

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成25年 7月19日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790068

研究課題名(和文) 家族性パーキンソン病責任遺伝子産物LRRK2の膜局在性とその意義の解析

研究課題名(英文) Membrane localization of LRRK2, a causative gene for familial Parkinson's disease

研究代表者

伊藤 弦太 (ITO, Genta)

東京大学・医学(系) 研究科(研究員)・助教

研究者番号：10431892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：電子顕微鏡を用いた解析からLRRK2が細胞内で膜上に存在することは報告されているが、詳細な性状解析はなされていなかった。本研究において、LRRK2の一部は界面活性剤可溶画分に回収され、LRRK2阻害剤で細胞を処理すると、LRRK2がLAMP1陽性リング状構造物に集積した。また、chemical-induced localization実験系を用い、LRRK2をオルガネラ膜上に強制的に移行させる実験系を確立した。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that LRRK2 exists on membrane of organelles or vesicles in cytoplasm by electron microscopic analysis. However, the membrane localization of LRRK2 has not been precisely characterized. In this study, we found that a small fraction of LRRK2 was eluted in the detergent-soluble membrane fraction. We also found that LRRK2 translocates to the LAMP1-positive structure upon treatment of cells with a LRRK2 inhibitor. In addition, we succeeded in forcing LRRK2 to translocate to organelles by using a chemical-induced localization system.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・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。LRRK2 はアミノ末端に LRRK2 リピート、中央付近に leucine-rich repeat (LRR) ドメイン、カルボキシル末端に WD40 リピート構造を有し、そのドメイン構造から種々のタンパク質を結合する scaffold としての役割を有する可能性が考えられている。FPD 変異としては、ROC ドメインに R1441C/G/H の 3 種、キナーゼドメインに G2019S、I2020T の 2 種、ROC ドメインとキナーゼドメインの間に位置する COR ドメインに Y1699C の合計 6 種が知られている。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 は細胞質に局在するキナーゼであるが、電子顕微鏡を用いた解析から、その一部がミトコンドリアなどの膜に結合して存在していることが報告され、伊藤らによる培養細胞の生化学的分画においても、過剰発現させた LRRK2 の約 20% が膜画分に回収された (Ito and Iwatsubo, Biochem J, 2012)。また、LRRK2 はオートファジーに際して autophagosome の膜上に局在し、その機能を調節する可能性が示唆されている。さらに、膜画分から精製した LRRK2 は、細胞質画分から精製した LRRK2 に比して *in vitro* にお

けるキナーゼ活性が高いことが報告された。これらの結果から、LRRK2 は細胞内の膜上において活性化されるキナーゼであり、FPD 変異型 LRRK2 が神経変性を惹起するのに、その部位への局在が必要であるという仮説が考えられたが、LRRK2 が膜局在する具体的な部位や、局在メカニズム、膜局在とキナーゼ活性上昇の因果関係が明らかでなく、膜局在に対する FPD 変異の影響も不明だった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的として以下の 2 点を挙げる。(1) LRRK2 の細胞内局在を生化学的、細胞生物学的に解析し、LRRK2 の膜結合性について詳細に解析する。(2) LRRK2 の膜局在の機能的意義を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) LRRK2 の細胞内局在の解析

細胞内局在の解析は培養細胞を用いて行った。ヒト胎児腎臓線維芽細胞由来の培養細胞である HEK293 細胞に、アミノ末端に 3xFLAG 配列をタグとして付加した LRRK2 (3xFLAG-LRRK2) を恒常的に過剰発現させた。この細胞に発現する LRRK2 を間接免疫蛍光法により蛍光標識し、蛍光顕微鏡で観察した。また生化学的抽出は、この細胞を Tris-buffered saline (TBS) 中でホモジナイズし、TBS 可溶画分を得たのち、TBS 不溶画分を 0.1% Triton X-100 を含む TBS 中でホモジナイズし、TBS-T 可溶画分を得た。さらに、TBS-T 不溶画分を SDS-PAGE サンプルバッファー中で可溶化した。得られたサンプルをイムノブロット解析した。また、細胞内局在の生化学的解析には、市販の抽出キット (ProteoExtract Kit; Merck-Millipore) を用いた解析もあわせて行った。

LRRK2 を内因性に有する培養細胞を用いた解析には、ヒト肺がん上皮細胞由来の A549 細胞を用いて行った。これは、各種培養細胞のライゼート (市販) を LRRK2 抗体を用いてイムノブロット解析したところ、A549 細胞のライゼートにおいて反応が見られたことから、A549 細胞には内在性 LRRK2 が存在すると考えられたからである。

