

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830035

研究課題名(和文) Optineurin変異によるALS発症メカニズムの分子基盤の解明

研究課題名(英文) Identification of molecular mechanism underlying ALS pathogenesis by Optineurin mutation

研究代表者

大澤 亮介(Ohsawa, Ryosuke)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：20719356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因遺伝子であるOptineurinの変異が、神経変性のメカニズムの一つと考えられるオートファジーの機能不全にどのように関わっているかを培養細胞を用いた実験系で検討した。その結果、傷害ミトコンドリアを除去する仕組みであるマイトファジー誘導時にOptineurinがミトコンドリア上に局在し、またOptineurinがマイトファジーの際に分解されていることを認めた。また別のALSの原因遺伝子であるTBK1と協調して機能していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study I investigated physiological roles of Optineurin, the causative gene for amyotrophic lateral sclerosis. Upon induction of mitochondrial damage, Optineurin is recruited to the surface of damaged mitochondria in the presence of Parkin, a gene shown to be mutated in Parkinson's disease. Furthermore, optineurin is degraded through mitophagy, suggesting that optineurin serves as an autophagic receptor during mitophagy. In addition, it is suggested that TBK1 cooperates with Optineurin to promote mitophagy.

研究分野：分子生物学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 神経変性疾患

### 1. 研究開始当初の背景

Optineurin 遺伝子は 2010 年に申請者らの研究グループが家族性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子として報告した。その後の国内外において、家族性および孤発性の ALS 発症例において Optineurin 遺伝子の変異が認められるとの報告が相次いでいるが、具体的な発症機序にどのように Optineurin が関わっているのかは全くの不明である。ALS の発症した患者の検体においては運動ニューロンに FUS もしくは TDP-43 陽性の封入体が認められることが知られているが、Optineurin はいずれの封入体にも局在することを申請者のグループは見いだしており、封入体の形成および ALS の発症に Optineurin が関わっていることが強く示唆される。

一方アルツハイマー病やパーキンソン病のような神経変性疾患の病理学的所見にも封入体がニューロンの細胞内に認められることがひろく知られており、封入体の形成は ALS を含む神経変性疾患の発症に重要な役割を果たしていると考えられている。封入体の形成には、細胞内の老朽化したタンパク質および細胞内小器官を分解、再利用する仕組みであるオートファジーの活性と関連があることが知られており、オートファジー活性を失うように作製された遺伝子改変マウスでは神経変性の症状を呈し、封入体が形成されることが知られている。ALS 原因遺伝子である Optineurin はサルモネラ菌がサルモネラ的一种が感染した際のオートファジーの選択的受容体として働き、オートファゴソーム上に集合する LC3 と結合することが知られている。

### 2. 研究の目的

以上の知見から、Optineurin の変異がオートファジーの経路に異常をきたす結果、ALS の発症に結びつくと推測されるが、実際にどのように Optineurin の変異が神経変性に結びつくのかその分子的機序はいっさい不明である。Optineurin の細胞内における分子レベルでの作用機序を明らかにし、ALS の発症のメカニズムを明らかにすることを目的に本研究を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) (1) ライブイメージング法によるオプチニューリンの細胞内局在の解析

細胞内エネルギーの供給元である細胞内小器官ミトコンドリアが傷害されたときに傷害ミトコンドリアを除去する仕組みであるオートファジーはオートファジーの一種である。Fv10i (Olympus 社) の共焦点顕微鏡でのライブイメージングにより、培養細胞にミトコンドリア傷害を誘導し

て、Optineurin タンパク質の局在変化について可視化をおこなった。

#### (2) Optineurin タンパク質の分解についての解析

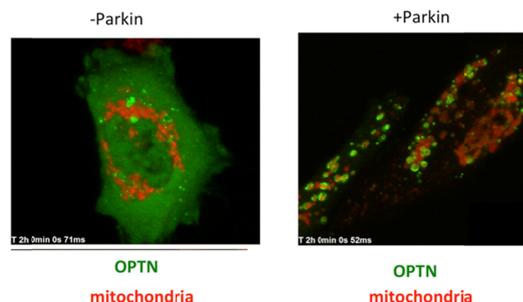
培養細胞の HeLa に Optineurin を発現させ、マイトファジーを脱電位誘導試薬により誘導させた後、細胞溶解してタンパク質サンプルを回収、調製して生化学的解析を行い Optineurin タンパクの生化学的変化について解析した。

