

< Symposium 33-1 > TDP-43 の新展開

TDP-43 変異の生化学的異常

山中 宏二¹⁾

要旨：変異 TDP-43 タンパク質の生化学的特徴と臨床情報の検討から、変異 TDP-43 の細胞内半減期は延長し、半減期と ALS の発症年齢は負に相関することをみいだした。本知見に基づき、TDP-43 の細胞内半減期を自由に調節できる細胞モデルを開発した。TDP-43 タンパク質を安定化するとタンパクの切断、界面活性剤に対する不溶化など孤発性 ALS の病巣でみられる TDP-43 の生化学的特徴を再現した。安定化 TDP-43 の存在下では自己 mRNA の制御機能が破綻し、TDP-43 タンパク質発現を慢性的に上昇させ、蛋白質の機能不全を惹起することを通じて、一部は gain-of-toxicity の機序で神経毒性をきたしうる。

(臨床神経 2014;54:1148-1150)

Key words : TDP-43, 筋萎縮性側索硬化症, タンパク質安定性

TDP-43 は、孤発性 ALS や前頭側頭葉変性症 (FTLD) などの病巣に異常蓄積する RNA 結合タンパク質であり、転写・翻訳制御、スプライシング制御など多面的な RNA 制御に関する機能が報告されている。TDP-43 タンパク質のどのような機能変調が ALS の運動神経変性に関与しているかを知るとは、孤発性 ALS の病態解明に向けて非常に重要であると考えられる。その第一歩として、ALS 患者由来の TDP-43 変異に着目した神経変性メカニズムに関する研究がすすめられている。本講演では、TDP-43 の生理的機能および変異 TDP-43 の生化学的異常について、自らの知見を交えてレビューする。

TDP-43 は主に核に局在する RNA 結合タンパク質であり、転写・翻訳制御、スプライシング制御など多面的な RNA 制御に関する機能がこれまで報告されている。しかし、TDP-43 のどのような機能の変調が ALS における運動神経変性に直結するものであるかは未解明であった。そこで、われわれはまず TDP-43 の核内の微細局在を検討した。TDP-43 は核内のスプライソソーム因子の成熟の場である Gem に集積し、脊髄性筋萎縮症 (SMA) の遺伝子産物 SMN (survival of motor neuron) タンパク質や、遺伝性 ALS の病因遺伝子産物 FUS/TLS タンパク質と結合することをみいだした。SMA の病態仮説の一つに、SMN の喪失による pre-mRNA のスプライシング制御の不調がある。そこで、TDP-43 が SMN と類似の機能を有する可能性を考えて解析をおこない、TDP-43 は small nuclear RNA (U snRNA) の制御に関与していることをみいだした。孤発性 ALS 脊髄試料では、ALS 運動神経核内の Gem の消失、スプライソソーム構成因子 U snRNA の異常蓄積をみとめたことから、ALS の運動神経では、TDP-43 の機能変調を介して pre-mRNA スプライシング異常をきたすことが、神経変性機序の一因となりうると考えられた¹⁾ (Fig. 1A, B)。

遺伝性 ALS 患者由来の TDP-43 変異がどのような機能異常

を示すかは、神経変性機序を明らかにするうえで重要と考えられる。ところが、野生型 TDP-43、変異型 TDP-43 ともに培養細胞、トランスジェニックマウスにおいて強制発現すると神経毒性、細胞毒性が惹起される。広く検討されている ALS 遺伝子である SOD1 変異にくらべて、野生型と変異型の表現型、生化学的性状の差をみいだすことは容易でない。

そこで、われわれは、まず TDP-43 ミスセンス変異を有し、明らかな優性遺伝形式の家族歴を有する ALS 患者約 80 名に関する既報告の臨床情報を検討することから開始した。同時に、培養神経細胞をもちいて、約 20 種類の変異 TDP-43 タンパク質の生化学的特徴を網羅的に解析し、疾患由来の変異 TDP-43 に共通する生化学的特徴をみいだした。カルボキシ末端に集中する変異 TDP-43 の細胞内半減期は野生型にくらべて延長し、半減期の長い変異体を有する患者ほど ALS の発症年齢が早く、双方のパラメーターには統計学的に有意な相関がみられた²⁾。さらに、RNA を認識するドメインである RRM 領域に局在する TDP-43 変異においても細胞内半減期が延長していることをみいだした³⁾ (Fig. 1C~E)。リコンビナントタンパク質をもちいた構造学的解析によっても、野生型と比較して変異 TDP-43 タンパク質はむしろ安定であることは、本知見を支持する。

これらの知見に基づき、TDP-43 の細胞内半減期を自由に調節できる細胞モデルを開発した。培養細胞において野生型 TDP-43 タンパク質を安定化するとタンパクの切断、界面活性剤 Sarkosyl に対する不溶化など孤発性 ALS の病巣でみられる TDP-43 の生化学的特徴を再現し、神経毒性を呈した。さらに安定化 TDP-43 の存在下では自己 mRNA の制御機能が破綻し、異常タンパク質の蓄積によりプロテアソームの機能が低下することが判明した。つまり、変異 TDP-43 は、その安定化を通じて TDP-43 タンパク質発現のセットポイントを慢性

¹⁾ 名古屋大学環境医学研究所病態神経科学分野 [〒464-8601 愛知県名古屋市千種区不老町]
(受付日：2014年5月24日)

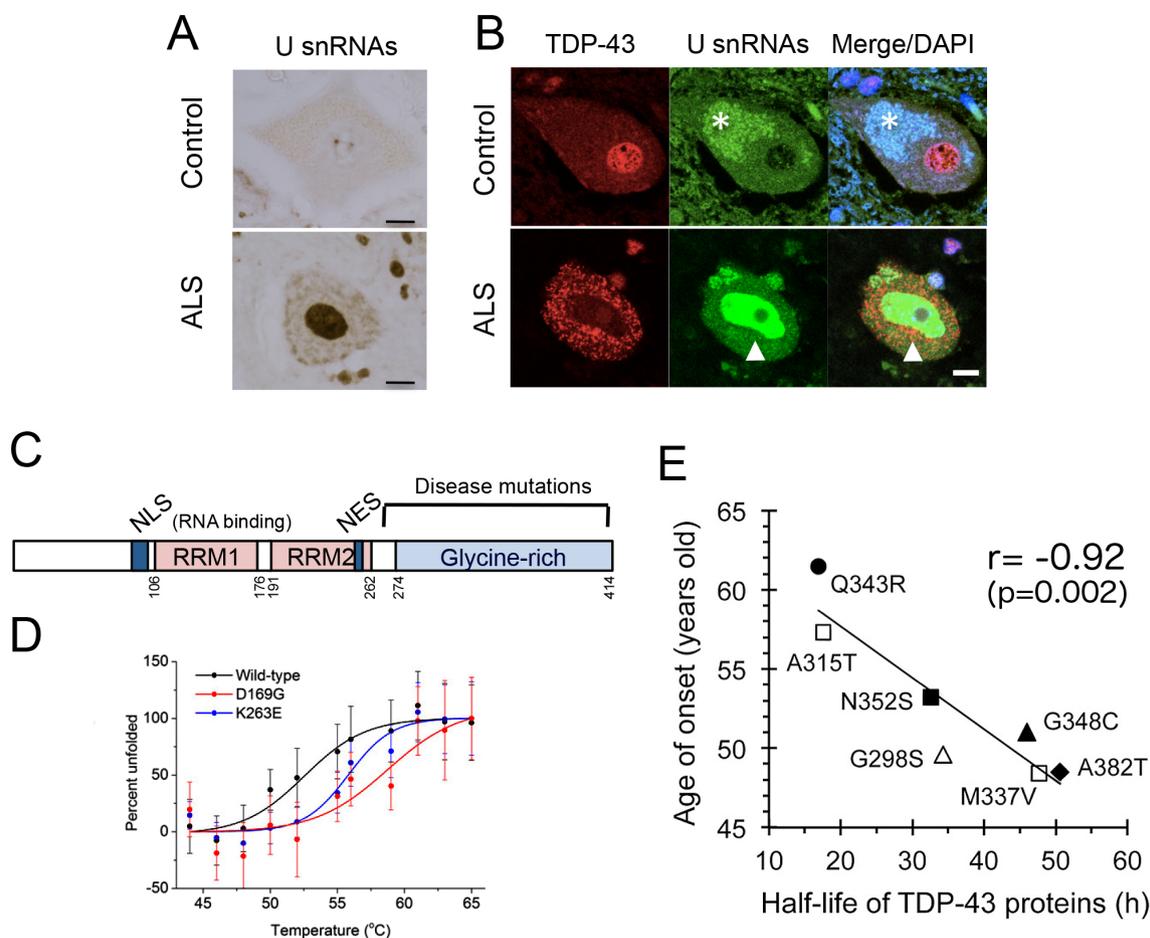


Fig. 1 TDP-43 abnormality in sporadic and familial ALS.

(A, B) Abnormal accumulation of U snRNAs in the lumbar motor neurons of sporadic ALS patients. Spinal cord sections derived from control and ALS patients were stained with indicated antibodies. Arrowhead indicates nuclear accumulation of U snRNA. Scale bars: 20 μ m (left), 10 μ m (right). (C) Domain structure of TDP-43 protein. (D) TDP-43 recombinant protein with RRM mutation shows higher thermal stability. Thermal stability was monitored by differential scanning fluorimetry. (E) Half-lives of familial ALS-linked mutant TDP-43 proteins were negatively correlated with age of disease onset. Calculated half-lives of TDP-43 proteins were plotted against mean ages of disease onset. The correlation between each parameter and age of onset was evaluated by the correlation coefficient (r) and probability (p).

