

学 位 論 文 要 旨

氏 名

服部 精人



論 文 題 目

「Studies on the membrane traffic induced by I2020T mutation of LRRK2 gene, a causative gene of the familial Parkinson's disease, using a new analytical method of intracellular protein

(新規細胞内タンパク質解析法を用いた遺伝性パーキンソン病原因遺伝子 *LRRK2* の I2020T 変異が引き起こすメンブレントラフィックに関する研究)」

指 導 教 授 承 認 印

末永 忠広



Studies on the membrane traffic induced by I2020T mutation of LRRK2 gene, a causative gene of the familial Parkinson's disease, using a new analytical method of intracellular protein

(新規細胞内タンパク質解析法を用いた遺伝性パーキンソン病原因遺伝子 *LRRK2* の I2020T 変異が引き起こすメンブレントラフィックに関する研究)

氏名 服部 精人

[背景]

パーキンソン病(PD)は、中脳黒質の神経細胞死によって運動障害や自律神経症状を生じる神経変性疾患である。北里大学では、日本の顕性遺伝性 PD 家系(S 家系) Leucine-Rich Repeat Kinase 2(LRRK2)のキナーゼドメイン内の I2020T 変異に起因することを発見し、LRRK2 の生理機能や基質分子を報告してきた。また、I2020T 変異 LRRK2 をもつ S 家系 PD 患者から樹立した iPS 細胞(LRRK2-iPSC)由来神経細胞を用いて、ドーパミンの放出異常やリン酸化タウの増加など患者剖検脳の病態の一部を *in vitro* で再現可能であることを報告してきた。近年、PD における低分子量 GTP 結合タンパク質 Rab を介したメンブレントラフィックの破綻は、PD 原因分子の一つである α -Synuclein の蓄積やドーパミン産生神経細胞死を誘発する可能性があることが解明されてきており、Rab タンパク質を介したメンブレントラフィックの異常は PD 病態解明のブレイクスルーとなりうる可能性がある。近年、LRRK2 は Rab タンパク質群をリン酸化することで輸送機能を調節していること、さらに微小管に直接結合することが報告されており、メンブレントラフィックと深く関わりがあることが推測される。しかしながら、I2020T 変異による Rab を介したメンブレントラフィックへの影響は不明な点が多い。また、Rab タンパク質による輸送機能に異常を来すと細胞内での局在に変化が生じることが報告されているが、この Rab タンパク質の細胞内局在を簡易的かつ客観的に評価することが困難であるという側面があった。そこで本研究では、Rab タンパク質群を簡易的かつ客観的に評価するための新規イメージング解析手法をオープンソース画像解析ソフト CellProfiler および ImageJ を用いて構築し、病態解析へ応用することで I2020T 変異 LRRK2 がもたらす Rab を介したメンブレントラフィックの輸送異常を明らかにすることを目的とした。

[方法]

Rab タンパク質群を簡易的かつ客観的に評価するための新規解析手法を構築し、病態解析へと応用して I2020T 変異 LRRK2 がもたらす Rab を介したメンブレントラフィックの輸送異常を明らかにするために以下の実験を行った。

1. CellProfiler を用いた細胞内タンパク質新規解析手法の構築

Rab タンパク質を含めた細胞内タンパク質の新規解析法を検証するために、ヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y)において抗 Rab 抗体を使用した免疫細胞化学染色を行った。蛍光画像は蛍光顕微鏡および共焦点顕微鏡で撮影した。その後、画像解析のために CellProfiler および ImageJ を使用して Rab タンパク質の発現強度、Puncta 数、局在を評価する解析系の構築を行った。また、同様に SH-SY5Y 細胞に取り込ませた Alexa Fluor 555 Transferrin (Tf)やマクロファージへ分化させたヒト単球由来細胞(THP-1)に

取り込ませた pHrodo™ Green E. coli BioParticles®, pHrodo™ Red Zymosan BioParticles®を CellProfiler を使用して、Tf で追跡した trafficking や貪食能の解析が可能かどうかを確認した。

