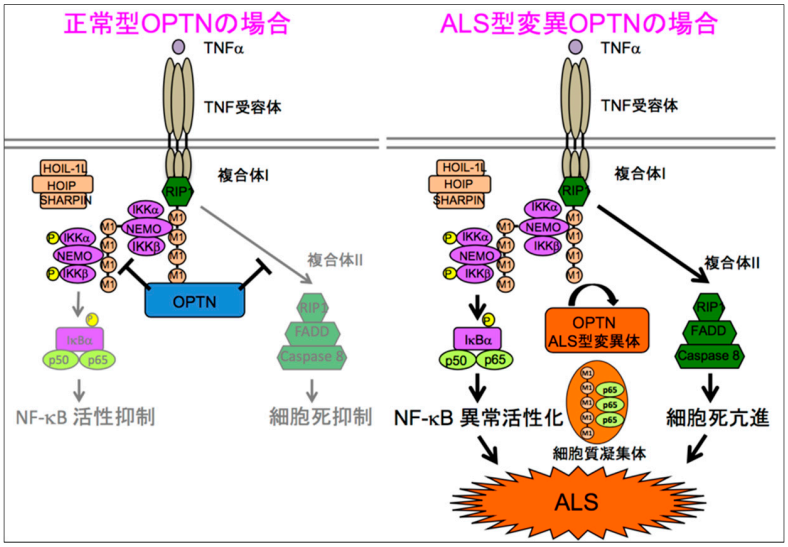
26　神経変性疾患の発症メカニズムと直鎖状ユビキチン鎖	及川　大輔

【目的】ALS （筋萎縮性側索硬化症）は、運動ニューロンが選択的に侵される神経難病で、約 90%は発症原因が不明な孤発性である一方、約 10%は遺伝子変異が関連する家族性であり、これまでに約 20 の原因遺伝子が見出されている。その一つとして、*OPTN* 遺伝子が重要な病因因子であることが、2010 年に日本のグループから報告されている。以前、筆者らのグループでは、ユビキチンの N 末端を介した特殊な連結様式により形成される「直鎖状ユビキチン鎖」が、炎症や免疫に重要な NF-κB シグナルを制御し、慢性皮膚炎や B 細胞リンパ腫などを含む各種免疫疾患と非常に密接に関連する事を世界に先駆けて報告してきた。また、OPTN（optineurin）はユビキチン結合タンパク質としても知られることから、今回、*OPTN* 変異を伴う ALS 発症に対する直鎖状ユビキチン鎖の寄与について研究を進めた。

【方法】まず、OPTN と ALS との関連性、特に OPTN が備える生理機能を解明する目的で、野生型及び 12 種の疾患関連 *OPTN* 変異体を作製し、LUBAC による NF-κB 活性化への影響を調べた。また、CRISPR/Cas9 法を用いて *OPTN* ノックアウト HeLa 細胞を作製し、NF-κB 活性化を解析すると共に、OPTN と直鎖状ユビキチンの結合を結晶構造解析により評価した。さらに、*OPTN* 変異を伴う ALS 患者由来の組織標本染色を行った。

【結果】*OPTN* 変異体を用いた Luc assay において、野生型および全ての緑内障を引き起こす *OPTN* 変異体は強く NF-κB 活性化を抑制したが、ほとんどの ALS 関連 OPTN 変異体では NF-κB 活性阻害能を失ったことから、OPTN による NF-κB 活性阻害には UBAN ドメインが重要性であることが示された。また、共結晶構造解析により、2 分子の OPTN-UBAN の両側に直鎖状ユビキチンが結合していることが明らかにした。さらに、*OPTN* ノックアウト HeLa 細胞の解析においては、*OPTN* 欠損によって NF-κB 活性化が亢進し、TNF-α とシクロヘキシミドによって惹起されるアポトーシスも亢進した。重要なことに、OPTN の Q398X や E478G 変異による ALS 患者由来の組織標本染色から、これら患者の運動ニューロンでは直鎖状ユビキチンや活性型 NF-κB 因子が細胞質に TDP-43 と共局在する凝集体に共局在していること、そのような細胞ではカスパーゼ 3 が活性化していることを見いだした。これらの結果から、OPTN は正常細胞では NF-κB と細胞死を抑制しているが、ALS を引き起こす変異体発現下では NF-κB 活性やアポトーシスが亢進し、最終的に ALS に至る可能性が示され、直鎖状ユビキチン鎖が ALS の新たな治療ターゲットになる可能性が示唆された。

