

博士学位論文

チューブリン恒常性の破綻が
タウタンパク質に与える影響

神経病理学研究室

藤原 ひとみ

2019年 11月

目次

序論.....	1
第1章 Mouse Tbce に対する miRNA の標的配列の同定	
1-1.概要.....	11
1-2.実験方法.....	11
1-3.実験結果及び考察.....	15
1-4.図表.....	17
第2章 抗 Mouse TBCE 抗血清の調製と力価評価	
2-1.概要.....	21
2-2.実験方法.....	21
2-3.実験結果及び考察.....	26
2-4.図表.....	28
第3章 miRNA 発現レンチウイルスを用いた海馬初代培養神経細胞での Mouse Tbce ノックダウンシステムの構築	
3-1.概要.....	35
3-2.実験方法.....	36
3-3.実験結果及び考察.....	42
3-4.図表.....	45
第4章 チューブリンの恒常性破綻とタウの異常性の関連性についての検討	
4-1.概要.....	56
4-2.実験方法.....	56
4-3.実験結果及び考察.....	59
4-4.図表.....	61
考察.....	67
結論.....	71
参考文献.....	72
謝辞.....	79

序論

認知症とは、後天的且つ不可逆的な脳の障害により一度獲得した認知機能が慢性的に低下し、日常生活や社会生活に支障をきたす状態をいう。認知症の患者数は年々増加しており、厚生労働省の発表によると 2025 年にはその患者数が 700 万人にのぼると算出されている¹⁾。認知症は患者のみならず介護者である家族の負担も大きく、さらには医療経済的な社会負担の面でも問題となっている。超高齢化社会に突入する日本において、認知症発症機序の解明及びそれに基づく根本的治療法の確立は喫緊の課題である。

認知症はアルツハイマー型認知症 (Alzheimer's disease, AD)、血管性認知症、レビー小体型認知症、前頭側頭型認知症などに分類されるが、その中でも発症頻度が最も高いのが AD である²⁾。AD の発症機序については依然として不明な部分が多い。現在、対症療法と考えられる医薬品 4 種が承認されているが、求められるのはその発症機序をターゲットにし、病態の進行そのものを抑える根本治療薬の開発である。

AD では大脳皮質及び海馬での神経細胞脱落による萎縮に加え、老人斑 (Senile Plaque) と神経原線維変化 (Neurofibrillary tangle, NFT) の病理学的特徴を認める (図 1)。老人斑と NFT はそれぞれアミロイドペプチド ($A\beta$) とタウタンパク質 (タウ) を主成分とし、これらが異常蓄積することで生じる³⁾⁻⁷⁾。家族性アルツハイマー病の遺伝学的解析から、 $A\beta$ の前駆体タンパク質 (Amyloid precursor protein, APP)、 $A\beta$ 産生に関与する酵素 γ セクレターゼの活性中心を担うプレセニリン 1 (Presenilin 1, PSEN1)、およびプレセニリン 2 (Presenilin 2, PSEN2) に遺伝子変異が同定された^{8,9)}。これらの遺伝子がいずれも $A\beta$ 産生に関わる基質あるいは酵素であったことから、 $A\beta$ の産生・蓄積が AD 病態形成の最上流に位置するというアミロイドカスケード仮説が提唱された^{10,11)} (図 2)。この仮説から $A\beta$ 産生機序の解明や $A\beta$ 除去を目指した治療法の確立こそが AD 発症の予防・抑制に繋がると考えられ、盛んに研究が行われた。抗 $A\beta$ 抗体 Aducanumab については 2020 年に米国にて承認申請を行う予定であることが発表されたが、それまでに開発された多くの抗 $A\beta$ 薬は、期待された有効性が確認できずに開発中止となってきた^{12,13)}。一方、病理学的解析から老人斑の出現は、認知機能や神経細胞脱落には相関がないことが知られている^{14,15)}。現在、 $A\beta$ の蓄積は神経変性よりもずっと早い時期に起きていると考えられており、抗 $A\beta$ 療法に関してはより早期の診断の実現とともに予防的な処方が検討されている。その一方で、連続剖検例を対象とした病理解析から神経原線維変化の出現部位と頻度は、神経細胞脱落と強い相関性があることが報告されており^{14,16)}、タウの異常は神経細胞死に直結した事象である可能性が想定されていた。また、1998 年に家族性前頭側頭型認知症 (Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17,

FTDP-17) の連鎖解析から原因遺伝子としてタウが同定された¹⁷⁾。これは、タウの何らかの異常が神経変性の直接的な原因であることを示唆する重要な発見であった。さらに、タウの凝集阻害剤として同定されたメチレンブルーがアルツハイマー病の進行を抑制する可能性が報告された¹⁸⁾。メチレンブルーについては第 3 相試験で有効性が確認できなかったものの、これらの研究の積み重ねにより、AD 研究分野においてタウの重要性は再認識された¹⁹⁾。現在ではタウによる神経変性メカニズムの同定やタウの伝播のステップをターゲットとする創薬に注目が集まり盛んに研究がおこなわれている。

タウは微小管の重合を促進する因子として同定された²⁰⁾。成人脳では **alternative splicing** により 6 種の **isoform** が発現している²¹⁾ (図 3)。タウの C-末端側には特徴的なリピート配列があり、微小管結合領域を形成している (図 3)。タウは、このドメインで微小管上に結合するとされている。また、タウは成熟した神経細胞の軸索に特異的に局在し、微小管の重合促進や安定化に寄与すると考えられている^{20,22)}。一方、変性神経細胞内で凝集・蓄積したタウは異常にリン酸化され、不溶性の封入体を形成している²³⁾。封入体は、超微形態的に二本の線維が交互に巻き付いた螺旋状の形状を特徴とする **Paired Helical Filament (PHF)** という構造体から形成される²⁴⁾。このような病理像を呈する神経変性疾患は、総称してタウオパチーと呼ばれる。タウオパチーには AD に加え、前頭側頭型認知症 (**Frontotemporal Dementia, FTD**)、進行性核上性麻痺 (**Progressive supranuclear palsy, PSP**)、皮質基底核変性症 (**Corticobasal degeneration, CBD**) などが含まれる。

タウによる神経変性メカニズムの研究は、患者脳に蓄積する不溶性タウの解析から始まった。PHF を形成するタウは、リン酸化、ユビキチン化、アセチル化、糖化などの翻訳後修飾を受けている事が明らかになっているが、その中でも最も精力的に研究されてきたのが異常リン酸化である²⁵⁾。PHF タウには異常なリン酸化が認められており、詳細な解析から現在では 40 カ所以上のリン酸化部位が同定されている²⁶⁾。生理的には胎児期のタウは強いリン酸化を受けており、成獣脳でも一部のアミノ酸はリン酸化されているが、PHF タウで同定されるリン酸化はそれらをはるかに超える²⁷⁾。これにはタウ 1 分子における平均リン酸化数が増加している事実や、PHF タウ特異的なリン酸化部位が提唱されていることから、PHF タウは質・量ともに過剰なリン酸化状態であると認識されている²⁸⁾。PHF タウは本来の生理機能である微小管重合促進能が消失しているのに対し、脱リン酸化により機能が回復した²⁹⁾。また、*in vitro* ではタウのリン酸化は微小管結合能・重合能の低下や凝集体形成能の促進を引き起こすことが報告されている³⁰⁻³³⁾。これらの結果から、タウオパチーの発症の起点はタウの過剰なリン酸化による微小管安定化能の消失であると信じられてきた。しかし、現在までにタウの過剰なリン酸化がタウオパチーを引き起こすことを再現した報告はない。例えば、低体

温麻酔下では、脱リン酸化酵素 PP2A の活性低下によりマウス脳内のタウのリン酸化が亢進することが知られている³⁴⁾。このような低体温モデルはタウのリン酸化の解析に広く応用されているが、このモデルではタウが高リン酸化状態にあっても、微小管結合能の低下や微小管の崩壊、さらにはタウの凝集能の獲得が認められない³⁵⁾。この他に、標的タンパク質におけるリン酸化の影響を検討する目的として、そのタンパク質のリン酸化部位をグルタミン酸などの酸性アミノ酸に置換し、恒常的なリン酸化状態を擬似的に再現する方法がある。この手法を利用して微小管結合領域及びその近傍領域に複数の擬似リン酸化変異を挿入したヒト型タウを発現させたノックインマウスが作製されたが、タウの神経細胞内局在に異常が認められたものの、タウオパチー病理変化を再現するに至らなかった³⁶⁾。さらに、部位によってタウのリン酸化は凝集に対し負の作用を有していることも報告されており³⁷⁾、現時点ではタウのリン酸化が病理変化を誘導する可能性は全く示されていない。これらの事実は、タウオパチー発症におけるタウのリン酸化の役割に対し疑念を生じさせるのに十分であり、タウオパチー発症メカニズムについて新たな仮説を提唱する必要があると言える。

そこで、本研究ではタウオパチーにおけるもう一つの重要な病理学的特徴に微小管あるいはその構成タンパク質であるチューブリンの消失に着目した(図4)^{38,39)}。上記の通り、変性神経細胞に蓄積するタウは異常リン酸化により生理機能を失っていることから、微小管もしくはチューブリンの消失はタウの異常性獲得の下流で起きる事象との認識があった。しかし、電子顕微鏡を用いた解析により、AD患者脳における微小管量は健常者と比較して有意に減少することが確認された。興味深いことに、微小管の減少は NFT 形成の有無に関係なくみられる事象あるとされている³⁹⁾。生理的なタウの存在様式については明らかになっていないが、脳内のタンパク質の 10% 近くを占める細胞内のチューブリン濃度と比較するとタウの濃度は十分に少量であると考えられる。このことから、細胞内の生理的タウのほとんどは微小管あるいはチューブリンに結合している可能性が考えられる。現在、タウにおいて最も凝集性の高い配列は微小管結合領域内に存在することが分かっている⁴⁰⁾。したがって、十分な微小管、チューブリン量が担保されている環境では微小管結合領域の立体障害によりタウの自己凝集は起こらないと想定される。通常、チューブリンもしくは微小管は細胞内で自己の制御をチューブリンの重合・脱重合の状態を通じて行い、恒常性を維持していると考えられる。上述した事象をふまえ、このようなチューブリン・微小管の恒常性システムが何らかの原因で破綻することでタウの異常性が引き起こされるのではないかという新規仮説の着想に至った(図5)。これまでに、本研究室では①タウのリン酸化が微小管の崩壊を引き起こさない一方、微小管の崩壊はタウの遊離に伴いリン酸化を亢進すること、②チューブリンの減少によりタウの神経障害が増大すること、③チューブリンの共存によりタウの凝集が抑えられることを報告している^{41,42)}。これら

は微小管の崩壊もしくはチューブリンの減少がタウの異常性を誘導する可能性を示唆し、先述した新規仮説を支持する結果である。一方、近年の研究からタウの微小管結合、軸索局在といった生理的な振る舞いはその発現パターンに強く依存している事実が報告された⁴³⁾。タウは本来周産期に盛んに産生され、生後まもなくその発現が抑制される。この発現パターンに従って合成されたタウは正確に軸索に局在し、微小管に結合する。しかし、この発現パターンに反し、異所性に発現させるとタウは異常局在や微小管からの解離など本来の生理的状态からかけ離れた振る舞いを呈する。したがって、これまでの中心的な解析材料である培養細胞と過剰発現を組み合わせた系では正確な解析は不可能であり、タウ異常化を評価するためには神経細胞の内在性タウを対象として研究する必要がある。

本研究の目的は、微小管の恒常性破綻が内在性タウへの局在やタウのリン酸化へ与える影響を明らかにすることである。本研究を遂行する上で、マウス等由来の神経細胞を対象にチューブリン・微小管の恒常性破綻を再現するシステムの構築が必須となる。チューブリン・微小管の恒常性破綻を誘発するには直接チューブリンをノックダウンする方策がまず考えられる。しかし、チューブリンには多数の isoform が存在する^{44,45)}。そのため、特定のチューブリン isoform を対象としたノックダウンでは期待される効果が得られない可能性が高い。また、微小管は細胞内物質輸送や細胞分裂、細胞形態の維持などの様々な生命活動に関与しているため、全体的なチューブリンの発現抑制では発生初期の過程で細胞に障害が生じ解析困難となる可能性が予想される。したがって、神経細胞においてチューブリン・微小管恒常性の破綻を引き起こすためには別の手法が求められる。

そこで、本研究では Tubulin-specific chaperon E (Tbce) というタンパク質に着目した。Tbce はチューブリンシャペロン群の一種であり (図 6A)、 α チューブリンの folding や α/β チューブリンの会合に関与する⁴⁶⁾。これまでに Tbce の遺伝子変異が進行性の運動神経障害モデルマウスやヒトでも同定されており、それにより運動神経細胞軸索で微小管が減少することが確認されている^{47,48)}。また、本研究室でも線虫で Tbce-1 遺伝子のノックダウンにより α チューブリン発現量が減少することを確認している⁴²⁾。これらの結果は、Tbce の機能不全により folding が不完全な可溶性 α チューブリンが産生されることで重合可能なチューブリンヘテロダイマーの形成が抑制されると、最終的には神経細胞内で微小管の減少などの異常を誘導することが可能であることを示唆している。以上より、本研究ではマウス初代培養神経細胞に対する特異的な Tbce ノックダウンシステムを構築し、不完全な可溶性 α チューブリンの産生により重合可能なチューブリンヘテロダイマーの形成を抑制することで (図 6B)、チューブリン・微小管の恒常性破綻を誘導することを試みた。さらに、これらの異常が内在性タウに与える影響について検討した。

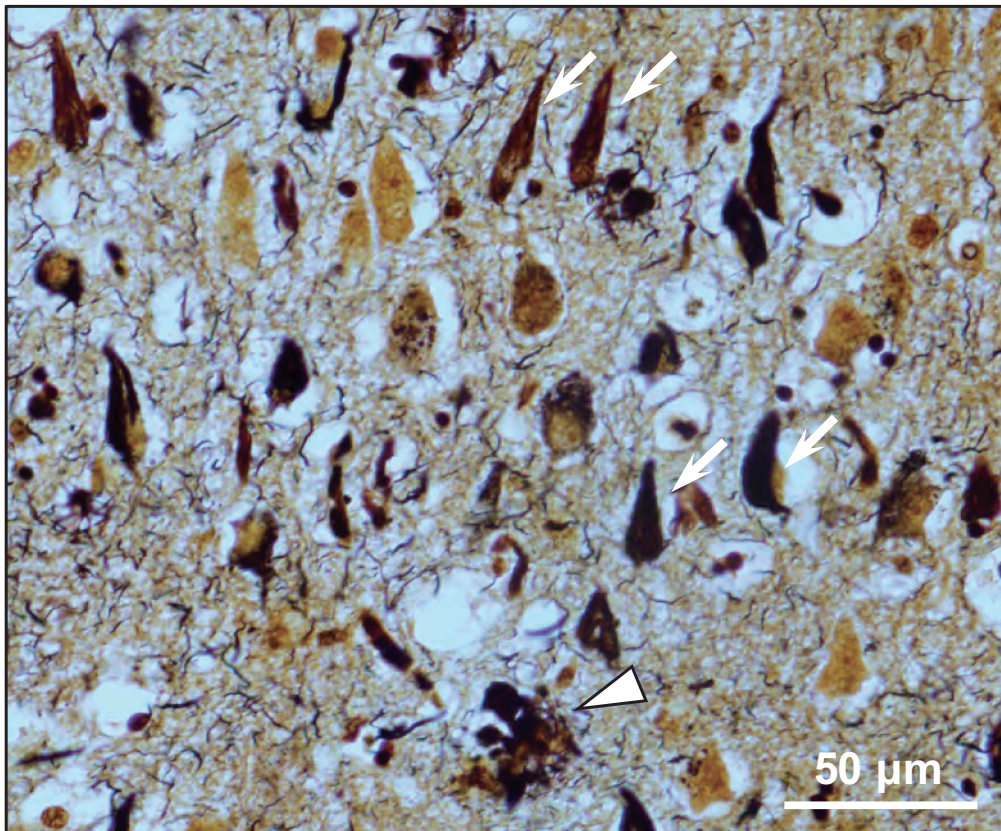


図 1 AD 患者脳海馬領域において認められる病理変化

AD 患者脳切片の Bielschowsky 染色像を示す。AD 患者脳では、老人斑（矢頭）と神経原線維変化（矢印）の病理所見を呈す。

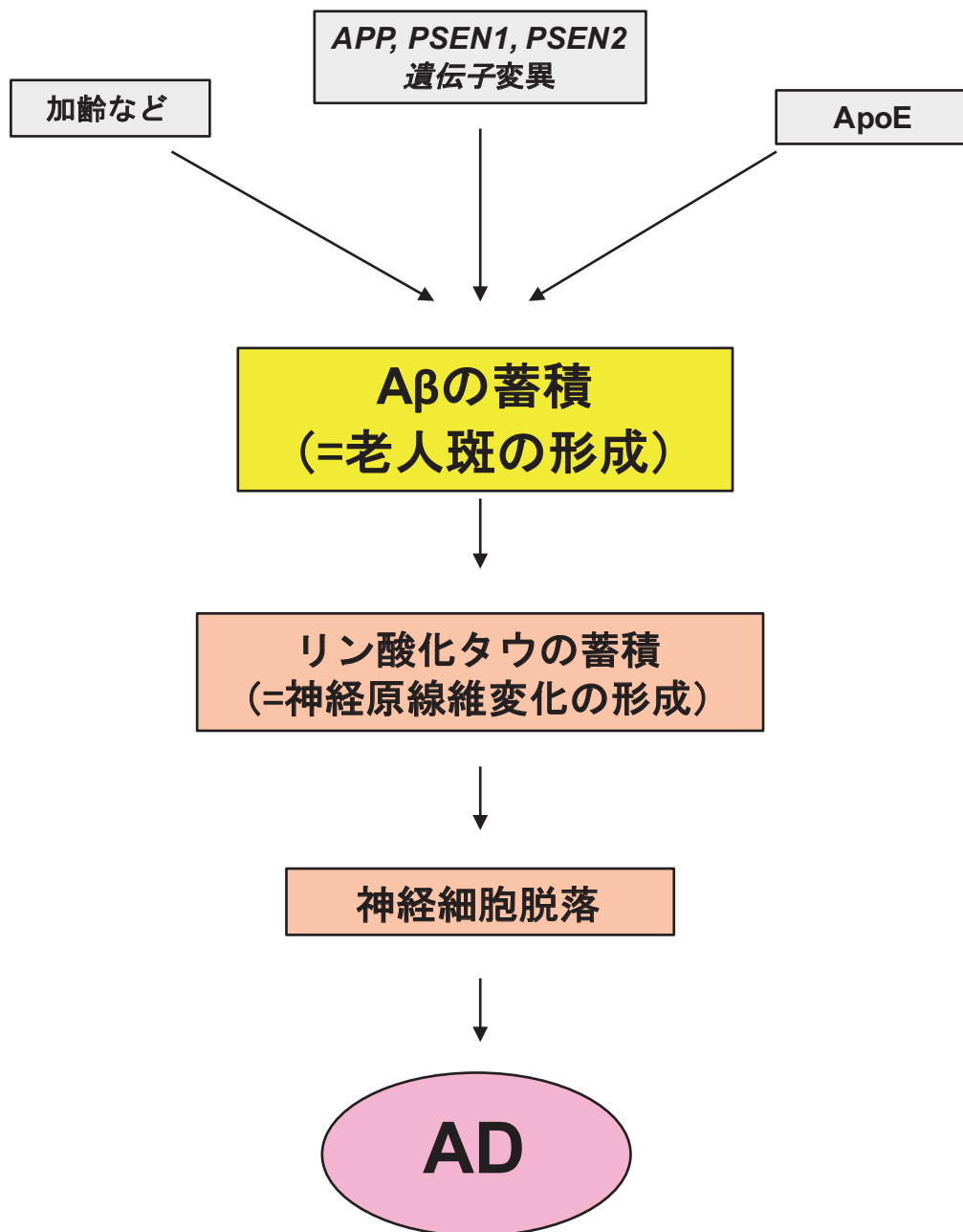
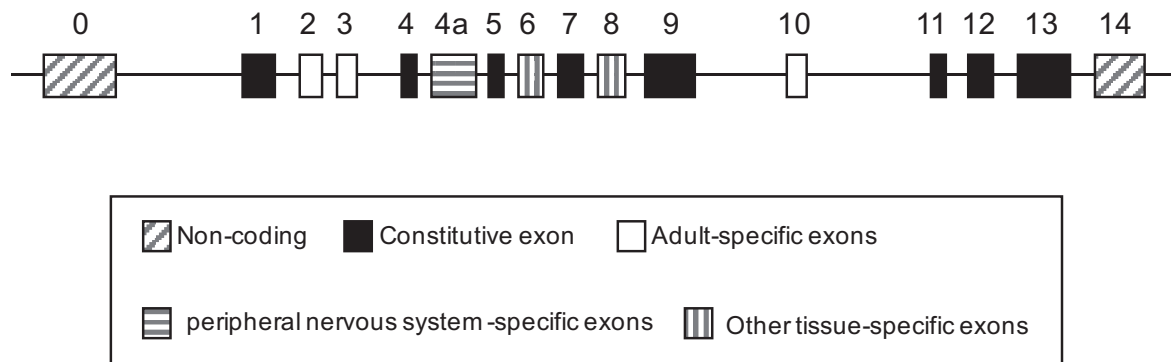


図2 アミロイドカスケード仮説

Hardy が提唱したアミロイドカスケード仮説について示す。A β 産生に参与する APP/PSEN1/PSEN2 の遺伝子変異、AD 発症の危険因子である Apolipoprotein (ApoE)、加齢などにより A β の異常産生・蓄積が生じる。これが引き金となり神経原線維変化が形成され、神経細胞の脱落を経て最終的には認知症が発症すると考えられている。

A



B

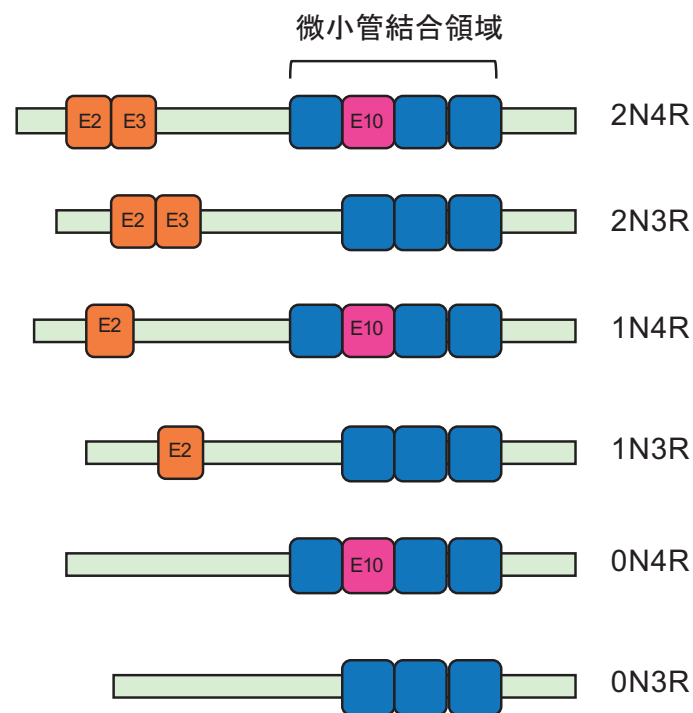
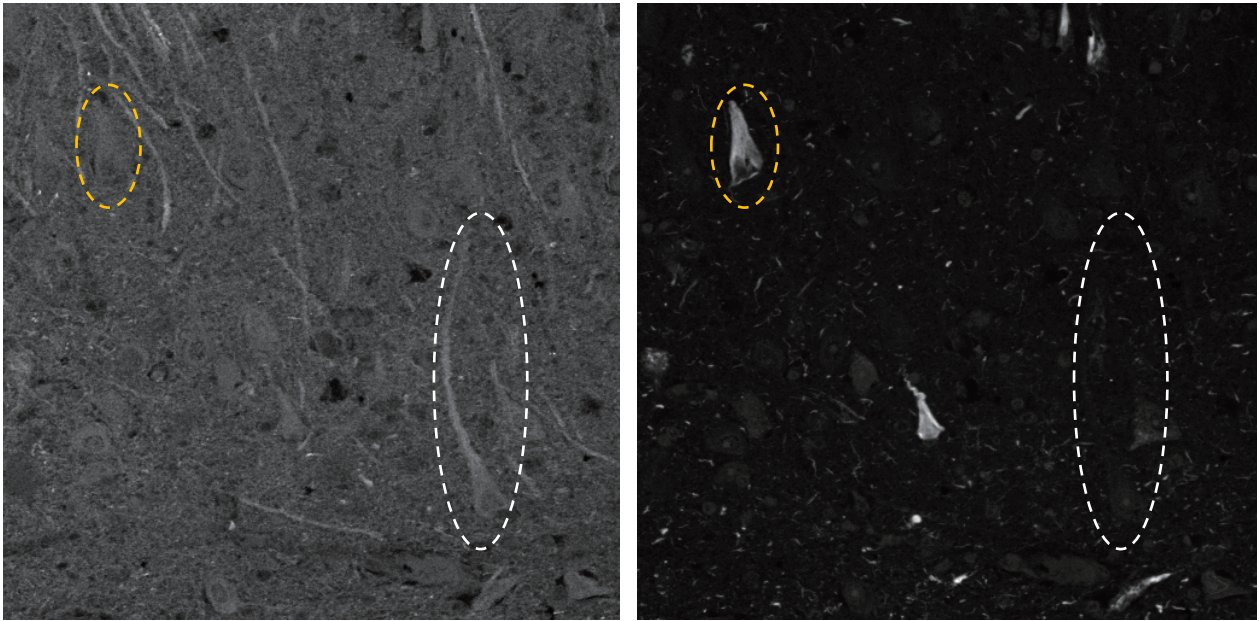


図 3 タウのアイソフォーム

(A)ヒトタウのゲノム構造を示す。ヒトタウ遺伝子は 16 個のエキソンからなる。ヒト型タウは Exon 2・3・10 の選択的スプライジングにより、6 つのアイソフォームを発現する。Exon 0、14 はタウ mRNA のプロモータ領域と 3'非翻訳領域である。Exon 1・4・5・7・9・11・12・13 は常時転写される。Exon 2、3、10 は成人脳特異的に転写される。Exon 4a は末梢神経系、Exon 6 は筋肉・脊髄、Exon 8 は平滑筋・脊髄・脳下垂体でのみ転写される。(B)ヒトタウ遺伝子の選択的スプライジングにより生じる 6 つのアイソフォームの構造を示す。N 末端部位には Exon 2、3 の有無によって 0N、1N、2N と呼ばれる 3 種類が存在し、微小管結合部位にある Exon10 の有無によって 4 repeat (4R)、3 repeat (3R) の 2 種類が存在する。

α -tubulin (Red)

リン酸化Tau (Green)



Merge

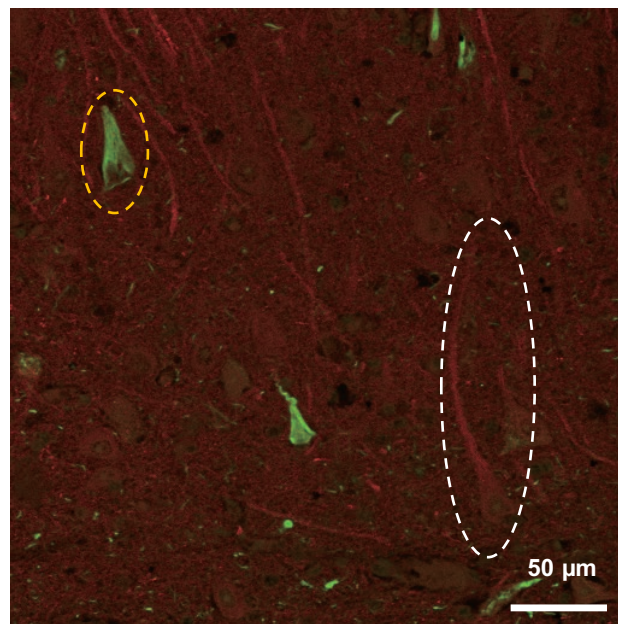


図4 タウオパチー変性神経細胞におけるチューブリンの消失

AD患者脳切片海馬領域をDM1A（抗 α チューブリン抗体）及びAT8（抗リン酸化Tau抗体）を用いて蛍光二重染色した結果を示す。白の破線内に存在する健康な神経細胞では α チューブリンのシグナルが検出できるのに対し、黄色の破線内に存在するTauが蓄積しているTauオパチー変性神経細胞では α チューブリンのシグナルの減弱が確認できる。

