みにれびゅう

Leucine-Rich Repeat Kinase 2の変異を介したパーキンソン病の発症機序

太田　悦朗[1,2]，小幡　文弥[1,2]

1.　はじめに

パーキンソン病（PD）は，中脳黒質の神経細胞死によって運動障害（安静時振戦，筋固縮，無動，姿勢反射障害）や自律神経障害が引き起こされる神経変性疾患である．PD患者の10%は，遺伝的要因が発症に関係している．現在，常染色体優性および劣性遺伝PD家系から同定されたPD原因分子の機能解析によって，ミトコンドリア機能障害，酸化ストレス障害，タンパク質分解機構障害，異常構造物蓄積による細胞毒性などの発症機序の一因が明らかになりつつある[1]．本稿では，日本の優性遺伝PD家系から同定されたPD原因分子Leucine-Rich Repeat Kinase 2（LRRK2）が，どのようにPDを引き起こすのか，その発症機構に関して，自身の研究と最近の話題にもふれながら紹介する．

2.　パーキンソン病の原因遺伝子 *LRRK 2*

LRRK 2 は北里大学免疫学研究室が報告した常染色体優性遺伝PD（PARK8）の候補遺伝子領域内から発見された新規の遺伝子である[2,3]．LRRK2は280 kDaの巨大なタンパク質であり，GTPaseやキナーゼドメインを持つことから，多彩な機能を有することが予想されている（**図1A**）[4]．現在までに，世界中の優性遺伝PD患者から25か所に及ぶLRRK2の変異が報告されており，そのうち最も多く検出される変異はキナーゼドメイン内の活性中心に位置しているG2019S変異である．LRRK2変異は，優性遺伝PD患者において高い頻度で検出されており，PD発症に関わる重要な分子と考えられている．

変異LRRK2が細胞に来す障害としては，軸索伸長や小胞輸送の異常，オートファジーの亢進などが報告されている[5]．現在，これらの要因として有力なものの一つが，G2019S変異LRRK2が示すキナーゼ活性の異常な亢進，すなわちLRRK2によるgain of toxic function説である[6]．しかし，その他の変異LRRK2ではキナーゼ活性の亢進は認められず，別の原因によって細胞死が誘発されていることを示している．この原因を明らかにするため，我々は，PARK8のoriginal familyである日本の優性遺伝PD家系（相模原家系）の発症原因であるI2020T変異LRRK2に関して機能解析を行った[7,8]．

3.　LRRK2のタンパク質安定性

G2019S変異LRRK2については，細胞内半減期が正常LRRK2と同じであり，タンパク質安定性に差異はないことが報告された[5]．一方我々は，ヒト腎臓細胞株HEK293あるいはヒト神経芽細胞株SH-SY5Yに発現させたI2020T変異LRRK2のタンパク質レベルが，正常LRRK2より低い現象を見いだした．また，パルスチェイス実験から，I2020T変異LRRK2は，正常LRRK2とG2019S変異LRRK2に比べて，細胞内での半減期が短いことを明らかにした[9]．これは，I2020T変異LRRK2が細胞内で分解されやすいことを示している．さらに，タンパク質分解阻害剤を用いた実験から，I2020T変異LRRK2のタンパク質分解経路が，ユビキチンプロテアソーム系とオートファジー系であることを明らかにした[9]．これらの事実をふまえ，次にI2020T変異が神経変性疾患に特徴的なアポトーシスにどのように影響するのかについて解析を進めた．

4.　LRRK2とアポトーシス

変異LRRK2を過剰発現させた培養細胞では，正常LRRK2を過剰発現させた細胞に比べ，アポトーシスが亢進することが報告されている．さらに正常LRRK2を過剰発現させた細胞も，元の細胞に比べてアポトーシスが亢進する．これらの報告は，変異の有無に関わらず，LRRK2そのものがアポトーシスを亢進させることを示唆する．一方，LRRK2ノックアウトマウスの腎細胞においては，正常マウスに比べ，オートファジーの異常からアポトーシス

