

平成21年 4月27日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006-2008

課題番号：18300117

研究課題名（和文） 神経変性疾患における蛋白質の構造変化と細胞変性機構に関する研究

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of conformational changes of proteins and neurodegeneration in neurodegenerative diseases.

研究代表者 長谷川 成人 (HASEGAWA MASATO)

財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・副参事研究員

研究者番号：10251232

研究成果の概要：

神経変性の共通の分子メカニズムを明らかにすることを目的として、患者脳に蓄積する蛋白質の解析、リコンビナント蛋白質を用いた解析を行った。その結果、同じ4リピートタウが蓄積するPSPとCBDにおいて、蓄積するタウの線維構造が異なっている可能性が示唆された。また、FTLD、ALSに蓄積するユビキチン陽性封入体の構成タンパク質としてリン酸化TDP-43を同定した。さらに α シヌクレインの部位特異抗体を用いて、 α シヌクレインのモノマーから線維化への構造変化をとらえることに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2007年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2008年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：分子神経生物学、病理生化学

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：タウ、 α シヌクレイン、TDP-43、アルツハイマー、パーキンソン

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病やパーキンソン病など、多くの神経変性疾患には、変性部位に特定の蛋白質の異常蓄積を伴う病変が観察される。個々の変性疾患における病態は多様であるが、蛋白質の異常蓄積という視点から見ると、蛋白質の構造変化、いくつかの翻訳後修飾、及びその蛋白質の蓄積と神経変性の間には共通の法則、共通の分子メカニズムが存在するようにみえる。

2. 研究の目的

様々な疾患における蓄積蛋白質を生化学的、蛋白化学的、また形態学的側面から総合的に解析し、この神経変性の共通の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。具体的には、(1)患者脳に蓄積する蛋白質を精製し、質量分析などの手法で蛋白質の翻訳後修飾やプロセッシングを明らかにすると共に、構造変化やコンホメーション変化について電子顕微鏡観察、プロテアーゼに対する感受性、耐性部位の同定、抗体による免疫反応性の相違などを組あせて調べる。(2)前頭側頭型認知症、ALS認知症などの疾患脳に見いださ

れる正体不明の異常病理構造物の構成蛋白質の同定、翻訳後修飾の解明を試みる。(3) リコンビナント蛋白を用いて蛋白質の構造変化を再現し、線維化した蛋白質の構造、線維への移行状態の構造を生化学的手法、NMRなどの蛋白質の構造解析法と組み合わせて調べる。

3. 研究の方法

(1) 疾患患者脳に蓄積する異常蛋白の解析。

ピック病、PSP、CBD、FTDP-17、AD、レビー小体型認知症、多系統萎縮症について検討を行う。脳に蓄積するタウ、 α シヌクレインをトリプシンなどのプロテアーゼで消化し、分解される部分と耐性を示して分解を受けない部分を質量分析や各種抗体を用いたイムノプロットで明らかにする。

(2) 前頭側頭葉変性症(FTLD)のユビキチン陽性封入体構成蛋白質の解析。

FTLDとして分類される中には、タウ陰性のユビキチン封入体が病変領域に多発する疾患群があり、同様の封入体が認知障害を伴う筋萎縮性側索硬化症(ALS)にも共通して出現がみられる。また、ALSのskein-like封入体も同じ分子で構成されている可能性があり、神経病理学的にこれらの疾患は一つの蛋白質の蓄積によって神経病理学的には括られる可能性もある。そこでこのFTLD患者脳から封入体を濃縮し、プロテオミクスの手法を用いて解析することを試みる。

(3) 蛋白質構造変化の解析。

リコンビナント蛋白を用いて脳内で起こる変化と同じような蛋白質の構造変化を再現し、線維化した蛋白質の構造、線維への移行状態の構造などを解析する。重合状態の異なる分子種をゲル濾過や遠心法を用いて分離、調製し、コンフォメーション特異的抗体や部位特異的な様々な抗体を用いて、蛋白質の構造変化を解析する。

