

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19366

研究課題名（和文）神経変性の緩和法としての解糖系の機能開拓

研究課題名（英文）Modulation of glycolysis for the mitigation of neurodegenerative diseases

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・特命准教授

研究者番号：30515664

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000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力が致死的に衰退する難病である。我々は、ALSの運動ニューロンに異常な凝集体を形成するRNA/DNA結合タンパク質TDP-43に注目し、熱帯魚ゼブラフィッシュのTDP-43機能に摂動を加えると、運動ニューロンの細胞内ATPレベルが著しく低下することを見出した。この研究では、主要な細胞内ATP供給経路の一つである解糖系を操作することで、運動ニューロンの細胞内ATPレベルを上昇させる新しい遺伝学的手法を開発し、TDP-43異常に起因する運動ニューロンのATPレベルを部分的に回復させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALSに対する効果的な治療法は、現在のところ非常に限られており、治癒はない。本研究は、生体内の運動ニューロンを直接的に観察できる利点を持った熱帯魚ゼブラフィッシュをモデルに用いて、運動ニューロンの細胞内エネルギー代謝状態の研究を実施した。その結果、TDP-43の機能異常に起因するATPレベルの低下を、解糖系の特定の遺伝子の機能操作によってレスキューできることを実証した。この成果は、新たなALSの治療戦略の構築に貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Amyotrophic sclerosis (ALS) is a debilitating disease where muscles throughout the body fatally waste due to degeneration of motor neurons. We found that perturbation of TDP-43, an RNA/DNA-binding protein that forms abnormal aggregates in motor neurons in ALS, lead to a significant decrease in cellular ATP levels. In this study, by manipulating the glycolysis pathway, one of the major cellular ATP supply routes, we developed a new genetic approach to increase cellular ATP levels in motor neurons, partially restoring ATP levels in motor neurons affected by TDP-43 abnormalities.

研究分野：神経科学、遺伝学

キーワード：ALS 解糖系 TDP-43 運動ニューロン ATP ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、脳からの運動指令を筋肉に伝達する神経細胞「運動ニューロン」が変性によって失われ、全身の筋力が致死的に衰退する難病である。1869 年に最初に記載されて以来 150 年以上を経た現在でも、依然として ALS の発症機序はほとんど不明であり、効果的な治療法が存在しない。

ALS 全体の 90%以上を占める単一の遺伝子変異に連鎖しないタイプの ALS (孤発性 ALS) では、変性運動ニューロンに蓄積する封入体が、凝集した TDP-43 タンパク質を主成分として含んでいることが 2006 年に見出された。TDP-43 は、転写、スプライシング、mRNA 輸送、翻訳などの多様な RNA 代謝の機能を担う RNA 結合タンパク質として知られていたことから、この発見を契機にして、RNA 代謝の異常が ALS の発症に関与していると考えられるようになった。一方で、TDP-43 は、哺乳類の中樞神経系においては約 6,000 種類の遺伝子 (ヒト全遺伝子のおよそ 30%) に由来する mRNA に結合するという報告などがなされている。これらの先行研究を考慮に入れると、限られた特定の遺伝子のスプライシングや翻訳を修正することが、効果的な ALS の治療戦略となりうるか、という問題については予断を許さない。

運動ニューロンは、脊椎の中を走行する脊髄に細胞体を保持し、細長い神経軸索を伸長して標的筋を支配する複雑な形態をもった大きい細胞である。それ故に、生体内の運動ニューロンを研究することは非常に難しく、ALS の原因究明を困難にさせている。我々は、この難点を克服すべく、透明性の高い身体組織をもった熱帯魚ゼブラフィッシュを用いて、運動ニューロン内部の ALS 関連因子のダイナミックな振る舞いを研究する技術を開発してきた。その過程で、運動ニューロンの TDP-43 のタンパク質量を増加させると、細胞内 ATP のレベルが減少することを見出した (未発表)。これらの結果から、細胞内 ATP レベルの低下 (つまり、細胞内エネルギーの低下)こそが、TDP-43 の異常によって顕在化する主要な細胞毒性であり、実は、神経変性のトリガーに近い現象なのではないか、という仮説を立て、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究は、運動ニューロンの細胞内 ATP レベルを上昇させる新しい遺伝学的手法を開発し、TDP-43 の機能異常がもたらす運動ニューロンの欠損を細胞内 ATP の供給によってレスキューできるか、否か、を検証することを目的とした。これにより、「細胞内 ATP の供給」という新たな ALS 治療戦略の可能性を拓くことを目指した。

3. 研究の方法

【1、細胞内 ATP レベルを上昇させる戦略：解糖系の活性化】TDP-43 の異常によって細胞内 ATP レベルが低下するメカニズムとして、(1) TDP-43 の制御を受ける既知の複数のミトコンドリアにおける呼吸鎖関連遺伝子の機能が低下し、ミトコンドリアの ATP 産生能が低下する、(2) グローバルなスプライシング異常に対処するタンパク質品質管理に、過剰な ATP が消費されている、などの可能性が考えられる。そこで我々は、ミトコンドリアにおける呼吸鎖とは別の ATP の産生経路である解糖系を活性化すれば、細胞内 ATP レベルを効果的に上昇させることができるのではないかと考えた。

