TDP43の発現抑制による細胞内小器官の形態変化

有 泉 優 子
新潟大学大学院医歯学総合研究科神経内科学分野
（主任：西澤正豊教授）

Reduced Expression of TDP - 43 Changes the Structures of Subcellular Organelles

Yuko ARIIZUMI

Department of Neurology, Niigata University Graduated School of Medical and Dental Science
Course for Molecular and Cellular Medicine/Molecular Neuroscience and Brain Disese/Neurology
(Director: Prof. Masatoyo NISHIZAWA)

要　旨

筋萎縮性側索硬化症ALSでは，運動神経細胞に認められる封入体の構成成分としてTAR DNA - binding protein of 43kDa（TDP - 43）が同定され，TDP - 43はALSの病態に関与していると想定される．TDP - 43はmRNA前駆体のスプライシングを調節する機能を有し，正常では核に存在する．しかし，ALSの運動神経細胞では，TDP - 43は細胞質へ移動し封入体を形成する．このことから，TDP - 43の機能異常が本症の背景にあると推察されているが，ALSの病態に直接関与するTDP - 43機能については判明していない．ALSの運動神経細胞では，ゴルジ装置の断片化，さらに小胞体やミトコンドリアなどの細胞内小器官の異常も指摘されてきた．ゴルジ装置と小胞体は互いに膜構造を共有し，また小胞体とミトコンドリアは密着しており，その機能，形態維持に密接な関係をもつ．しかし，TDP - 43の機能とこれら細胞内小器官との関連は不明であった．筆者は，TDP - 43の発現を抑制したHela細胞，COS7細胞，U87MG細胞では，ゴルジ装置が断片化することを示した．さらに小胞体の網状構造が減少すること，小胞体の網状部と近接するミトコンドリアが減少することを見いだし，TDP - 43の発現抑制が細胞内小器官に広汎な構造変化を引き起こすことを示した．以上の結果より，TDP - 43の機能低下による細胞内小器官の構造変化が，ALSの病態機序の背景にある可能性を示した．

キーワード：TAR DNA - binding protein of 43kDa（TDP - 43），筋萎縮性側索硬化症，ゴルジ装置，小胞体網状構造，ミトコンドリア

はじめに

筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis：ALS）は，成人期に発症し，進行性の筋萎縮と筋力低下をきたし，呼吸不全により致死性の経過をたどる神経変性疾患である．病理学的には，上位および下位運動神経細胞の変性と脱落を認め，残存する運動神経細胞にBunina小体，ユビ

Reprint requests to:Yuko ARIIZUMI
Department of Neurology
Brain Research Institute Niigata University
1 - 757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8585 Japan

別刷請求先：〒951 - 8585　新潟市中央区旭町通1 - 757
新潟大学脳研究所神経内科学教室　　有 泉 優 子

キチン陽性のskein様封入体を認めることが特徴である．ユビキチン陽性のskein様封入体にはTAR DNA-binding protein of 43kDa（TDP-43）が含まれる[1)2)]．さらに，家族性および孤発性のALSにて，TDP-43遺伝子変異が報告された[3)-12)]．これらの事実より，TDP-43はALSの病態に一次的に関与していると考えられている．

TDP-43は，エイズウィルスのHIV-1遺伝子に結合する蛋白として同定された蛋白である[13)]．N末側に核内移行シグナル，中央部に核外移行シグナルを持ち，核に優位に局在するが，核内外を移動する[14)]．C末側には2つのRNA認識モチーフ配列とglycine-rich domainを持つ[15)]．不均一核内リボ核酸蛋白質（heterogeneous nuclear ribonucleoproteins: hnRNP）の一つで，RNA認識モチーフ配列でmRNA前駆体と結合し，glycine-rich domainで他のhnRNPと結合して，mRNA前駆体のスプライシングに寄与する[16)-18)]．TDP-43がスプライシングに関与する遺伝子としては，cystic fibrosis transmembrane conductance regulator[19)]，survival motor neuron[20)]遺伝子が知られているが，ALSの病態に直接関係するような遺伝子のスプライシング異常は報告されていない．そのため，スプライシング調節機能以外の新たなTDP-43の機能が，ALSの病態に関与している可能性も考えられる．

ALSでは，病理学的特徴として，小胞体，ゴルジ装置等の細胞内小器官の構造異常が生じている．細胞内小器官の異常としては，粗面小胞体の異常を示唆するcentral chromatolysis[21)22)]，小胞体構造の拡大や断裂[23)]，ゴルジ装置の断片化が知られている[24)]．細胞内小器官とTDP-43との関連について，TDP-43が核から消失し，細胞質内封入体を形成した脊髄前角細胞において，ゴルジ装置の断片化が報告されている[25)]．さらにTDP-43は粗面小胞体に局在することが報告されている[26)]．しかし，TDP-43の機能と細胞内小器官との関連は明らかではない．

本論文において，筆者はTDP-43の新たな機能としてTDP-43が細胞内小器官の構造維持に関わる可能性を考え，TDP-43の発現を抑制した培養細胞にて細胞小器官の構造を検討し，ゴルジ装置が断片化することを示した．さらに，小胞体の網状構造が減少すること，小胞体網状部と近接するミトコンドリアが減少することを見いだした．この知見は，TDP-43が細胞内小器官の形態維持に関与する可能性を示した．本成果により，ALSの病態機序として，TDP-43の封入体形成によりTDP-43の機能低下がもたらされ，このため細胞内小器官の広汎な構造変化が引き起こされる可能性を提示するものである．

方　法

siRNAを用いたTDP-43発現抑制

siRNAはON-TARGET plus SMART pool Human TARDBP（L-012394-00, Thermo Scientific Dharmacon），陰性コントロールとしてON-TARGET plus Control Pool Non-Targetting pool（D-001810-10-20, Thermo Scientific Dharmacon）を使用した．HeLa，U87MG（ヒトグリオーマ由来），COS7細胞（サル腎臓由来）は37℃，5％CO_2条件下で10％FBSを含むDulbecco's modified Eagle Medium（DMEM, Gibco BRL, USA）で培養した．6 well dishに細胞播種24時間後，およそ50％コンフルエントとなった細胞に，トランスフェクション試薬Lipofectamine™ RNAiMAX（Invitrogen）7.5 μl/wellと，siRNA濃度が40nM/wellとなるように，それぞれOpti-MEM（Gibco）にて希釈し，混和後，各wellに添加した．2回目のsiRNAのトランスフェクションは，1回目のトランスフェクションの後72時間培養後，細胞を6 well dishに播きなおし，24時間後に行った．siRNAの発現抑制効率の確認はウェスタンブロット解析にて行った．

ウェスタンブロット解析

細胞dishを氷上に静置しcold PBSで洗浄後，lysis buffer（150mM NaCl, 50mM Tris-HCl（pH 7.4），0.5％NP-40, 0.5％Sodium deoxycholate, 5mM EDTA, 使用時にProtease inhibitor cocktailを添加）250 μl/wellを添加し，5分後にcell

scraperを用いて回収した．4℃/14,000rpm/5分間遠心後，上清を回収し，BCA Protein Assay kit（Thermo）で総蛋白量を測定した．核，細胞質，膜構造分画化方法は後述する．得られたサンプルは，超純水で総蛋白量をあわせ，等容量のsample buffer（95％Laemmli sample buffer（BIO RAD），5％β-mercaptoethanol（SIGMA））を加え，95℃で5分間熱変性を行った．10％ポリアクリルアミドゲルSuper Sep™ Ace（Wako）を用いたSDS-PAGEで蛋白を分離し，0.45μm PVDFメンブレン（Millipore，USA）に転写した．転写メンブレンをblocking buffer（5％Skim Milk，0.05％Tween20/PBS（Phosphate Buffered Saline））で室温1時間マスキングし，blocking bufferで希釈した一次抗体（monoclonal anti-TARDBP（TDP-43）antibody（1:2500または1:5000; Abnova），rabbit anti-TARDBP antibody（1:5000; Proteintech），monoclonal anti-BIP/GRP78 antibody（1:10000; BD Bioscience），chicken anti-GAPDH antibody（1:40000; Millipore），rabbit anti-Histone H4 antibody（1:2000; upstate），rabbit anti-VCP antibody（1:500; BETHYL），rabbit anti-p47 antibody（1:500; SantaCruz））を4℃，一晩かけ抗体反応を行った．反応後wash buffer（0.1％Tween20/ PBS）にて洗浄し，blocking bufferで希釈した2次抗体を室温1時間反応させ，再度wash bufferにて洗浄後，Immobilon Western HRP substrate（Millipore，USA）で検出した．

