

＜シンポジウム (3)－2－2＞FTLDの基礎と臨床

TDP-43, FUS/TLS と Ataxin2 における ALS/FTLD-U の分子病態

伊東 大介

(臨床神経 2012;52:1221-1223)

Key words : TDP-43, FUS, アタキシン2, 筋萎縮性側索硬化症, 前頭側頭葉変性症

近年の病理学的および遺伝学的アプローチにより、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) およびユビキチン陽性封入体をともなう前頭側頭葉変性症 (FTLD-U) の分子基盤として TDP-43 と FUS/TLS が同定され、ALS/FTLD-U の発症メカニズムの理解が急速に進展している¹⁾。両蛋白質とも RNA 認識モチーフをもち、mRNP 顆粒の一つであるストレス顆粒 (stress granule : SG) の構成要素であり、罹患組織での細胞質内局在の異常といった共通の生化学的特性を有する^{1)~3)}。近年、TDP-43 の結合標的 RNA を同定することを目的とした包括的な解析により、TDP-43 と FUS/TLS は多様な mRNA の翻訳、安定化、代謝、スプライシングに重要な役割を持つと考えられている。したがって、TDP-43 および FUS とともに、RNA の品質管理機構を介して ALS/FTLD-U の分子病態に関与していると考えられる¹⁾。

TDP-43 は、35, 25kDa の C 末端断片 (p35f, p25f) が caspase-3 依存性に産生され、病態への関与していることが指摘されていた⁶⁾。われわれは、caspase-3 欠損細胞やアラニンシキンをもちいた解析で、caspase-3 依存性の p35f, p25f 以外に、caspase-3 非依存性で開始コドンのシフトにより産生される新規アイソホーム (p35iso, p25iso) が存在することをみいだした³⁾。特記すべき点は、p35f, p35iso は、核移行シグナルをもたないがこの RNA 認識モチーフが完全に保たれていることであり、この p35iso を培養細胞に発現させると RNA の代謝や品質管理に関与する SG が誘導されることがわかった。したがって、TDP-43 蛋白質の細胞質機能として SG を介し RNA の品質管理にかかわる可能性が示された。次に、FUS においても同様に解析を展開した。細胞内局在の解析により C 末端の欠損株 (ΔC-FUS) では核輸送が障害され、細胞質に局在していた。また、ALS 関連変異導入 FUS の細胞内局在は核から細胞質に移行することをみいだした⁷⁾。したがって、FUS の ALS 関連変異は C 末端の核移行シグナルを障害することが示された。変異型 FUS の細胞質への過剰移行、蓄積が変性カスケードのトリガーとなると考えられた。さらに、強制発現変異型 FUS は、TDP-43 の p35 断片 (以下 TDP-p35) と協同して SG を形成することをみいだした。これらの知見をもとに、われわれは TDP-43 と FUS などの RNA 結合蛋白質の細胞質移行と SG 形成、過剰蓄積を介して RNA 代謝を攪乱し神経変性をひき起こすとする病態カスケードを提唱してい

る¹⁾。

近年、Elden らは、酵母、ショウジョウバエ網膜をもちいた研究で遺伝性脊髄小脳変性症 2 型 (SCA2) 関連しポリグルタミン残基を有する Ataxin2 が、TDP-43 毒性の強力な調節因子であることを示した⁸⁾。さらに同著者らは、ALS 患者のゲノム解析により、中程度の長さのポリグルタミン伸張 (27~33 のグルタミン残基) を持つ Ataxin2 の発現が ALS のリスクと関連することを明らかにした。注目すべき点として、Ataxin2 も RNA オリゴヌクレオチドに結合する Like Sm ドメイン (Lsm ドメイン) を持つ細胞質 RNA 結合タンパクであることである⁹⁾。

われわれは、Ataxin2 による TDP-43 と FUS の病理学的経路の調節機序を明らかにすることを目的として、発現細胞内での Ataxin2, TDP-43, FUS の関連を検討した。