4. 研究成果

(1) 疾患患者脳に蓄積する異常蛋白の解析。

ピック病、PSP、CBD、FTDP-17、AD患者脳に蓄積するタウについて、イムノプロット解析やプロテアーゼ耐性バンドの解析を行った結果、ピック病では3リピートタウ、PSP、CBDでは4リピートタウ、ADではすべてのタウアイソフォームが蓄積していることが明らかとなった。またPSPとCBDでは、同じ4リピートタウが蓄積するにも関わらず、そのプロテアーゼ耐性バンドのパターンが異なることから、蓄積しているタウの構造が異なる可能性が示唆された。

(2) FTLDのユビキチン陽性封入体構成蛋白質の解析。

FTLD、AD、DLB患者脳、及び対照脳からSarkosyl不溶性画分を調製し、電気泳動後、

分子量ごとにバンドを切り出し、ゲル内消化を行って、LC/MS/MS解析を行った。その結果、ADに $A\beta$ とタウ、DLBに α シヌクレインが検出され、FTLDの約25kDの分子量の領域ではTDP-43が特徴的に検出された。対照脳や他の疾患では検出されないことから、TDP-43の抗体を入手し、FTLD脳を染色したところ、TDP-43抗体がユビキチン陽性封入体を強く染色することが判明し、その構成成分であることが同定された。また、ALSに特徴的なユビキチン陽性構造物もTDP-43抗体で強く染色された。イムノプロット解析から患者脳に蓄積するTDP-43が異常リン酸化されていることが示唆され、候補部位の抗体を網羅的に作製してリン酸化部位を解析した結果、最C末端のSer409/410が主要リン酸化部位として同定された。またこの抗体を用いたイムノプロット解析から、患者組織に蓄積しているTDP-43は全長の他、C末端断片が多いこと、またC末端バンドのバンドパターンは疾患や病理によって異なることが判明した。

(3) 蛋白質構造変化の解析。

リコンビナント α シヌクレインを線維形成し、 α シヌクレインの部位特異抗体を用いて検討した。その結果、モノマー状態では α シヌクレインのC末端領域が強く反応するが、N末端や中央部の抗体はあまり反応しなかった。一方、線維化した α シヌクレインはN末端からC末端までいずれの抗体にも強く反応することが明らかとなった。この結果は α シヌクレインが線維化に伴って構造変化することを示唆する。また、線維化阻害剤を添加することによって得られた α シヌクレインの二量体はモノマーと線維の中間の反応様式を示した。この結果は、線維化阻害剤が線維形成の中間段階にある二量体に結合してそれを安定化することによって線維形成を抑制することを強く示唆する。

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25件)

1. Davidson Y, Amin H, Kelley T, Shi J, Tian J, Kumaran R, Lashley T, Lees AJ, Duplessis D, Neary D, Snowden J, Akiyama H, Arai T, Hasegawa M, et al. TDP-43 in ubiquitinated inclusions in the inferior olives in frontotemporal lobar degeneration and in other neurodegenerative diseases: a degenerative process distinct from normal ageing. Acta Neuropathol. 2009 Mar 28. [Epub ahead of print] 査読有

