

論文の内容の要旨

論文題目

アルツハイマー病リスク因子 TREM2/DAP12 と相互作用する タンパク質の解明

氏名 木村 新伍

【序論】

アルツハイマー病 (AD) の発症機序においては、アミロイド β ペプチド ($A\beta$) が脳内に蓄積・凝集し、神経障害性を発揮することが重要と考えられている。近年、非神経細胞であるミクログリアに発現する受容体をコードする *TREM2* 遺伝子の一塩基多型が AD の発症リスクを高めることが示され、 $A\beta$ とミクログリアの相互作用が AD の発症機序に積極的な役割をもつことが想定されている。AD 患者脳において、ミクログリアは $A\beta$ 斑を包み隠すようにその周囲に集簇することが知られており、その過程には TREM2 が必須の役割を果たしている。*TREM2* 遺伝子のリスク多型の保因者や *Trem2* 遺伝子欠損マウスでは $A\beta$ 斑周囲のミクログリアの生存性が著明に減弱する一方、 $A\beta$ 斑周囲の神経障害性が増悪することから、ミクログリアの増生と集簇は神経保護的な働きがあると考えられる。TREM2 自体は細胞質側に機能的ドメインを有さないが、アダプター分子である DAP12 と複合体を形成している (図 1)。この DAP12 の細胞質内領域に存在する Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) が Src によるリン酸化を受け、Syk などのタンパク質を膜動員し、生存性維持などに関わる下流シグナルを伝達することがマクロファージなどにおいて示されている。しかし、ミクログリアにおける Syk 以外の ITAM 結合分子や Syk の基質・下流因子についての知見は乏しい。そこで本研究では、ミクログリアにおける TREM2/DAP12 の下流経路に関するタンパク質の網羅的探索を目指した。

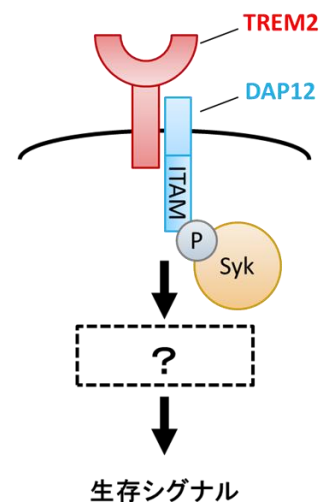


図 1 TREM2/DAP12 複合体とシグナル伝達のスキーム

【方法と結果】

1. 改変型アスコルビン酸ペルオキシダーゼによる DAP12 近接タンパク質の同定

免疫共沈降法などにより相互作用分子を解析する場合、安定かつ直接的な結合のないタンパク質を同定することは困難である。そこで本研究では、改変型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APEX2) に着目した。APEX2 は、基質であるビオチンフェノールと過酸化水素から高反応性のラジカルを産生し、これが近傍のチロシン残基などと反応することで近接タンパク質をビオチン標識する (Lam et al., Nat Meth, 2015; 図 2)。本研究では DAP12 の細胞質側末端に V5 タグと APEX2 タグを融合させた DAP12-APEX2 を用いて、TREM2/DAP12 の近傍で働くタンパク質の網羅的な同定を試みた。

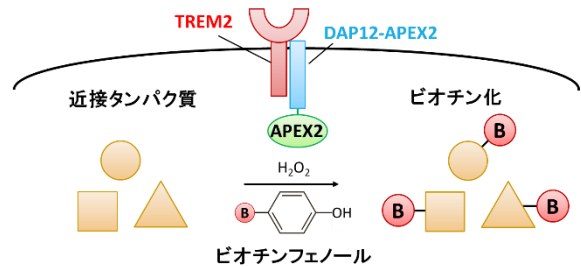


図 2 APEX2 による近位依存性ビオチン標識

APEX2 は、ビオチンフェノールを基質、過酸化水素を電子供与体として近傍蛋白質のチロシン残基をビオチン標識する。

2. DAP12-APEX2 の過剰発現によるレスキュー

Trem2 または *Dap12* をコードする *Tyrobp* の発現抑制により、初代培養ミクログリアの細胞生存性が低下することが知られている (Zheng et al., J Neurosci 2017)。この表現型は、マウスミクログリア由来培養細胞株 MG6 でも同様に観察され、また DAP12-APEX2 の共発現によりレスキューされた (図 3A)。このことは、DAP12-APEX2 が内因性 DAP12 の機能を代替できることを示唆する。さらに、DAP12-APEX2 と Syk の相互作用について検討した。脱リン酸化阻害剤の存在下では、DAP12-APEX2 と Syk は免疫共沈降されたが、ITAM 中のチロシンをフェニルアラニンに置換した DAP12 変異体 (Y92F, Y103F) では、Syk との相互作用は認められなかった (図 3B)。これらのことから、DAP12-APEX2 は Syk と結合し、細胞生存性の維持に必要な下流経路の活性化を引き起こすことが示唆された。

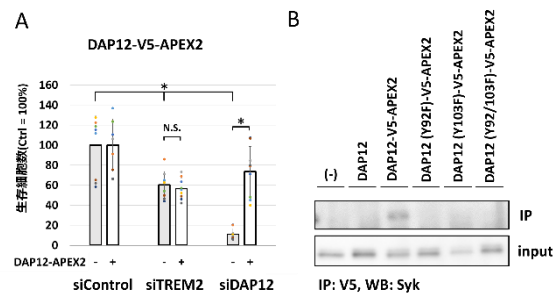


図 3 DAP12-APEX2 の過剰発現によるレスキューおよび DAP12-APEX2 の共免疫沈降

(A) DAP12-APEX2 の過剰発現によるレスキュー

N=9, Mean ± s.e.m. *: p<0.05, by Tukey HSD test

(B) DAP12-APEX2 およびその ITAM 変異体と Syk の相互作用解析

3. DAP12-APEX2 によるビオチン化反応

DAP12-APEX2 を安定発現する MG6 細胞において、ビオチン化反応が誘導できるか検討した。安定発現細胞にビオチンフェノールと過酸化水素を 1 分間処理した場合、総ビオチン化タンパク質量が増加することが、抗ビオチン抗体を用いたウェスタンブロット法により明らかになった (図 4A)。一方、DAP12 の ITAM 変異体 (Y92F, Y103F) を用いた場合には、ビオチン化のバンドパ

ターンが異なっており、DAP12 がチロシンリン酸化を介して特定の分子と相互作用することが示唆された。次に、免疫細胞化学により、DAP12-APEX2 が細胞膜に局在していることを見出した (図 4B)。さらに、細胞をビオチンフェノールと過酸化水素で処理した場合には、DAP12-APEX2 と同様に、細胞膜に局限したビオチン化タンパク質の蓄積を認めた。これらの結果は、APEX2 によるビオチン化反応が DAP12 の近傍でのみ生じることを示唆するものと考えられた。

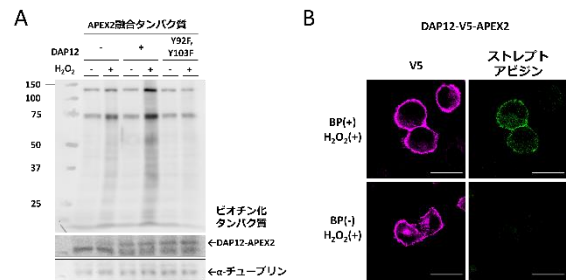


図 4 DAP12-APEX2 によるビオチン化反応
(A) DAP12-APEX2 によりビオチン化タンパク質の増加
(B) 蛍光標識ストレプトアビジンによるビオチン標識タンパク質の局在解析 (BP: ビオチンフェノール、scale bar 20 μ m)

4. 質量分析計による DAP12 近接タンパク質の同定

DAP12-APEX2 発現細胞にビオチン化反応を誘導したのち、ストレプトアビジンビーズによりビオチン化タンパク質を精製し、質量分析法によるタンパク質同定を行った。ビオチン化反応を行わないネガティブコントロール、APEX2 のみ発現している細胞、DAP12 の ITAM 変異体発現細胞の結果と比較して、DAP12-APEX2 発現細胞でのみ同定された、あるいは他よりも 2 倍以上多く同定されたタンパク質に注目し、118 の候補分子を得た。このなかには、DAP12 と相互作用する Syk が含まれており、実験系の妥当性が支持された。さらに、独立な 3 サンプルで共通して同定され、ネガティブコントロール群では検出されなかったタンパク質として唯一、BASP1 (CAP23) を見出した。

5. BASP1 ノックダウンによる細胞生存性への影響

ミクログリアは、類似した性質を示す末梢組織のマクロファージと比較して特異的な遺伝子サブセットを発現していることが示されている。これら遺伝子は microglia signature と呼ばれ、BASP1 はそのひとつである (Butovsky et al., Nat Neurosci 2014)。同様にミクログリアを特徴づける遺伝子には TREM2 が知られており、両者の機能的関連が想定される。そこで TREM2/DAP12 と同様に BASP1 が細胞の生存性に関与するか検討した。この目的のため、MG6 細胞に対して siRNA による Basp1 のノックダウンを行ったところ、生存細胞数の有意な減少を認めた (図 5)。従って BASP1 は TREM2/DAP12 と同様に生存性シグナルに何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

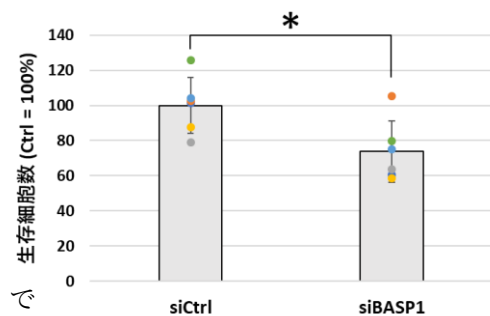


図 5 BASP1 ノックダウンによる生存細胞数の変化
N=6, Mean \pm s.e.m. *: $p < 0.05$, by Dunnett test

6. DAP12 の脂質ラフト局在

BASP1 はミリストイル基をもつ膜表在性タンパク質であり、脂質ラフトに局在することが知られている。上記の同定タンパク質には、脂質ラフト関連分子 Raftlin も含まれていたことから、DAP12 が脂質ラフトで働く可能性が示唆された。そこで、シヨ糖密度勾配遠心分離法により MG6 から detergent-resistant membrane (DRM) 画分を調製しウェスタンブロットにより解析した。その結果、DAP12、TREM2、BASP1 が DRM 画分に存在することを見出した (図 6)。次に BASP1 が脂質ラフトの DAP12 の局在に与える影響を解析した。Basp1 のノックダウンによって DRM 画分における DAP12、TREM2 の量が減少する傾向があった。従って BASP1 は DAP12 の脂質ラフト局在化に重要であることが示唆された。

【まとめと考察】

本研究において、TREM2 および DAP12 が脂質ラフトに局在することを見出した。また、DAP12 と近接相互作用する分子として BASP1 を同定し、BASP1 が DAP12 の脂質ラフト局在化を制御する可能性を示唆した。さらに、BASP1 は、DAP12 と同様にミクログリアの細胞生存性の維持に関与していた。先行研究において、コレステロールはミクログリアの生存性の維持に重要であることが示されており (Bohlen et al., Neuron 2017)、DAP12 が脂質ラフトに局在化することが細胞生存性シグナルの伝達に重要である可能性がある。

DAP12 は機能的な ITAM 配列に依存して BASP1 と相互作用することが明らかになった。このことから、DAP12 は脂質ラフトの内外を移動しており、恐らくリン酸化と関連して BASP1 と相互作用しラフト内に安定化されると考えられる (図 7)。

先行研究では AD モデルマウスや AD 脳において BASP1 の過剰なリン酸化が起こることが知られている (Tagawa et al., Hum Mol Genet 2015)。BASP1 はリン酸化を受けることで脂質ラフトへの移行が制御されているという報告もあるため、BASP1 のリン酸化レベルの変化は TREM2/DAP12 のシグナルに何らかの影響を与えている可能性がある。今後は、BASP1 ノックアウトマウスを用いてミクログリアの表現型を追究するとともに、AD 脳を用いてミクログリアにおける BASP1 の生化学的変化をについて詳しく解析することが重要と考えられる。

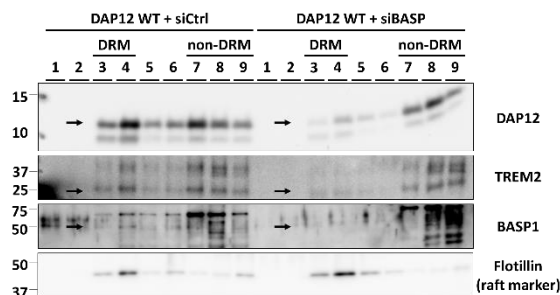


図 6 DRM 画分における TREM2、DAP12、BASP1 の局在および BASP1 のノックダウンによる DRM 画分における TREM2、DAP12 の減少。

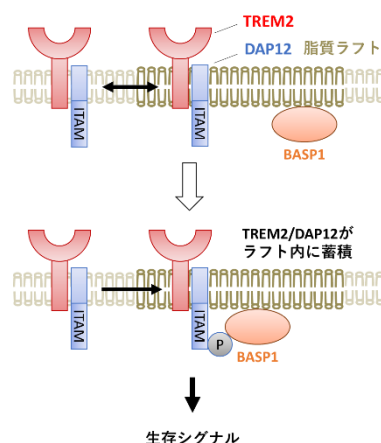


図 7 BASP1 による TREM2/DAP12 の局在の制御