

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07982

研究課題名(和文) ミクログリア神経疾患関連遺伝子を制御するRNA結合タンパク質

研究課題名(英文) RNA-binding proteins that regulate microglial genes associated with neurological diseases

研究代表者

紀 嘉浩 (Kino, Yoshihiro)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80415140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ミクログリアは脳を構成する細胞の一種であり、各種の脳疾患において近年その役割が注目されている。本研究では特にアルツハイマー病に関連する遺伝子であるTREM2およびCD33の発現制御を担う分子機構の解明を目指した。TREM2のエキソン3は選択的スプライシングの制御を受けるが、本研究ではその制御因子としてCELF2を見出した。さらにTREM2が5'非翻訳領域依存的に翻訳の段階でも制御を受けることも明らかにした。また、CD33のエキソン2の選択的スプライシングはミクログリアの貪食能に影響するが、HNRNPAファミリーのRNA結合タンパク質がこのスプライシングを制御することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではミクログリアの機能に関わるタンパク質であるTREM2とCD33がどのような発現制御を受けているかを明らかにした。この制御機構の知見を応用することで、両タンパク質の発現の人工的な操作が可能であると考えられる。TREM2やCD33はアルツハイマー病に影響するため、新たな治療介入の道が拓かれる。また、今回、ヒトとマウスのTREM2を比較したが、制御の受け方には種間で差がみられた。疾患研究ではマウスが多用されるが、少なくとも一部の性質はマウスのTREM2では再現されなかった。マウスモデルの使用は有用であるが、ミクログリアの動態の解釈には注意が必要であることを示唆する結果となった。

研究成果の概要(英文)：Microglial cells are brain cells implicated in the pathomechanisms of neurological disorders, including Alzheimer's disease (AD). Many genes that are preferentially expressed in microglia have been identified as the genetic risk of AD. Some of these genes have essential roles in the functions of microglia. In this study, we attempted to reveal the regulation of these genes at the level of RNA metabolisms. Previously, we reported that exon 3 of TREM2 is alternatively spliced. Here, we identified the RNA-binding protein CELF2 as a regulator of exon 3 splicing. In addition, we revealed that translation of TREM2 is regulated through its 5' untranslated region. Importantly, both exon 3 splicing and translational regulation of TREM2 are specific to primates. We also focused on the splicing regulation of CD33, in which exon 2 splicing is associated with the risk of AD. We found that HNRNPA family proteins suppress exon 2 inclusion, promoting the production of a protective isoform of CD33.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA結合タンパク質 アルツハイマー病 スプライシング hnRNPファミリー CD33 TREM2

1. 研究開始当初の背景

ミクログリアは脳の免疫担当細胞であり、正常な脳の発達・維持に加え、各種の神経疾患での役割が注目されている。ミクログリアは細胞の残骸や凝集タンパク質などの不要物を貪食・除去し、細胞環境の維持に関わる一方で、炎症反応による細胞障害やシナプスの過剰な除去により、脳に悪影響を与える側面も示唆されている。神経疾患においてミクログリアが注目される大きな理由の一つとして、多数のミクログリア関連遺伝子がアルツハイマー病リスク遺伝子として同定されてきたことが挙げられる。特に、アルツハイマー病リスク遺伝子として著名な APOE が特定のミクログリア集団で高発現すること、また APOE に次いで強力なリスクバリエーションを持つ TREM2 がミクログリア特異的に発現する膜タンパク質であり、APOE やアミロイドβと結合することが最近明らかになっている。このような背景のもと、近年、様々な条件下でミクログリアの遺伝子発現プロファイルを比較解析した報告が相次ぎ、ミクログリアの細胞系譜や、環境応答における遺伝子発現変化、ミクログリアマーカー遺伝子などが続々と明らかにされている。特に興味深い発見として、神経変性疾患で特異的に出現するミクログリアのサブグループ: disease-associated microglia (DAM) が挙げられる。定常時のミクログリアから DAM への変化には、上述の TREM2 が関わる。TREM2 の欠損や機能低下はアミロイド斑に対するミクログリアの集積と貪食を低下させる。先行研究において、我々は TREM2 の exon 3 が選択的スプライシングを受け、全長型の TREM2 の発現に影響することを見出した。しかし、その制御機構は不明である。一方、シアル酸結合タンパク質である CD33 も脳においてはミクログリア特異的遺伝子であり、全長型 CD33 はミクログリアの貪食能等を抑制する。CD33 の exon 2 は選択的スプライシングを示し、exon 2 を欠いたアイソフォームは逆にミクログリアの貪食能を増加させることが示唆されている。興味深いことに、CD33 の exon 2 の多型である rs12459419 はこのエキソンの選択的スプライシングに影響し、アルツハイマー病に対して保護的な rs12459419 のアリルはエキソン 2 のスキッピングを促進する効果を持つ。従って、多型以外にも exon 2 の挿入を促す因子はアルツハイマー病に対して保護的な効果を示す可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、ミクログリアに発現し、アルツハイマー病発症リスクと関連する遺伝子の RNA 代謝に注目し、その制御機構の解明を目指した。対象とする遺伝子として TREM2、CD33、TYROBP、PTK2B、APOE、TBC1D7 を扱い、特に TREM2 と CD33 を優先して解析した。

