



大阪科学・大学記者クラブ 御中

2016年8月5日

公立大学法人大阪市立大学 広報室

国立研究開発法人 日本医療研究開発機構

筋萎縮性側索硬化症(ALS)発症の仕組みの一端を解明

<概要>

大阪市立大学大学院医学研究科 分子病態学^{とくなが ふみのり}の徳永文稔教授らの研究グループは、東京大学大学院理学系研究科^{ぬれき おさむ} 濡木理教授、和歌山県立医科大学神経内科^{いとう ひでふみ} 伊東秀文教授らの研究チームとともに、家族性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子であるオプチニューリン (optineurin) の研究を行い、ALS 発症メカニズムの一端を明らかにしました。

ALS は、運動神経細胞 (ニューロン) が選択的に侵される神経難病で、多くは意識がはっきりしたまま、筋力低下のため歩行困難や構音障害 (発音が正しくできない症状) となり、呼吸不全に至りますが、根本的な治療法はありません。ALS のおよそ 90% は、発症原因が不明な孤発性 ALS ですが、約 10% は遺伝子変異が関連する家族性 ALS です。これまでに約 20 の原因遺伝子が見出され、その解析から ALS 発症機構解明を目指す研究が進められています。オプチニューリンの遺伝子変異が ALS に関わることは 2010 年に日本で発見され、重要な病因因子であることが明らかにされています。

以前、私たちはユビキチンという低分子たんぱく質が特異的な連結をした「直鎖状ユビキチン鎖」を発見し、この特異的構造体がたんぱく質分解ではなく、炎症や免疫に重要な NF- κ B (エヌエフ-カッパービー) を介したシグナル伝達経路を活性化することを見出していました。そして今回の研究で、オプチニューリンが直鎖状ユビキチン鎖に選択的に結合し、NF- κ B や細胞死を抑制していることを突き止め、実際にオプチニューリン変異に起因する ALS 患者の運動ニューロンでは、直鎖状ユビキチン鎖や活性化 NF- κ B が蓄積し、神経細胞死を引き起こしていることを明らかにしました。本研究から直鎖状ユビキチン鎖生成を介する慢性的な神経炎症の亢進が神経細胞死を引き起こすことが明らかになり、今後、ALS 治療の標的になる可能性が示唆されました。本研究の成果は、平成 28 年 8 月 24 日 (水) 午前 10 時 (英国現地時間)、日本時間では平成 28 年 8 月 24 日 (水) 午後 6 時に英国の科学雑誌 ネイチャー・コミュニケーションズにオンライン掲載されます。

【発表雑誌】 Nature Communications

【論文名】 Linear ubiquitination is involved in the pathogenesis of optineurin-associated amyotrophic lateral sclerosis

「オプチニューリン異常に伴う筋萎縮性側索硬化症の病因に直鎖状ユビキチン化が関与する」

【著者】 Seshiru Nakazawa, Daisuke Oikawa, Ryohei Ishii, Takashi Ayaki, Hirotaka Takahashi,

Hiroyuki Takeda, Ryuichiro Ishitani, Kiyoko Kamei, Izumi Takeyoshi, Hideshi Kawakami,

Kazuhiro Iwai, Izuho Hatada, Tatsuya Sawasaki, Hidefumi Ito, Osamu Nureki, and Fuminori Tokunaga

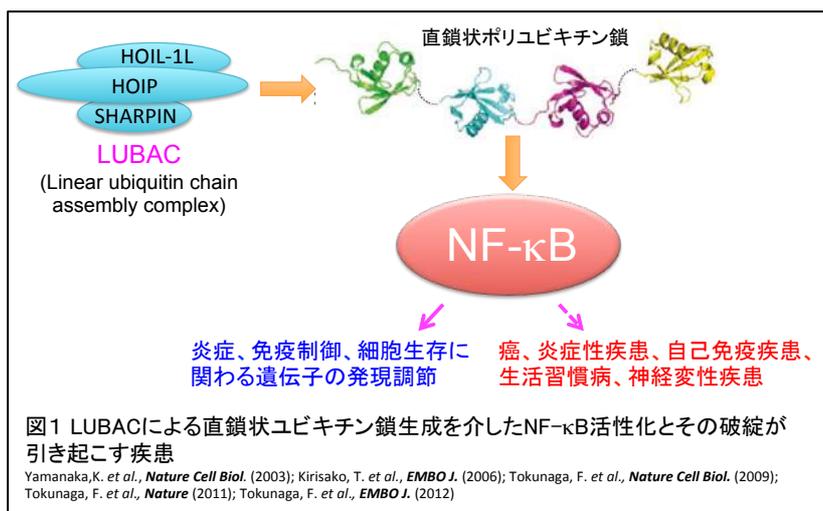
【掲載 URL】 <http://www.nature.com/ncomms/index.html>

<研究の背景>

ユビキチンは、細胞内の不要たんぱく質を分解に導く標識因子として見出されましたが、近年ではたんぱく質分解のみならず、ユビキチンの連結様式の多様性によって多彩な生理機能を調節することが明らかになっています（用語解説参照）。

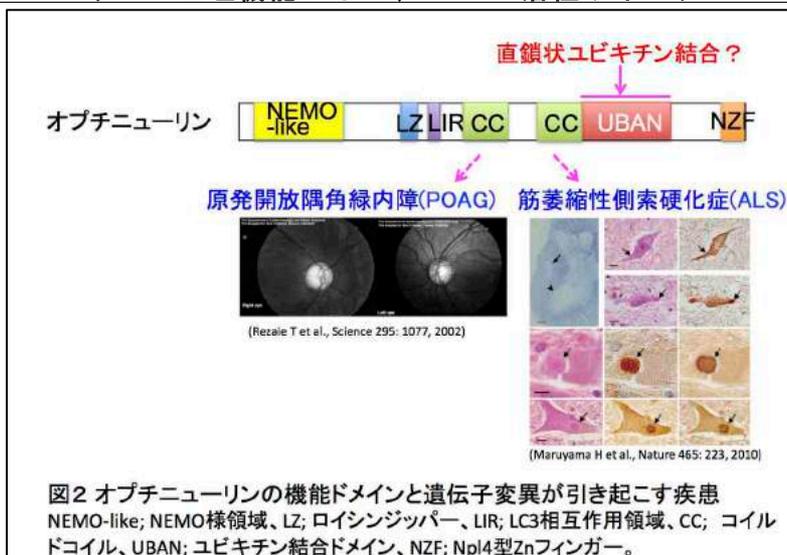
これまで知られているユビキチンの連結は、いわばジグザグ状（分子内のリシンというアミノ酸を介したイソペプチド結合による分岐鎖状ポリ

リユビキチン鎖）でしたが、私たちは真っ直ぐなタイプのユビキチン連結鎖（直鎖状ユビキチン鎖）を作ることができる酵素 LUBAC（ルーバック）を世界に先駆けて見出しました。LUBAC は直鎖状ユビキチン鎖を生成できる唯一の酵素です。さらに私たちは、**LUBAC による直鎖状ユビキチン鎖生成は、炎症や免疫応答の制御に重要な NF-κB シグナル活性化の足場として機能する**ことを明らかにしました（2009年、Nature Cell Biology 誌に発表）（図1）。さらに、LUBAC の生理的な新規サブユニットとして Sharnpin を同定し、Sharnpin が欠損したマウスでは慢性増殖性皮膚炎を引き起こすことを見出しました（2011年、Nature 誌に発表）。また、LUBAC による直鎖状ユビキチン鎖生成を介した NF-κB 活性化に拮抗する脱ユビキチン化酵素(A20)の解析から、A20 は直鎖状ユビキチン鎖に結合する領域を持っており、これが NF-κB 活性制御に重要であることや、その変異は B 細胞リンパ腫発症に関わることを明らかにしました（2012年、EMBO J 誌に発表）。現在、**直鎖状ユビキチン鎖を中心とした新しい炎症・免疫制御機構と疾患との関連の研究が世界的に高く注目されています。**



