

論文の内容の要旨

論文題目 Analyses on the phosphorylation and function of Parkinson's disease-related protein Rab29

(パーキンソン病関連因子 Rab29 のリン酸化と機能に関する研究)

氏名 小森 禎之

Rab29 はパーキンソン病のリスクアレル PARK16 にコードされる Rab ファミリー低分子量 G タンパク質である。近年、Rab29 は顕性遺伝性パーキンソン病の病因キナーゼである Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) の基質であると共に LRRK2 を制御する分子として報告されており、その機能の理解は、パーキンソン病の発症メカニズムの解明や、そのメカニズムを標的とした治療、またパーキンソン病の早期発見に役立つバイオマーカーへの活用に役立つことが期待されている。しかしながら、Rab29 の生理的な機能は未知であり、また LRRK2 とは異なり遺伝性のパーキンソン病を引き起こす変異も同定されていない。従って、Rab29 のパーキンソン病発症への寄与を解明するために、まず Rab29 の生理的な機能を解明することが肝要である。

Rab29 は 203 アミノ酸から成る低分子量 G タンパク質であり、その名の通りグアニンヌクレオチド結合能と、グアニンヌクレオチドの結合状態により構造が変化する 2 つのスイッチ領域を有している。C 末端には、他の Rab タンパク質同様に細胞膜との結合に必要なゲラニルゲラニル基が付加されるシステイン残基がある。Rab29 ノックアウトマウスでは、腎臓の近位尿細管において肥大化したリソソームの集積を認めることから Rab29 はリソソームに関連する細胞内輸送に関わる分子であると予想されていたが、その詳細な機能は不明のままであった。Rab29 が LRRK2 の基質の 1 つとして同定された後、Rab29 が LRRK2 の活性や局在を制御するという報告が複数なされた。その中で、リソソーム指向性薬剤であるクロロキン(CQ)の処理によるリソソームの人為的な肥大化が Rab29 をリソソームに誘引し、さらに Rab29 が LRRK2 をリソソームに誘引することが報告された。そこで本研究では、Rab29 の生理的な機能のうち、特にリソソームストレス下における Rab29 の局在を司るメカニズムを解明することを目的とした。

まず、CQ 処理時に Rab29 分子に生じる翻訳後修飾について、Rab29 を過剰発現する HEK293 細胞の生化学的解析により検討した。翻訳後修飾のうち最も一般的なリン酸化について、Phos-Tag SDS-PAGE 法を用いて検討した結果、CQ 処理群のみでリン酸化を示すバンドが出現した。このリン酸化がリソソームで起こる現象かを検討するために、FRB-FKBP システムを用いて人為的に Rab29 をリソソーム膜に局在変化させたところ、リソソームの肥大化を伴わない Rab29 のリン酸化が確認された。従って、Rab29 はリソソーム

ム膜上でリン酸化されること、またリソソームストレス負荷時に Rab29 をリソソーム膜上に誘引するメカニズムが存在することが考えられた。既報では LRRK2 が Rab29 の S72 残基をリン酸化するキナーゼであると報告されているため、このリソソーム膜上で CQ 処理依存的に生じる Rab29 のリン酸化が LRRK2 によるものである可能性について、S72 リン酸化特異抗体、Phos-tag SDS-PAGE におけるバンドの比較、および LRRK2 阻害剤投与実験により検討した。その結果、この CQ 処理依存的なリン酸化は LRRK2 非依存的であることが分かった。すなわち、Rab29 はリソソームストレス負荷時にリソソームに誘引された後、未知のキナーゼによってリン酸化を受けると考えられた。

次に、CQ 処理によって生じる Rab29 分子中のリン酸化部位を特定するために、Phos-tag SDS-PAGE で分離したリン酸化バンドを液体クロマトグラフィー質量分析計で解析し、185 番目のセリン (S185) を同定した。この部位に対するリン酸化抗体を作出し、CQ 処理時にバンドが増強すること、すなわち S185 でリン酸化された Rab29 を認識することを確認した。更に、この部位に対するリン酸化が有する機能について、リン酸化模倣体

(S185D, S185E) および非リン酸化型 (S185A) を発現する HEK293 細胞を用いて生化学的・免疫細胞化学的検討を行った。LRRK2 の活性や LRRK2 との結合については野生型と差が見られなかったが、S185 リン酸化模倣体を発現させた細胞では CQ 処理時のリソソーム肥大化が抑制されることが分かった。従って、リソソームストレス負荷時にリソソームに誘引された Rab29 は、リン酸化を受けることによってストレスに応答し、リソソームの形態維持に働く可能性が考えられた。

