

して同定された増殖因子(成長因子)の一種であるが、この発現が減少すると脳に異常TDP-43が蓄積する若年性認知症を発症することが報告されている。増殖因子(成長因子)とタンパク質の構造変化の関係を示すもので大変興味深い(西原らの稿)。異常タンパク質を生じる原因として、かつ細胞変性を生じる原因として、カスケードの上流と下流のいずれにもかかわっていると考えられるのがタンパク質の品質管理システムの破綻である(概念図)。ポリグルタミンをはじめとするタンパク質の凝集体が細胞内のプロテアソーム活性を阻害すること、ユビキチンプロテアソーム系やオートファジー系の障害がタンパク質の蓄積に重要であることが細胞モデルやノックアウトマウスの解析などから示されている(木村らの稿)。非分裂細胞である神経細胞では、その障害がより顕著に現れるのかもしれない。

③ タンパク質の構造異常の検出と制御

異常タンパク質の蓄積の程度と神経細胞の変性の間には、例外部位はあるものの、神経病理学的解析から相関が示されている(村山の稿)。タンパク質の構造変化による神経細胞の変性機序は、まだ解明されていない部分もあるが、前述の細胞内のプロテアソーム活性の阻害や、転写抑制、軸索輸送の障害などさまざまな要因が、単独あるいは複合的に働くと考えられる。細胞死の様式についてはアポトーシスでもネクローシスでもない、それらとは異なる死に方がポリグルタミンの細胞モデルで提案されている⁵⁾。毒性を示す分子種については、線維化したものよりもむしろオリゴマーの毒性が高いというのが最近の趨勢であるが、オリゴマー自体の定義が曖昧であり議論のあるところである。オリゴマーが線維形成のon-pathwayの中間体であるのか、それとも線維化とは異なる経路をとって形成されたoff-pathwayの産物なのか明確にしていない研究者も多い。

われわれは最近、部位特異抗体を用いることによって α シヌクレイン(α syn)の構造変化を感度よく検出することに成功した。 α synはPDやレビー小体病患者脳に蓄積する140アミノ酸からなるタンパク質であるが、明瞭な構造をとらないnatively unfolded proteinの一種とされている。ところがこれを α synのN末端からC末端まで、約10アミノ酸ごとのペプチドを抗原にして作製した部位特異抗体を用いて解析するとC末端の抗体は強く反応するのに対し、N末端や中央部分に対する抗体の反応が弱い⁶⁾。一方、線維化した α synはどの抗体もほぼ一様に強い反応を示した(図2)⁶⁾。この結果は α synが溶液中である程度の構造をとっており、線維化することによりその構造が大きく変化することを示す。さらに、凝集阻害効果を有する低分子化合物を添加すると化合物と結合したモノマーや二量体が形成される^{7) 8)}が、それらはモノマーと線維のちょうど中間的な反応を示した(図2)⁶⁾。この結果は低分子凝集阻害薬が結合した α synモノマーや二量体は線維形成のon-pathwayの中間体であり、阻害薬は構造変化したモノマーや二量体に作用して線維形成を抑制することを示唆する^{6)~8)}。

タンパク質が凝集する場合、その部分構造が少しでも異なると、構造や性質が異なる線維が形成されることがある。家族性PDに発見されたA30P変異を導入した α synは、野生型 α synとは性質が異なる断片化しやすい線維を形成する⁹⁾。断片化線維は超遠心でも沈殿しない。興味深いことに、このA30P線維を鋳型に野生型 α synを線維化すると、野生型ではなく、A30P型の性質を有する線維が形成される⁹⁾。逆に野生型 α syn線維を鋳型にA30P α synを線維化しても、A30P線維の構造と性質を有する線維が形成される⁹⁾。両者の構造の違いは

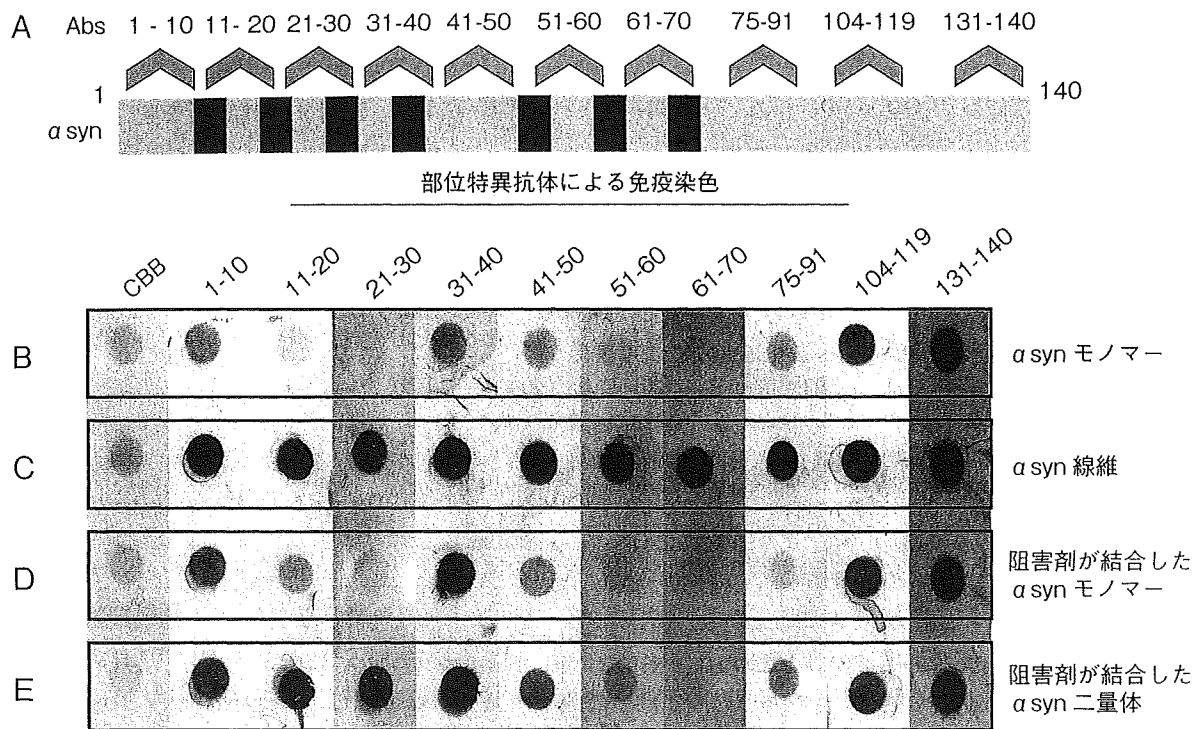


図2 部位特異抗体を用いた α シヌクレイン構造変化の解析

A) α シヌクレインの模式図と作製した部位特異抗体の認識部位を示す。B) 精製したリコンビナント α syn モノマーを PVDF 膜にドットした後、タンパク質染色 (CBB) と部位特異抗体で検出した。C) 線維化したリコンビナント α syn を PVDF 膜にドットした後、タンパク質染色と部位特異抗体で検出した。D) α シヌクレインと線維化阻害化合物を数日インキュベートし、化合物が結合したモノマーをゲル濾過で分離し、部位特異抗体で検出した。E) 線維化阻害化合物と数日インキュベートして形成された、化合物が結合した α シヌクレイン二量体をゲル濾過で分離し、部位特異抗体で検出した。凝集阻害剤が結合した α syn モノマー、二量体は、モノマーと線維の中間的な反応を示す (文献6より転載)

前述の部位特異抗体の反応性の違いやプロテアーゼ耐性バンドの違いとして検出される⁹⁾。アミロイド線維の性質の違いはそれを構成するタンパク質の構造と密接な関係があり、この違いが変性疾患の多様な病理、病態となって現れる可能性が考えられる。

■ おわりに

このように、多くの神経変性疾患は特定のタンパク質が構造変化を起こし、特定の領域の神経細胞内外に蓄積する「中枢神経系のアミロイドーシス」といえる。アミロイドの特徴はクロス β 構造とその構造によってもたらされる「不溶性」や、プロテアーゼやホスファターゼなどに対する耐性など、さまざまな物理化学的作用に対する「構造安定性」であるが、それは決して静的なものではない。プリオンに代表されるように、「自身を鋳型に正常分子をアミロイド型分子に変換して増殖する性質」を有している。変性疾患は病状が徐々に進行する疾患であるが、1カ所で形成されたアミロイド分子が、条件が整った場合に癌細胞のように徐々に広がって病気が進行する可能性が考えられる。この意味でアミロイドーシスは「タンパク質のがん」といえるかもしれない。変性疾患の主要な蓄積タンパク質、病原因子が明らかとなった今、これらのタンパク質の構造変化や蓄積を抑制する創薬、あるいはワクチン療

法や免疫療法などによって病原因子タンパク質を除去する方法の開発が重要になると考えられる。

文献

- 1) Goedert, M. et al. : Curr. Opin. Neurobiol., 8 : 619-632, 1998
- 2) Chiti, F. & Dobson, C. M. : Annu. Rev. Biochem., 75 : 333-366, 2006
- 3) Perutz, M. F. : Brain Res. Bull., 50 : 467, 1999
- 4) Serpell, L. C. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97 : 4897-4902, 2000
- 5) Hoshino, M. et al. : J. Cell. Biol., 172 : 589-604, 2006
- 6) Masuda, M. et al. : FEBS Lett., 583 : 787-791, 2009
- 7) Taniguchi, S. et al. : J. Biol. Chem., 280 : 7614-7623, 2005
- 8) Masuda, M. et al. : Biochemistry, 45 : 6085-6094, 2006
- 9) Yonetani, M. et al. : J. Biol. Chem., 284 : 7940-7950, 2009
- 10) Arai, T. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 351 : 602-611, 2006

参考図書

- 『認知症テキストブック』（日本認知症学会／編），中外医学社，2008
『タンパク質の一生—生命活動の舞台裏』（永田和宏／著），岩波書店，2008
『脳神経疾患の分子病態と治療への展開』（貫名信行，西川 徹／編），実験医学増刊，Vol.25 No.13，羊土社，2007

Profile

著者プロフィール

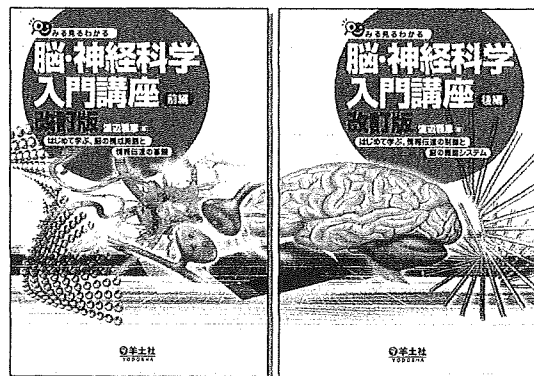
長谷川成人：新潟県新井市（現在の妙高市）生まれ。1986年，筑波大学大学院修士課程修了。'93年5月，東京大学医学部脳研究施設助手。井原康夫教授のもとアルツハイマー病脳に蓄積するタウのタンパク質化学解析に従事。'95年6月から英国MRC Laboratory of Molecular Biology（Michel Goedert教授）に留学。'99年2月，東京大学大学院薬学系研究科講師。岩坪 威教授のもとレビー小体病などの患者脳に蓄積する α シヌクレインの解析に従事。2001年4月から現職。TDP-43，タウ， α シヌクレインなど，細胞内タンパク質の構造異常と神経変性疾患の発症機構解明，治療に関する研究に従事。

他に類がないわかりやすさ！ 本書で一気に基礎固め 好評発売中

みる見るわかる

脳・神経科学 入門講座 改訂版

- 前編** はじめて学ぶ，脳の構成細胞と情報伝達の基盤
後編 はじめて学ぶ，情報伝達の制御と脳の機能システム
著／渡辺雅彦



- イラストをふんだんに加えつつ，重要な事項を整理，読みやすいボリュームに！
- 基本的な構造や仕組みを1つ1つ学んでいくので，理解度が違います。
特に神経伝達物質で切った解説は必読！分子から機能への道のりが見える，かつてない構成です

■ B5判 ■ 定価(本体3,600円+税)

【前編】■ 191頁 ■ ISBN978-4-7581-0729-7 【後編】■ 189頁 ■ ISBN978-4-7581-0730-3

発行  羊土社

神経変性疾患の細胞病理学

Cellular Pathology of Neurodegenerative Diseases

野中 隆, 新井哲明, 長谷川成人

Takashi Nonaka, Tetsuaki Arai, Masato Hasegawa

多くの神経変性疾患において、患者脳・変性部位の神経細胞内にユビキチン陽性の封入体が発見される。これらの封入体の多くは、病理学的にその疾患を特徴づけるマーカーであり、封入体を構成する主要なタンパク質は、その疾患の発症と密接に関連していると考えられる。Tau, α -synuclein, TDP-43といった種々の細胞内封入体の構成タンパク質は、いずれも通常は可溶性タンパク質であるが、何らかの異常により不溶性を獲得し、細胞内で蓄積を開始する。これらの蓄積により様々な細胞障害が生じ、最終的には神経細胞死が誘導され発症に至ると考えられているが、細胞内蓄積や細胞障害性の誘導機構などについてはいまだに不明な点が多い。これらの細胞内封入体を *in vitro* で再現し、その蓄積機構や細胞死誘導機構などを解明することは非常に重要な課題である。



