

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

浅川 和秀

Key words: 神経変性疾患, TDP-43, ALS, 運動ニューロン, 光遺伝学

神経系は、身体や外界の環境の変化を感知し、生体の機能を適切に調節する役割を担っている。このため、神経系の異常を伴う疾患の症状は多岐にわたる。ゼブラフィッシュは、ヒトと相同な中枢神経系の基本構造を持っており、中枢神経系を構成する神経細胞のタイプの多くもヒトと相同である。更に、遺伝子のおよそ70%がヒトに保存されていることから、様々な神経疾患の細胞メカニズムや遺伝要因を研究するための優れたモデル動物として活躍している。本稿では、まず、この四半世紀で急速に発展したゼブラフィッシュを用いた疾患研究とその背景を概観し、その後に、筆者が取り組んでいる神経変性疾患の一つ、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) のゼブラフィッシュモデルの研究を紹介し、神経疾患の研究におけるゼブラフィッシュの有用性と課題について議論したい。

I ゼブラフィッシュ遺伝学を用いた
疾患研究の興隆

1990年代後半から2000年代にかけて、表現型を指標にして網羅的に変異体を単離し、原因遺伝子を同定する順遺伝学的アプローチによって、反射的な運動や行動に異常を示すゼブラフィッシュ変異体が多数単離された¹⁻³⁾。これら変異体のなかには、ヒト疾患の病態を短期間で再現するものなど、疾患研究に有用なものが多数含まれた。一

方で、単離された変異体の原因変異を、運動や行動の表現型を指標に同定することは大きな労力を要する、という難点もあった。2010年代に入ると、TALENやCRISPR-Cas9などのゲノム編集技術がゼブラフィッシュにおいても盛んに用いられるようになり⁴⁻⁶⁾、既知の疾患遺伝子や、ヒトゲノムの解析から予言される疾患遺伝子の候補に変異を導入して変異体を作製する逆遺伝学的アプローチによって、より直接的に神経疾患の病態や、その遺伝要因を研究することが可能になった。

こうしたゲノム編集技術の到来と並行して、トランスジェニック技術を用いた中枢神経系細胞の可視化⁷⁾、Gal4トラップ法を用いた遺伝子の異所発現による細胞機能の操作^{8,9)}、光遺伝学を用いた神経細胞機能の操作¹⁰⁾、更には、カルシウムブローブを用いた広範な脳神経活動のイメージング^{11,12)}などの、中枢神経系の細胞や遺伝子の解析法も著しく発達した。こうした基盤技術の底上げにより、ゼブラフィッシュは、統合失調症、自閉症、てんかんなどを含む、様々な神経疾患の遺伝要因や細胞要因の研究に用いられるようになっていく¹³⁻¹⁶⁾。

更に、ここ10年余りの研究によって、ゼブラフィッシュの情動、認知行動、あるいは、社会的行動の神経基盤が明らかにされ始めている¹⁷⁻²⁰⁾。ゼブラフィッシュを用いたこれらの高次の神経ネットワーク機能の解析系は、今後、現代におい

Modelling neurological diseases using zebrafish

Asakawa Kazuhide: 国立遺伝学研究所発生遺伝学研究室 (〒411-8540 静岡県三島市谷田1111)

0370-9531/12/¥500/論文/JCOPY

て大きな社会問題となっている“心の病”の細胞メカニズムや遺伝要因を解明するための重要な疾患モデルとなっていくことが予想される。

II ゼブラフィッシュは非遺伝性の神経変性疾患をモデル化できるか？

特定の脳神経系の機能が徐々に失われていく神経変性疾患は、先進国だけでおよそ 2,000 万人が患っている認知症の最も大きい原因であり²¹⁾、その原因究明と治療法の開発は、現代社会が抱える喫緊の課題である。神経変性疾患は、人生の後半に発症することが多く、主要なリスク因子の一つは加齢である。研究室における標準的な飼育条件ではたかだか数年の寿命であるゼブラフィッシュを用いて、神経変性疾患の病態をモデル化できるだろうか？

近年の研究により、ゲノム編集法技術を用いて神経変性疾患の関連遺伝子に変異を導入することで、ゼブラフィッシュにおいても神経変性疾患の病態を再現できることが報告されている。例えば、変異が起るとパーキンソン病が発症しやすくなることが示されている糖脂質分解酵素グルコセレブロシダーゼ遺伝子のゼブラフィッシュパラログに変異を導入すると、3 か月齢においてドーパミン神経細胞の減少、ミトコンドリア DNA の細胞質への放出、運動障害などの病態が再現されることが報告された²²⁾。この変異体を細胞レベルや分子レベルに掘り下げて更に研究を進めることは、パーキンソン病のしくみの解明や、病態を緩和する低分子化合物のスクリーニングや評価に有用であると期待される。

