

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790850

研究課題名(和文)

筋萎縮性側索硬化症における TDP-43 蓄積機序の解明と治療応用の検討

研究課題名(英文)

The characterization of TDP-43 aggregation in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)

研究代表者

西本 祥仁 (NISHIMOTO YOSHINORI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30398622

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)に関連する TDP-43 の生化学的解析を行い、アポトーシス条件下において caspase-3 依存性に 35-kDa と 25-kDa の 2 種類の断片が切断・産生されること、非アポトーシス条件下においても caspase-3 に依存しない 35-kDa, 25-kDa の 2 種類の新規アイソフォームが産生されることを見出した。また、35-kDa タンパク発現系で認められる封入体が stress granule と aggresome であることを確認した。

研究成果の概要(英文)：We identified that caspase-3 generates two 35-kDa and 25-kDa fragments under the apoptotic condition. However, novel caspase-3-independent isoforms of these two variants were also detected under normal conditions. The 35-kDa fragment expression led to the formation of stress granules, while aggresomes were formed in the cytoplasm of cells expressing 35-kDa fragment in the presence of proteasome inhibitors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：ALS(筋萎縮性側索硬化症), TDP-43, caspase-3, aggresome, stress granule, RNA

1. 研究開始当初の背景

2006年に日米2つのグループから独立して神経変性疾患の孤発性 ALS と FTLD-U に共通してみられるユビキチン化された主な神経細胞質内、核内封入体の主成分として TDP-43 タンパクが同定され (Arai et al, *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, Neumann et al, *Science*, 2006), その遺伝子のミスセンス変異が ALS の常染色体優性遺伝家系に加えて孤発例においても見出された。そして TDP-43 タンパクの病理学的検討により, ALS, FTLD-U を中心とした疾患群は 'TDP-43 proteinopathy' と呼ばれるようになった。

TDP-43 の分子病態についての生化学的検討としては, 長谷川氏・新井氏らのグループからは ALS, FTLD-U の脳組織における異常リン酸化の重要性とその断片化パターンによる FTLD-TDP / FTLD-MND 疾患群の病理学的分類が提唱され, またプログリン(家族性 FTLD-U の疾患関連候補遺伝子の 1 つ)の発現低下に続く Caspase-3 による 25-kDa および 35-kDa 断片の産生についての報告がなされ, この産生された 25-kDa 断片が細胞質内封入体を形成し毒性を発揮すると考えられていたが, これについては賛否両論があり次の結論が待たれていた (Zhang et al, J

Neurosci, 2007). また FTLD-U 脳大脳皮質の尿素抽出物からさらに短い 22-kDa C 末断片を同定し, TDP-43 proteinopathy の病理学的特徴について考察されたものの (Igaz et al, *J Biol Chem*, 2009), TDP-43 の生化学的機序と細胞質封入体の特性については十分に解明されていないかった.

2. 研究の目的

本研究で我々は, Caspase-3 欠損マウスの胎生期線維芽細胞株を用いることによって, caspase-3 に依存的に産生される TDP-43 タンパク C 末断片, caspase-3 に非依存的に産生される新規のアイソフォームの存在とその産生機序について検討することを目的とした. また TDP-43 蛋白によって形成される細胞質内封入体の生化学的特性の解析により, TDP-43 の細胞内における新たな機能の考察, TDP-43 proteinopathy の解明に寄与することを目的とした.

3. 研究の方法

(1) Caspase-3 のヘテロ (+/-), ホモ (-/-) ノックアウトマウスの胎生期線維芽細胞株 (MEF) にスタウロスポリン処理を行い, 抗 TDP-43 ポリクローナル抗体での経時変化を検討した.

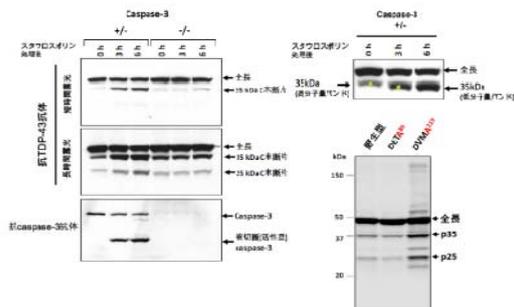
(2) TDP-43 C 末断片の産生に重要な部位を同定するため 10 アミノ酸ずつ欠如させたコンストラクトを作成した. (いずれも N 末に FLAG タグ, C 末に V5 タグを付加) 続けて, 切断認識部位と考えられた Met85-Asp89 において行われたアラニンスキャニングにより 35k-Da C 末断片の生成に必要な責任アミノ酸を同定した.

(3) N 末に FLAG タグ, C 末に V5 タグを有する TDP-43 全長, 35-kDa 蛋白導入細胞株に, プロテアソーム阻害剤の非投与下 / 投与下条件における封入体形成について比較検討した.