今回、解析対象としたオプチニューリン (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たんぱく質です（図2）。NEMO は私たちや他のグループによって、LUBAC によって直鎖状ユビキチンの結合を受けたり、直鎖状ユビキチン鎖に特異的に結合する UBAN ドメインと命名された領域をもつことが知られています。興味深いことに、オプチニューリンにも UBAN ドメインが存在し、直鎖状ユビキチン鎖に結合性を示す可能性が高いと考えられていました。これまでに、**オプチニューリンの生理機能として、NF-κB 活性やインターフェ**

ロン産生経路を抑制すること、オートファジー（細胞内の自食作用）を制御すること、細胞内膜輸送に関わることなどが報告されています。さらに、**オプチニューリン遺伝子の変異は、原発開放隅角緑内障 (POAG) や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの神経変性疾患を引き起こす**ことが発見されています（図2）。しかし、オプチニューリンの直鎖状ユビキチン結合性や、なぜ二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でした。そこで、本研究ではこれまでに見出された POAG を発症するオプチニューリン変異体（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ました。

< 研究の内容 >

まず私たちは、オプチニューリンの緑内障型変異や 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ました（図 3）。その結果、緑内障型オプチニューリン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 活性抑制能を喪失している**ことがわかりました。これらは、UBAN ドメインの欠損またはアミノ酸置換に起因しており、**オプチニューリンの 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**ことが示唆されました。次に、実際にオプチニューリンの UBAN ドメインが直鎖状ユビキチン鎖に結合できるか確かめるために、共結晶構造解析を行いました。その結果、オプチニューリンの UBAN ドメインは二量体を形成し、その両側に直鎖状ユビキチンが結合していることを見出しました（図 4A）。さらに、ALS 患者で変異がみられた E478 は直鎖状ユビキチン結合に重要なアミノ酸であることが示されました（図 4B）。この結果は、**オプチニューリン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**可能性を示唆しています。

そこで私たちは、ゲノム編集技術によってオプチニューリン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ました。これらの結果は、**オプチニューリンは NF-κB 活性化や細胞死を防ぐ役割を担っている**ことを意味します。最後に、オプチニューリン遺伝子変異（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 因子（リン酸化 p65）が細胞質凝集体に染色されることが見出され、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ました（図 5、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ましたが、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ものです。

そこで私たちは、ゲノム編集技術によってオプチニューリン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ました。これらの結果は、**オプチニューリンは NF-κB 活性化や細胞死を防ぐ役割を担っている**ことを意味します。最後に、オプチニューリン遺伝子変異（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 因子（リン酸化 p65）が細胞質凝集体に染色されることが見出され、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ました（図 5、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ましたが、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ものです。

これらの結果から、オプチニューリンは生理的には NF-κB 活性やアポトーシスを抑制し、細胞の生死

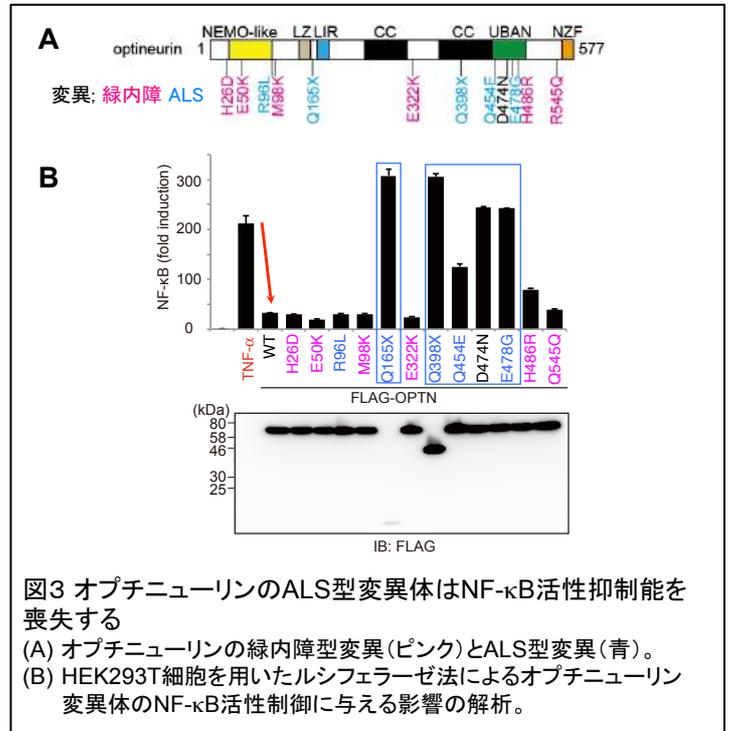


図3 オプチニューリンのALS型変異体はNF-κB活性抑制能を喪失する
(A) オプチニューリンの緑内障型変異(ピンク)とALS型変異(青)。
(B) HEK293T細胞を用いたルシフェラーゼ法によるオプチニューリン変異体のNF-κB活性制御に与える影響の解析。

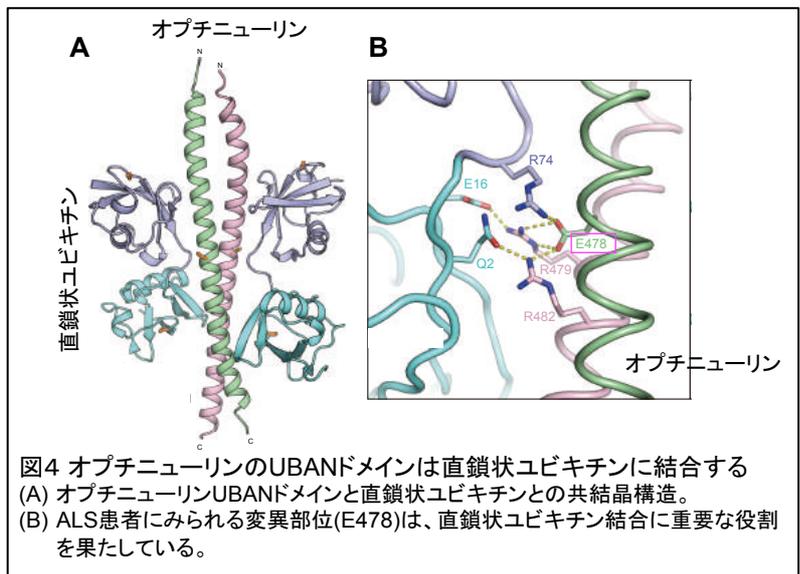
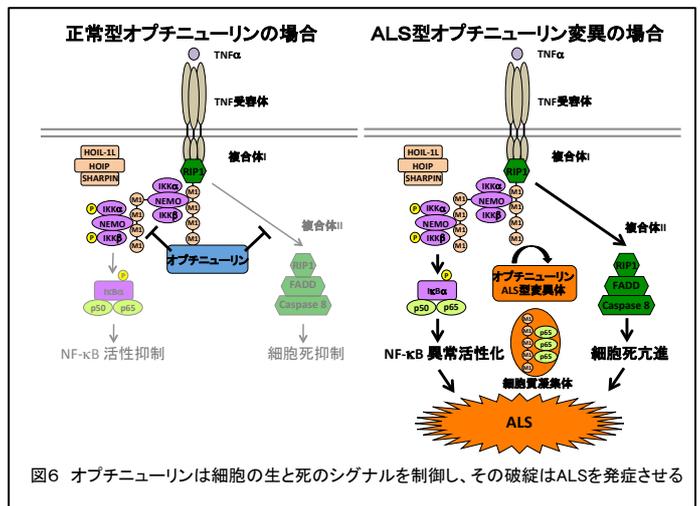
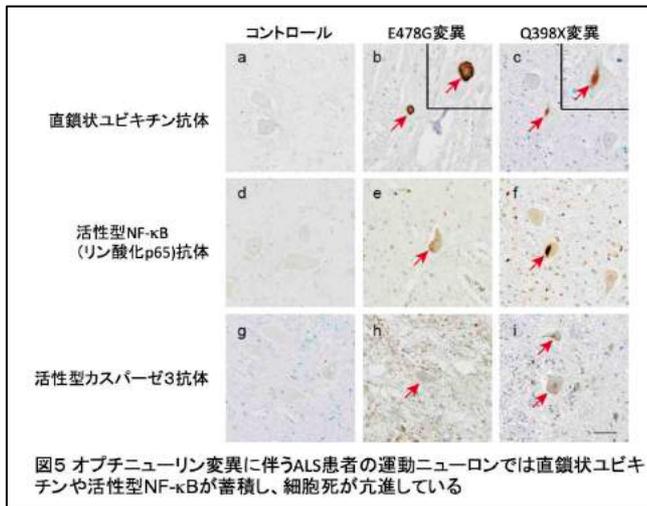