3. 研究の方法

TREM2 および CD33 遺伝子のゲノム断片に相当する minigene を発現するコンストラクトを作製し、各種スプライシング制御因子と共発現させることでその効果を判定した。得られた候補因子について、過剰発現だけでなく siRNA を用いたノックダウンの影響を調べ、一貫した結果が得られるかを検討した。外来の minigene だけでなく、THP-1 細胞やヒト iPS 細胞由来ミクログリアなどの内在性遺伝子のスプライシングへの影響も検討した。また、候補因子とその標的 RNA の特異的結合を RNA 免疫沈降法 (RIP) で検出した。さらに、得られた候補因子の相同遺伝子 (パラログ・オルソログ) の効果に加えて、TREM2・CD33 がそれぞれヒトとマウスで同じようにスプライシング制御を受けるかを確認した。TREM2 についてはスプライシングだけでなく、5'非翻訳領域 (5'UTR) の効果を調べた。5'UTR に存在する開始コドン (uAUG) または従来の開始コドン (dAUG) を変異させた発現コンストラクトを作製し、TREM2 タンパク質の発現に対する影響を検討した。さらに、uAUG からの翻訳開始により産生が予測される uTREM2 の検出を試みた。

4. 研究成果

TREM2 の minigene を用いた核種 RNA 結合タンパク質の検討の結果、RNA 結合タンパク質 CELF1、CELF2 が exon 3 の制御因子であることが示唆された。これらの過剰発現により exon 3 の挿入が抑制され、逆にノックダウンにより exon 3 の挿入が促進された。CELF1 より CELF2 の効果が強い傾向がみられ、同じファミリーのタンパク質である CELF3、CELF4 は影響を示さなかった。CELF2 は exon 3 のスキッピングを促進することで全長型 TREM2 タンパク質の発現を低下させた。次に TREM2 の exon 3 の選択的スプライシングの種間の保存性を検討した。ヒトとアフリカミドリザルの TREM2 では共通して exon 3 の選択的スプライシングが確認されたが、マウス Trem2 では exon 3 が構成的に挿入された。CELF2 に対する応答性も霊長類 TREM2 に共通していたが、マウス Trem2 では Celf2 を過剰発現してもスプライシングパターンの変化を引き起こさなかった。ヒトとマウスの TREM2 のスプライシングの違いを調べるた

め、両種のキメラ minigene を作製し、CELF2 発現時の変化を調べた。その結果、ヒトの intron 3 の領域に CELF2 応答配列が存在することが示唆され、この領域と CELF2 の結合も確認された。以上より、CELF2 がヒト TREM2 の制御因子であることを見出した。

