
TDP-43 と FTLD/ALS

東京都精神医学総合研究所 分子神経生物学研究チーム/チームリーダー

長谷川成人*

1. はじめに

多くの神経変性疾患では、変性部位の神経細胞、グリア細胞内にその病気を特徴づける異常構造物の出現が認められる。近年、神経病理学、生化学解析から、異常構造物の構成成分の解析が進み、その構成タンパク質が同定されると同時に、遺伝学的解析から、遺伝子異常によって発症する家族性疾患が報告され、特定のタンパク質の異常が、病気の発症や進行に深く関わっていることがわかってきた。一方、主要な神経変性疾患である前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration: FTLD) と、代表的な神経難病である筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) では、ユビキチン陽性封入体の存在が示されていたがその正体は長い間不明のままであった。我々、及びNeumannらはFTLDの不溶性画分のプロテオミクス解析を行うことにより、TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43) という核蛋白がFTLD-UとALSのユビキチン陽性構造物の構成タンパク質であることを同定した^{1,2)}

2. FTLD と ALS

FTLDは、前頭葉、及び側頭葉に限局して変性がおこる神経変性疾患の総称である。その多様な臨床症状から、前頭側頭型認知症、進行性失語症、意味性認知症など様々に分類されるが、神経病理学的には、タウの異常蓄積を伴う群と、タウ陰性ユビキチン陽性構造を伴う群 (FTLD-U)、明らかな異常構造物が認められない認知症 (dementia lacking distinctive histology: DLDH) に大別される。FTLD-U患者脳の高馬歯状回には、ユビキチン陽性の構造物が、また前頭、側頭葉では神経突起様の構造物が認められる。また5-10%は運動ニュー

ロンが変性する疾患を合併することが知られており、ALSとの関わりが示唆されていた。

ALSは筋肉に指令を送る運動神経が変性することによって筋肉の萎縮、筋力低下をきたす神経変性疾患であるが、進行がはやく、約半数が発症後3-5年で呼吸筋麻痺を起こして死に至る、有効な治療法がない難病である。ALSの発症原因や発症機構は不明であるが、変性する脊髄の運動神経にスケイン様封入体 (スケインは「もつれた糸」を意味する) と呼ばれるユビキチン陽性構造物が認められる。この異常構造物の存在は1988年に最初に報告され、ALSの運動ニューロン変性と密接に関係することが報告されていたが、その構成タンパク質は不明のままであった。

3. 疾患脳の不溶性タンパクの解析と TDP-43 の同定

筆者らはFTLD-U患者に出現するユビキチン陽性封入体の構成タンパク質を同定するため、FTLD-U、及び他の神経疾患 (アルツハイマー病: AD、レビー小体型認知症: DLB)、及び脳疾患のない剖検脳から不溶性画分を調製し、それを質量分析で網羅的に解析するプロテオミクス解析を行った。不溶性タンパク質を強い変性剤で溶解した後、分子の大きさにタンパク質を分離し、分離されたバンドを切り出して酵素消化し、質量分析でタンパク質を同定した。

ADの不溶性画分の低分子バンドからはアミロイドβ蛋白、レーン全体からタウ、またDLBの低分子のバンドからはαシヌクレインのペプチド断片が同定され、それぞれの疾患で蓄積する異常タンパク質が同定できることを確認した上で、FTLD-Uで頻度高く同定される分子がないか注意

* Masato Hasegawa, Director, Molecular Neurobiology Research, Tokyo Institute of Psychiatry.

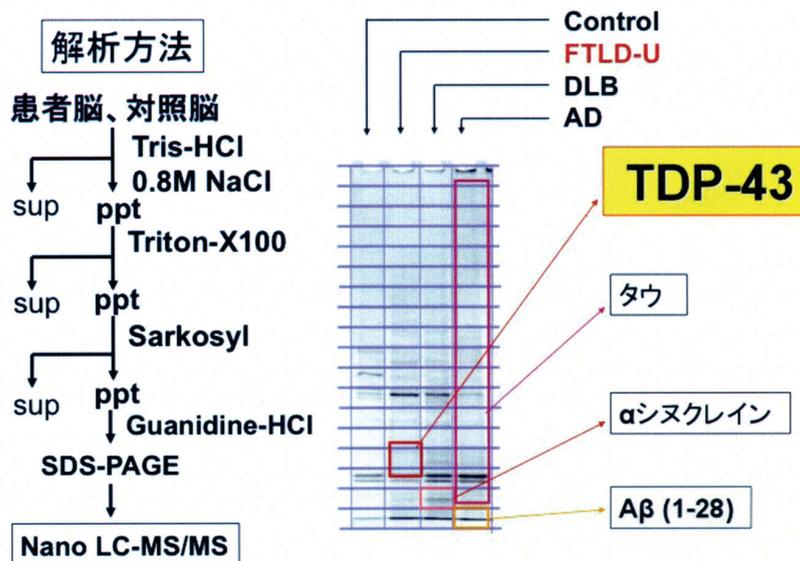


図1 FTLD-U、及び対照脳不溶性画分のプロテオミクス解析

深く調べていった結果、FTLD-Uの低分子領域においてTDP-43のペプチドが高頻度に検出された(図1)¹⁾。ADやDLB、あるいはコントロール脳では検出されないことから、TDP-43に対する抗体を入手し患者脳組織の免疫染色を行ったところ、この抗体がFTLD-Uのコピキチン陽性封入体を強く染色することがわかり、TDP-43がその構成成分として同定された¹⁾。さらに、ALSについても解析を進めたところ、ALS患者の脊髄前角の運動ニューロンに認められるスケイン様封入体や円形の封入体がTDP-43に陽性を示すことがわかった。

