

博士論文

家族性パーキンソン病原因遺伝子産物 **LRRK2** の
リソソームストレス応答における機能

江口智也

論文題目： 家族性パーキンソン病原因遺伝子産物 LRRK2 の
リソソームストレス応答における機能

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： 江口 智也

要旨

パーキンソン病原因遺伝子産物 **LRRK2** が、リソソームストレス負荷時においてどのような機能を持つのかについて解析を行った。哺乳類培養細胞を用いた解析から、定常状態において **LRRK2** は細胞質に局在するが、リソソーム過積載負荷が生じるとオートファジー関連分子依存的にリソソーム膜表面にリクルートされることを明らかにした。リクルートされた **LRRK2** はキナーゼ活性依存的に **Rab8a**、**Rab10** をリソソームにリクルートし、リソソームの肥大化抑制と内容物排出制御を行うことを示した。**LRRK2** は複数の **Rab GTPase** をリン酸化しその局在・機能を制御することにより、リソソームの恒常性維持に寄与する可能性が考えられる。

目次

要旨	2
第1章 序文.....	6
LRRK2 (Leucine-rich repeat kinase 2)とは	6
1-1 LRRK2 とパーキンソン病	6
1-2 LRRK2 と PD 以外の疾患に関する遺伝学的関連.....	19
1-3 LRRK2 の構造と特徴	21
1-4 LRRK2 の機能	24
リソソームとは	28
1-5 リソソームによる分解経路	29
1-6 リソソームエキソサイトーシス	36
1-7 リソソームの恒常性維持機構.....	37
第2章 本研究の目的	41
第3章 材料と方法.....	42
第4章 結果.....	55
4-1 LRRK2 の細胞内局在の解析.....	55
4-2 LRRK2 のリソソーム局在を誘導するストレスの探索	60
4-3 PD 関連遺伝子 <i>RAB7L1</i> は LRRK2 のリソソームへのリクルートに関与する	63

4-4 LRRK2 は複数の Rab タンパク質を肥大化リソソームにリクルートする	64
4-5 LRRK2 と Rab はリソソームの形態とリソソーム内容物の排出を制御する ..	71
4-6 オートファジー関連分子が LRRK2 のリソソーム局在に関与する可能性	75
第 5 章 考察.....	80
5-1 蛍光免疫染色法による LRRK2 局在解析	80
5-2 LRRK2 のリソソーム局在を誘導するリソソームストレスの種類.....	82
5-3 LRRK2 による Rab8a、Rab10 の局在制御メカニズム	83
5-4 LRRK2 の分子機能: LRRK2 によるリソソーム肥大化の抑制とリソソームエキ ソサイトーシス制御	87
5-5 Rab7L1-LRRK2-Rab8/10 が存在する可能性.....	88
5-6 Rab8a、Rab10 の下流分子.....	90
5-7 Rab8、Rab10 以外の Rab GTPase が LRRK2 の下流で機能する可能性.....	92
5-8 ノックダウン実験による機能解析の限界	93
5-9 LRRK2 のリソソームストレス応答機能の細胞種を越えた保存性.....	94
5-10 LRRK2 のリソソーム局在と機能の関連	96
5-11 オートファジー分子と LRRK2 のリソソーム局在	97
5-12 CQ 処理による LRRK2 機能解析の限界と有用性.....	101
5-13 本研究から推測される <i>Lrrk2</i> KO マウス表現型の発症メカニズム.....	104
5-14 生体内におけるリソソームストレス：リソソームの老化	105

5-15 パーキンソン病と LRRK2 の関係に関する今後の展望.....	107
参考文献	110

第1章 序文

LRRK2 (Leucine-rich repeat kinase 2)とは

Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)は51のエキソンからなる遺伝子にコードされた巨大なタンパク質である。全長2527アミノ酸からなり、分子内に複数のドメインを有している(図表1)[1]。LRRK2はもともと常染色体優性家族性パーキンソン病に連鎖する遺伝子として報告されたが[1-3]、その後ゲノムワイド関連解析(GWAS)をはじめとする多くの遺伝学的解析から、クローン病やハンセン病など複数の疾患にも関連する遺伝子であることが示されている[4-6]。LRRK2の分子細胞生物学的機能に関してはこれまで様々な研究がおこなわれてきたが、いまだ不明な点が多い。この章ではまずパーキンソン病や種々の疾患とLRRK2との遺伝学的関係に関して、次にLRRK2の分子構造、細胞内局在、機能におけるこれまでの研究に関してまとめる。

1-1 LRRK2 とパーキンソン病

1-1-1 パーキンソン病

パーキンソン病(Parkinson's disease; PD)はアルツハイマー病に次いで頻度の高い神経変性疾患であり、日本における有病率は10万人あたり100~150人程度と推定されている。加齢とともに有病率は上昇し、高齢化に伴いその患者数も増加している。臨床的に振戦、無動、筋固縮、姿勢反射障害などの運動症状を主徴とする。病理学的

には中脳黒質緻密部のドパミンニューロンや青斑核のノルアドレナリンニューロンの選択的脱落と、残存する神経細胞における Lewy 小体や Lewy neurite の出現が特徴的である。

中脳黒質は錐体外路を構成する要素の 1 つであり、不随意的に運動や姿勢の調整を行っている。黒質緻密部の投射先である線条体は直接路、間接路と呼ばれる 2 種類の投射経路で運動機能を制御している。線条体は黒質網様部および淡蒼球内接を介して視床→大脳皮質と投射するが直接路では線条体から直接、黒質網様部および淡蒼球内節に神経が投射する。一方間接路では線条体→淡蒼球外節→視床下核と経て黒質網様部および淡蒼球内節に投射する。黒質網様部および淡蒼球内接の神経は抑制性であり運動を抑制している。線条体が興奮すると直接路では黒質網様部および淡蒼球内節の神経を抑制し、これにより運動の脱抑制が起こる。一方間接路では黒質網様部および淡蒼球内節の神経が興奮し運動の抑制が強まる。直接路は意図する運動に必要な部分に対する抑制を外している一方、間接路では不必要な部分への抑制を強め運動を制御していると考えられている。中脳黒質緻密部は線条体神経の直接路に対しては興奮性、間接路に対しては抑制性のシナプスを投射しており、中脳黒質緻密部ドパミンニューロンが興奮すると直接路・間接路いずれにしろ運動の脱抑制が生じる。PD においてドパミンニューロンが変性すると運動の脱抑制が起こらず、筋固縮や無動などの症状が出現すると考えられる。

現在 PD 治療として使用される薬剤は L-DOPA であり、これは血液脳関門を通過

可能なドパミンの前駆体である。投与された L-DOPA は中脳黒質ドパミンニューロンに到達し代謝されることでドパミンとなり、ドパミンニューロンからの神経伝達物質放出量を増加させることで残存する神経の機能を補助していると考えられる。しかしながら現在の治療法では症状を一時的に改善するかとは可能であるが、ドパミンニューロンの変性・脱落そのものを抑制することはできない。したがって PD の根本治療開発のためには神経変性のメカニズムを明らかにし、それを標的とした治療法を確立することが必要である。

1-1-2 家族性パーキンソン病

パーキンソン病の多くは明確な家族歴のない孤発性であるが、その一部はメンデルの法則に則った遺伝様式で、家族性に発症する。これまでに複数の遺伝子が常染色体劣性または優性遺伝性の病因遺伝子として同定されている(図表 2)。 *LRRK2* 以外の家族性パーキンソン病病因遺伝子に関してこれまで明らかにされていることを以下にまとめる。

SNCA

SNCA は常染色体優性 PD の原因遺伝子である。*SNCA* がコードする α -synuclein は PD に特徴的な Lewy 小体、Lewy neurite の主要な構成タンパク質であり [7, 8]、家族性 PD のみならず孤発性 PD の発症においても非常に重要なタンパク質である

と考えられている。

SNCA と家族性 PD の関連に関する最初の報告は Polymeropoulos らによる連鎖解析であり、家族性 PD を発症するイタリアの家系を解析し染色体 4q21-q23 の領域が家族性 PD と連鎖することを解明、この遺伝子座を *PARK1* と名付けた[9]。その後同家系における PD の原因が *PARK1* 内にある *SNCA* 遺伝子の変異であり、これにより *SNCA* にコードされる α -synuclein の 53 番目のアラニンがスレオニンに置換されることが明らかとなった[10]。その後 A53T 変異に加え、A30P[11]、E46K[12]、H50Q[13, 14]、G51D[15]の計 5 つの変異が家族性 PD の原因として同定された。またこれらのミスセンス変異に加え野生型 *SNCA* の duplication および triplication も家族性 PD の原因となることが報告されており[16-18]、野生型の α -synuclein であっても発現量が上昇すれば PD を引き起こすことが示されている。加えて後述するように α -synuclein の発現量を上昇させるような多型が孤発性 PD のリスクとなっており、遺伝学的解析からも *SNCA* は家族性、孤発性 PD 双方に重要であることが示されている。

ヒト病理組織における Lewy 小体内の α -synuclein は線維状の構造をとっている[8]。またリコンビナントの α -synuclein を *in vitro* でインキュベートすると不溶性の線維状構造である fibril、およびその前駆体の protofibril を形成することから[19]、野生型の α -synuclein 自体が凝集する性質を持つことが明らかにされている。加えて家族性 PD の原因となる A53T 変異は凝集性が上昇させることが報告されている

[19]。これらの α -synuclein の性質と上述した遺伝学的解析から、 α -synuclein の代謝動態の変化が α -synuclein の凝集を誘導し、最終的に神経変性を引き起こすというモデルが広く受け入れられている。しかしながらどのようなメカニズムで α -synuclein の凝集が開始されるのか、そして α -synuclein の凝集がなぜ神経変性を引き起こすのかに関しては現在も解明されていない。

VPS35

VPS35 は常染色体優性 PD の原因遺伝子である。2 つの独立したグループがそれぞれオーストリア、スイスの常染色体優性 PD を発症する家系を解析し、その原因として VPS35 の D620N 変異を同定した[20, 21]。VPS35 変異による PD の病理組織所見は現時点でまだ報告が無いが、臨床所見は孤発性によく似ており発症年齢も 50 歳前後と晩発性である。そのため VPS35 変異による PD は孤発性 PD と同様の発症メカニズムであることが期待されている。

VPS35 は後期エンドソームからゴルジ体もしくは細胞膜へと小胞を輸送する複合体であるレトロマーのサブユニットの 1 つであり、小胞タンパクや膜タンパクのリサイクリングに関わるとされている[22]。VPS35 変異がどのような効果を持つのかに関しては不明な点も多いが、ゴルジ・エンドソーム経路における輸送に異常が出るのではないかと考えられている。

CHCHD2

2015年に常染色体優性遺伝性家族性PDの新たな原因遺伝子として *CHCHD2* が同定された[23]。*CHCHD2* はミトコンドリアタンパク質であり電子伝達系に関わるとされている。*CHCHD2* 変異によるPDの病理所見や発症機序に関しては今後の研究が待たれる。

PINK1, parkin

PINK1、*parkin* は共に常染色体劣性遺伝性PDの原因遺伝子である。近年の分子細胞生物学的解析により2つの遺伝子産物は同一の経路でミトコンドリアの品質管理に関与することが示されていることからここでは併せて述べる。

parkin は日本における常染色体劣性家族性PDの家系から発見された。若年性常染色体劣性家族性PDの家系は1970年代から報告されていたが、その後6q25-q27に存在する遺伝子の部分欠失変異がその原因であることが報告され、その遺伝子は *parkin* と名付けられた[24]。その後今日に至るまで数多くの変異が同定されている[25]。一般的には *parkin* 変異によるPDではLewy小体の形成を伴わない黒質ドパミンニューロンの選択的脱落が生じると考えられているが、剖検にてシヌクレイン病理の形成を確認したという報告も存在する[26]。常染色体劣性の家族性PDの内約60%は *parkin* 変異が原因であるとされ、加えて家族歴が無い若年性のPDにおいても19%の症例で *parkin* の変異が存在するとされている[25]。

一方 *PINK1* はシチリアの常染色体劣性 PD 家系において遺伝子座が同定され [27]、その後原因遺伝子がキナーゼをコードする *PINK1* であることが報告された [28]。*PINK1* 変異を原因とする PD も *parkin* によるそれと同様に若年発症であり、臨床所見も類似し、また Lewy 小体の形成は基本的には伴わないとされている。

近年の分子細胞生物学的研究からこれらの遺伝子がコードする *parkin*、*PINK1* は障害を受けたミトコンドリアを選択的にオートファジーで除去する機構を制御し、ミトコンドリアの恒常性維持に寄与することが明らかにされている。*PINK1* はその配列内にミトコンドリア移行シグナルを持ち、翻訳後ミトコンドリアへと輸送される。しかしその後ミトコンドリア内膜へと輸送され、そこに存在する *PARL* と呼ばれるプロテアーゼによって切断される [29]。切断を受けた *PINK1* は不安定化し分解される。ミトコンドリアの膜電位が低下すると *PINK1* の外膜から内膜への輸送が障害され、*PINK1* がミトコンドリア外膜上へ蓄積する。その後 *PINK1* はまずユビキチンをリン酸化する [30]。*parkin* はリン酸化ユビキチンに高い親和性を持ち、外膜上でのリン酸化ユビキチン産生に応答しミトコンドリアに局在移行する。さらに *parkin* も *PINK1* によるリン酸化を受けることで活性が上昇する。*parkin* は E3 ユビキチンリガーゼでありミトコンドリア膜上の様々なタンパク質をユビキチン化する。このユビキチン修飾を選択的オートファジーのマーカである p62 により認識され障害されたミトコンドリアはオートファジーにより除去される [31, 32]。

DJ-1

DJ-1 は常染色体劣性の若年性 PD 原因遺伝子であり、常染色体劣性若年性 PD 全体における 1~2% の症例が *DJ-1* 変異によるものであるとされている。*DJ-1* の機能ははっきりとはわかっていないが、シャペロンとして機能する、プロテアーゼとして機能する、ミトコンドリアの恒常性に関与する、酸化ストレスの軽減に寄与するなどといったことが報告されている[25]。

ATP13A2

Kufor-Rakeb syndrome は L-DOPA 応答性の若年性パーキンソニズムに加え、認知機能障害、ミオクロームスを併発する常染色体劣性の疾患である[33]。

ATP13A2 はその原因遺伝子であることが同定されている[34]。*ATP13A2* はリソソーム膜タンパク質であり、その機能ははっきりとはわかっていないが *ATP13A2* ノックアウトマウスは神経セロイドリポフスチノーシス様の表現型とミトコンドリア ATP 合成酵素サブユニット c の蓄積を呈することから、リソソームの分解機能に関与していることが示唆されている。

1-1-3 家族性 PD 病因遺伝子としての *LRRK2* 同定と、*LRRK2* 変異による PD の特徴

LRRK2 と PD の関係は日本人の家系における連鎖解析において最初に報告された。

この研究では相模原に在住する常染色体優性家族性 PD 家系を対象に連鎖解析を行い、既知の PD 原因遺伝子座とは異なる 12p11.2-q13.1 が PD と連鎖していることを解明、この遺伝子座を *PARK8* と名付けた[2]。その後 2 つの独立したグループがドイツ、アメリカ、スペイン、イギリスの複数の家系を対象にした連鎖解析を行い、*PARK8* に存在する *LRRK2* 遺伝子の変異が家族性 PD の原因であることを示した[1, 3]。

常染色体優性遺伝性の PD を引き起こす *LRRK2* の変異として確実なものとしてはこれまでに R1441C[1]、R1441G[3]、R1441H[35]、N1437H[36]、Y1699C[1, 3]、G2019S[37]、I2020T[38]の 5 か所のアミノ酸に関して計 7 種類が同定されている。これらの変異の *LRRK2* 分子内における位置については *LRRK2* の分子構造(後述)と共に図表 1 にまとめた。

LRRK2 の変異は晩発性の PD 発症を引き起こし、その臨床所見は孤発性と区別がつかないとされる。病理組織所見としては、G2019S 変異 *LRRK2* による家族性 PD では孤発性 PD と同様に Lewy 小体、Lewy neurite を呈することが多い[39]。しかしながら他の変異を持つ家系では Lewy 小体が確認された症例や[1, 40, 41]、Lewy 小体が見られず代わりに神経原線維変化や p62 陽性の封入体などが見られた症例[1]が報告されている。また多系統萎縮症のように α -synuclein の封入体がグリア細胞内に形成された症例も報告されている[40]。G2019S 以外の変異によって引き起こされる PD の病理組織学的所見は様々だが、少なくともその一部はシヌクレイン病理を呈すること、また G2019S 変異では α -synuclein 病理が好発すること、さらに *LRRK2* 変

異による PD は臨床所見が孤発性に類似することから、*LRRK2* 変異による家族性 PD の発症機序は孤発性 PD の発症機序と共通する部分があることが期待されている。また詳しくは後述するが、*LRRK2* は孤発性 PD のリスク遺伝子であることが報告されており、このことも *LRRK2* 研究が家族性 PD のみならず孤発性 PD の発症機序解明に結びつく可能性を示唆している。

1-1-4 パーキンソン病のリスクとなる遺伝子、遺伝子座

GWAS をはじめとした近年の遺伝学的研究により、孤発性 PD の発症頻度と関連する遺伝子・遺伝子座の多型も多く明らかにされている。そのような PD リスク遺伝子の中には家族性 PD の原因遺伝子としても同定されている *SNCA* や *LRRK2* も含まれている。これまでに 40 以上の遺伝子座における多型が PD のリスクであることが報告されており[42]、本節ではそのうちの代表的なものに関して述べる。

SNCA

SNCA は常染色体優性家族性 PD の原因遺伝子であることが連鎖解析により示されているが、孤発性 PD のリスク遺伝子でもあることが複数の研究で報告されている。*SNCA* のプロモーター領域に存在する REP-1 配列を PD 患者と健常者とで比較したケースコントロール研究において、この配列長の多型が PD に関連することが報告されている[43]。その後 REP-1 配列が長い多型では α -synuclein の発現量が

mRNA レベルでもタンパク質レベルでも上昇することが報告された[44]。また複数の GWAS でも *SNCA* 遺伝子のイントロン領域において PD と関連する SNP が発見されている[45-48]。このことから *SNCA* は家族性 PD の発症のみならず孤発性 PD 発症にも関与している可能性が示されている。

LRRK2

LRRK2 は家族性 PD 原因遺伝子の 1 つであるが、近年の大規模な GWAS により孤発性 PD のリスク遺伝子でもあることが報告された。Satake らは日本の孤発性 PD 患者を対象に GWAS を行い、*LRRK2* コード領域の上流に位置する SNP が PD と関連することを報告した[45]。その後行われた複数の GWAS 及びそのメタ解析において、*LRRK2* と PD との関連が確認された[47-50]。報告された SNP の多くは *LRRK2* のイントロン領域もしくは *LRRK2* 遺伝子上流及び下流の非コード領域に位置している。しかしながら Do らによる GWAS では G2019S のアミノ酸置換を引き起こすミスセンス変異が[51]、Lill らによる GWAS では G2385R を引き起こす変異[48]がそれぞれ同定された。この結果から *LRRK2* のミスセンス変異は家族性 PD 原因となるだけでなく孤発性 PD のリスクでもあることが示唆された。

LRRK2 遺伝子座の非コード領域に位置する SNP がどのような効果を持つのかは不明だが、野生型 *LRRK2* の発現量やスプライシングを変化させている可能性もあり、たとえミスセンス変異がなくとも *LRRK2* は孤発性 PD 発症に寄与する可能

性が考えられる。

GBA

*GBA*はリソソーム加水分解酵素 *glucocerebrosidase* をコードする遺伝子である。

この酵素は糖脂質であるグルコセレブロシドをグルコースとセラミドに分解する。

機能喪失型の *GBA* 変異をホモに持つとリソソーム蓄積病の 1 つであるゴーシェ病を発症することで知られている。

パーキンソン病もしくはパーキンソニズムを併発するゴーシェ病の症例が複数報告されており、ゴーシェ病とパーキンソン病の関連が示唆されていた[52, 53]。その後ゴーシェ病ではない孤発性 PD 患者、アルツハイマー病患者及び健常者を対象に *GBA* 遺伝子の変異を解析したケースコントロール研究がおこなわれ、PD 患者では AD 患者及び健常者に比して *GBA* 遺伝子の機能喪失型変異をヘテロで持つ割合が有意に高いことが明らかにされた[54, 55]。加えてこれらの研究で *GBA* 変異を持つ PD 患者の発症年齢は変異を持たない患者の発症年齢よりも有意に低いことも明らかにされた。このことから *GBA* 遺伝子変異をヘテロに持つことは PD 発症に対するリスクとなることが示唆された。

その後 GWAS にて *GBA* の存在する遺伝子座における多型が PD と関連することが示され[47, 49, 50]、*GBA* 自身の変異もしくはプロモーター領域の変異が PD 発症に関与することが改めて確認された。

MAPT

MAPT は neurofibrillary tangles の主要な構成タンパク質であるタウをコードする遺伝子である。複数の GWAS においてこの *MAPT* 遺伝子座上の多型が PD と関連することが報告されている[46-48]。*MAPT* のミスセンス変異は前頭側頭葉型認知症を引き起こすこと、またタウはアルツハイマー病に特徴的な neurofibrillary tangle の構成タンパク質であることで有名であるが、GWAS の結果より PD のリスク遺伝子でもあることが示され、神経変性疾患に共通する変性メカニズムが存在する可能性も示唆される。

PARK16

日本の孤発性 PD 患者 1078 人を対象に行われた GWAS により 1q32 に存在する遺伝子座における多型が PD 発症と関連することが明らかとなり、この遺伝子座は *PARK16* と名付けられた[45]。この遺伝子座は *SLC45A3*、*NUCLS1*、*RAB7L1*、*SLC41A1*、*PM20D1* の 5 つの遺伝子を含んでいる。

この 5 つの遺伝子の内、*RAB7L1* の翻訳産物である RAB7L1 は LRRK2 と相互作用することが報告されている[56, 57]。また *Rab7l1* ノックアウトマウスは *Lrrk2* KO マウスと類似の表現型を呈することが報告されている[58]。このことから *RAB7L1* は *PARK16* の責任遺伝子であり、また *LRRK2* の機能と関連する遺伝子

であることが示唆されている。

1-2 LRRK2 と PD 以外の疾患に関する遺伝学的関連

1-2-1 LRRK2 と炎症性腸疾患

炎症性腸疾患は消化管に慢性の炎症をきたす疾患の総称であり、クローン病と潰瘍性大腸炎の 2 疾患からなる。クローン病の炎症は回盲部に好発するものの、口腔から肛門まで消化管の全長にわたり非連続性に生じることが特徴である。その炎症は粘膜層を越え、さらに下層の粘膜下層や筋層にも及ぶ。慢性の炎症を繰り返し、腹痛や下痢、消化管出血などを呈し、重症化した場合には病変部を外科的に切除する必要がある。一方潰瘍性大腸炎は大腸の粘膜層のみが侵される疾患であり、下痢、粘血便、腹痛などを呈する。これら両疾患は消化管における慢性の炎症を主体とするが、その炎症の原因に関してはいまだ明らかにされていない。近年これら炎症性腸疾患のリスク遺伝子探索が盛んにおこなわれ、様々な遺伝子が同定されている。その中で、*LRRK2* も炎症性腸疾患のリスク遺伝子である可能性が報告されている。

Barrett らはヨーロッパで行われたクローン病に対する 3 つの GWAS を基にメタ解析を行い、*LRRK2-MUC19* 遺伝子の存在する領域がクローン病と関連することを明らかにした[4]。なお *MUC19* は粘液の成分であるムチンをコードする遺伝子の 1 つであり[59]、消化管を保護する機能があると考えられる。その後潰瘍性大腸炎に関する GWAS のメタ解析の結果から同遺伝子座がクローン病と潰瘍性大腸炎双方のリ

スクであることが報告された[60]。ただしこれらの GWAS ではあくまで *LRRK2* の乗る遺伝子座が炎症性腸疾患と関連があるという結果を示しており、その原因遺伝子が *LRRK2* であるということまでは示せていない。

1-2-2 *LRRK2* とハンセン病

ハンセン病はらい菌による慢性の感染症である。GWAS によるリスク遺伝子探索が行われており、漢民族を対象とした解析で *LRRK2* がリスク遺伝子の 1 つであることが報告された[5]。その後同民族において *LRRK2* 遺伝子多型解析を目的としたケースコントロール研究がおこなわれ、*LRRK2* 遺伝子上の 13 の SNP を解析し、うち 5 つがハンセン病と関連することが明らかとなった[61]。この 5 つの SNP の内 1 つは *LRRK2* のミスセンス変異、T2397M を引き起こし、メチオニンに置換したアレルではハンセン病のリスクが上昇する。なお T2397M 変異は *LRRK2* の半減期を短縮し、タンパク質の発現量を低下させることが報告されている[62]。

1-2-3 *LRRK2* と全身性エリテマトーデス

北漢民族の SLE 患者を対象とした遺伝学的解析で *LRRK2* 遺伝子座上に存在する SNP (rs2638272) が SLE の発症と相関することが報告された[6]。この研究では他の免疫関連疾患(1 型糖尿病やクローン病など)のリスク遺伝子として同定されていた遺伝子の内オートファジーとの関連が示唆されている 6 つの遺伝子に着目し、その遺伝

子座の SNP と SLE 発症との関連を解析している。上述の通り *LRRK2* はクローン病のリスク遺伝子として同定されていたためこの研究で解析の対象となった。解析された 6 つの遺伝子座の内 *LRRK2* 遺伝子座に存在する SNP のみで SLE と有意な関連が見られた。加えて SLE 発症に対して保護的なアレルでは *LRRK2* の発現が上昇するとしている。*LRRK2* と SLE の関連について報告した研究は現在のところこの 1 つのみであり、今後の解析が待たれる。

1-3 LRRK2 の構造と特徴

1-3-1 LRRK2 の分子構造

LRRK2 は N 末から LRRK2 特異的リピートドメイン、LRR (Leucine-Rich Repeat) ドメイン、ROC (Ras of complex protein) ドメイン、COR (Carboxyl-terminal of ROC) ドメイン、キナーゼドメイン、WD40 ドメインを持つ巨大なタンパク質である(図表 1)[1, 63]。ROC ドメイン、COR ドメインと連続する構造を持つことから LRRK2 は ROCO ファミリーに分類される[1]。哺乳類は 4 つの ROCO ファミリー遺伝子を持ち、*LRRK2* の他、*LRRK2* のパラログである *LRRK1* (*Leucine-Rich Repeat Kinase 1*)、*DAPK1* (*Death-Associated Protein Kinase 1*)、*MASL1* (*MFH-amplified sequences with leucine-rich repeats 1*)が含まれている[63, 64]。

LRRK2 は ROC ドメインとキナーゼドメインの 2 つの酵素ドメインを持つ。ROC ドメインは Ras と相同な GTP 結合ドメインであり、これまでの解析から LRRK2 の

ROC ドメインも GTP 結合能と GTPase 活性を持つことが報告されている[65-67]。

また LRRK2 のキナーゼドメインはセリン/スレオニンに対するキナーゼ活性を有することが示されている[68, 69]。

1-3-2 LRRK2 の遺伝子発現

LRRK2 は幅広い組織で発現しており、腎臓、肺、脾臓、脳において mRNA およびタンパク質レベルで高い発現が確認されている[66, 70]。中枢神経系では皮質、線条体、海馬及び中脳黒質ドパミン神経細胞に発現していることが報告されており[71, 72]、加えてミクログリアやアストロサイトでも発現が見られる[73]。血球系細胞では B リンパ球やマクロファージでの発現が高いことが報告されている[74, 75]。加えてマクロファージでの発現はインターフェロン- γ によって発現が誘導されることも報告されている[74]。このような発現パターンから LRRK2 は神経細胞のみならず活性化された免疫系細胞をはじめ多様な細胞・組織で機能を持つことが示唆される。

1-3-3 LRRK2 の細胞内局在

組織・培養細胞を分画し生化学的に LRRK2 の局在を解析した研究では、LRRK2 は一貫して細胞質画分だけでなく膜画分にも分画されることが報告されている[72, 76, 77]。このことから LRRK2 は何かしらの細胞内小器官、膜ドメインに結合・局在することが示唆されている。しかしながら免疫染色にて LRRK2 の細胞内局在を解析

した報告では **LRRK2** はゴルジ体、エンドソーム/リソソーム、ミトコンドリア、小胞体に局在するなど様々な報告がある。West らは **LRRK2** を **HEK293T** 細胞に過剰発現させ免疫染色にてその局在を解析し、細胞質に広く分布することを報告している [68]。Hatano らは生化学的解析に加え、**COS-1** 細胞、**SH-SY5Y** 細胞の内因性 **LRRK2** を免疫染色で解析し **LRRK2** がゴルジ体に局在し、加えて一部ミトコンドリアやエンドソーム、リソソームに局在することを報告している [72]。Biskup らはラット初代培養神経細胞の内因性 **LRRK2** を染色しミトコンドリアやリソソームと共局在することを報告している [71]。Alegre-Abarrategui らは蛍光タグ付き **LRRK2** を安定に発現する **HEK293** 細胞を用いて **LRRK2** の局在を解析し、蛍光免疫染色法にて **LRRK2** が **p62** や **LC3** といったオートファジーマーカーと共局在すること、また免疫電子顕微鏡による解析でカベオラの頸部や多胞体内部、**amphisome**、オートリソソームなどに局在することを示している [78]。Vitte らは中脳黒質ドパミンニューロンの内因性 **LRRK2** を染色し小胞体マーカーと共局在することを報告している [79]。また細胞内小器官への局在ではないが、Gardet らはマウスマクロファージ系培養細胞である **RAW264.7** 細胞にサルモネラ菌を感染させると、サルモネラの菌体そのものに内因性 **LRRK2** が集積することを報告している [74]。

免疫染色や免疫電子顕微鏡解析による **LRRK2** の細胞内局在解析では結果にコンセンサスが得られていないが、これまでの研究手法には複数の問題点が存在することにもその原因があると考えられる。問題点の 1 つは、**LRRK2** に限らず過剰発現したタ

ンパク質はしばしば非生理的な細胞内局在を呈するという点である。このようなタンパク質は凝集したり小胞体に蓄積したりするなど本来とは異なる局在を呈する。また内因性 LRRK2 の細胞内局在を解析した研究も行われているが、抗体の特異性を十分に確認しているものはこれまでにない。そのため免疫染色で得られたシグナルが本当に LRRK2 の細胞内局在を表しているかどうかは不明である。このような問題点に加え、LRRK2 の細胞内局在とその機能を結び付けるような研究も十分には行われていない。そのため、LRRK2 の細胞内局在解析とその機能的意義解明は、現時点においても LRRK2 研究における 1 つの大きな課題であると考えられる。

1-4 LRRK2 の機能

1-4-1 LRRK2 の基質

LRRK2 はプロテインキナーゼであり、その基質探索に関しては数多くの研究がおこなわれてきた。これまでに 15 以上のタンパク質ファミリーが LRRK2 の基質であることが報告されている。その多くは *in vitro* のみでリン酸化を受けることが確認されているが、Endophilin A1、リボソームプロテイン S15 などは細胞内においても LRRK2 によるリン酸化を受けることが報告されている[80, 81]。

近年細胞内における LRRK2 の新しい基質として複数の Rab GTPase が同定された[82]。この研究ではリン酸化プロテオミクス解析にて細胞内において Rab10 の Thr73 部位が LRRK2 依存的にリン酸化を受けることを明らかにした。さらに Rab10

Thr73 に相同な位置にスレオニンないしセリンを持つ他の Rab GTPase に対しても解析を行い、Rab10 を含め複数の Rab が in vitro で LRRK2 により直接リン酸化を受けることを示している。また Rab8a、Rab10、Rab12 に関しては細胞内において LRRK2 によるリン酸化を受けることを、リン酸化抗体および質量分析法を用いて示している。加えて家族性 PD と連鎖した *LRRK2* の変異は例外なく、これらの Rab に対するリン酸化を亢進させることも示されている。この研究より Rab GTPase は LRRK2 の生理的基質であり、また Rab のリン酸化はパーキンソン病発症にも関係する現象である可能性が強く示唆されている。Rab10 Thr73 は switch II 領域の中にあり、この領域は他のタンパク質との相互作用に関与する重要な領域であると考えられている。LRRK2 によりリン酸化を受けると、Rab GTPase と GDI および GEF との相互作用が低下することが示されており、不活性状態のまま膜に局在するというモデルが示されている[82]。しかしながら LRRK2 による Rab GTPase のリン酸化が細胞・個体にとってどのような意義を持つのか、その分子細胞生物学的な解析についてはいまだ行われていない。

1-4-2 *Lrrk2* ノックアウトマウス

Lrrk2 (*LRRK2* のマウスオルソログ)ノックアウトマウスは神経組織においては異常を呈さないが、腎臓と肺において表現型が報告されている。腎臓では色素沈着と加齢依存的なリソソーム数の増加、個々のリソソームの肥大化、リポフスチンの沈着が

みられる[83-85]。また p62 や LC3-II 量が増加することからオートファジー-リソソーム経路の障害が示唆されている。肺では II 型肺胞上皮細胞においてサーファクタントの分泌障害とラメラ体の蓄積が見られている[85]。とくに腎臓における表現型から LRRK2 はリソソームないしはオートファジー経路に関与する可能性が考えられるが、実際に LRRK2 がどのような機能を持つのかは明らかにされていない。

1-4-3 リソソームに対する LRRK2 の機能

LRRK2 とリソソームの関係に関する研究はこれまでに複数報告されている。初代培養神経細胞に G2019S LRRK2 を過剰発現させると LAMP1、タウ、LRRK2 の 3 者陽性の封入体が神経突起内に形成されることが報告されている[86]。またショウジョウバエにおける *LRRK2* オルソログ *Lrrk* に G2019S 変異に相当する変異を入れ過剰発現させると、リソソームが核近傍に集積することが報告されている[87]。G2019S *LRRK2*tg マウス由来初代培養アストロサイトでは野生型のアストロサイトに比してリソソームサイズの増加とリソソーム数の低下が見られている。また *Lrrk2*KO マウス由来アストロサイトではリソソームサイズに変化はなかったがリソソーム数は増加した[73]。健常者由来および G2019S キャリアーの PD 患者由来線維芽細胞におけるリソソームの形態を比較した研究では、PD 由来線維芽細胞において LAMP1 の染色性、リソソームのクラスター化が増加しており、LRRK2 のキナーゼ阻害剤を投与するとレスキューされるという結果が得られている[88]。また、このようなリソソーム

の形態変化はリソソーム膜チャネルである TPC2 のノックダウンでレスキューされたことから TPC2 を介している可能性が示されている。

このように LRRK2、特に G2019S 変異 LRRK2 がリソソームに対し何らかの機能を果たしている可能性を示唆する報告が複数ある。しかしながらその具体的なメカニズムや意義に関しては不明な点も多い。加えて内因性レベルの野生型 LRRK2 が持つ生理的な機能に関しても明らかにされていない。

1-4-4 オートファジー経路における LRRK2 の機能

LRRK2 とマクロオートファジーの関連を示唆する報告が複数存在する。神経芽細胞種由来培養細胞 SY-SY5Y に G2019S 変異 LRRK2 を過剰発現させると LC3 陽性の構造が細胞体内に増加することが報告されている[89]。また HEK-293T 細胞に LRRK2 を過剰発現させると AMPK の活性が上昇し、LC3 陽性構造物の数が増加することが報告されている[90]。蛍光タグ付き LRRK2 を安定発現した培養細胞において LRRK2 をノックダウンするとオートファジーフラックスが上昇し飢餓ストレスに対し抵抗性が上昇する[78]。しかしマクロファージ系培養細胞における内因性 LRRK2 をノックダウンするとオートファジーのフラックスが低下し、凝集性タンパク質が蓄積するという報告もある[77]。また LRRK2 はシャペロン介在オートファジーの基質であり、G2019S LRRK2 はシャペロン介在オートファジーを抑制するという報告もある[91]。このように LRRK2 とオートファジーの関係は注目を集めている

分野であり、LRRK2 がマクロオートファジーの誘導やクリアランスに関与している可能性が示されている。しかしながらオートファジーを正負どちらに制御しているのかに関して議論が分かれている部分もあり、またオートファジーを制御するメカニズムに関する詳細には明らかにされていない。

1-4-5 その他の LRRK2 の機能

オートファジーやリソソーム以外にも LRRK2 の機能は多数報告されており、例えば LRRK2 は転写因子 FOXO1 をリン酸化し下流の細胞死に関わる遺伝子の転写を亢進させる[92]、4E-BP をリン酸化し翻訳を亢進させる[93]、神経突起の軸索伸長を制御する[86]、Fas の下流分子 FADD と相互作用し細胞死シグナルを活性化させる[94]、など多彩な生命現象との関与が報告されている。

リソソームとは

リソソームは細胞内に存在する酸性のオルガネラであり、60 種類以上の加水分解酵素を内腔に持ち細胞内外の様々な基質の分解に関与する[95]。通常 100-500 nm 前後のサイズを持つ小胞状の形態であり、細胞内に数百程度存在しその総体積は細胞内の容積の 5%程度を占めるとされている。内腔の pH は 5 以下と酸性に保たれており、酸性条件下において活性を持つ様々な加水分解酵素によりタンパク質、脂質、糖など

の分解を担っている。またこれらの分解機能に加え分泌、シグナル伝達、細胞死制御といった多彩な生命現象に関与することが報告されている。

1-5 リソソームによる分解経路

1-5-1 エンドサイトーシス

エンドサイトーシスは細胞外の基質をリソソームに輸送する経路である。細胞外の基質は細胞膜の陥入と共に内在化され、初期エンドソーム、後期エンドソームへと運ばれ最終的にリソソームと融合する[96]。細胞膜上の受容体をクラスリン依存的に内在化するエンドサイトーシスが代表的だが、貪食細胞が菌体を取り込むファゴサイトーシスや、液体成分を取り込むマクロピノサイトーシスなど多彩な経路が存在する。これらの経路は初めに細胞膜で基質を取り囲み内在化する部分の分子機構に差異があり、例えばファゴサイトーシスではアクチン線維により細胞膜を進展させ菌体を取り囲むがクラスリンには依存しない。しかしながらその後の成熟過程は基本的に共通した分子機構を用いていると考えられる。

1-5-2 オートファジー

エンドサイトーシスが細胞外の基質をリソソームに輸送する経路であるのに対し、オートファジーは細胞質の構造をリソソームに輸送し分解する経路の総称である。その輸送形態に応じマクロオートファジー、ミクロオートファジー、シャペロン介在オ

オートファジーに分類される。加えて近年ゴルジ体が関与する ATG5 非依存分解経路、Glogi membrane-associated degradation pathway(GOMED)が報告された[97]。ここではこれらオートファジー経路に関してまとめる。

マクロオートファジー

マクロオートファジーは複数存在するオートファジー経路の中で最も主要な経路であり、また解析も進んでいる。そのため単に「オートファジー」といった場合このマクロオートファジーを指すことが多い。マクロオートファジーでは細胞質の一部分が隔離膜と呼ばれる膜構造によって取り囲まれ、オートファゴソームが形成される。その後オートファゴソームがリソソームと融合することにより内腔の構造物は分解される。定常状態や飢餓状態で誘導されるマクロオートファジーは細胞質の一部分をランダムに取り囲み分解していると考えられているが、障害されたオルガネラや凝集したタンパク質、細胞質内の細菌などを標的に特異的にマクロオートファジーで分解する機構も存在する。マクロオートファジーは飢餓ストレス時のアミノ酸供給、タンパク質やオルガネラの品質管理、特定の基質の発現量制御、菌体に対する感染防御と抗原提示など様々な現象に寄与していると考えられている[98]。

ミクロオートファジー

ミクロオートファジーはリソソームの膜が陥入し細胞質を直接内腔へと取り込む様式をとるオートファジーである。主に酵母を用いて解析されており、ESCRT と呼ばれる複合体やクラスリン依存的にリソソーム膜の陥入が生じ、細胞質構造物の取り込みがおきることが報告されている[99]。

シャペロン介在オートファジー

シャペロン介在オートファジーは、シャペロンタンパク質により基質タンパク質をほどいてリソソーム膜を直接通過させる様式をとるオートファジーである[100]。基質であるタンパク質は5アミノ酸からなる特異的な配列を持ち、これをシャペロンである Hsc70 が認識し結合する。シャペロンと基質タンパク質が結合すると、基質タンパク質はリソソーム表面へと輸送されリソソーム膜タンパク質の LAMP2 と相互作用する。LAMP2 は多量体を形成しリソソーム内へと基質を輸送するトランスポーターとして機能する。LAMP2 と相互作用した基質はシャペロンによりほどかれ LAMP2 によってリソソーム内腔へ輸送され分解を受ける。

Golgi membrane-associated degradation pathway (GOMED)

GOMED はゴルジ体からの分泌過程が阻害された際に、蓄積した分泌小胞が ATG5 非依存的に2重膜構造によって取り囲まれリソソームで分解される機構である。2重膜構造の膜の由来がゴルジ体であることから Golgi membrane-associated

と名付けられている。この経路はもともと酵母細胞を材料に ATG5 非依存的な分解経路を探索し、ゴルジ体からの輸送経路を阻害すると ATG5 非依存的な分解及びオートファゴソーム様の 2 重膜構造の出現を見出したことをきっかけに発見された [97]。細胞内の輸送が障害され分泌顆粒が蓄積すると、ゴルジ体の PI(4)P が低下し、分泌顆粒を取り囲むように膜が形成される。この膜は ATG5、ATG7 非依存的に出現するが、電子顕微鏡で観察するとオートファゴソーム様の 2 重膜構造をとっている。この 2 重膜構造はリソソームと融合し、内部に取り込まれた分泌顆粒は分解される。真核生物でも低血糖でインスリン分泌が抑制された際に膵臓ランゲルハンス島β細胞においてインスリン顆粒を分泌する経路に関与している。

1-5-3 オルガネロファジー

近年様々なオルガネラがマクロオートファジーの対象となりリソソームで分解されることが報告されている。このマクロオートファジーによる細胞内小器官の分解はオルガネロファジーと総称され、オルガネラの恒常性維持に重要であると考えられている。最も有名なオルガネロファジーの例はミトコンドリアを分解するマイトファジーであり、マイトファジー経路の 1 つは PD 原因遺伝子産物である PINK1、parkin によって担われている。また小胞体や核、ペルオキシソームもマクロオートファジーにより分解されることが報告されており、加えて膜障害を受けたエンドソーム、リソソーム自身も、リソソームによって分解される [101]。膜障害を受けたリソソームがオ

オートファジーにより除去される経路はリソファジーと呼ばれており、リソソームの恒常性維持機構の1つであると考えらる。

1-5-4 マクロオートファジー関連遺伝子の非オートファジー機能について

リソソームの機能とは少し離れるが、ここで ATG5 をはじめとしたマクロオートファジー関連分子のマクロオートファジー以外の機能に関してまとめる。ここでは①オートファジー依存的分泌経路、②LC3-associated phagocytosis およびそれに類する分子経路、の2つに関して述べる。

オートファジー依存的分泌経路: secretory autophagy

多くの分泌タンパクはシグナル配列を持ちエキソサイトーシス、すなわち粗面小胞体で合成後ゴルジ体を通り細胞膜へと輸送される経路によって分泌される。しかしながら一部の分泌タンパク質はシグナル配列を持たず、細胞質タンパク質として翻訳されるにもかかわらず細胞外へと分泌されることが知られていた。このようなタンパク質はエキソサイトーシスによらない未知の”unconventional secretory pathway”によって分泌されていると考えられてきたが、この経路の一部がオートファジー分子によって担われていることが近年明らかになりつつある。

secretory autophagy の概念は酵母を用いた2つの独立した研究で提唱され、これら研究では Acb1 と呼ばれる細胞質タンパク質がオートファジー分子依存的に分泌

されることを明らかにしている[102, 103]。その後哺乳類の細胞においてもシグナル配列を持たないタンパク質である IL-1 β がオートファジー分子依存的に分泌されることが報告された[104]。また最近パネート細胞の抗菌ペプチドの1つ、Lysozymeが secretory autophagy 経路で分泌されることが報告された。Lysozyme はシグナル配列を持ち定常状態では通常のエキソサイトーシス経路で分泌されるが、ストレス下で膜輸送が障害されると secretory autophagy 経路で分泌されることが明らかにされている。[105]。

secretory autophagy のメカニズムに関しては不明な点も多いが、少なくとも ATG5 などユビキチン様結合反応に必要な分子は secretory autophagy にも必須である。これらの分子がオートファゴソームを形成し細胞質タンパク質を取り囲むことで、カーゴを形成すると考えられている。加えて Rab8a が関与すること[104]、通常のオートファジーとは異なる SNARE タンパク質 (Sec22b, syntaxin 3, syntaxin 4, SNAP-23, SNAP-29)などが関与することなどが報告されており[106]、カーゴ形成後の分子メカニズムの解析も進んできている。

LC3-associated phagocytosis およびそれに類する分子経路

LC3-associated phagocytosis (LAP)とは貪食細胞が菌体を取り込みファゴソームが形成された際に、そのファゴソーム膜上にマクロオートファジーマーカーLC3が直接リクルートされる現象である。マクロオートファジーにおいて LC3 は 2 重