小胞体の蛍光標識

培養細胞を6 well dishに播種，24時間後，96時間後にTDP-43およびcontorl siRNAを2回トランスフェクションした．さらに24時間後に，Opti-MEM（Gibco）を用いて，小胞体に局在して糖蛋白の折りたたみやカルシウムホメオスターシスの維持に働くcalreticulinと，緑色蛍光蛋白（Azami-Green）との融合ベクター（ER-targeted mAG1 Expression Plasmid，pER-mAG，AM-V0202，MBL）4μg/wellと，Lipofectamine™ 2000（Invitrogen）10μ/wellの希釈溶液を作成，両者を混合した後，培養細胞に添加，トランスフェクションし発現させた．トランスフェクション24時間後に0.25％EDTA/Trypsinにて細胞を遊離し，35mm glass-bottom dish（MATSUNAMI）に捲きなおし，24時間後に生細胞にて小胞体形態を観察した．広範囲に小胞体の網状構造[27]を認める網状構造細胞と，網状構造が減少し（50％以下），核周囲からシート状構造の小胞体がびまん性に広がって分布するびまん性構造細胞とに分類し，頻度を解析した．また観察した細胞におけるTDP-43の発現抑制効率については，pER-mAGのトランスフェクション後の細胞の一部を，観察と同日に4％パラホルムアルデヒドで固定し，その後monoclonal anti-TARDBP antibody（1:1000; Abnova）を用いて免疫染色を行い，100細胞における発現抑制率（P）を算出した．次に，(1)｛発現抑制群の観察細胞数｝×Pにて，観察した細胞中の，TDP-43の発現が抑制されたと予測される細胞数を求める，(2)｛発現抑制群の観察細胞数｝×（1-P）×｛コントロール細胞群での各形態の割合｝を計算し，発現細胞群に混ざっていると予想される，TDP-43の発現が抑制されていない細胞の，各形態の数を算出する，(3)｛発現抑制細胞での各形態の細胞数｝から，(2)で得られた細胞数を引く，(4)(1)および(3)の結果から，補正後の形態ごとの割合を求めた．

免疫染色法

2回目のsiRNA導入の72時間後に8 well chamber slide（IWAKI）に播き直し，24時間培養した．小胞体観察を行う検体は，2回目のsiRNA導入24時間後に，pER-mAGをトランスフェクションした細胞を用いた．PBS（Dulbecco's Phosphate Buffered Saline（SIGMA））で2回洗浄後，4％パラホルムアルデヒド/PBS，pH 7.2にて37℃，5分固定した．PBSにて2回洗浄後，0.1％Triton-X100/PBS，10分にてパーマライズし，1％BSA/PBSにて30分ブロッキングを行い，1％BSA/0.05％Triton-X100/PBSで希釈した1次抗体（mouse monoclonal anti-TARDBP antibody（1:1000; Abnova），rabbit anti-TARDBP antibody

(1:800; Proteintech)，monoclonal anti-GM130 antibody (1:1000; BD Bioscience)，rabbit anti-TGN46 antibody (1:500, SIGMA)，monoclonal anti-cytochrome C antibody (1:1000; BD Pharmingen)) を4℃で一晩静置，反応させた．反応後に0.05％Triton-X100/PBSにて5分3回洗浄し，2次抗体 (Alexa fluor anti-rabbit または anti-mouse，488または594，各1:500) を1次抗体と同じbufferで希釈し，1時間室温で反応させ，0.05％Triton-X100/PBSにて5分3回洗浄した．β-tubulin染色時は，0.2％Triton-X100/PBS，15分にてパーマライズし，1％BSA/PBSにて30分ブロッキングを行い，1％BSA/0.1％Triton-X100/PBSで希釈した1次抗体 (rabbit anti-β-Tubulin antibody (1:50; Cell Signaling)，monoclonal anti-TARDBP antibody (1:1000; Abnova) の2重染色) を4℃で一晩静置，反応させた．反応後に0.1％Triton-X100/PBSにて5分3回洗浄し，2次抗体を1時間室温で反応させ，0.1％Triton-X100/PBSにて5分3回洗浄した．最後にVectashield Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories Inc., USA) にて封入し，蛍光顕微鏡 (Nicon TE300, JAPAN) または共焦点レーザー顕微鏡 (Nicon TE2000-U, JAPAN) で観察した．

ミトコンドリア，小胞体の画像解析

小胞体は蛍光標識法で示した手法で標識し，トランスフェクション後48時間で8 well chamberに蒔き直し，72時間後に固定した．続いて抗cytochrome C抗体を用いて蛍光免疫染色を行った．共焦点レーザー顕微鏡にてそれぞれの画像を取得し，AquaCosmos (Hamamatsu Photonics) を用いて解析した．小胞体の網状構造部に計測線を引き，線上のピクセルごとの輝度を解析し，グラフ化した．ピクセル幅5以上，輝度の差が5以上の波をピークとし，ピーク数をカウントすることにより，小胞体網状構造と，ミトコンドリアネットワークの分布数と位置を確認した．その中で，小胞体とミトコンドリアが共局在，もしくは接しているピークの数を小胞体のピーク数で割ることより，小胞体網目構造の中で，ミトコンドリアネットワークが接している割合を算出した．

ショ糖密度勾配遠心法およびRIPA bufferを用いた蛋白抽出

4週齢および12週齢のマウスの凍結脳組織に，組織重量の10倍量のTris-HCl buffer (10mM Tris-HCl，1mM EGTA，1mM dithiothreitol，0.25M Sucrose，1mM Na3VO4，5mM NaF，protease inhibitors) を加えてホモジナイズし，1,400×g/4℃/10分遠心処理を行い，上清 (S1) とpellet (P1) に分けた．S1を100,000×g/4℃/60分遠心処理し，S2とP2に分け，S2をcytosolic fractionとした．残存したpellet (P2) をTris-HCl bufferで洗浄した後，1％TritonX-100 buffer (Tris-HCl buffer，1％TritonX-100) を加え氷上で30分静置し，その後ホモジナイズし，氷上でさらに5分静置した．懸濁液を18,000×g/4℃/30分遠心処理を行い，S3とP3に分け，S3を膜分画 (細胞膜，細胞小器官) とした．P1に0.25M sucrose buffer (0.25M sucrose，10mM Tris-HCl，5mM $MgCl_2$，1mM dithiothreitol，0.1％TritonX-100，0.5mM phenylmethylsulfonyl fluoride) を加え再懸濁し，さらに2倍量の2.3M sucrose buffer (2.3M Sucrose，10mM Tris-HCl，5mM $MgCl_2$，1mM dithiothreitol，0.5mM phenylmethylsulfonyl fluoride) を加えて，混合液を2.3M sucrose bufferに重層し，12,400×g/4℃/60分の遠心処理を行った．得られたpelletに2％SDS buffer (Tris-HCl buffer，2％SDS) を加え，室温で10分間，回転混和し，超音波処理をした．18,000×g/10℃/30分遠心処理を行い，S4を核分画とした．

同様に，組織重量の10倍量のRIPA buffer (50mM Tris HCl，150mM NaCl，1％Nonidet P-40，0.5％Sodium deoxycholate，0.1％SDS，protease inhibitors) を加えて凍結脳組織をホモジナイズした．4℃で20分回転混和し，超音波処理をした後，18,000×g/4℃/30分で遠心処理を行い，その上清をRIPA whole画分とした．

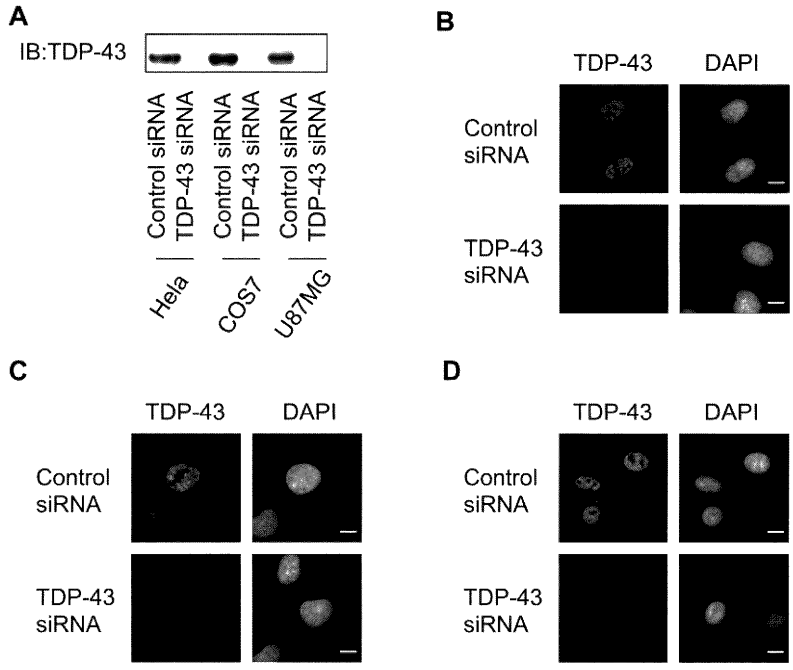

図1　TDP-43ノックダウン効率の検討

Hela，COS7，U87MG細胞において，siRNAによるTDP-43発現抑制効率を，ウェスタンブロット法と免疫染色法にて確認した．

（A）細胞播種後24時間と96時間後に，TDP-43もしくはコントロールsiRNAを2回導入し，導入終了後72時間で細胞を回収した．得られた細胞溶解液を用いて，抗TDP-43抗体によるウェスタンブロット法にて検討した．

（B-D）2回目のsiRNA導入72時間後に，4％パラホルムアルデヒドにて固定し，抗TDP-43抗体による蛍光免疫染色を行い，TDP-43の発現を確認した．（B）Hela細胞，（C）COS7細胞，（D）U87MG細胞．左はTDP-43，右はDAPI画像を示す．TDP-43 KD：TDP-43ノックダウン．（スケールは10μm）

免疫沈降法

Hela細胞を6 well dishで培養し，siRNAを用いて発現抑制した後，RIPA buffer（組成は前述の通り）にて回収した．超音波処理をし，14,000rpm/4℃/20分で遠心処理後，上清を400μl抽出した．抽出液に抗体（rabbit anti-TARDBP antibody (proteintech)，rabbit anti-VCP antibody（BETHYL），rabbit anti-p47 antibody（SantaCruz））2.5μg加えて2時間反応させ，引き続きconjugated Immobilized Protein A（PIEARCE）25μlを1時間反応させた．反応後，2,000rpm/室温/3分遠心し，残存したペレットをRIPA bufferで洗浄後，sample bufferを加え95℃，5分加熱し，2,000rpm/室温/1分遠心した．得られた溶液はウェスタンブロット解析にて検討した．

結　　果

TDP-43の発現抑制細胞でのゴルジ装置の形態変化

Hela細胞，COS7細胞，U87MG細胞を対象とし，siRNAによるTDP-43の発現抑制効率についてウェスタンブロット法にて検討した．siRNAの2回の導入により，Hela，COS7細胞では検出レベル以下に，U87MGでも十分な蛋白量の減少を認め（**図1A**），さらに，抗TDP-43抗体を用い

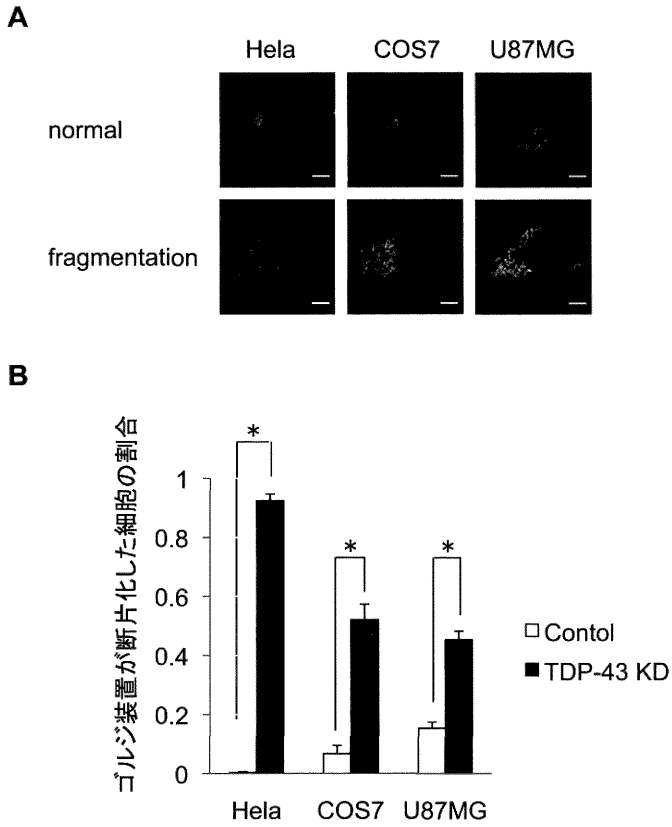

図2　TDP-43発現抑制による，ゴルジ装置の形態変化

TDP-43もしくはコントロールsiRNAを導入72時間後に，シス嚢蛋白GM130に対する抗体と抗TDP-43抗体にて，蛍光二重免疫染色を行った．TDP-43 siRNA処理群では，TDP-43の発現抑制が確認できた細胞を対象とした．TDP-43 KD：TDP-43ノックダウン

(A) Hela, COS7, U87MG細胞における，ゴルジ装置の正常形態（上段：normal）と，断片化形態（下段：fragmentation）を示す．ゴルジ装置の正常形態は，Hela細胞とU87MG細胞では，核周囲に層構造を構築しているが，COS7細胞はドーナツ型を示している．（スケールは10 μm）

(B) コントロール細胞と，TDP-43発現抑制細胞においてゴルジ装置の形態を観察し，ゴルジ装置が断片型を示す細胞の頻度を検討した（n=100）．グラフは3回の実験における平均値±標準誤差を示す．2群間比較は，Student-T法にて行った（*: $p < 0.005$）．

た蛍光免疫染色法でも十分な発現抑制効率を確認した（**図1B-D**）．核内にTDP-43が全く認められない細胞の割合は，平均でHela細胞88 %，COS7細胞95 %，U87MG細胞80 %であった．また，いずれの培養細胞も，TDP-43発現抑制後にアポトーシスの指標となるDAPI染色でのクロマチン凝集を認めなかった．このことから，本条件下でのTDP-43の発現抑制はアポトーシスを誘導しないと結論した．

次に蛍光免疫染色法にて，TDP-43の発現抑制下でのゴルジ装置の形態を検討した．正常細胞においても，ゴルジ装置は分裂期では断片化する．そのため，非分裂期細胞として，細胞が独立して存在し，核の辺縁が平滑で，核小体を同定できる

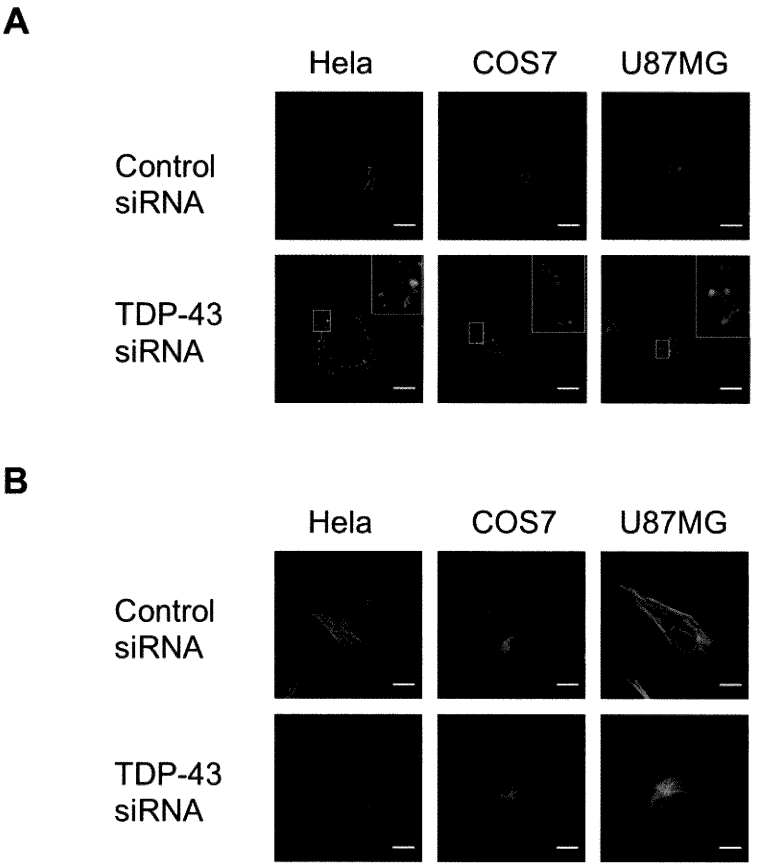

図3　ゴルジ装置の層構造の検討，およびゴルジ装置断片化細胞における，βチューブリン構造の検討

（A）コントロールsiRNA処理群（上段）とTDP-43 siRNA処理群（下段）において，ゴルジ装置の，シス/トランス嚢の局在を検討した．抗TGN46抗体（緑）と抗GM130抗体（赤）を用いた蛍光二重免疫染色像の，重ね合わせ画像を示す．シスおよびトランスの両マトリックスが共局在する部位は黄色に観察される．下段右上の白線内画像は，中央部の枠線内の拡大図．左（Hela細胞），中央（COS7細胞），右（U87MG細胞）画像を示す．スケールは10μm.

（B）コントロール細胞（上段）とTDP-43発現抑制細胞（下段）のβチューブリン染色像を示す．

細胞のみを解析した．Control siRNA処理群，非処理群でのゴルジ装置の形態は，Hela細胞では核に沿った層状，COS7細胞は円形状，U87MG細胞は層状に近い形態を示した（**図2A 上段**）．TDP-43発現抑制群では，いずれの細胞でも，TDP-43の発現抑制によりゴルジ装置の断片化を認め（**図2A 下段**），解析の結果では，観察細胞の50％以上で，ゴルジ装置の断片化を認めた（**図2B**）．

ゴルジ装置は層状構造をなすが，粗面小胞体側をシス嚢，反対側をトランス嚢という．粗面小胞体で合成された蛋白質はシス嚢から取り込まれ，トランス嚢から分泌され，このシス嚢－トランス嚢の方向性がゴルジ装置の機能において重要である[28]．そこで断片化されたゴルジ装置でのシス嚢とトランス嚢の関係を検討するため，シス嚢蛋白質GM130とトランス嚢蛋白質TGN46の抗体を用

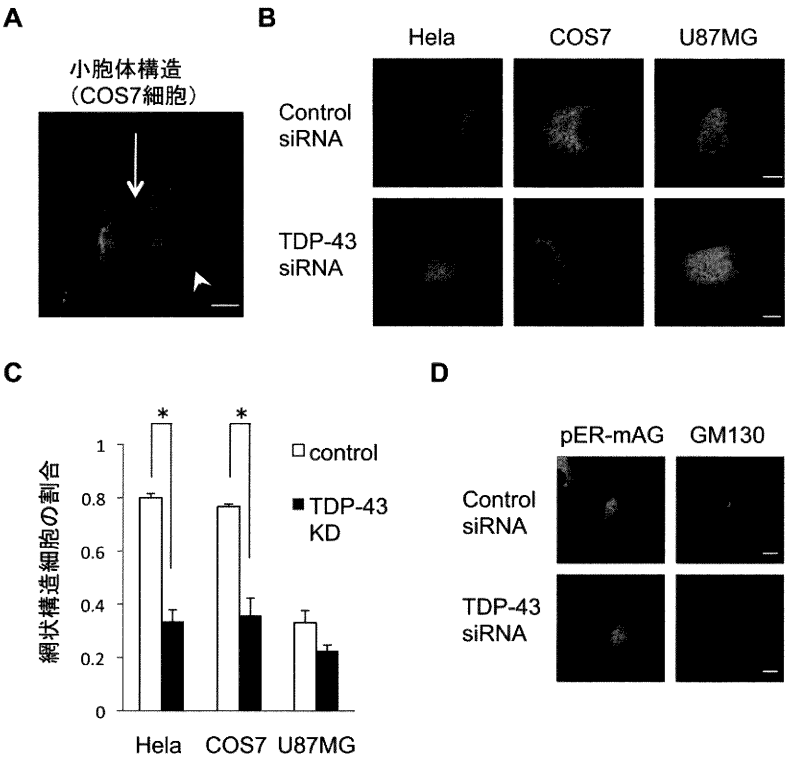

図 4　TDP-43 発現抑制細胞での小胞体構造の検討

(A) 正常の小胞体構造．小胞体局在蛋白 calreticulin と緑色蛍光蛋白の融合蛋白発現ベクター (pER-mAG) を導入し，48 時間後，小胞体構造を生細胞にて観察した．核周囲のびまん性に蛍光が認められる部分（矢印）はシート状構造，周囲に広がる網目状の部分（矢頭）は網状構造を示す．細胞は COS7 細胞．スケールは 10 μm.

(B) 各細胞での代表的な小胞体構造．上段はコントロール群で認められた，小胞体の網状構造が広く保たれている細胞（網状構造細胞）．下段は，TDP-43 発現抑制群で認められた，網状構造が減少し，細胞質の半分以上がシート状構造を示す細胞（びまん性構造細胞）．スケールは 10 μm.

(C) コントロール細胞（白箱）と TDP-43 発現抑制細胞（黒箱）での，小胞体構造（網状構造細胞，あるいはびまん性構造細胞）により分類し頻度を比較．Hela, COS7 細胞 (n=60)，U87MG 細胞 (n = 50) で検討した．グラフは，各細胞群における網状構造細胞の頻度についての，3 回の実験の平均値を示す．エラーバーは±標準誤差を示す．2 群間比較は，Student-T 法にて行った（*：$p < 0.005$）.

(D) ゴルジ装置と小胞体の構造の関連．pER-mAG ベクター導入 48 時間後に 4 %パラホルムアルデヒドで固定し，続いてゴルジ装置のシス嚢蛋白 GM130 に対する抗体で蛍光免疫染色を行った．図は Hela 細胞の結果を示す．上段はコントロール細胞，下段は TDP-43 発現抑制細胞．左が pER-mAG による小胞体．右が同一細胞における抗 GM130 抗体によるゴルジ装置．スケールは 10 μm.

