

主論文

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 リン酸化は、
Parkin 依存的マイトファジーを制御する)

名古屋大学 大学院理学研究科 生命理学専攻

藤田圭太郎

主論文目次

開始ページ

1. 要旨	3
2. 序論	4
3. 結果	7
4. 考察	16
5. 材料と方法	21
6. 謝辞	24
7. 参考文献	25
8. 図	32

1. 要旨

マイトファジーは、損傷したミトコンドリアを特異的に分解する選択的オートファジーの一つである。損傷したミトコンドリアは、マイトファゴソームと呼ばれる脂質二重膜から成る小胞によって覆われ、その後リソソームによって分解される。近年オートファジー開始に重要な ULK 複合体が、Parkin 依存的マイトファジーにも重要なことが明らかとなった。しかし、ULK 複合体がマイトファゴソーム形成を開始する機構については不明であった。最近、低分子量 G タンパク質 Rab7 が、Parkin 依存的マイトファジーに重要であることが報告された。さらに Rab7 Ser-72 のリン酸化が、マイトファゴソーム形成開始に重要な可能性が指摘された。これまで我々は、Rab7 Ser-72 をリン酸化するキナーゼとして、ROCO ファミリーキナーゼ LRRK1 を同定していた。そこで本研究では、Parkin 依存的マイトファジーにおける LRRK1 の役割について解析した。その結果 LRRK1 は、Parkin 依存的マイトファジーにおいて、ULK1/2 の下流で機能し、Rab7 Ser-72 をリン酸化することを明らかにした。さらに LRRK1 は、ULK 複合体構成因子 ATG13 と結合し、損傷ミトコンドリアにリクルートされることが明らかとなった。また活性化型 LRRK1 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因子 ATG9 や LC3 をミトコンドリア上に局在化できることも明らかとなった。本研究から LRRK1 は、Parkin 依存的マイトファジーにおいて、ATG13 によって損傷ミトコンドリアにリクルートされ、Rab7 Ser-72 をリン酸化し、ATG9 や LC3 をリクルートすることでマイトファゴソーム形成開始に機能していることが明らかとなった。

2. 序論

オートファジーは進化的に保存された細胞の恒常性維持機構の1つであり、細胞内の不要な、あるいは機能不全に陥ったタンパク質やオルガネラを除去し再利用している[1]。マイトファジーは選択的オートファジーの一つで、損傷したミトコンドリアを選択的に分解・除去している。このためマイトファジーは、ミトコンドリアの品質保持に必須である[2-4]。マイトファジーでは、損傷したミトコンドリアはユビキチン(Ub)によって標識される。続いて、オートファジーレセプタータンパク質が、自身のユビキチン結合ドメインを介して、ユビキチンで標識された損傷ミトコンドリアと結合する[5,6]。次に、オートファジー関連(ATG)タンパク質が損傷ミトコンドリア周辺に集積し、隔離膜と呼ばれる二重膜構造体を形成し、損傷ミトコンドリアを包み込みマイトファゴソームを形成する。その後マイトファゴソームは、リソソームと融合してマイトリソソームとなり、損傷ミトコンドリアを分解する[1,7,8]。損傷したミトコンドリアは酸化ストレスの原因となり、細胞にとって有害である。このことから、マイトファジーの機能不全はパーキンソン病(PD)などの神経変性疾患の病因として強く関連づけられている[4,9-11]。

マイトファジーの分子機構はこれまでに多くの研究が為され、重要なシグナル経路が複数発見されている。中でも、家族性パーキンソン病の原因遺伝子であるミトコンドリア局在キナーゼ PTEN-induced kinase 1 (PINK1)および E3-ユビキチンリガーゼ Parkin 依存的に駆動するマイトファジーがよく研究されてきた[9,11]。これまでの研究から、PINK1 が Parkin の上流で働くことが明らかとなっている[12-14]。PINK1 はミトコンドリアに局在するが通常は不安定で、すぐに分解される。しかし、ミトコンドリアが損傷すると、PINK1 はミトコンドリア外膜(OMM)上で安定化する[15,16]。外膜上の PINK1 は Parkin と Ub をそれぞれリン酸化し、Parkin を損傷ミトコンドリアにリクルートして活性化する[15-23]。続いて、Parkin によって OMM 上のタンパク質がポリユビキチン化されると、NDP52 やオプチニューリン(OPTN)といったオートファジーレセプターが損傷ミトコンドリアにリクルートされる。これらのレセプターは、ユビキチン化されたミトコンドリア外膜タンパクとポリユビキチン鎖を介して結合し、LC3 ファミリータンパク質やオー

トファジー開始因子(ULK 複合体)などを局在化して、マイトファゴソームの形成を開始する[24-26]。また、これらのオートファジーレセプターのユビキチン結合能は、TANK-binding kinase 1 (TBK1)によるリン酸化を受けると促進され、マイトファジーを強力に駆動することが知られている[27-29]。最近になって、ULK タンパク質複合体がマイトファジーに重要なことが示唆された。ULK 複合体は ULK1 または ULK2 キナーゼと、FIP200、ATG13、ATG101 によって構成されている[30]。マイトファジーにおいて、オートファジーレセプターNDP52 は FIP200 と複合体を形成することで、ULK 複合体を損傷ミトコンドリアにリクルートし、マイトファゴソームの形成を誘導する[31]。これまでの研究から、ULK 複合体がマイトファゴソームの形成に重要なことは明らかにされてきたが、このプロセスで機能する ULK 複合体の下流因子についてはほとんどわかっていなかった。

最近の研究から、低分子量 G タンパク質 Rab7a(以下、Rab7)が、Parkin 依存的マイトファジーにおいてマイトファゴソームの形成開始に重要なことが報告された[32,33]。Rab7 が属する Rab ファミリータンパク質は、膜と結合できる GTP 結合型(活性化型)と細胞質に存在する GDP 結合型(不活性型)が切り替わることによって、細胞内膜輸送の制御因子として機能している[34]。Rab7 は Parkin 依存的マイトファジーの早期の段階で損傷ミトコンドリアに局在し、マイトファゴソーム形成に重要な ATG9A(以下、ATG9)小胞を損傷ミトコンドリア周辺にリクルートしている[32,33,35]。興味深いことに、Rab7 Ser-72 のリン酸化が ATG9 のリクルートに重要である可能性が指摘され、TBK1 が *in vitro* で Rab7 Ser-72 を直接リン酸化することも報告された[36]。Rab7 Ser-72 は、GDP-GTP 交換や他のタンパク質との結合に必要な Switch II 領域にあり、リン酸化を受ける残基として Rab ファミリー間で高度に保存されている[37]。パーキンソン病の原因遺伝子 LRRK2 も、LRRK1 と異なる Rab ファミリーの保存された残基をリン酸化し、Rab とその制御因子との結合を制御している[38,39]。例えば LRRK2 は、Rab10 Thr-73(Rab7 Ser-72 に相当)をリン酸化し、マイトファジーを負に制御することが知られている[40]。

最近我々は、LRRK1 が Rab7 Ser-72 をリン酸化するキナーゼであることを報告した

[41]。LRRK1 は Rab7 Ser-72 をリン酸化し、Rab7 のエフェクター分子 RILP との結合を促進することで、上皮成長因子受容体(EGFR)を含んだエンドソームの細胞内輸送を制御している。最近の研究から、LRRK1 と LRRK2 はオートファジーを制御していることが報告されている[40,43,44]。そこで本研究では、LRRK1 が Parkin 依存的マイトファジーにおいて重要な働きをしていないか検討した。その結果、ULK 複合体-LRRK1 経路が、Rab7 Ser-72 のリン酸化を介して、Parkin 依存的マイトファジーを制御していることを明らかにした。

3. 結果

LRRK1 は Parkin 依存的マイトファジーに必要である

Parkin はミトコンドリア脱分極剤 carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) によってミトコンドリアを脱分極・損傷させると、速やかにミトコンドリアに局在し、マイトファジーによるミトコンドリアの分解・除去を誘導する[17]。まず、この系を用いて LRRK1 がマイトファジーに重要か検討した。本研究で用いた U2OS 細胞は、内在性 Parkin を持たない細胞であるため、Flag タグをつけた Parkin を一過的に発現させた[45]。マイトファジーは Flag 抗体とミトコンドリアマーカである、ミトコンドリア内膜タンパク質 core 1 subunit complex III (C-III core1)抗体を用いた細胞染色によって検討した[25,46]。先行研究では、Parkin を発現させた細胞に CCCP を 24 時間処理すると、マイトファジーによってミトコンドリアが完全に分解・消失する細胞が観察されるようになる[17]。実際に検討したところ、約 30%の細胞でミトコンドリアが完全に消失した(図. 1A,B)。一方、このようなミトコンドリアの分解は、Parkin を持たない細胞では見られなかった(図. 1A)。このことから、ミトコンドリアの消失は確かに Parkin 依存的マイトファジーによるものであると考えられた。では、LRRK1 は Parkin 依存的マイトファジーに必要であるか、siRNA を用いて LRRK1 をノックダウンし検討した(図. 17A)。Flag-Parkin を発現させた U2OS 細胞を CCCP で 24 時間処理した時、LRRK1 をノックダウンした細胞では、ミトコンドリア消失の割合が有意に低下した(図. 1A,B)。このことから、LRRK1 は Parkin 依存的マイトファジーに必要なことが明らかになった。

次に、LRRK1 のキナーゼ活性が損傷ミトコンドリアの除去に重要か、kinase-negative 型の LRRK1 [以下、LRRK1(KM)] を用いたレスキュー実験によって検討した。Kinase-negative 型 LRRK1 (KM) 変異体は 1243 番目のリシン残基をメチオニンに置換した変異体である[47]。LRRK1 をノックダウンした細胞に siRNA 耐性変異を持った野生型 GFP-LRRK1 を発現させると、CCCP 処理によるミトコンドリアの分解がレスキューされた。一方 siRNA 耐性型 LRRK1(KM)変異体ではレスキューしなかった(図. 1A, B)。以上のことから、LRRK1 のキナーゼ活性が Parkin 依存的マイトファジー

に重要なことが明らかになった。

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

Rab7 は ATG9 を含む小胞を損傷ミトコンドリア周囲にリクルートすることで、マイトファゴソームの形成に機能していることが知られている[32,33]。さらに Rab7 Ser-72 のリン酸化が、この過程に重要な可能性が指摘された[36]。そこで、マイトファジー時に Rab7 Ser-72 が実際にリン酸化されるか、リン酸化を特異的に認識する抗体 pS72-Rab7 抗体を用いた細胞染色で検討した。これまでの研究から、Parkin 発現細胞を CCCP で 3 時間処理すると、ミトコンドリアはネットワーク構造が破壊されて核近傍に凝集し、さらに Parkin が凝集したミトコンドリアに局在することが知られている[17]。実際 Flag-Parkin を発現させた細胞では、CCCP3 時間処理によってミトコンドリアが凝集し、そこに Parkin が局在した(図 2A)。さらにこの時、pS72-Rab7 のシグナルもミトコンドリアに局在していた(図 2A)。このことから、Parkin 依存的マイトファジーにおいて、損傷ミトコンドリア上で内在性 Rab7 Ser-72 がリン酸化されることが明らかとなった。

これまで我々は、LRRK1 がエンドソーム膜上で Rab7 Ser-72 をリン酸化することを明らかにしていた[41]。そこで LRRK1 が、Parkin 依存的マイトファジーにおいても Rab7 Ser-72 をリン酸化しているの検討した。Flag-Parkin 発現細胞を siRNA で処理し LRRK1 をノックダウンすると(図 17A)、CCCP 依存的な損傷ミトコンドリア上の pS72-Rab7 シグナルが顕著に減少した(図 2A, B)。このことから、LRRK1 は損傷ミトコンドリア上の Rab7 Ser-72 リン酸化に必要と考えられる。一方、LRRK1 をノックダウンしても、CCCP 処理によるミトコンドリアの凝集や、Parkin のミトコンドリア局在には影響は見られなかった(図 2A)。このことから、LRRK1 は Parkin のミトコンドリアへのリクルートには機能していないことが明らかとなった。続いて、siRNA 耐性変異体を用いたレスキュー実験を行った。その結果、LRRK1 ノックダウン細胞における CCCP 依存的な pS72-Rab7 のシグナルの減少は、野生型 GFP-LRRK1 の発現によってレスキューされたが、kinase-negative 型 GFP-LRRK1(KM)の発現によってはレスキューさ

れなかった(図 2C,D)。以上の結果から、LRRK1 は Parkin 依存的マイトファジーにおいて Rab7 Ser-72 をリン酸化するキナーゼであると考えられた。

次に、LRRK1 が Parkin 依存的マイトファジー時に活性化しているか検討した。LRRK1 のキナーゼ活性は、pS-72 Rab7 抗体を用いたウエスタンブロッティングによってモニターした。内在性 Parkin を発現する HEK293 細胞に、Flag-LRRK1 と Flag-Rab7 を共発現させ、CCCP で 3 時間処理後、細胞の lysate を pS72-Rab7 抗体を用いてウエスタンブロッティングした。その結果、CCCP 処理によって、pS72-Rab7 のバンド量が増加した(図 3)。このような増加は Flag-LRRK1(KM)を発現させた場合には見られなかったことから、確かに LRRK1 のキナーゼ活性を反映したものだと考えられた(図 3)。以上のことから、LRRK1 はマイトファジー時に活性化していることが明らかになった。

CCCP 依存的な Rab7 Ser-72 のリン酸化における LRRK1 と ULK キナーゼの関係

ULK1/2 キナーゼを含む ULK 複合体は、マクロオートファジーにおいて最も上流で機能する因子の一つである[30]。最近、ミトコンドリアが損傷すると、Parkin 依存的に ULK が損傷ミトコンドリアにリクルートされて活性化することが報告された[31]。そこで ULK と LRRK1 間の関係について検討した。まず、ULK が CCCP 依存的な Rab7 Ser-72 のリン酸化に重要か検討した。Flag-Parkin を発現させた U2OS 細胞に、ULK1 または ULK2 siRNA を処理しても(図 17B)、CCCP 依存的な損傷ミトコンドリア上の pS72-Rab7 シグナルはほとんど変化しなかった(図 4A,B)。これに対し、ULK1 と ULK2 をダブルノックダウンすると、pS72-Rab7 シグナルが有意に減少した(図 4A, B)。以上のことから、ULK1 と ULK2 は損傷ミトコンドリア上の Rab7 Ser-72 リン酸化を重複的に制御していることが明らかとなった。