[1] 北里大学医療衛生学部免疫学，[2] 北里大学医療衛生学部細胞デザイン研究開発センター（〒252-0373　神奈川県相模原市南区北里1-15-1）

Pathogenesis of Parkinson's disease through LRRK2 mutation

Etsuro Ohta and Fumiya Obata（Division of Immunology, Kitasato University School of Allied Health Sciences, 1-15-1 Kitasato, Minami-ku, Sagamihara, Kanagawa 252-0373, Japan）

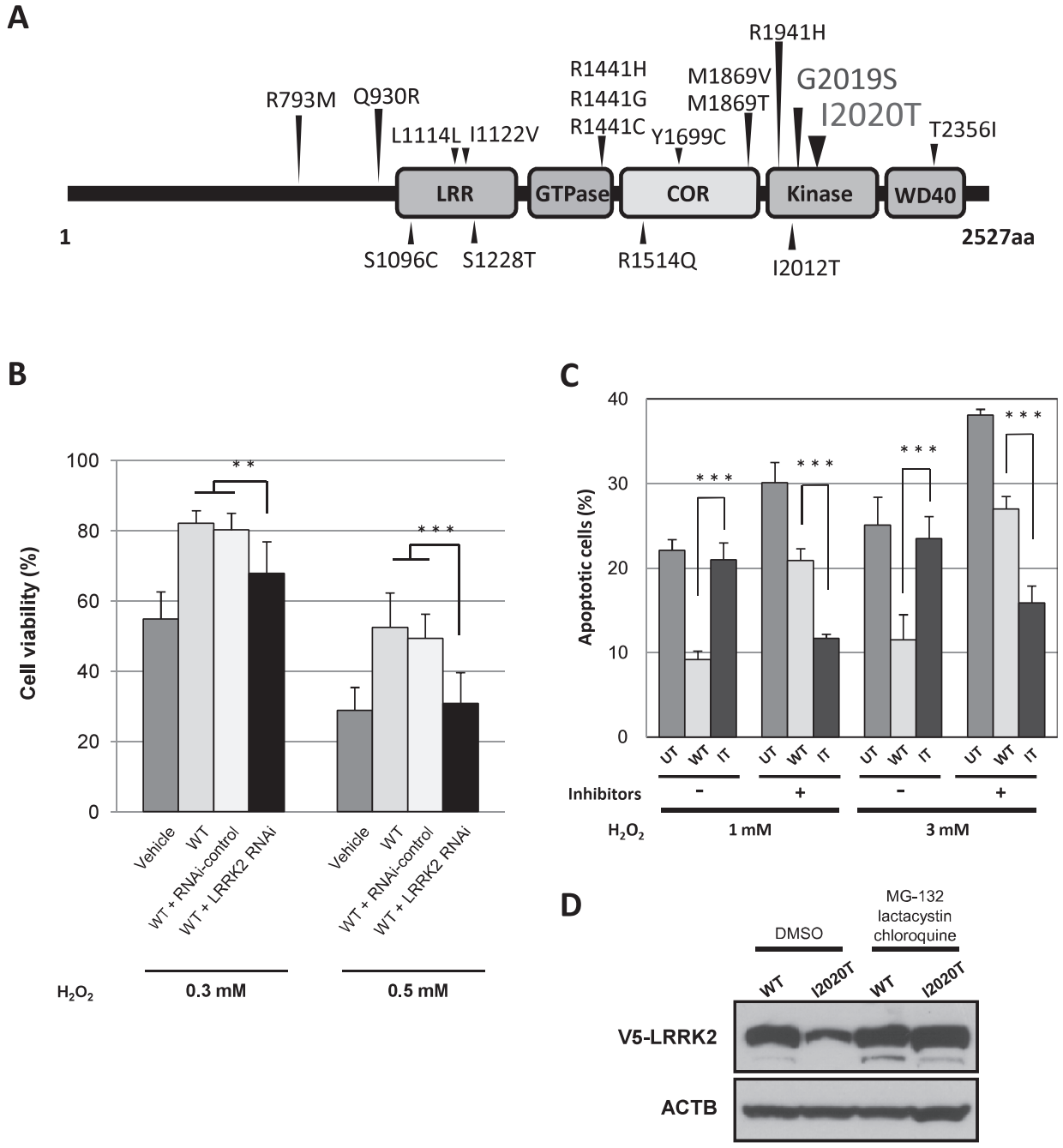

図1　LRRK2の構造とアポトーシス抑制能

（A）LRRK2の機能的ドメイン構造と既報変異．LRR：leucine Rich Repeat, COR：C-terminal of Roc.

（B）RNAiにより正常LRRK2をノックダウンした細胞の過酸化水素（H_2O_2）添加時の細胞生存率．Vehicle：非過剰発現細胞，WT：正常LRRK2過剰発現細胞，WT＋RNAi-control：RNAi-controlを導入した正常LRRK2過剰発現細胞，WT＋LRRK2 RNAi：正常LRRK2をノックダウンした細胞.

（C）ユビキチンプロテアソーム系（MG-132，ラクタシスチン）およびオートファジー系（クロロキン）タンパク質分解阻害剤カクテルで処理したLRRK2過剰発現細胞に対するH_2O_2添加によるアポトーシス誘導実験．UT：非過剰発現細胞，WT：正常LRRK2過剰発現細胞，IT：I2020T変異LRRK2過剰発現細胞.

（D）タンパク質分解阻害剤カクテルでタンパク質分解を阻害したI2020T変異LRRK2．ACTB：Beta-actin.

