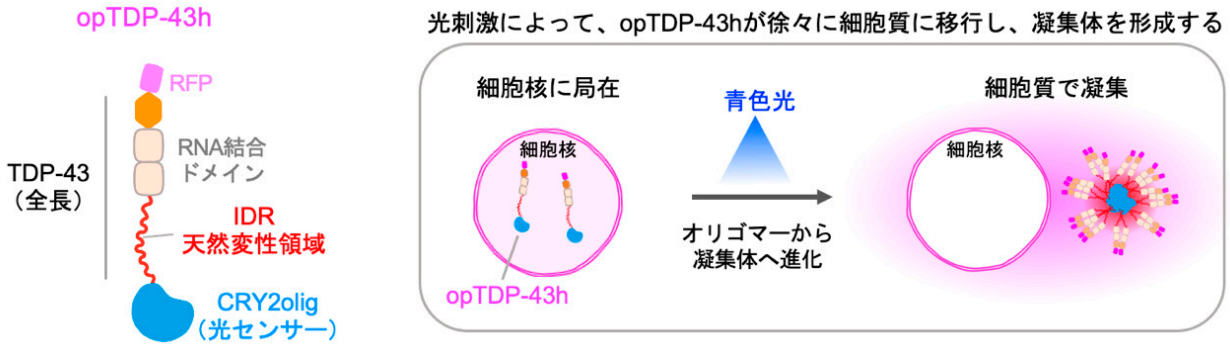
22　光遺伝学TDP-43を用いたALS病態の理解と制御	浅川　和秀

【目的】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。ALS 全体の 90%以上を占める遺伝子変異に連鎖しないタイプの ALS（孤発性 ALS）には、変性運動ニューロンの細胞質に凝集した TDP-43 タンパク質が蓄積する、という特徴がある。本研究に先立って、我々は、青色光を吸収するとクラスター化する CRY2olig タンパク質を TDP-43 に融合した光遺伝学型 TDP-43（opTDP-43h）を開発した。opTDP-43 を熱帯魚ゼブラフィッシュ仔魚の運動ニューロンに発現させ、仔魚に青色光を照射すると、細胞核に豊富に局在していた opTDP-43h が、次第に細胞質へと移行し、凝集体を形成することを見出した。我々は、この光照射による opTDP-43h の凝集が、ヒトや既存の ALS 動物モデルでは研究が困難とされてきた、変性初期の運動ニューロンの状態を再現している可能性があると考えた。本研究では、光刺激によって opTDP-43h の細胞内局在が、細胞核から細胞質への移行する現象において、TDP-43 の RNA への結合が果たす役割を検証することで、初期の運動ニューロン変性のメカニズムを明らかにしようと試みた。

【方法】2 つの RNA 結合ドメイン（RRM1 と RRM2）を欠失させた opTDP-43h（opTDP-43hdRRM12）を脊髄運動ニューロンに発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ Tg[mnr2b-hs:opTDP-43hdRRM12]を構築した。Tg[mnr2b-hs: opTDP-43hdRRM12]仔魚に青色光を照射し、opTDP-43hdRRM12 の細胞内局在の変化をリアルタイムで観察した。

【結果】青色光を照射する前の Tg[mnr2b-hs:opTDP-43hdRRM12]仔魚においては、opTDP-43hdRRM12 は細胞核に局在した。opTDP-43h は、青色光を 24 時間照射すると細胞質に移行して凝集するが、opTDP-43hdRRM12 は、青色光の照射後も細胞核への局在を維持した。この結果は、opTDP-43h の細胞質への移行には、RNA 結合ドメインが必須であることを示していた。青色光の照射によってクラスター化した opTDP-43h は、RNA と結合して細胞質に移行する可能性が示唆された。また、内在性の *TDP-43* 遺伝子が破壊された Tg[mnr2b-hs:opTDP-43hdRRM12]仔魚においては、青色光照射の有無にかかわらず、opTDP-43hdRRM12 が細胞体や神経軸索の接続部に大きな顆粒構造を形成した。この結果から、細胞核に豊富に局在するという典型的な TDP-43 の細胞内分布パターンには、RNA への結合が必須である可能性が示唆された。