【2、運動ニューロンの解糖系の理解】ほぼ全ての脊髄運動ニューロン (mnr2b 陽性細胞) が EGFP を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ系統 Tg[mnr2b-hs:Gal4] Tg[UAS:EGFP] (文献①) を用いて、シングルセルトランスクリプトーム (sc-RNAseq) 解析を実施し、脊髄運動ニューロンのクラスタリングを行うことを目指した。これにより、脊髄運動ニューロンにおける解糖系遺伝子の発現プロファイルを理解することを試みた。

【3、運動ニューロンの ATP 産生における解糖系の機能評価】解糖系は、9 段階の主要な酵素反応によって、グルコースからピルビン酸を産生し、その過程で正味 2 分子の ATP を産生する。解糖系遺伝子を、Gal4/UAS 法を用いて過剰発現させ、運動ニューロンの細胞内 ATP レベルが上昇するか検証した。ATP の検出には、iATPSnFR^{1.0} (文献②) を利用して独自に構築したレシオメトリック ATP センサーシステムを用いた。

【4、解糖系の活性化は TDP-43 異常による運動ニューロン欠損を緩和するか？】過剰発現によって運動ニューロンの細胞内 ATP レベルを上昇させる効果を持つ解糖系遺伝子を、TDP-43 の遺伝子破壊系統（文献③）において過剰発現し、運動ニューロンの神経軸索の伸長阻害を回復させるか検証した。これにより、解糖系の活性化が TDP-43 の機能異常に起因する運動ニューロンの欠損を緩和するか検証した。

4. 研究成果

運動ニューロンにおける解糖系遺伝子群の発現パターンを理解するために、ゼブラフィッシュの運動ニューロン（*mnr2b* 陽性細胞）をセルソーターによって分取し、*sc-RNAseq* によって解糖系遺伝子の発現プロファイルの全体像を明らかにしようと試みた。しかし、ゼブラフィッシュ仔魚の全細胞に占める *mnr2b* 陽性細胞の割合が少ないために、*sc-RNAseq* を実施するために必要な *mnr2b* 陽性細胞数を回収することが困難であることがわかった。

一方で、別課題において、運動ニューロンの神経軸索を伸長させる効果を発揮するリン酸化経路を見出していた。遺伝的にコードされた ATP センサー *iATPSnFR^{1.0}* を、*Gal4/UAS* 法を用いて運動ニューロンに発現させ、さらに、このリン酸化経路を活性化させたところ、運動ニューロン細胞内 ATP レベルが上昇することを見出した。このリン酸化経路を全身性に活性化させたゼブラフィッシュ仔魚の全身からシングルセルを分取して *sc-RNAseq* を実施した。神経細胞（*elav13* 陽性細胞）において、このリン酸化経路の活性化によって発現レベルが上昇する遺伝子群を網羅的に同定した。その結果として同定された遺伝子群に、解糖系の遺伝子が含まれることがわかった。本報告では、便宜的にこの解糖系遺伝子を *glycolysis1* と記す。

glycolysis1 遺伝子が、運動ニューロンの細胞内 ATP レベルを上昇させる効果を発揮するか否か、を検証するために、*Gal4/UAS* 法を用いて、*glycolysis1* と *iATPSnFR^{1.0}* をゼブラフィッシュの脊髄運動ニューロンに異所的に発現させた。その結果、*glycolysis1* の過剰発現により、運動ニューロンの細胞内 ATP レベルが上昇することがわかった。この結果は、*glycolysis1* の発現量が解糖系の ATP 産生効率に重要な影響を及ぼすことを示している。

ゼブラフィッシュの TDP-43 タンパク質をコードする 2 種類の遺伝子（*tardbp* と *tardbp1*）を欠失させた仔魚の運動ニューロンに *iATPSnFR^{1.0}* を発現させ、細胞内 ATP のレベルを検証した。その結果、TDP-43 遺伝子破壊によって運動ニューロンの ATP レベルが低下することがわかった。この結果は、細胞内 ATP レベルの低下が、運動ニューロンの ALS 病態の一つである、という仮説を支持する。さらに我々は、*glycolysis1* の過剰発現が、TDP-43 遺伝子破壊によって低下した運動ニューロンの ATP レベルを回復させることができることを見出した。この結果は、解糖系の活性化が、TDP-43 の機能が低下した運動ニューロンの ATP ホメオスタシスを部分的に回復させる効果を持っていることを示している。一方で、*glycolysis1* の過剰発現には、TDP-43 遺伝子破壊によって顕れる神経軸索の伸長欠損をレスキューする効果は認められなかった。この結果から、細胞内 ATP レベルの低下が、TDP-43 遺伝子破壊による神経軸索の伸長欠損の直接的な原因ではない可能性が示唆された。

