

主論文

シャペロン複合体による
ROCO キナーゼ LRRK2/LRK-1 の
制御機構

名古屋大学大学院 理学研究科 生命理学専攻

福菌 嵩

主論文目次

| | 開始ページ |
|-------|-------|
| 要旨 | 3 |
| 序論 | 4 |
| 結果 | 8 |
| 考察 | 19 |
| 材料と方法 | 25 |
| 謝辞 | 31 |
| 参考文献 | 32 |
| 図・表 | 43 |

要旨

パーキンソン病の原因遺伝子である Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) は ROCO ファミリープロテインキナーゼのひとつであり、種を越えて保存されている。しかし、その生理学的機能については不明の部分が多い。本研究では、ヒト LRRK2 に結合するタンパク質を LC-MS/MS 法により探索し、シャペロン複合体の構成因子として知られる BAG2 と HSC70 をそれぞれ同定した。さらに我々は、線虫 *Caenorhabditis elegans* をモデルとして、LRRK2 の線虫ホモログ LRK-1 が、BAG2 の線虫ホモログ UNC-23 と HSC70 の線虫ホモログ HSP-1 により、どのように制御されているかについて解析した。LRK-1 は、ゴルジ体においてシナプス小胞 (SV) タンパク質が樹状突起特異的な輸送経路に選別されないようにすることにより、SV タンパク質の軸索への極性的な局在制御を行っている。 *unc-23* 変異体では、 *lrk-1* 欠損変異体と同様に、SV タンパク質が軸索だけでなくシナプス前終末及び樹状突起の末端にも局在する表現型を示した。また、 *unc-23* 変異体の表現型を抑圧するが *lrk-1* 変異体の表現型を抑圧しない変異として、幾つかの *hsp-1* 変異を単離・同定した。さらに、UNC-23 が HSP-1 とともに、ゴルジ体における LRK-1 の局在を制御することも明らかにした。以上の結果から、LRK-1 はシャペロン複合体依存的な機構により、その局在が制御されていることが示唆された。

序論

パーキンソン病は神経変性疾患の一種であり、世界で 500 万人以上が罹患している難病の一つである。2004 年に常染色体優性パーキンソン病の原因遺伝子の一つとして leucine-rich repeat kinase 2

(LRRK2) が同定された (Paisán-Ruíz *et al.* 2004; Zimprich *et al.* 2004)。その後の解析から、LRRK2 は孤発性および家族性パーキンソン病の両方に関与することが示唆されている (Beilinaa *et al.*, 2014)。LRRK は ROCO ファミリーに属するプロテインキナーゼであり、LRRK1 と LRRK2 の 2 つのアイソフォームが存在する

(Bosgraaf & Van Haastert 2003; Lewis 2009)。これまでの研究から、LRRK2 はタンパク輸送やリソソームタンパク質分解経路、神経突起伸長、外因性細胞死、炎症反応のシグナル伝達経路、ミトコンドリア機能不全等の様々な生体反応経路に関わっていることが示唆されている (Rideout & Stefanis 2013)。また、LRRK2 は膜貫通ドメインを持たない細胞質タンパク質であるにも関わらず、ミトコンドリアやシナプス小胞タンパク質、小胞体 (ER)、ゴルジ体、エンドソーム/リソソーム等の膜構造体に結合していることが報告されている (Biskup *et al.* 2006)。しかし、LRRK1/LRRK2 の生理学的、細胞学的役割及びその制御機構については不明の部分が多く残されている。

ROCO ファミリータンパク質は、粘菌から哺乳動物まで種を越え

て保存されており、線虫 *Caenorhabditis elegans* では、LRRK 様の ROCO ファミリープロテインキナーゼをコードする遺伝子として、*lrk-1* 遺伝子が存在する (Sakaguchi-Nakashima *et al.* 2007; Lewis 2009)。これまでの研究から、LRK-1 はシナプス小胞 (SV) タンパク質の極性的な局在に必要であることが明らかになっている

(Sakaguchi-Nakashima *et al.* 2007)。神経は極性を持った細胞であり、軸索と樹状突起には性質や機能の異なるタンパク質が特異的に局在する。SV や多くの SV タンパク質は、主に軸索のシナプス前終末に局在し、樹状突起には局在しない。しかし、*lrk-1* 欠損変異体では、SV タンパク質の極性が失われ、軸索のみならず樹状突起の末端においても SV タンパク質の局在がみられる。この異所的な SV タンパク質の局在は、樹状突起への極性的な輸送を担う AP-1 クラスリンアダプタータンパク質である UNC-101 に依存しており、シナプス前終末への輸送を担うキネシンである UNC-104 には依存していなかった。また、LRK-1 はゴルジ体に局在することから、LRK-1 はトランスゴルジネットワークにおいて、SV タンパク質が樹状突起特異的な輸送機構へ選別されることを抑制することで、SV タンパク質の軸索への局在を正に制御していることが示唆された

(Sakaguchi-Nakashima *et al.* 2007)。

ROCO ファミリータンパク質は、Ras/Arf GTPase ファミリータンパク質に類似した ROC (Ras in complex proteins) ドメインの他に、プロテインキナーゼドメインや複数のタンパク質間相互作用ド

メインを持っている (Lewis 2009)。近年の LRRK2 と相互作用する因子を探索する目的で行われた共沈降実験及びタンデム質量分析により、多くの LRRK2 と結合する候補因子が同定された。それらの中に、heat-shock cognate protein 70 (HSC70)、heat-shock protein 70 (HSP70)、heat-shock protein 90 (HSP90)、cell division cycle 37 (CDC37)等、シャペロン経路に関わる因子が含まれていた (Wang *et al.* 2008)。シャペロンタンパク質は、細胞質に存在する数多くのタンパク質の適切なフォールディングや維持において重要な役割を果たす。また、タンパク質のリフォールディングやシャペロンタンパク質基質の分解を仲介することも知られている (Hartl *et al.* 2011)。特に、HSC70 と HSP70 はシャペロン経路で機能するシャペロン複合体において中核的な存在とされている。

本研究では、哺乳動物 LRRK2 の結合因子として、HSC70 の他に Bcl-2 athanogene (BAG) ファミリーのひとつである BAG2 を同定した。哺乳動物では BAG ファミリーとして BAG1、BAG2、BAG3、BAG4、BAG5、BAG6 の 6 つのタンパク質が報告されている

(Takayama & Reed 2001)。そのうち BAG2 は HSC70/HSP70 のコシャペロンとしての機能を持ち、タンパク質のフォールディング活性を制御している (Takayama *et al.* 1999)。線虫 *C. elegans* における BAG2 および HSC70 のホモログを探索したところ、それぞれ UNC-23 と HSP-1 が同定された。そこで線虫 *C. elegans* を用いて、LRK-1 の制御における UNC-23 と HSP-1 の役割を解析した。その

結果、UNC-23-HSP-1 のシャペロン複合体はゴルジ体における LRK-1 の局在を制御することで、SV タンパク質の軸索への極性的な選別輸送を制御することが示唆された。

結果

LRRK2 は BAG2、HSC70 と結合する

LRRK2 の制御機構を解析するために、LRRK2 と結合する因子の同定を試みた。Ras と LRRK2 とのホモロジーから、Roc ドメイン内の 1341 番目のグリシンがバリンに置き換わった変異型 LRRK2 (G1341V) では、GTPase 活性が欠損し、活性化型である GTP 結合型の LRRK2 が蓄積することが考えられた (Clanton *et al.* 1987)。そこで、変異型 LRRK2 (G1341V) を用いて LRRK2 と結合する因子の同定を行った。ヒト胎児由来腎臓 HEK293T 細胞に FLAG タグで標識した FLAG-LRRK2 (G1341V) を過剰発現させ、抗 FLAG 抗体で LRRK2 (G1341V) と結合タンパク質を免疫沈降した。その後、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析 (LC-MS/MS) を実施した (Iemura & Natsume 2012)。その結果、変異型 LRRK2 (G1341V) と結合するタンパク質として、BAG2 及び HSC70 を同定した。まず、アフリカミドリザル腎臓由来の培養細胞である COS-7 細胞を用いて免疫沈降実験を行い、LRRK2 と BAG2 および HSC70 の相互作用を確認した。COS-7 細胞にて LRRK2 と、HA タグで標識した BAG2 を共発現させた。FLAG-LRRK2 と HA-BAG2 のみの共発現では両者は共沈降しない (図 1A, レーン 2) もの、T7-HSC70 発現下では、FLAG-LRRK2 と HA-BAG2 が共沈降することが確認され

た(図 1A, レーン 3)。また、これまでの報告 (Takayama *et al.* 1999) と同様に、T7-HSC70 は HA-BAG2 の免疫沈降により共沈降した(図 1A, レーン 3)。これらの結果から、LRRK2 と BAG2 の結合は HSC70 に依存している可能性が示唆された。さらに、COS-7 細胞に、FLAG-LRRK2、T7-HSC70 を共発現させたところ、BAG 非発現下においても FLAG-LRRK2 が T7-HSC70 と共沈降したことから、LRRK2 は BAG2 非依存的に HSC70 と直接結合しており、BAG2 とは間接的に結合していることが示された(図 1B, レーン 2)。また、HA-BAG2 発現下では、LRRK2 と HSC70 の結合が減少することから、BAG2 は LRRK2 の HSC70 からの解離を誘導することが示唆された(図 1B, レーン 3)。

線虫 *C. elegans* における LRRK2、HSC70、BAG2 ホモログの関係について

生体内における BAG2、HSC70 による LRRK2 の制御機構を解析するため、線虫 *C. elegans* をモデル動物として解析を行った。線虫において、*lrk-1* 遺伝子、*hsp-1* 遺伝子はそれぞれ哺乳動物 LRRK2 及び HSC70/HSP70 の線虫ホモログをコードしている (Heschi & Baillie 1989; Sakaguchi-Nakashima *et al.* 2007)。また、BAG ファミリーも真核生物において種を越えて保存されており、哺乳動物 BAG ファミリーには、BAG1、BAG2、BAG3、BAG4、BAG5、BAG6 の 6 つのタンパク質が存在している (Takayama & Reed 2001)。線

虫 *C. elegans* では、BAG ファミリーとして BAG-1、BAG-2 が存在しており、それぞれ哺乳動物 BAG1、BAG2 のホモログである (図 2A, 図 3) (Takayama *et al.* 1999)。BAG-2 は、H14N18.1 ORF にコードされており、線虫遺伝子ノックアウトコンソーシアムの活動により *ok1408* と呼ばれる H14N18.1 ORF が欠損した系統が単離されている (図 2A)。そして、*ok1408* 個体は、*unc-23* 変異体と同様に bent-head の表現型を示した (図 7) (Waterston *et al.* 1980)。また、*unc-23* 遺伝子は H14N18.1 ORF の近くにマッピングされることから、*unc-23* (*e25*) 変異について、H14N18.1 ORF の遺伝子配列を解析した。その結果、*unc-23* 遺伝子内に 297 番目のグルタミン酸がリジンに変わる変異が存在した (図 4)。また、H14N18.1 を含む導入遺伝子は、*unc-23* (*e25*) 変異体の表現型をレスキューした。これらの結果から、H14N18.1 ORF は BAG-2 をコードする *unc-23* 遺伝子であることが示された (図 5)。これは他研究者による最近の報告とも合致する (Rahmani *et al.* 2015)。

次に、線虫 LRK-1、HSP-1、UNC-23 が、哺乳動物 LRRK2、HSC70、BAG2 と同様に相互作用するのか調べるために、免疫共沈降実験を行った。COS-7 細胞に HA-HSP-1、T7-UNC-23 を共発現させたところ、HSP-1 が UNC-23 と結合することが確認された (図 2B, 上段、レーン 1, 2)。さらに、UNC-23 の BAG ドメインのみでも HSP-1 と弱く結合した (図 2B, 2 段目、レーン 3)。*unc-23*(*e25*)変異に対応する変異型 UNC-23 (E297K) も、野生型 UNC-23 と同様に HSP-1

と結合したことから、*unc-23 (e25)* 変異は、UNC-23 と HSP-1 の結合に影響がないことが示唆された (図 2B, 上段、レーン 2, 6)。尚、COS-7 細胞において、LRK-1 は強制発現させることができなかつたため、LRK-1 と HSP-1、UNC-23 の結合は検証することができなかつた。

これまでの研究から、*lrk-1* 欠損変異体では、SV タンパク質がシナプス前終末及び樹状突起末端に局在することが示された (Sakaguchi-Nakashima *et al.* 2007)。そこで、*unc-23* 変異が SV タンパク質の局在に影響を与えるか調べるため、*unc-23* 変異体の SV タンパク質の局在を観察した。SV タンパク質を可視化するため、SV のマーカーである線虫 VAMP2/synaptobrevin に GFP を融合した SNB-1::GFP を作製した。そして、この融合タンパク質を、頭部感覚神経等の複数の神経で発現する *flp-13* プロモーターの下流に挿入し、観察を行った (Sakaguchi-Nakashima *et al.* 2007)。頭部感覚神経は、神経環の近くに存在する細胞体、神経環の周りを囲むように存在する軸索突起、頭部末端に伸びる樹状突起の 3 つの部位で構成されている (White *et al.* 1986)。野生型では、SNB-1::GFP は軸索に局在し、樹状突起には局在しない (図 5, 6)。一方、*unc-23 (e25)* 変異体では、*lrk-1 (km17)* 変異体と同様に SNB-1::GFP は軸索だけでなく、樹状突起の末端にも局在した (図 5, 6)。同様の表現型は *unc-23 (ok1408)* 欠損変異体でも観察された。さらに、この表現型が *unc-23* 変異によるものか調べるために、*unc-23* 変異体に

H14N18.1 ORF を含む DNA フラグメントを導入し、表現型を観察した。遺伝子導入個体では SNB-1::GFP は軸索にのみ局在し、樹状突起には局在しなかった(図 5, 6)。このことから、*unc-23* 変異は *lrk-1* 変異同様、SV タンパク質の極性的な局在に影響を与えることが示された。

unc-23 変異は、頭部において筋肉剥離の表現型を示し、その結果 bent-head の形態を示す (Waterston *et al.* 1980)。このことから、*unc-23* 変異体における SNB-1::GFP の局在異常は頭部形態異常が原因で引き起こされる可能性が考えられた。そこで、*unc-23* 変異体と同様に、筋肉剥離及び頭部形態異常を示す *vab-10* 変異体、*mua-10* 変異体において SNB-1::GFP の局在を観察した (Plenefisch *et al.* 2000)。しかし、それら変異体では SNB-1::GFP の局在異常は観察されなかった (data not shown)。この結果から、*unc-23* 変異体でみられる SV タンパク質の局在異常は、頭部形態異常が原因ではないことが示唆された。また、同じ BAG ファミリーである BAG-1 の変異体、*bag-1 (tm2899)* 欠損変異体についても、SV タンパク質の局在を観察したが、*unc-23* 変異体とは異なり、SV タンパク質の軸索への極性的な局在には影響がなかった(図 2A, 5, 6)。この結果から、*unc-23* 変異は特異的に SV タンパク質の極性的な局在に影響を与えることが明らかになった。

lrk-1 変異体でみられる SV タンパク質の樹状突起への異所的な局在は、ゴルジ体から樹状突起末端への極性的な輸送に関わる AP-1 μ 1

クラスリンアダプタータンパク質 UNC-101 に依存している (Dwyer *et al.* 2001; Sakaguchi-Nakashima *et al.* 2007)。そこで、*unc-23* 変異体でみられる SV タンパク質の局在異常が、*lrk-1* 変異体と同様に UNC-101 に依存しているのか調べるため、*unc-23(e25); unc-101(m1)* 二重変異体における SV タンパク質の局在を観察した。*unc-23(e25); unc-101(m1)* 二重変異体では、SNB-1::GFP は軸索にのみ局在し、樹状突起の末端には局在しなかった (図 5, 6)。この結果から、*unc-101* 変異は、*lrk-1* 変異体と同様に *unc-23* 変異体でみられる SV タンパク質の局在異常を抑圧することが示された。しかし、*unc-101* 変異は *unc-23* 変異体の示す頭部形態異常は抑圧せず、*lrk-1* 欠損変異体も頭部形態に影響は及ぼさなかった。このことから、*unc-101* 変異は *unc-23* 変異体の SV タンパク質の異常局在の表現型にのみ特異的に影響を及ぼすことが示された。これらの結果から、LRK-1 と UNC-23 は SV タンパク質の局在について、同一経路にて働くことが示唆された。また、同時に UNC-23 は LRK-1 を制御することで SV タンパク質の軸索への極性的な局在を制御している可能性が示唆された。

***unc-23* 変異体の抑圧変異の単離**

unc-23 遺伝子の機能について、さらなる解析を進めるために、*unc-23* 変異体の示す頭部形態異常の表現型を抑圧する変異体の遺伝子スクリーニングを行った。スクリーニングには、遺伝子欠損変異

体である *unc-23(ok1408)* 変異体、及び点変異を有する *unc-23(e25)* 変異体を用いた。スクリーニングの結果、*unc-23* 変異体の示す頭部形態異常を抑圧する *km57*、*km58*、*km59* の 3 つの独立した変異を単離した。*km57* 変異は *unc-23(ok1408)* 変異体から、*km58* 変異、*km59* 変異は *unc-23(e25)* 変異体からそれぞれ単離された (図 7)。変異の遺伝子マッピングの結果、3 つの変異全てが、*hsp-1* 遺伝子をコードする領域に位置する一塩基置換の変異であった。*km57* 変異では 384 番目のアスパラギン酸がアスパラギン変わる変異、*km58* 変異は 379 番目のアラニンがバリンに変わる変異、*km59* 変異は 321 番目のセリンがフェニルアラニンに変わる変異が起きていた (図. 8A)。HSC70/HSP70 は、N 端の核酸結合ドメイン (NBD) と C 端の基質結合ドメイン (SBD) が短いリンカー領域で結ばれている構造をしており、*km57* 変異、*km58* 変異は、NBD とリンカー領域の接合領域付近に位置し、*km59* 変異は NBD 内に存在していた (図. 8A) (Chappell *et al.* 1987)。興味深いことに、ウシ HSC70 の構造解析から、立体構造上、383 番目のアスパラギン酸は、378 番目のアラニンに隣接しており、ウシ HSC70 の 383 番目の Asp、378 番目の Ala は、それぞれ *km57* 変異が存在する HSP-1 の 384 番目の Asp、*km58* 変異が存在する 379 番目の Ala に対応していた (図. 8B) (Flaherty *et al.* 1990)。このことから、*km57* 変異、*km58* 変異は HSP-1 のリンカー領域の構造に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

HSC70 のリンカー領域は、NBD と SBD のドメイン間相互作用を

仲介していることから (Jiang *et al.* 2005)、線虫 HSP-1 の *km58* 変異に対応する哺乳動物 HSC70 (A378V) を作製し、*km58* 変異が LRRK2 及び BAG2 との結合に及ぼす影響について調べた (図. 8A)。上記に示した結果と同様に、T7-HSC70 は、Myc-LRRK2 と結合し、HA-BAG2 と共発現させることで、Myc-LRRK2 との結合が弱くなった (図 9, 上段、レーン 2, 3)。一方、T7-HSC70 (A378V) では、Myc-LRRK2 との結合が T7-HSC70 に比べ弱く、HA-BAG2 を共発現させることで、より結合が弱くなった (図 9, 上段、レーン 2, 5, 6)。さらに、T7-HSC70 (A378V) は、T7-HSC70 に比べ、HA-BAG2 と強く結合することが確認された (図 9, 2 段目、レーン 3, 6)。これらの結果から、HSC70 の A378V 変異は、LRRK2 と HSC70 の結合を弱くし、同時に BAG2 と HSC70 の結合を強くすることが示唆された。

hsp-1 変異体は、*unc-23* 変異体の頭部形態異常を抑圧することから、UNC-23 欠損によって引き起こされる SV タンパク質の異所的な局在について、その表現型をレスキューする可能性が考えられた。そこで、その可能性を検証するために、*hsp-1 (km57) ; unc-23 (ok1408)* 二重変異体で SV タンパク質の局在を観察した。その結果、*hsp-1 (km57) ; unc-23 (ok1408)* 二重変異体では、SV タンパク質は軸索にのみ局在し、樹状突起の末端には局在しなかった (図 5,6)。このことから、*hsp-1 (km57)* 変異は *unc-23 (ok1408)* 変異体の示す SV タンパク質の局在異常を抑圧することが示された。同様

の表現型の抑圧は、*unc-23 (e25); hsp-1 (km58)* 二重変異体、*unc-23 (e25); hsp-1 (km59)* 二重変異体でも観察された。一方、*hsp-1 (km57)* 単独変異体では、SNB-1::GFP は頭部感覚神経において正常な局在を示していた (図 5,6)。次に、HSP-1 が LRK-1 を介して SV タンパク質の極性的な局在を制御しているか調べるために、*lrk-1 (km17); hsp-1 (km57)* 変異体の SNB-1::GFP の局在を観察した。その結果、*lrk-1 (km17); hsp-1 (km57)* 二重変異体では、SNB-1::GFP は樹状突起の末端に異常局在していた (図 5,6)。このことから、*hsp-1* 変異は *unc-23* 変異体でみられる SV タンパク質の樹状突起末端への異常局在を抑圧するが、*lrk-1* 変異体の表現型は抑圧しないことが示された。これらの結果より、HSP-1 と UNC-23 は、SV タンパク質の極性的な局在制御において LRK-1 の上流で機能することが示唆された。また、*unc-23 (e25)* 変異体において、*lrk-1* 遺伝子の過剰発現により、頭部形態異常は抑圧できなかったものの、SV タンパク質の異常局在を抑圧することができたことから、その可能性が示唆された (図 5,6,7)。

UNC-23-HSP-1 は、ゴルジ体における LRK-1 の局在を制御する

HSC70/HSP70 のシャペロンシステムは、多くのタンパク質の適切なフォールディングと維持に必須であり、タンパク質のリフォールディング及び分解の仲介を行うことができる (Dai *et al.* 2005; Hartl *et al.* 2011 ; Liu *et al.* 2012; Meyer 2013)。そこで、*unc-23*

変異が LRK-1 のタンパク質量に影響を与えるのか調べるため、*lrk-1 (km17)* 変異体及び *lrk-1 (km17) ; unc-23 (e25)* 二重変異体に、*Plrk-1::lrk-1::flag* を遺伝子導入し、LRK-1::FLAG を発現させてそのタンパク質量をウェスタンブロットで検討した。その結果、LRK-1::FLAG のタンパク質量は *lrk-1 (km17)* 変異体と *lrk-1 (km17) ; unc-23 (e25)* 二重変異体で変化がなく、*unc-23 (e25)* 変異は LRK-1::FLAG のタンパク質量に影響を与えないことが示された (図 10A)。さらに、*unc-23 (e25)* 変異は内在性の LRK-1 のタンパク質量にも影響を与えなかった (図 10B)。これらの結果から、UNC-23-HSP-1 は LRK-1 の分解には関与していないことが示された。

