

パーキンソン病原因分子LRRK2によるTauの異常リン酸化機構

川上 文貴, 市川 尊文

1. はじめに

leucine rich-repeat kinase 2 (LRRK2) は、常染色体優性パーキンソン病 (PD) の発症に関わるプロテインキナーゼで、2002年に本邦で遺伝子座が同定されたPARK8の原因遺伝子産物である^{1,2)}。LRRK2の遺伝子変異は、これまでに報告された家族性PDの原因遺伝子のうち、最も高頻度で認められる。LRRK2遺伝子変異を有するPD患者には、孤発性PD患者と類似した臨床症状および病理学的所見がみられるが、一部の患者においてはレビー小体陰性の症例も報告されており、LRRK2変異に起因する神経病変には多様性があるとされている。このことから、LRRK2の生理機能とLRRK2遺伝子変異による神経変性機構を解析することは、PDのみならず広範な神経変性疾患の病態解明につながると考えられる。本稿では、多くの神経変性疾患でみられるTauの異常リン酸化におけるLRRK2の役割について概説する。

2. LRRK2の生理機能

LRRK2は2527アミノ酸で構成される巨大タンパク質であり、armadillo repeat (ARM), ankyrin repeat (ANK), leucine-rich repeat (LRR), GTPase (ROC), C-terminal of ROC (COR), プロテインキナーゼおよびWD40の複数の機能性ドメインを有している^{3,4)}(図1)。これまでの生化学的解析によると、LRRK2はSer/Thrプロテインキナーゼ活性と自己リン酸化活性を示し、そのキナーゼ活性がGTP (グアノシン三リン酸) の結合によって増強される。しかし、キナーゼ活性自体はGTP結合能および内在性のGTPase活性とは独立して発揮されると報告されている^{3,4)}。また、LRRK2はROCドメインを介してホモ二量体を形成し、この二量体化は

LRRK2キナーゼ活性を増強させることも報告されている⁵⁾。LRRK2は、多くの哺乳動物組織で発現が確認されており、ヒト脳組織では、大脳皮質、髄質、小脳、脊髄、被殻、および黒質に広く分布している。また、主に細胞質に存在しているが、ゴルジ体、ミトコンドリア、脂質ラフトなどへの局在も報告されている³⁾。LRRK2の主なPD関連遺伝子変異は、酵素活性に関わるドメインにおいて見いだされている(図1)。R1441C, R1441G, およびR1441Hは、ROCドメイン内に存在し、G2019SおよびI2020T変異はキナーゼドメインに位置している(図1)。中でも、LRRK2のPD関連変異体のうち最も頻度の高いG2019S変異は、LRRK2のキナーゼ活性を亢進させることが明らかとなっている³⁾が、他のPD関連変異のLRRK2キナーゼ活性に対する影響については結論が出されていない。また、LRRK2の一塩基多型 (SNP) が、炎症性腸疾患であるクローン病やハンセン病に関与することも報告されており、このことからLRRK2は神経機能のみならず免疫応答においても重要な役割を持つと考えられている。

LRRK2の生理的基質候補として、ezrin/radixin/moesin, 4E-BP, β -tubulin, Tau, Akt, MKK4/7, ribosomal protein s15などが報告されているが、PD発症に直接関わる基質分子については不明である^{3,4)}。これまでの多くの研究報告では、LRRK2のキナーゼ活性の増大が神経変性に関わることや、LRRK2を介する神経毒性はLRRK2キナーゼ活性の阻害によって軽減されることが*in vitro*および*in vivo*で示されており⁴⁾、LRRK2の真の基質に焦点を当てた研究に注目が集まっている。

