

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年 5月13日現在

機関番号：32607
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791000
 研究課題名（和文） パーキンソン病原因分子 LRRK2 のドミナントネガティブによる細胞死機構の解明
 研究課題名（英文） Elucidation of cell death mechanism by dominant negative of mutant LRRK2, the causative molecule of Parkinson's disease
 研究代表者
 太田 悦朗（OHTA ETSURO）
 北里大学・医療衛生学部・講師
 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、常染色体優性遺伝性パーキンソン病の原因分子である。本研究において、正常 LRRK2 が I2020T 変異 LRRK2 とのヘテロ二量体を形成することによって、タンパク質の寿命が短くなることをみつけた。また、I2020T 変異 LRRK2 が存在することにより、LRRK2 の新規基質分子である Akt1 のリン酸化能が減退することがわかった。さらに、正常 LRRK2 は過酸化水素によるアポトーシス誘導に対する保護的効果の低下がみられた。これらより、変異 LRRK2 とのヘテロ二量体がドミナントネガティブ効果を引き起こす可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：Mutant Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) is the molecule responsible for autosomal dominant Parkinson's disease (PD). In the present study, we found that the lifetime of WT LRRK2 protein was shortened by formation of a heterodimer with I2020T LRRK2. We also demonstrated that the kinase activity of WT LRRK2 for phosphorylation of Akt1 was diminished by the presence of I2020T LRRK2. Furthermore, the protective effect of WT LRRK2 against H2O2-induced apoptosis was impaired by co-transfection with I2020T LRRK2. These results provide a new insight into the etiology of PD caused by the LRRK2 mutation, i.e., a dominant-negative effect resulting from heterodimer formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

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、細胞死、ヘテロ二量体、Akt1

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) は、中脳黒質の神経

細胞死によって引き起こされる。

Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) は、

常染色体優性遺伝性 PD の原因遺伝子領域の *PARK8* (12p11.2-q13.1) から発見された新規遺伝子である。我々は、*PARK8* の original family である日本の優性遺伝 PD 家系 (相模原家系) の発症原因が LRRK2 の I2020T 変異であることを報告した [Ann Neurol 2005, Neurosci Lett 2007]。LRRK2 は、GTPase や Kinase などのドメインをもつことから、多彩な機能を有することが予想されている。

現在までに、25 種類の変異 LRRK2 が報告され、そのうち最も頻度が高い G2019S 変異 LRRK2 では、キナーゼ活性の異常な亢進 (gain of toxic function) が認められ、それが細胞死の原因と考えられている。しかし、I2020T を含む他の変異 LRRK2 ではキナーゼ活性の亢進は認められず、細胞死の原因は変異の部位により異なることが考えられた。申請者は、この原因を明らかにするため解析を進めた。その結果、I2020T 変異 LRRK2 は正常 LRRK2 や G2019S 変異よりもタンパク質の半減期が短く、ユビキチンプロテアソーム系とオートファジー系の両経路で分解されることを報告した [Biochem Biophys Res Commun 2009]。次に、正常 LRRK2 はアポトーシス抑制能をもつが、I2020T 変異 LRRK2 にはその機能がないこと、RNAi により正常 LRRK2 をノックダウンさせた細胞は細胞生存率が低下すること、を報告した [Biochem Biophys Res Commun 2010]。これらの知見から申請者は、細胞死の一因は LRRK2 の量的不足による機能低下であると考えている。

また近年、LRRK2 は主に二量体で細胞内に存在していることが報告され、この二量体 LRRK2 における基質分子や相互作用分子を明らかにすることが、細胞死機構の解明につながると考えられている。

2. 研究の目的

I2020T 変異 LRRK2 が、正常 LRRK2 との二量体形成により、正常 LRRK2 の分解誘発または正常 LRRK2 の機能抑制、のどちらか一方、もしくはその両方の原因すなわち dominant negative effect による細胞死が引き起こされるかを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 正常 LRRK2 と I2020T 変異 LRRK2 のヘテロ二量体形成時におけるタンパク質安定性の解析

ヒト腎臓細胞株 HEK293、ヒト神経芽細胞株 SH-SY5Y に相模原家系 PD 患者由来の正常 LRRK2 (WT) と I2020T 変異 (I2020T) の発現プラスミド (V5 タグ付または FLAG タグ付) を導入して一過性に共発現させた。その後、SDS-PAGE、Blue Native -PAGE を用いて免疫ブロットによって、WT/WT、WT/I2020T、I2020T/I2020T の二量体形成時における LRRK2 タンパク質を調べた。さらに、免疫沈降と放射性同位元素 [³⁵S]-Met, -Cys を用いたパルスチェイス実験を行い、二量体形成時におけるタンパク質の半減期を調べた。また、当研究室で樹立した V5 タグ付 LRRK2 を安定発現する SH-SY5Y (V5-LRRK2 安定発現 SH-SY5Y) を用いて、上述した実験を再検証した。