glycolysis1 は、過剰発現によって細胞内 ATP レベルを上昇させる効果を発揮するが、他の解糖系遺伝子も同様に過剰発現によって細胞内 ATP レベルを上昇させる効果があるか検証した。*glycolysis1* 以外の解糖系の律速酵素を *iATPSnFR^{1.0}* と共に、運動ニューロンにおいて過剰発現させた。その結果、ヘキソキナーゼ（HK）、ホスホフルクトキナーゼ（PFK1）、ピルビン酸キナーゼ（PKM2）の過剰発現は、細胞内 ATP レベルの上昇効果を示さなかった。この結果は、遺伝学的な解答系への介入によって ATP レベルを操作するためには、適切な遺伝子を選定しなくてはならないことを示している。*glycolysis1* は、そのような効果的な介入点の一つと言える。

本研究では、運動ニューロンの細胞内 ATP レベルを上昇させるための遺伝学的アプローチを同定した。今後は、*glycolysis1* の過剰発現が、細胞内 ATP レベルの回復以外の TDP-43 欠損をレスキューできるかを検証していく必要がある。

<引用文献>

- ① Asakawa et al., Cell reports 2018, DOI: 10.1016/j.celrep.2018.07.024
- ② Lobas et al., Nature Communications 2019, DOI: 10.1038/s41467-019-08441-5
- ③ Asakawa et al., Nature Communications 2020, DOI: 10.1038/s41467-020-14815-x

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Asakawa Kazuhide, Handa Hiroshi, Kawakami Koichi	4. 巻 158
2. 論文標題 Optogenetic interrogation of TDP-43 cytotoxicity in a zebrafish ALS model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Folia Pharmacologica Japonica	6. 最初と最後の頁 16 ~ 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.22085	査読の有無 無
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 浅川 和秀	4. 巻 73
2. 論文標題 連載講座 ヒトを知るモデル動物としてのゼブラフィッシュ-7 神経疾患のモデル動物としてのゼブラフィッシュ	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 585 ~ 590
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.2425201623	査読の有無 無
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 Asakawa Kazuhide, Handa Hiroshi, Kawakami Koichi	4. 巻 65
2. 論文標題 Dysregulated TDP 43 proteostasis perturbs excitability of spinal motor neurons during brainstem mediated fictive locomotion in zebrafish	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 446 ~ 452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12879	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 Asakawa Kazuhide, Handa Hiroshi, Kawakami Koichi	4. 巻 2707
2. 論文標題 In Vivo Optogenetic Phase Transition of an Intrinsically Disordered Protein	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in molecular biology	6. 最初と最後の頁 257 ~ 264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-3401-1_17	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Kazuhide Asakawa
2. 発表標題 An inverse relationship between autophagic flux and intracellular ATP level in ALS-vulnerable neuronal types in zebrafish
3. 学会等名 第35回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅川 和秀
2. 発表標題 神経細胞のALS脆弱性におけるオートファジー流動の役割
3. 学会等名 第8回ゼブラフィッシュ・メダカ創薬研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuhide Asakawa
2. 発表標題 An inverse relationship between autophagic flux and intracellular ATP level in ALS-vulnerable neuronal types in zebrafish
3. 学会等名 The 10th International Symposium on Autophagy（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuhide Asakawa
2. 発表標題 Energy metabolism and selective neuronal vulnerability in ALS
3. 学会等名 ZDM15（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅川 和秀
2. 発表標題 神経細胞のALS脆弱性におけるオートファジー流動と細胞内ATPの関係性
3. 学会等名 第28回小型魚類研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuhide Asakawa
2. 発表標題 Reorganization of central carbon metabolism rescues TDP-43 proteostasis collapse in spinal motor neurons
3. 学会等名 The 34th International Symposium on ALS/MND (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazuhide Asakawa
2. 発表標題 Reorganization of central carbon metabolism rescues TDP-43 proteostasis collapse in spinal motor neurons
3. 学会等名 ZDM16 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 浅川 和秀
2. 発表標題 神経細胞のALS脆弱性と倍数性の接点を探る
3. 学会等名 第一回倍数性研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 浅川 和秀
2. 発表標題 光遺伝学を用いたTDP-43の相転移操作で探るALS病態
3. 学会等名 千里ライフサイエンス振興財団セミナー「相分離がもたらす医療・創薬の新展開（招待講演）」
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 廣川 信隆、板東 武彦、古川 浩康	4. 発行年 2023年
2. 出版社 アドスリー	5. 総ページ数 240
3. 書名 ブレインサイエンス・レビュー2023	

1. 著者名 加藤 昌人、白木 賢太郎、中川 真一	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 247
3. 書名 フロントランナー直伝 相分離解析プロトコール	

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://www.asakawalab.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
---------	---------