

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870114

研究課題名(和文) エンドソーム・リソソーム系細胞内輸送に着目したパーキンソン病発症機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms of Parkinson's disease focusing on endo-lysosomal trafficking system

研究代表者

桑原 知樹 (Kawahara, Tomoki)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10533903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病関連遺伝子として同定されたLRRK2、RAB7L1は細胞内小器官であるエンドソーム・リソソームまわりの細胞内輸送を調節することが示唆されている。本研究において、マウスや線虫におけるRAB7L1-LRRK2遺伝子経路の存在を示すと同時に、その下流で機能する候補因子としてリソソームへの細胞内輸送に重要なAP-3複合体を同定し、LRRK2との機能的関連を明らかにした。また、パーキンソン病脳内において特徴的なシヌクレインの神経細胞内蓄積にリソソームが関与することを示唆する知見も得られた。以上より、パーキンソン病発症にリソソーム障害が重要な役割を果たすと考えられた。

研究成果の概要(英文)：LRRK2 and RAB7L1, two genes related to Parkinson's disease, are implicated in the regulation of intracellular transport mediated by subcellular organelles such as endosomes and lysosomes. Here we showed the existence of RAB7L1-LRRK2 genetic pathway in mice and nematodes, and demonstrated that lysosome-related adaptor protein complex AP-3 acts as a candidate downstream effector of RAB7L1-LRRK2 pathway. We also found the evidence that lysosome has a key role in the intraneuronal accumulation of alpha-synuclein, a major hallmark pathology in Parkinson's disease brains. Collectively, these results suggest that lysosomal impairment may underlie an important mechanism in the pathogenesis of Parkinson's disease.

研究分野：分子神経病理学

キーワード：パーキンソン病 LRRK2 細胞内輸送 エンドソーム リソソーム 脳神経疾患

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (Parkinson's disease; PD) は加齢に伴って発症する代表的な神経変性疾患の1つであり、中脳黒質のドーパミン作動性ニューロンを主体とする神経細胞の変性・脱落と、 α -synuclein タンパク質を主要構成成分とする神経細胞内封入体 Lewy 小体の出現を病理学的特徴とする。現時点において PD の発症・進行を抑制する根本的治療法は存在せず、発症メカニズムの解明が待たれている。

近年、家族性 PD 家系の連鎖解析および孤発性 PD のゲノムワイド関連解析から、複数の遺伝子または領域が病因遺伝子/危険因子として同定された。興味深いことに、その中には α -synuclein に加えて *LRRK2*、*VPS35*、*PARK16 (RAB7L1)*、*GBA*、*ATP13A2* などのエンドソーム・リソソーム経路遺伝子が含まれていた。また、*LRRK2* と α -synuclein は連鎖解析とゲノムワイド関連解析の両者から同定されており、その疾患発症における役割の解明はとりわけ重要である。

LRRK2 はキナーゼ活性を保持し、PD 発症に連鎖する代表的変異である G2019S 変異によりキナーゼ活性が上昇すること、およびその発現が培養ニューロンの突起を短縮させ、リソソームの肥大化を引き起こすことが報告されている。変異型 *LRRK2* が如何にしてこのような表現型を引き起こすのかについては不明であったが、我々はこの表現型を調節する因子として、これまでに孤発性 PD の危険遺伝子座 *PARK16* 領域内に存在する遺伝子 *RAB7L1 (Rab7-like variant 1)* を同定した。また、G2019S 型 *LRRK2* の発現や *RAB7L1* のノックダウンはともにリソソーム加水分解酵素の運搬を担うマンノース 6 リン酸受容体 (MPR) の細胞内輸送に異常をもたらし、培養ニューロンの突起短縮化とリソソームの肥大化を引き起こすこと、この異常は別の家族性 PD 病因遺伝子 *VPS35* の発現により回復することを明らかにした。*VPS35 (vacuolar sorting protein 35)* はエンドソームからトランスゴルジへの輸送を担うレトロマー複合体のサブユニットであり、レトロマーはエンドソームにおいて MPR などのカーゴ蛋白質の輸送を制御する。従って *RAB7L1-LRRK2* 経路が *VPS35* / レトロマーを介してエンドソーム・リソソーム系輸送経路を制御すると考えられた (MacLeod, Kuwahara et al, *Neuron*, 2013)。さらに我々はマウスや線虫を用いた遺伝学的解析をすすめ、*RAB7L1-LRRK2* 直列経路が線虫の神経突起長の制御やマウス腎臓近位尿管におけるリソソームの形態維持にも働くことを見出した (投稿中)。また、少なくとも線虫においては *RAB7L1* が *LRRK2* の上流で機能することを見出している。しかしこれらの表現型の背後にあるメカニズムの詳細については不明な点が多く残