の亢進が報告されている[10]．すなわちこの場合は，LRRK2がアポトーシスを抑制することが考えられる．このように，LRRK2がアポトーシスを抑制するのか否かについては議論が分かれている．

我々は，正常LRRK2を過剰発現させたHEK293に過酸化水素（H_2O_2）を添加し，アポトーシスを誘導した．還元発色試薬であるWST-8による細胞生存率測定の結果，正常LRRK2過剰発現細胞では，非発現細胞に比べ，生存率の上昇がみられた（図1B）[11]．また，RNA干渉（RNAi）により正常LRRK2をノックダウンすると，細胞生存率が低下した．これらの結果から，正常LRRK2はアポトーシス抑制能を有することがわかった．他の報告との違いは，我々が酸化ストレス下で解析を行ったのに対し，他の報告では定常状態における解析を行っていることかもしれない．すなわち，細胞内の状態に応じてLRRK2が異なる機能を発揮する可能性が考えられる．次に，I2020T変異LRRK2は，上述のように細胞内で分解されやすいことから，そのアポトーシス抑制能が低下する可能性を考えた．それを確認するため，アポトーシスした細胞で細胞表面に露出するホスファチジルセリンを認識するアネキシンVを用いた解析の結果，I2020T変異LRRK2過剰発現細胞では，正常LRRK2過剰発現細胞に比べ，アポトーシス抑制能の低下が示された（図1C）．さらに，タンパク質分解阻害剤を用いてI2020T変異LRRK2の細胞内分解を止めた結果，アネキシンV陽性アポトーシス細胞数が減少した（図1C, D）[11]．この結果は，アポトーシス実行分子の一つである活性化カスパーゼ9の解析によっても確認された．これらの知見から我々は，I2020T変異LRRK2発現細胞における神経細胞死の一因はLRRK2の量的不足によって生じるアポトーシス抑制能の低下によるものと考えている．

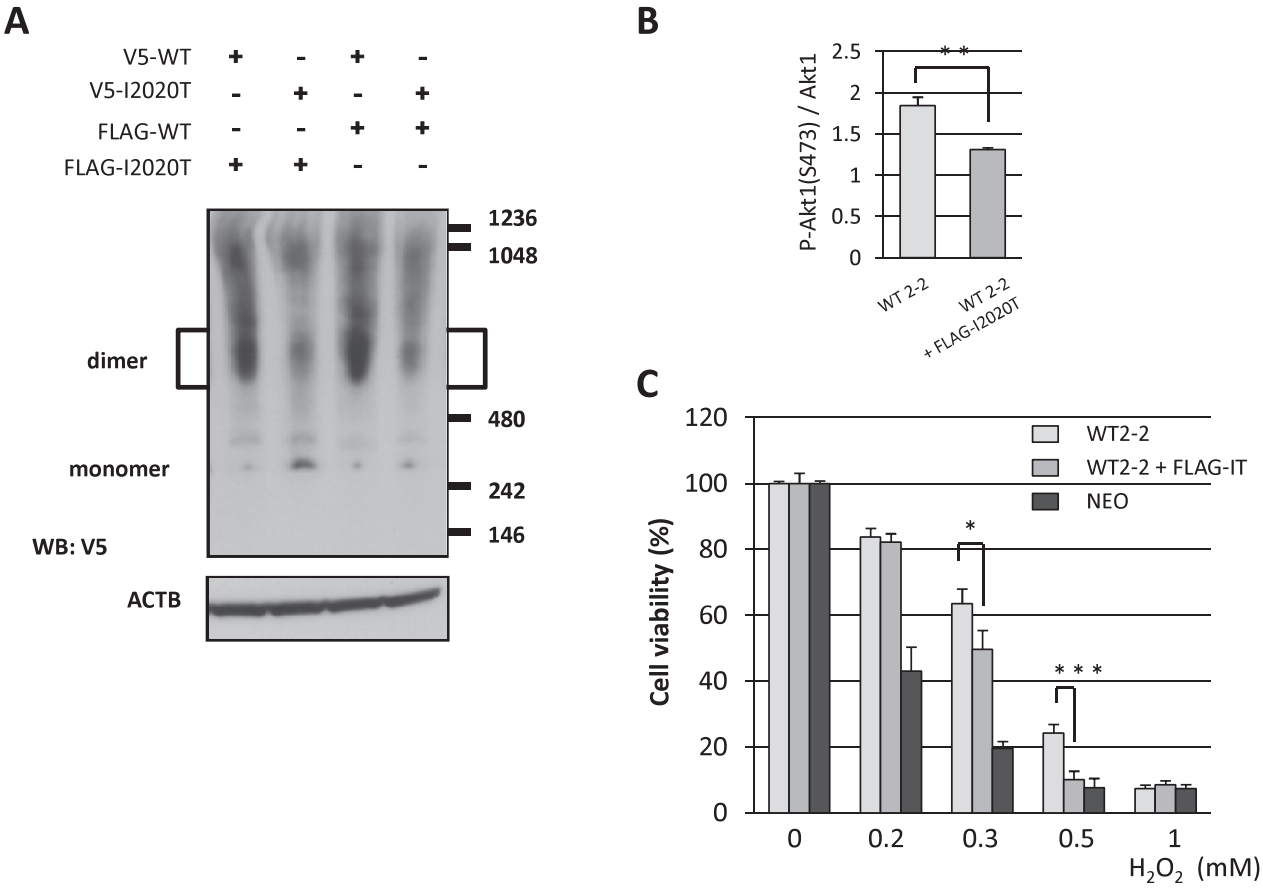

図2　LRRK2のヘテロ二量体

（A）Blue Native-PAGEを用いたLRRK2のヘテロ二量体［WT/I2020T］とホモ二量体［WT/WT，I2020T/I2020T］のタンパク質安定性．正常LRRK2とI2020T変異LRRK2を共発現したHEK293の細胞抽出液をBlue Native-PAGEによって分離後，抗V5抗体を用いてWT/I2020Tのタンパク質を調べた．

