論文の内容の要旨

論文題目：　トランスジェニックショウジョウバエを用いた TDP-43 プロテイノパチーの神経変性機序に関する研究

指導教員　　辻　省次　教授

東京大学大学院医学系研究科　平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経学専攻

井原　涼子

TAR-DNA binding protein of 43 kDa（TDP-43）は，2006 年に筋萎縮性側索硬化症（ALS）及びユビキチン陽性封入体を伴う前頭葉側頭葉変性症（FTLD-U）に共通する細胞質内のユビキチン陽性封入体の主要構成成分として同定されたタンパク質である．2008 年，常染色体優性遺伝性家族性 ALS において TDP-43 をコードする *TARDBP* の変異が見出され，ALS の病因遺伝子の一つと位置付けられた．これらの知見に基づき，TDP-43 は FTLD-U，ALS という二つの神経変性疾患を結びつけるタンパク質と理解されるようになり，TDP-43 陽性封入体を伴う神経変性疾患を TDP-43 プロテイノパチーと総称する新たな疾患概念が生まれた．TDP-43 は正常では主に核内に存在する heterogeneous nuclear ribonucleoprotein（hnRNP）であり，RNA 結合能を有し，pre-mRNA のスプライシングや mRNA の安定化に関わることが知られており，いくつかの標的 RNA

も同定されている．構造的には二つの RNA recognition motif（RRM）と C 末端寄りに Gly rich domain を持つのが特徴的である．家族性 ALS で認められる変異は C 末端領域に集中する．また ALS・FTLD-U の変性ニューロンでは TDP-43 は核から消失し，C 末端断片を含む，不溶化しリン酸化・ユビキチン化された細胞質内凝集体を形成する．これまでに培養細胞を用いた研究では TDP-43 の毒性は再現されておらず，変異が集中する C 末端領域の役割もわかっていない．またトランスジェニック動物も複数の動物種で作られており，いずれも野生型 TDP-43 の過剰発現で異常を認めるが，TDP-43 の毒性発揮機序における役割は明らかでなく，家族性 ALS の変異効果についてもいまだ不明である．本研究では，野生型，及び機能ドメイン欠失型変異型，家族性 ALS 変異型 TDP-43 トランスジェニックショウジョウバエを用い，TDP-43 の神経変性機序における作用，家族性 ALS 変異の変異効果の原因を検討した．

最初に野生型 TDP-43 を複眼特異的に発現するトランスジェニックショウジョウバエ（TDP-43 tg fly）を作出した．複眼は神経細胞に類似した性質を持っており，外部形態から変性を検出しやすいことから，これまでに複眼特異的に病因タンパク質を過剰発現するポリグルタミン病のモデルショウジョウバエなどが作出されている．TDP-43 tg fly は外部形態では，ごく微細な複眼の剛毛の配向性の乱れを認めるのみであったが，パラフィン包埋切片（矢状断）では光受容細胞の配列の乱れを認め，網膜の空胞化を認めた．anti-TDP-43 抗体による免疫組織化学では，TDP-43 は主に核内に発現しており，核内及び細胞質内ともに異常な凝集体の形成を認めなかった．また TDP-43 はユビキチン化，リン酸化を伴わなかった．この変化は TDP-43 の発現量に依存的であった．

続いて家族性 ALS 変異である A315T，Q343R，G298S，M337V 変異型 TDP-43 tg fly を作出した．いずれの変異でも野生型 TDP-43 tg fly と比して網膜空胞化の

程度は高度であった．また変異型 TDP-43 は野生型と同様に主に核内に発現していた．

よりヒト ALS に近いモデルを作出するため，複眼発現系に加えて，運動ニューロン特異的に TDP-43 を発現するトランスジェニックショウジョウバエを作出し，検討を行った．運動ニューロン発現系において，野生型 TDP-43 tg fly は対照の lacZ tg fly に比して著明に寿命が短縮し，家族性 ALS 変異では野生型 TDP-43 tg fly よりもさらに寿命が短縮した．また，日齢依存的な運動機能障害を認めた．しかしながら組織学的には lacZ tg fly と差異を認めず，本 Tg fly に認められた機能障害は，組織学的に明らかな神経細胞死を伴わないと考えられた．

次に，Tg fly で認められた TDP-43 の毒性がどのドメインに由来するかを検証するため，ドメイン欠失型，及び RNA 結合能低下型変異を持つ TDP-43 tg fly を作出した．C 末端領域を欠いたΔC，Gly rich domain を欠いたΔGly，N 末端領域を欠いたΔN，RRM1 と 2 を欠いたΔRRM，RRM1 を欠いたΔRRM1，RNA 結合能が低下することが示されている W113A/R151A 変異を用いた. その結果, ΔRRM, ΔRRM1 変異型 TDP-43 は核内に発現・局在するものの，野生型 TDP-43 tg fly で認められた複眼網膜の変性を全く生じなかった．W113A/R151A では変性の程度は軽度であった．一方，ΔC とΔGly では網膜の空胞化が増悪し，外部形態からも個眼の融合や剛毛の脱落が認められた．ΔN は核移行シグナル（nuclear localizing signal, NLS）を欠いており，核～細胞質にびまん性に局在し，網膜変性の程度は野生型 TDP-43 tg fly と比して高度であった．この結果から，TDP-43 tg fly で認められる毒性発揮機序には TDP-43 が本来有する RNA 結合能を介していると考えられ，家族性 ALS 変異が集中する C 末端領域の欠失では RNA 結合能が上昇するため，毒性がさらに増強するのではないかという仮説を立てた．