α -synuclein, TDP-43, Tau, 細胞内封入体

はじめに

アルツハイマー病 (AD) における病理学的特徴の1つである神経原線維変化の主要な構成タンパク質として、微小管結合タンパク質である Tau が同定され、またパーキンソン病 (PD) における代表的な病理構造物である Lewy 小体からは、 α -synuclein がその主要構成成分として同定された。近年、核タンパク質の一種である TDP-43 (TAR-DNA binding protein of 43 kDa) が、前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration; FTLD) および筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) におけるユビキチン陽性細胞内封入体の主要な構成タンパク質として同定され、注目を浴びている。本稿では、これらの疾患特異的な病理構造物とその主要な構成タンパク質について解説するとともに、特に TDP-43 について、筆者らの最新の研究成果を交え、その最近の研究の進展について解説する。

I Tau

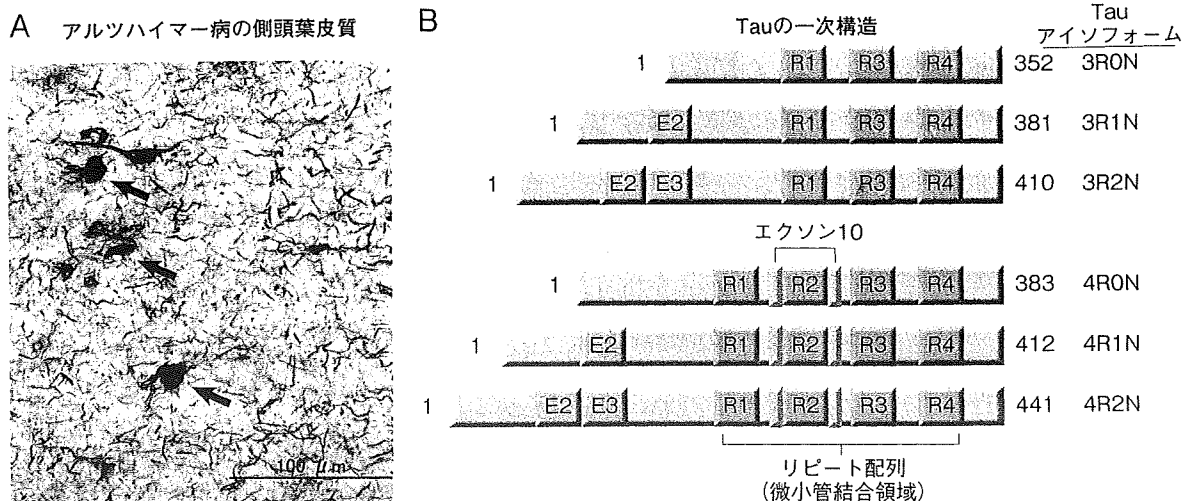
AD 患者脳に出現する細胞内封入体である神経原線維変化 (図1) は、PHF (paired helical filaments) と呼ばれる特異な線維束状の構造物であり、その主要な構成タンパク質として、

ユビキチン¹⁾および高度にリン酸化された Tau²⁾ (PHF Tau) が同定された。

微小管結合タンパク質として知られる Tau は神経細胞に豊富に発現しており、微小管に結合して安定化させる作用を有する。分子量 55~62kDa のポリペプチドであり、選択的スプライシングにより6種類のアイソフォームが存在している (図1)。

AD 患者脳の生化学的な解析より、PHF Tau は、6種類すべてのアイソフォームから構成され、また過剰にリン酸化されていることが判明した。質量分析計などを用いたタンパク質化学的な解析により、約20カ所のリン酸化部位が同定され、その多くはC末端側に位置するリピート配列 (微小管結合領域) を挟むように配置されていることが明らかとなった^{3), 4)}。PHF Tau を脱リン酸化すると、その微小管結合能が回復することから、異常リン酸化が、PHF Tau の機能低下の原因であると考えられる。

Tau が蓄積する神経変性疾患はタウオパチーと称されており、家族性のタウオパチーとして、第17染色体に連鎖した家族性前頭側頭型認知症 (frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17; FTDP-17) が知られている。1998年に、複数の家系に Tau 遺伝子の変異が発見され、Tau が FTDP-17 の原因遺伝子であることが報告された⁵⁾。現在までに、40種類以上の変異が同定されており、変異は、Tau の立体構造を変化させて微小管結合能を変化さ



■図1 神経原線維変化とTauの一次構造

A: アルツハイマー病の側頭葉皮質。抗Tau抗体(H150)による染色。矢印は神経原線維変化を示す。

B: Tauの一次構造。Tauは17番染色体に位置する遺伝子より産生され、N末端側のエクソン2(E2)および3(E3)の挿入の有無、およびC末端側のエクソン10の挿入の有無によって6種類のアミノ酸配列が形成される。

せるか、あるいは、Tau mRNAのスプライシングに影響を与えてそのアミノ酸配列の発現比率を変化させるか、どちらかの効果が確認されている。これらの変異効果により、細胞内において構造変化したTau、あるいは過剰となったTauがリン酸化を受け蓄積し、その結果異常機能を獲得し、神経細胞を変性させるというメカニズムが考えられる。

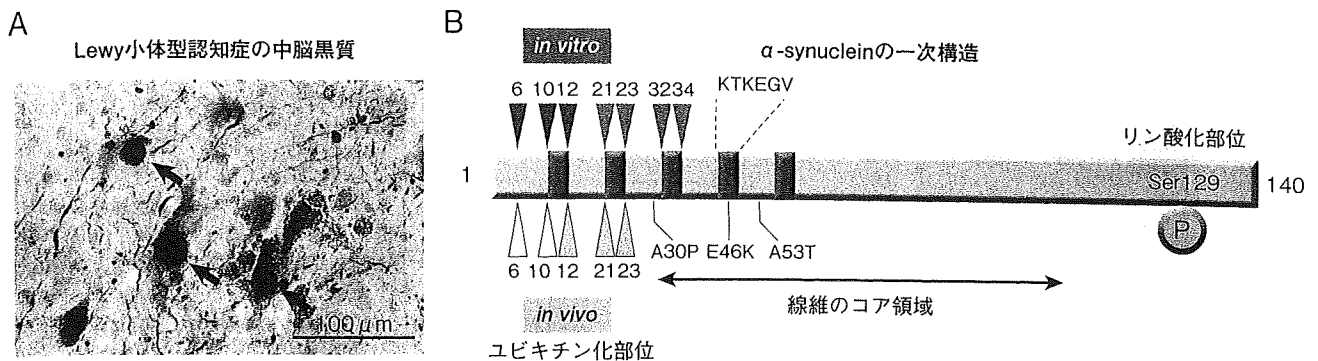
II α-synuclein

ADについて罹患率の高いPDの代表的な病理学的な特徴として、中脳黒質の神経細胞の脱落(細胞死)およびLewy小体と呼ばれる細胞内封入体(図2A)の出現が挙げられる。免疫化学的解析より、Lewy小体を構成する主要なタンパク質としてα-synucleinが同定され^{6,7)}、さらにこれらの知見を裏付けるようにほぼ時を同じくして、家族性PDの遺伝学的解析よりその病因遺伝子としてα-synucleinが同定され、53番目のアラニンがスレオニンに置換するミスセンス変異がその発症と連鎖することが明らかとなった⁸⁾。現在までに発症と連鎖するミスセンス変異は3カ所知られている(図2B)。

α-synucleinは140アミノ酸からなる可溶性タンパク質であり、そのN末端側にはKTKEGVを基本としたリピー

ト配列が存在し、分子中央部には疎水性が高い領域が位置している。脳に豊富に発現しているタンパク質で、全可溶性タンパク質の0.05%を占める発現量と推定されているが、その機能は不明な点が多い。ノックアウトマウスの解析より、ドーパミン神経伝達やシナプス小胞プールの調節に関与することが示唆されたが、このマウスに顕著な異常は見られていない。

タウオパチーになぞらえて、α-synucleinが蓄積する神経変性疾患はシヌクレイノパチーと総称されている。シヌクレイノパチー患者脳には、出現部位や細胞種は異なるが、α-synucleinが細胞内封入体の主要な構成成分として存在している。シヌクレイノパチー患者脳の生化学およびタンパク質化学的解析より、細胞内に蓄積したα-synucleinのほぼすべての分子において、129残基目のセリンがリン酸化されていること、および一部の分子はユビキチン化を受けていることが明らかとなった^{9,10)}(図2B)。これらのリン酸化およびユビキチン化といった翻訳後修飾は、正常な可溶性α-synucleinにはほとんど認められず、患者脳に蓄積した分子に特異な修飾である。上述した患者脳に蓄積したTauにもこれらの修飾が検出されることから、Tauやα-synucleinが細胞内で蓄積する機構には何らかの共通性がある可能性が示唆され、非常に興味深い。



■図2 Lewy小体と α -synucleinの一次構造

A: Lewy小体型認知症の中脳黒質。抗リン酸化 α -synuclein抗体による染色。矢印は、Lewy小体を示す。

B: α -synucleinの一次構造。N末端側にKTKEGVを基本とする5つのリピート配列およびユビキチン化部位が存在し、C末端側に1カ所のリン酸化部位が配置している。発症と連鎖する変異として、A30P、E46K、A53Tの3種類が、現在までに報告されている。

III TDP-43

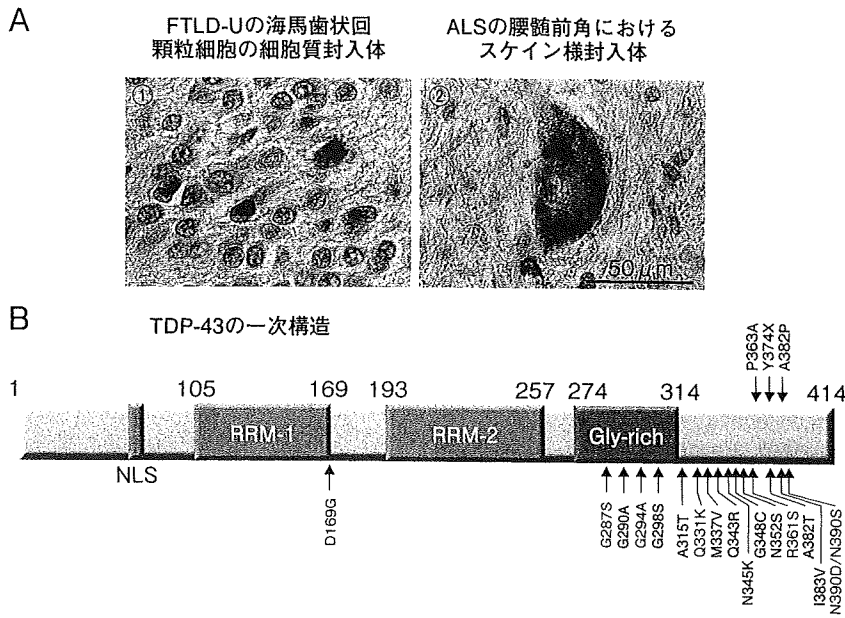
FTLDは、前頭葉や側頭葉に進行性的変性を呈する認知症性神経変性疾患で、初老期ではADに次いで頻度が高い。ALSは、運動ニューロンの変性により筋肉の萎縮と筋力低下を来し、その半数が発症後3～5年で呼吸筋麻痺により死亡するという難病である。これらの疾患には、ユビキチン陽性の細胞内封入体(図3A)が特異的に出現することが知られていたが、その主要構成タンパク質は長い間不明であった。2006年、筆者ら¹¹⁾およびNeumannら¹²⁾は、これらの主要な構成タンパク質としてTDP-43を同定した。2008年には、家族性および孤発性ALSにおいて、TDP-43遺伝子のミスセンス変異が相次いで報告され(図3B)、TDP-43の異常と神経変性の直接的な関係が明らかとなった。

TDP-43は、414アミノ酸からなるポリペプチドであり、2つのRNA認識配列(RNA-recognition motif; RRM)およびC末端側にグリシンに富む領域を有する(図3C)。核に局在する不均一核内リボ核酸タンパク質(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein; hnRNP)の一種であり、スプライシング調節に関与すると考えられている。例えば、TDP-43は、嚢胞性線維症の原因遺伝子である嚢胞性線維性膜貫通調節因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; CFTR)のエクソン9をスキップさせ、スプライシング抑制因子として作用する¹³⁾。

