

博士論文

パーキンソン病病因遺伝子産物 LRRK2 による

Rab7L1 リン酸化に関する研究

藤本 哲太

論文題目

パーキンソン病病因遺伝子産物 LRRK2 による

Rab7L1 リン酸化に関する研究

所属

脳神経医学専攻 神経病理学分野

指導教員

岩坪 威 教授

申請者

藤本 哲太

要旨	6
第 1 章 序論	7
1-1 パーキンソン病.....	7
1-2 家族性パーキンソン病.....	8
1-3 PARK1/4.....	8
1-4 PARK2	9
1-5 PARK6	10
1-6 PARK8	11
1-7 PARK17	13
1-8 孤発性 PD の危険因子.....	14
1-9 LRRK2	15
1-9-1 LRRK2 の構造	15
1-9-2 LRRK2 の組織・細胞内局在	17
1-9-3 LRRK2 の機能	18
1-9-4 LRRK2 の基質	19
1-9-5 LRRK2 の FPD 変異による効果	20
1-9-6 LRRK2 と Rab GTPase	21
1-9-7 Rab7L1	22
第 3 章 方法	26
3-1 LRRK2 及び Rab7L1 発現プラスミド	26
3-1-1 真核生物細胞用のヒト LRRK2 発現プラスミドの作製	26
3-1-2 真核生物細胞用のラット Rab7L1 発現プラスミドの作製.....	26
3-1-3 Rab7L1 発現プラスミドへの点変異の導入.....	26
3-1-4 大腸菌用 GST-Rab7L1 発現プラスミドの作製	27
3-2 大腸菌による GST-Rab7L1 の発現と精製.....	28
3-3 抗体	29
3-3-1 リン酸化 Ser72 Rab7L1 特異抗体の作製	29
3-3-2 その他の抗体	30
3-4 哺乳類細胞への遺伝子導入	31
3-4-1 HEK293 細胞及び HeLa 細胞の培養	31
3-4-2 Lipofectamine 3000 を用いたプラスミドの一過性導入	31
3-4-3 Rab7L1 恒常発現 HEK293 細胞株の樹立	32
3-5 Rab7L1 リン酸化の検出	32

3-5-1	<i>In vitro</i> における LRRK2 による Rab7L1 リン酸化反応	32
3-5-2	ウェスタンブロット解析	33
3-5-3	Phos-tag SDS-PAGE 解析	34
3-5-4	LRRK2 阻害剤処理	35
3-5-5	免疫沈降	35
3-6	³² P を用いた代謝ラベリング	37
3-6-1	代謝ラベリングを用いた LRRK2 による Rab7L1 リン酸化の検出	37
3-6-2	Rab7L1 に結合したグアニンヌクレオチドの TLC 法による検出	38
3-7	免疫細胞化学	39
3-8	定量解析	39
3-8-1	ウェスタンブロット解析、Phos-tag SDS-PAGE 解析における定量解析	39
3-8-2	細胞免疫染色による <i>trans</i> -Golgi morphology の定量解析	40
3-8-3	細胞免疫染色による TGN46 陽性である Golgi particle 及びその占有面積 に関する定量解析	40
第 4 章	結果	42
4-1	LRRK2 による Rab7L1 リン酸化	42
4-1-1	<i>In vitro</i> における LRRK2 による Rab7L1 リン酸化	42
4-1-2	細胞内における LRRK2 による Rab7L1 リン酸化	43
4-1-3	LRRK2 キナーゼ活性阻害剤処理による Rab7L1 リン酸化の変化	43
4-2	細胞内における LRRK2 による Rab7L1 リン酸化部位の同定	45
4-2-1	Rab7L1 変異体を用いた LRRK2 によるリン酸化部位の同定	45
4-2-2	リン酸化 Ser72 Rab7L1 特異抗体の作製	46
4-3	FPD 変異型 LRRK2 による Rab7L1 リン酸化	47
4-3-1	FPD 変異型 LRRK2 による Rab7L1 のリン酸化	47
4-3-2	FPD 変異型 LRRK2 による Rab7L1 Ser72 部位リン酸化	49
4-3-3	Rab7L1 リン酸化による GTP/GDP 結合能への影響	50
4-4	LRRK2 による Rab7L1 リン酸化と Rab7L1 細胞内局在との関係	51
4-4-1	細胞内における Rab7L1 の局在	52
4-4-2	LRRK2 による各種変異型 Rab7L1 のリン酸化	52
4-5	LRRK2 による Rab7L1 リン酸化と <i>trans</i> -Golgi の形態	53
第 5 章	考察	57
5-1	LRRK2 による Rab7L1 リン酸化について	57
5-2	LRRK2 による Rab7L1 リン酸化部位同定について	59

5-3 FPD 変異型 LRRK2 による Rab7L1 リン酸化の亢進について	62
5-4 LRRK2 による Rab7L1 リン酸化と <i>trans</i> -Golgi の形態について	64
5-5 LRRK2 による Rab GTPase のリン酸化について	66
第 6 章 結論	68
図表	82

要旨

近年、孤発性パーキンソン病の危険因子として推定される Rab7L1 は LRRK2 と協働してエンドソーム・リソソーム経路を調節することが明らかになったが、その分子機構については不明であった。

本研究で申請者は、Rab7L1 が LRRK2 の基質であると仮説を立て、LRRK2 による Rab7L1 リン酸化についての検討、及びその機能的意義の解明を目的とし、検証を行った。その結果、細胞内において LRRK2 が Rab7L1 の 72 番目のセリン残基をリン酸化し、FPD 変異型 LRRK2 の共通の効果として、リン酸化 Ser72 Rab7L1 を増加させることを見出した。また、細胞内において LRRK2 が Ser72 Rab7L1 のリン酸化を介して *trans*-Golgi 網の形態の制御に関与する可能性を示唆した。本研究は、LRRK2 による PD 発症の分子機構の解明に示唆を与える知見を加えるものである。

第1章 序論

1-1 パーキンソン病

パーキンソン病 (Parkinson's disease; PD) は、1817 年に James Parkinson が 6 例の振戦と運動障害を呈した患者について報告し、1888 年に Jean Martin Charcot によって名付けられたものである [1]。PD はアルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) に次いで患者数の多い神経変性疾患であり、高齢期、特に 50-60 歳代以降に発症する [1]。臨床症状として、筋固縮、安静時振戦、無動、姿勢反射障害に代表される進行性の運動障害を示す。病理学的特徴として、中脳黒質の DA (ドパミン) 神経細胞や青斑核のノルアドレナリン神経細胞の選択的脱落と、残存する神経細胞の細胞質内における Lewy 小体 (Lewy body; LB) や Lewy neurite (LN) と呼ばれる線維性封入体の出現を特徴とする [1]。

中脳黒質から線条体や淡蒼球に投射する DA 神経は、錐体外路系と呼ばれる運動の不随意的調節を行う経路の一部を形成していることが知られており、この箇所の変性、脱落により、振戦をはじめとする運動障害を呈するものと考えられている。PD における運動障害は投射先への DA 補充により改善され、DA の前駆体である L-DOPA の投与が治療として行われている。また、線条体における DA 神経系に拮抗しているアセチルコリン系神経を抑制する治療も行われ

てきた。しかし、これらの治療法は症状を緩和させる対症療法であり、病態解明に基づく根本的治療法の確立は急務である。

1-2 家族性パーキンソン病

PD の大部分は孤発例であるが、一部に遺伝性にパーキンソニズムを呈する家系が存在し、家族性パーキンソン病 (familial Parkinson's disease; FPD) と総称される。これらの家系の連鎖解析から、これまでに多くの遺伝子座との連鎖が報告されている (図表 1)。これらの遺伝子産物がパーキンソニズムの発症において果たす分子機構を解明することで、孤発性 PD の分子病態の解明に繋がると期待されている。以下、本研究の主題である LRRK2 に関連の深い、幾つかの代表的な病型に関して略述する。

1-3 PARK1/4

最初に行われた FPD 家系の連鎖解析において、FPD に連鎖する遺伝子座が同定され、*PARK1* と名付けられた[2]。その翌年に、常染色体優性遺伝性の PD 家系において、53 番目のアラニン残基がスレオニン残基に置換した点変異 (A53T) が α -synuclein タンパク質をコードする *SNCA* 遺伝子に同定された[3]。また、こ

れまでに A30P や E46K といった他のアミノ酸残基を置換する点変異も PD 家系から同定されている[4][5]。さらに、PD や Lewy 小体型認知症でみられる Lewy 小体の主要構成成分として α -synuclein が同定された[6][7]。

PARK4 において α -synuclein を含む *SNCA* 遺伝子座の triplication が報告されており[8]、triplication により α -synuclein タンパク質の発現量が約 2 倍に増加する[9]。これらのことより、 α -synuclein の過剰な発現や異常な凝集、蓄積が PD における神経変性の原因である可能性が示唆された。また、 α -synuclein は LB などの主要構成成分であることから、孤発性 PD の病態においても重要な役割を果たしていると推察される。

1-4 PARK2

PARK2 に連鎖する FPD 家系は 1997 年に Matsumine らによって報告され[10]、翌年に責任遺伝子として *Parkin* が同定された[11]。発症年齢が 10-40 歳代と若く、病理学的には黒質、青斑核に局限して神経細胞の脱落が認められる。また、PD の病理学的特徴である LB は原則として認められない[12]。これらのことから、*Parkin* 遺伝子の変異による FPD は常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソニズム (autosomal-recessive juvenile parkinsonism; AR-JP) として、孤発性 PD や類似の

所見を示す FPD とは異なる病型として区別されている。

Parkin タンパク質はアミノ末端側にユビキチン様ドメイン構造、カルボキシル末端側に RING-IBR-RING ドメインと呼ばれる特徴的な 2 つの RING finger モチーフを有している。また、ユビキチン E3 リガーゼ活性を有することが報告されている[13]。定常状態において Parkin は細胞質に不活性型として存在しており、ミトコンドリアが障害されると活性化され、ミトコンドリア外膜上に移行して基質をユビキチン化し、異常なミトコンドリアを隔離、分解することが報告されている[14][15]。このことから、Parkin の機能喪失によって、ミトコンドリア品質管理が障害されて PD 発症につながる可能性が推定されている。

1-5 PARK6

PARK6 に連鎖する FPD は発症年齢が 30-40 歳代と比較的若年性であり、*PARK2* と同類の AR-JP に分類される。2004 年に *PINK1* (*PTEN-induced kinase 1*) 遺伝子が、常染色体劣性遺伝性の責任遺伝子として同定された[16]。アミノ末端側に mitochondrial targeting motif を有し、ミトコンドリアまたは細胞質に存在していることが知られている[17]。*PINK1* はセリン/スレオニンキナーゼドメインを有しており、*PARK6* に連鎖した遺伝子変異がキナーゼドメインに集中しているこ

とから、キナーゼ活性の喪失が神経変性に関与している可能性が予想された。

ショウジョウバエを用いた解析において、PINK1 ノックアウトモデルが Parkin ノックアウトモデルと類似のミトコンドリアの異常を呈し、過剰発現によるレスキュー実験によって PINK1 が Parkin と同一のシグナル伝達経路上の上流に位置することが示唆された[18][19]。PINK1 は正常なミトコンドリアにおいて、膜電位依存的に分解を受けている。しかし、ミトコンドリアの異常に伴ってミトコンドリア外膜上に蓄積し、228 番目と 402 番目のセリン残基を自己リン酸化することで下流にミトコンドリアの異常を伝達することが報告されている[14][20]。さらに、このシグナルが下流である細胞質に存在する Parkin に伝達されることで、Parkin がミトコンドリア外膜に移行して活性化される[14]。以上より、PINK1 が Parkin と協調して、ミトコンドリア品質管理に関与していることが示唆された。

1-6 PARK8

PARK8 遺伝子座に連鎖する FPD は、日本の相模原の家系で最初に報告され[21][22]、2004 年に *LRRK2* (*leucine-rich repeat kinase 2*) 遺伝子が責任遺伝子であることが明らかになった[23][24]。これまでに N1437H、R1441C/G/H、Y1699C、

G2019S、I2020T の 7 種類のアミノ酸変異を伴う遺伝子変異が FPD に連鎖することが知られており、日本の相模原家系からは I2020T 変異が同定された[25]。7 種類の FPD に連鎖する変異の中で G2019S 変異が最も頻度が高く、アッシュケナー系ユダヤ人の FPD 患者の 29.7%、北アフリカ系アラブ人の FPD 患者の 37% を占めることが報告されている[26][27]。また、その他の人種も含めると、FPD 患者が G2019S 変異を有する頻度は、約 7%を占めている[28]。

LRRK2 遺伝子変異を有する PD 患者における平均発症年齢は約 58 歳であり、孤発性 PD に類似した臨床所見を呈することが報告されている[29]。*LRRK2* 遺伝子変異による FPD では、同一の変異を有していても病理所見に多様性があることが指摘された。G2019S 変異では典型的な LB 陽性の病理所見を呈する例が多いが、LB 陰性で tau 陽性の封入体を伴う例や、封入体を伴わないが黒質病変を示す症例なども報告されている[30]。R1441C 変異や Y1699C 変異をもつ患者の剖検脳では、 α -synuclein や tau 陰性だが、ユビキチン陽性の封入体を示す症例もある[24]。相模原の FPD 家系では黒質、青斑核に神経変性が限局しており、LB は 1 例のみで認められ、多系統萎縮症に類似したグリア細胞の細胞質封入体が認められた例も報告されている[31]。また、日本人や中国人などのアジア人の FPD あるいは孤発性 PD 患者において、健常人と比較して頻度の高い遺伝子多型

G2385R が危険因子として報告されている[32][33][34]。健常人においても人口の 3.6-5%において G2385R の多型が発見されており、危険因子であるもののそれだけでは PD 発症に十分ではなく、環境因子や遺伝学的背景などの他の因子の関与によって PD 発症の確率が影響されると考えられている[35]。

1-7 PARK17

常染色体優性遺伝性の PD 家系を対象としたエクソンシーケンシングによる遺伝子解析によって、*PARK17* の責任遺伝子として *VPS35* (*vacuolar protein sorting-associated protein 35*) 遺伝子が同定された[36][37]。*VPS35* 遺伝子変異を有する PD 患者における平均発症年齢は約 52 歳であり、典型的な PD の臨床所見を呈することが報告されている。病理所見については、これまでに *VPS35* 遺伝子変異を有する患者脳の剖検例がなく、病理学的解析が待たれている。

VPS35 はエンドソームからゴルジ体への積荷タンパク質の逆行性輸送を担うレトロマーの構成因子であることが知られている[38]。FPD 変異型 *VPS35* は、レトロマー複合体を形成するが、 α -synuclein の分解酵素として知られる cathepsin D の受容体である MPR (mannose 6-phosphate receptor) の輸送異常や成熟型の cathepsin D の減少を引き起こすことが報告されている[39]。また、培養神経細胞

において VPS35 のノックダウンまたは FPD 変異型 VPS35 の過剰発現が、MPR の輸送異常や神経突起の退縮を引き起こすことが報告されている[40]。さらに孤発性 PD 患者の中脳黒質や大脳皮質において、VPS35 mRNA が減少していることから[40]、VPS35 の機能低下によって細胞内輸送が障害され、PD 発症につながる可能性が考えられている。

1-8 孤発性 PD の危険因子

PD 患者の約 9 割以上は孤発性に発症する。ゲノム解読技術の発展に伴って、孤発性疾患のリスクとなる遺伝子を探索できるようになった。孤発性 PD は複数の因子が原因で発症する多因子疾患であると考えられ、GWAS (genome-wide association study) による危険因子の探索が複数行われた。これまでに GWAS やそのメタ解析によって複数の遺伝子多型が孤発性 PD の危険因子として同定されているが、その中でも FPD の責任遺伝子である α -synuclein や *LRRK2*、FTDP-17 (frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17) の責任遺伝子である *MAPT*、さらに *PARK16* や *BST-1* などが複数の解析において報告されている[41][42][43][44][45][46][47]。これらの遺伝子多型は、疾患への影響度は低いものの、頻度が高いために多くの患者にあてはまる可能性がある。

1-9 LRRK2

1-9-1 LRRK2 の構造

LRRK2 タンパク質は 2527 アミノ酸からなるサイズの大きな可溶性タンパク質であり、同一分子内に複数のドメイン構造を有している。アミノ末端側から順に、LRRK2 に特異的にみられるリピート構造 (LRRK2-specific repeat)、LRR (leucine-rich repeat) ドメイン、ROC (Ras of complex proteins) ドメイン、COR (carboxyl-terminal of ROC) ドメイン、kinase ドメイン、WD40 repeat が存在する (図表 3)。

LRRK2-specific repeat は、LRRK2 の最もアミノ末端側にあり、33-34 アミノ酸が 14 回繰り返される、約 700 アミノ酸からなる領域である。タンパク質間の相互作用において足場の働きを果たすと考えられているが[48]、機能の詳細は明らかになっていない。

LRR ドメインは 13 回の繰り返し配列からなり、様々なタンパク質にみられるモチーフである。これまでに様々なタンパク質の LRR ドメインの立体構造の X 線結晶構造解析により、 α -helix と β -strand がループで接続された単位構造を繰り返していることが明らかになっている。また LRRK2 の LRR ドメインについ

ては template assembly approach によってその構造が予測されている[49]。このような繰り返し配列は、タンパク質間の相互作用の際の足場として機能することが多く、LRRK2 においても同様の機能を有していると考えられている。

ROC ドメインは、低分子量 GTP 結合タンパク質に相同性が高い構造である[50]。また、GTP 結合活性及び GTP 加水分解活性を有していることが報告されており、GTP 結合能を欠損する変異を ROC ドメイン内に導入した LRRK2 がキナーゼ活性を消失することから、キナーゼ活性の発揮には ROC ドメインへの GTP 結合が必要であると考えられている[51][52]。

COR ドメインは LRRK2 が属する ROCO protein ファミリーにおいて、ROC ドメインのカルボキシル末端側に必ず存在するドメイン構造である。種間やホモログ間において保存性の高いサブドメイン構造を有していることから、ROC ドメインの機能に重要な役割を果たしていると考えられているが、機能については未だ明らかになっていない。

kinase ドメインは、典型的な kinase タンパク質に共通するサブドメイン構造を有しており、セリン/スレオニンキナーゼ活性を有していることが知られている[53]。WD40 repeat は、トリプトファン-アスパラギン酸で終わる 44-60 アミノ酸の繰り返し配列である。真核生物を中心に 160 以上のタンパク質が WD40 repeat

を有していることが報告されている[54]。

WD40 repeat もタンパク質間の相互作用の足場として機能するとの報告が多く、LRRK2 においてもタンパク質との相互作用に重要である可能性が考えられている。また WD40 repeat よりもカルボキシル末端側を欠損させた LRRK2 はキナーゼ活性が低下することから、キナーゼ活性を調節する上で重要な役割を果たしている可能性がある[55]。

LRRK2 遺伝子産物のアミノ酸配列は、ヒト LRRK2 と霊長類 LRRK2 の間で 90% 以上、齧歯類 LRRK2 においても 75% 程度の相同性が保たれている。新口動物においては、LRRK2 のパラログとして LRRK1 が存在する。ヒト LRRK1 は 2014 アミノ酸からなり、LRRK2 における LRRK2-specific repeat の代わりに ankyrin repeat を有しており、その他は LRRK2 と同様のドメイン構造を有する[56]。

1-9-2 LRRK2 の組織・細胞内局在

ヒトや齧歯類において、LRRK2 mRNA やタンパク質は腎臓、肺、脾臓、リンパ節などで発現が高く、脳においても発現が確認されている[57][58][59]。また、LRRK2 タンパク質の脳内における分布を免疫組織化学的に解析したところ、ヒト、マウスの両方において脳内の比較的広範囲に存在し、主に神経細胞が染色

されることが報告されている[60]。また培養細胞に全長 LRRK2 を過剰発現させて細胞内における局在を解析したところ、LRRK2 は細胞質に散在性またはドット状に染色された[53]。過剰発現させた LRRK2 を生化学的に分画すると、細胞質画分のみならず、ミクロソーム画分にも回収された[61]。このことから、LRRK2 は細胞質内の細胞小器官の膜上にも存在している可能性が考えられる。

1-9-3 LRRK2 の機能

これまでに LRRK2 の機能を解明するために、培養細胞やマウスなどを用いてノックダウンによる解析が行われてきた。初代培養神経細胞において、shRNA による LRRK2 のノックダウンを行うと、神経突起の伸長や分枝数の増加といった表現型がみられ、LRRK2 を過剰発現すると逆の表現型を呈することが示された[62]。このことから LRRK2 は神経突起の伸長および分枝に関与する可能性が考えられた。LRRK2 の過剰発現による神経突起の形成異常は、PD における黒質の細胞体の脱落に先行して線条体の神経軸索変性が生じるという病態に関与している可能性が考えられている[63]。

Lrrk2 を欠損させたマウスにおいては、PD 患者脳で観察される中脳黒質の DA 神経細胞の変性などの脳内での変化はみられないものの、異常に肥大化したり

ソソームが腎臓や肺などの一部の組織において蓄積することが複数の研究グループから報告されている[64][65][66][67][68]。これらの解析から、LRRK2 は腎臓におけるリソソームの恒常性維持に関与することが示唆されている。

1-9-4 LRRK2 の基質

LRRK2 は kinase ドメインを有していることから、キナーゼ活性が神経変性に関与していると考えられ、基質の同定が PD 発症メカニズム解明の重要な手掛かりになると期待された。2007 年に Jaleel らは KESTREL (kinase substrate tracking and elucidation) 法により、ERM (ezrin/radixin/moesin) protein family に属し、アクチン細胞骨格と細胞膜のアンカータンパク質である moesin が *in vitro* における基質であることを見出した[55]。しかし、moesin は *in vitro* において LRRK2 によってリン酸化されるものの、細胞内における LRRK2 キナーゼ活性依存的なリン酸化は検出されなかった。

2012 年に Samer らによって、細胞内において EndophilinA が LRRK2 によってリン酸化されることが報告され[69]、2014 年には Martin らによって、ribosomal protein S15 が細胞内において LRRK2 によってリン酸化されることが報告された[70]。そして近年になり、遺伝学的手法と薬理学的手法、リン酸化プロテオミク

スを用いたスクリーニング解析により、細胞内における小胞輸送制御に関わることが広く知られている Rab GTPase ファミリー分子である Rab8a、10、12 が LRRK2 によって細胞内でリン酸化される基質としてはじめて確実に同定された [71]。これらの 3 つの Rab GTPase のリン酸化部位は、ファミリー分子間で高度に保存された switch II と呼ばれる領域内に存在する相同な部位であり、他の Rab GTPase の中にも該当する部位を有するものが複数存在することから、他にも LRRK2 によってリン酸化される Rab GTPase が存在する可能性が示唆された。またごく最近、他の複数の Rab GTPase も細胞内において、LRRK2 によるリン酸化を受けることが報告された [72][73]。

1-9-5 LRRK2 の FPD 変異による効果

初代培養神経細胞や神経芽細胞腫由来の培養細胞に FPD 変異型 LRRK2 を過剰発現させると、野生型に比較して神経突起の退縮やアポトーシスの増加を生じることが報告されている [40][62][74]。また、キナーゼ活性を喪失した変異型 LRRK2 を用いると細胞死がみられないことから、FPD 変異による毒性はキナーゼ活性依存的であることが示唆されている [74]。野生型及び G2019S 変異型 LRRK2 トランスジェニックマウスの線条体において、野生型マウスと比較して

trans-Golgi の断片化が増加することが報告されている[75]。他にも I2020T 変異型 LRRK2 トランスジェニックマウスの中脳黒質の DA 神経細胞において、野生型マウスと比較してゴルジ体の断片化が増加していることが報告されている[76]。ゴルジ体の断片化は AD[77]や筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis; ALS）[78]などの神経変性疾患においてもみられることから、神経細胞障害との関係が注目されている。

1-9-6 LRRK2 と Rab GTPase

これまでの LRRK2 に関する研究から、LRRK2 は細胞内輸送の制御に関与することが示唆されており、特に近年は細胞内輸送のスイッチ分子として知られる Rab GTPase との関連が注目されている。Rab GTPase は Ras GTPase ファミリーに属する small GTPase であり、ヒトでは 60 種類以上の異なるアイソフォームが存在している[79]。Rab GTPase は GTP/GDP との結合能を有しており、GTP と結合している時には特定の細胞小器官の膜と結合する活性化状態、GDP と結合している時には細胞質に留まる不活性化状態をとる。この 2 つの状態を切り替えることで細胞内輸送を制御している[79]。これまでに LRRK2 は Rab7 の活性を介して EGFR の初期エンドソームから後期エンドソームへの輸送を制御して

おり、LRRK2 の G2019S 変異を有する PD 患者由来の線維芽細胞では、Rab7 の活性が低下することが報告されている[80]。また Rab32 と相互作用することが報告されている[81]。

