

微小管結合タンパク質を中心としたゲノム解析と機能解析

研究代表者 宮坂 知宏¹⁾

研究分担者 宮下 哲典²⁾, 御園生 裕明³⁾, 原 範和²⁾, 池内 健²⁾

- 1) 同志社大学生命科学部 2) 新潟大学脳研究所遺伝子機能解析学分野
3) 同志社大学脳科学研究科

研究要旨

微小管結合タンパク質 (MAPs) にはタウタンパク質をはじめ多数が知られており、それぞれ微小管の安定性や機能調節に寄与していると考えられている。このうち、タウは病理学的、遺伝学的にも認知症と強い関連が認められるものの、他の MAPs については疾患との関わりを示唆する報告は無い。本研究では、MAPs に特化したゲノムバリエーション情報と認知症との関係を再検証し、新たに見出されたバリエーションについて MAPs の機能解析を行い、その生理機能への影響についての解明を目指した。

2020 年度の成果として新潟大学脳研究所が保有する J-ADNI のエクソームデータから選出した2つの MAPs レアバリエーションを有するリコンビナント MAP2 の高度精製を行い、機能および凝集への影響について解析した。また、MAP2 機能欠損モデルとして MAP2-KO マウスの機能及び形態解析を行った。MAP2WT、tau-KO、MAP2-KO、double-KO マウス (n=4) の脳幹より精製した total RNA をもとに RNA-seq 解析を行った。得られたデータベースについての主成分分析、および組織病理学的検討から double-KO マウスの表現型についての解析を進めた。

A. 研究目的

微小管結合タンパク質 (MAPs) にはタウタンパク質、Microtubule associated protein2 (MAP2)、MAP1B、MAP1A、MAP6 など多数知られており、それぞれ微小管の安定性や機能調節に寄与していると考えられている。このうち、タウタンパク質はアルツハイマー病をはじめとする認知症の主要病理を形成するとともに、家族性認知症 (FTDP-17) の原因遺伝子としても知られている。これに対し、タウ以外の MAPs については脳神経疾患との明確な関わりを示唆する報告は無い。最近の同志社大学神経病理学研究室における遺伝子改変動物を用いた研究の成果として、これら MAPs 欠損でそれぞれ特徴的な表現型が確認されている。とくに MAP2 欠損 (MAP2-KO) マウスの解析から、生体の機械的刺激受容にかかわる機能に障害が起こることを見出している。これらの

結果は、これまで微小管への相補的な安定化として信じられてきた一部 MAPs の分子機能に対し、固有の生理機能が期待される事、個々の MAPs の変異や SNP の加算が特定の疾患に対する責任遺伝子となり得る可能性を意味している。

本研究では MAPs に特化したゲノムバリエーションの解析と臨床症状との関係を再検証し、ヒト脳における MAPs の個々、あるいは複合的な神経機能への影響について検証するものである。はじめに2020 年度に同定した複数の MAP2 レアバリエーションについて、MAP2 のタンパク質機能に対する影響について検証した。さらに解析中の tau/MAP2 欠損 (double-KO) マウスの表現型を説明すべくメカニズムの解明を目指した RNA-seq による発現解析を行った。同時に行った組織学的解析とともにタウ欠損、および MAP2 欠損が神経機能に与える影響について検証した。

本研究の成果は、神経機能を支える微小管およびその機能を調節するタンパク質群についての臨床的意義を明確にするとともに、翻って認知症にかかわるタウタンパク質の特異的な機能を明らかとするものである。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

新潟大学脳研究所遺伝子機能解析学分野において、これまでに解析した J-ADNI ゲノムサンプルより得られたバリエーション情報をもとに、同志社大学にて変異型リコンビナント MAP2 を精製した。2020 年度に達成した精製度では精密な機能解析に至らないと判断したため、さらに精製度の向上を目指し、逆相 HPLC での精製を行った。これにより 95% 以上高純度のリコンビナント MAP2 の精製に成功した。

各種リコンビナント MAP2 について *in vitro* tubulin polymerization assay (Cytoskeleton Inc) を行った。既報に従い、精製チューブリンと MAP2 を混和し、37° C で加温、経時的な微小管の形成についてプローブの蛍光で解析した。さらに重合反応後の微小管について遠心分離し、SDS-PAGE により定量した。

精製リコンビナント MAP2 タンパク質について、ヘパリンによる *in vitro* 凝集解析を行った。規定濃度の各種 MAP2 に対し、Thioflavin-T およびヘパリンを添加し、37° C での経時的なタンパク質凝集について評価した。168 時間のインキュベーション後、1% Sarkosyl 含有バッファーで処理した後、遠心分離することにより凝集した MAP2 について分画した。得られた不溶性画分について SDS-PAGE を行い、凝集 MAP2 について定量した。