されていた。

もう1つの PD 病因遺伝子 α -synuclein は、PD 脳に特徴的な Lewy 小体の主要構成成分をコードしており、*LRRK2* と並び重要な病因遺伝子である。しかし PD 連鎖変異型 α -synuclein を齧歯類脳内に単純に発現させても PD 脳内のような蓄積は見られず、可溶性蛋白質である α -synuclein が如何にして脳内に凝集・蓄積していくのかについては長らく不明であった。しかし近年、*in vitro* で凝集させた組換え α -synuclein をマウス脳内に人工的に導入することにより、内因性の α -synuclein が凝集を開始し、さらにその病態が細胞間を伝播して広がっていくことが報告された。この伝播には、凝集 α -synuclein の神経細胞内への取り込み、それを核とした内因性 α -synuclein の凝集化、そして凝集体の細胞外への排出、という一連のステップが必要と考えられるが、これらのステップにおける詳細な分子メカニズムについては未解明であった。

2. 研究の目的

本研究では以下の2点を主要な研究テーマとした。

(1) *RAB7L1-LRRK2* 経路のエンドソーム・リソソームに関連した生理的・病的機能およびそのメカニズムの解明

(2) α -Synuclein の神経細胞内凝集や細胞間伝播にエンドソーム・リソソーム経路が果たす役割の解明

3. 研究の方法

(1) 培養細胞 (神経系・非神経系) を用いた細胞生物学的・生化学的解析、および線虫 *C. elegans* を用いた遺伝学的解析により、*RAB7L1-LRRK2* 経路で機能すると考えられる候補因子 (AP-3 複合体、*VPS35* など) が *RAB7L1* や *LRRK2* とどのような機能的関連を有するかを検討する。また、エンドソーム・リソソーム機能を障害させた場合に *RAB7L1* や *LRRK2* の機能や局在がどのような影響を受けるか解析する。

(2) 組換え α -synuclein 凝集体の導入により内因性 α -synuclein の凝集・伝播を引き起こす培養神経細胞モデルおよびマウスモデルを作出し、*LRRK2*、*RAB7L1* や関連因子 (*VPS35*、AP-3 複合体、*GBA* など) その他のエンドソーム・リソソーム関連因子の効果を検討する。

4. 研究成果

(1) *RAB7L1-LRRK2* 経路の遺伝学的解析

線虫において *RAB7L1* と *LRRK2* のオルソログ分子 (それぞれ *GLO-1*、*LRK-1*) はいずれも機械受容神経細胞の軸索伸長を調節することをこれまでに見出している。*GLO-1* の遺伝学的下流分子として、リソソームへの

特定の積み荷タンパク質の細胞内輸送に重要なアダプタータンパク質 AP-3 複合体が報告されていたことから、まずは AP-3 と LRK-1/LRRK2 の遺伝学的上下関係について検討した。その結果、AP-3 複合体は LRK-1/LRRK2 の下流で機能し、軸索伸長を制御することが分かった。また RAB7L1-LRRK2 経路因子と考えられたレトロマー複合体構成因子 VPS35 との遺伝学的関係についても調べたところ、VPS35 は RAB7L1-LRRK2 経路の上流において機能し、かつ抑制的に作用することが示唆された。

(2) RAB7L1-LRRK2 経路の機能とメカニズムに関する細胞生物学的・生化学的解析

RAB7L1-LRRK2 経路の下流で AP-3 複合体が機能することと考えられたことから、次に LRRK2 と AP-3 との機能的関連について検討した。AP-3 は LAMP1 や LAMP2 などの代表的なリソソーム膜タンパク質のリソソームへの輸送を担うこと、また AP-3 複合体サブユニットを欠損させると LAMP1/2 の輸送障害の結果、細胞表面に LAMP1/2 が集積することが知られている。マウス神経系細胞 N2a 細胞において内因性 LRRK2 または AP-3 複合体サブユニット AP3B1 をノックダウンしたところ、いずれの場合でも抗体ラベルした LAMP1 の細胞表面から初期エンドソームへの輸送は障害されなかったものの、初期エンドソームから後期エンドソーム・リソソームへの輸送が遅延することが見出された。また HEK293 細胞表面の LAMP1/2 局在量を表面ビオチン化法により生化学的に検討したところ、LRRK2, AP3B1 いずれのノックダウンによっても表面 LAMP1/2 量が増加することが見出された。さらに LRRK2 と AP-3 との関係を調べるために両者の結合の有無について免疫沈降法により検討したところ、LRRK2 と AP3B1 の結合が見出された。またその結合部位は LRRK2 の N 末端側であることが示唆された。従って AP-3 複合体は RAB7L1-LRRK2 経路の下流で機能するエフェクター分子である可能性が示唆された。