2. Kametani F, Nonaka T, Suzuki T, Arai T, Dohmae N, Akiyama H, Hasegawa M. Identification of casein kinase-1 phosphorylation sites on TDP-43. *Biochem Biophys Res Commun*. 382: 405-9. Epub 2009 Mar 13. 査読有
3. Schwab C, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Yu S, McGeer PL. TDP-43 pathology in familial British dementia. *Acta Neuropathol*. 2009 Mar 13. [Epub ahead of print] 査読有
4. Yonetani M, Nonaka T, Masuda M, Inukai Y, Oikawa T, Hisanaga S, Hasegawa M. Conversion of wild-type α -synuclein into mutant-type fibrils and its propagation in the presence of A30P mutant. *J Biol Chem* 284: 7940-50, 2009. 査読有
5. Masuda M, Hasegawa M, Nonaka T, Oikawa T, Yonetani M, Yamaguchi Y, Kato K, Hisanaga S, Goedert M. Inhibition of α -synuclein fibril assembly by small molecules: analysis using epitope-specific antibodies. *FEBS Lett* 583: 787-91, 2009. 査読有
6. Nonaka T, Arai T, Buratti E, Baralle FE, Akiyama H, Hasegawa M. Phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 pathological inclusions in ALS and FTL-D-U are recapitulated in SH-SY5Y cells. *FEBS Lett* 583: 394-400, 2009. 査読有
7. Arai T Mackenzie IR, Hasegawa M, Nonaka T, Niizato K, Tsuchiya K, Iritani S, Onaya M, Akiyama H, Phosphorylated TDP-43 in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies *Acta Neuropathol*. 117: 125-36, 2009. 査読有
8. Fujishiro H, Uchikado H, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Yokota O, Tsuchiya K, Togo T, Iseki E. Accumulation of phosphorylated TDP-43 in brains of patients with argyrophilic grain disease. *Acta Neuropathol*. 117: 151-8, 2008. 査読有
9. Schwab C, Arai T, Hasegawa M, Yu S, McGeer PL, Colocalization of TDP-43 and Huntingtin in inclusions of Huntington's disease *J Neurol Pathol Exp Neurol* 67:1159-65, 2008. 査読有
10. Inukai Y, Nonaka T, Arai T, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Buratti E, Baralle FE, Akiyama H, Hisanaga SI, Hasegawa M, Abnormal phosphorylation of Ser409/410 of TDP-43 in FTL-D-U and ALS. *FEBS Lett* 582: 2899-2904, 2008. 査読有
11. Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Buratti E, Baralle F, Morita M, Nakano I, Oda T, Tsuchiya K, Akiyama H, Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 64: 60-70, 2008. 査読有
12. Obi K, Akiyama H, Kondo H, Shimomura Y, Hasegawa M, Iwatsubo T, Mizuno Y, Mochizuki H. Relationship of phosphorylated alpha-synuclein and tau accumulation to Abeta deposition in the cerebral cortex of dementia with Lewy bodies. *Exp Neurol* 210: 409-20, 2008. 査読有
13. Ishii A, Nonaka T, Taniguchi S, Saito T, Arai T, Mann D, Iwatsubo T, Hisanaga SI, Goedert M, Hasegawa M, Casein kinase 2 is the major enzyme in brain that phosphorylates Ser129 of human alpha-synuclein: Implication for alpha-synucleinopathies. *FEBS Lett* 581: 4711-4717, 2007. 査読有
14. Sasakawa H, Sakata E, Yamaguchi Y, Masuda M, Mori T, Kurimoto E, Iguchi T, Hisanaga SI, Iwatsubo T, Hasegawa M, Kato K, Ultra-high field NMR studies of antibody binding and site-specific phosphorylation of alpha-synuclein. *Biochem Biophys Res Commun* 363: 795-799, 2007. 査読有
15. Aoyagi H, Hasegawa M#, Tamaoka A, (# corresponding author) Fibrillogenic nuclei composed of P301L mutant tau induce elongation of P301L tau, but not wild-type tau. *J Biol Chem* 282: 20309-20318, 2007. 査読有
16. Hasegawa M, Arai T, Akiyama H, Nonaka T, Mori H, Hashimoto T, Yamazaki M, Oyanagi K., TDP-43 is deposited in the Guam parkinsonism-dementia complex brains. *Brain* 130,1386-1394, 2007. 査読有
17. Sato K, Zhu YS, Saito T, Yotsumoto K, Asada A, Hasegawa M, Hisanaga S.,

Regulation of membrane association and kinase activity of Cdk5-p35 by phosphorylation of p35. *J Neurosci Res.* 85: 3071-8, 2007. 査読有

