

パーキンソン病 病因タンパク質 LRRK2 の関わる新規ストレス応答機構の発見

1. 発表者：

江口 智也 (東京大学大学院医学系研究科 博士課程4年生 (研究当時))
桑原 知樹 (東京大学大学院医学系研究科 脳神経医学専攻 神経病理学分野 特任助教)
櫻井 まりあ (東京大学医学部 研究生)
岩坪 威 (東京大学大学院医学系研究科 脳神経医学専攻 神経病理学分野 教授)

2. 発表のポイント：

- ◆パーキンソン病の病因タンパク質「LRRK2」が、自らの持つ酵素活性による基質タンパク質「Rab」のリン酸化を介して、物質分解に関わる細胞小器官であるリソソームに対するストレスに応答し、リソソームの恒常性を維持する仕組みを明らかにしました。
- ◆LRRK2 と Rab タンパク質の持つ新たな機能に加えて、リソソームの過積載が引き起こす新規の細胞ストレスに対する応答機構を世界で初めて明らかにしました。
- ◆LRRK2 の関わるリソソームストレス応答機構は、パーキンソン病の根本的治療法の新たな標的として有望と期待されます。

3. 発表概要：

パーキンソン病は主に高齢者に発症し、運動の障害をきたす代表的な神経変性疾患ですが、 α シヌクレインなどの病因タンパク質が特定の神経細胞に蓄積し、細胞死に至る原因は明らかになっていません。パーキンソン病の一部には遺伝性を示す例があり、代表的な病因遺伝子の1つとして LRRK2 (注1) が知られています。従って LRRK2 の生体における機能を明らかにすることは、パーキンソン病の発症の仕組みを解明する鍵になると考えられます。今回、東京大学大学院医学系研究科の江口智也大学院生(研究当時)、桑原知樹特任助教、岩坪威教授、医学部の櫻井まりあ研究生らの研究グループは、LRRK2 が細胞内のタンパク質などの分解に関わる小器官であるリソソーム(注2)に対するストレスに応答して、その恒常性を維持する働きを持つことを発見しました。その仕組みとして、LRRK2 がストレスを受けて肥大化したリソソームの膜上に移行し、Rab(注3)と呼ばれるタンパク質群をリン酸化して膜上にとどめることにより、過積載状態になったリソソームの形態や機能を調節することを示しました。この発見は、リソソームがストレスに応答する新たな機構を提唱するものであると同時に、病因タンパク質の細胞内での分解障害や細胞外への放出などの、パーキンソン病の病態メカニズムの理解と治療法の開発にもつながるものと期待されます。

なお、本研究は順天堂大学医学部・神経生物学・形態学・小池正人教授、東北大学大学院生命科学系研究科・膜輸送機構解析分野・福田光則教授、大阪大学大学院医学系研究科・細胞生物学・原田彰宏教授との共同研究で行われました。本研究成果は、米国科学アカデミー紀要 オンライン版に9月10日に掲載されます。

4. 発表内容：

【研究の背景】

パーキンソン病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、65歳以上のおよそ100人に1人がふるえや動作の鈍さなどの運動症状を発症します。現在のところドパミン補充療法などの対症療法が普及していますが、神経細胞の変性と死そのものを止める根本的な

治療法はまだ存在しません。神経細胞に α シヌクレインなどの病因タンパク質が蓄積して、細胞死が起きるメカニズムを明らかにすることが、治療法の開発のためにも重要です。パーキンソン病の一部に遺伝性を示す症例が存在し、その研究はパーキンソン病の病因解明に有用な情報をもたらします。本邦の相模原で最初に発見された病型(PARK8)の家族性パーキンソン病の病因遺伝子として、2004年にLRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2) 遺伝子が報告されました。LRRK2はタンパク質リン酸化酵素の活性を持つこと、パーキンソン病を生じる遺伝子変異は酵素活性を上昇させることが報告されましたが、LRRK2が細胞の中でどのようなタンパク質をリン酸化しているのか、またその異常がどのようにしてパーキンソン病を引き起こすのかは不明でした。2016年に、LRRK2は細胞内の小胞の輸送に関わる低分子量Gタンパク質であるRab (Rab8, Rab10など)をリン酸化することが報告されました。一方、LRRK2遺伝子を欠損(ノックアウト)した動物の一部の臓器で、細胞内でタンパク質など様々な物質の分解に関わる細胞内小器官であるリソソームに障害が見られることから、LRRK2とリソソームの機能との間に何らかの関連があることも予想されてきました。しかしLRRK2、Rabとリソソームの機能的な関連、またこれらとパーキンソン病との関係は全く不明でした。