光照射による TDP-43 凝集



22. 光遺伝学 TDP-43 を用いた ALS 病態の理解と制御

浅川　和秀

*東京医科大学 医学科 ケミカルバイオロジー講座

Key words：TDP-43，ALS，運動ニューロン，光遺伝学，RNA 代謝

緒　言

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。現在、発病のメカニズムが不明であり、効果的な治療法が存在しない。今から 17 年前に、ALS 全体の 90%以上を占める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の細胞質に蓄積する封入体が、凝集した TDP-43 タンパク質を含んでいることが見出された [1, 2]。この発見を契機に、TDP-43 の凝集が ALS の発病に関与すると考えられるようになった。

TDP-43 は進化的に保存された RNA 結合タンパク質であり、健康な細胞においては細胞核に豊富に局在して、細胞核と細胞質を往来しながら、転写、mRNA プロセシング、翻訳、輸送などの多様な RNA 代謝機能を担っている。一方で、ヒトや哺乳類モデル動物の運動ニューロンは、身体深部にある脊髄から体表の筋肉を支配する非常に大きい細胞である為に、運動ニューロンにおける TDP-43 の動的性質を解析することが難しく、TDP-43 凝集と運動ニューロン変性の因果関係は検証されないままであった。

私は、TDP-43 の凝集が原因となって運動ニューロンが変性するのか、という未解明の問題を検証するために、運動ニューロンの TDP-43 を光照射による遠隔操作で凝集させる技術を開発した[3]。この研究で開発した光遺伝学型 TDP-43（以下、opTDP-43h と呼ぶ）は、青色光を吸収すると多量体を形成（オリゴマー化）するクリプトクローム CRY2olig が付加されており（図 1 左）、暗所では TDP-43 として機能するが、青色光の照射によって CRY2olig モジュールがオリゴマー化すると、それが引き金となって TDP-43 モジュールが相転移を起こし凝集するようにデザインされている。この opTDP-43h を、照射光が体内に到達しやすい透明な身体を持った熱帯魚ゼブラフィッシュ仔魚の運動ニューロンに発現させて、遊泳する仔魚に青色光を照射する実験を行なった。すると、細胞核に豊富に局在していた opTDP-43h が、次第に細胞質へと移行し、数日後には ALS 病態マーカーを含む凝集体を形成する、というあたかも ALS 病態として想定されているような現象が再現された（図 1 右）。

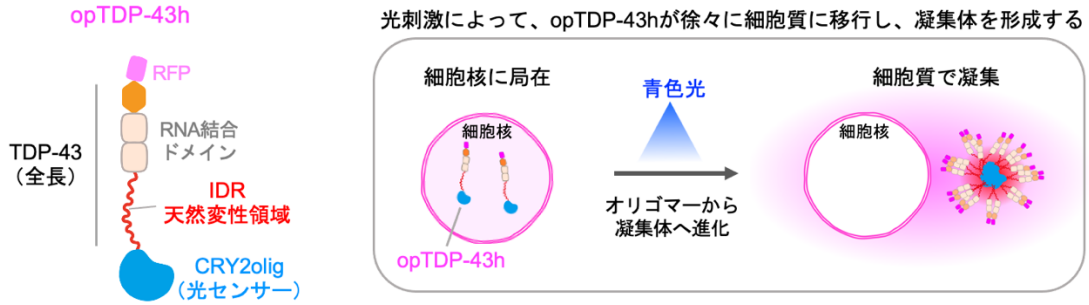


図 1. 光照射による TDP-43 凝集
光遺伝学型 TDP-43（opTDP-43h）の CRY2olig ドメインは、青色光を吸収するとクラスター化する。この時、主に細胞核に局在していた opTDP-43h は、細胞質で凝集体を形成する。opTDP-43h が細胞質に移行するメカニズムは不明である。

*現在の所属：国立遺伝学研究所 発生遺伝学研究室

私は、この光遺伝学型ゼブラフィッシュ ALS モデルは、ヒトや既存の ALS 動物モデルでは研究が困難とされてきた、正常さを失いつつある変性初期の運動ニューロンを再現している可能性があると考え、以下の 2 点の解析を進めることで、ALS において運動ニューロンが正常さを失い始めるメカニズムを理解することを目指した。

