

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04986

研究課題名(和文)小胞体・ミトコンドリア膜間領域の破綻に基づくALS病態の統合的理解

研究課題名(英文) Disruption of the mitochondria-associated membranes as a general pathomechanism in amyotrophic lateral sclerosis

研究代表者

渡邊 征爾 (Watanabe, Seiji)

名古屋大学・環境医学研究所・助教

研究者番号：70633577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、筋萎縮性側索硬化症(ALS)において、小胞体とミトコンドリア間の膜接触領域(小胞体・ミトコンドリア膜間領域；MAM)の破綻が普遍的な病態であるという仮説の検証を行った。我々はMAMtrackerと名付けた新規のレポーター分子を作製し、多くのALS原因遺伝子によってMAMが破綻することを明らかにした。さらに、MAMの破綻によって、ALSの原因遺伝子産物でもあるTANK結合キナーゼ1(TBK1)の活性が著しく低下し、その原因はストレス依存的なMAM特異的ユビキチン化が障害されるためであることを明らかにした。本研究は、今後MAMを標的としたALS治療法開発の基盤となると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はこれまでにMAMの破綻がSOD1または1受容体の変異に伴うALSで共通した病態であることを明らかにした。本研究では、これら以外のALS原因遺伝子によってもMAMの破綻が引き起こされることを明らかにし、MAMの破綻がALSにおいて普遍的な病態であることが示唆された。特にTBK1活性化へのMAMの関与はMAMの新規機能として興味深く、今後のALS治療における重要な標的機序となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tested the hypothesis that disruption of the membrane contact region between the endoplasmic reticulum and mitochondria (ER-mitochondrial intermembrane region; MAM) is a general pathogenesis in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). We generated a novel reporter molecule named MAMtracker and demonstrated that the MAM is disrupted by various ALS-causing genes. Furthermore, we found that MAM disruption significantly reduces the activity of TANK-binding kinase 1 (TBK1), which is also the causative gene product of ALS, and that this is due to impaired stress-dependent MAM-specific ubiquitination. This study will provide the basis for future development of MAM-targeted ALS therapies.

研究分野：病態神経科学

キーワード：小胞体・ミトコンドリア膜間領域 1受容体 TANK結合キナーゼ1 筋萎縮性側索硬化症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動神経細胞の選択的な変性を特徴とする神経変性疾患である。我々は以前の研究で *SOD1* および *SIGMAR1* 遺伝子上の変異を原因とする ALS において、小胞体とミトコンドリアの近接領域 (MAM) の破綻が病態と深く関連していることを見出した。MAM には脂質やイオンの受け渡しやタンパク質分解などに関わるオルガネラの恒常性を維持するために重要な分子が集積しているおり、MAM の不調は小胞体とミトコンドリア、両者の機能不全を同時に引き起こすことが想定された。しかし、ALS の原因遺伝子は既に 20 種類が同定され、また ALS 患者の多くは遺伝的な背景を持たない孤発例であることから、MAM の破綻が ALS において普遍的に重要な病態であるかは不明であった。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では ALS における MAM の破綻が普遍性をもつかどうか、現在判明している ALS 原因遺伝子について網羅的に検討を行うこと、および MAM の破綻が神経細胞死を引き起こす新規の分子機序を同定することを目指して検討を行った。

3. 研究の方法

MAM の量や構造は動的に変化し、また MAM に関連すると報告のあるタンパク質も常に MAM の形成に関与するわけではないため、我々は MAM の量を可逆的かつ定量的に評価できる実験系の構築が必要となった。そこで、本研究では MAM 特異的に蛍光または発光をする新規の MAM レポーター分子である MAMtracker-Green/Luc を作製した (図 1) (MAMGreen, MAMLuc)。MAMGreen は Campbell 博士らの開発した二量体依存性緑色蛍光タンパク質 (ddGFP) を、MAMLuc は Promega 社の分割型ルシフェラーゼ (LgBiT/smBiT) を、それぞれ小胞体とミトコンドリアでバイシストロニックに発現するために P2A 自己切断配列でつないで作製した。これにより、生細胞における MAM を定量的に評価することが可能になった。