筆者らは、脳からの神経シグナルを筋肉に伝達する役目を担う神経細胞“運動ニューロン”が変性して全身の筋肉が衰退してしまう、ALS の原因究明に取り組んでいる。ALS は、年間約 10 万人に 2 人の割合で発症し、わが国では、約 9,000 人がこの難病を患っていると推計されている。ALS の約 5-10% は、単一の遺伝子変異に連鎖して発症する家族性 ALS であるが、残りの約 90-95% の ALS は、遺伝しない孤発性である。つまり、ほとんどの ALS には、その原因となる単一の遺伝子変異が存在しないため、原因遺伝子のゼブラ

フィッシュパラログに変異を導入して病態を再現するというアプローチをとることができない。このような非遺伝性の ALS を、ゼブラフィッシュを用いてモデル化できるのだろうか？

III 運動ニューロンの細胞生物学的研究に適したゼブラフィッシュ

孤発性 ALS には単一の原因変異を見いだすことはできないが、運動ニューロンの細胞質に、異常な物質の集積(封入体)が蓄積する、という共通点があることが知られていた。2006 年に、この封入体の主成分が、TDP-43 と呼ばれるタンパク質の凝集体であることが明らかにされた^{23,24)}。TDP-43 は、ゼブラフィッシュを含む脊椎動物や昆虫にも広く保存された RNA/DNA 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、染色体構造の維持、遺伝子の転写、転写産物の編集、DNA 損傷への修復応答など、様々な機能を担っている。また、TDP-43 は、細胞核と細胞質を往来しており、編集された mRNA の細胞内輸送やタンパク質翻訳などの RNA の制御機能(RNA 代謝)を担っている。TDP-43 が、遺伝子発現制御の様々な階層で機能を発揮するためには、カルボキシ末端側にある天然変性領域(intrinsically disordered protein region: IDR)と呼ばれる固定された三次元構造をとらないドメインの機能が重要であると考えられている。TDP-43 をコードする *TARDBP* 遺伝子の変異にリンクしたまれに見いだされる家族性 ALS では、変異部位が IDR に集中していることから²⁵⁾、IDR の異常によって TDP-43 の非可逆的な凝集が起こり、細胞質に凝集体が蓄積する、と予想されている。

ALS の変性運動ニューロンには TDP-43 の凝集体が蓄積する、という相関関係から言われる、「TDP-43 の凝集が原因で運動ニューロンが変性するのではないか」という病態仮説は非常に魅力的であるが、実は、この仮説を運動ニューロンで検証することは容易ではない。手脚や体幹を動かす筋肉の収縮をコントロールする運動ニューロンは、背骨の中の空間を走行する直径 1 cm ほどの脊髄で脳からの神経シグナルを受け取り、神経軸索と呼ばれる細長いケーブルを介して筋肉に伝

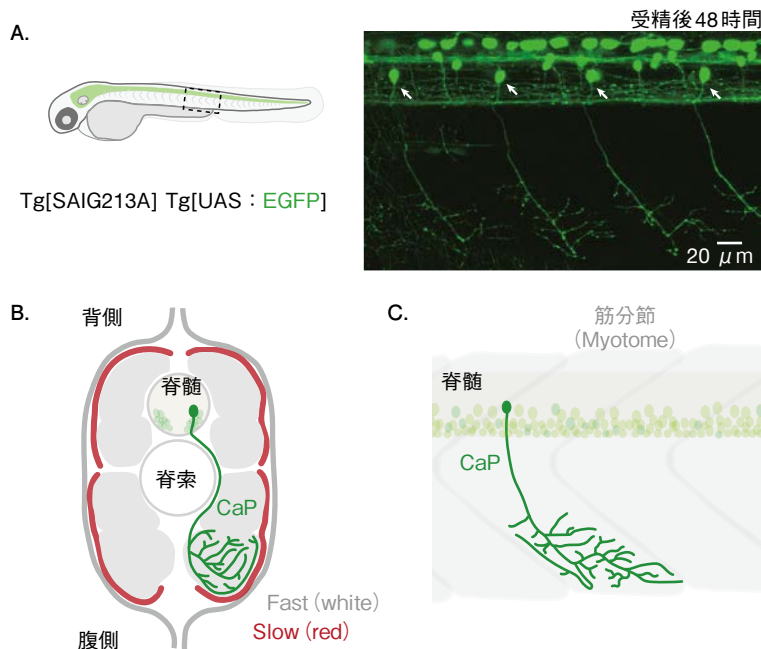


図 1 ゼブラフィッシュにおける運動ニューロンのライブイメージング (文献 30 より一部改変して引用)