筆者らは、長年Tauや α -synucleinの生化学・タンパク質

化学解析に従事しており、それらの解析で培った経験や知識をもとに、患者脳に蓄積するTDP-43の解析に着手した。患者剖検脳から調製した界面活性剤不溶性画分のイムノプロット解析の結果から、前述のTauや α -synucleinと同様に、脳内に蓄積したTDP-43もまた、高度にリン酸化されていることが予想された。そこで、そのリン酸化部位を同定する目的で、TDP-43アミノ酸配列に存在するセリンやスレオニン残基をリン酸化したペプチドを抗原として、網羅的にリン酸化ペプチド抗体を作製した。このうち、C末端側のSer379、Ser389、Ser393、Ser403/404、Ser409/410などのリン酸化ペプチドに対する抗体は、患者脳に出現するユビキチン陽性の封入体を染色し、なかでも409および410残基目のセリンをともにリン酸化したペプチドから得られた抗体(anti-pS409/410)が最も強い反応性を有していた¹⁴⁾。またこの抗体による患者脳のイムノプロット解析から、患者脳には、Ser409およびSer410が過剰にリン酸化された全長TDP-43およびC末端断片が蓄積していることが判明した。特に、全長TDP-43よりもそのC末端断片の存在量が圧倒的に多く、リン酸化や断片化が、病理過程において重要な役割を果たしていると考えられる。

また、前述のように2008年に相次いで報告された孤発性および家族性ALS患者から発見されたTDP-43のミスセンス変異は、1つを除いてすべてが分子のC末端側(エクソン6内)に集中している(図3)。この領域は、グリシンに富む領域であるため安定な立体構造を形成しにくいことが考えられ、この部位におけるミスセンス変異はTDP-43の立体構造



■図3 TDP-43陽性細胞内封入体とTDP-43の一次構造

A: ユビキチン陽性封入体を伴う前頭側頭葉変性症(FTLD-U)の海馬歯状回顆粒細胞における細胞質封入体(①)および筋萎縮性側索硬化症(ALS)の腰髄前角におけるスケイン(糸くず)様封入体(②)。いずれも抗リン酸化TDP-43抗体(pS409/410)による染色。茶色に染色されているのが細胞内封入体である。

B: TDP-43の一次構造。N末端側から、核移行シグナル(NLS)、2つのRNA認識配列(RRM)およびグリシンに富む領域(Gly-rich)の各ドメインが存在する。現在まで、20カ所の変異が報告されており、青字の変異は家族性ALSより見いだされた。他は孤発性ALSより見いだされた変異である。1つを除いて、その他の変異はすべて分子のC末端側に集中している。

変化に影響を及ぼす可能性が高い。また、このC末端領域を介して、他のhnRNPと結合することが報告されており、変異がこれらの分子間相互作用に影響を及ぼすことも容易に推測できる。

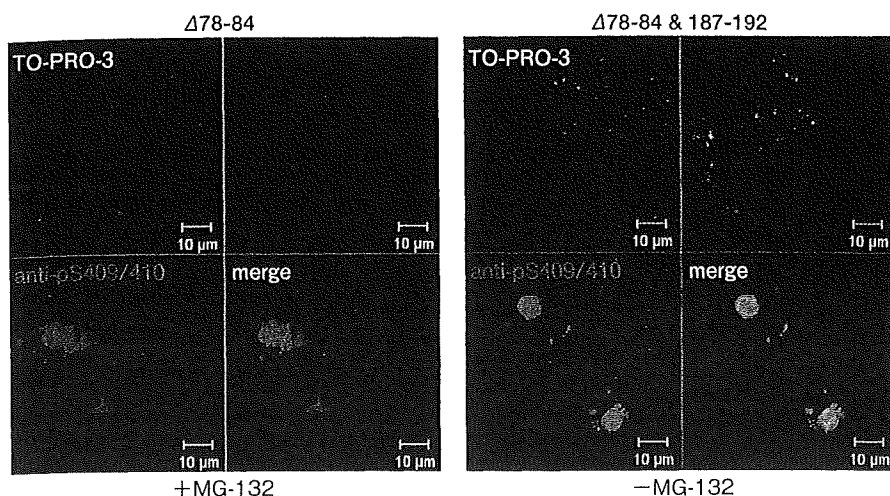
IV 細胞内タンパク質の*in vitro*蓄積モデルの構築

種々の神経変性疾患に認められる細胞内封入体の出現部位と、神経細胞の脱落部位にしばしば相関が見られることから、細胞内封入体の出現は、神経細胞死の誘導や発症に関与すると考えられている。上述したTau, α -synucleinやTDP-43は、本来可溶性のタンパク質であるが、何らかの変化により異常な不溶性を獲得し、細胞内で蓄積を開始すると予想される。“いかにして細胞内で不溶性を獲得するのか?”この疑問を解明するには、培養細胞などを用いた*in vitro*の細胞内タンパク質蓄積モデルの構築が必要である。現在、筆者らを含め世界中でこれらの細胞内タンパク質を培養細胞内で蓄積させ、患者脳に認められる細胞内封入体を*in vitro*で再現させる試みが行われているが、再現性の良い結果が得られているという報告は少ない。筆者らは、最近、TDP-43をヒト神経芽細胞SH-SY5Y内で蓄積させる系の開発に成功し、患者脳で見られる細胞内封入体とよく似た*in vitro*モデルを構築した¹⁵⁾。

TDP-43は核に存在するタンパク質であるが、患者脳にお

いては細胞質にも蓄積する。したがって、その細胞内局在の変化が封入体形成と関連するかどうかについて検討した。核移行シグナルは、一般的に塩基性アミノ酸に富む配列であることが知られており、SV40(simian virus 40) Large T抗原においては、PKKKRKVの配列が報告されている。そこで、TDP-43のアミノ酸配列を検索したところ、PKDNKRK(78~84残基)およびPLRSRK(187~192残基)の配列が見いだされた。これらの領域を欠損させた変異体を作製し、SH-SY5Y細胞に一過性に発現させたところ、78~84残基を欠損させた場合(Δ 78-84)には、その発現は細胞質に認められ、この部分が核移行シグナルとして機能していることが確認できた。一方、187-192残基を欠損させた変異体(Δ 187-192)を発現させると、その発現は核に認められたが、野生型とは異なりドット状の発現パターンが観察された¹⁵⁾。しかしながら、これらの欠損変異体を細胞に発現させただけでは、患者脳に特異的に認められる細胞内封入体は形成されなかった。

次に、TDP-43欠損変異体の発現細胞に対するプロテアソーム阻害剤(MG132)の効果について検討した。上記2種類の欠損変異体を発現させた細胞にMG132処理を行ったところ、 Δ 78-84発現細胞では細胞質に、 Δ 187-192発現細胞においては核内に凝集体が認められた(図4)。これらの凝集体はいずれも、直径が約10 μ m程度であり、患者脳に見られる封入体の大きさとよく一致した。さらにこれらはいずれも、筆者らが作製した抗リン酸化TDP-43特異抗体(pS409/410)



■図4 培養細胞を用いたTDP-43細胞内蓄積モデル

ヒト神経芽細胞SH-SY5Yに、核移行シグナルを除去した変異体(Δ78-84)、あるいは核移行シグナルとともに187-192残基を欠損させた変異体(Δ78-84&187-192)を発現させ、プロテアソーム阻害剤MG132の非存在下(右)および存在下(左)で培養した。細胞は固定した後、抗リン酸化TDP-43抗体(anti-pS409/410)、抗ユビキチン抗体(anti-Ub)、およびTO-PRO-3(核染色)で染色し、コンフォーカルレーザー顕微鏡で観察した。

Nonaka T, et al: FEBS Lett (2009) 583: 394-400より改変。

および市販の抗ユビキチン抗体に陽性であった。現在広く一般に使用されているProteinTech社の抗TDP-43ポリクローナル抗体では、これらの凝集体は鮮明には染色されなかった。また、両配列を欠損させた変異体(Δ78-84&187-192)を発現させると、MG132処理なしで、リン酸化TDP-43およびユビキチン陽性な細胞質凝集体が出現した(図4)。以上の結果より、筆者らは、患者脳に見られる細胞内TDP-43封入体と性質が類似したTDP-43の凝集体を培養細胞に再現することに成功した¹⁵⁾。

上述したように、筆者らが開発したリン酸化TDP-43特異抗体による解析により、患者脳には全長TDP-43よりもC末端断片のほうが多く蓄積していることが判明した。そこで、全長よりもC末端断片のほうが細胞内で蓄積しやすいことが考えられるため、これについて検討した。種々の断片をGFP(green fluorescent protein)との融合タンパク質として構築し、細胞に一過性に発現させた。その結果、予想どおり、C末端断片は全長よりも凝集体を形成しやすく、またこの凝集体はリン酸化およびユビキチン化を受けていることが明らかとなった。また一部のN末端断片の発現によっても、ユビキチン化された細胞内凝集体の形成が認められた(筆者ら;投稿中)。

最近、Wintonらは、培養細胞を用いたTDP-43蓄積モデ

ルを報告した¹⁶⁾。彼らも患者脳におけるTDP-43の細胞内局在の変化に着目し、核移行シグナルの同定を行い(82~98残基)、その変異体を発現させることにより細胞質凝集体の出現を確認した。しかし、ProteinTech社の抗体による検出のため、凝集体が鮮明に示されておらず、またリン酸化などの翻訳後修飾についても詳細に検討されていない。彼らはまた、核移行シグナル変異体の発現により細胞質凝集体が形成されるとともに、内在性TDP-43の核から細胞質への移行が生じることを報告しており、TDP-43の核-細胞質間輸送のバランスの障害が細胞内凝集体の形成に関与することを示唆している。しかしながら、これら凝集体を伴う細胞における細胞死については記述されていない。

また、酵母を用いた解析について、Johnsonらにより報告がなされた¹⁷⁾。彼らは、GFPをTDP-43のC末端側に結合した融合タンパク質を用いて、種々のドメインの欠損変異体を作製し、これを酵母に発現させ、TDP-43のどの領域が細胞内蓄積および細胞毒性に関与するかについて検討した。その結果、細胞内蓄積および毒性に必要な領域は、RRMの一部およびC末端領域(アミノ酸残基181~414)であった。この報告でも細胞内凝集体の十分な解析がなされておらず、リン酸化やユビキチン化に関してはまったく検討されていないが、C末端側断片の細胞毒性の可能性が示されたことは、非常に興味深い。

おわりに

ADにおけるTau、PDにおけるα-synucleinに次ぐ第三の細胞内蓄積タンパク質として、TDP-43が注目されている。筆者らが確立した抗リン酸化TDP-43特異抗体などを用いることにより、TDP-43もまた、Tauやα-synucleinと同様に、患者脳内でリン酸化、ユビキチン化および断片化などの翻訳後修飾を受けていることが明らかになった。しかしながら、これらの修飾が蓄積の原因であるのか、それとも単なる結果であるのかについては、Tauやα-synucleinと同様に

はっきりとした見解は得られていない。これらのタンパク質には、特に配列相同性は認められないが、これらが神経細胞において蓄積し、最終的に神経変性を引き起こすというメカニズムには何らかの共通性があるように思われる。このような神経変性疾患の発症に関与する細胞内タンパク質をターゲットにした創薬は、近年非常に注目されており、いくつかのものはすでに臨床試験に入っている。筆者らが確立しつつある様々な封入体構成タンパク質の細胞内蓄積モデルや動物モデルから得られる知見を有効に活用し、TDP-43のみならずTauや α -synucleinの細胞内蓄積をも妨げる化合物や遺伝子などの探索を行い、神経変性疾患全般に対する治療に貢献していきたいと考えている。

PROFILE 野中 隆

- 東京都精神医学総合研究所 分子神経生物学研究チーム
- E-mail: nonakat@prit.go.jp
- 趣味: 浦和レッズ観戦, 旅行, 美術館巡り, 家飲み

1996年埼玉大学大学院理工学研究科博士後期課程修了(橋本洋一教授), 1998年東京大学医科学研究所客員研究員, 1999年日本学術振興会特別研究員, 2002年東京都精神医学総合研究所流動研究員, 2004年より主席研究員として現在に至る。

PROFILE 新井 哲明

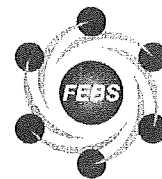
- 東京都精神医学総合研究所 老年期精神疾患研究チーム 主任研究員

PROFILE 長谷川 成人

- 東京都精神医学総合研究所 分子神経生物学研究チーム 副参事研究員(チームリーダー)