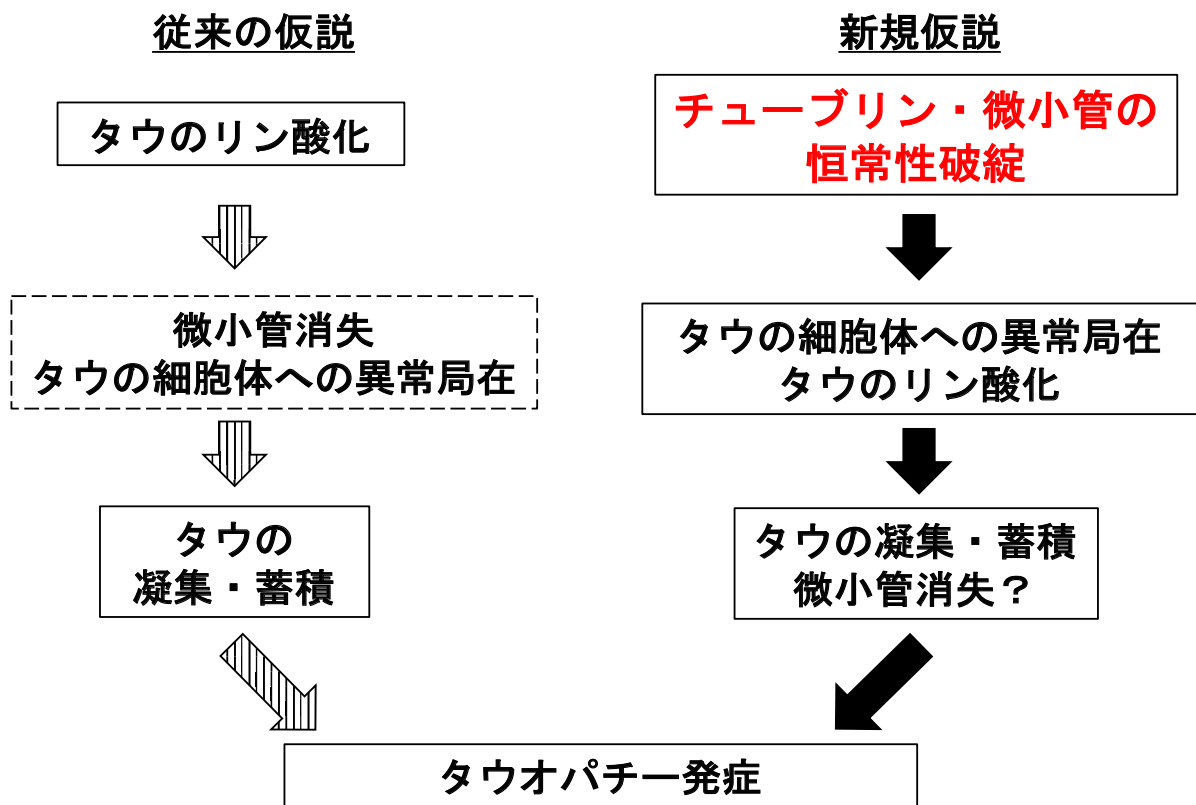


図 5 本研究において提示するタウオパチー発症に関する新規仮説

従来提唱されていた仮説ではタウオパチー発症の最上流がタウのリン酸化であったのに対し、今回提示した新規仮説ではチューブリン・微小管の恒常性の破綻がタウオパチー発症の起点であると考えている。

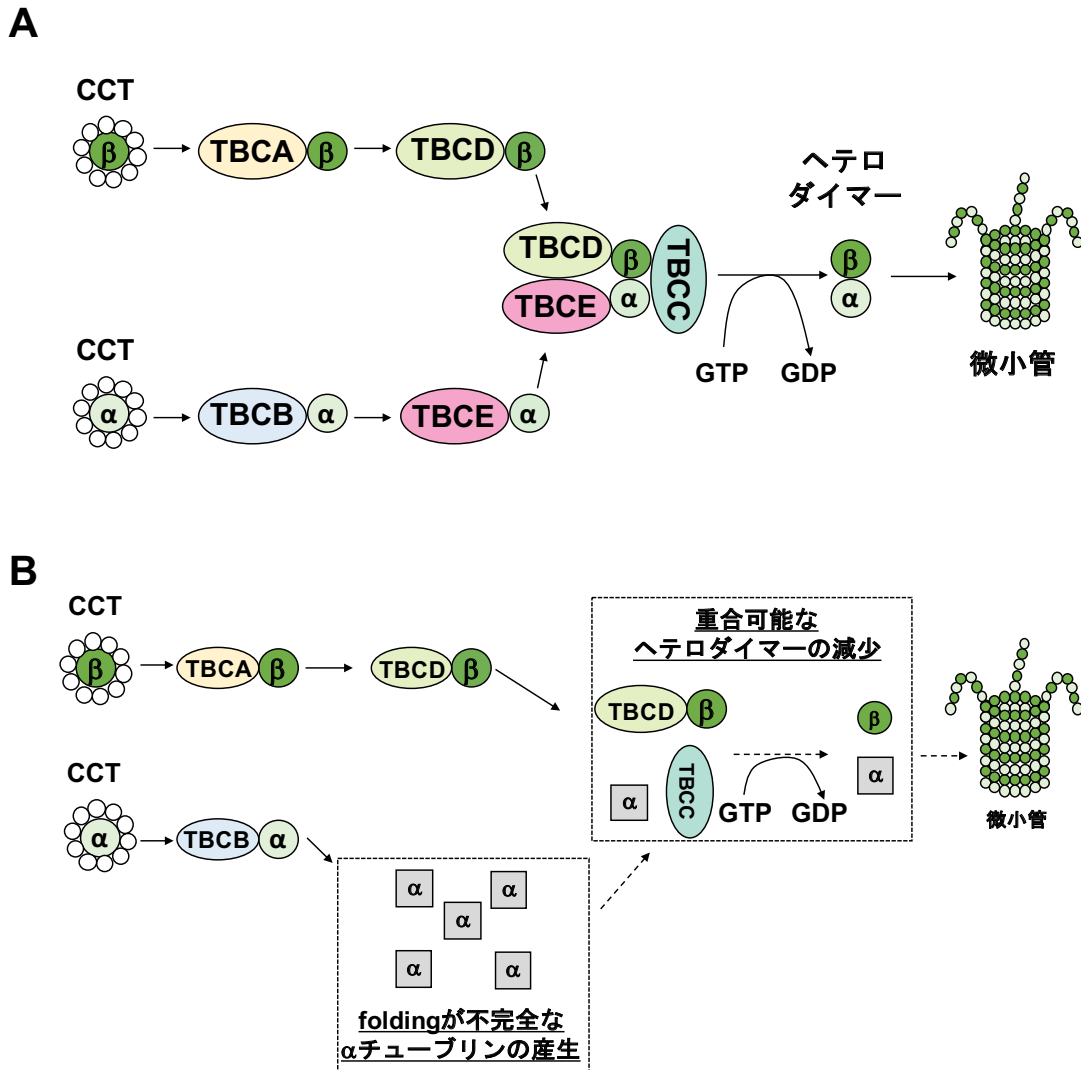


図6 α/β チューブリンヘテロダイマー形成に必要なチューブリンシャペロンシステム

(A) $\alpha \cdot \beta$ チューブリンが正常に folding し重合可能なヘテロダイマーを形成するには、細胞質シャペロン CCT と TBCA、TBCB、TBCC、TBCD、TBCE の5つのチューブリンシャペロン分子が必要となる。まず、新規に合成された可溶性の α チューブリン・ β チューブリンには、凝集防止のために CCT が結合する。CCT には ATP が結合しており、ATP の加水分解で生じるエネルギーを利用して CCT から各チューブリンを放出する。次に α チューブリン、 β チューブリンはそれぞれ TBCB、TBCA により中間状態までフォールディングし、その後 TBCE、TBCD により完成するとともに TBCC により最終的に会合が誘導され、機能単位であるヘテロダイマーとなる。(B) TBCE は α チューブリンの folding に関与していることから、Tbce ノックダウンを実施した場合にはまず folding が不完全な状態の α チューブリンが産生される。その結果、重合可能なヘテロダイマーの形成が抑制され、チューブリン・微小管の恒常性に破綻が生じると考えられる。

1 章 Mouse Tbce に対する miRNA の標的配列の同定

1-1 概要 :

本研究では、チューブリン・微小管の恒常性の破綻を再構成する目的で、 α チューブリンの folding や α/β チューブリンのヘテロダイマー形成に参与する分子シャペロンである Tubulin-specific chaperon E (Tbce) のノックダウンシステムの構築を試みた。従来、標的タンパク質のノックダウン方法としては shRNA による RNA 干渉が用いられてきた。しかし、shRNA は主に RNA ポリメラーゼ III 系の U6 もしくは H1 プロモーターで発現させるため、任意のプロモーターを用いて細胞特異的に shRNA の発現を誘導することは困難である。

一方、miRNA は、まず核内で RNA ポリメラーゼ II 及び III により primary micro RNA (Pri-miRNA) として発現する。したがって、shRNA と異なりその発現に任意のプロモーターを選択することができる。発現した Pri-miRNA は RNase III 系酵素の Drosha と 2 重鎖 RNA 結合型タンパク質 DGCR8 からなる microprocessor complex により 70~90 塩基ほどの Precursor miRNA (pre-miRNA) に切断される。Pre-miRNA は Exportin-5 を介して細胞質内へと輸送された後、Dicer により 19~22 ヌクレオチドの二本鎖の mature miRNA となる。Mature miRNA は RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれる複合体に取り込まれたのち、一方がガイド鎖となり標的 mRNA の相補的な配列もしくは 3'untranslated region (3' UTR) に結合し、標的 mRNA の分解もしくは mRNA の翻訳阻害を誘導する (図 7) ⁴⁹⁾。

本章では Mouse Tbce に対する 4 つの miRNA 標的配列を選定し、最も効率的に Mouse Tbce の発現を抑制する標的配列を同定した。

1-2 実験方法 :

・使用試薬

二本鎖 pre-miRNA 及び pre-miRNA 発現 construct の作製

Top strand DNA Oligo (Invitrogen)

Bottom strand DNA Oligo (Invitrogen)

10X Oligo Annealing Buffer (Invitrogen)

DNase/RNase-Free water (Invitrogen)

5X Ligation Buffer (Invitrogen)

T4 DNA Ligase (Invitrogen)

pcDNA3.3 vector

Esp3 I (New England Biolabs)

DH5 α コンピテントセル

PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen)

N2a 細胞を用いた miRNA による Mouse Tbce mRNA 発現抑制効果の検討

N2a 細胞

D-MEM (FUJIFILM 和光純薬)

Fetal Bovine Serum (Invitrogen)

Penicillin/Streptomycin (ナカライ)

Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent (Invitrogen)

Opti-MEM (Invitrogen)

ISOGEN-LS (日本ジーン)

クロロホルム (ナカライ)

メタノール (ナカライ)

Oligo-*Tex*™-dT30<Super> mRNA Purification Kit (Takara)

Takara RNA PCR kit (AMV) (Takara)

Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific)

HEK293 細胞を用いた miRNA による Mouse TBCE 発現抑制効果の検討

HEK293 細胞

D-MEM (FUJIFILM 和光純薬)

Fetal Bovine Serum (Invitrogen)

Penicillin/Streptomycin (ナカライ)

Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent (Invitrogen)

Opti-MEM (Invitrogen)

pcDNA3.1-His-Mouse Tbce

Acrylamide (ナカライ)

Glycerol (ナカライ)

2-Mercaptoethanol (ナカライ)

N,N'-Methylenebisacrylamide (ナカライ)
Tris(hydroxymethyl) aminomethane (ナカライ)
Tris(hydroxymethyl)aminomethane Hydrochloride (ナカライ)
Sodium Lauryl Sulfate (ナカライ)
Ammonium peroxodisulfate (ナカライ)
N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine (ナカライ)
Fluoro Trans PVDF Transfer Membrane (PALL Lifescience)
Skim Milk (ナカライ)
TBCE antibody (Novus)
Anti- β -Actin antibody (AC-15) (Sigma-Aldrich)
GFP (B-2) (Santa Cruz)
Peroxidase-conjugated AffinPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratory)
Peroxidase-conjugated AffinPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratory)
Chemi-lumi One L (ナカライ)

二本鎖 pre-miRNA の作製

Invitrogen の RNAi designer(www.invitrogen.com/rnai)を用いて Mouse Tbcce に対する miRNA 配列を 4 つ選定し、二本鎖 miRNA 作製用に Top strand Oligo DNA 及び Bottom strand Oligo DNA をそれぞれ設計した (表 1)。200 μ M の Top 及び Bottom strand Oligo DNA を用いてアニーリング反応液 (50 μ M Top strand Oligo DNA, 50 μ M Bottom strand Oligo DNA, 1x Oligo Annealing Buffer) を調製後、95°C で 4 分間、室温にて 5~10 分間反応し、二本鎖 miRNA を作製した。

pre-miRNA 発現用 construct の作製

二本鎖 pre-miRNA を結合させる pcDNA3.3 Vector (CMV プロモーターと EmGFP cDNA を含む)を *Esp3 I* により制限酵素処理し、線状化 pcDNA3.3 vector を調製した。線状化 pcDNA3.3 vector と二本鎖 pre-miRNA を用いて Ligation 反応液 (2 nM 二本鎖 pre-miRNA, 0.5 ng/ μ l pcDNA3.3 vector, 1x Ligation buffer, 0.05 U/ μ l の T4 DNA Ligase) を調製し、室温で 5 分間反応した。2 μ l の Ligation 溶液を 50 μ l の DH5 α コンピテントセルに加え、氷上で 5 分間、42°C で 2 分間、氷上で 5

分間反応した。形質転換させた DH5 α コンピテントセルは 50 $\mu\text{g/ml}$ の Ampicillin を含む LB plate に全量塗布し、37°Cで一晩培養した。LB プレートに形成されたコロニーを 50 $\mu\text{g/ml}$ の Ampicillin を含む 5 ml の LB 液体培地に植菌し、37°Cで 16~18 時間培養した。各大腸菌液から PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit を用いてプラスミド DNA を得た。

N2a 細胞を用いての各 miRNA construct の transfection

Transfection 前日に 2.5×10^4 cells/well の細胞密度となるように N2a 細胞を 6 well plate に播種した。翌日、2.5 μg の pcDNA3.3-CMV-EmGFP cDNA-miRNA control 及び各 pcDNA3.3-CMV-EmGFP cDNA-miRNA sequence を 250 μl の Opti-MEM、7.5 μl の Lipofectamine 3000、5 μl の P3000 と混和し室温で 10 分静置した後、全量 well 中に添加した。

N2a 細胞からの Total RNA 抽出

Transfection 後 2 日目に、各細胞を回収し、それらを 250 μl の PBS と 750 μl の ISOGEN-LS の混合液中において 1000 rpm、10 ストロークの条件でホモジナイズした。ホモジナイズ溶液を室温で 5 分間静置したのち、200 μl のクロロホルムを加え激しく混和した。室温で 5 分間静置した後に 12,000 rpm、4°Cの条件で 15 分間遠心し、RNA を含む透明層を 500 μl 程度得た。そこに 500 μl のイソプロパノールを添加し、混和してから室温で 10 分間静置した後、15,000 rpm、4°Cの条件で 10 分間遠心した。沈殿に対し 1 ml の 70%エタノールを加え洗浄し、再度 15,000 rpm、4°Cの条件で 5 分間遠心した。沈殿を 10 分間風乾させた後に精製水を 55 μl 添加し、55°Cで 10 分間保温することで total RNA を溶解した。

Total RNA からの mRNA 精製

得られた total RNA から Oligo- Tex^{TM} -dT30<Super> mRNA Purification Kit を用いて mRNA を精製した。10 μg の total RNA を 100 μl の 2x Binding Buffer および 10 μl の Oligotex™-dt30<Super> と混和、70°Cで 3 分間反応した後、室温で 10 分間静置した。15,000 rpm、20°Cの条件で 5 分間遠心して得られた沈殿に対し、350 μl の Wash Buffer を添加し懸濁した。懸濁液は専用のカラムに全量移し、15,000 rpm、20°Cの条件で 1 分間遠心した。カラム内に残存している沈殿を 350 μl の Wash Buffer で懸濁した後、再度 15,000 rpm、20°Cの条件で 1 分間遠心した。カラム内に残存している沈殿を 70°Cの RNase free-water 30 μl で懸濁した後、15,000 rpm、20°Cの条件で 1 分間遠心した。この作業を 2 回行い、mRNA を得た。

qRT-PCRによる Mouse Tbce mRNA 発現量の定量

得られた mRNA から Takara RNA PCR kit (AMV)を用いて cDNA を作製した。20 μ l の 1 ng/ μ l mRNA を 20 μ l の逆転写反応溶液 (4.7 mM MgCl₂, 0.93X RT Buffer, 0.928 U/ μ l RNase inhibitor, 0.93 mM dNTP, 0.083 pmol/ μ l Oligo-dT primer, 0.2 U/ μ l AMV Reverse Transcriptase XL) と混和した後、42°Cで 30 分間、99°Cで 5 分間、5°Cで 5 分間反応し cDNA を得た。得られた cDNA は RT-PCR 反応液 (1x Power SYBR Green PCR Master Mix, 0.3 μ M Forward primer, 0.3 μ M Reverse primer) と混合した後、50°Cで 2 分間、95°Cで 10 分間の反応を 1 サイクル、95°Cで 15 秒、60°Cで 1 分間の反応を 40 サイクル行い、Mouse Tbce mRNA の発現量を定量した。Mouse Tbce 及び標準化する際に用いた β -actin の mRNA 検出用の primer 配列については表 2 に示した。

HEK293 細胞を用いた miRNA による Mouse TBCE 発現抑制効果の検討

Transfection 前日に 5.0x10⁴ cells/well の細胞密度となるように HEK293 細胞 を 6 well plate に播種した。翌日、2.5 μ g の pcDNA3.1-Mouse Tbce cDNA と pcDNA3.3-CMV-EmGFP cDNA-miRNA control もしくは各 pcDNA3.3-CMV-EmGFP cDNA-miRNA sequence を 250 μ l の Opti-MEM、7.5 μ l の Lipofectamine 3000、5 μ l の P3000 と混和し室温で 10 分静置した後、全量 well 中に添加した。

Transfection 後 2 日目に、HEK293 細胞を 150 μ l の 1x Sample buffer (1% 2-Mercaptoethanol, 2% SDS, 80 mM Tris (pH 6.8) , 10% Glycerol) で溶解し、100°Cで 3 分間加熱した。加熱後のサンプルは 10%ポリアクリアミドゲルにて 1 時間電気泳動した後、200 mA で 90 分間 PVDF 膜に転写し、TBCE Antibody・Anti- β -Actin antibody・GFP (B-2) の各抗体を用いて Western blotting を行なった。

1-3 実験結果及び考察：

各 miRNA による Mouse Tbce mRNA 発現抑制効果の検討

Control 及び Mouse Tbce に対する miRNA (図 8A) をそれぞれ発現させたところ、miR-Tbce2 と miR-Tbce4 については control と比較して細胞死が多く見られた (図 8B)。次に、各 miRNA を発現させた N2a 細胞内の Mouse Tbce mRNA 発現量について、増幅領域が異なる 2 種類の primer を用いて qRT-PCR 解析により検討した。その結果、Mouse Tbce#1 primer による Mouse Tbce mRNA 発現量の定量では、miR-Tbce1 では 53.3%の減少、miR-Tbce2 では 14%、miR-Tbce3 では 4.67%の減少傾向、miR-Tbce4 では 26.3%の増加傾向が認められた。その一方で、Mouse Tbce#2

primer による Mouse Tbce mRNA 発現量の定量では、miR-Tbce1 では 36.7%の減少、miR-Tbce2 では 34.3%の減少傾向、miR-Tbce3 では 39.4%の減少、miR-Tbce4 では 12.6%の増加傾向が認められた (図 8C)。

miR-Tbce2 及び miR-Tbce3 発現細胞における Mouse Tbce mRNA 発現量は Mouse Tbce#1 primer よりも Mouse Tbce#2 primer で定量した方が減少していた。この結果の相違は、それぞれの miRNA の作用により生じた mRNA 切断産物のうち、Mouse Tbce#1 primer で増幅可能な産物の方が Mouse Tbce#2 のそれよりも分解速度が遅かったために生じてしまった可能性が考えられた。

各 miRNA による Mouse TBCE 発現抑制効果の検討

前節で 2 種類のプライマーを用いて qRT-PCR 解析を行なった結果、各 miRNA 発現細胞での Mouse Tbce mRNA 発現量がプライマーによって異なっていた。そのため、Mouse TBCE タンパク質発現量への影響も検討する必要がある。本来であれば、各 miRNA を発現した N2a 細胞内の Mouse TBCE 発現量を定量すべきであるが、解析当時 N2a 細胞の内在性 Mouse TBCE を検出できる TBCE 抗体が存在していなかった。そこで、前節で Mouse Tbce mRNA 量の減少もしくは減少傾向が見られた miR-Tbce1、miR-Tbce2、miR-Tbce3 と Mouse TBCE を HEK293 細胞に共発現させることで、各 miRNA による Mouse TBCE 発現抑制効果を Western blotting 法により検討した。

その結果、まず各 miRNA による Human TBCE への発現抑制効果は認められなかった (図 9A)。その一方で、外因性の Mouse TBCE 発現量は、control と比較して miR-Tbce1 では 96.6%、miR-Tbce2 では 92.1%、miR-Tbce3 では 97.5%の減少が認められた (図 9B)。

N2a 細胞での解析と比較すると、HEK 細胞での解析の方が各 miRNA の Mouse Tbce に対するノックダウン効果が高かった。N2a を用いた実験では miRNA のみを transfection を介して発現させていたのに対し、HEK 細胞を用いた実験においては Mouse TBCE と各 miRNA を同時に transfection し同じタイミングで両者を発現させている。そのため、miRNA による Mouse TBCE のノックダウンパターンは、miRNA の発現時期に依存すると考えられた。

これらの結果と前節の結果から miR-Tbce2 ではオフターゲット効果が生じている可能性があったことをふまえ、以後の海馬初代培養神経細胞を用いての Mouse Tbce ノックダウンシステムの構築では、miR-Tbce1 と miR-Tbce3 を使用した。

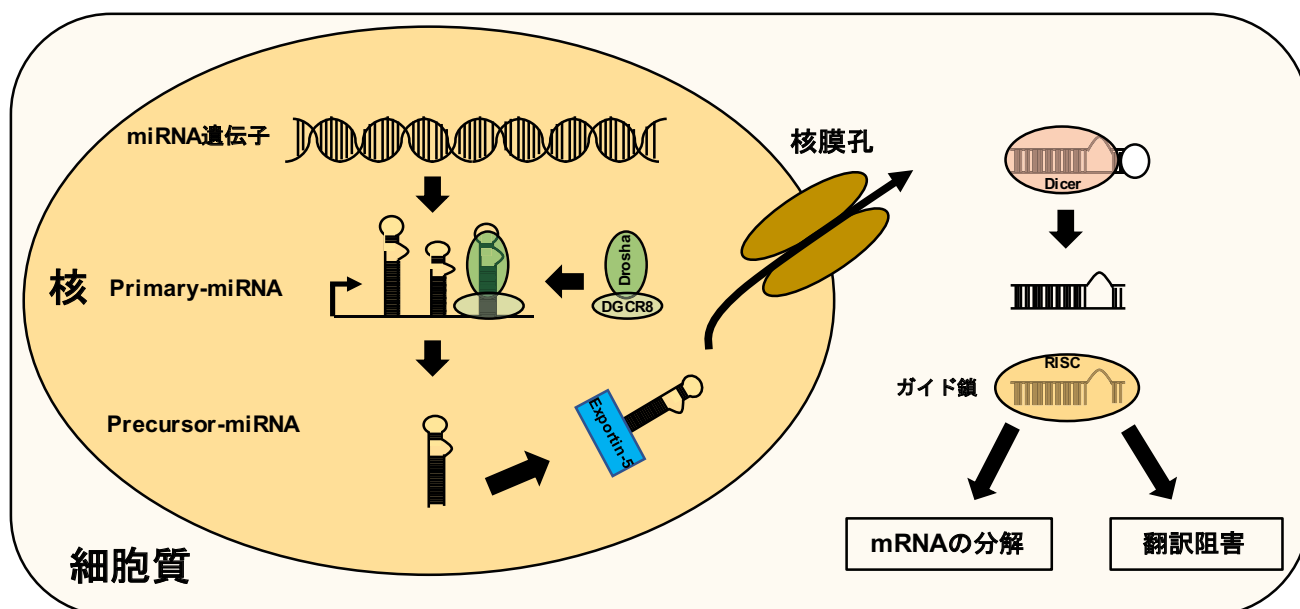


図 7 miRNA の遺伝子発現抑制機能

RNA ポリメラーゼ II 及び III により miRNA 遺伝子から転写された Primary micro RNA (Pri-miRNA) は、核内に存在する RNase III 酵素である Drosha による切断を受け Precursor miRNA (Pre-miRNA) となる。Pre-miRNA は Exportin-5 を介して細胞質に輸送される。Pre-miRNA が細胞質内に存在する Dicer による切断されることで、19~22 塩基程度の二本鎖 miRNA が生じる。二本鎖 mi-RNA のうち一方の鎖であるガイド鎖が RISC に取り込まれた後、標的 mRNA や標的 mRNA の 3'UTR に結合し mRNA の分解や翻訳阻害を誘導する。本図は <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K493500> の図を改変した。

miR-Tbce1	Top stand DNA oligo	5' -TGCTGATACAT AGT AC CTT CGT GG CTG TTT TG GCC ACT GA CTG ACA GC CAC GAG TACTA TGT AT -3'
	Bottom stand DNA oligo	5' -CCTGATACATA GTA CT CGT GGC TG TCA GTC AG TGG CCA AAA ACAGCC AC GAAGGT AC TAT GTA TC -3'
miR-Tbce2	Top stand DNA oligo	5' -TGCTGATCAAG AGC CT CCAGGT CT TTG TTT TG GCC ACT GA CTG ACA AA GAC CTAGG CTC TTG AT -3'
	Bottom stand DNA oligo	5' -CCTGATCAAG A GCC TA GGT CTT TG TCA GTC AG TGG CCA AAA ACA AAG AC CTG GAG GC TCT TGA TC -3'
miR-Tbce3	Top stand DNA oligo	5' -TGCTGCAATCT TGG CG ATA ATG AT CTG TTT TG GCC ACT GA CTG ACA GA TCA TTC GC CAA GAT TG -3'
	Bottom stand DNA oligo	5' -CCTGCAATCTT GGC GA ATG ATC TG TCA GTC AG TGG CCA AAA ACAGAT CA TTA TCG CC AAG ATT GC -3'
miR-Tbce4	Top stand DNA oligo	5' -TGCTGCAGAGA AGC TG GTA TCT AG GAG TTT TG GCC ACT GA CTG ACT CCT AG ATC AG CTT CTC TG -3'
	Bottom stand DNA oligo	5' -CCTGCAGAGAA GCT GA TCT AG GAG TCA GTC AG TGG CCA AAA ACT CCT AG ATA CCAGC TTC TCT GC -3'

表 1 Mouse Tbce に対する二本鎖 miRNA 作製のために設計した一本鎖 DNA 配列

primer name	forward primer	reverse primer
Mouse β -actin	5' -TCCTGTGGCAT CCA TGAAA CT-3'	5' -TGGTACCACCA GAC AG CAC TGT -3'
Mouse Tbce#1	5' -CGGGAGCCACG AAGGTACTA-3'	5' -GGTCCATCTTC GAG CA CATAGC -3'
Mouse Tbce#2	5' -GTGAGCCATGC TGG TGAAC A-3'	5' -CCACTTCATCC CAA GT TGA CAA -3'

表 2 qRT-PCR による Mouse Tbce mRNA 発現量の定量に使用したプライマー配列

A

miRNA name	miRNA sequence
miR-control	5'-AAAUGUACUGC GCGUGGAGAC-3'
miR-Tbce1	5'-AUACAUAGUAC CUUCGUGGCU-3'
miR-Tbce2	5'-AUCAAGAGCCUCCA GGUCUUU-3'
miR-Tbce3	5'-CAAUCUUGGCGAUA AUGAUCU-3'
miR-Tbce4	5'-CAGAGAAGCUGGUAUC UAGGA-3'