次に、*unc-23* 変異が LRK-1 の局在に与える影響を検討するために、*Pflp-13::lrk-1::venus* を用いて LRK-1 タンパク質の局在を観察した。これまでの研究から、LRK-1::VENUS は *lrk-1* 変異体の表現型をレスキューすることが確認されている (Sakaguchi-Nakashima *et al.* 2007)。*lrk-1* 変異体において、*Pflp-13::lrk-1::venus* をゴルジ体マーカーである *Pflp-13::manII::mCherry* とともに発現させたところ、LRK-1::VENUS と ManII::mCherry の蛍光が共局在することが観察された (図 11A, B)。これまでの研究結果と同様、この結果からも、LRK-1 はゴルジ体に局在していることが示された (Sakaguchi-Nakashima *et al.* 2007)。一方、*lrk-1 (km17) ; unc-23 (e25)* 二重変異体においては、ManII::mCherry と共局在する

LRK-1::VENUS の量は顕著に減少し、LRK-1::VENUS は細胞質全体に拡散していた。しかしながら、*lrk-1 (km17) ; unc-23 (e25) ; hsp-1 (km58)* 三重変異体では、*lrk-1 (km17) ; unc-23 (e25)* 二重変異体に比べ、ManII::mCherry と共局在する LRK-1::VENUS の量の増加が観察された (図 11A,B)。この結果は、*unc-23 (e25)* 変異によって引き起こされた LRK-1 の局在異常が、*hsp-1 (km58)* 変異によって抑圧された可能性を示唆している。また、*hsp-1 (km58)* 変異は、単独では LRK-1 のゴルジ体への局在に影響を与えなかった (図 11B)。これらの結果から、LRK-1 のゴルジ体への局在は UNC-23-HSP-1 に依存していることが示唆された。

考察

SV タンパク質とそれに関連するタンパク質は、前シナプス領域にのみ局在し、樹状突起には局在しない。これまでの研究から、線虫 *C. elegans* では、LRRK 様タンパク質 LRK-1 がゴルジ体で SV タンパク質の樹状突起への輸送を抑制することで、SV タンパク質の軸索特異的な局在を制御することが示されている (Sakaguchi-Nakashima *et al.* 2007)。本研究では、UNC-23-HSP-1 シャペロン複合体が、ゴルジ体への LRK-1 の局在およびそれを介した SV タンパク質の局在制御を行うことが示された。また *unc-23* 変異体ではゴルジ体への LRK-1 の局在が減少し、これにより LRK-1 が機能できず、SV タンパク質の局在異常が引き起こされることが明らかになった。

UNC-23 と HSP-1 は、それぞれヒト BAG2、HSC70/HSP70 のホモログである。HSC70/HSP70 は、単独では基質特異性が比較的低いため、特定の基質に結合して作用するためには、それを周りから制御する仕組みが必要となる。実際、多くのコシャペロンは、HSC70/HSP70 と基質との特異的な結合や、HSC70/HSP70 の基質からの解離を仲介・補佐する役割を担っている (Liu *et al.* 2012)。HSC70/HSP70 と基質の結合は、基本的に NBD への ATP の結合、ATP 加水分解、ADP/ATP 交換の 3 つの過程により制御される (Meyer 2013)。HSC70/HSP70 は、ATP 結合型では基質に対する

結合能が低く、ADP 結合型では基質結合能が高い。BAG2 は HSC70/HSP70 の ADP/ATP 交換を促進する因子であり、HSC70/HSP70 の NBD に結合することで、ADP から ATP への交換を引き起こして、HSC70/HSP70 からの基質の解離を促すことが報告されている (Takayama *et al.* 1999; Takayama & Reed 2001; Xu *et al.* 2008)。このことから、BAG2 は基質に結合した HSC70/HSP70 のヌクレオチド交換と、細胞内の様々な反応プロセスを結びつける役割を担う因子であると考えられる (Liu *et al.* 2012)。従って、線虫の UNC-23 も HSP-1 と結合してそのヌクレオチド交換反応を促進し、それを LRK-1 の局在制御と結びつけていると推測される (図 12)。HSC70/HSP70 と同様に、HSP-1 には基質である LRK-1 との結合能が低い ATP 結合型、及び結合能が高い ADP 型の 2 つの状態があり、ADP 型の HSP-1 に結合した LRK-1 はゴルジ体に局在できないと推測される。そして、UNC-23 は HSP-1 の ADP/ATP 交換反応を促進することで、HSP-1 の LRK-1 からの解離を促し、それが LRK-1 のゴルジ体への局在を誘導することが考えられる。今回、UNC-23 (E297K) 変異型も野生型と同様に HSP-1 と結合しており、また UNC-23 (E297K) を発現している *unc-23 (e25)* 変異体において、LRK-1 を過剰発現させることで SV タンパク質の局在異常が抑圧された。これらの結果から、E297K 変異は UNC-23 の ADP/ATP 交換反応能に影響を与え、結果として HSP-1 からの LRK-1 の解離が起きていない可能性が考えられる。

unc-23 変異の頭部形態異常の抑圧変異として単離した *hsp-1* 変異は、*unc-23* 変異体でみられる SV タンパク質の局在異常及び LRK-1 のゴルジ体への局在低下の表現型を抑圧した。一方、*hsp-1* 変異は *lrk-1* 変異を抑圧しなかった。これらのことから、HSP-1 は LRK-1 の上流且つ UNC-23 の下流で機能していることが示唆された。また、今回単離された 3 つの *hsp-1* 変異のうち、*hsp-1 (km59)* 変異は NBD ドメインの近くに位置し、生殖不能の表現型を示した（材料と方法参照）。同様の表現型は、*hsp-1* ノックダウン個体でも観察されることから（Piano *et al.* 2000; Gaiser *et al.* 2009）、*km59* 変異は機能欠損型変異であると考えられる。一般に、HSC70/HSP70 の主な機能は、シャペロンとしてタンパク質の正確なフォールディングを補佐することとされている（Liu *et al.* 2012）。そのため、一つの可能性として HSP-1 がシャペロンとして LRK-1 の正確なフォールディングを制御することで、機能的な LRK-1 を産生していることも考えられる。その場合、HSP-1 の機能欠損は LRK-1 のフォールディング異常を引き起こし、結果的に SV タンパク質の局在異常を示すことになる。しかし、*km59* 変異は、機能欠損変異体と考えられるにも関わらず、*unc-23* 変異による SV タンパク質の異常局在を抑圧した。このことは、HSP-1 はシャペロンとして LRK-1 の正確なフォールディングを促進することで、SV タンパク質の局在を制御しているわけではないことを意味する。つまり、HSP-1 は LRK-1 のゴルジ体への局在を抑制しているが、LRK-1 の正確なフォールディングには必要ない

と考えられる。そして UNC-23 は HSP-1 からの LRK-1 の解離促進を介してこの抑制を緩和することで、LRK-1 がゴルジ体へ局在できるようにしていると思われる。興味深いことに、近年の研究から、ヒト細胞において HSP70 ファミリーのメンバーである HSPA1L と BAG4 は、ダメージを受けたミトコンドリアへの Parkin の移行において正反対の役割を果たすことが報告されている (Hasson *et al.* 2013)。さらに、HSC70 と BAG1 は、膜タンパク質である CFTR の極性的な輸送の制御に関わっていることも報告されている (Matsumura *et al.* 2011)。これらの知見は、HSC70/HSP70-BAG シャペロン複合体が、様々なタンパク質の特定領域への移行を制御することを示唆しており、本研究の結果と符合するものである。

hsp-1 (km57) 変異、*hsp-1 (km58)* 変異はリンカー領域の近くに位置しており、これまでに HSP70/DnaK のリンカー領域は NBD と SBD の立体構造変化に重要であることが報告されている (Han & Christen 2001; Vogel *et al.* 2006; Swain *et al.* 2007)。HSC70/HSP70 は、ADP 結合型では、リンカー領域は可動性を保っており、NBD と SBD のカップリングは起きないが、ATP 結合型になることでリンカー領域は NBD の疎水性領域と相互作用し、SBD と NBD が結合する。この構造変化により HSC70/HSP70 の基質に対する結合能は減少する (Swain *et al.* 2007)。このことから、NBD と SBD の構造変化に重要なリンカー領域付近に位置する *km57* 変異と *km58* 変異は、リンカー領域の機能を変化させることで、NBD と

SBD の立体構造上のカップリングを妨げる可能性が考えられる。そして、それらの変異によって HSP-1 の構造変化が妨げられた結果、UNC-23 による ADP/ATP 交換反応がなくとも HSP-1 からの LRK-1 の解離が促進されていると推測される。また、線虫 HSP-1 の *km58* 変異に対応するヒト HSC70 (A378V) 変異タンパク質では、野生型のものと比べて LRRK2 との結合が低下したことから、ヒトでも A378V 変異により BAG2 非存在下において HSC70 と LRRK2 の解離が促進されていることが推測される。

hsp-1 欠損個体では、胚性致死等の多くの表現型を示すのに対して、*unc-23* 変異体の表現型はより限定されており、皮下筋肉剥離と SV タンパク質の局在異常しか示さない (Piano *et al.* 2000; Gaiser *et al.* 2009)。哺乳動物では BAG ファミリータンパク質の他に、HSPBP1 や HSP110 が HSC70/HSP70 の ADP/ATP 交換反応を行うことがわかっており (Shaye & Greenwald 2011 ; Liu *et al.* 2012)、線虫にもそのホモログが存在することから、それらの因子が UNC-23 の代わりに HSP-1 の ADP/ATP 交換反応を行うことにより、*unc-23* 変異体では見られないが *hsp-1* 変異体で見られる表現型の制御を行っている可能性が考えられる。これと符合する話として、HSP110 の線虫ホモログ *hsp-110* のノックダウンは、*hsp-1* ノックダウンと同様に胚性致死の表現型を示すことが報告されている (Piano *et al.* 2000)。今回、*unc-23* 変異体で見られる頭部形態異常、及び頭部感覚神経における SV タンパク質の異所的な局在という 2 つの表現型

がいずれも *hsp-1* 変異により遺伝学的に抑圧されたことから、これら 2 つの因子は SV タンパク質の局在制御と表皮—筋肉の結合制御の両方において重要な役割を果たしていると考えられる。一方、*lrk-1* 変異は SV タンパク質の局在異常を示すものの、皮下筋肉剥離の表現型は示さないことから、表皮と筋肉の結合制御には、LRK-1 とは異なる HSP-1 の基質が関与すると推測される。

ヒトにおいては、LRRK2 と HSC70 の結合は、ユビキチン-プロテアソーム系、またはシャペロンを介したオートファジーにより、LRRK2 の分解を誘導することが報告されている (Ding *et al.* 2009; Ko *et al.* 2009; Orenstein *et al.* 2013)。しかしながら、*unc-23* 変異体では LRK-1 のタンパク質量の減少はみられず、UNC-23 は LRK-1 のタンパク質分解を制御していないことが示唆された。また、本研究により、UNC-23-HSP-1 は LRK-1 のゴルジ体への局在を制御していることが示唆されたものの、LRK-1 の制御機構における UNC-23 の上流因子は不明である。ヒトでは、酸化ストレスによって活性化される MAPKAPK2 が BAG2 をリン酸化することが報告されており、酸化ストレスはパーキンソン病の進行に寄与していることから、LRRK2 の機能制御において BAG2 は酸化ストレスと関係しているかもしれない (Ueda *et al.* 2004; Subramaniam & Chesselet 2013)。LRK-1 の制御機構における UNC-23 の上流因子を明らかにするには、更なる解析が必要不可欠である。