次に、ULK1/2 と LRRK1 との関係を検討するために、ULK1 と ULK2 をダブルノックダウンした細胞に、恒常活性化型 LRRK1(Y944F) 変異体を発現させ[47]、損傷ミトコンドリア上の pS72-Rab7 シグナルを測定した。その結果、ULK1/ULK2 ダブルノックダウンによる pS72-Rab7 シグナルの減少が、GFP-LRRK1(Y944F)によってレスキューさ

れることが明らかとなった(図 4C,D)。以上のことから、LRRK1 は ULK1/2 キナーゼの下流で、CCCP 依存的に Rab7 Ser-72 をリン酸化していることが示唆された。

Parkin 依存的マイトファジーにおける LRRK1 と ATG13 の関係

次に、マイトファジーにおける ULK 複合体と LRRK1 の関係について解析した。ULK 複合体は ULK1 または ULK2 の他に、FIP200、ATG13、ATG101 で構成されている[30]。そこでまず、これらの因子と LRRK1 が結合するか、HEK 293 細胞に GFP-LRRK1 と Flag タグ付きの ATG101、FIP200、ATG13 または HA タグ付きの ULK1 を共発現させることで検討した。その結果 LRRK1 は、ATG101 または ATG13 と結合するが、ULK1 とは結合しないことが明らかとなった(図 5A,B)。FIP200 に関しては、Flag-FIP200 の発現量が低く、結合の有無が判断できなかった(図 5A)。

では ATG101 と ATG13 は、損傷ミトコンドリア上の Rab7 Ser-72 リン酸化に重要なのであろうか。Parkin 発現 U2OS 細胞に siRNA を用いて ATG101 をノックダウンしたところ、CCCP 依存的な Rab7 Ser-72 リン酸化はほとんど変化しなかった(図 6A, B and 17C)。これに対し、ATG13 をノックダウンすると、pS72-Rab7 シグナルが顕著に減少した(図 7A, B and 17D)。これらの結果から、ATG101 ではなく、ATG13 がマイトファジーにおける Rab7 Ser-72 リン酸化に重要なことが明らかとなった。LRRK1 は ULK1/2 の下流で機能することから、ATG13 ノックダウン細胞に恒常活性型 LRRK1 (Y944F) を発現させると、Rab7 のリン酸化がレスキューされることが期待できる。実際にこれを検討したところ、LRRK1 (Y944F) は、ATG13 ノックダウンによる pS72-Rab7 シグナルの減少をレスキューできなかった(図 7A,B)。

ではなぜ、ULK1/2 ダブルノックダウン細胞と ATG13 ノックダウン細胞とで、LRRK1 によるレスキュー能の違いが生じたのだろうか。先行研究から、ULK 複合体は損傷ミトコンドリアにリクルートされ、ULK の活性化が誘導されることが知られている[31]。このことから、LRRK1 が ULK 複合体依存的にミトコンドリアにリクルートされることが、損傷ミトコンドリア上の Rab7 Ser-72 リン酸化に必要なのではないかと考えた。つまり ATG13 ノックダウン細胞では、LRRK1 (Y944) を損傷ミトコンドリアにリクルートできな

ったために、Rab7 Ser-72 のリン酸化をレスキューできなかったのではないかと考えた。この仮説が正しいならば、恒常活性化型の LRRK1(Y944F)をミトコンドリアに強制的に局在させると、ATG13 ノックダウンによる Rab7 リン酸化の減少をレスキューできるはずである。そこで本研究では、強制的に LRRK1(Y944F) をミトコンドリアに局在させる方法として、rapamycin-analog (rapalog) 依存的に FK506-binding protein (FKBP) と FKBP12-rapamycin binding (FRB) domain が結合する性質を利用したシステムを用いた[31,48]。まず、FKBP と FRB をそれぞれ GFP-LRRK1(Y944F)とミトコンドリア外膜タンパク質 Fis1 に融合させた。これらを共発現させた細胞では、rapalog 処理によって FKBP と FRB が結合することにより、人為的に GFP-LRRK1(Y944F)をミトコンドリア外膜に局在させることができる(図 7C)。実際に U2OS 細胞に FKBP-GFP-LRRK1(Y944F)と FRB-Fis1 を共発現させ、rapalog を 24 時間処理すると確かに GFP-LRRK1(Y944F)がミトコンドリアに局在した(図 7D)。さらにこの時、ミトコンドリア上で Rab7 Ser-72 のリン酸化がみられた(図 7D,E)。なお、FKBP-GFP-LRRK1(Y944F)のみを発現させた U2OS 細胞に rapalog を処理しても、LRRK1(Y944F)や pS72-Rab7 のミトコンドリア局在は見られなかった(図 8)。次に、ATG13 をノックダウンした細胞で、LRRK1(Y944F)をミトコンドリアに強制局在させた。その結果、ATG13 をノックダウンしているにも関わらず、LRRK1(Y944F)をミトコンドリアに強制局在させると、Rab7 のリン酸化が誘導された(図 7D,E)。このことから、FKBP-FRB システムによる LRRK1 の人為的なミトコンドリア局在は、Rab7 リン酸化における ATG13 の機能をバイパスできることが明らかとなった。以上の結果から、Parkin 依存的マイトファジーにおいて、ATG13 は LRRK1 をミトコンドリアに局在させる役割を担っていることが示唆された。

LRRK1 はマイトファジー誘導時に ATG13 と結合する

これまでの結果から、LRRK1 はマイトファジー時に ATG13 と結合し、損傷ミトコンドリアにリクルートされる可能性が考えられた。そこで、LRRK1 と ATG13 が CCCP 依存的に結合するか、内在性 ATG13 を用いて検討した。その結果、GFP-LRRK1 と内在

性 ATG13 の結合は、CCCP 処理依存的に増加することが明らかとなった(図 9A)。同様に、GFP-LRRK1 と内在性 ULK1 の結合も、CCCP 処理によって増加した(図 9B)。LRRK1 と ULK1 を共に過剰発現させた場合は、LRRK1 と ULK1 の結合は見られなかったことから(図 9B)、LRRK1 は ATG13 を介して ULK1 と相互作用している可能性が考えられた。以上の結果から、LRRK1 はマイトファジー時に、ATG13 を介して ULK 複合体全体と結合していることが考えられた。

これまでの結果から、ATG13 は LRRK1 と結合し、LRRK1 を損傷ミトコンドリアにリクルートするのに必要な可能性が明らかになった。それでは逆に、ATG13 のミトコンドリア局在は、LRRK1 による Rab7 Ser-72 のリン酸化に対して十分なのだろうか。これを検討するため、FKBP-GFP-ATG13 と FRB-Fis1 を共発現させ、rapalog を処理によって ATG13 を強制的にミトコンドリアに局在させた時、Rab7 のリン酸化が誘導されるか検討した。その結果、ATG13 をミトコンドリアに強制的に局在させても、Rab7 Ser-72 のリン酸化は見られなかった(図 10A,B)。従って、ATG13 のミトコンドリア局在は、Rab7 リン酸化に十分でないことが明らかになった。一方、恒常活性化型 LRRK1(Y944F)を共発現させ、ATG13 をミトコンドリアに強制的に局在させると、LRRK1(YF)がミトコンドリアに局在するとともに、pS72-Rab7 のシグナルが観察された(図 10C,D)。この時、野生型 LRRK1 の共発現では、Rab7 のリン酸化は見られなかった(図 10C,D)。以上の結果から LRRK1 は、ミトコンドリア上で Rab7 Ser-72 をリン酸化するためには、ATG13 依存的にミトコンドリアに局在するだけでなく、ミトコンドリア上で活性化される必要があることが示唆された。

では LRRK1 は、マイトファジー時にどのように活性化するのだろうか。ここまでの解析から、LRRK1 は ULK1/2 の下流で Rab7 をリン酸化していることが明らかとなっている(図 4A,B)。ULK1/2 はキナーゼであることから、ULK1/2 が LRRK1 をリン酸化し活性化している可能性が考えられた。そこで、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST)ダグのついた ULK1 リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* kinase assay を行い、ULK1 が実際に LRRK1 をリン酸化するか検討した。ここでは免疫沈降によって精製した kinase-negative 型の LRRK1(KM)を基質として用いることで、LRRK1 の自己

リン酸化の影響を除外した。GFP-LRRK1(KM)と GST-ULK1 を混合してインキュベートしたところ、GST-ULK1 は LRRK1(KM)をリン酸化することを見出した(図 11)。以上の結果から、Parkin 依存的にマイトファジーにおいて、ULK 複合体と共に損傷ミトコンドリアに局在した LRRK1 は、ここで ULK によってリン酸化され活性化している可能性が示唆された。

Parkin 依存的マイトファジーにおける LRRK1 と ATG101 の関係

ATG13 とは異なり、ATG101 は損傷ミトコンドリア上の Rab7 Ser-72 のリン酸化に必要なではなかった(図 6A,B)。それでは ATG101 は Parkin 依存的マイトファジーに必要なのだろうか。これを検討するため、ATG101 をノックダウンした Parkin 発現細胞に ATP 合成阻害剤 oligomycin と複合体 III 阻害剤 antimycin A (O/A)を 24 時間処理してマイトファジーを誘導し、損傷ミトコンドリアが除去されるか検討した。その結果、ATG101 をノックダウンした細胞では、損傷ミトコンドリアが消失した細胞の割合が顕著に減少した(図 12A,B)。このことから、ATG101 はマイトファジーに重要なことが明らかとなった。つまり ATG101 は、損傷ミトコンドリア上の Rab7 Ser-72 リン酸化には必要ないが、損傷ミトコンドリアの分解・除去には必要なことが明らかになった。

これまでの結果を考えると、Parkin 依存的マイトファジーにおいて、ULK 複合体の下流で ATG13-LRRK1-Rab7 からなる経路と、LRRK1 非依存的な ATG101 からなる経路の2つの経路が存在する可能性が考えられた。このモデルが正しいならば、ULK1/2 ダブルノックダウン細胞に LRRK1(Y944F)を発現させた場合、LRRK1 依存的な経路が活性化するため、損傷ミトコンドリア上の Rab7 Ser-72 のリン酸化はレスキューされるが(図 4A,B)、LRRK1 非依存的な経路は阻害されているので、損傷ミトコンドリアの分解・除去はレスキューできないと考えられる。実際にこれを検討したところ、予想通り GFP-LRRK1(Y944F)は、ULK1/2 ダブルノックダウンによる損傷ミトコンドリアの除去の阻害をレスキューできなかった(図 13A,B)。

では LRRK1-Rab7 経路は、マイトファジーの過程をどこまで進めることができるのだろうか。これを検討するため、FKBP-FRS のシステムを用い、活性型 LRRK1 をミト

ミトコンドリアに強制局在させ、隔離膜の形成やミトコンドリアの分解・除去が見られるか検討した。rapalog 依存的に LRRK1(Y944F)をミトコンドリアに強制局在させると、隔離膜形成に必要な ATG9 や LC3 がミトコンドリアにリクルートされることが明らかとなった(図 14A-D)。このことから、活性型 LRRK1 は少なくとも隔離膜形成開始のイベントは誘導する可能性が示唆された。さらにミトコンドリアの分解が起きるか、rapalog 処理後ミトコンドリアマトリクス蛋白の有無を検討した。その結果、LRRK1(Y944F)を 72 時間ミトコンドリアに局在させても、ミトコンドリアマトリクスのタンパク質は分解されずに残っていた(図 14E,F)。以上のことから、LRRK1 経路の活性化によって、マイトファジー形成の開始イベントは誘導されるが、ミトコンドリア分解までは生じないことが明らかとなった。

CCCP 依存的な Rab7 Ser-72 リン酸化における LRRK1 と TBK1 との関係

最近、TBK1 が Parkin 依存的マイトファジー時に活性化し、*in vitro* で Rab7 Ser-72 をリン酸化することが報告された[36]。一方本研究から、Parkin 依存的マイトファジーにおいて、LRRK1 が Rab7 Ser-72 をリン酸化するキナーゼであることが明らかとなった。そこで、マイトファジーにおける Rab7 Ser-72 リン酸化に対する TBK1 と LRRK1 の関係について検討した。まず TBK1 が、CCCP 依存的な内在性 Rab7 Ser-72 のリン酸化に重要か、pS72-Rab7 抗体を用いて検討した。その結果、TBK1 ノックダウン細胞では CCCP 依存的な Rab7 Ser-72 のリン酸化が有意に減少した(図 15A,B and 17E)。さらに、LRRK1 と TBK1 をダブルノックダウンした細胞では、TBK1 または LRRK1 単独ノックダウンと同程度、Rab7 Ser-72 のリン酸化が減少した(図 15A,B)。このことから、TBK1 と LRRK1 が同一経路で機能している可能性が考えられた。次に、LRRK1 が TBK1 の下流で機能するか検討した。もし LRRK1 が TBK1 の下流で機能するならば、TBK1 ノックダウン細胞に恒常活性化型 LRRK1(Y944F)をミトコンドリアに局在させると、Rab7 がリン酸化されると考えられる。FKBP-FRS システムを用いてこれを検討したところ、予想通り TBK1 ノックダウン細胞でも、LRRK1(Y944F)のミトコンドリア強制局在は、Rab7 のリン酸化を誘導した(図 15C,D)。以上の結果から、

Parkin 依存的マイトファジーにおいて、TBK1 ではなく LRRK1 が、TBK1 の下流で Rab7 Ser-72 をリン酸化している可能性が示唆された。

4. 考察

LRRK1 による Parkin 依存的マイトファジーの制御

先行研究から LRRK1 は、マクロオートファジーの制御因子であることが報告されていた[43]。そこで本研究では、Parkin 依存的マイトファジーにおいても LRRK1 が機能している可能性に着目し研究を行った。その結果 LRRK1 は、ミトコンドリア損傷依存的に活性化した ULK1/2 によってリン酸化され活性化される可能性を明らかにした。活性化した LRRK1 は、損傷ミトコンドリア上で Rab7 Ser-72 をリン酸化し、その後損傷ミトコンドリアの分解を促進する。本研究から初めて LRRK1 が Parkin 依存的マイトファジーに重要なことが示され、ULK 複合体-LRRK1-Rab7 という新規シグナル経路が明らかとなった。

