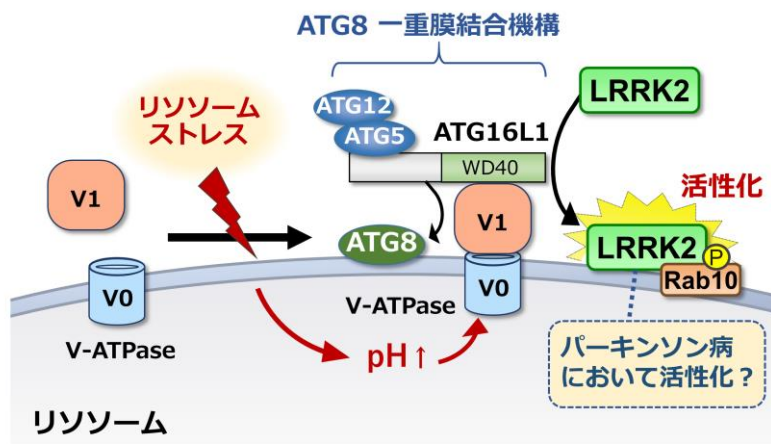


## パーキンソン病病因タンパク質 LRRK2 の 活性化をもたらす機構を解明

### 発表のポイント

- ◆パーキンソン病において異常な活性化が示唆される病因タンパク質「LRRK2」の活性化をもたらす分子メカニズムを明らかにしました。
- ◆LRRK2 の活性化は、オートファジーに類似した「ATG8 一重膜結合機構」を介して、細胞小器官であるリソソーム上に LRRK2 が局在化することにより生じることを発見しました。
- ◆本研究成果は、パーキンソン病における LRRK2 異常活性化を適切に制御することで、新たな根本的治療法の開発につながることを期待されます。



LRRK2 活性化のメカニズム

### 概要

東京大学大学院医学系研究科・神経病理学分野の桑原知樹講師、江口智也大学院生（研究当時、現：分子生物学分野助教）、櫻井まりあ特任研究員、岩坪威教授らのグループは、パーキンソン病（PD）の病因タンパク質 LRRK2（注1）が細胞小器官であるリソソーム（注2）へのストレスに応答して活性化する分子機構を明らかにしました。LRRK2 は家族性および孤発性 PD にかかわるタンパク質リン酸化酵素であり、その異常な活性化が PD の背景にあることが示唆されていますが、活性化の分子メカニズムや意義については多くが不明でした。研究グループは、リソソームにストレスを負荷すると LRRK2 が活性化するという発見をきっかけとして、リソソーム制御機構との関連を検討した結果、細胞内自己分解経路であるオートファジーに類似した「ATG8 一重膜結合機構」（注3）が LRRK2 を制御することを見出しました。この機構は LRRK2 をリソソーム膜上に局在化させることで活性化し、結果としてリソソームの形態調節や内容物放出に至ることが分かりました。これらの結果は、LRRK2 の異常活性化機構の理解につながるとともに、そのメカニズムへの介在が PD の治療戦略になる可能性を示すものです。本研究成果は、日本時間 2024 年 1 月 16 日に *Journal of Cell Biology* 誌に掲載されました。

## 発表内容

パーキンソン病（PD）は老年期に発症する代表的な神経難病であり、65歳以上のおよそ100人に1人がふるえや動作緩慢、筋強剛などの運動症状を呈する疾患です。脳内のドパミンを補充するなどの対処療法は普及しているものの、神経細胞の変性や死そのものを抑える根本的治療は未だ存在しません。PDの一部には遺伝性に発症する症例が存在し、その原因遺伝子として、2004年に *LRRK2* (leucine-rich repeat kinase 2) が同定されました。LRRK2はタンパク質リン酸化酵素（キナーゼ）であり、細胞内で Rab（注4）と呼ばれるタンパク質ファミリーの一群（Rab10, Rab8 など）をリン酸化します。顕性遺伝性PDの原因となる *LRRK2* 遺伝子の変異は LRRK2 の酵素活性（Rab リン酸化活性）を顕著に上昇させることが知られています。さらに、*LRRK2* 遺伝子の多型は PD の大多数を占める孤発性PDの発症リスクにも関わることで、孤発性PDの少なくとも一部において LRRK2 の酵素活性が上昇していることも示されています。従って、LRRK2はPDに関わる最重要分子の1つであると言えます。一方、生体において LRRK2 の酵素活性を完全に阻害すると、細胞小器官であるリソソームの顕著な肥大化が生じることも知られており、LRRK2は生理的にリソソームのメンテナンスに重要な機能を有していることが示唆されています。従って、PDの治療戦略を考えるうえでは LRRK2 酵素活性の適切な制御が鍵になると考えられます。

