

＜シンポジウム 13—1＞筋萎縮性側索硬化症の病因 TDP-43 および FUS/TLS 研究の最前線

ALS, FTLD の病因 TDP-43 の分子解剖

長谷川成人¹⁾ 新井 哲明²⁾³⁾ 野中 隆¹⁾ 辻 浩史¹⁾⁴⁾ 山下万貴子¹⁾
 細川 雅人²⁾ 亀谷富由樹¹⁾ 玉岡 晃⁴⁾ 秋山 治彦²⁾

(臨床神経 2010;50:937-939)

Key words : アミロイド, プリオン, リン酸化, ユビキチン化, 伝播

はじめに

多くの神経変性疾患はその変性部位に異常病理構造物の出現をとまう。重要なことにそのタンパク質の異常蓄積病変の広がりや病気の進行が強く相関する。アルツハイマー病の神経原線維変化やパーキンソン病のレビー小体など、主要病理構造物の構成成分は 90 年代までに同定されていたが、ユビキチン抗体の染色からその異常構造物の存在は知られるものの、正体が明らかにされていない構造物がいくつか残されていた。池田らは、前頭側頭葉変性症(frontotemporal lobar degeneration : FTLD) にタウ陰性ユビキチン陽性構造物をとまう病変が観察されることに早くから気づき、その構成成分の同定が病態、発症メカニズムを明らかにする上で重要であると考えた¹⁾。筆者らはその構成タンパク質が他の異常構造物と同様の不溶性を獲得していることを想定し、プロテオミクス解析をおこなった。その結果、対照例では検出されない低分子量領域に TDP-43 (TAR DNA binding protein of 43kDa) のペプチドが FTLD 例で検出されることに気がついた。TDP-43 の抗体を入手し、FTLD および ALS の免疫組織染色をおこなった結果、異常構造物が濃染され、さらに患者脳不溶性画分のイムノブロット解析において脱リン酸化処理で変化する異常 TDP-43 のバンドが確認されたことから、TDP-43 がその構成成分と考えられた²⁾。Neumann らは FTLD 患者の前頭葉皮質から調製したサルコシル不溶性画分をマウスに免疫して異常構造物を染める抗体を作製し、反応するバンドを二次元電気泳動で分離した後に質量分析をおこない、TDP-43 のペプチドを検出した。さらに TDP-43 抗体をもちいた免疫染色、イムノブロット解析をおこない、FTLD だけでなく、ALS にも TDP-43 の蓄積を確認すると共に、リン酸化、ユビキチン化についても検討し TDP-43 がその主要構成成分であることを同定した³⁾。

TDP-43 とその異常

TDP-43 は HIV 遺伝子の TAR に結合し発現を抑制する因子として同定されたことからこの名前がついているが、核に局在する不均一核内リボ核酸タンパク (hnRNP) の一種である。2008 年、家族性および孤発性 ALS 患者に TDP-43 の遺伝子変異が発見され⁴⁾、TDP-43 の異常が単なる結果ではなく、原因であることが明らかとなった。

患者脳には正常 TDP-43 よりもみかけ上分子量の大きい 45kDa の TDP-43 バンドが検出され、脱リン酸化するとその移動度が変化することから異常リン酸化がおこなわれていることが示唆された。そこで TDP-43 アミノ酸配列中に 56 カ所存在する Ser および Thr のうち 36 カ所についてリン酸化ペプチドを合成し、抗体作製を試み、えられた抗体が患者脳の細胞内封入体を染色するかどうかしらべた。その結果、C 末端の複数のリン酸化ペプチドに対する抗体が構造物を強く染め、とくに Ser409 と Ser410 の 2 カ所のリン酸化ペプチドに対する抗体(pSer409/410)は、核に局在する正常 TDP-43 と反応せず、患者脳の異常構造物を強く染色した⁵⁾。イムノブロットでは、リン酸化非依存性抗 TDP-43 抗体でははっきりと検出できなかった異常 (全長リン酸化 TDP-43、スメア状の反応、C 末断片の蓄積) を明瞭に検出した⁵⁾。

