

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03422

研究課題名(和文) ユビキチン・リガーゼを介する神経回路形成とエネルギー代謝の調節機構

研究課題名(英文) Role of ubiquitin-ligases in neural network and metabolism

研究代表者

豊福 利彦 (Toyofuku, Toshihiko)

大阪大学・医学系研究科・特任教授(常勤)

研究者番号：60322179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアの代謝異常は神経疾患特にパーキンソン病の病態と関わっている。申請者らはミトコンドリア機能調節を担うミトコンドリア・ユビキチン・リガーゼがパーキンソン病の原因遺伝子であるLRRK2により制御されることを見出した。ミトコンドリアの神経軸索内移動の動作メカニズムを検討した。LRRK2(G2019S)の神経軸索内ミトコンドリア輸送に対する抑制効果を示した。生化学的解析ではミトコンドリア代謝能を抑制することが判明した。さらにLRRK2はユビキチン・リガーゼを抑制することで神経軸索内ミトコンドリア輸送の抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアは細胞内代謝とりわけエネルギー産生における中心的器官である。細胞の運命決定機構としても重要な役割のあるミトコンドリアは多くの疾患とりわけ神経変性疾患において、その機能異常と病態の関連が報告されてきている。申請者らはパーキンソン病の病態に原因遺伝子であるLRRK2がミトコンドリア・ユビキチン・リガーゼ活性の過剰増加によるエネルギー代謝の低下を見出した。この知見よりLRRK2の機能制御を行う薬剤の開発によりパーキンソン病の治療に寄与することが見出された。

研究成果の概要(英文)：Disorder of mitochondrial metabolism is involved in the pathogenesis of Parkinson disease. We found that LRRK2, one of the causal gene for Parkinson disease, regulates mitochondrial metabolism through mitochondria ubiquitin ligases located in mitochondria. In the neural network, axonal transport of mitochondria from cell body to synaptic end is required for the maintenance of proper metabolism of neural network. Kinase active LRRK2, genetic mutation identified in Parkinson disease, decreased metabolism through suppressing mitochondrial transport. This suppression of mitochondrial transport was caused by the LRRK2-mediated suppression of mitochondrial ubiquitin ligases. Thus, our results demonstrated that LRRK2 regulated network formation through mitochondrial ubiquitin ligases, thereby suppressing the axonal mitochondrial transport.

研究分野：細胞生物学

キーワード：パーキンソン病 LRRK2 ミトコンドリア代謝 ユビキチン・リガーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

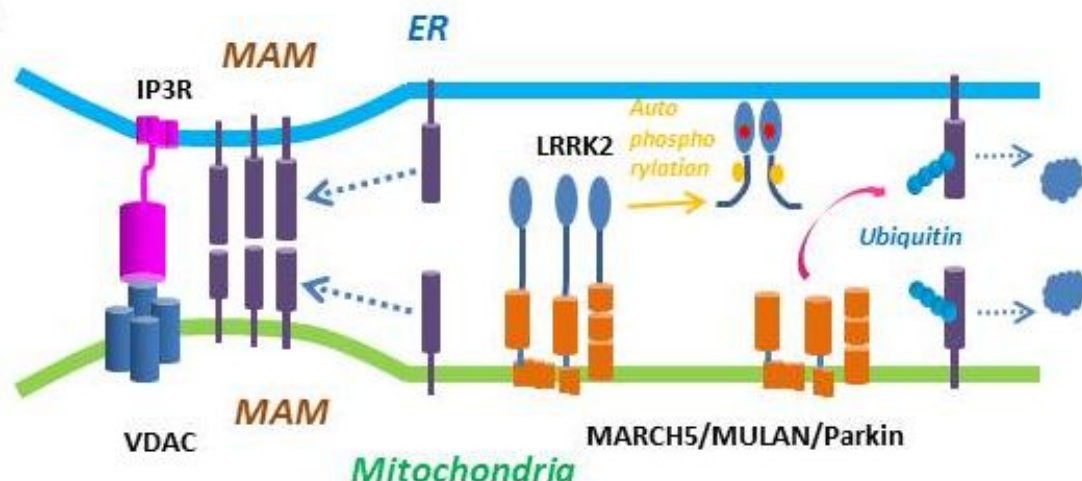
セマフォリン分子群の神経形成に関する研究において Sema6D が従来考えられていた神経ガイダンス作用(細胞骨格再構築による神経軸索の方向変化)とは異なり、神経軸索内のミトコンドリア輸送を制御することを見出した。ターゲット分子を検索した結果、ミトコンドリア・ユビキチン・キナーゼの活性を阻害することを見出した。また当講座で並行して行っていた LRRK2 とミトコンドリア代謝系の研究においてもミトコンドリア・ユビキチン・キナーゼの活性化を制御することを見出した。この2つの研究結果より申請者らはセマフォリン・シグナル系と LRRK2 シグナル系が協調してミトコンドリア機能制御することを予想した。LRRK2 と Sema6D の機能連関を解析するため、Sema6D 過剰発現マウスと LRRK(G2019S)発現マウスを交配し得られたマウスの表現型を検討した。単独の遺伝子改変マウスは顕著な運動神経症状を示さなかったが、両者の異常を持つ遺伝子改変マウスは下肢運動麻痺などの神経症状を示した。このことはセマフォリンと LRRK2 制御系が共通のターゲット分子(ユビキチン・リガーゼ)を介してミトコンドリア機能を調節する可能性を示唆している。そこで申請者らはユビキチン・リガーゼに着目して2つのシグナル系の連関を検証することとした。