本研究では、Parkin 依存的マイトファジーにおいて、ULK 複合体が LRRK1 の制御に重要なことを明らかにした。ULK 複合体は ULK1 または ULK2 と FIP200、ATG13、ATG101 によって構成される[30]。本研究から、ATG13 ノックダウン細胞においても、恒常活性化型 LRRK1(Y944F)をミトコンドリアに強制局在させると、Rab7 Ser-72 のリン酸化が誘導されることが明らかになった。このことは、LRRK1(Y944F)のミトコンドリア強制局在が、ATG13 の機能をバイパスできることを示すと同時に、Rab7 のリン酸化には、LRRK1 のミトコンドリア局在が必須であることを示している。また、LRRK1 はマイトファジー時に ATG13 と結合することを見出した。恐らく ATG13 は、LRRK1 を損傷ミトコンドリアにリクルートするのに機能しているのではないかと考えている。これまでの構造解析から、ATG13 は、ULK1/2、FIP200 及び ATG101 とそれぞれ直接結合し、ULK 複合体構成因子の橋渡し役となっていることが知られている[30]。私は ATG13 が LRRK1 とも結合することで、ULK 複合体と LRRK1 の相互作用の足場として機能し、LRRK1 を損傷ミトコンドリアにリクルートするのに機能しているのではないかと考えている。

ミトコンドリア損傷時における LRRK1 の活性化機構

本研究では、恒常活性化型 LRRK1(Y944F)が、ULK1/2 ダブルノックダウンによる CCCP 依存的な Rab7 Ser-72 リン酸化の阻害をレスキューできることを示した。さらに、ULK1 が LRRK1 をリン酸化することを明らかにした。これらのことから、ULK は LRRK1 をリン酸化することで活性化している可能性が考えられる。一方で、ATG13 をミトコンドリアに強制局在させただけでは、Rab7 Ser-72 のリン酸化は見られなかった。しかし LRRK1(Y944F)を共発現させると、ATG13 のミトコンドリア強制局在依存的に、LRRK1(Y944)もミトコンドリアに局在し、Rab7 Ser-72 のリン酸化が観察された。これに対し、野生型 LRRK1 を共発現させた場合は、ATG13 依存的な LRRK1 のミトコンドリア局在は見られるものの、pS72-Rab7 のシグナルは見られなかった。以上の結果は、ATG13 のみでは LRRK1 のミトコンドリア局在は誘導できるが、LRRK1 の活性化は誘導できないことを示している。つまり、ULK 複合体が LRRK1 の活性化に重要と考えられた。私は、(1)マイトファジーが誘導されると、ULK 複合体と LRRK1 が損傷ミトコンドリアに局在する、(2)損傷ミトコンドリアに局在した ULK はクラスター化することで活性化し[31]、LRRK1 をリン酸化して活性化している、のではないかと考えている。ULK 複合体による LRRK1 の活性制御は、マイトファジーにおける LRRK1 の活性化場所と活性化タイミングの両方を制御している可能性が高い。

ULK 複合体-LRRK1 経路の Parkin 依存的マイトファジーにおける役割

本研究の解析から、ATG101 はミトコンドリアの分解には必要だが、損傷ミトコンドリア上の Rab7 Ser-72 リン酸化には必要ないことが明らかとなった。このことは、ULK 複合体の下流で、LRRK1 に依存する経路と依存しない経路の 2 つが存在することを示唆している。ATG101 は、LRRK1 非依存経路で機能している(図 16)。このモデルと一致するように、恒常活性化型 LRRK1(Y944F)は、ULK1/2 ノックダウンによるミトコンドリア分解の阻害をレスキューできなかったが、Rab7 Ser-72 のリン酸化の阻害はレスキューできた。

また、活性化型 LRRK1(Y944F)をミトコンドリアに強制局在させると、マイトファゴソーム形成に重要な ATG9 や LC3 のミトコンドリア局在を誘導した。このことから ULK 複

合体-LRRK1 経路は、Rab7 Ser-72 のリン酸化を介して、ATG9 や LC3 を損傷ミトコンドリアにリクルートする役割を担っていると考えられる。これらの結果は、Rab7 Ser-72 のリン酸化が ATG9 の損傷ミトコンドリアへのリクルートに必要なとする先行研究の結果と一致する[36]。一方で、活性化型 LRRK1(Y944F)のミトコンドリア強制局在は、ミトコンドリアの分解・除去は引き起こさなかった。このことは LRRK1-Rab7 経路の活性化だけでは、マイトファジーを完遂することはできないことを示している。つまり Parkin 依存的マイトファジーにおいて、LRRK1 非依存的な経路(ATG13 を介する経路)が、マイトファゴソーム形成時に協働する必要があると考えられる(図 16)。

Parkin 依存的マイトファジーにおける LRRK1 と TBK1 の関係

最近の研究から、TBK1 が Rab7 Ser-72 をリン酸化することで、マイトファジーを制御していることが報告された[36]。しかし、本研究では TBK1 をノックダウンしても LRRK1(Y944F)をミトコンドリアに強制的に局在させると、ミトコンドリア上で Rab7 Ser-72 リン酸化が生じることが明らかとなった。これは、LRRK1 のミトコンドリア局在が TBK1 の機能をバイパスしたことを示している。また、TBK1 ノックダウンによる Rab7 Ser-72 リン酸化の減少は、LRRK1 とのダブルノックダウンによって促進されなかった。このことから、TBK1 と LRRK1 は同一経路で Rab7 Ser-72 のリン酸化に機能していることが考えられた。以上のことから、LRRK1 は TBK1 の下流でマイトファジーを制御していることが示唆された。さらに、最近の研究から、TBK1 がオートファジーレセプターNDP52 をリン酸化することで、NDP52 と FIP200 の結合を促進し、ULK 複合体をミトコンドリアの表面にリクルートしていることが示された[31]。加えて、ULK1 を強制的にミトコンドリアに局在させると、TBK1 非依存的にマイトファジーが誘導されることも報告された[31]。このことから、TBK1 は Parkin 依存的マイトファジーにおいて ULK 複合体の上流で機能していることが示唆された。従って、TBK1 はマイトファジーにおいて Rab7 Ser-72 を直接リン酸化するキナーゼではないと考えられる。

Parkin 依存的マイトファジーにおける Rab7 Ser-72 リン酸化の役割

先行研究から、Rab7 はミトコンドリア損傷依存的に損傷ミトコンドリアに局在し、ATG9 小胞を損傷ミトコンドリア周辺にリクルートすることでマイトファゴソームの形成を促進していることが知られていた[32,33]。さらに、Rab7 Ser-72 の非リン酸化型変異体 Rab7(S72A)を発現した細胞では、ATG9 小胞のリクルートが阻害されることから、Rab7 Ser-72 のリン酸化が ATG9 のリクルートに重要な可能性が報告された[36]。Rab7 の Ser-72 残基は、Rab7 の GTPase ドメイン内にある switch-II 領域に存在する。Rab7 switch-II 領域は、Rab7 とエフェクター分子との結合に重要な領域である[37]。また、Rab ファミリータンパク質において、Rab7 Ser-72 に相当する残基は高度に保存されており、リン酸化されることで、Rab ファミリーとエフェクター分子との結合を選別することが知られている[38,39]。一例として我々は、上皮成長因子受容体 (EGFR)の細胞内輸送において、LRRK1 が Rab7 Ser-72 をリン酸化すると、エフェクター分子 RILP との結合が促進されることを明らかにしている[41]。本研究により、LRRK1 が Rab7 Ser-72 をリン酸化することで、状況に応じて異なるエフェクター分子との結合を促進している可能性が示唆された。私はマイトファジーにおいては、LRRK1 が Rab7 Ser-72 をリン酸化することで、ATG9 のリクルートに関与するエフェクター分子との結合が促進されているのではないかと考えている。

LRRK1/LRRK2 による Rab タンパク質のリン酸化を介したマイトファジー制御

これまでの研究から、LRRK2 はミトコンドリアの恒常性に関与していることが知られている[44]。例えば、LRRK2 は Rab10 Thr-73 をリン酸化することで、マイトファジーを負に制御することが知られている[40]。Rab10 Thr-73 は Rab7 Ser-72 に相当する保存されたリン酸化部位である。Rab10 は Parkin 依存的に損傷ミトコンドリアに集積し、オートファジーレセプターOPTN をリクルートすることでマイトファジーを促進している。この時、パーキンソン病患者で見られる LRRK2 変異体は、Rab10 Thr-73 のリン酸化を促進し、Rab10 と OPTN の結合を阻害することでマイトファジーを阻害することが報告されている[40]。本研究から LRRK1 と LRRK2 は、それぞれ Rab7 または Rab10 をリン酸化することで、Parkin 依存的マイトファジーを正または負に制御している可能性

が明らかとなった。このことは、LRRK2 と異なり、パーキンソン病患者で LRRK1 の変異が同定されてこなかった原因なのかもしれない。

5. 材料と方法

細胞の培養

U2OS および HEK293 細胞は 10% fetal bovine serum(042-30555, FUJIFILM Wako) 含有 DMEM 培地を用いて、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。これらの細胞は、それぞれ the American Type Culture Collection または the Japanese Collection of Research Bioresources から入手した。

抗体および使用した試薬

使用した抗体は以下の通りである。

anti-TOM20 (F-10, Santa Cruz), anti-GFP (598, MBL), anti-Flag (M2, Sigma-Aldrich or FLA-1, MBL), anti-Myc (9E10, Santa Cruz), anti-HA (16B12, Babco), anti-ATG9 (Abcam), anti-LC3 (M152-3, MBL), anti-C-III core 1 (Invitrogen), anti-ATG13 (M183-3, MBL), anti-ULK1 (D8H5, CST or A7481, Sigma-Aldrich), anti-ATG101 (Abcam), and anti-PDH E2/E3bp (Abcam)

また、アフィニティ精製した pS72-Rab7 抗体(Sigma-Aldrich)は、合成を Sigma-Aldrich 社に委託して取得した。

CCCP および Antimycin A は Sigma-Aldrich、Oligomycin は Merck Millipore より取得した。A/C heterodimerizer (rapalog) は Takara より取得した。

使用したプラスミドおよび RNAi について

GFP-LRRK1, GFP-LRRK1(K1243M), GFP-LRRK1(Y944F)、および siRNA 耐性型 GFP-LRRK1, GFP-LRRK1(K1243M)はそれぞれ pEGFP-c1vector (clonotech)に PCR によって増幅したタンパク質コード配列を挿入した。Flag-Parkin は pCMVFb vector (clonotech)に PCR によって増幅したタンパク質コード配列を挿入した。pHAGE-FKBP-GFP vector および pHAGE-mt-Keima-P2A-FRB-Fis1 は Richard J. Youle 教授のグループより譲渡いただいた。GFP-ATG13 は Addgene plasmid #22875 より取

得した。FKBP-GFP-LRRK1(Y944F)および FKBP-GFP-ATG13 は pHAGE-FKBP-GFP vector に PCR で増幅したタンパク質コード配列を挿入した。

本研究で使用した siRNA 配列は以下の通りである。

human LRRK1 [配列: GCAGGAACAGGAAAGTCACCATTTA (TT)] (JBioS)

human ULK1 [配列: CGCCTGTTCTACGAGAAGA (TT)] (JBioS)

human ULK2 [配列: GCTCGTTACCTACATAGTA (TT)] (JBioS)

human ATG13 [配列: GCATTCATGTCTACCAGGCAATTTG (TT)] (JBioS)

human ATG101 [配列: GACTGTGACTTCATCGACTTCACTT (TT)] (JBioS)

Control siRNA (Silencer Select; Life Technologies)はネガティブコントロールとして使用した。アニーリングされた siRNA は RNAiMAX (invitrogen)を用いてトランスフェクションし、トランスフェクション後 72 時間経過した細胞を実験に使用した。

In vitro kinase assay

GST-ULK1 リコンビナントタンパク質は SignalChem から取得した。GFP-LRRK1(KM)タンパク質は、HEK293 細胞に発現させた GFP-LRRK1(KM)を GFP 抗体を用いた免疫沈降によって精製した。キナーゼ反応液 20 μ L 中には以下の試薬を記載した終濃度になるように混合し、30°C下で 20 分反応させた。

50 mM HEPES (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 5 μ Ci [γ -³²P]ATP, 100 μ M ATP. 反応はラーミンの SDS サンプルバッファーを加えることで停止させ、SDS-PAGE によって分離させた後、オートラジオグラフィーでタンパク質のリン酸化を検出した。

免疫沈降

細胞は RIPA バッファー[50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.25% deoxycholic acid, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, phosphatase inhibitor cocktail 2 (Sigma-Aldrich), and protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich)]を用いて溶解し、15000g で 12 分遠心した。遠心上清を 50 μ L (1.5 mg) の Dynabeads Protein G (invitrogen)に 10 μ g の anti-GFP (598, MBL)または anti-ULK1 (A7481, Sigma-

Aldrich)抗体を加え、4°C下で2時間インキュベートした。その後、beadsは氷冷したPBSで3回washし、SDS-PAGEによってタンパク質を分離した。

免疫染色と蛍光顕微鏡

免疫染色のための細胞は、カバーガラス上で培養し、試薬処理を行った後、4%パラホルムアルデヒド液で37°C、15分処理、またはメタノールで-20°C、2分処理によって固定した。透過処理は0.5% Triton X-100で5分間処理することで行った。その後、細胞を1次抗体、2次抗体で染色した。本研究で使用した1次抗体と希釈率は以下の通りである。括弧内は希釈率を示す。

mouse anti-Flag (1:500), anti-Myc (1:200), rabbit anti-TOM20 (1:200), anti-pS72-Rab7 (1:250), anti-ATG9 (1:100), anti-LC3 (1:500), anti-C-III core 1 (1:100), and anti-PDH E2/E3bp (1:500).