A. 一次運動ニューロン CaP (矢印) に酵母転写因子 Gal4 を発現する熱帯魚ゼブラフィッシュ Tg [SAIG213A] Tg [UAS : EGFP] 系統の仔魚
B, C. CaP は、筋分節 (Myotome) の腹側を支配する。Fast : 速筋, Slow : 遅筋

達している。このような大きく複雑な形態を持った運動ニューロンの全体像を捉えることや、運動ニューロンのなかの TDP-43 の動的な性質を研究することは非常に困難である。このような制約から、TDP-43 の凝集が原因で運動ニューロンが変性するのか、という仮説の妥当性は検証されていない。この仮説の検証は、TDP-43 の凝集体の形成を抑制することや、あるいは、蓄積した凝集体を除去することが、ALS の治療戦略となるのか否かを判断するうえで、非常に重要な研究課題として残されている。

筆者らは、この仮説の検証は、運動ニューロンが観察しにくい哺乳動物では困難であるが、ゼブラフィッシュを利用すれば可能になるのではないかと考えた。ゼブラフィッシュの仔魚は、身体組織の透明性が高いため、適切な蛍光タンパク質を発現させることで運動ニューロンの全体像や細胞内部の構造を、個体を生かしたまま観察することができる (図 1)。ゼブラフィッシュ仔魚の脊髄は、30 以上の脊髄節が身体の前後軸に沿って連

なった繰り返し構造をとっており、半脊髄節には 60 個ほどの運動ニューロンが含まれている。筆者らは、独自に開発したゼブラフィッシュ Gal4 トラップ法⁹⁾を利用して、半脊髄当たり 1 つだけ含まれる CaP と呼ばれる一次運動ニューロンに Gal4 を発現するトランスジェニック系統 Tg [SAIG213A] を取得した。CaP は、骨格筋の分節構造 (Myotome) の腹側 3 分の 1 ほどの領域を支配しており、CaP の神経軸索の総長が脊髄節間ではほぼ同じであることから、神経軸索の総長を指標にして TDP-43 の毒性を定量的に評価することができるのではないかと考えた。

では、CaP で TDP-43 を凝集させるには、どうしたらよいのであろうか。筆者らは、TDP-43 を凝集させる手法を模索する過程で、OptoDroplet 法と呼ばれる光遺伝学的手法に着目した。OptoDroplet 法は、青い光を吸収すると自己会合して凝集するシロイヌナズナの光受容タンパク質 Cryptochrome (CRY2) を IDR に融合させ、CRY2-IDR 融合タンパク質の液-液相分離や相転移を、

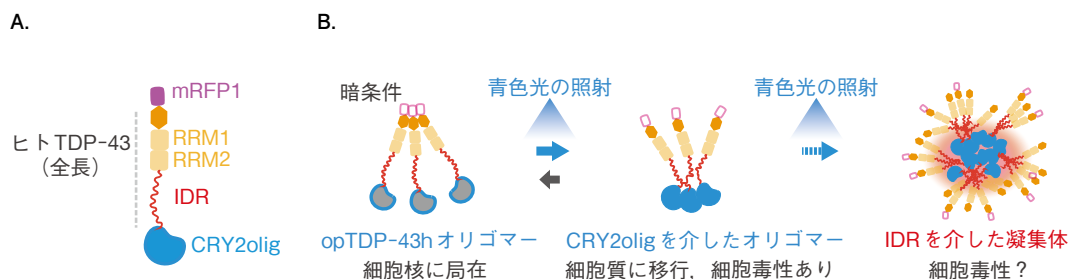


図 2 光遺伝学を用いた TDP-43 凝集体の形成誘導

A. 光遺伝学型 TDP-43 (opTDP-43h) の構造。RRM1 と RRM2 は、RNA 結合ドメイン

B. 青色光の照射によって opTDP-43h が凝集体を形成する推定メカニズム。opTDP-43h は、明確な凝集体として蓄積する前に、運動ニューロンに障害を与えている。

光照射によってコントロールする手法である。この手法は、培養細胞において IDR の凝集をコントロールすることが可能であるが^{26,27)}、筆者らは、身体組織の光透過性が高いゼブラフィッシュ仔魚ならば、運動ニューロンの TDP-43 を凝集させることに応用できるのではないかと考えた。そこで、ヒト TDP-43 全長のカルボキシ末端(C 末端)側に、凝集を促進する変異を導入した CRY2 を付加した融合タンパク質(図2)(以下、opTDP-43h と記す)を作製し、ほぼすべての運動ニューロンに opTDP-43h を発現する仔魚を作製した。