3. LRRK2による直接的なTauのリン酸化機構

これまでに、LRRK2変異を有するPD患者の脳組織においてTauに関連した神経病理変化が観察されているが、特にLRRK2のG2019SあるいはI2020T変異を有するPD患者においてリン酸化Tauによる病変が認められている^{4,6)}。さらに、マウスモデルを用いた解析によって、PD関連変異であるR1441GあるいはG2019S変異型LRRK2のトランスジェニックマウスの脳組織においてはTauのリン酸化が増加しており、その一方でLRRK2ノックアウトマウスにおいてはTauのリン酸化が減少していることが明らかにされている⁴⁾。これらのことから、LRRK2のPD関連変異が

北里大学大学院医療系研究科分子病態学群生体制御生化学 (〒252-0373 神奈川県相模原市南区北里1-15-1)

Molecular mechanisms of LRRK2-mediated abnormal phosphorylation of Tau protein

Fumitaka Kawakami and Takafumi Ichikawa (Department of Regulation Biochemistry, Graduate School of Medical Sciences, Kitasato University, 1-15-1, Kitasato, Minami-ku, Sagami-hara, Kanagawa 252-0373, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880248

© 2016 公益社団法人日本生化学会

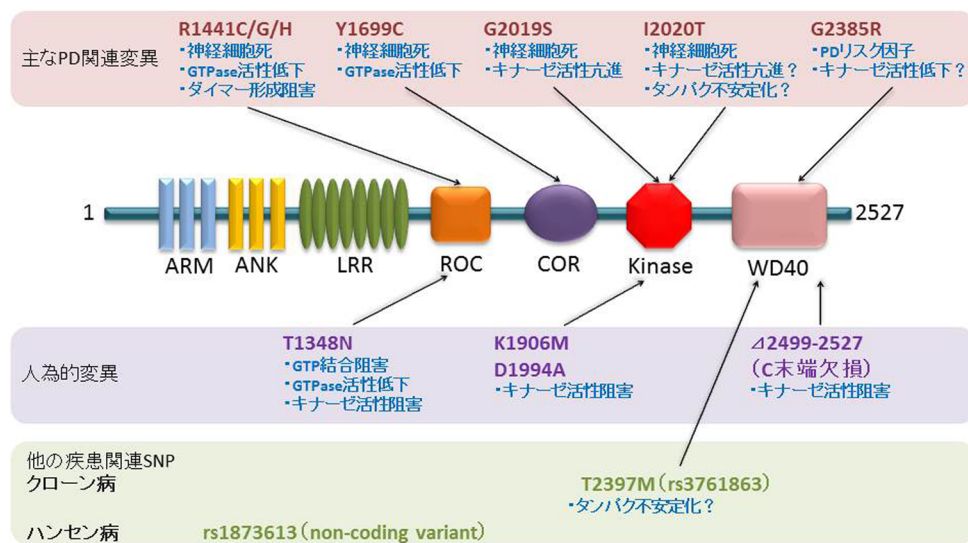


図1 LRRK2のドメイン構造と主な遺伝子変異

Rideout, H.J. & Stefanis, L. (2014) *Neurochem. Res.*, **39**, 576–592の図1を一部改変。

Tauの異常リン酸化を伴う神経病理変化に密接に関連することが強く示唆されている。

我々は、TauがLRRK2の基質になるかを確かめるために、リコンビナントタンパク質を用いた*in vitro*の実験を行った。その結果、LRRK2はTubulinと結合しているTauのみをリン酸化し、結合していない遊離のTauはリン酸化しないことを明らかにした⁷⁾。さらに、LRRK2によるTubulin依存的なTauのリン酸化はTauとTubulinの結合を阻害することも明らかにし、抗リン酸化Tau抗体を用いたウェスタンブロット法によりLRRK2によるTauのリン酸化部位の一つとしてThr181を同定した⁷⁾。次に、我々は各種PD関連変異型LRRK2によるTauのリン酸化能を比較した。その結果、G2019SおよびI2020T変異型LRRK2はTauリン酸化能が高いのに対してR1441C変異は野生型と同等であった⁷⁾。さらに、SH-SY5Y細胞を用いてLRRK2がTauのThr181をリン酸化しうるか確認したところ、TauのThr181のリン酸化は野生型LRRK2 (WT-LRRK2) の過剰発現により増加し、この増加は、LRRK2のノックダウンおよびLRRK2キナーゼ阻害剤により抑制された⁸⁾。このことから、LRRK2は細胞内でもTauのThr181をリン酸化することがわかった。その後、他のグループによりTauのThr149, Thr153およびThr231もLRRK2によりリン酸化されることが報告され⁴⁾、Tauは神経変性に関わるLRRK2の生理的基質候補であると考えられている。以上のことから、G2019S変異によりLRRK2のキナーゼ活性が促進すると、Tauのリン酸化が亢進されることで微小管の不安定化や脱重合が起こり、神経細胞変性が引き起こされるのではないかと考えられる (図2)。