いて 2 重染色を行った．正常なゴルジ装置では，いずれの細胞においても，シス嚢とトランス嚢は隣接して存在していた（**図 3A 上段**）．断片化したゴルジ装置でも，多くのゴルジ断片ではシス嚢，トランス嚢が共局在，または隣接していたが，GM130 のみ，あるいは TGN46 のみで染色されるゴルジ断片も認めた（**図 3A 下段**）．

また，細胞内小器官の位置，形態形成は微小管

の影響をうける[29]．TDP-43発現抑制によるゴルジ装置の形態変化が，微小管の構造異常による二次的なものかを確認するため，微小管構成蛋白であるβチューブリンに対する蛍光免疫染色法にて微小管の構造を検討した．いずれの細胞においても，TDP-43発現抑制細胞群でβチューブリンの構造に変化は認めなかった（**図3B**）．

TDP-43の発現抑制細胞での小胞体の形態変化

ゴルジ装置は，構造上，小胞体と密接な関係にある．そこで，主に小胞体腔内に存在するcalreticulinと緑色蛍光蛋白（Azami-green）の融合ベクターを用いて，小胞体の構造について検討した．観察された小胞体構造の形態から，広汎な網目状の構造を認める群（網状構造細胞）と，その構造が乱れ，蛍光が一様に認められる群（びまん性構造細胞）に大別した（**図4A, B**）．TDP-43の発現抑制群においては，Hela細胞とCOS7細胞でびまん性構造細胞の増加を認めた（**図4C**）．一方U87MG細胞では，正常でもびまん性構造細胞が多く，発現抑制後も変化は認めなかった（**図4C**）．核周囲にゴルジ装置が局在している細胞では網状構造を保っていたが，ゴルジ装置が断片化し細胞質に広く分布する細胞では，小胞体はびまん性構造を示した（**図4D**）．

TDP-43の発現抑制細胞での小胞体ーミトコンドリアネットワークの検討

ミトコンドリアは小胞体に隣接し一部結合し，小胞体との間でリン脂質やカルシウムのやりとりを行っている[30)31]．小胞体の構造変化がミトコンドリアの形態に影響を及ぼす可能性を考え，TDP-43の発現抑制条件下でのミトコンドリアの形態，ゴルジ装置，小胞体との位置関係を検討した．正常細胞では，ミトコンドリアは小胞体に添って細長くつながったネットワーク様に観察された（**図5A**）．TDP-43発現抑制群では，すべての細胞で，ミトコンドリアのネットワークが分断され，分布密度が減少した（**図5A下段**）．次にミトコンドリアとゴルジ装置の局在を，2重蛍光免疫染色法にて検討した（**図5B-D**）．ゴルジ装置が集合して存在している部分には，ミトコンドリアネットワークは認めなかった．一方，ゴルジ装置が断片化している細胞では，ミトコンドリアネットワークはゴルジ装置とは無関係に分布していた．さらに，小胞体とミトコンドリアの共局在について共焦点レーザー顕微鏡で検討した（**図5E, F**）．小胞体の中で，ミトコンドリアが共局在，もしくは隣接している小胞体の割合を求めると，TDP-43発現抑制細胞では，コントロール細胞に比して，ミトコンドリアと共局在，もしくは隣接している小胞体の割合が減少していた（**図5G**）．

TDP-43の細胞内局在とVCP，p47との関連についての検討

TDP-43の細胞質内での局在を検討するため，マウス脳組織を核，膜，膜を除く細胞質分画に分離し，ウェスタンブロット法にて検討した結果，TDP-43は核分画のほか，膜分画にも認めた（**図6A**）．次に，TDP-43がゴルジ装置，および小胞体の構造に関与する機序について検討した．TDP-43が，これらの構造を維持する蛋白質に影響を与える可能性を考え，候補蛋白質として，VCP（valosin-cintaining protein）とp47を想定した[32)33]．VCPは補因子であるp47と協調して，小胞体とゴルジ装置の構造維持，細胞分裂後の再構成に関与している．さらに，TDP-43のプロテオーム解析ではTDP-43とVCPとの結合が示唆されている[34]．まず，共免疫沈降法にてTDP-43とVCP，p47との蛋白ー蛋白間結合を検討したが，内在性のTDP-43，VCP，p47間で直接結合を示す結果は得られなかった（**図6B**）．また，TDP-43を発現抑制したHela細胞において，VCPおよびp47蛋白の発現量を検討したが，変化を認めなかった（**図6C**）．

考　　察

筆者は，TDP-43の発現を抑制することにより，Hela，COS7，U87MG細胞にて，ゴルジ装置の断片化が起こることを示した．ALSの運動神経細胞では，TDP-43が核から消失し，細胞質内に

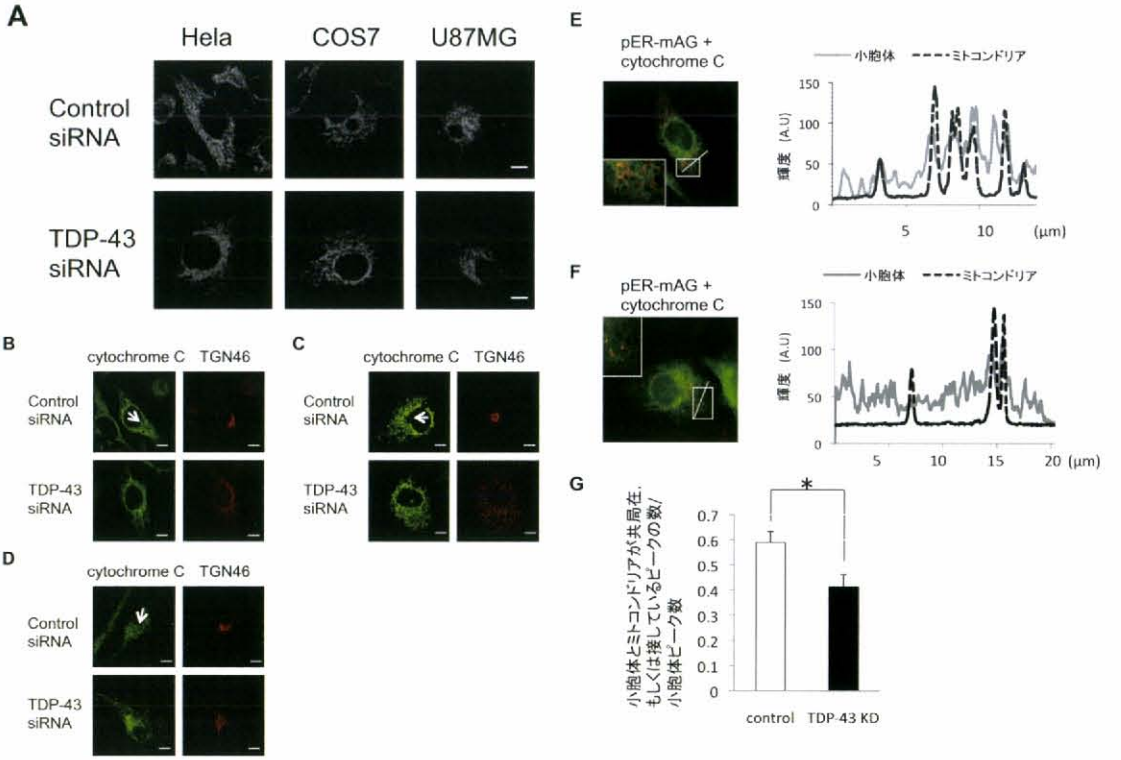

図 5　TDP-43 発現抑制でのミトコンドリアの構造と，小胞体，ゴルジ装置との関係

（A）TDP-43 siRNA もしくはコントロール siRNA を 2 回導入後 72 時間で固定し，抗 cytochrome C 抗体にてミトコンドリアを標識，さらに抗 TDP-43 抗体を用いて蛍光二重免疫染色にて観察した．図は抗 cytochrome C 抗体で得られた画像で，TDP-43 抗体で陽性なコントロール群（上段）と陰性な TDP-43 発現抑制群（下段）の，細胞内ミトコンドリアを示す．スケールは 10 μm.

（B）Hela 細胞，（C）COS7 細胞，（D）U87MG 細胞での，ミトコンドリアとゴルジ装置の局在を，抗 cytochrome C 抗体（緑，左）と，ゴルジ装置のトランス嚢蛋白 TGN46 に対する抗体（赤，右）による，蛍光二重免疫染色画像にて観察した．ゴルジ装置が正常である細胞（上段），ゴルジ装置が断片化した細胞（下段）を示す．また各細胞の左上段図中の矢印は，ゴルジ装置にて，ミトコンドリアの分布が抜けている部分を示す．スケールは 10 μm.