的に上昇させ、タンパク質の機能不全を惹起することを通じて、一部は gain-of-toxicity の機序で神経毒性をきたうことが考えられる²⁾。実際に、TDP-43 変異を有する ALS 患者の iPS 細胞由来ニューロンにおいても TDP-43 タンパク質の蓄積が示されており、われわれの病態仮説を支持している⁴⁾。Sarkosyl に不溶性となる TDP-43 の病的生化学変化を再現する細胞モデルとして、われわれのモデルの他には、不溶性 TDP-43 をシードとして細胞内に導入するモデルが報告されており、TDP-43 の生化学的異常を研究するうえで有用なツールと考えられる⁵⁾⁶⁾。

さらに、海外を中心に変異型 TDP-43 の機能異常に関する知見が相次いでいる。TDP-43 は核内、細胞質を往來することが知られ、一部は、細胞質や神経突起で RNA 顆粒の構成成分として局所の RNA 代謝にかかわっている。変異 TDP-43 をふくむ RNA 顆粒の軸索輸送や、樹状突起における輸送が傷

害、遅延していることが最近報告され、核外における変異 TDP-43 の機能異常として注目される⁷⁾⁸⁾。

最後に、SOD1 変異をはじめ多くの神経変性疾患における変異タンパク質は不安定化し、凝集傾向を有するが、TDP-43 変異の特徴はそれらと逆の傾向がみられたことから、新たな神経変性メカニズムを考える必要がある。TDP-43 変異による遺伝性 ALS の発症について、本タンパク質が安定化することが、神経変性にいたる初期変化として重要であると考えられた。

※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) Tsujii H, Iguchi Y, Furuya A, et al. Spliceosome Integrity is defective in Motor Neuron Diseases, ALS and SMA. EMBO

- Mol Med 2013;5:221-234.
- 2) Watanabe S, Kaneko K, Yamanaka K. Accelerated disease onset with stabilized familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-linked mutant TDP-43 proteins. *J Biol Chem* 2013;288:3641-3654.
 - 3) Austin JA, Wright GSA, Watanabe S, et al. Aggregation resistant TDP-43 RRM domain disease mutants have increased stability and half-life. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:4309-4314.
 - 4) Bilican B, Serio A, Barmada SJ, et al. Mutant induced pluripotent stem cell lines recapitulate aspects of TDP-43 proteinopathies and reveal cell-specific vulnerability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:5803-5808.
 - 5) Furukawa Y, Kaneko K, Watanabe S, et al. A seeding reaction recapitulates intracellular formation of Sarkosyl-insoluble transactivation response element (TAR) DNA-binding protein-43 inclusions. *J Biol Chem* 2011;286:18664-18672.
 - 6) Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, et al. Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains. *Cell Rep* 2013;4:124-134.
 - 7) Alami NH, Smith RB, Carrasco MA, et al. Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations. *Neuron* 2014;81:536-543.
 - 8) Liu-Yesucevitz L, Lin AY, Ebata A, et al. ALS-linked mutations enlarge TDP-43-enriched neuronal RNA granules in the dendritic arbor. *J Neurosci* 2014;34:4167-4174.

Abstract

Biochemical abnormality of mutant TDP-43 protein

Koji Yamanaka, M.D., Ph.D.¹⁾

¹⁾Department of Neuroscience and Pathobiology, Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University

Dominant mutations in the TDP-43 gene are causative for familial ALS, however, the relationship between mutant protein biochemical phenotypes and disease course and their significance to disease pathomechanism are unclarified. We found that longer half-lives of mutant proteins correlated with accelerated disease onset. Increased stability of TDP-43 protein was also observed in ALS/FTLD linked mutations in RNA recognition motif of TDP-43. Based on our findings, we established a cell model in which chronic stabilization of wild-type TDP-43 protein provoked cytotoxicity and recapitulated pathogenic protein cleavage and insolubility to the detergent sarkosyl, TDP-43 properties that have been observed in the lesions of sporadic ALS. Moreover, these cells expressing stabilized TDP-43 showed proteasomal impairment and dysregulation of their own mRNA levels. These results suggest that chronically increased stability of mutant or wild-type TDP-43 proteins results in a gain of toxicity through abnormal proteostasis.

(*Clin Neurol* 2014;54:1148-1150)

Key words: TDP-43, amyotrophic lateral sclerosis, protein stability