

FTD における TDP-43 蓄積の意義

長谷川成人¹⁾ 新井 哲明¹⁾ 野中 隆¹⁾ 亀谷富由樹¹⁾
 吉田 眞理²⁾ 橋詰 良夫²⁾ Thomas Beach³⁾ 森田 光哉⁴⁾
 中野 今治⁴⁾ 織田 辰郎⁵⁾ 土谷 邦秋⁶⁾ 秋山 治彦¹⁾

(臨床神経, 48 : 994—997, 2008)

Key words : ユビキチン, タウ, リン酸化, 断片, ALS

多くの神経変性疾患では変性部位にその病気を特徴づける異常病理構造物の出現が知られている。老人斑やプリオン斑のような細胞外構造物もあるが、神経細胞、グリア細胞の細胞内や突起内に「封入体」として出現するばあいが多い。その形態、構成タンパク質などは疾患によってことなるが、正常にはみられないクロスβシート構造に富む構造をとることや界面活性剤に対して不溶性を示すことなど共通の性質を有し、多くはユビキチン抗体に陽性を示す。ユビキチンは細胞内の不要なタンパク質や異常タンパク質が生じたばあいに、そのタンパク質に共有結合し、プロテアソームに運んで処理するための目印になる分子であり、封入体として蓄積するタンパク質が異常であると認識され、プロテアソームでの分解を試みた形跡とみることができる。実際、アルツハイマー脳に蓄積するタウ、レビー小体病脳に蓄積するαシヌクレインが26SプロテアソームへのターゲッティングシグナルであるLys48を介したポリユビキチン化を受けている^{1)~3)}。重要なことに、ユビキチン化を受けて封入体に蓄積していることが証明されたタンパク質は、タウやαシヌクレインがそうであるように、その遺伝子異常によって発症する家族例が存在する。

われわれ、およびNeumannらは患者脳の不溶性タンパク質の詳細なタンパク化学解析と免疫組織学的解析により、前頭側頭葉変性症 (FTLD) と筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に出現するユビキチン陽性封入体の構成成分として核タンパク質の一種である TAR DNA binding protein of 43kDa (TDP-43) を同定した⁴⁾⁵⁾。この発見の後、TDP-43が真の構成成分か、病気の発症原因というよりも下流の反応ではないか、変性との関係はどうかなど、TDP-43の蓄積の意義についていくつかの疑問がもたれた。その理由は複数あるが、市販のTDP-43抗体が異常構造物だけでなく、正常TDP-43が局在する核を強く染めること、イムノブロット解析において対照例との違いが明確でないこと、FTLD-U患者のTDP-43の遺伝子解析

がおこなわれたがこれまで変異が発見されなかったことなどによる。

われわれはこれらの疑問を明らかにするため、TDP-43に対する様々な抗体を作製し、患者脳に蓄積するTDP-43を生化学的、免疫組織化学的に解析した。タウ、αシヌクレインのばあいがそうであったようにリン酸化部位に対する抗体作製が異常TDP-43の検出に重要と考え、まず異常リン酸化部位の同定を試みた。しかしながら患者組織に蓄積するTDP-43はアルツハイマー病のタウなどとくらべ量的に少ない上、TDP-43が酵素消化にあまり適さないアミノ酸配列であることから直接解析が困難であると予想された。そこで、リン酸化される可能性がある部位のリン酸化ペプチドを合成し、特異抗体を作製することを考えた。56カ所あるヒトTDP-43のSer/Thrのうち36カ所を選んで、抗体作製をおこなった結果、409番目のセリン(Ser409)と410番目のセリン(Ser410)のリン酸化ペプチドに対する抗体(pSer409/410)が核を染めず、患者脳の封入体を強く染色することが明らかとなった(Fig. 1)⁶⁾。この他、Ser379, Ser393, Ser403/404などのリン酸化部位に対する抗体も強弱の違いはあるが同様の染色を示した。さらに、これらの抗体を患者脳不溶性画分のイムノブロットにもちいたところ、正常対照例にはまったくみられない45kDaのリン酸化TDP-43バンド、~25kDaのC末断片と思われる複数のバンド、レーン全体がスミア状に染まる特徴的な反応が患者脳に強く検出された(Fig. 2)⁶⁾。すなわちリン酸化部位を認識する抗体をもちいることにより、これまで市販TDP-43抗体では検出できなかった異常(とくに~25kDaのバンド)が明瞭な形となって検出されたのである。市販TDP-43抗体は特異性も、親和性も高い良い抗体であるが、その認識部位はN末端側にあり、患者脳に蓄積する主要な分子種であるC末断片は認識しえないことが一つの理由と考えられる。

