

論文の内容の要旨

論文題目：家族性パーキンソン病病因遺伝子産物 LRRK2 の活性制御機構に関する研究

氏 名：伊藤 弦太

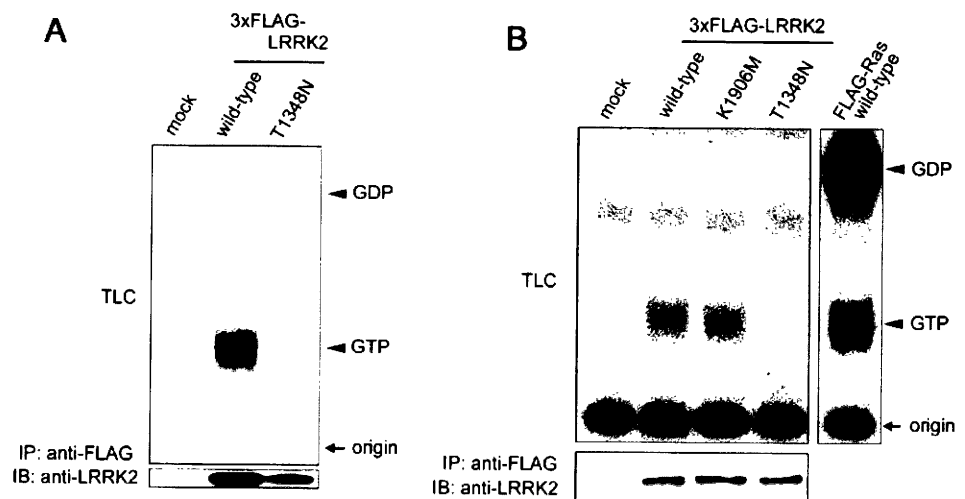
【序論】

パーキンソン病 (Parkinson's disease; PD) は、安静時振戦、筋固縮、寡動、姿勢反射障害を主症状とする進行性の神経変性疾患である。PD の大部分は孤発例であるが、一部に家族性にパーキンソニズムを発症する家系が知られている。Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) は、優性遺伝性家族性パーキンソン病 (FPD) の一型である PARK8 の病因遺伝子として 2004 年にクローニングされた。LRRK2 は 2527 アミノ酸からなる可溶性蛋白質で、同一分子内に低分子量 GTP 結合蛋白質 Ras 様の ROC (Ras of complex proteins) ドメインとキナーゼドメインを併せ持つユニークな構造を有している。現在までに、FPD 患者に最も高頻度に同定される G2019S 変異はキナーゼ活性を異常に上昇させること、G2019S 変異型 LRRK2 を神経系細胞に過剰発現するとキナーゼ活性依存的に細胞毒性が生じることが知られており、PARK8 では LRRK2 のキナーゼ活性の異常な上昇による基質蛋白質の過剰リン酸化が神経変性を引き起こすという仮説が想定された。そこで、私は LRRK2 の活性制御機構を解明することを目的に、LRRK2 の GTP 結合活性と自己リン酸化に着目して本研究を行った。

【本論】

1. LRRK2 の GTP 結合活性

まず LRRK2 の ROC ドメインが GTP 結合活性を有するか否かを検討した。HEK293 細胞に過剰発現させた 3xFLAG-LRRK2 を、抗 FLAG 抗体で免疫沈降した。沈降した LRRK2 を $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ とインキュベートした後、薄層クロマトグラフィー (TLC) により結合した $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ を解析した



