

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：32684

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20700

研究課題名（和文）ミクログリアの機能調節におけるTREM2発現制御因子の役割

研究課題名（英文）The role of TREM2 regulatory factors in modulating microglial function

研究代表者

柳津 茂慧（Yanaizu, Motoaki）

明治薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20913362

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題は、アルツハイマー病リスク遺伝子TREM2の発現を制御する因子が、ミクログリアの機能調節においてどのような役割を担うのかを明らかにするための手がかりを得ることを目的とした研究課題である。本課題では、TREM2の翻訳制御に注目し、研究を進めた結果、TREM2の非コード領域における開始コドンにはTREM2の翻訳を抑制する役割があることを見出した。また、この開始コドンから翻訳された場合、通常よりもN末端が長いTREM2タンパク質が産生されることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病リスク遺伝子として知られているTREM2はミクログリアの機能を制御する事でも知られている。TREM2の発現量がミクログリアの機能調節に関与することが示唆されているが、発現量の変化がどのように生じるのかは知見が不足している。本課題によって明らかになったTREM2発現制御機構は、ミクログリアの機能レベルがどのように制御されているのかを明らかにする手がかりとなる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The objective of this project is to elucidate the role of regulatory factors of TREM2 known as a risk gene for Alzheimer's disease in modulating microglial function. Our studies revealed that the initiation codon in the non-coding region of TREM2 plays a role in suppressing TREM2 mRNA translation. Additionally, we found that translation from this initiation codon results in the production of a TREM2 protein with an extended N-terminus compared to the conventional TREM2 isoform.

研究分野：疾患RNA代謝

キーワード：アルツハイマー病 TREM2 ミクログリア 発現制御

1. 研究開始当初の背景

- (1) 認知症とは、正常な認知機能が障害され、日常生活に支障が出る状態のことを指し、認知症を発症する疾患には、血管性認知症やアルツハイマー病などが知られている。認知症は加齢が大きナリスク因子であることから、高齢化社会においては増加の一途をたどることが予測されている。特に、アルツハイマー病は認知症の原因疾患の中で頻度が最も高い。アルツハイマー病患者のゲノムを網羅的に解析することで、これまでに多くのリスク遺伝子が同定されてきた。その中でも、APOE 遺伝子における e4 や TREM2 遺伝子における rs75932628 (R47H をコードする) は、アルツハイマー病の発症リスクを増加させる因子として知られている。
- (2) アルツハイマー病のリスク遺伝子の多くは、ミクログリアという細胞に発現が認められることが知られている。ミクログリアとは、脳内の免疫担当細胞として知られており、前述の TREM2 は脳内ではミクログリアに発現する。これまでに TREM2 自体の機能の解明を目的とした研究成果が多く報告されており、TREM2 はミクログリアの機能を調節する役割があることが明らかになっている。さらに、脳内環境に依存したミクログリアの機能変化が生じることが示唆されており、この変化に TREM2 が関与することも示されている。この時、TREM2 の発現量が変化していることから、TREM2 の発現を調節する因子が、ミクログリアの機能変化に関与することが考えられる。しかしながら、TREM2 遺伝子の発現がどのような制御を受けているのか、そのメカニズムはよく分かっていなかった。我々はこれまでに、TREM2 exon 3 が選択的 exon で、exon 3 の使用の程度と TREM2 タンパク質の発現量との間に相関があること、この選択的 exon のスプライシングは RNA 結合タンパク質 CELF2 が制御因子であることを明らかにしている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、TREM2 の発現を制御する因子を同定すること、そしてミクログリアの機能調節において TREM2 の発現制御因子がどのような関与を示すのかを明らかにするための糸口を得ることを目的とした。TREM2 の発現制御機構を明らかにするにあたり、知見が不足している翻訳制御に注目した。

3. 研究の方法

作製した各 TREM2 発現ベクターを培養細胞に導入し、TREM2 の発現量の変化を検出することで、TREM2 の翻訳に影響する因子とそのメカニズムの解明を試みた。