2次抗体には以下のものを用いた。

Alexa-Fluor 488-, 555-, or 647-goat anti-mouse IgG antibodies (Invitrogen)またはanti-rabbit IgG antibodies (Invitrogen)

共焦点顕微鏡はZeiss LSM800顕微鏡を用いた。ミトコンドリア上のpS72-Rab7やミトコンドリアマトリクスタンパク質C-III core1およびPDH E2/E3bpの有無は、目視でカウントし、割合を求めた。顕微鏡の設定は核実験毎に固定して撮影し、シグナルのサチュレーションがないように行った。

統計処理

統計処理は、Dunnett's multiple-comparison test または Welch's t-test によって行った。独立して行った3回分の実験データを持って統計処理を行った。各グラフのエラーバーは標準偏差(s.d.)を示している。統計処理に供した細胞の数は、各レジェンドに記載した。有意差検定にあたっては、GraphPad Prism ソフトウェアを用いて行った。

6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、的確なご指導とご助言をいただきました花房洋先生、松本邦弘先生、久本直毅先生に、心より感謝いたします。また、pHAGE-FKBP vector を快く提供して下さった Richard J. Youle 教授のグループの皆様に、この場を借りて厚くお礼申し上げます。最後に、日頃から共に研究生活に励み続けてくれた生体機序論グループの方々に、深く御礼申し上げます。

7. 参考文献

1. Mizushima, N., Yoshimori, T. and Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 107–132. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154005
2. Palikaras, K., Lionaki, E. and Tavernarakis, N. (2018). Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nat. Cell Biol.* 20, 1013–1022. doi:10.1038/s41556-018-0176-2
3. Pickles, S., Vigié, P. and Youle, R. J. (2018). Mitophagy and quality control mechanisms in mitochondrial maintenance. *Curr. Biol.* 28, R170–R185. doi:10.1016/j.cub.2018.01.004
4. Killackey, S. A., Philpott, D. J. and Girardin, S. E. (2020). Mitophagy pathways in health and disease. *J. Cell Biol.* 219, e202004029. doi:10.1083/jcb.202004029
5. Stolz, A., Ernst, A. and Dikic, I. (2014). Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat. Cell Biol.* 16, 495–501. doi:10.1038/ncb2979
6. Gatica, D., Lahiri, V. and Klionsky, D. J. (2018). Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nat. Cell Biol.* 20, 233–242. doi:10.1038/s41556-018-0037-z
7. Bento, C. F., Renna, M., Ghislat, G., Puri, C., Ashkenazi, A., Vicinanza, M. Menzies, F. M. and Rubinsztein, D. C. (2016). Mammalian autophagy: how does it work? *Annu. Rev. Biochem.* 85, 685–713. doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014556
8. Nakatogawa, H. (2020). Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 439–458. doi:10.1038/s41580-020-0241-0
9. Pickrell, A. M. and Youle, R. J. (2015). The roles of PINK1, Parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron* 85, 257–273. doi:10.1016/j.neuron.2014.12.007
10. Bose, A. and Beal, M. F. (2016). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's

- disease. *J. Neurochip.* 139, 216–231. doi:10.1111/jnc.13731
11. McWilliams, T. G. and Muqit, M. M. K. (2017). PINK1 and Parkin: emerging themes in mitochondrial homeostasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 45, 83–91. doi: 10.1016/j.ceb.2017.03.013
 12. Clark, I. E., Dodson, M. W., Jiang, C., Cao, J. H., Huh, J. R., Seol, J. H., Yoo, S. J., Hay, B. A. and Guo, M. (2006). *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 441, 1162–1166. doi:10.1038/nature04779
 13. Park, J., Lee, S. B., Lee, S., Kim, Y., Song, S., Kim, S., Bae, E., Kim, J., Shong, M., Kim, J.-M. et al. (2006). Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 441, 1157–1161. doi:10.1038/nature04788
 14. Yang, Y., Gehrke, S., Imai, Y., Huang, Z., Ouyang, Y., Wang, J.-W., Yang, L., Beal, M. F., Vogel, H. and Lu, B. (2006). Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 10793–10798. doi:10.1073/pnas.0602493103
 15. Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, C. A., Sou, Y., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F. et al. (2010). PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J. Cell Biol.* 189, 211–221. doi:10.1083/jcb.200910140
 16. Narendra, D. P., Jin, S. M., Tanaka, A., Suen, D.-F., Gautier, C. A., Shen, J., Cookson, M. R. and Youle, R. J. (2010). PINK1 Is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol.* 8, e1000298. doi:10.1371/journal.pbio.1000298
 17. Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F. and Youle, R. J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.* 183, 795–803. doi:10.1083/jcb.200809125

18. Geisler, S., Holmström, K. M., Skujat, D., Fiesel, F. C., Rothfuss, O. C., Kahle, P. J. and Springer, W. (2010). PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent
19. Kondapalli, C., Kazlauskaitė, A., Zhang, N., Woodroof, H. I., Campbell, D. G., Gourlay, R., Burchell, L., Walden, H., Macartney, T. J., Deak, M. et al. (2012). PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65. *Open Biol.* 2, 120080. doi:10.1098/rsob.120080
20. Shiba-Fukushima, K., Imai, Y., Yoshida, S., Ishihama, Y., Kanao, T., Sato, S. and Hattori, N. (2012). PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. *Sci. Rep.* 2, 1002. doi:10.1038/srep01002
21. Kane, L. A., Lazarou, M., Fogel, A. I., Li, Y., Yamano, K., Sarraf, S. A., Banerjee, S. and Youle, R. J. (2014). PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity. *J. Cell Biol.* 205, 143–153. doi:10.1083/jcb.201402104
22. Kazlauskaitė, A., Kondapalli, C., Gourlay, R., Campbell, D. G., Ritorto, M. S., Hofmann, K., Alessi, D. R., Knebel, A., Trost, M. and Muqit, M. M. K. (2014). Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65. *Biochem. J.* 460, 127–141. doi:10.1042/BJ20140334
23. Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., Kimura, Y., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Hirokawa, T. et al. (2014). Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature* 510, 162–166. doi:10.1038/nature13392
24. Birgisdóttir, A. B., Lamark, T. and Johansen, T. (2013). The LIR motif – crucial for selective autophagy. *J. Cell Sci.* 126, 3237–3247. doi:10.1242/jcs.126128
25. Lazarou, M., Sliter, D. A., Kane, L. A., Sarraf, S. A., Wang, C., Burman, J. L., Sideris, D. P., Fogel, A. I. and Youle, R. J. (2015). The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* 524, 309–314. doi:10.1038/nature14893

26. Wang, L., Qi, H., Tang, Y. and Shen, H.-M. (2020). Post-translational modifications of key machinery in the control of mitophagy. *Trends Biochem.* 45, 58–75. doi:10.1016/j.tibs.2019.08.002
27. Heo, J.-M., Ordureau, A., Paulo, J. A., Rinehart, J. and Harper, J. W. (2015). The PINK1–PARKIN mitochondrial ubiquitylation pathway drives a program of OPTN/NDP52 recruitment and TBK1 activation to promote mitophagy. *Mol. Cell* 60, 7–20. doi:10.1016/j.molcel.2015.08.016
28. Matsumoto, G., Shimogori, T., Hattori, N. and Nukina, N. (2015). TBK1 controls autophagosomal engulfment of polyubiquitinated mitochondria through p62/SQSTM1 phosphorylation. *Hum. Mol. Genet.* 24, 4429–4442. doi:10.1093/hmg/ddv179
29. Richter, B., Sliter, D. A., Herhaus, L., Stolz, A., Wang, C., Beli, P., Zaffagnini, G., Wild, P., Martens, S., Wagner, S. A. et al. (2016). Phosphorylation of OPTN by TBK1 enhances its binding to Ub chains and promotes selective autophagy of damaged mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, 4039–4044. doi:10.1073/pnas.1523926113
30. Hurley, J. H. and Young, L. N. (2017). Mechanisms of autophagy initiation. *Annu. Rev. Biochem.* 86, 225–244. doi:10.1146/annurev-biochem-061516-044820
31. Vargas, J. N. S., Wang, C., Bunker, E., Hao, L., Maric, D., Schiavo, G., Randow, F. and Youle, R. J. (2019). Spatiotemporal control of ULK1 activation by NDP52 and TBK1 during selective autophagy. *Mol. Cell* 74, 347–362.e6. doi:10.1016/j.molcel.2019.02.010
32. Jimenez-Orgaz, A., Kvainickas, K., Nägele, H., Denner, J., Eimer, S., Dengjel, J. and Steinberg, F. (2018). Control of RAB7 activity and localization through the retromer–TBC1D5 complex enables RAB7-dependent mitophagy. *EMBO J.* 37, 235–254. doi:10.15252/emboj.201797128
33. Yamano, K., Wang, C., Sarraf, S. A., Münch, C., Kikuchi, R., Noda, N. N., Hizukuri,

- Y., Kanemaki, M. T., Harper, W., Tanaka, K. et al. (2018). Endosomal Rab cycles regulate Parkin-mediated mitophagy. *eLife* 7, e31326. doi:10.7554/eLife.31326
34. Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 513–525. doi:10.1038/nrm2728
35. Yamamoto, H., Kakuta, S., Watanabe, T. M., Kitamura, A., Sekito, T., Kondo-Kakuta, C., Ichikawa, R., Kinjo, M. and Ohsumi, Y. (2012). Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *J. Cell Biol.* 198, 219–233. doi:10.1083/jcb.201202061
36. Heo, J.-M., Ordureau, A., Swarup, S., Paulo, J. A., Shen, K., Sabatini, D. M. and Harper, J. W. (2018). RAB7A phosphorylation by TBK1 promotes mitophagy via the PINK-PARKIN pathway. *Sci. Adv.* 4, eaav0443. doi:10.1126/sciadv.aav0443
37. Pfeffer, S. R. (2005). Structural clues to Rab GTPase functional diversity. *J. Biol. Chem.* 280, 15485–15488. doi:10.1074/jbc.R500003200
38. Steger, M., Tonelli, F., Ito, G., Davies, P., Trost, M., Vetter, M., Wachter, S., Lorentzen, E., Duddy, G., Wilson, S. et al. (2016). Phosphoproteomics reveals that Parkinson's disease kinase LRRK2 regulates a subset of Rab GTPases. *eLife* 5, e12813. doi:10.7554/eLife.12813
39. Steger, M., Diez, F., Dhekne, H. S., Lis, P., Nirujogi, R. S., Karayel, O., Tonelli, F., Martinez, T. N., Lorentze, E., Pfeffer, S. R. et al. (2017). Systematic proteomic analysis of LRRK2-mediated Rab GTPase phosphorylation establishes a connection to ciliogenesis. *eLife* 6, e31012. doi:10.7554/eLife.31012
40. Wauters, F., Cornelissen, T., Imberechts, D., Martin, S., Koentjoro, B., Sue, C., Vangheluwe, P. and Vandenberghe, W. (2019). LRRK2 mutations impair depolarization-induced mitophagy through inhibition of mitochondrial accumulation of RAB10. *Autophagy* 16, 203–222. doi:10.1080/15548627.2019.1603548
41. Hanafusa, H., Yagi, T., Ikeda, H., Hisamoto, N., Nishioka, T., Kaibuchi, K.,

- Shirakabe, K. and Matsumoto, K. (2019). LRRK1 phosphorylation of Rab7 at Ser-72 links trafficking of EGFR-containing endosomes to its effector RILP. *J. Cell Sci.* 132, jcs228809. doi:10.1242/jcs.228809
42. Bosgraaf, L. and Van Haastert, P. J. M. (2003). Roc, a Ras/GTPase domain in complex proteins. *Biochimica. Biophysica. Acta* 1643, 5–10. doi:10.1016/j.bbamcr.2003.08.008
43. Toyofuku, T., Morimoto, K., Sasawatari, S. and Kumanogoh, A. (2015). Leucine-Rich Repeat Kinase 1 regulates autophagy through turning on TBC1D2-dependent Rab7 inactivation. *Mol. Cell Biol.* 35, 3044–3058. doi:10.1128/MCB.00085–15
44. Bonello, F., Hassoun, S.-M., Mouton-Liger, F., Shin, Y. S., Muscat, A., Tesson, C., Lesage, S., Beart, P. M., Brice, A., Krupp, J. et al. (2019). LRRK2 impairs PINK1/Parkin-dependent mitophagy via its kinase activity: pathologic insights into Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 28, 1645–1660. doi:10.1093/hmg/ddz004
45. Lei, Z., Duan, H., Zhao, T., Zhang, Y., Li, G., Meng, J., Zhang, S. and Yan, W. (2018). PARK2 inhibits osteosarcoma cell growth through the JAK2/STAT3/VEGF signaling pathway. *Cell Death Dis.* 9, 1–13. doi:10.1038/s41419-018-0401-8
46. Yoshii, S. R., Kishi, C., Ishihara, N. and Mizushima, N. (2011). Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 286, 19630–19640. doi:10.1074/jbc.M110.209338
47. Hanafusa, H., Ishikawa, K., Kedashiro, S., Saigo, T., Iemura, S.-I., Natsume, T., Komada, M., Shibuya, H., Nara, A. and Matsumoto, K. (2011). Leucine-rich repeat kinase LRRK1 regulates endosomal trafficking of the EGF receptor. *Nat. Commun.* 2, 158. doi:10.1038/ncomms1161

48. Clackson, T., Yang, W., Rozamus, L. W., Hatada, M., Amara, J. F., Rollins, C. T., Stevenson, L. F., Magari, S. R., Wood, S. A., Courage, N. L. et al. (1998). Redesigning an FKBP–ligand interface to generate chemical dimerizers with novel specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 10437–10442. doi:10.1073/pnas.95.18.10437