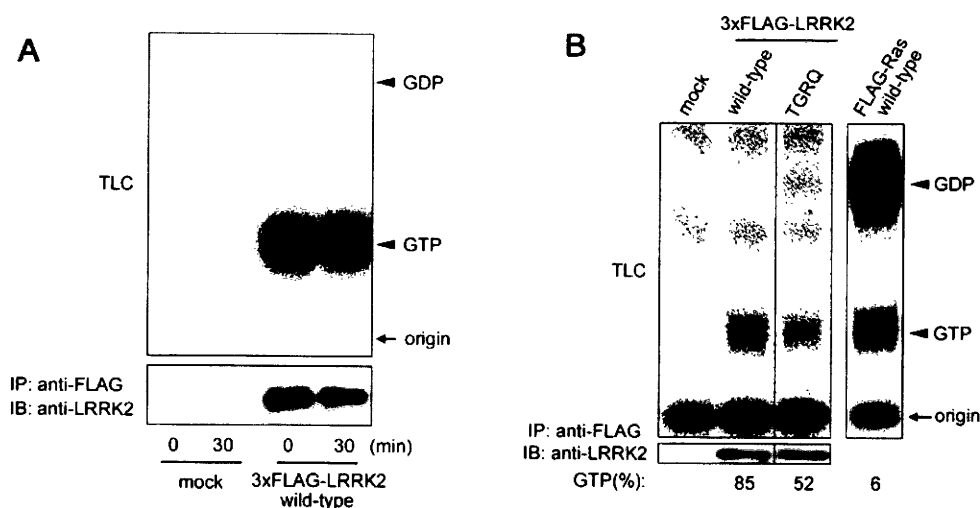
〔図 1〕 LRRK2 の GTP 結合活性

ところ、野生型 LRRK2 では GTP の結合が見られた (図 1A)。一方、多くの GTP 結合蛋白質において GTP 結合活性喪失変異に相当する T1348N 変異を ROC ドメイン内に導入した変異体では、結合が全く見られなかった。これらの結果から、LRRK2 の ROC ドメインは *in vitro* において GTP 結合活性を有することが示された。

次に、培養細胞内における GTP 結合活性について検討した。HEK293 細胞あるいはマウス神経芽細胞腫由来の Neuro-2a 細胞に 3xFLAG-LRRK2 を過剰発現させ、 $[^{32}\text{P}]$ リン酸で代謝ラベリングした。抗 FLAG 抗体で免疫沈降された LRRK2 からヌクレオチドを溶出し、TLC により解析したところ、野生型 LRRK2 からは主に GTP のシグナルが観察された (図 1B)。また、T1348N 変異体は、培養細胞内においても GTP 結合活性が見られなかった。さらに、キナーゼ活性喪失型である K1906M 変異体は、野生型と同等の GTP 結合活性を有していた。これらの結果から、LRRK2 は培養細胞内においても GTP 結合活性を有し、その活性にキナーゼ活性は必要でないことが明らかになった。

2. LRRK2 の GTPase 活性

前項において、LRRK2 が細胞内において主として GTP 結合型として存在したことから、LRRK2 が GTPase 活性を有さない可能性が考えられた。そこで、まず *in vitro* において LRRK2 の GTPase 活性を解析した。免疫沈降した LRRK2 に $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP を結合させ、



[図 2] LRRK2 の GTPase 活性

30°Cでインキュベーションしたところ、GTP の加水分解はほとんど見られなかった (図 2A)。以上の結果から、LRRK2 は *in vitro* において GTPase 活性をほとんど有さないことが明らかになった。

LRRK2 の ROC ドメインは低分子量 GTP 結合蛋白質において保存されたサブドメイン構造を有しているが、GTP の加水分解に必要とされる 2 つのアミノ酸が LRRK2 では保存されていない。そこで、この 2 つのアミノ酸を Ras 型に置換した (T1343G/R1398Q; TGRQ) 変異体を作製し、細胞内における GTP/GDP 結合状態を解析したところ、TGRQ 変異体では GTP 結合型に加えて、GDP 結合型 LRRK2 が観察された (図 2B)。この結果から、野生型 LRRK2 は細胞内でも GTPase 活性を持たず、その結果 GTP 結合型として存在している可能性が示唆された。