4. 研究成果

(1) TREM2 5' 非翻訳領域における開始コドン (uAUG) の保存性

ゲノムブラウザを参照すると、TREM2 の 5' 非翻訳領域 (5' UTR) に開始コドンがあることが分かった (図 1 における緑マーカー部分)。TREM2 タンパク質は灰色でハイライトされた AUG (downstream AUG, dAUG) から翻訳される。一般的に、5' UTR に存在する開始コドンは、その遺伝子の mRNA の翻訳を調節する役割があることが知られている。TREM2 5' UTR に存在する開始コドン (upstream AUG, uAUG) は、一部の霊長類において保存されていることから、uAUG の役割は種特異的である可能性が考えられた (図 1)。

human	AUGCCUGAUCCUCUCUUUCUGCAGUUC AAGGGAAAGACGAGAUUCUUGCACAAGGCACUCUGCUUCUGCCCUUUGGCUGGGGAAGGGUGGCAUG
chimpanzee	AUGCCUGAUCCUCUCUUUCUGCAGUUC AAGGGAAAGACGAGAUUCUUGCACAAGGCACUCUGCAUCUGCCCUUUGGCUGGGGAAGGGUGGCAUG
marmoset	AUGCCUGAUCCUCUCUUUCUGCAGUUC AAGGGAAAGACGAGAUUCUUGCACAAGGCACUCUGCAUCUCUCCCUUUGGCUGGGGAAGGGUGGCAUG
mouse	GGCUUGGUCUUCUCUUUCUGCAGUUC AAGGGAAAGACGAGAUUCUUGCACAAGGCACUCUGCUUCUGCCCUUUGGCUGGGGAAGGGUGGCAUG
rat	UCAUCUCUUUCUGCAGUUC AAGGGAAAGACGAGAUUCUUGCACAAGGCACUCUGCUUCUGCCCUUUGGCUGGGGAAGGGUGGCAUG
cow	GUGGSCAGUUCUGGGGACCCUGA CCCUGUGA AAGACGAGAUUCUUGCACAAGGCACUCUGCUUCUGCCCUUUGGCUGGGGAAGGGUGGCAUG
pig	AGGCUCGACGUCUCUUUCUGCAGUUC AAGGGAAAGACGAGAUUCUUGCACAAGGCACUCUGCUUCUGCCCUUUGGCUGGGGAAGGGUGGCAUG

図1 各生物種におけるTREM2 uAUGの保存性

(2) TREM2 uAUG の役割の検討

次に、図2に示すように、5' UTR がない TREM2 (none)、uAUG が保持された TREM2 (WT)、uAUG を uGUG に置換した TREM2 (Mu)、dAUG を GUG に置換した TREM2 (Md)、uAUG、dAUG とともに置換した TREM2 (Mud) を作製した。これらの発現ベクターが Flp-In システムに対応した HEK293 で安定的に発現する HEK293 細胞株を作製し、各種の TREM2 発現ベクター由来の TREM2 タンパク質の発現量を検討した。その結果、WT で TREM2 タンパク質の発現量が減少し、Mu で回復した。この時、各 TREM2 発現ベクター由来の TREM2 mRNA の発現量に変化がなかった。従って、TREM2 uAUG は、TREM2 の翻訳を抑制する効果があることが明らかになった。

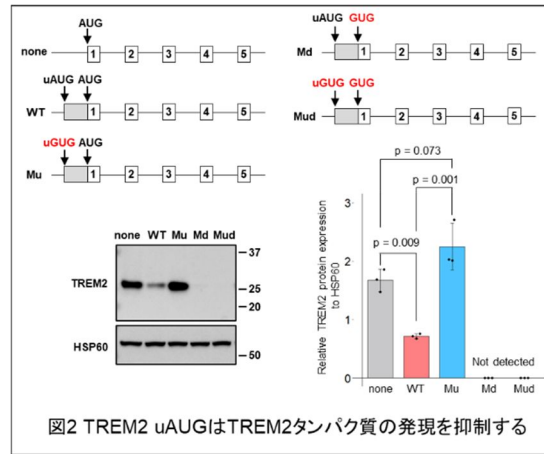


図2 TREM2 uAUGはTREM2タンパク質の発現を抑制する

(3) uAUG から翻訳されると N 末端が伸長した TREM2 タンパク質が発現する

図1より、TREM2 uAUG から dAUG までは、90 塩基である。つまり、uAUG から翻訳された場合、in-frame で翻訳が進行する可能性があり、その結果、dAUG から翻訳されて産生される TREM2 タンパク質 (dTREM2) よりも大きい TREM2 タンパク質が産生されることが

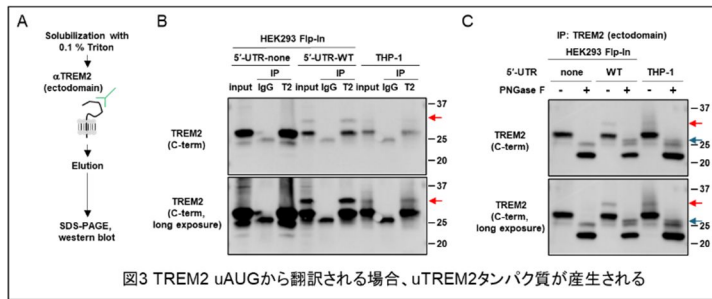


図3 TREM2 uAUGから翻訳される場合、uTREM2タンパク質が産生される

考えられる。もし、uAUG から翻訳されて産生された TREM2 タンパク質が存在するのであれば、TREM2 抗体によって認識され、免疫沈降で濃縮されることが考えられる (図 3A)。実際に、uAUG が存在する場合、つまり 5' UTR-WT では、dAUG から翻訳された TREM2 タンパク質に加えて、赤矢印で示す位置にバンドが検出された (図 3B)。これは uAUG から翻訳されて産生された TREM2 タンパク質 (uTREM2 タンパク質) であることが示唆された。uTREM2 タンパク質は、内在性 TREM2 を発現する細胞である THP-1 でも同様に検出された。さらに、免疫沈降後、N 型糖鎖を切断する酵素である PNGase F で消化すると、脱グリコシル化された uTREM2 と考えられるバンドが検出された (図 3C、青矢印)。

(4) uTREM2 はプロテアソームによって分解される

5' -UTR-WT, Md から uTREM2 が検出されるが (図 4A、赤矢印) プロテアソーム阻害剤 MG132 を処理すると、uTREM2 を示すバンドが消失し、特異的なバンドが検出された (図 4A、青矢印)。従って、uTREM2 はプロテアソームで分解されている可能性が考えられた。次に、MG132 で処理した細胞に対して、PNGase F で消化すると、脱グリコシル化された uTREM2 が検出された (図 4A、青矢印)。以上の結果から、プロテアソームで分解されなかった一部の uTREM2 がグリコシル化され、dTREM2 が産生されることが考えられる (図 4B)。

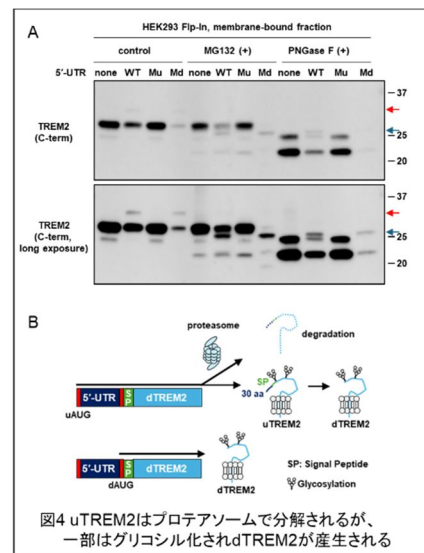


図4 uTREM2はプロテアソームで分解されるが、一部はグリコシル化されdTREM2が産生される

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 2件）

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 -
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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Motoaki Yanaizu, Haruka Adachi, Jun-ichi Satoh, Yoshihiro Kino
2. 発表標題 A regulatory mechanism of TREM2 through its 5' untranslated region
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳津茂慧、足立遙香、佐藤準一、紀嘉浩
2. 発表標題 TREM2タンパク質の発現におけるTREM2上流翻訳領域の役割
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 柳津茂慧、足立遥香、佐藤準一、紀嘉浩
2. 発表標題 TREM2上流開始コドンによるTREM2の翻訳制御機構
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022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 Motoaki Yanaizu, Haruka Adachi, Makoto Araki, Kenji Kontani, Yoshihiro Kino
2. 発表標題 The upstream AUG codon of TREM2 suppresses the translation of TREM2
3. 学会等名 第24回日本RNA学会年会
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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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