

N-cadherin Regulates p38 Signaling via JLP

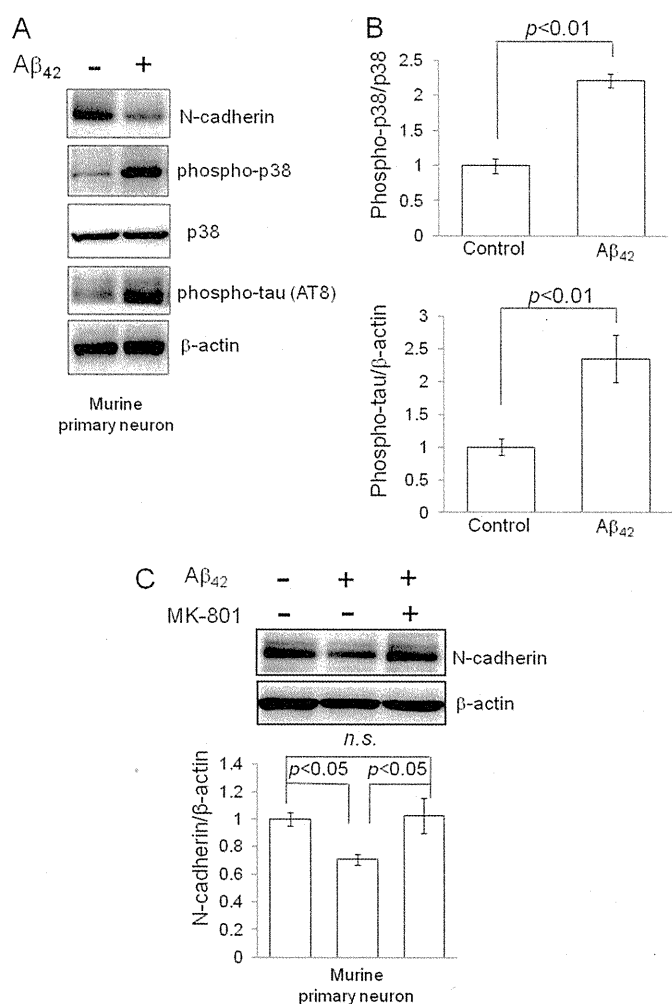


FIGURE 3. Aβ₄₂ decreased N-cadherin expressions through NMDA receptors in murine primary neurons. *A*, murine primary neurons were treated with or without 100 nM synthetic Aβ₄₂ peptides for 48 h, and the lysates were immunoblotted with anti-N-cadherin, phospho-p38, p38 MAPK, phospho-Tau (AT8), and β-actin antibodies, successively. Aβ₄₂ treatment reduced N-cadherin expressions and induced phosphorylation of p38 MAPK and Tau in murine primary neurons. *B*, the band densities of phospho-p38, p38 MAPK, phospho-Tau (AT8), and β-actin were quantified by National Institutes of Health Image. The ratios of phospho/total p38 MAPK and phospho-Tau (AT8)/β-actin were calculated and analyzed by Student's *t* test ($n = 3$, $p < 0.01$). *C*, murine primary neurons were pretreated with 10 μM MK-801, NMDA receptor antagonist for 30 min followed by 100 nM synthetic Aβ₄₂ peptides for 48 h. The lysates were evaluated by Western blot using anti-N-cadherin and β-actin antibodies. The band densities of N-cadherin and β-actin were quantified by National Institutes of Health Image. The N-cadherin/β-actin ratio was calculated and analyzed by one-way ANOVA. NMDA receptor antagonist MK-801 prevented the Aβ₄₂-induced decrease in N-cadherin levels ($n = 3$, $p < 0.05$).

acids 210–398, lacking amino acids 160–209 and leucine zipper II domain of amino acids 398–463, failed to co-immunoprecipitate with N-cadherin. These results implicated that both the region containing amino acids 160–209 and leucine zipper II domain in JLP are essential for its association with N-cadherin.

N-cadherin Expression Had a Negative Effect on p38 MAPK Activation by Inhibiting JLP/p38 MAPK Association—We next focused on investigating the functional role of the molecular association between N-cadherin and JLP. Previously, JLP has been reported to act as a scaffolding protein to bring p38

MAPK together with their upstream kinases MKK4 and MEKK3 (21), thereby activating the p38 MAPK pathway. As demonstrated above, we found that one of the N-cadherin-binding domains is the region spanning amino acids 160–209 of JLP. Interestingly, the same JLP domain has been identified to be involved in the association with p38 MAPK (21). Therefore, we hypothesized that N-cadherin could regulate the p38 MAPK signaling pathway via modulating JLP-p38 MAPK association. To prove this hypothesis, we investigated the effect of N-cadherin expression on the p38 MAPK signaling pathway in COS7 cells. FLAG-tagged p38 MAPK was transiently co-transfected into COS7 cells together with FLAG-tagged MKK4, S-tagged JLP, and HA-tagged N-cadherin as designated in Fig. 6A. The cell lysates were analyzed by immunoblotting with anti-phospho-p38 MAPK or p38 MAPK antibodies, respectively (Fig. 6A). Consistent with the previous report, the phosphorylation of p38 MAPK was enhanced by the co-expression of JLP and MKK4, upstream kinase for p38 MAPK ($n = 3$, $p < 0.05$). Interestingly, we found that this activation of p38 MAPK induced by the co-expression of MKK4 and JLP was significantly suppressed by the co-expression of N-cadherin ($n = 3$, $p < 0.05$). Alternatively, we co-transfected HA-tagged MEKK3, another upstream kinase of p38 MAPK, into COS7 cells. Similarly, we observed that the enhancement of phosphorylated p38 MAPK under the co-expression of both MEKK3 and JLP was significantly suppressed by the co-expression of N-cadherin (Fig. 6B, $n = 3$, $p < 0.05$). Moreover, when we pull down JLP with S-agarose, we found a reduced interaction between JLP and p38 MAPK in the presence of N-cadherin (Fig. 6), indicating that N-cadherin competitively inhibits the binding of p38 MAPK to JLP. Indeed, co-transfection of FLAG-tagged p38 MAPK, FLAG-tagged MKK4, and JLP fragment corresponding to the region of amino acids 160–463, which could associate with N-cadherin into COS7 cells, showed the increased phosphorylation of p38 MAPK (supplemental Fig. S5). This result implies that this short fragment of JLP may compete with the endogenous JLP for the N-cadherin binding, resulting in the release of JLP from the N-cadherin and subsequent p38 MAPK activation. Taken together, these results suggested that N-cadherin expression had an inhibitory effect on the p38 MAPK signaling pathway via inhibition of JLP-p38 MAPK association.

DISCUSSION

The molecular mechanism of synaptic adhesion and cell viability pathway of p38 MAPK is not well understood yet. Our present study suggested a potentially new signaling pathway contributing to the aberrant activation of p38 MAPK in AD. We showed that ADH-1 caused a significant increase in p38 MAPK activation and Tau phosphorylation with a subsequent decrease in neuronal viability (Fig. 2, *A* and *B*, and supplemental Fig. S1). In alternative ways, application of N-cadherin-neutralizing antibody also activated p38 MAPK and increased phosphorylation of Tau in murine primary neurons (supplemental Fig. S2), suggesting that the disruption of N-cadherin-based cell adhesion could lead to p38 MAPK activation and Tau phosphorylation. Importantly, we demonstrated that the inhibition of the p38 MAPK pathway with specific

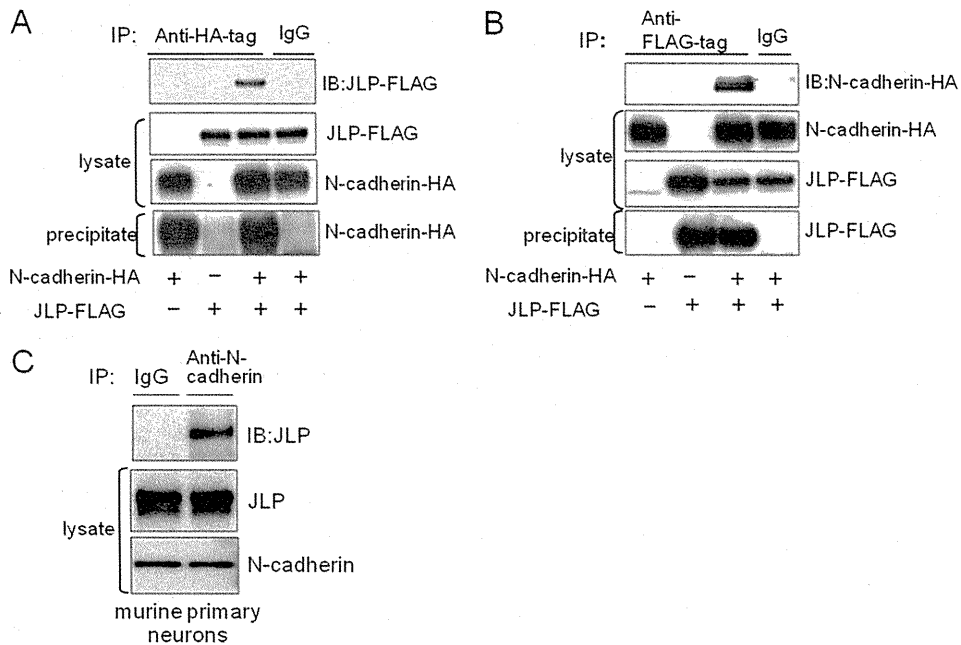


FIGURE 4. The association of N-cadherin with JLP in HEK293 cells and neuronal cells. *A*, lysates of HEK293 cells, transiently transfected with HA-tagged N-cadherin and/or FLAG-tagged JLP expressing vectors, were immunoprecipitated (IP) with anti-HA antibody (lanes 1–3) or normal IgG (lane 4). The immunoprecipitates and the lysates were analyzed by immunoblotting (IB) with the specific antibodies against the FLAG tag and HA tag. *B*, lysates of HEK293 cells, transiently transfected with HA-tagged N-cadherin and/or FLAG-tagged JLP expressing vectors were immunoprecipitated with anti-FLAG antibody (lanes 1–3) or normal IgG (lane 4). The immunoprecipitates and the lysates were analyzed by Western blot with the specific antibodies against the HA tag and FLAG tag. *C*, the endogenous association between N-cadherin and JLP in murine primary neurons was analyzed. The neurons were lysed and immunoprecipitated with either anti-N-cadherin antibody or normal IgG. The immunoprecipitates and the lysates were immunoblotted with the specific antibodies against JLP and N-cadherin.

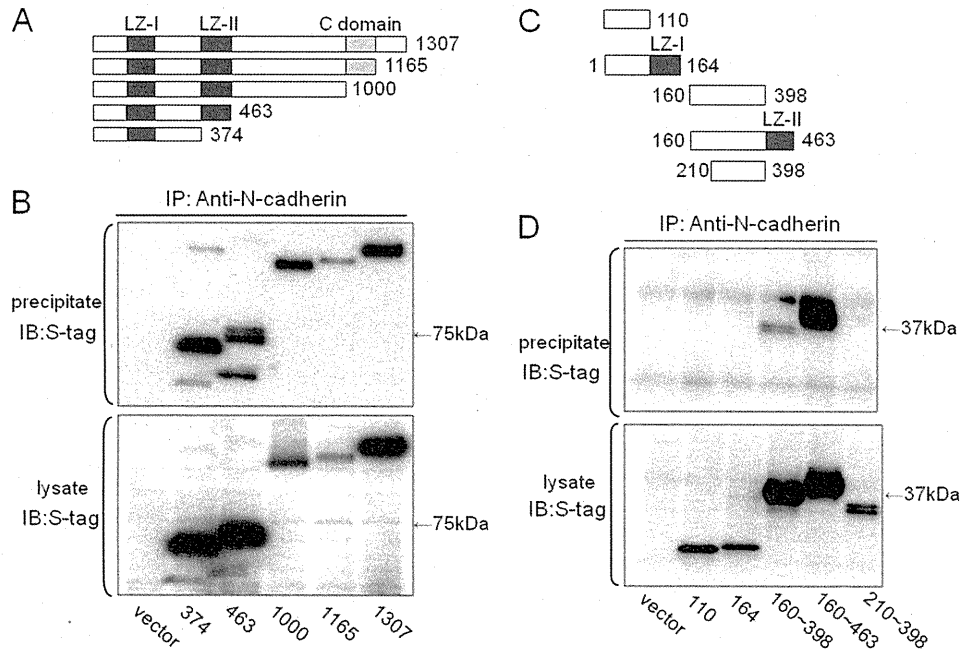


FIGURE 5. Deletion mapping of N-cadherin-interacting domain of JLP. *A*, schematic diagram of the C-terminally truncated S-tagged JLP constructs used for analysis of the JLP-N-cadherin interaction. The sizes of these deletion mutants were 374 (amino acids 1–374), 467 (amino acids 1–467), 1000 (amino acids 1–1000), 1165 (amino acids 1–1165), and 1307 amino acids (full length, residues 1–1307), respectively. *B*, COS7 cells were transiently transfected with the WT or C-terminally truncated mutants of S-tagged JLP. The lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-N-cadherin antibody. The immunoprecipitates and the lysates were subjected to Western blot analysis with the specific antibodies against S-tag. All of these deletion mutants of JLP were co-immunoprecipitated with N-cadherin. *C*, schematic diagram representing shorter constructs of C-terminally truncated S-tagged JLP. N-terminally truncated short constructs were also prepared as shown in Fig. 5C. *D*, COS7 cells were transiently transfected with these different mutants of S-tagged JLP. The lysates were immunoprecipitated with anti-N-cadherin antibody, and the immunoprecipitates were immunoblotted (IB) with anti-S-tag antibody. The mutants consisting of amino acids 160–398 and 160–463 of JLP were co-immunoprecipitated with N-cadherin, whereas the mutant consisting of amino acids 210–398 of JLP was not co-immunoprecipitated with N-cadherin.

p38 MAPK inhibitor (SB203580) attenuated ADH-1-induced neurotoxicity (Fig. 2C), indicating an important role of p38 MAPK in the cell death caused by the inhibition of N-cad-

herin-based cell adhesion. However, because the application of SB203580 did not block ADH-1-induced cell death completely, we assume that other alterations in cellular signaling

N-cadherin Regulates p38 Signaling via JLP

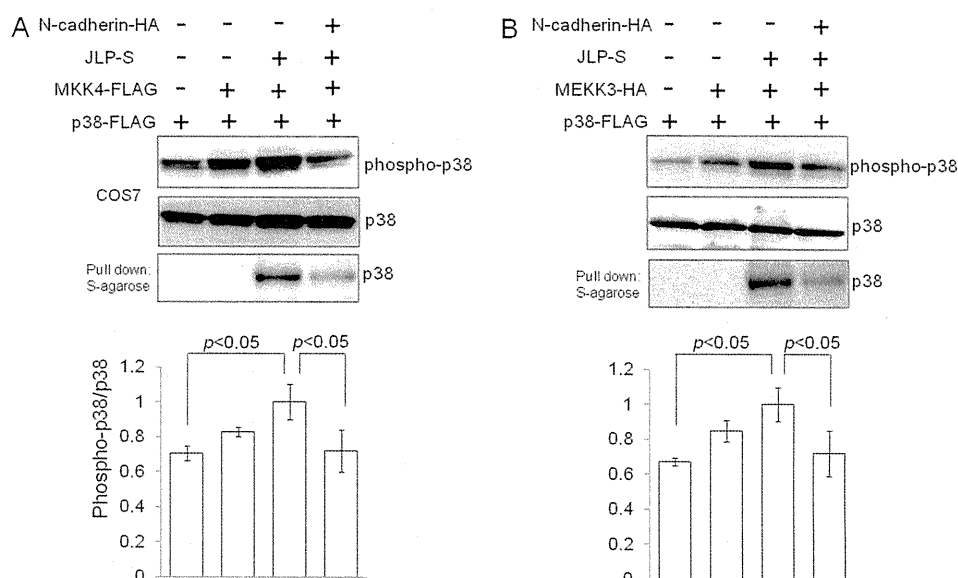


FIGURE 6. N-cadherin expression inhibited JLP-associated p38 MAPK pathway. *A*, COS7 cells were co-transfected with FLAG-tagged p38 α , FLAG-tagged MKK4, S-tagged JLP, and HA-tagged N-cadherin. 24 h after transfection, the lysates were precipitated with S-protein-agarose. The lysates and precipitates were subjected to Western blot analysis with anti-phospho-p38 or p38 MAPK antibodies. One representative immunoblot result is shown. The band densities of phospho-p38 and p38 MAPK were quantified by National Institutes of Health Image. The phospho/total p38 MAPK ratio was calculated and analyzed by one-way ANOVA. N-cadherin expression significantly inhibited JLP/MKK4-mediated phosphorylation of p38 MAPK compared with that without expression of N-cadherin ($n = 3$, $p < 0.05$). Pull-down assay using S-protein-agarose showed that N-cadherin expression decreased the interaction between JLP and p38 MAPK. *B*, COS7 cells were co-transfected with FLAG-tagged p38 α , HA-tagged MEKK3, S-tagged JLP, and HA-tagged N-cadherin. 24 h after transfection, the lysates were subjected to Western blot analysis with anti-phospho-p38 or p38 MAPK antibodies. One representative immunoblot result is shown. The band densities of phospho-p38 and p38 were quantified by National Institutes of Health Image. The ratio of phospho/total p38 MAPK was calculated and analyzed by one-way ANOVA. N-cadherin expression inhibited JLP/MEKK3-mediated phosphorylation of p38 MAPK significantly compared with that without expression of N-cadherin ($n = 3$, $p < 0.05$). Pull-down assay using S-protein-agarose showed that N-cadherin expression inhibited the interaction between JLP and p38 MAPK.

might be involved in neuronal death in addition to activation of p38 MAPK signaling. Notably, previous studies have shown that N-cadherin-mediated cell adhesion leads to the recruitment of PI3K into the N-cadherin adhesion complex followed by activation of Akt, which is an important regulator of anti-apoptotic pathways (12). Thus, down-regulation of PI3K/Akt signaling could also be participating in the ADH-1-induced cell death. Collectively, these results suggest that N-cadherin-mediated synaptic contact might contribute to neuroprotective signaling. Disruption of this synaptic contact might lead to neuronal cell apoptosis by perturbing these signalings.

Concerning a potential molecular link between N-cadherin and p38 MAPK signaling, we identified JLP as a novel N-cadherin-interacting protein in human brains by proteomic analysis. JLP is a member of the JIP (JNK-interacting protein) family, which provides a scaffolding function for the JNK/p38 MAPK signaling module. JLP is encoded by the *JIP4* gene, which generates three distinct splice variants, namely, JLP, JIP4, and SPAG9 (32). Specifically, JLP was identified as a scaffold protein involved in the p38 MAPK signaling pathway to bring p38 MAPK together with its upstream kinases (21). We also demonstrated that both the leucine zipper II domain and the region containing amino acids 160–209 of JLP were required for the association with N-cadherin, the same region for the interaction with p38 MAPK, which may explain the competitive regulation by N-cadherin. Moreover, our data showed that N-cadherin overexpression interfered with the physical interaction between JLP and p38 MAPK, thereby inhibiting the JLP-mediated activation of p38 MAPK signal-

ing. Thus, it is plausible that perturbation of N-cadherin-based cell adhesion and/or reduced expression of N-cadherin could lead to aberrant activation of p38 MAPK via facilitating JLP-mediated p38 MAPK signaling.

Several recent reports have shown that cysteine dioxygenase type I associates with both N-cadherin and JLP in myoblasts (33, 34). However, our observation demonstrated an opposite result to the recent report showing that N-cadherin ligation activates p38 MAPK in a cysteine dioxygenase type I- and JLP-dependent manner during myoblast differentiation (35). Although it was unclear whether cysteine dioxygenase type I is involved in the p38 MAPK activation induced by the inhibition of N-cadherin-based cell adhesion in our study, we speculate that the discrepancy between our study and previous reports could be attributed to the differences in cell type specificity and the cellular context examined (*i.e.* myoblast differentiation *versus* neuronal degeneration). Variable roles of JLP and N-cadherin according to the differential cellular context have been demonstrated in previous studies. For example, JLP has been reported to negatively regulate NGF-induced neurite outgrowth via JNK inhibition during neuronal differentiation (36) as opposed to the previous report demonstrating that N-cadherin is involved in NGF-induced neurite outgrowth (37). Thus, the association between N-cadherin and JLP may be involved in differential cell fate by modulating signaling pathways including p38 MAPK and JNK according to the cellular context.

With respect to AD pathophysiology, the effect of A β on N-cadherin expression has been unclear. In this study, we

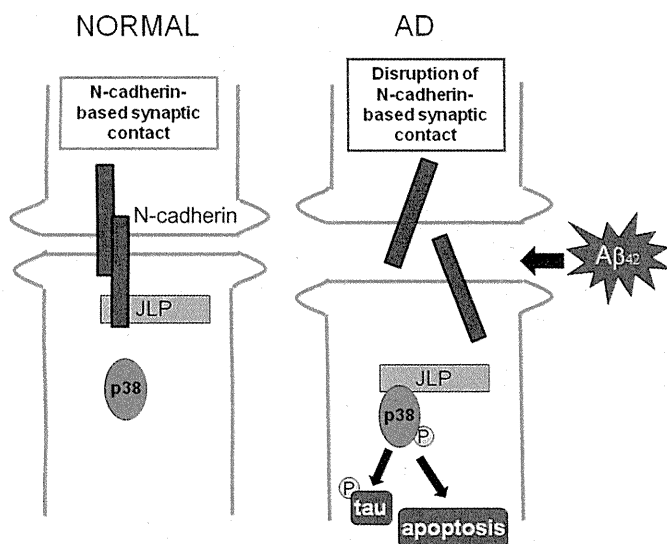


FIGURE 7. Hypothetical model of AD pathogenesis caused by the disruption of N-cadherin-based synaptic contact. Left panel, in the basal state at the synapse, N-cadherin-based synaptic adhesion stabilizes JLP, which suppresses neurotoxic p38 MAPK activation. Right panel, in AD, when N-cadherin-based synaptic contact is disrupted by $A\beta_{42}$, $A\beta_{42}$ could decrease N-cadherin expressions resulting in aberrant p38 MAPK activation followed by the subsequent Tau phosphorylation and neuronal death.

demonstrated that treatment with $A\beta_{42}$ decreased endogenous N-cadherin expression in murine primary neurons, whereas the aberrant phosphorylation of both p38 MAPK and p38 MAPK-sensitive Tau Ser-202/Thr-205 epitopes were simultaneously observed, as previously reported (29, 38). This result raises the possibility that $A\beta_{42}$ could interfere with N-cadherin-mediated synaptic contact, resulting in p38 MAPK activation. Recently, converging lines of evidence suggest that natural soluble $A\beta$ oligomers trigger synaptic loss (3, 20). Therefore, it is plausible that synaptic dissociation caused by $A\beta$ activates the p38 MAPK signaling pathway, leading to neuronal death as well as Tau phosphorylation. Interestingly, it has been shown that electroconvulsive and other excitatory stimuli induce arcadlin, a protocadherin, to promote activation of p38 MAPK and the endocytosis of N-cadherin at the synapse (39). Indeed, the neurodegeneration caused by $A\beta$ has long been related to the excessive activation of glutamate receptors, namely, excitotoxicity (30). Moreover, it is demonstrated that even physiological levels of $A\beta$ can enhance glutamate excitotoxicity (31). Importantly, we showed that $A\beta_{42}$ -induced reduction of N-cadherin levels was NMDA receptor-dependent (Fig. 3B). Thus, it is possible that $A\beta$ enhances excitotoxicity to promote the endocytosis of N-cadherin at the synapse, presumably followed by its degeneration by endosome/lysosome pathway. Alternatively, another group previously reported calpain-mediated degradation of N-cadherin after NMDA receptor stimulation (40). In either scenario, a decrease in N-cadherin expression could accelerate the JLP-mediated p38 MAPK activation, resulting in synaptic loss, increased phosphorylated Tau, and neuronal death in AD pathology. Overall, we suggest the possibility that JLP is a key molecule linking synaptic adhesion to p38 MAPK signaling involved in Tau phosphorylation and neuronal death associated with AD (Fig. 7).

In summary, our study suggested the physical and functional association between N-cadherin and p38 MAPK via JLP. We also demonstrated that perturbation of N-cadherin-mediated synaptic contact activated p38 MAPK pathway and increased Tau phosphorylation, leading to neuronal death. From observations obtained from the present study, we would like to extend our view of JLP function further and suggest that JLP is involved in the N-cadherin/p38 MAPK signaling pathway from synaptic adhesion to neurodegeneration. Because there were no reports focusing on the effect of $A\beta$ on synaptic adhesion, this is the first report proposing an attractive possibility that $A\beta_{42}$ may dissociate N-cadherin-mediated synaptic contact to trigger p38 MAPK activation, followed by neurodegeneration such as synaptic loss, Tau phosphorylation, and neuronal death in AD. Future study in this field could lead to a better understanding of AD pathophysiology.

Acknowledgments—We greatly thank Dr. E. P. Reddy (Temple University) for WT-JLP-S and its mutant derivatives, Dr. Johnson (National Jewish Center for Immunology and Respiratory Medicine) for MEKK3-HA, and Dr. Gupta (Adherex Technologies Inc.) for ADH-1.

REFERENCES

- Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L. A., and Katzman, R. (1991) *Ann. Neurol.* **30**, 572–580
- Selkoe, D. J. (2002) *Science* **298**, 789–791
- Shankar, G. M., Bloodgood, B. L., Townsend, M., Walsh, D. M., Selkoe, D. J., and Sabatini, B. L. (2007) *J. Neurosci.* **27**, 2866–2875
- Wolfe, M. S., De Los Angeles, J., Miller, D. D., Xia, W., and Selkoe, D. J. (1999) *Biochemistry* **38**, 11223–11230
- Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T., and Selkoe, D. J. (1999) *Nature* **398**, 513–517
- Rogaev, E. I., Sherrington, R., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Sorbi, S., Nacmias, B., Piacentini, S., Amaducci, L., Chumakov, I., Cohen, D., Lannfelt, L., Fraser, P. E., Rommens, J. M., and St. George-Hyslop, P. H. (1995) *Nature* **376**, 775–778
- Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Foncin, J. F., Bruni, A. C., Montesi, M. P., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., Chumakov, I., Pollen, D., Brookes, A., Sanseau, P., Polinsky, R. J., Wasco, W., Da Silva, H. A., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A., Tanzi, R. E., Roses, A. D., Fraser, P. E., Rommens, J. M., and St. George-Hyslop, P. H. (1995) *Nature* **375**, 754–760
- Thinakaran, G. (1999) *J. Clin. Invest.* **104**, 1321–1327
- Benson, D. L., and Tanaka, H. (1998) *J. Neurosci.* **18**, 6892–6904
- Murase, S., Mosser, E., and Schuman, E. M. (2002) *Neuron* **35**, 91–105
- Togashi, H., Abe, K., Mizoguchi, A., Takaoka, K., Chisaka, O., and Takeichi, M. (2002) *Neuron* **35**, 77–89
- Tran, N. L., Adams, D. G., Vaillancourt, R. R., and Heimark, R. L. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 32905–32914
- Baki, L., Shioi, J., Wen, P., Shao, Z., Schwarzman, A., Gama-Sosa, M., Neve, R., and Robakis, N. K. (2004) *EMBO J.* **23**, 2586–2596
- Uemura, K., Kuzuya, A., Shimozono, Y., Aoyagi, N., Ando, K., Shimohama, S., and Kinoshita, A. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 15823–15832
- Uemura, K., Lill, C. M., Banks, M., Asada, M., Aoyagi, N., Ando, K., Kubota, M., Kihara, T., Nishimoto, T., Sugimoto, H., Takahashi, R., Hyman, B. T., Shimohama, S., Berezovska, O., and Kinoshita, A. (2009) *J. Neurochem.* **108**, 350–360
- Johnson, G. V., and Bailey, C. D. (2003) *Exp. Neurol.* **183**, 263–268
- Hensley, K., Floyd, R. A., Zheng, N. Y., Nael, R., Robinson, K. A., Nguyen, X., Pye, Q. N., Stewart, C. A., Geddes, J., Markesbery, W. R.,

N-cadherin Regulates p38 Signaling via JLP

- Patel, E., Johnson, G. V., and Bing, G. (1999) *J. Neurochem.* **72**, 2053–2058
18. Zhu, X., Rottkamp, C. A., Hartzler, A., Sun, Z., Takeda, A., Boux, H., Shimohama, S., Perry, G., and Smith, M. A. (2001) *J. Neurochem.* **79**, 311–318
19. Savage, M. J., Lin, Y. G., Ciallella, J. R., Flood, D. G., and Scott, R. W. (2002) *J. Neurosci.* **22**, 3376–3385
20. Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., and Malinow, R. (2006) *Neuron* **52**, 831–843
21. Lee, C. M., Onésime, D., Reddy, C. D., Dhanasekaran, N., and Reddy, E. P. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 14189–14194
22. Ito, M., Yoshioka, K., Akechi, M., Yamashita, S., Takamatsu, N., Sugiyama, K., Hibi, M., Nakabeppu, Y., Shiba, T., and Yamamoto, K. I. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7539–7548
23. Blank, J. L., Gerwins, P., Elliott, E. M., Sather, S., and Johnson, G. L. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 5361–5368
24. Masliah, E., Terry, R. D., DeTeresa, R. M., and Hansen, L. A. (1989) *Neurosci. Lett.* **103**, 234–239
25. Gylys, K. H., Fein, J. A., Yang, F., Wiley, D. J., Miller, C. A., and Cole, G. M. (2004) *Am. J. Pathol.* **165**, 1809–1817
26. Williams, E., Williams, G., Gour, B. J., Blaschuk, O. W., and Doherty, P. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 4007–4012
27. Snyder, E. M., Nong, Y., Almeida, C. G., Paul, S., Moran, T., Choi, E. Y., Nairn, A. C., Salter, M. W., Lombroso, P. J., Gouras, G. K., and Greengard, P. (2005) *Nat. Neurosci.* **8**, 1051–1058
28. Zhu, X., Mei, M., Lee, H. G., Wang, Y., Han, J., Perry, G., and Smith, M. A. (2005) *Neurochem. Res.* **30**, 791–796
29. Reynolds, C. H., Nebreda, A. R., Gibb, G. M., Utton, M. A., and Anderson, B. H. (1997) *J. Neurochem.* **69**, 191–198
30. Hynd, M. R., Scott, H. L., and Dodd, P. R. (2004) *Neurochem. Int.* **45**, 583–595
31. Kihara, T., Shimohama, S., Sawada, H., Honda, K., Nakamizo, T., Shibasaki, H., Kume, T., and Akaike, A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 13541–13546
32. Kelkar, N., Standen, C. L., and Davis, R. J. (2005) *Mol. Cell. Biol.* **25**, 2733–2743
33. Kang, J. S., Feinleib, J. L., Knox, S., Ketteringham, M. A., and Krauss, R. S. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 3989–3994
34. Takaesu, G., Kang, J. S., Bae, G. U., Yi, M. J., Lee, C. M., Reddy, E. P., and Krauss, R. S. (2006) *J. Cell Biol.* **175**, 383–388
35. Lu, M., and Krauss, R. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 4212–4217
36. Xu, H., Dhanasekaran, D. N., Lee, C. M., and Reddy, E. P. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 3548–3553
37. Hansen, S. M., Berezin, V., and Bock, E. (2008) *Cell Mol. Life. Sci.* **65**, 3809–3821
38. Goedert, M., Jakes, R., and Vanmechelen, E. (1995) *Neurosci. Lett.* **189**, 167–169
39. Yasuda, S., Tanaka, H., Sugiura, H., Okamura, K., Sakaguchi, T., Tran, U., Takemiya, T., Mizoguchi, A., Yagita, Y., Sakurai, T., De Robertis, E. M., and Yamagata, K. (2007) *Neuron* **56**, 456–471
40. Jang, Y. N., Jung, Y. S., Lee, S. H., Moon, C. H., Kim, C. H., and Baik, E. J. (2009) *J. Neurosci.* **29**, 5974–5984

＜シンポジウム 26—3＞変性疾患のシード・凝集・神経回路網伝搬仮説の検証

神経変性疾患における蛋白癌仮説

長谷川成人

(臨床神経 2011;51:1101-1104)

Key words : アミロイド, プリオン, 伝播, タウ, α シヌクレイン, TDP-43

はじめに

アルツハイマー病 (AD) におけるタウ, パーキンソン病 (PD) における α シヌクレイン (α S), 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や前頭側頭様変性症 (FTLD) における TDP-43 など, 多くの神経変性疾患には特定の蛋白質が, 異常リン酸化, あるいはユビキチン化などの翻訳後修飾を受けて, その病気を定義づけるような特徴的病理構造物 (封入体) として神経細胞, あるいはグリア細胞内に出現する. さらにその出現部位や程度が臨床症状と強く相関し, 細胞脱落とも密接な関係がみいだされている. Braak ら, Saito らは多数例の患者剖検脳の神経病理学解析からタウ, α S の異常病変の広がりによって病気をステージ分けすることができることも報告している¹⁾²⁾. 本稿では神経変性疾患の「進行性」を説明する筆者の新しい考え方と現時点での検証を提示する.

「蛋白癌仮説」

神経変性疾患を説明する「蛋白癌仮説」とは, 細胞内に生じた異常蛋白質が, プリオン同様その特殊な構造から自身を鋳型に正常蛋白を異常蛋白に変換して増殖し, 癌細胞が転移するように, シナプスを介して他の細胞に広がって, 神経変性が進行するという仮説である (Fig. 1)³⁾⁴⁾. プリオンが個体から個体への感染を意味するのに対して, 脳内における異常分子の細胞間の広がりを強調したいと考えて「癌」という表現を使っている.

老化, 環境変化などにより, 細胞内蛋白質品質管理システムの障害, 破綻がおこると, 特定の蛋白質 (タウや α シヌクレインなど) が重合してアミロイド様分子を形成する. さらにそれが鋳型となって正常分子を取り込んで異常に変換する. それらが一つの細胞内に留まれば大きな問題とはならないが, 神経ネットワークなどを介して他の細胞に伝播する. その結果, 癌細胞が転移して増殖するように細胞内の異常蛋白質が増え, 同じ病変がひろがって, 神経変性が進行するという考え方である.

実際に変性疾患患者脳の異常蛋白病変は, 蛋白質が無構造, 無秩序に溜まるというのではなく, 規則正しい, 線維構造を

とって蓄積している. AD のタウは PHF という特異な線維として, PD の α S は PHF よりも細い 5~10nm の線維として蓄積する. さらにこれらの線維はいずれも, 異常プリオンと同じアミロイド線維の特徴であるクロス β 構造をとっていることが X 線回折の結果から示されている.

試験管モデル

精製したタウ, あるいは α S に, それぞれの線維を少量添加すると, 添加した線維をシードにして, 線維形成が進行する. この過程はプリオンなどのアミロイド線維の形成過程と同じで, 正常分子は添加したシードを鋳型にするようにして同じ構造に変化し線維に組み込まれるばあいが多い. α S 線維をある程度高い濃度で, 37°C で振とうすると, WT α syn, A30P α syn のいずれも, 分子間重合をおこしてアミロイド線維を形成する. ところが, その線維の性質は少しことなり, A30P α syn 線維は, WT α syn 線維にくらべて機械力に対して弱く, 断片化しやすい. 興味深いことに, WT α syn に, この A30P 線維を少量添加して放置すると, WT α syn であるにもかかわらず, A30P 線維と同じ断片化しやすい線維が形成される (Fig. 2)⁵⁾. また, そのプロテアーゼ抵抗性バンドをしらべてみると, A30P 線維を添加した形成した WT α syn は A30P 線維と同じバンドパターンを示し, WT 線維とはことなっていた⁷⁾. この結果は線維化 α syn に正常分子を異常分子に変換するプリオン様特性があることを示す.

一方, シードを加えても構造変化がおこらないばあいもある. WT タウに WT タウ線維を少量加えると線維形成が加速するが, WT タウに少量の P301L 変異タウ線維を添加してもそうならない⁶⁾. たった一つのアミノ酸の置換であるが, P301L 変異はタウの構造に対する影響が大きいと考えられる. このようにシードと宿主蛋白の反応には相性があり, 基本的にはシードは異種蛋白には働きにくい. このことは, 変性疾患を考えるばあいに重要で, 封入体を構成する蛋白質が基本的には一種類であるという現象が説明できる. 実際 P301L 変異の FTDP-17 の患者脳には P301L 変異体が主に蓄積していることが示されている.

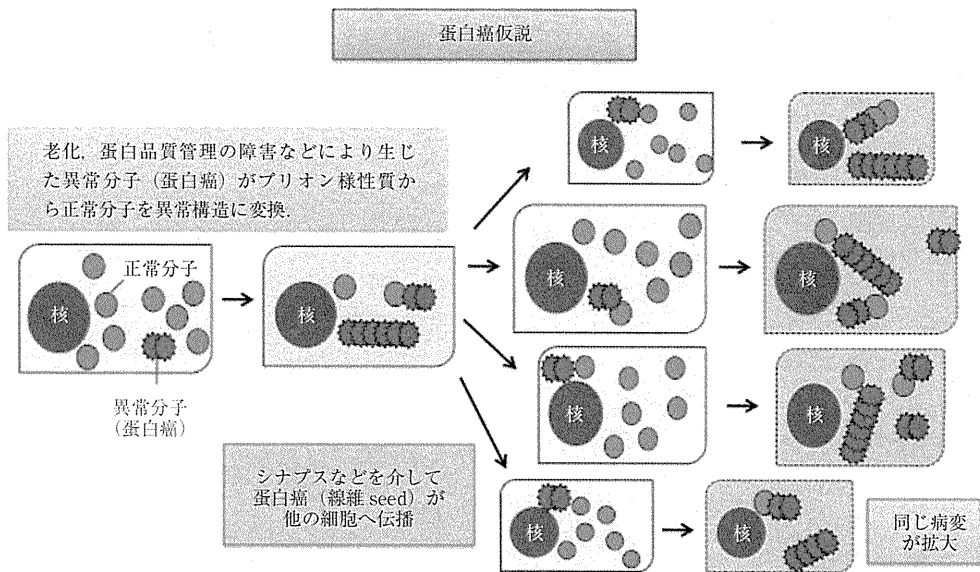


Fig. 1 神経変性疾患における細胞内異常蛋白質病変の広がりと「進行性」を説明する「蛋白凝集」仮説の模式図。

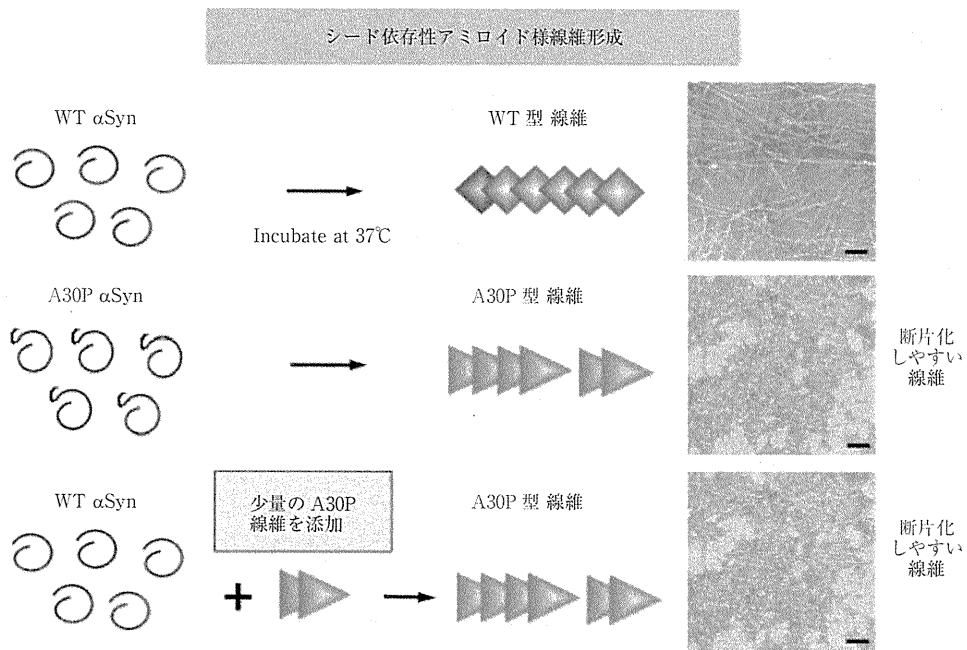


Fig. 2 α シヌクレイン (α S) のシード依存性アミロイド様線維形成の模式図。
 α S の野生型 (WT), A30P 変異体は, ある条件で放置すると構造, 性質の異なる線維を形成する。
 興味深いことに, WT α S に少量の A30P 線維を添加すると, WT α S が A30P 線維と同じ構造, 性質
 に変化する。

細胞モデル

培養細胞にヒト α S プラスミドを導入し, α S を過剰発現しても, レビー小体様の凝集体は形成されない。しかしながら, ここにあらかじめ試験管の中で重合した α S 線維をリポフェ

クタミンと共に処理すると, 線維が細胞内に導入され, 患者脳にみられるものと区別できない, リン酸化, ユビキチン化された α syn の封入体が形成される⁷⁾。凝集体が形成された細胞においては, ポリユビキチンの増加とプロテアソーム活性の低下が検出され, ユビキチンプロテアソーム系の障害と思われる細胞死が観察される⁷⁾。

タウについても同様のシード導入による線維性蛋白凝集がおこる。興味深いことに、微小管結合領域のくりかえし配列が3つの3リピート(3R)タウを発現する細胞に3Rタウ線維を導入すると凝集体形成が観察されるが、4つの4Rタウ線維を導入しても蓄積はみられない⁷⁾。逆に4Rタウを発現する細胞に3Rタウ線維を導入しても蓄積はみられず、4Rタウ線維を導入すると凝集がみられる⁷⁾。ピック病では3Rタウが選択的に蓄積し、CBDやPSPでは4Rタウが選択的に蓄積することが知られているが、一部のアイソフォームが選択的に蓄積する現象がこの蛋白癌の考えを導入することによって説明できる。

In vivo モデル

マウスなどの動物の脳内にタウ線維や α S線維を注入し、それが細胞間を伝わって異常病変が広がるかどうかを検討すれば、本仮説の直接的な検証が可能になる。当研究室でも早くからこの種の実験に取り組んでいるが、同じ発想の研究がGoedertのグループから2009年に発表された⁸⁾。彼らはタウの蓄積がおこらないWT-4Rタウを発現するTgマウスに、線維性タウが蓄積するP301S-4Rタウを発現するTgマウスの脳抽出物を注入した結果、約半年後に、WTタウの蓄積が観察され、それらは神経回路に沿って広がったことを報告した⁸⁾。マウスの脳内で、導入したP301Sタウの線維がシードとなってWTタウが線維化することを示す。

実際のPD患者脳内においても α S病変が広がる可能性が示唆されている。胎児中脳のドーパミン作動性ニューロンの移植後に長期間生存した2人のPD患者で、移植ニューロン中に α S陽性の構造の形成が観察されている。この結果は、異常 α Sが宿主から移植細胞へ伝播することを示唆する⁹⁾。

患者剖検脳の解析から

異常プリオンはプロテアーゼ抵抗性を示し、そのバンドパターンの違いはプリオン株の違いとして、その病理像や臨床像を決定することが示されている。変異型CJDがウシからヒトへプリオンが感染したことの証拠となっているのもこの異常プリオンのProtease耐性バンドのパターンがウシ由来のプリオンのそれと区別がつかないことによる¹⁰⁾。この考え方を細胞内異常蛋白質にも適用すると脳の様々な部位に蓄積した異常分子の構造が同じかどうかをしらべることができる。われわれはALS患者の様々な部位に蓄積するTDP-43の生化学、組織化学的解析をおこなった。TDP-43の蓄積様式は臨床、病理型によってことなるが、その違いは生化学的にも検出され、18~26kDaのリン酸化TDP-43のC末端のバンドパターンの違いとして検出される¹⁾。ところが、一人のALSの脳や脊髄など、様々な部位に蓄積したTDP-43を、生化学的にしらべてみても、そのバンドのパターンはどの部位においても基本的に同じで区別がつかない。この結果は、脳の様々な部位において、同じ分子重合様式をとったTDP-43が蓄積する

ことを意味する。様々な部位で同じ異常が同調しておこるとは考えにくく、最初にできた異常構造が細胞を伝わって広がったことを示唆する。

おわりに

以上のように、タウ、 α シヌクレイン、TDP-43などのアミロイド様異常分子が、一つの細胞内に留まらず、シナプスなどを介して細胞間を伝播することにより、癌細胞のように広がって病気が進行することを示唆する。最初にできる癌の部位やその性質により、症状や進行の程度などがことなるのと同じように、脳のどの部位の神経細胞、グリア細胞に、どのタンパク質の、どのような構造変化がおこるかによって、病変の広がりや変性する細胞に選択性が決まり、臨床症状の違いとなって現れる可能性が考えられる。

文 献

- 1) Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991;82:239-259.
- 2) Saito Y, Kawashima A, Ruberu NN, et al. Accumulation of phosphorylated alpha-synuclein in aging human brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:644-654.
- 3) 長谷川成人, 企画/編集. 概論-因子から解明される神経変性疾患の分子基盤. *実験医学* 2009;27:1318-1323.
- 4) Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, et al. Molecular Dissection of TDP-43 Proteinopathies. *J Mol Neurosci* 2011.
- 5) Yonetani M, Nonaka T, Masuda M, et al. Conversion of wild-type alpha-synuclein into mutant-type fibrils and its propagation in the presence of A30P mutant. *J Biol Chem* 2009;284:7940-7950.
- 6) Aoyagi H, Hasegawa M, Tamaoka A. Fibrillogenic nuclei composed of P301L mutant tau induce elongation of P301L tau but not wild-type tau. *J Biol Chem* 2007;282:20309-20318.
- 7) Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, et al. Seeded aggregation and toxicity of alpha-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J Biol Chem* 2010;285:34885-34898.
- 8) Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, et al. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 2009;11:909-913.
- 9) Li JY, Englund E, Holton JL, et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* 2008;14:501-503.
- 10) Collinge J, Sidle KC, Meads J, et al. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 1996;383:685-690.

Abstract**“Protein cancers” hypothesis for neurodegenerative diseases**

Masato Hasegawa

Department of Neuropathology and Cell Biology Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

Intracellular filamentous inclusions composed of amyloid-like proteins are common neuropathological features of many neurodegenerative disorders. Although the extent of the abnormal protein pathologies is closely correlated with the disease progression, little attention has been given to the molecular mechanisms to explain how these pathological proteins spread. We developed a novel method for introducing amyloid seeds into cells, and presented experimental evidence of seed-dependent polymerization, leading to the formation of filamentous protein deposits and cell death. Overexpression of alpha-synuclein itself does not generate abnormal inclusions, but if fibril seeds are introduced, abundant alpha-synuclein inclusions positive for P_{Ser129} and ubiquitin are developed, and the cells undergo cell death. This was also clearly demonstrated in cells expressing different tau isoforms by introducing the corresponding tau fibril seeds.

These results obtained from biochemical analyses of abnormal proteins in patients strongly suggest that amyloid-like proteins, including tau, alpha-synuclein and TDP-43, propagate from cell to cell and this propagation is the cause of disease progression, analogously to metastasis of cancer cells to multiple different tissues in cancer progression. From this point of view, I have proposed as a hypothesis that neurodegenerative diseases with amyloid-like proteins can be regarded as “protein cancers”.

(Clin Neurol 2011;51:1101-1104)

Key words: amyloid, prion, propagation, tau, α -synuclein, TDP-43

特集1

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の基礎研究

ALS 病態における TDP-43 および FUS/TLS

は せ が わ ま さ と あ ら い て つ あ き
長谷川成人¹⁾, 新井哲明²⁾

¹⁾財団法人東京都医学総合研究所 (〒156-8506 東京都世田谷区上北沢2-1-6)
E-mail: hasegawa-ms@igakuken.or.jp
²⁾筑波大学大学院 人間総合科学研究科精神病態医学

SUMMARY

ALSの病態、運動ニューロン変性の分子機構は長い間不明であったが、2006年、孤発性ALSと前頭側頭葉変性症のユビキチン陽性構造物の構成成分としてTDP-43が同定されたことを契機に、その組織病理、生化学的解析が著しく進んだ。さらに細胞生物学的解析から、その蓄積や神経変性の機構が明らかになりつつある。また、家族性ALSの一型であるALS6において、TDP-43と類似のドメインを持つ分子の探索を優先させた結果、FUS/TLSがその原因遺伝子として同定された。その後の免疫組織解析から、それまで不明であった異常構造物がFUS/TLS陽性であることが示され、タウ、 α シヌクレイン、TDP-43に次ぐ第4のプロテノパチーとなる可能性が出てきた。

はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: 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きたす神経変性疾患である。東京大学医学部神経内科の初代教授をつとめられた豊倉康夫先生が「ALSは手がかりを残さない完全犯罪」とたとえたように、その病態、運動ニューロン変性の分子機構は長い間不明であった。1987年、アルツハイマー病の特徴的病理構造物である神経原線維変化にユビキチンが同定されたことをきっかけに、ALS脊髄の変性運動ニューロンにおいてもユビキチン陽性の異常構造物が存在することが報告された。その後20年近く、この構造物が何からできているかは不明のままであったが、2006年になり、ALSに出現するユビキチン陽性病理構造物と前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration: FTLD) のユビキチン陽性封入体のいずれもが、核蛋白質の一種であるTDP-43 (TAR DNA binding protein of 43 kDa) であることが明らかとなった^{1,2)}。さらに、2008年、家族性及び孤発性ALSの患者にTDP-43の遺伝子変異が続々と報告され^{3,5)}、この蛋白質自体の異常が、運動ニューロン変性を引き起こし、ALS発症に関わることが遺伝学的にも証明された。その後、この発見が引き金となり、家族性ALS (familial ALS: FALS) の一型であるALS6

KEY WORDS

ユビキチン
リン酸化
hnRNP
核蛋白
RNA

に、TDP-43 と同じ RNA 結合性の核蛋白質の一種である FOS/TLS (fused in sarcoma/translated in liposarcoma) の遺伝子変異が同定された^{6,7)}。このように TDP-43 の発見以降、ALS の発症や病態に関わる分子の同定が次々と報告され、それまで全く不明であった孤発性 ALS の分子機構の解明が著しく加速している。本稿では、ALS の 90% 以上を占める孤発性 ALS の発症と進行に関わる TDP-43 を中心に、FUS/TLS の病態、異常蛋白分子と神経変性の関係について論じたい。

I. TDP-43 とその異常

TDP-43 は、核に局在する不均一核内リボ核酸蛋白 (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins: hnRNP)

の一種であるが、もともと HIV 遺伝子の反復配列内にある TAR (trans activation responsive region) に結合し、転写を抑制する因子として最初に同定されたことからこの名前がついている。中央部に二つの RNA 認識モチーフと一つのグリシンリッチ領域をもつ。C 末領域において他の種類の hnRNP と相互作用しながら、RNA のスプライシングなどの転写制御に関与する⁸⁾。

本来、核に局在するはずの TDP-43 が、ALS や FTL D の患者の脳、脊髄の神経細胞やグリア細胞では、主に細胞質や突起内、あるいは症例によっては核内に、異常構造物の形態をとって蓄積する病変が認められる。この TDP-43 の異常は、病気の種類、脳の部位、細胞の種類などで様々な形態をとるが、ALS の脊髄で

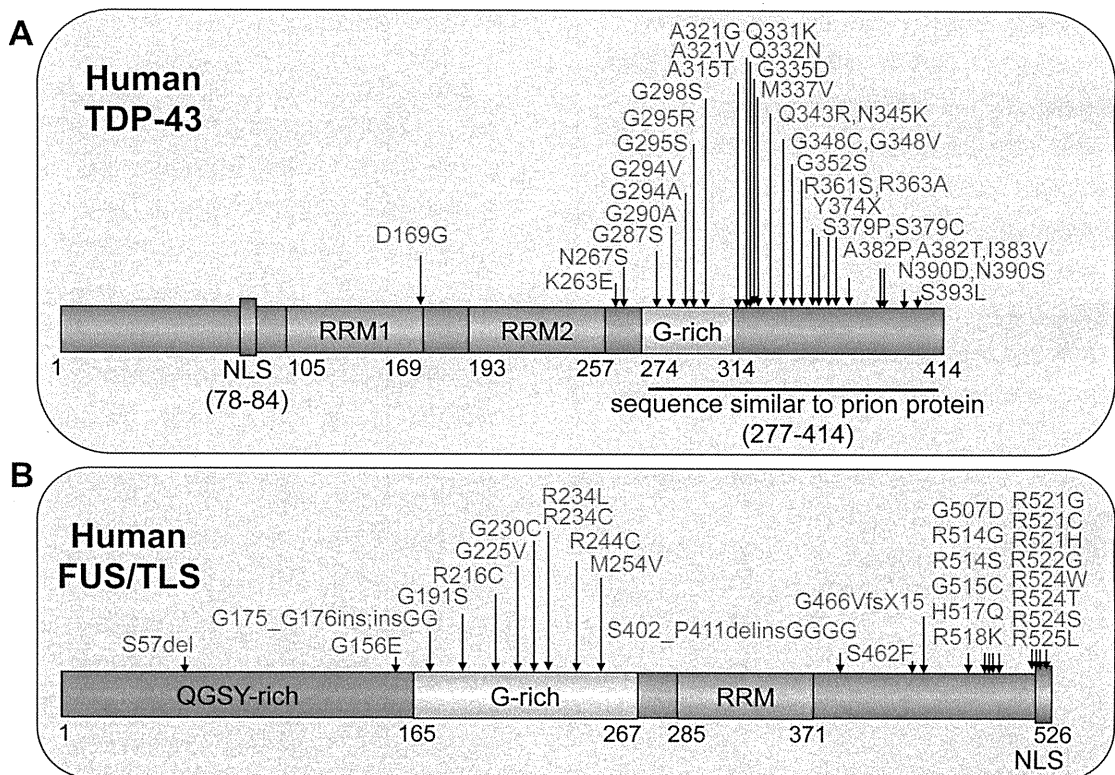


図1 TDP-43, FUS/ALS のドメイン構造とこれまでに同定されている遺伝子変異

A: ヒト TDP-43 は 414 アミノ酸からなるポリペプチドで、2つの RNA 認識モチーフ (RRM) と一つのグリシンに富む領域をもつ。家族性および孤発性 ALS 患者に多数の遺伝子変異が同定されているが、1カ所を除いて C 末側側に集中している。C 末側半分はプリオン蛋白と似たアミノ酸配列の領域が存在するだけでなく、患者脳脊髄において、異常リン酸化され 18~26 kDa のバンドとして検出される。B: ヒト FUS/TLS は、N 末側に QGSY に富む領域、中央部に RRM、C 末側に mRNA/DNA、あるいは他の hnRNP と複合体を形成する領域や核移行に関与する配列をもつ。変異は C 末端に多いが、他の領域にも多数報告されている。(遺伝子変異は、「Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database」を参考に記載)

は、スケイン様封入体 (skein-like inclusions), 球状封入体 (round inclusions), グリア細胞内封入体 (glial cytoplasmic inclusions: GCI) などとして観察される^{1,2)}。興味深い知見として、TDP-43の細胞質蓄積を認める細胞では、本来のTDP-43の核への局在が消失していることが示されている。もう一つの重要な形態学的特徴として、異常構造物として蓄積するTDP-43が線維状構造をとっていることが電子顕微鏡観察から示されている⁹⁾。これは、アルツハイマー病の細胞内異常蛋白質のタウや、パーキンソン病における α シヌクレインがそれぞれ特徴的な線維構造をとっている点と共通している特徴であり、神経変性疾患における異常蛋白質の共通性を考える上でも重要である。

II. 異常 TDP-43 の生化学的特徴

異常形態をとって蓄積しているTDP-43は、高度にリン酸化され、またその一部はユビキチン化されている^{1,2)}。TDP-43はその名前の通り、電気泳動による分離で、43 kDaの位置に泳動される分子であるが、患者脳脊髄には、これよりも見かけ上分子量が大きい45 kDaのバンドが検出される。このバンドはホスファ

ターゼを用いた脱リン酸化処理により43 kDaに移動することから、リン酸化による変化である。我々は試行錯誤の結果、リン酸化される可能性があるSer, Thr残基のリン酸化ペプチドを合成し、特異抗体を作製、剖検脳標本における反応性を確認するという作業を行い、C末端の複数の部位(特にSer403, Ser404, Ser409, Ser410)を同定した⁹⁾。これらのリン酸化TDP-43に対する抗体は、正常TDP-43が局在する核を染めず、ALSのスケイン様封入体やグリア細胞封入体、FTLDの様々な異常構造物を特異的に染めた⁹⁾。また、ウエスタンブロット解析では、ALS、FTLDの界面活性剤不溶性画分に、45 kDaバンド、18~26 kDaの断片、それからレーン全体がスメア状に染まる異常を強く検出した⁹⁾。リン酸化非依存性TDP-43抗体が、正常のTDPと強く反応するため、組織学的にも、生化学的にも判別が困難であったTDP-43の異常が、抗リン酸化TDP-43抗体により、明瞭に、感度よく検出できるようになった。前述したように患者脳脊髄に蓄積する酸化TDP-43は線維構造をとっており、このため、プロテアーゼに対する抵抗性が高い¹⁰⁾。

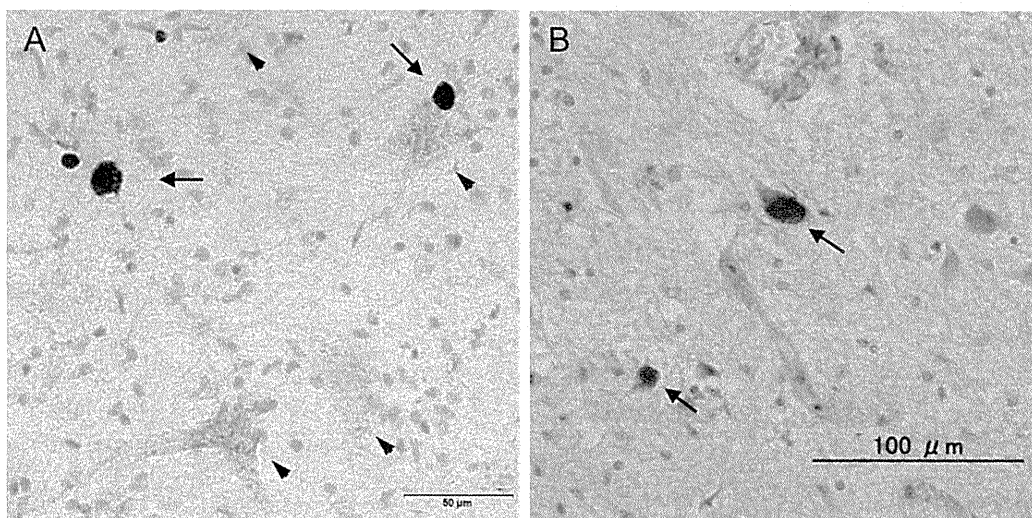


図2 孤発性ALS患者脊髄に認められるTDP-43の異常(A)と家族性ALS(ALS6)患者の脊髄に認められるFUS/TLS陽性構造物(B)

A: 孤発性ALS患者脊髄の抗リン酸化TDP-43抗体pS409/410による免疫染色。球状封入体(矢印)や細胞質に顆粒状に蓄積するリン酸化TDP-43(矢印)が観察される。B: FUS/TLS変異を有する患者脊髄の抗FUS/TLS抗体による免疫染色。FUS/TLS陽性細胞質内封入体(矢印)が観測される。

III. FUS/TLS

FUS/TLS は、転写因子の CCAAT enhancer binding homologous protein (CHOP) と融合遺伝子を形成し、myxoid liposarcoma (ヒト粘液性脂肪肉腫) の癌化を誘導する因子として最初に同定された^{11, 12)}。遺伝子は、染色体 16p11.2 上に存在し、15 個のエクソンから成り、526 のアミノ酸をコードする。構造、機能的に TDP-43 とよく似ており、RNA 認識モチーフとグリシンリッチドメインを 1 個ずつ有する。N 末側 (QGSY-rich region) でポリメラーゼと結合することにより転写促進、C 末側で mRNA/DNA と結合あるいは他の hnRNP と複合体を形成することにより pre-mRNA のスプライシングや輸送の調節に関与する。また、アクチン関連蛋白をコードする mRNA をスパインに輸送し、シナプス可塑性の維持にも関与することが知られる¹³⁾。他、細胞増殖や DNA 修復など FUS の多彩な機能が報告されている。FUS/TLS 蛋白は、全身に広く発現し、そのほとんどは核と細胞質の両方に存在する。ただ、神経細胞では、細胞質よりも核により多く局在する傾向があり、グリア細胞では核のみ存在すると報告されている¹⁴⁾。