LRRK2 はマクロファージにおいてインターフェロン  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) 依存的に発現上昇し、phagocytosis 時に phagosome 上に集積することが知られている。この現象も LRRK2 の膜局在の機能的意義に関連すると考え、LRRK2 の phagosome への局在を変化させる薬剤の探索も行った。この検討には、マウスマクロファージ由来の培養細胞株である Raw264.7 細胞を用いた。

## (2) 膜局在の機能的意義

LRRK2 の膜局在の機能的意義を解析するため、LRRK2 を強制的に膜局在させる実験系を開発した。カルボキシル末端に 2xMyc 配列をタグとして有する LRRK2 のアミノ末端に、FKBP12 の改変配列を融合させた (FKBP-LRRK2-2xMyc)。このプラスミドを HEK293 細胞に遺伝子導入し、恒常発現細胞を取得した。次に、mTOR (mammalian Target of Rapamycin) と呼ばれるキナーゼの rapamycin 結合部位である FRB ドメインを、様々な細胞内コンパートメントに局在するタンパク質またはそのシグナル配列を融合させたポリペプチドを発現するプラスミドを作成した。ミトコンドリア局在には Fis1 全長および TOMM20 ミトコンドリア局在シグナル配列 (TOMM20N)、リソソーム局在には LAMP1 全長、ペルオキシソーム局在には PMP34 全長、細胞表面膜の細胞質側への局在には Lyn の N 末端ペプチド (LynN)、ゴルジ体局在には eNOS の N 末端ペプチド (eNOSN)、アクチン線維への局在には Ezrin の C 末端ペプチド (EzC) をそれぞれ用いた。FKBP-LRRK2-2xMyc を恒常発現する細胞に、これらのプラスミドを遺伝子導入した。

FKBP12 タンパク質と FRB ドメインは、rapamycin の存在化で結合することが知られている。rapamycin は内在性 FKBP12 に結合して mTOR を阻害してしまうことから、内在性 FKBP12 への結合性を有さず、改変型 FKBP にのみ結合する低分子化合物である AP21967 を用いた。両者を共発現させた細胞を AP21967 で処理することにより、FKBP-LRRK2-2xMyc と FRB 融合ポリペプチドが強制的に会合し、LRRK2 が特定の細胞内コンパートメントに局在化される。このときの LRRK2 の局在を蛍光染色により可視化した。また、細胞形態の変化を観察した。

## 4. 研究成果

### (1) LRRK2 の細胞内局在の解析

LRRK2 を恒常発現させた HEK293 細胞 (WT4 細胞) を、FLAG タグに対する抗体を用いて蛍光染色したところ、細胞質にドット上の染色が見られた。この結果から、LRRK2 が何らかのオルガネラの膜上に存在する可能性が示唆されたが、特定のマーカートンパク質との共局在は見られなかった。WT4 細胞を LRRK2 阻害剤である LRRK2-IN-1 で処理したところ、興味深いことにリング状の構造物に LRRK2 が集積した。このリング状構造物は、LAMP1 陽性であり、後期エンドソームまたはリソソーム関連の構造物であると考えられた。

次に、WT4 細胞から LRRK2 を段階的に抽出し、イムノブロット解析を行った。このとき、TBS 可溶画分 (細胞質画分) に 90% 程度の LRRK2

が回収され、10% 程度が TBS-T 可溶画分 (膜画分) に回収された。この結果からも、少なくとも LRRK2 の一部は膜に結合して存在することが示唆された。ProteoExtract Kit を用いた解析においても、90% 程度が細胞質画分に回収され、10% 程度が膜画分に回収された。生化学的に分画された LRRK2 のキナーゼ活性を *in vitro* kinase assay により定量したところ、細胞質画分と膜画分の LRRK2 のキナーゼ活性に差は見られなかった。

過剰発現細胞を用いた解析では、LRRK2 の生理的局在を正しく反映しない可能性を考え、内在性に LRRK2 を発現する A549 細胞でも同様の解析を行った。その結果、WT4 細胞と同様の結果が得られ、LRRK2 の一部は生理的に膜に結合して存在することが確かめられた。

LRRK2 は phagocytosis 時に phagosome に局在することが知られている。マウスマクロファージ由来 Raw264.7 細胞を IFN $\gamma$  処理した後、zymosan を貪食させたところ、形成された phagosome の 10% 程度が LRRK2 陽性となることを免疫染色により明らかにした。このとき、Protein Kinase D (PKD) 阻害剤で処理すると、LRRK2 の phagosome 局在がほぼ完全に消失することを見出した。