次に Hela 細胞にて，ミトコンドリアと小胞体局在について検討した（E-G）．2 回 siRNA 導入後 24 時間後に，小胞体局在蛋白 calreticulin と緑色蛍光蛋白融合ベクター（pER-mAG）を導入し，48 時間後に固定した．続いて抗 cytochrome C 抗体で蛍光免疫染色し，観察した．

（E）コントロール細胞，（F）TDP-43 発現抑制細胞における小胞体（緑）とミトコンドリア（赤）の重ね合わせ画像を示す（左）．図の左下は，枠線内の拡大図．右のグラフは，それぞれ図中の計測線上の輝度を数値化し，それぞれの構造ごとにグラフ化した．ピークは小胞体網状構造，もしくはミトコンドリアネットワーク構造の存在を示している．（A.U ： arbitrary unit）

（G）方法で示した通り，小胞体のピーク数と小胞体と共局在，もしくは隣接するミトコンドリアのピーク数をカウントし，小胞体の網状構造のうちミトコンドリアネットワークが密接している割合を計算した．グラフは，コントロール群（n=16）と発現抑制群（n=14）における平均値を示す．エラーバーは標準誤差を示す．2 群間比較は，mann - whitney 検定にて行った（* p ：< 0.05）．

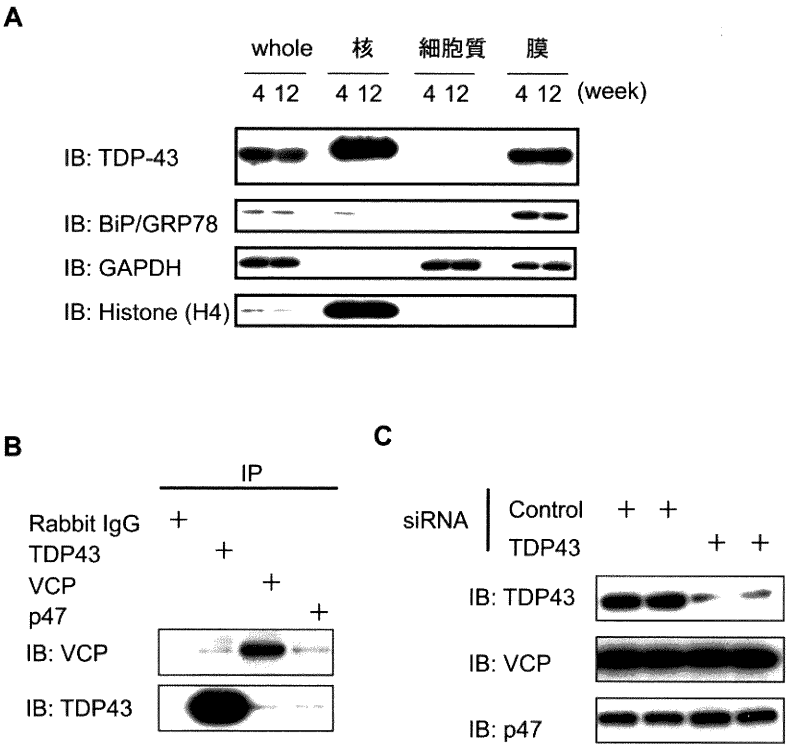

図6　TDP-43の膜分画への局在とVCP, P47との結合

（A）4週齢，および12週齢のマウス脳組織を，ショ糖濃度勾配遠心法で分画化した蛋白，およびRIPA bufferにて溶解し得られた蛋白を用いて，TDP-43抗体でウェスタンブロットを行い，TDP-43の細胞内局在を検討した（上段）．分画化の確認は，膜分画をBiP/GRP78，細胞質分画をGAPDH，核分画をHistoneH4抗体でウェスタンブロット法にて行った．

（B）免疫沈降法で，TDP-43とVCP，および補因子であるp47の蛋白-蛋白結合を検討した．Hela細胞にて，左上段で示した抗体を用いて免疫沈降し，得られた蛋白を抗VCP抗体（上段），抗TDP-43抗体（下段）を用いてウェスタンブロットを行い，それぞれ結合を確認した．

（C）Hela細胞において，TDP-43発現抑制による，VCP，p47タンパク発現への影響を検討した．TDP-43 siRNAもしくはcontrol siRNA処理を2回行った後，回収した蛋白にてウェスタンブロットを行った．上段のTDP-43抗体による結果にて，発現抑制効率を確認している．中段，下段は，それぞれVCP，p47のウェスタンブロットを示す．（2回の実験結果を並べて表示）

封入体を形成した細胞で，ゴルジ装置の断片化が報告されている[25]．これらの細胞では正常なTDP-43の機能が失われている可能性が推察されている．TDP-43の発現抑制によって，ゴルジ装置が断片化するという事実は，ALSの運動神経細胞で認められるゴルジ装置の断片化が，TDP-43の機能障害による可能性を示すものである．

ゴルジ装置の断片化は，アルツハイマー病[35]，多系統萎縮症[36]などの神経変性疾患においても報告されている．この現象は，微小管の構造，機能異常や[37]，アポトーシスによって二次的にも引き起こされる．しかし，筆者の系では微小管の構造変化は認めず，また，アポトーシスについては，アポトーシスの指標であるクロマチン凝集が起こっていないことを確認した．これらの結果より，今回観察したゴルジ装置の断片化は，微小管

の構造異常や細胞死による結果ではなく，TDP-43の発現抑制によって引き起こされたより直接的な現象と考えた．

この断片化がゴルジ装置の機能にどのような影響を与えているか，今回の検討では明らかではない．ゴルジ装置はシス嚢ー中間嚢ートランス嚢からなる膜様構造をしており，この方向性を持った構造体を蛋白質が通過することにより，蛋白質の修飾，プロセシング，選別輸送が行われる[28]．今回認められた断片化したゴルジ装置の多くは，シス嚢とトランス嚢を伴ったまま断片化していた．しかし，その層構造は乱れており，方向性を持つ膜様構造の破壊により，ゴルジ装置の機能が障害されている可能性が高いと考えた．実際，ゴルジ装置の断片化により，選別輸送が障害されるとする報告もある[38]．今後，このゴルジ装置の断片化がゴルジ装置の機能にどのような障害を与えるかについて，検討を加える必要がある．

さらに筆者は，TDP-43の発現を抑制することにより，Hela細胞とCOS7細胞において，小胞体の網目状構造が減少することを示した．従来，ALSの脊髄前角運動神経細胞では小胞体の異常が指摘されており，Central chromatolysisという粗面小胞体の構造変化を示唆する所見や[21)22)]，粗面小胞体膜上のリボゾームの減少[23)]，小胞体の不規則な拡大や断裂[22)23)]が認められる．小胞体とゴルジ装置間には膜輸送経路が存在しており，ゴルジ装置の断片化と合わせて考えると，小胞体ーゴルジ装置間の膜輸送の障害により，これらの形態変化が引き起こされる可能性が推察される．今後，ゴルジ装置の断片化，小胞体の構造異常，もしくは両者間の膜輸送のいずれが障害の起点となるか検討が必要である．一方，U87MG細胞ではTDP-43発現抑制細胞で形態上に差が認められなかった．U87MG細胞では，Hela細胞やCOS7細胞比して，正常でも網目状構造の広がりが少ない細胞が多かったため，今回の解析方法が，U87MG細胞での小胞体構造変化を検討するのに不適切であったと考えた．小胞体構造異常が神経系細胞でも適応されるか，今後の検討が必要である．

小胞体の構造障害により運動神経の細胞死をきたす疾患としては，遺伝性痙性対麻痺3型が知られている．本症の原因遺伝子産物atlastinはGTPaseであり，小胞体およびゴルジ装置に局在し，小胞体からゴルジ装置への膜輸送に関与し，さらにゴルジ装置や小胞体の形成にも関与している[39)40)]．本遺伝子の異常によりゴルジ装置，小胞体の形態異常が引き起こされ，運動神経細胞死が引き起こされる[39)40)]．全身に発現するatlastinの遺伝子異常によって引き起こされる小胞体ーゴルジ装置の形態異常が，運動神経細胞の選択的細胞死を引き起こすという事実は，運動神経細胞が，この構造異常に対して脆弱である可能性を示唆している．この例からも，筆者のTDP-43機能喪失モデルで認められた小胞体，ゴルジ装置の異常はALSでの選択的運動神経細胞死に関与している可能性がある．

