

論文の内容の要旨

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

江口智也

要旨

LRRK2 (Leucine-Rich Repeat Kinase 2) は常染色体優性遺伝性の家族性パーキンソン病 (Parkinson's disease, PD) の原因遺伝子である。また複数のゲノムワイド関連解析の結果から孤発性 PD のリスク遺伝子としても同定されている。加えて近年の大規模な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関連する遺伝子であることが報告されている。*LRRK2* がどのように PD およびその他の疾患発症に関与するのか、その分子メカニズムを明らかにすることで疾患に対する新たな予防・治療法の標的を発見できると期待されている。しかしながら *LRRK2* がそれぞれの疾患発症機序にどのように関与するのか具体的なことは明らかでない。*LRRK2* と疾患との関係解明にあたり、その基礎として *LRRK2* の持つ分子細胞生物学的な生理機能の解明が重要であると考えられる。

LRRK2 は 2527 アミノ酸からなる巨大なタンパク質であり、分子内に GTPase ドメイン、キナーゼドメインなど複数のドメインを有している。*Lrrk2 (LRRK2 のマウスオルソログ)* ノックアウトマウスは腎臓近位尿細管上皮細胞においてリソソームの肥大化とリポフスチンの蓄積を呈し、*LRRK2* のリソソームに対する機能が示唆されるが、その詳細は明らかでなかった。*LRRK2* のキナーゼ活性の基質候補はこれまでに多数報告されている。多くは *in vitro* での基質であるが、近年、Rab8a、Rab10 を含めた複数の Rab GTPase が *LRRK2* の *in cell* における基質であるとする報告がなされた。しかしながら *LRRK2* が Rab GTPase をリン酸化することで細胞内においてどのような機能が発揮されるのか、その分子細胞生物学的な意義は明らかでなかった。生化学的な解析により *LRRK2* は細胞質画分のみならず膜画分に検出されることが報告されており、細胞内のいずれかの構造に局在することが示唆されている一方、免疫細胞化学による解析ではその具体的な局在は明らかにされていなかった。そこで私は *LRRK2* の細胞内局在を解析すると共に、*LRRK2* の局在、基質である Rab GTPase との関係、そして *LRRK2* やその基質のリソソームにおける機能を明らかにする研究に着手した。

まず、複数の細胞種における内因性 *LRRK2* および過剰発現 *LRRK2* の細胞内局在について、免疫細胞化学的手法を用いて解析した。その結果、*LRRK2* は多くの細胞で細胞質に広く局在したが、ごく一部の細胞において肥大化したリソソームに局在した。*LRRK2* のリソソーム局在が観察された細胞において大小のリソソームが確認されたが、これらの内 *LRRK2* が局在したのは肥大化したリソソームのみであった。このことから *LRRK2* は肥大化したリソソームに局在する可能性が考えられた。クロロキン (CQ) はリソソーム指向性試薬でありリソソームを人為的に肥大化させる。細胞に対し CQ 処理を行うとリソソームは肥大化し、その肥大化リソソームの一部に *LRRK2* がリクルートされた。内因性 *LRRK2* を染色する際の抗体の特異性に関しては複数の抗体で同一の染色像が得られること、*Lrrk2* KO マウス由来の細胞で染色が見られないことで確認した。

リソソームに対するどのような刺激が *LRRK2* のリソソーム局在を誘導するのか、薬理学的手法で検討を行った。リソソーム膜上のプロトンポンプの阻害剤である Bafilomycin A1 (BafA1) は、リソソーム pH を十分に上昇させたにもかかわらず *LRRK2* のリソソーム局在を誘導しなかった。またリソ

ソームを肥大化させる Vacuolin-1 も、リソソームの肥大化は誘導したが LRRK2 のリソソーム局在を誘導しなかった。加えて BafA1 存在下で CQ 処理を行うと CQ によるリソソームの肥大化及び LRRK2 のリソソーム局在が消失した。CQ はリソソームの酸性度依存的にリソソーム内腔に蓄積し、BafA1 存在下ではその蓄積が生じない。以上のことから pH の上昇やリソソームの形態的变化ではなく、リソソーム内腔に CQ が蓄積することが LRRK2 のリソソームへのリクルートに必要であることが考えられた。また BafA1 は短時間の処理では LRRK2 のリソソーム局在を誘導しなかったが、長時間の処理では LRRK2 のリソソーム局在を誘導した。これはリソソーム pH を上昇させ 2 次的にリソソーム内腔への基質蓄積を誘導したためと考えられる。このことからリソソーム内腔に物質が蓄積し過積載負荷が生じると、LRRK2 がリクルートされることが考えられた。

次に LRRK2 のリソソーム局在を制御する因子に関して探索を行った。*Rab7L1* は孤発性パーキンソン病のリスク遺伝子座にコードされる遺伝子であり、その翻訳産物は LRRK2 と相互作用することが知られている。*Rab7L1* の細胞内局在を解析したところ定常状態ではトランスゴルジに局在していた。しかしながら細胞に CQ 処理を行うと LAMP1 で染色されるリソソームに局在した。また *Rab7L1* の過剰発現は CQ 処理時における LRRK2 のリソソーム局在を亢進させ、また *Rab7L1* のノックダウンは LRRK2 のリソソーム局在を抑制した。以上のことから *Rab7L1* が LRRK2 の局在を制御している可能性が示された。*Rab7L1* は LRRK2 と相互作用するため、特に *Rab7L1* が LRRK2 をリソソーム膜上へリクルートするアダプターとして機能している可能性が考えられた。

LRRK2 がリソソームにリクルートされた後に、リソソーム膜上で何らかの基質をリン酸化する可能性が考えられた。複数の Rab GTPase が LRRK2 の細胞内における有力な基質候補であると報告されており、CQ 処理時に肥大化リソソーム上で LRRK2 と共局在する Rab GTPase を探索した。LRRK2 の基質となりうる Rab GTPase を細胞内に発現させ、それぞれ LRRK2 との共局在が見られるか検討を行ったところ、興味深いことに *Rab8a* および *Rab10* は LRRK2 のキナーゼ活性依存的に LRRK2 と共局在することが判明した。内因性の *Rab8a* および *Rab10* もやはり CQ 処理時に LRRK2 陽性肥大化リソソームに局在し、LRRK2 のキナーゼ活性阻害剤処理により *Rab8a*、*Rab10* の局在は消失した。*Rab8a* の LRRK2 によるリン酸化部位である Thr72 をアラニンに置換した非リン酸化模倣変異体は LRRK2 によるリクルートを受けなかった。以上の結果から LRRK2 は *Rab8a*、*Rab10* をリン酸化することで肥大化リソソームにリクルートする可能性が考えられた。

LRRK2 および下流でリクルートされる *Rab8a* および *Rab10* がリソソーム過積載負荷時にどのような機能を有するか検討を行った。*LRRK2* のノックダウンは単独ではリソソームの形態を変化させなかった。しかしながらこの細胞に CQ 処理を行うとリソソームの肥大化が有意に増強された。2 種類の LRRK2 キナーゼ活性阻害剤処理も CQ によるリソソームの肥大化を増強した。またリソソーム内容物の細胞外への排出を培地中 Cathepsin D (CatD) 量を指標に解析したところ LRRK2 のノックダウンおよびキナーゼ活性阻害剤処理は CQ 処理時の CatD 放出を減少させた。*Rab8a* および相補的な機能を有する *Rab8b* のダブルノックダウンは CQ 処理時のリソソーム肥大化を増強した。しかし *Rab8a*、*Rab8b* ダブルノックダウンは培地中への CatD 放出量は変化させなかった。一方で *Rab10* のノックダウンは CQ 処理時のリソソーム肥大化を増強しなかったが、CatD の放出量は減少させた。以上の結果から LRRK2 はリソソーム膜上に複数の Rab GTPase をリクルートし、*Rab8a*・*Rab8b* を介してリソソーム肥大化の抑制を、*Rab10* を介してリソソーム内容物の放出を制御する可能性が示された。

本研究から、LRRK2 はリソソーム過積載負荷時にオートファジー分子の下流でリソソームにリクル

ートされ、基質である **Rab8a**、**Rab10** をキナーゼ活性依存的にリクルートする可能性が示された。リクルートされた **Rab8a** はリソソームの肥大化を抑制する一方 **Rab10** はリソソームからの内容物排出を制御し、それぞれ異なる機能を有していることが考えられた。**LRRK2** は複数の **Rab GTPase** の局在と機能をキナーゼ活性依存的に制御し、多角的にリソソームストレスに対して応答する分子である可能性が考えられた。また *Lrrk2* KO マウスの近位尿細管上皮細胞内で見られるリソソーム肥大化とリポフスチン蓄積は、**LRRK2** によるリソソームストレス応答経路の破綻によるものであると考えられる。本研究により **LRRK2** はリソソームの恒常性、ひいてはリソソームの老化を制御するタンパク質である可能性が示唆された。このリソソーム恒常性維持経路の破綻が複数の疾患に関連する可能性が考えられる。