4. LRRK2によるTauキナーゼを介した間接的なTauのリン酸化機構

これまでに、G2019S-LRRK2のトランスジェニックマウスの脳組織においてTauのSer396およびSer404のリン酸化レベルの増加が示されている⁴⁾。TauのSer396はTauの主要なキナーゼであるGSK-3 β (glycogen synthase kinase-3 β)の標的部位であることから、我々はLRRK2が直接的なリン酸化だけでなくGSK-3 β を介する機構によってもTauのリン酸化を制御するものと予想した。実際、我々が行った生化学的な解析により、LRRK2はキナーゼドメインを介してGSK-3 β と直接結合すること、そしてLRRK2との結合はGSK-3 β のキナーゼ活性を増強させることがわかった⁸⁾。しかしながら、LRRK2によるGSK-3 β の活性化にはLRRK2自身のキナーゼ活性は必須ではなかった⁸⁾。また、WT-LRRK2を過剰発現させたSH-SY5Y細胞においてTauのSer396のリン酸化が増加しており、このリン酸化はLRRK2のキナーゼ阻害剤では抑制されずにLRRK2のノックダウンにより抑制された⁸⁾。これらの結果から、LRRK2はGSK-3 β と相互作用してGSK-3 β キナーゼ活性を増強することでTauのリン酸化を促進させるものと考えられた。LRRK2の結合によりGSK-3 β が活性化する機構については、さらなる解析が必要である。

次に、各種PD関連変異型LRRK2のGSK-3 β に対する結合能を比較したところ、G2019S-LRRK2は野生型よりも強くGSK-3 β に結合し、GSK-3 β キナーゼ活性を増大させた⁸⁾。さらに、G2019S-LRRK2を過剰発現させたSH-SY5Y細胞において、TauのSer396のリン酸化がWT-LRRK2過剰発現細胞に比して有意に高かった⁸⁾。これらの結果が