(3) リソソーム障害と RAB7L1-LRRK2 経路の関連に関する解析

リソソームの機能調節における RAB7L1-LRRK2 経路の役割を解析するため、種々のリソソーム機能障害剤を細胞に投与し、RAB7L1 や LRRK2 の局在を観察した。その結果、複数の作用機序の異なるリソソーム障害剤処理により、RAB7L1 と LRRK2 が肥大化したリソソーム膜表面に移行することが見出された。またこの場合にも RAB7L1 が LRRK2 の上流で機能する可能性が示唆された。さらにリソソーム障害に伴う肥大化は、LRRK2 の欠損によって増悪することが見出された。以上より、RAB7L1-LRRK2 経路がリソソームのメンテナンスに一定の役割を果たす可能性が示唆された。

(4) α -Synuclein 凝集・伝播の *in vitro*, *in vivo* 評価系の確立とエンドソーム・リソソームの関与の検討

大腸菌よりリコンビナント α -synuclein (全長および C 末端欠損型) を精製し、*in vitro* で振とう培養させて凝集させたのち、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞およびマウス初代培養神経細胞に投与することにより、内因性 α -synuclein の細胞内凝集とリン酸化を再現するモデル細胞を構築した。界面活性剤による分画実験から、C 末端欠損型 α -synuclein の凝集体を細胞に導入した場合に内因性の全長 α -synuclein が不溶画分に回収されることが分かった。この系を用いて種々のリソソーム阻害剤や PD 関連因子 (LRRK2、RAB7L1 など) の効果を調べたところ、特定のリソソーム阻害剤処理によって不溶性 α -synuclein が増加することが見出された。一方、細胞外に分泌された内因性 α -synuclein を ELISA により定量したところ、また別の処理下において α -synuclein 分泌が増加または減少する傾向が見出された。

次に、あらかじめ凝集させたリコンビナント α -synuclein をマウス脳内 (線条体) にインジェクションし、3 ヶ月後に脳内における内因性 α -synuclein の蓄積・伝播を観察したところ、特に大脳皮質の一部の層と中脳黒質にリン酸化 α -synuclein 陽性凝集体が多数出現することが確認された。またリン酸化タウや TDP-43 などのタンパク質の蓄積も観察された。そこでこの系を用いて、LRRK2 ノックアウトマウスや VPS35 遺伝子改変マウスに同様のインジェクション実験を施行した。またエンドソーム・リソソーム関連因子の阻害の効果についても検討を開始した。現在、これらの結果の解析を進めている。

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 1 件)

1. Ito G, Fujimoto T, Kamikawaji S, Kuwahara T, Iwatsubo T. Lack of correlation between the kinase activity of LRRK2 harboring kinase-modifying mutations and its phosphorylation at Ser910, 935, and Ser955. *PLOS ONE*, 9(5): e97988, 2014 年 査読有り DOI: 10.1371/journal.pone.0097988.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 江口智也、桑原知樹、上川路翔悟、伊藤弦太、岩坪威 パーキンソン病病因遺伝子 LRRK2 のマクロファージにおける機能の解明 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 2015 年 12 月 1 日 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

2 . Kuwahara T, Inoue K, Iwatsubo T, Abeliovich A. An evolutionarily conserved RAB7L1-LRRK2 pathway regulates lysosome integrity and neurite morphology. Society for Neuroscience 45th annual meeting, 2015 年 10 月 21 日、シカゴ(米国)

3 . Kuwahara T, Inoue K, MacLeod DA, Iwatsubo T, Abeliovich A. The Parkinson disease-associated genes LRRK2 and RAB7L1 define an evolutionarily-conserved regulatory module essential for lysosomal integrity. The 13th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's diseases, 2015 年 3 月 21 日、ニース(フランス)

4 . 江口智也、上川路翔悟、伊藤弦太、桑原知樹、岩坪威 パーキンソン病病因遺伝子 LRRK2 の免疫系における機能の解明 第 33 回日本認知症学会学術集会 2014 年 11 月 29 日 - 12 月 1 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

5 . 藤本哲太、伊藤弦太、上川路翔悟、桑原知樹、岩坪威 パーキンソン病病因遺伝子 LRRK2 の細胞内リン酸化制御機構 第 33 回日本認知症学会学術集会 2014 年 11 月 29 日 - 12 月 1 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 1 件)

1 . 桑原知樹 医歯薬出版 医学のあゆみ 2014 年、2 頁

〔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

桑原 知樹 (KUWAHARA, Tomoki)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10533903