3. GTP 結合活性とキナーゼ活性の関係

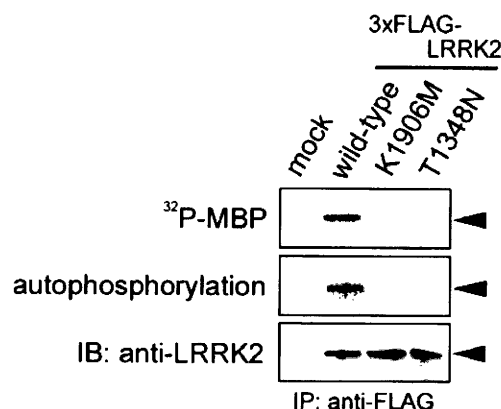
LRRK2 は 1 分子内に ROC ドメインとキナーゼドメインを併せ持つことから、ROC ドメインの GTP 結合状態がキナーゼ活性の制御に関与している可能性を考えた。野生型、キナーゼ活性喪失型 (K1906M)、GTP 結合活性喪失型 (T1348N) LRRK2 を HEK293 細胞にそれぞれ過剰発現させ、抗 FLAG 抗体で免疫沈降した

後、*in vitro*におけるキナーゼ活性を測定した。その結果、野生型 LRRK2 がキナーゼ活性を示したのに対し、T1348N 変異体は K1906M 変異体と同様にキナーゼ活性を示さなかった（図 3）。これらの結果から、LRRK2 の ROC ドメインへの GTP 結合は、キナーゼ活性に必要であることが示された。

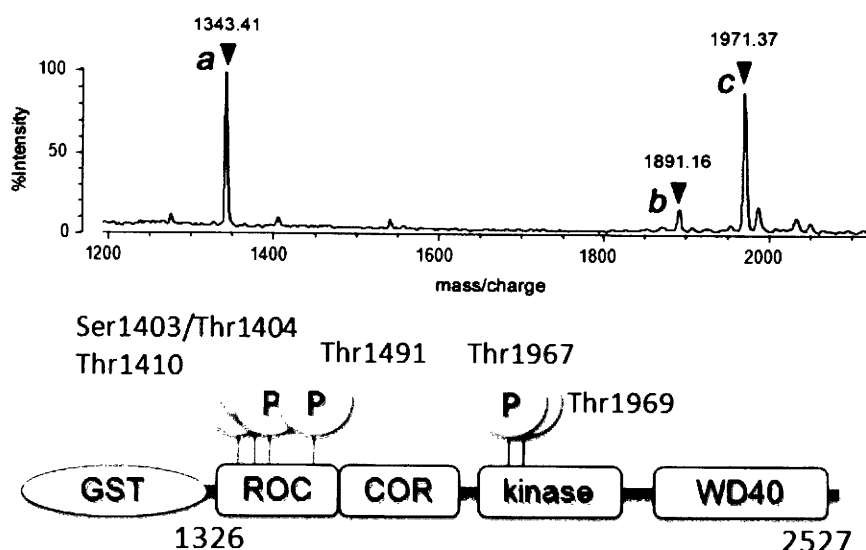
4. 自己リン酸化による LRRK2 活性制御

多くのキナーゼが自己リン酸化によって活性調節を受けることから、次に自己リン酸化部位の同定を目指した。これまでに同定されているアミノ末端側のリン酸化残基を欠く変異体 ΔN-LRRK2（1326–2527 aa）を用いた。