1-9-7 Rab7L1

孤発性 PD の危険因子として推定される Rab7L1 (Rab7-like variant 1) はヒト placenta cDNA ライブラリーから randomly selected expressed sequence tag を用いた解析から、Rab7 と配列相同性がある Rab GTPase として同定された[82]。Rab7L1 は LRRK2 と遺伝学的に相互作用し、LRRK2 と協働してリソソーム加水分解酵素の運搬を担う MPR の細胞内輸送、リソソームや神経突起の形態を調節することが報告されている[40]。Rab7L1 は細胞内において、主にゴルジ体に局在しており、Rab7L1 をノックダウンすると *trans*-Golgi の断片化が生じることから、*trans*-Golgi の形態制御に関与している可能性が考えられている[83][84]。また、培養細胞に LRRK2 と Rab7L1 を過剰発現させると、細胞内で結合し、オートファジー・リソソーム経路を介して TGN (*trans*-Golgi network) の分解を促進することが知られている[85]。

Rab7L1 を欠損したマウスでは、*Lrrk2* 欠損マウスに類似して、腎臓などの一

部の組織で異常に肥大化したリソソームや老廃物であるリポフスチンの蓄積が観察された[68]。以上より、Rab7L1 はゴルジ体やリソソームの恒常性維持に関与している可能性が考えられた。

第2章 本研究の目的

LRRK2 遺伝子変異を有する PD 患者の臨床及び病理学的所見が孤発性 PD に類似していることや、孤発性 PD の危険因子としても同定されていることから、*LRRK2* は *PARK8* に連鎖する FPD のみならず、孤発性 PD の発症にも重要な役割を果たしていると考えられる。

これまでに *LRRK2* は、様々な細胞内輸送制御に関わる分子との関連が報告されており、特に細胞内輸送のスイッチ分子として知られる Rab GTPase ファミリー分子のいくつかは基質として同定されている。*LRRK2* との関連が報告されている Rab GTPase の中でも、特に孤発性 PD の危険因子と推定されている Rab7L1 は *LRRK2* と遺伝学的に相互作用し、*LRRK2* と協働して神経突起の形態やリソソーム加水分解酵素の運搬を担う MPR の細胞内輸送、リソソームの形態を調節することが報告されている。また、培養細胞において *LRRK2* と Rab7L1 を過剰発現すると、両者は細胞内で結合し、オートファジー・リソソーム経路を介して TGN の分解を促進することが報告されている。*LRRK2* と Rab7L1 に関する詳細な分子機構の解明は、FPD のみならず孤発性 PD の神経変性の原因を明らかにする糸口となるものと考えられるが、その詳細は未だ不明である。

そこで本研究では、Rab7L1 が *LRRK2* の細胞内における基質として有力な候

補であると想定し、LRRK2 による Rab7L1 リン酸化の詳細を生化学的解析する

とともに、その機能的意義を解明することを目的とし、検討を行った。

第3章 方法

3-1 LRRK2 及び Rab7L1 発現プラスミド

3-1-1 真核生物細胞用のヒト LRRK2 発現プラスミドの作製

SV40 複製開始点を有し、選択マーカーとしてネオマイシン耐性遺伝子を持つ真核細胞用発現ベクターp3xFLAG-CMV-10 の NotI - Asp718 サイトにヒト野生型及び変異型 (K1906M、R1441C/G/H、Y1699C、G2019S、I2020T) 全長 LRRK2 が挿入された LRRK2 発現プラスミドは、当研究室に所属していた伊藤弦太博士、上川路翔悟博士により作製された。

3-1-2 真核生物細胞用のラット Rab7L1 発現プラスミドの作製

SV40 複製開始点をもち、選択マーカーとしてネオマイシン耐性遺伝子を持つ真核生物用発現ベクターpEGFP-C1 の BglIII - EcoRI サイトにラット野生型及び変異型 (T21N、Q67L) 全長 Rab7L1 が挿入された Rab7L1 発現プラスミドは、Columbia 大学 (NY, USA) の Asa Abeliovich 准教授から供与いただいた。

3-1-3 Rab7L1 発現プラスミドへの点変異の導入

pEGFP-C1 ベクターに挿入された Rab7L1 への点変異導入は、pEGFP-C1

Rab7L1 (WT) プラスミドを鋳型とし、site-directed mutagenesis 法による部位特異的変異導入を行った。プライマーは図表 4 の組み合わせをそれぞれ用いた。図表 4 のプライマーと Platinum Pfx DNA polymerase (Invitrogen) を用いて、PCR 反応を行った。PCR 条件は、95°C、2 分間熱変性後、95°C、30 秒間熱変性、60-70°C、1 分間アニーリング、68°C、8 分間 DNA 合成を 16 回繰り返し、非特異的な増幅を除くためにさらに 68°C、10 分間 DNA 合成を行い、点変異を導入した。その後、PCR 反応液に DpnI を添加し、37°C で 2 時間以上反応させることで鋳型 DNA を切断した。反応液を DH5 α competent cell (TaKaRa) に形質転換後、S.O.C.培地を加えて 37°C、1 時間振とう培養を行った。その後、全量を 50 μ g/ml Kanamycin (和光純薬) を含む LB プレート上にまき、37°C、12-14 時間培養した。Kanamycin による選別を受けたコロニーを回収し、50 μ g/ml Kanamycin を含む LB 培地で培養後、アルカリ SDS 法による mini prep を行い、プラスミドを精製した。その後、精製したプラスミドの塩基配列についてシーケンスを行い、確認した。

3-1-4 大腸菌用 GST-Rab7L1 発現プラスミドの作製

pBR322 複製開始点を有し、大腸菌用発現ベクター pDEST15 にラット野生型全長 Rab7L1 が挿入された Rab7L1 発現プラスミドは、当研究室の桑原知樹博士に

より作製された。

3-2 大腸菌による GST-Rab7L1 の発現と精製

pDEST15-GST-Rab7L1 プラスミドを BL21 (DE3) competent cell (Novagen) に形質転換後、S.O.C. 培地を加えて 200 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin (和光純薬) を含む LB プレート上にまき、37°C で一晩培養した。Ampicillin による選別を受けたコロニーを回収し、200 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin を含む 50 ml LB (amp+) 培地で一晩振とう培養した。その後、25 ml を 250 ml LB (amp+) 培地に移し、37°C で 1.5 時間振とう培養した。終濃度 0.1 mM となるように Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を加え、さらに 3-4 時間振とう培養してタンパク質の発現を誘導した。その後、培養液を回収し、4000 rpm、8 分間遠心後、菌体を Phosphate buffered saline (PBS; 8 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、2 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、131 mM NaCl) で一回洗浄した。菌体に sonication buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、50 mM NaCl、1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、1 mM dithiothreitol (DTT)) を 10 ml 加えて懸濁し、超音波破碎を行った。その後、終濃度 1% となるように Triton X-100 を加え、転倒混和して氷上で 5 分間静置した。10000 rpm、30 分間遠心後、回収した上清に sonication buffer で平衡化した 50% Glutathione Sepharose 4B (GS4B; GE

healthcare Bioscience) を 1 ml 加え、4°Cで一晩転倒混和した。5000 rpm、5 分間遠心後、沈降した GS4B ビーズを PBS-T (0.5% Triton X-100、PBS) で 3 回洗浄した。Sonication buffer で 1 回洗浄後、Elution buffer (16 mM glutathione (還元型; 和光純薬)、50 mM Tris-HCl (pH 9.6)) を 500 μ l 加えて懸濁し、4°C、10 分間転倒混和した。5000 rpm、5 分間遠心後、上清を回収し、Tris-buffered saline (TBS; 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl) で透析を行った。

3-3 抗体

3-3-1 リン酸化 Ser72 Rab7L1 特異抗体の作製

KLH (keyhole limpet hemocyanin) に結合させたリン酸化ペプチド (QERFT(p)SMTRLYYRDASAC) をウサギに 7 週間で計 7 回免疫し、血清を回収して ELISA により力価を確認した。血清を非リン酸化ペプチドが結合したカラムによるアフィニティー精製を行い、その後非吸着画分を用いてリン酸化ペプチドが結合したカラムによるアフィニティー精製を行った。吸着画分を回収し、これをリン酸化抗体とした。これらの操作については、GL Biochem 社 (上海、中国) に委託し、行った。

3-3-2 その他の抗体

その他、以下の抗体を解析に用いた。

ウェスタンブロット、Phos-tag SDS-PAGE 解析に用いた抗体

・1 次抗体

Anti-FLAG 抗体 (M2; mouse monoclonal antibody, Sigma-Aldrich)

Anti-p-Ser1292 LRRK2 抗体 (ab203181; rabbit monoclonal antibody, abcam)

Anti-GFP 抗体 (A11122; rabbit polyclonal antibody, Invitrogen)

Anti-Rab7L1 抗体 (2B8; mouse monoclonal antibody, Sigma-Aldrich)

・2 次抗体

Anti-mouse IgG-HRP 抗体 (Jackson ImmunoResearch)

Anti-rabbit IgG-HRP 抗体 (Jackson ImmunoResearch)

免疫細胞化学に用いた抗体

・1 次抗体

Anti-FLAG 抗体 (M2; mouse monoclonal antibody, Sigma-Aldrich)

Anti-TGN46 抗体 (AHP500GT; sheep polyclonal antibody, BIO-RAD)

・2 次抗体

Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 546
(Invitrogen)

Donkey anti-Sheep IgG (H+L) Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647
(Invitrogen)

3-4 哺乳類細胞への遺伝子導入

3-4-1 HEK293 細胞及び HeLa 細胞の培養

HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) 細胞及び HeLa 細胞は、ペニシリン (50 U/ml) / ストレプトマイシン (50 μ g/ml) (Invitrogen) 及び 10% 非働化ウシ胎児血清 (FBS; Fetal Bovine Serum) (biowest, S1820) を含む高グルコースダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM; Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma-Aldrich) (DMEM (+/+)) を用いて、5% CO₂を満たした 37°C湿式インキュベータ (Thermo Scientific) 内で培養した。

3-4-2 Lipofectamine 3000 を用いたプラスミドの一過性導入

HEK293 細胞もしくは HeLa 細胞を 12 well プレートに 8.8×10^4 cells/well の密度で撒き、24 時間培養後に Lipofectamine 3000 (Invitrogen) を用いて遺伝子導入

を以下のように行った。50 μ l の Opti-MEM (Gibco) と 1.5 μ l の Lipofectamine 3000 を軽く混和し、室温で 5 分間静置した (A 液)。また 50 μ l の Opti-MEM と 2 μ l の P3000、600 ng のプラスミドを混和した (B 液)。A 液と B 液を混和し、室温で 5 分間静置した。その後、A+B 液全量を well に直接滴下した。その後、48 時間培養した。6 well プレート、6 cm dish を用いる場合には、細胞及び遺伝子導入試薬をそれぞれ 3 倍、5 倍にスケールアップして用いた。

3-4-3 Rab7L1 恒常発現 HEK293 細胞株の樹立

HEK293 細胞に 3-1-4 で作製した野生型及び S72A 変異型 Rab7L1 プラスミドを 3-4-2 の方法で遺伝子導入した。24 時間後に 500 μ g/ml G-418 (Roche) を含む DMEM に培地を交換した。その後、3 日ごとに G-418 を含む DMEM に培地を交換し、継代しながら 1 ヶ月培養した。そして、G-418 の存在下で正常に増殖したものを回収し、ウェスタンブロット解析により発現確認を行い、ポリクローン株とした。

3-5 Rab7L1 リン酸化の検出

3-5-1 *In vitro* における LRRK2 による Rab7L1 リン酸化反応

3-2 で精製した組換え GST-Rab7L1 タンパク質 4 μg と市販の組換え FLAG-LRRK2 (G2019S) タンパク質 (A15200; Life technologies) 1 μg を 2 x Reaction Mix (100 mM Tris-HCl (pH7.5)、40 mM MgCl_2 、4 mM DTT、0.2 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA)、2 mM adenosine triphosphate (ATP)) に加え、ThermoMixer compact (Eppendorf) で 30°C、900 rpm、1 時間の条件でミキシングしながらインキュベートした。その後、終濃度が 1% (v/v) となるように 2-mercaptoethanol を加えた NuPAGE 4 x LDS sample buffer (Invitrogen) (4 x SB(+)) を加えて反応を止めた。その後、5 分間煮沸した。

3-5-2 ウェスタンブロット解析

遺伝子導入 48 時間後の HEK293 細胞を Dullbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS; 8 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、1.5 mM KH_2PO_4 、150 mM NaCl、2.7 mM KCl) で 1 回洗浄後、Lysis buffer (0.5% Tween-20、PhosSTOP (Roche)、Complete EDTA-free (Roche)、TBS) を加え、4°C で 30 分間可溶化した。14000 rpm、5 分間遠心し、上清の可溶画分を用いて BSA 法によるタンパク質定量を行った。4 x SB (+) を加えてサンプルを調製後、5 分間煮沸し、ノーマルゲル (ランニングゲル; 6.5% or 10% (w/v) acrylamide/bis mixed solution (30:0.8)、375 mM Tris-HCl (pH 8.8)、0.1%

(w/v) SDS 、 0.05% (w/v) ammonium persulfate (APS) 、 0.15% N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)、スタッキングゲル; 4% (w/v) acrylamide/bis mixed solution (30:1.5)、125 mM Tris-HCl (pH 6.6)、0.1% (w/v) SDS, 0.08% (w/v) APS、0.25% (w/v) TEMED)を用いて SDS-PAGE によりタンパク質を分離した。分離したタンパク質を blotting buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 10% methanol) 中で 226 mA、2 時間の条件で PVDF 膜 (Millipore) に転写後、5% skim milk/TBS-T (0.1% Tween-20、TBS)、もしくは 3% Bovine serum albumin/TBS-T を用いて室温で 30 分間ブロッキングした。TBS-T で洗浄後、イムノエンハンサー A 液 (和光純薬) を用いて適切な濃度に希釈した各種 1 次抗体と 4°Cで一晩反応させた。TBS-T で 5 分間洗浄を 3 回繰り返し、イムノエンハンサー B 液 (和光純薬) で 10000 倍に希釈した HRP (Horseradish peroxidase) 標識各種 2 次抗体と室温で 45 分間反応させた。TBS-T で 10 分間洗浄を 3 回繰り返し、ImmunoStar detection kit (和光純薬) あるいは SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo) による化学発光を LAS-4000 mini system (富士フイルム) を用いて検出した。

3-5-3 Phos-tag SDS-PAGE 解析

3-5-2 と同じように調整したサンプルを Phos-tag ゲル (ランニングゲル; 7.5% (w/v) acrylamide/bis mixed solution (30:0.8)、375 mM Tris-HCl (pH 8.8)、0.1% (w/v) SDS、0.05% (w/v) APS、0.15% TEMED、50 μ M Phos-tag Acrylamide (和光純薬)、100 μ M MnCl₂、スタッキングゲル; 4% (w/v) acrylamide/bis mixed solution (30:1.5)、125 mM Tris-HCl (pH 6.6)、0.1% (w/v) SDS、0.08% (w/v) APS、0.25% (w/v) TEMED) で電気泳動し、タンパク質を分離した。泳動後の Phos-tag ゲルを 5 mM EDTA を含む blotting buffer で 10 分間洗浄を 2 回、blotting buffer で 10 分間洗浄した。PVDF 膜への転写からは 3-5-2 と同様の操作を行った。

3-5-4 LRRK2 阻害剤処理

3-4-2 の方法で遺伝子導入した HEK293 細胞に、LRRK2 阻害剤処理を以下のように行った。ジメチルスルホキシド (DMSO) に選択的 LRRK2 キナーゼ阻害剤である GSK2578215A (Sigma-Aldrich) を溶解し、終濃度 5 μ M となるように DMEM (+/-) で希釈したものを回収の 1、3、5、10 分前に培地と交換した。その後、サンプルを回収した。

3-5-5 免疫沈降

免疫沈降には以下の抗体もしくは抗体結合ビーズを用いた。

Anti-GFP 抗体 (11814460001; mixture of two mouse monoclonal antibodies, Roche)

GFP-Trap-A (chromotek)

遺伝子導入 48 時間後の HEK293 細胞を DPBS で 1 回洗浄後、Lysis buffer を加え、4°C で 30 分間可溶化した。14000 rpm、5 分間遠心し、上清の可溶画分を用いて BSA 法によるタンパク質定量を行った。

Anti-GFP 抗体を用いた場合

上清に 2 μ l ずつ Anti-GFP 抗体を加え、4°C で 3 時間転倒混和した。その後、50% protein G agarose (Roche) を 20 μ l ずつ加えて 4°C で一晩転倒混和した。5000 rpm、3 分間遠心後、wash buffer (0.5% Triton X-100、TBS) でビーズを 3 回洗浄した。その後、30 μ l 2xSB (+) と 30 μ l lysis buffer を加え、5 分間煮沸してビーズを取り除いた。

GFP-Trap-A を用いた場合

非特異的な結合を避けるために、プロテアーゼ阻害剤とホスファターゼ阻害剤を添加した TBS (PhosSTOP、Complete EDTA-free、TBS) を加えて、上清中の Triton X-100 の濃度を 0.2% 以下に下げた。50% GFP-Trap A を 10 μ l ずつ加え、4°C

で 2 時間転倒混和した。5000 rpm、3 分間遠心後、TBS でビーズを 3 回洗浄した。

その後、30 μ l 2xSB (+) と 30 μ l lysis buffer を加え、5 分間煮沸してビーズを取り除いた。

3-6 ^{32}P を用いた代謝ラベリング

3-6-1 代謝ラベリングを用いた LRRK2 による Rab7L1 リン酸化の検出

GFP-Rab7L1 (WT) を恒常的に発現する HEK293 細胞をコラーゲン I コートされた 6 cm dish (BD Falcon) に撒き、翌日 3-4-2 の方法で各種変異型 LRRK2 の遺伝子導入を行った。遺伝子導入 48 時間後に、2 ml の HEPES Buffered Saline (HBS; 20 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)、150 mM NaCl) で 2 回洗浄、2 ml リン酸不含 DMEM (Invitrogen) で 1 回洗浄し、1.5 ml リン酸不含 DMEM を加えた。50 μ Ci [^{32}P] orthophosphate (Phosphorus-32; PerkinElmer) を加えたリン酸不含 DMEM を 500 μ l 添加し、8 時間培養した。2 ml Buffer A (1 mM Na_3VO_4 、HBS) で 2 回洗浄後、360 μ l Lysis buffer を加え、細胞を回収し、4°C で 30 分間転倒混和して可溶化した。14000 rpm、5 分間遠心し、上清の可溶画分を回収し、あらかじめプロテアーゼ阻害剤とホスファターゼ阻害剤を添加した TBS (PhosSTOP、Complete EDTA-free、TBS) を加えて、上清中の Triton X-100 の濃度を 0.2% 以下に下げた。50%

GFP-Trap A を $10\ \mu\text{l}$ ずつ加え、 4°C で 2 時間転倒混和した。5000 rpm、3 分間遠心後、TBS でビーズを 3 回洗浄した。その後、 $20\ \mu\text{l}$ TLC sample buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、20 mM EDTA、2% SDS、1 mM GTP、1 mM GDP) を加えて、 68°C で 10 分間加熱した。その後、 $12\ \mu\text{l}$ を薄層クロマトグラフィー (TLC) 用サンプルとして回収し、残りのサンプルに 2xSB (+) を加えて泳動用サンプルとした。泳動用サンプルを用いて、3-5-2 の方法でウェスタンブロット解析を行った。

この際に、化学発光の検出には Hyperfilm ECL (GE healthcare Bioscience) を用いた。その後、風乾させた PVDF 膜をイメージングプレート (富士フィルム) に露光し、BAS-2500 (富士フィルム) を用いてオートラジオグラフィー解析を行った。

3-6-2 Rab7L1 に結合したグアニンヌクレオチドの TLC 法による検出

3-6-1 で回収した薄層クロマトグラフィー (TLC) 用サンプルを、あらかじめメタノールで洗浄しておいた phospho-cellulose TLC plate (Merck) に風乾させながら $1\ \mu\text{l}$ ずつ計 $10\ \mu\text{l}$ スポットした。再度メタノールで洗浄後、 $0.75\ \text{M}\ \text{KH}_2\text{PO}_4$ を入れた展開槽に TLC plate を立てて室温で 2 時間展開させた。展開後の TLC plate を乾燥させて、オートラジオグラフィー解析を行った。

3-7 免疫細胞化学

Poly-D-lysine でコートした 12 mm 丸カバーガラス (MATSUNAMI) 上に HEK293 細胞を撒き、24 時間培養した。3-4-2 の方法で遺伝子導入を行い、48 時間培養した。DPBS で 1 回洗浄後、4% Paraformaldehyde (PFA) で 30 分間固定を行った。DPBS で 3 回洗浄後、ブロッキング液 (3% bovine serum albumin、0.1% Triton X-100、DPBS) で 30 分間、浸透化とブロッキングを同時に行った。その後、ブロッキング液で希釈した 1 次抗体液と 4°C で一晩反応させた。DPBS で 5 分間洗浄を 3 回繰り返し、ブロッキング液で希釈した 2 次抗体液と室温で 45 分間反応させた。DPBS で 10 分間洗浄を 3 回繰り返し、PermaFluor Aqueous Mounting Medium (Thermo Scientific) を用いてカバーガラスをスライドガラス上に封入した。細胞の観察、撮影は SP5 共焦点顕微鏡 (Leica) と Leica LAS AF software を用いて行った。

3-8 定量解析

3-8-1 ウェスタンブロット解析、Phos-tag SDS-PAGE 解析における定量解析

NIH Image J を用いて、対象となるバンドの Integrated Density を算出し、平均値を割り出して野生型 LRRK2 によるリン酸化 Rab7L1 の値を 100% として標準

化した（独立した試行回 $N = 4-7$ 、平均±標準誤差）。尚、有意差検定には one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test を用いた。

3-8-2 細胞免疫染色による *trans*-Golgi morphology の定量解析

HEK293 細胞を用いた細胞免疫染色において、TGN46-positive である Golgi を以下の 2 つのグループに分類した。

- (1) 複数の puncta 状の染色を呈し、広範囲に広がった形態を示すもの
- (2) 大きな puncta 状の染色を呈し、集簇した形態を示すもの

各サンプルで試行回の異なる 3 枚のカバーガラス上の細胞を計 42-70 個ずつ選択し、検者に対してブラインドの条件下で上記 2 つのグループに分類した。尚、有意差検定には Fisher's exact test を用いた(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

3-8-3 細胞免疫染色による TGN46 陽性である Golgi particle 及びその占有面積に関する定量解析

HeLa 細胞を用いた細胞免疫染色において、各サンプルで試行回の異なる 3 枚のカバーガラス上から遺伝子導入された細胞を選択し、TGN46 陽性である Golgi particle ($> 0.3 \mu\text{m}^2$) の数を NIH Image J を用いて算出し、平均値を割り出し（細

胞数 $n = 43-60$ 、平均 \pm 標準誤差)、one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test を用いて有意差検定を行った。また、同様に各サンプルで試行回の異なる 3 枚のカバーガラス上から遺伝子導入された細胞を選択し、細胞において TGN46 陽性部分が占める面積比率の平均値について NIH Image J を用いて算出した。算出した平均値は mock の値を 1 として標準化し（細胞数 $n = 113-126$ 、平均 \pm 標準誤差)、one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test を用いて有意差検定を行った。

第4章 結果

4-1 LRRK2 による Rab7L1 リン酸化

4-1-1 *In vitro* における LRRK2 による Rab7L1 リン酸化

In vitro における LRRK2 による Rab7L1 リン酸化について検討するために、大腸菌発現用の GST-Rab7L1 発現プラスミドを作製し、組換え GST-Rab7L1 タンパク質を精製した。*In vitro* において、キナーゼ活性が上昇していることが知られている活性型の G2019S 変異型 LRRK2 (FLAG-LRRK2 (G2019S)) 組換えタンパク質と精製した GST-Rab7L1 を ATP 存在下で反応させて、Phos-tag SDS-PAGE による電気泳動を行った。Phos-tag SDS-PAGE は、ゲル中の Phos-tag 分子がタンパク質のリン酸基を捕捉することにより泳動度が変化し、リン酸化タンパク質を分離・検出することが可能となる検出手法である (図表 5)。泳動後、Colloidal Blue staining でタンパク質を可視化したところ、GST-Rab7L1 の非リン酸化 Rab7L1 と考えられるバンドが検出された (図表 6)。また、FLAG-LRRK2 と反応させたサンプルにおいては、GST-Rab7L1 単体のサンプルでは見られない泳動度の異なる LRRK2 依存的なリン酸化 Rab7L1 と思われるバンドが認められた (図表 6)。この結果から、*in vitro* において G2019S 変異型 LRRK2 が Rab7L1 をリン酸化することが示唆された。

4-1-2 細胞内における LRRK2 による Rab7L1 リン酸化

細胞内における LRRK2 による Rab7L1 リン酸化について検討するために、HEK293 細胞に GFP-Rab7L1 と 3xFLAG-LRRK2 (G2019S) を一過性に過剰発現させ、回収後溶解し、Phos-tag SDS-PAGE による電気泳動とウェスタンブロット解析を行った。その結果、非リン酸化 Rab7L1 と考えられるバンドが検出された (図表 7)。また、LRRK2 発現非依存的に泳動度の異なるリン酸化 Rab7L1 と思われるバンドと LRRK2 発現依存的に泳動度の異なるリン酸化 Rab7L1 と思われるバンドが検出された (図表 7)。以上の結果より、細胞内において G2019S 変異型 LRRK2 が Rab7L1 をリン酸化することが示唆された。また、Rab7L1 は細胞内において LRRK2 非依存的なリン酸化を受けていることも示唆された。