【研究の内容】

東京大学大学院医学系研究科の江口智也院生、桑原知樹特任助教、岩坪威教授らのグループは、LRRK2の機能を明らかにすることを目的に、まず培養細胞を用いてLRRK2の細胞内での局在を詳細に観察し、リソソームの中に溜まってその肥大化を起こす薬剤であるクロロキンを細胞に投与した際に、LRRK2がリソソームの膜上に移行することを見出しました。このようにLRRK2は内容物が蓄積して過積載状態となり、ストレスを受けたリソソームの膜上に集積すること(図1)、それに伴ってLRRK2のリン酸化酵素活性が上昇することが分かりました。次に、この現象とLRRK2によるRabタンパク質のリン酸化の関係を検討するため、27種類のRabファミリータンパク質を1つずつ細胞に発現させ、LRRK2によるリン酸化に依存してリソソームに集積するRabを探索しました。その結果、肥大化したリソソーム上にはまずRab7L1が集積したのち、LRRK2が移行すること、これに引き続いてLRRK2によりリン酸化されたRab8aとRab10がリソソーム上に集積することが分かりました(図1)。さらにLRRK2やRab8, 10の機能をLRRK2阻害剤やRNA干渉(注4)により抑制すると、リソソームの肥大化はより亢進し、リソソーム内容物の細胞外への放出が抑制されました。リソソーム上に集積したリン酸化Rab8a、Rab10は、相互作用因子であるEHBP1, EHBP1L1を動員してリソソーム膜の動態を調節することも分かりました。LRRK2を欠損(ノックアウト)したマウスは、クロロキンによるリソソームストレス刺激に対してリソソームが拡大しやすい脆弱性を示しました。以上の結果から、リソソームの過積載によるストレスに対して、Rab7L1, LRRK2からRab8/10に至る一連のタンパク質がリソソームに局在を変化させ、Rab8, 10のリン酸化を介してリソソームの恒常性を維持しようとする仕組み(図2)が細胞には存在することが分かりました。

【社会的意義と今後の展開】

本研究により、LRRK2の正常な機能がリソソームに関係することが初めて明らかになりました。さらにリソソームの過積載という細胞ストレスに応答するシグナル経路が存在し、そこにLRRK2やRabが関わることを発見した点も画期的な成果です。Rabによる細胞内での膜や小胞の輸送の制御は、GTPの結合や加水分解によって調節されることが知られていましたが、ストレスに依存して生じるリン酸化という修飾によっても時・空間的な制御を受けるという、今までにない新たな概念が生まれました。

パーキンソン病患者の脳には、 α シヌクレインタンパク質がレビー小体として蓄積し、神経細胞の死に関係します。近年、 α シヌクレインの分解にリソソームが関係すること、リソソームなどから α シヌクレイン等の異常に凝集したタンパク質が細胞外に放出され、他の神経細胞に病変が広がってゆくことも示唆されています。LRRK2 がリソソームに対するストレスに応答し、細胞の恒常性を維持しようとする一方で、異常タンパク質のリソソームでの分解が抑制され、細胞外への放出が促進されれば、パーキンソン病の病態が促進される可能性も想定されます。最近になり LRRK2 の酵素活性阻害薬が開発され、ヒトでの治験も進んでいます。本研究の成果を、 α シヌクレインなどの病因タンパク質の動態の解析に繋げてゆくことにより、LRRK2 遺伝子変異を有する家族性パーキンソン病のみならず、パーキンソン病全般の病態解明と、治療法の開発が格段に進むものと期待されます。

5. 発表雑誌：

雑誌名：米国科学アカデミー紀要 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) 9月10日(米国東部夏時間)の週のオンライン版

論文タイトル：LRRK2 and its substrate Rab GTPases are sequentially targeted onto stressed lysosomes and maintain their homeostasis

