

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09679

研究課題名(和文)パーキンソン病原因遺伝子変異によるシナプス小胞動態異常と治療標的遺伝子探索

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism of synaptic vesicle dynamics which regulated by Parkinson's disease causative genes and identification of therapeutic target of Parkinson's disease related genes.

研究代表者

井下 強 (Inoshita, Tsuyoshi)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20601206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：神経変性疾患パーキンソン病(PD)の発症機序解明と新規治療標的探索のため、8個のPD関連遺伝子間の遺伝的相関を解析した。その結果、PD原因遺伝子LRRK2が中心的な役割を持つことを明らかにした。また、LRRK2の機能欠失や病変性変異体の発現により軸索輸送異常に関連したシナプスにおけるArl8の蓄積が起きることを明らかにした。さらに、Arl8蓄積シナプスにおけるシヌクレインの蓄積やPD患者剖検脳におけるArl8とシヌクレインの共局在観察から、LRRK2によるArl8の軸索輸送制御機構の異常がPD発症に関わ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

神経変性疾患の一つパーキンソン病は、加齢が発症リスクであるが、根本的な治療法は確立されておらず、超高齢化が進む本邦では新規治療法の開発が強く求められている。既に20個以上の原因遺伝子やリスク遺伝子が同定されているが、最適な治療標的特定のためには、より中心的な遺伝子の特定が必要である。本研究は、PD原因遺伝子LRRK2と他の4個のPD関連遺伝子との遺伝的相関を明らかにすることで、LRRK2が制御する分子機構が広範なPD患者への治療標的となることを明らかにした。さらに、LRRK2によるArl8やシヌクレインの軸索輸送制御機構を明らかにし、軸索輸送の正常化がPD治療に貢献する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：To understand the pathogenic mechanism of Parkinson's disease (PD), a neurodegenerative disease, and search for new therapeutic targets, we analyzed the genetic correlation between eight PD-related genes. Our results revealed that the PD causative gene LRRK2 has a central role. We also demonstrated that loss of LRRK2 function and expression of pathogenic mutants cause Arl8 accumulation in synapses associated with axonal transport abnormalities. In addition, accumulation of α -synuclein in Arl8-accumulating synapses and co-localization of Arl8 and α -synuclein in autopsy brain of PD patients were revealed. These findings suggested that LRRK2 regulates axonal transport of Arl8 and α -synuclein and disorder of their axon transport might be involved in PD onset.

研究分野：神経科学

キーワード：パーキンソン病 神経変性 小胞動態 ショウジョウバエ 軸索輸送 シヌクレイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢依存的神経変性疾患であるパーキンソン病(以下PD)は、治療法が確立されていない神経難病の一つである。超高齢化が進む本邦において、患者数は増大しており、より効果的な治療法や早期発見法の樹立が求められている。しかし、90%以上の患者は、孤発性であり発症機序解明が困難である。10%ほどの患者からは、20個以上のPDの原因となる遺伝子が同定されており、それらの機能解析から、PD発症機序解明と治療法開発が進められている。PDの病理的特徴は、中脳黒質ドーパミン神経(以下DA神経)の変性・脱落である。PD原因遺伝子には、小胞輸送に関わる遺伝子が複数含まれることから、神経特異的な小胞輸送動態制御の異常とPD発症の関連が推察される。申請者らは、ショウジョウバエモデルの利用により、PD原因遺伝子であるVps35とLRRK2の遺伝的相関の解明を進めていたが(引用文献)、これら分子による神経特異的な小胞輸送動態制御機構には未解明な部分が多く、詳細な解析が求められていた。また、他の小胞動態に関わるPD原因遺伝子や関連遺伝子との遺伝的相関も推測されるが、PD関連遺伝子間の相関は未解明であった。PD関連遺伝子間の相関解明は、神経特異的な小胞動態制御機構において中心的な機能を持つPD遺伝子の特定につながり、汎用性が高く、効率的な治療標的を見つけることになる。そこで、本研究では、PD関連遺伝子間の遺伝的相関の解明を試みた。