4-1-3 LRRK2 キナーゼ活性阻害剤処理による Rab7L1 リン酸化の変化

4-1-2 において、Phos-tag SDS-PAGE によって検出された LRRK2 発現依存的なリン酸化 Rab7L1 のバンドが、LRRK2 のキナーゼ活性依存的であることを確認するために、LRRK2 キナーゼ活性阻害剤として報告されている GSK2578215A を用いた検討を行った。GFP-Rab7L1 と 3xFLAG-LRRK2 (G2019S) を一過性に過

剰発現させた HEK293 細胞を、GSK2578215A でそれぞれ 1、3、5、10 分間処理し、細胞を回収後、Phos-tag SDS-PAGE による電気泳動で分離し、ウェスタンブロット解析を行った。また、GSK2578215A による LRRK2 キナーゼ活性阻害効果の指標として、LRRK2 の自己リン酸化部位である 1292 番目のセリン残基のリン酸化を認識する anti-p-Ser1292 LRRK2 抗体を用いてウェスタンブロット解析を同時に行った。その結果、GSK2578215A 処理 1 分の時点から LRRK2 自己リン酸化の低下が認められた (図表 8)。処理時間 3、5、10 分後には処理時間 1 分と同程度の LRRK2 自己リン酸化の低下が認められた。Phos-tag SDS-PAGE による LRRK2 発現依存的なリン酸化 Rab7L1 バンドは GSK2578215A 処理 1 分からバンド強度の低下が認められた (図表 8)。また処理時間 3、5、10 分では時間依存的にリン酸化 Rab7L1 バンド強度の低下が認められた。この結果から、Phos-tag SDS-PAGE で検出される LRRK2 発現依存的な Rab7L1 リン酸化バンドの出現は、LRRK2 キナーゼ活性に依存していることが示唆された。また、GSK2578215A 処理による LRRK2 自己リン酸化と Rab7L1 リン酸化の低下速度に違いがみられることは、両者のリン酸基のターンオーバーの時間の違いを反映している可能性を考えた。

4-2 細胞内における LRRK2 による Rab7L1 リン酸化部位の同定

4-2-1 Rab7L1 変異体を用いた LRRK2 によるリン酸化部位の同定

LRRK2 による Rab7L1 のリン酸化部位を同定するために、リン酸化部位と想定されるセリン・スレオニン残基を 1 つずつアラニン残基に置換した Rab7L1 変異体を作製した。対象となる Rab7L1 内のセリン・スレオニン残基は、ヒト・ラット・マウスの種間で保存されている部位を選択した（図表 9）。作製した各種 Rab7L1 変異体と 3xFLAG-LRRK2 (G2019S) を HEK293 細胞に一過性に過剰発現し、回収後、Phos-tag SDS-PAGE による解析を行った。その結果、T21A、S72A、S155A 変異型 Rab7L1 において、LRRK2 によるリン酸化 Rab7L1 バンドの消失がみられた（図表 10）。S72A 変異型 Rab7L1 は細胞内において、野生型 Rab7L1 と同様に主にゴルジ体に局在していた。一方で T21A、S155A 変異型 Rab7L1 は野生型 Rab7L1 と異なり、大部分が細胞質全体に局在していた（データ非掲載）。21 番目のスレオニン残基と 155 番目のセリン残基は、GTP 結合に重要な部位であり、変異によって立体構造が変化した結果、細胞内での局在とリン酸化に影響したと考えられた。このことから 72 番目のセリン残基が LRRK2 によるリン酸化部位である可能性が示唆された。

72 番目のセリン残基はスレオニン残基と隣接しているため、T71A/S72A 変異

型 Rab7L1 を作製し、より詳細な検討を行った。その結果、S72A 変異型 Rab7L1 と T71A/S72A 変異型 Rab7L1 において、LRRK2 によるリン酸化 Rab7L1 バンドの消失がみられた（図表 11）。この結果から、Rab7L1 の 72 番目のセリン残基が LRRK2 によるリン酸化部位である可能性を想定した。

4-2-2 リン酸化 Ser72 Rab7L1 特異抗体の作製

4-2-1 で同定した Rab7L1 リン酸化部位をリン酸化特異抗体により検出することを目的に、リン酸化 Ser72 とその周辺を含む 18 アミノ酸からなるペプチドをウサギに複数回免疫し、抗血清を回収した。回収した抗血清を 72 番目のセリン残基を含む非リン酸化ペプチドを結合したカラムに吸着し、アフィニティー精製後、非吸着画分をリン酸化ペプチドが結合したカラムを通してアフィニティー精製を行い、吸着画分を回収した。作製したリン酸化特異抗体の反応特異性を調べるために、ウェスタンブロット解析による検討を行った。HEK293 細胞に GFP-Rab7L1 もしくは S72A 変異型 GFP-Rab7L1 と 3xFLAG-LRRK2 (G2019S) を一過性に過剰発現させて、抗 GFP 抗体を用いて免疫沈降後、作製したリン酸化 Ser72 Rab7L1 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。その結果、GFP-Rab7L1 のみを泳動した場合にも、50 kDa 付近に Rab7L1 発現依存的なバン

ドが検出された (図表 13A)。しかし、このバンドの強度は LRRK2 発現依存的に増加していたことから、作製した抗体の反応性は、リン酸化 Ser72 Rab7L1 の増加を反映していると考えられた。S72A 変異型 Rab7L1 のみのサンプルにも同様に Rab7L1 発現依存的なバンドが検出された (図表 13A)。しかし、LRRK2 発現依存的なバンド強度の増加は認められなかった。この結果から、作製したリン酸化 Ser72 Rab7L1 抗体は、非リン酸化 Rab7L1 に交差反応している可能性が考えられた。そこで、組換えタンパク質を用いて、*in vitro* におけるリン酸化特異抗体の反応特異性について検討を行った。組換え GST-Rab7L1 と組換え FLAG-LRRK2 (G2019S) を ATP 存在下で反応させて、ウェスタンブロット解析を行った。その結果、GST-Rab7L1 のみのサンプルで Rab7L1 依存的なバンドが検出された (図表 13B)。また、LRRK2 と反応させたサンプルにおいても、同程度のバンド強度のバンドが検出された。これらの結果から、作製したリン酸化 Ser72 Rab7L1 抗体は、非リン酸化 Rab7L1 にもある程度交差反応を示すが、LRRK2 によるリン酸化 Ser72 Rab7L1 の増加を検出可能であることが示唆された。

4-3 FPD 変異型 LRRK2 による Rab7L1 リン酸化

4-3-1 FPD 変異型 LRRK2 による Rab7L1 のリン酸化

4-1-2 において、G2019S 変異型 LRRK2 が細胞内において Rab7L1 をリン酸化することが明らかになった。そこで、他の FPD 変異型 LRRK2 による Rab7L1 リン酸化効果について評価するために、野生型及びキナーゼ活性喪失型 LRRK2 (K1906M)、6 種類の FPD 変異型 LRRK2 (R1441C/G/H, Y1699C, G2019S, I2020T) を用いて検討を行った。各種 FPD 変異型 3xFLAG-LRRK2 と GFP-Rab7L1 を一過性に過剰発現させた HEK293 細胞を回収し、Anti-GFP 抗体を用いて Phos-tag SDS-PAGE 解析を行った。そして、Phos-tag SDS-PAGE 解析における LRRK2 発現依存的なリン酸化 Rab7L1 のバンド強度を測定し、野生型 LRRK2 によるリン酸化 Rab7L1 の値を 100%として標準化し、定量解析を行った。その結果、野生型 LRRK2 による Rab7L1 リン酸化と比較して、K1906M LRRK2 を co-incubate した場合の Rab7L1 のリン酸化比率は約 58%であった(図表 14A、B)。一方、各種 FPD 変異型 LRRK2 による Rab7L1 リン酸化は、R1441C では約 237%、R1441G では約 241%、R1441H では約 282%、Y1699C では約 382%、G2019S では約 277%、I2020T では約 249%とリン酸化が有意に増加しており (図表 14A、B)、全ての FPD 変異型 LRRK2 について、野生型 LRRK2 と比較して Rab7L1 のリン酸化が 2 倍以上に上昇していることが示された。この結果から、細胞内において 6 種類の FPD 変異型 LRRK2 は野生型 LRRK2 と比較して Rab7L1 リン酸化を亢進させる

ことが示唆された。

4-3-2 FPD 変異型 LRRK2 による Rab7L1 Ser72 部位リン酸化

4-3-1 の結果から、細胞内において FPD 変異型 LRRK2 が野生型 LRRK2 と比較して、Rab7L1 リン酸化を亢進させることが Phos-tag SDS-PAGE 解析によって示された。そこで次に、Phos-tag SDS-PAGE で検出された Rab7L1 リン酸化の増加が、72 番目のセリン残基のリン酸化の増加を反映している可能性について検討を行った。各種 FPD 変異型 3xFLAG-LRRK2 と GFP-Rab7L1 を一過性に過剰発現させた HEK293 細胞を回収し、GFP-Trap A を用いて免疫沈降後にリン酸化 Ser72 Rab7L1 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。そして、ウェスタンブロット解析におけるリン酸化 Ser72 Rab7L1 のバンド強度を Rab7L1 発現量で規格化し、野生型 LRRK2 によるリン酸化 Rab7L1 の値を 100%として標準化し、定量解析を行った。その結果、野生型 LRRK2 による Rab7L1 Ser72 のリン酸化と比較して、K1906M LRRK2 による Rab7L1 Ser72 のリン酸化は約 58%であった(図表 15A、B)。一方で、各種 FPD 変異型 LRRK2 による Rab7L1 Ser72 のリン酸化は、R1441C では約 219%、R1441G では約 256%、R1441H では約 246%、Y1699C では約 260%、G2019S では約 258%、I2020T では約 232%とリン酸化が

有意に増加していた (図表 15A、B)。どの FPD 変異型 LRRK2 においても、野生型 LRRK2 と比較して、Rab7L1 へのリン酸化が 2 倍以上に上昇していることが示された。この結果から、細胞内において 6 種類の FPD 変異型 LRRK2 は野生型 LRRK2 と比較して Rab7L1 の 72 番目のセリン残基のリン酸化を亢進させることが示唆された。

4-3-3 Rab7L1 リン酸化による GTP/GDP 結合能への影響

これまでにみられた LRRK2 による Rab7L1 リン酸化が、Rab7L1 の GTP/GDP 結合能に対して影響を及ぼすか否かについて検討するために、 $[^{32}\text{P}]$ orthophosphate を用いた Rab7L1 の代謝ラベリングを行った。各種 FPD 変異型 3xFLAG-LRRK2 と GFP-Rab7L1 を一過性に過剰発現させた HEK293 細胞を回収し、GFP-Trap A を用いて免疫沈降後に Rab7L1 のリン酸化と GTP/GDP 結合能についてオートラジオグラフィ解析を行った。その結果、野生型 LRRK2 による Rab7L1 のリン酸化と比較して、K1906M LRRK2 による Rab7L1 のリン酸化は約 83%であった (図表 16A、B)。一方で、各種 FPD 変異型 LRRK2 による Rab7L1 のリン酸化は、R1441C では約 176%、R1441G では約 202%、R1441H では約 195%、Y1699C では約 198%、G2019S では約 202%、I2020T では約 175%とリン酸化が

有意に増加していた (図表 16A、B)。どの FPD 変異型 LRRK2 においても 4-3-2 の結果と同様に、野生型 LRRK2 と比較して、Rab7L1 へのリン酸化が約 2 倍近くに上昇していることが示された。また Rab7L1 の GTP/GDP 結合能について薄層クロマトグラフィーを用いたオートラジオグラフィー解析を行った。その結果、コントロールである FLAG-Ras に対する GDP 結合量に対して低値であるが、Rab7L1 への GDP 結合が認められた (図表 17A、B)。WT+Rab7L1 における Rab7L1 への GDP 結合量と比較して、K1906M+Rab7L1 における Rab7L1 への GDP 結合量に差はみられなかった (図表 17A、B)。また、各種 FPD 変異型 LRRK2 を含むサンプルにおける Rab7L1 への GDP 結合量についても差がみられなかった (図表 17A、B)。GTP 結合量についても同様に、コントロールである FLAG-Ras に対する GTP 結合量に対してかなり少ないものの、Rab7L1 への GTP 結合が認められた (図表 17A、C)。WT+Rab7L1 における Rab7L1 への GTP 結合量について比較した結果、どのサンプルにおいても GTP 結合量に差はみられなかった (図表 17A、C)。この結果から、LRRK2 による Rab7L1 へのリン酸化は、Rab7L1 の GTP/GDP 結合能に影響を及ぼさないことが示唆された。

4-4 LRRK2 による Rab7L1 リン酸化と Rab7L1 細胞内局在との関係

4-4-1 細胞内における Rab7L1 の局在

細胞内における Rab7L1 の局在について、免疫細胞化学的検討を行った。

HEK293 細胞に変異型 GFP-Rab7L1 (WT、Q67L; 活性型と推定される変異型 Rab7L1、T21N; 不活性型と推定される変異型 Rab7L1) を一過性に過剰発現させて培養後、4% PFA で固定し、細胞免疫染色を行った。コンフォーカル顕微鏡を用いた観察の結果、野生型 Rab7L1 は主に核近傍に存在しており、*trans*-Golgi マーカーである TGN46 との共局在が観察された (図表 18)。このことから、野生型 Rab7L1 は主にゴルジ体に局在していることが示唆された。一方、Q67L 変異型 Rab7L1 は主に細胞質全体に局在しており、TGN46 との共局在率は低下していた (図表 18)。また、T21N 変異型 Rab7L1 も同様に主に細胞質全体に局在し、TGN46 との共局在率は低下していた (図表 18)。このことから、Q67L、T21N 変異型 Rab7L1 は主に細胞質に局在していることが示唆された。

4-4-2 LRRK2 による各種変異型 Rab7L1 のリン酸化

4-4-1 で示された各種変異型 Rab7L1 の細胞内局在と、LRRK2 による Rab7L1 リン酸化との関係について明らかにするために、LRRK2 による各種変異型 Rab7L1 のリン酸化について検討を行った。変異型 GFP-Rab7L1 (WT、Q67L、

T21N) と G2019S 変異型 3xFLAG-LRRK2 を一過性に過剰発現させた HEK293 細胞を回収し、anti-GFP 抗体を用いて Phos-tag SDS-PAGE 解析を行った。その結果、野生型 Rab7L1 では 4-1-2 と同様に LRRK2 発現依存的なリン酸化 Rab7L1 のバンドが認められた (図表 19)。一方、Q67L 変異型 Rab7L1 においては、LRRK2 発現依存的なリン酸化 Rab7L1 のバンドは認められなかった (図表 19)。また、T21N 変異型 Rab7L1 においても同様に、LRRK2 発現依存的なリン酸化 Rab7L1 のバンドは認められなかった (図表 19)。このことから、Q67L、T21N 変異型 Rab7L1 は細胞内において LRRK2 によるリン酸化を受けないことが示唆された。4-4-1 の結果と合わせて、ゴルジ体に局在する Rab7L1 が LRRK2 によってリン酸化を受ける可能性を考えた。

4-5 LRRK2 による Rab7L1 リン酸化と *trans*-Golgi の形態

これまで複数の報告において、Rab7L1 は *trans*-Golgi の形態の制御に関与することが示唆されている。従って、LRRK2 による Rab7L1 の 72 番目のセリン残基のリン酸化も *trans*-Golgi の形態制御に修飾的に影響を与えるのではないかと考え、72 番目のセリン残基のリン酸化を模倣した S72E 変異型 Rab7L1 を作製し、免疫細胞化学的検討を行った。尚、同様に S72D 変異型 Rab7L1 もリン酸化模倣

体として作製したが、細胞内での発現レベルが不安定で低かったことから、検討には用いなかった（データ非掲載）。HEK293 細胞に各種変異型 GFP-Rab7L1（WT、S72A、S72E）を一過性に過剰発現させて培養後、4% PFA で固定して細胞免疫染色を行ったところ、S72A、S72E 変異型 Rab7L1 は野生型 Rab7L1 と同様に TGN46 陽性のゴルジ体に局在していた（図表 20A）。しかし、Rab7L1 が局在する TGN46 陽性のゴルジ体の形態は変異体ごとに異なっていることを見出した（図表 20A）。そこで、TGN46 陽性のゴルジ体の形態を(1) 複数の puncta 状の染色を呈し、広範囲に広がった形態を示すもの、(2) 大きな puncta 状の染色を呈し、集簇した形態を示すもの、の 2 種類に分類し、定量を行った。野生型及び S72A 変異型 Rab7L1 を発現する細胞では TGN46 陽性のゴルジ体が核近傍に集簇し、TGN46 陽性の particle の数が減少していた（図表 20A、B）。一方、S72E 変異型 Rab7L1 を発現する細胞では TGN46 陽性のゴルジ体は細胞質に散在しており、mock 発現細胞と類似していた（図表 20A、B）。また、TGN46 陽性の particle の数と、細胞内で TGN46 陽性部分が占める面積比率について、HeLa 細胞を用いて検討した。HeLa 細胞は HEK293 細胞と比較して細胞質が大きいいため、細胞内小器官の形態評価により適していた。各種 Rab7L1 を一過性に過剰発現した HeLa 細胞を解析したところ、野生型 Rab7L1 を発現した細胞では TGN46 陽性の

particle の数が mock 細胞に比べて有意に低下していた（図表 21A、B）。S72A 変異型 Rab7L1 を発現した細胞では TGN46 陽性の particle の数が mock 細胞に比べてやはり有意に低下していた（図表 21A、B）。一方、S72E 変異型 Rab7L1 を発現した細胞では、TGN46 陽性の particle の数が野生型 Rab7L1 を発現した細胞に比べて有意に増加しており、mock 細胞に類似していた（図表 21A、B）。また、細胞において TGN46 陽性部分が占める面積比率は、野生型 Rab7L1 を発現している細胞と比較して、S72A 変異型 Rab7L1 を発現している細胞では有意に低下していた（図表 21A、C）。一方で、S72E 変異型 Rab7L1 を発現した細胞では、野生型 Rab7L1 を発現している細胞と比較して TGN46 陽性部位が有意に増加していた（図表 21A、C）。さらに、LRRK2 による Rab7L1 リン酸化による *trans*-Golgi の形態への影響について確かめるために、一過性に野生型 Rab7L1 と各種変異型 LRRK2（WT、K1906M、Y1699C、G2019S）を過剰発現した HEK293 細胞を用いて検討を行った。キナーゼ活性型の K1906M 変異型 LRRK2 と野生型 Rab7L1 を共発現した細胞では、TGN46 陽性のゴルジ体が核近傍に集簇し、TGN46 陽性の particle の数が減少していた（図表 20A、B）。一方、キナーゼ活性を有する野生型もしくは Y1699C、G2019S 変異型 LRRK2 と野生型 Rab7L1 を発現する細胞では、TGN46 陽性のゴルジ体は細胞質に散在していた（図表 20A、B）。以上の

結果から、非リン酸化 Rab7L1 の発現は TGN46 陽性のゴルジ体を核近傍に集簇させる効果があり、Rab7L1 がリン酸化されることによってその効果は失われ、TGN46 陽性のゴルジ体が断片化されて細胞質に散在するものと考えられた（図表 22）。

第5章 考察

本研究より、LRRK2 による Rab7L1 リン酸化について以下の 4 つの新たな知見を得た。

1. LRRK2 は Rab7L1 を細胞内でリン酸化する。
2. LRRK2 は Rab7L1 の 72 番目のセリン残基をリン酸化する。
3. FPD 変異型 LRRK2 は Rab7L1 のリン酸化を亢進させる。
4. LRRK2 は Rab7L1 の Ser72 へのリン酸化を介して、*trans*-Golgi の形態を制御する。

これらの結果について、以下で考察する。

5-1 LRRK2 による Rab7L1 リン酸化について

本研究において、精製組換えタンパク質を用いた *in vitro* の検討から、LRRK2 が Rab7L1 を直接リン酸化することが示された (図表 6)。また、細胞内においても LRRK2 キナーゼ活性依存的に Rab7L1 がリン酸化されることから、Rab7L1 は細胞内における LRRK2 の基質であることが示唆された (図表 8)。

Phos-tag SDS-PAGE による解析から、細胞内において LRRK2 キナーゼ活性依存的にリン酸化された Rab7L1 は非リン酸化 Rab7L1 と比較すると少量であり、

リン酸化効率は低いと考えられた。しかし、培養細胞において、LRRK2 と Rab7L1 が過剰発現によって共発現される細胞の比率は低く、全細胞全体の数%程度であったことから、培養細胞における LRRK2 と Rab7L1 の共発現率の低さが、Phos-tag SDS-PAGE で検出される低いリン酸化 Rab7L1 量に影響したと考えた。

Phos-tag SDS-PAGE による解析から、定常状態において泳動度が異なる Rab7L1 バンドが検出された。このことから Rab7L1 が細胞内で複数のキナーゼからリン酸化を受ける可能性が示唆された。これまでに HeLa S3 細胞を用いたプロテオミクス解析によって、約 8000 近くのリン酸化タンパク質が検出され、その中に複数の残基がリン酸化された Rab7L1 が含まれていたことから、定常状態において細胞内で Rab7L1 がリン酸化を受けていることを支持している[86]。

本研究で用いた HEK293 細胞は内因性に LRRK2 を発現していてもごく微量であり、Rab7L1 リン酸化への影響はないと考えられる。また、申請者は薬理学的手法を用いた質量分析による検討から、Rab7L1 が LRRK2 非依存的に 72 番目のセリン残基とは異なる部位をリン酸化されることを見出した（データ非掲載）。今後、定常状態における Rab7L1 リン酸化の機能的意義や LRRK2 によるリン酸化との関連について、さらなる検討が必要である。

T21N、Q67L 変異型 Rab7L1 を用いた検討から、Rab7L1 はゴルジ体において

LRRK2 によるリン酸化を受ける可能性が示唆された (図表 18、19)。ごく最近、Liu らは同様の検討を行い、類似の結果を報告している[87]。また彼らは、膜成分を多く含む Triton-X-100 可溶画分と可溶画分に分画した際に、LRRK2 によってリン酸化された Rab7L1 の大部分が Triton-X-100 可溶画分に存在していることを示していた。また野生型 LRRK2 と比較して FPD 変異型 LRRK2 が、Rab7L1 が局在する TGN46 陽性のゴルジ体に多く局在していることも示している[87]。この報告を考え合わせると、Rab7L1 がゴルジ体において LRRK2 によりリン酸化を受ける可能性が支持される。

本研究における LRRK2 による Rab7L1 のリン酸化に関する解析は、培養細胞における過剰発現系を用いたものであり、内因性レベルでのリン酸化を検出したものではない。Rab7L1 が LRRK2 の真に生理的な基質であることを示すためには、今後内因性 Rab7L1 の検出法の開発を含めた、さらなる検討が必要である。

5-2 LRRK2 による Rab7L1 リン酸化部位同定について

本研究では、LRRK2 による Rab7L1 リン酸化部位を同定するために Phos-tag SDS-PAGE と Rab7L1 変異体を用いた解析を行った。その結果、S72A 変異型 Rab7L1 において LRRK2 キナーゼ活性依存的なリン酸化バンドの消失が認めら

れた（図表 10、11）。このことから、LRRK2 による Rab7L1 のリン酸化部位は 72 番目のセリン残基であると考えられた。Rab7L1 における 72 番目のセリン残基は、複数の Rab GTPase において保存されている部位であり、これまでに報告されている Rab8a、Rab10、Rab12 のリン酸化部位とアミノ酸配列上相同な部位である[71]。またごく最近、培養細胞での過剰発現系における質量分析を用いた解析により、Rab7L1 の 71 番目のスレオニン残基と 72 番目のセリン残基の 2 箇所が LRRK2 によってリン酸化を受ける部位であるとの報告もなされた[72]。一方、Liu らは Rab7L1 の 71 番目のスレオニン残基がメジャーなリン酸化部位であると報告している[87]。Liu らの検討では、T71E 及び S72D 変異型 Rab7L1 を用いると、T71E 変異型 Rab7L1 においてのみ Rab7L1 のリン酸化が消失したことから、71 番目のスレオニン残基がメジャーなリン酸化部位であると主張している。アスパラギン酸やグルタミン酸は電荷を持つアミノ酸であり、リン酸化を受けたセリンやスレオニン残基の模倣体として繁用されることから、これらのアミノ酸置換によって立体構造が変化した結果、隣接残基のリン酸化阻害や人為的なリン酸化の増加が生じた可能性も否定できない。申請者の検討においてもアミノ酸置換による Rab7L1 立体構造の変化が結果に影響を及ぼした可能性は除外できないが、リン酸化 Ser72 Rab7L1 特異抗体を用いた検討において、