研究グループはこれまでに、リソソームに蓄積して過積載ストレスを与える性質を有するクロロキン（注5）などの化合物を細胞に投与すると、LRRK2が活性化することを見出していました。今回、クロロキン投与時における LRRK2 の細胞内局在を詳細に観察した結果、肥大化したリソソームの一重膜上で LRRK2 が LC3（注6）と呼ばれるタンパク質と共局在していることを見出しました（図1）。LC3は ATG8（注6）と総称されるタンパク質群の1つであり、ATG8は細胞内自己分解経路であるオートファジーのマーカースタンパク質としてよく知られています。通常、ATG8はオートファジーの際に形成される脂質二重膜からなる隔離膜（オートファゴソーム）に局在しますが、LRRK2との共局在時には一重膜上に存在していたことから、近年報告された「ATG8一重膜結合機構」が働いている可能性が考えられました。ATG8一重膜結合機構は、オートファジーの開始に必須の因子群では誘導されず、むしろ、リソソームのpH上昇を感知して作動し、リソソーム膜タンパク質V-ATPaseと、その相互作用相手である ATG16L1のWD40ドメインと呼ばれる構造を必要とします。細胞生物学的・生化学的・遺伝学的解析から、LRRK2のリソソーム局在化とそれに伴う活性化は ATG8一重膜結合機構によって介在されることが示されました（図2）。さらにこのメカニズムは、ストレスを受けたリソソームの肥大化を抑制し、リソソーム内容物を細胞外に放出させる役割を果たすことが分かりました（図2）。

以上の結果から、LRRK2 の活性化とその結果生じるリソソームストレス応答をもたらす分子メカニズムが明らかとなりました。PD や類縁の神経変性疾患においてはこれまでもリソソームの機能的異常が多く指摘されており、また、*LRRK2* 以外にも複数のリソソーム関連遺伝子が PD の発症リスクに関わることが示されています。本研究で見出したメカニズムも PD における *LRRK2* の異常活性化に関わることが想定され、本メカニズムへの介在が *LRRK2* 活性の適切な制御につながることを期待されます。

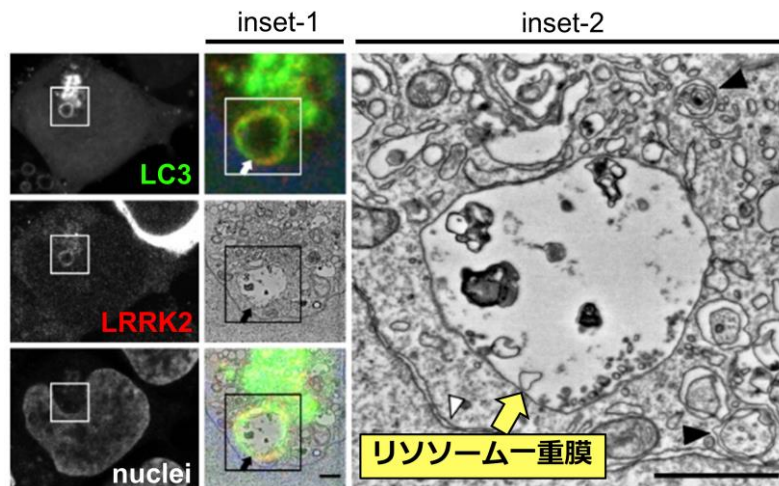


図 1 : リソソーム一重膜上に集積する LRRK2 と LC3

GFP-LC3 (緑色蛍光) と mCherry-LRRK2 (赤色蛍光) を発現させた HEK293 細胞にクロロキンを投与し、LC3 と LRRK2 の細胞内局在を光-電子相関顕微鏡法 (CLEM) により観察した。矢印は LRRK2/LC3 両陽性の一重膜構造を示す。対比としてオートファゴソーム膜 (黒矢先、二重膜)、核膜 (白矢先、二重膜) を示した。