膜構造に局在するのに対し、LAP では LC3 がファゴソームの 1 重膜の上で直接脂質化されリクルートされる[107]。A 群連鎖球菌のような侵襲性の高い菌を貪食した場合、菌がファゴソーム膜を破り細胞質へ脱出する場合があります、このような時も菌体を取り囲むように LC3 陽性の構造物が形成されるが[108]、これはマクロオートファジー性の 2 重膜構造である。ファゴソーム、エンドソームを破った菌体に対するマクロオートファジーはゼノファジーと呼ばれており、菌体を LC3 が取り囲むという点では同様だが、その膜構造(1 重膜か 2 重膜か)、誘導メカニズム、機能において LAP とは全く別の現象である。LAP はエンドサイトーシスによって生じた小胞に LC3 がリクルートされているだけであり、細胞内の構造の分解をしているわけではないので本来の意味ではオートファジーの定義からも外れるが[109]、マクロオートファジーマーカーの LC3 陽性になることから noncanonical autophagy と呼ばれることもある。

LAP は Toll-like receptor (TLR)を活性化するような粒子を貪食した際に誘導される。この時電子顕微鏡観察を行うと LC3 陽性の構造はマクロオートファジー性の構造とは異なり 1 重の膜からなることが確認される[107]。LAP 経路における LC3 の脂質化はマクロオートファジー経路と同様に ATG5 や ATG7 といったユビキチン様結合反応を担う分子を必要とする。しかしながらマクロオートファジーの最上流に位置する ULK1/2 や FIP200 といった分子は LAP の誘導に関与しない。代わりに Rubicon、NOX2、および NOX2 によって産生される活性酸素が LAP の誘導

に必要であると報告されている[110]。菌体を貪食した際の LAP 経路の意義としては、ファゴソーム内における菌体の分解、過剰な炎症応答の抑制、感染防御に寄与しているなどの可能性が示されている[107, 110]。

また死細胞を貪食した際にも LAP が誘導されることが報告されており、この時 LAP 経路は内在化した死細胞の分解に必要である[111]。また LAP 経路が障害されたマウス(*Atg5*, *Nox2*, *Rubicon* などの KO マウス)に死細胞粒子を血中投与するとループス腎炎様の表現型を呈することから個体においては死細胞の分解を制御し、自己免疫疾患発症を防いでいる可能性も示唆されている[112]。

近年リソソームに浸透圧ストレスが加わった場合にも LAP 様の LC3 リクルート現象が誘導されることが報告された[113, 114]。細胞に対しクロロキン処理や低浸透圧培地処理を行うとリソソーム内部の圧が上昇する。これに伴いリソソーム膜上に LC3 がリクルートされるが、これは LAP の場合と同様にリソソームの 1 重膜に直接 LC3 がリクルートされていると考えられている。加えてこの LC3 の脂質化は LAP 経路の場合と同様に ATG5 や ATG7 には依存するが、ULK1 複合体に依存しないことが示されている[113]。しかしながらこのようなリソソームに圧負荷が加わった際の LC3 リクルートが機能的にどのような意義を持つのかに関しては全くの不明である。

1-6 リソソームエキソサイトーシス

リソソームは分解のためのオルガネラであると同時に分泌機能も持つことが近年明らかになっている。特定の刺激、環境下ではリソソームが細胞辺縁部へと輸送されリソソーム膜と細胞膜が融合する。それによりリソソーム内腔の物質が細胞外へと放出されるとともにリソソーム膜が細胞膜へと供給される。このようなリソソームの放出現象はリソソームエキソサイトーシスと呼ばれており、その生理的意義としては損傷した細胞膜の修復[115]、シグナル物質の放出[116]、神経突起伸長における膜供給[117]、貪食細胞における貪食杯の形成[118]など様々な生命現象に関与することが報告されている。

リソソームエキソサイトーシスでは細胞の辺縁部に存在するリソソームが Ca^{2+} 依存的細胞膜と融合する。 Ca^{2+} はリソソーム内腔から供給されると考えられており、リソソーム膜上のチャネルである TRPML1 が重要な役割を果たしている。 Ca^{2+} の濃度上昇はリソソーム膜上に存在する synaptotagmin VII により感知され、これにより V-SNAER である VAMP-7 と細胞膜上に存在する SNAP-22, syntaxin-4 が活性化しリソソーム膜と細胞膜を融合させる。また細胞膜修復の際のリソソームエキソサイトーシスに関与する Rab GTPase を siRNA ライブラリーで探索した研究では Rab3a と Rab10 が lysosomal exocytosis に必要な Rab として同定されており[119]、メカニズムは十分に解明されていないものの Rab GTPase の関与が示唆されている。

1-7 リソソームの恒常性維持機構

1-7-1 Lysophagy

Lysophagy とは破裂したリソソームに対して特異的に誘導されるマクロオートファジーである。リソソームに対し膜障害性のストレスが加わるとリソソーム膜が破れカテプシン B などのリソソーム加水分解酵素が細胞質に漏出する。このような現象は Lysosomal membrane permeabilization (LMP) と呼ばれている。LMP を引き起こしたリソソームは隔離膜によって取り囲まれ別のリソソームによって分解される [101]。リソソームに蓄積し膜を傷害する薬剤である LLOMe (L-Leucyl-L-Leucine methyl ester) で細胞を処理すると、リソソームは LMP を起こし、選択的オートファジーのマーカーである p62、LC3 陽性となる。その後障害されたリソソームは正常なリソソームにより分解され除去されると考えられる。

1-7-2 リソソームの生合成: TFEB

TFEB は転写因子であり、リソソームにおいて機能する各種膜タンパク質、加水分解酵素の遺伝子発現を協調的に制御している [120]。TFEB は CLEAR エlement と名付けられたゲノム上の配列 (GTCACGTGAC) に結合し下流にある遺伝子の発現を誘導する。定常状態では TFEB は mTORC1 によるリン酸化をうけており、そのリン酸化依存的に 14-3-3 タンパク質と結合している。リン酸化された TFEB は細胞質に留まるが、リソソームに基質が蓄積した場合や細胞に飢餓ストレスが加わった場合には、mTORC1 の活性が抑制され TFEB が脱リン酸化される。すると 14-3-3 との結合

が外れ TFEB は核移行しリソソーム関連遺伝子の発現を誘導する[121]。また最近 mTORC1 以外に GSK3 β も TFEB をリン酸化していることが報告された[122]。TFEB の活性化によりリソソームの生合成が亢進し加水分解能が上昇すると考えられている。加えてリソソーム膜の Ca²⁺チャネルである TRPML1 の発現も上昇し、これによりリソソームエキソサイトーシスも亢進することが報告されている[123]。TFEB の過剰発現は細胞レベルでも個体レベルでもリソソーム蓄積病モデルにおける表現型、すなわちリソソーム基質の蓄積及びリソソームの肥大化、細胞障害をレスキューすることが報告されている[123, 124]。

1-7-3 リソソームエキソサイトーシス

リソソームエキソサイトーシスはリソソームの恒常性維持機構の 1 つである可能性が考えられている。リソソームエキソサイトーシスを亢進させる TRPML1 過剰発現や TRPML1 アゴニスト投与は、リソソーム蓄積病モデル細胞におけるリソソーム基質蓄積を軽減、リポフスチン量を減少させることが報告されている[125]。TRPML1 活性化によるリソソーム病表現型のレスキューは、リソソームエキソサイトーシスに必要である synaptotagmin VII のノックアウトで見られなくなることが確かめられている[125]。また個体においてはリソソーム病モデルマウスに TFEB を過剰発現させると、リソソーム基質の蓄積軽減と共にリソソームエキソサイトーシスの亢進がみられる[123, 124]。リソソームエキソサイトーシス亢進とリソソーム病様表現型の軽

減との因果関係に関しては十分な解析がなされていないが、リソソームエキソサイトーシスが個体においてもリソソームの恒常性維持に寄与している可能性が示されている。

第 2 章 本研究の目的

LRRK2 は遺伝学的にパーキンソン病、クローン病、ハンセン病など様々な疾患との関連が報告されている重要な遺伝子であるが、その病的機能は明らかでない。*LRRK2* と疾患との関係を分子メカニズムに基づいて解析するためには、その基礎として *LRRK2* の正常な分子機能の解明が重要であると考えられる。

Lrrk2 KO マウスは近位尿細管上皮細胞においてリポフスチンの蓄積とリソソームの肥大化を呈し、*LRRK2* がリソソーム系において何らかの機能を有することが想定されたが、その詳細は明らかにされていなかった。*LRRK2* は細胞内において複数の Rab GTPase をリン酸化することが報告されており膜輸送に関与している可能性が示唆されたが、リン酸化の分子細胞生物学的意義は不明であった。

以上から *LRRK2* は細胞内のいずれかの領域に局在し、Rab GTPase をリン酸化しリソソームに対し機能することが考えられた。そこで私は *LRRK2* の細胞内局在を詳細に解析するとともに、基質である Rab GTPase のリン酸化がどのような意義を持つのか、そしてリソソームにおいてどのような機能を持つのかを明らかにする研究に着手した。

第3章 材料と方法

試薬・抗体

使用した1次抗体とその希釈倍率は図表3にまとめた。蛍光免疫染色の2次抗体はAlexa488、Alexa546もしくはAlexa647で標識された各動物種に対するgoat anti-IgG抗体(Thermo Fisher Scientific)を使用した。免疫ブロッティングの2次抗体はHRP標識されたanti-IgG抗体(Jackson ImmunoResearch)を使用した。マウスIFN- γ はCell signaling Technologyより購入し1% BSA (w/v)/DPBSに溶解、最終濃度15 ng/mLで使用した。クロロキンはSigma Aldrichから購入し蒸留水に溶解し、各実験で記載の濃度で使用した。Bafilomycin A1はWakoより購入しDMSOに溶解、最終濃度100 nMで使用した。Vacuolin-1はSanta Cruzより購入しDMSOに溶解、最終濃度500 nMで使用した。GSK2578215AはSigma Aldrichから購入しDMSOに溶解、最終濃度1 μ Mで使用した。PF-06447475はMedChem Expressより購入しDMSOに溶解、最終濃度1 μ Mで使用した。

細胞の培養と継代

ヒト胎児腎細胞由来培養細胞株HEK293細胞、マウス線維芽細胞系培養細胞3T3-Swiss albino細胞(ECACCより購入)、マウスマクロファージ系培養細胞株RAW264.7細胞(ECACCより購入)は10% FBS(ウシ胎児血清、HyClone社製もしくはBioWest

社製)、1% PS (ペニシリン/ストレプトマイシン、gibco 社製)を加えた DMEM (Dulbecco's modified eagle medium、Wako)中で 5% CO₂ 存在下、37°Cにて培養した。RAW264.7 細胞は解析の 48 時間前より IFN- γ (15 ng/mL)を含む培地に交換し活性化した。

HEK293 細胞、3T3 Swiss albino 細胞は接着細胞培養用のディッシュ(コーニング)上で培養し、Trypsin EDTA で細胞を剥がし継代した。RAW264.7 細胞は浮遊細胞用低接着ディッシュ(SUMITOMO BAKELIE CO.)上で培養し、接着した細胞をピペッティングで剥がし継代した。

野生型もしくはK1906M変異をもつ3×FLAG-LRRK2を安定に発現するHEK293細胞は当研究室において作成された。LRRK2 安定発現 HEK293 細胞は通常のHEK293 細胞と同様の方法で培養・継代した。

骨髓幹細胞由来マクロファージの培養

***Lrrk2* KO マウス**

Lrrk2 KO マウスは Jie Shen 教授(Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School)よりいただいた。マウスの管理及び実験への使用においては東京大学のガイドラインに即して行った。

L929 コンディション培地の作製

L929 細胞は 10% FBS、1% PS を添加した RPMI 1640 培地 (Thermo Fisher Scientific) で培養・維持した。コンディショニング培地作成の際は L929 細胞を 15 cm ディッシュに 2/3 コンフルエントとなるように播き、60 mL の RPMI 1640 培地で 7 日間培養した。培養上清を回収し 0.45 mM のフィルターで細胞残滓を取り除き、L929 コンディショニング培地とした。L929 コンディショニング培地は 15 mL チューブに分注し -20°C で保存した。

骨髓幹細胞の採取とマクロファージへの分化誘導

8~10 週齢のマウスの両側大腿骨及び脛骨から骨髓幹細胞を採取し、BMDM ϕ 培地 [10% FBS、1% PS を含んだ RPMI 1640 培地と L929 コンディショニング培地を 4:1 で混合し作製] 中で 7 日間培養した。2 日に 1 回培地を除去し DPBS で洗浄、非接着細胞を除去した後新鮮な BMDM ϕ 培地を入れた。7 日目に IFN- γ を 15 ng/mL となるよう添加した BMDM ϕ 培地に交換し、さらに 48 時間培養、活性化された骨髓幹細胞由来マクロファージを得た。

RAW264.7 細胞への siRNA 導入

RAW264.7 細胞への siRNA トランスフェクションは Lipofectanime RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) を用いて、メーカーの推奨プロトコルを少し改変して行った。トランスフェクションの 48 時間前に RAW264.7 細胞を浮遊細胞用低接着ディシ

ユないしプレートに 1/6 コンフルエントの細胞密度で播いた。48 時間後 Lipofectamin RNAiMAX を用いて siRNA のトランスフェクションを行った。これは 6 well プレーートの 1 well に対して、siRNA 30 fmol、RNAiMAX 5 μ L の複合体を opti-MEM を用いて調整し、well に滴下して行った。複数遺伝子に対する siRNA を同時に導入する際は、各遺伝子に対し 30 fmol の siRNA を用意し混合後、5 μ L の RNAiMAX と混合した。siRNA トランスフェクションの 24 時間後に解析用のプレート/ディッシュに播きなおし、IFN- γ を添加した DMEM でさらに 48 時間培養した。

使用した siRNA はすべて Dharmacon より購入した siGENOME siRNA であり、これは off-target 効果を軽減するため標的遺伝子に対する 4 種類の異なる配列の siRNA が等量ずつ混合されている。siRNA は siRNA バッファー [5 \times siRNA buffer (Thermo Fisher Scientific)を RNase free water (Thermo Fisher Scientific)]に 20 nM の濃度となるように溶解し、分注して-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

HEK293 細胞へのプラスミドベクター導入

3xFLAG LRRK2 の発現ベクターは当研究室にてヒト LRRK2 cDNA を p3xFLAG-CMV10 ベクター (Sigma)にクローニングすることで作成された[65]。EGFP-RabGTPase(マウス)を発現するベクターは東北大学福田光則教授よりご供与いただいた。EGFP-RabGTPase は pEGFP-C1 ベクター (BD Biosciences Clontech)にクローニングされた[126]。LRRK2 および各種 Rab GTPase は CMV プロモータ下で発現する。

プラスミド DNA は PureLink HiPure Plasmid Filter Maciprep Kit(Thermo Fisher Scientific)を用いてメーカーのプロトコルに従い精製した。プラスミドベクターのトランスフェクションは Lipofectamin LTX (Thermo Fisher Scientific)を用いて、メーカー推奨プロトコルにしたがって行った。トランスフェクションの翌日に HEK293 細胞をカバーガラス上に播きなおし、さらに 24 時間後に解析に用いた。

免疫細胞化学

細胞の培養

免疫染色を行う細胞はカバーガラス(松浪硝子)に播き培養した。購入したカバーガラスは 1M の水酸化ナトリウム水溶液で 1 晩以上洗浄することで油脂を除去し、その後蒸留水で洗浄した。洗浄したカバーガラスはオートクレーブで滅菌し実験に使用した。Poly-D-Lysin コートはすくなくとも HEK293 細胞、3T3 Swiss albino 細胞、骨髄幹細胞由来マクロファージに対しては毒性が見られた。そのため本実験ではすべての実験・細胞に対しコーティングを行わずにカバーガラスを使用した

細胞の固定

各実験において特に断りのない限り 4% PFA 固定および 100% エタノール処理を行い細胞を固定した。まず 4% PFA/DPBS を用いて 30 分間室温で固定した。その後 DPBS で PFA を洗浄し、カバーガラスを-20℃ 100% エタノールに入れ処理した。

この状態でサンプルを保存した。100%エタノールを DPBS で十分に洗浄し免疫染色を行った。

メタノール固定は 100%メタノールを -20°C に冷却し、細胞が接着したカバーガラスをメタノールに入れることで固定した。15 分間メタノールで浸潤固定した後、DPBS で十分に洗浄し免疫染色に使用した。

10% トリクロロ酢酸(TCA)処理は以下のように行った。まず細胞を 4% PFA で 30 分間室温で固定し、DPBS で十分に洗浄した。蒸留水に TCA を 10% (w/v)となるように溶解し、10% TCA 溶液を作出した。固定後の細胞を 10% TCA 溶液で 15 分間 4°C で処理した。細胞を DPBS で十分に洗浄して免疫染色を行った。

免疫染色

100% EtOH 中で保存していたサンプルは DPBS で十分に EtOH を洗浄した。その後ブロッキング液[3% (w/v) BSA、0.1% (v/v) Triton X-100 を加えた DPBS]で 30 分間ブロッキングした。1 次抗体はブロッキング液に希釈した。パラフィルムの上に 30~40 μL の抗体液をたらし、カバーガラスの細胞接着面が下になるように置き、室温で 2 時間インキュベートした。カバーガラスを DPBS で 10 分 \times 3 回洗浄した。2 次抗体および核染色用試薬(DRAQ5 Cell Signaling Technology 1:2000 希釈)をブロッキング液に希釈し、1 次抗体と同様にパラフィルム上に乗せ、カバーガラスの細胞接着面が下になるように置き室温で 1 時間インキュベートした。カバーガラスを DPBS

で 10 分×3 回洗浄し、水溶性封入剤(Mountant, PermaFluor、Thermo Fisher Scientific)を用いてスライドガラスに封入した。

サンプルの画像撮影は共焦点顕微鏡(SP5、Leica)を用いて行った。画像のコントラストは画像処理ソフト GIMP を用いてレベル補正を行い調整した。

細胞からのタンパク質抽出

細胞は氷冷 DPBS で洗浄後、Lysis バッファー[50 mM Tris HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.5% (v/v) Triton X-100, Complete protease inhibitor cocktail (Roche)]を加え 4°C で振盪し可溶化した。リン酸化を解析する際は Lysis バッファーにさらに PhosSTOP phosphatase inhibitor Cocktail (Roche)を加えた。可溶化後、lysate を遠心分離(20,400 x g、15 分間、4°C)し、上清に 1/3 量の 4×LDS Buffer [Thermo Fisher Scientific 社製製品に 4% (v/v)の 2-メルカプトエタノールを添加)を加えた。サンプルは 95°C で 5 分間加熱しタンパク質を十分に還元・変性させた。BCA assay にてサンプルのタンパク質濃度を測定する場合は Lysis バッファーで可溶化し遠心後、4×LDS バッファーを加える前の上清を分注し TaKaRa BCA Protein Assay Kit (TaKaRa)を用いて解析した。

SDS-PAGE および Phos-tag PAGE 両方で解析するサンプルに関しては Lysis バッファー中に加える complete を EDTA free のものにし、さらに PhosSTOP phosphatase inhibitor Cocktail (Roche)を加えた。また、可溶化後遠心分離した上清、

4×LDS Buffer、および 10 mM MnCl₂ を 13:5:2 の割合で混合し、サンプル中に Mn²⁺ イオンが終濃度 1 mM で添加されるように調整した。

Cathepsin D 放出解析

IFN- γ で 48h 活性化した RAW264.7 細胞を DMEM phenol red (-) で洗浄し、1% FBS を含む DMEM phenol red (-) で 3 時間培養した。培養上清を回収し 200 x g で 5 分間遠心、細胞残屑を除去した上清の一部に 4×LDS Buffer を加え培養上清サンプルとした。上清の残りは LDH 活性の測定に使用した。プレート上に残った細胞は培養上清と等量の Lysis バッファーで可溶化し、通常のパク質抽出と同様の手法でサンプル調製を行った。

LDH assay

培養上清中の LDH 活性測定は Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche) を用いて行った。培養上清を回収し 96 well plate に入れ、メーカーのプロトコルに従い呈色反応を行った。LDH 活性の値はコントロールの well の平均値を 1 となるように補正し解析を行った。

イムノプロット解析

タンパク質の分離は SDS-PAGE を行った。7.5%、10%もしくは 15% Tris-Glycin ゲルを用いて、分子量マーカー(Precision Plou Protein Standard、Bio-Rad)と共に電気泳動した。分離したタンパク質はブロッキングバッファー[10%または 20% (v/v) メタノール、25 mM Tris HCl、200 mM グリシン]中で PVDF (polyvinylidene fluoride)膜(millipore)に転写した。

Phos-tag SDS-PAGE はスタッキングゲル[4% (w/v) acrylamide, 125 mM Tris-HCl pH 6.6, 0.1% (w/v) SDS, TEMED, and APS]、分離ゲル[12.5% (w/v) acrylamide, 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 150 μ M MnCl₂, 75 μ M Phos-tag acrylamide (Wako), 0.1% (w/v) SDS, TEMED, and APS]の組成でゲルを作成し、電気泳動でタンパク質を分離した。Phos-tag SDS-PAGE ゲルは泳動後 EDTA を添加したブロッキングバッファーで振盪し、ゲル中の Mn²⁺イオンをキレートしてから PVDF 膜へ転写した。

タンパク質を転写した PVDF 膜は PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal (TOYOBO LIFE SCIENCE)中で 1 時間ブロッキングした。2.5% skim milk または イムノエンハンサー(Wako)で希釈した 1 次抗体液で 4°Cにて一晩インキュベートした。TS-Tween[0.1% Tween20 (関東化学)を含む TS (50 mM Tris, 150mM NaCl, pH 7.6)]にて洗浄した。二次抗体は 2.5% skim milk に希釈し、室温で 1 時間インキュベートした。TS-Tween で洗浄後イムノスター(Wako)または SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific)を用いて化学発光させた。発光は LAS-4000 mini (FUJIFILM)にて検出した。

バンド強度の定量

バンド強度は Image J を用いて *integrated density* を算出することで定量した。データセットが複数のメンブレンにまたがっている場合は、各メンブレンのコントロールバンドの強度で他のバンドを割った比を算出し、その比を定量解析した。統計解析を行う際には独立の実験を 3 セット以上同時に行い、各実験セット・条件における *integrated density* を算出、その平均値を SD と共に棒グラフに示した。それぞれのデータにおいて行ったセット数に関しては図表内に記載した。

LRRK2 陽性リソソームを持つ細胞の割合の算出

画像は共焦点顕微鏡を用いて *z-stack* 撮影し、*maximal-projection* を行い取得した。撮影する際の視野は 250 μm 四方であり、ランダムに選択した。比較検定を行うデータセット内においては、それぞれレーザー強度や検出器のゲイン、コントラスト調整は同一の条件で画像取得・解析した。取得した画像にて LRRK2 陽性のリソソームを有する細胞数および全細胞数を算出し、その割合を算出した。解析の対象は画像内に全体像が含まれる生細胞すべてとし、核や細胞質が崩壊している死細胞および視野の端に位置し細胞全体が撮影されていないものは除外した。個々の細胞の区別は LRRK2 および DRAQ5 の細胞質のバックグラウンド染色、および DRAQ5 による核

の染色によって判断した。LRRK2 陽性リソソームの判定は実験者が行った。特に Rab7L1、ATG 分子のノックダウンが LRRK2 陽性リソソームを持つ細胞の割合に与える影響を検討する際には、各画像がどのサンプルに対応するかブラインドで解析を行った。統計解析を行う際には独立の実験を 3 セット以上同時に行い、各実験セット・条件における % of cells with LRRK2 positive lysosome を算出、その平均値を SEM と共に棒グラフに示した。それぞれのデータにおいて行ったセット数、および各実験セット、各条件において解析した細胞数に関しては図表内に記載した。

ファゴソームの LRRK2 陽性率算出

画像は共焦点顕微鏡を用いて 250 μm 四方の視野を 1 断面で撮影し、視野内に含まれるファゴソームを解析対象とした。比較検定を行うデータセット内においては、それぞれレーザー強度や検出器のゲイン、コントラスト調整は同一の条件で画像取得・解析した。ファゴソームの判定は形態学的に行い、視野内のすべてのファゴソーム数および LRRK2 陽性ファゴソーム数をカウントした。LRRK2 陽性陰性に関する判定は細胞質の LRRK2 蛍光強度とファゴソーム膜上の LRRK2 蛍光強度のコントラストに基づいて実験者が行った。また解析の際には各画像がどのサンプルに対応するかブラインドで解析を行った。統計解析を行う際には独立の実験を 3 セット以上同時に行い、各実験セット・条件における % of LRRK2 positive phagosomes を算出、その平均値を SEM と共に棒グラフに示した。それぞれのデータにおいて行ったセット数、

および各実験セット、各条件において解析したファゴソーム数に関しては図表内に記載した。

リソソーム断面積の定量

画像は共焦点顕微鏡を用いて 250 μm 四方の視野を 1 断面で撮影し、視野内に含まれる細胞を解析対象とした。各視野はランダムに選択し、撮影断面は視野内の細胞群の核およびリソソームが明瞭に見える高さに合わせた。解析の対象は画像内に全体像が含まれる生細胞すべてとし、核や細胞質が崩壊している死細胞および視野の端に位置し細胞全体が撮影されていないものは除外した。細胞全体の形態は LRRK2 抗体、および DRAQ5 の細胞質におけるバックグラウンドを指標に判断した。各細胞における最も肥大化したリソソームの断面積を定量した。断面積は Image J を用いて、選択ツール(oval selection または polygon selection)で LAMP1 染色を指標にリソソームの周囲を囲み、内側の面積を算出することで得た。各細胞における最大リソソームの断面積は点でプロットし、平均値・SD と共にグラフに示した。また独立の実験を 3 セット以上同時に行った場合には、各実験セット・条件における最大リソソームサイズの平均値を算出し、さらに複数セットにおけるその平均値を SEM と共に棒グラフに示した。それぞれのデータにおいて行ったセット数、および各実験セット、各条件において解析した細胞数に関しては図表内に記載した。

LRRK2 陽性リソソームにおける Rab GTPase の局在

画像は共焦点顕微鏡を用いて LRRK2 陽性リソソームに視野、ピントを合わせて撮影した。LRRK2 陽性リソソームにおける Rab GTPase の局在は細胞質・リソソーム膜上の Rab GTPase 蛍光のコントラストに基づいて実験者が行った。

アラインメント解析

ヒト Rab GTPase のアミノ酸配列を NCBI から取得しアラインメント解析を行った。解析には遺伝情報処理ソフトウェア GENETYX ver9 を用いて、multiple alignment を行った。

統計解析

統計解析は GraphPad Prism を用いて行った。2 群間の平均値の比較にはスチューデント t 検定を、3 群以上の平均値の比較には 1 元配置の分散分析を行った。 $P < 0.05$ をもって有意な差とした。

第 4 章 結果

4-1 LRRK2 の細胞内局在の解析

4-1-1 定常状態における LRRK2 の細胞内局在

LRRK2 の細胞内局在に関する解析はこれまでも複数報告があるが、一貫した結論は得られておらず、LRRK2 の分子細胞生物学的機能を解明するうえで重要な課題の 1 つとなっていた。そこでまず内因性および過剰発現 LRRK2 の細胞内局在を複数種類の培養細胞を用いて蛍光免疫染色法で詳細に解析した。解析対象としては内因性 LRRK2 の発現が高い 3T3-Swiss albino 細胞(マウス線維芽細胞系培養細胞)、RAW264.7 細胞(マウスマクロファージ系培養細胞)、また 3×FLAG LRRK2 を安定に発現する HEK293 細胞を選択した。これら 3 種類の細胞種において内因性 LRRK2 または過剰発現 LRRK2 は細胞質全体に広がるように、びまん性もしくは顆粒状に染色された。しかしながら全体の 0.1~1%程度の細胞において LRRK2 が小胞状に染色された。このとき LRRK2 はリソソームマーカーである LAMP1 と共染色された(図表 4)。細胞内には LRRK2 陽性リソソーム以外に、LRRK2 陰性のリソソームが無数に確認できたが、多くのリソソームは直径が 100~500 nm 程度であった。しかしながら LRRK2 が局在するリソソームは 1~2 μm 程度の径を持ち、蛍光免疫染色で内腔が十分に確認できる大きさであった。以上のことから LRRK2 は主に細胞質に局在し、一部の細胞では肥大化したリソソームに局在すると考えられた。

4-1-2 リソソーム肥大化処理時における LRRK2 の細胞内局在

定常状態の培養細胞において肥大化リソソームにおける LRRK2 局在が観察されたことから、LRRK2 は肥大化リソソームにリクルートされる可能性が考えられた。クロロキン(CQ)はリソソームに蓄積する低分子化合物であり、リソソームの肥大化を誘導することが知られている。

RAW264.7 細胞、3T3-Swiss albino 細胞、HEK293 細胞に CQ 処理を行うとリソソームの肥大化が生じ、肥大化したリソソームの一部に LRRK2 が局在した(図表 5)。LRRK2 の局在変化を十分に誘導する CQ 処理条件は細胞ごとに異なっており、RAW264.7 細胞では 50 μ M 3 時間処理、3T3-Swiss albino 細胞では 200 μ M 24 時間処理、HEK293 細胞では 50 μ M 24 時間処理を行った。RAW264.7 細胞において最も短時間の処理で高頻度に LRRK2 の局在変化が誘導され、この細胞株では LRRK2 は特によく機能している可能性が示唆された。そのため内因性 LRRK2 の局在・機能解析では RAW264.7 細胞を材料とすることとした。一方で他の細胞株でも CQ による LRRK2 の局在変化は見られており、CQ に対する LRRK2 の応答は細胞種を越えて保存されている可能性が示された。

RAW264.7 細胞に対し CQ 処理を行い、LRRK2 発現量の変化が起こるかどうか WB (western blotting) で解析した。その結果 CQ 処理は LRRK2 の発現量を変化させないことが明らかとなった(図表 6a, b)。このことから①LRRK2 局在変化は LRRK2

の転写・翻訳の亢進を伴わないこと、②CQは少なくとも3時間処理ではLRRK2の分解抑制とそれに伴うLRRK2蓄積を引き起こさないこと、の2つが示唆された。加えてリソソームマーカーであるLAMP1のタンパク量も変化しなかった(図表 6a, c)。

リソソームの肥大化とLRRK2のリソソーム局在との間の時間的關係を解析するためRAW264.7細胞に時間を振ってCQ処理を行った。リソソーム肥大化の指標としては各細胞の中で最も肥大化したリソソームの面積を共焦点顕微鏡の写真から算出した。1つの細胞に対し1つのリソソームを代表として選択した理由はすべてのリソソームの大きさを測定し平均を出すことは現実出来ではなく、またLAMP1抗体で染色された輝点の内、径の小さいものに関してはリソソームと染色むらによるアーティファクトとの区別がつかなかったためである。解析の結果、リソソームの肥大化はCQ処理の30分後から観察されたのに対し、LRRK2のリソソーム局在はCQ処理1時間後からその頻度が上昇した。このことからLRRK2の局在変化はCQのリソソーム蓄積およびリソソーム肥大化の後に起こることが示唆された(図表 7)。

4-1-3 内因性LRRK2の染色条件に関する検討と、その染色の特異性の確認

内因性LRRK2染色におけるanti-LRRK2抗体の特異性と固定・染色条件に関して検討を行った。まずこれまでの検討で使用していたanti-LRRK2(MJFF2 c41-2)抗体の染色条件に関して検討を行った。RAW264.7細胞に対しCQ処理を行い4%PFAで30分間固定後、anti-LRRK2抗体(MJFF2 c41-2)を用いて染色した。しかしながら肥

大化リソソームにおける LRRK2 のシグナルは微弱であった(図表 8 上段)。これまでの染色では 4% PFA 固定後にサンプルの浸透化および保存のため、サンプルを 100% エタノールで処理していた。そこで 4% PFA で固定後のサンプルを 100% エタノール(EtOH)で 4°C 15 分間処理したところ LRRK2 染色のシグナルが上昇した(図表 8 中段)。

100% EtOH 処理により anti-LRRK2 抗体(MJFF2 c41-2)による染色性が上昇した理由として、①EtOH による脱脂効果が重要である、②EtOH による脱水の効果が重要である、という 2 つの可能性が考えられた。しかしながら免疫染色のブロッキング液および抗体希釈液には界面活性剤として 0.1% Triton X-100 が含まれており、EtOH 処理を行わずとも十分に脱脂は行えていると考えられた。このことから前者の可能性は否定的であった。そこでサンプルの脱水が anti-LRRK2 抗体(MJFF2 c41-2)による染色性を向上させている可能性に関して検討を行った。トリクロロ酢酸(TCA)はタンパク質に結合する水を奪い脱水・変性させる。4% PFA 固定後の細胞を 10% TCA で 4°C 15 分間処理したところ EtOH 処理と同様に anti-LRRK2 抗体(MJFF2 c41-2)による染色性が増強された(図表 8 下段)。以上の結果から anti-LRRK2 抗体(MJFF2 c41-2)を用いた染色では固定後に EtOH もしくは TCA 処理が必要であることが判明し、EtOH および TCA はタンパク質に対する脱水作用を介して抗原の賦活化をしている可能性が示唆された。

次に内因性 LRRK2 染色の特異性に関して検討を行った。CQ 処理を行い 4% PFA 固定後 100% EtOH 処理を行った RAW264.7 細胞サンプルを用意した。このサンプルを 3 種類の anti-LRRK2 モノクローナル抗体(MJFF2 c41-2, UDD3 30, N138/6)で染色した(図表 9a)。MJFF2 c41-2 抗体がリソソームに局在した LRRK2 をもつとも S/N 比よく染色したが、他 2 つの抗体でも同様の染色像が見られた(図表 9b)。このことからこれらの anti-LRRK2 抗体による染色は、少なくともリソソームに集積した LRRK2 に関しては特異性があることが確認された。

さらに LRRK2 抗体による染色の特異性を確かめるため LRRK2 ノックアウト細胞を用いた免疫染色実験を行った。RAW264.7 細胞はマクロファージ系培養細胞であるためマクロファージで LRRK2 のリソソーム局在が高頻度で見られると考えマウス骨髄幹細胞由来マクロファージ(BMDM ϕ)を採取した。LRRK2 ヘテロノックアウトマウス由来の BMDM ϕ に対し CQ 処理を行い anti-LRRK2 抗体(MJFF2 c42-2)で染色したところ LRRK2 のリソソーム局在が観察された。しかしながら LRRK2 ノックアウトマウス由来の BMDM ϕ では、肥大化リソソームにおける LRRK2 の染色は全く観察されなかった(図表 9c)。

以上の結果から、内因性 LRRK2 の染色は少なくともリソソームに局在した LRRK2 に関しては特異的なものであり、内因性 LRRK2 は一部の肥大化したリソソームに局在するという結果は十分に信頼できるものであると考えられた。

4-2 LRRK2 のリソソーム局在を誘導するストレスの探索

4-2-1 CQ による LRRK2 のリソソーム局在誘導は CQ の蓄積によって引き起こされる

LRRK2 は一部の肥大化リソソームに局在し、このことからリソソームにおける何かしらの異常が LRRK2 の局在変化を引き起こすことが示唆された。CQ は弱塩基性のリソソーム指向性試薬の 1 つであり、リソソーム内腔に蓄積し様々な作用をもたらす[127]。電荷をもたない状態では脂質膜を透過し細胞内および各種オルガネラ内部に到達する。しかし酸性コンパートメントに到達すると弱塩基である CQ はプロトンと結合し正電荷を獲得、その結果膜透過性を失う。これにより CQ は酸性コンパートメント内にトラップされ蓄積する。このような薬理学的作用機序により CQ は①リソソーム内部のプロトンと結合し pH を上昇させる、②リソソーム内部に蓄積し浸透圧ストレスを与える、③浸透圧ストレスによりリソソームの形態を変化させる、といった複数の効果を引き起こす。4-1-2 ですでに明らかにした通り、定常状態では LRRK2 は主に細胞質に局在したが(図表 10a)、CQ 処理を行うと LRRK2 は肥大化したリソソームに局在を変化させた(図表 10b)。

まずこの CQ による LRRK2 の局在変化効果がリソソーム内腔の pH 上昇に起因するかどうか検討を行うため、RAW264.7 細胞を V-ATPase の阻害剤である Bafilomycin A1(BafA1)で処理した。BafA1 が十分に作用していることを確かめるため培養液中に LysoTracker を加え、Live Imaging にて LysoTracker の蛍光を確認し

た。LysoTracker はリソソームの酸性度依存的にリソソーム内部に蓄積する蛍光物質
であるが、培地中への BafA1 添加により LysoTracker の染色が失われた。このことか
ら BafA1 はリソソームの pH を十分に上昇させていると考えられた(図表 11)。しか
しながら RAW264.7 細胞に対し BafA1 処理を行っても LRRK2 のリソソームへの局
在変化は観察されなかった(図表 10c)。このことから pH の上昇自体は LRRK2 の局
在変化を引き起こさないことが示された。

次に LRRK2 がリソソームのサイズ自体や膜の曲率の低下などを検知してリソソ
ームに局在する可能性を考え、リソソームの形態的变化が LRRK2 の局在変化を引き起
こすかどうか検討を行った。リソソームの肥大化を誘導する Vacuolin-1 で RAW264.7
細胞を処理したところ、CQ 処理と同様に LAMP1 陽性のリソソームが肥大化した
が、出現した肥大化リソソームに LRRK2 は局在しなかった(図表 10d)。このことからリ
ソソームの形態的な変化自体も LRRK2 の局在変化を引き起こさないことが明らかと
なった。

最後に CQ の蓄積およびそれに伴う浸透圧ストレスが LRRK2 のリソソーム局在を
誘導する可能性を検討した。上述した通り CQ はリソソーム内腔のプロトン依存的に
リソソームに蓄積するため、BafA1 でリソソーム pH を上昇させると培地中に CQ を
加えてもリソソーム内腔には CQ 蓄積しない。RAW264.7 細胞に対して BafA1 存在
下で CQ 処理を行ったところ、CQ の単独処理では見られたリソソームの肥大化が生
じなくなった。それに加えて LRRK2 のリソソーム局在も観察されなかった(図表 10e)。

このことから CQ 処理による LRRK2 の局在変化は CQ がリソソーム内腔に蓄積することによって引き起こされることが示された。以上のデータの定量結果は(図表 10f)に示した。

4-2-2 リソソーム基質の蓄積も LRRK2 の局在変化を誘導する

CQ の蓄積のみならず、内因性のリソソーム基質の蓄積も LRRK2 の局在変化を誘導するのかどうかについて検討を行った。リソソームの加水分解を阻害しリソソーム基質の蓄積を誘導するため RAW264.7 細胞に対し時間を振って BafA1 処理を行った。BafA1 処理は 3 時間では LRRK2 の局在変化を引き起こさないことはすでに示しているが(図表 10c, f)、この実験ではより長期的な処理を行い 2 次的なリソソーム加水分解阻害と基質の蓄積を誘導することを目的としている。解析の結果 BafA1 により LRRK2 陽性リソソームの出現頻度は継時的に上昇し、6 時間以上の処理では BafA1 処理 0 時間に対し有意な差が確認できた(図表 12)。この結果から CQ 処理と同様にリソソーム加水分解の阻害及びそれに伴う基質の蓄積も LRRK2 のリソソーム局在を誘導する可能性が考えられた。ただし BafA1 長期投与によるエンドソーム経路の輸送障害や細胞への毒性といった作用からの 2 次的な効果によるものである可能性も否定はできない。

4-2-3 菌体の貪食も LRRK2 の局在変化を誘導する

貪食はマクロファージなどをはじめとする免疫細胞が細胞外の菌体を取り込みリソソームで消化・殺菌する現象である。貪食時にはファゴソーム・ファゴリソソームに酸化ストレス・浸透圧ストレスなどが加わる可能性が報告されている[113, 128]。CQ や BafA1 長期投与といった人工的なリソソームストレスのみならず、より生理的なストレスでも LRRK2 のリソソーム局在が誘導されるか検討を行った。RAW264.7 細胞に対し zymosan (酵母細胞壁画分)処理を行った。zymosan を懸濁した培地で培養後 1 時間後に固定し免疫染色で解析した。その結果細胞内に形態学的に zymosan を取り込んだファゴソーム・ファゴリソソームと判断できる構造物が出現し、その一部に LRRK2 が局在した(図表 13)。

4-3 PD 関連遺伝子 *RAB7L1* は LRRK2 のリソソームへのリクルートに関与する

LRRK2 のリソソーム局在のメカニズムを解析した。LRRK2 は細胞質タンパク質であり膜結合ドメインや脂質修飾などを有さないことから、リソソーム膜上の他のタンパク質と結合しリソソーム膜に局在することが想定された。*RAB7L1* は GWAS にて孤発性 PD のリスク遺伝子である可能性が報告されており[45]、その翻訳産物は LRRK2 との相互作用分子であることが報告されている[56-58]。そこで Rab7L1 が LRRK2-リソソームストレス経路に関与するかどうか検討を行った。まず HEK293 細胞に EGFP-Rab7L1 を発現させ細胞内局在を観察した。Rab7L1 は定常状態では TGN46 で染色されるトランスゴルジに局在し、リソソームには局在しなかった(図表

14a)。この細胞に対し CQ 処理を行うと Rab7L1 は LAMP1 陽性のリソソームに集積した(図表 14b)。また 3×FLAG-LRRK2 安定発現 HEK293 細胞に EGFP-Rab7L1 を共発現させ CQ 処理を行うと LRRK2 と Rab7L1 はリソソームで共局在した(図表 15a)。さらに GFP を導入した細胞よりも LRRK2 のリソソーム局在頻度が上昇し(図表 15b)た。Rab7L1 は LRRK2 と相互作用することが報告されており、本実験の結果から Rab7L1 はリソソームストレス時にリソソームに局在し LRRK2 をリソソームにリクルートする可能性が示唆された。

内因性の Rab7L1 が LRRK2 のリソソーム局在に関与するかどうか検討するため RAW264.7 細胞に対しノックダウンを行い LRRK2 のリソソーム局在を解析した。RAW264.7 細胞に *Rab7L1* およびその近縁の *Rab32*、*Rab38* 遺伝子に対する siRNA を導入し CQ 処理を行った。その結果 *Rab7L1* のノックダウンでのみ LRRK2 のリソソーム局在が抑制され non-target および *Rab32*、*Rab38* に対する siRNA では抑制効果はみられなかった(図表 16)。

4-4 LRRK2 は複数の Rab タンパク質を肥大化リソソームにリクルートする

4-4-1 LRRK2 局在変化の下流で制御される Rab GTPase の探索

複数の Rab GTPase が細胞内における LRRK2 の基質であることが報告されている[82, 129]。Rab GTPase の機能には GTP 結合状態に加え、その細胞内局在が重要

であることが知られている。そこで Rab GTPase の局在が LRRK2 のリソソーム局在の下流で制御されるかどうか検討を行った。

野生型 LRRK2 もしくはキナーゼ活性喪失変異体の LRRK2 (K1906M) を安定に発現する HEK293 細胞に対し、Rab GTPase 遺伝子を導入しその局在を解析した。ヒトは 66 種類の Rab 遺伝子を持つが[130]、そのうち LRRK2 の基質である Rab10 のリン酸化部位(Thr73)と相同なスレオニンないしはセリンが保存されている Rab GTPase を対象に解析を行った(図表 17)。また Rab5a、Rab5b、Rab5c のように複数のアイソフォームを持つ Rab に関してはそのうちの 1 つを代表として解析した。Rab 遺伝子を導入した LRRK2 安定発現 HEK293 細胞に対し CQ 処理を行い Rab GTPase の局在を解析したところ、導入した Rab GTPase はその細胞内局在に基づいて以下の 3 つのグループに分類的可能なことが判明した。すなわち①LRRK2 陽性リソソームに局在しない Rab、②野生型・キナーゼ活性喪失型を問わず LRRK2 陽性リソソームに局在する Rab、③野生型 LRRK2 陽性のリソソームのみに局在し、キナーゼ活性喪失型 LRRK2 陽性のリソソームには局在しない Rab GTPase、である。各 Rab GTPase の局在を解析した免疫染色のデータを(図表 18)に、そのまとめを(図表 19)に示した。これら 3 つのグループの内、グループ③に属するものは LRRK2 のキナーゼ活性依存的に肥大化リソソームにリクルートされる Rab GTPase であり、LRRK2 の下流分子候補として重要であると考えられる。

上で示したスクリーニング的解析では Rab3a、Rab8a、Rab10 および Rab35 がグループ③に属し、Rab8a や Rab10 に近縁な Rab13 はグループ①であった。このことから LRRK2 による Rab のリクルートは Rab 特異性があることが示された。以上より Rab3a、Rab8a、Rab10、Rab35 が LRRK2 のキナーゼ活性依存的に LRRK2 陽性肥大化リソソームに局在する可能性が示された。ただし本スクリーニングは各 Rab GTPase に関して 1 度のみ検討を行っており、また定量的な解析にも至っていない。