## 2. 研究の目的

申請者は以前より神経ガイダンス因子の代表的な分子群であるセマフォリンに関する研究を行い、セマフォリンが神経回路形成に重要な役割を示す一方、血管系の発生及び免疫系における調節作用を有することを発見し報告してきた(*Genes & Dev.* 18: 435, 2004, *Nat Cell Biol* 6:1204, 2004, *Immunity* 22: 305, 2005, *Nat Neurosc.* 8:1712, 2005, *Nat Cell Biol.* 8: 615, 2006, *EMBO J.* 26:1373, 2007, *Dev. Biol.* 321: 251, 2008, *Nat Immunol.* 11: 594, 2010, *Nature* 467: 1123, 2010, *Genes & Dev.* 26:816, 2012, *Nat Comm.* 4:1407, 2013)。神経細胞は神経突起の伸長と末端での標的神経細胞とのシナプス形成するために神経体からミトコンドリアを輸送し末端へのエネルギー供給を行っている。申請者はセマフォリン・ファミリーの膜結合型セマフォリン Sema6D の神経回路形成において、細胞内ミトコンドリア輸送の抑制と神経突起形成の抑制を観察した(未発表)。さらに免疫細胞のマクロファージにおいて Sema6D が代謝制御により抑制性マクロファージへの分化促進を介して免疫応答の抑制に働くことを見出した(*Nature Immunol.* 19(6):561-570. 2018)。このことから神経細胞においても Sema6D を介するミトコンドリアのエネルギー産生と神経回路形成は密接に関連していることが考えられた。

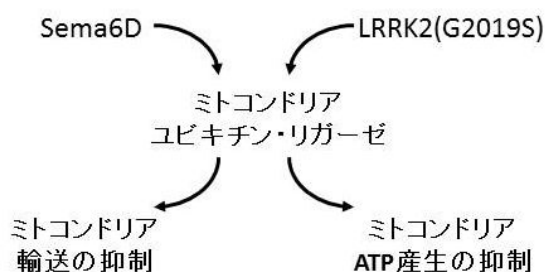
ミトコンドリアは細胞内代謝とりわけエネルギー産生における中心的器官である。正常状態でのエネルギー産生に加え、飢餓状態ではオートファジーによる自己消化作用で細胞内物質の再利用により細胞機能の維持を行い、再生不能状態ではアポトーシス(細胞死)により細胞の除去を行う。このように細胞の運命決定機構としても重要な役割のあるミトコンドリアは多くの疾患とりわけ神経変性疾患において、その機能異常と病態の関連が報告されてきている。パーキンソン病は中脳黒質のドーパミン細胞の変性脱落を示す神経疾患で、家族性パーキンソン病の原因遺伝子として  $\alpha$ -synuclein および LRRK2 の遺伝子変異が報告されている。近年、申請者らは LRRK2 の構造類似体 LRRK1 が

ミトコンドリアにおけるオートファジーを制御することを見出した (Mol Cell Biol, 35: 3044, 2015, Sci Rep. 6: 25738, 2016)。LRRK2 の代表的な遺伝子変異は LRRK2(G2019S)である。LRRK2(G2019S)発現細胞において LRRK2 キナーゼ活性の増加とミトコンドリア・ユビキチン・リガーゼ活性の過剰増加によりミトコンドリアにおけるエネルギー代謝の低下を引き起こすことを発見した。