2. 研究の目的

本研究は、小胞輸送に関わる8個のPD関連遺伝子LRRK2, Vps35, Auxilin, Synaptojanin, Vps13, Rab32, Rme-8, INPP5Fの遺伝的相関を明らかにし、中心的な役割を持つ遺伝子を特定し、その小胞動態制御機構を解明することを目的とした。

1) 上記の8個の遺伝子の変異は、PDの発症原因やリスクとなる。個々の遺伝子の機能解析から、エンドサイトーシスやシナプス小胞リサイクリングなどに関わることで報告されており、一連の分子経路で機能している可能性が推察され、既にLRRK2とVps35の遺伝的相関が報告されている。そこで、これら8個のPD関連遺伝子の遺伝的相関を調べ、遺伝子間ネットワークを明らかにする。

2) 汎用性の高い治療法開発のための治療標的を特定するために、遺伝子間ネットワークにおいて中心的役割を持つ遺伝子を特定する。さらに、中心的遺伝子の機能解析と小胞輸送に関わる関連遺伝子を探索することで新たな治療法開発の手がかりを見つける。

3. 研究の方法

1) LRRK2, Vps35, Auxilin, Synaptojanin, Vps13, Rab32, Rme-8, INPP5Fの8個の遺伝子の機能欠失変異を組み合わせた八工を作製し、免疫染色による、オルガネラやシナプス関連分子の局在異常、電子顕微鏡を用いたシナプス形態異常の探索を行い、単独の機能欠失と比較して増悪・改善する組み合わせを特定した。シナプス内のオルガネラや分子の局在が容易で、超微細構造観察も可能な幼虫神経筋接合部(NMJ)を用いて解析を行った。

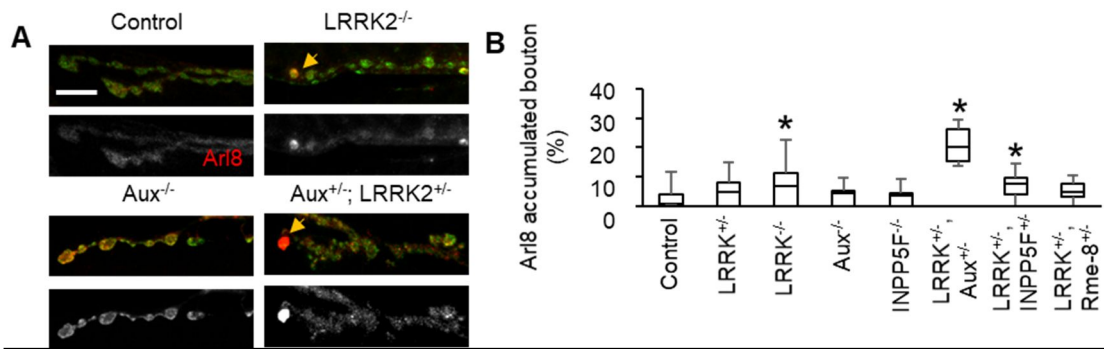
2) 1)で特定した組み合わせで生じた表現型をもとに、シナプスでのPD関連分子の局在観察やシナプス小胞動態関連分子との共局在を観察した。Vps35, LRRK2は、既に抗体があったが、他のPD分子については、蛍光タンパク質(GFP, RFP)を結合させたトランスジェニック八工の使用や新たな抗体作製を行った。関連分子としては、シナプス小胞動態制御に関わるRab3, Rab5, Rab7の局在を観察した。

3) 1), 2)から中心的な役割を持つ遺伝子を特定し、その表現型異常を解析した。さらに、関連遺伝子の過剰発現や発現抑制による表現型異常改善効果を解析した。

4. 研究成果

1) LRRK2, Vps35, Auxilin, Synaptojanin, Vps13, Rab32, Rme-8, INPP5Fの機能欠失変異を組み合わせた八工のNMJにおいて、ゴルジ体、小胞体、リソソーム、初期エンドソーム、後期エンドソームのマーカー分子の抗体を用いた免疫染色により局在変化を示す組み合わせを探索した。その結果、LRRK2-Auxilin, LRRK2-INPP5Fの機能欠失の組み合わせにより、リソソームのマーカー分子であるArl8のシナプス終末における蓄積が観察された。LRRK2単独の機能欠失によってもArl8の蓄積は生じていたが、Auxilin, INPP5Fの機能欠失との組み合わせにより、Arl8蓄積頻度が有意に上昇した(図1)。Auxilin, INPP5F単独の機能欠失では、こうしたArl8の蓄積は増加していないことから、Arl8の動態制御においてはLRRK2がより重要な役割を持つことが示唆された。