TDP-43は、エイズウイルスのHIV-1遺伝子の末端反復配列内にあるTAR領域に結合し、転写を抑制する因子として最初に同定されたためにこの名前が付いている³⁾が、不均一核内リボ核酸蛋白質(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein: hnRNP)の一種である。一次構造上、中央部に2つのコンセンサス配列(RNP-1, RNP-2)を含むRNA認識モチーフ(RNA-recognition motif: RRM)を2個、C末端側に1個のグリシンリッチ領域をもち、他のhnRNP分子などと複合体を形成し、スプライシング調節作用などに働くと考えられている⁴⁾。

4. 患者組織に蓄積する TDP-43

FTLD-U患者脳の不溶性画分のイムノブロットを行うと、正常の全長TDP-43のバンドの他に、FTLD-U患者に45kDaのバンドとレーン全体がスマア状に染まる反応が検出された。酵素で脱リン酸化すると、45kDaのバンドは消失したことから、リン酸化されていることが示唆された。そこでリン酸化の解析を行うため、56カ所あるSer/Thrのうち、36カ所の部位についてリン酸化ペプチドを合成し、免疫して抗体を作製し組織染色を行った。その結果、C末端の複数の部位に対する抗体が患者脳に異常構造物を強く染めることがわかった⁵⁾。特に最C末のSer409とSer410の両方をリン酸化したペプチドに対する抗血清(pS409/410)は特異性が高く、正常TDP-43が局在する核を染めず、異常構造物を強く染めた。またイムノブロット解析でも43kDaの正常TDP-43とはほとんど反応せず、FTLD-UとALS患者脳に蓄積する45kDaの異常TDP-43、18-26kDaの断片、レーン全体のスマア状物質と強く反応した(図2)⁵⁾。pS409/410についてはモノクローナル抗体も作製してラット組織を用いて正常のリン酸化状態についても検討したが、正常組織において、この部位のリン酸化は全く検出されなかった⁶⁾。以上のことから、患者組織に蓄積するTDP-43は異常リン酸化されて

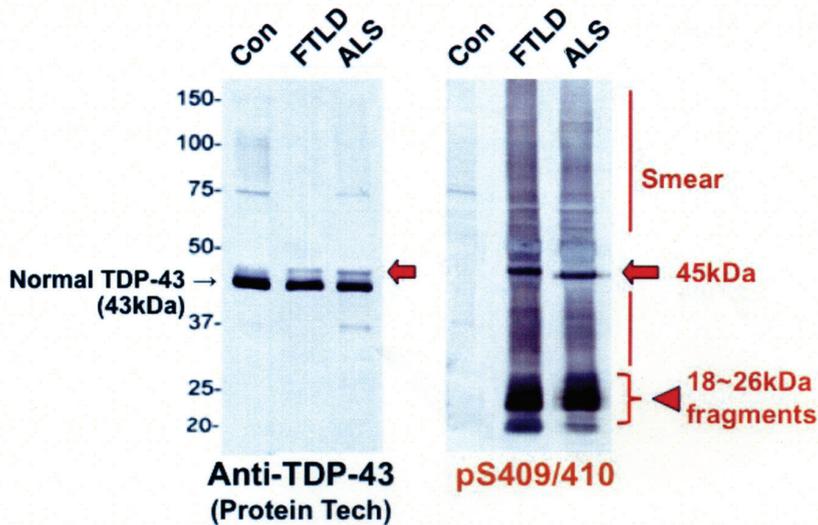


図2 FTLD-U, ALS患者脳、及び対照 (Con) 脳不溶性画分のイムノブロット解析。リン酸化TDP-43抗体pS409/410は正常TDP-43とは反応せず、45kDaの全長TDP-43、18-26kDaのC末断片、及びレーン全体のスメア物質と強く反応した。