図4 オプチニューリンのUBANドメインは直鎖状ユビキチンに結合する
(A) オプチニューリンUBANドメインと直鎖状ユビキチンとの共結晶構造。
(B) ALS患者にみられる変異部位(E478)は、直鎖状ユビキチン結合に重要な役割を果たしている。

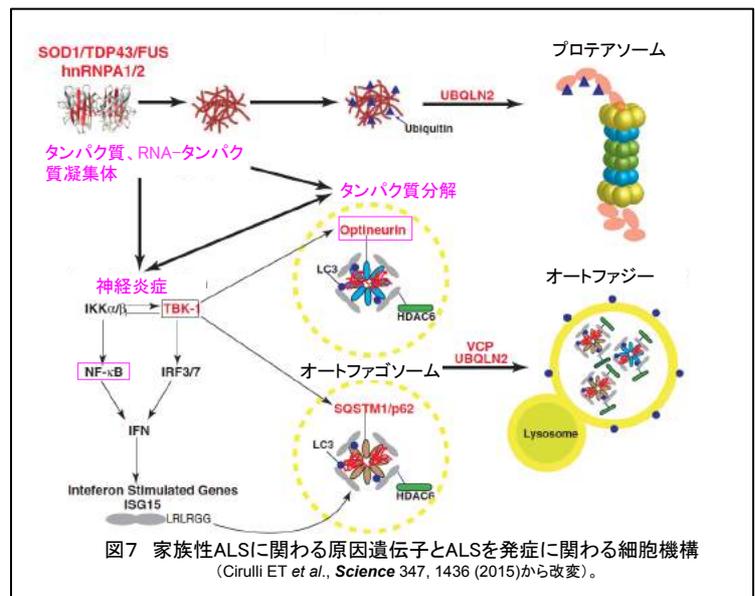
これらの結果から、オプチニューリンは生理的には NF-κB 活性やアポトーシスを抑制し、細胞の生死

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ました (図 6 左)。一方、ALS を引き起こすオプチニューリン変異では、直鎖状ユビキチン鎖に結合できないため NF- κ B 活性が恒常的に亢進すると考えられます。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- κ B 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) も亢進すると示唆されました (図 6 右)。この様に、本研究から**オプチニューリン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起こり、これが ALS 発症に関わる**可能性が示されました。



< 本研究の意義 >

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だんだんやせて力がなくなっていく難病です。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) の患者がおられ、年々増加傾向を示しています。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りますが、根本的な治療法はまだありません。ALS の約 90% は発症原因が不明で遺伝性のない孤発性 ALS



ですが、約 10% は遺伝子変異が関連する家族性 ALS です。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 発症機構解明を目指す研究が精力的に進められています。オプチニューリンの遺伝子変異が ALS に関わることは 2010 年に日本で発見され、症例数は多くありませんが、ALS 発症に関連する重要なたんぱく質であることが明らかにされています。

