

## 神経難病・筋萎縮性側索硬化症の病原蛋白質を 分解する新たな仕組みを発見

- ALS の新たな病態の発見と分子標的治療の可能性を開く -

### 概要

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は最も重篤な神経難病の一つであるが病態は未だに不明で、根治的な治療法も存在しない。しかし以前から ALS の病巣に異常凝集物が蓄積する現象は知られており、近年 TDP-43 という蛋白質が主な成分と判明したことから治療標的として注目を浴びている。今回我々は、がん関連蛋白質 von Hippel Lindau (VHL) と Cullin2 (CUL2)からなるユビキチンリガーゼ複合体が、ALS で出現する病的な TDP-43 と結合し、ユビキチン化とプロテアソームでの分解を促進することを発見した。さらにその仕組みの破綻が神経細胞周囲のグリア細胞であるオリゴデンドロサイトにおける病的封入体形成に関与していることを明らかにした。オリゴデンドロサイトの機能異常は近年 ALS 病態の重要な要素として注目されており、VHL/CUL2 の調節異常の解明は ALS 病態の解明と治療開発への道を開くものと期待ができる。

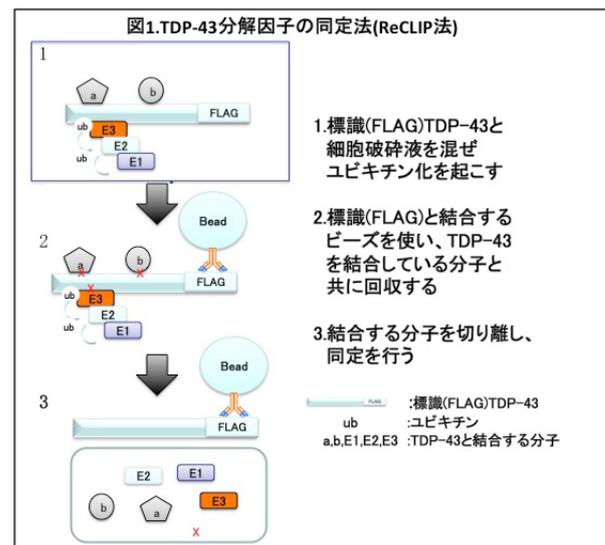
### 1. 背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は随意運動を司る神経がほぼ選択的に死滅し、全身の筋肉の萎縮と筋力低下を進行性にきたす神経難病である。発症より 3~5 年程度で自ら呼吸することが不可能となり機械による人工呼吸を受けるか選択を迫られる。長らく原因は不明であったが、近年 ALS の脳や脊髄の病巣で蓄積するユビキチン陽性の異常物質の本体として TAR DNA binding protein-43 (TDP-43) という蛋白質が同定された。TDP-43 は正常では核内で機能する RNA 結合物質であるが、ALS では細胞質へ移り、異常に切断された状態で蓄積しており、これらが様々な病的現象と関連すると考えられている。このように現在 ALS は TDP-43 などの原因蛋白質が正常な構造からの病気を引き起こす異常構造への変換を背景とした「蛋白質ミスフォールディング病」と考えられており、その病的構造を適切に捉え、除去することが出来れば根治的な治療法開発へと繋がることが期待される。TDP-43 はユビキチン化を受けていることから、ユビキチン-プロテアソーム分解系が関与していることが想定されるが、これまで TDP-43 が細胞内で如何に分解されるのかについて、その仕組みは不明であった。我々はその解明に取り組み、その仕組みの一端を明らかにできたため、ここに報告することとした。