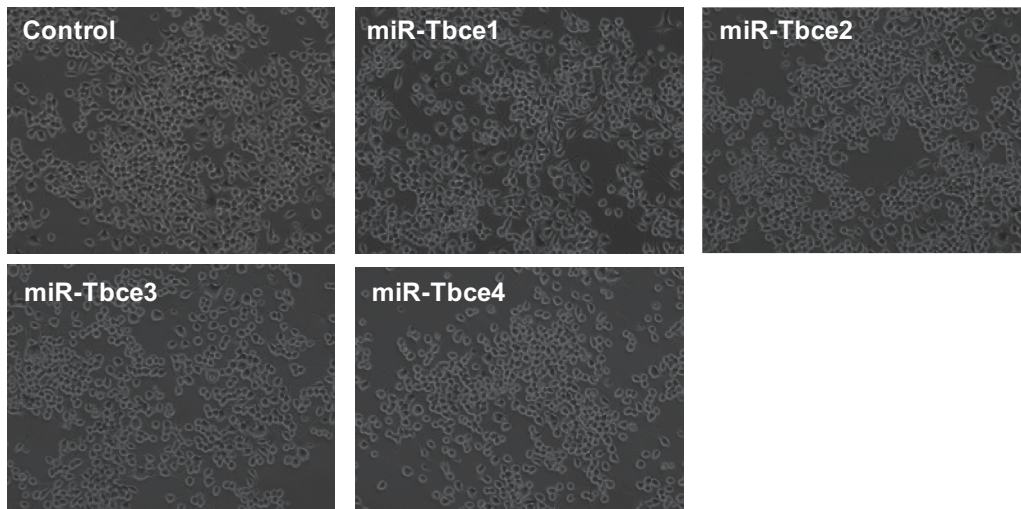
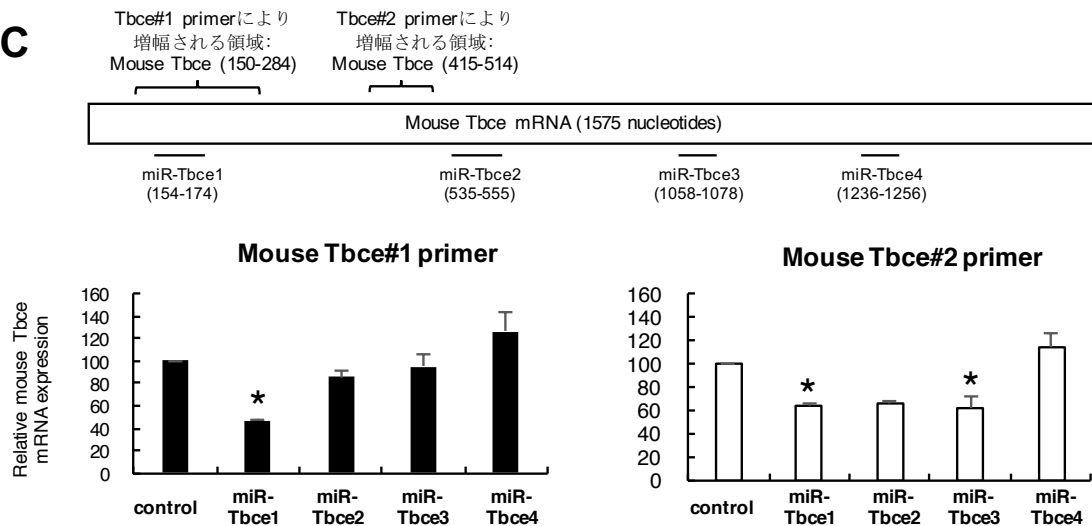
B**C**

図 8 各 miRNA 候補による Mouse Tbce mRNA 発現量抑制効果の検討

(A) Control 及び選定した Mouse Tbce に対する 4 つの miRNA 候補の各配列を示す。(B) Control 及び各 miRNA construct を transfection してから 2 日後の N2a 細胞を示す。(C) Mouse Tbce#1・Tbce#2 primer を用いて control もしくは各 miRNA を発現させた際の Mouse Tbce の mRNA 発現量を qRT-PCR により定量した (means \pm SEM, n=3)。グラフ上部には、各 primer を用いて PCR を行なった際の増幅領域と Mouse Tbce に対する各 miRNA の標的配列を示した。Mouse Tbce の mRNA 発現量は β -actin を用いて標準化した。有意差検定は ANOVA 解析後に Bonferroni 法を用いて行なった (* $p < 0.05$, vs control)。

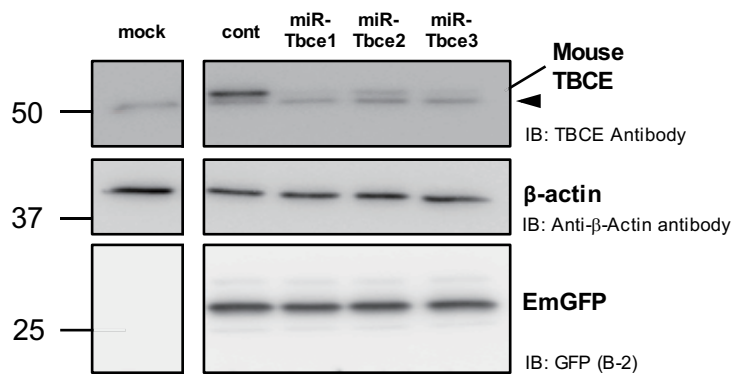
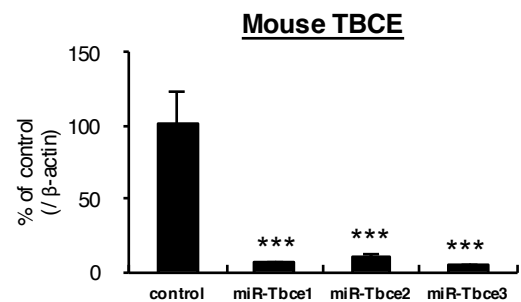
A**B**

図9 各 miRNA 候補による Mouse TBCE 発現量抑制効果の検討

(A) Control または qRT-PCR 解析により Mouse Tbce mRNA 発現量の減少が認められた miR-Tbce1、miR-Tbce2、miR-Tbce3 と Mouse TBCE を共発現させた HEK293 細胞を用いて Western blotting を行なった。Mouse TBCE については TBCE Antibody、 β -actin については Anti- β -Actin antibody (AC-15)、EmGFP については B-2 (GFP) の抗体をそれぞれ用いて検出した。矢頭は内在性の Human TBCE を示す。(B) Mouse TBCE と control または miR-Tbce1、miR-Tbce2、miR-Tbce3 を共発現させた際の Mouse TBCE 発現量を定量した (means \pm SEM, n=3)。各細胞における Mouse TBCE 発現量は β -actin を用いて標準化した。有意差検定は ANOVA 解析の後、Bonferroni 法を用いて行なった (***) $p < 0.005$, vs control)。

第2章 抗 Mouse TBCE 抗血清の調製と力価評価

2-1 概要 :

miRNA による Mouse Tbc nockdown システム構築において、Western blotting 法による組織中の Mouse TBCE 定量法の確立は必用不可欠である。しかし、市販されている TBCE 抗体は主に Human TBCE を検出するものが多く、Mouse TBCE に交差し、高感度に検出できる抗体が確定していない。そこで、Mouse TBCE 断片の作製及び精製を行い、得られた TBCE 断片を抗原とした抗 Mouse TBCE 抗血清の調製を試みた。さらに、調製した抗 Mouse TBCE 抗血清の力価評価を行ない、市販の抗体との比較を行った。

2-2 実験方法 :

・使用試薬

Mouse TBCE construct の作製

Mouse cDNA Library (plasmid) brain (Takara)

DH5 α コンピテントセル

pRK-172 vector

10x PFU Ultra Buffer (Agilent Technology)

PFU Ultra (Agilent Technology)

dNTPmix (Takara)

10X TA buffer (TOYOBO)

Dpn I (TOYOBO)

Ampicillin (ナカライ)

BactTM Tryptone (BD)

BactTM Yeast Extract (BD)

INA AGAR (funakosi)

PureLinkTM Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen)

Tbce (A1230/1242/1245G) forward primer-

[5'-TTCATGCTGAAAAACAGCTGCTGACCCTG-3'] (北海道システムサイエンス)

Tbce (A1230/1242/1245G) reverse primer-

[5'-TTCATGCTGAAAAACAGCTGCTGACCCTG-3'] (北海道システムサイエンス)

Tbce (A1551C+A1560/1563G+A1569C) forward primer

[5'-AATGGCGATTGCCTGCTGGTGCCTGGTAA-3'] (北海道システムサイエンス)

Tbce (A1551C+A1560/1563G+A1569C) reverse primer

[5'-TTACCAGCGCACCAGCAGGCAATCGCCATT-3'] (北海道システムサイエンス)

Mouse TBCE 断片の作製・精製・濃縮

BL21 (DE3) コンピテントセル (Novagen)

Minsart 0.8 μ m (Sartorius)

Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside [IPTG] (ナカライ)

His Buffer Kit (GE Healthcare)

Ammonium sulfate (ナカライ)

Biotech 透析膜 MWCO:3500 (Spectra/Por[®])

KCl (ナカライ)

Tris(hydroxymethyl)aminomethane Hydrochloride (ナカライ)

Glycine (ナカライ)

Acrylamide (ナカライ)

Glycerol (ナカライ)

2-Mercaptoethanol (ナカライ)

N,N'-Methylenebisacrylamide (ナカライ)

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (ナカライ)

Tris(hydroxymethyl)aminomethane Hydrochloride (ナカライ)

Sodium Lauryl Sulfate (ナカライ)

Ammonium Peroxodisulfate (ナカライ)

N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine (ナカライ)

Fluoro Trans PVDF Transfer Membrane (PALL Lifescience)

TBCE-Antibody (Novus)

Anti-His-tag mAb (MBL)

Peroxidase-conjugated AffinPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson Immunoresearch Laboratory)

Peroxidase-conjugated AffinPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson Immunoresearch

Laboratory)

NAP10 column (GE Healthcare)

Mupid ミニゲル泳動槽 (Mupid)

BRANSON SONIFIER 250 (Branson)

BIO-CHAKER BR-30 (TAITECK)

抗 Mouse TBCE 抗血清力価評価

Immuno Plate (Nunc)

Peroxidase-conjugated AffinPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson Immunoresearch Laboratory)

ELIZA POD 基質 TMB キット (ナカライ)

TBCE Antibody (Novus)

Chemi-lumi One L (ナカライ)

Immnostar LD (FUJIFILM 和光純薬)

His-Mouse TBCE 断片発現用 construct の作製

Mouse cDNA Library (plasmid) brain (Takara) を鋳型とし、Mouse Tbce の C 末端断片に相当する cDNA を Tbce (A1230/1242/1245G) forward/reverse primer と Tbce (A1551C+A1560/1563G+A1569C) forward/reverse primer を用いて PCR で増幅し、それらが大腸菌タンパク質発現用プラスミド pRK-172 vector に組み込んだ。

Mouse TBCE 断片の作製・精製

・初回免疫用抗原の作製・精製

pRK172-His-Mouse Tbce (1284-1575) と pRK172-His-Mouse Tbce (1284-1575 [A1230/1242/1245G+A1551C+A1560/1563G+A1569C]) をそれぞれ各 5 µl ずつ BL21 (DE3) コンピテントセル 10 µl に加え混和し、氷上で 3 分間、42°C で 1 分間、氷上で 3 分間静置した。そこに LB 液体培地を 200 µl 加え、37°C で 30 分間静置した後、50 µg/ml の Ampicillin を含む LB 液体培地 5.5 ml に全量添加し 37°C で 12~16 時間振盪培養した。形質転換された大腸菌培養液を 50 µg/ml の Ampicillin を含む LB 液体培地 500 ml に全量加え、37°C で 4~6 時間振盪培養した。OD 値が 0.6 前後であることを確認した後、0.5 M の IPTG を 500 µl 添加し 37°C で 2 時間振盪培養した。IPTG

による発現誘導終了後、大腸菌培養液を 5,000 rpm、4℃の条件で 10 分間遠心した。上清を除去後、沈殿物に対し 10 ml の Binding Buffer⁺ (20 mM Sodium Phosphate, 0.5 M NaCl, 20 mM Imidazole, 1 mM PMSF, 5 µg/ml Leupeptin, 1x protease inhibitor cocktail) を加え懸濁した後、氷上で超音波破碎を output control 3~4、Duty cycle 50、1 分間の条件で 2 回行った。さらにこの懸濁液を 15,000 rpm、4℃の条件で 15 分間遠心分離し、上清を回収した。上清は Minsart 0.8 µm の Filter で濾過した後、可溶性画分として -80℃ で保存した。これらの作業を 2 回行い、計 20 ml の可溶性画分を得た。それぞれの Mouse TBCE 断片が含まれている可溶性画分は、グラジエントゲルを用いて 1 時間電気泳動した後、CBB 染色もしくは Anti-His-tag mAb (MBL) を用いて Western blotting を行うことで各断片の収量について検討した。

得られた可溶性画分からニッケルカラムを用いて Mouse TBCE (428-524) 断片を精製した。まず HisGraviTrapTM カラムに 20 ml の Binding Buffer (20 mM Sodium Phosphate, 0.5 M NaCl, 20 mM Imidazole) を加え平衡化した。次に 20 ml の可溶性画分をカラムに加えた後、10 ml の Binding Buffer⁺ で 3 回 wash した。その後、4 ml の Elution Buffer (20 mM Sodium Phosphate, 0.5 M NaCl, 500 mM Imidazole) を加え、Mouse TBCE (428-524) 断片を溶出した。

回収した溶出液 1 ml に対し 2x sample buffer (2% 2-Mercaptoethanol, 4% SDS, 0.16 M Tris (pH 6.8), 20% Glycerol) を 1 ml 加え、100 °C で 3 分間加熱した。加熱後のサンプルを Electro elution 用のゲル 1 枚につき 500 µl アプライし、計 6 枚のゲルを用いて 1 時間泳動した。泳動終了後にサイズマーカーの 15 kDa から 10 kDa に相当する部分を切り出し、計 6 つのゲル片を得た。透析膜一つに対しゲル片一つと 2 ml の 1x Running buffer (50 mM Tris, 50 mM Glycine) を入れ、Mupid 電気泳動槽を用いて 1x Running buffer 中で 50 V、4℃の条件で 3 時間溶出を行なった。溶出後、透析膜中に残存している計 12 ml の溶液を回収し、3 M の KCl 溶液を 120 µl 加え混和した後、氷上で 15 分間静置した。次に 15,000 rpm、4℃の条件で 15 分間遠心し、上清を回収した。

得られた上清は再度透析膜に入れ、100%硫酸アンモニウム溶液中で 2 時間透析を行なった。透析終了後に透析膜中に残存している溶液 4 ml を回収し、30,000 rpm、4℃の条件で 15 分間遠心した。沈殿物を PBS 1 ml で溶解した後 NAP10 カラムを用いて脱塩を行い、最終的に 2 ml の PBS で Mouse TBCE (428-524) 断片を溶出した。

可溶性画分・ニッケルカラムによる精製・Electro Elution・硫酸アンモニウム沈殿・NAP カラムによる脱塩の各ステップで得られたサンプルは 12%ポリアクリルアミドを用いて 1 時間電気泳動し、CBB 染色により Mouse TBCE (428-524) 断片を検出した上で収量を測定した。

・追加免疫用抗原の作製・精製

初回免疫用抗原と同様に大腸菌 BL21 (DE3) コンピテントセルに発現させ、可溶性画分を得た。ただし、ニッケルカラムからの溶出は 200 mM Imidazole を含む Elution buffer (20 mM Sodium Phosphate, 0.5 M NaCl, 200 mM Imidazole) で回収し、80%飽和硫酸アンモニウム沈殿画分を得た。沈殿に対し 6 ml の PBS を加えて溶解し、精製度、収量について 12%ポリアクリルアミドゲル電気泳動および CBB 染色により測定した。

抗 Mouse TBCE 抗血清の調製

ウサギへの免疫から採血については紀和実験動物研究所に依頼した。上述した方法で得た脱塩後の溶出液および硫酸沈殿画分を PBS で溶解した溶液を抗原として、ウサギ一羽に対し抗原 100~200 µg を 2 週間毎に計 5 回免疫し、最終免疫から一週間後に全採血を行なった。2 羽のウサギに免役し、それぞれ#1、#2 の抗血清を得た。

抗 Mouse TBCE 抗血清の力価評価

抗原用として調製した Mouse TBCE (524-528) 断片を 50 mM の Carbonate buffer (pH 9.6) で 0.01 µg/µl に希釈した後、イムノプレートに 100 µl/well ずつ加え 4°C で一晚固相化させた。次に 3% BSA を含む 50 mM Carbonate buffer を 200 µl/well ずつ加え、4°C で一晚 Blocking を行なった。TBS-t を 200 µl/well ずつ加え 3 回 wash した後、抗 Mouse TBCE 抗血清 #1・#2 および市販の抗体 TBCE Antibody (Novus) をそれぞれ 1% BSA を含む PBS を用いて 1/1000、1/4000、1/16000、1/256000、1/1024000、1/4096000、1/16384000 に希釈し、それぞれを 150 µl/well ずつ加え室温で 3 時間反応した。TBS-t を 200 µl/well ずつ加え 3 回 wash した後、1% BSA を含む PBS を用いて 1/10000 に希釈した Peroxidase-conjugated AffinPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) を 100 µl/well ずつ加え、1 時間反応した。TBS-t を 200 µl/well ずつ加え 4 回 wash した後、TMB 溶液を 100 µl/well ずつ加え発色させた。十分な発色を確認した後に発色停止液を 100 µl/well ずつ加え、吸光度を測定した。

抗 Mouse TBCE 抗血清を用いた Western blotting による Mouse TBCE の検出

Control 及び miR-Tbce1 を発現させた培養開始 14 日目の海馬初代培養神経細胞 (6×10^5 cells) を 1x Sample buffer (1% 2-Mercaptoethanol, 2% SDS, 80 mM Tris (pH 6.8), 10% Glycerol) で溶解し、100°C で 3 分間加熱した。加熱後のサンプルは 10%ポリアクリルアミドゲルにて 1 時間電気

泳動した後、200 mA で 90 分間 PVDF 膜に転写し、抗 Mouse TBCE 抗血清#1・#2、および比較対象として市販の TBCE Antibody (Novus) を用いて Western blotting を行なった。

2-3 実験結果及び考察:

Mouse TBCE construct の作製

予備実験から、BL21 (DE3) コンピテントセルを用いて全長の Mouse TBCE を発現させた場合、その発現量が非常に微量であることが確認されていた。抗血清の調製には最低でも抗原が 800 µg 必要であったため、Mouse TBCE の回収量を向上させる必要があった。そこで、Mouse TBCE 配列内で高発現が可能な領域を同定するために異なる長さの Mouse TBCE 断片をそれぞれ大腸菌に発現させた。その結果、Mouse TBCE の C 末端断片 (428-524 アミノ酸) で比較的高い発現が確認された (図 10)。前章で使用していた TBCE Antibody (Novus) は 527 アミノ酸から構成されている Human TBCE 配列内の 430-527 の領域を抗原として調製した抗体であり、過剰発現させた Mouse TBCE に交差することを前章で確認していた (図 9A)。これらの結果から、Mouse TBCE の C 末端側の配列を抗原として用いれば内在性の Mouse TBCE を検出可能な抗血清が得られるのではないかと考え、抗 Mouse TBCE 抗血清の抗原を Mouse TBCE (428-524) 断片とした。そして、Mouse TBCE (428-524) 断片のさらなる発現量の向上を目指し、Mouse TBCE の C 末端断片に存在するレアコドン (CTA・GGA・CGA) のうち 7 カ所について翻訳効率が高いサイレント変異を導入した (図 11) ⁵⁰。

Mouse TBCE 断片の作製・精製・濃縮

・初回免疫用抗原の作製・精製・濃縮

レアコドンのサイレント変異導入により、導入前の construct と比較して Mouse TBCE 断片の発現量が 1.5 倍程度増加した (図 12)。得られた Mouse TBCE 断片をニッケルカラムで粗精製した後に Electro Elution を行なった結果、極めて高純度の Mouse TBCE 断片を得た。Electro Elution により Mouse TBCE 断片を精製した際に溶出液中に SDS が残存していたことから、KCl 溶液添加により SDS を除去した上で、硫酸沈殿と脱塩を経て 400 µg/2 ml の Mouse TBCE 断片を得た (図 13)。

・追加免疫用抗原の作製・精製・濃縮

Elution buffer に含まれる Imidazole 濃度を 500 mM から 200 mM に変更した結果、His カラムによる粗精製のみで比較的純度の高い Mouse TBCE 断片を得ることができた (図 14A)。この溶液

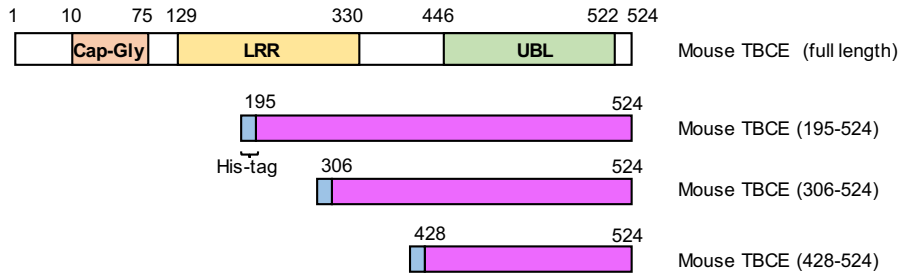
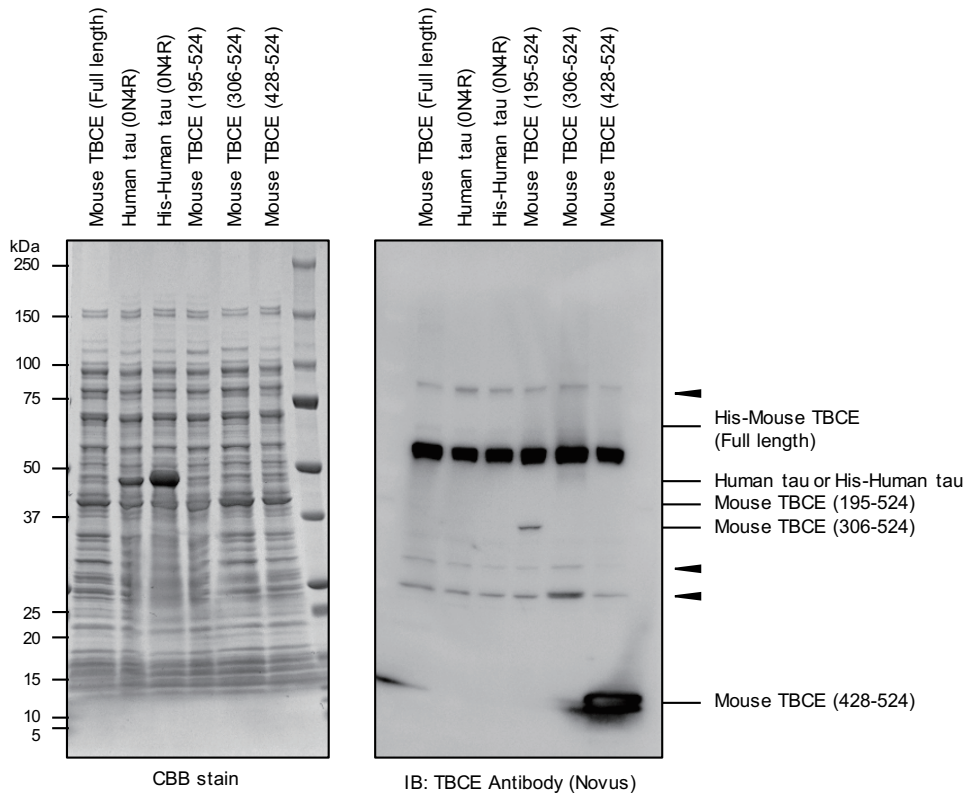
を硫酸沈殿させ最終的に PBS で溶解し、5.64 mg/6 ml の Mouse TBCE 断片を得た (図 14B)。

抗 Mouse TBCE 抗血清の力価評価

ELISA により調製した抗血清及び市販の抗体の力価測定を行なった結果、抗 Mouse TBCE 抗血清 #1・#2・市販の抗体の TBCE Antibody の順で力価が高いことが確認された (図 15)。

抗 Mouse TBCE 抗血清を用いての Western blotting による Mouse TBCE の検出

Mouse TBCE には全長を含め 3 つの isoform が存在する (図 16A)。そこで、Western blotting により海馬初代培養神経細胞で発現している Mouse TBCE の各 isoform の検出を試みた。その結果、最も高感度に Mouse TBCE の全 isoform を検出できたのは抗 Mouse TBCE 抗血清#1 であった (図 16B)。その一方で検出感度は弱かったものの、抗 Mouse TBCE 抗血清#2 では全長の Mouse TBCE と Mouse TBCE isoform 1、市販の TBCE Antibody では Mouse TBCE isoform 1 のみが検出された (図 16C)。これらの結果から、最も高感度に全長の Mouse TBCE を検出した抗 Mouse TBCE 抗血清 #1 を Anti-TBCE 抗体とし、以後の実験に用いた。

A**B**

※ (宮坂、延原らデータ)

図 10 BL21 (DE3) コンピテントセルを用いたタンパク質発現において、高発現を可能とする Mouse TBCE 領域の同定

(A)本研究でノックダウン標的と定めた Mouse TBCE 全長の構造と、抗 Mouse TBCE 抗血清の抗原候補の各 Mouse TBCE 断片を示す。Mouse TBCE は 524 個のアミノ酸から構成され、 α チューブリンとの結合領域である cytoskeleton associated protein, Glycine-rich (Cap-Gly) domain、ロイシンに富む Leucine-Rich Region (LRR)、ユビキチンと同様に β -grasp 構造をとる Ubiquitin-like (UBL) domain が存在する。そこから Mouse TBCE の 195~524 番目・306~524 番目・428~524 番目までの Mouse TBCE 断片 (N 末端に His-tag を付加済み) をそれぞれ作製した。(B)全長の Mouse TBCE 及び各 Mouse TBCE 断片を発現させた BL21 (DE3) コンピテントセルから得られた可溶性画分をグラジエントゲルにて電気泳動し、CBB 染色と Western blotting を行なった結果を示す。Western blotting では TBCE Antibody (Novus) を用いて各 Mouse TBCE 断片を検出した。矢頭は非特異的なバンドを示す。

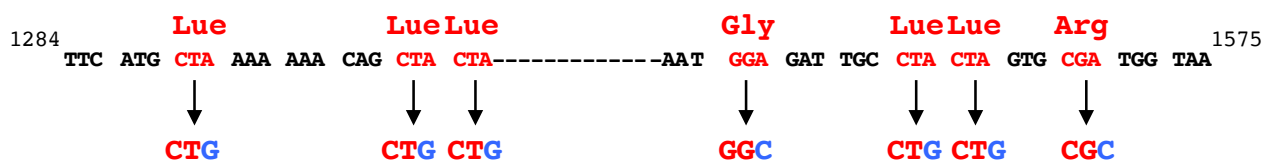


図 11 抗 Mouse TBCE 抗血清の抗原として調製した Mouse TBCE 断片

抗 Mouse TBCE 抗血清の抗原として用いた Mouse TBCE (428-524) 断片を指定する塩基配列を示す。今回作製を試みた Mouse TBCE (428-524) 断片の塩基配列中にはレアコドン (赤字) と呼ばれるコドンが存在する。レアコドンはタンパク質の翻訳効率を低下させることで知られており、Mouse TBCE (428-524) 断片中に 12% の割合で存在している。それらのうち、本章では 7 つのレアコドンを翻訳使用頻度の高い別のコドンに変更することで、Mouse TBCE 断片の収量増大を試みた。

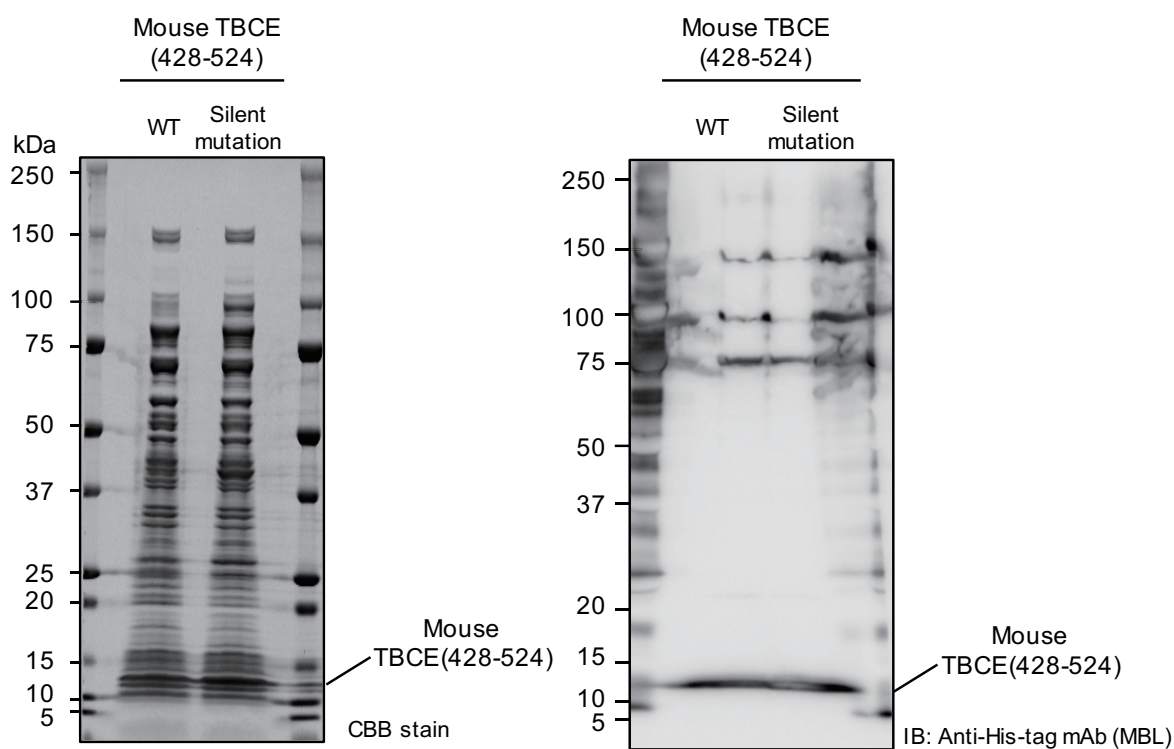


図 12 サイレント変異導入による Mouse TBCE 断片のタンパク質量への影響の検討

サイレント変異導入前と導入後の Mouse TBCE (428-524) 断片発現用 construct を用いて、BL21 (DE3) コンピテントセルで各 Mouse TBCE 断片を発現させた。それらの大腸菌から可溶性画分をそれぞれ回収し、グラジエントゲルを用いて電気泳動した。電気泳動後、CBB 染色及び Anti-His-tag mAb (MBL) を用いて Western blotting を行い、各 Mouse TBCE 断片を検出した。

