

審査の結果の要旨

氏名 江口 智也

本研究はパーキンソン病を含め複数の疾患との関連が遺伝学的に示されている遺伝子、*LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2)*について、その翻訳産物の正常機能を解析したものである。培養細胞を用いた実験系において、以下の結果を得ている。

1. RAW264.7 細胞(マウスマクロファージ系培養細胞), 3T3 Swiss-albino 細胞(マウス繊維芽細胞)の内因性 *LRRK2* が定常状態において肥大化リソソームに局在した。また 3xFLAG *LRRK2* を安定に発現する HEK293 細胞においても同様の局在が観察された。加えてリソソームを肥大化させるクロロキン (CQ)処理を行うと、*LRRK2* のリソソーム局在が誘導され、*LRRK2* が肥大化リソソームにリクルートされる可能性が示された。
2. *LRRK2* の相互作用分子である Rab7L1 は CQ 処理時にトランスゴルジからリソソームへと局在変化した。また Rab7L1 の過剰発現は CQ 処理時の *LRRK2* リソソーム局在を亢進させ、Rab7L1 のノックダウンは *LRRK2* のリソソームへの局在を抑制した。これにより Rab7L1 が *LRRK2* のリソソーム局在を制御している可能性が示された。
3. *LRRK2* の基質として報告されている Rab8a, Rab10 は、CQ 処理時に肥大化リソソーム上で *LRRK2* と共局在した。Rab8a, Rab10 はキナーゼ活性喪失変異型 *LRRK2* とは共局在しなかった。また *LRRK2* のキナーゼ活性阻害剤存在下で CQ 処理を行うと *LRRK2* 陽性肥大化リソソームにおける Rab8a, Rab10 の局在が消失した。以上の結果から *LRRK2* はキナーゼ活性依存的に Rab8a, Rab10 をリソソームヘリクルートする可能性が示された。加えて *LRRK2* によるリン酸化部位をアラニンに置換した T72A Rab8a は *LRRK2* 陽性肥大化リソソームへの局在を呈さなかったことから、*LRRK2* による Rab GTPase のリクルートは Rab のリン酸化を介している可能性が示された。
4. *LRRK2* のノックダウンおよびキナーゼ活性阻害剤処理は CQ 処理時のリソソーム肥大化を増強し、また CQ 依存的なリソソーム放出を抑制した。このことから *LRRK2* はリソソーム肥大化を抑制し、またリソソーム放出を正に制御していることが示され

た。**Rab7L1** のノックダウンも同様に **CQ** 処理時のリソソーム肥大化を増強し、また **CQ** 依存的なリソソーム放出を抑制した。また **Rab8** 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、**Rab10** のノックダウンは **CQ** 依存的なリソソーム放出を抑制した。このことから **Rab7L1**, **LRRK2**, **Rab8/10** は **CQ** 処理時に順にリソソーム膜上へ移行し、リソソームストレスに応答している可能性が示された。

以上、本論文は少なくとも **CQ** 処理時に **Rab7L1-LRRK2-Rab8/10** が順にリソソーム膜上にリクルートされることを明らかにし、これらの分子がリソソームの恒常性維持に関与している可能性を示した。本研究はこれまで未知に等しかった **LRRK2** の正常機能および **LRRK2** とその基質である **Rab8/10** の関係解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。