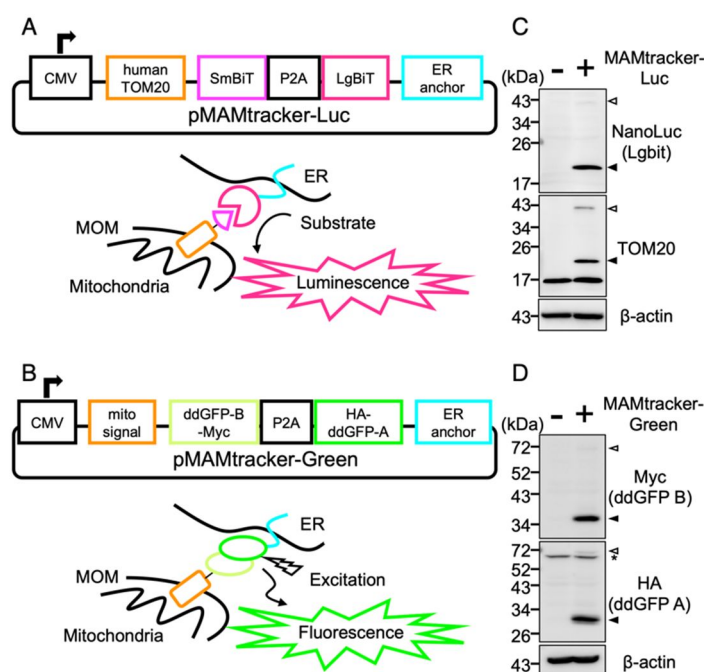


図 1 MAMtracker の作製

A MAMLuc の模式図。LgBiT と SmBiT が MAM で近接すると、ルシフェラーゼが再構成されて基質依存的に発光を生じる。なお、Promega 社の結果から SmBiT の解離定数 Kd は 190 μ M であり、細胞内で十分に可逆的であると想定される。

B MAMLuc の発現確認。P2A ペプチドにより自己開裂するため、各サブユニットはほぼ等量が独立に発現することを確認した。

C MAMGreen の模式図。基本は Luc と同等であるが、蛍光観察のため ddGFP に置換している。

D MAMGreen の発現確認。MAMLuc 同様に各サブユニットは自己開裂により、独立して発現している。

上記のレポーター分子を、我々が作製した ALS 原因遺伝子の発現ライブラリーと組み合わせることによって各種の ALS 原因遺伝子のマウス神経芽腫細胞 Neuro2a における過剰発現が MAM に与える影響を明らかにすることを目指した。

また、MAM の破綻が神経細胞死を引き起こす原因を明らかにするため、ALS 原因遺伝子産物のひとつでもある TANK 結合キナーゼ 1 (TBK1) に着目して解析を進めた。MAM が破綻するモデルとして、以前の研究でも使用した 1 受容体欠損マウスおよび変異 *SOD1* トランスジェニックマウスの脳および脊髄について、免疫組織化学染色や生化学的な MAM の単離によって、MAM の破綻が TBK1 に与える影響を解析した。さらに、本研究ではヒト子宮頸がん細胞 HeLa やマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) において、亜ヒ酸処理が TBK1 の MAM 依存的な活性化を引き起こす (後述) ことを見出し、亜ヒ酸処理をモデルにして細胞内の MAM 依存的な TBK1 活性化の分子機序を解析した。

4. 研究成果

MAMGreen/MAMLuc を用いて、約 20 種類の ALS 原因遺伝子で検討を行ったところ、およそ 8 割の遺伝子で MAM の減少が認められた (図 2)。一方、過剰発現により MAM を増加させた遺伝子は *SIGMAR1*, *TBK1*, *FUS* の 3 種類に限られ、また、これら 3 種類の遺伝子は機能喪失 (loss-of-function) によって ALS を発症することが知られていることから、いずれも MAM の破綻を示唆する結果と考えられた。従って、MAM の破綻は特定の遺伝子に限定されるのではなく、多くの原因遺伝子によって共通して引き起こされる普遍性の高い現象であることが明らかとなった。また、本研究で作製したレポーター分子 MAMtracker は可逆的な MAM 量の変化を追える点に大きな利点があり、これは今後の MAM 研究において有用なツールとして利用可能であると考えられる。