文献

- 1) Mori H, et al: Science (1987) 235: 1641-1644
- 2) Lee VM, et al: Science (1991) 251: 675-678
- 3) Hasegawa M, et al: J Biol Chem (1992) 267: 17047-17054
- 4) Morishima-Kawashima M, et al: J Biol Chem (1995) 270: 823-829
- 5) Hutton M, et al: Nature (1998) 393: 702-705
- 6) Spillantini MG, et al: Nature (1997) 388: 839-840
- 7) Baba M, et al: Am J Pathol (1998) 152: 879-884
- 8) Polymeropoulos MH, et al: Science (1997) 276: 2045-2047
- 9) Fujiwara H, et al: Nat Cell Biol (2002) 4: 160-164
- 10) Hasegawa M, et al: J Biol Chem (2002) 277: 49071-49076
- 11) Arai T, et al: Biochem Biophys Res Commun (2006) 351: 602-611
- 12) Neumann M, et al: Science (2006) 314: 130-133
- 13) Buratti E, et al: EMBO J (2001) 20: 1774-1784
- 14) Hasegawa M, et al: Ann Neurol (2008) 64: 60-70
- 15) Nonaka T, et al: FEBS Lett (2009) 583: 394-400
- 16) Winton MJ, et al: J Biol Chem (2008) 283: 13302-13309
- 17) Johnson BS, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2008) 105: 6439-6444



Methylene blue and dimebon inhibit aggregation of TDP-43 in cellular models

Makiko Yamashita^{a,1}, Takashi Nonaka^{a,1}, Tetsuaki Arai^b, Fuyuki Kametani^a, Vladimir L. Buchman^c, Natalia Ninkina^{c,d}, Sergey O. Bachurin^d, Haruhiko Akiyama^b, Michel Goedert^e, Masato Hasegawa^{a,*}

^a Department of Molecular Neurobiology, Tokyo Institute of Psychiatry, Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research, 2-1-8 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8585, Japan

^b Department of Psychogeriatrics, Tokyo Institute of Psychiatry, Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research, 2-1-8 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8585, Japan

^c School of Biosciences, Cardiff University, Cardiff CF10 3US, UK

^d Institute of Physiologically Active Compounds, RAS, Chernogolovka 142432, Russian Federation

^e MRC Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge CB2 0QH, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 May 2009

Revised 10 June 2009

Accepted 22 June 2009

Available online 26 June 2009

Edited by Jesus Avila

Keywords:

Tau
Alpha-synuclein
Inhibitor
Alzheimer
ALS
FTLD

ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal lobar degeneration with ubiquitinated inclusions (FTLD-U) are major neurodegenerative diseases with TDP-43 pathology. Here we investigated the effects of methylene blue (MB) and dimebon, two compounds that have been reported to be beneficial in phase II clinical trials of Alzheimer's disease (AD), on the formation of TDP-43 aggregates in SH-SY5Y cells. Following treatment with 0.05 μ M MB or 5 μ M dimebon, the number of TDP-43 aggregates was reduced by 50% and 45%, respectively. The combined use of MB and dimebon resulted in a 80% reduction in the number. These findings were confirmed by immunoblot analysis. The results indicate that MB and dimebon may be useful for the treatment of ALS, FTLD-U and other TDP-43 proteinopathies.

© 2009 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease that is characterized by progressive weakness and muscle wasting, and for which no effective therapies exist. Frontotemporal lobar degeneration (FTLD) is the second most common form of dementia after Alzheimer's disease (AD) in the population below the age of 65 years. In many cases with these disorders, ubiquitin (Ub)-positive, tau-negative intracytoplasmic inclusions form in nerve cells and glial cells. TAR DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43) is the major component of these inclusions [1–3]. Biochemical and histological analyses demonstrated that TDP-43 accumulates in brain and spinal cord in a hyperphosphorylated and fibrillar form [4]. Furthermore, missense mutations in the TDP-43 gene have been identified in familial cases of ALS and ALS with FTLD-U [5–9]. Together, these findings indicate that dysfunction of TDP-43 is central to the etiology and pathogenesis of ALS and FTLD-U. In addition, TDP-43 has also been found to accumulate in other neurodegenerative disorders, including AD, dementia with Lewy bodies [10], Parkinsonism-dementia complex

of Guam [11], argyrophilic grain disease [12], Huntington's disease [13], Perry syndrome [14] and familial British dementia [15].

Inhibition of the aggregation of TDP-43 and promotion of its clearance are considered to be major therapeutic avenues for ALS and FTLD-U. As for other neurodegenerative diseases, current tools include antibodies, synthetic peptides, molecular chaperones and chemical compounds. Of the latter, methylene blue (MB) and dimebon have recently been reported to have significant beneficial effects in phase II clinical trials of AD [16,17]. MB is a phenothiazine compound that has been used for treating methemoglobinemia [18,19], inhibiting nitric oxide synthase [20], reducing nGMP [21], enhancing β -oxydation in mitochondria [22], inhibiting of noradrenaline re-uptake [23] and enhancing brain mitochondrial cytochrome oxidase activity [24,25]. It has also been shown to inhibit AD-like A β and tau aggregation in vitro [26,27]. Dimebon is a non-selective anti-histaminergic compound that was in clinical use for many years before more selective agents became available [28]. It has been reported to inhibit butyrylcholinesterase, acetylcholinesterase, NMDA receptors, voltage-gated calcium channels, adrenergic receptors, histamine H1 receptors, histamine H2 receptors and serotonin receptors, as well as to stabilize glutamate-induced Ca²⁺ signals [29–31]. The effects of dimebon on pathological protein aggregation have not been studied in detail, but recently we demonstrated that chronic administration of this drug reduced

* Corresponding author. Fax: +81 3 3329 8035.

E-mail address: masato@prit.go.jp (M. Hasegawa).

¹ These authors contributed equally to this work.

the number of nerve cell deposits in a mouse model of synucleinopathy [32].

Here we investigated whether MB and dimebon can reduce the formation of TDP-43 inclusions in SH-SY5Y cellular models. Significantly, the treatment of cells with each compound and their combined application inhibited the formation of TDP-43 aggregates, suggesting that MB and dimebon may be effective for the treatment of ALS and FTL-D.

2. Materials and methods

2.1. Antibodies

A polyclonal anti-TDP-43 antibody (anti-TDP-43) was purchased from ProteinTech Group Inc. (10782-1-AP, Chicago, USA).

A polyclonal antibody specific for phosphorylated TDP-43 (anti-pS409/410) (available from Cosmo Bio Co., Tokyo, Japan) [4] and an anti-Ub antibody (MAB1510, Chemicon, Billerica, USA) were used for the evaluation of pathological forms of TDP-43.

2.2. TDP-43 cellular models and addition of compounds

To investigate the effects of MB and dimebon on the formation of TDP-43 aggregates, we used two cellular models of TDP-43 proteinopathy. The first consists of SH-SY5Y cells expressing mutant TDP-43 that lacks both the nuclear localization signal (NLS) and residues 187–192 (Δ NLS&187-192). In these cells, round structures positive for both anti-pS409/410 and anti-Ub are observed [33]. The second model consists of SH-SY5Y cells expressing an aggregation-prone TDP-43 C-terminal fragment (residues 162–

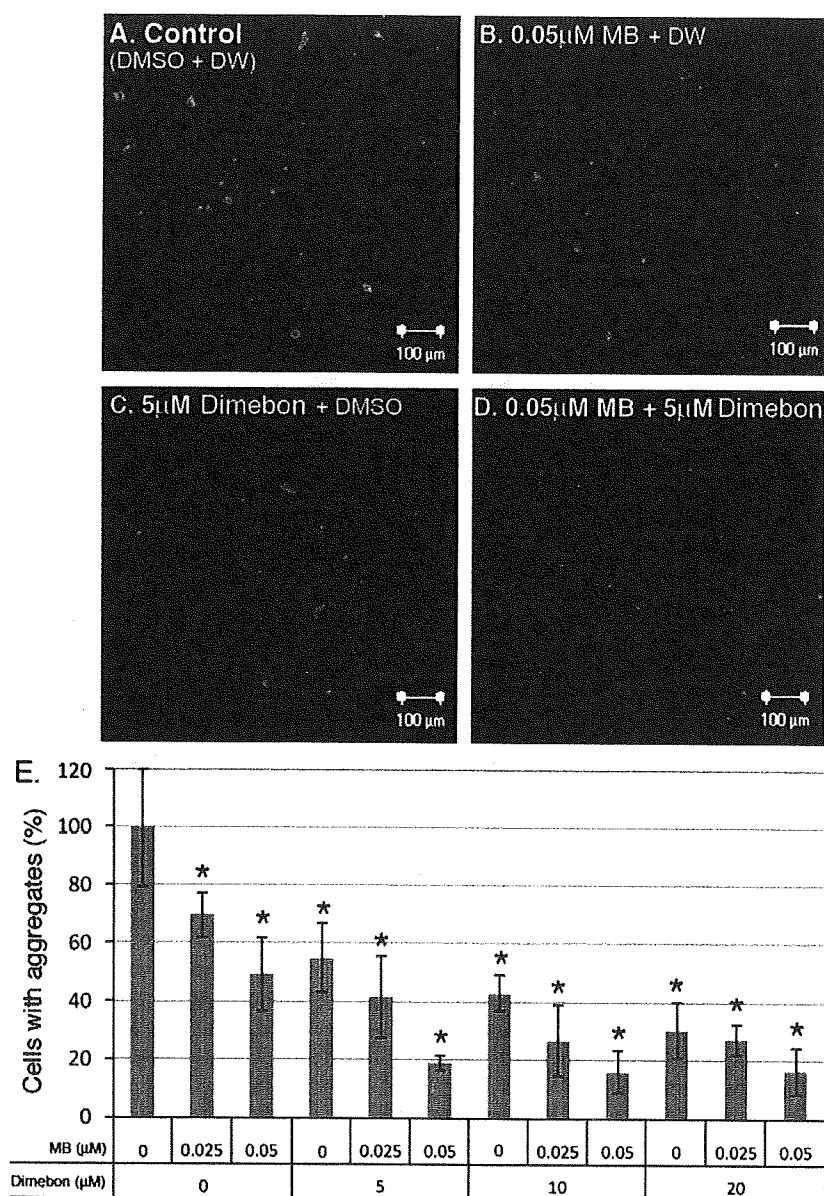


Fig. 1. Immunohistochemical analysis of the effects of methylene blue (MB) and dimebon on the aggregation of TDP-43 in SH-SY5Y cells expressing TDP-43 (Δ NLS&187-192). TDP-43 inclusions were stained with anti-pS409/410 antibody and detected with Alexa Fluor 488-labeled secondary antibody. Representative confocal images from cells treated with control (DMSO + DW) (A), 0.05 μM MB + DW (B), 5 μM dimebon + DMSO (C) and 0.05 μM MB + 5 μM dimebon (D) are shown. (E) Quantitation of cells with TDP-43 aggregates. The number of cells with intracellular TDP-43 aggregates was counted and expressed as the percentage of cells with aggregates in the absence of compound (taken as 100%). Fluorescence intensity within an area of approximately 800 μm × 800 μm was assessed by confocal microscopy. The intensity of Alexa Fluor 488 was calculated as the ratio of that of TO-PRO-3. At least 8 areas per sample were measured (n = 8–16). Data are means ± S.E.M. *P < 0.01 by Student's *t* test.

414) as a green fluorescent protein (GFP)-fusion [34,35]. Its expression also results in the formation of anti-pS409/410- and anti-Ub-positive inclusions. Six hours after transfection, the cells were treated with MB (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), dimebon dissolved in sterile distilled water (DW) or MB + dimebon and cultured for 3 days. As controls, cells were treated with either DMSO or DW, or both of them for 3 days.

2.3. Immunohistochemical analysis

SH-SY5Y cells were grown on coverslips and transfected as described [33]. After incubation for the indicated times, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with anti-phosphorylated TDP-43 antibody pS409/410 or anti-Ub, followed by Alexa Fluor 488- or Alexa Fluor 568-labeled IgG (Invitrogen, Carlsbad,

USA). After washing, the cells were further incubated with TO-PRO-3 (Invitrogen, Carlsbad, USA) to stain nuclear DNA. To quantify the cells with TDP-43 aggregates, the laser power (at 488 nm for detection of Alexa Fluor 488 and GFP) was adjusted, so that only aggregates were detected as described [34]. Total intensity of fluorescence detected at the threshold laser power and that of TO-PRO-3 fluorescence, the latter corresponding to the total number of cells in a given field (approximately 800 $\mu\text{m} \times 800 \mu\text{m}$), were measured with LSM5 Pascal v 4.0 software (Carl Zeiss), and the ratio of cells with inclusions calculated.