材料と方法

線虫 *C. elegans* の系統

本研究に用いた線虫 *C. elegans* の系統は、表 1 に記載した。線虫の飼育には NGM プレートに OP50 を適量塗布して用いた (Sulston *et al.* 1988)。

unc-23 変異体の抑圧変異スクリーニング

unc-23 変異体の抑圧変異を単離するために、*unc-23 (e25) ; juIs137* 系統及び *unc-23(ok1408); juIs137* を 0.5% の ethylmethane sulfonate (EMS) にて 4 時間変異原処理を行った。変異原処理を行った 132 の *unc-23 (e25) ; juIs137* 系統、72 の *unc-23 (ok1408) ; juIs137* 系統のうち、頭部形態異常が見られない系統について継代を行った。*km57* 変異、*km58* 変異、*km59* 変異はヘテロ接合体であったが、継代を行うことで *km57*、*km58* 変異体についてはホモ接合体を単離した。一方、*km59* 変異体のホモ接合体は生殖不能であるため、ホモ接合体の子孫の系統を得ることができなかった。これら変異体は、ヘテロ接合体、ホモ接合体に関わらず、頭部形態は正常であった。

顕微鏡観察

成虫は、10~20mM のアジ化ナトリウムまたはフェノキシプロパノールを含む 2%アガロースで作製したアガロースパッド上で麻酔をかけた。遺伝子導入をした線虫の蛍光観察には、Zeiss Axioplan II の 63 倍の対物レンズまたは Nikon ECRIPSE E800 の 60 倍の対物レンズを用い、浜松フォトニクス の 3CCD カメラにて撮影を行った。共焦点の蛍光観察には、共焦点レーザー走査型顕微鏡である Olympus FV500、FV1000 の 60 倍または 100 倍の対物レンズを用いた。

SNB-1::GFP の局在異常の定量分析

樹状突起への SNB-1::GFP の異常局在は、*juIs137* 導入遺伝子を持つ成虫を用いて計測した。樹状突起末端への SNB-1::GFP の異常局在は、強度を 0 から 2 の 3 段階に分けて評価した。樹状突起末端への異常局在が全く見られないものをスコア 0 とし、わずかに異常局在がみられるものの、I5 神経の軸索や DD 神経の背側神経索でみられるシナプスボタンの蛍光強度よりも弱いものをスコア 1 とした。また、I5 神経の軸索や DD 神経の背側神経索でみられるシナプスボタンの蛍光強度と同程度の蛍光強度が樹状突起の末端でみられるものをスコア 2 とした。本研究において、スコア 1 は観察されなかったため、本文中のグラフからは除いて、スコア 0 とスコア 2 の数で計測している。

ゴルジ体における LRK-1::VENUS の局在の定量分析

LRK-1::VENUS のゴルジ体への局在は、頭部感覚神経における LRK-1::VENUS と ManII::mCherry の共焦点蛍光顕微鏡の写真を ImageJ にて分析することで計測した。ManII::mCherry の強度が周囲と比べて 3 倍以上高い領域を“ゴルジ体領域”とし、LRK-1::VENUS の強度が周囲と比べて 3 倍以上高い領域を“LRK-1 の局在”とした。この 2 つの領域が重複する領域を“LRK-1::VENUS が局在するゴルジ体”とした。

マイクロインジェクション法による遺伝子導入

雌雄同体の成虫線虫の生殖巣に DNA を注入するマイクロインジェクション法は、Mello らの方法に倣った (Mello *et al.* 1991)。レポーター遺伝子を発現させる実験においては、*Pflp-13::lrk-1::venus* と *Pflp-13::manII::mCherry* を 100 μ g/ml もしくは 50 μ g/ml でインジェクションした。これらレポーター遺伝子は、遺伝子マーカーである *Pofm-1::dsRed monomer* (25 μ g/ml) とともにインジェクションした。レスキュー実験では、*Punc-23::unc-23* (50 μ g/ml) を *Pmyo-2::dsRed monomer* マーカー (25 μ g/ml) とともに *unc-23 (e25) ; julS137* にインジェクションした。生化学的解析では、*Plrk-1::lrk-1::flag*(50 μ g/ml)を *Pofm-1::dsRed monomer*(25 μ g/ml) とともにインジェクションした。遺伝子導入個体は、dsRed monomer マーカーを指標に選別した。

プラスミド作製

哺乳動物 LRRK2 cDNA は cDNA テンプレート (Clontech) から RT-PCR によって増幅し、pBS ベクターにサブクローニングした。そして、pRK5、pRK5-FLAG、pRK5-Myc ベクターにクローニングした。LRRK2 (G1341V) 変異は、PCR による部位特異的変異導入にて作製した。変異導入した LRRK2 遺伝子のコーディング領域は pPR5 ベクターにクローニングした。哺乳動物 BAG2 の cDNA は HeLa cDNA ライブラリーから RT-PCR によって増幅した。HA-BAG2 は、BAG2 cDNA を pCMV-HA ベクターに挿入して作製した。T7-HSC70 は、Dr. S. Kota から頂いた pGEX6P-1 プラスミドにクローニングされた哺乳動物 HSC70 cDNA を pCMV-T7 ベクターに移し、作製した。T7-HSC70 (A378V) 変異は、PCR による部位特異的変異導入にて作製した。*Punc-23::unc-23* プラスミドは、線虫 *C. elegans* の遺伝子より *unc-23* 遺伝子を PCR により増幅し、pCR2.1 (Invitrogen) に挿入し、作製した。T7-UNC-23、*unc-23* cDNA は、*C. elegans* cDNA ライブラリーより RT-PCR によって増幅し pCMV-T7 ベクターに挿入し、作製した (Kawasaki *et al.* 1999)。UNC-23 の BAG ドメインは、T7-UNC-23 プラスミドから BAG ドメインの配列のみを増幅して、pCMV-T7 に挿入し、作製した。T7-UNC-23 (E297K) は、T7-UNC-23 プラスミドをテンプレートとして、PCR による部位特異的変異導入を行い作製した。E297K の点

変異は、シーケンスにて確認した。HA-HSP-1 は線虫 *C.elegans* cDNA ライブラリーから *hsp-1* cDNA を増幅し、pCMV-HA ベクターに挿入した (Kawasaki *et al.* 1999)。 *Pflp-13::manII::mCherry* は、線虫 *C. elegans* cDNA ライブラリーから RT-PCR により、AMAN-2 (F58H1.1) の先端から 82 のアミノ酸配列をコードする領域を増幅し、*flp-13* プロモーターを含むベクターに挿入した (Kawasaki *et al.* 1999)。その後、*mCherry* 遺伝子を挿入し、作製した。これまでに、AMAN-2 は、末端から 82 のアミノ酸配列でゴルジ体に局在することが報告されている (Rolls *et al.* 2002)。 *Pflp-13p::lrk-1::venus* の作製は、Sakaguchi-Nakashima らの方法に倣った (Sakaguchi-Nakashima *et al.* 2007)。 *Plrk-1::lrk-1::flag* は、*Plrk-1::lrk-1::venus* より、*venus* 遺伝子の配列を切り出し、FLAG の DNA フラグメントを挿入し、作製した。DNA 配列は、シーケンスにて確認した。 *Pofm-1::dsRed monomer* と *Pmyo-2::dsRed monomer* プラスミドは、以前作製されたものを用いた (Arimoto *et al.* 2011)。

生化学的解析

結合タンパク質の同定は、H. Hanafusa らの方法に倣い、LC-MS/MS 解析にて行った (Hanafusa *et al.* 2011; Iemura & Natsume 2012)。FLAG タグで標識した LRRK1、LRRK2 (G1341V) を HEK293T 細胞に発現させ、抗 FLAG 抗体で免疫共沈降すること

で、細胞抽出液より LRRK1、LRRK2 (G1341V) と結合タンパク質を回収。結合タンパク質は、nano LC-MS/MS システムを用いて分析した。COS-7 細胞への遺伝子導入、細胞抽出液の作製、免疫沈降、免疫ブロッティングは文献の方法に倣った (Tanaka-Hino *et al.* 2002; Hanafusa *et al.* 2011)。免疫ブロッティングのバンド強度は ImageJ にて解析した。

抗 LRK-1 抗体の作製

抗 LRK-1 のウサギのポリクローナル抗血清は、ROC-COR ドメイン内の配列“CDDGELPITSSSHMKGR”に対して作製した。抗血清は、アフィニティー精製して使用した。

遺伝子配列解析

ホモロジー解析、保存されたドメイン、アミノ酸配列の同定・解析には NCBI BLAST 及び Genetyx-Mac を用いた。系統樹作製には、系統学的解析ツール (MEGA5.2) を用いた (Tamura *et al.* 2011)。HSC70 の分子構造を可視化には、CN3D プログラム及び NCBI の立体構造情報 (3HSC) を用いた。

統計学的解析

統計学解析の方法は、文献に倣った (Pastuhov *et al.* 2012)。95% 信頼区間を modified Wald 法により算出するとともに、フィッシャ

一の正確確率検定によって両側の P 値を算出した(<http://www.graphpad.com/quickcalcs/>)。

謝辞

本研究を行うにあたり、私を支えてくださった方々に心より感謝申し上げます。松本 邦弘 教授には、常に適正な御指導及びご助言を頂きました。久本 直毅 准教授には、直接御指導頂くとともに、本研究を技術的にも全面的に御支援頂きました。また、花房 洋 助教、Strahil Pastuhov 博士、福島 沖之さんには、技術的な支援と適切な助言を頂きました。

最後に、本研究にあたり、快適な環境と多くの助言を頂きました分子第六講座の皆様に深く感謝申し上げます。

参考文献

Arimoto, M., Koushika, S.P., Choudhary, B., Li, C., Matsumoto, K. & Hisamoto, N. (2011) The *C. elegans* JIP3 protein UNC-16 functions as an adaptor to link kinesin-1 with cytoplasmic dynein. *J. Neurosci.* **31**, 2216–2224.

Beilinaa A, Rudenkoa IN, Kaganovicha A, Civierob L, Chauc H, Kaliad SK, Kaliae LV, Lobbstaelf E, Chiaa R, Ndukwea K, Dingg J, Nallsh MA, International Parkinson's Disease Genomics Consortium, North American Brain Expression Consortium, Olszewskii M, Hausera DN, Kumarana R, Lozanod AM, Baekelandtf V, Greenei LE *et al.* (2014) Unbiased screen for interactors of leucine-rich repeat kinase 2 supports a common pathway for sporadic and familial Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, 2626-2631.

Biskup, S., Moore, D.J., Celsi, F., Higashi, S., West, A.B., Andrabi, S.A., Kurkinen, K., Yu, S.W., Savitt, J.M., Waldvogel, H.J., Faull, R.L., Emson, P.C., Torp, R., Ottersen, O.P., Dawson, T.M. & Dawson, V.L. (2006) Localization of LRRK2 to membranous

and vesicular structures in mammalian brain. *Ann. Neurol.* **60**, 557–569.

Bosgraaf, L. & van Haastert, P.J. (2003) Roc, a Ras/GTPase domain in complex proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1643**, 5–10.

Chappell, T.G., Konforti, B.B., Schmid, S.L. & Rothman, J.E. (1987) The ATPase core of a clathrin uncoating protein. *J. Biol. Chem.* **262**, 746–751.

Chen, C.C., Schweinsberg, P.J., Vashist, S., Mareiniss, D.P., Lambie, E.J. & Grant, B.D. (2006) RAB-10 is required for endocytic recycling in the *Canorhabditis elegans* intestine. *Mol. Biol. Cell* **17**, 1286–1297.

Clanton, D.J., Lu, Y.Y., Blair, D.G. & Shih, T.Y. (1987) Structural significance of the GTP-binding domain of ras p21 studied by site-directed mutagenesis. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 3092–3097.