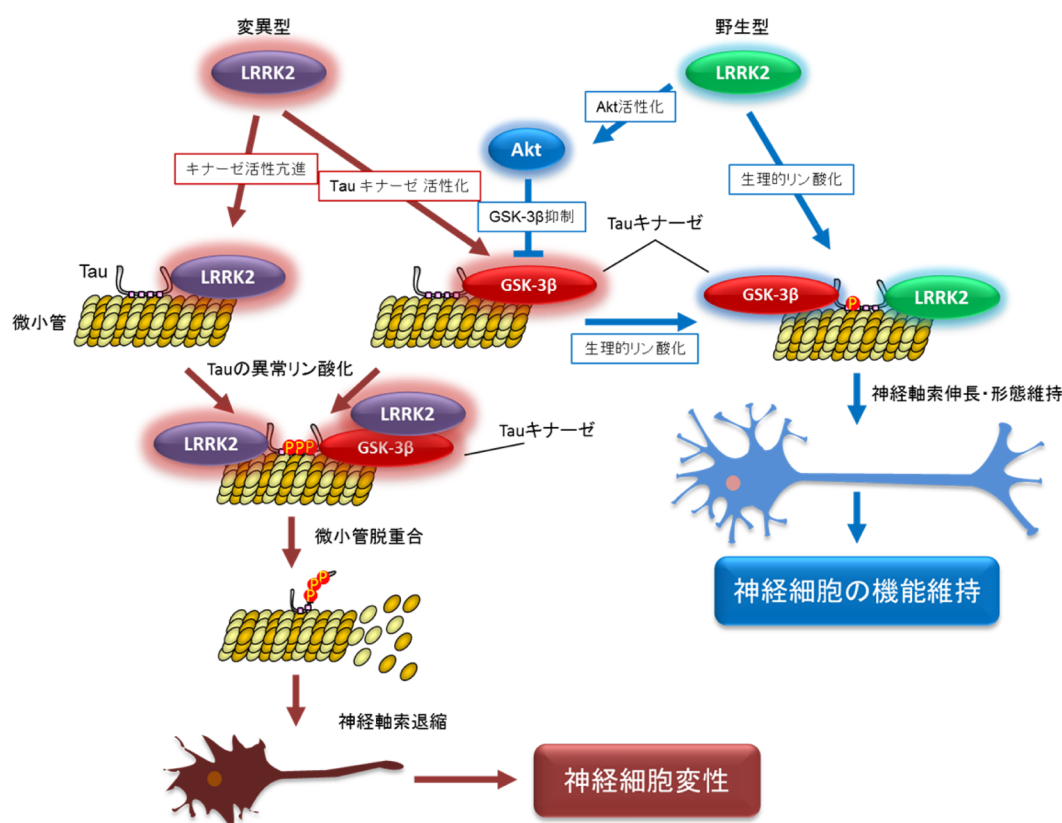


図2 変異型LRRK2によるTauの異常リン酸化メカニズム

野生型LRRK2は、微小管上での直接的なTauのリン酸化でなく、Akt経路や直接的相互作用を介したTauキナーゼの制御を介して神経軸索の形態や機能の維持に重要なTauの生理的なリン酸化を調節しているものと考えられる。一方、PD関連変異型であるG2019S-LRRK2は、自身のキナーゼ活性の促進に伴うTauのリン酸化の亢進や、Akt活性の減弱によるGSK-3 β の活性化、および直接的相互作用の増強によるGSK-3 β やCdk5などのTauキナーゼの活性化を誘導することで、Tauの過剰なリン酸化を引き起こすものと考えられる。

ら、G2019S-LRRK2は、直接Tauをリン酸化するだけでなく、GSK-3 β 依存的なメカニズムも介してTauの異常リン酸化に関与するものと考えられる。この仮説を強く支持する結果として、G2019S-LRRK2トランスジェニックショウジョウバエのニューロンにおいてGSK-3 β によるTauの異常リン酸化とTauの局在異常が観察されている⁹⁾。加えて、この報告ではG2019S-LRRK2はGSK-3 β に強く結合するのに対して、R1441C-LRRK2はGSK-3 β と結合しないことが示されている⁹⁾。また、我々は、LRRK2がGSK-3 β の抑制分子であるAkt1をリン酸化して活性化することも明らかにしている¹⁰⁾。PD関連変異型(R1441C、G2019S、およびI2020T) LRRK2のAkt1に対するリン酸化活性は野生型に比べて低かった¹⁰⁾ことから、PD関連変異型LRRK2を発現する細胞ではAkt1によるGSK-3 β の抑制作用が減弱しており、それによってGSK-3 β のキナーゼ活性がWT-LRRK2の発現細胞よりも高くなると考えられる。実際、I2020T変異型LRRK2を有するPD患者由来のiPS細胞から樹立した神経細胞においてAktのリン酸化レベルの低下と、それに伴うGSK-3 β の活性化およびTauのリン酸化の上昇が観