(2) LRRK2 の基質候補分子の解析

LRRK2 の基質候補分子として Akt1 を見出したため、N 末端 GST タグ融合リコンビナント LRRK2 タンパク質を用いて、Akt1 との結合能および Akt1 のリン酸化能を調べた。さらに、siRNA によって、SH-SY5Y の LRRK2 をノックダウンさせて、Akt1 のリン酸化能への影響を検討した。さらに、R1441C、G2019S、I2020T 変異 LRRK2 のリコンビナントタンパク質における Akt1 との結合能および Akt1 のリン酸化

能を調べた。

(3) 正常 LRRK2 と I2020T 変異 LRRK2 のヘテロ二量体形成時におけるキナーゼ活性と細胞死に関する解析

HEK293 に WT と I2020T の発現プラスミドを導入して一過性に共発現させた。同様に正常 V5-LRRK2 安定発現 SH-SY5Y に I2020T 変異 LRRK2 を共発現させた。その後、WT/WT、WT/I2020T、I2020T/I2020T の二量体における LRRK2 の基質分子である Akt1 のリン酸化能の差異を調べた。また、細胞に過酸化水素を添加することによる WT/I2020T のヘテロ二量体における細胞生存率への影響を調べた。

(4) I2020T、G2019S 変異以外の 23 種の変異 LRRK2 の発現プラスミドの作製

PD 患者で報告されている I2020T、G2019S 変異以外の 23 種の変異 LRRK2 (R1441C、R1441G、R1441H、Y1699C、R1941H、I2012T など) について、同様のメカニズムによって細胞死が誘発されているかを検証するために、発現プラスミドを作製した。

4. 研究成果

(1) 正常 LRRK2 と I2020T 変異 LRRK2 のヘテロ二量体形成時におけるタンパク質安定性

Native-PAGE によって、HEK293、SH-SY5Y にそれぞれ発現させた正常 LRRK2 と I2020T 変異 LRRK2 は、主に二量体で存在していた

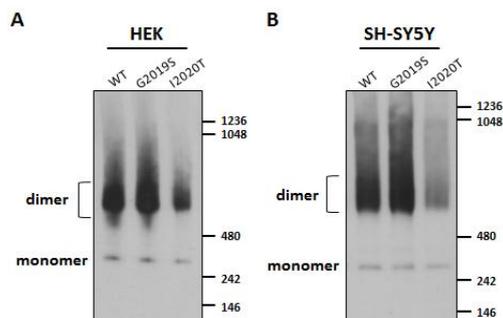


図 1. 二量体 LRRK2 の解析

(図 1)。しかし、正常 LRRK2 に比べて I2020T 変異の二量体 LRRK2 のタンパク質が減少していた。次に、相模原家系 PD 患者の LRRK2 発現様式と同様に、WT と I2020T を共発現させた HEK293 について調べた。Blue Native-PAGE の実験から、WT/I2020T のヘテロ二量体形成により正常 LRRK2 の減少がみられた (図 2)。

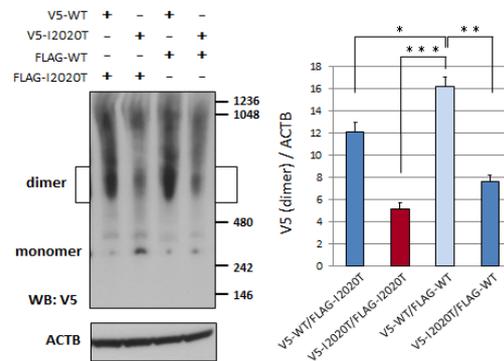


図 2. ヘテロ二量体 LRRK2 の解析

また、免疫沈降による実験でも同様の結果が認められた。そして、パルスチェイス実験の結果、WT/WT に比べて WT/I2020T のヘテロ二量体が存在する細胞内の LRRK2 タンパク質の寿命は有意に低下していた (図 3)。