**図1** LRRK2 は定常状態ではミトコンドリア・ユビキチン・リガーゼ( MARCH5, MULAN, Parkin ) と結合し、リガーゼ活性を抑制している。キナーゼ活性の亢進した LRRK2(G2019S)は自己リン酸化しリガーゼより分離する。分離されたリガーゼは小胞体ミトコンドリア結合 (MAM) 構成タンパク質をユビキチン化して除去する。この変化が MAM を介するカルシウム・シグナル伝達を低下し、ミトコンドリア代謝抑制を起こす。

さらに活性型 Sema6D 発現神経細胞においてミトコンドリア・ユビキチン・リガーゼ活性が増加することを観察した (未発表)。このように Sema6D を介する神経回路形成と LRRK2 を介するミトコンドリア代謝機能の調節は共通のターゲット分子であるミトコンドリア・ユビキチン・リガーゼを介して機能連関していると予想される (図2)。



**図2** 仮説：Sema6D と LRRK2 は共通のユビキチン・キナーゼを介してミトコンドリア機能を制御している。

以上の結果より、申請者はミトコンドリア・ユビキチン・キナーゼが神経回路形成とミトコンドリアのエネルギー産生のバランスを調節する動作メカニズムのキー分子であることを本研究においてを明らかにする予定である。さらに LRRK2(G2019S)を原因とするパーキンソン病のミトコンドリア代謝障害の治療法へのセマフォリン・シグナル分子の応用も目指す予定である。

### 3. 研究の方法

#### 細胞レベルでの解析

細胞は MEF を用いる。LRRK2(G2019S)発現細胞、LRRK2 欠損細胞は CRISPR/Cas9 法を用いて作成している。LRRK2 キナーゼ活性阻害 (LRRK2-IN-1) でキナーゼ活性抑制する。ユビキチン・リガーゼは活性型、不活性型リガーゼを遺伝子変異導入にて作成する。siRNA を使用したリガーゼ欠損細胞の作成も行。コントロール細胞、LRRK2(G2019S)細胞に上記薬剤ないし DNA コンストラクトをエレクトロポレーション法で導入した細胞に活性型、不活性型 Sema6D を導入し細胞内ミトコンドリア機能を以下の方法を用いて解析する。

#### (A) 小胞体 ミトコンドリア間機能連関の検討

(A-1) ミトコンドリア内カルシウム濃度測定: pcDNA-mt-cameleon を導入した細胞において測定する。導入された mt-cameleon はミトコンドリアに局在し、カルシウム結合により励起 発光波長が変化する。この試薬を用いることで生細胞においてミトコンドリア内カルシウム濃度測定を行う。予備実験において LRRK2(G2019S) 発現細胞は小胞体カルシウム放出刺激剤 (bradykinin, histamine) によるミトコンドリア内カルシウム濃度増加が抑制されていた。この細胞に活性型、不活性型 Sema6D を導入し、ミトコンドリア内カルシウム濃度変化を解析する。

(A-2) 小胞体 ミトコンドリア間のタンパク質間結合の評価: Proximity ligation 法を用いる。オリゴヌクレオチドが結合した 2 分子間の距離が近接したとき、これらのオリゴヌクレオチドがハイブリダイズすることで、核酸合成・伸長反応が起こる。この増幅された核酸を標識することで、分子間相互作用を検出する方法である。小胞体に局在する IP3 受容体とミトコンドリアに局在する VDAC は結合して小胞体 ミトコンドリア間カルシウム流入を行う。両者の蛋白質にオリゴヌクレオチドを結合し、タンパク質間の距離より小胞体 ミトコンドリア間結合を評価する。この細胞に活性型、不活性型 Sema6D を導入し、膜間の結合について解析する。

#### (B) オートファジー機能の検討

Tunicamycin, または飢餓状態 (FCS、グルコース不含培地) により 4 時間培養後、オートファジー誘導について LC3-II 形成をウエスタンブロットにて検討する。さらに共焦点レーザー顕微鏡で LC3 で染色されたオートファゴゾームの形態とリソゾームの位置関係と融合の有無を検討しオートファゴゾーム形成を検証する。

