



The optineurin oligomer: its existence as a major form in cells and cross-linking upon oxidative stimuli through ubiquitin binding domain

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-04-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高, 潔 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/2702

博士(医学) 高 潔

論文題目

The optineurin oligomer: its existence as a major form in cells and cross-linking upon oxidative stimuli through ubiquitin binding domain

(オプチニューリンオリゴマー:細胞内での主要な形態としての存在および酸化刺激下でのユビキチン結合ドメインを介した架橋結合)

[はじめに]

オプチニューリン遺伝子(OPTN)は、原発性開放隅角緑内障(POAG)の原因遺伝子として同定された。OPTNの遺伝子変異はPOAGのうち、正常眼圧緑内障(NTG)患者において、より高率に検出された。OPTNがコードするタンパク質(OPTN)は、577アミノ酸(計算上の分子量66 kDa)からなり、NF- κ B essential modulator(NEMO)と53%の配列相同性を有する。OPTNは網膜を含めた眼の組織、および眼以外の組織に広く発現している。OPTNの機能として、TNF α が誘導するNF- κ B活性化(TINA)に対する負の調節、ゴルジ体の構築や小胞輸送で役割を果たすこと等が報告されてきた。また、最も頻度が高く、症状も重篤なE50K変異を持つOPTNを、網膜神経節(RGC)由来培養細胞で発現させると細胞内の酸化ストレスが増加し、さらに細胞死を誘導すること、及び、同変異OPTNを発現するトランスジェニックマウスでは網膜が変性を示すことが報告された。しかし、OPTNの機能の詳細、変異による発症誘導の機構など、依然として不明な点が多い。OPTNは、細胞内でオリゴマーを形成することを示唆する報告もあるが、それに関しても詳細な記載はなされていなかった。そこで、本研究では、OPTNオリゴマーの存在の検証・追究と、それに与える酸化ストレス等の環境刺激、及びOPTNの変異の影響について培養細胞を用いての解析を行った。

[材料ならびに方法]

1. 正常及び変異OPTN発現プラスミドの作成と使用細胞:正常および変異OPTNをGFP融合またはFLAGタグ付加タンパク質として発現するプラスミド(GFP-OPTN、FLAG-OPTN)を構築した。変異OPTNとしては、以下に示す部分欠失体シリーズの他、E50Kを含む種々の緑内障原因ミスセンス変異、及び、ユビキチン結合ドメイン(UBD)内の人為的D474N変異を設計した。部分欠失体シリーズは、NEMOとの相同性解析に基づいて区分したOPTNの4領域のうち、各1領域を欠く群(Lc1st、Lc2nd、Lc3rd、Lc4th)、及び第4領域中のUBDとZnフィンガードメイン(ZF)を欠くもの(LcUBD、LcZF)からなる。これらのプラスミドはFuGENE6を用いてNIH3T3またはHeLaS3細胞に導入した。
2. OPTNオリゴマー形成の解析:細胞にOPTN発現プラスミドを導入した後、非刺激あるいは25 mM H₂O₂(20分間)処理後、blue native電気泳動(BNE)で非変性状態の、SDS-PAGEで変性状態のOPTNタンパク質を分離した。OPTNの検出には、抗FLAG、抗GFP、または抗OPTN抗体によるウェスタンブロットを用いた。内在性OPTNについてはプラスミド導入を行わず、同様に解析した。
3. *In situ* Proximity Ligation Assay(*in situ* PLA)によるOPTNオリゴマーの検出:細胞は接着培養状態のまま4%パラホルムアルデヒドで固定し、抗FLAG及び抗GFP抗体を結合させ、*in situ* PLA法を施行した。
4. TINAに対する抑制効果の解析:HeLaS3細胞に、正常及び変異OPTNを導入し、TNF α (10 ng/ml、5時間)が誘導するNF- κ B活性を、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイにより測定した。

[結果]

1. BNE での解析の結果、内在性及びプラスミド導入の場合ともに、OPTN は、ほぼ全分子が 400 kDa 前後の高分子量複合体の中に存在することがわかった。この複合体は TNF α によるアポトーシス刺激で解離することにはなかった。
2. GFP-OPTN と FLAG-OPTN の相互作用を *in situ* PLA 法で解析した結果、OPTN は細胞質内で、相互に結合しオリゴマーを形成することが明らかになった。
3. H₂O₂ 処理により、OPTN の一部は、還元条件での SDS-PAGE で高分子複合体として観察され、非 S-S の共有結合による架橋が起きることが示唆された。Lc1st、Lc2nd、Lc3rd でもこの複合体形成は起き、正常 OPTN の場合を含めて、複合体の分子量は単量体の 3 倍を示したので、架橋結合 OPTN 3 量体(cOPTN₃)と命名した。
4. E50K 変異 OPTN を導入した細胞では、H₂O₂ 処理を行わなくても、cOPTN₃ が形成された。さらに、その形成はアスコルビン酸、ジメチルチオ尿素等の抗酸化剤により阻害されることが判明した。
5. LcUBD および D474N 変異体は TINA 抑制能を失っていた。同抑制にはユビキチン結合が必要と考えられた。一方、cOPTN₃ の形成は、LcUBD では起こらなかったが、UBD に含まれるユビキチン結合必須アミノ酸残基の変異体 D474N では起こることが観察され、ユビキチン結合そのものには依存しない、異なる機序によるものであることが明らかとなった。

[考察]

1. OPTN の存在様式

OPTN は細胞内では高分子複合体として存在し、その中に 2 分子以上の OPTN がオリゴマーとして含まれていることが強く示唆された。同高分子複合体は、それが OPTN のみからなるホモオリゴマーと仮定すれば、BNE での推定分子量からは 6 量体であることが示唆される。

2. 酸化的刺激下での OPTN オリゴマーの架橋結合

細胞の H₂O₂ 処理で cOPTN₃ が形成されたことから、OPTN の高分子複合体は、OPTN の 3 量体を含むことが示唆された。同高分子複合体が OPTN の 6 量体であるのか、3 量体に他のタンパク質が結合しているのか等については、さらなる検討を要する。

3. E50K 変異に関する新しい考察

E50K 導入細胞では自発的に cOPTN₃ が形成されたこと、そしてその形成が抗酸化剤により抑制されたことは、先行研究で報告された E50K 導入細胞における酸化ストレスの増加の現象とよく一致する。しかし、それ以上に、生じた cOPTN₃ が、細胞毒性の実体の少なくとも一部である可能性、そして、E50K 変異を持つ緑内障患者の症状の重篤性との関連をも示唆すると考えられる。

[結論]

OPTN は細胞内で高分子複合体として存在し、その中に 3 量体以上のオリゴマーとして含まれている可能性が高い。高分子複体内の OPTN は、酸化的刺激下で、あるいは E50K 変異により、非 S-S の架橋結合で cOPTN₃ を形成する。cOPTN₃ の形成は、緑内障の発症機序の一部を説明する可能性がある。