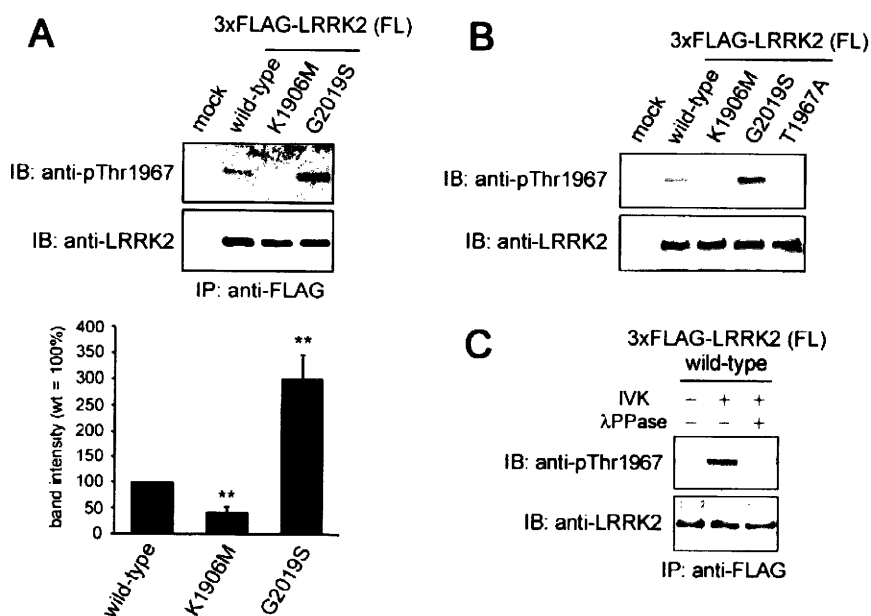
GST-ΔN-LRRK2 を Sf9 細胞に発現させ、大量精製した。精製した ΔN-LRRK2 を *in vitro*において自己リン酸化させた標品を用いて、SDS-PAGE ゲル内においてトリプシン消化した。リン酸化ペプチドを選択的に濃縮するため、得られたトリプシン消化物を、リン酸基と強い親和性を有することが知られている Fe³⁺ ビーズとインキュベートし、吸着したペプチドをリン酸で溶出した。MALDI-TOF 質量分析の結果、ΔN-LRRK2 の自己リン酸化部位として、ROC ドメイン内に Ser1403, Thr1404, Thr1410, Thr1491 を、キナーゼドメイン内に Thr1967, Thr1969 を同定した（図 4）。Thr1967 に関してリン酸化特異抗体（anti-pThr1967）を作出し、全長 LRRK2 のイムノブロット解析を行ったところ、野生型 LRRK2 および G2019S 変異体は認識されたのに対し、K1906M 変異体は認識されなかった（図 5A）。T1967A 変異体に対する anti-pThr1967 の反応性