Dai, Q., Qian, S.B., Li, H.H., McDonough, H., Borchers, C., Huang, D., Takayama, S., Younger, J.M., Ren, H.Y., Cyr, D.M. &

- Patterson, C. (2005) Regulation of cytoplasmic quality control protein degradation pathway by BAG2. *J. Biol. Chem.* **280**, 38673–38681.
- Ding, X. & Goldberg, M.S. (2009) Regulation of LRRK2 stability by the E3 ubiquitin ligase CHIP. *PLoS One* **4**, e5949.
- Dwyer, N.D., Adler, C.E., Crump, J.G., L'Etoile, N.D. & Bargmann, C.I. (2001) Polarized dendritic transport and the AP-1 mediated clathrin adaptor UNC-101 localize odorant receptors to olfactory cilia. *Neuron* **31**, 277–287.
- Flaherty, K.M., Deluca-Flaherty, C. & McKay, D.B. (1990) Three-dimensional Structure of the ATPase Fragment of a 70K Heat-shock Cognate Protein. *Nature* **346**, 623–628.
- Gaiser, A.M., Brandt, F. & Richter, K. (2009) The noncanonical Hop protein from *Caenorhabditis elegans* exerts essential functions and forms binary complexes with either Hsc70 and Hsp90. *J. Mol. Biol.* **391**, 621–634.
- Han, W. & Christen, P. (2001) Mutations in the interdomain

linker region of DnaK abolish the chaperone action of the DnaK/DnaJ/GrpE system. *FEBS Lett.* **497**, 55–58.

Hanafusa, H., Ishikawa, K., Kedashiro, S., Saigo, T., Iemura, S., Natsume, T., Kodama, M., Shibuya, H., Nara, A. & Matsumoto, K. (2011) Leucine-rich repeat kinase LRRK1 regulates endosomal trafficking of the EGF receptor. *Nat. Commun.* **2**, e158.

Hartl, F.U., Bracher, A. & Hayer-Hartl, M. (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* **475**, 324–332.

Hasson, S.A., Kane, L.A., Yamano, K., Huang, C.H., Sliter, D.A., Buehler, E., Wang, C., Heman-Ackah, S.M., Hessa, T., Guha, R., Martin, S.E. & Youle, R.J. (2013) High-content genome-wide RNAi screens identify regulators of parkin upstream of mitophagy. *Nature* **504**, 291–295.

Heschi, M.F. & Baillie, D.L. (1989) Identification of a heat-shock pseudogene from *Caenorhabditis elegans*. *Genome* **32**, 190–195.

Iemura, S. & Natsume, T. (2012) One-by-one sample preparation method for protein network analysis. Cai, J. & Wang, R.E. ed. *Protein Interaction, Croatia Intech*, 293–310.

Jiang, J., Prasad, K., Lafer, E.M. & Sousa, R. (2005) Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone. *Mol. Cell* **20**, 513–524.

Kawasaki, M., Hisamoto, N., Iino, Y., Yamamoto, M., Ninimiya-Tsuji, J., Matsumoto, K. (1999) A *Caenorhabditis elegans* JNK signal transduction pathway regulates coordinated movement via type-D GABAergic motor neurons. *EMBO J.* **18**, 3604–3615.

Ko, H.S., Bailey, R., Smith, W.W., Liu, Z., Shin, J.H., Lee, Y.I., Zhang, Y.J., Jiang, H., Ross, C.A., Moore, D.J., Patterson, C., Petrucelli, L., Dawson, T.M. & Dawson, V.L. (2009) CHIP regulates leucine-rich repeat kinase-2 ubiquitination, degradation, and toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 2897–2902.

Lewis, A.T. (2009) The function of ROCO proteins in health and

disease. *Biol. Cell* **101**, 183–191.

Liu, T., Daniels, C.K. & Cao, S. (2012) Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. *Pharmacol. Ther.* **136**, 354–374.

Matsumura, Y., David, L.L. & Skach, W.R. (2011) Role of Hsc70 binding cycle in CFTR folding and endoplasmic reticulum-associated degradation. *Mol. Biol. Cell* **22**, 2797–2809.

Mello, C.C., Kramer, J.M., Stinchcomb, D. & Ambros, V. (1991) Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J.* **10**, 3959–3970.

Meyer, M.P. (2013) Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends Biochem. Sci.* **38**, 507–514.

Orenstein, S.J., Kuo, S.H., Tasset, I., Arias, E., Koga, H., Fernandez-Carasa, I., Cortes, E., Honig, L.S., Dauer, W.,

- Consiglio, A., Raya, A., Sulzer, D. & Cuervo, A.M. (2013) Interplay of LRRK2 with chaperone-mediated autophagy. *Nat. Neurosci.* **4**, 394–406.
- Paisán-Ruíz, 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) Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* **44**, 595–600.
- Piano, F., Schetter, A.J., Mangone, M., Stein, L. & Kempthues, K.J. (2000) RNAi analysis of genes expressed in the ovary of *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* **10**, 1619–1622.
- Plenefisch, J.D., Zhu, X. & Hedgecock, E.M. (2000) Fragile skeletal muscle attachments in dystrophic mutants of *Caenorhabditis elegans*: isolation and characterization of the *mua* genes. *Development* **127**, 1197–1207.
- Rideout, H.J. & Stefanis, L. (2013) The Neurobiology of LRRK2

and its role in the pathogenesis of Parkinson's disease.

Neurochem. Res. **39**, 576–592.

Rolls, M.M., Hall, D.H., Victor, M., Stelzer, H.K. & Rapoport, T.A. (2002) Targeting of rough endoplasmic reticulum membrane proteins and ribosomes in invertebrate neurons. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1778–1791.

Sakaguchi-Nakashima, A., Meir, J.Y., Jin, Y., Matsumoto, K. & Hisamoto, N. (2007) LRK-1, a *C. elegans* PARK8-related kinase, regulates axonal-dendritic polarity of SV proteins. *Curr. Biol.* **17**, 592–598.

Subramaniam, S.R. & Chesselet, M.F. (2013) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* **106–107**, 17–32.

Sulston, J. & Hodgkin, J. (1988) Methods. In *The Nematode Caenorhabditis elegans*. Wood, W.B. ed. *New York, Cold Spring Harbor Laboratory*. 587–606.

Swain, J.F., Dinler, G., Sivendran, R., Montgomery, D.L., Stotz, M.

- & Gierasch, L.M. (2007) Hsp70 chaperone ligands control domain association via an allosteric mechanism mediated by the interdomain linker. *Mol. Cell* **26**, 27–39.
- Takayama, S., Xie, Z. & Reed, J.C. (1999) An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J. Biol. Chem.* **274**, 781–786.
- Takayama, S. & Reed, J.C. (2001) Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins. *Nat. Cell. Biol.* **3**, 237–241.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **10**, 2731–2739.
- Tanaka-Hino, M., Sagasti, A., Hisamoto, N., Kawasaki, M., Nakano, S., Ninomiya-Tsuji, J., Bargmann, C.I. & Matsumoto, K. (2002) SEK-1 MAPKK mediates Ca²⁺ signaling to determine neuronal asymmetric development in *C. elegans*. *EMBO Rep.* **3**, 56–62.

- Ueda, K., Kosato, H., Fukui, Y. & Hattori, S. (2004) Proteomic identification of Bcl2-associated athanogene 2 as a novel MAPK-activated protein kinase 2 substrate. *J. Biol. Chem.* **279**, 41815–41821.
- Vogel, M., Mayer, M.P. & Bukau, B. (2006) Allosteric regulation of Hsp70 chaperones involves a conserved interdomain linker. *J. Biol. Chem.* **281**, 38705–38711.
- 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) The chaperone activity of heat shock protein 90 is critical for maintaining the stability of leucine-rich repeat kinase 2. *J. Neurosci.* **28**, 3384–3391.
- Waterston, R.H., Thomson, J.N. & Brenner, S. (1980) Mutants with altered muscle structure in *C. elegans*. *Dev. Biol.* **77**, 271–302.
- White, J.G., Southgate, E., Thomson, J.N. & Brenner, S. (1986) The structure of the nervous system of the nematode

Caenorhabditis elegans. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* **314**, 1–340.

Xu, Z., Page, R.C., Gomes, M.M., Kohli, E., Nix, J.C., Herr, A.B., Patterson, C. & Misra, S. (2008) Structural basis of nucleotide exchange and client binding by the Hsp70 cochaperone Bag2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 1309–1317.

Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Uitti, R.J., Calne, D.B., Stoessl, A.J., Pfeiffer, R.F., Patenge, N., Carbajal, I.C., Vieregge, P., Asmus, F., Müller-Myhsok, B., Dickson, D.W., Meitinger, T., Strom, T.M., Wszolek, Z.K. & Gasser, T. (2004) Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* **44**, 601–607.

表 1. 本研究で用いた *C. elegans* の系統

| Strain | Genotype |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| N2 | Wild type |
| CZ2060 | <i>juls137 [Pflp-13::snb-1::gfp] II.</i> |
| KU17 | <i>lrk-1(km17) I.</i> |
| KU1025 | <i>lrk-1(km17) I; juls137 II.</i> |
| KU1101 | <i>juls137 II; unc-23(ok1408) V.</i> |
| KU1102 | <i>juls137 II; unc-23(e25) V.</i> |
| KU1103 | <i>bag-1(tm2899) I; juls137 II.</i> |
| KU1104 | <i>unc-101(m1) I; juls137 II; unc-23(e25) V.</i> |
| KU1105 | <i>juls137 II; hsp-1(km57) IV; unc-23(ok1408) V.</i> |
| KU1106 | <i>juls137 II; hsp-1(km58) IV; unc-23(e25) V.</i> |
| KU1107 | <i>juls137 II; hsp-1(km59)/+ IV; unc-23(e25) V.</i> |
| KU1108 | <i>juls137 II; hsp-1(km57) IV.</i> |
| KU1109 | <i>lrk-1(km17) I; juls137 II; hsp-1(km57) IV.</i> |
| KU1174 | <i>juls137 II; unc-23(e25) V; Ex[Punc-23::unc-23 + Pmyo-2::dsred-monomer].</i> |
| KU1175 | <i>juls137 II; unc-23(e25) V; Ex[Plrk-1::lrk-1::venus + Pofm-1::dsred-monomer].</i> |
| KU1176 | <i>lrk-1(km17) I; Ex[Pflp-13::lrk-1::venus + Pflp-13::manII::mcherry + Pofm-1::dsred-monomer].</i> |
| KU1177 | <i>lrk-1(km17) I; unc-23(e25) V; Ex[Pflp-13::lrk-1::venus + Pflp-13::manII::mcherry + Pofm-1::dsred-monomer].</i> |
| KU1178 | <i>lrk-1(km17) I; hsp-1(km58) IV; unc-23(e25) V; Ex[Pflp-13::lrk-1::venus + Pflp-13::manII::mcherry + Pofm-1::dsRed-Monomer].</i> |
| KU1179 | <i>lrk-1(km17) I; hsp-1(km58) IV; Ex[Pflp-13::lrk-1::venus + Pflp-13::manII::mcherry + Pofm-1::dsred-monomer].</i> |
| KU1180 | <i>lrk-1(km17) I; Ex[Plrk-1::lrk-1::flag + Pofm-1::dsred-monomer]</i> |
| KU1195 | <i>lrk-1(km17) I; unc-23(e25) V; Ex[Plrk-1::lrk-1::flag + Pofm-1::dsred-monomer].</i> |