8. 図

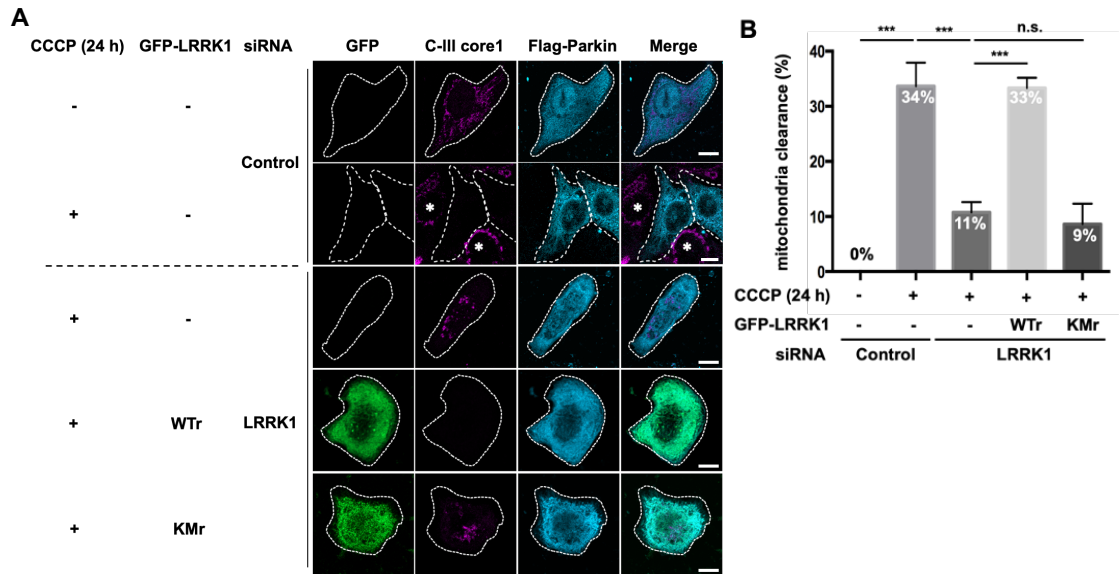


図 1. LRRK1 は Parkin 依存的マイトファジーに必要である。

(A) LRRK1 ノックダウンの損傷ミトコンドリアの除去に対する効果を検討した。コントロールまたは LRRK1 siRNA を処理した U2OS 細胞に Flag-Parkin と siRNA 耐性野生型 GFP-LRRK1(WTr)または kinase-negative 型 GFP-LRRK1(KMr)を記載の通りに発現させた。CCCP(10 μ M)で 24 時間処理した細胞を、ミトコンドリアマトリクスタンパク質 C-III core 1 抗体(マゼンタ)と Flag 抗体(シアン)で染色した。白の点線は Flag-Parkin 発現細胞を示し、アスタリスクは Parkin が発現していない細胞を示す。スケールバーの長さは 10 μ m である。(B) ミトコンドリアの分解について定量化した。Flag-Parkin 発現細胞のうち、C-III core 1 (ミトコンドリア)のシグナルが完全に消失した細胞の割合を計測した。各回 30 以上の細胞を解析し、3回の独立した実験を行った。エラーバーは標準偏差を示し、有意差検定は Dunnet's multiple-comparison test により行った。***: $P < 0.001$ 、n.s.: 有意差なし。

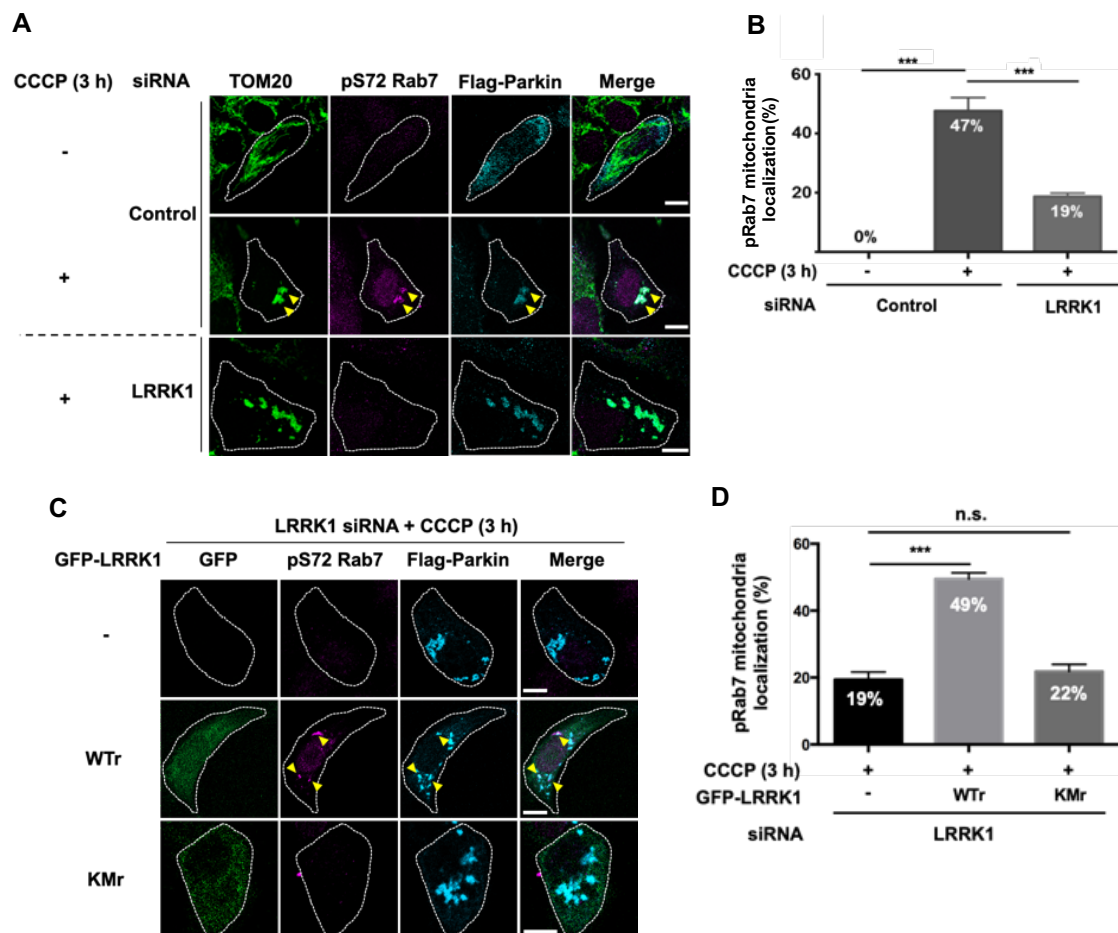


図 2. LRRK1 は損傷ミトコンドリア上の Rab7 Ser-72 のリン酸化に必要である。
 (A,C) LRRK1 ノックダウンによるミトコンドリア上の Rab7 Ser-72 のリン酸化に対する効果を検討した。コントロールまたは LRRK1 siRNA を処理した U2OS 細胞に Flag-Parkin または siRNA 耐性野生型 GFP-LRRK1(WTr)または kinase-negative 型 GFP-LRRK1(KMr)を発現させ、CCCP (10 μ M)で 3 時間処理した。その後、ミトコンドリアマーカー TOM20 抗体 (緑)、pS72-Rab7 抗体 (マゼンタ)、Flag 抗体 (シアン) で染色した。白の点線は Parkin 発現細胞を示し、黄矢印は Parkin が局在したミトコンドリア上の pS72-Rab7 を示す。スケールバーは 10 μ m である。(B,D) (A,C)の定量化を行った。Parkin 発現細胞の内、pS72-Rab7 が TOM20 または Flag-Parkin (ミトコンドリア) と共局在している細胞の割合を示した。各回 (B) 70 以上、(D) 30 以上の細胞を解析し、3 回の独立した実験を行った。エラーバーは標準偏差を示し、有意差検定は Dunnett's multiple-comparison test により行った。*** : P<0.001、n.s. : 有意差なし。

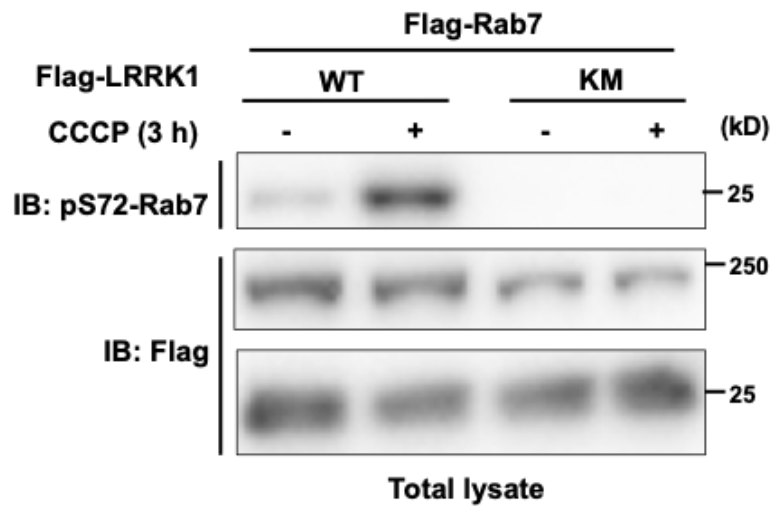


図 3. LRRK1 は CCCP 処理によって活性化する

HEK293 細胞に Flag-Rab7 と野生型 Flag-LRRK1(WT)または kinase-negative 型 Flag-LRRK1(KM)を共発現させ、CCCP (10 μ M)で 3 時間処理した。これらの細胞の溶解液を図に示した抗体を用いて western blot を行った。

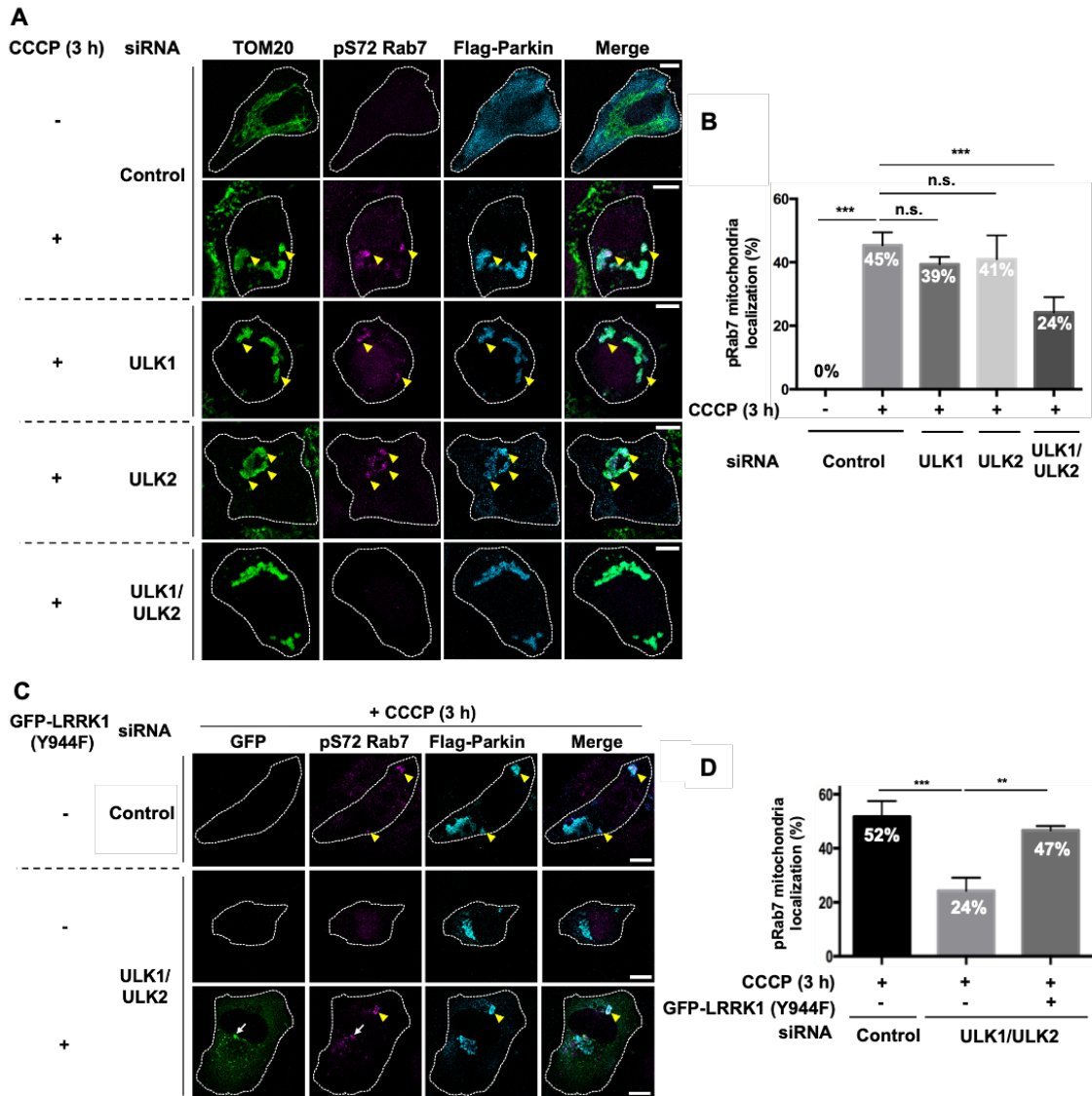


図 4. LRRK1 は ULK の下流で CCCP 依存的な Rab7 Ser-72 のリン酸化に機能している

(A,C) Rab7-Ser-72 のリン酸化に対する ULK1/ULK2 ダブルノックダウンの効果を検討した。コントロール、ULK1/ULK2、または ULK1 と ULK2 siRNA を処理した U2OS 細胞に Flag-Parkin と空ベクターまたは GFP-LRRK1(Y944F)を図に示すように発現させた。CCCP (10 μ M) で 3 時間処理後、TOM20 抗体(緑)、pS-72 Rab7 抗体(マゼンタ)、Flag 抗体(シアン)で染色した。白の点線は Parkin 発現細胞を示し、黄矢印はミトコンドリア上の pS72-Rab7 を示す。また、白矢印は GFP-LRRK1(Y944F)が局在したエンド

ソームと思われる場所上の pS72-Rab7 を示す。スケールバーは 10 μ m である。
(B,D) (A,C)について定量化を行った。Parkin 発現細胞の内、pS72-Rab7 が TOM20 または Flag-Parkin(ミトコンドリア)に局在する細胞の割合を示した。各回 30 以上の細胞を解析し、3 回の独立した実験を行った。エラーバーは標準偏差を示し、有意差検定は Dunnet' s multiple-comparison test により行った。** : P<0.01、*** : P<0.001、n.s. : 有意差なし