2. I2020T 変異 LRRK2 変異が引き起こす Rab を介したメンブレントラフィッキング異常の評価

I2020T 変異 LRRK2 が Rab タンパク質に異常を来す可能性があるかを調べるために先行して、SH-SY5Y 細胞、I2020T 変異 LRRK2 安定発現 SH-SY5Y 細胞において初期エンドソームの Rab5、リサイクリングエンドソームの Rab4、後期エンドソームの Rab7 に対する抗体を使用して免疫細胞化学染色を行った。LRRK2-iPSC 由来神経細胞と isogenic-iPSC 由来神経細胞においては Rab4、Rab5、Rab7 に加えてエクソサイトシスに關与する Rab8、PhosphoRab8(p-Rab8)、Rab10、PhosphoRab10(p-Rab10)、リサイクリングに關与する Rab9、Rab11 に対する抗体を使用して免疫染色を行った。その後、構築した解析系を用いることで、Rab タンパク質の発現強度、Puncta 数、局在を解析した。また、Tf の輸送を評価するために、細胞内に Tf 取り込ませた後に取り込みを止めるために PBS で 2 回洗浄し、培地を交換する Wash Out の作業を行った。Wash Out 直後(T0)、Wash Out30 分後(T30)、Wash Out100 分後(T100) いずれかで細胞を固定し、リサイクリングに關与する Rab 群との共局在を解析した。さらに、Tf を取り込ませた後の上清および Wash Out し 2 時間 37℃ でインキュベートして取り込ませた Tf を放出させた上清を回収し、マルチモードマイクロプレートリーダーで蛍光強度を測定することで Tf の取り込みと放出を評価した。

3. I2020T 変異 LRRK2 が与えるミトコンドリア輸送とマイトファジーの評価

I2020T 変異 LRRK2 が引き起こすメンブレントラフィッキング異常がミトコンドリア輸送に与える影響を調べるために、SH-SY5Y 細胞、I2020T 変異 LRRK2 安定発現 SH-SY5Y 細胞、LRRK2-iPSC 由来神経細胞と isogenic-iPSC 由来神経細胞において CellLight™ Mitochondria を使用して細胞内ミトコンドリアを蛍光ラベルした。その後ミトコンドリア粒子を KEYENCE BZ-810 を使用して 15 分間タイムラプスイメージングで撮影しミトコンドリア粒子のトラッキング解析を行った。トラッキングでは時間内でのミトコンドリア粒子の移動距離と移動方向の転換回数を評価した。また、Mitophagy Detection Kit を使用して共脱役剤の carbonylcyanide m- chlorophenyl-hydrazone(CCCP)を添加した後にマイトファジー陽性細胞の検出を行った。

[結果]

1. 細胞内タンパク質新規解析手法の構築

CellProfilerにおいて Rab タンパク質の画像解析を行うために CellProfiler の Pipeline の構築を行った。その結果 SH-SY5Y 細胞内の Rab タンパク質を明瞭化して抽出することに成功し、その数をカウントすることが可能であることが明らかになった。さらに明瞭化して抽出した画像は核や細胞質のデータとマージして解析が可能であることも確認した。そこで、ImageJ を併用して解析を行うことで Rab タンパク質の発現強度、puncta 数、局在を評価可能なシステムの構築ができた。また、SH-SY5Y 細胞内に取り込まれた Tf やマクロファージへ分化させた THP-1 に取り込まれた pHrodo™ Green E. coli BioParticles®, pHrodo™ Red Zymosan BioParticles®も同様に解析が可能であることを確認した。

2. I2020T 変異 LRRK2 が引き起こす Rab 群の異常

構築した解析系を使用し、SH-SY5Y 細胞および I2020T 変異 LRRK2 安定発現 SH-SY5Y 細胞において初期エンドソーム Rab5、後期エンドソーム Rab7、リサイクリングエンドソームの Rab4 の発現強度、puncta 数、局在について解析した結果、T0 もしくは T100 のいずれかで SH-SY5Y 細胞と I2020T 変異 LRRK2 安定発現 SH-SY5Y 細胞の間では差がみられる傾向があった。また、Tf と Rab4 との共局在解析においても両者の共局在率に差が確認された。そこで、より詳細な解析を行うために行った LRRK2-iPSC 由来神経細胞と isogenic-iPSC 由来神経細胞における Rab 群の発現強度、puncta 数、局在解析においても Rab4、Rab5、Rab7、Rab8、p-Rab8、Rab10、p-Rab10、Rab11 において差が確認された。また、Tf と Rab4、Rab9、Rab11 との共局在解析においても T0、T30、T100 のいずれかで共局在率の差異がみられた。さらに、Tf を取り込ませた後の上清および取り込ませた Tf を放出させた上清をプレートリーダーで蛍光強度を測定すると、I2020T 変異 LRRK2 安定発現 SH-SY5Y 細胞では Tf の放出が増加し、LRRK2-iPSC 由来神経細胞では Tf の取り込みは減少し、放出は増加していることが確認された。