著者：Tomoya Eguchi[#], Tomoki Kuwahara[#], Maria Sakurai[#], Tadayuki Komori, Tetta Fujimoto, Genta Ito, Shin-ichiro Yoshimura, Akihiro Harada, Mitsunori Fukuda, Masato Koike & Takeshi Iwatsubo* (*corresponding author, [#]co-first authors)

DOI 番号、論文(open access) URL：www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1812196115

6. 問い合わせ先：

【研究に関すること】

国立大学法人東京大学 大学院医学系研究科 神経病理学分野

教授 岩坪 威 (いわつぼ たけし)

電話：03-5841-3541 (直通)、Email：iwatsubo@m.u-tokyo.ac.jp

国立大学法人東京大学 大学院医学系研究科 神経病理学分野

特任助教 桑原 知樹 (くわはら ともき)

電話：03-5841-3533

【報道に関すること】

国立大学法人東京大学 大学院医学系研究科 総務係

電話：03-5841-3304 FAX：03-5841-8585

7. 用語解説：

(注1) LRRK2

Leucine-rich repeat kinase 2 の略。ラーク・トゥーと発音される。1978年に日本の相模原で発見された常染色体優性遺伝性家族性パーキンソン病の大家系を皮切りに、世界で同様の家系が報告され、2004年に欧州の研究グループにより LRRK2 遺伝子が同定された。臨床経過、 α シヌクレイン蓄積を特徴とする病理学的変化は、成人発症の通常のパーキンソン病に類似している。アッシュケナージ系ユダヤ人では G2019S 変異の頻度が高く、Google の創業者 Sergey Brin 氏は本変異の保有者であることを公表している。LRRK2 タンパク質は複数の機能ドメインを有す

る巨大なタンパク質であり、Rab などの基質タンパク質をリン酸化するキナーゼ活性を有し、家族性パーキンソン病変異型 LRRK2 はキナーゼ活性が亢進している。最近米国 Denali 社による LRRK2 キナーゼ活性阻害剤の第 1 相治験の成功が報じられた。

(注 2) リソソーム

真核生物が持つ細胞内小器官の 1 つであり、内部に多種類の加水分解酵素を含み、タンパク質、脂質などの細胞内外成分の分解・再利用装置として機能する。細胞内の代謝回転、細胞移動、細胞膜修復、免疫応答などにも重要な役割を果たす。パーキンソン病をはじめとする神経変性疾患の神経細胞に蓄積する病因タンパク質の一部はリソソームにおいて分解され、変性疾患ではリソソームでの分解が低下している可能性が注目されている。

(注 3) Rab

Rab は低分子量 G タンパク質（グアニンヌクレオチド結合タンパク質）に属する主要なファミリー分子群であり、真核生物において普遍的に保存され、ヒトやマウスでは 60 種類以上の Rab アイソフォームが存在する。主に細胞内小胞輸送を司り、各 Rab アイソフォームごとに異なる細胞内の場で機能する。Rab は GTP（グアニンヌクレオチド 3 リン酸）を結合した活性化型と、GDP（グアニンヌクレオチド 2 リン酸）を結合した不活性化型の間をサイクルすることにより小胞輸送を制御することが知られているが、Rab のリン酸化の役割は従来ほとんど不明であった。

(注 4) RNA 干渉

細胞内の遺伝子発現が二本鎖の RNA により抑制される現象であり、RNA 干渉法は生命科学分野において特定の遺伝子の機能を抑制するために使われる普遍的な研究手法である。