ALS の発症機構としては、ダメージを受けたたんぱく質や RNA とたんぱく質との複合体などが構造異常となり、たんぱく質分解機構 (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- κ B 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と考えられています (図 7)。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、これはたんぱく質分解の不全に由来すると考えられていましたが、今回の研究から**たんぱく質分解ではなく、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ました。**本研究は、ALS 発症の新たな細胞機構を示したものといたします。

<期待される効果>

本研究は LUBAC による直鎖状ユビキチン鎖生成を介した NF- κ B 活性化や、その制御破綻が ALS 発症に関わる可能性を示したもので、今後、**LUBAC 活性阻害剤が ALS 治療薬開発の標的となるなど、新たな研究進展が期待されます。**

<今後の展開について>

本研究ではオプチニューリン異常に由来する ALS に直鎖状ユビキチン鎖の生成・蓄積が関わることが分かりましたが、今後、孤発性 ALS や他の遺伝子異常に由来する ALS など研究の範囲を広げることで、本研究で見出されたメカニズムの重要性を解析することが必要です。さらに、アルツハイマー病やパーキンソン病などユビキチン陽性凝集体形成を伴う**各種神経変性疾患において、どのような連結様式のユビキチン鎖が蓄積しているか解析することで疾患発症を引き起こす細胞機構解明の新たな展開が期待**されます。また、ユビキチン修飾系や NF- κ B シグナル伝達経路因子を標的とした機能抑制性化合物が新たな創薬へ繋がる可能性があります。この様な基礎研究から ALS という難病発症の仕組みの一端が解明され、根本的治療法確立へ一歩を進めることができるよう、今後も研究を進めて参ります。

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の革新的先端研究開発支援事業（AMED-CREST）「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出」研究開発領域（研究開発総括：宮坂昌之）における研究開発課題「慢性炎症による疾患発症機構の構造基盤」（研究開発代表者：濡木理）の一環で行われました。なお、本研究開発領域は、平成27年4月の日本医療研究開発機構の発足に伴い、国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）より移管されたものです。また一部、科研費等の支援も受けています。

【用語解説】

◎ユビキチン

ユビキチンは、酵母からヒトまでの真核生物で高度に保存された低分子量たんぱく質で、細胞内で不要になったたんぱく質に結合することで、分解へ導く標識としてはたらく。このシステムを同定したイスラエルの研究者（アブラム・ハーシュコ、アーロン・チカノバー、アーヴィン・ローズ）らは 2004 年にノーベル化学賞を受賞した。その後の研究から、ユビキチンは多様な連結をすることで、たんぱく質分解だけでなく、DNA 修復やシグナル伝達、細胞内膜輸送など多彩な役割を果たすことが明らかになっている。

◎NF- κ B

NF- κ B は、1986 年に米国のデイヴィッド・バルチモアーによって見出されたたんぱく質で、炎症や免疫制御に関わる 500 種以上の遺伝子の発現調節を司る転写因子である。NF- κ B 活性化経路の破綻は、多くの癌、炎症性疾患（炎症性大腸炎など）、自己免疫疾患（関節リウマチなど）、生活習慣病（糖尿病、肥満など）、神経変性疾患（アルツハイマー病、パーキンソン病、ALS など）に関わることから、創薬標的として臨床的にも高く注目されている。

【研究内容に関するお問い合わせ先】

大阪市立大学大学院 医学研究科
分子病態学 教授 徳永 文穂
TEL : 06-6645-3720 FAX : 06-6645-3721
E-mail : ftokunaga@med.osaka-cu.ac.jp

【AMED 事業に関するお問い合わせ先】

国立研究開発法人 日本医療研究開発機構 (AMED)
戦略推進部 研究企画課
TEL : 03-6870-2224 FAX : 03-6870-2243
E-mail : kenkyuk-ask@amed.go.jp

【報道に関するお問合せ先】

大阪市立大学法人運営本部 広報室
担当：竹谷
TEL : 06-6605-3411 FAX : 06-6605-3572
E-mail : t-koho@ado.osaka-cu.ac.jp