2.4. Immunoblot analysis

Tris saline (TS)-soluble, Triton X-100 (TX)-soluble and Sarkosyl (Sar)-soluble fractions, as well as the final pellet, were prepared,

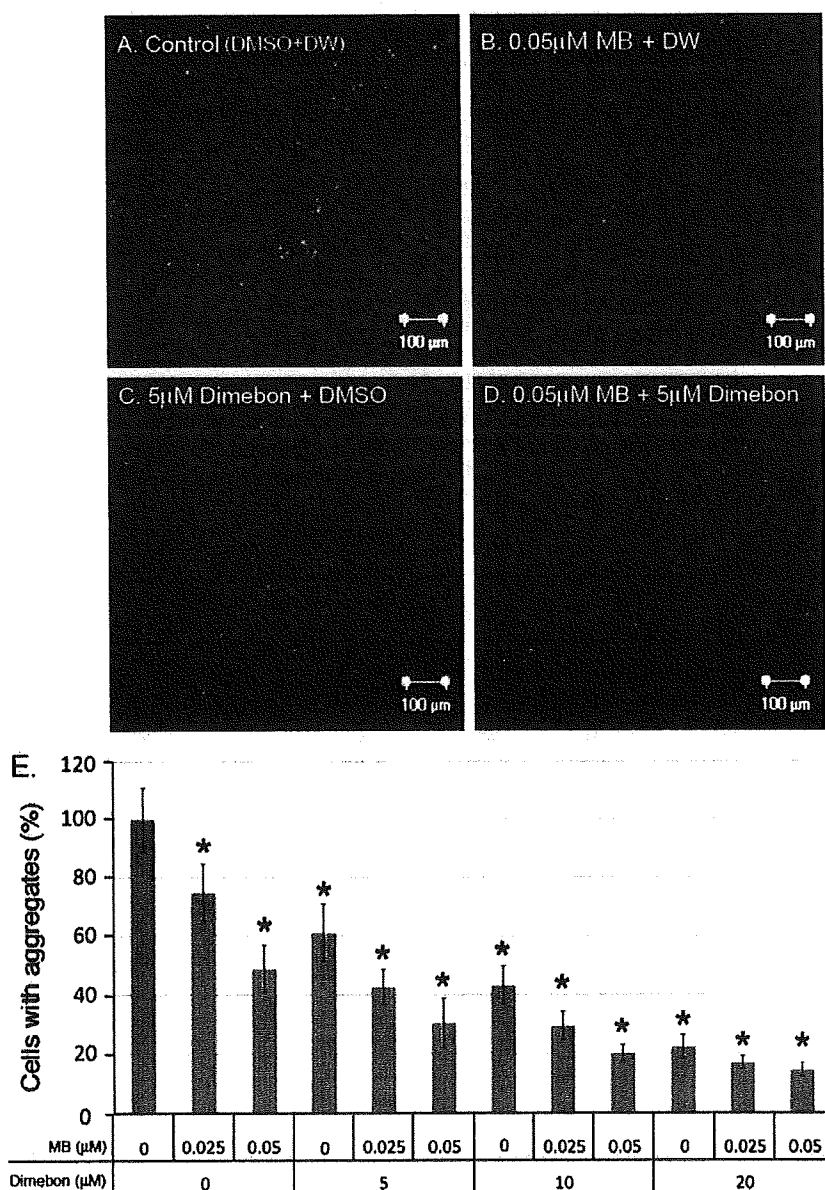


Fig. 2. Immunohistochemical analysis of the effects of methylene blue (MB) and dimebon on the aggregation of TDP-43 in SH-SY5Y cells expressing TDP-43 C-terminal fragment (162–414) as GFP fusion protein. TDP-43 inclusions were detected by fluorescence of GFP, when the laser power was adjusted. Representative confocal images from cells treated with control (DMSO + DW) (A), 0.05 μM MB + DW (B), 5 μM dimebon + DMSO (C) and 0.05 μM MB + 5 μM dimebon (D) are shown. (E) Quantitation of cells with TDP-43 aggregates. The intensity of fluorescence of GFP was calculated as the ratio of that of TOPRO-3. At least 8 areas per sample were measured ($n = 8-16$). Data are means \pm S.E.M. * $P < 0.01$ by Student's t test.

run on SDS-PAGE and immunoblotted with anti-TDP-43 and anti-pS409/410 antibodies, as described [33].

3. Results

3.1. Effects of MB and dimebon on the formation of TDP-43 inclusions

We first investigated the cytotoxicity of MB and dimebon. SH-SY5Y cells were treated with different concentrations of each compound, cultured for 1 day, followed by growth measurements. No toxic effects were detected with dimebon at concentrations of 1–60 μM , whereas a significant decrease in the number of cells was observed with MB at concentrations greater than 0.1 μM . Cells transfected with TDP-43 ($\Delta\text{NLS}\&187-192$) formed round intracellular inclusion-like structures that were positive with both anti-pS409/410 and anti-Ub antibodies, as reported previously [33] (Fig. 1A). When the cells were treated for 3 days with MB, dimebon or MB + dimebon, the number of TDP-43 inclusions was reduced (Fig. 1B–D). Compared to controls, we observed a 50% reduction in the number of inclusions with 0.05 μM MB, a 45% reduction with 5 μM dimebon and a 80% reduction with 0.05 μM MB + 5 μM dimebon (Fig. 1B–E). The effects were concentration-dependent and statistically significant (Fig. 1E). Thus, 10 μM dimebon caused a 60% reduction and 20 μM dimebon a 70% reduction in the number of TDP-43 inclusions. Similar results were obtained using a second cellular model of TDP-43 proteinopathy (Fig. 2), which expresses a C-terminal fragment (162–414) of TDP-43 as GFP fusion protein [34]. Other anti-histaminergic compounds, including promethazine hydrochloride, diphenhydramine hydrochloride (H1 histamine receptor antagonist) and thioperamide maleate (H3 histamine receptor antagonist) (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA), did not affect the number of TDP-43 aggregates (Fig. 3). Similarly, two phenothiazine compounds tested, chlorpromazine hydrochloride and perphenazine (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA), which failed to exert any effect on tau aggregation, did not affect the aggregation of TDP-43 (Fig. 3)

3.2. Immunoblot analysis of TDP-43 in cells treated with MB and dimebon

The immunohistochemical results were confirmed by immunoblotting. Cells expressing TDP-43 ($\Delta\text{NLS}\&187-192$) (data not shown) or the C-terminal fragment (162–414) of TDP-43 (Fig. 4) were sequentially extracted with TS, TX, and Sar, and the supernatants and pellets analyzed by immunoblotting. In cells transfected with the C-terminal fragment (162–414) of TDP-43, phosphorylated C-terminal fragment of TDP-43 was detected in the Sar-insoluble fraction, as reported previously [34] (black arrowhead in Fig 4A). The levels of this band with slower gel mobility were reduced when the cells were treated with MB, dimebon or MB + dimebon (Fig. 4A and B). By contrast, similar levels of endogenous TDP-43 (black arrow in Fig. 4A) and expressed C-terminal fragment of TDP-43 (white arrowhead in Fig. 4A) were detected in TS- and TX-soluble fractions of control cells and of cells treated with MB or dimebon, indicating that these compounds did not affect the amount of TDP-43.

4. Discussion

In this study, we examined the effects of two compounds, MB and dimebon, on the formation of abnormally phosphorylated TDP-43 inclusions using SH-SY5Y cellular models. Both compounds, when used singly or in combination, significantly reduced the number of TDP-43 aggregates. Although its mechanism of action remains to be clarified, it is reasonable to speculate that MB may bind to dimers and oligomers of TDP-43 and thereby inhibit fibril formation, as has previously been demonstrated for the inhibition of A β and tau aggregation by MB in vitro [27]. The present findings show, for the first time, that MB can reduce protein aggregation in cells.

In addition, we have identified dimebon as a compound capable of inhibiting the formation of abnormal inclusions of TDP-43. In view of the recent demonstration of its efficacy in a phase II

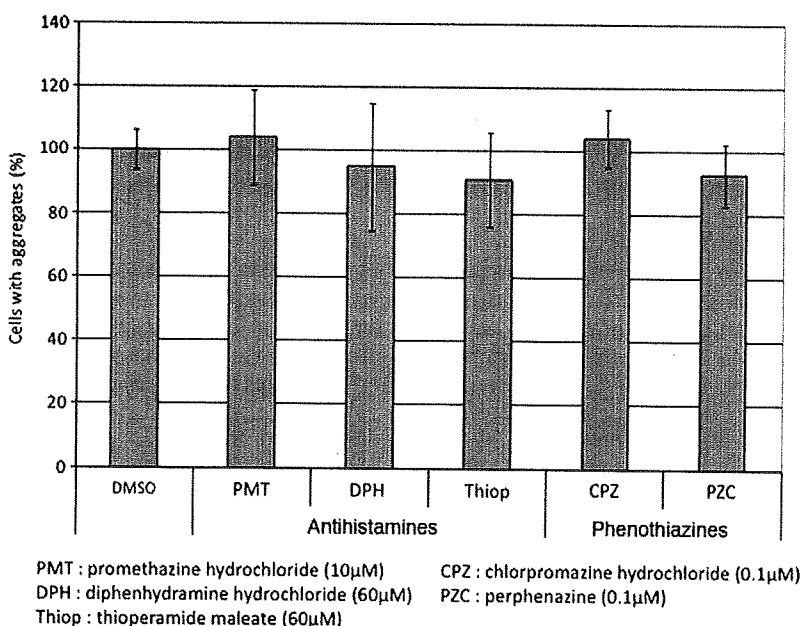


Fig. 3. Immunohistochemical analysis of the effects of three anti-histaminergic compounds, promethazine hydrochloride (PMT), diphenhydramine hydrochloride (DPH) and thioperamide maleate (Thiop), and two phenothiazine compounds, chlorpromazine hydrochloride (CPZ) and perphenazine (PZC) on the aggregation of TDP-43 in SH-SY5Y cells expressing GFP-fused TDP-43 C-terminal fragment (162–414) as GFP fusion protein. Quantitation of cells with TDP-43 aggregates is shown. No reduction in the TDP-43 aggregation was observed with these compounds. Promethazine hydrochloride and phenothiazines were tested at 10 μM and 0.1 μM , respectively, because they were toxic at higher concentrations.

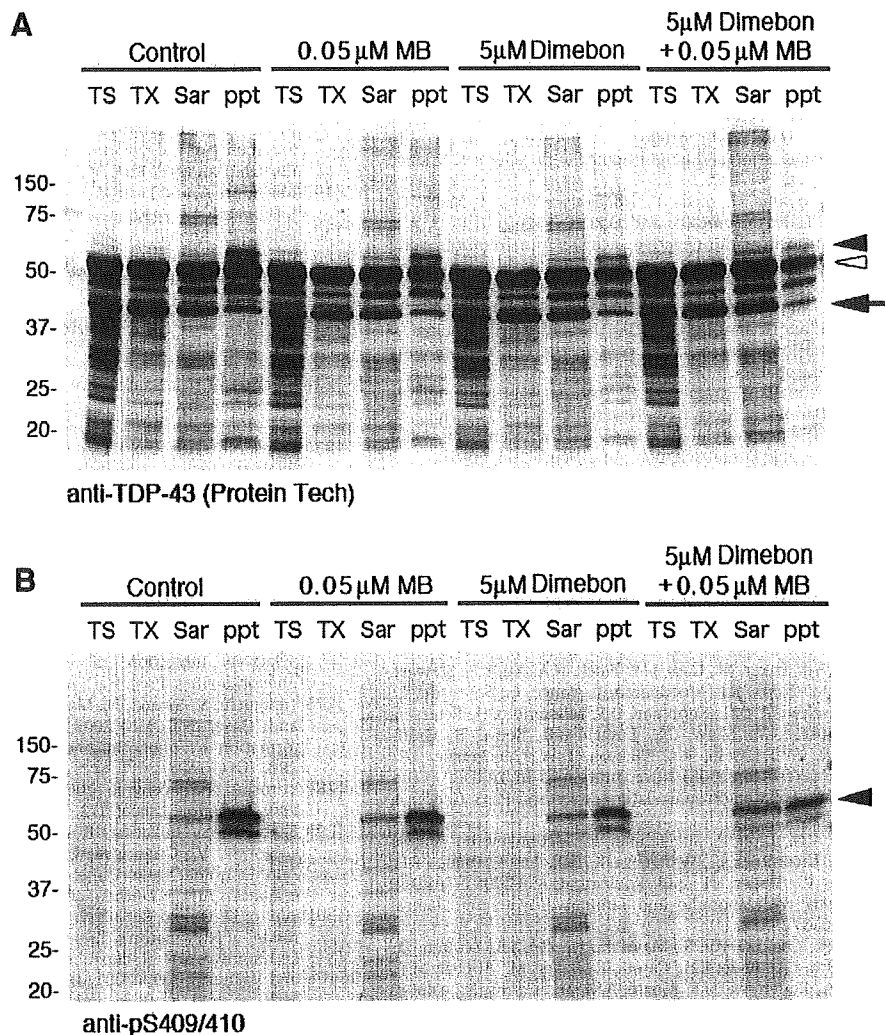


Fig. 4. Immunoblot analysis of the effects of methylene blue (MB) and dimebon on the aggregation of TDP-43 in SH-SY5Y cells expressing GFP-tagged TDP-43 C-terminal fragment (162–414). Tris saline (TS)-soluble material, Triton X-100 (TX)-soluble material, Sarkosyl (Sar)-soluble material and the remaining pellet (ppt) were prepared from control cells and from cells treated with 0.05 μ M MB, 5 μ M dimebon or 0.05 μ M MB + 5 μ M dimebon, run on SDS-PAGE and immunoblotted with anti-TDP-43 antibody (A) or anti-pS409/410 antibody (B). Abnormally phosphorylated TDP-43 C-terminal fragment (162–414) with a higher apparent molecular mass than the corresponding non-phosphorylated fragment (white arrowhead) was detected by both antibodies (black arrowheads). Similar levels of the non-phosphorylated GFP-tagged C-terminal fragment of TDP-43 (white arrowhead) and of endogenous TDP-43 (black arrow) were detected with the anti-TDP-43 antibody (A).

clinical trial, dimebon may well become a new drug for the treatment of AD and other neurodegenerative diseases. Although there have been some reports suggesting that dimebon may act as a neuroprotective agent and prevent mitochondrial pore transition in experimental models of AD [36] and Huntington's disease [30], its precise mode of action remains unknown. The present study suggests that dimebon may act by reducing the production or accumulation of abnormal protein aggregates. It remains to be determined whether the effects on TDP-43 aggregation are of a direct or an indirect nature. It will also be interesting to investigate the effects of dimebon in existing [37] and future animal models of TDP-43 proteinopathy. We could not detect a significant effect of dimebon on the *in vitro* assembly of recombinant human α -synuclein into filaments and on the heparin-induced assembly of recombinant human tau into filaments (data not shown). The recent demonstration that dimebon reduces the number of protein inclusions in a model synucleinopathy [32] suggests that its effects may be indirect.