〔図 3〕 GTP 結合活性とキナーゼ活性の関係



〔図 4〕 ΔN-LRRK2 の自己リン酸化部位の同定



〔図 5〕 自己リン酸化特異抗体 anti-pThr1967 の作出

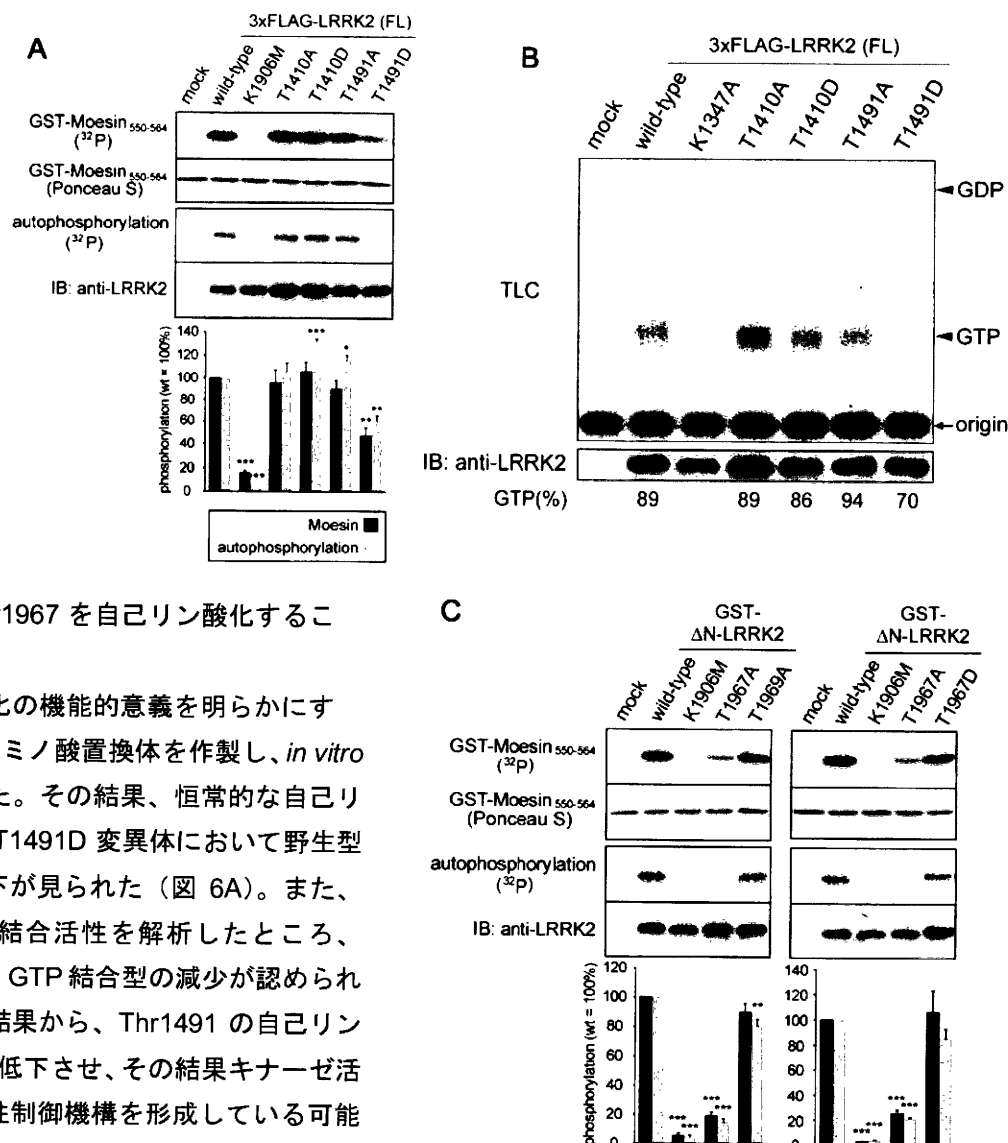
は、K1906M 変異体と同程度であり（図 5B）、phosphatase により脱リン酸化すると、anti-pThr1967 の反応性が消失した（図 5C）。以上の結果から、anti-pThr1967 が LRRK2 の Thr1967 における自己リン酸化を特異的に認識すること、全長 LRRK2 も Thr1967 を自己リン酸化することが明らかになった。

同定した自己リン酸化の機能的意義を明らかにするために、それぞれのアミノ酸置換体を作製し、*in vitro* キナーゼ活性を測定した。その結果、恒常的な自己リン酸化状態を模倣する T1491D 変異体において野生型に比して有意な活性低下が見られた（図 6A）。また、細胞内における GTP 結合活性を解析したところ、T1491D 変異体において GTP 結合型の減少が認められた（図 6B）。これらの結果から、Thr1491 の自己リン酸化は GTP 結合活性を低下させ、その結果キナーゼ活性が低下するという活性制御機構を形成している可能性が示唆された。

次に、T1967A および T1969A 変異体のキナーゼ活性を解析したところ、T1967A 変異体で野生型に比して有意な活性の低下が見られた（図 6C）。T1967D 変異体のキナーゼ活性が野生型と同程度であったことから、Thr1967 の自己リン酸化がキナーゼ活性の維持に重要である可能性が示唆された。

【結語】

本研究において、私は LRRK2 の ROC ドメインへの GTP 結合がキナーゼ活性の発揮に必要であること、LRRK2 の Thr1410 および Thr1967 の自己リン酸化はキナーゼ活性の調節、維持にそれぞれ重要な役割をもつことを示した。LRRK2 の異常活性化が PARK8 における神経変性の原因であるとすれば、本研究で見出した LRRK2 の活性制御機構に関する知見は、LRRK2 の異常活性化のメカニズムを解明するにあたり重要である。今後さらに研究を進め、PD の分子病態において LRRK2 の果たす役割を明らかにしたい。



【図 6】自己リン酸化による LRRK2 活性制御
mean±SEM; *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.001