(1) opTDP-43h の光刺激によって運動ニューロンに誘発されるトランスクリプトームの変化を、シングルセル RNA シーケンス解析によって明らかにする。

(2) 光刺激によって駆動される opTDP-43h の細胞質への移行において、RNA への結合が果たす役割を明らかにする。

なお、この報告書の作成時点で、上記の課題 (1) については解析途中であるため、本報告書では、課題 (2) の opTDP-43h の細胞質への移行における RNA 結合に関する研究の報告を行う。

方法および結果

1. opTDP-43h の細胞質への移行において、RNA との結合が果たす役割

ゼブラフィッシュの脊髄運動ニューロンにおいて発現させた opTDP-43h は、野生型 TDP-43 と同様に、主に細胞核に局在する。青色光を照射すると、opTDP-43h は次第に細胞質に移行し、凝集体を形成する [1]。この時、opTDP-43h が細胞核ではなく、細胞質に移行して凝集するメカニズムは、不明であった。この細胞質への移行のメカニズムを理解するために、opTDP-43h の RNA への結合が細胞質への移行に果たす役割を検証することとした。

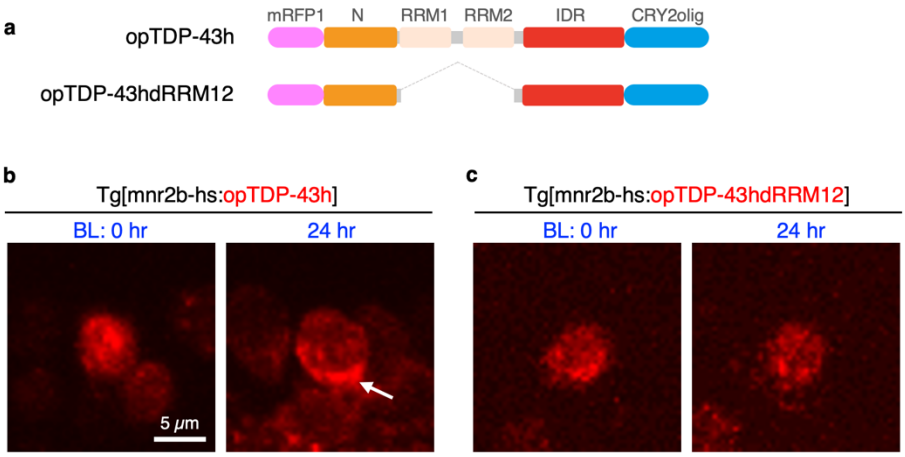


図 2. opTDP-43h の細胞内局在において RNA 結合ドメインが果たす役割

a) opTDP-43hdRRM12 は、2 つの RNA 結合ドメインを欠失している。

b) opTDP-43h は、24 時間の青色光照射 (BL) によって細胞質に移行する。矢印は、細胞質に蓄積した opTDP-43h。

c) opTDP-43hdRRM12 は、24 時間の青色光照射後も、主に細胞核に局在する。

opTDP-43h の RNA 結合ドメイン (RRM1 と RRM2) を欠失させた opTDP-43h (以下、opTDP-43hdRRM12 と記す) をコードする遺伝子断片を構築し (図 2a)、運動ニューロンの発生・分化を制御するホメオボックス遺伝子 *mnr2b* 座位を含む細菌染色体 (Bacterial artificial chromosome、以下、BAC と記す) の *mnr2b* プロモーター下に導入した。この BAC を染色体に組み込んだゼブラフィッシュ系統 Tg[mnr2b-hs:opTDP-43hdRRM12] を樹立したところ、*mnr2b* 陽性細胞 (ほとんど全ての脊髄運動ニューロンを含む) において opTDP-43hdRRM12 の発現が検出され、opTDP-43dRRM12 は、典型的な細胞核への局在を示した (図 2b)。光照射による opTDP-43h の細胞質への移行において RNA への結合が果たす役割を検証するために、受精後 48 時間の Tg[mnr2b-hs:opTDP-43hdRRM12]仔魚に対して、24 時間の青色光照射を行った。青色光照射によって opTDP-43h は細胞質に移行する一方で (図 2b)、opTDP-

