

氏名 伊藤 弦 太

パーキンソン病(Parkinson's disease; PD)は、安静時振戦、筋固縮、暴動、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。PARK8家系の患者が孤発性PDに近い臨床、病理像を呈することや、アジア人において孤発性PDの危険因子となる遺伝子多型(G2385R)が知られていることなどから、LRRK2はPARK8のみならず孤発性PDの発症にも重要な役割を果たすと考えられている。

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変異体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。申請者・伊藤弦太は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。

1. LRRK2のGTP結合活性

ROCドメインはLRRK2以外にもROCO protein familyと呼ばれる一群のファミリー蛋白質において保存されているが、ROCドメインがGTP結合活性を有しているか否かはこれまで明らかでなかった。

そこで、まず*in vitro*におけるLRRK2のGTP結合活性について検討を行った。アミノ末端に3xFLAGタグを付加した全長LRRK2をHEK293細胞に過剰発現させ、抗FLAG抗体で免疫沈降した。沈降した3xFLAG-LRRK2を $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ とインキュベートした後、LRRK2に結合した $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ を溶出し、薄層クロマトグラフィー(TLC)により解析したところ、野生型LRRK2では $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ の結合が見られた。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GTP結合活性を有することが示された。また、野生型LRRK2に対する $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ 結合実験において、放射標識されていない(cold)GTPもしくはGDPを $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ と同時に加えると、cold GTP/GDPの濃度依存的に $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ の結合が阻害された。この結果から、LRRK2がGDP結合活性も有することが示唆された。

次に、 ^{32}P リン酸による代謝ラベリングにより、LRRK2の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}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。また、*in vitro*においてGTP結合活性を喪失した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

Rasをはじめとする低分子量GTP結合蛋白質は、定常状態においては、自身のGTPase活性により主としてGDP結合型として存在することが知られている。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

において LRRK2 の GTPase 活性を解析した。HEK293 細胞に過剰発現させ免疫沈降した LRRK2 に [α - 32 P]GTP を結合させ、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。同様の条件下において、野生型 FLAG-Ras は 30 分間のインキュベーション後に GDP への加水分解が見られ、GTPase 活性喪失変異体 (G12V) では GTP の加水分解は見られなかった。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アミノ酸 (Ras における Gly12, Gln61) が LRRK2 ではそれぞれ Thr1343 と Arg1398 であり、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) 変異体を作製した。HEK293 細胞に野生型 LRRK2 および TGRQ 変異型 LRRK2 を過剰発現させ、 32 P リン酸による代謝ラベリングにより細胞内における GTP/GDP 結合状態を解析したところ、野生型 LRRK2 の 85% 程度が GTP 結合型として存在するのに対し、TGRQ 変異体は GTP 結合型の割合が 50% 程度にまで低下し、GDP 結合型 LRRK2 が観察された。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

Mitogen activated kinase kinase kinase である Raf-1 は、低分子量 GTP 結合蛋白質である Ras の GTP 結合型と特異的に相互作用し、活性化されることが知られている。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、 $[\gamma$ - 32 P]ATP を用いた *in vitro* kinase assay によりキナーゼ活性を測定した。その結果、野生型 LRRK2 が自己リン酸化活性および人工基質であるミエリン塩基性蛋白質 (myelin basic protein; MBP) に対するリン酸化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。以上の結果から、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. リン酸化による LRRK2 の活性制御

32 P リン酸による代謝ラベリングにより、全長 LRRK2 が細胞内においてリン酸化を受けることが示された。キナーゼ活性喪失型 K1906M 変異体でも野生型と同程度のリン酸化が見られることから、この細胞内リン酸化は LRRK2 以外のキナーゼにより生じる可能性が示唆された。GTP 結合活性喪失型 T1348N 変異体の細胞内リン酸化を検討したところ、全くリン酸化を受けなかった。この結果から、LRRK2 が GTP 結合依存的にリン酸化を受け、活性化される可能性が示唆された。そこで、LRRK2 のリン酸化部位を同定し、その機能的意義を解析することにした。

全長 3xFLAG-LRRK2 を恒常発現する HEK293 細胞株から全長 LRRK2 を精製し、SDS-PAGE で分離後、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 Fe^{3+} 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、Ser910, Ser973 をはじめ、LRR ドメインアミノ末端側にクラスター状に存在する複数のリン酸化部位を同定した。しかしながら、これらのリン酸化残基を全てアラニンに置換した 6xSA 変異体は、野生型と同程度のキナーゼ活性を保持しており、これらのリン酸化はキナーゼ活性に必要でないことが明らかになった。

5. 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。全長 LRRK2 は、細胞内において他のキナーゼにより高度にリン酸化されることから、自己リン酸化部位の同定は適さないと考え、これまでに同定したアミノ末端側のリン酸化残基を欠く変異体 Δ N-LRRK2(1326-2527 aa)を用いた。 Δ N-LRRK2 を GST 融合蛋白質として HEK293 細胞に発現させ、代謝ラベリングにより細胞内リン酸化を解析すると、野生型 Δ N-LRRK2 は細胞内でリン酸化を受けるのに対し、キナーゼ活性喪失型 K1906M, D1994A 変異体はリン酸化を受けなかった。この結果から、 Δ N-LRRK2 は細胞内において他のキナーゼによるリン酸化を受けず、自己リン酸化のみを生じるものと考えられた。

次に、baculovirus を用いて GST- Δ N-LRRK2 を Sf9 細胞に発現させ、大量精製した。精製した Δ N-LRRK2 を *in vitro* において自己リン酸化させた標品を用いて、全長 LRRK2 と同様に MALDI-TOF 質量分析を行った。その結果、 Δ N-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。Thr1967 に関してリン酸化特異抗体を作出し、全長 LRRK2 においても Thr1967 が自己リン酸化されることを確認した。

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た。まず、ROCドメイン内の Thr1410 および Thr1491 の置換体について、代謝ラベリングを用いて細胞内における GTP 結合活性を解析した。その結果、T1410A および T1491A 変異体は野生型と同様に GTP 結合型として存在することが明らかになった。一方、恒常的な自己リン酸化状態を模倣する T1410D および T1491D 変異体について同様の解析を行ったところ、T1491D 変異体において GTP 結合型の減少が認められた。さらに、自己リン酸化活性および人工基質である GST-Moesin₅₅₀₋₅₆₄ のリン酸化活性を指標として *in vitro* キナーゼ活性を測定したところ、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。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ネガティブフィードバック機構を形成している可能性が示唆された。

次に、キナーゼドメイン内の Thr1967, Thr1969 について、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。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。

本研究において、申請者・伊藤弦太は 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。今後の課題としては、自己リン酸化抗体を用いた LRRK2 の上流の活性制御機構の探索、過剰リン酸化が神経変性のトリガーとなるような基質蛋白質の探索などが挙げられる。

以上のごとく、本研究はパーキンソン病の分子病態における LRRK2 の役割について、多くの新知見をもってその基盤を解明したものであり、博士(薬学)の学位に相応しいものと判定する。