また筆者は，本論文にて，TDP-43の発現を抑制した細胞でのミトコンドリアの形態異常も明らかにした．以前よりALSでは，ミトコンドリアの腫大，凝集などの形態異常が報告され，ミトコンドリアの機能異常が注目されていた[41)42)]．ミトコンドリアは滑面小胞体と結合し，滑面小胞体からカルシウムイオンを供給されている[31)]．TDP-43の発現を抑制した細胞では，主に滑面小胞体からなる細胞辺縁の網目状構造部において，ミトコンドリアの数の減少を認め，結果，小胞体と共局在するミトコンドリアも減少していた．小胞体とミトコンドリアの構造異常により，運動神経細胞を選択的に障害する疾患として，遺伝性末梢神経障害2型があげられる．本疾患の原因遺伝子であるmitofusin 2は小胞体とミトコンドリアを結合する[43)]．mitofusin 2の異常により小胞体とミトコンドリアが解離し，小胞体からミトコンドリアへのカルシウムイオンの供給が障害され細胞障害をきたす[43)]．mitofusin 2は全ての組織に広く発現しており，本異常で運動神経優位の細胞障害が起こることは，小胞体とミトコンドリアの解離に対して，運動神経細胞が脆弱であることを示唆する．同様の機序がALSでの病態機序の背景にあるか，今後，小胞体とミトコンドリアとの関係，ミ

トコンドリアの形態的な異常について，ALS患者やTDP-43機能喪失モデルマウスでの運動神経細胞にて検討を加える必要がある．

現時点で，TDP-43がゴルジ装置，小胞体の構造に変化をもたらす機序は不明である．筆者は，マウス脳組織においてTDP-43が膜分画に存在することを示した．この結果は，TDP-43が細胞内小器官に局在することを示す．次に，TDP-43がゴルジ装置の形成に関与する蛋白質と結合している可能性を考え，候補蛋白質として，TDP-43との結合が示唆され，ゴルジ装置の形成に寄与するVCPおよびp47について検討した[32)-34)]．興味深いことに，VCPは，TDP-43陽性の封入体をもつ遺伝性前頭側頭葉型認知症やALSの原因遺伝子としても知られている[44)-46)]．しかし，筆者の系では，TDP-43とVCP，p47間での蛋白ー蛋白間結合を認めなかった．VCPとTDP-43の結合を示した先行研究は，過剰発現系を用いて，質量分析計により解析していた[34)]．TDP-43は野生株であっても，過剰発現により凝集体を形成する．そのため，過剰発現系での先行研究では，凝集体により非特異的な蛋白間結合を同定した可能性も考えられる[47)-50)]．またTDP-43の発現を抑制した細胞において，VCPとp47蛋白の発現量を検討したが，これにも変化を認めなかった．これらの結果から，TDP-43の機能低下がVCPやp47を介してゴルジ装置の断片化を引き起こしている可能性は否定的と考えた．

本論文では，培養細胞においてTDP-43の発現抑制により，細胞内小器官の形態が広汎に変化することを示した．今後は，TDP-43がこれら細胞内小器官の形態の維持に関与する機構について，分子レベルでの解析をすすめ，その作用機序を明らかにする必要がある．また，TDP-43ノックアウトマウスやALSの脳，脊髄の運動細胞で同様の変化が認められるか，さらなる解析が必要である．

謝　辞

最後に，本研究をご指導いただきました新潟大学脳研究所神経内科学教授 西澤正豊先生，新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター分子神経疾患資源解析学分野准教授 小野寺理先生，新潟大学大学院医歯学総合研究科博士課程 志賀篤先生（現日本学術振興会特別研究員），佐藤達哉先生（現新潟大学脳研究所神経内科学），新潟大学大学院医歯学総合研究科修士課程 横尾麻理子先生（現デンカ生研），石平悠先生，桑原美咲先生に深謝いたします．

引用文献

1）Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretzschmar HA, Trojanowski JQ and Lee VM-Y: Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. Science（New York, N.Y.）314: 130-133, 2006.

2）Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y and Oda T: TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. Biochemical and biophysical research communications 351: 602-611, 2006.

3）Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, Bouchard J-P, Lacomblelz L, Pochigaeva K, Salachas F, Pradat P-F, Camu W, Meininger V, Dupre N and Rouleau GA: TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature genetics 40: 572-574, 2008.

4）Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC, Milliams KL, Buratti E, Baralle F, Belleroche J, Mitchell JD, Leigh PN, Al-Chalabi A, Miller CC, Nicholson G and Shaw CE: TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Science

(New York, N.Y.) 319: 1668 - 1672, 2008.

5) Gitcho MA, Baloh RH, Chakraverty S, Mayo K, Norton JB, Levitch D, Hatanpaa KJ, White CL, Bigio EH, Caselli R, Baker M, Al - Lozi MT, Morris JC, Pestronk A, Rademakers R, Goate AM and Cairns NJ: TDP - 43 A315T mutation in familial motor neuron disease. Annals of neurology 63: 535 - 538 2008.

6) 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: TDP - 43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. Annals of neurology 63: 538 - 542, 2008.

7) Rutherford NJ, Zhang Y - J, Baker M, Gass JM, Finch N a, Xu Y - F, Stewart H, Kelley BJ, Kuntz K, Crook RJP, Sreedharan J, Vance C, Sorenson E, Lippa C, Bigio EH, Geschwind DH, Knopman DS, Mitsumoto H, Petersen RC, Cashman NR, Hutton M, Shaw CE, Boylan KB, Boeve B, Graff - Radford NR, Wszolek ZK, Caselli RJ, Dickson DW, Mackenzie IR, Petrucelli L and Rademakers R: Novel mutations in TARDBP (TDP - 43) in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. PLoS genetics 19: e1000193, 2008.

8) Kühnlein P, Sperfeld A - D, Vanmassenhove B, Van Deerlin V, Lee VM - Y, Trojanowski JQ, Kretzschmar HA, Lucolph AC and Neumann M: Two German kindreds with familial amyotrophic lateral sclerosis due to TARDBP mutations. Archives of neurology 65: 1185 - 1189, 2008.

9) Daoud H, Valdmanis PN, Kabashi E, Dion P, Dupré N, Camu W, Meininger V and Rouleau G: Contribution of TARDBP mutations to sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Journal of medical genetics 46: 112 - 114, 2009.

10) Corrado L, Ratti a, Gellera C, Buratti E, Castellotti B, Carlomagno Y, Ticozzini L, Testa L, Taroni F, Baralle FE, Silani V and D'Alfonso S: High frequency of TARDBP gene mutations in Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis. Human mutation 30: 688 - 694, 2009.

11) Del Bo R, Ghezzi S, Corti S, Pandolfo M, Ranieri M, Santoro D, Ghione I, Prelle A, Orsetti V, Mancuso M, Sorarù G, Briani C, Angelini C, Siciliano G, Bresolin N and Comi GP: TARDBP (TDP - 43) sequence analysis in patients with familial and sporadic ALS: identification of two novel mutations. European journal of neurology 16: 727 - 732, 2009.

12) Lemmens R, Race V, Hersmus N, Matthijs G, Van Den Bosch L, Van Damme P, Dubois B, Boonen S, Goris A and Robberecht W: TDP - 43 M311V mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry 80: 354 - 355, 2009.

13) Ou SH, Wu F, Harrich D, García - Martínez LF and Gaynor RB: Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP - 43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. Journal of virology 69: 3584 - 3596, 1995.

14) Ayala YM, Zago P, D'Ambrogio A, Xu Y - F, Petrucelli L, Buratti E and Baralle FE: Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP - 43. Journal of cell science 121: 3778 - 3785, 2008.

15) Wang H - Y, Wang I - F, Bose J and Shen C - KJ: Structural diversity and functional implications of the eukaryotic TDP gene family. Genomics 83: 130 - 139, 2004.

16) Buratti E, Brindisi A, Giombi M, Tisminetzky S, Ayala YM and Baralle FE: 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. The Journal of biological chemistry 280: 37572 - 37584, 2005.

17) Ayala YM, Pantano S, D'Ambrogio A, Buratti E, Brindisi A, Marchetti C, Romano M and Baralle FE: Human, Drosophila, and C.elegans TDP - 43: nucleic acid binding properties and splicing regulatory function. Journal of molecular biology 348: 575 - 588, 2005.