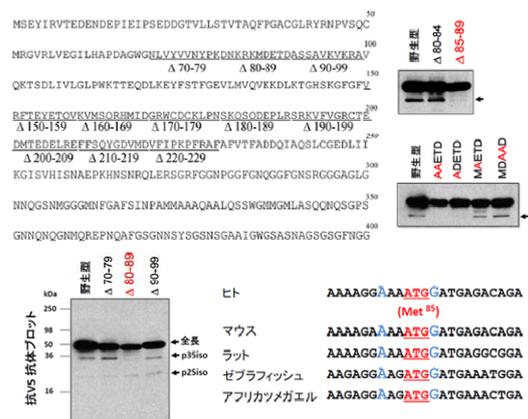
4. 研究成果

(1) スタウロスポリンでアポトーシスを誘導するとヘテロ (+/-) MEF では 35-kDa, 25-kDa C 末断片はいずれもより産生の亢進を認めた. 一方, 我々はアポトーシスを誘導する前の caspase-3 (+/-) MEF および caspase-3 (-/-) MEF もまた, ある一定の濃さの 35-kDa, 25-kDa バンドを産生していることを発見した. さらにこれを高解像度のゲル解析でみてみると, 35-kDa の正常状態において認められるバンドは, アポトーシスの条件下で caspase により切断されて産生されてくるバンドよりもわずかに高い分子量を有していた. すなわち 35-kDa のバンドは 2

つの異なるバンド, 非アポトーシス条件下でみられるバンド(*)とアポトーシス条件下で誘導されてくるバンド(#)からなっていた. 細胞抽出物の抗 V5 抗体プロットでは, TDP-43 遺伝子内に 2 か所ある caspase-3 切断コンセンサス部位の D (アスパラギン酸) を A (アラニン) に置換した DETA⁸⁹ 変異遺伝子を導入した HeLa 細胞株においても, 野生型 TDP-43 遺伝子を導入したコントロールに比べて, C 末断片 (p35) の優位な減少は認められなかった. これらの結果から, caspase 非依存性のアイソフォームが存在することを明らかにした.



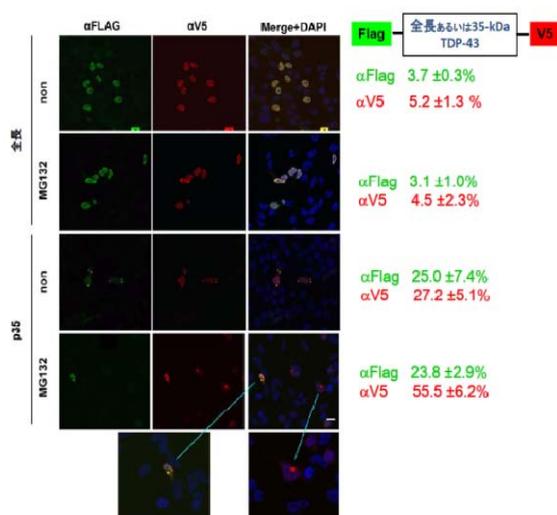
(2) 次に TDP-43 内の 10 アミノ酸ずつ欠如させた各種コンストラクトの中で 80-89 位アミノ酸欠損型と 85-89 位アミノ酸欠損型で p35iso が産生されなかった. さらにアミノ酸 85-88 位について行ったアラニンスキャニングにより 85 位のメチオニンが 35-kDa アイソフォームの産生に重要な働きを果たしていることがわかった. この Met85 はイン・フレームのメチオニンであり, 脊椎動物の種間でよく保存されたコザック・コンセンサス配列 (AAAATGG) に認められた.



我々はオリジナルの-1 位~30 位の 5' 非翻訳領域を含んだヌクレオチドをもつ TDP-43 cDNA を作成し, *in vitro* での転写/翻訳実験も行ってみたところ, 全長 TDP-43 タンパクに加え, p35 産物もしっかりと発現している

ことが確認された。そしてこの系においてもアミノ酸 80-89 位を欠損したコンストラクトでは 35-kDa アイソフォームの産生は認められなかった (図掲載省略)。以上の結果から、新規 p35 アイソフォームは内部にある下流開始コドンからの翻訳により産生されることが示された。

(3) 以前の報告から、TDP-43 断片はプロテアソーム阻害剤 MG132 を加えると凝集を引き起こすので、ユビキチン・プロテアソーム系により分解されると推測されていた (Rutherford et al, *PLoS Genet*, 2008)。そこで我々は、MG132 処理をした全長 TDP-43、p35 各々の発現細胞株における封入体について検討した。免疫細胞化学の結果から、MG132 を加えたときに抗 V5 抗体陽性封入体の頻度は p35 導入株においては 55.5% へ増加していたが、全長 TDP-43 導入株では 4.5% と増加を認めなかった。一方、抗 FLAG 陽性封入体の出現頻度に関しては、MG132 投与後も全長 TDP-43 導入株で 3.1%、p35 導入株で 23.8% と MG132 非投与時と比べて差は認められなかった。これは、プロテアソーム機能が阻害されたときに、p35 が切断されてから細胞質内に凝集している可能性を示唆するものであった。p35 はこのように正常状態における封入体 (IBNC) とプロテアソーム阻害条件下における封入体 (IBPI) と異なる 2 つの凝集形態をとっていると考えられた。