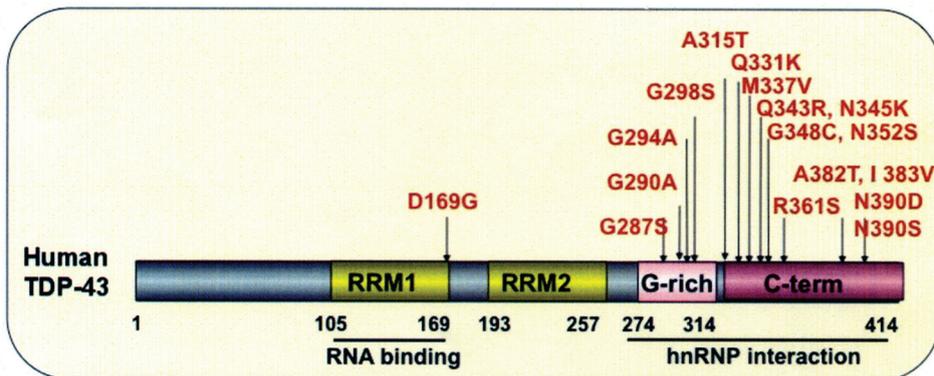


図3 TDP-43の模式図と、家族性、及び孤発性ALSに同定されたTDP-43の遺伝子変異の位置と種類。

いること、全長分子よりもN末端が切断されたC末端断片が多く蓄積していること、さらにそのバンドパターンは疾患や病理の違いによって異なることが明らかとなった。

5. 家族性、及び孤発性 ALS における TDP-43 遺伝子変異の発見

筆者らは、TDP-43がFTLD-UやALSの神経変性の実行犯であることを主張してきたが、2008年、家族性、および孤発性ALSの患者にTDP-43の遺伝子変異が相次いで報告され⁷⁻¹²⁾、TDP-43の異常

がALSを発症することが遺伝学的に証明された。現在まで16カ所に17種類の変異が報告されているが、変異は一カ所をのぞいてすべてC末端に集中している (図3)。C末端は他のhnRNPと結合することが示されている領域であり、また患者組織においては、リン酸化、断片化を受けて蓄積している領域である。このTDP-43の変異がどのように作用してALSが発症するのかについて大きな注目が集まっている。これまでいくつかのグループが変異効果について議論している。Sreedharanらは、Q331K, M337V変異TDP43をCHO細胞に

発現すると、WTより18kDa断片が増加すること、また、ニワトリ胚の脊髄に変異TDP-43を発現するとアポトーシスがおこることを報告している⁷⁾。またKabashiらはG348C, R361S, N390D変異を有する患者由来のリンパ球株化細胞を調べると不溶性の～28kDa断片が増加していること、またそれはMG132処理するとさらに顕著になることを報告している⁸⁾。最近、Rutherfordらも、M337V, N345K, 1383V変異を有する患者由来のリンパ球株化細胞において、MG132処理により、不溶性の35kDaと25kDaのカスパーゼ断片が増加することを報告している¹²⁾。しかしながら、これらの論文で使用している抗体はすべてTDP-43のN末端に対する抗体であることを注意する必要がある。患者脳ではN末断片の蓄積はほとんど検出されないことから、今後のさらなる解析が必要と思われる。

6. おわりに

FTLD-U, ALSに出現するユビキチン陽性異常構造物の主要構成成分としてTDP-43が発見され、家族性、及び孤発性ALSにTDP-43の遺伝子変異が発見されたことで、TDP-43がALS、FTLD-Uにおける神経変性の実行犯であることがほぼ確実なものとなった。今後、細胞、動物モデルの構築を通してTDP-43蓄積や神経変性のメカニズムが解明され、ALSやFTLD-Uの診断・治療法の開発につながることを期待される。

文献

- 1) Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, 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.*, 351: 602-611, 2006
- 2) Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 314: 130-133, 2006
- 3) Ou SH, Wu F, Harrich D, García-Martínez LF, Gaynor RB. Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *J. Virol.*, 69: 3584-3596, 1995
- 4) Buratti E, Dörk T, Zuccato E, Pagani F, Romano M, et al. Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping. *EMBO J.*, 20: 1774-1784, 2001
- 5) Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, et al. Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.*, 64: 60-70, 2008
- 6) Inukai Y, Nonaka T, Arai T, Yoshida M, Hashizume Y, et al. Abnormal phosphorylation of Ser409/410 of TDP-43 in FTL-D-U and ALS. *FEBS Lett* 582: 2899-904, 2008.
- 7) Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 319: 1668-1672, 2008
- 8) Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, et al. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Genet.*, 40: 572-574, 2008
- 9) Gitcho MA, Baloh RH, Chakraverty S, Mayo K, Norton JB, et al. TDP-43 A315T mutation in familial motor neuron disease. *Ann. Neurol.*, 63: 535-538, 2008
- 10) Yokoseki A, Shiga A, Tan CF, Tagawa A, Kaneko H, et al. TDP-43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.*, 63: 538-542, 2008
- 11) Van Deerlin VM, Leverenz JB, Bekris LM, Bird TD, Yuan W, et al. TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis. *Lancet Neurol.*, 7: 409-416, 2008
- 12) Rutherford NJ, Zhang YJ, Baker M, et al. Novel mutations in TARDBP (TDP-43) in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS Genet.* 2008 Sep 19; 4 (9): e1000193.

この論文は、平成20年10月25日(土)第17回中部老年期認知症研究会で発表された内容です。