7. 添付資料：

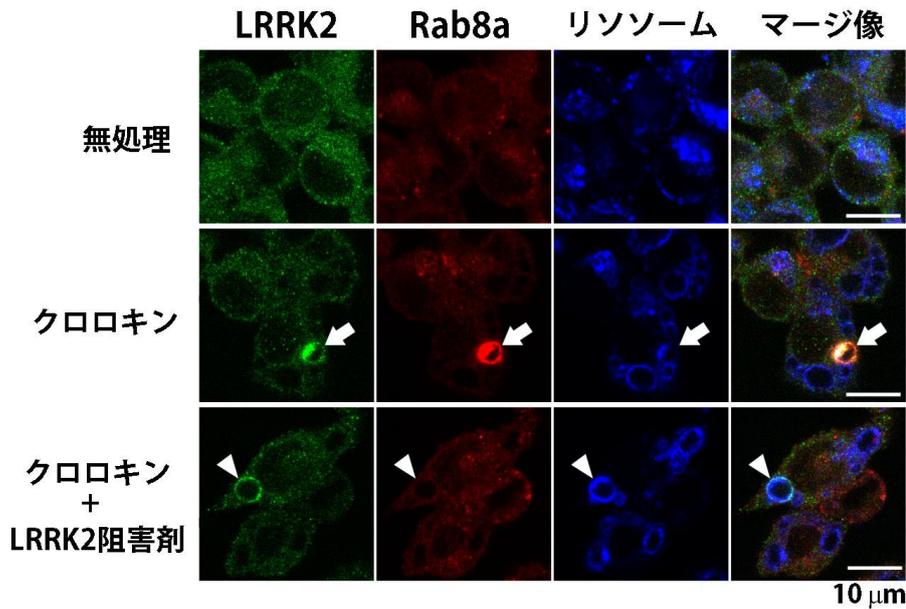


図1. LRRK2 と基質 Rab は肥大化したリソソーム上に集積する
 矢印は LRRK2 と Rab8a が集積したリソソーム、矢頭は LRRK2 のみが集積し、Rab の局在しないリソソームを示す。クロロキニン処理により生じた Rab8a の集積は、LRRK2 阻害剤により抑制される。

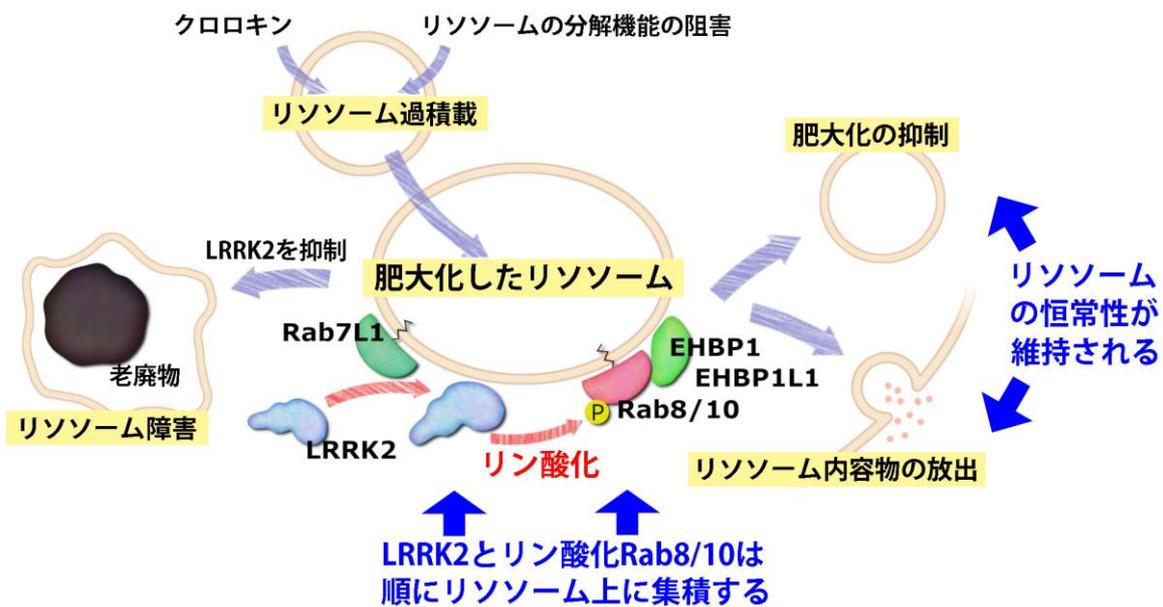


図2. LRRK2 と Rab によるリソソームストレス応答機構の模式図

リソソーム過積載ストレスによりリソソームに集積した Rab7L1 は LRRK2 を集積させ、活性化させる。LRRK2 のリン酸化酵素活性により、基質である Rab8, Rab10 がリソソーム膜上でリン酸化を受け、集積する。Rab8, Rab10 は相互作用因子 EHBP1, EHBP1L1 の作用を介して、リソソームの肥大化抑制、リソソーム内容物の放出促進を生じ、リソソームの恒常性が維持される。LRRK2 の作用が亢進した場合には、リソソームでの分解が不完全となると同時に内容物の放出も増加し、神経変性が促進されることも想定される。