（B）I2020T変異LRRK2を追加導入した正常LRRK2安定発現SH-SY5YにおけるAkt1のリン酸化能．WT2-2：正常LRRK2安定発現SH-SY5Y，WT2-2＋FLAG-I2020T：I2020T変異LRRK2を追加導入した正常LRRK2安定発現SH-SY5Y．

（C）I2020T変異LRRK2を追加導入した正常LRRK2安定発現SH-SY5YのH_2O_2添加時の細胞生存率．WT2-2：正常LRRK2安定発現細胞，WT2-2＋FLAG-IT：I2020T変異LRRK2を追加導入した正常LRRK2安定発現SH-SY5Y，NEO：非遺伝子導入SH-SY5Y．

5. LRRK2の基質分子

LRRK2の基質分子として，タンパク質翻訳に関与する4E-BP1など多くの候補分子が報告されているが，真の基質分子の同定には至っていない[12]．我々は，細胞生存シグナルに重要な分子であるAkt1がLRRK2のアポトーシス抑制能に関係する可能性を考え，リコンビナント正常LRRK2タンパク質によるAkt1のリン酸化能を解析した．その結果，LRRK2はAkt1に直接結合し，Akt1のSer^{473}をリン酸化した[13]．また，RNAiにより正常LRRK2をノックダウンしたSH-SY5Yは，コントロール細胞に比べ，Akt1のリン酸化が低下した．したがって，Akt1は正常LRRK2の基質分子であることが明らかとなった．さらに，I2020T変異，G2019S変異，R1441C変異LRRK2では，正常LRRK2に比べ，Akt1との結合能およびSer^{473}のリン酸化能が低下していた．これらの事実から，変異LRRK2では，Akt1のリン酸化能が低くアポトーシス抑制能が破綻