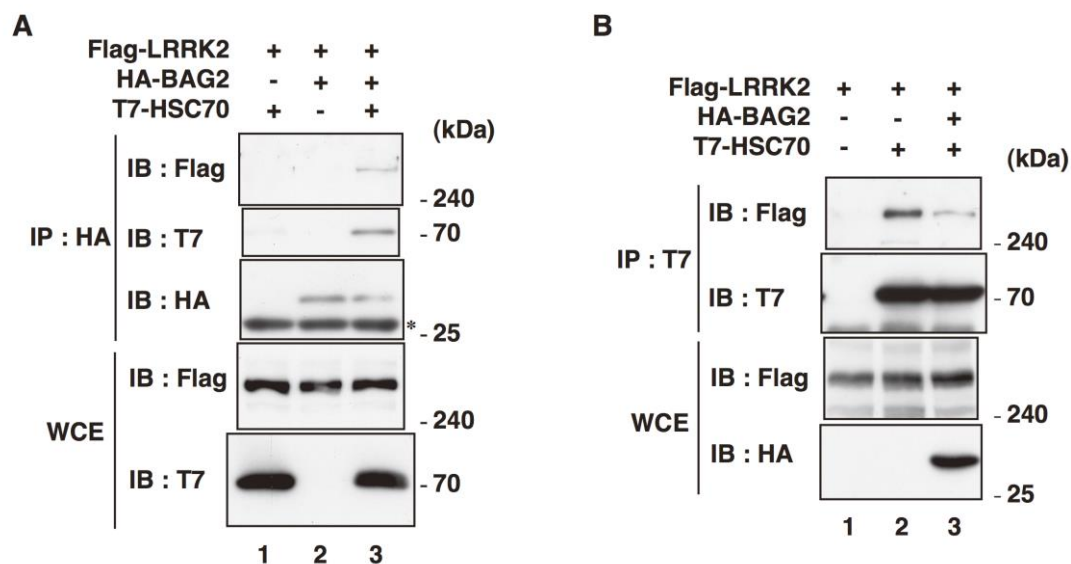


図 1. LRRK2 と BAG2 及び HSC70 の結合

(A,B) COS-7 細胞に図に示す組み合わせで FLAG-LRRK2、HA-BAG2、T7-HSC70 を発現させた。細胞抽出液 (WCE: Whole-cell extracts) と免疫沈降物を、図に示す抗体を用いて免疫ブロッティングにて解析した。アスタリスク (*) は IgG の軽鎖を示している。

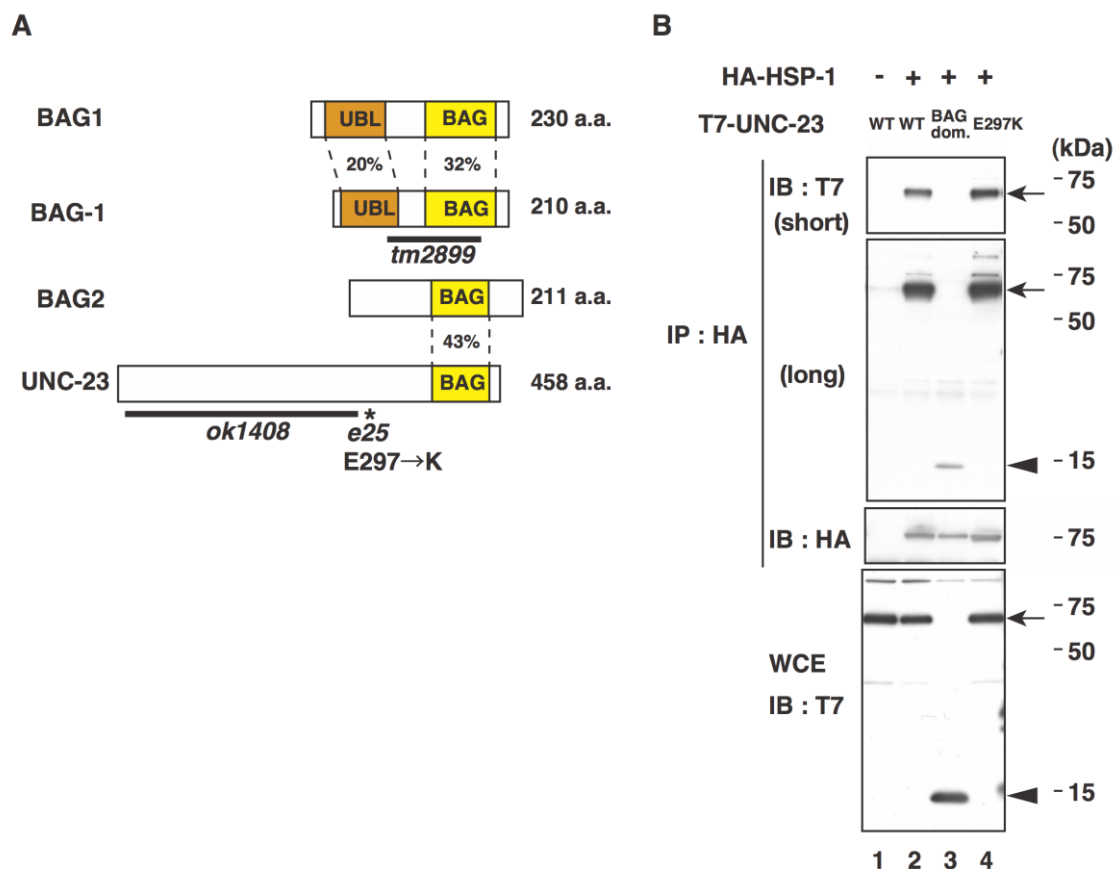


図 2. HSP-1 と UNC-23 の結合

(A) BAG-1 及び UNC-23 の構造。BAG-1 と BAG1、及び UNC-23 と BAG2 のモデル図と構造比較を示す。図中に示したドメインは、ユビキチン様ドメイン (UBL) と BAG ドメインである。図中に各ドメインのアミノ酸類似性も示す。モデル図の下に示した太線は、各変異体の欠損領域を示している。*e25* 変異の点変異箇所はアスタリスクで示している。(B) HSP-1 と UNC-23 の結合。COS-7 細胞に HA-HSP-1、T7-UNC-23[野生型、BAG ドメイン、E297K]を図に示す組み合わせで発現させた。細胞抽出液と免疫沈降物を、抗 HA 抗体を用いて免疫ブロッティングにて解析した。矢印と矢頭は、それぞれ T7-UNC-23、BAG ドメインのみを含む T7-UNC-23[BAG domain]を示している。

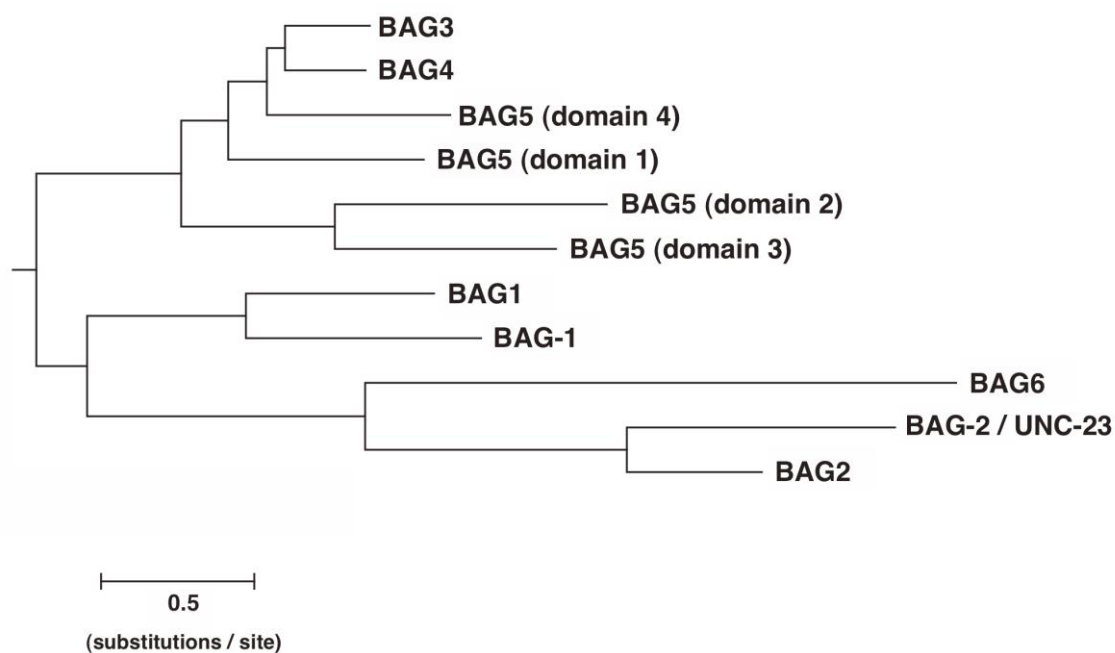


図 3. BAG ファミリーメンバーの遺伝学的系統樹

線虫 *C. elegans* 及びヒトの BAG ファミリーメンバーの遺伝学的系統樹を示す。図に示したタンパク質の BAG ドメイン配列を比較した。BAG5 は 4 つの BAG ドメインを持つため、カッコ内にドメインの番号を記載。系統樹は MEGA5.2 を用いて作製。スケールバーは、進化距離を示している。ヒト BAG タンパク質は BAG1-BAG6 まで 6 つあるが、線虫には BAG-1 と BAG-2/UNC-23 の 2 つしかない。

*e25 (E297→K)

| | | | |
|--------|-----|---------------------------------------------------------------|-----|
| BAG2 | 1 | MAQAKINAKANEG-RFCRSSSMADRSSRLLESLDQLELRVEALREAATAVEQEKEILLEM | 59 |
| UNC-23 | 261 | LTSPITEGKPKRGKKLORNQSVVDFNAKTIVTLDKIELQVEQLRKKAAELEMEKEQILRS | 320 |
| | | | |
| BAG2 | 60 | IHSIQNSQDMRQISDGEREELNLTANRLMGRITLTVEVSVETIRNPQQQESLKHATRIIDE | 119 |
| UNC-23 | 321 | LGEISVHNCMFKLEECDREEIEAITDRLTKRKTQVVVETPRNEEQKKALEDATLMIDE | 380 |
| | | | |
| BAG2 | 120 | VVNKFLDDLGNKSHLMSLYSACSSEVPHGPVDQKFQSIIVIGCALEDQKKIKRRLETLLR | 179 |
| UNC-23 | 381 | VGEMMHSNIEKAKLCLQTYMNACSYEETAGATCNFLKIIIQCAADDQKRIKRRLENLMS | 440 |
| | | | |
| BAG2 | 180 | DIENSDKAIK-LLEHSGAGSKTLQONAESRFN | 211 |
| UNC-23 | 441 | QIENAERTKADLMD-----DQSE | 458 |

図 4. UNC-23 と BAG2 の比較

UNC-23 と BAG2 の *e25* 変異近傍のアミノ酸配列を示す。同一又は類似のアミノ酸配列は、それぞれ黒又は灰色の網掛けにて表示。*e25* 変異の位置をアスタリスクで示す。下線は BAG ドメインの位置を示す。