18) Buratti E, Dörk T, Zuccato E, Pagani F, Romano M and Baralle FE: Nuclear factor TDP - 43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping. The EMBO journal 20: 1774 -

1784, 2001.
19) Bose JK, Wang I-F, Hung L, Tarn W-Y and Shen C-KJ: TDP-43 overexpression enhances exon 7 inclusion during the survival of motor neuron pre-mRNA splicing. The Journal of biological chemistry 283: 28852-28859, 2008.
20) 井上聖啓，平野朝雄：筋萎縮性側索硬化症の初期病変－全経過10ヶ月の1剖検例－．神経内科 11: 448-455, 1979.
21) 平野朝雄，井上聖啓：筋萎縮性側索硬化症の初期病変－ chromatolysis, spheroid, Bunina 小体の電顕的観察－．神経内科 13: 148-160, 1980.
22) Oyanagi K, Yamazaki M, Takahashi H, Watabe K, Wada M, Komori T, Morita T and Mizutani T: Spinal anterior horn cells in sporadic amyotrophic lateral sclerosis show ribosomal detachment from, and cisternal distention of the rough endoplasmic reticulum. Neuropathology and applied neurobiology 34: 650-658, 2008.
23) Mourelatos Z, Adler H and Gonatas NK: Fragmentation of the Golgi apparatus of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis revealed by organelle-specific antibodies. Neurobiology 87: 4393-4395, 1990.
24) Fujita Y, Mizuno Y, Takatama M and Okamoto K: Anterior horn cells with abnormal TDP-43 immunoreactivities show fragmentation of the Golgi apparatus in ALS. Journal of the neurological sciences 269: 30-34, 2008.
25) Sasaki S, Takeda T, Shibata N and Kobayashi M: Alterations in subcellular localization of TDP-43 immunoreactivity in the anterior horns in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Neuroscience letters 478: 72-76, 2010.
26) Voeltz GK, Rolls MM and Rapoport TA: Structural organization of the endoplasmic reticulum. EMBO reports 3: 944-950, 2002.
27) Polishchuk RS and Mironov AA: Structural aspects of Golgi function. Cellular and molecular life sciences 61: 146-158, 2004.
28) Thyberg J and Moskalewski S: Role of microtubules in the organization of the Golgi complex. Experimental cell research 246: 263-279, 1999.
29) Voelker DR: New perspectives on the regulation of intermembrane glycerophospholipid traffic. Journal of lipid research 44: 441-449, 2003.
30) Carafoli E: Historical review: Mitochondria and calcium: ups and downs of an unusual relationship. Trends in Biochemical Sciences 28: 175-181, 2003.
31) Kondo H, Rabouille C, Newman R, Levine TP, Pappin D, Freemont P and Warren G: p 47 is a cofactor for p 97-mediated membrane fusion. Nature 388: 75-78, 1997.
32) Uchiyama K, Totsukawa G, Puhka M, Kaneko Y, Jokitalo E, Dreveny I, Beuron F, Zhang X, Freemont P and Kondo H: p37 is a p97 adaptor required for Golgi and ER biogenesis in interphase and at the end of mitosis. Developmental cell 11: 803-816, 2006.
33) Freibaum BD, Chitta RK, High AA and Taylor JP: Global Analysis of TDP-43 Interacting Proteins Reveals Strong Association with RNA Splicing and Translation Machinery research articles. Journal of Proteome Research 9: 1104-1120, 2010.
34) Stieber A, Mourelatos Z and Gonatas NK: In Alzheimer's Disease the Golgi Apparatus of a Population of Neurons without Neurofibrillary Tangles Is Fragmented and Atrophic. Methods 148: 415-426, 1996.
35) Sakurai A, Okamoto K, Yaguchi M, Fujita Y, Mizuno Y, Nakazato Y and Gonatas NK: Pathology of the inferior olivary nucleus in patients with multiple system atrophy. Acta neuropathologica 103: 550-554, 2002.
36) Yoshiyama Y, Zhang B, Bruce J, Trojanowski JQ and Lee VM-Y: Reduction of detyrosinated microtubules and Golgi fragmentation are linked to tau-induced degeneration in astrocytes. The Journal of neuroscience 23: 10662-10671, 2003.
37) Graves TK, Patel S, Dannies PS and Hinkle PM: Misfolded growth hormone causes fragmentation of the Golgi apparatus and disrupts endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic. Journal of cell science 114: 3685-3694, 2001.
38) Orso G, Pendin D, Liu S, Tosetto J, Moss TJ, Faust JE, Micaroni M, Egorova A, Martinuzzi A,

McNew JA and Daga A: Homotypic fusion of ER membranes requires the dynamin - like GTPase atlastin. Nature 460: 978 - 983, 2009.

39) Rismanchi N, Soderblom C, Stadler J, Zhu P - P and Blackstone C: Atlastin GTPases are required for Golgi apparatus and ER morphogenesis. Human molecular genetics 17: 1591 - 1604, 2008.

40) Israelson A, Arbel N, Da Cruz S, Ilieva H, Yamanaka K, Shoshan-Barmatz V and Cleveland DW: Misfolded Mutant SOD1 Directly Inhibits VDAC1 Conductance in a Mouse Model of Inherited ALS. Neuron 67: 575 - 587, 2010.

41) Kawamata H and Manfredi G: Mitochondrial dys - function and intracellular calcium dysregulation in ALS. Mechanisms of ageing and development 131: 517 - 526, 2010.

42) Brito OM de and Scorrano L: Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. Nature 456: 605 - 610,2008.

43) Neumann M, Mackenzie IR, Cairns NJ, Boyer PJ, Markesbery WR, Smith CD, Taylor JP, Kretzschmar HA, Kimonis VE and Forman MS: TDP - 43 in the ubiquitin pathology of frontotempo - ral dementia with VCP gene mutations. J Neuropathol Exp Neurol. 66: 152 - 157, 2007.

44) Gitcho M a, Strider J, Carter D, Taylor - Reinwald L, Forman MS, Goate AM and Cairns NJ: VCP mutations causing frontotemporal lobar degener - ation disrupt localization of TDP - 43 and induce cell death. The Journal of biological chemistry 284: 12384 - 12398, 2009.

45) Johnson JO, Mandrioli J, Benatar M, Abramzon Y, Van Deerlin VM, Trojanowski JQ, Gibbs JR, Brunetti M, Gronka S, Wuu J, Ding J, McCluskey L, Martinez - Lage M, Falcone D, Hernandez DG, Arepalli S, Chong S, Schymick JC, Rothstein J, Landi F, Wang Y - D, Calvo A, Mora G, Sabatelli M, Monsurrò MR, Battistini S, Salvi F, Spataro R, Sola P, Borghero G, Galassi G, Scholz SW, Taylor JP, Restagno G, Chiò A and Traynor BJ: Exome Sequencing Reveals VCP Mutations as a Cause of Familial ALS. Neuron 68: 857 - 864, 2010.

46) Johnson BS, McCaffery JM, Lindquist S and Gitler AD: A yeast TDP - 43 proteinopathy model: Exploring the molecular determinants of TDP - 43 aggregation and cellular toxicity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 6439 - 6444, 2008.

47) Zhang Y - J, Xu Y - F, Cook C, Gendron TF, Roettges P, Link CD, Lin W - L, Tong J, Castanedes - Casey M, Ash P, Gass J, Rangachari V, Buratti E, Baralle F, Golde TE, Dickson DW and Petrucelli L: Aberrant cleavage of TDP - 43 enhances aggregation and cellular toxicity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106: 7607 - 7612, 2009.

48) Ash PE a, Zhang Y - J, Roberts CM, Saldi T, Hutter H, Buratti E, Petrucelli L, Link CD. Neurotoxic effects of TDP - 43 overexpression in C. elegans. Human molecular genetics 19: 3206 - 3218, 2010.

49) Wils H, Kleinberger G, Janssens J, Pereson S, Joris G, Cuijt I, Smits V, Ceuterick - de Groote C, Van Broeckhoven C, Kumar - Singh S. TDP - 43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107: 3858 - 3863, 2010.

（平成23年1月17日受付）