

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06933

研究課題名(和文) 運動ニューロンの多様性から探るALS脆弱性・耐性の分子生理学的基盤

研究課題名(英文) Molecular and physiological basis of neuronal vulnerability in ALS

研究代表者

浅川 和秀 (Asakawa, Kazuhide)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・客員研究員

研究者番号：30515664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、運動ニューロンの変性が原因で、全身の筋肉が衰える難病である。我々はゼブラフィッシュをモデルに用いて、ALS脆弱性が高いとされる細胞サイズが大きい運動ニューロンほど、オートファジー流動が亢進していることを見出していた。本研究では、大きい運動ニューロンほど細胞内ATPレベルが低下していることを見出した。また、オートファジー流動を阻害すると、細胞内ATPレベルは低下し、神経軸索の成長が阻害された。これらの結果から、細胞内のエネルギー供給において、オートファジー流動への依存度が大きい細胞ほど、ALSに対して脆弱である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、脳が発する運動の指令を筋肉に伝達する神経細胞「運動ニューロン」が変性して失われ、全身の筋肉が衰える難病である。ALSの根本的な原因は未だ不明であるが、運動ニューロンの中でもとりわけ、サイズが大きい運動ニューロンほど、変性しやすいことが知られている。本研究によって、大きい運動ニューロンでは、「細胞のエネルギー通貨」ともよばれるATPが低下していて、なおかつ、細胞内のリサイクルシステム「オートファジー」が活発に働いていることがわかった。細胞のエネルギーの産生をオートファジー流動に大きく依存している細胞ほど、ALSで失われやすい可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：A major hallmark of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is that the motor neurons regulating skeletal muscle contraction are selectively targeted for degeneration, while sensory neurons and interneurons are relatively spared. It has also been known that, among the motor neurons, large cells are more vulnerable than smaller ones. Understanding of molecular and physiological basis of these selective neuronal vulnerability in ALS may provide a clue for designing effective therapy for this currently incurable disease. In this study, we discover that, in zebrafish, the larger spinal motor neurons display a higher autophagic flux and lower intracellular ATP level than smaller ones. Repression of autophagic flux by overexpression of mTOR kinase led to a decrease in intracellular ATP level and diminished motor axon outgrowth. These results imply that a stagnant autophagic flux would increase neuronal ALS vulnerability via reduction of intracellular ATP level.

研究分野：遺伝学、神経科学、細胞生物学

キーワード：ALS オートファジー 運動ニューロン ATP 神経変性 ALS脆弱性

## 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、筋肉の収縮を制御する脳や脊髄の神経細胞「運動ニューロン」が変性によって失われ、全身の筋肉が衰える難病である。運動ニューロンが変性する一方で、感覚ニューロンや介在ニューロンは保たれることが ALS の大きな特徴であるが、運動ニューロンのサブタイプ間においても、(i)速い、かつ、疲労しやすい筋収縮 (Fast-twitch, Fast-fatigable) を指令する運動ニューロン (FF 運動ニューロン) ほど変性し易い、あるいは、(ii) 眼球運動を制御する運動ニューロンは変性し難い、といった変性のし易さに差があることが知られている。ALS における神経細胞の変性し易さ (神経細胞の ALS 脆弱性) のメカニズムは、効果的な ALS の治療戦略を構築するための突破口になると期待されているが、現在、ほとんど理解されていない。

我々は、ゼブラフィッシュを用いて ALS の神経変性をモデル化する過程で、オルガネラやタンパク質の分解系であるオートファジーの活性 (オートファジー流動) をイメージングによって解析する系を構築した。この系を用いて、脊髄運動ニューロンのオートファジー流動が、感覚ニューロンや介在ニューロンよりも有意に亢進していることを、思いがけず見出した。また、ゼブラフィッシュにおいて、FF 運動ニューロンに相当する性質を備えた細胞のサイズが大きい運動ニューロンほど、オートファジー流動が高いことを確認した。さらに、眼球運動ニューロン (外転神経) と脊髄運動ニューロンを同時に可視化するゼブラフィッシュ系統を構築することにより、眼球運動ニューロンにおけるオートファジー流動が、脊髄運動ニューロンよりも有意に低いという、結果を得た。