MB has been used for many years to treat a variety of conditions, including methemoglobinemia [19], septic shock [20] and depression [38]. It has recently been used in a phase II trial of AD

[16]. Furthermore, MB has been reported to have activity as an enhancer of mitochondrial activity [24], and a recent study has reported that it delays cellular senescence in cultured human fibroblasts [25]. However, high doses of MB are known to be toxic and to cause the formation of Heinz bodies in erythrocytes in infants [39]. A combination therapy, like the one used here, may therefore be advantageous.

In conclusion, the present results showing a reduction in the number of TDP-43 inclusions following the addition of MB and/or dimebon to transfected SH-SY5Y cells suggest that these compounds may be beneficial for the treatment of ALS and FTLD-U.

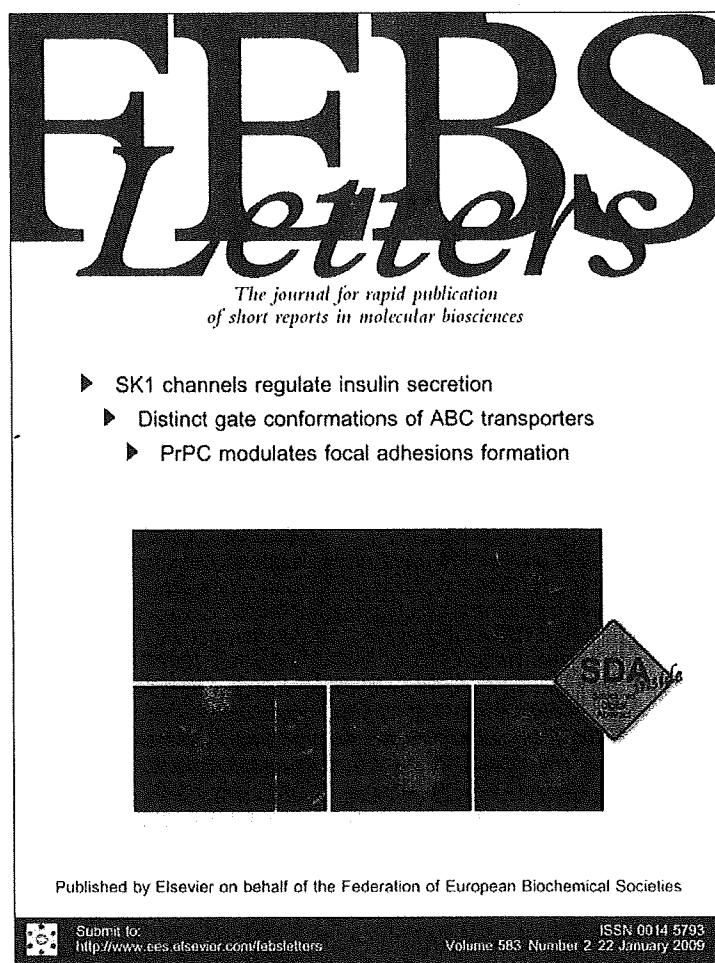
Acknowledgements

We thank Dr. Shahin Zibae for helpful comments on the manuscript. This work was supported by a Grant-in-aid for Scientific Research on Priority Area – Research on Pathomechanisms of Brain Disorders (to M.H., 20023038) from Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology and grants from Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan, and a Russian Foundation for Basic Research Grant (to N.N., 09-04-01412-a).

References

- [1] Neumann, M., Sampathu, D.M., Kwong, L.K., Truax, A.C., Micsenyi, M.C., Chou, T.T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C.M., McCluskey, L.F., Miller, B.L., Masliah, E., Mackenzie, I.R., Feldman, H., Feiden, W., Kretzschmar, H.A., Trojanowski, J.Q. and Lee, V.M. (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314, 130–133.
- [2] Arai, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Ikeda, K., Nonaka, T., Mori, H., Mann, D., Tsuchiya, K., Yoshida, M., Hashizume, Y. and Oda, T. (2006) 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.
- [3] Davidson, Y., Kelley, T., Mackenzie, I.R., Pickering-Brown, S., Du Plessis, D., Neary, D., Snowden, J.S. and Mann, D.M. (2007) Ubiquitinated pathological lesions in frontotemporal lobar degeneration contain the TAR DNA-binding protein. TDP-43. *Acta Neuropathol.* 113, 521–533.
- [4] Hasegawa, M., Arai, T., Nonaka, T., Kametani, F., Yoshida, M., Hashizume, Y., Beach, T.G., Buratti, E., Baralle, F., Morita, M., Nakano, I., Oda, T., Tsuchiya, K. and Akiyama, H. (2008) Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 64, 60–70.
- [5] Yokoseki, A., Shiga, A., Tan, C.F., Tagawa, A., Kaneko, H., Koyama, A., Eguchi, H., Tsujino, A., Ikeuchi, T., Kakita, A., Okamoto, K., Nishizawa, M., Takahashi, H. and Onodera, O. (2008) TDP-43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 63, 538–542.
- [6] Sreedharan, J., Blair, I.P., Tripathi, V.B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., Ackerley, S., Durnall, J.C., Williams, K.L., Buratti, E., Baralle, F., de Belleruche, J., Mitchell, J.D., Leigh, P.N., Al-Chalabi, A., Miller, C.C., Nicholson, G. and Shaw, C.E. (2008) TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 319, 1668–1672.
- [7] Rutherford, N.J., Zhang, Y.J., Baker, M., Gass, J.M., Finch, N.A., Xu, Y.F., Stewart, H., Kelley, B.J., Kuntz, K., Crook, R.J., Sreedharan, J., Vance, C., Sorenson, E., Lippa, C., Bigio, E.H., Geschwind, D.H., Knopman, D.S., Mitsumoto, H., Petersen, R.C., Cashman, N.R., Hutton, M., Shaw, C.E., Boylan, K.B., Boeve, B., Graff-Radford, N.R., Wszolek, Z.K., Caselli, R.J., Dickson, D.W., Mackenzie, I.R., Petrucelli, L. and Rademakers, R. (2008) Novel mutations in TARDBP (TDP-43) in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS Genet.* 4, e1000193.
- [8] Kabashi, E., Valdmanis, P.N., Dion, P., Spiegelman, D., McConkey, B.J., Vande Velde, C., Bouchard, J.P., Lacomblez, L., Pochigaeva, K., Salachas, F., Pradat, P.F., Camu, W., Meininger, V., Dupre, N. and Rouleau, G.A. (2008) TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Genet.* 40, 572–574.
- [9] Gitcho, M.A., Baloh, R.H., Chakraverty, S., Mayo, K., Norton, J.B., Levitch, D., Hatanpaa, K.J., White 3rd, C.L., Bigio, E.H., Caselli, R., Baker, M., Al-Lozi, M.T., Morris, J.C., Pestronk, A., Rademakers, R., Goate, A.M. and Cairns, N.J. (2008) TDP-43 A315T mutation in familial motor neuron disease. *Ann. Neurol.* 63, 535–538.
- [10] Arai, T., Mackenzie, I.R., Hasegawa, M., Nonaka, T., Niizato, K., Tsuchiya, K., Iritani, S., Onaya, M. and Akiyama, H. (2009) Phosphorylated TDP-43 in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol.* 117, 125–136.
- [11] Hasegawa, M., Arai, T., Akiyama, H., Nonaka, T., Mori, H., Hashimoto, T., Yamazaki, M. and Oyanagi, K. (2007) TDP-43 is deposited in the Guam parkinsonism-dementia complex brains. *Brain* 130, 1386–1394.
- [12] Fujishiro, H., Uchikado, H., Arai, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Yokota, O., Tsuchiya, K., Togo, T., Iseki, E. and Hirayasu, Y. (2009) Accumulation of phosphorylated TDP-43 in brains of patients with argyrophilic grain disease. *Acta Neuropathol.* 117, 151–158.
- [13] Schwab, C., Arai, T., Hasegawa, M., Yu, S. and McGeer, P.L. (2008) Colocalization of transactivation-responsive DNA-binding protein 43 and huntingtin in inclusions of huntington disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67, 1159–1165.
- [14] Farrer, M.J., Hulihan, M.M., Kachergus, J.M., Daxsel, J.C., Stoessl, A.J., Grantier, L.L., Calne, S., Calne, D.B., Lechevalier, B., Chapon, F., Tsuboi, Y., Yamada, T., Gutmann, L., Elibol, B., Bhatia, K.P., Wider, C., Vilarino-Guell, C., Ross, O.A., Brown, L.A., Castanedes-Casey, M., Dickson, D.W. and Wszolek, Z.K. (2009) DCTN1 mutations in Perry syndrome. *Nat. Genet.* 41, 163–165.
- [15] Schwab, C., Arai, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Yu, S. and McGeer, P.L. (2009) TDP-43 pathology in familial British dementia. *Acta Neuropathol.*, in press, doi:10.1007/s00401-009-0514-3.
- [16] Gura, T. (2008) Hope in Alzheimer's fight emerges from unexpected places. *Nat. Med.* 14, 894.
- [17] Doody, R.S., Gavrilova, S.I., Sano, M., Thomas, R.G., Aisen, P.S., Bachurin, S.O., Seely, L. and Hung, D. (2008) Effect of dimebon on cognition, activities of daily living, behaviour, and global function in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet* 372, 207–215.
- [18] Kristiansen, J.E. (1989) Dyes, antipsychotic drugs, and antimicrobial activity. Fragments of a development, with special reference to the influence of Paul Ehrlich. *Dan Med. Bull.* 36, 178–185.
- [19] Mansouri, A. and Lurie, A.A. (1993) Concise review: methemoglobinemia. *Am. J. Hematol.* 42, 7–12.
- [20] Faber, P., Ronald, A. and Millar, B.W. (2005) Methylthionium chloride: pharmacology and clinical applications with special emphasis on nitric oxide mediated vasodilatory shock during cardiopulmonary bypass. *Anaesthesia* 60, 575–587.
- [21] Heiberg, I.L., Wegener, G. and Rosenberg, R. (2002) Reduction of cGMP and nitric oxide has antidepressant-like effects in the forced swimming test in rats. *Behav. Brain Res.* 134, 479–484.
- [22] Visarius, T.M., Stucki, J.W. and Lauterburg, B.H. (1997) Stimulation of respiration by methylene blue in rat liver mitochondria. *FEBS Lett.* 412, 157–160.
- [23] Chies, A.B., Custodio, R.C., de Souza, G.L., Correa, F.M. and Pereira, O.C. (2003) Pharmacological evidence that methylene blue inhibits noradrenaline neuronal uptake in the rat vas deferens. *Pol. J. Pharmacol.* 55, 573–579.
- [24] Wrubel, K.M., Riha, P.D., Maldonado, M.A., McCollum, D. and Gonzalez-Lima, F. (2007) The brain metabolic enhancer methylene blue improves discrimination learning in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 86, 712–717.
- [25] Atamna, H., Nguyen, A., Schultz, C., Boyle, K., Newberry, J., Kato, H. and Ames, B.N. (2008) Methylene blue delays cellular senescence and enhances key mitochondrial biochemical pathways. *FASEB J.* 22, 703–712.
- [26] Wischik, C.M., Edwards, P.C., Lai, R.Y., Roth, M. and Harrington, C.R. (1996) Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11213–11218.
- [27] Taniguchi, S., Suzuki, N., Masuda, M., Hisanaga, S., Iwatsubo, T., Goedert, M. and Hasegawa, M. (2005) Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins. *J. Biol. Chem.* 280, 7614–7623.
- [28] Burns, A. and Jacoby, R. (2008) Dimebon in Alzheimer's disease: old drug for new indication. *Lancet* 372, 179–180.
- [29] Bachurin, S., Bukatina, E., Lermontova, N., Tkachenko, S., Afanasiev, A., Grigorieva, I., Ivanov, Y., Sablin, S. and Zefirov, N. (2001) Antihistamine agent Dimebon as a novel neuroprotector and a cognition enhancer. *Ann. NY Acad. Sci.* 939, 425–435.
- [30] Wu, J., Li, Q. and Bezprozvanny, I. (2008) Evaluation of dimebon in cellular model of Huntington's disease. *Mol. Neurodegener.* 3, 15.
- [31] Lermontova, N.N., Redkozubov, A.E., Shevtsova, E.F., Serkova, T.P., Kireeva, E.G. and Bachurin, S.O. (2001) Dimebon and tacrine inhibit neurotoxic action of beta-amyloid in culture and block L-type Ca(2+) channels. *Bull. Exp. Biol. Med.* 132, 1079–1083.
- [32] Bahurin, S.O., Ustyugov, A.A., Peters, O., Shelkovnikova, T.A., Buchman, V.L. and Ninkina, N.N. (2009). Hindering of proteinopathy-induced neurodegeneration as a new mechanism of action for neuroprotectors and cognition enhancing compounds. *Dokl. Biochem. Biophys.*, in press.
- [33] Nonaka, T., Arai, T., Buratti, E., Baralle, F.E., Akiyama, H. and Hasegawa, M. (2009) Phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 pathological inclusions in ALS and FTLD-U are recapitulated in SH-SY5Y cells. *FEBS Lett.* 583, 394–400.
- [34] Nonaka, T., Kametani, F., Arai, T., Akiyama, H. and Hasegawa, M. (2009). Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. *Hum. Mol. Genet.*, in press, doi:10.1093/hmg/ddp275.
- [35] Johnson, B.S., McCaffery, J.M., Lindquist, S. and Gitler, A.D. (2008) A yeast TDP-43 proteinopathy model: exploring the molecular determinants of TDP-43 aggregation and cellular toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 6439–6444.
- [36] Lermontova, N.N., Lukoyanov, N.V., Serkova, T.P., Lukoyanova, E.A. and Bachurin, S.O. (2000) Dimebon improves learning in animals with experimental Alzheimer's disease. *Bull. Exp. Biol. Med.* 129, 544–546.
- [37] Tatom, J.B., Wang, D.B., Dayton, R.D., Skalli, O., Hutton, M.L., Dickson, D.W. and Klein, R.L. (2009) Mimicking aspects of frontotemporal lobar degeneration and Lou Gehrig's disease in rats via TDP-43 overexpression. *Mol. Ther.* 17, 607–613.
- [38] Naylor, G.J., Martin, B., Hopwood, S.E. and Watson, Y. (1986) A two-year double-blind crossover trial of the prophylactic effect of methylene blue in manic-depressive psychosis. *Biol. Psychiatr.* 21, 915–920.
- [39] Sills, M.R. and Zinkham, W.H. (1994) Methylene blue-induced Heinz body hemolytic anemia. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 148, 306–310.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