TDP-43 proteinopathy の細胞、動物モデル

患者脳でおこなっている蓄積を細胞、動物レベルで再現することは病気の発症機序解明だけでなく、治療法開発にとって重要である。全長 TDP-43 を細胞に発現しただけでは、核に局在するだけで、リン酸化や凝集は観察されないが、その C 末断片 (162-414,あるいは 218-414) を GFP の融合蛋白質として発現するとリン酸化された TDP-43 凝集体が形成された⁶⁾⁷⁾。さらに、この C 末端に ALS 患者に発見されたミスセンス変異を導入したところ、変異がその凝集を促進する傾向が

¹⁾ 東京都精神医学総合研究所分子神経生物学研究チーム [〒156-8585 東京都世田谷区上北沢 2—1—8]

²⁾ 同 老年期精神疾患研究チーム

³⁾ 筑波大学大学院人間総合科学研究科精神病態医学分野

⁴⁾ 同 人間総合科学研究科神経病態医学分野

(受付日 : 2010 年 5 月 22 日)

みとめられ、一部は有為差をもって検出された⁷⁾。また、凝集しやすいC末断片と全長TDPを共発現すると、一部であるがC末断片の凝集体に全長TDPが取り込まれ、全長TDP-43の核への局在が消失している像が観察された⁸⁾。患者脳においてTDP-43凝集体が存在する細胞の核の染色が消失する像が観察されるが、これを再現するものである。

TDP-43の異常蓄積が様々な機能障害を介して神経変性をおこすと考えられることから、野生型および変異型ヒトTDP-43を過剰発現するTgマウスの作製をおこなっている。野生型ヒトTDP-43を発現するTgマウスをThy1プロモータで発現するマウスを作製した結果、生後早い時期から運動機能の異常がみとめられるマウスが産まれた。小刻みなけいれんがみとめられ、下肢の運びがわるく、動作が遅い。このマウスの病理、生化学について現在検討を進めているが、明らかな封入体の形成は非常にまれである。実際の患者の病態に近いモデルかどうか今後注意深い観察が必要である。

異常TDP-43の伝播の可能性

TDP-43の異常がみとめられる疾患はTDP-43 proteinopathyと総称されるが、その病理型から、突起内の封入体が優位に出現するI型、円形の細胞内封入体が優位のII型、短い突起と細胞内封入体をとともうIII型に分類される。筆者らはpS409/410抗体をもちいたイムノブロット解析で18~26kDaのC末端断片のバンドパターンが、臨床病理型の違い(FTLDとALS)でことなることをすでに報告している⁵⁾が、この異常分子の断片パターンの違いの意味についてさらに検討した。断片の違いが、脳内でプロテアーゼによる分解を受け、分解されずに残った部分である可能性、すなわち異常分子のコンフォメーション(立体構造)の違いを反映する可能性を考えプロテアーゼ処理を試みた。その結果、トリプシン処理により45kDの全長分子、断片、スミアの反応は消失し、新たに25kD、16kDaのバンドが出現した。さらに、そのバンドパターンはALSとFTLDでことなっていた。キモトリプリシンを使っても、同様の違いが検出された。プロテアーゼ耐性分子のバンドパターンの違いは異常分子のコンフォメーションの違いを反映すると考えられる。よく似た生化学的解析が、異常プリオンのウシからヒトへの感染の検証で使われている。変異CJD患者の異常プリオンのProtease耐性バンドのパターンがウシ由来のプリオンのそれと区別がつかないことを示し、ウシからヒトへ感染したことの根拠とされている⁸⁾。

ALSにおけるTDP-43の病変は脊髄だけでなく、大脳の頭頂葉をはじめ様々な部位にみとめられる。そこで脊髄と大脳皮質(運動野)に蓄積するTDP-43の生化学解析を行った。その結果、脳と脊髄に蓄積するTDP-43は生化学的に区別できないことが示された。

アミロイド線維は、最初に正常タンパク質が変化して重合核(シード)が形成され、その重合核に正常分子が結合することによって伸長反応がおこり重合が進行するモデルが提唱さ

