

論文の内容の要旨

論文題目 パーキンソン病病因遺伝子産物 LRRK2 による Rab7L1 リン酸化に関する研究

氏名 藤本哲太

背景

パーキンソン病 (Parkinson's disease; PD) は加齢に伴い発症する頻度の高い神経変性疾患であり、高齢化が進行する現代においてその病態形成の分子メカニズム解明と根本的治療法の確立は急務である。PD の病理学的特徴として、中脳黒質を主体とする神経変性・脱落と、 α -synuclein タンパク質凝集体を主成分とする神経細胞封入体の出現が挙げられる。

LRRK2 (*leucine-rich repeat kinase 2*) は PD の一部に存在する常染色体優性遺伝性の家族性パーキンソン病 (Familial PD; FPD) において、最も高頻度に変異が認められる遺伝子である。*LRRK2* に変異を有する PD 患者の臨床・病理所見は孤発性 PD に類似している。また、*LRRK2* の一塩基多型は孤発性 PD の強い危険因子でもあることから、FPD のみならず、孤発性 PD の発症にも重要な役割を果たしていると考えられている。*LRRK2* タンパク質は 2527 アミノ酸からなるキナーゼであり、これまでに N1437H、R1441C/G/H、Y1699C、G2019S、I2020T といった 7 種類のアミノ酸変異が FPD に連鎖することが知られている。これまでに FPD 変異型 *LRRK2* を培養細胞に過剰発現させるとキナーゼ活性依存的に神経突起の退縮が起き、アポトーシスが増加することなどが報告された。しかし、*LRRK2* がキナーゼ活性を介して神経細胞死を引き起こす分子メカニズムは明らかになっていない。

これまでに *LRRK2* は様々な細胞内輸送制御に関わる分子との関連が報告されており、特に細胞内輸送のスイッチ分子として知られる Rab GTPase ファミリー分子のいくつかは基質として同定されている。*LRRK2* との関連が報告されている Rab GTPase の中でも、特に孤発性 PD の危険因子として推定される Rab7L1 は *LRRK2* と遺伝学的に相互作用し、*LRRK2* と協働して神経突起の形態やリソソーム加水分解酵素の運搬を担うマンノース 6-リン酸受容体の細胞内輸送、リソソームの形態を調節することが報告された。また、培養細胞において *LRRK2* と Rab7L1 は結合し、オートファジー・リソソーム経路を介して TGN の分解を促進することが報告されている。*LRRK2* と Rab7L1 に関する詳細な分子機構の解明は、FPD のみならず孤発性 PD の神経変性の原因を明らかにする糸口と考えられるが、未だ不明である。

目的

これまでの知見から、Rab7L1 が *LRRK2* の細胞内における基質として有力な候補であると考

えられた。そこで本研究では、LRRK2 による Rab7L1 リン酸化について生化学的に検討し、その機能的意義の一端を解明することを目的とし、実験的検討を行った。

結果・考察

本研究において、精製組換えタンパク質を用いた *in vitro* の検討から、LRRK2 が Rab7L1 を直接リン酸化することが示された。また、細胞内においても LRRK2 キナーゼ活性依存的に Rab7L1 がリン酸化されたことから、Rab7L1 は細胞内における LRRK2 の基質であることが示唆された。

野生型と異なりゴルジ体への局在がみられない T21N、Q67L 変異型 Rab7L1 は LRRK2 によるリン酸化を受けないことから、Rab7L1 はゴルジ体において LRRK2 によるリン酸化を受ける可能性が示唆された。

LRRK2 による Rab7L1 リン酸化部位を同定するため、Rab7L1 配列内の各セリン・スレオニン残基をアラニンに置換した Rab7L1 変異体を用いて Phos-tag SDS-PAGE による解析を行った。その結果、S72A 変異型 Rab7L1 において LRRK2 キナーゼ活性依存的なリン酸化の消失が認められた。また、リン酸化 Ser72 Rab7L1 特異抗体を作出して検討したところ、LRRK2 キナーゼ活性依存的な Rab7L1 リン酸化の増加が認められた。従って、LRRK2 による Rab7L1 のリン酸化部位は 72 番目のセリン残基であると考えられた。

Rab7L1 の 72 番目のセリン残基は、switch II ドメインと呼ばれる領域内に位置しており、このドメインは GTP または GDP の結合によって立体構造が変化し、活性型 (GTP 結合型) の Rab GTPase に結合するエフェクター分子や活性化因子である GEF (guanine-nucleotide exchange factor)、不活性化因子である GAP (GTPase activating protein) などの相互作用分子との結合を調節している領域である。このことから、Rab7L1 の 72 番目のセリン残基がリン酸化されることにより、立体構造が変化して GTP/GDP 結合能に影響を及ぼす可能性も考えられた。そこで細胞内における Rab7L1 の GTP/GDP 結合についての解析を行ったが、リン酸化による GTP/GDP 結合能への影響はみられなかった。

次に FPD 変異型 LRRK2 による Rab7L1 リン酸化について解析を行い、使用した 6 つの FPD 変異型 LRRK2 において共通して細胞内での pSer72 Rab7L1 リン酸化が増加することを見出した。続いて、最近 Rab7L1 が *trans*-Golgi の形態制御に関与することが報告されていることから、LRRK2 による Rab7L1 の 72 番目のセリン残基のリン酸化が *trans*-Golgi の形態制御に修飾的に影響を与える可能性を想定し、免疫細胞化学的な検討を行った。その結果、野生型 Rab7L1 やリン酸化部位欠損型の S72A 変異型 Rab7L1 を発現させた細胞では、TGN が核近傍に集簇した形態を示した。一方、リン酸化模倣型の S72E 変異型 Rab7L1 を発現させた細胞や、LRRK2 と野生型 Rab7L1 を共発現させた細胞では TGN が細胞質に散在した形態・分布を示した。この結果から、LRRK2 は Rab7L1 の Ser72 リン酸化を介して、*trans*-Golgi の形態を制御している可能性が示唆さ

れた。本研究におけるリン酸化模倣型の S72E 変異型 Rab7L1 や、LRRK2 と野生型 Rab7L1 を共発現させた細胞における TGN の形態は、PD を含む種々の神経変性疾患脳内において観察される TGN の断片化に類似しており、LRRK2 による Ser72 Rab7L1 のリン酸化を介した TGN の形態異常が神経変性に関与している可能性も考えられた。

結論

本研究において、LRRK2 が細胞内において Rab7L1 の 72 番目のセリン残基をリン酸化し、そのリン酸化を介して *trans*-Golgi の形態の制御に関与していることを見出した。本研究から得られた知見は、LRRK2 による PD 発症の分子機構の解明に示唆を与えるものと考えられる。