

## 論文の内容の要旨

論文題目： 家族性パーキンソン病に連鎖した変異による LRRK2 機能異常の解析  
～自己リン酸化に着目した細胞内 LRRK2 活性の検出～

氏名： 上川路翔悟

### 【序論】

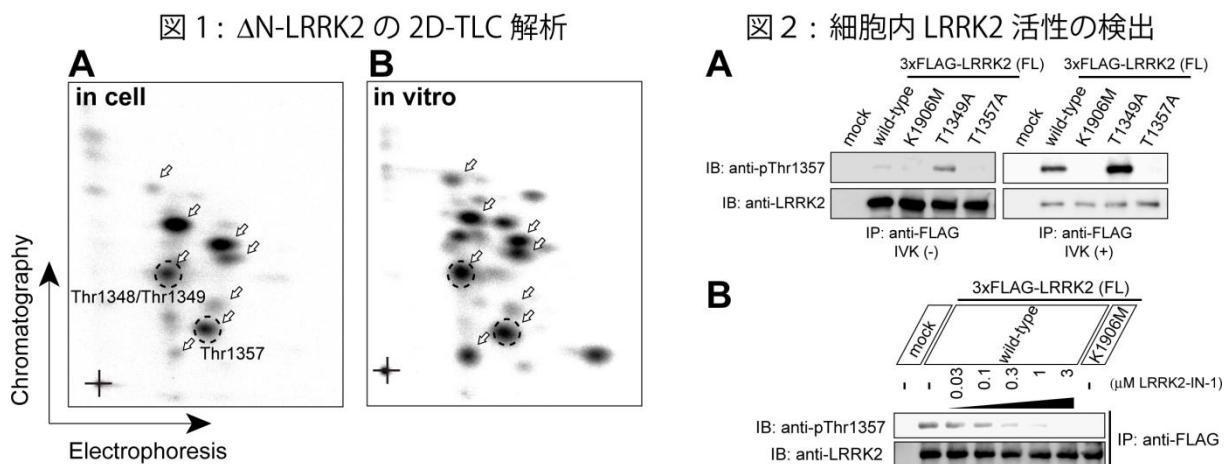
パーキンソン病 (PD) は、安静時振戦、筋固縮、無動、姿勢反射障害などの運動症状および中脳黒質におけるドパミン神経細胞の選択的な変性、脱落を病理学的な特徴とする、頻度の高い神経変性疾患である。PD の多くは孤発性であるが、一部に家族性 PD (FPD) が存在する。*PARK8* 家系の病因遺伝子として *LRRK2*、その遺伝子産物として、Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) が同定された。LRRK2 は、Ras などの低分子量 G タンパク質と相同性の高い ROC ドメインとプロテインキナーゼドメインという 2 つの機能ドメインを 1 分子内に併せ持つユニークなドメイン構造を有しており、FPD 変異はこれらの機能ドメイン内に局在している。FPD 変異型 LRRK2 の過剰発現は神経細胞毒性を生じること、この毒性発現にはキナーゼ活性が必要であることから、キナーゼ活性やその調節機構が FPD 変異により異常をきたす可能性が想定されてきた。しかし、LRRK2 の細胞内基質は未だに同定されておらず、生理的条件下における LRRK2 活性を評価することは困難であった。そこで私は、LRRK2 が細胞内において活性依存的に自己リン酸化を起こすことに着目し、LRRK2 の細胞内自己リン酸化活性を検出するために自己リン酸化部位の同定を行い、LRRK2 活性や細胞内リン酸化に対する FPD 変異の影響を解析した。

### 【方法・結果】

#### 1. LRRK2 の主要な自己リン酸化部位の同定

全長 LRRK2 (FL-LRRK2) は *in vitro* において自身をリン酸化する活性を有するが、細胞内においては他のキナーゼによりリン酸化されるため、自己リン酸化を選択的に検出することは困難であった。他のキナーゼによるリン酸化は LRR ドメインの N 末端側の領域に局限して生じることから、この領域を含む N 末端側を欠損させた  $\Delta$ N-LRRK2 を用いて [ $^{32}$ P] 代謝ラベリングを行い、

$\Delta$ N-LRRK2 が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ことを明らかにした (Kamikawaji *et al.*, 2009)。これらの自己リン酸化を個別に解析するために、 $\Delta$ N-LRRK2 のトリプシン消化産物を TLC プレートで 2 次元に展開することにより、リン酸化ペプチドのマッピングを行った (2D-TLC 解析)。 $\Delta$ N-LRRK2 を、 $[^{32}\text{P}]$  代謝ラベリングにより細胞内で (図 1A)、または  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 存在下 *in vitro* で (図 1B)、自己リン酸化を放射性標識し、2D-TLC 解析を行った結果、両者で共通のスポットが複数観察され (図 1、矢印)、さらにこれらのスポットは ROC ドメインに絞った 2D-TLC 解析においても見られた。ROC ドメイン内の Thr 残基の Ala 置換体を作製し、2D-TLC 解析を行った結果、Thr1348, Thr1349, Thr1357 の Ala 置換によって主要なスポットが移動、消失したことから、これらの残基が LRRK2 の主要な自己リン酸化部位であると考えられた。さらに、リン酸化 Thr1357 に対する特異抗体 (pThr1357 抗体) を作出し、Thr1357 の自己リン酸化は全長 LRRK2 でも生じることを確認した (図 2A)。また、キナーゼ活性を喪失させる K1906M 変異体は pT1357 抗体で認識されないこと (図 2A)、培養細胞の LRRK2 阻害剤 (LRRK2-IN-1) 処理によって用量依存的に Thr1357 のリン酸化レベルが低下することから (図 2B)、LRRK2 の Thr1357 は、細胞内においても自己リン酸化されることが明らかになった。