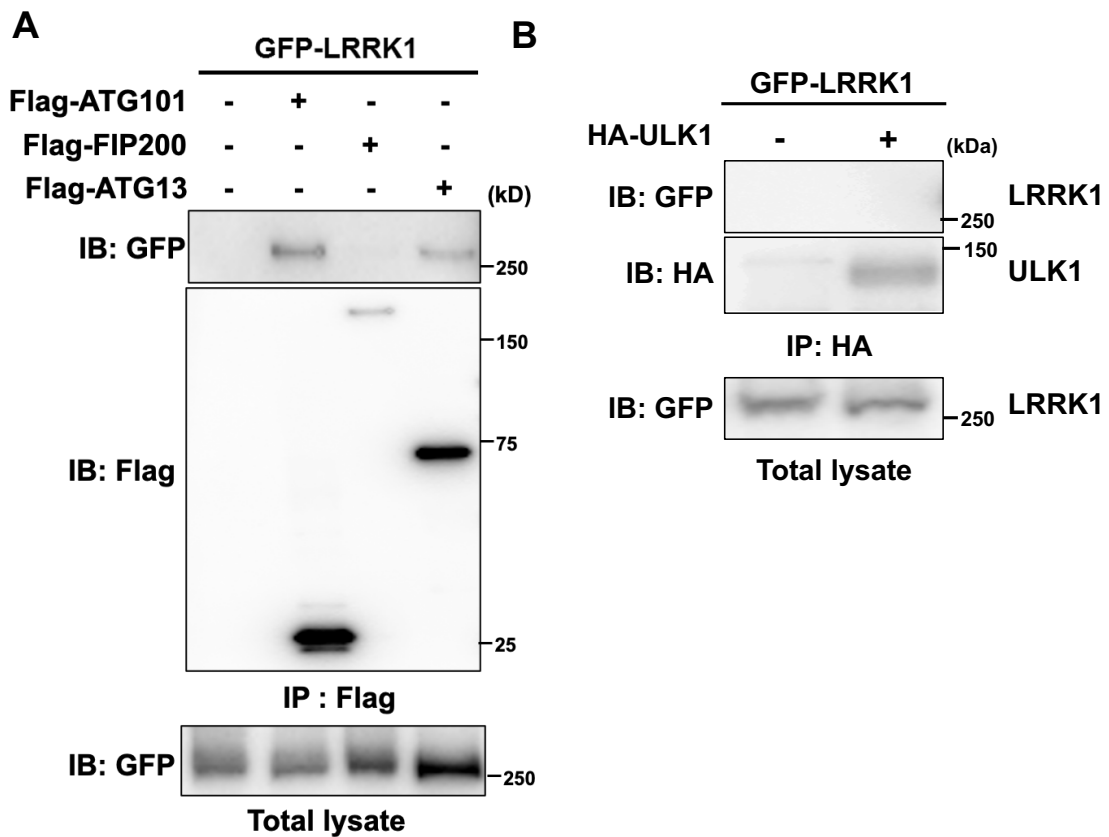


図 5. LRRK1 と ATG101、FIP200、ATG13 または ULK1 との結合

(A) HEK293 細胞に GFP-LRRK1 と Flag-ATG101、Flag-FIP200 または Flag-ATG13 を図に示すように共発現させた。LRRK1 との結合は、Flag 抗体を用いた免疫沈降 (IP) によって検出し、図に示す抗体を用いて western blot を行った。(B) HEK293 細胞に GFP-LRRK1 と HA-ULK1 を図に示すように共発現させた。LRRK1 との結合は HA 抗体を用いた免疫沈降 (IP) によって検出し、図に示す抗体を用いて western blot を行った。

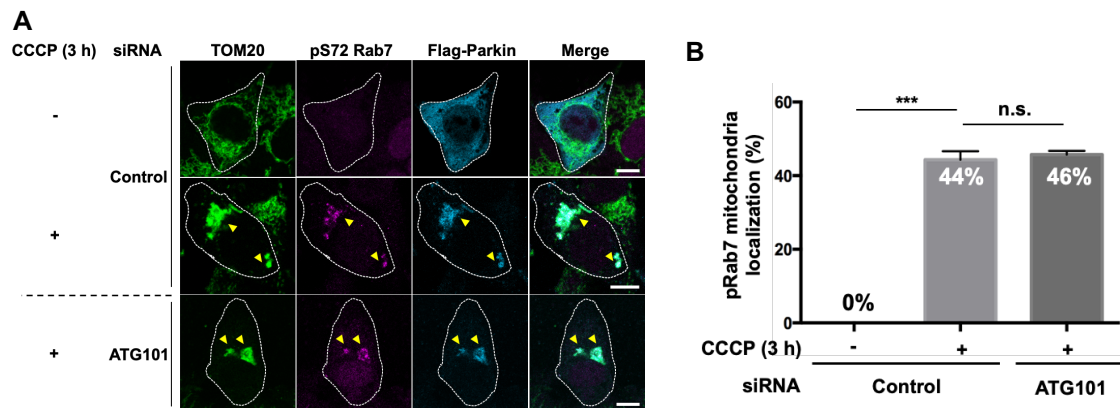


図 6. CCCP 依存的な Rab7 Ser-72 のリン酸化に対する ATG101 ノックダウンの効果
 (A) コントロールまたは ATG101 siRNA を処理した U2OS 細胞に Flag-Parkin を発現させた。これに CCCP (10 μ M) を 3 時間処理した後、TOM20 抗体 (緑)、pS72-Rab7 抗体 (マゼンタ)、Flag 抗体 (シアン) を用いて染色した。白の点線は Parkin 発現細胞を示し、黄矢印はミトコンドリアに局在する pS72-Rab7 を示す。スケールバーは 10 μ m である。(B) (A) の定量化を行った。Parkin 発現細胞の内、pS72-Rab7 が TOM20 (ミトコンドリア) に局在している細胞の割合を示した。各回 30 以上の細胞を解析し、3 回の独立した実験を行った。エラーバーは標準偏差を示し、有意差検定は Dunnett's multiple-comparison test により行った。n.s. : 有意差なし。

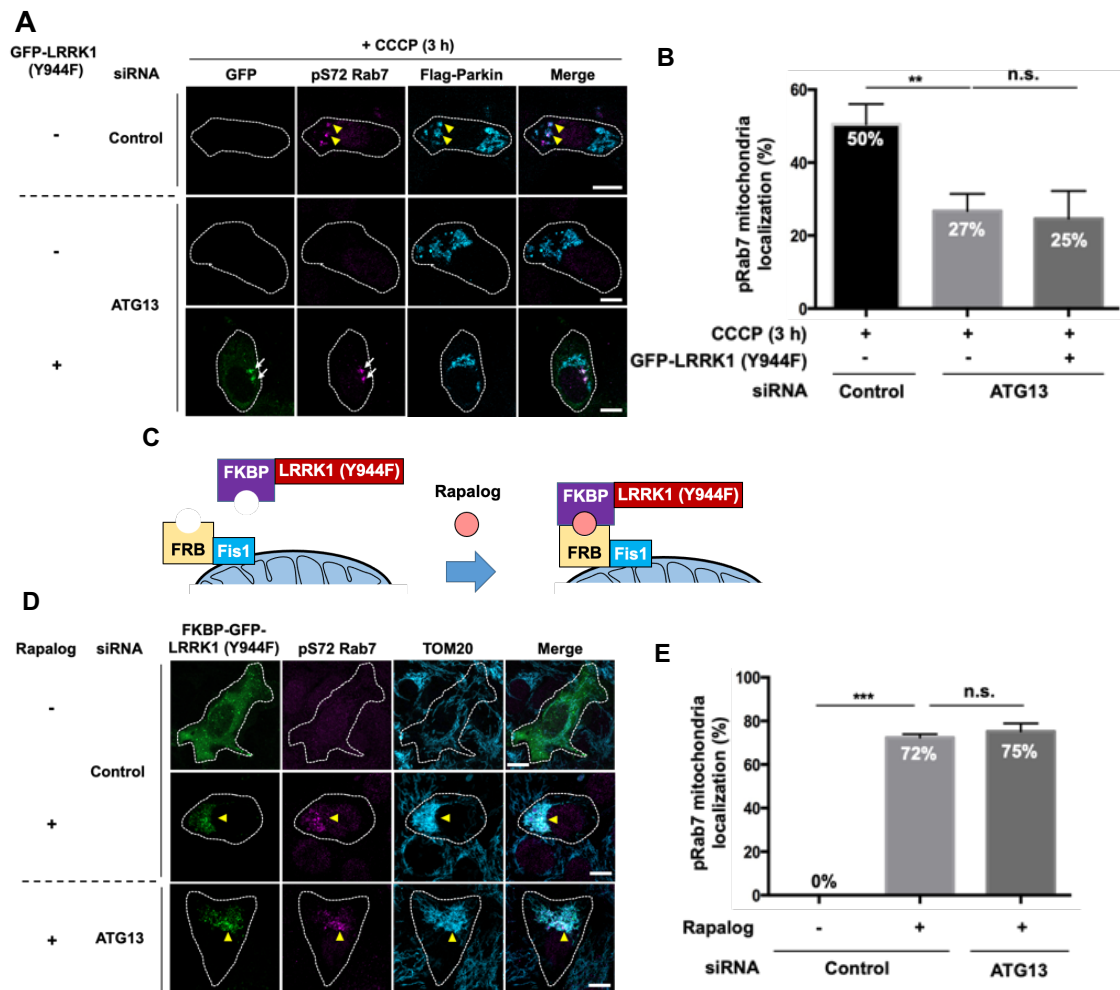


図 7. CCCP 依存的な Rab7 Ser-72 のリン酸化に対する ATG13 ノックダウンの効果
 (A) コントロールまたは ATG13 siRNA を処理した U2OS 細胞に Flag-Parkin と GFP-LRRK1(Y944F)を図に示すように発現させた。これに CCCP (10 μ M)を 3 時間処理した後、pS72-Rab7 抗体(マゼンタ)、Flag 抗体(シアン)を用いて染色した。白の点線は Parkin 発現細胞を示し、黄矢印は Parkin が局在するミトコンドリアと共局在する pS72-Rab7 を示す。白矢印は GFP-LRRK1(Y944F)が局在するエンドソーム上の pS72-Rab7 を示す。スケールバーは 10 μ m である。(B) (A)の定量化を行った。Parkin 発現細胞の内、pS72-Rab7 が Flag-Parkin(ミトコンドリア)に局在している細胞の割合を示した。各回 30 以上の細胞を解析し、3 回の独立した実験を行った。エラー

バーは標準偏差を示し、有意差検定は Dunnet' s multiple-comparison test により行った。** : $P < 0.01$ 、n.s. : 有意差なし。(C) タンパク質二量体誘導化合物を用いた、LRRK1(Y944F)をミトコンドリアに強制的に局在させるシステムの概念図を示した。(D) LRRK1(Y944F)をミトコンドリアに強制的に局在させた場合の、Rab7 Ser-72 のリン酸化に対する効果を検討した。コントロールまたは ATG13 siRNA を処理した U2OS 細胞に FKBP-GFP-LRRK1(Y944F)と FRB-Fis1 を発現させ、rapalog (0.5 μ M)で 24 時間処理した。細胞は pS72-Rab7 抗体(マゼンタ)と TOM 20 抗体(シアン)で染色した。白の点線は GFP-LRRK1(Y944F)発現細胞を示し、黄矢印は GFP-LRRK1(Y944F)が局在したミトコンドリア上の pS72-Rab7 を示している。スケールバーは 10 μ m である。(E) (D)を定量化した。GFP-LRRK1(Y944F)発現細胞の内、GFP-LRRK1(Y944F)が局在するミトコンドリアと pS72-Rab7 が共局在している細胞の割合を示した。各回 30 以上の細胞を解析し、3 回の独立した実験を行った。エラーバーは標準偏差を示し、有意差検定は Dunnet' s multiple-comparison test により行った。*** : $P < 0.001$ 、n.s. : 有意差なし。

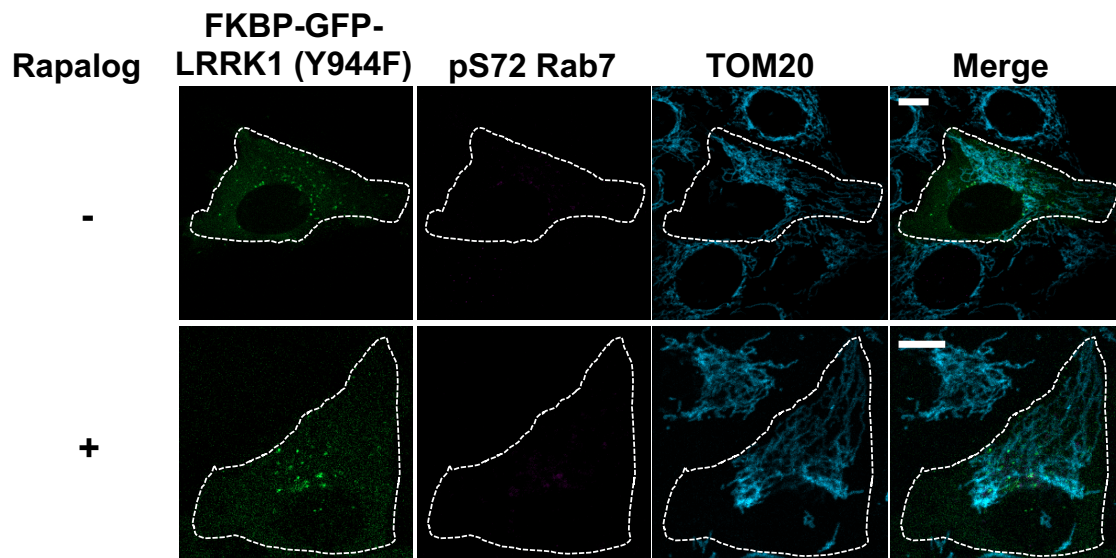


図 8. FRB-Fis1 は FKBP-GFP-LRRK1(Y944F)のミトコンドリア局在に必要である
 U2OS 細胞に FKBP-GFP-LRRK1(Y944F)を発現させ、rapalog (0.5 μ M)で 24 時間処
 理した。細胞は pS72-Rab7 抗体(マゼンタ)と TOM20 抗体(シアン)で染色した。白の
 点線は GFP-LRRK1(Y944F)発現細胞を示す。スケールバーは 10 μ m である。