ヒト TREM2 遺伝子の 5'UTR には開始コドン (uAUG) が存在するため、これが TREM2 タンパク質の翻訳に影響する可能性が考えられた。興味深いことに、多くの霊長類の TREM2 では uAUG が確認されるが、マウスを含む非霊長類の TREM2 には uAUG が存在しない。そこで、5'UTR および uAUG の影響を調べた。ヒトまたはマウスの TREM2 の 5'UTR をヒト TREM2 のコード領域の配列の上流に付加すると、ヒト 5'UTR の場合で TREM2 タンパク質の発現量低下がみられた。この低下は uAUG を変異させるとみられなくなった。次に uAUG から開始する TREM2 (uTREM2) の発現の検出を試みた。uTREM2 は従来の TREM (dTREM2) と比べて N 末端が 30 残基分長いタンパク質と予想される。TREM2 抗体を用いた免疫沈降で濃縮することで、通常の TREM2 に加えて高分子量側にバンドが検出された。このバンドを質量分析にかけた結果、uTREM2 特異的な N 末端領域に由来するペプチドが検出された。uTREM2 は不安定な糖タンパク質であり、産生後すみやかにプロテアソームで分解されることが判明したが、それ自体の機能は不明である。しかし、uAUG からの翻訳開始は dTREM2 の翻訳を抑制する効果を持つことが示唆された。また、アミノ酸飢餓時において、uAUG の有無により dTREM2 の発現量に差があることを見出した。以上より、霊長類の TREM2 の 5'UTR にみられる uAUG が dTREM2 の翻訳に影響することを明らかにした。

CD33 遺伝子の exon2 のスプライシング制御はミクログリアの機能に影響することが既に明らかにされており、その制御因子の特定は重要であると考えられる。CD33 minigene を用いた解析から、HNRNPA1 が候補因子として得られた。しかし、HNRNPA1 を過剰発現した際は exon 2 のスキッピングの促進が確認されたが、siRNA による発現抑制時には大きな変化がみられなかった。そこで、同じファミリーに属する HNRNPA2B1 および HNRNPA3 とともに同時に発現抑制したところ、CD33 の exon 2 の挿入が有意に促進された。これらの結果から、HNRNPA ファミリーの 3 つのタンパク質が冗長に CD33 のスプライシングを制御することが示唆された。HNRNPA1 と CD33 の mRNA 前駆体との結合を検討したところ、intron 2 への結合が示唆された。また、マウス Cd33 の exon 2 の選択的スプライシングについてはこれまで不明であったが、マウスの脳において exon 2 のスキッピングに加えて、ヒトでは生じない exon 2 の一部が欠けるスプライシングパターンが検出された。マウスにおいても Hnrnpa ファミリーが exon 2 のスキッピングを促進することが示唆された。以上より、HNRNPA ファミリーのタンパク質が CD33 の制御因子であることが明らかになった。

これらの結果から、ミクログリアの機能に重要なタンパク質の機能に関わる新たな制御因子を見出した。以上に加えて、アルツハイマー病関連遺伝子 PTK2B、TYROBP、TBC1D7 のスプライシング制御とその影響についても新たな知見が得られたため、今後論文化する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11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 Masuda Youki, Fujihara Koji, Hayashi Satoshi, Sasaki Hiroaki, Kino Yoshihiro, Kamauchi Hitoshi, Noji Masahiro, Satoh Jun-ichi, Takanami Toshikatsu, Kinoshita Kaoru, Koyama Kiyotaka	4. 巻 84
2. 論文標題 Inhibition of BACE1 and Amyloid- Aggregation by Meroterpenoids from the Mushroom <i>Albatrellus yasudae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 1748 ~ 1754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.0c01329	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 Yokoya Masashi, Nakai Keiyo, Kawashima Miki, Kurakado Sanae, Sirimangkalakitti Natchanun, Kino Yoshihiro, Sugita Takashi, Kimura Shinya, Yamanaka Masamichi, Saito Naoki	4. 巻 99
2. 論文標題 Inhibition of BACE1 and amyloid aggregation by polyketide from <i>Streptomyces</i> sp.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Biology & Drug Design	6. 最初と最後の頁 264 ~ 276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cbdd.13980	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 Miyazaki Haruko, Yamanaka Tomoyuki, Oyama Fumitaka, Kino Yoshihiro, Kurosawa Masaru, Yamada-Kurosawa Mizuki, Yamano Risa, Shimogori Tomomi, Hattori Nobutaka, Nukina Nobuyuki	4. 巻 295
2. 論文標題 FACS-array?based cell purification yields a specific transcriptome of striatal medium spiny neurons in a murine Huntington disease model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 9768 ~ 9785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.012983	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 Yanaizu Motoaki, Washizu Chika, Nukina Nobuyuki, Satoh Jun-ichi, Kino Yoshihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 CELF2 regulates the species-specific alternative splicing of TREM2	5. 発行年 2020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/s41598-020-75057-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 -