LRRK2 キナーゼ活性依存的なリン酸化の増加が認められたことは、72 番目のセリン残基が LRRK2 によるメジャーなリン酸化部位であることを支持する結果と考える (図表 13)。

Rab7L1 の 72 番目のセリン残基は、switch II ドメインと呼ばれる領域内に位置している (図表 12)。switch II ドメインは、GTP または GDP が分子に結合することによって立体構造が変化し、活性型 (GTP 結合型) の Rab GTPase に結合するエフェクター分子や活性化因子である GEF (guanine-nucleotide exchange factor)、不活性化 (GDP 結合型) 因子である GAP (GTPase activating protein) などの相互作用分子との結合を調節する領域と考えられている[88]。このことを考慮すると、Rab7L1 の 72 番目のセリン残基がリン酸化されることにより、立体構造が変化して GTP/GDP 結合能に影響を及ぼす可能性も想定した。しかし、細胞内における Rab7L1 の GTP/GDP 結合についての解析では、リン酸化による GTP/GDP 結合能への影響はみられなかった (図表 17)。LRRK2 によって Rab7L1 の 72 番目のセリン残基と相同な部位がリン酸化される複数の Rab GTPase (Rab3A/B/C/D、5A/B/C、8A/B、10、12、29 (Rab7L1)、35、43) において、リン酸化部位をアラニンもしくはアスパラギン酸に置換した変異体を用いて GDI1/2 との結合について解析したところ、Rab7L1 を除く Rab GTPase のアスパ

ラギン酸置換体で GDI1/2 との結合が低下したとの報告がある[72]。また、72 番目のスレオニン残基がリン酸化される Rab8a では、リン酸化によって GEF である Rabin8 との結合が低下し、GTP の加水分解が低下することが報告されている[71]。これまでに、前頭側頭型認知症を合併する ALS の原因遺伝子として知られる C9orf72 (chromosome 9 open reading frame 72) が Rab7L1 と結合し、特に活性化型と推定される Q67L 変異型 Rab7L1 に結合することからエフェクター分子である可能性が示されている[89]。以上の知見を考え合わせると、LRRK2 による Rab7L1 リン酸化は C9orf72 との結合に影響を及ぼす可能性も考えられ、今後解析を行ってみたい。

5-3 FPD 変異型 LRRK2 による Rab7L1 リン酸化の亢進について

これまでに、LRRK2 の FPD 変異の効果としてキナーゼ活性に対する影響について、数多くの研究がなされてきた。LRRK2 のキナーゼ活性については、*in vitro* においてのみリン酸化が確認される moesin や人工基質である LRRKtide のリン酸化、もしくは LRRK2 自身の自己リン酸化活性をサロゲートマーカーとした指標を用いて評価が行われてきた。これらの指標を用いた LRRK2 キナーゼ活性の評価では、G2019S 変異型 LRRK2 でのみ、野生型と比較してキナーゼ活性が約

2-3 倍近く上昇しており、他の FPD 変異型 LRRK2 については一貫した結果が報告されておらず、果たしてその効果がキナーゼ活性の亢進として統一的に解釈可能であるかについては、議論が分かれていた。FPD 変異によるキナーゼ活性への影響を評価するためには、LRRK2 の生理的な、あるいは細胞内における基質の同定が必要不可欠であった。

本研究では、FPD 変異型 LRRK2 による Rab7L1 リン酸化について解析を行い、検討した 6 つの FPD 変異型 LRRK2 に共通して、細胞内での pSer72 Rab7L1 リン酸化が増加することを見出した (図表 15)。これまでに報告されている他の複数の Rab GTPase についても、細胞内において FPD 変異型 LRRK2 によるリン酸化の亢進が報告されている [71][72][73]。また、Rab7L1 についても、FPD 変異型 LRRK2 によるリン酸化亢進がごく最近報告された [87]。これらのことから、LRRK2 の FPD 変異には LRRK2 のキナーゼ活性を亢進させる効果があると考えた。本研究で得られた、細胞内における FPD 変異型 LRRK2 のキナーゼ活性に関する結果は、これまで *in vitro* や自己リン酸化活性を指標としたキナーゼ活性評価の結果とは異なっていた。*In vitro* におけるキナーゼ活性評価は、細胞内におけるリン酸化反応に関与する足場となるタンパク質や相互作用分子による影響が考慮できないことが問題となりうる。また、自己リン酸化活性による評価

は、細胞内におけるキナーゼ活性をサロゲートマーカーとして評価できるものの、変異による LRRK2 自身の基質としての性質の変化に影響される可能性もある。これらのことを考慮すると、FPD 変異による LRRK2 キナーゼ活性への効果は、以下の 2 つにまとめて考察が可能と考える。

- I. G2019S 変異は、LRRK2 単体でのキナーゼ活性を上昇させる効果がある。
- II. R1441C/G/H、Y1699C、I2020T 変異は、細胞内における他のタンパク質などとの相互作用を介して、キナーゼ活性を上昇させる効果がある。

細胞内における LRRK2 による Rab GTPase リン酸化を指標としたキナーゼ活性評価より、FPD 変異によりプロセスは異なるものの、共通の効果としてキナーゼ活性を上昇することが本研究から見出された。従って、FPD 変異型 LRRK2 はキナーゼ活性上昇に伴う Rab7L1 を含む Rab GTPase の過剰なリン酸化を介して、神経細胞に対する障害性を発揮する可能性がある。

5-4 LRRK2 による Rab7L1 リン酸化と *trans*-Golgi の形態について

本研究における *trans*-Golgi の形態に関する検討から、LRRK2 は Rab7L1 の 72 番目のセリン残基のリン酸化を介して、*trans*-Golgi の形態を制御している可能性が示唆された（図表 20、21）。これまでに、培養細胞に LRRK2 と Rab7L1 を

過剰発現させると、細胞内で結合し、TGN の断片化が生じること、この際にオートファジー・リソソーム経路を介して TGN が分解されることが示唆されている[85]。また、培養細胞において Rab7L1 をノックダウンすると、TGN の断片化が生じることが報告されている[83]。本研究におけるリン酸化模倣型の S72E 変異型 Rab7L1 や、LRRK2 と野生型 Rab7L1 を共発現させた細胞における TGN の形態は、これらの報告における結果と符合していた（図表 20、21）。また、野生型 Rab7L1 やリン酸化部位欠損型の S72A 変異型 Rab7L1 を発現させた細胞では、TGN が集簇した形態を示すことから、非リン酸化 Rab7L1 には TGN を集簇させる効果があり、Rab7L1 の 72 番目のセリン残基がリン酸化されることでその効果が低下する可能性が考えられた（図表 22）。

Rab7L1 の 72 番目のセリン残基は GTP/GDP 結合によって立体構造が変化する switch 2 ドメイン内に存在することから、相互作用分子との結合に影響を与えると考えられた。このことから、LRRK2 による Rab7L1 リン酸化によって結合様式が変化する相互作用分子が存在し、ゴルジ体の形態制御に関与している可能性があると考えられる（図表 23）。

これまでに PD 患者脳において、TGN の断片化が見られるとの報告があり、AD や ALS などの他の神経変性疾患においても TGN の断片化は報告されている

[77][78][90]。このことから、LRRK2 による Rab7L1 の 72 番目のセリン残基のリン酸化を介した TGN の形態異常が、神経変性に一定の役割を果たしているのではないかと考えた。PD における Rab7L1 リン酸化の関与を明らかにするためには、PD 患者脳におけるリン酸化 Ser72 Rab7L1 が増加しているかを調べる必要があり、この点においても、内因性レベルで Rab7L1 のリン酸化を検出できる系の樹立は今後の課題である。

5-5 LRRK2 による Rab GTPase のリン酸化について

これまでに Steger らは、Rab8a、10、12 が細胞内における LRRK2 の基質であることを報告している[71]。またごく最近、同じグループが質量分析を用いた追加解析を行い、新たに Rab3、5、35、43 及び本研究において解析した Rab7L1 が、細胞内で LRRK2 によるリン酸化を受けることを報告した[72]。これまでに報告されている LRRK2 による Rab GTPase のリン酸化部位は、全て switch II ドメイン内に存在する配列的に相同な部位である[72]。申請者による検討や Steger らの報告で用いられた Rab7 や Rab18 はリン酸化が確認された Rab GTPase と同様に相同な部位を有していたが、LRRK2 によるリン酸化は確認されなかった(データ非掲載)。また、この相同な部位を持たない Rab GTPase (ex. Rab32, Rab38)

ではリン酸化が確認されていないことから、switch II ドメイン内に存在する相同な部位を有することは LRKK2 によってリン酸化を受けるための必要条件ではあるが、十分条件ではないことが考えられる。

本研究及びこれまでの報告から、LRRK2 は様々な Rab GTPase のリン酸化を介して細胞内輸送の制御に関与する可能性が示唆された。しかし、内因性レベルで、リン酸化が検出されているのは Rab8、10、35 のみであり[73][91]、他の Rab GTPase については過剰発現系のみで検出されている。また、PD 患者脳において Rab GTPase のリン酸化が上昇しているかは不明であり、今後の検討が課題である。

第6章 結論

本研究において、細胞内で LRRK2 が Rab7L1 の 72 番目のセリン残基をリン酸化し、FPD 変異型 LRRK2 の共通の効果として、リン酸化 Ser72 Rab7L1 が増加することを見出した。また、細胞内において LRRK2 が Ser72 Rab7L1 のリン酸化を介して *trans*-Golgi の形態の制御に関与する可能性を示唆した。リン酸化模倣型の S72E 変異型 Rab7L1 や、LRRK2 と野生型 Rab7L1 を共発現させた細胞における TGN の形態は、PD を含む複数の神経変性疾患患者において生じている TGN の断片化に類似しており、LRRK2 による Rab7L1 の 72 番目のセリン残基のリン酸化を介した TGN の形態異常が、神経変性に関与する可能性を想定した。

本研究において、LRRK2 が細胞内において Rab7L1 の 72 番目のセリン残基をリン酸化し、そのリン酸化を介して *trans*-Golgi の形態の制御に関与していることを見出した。本研究から得られた知見は、LRRK2 の機能ならびに PD 発症の分子機構の解明に示唆を与えるものと考ええる。

引用文献

- [1] S. Fahn, Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 991 (2003) 1-14.
- [2] M.H. Polymeropoulos, J.J. Higgins, L.I. Golbe, W.G. Johnson, S.E. Ide, G. Di Iorio, G. Sanges, E.S. Stenroos, L.T. Pho, A.A. Schaffer, A.M. Lazzarini, R.L. Nussbaum, R.C. Duvoisin, Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23, *Science (New York, N.Y.)*, 274 (1996) 1197-1199.
- [3] M.H. Polymeropoulos, C. Lavedan, E. Leroy, S.E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E.S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetropoulos, W.G. Johnson, A.M. Lazzarini, R.C. Duvoisin, G. Di Iorio, L.I. Golbe, R.L. Nussbaum, Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease, *Science (New York, N.Y.)*, 276 (1997) 2045-2047.
- [4] R. Kruger, W. Kuhn, T. Muller, D. Woitalla, M. Graeber, S. Kosel, H. Przuntek, J.T. Epplen, L. Schols, O. Riess, Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease, *Nature genetics*, 18 (1998) 106-108.
- [5] J.J. Zarranz, J. Alegre, J.C. Gomez-Esteban, E. Lezcano, R. Ros, I. Ampuero, L. Vidal, J. Hoenicka, O. Rodriguez, B. Atares, V. Llorens, E. Gomez Tortosa, T. del Ser, D.G. Munoz, J.G. de Yebenes, The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia, *Annals of neurology*, 55 (2004) 164-173.
- [6] M.G. Spillantini, M.L. Schmidt, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski, R. Jakes, M. Goedert, Alpha-synuclein in Lewy bodies, *Nature*, 388 (1997) 839-840.
- [7] M. Baba, S. Nakajo, P.H. Tu, T. Tomita, K. Nakaya, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski, T. Iwatsubo, Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies, *The American journal of pathology*, 152 (1998) 879-884.
- [8] A.B. Singleton, M. Farrer, J. Johnson, A. Singleton, S. Hague, J. Kachergus, M. Hulihan, T. Peuralinna, A. Dutra, R. Nussbaum, S. Lincoln, A. Crawley, M. Hanson, D. Maraganore, C. Adler, M.R. Cookson, M. Muenter, M. Baptista, D. Miller, J. Blancato, J. Hardy, K. Gwinn-Hardy, alpha-Synuclein locus triplication

causes Parkinson's disease, *Science* (New York, N.Y.), 302 (2003) 841.

[9] D.W. Miller, S.M. Hague, J. Clarimon, M. Baptista, K. Gwinn-Hardy, M.R. Cookson, A.B. Singleton, Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication, *Neurology*, 62 (2004) 1835-1838.

[10] H. Matsumine, M. Saito, S. Shimoda-Matsubayashi, H. Tanaka, A. Ishikawa, Y. Nakagawa-Hattori, M. Yokochi, T. Kobayashi, S. Igarashi, H. Takano, K. Sanpei, R. Koike, H. Mori, T. Kondo, Y. Mizutani, A.A. Schaffer, Y. Yamamura, S. Nakamura, S. Kuzuhara, S. Tsuji, Y. Mizuno, Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27, *American journal of human genetics*, 60 (1997) 588-596.

[11] T. Kitada, S. Asakawa, N. Hattori, H. Matsumine, Y. Yamamura, S. Minoshima, M. Yokochi, Y. Mizuno, N. Shimizu, Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism, *Nature*, 392 (1998) 605-608.

[12] M. Farrer, P. Chan, R. Chen, L. Tan, S. Lincoln, D. Hernandez, L. Forno, K. Gwinn-Hardy, L. Petrucelli, J. Hussey, A. Singleton, C. Tanner, J. Hardy, J.W. Langston, Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations, *Annals of neurology*, 50 (2001) 293-300.

[13] H. Shimura, N. Hattori, S. Kubo, Y. Mizuno, S. Asakawa, S. Minoshima, N. Shimizu, K. Iwai, T. Chiba, K. Tanaka, T. Suzuki, Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase, *Nature genetics*, 25 (2000) 302-305.

[14] N. Matsuda, S. Sato, K. Shiba, K. Okatsu, K. Saisho, C.A. Gautier, Y.S. Sou, S. Saiki, S. Kawajiri, F. Sato, M. Kimura, M. Komatsu, N. Hattori, K. Tanaka, PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy, *The Journal of cell biology*, 189 (2010) 211-221.

[15] K. Okatsu, K. Saisho, M. Shimanuki, K. Nakada, H. Shitara, Y.S. Sou, M. Kimura, S. Sato, N. Hattori, M. Komatsu, K. Tanaka, N. Matsuda, p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria, *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 15 (2010) 887-900.

[16] E.M. Valente, P.M. Abou-Sleiman, V. Caputo, M.M. Muqit, K. Harvey, S. Gispert, Z. Ali, D. Del Turco, A.R. Bentivoglio, D.G. Healy, A. Albanese, R.

- Nussbaum, R. Gonzalez-Maldonado, T. Deller, S. Salvi, P. Cortelli, W.P. Gilks, D.S. Latchman, R.J. Harvey, B. Dallapiccola, G. Auburger, N.W. Wood, Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1, *Science* (New York, N.Y.), 304 (2004) 1158-1160.
- [17] S. Takatori, G. Ito, T. Iwatsubo, Cytoplasmic localization and proteasomal degradation of N-terminally cleaved form of PINK1, *Neuroscience letters*, 430 (2008) 13-17.
- [18] I.E. Clark, M.W. Dodson, C. Jiang, J.H. Cao, J.R. Huh, J.H. Seol, S.J. Yoo, B.A. Hay, M. Guo, *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin, *Nature*, 441 (2006) 1162-1166.
- [19] J. Park, S.B. Lee, S. Lee, Y. Kim, S. Song, S. Kim, E. Bae, J. Kim, M. Shong, J.M. Kim, J. Chung, Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin, *Nature*, 441 (2006) 1157-1161.
- [20] K. Okatsu, T. Oka, M. Iguchi, K. Imamura, H. Kosako, N. Tani, M. Kimura, E. Go, F. Koyano, M. Funayama, K. Shiba-Fukushima, S. Sato, H. Shimizu, Y. Fukunaga, H. Taniguchi, M. Komatsu, N. Hattori, K. Mihara, K. Tanaka, N. Matsuda, PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria, *Nature communications*, 3 (2012) 1016.
- [21] K. Hasegawa, H. Kowa, Autosomal dominant familial Parkinson disease: older onset of age, and good response to levodopa therapy, *European neurology*, 38 Suppl 1 (1997) 39-43.
- [22] M. Funayama, K. Hasegawa, H. Kowa, M. Saito, S. Tsuji, F. Obata, A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1, *Annals of neurology*, 51 (2002) 296-301.
- [23] C. Paisan-Ruiz, S. Jain, E.W. Evans, W.P. Gilks, J. Simon, M. van der Brug, A. Lopez de Munain, S. Aparicio, A.M. Gil, N. Khan, J. Johnson, J.R. Martinez, D. Nicholl, I.M. Carrera, A.S. Pena, R. de Silva, A. Lees, J.F. Marti-Masso, J. Perez-Tur, N.W. Wood, A.B. Singleton, Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease, *Neuron*, 44 (2004) 595-600.
- [24] A. Zimprich, S. Biskup, P. Leitner, P. Lichtner, M. Farrer, S. Lincoln, J. Kachergus, M. Hulihan, R.J. Uitti, D.B. Calne, A.J. Stoessl, R.F. Pfeiffer, N.

Patenge, I.C. Carbajal, P. Vieregge, F. Asmus, B. Muller-Myhsok, D.W. Dickson, T. Meitinger, T.M. Strom, Z.K. Wszolek, T. Gasser, Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology, *Neuron*, 44 (2004) 601-607.

[25] M. Funayama, K. Hasegawa, E. Ohta, N. Kawashima, M. Komiyama, H. Kowa, S. Tsuji, F. Obata, An LRRK2 mutation as a cause for the parkinsonism in the original PARK8 family, *Annals of neurology*, 57 (2005) 918-921.

[26] L.J. Ozelius, G. Senthil, R. Saunders-Pullman, E. Ohmann, A. Deligtisch, M. Tagliati, A.L. Hunt, C. Klein, B. Henick, S.M. Hailpern, R.B. Lipton, J. Soto-Valencia, N. Risch, S.B. Bressman, LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews, *The New England journal of medicine*, 354 (2006) 424-425.

[27] S. Lesage, A. Durr, M. Tazir, E. Lohmann, A.L. Leutenegger, S. Janin, P. Pollak, A. Brice, LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs, *The New England journal of medicine*, 354 (2006) 422-423.

[28] C. Paisan-Ruiz, LRRK2 gene variation and its contribution to Parkinson disease, *Human mutation*, 30 (2009) 1153-1160.

[29] N.L. Khan, S. Jain, J.M. Lynch, N. Pavese, P. Abou-Sleiman, J.L. Holton, D.G. Healy, W.P. Gilks, M.G. Sweeney, M. Ganguly, V. Gibbons, S. Gandhi, J. Vaughan, L.H. Eunson, R. Katzenschlager, J. Gayton, G. Lennox, T. Revesz, D. Nicholl, K.P. Bhatia, N. Quinn, D. Brooks, A.J. Lees, M.B. Davis, P. Piccini, A.B. Singleton, N.W. Wood, Mutations in the gene LRRK2 encoding dardarin (PARK8) cause familial Parkinson's disease: clinical, pathological, olfactory and functional imaging and genetic data, *Brain : a journal of neurology*, 128 (2005) 2786-2796.

[30] C. Gaig, M. Ezquerra, M.J. Marti, F. Valldeoriola, E. Munoz, A. Llado, M.J. Rey, A. Cardozo, J.L. Molinuevo, E. Tolosa, Screening for the LRRK2 G2019S and codon-1441 mutations in a pathological series of parkinsonian syndromes and frontotemporal lobar degeneration, *Journal of the neurological sciences*, 270 (2008) 94-98.

[31] K. Hasegawa, A.J. Stoessl, T. Yokoyama, H. Kowa, Z.K. Wszolek, S. Yagishita, Familial parkinsonism: study of original Sagamihara PARK8 (I2020T) kindred with variable clinicopathologic outcomes, *Parkinsonism & related*

disorders, 15 (2009) 300-306.

[32] I.F. Mata, J.M. Kachergus, J.P. Taylor, S. Lincoln, J. Aasly, T. Lynch, M.M. Hulihan, S.A. Cobb, R.M. Wu, C.S. Lu, C. Lahoz, Z.K. Wszolek, M.J. Farrer, Lrrk2 pathogenic substitutions in Parkinson's disease, *Neurogenetics*, 6 (2005) 171-177.

[33] E.K. Tan, Y. Zhao, L. Skipper, M.G. Tan, A. Di Fonzo, L. Sun, S. Fook-Chong, S. Tang, E. Chua, Y. Yuen, L. Tan, R. Pavanni, M.C. Wong, P. Kolatkar, C.S. Lu, V. Bonifati, J.J. Liu, The LRRK2 Gly2385Arg variant is associated with Parkinson's disease: genetic and functional evidence, *Human genetics*, 120 (2007) 857-863.

[34] C.P. Zabetian, M. Yamamoto, A.N. Lopez, H. Ujike, I.F. Mata, Y. Izumi, R. Kaji, H. Maruyama, H. Morino, M. Oda, C.M. Hutter, K.L. Edwards, G.D. Schellenberg, D.W. Tsuang, D. Yearout, E.B. Larson, H. Kawakami, LRRK2 mutations and risk variants in Japanese patients with Parkinson's disease, *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 24 (2009) 1034-1041.

[35] M.J. Farrer, J.T. Stone, C.H. Lin, J.C. Dachsel, M.M. Hulihan, K. Haugarvoll, O.A. Ross, R.M. Wu, Lrrk2 G2385R is an ancestral risk factor for Parkinson's disease in Asia, *Parkinsonism & related disorders*, 13 (2007) 89-92.

[36] C. Vilarino-Guell, C. Wider, O.A. Ross, J.C. Dachsel, J.M. Kachergus, S.J. Lincoln, A.I. Soto-Ortolaza, S.A. Cobb, G.J. Wilhoite, J.A. Bacon, B. Behrouz, H.L. Melrose, E. Hentati, A. Puschmann, D.M. Evans, E. Conibear, W.W. Wasserman, J.O. Aasly, P.R. Burkhard, R. Djaldetti, J. Ghika, F. Hentati, A. Krygowska-Wajs, T. Lynch, E. Melamed, A. Rajput, A.H. Rajput, A. Solida, R.M. Wu, R.J. Uitti, Z.K. Wszolek, F. Vingerhoets, M.J. Farrer, VPS35 mutations in Parkinson disease, *American journal of human genetics*, 89 (2011) 162-167.

[37] A. Zimprich, A. Benet-Pages, W. Struhal, E. Graf, S.H. Eck, M.N. Offman, D. Haubenberger, S. Spielberger, E.C. Schulte, P. Lichtner, S.C. Rossle, N. Klopp, E. Wolf, K. Seppi, W. Pirker, S. Presslauer, B. Mollenhauer, R. Katzenschlager, T. Foki, C. Hotzy, E. Reinthaler, A. Harutyunyan, R. Kralovics, A. Peters, F. Zimprich, T. Brucke, W. Poewe, E. Auff, C. Trenkwalder, B. Rost, G. Ransmayr, J. Winkelmann, T. Meitinger, T.M. Strom, A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease,

American journal of human genetics, 89 (2011) 168-175.

[38] J.S. Bonifacino, J.H. Hurley, Retromer, Current opinion in cell biology, 20 (2008) 427-436.

[39] J. Follett, S.J. Norwood, N.A. Hamilton, M. Mohan, O. Kovtun, S. Tay, Y. Zhe, S.A. Wood, G.D. Mellick, P.A. Silburn, B.M. Collins, A. Bugarcic, R.D. Teasdale, The Vps35 D620N mutation linked to Parkinson's disease disrupts the cargo sorting function of retromer, Traffic (Copenhagen, Denmark), 15 (2014) 230-244.

[40] D.A. MacLeod, H. Rhinn, T. Kuwahara, A. Zolin, G. Di Paolo, B.D. McCabe, K.S. Marder, L.S. Honig, L.N. Clark, S.A. Small, A. Abeliovich, RAB7L1 interacts with LRRK2 to modify intraneuronal protein sorting and Parkinson's disease risk, Neuron, 77 (2013) 425-439.

[41] W. Satake, Y. Nakabayashi, I. Mizuta, Y. Hirota, C. Ito, M. Kubo, T. Kawaguchi, T. Tsunoda, M. Watanabe, A. Takeda, H. Tomiyama, K. Nakashima, K. Hasegawa, F. Obata, T. Yoshikawa, H. Kawakami, S. Sakoda, M. Yamamoto, N. Hattori, M. Murata, Y. Nakamura, T. Toda, Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease, Nature genetics, 41 (2009) 1303-1307.