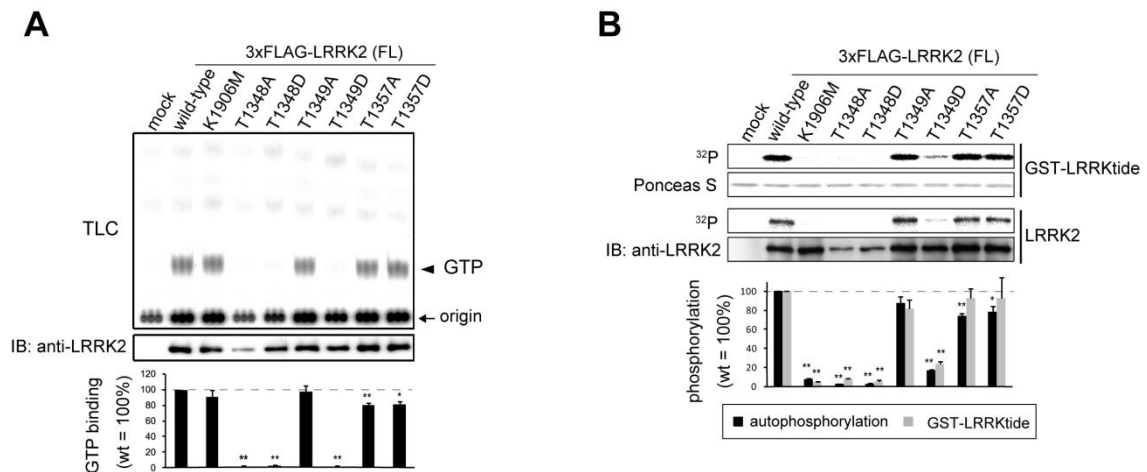
(A) HEK293 細胞内、または (B) *in vitro* で、自己リン酸化を放射性標識した  $\Delta$ N-LRRK2 の 2D-TLC 解析結果を図 1 に示す。図 2: (A) 全長 LRRK2 の細胞内自己リン酸化 (IVK (-): 左)、および *in vitro* 自己リン酸化 (IVK (+): 右) を pT1357 抗体を用いて検出した。(B) HEK293 細胞の LRRK2 阻害剤で処理によって、Thr1357 のリン酸化量が低下した。

## 2. LRRK2 のキナーゼ活性は自己リン酸化によって負に制御される

Ras/MAP キナーゼシグナル伝達経路において、GTP 結合型の Ras によってそのエフェクターの 1 つである RAF が活性化されるように、LRRK2 においても、ROC ドメインへの GTP 結合によってキナーゼが活性化されるという分子内制御の存在が想定されている。X 線結晶構造解析から得られた ROC ドメインの立体構造において、同定した自己リン酸化部位が GTP 結合部位周辺に位置することから、自己リン酸化によって GTP 結合能が調節される可能性を考えた。これを検証するため、自己リン酸化状態および非自己リン酸化状態を模倣する Asp 変異体および Ala 変異体をそれぞれ作製し、各変異体について  $[^{32}\text{P}]$  代謝ラベリングにより細胞内 GTP 結合能を評価するとともに、*in vitro* における自己リン酸化活性および人工基質 (GST-LRRKtide) に対するリン酸化活

性を解析した。T1348A, T1348D および T1349D 変異体は GTP 結合能をほとんど示さず、キナーゼ活性も見られなかった (図 3A, B)。一方、T1349A 変異体および T1357A/D 変異体は GTP 結合能が若干低下するものの、人工基質に対するキナーゼ活性は変化しなかった (図 3A,B)。Thr1349 の Ala 変異体では GTP 結合、キナーゼ活性が変化せず、Asp 変異体で GTP 結合能の低下およびキナーゼ活性の低下が見られたことから、Thr1349 の自己リン酸化によって、GTP 結合能の低下を介してキナーゼ活性の低下に至る可能性が示唆された。一方、Thr1348 は Ala, Asp 変異いずれによっても活性が低下したことから、Thr1348 の側鎖が活性に必要であると考えられた。