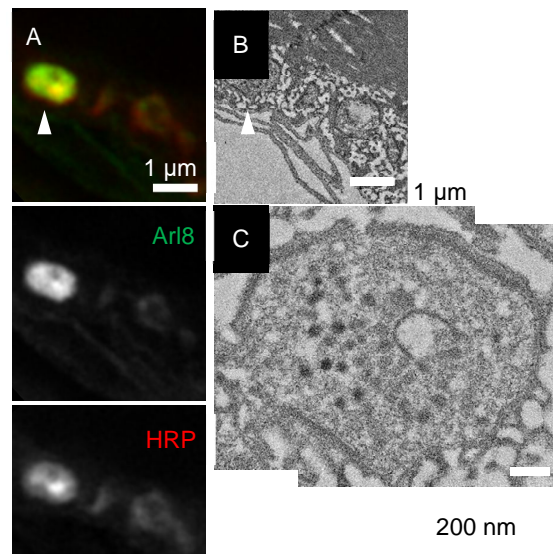
次に、LRRK2欠失体のシナプスにおけるArl8蓄積部位におけるPD遺伝子や関連分子の局在を観察した。Arl8蓄積シナプスでは、遺伝的相関のあるAuxilinは共局在していたが、Arl8の蓄積していないシナプスとの量的差は見られなかった。一方、INPP5Fは、Arl8の蓄積がないシナプスにおいても局在が観察されたが、Arl8蓄積シナプスではシグナル強度が高くなっており、量的にも相関が示された。また、興味深いことにRme-8とLRRK2の機能欠失体の組み合わせでは、Arl8の蓄積は亢進して無かったが、Arl8蓄積シナプスではRme-8のシグナル上昇が観察されたことから、LRRK2と協働している可能性が示唆された。他のシナプス関連分子との共局在においては、後期エンドソームに局在するRab7やリソソームに局在するLAMP1は、Arl8蓄積部位に部分的に共局在していたが、Arl8蓄積が生じていないシナプスと量的な差が無いことから、遺伝的相関は低いと考えられる。



1. 幼虫運動神経シナプスにおける Arl8 蓄積

LRRK2 欠失体(LRRK2^{-/-})のシナプスにおいて Arl8 の蓄積(A:矢印)が観察される。Auxilin 欠失体(Aux^{-/-})では、Arl8 の蓄積は観察されないが、Aux^{+/-}と LRRK^{+/-}の組み合わせでは、LRRK2 欠失体より Arl8 蓄積割合が大きい。Bar = 10μm, *: p < 0.05, Dunnett's test vs. control.

2) 次に、超微細構造の観察により、LRRK2 機能欠失が示す表現型を観察した。LRRK2 の機能欠失体のシナプス中では、電子密度の高い小胞が有意に増加していた。こうした電子密度の高い小胞は、ドーパミンなどの神経伝達物質が充填された有芯小胞と呼ばれる小胞と考えられる。また、一部のシナプスにおいては、後期エンドソームに分類される multi-vesicular body の増加も観察された。通常の超微細構造の観察では、観察部位の分子の局在は判別できないため、Arl8 蓄積部位に有芯小胞又は multi-vesicular body のどちらが存在するか判別できない。そこで、蛍光免疫染色像と超微細構造を合わせて観察可能な CLEM(Correlative light and electron microscopy)法により、Arl8 蓄積部位の超微細構造を観察した(図 2)。その結果、Arl8 蓄積部位における電子密度の高い小胞の集積が確認できた。



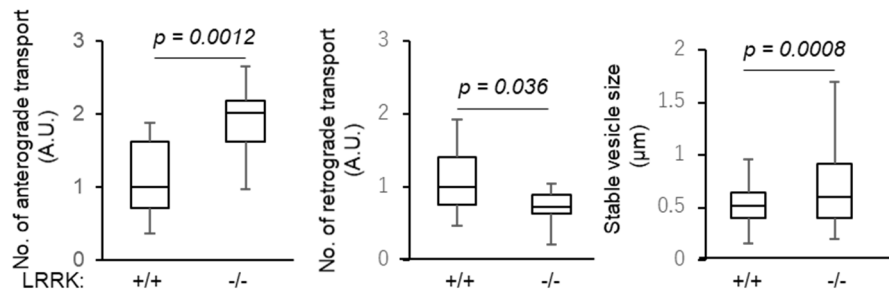
2. CLEM 法による Arl8 蓄積ボタンの超微細構造

LRRK2 欠失体の Arl8 蓄積シナプス(A, B:矢頭)の超微細構造観察像。電子密度の高い有芯小胞様の小胞が集積している。

3) LRRK2 の機能欠失によるシナプスでの Arl8 の蓄積が示されたが、PD の原因となる LRRK2 の変異では、LRRK2 のリン酸化酵素活性が上昇していると考えられている。そのため、LRRK2 の機能欠失とは逆の表現型を生じる可能性が考えられた。そこで、LRRK2 の病原性変異体の発現により Arl8 の局在異常が生じるかを検証した。異なる領域に変異が入った 2 つの病原性変異 Y1383C 変異と I1915T 変異体を運動神経で発現させ、NMJ のシナプスにおける Arl8 の蓄積頻度を計測したところ、どちらも有意な Arl8 蓄積増加が生じていた。一方、リン酸化酵素活性が無い 3KD 変異体を発現させても Arl8 の蓄積は亢進していなかった。興味深いことに野生型の LRRK2 の過剰発現では、リン酸化活性の上昇が予測されるが、Arl8 の蓄積は亢進しておらず、単純に LRRK2 のリン酸化酵素活性と Arl8 の蓄積には相関が無かった。LRRK2 の機能欠失とリン酸化酵素活性が上昇している病原性変異体の発現、どちらも Arl8 の蓄積が亢進していたことや野生型 LRRK2 の過剰発現では Arl8 蓄積が亢進しないことから、Arl8 の蓄積には、LRRK2 による基質のリン酸化状態の切り替えが重要であると考えられる。

4) LRRK2 の機能欠失や病原性変異体の発現が Arl8 のシナプスでの蓄積を生じる機構の一つに軸索輸送異常が想定される。そこで、LRRK2 の機能欠失による Arl8 の軸索輸送を解析した。幼虫運動神経に GFP ラベルした Arl8 を発現させ、順行性・逆行性の軸索輸送と輸送されない Arl8 のシグナルに対する LRRK2 の機能欠失の影響を解析した。LRRK2 の機能欠失体では、順行性・逆行性軸索輸送の速度が同程度上昇していたが、輸送されるシグナルの数は、順行性輸送で増加

し、逆行性輸送では減少していた(図3)。これは、シナプス終末にArl8 局在小胞が運ばれる頻度が増え、シナプス終末から細胞体へ戻るArl8 局在小胞が減少することを示唆する。こうした軸索輸送異常により、シナプスにおけるArl8 局在小胞の蓄積が起きると考えられた。さら