### 2. 研究手法・成果

#### 【研究手法】

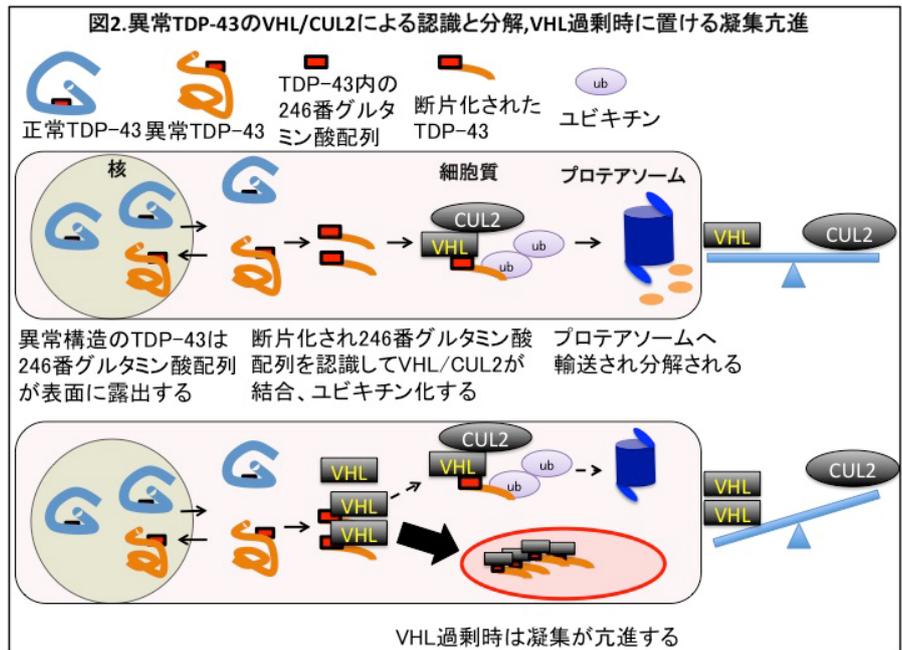
標識した TDP-43 蛋白質をユビキチン・プロテアソーム系に必要な分子を含む細胞破碎液と混ぜてユビキチン化反応をおこし、Reversible covalent linked immunoprecipitation (ReCLIP) 法という方法でユビキ



チン化の過程で TDP-43 と架橋剤で結合させられた蛋白質を回収し、結合を解離させた後に質量解析を行い、アミノ酸配列を同定した (図 1)。同定された分子が病的な TDP-43 のユビキチン化や分解、さらに ALS の病態と如何に関連するかについて、培養細胞の遺伝子導入実験や独自の抗体を用いた ALS 患者組織の組織化学解析を行った。

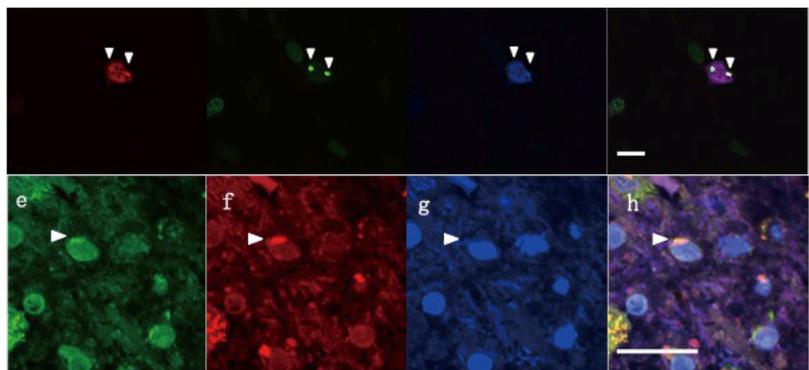
**【成果】**

質量解析の結果 cullin2 (CUL2) という蛋白質を同定した。CUL2 は癌関連蛋白質である von Hippel Lindau protein (VHL) 蛋白質と複合体を形成し、hypoxia inducible factor (HIF)1 $\alpha$  蛋白質をユビキチン化するユビキチンリガーゼであるが、今回我々は基質結合蛋白質である VHL が、正常構造より病的な異常構造に変化した TDP-43 を強く認識し、さらに ALS の病巣に存在する切断された TDP-43 にユビキチンを連結しプロテアソームでの分解を促進することをつきとめ、TDP-43 分子の中で異常構造の目印となる配列 (246 番グルタミン) を特定した (図 2)。一方で、培養細胞では VHL 蛋白質のみが過剰になると、むしろ TDP-43 は異常に蓄積し、病的な凝集及び封入体形成を促進するという ALS 病態の悪化を再現し、さらに TDP-43 の機能が低下すると VHL 蛋白質量が増加することが確認された。VHL は従来血管系細胞に存在することが知られていたが、ALS 患者脊髄の観察により VHL はオリゴデンドロサイトというグリア細胞内の細胞質に存在し、グリア細胞質封入体 (GCI) と呼ばれる病的な封入体で異常な TDP-43 と共存しており、VHL/CUL2 の機能不全が同細胞の凝集体形成の背景にあることが示唆された。以上の結果は、正常人を持つ TDP-43 蛋白質が ALS 発症に関係する異常構造体に転換した際に、それを認識し排除する仕組みが存在し、その一つが VHL/CUL2 複合体であることを示している。また ALS の発症や進行との関係が注目されているオリゴデンドロサイトの封入体形成の仕組みについてはこれまで全く知見がなく、VHL と CUL2 の調節の仕組みをさらに明らかにすることで ALS の病態解明と新たな治療法開発が進むものと期待される。