OPTN による直鎖状ユビキチン鎖を介した細胞生死シグナル制御と ALS への関与



26. 神経変性疾患の発症メカニズムと直鎖状ユビキチン鎖

及川　大輔

大阪市立大学 大学院医学研究科 分子病態学

Key words：直鎖状ユビキチン鎖，ALS（筋萎縮性側索硬化症），NF-κB，細胞死

緒　言

タンパク質のユビキチン化は、当初、プロテアソーム分解へ導かれる翻訳後修飾として同定されたが、現在では、エンドサイトーシス、シグナル伝達、DNA 修復など、非常に多彩な細胞機能制御に関連することが明らかになっている。筆者らの研究室では、「直鎖状ポリユビキチン鎖」という全く新しいタイプのユビキチン鎖を世界に先駆けて見出し[1]、その特異的な合成酵素複合体（LUBAC）を同定し解析を進め、直鎖状ユビキチン鎖が各種炎症シグナルの制御に必須であること、さらに、慢性皮膚炎や B 細胞リンパ腫などを含む各種免疫疾患と非常に密接に関連する事を世界に先駆けて報告してきた(図 1) [2～4]。ALS（筋萎縮性側索硬化症)の原因遺伝子として報告されている *OPTN*(optineurin)は、NF-κB 活性化経路において重要な酵素である IκB キナーゼの制御因子（NEMO）に高い相同性を示すタンパク質で、過去の筆者らのグループを含む報告から、NEMO が LUBAC によって直鎖状ユビキチンの結合を受けることや、直鎖状ユビキチン鎖に特異的に結合する UBAN ドメインを備えることが知られている。興味深いことに、OPTN にも UBAN ドメインが存在し、直鎖状ユビキチン鎖に結合する可能性が高いと考えられていた。それまで、OPTN の生理機能として NF-κB 活性やインターフェロン産生経路を抑制すること、autophagy を制御することや細胞内膜輸送に関わることが報告されていた。さらに、*OPTN* 遺伝子の変異は、原発開放隅角緑内障（POAG）や筋萎縮性側索硬化症（ALS）[5] などの神経変性疾患を引き起こすことも発見されていたが、OPTN の直鎖状ユビキチン結合性や、なぜ 2 つの異なる疾患を発症するのか、そのメカニズムについては不明だった。そこで本研究では、これまでに見出された POAG を発症する OPTN 変異体（6 種）と ALS を発症する変異体（5 種）を包括的に作製し、NF-κB 活性制御や直鎖状ユビキチン鎖結合との連関を解析した。

