

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) 同志社大学生命医科学部 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解明を目指した。

健常例、MCI 例、アルツハイマー病 (AD) 例を含む Whole exome sequence データから、AD に関連した *MAPT* および *MAP2* のレアバリエーションを同定した。このうち *MAP2* のバリエーション X および Y については新規であり、健常例、MCI 例には認められなかった。これら *MAP2* バリエーションの生理機能への影響を解析する目的で、変異型リコンビナント MAP2 を作成、精製した。また、各 MAPs の欠損マウス脳における RNA-seq を行い、新たな mRNA 発現ライブラリーを構築した。

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 欠損で特徴的な表現型が確認されている。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 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。得られた結果については、同志社大学において確立されている複数の MAPs 機能解析に供し、その生理機能への影響を検証する。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

ルの Whole exome sequence データをもとに MAPT, MAP2 遺伝子について Mutant Allele Frequency, PEXT Score, CADD score をもとに絞り込みを行い、認知症との高い関係が疑われるレアバリエントを同定した。

得られたバリエント情報をもとに同志社大学で保有する human MAP2C 大腸菌発現ベクターをもとに site directed mutagenesis により変異型 MAP2 発現ベクターを作成した。さらにこれらプラスミドを用いて、野性型 MAP2、バリエント X-MAP2、バリエント Y-MAP2 リコンビナントタンパク質を大腸菌 BL21 (DE3) 株に誘導発現させ、Ni²⁺-Sepharose カラムを用いて精製した。得られたタンパク質について SDS-PAGE / CBB 染色を行い、精製度、回収量について検証した。

野性型マウス脳を 0.5 M NaCl を添加した Microtubule Stabilization Buffer でホモジナイズし、超遠心により内在性 MAPs を持たない微小管画分を得た。得られた微小管と各リコンビナント MAP2 を混和し、4°C, 30 分静置した後に超遠心分離し、微小管結合画分および非結合画分を得た。各画分に得られた MAP2 について Western blotting 法により定量した。

3ヶ月齢の雄 WT, TKO, MKO, DKO マウスから脳幹を摘出し、-80°Cで凍結保存した。ISOGEN-LS 中でホモジナイズし、規定の手法に基づき total RNA を調整した。得られた RNA について定量および Agarose gel 電気泳動により quality check を行った。

脳幹より得られた total RNA より RNA-seq ライブラリを作成し、NextSeq500 でシーケンス解析を行った、得られたシーケンスリードについてマウス参照配列 (GRCm38: Ensembl release 102) マッピングを行い、DESeq2 v1.30.1 を用いて発現変動解析を行った。

本研究は同志社大学動物実験委員会 (A20039 号) および同志社大学組換え DNA 実験安全管理委員会 (D20024 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、MAPT および MAP2 遺伝子のバリエントを検索した。さらにアミノ酸変異をおこ

すもの、変異アレル頻度が十分に低いもの、脳での明確な発現が認められるもの、疾患との関係性が期待されるものについて絞り込みを行った結果、MAPT では 1 例、MAP2 には 2 例の変異を同定した。タウの変異については既知であったが、MAP2 についてはこれまで報告にないレアバリエントであった。これをバリエント X, Y とした。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。

得られたバリエント X, Y の MAP2 への影響について検証する目的で、リコンビナントの作成を試みた。既存の His-MAPs 精製法を応用することにより、His-MAP2、His-X-MAP2、His-Y-MAP2 についてそれぞれ 1.500 mg, 1.755 mg, 2.040 mg の高純度タンパク質を精製した。現在、これらを用いてマウス脳より精製した安定微小管に対する結合解析法の検討を行っており、安定した微小管への結合条件を見出したところである。さらに次年度においてチューブリン重合促進活性、さらには神経細胞内における局在解析を行う予定である。

これまでの解析から TKO 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。MKO マウスについては同志社大学における先行研究において生理学的な機能障害が認められている。これらは MAPs 単独の機能損失が様々な神経機能へ影響を及ぼす可能性を示している。MAPs 欠損の遺伝子発現への影響を調べる目的で、各系統脳より得られた total RNA をもちいた RNA-seq 解析を行った。得られたシーケンスリードについて主成分分析を行った結果、WT, TKO, MKO については特徴的な発現パターンが確認された。DKO については TKO, MKO の特徴を併せ持つ発現パターンであることが確認された。また、クラスター解析の結果、タウまたは MAP2 の欠損で発現が変動する mRNA 群を同定した。

D. 考察

マウスにおいて、タウあるいは MAP2 の欠損により特徴的な表現型と遺伝子発現パターンの変

動が認められた事から、各 MAPs は生体において独自の機能を有していること、さらにその機能損失は何らかのステップを介し、神経細胞の機能さらには遺伝子発現に影響を与えてると考えられる。これらモデル動物より得られた情報は MAPs の疾患に関与する未知のレアバリエントの可能性を示唆するものである。

E. 結論

MAPs には疾患や機能損失に関わる可能性があるレアバリエントがあり、その代表として MAP2 には X、Y といったものがある。また、タウ、MAP2 の欠損によりそれぞれに特徴的な発現変動を呈する遺伝子群がある。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

特になし。

2. 学会発表

特になし。

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。