3. 細胞内ミトコンドリアトラッキングおよびマイトファジー解析

I2020T 変異 LRRK2 がメンブレントラフィッキングに異常を引き起こす可能性が示唆されたために細胞内ミトコンドリアのトラッキングを行った結果、I2020T 変異安定発現 SH-SY5Y 細胞および LRRK2-iPSC 由来神経細胞ではミトコンドリアの移動距離と方向転換回数が増加する傾向がみられた。また、CCCP を加えた時にマイトファジー陽性細胞の増加傾向も確認された。

[考察]

本実験で構築した CellProfiler および ImageJ を併用した新規タンパク質の解析システムでは、これまでの Rab タンパク質の局在解析法とは異なり、細胞内のタンパク質粒子を明瞭化し、粒子ごとに局在を計測することで、より解析の正確性を向上させることができた。これらの解析システムを用いて Rab タンパク質の発現強度、puncta 数、局在について SH-SY5Y 細胞および I2020T 変異 LRRK2 安定発現 SH-SY5Y 細胞の間で確認された Rab4、Rab5、Rab7 に差がみられる傾向があったことから I2020T 変異が Rab の機能に異常を来す可能性が予想された。そこで、より詳細な解析のために、LRRK2-iPSC 由来神経細胞および isogenic-iPSC 由来神経細胞で行った解析では Rab4、Rab5、Rab7、Rab8、p-Rab8、Rab10、p-Rab10、Rab11 において両者の間に差が確認された。これまでに I2020T 変異 LRRK2 とエクソサイトシスに関与する Rab8、p-Rab8、Rab10、p-Rab10 の機能を亢進させている可能性が報告されてきたが、本実験では I2020T 変異 LRRK2 が初期エンドソーム、リサイクリングエンドソーム、後期エンドソームといったメンブレントラフィッキング経路にも影響を与えている可能性が示唆された。特に後期エンドソームの Rab7 は PD 原因タンパク質の α -Synuclein のオートファジーによる分解に関与していることから Rab7 の機能異常は神経細胞内での α -Synuclein 蓄積などにも影響することが予想される。また、リサイクリングに関与する Rab4、Rab9、Rab11 と Tf の共局在率の異常および、マイクロプレートリーダーによる上清中の Tf 蛍光強度測定の結果から、神経細胞におけるドーパミンのリサイクリングにも影響が出ている可能性も考えられる。最後に SH-SY5Y 細胞、I2020T 変異 LRRK2 安定発現 SH-SY5Y 細胞、LRRK2-iPSC 由来神経細胞、isogenic-iPSC 由来神経細胞における細胞内ミトコンドリアのトラッキング解析は I2020T 変異 LRRK2 によるミトコンドリア輸送障害を示唆している可能性が考えられた。LRRK2 は Rab タンパク質群を介したキネシン、ダイニンの輸送に深く関わっている。

今回の I2020T 変異 LRRK2 安定発現 SH-SY5Y 細胞および LRRK2-iPSC 由来神経細胞で確認されたミトコンドリア粒子の移動距離と方向転換数の増加傾向は Rab タンパク質群を介した輸送異常によってキネシン、ダイニンによる順行輸送、逆行輸送の混乱が引き起こされている可能性がある。このミトコンドリアの輸送障害はマイトファジーの異常にも繋がっている可能性があるが、LRRK2 変異とマイトファジーの関係は変異と細胞の種類によっても報告に違いが生じているために今後、より詳細な解析が必要である。また、今回は pan ニューロンによる解析を行っているが、Rab タンパク質の機能障害によってドーパミン産生神経細胞が特異的に死滅する報告がなされている事を考えると、領域特異的な神経細胞を創出し、細胞内における Rab 群の詳細な解析も今後必要である。

結語

本実験により、細胞内タンパク質の新規解析法を構築し、I2020T 変異 LRRK2 による Rab タンパク質を介したメンブレントラフィッキングやミトコンドリアの輸送異常、マイトファジーの異常を明らかにした。