4-4-2 LRRK2 は内因性 Rab8a、Rab10 をキナーゼ活性依存的にリクルートする

内因性の LRRK2 が内因性の Rab GTPase をリクルートするかどうか RAW264.7 細胞を用いて検討した。内因性のタンパク質を染色可能な抗体が存在した Rab8a、Rab10 に関して検討したところ、CQ 処理を行った RAW264.7 細胞において LRRK2 と Rab8a、Rab10 は肥大化リソソーム上で共局在した(図表 20a)。さらに LRRK2 キナーゼ活性阻害剤 GSK2578215A (GSK)存在下で CQ 処理を行と、LRRK2 陽性のリソソームにおける Rab8a、Rab10 の局在が消失した。この結果から内因性の Rab8a、Rab10 は内因性 LRRK2 のキナーゼ活性依存的に肥大化リクルートにリクルートされることが確かめられた(図表 20b)。

キナーゼ活性阻害剤が LRRK2 のキナーゼ活性を抑制しているかどうかは LRRK2 Ser935 のリン酸化を指標に検討した。この部位は LRRK2 の自己リン酸化部位ではないが、LRRK2 キナーゼ活性阻害剤処理により LRRK2 のキナーゼ活性と相関して

同部位のリン酸化が低下することが知られている[131]。1回の検討ではあるが、RAW264.7細胞を2種類のキナーゼ活性阻害剤 GKS および PF-06447475 (PF)で3時間処理したところ、両阻害剤とも1 mMの濃度で十分にLRRK2 Ser935リン酸化を低下させ、十分に効果を発揮していることが裏付けられた(図表 21)。

LRRK2はRab8aのThr72をリン酸化することが報告されている[82]。LRRK2によるRab8aの肥大化リソソームへのリクルートは、この部位へのリン酸化を介するのかどうか検討を行うためRab8a T72A変異体を用いた解析を行った。Rab8aの野生型およびT72A変異体をLRRK2 stable HEK293細胞に導入しCQ処理時の局在を解析したところ、野生型Rab8aはLRRK2と共局在するのに対しT72A変異体はLRRK2と共局在しなかった(図表 22)。このことからRab8aのリクルートにはLRRK2によるThr72のリン酸化を必要とすることが示唆された。定量的な解析は行えていないが、LRRK2キナーゼ活性依存的なRab8/10のリクルートに関しては同様の観察結果を2回以上得ている。

4-4-3 LRRK2によるRab10のリン酸化はCQ処理によって亢進する可能性

CQ処理時にLRRK2はキナーゼ活性依存的にRab8a、Rab10をリソソームにリクルートすることが示された。そこでCQ処理時にLRRK2によるRab GTPaseのリン酸化が亢進しているのかどうか検討を行った。Phos-tag SDS PAGEは電気泳動によりリン酸化タンパク質と非リン酸化タンパク質を分離する手法である[132]。リン酸

基に親和性を持つ低分子化合物 Phos-tag をアクリルアミドゲルに添加し、リン酸化タンパク質の泳動度を低下させることで非リン酸化タンパク質と分離することができ、実際に Phos-tag SDS PAGE により内因性 Rab10 の非リン酸化体、リン酸化体のバンドを検出できることがすでに報告されている[129]。そこで CQ 処理を行った RAW264.7 細胞において Rab8a、Rab10 のリン酸化量が変化するかどうか解析を行った。

内因性 Rab8a のリン酸化体バンドは検出できなかったが(データ非収載)、Rab10 は非リン酸化体と考えられるバンドの上に複数のバンドが検出された。その中でもバンド A は CQ 処理により増加し、2 種類の構造の異なる LRRK2 キナーゼ活性阻害剤 GSK、PF にてバンド強度が減少する傾向が見られた(図表 24a, b)。バンド①は各種処理でほとんど変動が無く、バンド②は CQ 処理でわずかに増加する傾向が見られたが、バンド A と比較するとその傾向は弱かった。

次にリン酸化 Rab10 (pThr73)抗体を用いての WB 解析を行った。Rab10 の推定分子量付近に、近接する 2 本のバンドが確認され、そのうち下のバンド B は CQ 処理により強度が増加し、2 種類の構造の異なる LRRK2 キナーゼ活性阻害剤 GSK、PF にてバンド強度が減少した(図表 23a, b)。バンド③ではこのような傾向は見られなかった。Phos-tag SDS-PAGE のバンド A、pRab10 Thr73 抗体による WB のバンド B が同様の挙動を示したことからこれらのバンドは LRRK2 キナーゼ活性依存的な

Rab10 のリン酸化を表しており、Rab10 のリン酸化は CQ 処理時に亢進すると考えられた。

1 回のみの実験ではあるが、バンドの特異性に関してノックダウンを行いさらに検討した(図表 24)。non-target siRNA を導入した RAW264.7 細胞の lysate を解析したところ、phos-tag SDS-PAGE ・ pRab10 リン酸化抗体による WB 共に CQ 処理で増加し、2 種類の LRRK2 キナーゼ活性阻害剤で増加が抑制されるバンドが確認された。このことから図表 24a の実験結果が再現できており、それぞれ図表 24a のバンド A、バンド B に対応するバンドであることが考えられた。Rab10 のノックダウンを行うと CQ 処理時のバンド A、バンド B の増加が見られなくなった。一方で CQ 非処理時のバンドの濃さには変化がなかった。phos-tag SDS-PAGE 後の WB で用いた Rab10 抗体について、通常の SDS-PAGE 後の WB におけるバンドパターンを解析したところ、Rab10 のバンドが確認できる発色・露光条件では 1 本のみバンドが観察された。しかしながら phos-tag SDS-PAGE での発色・露光条件と同一の長時間露光で解析すると Rab10 のバンドの上に無数のバンドが確認された。特に phos-tag によるリン酸化 Rab10 のバンドは、これらの交差反応によるバンド群の中に泳動されていることが示された。このことからバンド A、バンド B 共に Rab10 以外のタンパク質に対する交差反応が無視できないが、CQ 処理時に増加する分に関しては Rab10 のリン酸化そのものを反映しているものと考えられた。リン酸化 Rab10 の量自体は非 Rab10 タンパク質への交差反応の分だけ過大評価されている可能性がある一方で、CQ 処理時

のリン酸化 Rab10 の増加率に関しては過小評価されている可能性がある。以上より少なくとも CQ 処理時にバンド強度が増加する現象は LRRK2 のキナーゼ活性依存的な Rab10 リン酸化の上昇を反映するものであると考えられる。

図表 23a で得られたバンドに関して統計的な解析を行った(図表 23b-f)。本実験ではメンブレンが複数枚にわたっているため、バンド強度そのものや total Rab10 で規格化したバンド強度の値をそのまま統合することはできない。そのため各 replication の DMSO 処理サンプルを 1 として CQ+DMSO, CQ+GSK, CQ+PF 処理サンプルをそれぞれ数値化している。従って DMSO 処理サンプルに関しては 6 replication 分のデータですべて 1 という値になりエラーバーが定義できないデータとなっている。図表には one-way ANOVA with Tukey's test および non-parametric 解析である Kruskal-Wallis test の解析結果を両方示した。エラーバーが無い群を含むデータを ANOVA with Tukey test, Bonferoni/Dunn test で解析している論文も存在するが[81, 133]、これらの統計解析は正規分布性・等分散性を仮定するため本来は適応できないという問題がある。one-way ANOVA with Tukey's test ではバンド A、バンド B 共に CQ 処理時にその強度が有意に増加し 2 種類の LRRK2 キナーゼ活性阻害剤で減弱した(図表 23b, c)。一方 Kruskal-Wallis test ではバンド A に関しては CQ+DMSO 群と CQ+GSK 群の間、CQ+DMSO 群と CQ+PF 群の間でのみ有意な差が検出された(図表 23b)。またバンド B では CQ+DMSO 群と CQ+PF 群の間でのみ有意な差が検出された(図表 23c)。

4-5 LRRK2 と Rab はリソソームの形態とリソソーム内容物の排出を制御する

4-5-1 LRRK2 はキナーゼ活性依存的にリソソームの形態と内容物排出を制御する

リソソームストレスに際してリクルートされる LRRK2 や Rab GTPase がどのような機能を持つのか検討を行った。まず RAW264.7 細胞に対し siRNA を用いて *LRRK2* のノックダウンを行いリソソームの形態を解析した。*LRRK2* のノックダウン単独ではリソソームの形態に変化は見られなかった。しかしながら *LRRK2* をノックダウンした細胞に CQ 処理を行うと、non-target siRNA を導入した細胞に比べリソソームの肥大化が顕著に亢進した(図表 25)。このことから LRRK2 はリソソームストレス時におけるリソソームの肥大化を抑制することが示された。

次に LRRK2 のキナーゼ活性が LRRK2 の機能に関わっているかどうか検討するため LRRK2 キナーゼ活性阻害剤存在下で CQ 処理を行った。その結果 *LRRK2* のノックダウンと同様に LRRK2 キナーゼ活性阻害も CQ によるリソソーム肥大化を亢進させた(図表 26)。このことから LRRK2 のリソソーム形態維持に対する寄与はキナーゼ活性依存的であることが示された。加えて阻害剤処理はノックダウンと異なり CQ 処理時のみ LRRK2 の機能を阻害するため、LRRK2 は定常状態においてすでにリソソームの性質を変化させているという可能性は否定的であり、CQ 処理時に機能を発揮するということが併せて示された。

LRRK2 はリソソーム内圧の上昇に応答しているため、リソソームからの内容物排出に関与している可能性を考え検討を行った。CQ の排出を直接測定することはできないため、リソソーム内腔の可溶性加水分解酵素 Cathepsin D (CatD) の培養上清中への放出を指標に解析を行った。CatD は粗面小胞体で合成されたのち酸性コンパートメントに到達し、その後リソソーム内で 2 回切断を受けて成熟する。これらの未成熟 CatD、一回切断を受けた中間活性 CatD、2 回切断を受けた成熟 CatD はそれぞれ電気泳動で異なる位置に泳動されるため WB で区別可能である。

培地中の CatD 量を解析したところ、CQ 処理により切断を受けた CatD 量が増加する傾向が見られた。一方で培地中における未成熟 CatD の量は CQ 処理の有無で変化が見られなかった(図表 27a)。このことからリソソーム内で切断を受けた CatD が CQ 処理時に放出されていることが示唆された。次にこの CatD 放出が LRRK2 のキナーゼ活性に依存するかどうか検討を行うため、阻害剤存在下で CQ 処理を行った。その結果、LRRK2 阻害剤処理により intermediate active cathepsin D の放出が有意に抑制された(図表 27a, b)。また mature cathepsin D の放出に関しても統計学的に有意ではないが LRRK2 阻害剤処理により抑制される傾向が見られた(図表 27a, c)。培地中の LDH 活性は CQ 処理及び LRRK2 キナーゼ活性阻害剤処理で大きく変動せず、CQ 依存的な cathepsin D の放出および LRRK2 キナーゼ活性剤による放出抑制は細胞死に関連するものではないことが示唆された(図表 27d)。

4-5-2 Rab7L1 もリソソームの形態と内容物排出を制御する

LRRK2 のリソソームターゲティングを制御している可能性のある Rab7L1 が CQ 処理時のリソソーム形態、リソソーム放出においてどのような機能を有しているかノックダウンを行い解析した。Rab7L1 siRNA を導入した細胞では non-target siRNA を導入した細胞に比して CQ 処理時のリソソームの肥大化が有意に増強された(図表 28a, b)。また培養上清中への cathepsin D 放出は Rab7L1 のノックダウンで有意に抑制された(図表 28c-f)。このことから Rab7L1 は LRRK2 の局在だけでなく機能を制御する上流因子である可能性が示唆された。

4-5-3 Rab8a、Rab8b はリソソームの形態を、Rab10 はリソソーム内容物排出を制御する

LRRK2 によりリン酸化されリソソームにリクルートされる Rab8a、Rab10 がリソソームの形態維持、リソソーム内容物の排出においてどのような機能を持つか siRNA を用いたノックダウン法により検討を行った。*Rab8a*、*Rab8b* は極めて近縁であり、少なくとも小腸上皮細胞における極性輸送、線毛形成に関しては代償的に機能することが報告されているため[134]、両者は同時にノックダウンを行った。多重ノックダウンの際にはそれぞれの遺伝子に対する siRNA の量は変えず、siRNA の総量を増やして treansfection を行った。まずリソソームの形態維持における Rab GTPase の機能解析を行った。その結果 *Rab8a*、*Rab8b* のノックダウンでは *LRRK2* ノックダウン

と同様にリソソームの肥大化が見られた(図表 29)。Rab10 単独ノックダウンを行った細胞は non-target コントロールと同程度のリソソーム肥大化を示し、また Rab8a と Rab8b ダブルノックダウン細胞は Rab8a、Rab8b、Rab10 のトリプルノックダウン細胞と同程度のリソソーム肥大化を呈した。このことから Rab10 のリソソーム形態維持に関する関与はあったとしても微小であることが示唆された。

次にリソソーム内容物の放出における Rab GTPase の関与を検討した。LRRK2 のノックダウンおよび Rab10 のノックダウンは CQ 処理時の培地中への intermediate active CatD 放出を有意に減少させた。mature cathepsin D の放出は LRRK2 ノックダウン・Rab8a/8b/10 トリプルノックダウンでは有意な差ではなかったが抑制傾向は見られた。Rab8a+Rab8b のダブルノックダウンではこの効果はみられなかった。このことからリソソーム内容物の放出には Rab10 が優位に関与している可能性が示された(図表 30)。

本実験では各遺伝子に対する siRNA の量をそろえたため多重ノックダウンの際の siRNA 総量が non-target siRNA 量とそろっていないため、siRNA 量増加による効果が表れている可能性も否定はできない。ただしリソソーム肥大化の解析では Rab8a/8b ダブルノックダウンと Rab8a/8b/10 トリプルノックダウンでは差が見られず、また cathepsin D 放出の解析では LRRK2 や Rab10 の単独ノックダウンで分泌抑制効果が見えているが Rab8a/8b ダブルノックダウンではその効果が見られなかった。加えて cathepsin D の放出に関しては 1 度の検証ではあるが non-target siRNA の

量を通常の 1 倍量 (6 well palte の 1well あたり 30 fmol)から 4 倍量まで投与量を振っても影響は見られなかった(図表 31)。以上より siRNA 量の増加によってリソソームの肥大化増強、リソソーム放出抑制といった表現型を誘導する可能性は低いのではないかと考えられる。

4-6 オートファジー関連分子が LRRK2 のリソソーム局在に関与する可能性

4-6-1 LRRK2 のリソソーム、ファゴリソソーム局在はオートファジー関連分子を必要とする

CQ 処理及び zymosan 貪食はリソソーム膜上、ファゴリソソーム膜上での LC3 脂質化を誘導することが知られている[107, 113]。この時 LC3 はマクロオートファジーで生じる隔離膜やその他 2 重膜の構造物ではなく、リソソームの 1 重膜に直接リクルートされる。まず LRRK2 がこれらの LC3 リクルート現象と関連するのかどうか、LC3 と LRRK2 の共染色を行うことで検討した。その結果 CQ 処理時および zymosan 貪食時には LRRK2 と LC3 がリソソーム、ファゴソーム上で共局在することが明らかとなった(図表 32)。

これまで過去の報告で LRRK2 はマクロオートファジーの誘導に関わることが示唆されている[77, 78, 89, 90]。そこで LRRK2 が CQ 処理時における LC3 の脂質化に関与しているかどうか検討するため *Lrrk2* のノックダウンを行った。RAW264.7 細胞に Lipofectamine RNAiMAX を用いて *Lrrk2* siRNA を導入すると LRRK2 のタンパ

ク量は約8割減少し、ノックダウンが十分に効いていることが確かめられた(図表 33a, b)。しかしながら CQ 処理時の LC3-II 量に変化は見られなかった(図表 33a, c)。このことから少なくとも CQ 処理時の LC3 脂質化においては LRRK2 がその制御因子であるという可能性は否定的であった。

次にオートファジー関連分子が LRRK2 リソソーム局在の上流にある可能性を検討した。ATG5、ATG7、ATG16L1 は LC3 のフォスファチジルエタノールアミン化を制御するタンパク質である。これらの RAW264.7 細胞に対しこれらの遺伝子に対する siRNA を導入し CQ 処理時の LRRK2 リソソーム局在を解析したところ、ATG5、ATG7、ATG16L1 のノックダウンで LRRK2 の局在変化は有意に抑制された(図表 34)。以上より、LRRK2 の局在変化の上流にオートファジー関連分子が存在することが示唆された。

4-6-2 Lysosomal membrane permeabilization は LRRK2 局在変化を誘導しない

Lysosomal membrane permeabilization (LMP) はリソソーム膜の完全性が失われ、リソソーム内腔のプロトンや加水分解酵素が細胞質に漏出する現象である。CQ 処理もこの LMP を引き起こすことが報告されている[135, 136]。LMP が起きたリソソームは選択的オートファジーのマーカである p62 で標識され、隔離膜で取り囲まれる、その後マクロオートファジーによって正常なリソソームで分解されると報告され

ている[101]。このような障害されたリソソームをオートファジーで分解する経路はリソファジーと呼ばれている。

LRRK2 が LMP を起こしたリソソームに局在している可能性を検討するため、選択的オートファジーのマーカーである p62 および膜障害のマーカーである galectin-3 で染色した。galectin-3 は β -ガラクトシド結合能を持つ細胞質タンパク質である。 β -ガラクトシドを含む糖鎖はゴルジ体以降のオルガネラ内腔及び細胞表面にのみ存在し、細胞質に局在する galectin-3 とは通常相互作用しない。しかしオルガネラ膜が障害され細胞質と内腔が連続すると、galectin-3 はオルガネラ内腔に侵入し糖鎖に結合する。そのため内膜系の障害のマーカーとして用いることが可能であり[137]、LMP を起こしたリソソームにも局在する[101]。CQ 処理を行った RAW264.7 細胞を anti-LRRK2 抗体、anti-galectin-3 抗体、anti-p62 抗体で染色したところ LRRK2 と galectin-3 および p62 との共局在はみられなかった(図表 35a)。このことから CQ 処理時の LRRK2 リソソーム局在は LMP を介していないことが示唆された。

次に LMP を人為的に誘導し LRRK2 のリソソーム局在を誘導できるかどうか検討を行った。L-Leucyl-L-leucine methyl ester (LLOMe)はリソソーム指向性試薬の 1 つであり、リソソーム内腔の加水分解酵素 dipeptidyl peptidase I によって膜傷害性の分子に変換され LMP を引き起こす。RAW264.7 細胞に対し LLOMe 処理を行ったところ p62 および galectin-3 陽性のリソソームが観察された。このことから LLOMe 処理は RAW264.7 細胞において LMP を誘導できたことが確認できる。また LLOMe 処

理により一部の細胞でLRRK2のリソソーム局在も観察された。しかしながらLRRK2と galectin-3 は共局在しなかった(図表 35b)。このことから LMP は LRRK2 の局在変化を誘導するわけではないことが示唆された。LRRK2 のリソソーム局在はLLOMeのリソソーム指向性試薬の性質に由来するものであり、LLOMe がリソソームに蓄積した後さらに LMP まで生じたソソームには LRRK2 は局在しない可能性が考えられた。

4-6-3 LC3 associated phagocytosis 様の経路で LRRK2 の局在変化が誘導される

zymosan など TLR (Toll like receptor)リガンドの貪食はファゴソーム・ファゴリソソームの1重膜上にLC3のリクルートを誘導することが知られている[107]。このようなLC3リクルートを伴うファゴサイトーシス現象はLC3 associated phagocytosis(LAP)と呼ばれている。LRRK2 のファゴリソソーム局在がLAP経路の下流で制御されているかどうか検討を行うため、LAPに関わる遺伝子のノックダウンを行った。LAP経路では *ATG5*, *ATG16L1*, *Beclin-1* といった通常のマクロオートファジーにもかかわる遺伝子が機能しているほか、*NOX2*, *Rubicon* というマクロオートファジーには関与せずLAPにのみ関与する遺伝子が知られている[110]。まず *ATG5*, *ATG16L1* のノックダウンを行ったところLRRK2の局在変化が有意に抑制された(図表 36a, b)。次に *NOX2*, *Rubicon* のノックダウンを行ったところこれらの遺伝子のノックダウンでもやはりLRRK2の局在変化は有意に抑制された(図表 36c, d)。

これらのことから **LAP** および **LAP** 様経路の下流で **LRRK2** の局在が制御されていることが示唆された。

第 5 章 考察

5-1 蛍光免疫染色法による LRRK2 局在解析

本研究において LRRK2 は定常状態及びクロロキン処理を行った細胞内において肥大化リソソーム膜上に局在することが明らかとなった(図表 4,5)。複数の先行研究においても LRRK2 の細胞内局在に関する研究はなされていた(序章 1-3-3)。しかしながらそれらは過剰発現した LRRK2 の局在を解析している、もしくは内因性 LRRK2 を抗体で染色しているがその抗体の特異性確認がなされていないという問題点があった。本研究では

- ① 内因性 LRRK2 の局在を解析している(図表 5a-d)
- ② 内因性 LRRK2 に対する複数の抗体を用いて抗体の特異性を確認している(図表 9b)
- ③ LRRK2 KO 細胞を用いて抗体の特異性を確認している(図表 9c)
- ④ エピトープタグ(3×FLAG)を付加した LRRK2 を、一般的に用いられているタグ抗体(anti-FLAG M2 抗体)を用いて染色し、内因性 LRRK2 の局在と類似した染色像を確認している(図表 5f)

と複数の方法で LRRK2 染色の信頼性を確認した。

また、LRRK2 がエンドソーム系に局在することを報告した論文もあり、この研究では免疫電顕を用いて Ypet-LRRK2 の局在を解析し多胞体、amphisome、オートリソ

ソームに局在することを示している[78]。しかしながら **LRRK2** を標識した金コロイドはこれらオルガネラの内腔に観察されており、リソソーム膜表面への局在を示唆する本研究の結果とは異なる可能性も考えられる。リソソーム内腔におけるシグナルは、立体構造が不安定になった **LRRK2** がマクロオートファジーなどでリソソームに輸送され分解を受ける過程を見ているだけの可能性もあり、機能的な局在とは異なる可能性が考えられる。一方リソソーム表面への局在は、リソソーム膜上で **LRRK2** が何かしらの機能を持つ可能性が示唆され、その後本研究において **LRRK2** とリソソームの関係を解析する大きな動機になっている。

しかしながら本研究はあくまでも **LRRK2** のリソソーム局在を示しているだけであり、他の細胞内小器官への局在を報告した過去の研究結果を否定するものではない。特に定常状態において細胞質全体に広く染色される **LRRK2** が本当に細胞質に局在するのか、何かしらの細胞内小器官に局在しているのかに関しては解析できてはいない。リソソームに局在しない **LRRK2** が細胞内のどこに存在するのかに関してはさらなる解析が必要である。

蛍光免疫染色法により肥大化リソソームにおいて **LRRK2** と **LAMP1** が共局在することは示したが、**LRRK2** がリソソーム膜の細胞質側にいるのか内腔側にいるのか、また膜に結合しているのかなどに関しては解析できていない。これらを解析するためには①より分解能の高い免疫電子顕微鏡法を用いて解析する、②リソソームを精製し **LRRK2** が分画されてくるかどうか検討する、③分画された **LRRK2** が **protease K**

などの消化を受けるか確認しリソソーム膜の細胞質側に局在するか解析する、といった実験が必要であると考えられる。

5-2 LRRK2 のリソソーム局在を誘導するリソソームストレスの種類

定常状態において LRRK2 が肥大化リソソームに局在すること(図表 4)、加えて CQ 処理時に LRRK2 のリソソーム局在が誘導されることから(図表 5)、リソソームの異常が LRRK2 のリソソーム局在を誘導することが考えられた。本研究ではリソソームに影響を与える薬剤で細胞を処理しどのような薬剤が LRRK2 のリソソーム局在を誘導するか検討した。その結果リソソームの pH を上昇させる BafA1 やリソソームを肥大化させる Vacuolin-1 では LRRK2 のリソソーム局在は誘導されなかった。加えて BafA1 存在下で CQ 処理を行い CQ のリソソーム内腔への蓄積を阻害すると、LRRK2 のリソソーム局在はみられなくなった(図表 10)。以上のことから CQ がリソソームの内腔に蓄積することが LRRK2 のリソソーム局在を誘導していると考えられる。

さらに BafA1 も 6 時間以上の長時間投与では LRRK2 のリソソーム局在を誘導した(図表 12)。BafA1 はリソソームのプロトンポンプを阻害してリソソームにおける加水分解を阻害、2 次的にリソソーム基質の蓄積を誘導する。そのため BafA1 長時間投与ではリソソーム基質の蓄積により LRRK2 のリソソーム局在が誘導された可能性が考えられる。

LRRK2 のリソソーム局在は薬理学的処理を行っていない細胞でも低頻度ながら観察されている。このような定常状態において出現する LRRK2 陽性肥大化リソソームは、オートファジー経路・エンドサイトーシス経路によるリソソームへの基質流入がリソソームの加水分解能を上回って内腔に蓄積し、出現した可能性が考えられる。

5-3 LRRK2 による Rab8a、Rab10 の局在制御メカニズム

本研究において Rab8a、Rab10 が LRRK2 のキナーゼ活性依存的に LRRK2 陽性肥大化リソソームにリクルートされることを明らかにした(図表 20)。LRRK2 は Rab8a、Rab10 を直接リン酸化することがすでに示されており[82, 129]、実際本研究においても CQ 処理時に Rab10 のリン酸化は LRRK2 のキナーゼ活性依存的に亢進することを明らかにしている(図表 23)。加えて本研究において LRRK2 による Rab8a のリン酸化部位である Thr72 をアラニンに置換した T72A 変異体は LRRK2 によるリクルートを受けないことを明らかにした(図表 22)。以上の結果から LRRK2 は Rab GTPase をリソソーム膜上でリン酸化することで、Rab GTPase をリソソーム上にリクルートする可能性が示された。LRRK2 によるリン酸化部位は Rab GTPase のスイッチ II 領域内に位置しており、この領域は Rab GTPase と他のタンパク質との相互作用に関わっている。

Rab GDI (GDP-dissociation inhibitor)は Rab GTPase のゲラニルゲラニル基と相互作用し、覆い隠すタンパク質である。このゲラニルゲラニル基は Rab GTPase が脂

質膜に局在する際のアンカーとして必要である。また Rab GEF (guanine-nucleotide exchange factor)は Rab GTPase から GDP を解離させ GTP 結合型へと変換させるタンパク質である。LRRK2 による Rab8a Thr72 のリン酸化は、Rab8a と GDI および GEF との相互作用を低下させることが示されている[82]。また TAK1 は Rab1 の Thr75 (Rab8a Thr72 と相同な部位)を細胞内でリン酸化し、GEF との相互作用は変化させないが GDI との相互作用は低下させる[138]。加えて細胞質と膜画分に分画するとリン酸化 Rab1 は膜画分でのみ検出され、細胞質が Rab1 はほとんどリン酸化を受けていないことも示されている。また Rab7 の Ser72 は PTEN により脱リン酸化され、同部位をリン酸化模倣体に変異させた S72E Rab7 は GDI、GEF およびエフェクタータンパク質である RILP との相互作用が低下することも報告されている[139]。このように Rab GTP スイッチ II 領域のリン酸化は GDI を含め相互作用分子との結合を低下させることが示されつつある。特に GDI との結合が低下することは 3 つの研究で一貫して示されており、これにより Rab GTPase のゲラニルゲラニル基が露出し Rab GTPase が膜へと局在する可能性が考えられる。細胞質の Rab8a、Rab10 はリソソーム膜上の LRRK2 によってリン酸化を受け GDI と解離、その結果近傍の膜構造であるリソソームに局在するというモデルが考えられる。

LRRK2 による Rab GTPase のリン酸化は Rab GTPase のリソソーム局在に必要であると考えられるが、Phos-tag SDS PAGE 解析から予想されるリン酸化 Rab10、非リン酸化 Rab10 の比率は 1/100 にも満たない(図表 23、24)。CQ 処理時において

も細胞内のごくわずかの量の Rab10 しかリン酸化を受けていない。これは Rab GTPase がリソソームにリクルートされたのち、直ちに脱リン酸化されるというモデルで説明が可能である。また詳しくは後述するが本研究においてリソソームにリクルートされた Rab GTPase は機能を持つことが示唆された。しかし過去の報告ではリン酸化 Rab GTPase は活性が抑制されることが示唆されている[82, 139]。リン酸化を受けてリクルートされた Rab GTPase は、直ちに脱リン酸化されて機能を発揮するというモデルは、本研究で示された Rab GTPase のリン酸化がその機能に必要であるという結果と、過去の Rab GTPase のリン酸化はその機能を阻害するという報告の矛盾を解消できる。このモデルに関して模式図を図表 37 に示した。

Rab GTPase の局在はその機能に深くかかわると考えられているが、特定のオルガネラに局在するメカニズムに関しては不明な点も多い。これまでの研究で Rab 自体のアミノ酸配列[140]、Rab GEF との相互作用[141, 142]、エフェクターとの相互作用[143]、が Rab GTPase の局在を規定する因子として報告されている。とくに GEF に関しては人為的に Rabin8 をミトコンドリアにターゲティングさせると Rab8a がリクルートされること[141]、Rab27a GEF である Rab3GEF のノックダウンが Rab27a の標的オルガネラへの局在を消失させることが報告されており[142]、Rab GTPase を特定オルガネラにリクルートする分子であると注目されていた。今回これらの要素に加えて新しく、キナーゼによるリン酸化が Rab GTPase のオルガネラ局

在に関与する可能性が示され、LRRK2 分野だけでなく Rab GTPase の研究分野においても重要な結果であると考えられる。

ただし本研究において LRRK2 による Rab8a のリン酸化自体が Rab8a の肥大化リソソーム局在に必要であるということを示すデータは、Rab8a T72A 変異体が LRRK2 によるリクルートを受けないという実験結果のみである。この変異体が LRRK2 によるリン酸化を受けないという点以外において野生型 Rab8a と同等の性質を持つということは担保できていない。例えば Rab8a の GEF である Rabin8 は Rab8a をリクルートする機能を持つが、Rab8a T72A も Rabin8 によるリクルートを受け、またさらに下流のエフェクター分子をリクルートできることを確認する実験などを行い、T72A 変異 Rab8a が Rab8a 本来の正常な機能を失っていないことを示せばさらに説得力が増すものとする。

なおリン酸化模倣変異体である Rab8a T72D/E 変異体は単独ではリソソームに局在せず、加えて LRRK2 によるリクルートも受けけないという結果が当研究室で得られている。この結果に関しては第一にリン酸化模倣体が phospho-Rab8a を模倣していない可能性が考えられる。また LRRK2 は Rab8a をリクルートする際にリソソームに局在する。このことから Rab8a のリン酸化が重要だとしても、どこでリン酸化を受けるのかということも重要である可能性も考えられる。リン酸化模倣体は翻訳された時点からリン酸化状態を模倣するので「いつ」「どこで」リン酸化を受けるという情報は得られない。LRRK2 が「リソソーム膜上」で Rab8a をリン酸化することが Rab8a

のリソソーム局在に重要であるため、リン酸化模倣体はリソソームに局在しない可能性も考えられる。

5-4 LRRK2 の分子機能: LRRK2 によるリソソーム肥大化の抑制とリソソームエキソ

サイトーシス制御

リソソームがストレスを受けると LRRK2 がリクルートされることを明らかにした。このことから LRRK2 はストレスを受けたリソソームで機能を持つ可能性が示唆された。そこで CQ 処理時におけるリソソームの形態における LRRK2 の効果を siRNA による LRRK2 ノックダウン、および低分子化合物による LRRK2 のキナーゼ活性阻害を行い検討した。その結果 LRRK2 はキナーゼ活性依存的に CQ 処理時のリソソーム肥大化を抑制していることが判明した(図表 25, 26)。加えて LRRK2 はリソソーム内腔酵素の Cathepsin D をキナーゼ活性依存的に細胞外に排出していることが明らかとなった(図表 27)。細胞外への Cathepsin D 排出はリソソームエキソサイトーシスと類似した経路であると考えられ、Cathepsin D と共にリソソーム内腔の他の加水分解酵素、CQ、水などが細胞外へと放出されていると想定される。

次に LRRK2 によってリクルートされる Rab GTPase が CQ 処理時のリソソーム肥大化抑制、リソソームエキソサイトーシスに関与するかどうか siRNA によるノックダウンで検討した。その結果 Rab8a+Rab8b のダブルノックダウンでリソソームの肥大化が亢進することが判明した(図表 29)。Rab10 のノックダウンではこのような

効果はみられなかったため、リソソーム肥大化抑制における Rab10 の効果はあったとしてもマイナーであると考えられる。一方リソソームエキソサイトーシスは Rab10 ノックダウンで有意に低下した(図表 30)。このことからリソソーム肥大化抑制とリソソームエキソサイトーシスはそれぞれ異なる Rab GTPase によって担われている可能性が示唆された。LRRK2 は複数種類の Rab GTPase の局在・機能を制御し、それぞれ異なる複数の経路を活性化することでリソソームストレスに応答している可能性が示唆された。

リソソームエキソサイトーシスはリソソーム内腔の物質を排出することで、上昇したリソソーム内圧を低下させることに寄与している可能性が考えられる。一方で Rab8 が関与するリソソームの肥大化抑制はリソソーム同士の融合の抑制、またはリソソームの分裂の亢進といった膜輸送制御によって制御されている可能性も考えられる。リソソーム肥大化抑制の意義としては、過度な肥大化はリソソームの破裂のリスクを上昇させることが知られており、LMP を防いでいる可能性がある。またリソソーム同士の融合を抑制しているのであれば、基質が蓄積したリソソームと健全なリソソームの融合を抑制しリソソームの異常が広がることを防いでいることも想定される。肥大化抑制の意義を明らかにするためには LRRK2 や Rab8 がどのようなメカニズムで肥大化を抑制しているか明らかにする必要がある。

5-5 Rab7L1-LRRK2-Rab8/10 が存在する可能性

本研究では Rab7L1 が LRRK2 をリソソームにリクルートすること(図表 15、16)、また LRRK2 は Rab8a、Rab10 をリソソームにリクルートすることを明らかにした(図表 20)。加えて Rab7L1 ノックダウンは LRRK2 ノックダウンと同様に CQ 処理時のリソソームの肥大化を亢進させ、catheosinD 放出を抑制した(図表 28)。また Rab8a および Rab8b のノックダウンが LRRK2 ノックダウンと同様に CQ 処理時のリソソーム肥大化を亢進させること、また Rab10 のノックダウンが LRRK2 ノックダウンと同様に CQ 処理時の Cathepsin D 排出を抑制することを明らかにした(図表 29、30)。さらに LRRK2 によるリソソーム肥大化抑制、リソソームエキソサイトーシスは LRRK2 のキナーゼ活性依存的であり、また Rab GTPase のリクルートもキナーゼ活性依存的である。以上のことから Rab7L1 が LRRK2 をリクルートし、LRRK2 はキナーゼ活性依存的に下流の Rab GTPase をリクルートし、それらの Rab GTPase が膜輸送を制御しリソソームへの機能を発揮すると推論できる。しかしながら本研究では直接的に LRRK2 と Rab GTPase が機能的に同一の経路に位置していることを示す実験は行えておらず、今後の課題である。

過去の報告から Rab7L1 は生体内においても LRRK2 と共通した機能を有している可能性が示唆されている。*Rab7L1* ノックアウトマウスは近位尿細管上皮細胞においてリポフスチン顆粒(自家蛍光)の蓄積や肥大化リソソームの蓄積が見られると報告されており、本研究結果に一致する部分がある。しかしながら *Rab7L1* KO マウス近位尿細管上皮細胞におけるリソソーム異常程度は *Lrrk2* KO マウスにおけるそれと

比してかなり弱い。Rab7L1 の単独欠損では LRRK2 の機能が完全には阻害されない可能性、また Rab7L1 は LRRK2 の局在制御以外に late endosome からの逆行性輸送を制御していると報告されており [144]、このような機能の阻害による表現型でマスクされている可能性も考えられる。

一方本研究で LRRK2 の下流因子の 1 つであることが示唆された Rab8a の単独ノックアウトマウスは消化管上皮細胞における極性輸送の異常が報告されている [145]。また *Rab8a* KO マウスは生後 3-4 週で死亡し、これは消化管からの栄養吸収不良であるためと考えられている。Rab8a KO マウスの近位尿細管上皮細胞ではリソソームの数の増加が見られるということだがデータの収載はない。消化管上皮細胞では極性輸送以上に加え、顕著に肥大化したリソソームが見られる。*Lrrk2* KO マウスは消化管上皮におけるリソソーム異常は見られないが、*Rab8* KO では極性輸送障害も併せて生じるため、様々なタンパク質の miss transport に伴うリソソームへの負荷が生じている可能性も否定はできない。生体内において LRRK2 の下流で Rab8 が機能していることを示すためには、腎特異的な Rab8a/b KO マウスの作出や T72A 変異 Rab8a/b ノックインマウスの作出が必要かもしれない。なお *Rab10* のノックアウトマウスは報告がない。

5-6 Rab8a、Rab10 の下流分子

本研究の結果より Rab8a、Rab8b が CQ 処理時のリソソーム肥大化を抑制し、Rab10 がリソソームエキソサイトーシスを制御する可能性が示された。ではこれらの Rab GTPase の下流にはどのような分子が存在するのだろうか。

Rab GTPase は GTP 結合状態依存的にエフェクタータンパク質と総称される機能的タンパク質と結合し膜輸送を制御することが知られている。これまでに報告されている Rab8a のエフェクタータンパク質は myosin Vb、MICAL ファミリー、EHBP1-L1、optineurin、ORCL1 などである。myosin Vb はアクチン線維と相互作用するモータータンパク質であり、Rab8 の下流で様々な小胞の分泌経路に関与することが報告されている[146-148]。EHBP1L1 は Rab8a の下流で極性輸送を制御することが報告されており、相互作用分子である Bin1 をリクルートし膜の曲率を制御しエンドソームからの小胞の出芽を制御していると考えられている[149]。一方 Rab10 の既知のエフェクタータンパク質はあまり知られていないが、SEC16A は Rab10 の下流でインスリン依存的な GLUT4 の細胞膜への輸送に関与することが報告されている[150]。

既知のエフェクターの中でリソソームストレス-LRRK2 経路で機能することが特に示唆されるものは無いが、今後これらエフェクタータンパク質をノックダウンするなどし LRRK2 の下流分子であるかどうか検討する実験が可能である。また未知のエフェクタータンパク質が関与している可能性も存在する。一般的に Rab GTPase のエフェクタータンパク質の探索には酵母ツーハイブリッド法もしくはプルダウンア

ッセイが用いられる。これらの実験により新規の Rab8、Rab10 エフェクタータンパク質を同定する必要がある可能性も考えられる。

またリン酸化 Rab GTPase 特異的なエフェクタータンパク質が存在する可能性も考えられる。Rab8a、Rab8b、Rab10 は LRRK2 の基質であり [82, 129]、LRRK2 のキナーゼ活性依存的にリソソームへリクルートされる(図表 20)。LRRK2 による Rab8a のリクルートには Rab8a のリン酸化が直接関与する可能性が示されており(図表 22)、リソソーム膜上の Rab GTPase はリン酸化状態で機能する可能性も考えられる。このような可能性を考慮する場合リン酸化模倣変異体 Rab GTPase を用いたエフェクタータンパク質探索が必要となる。ただし 5-4 で議論した通り、現時点では Rab GTPase は脱リン酸化状態で機能を発揮することを想定している。

5-7 Rab8、Rab10 以外の Rab GTPase が LRRK2 の下流で機能する可能性

本研究では LRRK2 の下流分子として Rab8a、Rab8b、Rab10 の局在・機能を解析した。しかしながら LRRK2 の下流で局在が制御される Rab GTPase のスクリーニング的探索では Rab3a、Rab35 も LRRK2 のキナーゼ活性依存的にリソソームにリクルートされる可能性が示された(図表 18, 19)。過剰発現タンパク質はしばしば非生理的な細胞内局在を呈するため、内因性 Rab GTPase の局在を解析することは必須であると考えられる。本研究では Rab8a および Rab10 のみ内因性タンパク質の局在解析が可能であったため、これらの Rab GTPase に着目しその後の研究を進めた。しか

しながら Rab3a や Rab35 も LRRK2 の下流として機能している可能性が考えられる。とくに Rab3a に関しては Rab10 と同様にリソソームエキソサイトーシスに関与することが報告されており [119]、LRRK2 の下流で機能する可能性も十分に考えられる。今後これらの Rab GTPase に関しては一過性の過剰発現でなく安定発現細胞株を作出し低レベルに発現させた条件下で局在を解析し、スクリーニングの結果を検証する必要がある。またこれらの Rab GTPase 遺伝子をノックダウンしリソソームにどのような影響が出るか解析する必要もある。

また本研究におけるスクリーニングでは Rab10 Thr73 と相同なセリンまたはスレオニンを持つ Rab GTPase のみに着目した。しかしながらそのようなセリン/スレオニンを持たない Rab GTPase が本当に LRRK2 の下流分子とはならないかどうか解析が必要である。

5-8 ノックダウン実験による機能解析の限界

本研究では各遺伝子の機能解析のため siRNA を用いたノックダウンを行っている。ノックダウン効率は LRRK2、Rab8a、Rab10 に関しては WB でそれぞれ確認している(図表 30、33)。しかしながら Rab7L1、Rab32、Rab38、ATG5、ATG7、ATG16L1、p22、Rubicon については抗体が無くノックダウンの効率を担保できてはいない。しかしながら Rab7L1、ATG5、ATG7、ATG16L1、p22、Rubicon のノックダウンに関

しては LRRK2 のリソソーム局在、ファゴソーム局在を抑制するという細胞レベルでの表現型が確認できたため、ノックダウンの効果があると判断した。

また siRNA によるノックダウンではタンパク質レベルでのノックダウン効率がそのままそのタンパク質の機能抑制の程度を示すとは限らないという問題点もある。それぞれのタンパク質には予備能があり、その予備能を越えて一定程度以上の発現抑制が起こらなければ機能抑制にはつながらないと考えられる。一方ノックアウトでは発現がゼロになるため機能も完全に喪失すると考えられている。従ってノックダウンにより特定の機能が低下しても、その遺伝子が機能にどの程度関与しているのか、あるいは必須なのかといったことまでは解明できず、そのような場合にはノックアウトを用いた実験が必要だろう。またノックダウンで表現型が見られずとも、ノックダウン効率が不十分である可能性を除外できない。そのため例えば Rab32/38 が LRRK2 のリソソーム局在に関与しないということを示す際にはノックアウトの実験が好ましい。

5-9 LRRK2 のリソソームストレス応答機能の細胞種を越えた保存性

CQ 処理による LRRK2 のリソソーム局在はマクロファージ系培養細胞 RAW264.7 細胞や骨髄幹細胞由来マクロファージにおいて特に高効率に誘導された(図表 5g)。マクロファージは貪食細胞であり V-ATPase や加水分解酵素などリソソーム系遺伝子の発現が高いことで知られており、同様にリソソーム恒常性維持経路に関わる遺伝子の

発現も高い可能性が考えられる。一方で HEK293 細胞、3T3-Swiss albino 細胞でも CQ による LRRK2 のリソソーム局在は確認された(図表 5h, i)。したがって LRRK2 のリソソームストレス応答は多くの細胞で保存されている経路であることが示された。加えて本研究において RAW264.7 細胞において LRRK2 は CQ 処理時のリソソーム肥大化を抑制していることを示したが(図表 25, 26)、HEK293 細胞に野生型 LRRK2 を過剰発現させた場合も同様にリソソームの肥大化が抑制されることが当研究室において示されている。したがってリソソームへの局在変化だけでなく、肥大化抑制という LRRK2 の機能も RAW264.7 細胞および HEK293 細胞で共通していることが示されている。また HEK293 細胞では過剰発現実験ではあるが、LRRK2 による Rab 8a、10 のリクルートに関しても RAW264.7 細胞と HEK293 細胞で同様に確認している(図表 18, 20)。したがって内因性 LRRK2 の発現および機能が高いと推察される RAW264.7 細胞を用いた分子細胞生物学的な解析結果は、他の細胞種にも適用できるものと考えられる。ただし本研究では神経細胞において LRRK2 のリソソーム局在が見られるかどうかは検討できていない。初代培養マウス大脳皮質神経細胞に対し CQ 処理を行ったが細胞毒性が強く解析ができなかった。神経細胞における実験はさらに条件を検討して続行する必要がある。

なお骨髄幹細胞由来マクロファージ及び RAW264.7 細胞では CQ 処理による LRRK2 のリソソーム局在は 3 時間程度で十分に誘導できた。しかしながら HEK293 細胞では 12 時間の CQ 処理では不十分で 24 時間必要であった。HEK293 細胞で CQ

処理時間がこれほど長く必要な理由として新規の遺伝子発現を介している可能性が考えられる。CQ 処理は転写因子 TFEB を活性化しリソソーム・マクロオートファジーに関与する遺伝子群の発現を亢進させることが知られている[120]。また TFEB の関与は直接的には示されていないが、CQ と同様に TFEB を活性化させるスクロース処理を行うと Rab7L1 の発現が亢進することも報告されている[151]。オートファジー関連遺伝子、Rab7L1 は本研究において LRRK2 のリソソーム局在を制御する遺伝子である可能性が示唆されており、CQ 長時間投与による遺伝子発現の変化が、LRRK2 の CQ への応答性を変化させている可能性は十分に考えられる。

