

博士論文 (要約)

**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)

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ルニルゲラル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の安定化が起こりやすくなり、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複合体が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。