1. 著者名 Sato Jun-ichi, Kino Yoshihiro, Yanaizu Motoaki, Ishida Tsuyoshi, Saito Yuko	4. 巻 9
2. 論文標題 Reactive astrocytes express Aggregatin (<i>FAM222A</i>) in the brains of Alzheimer's disease and Nasu-Hakola disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Intractable & Rare Diseases Research	6. 最初と最後の頁 217 ~ 221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/irdr.2020.03080	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 Sato Jun-ichi, Kino Yoshihiro, Yanaizu Motoaki, Ishida Tsuyoshi, Saito Yuko	4. 巻 8
2. 論文標題 Microglia express GPNMB in the brains of Alzheimer's disease and Nasu-Hakola disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Intractable & Rare Diseases Research	6. 最初と最後の頁 120 ~ 128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/irdr.2019.01049	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 Sato Jun-ichi, Kino Yoshihiro, Yanaizu Motoaki, Ishida Tsuyoshi, Saito Yuko	4. 巻 8
2. 論文標題 Microglia express TMEM119 in the brains of Nasu-Hakola disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Intractable & Rare Diseases Research	6. 最初と最後の頁 260 ~ 265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/irdr.2019.01123	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 Yatsu Genki, Kino Yoshihiro, Sasaki Hiroaki, Sato Jun-ichi, Kinoshita Kaoru, Koyama Kiyotaka	4. 巻 82
2. 論文標題 Meroterpenoids with BACE1 Inhibitory Activity from the Fruiting Body of <i>Boletinus asiaticus</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 1797 ~ 1801
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.8b01092	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 Sone J, Mitsuhashi S, Fujita A, Mizuguchi T, (20名省略), Kino Y, Katsuno M, Iwasaki Y, Yoshida M, Tanaka F, Suzuki I K., Frith M C., Matsumoto N, Sobue G	4. 巻 51
2. 論文標題 Long-read sequencing identifies GGC repeat expansions in NOTCH2NLC associated with neuronal intranuclear inclusion disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Genetics	6. 最初と最後の頁 1215 ~ 1221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41588-019-0459-y	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 Komuro Riho, Honda Yuka, Yanaizu Motoaki, Nagahama Masami, Kino Yoshihiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Alzheimer ' s Disease-Associated Alternative Splicing of CD33 Is Regulated by the HNRNPA Family Proteins	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 602 ~ 602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells12040602	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 Yanaizu Motoaki, Adachi Haruka, Araki Makoto, Kontani Kenji, Kino Yoshihiro	4. 巻 6
2. 論文標題 Translational regulation and protein-coding capacity of the 5' untranslated region of human TREM2	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 616 ~ 616
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-04998-6	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10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 柳津茂慧、足立 遥香、佐藤 準一、紀嘉浩
2. 発表標題 TREM2 5' UTRを介した新規発現制御機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小室璃歩、本多由佳、柳津茂慧、佐藤準一、紀嘉浩
2. 発表標題 hnRNPファミリータンパク質によるアルツハイマー病リスク遺伝子CD33の制御
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshihiro Kino, Motoaki Yanaizu, Yuka Honda, Jun-ichi Satoh
2. 発表標題 RNA-binding proteins that regulate genes associated with Alzheimer's disease
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 柳津 茂慧、石井 りさ、岩崎 大輝、足立 遥香、佐藤 準一、紀 嘉浩
2. 発表標題 TREM2タンパク質アイソフォームの発現調節メカニズム
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳津茂慧、紀嘉浩、佐藤準一
2. 発表標題 アルツハイマー病リスク遺伝子TREM2の種特異的な選択的スプライシング制御機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本多由佳、柳津茂慧、紀嘉浩、佐藤準一
2. 発表標題 アルツハイマー病リスク因子CD33のスプライシング制御因子の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小室 璃歩、本多 由佳、柳津 茂慧、長浜 正巳、紀 嘉浩
2. 発表標題 HNRNPA1によるCD33選択的スプライシングの制御とその進化的保存性
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柳津 茂慧、足立 遥香、紀 嘉浩
2. 発表標題 TREM2の翻訳における5' 非翻訳領域の役割
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土屋 菜美、柳津 茂慧、荒木 信、紺谷 圏二、紀 嘉浩
2. 発表標題 脳疾患関連遺伝子TBC1D7の選択的スプライシング制御とその意義
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023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
研究協力者	柳津 茂慧 (Yanaizu Motoaki)	明治薬科大学・病態RNA制御学・助教 (32684)	

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