

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592622

研究課題名(和文) 筋萎縮性側索硬化症との発症起因の共通性に基づいた緑内障発症機構解析

研究課題名(英文) Analysis of pathogenic mechanism of glaucoma based on commonality with Amyotrophic lateral sclerosis

研究代表者

大坪 正史(Ohtsubo, Masafumi)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・助教

研究者番号：10327653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：OPTN相互作用蛋白として見出したSLC4A2が形成する空胞様異常構造および、類縁現象であるOPTNの緑内障E50K変異体が細胞内で形成するOPTN顆粒について、関わるシグナル伝達経路、ALS変異と緑内障変異での形成の違い、細胞内局在について検討を加えた。これらの異常蛋白蓄積現象は、オートファジー誘導により抑制された。この抑制は、ALS原因遺伝子TARDBPの細胞内凝集体形成でも同様にみとめられた。他のALS凝集体にもOPTNが検出される。オートファジー能を超える異常蛋白の過剰蓄積あるいはOPTN変異による自身の機能低下が両疾患の発症機序であり、これを外的に補うことで発症抑制が期待できる。

研究成果の概要(英文)：For “the vacuole-like abnormal intracellular structure” (our finding) which is generated when an anion transport protein SLC4A2 is coexpressed with optineurin (OPTN) and “the OPTN granules” which is induced in cultured cells by the glaucomatous OPTN mutation E50K, we analyzed the signaling pathway, formation difference between ALS- and glaucomatous-mutation, and, the cellular localization. In addition, we found that these phenomena related to the abnormal protein accumulation were suppressed by induction of autophagy. This effect was also observed in case of the intracellular inclusion generated by another ALS-causative gene TARDBP. It was reported that OPTN is detected in the inclusion bodies of ALS patients' nerve cells caused by SOD1 or TARDBP mutation. It suggested that over-accumulation of abnormal protein or decreasing of autophagy function of OPTN by mutation is possible disease onset mechanism and that inducing autophagy possibly suppresses the onset of ALS and glaucoma.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：緑内障 筋萎縮性側索硬化症 異常蛋白蓄積 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

オプチニューリン (OPTN) は、緑内障原因遺伝子として知られ、視神経の変性に対する何らかの保護作用が推測されてきた。一方、最近になり、同遺伝子の変異により ALS (筋萎縮性側索硬化症) が起こる事が報告された (Maruyama et al. Nature, 2010)。我々は以前から、緑内障の障害 (= 変性) 部位が視神経であることから、『脳の延長としての眼』の疾患として捉え、中枢神経における変性疾患と共通の分子的背景の存在を想定して研究を続けてきた。

上記 ALS の報告では、変異による NF- κ B 活性の変化の他に、発症部位である脊髄の細胞で検出される OPTN およびその他の ALS 原因遺伝子産物タンパクの凝集体の存在が示された。この細胞内凝集体の形成は、空胞様の異常構造と同様に、ER ストレスが惹起された場合に神経変性疾患で見られる現象である。これらの現象は、細胞内に蓄積した毒性となる変性タンパクの蓄積を処理しようとする「細胞の生き残りのための最期応答」であり、これら構造を形成できない場合 (例: 若年性アルツハイマー) は、細胞は、より速やかにダメージを被ると考えられる。

一方、緑内障の研究でも、OPTN の疾患原因性を NF- κ B との関連で論じる研究が多いが、ER ストレス応答が誘導されるとの報告 (Doh SH, et al. Brain Res., 2010) もある。

さらに、我々は、これまでに、OPTN 相互作用タンパクの同定をおこない ER 内シャペロンタンパク Bip やユビキチンプロテアソーム系のタンパクと相互作用し、ER ストレスを制御することを見出し、OPTN が、細胞内蛋白質品質管理の機能を有すること、ER (小胞体) ストレスが緑内障発症の機序に重要な意義を持つことを示唆するデータを得てきた。また、OPTN 相互作用タンパクとして、膜内陰イオン輸送蛋白 SLC4A2 を見出した。この遺伝子は神経・眼において高発現している。我々は、緑内障のリンケージ解析に用いられた患者において、この遺伝子に、発症と相関するアミノ酸置換を伴う塩基変化を見出した。さらに、培養細胞で SLC4A2 と OPTN を過剰共発現した場合、細胞内に空胞様の異常構造が生じること、また興味深いことに、前記アミノ酸置換を持つ SLC4A2 は OPTN との共発現時に、部分分解を受けることを見出した。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も示唆される。

我々は、前述の独自に得てきた結果と ALS の知見を加味して、緑内障をタンパク品質管理機能の破綻による ER ストレスが惹起する障害と「仮定」する。この仮説は、同じ遺伝子が原因となる ALS で認められる現象も容易に理解できる。

また、NF- κ B 活性が関与するアポトーシス応答は、急性応答であり全ての細胞で起こりうる現象である。高齢発症で症状が緩慢に進行する緑内障を考えた場合、他の経路が関与する可能性は十分に大きい。本研究の仮説は、神経細胞内への異常タンパクの蓄積を起因とするものであり、この「異常タンパクの蓄積は、非分裂細胞であるが故に、神経細胞では特異的に起こる」ことが推測できるため、疾患の発症部位特異性をも説明できる。検討する意義は大きいと考える。

2. 研究の目的

OPTN は、緑内障と ALS (筋萎縮性側索硬化症) の両疾患の原因遺伝子であり、共通する発症機序が存在すると考えられる。我々は、これまでに、OPTN が、細胞内蛋白質品質管理の機能を有すること、ER (小胞体) ストレスが緑内障発症の機序に重要な意義を持つことを示唆するデータを得てきた。また、ER ストレスに関連する空胞様異常構造を細胞に引き起こす SLC4A2 遺伝子を見出している。本研究課題では、1) OPTN の蛋白質品質管理機能の破綻、すなわち、異常蛋白蓄積に関する現象が疾患要因であることの検証、2) 緑内障家系の患者特異的に見出された SLC4A2 のアミノ酸置換体の意義の探求、を目的とする。

3. 研究の方法

これまで、文部科学省科研費などでの検討で、前述のように、OPTN が、細胞内蛋白質品質管理の機能を有すること、相互作用タンパクである膜内陰イオン輸送蛋白 SLC4A2 がこの OPTN の機能に重要な関与を果たしているであろうこと、さらに、緑内障患者家系において、この遺伝子にアミノ酸置換を伴う塩基変化を見出し、この塩基変化が SLC4A2 タンパクの部分分解に繋がることを見出した。このアミノ酸置換体は、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

本研究では、この OPTN のタンパク品質管理系での働きを検証すると共に、SLC4A2 の関わる空胞様異常構造の意義について追求する。SLC4A2 が、OPTN 機能に重要なタンパクであることが明らかになった場合は、同タンパク・遺伝子をターゲットとした疾患の診断法および治療法に繋がる基礎検討へ、研究内容をシフトさせる予定である。また、OPTN 自身の機能解析もおこなう。

4. 研究成果

(1) OPTN の蛋白質品質管理の破綻:

緑内障変異のうち症状が重篤である E50K 変異体では OPTN が一部凝集体 (foci) として存在し、空胞形成は極めて顕著に亢進

した。この際、fociの空胞周囲への局在が見られ、SLC4A2も共在した。HeLaS3細胞の他、神経由来細胞Neuro2Aなどにおいても、同傾向がみられた。

シグナル伝達関連蛋白について検討を加えた。OPTNの正常型及びE50K変異体での差異は認められなかったか、STRによる空胞形成の低下の際に、PERKリン酸化の低下、WFS1発現の上昇、LC3発現の上昇を認めた。

緑内障変異とALS変異の違いの検討: 緑内障原因変異H26D、E50K、M98K、H486RおよびALS原因変異Q314L、Q454E、E478G、K557T等を持つFLAGタグ付加OPTN発現プラスミドを作成した。これらをHAタグ付加SLC4A2と共に細胞に導入し、タグ抗体による免疫蛍光法で、顆粒および空胞を観察した。顆粒は、既報告があるE50K以外のH486Rなど緑内障変異でも、顕著に観察された。また、空胞形成についても、緑内障変異に顕著な亢進が見られた。一方、ALS変異では、Q314Lなど一部の變異で顆粒形成が見られたが、一概に顆粒は形成されず、空胞についても、A481Vに微細なモノがみられるのみで、形成は観察されなかった。

SLC4A2が関与する空胞形成およびfoci形成: 共焦点顕微鏡で、fociについて検討し、ゴルジマーカ周辺に存在するが完全に一致はしないこと、また、タイプラプス顕微鏡での経時的な観察により、ゴルジ体の部分分解物を(fociは)起源としないことを示唆する結果を得た。さらに、OPTNの顆粒形成/SLC4A2共存での空胞形成の過程についても、タイプラプス顕微鏡を用いて経時的に観察した。アミノ酸置換体は、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ている。

(2) オートファジー惹起によるレスキュー:

特定の薬剤(仮称STR)処理によって、前項の空胞の形成は、顕著に抑制され、foci形成も減少した。

前項の薬剤STRの効果がAP惹起によるものか、すなわちオートファジーを惹起することが当該構造形成を抑制し得るか否かを検討したところ、ラパマイシンによるAP誘導により同様の結果が得られた。また、3-MA処理によるAP阻害により薬剤の効果は抑制された。また、オートファジーマーカータンパクLC3蛋白量の上昇を認めた。

前項の応答について、他の培養細胞株HEK293FTや神経細胞系の培養細胞株(Neuro2a, PC-12)を用いて検討した。これらの細胞株においても、LC3蛋白量の上昇を確認した。また、Neuro2aで島状に固まった培養細胞集団像を観察し、増殖あるいは接着への影響が示された。

オートファジー経路: OPTNの関する凝集体の発症に関する役割を明らかにするために、STR作用経路の候補としてmTOR経路について検討した。STRおよびmTOR阻

害剤による活性化状態は、リン酸化特異的抗体を用いたウエスタンブロットで評価した。mTOR阻害剤は、mTORおよびその経路下流のp70S6Kのリン酸化を阻害した。一方、STRは、これらのリン酸化に影響を与えず、別経路によりオートファジーを活性化することが示唆された。

オートファジー誘導の確認: マーカー蛋白LC3に対するsiRNAを用いて、これら薬剤による効果が確かにオートファジー活性化によるものであることを確認した。2種のsiRNAのうち蛋白産生を低下させた1種は、これら薬剤の効果を無効化した。

(3) OPTN自身の性状:

報告がある酸化ストレスによるOPTN核移行は再現できなかったが、NRLとの共発現の場合に、OPTNも核内に局在することを見出した(常時少量は核内移行しており、それが(論文報告済みのNRLとの結合により)トラップされる可能性)。一方、相同タンパクNEMOに対応する領域が存在しない第2領域を欠く変異体では、刺激なしでの核内局在を、共焦点顕微鏡で確認した。また、OPTNの細胞内での主たる存在様式が高分子複合体であること、酸化ストレスがOPTNを共有結合3量体(cOPTN3)として固定すること、E50K変異OPTNは酸化ストレス刺激なしにcOPTN3を形成することを見出した。これらはfoci形成機序とも関わり得る知見であり、緑内障の発症メカニズムの理解にも有益である。

酸化ストレスで固定されるOPTN共有結合3量体(cOPTN3)の「3量体」は分子量からの演繹であったので、この分子構成についてさらに検討を加えた。2種のタグ(FLAGとGFP)付加OPTNを共導入して、PLA法による結合特異的可視化と、この時のHMCの分子量および2種の抗タグ抗体との反応性から、HMCが複数のOPTN分子を含むことを示す実証結果を得た(PLoS ONE 9(7): e101206, 2014)。

(4) OPTN以外の異常タンパク蓄積:

上述の緑内障性変異による異常タンパク蓄積に加え、TDP-43のALS性凝集体、すなわち、ALS原因遺伝子TDP-43(TARDBP蛋白)の部分断片の発現で培養細胞に形成される凝集体に対しても検討した。Casp3認識部位に基づく短縮体を作成し検討した結果、C端側の切断部位の断片TDP-25が顕著に細胞質に凝集する像が得られた。経時的観察により、凝集体に強い細胞毒性があることが示唆された。STR処理により、TDP-25凝集体のサイズが縮小したものや、細胞質や核にのみTDP-25が存在し、凝集体が完全に消失したものが観察され、(緑内障変異E50K変異による細胞内異常構造に加え本現象についても)改善効果が認められた。OPTNの緑内障変異E50Kのみならず、ALS原因遺伝子に