察されている¹¹⁾。また最近、LRRK2がCdk5とTauに相互作用してTauのリン酸化を促進するとの結果も報告されている¹²⁾。以上のように、LRRK2は直接的なTauのリン酸化機構だけでなく、各種Tauキナーゼを介した間接的なメカニズムによってもTauのリン酸化制御に関わるものと考えられ、その機構はLRRK2の各種PD関連変異型によって異なるのではないかと予想している(図2)。今後、LRRK2に関連するTauの異常リン酸化の分子機構を詳細に理解するためには、Tauのリン酸化に関連する分子と各種PD関連変異型LRRK2との相互作用の特異性の検討と、6種類あるTauのアイソフォームのうちどのアイソフォームの異常がLRRK2変異と関連しているのかを検討する必要があると考えている。

5. LRRK2によるTauの異常リン酸化抑制を標的にするPD治療薬の可能性

次に、熱ショックタンパク質(HSP)の分子シャペロン機能に注目して、HSPによるTauのリン酸化抑制の可能性

について考察する。HSPは、分子シャペロンとして多数のシグナル伝達タンパク質のフォールディングおよび安定化に関与するタンパク質ファミリーであり、熱ショックや酸化ストレスなどの多くの細胞ストレスに対して細胞保護作用を有することが知られている¹³⁾。そこで、LRRK2とHSPの生理的関係についての最近の報告を踏まえ、LRRK2によるTauのリン酸化の阻害に基づくPDの治療標的としてのHSPの可能性について考察する。

これまでに、HSP90阻害剤がWT-LRRK2のみならずG2019S-LRRK2のタンパク質発現量を減少させることが、G2019Sトランスジェニックマウス由来の初代培養ニューロンおよびLRRK2を過剰発現させたHEK293細胞において示されている¹⁴⁾。また興味深いことに、この報告ではHSP90阻害剤を培養細胞に処理すると、哺乳動物細胞で構成的に発現するHSP70のアイソフォームであるHSC70とLRRK2との相互作用を促進することが示されている¹⁴⁾。したがって、HSP90阻害薬は変異型LRRK2の細胞内発現量を低下させるだけでなく、HSC70を誘導してLRRK2とGSK-3 β の結合を阻害することにより、LRRK2によるGSK-3 β の活性化を介したTauの異常リン酸化を抑制するのではないかと予想される。また、HSC70と90%以上のアミノ酸相同性を示すHSP70に関しても、培養細胞においてLRRK2と結合しその凝集を抑制することが報告されている¹⁵⁾。ことから、HSP70の発現誘導によってもLRRK2によるGSK-3 β を介したTauの異常リン酸化を抑制できるのではないかと考えられる。現在までに、エストロゲン、ゲラニルゲラニルアセトン、クルクミン、およびセラストールなどのいくつかのHSP70誘導剤がアルツハイマー病の病態に予防効果を持つ可能性が示唆されている¹⁶⁾。したがって、HSP70誘導剤は変異型LRRK2によるTauの異常リン酸化を抑制できる効果的なPD治療薬となる可能性がある。

6. おわりに

本稿ではLRRK2とTauの異常リン酸化について概説したが、我々を含めた複数のグループはLRRK2以外のPD原因分子である α -SynucleinもGSK-3 β を介するTauの異常リン酸化に関わることを報告している。このことから、広範な神経変性疾患でみられるTauの異常リン酸化のメカニズムを解明するためには、各種神経変性疾患の原因分子とGSK-3 β やCdk5といったTauキナーゼとの生理的関係を解

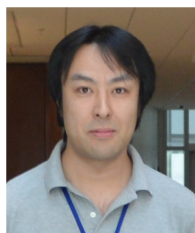
析する必要がある。また、我々はHSPの発現誘導によって異常リン酸化Tauに関連する神経病理変化を抑制できるのではないかと予想しており、血液脳関門を通過可能なHSP誘導剤を用いることができれば、LRRK2によるTauの異常リン酸化の抑制を分子基盤としたPDの効果的な治療薬の開発につながるのではないかと期待している。

