもリン酸化されるわけではないことが明らかになった。さらに、全長タンパク質のN末端にFLAG タグを付加したものを3xFLAG-LRRK2とともにHEK293細胞に過剰発現させ、免疫沈降後のビーズ上でリン酸化反応を行ったところ、Atg4B, Dock180, Synaptotagmin-1, ErbB2は全長タンパク質でもLRRK2によってリン酸化された。また、ErbB2はLRRK2と共沈降することも明らかになった。

### (3) 得られた成果の位置づけとインパクト

これまでに知られていたLRRK2基質は、*in vitro*におけるスクリーニングから同定されたものであり、細胞内でのリン酸化が確認されたものはなかった。それゆえ、さらなる基質の探索が急務となっているが、キナーゼ基質探索に確立された方法論はなく、新規基質の同定は難航していた。本研究では、固相リン酸化スクリーニングと、データベース検索から候補タンパク質の選出という異なる視点から基質探索を行い、新規基質の同定に成功した点でインパクトが大きい。

### (4) 今後の展望

本研究で同定された基質タンパク質が、細胞内でLRRK2によりリン酸化されるか否かが最重要課題である。ErbB2のように、LRRK2と相互作用するタンパク質については、細胞内においてもLRRK2によりリン酸化される可能性が高い。

固相リン酸化スクリーニングについては、一般的なキナーゼのように活性の高いリコンビナントタンパク質を大量精製することが困難であった。今後、スクリーニングに耐えるリコンビナントLRRK2の精製方法が確立されれば、再度試行すべき実験系であると考えられる。

以上のように、本研究により、LRRK2の新規基質を複数同定することに成功した。今後、リン酸化が細胞内で生じているかなど検討を続けるとともに、リン酸化の意義や神経変性への関与などを解析する。

## 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2件)

- ① Ito G, Iwatsubo T., Re-examination of the dimerization state of leucine-rich

repeat kinase 2: predominance of the monomeric form. *Biochemical Journal*, 査読有, 2012年, 441巻, 987-994ページ, DOI: 10.1042/BJ20111215

- ② Kuwahara T, Tonegawa R, Ito G, Mitani S, Iwatsubo T. Phosphorylation of alpha-synuclein at Ser129 reduces neuronal dysfunction by lowering its membrane-binding property in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry*, 査読有, 2012年, 287巻, 7098-7109ページ, DOI: 10.1074/jbc.M111.237131

[学会発表] (計5件)

- ① 伊藤 弦太, 上川路 翔悟, 岩坪 威, Identification and functional characterization of novel autophosphorylation sites of LRRK2., 米国神経科学会, 平成23年11月13日, ワシントンDC, アメリカ合衆国
- ② 上川路 翔悟, 伊藤 弦太, 岩坪 威, Identification of *in vivo* autophosphorylation sites of LRRK2., 米国神経科学会, 平成23年11月13日, ワシントンDC, アメリカ合衆国
- ③ 伊藤 弦太, 岩坪 威, Biochemical characterization of the dimerization of LRRK2., 米国神経科学会, 平成22年11月16日, サンディエゴ, アメリカ合衆国
- ④ 功刀 隼人, 伊藤 弦太, 岩坪 威, Rotenone treatment enhances apoptosis caused by G2019S familial Parkinson mutant LRRK2., 米国神経科学会, 平成22年11月14日, サンディエゴ, アメリカ合衆国
- ⑤ 新留 一樹, 伊藤 弦太, 岩坪 威, 家族性パーキンソン病責任遺伝子産物LRRK2の新規基質探索, 日本認知症学会第29回学術集会, 平成22年11月5日, 愛知県産業労働センター, 愛知県

[その他]

ホームページ等

<http://web.f.u-tokyo.ac.jp/~neurops/en/tranceja2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 弦太 (ITO GENTA)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10431892

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし