

## 別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

## 主 論 文 の 要 旨

論文題目 The ULK complex-LRRK1 axis regulates Parkin-mediated mitophagy via Rab7 Ser-72 phosphorylation  
(ULK 複合体-LRRK1 による Rab7 Ser-72 のリン酸化は、Parkin 依存的マイトファジーを制御する)

氏 名 藤田圭太郎

## 論 文 内 容 の 要 旨

## 目的

ミトコンドリアは細胞内で ATP を産生する主要なオルガネラであり、ATP を合成する過程で生じる活性酸素によって常に障害を受けている。このため、細胞は損傷ミトコンドリアをマイトファジーという選択的オートファジーによって除去する。マイトファジーの破綻はパーキンソン病など神経変性疾患を引き起こすことが知られており、Parkin や LRRK2 などの家族性パーキンソン病原因遺伝子がマイトファジーに重要なことが知られている。LRRK1 は LRRK2 のファミリー分子である。最近我々は、LRRK1 が低分子量 G タンパク質 Rab7 の Ser-72 をリン酸化し、上皮成長因子受容体 (EGFR) の細胞内輸送に機能していることを明らかにした。一方、マイトファジーにおいても Rab7 Ser-72 のリン酸化が重要な可能性が報告された。そこで LRRK1 が、Rab7 Ser-72 をリン酸化することで、Parkin 依存的マイトファジーに機能している可能性を検討した。

## 結果

**(1) LRRK1 は Parkin 依存的マイトファジーに必要である**

まず、LRRK1 が Parkin 依存的マイトファジーに重要か、siRNA によって LRRK1 をノックダウンし検討した。Parkin を発現させた U2OS 細胞を、ミトコンドリア脱分極剤 CCCP で 24 時間処理すると、マイトファジーによって損傷ミトコンドリアが除去される。一方、LRRK1 をノックダウンした細胞では、損傷ミトコンドリアの除去が阻害された。このことから、LRRK1 は Parkin 依存的マイトファジーに必須なことが明らかとなった。

**(2) LRRK1 は損傷ミトコンドリア上の Rab7 Ser-72 をリン酸化する**

次に、LRRK1 が損傷ミトコンドリア上の Rab7 Ser-72 のリン酸化に重要か、Rab7 Ser-72 のリン酸化を特異的に認識する抗体を用いて検討した。その結果、Parkin 発現 U2OS 細胞を CCCP で 3 時間処理すると、リン酸化 Rab7 がミトコンドリアに局在するが、LRRK1 をノックダウンした細胞ではこれが消失した。このことから、LRRK1 が

損傷ミトコンドリア上の Rab7 Ser-72 をリン酸化していることが明らかとなった。

### (3) LRRK1 は ULK 複合体の下流で Rab7 Ser-72 をリン酸化する

ULK1/2 はマイトファジー初期に重要なキナーゼとして知られている。そこで、ULK と LRRK1 の関係について検討した。ULK1/2 をダブルノックダウンすると、損傷ミトコンドリアにおける Rab7 Ser-72 のリン酸化が消失した。この細胞に恒常活性化型 LRRK1 (Y944F) を発現させると、Rab7 Ser-72 のリン酸化がレスキューされた。このことから、LRRK1 は ULK の下流で機能することが明らかとなった。ULK1/2 は FIP200、ATG101、ATG13 と複合体を形成している。そこで次に、これらの因子と LRRK1 の関係を検討した。その結果、CCCP 処理依存的に ATG13 と LRRK1 が結合することを見出した。さらに LRRK1 は ATG13 を介して、ULK 複合体全体と相互作用していることが明らかとなった。

### (4) ATG13 は LRRK1 をミトコンドリアヘリクルートし活性化させている

ATG13 をノックダウンすると、損傷ミトコンドリア上の Rab7 Ser-72 リン酸化が阻害される。この時、ULK1/2 ダブルノックダウンと異なり、活性化型 LRRK1 (Y944F) は、ATG13 ノックダウンによる Rab7 のリン酸化阻害をレスキューできなかった。これは ATG13 ノックダウンによって、LRRK1 がミトコンドリアに局在できなかったためと考えた。そこで、LRRK1 を強制的にミトコンドリアに局在させるシステムを用い、この可能性を検討した。FRB と FKBP は rapalog を介して結合するタンパク質である。ミトコンドリア外膜タンパク質 Fis1 に FRB を、LRRK1 に FKBP をそれぞれ融合させると、rapalog 依存的に LRRK1 をミトコンドリアに局在させることができる。このシステムを用いて LRRK1 (Y944F) をミトコンドリアに局在させたところ、ATG13 をノックダウンしても、Rab7 のリン酸化が観察された。このことから、ATG13 は LRRK1 をミトコンドリアに局在させるのに必要な可能性が示唆された。一方、野生型 LRRK1 をミトコンドリアに人為的に局在させても、Rab7 のリン酸化は誘導されなかった。このことは、LRRK1 の活性化のステップが必要なことを示唆している。興味深いことに我々は、ULK1 が LRRK1 を *in vitro* でリン酸化することを明らかにした。以上の結果から、ATG13 は LRRK1 の損傷ミトコンドリアへの局在と、ULK1 によるリン酸化・活性化の2つのステップに重要な可能性が考えられた。

### (4) LRRK1-Rab7 経路によるマイトファジー制御

活性化型 LRRK1 (Y944F) を人為的にミトコンドリアに局在させると、Parkin やミトコンドリア損傷非依存的に、マイトファゴソーム形成開始に重要な ATG9 や LC3 をリクルートすることを見出した。一方で、ミトコンドリア上で LRRK1 を活性化させるだけでは、ミトコンドリアの分解・除去までは至らないことも明らかとなった。

## 考察

以上の結果から、次のようなモデルを提唱する。ミトコンドリアが損傷すると LRRK1 は ATG13 と結合することで、ULK 複合体とともに損傷ミトコンドリアに局在し、ULK によってリン酸化され活性化する。活性化した LRRK1 は Rab7 Ser-72 をリン酸化し、マイトファゴソームの形成を促進することで損傷ミトコンドリアの分解・除去に機能している。