この仔魚をアガロースに包埋し、3 時間にわたって青色光を照射すると、意外なことに、運動ニューロンの細胞核に局在していた opTDP-43h が、細胞核と細胞質を含む細胞全体に拡散し、明確な凝集体の蓄積は認められなかった。また、3 時間の青色光照射後、青色光照射を停止し、暗所に戻して飼育を続けると、opTDP-43h は凝集体を形成せず、再び細胞核への局在を回復した。筆者らは、このような opTDP-43 の細胞全体への一過的な拡散が及ぼす効果を評価するために、3 時間青色光を照射した CaP と、暗所で発生した CaP の細胞形態を詳しく比較した。その結果、3 時間青色光を照射した CaP では、神経軸索の総長が低下していた。この結果は、細胞質に凝集体として蓄積する前に、opTDP-43h が既に細胞毒性を発揮していることを示していた。また、本稿では詳細を割愛するが、数日間にわたって青色 LED を光照射できる飼育装置をセットアップすることで、運動ニューロンにおいて発現している opTDP-

43h が、青色光の照射によって細胞核から細胞全体に拡散し、やがて ALS の病態マーカーを含んだ凝集体を細胞質に形成することを確認した²⁸⁾。このことは、部分的にはあるが、ALS 病態に準えることができる TDP-43 の凝集を生体内の運動ニューロンで再現できたことを示している。

IV 疾患モデルの有用性と限界の評価の重要性

筆者らは、当初、TDP-43 の凝集が原因で運動ニューロンが変性するのか、という仮説を検証するために opTDP-43h を開発した。しかし、opTDP-43h を青色光照射によって自己会合させると、最終的には細胞質に opTDP-43h の凝集体が蓄積するものの、その前に、既に運動ニューロンが障害を受けている、という予想外の結果を得た。この結果は、この光遺伝学 ALS モデルでは、細胞質に蓄積する TDP-43 凝集体の毒性のみを評価できないため、TDP-43 凝集と運動ニューロン変性の因果関係の検証が困難であることを示していた。一方で、この光遺伝学 ALS モデルから得られた結果は、TDP-43 は凝集体を形成しなくても毒性を発揮することができる、という比較的新しい考え方²⁹⁾を支持する。更に、これまでアプローチが困難とされてきた、TDP-43 凝集の上流のイベントを研究するための貴重な *in vivo* 細胞モデルとなると期待される。

筆者らが作製した光遺伝学を使ったゼブラフィッシュ ALS モデルは、身体組織の光透過性に依存していることや、ゼブラフィッシュが成長

に従って青色光に対する生理的な反応性を発達させることなどから、実験は仔魚期に限定されており、今後、稚魚や成魚を用いた研究に発展させるためには、青色光の照射条件の更なる工夫が求められる。ALS においては、運動ニューロンが特異的に失われるメカニズムの一つとして、運動ニューロン間で TDP-43 の凝集が伝播されているのではないかと予想されている。稚魚期や成魚期に活発になると予想されるこのような運動ニューロン同士の相互作用、あるいは、免疫細胞などの異細胞種との相互作用などが関係する ALS 病態をゼブラフィッシュにおいて再現できるか否か、について現在検証中である。光遺伝学を使ったゼブラフィッシュ ALS モデルが、生体内の ALS 細胞モデルに限定されるのか、あるいは個体レベルの ALS モデルとして有用であるのかを見極めることが、今後の重要な検討課題である。孤発性 ALS を忠実に再現する動物モデルが存在せず、その開発が待望されている現状においては、限界を見極めたくて、個々の病態モデルの有用性を活かすことが重要である。