5-10 LRRK2 のリソソーム局在と機能の関連

本研究において LRRK2 は CQ 処理時にリソソームに局在すること、CQ 処理時に LRRK2 が Rab をキナーゼ活性依存的に LRRK2 陽性リソソームにリクルートすること、CQ 処理に LRRK2 はリソソーム肥大化の抑制と排出を制御することを明らかにした。これらの結果から LRRK2 は障害を受けたリソソームに特異的にリクルートされ、そのリソソームのストレス応答を制御する可能性が示唆された。障害を受けたミトコンドリア上では特異的に PINK1、parkin が活性化され障害ミトコンドリア特異的なマクロオートファジーが誘導されるが、同様に内腔に物質が蓄積し肥大化したリソソームに関しては LRRK2 がリクルートされ、Rab GTPase を介した膜輸送制御に

よるストレス応答が被ストレスリソソーム特異的に行われている可能性が考えられる。

しかし本研究では **LRRK2** のリソソーム局在がその機能に必須であるかどうかに関して厳密には示せていない。これを示すには、例えばキナーゼ活性は有するがリソソーム局在はみられない変異型 **LRRK2** を作出し、この変異体はリソソームストレスへの機能を喪失するなどの実験が必要である。また **PINK1** に関しては人為的にミトコンドリアや他のオルガネラにターゲティングさせると、標的オルガネラに **parkin** がリクルートされさらにマクロオートファジーが誘導されることが報告されている [152]。このような実験系を用いて、**LRRK2** をリソソームに強制的にターゲティングさせた際に **Rab GTPase** がリクルートされるかどうかを解析し、**LRRK2** のリソソーム局在が **LRRK2** の機能発揮に十分であるかどうかを検討することも重要であろう。

5-11 オートファジー分子と **LRRK2** のリソソーム局在

LRRK2 のリソソーム局在が **LC3 associated phagocytosis (LAP)** およびそれと類似する分子経路の下流で制御されている可能性が示された。**CQ** 処理及び **zymosan** 食食は共にリソソーム/ファゴリソソームの 1 重膜への **LC3** のリクルートを誘導することが知られている [107, 113]。そして **CQ** 処理及び **zymosan** 食食は **LRRK2** をリソソーム/ファゴリソソームへとリクルートし、**LRRK2** は **LC3** と共局在した(図表 32)。

LC3のリクルートに必要な遺伝子である *ATG5*、*ATG7*、*ATG16L1* をノックダウンすると、CQ 処理時の *LRRK2* リソソーム局在が抑制された(図表 34)。また LAP において LC3 誘導に必要な遺伝子である *ATG5*、*ATG16L1*、*p22^{phox}* のノックダウンにより、*LRRK2* のファゴリソソームへのリクルートが抑制された(図表 36)。以上の結果からオートファジー関連分子は *LRRK2* のリソソーム局在を制御することが示された。*ATG5* ノックダウンでは *LRRK2* のリソソーム局在がコントロールの半分程度に抑制されたが、siRNA を用いたノックダウンの結果であるため *ATG5* が *LRRK2* のリソソーム局在に必須であるかどうかは *ATG5* ノックアウト細胞を用いたさらなる検討が必要であると考えられる。

LAP および CQ 処理によるリソソームへの LC3 リクルートでは、飢餓誘導オートファジーにおける LC3 脂質化とは異なり *ULK1/2*、*ATG13* などを必要としないことが知られている。*LRRK2* がマクロオートファジーではなく LAP 関連経路の下流でリソソームに局在することを示すためにはこれらの遺伝子が *LRRK2* リソソーム局在に関与しないことを示す必要がある。しかしながら siRNA を用いたノックダウン実験では、ノックダウンで *LRRK2* のリソソーム局在が抑制されなかったとしても、ノックダウン効率が十分でなかった可能性を否定できない。そのためノックアウト細胞を用いた検討が必要となる。しかしながら本研究ではノックアウトマウスを準備できず骨髄幹細胞由来マクロファージを用いた検討はできておらず、また RAW264.7 細胞は遺伝子発現が困難で CRISPER/Cas9 システムによるノックアウト細胞作出にも

至らなかった。ノックアウト細胞を用いて *ATG5*、*ULK1/2* を含む各オートファジー関連遺伝子が *LRRK2* のリソソーム局在へどのように関与するか解析することは今後の課題である。

オートファジー関連分子はどのようなメカニズムで *LRRK2* をリソソームにリクルートするのだろうか。*LRRK2* は膜貫通ドメインや膜結合領域を持たないタンパク質であり、脂質修飾なども知られていない。そのため別の膜局在タンパク質と相互作用しリソソームに局在すると考えられる。*LRRK2* と相互作用する分子がオートファジー分子依存的にリソソーム膜にリクルートされる、もしくはリソソーム膜上のタンパク質と *LRRK2* の相互作用がオートファジー分子依存的に制御されている可能性が考えられる。*ATG8* ホモログは *LC3-interacting region (LIR)* モチーフと呼ばれる配列を持つタンパク質と相互作用することが知られている。*p62* など選択的オートファジーの受容体は *LIR* モチーフを持ち *LC3* と相互作用することが知られているが、他にもオートファゴソームの形成・成熟に関わる様々なタンパク質が *LIR* モチーフを持つことがこれまでに報告されている[153]。マクロオートファジーにおいては *Rab33b* の *Rab GAP* である *TBC1D25* や *Rab7* のエフェクターである *FYCO1* が *LC3* と相互作用し、オートファゴソームの成熟に関与することが知られている[126, 154]。またトキソプラズマ感染によって誘導される *LAP* 経路においては、*ATG8* ホモログの内 *GABARAP* サブファミリー分子が低分子 G タンパク質である *Arf1* と相互作用し活性化、これによりさらに下流の免疫関連低分子 G タンパク質がトキソプ

ラズマを囲む小胞にリクルートされてくることが報告されている[155]。このように ATG8 ホモログ分子によってリクルートないし活性化される分子が存在し、そのような分子の下流で LRRK2 のリソソーム局在が制御されている可能性が考えられる。

本研究において LRRK2 をリソソーム膜上にリクルートする際のアダプター分子の候補として Rab7L1 を見出した。Rab7L1 は LRRK2 と直接相互作用することが報告されている[56, 57]。Rab7L1 はトランスゴルジに局在すると報告されており[56, 144]、本研究においても EGFP-Rab7L1 を HEK293 細胞に発現させると定常状態においてはトランスゴルジマーカーの TGN46 と共局在することを確認した(図表 14a)。しかしながら Rab7L1 を発現した HEK293 細胞に対し CQ 処理を行うと Rab7L1 はリソソームマーカー LAMP1 と共局在した(図表 14b)。加えて RAW264.7 細胞の内因性 *Rab7L1* をノックダウンすると、CQ 処理時による LRRK2 のリソソーム局在が抑制された(図表 16)。この効果は *Rab7L1* と近縁の Rab GTPase である *Rab32*、*Rab38* のノックダウンでは見られなかったことから *Rab7L1* 特異的であることが示唆された。RAW264.7 細胞における内因性 Rab7L1 の局在は染色可能な抗体が存在しないため解析できていないが、HEK293 細胞を用いた実験の結果を外挿すると、RAW264.7 細胞においても CQ 処理時に Rab7L1 はゴルジ体からリソソームへと移行すると考えられる。そして LRRK2 と結合し LRRK2 をリソソーム膜へリクルートしている可能性が考えられる。

本研究では Rab7L1 とオートファジー分子の関係については全く解析できていない。しかしながら両者ともにノックダウンを行うと LRRK2 のリソソーム局在が抑制されるという結果が得られている。このことから Rab7L1 とオートファジー分子の関係について

- 1) 異なる独立の経路で LRRK2 のリソソーム局在を制御する
- 2) Rab7L1 のリソソーム局在はオートファジー分子によって制御される
- 3) オートファジー分子の活性が Rab7L1 によって制御される
- 4) オートファジー分子と Rab7L1 は独立にリソソーム上に集積・活性化し、協調して LRRK2 リクルートに寄与する

などの可能性が考えられる。Rab7L1 が LRRK2 に直接結合しリソソームにリクルートする分子であると仮定すると、(3)の可能性は否定的である。(4)の可能性に関しては例えばオートファジー分子がリソソーム上の Rab7L1 と LRRK2 の結合を亢進させるなどの可能性が考えられる。この場合 Rab7L1 とオートファジー分子は互いの局在には影響を及ぼさないが、両者ともに LRRK2 のリクルートに関与することになる。

Rab7L1、オートファジー分子、LRRK2 の 3 社の関係に関しては今後の検討課題ではあるが、少なくとも LRRK2 のリソソーム局在を Rab7L1 が制御する可能性、オートファジー分子が制御する可能性は、それぞれ相反するものではないと考えられる。

5-12 CQ 処理による LRRK2 機能解析の限界と有用性

本研究で **LRRK2** の分子機能解析を行うにあたり、多くの実験で **CQ** 処理を行っている。**CQ** は人工的なリソソーム指向性試薬であり、細胞内に無数に存在するすべての酸性コンパートメントに急激に蓄積し強いストレスを与える。そのため **CQ** によるリソソームストレスが人工的なものであり生理的に生じるストレスではないという批判が十分に想定される。しかしながら以下のような理由で **LRRK2** は生体内におけるリソソームストレスにも応答している可能性が考えられる。

まず定常状態の培養細胞においても一定の割合で **LRRK2** のリソソーム局在が観察されるという点が挙げられる。**CQ** 処理は **LRRK2** 陽性の肥大化リソソームを有する細胞の割合を上昇させるが、定常状態でもわずかではあるがリソソーム局在は観察される(図表 4)。定常状態において細胞内には無数の小型リソソームと少数の肥大化リソソームが混在しており、**LRRK2** は肥大化リソソームに特異的に局在している。このような定常状態における **LRRK2** の肥大化リソソーム局在は **RAW264.7** 細胞、**3T3 Swiss albino** 細胞、**3×FLAG LRRK2** 安定発現 **HEK293** 細胞とこのことから少なくとも培養細胞においては定常状態においても過積載負荷により肥大化したリソソームは低頻度ながら出現しており、**LRRK2** はこのようなリソソームにリクルートされていることが示唆される。培養細胞での観察結果が生体内に存在する細胞に対して直ちに外挿できるわけではないが、生体内においても一定の頻度で被ストレスリソソームの出現とそれに対する **LRRK2** の応答が生じている可能性が考えられる。

2つ目の根拠として貪食細胞に特異的なストレスではあるが、zymosan の貪食過程においても LRRK2 がファゴリソソームにリクルートされることが挙げられる。このことはまずマクロファージにおいてはその細胞の生体内における主要な機能の 1 つである貪食過程でリソソーム/ファゴリソソームストレスが生じ LRRK2 の応答が誘導されうるということを示唆している。加えて CQ という人工的で強力なリソソームストレス誘導剤のみならず生体内で生じうる強さのストレスでも LRRK2 がリソソームにリクルートされる可能性が十分にあることが示唆される。

最後に *Lrrk2* KO マウスの表現型として近位尿細管上皮細胞における加齢依存的なリソソームの異常が見られるという点が挙げられる。LRRK2 機能喪失がどのようなメカニズムで近位尿細管上皮細胞におけるリソソーム異常を生じさせるかについての考察は次節で述べるが、近位尿細管はエンドサイトーシス活性が高くリソソームへの負荷が多いと考えられる。従って少なくとも近位尿細管においては LRRK2 がリソソームストレスに応答している可能性が考えられる。

本研究では CQ 処理時に LRRK2 がキナーゼ活性依存的に Rab8/10 をリソソームにリクルートし、リソソームの形態維持と排出を制御していることを明らかにした。CQ 処理は定常状態では低頻度である LRRK2 のリソソーム応答を高度に誘導することで、その分子細胞生物学的な機能解析を容易にするという利点があると考えられる。今後の検討に関しても例えば LRRK2 の下流で Rab8/10 やそのエフェクタータンパク質を含めどのようなタンパク質がリクルートされるか網羅的に解析を行うような

場合には CQ 処理は強力なツールとなると考えられる。一方で LRRK2 のリソソームストレス応答が生体内においてどのような意義を持つのかに関してさらに解析することも今後の課題の 1 つである。

5-13 本研究から推測される *Lrrk2* KO マウス表現型の発症メカニズム

LRRK2 ノックアウトマウスの主たる表現型は腎臓近位尿細管における加齢依存的なリソソームの増加・肥大化およびリポフスチンの沈着である。近位尿細管上皮細胞は 2 種類の受容体 megalin、cubilin を発現しており、これはタンパク質や低分子化合物を含め原尿中の様々な物質の再吸収に関与している[156]。原尿中のタンパク質はこの受容体に結合しエンドサイトーシスによって近位尿細管上皮細胞内に取り込まれリソソームにて分解されるが、これによりリソソームに強い負荷がかかることが示唆されている[157]。

本研究では、LRRK2 はリソソームへの過積載負荷に応答し、ストレス軽減に寄与している可能性を示した。この結果と *Lrrk2* KO マウスの表現型を併せて考えると、エンドサイトーシス活性が高くリソソームへの基質流入が多い近位尿細管上皮細胞において、LRRK2 はリソソームのストレスを軽減し過剰な基質の排出とリソソーム肥大化の抑制を担っている可能性が考えられる。LRRK2 が欠損するとリソソームストレスに対する抵抗性が失われ、リソソームの肥大化および分解に失敗したリソソーム基質の残骸であるリポフスチンの蓄積が生じると考えられる。*Lrrk2* KO マウスで

は各種リソソーム遺伝子の発現量が亢進していることが報告されているが、これはリソソームストレス上昇により代償的に転写因子 **TFEB** が活性化したためである可能性が考えられる。また *Lrrk2* KO マウスで見られる **p62** の蓄積はリソソーム機能低下による 2 次的なものである可能性が考えられる。

実際に *Lrrk2* KO マウスにおける腎臓の表現型がリソソーム過積載負荷によるものであることを示すためには、**megalin** の近位尿細管特異的ノックアウトと掛け合わせて *Lrrk2* KO の表現型がレスキューできること、*Lrrk2* KO マウスに人為的にタンパク尿を誘導するとリソソーム負荷がさらに上昇し表現型が増悪することなどの実験を行う必要がある。これらの実験は **LRRK2** の生理機能解明を通じた **PD** 発症メカニズム解明という目的に鑑みては不必要であるかもしれない。しかしながら **megalin** を介したリソソーム過積載負荷は生活習慣病による腎不全発症に関与する可能性が示唆されている[157]。現在 **megalin** を介したエンドサイトーシス部分に着目して研究がおこなわれているが、そこに加えエンドサイトーシス後の **LRRK2** によるリソソーム保護の観点からリソソーム過積載負荷と腎機能の関係を解析することで、さらに研究を発展させることが可能であるかもしれない。

5-14 生体内におけるリソソームストレス：リソソームの老化

一部前節の内容と重複するが、改めて生体内においてリソソームストレスを生じうる要因について考察する。本研究において **LRRK2** はリソソームストレスに応答して

いることが示された。*Lrrk2* KO マウスは加齢依存的に近位尿細管リソソームの肥大化とリポフスチン蓄積を呈する。加えて近位尿細管における表現型は CQ 投与によるリソソームストレスで加速されるという結果が、当研究室において得られている。以上から生体内において、少なくともマウス近位尿細管では加齢依存的なリソソームストレスが存在し、LRRK2 はそのストレスに応答していると考えられる。

マウスより長寿なヒトにおいては腎臓に加え脳・心筋など様々な臓器・組織において加齢依存的なリソソームの肥大化やリポフスチンの蓄積といった変化が生じることが知られている。このことから特に高齢のヒトにおいては近位尿細管のみならず多くの組織でリソソームに対するストレスが生じている可能性が考えられる。

このような加齢依存的なリソソームの変化・リソソームへのストレスを生じさせる要因として①リソソームの加水分解能の低下、②凝集性タンパク質の蓄積、③ミトコンドリアの機能異常が考えられる。in situ におけるリソソームの活性を評価する手法が確立されていないため加齢依存的なリソソーム機能の変化を直接的に検討する研究は行われていないが、タンパク質の分解速度は加齢依存的に低下することからリソソームの分解機能も加齢依存的に低下していると考えられている[158]。tau や α -synuclein、huntingtin など凝集性タンパク質がマクロトファジーの基質となりリソソーム内腔へ輸送されることが報告されている。凝集し分解を受けにくいタンパク質がリソソームに蓄積し、ストレスを引き起こしている可能性も考えられる。加えてミトコンドリアの酸化ストレスがリソソームにストレスを引き起こす可能性も提唱

されている[159]。ミトコンドリアで発生した活性酸素は近傍のリソソーム内部に浸透し内部のタンパク質などを酸化する。酸化されたタンパク質は加水分解に対し抵抗性となり蓄積しリポフスチンとなる。加齢依存的なミトコンドリアの機能異常が二次的にリソソームの老化を引き起こす可能性も考えられる。

これらの複数の要因により生体内においてもリソソームの過積載負荷が生じている可能性が考えられる。LRRK2 と老化によるリソソームストレスとの関係を明らかにするためにはさらなる検討が必要である。

5-15 パーキンソン病と LRRK2 の関係に関する今後の展望

LRRK2 の正常機能に関する本研究は直接的にパーキンソン病(PD)発症機序解明を目指すものではないが、LRRK2 によるパーキンソン病発症機序の研究においても大きな意義があると考えられる。過去の LRRK2-パーキンソン病研究は、LRRK2 が常染色体優性家族性 PD の原因遺伝子であることから LRRK2 の変異効果に着目した研究がほとんどであった。そのようなマウスをはじめとするモデル動物、もしくは *in vitro* で細胞に FPD 変異型 LRRK2 を発現させ野生型 LRRK2 を発現させた場合と比較するという手法が用いられている。しかしながらこれまで数多くの研究がなされてきたにもかかわらず現在のところ LRRK2 変異がヒトでどのようにパーキンソン病を引き起こすのかは明らかでない。

変異型 LRRK2 を用いた解析だけでは限界がある中で、野生型 LRRK2 がどのような性質・機能を有しているのかという知見も重要であると考えられる。本研究では LRRK2 の正常機能、すなわち本来 LRRK2 は①どのような刺激を受けた際に、②細胞内のどこで、③どのような基質をリン酸化し、④リン酸化によって基質にどのような変化をもたらし、⑤最終出来にどのような機能を発揮するのか、という点について分子細胞生物学的に解析を行った。その結果 LRRK2 はリソソームにストレスが加わった際に、リソソームに局在変化し、Rab8/10 をリン酸化し、それらの Rab GTPase をリソソームにターゲティングさせ、リソソームストレスを軽減するという機能を有している可能性が考えられた。

本研究の結果から Rab8/10 のリン酸化はリソソームターゲティング及びリソソームストレスへの抵抗に関与することが考えられる。そして Rab GTPase のリン酸化は LRRK2 によるパーキンソン病発症に深く関係することが示唆されている。複数同定されている LRRK2 の家族性 PD 変異はすべて例外なく Rab GTPase に対するリン酸化を亢進させる[82, 133]。LRRK2 の基質はこれまで多数報告されているが、LRRK2 変異全てでリン酸化が上昇するものは報告されていなかった。自己リン酸化や人工基質へのリン酸化も変異によって上昇するものとしなないものがあり、家族性 PD 変異で一貫した結果は得られていなかった。その中で Rab GTPase に対するリン酸化は LRRK2 変異で一貫して上昇することが報告され、パーキンソン病発症に関わる重要な基質であることが強く示唆された。従って LRRK2 によるリソソームストレ

ス応答がパーキンソン病発症に関係がある可能性も十分に考えられる。加えて DLB、PD 患者の脳病理組織において LRRK2 が肥大化リソソームに局在すること [159]、Rab7L1 は GWAS にて孤発性 PD のリスク遺伝子産物である可能性が報告されていること [45] からも、Rab7L1-LRRK2-Rab8/10 経路が PD 発症に関与する可能性を示唆される。

加えて本研究で LRRK2 はリソソームストレス時に局在を変化させ Rab10 のリン酸化を亢進させることから、リソソームストレス時に特に機能する可能性が示された。これまで変異型 LRRK2 発現による表現型解析をリソソームストレス下で行った研究は無く、このような条件下では新しい LRRK2 の変異効果が判明する可能性もある。

変異型 LRRK2 による PD の発症機序、および孤発性 PD 一般の発症機序解明は今後の大きな研究課題であるが、LRRK2 の正常機能解明はその基礎として重要な知見をもたらすものであると考えられる。

参考文献

1. Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Uitti, R.J., Calne, D.B., Stoessl, A.J., Pfeiffer, R.F., Patenge, N., Carbajal, I.C., Vieregge, P., Asmus, F., Müller-Myhsok, B., Dickson, D.W., Meitinger, T., Strom, T.M., Wszolek, Z.K. & Gasser, T. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* **44**, 601-607 (2004).
2. Funayama, M., Hasegawa, K., Kowa, H., Saito, M., Tsuji, S. & Obata, F. A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Annals of neurology* **51** (2002).
3. Paisán-Ruíz, C., Jain, S., Evans, E.W., Gilks, W.P., Simón, J., van der Brug, M., de Munain, A., Aparicio, S., Gil, A., Khan, N., Johnson, J., Martinez, J., Nicholl, D., Carrera, I., Peña, A., de Silva, R., Lees, A., Martí-Massó, J., Pérez-Tur, J., Wood, N.W. & Singleton, A.B. Cloning of the Gene Containing Mutations that Cause PARK8-Linked Parkinson's Disease. *Neuron* **44**, 595-600 (2004).
4. Barrett, J.C., Hansoul, S., Nicolae, D.L., Cho, J.H., Duerr, R.H., Rioux, J.D., Brant, S.R., Silverberg, M.S., Taylor, K.D., Barmada, M.M., Bitton, A., Dassopoulos, T., Datta, L., Green, T., Griffiths, A.M., Kistner, E.O., Murtha, M.T., Regueiro, M.D., Rotter, J.I., Schumm, P.L., Steinhart, H.A., Targan, S.R., Xavier, R.J., Consortium, N., Libioulle, C., Sandor, C., Lathrop, M., Belaiche, J., Dewit, O., Gut, I., Heath, S., Laukens, D., Mni, M., Rutgeerts, P., Gossu, A., Zelenika, D., Franchimont, D., Hugot, J.-P., de Vos, M., Vermeire, S., Louis, E., Consortium, B.-F., Consortium, W., Cardon, L.R., Anderson, C.A., Drummond, H., Nimmo, E., Ahmad, T., Prescott, N.J., Onnie, C.M., Fisher, S.A., Marchini, J., Ghori, J., Bumpstead, S., Gwilliam, R., Tremelling, M., Deloukas, P., Mansfield, J., Jewell, D., Satsangi, J., Mathew, C.G., Parkes, M., Georges, M. & Daly, M.J. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nature Genetics* **40**, 955-962 (2008).
5. Zhang, F.-R., Huang, W., Chen, S.-M., Sun, L.-D., Liu, H., Li, Y., Cui, Y., Yan, X.-X., Yang, H.-T., Yang, R.-D., Chu, T.-S., Zhang, C., Zhang, L., Han, J.-W., Yu, G.-Q., Quan, C., Yu, Y.-X., Zhang, Z., Shi, B.-Q., Zhang, L.-H., Cheng, H., Wang, C.-Y., Lin, Y., Zheng, H.-F., Fu, X.-A., Zuo, X.-B., Wang, Q., Long, H., Sun, Y.-P., Cheng, Y.-L., Tian, H.-Q., Zhou, F.-S., Liu, H.-X., Lu, W.-S., He, S.-M., Du, W.-L., Shen, M., Jin, Q.-Y., Wang, Y., Low, H.-Q., Erwin, T., Yang, N.-H., Li, J.-Y., Zhao, X., Jiao, Y.-L., Mao, L.-G., Yin, G., Jiang, Z.-X., Wang, X.-D., Yu, J.-P., Hu, Z.-H., Gong, C.-H., Liu, Y.-Q., Liu, R.-Y., Wang, D.-M., Wei, D., Liu, J.-X., Cao, W.-K., Cao, H.-Z., Li, Y.-P., Yan, W.-G., Wei, S.-Y., Wang, K.-J., Hibberd, M.L., Yang, S., Zhang, X.-J. & Liu, J.-J. Genomewide Association Study of Leprosy. *The New England Journal of Medicine* **361**, 2609-2618 (2009).
6. Zhang, Y.M., Zhou, X.J., Cheng, F.J., Qi, Y.Y., Hou, P., Zhao, M.H. & Zhang, H. Autophagy-related gene LRRK2 is likely a susceptibility gene for systemic lupus erythematosus in

- northern Han Chinese. *Oncotarget* **8**, 13754-13761 (2017).
7. Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R. & Goedert, M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**, 839-840 (1997).
 8. Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M. & Goedert, M. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 6469-6473 (1998).
 9. Polymeropoulos, M.H., Higgins, J.J., Golbe, L.I., Johnson, W.G., Ide, S.E., Iorio, G., Sanges, G., Stenroos, E.S., Pho, L.T., Schaffer, A.A., Lazzarini, A.M., Nussbaum, R.L. & Duvoisin, R.C. Mapping of a Gene for Parkinson's Disease to Chromosome 4q21-q23. *Science* **274**, 1197-1199 (1996).
 10. Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Iorio, G., Golbe, L.I. & Nussbaum, R.L. Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science* **276**, 2045-2047 (1997).
 11. Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kösel, S., Przuntek, H., Epplen, J.T., Schöls, L. & Riess, O. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nature genetics* **18**, 106-108 (1998).
 12. Zarranz, J.J., Alegre, J., Gómez - Esteban, J.C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atarés, B., Llorens, V., Tortosa, E., del Ser, T., Muñoz, D.G. & de Yébenes, J.G. The new mutation, E46K, of α - synuclein causes parkinson and Lewy body dementia. *Annals of Neurology* **55**, 164-173 (2004).
 13. Appel - Cresswell, S., Vilarino - Guell, C., Encarnacion, M., Sherman, H., Yu, I., Shah, B., Weir, D., Thompson, C., Szu - Tu, C., Trinh, J., Aasly, J.O., Rajput, A., Rajput, A.H., Stoessl, A. & Farrer, M.J. Alpha - synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Movement Disorders* **28**, 811-813 (2013).
 14. Proukakis, C., Dudzik, C.G., Brier, T., MacKay, D.S., Cooper, J.M., Millhauser, G.L., Houlden, H. & Schapira, A.H. A novel α -synuclein missense mutation in Parkinson disease. *Neurology* **80**, 1062-1064 (2013).
 15. Lesage, S., Anheim, M., Letournel, F., Bousset, L., Honoré, A., Rozas, N., Pieri, L., Madiona, K., Dürr, A., Melki, R., Verny, C. & Brice, A. G51D α - synuclein mutation causes a novel Parkinsonian-pyramidal syndrome. *Annals of Neurology* **73**, 459-471 (2013).
 16. Singleton, A.B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., Lincoln, S., Crawley, A., Hanson, M., Maraganore, D., Adler, C., Cookson, M.R., Muentner, M., Baptista, M., Miller, D., Blancato, J., Hardy, J. & Gwinn-Hardy, K. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)* **302**, 841 (2003).

17. Ibáñez, P., Bonnet, A.M.M., Débarges, B., Lohmann, E., Tison, F., Pollak, P., Agid, Y., Dürr, A. & Brice, A. Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet (London, England)* **364**, 1169-1171 (2004).
18. Nishioka, K., Hayashi, S., Farrer, M.J., Singleton, A.B., Yoshino, H., Imai, H., Kitami, T., Sato, K., Kuroda, R., Tomiyama, H., Mizoguchi, K., Murata, M., Toda, T., Imoto, I., Inazawa, J., Mizuno, Y. & Hattori, N. Clinical heterogeneity of α - synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Annals of Neurology* **59**, 298-309 (2006).
19. Conway, K.A., Harper, J.D. & Lansbury, P.T. Accelerated in vitro fibril formation by a mutant α -synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nature Medicine* **4**, 1318-1320 (1998).
20. Zimprich, A., Benet-Pagès, A., Struhal, W., Graf, E., Eck, S.H., Offman, M.N., Haubenberger, D., Spielberger, S., Schulte, E.C., Lichtner, P., Rossle, S.C., Klopp, N., Wolf, E., Seppi, K., Pirker, W., Presslauer, S., Mollenhauer, B., Katzenschlager, R., Foki, T., Hotzy, C., Reinthaler, E., Harutyunyan, A., Kralovics, R., Peters, A., Zimprich, F., Brücke, T., Poewe, W., Auff, E., Trenkwalder, C., Rost, B., Ransmayr, G., Winkelmann, J., Meitinger, T. & Strom, T.M. A Mutation in VPS35, Encoding a Subunit of the Retromer Complex, Causes Late-Onset Parkinson Disease. *The American Journal of Human Genetics* **89**, 168-175 (2011).
21. Vilariño-Güell, C., Wider, C., Ross, O.A., Dachsel, J.C., Kachergus, J.M., Lincoln, S.J., Soto-Ortolaza, A.I., Cobb, S.A., Wilhoite, G.J., Bacon, J.A., Behrouz, B., Melrose, H.L., Hentati, E., Puschmann, A., Evans, D.M., Conibear, E., Wasserman, W.W., Aasly, J.O., Burkhard, P.R., Djaldetti, R., Ghika, J., Hentati, F., Krygowska-Wajs, A., Lynch, T., Melamed, E., Rajput, A., Rajput, A.H., Solida, A., Wu, R.-M., Uitti, R.J., Wszolek, Z.K., Vingerhoets, F. & Farrer, M.J. VPS35 Mutations in Parkinson Disease. *The American Journal of Human Genetics* **89**, 162-167 (2011).
22. Williams, E.T., Chen, X. & Moore, D.J. VPS35, the Retromer Complex and Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's Disease* **Preprint**, 1-15 (2017).
23. Funayama, M., Ohe, K., Amo, T., Furuya, N., Yamaguchi, J., Saiki, S., Li, Y., Ogaki, K., Ando, M., Yoshino, H., Tomiyama, H., Nishioka, K., Hasegawa, K., Saiki, H., Satake, W., Mogushi, K., Sasaki, R., Kokubo, Y., Kuzuhara, S., Toda, T., Mizuno, Y., Uchiyama, Y., Ohno, K. & Hattori, N. CHCHD2 mutations in autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study. *The Lancet. Neurology* **14** (2015).
24. Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y. & Shimizu, N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* **392**, 605-608 (1998).
25. Ferreira, M. & Massano, J. An updated review of Parkinson's disease genetics and clinicopathological correlations. *Acta Neurologica Scandinavica* **135**, 273-284 (2017).
26. Pramstaller, P.P., Schlossmacher, M.G., Jacques, T.S., Scaravilli, F., Eskelson, C., Pepivani,

- I., Hedrich, K., Adel, S., Gonzales - McNeal, M., Hilker, R., Kramer, P.L. & Klein, C. Lewy body Parkinson's disease in a large pedigree with 77 Parkin mutation carriers. *Annals of Neurology* **58**, 411-422 (2005).
27. Valente, E.M., Bentivoglio, A.R., Dixon, P.H., Ferraris, A., Ialongo, T., Frontali, M., Albanese, A. & Wood, N.W. Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36. *American journal of human genetics* **68**, 895-900 (2001).
 28. Valente, E.M., Abou-Sleiman, P.M., Caputo, V., Muqit, M.M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A.R., Healy, D.G., Albanese, A., Nussbaum, R., González-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W.P., Latchman, D.S., Harvey, R.J., Dallapiccola, B., Auburger, G. & Wood, N.W. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science (New York, N.Y.)* **304**, 1158-1160 (2004).
 29. Jin, S., Lazarou, M., Wang, C., Kane, L.A., Narendra, D.P. & Youle, R.J. Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *The Journal of Cell Biology* **191**, 933-942 (2010).
 30. Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., Kimura, Y., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Hirokawa, T., Endo, T., Fon, E.A., Trempe, J.-F., Saeki, Y., Tanaka, K. & Matsuda, N. Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature* **510**, 162-166 (2014).
 31. Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F.F. & Youle, R.J. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of cell biology* **183**, 795-803 (2008).
 32. Geisler, S., Holmström, K.M., Skujat, D., Fiesel, F.C., Rothfuss, O.C., Kahle, P.J. & Springer, W. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature cell biology* **12**, 119-131 (2010).
 33. Al - Din, A.S., Wriekat, A., Mubaidin, A., Dasouki, M. & Hiari, M. Pallido - pyramidal degeneration, supranuclear upgaze paresis and dementia: Kufor - Rakeb syndrome. *Acta Neurologica Scandinavica* **89**, 347-352 (1994).
 34. Ramirez, A., Heimbach, A., Gründemann, J., Stiller, B., Hampshire, D., Cid, P.L., Goebel, I., Mubaidin, A.F., Wriekat, A.-L., Roeper, J., Al-Din, A., Hillmer, A.M., Karsak, M., Liss, B., Woods, G.C., Behrens, M.I. & Kubisch, C. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nature Genetics* **38**, 1184-1191 (2006).
 35. Zabetian, C.P., Samii, A., Mosley, A.D., Roberts, J.W., Leis, B.C., Yearout, D., Raskind, W.H. & Griffith, A. A clinic-based study of the LRRK2 gene in Parkinson disease yields new mutations. *Neurology* **65**, 741-744 (2005).
 36. Aasly, J.O., Vilariño - Güell, C., Dachsel, J.C., Webber, P.J., West, A.B., Haugarvoll, K., Johansen, K.K., Toft, M., Nutt, J.G., Payami, H., Kachergus, J.M., Lincoln, S.J., Felic, A.,

- Wider, C., Soto - Ortolaza, A.I., Cobb, S.A., White, L.R., Ross, O.A. & Farrer, M.J. Novel pathogenic LRRK2 p.Asn1437His substitution in familial Parkinson's disease. *Movement Disorders* **25**, 2156-2163 (2010).
37. Fonzo, A., Rohé, C.F., Ferreira, J., Chien, H.F., Vacca, L., Stocchi, F., Guedes, L., Fabrizio, E., Manfredi, M., Vanacore, N., Goldwurm, S., Breedveld, G., Sampaio, C., Meco, G., Barbosa, E., Oostra, B.A., Bonifati, V. & the Network, I. A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. *The Lancet* **365**, 412-415 (2005).
38. Funayama, M., Hasegawa, K., Ohta, E., Kawashima, N., Komiyama, M., Kowa, H., Tsuji, S. & Obata, F. An LRRK2 mutation as a cause for the parkinsonism in the original PARK8 family. *Annals of Neurology* **57**, 918-921 (2005).
39. Ross, O.A., Toft, M., Whittle, A.J., Johnson, J.L., Papapetropoulos, S., Mash, D.C., Litvan, I., Gordon, M.F., Wszolek, Z.K., Farrer, M.J. & Dickson, D.W. Lrrk2 and Lewy body disease. *Annals of neurology* **59**, 388-393 (2006).
40. Hasegawa, K., Stoessl, A.J., Yokoyama, T., Kowa, H., Wszolek, Z.K. & Yagishita, S. Familial parkinsonism: study of original Sagami-hara PARK8 (I2020T) kindred with variable clinicopathologic outcomes. *Parkinsonism & related disorders* **15**, 300-306 (2009).
41. Khan, N.L., Jain, S., Lynch, J.M., Pavese, N., Abou-Sleiman, P., Holton, J.L., Healy, D.G., Gilks, W.P., Sweeney, M.G., Ganguly, M., Gibbons, V., Gandhi, S., Vaughan, J., Eunson, L.H., Katzenschlager, R., Gayton, J., Lennox, G., Revesz, T., Nicholl, D., Bhatia, K.P., Quinn, N., Brooks, D., Lees, A.J., Davis, M.B., Piccini, P., Singleton, A.B. & Wood, N.W. 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).
42. Chang, D., Nalls, M.A., Hallgrímsson, I.B., Hunkapiller, J., van der Brug, M., Cai, F., Consortium, I., Team, M., Kerchner, G.A., Ayalon, G., Bingol, B., Sheng, M., Hinds, D., Behrens, T.W., Singleton, A.B., Bhangale, T.R. & Graham, R.R. A meta-analysis of genome-wide association studies identifies 17 new Parkinson's disease risk loci. *Nature Genetics* **49**, 1511-1516 (2017).
43. Maraganore, D.M., de Andrade, M., Elbaz, A., Farrer, M.J., Ioannidis, J.P., Krüger, R., Rocca, W.A., Schneider, N.K., Lesnick, T.G., Lincoln, S.J., Hulihan, M.M., Aasly, J.O., Ashizawa, T., Chartier-Harlin, M.-C.C., Checkoway, H., Ferrarese, C., Hadjigeorgiou, G., Hattori, N., Kawakami, H., Lambert, J.-C.C., Lynch, T., Mellick, G.D., Papapetropoulos, S., Parsian, A., Quattrone, A., Riess, O., Tan, E.-K.K., Van Broeckhoven, C. & of Consortium, G. Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA* **296**, 661-670 (2006).
44. Cronin, K.D., Ge, D., Manninger, P., Linnertz, C., Rossoshek, A., Orrison, B.M., Bernard, D.J., El-Agnaf, O.M.A., Schlossmacher, M.G., Nussbaum, R.L. & Chiba-Falek, O. Expansion of the Parkinson disease-associated SNCA-Rep1 allele upregulates human

- alpha-synuclein in transgenic mouse brain. *Human molecular genetics* **18**, 3274-3285 (2009).
45. Satake, W., Nakabayashi, Y., Mizuta, I., Hirota, Y., Ito, C., Kubo, M., Kawaguchi, T., Tsunoda, T., Watanabe, M., Takeda, A., Tomiyama, H., Nakashima, K., Hasegawa, K., Obata, F., Yoshikawa, T., Kawakami, H., Sakoda, S., Yamamoto, M., Hattori, N., Murata, M., Nakamura, Y. & Toda, T. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nature Genetics* **41**, 1303-1307 (2009).
 46. Simón-Sánchez, J., Schulte, C., Bras, J.M., Sharma, M., Gibbs, R.J., Berg, D., Paisan-Ruiz, C., Lichtner, P., Scholz, S.W., Hernandez, D.G., Krüger, R., Federoff, M., Klein, C., Goate, A., Perlmutter, J., Bonin, M., Nalls, M.A., Illig, T., Gieger, C., Houlden, H., Steffens, M., Okun, M.S., Racette, B.A., Cookson, M.R., Foote, K.D., Fernandez, H.H., Traynor, B.J., Schreiber, S., Arepalli, S., Zonozi, R., Gwinn, K., van der Brug, M., Lopez, G., Chanock, S.J., Schatzkin, A., Park, Y., Hollenbeck, A., Gao, J., Huang, X., Wood, N.W., Lorenz, D., Deuschl, G., Chen, H., Riess, O., Hardy, J.A., Singleton, A.B. & Gasser, T. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nature Genetics* **41**, 1308-1312 (2009).
 47. Do, C.B., Tung, J.Y., Dorfman, E., Kiefer, A.K., Drabant, E.M., Francke, U., Mountain, J.L., Goldman, S.M., Tanner, C.M., Langston, J.W., Wojcicki, A. & Eriksson, N. Web-based genome-wide association study identifies two novel loci and a substantial genetic component for Parkinson's disease. *PLoS genetics* **7** (2011).
 48. Lill, C.M., Roehr, J.T., McQueen, M.B., Kavvoura, F.K., Bagade, S., Schjeide, B.-M.M., Schjeide, L.M., Meissner, E., Zauft, U., Allen, N.C., Liu, T., Schilling, M., Anderson, K.J., Beecham, G., Berg, D., Biernacka, J.M., Brice, A., DeStefano, A.L., Do, C.B., Eriksson, N., Factor, S.A., Farrer, M.J., Foroud, T., Gasser, T., Hamza, T., Hardy, J.A., Heutink, P., Hill-Burns, E.M., Klein, C., Latourelle, J.C., Maraganore, D.M., Martin, E.R., Martinez, M., Myers, R.H., Nalls, M.A., Pankratz, N., Payami, H., Satake, W., Scott, W.K., Sharma, M., Singleton, A.B., Stefansson, K., Toda, T., Tung, J.Y., Vance, J., Wood, N.W., Zabetian, C.P., of Consortium, a., Consortium, I., Consortium, P.s., Wellcome, Young, P., Tanzi, R.E., Khoury, M.J., Zipp, F., Lehrach, H., Ioannidis, J.P.A. & Bertram, L. Comprehensive Research Synopsis and Systematic Meta-Analyses in Parkinson's Disease Genetics: The PDGene Database. *PLoS Genetics* **8** (2012).
 49. Nalls, M.A., Plagnol, V., Hernandez, D.G., Sharma, M., Sheerin, U.-M., Saad, M., Simón-Sánchez, J., Schulte, C., Lesage, S., Sveinbjörnsdóttir, S., Stefánsson, K., Martinez, M., Hardy, J., Heutink, P., Brice, A., Gasser, T., Singleton, A.B. & Wood, N.W. Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *The Lancet* **377**, 641-649 (2011).
 50. Nalls, M.A., Pankratz, N., Lill, C.M., Do, C.B., Hernandez, D.G., Saad, M., DeStefano, A.L.,

- Kara, E., Bras, J., Sharma, M., Schulte, C., Keller, M.F., Arepalli, S., Letson, C., Edsall, C., Stefansson, H., Liu, X., Pliner, H., Lee, J.H., Cheng, R., International, Parkinson's, Me, GenePd, NeuroGenetics, of, H., Investigator, T., for, in, C., North, United, Consortium, G., Group, A., Ikram, A.M., Ioannidis, J.P.A., Hadjigeorgiou, G.M., Bis, J.C., Martinez, M., Perlmutter, J.S., Goate, A., Marder, K., Fiske, B., Sutherland, M., Xiromerisiou, G., Myers, R.H., Clark, L.N., Stefansson, K., Hardy, J.A., Heutink, P., Chen, H., Wood, N.W., Houlden, H., Payami, H., Brice, A., Scott, W.K., Gasser, T., Bertram, L., Eriksson, N., Foroud, T. & Singleton, A.B. Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nature Genetics* **46** (2014).
51. Do, C.B., Tung, J.Y., Dorfman, E., Kiefer, A.K., Drabant, E.M., Francke, U., Mountain, J.L., Goldman, S.M., Tanner, C.M., Langston, W.J., Wojcicki, A. & Eriksson, N. Web-Based Genome-Wide Association Study Identifies Two Novel Loci and a Substantial Genetic Component for Parkinson's Disease. *PLoS Genetics* **7** (2011).
52. Neudorfer, O., Giladi, N., Elstein, D., Abrahamov, A., Turezkite, T., Aghai, E., Reches, A., Bembi, B. & Zimran, A. Occurrence of Parkinson's syndrome in type 1 Gaucher disease. *QJM: An International Journal of Medicine* **89**, 691-694 (1996).
53. Machaczka, M., Rucinska, M., Skotnicki, A.B. & Jurczak, W. Parkinson's syndrome preceding clinical manifestation of Gaucher's disease. *American journal of hematology* **61**, 216-217 (1999).
54. Aharon-Peretz, J., Rosenbaum, H. & Gershoni-Baruch, R. Mutations in the Glucocerebrosidase Gene and Parkinson's Disease in Ashkenazi Jews. *The New England Journal of Medicine* **351**, 1972-1977 (2004).
55. Sidransky, E., Nalls, M.A., Aasly, J.O., Aharon-Peretz, J., Annesi, G., Barbosa, E.R., Bar-Shira, A., Berg, D., Bras, J., Brice, A., Chen, C.M., Clark, L.N., Condroyer, C., Marco, E.V.D., Dürr, A., Eblan, M.J., Fahn, S., Farrer, M.J., Fung, H.C., Gan-Or, Z., Gasser, T., Gershoni-Baruch, R., Giladi, N., Griffith, A., Gurevich, T., Januario, C., Kropp, P., Lang, A.E., Lee-Chen, G.J., Lesage, S., Marder, K., Mata, I.F., Mirelman, A., Mitsui, J., Mizuta, I., Nicoletti, G., Oliveira, C., Ottman, R., Orr-Urtreger, A., Pereira, L.V., Quattrone, A., Rogaeva, E., Rolfs, A., Rosenbaum, H., Rozenberg, R., Samii, A., Samaddar, T., Schulte, C., Sharma, M., Singleton, A., Spitz, M., Tan, E.K., Tayebi, N., Toda, T., Troiano, A.R., Tsuji, S., Wittstock, M., Wolfsberg, T.G., Wu, Y.R., Zabetian, C.P., Zhao, Y. & Ziegler, S.G. Multicenter Analysis of Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson's Disease. *The New England Journal of Medicine* **361** (2009).
56. MacLeod, D.A., Rhinn, H., Kuwahara, T., Zolin, A., Di Paolo, G., McCabe, B.D., Marder, K.S., Honig, L.S., Clark, L.N., Small, S.A. & Abeliovich, A. RAB7L1 interacts with LRRK2 to modify intraneuronal protein sorting and Parkinson's disease risk. *Neuron* **77**, 425-439 (2013).
57. Beilina, A., Rudenko, I.N., Kaganovich, A., Civiero, L., Chau, H., Kalia, S.K., Kalia, L.V.,

