

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592223

研究課題名（和文） 緑内障の分子機構追究：オプチニューリン結合蛋白の in utero 機能抑制解析

研究課題名（英文） Molecular analysis of glaucoma-developing mechanism: Investigation of an OPTN-interacting protein

研究代表者

大坪 正史（OHTSUBO MASAFUMI）

浜松医科大学・メディカルフォトリクス研究センター・助教

研究者番号：10327653

研究成果の概要（和文）：OPTN 相互作用タンパクのうち、眼組織で発現するものについて機能解析を行い、タンパク品質管理系や ER ストレスと関連があるとされる空胞様異常構造の形成に関与するタンパクとして、SLC4A2 を絞り込んだ。緑内障家系で見出された G26E アミノ酸置換による機能の変化について検討を加え、SLC4A2 タンパクの断片化・局在の変化など異常様態を呈し、空胞様異常構造の形成にも影響することを見出した。このことから、SLC4A2 がタンパク品質管理の一端を担い、断片化により空胞様異常構造という生き残りのための構造の構築が不十分となることが、緑内障発症の原因となる可能性が示唆された。我々が新規に発見した OPTN の品質管理系での機能は、最近報告された筋萎縮側索硬化症（ALS）における OPTN を含む凝集体の観察とも関連が推測できる。

研究成果の概要（英文）：Among OPTN-interacting proteins, we screened those which are expressed in retina, and carried out the functional analysis. A solute carrier family protein SLC4A2 was particularly analyzed because we found the protein is involved in the vacuole formation which has been reported to have a certain relation with the protein quality control system and ER stress. We found an amino acid substitution p.G26E of SLC4A2 in a glaucoma patient family and various differences between an ordinary type p.26G and a variant p.26E regarding the behavior. The differences included changes in the intracellular localization, fragmentation of SLC4A2 itself in p.26E but not in p.26G, and less extent of vacuolization in p.26E than in p.26G. From this, it was suggested that SLC4A2 plays some roles in the protein quality control. Furthermore, it was even possible to speculate that the insufficient formation of vacuoles caused by the amino acid change G26E is responsible for the onset of glaucoma. Our new finding on the function of OPTN in the protein quality control system may relate to the OPTN-containing inclusion body observed in the tissues of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：緑内障、相互作用タンパク、遺伝子、シグナル伝達、神経科学、プロテオーム、生体分子

1. 研究開始当初の背景

緑内障の既知原因遺伝子のうちオプチニューリン (OPTN) は視神経変性への直接の関与が想定される重要な遺伝子である。しかし、生体での機能は十分に明らかではない。

今までに、「ゴルジ体近傍への局在」、「酸化ストレス刺激などによる核移行」、「TNF α シグナルに関するアポトーシス保護機能」等が報告されている。また、変異による視神経保護能の破綻が、発症に関与することと考えられている。この過程で働くタンパク機能複合体およびその機序を解明することは、オプチニューリンが関与する緑内障の発症メカニズム (分子生物学的機序) の解明につながるだけでなく、新しい原因遺伝子の発見にも繋がると期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、酵母2ハイブリッド法を基として既に見出している OPTN 相互作用タンパクを機能解析することで、関わる発症機序を探ると共に、機能破壊により、緑内障臨床症状との関連を多角的に検証する。

(1) 培養細胞を用いた基礎検討: ① 網膜神経節細胞などで相互作用の確認。② モルフォリノ、siRNA あるいはアミノ酸置換などによる機能欠損遺伝子の導入による評価。③ OPTN-相互作用タンパク複合体全体の共免疫沈殿-質量分析計解析。

(2) 生体を用いた検討: ① 生体、眼組織での相互作用タンパクの発現の確認。② モルフォリノ、siRNA、機能破壊遺伝子を、子宮内胚または新生児、成体マウスへ導入し、緑内障への寄与を評価する。

(3) 絞り込んだ相互作用タンパクについて、さらに緑内障発症に繋がる機能の解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 細胞での評価:

同定した OPTN 相互作用タンパクのクローニングをおこない、タグ融合タンパクとして細胞内で発現させ解析する。

① Y2H により同定した相互作用遺伝子のクローニング、および、OPTN について変異遺伝子を作成する。

② 緑内障モデル細胞系への遺伝子導入による発現と細胞内局在確認。共免疫沈殿による相互作用の確認。

③ 加圧培養や、過酸化水素による酸化ストレスの付加による、形態変化、アポトーシス

など細胞障害を観察、検出。

④ 変異 OPTN や変異型相互作用タンパク遺伝子の導入による、相互作用タンパクの局在変化やアポトーシス応答の確認。

⑤ モルフォリノや siRNA、あるいは機能欠損遺伝子の細胞導入による、細胞死における役割の確認。

(2) 複合体全貌の検出:

CoIP-MS 法などの手法により、OPTN あるいは相互作用タンパクを含むタンパク機能複合体全体を単離・同定する。

① プルダウンアッセイによる共精製と二次元電気泳動による分離。

② MS 解析による同定。得られたタンパク群についても、細胞・組織内分布や、機能破壊による影響を検討する。

(3) 生体を用いた検討:

① 得られた相互作用タンパク遺伝子のラットの眼組織における発現を、in situ ハイブリダイゼーションや抗体免疫染色で解析し、機能の推定を行う。器官培養を行い、モルフォリノおよび機能欠損遺伝子の導入などを行う。

② 変異遺伝子導入あるいは siRNA による遺伝子破壊の個体での表現型の解析をおこなう。ALS 病で見られる OPTN 変異と病態との関連も念頭に置いて検討する。

4. 研究成果

(1) OPTN 相互作用タンパクの機能解析

相互作用タンパク遺伝子の、翻訳領域全長 cDNA のクローニング・変異導入を行った。遺伝子導入による発現と細胞内局在確認、共免疫沈殿による相互作用の確認を実施した。核移行など幾つかの機能解析について以下に例示する。

① 核移行に関する検討: 部分断片型 OPTN 発現ベクターと Y2H 法を用いて、相互作用部位を大まかに決定した。核移行関連タンパク RANBP の N 端部への強い結合を検出した。また、OPTN のゴルジ装置への局在に寄与する Rab8 の恒常的活性化変異体では OPTN との結合が減弱することを確認した。

② Ub 化の検討: 前項と同様の手法で、Ub の OPTN C 端部 (411-577aa) への結合を検出した。OPTN と機能類似性を示すタンパクとのアミノ酸配列比較で、保存領域を明らかにした。患者で同定されている OPTN 変異 H486R 周辺領域が、Ub との結合に必須であった。また、シグナル活性化に関する Lys63 分岐 poly-Ub と、タンパク分解に関わる Lys48 分岐 poly-Ub に関して、in vitro において、

OPTN との結合を検討した。

③ タンパク品質管理系の検討：SLC4A2 と OPTN の共発現による、Vacuole (空胞) 様の異常構造の出現を見出した。E50K 変異 OPTN について、SLC4A2 との結合能の低下と、空胞形成の増加を見出した。この時、タンパク品質管理系の破綻と ER ストレスの発生を示唆する結果を得た。OPTN については、E50K 変異ではタンパク品質管理系の破綻による ER ストレスの発生が、また、H486R 変異については、Ub 結合能の低下によるユビキチン化およびプロテアソーム分解系（これらも ERAD 系に含まれる）の機能低下による ER ストレスの増大が起因する可能性を見出している。

(2) 複合体全貌の検出：架橋剤処理の後、HA-SLC4A2 および FLAG-OPTN に対する抗体で2段階の Co-IP を実施して、OPTN あるいは相互作用タンパクを含むタンパク機能複合体全体の単離・同定を試みた。

① また、転写調節タンパク、ヒストンおよび RNA に関するタンパク等、核に局在するものも多く同定した。

② 核内タンパク NRL：視細胞の分化に関する核内タンパク NRL と OPTN との結合に関して、培養細胞への共遺伝子導入および細胞質/核の分画後の共免疫沈殿の結果から、核内で結合していること、OPTN の UBD ドメインを含む第4領域と NRL の bZIP ドメインを含む後半領域を介して結合していることを見出した。また、別途、OPTN と相互作用するタンパク質の細胞内（核内）での結合について、顕微鏡による可視化をおこなうことを試みた。可視化には、PLA (Proximity Ligation Assay) 法を用いた。PLA 法では、ふたつのタンパクが近接（約 40 nm 以内）した場合のみ、ポジティブシグナルが得られる。共遺伝子導入した細胞における OPTN-NRL の結合は、PLA シグナルとして核内で特異的に検出された。

(3) 個体組織での検討：これまでに Y2H 法により得られた相互作用タンパクのうち(1)により評価したもの、および(2)により得られたものから、Vesicle Trafficking に関与し OPTN のゴルジ体への局在に関係している Rab8、ER ストレスおよびタンパク品質管理に関係する WFS1、TGF β 受容体と結合シグナル経路を抑制する TRAP1、上述の SLC4A2、NF κ B 経路の S/T キナーゼである TBK、その他に、WDR77、NDR1 を選択して、発現解析用の抗体および、機能阻害用 siRNA について評価をおこなった。

成体における眼組織における発現解析を、抗体免疫染色により実施した。角膜、網膜、水晶体、胸膜に区分して試料とした。SLC4A2

を初めとして、全ての候補タンパクの場合でも、網膜での発現が確認された。siRNA は、培養細胞においては、これらのタンパクの産生を抑制することを確認した。

(4) OPTN 相互作用タンパクについて機能解析を行い、タンパク品質管理に関わる機能を有すると示唆されるタンパクである SLC4A2 を絞り込み、さらに検討を加えた。得られた知見の概要を示す。

① SLC4A2 遺伝子、タンパク品質管理の検討：これまでに、培養細胞への OPTN との共遺伝子導入で空胞様異常構造 (Vacuole) が形成されること、既知の緑内障原因遺伝子候補領域に座位し、同領域を決定した緑内障家系において疾患発症の有無と相関するアミノ酸置換変異 (G26E) が存在することを見出している。今回の検討では、(1) OPTN と共遺伝子導入した場合、E50K 変異 OPTN は野生型 OPTN に比して、Vacuole 形成を有意に増加させること、(2) E50K 変異体の SLC4A2 との結合の低下、アポトーシスの指標である PARP 断片化の増加、ER ストレスセンサーである PERK リン酸化の亢進が起ること、(3) 変異 SLC4A2 は野生型と異なり、OPTN との共導入に伴い、部分分解を受けることを見出した。

以上の結果より、OPTN がタンパク品質管理系で機能し、E50K 変異は同系の破綻により ER ストレスを引き起こす可能性が示された。緑内障発症の機序に新たな知見を加えると考える。品質管理系での機能は、最近報告された筋萎縮側索硬化症 (ALS) における OPTN を含む凝集体の観察とも関連が推測される興味深い結果である。

(5) そこで、SLC4A2 の G26E アミノ酸置換が緑内障に関わる可能性について、さらに以下の検討を加えた。

① G26E の評価：SLC4A2 の G26E アミノ酸置換体について、結合依存的な検出手法である PLA 法により評価を実施した。空胞様異常構造の周囲に顕著に集積し、その際、当該構造の発生頻度が低下することを見出した。また、p.26E 型の SLC4A2 は一部が断片化することからも、SLC4A2 がタンパク品質管理の一端を担い、断片化により空胞様異常構造という生き残りのための構造の構築が不十分となること、緑内障発症の原因となる可能性も示唆された。また、この集積は、緑内障における E50K 変異 OPTN を細胞に導入した際に認められる細胞内顆粒状局在とは異なるものと考えられる。

② 部分分解の検討：各種タンパク分解経路に関する阻害剤を用いて、SLC4A2 の p.G26E 変異における部分分解への影響を検討した。

Proteasome 阻害剤処理した場合のみ、断片化されたバンドの量が増加した。部分分解の機序は今だ明らかではないが、少なくとも、部分分解された SLC4A2 は、Proteasome 経路により分解されることが推測された。

③ OPTN の SLC4A2 との結合領域の同定:人為的部分欠失 OPTN 変異体を用いて、SLC4A2 との共遺伝子導入後の共免疫沈殿法により、結合部位の同定を試みた。OPTN 特異的な第 2 領域を欠損した場合、SLC4A2 との結合が見られず、第 4 領域欠損体でも結合能低下の傾向が認められた。第 4 領域は、様々な蛋白と結合する部位であることは知られており、また、ユビキチン結合領域が含まれることから、これら 2 つの領域は、ERAD 活性にとっても重要であると推測される。

以上のように、OPTN 相互作用タンパクのうち、眼組織で発現するものについて機能解析を行い、タンパク品質管理系や ER ストレスと関連があるとされる空胞様異常構造の形成に関与するタンパクとして、SLC4A2 を絞り込んだ。緑内障家系で見出された G26E アミノ酸置換による断片化・局在の変化など異常様態を見出した。このことから、SLC4A2 がタンパク品質管理の一端を担い、断片化により空胞様異常構造という生き残りのための構造の構築が不十分となることが、緑内障発症の原因となる可能性が示唆された。我々が新規に発見した OPTN の品質管理系での機能は、最近報告された筋萎縮側索硬化症 (ALS) における OPTN を含む凝集体の観察とも関連が推測できる。

OPTN に関しても、計画当初の緑内障のみの原因遺伝子としてしか知られていなかった状況から、遂行中に、ALS の原因遺伝子ともなることが明らかとなった。表現型検討について、視機能への影響以外に、神経細胞における凝集体の形成のように、主観的に変異の影響を把握しやすい評価法も可能となった。本研究で得られた知見を基盤として、続く研究においては、ALS における変異におけるタンパク品質管理機能への影響の差違などについても、それら評価法を交えて、遂行していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 5 件)

1) 大坪正史、高 潔、堀田喜裕、蓑島伸生、蛋白品質管理機構の破綻と ER ストレス発生の観点に基づく緑内障発症機構の分子解

析: オプチニューリン相互作用蛋白 SLC4A2 の挙動と役割の検討 (Molecular analysis of glaucoma-developing mechanism from a novel viewpoint based on the failure of endoplasmic reticulum quality control system: Investigation of an OPTN-interacting protein SLC4A2)、第 34 回日本分子生物学会年会、2011.12/14(水)、パシフィコ横浜 (神奈川県)

2) 大坪正史、タンパク品質管理系の OPTN による制御と SLC4A2 変異の検討、第 3 回浜松医科学シンポジウム: 2011.2/25(金)、浜松医科大学 (静岡県)

3) 大坪正史、細野克博、高 潔、Mary K. Wirtz、堀田喜裕、蓑島伸生、緑内障原因遺伝子オプチニューリンによるタンパク品質管理系の制御の可能性の検討 (The possibility for protein maintenance by glaucoma-causative gene OPTN)、第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会 合同大会 (BMB2010)、2010.12/10(金)、神戸ポートアイランド (兵庫県)

4) 大坪正史、Thanseem Ismail、細野克博、堀田喜裕、蓑島伸生、Isolation of proteins interacting with optineurin, a glaucoma-causative gene product (緑内障原因遺伝子産物オプチニューリンと相互作用するタンパクの同定)、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 12 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

5) 大坪正史 (Masafumi Ohtsubo), Thanseem Ismail, 細野克博 (Katsuhiko Hosono), Ryo Asaoka, Chunxia Wang, Hiroshi Nakanishi, Hiroyuki Mineta, Yoshihiro Hotta, Shinsei Minoshima, Isolation of proteins interacting with optineurin, a product protein of glaucoma-causative gene、第 9 回慶北-浜松合同医学シンポジウム (The 9th Kyungpook-Hamamatsu Joint Medical Symposium, Hamamatsu Meeting)、2009 年 9 月 25 日、慶北医科大学(中国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大坪 正史 (OHTSUBO MASAFUMI)

浜松医科大学・メテオルフォニクス研究センター・助教
研究者番号: 10327653

(2) 研究分担者

大石 健太郎 (OHISHI KENTAROU)

浜松医科大学・メテオルフォニクス研究センター・助教
研究者番号: 80345826

細野 克博 (HOSONO KATSUHIRO)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号: 60402260