¹⁾ 東京都精神医学総合研究所〔〒156-8585 東京都世田谷区上北沢2-1-8〕

²⁾ 愛知医科大学加齢医学研究所

³⁾ Sun Health Research Institute

⁴⁾ 自治医科大学神経内科

⁵⁾ 下総精神医療センター

⁶⁾ 都立松沢病院検査科

(受付日: 2008年5月17日)

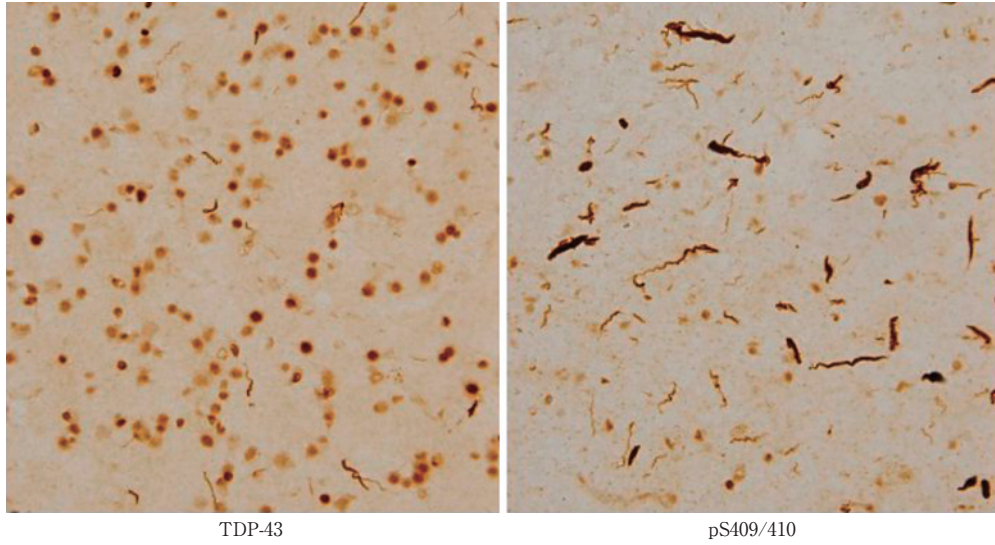


Fig. 1

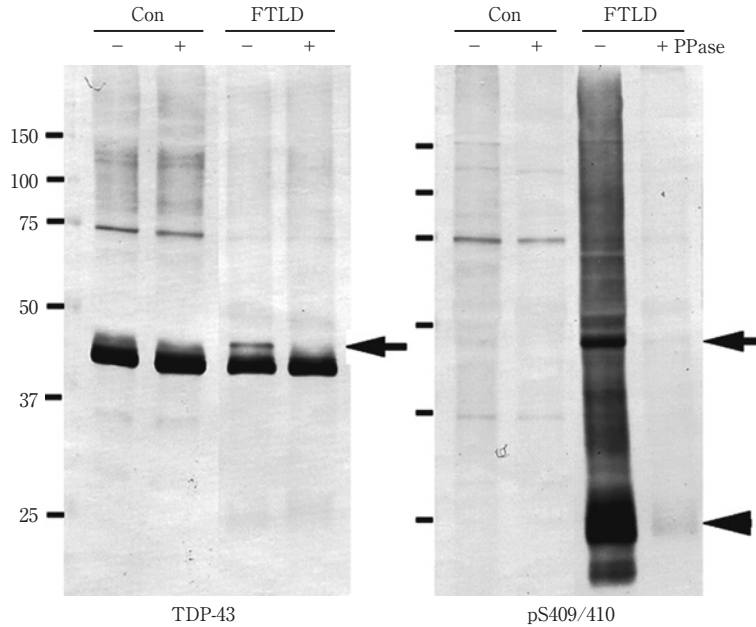


Fig. 2

TDP-43 のリン酸化部位に対する抗体が作製されたことにより、正常分子と異常分子を明確に区別して検出することが可能となり、患者脳に蓄積する異常 TDP-43 の検出感度、精度が大きく進歩した。また同時にこれまで不明瞭だった TDP-43 蓄積が明白となり、患者組織に蓄積している TDP-43 の実像が浮かび上がってきた。すなわち、患者脳に蓄積する TDP-43 はリン酸化された全長 TDP-43 と N 末を欠いた 18~26 kDa の C 末断片が主要分子であることが明らかとなった⁶⁾。リン酸化や断片化がその蓄積の原因か結果かは、タウ、 α シヌクレインのばあいと同様、今後のさらなる解析が必要であるが、これらの異常は正常 TDP-43 と患者脳に蓄積する TDP-43 を区別する重要な翻訳後修飾であることはまちがいない。