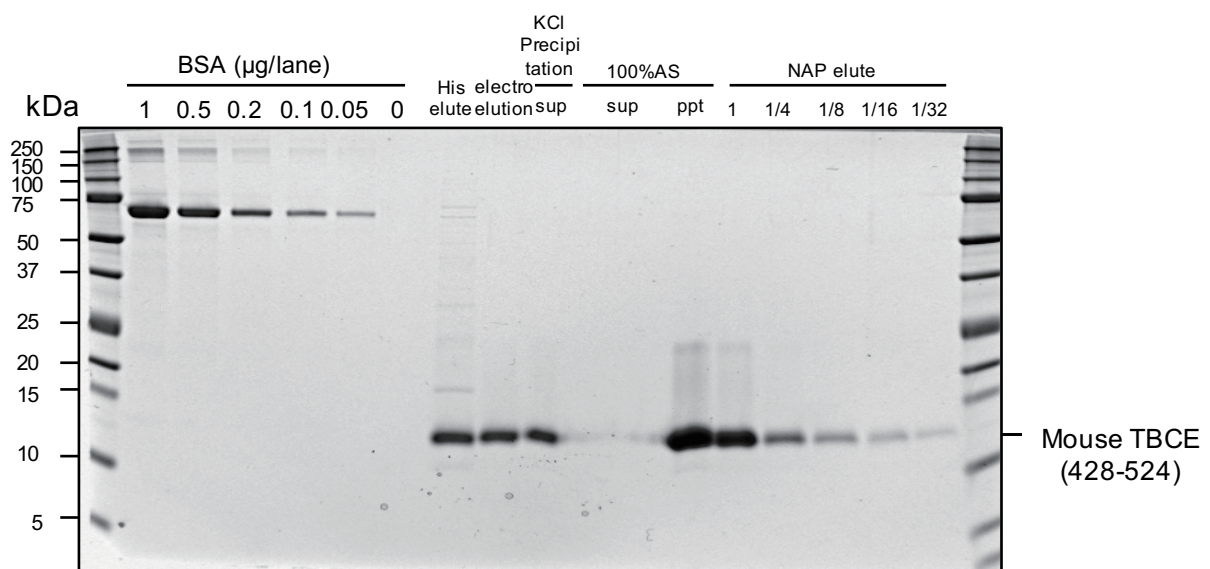


図 13 初回免疫用抗原の精製・濃縮

サイレント変異導入後の Mouse TBCE (428-524) 断片を His カラムで精製後、電氣的溶出・KCl 溶液添加による SDS 除去・100%硫酸アンモニウム中での透析・NAP カラムによる脱塩のステップを経て濃縮した。各ステップで得られた溶液を 12%ポリアクリルアミドゲルにて 1 時間泳動した後、CBB 染色により Mouse TBCE (428-524) 断片を検出し、BSA による検量線をもとに収量を測定した。

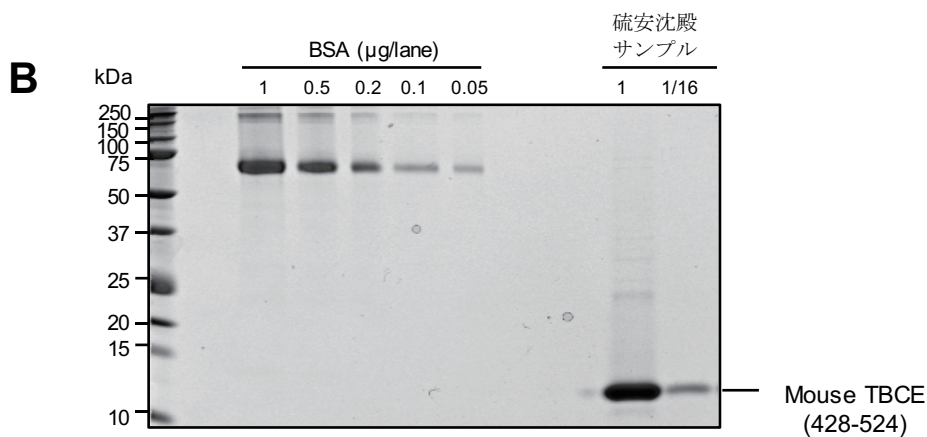
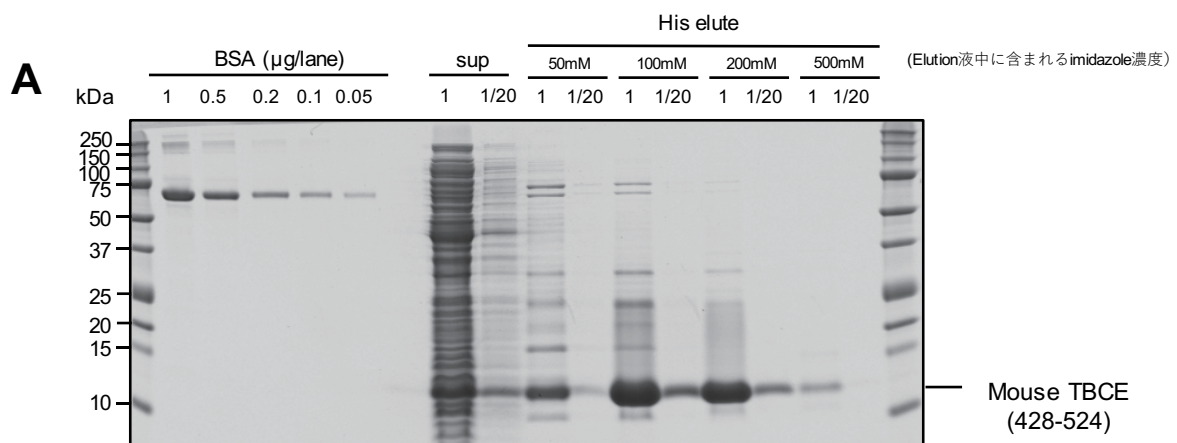


図 14 初回免疫以後用抗原の精製

(A) Imidazole の最終濃度を 50 mM、100 mM、200 mM、500 mM とした溶出液を用い、サイレント変異導入後の Mouse TBCE (428-524) 断片を His カラムからグラジエント溶出させた。各溶出液を 12% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した後、CBB 染色にて Mouse TBCE (428-524) 断片を検出し、BSA による検量線をもとに収量を測定した。(B) 200 mM の Imidazole を含む溶出液を用いて溶出させた Mouse TBCE (428-524) 断片に最終濃度が 80% となるよう硫安アンモニウムを加え、硫安沈殿を行なった。沈殿サンプルを 6 ml の PBS で溶解し 12% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した後、CBB 染色にて Mouse TBCE (428-524) 断片を検出し、BSA による検量線をもとに収量を測定した。

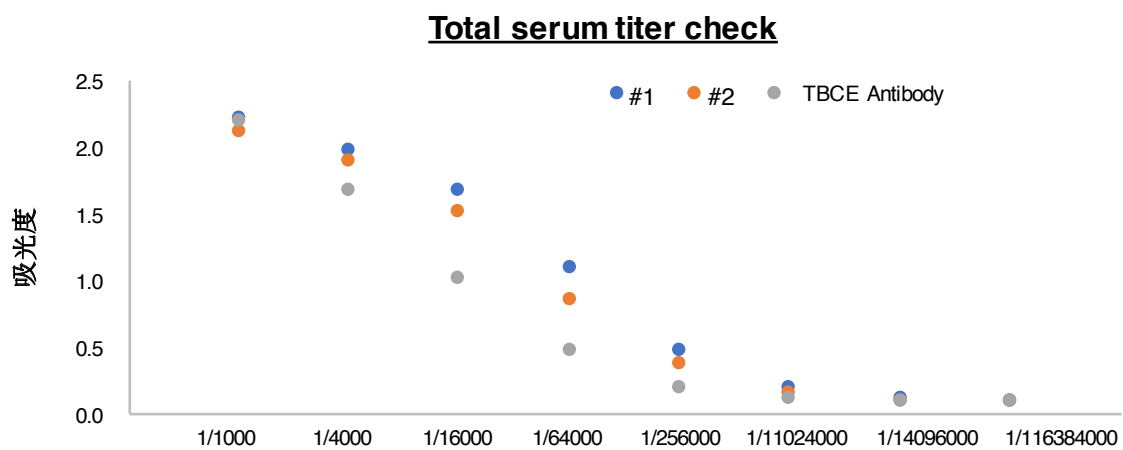
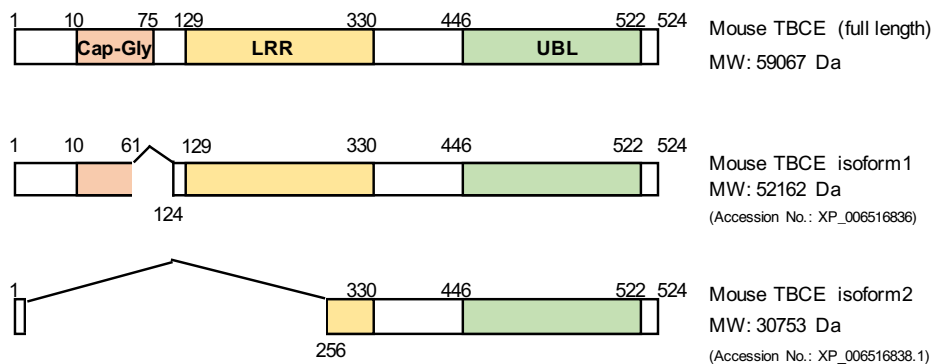
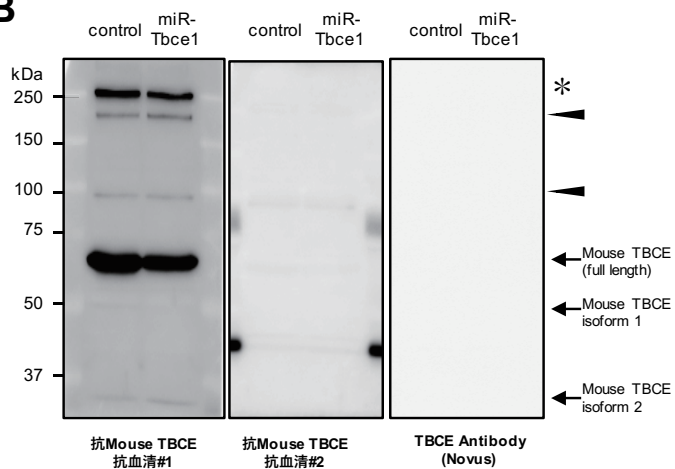
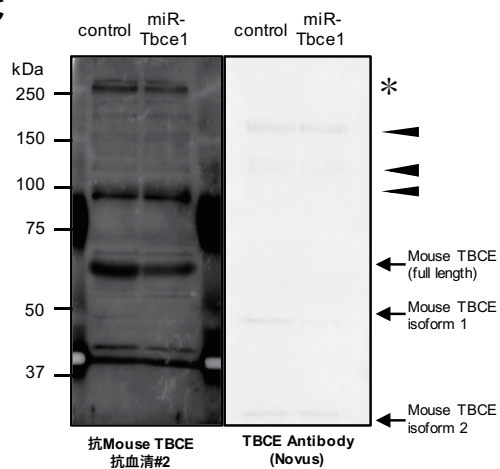


図 15 作製した抗 Mouse TBCE 抗血清の力価評価

ELISA 法を用いて、固相化した Mouse TBCE (428-524) 断片を今回作製した抗 Mouse TBCE 抗血清#1・#2 及び TBCE Antibody (Novus) を用いて検出し、抗血清及び市販抗体の力価を測定した。

A**B****C****図 16 本研究で作製した抗 Mouse TBCE 抗血清を用いての Western blotting**

(A) Mouse TBCE の各 isoform とそれぞれの分子量を示す。(B) Control 及び miR-Tbce1 を発現させた培養 14 日目の海馬初代培養神経細胞の total lysate サンプルを電気泳動し、抗 Mouse TBCE 抗血清#1・#2 及び TBCE Antibody (Novus) を用いて Western blotting を行なった。発色には、フェムトグラムレベルのタンパク質の検出が可能な Chemi-Lumi One L を用いた。(C) (B)にてシグナルが微弱であった抗 Mouse TBCE 抗血清#2 と TBCE Antibody (Novus) と反応したメンブレンをピコグラムレベルのタンパク質の検出が可能な Immunostar を用いて再度発色した。矢頭は非特異的なバンドを示す。*で示したバンドについては、miR-Tbce1 細胞で若干量減少していることから、Mouse TBCE の全長か isoform 1 の多量体であることが考えられた。

第 3 章 miRNA 発現レンチウイルスを用いた海馬初代培養神経細胞での Mouse Tbce ノックダウンシステムの構築

3-1 概要 :

第 1 章で同定した miR-Tbce1 もしくは miR-Tbce3 を用いて、マウス脳から単離した海馬初代培養神経細胞での Mouse Tbce ノックダウンシステムの構築を目指した。海馬初代培養神経細胞においても Mouse Tbce の発現抑制を再現するには、適切な遺伝子導入法を選択する必要がある。海馬初代培養神経細胞で miRNA を発現させる方法として第 1 章で用いたリポフェクション法を用いた場合、細胞毒性が強く遺伝子導入率も低いことから、長期的な Mouse Tbce 発現抑制を見込めない可能性が高い。そこで、本研究では細胞毒性の低減と高効率かつ長期的な miRNA 発現を目的として、レンチウイルスベクターを用いて miRNA の発現導入を行なった。

レンチウイルスベクターはヒト免疫ウイルス (Human immunodeficiency virus type 1; HIV-1) を元に開発されており、パッケージングプラスミド・エンベローププラスミド・Rev プラスミド・トランスファープラスミドの 4 つのプラスミドを用いて作製する⁵¹⁾ (図 17A)。パッケージングプラスミドはエンベロープ以外のウイルス遺伝子 (gag/pol) をコードしており、ウイルス粒子作製に必要な蛋白質の供給を担う。Rev プラスミドは、スプライシングされていない gag、gag-pol mRNA を選択的に核外に輸送する役割を持つ Rev をコードしている。エンベローププラスミドでは、宿主細胞の拡大を目的として Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein (VSV-G) をコードしたプラスミドを用いる。トランスファープラスミドは、プロモーター活性を有する Long terminal repeat (LTR)、ウイルス RNA ゲノムがウイルス粒子中に取り込まれるために必要なパッケージングシグナル(Ψ)、逆転写に必須のプライマー結合部位をもち、このプラスミドから転写された RNA はウイルス粒子内に取り込まれる。本研究ではこのプラスミドに EmGFP cDNA と miRNA をコードする miRNA カセットを組み込み、これらを Synapsin I promoter を用いて神経細胞特異的に発現させる。これら 4 つのプラスミドをパッケージング細胞にトランスフェクションすることで、培養上清中にレンチウイルスベクターが産生される。

上記の原理を用いて調製した miRNA 発現レンチウイルスベクターを海馬初代培養神経細胞に感染させ、EmGFP 陽性細胞で Mouse Tbce 発現抑制効果が維持されているかについて Western blotting 法を用いて検討した。さらに、Mouse Tbce ノックダウン条件下における α チューブリンの影響についても検討した。

3-2 実験方法：

・使用試薬

miRNA 発現用レンチウイルスベクターの作製

PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase (Clontech)

QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)

Xho I (New England Biolabs)

Sal I (New England Biolabs)

Cutsmart Buffer (New England Biolabs)

In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech)

HST08 コンピテントセル (Clontech)

Stbl3 コンピテントセル (Invitrogen)

pRRL vector (Addgene)

PureLink[™] Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen)

miRNA 発現用レンチウイルスの作製

Lenti-X[™] 293T 細胞株 (Clontech)

pRSV-Rev (Addgene)

pMD2.G (Addgene)

pMDLg/p PRE (Addgene)

BES-sodium salt (Sigma-Aldrich)

NaCl (ナカライ)

NaH₂PO₄ (ナカライ)

CaCl₂ (ナカライ)

DMEM (FUJIFILM 和光純薬)

Fetal Bovine Serum (Invitrogen)

Penicillin/Streptomycin (ナカライ)

Opti-MEM (Invitrogen)

Sodium pyruvate (Sigma-Aldrich)

Glucose (ナカライ)

0.45 μm filter (Sartorius)

Lenti-X™ qRT-PCR titration Kit (Takara)

海馬神経初代培養

MEM (ナカライ)

Glucose (ナカライ)

Penicillin/Streptomycin (ナカライ)

Fetal Bovine Serum (Sigma-Aldrich)

B-27 supplement (Invitrogen)

Sodium pyruvate (Sigma-Aldrich)

Putrescine (Sigma-Aldrich)

Apo-transferrin (Sigma-Aldrich)

Insulin (Sigma-Aldrich)

Progesterone (Sigma-Aldrich)

SeO₂ (Sigma-Aldrich)

Cytosine Arabinoside (Sigma-Aldrich)

Boric acid (Sigma-Aldrich)

Sodium Borate (FUJIFILM 和光純薬)

Poly-L-Lysine (Sigma-Aldrich)

Coverslip (Marienfeld)

Paraffin wax (Sigma-Aldrich)

0.25% Trypsin/1 mM EDTA (ナカライ)

蛍光免疫染色法によるαチューブリンの局在解析

Paraformaldehyde (ナカライ)

Glutaraldehyde (ナカライ)

Skim Milk (ナカライ)

Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate (ナカライ)

Bovine serum albumin (BSA) (ナカライ)

一次抗体 (表 3 に示す)

Goat Anti-Chicken IgY H&L (Alexa Fluor[®] 488) (Abcam)

Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Flour 514 (Life technologies)

Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Flour 568 (Life technologies)

Goat anti-Rat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Flour 647 (Life technologies)

ProLong™ Diamond Antifade Mountant (ThermoFisher scientific)

MICRO SLIDE GLASS (松浪硝子工業)

Western blottingによるαチューブリンの性状解析及びタンパク質発現量の定量

Piperazine-1,4-bis (2-ethanesulfonic Acid) 1,4-Piperazinediethanesulfonic Acid (ナカライ)

Ethylene glycol-bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (ナカライ)

MgCl₂ (ナカライ)

Polyethylene Glycol Mono-p-isooctylphenyl Ether (ナカライ)

cOmplete™, EDTA-free Protease inhibitor Cocktail (Roche)

Taxol (LC laboratories)

GTP (ナカライ)

Na₃VO₄ (FUJIFILM 和光純薬)

NaF (Sigma-Aldrich)

Okadaic acid (LC laboratories)

β-Glycelophosphate (Merck)

Phenylmethylsulfonyl fluoride (ナカライ)

Diisopropyl fluorophosphate (Sigma-Aldrich)

Pepstatin (PEPTIDE)

Antipain (PEPTIDE)

Aprotinin (ナカライ)

Leupeptin (PEPTIDE)

Tosyl lysine chloromethyl ketone (ナカライ)

Acrylamide (ナカライ)

Glycerol (ナカライ)

2-Mercaptoethanol (ナカライ)

N,N'-Methylenebisacrylamide (ナカライ)

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (ナカライ)

Tris(hydroxymethyl)aminomethane Hydrochloride (ナカライ)

Sodium Lauryl Sulfate (ナカライ)

Ammonium Peroxodisulfate (ナカライ)

N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine (ナカライ)

Fluoro Trans PVDF Transfer Membrane (PALL Lifescience)

Skim Milk (ナカライ)

一次抗体 (表 3 に示す)

Peroxidase-conjugated AffinPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratory)

Peroxidase-conjugated AffinPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratory)

Chemi-lumi One L (ナカライ)

miRNA 発現用レンチウイルスベクターの作製

第 1 章にて既に作製していた pcDNA3.3-Syn promoter-EmGFP cDNA-miRNA sequence を鋳型として、pRRL to miR-F-Xho I forward primer と pRRL to miR-R-Sal I primer を用いて PCR 反応液 (4 pg/μl pcDNA3.3-Syn promoter-EmGFP cDNA-miRNA sequence, 2 pmol forward primer, 2 pmol reverse primer, 1x PrimeSTAR Max Premix) を調製し、98°C で 10 秒、55°C で 5 秒、72°C で 25 秒の反応を 40 サイクル行った。得られた PCR 産物を QIAquick Gel Extraction Kit を用いてゲルから切り出し精製した。精製した PCR 産物、Xho I と Sal I で二重消化した線状化 pRRL vector、5x Infusion mix を用いて 5 μl の Infusion 溶液 (PCR 産物 3 μl, 線状化 pRRL vector 1 μl, 5x Infusion mix 1 μl) を調製した後、50°C で 15 分間反応した。Infusion 溶液全量を 50 μl の HSP08 コンピテントセルに加えた後、氷上で 3 分間、37°C で 2 分間、氷上で 3 分間反応し形質転換させた。この大腸菌液に対し SOC 培地を 100 μl 添加し、50 μg/ml の Carbenicillin を含む LB plate に全量塗布し 37°C で一晩培養した。LB plate に形成されたコロニーを 50 μg/ml の Carbenicillin を含む LB 液体培地に植菌し、37°C で 16~18 時間培養した。培養後の大腸菌液から PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit を用いてプラスミド DNA を得た。miRNA 発現用レンチウイルスの作製で用いる plasmid に関しては、Stbl3 コンピテントセルを用いて再度形質転換させた後に、QIAGEN

Plasmid Plus Midi Kit を用いて得られたプラスミドを使用して行なった。

miRNA 発現用レンチウイルスの作製

miRNA 発現用レンチウイルスの作製は、岩田らの方法を改変して行った⁵²⁾。37°Cのインキュベーターにて DMEM (1x Penicillin/Streptomycin, 10% Fetal bovine Serum in DMEM) で培養していた Lenti-X HEK293T 細胞を、transfection 前日に 1×10^6 cells/dish の細胞密度となるよう 10 cm dish に播種した。12 μ g の各 transfer plasmid (pRRL-Syn-EmGFP cDNA-miR control sequence, pRRL-Syn-EmGFP cDNA-miR Tbce1, pRRL-Syn-EmGFP cDNA-miR Tbce3) に対し、Packaging plasmid である pMDLg/p-PRE、pRSV-Rev、envelop plasmid である pMD2.G をそれぞれ 6 μ g ずつ、50 μ l の 2.5 M CaCl₂を加えた後に総量が 500 μ l となるよう滅菌水を加えた。さらに 2x BES-buffered saline (50 mM BES sodium salt, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄ [pH 6.95]) を 500 μ l 加え混和した後、室温で 20 分間静置した。この溶液を全量 Lenti-X HEK293T 細胞に添加した後、3% CO₂、37°Cのインキュベーターで一晩培養した。Transfection 翌日に、0.6% Glucose、1 mM Sodium pyruvate、1x Penicillin/Streptomycin を含む Opti-MEM 10ml に培地交換した後、5% CO₂、37°Cのインキュベーターに移し一晩培養した。培地交換翌日に培地上清を回収し、0.45 μ m フィルターを用いた濾過により細胞破片を除去した。濾過後の溶液をレンチウイルス上清とした。これからウイルス RNA を得た後、Lenti-X™ qRT-PCR titration Kit を用いてウイルス力価測定を行なった。

海馬初代培養神経細胞の作製

海馬初代培養神経細胞の作製は御園生らの方法を改変して行なった⁵³⁾。海馬初代培養神経細胞と共培養する astrocyte については、御園生らの方法に従って培養した⁵³⁾。妊娠 17 日目の C57BL/6 マウス脳から両側海馬を採取し、それらに 5 ml の 0.25% trypsin/1 mM EDTA を加え、37°Cで 15 分間反応した。そこに 5 ml の Neuron planting medium (0.6% Glucose, 5% Fetal Bovine Serum, 1x Penicillin/Streptomycin in MEM) を加え、1,000 rpm で 5 分間遠心した。得られた沈殿に対し 10~15 ml の Neuron planting medium を加え、パスツールピペットを用いて懸濁した。1 mg/ml の Poly-L-Lysine でコーティングした coverslip に形態学的解析・生化学的解析用サンプルとして分散させた細胞を 30,000 個もしくは、300,000 個播種し、37°Cで 1~2 時間静置した。神経細胞が接着している coverslip は各 well に 1.5 ml の astrocyte conditioned medium が入っている 6 well plate に移した後、 4.4×10^9 copies のウイルス液を加え 2 日間感染させた。感染終了後、coverslip は

Neuron maintenance medium (0.6% Glucose, 1x Penicillin/Streptomycin, 0.1 mg/ml Apo-transferrin, 1 mM Sodium Pyruvate, 0.5x B-27, 0.05 mg/ml Insulin, 0.1 mM Putrescine, 0.2 μ M Progesterone, 0.3 μ M SeO₂ in MEM) で astrocyte を培養している 6 well plate に移した。Coverslip 上でのグリア細胞の増殖を抑制するために、培養開始 2 日目 (2 days *in vitro*, 2 DIV) で最終濃度が 5 μ M となるよう Cytosine arabinoflanoside を添加した。Neuron は 14 DIV まで維持培養した。

海馬初代培養神経細胞における miR-Tbce1・miR-Tbce3 による Mouse TBCE 発現抑制効果の検討

3、7、14 DIV の miR-control・miR-Tbce1 及び miR-Tbce3 発現神経細胞を 150 μ l の 1x Sample buffer (1% 2-Mercaptoethanol, 2% SDS, 80 mM Tris (pH 6.8), 10% Glycerol) で溶解し、100°C で 3 分間加熱した。加熱後のサンプルは 10%ポリアクリアミドゲルにて 1 時間電気泳動した後、200 mA で 90 分間 PVDF 膜に転写した。転写後の PVDF 膜については、表 3 に示す抗体を用いて Western blotting を行なった。

蛍光免疫染色法による α チューブリンの局在解析

7、14 DIV の miR-control もしくは miR-Tbce1 発現神経細胞に 4% paraformaldehyde/0.1% glutaraldehyde を 1 ml 加えた後に室温で 15 分間静置し、それぞれの神経細胞を固定した。固定後の神経細胞は、1 ml の Blocking buffer (4% Skim Milk, 0.1% Triton-X in PBS) と室温で 30 分以上反応させてブロッキングした。その後、一次抗体を含む 1% BSA in PBS-t (0.1% Tween in PBS) を 1 ml 加え一晩室温で反応した。次に二次抗体を含む 1% BSA in PBS-t を 1 ml 加え、1 時間以上室温で反応した。二次抗体反応終了後、ProLong™ Diamond Antifade Mountant を用いてそれぞれの神経細胞を封入した。封入後の神経細胞は、TCS SP8 共焦点顕微鏡 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて観察した。免疫染色にて使用した抗体は、表 3 に示した。また、 α チューブリンの局在解析法については、図 20・21 に記載した。

Western blotting による α チューブリンの性状解析及びタンパク質発現量の定量

金井らの方法を改変して、7、14 DIV の miR-control もしくは miR-Tbce1 発現神経細胞から可溶性のフリーチューブリン及び微小管を分離した⁵⁴⁾。それぞれの神経細胞に対し、250 μ l の Microtubule stabilizing buffer (80 mM PIPES-KOH (pH6.6), 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.2% Triton-X, 1x cOmplete EDTA-free protease cocktail, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 0.5 μ M Okadaic acid, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM DIFP, 1 μ g/ml Pepstatin, 1 μ g/ml Antipain, 10 μ g/ml Aprotinin, 10

μg/ml Leupeptin, 50 μg/ml TLCK, 1 mM GTP, 10 μM Taxol) を加え、37°Cで2分間静置した。添加した Microtubule stabilizing buffer 中には可溶性のチューブリンが含まれているので free tubulin fraction として回収した。一方、coverslip 上の神経細胞内には微小管が残存しているので、これらを microtubule fraction として 150 μl の 1x Sample buffer で回収した。また、7、14 DIV の miR-control もしくは miR-Tbce1 発現神経細胞を 150 μl の 1x Sample buffer で溶解し、total lysate を得た。得られたサンプルは 100°Cで3分間加熱した。加熱後のサンプルは 10%ポリアクリアミドゲルにて1時間電気泳動した後、200 mA で90分間 PVDF 膜に転写した。転写後の PVDF 膜については、表 3 に示す抗体を用いて各種αチューブリンを検出した。