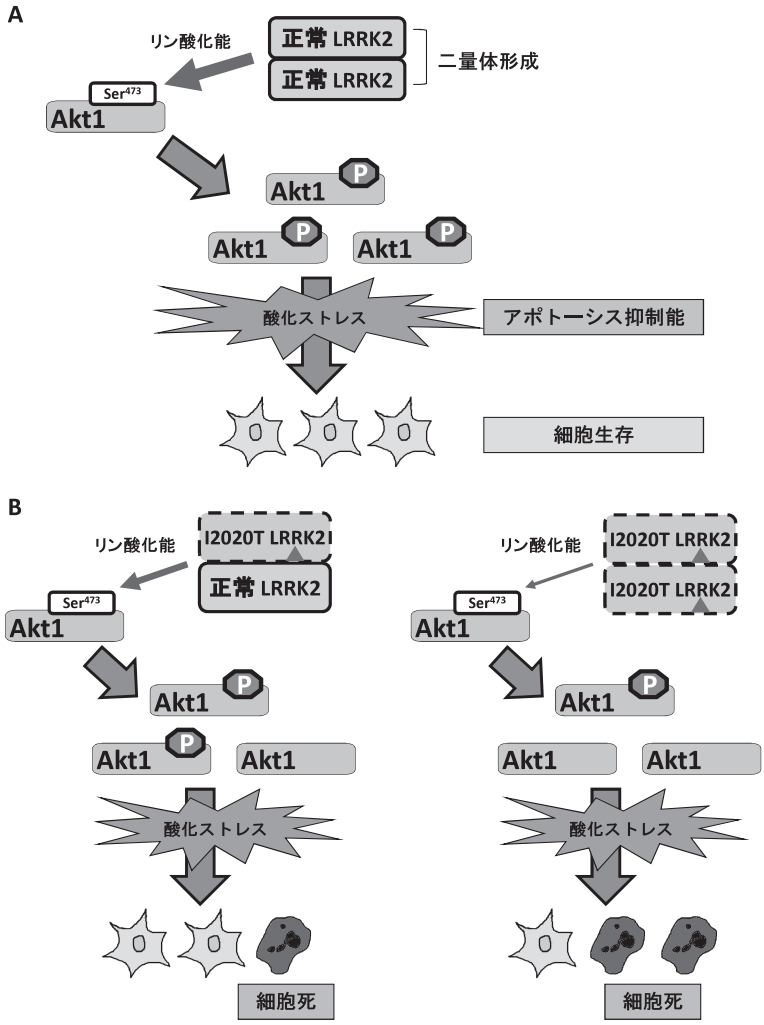

図3 変異LRRK2によるパーキンソン病の発症機序の仮説
（A）正常LRRK2のAkt1を介した酸化ストレスに対するアポトーシス抑制能．
（B）I2020T変異LRRK2と正常LRRK2のヘテロ二量体およびI2020T変異LRRK2のホモ二量体が引き起こすアポトーシス抑制能低下による細胞死．I2020T変異LRRK2は，正常型LRRK2に比べAkt1のリン酸化能が低く，タンパク質不安定性からユビキチンプロテアソーム系およびオートファジー系による分解を受けやすいため，Akt1によるアポトーシス抑制能が低下して細胞死を誘発しやすい（右図）．またI2020T変異LRRK2は，正常型LRRK2とのヘテロ二量体形成によって，正常LRRK2の分解誘発，Akt1のリン酸化に対する機能抑制をそれぞれ来し，リン酸化Akt1を減少させることで細胞死を誘発する（左図）．

する可能性が考えられた．それに加え，I2020T 変異 LRRK2 の場合は，上述した細胞内分解による量的低下がみられることから複数の要因が神経変性に関係することが考えられる．

6. LRRK2 のヘテロ二量体形成

LRRK2 は主に二量体で細胞内に存在し，キナーゼ活性を持つことが報告されている[14]．LRRK2 による発症が優性遺伝であることおよび我々がこれまでに得た知見から，I2020T 変異 LRRK2 は，正常 LRRK2 との二量体形成により，正常 LRRK2 の分解誘発や機能抑制によって細胞死を引き起こす可能性を考えた．タンパク質の高次構造や複合体構造を保持したまま分子を分離できる Blue Native-PAGE を用いて，正常 LRRK2 と I2020T 変異 LRRK2 のヘテロ二量体（WT/I2020T）のタンパク質安定性を調べた結果，正常 LRRK2 のホモ二量体（WT/WT）に比べ，ヘテロ二量体における WT LRRK2 の減少がみられた（**図 2 A**）[15]．また，パルスチェイス実験の結果，WT/I2020T を発現する細胞内 LRRK2 タンパク質の寿命は，WT/WT に比べ，有意に短縮していた[15]．

次に，ヘテロ二量体がキナーゼ活性と細胞死に及ぼす影響を調べるため，正常 LRRK2 を安定発現する SH-SY5Y クローンに I2020T 変異 LRRK2 を追加導入し，Akt1 のリン酸化能と細胞生存率を調べた．その結果，WT/WT のみを発現する細胞に比べ，I2020T 変異 LRRK2 を追加導入した細胞では，Akt1 Ser^{473} のリン酸化が有意に低下した（図 2B）[15]．さらに，H_2O_2 添加時の細胞生存率は，I2020T 変異 LRRK2 の追加導入によって，有意に低下した（図 2C）．このように，I2020T 変異 LRRK2 は，正常 LRRK2 とのヘテロ二量体形成によって，正常 LRRK2 のタンパク質安定性および Akt1 のリン酸化能を低下させ，細胞死を誘発することが明らかとなった．すなわち，正常 LRRK2 の分解誘発とその機能抑制という dominant negative effect によって，細胞死を引き起こすことが示唆された（**図 3**）．