- Lobbestael, E., Chia, R., Ndukwe, K., Ding, J., Nalls, M.A., Consortium, I., Consortium, N., Olszewski, M., Hauser, D.N., Kumaran, R., Lozano, A.M., Baekelandt, V., Greene, L.E., Taymans, M.J., Greggio, E. & Cookson, M.R. 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* **111**, 2626-2631 (2014).
58. Kuwahara, T., Inoue, K., D'Agati, V.D., Fujimoto, T., Eguchi, T., Saha, S., Wolozin, B., Iwatsubo, T. & Abeliovich, A. LRRK2 and RAB7L1 coordinately regulate axonal morphology and lysosome integrity in diverse cellular contexts. *Scientific Reports* **6**, 29945 (2016).
59. Chen, Y., Zhao, Y., Kalaslavadi, T., Hamati, E., Nehrke, K., Le, A., Ann, D.K. & Wu, R. Genome-Wide Search and Identification of a Novel Gel-Forming Mucin MUC19/Muc19 in Glandular Tissues. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **30**, 155-165 (2004).
60. Umeno, J., Asano, K., Matsushita, T., Matsumoto, T., Kiyohara, Y., Iida, M., Nakamura, Y., Kamatani, N. & Kubo, M. Meta - analysis of published studies identified eight additional common susceptibility loci for Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases* **17**, 2407-2415 (2011).
61. Wang, D., Xu, L., Lv, L., Su, L.Y., Fan, Y., Zhang, D.F., Bi, R., Yu, D., Zhang, W., Li, X.A., Li, Y.Y. & Yao, Y.G. Association of the LRRK2 genetic polymorphisms with leprosy in Han Chinese from Southwest China. *Genes and Immunity* **16**, 112-119 (2015).
62. Liu, Z., Lee, J., Krummey, S., Lu, W., Cai, H. & Lenardo, M.J. The kinase LRRK2 is a regulator of the transcription factor NFAT that modulates the severity of inflammatory bowel disease. *Nature immunology* **12**, 1063-1070 (2011).
63. Marín, I. The Parkinson Disease Gene LRRK2: Evolutionary and Structural Insights. *Molecular Biology and Evolution* **23**, 2423-2433 (2006).
64. Marín, I., van Egmond, W.N. & van Haastert, P.J.M. The Roco protein family: a functional perspective. *The FASEB Journal* **22**, 3103-3110 (2008).
65. Ito, G., Okai, T., Fujino, G., Takeda, K., Ichijo, H., Katada, T. & Iwatsubo, T. GTP binding is essential to the protein kinase activity of LRRK2, a causative gene product for familial Parkinson's disease. *Biochemistry* **46**, 1380-1388 (2007).
66. Li, X., Tan, Y.C., Poulouse, S., Olanow, C.W., Huang, X.Y. & Yue, Z. Leucine - rich repeat kinase 2 (LRRK2)/PARK8 possesses GTPase activity that is altered in familial Parkinson's disease R1441C/G mutants. *Journal of Neurochemistry* **103** (2007).
67. Lewis, P.A., Greggio, E., Beilina, A., Jain, S., Baker, A. & Cookson, M.R. The R1441C mutation of LRRK2 disrupts GTP hydrolysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **357**, 668-671 (2007).
68. West, A.B., Moore, D.J., Biskup, S., Bugayenko, A., Smith, W.W., Ross, C.A., Dawson, V.L. & Dawson, T.M. 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**, 16842-16847 (2005).
69. West, A.B., Moore, D.J., Choi, C., Andrabi, S.A., Li, X., Dikeman, D., Biskup, S., Zhang, Z., Lim, K.-L., Dawson, V.L. & Dawson, T.M. Parkinson's disease-associated mutations in LRRK2 link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity. *Human Molecular Genetics* **16**, 223-232 (2007).
 70. Biskup, S., Moore, D.J., Rea, A., Lorenz-Deperieux, B., Coombes, C.E., Dawson, V.L., Dawson, T.M. & West, A.B. Dynamic and redundant regulation of LRRK2 and LRRK1 expression. *BMC Neuroscience* **8** (2007).
 71. Biskup, S., Moore, D.J., Celsi, F., Higashi, S., West, A.B., Andrabi, S.A., Kurkinen, K., Yu, S.-W.W., Savitt, J.M., Waldvogel, H.J., Faull, R.L., Emson, P.C., Torp, R., Ottersen, O.P., Dawson, T.M. & Dawson, V.L. Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain. *Annals of neurology* **60**, 557-569 (2006).
 72. Hatano, T., Kubo, S.-I., Imai, S., Maeda, M., Ishikawa, K., Mizuno, Y. & Hattori, N. Leucine-rich repeat kinase 2 associates with lipid rafts. *Human molecular genetics* **16**, 678-690 (2007).
 73. Henry, A.G., Aghamohammadzadeh, S., Samaroo, H., Chen, Y., Mou, K., Needle, E. & Hirst, W.D. Pathogenic LRRK2 mutations, through increased kinase activity, produce enlarged lysosomes with reduced degradative capacity and increase ATP13A2 expression. *Pathogenic LRRK2 mutations, through increased kinase activity, produce enlarged lysosomes with reduced degradative capacity and increase ATP13A2 expression* **24** (2015).
 74. Gardet, A., Benita, Y., Li, C., Sands, B.E., Ballester, I., Stevens, C., Korzenik, J.R., Rioux, J.D., Daly, M.J., Xavier, R.J. & Podolsky, D.K. LRRK2 Is Involved in the IFN- γ Response and Host Response to Pathogens. *The Journal of Immunology* **185**, 5577-5585 (2010).
 75. Maekawa, T., Kubo, M., Yokoyama, I., Ohta, E. & Obata, F. Age-dependent and cell-population-restricted LRRK2 expression in normal mouse spleen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **392** (2010).
 76. Berger, Z., Smith, K.A. & Lavoie, M.J. Membrane localization of LRRK2 is associated with increased formation of the highly active LRRK2 dimer and changes in its phosphorylation. *Biochemistry* **49** (2010).
 77. Schapansky, J., Nardozi, J.D., Felizia, F. & LaVoie, M.J. Membrane recruitment of endogenous LRRK2 precedes its potent regulation of autophagy. *Hum Mol Genet* **23**, 4201-4214 (2014).
 78. Alegre-Abarrategui, J., Christian, H., Lufino, M.M., Mutihac, R., Venda, L.L., Ansoorge, O. & Wade-Martins, R. LRRK2 regulates autophagic activity and localizes to specific membrane microdomains in a novel human genomic reporter cellular model. *Human molecular genetics* **18**, 4022-4034 (2009).
 79. Vitte, J., Traver, S., Maués De Paula, A., Lesage, S., Rovelli, G., Corti, O., Duyckaerts, C. & Brice, A. Leucine-rich repeat kinase 2 is associated with the endoplasmic reticulum in

- dopaminergic neurons and accumulates in the core of Lewy bodies in Parkinson disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **69**, 959-972 (2010).
80. Matta, S., Van Kolen, K., da Cunha, R., van den Bogaart, G., Mandemakers, W., Miskiewicz, K., De Bock, P.-J., Morais, V.A., Vilain, S., Haddad, D., Delbroek, L., Swerts, J., Chávez-Gutiérrez, L., Esposito, G., Daneels, G., Karran, E., Holt, M., Gevaert, K., Moechars, D.W., De Strooper, B. & Verstreken, P. LRRK2 Controls an EndoA Phosphorylation Cycle in Synaptic Endocytosis. *Neuron* **75**, 1008-1021 (2012).
 81. Martin, I., Kim, J., Lee, B., Kang, H., Xu, J.-C., Jia, H., Stankowski, J., Kim, M.-S., Zhong, J., Kumar, M., Andrabi, S.A., Xiong, Y., Dickson, D.W., Wszolek, Z.K., Pandey, A., Dawson, T.M. & Dawson, V.L. Ribosomal Protein s15 Phosphorylation Mediates LRRK2 Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *Cell* **157**, 472-485 (2014).
 82. Steger, M., Tonelli, F., Ito, G., Davies, P., Trost, M., Vetter, M., Wachter, S., Lorentzen, E., Duddy, G., Wilson, S., Baptista, M.A., Fiske, B.K., Fell, M.J., Morrow, J.A., Reith, A.D., Alessi, D.R. & Mann, M. Phosphoproteomics reveals that Parkinson's disease kinase LRRK2 regulates a subset of Rab GTPases. *eLife* **5** (2016).
 83. Tong, Y., Yamaguchi, H., Giaime, E., Boyle, S., Kopan, R., Kelleher, R.J. & Shen, J. 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**, 9879-9884 (2010).
 84. Tong, Y., Giaime, E., Yamaguchi, H., Ichimura, T., Liu, Y., Si, H., Cai, H., Bonventre, J.V. & Shen, J. Loss of leucine-rich repeat kinase 2 causes age-dependent bi-phasic alterations of the autophagy pathway. *Molecular neurodegeneration* **7**, 2 (2012).
 85. Herzig, M.C., Kolly, C., Persohn, E., Theil, D., Schweizer, T., Hafner, T., Stemmelen, C., Troxler, T.J., Schmid, P., Danner, S., Schnell, C.R., Mueller, M., Kinzel, B., Grevot, A., Bolognani, F., Stirn, M., Kuhn, R.R., Kaupmann, K., van der Putten, P.H., Rovelli, G. & Shimshek, D.R. LRRK2 protein levels are determined by kinase function and are crucial for kidney and lung homeostasis in mice. *Human molecular genetics* **20**, 4209-4223 (2011).
 86. MacLeod, D., Dowman, J., Hammond, R., Leete, T., Inoue, K. & Abeliovich, A. The Familial Parkinsonism Gene LRRK2 Regulates Neurite Process Morphology. *Neuron* **52**, 587-593 (2006).
 87. Dodson, M.W., Zhang, T., Jiang, C., Chen, S. & Guo, M. Roles of the Drosophila LRRK2 homolog in Rab7-dependent lysosomal positioning. *Human molecular genetics* **21**, 1350-1363 (2012).
 88. Hockey, L.N., Kilpatrick, B.S., Eden, E.R., Lin-Moshier, Y., Brailoiu, C.G., Brailoiu, E., Futter, C.E., Schapira, A.H., Marchant, J.S. & Patel, S. Dysregulation of lysosomal morphology by pathogenic LRRK2 is corrected by TPC2 inhibition. *Journal of Cell Science* **128**, 232-238 (2015).
 89. Plowey, E.D., Cherra, S.J., Liu, Y.J. & Chu, C.T. Role of autophagy in G2019S - LRRK2 -

- associated neurite shortening in differentiated SH - SY5Y cells. *Journal of Neurochemistry* **105**, 1048-1056 (2008).
90. Gómez-Suaga, P., Luzón-Toro, B., Churamani, D., Zhang, L., Bloor-Young, D., Patel, S., Woodman, P.G., Churchill, G.C. & Hilfiker, S. Leucine-rich repeat kinase 2 regulates autophagy through a calcium-dependent pathway involving NAADP. *Human Molecular Genetics* **21**, 511-525 (2012).
 91. Orenstein, S.J., Kuo, S.H., Tasset, I., Arias, E., Koga, H., Fernandez-Carasa, I., Cortes, E., Honig, L.S., Dauer, W., Consiglio, A., Raya, A., Sulzer, D. & Cuervo, A.M. Interplay of LRRK2 with chaperone-mediated autophagy. *Nature neuroscience* **16**, 394-406 (2013).
 92. Kanao, T., Venderova, K., Park, D.S., Unterman, T., Lu, B. & Imai, Y. Activation of FoxO by LRRK2 induces expression of proapoptotic proteins and alters survival of postmitotic dopaminergic neuron in Drosophila. *Human Molecular Genetics* **19**, 3747-3758 (2010).
 93. Imai, Y., Gehrke, S., Wang, H.Q., Takahashi, R., Hasegawa, K., Oota, E. & Lu, B. Phosphorylation of 4E - BP by LRRK2 affects the maintenance of dopaminergic neurons in Drosophila. *The EMBO Journal* **27**, 2432-2443 (2008).
 94. Ho, C., Rideout, H.J., Ribe, E., Troy, C.M. & Dauer, W.T. The Parkinson Disease Protein Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Transduces Death Signals via Fas-Associated Protein with Death Domain and Caspase-8 in a Cellular Model of Neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience* **29**, 1011-1016 (2009).
 95. Xu, H. & Ren, D. Lysosomal physiology. *Annual review of physiology* **77**, 57-80 (2015).
 96. Huotari, J. & Helenius, A. Endosome maturation. *The EMBO journal* **30**, 3481-3500 (2011).
 97. Yamaguchi, H., Arakawa, S., Kanaseki, T., Miyatsuka, T., Fujitani, Y., Watada, H., Tsujimoto, Y. & Shimizu, S. Golgi membrane - associated degradation pathway in yeast and mammals. *The EMBO Journal* **35**, 1991-2007 (2016).
 98. Mizushima, N., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Cell and Developmental Biology* **27**, 107-132 (2011).
 99. Oku, M., Maeda, Y., Kagohashi, Y., Kondo, T., Yamada, M., Fujimoto, T. & Sakai, Y. Evidence for ESCRT⁺ and clathrin-dependent microautophagy. *J Cell Biol* **216** (2017).
 100. Cuervo, A.M. & Wong, E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell research* **24**, 92-104 (2014).
 101. Maejima, I., Takahashi, A., Omori, H., Kimura, T., Takabatake, Y., Saitoh, T., Yamamoto, A., Hamasaki, M., Noda, T., Isaka, Y. & Yoshimori, T. Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. *The EMBO journal* **32**, 2336-2347 (2013).
 102. Manjithaya, R., Anjard, C., Loomis, W.F. & Subramani, S. Unconventional secretion of *Pichia pastoris* Acb1 is dependent on GRASP protein, peroxisomal functions, and autophagosome formation. *The Journal of Cell Biology* **188** (2010).
 103. Duran, J.M., Anjard, C., Stefan, C., Loomis, W.F. & Malhotra, V. Unconventional secretion

- of Acb1 is mediated by autophagosomes. *The Journal of Cell Biology* **188** (2010).
104. Dupont, N., Jiang, S., Pilli, M., Ornatowski, W., Bhattacharya, D. & Deretic, V. Autophagy - based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL - 1 β . *The EMBO Journal* **30** (2011).
 105. Bel, S., Pendse, M., Wang, Y., Li, Y., Ruhn, K.A., Hassell, B., Leal, T., Winter, S.E., Xavier, R.J. & Hooper, L.V. Paneth cells secrete lysozyme via secretory autophagy during bacterial infection of the intestine. *Science* **357**, 1047-1052 (2017).
 106. Kimura, T., Jia, J., Kumar, S., Choi, S., Gu, Y., Mudd, M., Dupont, N., Jiang, S., Peters, R., Farzam, F., Jain, A., Lidke, K.A., Adams, C.M., Johansen, T. & Deretic, V. Dedicated SNAREs and specialized TRIM cargo receptors mediate secretory autophagy. *The EMBO Journal* **36**, 42-60 (2017).
 107. Sanjuan, M.A., Dillon, C.P., Tait, S.W.G., Moshiah, S., Dorsey, F., Connell, S., Komatsu, M., Tanaka, K., Cleveland, J.L., Withoff, S. & Green, D.R. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* **450**, 1253-1257 (2007).
 108. Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., Hamada, S. & Yoshimori, T. Autophagy Defends Cells Against Invading Group A Streptococcus. *Science* **306**, 1037-1040 (2004).
 109. Galluzzi, L., Baehrecke, E.H., Ballabio, A., Boya, P., Pedro, J., Cecconi, F., Choi, A.M., Chu, C.T., Codogno, P., Colombo, M., Cuervo, A., Debnath, J., Deretic, V., Dikic, I., Eskelinen, E.L., Fimia, G., Fulda, S., Gewirtz, D.A., Green, D.R., Hansen, M., Harper, W.J., Jäättelä, M., Johansen, T., Juhasz, G., Kimmelman, A.C., Kraft, C., Ktistakis, N.T., Kumar, S., Levine, B., Lopez - Otin, C., Madeo, F., Martens, S., Martinez, J., Melendez, A., Mizushima, N., Münz, C., Murphy, L.O., Penninger, J.M., Piacentini, M., Reggiori, F., Rubinsztein, D.C., Ryan, K.M., Santambrogio, L., Scorrano, L., Simon, A., Simon, H.U., Simonsen, A., Tavernarakis, N., Tooze, S.A., Yoshimori, T., Yuan, J., Yue, Z., Zhong, Q. & Kroemer, G. Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal* **36**, 1811-1836 (2017).
 110. Martinez, J., Malireddi, R.K., Lu, Q., Cunha, L.D., Pelletier, S., Gingras, S., Orchard, R., Guan, J.-L.L., Tan, H., Peng, J., Kanneganti, T.-D.D., Virgin, H.W. & Green, D.R. Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. *Nature cell biology* **17**, 893-906 (2015).
 111. Martinez, J., Almendinger, J., Oberst, A., Ness, R., Dillon, C.P., Fitzgerald, P., Hengartner, M.O. & Green, D.R. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 17396-17401 (2011).
 112. Martinez, J., Cunha, L.D., Park, S., Yang, M., Lu, Q., Orchard, R., Li, Q.-Z.Z., Yan, M., Janke, L., Guy, C., Linkermann, A., Virgin, H.W. & Green, D.R. Noncanonical autophagy inhibits the autoinflammatory, lupus-like response to dying cells. *Nature* **533**, 115-119

- (2016).
113. Florey, O., Gammoh, N., Kim, S.E., Jiang, X. & Overholtzer, M. V-ATPase and osmotic imbalances activate endolysosomal LC3 lipidation. *Autophagy* **11**, 88-99 (2015).
 114. Jacquin, E., Leclerc-Mercier, S., Judon, C., Blanchard, E., Fraitag, S. & Florey, O. Pharmacological modulators of autophagy activate a parallel noncanonical pathway driving unconventional LC3 lipidation. *Autophagy* (2017).
 115. Reddy, A., Caler, E.V. & Andrews, N.W. Plasma Membrane Repair Is Mediated by Ca²⁺-Regulated Exocytosis of Lysosomes. *Cell* **106**, 157-169 (2001).
 116. Dou, Y., Wu, H.-j., Li, H.-q., Qin, S., Wang, Y.-e., Li, J., Lou, H.-f., Chen, Z., Li, X.-m., Luo, Q.-m. & Duan, S. Microglial migration mediated by ATP-induced ATP release from lysosomes. *Cell Research* **22**, 1022-1033 (2012).
 117. Arantes, R.M.E. & Andrews, N.W. A Role for Synaptotagmin VII-Regulated Exocytosis of Lysosomes in Neurite Outgrowth from Primary Sympathetic Neurons. *The Journal of Neuroscience* **26**, 4630-4637 (2006).
 118. Czibener, C., Sherer, N.M., Becker, S.M., Pypaert, M., Hui, E., Chapman, E.R., Mothes, W. & Andrews, N.W. Ca²⁺ and synaptotagmin VII-dependent delivery of lysosomal membrane to nascent phagosomes. *The Journal of Cell Biology* **174**, 997-1007 (2006).
 119. Encarnação, M., Espada, L., Escrevente, C., Mateus, D., Ramalho, J., Michelet, X., Santarino, I., Hsu, V.W., Brenner, M.B., Barral, D. & Vieira, O.V.V. A Rab3a-dependent complex essential for lysosome positioning and plasma membrane repair. *The Journal of cell biology* **213**, 631-640 (2016).
 120. Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D.L., Valenza, M., Gennarino, V.A., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R.S., Banfi, S., Parenti, G., Cattaneo, E. & Ballabio, A. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science (New York, N.Y.)* **325**, 473-477 (2009).
 121. Rocznik-Ferguson, A., Petit, C.S., Froehlich, F., Qian, S., Ky, J., Angarola, B., Walther, T.C. & Ferguson, S.M. The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis. *Science signaling* **5** (2012).
 122. Li, Y., Xu, M., Ding, X., Yan, C., Song, Z., Chen, L., Huang, X., Wang, X., Jian, Y., Tang, G., Tang, C., Di, Y., Mu, S., Liu, X., Liu, K., Li, T., Wang, Y., Miao, L., Guo, W., Hao, X. & Yang, C. Protein kinase C controls lysosome biogenesis independently of mTORC1. *Nature cell biology* **18**, 1065-1077 (2016).
 123. Medina, D.L., Fraldi, A., Bouche, V., Annunziata, F., Mansueto, G., Spampanato, C., Puri, C., Pignata, A., Martina, J.A., Sardiello, M., Palmieri, M., Polishchuk, R., Puertollano, R. & Ballabio, A. Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular clearance. *Developmental cell* **21** (2011).
 124. Spampanato, C., Feeney, E., Li, L., Cardone, M., Lim, J.A., Annunziata, F., Zare, H., Polishchuk, R., Puertollano, R., Parenti, G., Ballabio, A. & Raben, N. Transcription factor

- EB (TFEB) is a new therapeutic target for Pompe disease. *EMBO Molecular Medicine* **5**, 691-706 (2013).
125. Cao, Q., Zhong, X., Zou, Y., Zhang, Z., Toro, L. & Dong, X.-P. BK Channels Alleviate Lysosomal Storage Diseases by Providing Positive Feedback Regulation of Lysosomal Ca²⁺ Release. *Developmental Cell* **33**, 427-441 (2015).
126. Itoh, T., Kanno, E., Uemura, T., Waguri, S. & Fukuda, M. OATL1, a novel autophagosome-resident Rab33B-GAP, regulates autophagosomal maturation. *The Journal of Cell Biology* **192**, 839-853 (2011).
127. de Duve, C., de Barsey, T., Poole, B., Trouet, A., Tulkens, P. & Hoof, V.F. Commentary. Lysosomotropic agents. *Biochemical pharmacology* **23**, 2495-2531 (1974).
128. Reeves, E.P., Lu, H., Jacobs, H., Messina, C.G.M., Bolsover, S., Gabella, G., Potma, E.O., Warley, A., Roes, J. & Segal, A.W. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature* **416** (2002).
129. Ito, G., Katsemonova, K., Tonelli, F., Lis, P., Baptista, M.A., Shpiro, N., Duddy, G., Wilson, S., Ho, P.W., Ho, S.-L.L., Reith, A.D. & Alessi, D.R. Phos-tag analysis of Rab10 phosphorylation by LRRK2: a powerful assay for assessing kinase function and inhibitors. *The Biochemical journal* **473**, 2671-2685 (2016).
130. Klöpffer, T.H., Kienle, N., Fasshauer, D. & Munro, S. Untangling the evolution of Rab G proteins: implications of a comprehensive genomic analysis. *BMC Biology* **10**, 1-17 (2012).
131. Dzamko, N., Deak, M., Hentati, F., Reith, A.D., Prescott, A.R., Alessi, D.R. & Nichols, J.R. Inhibition of LRRK2 kinase activity leads to dephosphorylation of Ser910/Ser935, disruption of 14-3-3 binding and altered cytoplasmic localization. *Biochemical Journal* **430**, 405-413 (2010).
132. Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Takiyama, K. & Koike, T. Phosphate-binding Tag, a New Tool to Visualize Phosphorylated Proteins. *Molecular & Cellular Proteomics* **5**, 749-757 (2006).
133. 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2017).
134. Sato, T., Iwano, T., Kunii, M., Matsuda, S., Mizuguchi, R., Jung, Y., Hagiwara, H., Yoshihara, Y., Yuzaki, M., Harada, R. & Harada, A. Rab8a and Rab8b are essential for several apical transport pathways but insufficient for ciliogenesis. *Journal of Cell Science* **127**, 422-431 (2014).
135. Boya, P., Gonzalez-Polo, R.-A., Poncet, D., Andraeu, K., Vieira, H.L.A., Roumier, T., Perfettini, J.-L. & Kroemer, G. Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. *Oncogene* **22**, 3927-3936 (2003).
136. Aits, S., Krickler, J., Liu, B., Ellegaard, A.-M., Hämälistö, S., Tvingsholm, S., Corcelle-

- Termeau, E., Høgh, S., Farkas, T., Jonassen, A., Gromova, I., Mortensen, M. & Jäättelä, M. Sensitive detection of lysosomal membrane permeabilization by lysosomal galectin puncta assay. *Autophagy* **11**, 1408-1424 (2015).
137. Paz, I., Sachse, M., Dupont, N., Mounier, J., Cederfur, C., Enninga, J., Leffler, H., Poirier, F., Prevost, M.C., Lafont, F. & Sansonetti, P. Galectin - 3, a marker for vacuole lysis by invasive pathogens. *Cellular Microbiology* **12**, 530-544 (2010).
138. Levin, R.S., Hertz, N.T., Burlingame, A.L., Shokat, K.M. & Mukherjee, S. Innate immunity kinase TAK1 phosphorylates Rab1 on a hotspot for posttranslational modifications by host and pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113** (2016).
139. Shinde, S. & Maddika, S. PTEN modulates EGFR late endocytic trafficking and degradation by dephosphorylating Rab7. *Nature Communications* **7** (2016).
140. Ali, B.R., Wasmeier, C., Lamoreux, L., Strom, M. & Seabra, M.C. Multiple regions contribute to membrane targeting of Rab GTPases. *Journal of Cell Science* **117**, 6401-6412 (2004).
141. Blümer, J., Rey, J., Dehmelt, L., Mazel, T., Wu, Y.-W., Bastiaens, P., Goody, R.S. & Itzen, A. RabGEFs are a major determinant for specific Rab membrane targeting. *The Journal of Cell Biology* **200**, 287-300 (2013).
142. Tarafder, A.K., Wasmeier, C., Figueiredo, A.C., Booth, A.E.G., Orihara, A., Ramalho, J.S., Hume, A.N. & Seabra, M.C. Rab27a Targeting to Melanosomes Requires Nucleotide Exchange but Not Effector Binding. *Traffic* **12**, 1056-1066 (2011).
143. Carroll, K.S., Hanna, J., Simon, I., Krise, J., Barbero, P. & Pfeffer, S.R. Role of Rab9 GTPase in Facilitating Receptor Recruitment by TIP47. *Science* **292**, 1373-1376 (2001).
144. Wang, S., Ma, Z., Xu, X., Wang, Z., Sun, L., Zhou, Y., Lin, X., Hong, W. & Wang, T. A Role of Rab29 in the Integrity of the Trans-Golgi Network and Retrograde Trafficking of Mannose-6-Phosphate Receptor. *PLoS ONE* **9** (2014).
145. Sato, T., Mushiaki, S., Kato, Y., Sato, K., Sato, M., Takeda, N., Ozono, K., Miki, K., Kubo, Y., Tsuji, A., Harada, R. & Harada, A. The Rab8 GTPase regulates apical protein localization in intestinal cells. *Nature* **448**, 366-369 (2007).
146. Kanerva, K., Uronen, R.-L., Blom, T., Li, S., Bittman, R., Lappalainen, P., Peränen, J., Raposo, G. & Ikonen, E. LDL Cholesterol Recycles to the Plasma Membrane via a Rab8a-Myosin5b-Actin-Dependent Membrane Transport Route. *Developmental Cell* **27**, 249-262 (2013).
147. Khandelwal, P., Prakasam, S.H., Clayton, D.R., Ruiz, W.G., Gallo, L.I., van Roekel, D., Lukianov, S., Peränen, J., Goldenring, J.R. & Apodaca, G. A Rab11a-Rab8a-Myo5B network promotes stretch-regulated exocytosis in bladder umbrella cells. *Molecular Biology of the Cell* **24**, 1007-1019 (2013).
148. Sun, Y., Chiu, T.T., Foley, K.P., Bilan, P.J. & Klip, A. Myosin Va mediates Rab8A-regulated GLUT4 vesicle exocytosis in insulin-stimulated muscle cells. *Molecular Biology of the Cell*

- 25**, 1159-1170 (2014).
149. Nakajo, A., Yoshimura, S.-i., Togawa, H., Kunii, M., Iwano, T., Izumi, A., Noguchi, Y., Watanabe, A., Goto, A., Sato, T. & Harada, A. EHBP1L1 coordinates Rab8 and Bin1 to regulate apical-directed transport in polarized epithelial cells. *The Journal of Cell Biology* **212**, 297-306 (2016).
 150. Bruno, J., Brumfield, A., Chaudhary, N., Iaea, D. & McGraw, T.E. SEC16A is a RAB10 effector required for insulin-stimulated GLUT4 trafficking in adipocytes. *The Journal of Cell Biology* **214**, 61-76 (2016).
 151. Helip-Wooley, A. & Thoene, J.G. Sucrose-induced vacuolation results in increased expression of cholesterol biosynthesis and lysosomal genes. *Experimental Cell Research* **292**, 89-100 (2004).
 152. Lazarou, M., Jin, S., Kane, L.A. & Youle, R.J. Role of PINK1 Binding to the TOM Complex and Alternate Intracellular Membranes in Recruitment and Activation of the E3 Ligase Parkin. *Developmental Cell* **22**, 320-333 (2012).
 153. Goold, R., McKinnon, C., Rabbanian, S., Collinge, J., Schiavo, G. & Tabrizi, S. The LIR motif – crucial for selective autophagy. *Journal of Cell Science* **126**, 3237-3247 (2013).
 154. Pankiv, S., Alemu, E.A., Brech, A., Bruun, J.-A., Lamark, T., Øvervatn, A., Bjørkøy, G. & Johansen, T. FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *The Journal of Cell Biology* **188**, 253-269 (2010).
 155. Sasai, M., Sakaguchi, N., Ma, J., Nakamura, S., Kawabata, T., Bando, H., Lee, Y., Saitoh, T., Akira, S., Iwasaki, A., Standley, D.M., Yoshimori, T. & Yamamoto, M. Essential role for GABARAP autophagy proteins in interferon-inducible GTPase-mediated host defense. *Nature Immunology* **18** (2017).
 156. Nielsen, R., Christensen, E.I. & Birn, H. Megalin and cubilin in proximal tubule protein reabsorption: from experimental models to human disease. *Kidney international* **89**, 58-67 (2016).
 157. Kuwahara, S., Hosojima, M., Kaneko, R., Aoki, H., Nakano, D., Sasagawa, T., Kabasawa, H., Kaseda, R., Yasukawa, R., Ishikawa, T., Suzuki, A., Sato, H., Kageyama, S., Tanaka, T., Kitamura, N., Narita, I., Komatsu, M., Nishiyama, A. & Saito, A. Megalin-Mediated Tubuloglomerular Alterations in High-Fat Diet-Induced Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* **27**, 1996-2008 (2015).
 158. Cuervo, A. & Dice, J.F. When lysosomes get old☆. *Experimental Gerontology* **35**, 119-131 (2000).
 159. Brunk, U.T. & Terman, A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *European journal of biochemistry / FEBS* **269**, 1996-2002 (2002).

遺伝子	機能	遺伝様式	Lewy小体
<i>SNCA</i>	不明	常染色体優性	出現する
<i>LRRK2</i>	セリン/スレオニンキナーゼ	常染色体優性	出現する
<i>VPS35</i>	レトロマーサブユニット	常染色体優性	剖検例無し
<i>CHCHD2</i>	ミトコンドリアタンパク質	常染色体優性	剖検例無し
<i>PINK1</i>	ミトコンドリアセリン/スレオニンキナーゼ	常染色体劣性	出現しない
<i>parkin</i>	E3ユビキチンリガーゼ	常染色体劣性	出現しない
<i>DJ-1</i>	不明	常染色体劣性	剖検例無し
<i>ATP13A2</i>	リソソーム膜タンパク質	常染色体劣性	剖検例無し

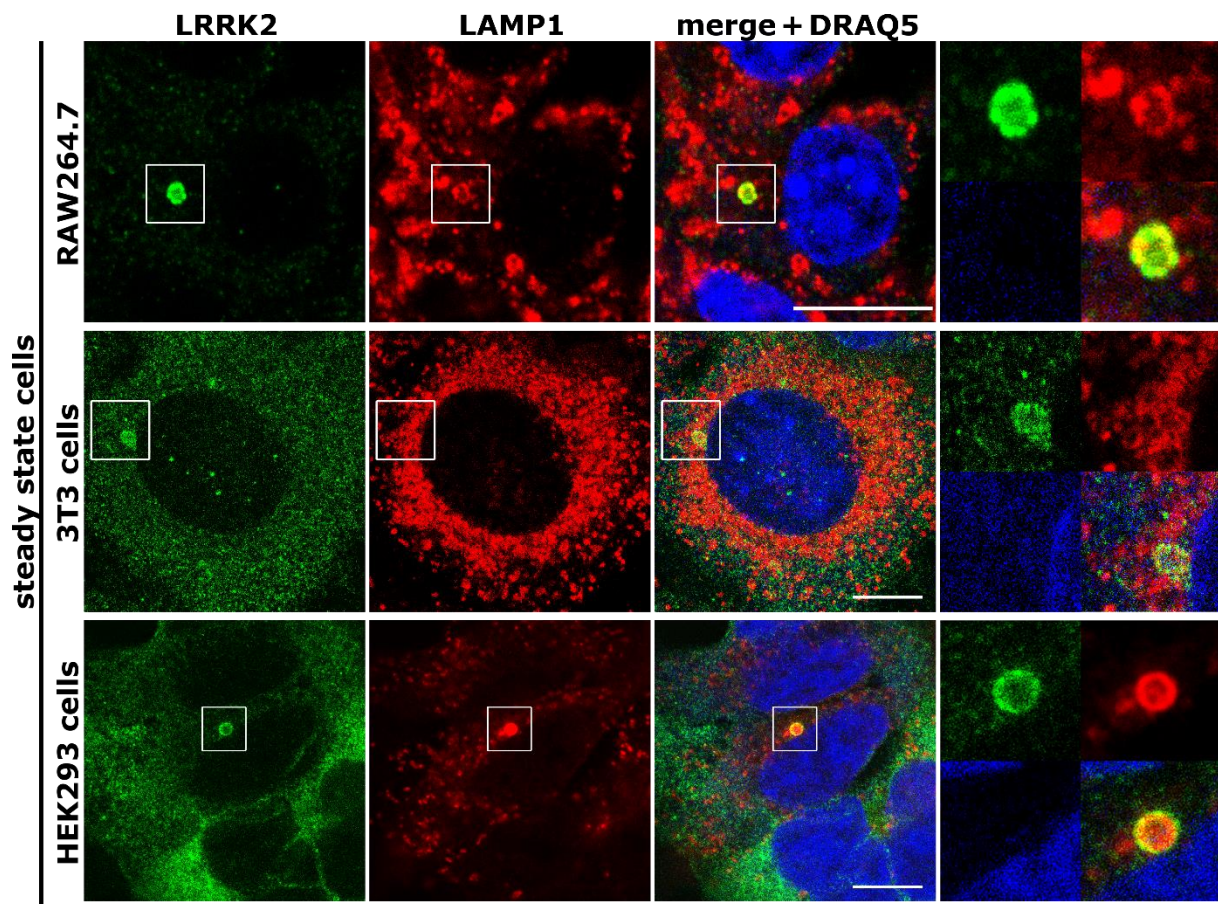
図表 2 家族性パーキンソン病の原因遺伝子

これまでに同定されている家族性パーキンソン病原因遺伝子のうち、代表的なものを列挙した。

抗原	メーカー	クローン	使用実験及び希釈倍率
FLAG	Sigma Aldrich	M2	ICC 1:500
LRRK2	abcam	MJFF2 (c41-2)	ICC 1:250、WB 1:1000
LRRK2	Neuromab	N138/6	ICC 1:125
LRRK2	MRC PPU	UDD3	ICC 1:250
pLRRK2 (pSer935)	abcam	UDD2 10(12)	WB: 1:1000
Rab8a	abcam	ERP14873	ICC 1:500、WB 1:1000
Rab10	CST	D36C4	ICC 1:250、WB 1:1000
pRab10	※	Rabbit pAb	WB 1:1000
LAMP1	Bio-Rad	1D4B	ICC 1:1000、WB 1:1000
LAMP1	CST	D2D11	ICC 1:250
TGN46	Serotec	AHP500GT (Sheep pAb)	ICC 1:250
CathepsinD	abcam	ERP3057Y	WB 1:1000
p62	Abnova	2C11	ICC 1:250
Galectin-3	BioLegend	M3/38	ICC 1:500
LC3	MBL	4E12	ICC 1:50
LC3	CST	D3U4C	WB 1:1000

図表 3 本研究において使用した 1 次抗体

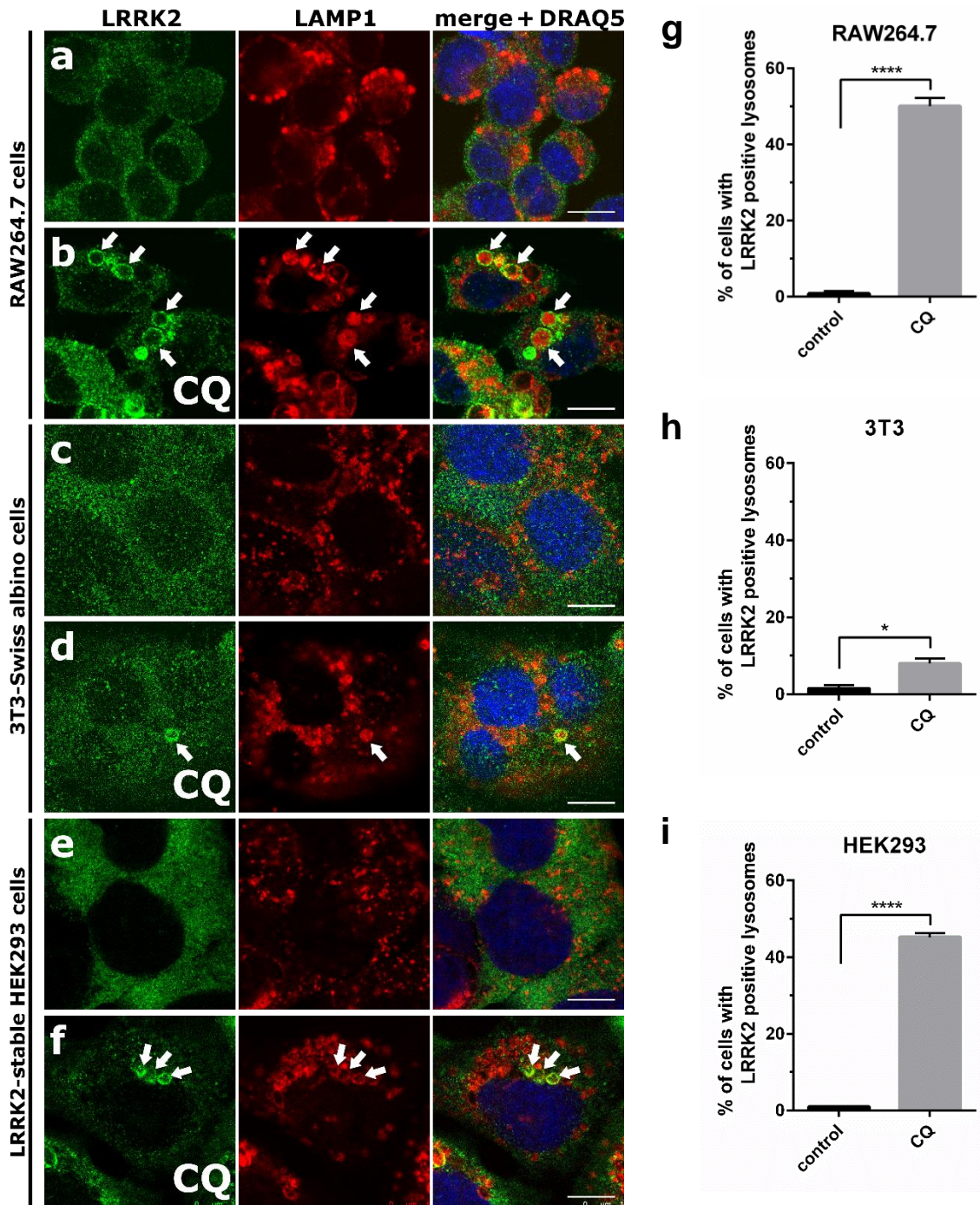
本研究で実験に使用した 1 次抗体をリスト化した。ICC: 免疫細胞化学、WB: イムノブロッティング、※: 東京大学薬学系研究科機能病態教室より供与。



図表 4 定常状態の細胞において LRRK2 は肥大化したリソソームに局在する

RAW264.7 細胞(上段)、3T3-Swiss albino 細胞(中段)、3×FLAG LRRK2 stable HEK293 細胞(下段)における LRRK2 の細胞内局在。細胞は 4% PFA で固定後 100% EtOH 処理を行い染色した。RAW264.7 細胞、3T3-Swiss albino 細胞においては内因性 LRRK2 を anti-LRRK2 (MJFF2 c41-2)抗体で、3×FLAG LRRK2 stable HEK293 細胞においては過剰発現 LRRK2 を anti-FLAG (M2)抗体で染色した。白枠の領域を拡大し、右列に示した。

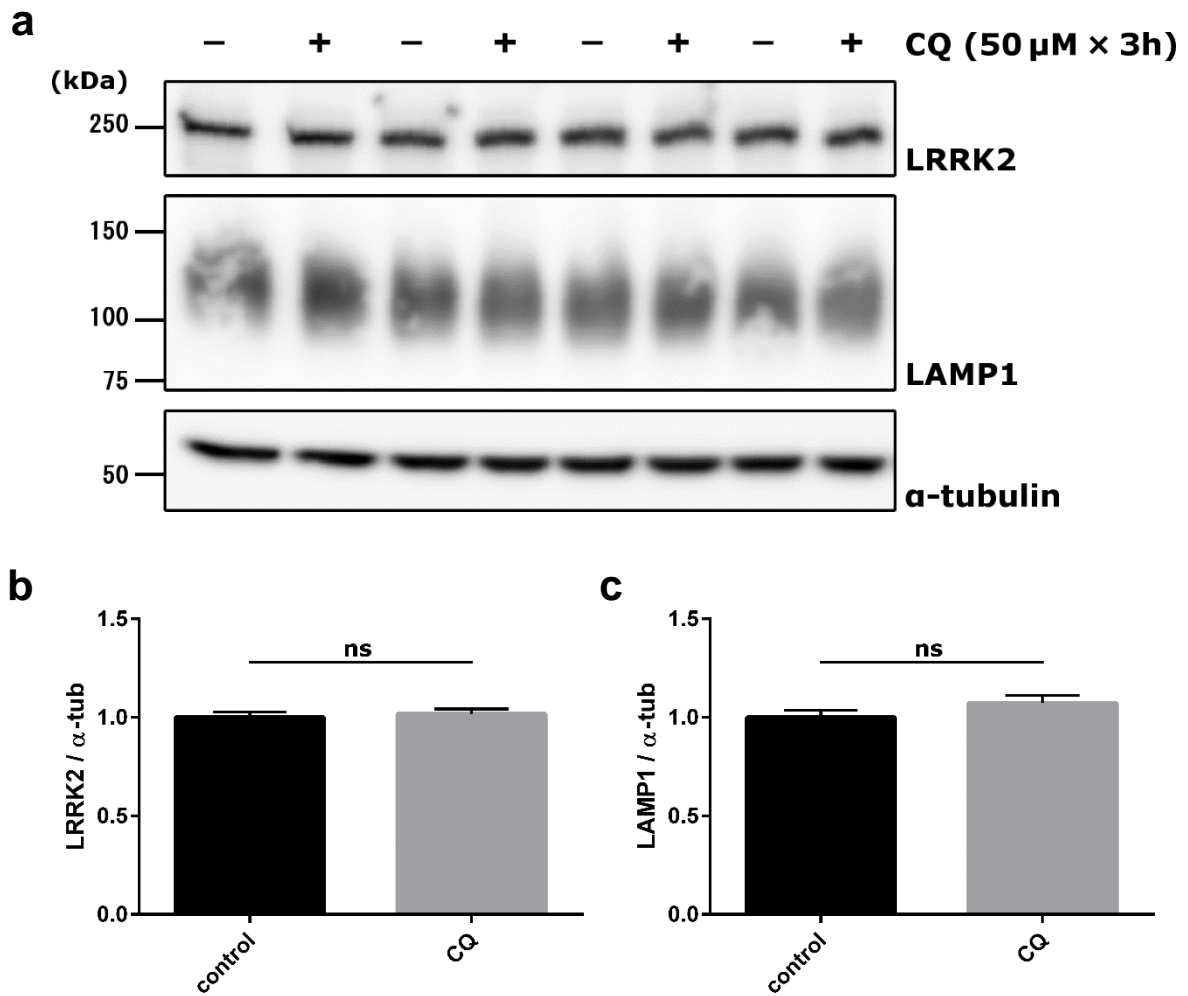
スケールバー: 10 μm。



図表 5 LRRK2 は CQ 処理により肥大化したリソソームに局在する

(a-f) RAW264.7 細胞(a, b)、3T3-Swiss albino 細胞(c, d)、3×FLAG LRRK2 stable HEK293 細胞(e, f)における LRRK2 の細胞内局在を解析した。定常状態ではほとんどの細胞で LRRK2 は細胞質に局在したが(a, c, e)、クロロキン処理を行うとリソソームが肥大化しその一部に LRRK2 が局在した(b, d, f)。スケールバー: 10 μm、矢印: LRRK2 陽性肥大化リソソーム。

(g, h, i) 各細胞における LRRK2 陽性リソソームを持つ細胞の割合を定量した。mean ± SEM, n = 3, * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$, t test, 各実験の各条件において 100 細胞以上(RAW264.7 細胞: 152-291 cells, 3T3-Swiss albino 細胞: 101-194 cells, HEK293 細胞: 220-261 cells)を解析した。

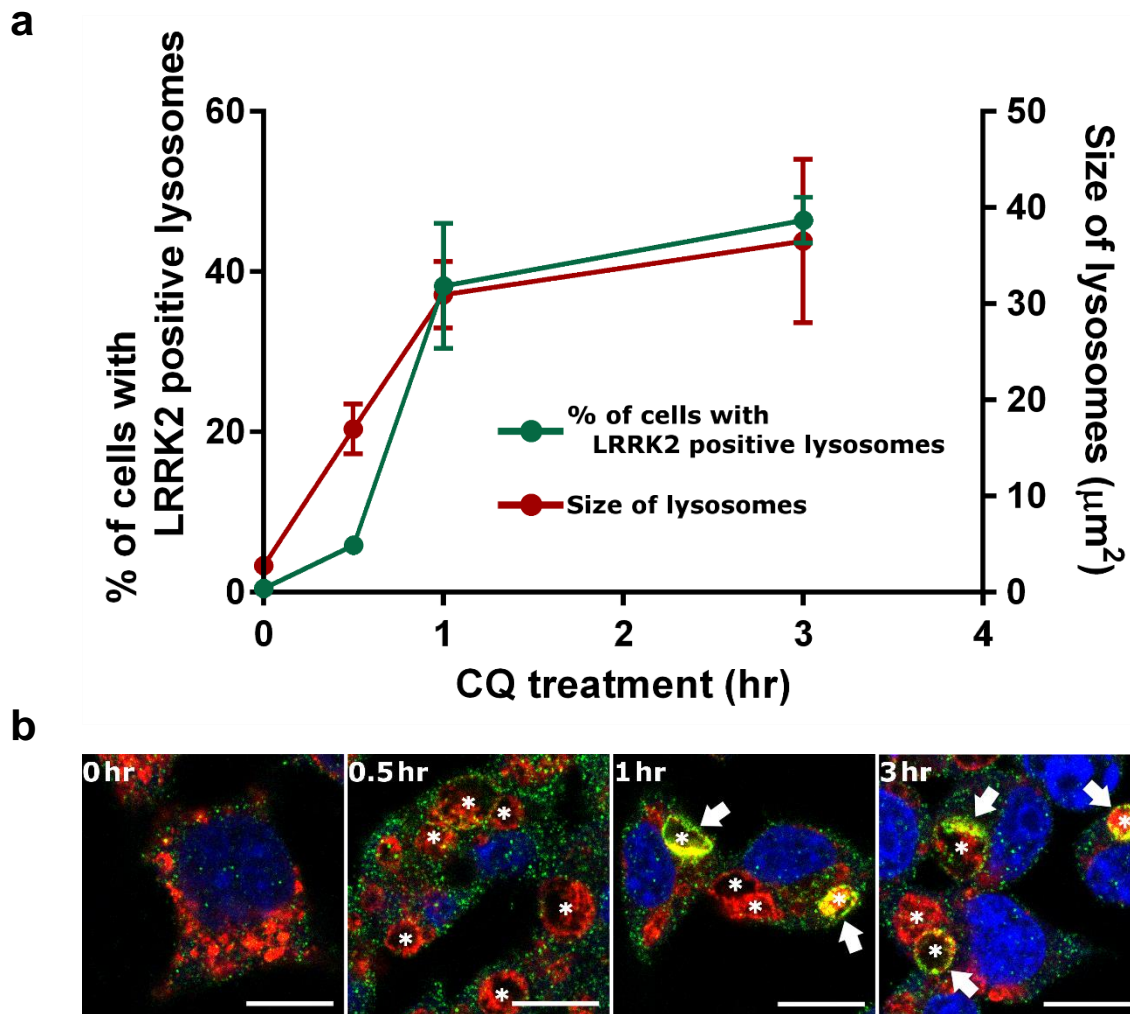


図表 6 CQ 処理は LRRK2 量を変化させない

(a) CQ 処理を行った RAW264.7 細胞における LRRK2、LAMP1、 α -tubulin タンパク量を WB で解析した。

(b) α -tubulin で規格化した LRRK2 タンパク量。mean \pm SD, n = 4, ns: not significant, t test.