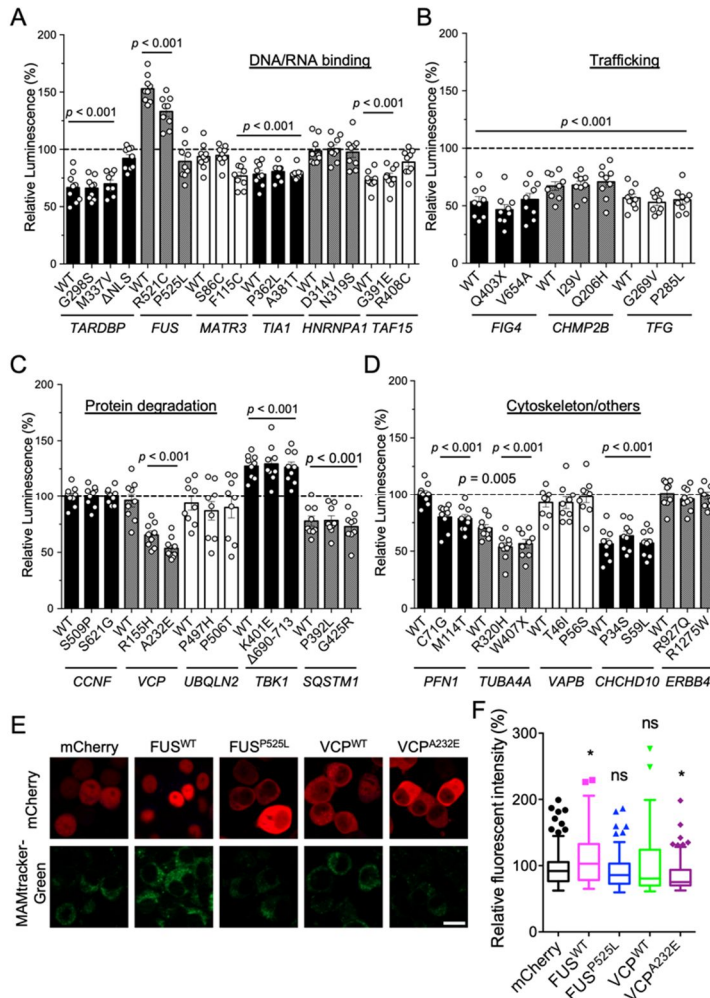


図 2 MAMtracker を用いた ALS 原因遺伝子の過剰発現による MAM 破綻スクリーニング

A-D ALS 原因遺伝子を各機能別 (A, DNA/RNA 結合; B, 細胞内輸送; C, タンパク質分解; D, 細胞骨格) に分類し、MAMLuc により細胞内 MAM 量の定量を行った。各遺伝子につき、既知の ALS 関連変異の中から比較的症例数の多いもの 2 種類を選択して検証した。結果、ほとんどの遺伝子で MAM 量の低下を認めた。

E and F MAMGreen による MAMLuc スクリーニング結果の確認。FUS および VCP を対象に MAMLuc の結果を蛍光観察で確認したところ、MAMLuc と一致して ALS 関連変異による MAM 量の有意な変化を確認できた。

一方、MAM が破綻する ALS モデルマウス (変異 *SOD1* マウス) の脊髄を用いてイムノプロットや免疫組織染色によって検討したところ、我々は *TBK1* の活性化が著しく低下していることを見出した (図 3)。このような MAM の破綻に関連した *TBK1* の不活性化は、別の MAM 破綻モデルである 1 受容体欠損マウスでも同様に観察されたことから、*TBK1* の不活性化は MAM の破綻に関連していると考えられた。一方、野生型マウスの組織を用いて *TBK1* の通常の組織における活性化レベルを検討したところ、*TBK1* の活性化は中枢神経系に特徴的で、肺や肝臓などの他組織よりも顕著に高かった。さらに ALS 患者脊髄組織を用いた検討を行った結果、遺伝的背景をもたない孤発性の ALS 患者でも *TBK1* の活性低下が見られることが明らかとなった。この結果は、上述の ALS において広範に MAM の破綻が引き起こされ得ることを示した MAMLuc のスクリーニング結果ともよく一致している。従って、MAM 依存的な *TBK1* の活性が中枢神経系の機能維持に重要であると予想され、その破綻が孤発性も ALS 病態と関連することが強く示唆された。