起因する異常蛋白蓄積に関する現象にも効果が示されたことは、両疾患の発症機序の共通性を示唆すると考えられる。

(5) モデル動物を用いた検討：

オートファジー誘導による異常タンパク蓄積の軽減が、*in vitro* でも発症の抑止に働くかについて、家族性 ALS の原因遺伝子 SOD1、および孤発性の ALS 患者の原因遺伝子 TARDBP の疾患モデルトランスジェニックマウス 2 系統を用いた検討を実施するために、まず

正常マウス STR のオートファジー誘導の検討をおこなった。脳、脊髄、および眼において、STR および mTOR 阻害剤の処理による LC3 の増加を認めた(筋では認められなかった)。

これを踏まえて、オートファジー誘導による異常タンパク蓄積の軽減が、*in vivo* でも発症の抑止に働くかについて、家族性 ALS の原因遺伝子 SOD1、および孤発性の ALS 患者の原因遺伝子 TARDBP の疾患モデルトランスジェニックマウス 2 系統を用いた予備検討を実施した。効果は、生存期間、発症時期、罹病期間における運動機能(後肢反射テスト、ローターロッドテスト、行動観察などによる)を評価項目とした。STR、mTOR 阻害剤投与群に、生存期間の延長と運動機能の改善傾向がみられた。本傾向は、メスよりもオスにより顕著であった。

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)

[雑誌論文](計2件)

Gao J, Ohtsubo M, Hotta Y, Minoshima S. Oligomerization of optineurin and its oxidative stress- or E50K mutation-driven covalent cross-linking: possible relationship with glaucoma pathology. *PLoS One*. 査読有. 2014, 9(7):e101206 doi:10.1371/journal.pone.0101206.

Wang C, Hosono K, Ohtsubo M, Ohishi K, Gao J, Nakanishi N, Hikoya A, Sato M, Hotta Y, Minoshima S. Interaction between optineurin and the bZIP transcription factor NRL. *Cell Biol Int*. 査読有. 2014, 38(1):16-25 doi:10.1002/cbin.10174.

[学会発表](計20件)

大坪正史、堀田喜裕、蓑島伸生. 柑橘系果皮由来成分による TDP-43 凝集体蓄積の抑制の検討、BMB2015、2015/12、神戸ポートアイランド(神戸)

大坪正史、堀田喜裕、蓑島伸生 An *in vitro* analysis of the induction mechanism of

the autophagy by a component chemical of citrus peel and its application to whole animal system, Aia-ARVO 2015、2015/2、東京フォーラム(東京)

大坪正史、高 潔、堀田喜裕、蓑島伸生. 緑内障原因遺伝子 OPTN 産物タンパク質 3 量体の構成に関する検討、第 59 回日本人類遺伝学会 / 第 21 回日本遺伝子診療学会合同大会、2014/11、タワーホール船堀(東京)

大坪正史、大泉 康、堀田喜裕、蓑島伸生. オートファジーを誘導する柑橘系果皮由来成分の mTOR 阻害剤との作用機序比較検討および生体への投与における作用の検討、第 37 回日本分子生物学会年会、2014/11、パシフィコ横浜(横浜)

大坪正史、高 潔、堀田喜裕、蓑島伸生. 緑内障および ALS の原因遺伝子 OPTN が関わる空胞様異常構造形成とオートファジーの関与、第 20 回日本遺伝子診療学会総会、2013/7、アクトシティ浜松コングレスセンター(浜松)

高 潔、大坪正史、堀田喜裕、蓑島伸生. Analysis of the Covalent High Molecular Weight Protein Complex Containing Optineurin and Its Relationship with Glaucoma. ARVO 2013 Annual Meeting、2013/05/06、シアトル(米国)

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. 第 34 回日本分子生物学会年会、2012/12、福岡国際会議場ほか(福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大坪 正史 (OHTSUBO MASAFUMI)
浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・助教

研究者番号：10327653