43hdRRM12 は、細胞核に局在し続けた（図 2c）。この結果は、RNA 結合ドメインが細胞質への移行に必須の役割を果たしていることを示す。また、青色光によって多量体化した opTDP-43h は、RNA に結合することで細胞質に移行していることを示唆している。

次に、このような opTDP-43dRRM12 の細胞内局在に対して、内在性の TDP-43 タンパク質が及ぼす影響を評価するために、2 種類の内在性のゼブラフィッシュ *TDP-43* 遺伝子（*tardbp* と *tardbpl*）が共に破壊された Tg[mnr2b-hs:opTDP-43hdRRM12]フィッシュ（以下、TDP-43-DKO Tg[mnr2b-hs:opTDP-43hdRRM12]と記す）を作製した。興味深いことに、TDP-43-DKO Tg[mnr2b-hs:opTDP-43hdRRM12]フィッシュの *mnr2b* 陽性細胞においては、青色光非照射条件において、opTDP-43hdRRM12 の典型定な細胞核への局在パターンは喪失し、opTDP-43hdRRM12 の大きな顆粒構造が、細胞体領域や、細胞体と軸索の境界部分に観察された。この結果は、opTDP-43hdRRM12 そのものには、細胞核へ局在する能力が備わっていないことを示している。すなわち、TDP-43 の細胞核への局在には、RNA への結合が重要な役割を果たしていることを示唆している。また、内在性 TDP-43 の存在下では、opTDP-43hdRRM12 は細胞核への局在を示したことから、opTDP-43hdRRM12 は内在性 TDP-43 との相互作用によって、細胞核に局在していることが示唆された。

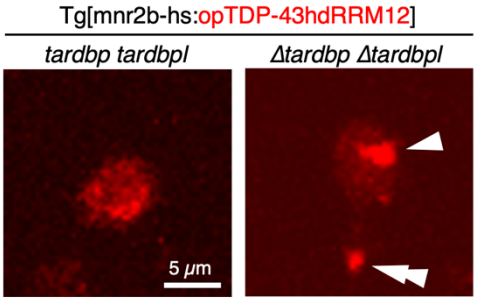


図 3. RNA 結合ドメインは、opTDP-43h の核局在に必須である
内在性の *TDP-43* 遺伝子が破壊された運動ニューロン（右）では、opTDP-43hdRRM12 は細胞体（矢頭）や、細胞体と軸索の接続領域（二重矢頭、細胞質領域に相当）に顆粒状構造を形成する。

考　察

健康な細胞では、細胞核に豊富に存在する TDP-43 が、ALS の運動ニューロンでは細胞質で凝集するメカニズムは理解されていない。ALS において、細胞質における TDP-43 の凝集体が細胞毒性を発揮しているか否かについては論争が続いているが、TDP-43 の凝集体が毒性を発揮しているならば、TDP-43 の細胞質への移行を抑制することにより、TDP-43 の細胞毒性を緩和できる可能性がある。その為、TDP-43 が細胞質へ移行するメカニズムの理解は ALS 治療戦略の構築においても重要である。

TDP-43 に含まれる 2 つの RNA 結合ドメイン（RRM1 と RRM2）のうち、RRM2 にはバイオインフォーマティクス的手法によって予測される核外搬出シグナル（Nuclear export signal：NES）が含まれる。この“推定 NES”の変異によって、細胞核内で TDP-43 が顆粒構造を形成することから、“推定 NES”は、実際に核外搬出シグナルとして機能していると提唱された [4]。しかし、この“推定 NES”を認識するとされる核外搬出レセプターXPO1 によって TDP-43 が核外搬出されることを示す試みがなされるも、これを支持する結果は得られておらず、論争が続いている [5〜7]。