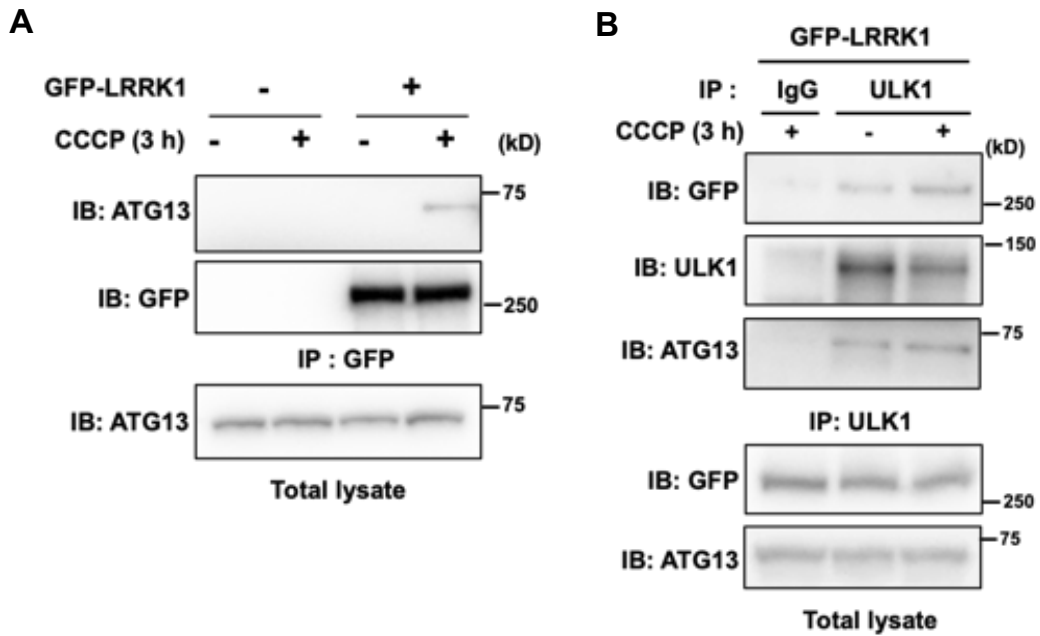


図 9. LRRK1 は CCCP 依存的に ATG13 及び ULK1 と結合する。

(A) LRRK1 と ATG13 の CCCP 依存的な結合を検討した。HEK293 細胞に GFP-LRRK1 を発現させ、CCCP (10 μ M) で 3 時間処理した。複合体形成は GFP 抗体を用いた免疫沈降 (IP) によって検出し、図に示す抗体を用いて western blot を行った。

(B) LRRK1 と ULK1 の結合について検討した。HEK293 細胞に GFP-LRRK1 を発現させ、CCCP (10 μ M) で 3 時間処理した。複合体形成は GFP 抗体を用いた免疫沈降によって検出し、図に示す抗体を用いて western blot を行った。

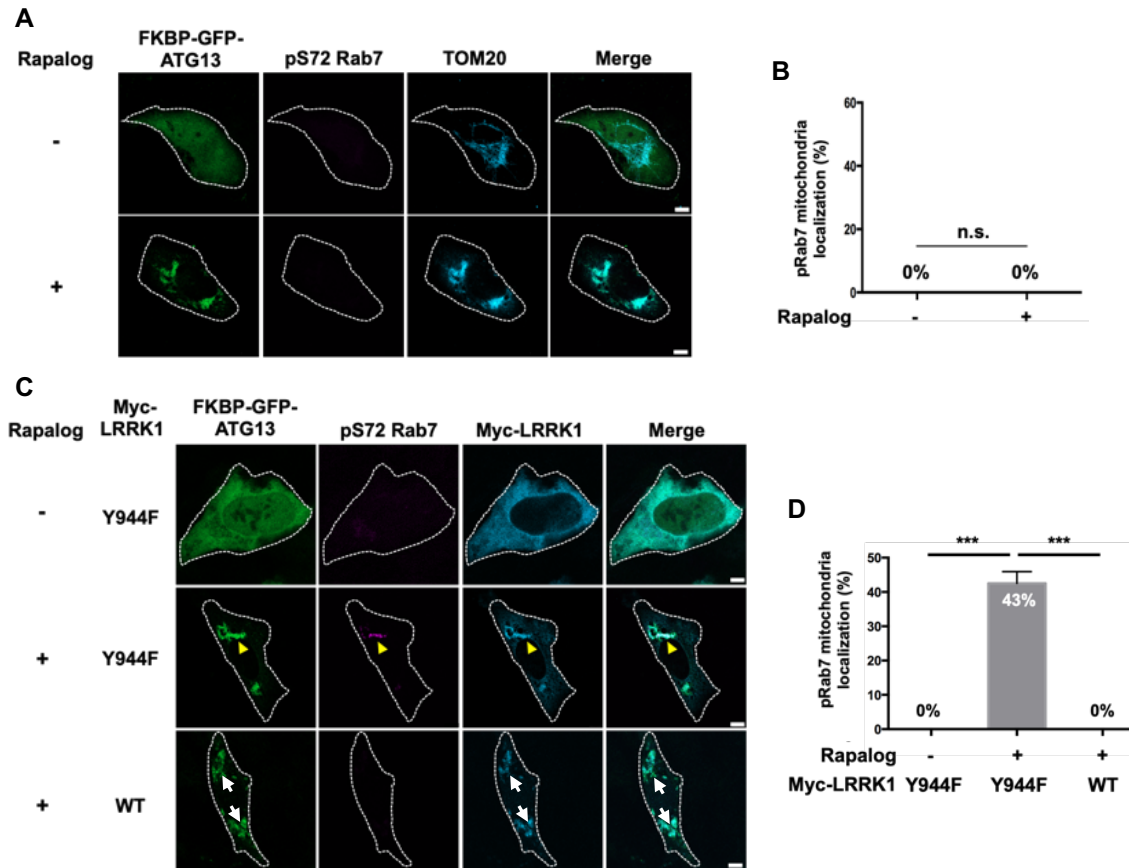


図 10. Rab7 Ser-72 リン酸化に対する ATG13 ミトコンドリア強制局在の効果
 (A,C) FKBP-GFP-ATG13 と FRB-Fis1 を共発現させた細胞に、野生型 Myc-LRRK1(WT)または Myc-LRRK1(Y944F)の存在下 (C) または非存在下 (A) で rapalog ($0.5 \mu\text{M}$) を 24 時間処理した。細胞は pS72-Rab7 抗体(マゼンタ)と TOM20 または Myc 抗体(シアン)を用いて、図に示すように染色した。黄矢印はミトコンドリアに局在した pS72-Rab7 を示し、白矢印はミトコンドリアに局在した Myc-LRRK1(WT)のシグナルを示す。スケールバーは $10 \mu\text{m}$ である。(B,D) (A,C)を定量化した。GFP-ATG13 発現細胞の内、pS72-Rab7 がミトコンドリアに局在した細胞の割合を示した。各回 30 以上の細胞を解析し、3 回の独立した実験を行った。エラーバーは標準偏差を示し、有意差検定は Dunnett's multiple-comparison test により行った。
 *** : $P < 0.001$ 、n.s. : 有意差なし。

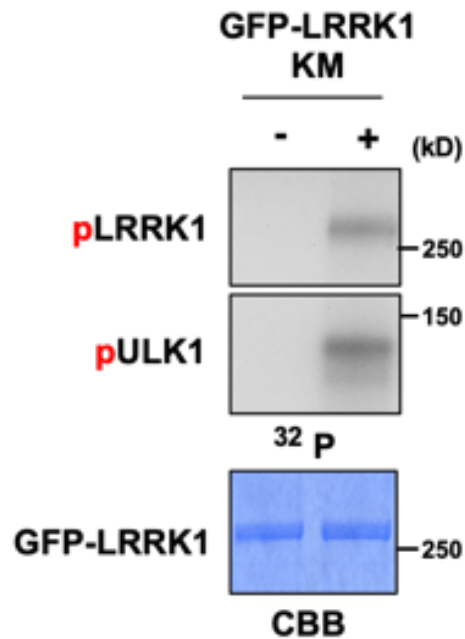


図 11. ULK1 は in vitro で LRRK1 をリン酸化する

HEK293 細胞に GFP-LRRK1(KM)を発現させ、その溶解液から GFP 抗体を用いた免疫沈降によって GFP-LRRK1(KM)タンパク質を精製した。精製した LRRK1 タンパク質は、GST-ULK1 リコンビナントタンパク質と、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP の存在下で 30°C、20 分震盪した。自己リン酸化された ULK1 とリン酸化された LRRK1 は SDS-PAGE で分離し、総タンパク質量は Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色によって確認した。

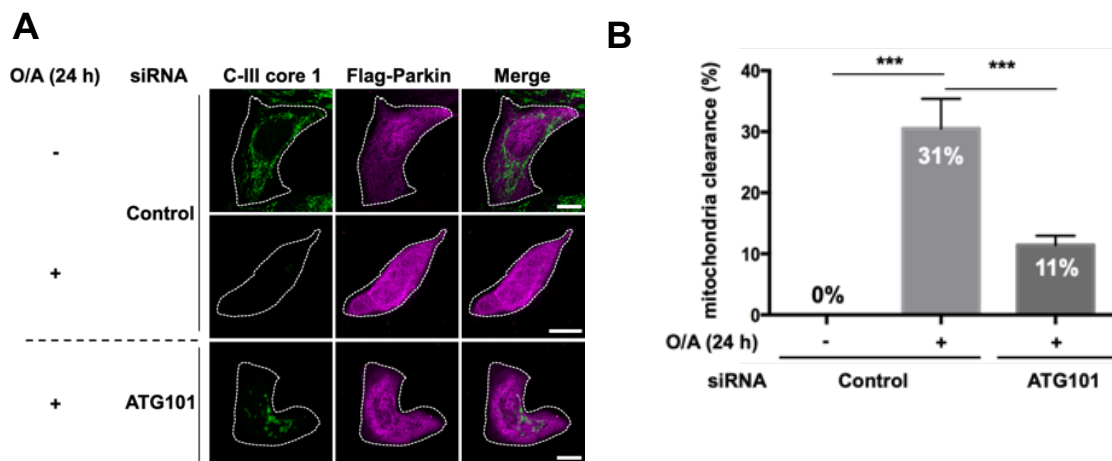


図 12. ミトコンドリア分解に対する ATG101 ノックダウンの効果

(A) コントロールまたは ATG101 siRNA を処理した U2OS 細胞に Flag-Parkin を発現させ、oligomycin (10 μ M) と antimycin A (10 μ M) を 3 時間共処理 (O/A) した。細胞はミトコンドリアマトリクスマーカー C-III core 1 抗体 (緑) と Flag 抗体 (マゼンタ) で染色した。白の点線は Parkin 発現細胞を示す。スケールバーは 10 μ m である。(B) (A) の定量化を行った。Flag-Parkin 発現細胞の内、ミトコンドリアマトリクスのシグナルが消失した細胞の割合を表示した。各回 30 以上の細胞を解析し、3 回の独立した実験を行った。エラーバーは標準偏差を示し、有意差検定は Dunnett's multiple-comparison test により行った。*** : $P < 0.001$ 。

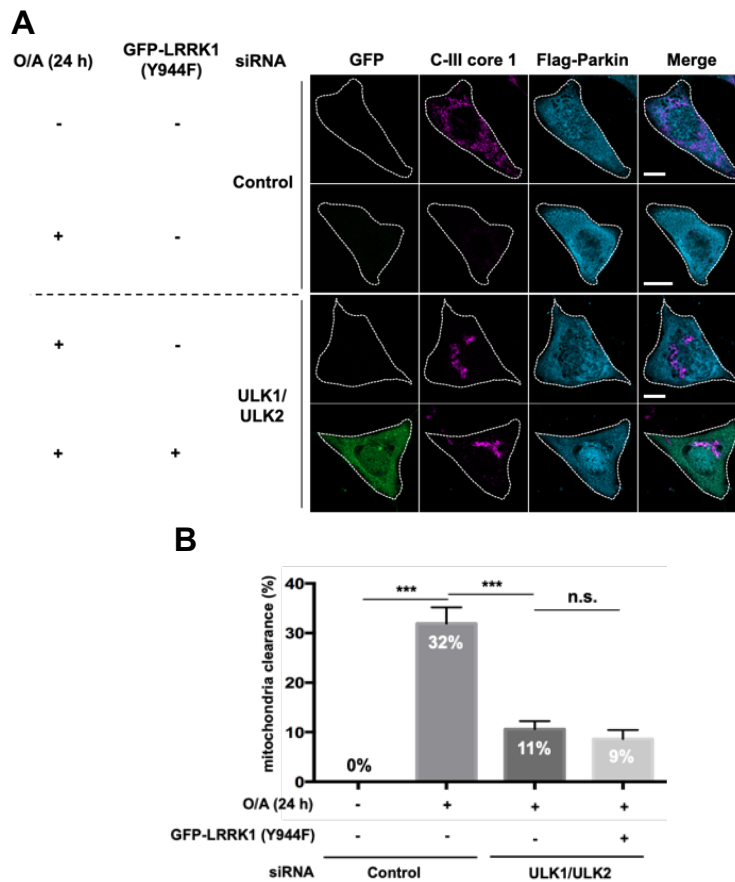


図 13. 損傷ミトコンドリア分解における LRRK1 と ULK1/2 の関係

(A) ULK1/ULK2 ダブルノックダウンによる損傷ミトコンドリアの分解に対する効果を検討した。コントロールまたは ULK1/ULK2 siRNA を処理した U2OS 細胞に Flag-Parkin と GFP-LRRK1(Y944F)を図に示すように発現させ、oligomycin (10 μ M)と antimycin A (10 μ M)を 24 時間共処理 (O/A) した。細胞はミトコンドリアマトリクスマーカー C-III core 1 抗体(マゼンタ)と Flag 抗体(シアン)で染色した。白の点線は Parkin 発現細胞を示す。スケールバーは 10 μ m である。(B) (A)の定量化を行った。Flag-Parkin 発現細胞の内、ミトコンドリアマトリクスのシグナルが消失した細胞の割合を表示した。各回 30 以上の細胞を解析し、3回の独立した実験を行った。エラーバーは標準偏差を示し、有意差検定は Dunnet's multiple-comparison test により行った。*** : P<0.001、n.s. : 有意差なし。