2009 年、家族性 ALS (familial ALS: FALS) の一型である ALS6 の遺伝子解析において、TDP-43 と類似のドメインを持つ分子の探索を優先させた結果、FUS/TLS がその原因遺伝子として同定された^{6, 7)}。Kwiatkowski ら⁶⁾によって 13 種類、Vance ら⁷⁾によって 3 種類の変異が報告されたが、その多くが C 末端側のエクソン 15 に集中している。C 末端には核移行配列があることから、FUS/TLS の核への移行障害が病態形成に関わっていることが示唆されるが、C 末端以外にも多数の変異が同定されており、その他の障害や複合的な機序を考える必要がある。FALS 全体における ALS6 の頻度は 3% であり、平均発症年齢は 44.5 歳、平均罹病期間は 33 ヶ月である⁷⁾。通常の ALS と同様の経過を辿る例が多いが、上肢近位筋や頸部筋の筋力低下が目立つ例も報告されている。神経病理については、R521C および R521H 変異例で解析がなされており、上位および下位運動ニューロンの脱落が共通して認められる所見とされている。FUS/TLS の

局在については、Kwiatkowski らの R521G 変異例では、大脳皮質および脊髄の神経細胞において、細胞質の FUS/TLS 染色性が増すことを報告している⁶⁾が、封入体形成については記載していない。一方、Vance らは、R521C および R521H 変異例で、下位運動ニューロンに FUS/TLS 陽性かつ TDP-43 陰性の細胞質内球状封入体や変性神経突起様構造があることを報告している⁷⁾。

その後、TDP-43 によって示された ALS と FTL D の共通性、TDP-43 と FUS の構造、機能および蓄積の類似性 (核から細胞質への移行傾向) から、atypical FTLD-U や basophilic inclusion body disease などの FTLD 群について FUS/TLS の免疫組織染色が行われた結果、タウ陰性・TDP-43 陰性構造物が、FUS/TLS に陽性を示すことが明らかになった^{15, 16)}。

IV. TDP-43 と FUS/TLS の類似点と相違点

TDP-43 と FUS/TLS について、これまでの研究からいくつかの類似点と相違点が認められる。両者の類似点として、蛋白質の構造 (RNA 結合) と機能 (転写調節) の類似性が第一に挙げられる。もう一つは、ミスセンス変異により ALS を発症し、遺伝子産物が神経細胞およびグリア細胞に蓄積するという点がある。また、疾患の表現型として、ALS、FTLD、両者の合併という 3 型が存在する点も共通している点であろう。一方相違点としては、正常神経細胞において、TDP-43 は核にのみ局在するが、FUS/TLS は核と細胞質のどちらにも存在が認められる。また封入体を形成した細胞において、TDP-43 が核から消失するのに対し、FUS/TLS は核の染色性が低下するものものや、ほとんど変化しないものなど様々である。また、不溶性画分に回収される TDP-43 にはリン酸化や断片化など、明らかな異常が認められるのに対し、FUS/TLS は、現在までのところそのような異常修飾を示唆する所見が認められない。今後 FUS/TLS の異常を認識するような特異抗体が得られた場合に、認識が変わる可能性もあるが、現在使われている抗体で見える限りにおいて、生化学的に明らかな異常所見は検出できていない。

V. TDP-43の細胞、動物モデル

TDP-43蓄積症モデルができれば蓄積機序の解明や蓄積を制御する薬剤の探索に役立つと考えられ、実際の患者脳脊髄の病態を再現するモデルの構築が望まれる。筆者らはまず、TDP-43の核への移行障害の可能性を考え、核移行に関わる配列を調べたところ、塩基性アミノ酸に富む領域が2カ所(78-84と187-192)見つかった。それぞれ、あるいは両方の欠損体を発現させた結果、78-84の配列が核への移行配列として機能していることが判明した¹⁷⁾。また、この両方の欠損体は、細胞に発現させただけで、リン酸化、ユビキチン化された凝集体が形成された¹⁷⁾。次に、患者脳にはC末端断片が多く蓄積していることから、TDP-43のC末端断片(162-414、あるいは218-414)をGFPの融合蛋白質として細胞に発現させたところ、リン酸化されたTDP-43凝集体が形成された¹⁸⁾。さらに、ALSのミスセンス変異のほとんどがこのC末端断片の凝集を強める効果が示された。さらに、凝集しやすいC末端断片と全長TDP-43と一緒に細胞に発現すると、全長TDP-43が凝集体に取り込まれ、その核の局在が消失するのが観察された。患者脳でTDP-43凝集体が存在する細胞の核ではTDP-43の染色が消失する現象を再現するものである¹⁸⁾。このような結果からすると、TDP-43が切断され、核移行しない、かつ凝集しやすいC末端断片が生じ、凝集の引き金になることが考えられる。しかしながら、断片が複数検出されていること、断片のパターンは病理、すなわち異常構造物の形態と密接な関係があることなどから、筆者らは断片化よりも凝集、蓄積の方が先におこる可能性が高いと考えている^{19), 20)}。

動物モデルとしては、野生型ヒトTDP-43やALS患者の変異を導入したTDP-43を過剰発現するトランスジェニックマウスが作製され、複数報告されている。けいれんや運動機能の障害、行動異常などの症状を示すものがほとんどであるが、その病理については、細胞質内への局在変化が起こっていると報告するものや異常蓄積がほとんどみられないというものまで様々である。現時点での報告を総合すると、患者脳脊髄にみられるようなTDP-43の病理は非常に稀にみら

れるか、ほとんどないにも関わらず、かなり初期から運動機能の障害や異常という症状がでている。TDP-43はRNA結合蛋白質であり、その機能が多岐にわたること、発現が制御されている分子であることなどを考えると、過剰発現細胞において様々な障害や異常が起こっている可能性が高い。今後、少し別のアプローチから動物モデルの構築を試みる必要があると考えられる。

参考文献

- 1) Arai 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, et al : Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **314** : 130-133, 2006.
- 3) Kabashi E, et al : TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* **40** : 572-574, 2008.
- 4) Sreedharan J, et al : TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **319** : 1668-1672, 2008.
- 5) Yokoseki A, et al : TDP-43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **63** : 538-542, 2008.
- 6) Kwiatkowski TJJr, et al : Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **323** : 1205-1208, 2009.
- 7) Vance C, et al : Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* **323** : 1208-1211, 2009.
- 8) Buratti E, et al : TDP-43 binds heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B through its C-terminal tail: an important region for the inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 splicing. *J Biol Chem* **280** : 37572-37584, 2005.
- 9) Hasegawa, et al : Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **64** : 60-70, 2008.
- 10) Tsuji H, et al : Epitope mapping of antibodies against TDP-43 and detection of protease-resistant fragments of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011.
- 11) Crozat A, et al : Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma. *Nature* **363** : 640-644, 1993.
- 12) Dunah AW, et al : Spl and TAFIII30 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science* **296** : 2238-2243, 2002.

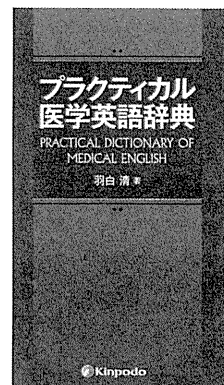
- 13) Fujii R, et al : The RNA binding protein TLS is translocated to dendritic spines by mGluR5 activation and regulates spine morphology. *Curr Biol* **15** : 587-593, 2005.
- 14) Andersson MK, et al : The multifunctional FUS, EWS and TAF15 proto-oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response. *BMC Cell Biol* **9** : 37, 2008
- 15) Munoz DG, et al : FUS pathology in basophilic inclusion body disease. *Acta Neuropathol* **118** : 617-627, 2009.
- 16) Neumann M, et al : A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. *Brain* **132** : 2922-2931, 2009.
- 17) Nonaka T, et al : Phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 pathological inclusions in ALS and FTLD-U are recapitulated in SH-SY5Y cells. *FEBS Lett* **583** : 394-400, 2009.
- 18) Nonaka,T, et al : Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. *Hum Mol Genet* **18** : 3353-3364, 2009.
- 19) Arai T, et al : Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLD and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy. *Neuropathology* **30** : 170-181, 2010.
- 20) Hasegawa M, et al : Molecular dissection of TDP-43 proteinopathies. *J Mol Neurosci* **45** : 480-485, 2011.

プラクティカル 医学英語辞典

著 羽白 清

和英・英和医学用語辞典, 略語集, 冠名用語集, 診療録記載法, 診療会話・プレゼンテーション・紹介状の英語表現集, 実用医薬品集を兼ねる盛りだくさん。

B6変型判・846頁 定価 5,040円(本体4,800円+税5%) ISBN978-4-7653-1423-7



株式会社 **金芳堂** 京都市左京区鹿ヶ谷西寺ノ前町 34 番地 〒606-8425
Tel 075-751-1111 Fax 075-751-6858

E-mail(営業部): eigyo@kinpodo-pub.co.jp
<http://www.kinpodo-pub.co.jp/>