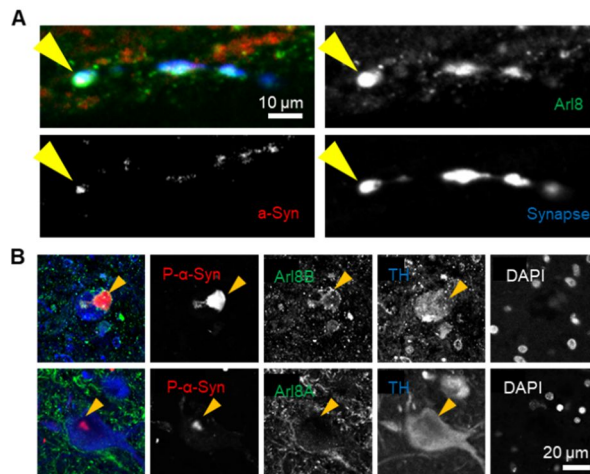
3. LRRK2 による Arl8 局在小胞の軸索輸送制御

LRRK2 欠失体の順行性(左)、逆行性(中央)軸索輸送小胞数と動かない小胞数(右)。LRRK2 欠失により順行性輸送の亢進、逆行性輸送の低下と軸索内での渋滞が起きる。

に、LRRK2 の機能欠失体では、軸索中に動かないArl8 の集積が生じており、Arl8 の軸索輸送が阻害されていると考えられる。軸索輸送は、キネシンやダイニンといったモータータンパク質により制御されている。LRRK2 機能欠失により軸索輸送に異常が生じることから、LRRK2 が、モータータンパク質の機能を制御している可能性が推測される。そこで、キネシンやダイニンの欠失体におけるArl8 のシナプスでの蓄積を観察したところ、キネシンの欠失体ではArl8 の蓄積が阻害されていた。一方、ダイニンの欠失体では、Arl8 の蓄積には影響が無く、LRRK2 の機能欠失と組み合わせても、Arl8 の蓄積にはダイニンの欠失の影響は見られなかった。また、Arl8 とキネシンの局在を観察すると、Arl8 蓄積シナプスにおけるキネシンの蓄積が生じており、LRRK2 機能欠失により生じるArl8 蓄積とキネシン動態の関連が示唆された。モータータンパク質の機能制御は、シナプスの形成や恒常性維持に重要であることから、神経機能制御や神経細胞の生存に重要である。そこで、さらなる解析により、LRRK2 によるキネシンの動態・活性制御機構の解析が必要と考えられる。

5) 線虫を用いた先行研究は、LRRK2 の機能欠失が、シナプス小胞動態制御に関わる small GTPase, Rab3 の軸索輸送や軸索での局在異常を生じることを示している。Rab3 はLRRK2 によりリン酸化を受けることから、LRRK2 によるRab3 の機能・局在制御が推測される。LRRK2 にリン酸化を受けるRab small GTPase は、他にRab8, Rab10, Rab35 があり、LRRK2 の活性制御にはRab7L1 (ハエのRab32)が関わるということが報告されている。そこで、Arl8 蓄積シナプスにおけるこれら Rab タンパク質の局在を観察した。LRRK2 機能欠失体におけるRab タンパク質の局在観察の結果、Rab3 がArl8 蓄積シナプスで蓄積しており、Arl8 とRab3 の動態が共にLRRK2 により制御されることが示唆された。しかし、他のRab タンパク質の局在は、Arl8 の蓄積と相関が無く、Arl8 蓄積においてはRab3 が関わる機構との相関が示唆された。

Rab3 は、シナプスにおいてシナプス小胞の放出に関わる。シナプス小胞の放出には、PD の発症と密接にかかわるシヌクレインも関わるということが報告されている。そこで、Arl8 蓄積シナプスにおけるシヌクレインの局在を観察した。ショウジョウバエは、内在のシヌクレインを持たないため、蛍光タンパク質でラベルしたシヌクレインの取り込み実験を行った。幼虫運動神経に細胞外からシヌクレインを取り込ませると、シナプス内にシヌクレイン



4. LRRK2 欠失ハエシナプスとPD 患者剖検脳における Arl8 とシヌクレインの共局在

A) LRRK2 欠失ハエのArl8 蓄積シナプス(矢頭)においてシヌクレインの蓄積が生じる。B) PD 患者剖検脳ドーパミン神経のレヴィー小体ではシヌクレインとArl8B が局在する。