MAP2-KO マウスで認められる聴覚障害の病理解析を目的に蝸牛のホールマウント染色を試みた。マウスを灌流固定し、蝸牛を含む側頭骨を採取した。後固定後、脱灰した後に実体顕微鏡下で蝸牛から内有毛細胞、外有毛細胞を含む部位について頂部、中部、基底部分けて採取した。得られた標本について、ホールマウント免疫染色を試みた。また、出産直後の WT, tau-KO, MAP2-KO, double-KO マウスより脳幹ピブラトーム切片を作成し、抗 c-fos 抗体、抗 oxytocin 抗体を用いた免疫染色を行った。染色結果については共焦点顕微鏡で解

析し、ImageJ をもちいて定量化した。

本研究は同志社大学動物実験委員会 (A21039 号) および同志社大学組換え DNA 実験安全管理委員会 (D21028 号) の承認を得て行った。

C. 研究結果

J-ADNI で集積された健常 147 例、MCI 221 例、AD 140 例を対象に行った Whole exome sequence データをもとに、2つの注目すべき MAP2 遺伝子のバリエーション (X, Y) を同定した。それぞれの変異アミノ酸部位およびこれまでに同志社大学でおこなってきた MAP2 の生理機能に対するドメイン解析の結果から、これらの変異は MAP2 の神経細胞内局在、あるいは微小管への機能に影響を与える可能性が示唆された。

得られたバリエーション X, Y の MAP2 機能への影響について検証する目的で、リコンビナント MAP2 を精製し、チューブリン重合促進活性について検証した。その結果、バリエーション X については野性型に比べて有意に微小管重合活性は低下していた。これより、X を含む領域が微小管重合促進に必須であること、このレアバリエーションは MAP2 タンパク質に対して重大な機能障害を引き起こすことが明らかとなった。

これまでの解析から Tau-KO では明確な発達障害、形態学的異常はおこらないものの、様々な表現型が報告されている。一方、同志社大学による先行研究において、MAP2-KO マウスにおける特徴的な聴覚障害が認められている。ABR 解析の結果からこの機能障害の責任病巣がコルチ器における感覚受容の低下の可能性が疑われている。MAP2 欠損によるコルチ器発生障害の有無について解析する目的で、蝸牛のホールマウント染色法についての確立を試みた。現在、マウス蝸牛のホールマウント標本の作製、および免疫組織染色のための条件検討を終えており、今後蝸牛各部位における有毛細胞の形成、有毛細胞における MAP2 の局在解析、感覚毛の形態解析を進める予定である。

Tau-KO と MAP2-KO の交配により産生された double-KO マウスは、目立った脳の形態形成異常は認められなかったものの、雌マウスにおいて出産後の育児行動に障害が認められた。はじめに double-KO マウスの発現異常について解析する

目的で WT, tau-KO, MAP2-KO, double-KO より調製した RNA をもちいた RNA-seq 解析を行った。その結果、double-KO マウスでは tau-KO, MAP2-KO で認められた発現異常が加算的に起きていることが明らかとなった。さらに、double-KO マウスの行動障害についてオキシトシンの分泌能の異常が想定されたため、周産期におけるオキシトシンの投与を行った。その結果、オキシトシンの経鼻与党により double-KO マウスの育児行動に有意な改善が認められた。さらに上記4系統のマウスを対象にオキシトシン分泌神経細胞の機能について免疫組織学的解析を行った。その結果、MAP2-KO マウスでは c-fos で検出されるオキシトシン神経細胞の発火が低下すること、tau-KO マウスではオキシトシン分泌能の低下に起因すると思われる細胞体におけるオキシトシンの滞留が認められた。さらに double-KO では双方の異常が認められ、tau および MAP2 それぞれの欠損による表現型の加算が double-KO マウスにおけるオキシトシン分泌障害に繋がっている可能性を見出した。

D. 考察

2021 年度成果として、実際に臨床 WES データの解析から見出したレアバリエントについてタンパク質の機能解析を行い、機能低下に繋がる候補を同定した。この成果はまさに発案当初目指していた「エクソームデータからタンパク質の機能異常同定に至るモデルケース」を体現したものであり、本研究戦略の今後の発展性を示すとともに、本研究戦略についての概念実証に至ったと考えている。さらに、用いるデータベースを拡張することで、新たなレアバリエントの同定と機能解析が可能と考えている。また、tau-KO, MAP2-KO およびその交配による double-KO マウスについての解析から、少なくとも tau と MAP2 についてその表現型は独立したものであり、それぞれの表現型は加算的に出現しうることを明らかとした。Tau と MAP2 は脊椎動物の出現から遺伝子重複により生じたパラログとされている。得られた結果から、一般的に想定される直接的な機能相補とは異なり、それぞれの遺伝子産物が独自に機能するなかで、特定の生理機能に対して間接的に機能補完している一例と考えている。

E. 結論

データベースから同定した MAP2 レアバリエントの一部について、確かに機能障害にかかわることを明らかとした。また、tau および MAP2 欠損の影響は独立したものであるにもかかわらず、両事象が重なる場合新たな生理機能障害を呈する可能性があることを見出した。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表
現在準備中。
2. 学会発表
現在準備中。

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。