おわりに

神経疾患では、疾患部位への介入そのものが神経組織を傷つけ、障害を引き起こす可能性があるため、進行中の病態を研究することが難しい。このため、疾患のメカニズムの解明や治療法の開発には、疾患モデルが不可欠である。一方で、多くの神経変性疾患がそうであるように、疾患のメカニズム自体が未知な場合は、研究の解像度が上がれば上がるほど、疾患モデルで観察される現象が、ヒト病態を真に再現しているか否かは、実はよくわからない、というジレンマがある。このような状況でできることは、疾患の本質と予想される現象を切り取ったモデルを作製し、得られた実験結果から病態仮説を提唱し、その仮説が正しいか、また別のモデルで検証する、ということの繰り返しである。ALS 研究においても、動物、細胞、試験管、計算モデルを駆使して、世界中の多くの研究者がこのような試行錯誤を繰り返しながら研究を進めている。運動ニューロンが失われ身体を動かさなくなってしまうという ALS の特徴

を、今後、ゼブラフィッシュにおいて完全に再現できるようになるか否かは定かではないが、本稿で触れたように、ゼブラフィッシュが、他の高等動物モデルに比して、中枢神経系を細胞レベル、更には分子レベルで研究する優れた動物モデルであることは疑いが無い。このようなゼブラフィッシュの特性を活かした研究から、他のモデルではアプローチできない疾患メカニズムに光が当たり、それが他のモデルの研究を加速させ、全体として疾患の克服につながることを願っている。

●文 献

- 1) Granato M, van Eeden FJ, Schach U et al : *Development*. **123** : 399-413, 1996
- 2) Muto A, Orger MB, Wehman AM et al : *PLoS Genet*. **1** : e66, 2005
- 3) Wolman MA, Jain RA, Marsden KC et al : *Neuron*. **85** : 1200-1211, 2015
- 4) Huang P, Xiao A, Zhou M et al : *Nat Biotechnol*. **29** : 699-700, 2011
- 5) Sander JD, Cade L, Khayter C et al : *Nat Biotechnol*. **29** : 697-698, 2011
- 6) Hwang WY, Fu Y, Reyon D et al : *Nat Biotechnol*. **31** : 227-229, 2013
- 7) Higashijima S, Hotta Y, Okamoto H : *J Neurosci*. **20** : 206-218, 2000
- 8) Scott EK, Mason L, Arrenberg AB et al : *Nat Methods*. **4** : 323-326, 2007
- 9) Asakawa K, Suster ML, Mizusawa K et al : *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105** : 1255-1260, 2008
- 10) Wyart C, Del Bene F, Warp E et al : *Nature*. **461** : 407-410, 2009
- 11) Muto A, Ohkura M, Abe G et al : *Curr Biol*. **23** : 307-311, 2013
- 12) Ahrens MB, Orger MB, Robson DN et al : *Nat Methods*. **10** : 413-420, 2013
- 13) Thyme SB, Pieper LM, Li EH et al : *Cell*. **177** : 478-491.e20, 2019
- 14) Hoffman EJ, Turner KJ, Fernandez JM et al : *Neuron*. **89** : 725-733, 2016
- 15) Stödlberg T, McTague A, Ruiz AJ et al : *Nat Commun*. **6** : 8038, 2015
- 16) Diaz Verdugo C, Myren-Svelstad S, Aydin E et al : *Nat Commun*. **10** : 3830, 2019
- 17) Chou MY, Amo R, Kinoshita M et al : *Science*. **352** : 87-90, 2016
- 18) Okamoto H, Cherng BW, Nakajo H et al : *Curr Opin Neurobiol*. **68** : 36-43, 2021
- 19) Torigoe M, Islam T, Kakinuma H et al : *Nat Commun*. **12** : 5712, 2021
- 20) Kappel JM, Förster D, Slangewal K et al : *Nature*. **608** : 146-152, 2022
- 21) Zheng JC, Chen S : *Transl Neurodegener*. **11** : 1, 2022

- 22) Matsui H, Ito J, Matsui N et al : *Nat Commun.* **12** : 3101, 2021
- 23) Arai T, Hasegawa M, Akiyama H et al : *Biochem Biophys Res Commun.* **351** : 602-611, 2006
- 24) Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK et al : *Science.* **314** : 130-133, 2006
- 25) Lagier-Tourenne C, Cleveland DW : *Cell.* **136** : 1001-1004, 2009
- 26) Taslimi A, Vrana JD, Chen D et al : *Nat Commun.* **5** : 4925, 2014
- 27) Shin Y, Berry J, Pannucci N et al : *Cell.* **168** : 159-171.e14, 2017
- 28) Asakawa K, Handa H, Kawakami K : *Nat Commun.* **11** : 1004, 2020
- 29) Arnold ES, Ling SC, Huelga SC et al : *Proc Natl Acad Sci U S A.* **110** : E736-E745, 2013
- 30) Asakawa K, Handa H, Kawakami K : *Front Cell Dev Biol.* **9** : 640414, 2021