3-3 実験結果及び考察

海馬初代培養神経細胞を用いた miRNA による Mouse TBCE 発現抑制効果の検討

予備実験として海馬初代培養神経細胞において miR-Tbce1 及び miR-Tbce3 による Mouse TBCE 発現量への影響を検討した。その結果、miR-Tbce1 発現レンチウイルスを感染させた場合に Mouse TBCE 発現抑制効果が最も高かったため、以後の実験においては miR-Tbce1 を用いた (図 18)。

miR-Tbce1 の Mouse Tbce ノックダウン効果について詳細に検討するため、3、7、14 DIV での Mouse TBCE 発現量を定量した (図 19)。その結果、miR-Tbce1 発現細胞では Mouse TBCE 発現量が control と比較して 3 DIV で $82.7 \pm 4.7\%$ となり、わずかながら減少傾向を示した。一方、7 DIV では $47.2 \pm 8.0\%$ 、14 DIV では $58.5 \pm 6.3\%$ と有意な減少が認められた。以上の結果から、miR-Tbce1 により 14 DIV まで継続的な Mouse TBCE の発現抑制が確認された (図 19B, C)。本章で使用している miRNA の上流には EmGFP カセットを挿入しているため (図 17B)、次に EmGFP の発現量を定量し miRNA の発現推移についても検討した (図 19)。その結果、培養初期から培養後期に向かうに従って、EmGFP 発現量が増加していくことが確認できた (図 19B)。この結果は、Synapsin プロモーターによる miRNA 発現において、培養後期にその発現ピークがおとずれることを示唆している。以上のことから、本節で構築した Mouse Tbce ノックダウンシステムにおけるノックダウン効果は、Synapsin プロモーターによる miRNA 発現量に依存していることが考えられた。当研究室では、線虫でも Tbce ノックダウンによるαチューブリン・微小管の恒常性破綻とタウの異常化の影響について検討を行なっている⁴²⁾。線虫を用いた実験では shRNA を用いて Tbce ノックダウンを行っており、ここでは Tbce mRNA 発現量が 80%程度減少していた。第 1 章で行なった HEK 細胞を用いた実験において shRNA と miRNA の Mouse TBCE 発現抑制効果の違いについても検討したところ、miRNA では最高でも 97%程度のノックダウン効果であったのに対し、shRNA ではほぼ

100%の効果が得られていた (data not shown)。この結果から、shRNA を用いて Tbcce ノックダウンを実施したため、本実験よりも線虫を用いた実験の方で Tbcce ノックダウン効果が高かったと考えられた。

Mouse Tbcce ノックダウンによる α チューブリンの局在への影響の検討

Mouse Tbcce ノックダウンによる α チューブリンの局在への影響について、免疫染色を用いて検討した。はじめに、局在解析を行う上で重要となる軸索の同定法と局在への影響を定量化するシステムの確立を行なった。まず、細胞体や樹状突起に特異的に局在する MAP2 に対する抗体と抗 GFP・抗タウ抗体との多重染色・染色像の比較により、海馬初代培養神経細胞の軸索を特定した (図 20)。次に Image J ソフトを用いて細胞体及び細胞体から 100 μ m 離れた軸索部位を line scan して各部位におけるタンパク質の存在量を蛍光値として表し (図 21A, B)、それらを用いて細胞体/軸索の比率を求めた。その結果、7 DIV での細胞体/軸索比は、MAP2 と比較すると主に軸索に局在するタウ (トータルタウ) で有意に減少した (1.18 ± 0.21 vs 0.29 ± 0.027 , $p=0.0063$) (図 21C)。また 14 DIV でのトータルタウの細胞体/軸索比は、細胞体にタウの残存が若干量認められる 7 DIV と比較するとわずかに減少した (0.29 ± 0.027 vs 0.19 ± 0.035 , $p=0.043$)。これらの結果から、解析対象となるタンパク質の細胞体/軸索比が高い場合、対照よりも細胞体に局在していると考えられた。この定量法を用いてまず α チューブリンの局在について検討した結果、7 DIV の Mouse Tbcce ノックダウン細胞では、control 細胞と比較して細胞体に局在する α チューブリン量はわずかに減少していたのに対し、14 DIV ではそれは有意に増加していた (1.49 ± 0.16 倍, $p=0.0058$) (図 22, 23, 25A)。その一方で、軸索では control 細胞と Mouse Tbcce ノックダウン細胞の α チューブリン量に有意な差は認められなかった (図 22, 23, 25A)。この結果をもとに α チューブリンの細胞体/軸索比を算出した結果、14 DIV の Mouse Tbcce ノックダウン細胞でそれは有意に増加した (2.70 ± 0.66 倍, $p=0.013$) (図 22, 23, 25B)。一方、 α チューブリンの蓄積が見られた神経細胞では、control 細胞と比較して細胞体に局在するアセチル化 α チューブリン量は減少していた (1.52 ± 0.30 vs 0.76 ± 0.18 , $p=0.026$) (図 24, 25 C・D)。しかし、軸索では control 細胞と Mouse Tbcce ノックダウン細胞のアセチル化 α チューブリン量に有意な差は認められなかった (図 25D)。アセチル化 α チューブリンは安定化した微小管を構成するチューブリンの分子修飾である⁵⁵⁾。以上の結果より、Mouse Tbcce ノックダウンにより微小管には組み込まれないような α チューブリンが細胞体に蓄積している可能性が示唆された。

Mouse Tbce ノックダウンにより生じた異常 α チューブリンの性状解析及びタンパク質発現量への影響の検討

Mouse Tbce ノックダウン細胞で細胞体に異常蓄積した α チューブリンの性状について、微小管分画法を用いて解析した⁵⁴⁾。その結果、14 DIV の Mouse Tbce ノックダウン細胞では、free tubulin fraction 中の α チューブリン量が control 細胞よりも 1.4 倍程度増加することが確認された (1.40 ± 0.11 倍, $p = 0.037$) (図 26A, B)。この増加した可溶性の α チューブリンにおいては、アセチル化の修飾量に変動は見られなかった (図 26A, B)。Tbce は α チューブリンの folding に関与していることをふまえると、増加した可溶性の α チューブリンは folding が不完全な状態であると考えられた。その一方で、microtubule fraction では control 細胞と Mouse Tbce ノックダウン細胞間で α チューブリン量・アセチル化 α チューブリン量どちらにおいても control 細胞と Mouse Tbce ノックダウン細胞で変動は見られなかった (図 26A, B)。これらに対し、7 DIV では free tubulin fraction ・ microtubule fraction に含まれる α チューブリン・アセチル化 α チューブリン量は、いずれも control 細胞と Mouse Tbce ノックダウン細胞間で変化は見られなかった (図 26A, B)。さらに、タンパク質発現量についても検討したが、7、14 DIV で α チューブリン・アセチル化 α チューブリン量ともに control 細胞と Mouse Tbce ノックダウン細胞間で優位な差は認められなかった (図 26C, D)。

当研究室で行なった線虫を用いた実験では、30%程度の α チューブリン量の減少したのに対し、本実験ではその量に変動は見られず、14 DIV で可溶性 α チューブリンの増大のみ確認された。本実験では Mouse Tbce のノックダウン効果が中程度であったことから、「可溶性 α チューブリンの増大」という α チューブリン量の減少が起きるまでの中間過程の事象のみが 14 DIV で確認されたと考えられた。また、①Tbce は微小管の *de novo* 合成に関与するシャペロンであることから、Mouse TBCE 量の有意な減少がみられた 7 DIV 以前に合成された微小管には影響を与えない、②マウス脳でのチューブリンの合成は周産期で盛んに作られ、出生後 7 日目から 14 日目でその合成が停止に向かうため⁴³⁾、Mouse TBCE のノックダウン効果が見られた 7、14 DIV で微小管の合成に影響が出たとしても、それは僅かな程度であることが予測された。そのため、7、14 DIV の Mouse Tbce ノックダウン細胞での microtubule fraction 中のアセチル化 α チューブリン量に変動が見られなかったことが考えられた。

これらの結果から、Mouse Tbce ノックダウンにより、微小管を構成できない不活性型の α チューブリンが細胞体に異常蓄積することが示唆された。

Antibody name	Dilution	Manufacturer
Anti-TBCE (Mouse TBCE)	1/5000 (WB)	In house
DM1A (α -tubulin)	1/5000 (WB, IF)	Sigma-Aldrich
6-11B1 (acetylated α -tubulin)	1/10000 (WB, IF)	Sigma-Aldrich
Anti-tubulin (α -tubulin)	1/5000 (IF)	Abcam
RTM38 (total tau)	1/5000 (IF)	In house
Anti-MAP2N (MAP2)	1/20000 (IF)	In house
AC-15 (β -actin)	1/5000 (WB)	Sigma-Aldrich
B-2 (GFP) (EmGFP)	1/5000 (WB)	Santa Cruz
Anti-GFP (EmGFP)	1/10000 (IF)	Abcam
※Western blotting (WB), Immunofluorescence (IF)		

表 3 免疫染色及び Western blotting で使用した抗体

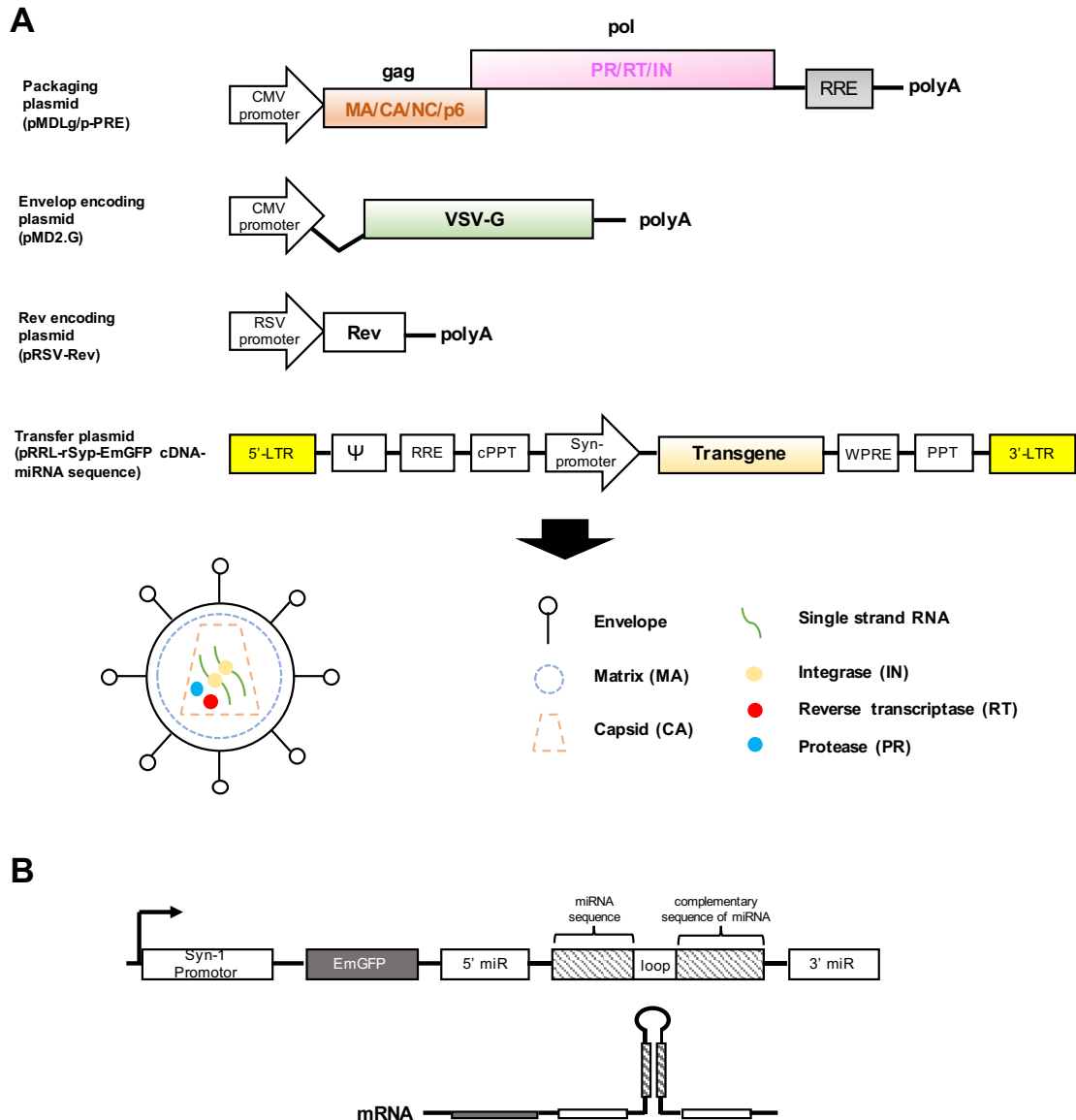


図 17 本章で使用したレンチウイルスベクターシステム

(A) レンチウイルスベクターの調製に使用した 4 つのプラスミドの構造を示す。pMDLg/p-PRE は gag・pol 遺伝子をコードしており、Rev-responsive element (RRE) 配列も挿入されている。gag 遺伝子産物はプロテアーゼによって、Matrix (MA)、Capsid (CA)、Nucleocapsid (NC)、ウイルスの放出に必要な p6 に切断される。pMD2.G はエンベロープタンパク質である Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein (VSV-G) をコードする。pRSV-Rev は RNA に作用してスプライシングされていない gag, gag-pol mRNA を選択的に核外に輸送する役割を持つ Rev をコードしている。Transfer plasmid では両端にプロモーター活性を持つ Long terminal repeat (LTR)、5'-LTR 側にウイルス RNA ゲノムがウイルス粒子中に取り込まれるために必要なパッケージングシグナル (Ψ) が存在している。両端の LTR の間に内部プロモーターと目的とする遺伝子が組み込まれている。さらには、RRE、ウイルスゲノムからの逆転写の際の DNA 合成開始点である polypurine tract (PPT) と central polypurine tract (cPPT)、mRNA の安定性を高める woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE) も組み込まれている。これらのプラスミドをパッケージング細胞に transfection することで、組換えレンチウイルスを産生させる。(B) 本研究で使用した Transfer plasmid において、両端の LTR の間に挿入したプロモーターと目的遺伝子の配列を示す。miRNA 配列と相補的な miRNA 配列をループで結合させた miRNA カセットを 5' 及び 3'-flanking miR region 間に組み込み、それらを Synapsin I promoter-EmGFP cDNA の下流に挿入した。

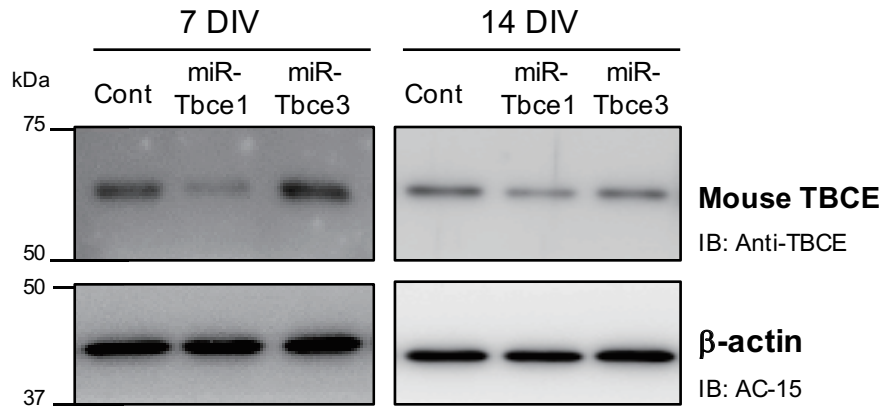
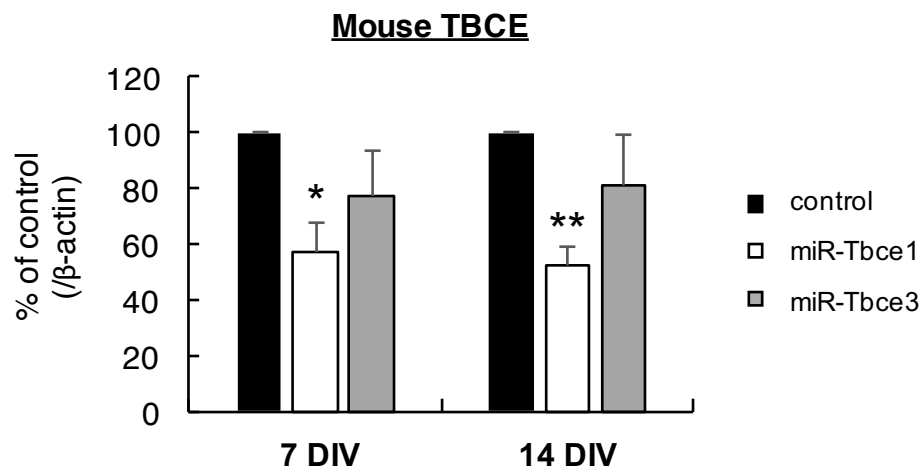
A**B**

図 18 海馬初代培養神経細胞での miR-Tbce1・miR-Tbce3 発現による Mouse TBCE 発現量抑制効果の検討

(A)Control、miR-Tbce1 及び miR-Tbce3 発現レンチウイルスを感染させた 7、14 DIV の海馬初代培養神経細胞の total lysate を用いて Western blotting を行なった。Mouse TBCE は Anti-TBCE (In house)、 β -actin は Anti- β -Actin antibody (AC-15)、EmGFP は GFP (B-2) の抗体を用いて検出した。(B)(A)のデータを用いて、各 DIV における Mouse TBCE 発現量を定量した。定量値は β -actin 量にて標準化した (means \pm SEM, n=6~8)。有意差検定は ANOVA 解析の後に Dunnet's test 法を用いて行なった (* $p < 0.05$, *** $p < 0.005$, vs control)。

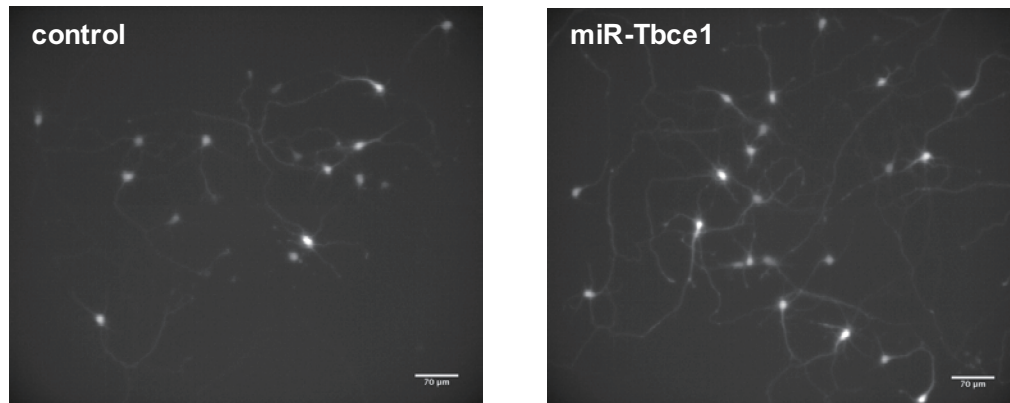
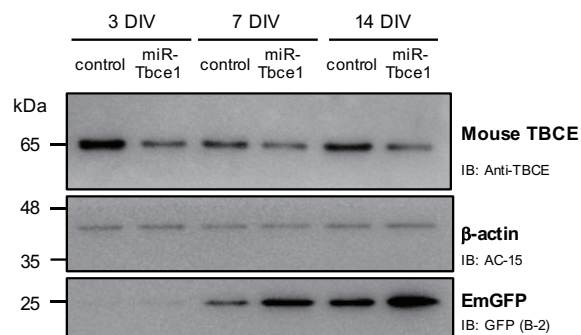
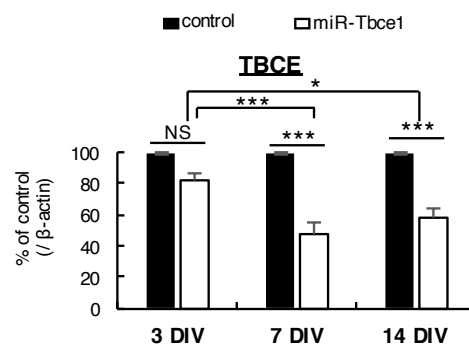
A**B****C**

図 19 海馬初代培養神経細胞における miR-Tbce1 発現による Mouse TBCE 発現量抑制効果の検討
 (A)Control 及び miR-Tbce1 発現レンチウイルスを感染させた海馬初代培養神経細胞を蛍光顕微鏡下で観察した様子を示す。(B)Control 及び miR-Tbce1 発現レンチウイルスを感染させた 3、7、14 DIV の海馬初代培養神経細胞の total lysate を用いて Western blotting を行なった。Mouse TBCE は Anti-TBCE (In house)、 β -actin は Anti- β -Actin antibody (AC-15)、EmGFP は GFP (B-2) の抗体を用いて検出した。(C)(B)のデータを用いて、各 DIV における Mouse TBCE 発現量を定量した。定量値は β -actin 量にて標準化した (means \pm SEM, n=4~8)。有意差検定は ANOVA 解析の後に Tukey test 法を用いて行なった (* $p < 0.05$, *** $p < 0.005$, vs control)。

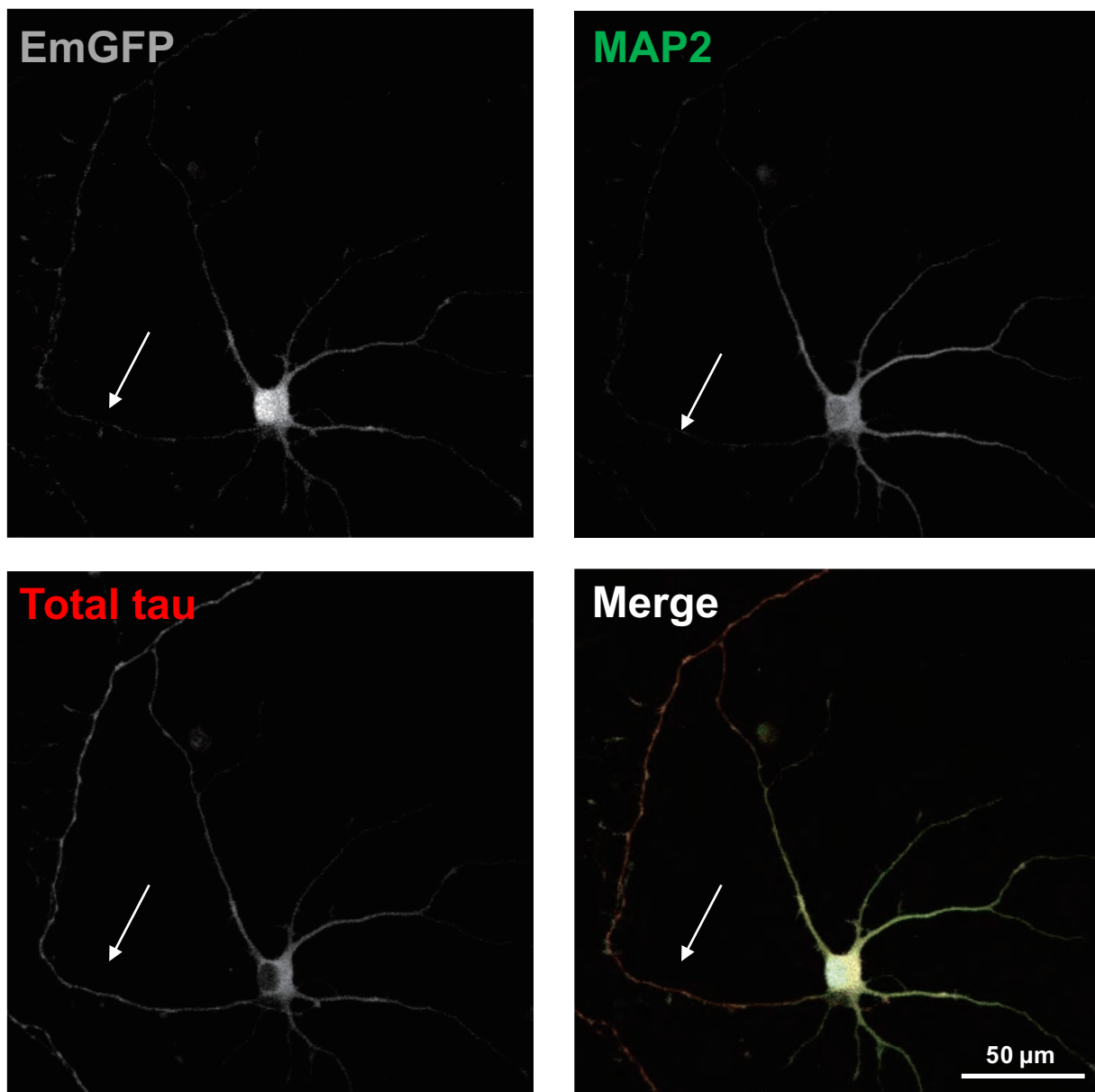


図 20 免疫染色法を用いた海馬初代培養神経細胞における軸索の特定

7 DIV の Control-miRNA 発現神経細胞を Anti-GFP (EmGFP)、Anti-MAP2N (MAP2)、RTM38 (トータルタウ) の抗体で免疫染色した結果を示す。MAP2 は細胞体や樹状突起に特異的に局在するため、軸索での MAP2 シグナルは著しく減少する。したがって、Anti-GFP や RTM38 による染色画像と Anti-MAP2N による染色画像を Merge させ、EmGFP やトータルタウのシグナルは検出されるが MAP2 のシグナルが確認されない神経突起を軸索とした。矢印は軸索を示す。

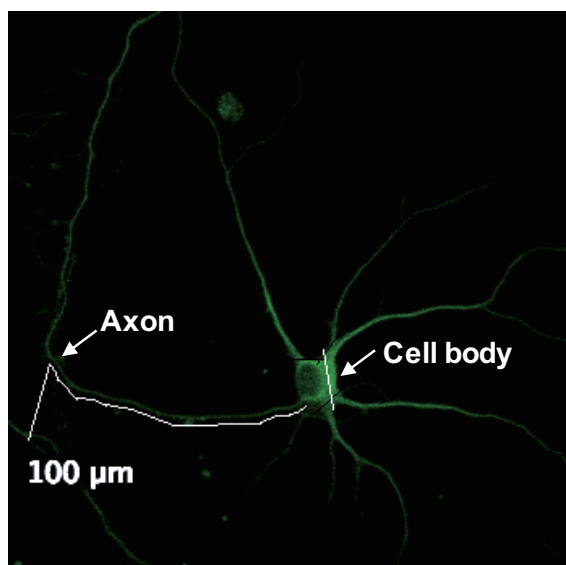
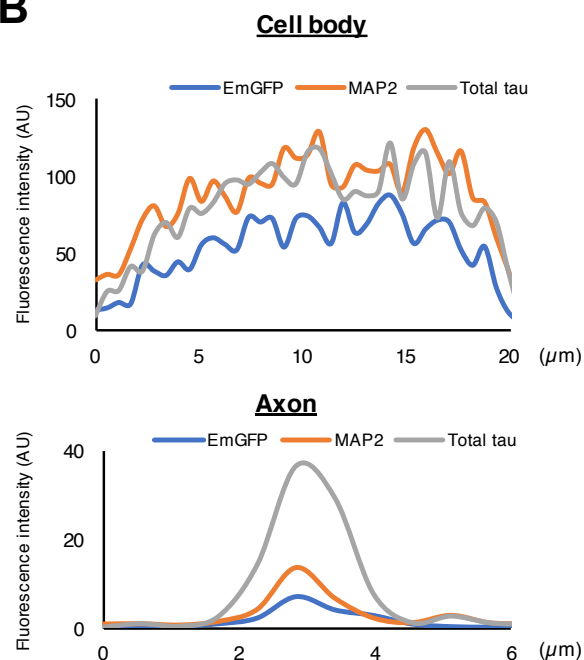
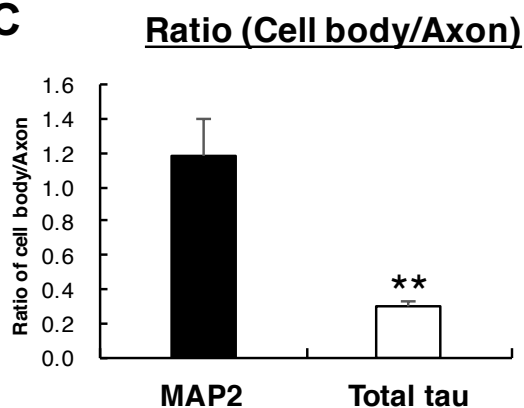
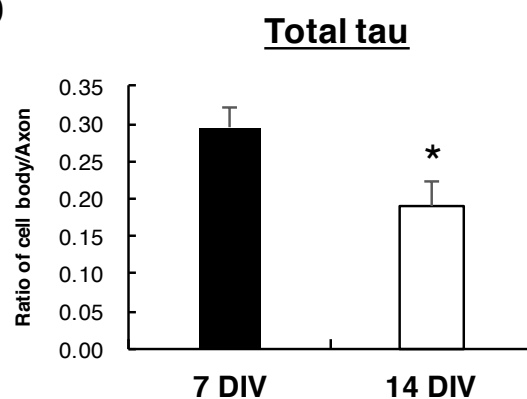
A**B****C****D**