ELSEVIER

FEBS Letters

journal homepage: www.FEBSLetters.org

Phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 pathological inclusions in ALS and FTLD-U are recapitulated in SH-SY5Y cells

Takashi Nonaka^{a,*}, Tetsuaki Arai^b, Emanuele Buratti^c, Francisco E. Baralle^c, Haruhiko Akiyama^b, Masato Hasegawa^{a,*}

^a Department of Molecular Neurobiology, Tokyo Institute of Psychiatry, Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research, 2-1-8 Kamikitazawa, Setagaya-ku 156-8585, Tokyo, Japan

^b Department of Psychogeriatrics, Tokyo Institute of Psychiatry, Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research, 2-1-8 Kamikitazawa, Setagaya-ku 156-8585, Tokyo, Japan

^c International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, 34012 Trieste, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2008

Revised 10 December 2008

Accepted 11 December 2008

Available online 25 December 2008

Edited by Barry Halliwell

Keywords:

TDP-43

FTLD-U

ALS

Phosphorylation

Ubiquitination

ABSTRACT

We report phosphorylated and ubiquitinated aggregates of TAR DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43) in SH-SY5Y cells similar to those in brains of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal lobar degeneration with ubiquitinated inclusions (FTLD-U). Two candidate sequences for the nuclear localization signal were examined. Deletion of residues 78–84 resulted in cytoplasmic localization of TDP-43, whereas the mutant lacking residues 187–192 localized in nuclei, forming unique dot-like structures. Proteasome inhibition caused these to assemble into phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 aggregates. The deletion mutants lacked the exon skipping activity of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) exon 9. Our results suggest that intracellular localization of TDP-43 and proteasomal function may be involved in inclusion formation and neurodegeneration in TDP-43 proteinopathies.

© 2008 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Frontotemporal lobar degeneration with ubiquitinated inclusions (FTLD-U) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) are well-known neurodegenerative disorders. FTLD is the second most common form of cortical dementia in the population below the age of 65 years [1]. ALS is the most common of the motor neuron diseases, being characterized by progressive weakness and muscular wasting, resulting in death within a few years. Ubiquitin (Ub)-positive inclusions were found as a pathological hallmark in brains of patients with FTLD-U and ALS, as well as in Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD). Recently, TAR DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43) has been

identified to be a major protein component of ubiquitin-positive inclusions in FTLD-U and ALS brains [2,3]. TDP-43 was first identified as a cellular factor that binds to the TAR DNA of HIV type 1 [4], and was also identified independently as part of a complex involved in inhibition of the splicing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene [5]. TDP-43 aggregates in neuronal cytoplasm and nuclei in a variety of neurodegenerative disorders, which are now collectively referred to as TDP-43 proteinopathies. For understanding molecular pathogenesis and evidence-based therapies for TDP-43 proteinopathies, it is necessary to study the molecular mechanisms of aggregation of TDP-43.

To elucidate these issues, in this study, we have established the cellular models for intracellular aggregates of TDP-43 similar to those in brains of TDP-43 proteinopathies patients. Expression of deletion mutants of TDP-43 lacking two candidate sequences for the nuclear localization signal (NLS), residues 78–84 or 187–192, resulted in the formation of Ub- and phosphorylated TDP-43-positive cytoplasmic inclusions in the presence of a proteasome inhibitor. These results suggest that intracellular localization of TDP-43 and proteasomal function may be involved in the pathological process of TDP-43 proteinopathies.

Abbreviations: FTLD-U, frontotemporal lobar degeneration with ubiquitinated inclusions; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; Ub, ubiquitin; TDP-43, TAR DNA binding protein of 43 kDa; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; NLS, nuclear localization signal; TX, Triton X-100; Sar, Sarkosyl.

* Corresponding authors. Fax: +81 3 3329 8035 (T. Nonaka).

E-mail addresses: nonakat@prit.go.jp (T. Nonaka), masato@prit.go.jp (M. Hasegawa).

2. Materials and methods

2.1. Construction of plasmids

The PCR product of the open-reading frame of human TDP-43 using pRc-CMV-TDP-43 as a template was subcloned into the mammalian expression vector pcDNA3 (Invitrogen) using restriction sites BamH I and Xba I, creating pcDNA3-TDP-43. To construct plasmids of the deletion mutants, we used a site-directed mutagenesis kit (Stratagene). PCR was performed using the forward primer (5'-GTATGTTGCAACTATATGGATGAGACAGATGC-3') and the reverse primer (5'-GCATCTGTCTCATCCATATAGTTGACAACATAC-3') for the deletion mutant of 78–84 residues (Δ NLS), and the forward primer (5'-GCAAAGCCAAGATGAGGTGTTGTGGGGCGC-3') and the reverse primer (5'-GCGCCCCACAAACACCTCATCTTGGCTTTC-3') for the deletion mutant of 187–192 residues (Δ 187–192), with pcDNA3-

TDP-43 as a template, respectively. For the construction of the double-deletion mutant Δ NLS&187–192, PCR was performed using the forward primer (5'-GCAAAGCCAAGATGAGGTGTTGTGGGGCGC-3') and the reverse primer (5'-GCGCCCCACAAACACCTCATCTTGGCTTTC-3') with pcDNA3-TDP-43 Δ NLS as a template.

The reporter plasmid pSPL3-CFTR9 was constructed as follows. Healthy human genomic DNA (a gift from Dr. Makoto Arai, Tokyo Institute of Psychiatry, Japan) was subjected to PCR with the use of the forward primer (5'-CGGAATTCACCTTGATAATGGGCAAA-TATC-3') and the reverse primer (5'-CCCTCGAGCTGCCATGTGCAAGATACAG-3'), containing EcoR I and Xho I sites, respectively. The genomic region containing 221 bp of intron 8, the entire exon 9 (183 bp), and 266 bp of intron 9 of the human CFTR gene was amplified and digested with the two restriction enzymes, followed by ligation into pSPL3 (Life Technologies), affording the plasmid pSPL3-CFTR9. All constructs were verified by DNA sequencing.

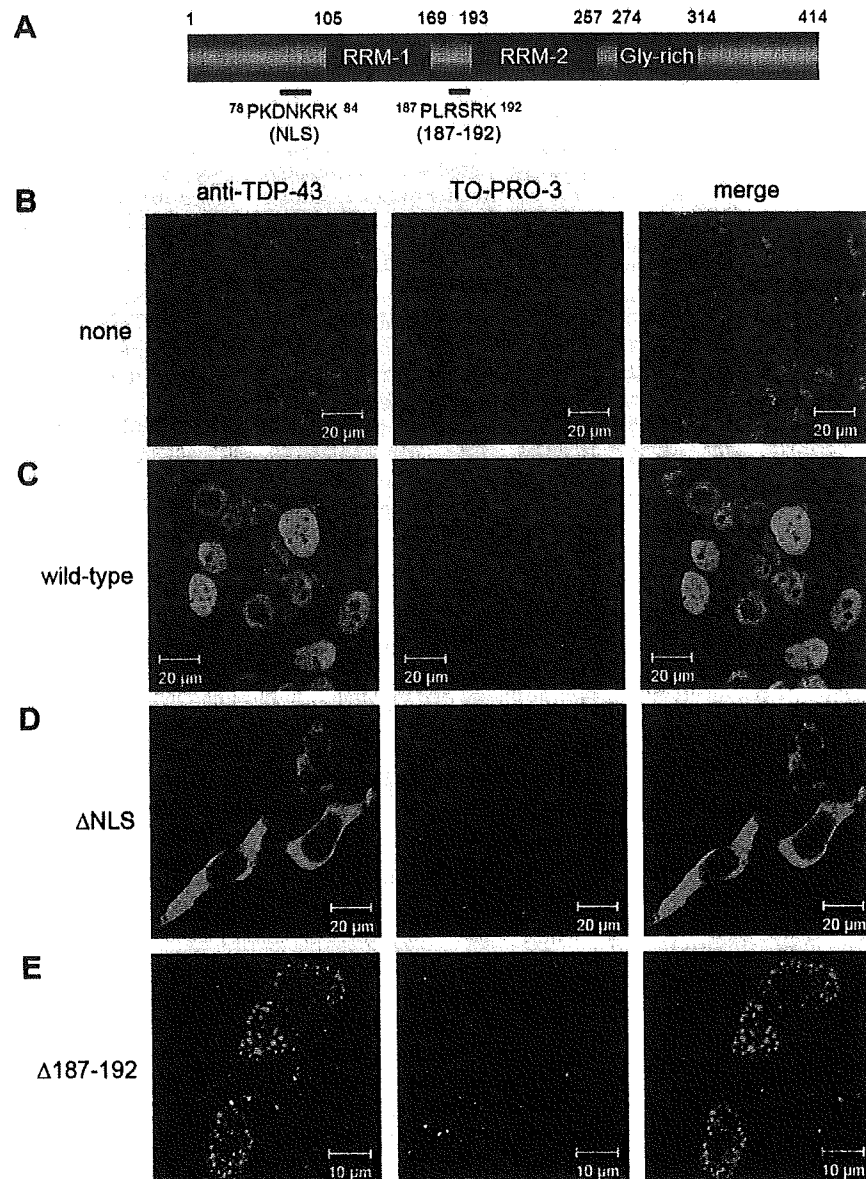


Fig. 1. Subcellular localization of wild-type and mutant TDP-43 in SH-SY5Y cells. (A) Schematic diagram of the structural domains of TDP-43, RNA recognition motifs (RRM-1 and -2; blue) and glycine-rich domain (Gly-rich; red) are shown. (B–E) Immunostaining of untransfected SH-SY5Y cells (B) and cells 72 h post transfection with wild-type TDP-43 (C), Δ NLS (Δ 78–84) TDP-43 (D), and Δ 187–192 TDP-43 (E) with anti-TDP-43 antibody (Left panel, green), nuclear staining by TO-PRO-3 (middle panel, blue) and the merged image (right panel) are shown.