[42] J. Simon-Sanchez, C. Schulte, J.M. Bras, M. Sharma, J.R. Gibbs, D. Berg, C. Paisan-Ruiz, P. Lichtner, S.W. Scholz, D.G. Hernandez, R. Kruger, M. Federoff, C. Klein, A. Goate, J. Perlmutter, M. Bonin, M.A. Nalls, T. Illig, C. Gieger, H. Houlden, M. Steffens, M.S. Okun, B.A. Racette, M.R. Cookson, K.D. Foote, H.H. Fernandez, B.J. Traynor, S. Schreiber, S. Arepalli, R. Zonozi, K. Gwinn, M. van der Brug, G. Lopez, S.J. Chanock, A. Schatzkin, Y. Park, A. Hollenbeck, J. Gao, X. Huang, N.W. Wood, D. Lorenz, G. Deuschl, H. Chen, O. Riess, J.A. Hardy, A.B. Singleton, T. Gasser, Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease, Nature genetics, 41 (2009) 1308-1312.

[43] M.A. Nalls, V. Plagnol, D.G. Hernandez, M. Sharma, U.M. Sheerin, M. Saad, J. Simon-Sanchez, C. Schulte, S. Lesage, S. Sveinbjornsdottir, K. Stefansson, M. Martinez, J. Hardy, P. Heutink, A. Brice, T. Gasser, A.B. Singleton, N.W. Wood, Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies, Lancet (London, England), 377 (2011) 641-649.

- [44] M. Saad, S. Lesage, A. Saint-Pierre, J.C. Corvol, D. Zelenika, J.C. Lambert, M. Vidailhet, G.D. Mellick, E. Lohmann, F. Durif, P. Pollak, P. Damier, F. Tison, P.A. Silburn, C. Tzourio, S. Forlani, M.A. Lorient, M. Giroud, C. Helmer, F. Portet, P. Amouyel, M. Lathrop, A. Elbaz, A. Durr, M. Martinez, A. Brice, Genome-wide association study confirms BST1 and suggests a locus on 12q24 as the risk loci for Parkinson's disease in the European population, *Hum Mol Genet*, 20 (2011) 615-627.
- [45] C.B. Do, J.Y. Tung, E. Dorfman, A.K. Kiefer, E.M. Drabant, U. Francke, J.L. Mountain, S.M. Goldman, C.M. Tanner, J.W. Langston, A. Wojcicki, N. Eriksson, Web-based genome-wide association study identifies two novel loci and a substantial genetic component for Parkinson's disease, *PLoS genetics*, 7 (2011) e1002141.
- [46] A two-stage meta-analysis identifies several new loci for Parkinson's disease, *PLoS genetics*, 7 (2011) e1002142.
- [47] C.M. Lill, J.T. Roehr, M.B. McQueen, F.K. Kavvoura, S. Bagade, B.M. Schjeide, L.M. Schjeide, E. Meissner, U. Zauft, N.C. Allen, T. Liu, M. Schilling, K.J. Anderson, G. Beecham, D. Berg, J.M. Biernacka, A. Brice, A.L. DeStefano, C.B. Do, N. Eriksson, S.A. Factor, M.J. Farrer, T. Foroud, T. Gasser, T. Hamza, J.A. Hardy, P. Heutink, E.M. Hill-Burns, C. Klein, J.C. Latourelle, D.M. Maraganore, E.R. Martin, M. Martinez, R.H. Myers, M.A. Nalls, N. Pankratz, H. Payami, W. Satake, W.K. Scott, M. Sharma, A.B. Singleton, K. Stefansson, T. Toda, J.Y. Tung, J. Vance, N.W. Wood, C.P. Zabetian, P. Young, R.E. Tanzi, M.J. Khoury, F. Zipp, H. Lehrach, J.P. Ioannidis, L. Bertram, Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database, *PLoS genetics*, 8 (2012) e1002548.
- [48] I. Marin, The Parkinson disease gene LRRK2: evolutionary and structural insights, *Molecular biology and evolution*, 23 (2006) 2423-2433.
- [49] R. Vancraenenbroeck, E. Lobbestael, S.D. Weeks, S.V. Strelkov, V. Baekelandt, J.M. Taymans, M. De Maeyer, Expression, purification and preliminary biochemical and structural characterization of the leucine rich repeat namesake domain of leucine rich repeat kinase 2, *Biochimica et biophysica acta*, 1824 (2012) 450-460.
- [50] J. Deng, P.A. Lewis, E. Greggio, E. Sluch, A. Beilina, M.R. Cookson,

Structure of the ROC domain from the Parkinson's disease-associated leucine-rich repeat kinase 2 reveals a dimeric GTPase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (2008) 1499-1504.

[51] G. Ito, T. Okai, G. Fujino, K. Takeda, H. Ichijo, T. Katada, T. Iwatsubo, GTP binding is essential to the protein kinase activity of LRRK2, a causative gene product for familial Parkinson's disease, *Biochemistry*, 46 (2007) 1380-1388.

[52] A.B. West, D.J. Moore, C. Choi, S.A. Andrabi, X. Li, D. Dikeman, S. Biskup, Z. Zhang, K.L. Lim, V.L. Dawson, T.M. Dawson, Parkinson's disease-associated mutations in LRRK2 link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity, *Hum Mol Genet*, 16 (2007) 223-232.

[53] A.B. West, D.J. Moore, S. Biskup, A. Bugayenko, W.W. Smith, C.A. Ross, V.L. Dawson, T.M. Dawson, Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (2005) 16842-16847.

[54] T. Suganuma, S.G. Pattenden, J.L. Workman, Diverse functions of WD40 repeat proteins in histone recognition, *Genes & development*, 22 (2008) 1265-1268.

[55] M. Jaleel, R.J. Nichols, M. Deak, D.G. Campbell, F. Gillardon, A. Knebel, D.R. Alessi, LRRK2 phosphorylates moesin at threonine-558: characterization of how Parkinson's disease mutants affect kinase activity, *Biochem J*, 405 (2007) 307-317.

[56] D. Korr, L. Toschi, P. Donner, H.D. Pohlenz, B. Kreft, B. Weiss, LRRK1 protein kinase activity is stimulated upon binding of GTP to its Roc domain, *Cellular signalling*, 18 (2006) 910-920.

[57] S. Biskup, D.J. Moore, A. Rea, B. Lorenz-Deperieux, C.E. Coombes, V.L. Dawson, T.M. Dawson, A.B. West, Dynamic and redundant regulation of LRRK2 and LRRK1 expression, *BMC neuroscience*, 8 (2007) 102.

[58] A. Gardet, Y. Benita, C. Li, B.E. Sands, I. Ballester, C. Stevens, J.R. Korzenik, J.D. Rioux, M.J. Daly, R.J. Xavier, D.K. Podolsky, LRRK2 is involved in the IFN-gamma response and host response to pathogens, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185 (2010) 5577-5585.

- [59] T. Maekawa, M. Kubo, I. Yokoyama, E. Ohta, F. Obata, Age-dependent and cell-population-restricted LRRK2 expression in normal mouse spleen, *Biochemical and biophysical research communications*, 392 (2010) 431-435.
- [60] S. Biskup, D.J. Moore, F. Celsi, S. Higashi, A.B. West, S.A. Andrabi, K. Kurkinen, S.W. Yu, J.M. Savitt, H.J. Waldvogel, R.L. Faull, P.C. Emson, R. Torp, O.P. Ottersen, T.M. Dawson, V.L. Dawson, Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain, *Annals of neurology*, 60 (2006) 557-569.
- [61] C.J. Gloeckner, N. Kinkl, A. Schumacher, R.J. Braun, E. O'Neill, T. Meitinger, W. Kolch, H. Prokisch, M. Ueffing, The Parkinson disease causing LRRK2 mutation I2020T is associated with increased kinase activity, *Hum Mol Genet*, 15 (2006) 223-232.
- [62] D. MacLeod, J. Dowman, R. Hammond, T. Leete, K. Inoue, A. Abeliovich, The familial Parkinsonism gene LRRK2 regulates neurite process morphology, *Neuron*, 52 (2006) 587-593.
- [63] A. Abeliovich, M. Flint Beal, Parkinsonism genes: culprits and clues, *Journal of neurochemistry*, 99 (2006) 1062-1072.
- [64] Y. Tong, H. Yamaguchi, E. Giaime, S. Boyle, R. Kopan, R.J. Kelleher, 3rd, J. Shen, Loss of leucine-rich repeat kinase 2 causes impairment of protein degradation pathways, accumulation of alpha-synuclein, and apoptotic cell death in aged mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (2010) 9879-9884.
- [65] M.C. Herzig, C. Kolly, E. Persohn, D. Theil, T. Schweizer, T. Hafner, C. Stemmelen, T.J. Troxler, P. Schmid, S. Danner, C.R. Schnell, M. Mueller, B. Kinzel, A. Grevot, F. Bolognani, M. Stirn, R.R. Kuhn, K. Kaupmann, P.H. van der Putten, G. Rovelli, D.R. Shimshek, LRRK2 protein levels are determined by kinase function and are crucial for kidney and lung homeostasis in mice, *Hum Mol Genet*, 20 (2011) 4209-4223.
- [66] K.M. Hinkle, M. Yue, B. Behrouz, J.C. Dachselt, S.J. Lincoln, E.E. Bowles, J.E. Beevers, B. Dugger, B. Winner, I. Prots, C.B. Kent, K. Nishioka, W.L. Lin, D.W. Dickson, C.J. Janus, M.J. Farrer, H.L. Melrose, LRRK2 knockout mice have an intact dopaminergic system but display alterations in exploratory and motor co-ordination behaviors, *Mol Neurodegener*, 7 (2012) 25.

- [67] R.N. Fuji, M. Flagella, M. Baca, M.A. Baptista, J. Brodbeck, B.K. Chan, B.K. Fiske, L. Honigberg, A.M. Jubb, P. Katavolos, D.W. Lee, S.C. Lewin-Koh, T. Lin, X. Liu, S. Liu, J.P. Lyssikatos, J. O'Mahony, M. Reichelt, M. Roose-Girma, Z. Sheng, T. Sherer, A. Smith, M. Solon, Z.K. Sweeney, J. Tarrant, A. Urkowitz, S. Warming, M. Yaylaoglu, S. Zhang, H. Zhu, A.A. Estrada, R.J. Watts, Effect of selective LRRK2 kinase inhibition on nonhuman primate lung, *Science translational medicine*, 7 (2015) 273ra215.
- [68] T. Kuwahara, K. Inoue, V.D. D'Agati, T. Fujimoto, T. Eguchi, S. Saha, B. Wolozin, T. Iwatsubo, A. Abeliovich, LRRK2 and RAB7L1 coordinately regulate axonal morphology and lysosome integrity in diverse cellular contexts, *Scientific reports*, 6 (2016) 29945.
- [69] S. Matta, K. Van Kolen, R. da Cunha, G. van den Bogaart, W. Mandemakers, K. Miskiewicz, P.J. De Bock, V.A. Morais, S. Vilain, D. Haddad, L. Delbroek, J. Swerts, L. Chavez-Gutierrez, G. Esposito, G. Daneels, E. Karran, M. Holt, K. Gevaert, D.W. Moechars, B. De Strooper, P. Verstreken, LRRK2 controls an EndoA phosphorylation cycle in synaptic endocytosis, *Neuron*, 75 (2012) 1008-1021.
- [70] I. Martin, J.W. Kim, B.D. Lee, H.C. Kang, J.C. Xu, H. Jia, J. Stankowski, M.S. Kim, J. Zhong, M. Kumar, S.A. Andrabi, Y. Xiong, D.W. Dickson, Z.K. Wszolek, A. Pandey, T.M. Dawson, V.L. Dawson, Ribosomal protein s15 phosphorylation mediates LRRK2 neurodegeneration in Parkinson's disease, *Cell*, 157 (2014) 472-485.
- [71] M. Steger, F. Tonelli, G. Ito, P. Davies, M. Trost, M. Vetter, S. Wachter, E. Lorentzen, G. Duddy, S. Wilson, M.A. Baptista, B.K. Fiske, M.J. Fell, J.A. Morrow, A.D. Reith, D.R. Alessi, M. Mann, Phosphoproteomics reveals that Parkinson's disease kinase LRRK2 regulates a subset of Rab GTPases, *eLife*, 5 (2016).
- [72] M. Steger, F. Diez, H.S. Dhekne, P. Lis, R.S. Nirujogi, O. Karayel, F. Tonelli, T.N. Martinez, E. Lorentzen, S.R. Pfeffer, D.R. Alessi, M. Mann, Systematic proteomic analysis of LRRK2-mediated Rab GTPase phosphorylation establishes a connection to ciliogenesis, *eLife*, 6 (2017).
- [73] P. Lis, S. Burel, M. Steger, M. Mann, F. Brown, F. Diez, F. Tonelli, J.L. Holton, P.W. Ho, S.L. Ho, M.Y. Chou, N.K. Polinski, T.N. Martinez, P. Davies,

D.R. Alessi, Development of phospho-specific Rab protein antibodies to monitor in vivo activity of the LRRK2 Parkinson's disease kinase, *Biochem J*, (2017).

[74] W.W. Smith, Z. Pei, H. Jiang, V.L. Dawson, T.M. Dawson, C.A. Ross, Kinase activity of mutant LRRK2 mediates neuronal toxicity, *Nat Neurosci*, 9 (2006) 1231-1233.

[75] X. Lin, L. Parisiadou, X.L. Gu, L. Wang, H. Shim, L. Sun, C. Xie, C.X. Long, W.J. Yang, J. Ding, Z.Z. Chen, P.E. Gallant, J.H. Tao-Cheng, G. Rudow, J.C. Troncoso, Z. Liu, Z. Li, H. Cai, Leucine-rich repeat kinase 2 regulates the progression of neuropathology induced by Parkinson's-disease-related mutant alpha-synuclein, *Neuron*, 64 (2009) 807-827.

[76] T. Maekawa, S. Mori, Y. Sasaki, T. Miyajima, S. Azuma, E. Ohta, F. Obata, The I2020T Leucine-rich repeat kinase 2 transgenic mouse exhibits impaired locomotive ability accompanied by dopaminergic neuron abnormalities, *Mol Neurodegener*, 7 (2012) 15.

[77] G. Joshi, M.E. Bekier, 2nd, Y. Wang, Golgi fragmentation in Alzheimer's disease, *Frontiers in neuroscience*, 9 (2015) 340.

[78] G. Haase, C. Rabouille, Golgi Fragmentation in ALS Motor Neurons. New Mechanisms Targeting Microtubules, Tethers, and Transport Vesicles, *Frontiers in neuroscience*, 9 (2015) 448.

[79] H. Stenmark, Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10 (2009) 513-525.

[80] P. Gomez-Suaga, P. Rivero-Rios, E. Fdez, M. Blanca Ramirez, I. Ferrer, A. Aiastui, A. Lopez De Munain, S. Hilfiker, LRRK2 delays degradative receptor trafficking by impeding late endosomal budding through decreasing Rab7 activity, *Hum Mol Genet*, 23 (2014) 6779-6796.

[81] D. Waschbusch, H. Michels, S. Strassheim, E. Ossendorf, D. Kessler, C.J. Gloeckner, A. Barnekow, LRRK2 transport is regulated by its novel interacting partner Rab32, *PloS one*, 9 (2014) e111632.

[82] F. Shimizu, T. Katagiri, M. Suzuki, T.K. Watanabe, S. Okuno, Y. Kuga, M. Nagata, T. Fujiwara, Y. Nakamura, E. Takahashi, Cloning and chromosome assignment to 1q32 of a human cDNA (RAB7L1) encoding a small GTP-binding protein, a member of the RAS superfamily, *Cytogenetics and cell genetics*, 77 (1997) 261-263.

- [83] S. Wang, Z. Ma, X. Xu, Z. Wang, L. Sun, Y. Zhou, X. Lin, W. Hong, T. Wang, A role of Rab29 in the integrity of the trans-Golgi network and retrograde trafficking of mannose-6-phosphate receptor, *PloS one*, 9 (2014) e96242.
- [84] R. Chia, S. Haddock, A. Beilina, I.N. Rudenko, A. Mamais, A. Kaganovich, Y. Li, R. Kumaran, M.A. Nalls, M.R. Cookson, Phosphorylation of LRRK2 by casein kinase 1alpha regulates trans-Golgi clustering via differential interaction with ARHGEF7, *Nature communications*, 5 (2014) 5827.
- [85] A. Beilina, I.N. Rudenko, A. Kaganovich, L. Civiero, H. Chau, S.K. Kalia, L.V. Kalia, E. Lobbestael, R. Chia, K. Ndukwe, J. Ding, M.A. Nalls, C. International Parkinson's Disease Genomics, C. North American Brain Expression, M. Olszewski, D.N. Hauser, R. Kumaran, A.M. Lozano, V. Baekelandt, L.E. Greene, J.M. Taymans, E. Greggio, M.R. Cookson, Unbiased screen for interactors of leucine-rich repeat kinase 2 supports a common pathway for sporadic and familial Parkinson disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111 (2014) 2626-2631.
- [86] K. Sharma, R.C. D'Souza, S. Tyanova, C. Schaab, J.R. Wisniewski, J. Cox, M. Mann, Ultradeep human phosphoproteome reveals a distinct regulatory nature of Tyr and Ser/Thr-based signaling, *Cell reports*, 8 (2014) 1583-1594.
- [87] Z. Liu, N. Bryant, R. Kumaran, A. Beilina, A. Abeliovich, M.R. Cookson, A.B. West, LRRK2 phosphorylates membrane-bound Rabs and is activated by GTP-bound Rab7L1 to promote recruitment to the trans-Golgi network, *Hum Mol Genet*, (2017).
- [88] S.R. Pfeffer, Structural clues to Rab GTPase functional diversity, *The Journal of biological chemistry*, 280 (2005) 15485-15488.
- [89] Y. Aoki, R. Manzano, Y. Lee, R. Dafinca, M. Aoki, A.G.L. Douglas, M.A. Varela, C. Sathyaprakash, J. Scaber, P. Barbagallo, P. Vader, I. Mager, K. Ezzat, M.R. Turner, N. Ito, S. Gasco, N. Ohbayashi, S. El Andaloussi, S. Takeda, M. Fukuda, K. Talbot, M.J.A. Wood, C9orf72 and RAB7L1 regulate vesicle trafficking in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, *Brain : a journal of neurology*, 140 (2017) 887-897.
- [90] Y. Fujita, E. Ohama, M. Takatama, S. Al-Sarraj, K. Okamoto, Fragmentation of Golgi apparatus of nigral neurons with alpha-synuclein-positive inclusions in patients with Parkinson's disease, *Acta*

neuropathologica, 112 (2006) 261-265.

[91] Y. Fan, A.J. Howden, A.R. Sarhan, P. Lis, G. Ito, T.N. Martinez, K. Brockmann, T. Gasser, D.R. Alessi, E.M. Sammler, Interrogating Parkinson's disease LRRK2 kinase pathway activity by assessing Rab10 phosphorylation in human neutrophils, *Biochem J*, (2017).

		責任遺伝子	形式	参照
PARK1	4q22.1	α -synuclein	AD	Polymeropoulos et al., <i>Science</i> 1996
PARK2	6q26	Parkin	AR	Kitada et al., <i>Nature</i> 1998
PARK3	2p13	unknown		Gasser et al., <i>Net Genet</i> 1998
PARK4	4q22.1	α -synuclein	AD	Singleton et al., <i>Science</i> 2003
PARK5	4p13	UCHL1		Leroy et al., <i>Nature</i> 1998
PARK6	1q36.12	PINK1	AR	Valente et al., <i>Science</i> 2004
PARK7	1p36.23	DJ-1	AR	Bonifati et al., <i>Science</i> 2003
PARK8	12q12	LRRK2	AD	Parisian-Ruiz et al., <i>Neuron</i> 2004 Zimprich et al., <i>Neuron</i> 2004
PARK9	1p36.13	ATP13A2	AR	Ramirez et al., <i>Nat Genet</i> 2006
PARK10	1p32	unknown		Hicks et al., <i>Ann Neurol</i> 2002
PARK11	2q37.1	GIGYF2		Pankratz et al., <i>Am J Hum Genet</i> 2003
PARK12	xq21-q25	unknown		Pankratz et al., <i>Hum Molec Genet</i> 2003
PARK13	2p13.1	HTRA2		Strauss et al., <i>Hum Molec Genet</i> 2005
PARK14	22q13.1	PLA2G6	AR	Parisian-Ruiz et al., <i>Ann Neurol</i> 2009
PARK15	22q12.3	FBXO7	AR	Shojaee et al., <i>Am J Hum Genet</i> 2008
PARK16	1q32	unknown		Satake et al., <i>Nature Genet</i> 2009
PARK17	16q11.2	VPS35	AD	Vilarino-Guell et al., <i>Am J Hum Genet</i> 2011 Zimprich et al., <i>Am J Hum Genet</i> 2011
PARK18	3q27.1	ELF4G1	AD	Chartier-Harlin et al., <i>Am J Hum Genet</i> 2011
PARK19	1p31.3	DNJC6	AR	Edvardson et al., <i>PLOS ONE</i> 2012
PARK20	21q22.11	SYNJ1	AR	Krebs et al., <i>Hum Mutat</i> 2013 Quadri et al., <i>Hum Mutat</i> 2013
PARK21	3q22	TMEM230	AD	Deng et al., <i>Nat Genet</i> 2016
PARK22	7p11.2	CHCHD2		Funayama et al., <i>Lancet Neurol</i> 2015
PARK23	15q22.2	VPS13C	AR	Lesage et al., <i>Am J Hum Genet</i> 2016

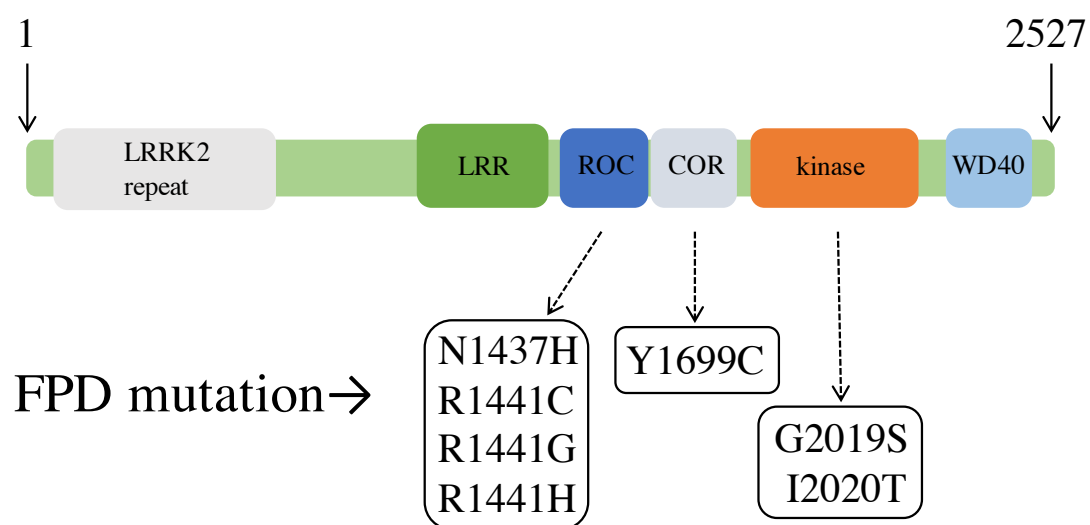
図表 1 家族性パーキンソン病の責任遺伝子

これまでに報告されている家族性パーキンソン病の責任遺伝子を表記した。優性遺伝性の遺伝形式については、黄色で示した。

遺伝子 (座)	参照
α -synuclein	Satake et al., <i>Nature Genet</i> 2009 Sanchez et al., <i>Nature Genet</i> 2009 Nalls et al., <i>Lancet</i> 2011 Saad et al., <i>Hum Mol Genet</i> 2011 Do et al., <i>PLoS Genet</i> 2011 Lill et al., <i>PLoS Genet</i> 2012
LRRK2	Satake et al., <i>Nature Genet</i> 2009 Sanchez et al., <i>Nature Genet</i> 2009 Nalls et al., <i>Lancet</i> 2011 Saad et al., <i>Hum Mol Genet</i> 2011 Do et al., <i>PLoS Genet</i> 2011 Lill et al., <i>PLoS Genet</i> 2012
PARK16	Satake et al., <i>Nature Genet</i> 2009 Sanchez et al., <i>Nature Genet</i> 2009 IPDGC and WTCCC2., <i>PLoS Genet</i> 2011 Do et al., <i>PLoS Genet</i> 2011 Lill et al., <i>PLoS Genet</i> 2012
BST1	Satake et al., <i>Nature Genet</i> 2009 Saad et al., <i>Hum Mol Genet</i> 2011 Nalls et al., <i>Lancet</i> 2011 Do et al., <i>PLoS Genet</i> 2011 Lill et al., <i>PLoS Genet</i> 2012
MAPT	Sanchez et al., <i>Nature Genet</i> 2009 Nalls et al., <i>Lancet</i> 2011 IPDGC and WTCCC2., <i>PLoS Genet</i> 2011 Do et al., <i>PLoS Genet</i> 2011 Lill et al., <i>PLoS Genet</i> 2012