このような結果を基にして我々は、ゼブラフィッシュにおいて見出した神経細胞のオートファジー流動の多様性と、ALS 脆弱性との相関関係に着眼することで、神経細胞の ALS 脆弱性の理解を前進させることができるかもしれないと考え、本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究は、オートファジー流動の活発さの差に着目して運動ニューロンの多様性を理解することにより、神経細胞の ALS 脆弱性の分子生理的メカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

我々は、運動ニューロンにおけるオートファジー流動の活発さは、細胞内のエネルギー代謝と何らかの関連性があると予想した。そこで、レシオメトリックな細胞内 ATP のレポーターを酵母転写因子 Gal4 依存的に発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ系統を構築し、脊髄運動ニューロンの ATP レベルをイメージングによって定量し、比較した。また、同様の ATP レベルの解析を、ALS の原因遺伝子の一つである TDP-43/TARDBP 遺伝子の過剰発現の条件において実施することにより、ALS 病態における細胞内のエネルギー状態を検討し、オートファジー流動との関連性を探った。

## 4. 研究成果

(1) 細胞内エネルギーを定量的に評価するための細胞内 ATP レポーターフィッシュ系統の構築  
細胞内 ATP レベルをモニターする為に、先行研究において開発された緑蛍光を発する ATP センサー iATPSnFR (引用文献①) と赤色蛍光タンパク質 mRFP1 を、自己切断活性を持つ T2A ペプチド配列で連結し、酵母転写因子 Gal4 の認識配列 (UAS) に接続した UAS:iATPSnFR-T2A-mRFP1 コンストラクトを作製した。UAS:iATPSnFR-T2A-mRFP1 をゲノムに組み込んだトランスジェニックゼブラフィッシュ系統 Tg[UAS:iATPSnFR-T2A-mRFP1] を樹立した。Tg[UAS:iATPSnFR-T2A-mRFP1] フィッシュを、脊髄における感覚ニューロン (RB 細胞)、少数の介在ニューロン、脊髄運動ニューロン CaP において Gal4 を発現するドライバー Tg[SAIG213A] 系統 (引用文献②) と交配し、得られた Tg[SAIG213A]Tg[UAS:iATPSnFR-T2A-mRFP1] 二重トランスジェニックフィッシュの脊髄のライブイメージングを実施した。それぞれの単一細胞ごとに iATPSnFR/mRFP1 の蛍光レシオを計測したところ、RB 細胞、介在ニューロン、CaP のそれぞれにおいて iATPSnFR の発現レベルに関わらず、ほぼ一定の値を得たことから、これらの細胞種は、ほぼ同程度の ATP レベルを維持していることが示唆された。また、この結果は、iATPSnFR-T2A-mRFP1 をプローブとして、細胞外環境や遺伝子変異などによる様々な摂動が、生体内の細胞の ATP レベルの増減を評価できること示唆していた (以降参照)。

### (2) 細胞サイズに相関した脊髄運動ニューロンの細胞内 ATP レベル勾配

運動ニューロン特異的な Gal4 ドライバー系統 Tg[mnr2b-hs:Gal4] (引用文献③) と、Tg[UAS:iATPSnFR-T2A-mRFP1] を交配し、ほぼ全ての脊髄運動ニューロンに iATPSnFR-T2A-mRFP1 を発現する二重トランスジェニックフィッシュを構築した。共焦点顕微鏡を用いて、個々の単一脊髄運動ニューロンの細胞内 ATP レベルの比較検討を行った。その結果、細胞のサイズが大きい脊髄運動ニューロンほど、細胞内 ATP レベルが有意に低い傾向があることを見出した。

### (3) オートファジー流動の変化が細胞内 ATP レベルに与える影響の評価

脊髄運動ニューロンのオートファジー流動を遺伝学的手法によって操作し、オートファジー流動の変化が細胞内 ATP レベルに及ぼす影響を評価することを試みた。mTOR キナーゼは、様々な細胞種においてオートファジー流動を抑制することが知られている(引用文献④)。脊髄運動ニューロンにおいても、mTOR がオートファジー流動を抑制するか否かを検証する為に、オートファジー流動のレポーター-GFP-LC3-RFP-LC3ΔG (引用文献⑤) と mTOR を、Gal4 依存的に同時に発現する二方向性 UAS 系統 Tg[myc-mTOR:UAS:GFP-LC3-RFP-LC3ΔG] を樹立した。Tg[SAIG213A] Tg[myc-mTOR:UAS:GFP-LC3-RFP-LC3ΔG] 二重トランスジェニックフィッシュにおいて、CaP のオートファジー流動を定量したところ、mTOR の発現によってオートファジー流動が抑制されていることがわかった。次に、細胞内 ATP のレポーター-iATPSnFR-T2A-mRFP1 と mTOR を同時に発現する二方向性 UAS 系統 Tg[myc-mTOR:UAS:iATPSnFR-T2A-mRFP1] を樹立した。Tg[SAIG213A] Tg[myc-mTOR:UAS:iATPSnFR-T2A-mRFP1] フィッシュにおいて、CaP の細胞内 ATP レベルを定量したところ、mTOR の発現によって細胞内 ATP レベルが低下することがわかった。この結果は、オートファジー流動による細胞内 ATP レベルの直接的な制御を示すものではないが、脊髄運動ニューロンにおいてはオートファジー流動によって細胞内 ATP レベルが維持されている、という仮説を支持する。

### (4) TDP-43 の過剰発現が脊髄運動ニューロンのオートファジー流動と細胞内 ATP レベルに与える影響の評価

我々は、ALS の変性運動ニューロンに凝集体を形成する RNA/DNA 結合タンパク質 TDP-43 を CaP において過剰発現すると、神経軸索の伸長が阻害されることを見出ししていた (Asakawa et al., 2020)。TDP-43 の過剰発現が、オートファジー流動に与える影響を評価する為に、GFP-LC3-RFP-LC3ΔG と myc タグを付加したヒト TDP-43 (myc-TDP-43) を、Gal4 依存的に同時に発現する二方向性 UAS 系統 Tg[myc-TDP-43:UAS:GFP-LC3-RFP-LC3ΔG] を樹立した。Tg[SAIG213A] Tg[myc-TDP-43:UAS:GFP-LC3-RFP-LC3ΔG] フィッシュにおいて、CaP のオートファジー流動を定量したところ、myc-TDP-43 の過剰発現によってオートファジー流動が抑制されることがわかった。次に、TDP-43 の過剰発現が、細胞内 ATP レベルに与える影響を評価する為に、二方向性 UAS 系統 Tg[myc-TDP-43:UAS:iATPSnFR-T2A-mRFP1] を樹立した。Tg[SAIG213A] Tg[myc-TDP-43:UAS:iATPSnFR-T2A-mRFP1] フィッシュにおいて、CaP の細胞内 ATP レベルが著しく低下することがわかった。これらの結果から、TDP-43 過剰発現が、オートファジー流動と細胞内 ATP レベルをともに低下させる効果を発揮することがわかった。

### (5) まとめと展望

我々は、本研究の実験結果を基に、健康な状態においても細胞内 ATP 量が相対的に低下していることが、大きい運動ニューロンの ALS 脆弱性を高めており、細胞内 ATP を補うためにオートファジー流動を亢進させている、という仮説を考えた。また、ALS における TDP-43 の細胞毒性は、オートファジー流動の低下や、細胞内 ATP レベルの低下を介して発揮されている可能性が示唆された。この為、生得的に細胞内 ATP レベルが低い傾向がある大きい運動ニューロンでは、より TDP-43 の毒性が発揮されやすい (ALS 病態が進行しやすい) 可能性がある。今後は、オートファジー流動と細胞内 ATP レベルの因果関係を明らかにする為に、脊髄運動ニューロンにおいて亢進しているオートファジー流動は、細胞の主要な ATP の供給源であるミトコンドリアの品質管理の活発さを反映している可能性を検証する必要があると考える。