#### (C) ミトコンドリア代謝能の検討

生化学的解析は培養細胞よりミトコンドリアを分離精製し、電子伝達系を構成する complex I, IV 活性を測定する。さらに ATP 濃度は d-luciferin を使用した測定キット (Molecular Probe 社) にて測定する。さらに生細胞を用いた代謝解析は細胞外フラックスアナライザー (プライムテック社製) を使用して培養細胞の酸素消費量を計測し基礎酸素消費量および予備酸素消費能から、細胞のミトコンドリア代謝機能を評価する。

#### (D) ユビキチン・リガーゼ機能の検討

精製したユビキチン・リガーゼと基質となる MAM 構成タンパク質の mitofusin を混合し、UbcH7 存在下でインキュベートする。ユビキチン化された mitofusin は SDS-P

A G Eにて展開し、抗ユビキチン抗体、抗 mitofusin 抗体にて検出する。

( E ) 神経細胞として PC12 細胞株を用いた。この細胞は低用量 FBS 培養液中で神経細胞類似の神経突起を発現し、その軸索内のミトコンドリアそのほかの細胞小器官の輸送を共焦点レーザー顕微鏡にて解析することが可能である。LRRK2(G2019S)発現 PC12 細胞、LRRK2 欠損 PC 細胞を樹立して以下の解析を行った。

( a )ミトコンドリア神経軸索内移動の検討:( a - 1 ) mito-GFP を PC12 細胞に遺伝子導入してミトコンドリア移動を停止・移動の比率、移動速度の測定した ( a - 2 ) 神経軸索内での小胞体 ミトコンドリア間のタンパク質間結合の評価: Proximity ligation 法を用いる。小胞体に局在する IP3 受容体とミトコンドリアに局在する VDAC の蛋白質間結合により小胞体 ミトコンドリア間結合を評価した。

#### 遺伝子改変マウスを用いた生体での解析

LRRK2(G2019S)発現マウスに Sema6D 過剰発現マウス、Sema6D 欠損マウスを交配し作成した遺伝子改変マウスについて神経症状と脳組織の異常を解析する。さらに神経毒 MPTP によるパーキンソン病モデルを使用して Sema6D 阻害剤、ユビキチン・キナーゼ阻害剤の有効性を検証する。

#### 4. 研究成果

ミトコンドリアの代謝異常は神経疾患特にパーキンソン病の病態と関わっている。申請者らはミトコンドリア機能調節を担うミトコンドリア・ユビキチン・リガーゼがパーキンソン病の原因遺伝子である LRRK2 により制御されることを見出した。本年度はミトコンドリアの神経軸索内移動の動作メカニズムを検討した。

神経細胞として PC12 細胞株を用いた。この細胞は低用量 FBS 培養液中で神経細胞類似の神経突起を発現し、その軸索内のミトコンドリアそのほかの細胞小器官の輸送を共焦点レーザー顕微鏡にて解析することが可能である。LRRK2(G2019S)発現 PC12 細胞、LRRK2 欠損 PC 細胞を樹立して以下の解析を行った。

( A )ミトコンドリア神経軸索内移動の検討:( A - 1 ) mito-GFP を PC12 細胞に遺伝子導入してミトコンドリア移動を停止・移動の比率、移動速度の測定: LRRK2(G2019S)活性型細胞では神経内でのミトコンドリアの移動量の抑制が起きた。速度は一定。LRRK2(G2019S)欠損細胞では神経内ミトコンドリア移動量の増加が起きた。速度は一定 ( A - 2 ) 神経軸索内での小胞体 ミトコンドリア間のタンパク質間結合の評価: Proximity ligation 法を用いる。小胞体に局在する IP3 受容体とミトコンドリアに局在する VDAC の蛋白質間結合により小胞体 ミトコンドリア間結合を評価する。LRRK2(G2019S)活性型細胞では結合の増加が起きた。その程度は移動ミトコンドリア量と相関があり、小胞体 ミトコンドリア間結合が移動するしないの決定に重要と考えられた。

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 1件）

1. 著者名 Toyofuku T, Okamoto Y, Ishikawa T, Sasawatari S, Kumanogoh A	4. 巻 39
2. 論文標題 LRRK2 regulates endoplasmic reticulum-mitochondrial tethering through the PERK-mediated ubiquitination pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EMBO J.	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2018100875	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------