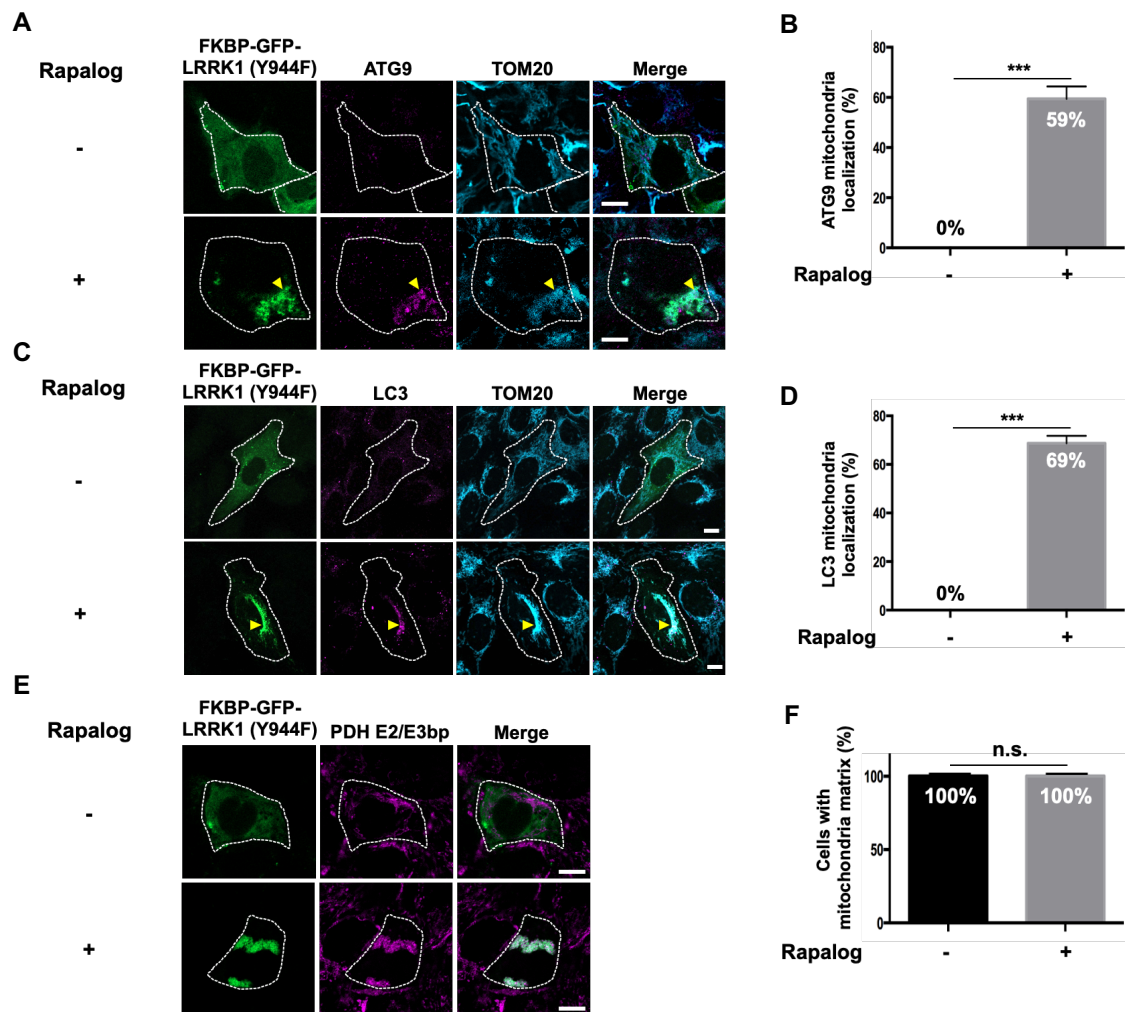


図 14. マイトファジーに対する LRRK1(Y944F)ミトコンドリア強制局在の効果
 (A,C) LRRK1(Y944F)をミトコンドリアに強制的に局在させた場合の、ATG9 や LC3 のミトコンドリアへのリクルートに対する効果を検討した。U2OS 細胞に FKBP-GFP-LRRK1(Y944F)と FRB-Fis1 を発現させ、Rapalog (0.5 μ M) で 24 時間処理した。細胞は、(A) ATG9 抗体、(C) LC3 抗体(マゼンタ)と TOM20 抗体(シアン)で染色した。白の点線は GFP-LRRK1(Y944F)発現細胞を示し、黄矢印はミトコンドリアに局在した ATG9 または LC3 のシグナルを示す。スケールバーは 10 μ m である。(B,D) (A,C)の定量化を行った。GFP-LRRK1(Y944F)発現細胞の内、ATG9 (B) または LC3 (D) が TOM20 と共局在した細胞の割合を表示した。各回 30 以上の細胞を解析し、3 回の独立した実験を行った。エラーバーは標準偏差を示し、有意差検定は Dunnet's

multiple-comparison test により行った。*** : $P < 0.001$ 。(E) LRRK1(Y944F)をミトコンドリアに強制的に局在させた場合の、ミトコンドリアの分解に対する効果を検討した。U2OS 細胞に FKBP-GFP-LRRK1(Y944F)と FRB-Fis1 を発現させ、Rapalog ($0.5 \mu\text{M}$) で 72 時間処理した。細胞はミトコンドリアマトリクスマーカーPDH E2/E3bp 抗体(マゼンタ)で染色した。白の点線は GFP-LRRK1(Y944F)発現細胞を示す。スケールバーは $10 \mu\text{m}$ である。(F) (E)の定量化を行った。GFP-LRRK1(Y944F)発現細胞の内、ミトコンドリアマトリクスのシグナルが存在する細胞の割合を表示した。各回 30 以上の細胞を解析し、3 回の独立した実験を行った。エラーバーは標準偏差を示し、有意差検定は Dunnet's multiple-comparison test により行った。n.s. : 有意差なし。

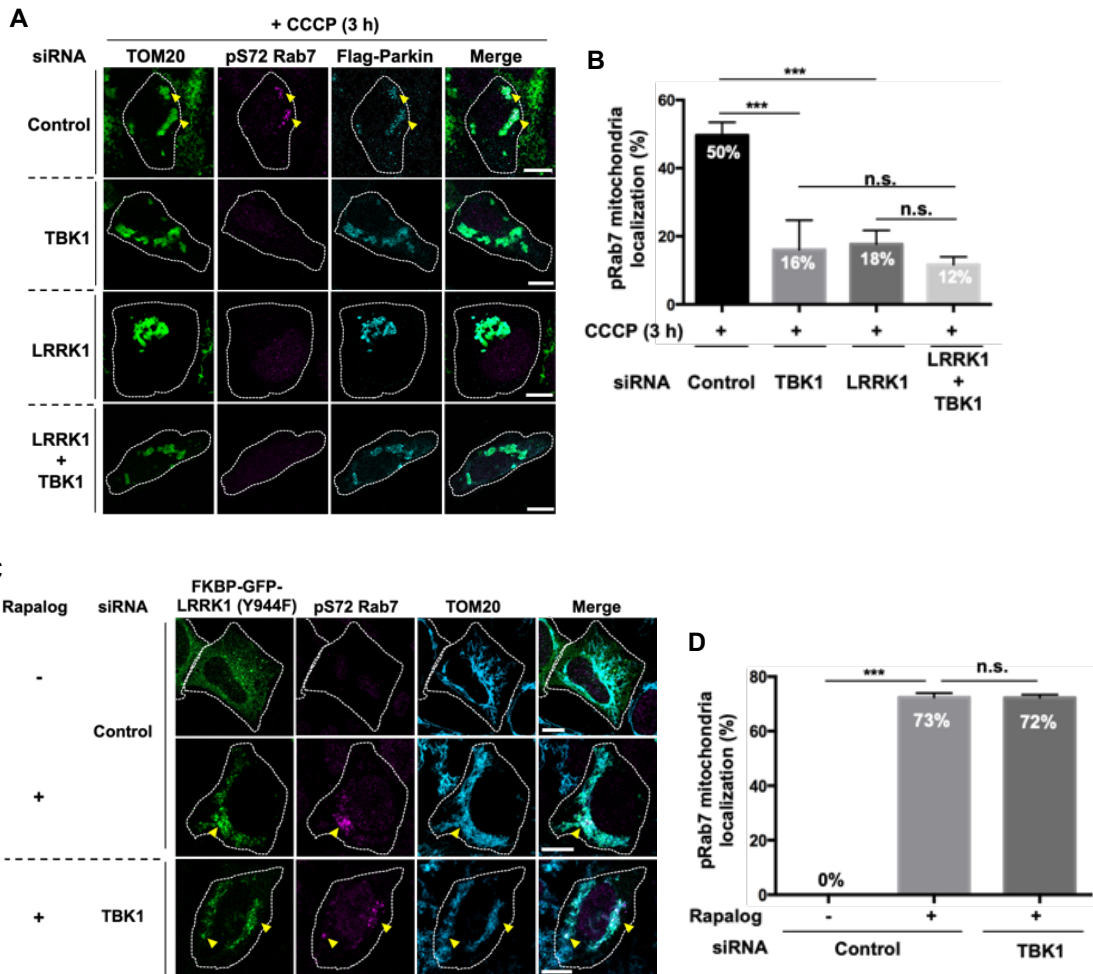


図 15. CCCP 依存的な Rab7 Ser-72 リン酸化における TBK1 と LRRK1 の関係
 (A) TBK1 ノックダウンによる Rab7 Ser-72 のリン酸化に対する影響を検討した。コントロール、TBK1、LRRK1 siRNA を図に示すように処理した U2OS 細胞に Flag-Parkin を発現させた。細胞は CCCP (10 μ M) で 3 時間処理した後、TOM20 抗体 (緑)、pS72-Rab7 抗体 (マゼンタ)、Flag 抗体 (シアン) で染色した。白の点線は Parkin 発現細胞を示し、黄矢印はミトコンドリアに局在した pS72-Rab7 を示す。スケールバーは 10 μ m である。(B) (A) の定量化を行った。Parkin 発現細胞の内、pS72-Rab7 が TOM20 と今日局在する細胞の割合を表示した。各回 30 以上の細胞を解析し、3 回の独立した実験を行った。エラーバーは標準偏差を示し、有意差検定は Dunnet's multiple-comparison test により行った。*** : $P < 0.001$ 、n.s. : 有意差なし。(C)

LRRK1(Y944F)をミトコンドリアに強制的に局在させた時の効果について検討した。コントロールまたは TBK1 siRNA を処理した U2OS 細胞に FKBP-GFP-LRRK1(Y944F) と FRB-Fis1 を共発現させ、rapalog (0.5 μ M) で 24 時間処理した。細胞は pS72-Rab7 抗体(マゼンタ)と TOM20 抗体(シアン)で染色した。白の点線は GFP-LRRK1(Y944F)を発現させた細胞を示し、黄矢印はミトコンドリアに局在した pS72-Rab7 を示している。スケールバーは 10 μ m である。(D) (C)の定量化を行った。GFP-LRRK1(Y944F)発現細胞の内、pS72-Rab7 と TOM20 が共局在する細胞の割合を表示した。各回 30 以上の細胞を解析し、3 回の独立した実験を行った。エラーバーは標準偏差を示し、有意差検定は Dunnet' s multiple-comparison test により行った。*** : P<0.001、n.s. : 有意差なし。

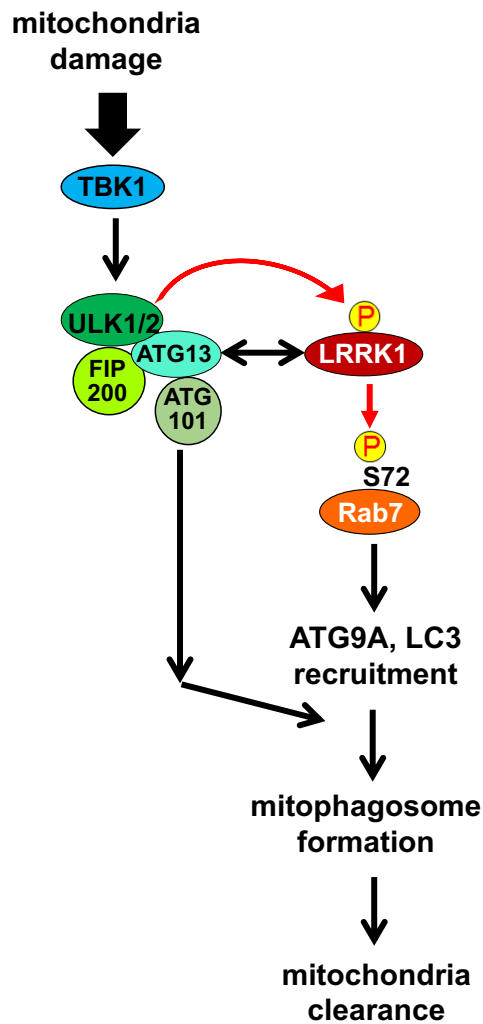


図 16. ULK 複合体-LRRK1 経路による Parkin 依存的マイトファジー制御機構
 ULK 複合体は LRRK1 に依存的な経路と非依存的な経路を媒介している。ATG101 は後者の経路に属している。LRRK1 非依存的な経路は、LRRK1 依存的に誘導されるマイトファゴソームの生合成の下流で LRRK1 依存的な経路と合流する。

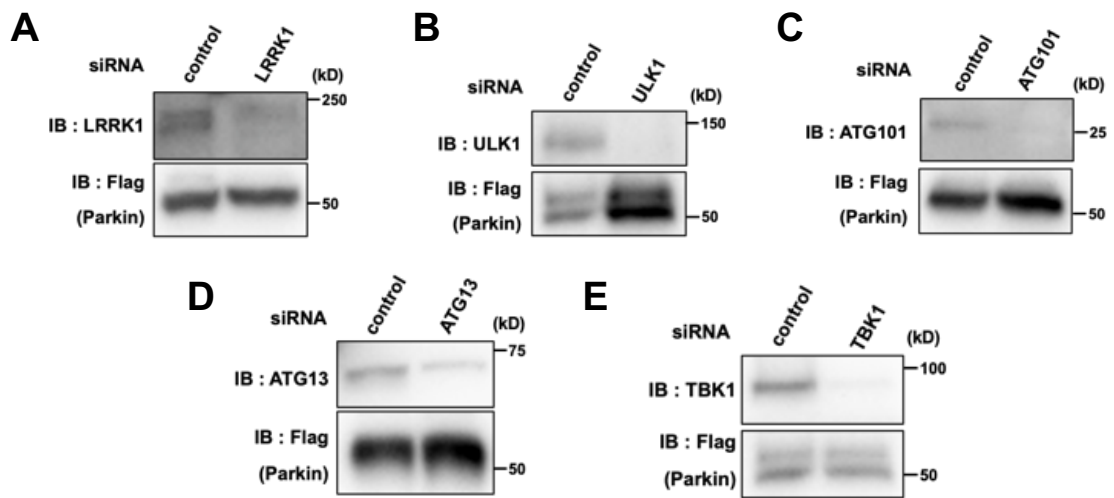


図 17. 各種 siRNA の効果

(A-E) Flag-Parkin を発現させた U2OS 細胞にコントロール、LRRK1 (A)、ULK1 (B)、ATG101 (C)、ATG13 (D)、TBK1 siRNA (E) を処理した。これらの細胞の溶解液を、図に示す抗体を用いて western blot を行った。Flag-Parkin はローディングコントロールとして用いた。