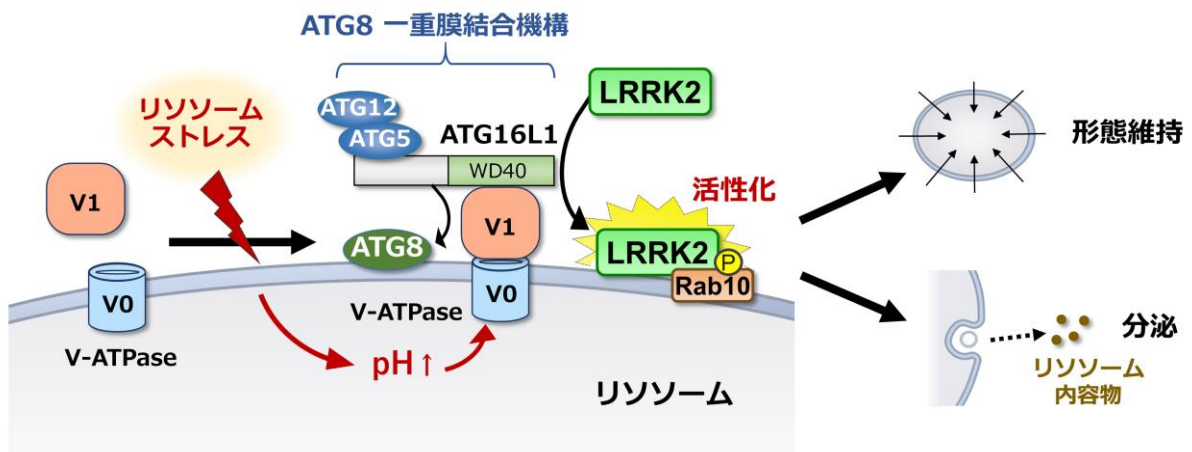


図 2 : LRRK2 活性化をもたらす分子メカニズムとその役割

リソソームへのストレスにより、pH 上昇を検知して作動したリソソーム膜タンパク質 V-ATPase とその相互作用相手 ATG16L1 の WD40 ドメインを介した「ATG8 一重膜結合機構」が ATG8 と LRRK2 をリソソーム膜上にリクルートする。LRRK2 はリソソーム膜上で活性化して Rab10 をリン酸化し、リソソームの形態維持とリソソーム内容物の細胞外分泌がもたらされる。

## 発表者・研究者等情報

東京大学大学院医学系研究科神経病理学分野

桑原 知樹 講師

江口 智也 研究当時：博士課程

現：分子生物学分野 助教

櫻井 まりあ 特任研究員

岩坪 威 教授

兼：東京大学医学部附属病院 早期・探索開発推進室 室長

兼：国立精神・神経医療研究センター神経研究所 所長

## 論文情報

雑誌名：Journal of Cell Biology

題名：The V-ATPase-ATG16L1 axis recruits LRRK2 to facilitate the lysosomal stress response

著者名：Tomoya Eguchi#, Maria Sakurai#, Yingxue Wang, Chieko Saito, Gen Yoshii, Thomas Wileman, Noboru Mizushima, Tomoki Kuwahara\*, Takeshi Iwatsubo\* (\*:責任著者)(#:共同筆頭著者)

DOI: 10.1083/jcb.202302067

URL: <https://doi.org/10.1083/jcb.202302067>

## 研究助成

本研究は、科研費「ATG結合系の非オートファジー機能とその神経変性における役割の解明（課題番号：22H04638）（代表：桑原知樹）」、「リソソーム品質管理の異常を介した新規パーキンソン病病態形成機構の解明（課題番号：22H02949）（代表：桑原知樹）」、「リソソームストレスにより誘導されるLRRK2活性化機構の解明と創薬への応用（課題番号：19K07816）（代表：桑原知樹）」、「LRRK2によるリソソーム恒常性維持機構およびパーキンソン病との関連（課題番号：16K07039）（代表：桑原知樹）」、「神経変性疾患におけるストレス依存的な凝集タンパク質の生成・放出機構（課題番号：20H00525）（代表：岩坪威）」、「オルガネラ膜の損傷・断裂を普遍的に検知する膜貫通ドメイン（課題番号：22K15057）（代表：江口智也）」、「リソソームはいかにしてストレスを感知し、恒常性維持機構を活性化させるのか?（課題番号：19K16118）（代表：江口智也）」、「LRRK2が関わるストレス誘導性リソソーム内容物放出機構の解明（課題番号：21J12881）（代表：櫻井まりあ）」、東京大学WINGS-LST共同研究支援（櫻井まりあ）の支援により実施されました。