1) 内因性 Ataxin2 は ALS 関連分子である TDP-43 および FUS によって形成されるストレス顆粒内に局在化する。

TDP-43 (全長または TDP-p35f) および GFP で標識した FUS (野生型または変異型 P525L) を発現させた HeLa 細胞をもちいて、内因性 Ataxin2 の三重免疫蛍光染色をおこなった。p35f と P525L を共発現させると協同的に SG を形成するが、Ataxin2 抗体により内因性の Ataxin2 もこの SG に共局在していた。これらの所見は、Ataxin2 と SG 内の ALS/FTLD-U 関連 RNA 結合タンパク TDP-43 および FUS とは特異的な相互作用を持っていることを示唆している。三つの ALS/FTLD-U 関連分子が同一の細胞内コンパートメントに存在していることは大変興味深い。

2) Ataxin2 の過剰発現は ALS/FTLD-U 関連分子 FUS および TDP-43 のミスロケーションを増悪させる。

次に、Ataxin2 の発現変化が変異型 FUS または TDP-p35f の細胞質内レベルにどのように影響をおよぼすかを検討した。Ataxin2 (Q22) 存在下または非存在下で変異型 FUS または TDP-p35f を発現させた細胞をもちいて、細胞質内にびまん性に分布した変異型 FUS と TDP-p35f の蛍光レベルを定

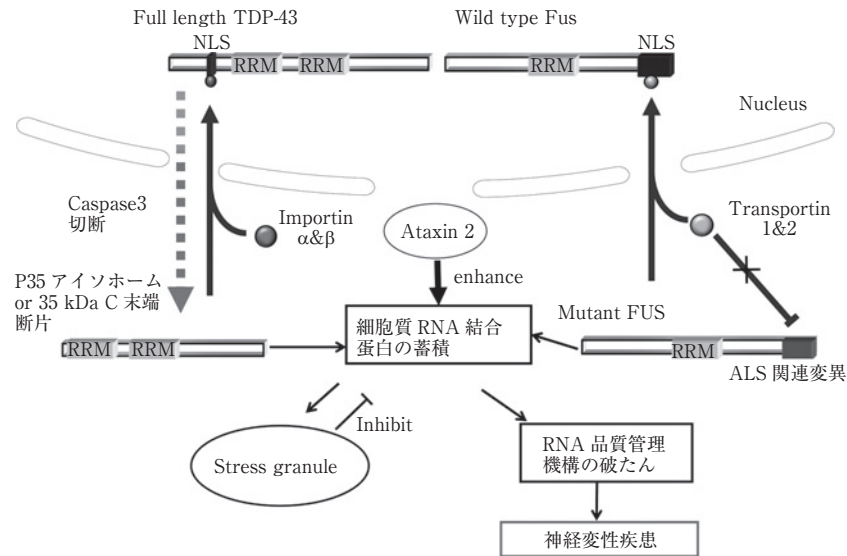


Fig. 1 TDP-43とFUSプロテインパチーにおける細胞質の異常局在と神経変性分子メカニズム。全長TDP-43は、importin α , β により核内に輸送されるが、NLSを持たないp35isoとcaspase-3切断p35fは細胞質に分布する。一方、FUSはtransportinにて核内に輸送されるが、ALS関連変異はC末端NLSのtransportinとの結合を低下させ、変異型FUSは細胞質に分布することとなる。細胞質内に蓄積したRNA結合蛋白TDP-43とFUSは、RNA品質管理機構を破たんさせ、神経変性カスケードをひきおこすと考えられる。また、Ataxin2はおそらくTDP-43とFUSの細胞内異常局在を増悪させ、神経変性カスケード促進させるものと示唆される。

量した。Ataxin2を過剰発現した細胞ではTDP-p35fと変異型FUSの全細胞内レベルは、Ataxin2を導入していない細胞よりも有意に高かった。細胞内コンパートメント解析の結果、細胞質にびまん性に分布した変異型FUSとTDP-p35fは、Ataxin2過剰発現下で明らかに増加していた。一方、これらの蛋白の核内分布は、Ataxin2過剰発現細胞で有意に低かった。以上より、Ataxin2の発現上昇は、細胞質の変異型FUSとTDP-p35fを増加させ、逆に両蛋白の核内分布を減少させミクロケーションを増悪させることが示唆された。