のシグナルが観察されるが、LRRK2 欠失体では、Arl8 蓄積シナプスにおいて、蓄積が無いシナプスより有意に強いシヌクレインのシグナルが観察された(図4A)。このことから、Arl8 のシナプスでの蓄積は、シヌクレインの蓄積と相関する可能性が示唆された。そこで、Arl8 とシヌクレインの関連をヒトPD 患者の剖検脳で観察した。PD 患者では、中脳黒質のドーパミン神経において、シヌクレインの凝集体であるレヴィー小体が観察できる。そこで、Arl8A, Arl8B

の免疫染色を行ったところ、レヴィー小体において、Ar18B の共局在が確認できた。以上の結果から、ヒトドーパミン神経においても、Ar18 と α -シヌクレインの動態に関連があることが示唆された(図 4B)。

本研究成果をまとめると、小胞輸送に関わる PD 関連遺伝子のうち LRRK2 と Auxilin, INPP5F の間に遺伝的相関があり、LRRK2 の機能欠失は、PD 遺伝子 Rme-8 の局在にも影響を与えたことから、LRRK2 がより中心的な役割を持つことが示唆された。LRRK2 の機能欠失や病理性変異体のシナプスにおいては、Ar18, Rab3, α -シヌクレインが蓄積していることが示され、こうした分子動態異常が神経機能異常を招くと考えられる。また、Ar18 の蓄積機構として、LRRK2 を介した軸索輸送の異常が考えられる。こうした結果から、軸索輸送の正常化が、PD 治療法の開発における新たな治療標的となることが示唆された。

引用文献：T, Inoshita *et al.*, Vps35 in cooperation with LRRK2 regulates synaptic vesicle endocytosis through the endosomal pathway in *Drosophila*, *Human Molecular Genetics*, 26, 2933–2948 (2017).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Inoshita Tsuyoshi, Arano Taku, Hosaka Yuka, Meng Hongrui, Umezaki Yujiro, Kosugi Sakiko, Morimoto Takako, Koike Masato, Chang Hui-Yun, Imai Yuzuru, Hattori Nobutaka	4. 巻 26
2. 論文標題 Vps35 in cooperation with LRRK2 regulates synaptic vesicle endocytosis through the endosomal pathway in Drosophila	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 2933 ~ 2948
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/hmg/ddx179	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井下 強、荒野 拓、穂坂 有加、孟 紅蕊、梅崎 勇次郎、小杉 紗紀子、森本 高子、小池 正人、Chang Hui-Yun、今居 謙、服部 信孝
2. 発表標題 パーキンソン病原因遺伝子 Vps35はシナプス小胞再生関連遺伝子と協働して神経伝達を制御する
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井下 強、崔 長旭、荒野 拓、穂坂 有加、孟 紅蕊、梅崎 勇次郎、小杉 紗紀子、森本 高子、小池 正人、Chang Hui-Yun、今居 謙、服部 信孝
2. 発表標題 Vps35 in cooperation with LRRK2 regulates synaptic vesicle recycling through the endosomal pathway
3. 学会等名 第40回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井下 強、荒野 拓、穂坂 有加、孟 紅蕊、梅崎 勇次郎、小杉 紗紀子、森本 高子、小池 正人、Hui-Yun Chang、今居 謙、服部 信孝
2. 発表標題 パーキンソン病原因遺伝子の一部は、シナプス小胞動態を制御する
3. 学会等名 第39回分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Inoshita T, Liu J, Taniguchi D, Cui C, Takanashi M Imai Y, Hattori N
2. 発表標題 Parkinson ' s disease-associated genes regulate the quality control of α -synuclein at presynapses through the endo-lysosomal pathway.
3. 学会等名 第42回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井下 強、劉 俊逸、谷口 大祐、高梨 雅史、今居 謙、服部 信孝
2. 発表標題 パーキンソン病関連遺伝子はsmall GTPase, Arl-8の動態制御を介し α -シヌクレインのターンオーバーを調節する。
3. 学会等名 第13回パーキンソン病・運動障害性疾患コンgres
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inoshita T, Liu J, Taniguchi D, Cui C, Takanashi M Imai Y, Hattori N
2. 発表標題 Parkinson ' s disease-associated genes regulate α -Synuclein turnover through the dynamics of a small GTPase Arl-8 at synapses.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----