7. 今後の研究の展望

本研究では，変異 LRRK2 による PD 発症機序として，それまでに知られていた gain of toxic function とは異なる，dominant negative effect を提唱した．今後，G2019S 変異以外の R1441C，R1441G，Y1699C や I2012T などの変異 LRRK2 においても，同様のメカニズムによって細胞死が誘発されるか否かを検証したい．また，この発症機序の立証には，患者由来の神経細胞による，より直接的な解析が必須である．現在，I2020T 変異 LRRK2 を有する PD 患者から樹立した iPS 細胞由来神経細胞を用いた解析を進めている．それによって，発症機構の解明だけでなく，将来的にはパーキンソン病の治療に向けた研究へと発展させていきたい．

1）Farrer, M.J.（2006）*Nat. Rev. Genet*., **7**, 306–318.
2）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., Muller-Myhsok, B., Dickson, D.W., Meitinger, T., Strom, T.M., Wszolek, Z.K., & Gasser, T.（2004）*Neuron*, **44**, 601–607.
3）Paisan-Ruiz, C., Jain, S., Evans, E.W., Gilks, W.P., Simon, J., van der Brug, M., Lopez de Munain, A., Aparicio, S., Gil, A. M., Khan, N., Johnson, J., Martinez, J.R., Nicholl, D., Carrera, I.M., Pena, A.S., de Silva, R., Lees, A., Marti-Masso, J.F., Perez-Tur, J., Wood, N.W., & Singleton, A.B.（2004）*Neuron*, **44**, 595–600.
4）Meylan, E. & Tschopp, J.（2005）*Trends Biochem. Sci*., **30**, 151–159.
5）Seol, W.（2010）*BMB Rep*., **43**, 233–244.
6）Greggio, E. & Cookson, M.R.（2009）*ASN NEURO*, **1**, e00002.
7）Funayama, M., Hasegawa, K., Ohta, E., Kawashima, N., Komiyama, M., Kowa, H., Tsuji, S., & Obata, F.（2005）*Ann. Neurol*., **57**, 918–921.
8）Ohta, E., Hasegawa, K., Gasser, T., & Obata, F.（2007）*Neurosci. Lett*., **417**, 21–23.
9）Ohta, E., Katayama, Y., Kawakami, F., Yamamoto, M., Tajima, K., Maekawa, T., Iida, N., Hattori, S., & Obata, F.（2009）*Biochem. Biophys. Res. Commun*., **390**, 710–715.
10）Tong, Y., Yamaguchi, H., Giaime, E., Boyle, S., Kopan, R., Kelleher, R.J. 3 rd, & Shen, J.（2010）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 9879–9884.
11）Ohta, E., Kubo, M., & Obata, F.（2010）*Biochem. Biophys. Res. Commun*., **391**, 242–247.
12）Lobbestael, E., Baekelandt, V., & Taymans, J.M.（2012）*Biochem. Soc. Trans*., **40**, 1102–1110.
13）Ohta, E., Kawakami, F., Kubo, M., & Obata, F.（2011）*FEBS Lett*., **585**, 2165–2170.
14）Greggio, E., Zambrano, I., Kaganovich, A., Beilina, A., Taymans, J.M., Daniëls, V., Lewis, P., Jain, S., Ding, J., Syed, A., Thomas, K.J., Baekelandt, V., & Cookson, M.R.（2008）*J. Biol. Chem*., **283**, 16906–16914.
15）Ohta, E., Kawakami, F., Kubo, M., & Obata, F.（2013）*Biochem. Biophys. Res. Commun*., **430**, 560–566.

著者寸描

●**太田悦朗**（おおた　えつろう）

北里大学医療衛生学部免疫学講師．医学博士．

■**略歴**　1978年長野県に生る．2003年麻布大学環境保健学部衛生技術学科卒業．05年北里大学大学院医療系研究科修士課程修了．08年同大学院医療系研究科博士課程修了．同年北里大学医療衛生学部免疫学助教．12年より現職．

■**研究テーマと抱負**　パーキンソン病の発病機構の解明．

■**ホームページ**　http://www.ahs.kitasato-u.ac.jp/~men_eki/index.html

■**趣味**　旅行，ダイビング，野外音楽フェスへの参加．