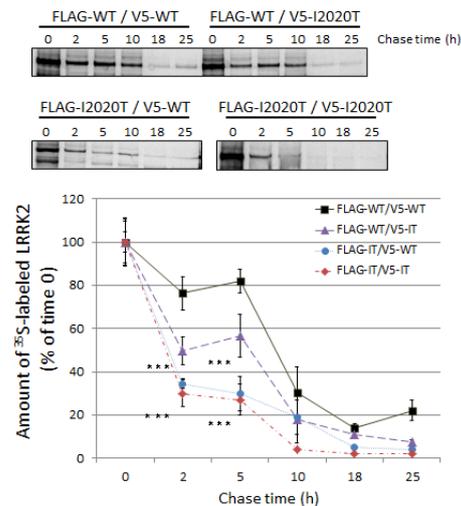


図 3. ヘテロ二量体 LRRK2 の半減期解析

(2) LRRK2 の新規基質分子 Akt1 の解析

リコンビナント LRRK2 タンパク質を用いた解析、LRRK2 siRNA による SH-SY5Y の Akt1 の

リン酸化能解析の結果、LRRK2 は Akt1 の Ser473 をリン酸化することがわかった(図4、5)。

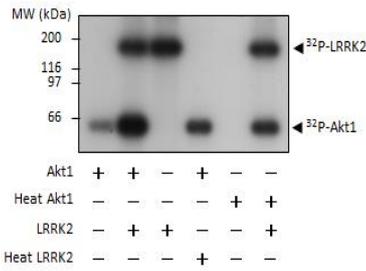


図4. リコンビナント LRRK2 を用いた解析

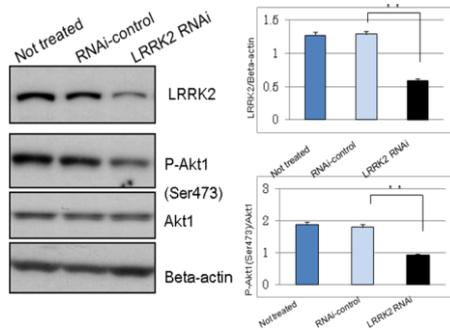


図5. LRRK2 siRNA による Akt1 のリン酸化能解析

さらに、正常 LRRK2 に比べて I2020T、G2019S、R1441C 変異 LRRK2 では Akt1 との結合能および Akt1 のリン酸化能が低下していた(図6)。

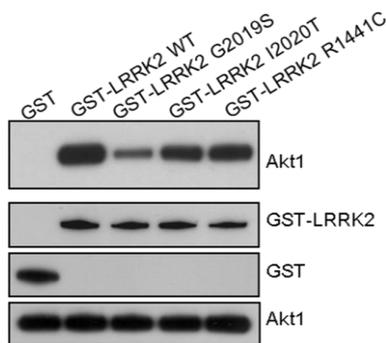


図6. 変異 LRRK2 と Akt1 との結合能

(3) 正常 LRRK2 と I2020T 変異 LRRK2 のヘテロ二量体形成時におけるキナーゼ活性と細胞死への影響

WT と I2020T を共発現させた HEK293 における

Akt1 のリン酸化能と細胞生存率を調べた。その結果、WT/WT のみの細胞に比べて WT/I2020T を有する細胞では、Akt1 の Ser473 のリン酸化能は有意に低下していた。同様に、正常 V5-LRRK2 安定発現 SH-SY5Y に I2020T 変異 LRRK2 を共発現させた細胞においても、WT/WT のみの細胞に比べて WT/I2020T を有する細胞では、Akt1 の Ser473 のリン酸化能が有意に低下した(図7)。さらに、WT/WT と WT/I2020T における細胞生存率には差異が認められないが、過酸化水素添加時によって、WT/I2020T の細胞生存率は有意に低下した(図8)。