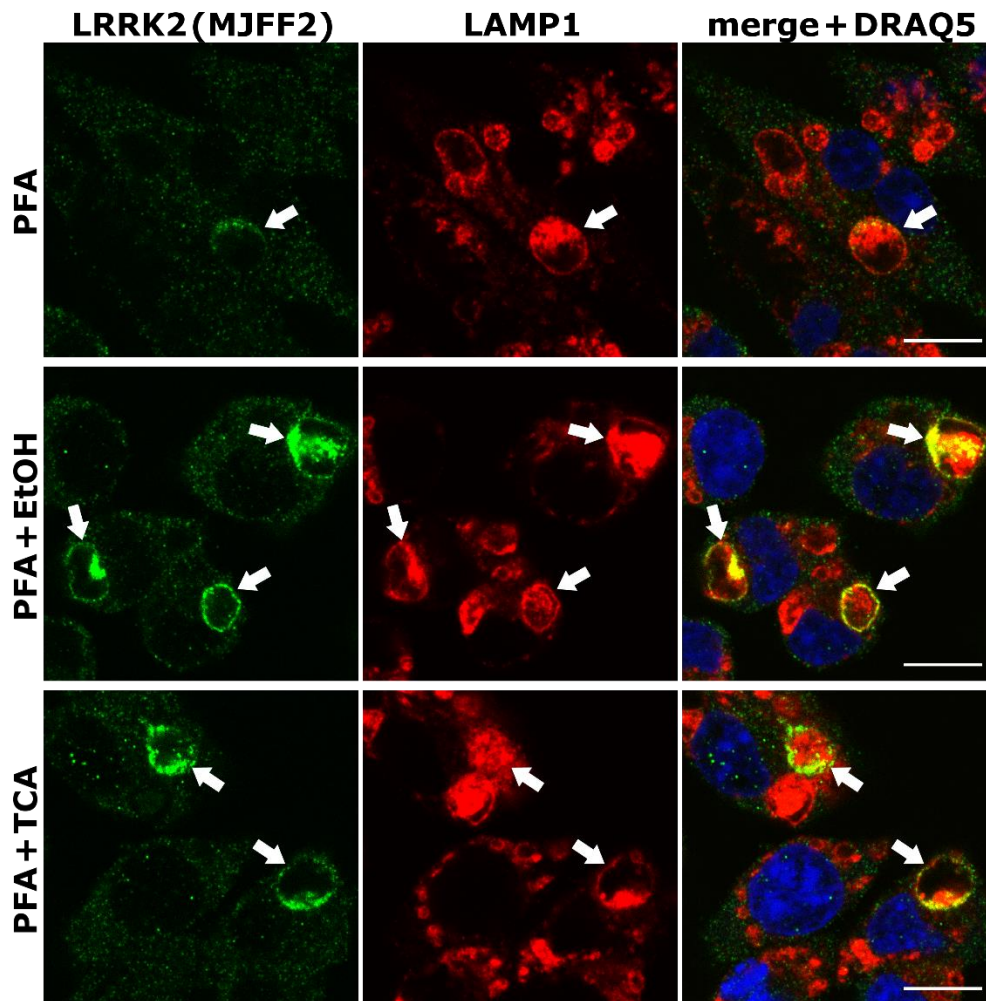
(c) α -tubulin で規格化した LAMP1 タンパク量。mean \pm SD, n = 4, ns: not significant, t test.



図表 7 CQ 処理時のリソソーム肥大化と LRRK2 局在変化の経時変化

(a) CQ 処理時のリソソーム肥大化(赤線)と LRRK2 のリソソーム局在(緑線)に関する定量結果。リソソームサイズは各時点において 20 細胞以上の細胞に対し最も肥大化したリソソームの断面積を定量し、 $\text{mean} \pm \text{SD}$ で示した。LRRK2 のリソソーム局在は同様の実験を 3 回行い定量し(各実験の各条件に付いて 91-148 細胞を解析)、 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ で示した。

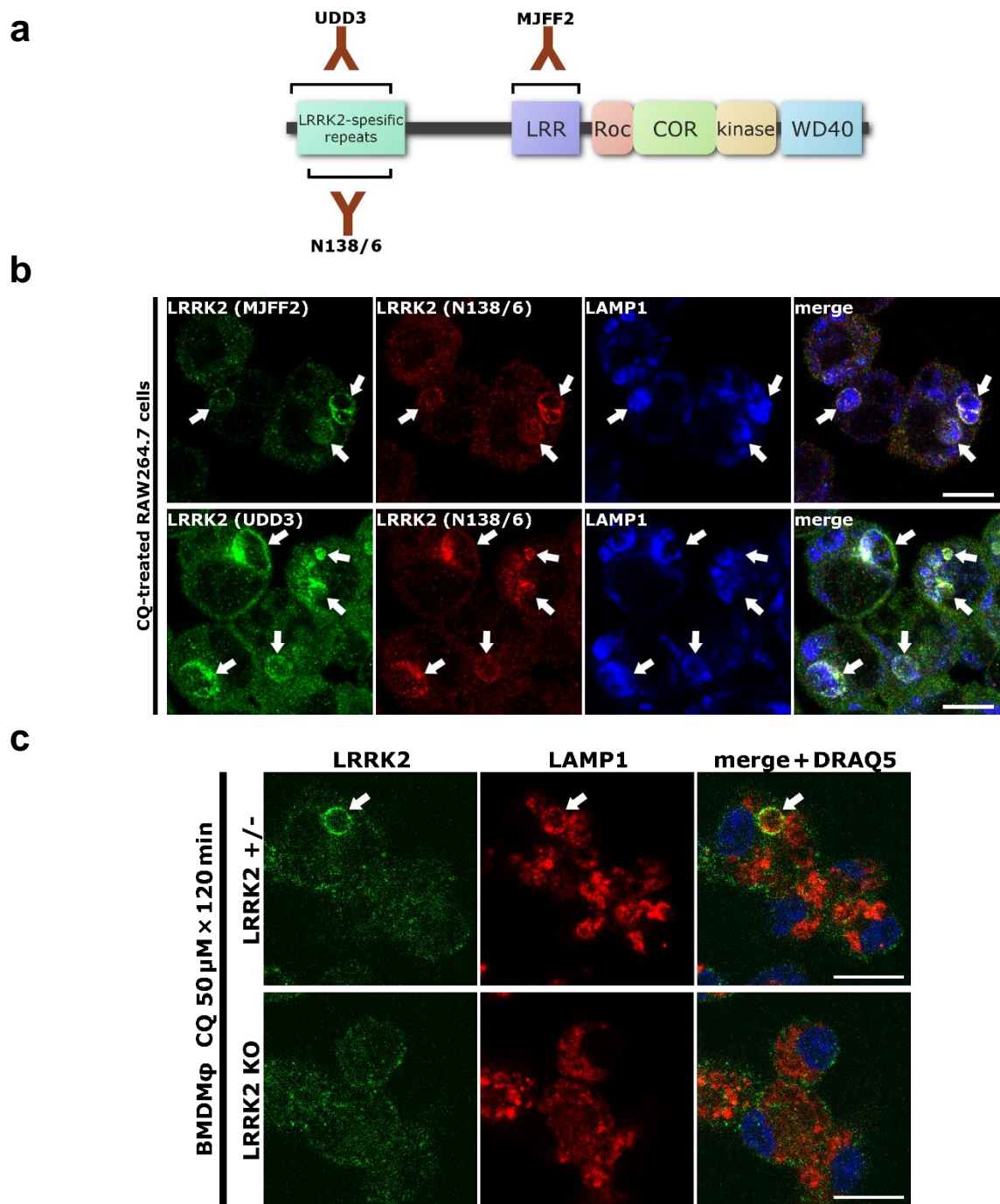
(b) 代表的な細胞の免疫染色像を示した(緑: LRRK2、赤: LAMP1、青: DRAQ5)。アスタリスク: 肥大化リソソーム、矢印: LRRK2 陽性リソソーム、スケールバー: 10 μm 。



図表 8 EtOH、TCA 処理は anti-LRRK2 (MJFF2 c42-2)抗体による染色を増強させる

RAW264.7 細胞に対し CQ 処理を行い 4% PFA で固定した。固定後のサンプルを DPBS 処理(上段)、100% EtOH 15 分処理(中段)、10% TCA 15 分処理(下段)した後、anti-LRRK2 抗体(MJFF2 c41-2)で染色した。固定後の EtOH 処理または TCA 処理で LRRK2 の染色性が上昇した。

矢印: LRRK2 陽性リソソーム, スケールバー 10 μ m。



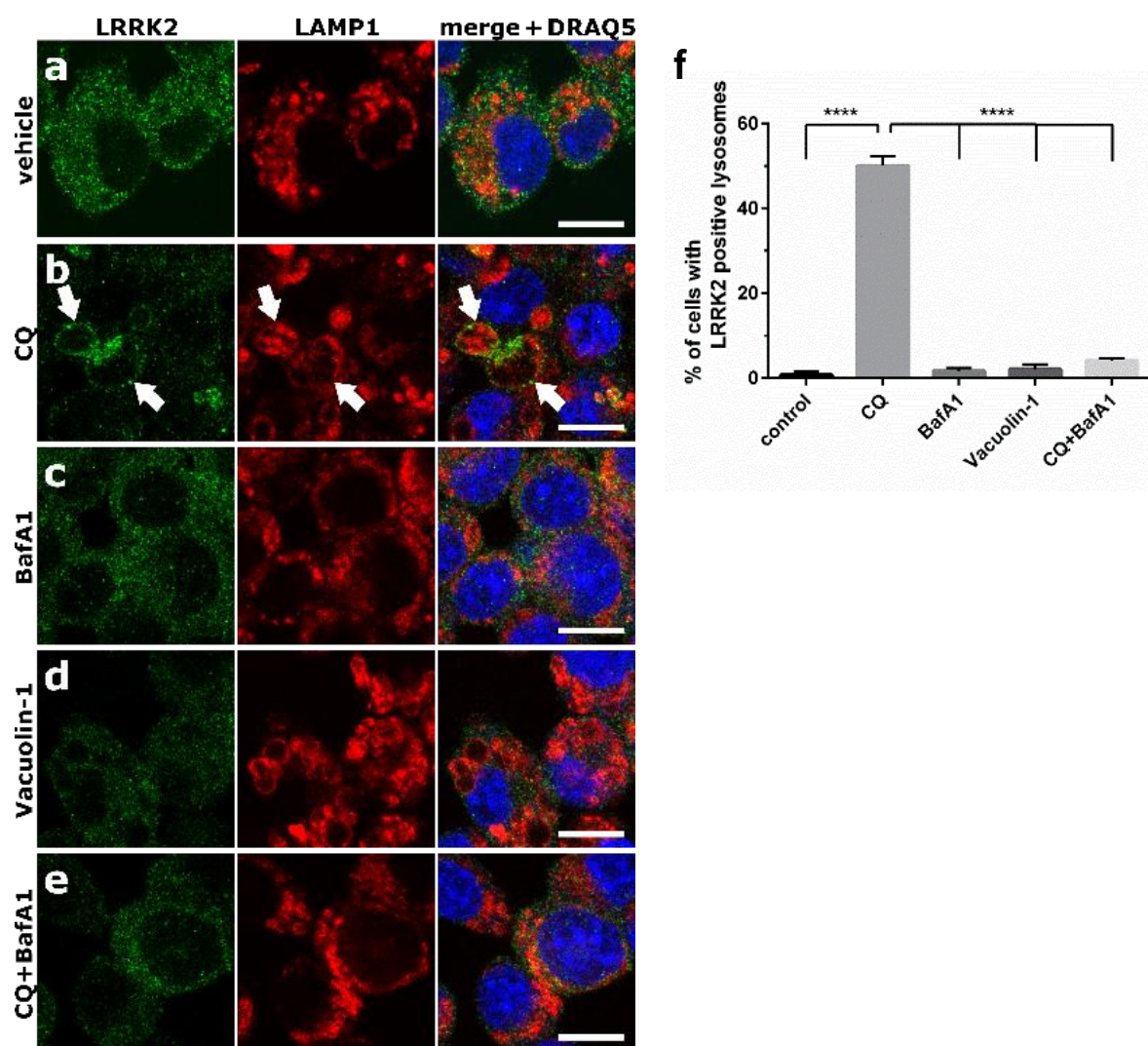
図表 9 LRRK2 抗体による内因性 LRRK2 染色は特異的である

(a) anti-LRRK mAb のエピトープ部位模式図

(b) RAW264.7 細胞に対し CQ 処理を行い内因性 LRRK2 を複数のモノクローナル抗体(ラビットモノクローナル抗体である MJFF2 c41-2、UDD3 30、およびマウスモノクローナル抗体である N138/6)で染色した。

矢印: LRRK2 陽性リソソーム, スケールバー 10 μm 。

(c) *Lrrk2*ヘテロノックアウトおよびホモノックアウトマウス由来の BMDM ϕ に対し CQ 処理を行い内因性 LRRK2 を染色した。ヘテロノックアウト細胞でのみ LRRK2 のリソソーム局在が観察された。矢印: LRRK2 陽性リソソーム, スケールバー 10 μm 。



図表 10 CQ 処理による浸透圧ストレスが LRRK2 の局在変化を誘導する

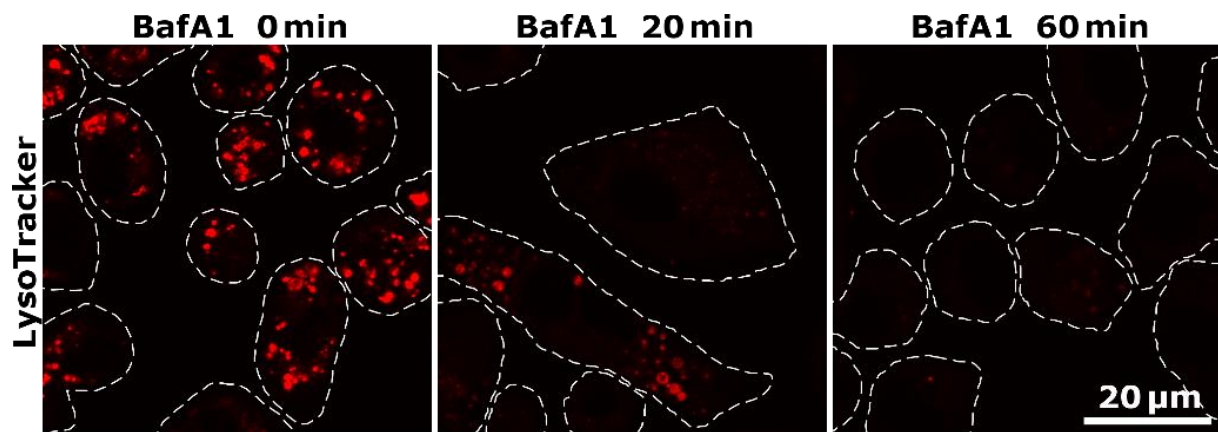
(a-e) RAW264.7 細胞に対し記載した薬剤処理を 3 時間行い LRRK2 と LAMP1 を染色した。

矢印: LRRK2 陽性リソソーム, スケールバー 10 μm 。

(f) a-e と同様の条件の実験を計 3 セット行い、LRRK2 のリソソーム局在頻度を定量した。

mean \pm SEM, n = 3, one-way ANOVA with Tukey's test, **** $P < 0.0001$ 。

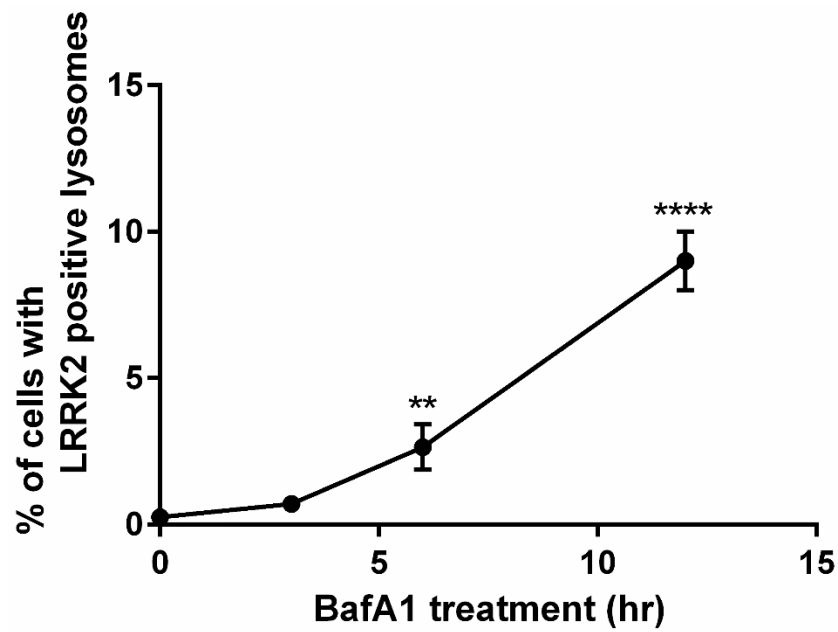
各実験の各条件において 171-390 細胞を解析した。



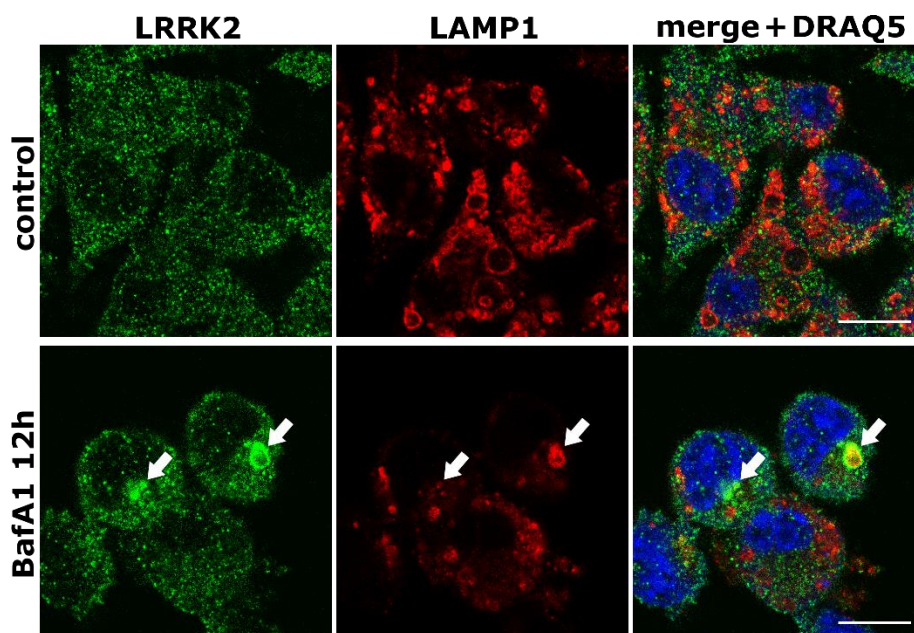
図表 11 CQ 処理による浸透圧ストレスが LRRK2 の局在変化を誘導する

RAW264.7 細胞を LysoTracker Red DND99 を含む培地で培養し BafA1 処理後の蛍光を Live Imaging で撮影した。破線: 細胞の輪郭, スケールバー: 20 μm。

a



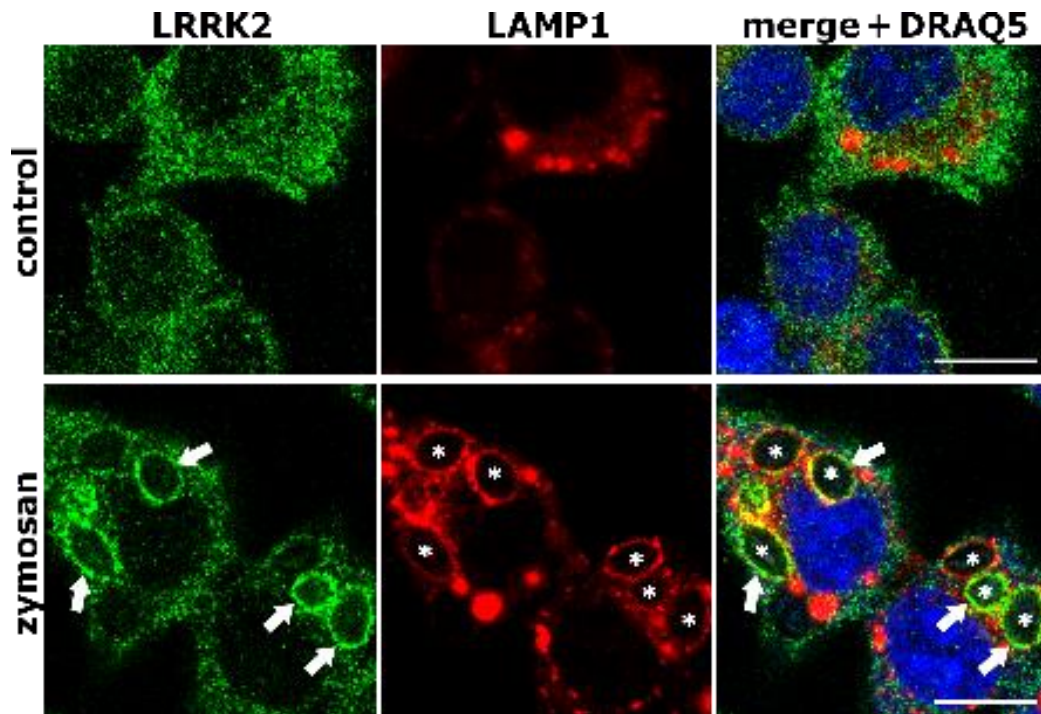
b



図表 12 BafA1 の長時間投与は LRRK2 のリソソーム局在を誘導する

(a) RAW264.7 細胞を記載の時間 BafA1 で処理し LRRK2 陽性リソソームを持つ細胞の割合を定量した。mean \pm SEM, $n = 4$, One-Way ANOVA with Tukey's test, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。各実験の各条件において 112-454 細胞を解析した。

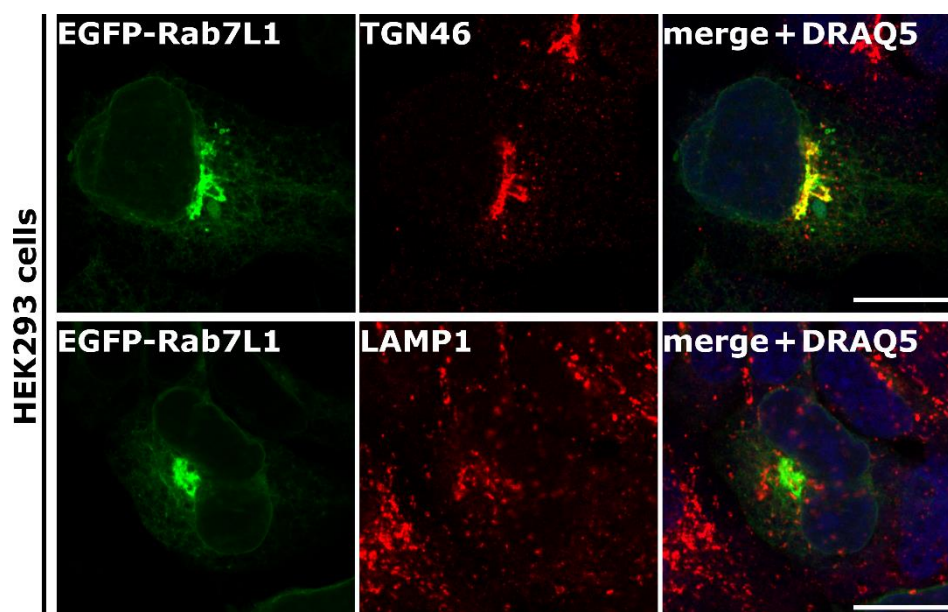
(b) BafA1 12 時間処理時の代表的な細胞の免疫染色像。
矢印: LRRK2 陽性リソソーム, スケールバー 10 μm 。



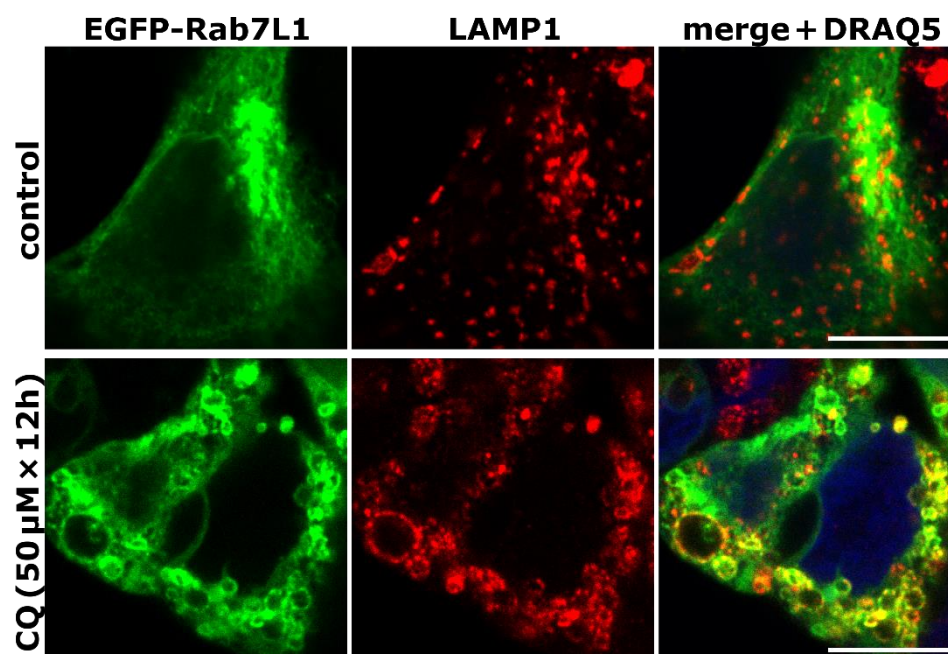
図表 13 LRRK2 は zymosan を取り込んだファゴリソソームの一部に局在する

RAW264.7 細胞に対し zymosan を与え 1 時間後に固定、LRRK2 の局在を解析した。アスタリスク: zymosan を取り込んだファゴリソソーム、矢印: LRRK2 陽性ファゴリソソーム、スケールバー: 10 μ m

a



b

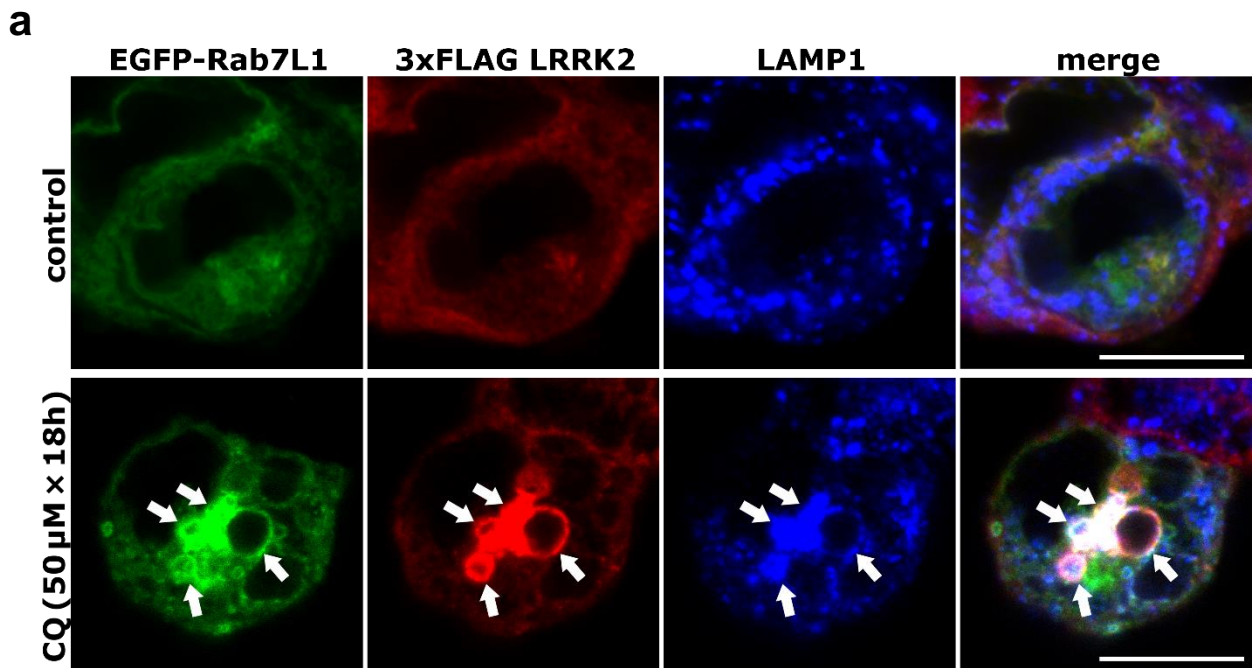


図表 14 Rab7L1 は CQ 処理時にリソソームに集積する

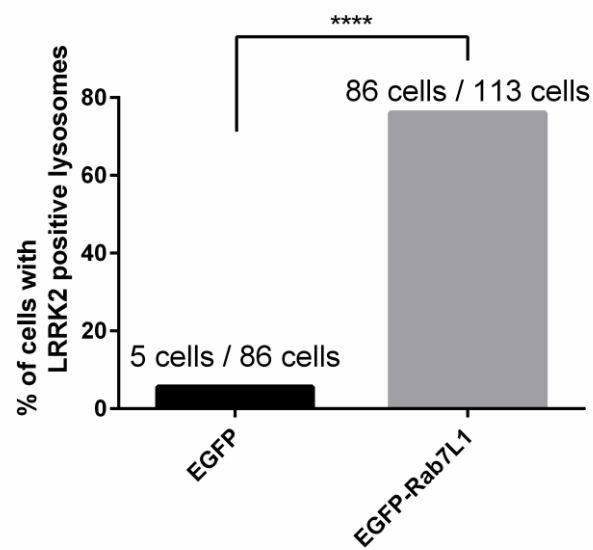
(a) HEK293 細胞に EGFP-Rab7L1 を過剰発現し、定常状態における細胞内局在を解析した。

(b) Rab7L1 を過剰発現し HEK293 細胞に対し CQ 処理を行い Rab7L1 の局在を解析した。

スケールバー: 10 μ m。



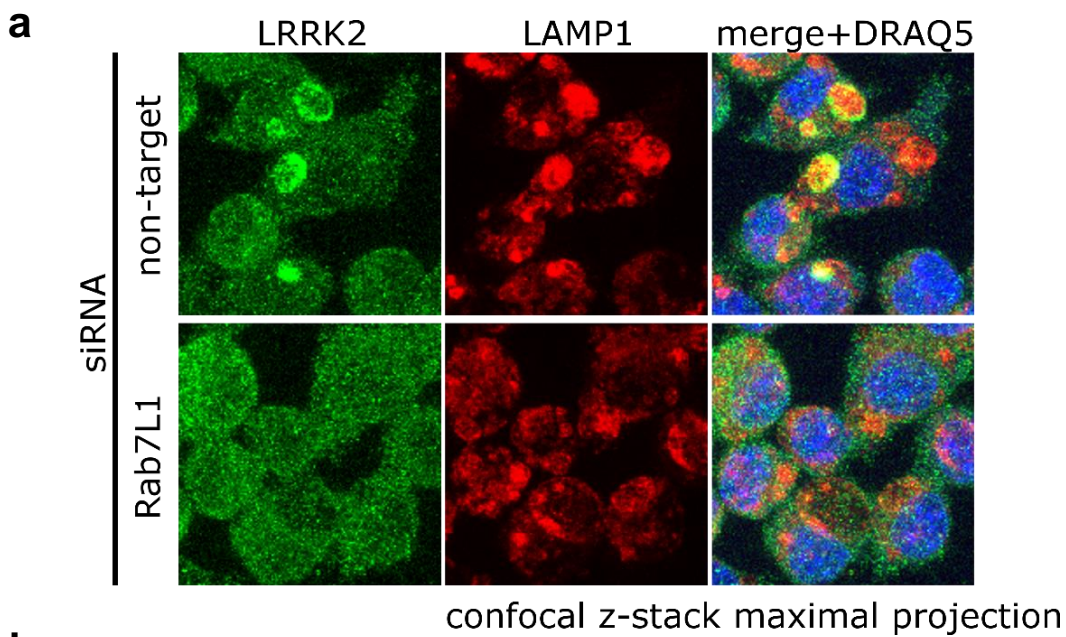
b



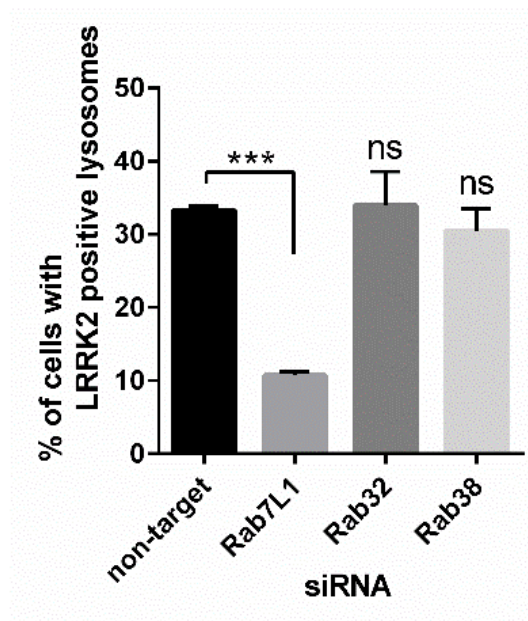
図表 15 Rab7L1 過剰発現は LRRK2 のリソソーム局在を促進する

(a) 3×FLAG LRRK2 stable HEK293 細胞に EGFP-Rab7L1 を過剰発現し、Rab7L1、LRRK2 の局在を解析した。スケールバー 10 μm、矢印 Rab7L1-LRRK2 陽性リソソーム。

(b) EGFP または EGFP-Rab7L1 を過剰発現させた 3×FLAG LRRK2 stable HEK293 細胞に対し CQ 処理を行い LRRK2 のリソソーム局在を定量した。統計解析は Fisher の正確確立検定を用いた。**** $p < 0.0001$ 。



b



図表 16 Rab7L1 ノックダウンは LRRK2 局在変化を抑制する

(a) RAW264.7 細胞に対し non-target (上段)または *Rab7L1* (下段)に対する siRNA を導入し CQ 処理を行った。写真は z-stack の maximal projection。

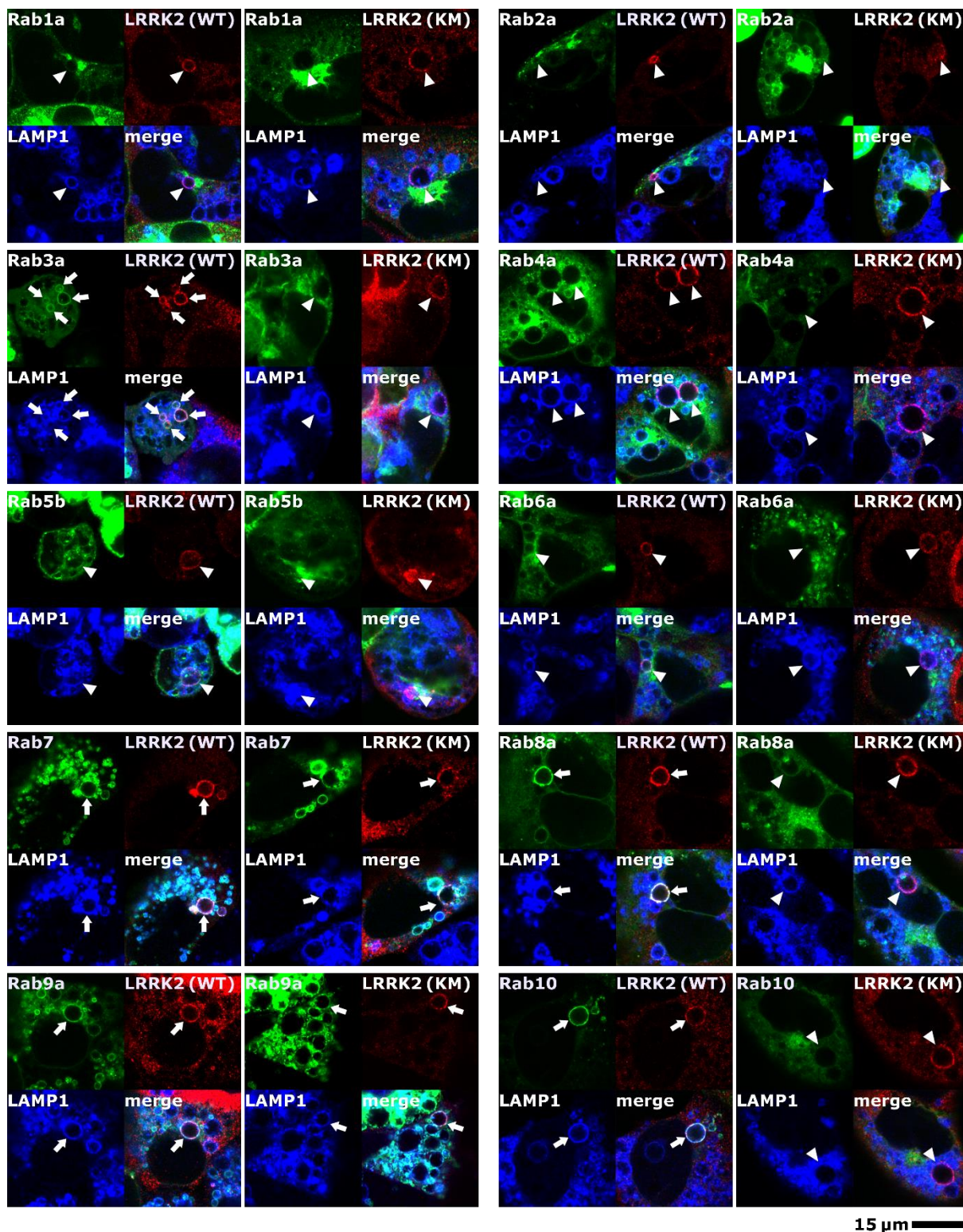
(b) **a** で示した実験を含む各種 siRNA を導入した際の LRRK2 のリソソーム局在を定量。

mean \pm SEM, n=3, one-way ANOVA with Tukey's test。各実験セットの各条件で 440-550 細胞を解析した。

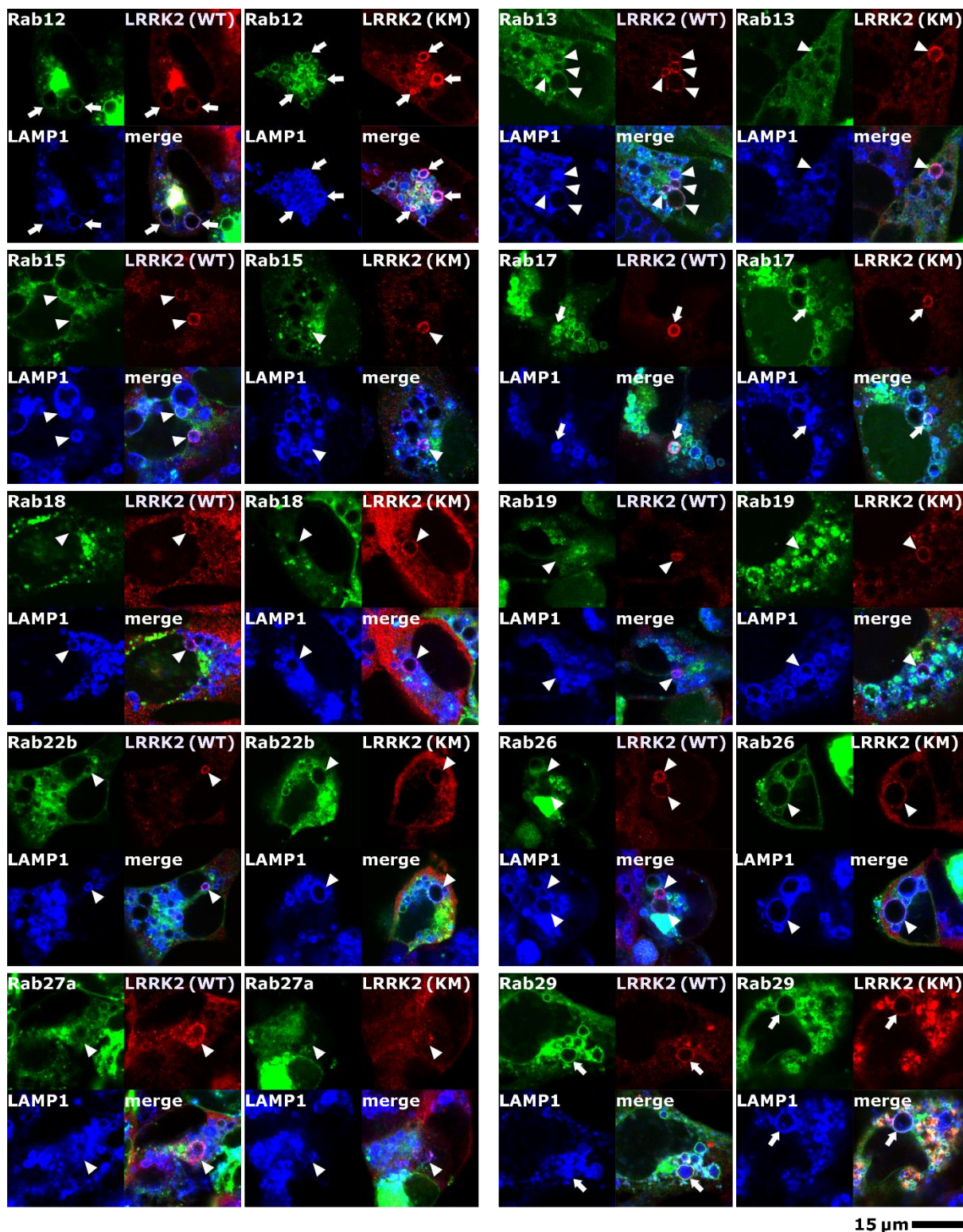
human Rab1A	65	WDTAGQERFR-TITSSYYRG	83
human Rab2A	36	WDTAGQESFR-SITRSYYRG	54
human Rab3A	76	WDTAGQERYR-TIITAYYRG	94
human Rab4A	67	WDTAGQERFR-SVTRSYYRG	85
human Rab5B	74	WDTAGQERYH-SLAPMYRG	92
human Rab6A	67	WDTAGQERFR-SLIPSYIRD	85
human Rab7A	62	WDTAGQERFQ-SLGVAFYRG	80
human Rab8A	62	WDTAGQERFR-TIITAYYRG	80
human Rab9A	61	WDTAGQERFR-SLRTPFYRG	79
human Rab10	63	WDTAGQERFH-TIITSSYYRG	81
human Rab12	96	WDTAGQERFN-SITSAYYRS	114
human Rab13	62	WDTAGQERFK-TIITAYYRG	80
human Rab15	62	WDTAGQERYQ-TITKQYYRR	80
human Rab16 (Rab3D)	76	WDTAGQERYR-TIITAYYRG	94
human Rab17	72	WDTAGQEKYH-SVCHLYFRG	90
human Rab18	62	WDTAGQERFR-TLTPSYRG	80
human Rab19	71	WDTAGQERFR-TITQSYYS	89
human Rab26	118	WDTAGQERFR-SVTHAYYRD	136
human Rab27A	73	WDTAGQERFR-SLITAFFRD	91
human Rab29	62	WDIAGQERFT-SMTRLYYRD	80
human Rab30	63	WDTAGQERFR-SITQSYYS	81
human Rab31 (Rab22B)	60	WDTAGQERFH-SLAPMYRG	78
human Rab35	62	WDTAGQERFR-TITSTYYRG	80
human Rab37	77	WDTAGQERFR-SVTHAYYRD	95
human Rab39B	63	WDTAGQERFR-SITRAYYRN	81
human Rab40A	68	WDTSGQGRFC-TIFRSYSRG	86
human Rab41	84	WDTAGQERFH-SLIPSYIRD	102
human Rab43	72	WDTAGQERFR-TITQSYYS	90
human Rab11A	65	WDTAGQERYR-AITSAYYRG	83
human Rab14	65	WDTAGQERFR-AVTRSYYRG	83
human Rab20	89	VELEDRFLGLTDTASKDCLF	108
human Rab21	73	WDTAGQERFH-ALGPIYYRD	91
human Rab22A	59	WDTAGQERFR-ALAPMYRG	77
human Rab23	63	WDTAGQEEFD-AITKAYYRG	81
human Rab24	62	WDTAGSERYE-AMSRIYYRG	80
human Rab25	66	WDTAGLERYR-AITSAYYRG	84
human Rab28	67	WDIGGQTIGG-KMLDKYIYG	85
human Rab32	53	HYRATIGVDFALKVLNWDSDR	72
human Rab33A	90	WDTAGQERFRKSMVEHYRN	109
human Rab34	106	WDTAGQERFK-CIASTYYRG	124
human Rab36	201	WDTAGQEKFK-CIASAYYRG	219
human Rab38	37	HYRATIGVDFALKVLHWDPE	56
human Rab42	69	WDTAGHERFR-CITRSFYRN	87