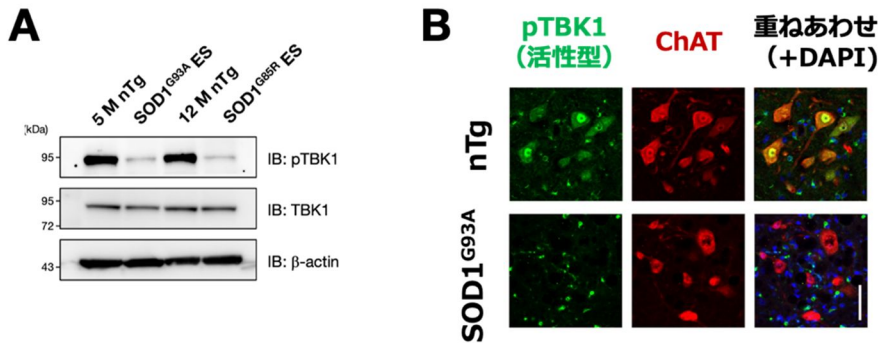


図 3 MAM の破綻によりマウス脊髄での TBK1 の活性が低下する

A MAM が破綻する ALS モデルマウスである変異 SOD1 トランスジェニックマウス (SOD1^{G93A}, SOD1^{G85R}) の終末期脊髄を用いたイムノブロット. 活性化型であるリン酸化 TBK1 (pTBK1) が野生型 (nTg) と比較して顕著に低下していた. TBK1 の総タンパク質量に変化は見られず、TBK1 の分解ではなく、活性化の阻害もしくは不活性化が生じていることが示唆された.

B 免疫組織染色による活性化型 TBK1 の減少. 野生型 (nTg) マウスの脊髄では、ChAT 陽性の脊髄前角運動神経細胞において、高いレベルの TBK1 の活性が見られた. ALS モデルマウスでは運動神経細胞における TBK1 の活性が顕著に減少していた.

そこで TBK1 の活性化がどのように引き起こされるのか検討するため、培養細胞を用いて各種の検討を行った。予想外なことに Neuro2a、HeLa、MEF、ヒト神経芽主細胞株 SHSY-5Y の各培養細胞では TBK1 の活性化がほとんど見られなかった。TBK1 の MAM 依存的な活性化を引き起こす因子を探索したところ、亜ヒ酸処理などのタンパク質恒常性に影響を与えるストレスが該当することが判明した。TBK1 は自然免疫系における重要なプレーヤーとしても知られ、確かに自然免疫系を活性化する刺激 (リポ多糖など) は TBK1 を活性化したが、その活性化に MAM の破綻は影響しなかった。従って、MAM を介した TBK1 の活性化は自然免疫応答とは独立であると考えられた。MAM を介した TBK1 の活性化には、TBK1 のユビキチン様ドメインが重要であったため、TBK1 はユビキチン化タンパク質により MAM ヘリクルートされて活性化されることが考えられた。そこで、その責任因子を同定するため、MAM の関与が指摘されている小胞体関連分解 (ERAD) に関わる E3 ユビキチンリガーゼを検討した結果、自己分泌運動因子受容体 (AMFR) を抑制することで亜ヒ酸処理に伴うユビキチン化と TBK1 の活性化を抑制できることが判明した。

MAM が破綻したモデルでは、TBK1 の活性低下に相関して細胞のストレス顆粒形成に遅延が見られた (図 4)。この原因を検討したところ、TBK1 の活性化によりオートファジーが誘導され、リボソーム関連タンパク質の分解が促進されていることが判明した。ストレス顆粒形成においては、翻訳装置を速やかに分解することで翻訳の停止と RNA の顆粒への誘導が行われるという既報告が存在し、それを前提とすると TBK1 の活性化はオートファジーを介した迅速な翻訳停止に貢献していることが示唆された。ストレス顆粒の形成遅延は HeLa 細胞において有意に細胞死を増加させ、またマウスに亜ヒ酸を飲水投与したところ、1 受容体欠損マウスでのみ、TBK1 の不活性化に相関して運動機能障害が見られることが判明した。以上の結果から、ストレス依存的な TBK1 の活性化は細胞のストレス耐性を維持するのに重要であり、MAM の破綻がストレスに対する神経細胞の脆弱性を亢進して神経変性につながることを示唆された。