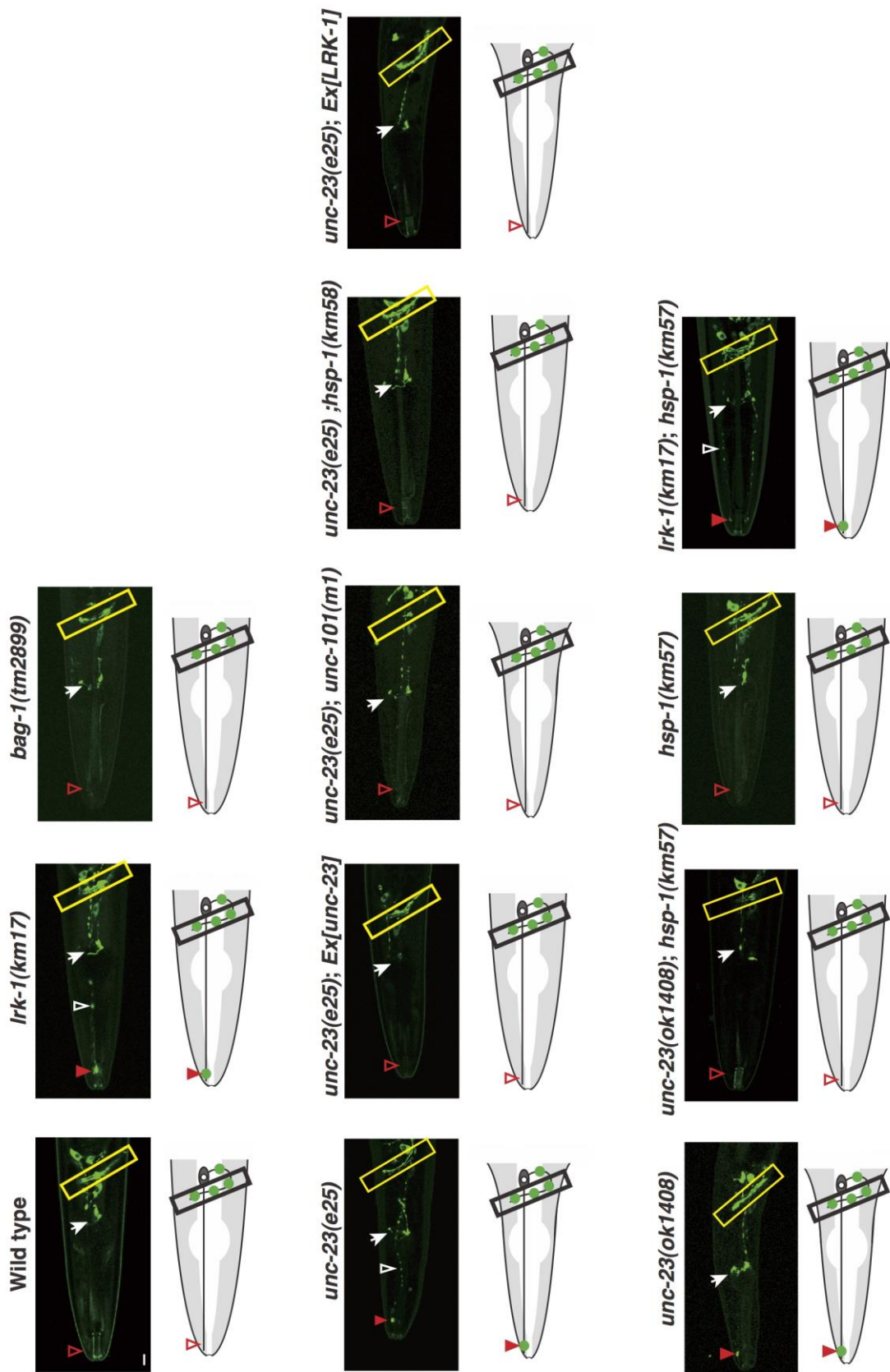


図 5. *unc-23* 変異と *hsp-1* 変異が SV タンパク質の局在に与える影響
成虫の双器感覚神経における SV タンパク質の局在を示す。樹状突起の末端、樹状突起、軸索をそれぞれ赤い矢頭、白い矢頭、黄色い四角で示している。SNB-1::GFP の発現は、咽頭神経（白い矢印）と未同定の複数の神経において確認された。画像は共焦点蛍光顕微鏡により Z 軸を動かし撮影された複数枚の画像を重ねたものである。画像の左側が線虫の頭部である。図中のスケールバーは 10 μ m を示している。

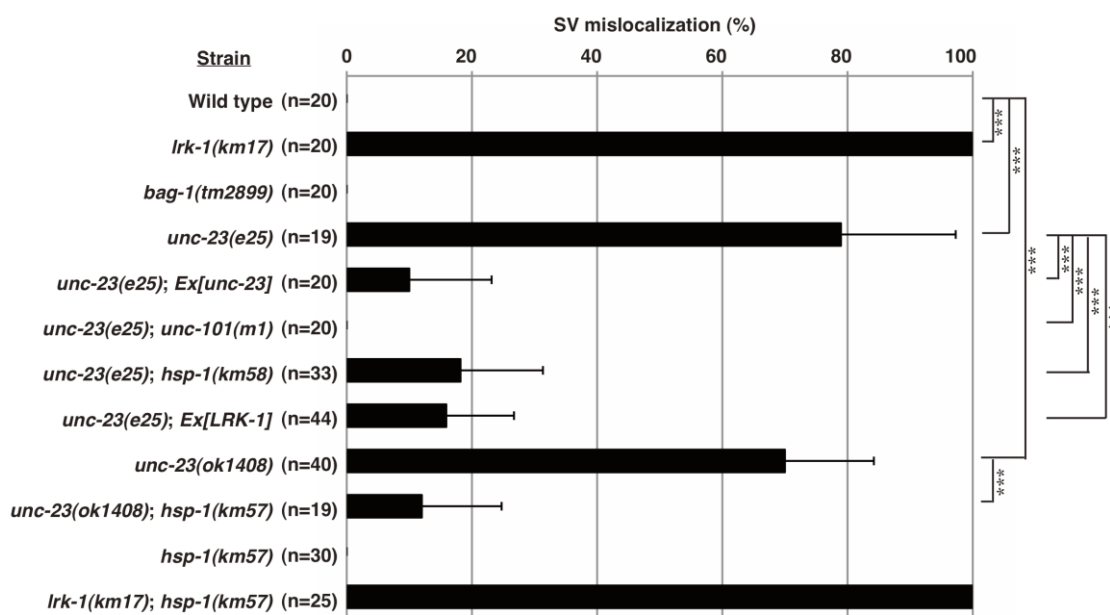


図 6. SNB-1::GFP の局在異常を示す個体の割合
 観察した個体の数を示す。P 値は、フィッシャーの正確確率検定を用いて算出した。*** $P < 0.001$ 。

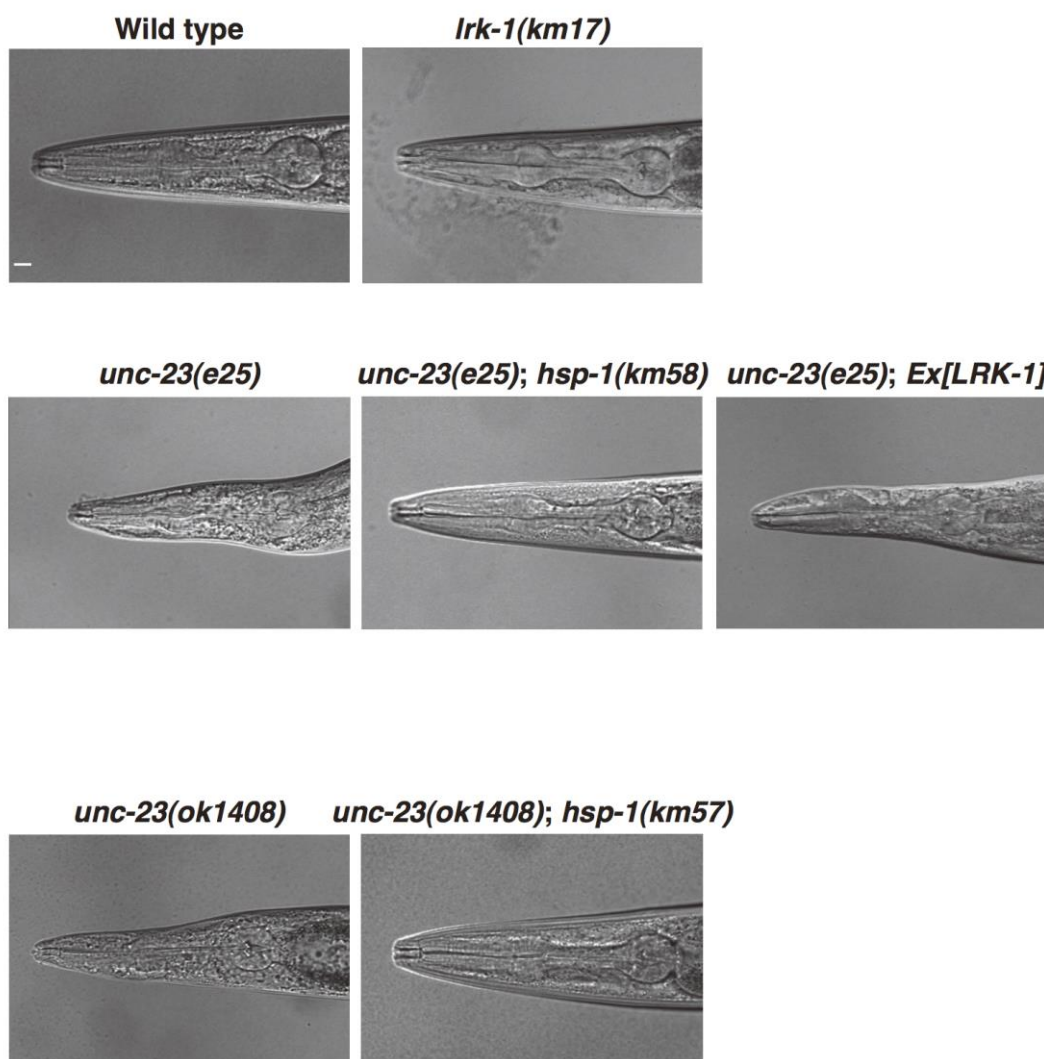


図 7. *unc-23* の抑圧変異としての *hsp-1* 変異の単離

線虫の頭部形態を示す。*unc-23(e25)* および *unc-23(ok1408)* 変異体は、どちらも bent-head の表現型を示す。*hsp-1(km57)* 変異および *hsp-1(km58)* 変異は、*unc-23* 変異体の示す bent-head の表現型を抑制した。図の左側が線虫の頭部。図中のスケールバーは 10 μm を示している。

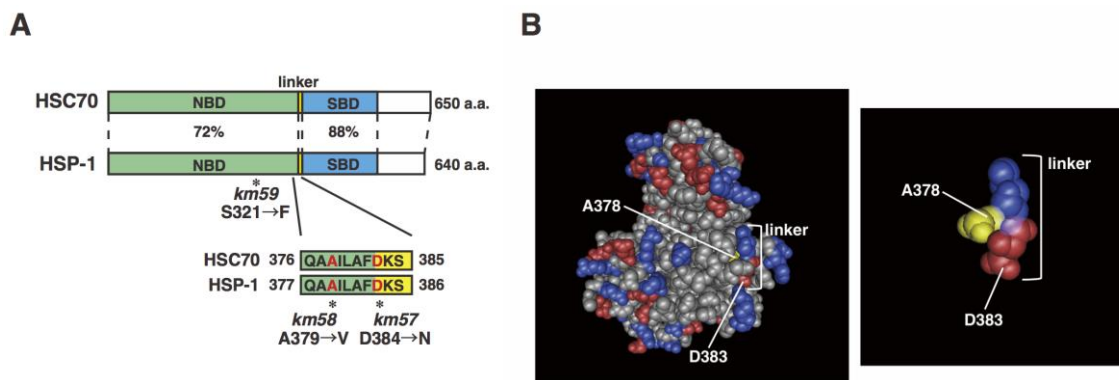


図 8. HSP-1 の構造

(A) 線虫 *C. elegans* の HSP-1 及び哺乳動物 HSC70 のモデル図を示す。ヌクレオチド結合ドメイン (NBD)、リンカー領域、基質結合ドメイン (SBD) をそれぞれ緑、黄色、青で示している。図中に、それぞれのドメインのアミノ酸類似性を示す。*km57* 変異、*km58* 変異の付近の HSP-1 及び HSC70 のアミノ酸配列を示す。*km59* 変異の位置はアスタリスクで示す。

(B) ウシ HSC70 の三次元立体構造を示す。立体構造上で、383 番目のアスパラギン酸 (HSP-1 の 384 番目のアスパラギン酸に対応する) は 378 番目のアラニン (HSP-1 の 379 番目のアラニンに対応する) の近傍に存在する。