図 3 自己リン酸化部位の変異体の解析

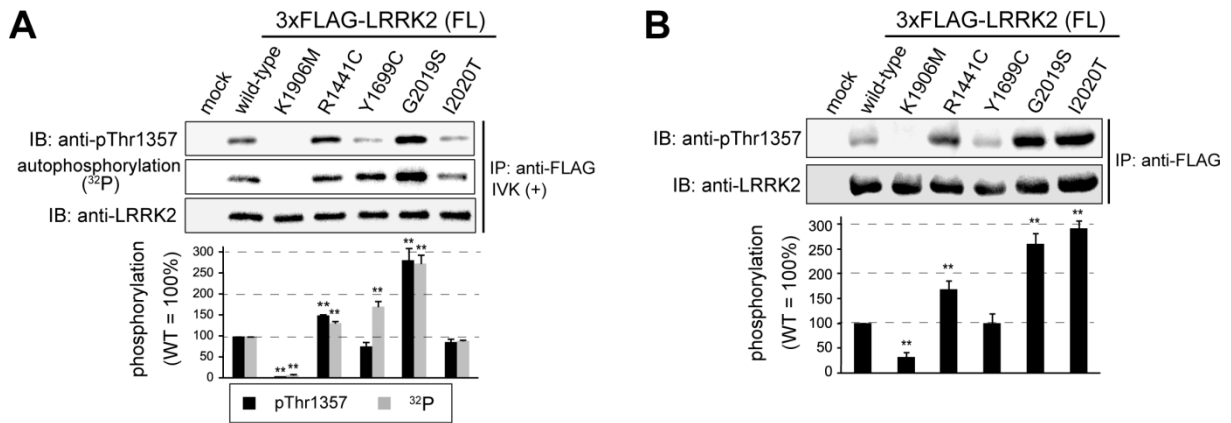


(A) 細胞内 GTP 結合量を代謝ラベリングにより解析 (B) *in vitro* 自己リン酸化活性および人工基質に対するリン酸化活性を解析 (n = 3, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01)

### 3. FPD 変異体の解析: 細胞内キナーゼ活性

FPD 変異型 LRRK2 は活性に依存して神経毒性を發揮するが、その詳細な分子メカニズムは明らかではない。FPD 変異が LRRK2 活性に与える影響を解析するため、FPD 変異体 (R1441C, Y1699C, G2019S, I2020T) の *in vitro* における自己リン酸化活性を、pThr1357 抗体および [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP を用いて評価した。キナーゼドメイン内の変異のうち、G2019S LRRK2 は野生型に比して顕著な活性上昇を示したが、I2020T 変異体の活性は変化しなかった (図 4A)。一方、pThr1357 抗体を用いて FPD 変異体の細胞内における Thr1357 リン酸化を解析したところ、G2019S 変異体のみならず、I2020T 変異体もリン酸化の顕著な上昇を示した (図 4B)。また、ROC ドメイン内に存在する R1441C 変異は、*in vitro* および細胞内における LRRK2 の自己リン酸化活性を上昇させた (図 4A, B)。一方、COR ドメイン内に変異を有する Y1699C 変異体は、pThr1357 抗体と [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP を用いて評価した *in vitro* 自己リン酸化活性との間に乖離が生じたため、Y1699C 変異体の細胞内自己リン酸化活性を pThr1357 抗体を用いて評価することは妥当ではないと判断した (図 4A)。以上の結果から、R1441C, G2019S, I2020T 変異は LRRK2 の細胞内でのキナーゼ活性を上昇させることが示唆された。

図4 FPD 変異体の自己リン酸化活性



(A) *in vitro* 自己リン酸化活性を pThr1357 抗体と  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP の放射活性により評価 (B) 細胞内自己リン酸化活性を pT1357 抗体を用いて評価 (n = 4~5, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01)

### 【まとめ】

本研究において私は、2D-TLC 解析を駆使することにより、LRRK2 の細胞内における自己リン酸化部位を同定し、同定した自己リン酸化部位に対する特異抗体 (pThr1357 抗体) を用いて全長 LRRK2 の細胞内キナーゼ活性を評価することに世界に先駆けて成功した。LRRK2 の詳細な活性制御機構はこれまで明らかではなかったが、同定した自己リン酸化部位の変異体解析から、ROC ドメイン内の Thr1349 の自己リン酸化によって GTP 結合能が低下し、キナーゼ活性が負に制御される可能性を示唆した。さらに細胞内においては、FPD 変異体のうち R1441C, G2019S, I2020T の少なくとも 3 つの変異体は自己リン酸化活性が上昇することを示した。

通常、低分子量 G 蛋白質は自身の GTPase 活性により、GTP 型から GDP 型へと変化することで機能が制御されるが、たとえば RhoE は GTPase 活性を持たないために恒常的に GTP 型として存在し、その機能は ROCK によるリン酸化により制御されることが知られている。それゆえ、細胞内で主に GTP 型として存在する LRRK2 の ROC ドメインの機能がリン酸化によって制御を受ける可能性は十分に考えられる。

キナーゼ活性を上昇させる R1441C, G2019S, I2020T 変異は、基質の過剰なリン酸化を介して神経毒性を発揮することが示唆される。今後は、自己リン酸化による ROC ドメインの活性制御様式を詳細に検討するとともに、神経毒性に関与する基質の探索を進めていきたい。