#### (3) 神経系における免疫系細胞であるミクログリアを実験に用いる為にマウスミクログリアの細胞株 BV2 で Optineurin のノックダウン細胞を樹立した。また初代培養ミクログリアの単離法についても系を確立した。

### 4. 研究成果

- (1) HeLa 細胞に Optineurin もしくは Optineurin と Parkin をトランスフェクション (遺伝子導入) して、ミトコンドリアの膜電位を脱分極させる試薬 CCCP でミトコンドリア傷害を誘導させた。Optineurin は緑色に光る蛍光タンパク EGFP をつなげることで、ミトコンドリアは赤く光る試薬マイトトラッカーで可視化して、生細胞での観察を可能にした。以下に示す処理 2 時間後において、顆粒状に断片化したミトコンドリアの表面上に Optineurin タンパクが局在している

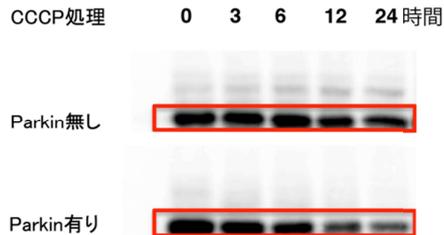
CCCP 処理 2hr



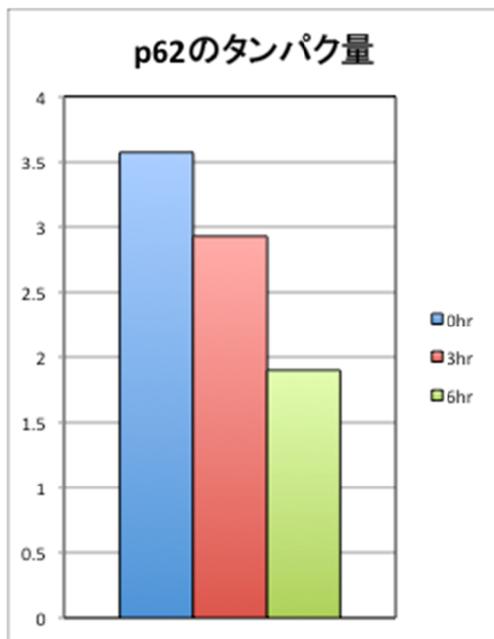
ことが明らかになった。この現象はパーキンソン病の原因遺伝子である Parkin を共発現させたときのみ観察された。また、ALS 患者に認められる Optineurin 遺伝子上の点変異 (E478G) を導入した Optineurin タンパクはマイトファジーを誘導してもミトコンドリア上に局在しなかった。以上の知見は運動ニューロンが特異的に変性、脱落する ALS と中脳のドーパミン作動性ニューロンが特異的に脱落するパーキンソン病の分子経路に共通のメカニズムがあることを示唆しているこの知見は神経変性疾患の研究上非常に意義深いと考えられる。

- (2) HeLa 細胞に Optineurin タンパクを発現させ、マイトファジーを CCCP 試薬により誘導させ、細胞溶解液を調製し、細胞内

Optineurinのタンパク質量の変化を経時的に追跡した。Parkinとの関連を調べるために Parkin を共発現したものと同時に解析した。以下に示すように Parkin を共発現させたときに Optineurin の分解が促進された。このことは Parkin と Optineurinが協調的にミトファジーを促進していることを示している。



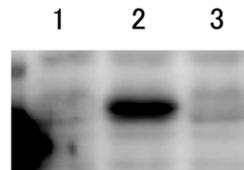
さらに Optineurin と Parkin 存在下ミトファジーを誘導した際にオートファジーの指標である p62 のタンパク量を調べたところ、経時的に p62 が減少していることを明らかにした。



これらの結果は、Optineurinがミトファジーの進行を促進していることを示しており、ミトコンドリアの除去の不全がALSの発症のメカニズムである可能性を示唆している。

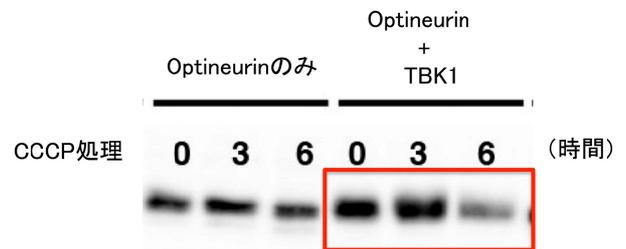
さらに研究期間中の他の研究グループから発表された TBK1 遺伝子と Optineurin 遺伝子の両方に変異のある ALS の孤発例の報告に基づき、TBK1 との機能的関わりについても解析をおこなった。TBK1 が Optineurin をリン酸化することは既に報告されており、Optineurin の 177 番目のセリン残基をリン酸化する。