文 献

- 1) Funayama, M., Hasegawa, K., Kowa, H., Saito, M., Tsuji, S., & Obata, F. (2002) *Ann. Neurol.*, **51**, 296–301.
- 2) Paisán-Ruiz, C., Jain, S., Evans, E.W., Gilks, W.P., Simón, J., van der Brug, M., López 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., Martí-Massó, J.F., Pérez-Tur, J., Wood, N.W., & Singleton, A.B. (2004) *Neuron*, **44**, 595–600.
- 3) Cookson, M.R. (2010) *Nat. Rev. Neurosci.*, **11**, 791–797.
- 4) Kawakami, F. & Ichikawa, T. (2015) *Parkinsons Dis.*, **2015**, 734746.
- 5) Sen, S., Webber, P.J., & West, A.B. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 36346–36356.
- 6) Ujiie, S., Hatano, T., Kubo, S., Imai, S., Sato, S., Uchihara, T., Yagishita, S., Hasegawa, K., Kowa, H., Sakai, F., & Hattori, N. (2012) *Parkinsonism Relat. Disord.*, **18**, 819–823.
- 7) Kawakami, F., Yabata, T., Ohta, E., Maekawa, T., Shimada, N., Suzuki, M., Maruyama, H., Ichikawa, T., & Obata, F. (2012) *PLoS ONE*, **7**, e30834.
- 8) Kawakami, F., Shimada, N., Ohta, F., Kagiya, G., Kawashima, R., Maekawa, T., Maruyama, H., & Ichikawa, T. (2014) *FEBS J.*, **281**, 3–13.
- 9) Lin, C.H., Tsai, P.I., Wu, R.M., & Chien, C.T. (2010) *J. Neurosci.*, **30**, 13138–13149.
- 10) Ohta, E., Kawakami, F., Kubo, M., & Obata, F. (2011) *FEBS Lett.*, **585**, 2165–2170.
- 11) Ohta, E., Nihira, T., Uchino, A., Imaizumi, Y., Okada, Y., Akamatsu, W., Takahashi, K., Hayakawa, H., Nagai, M., Ohshima, M., Ryo, M., Ogino, M., Murayama, S., Takashima, A., Nishiyama, K., Mizuno, Y., Mochizuki, H., Obata, F., & Okano, H. (2015) *Hum. Mol. Genet.*, **24**, 4879–4900.
- 12) Shanley, M.R., Hawley, D., Leung, S., Zaidi, N.F., Dave, R., Schlosser, K.A., Bandopadhyay, R., Gerber, S.A., & Liu, M. (2015) *Biochemistry*, **54**, 5198–5208.
- 13) Mayer, M.P. & Bukau, B. (2005) *Cell. Mol. Life Sci.*, **62**, 670–684.
- 14) Wang, L., Xie, C., Greggio, E., Parisiadou, L., Shim, H., Sun, L., Chandran, J., Lin, X., Lai, C., Yang, W.J., Moore, D.J., Dawson, T.M., Dawson, V.L., Chiosis, G., Cookson, M.R., & Cai, H. (2008) *J. Neurosci.*, **28**, 3384–3391.
- 15) Lichtenberg, M., Mansilla, A., Zecchini, V.R., Fleming, A., & Rubinstein, D.C. (2011) *Cell Death Dis.*, **2**, e196.
- 16) Lu, R.C., Tan, M.S., Wang, H., Xie, A.M., Yu, J.T., & Tan, L. (2014) *Biomed. Res. Int.*, 435203.

著者寸描

●川上 文貴（かわかみ ふみたか）



北里大学大学院医療系研究科分子病態学
群生体制御生化学講師。医学博士。

■略歴 1979年岩手県に生まれる。2002
年北里大学大学院医療系研究科を修了。
同年より現職。13年10月から1年間NIH,
NIAのLaboratory of Neurogeneticsに留学。

■研究テーマと抱負 疾患の発症に関わ
るタンパク質リン酸化シグナルの解明を
テーマとして、現在は、パーキンソン病

や炎症性腸疾患のクローン病の発症に関わるLRRK2を介した
シグナル伝達機構についての研究を行っている。