TDP-43 の蓄積と神経変性の関係についても今後の解析が待たれるが、今年に入り、たくさんのミスセンス変異が家族性および孤発性 ALS 患者に発見されてきた⁷⁻¹⁰⁾。TDP-43 タンパク質の異常そのものが ALS の発症原因となることが遺伝学的に証明されたことになる。これまで FTL D には発症と連鎖する TDP-43 の遺伝子変異はまだ同定されていないが、FTLD のばあいも TDP-43 の異常、蓄積が神経変性に深くかかわっていることが示唆される。リン酸化 TDP-43 抗体は神経病理学的解析に有用であるだけでなく、タウや α シヌクレインのばあいと同様、今後 ELISA などをもちいた診断キットの開発やワクチン療法など、臨床、治療への応用も期待される。

文 献

- 1) Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, et al: Ubiquitin is conjugated with amino-terminally processed tau in paired helical filaments. *Neuron* 1993; 10: 1151
- 2) Cripps D, Thomas SN, Jeng Y, et al: Alzheimer disease-specific conformation of hyperphosphorylated paired helical filament-Tau is polyubiquitinated through Lys-48, Lys-11, and Lys-6 ubiquitin conjugation. *J Biol Chem* 2006; 281: 10825
- 3) Anderson JP, Walker DE, Goldstein JM, et al: Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. *J Biol Chem* 2006; 281: 29739
- 4) Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, et al: TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351: 602
- 5) Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, et al: Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006; 314: 130
- 6) Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, et al: Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and ALS. *Ann Neurol* 2008; 63: 535—538
- 7) Gitcho MA, Baloh RH, Chakraverty S, et al: TDP-43 A315T mutation in familial motor neuron disease. *Ann Neurol* 2008; 63: 535—538
- 8) Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, et al: TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2008; 319: 1668—1672
- 9) Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, et al: TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2008; 40: 572—574
- 10) Yokoseki A, Shiga A, Tan CF, et al: TDP-43 mutation in Familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2008; 63: 538—542

Abstract**The significance of the TDP-43 deposition in FTLD-U and ALS**

Masato Hasegawa, M.D.¹⁾, Tetsuaki Arai, M.D.²⁾, Takashi Nonaka, M.D.¹⁾, Fuyuki Kametani, M.D.¹⁾,
Mari Yoshida, M.D.³⁾, Yoshio Hashizume, M.D.³⁾, Thomas G Beach, M.D.⁴⁾, Mitsuya Morita, M.D.⁵⁾,
Imaharu Nakano, M.D.⁵⁾, Tatsuro Oda, M.D.⁶⁾, Kuniaki Tsuchiya, M.D.⁷⁾ and Haruhiko Akiyama, M.D.²⁾

¹⁾Department of Molecular Neurobiology, Tokyo Institute of Psychiatry,
Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research

²⁾Department of Psychogeriatrics, Tokyo Institute of Psychiatry, Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research

³⁾Department of Neuropathology, Institute for Medical Science of Aging, Aichi Medical University

⁴⁾Sun Health Research Institute

⁵⁾Department of Neurology, Jichi Medical University

⁶⁾Department of Neuropsychiatry, National Shimofusa Mental Hospital

⁷⁾Department of Laboratory Medicine and Pathology, Tokyo Metropolitan Matsuzawa Hospital

Tau-negative and ubiquitin-positive inclusions (UPI) are the pathological hallmarks of frontotemporal lobar degeneration (FTLD-U) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Recently, TDP-43, a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein was identified as a component of these UPI. However, it remains to be determined whether TDP-43 is the major component of UPI, because only antibodies recognizing both normal and abnormal TDP-43 have been available. We raised antibodies to phosphopeptides representing 36 out of 64 candidate phosphorylation sites of human TDP-43. Of the generated antibodies, pS379, pS403/404, pS409, pS410 and pS409/410 clearly labeled UPI and glial cytoplasmic inclusions but not the nuclei. Immunoblot analyses of sarkosyl insoluble fractions demonstrated that the phosphorylation-specific antibodies recognized TDP-43 at -45 kDa, smearing substances and the -25 kDa fragment, all of which were present in the brains of FTLD-U and ALS but not controls. These antibodies did not recognize normal TDP-43 at 43 kDa. These results clearly indicate that abnormally phosphorylated full-length TDP-43 and the C-terminal fragments are the major component of UPI in FTLD-U and ALS. These findings together with recent discovery of mutations in the TDP-43 gene in ALS strongly suggest that TDP-43 is the key molecule responsible for neurodegeneration in FTLD-U and ALS.

(Clin Neurol, 48: 994—997, 2008)

Key words: ubiquitin, tau, phosphorylation, fragment, ALS