図 21 細胞体もしくは軸索に局在する各タンパク質の存在量の定量方法

(A)細胞体もしくは軸索に局在する各タンパク質の存在量を定量化するために、各部位において矢印で示す部位を Image J soft を用いて line scan し蛍光値を得た。軸索は、細胞体から 100 μm 離れた部位を Image J soft を用いて line scan した。(B)(A)の図を用いて、各部位で line scan した結果を示す。(C)(B)で得られた蛍光値を用いて、7 DIV の MAP2 及びトータルタウにおける細胞体/軸索の比率を定量した結果を示す。細胞体もしくは軸索における各タンパク質の蛍光値は、EmGFP の蛍光値で標準化した (means ± SEM, n=5 neurons)。有意差検定は、paired t-test を用いて行なった ($p^{**}>0.01$, vs MAP2)。(D)トータルタウについて、7、14 DIV での細胞体における蛍光値/軸索における蛍光値の割合を定量した結果を示す。細胞体もしくは軸索における各タンパク質の蛍光値は、EmGFP の蛍光値で標準化した (means ± SEM, n=5 neurons (7 DIV) and 8 neurons (14 DIV))。有意差検定は、unpaired t-test を用いて行なった ($p^{*}>0.05$, vs 7 DIV)。

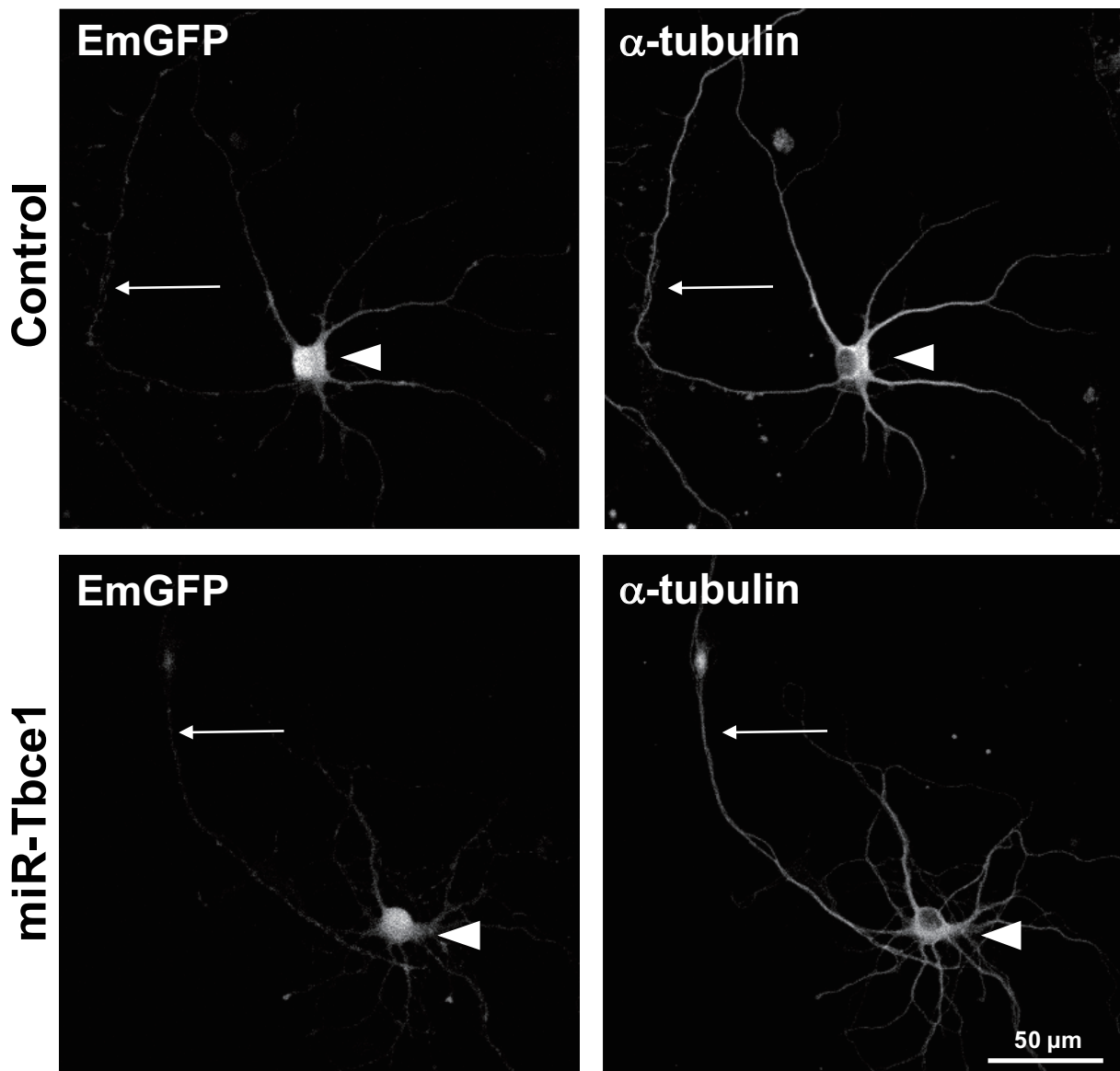


図 22 7 DIV での control 及び miR-Tbce1 発現神経細胞における α チューブリンの局在
Control 及び miR-Tbce1 発現レンチウイルスが感染した海馬初代培養神経細胞を 7 DIV で固定した後、Anti-GFP (EmGFP)、DM1A (α チューブリン) 抗体で染色した結果を示す。矢頭は細胞体、矢印は樹軸索を示す。

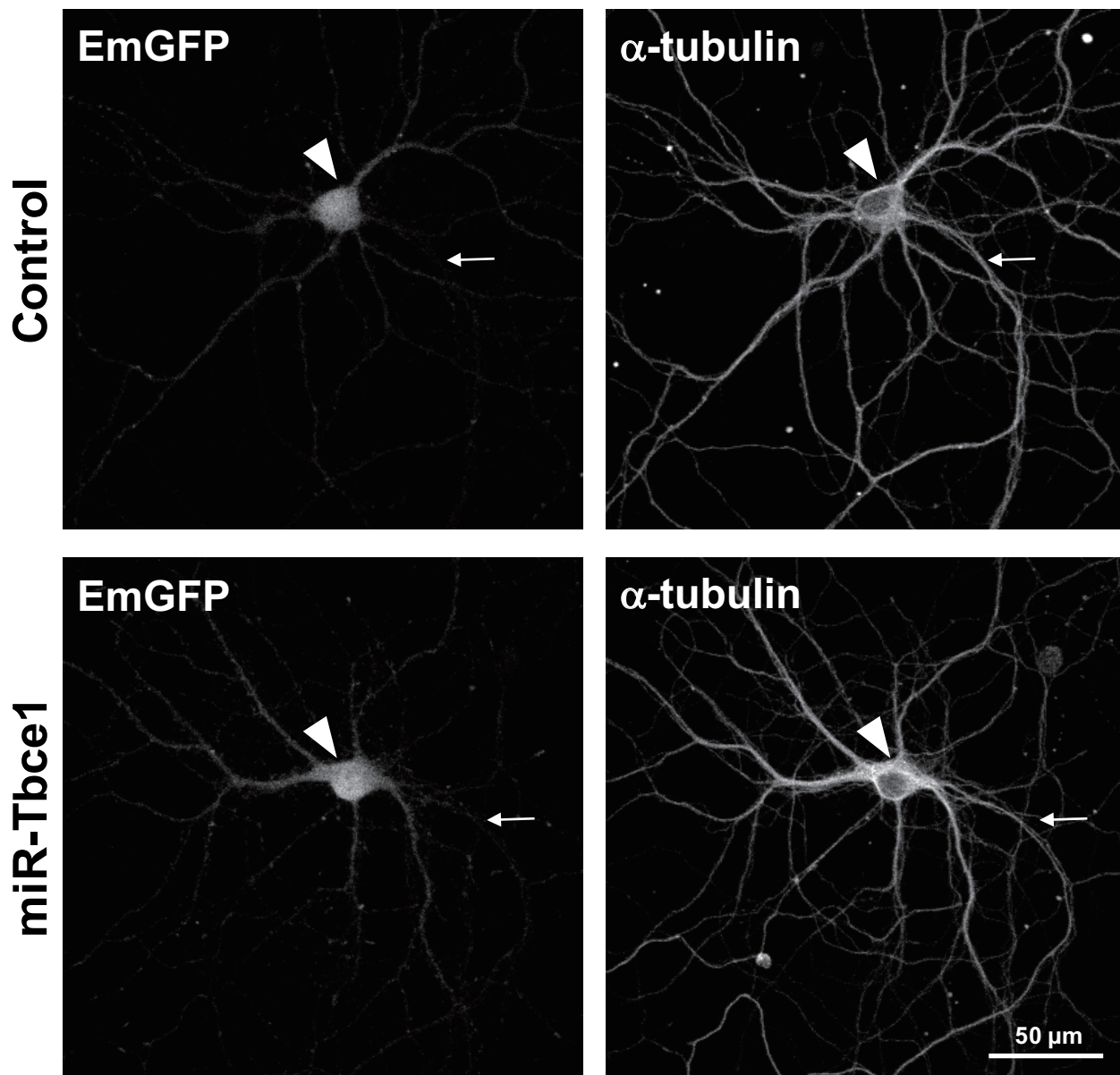


図 23 14 DIV での control 及び miR-Tbce1 発現細胞における α チューブリンの局在
 Control 及び miR-Tbce1 発現レンチウイルスを感染させた海馬初代培養神経細胞を 14 DIV で固定した
 後、Anti-GFP (EmGFP)、DM1A (α チューブリン) 抗体で染色した結果を示す。矢頭は細胞体、
 矢印は軸索を示す。

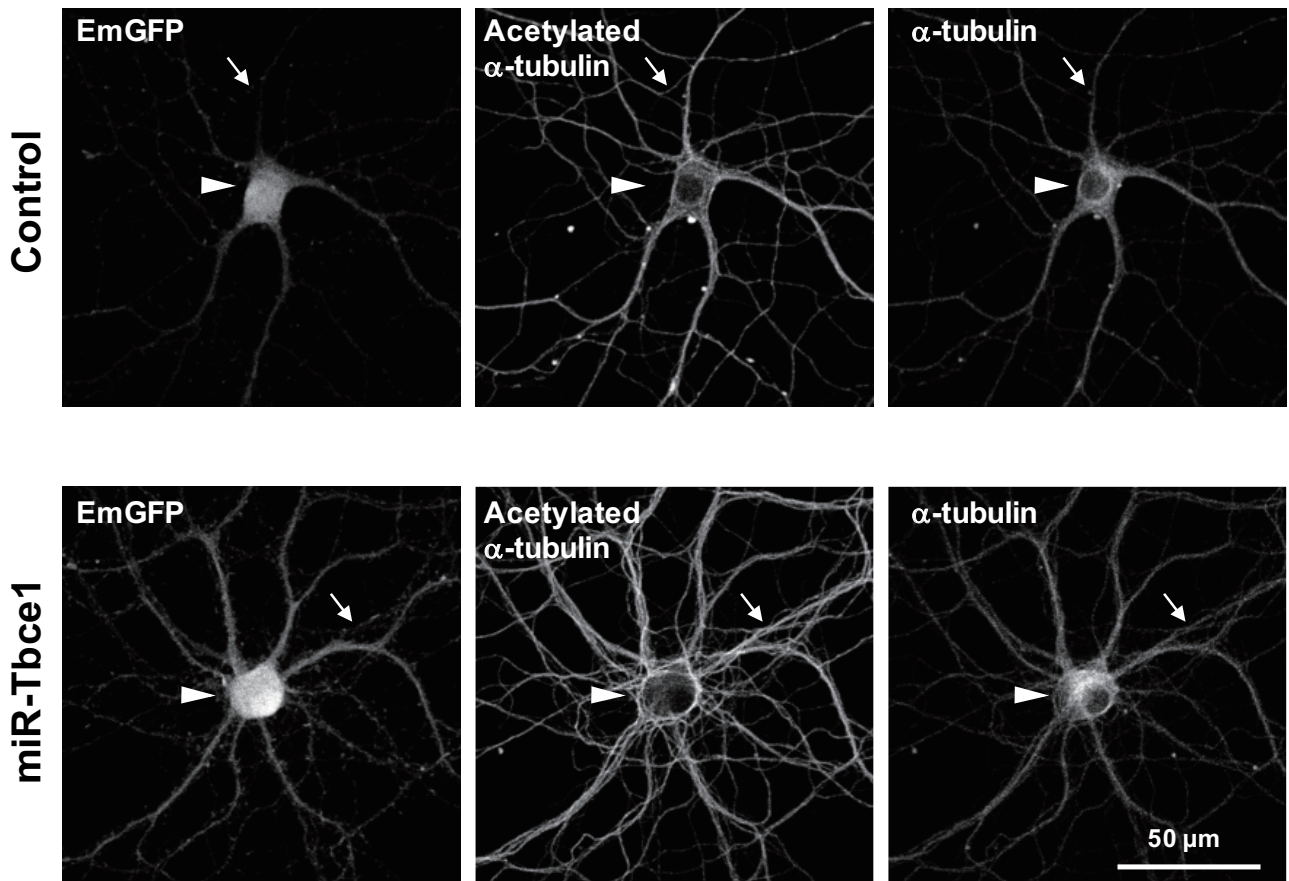


図 24 14 DIV での control 及び miR-Tbce1 発現細胞におけるアセチル化 α チューブリン・ α チューブリンの局在

Control 及び miR-Tbce1 発現レンチウイルスを感染させた海馬初代培養神経細胞を 14 DIV で固定した後、Anti-GFP (EmGFP)、6-11B1 (アセチル化 α チューブリン)、Anti-tubulin (α チューブリン) 抗体で染色した結果を示す。矢頭は細胞体、矢印は軸索を示す。

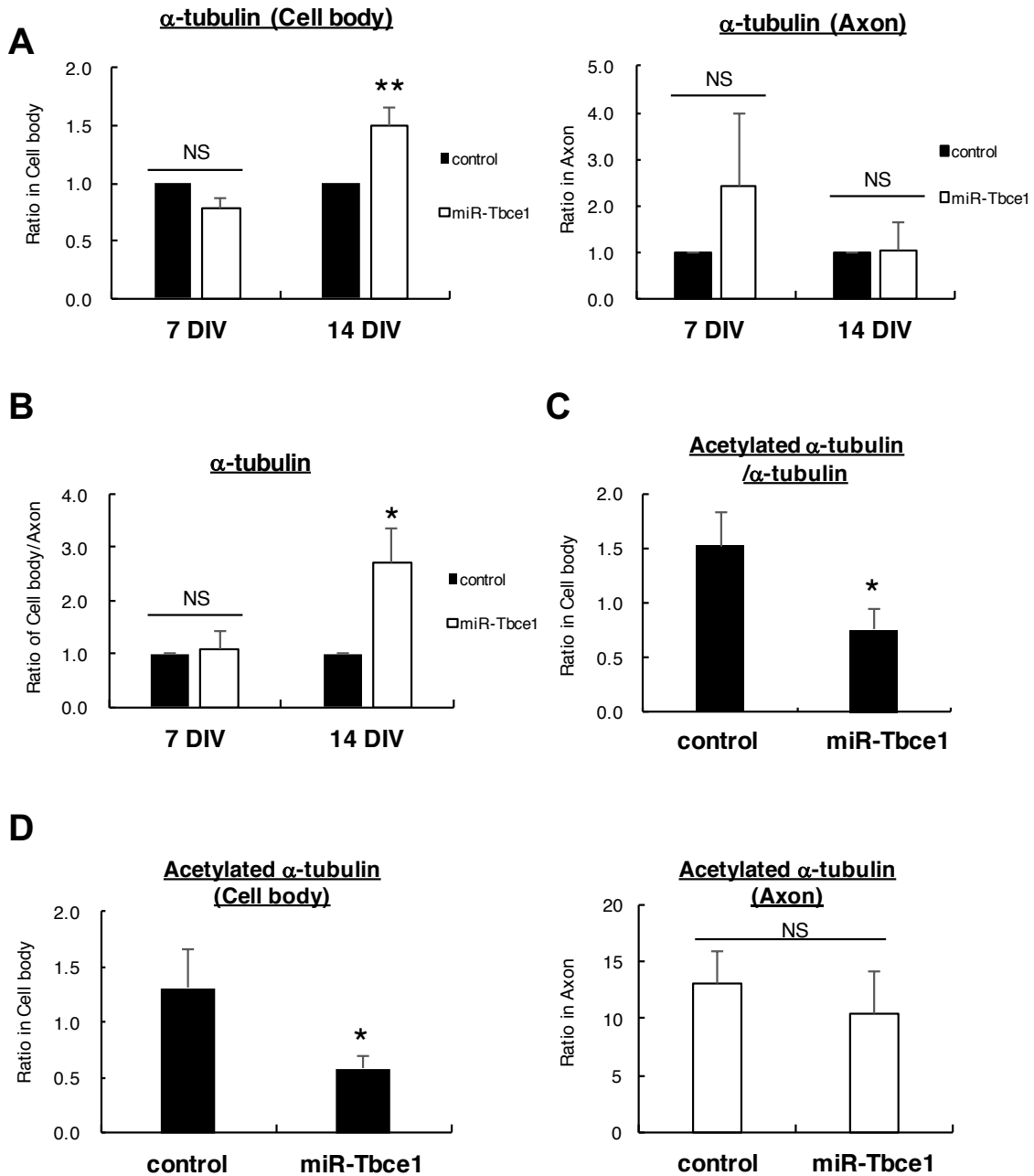


図 25 Control と miR-Tbce1 発現神経細胞における α チューブリン及びアセチル化 α チューブリンの局在解析

(A)図 22 及び図 23 のデータを用いて、7、14 DIV で各細胞の細胞体・軸索に局在する α チューブリンの蛍光値を定量した結果を示す。各部位における蛍光値は、EmGFP の蛍光値を用いて標準化した (means \pm SEM, n=5 (7 DIV) 及び 12 neurons (14 DIV))。有意差検定は paired t-test を用いて行なった ($p^{**} > 0.01$, vs control)。 (B)図 22 及び図 23 のデータを用いて、7、14 DIV での各細胞における α チューブリンの局在解析した結果を示す。各部位における蛍光値は、EmGFP の蛍光値を用いて標準化した (means \pm SEM, n=5 (7 DIV) 及び 12 neurons (14 DIV))。有意差検定は paired t-test を用いて行なった ($p^{*} > 0.05$, vs control)。 (C)図 24 のデータを用いて、14 DIV で各細胞の細胞体に局在するアセチル化 α チューブリン/ α チューブリンの割合を求めた結果を示す。アセチル化 α チューブリン及び α チューブリンの蛍光値は EmGFP の蛍光値を用いて標準化した (means \pm SEM, n=8 neurons)。有意差検定は paired t-test を用いて行なった ($p^{*} > 0.05$, vs control)。 (D)図 24 のデータを用いて、14 DIV で各細胞の細胞体・軸索に局在するアセチル化 α チューブリンの蛍光値を定量した結果を示す。各部位におけるアセチル化 α チューブリンの蛍光値は EmGFP の蛍光値を用いて標準化した (means \pm SEM, n=8 neurons)。有意差検定は paired t-test を用いて行なった ($p^{*} > 0.05$, vs control)。

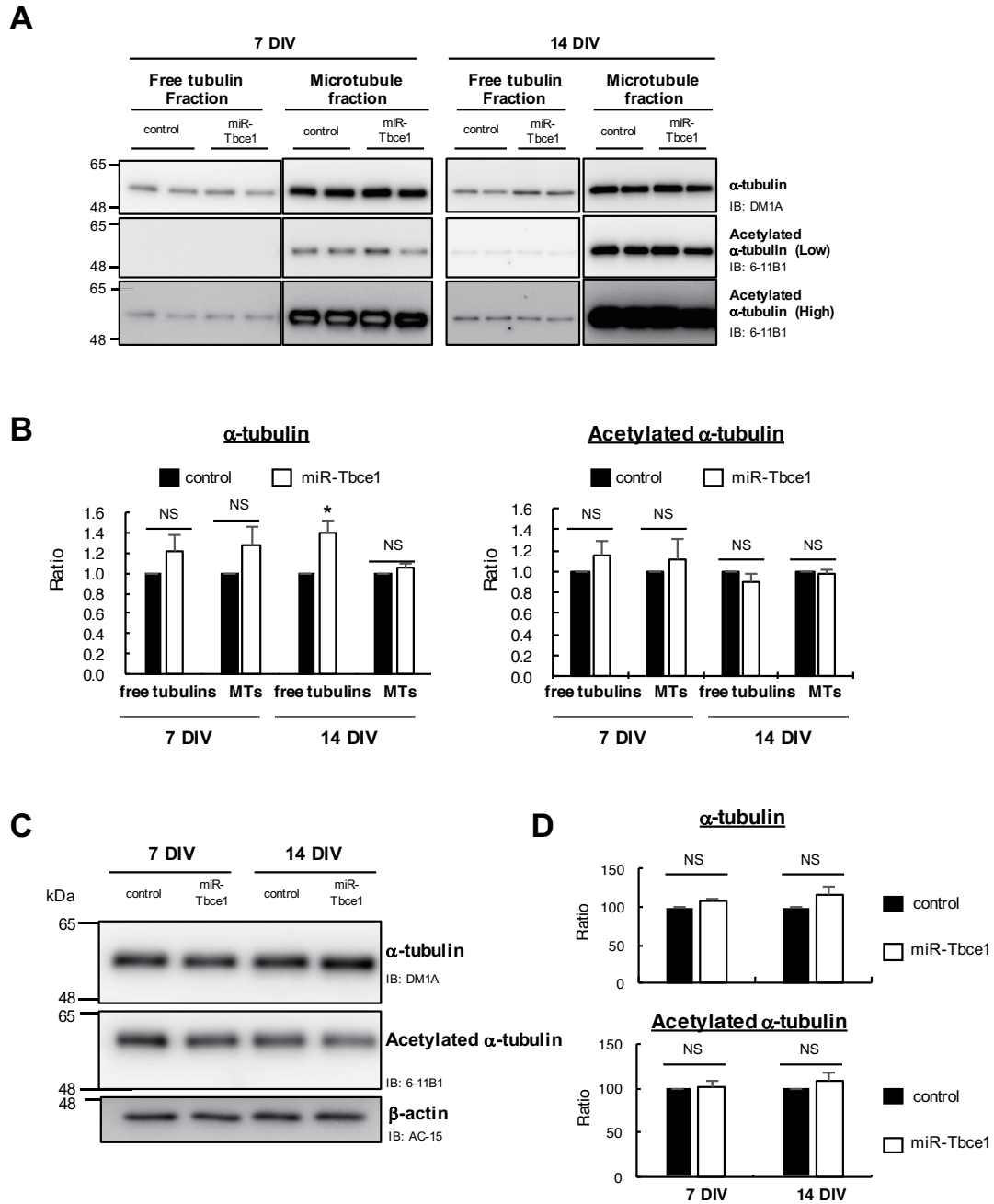


図 26 Control と miR-Tbce1 発現神経細胞におけるαチューブリンの性状解析及びタンパク質発現量定量
 (A) 7・14 DIV の control もしくは miR-Tbce1 発現神経細胞から Microtubule stabilizing buffer を使用して free tubulin と microtubule fraction を回収し、それらを用いて Western blotting を行なった。各画分に含まれるαチューブリン及びアセチル化αチューブリンは、DM1A と 6-11B1 抗体によりそれぞれ検出した。(B)(A)のデータを用い、7・14 DIV において各 fraction に含まれるαチューブリン及びアセチル化αチューブリン量を定量した (means ± SEM, n=5 (7 DIV) and 3 (14 DIV))。有意差検定は paired t-test を用いて行なった ($p^* > 0.05$, vs control)。 (C) 7・14 DIV の control もしくは miR-Tbce1 発現神経細胞から得られた total lysate を用い、Western blotting を行なった。αチューブリン・アセチル化αチューブリン・β-actin は、DM1A・6-11B1・Anti-β-Actin antibody (AC-15) の抗体を用いてそれぞれ検出した。(D)(C)のデータを用い、7・14 DIV において各細胞内で発現している α チューブリン・アセチル化αチューブリン量を定量した。各種チューブリンのタンパク量はβ-actin を用いて標準化した (means ± SEM, n=8)。有意差検定は paired t-test を用いて行なった ($p^* > 0.05$, vs control)。

第4章 チューブリンの恒常性破綻とタウの異常性の関連性についての検討

4-1 概要：

前章で、miR-Tbce1 の発現により、海馬初代培養神経細胞内において継続的な Mouse TBCE のノックダウンおよび α チューブリンの異常蓄積が確認された。仮説に従えば、チューブリンの恒常性破綻により、内在性タウのリン酸化、微小管からの遊離、細胞体への異常局在といった異常性が獲得される可能性がある。本研究では、miR-Tbce1 の発現に伴うタウの異常性について検討した。

4-2 実験方法：

・使用試薬

蛍光免疫染色法によるタウの局在解析

Paraformaldehyde (ナカライ)

Glutaraldehyde (ナカライ)

Skim Milk (ナカライ)

Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate (ナカライ)

Bovine serum albumin (BSA) (ナカライ)

一次抗体 (表 3 に示す)

Goat Anti-Chicken IgY H&L (Alexa Fluor[®] 488) (Abcam)

Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 514 (Life technologies)

Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568 (Life technologies)

Goat anti-Rat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647 (Life technologies)

ProLong[™] Diamond Antifade Mountant (ThermoFisher scientific)

MICRO SLIDE GLASS (松浪硝子工業)

Western blotting によるタウの性状解析及びタンパク質発現量の定量

Piperazine-1,4-bis (2-ethanesulfonic Acid) 1,4-Piperazinediethanesulfonic Acid (ナカライ)

Ethylene glycol-bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (ナカライ)

MgCl₂ (ナカライ)

Polyethylene Glycol Mono-p-isooctylphenyl Ether (ナカライ)
cOmplete™, EDTA-free Protease inhibitor Cocktail (Roche)
Taxol (LC laboratories)
GTP (ナカライ)
Na₃VO₄ (FUJIFILM 和光純薬)
NaF (Sigma-Aldrich)
Okadaic acid (LC laboratories)
β-Glycelophosphate (Merck)
Phenylmethylsulfonyl fluoride (ナカライ)
Diisopropyl fluorophosphate (Sigma-Aldrich)
Pepstatin (PEPTIDE)
Antipain (PEPTIDE)
Aprotinin (ナカライ)
Leupeptin (PEPTIDE)
Tosyl lysine chloromethyl ketone (ナカライ)
Acrylamide (ナカライ)
Glycerol (ナカライ)
2-Mercaptoethanol (ナカライ)
N,N'-Methylenebisacrylamide (ナカライ)
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (ナカライ)
Tris(hydroxymethyl)aminomethane Hydrochloride (ナカライ)
Sodium Lauryl Sulfate (ナカライ)
Ammonium Peroxodisulfate (ナカライ)
N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine (ナカライ)
Fluoro Trans PVDF Transfer Membrane (PALL Lifescience)
Skim Milk (ナカライ)
一次抗体 (表 3 に示す)
Peroxidase-conjugated AffinPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson Immunoresearch Laboratory)
Peroxidase-conjugated AffinPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson Immunoresearch

Laboratory)

Chemi-lumi One L (ナカライ)

qRT-PCR 法による α チューブリンおよびタウの遺伝子発現量の定量

ISOGEN-LS (日本ジーン)

クロロホルム (ナカライ)

メタノール (ナカライ)

After Tri-Reagent RNA Clean-up kit (Favorgen)

DNase I (Sigma-Aldrich)

One Step TB Green™ PrimeScript™ RT-PCR kit (Takara)

蛍光免疫染色法によるタウの局在解析、Western blotting によるタウの性状解析及びタンパク質発現量の定量

第 3 章に示した手順で行なった。また、使用した抗体については表 4 に示した。

qRT-PCR 法によるチューブリンおよびタウの遺伝子発現量の定量

第 2 章に示した手順で、control および miR-Tbce1 発現細胞から total RNA を抽出した。Total RNA は、30 μ l の RNase-free water で溶解した。得られた total RNA から After Tri-Reagent RNA Clean-up kit を用いて精製 RNA を回収した。Total RNA サンプルの volume を RNase-free water により 100 μ l とした後、350 μ l の FRAP buffer を加え激しく混和した。そこに 250 μ l の 100% エタノールを加え混和した後、付属のカラムに全量移し 14,000 rpm、4°C の条件で 1 分間遠心した。カラムに 250 μ l の Wash buffer 1 を加え、再度 14,000 rpm、4°C の条件で 1 分間遠心した。100 μ l の DNase I (0.5 U/ μ l) をカラム内に加え、室温で 1 時間静置した。DNase 反応終了後、カラムにさらに 250 μ l の Wash buffer 1 を加え、14,000 rpm、4°C の条件で 1 分間遠心した。次に 750 μ l の Wash buffer 2 を加え、14,000 rpm、4°C の条件で 1 分間遠心した。これを 2 回繰り返した。カラム内のエタノールを除去するために、14,000 rpm、4°C の条件で 3 分間遠心した。最後に 70°C で保温していた 30 μ l の RNase-free water をカラム内に添加し、14,000 rpm、25°C の条件で 2 分間遠心した。遠心後に得られた溶出液を精製 RNA とした。