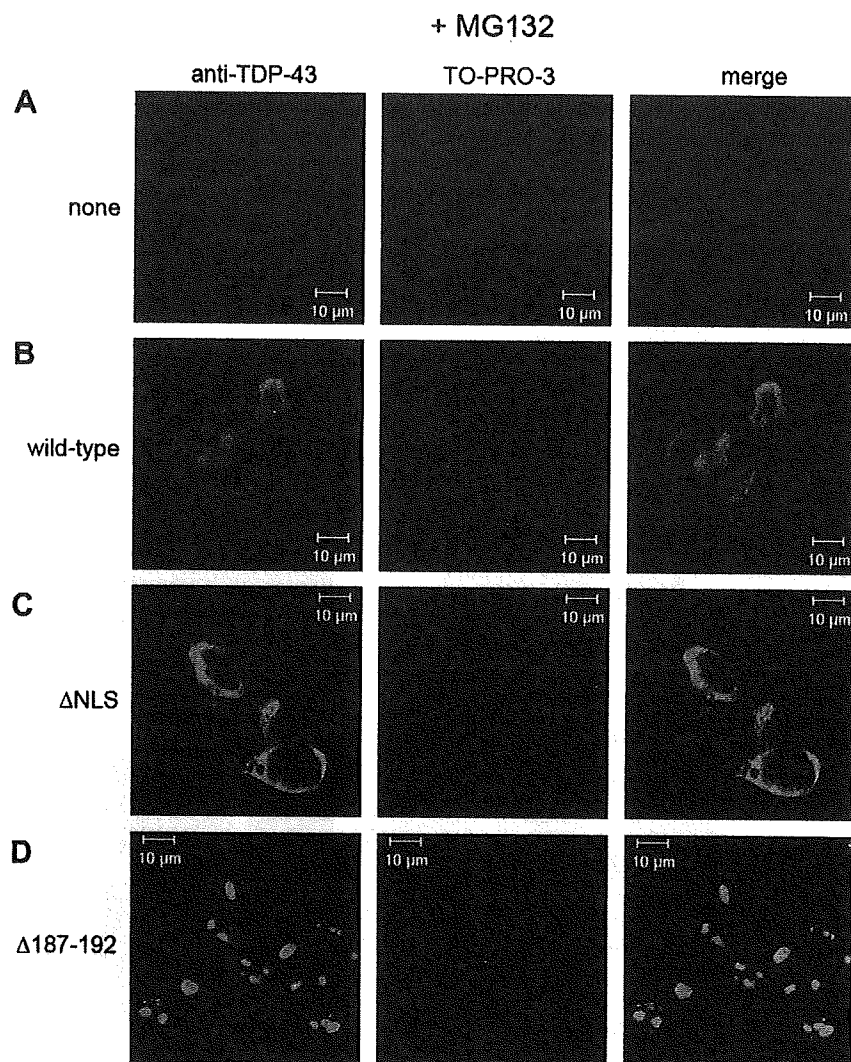


Fig. 2. Expression of mutant TDP-43 followed by proteasome inhibition with MG132 results in the formation of intranuclear inclusions. Immunostaining of untransfected cells (A) and cells 72 h post transfection with wild-type TDP-43 (B), Δ NLS (C), and Δ 187-192 (D) followed by MG132 treatment (20 μ M for 6 h) with anti-TDP-43 antibody (left panel, green), nuclear staining by TO-PRO-3 (middle panel, blue) and merged image (right panel).

2.2. Antibodies

A polyclonal TDP-43 antibody 10782-1-AP (anti-TDP-43) was purchased from ProteinTech Group Inc. A polyclonal antibody specific for phosphorylated TDP-43 (anti-pS409/410) was prepared as described [6]. Anti-ubiquitin monoclonal antibody (mAb), MAB1510, was purchased from Chemicon. Monoclonal anti-HA clone HA-7 were obtained from Sigma.

2.3. Cell culture and expression of plasmids

SH-SY5Y cells were cultured in DMEM/F12 medium (Sigma) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, penicillin-streptomycin-glutamine (Gibco), and MEM non-essential amino acids solution (Gibco). Cells were then transfected with expression plasmids using FuGENE6 (Roche) according to the manufacturer's instructions. In the proteasome inhibition experiments, final 1 μ M MG132 (Peptide institute) in DMSO was added to the culture medium, and incubated overnight.

2.4. Confocal immunofluorescence microscopy

SH-SY5Y cells were grown on a coverslip (15 \times 15 mm) and transfected with expression vector (1 μ g). After incubation for the

indicated time, the transfected cells on the coverslips were fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 30 min. The coverslips were then incubated with 0.2% (v/v) Triton X-100 (TX) in PBS for 10 min. After blocking for 30 min in 5% (w/v) BSA in PBS, cells were incubated with anti-phosphorylated TDP-43 antibody, pS409/410 (1:500 dilution), anti-TDP-43 (1:500), anti-Ub (1:500) or anti-HA (1:500) for 1 h at 37 $^{\circ}$ C, followed by FITC- or TRITC-labeled goat anti-rabbit or-mouse IgG (Sigma, 1:500 dilution) as a secondary antibody for 1 h at 37 $^{\circ}$ C. After washing, the cells were further incubated with TO-PRO-3 (Molecular Probes, 1:3000 dilution in PBS) for 1 h at 37 $^{\circ}$ C to stain nuclear DNA, and analyzed using a LSM5 Pascal confocal laser microscope (Carl Zeiss).

2.5. Sequential extraction of proteins and immunoblotting

SH-SY5Y cells were grown in 6-well plates and transfected transiently with expression plasmids (1 μ g). After incubation for the indicated time, cells were harvested and lysed in TS buffer [50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 5 mM ethylene glycol bis(β -aminoethyl ether)-*N,N,N,N*-tetraacetic acid, and protease inhibitor cocktail (Roche)]. Lysates were centrifuged at 290,000 \times g for 20 min at 4 $^{\circ}$ C, and the supernatant was recovered as the TS-soluble fraction.

TS-insoluble pellets were lysed in TS buffer containing 1% (v/v) TX, and centrifuged at 290,000×g for 20 min at 4 °C. The supernatant was collected as TX-soluble fraction. TX-insoluble pellets were further sonicated in TS buffer containing 1% (w/v) Sarkosyl (Sar), and incubated for 30 min at 37 °C. The mixtures were centrifuged at 290,000×g for 20 min at room temperature, and the supernatant was recovered as the Sar-soluble fraction. The remaining pellets (insoluble in Sar) were lysed in SDS-sample buffer and heated for 5 min.

Each sample (10 or 20 µg) was separated by 12% (v/v) SDS-PAGE using Tris-glycine buffer system, and proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride membrane (Millipore). The blots were incubated overnight with the indicated primary antibody at an appropriate dilution (1:1000–3000) at room temperature, followed by the incubation with a biotin-labeled secondary antibody. Signals were detected using an ABC staining kit (Vector).

2.6. CFTR exon 9 skipping assay

Cos-7 cells in 6-well plates were transfected with 0.5 µg of the reporter plasmid pSPL3-CFTR9 plus 1 µg of pcDNA3 plasmid encoding wild-type or its mutants, using FuGENE6. The cells were harvested 48 h post transfection, and total RNA was extracted with TRIzol (Invitrogen). The cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA with the use of the Superscript II system (Invitrogen). Primary and secondary PCRs were carried out according to the instruction manual of the exon trapping system (Life Technologies).

3. Results

3.1. Effect of deletion of two candidate NLS in TDP-43

Amino acid sequence containing proline followed by a cluster of basic amino acids is known to be typical NLS. We found two such sequences in TDP-43, PKDNKRK (residues 78–84) and PLRSRK (residues 187–192) (Fig. 1A). To examine whether these sequences function as the NLS, we constructed corresponding deletion mutants of TDP-43 and expressed them in SH-SY5Y cells. We employed non-tagged TDP-43 plasmid for expression in cultured cells, since expression of hemagglutinin (HA)-tagged TDP-43 in SH-SY5Y cells caused formation of inclusion-like structures (Fig. S1), suggesting that addition of the epitope tag to the N-terminus may affect the conformation of TDP-43 and promote non-specific aggregate formation.

Endogenous TDP-43 expressed in the nucleus (Fig. 1B). Similar but stronger nuclear TDP-43 staining was observed in cells expressing wild-type TDP-43 (Fig. 1C), as compared with non-transfected cells (Fig. 1B). When the deletion mutant lacking residues 78–84 (Δ NLS) was transiently expressed, strong TDP-43 signals were detected in cytoplasm (Fig. 1D). This is reasonable because the sequence of 78–84 contains a part of the bipartite NLS in TDP-43 recently identified by Winton et al. [7].

When the deletion mutant lacking residues 187–192 (Δ 187–192) was expressed, on the other hand, the mutant protein formed dot-like structures in nuclei (Fig. 1E). This observation suggests that this sequence does not function as a NLS.

3.2. Formation of intracellular TDP-43 inclusions in cultured SH-SY5Y cells

Impaired Ub-proteasome system has been suggested in some forms of neurodegenerative disease [8], and TDP-43 is indeed ubiquitinated in the brains of patients with FTLD-U or ALS [3]. To examine whether impaired Ub-proteasome system is involved in inclusion formation, we treated cells transfected with TDP-43

wild-type or deletion mutants with a proteasome inhibitor, MG132. In immunocytochemistry using phosphorylation-independent anti-TDP-43 antibody, no obvious change in the localization of TDP-43 was observed in mock cells (Fig. 2A), or in cells transfected with wild-type (Fig. 2B) or Δ NLS mutant (Fig. 2C) after MG132 treatment, as compared to those without MG132 (Fig. 1). In contrast, many round nuclear inclusions were generated in cells transfected with Δ 187–192 mutant after MG132 treatment (Fig. 2D: ~12% of inclusion-positive cells).

Fig. 3 revealed the results of double immunostaining using anti-pS409/410, phosphorylation-dependent anti-TDP-43 antibody [6], and anti-Ub antibody. Cells expressing wild-type TDP-43 showed

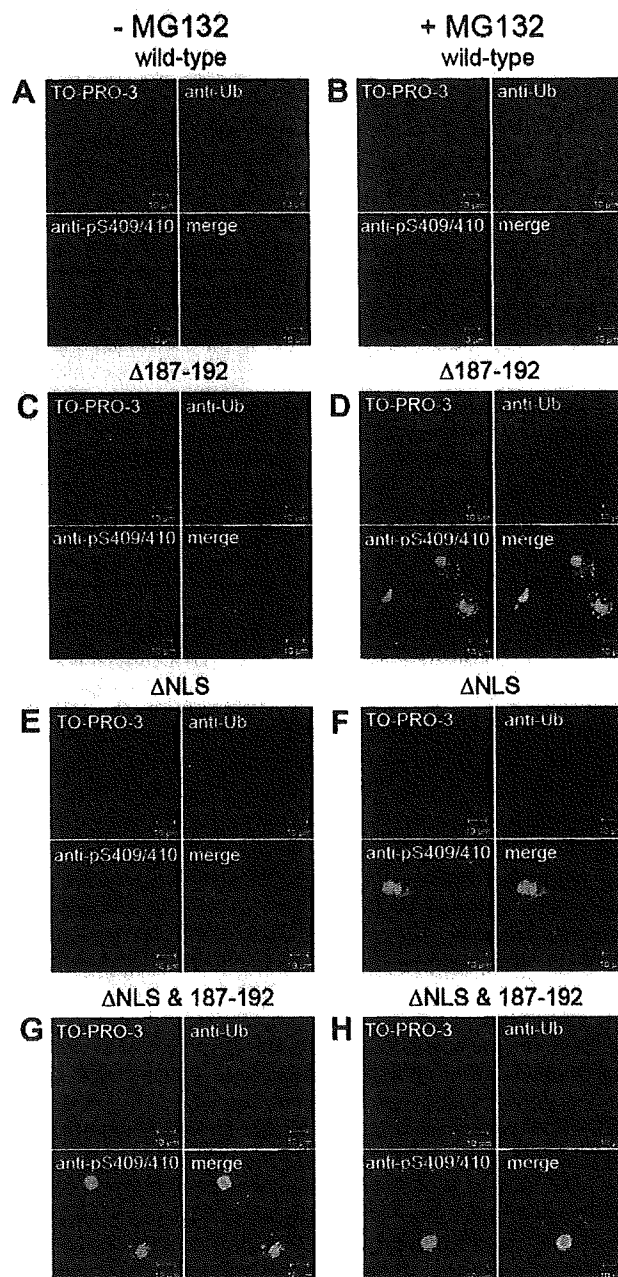


Fig. 3. Immunocytochemical analyses of intracellular inclusion-like structures formed in cells transfected with deletion mutants of TDP-43. SH-SY5Y cells 72 h post transfection with wild-type (A and B), Δ 187–192 (C and D), Δ NLS (E and F), and Δ NLS&187–192 (G and H) before (A, C, E, G) and after (B, D, F, H) treatment with MG132 (20 µM for 6 h) were stained with a phosphorylation-specific antibody, anti-pS409/410 (green), anti-ubiquitin (Ub; red) antibodies, and TO-PRO-3 (blue).