



Interaction of optineurin and bZIP transcription factor NRL

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 王, 春霞 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/369

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 500号	学位授与年月日	平成20年 3月17日
氏名	王 春 霞		
論文題目	Interaction of optineurin and bZIP transcription factor NRL (オプチニューリンと bZIP 転写因子 NRL の相互作用)		

博士(医学) 王 春 霞

論文題目

Interaction of optineurin and bZIP transcription factor NRL

(オプチニューリンとbZIP転写因子NRLの相互作用)

論文の内容の要旨

[はじめに]

緑内障は、高齢化社会における失明原因として最も重要であり、その主要な疾患である開放隅角緑内障(OAG)は遺伝的要素が大きく、OAG症例の30%以上が家族性であるという報告もある。オプチニューリン(OPTN)はOAGの原因遺伝子として発見されたが、我が国での変異存在率は低く、変異による発症機序の詳細は不明である。申請者の研究室では、OPTNタンパクの機能と緑内障の発症機序を解析するために、OPTNと相互作用するタンパクの酵母2ハイブリッド法によるスクリーニングが行われている。その過程で、bZIP転写因子NRL(Neural Retina Leucin zipper)タンパクがOPTNと結合する可能性が示唆された。NRL遺伝子は、網膜色素変性の原因遺伝子として知られている。本研究では、二つの重要な遺伝性眼疾患の原因遺伝子が相互作用することの実験的証明を行った。(以下、“OPTN”、“NRL”の単独表記は、動物種を問わずタンパクを表すこととする。)

[材料ならびに方法]

NRLとOPTN両遺伝子のcDNAはヒト網膜Marathon cDNA(TAKARA社)からPCRで増幅し、それぞれHAタグ、FLAGタグのベクターにクローニングした。培養細胞(HeLa S3)への遺伝子導入はFuGENE6で行った。抗OPTN抗体はProteinTech Group社より、抗NRL抗体はSanta Cruz Biotechnology社より購入した。これらは、それぞれヒト、マウス、ラットのOPTNおよびNRLに反応することが確認されている。抗HAタグ抗体、抗FLAGタグ抗体は、それぞれMBL社およびSigma社より購入した。共免疫沈殿には、プロテインGビーズを用いた。細胞からのタンパク抽出は、1% TritonX-100/50mM Tris-HCl/0.15M NaCl (pH 7.4)を用いた。神経網膜組織からの核画分と細胞質画分の調製は次のように行った。組織に50mM Tris-HCl/0.15M NaCl (pH 7.4)を加え、ダウンス型ホモジナイザー(ペッスルB)で細胞を破碎して、遠心(100 x g)で上清(細胞質画分)と沈殿(核画分)を分離した。神経網膜組織および核画分からのタンパク抽出には、細胞からの抽出と同じ溶液を用いた。齧歯類眼組織の標本作製は次の方法で行った。マウス(C57/BL6 Cr)は、エーテル過量吸入により安楽死させた後、眼球を摘出し、10%ホルマリンで固定後、通常の方法でパラフィン包埋ブロックを作製した。ラットは、LEW/SsN SlcとWKY/Izmの両strainを掛け合わせたF1(15~20週齢)を用いた。エーテル麻酔し、2%パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝液(pH 7.2)による灌流固定の後、眼球を摘出してパラフィン包埋ブロックを作製した。

[結果]

培養細胞での共発現系におけるNRL-OPTNの相互作用：NRLとOPTNの相互作用を、HeLa S3細胞での共発現系で確認した。HAタグ付きNRLとFLAGタグ付きOPTNをHeLa S3で発現させ、タンパクを抽出して共免疫沈殿実験を行った。抗FLAGタグ抗体で免疫沈殿を行い、回収したタンパクをSDS電気泳動で分離して、抗HAタグ抗体でウェスタンブロット(WB)法を行ったところ、HAタグ付きのNRL(33 kDa)のバ

ンドが認められた。抗HAタグ抗体による免疫沈殿の後、抗FLAGタグ抗体でWB法を行ったところ、FLAGタグ付きOPTN(69 kDa)のバンドが認められた。すなわち、両タンパクは、HeLa S3の中でタグ付きタンパクとして共発現させた場合、結合することが示された。この共発現系を利用して、次項以降で用いる抗NRL抗体と抗OPTN抗体の抗原への結合性を調べた。その結果、抗OPTN抗体での免疫沈殿後、ウェスタンブロットでNRLは検出されたが、抗NRL抗体での免疫沈殿では、OPTNは検出されなかった。この抗NRL抗体による免疫沈殿で、NRL自体はWB法により検出できたので、用いた抗NRL抗体は、OPTNが結合したNRLに結合できないと考えられた。