精製 RNA と各種プライマーを用いて、One Step TB Green™ PrimeScript™ RT-PCR kit のマニュアルに従って各タンパク質の遺伝子発現量を定量した。精製 RNA から qRT-PCR 反応液 (0.27

ng/μl 精製 RNA, 1x One Step TB Green RT-PCR Buffer⁴, 0.1 U/μl Takara Ex Taq HS Mix, Primescript PLUS RTase Mix, 0.4 μM forward / reverse primer) を調製した後、42°Cで5分間、95°Cで10秒反応を1サイクル、95°Cで5秒、60°Cで34秒反応を40サイクル行い、各種タンパク質の遺伝子発現量を定量した。使用したプライマーの配列は、表5に示した。

4-3 実験結果及び考察：

チューブリンの恒常性破綻によるタウの局在への影響の検討

まずαチューブリンの異常が内在性タウの局在に与える影響について検討した。内在性タウの局在については、リン酸化状態に関係なくタウの検出が可能な RTM38 抗体 (所属研究室にて作製した) を用いて行った。その結果、14 DIV の Mouse Tbc1¹ ノックダウン細胞では、不活性型のαチューブリンと同様にトータルタウが細胞体に異常局在している (1.4 ± 0.16 倍, $p = 0.015$) 一方で、軸索で変化は見られなかった (図 27, 29A)。これらの結果をもとにトータルタウの細胞体/軸索比を算出した結果、それは control 細胞よりも増加していた (3.34 ± 0.81 倍, $p = 0.0078$) (図 27, 29C)。さらにリン酸化タウの解析で広く使用されている抗体である AT8 を用いて同様の解析を行なった。その結果、トータルタウと同様に Ser202/Thr205 リン酸化タウにおいても細胞体での蓄積が確認された (1.63 ± 0.18 倍, $p = 0.0025$) (図 28, 29B)。また、Ser202/Thr205 リン酸化タウの細胞体/軸索比も、control 細胞よりも増加することが確認された (3.28 ± 0.84 倍, $p = 0.0098$) (図 28, 29D)。

チューブリンの恒常性破綻によるタウのタンパク質発現量および遺伝子発現量への影響の検討

局在解析で認められたトータルタウ及びリン酸化タウの局所的な増加について、さらに生化学的解析により検討した。その結果、14 DIV の Mouse Tbc1¹ ノックダウン細胞において、free tubulin fraction および Microtubule fraction に含まれるトータルタウ量が control 細胞と比較して 1.5 倍から 1.6 倍程度増加することが確認された (1.55 ± 0.06 倍 及び 1.66 ± 0.1 倍, $p = 0.0054$ 及び $p = 0.011$) (図 30A, B)。また、Ser202/Thr205 リン酸化タウにおいても、両 fraction で 1.8 倍程度の増加傾向及び 2 倍程度の増加が確認された (1.83 ± 0.31 倍及び 1.97 ± 0.13 倍, $p = 0.057$ 及び $p = 0.009$) (図 30A, B)。一方、14 DIV での Mouse Tbc1¹ ノックダウン細胞でのトータルタウの発現量においては、control 細胞と比較して 140%程度まで増加することが確認された ($42.2 \pm 17.7\%$, $p = 0.017$) (図 30C, D)。また、各種リン酸化タウについても検討した結果、Ser202/Thr205 および Ser396/404 リン酸化タウについてはそれぞれ 120%または 140%程度の増加が認められた ($126.3 \pm 12.3\%$, $141.4 \pm 7.8\%$, いずれも $p = 0.028$) (図 30C, D)。Thr181 リン酸化タウ量については、control

細胞と Mouse Tbc1e ノックダウン細胞間で有意な差はみられなかった (図 30C, D)。一方、7 DIV では Mouse Tbc1e ノックダウン細胞でトータルタウ及び各種リン酸化タウの発現量の変化は認められなかった (図 30C, D)。

今回得られた結果から、トータルタウ及び pSer202/Thr205 タウの異常局在が認められた 14 DIV で、タウのタンパク質量及び可溶性タウの増大が確認された。当研究室ではこれまでに①タウの細胞体での異常局在はタウの異所的な発現に起因すること、②細胞体に異常局在しているタウは微小管に結合していない可溶性のタウであることなどを明らかにしている⁴³⁾。これらの結果をふまえると、本研究で見られた 14 DIV でのタウの細胞体での異常局在は、①タウの異所的な発現により可溶性のタウの増加したことで起きた事象であること、②細胞体に異常局在したタウは当研究室ですでに報告した結果と同様に可溶性のタウの可能性があることなどが考えられた。また、このタウのタンパク質量増大の要因は、遺伝子発現量の増大である可能性があった。そのため、qRT-PCR 法を用いて Mouse Tbc1e ノックダウン条件下での α チューブリンおよびタウの遺伝子発現量の影響についても検討した。その結果、7、14 DIV の Mouse Tbc1e ノックダウン細胞での α チューブリン・タウの遺伝子発現量は、control 細胞と比較しても特に変動が見られなかった。このことから、タウタンパク質の増大については、タウ mRNA の転写ではなく翻訳の亢進やタンパク質分解経路の破綻などが関与している可能性が示唆された。

Antibody name	Dilution	Manufacturer
DM1A (α -tubulin)	1/5000 (WB, IF)	Sigma-Aldrich
Rodent tau N (Total tau)	1/5000 (WB)	In house
RTM38 (Total tau)	1/5000 (IF)	In house
AT270 (pThr181 tau)	1/1000 (WB, IF)	ThermoFisher
AT8 (pSer202/Thr205 tau)	1/1000 (WB), 1/2000 (IF)	ThermoFisher
PHF1 (pSer396/404 tau)	1/2500 (WB)	a kind gift of Dr. P Davies
Anti-MAP2N	1/20000 (IF)	In house
Anti-GFP (EmGFP)	1/10000 (IF)	Abcam
※Western Blot (WB), Immunofluorescence (IF)		

表 4 免疫染色及び Western blotting で使用した抗体

primer name	forward primer	reverse primer
Mouse Tbce#5	5' -GGAAGTAAACAAGTGCAAACTATTGG-3'	5' -ATGGCTCACGGCACAGTTC-3'
α -tubulin#1	5' -GGTTCCCAAAGATGTC AATGCT-3'	5' -CAAAC TGGATGGTACGCTTGGT-3'
tau#1	5' -AGACTCCTCCAGGGTCAGGT-3'	5' -GGACCACTGCCACCTTCTT-3'
ribosomal protein L 13A#1	5' -AGCCTACCAGAAAGTTTGC TTAC-3'	5' -GCTTCTTCTTCGATAGTGCA TC-3'
EmGFP#2	5' -CAGGAGCGCACCATCTTCTT-3'	5' -CGATGCCCTTCAGTCGAT-3'

表 5 qRT-PCR で用いた各 primer 配列

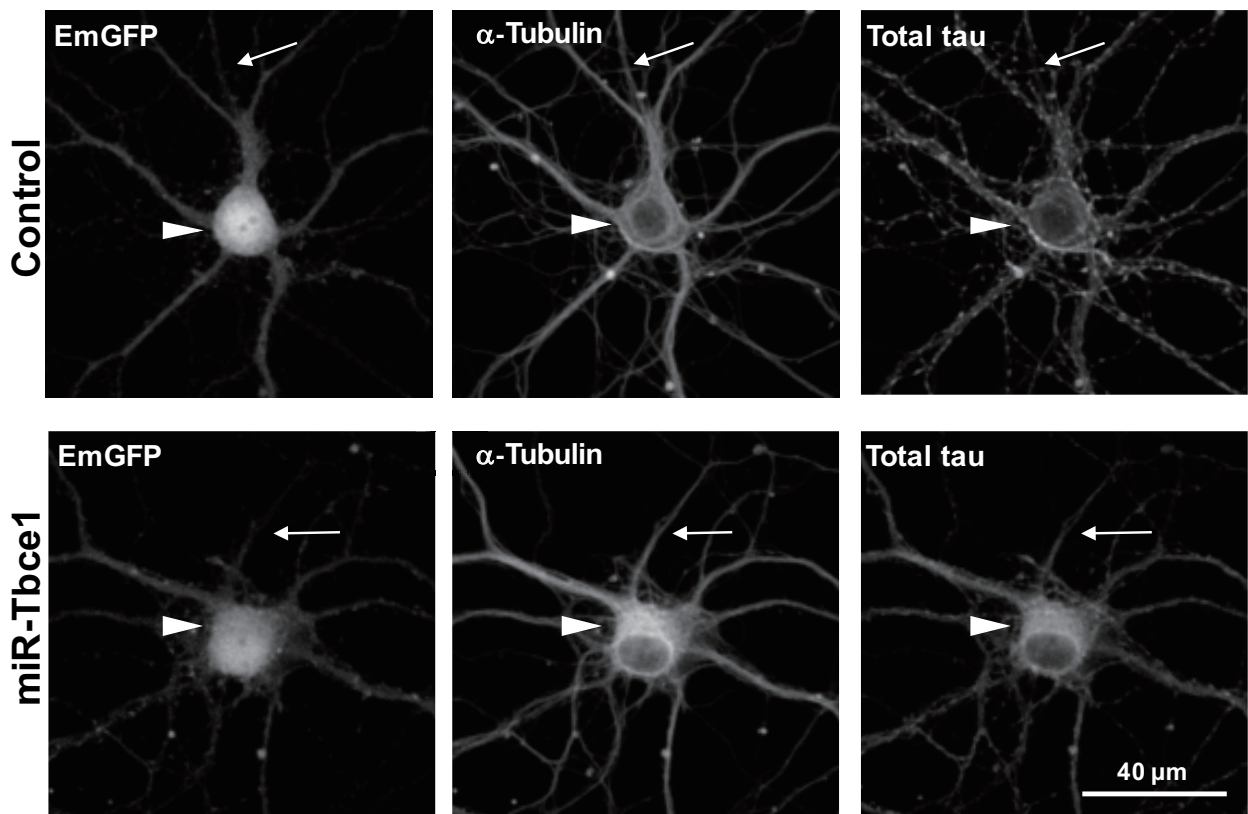


図 27 14 DIVでの control 及び miR-Tbce1 発現細胞における α チューブリン・トータルタウの局在
Control 及び miR-Tbce1 発現レンチウイルスを感染させた海馬初代培養神経細胞を 14 DIV で固定し、
Anti-GFP (EmGFP)、DM1A (α チューブリン)、RTM38 (トータルタウ) 抗体で免疫染色した。矢
頭は細胞体、矢印は軸索を示す。

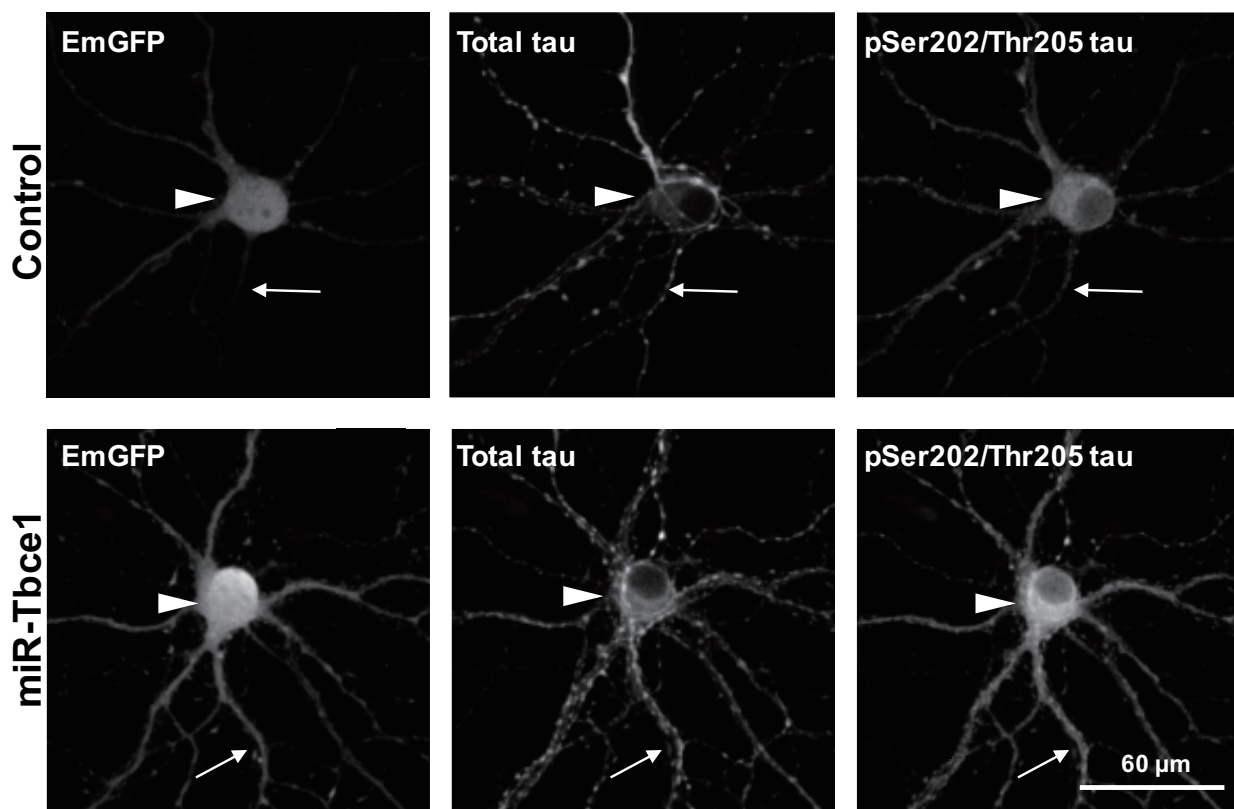


図 28 14 DIV での control 及び miR-Tbce1 発現細胞における Ser202/Thr205 リン酸化タウとトータルタウの局在
 Control 及び miR-Tbce1 発現レンチウイルスを感染させた海馬初代培養神経細胞を 14 DIV で固定し、Anti-GFP
 (EmGFP)、AT8 (Ser202/Thr205 リン酸化タウ)、RTM38 (トータルタウ) 抗体で免疫染色した結果を示す。矢
 頭は細胞体、矢印は軸索を示す。

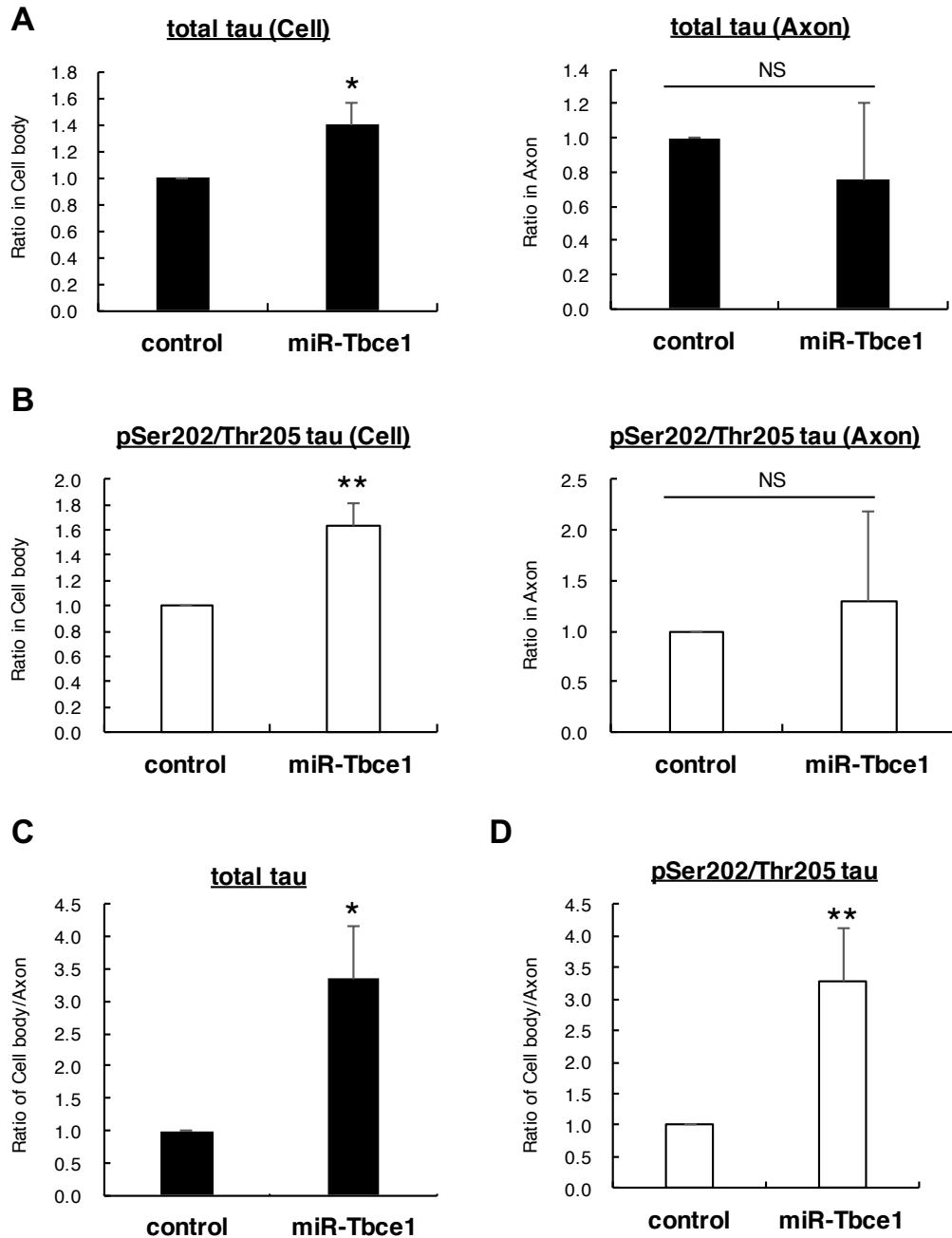


図 29 Control と miR-Tbce1 発現神経細胞におけるトータルタウ及び Ser202/Thr205 リン酸化タウの局在解析

(A)図 27 のデータを用いて、14 DIV で各細胞の細胞体・軸索に局在するトータルタウの蛍光値を定量した結果を示す。各部位における蛍光値は、EmGFP の蛍光値を用いて標準化した (means \pm SEM, n= 12 neurons)。有意差検定は paired t-test を用いて行なった ($p^* > 0.05$, vs control)。 (B)図 28 のデータを用いて、14 DIV で各細胞の細胞体・軸索に局在する Ser202/Thr205 リン酸化タウの蛍光値を定量した結果を示す。各部位における蛍光値は、EmGFP の蛍光値を用いて標準化した (means \pm SEM, n= 12 neurons) 有意差検定は paired t-test を用いて行なった ($p^{**} > 0.01$, vs control)。 (C)図 27 のデータを用いて、14 DIV での各細胞におけるトータルタウの局在解析を行った結果を示す。各部位における蛍光値は、EmGFP の蛍光値を用いて標準化した (means \pm SEM, n=12 neurons)。有意差検定は paired t-test を用いて行なった ($p^* > 0.05$, vs control)。 (D)図 28 のデータを用いて、14 DIV での各細胞における Ser202/Thr205 リン酸化タウの局在解析を行った結果を示す。各部位における蛍光値は、EmGFP の蛍光値を用いて標準化した (means \pm SEM, n=12 neurons)。有意差検定は paired t-test を用いて行なった ($p^{**} > 0.01$ vs control)。

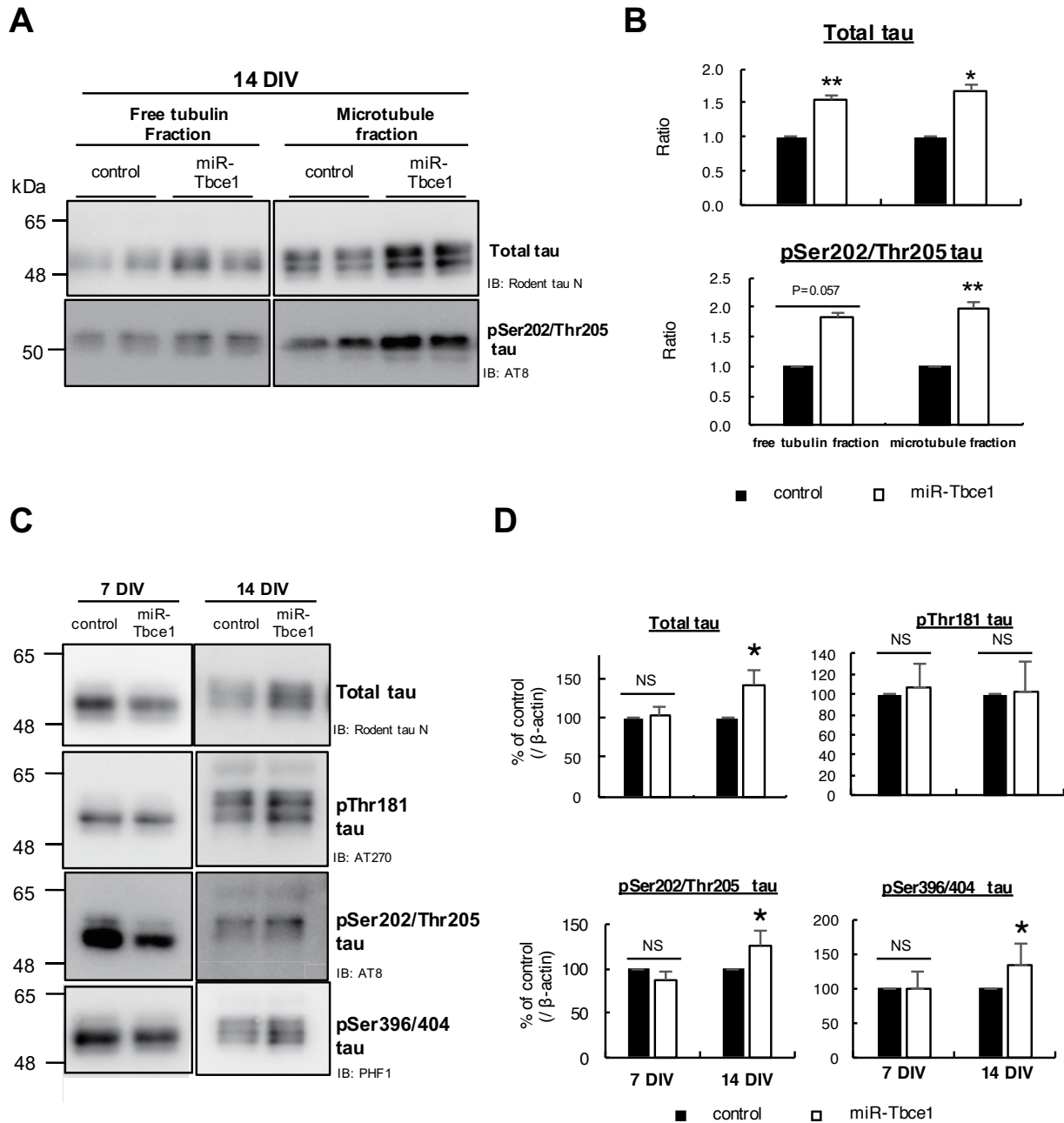


図 30 Control と miR-Tbce1 発現神経細胞におけるトータルタウ及び各種リン酸化タウの発現量の定量 (A)14 DIV の control もしくは miR-Tbce1 発現神経細胞から Microtubule stabilizing buffer を使用して free tubulin と microtubule fraction を回収し、それらを用いて Western Blotting を行なった。各 fraction に含まれるトータルタウ及び Ser202/Thr205 リン酸化タウは、Rodent tau N および AT8 抗体を用いてそれぞれ検出した。(B)(A)のデータを用い、14 DIV において各 fraction に含まれるトータルタウおよび Ser202/Thr205 リン酸化タウ量を定量した (means \pm SEM, n=3)。有意差検定は paired t-test を用いて行なった ($p^* > 0.05$, vs control)。(C)14 DIV で各細胞から得られた total lysate を用いて、Western blotting を行なった。トータルタウは Rodent tau N、Thr181 リン酸化タウは AT270、Ser202/Thr205 リン酸化タウは AT8、Ser396/404 リン酸化タウは PHF1 抗体を用いて検出した。(D)(C)のデータを用いて、トータルタウ及び各種リン酸化タウ量を定量した。各タンパク量は、 β -actin を用いて標準化した (means \pm SEM, n=3~10)。有意差検定は paired t-test を用いて行なった ($p^* > 0.05$, vs control)。

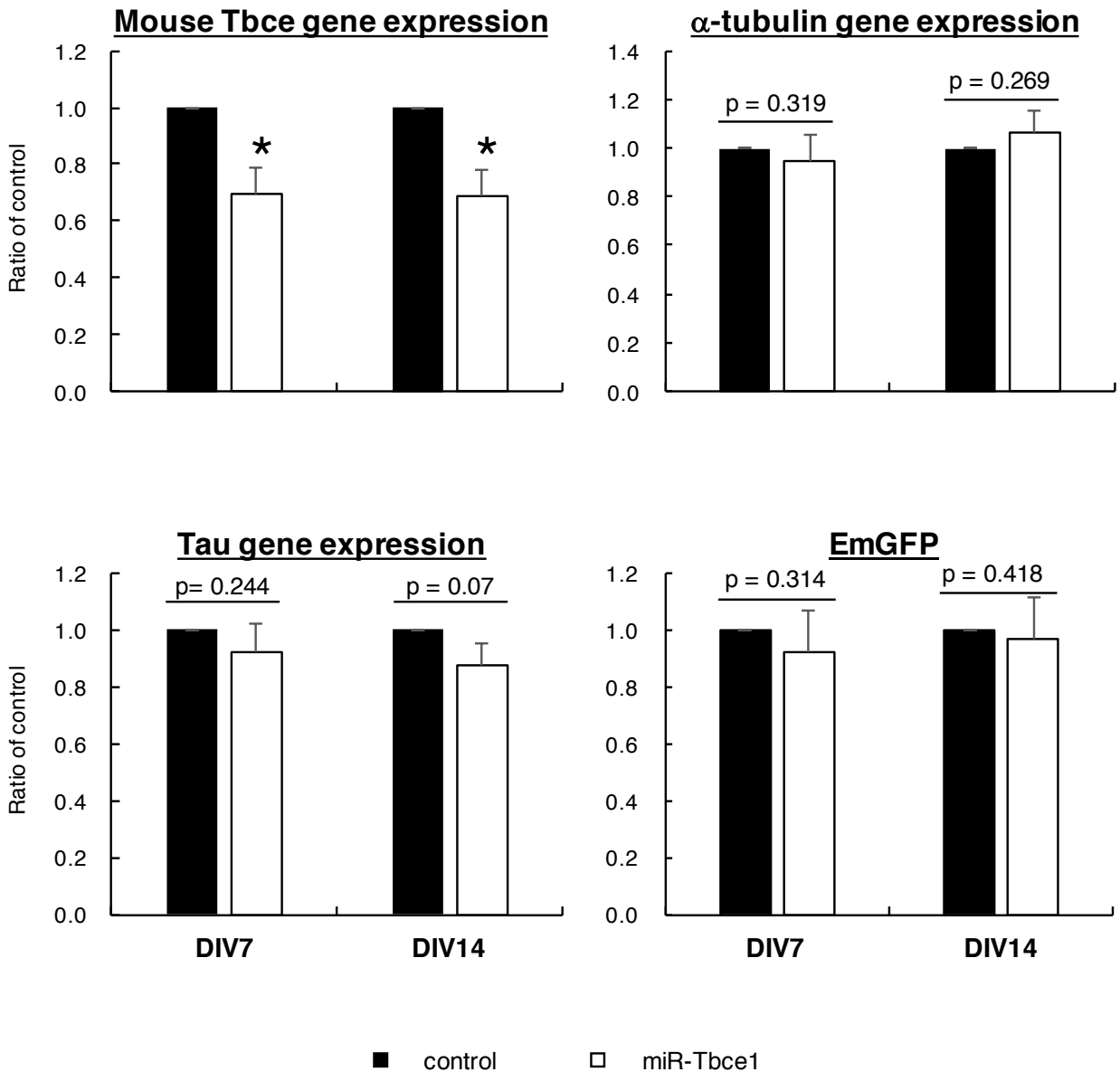


図 31 Control と miR-Tbce1 発現神経細胞における α チューブリン及びタウの遺伝子発現量の定量

(A)7・14 DIV の control もしくは miR-Tbce1 発現神経細胞から抽出・精製した RNA を用いて α チューブリン及びタウの遺伝子発現量を定量した。各遺伝子発現量は ribosomal protein L 13A を用いて標準化した (means \pm SEM, n = 5 (7 DIV) 及び 6 (14 DIV))。有意差検定は paired t-test を用いて行った ($p^* > 0.05$, vs control)。

考察

本研究では、海馬初代培養神経細胞を用いて miRNA を介した Mouse Tbc1e ノックダウンシステムを構築した。Mouse Tbc1e 発現量の減少は培養初期から後期まで継続的に確認された。発生初期から大幅な Mouse Tbc1e の機能損失がおこると神経細胞の生存自体に影響を与える可能性があったが⁵⁶⁾、今回の Mouse Tbc1e ノックダウン条件下では神経細胞の形態異常や生存率の低下はみられなかった。これは、本研究で得られた Mouse Tbc1e ノックダウン効果が Mouse Tbc1e 発現量を 50% 程度減少させる中程度のものであったためだと考えられる。これまでに、遺伝子変異により Tbc1e の機能不全が引き起こされた場合、7 DIV ですでに形態異常が生じ、生存率が低下することが報告されている⁵⁷⁾。したがって、本研究で構築した Mouse Tbc1e ノックダウンシステムは、発生段階の細胞に障害を与えることなく Mouse Tbc1e の機能損失について評価できる、慢性的なチューブリンの恒常性破綻を再現させるには適切な発現抑制効果を有す系であると考えられる。