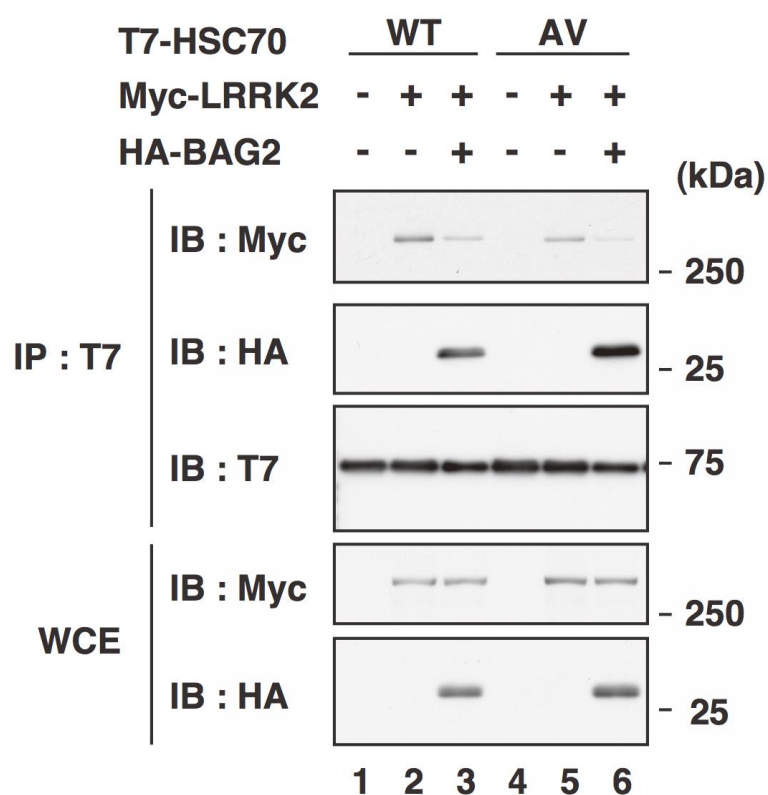


図 9. A378V 変異が HSC70 と LRRK2 及び BAG2 との結合に及ぼす影響

COS-7 細胞に T7-HSC70[野生型、A378V(AV)変異型]、Myc-LRRK2、HA-BAG2 を図に示す組み合わせで発現させた。細胞抽出液、免疫沈降物を、図に示す抗体を用いて免疫ブロッティングにて解析した。

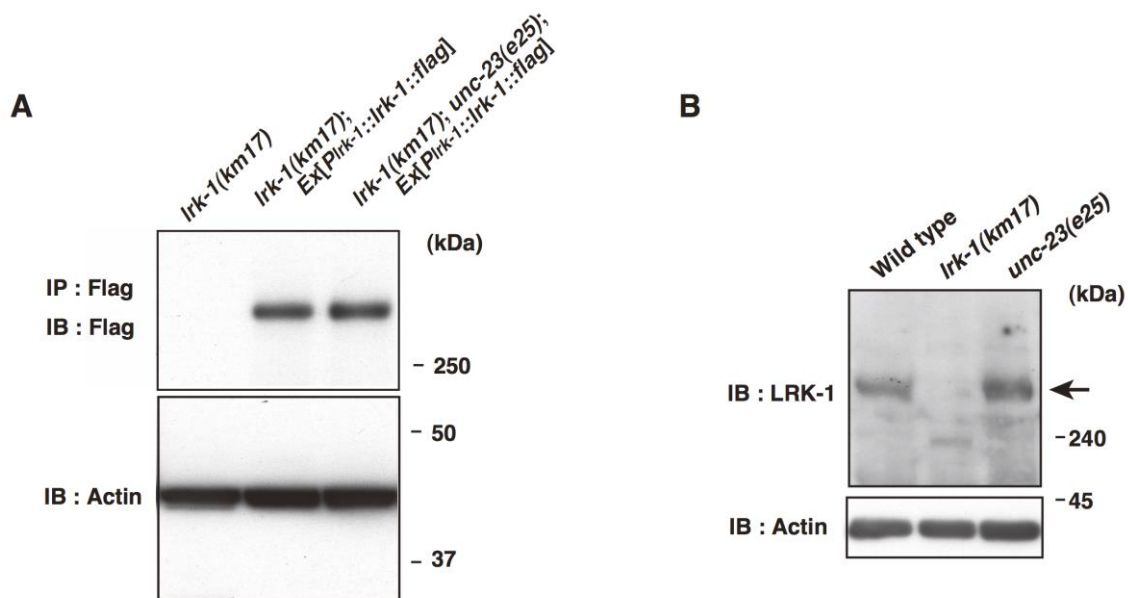


図 10. *unc-23* 変異による LRK-1 のタンパク質量への影響

(A) FLAG で標識した LRK-1 の免疫ブロッティング。それぞれの個体から採取した細胞抽出液を抗 FLAG 抗体で免疫沈降及び免疫ブロッティングした。アクチンはローディングコントロールとして使用した。

(B) 内在性 LRK-1 の免疫ブロッティング。上段のパネルは抗 LRK-1 抗体による免疫ブロッティングを示している。内在性 LRK-1 の位置は矢印で示す。下段のパネルはローディングコントロールとして用いたアクチンを示している。

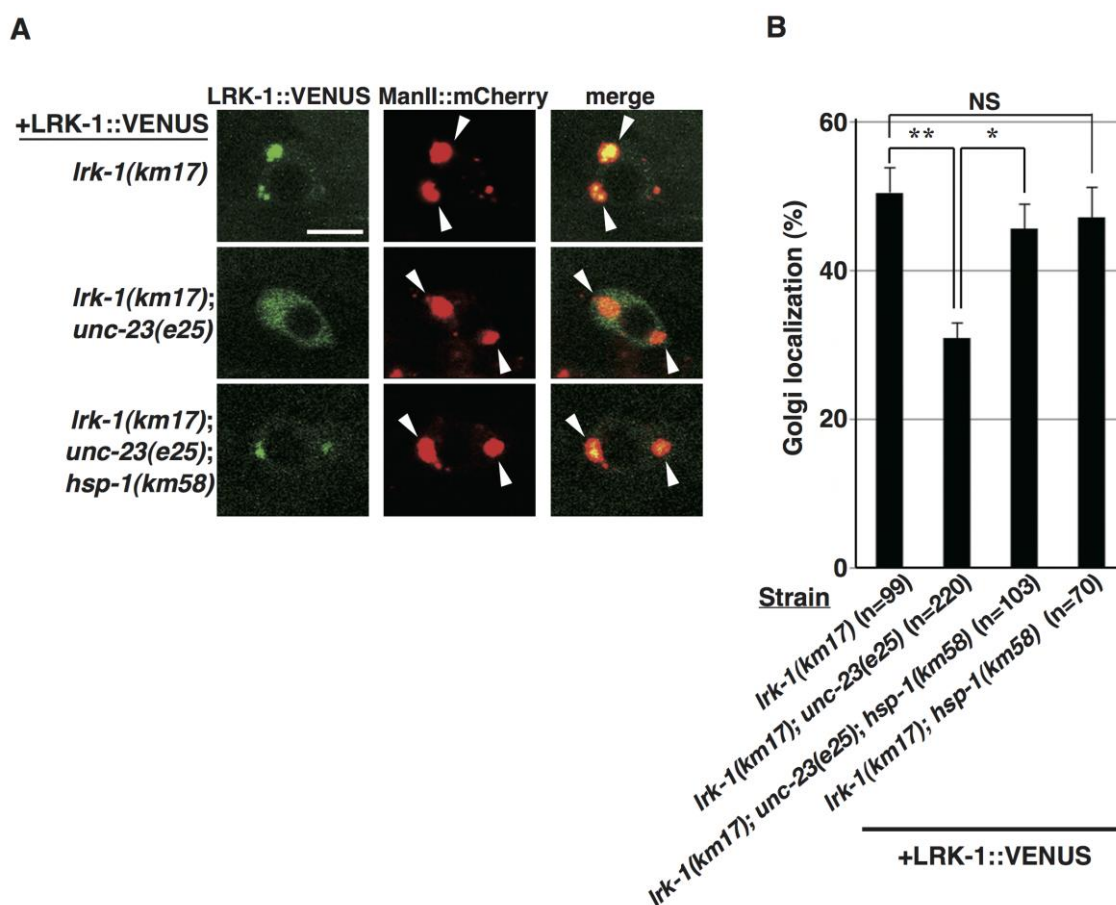


図 11. *unc-23* 変異による LRK-1 の局在への影響

(A) LRK-1 の局在。LRK-1::VENUS とゴルジ体マーカーである ManII::mCherry を、*flp-13* プロモーターを用いて頭部神経で発現させた。左の画像を重ね合わせたものを右のパネルで示している。LRK-1:VENUS が発現している細胞のゴルジ体を白い矢頭で示している。線虫 *C. elegans* のゴルジ体は、小さなゴルジ体が層構造を作ることによって構成されている(Chen *et al.* 2006)。スケールバーは 5 μ m を示している。

(B) ゴルジ体に強く局在する LRK-1 の割合。観察した個体の数を示す。エラーバーは 95%信頼区間を示す。 P 値はフィッシャーの正確確率検定を用いて算出した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、NS (not significant)。

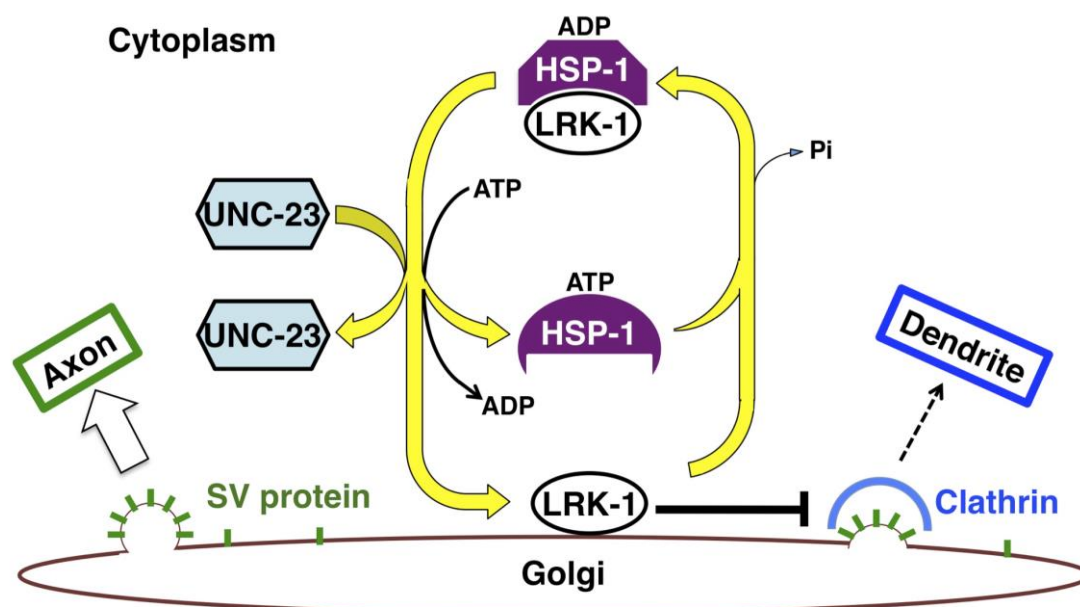


図 12. モデル図

ADP 結合型の HSP-1 は、細胞質中で LRK-1 と結合している。ここに UNC-23 が結合し、HSP-1 の ADP/ATP 交換反応を促進することで、LRK-1 が HSP-1 より解離する。解離した LRK-1 はゴルジ体に局在して、SV タンパク質が樹状突起への輸送に選別されることを防ぐことで SV タンパク質の極性的な局在を抑制する。