本研究では、RNA 結合ドメインの欠失によって opTDP-43hdRRM12 が、細胞核、細胞質を問わず、異常な顆粒状構造を形成することを示した。このことから、細胞核と細胞質を往来しつつ細胞核に豊富に局在する、という TDP-43 の特性は、RNA と結合することにより保たれている可能性が示唆された。特に、この異常な opTDP-43hdRRM12 の顆粒構造が、細胞体と軸索の接続領域（つまり細胞質）にも検出されたことは、“推定 NES”が必ずしも NES として機能していないことを示唆している。また、このような際立った opTDP-43hdRRM12 の顆粒状構造は、内在性 TDP-

43 が存在する状態では検出されないことから、opTDP-43hdRRM12 そのものは RNA に結合しなくても、内在性 TDP-43 との相互作用により、正常な細胞内局在を示すことが可能になることがわかった。この結果は、TDP-43 変異体の細胞内局在は、内在性 TDP-43 により大きく影響を受けることを示しているため、先行研究、及び、今後の実験における TDP-43 局在の解釈においては、この点に留意する必要がある。

内在性 TDP-43 が存在する状態で細胞核に局在する opTDP-43hdRRM12 が、青色光を照射しても細胞質に移行しないという結果は、opTDP-43h が RNA への結合を介して細胞質へ移行している可能性を示唆している。この考えは、TDP-43 の核外搬出には RNA 結合は必要ないという先行研究［6］と、一見異なる。青色光によってオリゴマー化した opTDP-43h のみが、特異的に RNA に結合したまま核外に搬出されている可能性があり、今後、TDP-43 のオリゴマー化状態、RNA 結合、細胞内局在の関係性を理解する上で、大変興味深い。本研究で用いた opTDP-43hdRRM12 は、TDP-43 タンパク質分子の一次構造の中央部およそ 3 分の 1 を欠失する大きな構造変化を伴っている為に、今後、RNA 結合能を低下させる点変異を用いた研究によって、本研究結果を再検証することが必要である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京医科大学ケミカルバイオロジー講座の半田宏特任教授、国立遺伝学研究所発生遺伝学研究室の川上浩一教授である。ゼブラフィッシュの飼育管理をしてくださった国立遺伝学研究所発生遺伝学研究室の皆さんに深く感謝する。

文　献

1） Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y, Oda T. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. Biochem Biophys Res Commun. 2006 Dec 22;351(3):602-11. PMID: 17084815 doi: 10.1016/j.bbrc.2006.10.093.

2） 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, Lee VM. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. Science. 2006 Oct 6;314(5796):130-3. PMID: 17023659 doi: 10.1126/science.1134108.

3） Asakawa K, Handa H, Kawakami K. Optogenetic modulation of TDP-43 oligomerization accelerates ALS-related pathologies in the spinal motor neurons. Nat Commun. 2020 Feb 21;11(1):1004. PMID: 32081878 doi: 10.1038/s41467-020-14815-x.

4） Winton MJ, Igaz LM, Wong MM, Kwong LK, Trojanowski JQ, Lee VM. Disturbance of nuclear and cytoplasmic TAR DNA-binding protein (TDP-43) induces disease-like redistribution, sequestration, and aggregate formation. J Biol Chem. 2008 May 9;283(19):13302-9. PMID: 18305110 doi: 10.1074/jbc.M800342200.

5） Archbold HC, Jackson KL, Arora A, Weskamp K, Tank EM, Li X, Miguez R, Dayton RD, Tamir S, Klein RL, Barmada SJ. TDP43 nuclear export and neurodegeneration in models of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. Sci Rep. 2018 Mar 15;8(1):4606. PMID: 29545601 doi: 10.1038/s41598-018-22858-w.

6） Ederle H, Funk C, Abou-Ajram C, Hutten S, Funk EBE, Kehlenbach RH, Bailer SM, Dormann D. Nuclear egress of TDP-43 and FUS occurs independently of Exportin-1/CRM1. Sci Rep. 2018 May 4;8(1):7084. PMID: 29728564 doi: 10.1038/s41598-018-25007-5.

7） Pinarbasi ES, Cağatay T, Fung HYJ, Li YC, Chook YM, Thomas PJ. Active nuclear import and passive nuclear export are the primary determinants of TDP-43 localization. Sci Rep. 2018 May 4;8(1):7083. PMID: 29728608 doi: 10.1038/s41598-018-25008-4.