Rab29 をリン酸化するキナーゼについて、生化学的手法を用いて探索を試みた。Rab タンパク質を基質とするキナーゼのうち、C 末端領域をリン酸化するキナーゼとしては唯一 PKC が報告されている。そこで精製した複数の PKC サブタイプと Rab29 を *in vitro* で反応させ、S185 リン酸化 Rab29 抗体を用いてリン酸化が生じているかを検討すると、PKC α は Rab29 と反応して S185 をリン酸化したが、PKC ϵ ではリン酸化を生じなかったことから、PKC α が Rab29 の S185 における責任キナーゼの 1 つであると考えられた。そこで次に、PKC α が Rab29 の局在に与える影響について、内因性 Rab29 を検出可能な

RAW264.7 細胞を用いて免疫細胞化学的に検討した。PKC 阻害剤処理と同時に CQ 処理を行うと Rab29 のリソソームへの局在変化が抑制された。反対に、PKC 活性化剤である phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を細胞に投与すると、Rab29 は肥大化していないリソソームに局在化した。また、LRRK2 阻害剤を投与すると、PMA による Rab29 の局在変化が抑制された。PMA 処理のみで Rab29 がリソソームへ局在化したこと、またリソソーム上でリン酸化を受けることを考え合わせると、Rab29 は定常状態ではリソソームへ移行しても PKC α によるリン酸化を受ける前に離脱してしまうが、PMA 処理による PKC α 活性化時には移行してきた Rab29 がリソソーム膜上でリン酸化され、そこで安定化するために局在化に至ったものと考察した。また CQ 処理時にはリソソーム上への Rab29 の移行が増えるため、PKC α による Rab29 の安定化が起りやすくなり、Rab29 の局在変化

が容易に検出可能になったと考えた。更に、PMAによる局在変化が LRRK2 阻害剤処理により抑制されたことから、S185 のリン酸化の後に LRRK2 によるリン酸化が生じ、Rab29 をより長くリソソーム膜上に局在化させる可能性を考えた。

Rab29 のリソソーム移行を介在する分子を、生化学的手法を用いて探索した。APEX2 は生細胞内での分子ラベリングに用いられるペルオキシダーゼであり、APEX2 融合タンパク質の周囲 10 nm に存在しチロシン残基を含むタンパク質は、過酸化水素と biotin-tyramide の添加時に速やかにビオチン化される。このようにビオチン化されたタンパク質群をビオチンと親和性の高いストレプトアビジンを用いて精製することで周囲 10 nm に存在するタンパク質群の網羅的解析が可能になる。APEX2-Rab29 を発現する HEK293 細胞を用いて、CQ 処理群およびコントロール群の Rab29 周囲プロテオームをショットガンプロテオミクスにより解析した。CQ 処理群で多く検出されたタンパク質を選別したところ、VPS26a、VPS26b、VPS35 などの Retromer 複合体の構成タンパク質が同定された。Retromer はエンドソーム膜上において選別輸送に関わる複合体タンパク質として知られており、また VPS35 は優性遺伝性パーキンソン病の病因遺伝子の 1 つとしても報告されている。siRNA を用いてこれらの分子をノックダウンした RAW264.7 細胞に CQ を投与し、内因性 Rab29 の局在変化を免疫細胞化学的に解析したところ、VPS26a もしくは VPS35 のノックダウンにより Rab29 のリソソームへの局在化が有意に抑制された。また、同様のサンプルを用いて CQ 処理時のリソソーム肥大化に与える影響を解析すると、Rab29 の局在変化には関与しなかった VPS26b を含む、Retromer 複合体構成因子のいずれのノックダウンによってもリソソームの肥大化が亢進した。以上より、Rab29 のリソソーム局在化には VPS26a 及び VPS35 が、リソソームの肥大化調節には Retromer 複合体全体が寄与していることが考えられた。

本研究の結果から、Rab29 は細胞内において、リソソームストレス負荷時に Retromer 複合体の構成因子の一部である VPS26a と VPS35 を介してリソソームに局在化すること、リソソーム膜上で PKC α によって S185 残基のリン酸化を受け、さらに LRRK2 によるリン酸化及び LRRK2 との相互作用を経てリソソーム膜上で安定化することが示唆された。また、Retromer 複合体の正常な機能が損なわれている状況下では、Rab29 と LRRK2 により制御されるリソソーム肥大化調節機構が働かなくなる可能性も考えられた。このように、Rab29 は、Retromer 複合体に関わる膜輸送機構とリソソームストレス応答分子である LRRK2 を繋ぐ分子である可能性が示された。