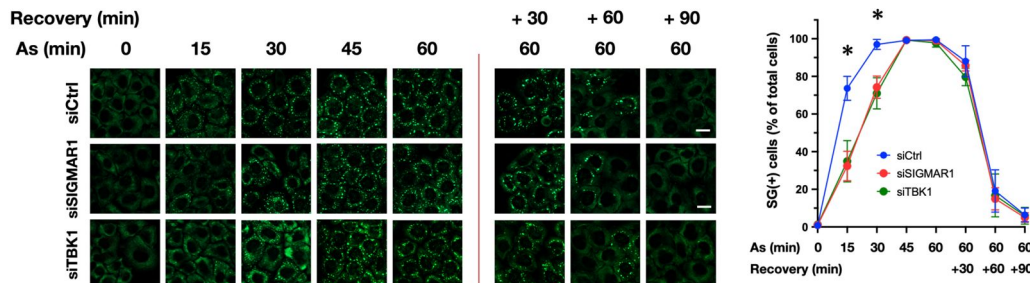


図 4 TBK1 の不活性化はストレス顆粒形成を遅延させる

HeLa 細胞を亜ヒ酸 (As, 0.1 mM) で処理してストレス顆粒形成を誘導した。ストレス顆粒の形成はマーカー分子である G3BP (図中緑色蛍光) の凝集で判定した。通常、処理後 15 分でほとんどの細胞にストレス顆粒が誘導されるが、1 受容体を抑制して MAM を破綻させたり、TBK1 の抑制を行うとストレス顆粒の形成が顕著に遅延した。また、亜ヒ酸を除いて回復させる際のストレス顆粒の解離には TBK1 の活性は影響しなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Nishino Kohei, Watanabe Seiji, Shijie Jin, Murata Yuri, Oiwa Kotaro, Komine Okiru, Endo Fumito, Tsuiji Hitomi, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Mishra Amit, Yamanaka Koji	4. 巻 7
2. 論文標題 Mice deficient in the C-terminal domain of TAR DNA-binding protein 43 develop age-dependent motor dysfunction associated with impaired Notch1/Akt signaling pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	6. 最初と最後の頁 118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40478-019-0776-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Seiji, Oiwa Kotaro, Murata Yuri, Komine Okiru, Sobue Akira, Endo Fumito, Takahashi Eiki, Yamanaka Koji	4. 巻 13
2. 論文標題 ALS-linked TDP-43M337V knock-in mice exhibit splicing deregulation without neurodegeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-020-0550-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tokuda Eiichi, Nomura Takao, Ohara Shinji, Watanabe Seiji, Yamanaka Koji, Morisaki Yuta, Misawa Hidemi, Furukawa Yoshiaki	4. 巻 1864
2. 論文標題 A copper-deficient form of mutant Cu/Zn-superoxide dismutase as an early pathological species in amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease	6. 最初と最後の頁 2119 ~ 2130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbadis.2018.03.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Komine Okiru, Yamashita Hirofumi, Fujimori-Tonou Noriko, Koike Masato, Jin Shijie, Moriwaki Yasuhiro, Endo Fumito, Watanabe Seiji, Uematsu Satoshi, Akira Shizuo, Uchiyama Yasuo, Takahashi Ryosuke, Misawa Hidemi, Yamanaka Koji	4. 巻 25
2. 論文標題 Innate immune adaptor TRIF deficiency accelerates disease progression of ALS mice with accumulation of aberrantly activated astrocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Death & Differentiation	6. 最初と最後の頁 2130 ~ 2146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41418-018-0098-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tsuiji Hitomi, Inoue Ikuyo, Takeuchi Mari, Furuya Asako, Yamakage Yuko, Watanabe Seiji, Koike Masato, Hattori Mitsuharu, Yamanaka Koji	4. 巻 7
2. 論文標題 TDP-43 accelerates age-dependent degeneration of interneurons	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-14966-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Nozomu, Onozuka Wataru, Watanabe Seiji, Wakasugi Keisuke	4. 巻 7
2. 論文標題 Chimeric ZHHH neuroglobin acts as a cell membrane-penetrating inducer of neurite outgrowth	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1338 ~ 1349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12271	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Seiji, Komine Okiru, Endo Fumito, Wakasugi Keisuke, Yamanaka Koji	4. 巻 145
2. 論文標題 Intracerebroventricular administration of Cystatin C ameliorates disease in SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 80 ~ 89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.14285	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 渡邊征爾、大岩康太郎、山中宏二
2. 発表標題 家族性ALS/FTLD原因遺伝子によって引き起こされるTDP-43の凝集は2つの異なる経路によって生じる
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会第62回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大岩康太郎、渡邊征爾、祖父江 颯、小峯 起、勝野雅央、山中宏二
2. 発表標題 TDP-43の多量体化が、その細胞内局在の決定に重要である
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会第62回日本神経化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Watanabe S, Nishino K, Murata Y, Oiwa K, Yamanaka K
2. 発表標題 TDP-43 mutant lacking its C-terminal domain induces age-dependent motor dysfunction in mice
3. 学会等名 30th International Symposium on ALS/MND (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Watanabe S, Nishino K, Matsuoka Y, Jin S, Komine O, Endo F, Tsuiji H, Sakimura K, Mishra A, Yamanaka K.
2. 発表標題 Mice deficient of C-terminal domain of TDP-43 develop age-dependent motor dysfunction via Notch1-Akt signaling pathway.
3. 学会等名 5th RNA Metabolism in Neurological Disease Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Komine O, Yamashita H, Fujimori-Tonou N, Koike M, Jin S, Moriwaki Y, Endo F, Watanabe S, Uematsu S, Akira S, Uchiyama Y, Takahashi R, Misawa H, Yamanaka K
2. 発表標題 Innate immune adaptor TRIF confers neuroprotection in ALS mice by eliminating abnormal astrocytes.
3. 学会等名 Society for Neuroscience 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Watanabe S, Komine O, Endo F, Wakasugi K, Yamanaka K
2. 発表標題 Intracerebroventricular administration of cystatin C extended the survival time of SOD1G93A mouse model.
3. 学会等名 the29th International Symposium on ALS/MND (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Watanabe S
2. 発表標題 Disruption of mitochondria-associated membranes in amyotrophic lateral sclerosis.
3. 学会等名 Japan-UK Neuroscience Symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊征爾、西野晃平、松岡由理、金 世杰、小峯 起、遠藤史人、築地仁美、崎村健司、山中宏二
2. 発表標題 TDP-43C末端ドメイン欠損変異体はNotch1-Akt1シグナル経路を介して加齢依存的な運動障害を引き起こす.
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊征爾
2. 発表標題 ALS共通病態としての小胞体・ミトコンドリア膜間領域(MAM)破綻の検証
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会 第61回日本神経化学会大会 合同年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Inami H, Watanabe S, Yamanaka K.
2. 発表標題 Screening of familial ALS/FTLD causative genes identifies mechanism of TDP43 aggregation in cultured neuronal cells.
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会 第61回日本神経化学会大会 合同年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nishino K, Watanabe S, Endo F, Yamanaka K
2. 発表標題 Mice Heterozygously lacking C-terminal domain of TDP-43 show age-dependent motor dysfunction.
3. 学会等名 第23回世界神経学会議（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡邊征爾，小峯起，遠藤史人，山中宏二
2. 発表標題 小胞体・ミトコンドリア膜間領域は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の新規治療標的である
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡邊征爾，小峯起，遠藤史人，山中宏二
2. 発表標題 筋萎縮性側索硬化症におけるシスタチンCの神経保護効果
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高橋望, 小野塚渉, 渡邊征爾, 若杉柱輔
2. 発表標題 ニューログロビンがもつ神経突起伸長能の作用機序の解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関