齧歯類眼組織におけるNRLとOPTNの発現：マウス眼組織切片(4 μm 厚)に対して、抗NRL抗体と抗OPTN抗体で蛍光抗体染色を行ったところ、NRLは外顆粒層(視細胞の核を含む層)に発現していた。OPTNは、視細胞内節と外網状層に強く発現していたが、外顆粒層にも発現していた。次に、ラット眼組織切片を抗OPTN抗体で蛍光抗体染色し、外顆粒層での発現を解析したところ、大半の細胞で細胞質に抗OPTN抗体の蛍光が見られたが、核は蛍光を示す細胞と示さない細胞が見られた。これらの結果は、OPTNが視細胞に存在し、一部の視細胞では核にも存在することを示し、視細胞核内でのNRLとの相互作用の可能性を示唆した。

ラット神経網膜核画分でのNRLとOPTNの相互作用：単離したラット神経網膜からタンパクを抽出し、抗OPTN抗体で免疫沈殿して、WB法でNRLの検出を試みた。しかし、NRLは検出されなかった。これは、OPTNの大半が細胞質に存在し、NRLと結合していないため、核を含めた細胞全体のOPTNを調べても、NRLが結合しているOPTNの割合は非常に少ないためと解釈できた。実際に、ラット神経網膜から核と細胞質の両画分を単離してWB法で調べたところ、細胞質に比べて少量のOPTNが、核画分に検出された。これは、ラット眼組織の蛍光抗体染色による観察の結果と一致した。そこで、核画分に存在するOPTNにNRLが結合している可能性を、免疫沈殿とWB法により検討した。核内のOPTNは少量であることを考慮し、4眼分の神経網膜の核画分からタンパクを抽出して、その全量を用いて抗OPTN抗体で免疫沈殿を行ったところ、WB法にてNRLが検出された。この結果と蛍光抗体染色による観察の結果を総合して、視細胞の核の一部にOPTNが存在し、NRLと相互作用していることが強く示唆された。

[考察]

視細胞でのOPTNの発現の報告は本研究が初めてである。培養細胞での実験で、OPTNは細胞に H_2O_2 処理等のストレスにより核に移行することが報告されており、一部の視細胞のみで核にOPTNが存在する現象には、ストレスなどの細胞の状態が関与している可能性がある。これまでにOPTNと結合するタンパクは、Huntingtin, TFIIIA, Rab8などが報告されたが、眼に特異的なタンパクとの相互作用は、本報告のNRLが最初である。OPTNは眼以外の組織でも機能するタンパクであるにも関わらず、その変異が緑内障のみを起こす理由は、今後解明されねばならないが、眼に特異的なタンパクとの相互作用が、その糸口となる可能性は大きい。また、視細胞の核でOPTNがNRLと相互作用することの意味は不明であるが、OPTNの視細胞での機能とともに解析する必要がある。さらに、OPTNの変異が神経節細胞のみならず視細胞に与える影響をノックアウトマウス等を用いて解析することで、緑内障と網膜色素変性の病態とともに、神経網膜の細胞死に関する新しい知見が得られる可能性がある。

[結論]

マウス、ラットの視細胞の細胞質および核におけるOPTNの発現を初めて検出し、報告した。視細胞の核においてNRLとOPTNが相互作用することを強く示唆することができた。

論文審査の結果の要旨

緑内障は、高齢化社会における失明原因として最も重要であり、その主要な疾患である開放隅角緑内障(OAG)は遺伝的要素が大きく、OAG症例の30%以上が家族性であるという報告もある。オプチニューリン(OPTN)はOAGの原因遺伝子として発見されたが、我が国での変異存在率は低く、変異による発症機序の詳細は不明である。申請者の研究室では、OPTNタンパクの機能と緑内障の発症機序を解析するために、OPTNと相互作用するタンパクの酵母2ハイブリッド法によるスクリーニングが行われており、その過程で、bZIP転写因子NRL(Neural Retina Leucin zipper)タンパクがOPTNと結合する可能性を示唆している。また、NRL遺伝子は、網膜色素変性の原因遺伝子としても知られおり、本研究は、二つの重要な遺伝性眼疾患の原因遺伝子の相互作用を実験的に証明したものである。

まず、申請者は、NRLとOPTNの相互作用を、HeLa S3細胞での共発現系で確認した。HAタグ付きNRLとFLAGタグ付きOPTNをHeLa S3で発現させ、タンパクを抽出して共免疫沈殿実験を行った。抗FLAGタグ抗体で免疫沈殿を行い、回収したタンパクをSDS電気泳動で分離して、抗HAタグ抗体でウェスタンブロット(WB)法を行ったところ、HAタグ付きのNRL(33 kDa)のバンドが認められた。また、抗HAタグ抗体による免疫沈殿の後、抗FLAGタグ抗体でWB法を行ったところ、FLAGタグ付きOPTN(69 kDa)のバンドが認められた。すなわち、両タンパクは、HeLa S3の中でタグ付きタンパクとして共発現させた場合、結合することが示された。

次に、マウス眼組織切片(4 μm厚)に対して、抗NRL抗体と抗OPTN抗体で蛍光抗体染色を行ったところ、NRLは外顆粒層(視細胞の核を含む層)に発現していた。OPTNは、視細胞内節と外網状層に強く発現していたが、外顆粒層にも発現していた。次に、ラット眼組織切片を抗OPTN抗体で蛍光抗体染色し、外顆粒層での発現を解析したところ、大半の細胞で細胞質に抗OPTN抗体の蛍光が見られたが、核は蛍光を示す細胞と示さない細胞が見られた。これらの結果は、OPTNが視細胞に存在し、一部の視細胞では核にも存在することを示し、視細胞核内でのNRLとの相互作用の可能性を示唆した。

さらに、単離したラット神経網膜からタンパクを抽出し、抗OPTN抗体で免疫沈殿して、WB法でNRLの検出を試みた。しかし、NRLは検出されなかった。これは、OPTNの大半が細胞質に存在し、NRLと結合していないため、核を含めた細胞全体のOPTNを調べても、NRLが結合しているOPTNの割合は非常に少ないためと解釈できた。実際に、ラット神経網膜から核と細胞質の両画分を単離してWB法で調べたところ、細胞質に比べて少量のOPTNが、核画分に検出された。これは、ラット眼組織の蛍光抗体染色による観察の結果と一致した。そこで、核画分に存在するOPTNにNRLが結合している可能性を、免疫沈殿とWB法により検討した。神経網膜の核画分からタンパクを抽出して、その全量を用いて抗OPTN抗体で免疫沈殿を行ったところ、WB法にてNRLが検出された。この結果と蛍光抗体染色による観察の結果を総合して、視細胞の核の一部にOPTNが存在し、NRLと相互作用していることが強く示唆された。

先行研究で、OPTNは細胞にH₂O₂処理等のストレスを加えることにより核に移行することが報告されており、一部の視細胞のみで、核にOPTNが存在する現象には、ストレスなどの細胞の状態が関与している可能性が想定された。これまでにOPTNと結合するタンパクは、Huntingtin, TFIIIA, Rab8などが報告されているが、眼に特異的なタンパクとの相互作用は、本報告のNRLが最初である。OPTNは眼以外の組織でも機能するタンパクであるにも関わらず、その変異が緑内障のみを起こす理由は、今後解明されねばならないが、眼に特異的なタンパクとの相互作用が、その糸口となる可能性は大きい。さらに、OPTNの変異が神経節細胞のみならず視細胞に与える影響をノックアウトマウス等を用いて解析することで、緑内障と網膜色素変性の病態とともに、神経網膜の細胞死に関する新しい知見が得られる可能性が期待さ

れる。

審査委員会では、マウス、ラットの視細胞の細胞質および核におけるOPTNの発現を明らかとし、さらにOPTNがNRLと結合することを世界で初めて報告した点を高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) 緑内障と網膜色素変性症の病因論的関連性
- 2) この研究の学問的位置づけ
- 3) OPTNとアポトーシスの関連について
- 4) 免疫組織化学法の条件設定について
- 5) 界面活性剤の化学的作用について
- 6) 核移行シグナルについて
- 7) OPTNの遺伝子異常の様式について
- 8) OPTNとNRLの相互作用様式について
- 9) どのようなアポトーシスの経路が想定されるか
- 10) HeLa細胞を使った理由

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	佐藤康二			
	副査	峯田周幸	副査	山本清二	