図表 17 Rab GTPase のアラインメント解析

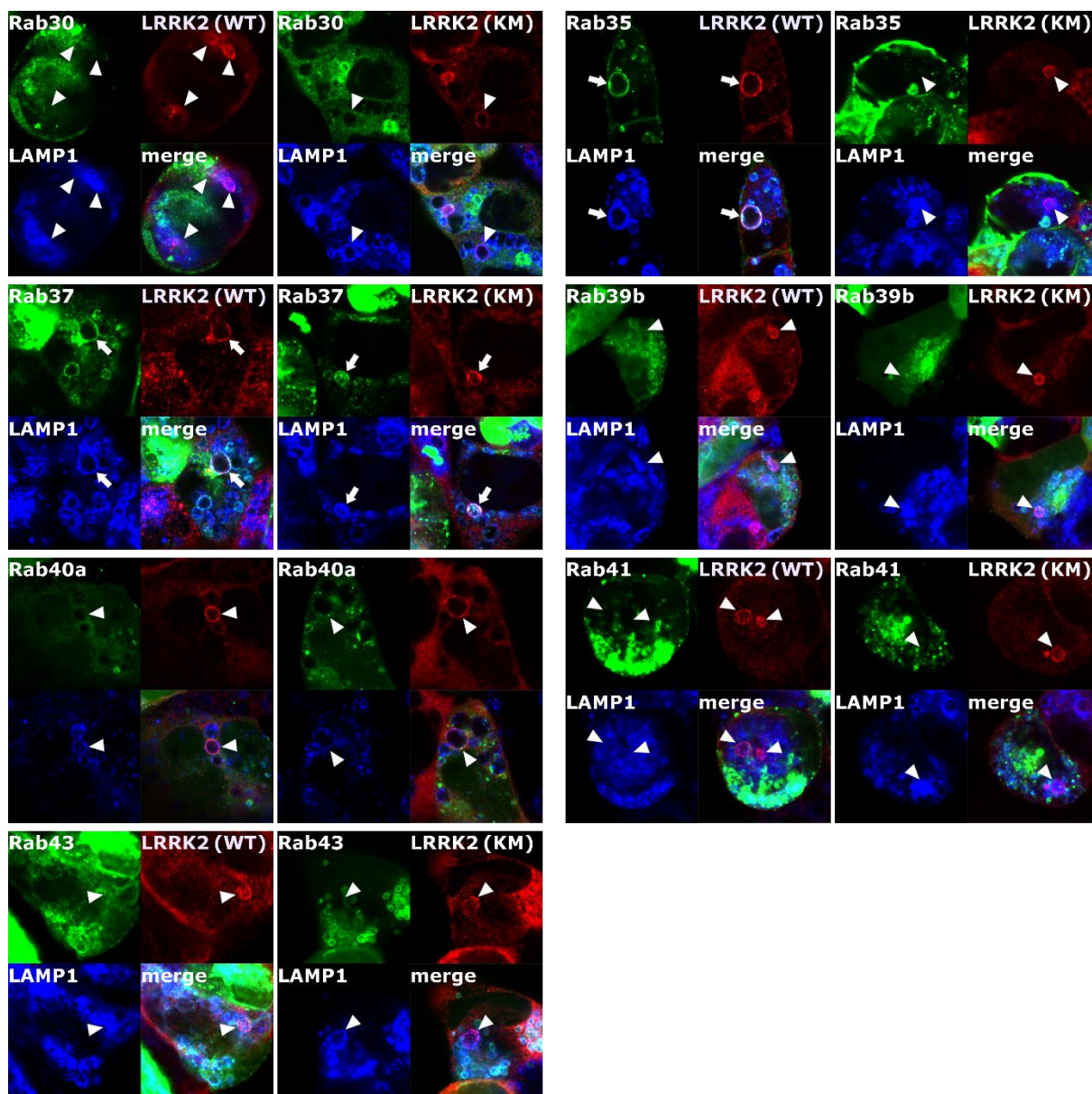
ヒトの各 Rab GTPase アミノ酸配列をアラインメント解析結果。Rab8A Thr72 と相同な部位にセリン/スレオニンが保存されているものに関しては赤色で示した。



図表 18-1 Rab3a, Rab8a, Rab10, Rab35 はキナーゼ活性を有する LRRK2 とのみ共局在する
 野生型もしくはキナーゼ活性喪失型変異(K1906M 変異、KM と記載)LRRK2 を安定に発現する HEK293 細胞に各種 EGFP-Rab GTPase を遺伝子導入しクロロキン処理を行った。Rab1a～ Rab10 までのデータを本ページに示す。
 矢印: LRRK2 陽性かつ Rab 陽性リソソーム、矢頭: LRRK2 陽性だが Rab 陰性リソソーム。



図表 18-2 Rab3a, Rab8a, Rab10, Rab35 はキナーゼ活性を有する LRRK2 とのみ共局在する
 野生型もしくはキナーゼ活性喪失型変異(K1906M 変異、KM と記載)LRRK2 を安定に発現する HEK293 細胞に各種 EGFP-Rab GTPase を遺伝子導入しクロロキン処理を行った。Rab12～ Rab29 までのデータを本ページに示す。
 矢印: LRRK2 陽性かつ Rab 陽性リソソーム、矢頭: LRRK2 陽性だが Rab 陰性リソソーム。



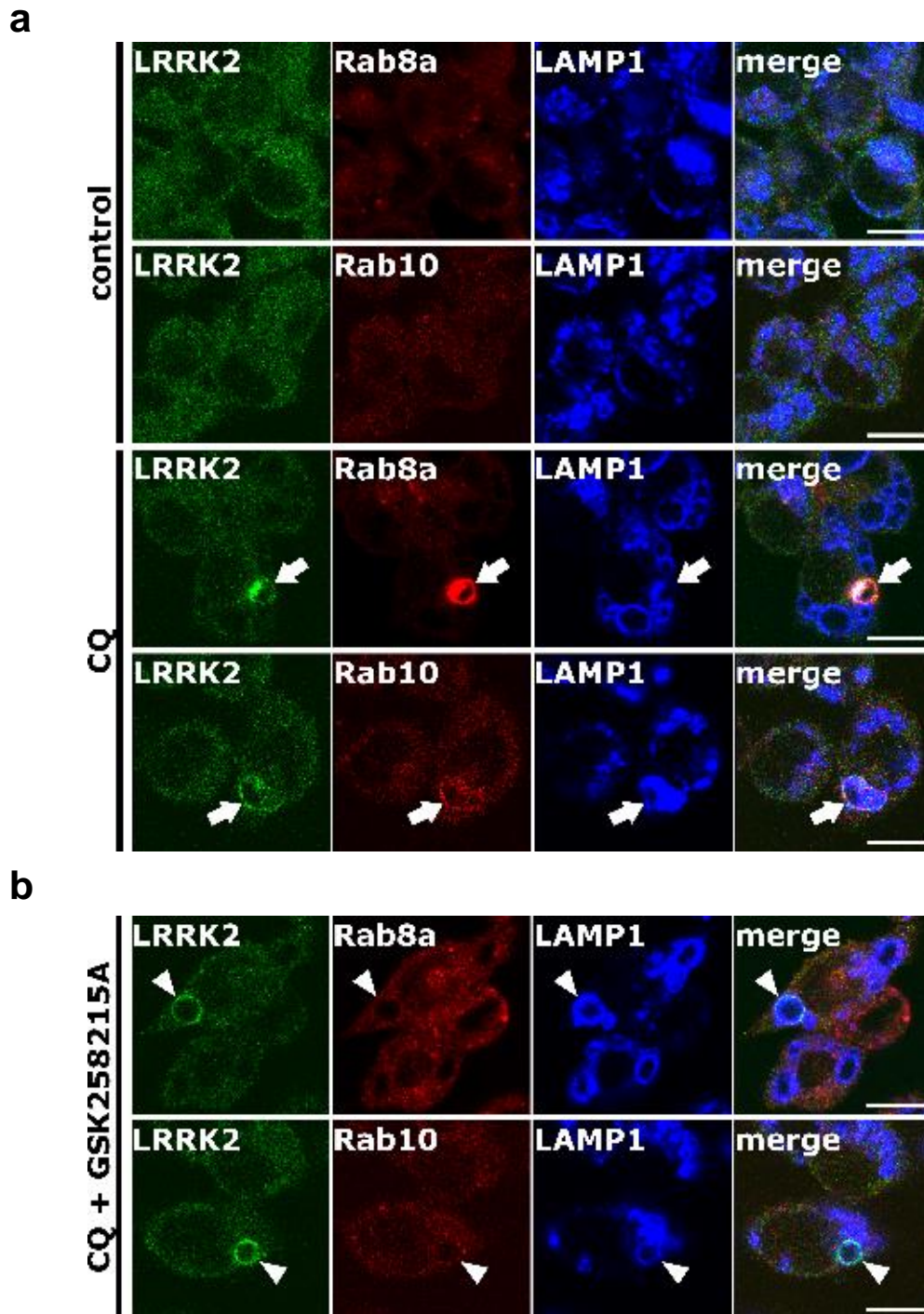
15 μm

図表 18-3 Rab3a, Rab8a, Rab10, Rab35 はキナーゼ活性を有する LRRK2 とのみ共局在する
 野生型もしくはキナーゼ活性喪失型変異(K1906M 変異、KM と記載)LRRK2 を安定に発現する
 HEK293 細胞に各種 EGFP-Rab GTPase を遺伝子導入しクロロキン処理を行った。Rab30～
 Rab43 までのデータを本ページに示す。
 矢印: LRRK2 陽性かつ Rab 陽性リソソーム、矢頭: LRRK2 陽性だが Rab 陰性リソソーム。

EGFP-Rab	colocalized with LRRK2?		LRRK2 activity dependent?
	LRRK2 (WT)	LRRK2 (K1906M)	
Rab1a	No	No	No
Rab2a	No	No	No
<u>Rab3a</u>	Yes	No	Yes
Rab4a	No	No	No
Rab5a	No	No	No
Rab6a	No	No	No
Rab7	Yes	Yes	No
<u>Rab8a</u>	Yes	No	Yes
Rab9a	Yes	Yes	No
<u>Rab10</u>	Yes	No	Yes
Rab12	Yes	Yes	No
Rab13	No	No	No
Rab15	No	No	No
Rab17	Yes	Yes	No
Rab18	No	No	No
Rab19	No	No	No
Rab22b	No	No	No
Rab26	No	No	No
Rab27a	No	No	No
Rab29 (Rab7L1)	Yes	Yes	No
Rab30	No	No	No
<u>Rab35</u>	Yes	No	Yes
Rab37	Yes	Yes	No
Rab39b	No	No	No
Rab40a	No	No	No
Rab41	No	No	No
Rab43	No	No	No

図表 19 LRRK2 と共局在する Rab GTPase スクリーニングの結果まとめ

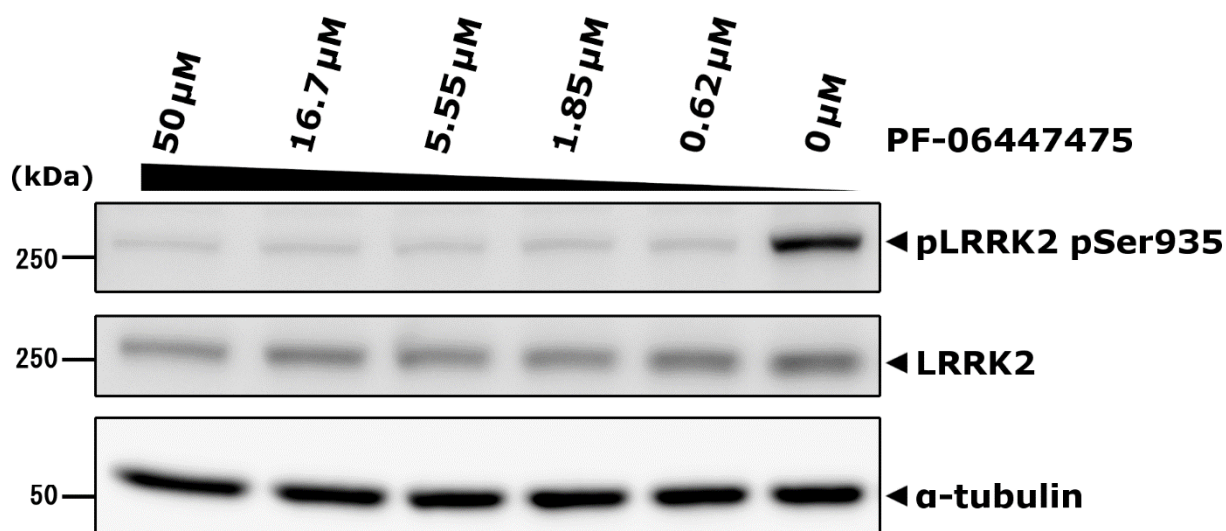
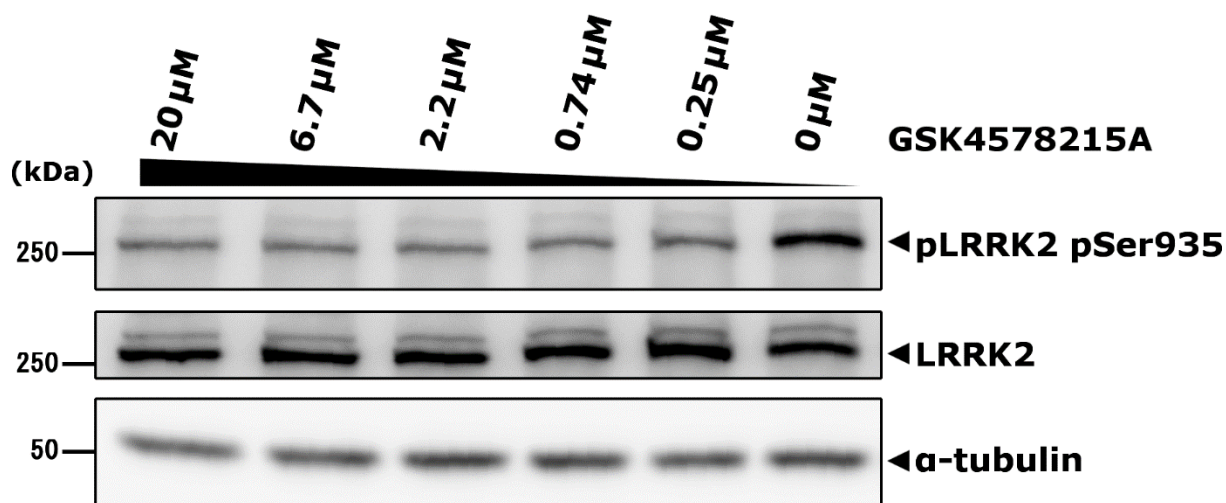
各 Rab GTPase が CQ 処理時に LRRK2 とリソソーム上で共局在するかどうかをまとめた。野生型 LRRK2 とのみ共局在し、K1906M 変異体とは共局在しない Rab GTPase は LRRK2 のキナーゼ活性依存的に LRRK2 と共局在すると判断した。



図表 20 内因性 Rab8a、Rab10 のリクルート

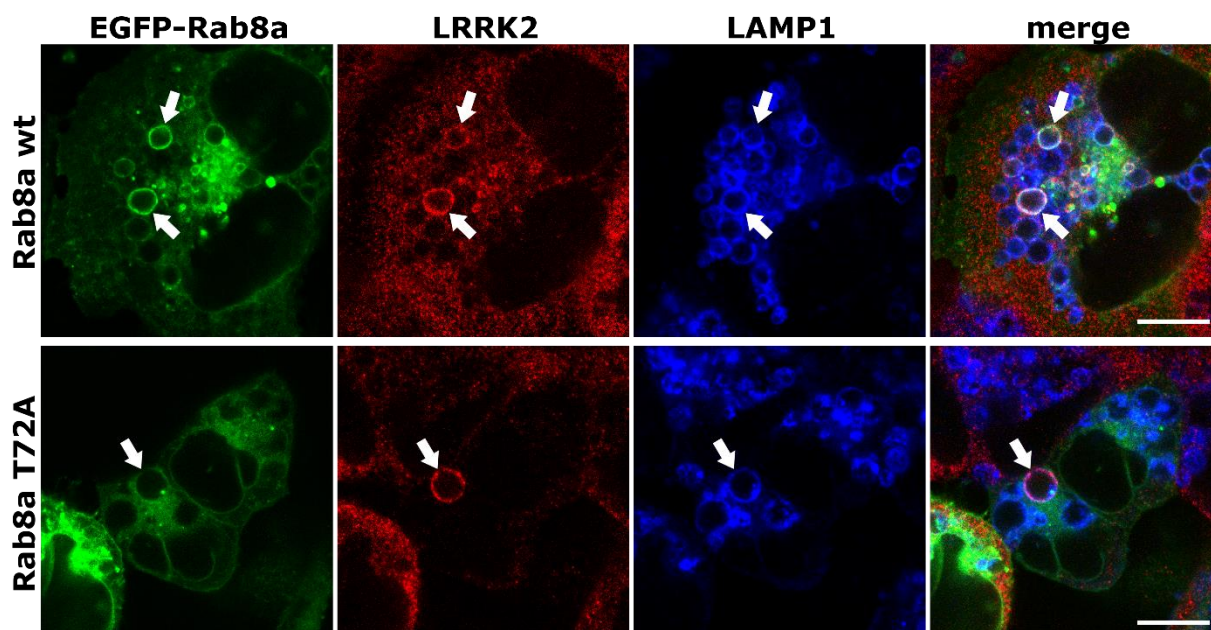
(a) 定常状態(上 2 段)もしくはクロロキン処理(下 2 段)を行った RAW264.7 細胞における内因性 LRRK2 および Rab8a、Rab10 の局在を解析した。クロロキン処理時に LRRK2 と Rab8a、Rab10 の共局在が観察された(矢印)。スケールバー: 10 μ m。

(b) RAW264.7 細胞に対し LRRK2 キナーゼ活性阻害剤 GSK2578215A 存在下で CQ 処理を行い、LRRK2 および Rab8a、Rab10 の局在を解析した。LRRK2 陽性リソソームにおける Rab の局在が消失した(矢頭)。スケールバー: 10 μ m。



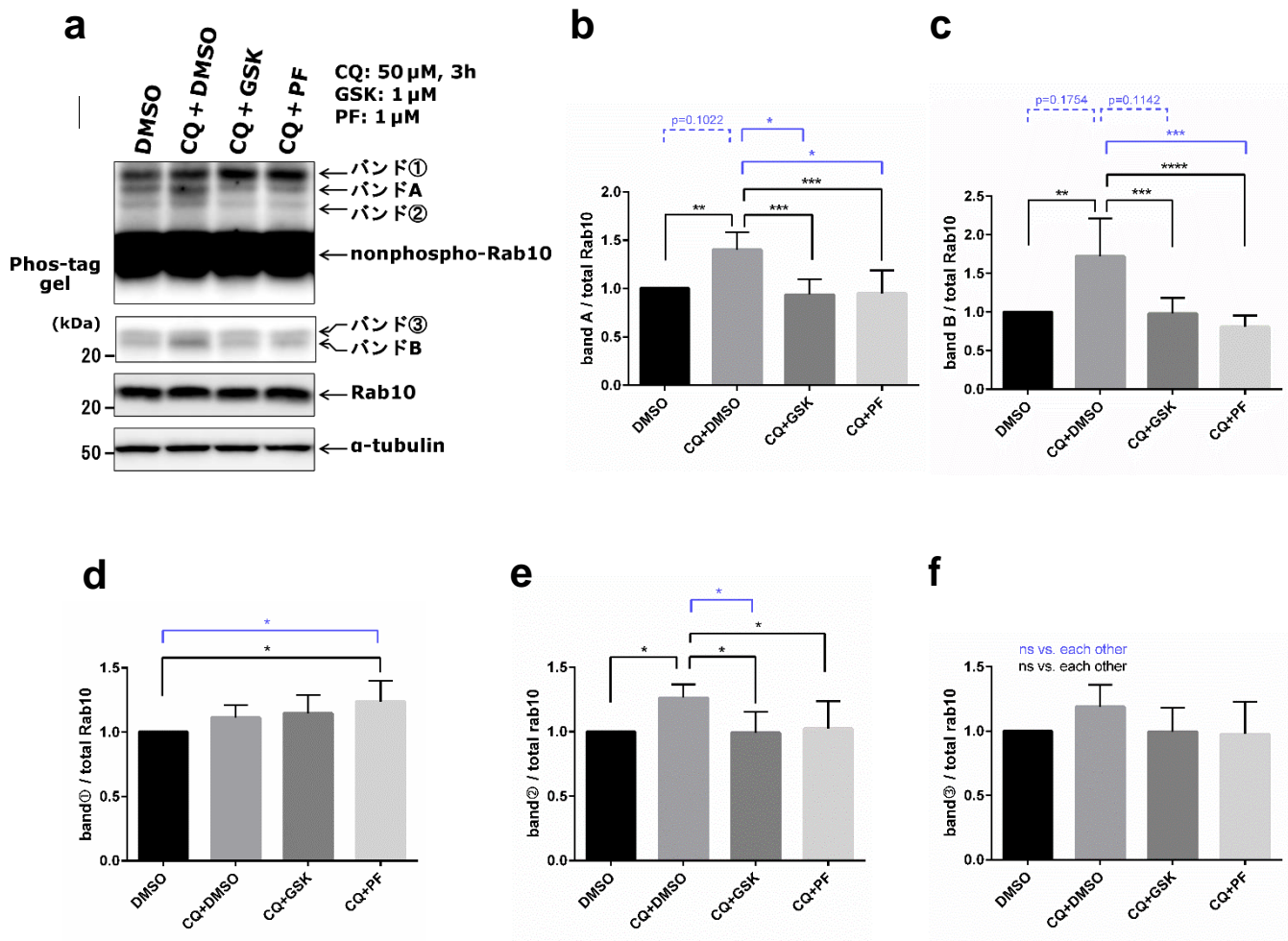
図表 21 LRRK2 キナーゼ活性阻害剤の効果検証

2 種類の LRRK2 キナーゼ活性阻害剤(GSK2578215A: 上段、PF06447475: 下段)の効果をも pLRRK2 pSer935 を指標に解析した



図表 22 非リン酸化模倣型 Rab8a は LRRK2 によるリクルートを受けない

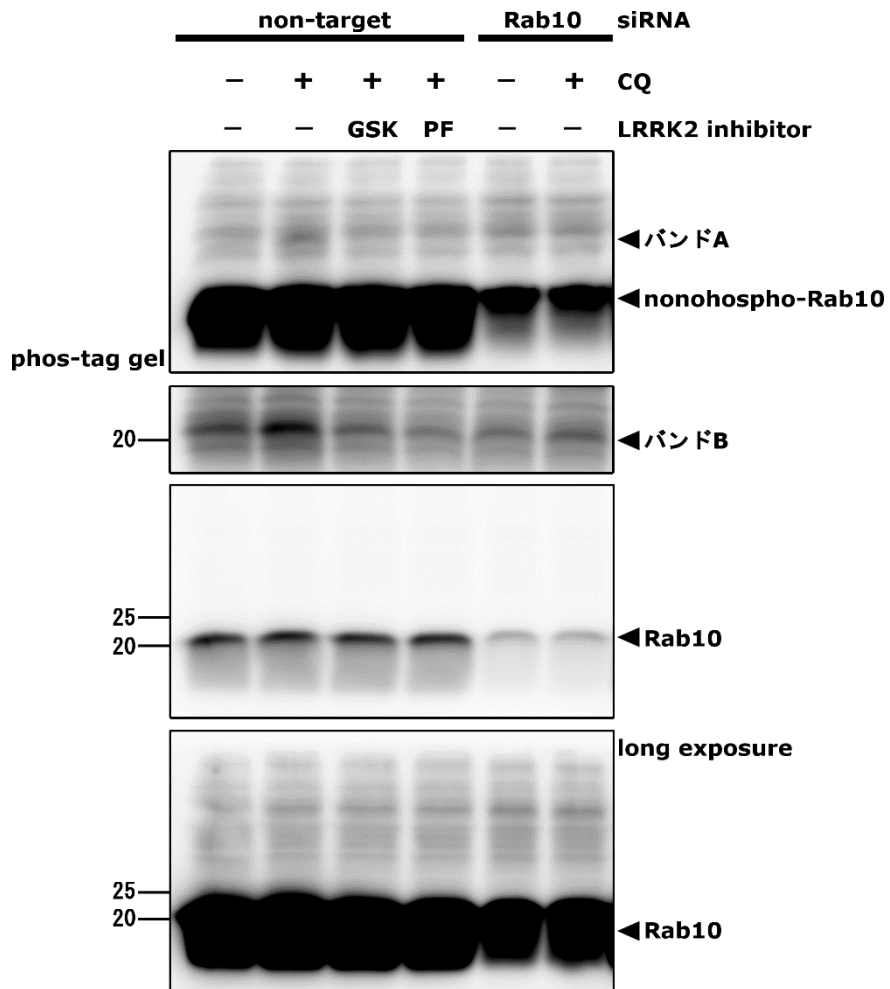
野生型 LRRK2 安定発現 HEK293 細胞に野生型もしくは T72A 変異型 EGFP-Rab8a を導入し CQ 処理を行った。野生型 Rab8a は LRRK2 陽性リソソームに局在したが、T72A 変異体は LRRK2 と共局在しなかった。矢印: LRRK2 陽性リソソーム、スケールバー: 10 μm 。



図表 23 CQ 処理時に Rab10 のリン酸化は LRRK2 キナーゼ活性依存的に亢進する

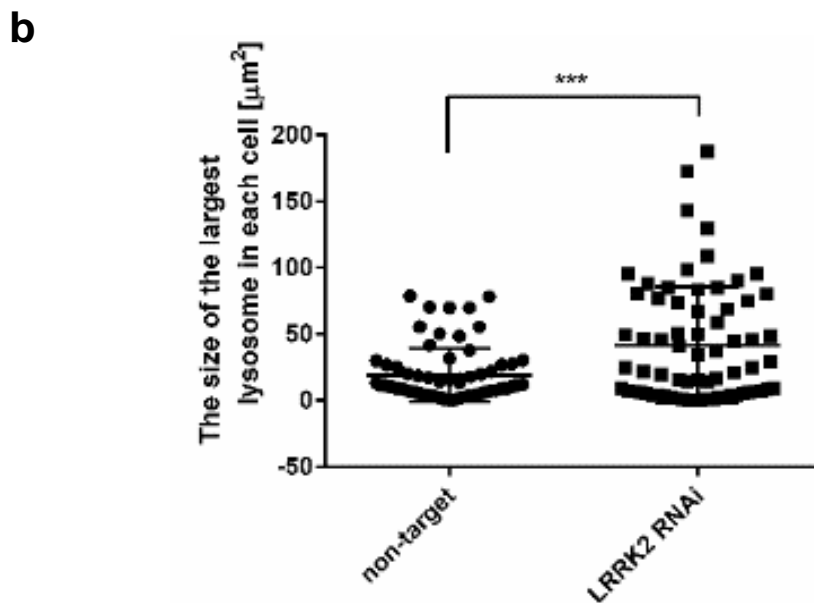
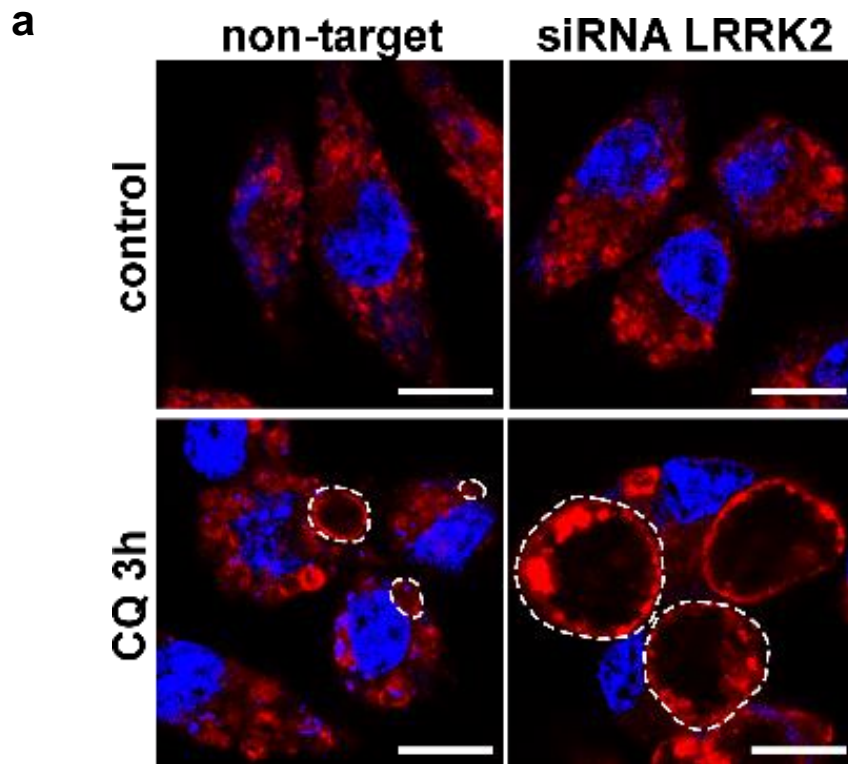
(a) RAW264.7 細胞における Rab10 のリン酸化を Phos-tag SDS PAGE およびリン酸化 Rab10 (p-Thr73)抗体を用いて解析した。

(b-f) バンド A, B, ①-③の定量結果。DMSO 処理を 1 とした。mean \pm SD, n=6, * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, **** P <0.0001, 黒字: one-way ANOVA with Tukey's test、青字: Kruskal-Wallis test with Dunn's test。



図表 24 Rab10 リン酸化解析におけるバンドの特異性の確認

RAW264.7細胞に対し non-target または Rab10 に対する siRNA を導入し CQ 処理 (50 μ M, 3h)、LRRK2 阻害剤処理 (GSK, PF 共に 1 μ M) を行った。cell lysate を phos-tag SDS-PAGE または通常の SDS-PAGE で分離し、Rab10, pRab10 (pThr73) 抗体で WB を行った。

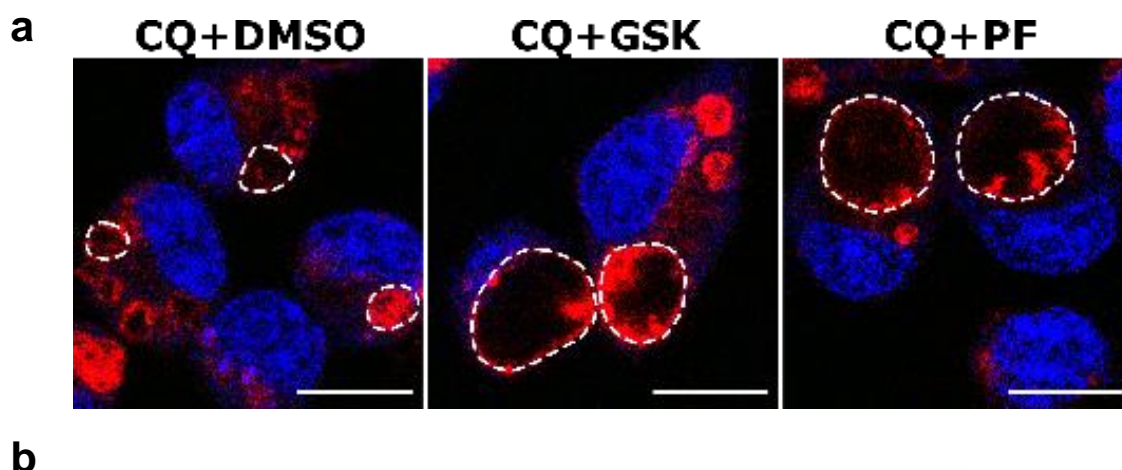


図表 25 *LRRK2* ノックダウンは CQ 処理時のリソソーム肥大化を増強する

(a) non-target (左)、もしくは *LRRK2* (右) siRNA を導入した RAW264.7 細胞におけるリソソームの形態。定常状態(上段)では違いはみられなかったが、CQ 処理時では *LRRK2* siRNA を導入した細胞の方がよりリソソーム肥大化が亢進した。赤: LAMP1、青: DRAQ5、スケールバー: 10 μm 、破線: 各細胞で最も肥大化したリソソーム。

(b) CQ 処理時における各細胞の最も肥大化したリソソームの断面積を定量した。

mean \pm SD. $n = 68$ and 69 for non-target and *LRRK2* RNAi, respectively, *** $P < 0.001$, t test.

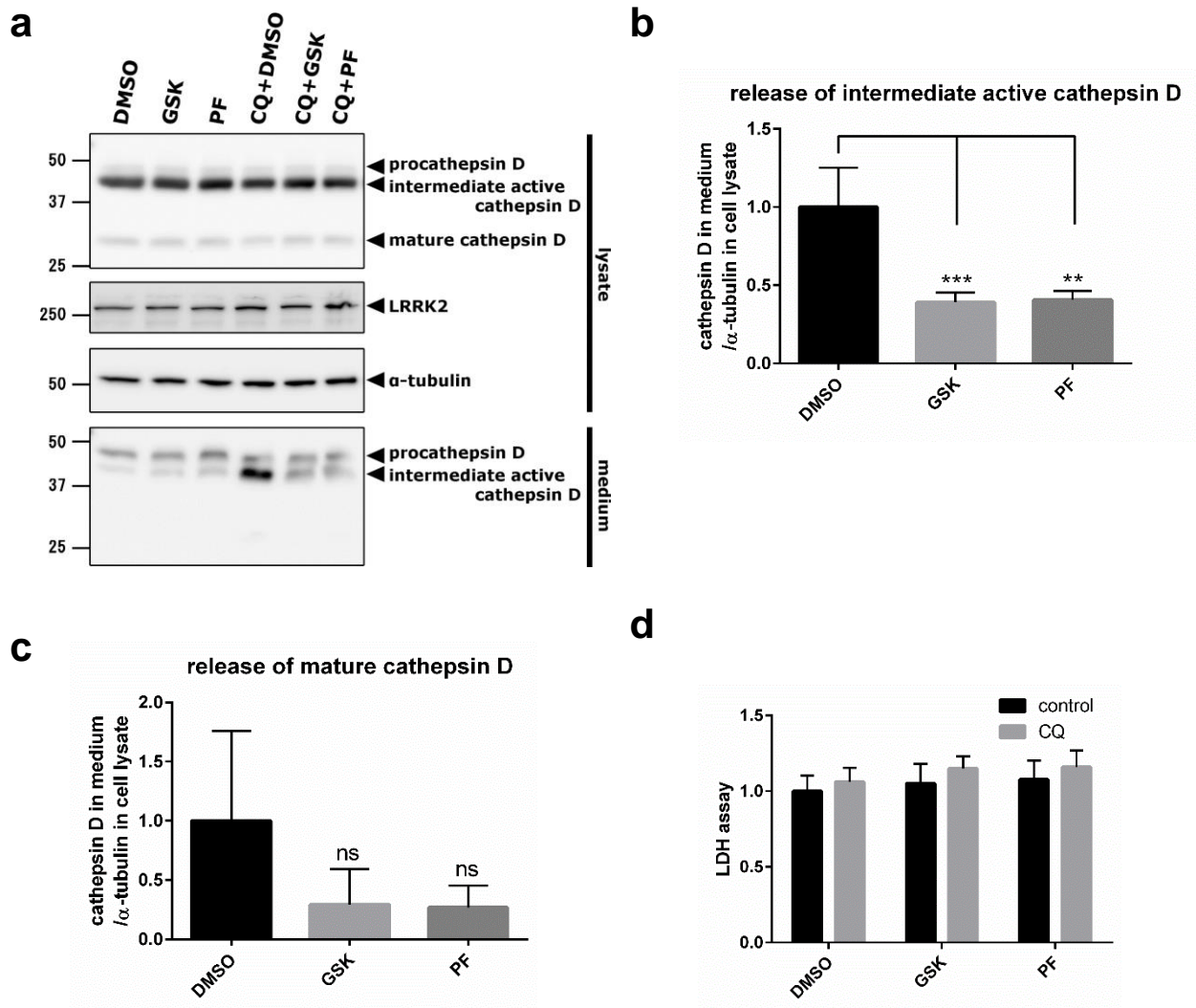


図表 26 LRRK2 キナーゼ活性阻害剤は CQ 処理時のリソソーム肥大化を増強する

(a) RAW264.7 細胞に対し LRRK2 キナーゼ活性阻害剤存在下で CQ 処理を行った。赤: LAMP1、青: DRAQ5、スケールバー: 10 μm 、破線: 各細胞で最も肥大化したリソソーム。

(b) CQ 処理時における各細胞の最も肥大化したリソソームの断面積を定量した。

mean \pm SD. n = 96, 78 and 102 for DMSO, GSK and PF, respectively, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ one-way ANOVA with Tukey's test.