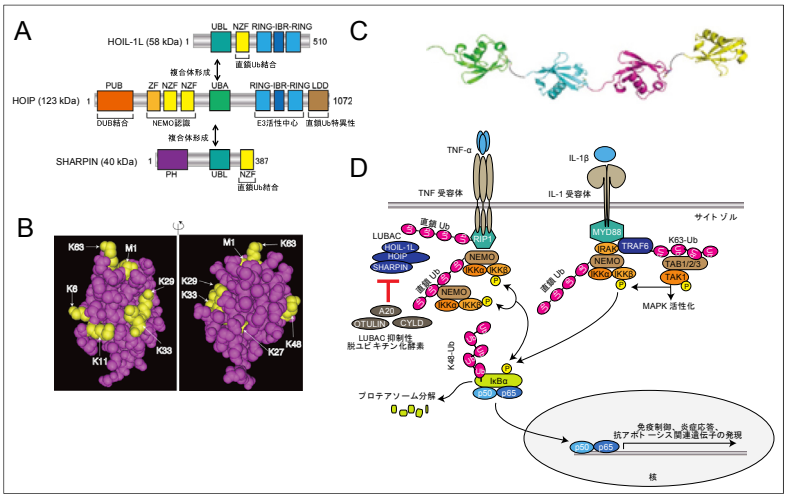


図 1. 直鎖状ユビキチン鎖による NF-κB シグナル制御

A）LUBAC ユビキチンリガーゼ複合体を構成するサブユニットのドメイン構造。　B）ユビキチンの立体構造。

C）直鎖状ユビキチン鎖の立体構造。　D）NF-κB 活性化経路における直鎖状ユビキチン鎖の役割。

方法および結果

1. OPTN による NF-κB 活性の抑制と直鎖状ユビキチン結合

まず筆者らは、*OPTN* の緑内障型変異や ALS 型変異が NF-κB 活性制御にどのような影響を与えるか解析した。その結果、緑内障型 OPTN 変異体は野生型同様、強く NF-κB 活性を抑制するが、ALS 型変異体の多くは NF-κB 活性抑制能を喪失することが分かった (図 2)。これらは UBAN ドメインの欠失、またはアミノ酸置換に起因しており、OPTN の NF-κB 阻害活性に UBAN ドメインが重要であり、その機能破綻が ALS 発症に関連することが示唆された。次に、実際に OPTN UBAN ドメインが直鎖状ユビキチン鎖に結合できるかを確かめるために、共結晶構造解析を行った。その結果、OPTN UBAN ドメインは 2 量体を形成し、その両側に直鎖状ユビキチンが結合することを見出した (図 3A)。さらに、ALS 患者で変異が見られた E478 は直鎖状ユビキチン結合に重要なアミノ酸残基であることが示された (図 3B)。この結果は、OPTN の直鎖状ユビキチン結合能の喪失が ALS 発症を引き起こす可能性を示唆する。