### (2) 膜局在の機能的意義

近年、タンパク質のオルガネラ膜表面への局在の機能的意義を解析するツールとして、chemical-induced localization (CIL) 実験系が頻用されている。本研究では、FKBP-LRRK2-2xMyc を恒常発現する HEK293 細胞 (F-WT 細胞) を作製し、そこに FRB 融合ポリペプチドを発現させることにした。作製した FRB 融合ポリペプチドのうち、FRB-eNOSN については目的のゴルジ体への局在が見られなかったため、以降の解析には使用しなかった。一方、Fis1、TOMM20N 融合ポリペプチドを発現させ、AP21967 処理した細胞では、LRRK2 がミトコンドリア膜上に局在していた。ミトコンドリアの断片化が促進される傾向があったが、これはキナーゼ活性のない K1906M 変異体を恒常発現する細胞 (F-KM 細胞) でも同様の傾向が見られたことから、LRRK2 のキナーゼ活性に依存した現象ではないと考えられた。FRB-LAMP1 の共発現では、AP21967 処理によって LRRK2 が LAMP1 陽性構造物 (後期エンドソーム、リソソーム) を取り囲むような染色像を示し、後期エンドソーム、リソソームへの局在が示唆されたが、それらの形態に特に変化は見られなかった。FRB-PMP34 の共発現でも、AP21967 処理依存的にペルオキシソーム周囲への局在化が見られたが、その形態に特に変化は見られなかった。Lyn-FRB の共発現では、AP21967 処理依存的に LRRK2 が細胞表面膜の細胞質側に移

行したが、細胞形態に特に変化は見られなかった。FRB-EzC を F-WT 細胞に発現させると、細胞表面に無数の突起が出現し、アクチン骨格のリモデリングが生じたことが示唆された。AP21967 処理によって LRRK2 をアクチン線維に局在させることによる変化は検出できなかった。

### (3) 得られた成果の位置づけと今後の展望

「1. 研究開始当初の背景」で述べたように、LRRK2 は超微形態的にも細胞内のオルガネラ膜上に存在することが知られていた。本研究においては、異なる原理に基づく2種類の生化学的解析法を用いて、LRRK2 が界面活性剤可溶画分に存在することを確認した。最近の研究から、メカニズムは不明であるが、LRRK2 阻害剤で細胞を処理することにより、LRRK2 の細胞内局在が変化することが報告されている。本研究では、LRRK2 阻害剤処理時に、LRRK2 が LAMP1 陽性のリング状構造物に集積することを初めて明らかにした。これは、LRRK2 が不活性化されると後期エンドソームやリソソームに移行することを示唆しており、非常に重要な成果である。

LRRK2 の一塩基多型が炎症性腸疾患の危険因子となることから、LRRK2 の免疫系における機能が注目されている。LRRK2 はマクロファージの phagocytosis 時に phagosome に局在するが、その分子メカニズムは全く明らかになっていない。本研究では、PKD 阻害剤処理により phagosome 局在が消失することから、LRRK2 の phagosome 移行に PKD が必要であることを初めて明らかにした。これらの結果は、LRRK2 の phagosome 局在の分子メカニズムおよびその意義のみならず、マクロファージにおける PKD の役割にも迫る足がかりとなる重要な成果であると考えている。

さらに、本研究では、CIL 実験系を用いて、LRRK2 を強制的にオルガネラ膜表面に移行させる実験系を確立した。LRRK2 が阻害剤処理時に LAMP1 陽性のリング状構造物に集積したことが、FRB-LAMP1 を用いた解析では LAMP1 陽性構造物の形態などに異常は見られなかった。今後、後期エンドソームにおける小胞輸送や、リソソームにおけるタンパク質分解などのオルガネラ機能に着目した研究へと展開してゆきたい。また、本研究では、膜局在性を喪失した LRRK2 の作出を行うことができなかった。LRRK2 の生理的機能は不明であるが、将来的に LRRK2 の生理的機能における膜局在性の必要性を検討するため、膜局在性を喪失した LRRK2 についても探索を続けてゆきたい。

### 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. 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1件)

1. Genta Ito, Shogo Kamikawaji, Takeshi Iwatsubo, Molecular mechanism of hypophosphorylation of LRRK2 caused by familial mutations., 米国神経科学会、平成24年10月15日、ニューオーリンズ、アメリカ合衆国

### [その他]

ホームページ等

<http://www.neuropathology.m.u-tokyo.ac.jp/>

### 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