れている。最初に重合核が形成されるまでが律速段階とされ、この重合核が形成されると伸長反応はいちじるしく加速する。また、アミロイドは最初にできた重合核の構造に依存したアミロイドが形成されることが多いことも示されている⁹⁾。最近筆者らは細胞に重合核を導入するというまったく新しいモデルを確立し、重合核の添加によって細胞内異常タンパク質の凝集、蓄積がおこることを再現することに成功した¹⁰⁾。TDP-43がアミロイド様構造をとっているかどうかは不明であるが、異常線維構造をとって蓄積していることは示されている⁵⁾。以上の生化学、病理学的解析から、細胞内に生じた異常TDP-43がプリオンのように伝播し、それが広がることで病変が拡大して、病気が進行する可能性が考えられる。

文 献

- 1) 池田研二, 土谷邦秋, 秋山治彦ら. ピック病の再検討—“ピック小体を伴わない葉性萎縮”の位置付け. 神経研究の進歩 2001;45:329-341.
- 2) 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;351:602-611.
- 3) Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006;314:130-133.
- 4) Yokoseki A, Shiga A, Tan CF, et al. TDP-43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2008;63:538-542.
- 5) Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, et al. Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2008;64:60-70.
- 6) Nonaka T, Arai T, et al. Phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 pathological inclusions in ALS and FTLD-U are recapitulated in SH-SY5Y cells. *FEBS Lett* 2009;583:394-400.
- 7) Nonaka T, Kametani F, Arai T, et al. Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. *Hum Mol Genet* 2009;18:3353-3364.
- 8) Collinge J, Sidle KC, Meads J, et al. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 1996;383:685-690.
- 9) Yonetani M, Nonaka T, Masuda M, et al. Conversion of wild-type alpha-synuclein into mutant-type fibrils and its propagation in the presence of A30P mutant. *J Biol Chem* 2009;284:7940-7950.
- 10) Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, et al. Seeded aggregation and toxicity of alpha-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J Biol Chem* 2010.

Abstract**Molecular dissection of TDP-43 in ALS and FTLD**

Masato Hasegawa, M.D.¹⁾, Tetsuaki Arai, M.D.²⁾³⁾, Takashi Nonaka, M.D.¹⁾,
Hiroshi Tsuji, M.D.¹⁾⁴⁾, Makiko Yamashita, M.D.¹⁾, Masato Hosokawa, M.D.²⁾,
Fuyuki Kametani, M.D.¹⁾, Akira Tamaoka, M.D.⁴⁾ and Haruhiko Akiyama, M.D.²⁾

¹⁾Department of Molecular Neurobiology, Tokyo Institute of Psychiatry

²⁾Department of Psychogeriatrics, Tokyo Institute of Psychiatry

³⁾Department of Neuropsychiatry, University of Tsukuba

⁴⁾Department of Neurology, University of Tsukuba

Proteomic and immunochemical analyses have shown that hyperphosphorylated TDP-43 is a major component of ubiquitin-positive inclusions from brain of frontotemporal lobar degeneration (FTLD) patients. In 2008, TDP-43 gene mutations were discovered in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS), indicating that TDP-43 protein abnormality is associated with neurodegeneration. We raised antibodies against 36 synthetic phosphopeptides and demonstrated that abnormal phosphorylation takes place in the C-terminal region of TDP-43. One antibody, pS409/410, stained the inclusions in both FTLD and ALS brains, with no nuclear staining. Immunoblotting revealed the presence of hyperphosphorylated 45 kDa band, smearing substances and 18-26 kDa fragments in deposits, and the band patterns were different between FTLD and ALS. Overexpression of TDP-43 C-terminal fragments as GFP-fusions resulted in formation of inclusions positive for antibodies to phosphorylated TDP-43 and ubiquitin. We further investigated the protease-resistant TDP-43 and found that it is also different between ALS and FTLD, supporting the idea that the different band patterns reflect different conformations of abnormal TDP-43. Interestingly, the C-terminal band pattern is indistinguishable among brain regions and spinal cord in each individual patient. These results suggest that abnormal TDP-43 produced in a cell may be transferred to different regions and propagated during disease progression.

(Clin Neurol 2010;50:937-939)

Key words: amyloid, prion, phosphorylation, ubiquitination, propagation