18. Arai T*, Hasegawa M*, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y, Oda T, TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 351:602-611, 2006. (*co-1st author, # co-corresponding author) 査読有

19. Kim EJ, Sung JY, Lee HJ, Rhim H, Hasegawa M, Iwatsubo T, Min DS, Kim J, Paik SR, Chung KC, Dyrk1A phosphorylates alpha-synuclein and enhances intracellular inclusion formation. *J Biol Chem* 281: 33250-33257, 2006. 査読有

20. Masuda M, Suzuki N, Taniguchi S, Oikawa T, Nonaka T, Iwatsubo T, Hisanaga SI, Goedert M, Hasegawa M, Small molecule inhibitors of alpha-synuclein filament assembly. *Biochemistry* 45:6085-6094, 2006. 査読有

21. Masuda M, Dohmae N, Nonaka T, Oikawa T, Hisanaga S, Goedert M, Hasegawa M, Cysteine misincorporation in bacterially expressed human alpha-synuclein. *FEBS Lett* 580:1775-1779, 2006. 査読有

22. Yamakawa K, Takanashi M, Watanabe M, Nakamura N, Kobayashi T, Hasegawa M, Mizuno Y, Tanaka S, Mori H. Pathological and biochemical studies on a case of Pick disease with severe white matter atrophy. *Neuropathology* 26, 586-591, 2006. 査読有

23. Hasegawa M, Biochemistry and molecular biology of tauopathies. *Neuropathology* 26: 484-490, 2006. 査読有

24. Sakai K, Piao YS, Kikugawa K, Ohara S, Hasegawa M, Takano H, Fukase M, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H, Corticobasal degeneration with focal, massive tau accumulation in the subcortical white matter astrocytes. *Acta Neuropathol* 112: 341-348, 2006. 査読有

25. Wakabayashi K, Mori F, Hasegawa M, Kusumi T, Yoshimura I, Takahashi H, Kaneko S, Co-localization of beta-peptide and phosphorylated tau in astrocytes in a patient with corticobasal degeneration. *Neuropathology* 26: 66-71, 2006. 査読有

[学会発表] (計 14 件)

1. 長谷川成人, 新井哲明, 野中隆, 亀谷富由樹, 吉田眞理, 橋詰良夫, Beach T, 森田光哉, 中野今治, 織田辰郎, 土谷邦秋, 秋山治彦 (2008) FTLD、ALS に蓄積する異常 TDP-43 の解析. 第 27 回日本認知症学会, 前橋 [2008/10/11]

2. 米谷元邦, 犬飼有紀, 野中隆, 久永眞市, 長谷川成人 (2008) α シヌクレインの線形成における A30P 凝集核の効果. 第 27 回日本認知症学会, 前橋 [2008/10/10]

3. 犬飼有紀, 野中隆, 新井哲明, 吉田眞理, 橋詰良夫, 秋山治彦, 久永眞市, 長谷川成人 (2008) TDP-43 における Ser409/410 の異常リン酸化. 第 27 回日本認知症学会, 前橋 [2008/10/10]

4. 野中隆, 新井哲明, 秋山治彦, 長谷川成人 (2008) TDP-43 の細胞内封入体モデルの作製. 第 27 回日本認知症学会, 前橋 [2008/10/11]

5. Nonaka T, Arai T, Akiyama H, Buratti E, Baralle F E, and Hasegawa M (2008) Intracellular aggregation of phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 in SH-SY5Y cells. International Conference on Alzheimer's Disease 2008, Chicago, USA [2008/07/27]

6. Arai T, Hasegawa M, Nonaka T, Kametani F, Ikeda K, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Buratti E, Baralle F, Morita M, Nakano I, Oda T, Tsuchiya K, Akiyama H (2008) Accumulation of phosphorylated TDP-43 in neurodegenerative disorders. International Conference on Alzheimer's Disease 2008, Chicago, USA [2008/07/28]