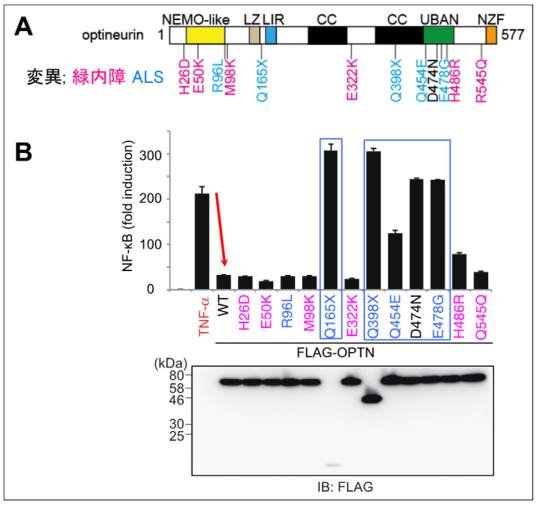


図 2. OPTN の ALS 型変異体は NF-κB 抑制能を喪失する

A) OPTN の緑内障型変異（ピンク）と ALS 型変異（青）。

B) HEK293T 細胞を用いた Luc assay による OPTN 変異体の NF-κB 活性制御に与える影響の解析。

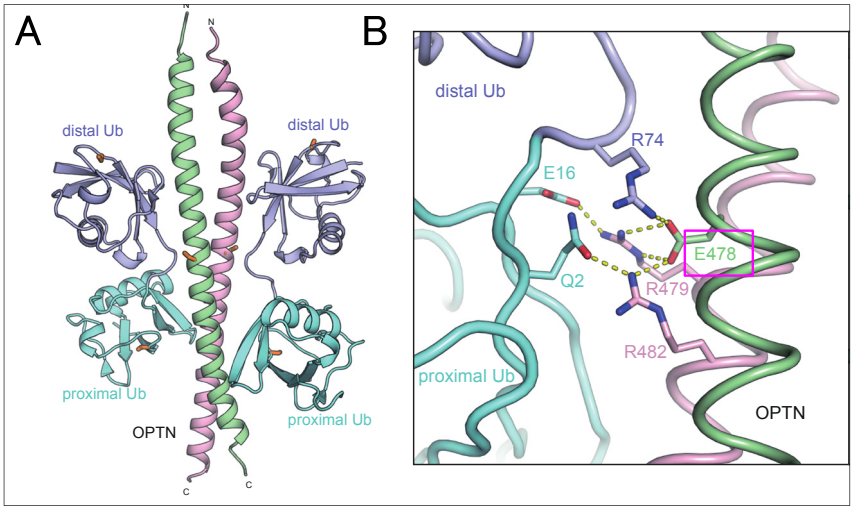


図 3. OPTN の UBAN ドメインは直鎖状ユビキチンに結合する

A) OPTN UBAN ドメインと直鎖状ユビキチンとの共結晶構造。

B) ALS 患者に見られる変異部位（E478） は、直鎖状ユビキチン結合に重要な役割を果たす。

2. OPTN 破壊細胞における NF-κB や細胞死の亢進

次に、ゲノム編集技術によって *OPTN* 遺伝子を欠損させた細胞を作製し、この細胞では刺激に伴う NF-κB 活性化が正常型より強くなることや、細胞死（アポトーシス）も亢進することを見出した。これらの結果は、OPTN が NF-κB 活性化や細胞死を防ぐ役割を担っていることを意味する。

3. ALS 患者における直鎖状ユビキチン鎖の動態

最後に、*OPTN* 遺伝子変異（Q398X や E478G 変異）を伴う ALS 患者由来の運動ニューロンの病理染色を行ったところ、これらの患者由来標本では直鎖状ユビキチンや活性型 NF-κB （リン酸化 p65）が細胞質凝集体に染色され、細胞死の指標である活性型カスパーゼ 3 の染色も亢進していた（図 4、赤矢印）。これまで、アルツハイマー病、パーキンソン病、ALS など神経変性疾患でユビキチン陽性凝集体が検出されることはよく知られていたが、直鎖状ユビキチン鎖が凝集体に包含されているという知見は、今回初めて見出された非常にユニークな現象であった。

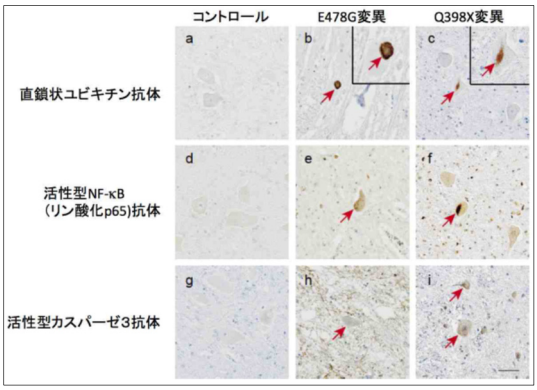


図 4. OPTN 変異を伴う ALS 患者の運動ニューロンでは直鎖状ユビキチンや活性型 NF-κB が蓄積し、細胞死が亢進する

スケールバー：50 μm。

これらの結果から、OPTN は NF-κB 活性やアポトーシスを抑制し、細胞の生死に関わる重要なシグナル伝達経路を制御することが示された（図 5 左）。一方、ALS を引き起こす OPTN 変異体では、直鎖状ユビキチン鎖に結合できないため NF-κB 活性が恒常的に亢進し、このため、患者の運動ニューロンでは、直鎖状ユビキチンや活性型 NF-κB 因子（P-p65）がサイトゾル凝集体に蓄積し、細胞死（アポトーシス反応）も亢進することが示唆された（図 5 右）。この様に、本研究から OPTN の機能不全によって神経炎症の持続的亢進と神経細胞死の促進がおこり、これが ALS 発症に関わる可能性が示された［6］。