図表 2 孤発性パーキンソン病の危険因子

複数の報告において同定された孤発性 PD の危険因子を示した。



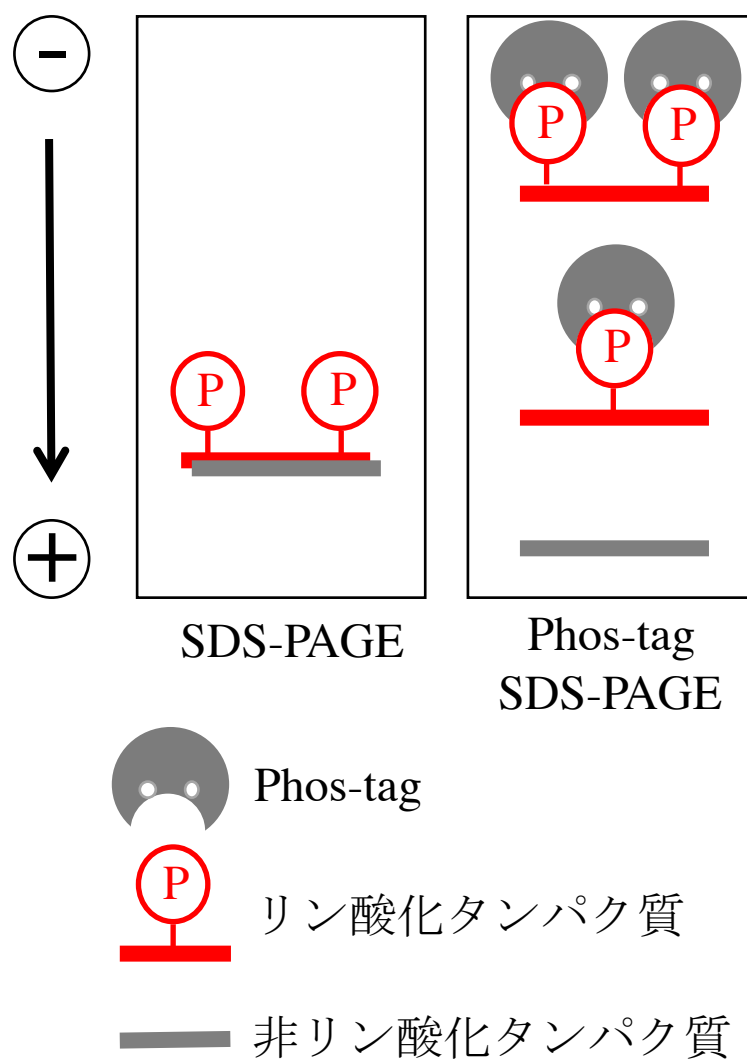
図表 3 LRRK2 のドメイン構造と 7 種類の FPD 変異

LRRK2 タンパク質のドメイン構造と家族性パーキンソン病 (FPD) に連鎖することが報告されているアミノ酸変異の位置を記した。アミノ末端側から順に、LRRK2 に特異的に見られるリピート構造 (LRRK2-specific repeat)、LRR (leucine-rich repeat) ドメイン、ROC (Ras of complex proteins) ドメイン、kinase ドメイン、WD40 repeat ドメインを有している。

	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
Rab7L1_S3A	ATGGGCGCCCGAGATCACCTG	CAGGTGATCTCGGGCGCCCAT
Rab7L1_T21A	GTGGGTAAGGCGTCACTGGTC	GACCAGTGACGCCTTACCCAC
Rab7L1_S22A	GGTAAGACGGCACTGGTCCAG	CTGGACCAGTGCCGTCTTACC
Rab7L1_S28A	CAGCGCTACGCCCAGGACAGCTTC	GAAGCTGTCTGGGCGTAGCGCTG
Rab7L1_S31A	TCCAGGACGCCTTCAGCAAG	CTTGCTGAAGGCGTCTGGGA
Rab7L1_S33A	GACAGCTTCGCCAAGCACTAC	GTAGTGCTTGCGGAAGCTGTC
Rab7L1_S38A	AGCACTACAAGGCTACCGTGGGAG	CTCCACGGTAGCCTTGTAGTGCT
Rab7L1_T39A	TACAAGTCTGCCGTGGGAGTG	CACTCCCACGGCAGACTTGTGA
Rab7L1_S52A	CTCCAGTGGGCGGACTCAGAA	TTCTGAGTCGGGCCACTGGAG
Rab7L1_T71A	GAGCGTTTCGCATCCATGACA	TGTCATGGATGCGAAACGCTC
Rab7L1_S72A	CGTTTCACAGCCATGACACGA	TCGTGTCATGGCTGTGAAACG
Rab7L1_T71AS72A	GAGCGTTTCGCAGCCATGACACGA	TCGTGTCATGGCTGCGAAACGCTC
Rab7L1_S72E	AGCGTTTCACAGAAATGACACGACT	AGTCGTGTCATTTCTGTGAAACGCT
Rab7L1_T74A	TTCACATCCATGGCAGACTCTACTAC	GTAGTAGAGTCGTGCCATGGATGTGAA
Rab7L1_S82A	TACCGAGATGCTGCTGCCTGT	ACAGGCAGCAGCATCTCGGTA
Rab7L1_T91A	ATGTTTGACGTCGCCAATGCCACTACT	AGTAGTGCCATTGGCGACGTCAAACAT
Rab7L1_T94A	ACCAATGCCGCTACTTTCAGC	GCTGAAAGTAGCGGCATTGGT
Rab7L1_T95A	AATGCCACTGCTTTCAGCAAC	GTTGCTGAAAGCAGTGGCATT
Rab7L1_S97A	ACTACTTTCGCCAACAGCCAA	TTGGCTGTTGGCGAAAGTAGT
Rab7L1_S99A	ACTTTCAGCAACGCCAACGA	TCGTTGGGCGTGTGCTGAAAGT
Rab7L1_S108A	GATCTGGATGCCAAGCTCACA	TGTGAGCTTGGCATCCAGATC
Rab7L1_T111A	GATAGCAAGCTCGCACTGCCAGT	ACTGGGCAGTGCGAGCTTGCTATC
Rab7L1_S130A	AAGAGTGATCTGGCCCCTTGG	CCAAGGGGCCAGATCACTCTT
Rab7L1_S135A	GCAGTGGCCCCGGGACCAGATT	AATCTGGTCCCGGGCCACTGC
Rab7L1_S143A	GACCGTTTCGCCAAAGAGAAC	GTTCTCTTTGGCGAACCCGGTC
Rab7L1_T149A	GAGAACGGTTTTGCGGGCTGGACAGAA	TTCTGTCCAGCCCGCAAAACCGTTCTC
Rab7L1_T152A	TTTACGGGCTGGGCAGAAACATCAGTC	GACTGATGTTTCTGCCAGCCCGTAAA
Rab7L1_T154A	GGCTGGACAGAAGCATCAGTCAAGGAG	CTCCTTGACTGATGCTTCTGTCCAGCC
Rab7L1_S155A	ACAGAAACAGCAGTCAAGGAG	CTCCTTGACTGCTGTTCTGT
Rab7L1_S177A	ATGAACAATGCCAGAGAAGAT	ATCTTCTCTGGCATGTTCAT
Rab7L1_S183A	ATAATGGCTTCGTCCACCCAA	TTGGGTGGACGAAGCCATTAT
Rab7L1_S185A	ATAATGTCTTCGGCCACCCAA	TTGGGTGGCCGAAGACATTAT
Rab7L1_T186A	ATGTCTTCGTCCGCCAAGGGAAGTAC	GTAGTTCCTTGGGCGGACGAAGACAT
Rab7L1_S197A	AAACCCGCCCCAGGCTGGACA	TGTCCAGCCTGGGGCGGGTTT
Rab7L1_T202A	CCAGGCTGGGCATGCTGCTAG	CTAGCAGCATGCCAGCCTGG

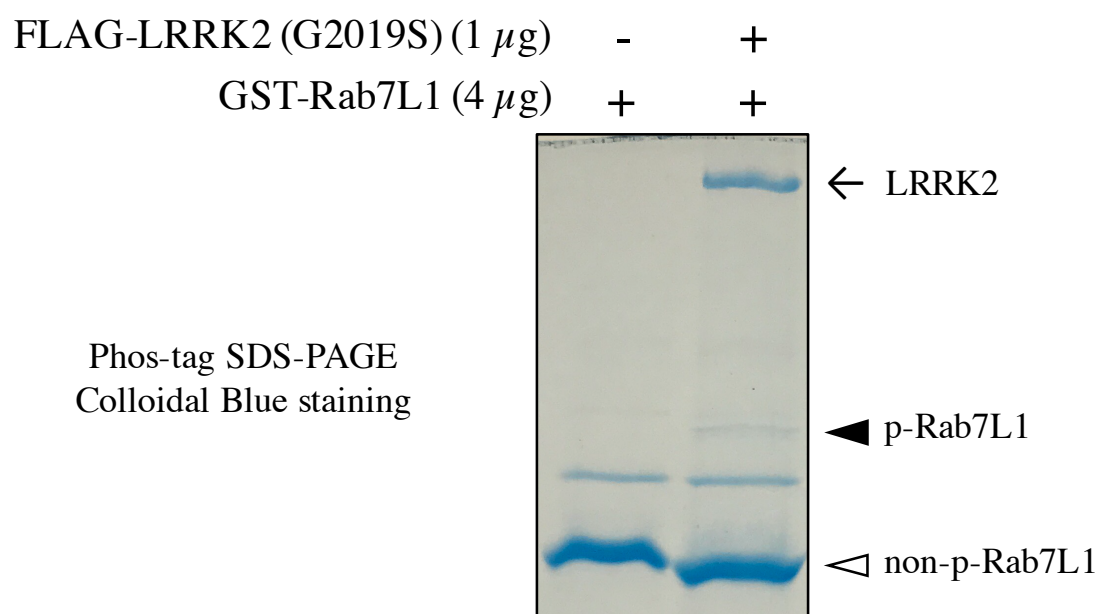
図表 4 Rab7L1 変異体作製に用いた primer

本研究において、Rab7L1 変異体の作製に用いた primer セットを記した。



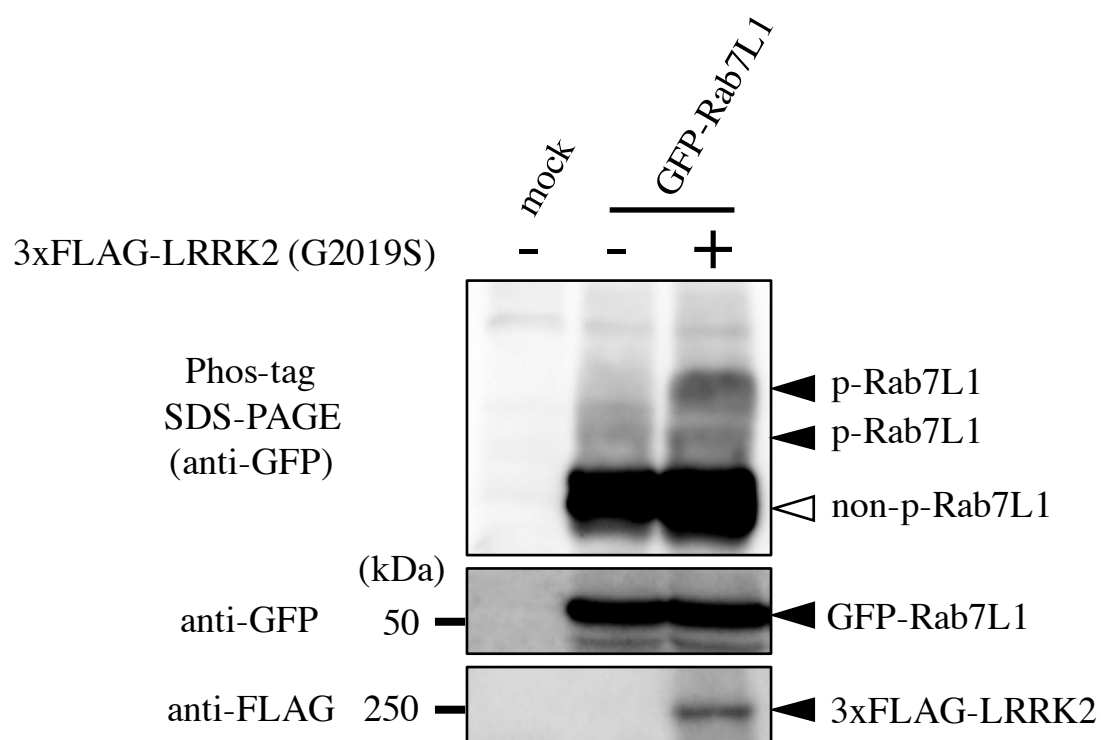
図表 5 Phos-tag SDS-PAGE の概略図

ゲル中の Phos-tag 分子がタンパク質のリン酸基を捕捉することで泳動度が変化し、リン酸化タンパク質を分離・検出することができる。



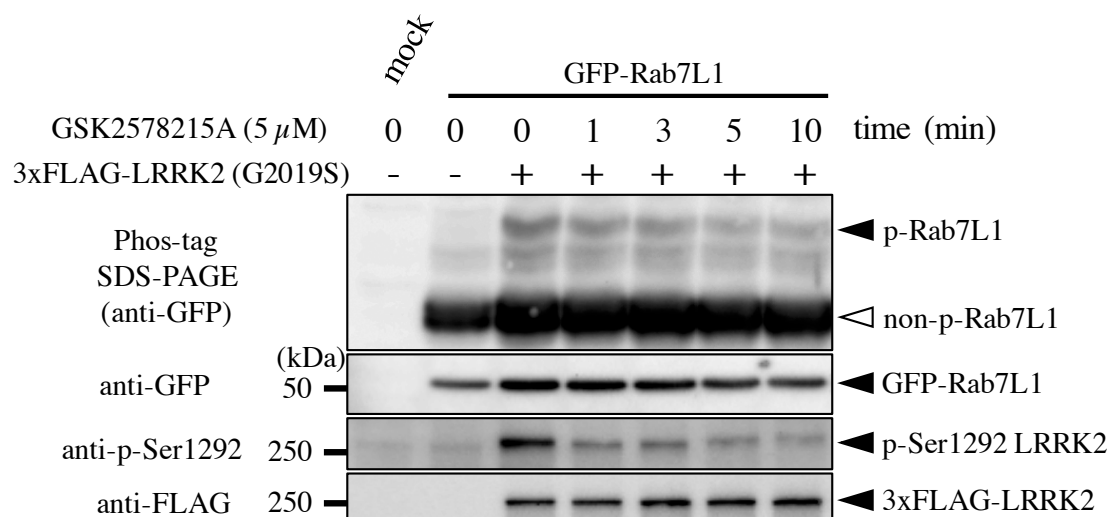
図表 6 *In vitro* における LRRK2 による Rab7L1 リン酸化の検出

組換え GST-Rab7L1 と FLAG-LRRK2 (G2019S) を ATP 存在下で反応させて、Phos-tag ゲルを用いて泳動した。その後、Colloidal Blue staining を行い、タンパク質を可視化した。



図表7 細胞内における LRRK2 による Rab7L1 リン酸化の検出

3xFLAG-LRRK2 (G2019S) と GFP-Rab7L1 を一過性に過剰発現させた HEK293 細胞を回収し、Anti-GFP 抗体を用いて Phos-tag SDS-PAGE 解析を行った (上段)。さらに Anti-GFP (中段)、Anti-FLAG 抗体 (下段) を用いてウェスタンブロット解析を行った。



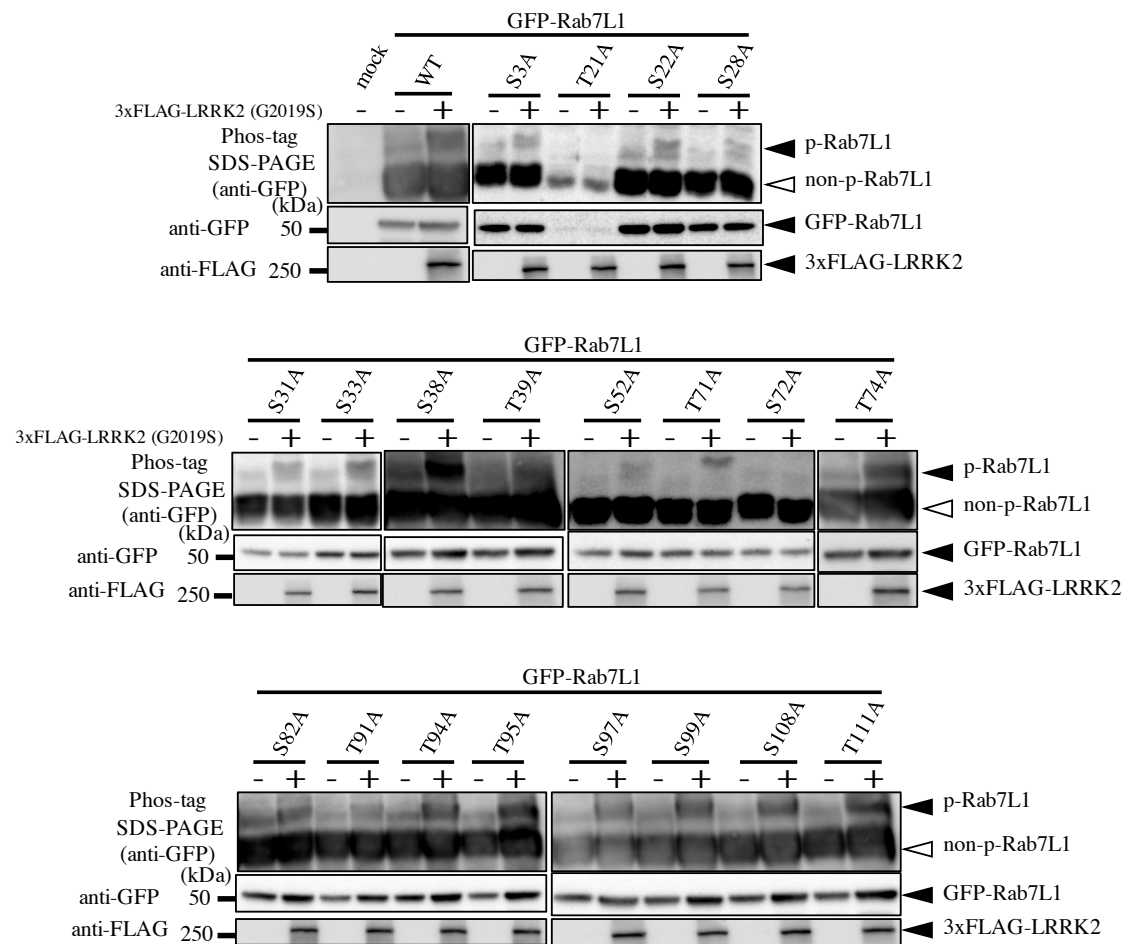
図表 8 LRRK2 キナーゼ活性阻害剤処理による Rab7L1 リン酸化の変化

3xFLAG-LRRK2 (G2019S) と GFP-Rab7L1 を一過性に過剰発現させた HEK293 細胞に 5 μ M GSK2578215A (LRRK2 キナーゼ活性阻害剤) を処理し、Anti-GFP 抗体を用いて Phos-tag SDS-PAGE 解析を行った (最上段)。さらに Anti-GFP (上から 2 段目)、Anti-p-Ser1292 LRRK2 (上から 3 段目)、Anti-FLAG (最下段) 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。

Rab7L1 amino acid sequence		
Human	1	MG ³ S - - - RDHL - FKV L V V GDA A V G K T S ^{21 22} L V Q R Y S ²⁸ Q D S ³¹ F S ³³ K H Y K S ^{38 39} T V
Rat	1	MG S - - - RDHL - FKV L V V GDA A V G K T S ^{21 22} L V Q R Y S ²⁸ Q D S ³¹ F S ³³ K H Y K S ^{38 39} T V
Mouse	1	MG S - - - RDHL - FKV L V V GDA A V G K T S ^{21 22} L V Q R Y S ²⁸ Q D S ³¹ F S ³³ K H Y K S ^{38 39} T V
Human	41	G V D F A L K K V L Q W S ⁵² D Y E I V R L Q L W D I A G Q E R F T S ^{71 72} M T ⁷⁴ R L Y Y R D A S A C ⁸²
Rat	41	G V D F A L K K V L Q W S ⁵² D S E M V R L Q L W D I A G Q E R F T S ^{71 72} M T ⁷⁴ R L Y Y R D A S A C ⁸²
Mouse	41	G V D F A L K K V L Q W S ⁵² D S E M V R L Q L W D I A G Q E R F T S ^{71 72} M T ⁷⁴ R L Y Y R D A S A C ⁸²
Human	85	V I M F D V T ⁹¹ N A T ^{94 95} T F S ⁹⁷ S ⁹⁹ Q R W K Q D L D S ¹⁰⁸ S K L T ¹¹¹ L P N G E P V P C L L A N K S D ¹²⁸
Rat	85	V I M F D V T ⁹¹ N A T ^{94 95} T F S ⁹⁷ S ⁹⁹ Q R W K Q D L D S ¹⁰⁸ S K L T ¹¹¹ L P S G E P V P C L L A N K S D ¹²⁸
Mouse	85	V I M F D V T ⁹¹ N A T ^{94 95} T F S ⁹⁷ S ⁹⁹ Q R W K Q D L D S ¹⁰⁸ S K L T ¹¹¹ L P S G E P V P C - - A N K S D ¹²⁵
Human	129	L S ¹³⁰ P W A V S ¹³⁵ R D Q I D R F S ¹⁴³ K E N G F T ¹⁴⁹ G W T ¹⁵² E T S ^{154 155} V K E N K N I N E A M R V L I E K ¹⁷²
Rat	129	L S P W A V S ¹³⁵ R D Q I D R F S ¹⁴³ K E N G F T ¹⁴⁹ G W T ¹⁵² E T S ^{154 155} V K E N K N I N E A M R V L I E K ¹⁷²
Mouse	126	L S P W A V S ¹³⁵ R D Q I D Q F S ¹⁴³ K E N G F T ¹⁴⁹ G W T ¹⁵² E T S ^{154 155} V K E N K N I N E A M R V L I E K ¹⁶⁹
Human	173	M M R N S ¹⁷⁷ T E - - - D I M S L S ¹⁸³ T Q G D Y I N L Q T K - S ¹⁹⁰ S S W - - - S ²⁰² C C ²⁰³
Rat	173	M M N N S R E - - - D I M S S ¹⁸³ T Q G N Y I N L Q T K P S P G W - - - T C C ²⁰⁴
Mouse	170	M M N N S R E - - - D V M S L S ¹⁸³ T Q G N Y I N L Q A K P S S G W - - - T C C ²⁰¹

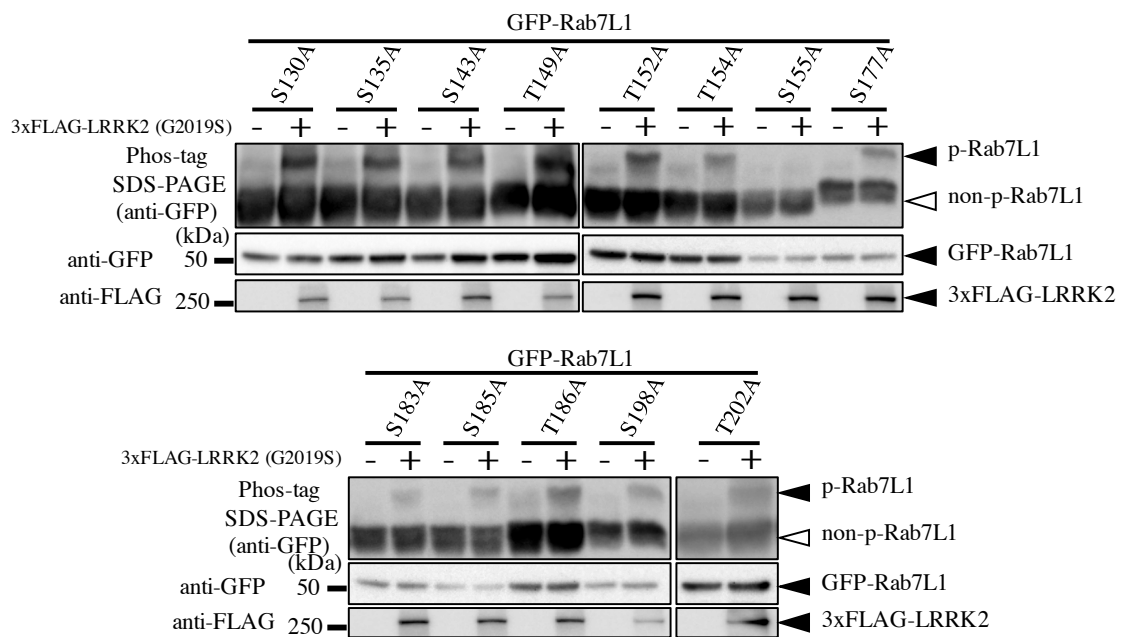
図表9 ヒト、ラット、マウスの Rab7L1 アミノ酸配列

ヒト、ラット、マウスの Rab7L1 アミノ酸配列。種間で保存されているセリン・スレオニン残基を黄色で示した。



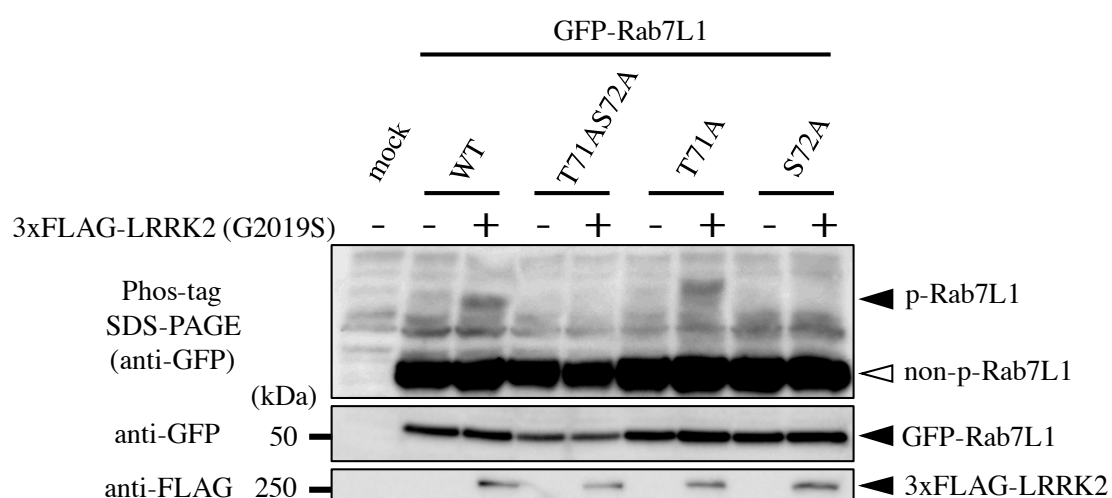
図表 10 Rab7L1 変異体を用いた LRRK2 によるリン酸化部位の同定

3xFLAG-LRRK2 (G2019S) と各種 GFP-Rab7L1 アラニン置換体を一過性に過剰発現させた HEK293 細胞を回収し、Anti-GFP 抗体を用いて Phos-tag SDS-PAGE 解析を行った。



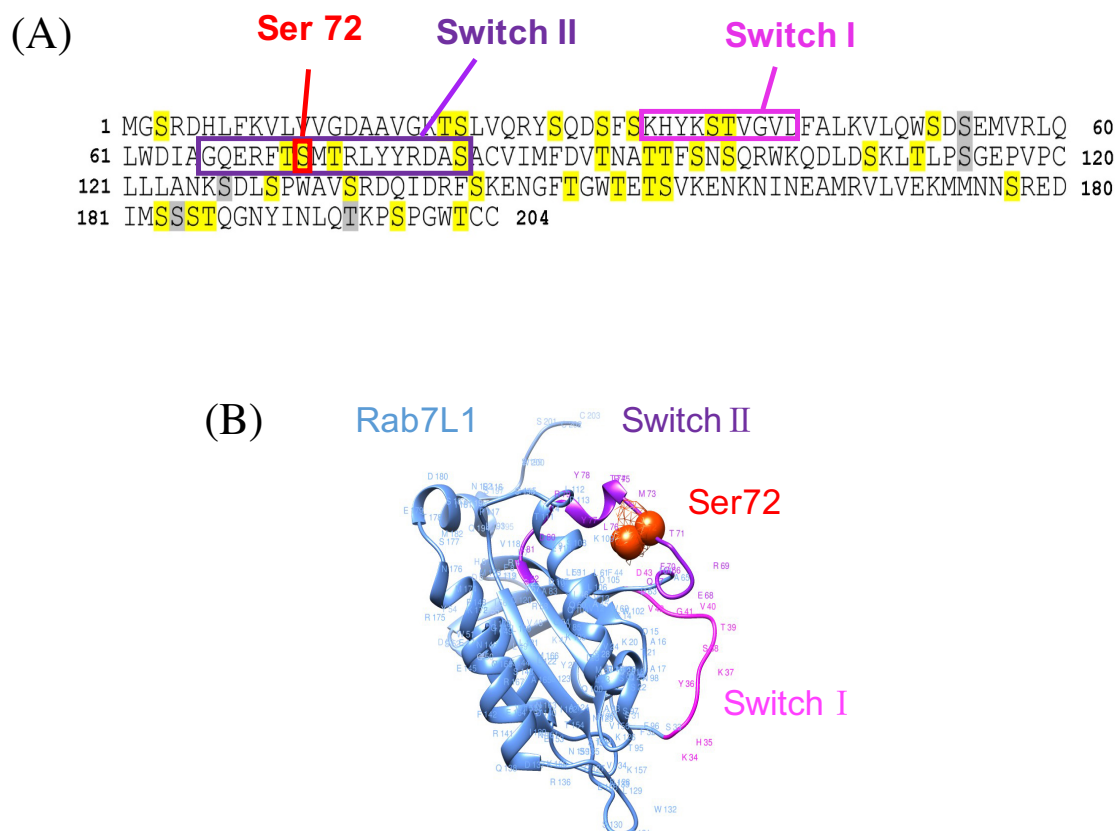
図表 10 Rab7L1 変異体を用いた LRRK2 によるリン酸化部位の同定 (続き)

3xFLAG-LRRK2 (G2019S) と各種 GFP-Rab7L1 アラニン置換体を一過性に過剰発現させた HEK293 細胞を回収し、Anti-GFP 抗体を用いて Phos-tag SDS-PAGE 解析を行った。



図表 11 LRRK2 による Rab7L1 S72A 置換体のリン酸化

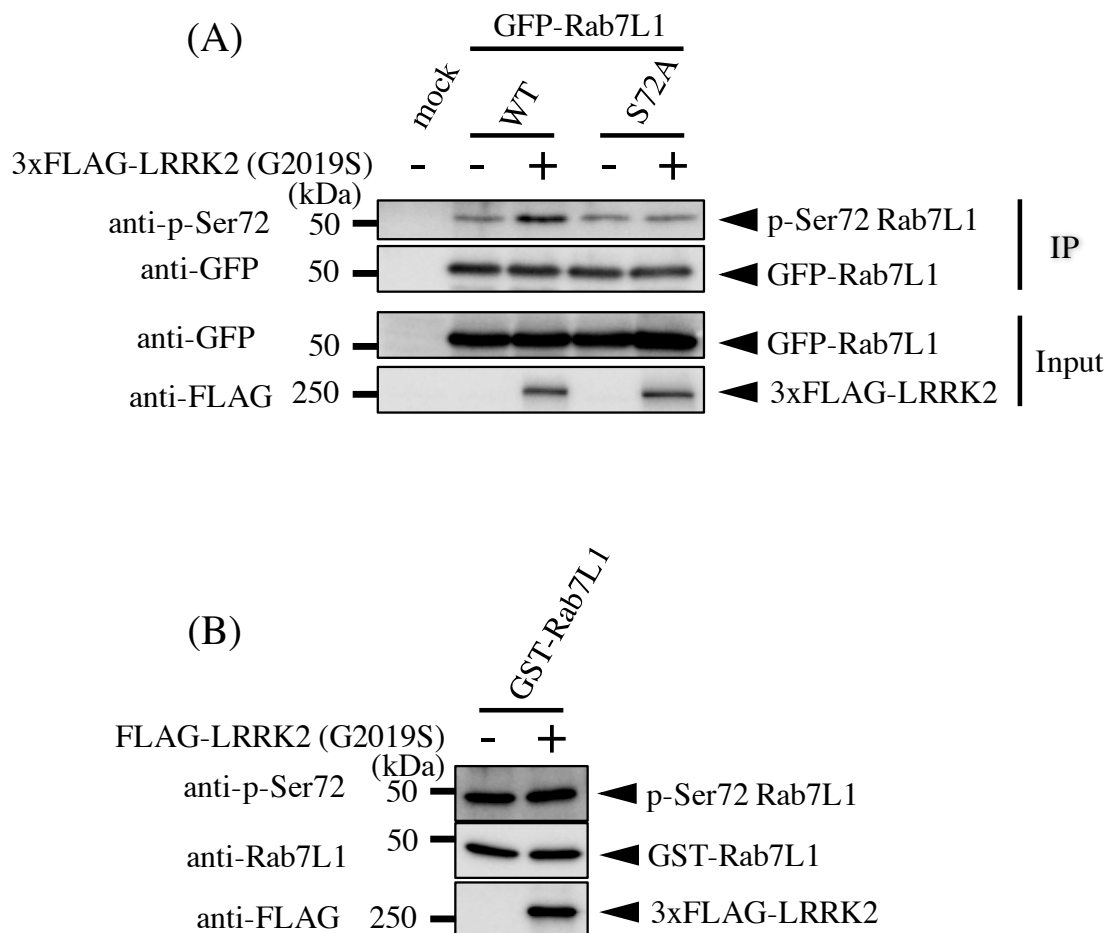
3xFLAG-LRRK2 (G2019S) と GFP-Rab7L1 (WT、T71AS72A、T71A、S72A)を一過性に過剰発現させた HEK293 細胞を回収し、Anti-GFP 抗体を用いて Phos-tag SDS-PAGE 解析を行った (上段)。さらに Anti-GFP (中段)、Anti-FLAG (下段) 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。



図表 12 Rab7L1 における 72 番目のセリン残基の位置と推定される立体構造

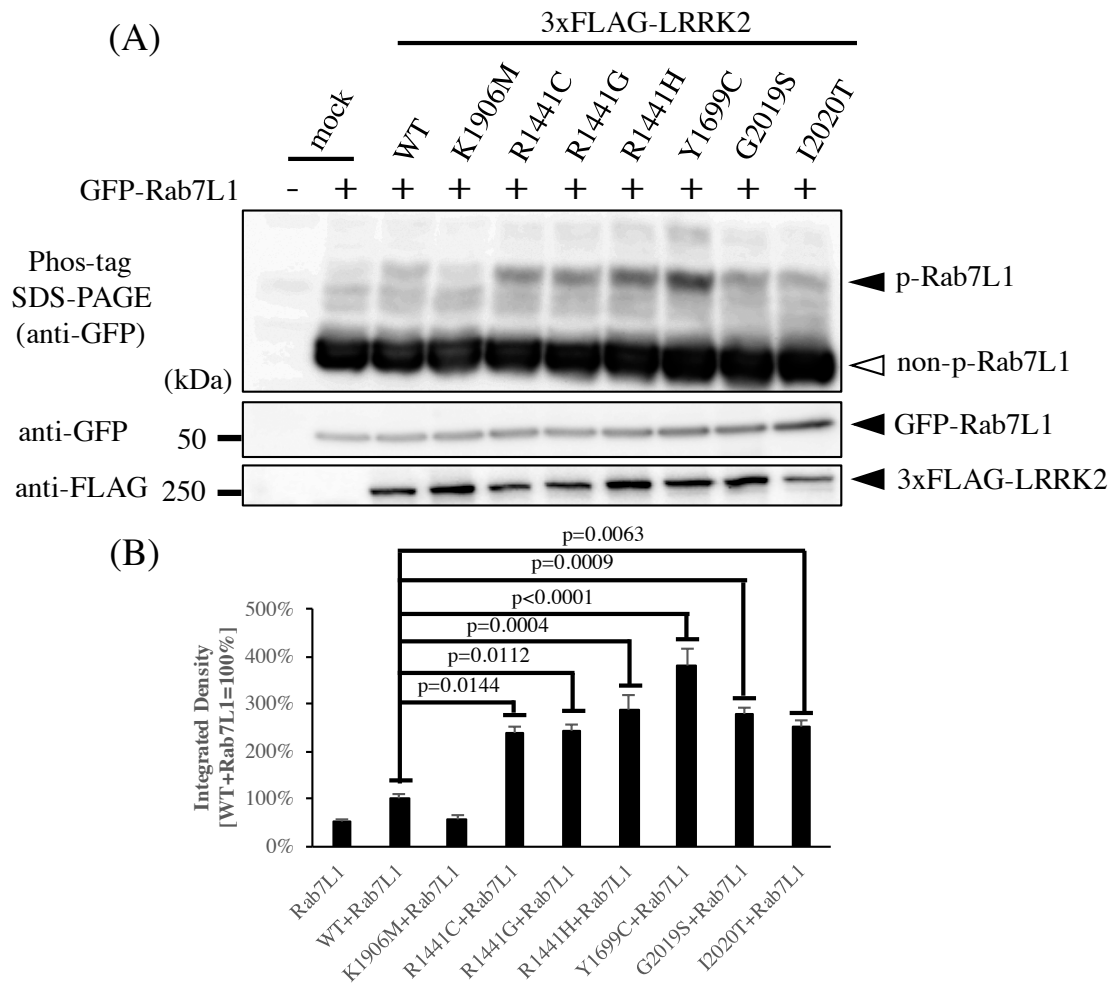
ラット Rab7L1 アミノ酸配列。種間で保存されており、アラニンに置換したセリン・スレオニン残基を黄色で示した。また、Switch Iドメインをピンク色、Switch IIドメインを紫色の枠で示した。

(A) アミノ酸配列から推定される Rab7L1 立体構造と同一したリン酸化部位の予測位置を示した。



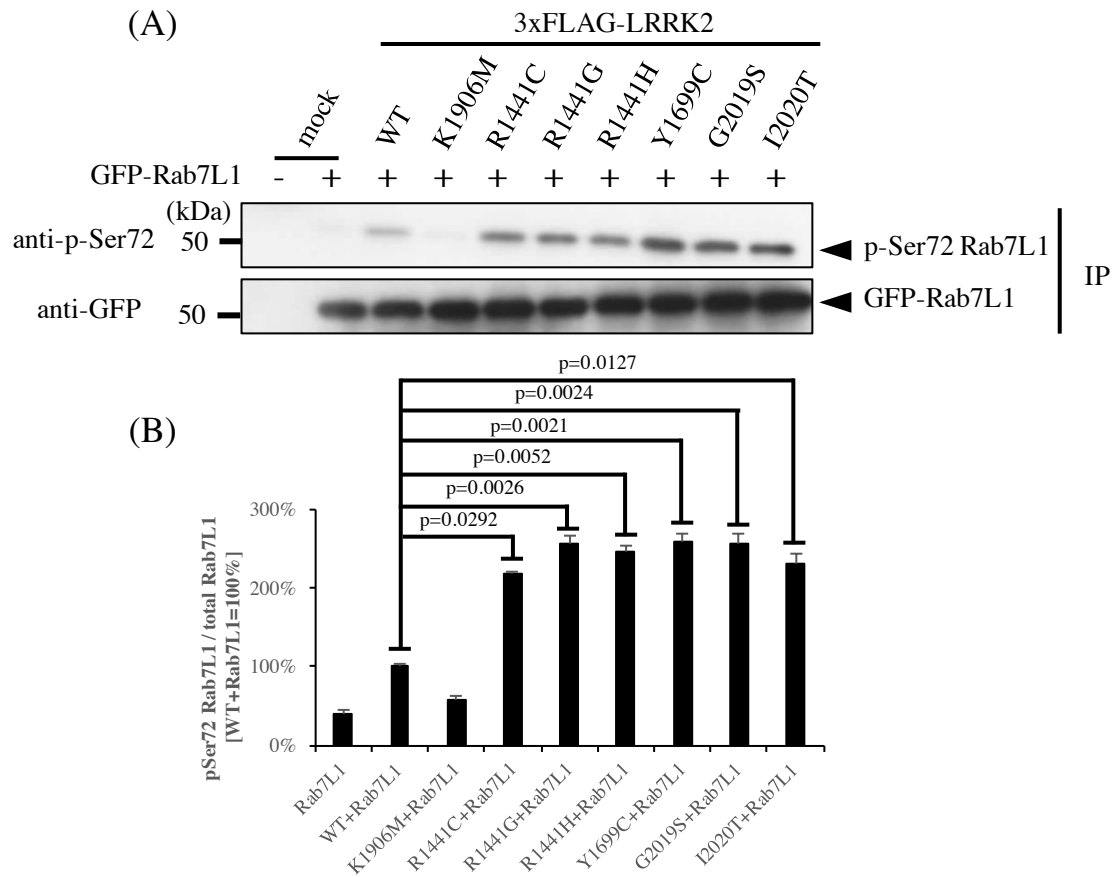
図表 13 LRRK2 による Rab7L1 S72A 置換体のリン酸化

- (A) 3xFLAG-LRRK2 (G2019S) と GFP-Rab7L1 (WT、S72A)を一過性に過剰発現させた HEK293 細胞を回収し、Anti-GFP 抗体を用いて免疫沈降後、Anti-p-Ser72 Rab7L1 抗体 (最上段)、Anti-GFP (上から 2 段目及び 3 段目)、Anti-FLAG (最下段) 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。
- (B) 組換え GST-Rab7L1 と FLAG-LRRK2 (G2019S) を ATP 存在下で反応させて、Anti-p-Ser72 Rab7L1 抗体 (上段)、Anti-Rab7L1 (中段)、Anti-FLAG (下段) 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。



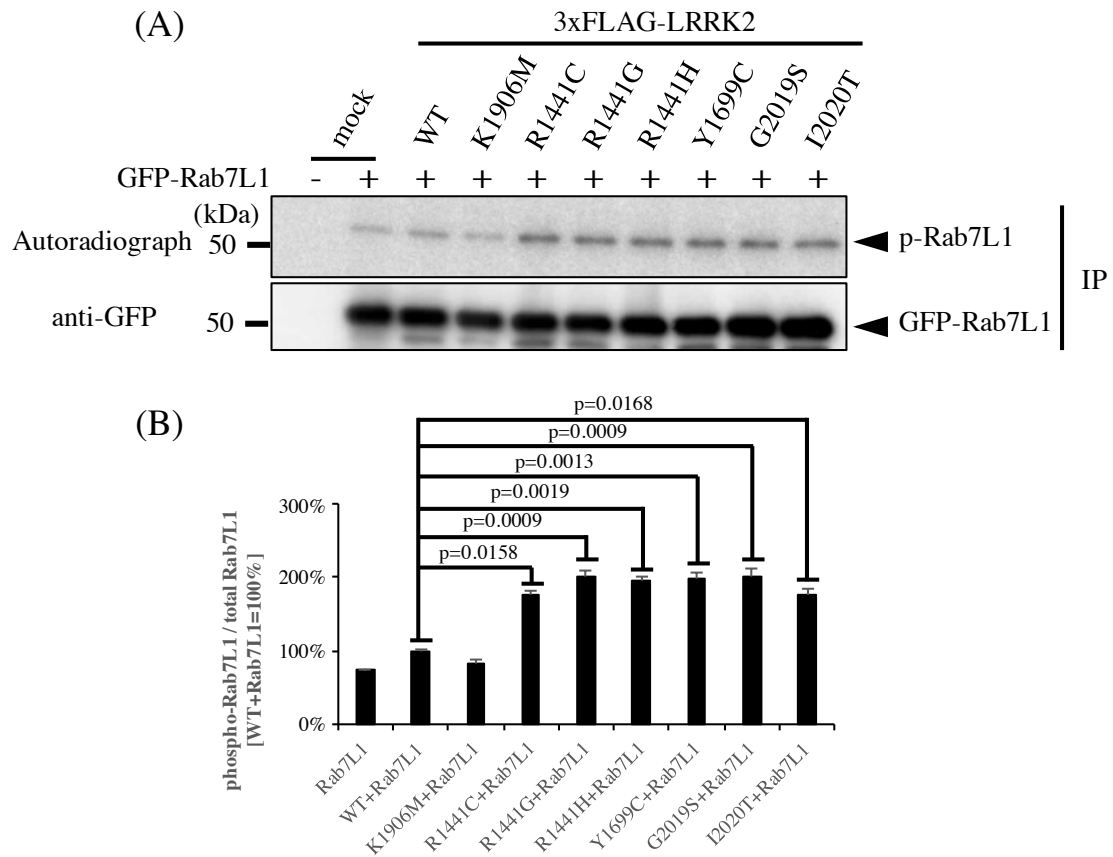
図表 14 FPD 変異型 LRRK2 による Rab7L1 のリン酸化

- (A) 3xFLAG-LRRK2 (WT、K1906M、R1441C/G/H、Y1699C、G2019S、I2020T) と GFP-Rab7L1 を一過性に過剰発現させた HEK293 細胞を回収し、Anti-GFP 抗体を用いて Phos-tag SDS-PAGE 解析を行った (上段)。さらに Anti-GFP (中段)、Anti-FLAG (下段) 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。
- (B) Phos-tag SDS-PAGE 解析における LRRK2 発現依存的なリン酸化 Rab7L1 のバンド強度を定量し、WT+Rab7L1 の値を 100%として標準化した (独立した試行回 N = 7、平均±標準誤差)。有意差検定には one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test を用いた。



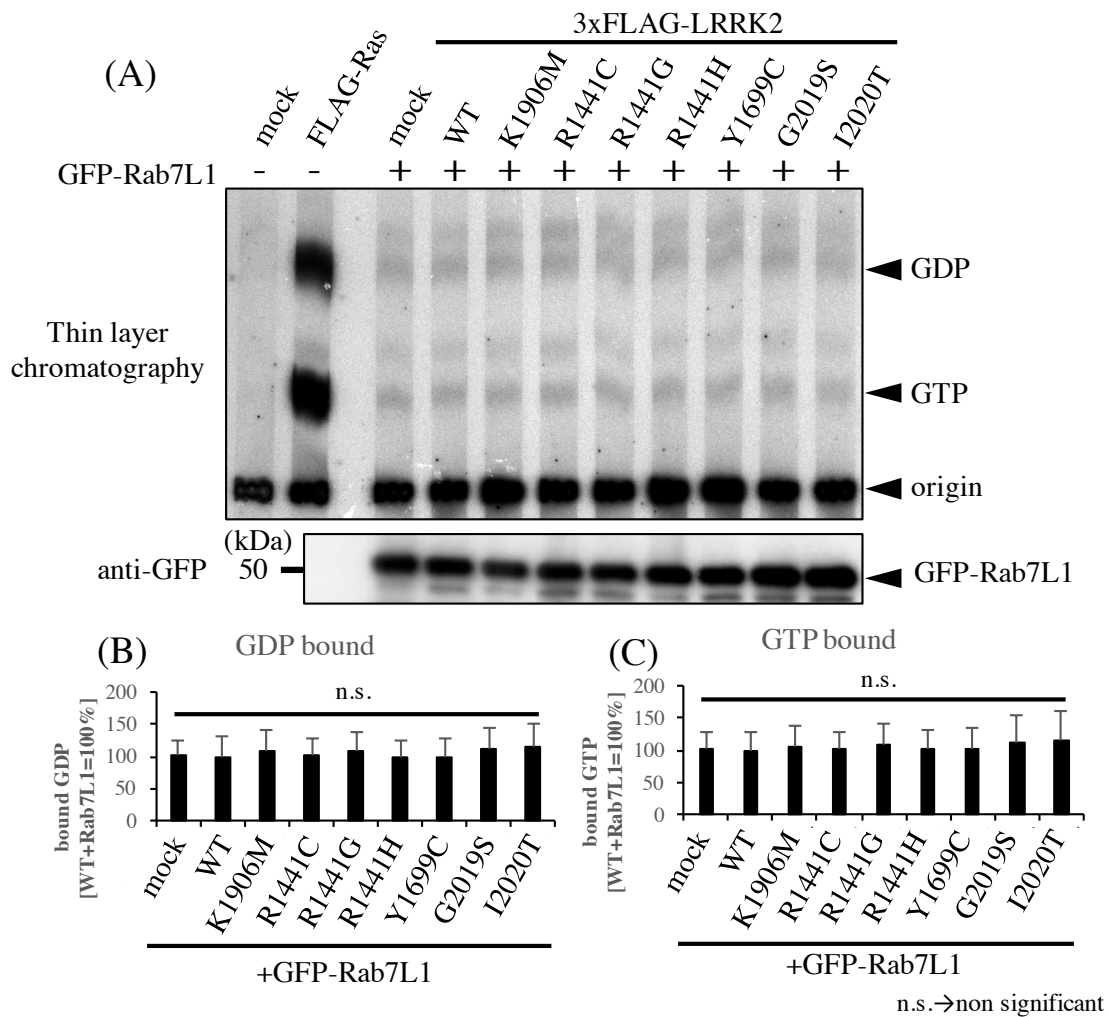
図表 15 FPD 変異型 LRRK2 による Rab7L1 Ser72 部位リン酸化

- (A) 3xFLAG-LRRK2 (WT、K1906M、R1441C/G/H、Y1699C、G2019S、I2020T) を一過性に過剰発現させた GFP-Rab7L1 恒常発現 HEK293 細胞を回収し、GFP-Trap A を用いて免疫沈降した。その後、Anti-p-Ser72 Rab7L1 (上段)、Anti-GFP (下段) 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。
- (B) ウェスタンブロット解析におけるリン酸化 Ser72 Rab7L1 のバンド強度を Rab7L1 発現量で規格化し、WT+Rab7L1 の値を 100% として標準化した (独立した試行回 N = 4、平均 ± 標準誤差)。有意差検定には one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test を用いた。



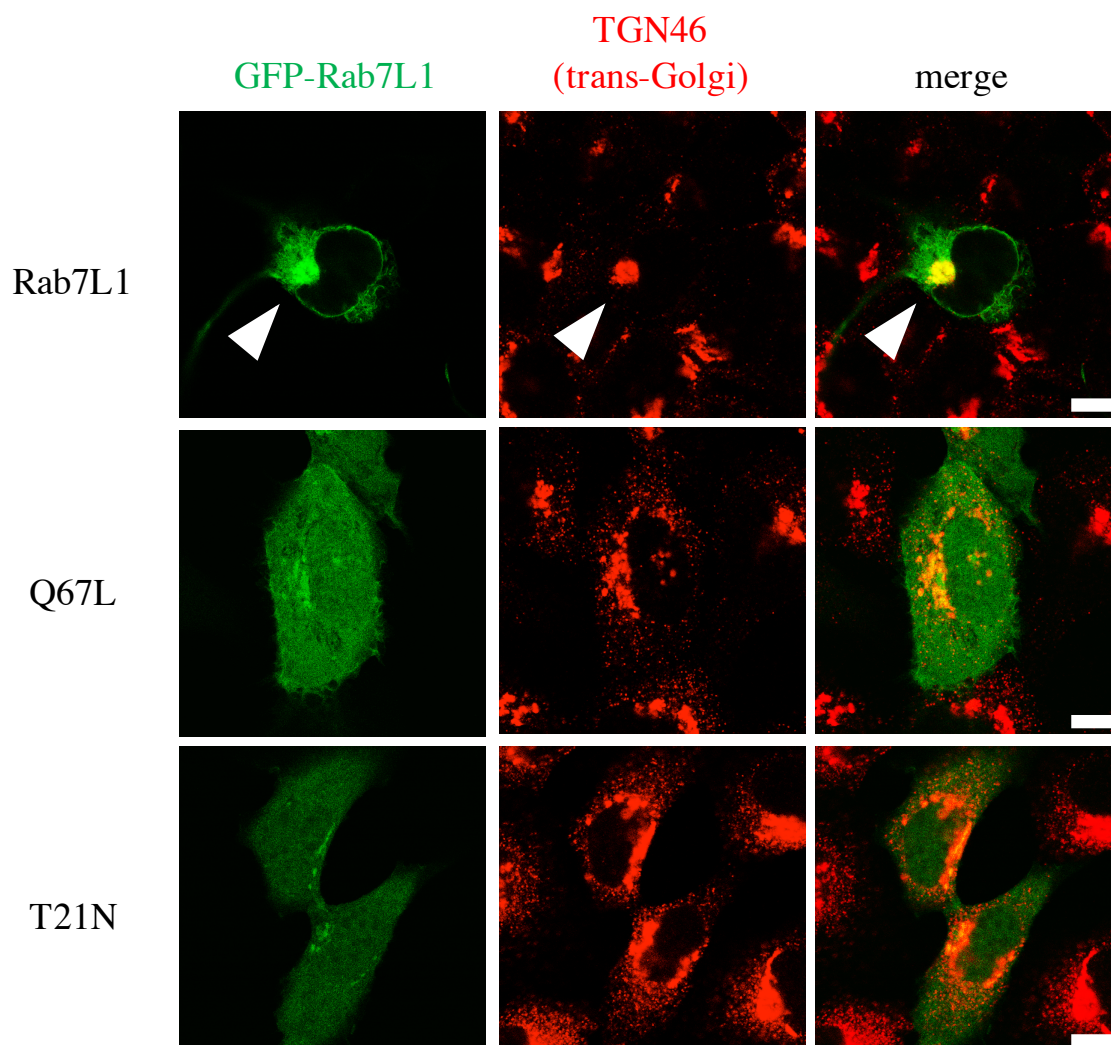
図表 16 FPD 変異型 LRRK2 による Rab7L1 のリン酸化

- (A) 3xFLAG-LRRK2 (WT、K1906M、R1441C/G/H、Y1699C、G2019S、I2020T) を一過性に過剰発現させた GFP-Rab7L1 恒常発現 HEK293 細胞に^[32P]リン酸による代謝標識を行い、GFP-Trap A を用いて免疫沈降した。その後、オートラジオグラフィー解析を行った (上段)。さらに Anti-GFP (下段) 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。
- (B) オートラジオグラフィー解析におけるリン酸化 Rab7L1 のバンド強度を Rab7L1 発現量で規格化し、WT+Rab7L1 の値を 100% として標準化した (独立した試行回 N = 4、平均 ± 標準誤差)。有意差検定には one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test を用いた。



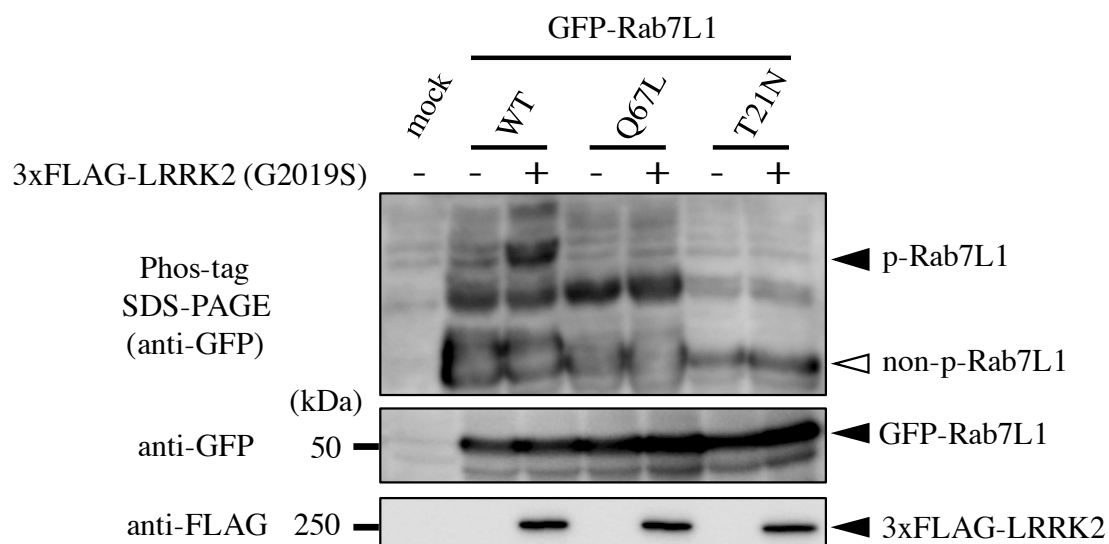
図表 17 Rab7L1 への GDP/GTP 結合能へのリン酸化の影響

- (A) 3xFLAG-LRRK2 (WT、K1906M、R1441C/G/H、Y1699C、G2019S、I2020T) を一過性に過剰発現させた GFP-Rab7L1 恒常発現 HEK293 細胞に³²P]リン酸による代謝標識を行い、GFP-Trap A を用いて免疫沈降した。その後、薄層クロマトグラフィーを用いてオートラジオグラフィー解析を行った (上段)。さらに Anti-GFP (下段) 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。
- (B, C) オートラジオグラフィー解析における Rab7L1 への GDP、GTP 結合量のバンド強度を Rab7L1 発現量で規格化し、WT+Rab7L1 の値を 100%として標準化した (独立した試行回 N = 4、平均±標準誤差)。有意差検定には one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test を用いた。



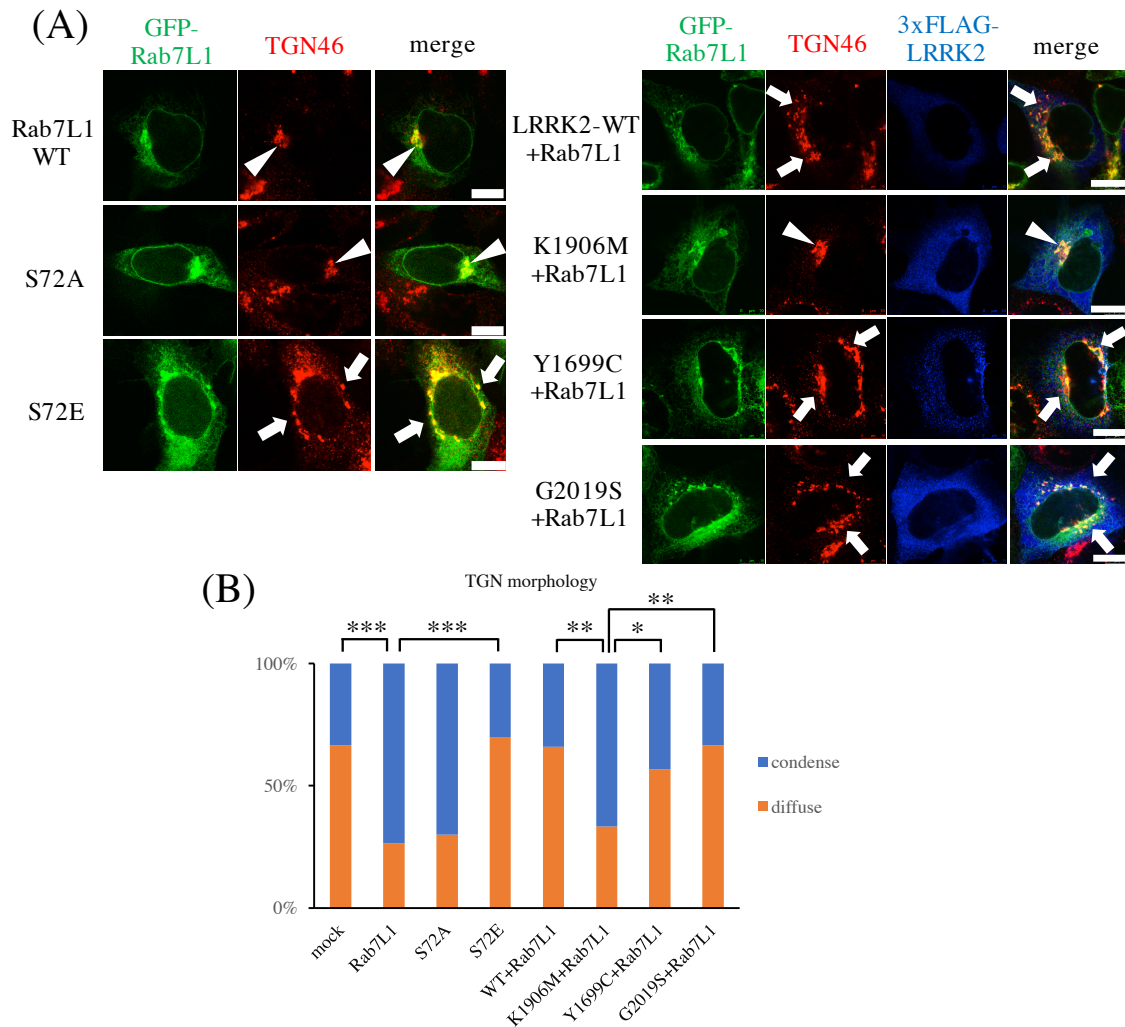
図表 18 各種変異型 Rab7L1 の細胞内局在

各種変異型 GFP-Rab7L1 (WT、Q67L; 活性型と推定される変異型 Rab7L1、T21N; 不活性型と推定される変異型 Rab7L1) を一過性に過剰発現させた HEK293 細胞を 4% PFA で固定し、Anti-TGN46 (*trans*-Golgi marker) 抗体を用いて細胞免疫染色を行った (scale bar = 10 μ m)。矢尻は TGN46 陽性のゴルジ体に局在する Rab7L1 を示した。



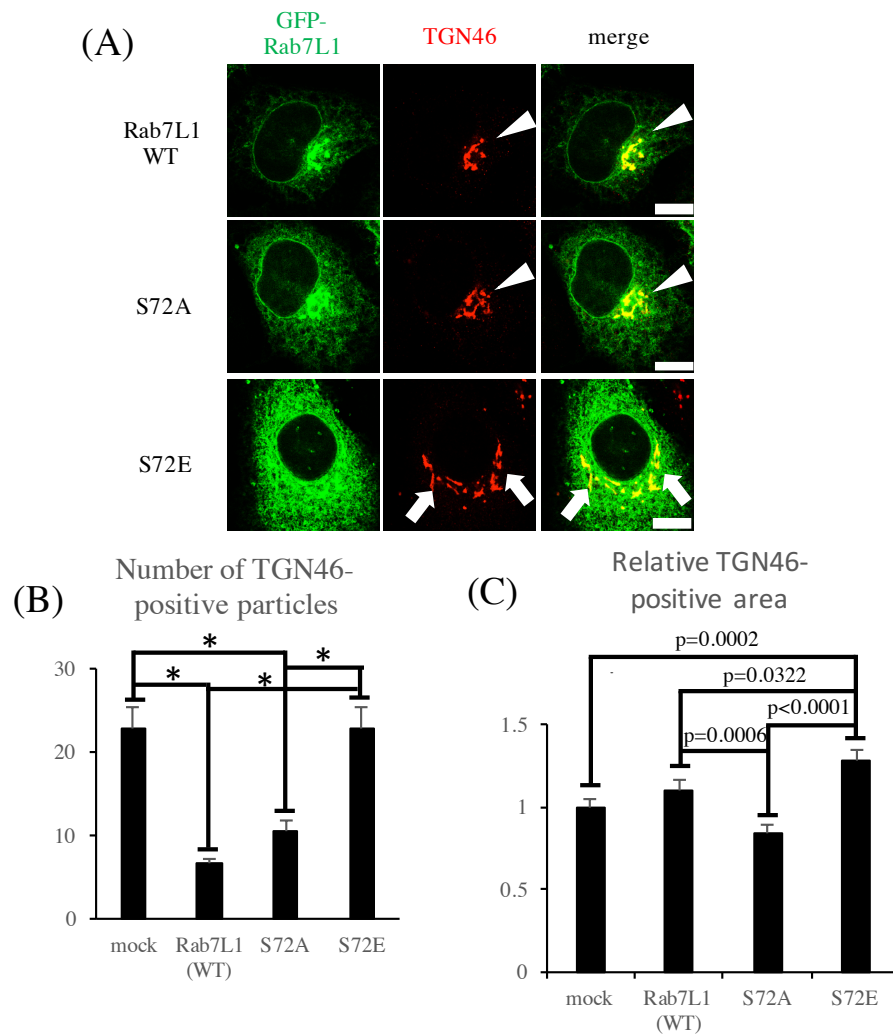
図表 19 LRRK2 による各種変異型 Rab7L1 のリン酸化

3xFLAG-LRRK2 (G2019S) と GFP-Rab7L1 (WT、Q67L、T21N)を一過性に過剰発現させた HEK293 細胞を回収し、Anti-GFP 抗体を用いて Phos-tag SDS-PAGE 解析を行った (上段)。さらに Anti-GFP (中段)、Anti-FLAG (下段) 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。



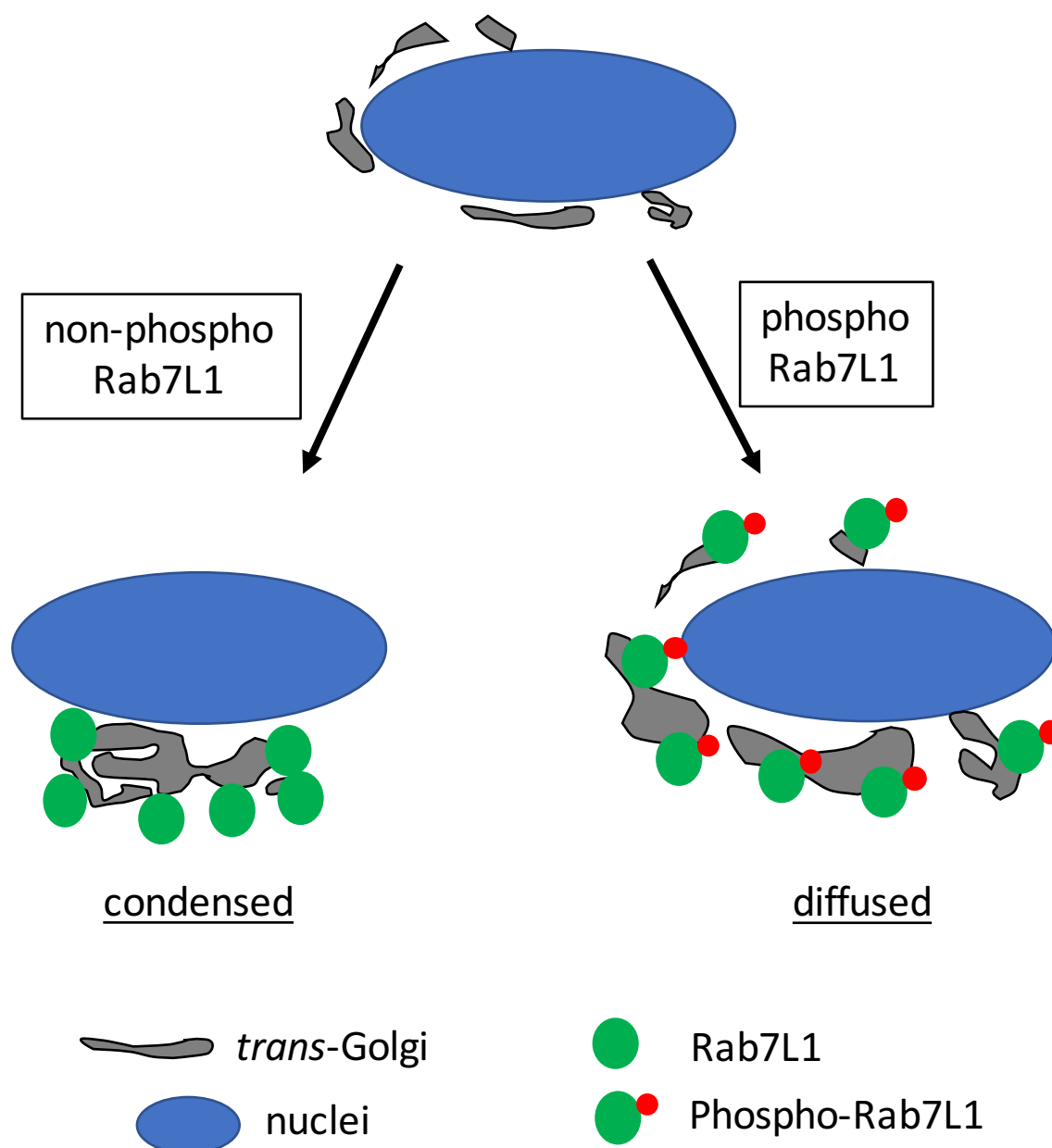
図表 20 HEK293 細胞を用いた Rab7L1 リン酸化と *trans*-Golgi の形態に関する解析

- (A) 各種 GFP-Rab7L1 (WT、S72A、S72E)もしくは各種 3xFLAG-LRRK2 (WT、K1906M、Y1699C、G2019S) と野生型 GFP-Rab7L1 を一過性に過剰発現させた HEK293 細胞を 4% PFA で固定し、Anti-TGN46 (*trans*-Golgi marker) 抗体を用いて細胞免疫染色を行った (scale bar = 10 μ m)。矢尻は condense な形態の TGN46 陽性のゴルジ体、矢印は diffuse な形態の TGN46 陽性のゴルジ体を示した。
- (B) (A)における TGN46 陽性のゴルジ体について、それぞれ condense、diffuse に分類し、定量解析を行った (独立した試行回 N = 3、細胞数 n = 42-70)。有意差検定には Fisher's exact test を用いた(*p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001)。



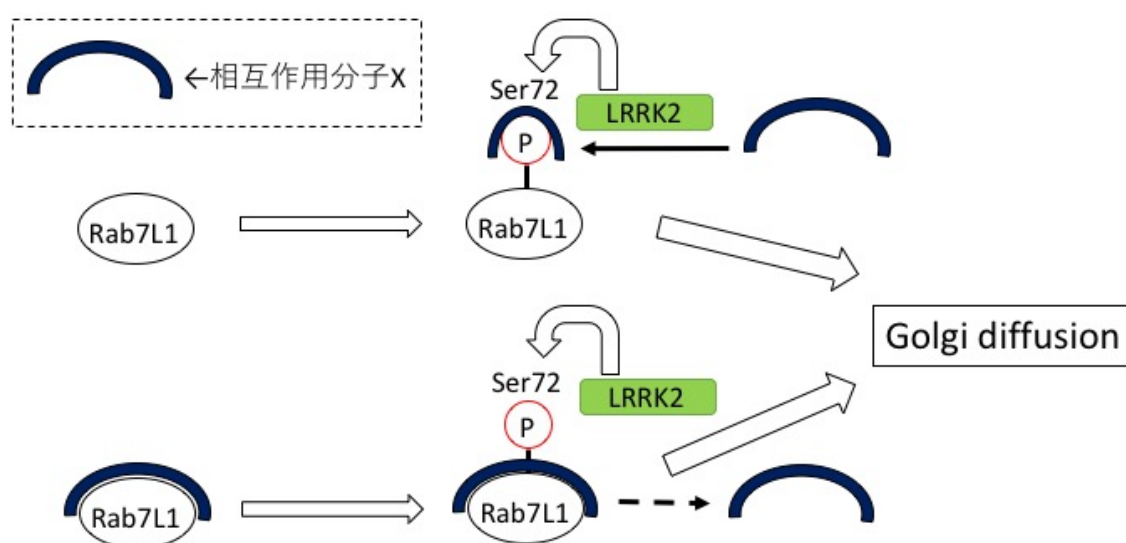
図表 21 HeLa 細胞を用いた Rab7L1 リン酸化と *trans*-Golgi の形態に関する解析

- (A) 各種 GFP-Rab7L1 (WT、S72A、S72E)を一過性に過剰発現させた HeLa 細胞を 4% PFA で固定し、Anti-TGN46 (*trans*-Golgi marker) 抗体を用いて細胞免疫染色を行った (scale bar = 10 μ m)。
- (B) (A) における TGN46 陽性の particle 数について定量解析を行った (試行回 N=3、細胞数 n = 43-60、平均±標準誤差)。有意差検定には one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test を用いた (**p < 0.0001)。
- (C) (A) における細胞の面積に占める TGN46 陽性 area の割合について、mock の値を 1 として標準化した (独立した試行回 N = 3、細胞数 n = 113-126、平均±標準誤差)。有意差検定には one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test を用いた。



図表 22 LRRK2 による Rab7L1 リン酸化を介した TGN の形態制御の概略図

非リン酸化状態の Rab7L1 は TGN を核近傍に集簇させる効果があり、LRRK2 によって Rab7L1 の 72 番目のセリン残基がリン酸化されるとその効果を失い、TGN が断片化されて細胞質に散在すると考えられた。



図表 23 LRRK2 による Rab7L1 リン酸化を介したゴルジ体の形態制御機構に関する仮説

ゴルジ体の形態制御に関わる相互作用分子 X が存在し、LRRK2 による Rab7L1 リン酸化によって結合様式が変化し、ゴルジ体の形態制御に関与している可能性が考えられた。

本研究の結果の要点は、以下の原著論文として公表した。

Fujimoto T, Kuwahara T, Eguchi T, Sakurai M, Komori T, Iwatsubo T: Parkinson's disease-associated mutant LRRK2 phosphorylates Rab7L1 and modifies trans-Golgi morphology. *Biochem Biophys Res Commun* **495**, 1708-1715 (2018)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導、御鞭撻頂きました東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経病理学分野、岩坪威教授に謹んで感謝の意を表します。研究に集中して取り組むことのできる恵まれた環境、そして切磋琢磨し合える素晴らしい仲間と科学の発展に取り組む機会を与えていただき、何物にも代え難い経験をすることができました。心から御礼申し上げます。

研究の遂行・論文の執筆にあたり、直接御指導頂きました桑原知樹特任助教に心から御礼申し上げます。修士課程の頃より実験手技や研究の基礎を教えて頂き、また日頃から議論の時間を多く設けて頂きましたこと、心から感謝致しております。

修士課程において、留学されるまで直接御指導頂きました東京大学大学院薬学系研究科機能病態学教室、伊藤弦太特任講師に深く感謝致します。帰国後もGTP 結合に関する研究を遂行する上で技術指導や折に触れて貴重な助言や議論をして頂き、大変感謝致しております。

本研究で用いたプラスミドをご提供下さいました、Columbia University、Asa Abeliovich 准教授に感謝致します。

研究生活を送る上で、様々な御指導、議論をして頂いた神経病理学分野、橋本唯史特任准教授、若林朋子助教、山田薫助教に御礼申し上げます。

同じ研究グループの一員である江口智也医学士、修士課程からの同期である宗実悠佳修士の二人には、日頃から研究以外の面でも大変お世話になりました。素晴らしい同期がいたからこそ、研究に励むことができたと感じております。

同じパーキンソン病グループの一員である櫻井まりあ学士、小森禎之君の二人をはじめ、神経病理学分野の皆様、並びに機能病態学教室の皆様には大変お世話になりました。感謝致します。

最後に研究生活を支えてくれた家族、友人にこの場を借りて感謝致します。