7. 長谷川成人, 新井哲明, 野中隆, 亀谷富由樹, 吉田眞理, 橋詰良夫, Thomas Beach, 森田光哉, 中野今治, 織田辰郎, 土谷邦秋, 秋山治彦 (2008) FTD における TDP-43 蓄積の意義. 第 49 回日本神経学会総会, 横浜 [2008/05/17]

8. 長谷川成人, 野中隆, 新井哲明, 犬飼有

紀, 亀谷富由樹, 久永眞市, 秋山治彦 (2008) ALS、FTLD におけるリン酸化 TDP-43 の蓄積. 第 8 1 回日本生化学会大会, シンポジウム「神経変性疾患関連遺伝子探索と機能解析」神戸, [2008/12/11]

9. 長谷川成人, 新井哲明, 前頭側頭葉変性症、筋萎縮性側索硬化症に出現するユビキチン陽性封入体のプロテオミクス解析と TDP-43 の同定. 日本ヒトプロテオーム機構 第 5 回大会, 東京 [2007/07/31]

10. 長谷川成人, 新井哲明, 秋山治彦, 橋本智代, 山崎峰雄, 小柳清光, グラム PDC 患者脳における TDP-43 の蓄積. 第 48 回日本神経学会総会, 名古屋 [2007/05/17]

11. 長谷川成人 シヌクレイノパチーの基礎研究. 第 25 回日本認知症学会, シンポジウム 3 「シヌクレイノパチーの臨床と基礎研究」, 広島 [2006/10/07].

12. Hasegawa M, Ishii A, Nonaka T, Saito T, Arai T, Hisanaga S, Iwatsubo T (2006) CK2 is the major enzyme in brain that generates P^{Ser129} epitope of alpha-synuclein. The 6th Annual Meeting of International College of Geriatric Psychoneuropharmacology (ICGP), Hiroshima, Japan [2006/10/05].

13. Nonaka T, Hasegawa M (2006) Proteasome inhibition by alpha-synuclein in living cells. The 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders, Madrid, Spain [2006/07/19].

14. Masuda M, Suzuki N, Taniguchi S, Oikawa T, Nonaka T, Iwatsubo T, Hisanaga S, Goedert M, Hasegawa M (2006) Small molecule inhibitors of alpha-synuclein filament assembly. The 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders, Madrid, Spain [2006/07/19].

[図書] (計 2 件)

1. 長谷川成人, タウ: 老年期認知症ナビゲーター (平井俊策監修), pp218-219. 東京: メディカルレビュー社, 2006.

2. 長谷川成人, 神経原線維変化: 老年期認知症ナビゲーター (平井俊策監修), pp214-215. 東京: メディカルレビュー社, 2006.

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

名称: TDP-43 蓄積細胞モデル
発明者: 野中隆、新井哲明、秋山治彦、長谷川成人

権利者: 財団法人東京都医学研究機構

種類: 特許

番号: 特願 2008-101899

出願日: 平成 20 年 4 月 9 日

国内外の別: 国内

名称: 遺伝子変異を用いた筋萎縮性側索硬化症の予測法

発明者: 糸川昌成、新井誠、長谷川成人、野中隆、秋山治彦、新井哲明

権利者: 財団法人東京都医学研究機構

種類: 特許

番号: 特願 2008-095035

出願日: 平成 20 年 4 月 1 日

国内外の別: 国内

名称: TDP-43 凝集物に特異的に結合する抗体

発明者: 長谷川成人、新井哲明、野中隆、亀谷富由樹、秋山治彦

権利者: 財団法人東京都医学研究機構

種類: 特許

番号: 特願 2007-178583

出願日: 平成 19 年 7 月 6 日

国内外の別: 国内

名称: 神経変性疾患治療用物質のスクリーニング方法

発明者: 野中隆、増田雅美、長谷川成人

権利者: 財団法人東京都医学研究機構

種類: 特許

番号: 特願 2006-030530

出願日: 平成 18 年 2 月 8 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 成人 (HASEGAWA MASATO)

財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・副参事研究員

研究者番号: 10251232

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者