### <引用文献>

- ① Lobas et al., A genetically encoded single-wavelength sensor for imaging cytosolic and cell surface ATP. *Nat Commun.* 2019 10:711.
- ② Asakawa et al., The Tol2-mediated Gal4-UAS method for gene and enhancer trapping in zebrafish. *Methods.* 2009 49:275-81.
- ③ Asakawa et al., Protocadherin-Mediated Cell Repulsion Controls the Central Topography and Efferent Projections of the Abducens Nucleus. *Cell Rep.* 2018 24:1562-1572.
- ④ Shimobayashi et al, Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 15:155-62.
- ⑤ Kaizuka et al, An Autophagic Flux Probe that Releases an Internal Control. *Mol Cell.* 2016 64:835-849.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Asakawa Kazuhide, Handa Hiroshi, Kawakami Koichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Illuminating ALS Motor Neurons With Optogenetics in Zebrafish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	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） 10.3389/fcell.2021.640414	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 Asakawa Kazuhide, Handa Hiroshi, Kawakami Koichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Multi-phaseted problems of TDP-43 in selective neuronal vulnerability in ALS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	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） 10.1007/s00018-021-03792-z	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 Asakawa Kazuhide, Handa Hiroshi, Kawakami Koichi	4. 巻 16
2. 論文標題 Do not curse the darkness of the spinal cord, light TDP-43	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neural Regeneration Research	6. 最初と最後の頁 986 ~ 986
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4103/1673-5374.297073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kazuhide Asakawa, Hiroshi Handa, Koichi Kawakami	4. 巻 11
2. 論文標題 Optogenetic modulation of TDP-43 oligomerization accelerates ALS-related pathologies in the spinal motor neurons.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1004
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-14815-x.	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7件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 浅川和秀
2. 発表標題 運動ニューロンにおけるTDP-43ダイナミクスと細胞毒性の光遺伝学的解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅川和秀
2. 発表標題 Optogenetic modulation of TDP-43 oligomerization accelerates ALS-related pathologies in the spinal motor neurons
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅川和秀
2. 発表標題 熱帯魚ゼブラフィッシュから眺める運動制御回路の構造と疾患
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅川和秀
2. 発表標題 Optogenetic modulation of TDP-43 oligomerization fast-forwards ALS-related pathologies in the spinal motor neurons
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅川和秀
2. 発表標題 Reconstruction of ALS pathology by optogenetic regulation of TDP-43 intermolecular interaction in spinal motor neurons
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuhide Asakawa
2. 発表標題 Pathological alterations of the spinal motor neurons induced by optogenetic TDP-43 oligomerization
3. 学会等名 Gordon Research Conference, Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and Related Motor Neuron Diseases (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅川和秀
2. 発表標題 PI3K -mTOR経路の活性化は、TDP-43のタンパク質恒常性破綻による運動ニューロンの神経萎縮をレスキューする
3. 学会等名 第9回TOR研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 融合タンパク質及びその利用	発明者 浅川和秀、川上浩一	権利者 情報・システム 研究機構
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-550350	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 FUSION PROTEIN AND UTILIZATION THEREOF	発明者 浅川和秀、川上浩一	権利者 情報・システム 研究機構
産業財産権の種類、番号 特許、17/281,550	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 融合タンパク質及びその利用特許権	発明者 浅川和秀、川上浩一	権利者 情報・システム 研究機構
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/037829	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

Researchmap  
<https://researchmap.jp/kazuhideasakawa>  
Kazuhide Asakawa HP  
<https://kazuhide-asakawa.com/>

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
---------	---------