## 用語解説

（注1）LRRK2

Leucine-rich repeat kinase 2 の略。ラク・トゥーと発音される。常染色体顕性遺伝性PDにおいて最も高頻度に変異を認める遺伝子であり、2004年に欧州の研究グループにより同定された。臨床および病理学的特徴は、成人発症の孤発例PDに類似している。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リン酸化酵素（キナーゼ）であり、主にRabタンパク質をリン酸化する。LRRK2キナーゼ活性阻害剤BIIB122/DNL151は米国Biogen社とDenali社により、早期PD患者を対象とした第IIb相治験およびLRRK2変異保有PD患者を対象とした第III相治験が進められている。

#### (注2) リソソーム

真核生物の細胞小器官の1つであり、内部の pH が 5 前後の酸性に保たれた一重膜からなる構造体である。種々の加水分解酵素を含んでおり、主に細胞内外成分の分解・再利用装置として機能するほか、細胞膜修復や免疫応答などにも重要な役割を果たす。

#### (注3) ATG8 一重膜結合機構

英文表記で CASM (conjugation of ATG8 to endolysosomal single membranes) と呼称されており、ATG8 タンパク質がエンドリソソームの一重膜に局在化する現象およびその機構を指す。ATG8 はオートファジーの誘導時に形成される脂質二重膜からなる隔離膜に局在化することがよく知られており、その現象と区別するために CASM という呼称が近年定着した。以前は non-canonical autophagy (非典型的オートファジー) とも呼ばれていたが、細胞内分解を伴わないためオートファジーとは異なる。メカニズムとして、リソソーム膜上のプロトンポンプ V-ATPase とその相互作用因子 ATG16L1 の WD40 ドメインを介した「V-ATPase-ATG16L1 軸」が関与することが示されている。

#### (注4) Rab

低分子量 G タンパク質 (Guanine nucleotide binding protein) であり、ヒトやマウスでは 60 種類以上のアイソフォーム (類似のタンパク質) からなる主要なファミリー分子群を指す。主に細胞内小胞輸送を司り、その機能は主に GTP (Guanosine triphosphate) に結合した活性型と GDP (Guanosine diphosphate) に結合した不活性型の間をサイクルすることにより制御される。2016 年に入り、一部の Rab が細胞内で LRRK2 によってリン酸化されること、それにより Rab の GTP-GDP 結合サイクルが追加的に制御されることが報告された。

#### (注5) クロロキン

塩基性かつ両親媒性の低分子化合物であり、その弱塩基としての性質からリソソームに移行後プロトンを受け取ってリソソーム内に蓄積し、リソソームの肥大化・pH 上昇・過積載をもたらす。研究では一般にリソソーム阻害剤として用いられる。臨床では主に抗マラリア剤として用いられるが、網膜障害などの副作用も知られている。

#### (注6) LC3/ATG8

LC3 は酵母の Atg8 タンパク質の哺乳動物におけるオルソログ (相当分子) であり、ヒトでは LC3 を含め 6 つの類似タンパク質がオルソログであるが、それらはまとめて ATG8 とも呼称される。オートファジーのマーカー分子として広く認知されており、脂質修飾を受けて隔離膜 (オートファゴソーム、二重膜) に局在化する。近年、クロロキン投与時などのリソソームストレス下ではエンドリソソームの一重膜にも局在化することが知られるようになった。

## 問合せ先

(研究内容については発表者にお問合せください)

東京大学大学院医学系研究科 神経病理学分野

講師 桑原 知樹 (くわはら ともき)

Tel : 03-5841-3533 E-mail : kuwahara@m.u-tokyo.ac.jp

教授 岩坪 威 (いわつぼ たけし)

Tel : 03-5841-3543 E-mail : iwatsubo@m.u-tokyo.ac.jp

東京大学医学部・医学系研究科 総務チーム

Tel : 03-5841-3304 E-mail : ishomu@m.u-tokyo.ac.jp