さらに，TDP-43 は核内，細胞質内のいずれで毒性を発揮するかを検討するた

めに，核局在シグナル（nuclear localizing signal, NLS）を欠く NLS 変異型（NLS mt）TDP-43 tg fly を作出した．NLS mt は細胞質に局在し，野生型 TDP-43 と同等もしくはより顕著な網膜変性を生じた．NLS を欠失し，同時にΔRRM1 もしくはW113A/R151A 変異のいずれかを持った二重変異型 TDP-43 tg fly を作出したところ，網膜変性は全く消失した．このことは，TDP-43 は核，細胞質のいずれにおいても RNA 結合を介して毒性を発揮することを示唆する．TDP-43 は NLS と nuclear export signal（NES）双方を持つタンパク質であることから，核と細胞質の双方に特異的な標的 RNA を持つ可能性がある．また，NLS mt に家族性 ALS 変異を加えた二重変異では，NLS mt に比して複眼の変性は著明に増悪した．この結果は，家族性 ALS 変異では細胞質局在が増えるため毒性が強くなるという仮説に反論を与えるものである．

各種の神経変性疾患脳では，不溶化した病因タンパク質の蓄積が観察され，これらが毒性を発揮すると考えられている．Tg fly における TDP-43 の不溶化を検討するために，野生型，ΔC，ΔGly，ΔN，NLS mt，Q343R，G298S，M337V 変異型 TDP-43 tg fly の頭部を界面活性剤や変性剤を用いて段階的に抽出し，可溶性について生化学的に検討した．ΔC，ΔGly では可溶性画分の回収比率が高かったが，その他については一定の傾向はなく，TDP-43 tg fly で認められた変性の強度と組織内に蓄積した TDP-43 の不溶性に相関は見られなかった．

上記のごとく，Tg fly を用いた *in vivo* の検討から，RNA 結合能の低下により組織変性が軽減したが，C 末端領域の欠失あるいは変異により変性が増強した．これらの結果から，本実験系において TDP-43 は RNA 結合能を介して変性を惹起し, TDP-43 の C 末端領域は RNA 結合能に抑制的に働き, その変異により RNA 結合能が上昇した可能性を考えた. この可能性を *in vitro* で検証するために, RNA 結合能を測定する実験 electromobility shift assay（EMSA）を行った．EMSA 法で

は特定のリコンビナントタンパク質と特定の配列のオリゴヌクレオチドの 2 者間における結合能を評価することが可能である．今回は TDP-43 との結合が示されている$(UG)_{12}$オリゴヌクレオチドとリコンビナント TDP-43 の結合を評価した．その結果，ΔC の RNA 結合能は野生型 TDP-43 の 2 倍に上昇しており，Q343R，G298S，M337V も野生型 TDP-43 の 1.25 倍程度の結合能を示した．これらの結果は，Tg fly で観察された変性の強度と，過剰発現した TDP-43 の RNA 結合能の関連を支持するものである．

以上の *in vivo*，*in vitro* の実験から，TDP-43 は RNA 結合能を介して毒性を発揮することを示し，C 末端領域が RNA 結合能の抑制機能を持ち，家族性 ALS 変異ではその抑制機能が低下するため毒性が増強する可能性を提唱した．

本研究遂行中の 2009 年に，家族性 ALS の病因遺伝子として TDP-43 に加えて，同じく RNA 結合タンパク質である FUS/TLS が新たに同定されたことから，神経変性疾患の病態における RNA 代謝・成熟の重要性はさらに注目されている．今後 *in vivo* においても RNA 結合能の上昇が見られるかを検証するために，以下の実験を検討中である．TDP-43 の RNA 結合能が変化すれば，その標的 RNA の代謝・成熟に変化が生じると考えられ，TDP-43 の標的 RNA として知られる中で，ショウジョウバエでも保存されている HDAC6 mRNA あるいはタンパク質の量が変化すると考えられる．そのため TDP-43 の過剰発現組織における HDAC6 タンパク質の定量を試みているが，過剰発現組織のみの単離が困難であり，freeze-dry 法による複眼の単離などを試みる方針である．

今回用いたヒト TDP-43 を過剰発現したトランスジェニックショウジョウバエ系は，ヒト神経変性疾患のモデルとしては，(1) 異なる動物種への発現系であること，(2) 機能分子の過剰発現系であることなどの制約も想定される．なかでも，本実験系において観察された変性の表現系が，過剰発現された TDP-43 と複

合体を形成して機能する補因子の不足に起因するなどの可能性も除外する必要がある．今後，*in vivo* のトランスジェニックショウジョウバエモデルにおいて TDP-43 の標的 RNA のプロセッシングにどのような変化が生じており，いかなる標的 RNA が変性過程に原因的に関与するかを網羅的に探索したい．特にショウジョウバエモデルにおいては，他系統の過剰発現／ノックダウンハエとの交配により表現系に影響を与える遺伝学的因子の探索を行うことができるメリットを活かし，哺乳類細胞・モデル動物への展開も視野に入れつつ，今後の研究を発展させたい.