まとめ

われわれの検討から、Ataxin2の過剰発現は細胞質TDP-p35fと変異型FUSの濃度を上昇させ、一方、核内分布は減少させることが明らかになった。これらの所見から、Ataxin2がTDP-43やFUSなどのRNA結合タンパクの細胞内局在の異常をひきおこすことにより、RNAの質管理機構の破たんを増長させ、ALS/FTLD-U変性カスケードをひきおこしているとかんがえられた。このAtaxin2は、ALS/FTLD-Uの新規の治療ターゲットになりうる可能性が示唆された(Fig. 1)。

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

文献

1) Ito D, Suzuki N. Conjoint pathological cascades mediated by the ALS/FTLD-U linked RNA-binding proteins. *Neurology* 2011;77:1636-1643.

2) Ito D, Seki M, Tsunoda Y, et al. Nuclear transport impairment of ALS-linked mutations in FUS/TLS. *Ann Neurol* 2010;69:152-162.

3) Nishimoto Y, Ito D, Yagi T, et al. Characterization of alternative isoforms and inclusion body of the TAR DNA-binding protein-43. *J Biol Chem* 2010;285:608-619.

4) Tollervey JR, Curk T, Rogelj B, et al. Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43. *Nat Neurosci* 2011;14:452-458.

5) Polymenidou M, Lagier-Tourenne C, Hutt KR, et al. Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nat Neurosci* 2011;14:459-468.

6) Zhang YJ, Xu YF, Dickey CA, et al. Progranulin mediates caspase-dependent cleavage of TAR DNA binding protein-43. *J Neurosci* 2007;27:10530-10534.

7) Ito D, Seki M, Tsunoda Y, et al. Nuclear transport impairment of ALS-linked mutations in FUS/TLS. *Ann Neurol* 2011;69:152-162.

8) Elden AC, Kim HJ, Hart MP, et al. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature* 2010;466:1069-1075.

9) Albrecht M, Golatta M, Wullner U, et al. Structural and functional analysis of ataxin-2 and ataxin-3. *Eur J Biochem* 2011;77:1636-1643.

chem 2004;271:3155-3170.
10) Nonhoff U, Ralser M, Welzel F, et al. Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and inter-

feres with P-bodies and stress granules. Mol Biol Cell 2007;18:1385-1396.

Abstract

Conjoint pathological cascades mediated by RNA-binding proteins, TDP-43, FUS and Ataxin-2

Daisuke Ito, M.D., Ph.D.

Department of Neurology, School of Medicine, Keio University

Recently, critical RNA-binding proteins that are directly associated with the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions (FTLD-U) have also been identified, including TAR DNA-binding protein (TDP-43), fused in sarcoma/translated in liposarcoma (FUS) protein and ataxin-2. TDP-43 and FUS are normally localized in the nucleus, in sites affected by ALS and FTLD-U, but both are mislocalized to the cytoplasm and form cytoplasmic inclusions. They are transported to the nucleus via nuclear import receptors, but also contribute to the formation of stress granules (SGs), which are intracytoplasmic structures incorporating RNA. C-terminal truncations of TDP-43 eliminate the nuclear transport signal and cause mislocalization of the protein to the cytoplasm, where it accumulates and forms SGs. ALS-associated FUS mutations impair nuclear transport and cause mislocalization of FUS to the cytoplasm, where it also contributes to assembly of SGs. Furthermore, the ALS susceptibility factor ataxin-2 is recently identified as a potent modifier of TDP-43 toxicity and growing evidence indicates that intermediate-length polyglutamine expansions in ataxin-2 are a genetic risk factor for ALS. Interestingly, ataxin-2 is also a cytoplasmic RNA-binding protein and a constituent protein of SGs, suggesting that it is a part of the common pathological cascade formed by TDP-43, FUS and ataxin-2. Thus, we propose that aberrant distribution of the RNA-binding proteins TDP-43, FUS, and ataxin-2 into the cytoplasm leads to impairment of the RNA quality control system, forming the core of the ALS/FTLD-U degenerative cascade.

(Clin Neurol 2012;52:1221-1223)

Key words: TDP-43, FUS, Ataxin-2, Amyotrophic lateral sclerosis, Frontotemporal lobar degeneration