**3. 波及効果**

VHL/CUL2 複合体は TDP-43 のみならず、HIF1 $\alpha$  など正常細胞でも機能する他の蛋白質の分解にも関与している。今後 VHL/CUL2 の調節の仕組みがさらに解明されると病的 TDP-43 に絞った治療が期待される。オリゴデンドロサイ



a-d 易凝集型TDP-43を過剰発現させた培養細胞のALSモデル凝集体におけるVHL, TDP-43 染色 a.VHL (赤)b.TDP-43(緑) c.DAPI(核の染色 青) d.a-cの重ね合わせ像 凝集体でVHLTDP-43は共局在している (bar 50  $\mu$ m)

e-h ALS患者脊髄組織におけるVHL, TDP-43 蛍光染色 e.VHL (緑) f.リン酸化TDP-43(赤) g.DAPI(核の染色 青) h.e-gの重ね合わせ像 オリゴデンドロサイトの細胞質凝集体でVHLとリン酸化TDP-43は共局在している (bar 50  $\mu$ m)

トの機能異常は近年 ALS 病態の重要な病態として注目されており、VHL/CUL2 の調節異常の解明が今後の治療開発における有望な治療標的として期待ができる。また我々が特定した異常な TDP-43 の目印（246 番グルタミン酸）は、分子標的治療や診断プローブの開発にも有用と考えている。

#### <用語解説>

##### **TAR DNA-binding protein-43 (TDP-43) :**

ALS の脳脊髄病巣で蓄積することが知られていたユビキチン化された異常封入体の本体なす蛋白質の 1 つ。本来核内に存在するが、ALS では異常なリン酸化と、切断を受けた短い断片が蓄積しており、現在 ALS を引き起こす原因蛋白質の 1 つとして注目されている。

##### **蛋白質ミスフォールディング病:**

蛋白質は一次構造であるアミノ酸配列により立体構造を形成して機能を果たす。蛋白質が正しい立体構造をとる過程は折りたたみ（フォールディング）と呼ばれ、何らかの理由で正しくフォールディングされなかった（ミスフォールディング）異常構造の蛋白質は通常ユビキチン・プロテアソーム系（後述）で分解される。分解されなかったミスフォールディング蛋白質は蓄積、凝集して毒性を示すと考えられており、異常な構造の蛋白質が原因となる一群の疾患は蛋白質ミスフォールディング病と呼ばれる。ALS を始め様々な神経変性疾患で認められる封入体形成蛋白質は異常構造を示しており、蛋白質ミスフォールディング病と考えられている。

##### **Reversible covalent linked immunoprecipitation (ReCLIP)法:**

蛋白質と結合する分子群を効率よく同定するときに用いる方法。結合が一時的な分子を逃さないために、架橋剤を用いて反応している蛋白質同士を結合させる。その後免疫沈降法（抗原と抗体が特異的に反応して沈殿する反応）によって結合物質を複合体ごと回収し、さらに還元剤を用いて個々の物質を分離し、質量解析を組み合わせることによって結合している蛋白質を同定できる。

##### **von Hippel Lindau protein (VHL) :**

ガン抑制遺伝子の一つであり、von Hippel Lindau 病の原因遺伝子。

##### **ユビキチン・プロテアソーム系:**

ユビキチンという小さな蛋白質を標識に用いて、標的となる蛋白質（基質）を特異的に分解する蛋白質分解機構。基質は特定のユビキチンリガーゼにより選択的にユビキチンで標識され、プロテアソームによって分解される。

##### **グリア細胞:**

神経細胞の周囲にあり、形態維持や栄養補給を行う細胞。ALS を含む複数の神経疾患の病態においてグリア細胞と神経細胞の相互作用が指摘されている。オリゴデンドロサイトはグリア細胞の一種で神経の髄鞘形成や栄養補給を行い、近年 ALS の発症や進行に関わっているとして注目されている。