Mouse Tbc1e をノックダウンした結果、微小管を構成できない不活性型の α チューブリンの増大に伴い、細胞体でリン酸化タウの蓄積が確認された。リン酸化タウの細胞体での異常局在は、タウオパチー変性神経細胞で見られるタウの異常性の一つであるが、これまでは FTDP-mutation が導入されたヒト型タウを過剰発現させたタウオパチーモデルマウスで確認されるのが主であった⁴⁰⁾。このような系においても、外来性のヒト型タウの異常局在に対し、内在性のマウスタウは正常な局在を保つことが知られている。そのため、本研究で得られた結果は、内在性タウが細胞体に異常局在・蓄積した数少ない発見の一つであると考えられる⁵⁸⁾。

α チューブリンの異常に伴い生じた細胞体でのタウの蓄積は、培養後期におけるタウの異常産生が原因の一つとして考えられた。本研究室では、タウの発現が出生後発生段階において厳密に制御されていることをこれまでに明らかにした⁴³⁾。正常なタウは本来周産期に盛んに産生され、脳の発達が進むとともにそれがほぼ停止状態となる。この発現推移に反し成熟後の神経細胞で外因性のタウを過剰発現させると、外因性のタウは軸索だけでなく細胞体や樹状突起に異常局在する。この結果は、成熟神経細胞内でのタウの新規合成は、タウの細胞体での異常局在を誘導する一つの原因であることを示唆している。そのため、タウのタンパク質量増大は mRNA 発現量の増加によるものと考え、Mouse Tbc1e ノックダウン条件下でタウの遺伝子発現量を検討した。しかし、7 DIV 及び 14 DIV どちらにおいても control 細胞と Mouse Tbc1e ノックダウン細胞間でタウの遺伝子発現量に有意な差は得られなかった。チューブリンには、細胞内でのチューブリン発現量を厳密に制御するオートレギュレーション機能が存在する⁵⁹⁾。第 3 章でも示したが、チューブリンは可溶性のチューブリンもしくは微小管のどちらかの状態で存在している。そのうち、可溶性のチューブリン量が増

大すると、それらがチューブリンの mRNA に作用することで翻訳を抑制し、結果としてチューブリンの新規合成が停止するというネガティブフィードバック機構が存在するのである⁶⁰⁾。タウについて同様なタンパク質合成の制御機構に関する報告はないが、タウも可溶性タウの増大により翻訳レベルでの発現制御が働いたため、遺伝子発現量の変動を検出できなかった可能性が考えられる。その一方で、タンパク質量の増大は分解経路の抑制が原因となる場合も考えられる。タウは、プロテアソーム・ユビキチン系やオートファジーによる分解や、プロテアーゼであるカルパインによる切断を受けることが知られている⁶¹⁾。そのため、本研究で確認されたタウタンパク質発現量の増大とタンパク質分解経路との関連性については、今後検討すべき課題であると考えている。

タウの細胞体蓄積のもう一つの原因として、タウの軸索輸送の阻害も考えられる。通常、培養神経細胞では 7 DIV から 14 DIV の間でほぼ軸索のみに局在するようになる。そのため、Mouse Tbce ノックダウン細胞ではこの期間内でタウの軸索への輸送が滞り、結果として 14 DIV で細胞体での局在の程度が増強したことが可能性が考えられた。これまでに御園生・岩田らの成果により、タウが正常に軸索に輸送されるには、微小管からある程度遊離した状態で存在する必要があることを明らかにしている（御園生・岩田ら、未発表）。それに加え、タウが過剰にリン酸化されると細胞体に異常局在するという報告もある³⁶⁾。14 DIV では Mouse Tbce ノックダウン細胞で Ser202/Thr205 及び Ser396/404 リン酸化タウの増加が確認できている。このことから、Mouse Tbce ノックダウン細胞ではこれらのリン酸化タウの軸索輸送が抑制されている可能性も考えられた。

本研究では、チューブリンの恒常性破綻と内在性タウの異常性の関連性に焦点をあて解析をおこなった。タウオパチーでは孤発性の疾患だけでなく、家族性の疾患である FTDP-17 も存在する。そのため、今後チューブリンの恒常性破綻と FTDP-17 変異タウの関連性についても検討する必要がある。FTDP-17 の患者は、生後より変異タウを発現しているはずであるのに対し、中年期に FTD に特徴的な異常行動が現れるまでは極めて正常に発達し、権威的な職業に就いていた例も知られている。したがって、FTDP-17 変異タウの発現自体が直接神経機能の影響するわけではないと考えられる。実験的にも、これまでに数多くの FTDP-17 変異を用いたタウオパチーモデルマウスが作製されたが、タウの異常局在やタウの凝集体形成などタウオパチーで見られるタウの異常性を再現するものはいずれも強力な発現プロモーターの元タウを過剰発現させたモデルである。一方、これまでに作製された FTDP-17 変異タウのノックインマウスでは、タウの凝集体形成どころかタウの異常局在すら確認できない⁴³⁾。この結果から、変異タウの異常性を引き起こすには、何らかのきっかけが必要であると考えられる。そのきっかけの一つが「チューブリンの恒常性破綻」である可能性は高い。よって、FTDP-変異タウノックインマウスと今回構築した Mouse Tbce ノックダウンシステ

ムを用いて、チューブリンの異常と FTDP-変異タウの異常性獲得の関係性についてこれから検討していく予定である。

最後に、本研究では、マウス海馬初代培養神経細胞においてチューブリンの異常と共に内在性タウの局在異常及びタンパク質発現量の増大が確認された。しかし、現段階でタウの凝集能の獲得については検討できてない。タウの凝集体形成には数ヶ月を要すと考えられるため、培養神経細胞はこれらの異常性についての検討材料として用いるには適切でないと考えられる⁶²⁾。したがって、チューブリンの恒常性破綻とタウの凝集形成能の獲得、最終的には神経原線維変化形成への関連性については、今回構築した Mouse *Tbce* ノックダウンシステムを *in vivo* の系に移行した上で検討していく予定である。*In vivo* においては、脳定位注入法を用いてマウスの海馬 CA1 領域錐体細胞層へ miR-*Tbce1* 発現ウイルスを感染させることで Mouse *Tbce* ノックダウンシステムを稼働させる。これまでに、3ヶ月齢のマウスに miR-*Tbce1* 発現ウイルスを注入した結果、注入後6ヶ月まで miR-*Tbce1* 発現細胞を追跡可能であることを確認している。また、一例ではあるが脳定位注入後6ヶ月の段階で、miR-*Tbce1* 発現細胞の細胞体でタウの蓄積が確認できた(図32)。当研究室では、病理学的に凝集したタウを除き、一般的な組織学的手法によるリン酸化タウの検出は極めて困難であることをこれまでに明らかにしている(宮坂・東ら、未発表)。したがって、蓄積したタウのリン酸化状態については評価できないが、まだ封入体形成までは至っていない可能性が高い。これら予備実験の結果についてさらに再現性を確認すると共に、今後は現在開発中のリン酸化タウ染色法を導入して、*in vivo* でのチューブリン恒常性の破綻によるリン酸化タウの蓄積、さらにはそれ以後に生じるタウの異常性についても検討する必要があると考える。

また、近年これまでの過剰発現に頼るタウオパチーモデルには、外来性遺伝子導入部位における遺伝子破壊の影響や異常なタウの発現量などのアーチファクトが知られてきており、創薬の評価系としての応用への懸念が高まっている。これに対し、本研究で開発された Mouse *Tbce* ノックダウンウイルスによる *in vivo* モデルは、内在性タウの異常化が再現されることや、感染制御による発症部位や時期のコントロールが可能なことから、より病態に近い次世代のタウオパチーモデルになる可能性を秘めている。さらなる検証においてタウの異常化が証明されれば、将来タウオパチーに対する新薬開発の際、薬の有効性を確認する重要なツールになる可能性が考えられる。

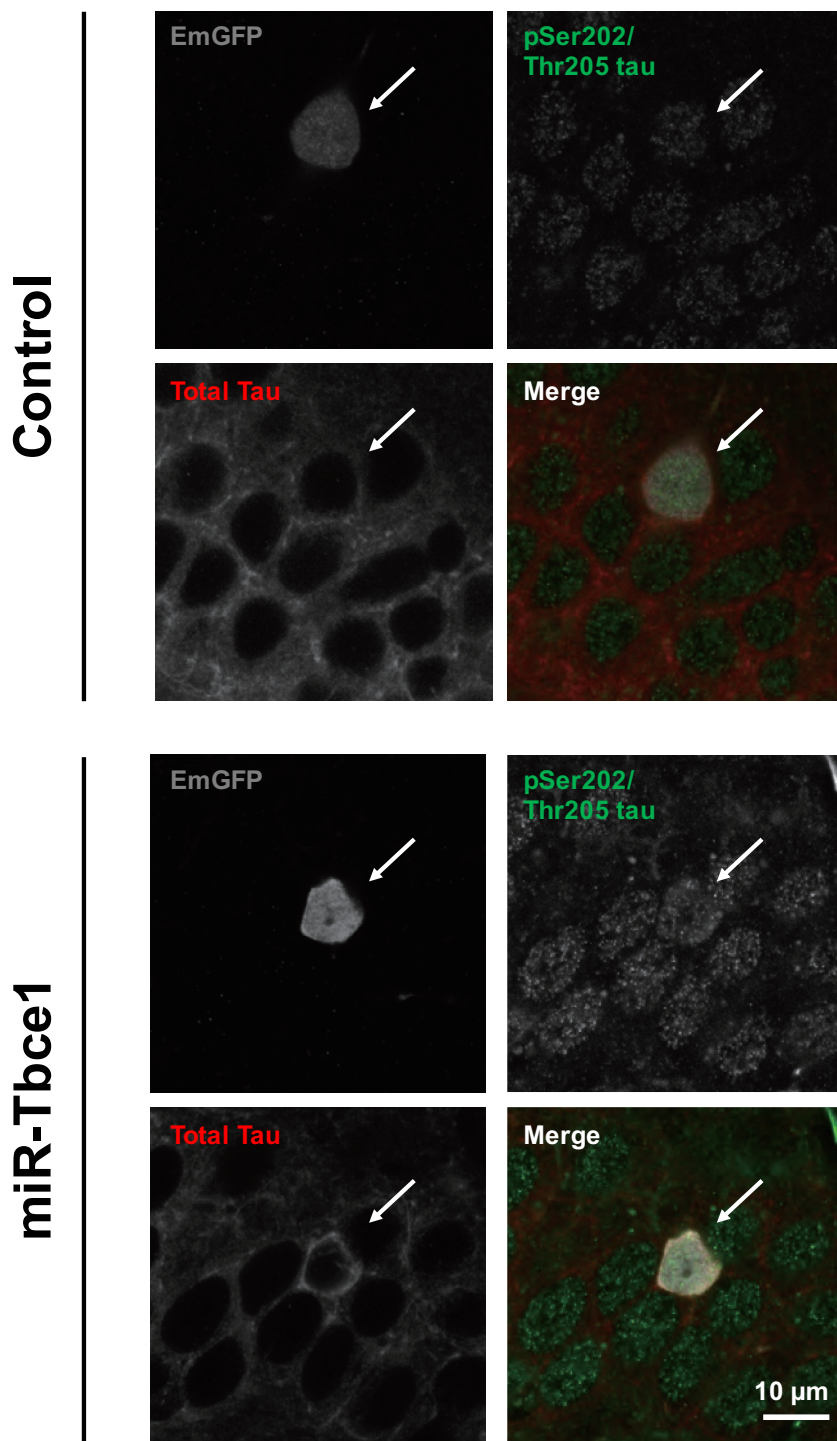


図 32 miR-Tbce1 発現細胞における内在性タウの細胞体での異常局在

Control および miR-Tbce1 発現レンチウイルスを海馬 CA1 領域の錐体細胞層に脳定位注入したマウス脳（脳定位注入から 6 ヶ月後に採取）から得られた切片を用いて、免疫染色した結果を示す。EmGFP は Anti-GFP、Ser202/Thr205 リン酸化タウは AT8、トータルタウは Rodent tau N 抗体を用いて検出した。矢印は control 及び miR-Tbce1 発現細胞を示す。miR-Tbce1 発現細胞では、control 細胞と比較してトータルタウの細胞体への異常局在が確認できた。その一方で、Ser202/Thr205 リン酸化タウの細胞体での異常局在については確認できなかった。

結論

1. Mouse Tbce ノックダウンにより、「微小管を構成できない不活性型の α チューブリンが細胞体に異常蓄積する」というチューブリンの異常を誘導することが可能となった。
2. チューブリンの恒常性の破綻に伴い、リン酸化タウの細胞体への異常局在およびタンパク質量の増大というタウオパチー変性神経細胞で見られるようなタウの異常性を内在性タウで再現した。
3. Mouse Tbce ノックダウン細胞で、タウのタンパク質量の増大は確認できたが遺伝子発現量に変動が見られなかったことから、チューブリンの恒常性の破綻時にタウのタンパク質発現量の増加メカニズムにはタウの翻訳亢進・新たなタンパク質合成制御機構の存在・タンパク質分解経路の破綻などが関与する可能性が示唆された。

参考文献

- 1) 厚生労働省、2015年1月27日発表、認知症施策推進総合戦略（新オレンジプラン）～認知症高齢者等にやさしい地域づくりに向けて～
- 2) 研究代表者 朝田隆、2013年3月発表、平成23年度～平成24年度 厚生労働科学研究費補助金 認知症対策総合研究事業「都市部における認知症有病率と認知症の生活機能障害への対応」
- 3) C. L. Masters, G. Smmis, N. A. Weinman, G. Multhaup, B. L. MacDonald, K. Beyreuther. (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4245-4249.
- 4) N. Nukina, Y. Ihara. (1986) One of the antigenic determinants of Paired Helical Filaments is related to tau protein. *J. Biochem.* **99**, 1541-1544.
- 5) Y. Ihara, N. Nukina, R. Miura, M. Ogawara. (1986) Phosphorylated tau protein is integrated into Paired Helical Filaments in Alzheimer's disease. *J. Biochem.* **99**, 1807-1810.
- 6) J. G. Wood, S. S. Mirra, N. J. Pollock, L. I. Binder. (1986) Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (τ). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4040-4043.
- 7) I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Y-C. Tung, M. Quinlan, H. M. Wisniewski, L. I. Binder. (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein τ (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4913-4917.
- 8) D. J. Selkoe. (2005) Defining molecular targets to prevent Alzheimer disease. *Arch Neurol.* **62**, 192-195.
- 9) J. Hardy. (2017) The discovery of Alzheimer-causing mutations in the APP gene and the formulation of the “amyloid cascade hypothesis”. *FEBS J.* **284**, 1040-1044.
- 10) J. A. Hardy, G. A. Higgins. (1992) Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**, 184-185.
- 11) T. E. Golde. (2003) Alzheimer disease therapy: Can the amyloid cascade be halted? *J Clin*

Invest. **111**, 11-18.

12) エーザイ株式会社、2019年10月22日発表、ニュースリリース アデュカヌマブ 臨床第Ⅲ相試験で得られた大規模データセットの新たな解析結果に基づき、アルツハイマー病を対象とした新薬承認申請を予定

13) F. Mangialasche, A. Solomon, B. Winblad, P. Mecocci, M. Kivipelto. (2010) Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol.* **9**, 702-716.

14) T. Gomes-Isla, R. Holluster, H. West, Stina Mui, J. H. Growdon, R. C. Petersen, J. E. Parisi, B. T Hyman. (1997) Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **41**, 17-24.

15) C. Homles, D. Boche, D. Wilkinson, G. Yadegarfar, V. Hopkins, A. Bayer, R. W. Jones, R. Bullock, S. Love, J. W. Neal, E. Zotova, J. A. R. Nicoll. (2008) Long-term effects of A β ₄₂ immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomized, placebo-controlled phase 1 trial. *Lancet.* **372**, 216-223.

16) H. Braak, E. Braak. (1991) Neuropathological stage of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* **82**, 239-259.

17) B. Ghetti, A. L. Oblak, B. F. Boeve, K. A. Jhonson, B.C. Dickerson, M. Goedert. (2015) Invited review: Frontotemporal dementia caused by microtubule-associated protein tau gene (MAPT) mutations: a chameleon for neuropathology and neuroimaging. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **41**, 24-46.

18) C. M. Wischik, P. Bentham, D. J. Wischik, K. M. Seng. (2008) Tau aggregation inhibitor (TAI) therapy with Rember™ arrests disease progression in mild and moderate Alzheimer's disease over 50 weeks. *Alzheimer's and Dement.* **4**, T167.

19) S. Gauthier, H. H. Feldman, L. S. Schneider, G. K. Wilcock, G. B. Frisoni, J. H. Hardlund, H. J. Moebius, P. Bentham, L. A Kook, D. J. Wischik, B. O. Schelter, C. S. Davis, R. T. Staff, L. Bracoud, K. Shamsi, J. M. D. Storey, C. R. Harrington, C. M. Wischik. (2016) Efficacy and safety of tau-aggregation inhibitor therapy in patients with mild or moderate Alzheimer's disease: a

randomized, controlled, double-blind, parallel-arm, phase 3 trial. *Lancet*. **388**, 2873-2884.

20) M. D. Weingarten, A. H. Lockwood, S-Y. Hwo, M. W. Kirchner. (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 1858-1862.

21) A. Andreadis. (2012) Tau splicing and the intricacies of dementia. *J. Cell. Physiol.* **227**, 1220-1225.

22) A. Kubo, H. Misonou, M. Murayama, A. Nomori, S. Wada-Kakuda, A. Takashima, M. Kawata, S. Murayama, Y. Ihara, T. Miyasaka. (2019) Distribution of endogenous normal tau in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* **527**, 985-998.

23) M.G. Spillantini, M. Goedert. (2013) Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol.* **12**, 609-622.

24) H. M. Wisniewsk, G. Y. Wen. (1985) Substructures of Paired Helical Filaments from Alzheimer's Disease neurofibrillary tangle. *Acta Neuropathol. (Berl)* **66**, 173-176.

25) 宮坂知宏、高島明彦 (2002) タウタンパク質の分子修飾、医学書院第 54 巻 9 号

26) W. Noble, D. P. Hanger, C.C. J. Miller, S. Lovetone. (2013) The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. *Front. Neurol.* **4**, 83.

27) M. Morishima-Kawashima, M. Hasegawa, K. Takio, M. Suzuki, H. Yoshida, A. Watanabe, K. Titani, Y. Ihara. (1993) Hyperphosphorylation of tau in PHF. *Neurobiol. Aging.* **16**, 371-380.

28) C.-X. Gong and K. Iqbal. (2008) Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for alzheimer disease. *Curr. Med. Chem.* **15**, 2321-2328.

29) H. Yoshida, Y. Ihara. (1993) τ in Paired Helical Filaments is functionally distinct from fetal τ : Assembly incompetence of Paired Helical Filament- τ . *J. Neurochem.* **61**, 1183-1186.

30) J-H. Cho, G. V. W. Johnson. (2003) Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) phosphorylates tau at both primed and unprimed sites: differential impact on microtubule binding. *J. Biol. Chem.* **278**, 187-193.

- 31) A. D. C. Alonso, A. Zaidi, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal. (1994) Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5562-5566.
- 32) A. D. C. Alonso, T. Zaidi, M. Novak, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal. (2001) Hyperphosphorylation induces self-assembly of τ into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 6923-6928.
- 33) M. O. Chohan, N. Haque, A. Alonso, E. El-Akkad, I. Grundke-Iqbal, A. Grover, K. Iqbal. (2005) Hyperphosphorylation-induced self assembly of murine tau: a comparison with human tau. *J. Neural. Transm.* **112**, 1035-1047.
- 34) E. Planel, P. K. E. G. Richer, C. E. Nolan, J. E. Finley, L. Liu, Y. Wen P. Krishnamurthy, M. Herman, L. Wang, J. B. Schachter, R. B. Nelson, L-F. Lau, K. E. Duff. (2007) Anesthesia leads to tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. *J. Neurosci.* **27**, 3090-3097.
- 35) E. Planel, P. Keishnamurthy, T. Miyasaka, L. Liu, M. Herman, A. Kumar, A. Bretteville, H. Y. Figueroa, W. H. Yu, R. A. Whittington, P. Davies, A. Takashima, R. A. Nixon, K. E. Duff. (2008) Anesthesia-induced hyperphosphorylation detaches 3-repeat tau from microtubules without affecting their stability *in vivo*. *J. Neurosci.* **28**, 12798-12807.
- 36) J. Gilley, K. Ando, A. Seereeram, T. Rodriguez-Martin, A. M. Pooler, L. Sturdee, B. H. Anderton, J-P. Brion, D. P. Hanger, M. P. Coleman. (2016) Mislocalization of neuronal tau in the absence of tangle pathology in phosphomutant tau knockin mice. *Neurobiol. Aging.* **39**, 1-18.
- 37) K. H. Strang, Z. A. Sorrentino, C. J. Riffe, K-M. M. Gorion, N. Vijayaraghavan, T. E. Golde, B. I. Giasson. (2018) Phosphorylation of serine 305 in tau inhibits aggregation. *Neurosci. Lett.* **692**, 187-192.
- 38) R. D. Terry, N. K. Gonatas, M. Weiss. (1964) Ultrastructural studies in Alzheimer's presenile dementia. *Am. J. Pathol.* **44**, 269-297.
- 39) A. D. Cash, G. Aliev, S. L. Siedlak, A. Nonomura, H. Fujioka, X. Zhu, A. K. Raina, H. V. Vinters, M. Tabaton, A. B. Johnson, M. Paula-Barbosa, J. Avila, P. K. Jones, R. J. Castellani, M.

- A. Smith, G. Perry. (2003) Microtubule reduction in Alzheimer's disease and aging is independent of τ filament formation. *Am. J. Pathol.* **162**, 1623-1627.
- 40) M. V. Bergen, P. Friedhoff, J. Biernat, J. Heberle, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow. (2000) Assembly of τ protein into Alzheimer paried helical filaments depends on a local sequence motif (³⁰⁶VQIVYK³¹¹) forming Phosphorylation of serine 305 in tau inhibits aggregation. β structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5129-5134.
- 41) T. Miyasaka, S. Sato, Y. Tatebayashi, A. Takashima. (2010) Microtubule destruction induces tau liberation and its subsequent phosphorylation. *FEBS Lett.* **584**, 3227-3232.
- 42) T. Miyasaka, Y. Shinzaki, S. Yoshimura, S. Yoshina, E. Kage-Nakadai, S. Mitani, Y. Ihara. (2018) Imbalanced expression of tau and tubulin induces neuronal dysfunction in *C. elegans* models of tauopathy. *Front. Neurosci.* **12**, 415.
- 43) A. Kubo, S. Ueda, A. Yamane, S. Wada-Kakuda, M. Narita, M. Matuyama, A. Nomori, A. Takashima, T. Kato, O. Onodera, M. Goto, M. Ito, T. Tomiyama, H. Mori, S. Murayama, Y. Ihara, H. Misonou, T. Miyasaka. (2019) Ectopic expression induces abnormal somatodendritic distribution of tau in the mouse brain. *J. Neurosci.* **39**, 6781-6797.
- 44) A. Villasante, D. Wang, P. Dobner, P. Dolph, S. A. Lewis, N. J. Cowan. (1986) Six mouse α -tubulin mRNAs encode five distinct isotypes: Testis-specific expression of two sister genes. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 2409-2419.
- 45) S. A. Lewis, M. G-S. Lee, N. J. Cowan. (1985) Five mouse tubulin isotypes and their regulated expression during development. *J. Cell. Biol.* **101**, 852-861.
- 46) E. Szolajska, J. Chroboczek. (2011) Faithful chaperones. *Cell. Mol. Life. Sci.* **68**, 3307-3322.
- 47) N. Martin, J. Jaubert, P. Gounon, E. Salido, G. Haase, M. Szatanik, J-L. Guenet. (2002) A missense mutation in *Tbce* causes progressive motor neuronopathy in mice, *Nat. Genet.* **32**, 443-447.
- 48) A. Sferra, G. Baillat, T. Rizza, S. Barresi, E. Flex, G. Tasca, A. D. Amico, E. Bellacchio, A. Ciolfi, V. Caputo, S. Cecchetti, A. Torella, G. Zanni, D. Diodato, E. Piermarini, M. Niceta, A.

- Coppola. E. Tedeschi, D. Martinelli, C. Dionisi-Vici, V. Nigro, B. Dallapiccola., C. Compagnucci, M. Tartaglia, G. Haase, E. Bertini. (2016) TBCE mutations cause early-onset progressive encephalopathy with distal spinal muscular atrophy. *Am. J. Hum. Genet.* **99**, 974-983.
- 49) H. Li, B. B. Yang. (2013) Friend or foe: the role of micro RNA in chemotherapy resistance. *Acta. Pharmacol. Sin.* **34**, 870-879.
- 50) J. F. Kane. (1995) Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 494-500.
- 51) T. Sakuma, M. A. Barry, Y. Ikeda. (2012) Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem. J.* **443**, 603-618.
- 52) M. Iwata, S. Watanabe, A. Yamane, T. Miyasaka, H. Misonou. (2019) Regulatory mechanisms for the axonal localization of tau protein in neurons. *Mol. Biol. Cell.* **30**, 2441-2457.
- 53) H. Misonou, J.S. Trimmer. (2005) A primary culture system for biochemical analyses of neuronal proteins, *J. Neurosci. Methods* **144**, 165-173.
- 54) Y. Kanai, N. Hirokawa. (1995) Sorting mechanisms of tau and map2 in neurons: suppressed axonal transit of map2 and locally regulated microtubule binding, *Neuron* **14**, 421-432.
- 55) M. M. Magiera, C. Janke. (2014) Post-translational modifications of tubulin. *Curr. Biol.* **24**, R351-354.
- 56) G. Banker. (2018) The development of neuronal polarity: a retrospective view, *J. Neurosci.* **38**, 1867-1873.
- 57) H. Bommel, G. Xie, W. Rossoll, S. Wiese, S. Jabloka, T. Boehm, M. Sendtner. (2002) Missense mutation in the tubulin-specific chaperon E (Tbce) gene in the mouse mutant progressive motor neuropathy, a model of human motoneuron disease. *J. Cell. Biol.* **159**, 563-569.
- 58) H. Zempel, E. Thies, E. Mandelkow, E-M. Mandelkow. (2010) A β oligomers cause localized Ca²⁺ elevation, missorting of endogenous tau into dendrites, tau phosphorylation, and destruction of microtubule. *J. Neurosci.* **30**, 11938-11950.

- 59) D.W. Cleveland, N.G. Theodorakis. (1994) Regulation of tubulin synthesis. *Microtubules*, 47-58.
- 60) M L. Gonzalez-Garay, F. Cabral. (1996) α -tubulin limits own synthesis: evidence for a mechanism involving translational repression. *J. Cell. Biol.* **135**,1525-1534.
- 61) A. S. Chesser, S. M. Pritchard, G. V. M. Johnson. (2013) Tau clearance mechanism and their possible role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front. Neurol.* **4**, doi:10.3389/fneur.2013.00122.
- 62) T. Miyasaka, A. Watanabe, Y. Saito, S. Murayama, D.; M. A. Mann, M. Yamazaki, E.E. Ravid, M. Morishima-Kawashima, K. Nagashima, Y. Ihara. (2005) Visualization of newly deposited tau in neurofibrillary tangles and neuropil threads. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **64**, 665-674. doi:10.1097/01.jnen.0000173890.79058.1d.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切なご指導、ご鞭撻を賜りました同志社大学生命医科学部医生命システム学科神経病理学研究室 宮坂知宏准教授に深く感謝申し上げます。また、卒業研究から博士課程初期に至るまでの研究においてご指導いただきました同研究室 舟本聡准教授ならびに井原康夫教授にも深く感謝申し上げます。

Construct 作製や qRT-PCR による遺伝子発現解析に関してご助言いただきました、同研究室 延原美香技術員、和田聡子技術員に深く感謝申し上げます。

また、本研究の根幹であった初代培養・レンチウイルスによる miRNA の発現システム構築において多大なる御助力をいただきました同志社大学大学院脳科学研究科発達加齢脳専攻チャネル病態生理部門 御園生裕明教授、渡辺祥司助教（現関西医科大学助教）、岩田実里研究科生に深く感謝申し上げます。

さらには、考察にて述べた脳定位注入法を用いた *in vivo* 解析を行うにあたり、脳定位注入法の技術供与をいただきました名古屋大学医科学研究科 石垣診祐助教ならびに藤岡祐介研究員に深く感謝申し上げます。

また、研究のことなどで悩んでいる際に幾度となく相談に乗ってくださった 西村典子秘書、石原聖子技術員をはじめとした同研究室のメンバーに深く感謝いたします。最後に、これまで精神的・経済的援助を惜しまずおこなってくれた家族の皆に深く感謝いたします。