その後 G3BP, PABP, HuR や DCP1a マーカーを用いた免疫細胞染色による検討を加えた結果、前者 IBNC が stress granule, 後者 IBPI が aggresome であることも明らかにした。加えて stress granule 誘導体として知られている酸化砒素で処理した HeLa 細胞株においては、内在性 TDP-43 が stress granule に

取り込まれているという現象も確認された。一方、翻訳タンパク伸長の阻害剤である Emetine がポリソームを安定化し、stress granule 形成を抑制することが知られていたため (Kedersha, *J Cell Biol*, 2000), Emetine を用いて p35 発現 HeLa 細胞株における IBNC を有する細胞数を比較したところ、Emetine (-) では 26.3% 認められたのに対し、Emetine (+) では 4.3% と有意な低下を示した ($p < 0.01$)。以上の結果から IBNC が stress granule であるという事実は強く証明された。

以上の結果から、TDP-43 が細胞質において、stress granule 形成を介しての RNA 品質管理を担っている可能性が示唆された。遺伝的・環境的要因による影響でこの stress granule の RNA 調節機構が破綻したり、プロテアソーム阻害やさらなる断片化によって aggresome が形成されることにより、細胞毒性が蓄積し ALS における神経細胞死につながっていく、という病態機序が本研究からは推測された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① 西本祥仁 「マイクロ RNA-206 による ALS モデルマウスの疾患進行抑制と神経筋シナプス再生の促進」 *MEDICAL BRIEFS IN Brain & Nerve* 査読無, 18(2):8-9, 2011
- ② 西本祥仁, 伊東大介, 鈴木則宏 「TDP-43 タンパク新規アイソフォームの同定と 35-kDa 封入体特性の検討」最新医学, 査読無, 65(7):1579-1587, 2010
- ③ Hideyama T, Yamashita T, Nishimoto Y, Suzuki T, Kwak S. Novel etiological and therapeutic strategies for neurodegenerative diseases: RNA editing enzyme abnormality in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of pharmacological sciences* 査読有, 113(1):9-13, 2010
- ④ Nishimoto Y, Ito D, Yagi T, Nihei Y, Tsunoda Y, Suzuki N. Characterization of alternative isoforms and inclusion body of the TAR DNA-binding protein-43. *Journal of Biological Chemistry* 査読有, 285(1):608-619, 2010

〔学会発表〕（計 6 件）

- ① 西本祥仁, 伊東大介, 鈴木則宏 演題
「Investigation into novel functions of the 35-kDa short form of TDP-43」
ポスター発表, 第 1 回新潟大学脳研究所
共同研究拠点国際シンポジウム BRI
International Symposium 2010 Current
Understandings and Future Directions
for ALS (新潟大学医学部 統合脳機能研
究センター), 2010 年 11 月 22-23 日
- ② 西本祥仁, 伊東大介, 鈴木則宏「TDP-43
蛋白の新規アイソフォームの同定と
Stress granule の形成」, 第 51 回 日本
神経学会総会 (東京国際フォーラム),
2010 年 5 月 21 日
- ③ 西本祥仁, 伊東大介, 鈴木則宏 演題
「TDP-43 蛋白 C 末断片の産生機序解明と
その生化学的的特性の解析」口演発表, こ
ころの健康科学「筋萎縮性側索硬化症・認
知症を伴う筋萎縮性側索硬化症・ユビキ
チン陽性封入体を伴う前頭側頭葉変性症
脳・脊髄資源の構築」班会議 (東京都健康
長寿医療センター高齢者ブレインバン
ク), 2010 年 1 月 30 日
- ④ 西本祥仁, 伊東大介, 八木拓也, 二瓶義
廣, 角田佳子, 鈴木則宏
「Characterization of alternative
isoforms and inclusion bodies of the
TDP-43」口演発表, 第 10 回慶應大学医科
歯科大学神経内科合同カンファレンス
(ホテルメトロポリタンエドモント(飯田
橋)), 2009 年 11 月 26 日
- ⑤ Yoshinori Nishimoto, Daisuke Ito,
Takuya Yagi, Yoshihiro Nihei, Yoshiko
Tsunoda, Norihiro Suzuki:
Characterization of proteolytic
cleavage and inclusions of the TDP-43
protein. Poster presentation, Society
for Neuroscience 2009 (McCormick
Place), Chicago, USA, Oct 18, 2009
(Abstr Soc Neurosci 2009; 145:10)
- ⑥ 西本祥仁, 伊東大介, 八木拓也, 二瓶義
廣, 角田佳子, 鈴木則宏
「Characterization of alternative
isoforms and inclusion bodies of the
TDP-43」口演発表, J-CAN
(Japanese Consortium of Age-related
Neurodegenerative disorders) (東京ス
テーションコンファレンス (サピアタワ
ー)), 2009 年 9 月 19 日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西本 祥仁 (NISHIMOTO YOSHINORI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30398622

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし