

## ＜シンポジウム (2)－2－2＞ALS の病態進行機序の新展開

### TDP-43 のシード依存的細胞内凝集体形成

野中 隆 長谷川成人

(臨床神経 2012;52:1056-1058)

**Key words** : 前頭側頭葉変性症, 筋萎縮性側索硬化症, TDP-43, 伝播, シード依存的凝集体形成

アルツハイマー病 (AD) やパーキンソン病 (PD) などに代表される多くの神経変性疾患では, 患者脳の神経細胞内に疾患特異的な封入体が観察される。たとえば, AD では神経原線維変化, PD ではレビー小体と呼ばれる細胞内封入体が, 変性神経細胞内にみとめられ, 前者ではタウ, 後者では  $\alpha$  シヌクレインが, それらの異常構造物の主要な構成タンパク質であることが知られている。これらの構造物は多くのばあい, リン酸化およびユビキチン化といった翻訳後修飾を受け, かつ高度に不溶化した線維状構造物である。これらの細胞内封入体が出現する部位では神経脱落が顕著に観察されることから, 封入体あるいはその前段階の構造物と考えられるオリゴマーの細胞毒性により神経細胞死が誘導され, 最終的に発症にいたるのではないかと考えられている。

2006 年に, われわれのグループおよび米国のグループはそれぞれ独立して, 前頭側頭葉変性症 (FTLD-TDP) や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の患者脳などにみられる細胞内異常凝集体の主要な構成タンパク質として TDP-43 を同定した<sup>1)2)</sup>。TDP-43 は, 元々ヒト・エイズウイルス (HIV-1) 遺伝子の末端反復配列内に存在する TAR (trans activation responsive region) という領域に結合する因子として発見された。このタンパク質は, 414 アミノ酸からなる一本鎖ポリペプチドであり, 核に局在するタンパク質である。N 末端側には核移行シグナルを有し, 2つの RNA 認識配列 (RRM), およびグリシンに富む領域 (Gly-rich) が存在する。TDP-43 は, 不均一核リボ核酸タンパク質 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein : hnRNP) の一種であり, Gly-rich ドメインをふくむ C 末端領域を介して hnRNP A2/B1 や hnRNP A1 などの他の RNA 結合タンパク質と結合し, タンパク質複合体を形成することによってスプライシング抑制に働く (Fig. 1)。たとえば, TDP-43 は, 嚢胞性線維症の原因遺伝子である嚢胞性線維性膜貫通調節因子 (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator : CFTR) のエクソン 9 をスキップさせ, スプライシング抑制因子として作用する<sup>3)</sup>。また最近では, ヒト低分子量ニューロフィラメント (hNFL) mRNA の安定化<sup>4)</sup>, cyclin-dependent kinase 6 (Cdk6) の発現抑制<sup>5)</sup>, survival of motor neuron 2 遺伝子 (SMN2) のエクソン 7 のスプライシング促進<sup>6)</sup>などが報告されている。

2008 年には, 家族性および孤発性 ALS において, TDP-43

遺伝子 (TARDBP) のミスセンス変異が相次いで報告され, TDP-43 の異常と神経変性の直接的な関係が明らかとなった。TARDBP は, 染色体 1p36.21 上に存在し, 6 個のエキソンをふくむ。現在までに約 30 カ所の変異が報告されているが, 1つ (D169G) を除いてその他すべては, C 末端領域 (239~414 残基) をコードするエクソン 6 にみだされている (Fig. 1)。またごく最近, 運動ニューロン障害をともなう家族性 FTLD-MND においても, TARDBP のミスセンス変異がエクソン 6 内に発見された。TDP-43 の C 末端領域には Gly-rich ドメインが存在するため, 安定な立体構造を形成しにくいと推測され, このような領域に変異が多数集中していることから, これらの変異が TDP-43 の立体構造に影響をおよぼす可能性が考えられる。

FTLD-TDP や ALS 患者脳に蓄積する TDP-43 は, AD におけるタウや PD における  $\alpha$  シヌクレインと同様に, 脳内においてリン酸化およびユビキチン化を受けて蓄積している<sup>7)</sup>。われわれが作製した抗リン酸化 TDP-43 抗体による患者脳の解析より, 脳内に蓄積した TDP-43 において, 少なくとも 403, 404, 409, および 410 残基目のセリンがリン酸化されていることをみだした<sup>8)</sup>。ユビキチン化の部位については現在検討中であるが, 分子の C 末端側にはリジン残基が数カ所しかないことから, N 末端側のリジン残基がユビキチン化されている可能性が高いと考えられる。これらの凝集体の出現部位では神経細胞の脱落が多くみられることから, 異常蓄積した TDP-43 が細胞障害をひきおこし, 最終的に神経細胞死を誘導すると考えられるが, その詳細は不明である。本研究では, TDP-43 の細胞内凝集体の形成やその細胞障害機構を明らかにする目的で, 患者脳にみられる TDP-43 の細胞内凝集体を培養細胞に再現させることを試みた。

線維形成能を有する多くのタンパク質は, *in vitro* において重合核 (シード) が存在するとその線維形成はいちじるしく促進することが知られている。そこで, 患者脳より調製した界面活性剤不溶性画分をシードとして細胞内に導入することにより<sup>9)</sup>, この線維化促進反応を細胞内で再現させ, 細胞内凝集体が形成されるかどうかについてしらべた。

SH-SY5Y 細胞に TDP-43 のプラスミドを発現させただけでは, 患者脳にみられる細胞内凝集体は出現しないが, 予めプラスミドを一過性に発現させた細胞に, FTLD-TDP や ALS

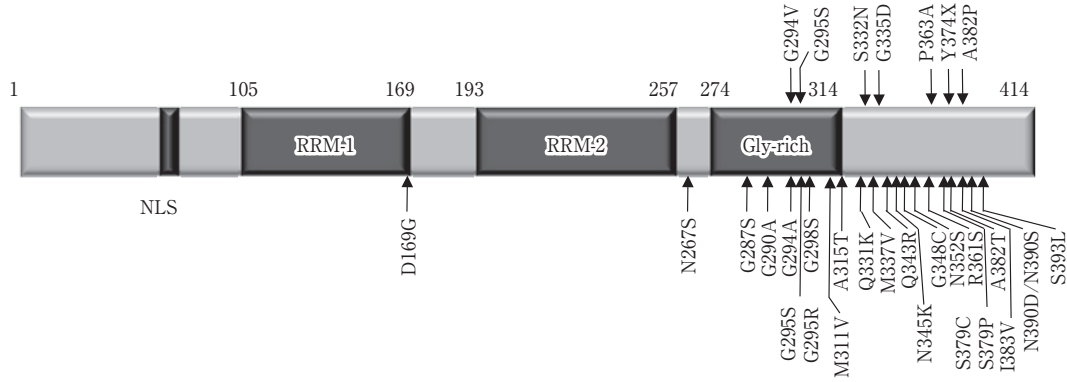


Fig. 1 TDP-43 の一次構造.

TDP-43 には、核移行シグナル (NLS)、2つの RNA 認識配列 (RRM) およびグリシンに富む領域 (Gly-rich) のドメインが存在する。これまで 30 以上の変異が報告されているが、興味深いことに、その多くは分子の C 末端側に集中している。

患者脳より調製した界面活性剤不溶性画分を導入した細胞では、TDP-43 の細胞内凝集体が出現した。これらの凝集体は、本来なら蓄積しないプラスミド由来の TDP-43 から構成され、患者脳に蓄積する TDP-43 と同じようにリン酸化およびユビキチン化といった翻訳後修飾を受けていた。また、凝集体のイムプロット解析においては、不溶性画分に全長 TDP-43 の蓄積および C 末端断片が顕著に検出された。とくに C 末端断片のバンドパターンは、シードとして加えた患者脳の不溶性画分のバンドパターンとよく似ていた。さらに、乳酸脱水素酵素 (LDH) 漏出アッセイにより、このような TDP-43 の凝集体を形成する細胞において細胞死がみとめられた。これらの結果より、細胞外から加えたシード依存的に、可溶性の全長 TDP-43 が細胞内で蓄積することにより細胞死がひきおこされる可能性が考えられる。以上のことから、この細胞モデルは、これまで報告されたモデルよりも、FTLD-TDP や ALS の患者脳の異常を反映したモデルであり、これらの疾患の治療薬を開発する上で非常に有用なツールになると期待できる。

※本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織、団体はいずれもありません。

## 文 献

- 1) 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.
- 2) Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006;314:130-133.
- 3) Buratti E, Dork T, Zuccato E, et al. Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping. *EMBO J* 2001;20:1774-1784.
- 4) Strong MJ, Volkening K, Hammond R, et al. TDP43 is a human low molecular weight neurofilament (hNFL) mRNA-binding protein. *Mol Cell Neurosci* 2007;35:320-327.
- 5) Ayala YM, Misteli T, Baralle FE. TDP-43 regulates retinoblastoma protein phosphorylation through the repression of cyclin-dependent kinase 6 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:3785-3789.
- 6) Bose JK, Wang IF, Hung L, et al. TDP-43 Overexpression Enhances Exon 7 Inclusion during the Survival of Motor Neuron Pre-mRNA Splicing. *J Biol Chem* 2008;283:28852-28859.
- 7) Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, et al. Molecular dissection of TDP-43 proteinopathies. *J Mol Neurosci* 2011;45: 480-485.
- 8) 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.
- 9) Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, et al. Seeded aggregation and toxicity of alpha-synuclein and tau. *J Biol Chem* 2010;285:34885-34898.

**Abstract****Intracellular seeded aggregation of TDP-43**

Takashi Nonaka and Masato Hasegawa  
Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

TAR-DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43) is the component protein of inclusions in brains of patients with frontotemporal lobar degeneration (FTLD-TDP) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Here we report a seed-dependent TDP-43 aggregation model using SH-SY5Y cells into which detergent-insoluble TDP-43 from diseased brains is introduced to provide seeds for aggregation. When these seeds were introduced into cells expressing HA-tagged TDP-43, round aggregates composed of phosphorylated and ubiquitinated HA-tagged TDP-43 were formed. Biochemical fractionation revealed the presence of Sarkosyl-insoluble phosphorylated full-length TDP-43 as well as its C-terminal fragments. Cells bearing TDP-43 inclusions exhibited increased levels of cell death and proteasome dysfunction. This seeding model reproduces characteristic features of affected neurons in brains with TDP-43 proteinopathy.

(Clin Neurol 2012;52:1056-1058)

**Key words:** frontotemporal lobar degeneration (FTLD-TDP) , amyotrophic lateral sclerosis (ALS), TAR-DNA binding protein of 43 kDa, propagation, seed-dependent protein aggregation

---