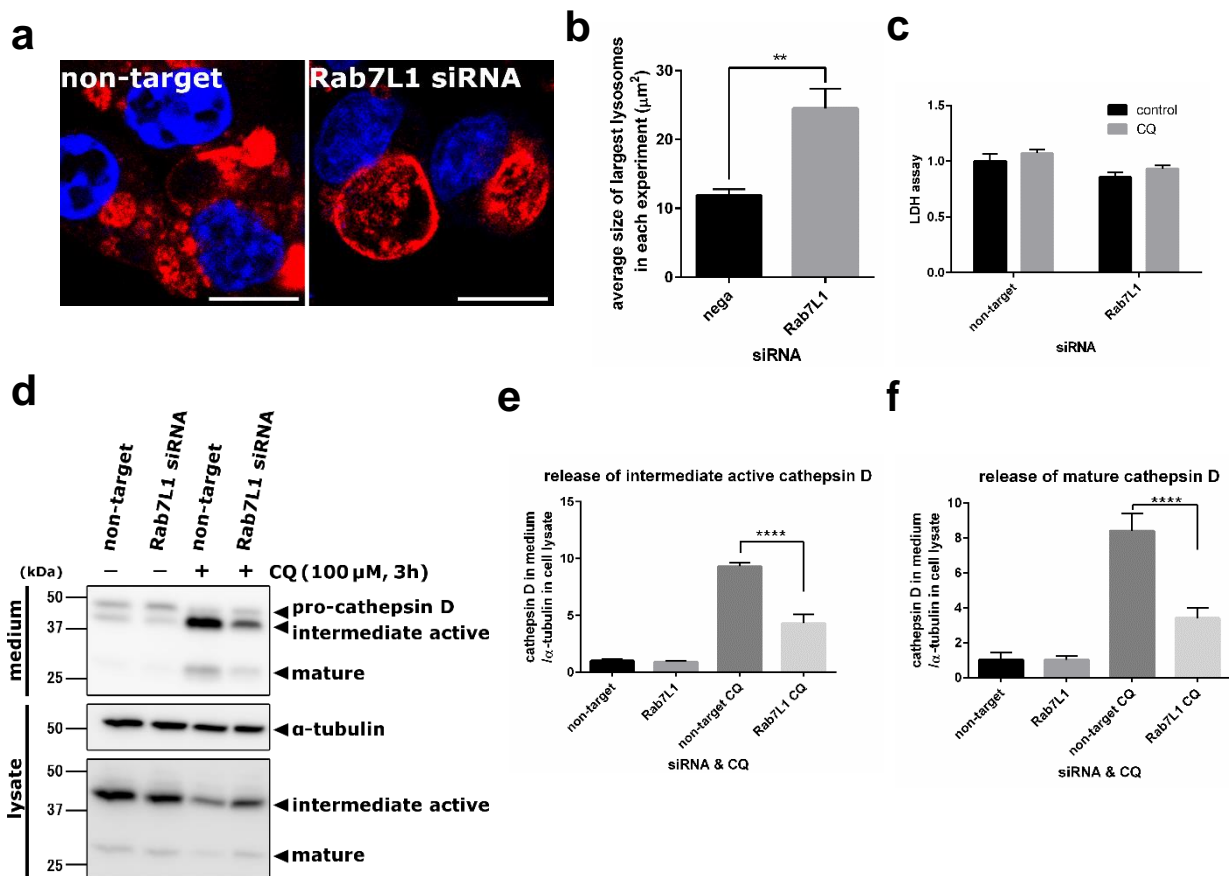
図表 27 LRRK2 はキナーゼ活性依存的にカテプシン D の排出を制御する

(a) RAW264.7 細胞に対し LRRK2 キナーゼ活性阻害剤および CQ 処理 (100 μ m, 3h) を行い、cell lysate および培養上清中の各タンパク量を WB で解析した。procathepsin D は小胞体・ゴルジ体にて糖鎖修飾を受けた未成熟なもの、intermediate active cathepsin D はリソソームに輸送後 1 回切断を受け活性化されたもの、mature cathepsin D はリソソームで再度切断を受け完全に活性化されたものである。

(b) CQ 処理時の培養上清中の intermediate active cathepsin D 量を定量した。cell lysate 中の α -tubulin 量で割ることで細胞数による分泌量の変化を補正した。mean \pm SD. n = 4, ** P < 0.01, *** P < 0.001, one-way ANOVA with Tukey's test

(c) CQ 処理時の培養上清中の mature cathepsin D 量を定量した。cell lysate 中の α -tubulin 量で割ることで細胞数による分泌量の変化を補正した。mean \pm SD. n = 4, one-way ANOVA with Tukey's test

(d) 培養上清中の LDH 活性を測定した。mean \pm SD. n = 4



図表 28 Rab7L1 は CQ 処理時のリソソームの形態、リソソーム内容物放出を制御する

non-target または Rab7L1 siRNA を導入した RAW264.7 細胞に対し CQ 処理 (100 μM , 3h) を行った。

(a) CQ 処理後の細胞を免疫染色した。赤: LAMP1、青: DRAQ5、スケールバー: 10 μm 。

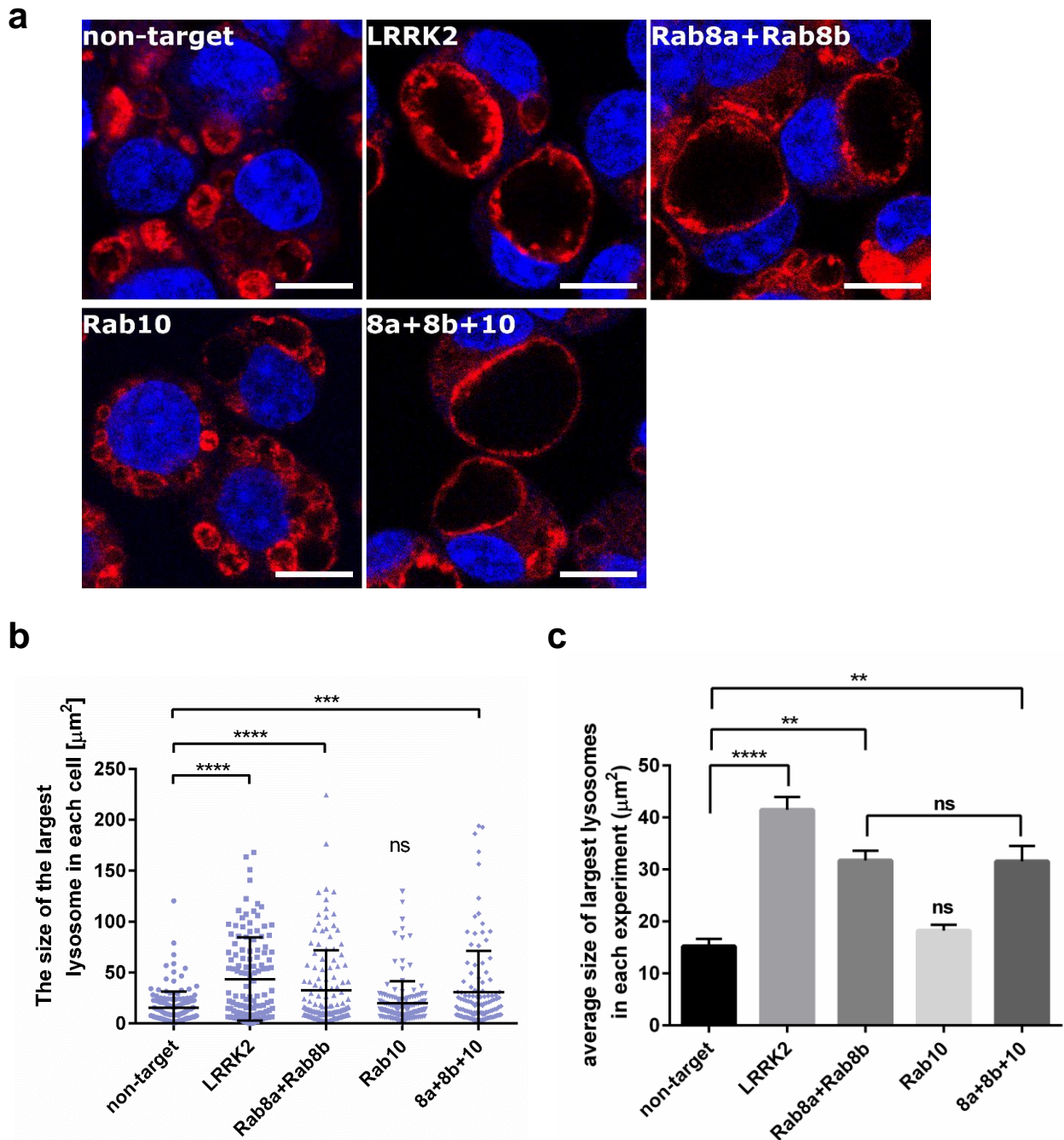
(b) 4 セットの独立した実験におけるそれぞれの最大肥大化リソソームの平均値の平均値を算出した。n=4, mean \pm SEM, ** $P < 0.01$, t test。各セットの各条件において 105-163 細胞を解析した。

(c) 培養上清中の LDH 活性を測定した。mean \pm SD. n = 4

(d) cell lysate および培養上清中の各タンパク量を WB で解析した。

(e) CQ 処理時の培養上清中の intermediate active cathepsin D 量を定量した。cell lysate 中の α -tubulin 量で割ることで細胞数による分泌量の変化を補正した。mean \pm SD. n = 4, **** $P < 0.0001$, one-way ANOVA with Tukey's test。

(f) CQ 処理時の培養上清中の mature cathepsin D 量を定量した。cell lysate 中の α -tubulin 量で割ることで細胞数による分泌量の変化を補正した。mean \pm SD. n = 4, **** $P < 0.0001$, one-way ANOVA with Tukey's test。



図表 29 Rab8a ノックダウンでも LRRK2 ノックダウンと同様に肥大化が亢進する

(a) RAW264.7 細胞に対し記載の siRNA を導入し CQ 処理を行った。赤: LAMP1、青: DRAQ、スケールバー: 10 μm

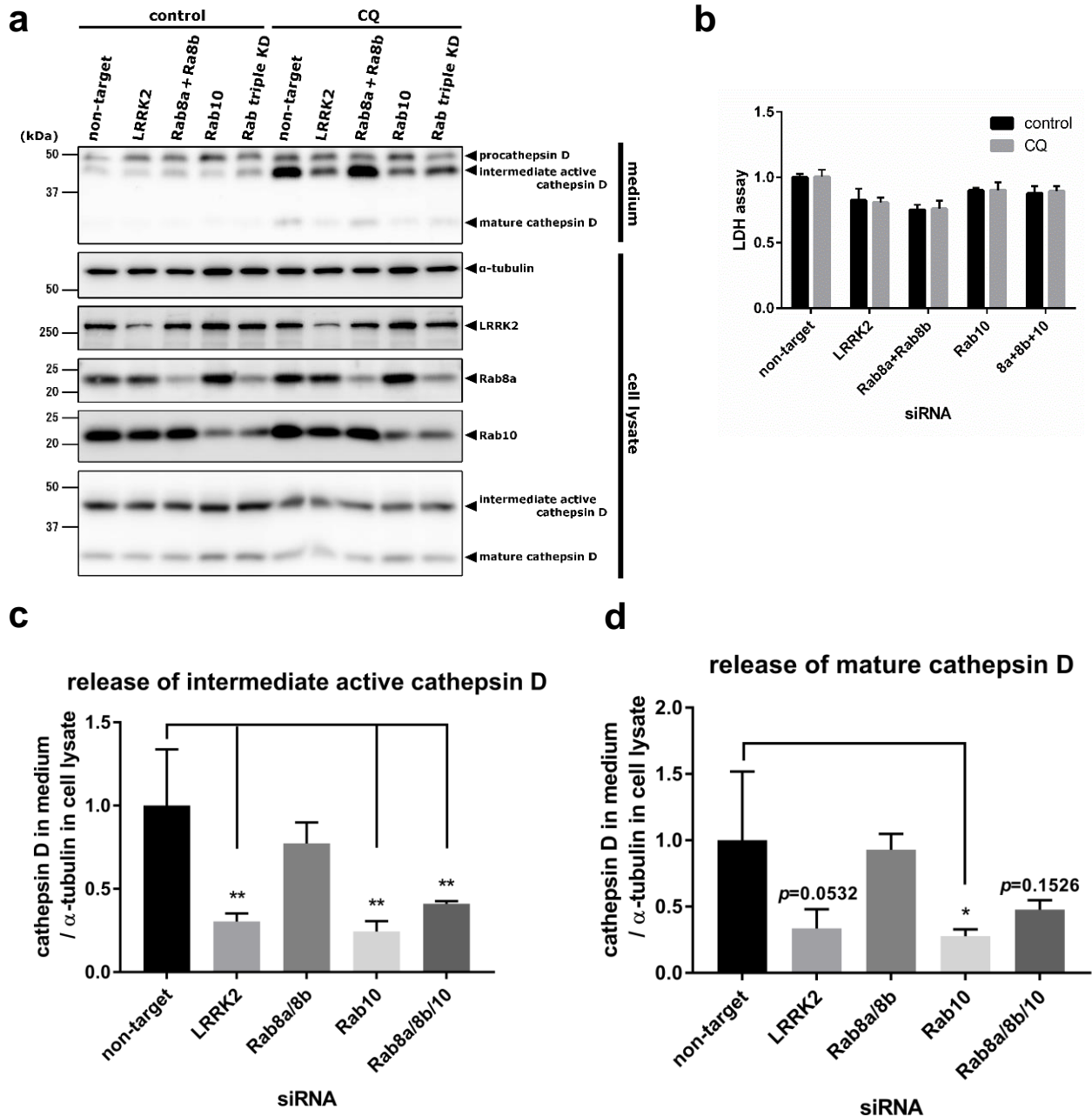
(b) CQ 処理時における各細胞の最も肥大化したリソソームの断面積を定量した。

mean \pm SD, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ns: not significant against non-target, one-way ANOVA with Tukey's test.

(c) b と同様の実験を計 3 セット行い、各実験における最大肥大化リソソームの平均値を定量した。

mean \pm SEM, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, ns: not significant, one-way ANOVA with Tukey's test。各実験セットの各条件において 107-167 細胞を解析した。

Rab10 単独ノックダウンは non-target と有意差が見られなかった。



図表 30 LRRK2 および Rab10 ノックダウンは CQ 処理時の CatD 放出を抑制する

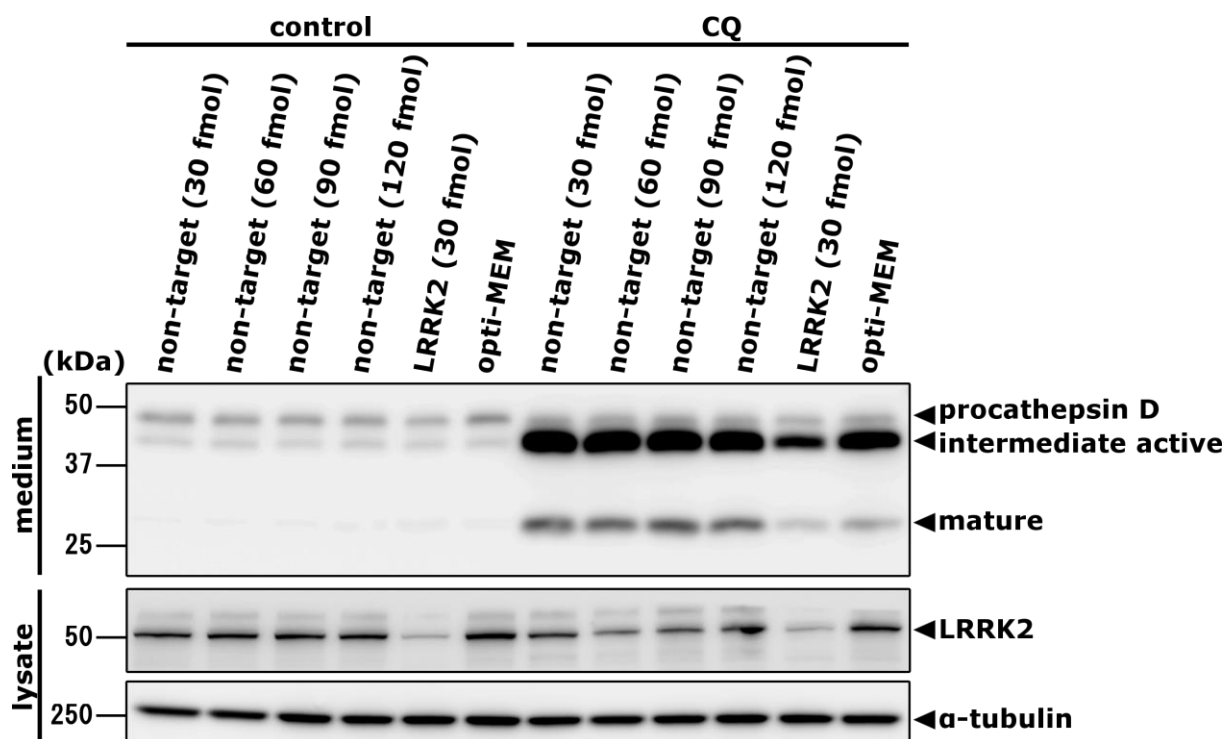
RAW264.7 細胞に対し各種 Rab GTPase のノックダウンを行い、培地中への CatD 放出量を WB で解析した。

(a) WB の解析結果

(b) 培養上清中における LDH 活性。 mean ± SD、n = 3。

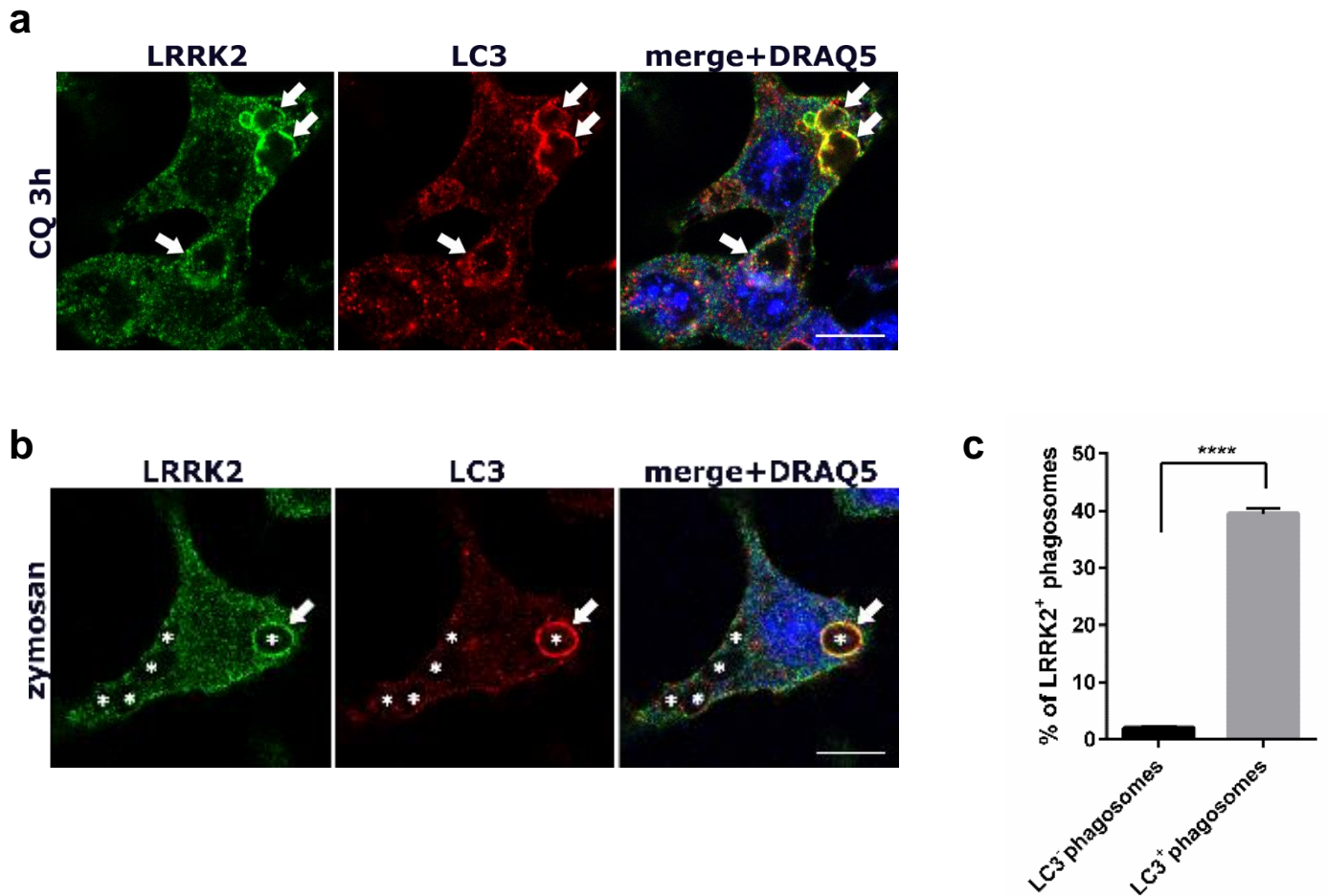
(c) CQ 処理時の培養上清中の intermediate active cathepsin D 量を定量した。cell lysate 中の α-tubulin 量で割ることで細胞数による分泌量の変化を補正した。mean ± SD. n = 3, **P < 0.01, one-way ANOVA with Tukey's test。

(d) CQ 処理時の培養上清中の mature cathepsin D 量を定量した。cell lysate 中の α-tubulin 量で割ることで細胞数による分泌量の変化を補正した。mean ± SD. n = 3, *P < 0.05, one-way ANOVA with Tukey's test。



図表 31 siRNA 導入による cathepsin D 放出への影響

RAW264.7 細胞に対し non-target または LRRK2 の siRNA を導入、CQ 処理時の培養上清中への cathepsin D 放出を解析した。括弧内の数値は 6well plate の 1well あたりに投与した siRNA の量。opti-MEM は siRNA、transfection 試薬を含まない opti-MEM のみを投与したサンプル。



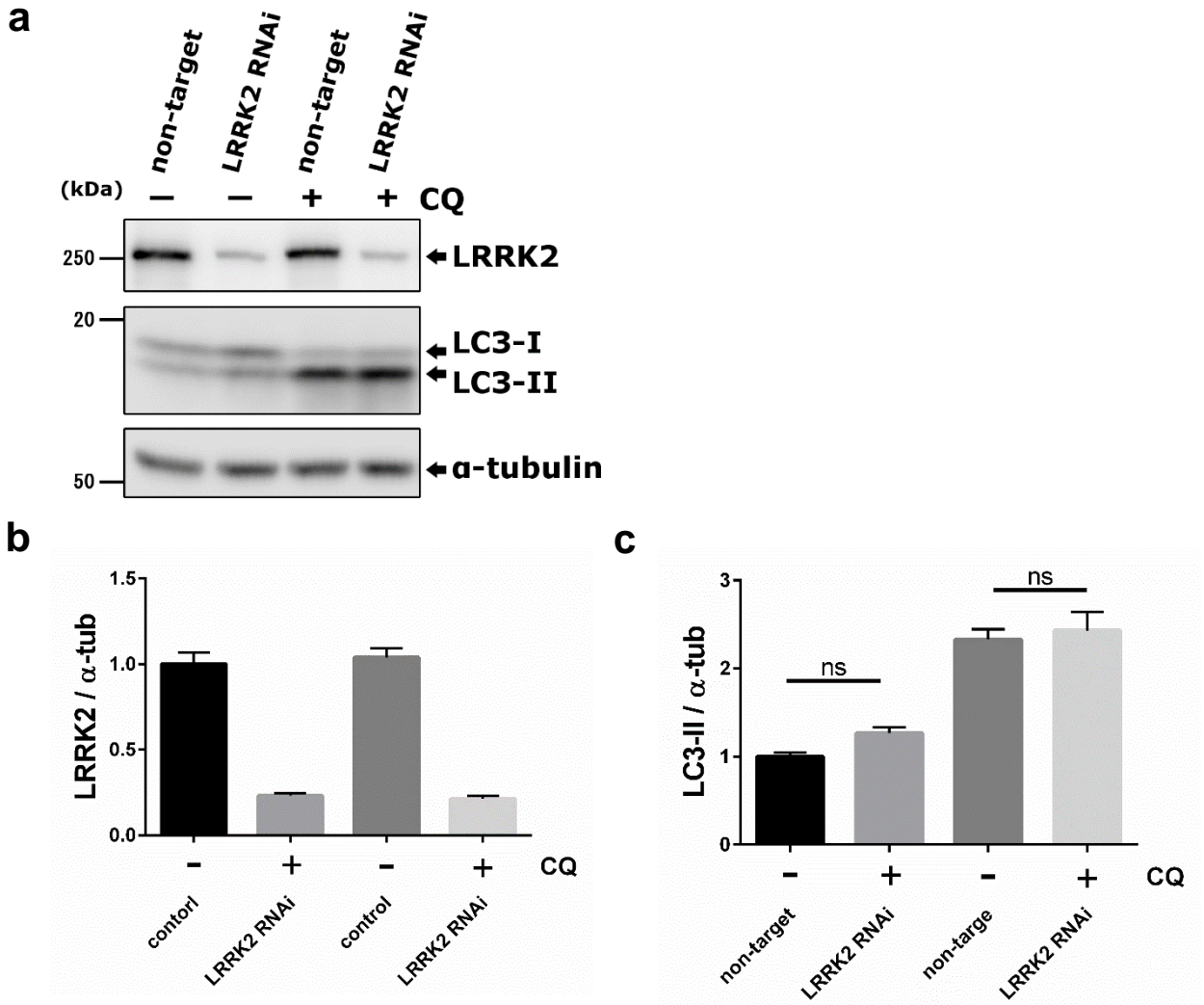
図表 32 LRRK2 は肥大化リソソーム、ファゴソーム上で LC3 と共局在する

RAW264.7 細胞に対し CQ、zymosan 処理を行いメタノールで固定、その後 LRRK2 抗体、LC3 抗体で染色した。

(a) CQ 処理(50 μ m, 3h)時の LRRK2 および LC3 免疫染色像。矢印: LRRK2 および LC3 陽性リソソーム、スケールバー: 10 μ m。

(b) zymosan 食食時の LRRK2 と LC3 の免疫染色像。矢印: LRRK2 および LC3 陽性リソソーム、アスタリスク: ファゴソーム、スケールバー: 10 μ m。

(c) LC3 陽性および陰性ファゴソームそれぞれにおける LRRK2 の陽性率。mean \pm SEM, n=3, t test, **** $P < 0.0001$ 各実験においてそれぞれ 50 以上の LC3 陽性・陰性ファゴソームを解析した。

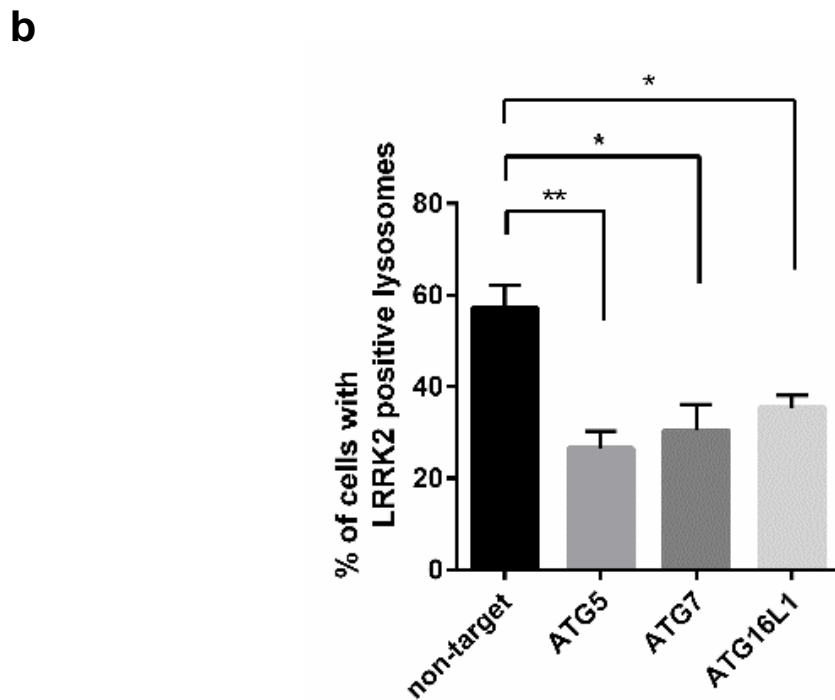
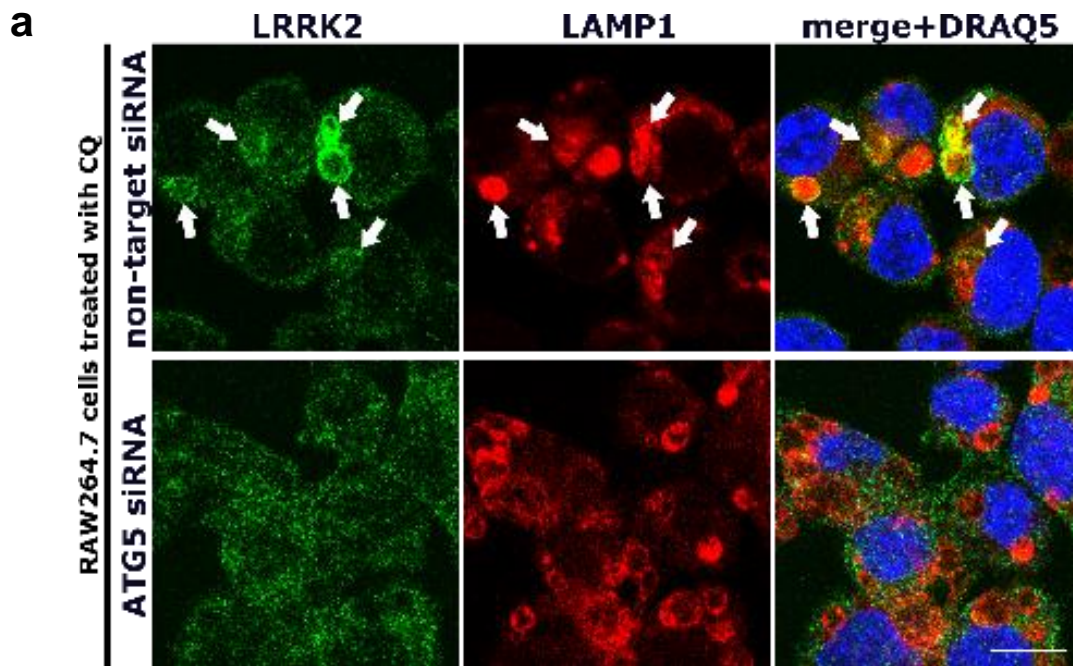


図表 33 LRRK2 ノックダウンは LC3 脂質化を阻害しない

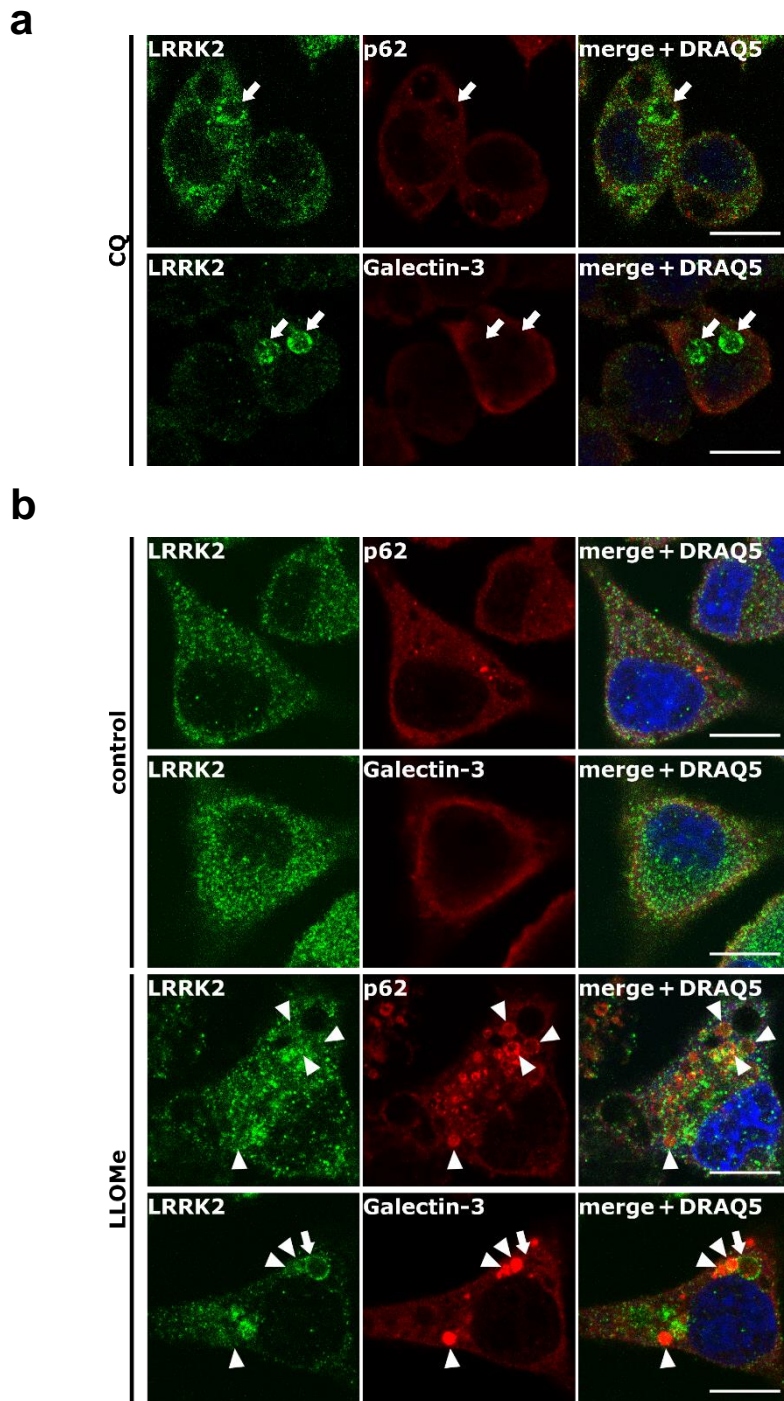
(a) *LRRK2* ノックダウンを行った RAW264.7 細胞に対し CQ 処理を行い LRRK2、LC3-I、LC3-II のタンパク量を WB で解析した。

(b) a で示した実験における LRRK2 のタンパク量を定量した。mean ± SEM, n = 4。

(c) a で示した実験における LC3-II のタンパク量を定量した。mean ± SEM, n = 4, t-test。



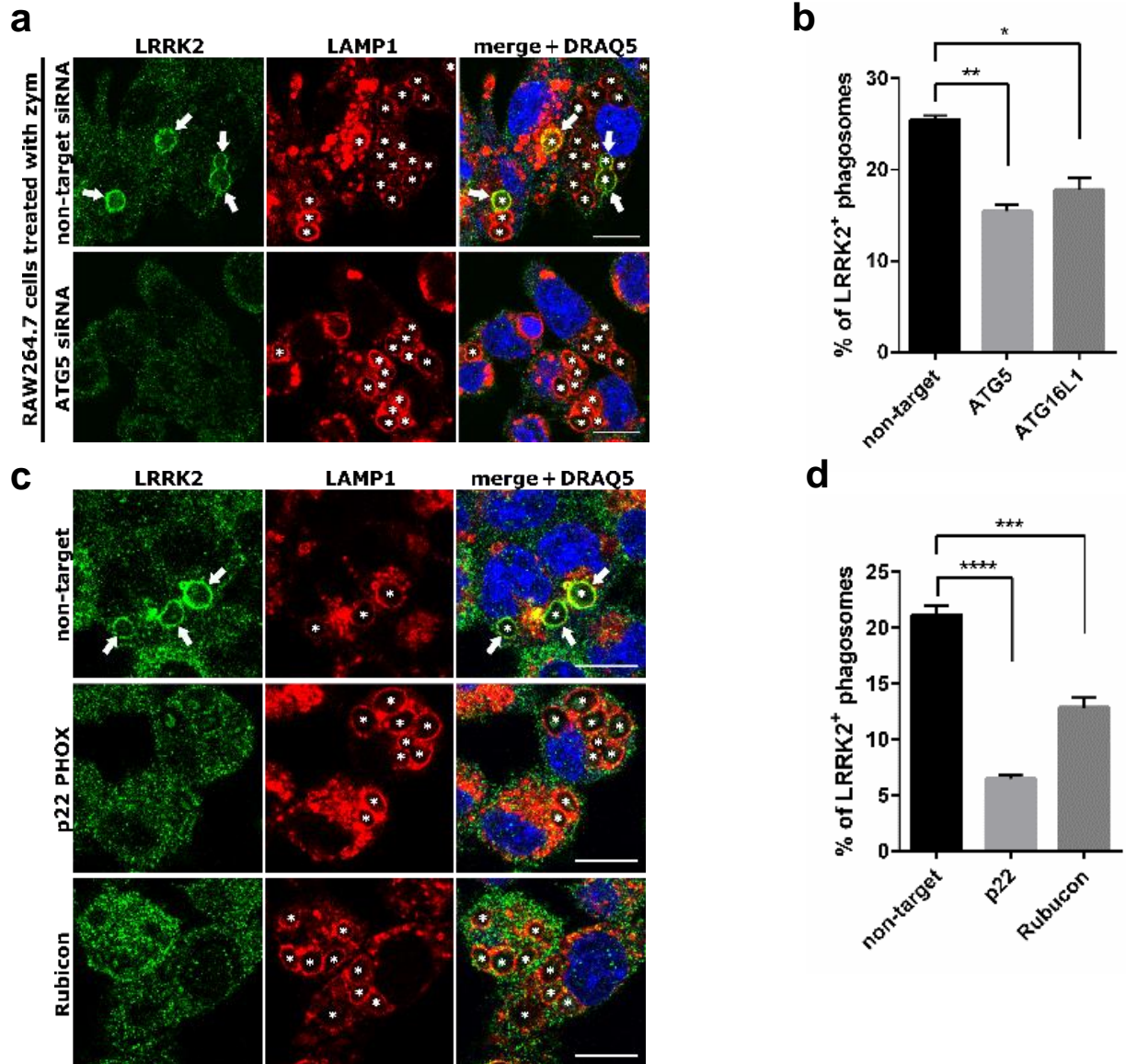
図表 34 オートファジー遺伝子ノックダウンは CQ 処理の LRRK2 のリソソーム局在を抑制する
(a) non-target (上段)もしくは *ATG5*(下段) siRNA を導入した RAW264.7 細胞に対し CQ 処理を行い LRRK2 の局在を解析した。矢印: LRRK2 陽性肥大化リソソーム、スケールバー: 10 μm 。
(b) オートファジー関連遺伝子ノックダウンを行った RAW264.7 細胞に CQ 処理を行い LRRK2 のリソソーム局在を定量した。mean \pm SEM, n = 3, one-way ANOVA with Tukey's test, * P < 0.05, ** P < 0.01。各実験の各条件においてそれぞれ 100 細胞以上をカウントした。



図表 35 LMP と LRRK2 のリソソーム局在は相関しない

(a) RAW264.7 細胞に対し CQ 処理を行い LMP のマーカーである p62、galectin-3 を染色した。CQ 処理では LMP マーカー陽性となるリソソームは出現しなかった。矢印: LRRK2 陽性リソソーム、スケールバー 10 μ m。

(b) RAW264.7 細胞に LLOMe 処理を行い LRRK2、p62、galectin-3 を染色した。LLOMe 処理により p62、galectin-3 陽性リソソームが出現したが、これらと LRRK2 は共局在しなかった。矢印: LRRK2 陽性かつ galectin-3 陰性リソソーム、矢頭: LRRK2 陰性かつ p62 または galectin-3 陽性リソソーム、スケールバー 10 μ m。



図表 36 LAP 経路関連遺伝子のノックダウンは LRRK2 のファゴソーム局在を抑制する

(a) RAW264.7 細胞に *ATG5* siRNA を導入し zymosan を貪食させた。アスタリスク: ファゴソーム、矢印: LRRK2 陽性ファゴソーム、スケールバー 10 μ m。

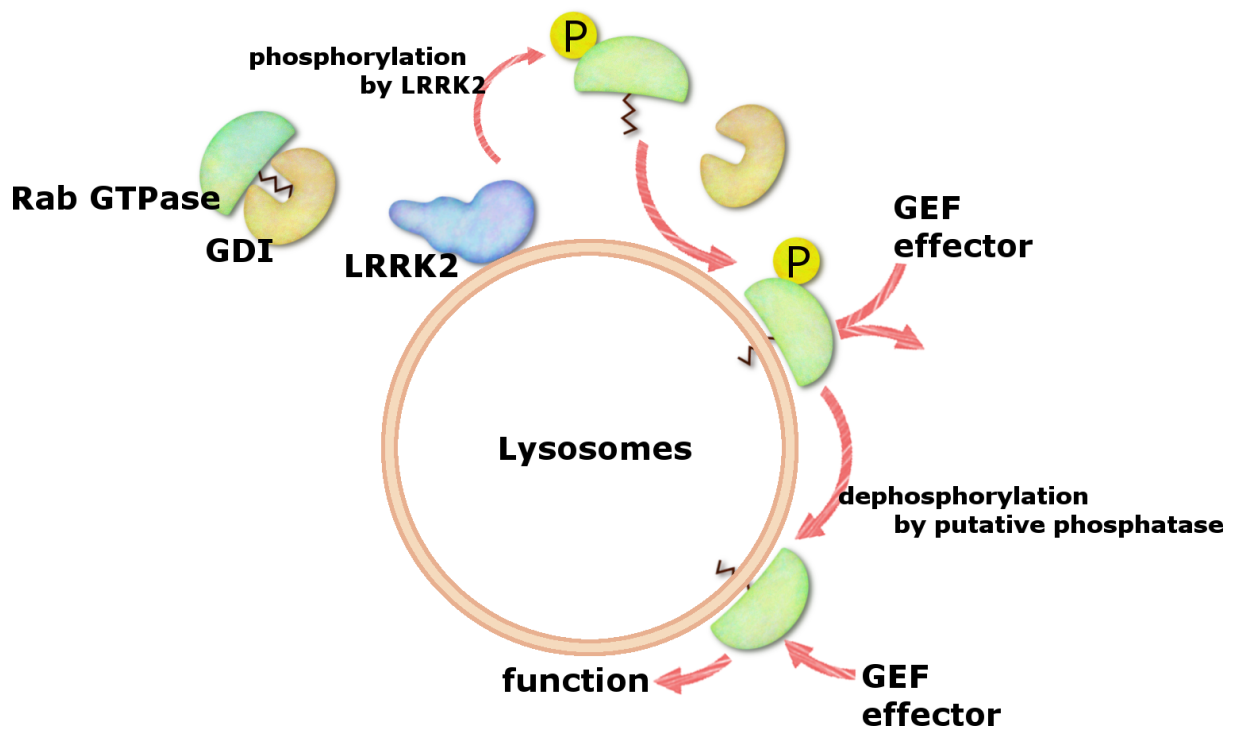
(b) *ATG5*、*ATG16L1* ノックダウン細胞に対し zymosan を貪食させた際のファゴソームへの LRRK2 リクルートを定量した。

mean \pm SEM. n=6, * P < 0.05, ** P < 0.01, one-way ANOVA with Dunnett's test, 各実験の各条件において 100 以上のファゴソームを解析した。

(c) RAW264.7 細胞に *p22 PHOX*、*Rubicon* siRNA を導入し zymosan を貪食させた。アスタリスク: ファゴソーム、矢印: LRRK2 陽性ファゴソーム、スケールバー 10 μ m。

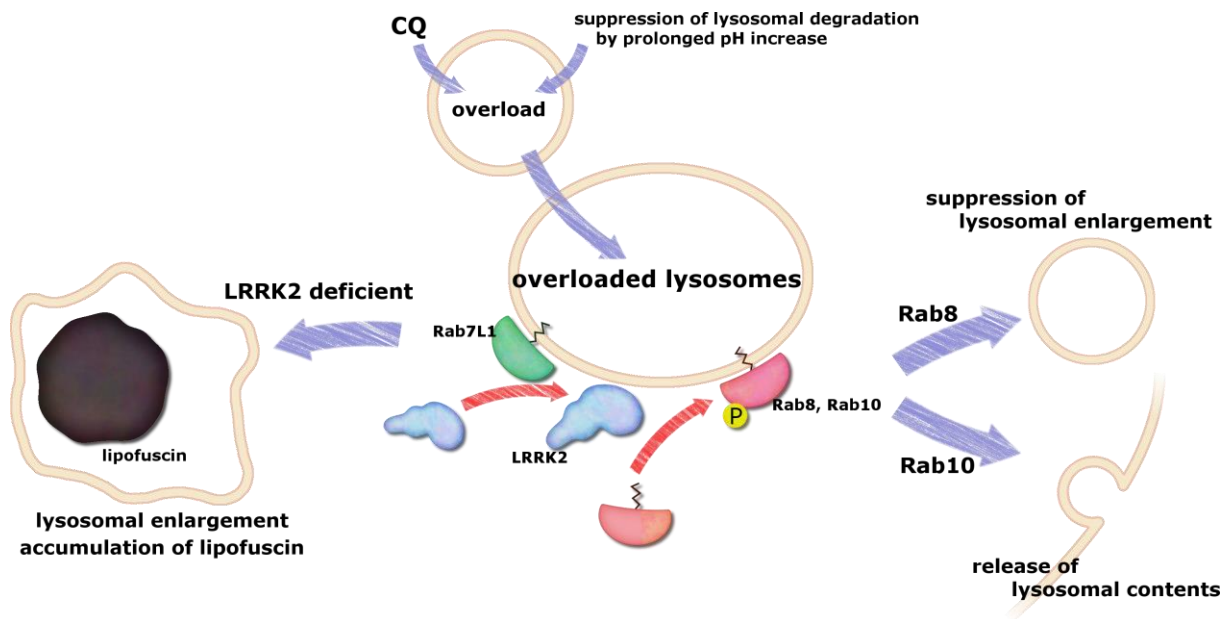
(d) c で示した実験における LRRK2 のファゴソーム局在を定量した。

mean \pm SEM. n=3, *** P < 0.001, **** P < 0.0001, One-Way ANOVA with Dunnett's test, 各実験の各条件において 100 以上のファゴソームを解析した。



図表 37 LRRK2 が Rab GTPase の局在・機能を制御するメカニズムのモデル

LRRK2 はリソソーム膜上に局在し細胞質の Rab GTPase をリン酸化する。リン酸化された Rab GTPase は GDI と解離し、ゲラニルゲラニル基が露出する。すると Rab GTPase は近傍の脂質膜に局在する。リン酸化された Rab GTPase は GDI と同様に GEF やエフェクタータンパク質とも相互作用しない。しかしリソソームにリクルートされた Rab GTPase は直ちに脱リン酸化され GEF、エフェクタータンパク質との相互作用を回復、機能を発揮するようになる。



図表 38 リソソームストレス-LRRK2-Rab GTPase 経路

本研究から推察される LRRK2 を中心としたリソソームストレス応答経路の模式図。リソソームに過積載負荷が加わるとまず Rab7L1 がリソソーム膜上に集積する。Rab7L1LRRK2 と結合するアダプタータンパク質として機能し、LRRK2 をリソソーム膜上にリクルートする。LRRK2 は Rab8a、Rab10 を含む複数の Rab GTPase をリン酸化することでリソソーム膜上にリクルートする。これらの Rab GTPase はそれぞれ LRRK2 の下流分子として機能し、Rab8a・Rab8b は肥大化の抑制、Rab10 はリソソーム内容物の排出を制御する。生体内においても LRRK2 はリソソームストレスに応答しており、LRRK2 の機能喪失は少なくとも近位尿細管上皮細胞においてはリポフスチンの蓄積やリソソームの肥大化などのリソソーム異常が加齢依存的に進行する。

謝辞

はじめに、本研究を遂行するにあたり東京大学大学院医学系研究科神経病理学分野、岩坪威教授に厚く感謝申し上げます。自分が医学部に在籍していた頃から研究室に受け入れてくださり、正規のメンバーでないにもかかわらず自由に実験ができる環境を下さいました。また、その後も博士課程に進学し今日に至るまでミーティング、セミナーなどの場で研究に関する重要な提言・指導をしていただきました。加えて、研究以外に関しても熱心に面倒を見ていただきました。

同教室、桑原知樹助教には直接の指導者として研究の仕方、学会発表、博士論文、論文執筆に至るまで広くご指導いただきました。至らぬ点が多く頑固な私に対して、忍耐強く様々なアドバイスを下さりご指導いただきました。この場を借りてこれまでの感謝を申し上げます。

順天堂大学神経機能構造学分野、小池正人教授には **LRRK2** の免疫電顕撮影で大変お世話になりました。

また伊藤弦太助教、上川路翔悟さんには学部時代に研究室に出入りさせていただいたころ、ご指導いただきました。実験に関して右も左も分からない上、研究室に来るのも夕方だけの自分に対し、実験を基礎から丁寧に教えてくださりありがとうございました。

神経病理学教室の橋本唯史徳仁准教授(現社会連携講座教室)、若林朋子助教、山田薫助教、薬学系研究科機能病態学教室の富田泰助教授、高鳥翔助教、堀由紀子助教にも研究グループを越えて **LRRK2** に関するディスカッションをしていただき、深く感謝申し上げます。

同じパーキンソン病-**LRRK2** グループのメンバーの藤本哲太さん、小森禎之さん、櫻井まりあさんには、日ごろの研究生活を通して様々なことを学ばせていただき、時に実験を手伝っていただきました。この場を借りて感謝申し上げます。

グループを越えて研究のディスカッションをしたり、また様々な研究室のイベントを企画したりし、研究生活に潤いを与えてくださった研究室の皆様方にも感謝申し上げます。

最後に、研究生活を送るにあたり様々な点で支えてくれた家族に感謝します。