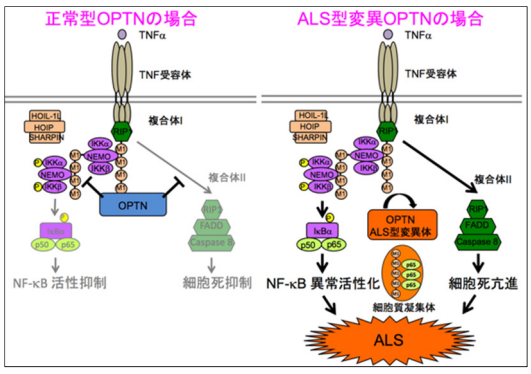


図 5. OPTN は細胞の生と死のシグナルを制御し、その破綻は ALS を発症させる

考　察

ALS は、筋肉を動かし、運動を司る神経細胞（ニューロン）が特異的に障害を受けるため、手足、のど、舌の筋肉や呼吸に必要な筋肉が痩せて力が無くなっていく難病である。発症は 60〜70 歳代が主で、男女比はおよそ 1.3 : 1 と男性が多く、国内には約 1 万人（平成 26 年度 9,950 人）の患者がおり、年々増加傾向を示している。現在、神経細胞の保護効果を持ち、病気の進行を抑制する薬剤はあるものの、根本的な治療法は確立されていない。ALS の約 90%は発症原因が不明で遺伝性のない孤発性 ALS だが、約 10%は遺伝子変異が関連する家族性 ALS である。これまでに約 20 の原因遺伝子が見出され、その遺伝子異常が引き起こす生理機能破綻を解析することで、ALS 発症機構の解明を目指す研究が精力的に進められている。*OPTN* 遺伝子変異が ALS に関わることは 2010 年に日本で発見され［5］、症例数は多く無いが、ALS 発症に関連する重要なタンパク質であることが明らかにされている。

ALS の発症機構として、ダメージを受けたタンパク質や、RNA-タンパク質複合体などが構造異常となり、タンパク質分解機構（プロテアソーム系やオートファジー系）で適切に分解されず細胞内に蓄積すること、これが NF-κB シグナルの活性化を介して神経炎症を引き起こすことが重要だと考えられている。これまでも各種神経変性疾患でユビキチン陽性凝集体が細胞内に蓄積していることはよく知られており、これはタンパク質分解の不全に由来すると考えられていたが、今回の研究からタンパク質分解ではなく、炎症惹起に関わる「直鎖状ユビキチン鎖」がサイトゾル凝集体に局在しており、神経細胞死に関わるという全く新しい知見を得ることが出来た［6］。本研究は、ALS 発症の新たな細胞機構を示したものと言える。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻の濡木理教授、和歌山県立医科大学神経内科の伊東秀文教授、広島大学原爆放射線医科学研究所分子疫学研究分野の川上秀史教授、愛媛大学プロテオサイエンスセンター無細胞生命科学部門の澤崎達也教授である。

文　献

1） Kirisako T, Kamei K, Murata S, Kato M, Fukumoto H, Kanie M, Sano S, Tokunaga F, Tanaka K, Iwai K. A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. EMBO J. 2006 Oct 18;25(20):4877-87. PMID: 17006537.

2） Tokunaga F, Sakata S, Saeki Y, Satomi Y, Kirisako T, Kamei K, Nakagawa T, Kato M, Murata S, Yamaoka S, Yamamoto M, Akira S, Takao T, Tanaka K, Iwai K. Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation. Nat Cell Biol. 2009 Feb;11(2):123-32. doi: 10.1038/ncb1821.

3） Tokunaga F, Nakagawa T, Nakahara M, Saeki Y, Taniguchi M, Sakata S, Tanaka K, Nakano H, Iwai K. SHARPIN is a component of the NF-κB-activating linear ubiquitin chain assembly complex. Nature. 2011 Mar 31;471(7340):633-6. doi: 10.1038/nature09815.

4） Tokunaga F, Nishimasu H, Ishitani R, Goto E, Noguchi T, Mio K, Kamei K, Ma A, Iwai K, Nureki O. Specific recognition of linear polyubiquitin by A20 zinc finger 7 is involved in NF-κB regulation. EMBO J. 2012 Oct 3;31(19):3856-70. doi: 10.1038/emboj.2012.241. Epub 2012 Aug 28.

5） Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, Kinoshita Y, Kamada M, Nodera H, Suzuki H, Komure O, Matsuura S, Kobatake K, Morimoto N, Abe K, Suzuki N, Aoki M, Kawata A, Hirai T, Kato T, Ogasawara K, Hirano A, Takumi T, Kusaka H, Hagiwara K, Kaji R, Kawakami H. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. Nature. 2010 May 13;465(7295):223-6. doi: 10.1038/nature08971. Epub 2010 Apr 28.

6) Nakazawa S, Oikawa D, Ishii R, Ayaki T, Takahashi H, Takeda H, Ishitani R, Kamei K, Takeyoshi I, Kawakami H, Iwai K, Hatada I, Sawasaki T, Ito H, Nureki O, Tokunaga F. Linear ubiquitination is involved in the pathogenesis of optineurin-associated amyotrophic lateral sclerosis. Nat Commun. 2016 Aug 24;7:12547. doi: 10.1038/ncomms12547.