このセリン残基がリン酸化された状態を認識する抗体を作製した (下図)。

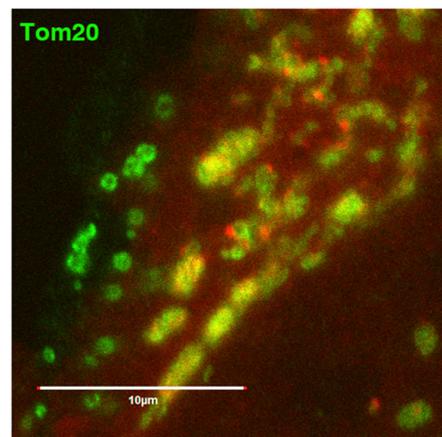


1 : Optineurin  
2 : Optineurin + TBK1  
3 : Optineurin S177A置換 + TBK1

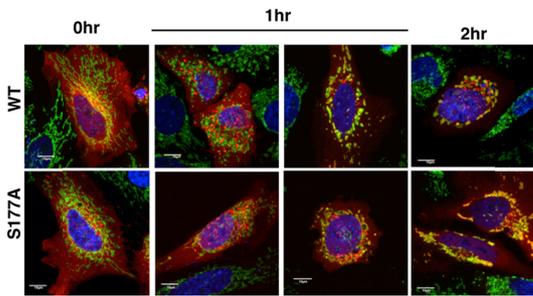
さらに TBK1 存在下でミトファジーを誘導した際に、Optineurin タンパク量はどう変化するかを調べると、TBK1 がいないときに比べて Optineurin の分解が有意に進んでいることが認められた。



しかし、TBK1 の阻害剤 BX795 添加時のミトファジー誘導時での Optineurin のミトコンドリア局在 (ミトコンドリアマーカーの Tom20 で緑色に染色、Optineurin は蛍光タンパクで赤く可視化) は BX795 非添加時と比べはっきりした差

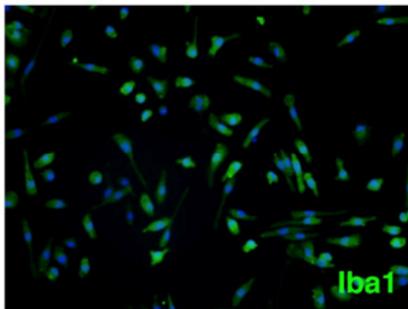


いは認められなかった。リン酸化を受けない Optineurin の S177A 置換体を用いてミトファジーを誘導した際の Optineurin の局在変化についても 0、1、2 時間後について解析を行ったが、Optineurin の局在は正常に起きることが認められた。



以上のことから TBK1 と Optineurin の機能的なつながりと、神経変性の関わりは、更なる検討を要する。

- (3) ミクログリアの細胞株 BV2 に Optineurin の shRNA を発現するレンチウイルスを用いることでノックダウンを行った。また、マウス新生仔の脳組織より細胞を単離し、1 週間～10 日間培養することでグリア細胞集団を培養し、振盪することでミクログリアのみを単離した。ミクログリアのマーカーである Iba1 抗体をもちいて免疫染色を行い、ミクログリアが選択的に単離されていることを確認した。



Optineurin ノックアウトマウスより初代培養を行い、機能解析、遺伝子発現解析等を行うことで神経炎症との関わりについて明らかにできることが期待される。

## 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)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Morino H., Matsuda Y., Muguruma K., Miyamoto R., Ohsawa R., Ohtake T., Otobe R., Watanabe M., Maruyama H., Hashimoto, K., and Kawakami, H. A mutation in the low voltage-gated calcium channel CACNA1G alters the physiological properties of the channel, causing spinocerebellar ataxia. *Mol. Brain* (2015) Dec 29;8:89. doi: 10.1186/s13041-015-0180-4. (査読有)
2. Morino, H., Pierce, S., Matsuda, Y., Walsh, T., Ohsawa, R., Newby, M., Hiraki-Kamon, K., Kuramochi, M., Lee, M.,

Klevit, R., Martin, A., Maruyama, H., King, M., and Kawakami, H. (2014) Mutations in Twinkle primase-helicase cause Perrault syndrome with neurologic features. *Neurology* 83, 2054-2061.

DOI:10.1212/WNL.0000000000001036. (査読有)

3. 大澤亮介・川上秀史 (2014) オプチニューリン遺伝子異常による脳内環境変化と神経変性の関わり の 解 明 遺 伝 子 医 学 MOOK 26, 97-101. (査読無)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

大澤 亮介 (OHSAWA, Ryosuke)

広島大学原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：2 0 7 1 9 3 5 6