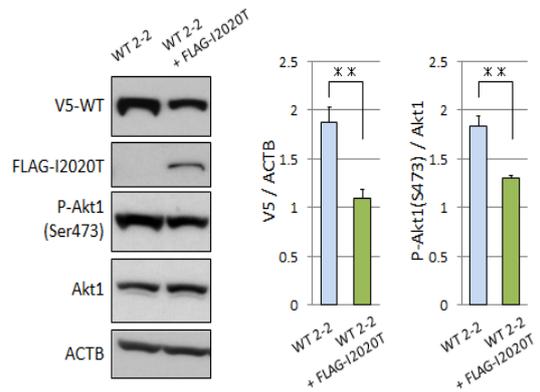


図7. WT/I2020T ヘテロ二量体における Akt1 のリン酸化能

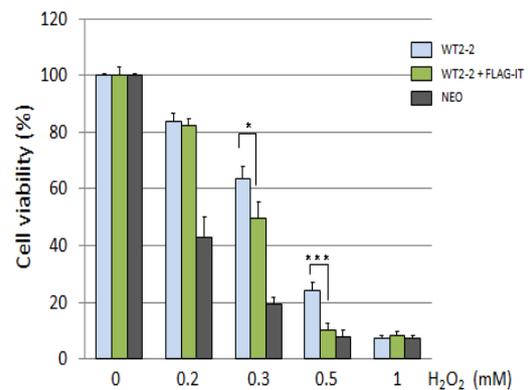


図8. WT/I2020T ヘテロ二量体における細胞生存率

(4) I2020T、G2019S 変異以外の 23 種の変異 LRRK2 の発現プラスミドの作製

PD 患者で報告されている I2020T、G2019S 変異以外の変異 LRRK2 のうち、6 種 (R1441C、R1441G、R1441H、Y1699C、R1941H、I2012T) の変異 LRRK2 について発現プラスミドを作製し、細胞内に遺伝子導入して、タンパク質の発現を確認した。今後、同様のメカニズムによって細胞死が誘発されているかを検証していきたい。

本研究において、I2020T 変異 LRRK2 は、WT/I2020T のヘテロ二量体形成によって、正常 LRRK2 のタンパク質安定性および Akt1 のリン酸化能を低下させ、細胞死を誘発することが考えられた。これは、I2020T 変異 LRRK2 とのヘテロ二量体によって、ドミナントネガティブ効果を引き起こす可能性が示唆される。今後、その他の変異 LRRK2 も含めて、患者の剖検脳または患者由来 iPS 細胞から分化した神経細胞における直接的な病態解析を検討していきたい。

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, Kawakami F, Kubo M, Obata F. Dominant-negative effects of LRRK2 heterodimers: A possible mechanism of neurodegeneration in Parkinson's disease caused by LRRK2 I2020T mutation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 430 (2), 560-566. 査読有り
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.11.113.
- (2) Ohta E, Kawakami F, Kubo M, Obata F. LRRK2 directly phosphorylates Akt1 as a possible physiological substrate:

impairment of the kinase activity by Parkinson's disease-associated mutations. *FEBS Lett*, 2011, 585 (14), 2165-2170. 査読有り
DOI: 10.1016/j.febslet.2011.05.044.

[学会発表] (計 7 件)

- ① Ohta E, Kawakami F, Kubo M, Obata F. Dominant-negative effects of LRRK2 heterodimers: A possible mechanism of neurodegeneration in Parkinson's disease caused by LRRK2 I2020T mutation. The 11th International Conference AD/PD 2013 年 3 月 8 日 Fortezza da Basso (Florence, Italy)
- ② Ohta E, Kawakami F, Kubo M, Obata F. LRRK2 directly phosphorylates Akt1 as a possible physiological substrate: impairment of the kinase activity by Parkinson's disease-associated mutations. 11th APSN, 55th JSN 2012 年 10 月 1 日-2 日 Kobe Convention Center (Kobe, Japan)
- ③ Ohta E, Kawakami F, Kubo M, Obata F. LRRK2 directly phosphorylates Akt1 as a possible physiological substrate: impairment of the kinase activity by Parkinson's disease-associated mutations. 22nd IUBMB & 37th FEBS Congress 2012 年 9 月 6 日 FIBES-Seville Conference and Exhibition Centre (Sevilla, Spain)
- ④ 太田悦朗、川上文貴、久保誠、小幡文弥. Leucine-Rich Repeat Kinase 2 の新規基質分子 Akt1 の解析 第 53 回日本神経学

会学術大会 2012年5月23日 東京国際フォーラム（東京都）

⑤ Ohta E, Kawakami F, Kubo M, Obata F. LRRK2 directly phosphorylates Akt1 as a possible physiological substrate: impairment of the kinase activity by Parkinson's disease-associated mutations. XIX WFN World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders 2011年12月14日 Shanghai International Convention Centre (Shanghai, China)

⑥ 太田悦朗、川上文貴、久保誠、小幡文弥. LRRK2 directly phosphorylates Akt1 as a possible physiological substrate: impairment of the kinase activity by Parkinson's disease-associated mutations 2011年9月22日 第84回日本生化学会大会合同大会 京都国際会館（京都府）

⑦ 太田悦朗、川上文貴、久保誠、小幡文. I2020T変異LRRK2と正常型LRRK2のヘテロダイマーにおける蛋白質不安定性の解析 2011年5月18日 第52回日本神経学会学術大会 名古屋国際会議場（愛知県）

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・講師
研究者番号：60508042