

新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

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。このうちタウについては病理学的、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、タウ型 MAPs の生理機能とその機能損失の影響を明らかにする目的で、tau-KO, MAP2-KO およびそれらを掛け合わせた double-KO マウスの解析を行った。とくに Double-KO マウスにおける育児行動障害のメカニズム解析として、遺伝学的、形態学的、生化学的解析を行った。

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 (tau)、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、tau 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、tau 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、これまでに 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の検証を試みた。新潟大学脳研究所の遺伝子データベースより同定した複数の 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、MAPs としての機能障害を見出した。さらに今年度は解析中の 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、行動障害に付随した組織における RNA-seq による発現解析を行った。さらに同時に行った組織学的解析とともに tau 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)

B-1. Genotyping 及び DKO マウスの作製と組織サンプリング

野生型 (WT) C57B/6 系統マウスについてはブリーダーより購入した。Tau-KO および MAP2-KO マウス、double-KO マウスについてはそれぞれ然るべき遺伝子型の雌マウスを交配させ、得られた仔マウスについて PCR により genotyping した。得られた各系統の♀マウスについて3ヶ月齢まで飼育し、それぞれ野生型♂マウスと交配させた。妊娠、出産、育児行動について評価後、母マウスより血漿、凍結脳幹組織、固定脳標本を以下のとおり採取した。各マウスを深麻酔下で解剖台上でマウスを背位固定して開胸し、心臓を露出させた。灌流用注射針を左心室に設置した状態で右心房より静脈血を採取した。凍結脳幹組織を採取する場合は、血液採取後、約 20 ml の PBS を灌流にすることにより脱血し、脳幹を摘出・秤量し、即座に液体窒素にて凍結させ-80°C で保存した。固定脳標本については血液採取後のマウスについて PBS 灌流により脱血後、4% paraformaldehyde/0.5% glutaraldehyde を含む PBS を灌流し、固定した。さらにマウスの頭部を同固定液にて 24 時間浸漬固定した後、脳を摘出した。

B-2. mRNA 発現解析

採取した凍結脳幹組織より ISOGEN を用いて total RNA を調製した。得られた total RNA については定量およびアガロースゲル電気泳動によるクオリティチェックを行った後に新潟大学脳研究所遺伝子機能解析学分野の宮下哲典先生、原範和先生に送付し、RNA-seq 解析に供した。Total RNA 500 ng より RNA-seq ライブラリを作製した。RIN 解析後、RNA-seq ライブラリについて NextSeq500 (2x76bp) または NextSeq2000 (2x101bp) でシーケンスし、各ライブラリから平均 2100 万のペアエンドリードを得た。シーケンスリードはマウス参照配列

(GRCm38: Ensembl release 102) に *Salmon* v1.4.0 を用いてマッピングをおこなった。その後、DESeq2 v1.30.1 を用いて発現変動解析をおこない発現変動する遺伝子を同定した。さらに RNA-seq で得られた結果については、同志社大学において Q-PCR 法で更なる検証を行った。

B-3. Genotyping 及び DKO マウスの作製と組織サンプリング

灌流固定した脳よりオキシトシン神経細胞が豊富に観察出来る Bregma -0.82 mm を標的とし、厚さ 30 μ m のマイクロスライサー切片を作成した。得られた切片について、メタノールによる透過処理後、10% Goat Serum in PBS で1時間振盪しブロッキングした。その後、1% Bovine serum albumin (BSA) を含む PBS-T で希釈した各種一次抗体を 48 ~ 72 時間反応させ PBS-T で洗浄した。さらに 1% BSA in PBS-T で希釈した二次抗体を 48 ~ 72 時間反応させた。洗浄後 ProLong diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific) によって封入し、共焦点顕微鏡にて観察した。

B-4. 血中オキシトシンの定量

採取した血液に、100 KIU / ml Aprotinin 及び 1/750 v/v の Proclin950 を添加し、緩やかに混倒した。5,000 rpm、4°Cの条件下で 10 分遠心した後、得られた上清 (血漿) を-80°Cにて保存した。オキシトシンの定量はオキシトシン ELISA キットワークスを用いて行った。指定の方法に従い、発色させた後に、プレートリーダー (ParkinElmer EnVision2103) を用いて、発光試薬添加 10~20 分後の発光強度を測定した。

B-5. その他

本研究は同志社大学において DNA 組換え実験計画 D22035 号および動物実験計画 A22037 号として承認されたものであり、それぞれ同志社大学が定める規定に則って遂行された。

C. 研究結果

C-1. DKO マウスの育児行動

WT, tau-KO, MAP2-KO, double-KO の各系統♀マウスについて野生型♂マウスと交配させ出産させた。WT, tau-KO, MAP2-KO については出産後、nesting, retrieving, nursing といった育児行動を呈したのに対し、double-KO マウスではそ

のような育児行動を示さず、育児放棄となった。

C-2. DKO の RNA 発現変動

出産後の各マウスより採取した total RNA を用いて RNA-seq 解析を行った。RIN 解析の結果、いずれも 8.4–9.3 と解析には充分高い値である事を確認した。RNA-seq で得られたデータについては先に解析した♂マウスのデータとの比較、出産後の♀マウスのみでの比較と多角的におこなった。全解析群を対象とした主成分分析の結果、雌雄で大きな差が認められるものの、遺伝型における特徴的な分布の差は認められなかった。出産後の♀マウス間での比較では double-KO のみで有意に発現が減少する遺伝子を 19 種、発現が上昇する遺伝子を 29 種同定した。変動遺伝子に対するエンリッチメント解析の結果、繁殖にかかわる遺伝子群が double-KO で低下していた。各遺伝子の発現変動に着目した結果、double-KO の育児行動障害を直接指示する候補は無く、オキシトシン mRNA についても群間で発現変動は認められなかった。同様の結果は Q-PCR でも支持された。

一方、RNA-seq 解析において、tau mRNA の発現に応じて大きく変動する遺伝子 X が認められた。一方、この遺伝子 X の発現変動は Q-PCR では検出されなかった。

C-3. DKO の RNA 発現変動

微小管の重合促進や安定化に寄与しているとされる Tau や MAP2 の欠損が、オキシトシン神経細胞の微小管に影響を与える可能性が考えられる。とくに tau 欠損による軸索微小管の障害について検証する目的で、Oxt 神経細胞の軸索微小管形態解析法の確立を行った。WT マウスを用いて条件検討を行った結果、組織固定液として 4% PFA / 0.5% GA を用いる事、薄切に厚さ 76 μm のカミソリ刃を用いる事、抗チューブリン抗体の染色が切片表面に限局されることから、30 μm 厚の切片とし、薄切面直下の軸索について z スタックによる画像撮影を行うことなどによりオキシトシン軸索の微小管が観察可能であることを確認した。Tau-KO マウス脳においた観察では、WT と比較して軸索中オキシトシンの蛍光が乏しく、オキシトシン神経軸索の同定が困難であった。この観察法では、軸索輸送中のオキシトシンを指標に軸索微小管を特定したため、別途オキ

シトシン神経をラベル化し、本解析を行うことが適切と判断した。現在、オキシトシンプロモータで GFP を発現させるコンストラクトを作成し、AAV によりラベル化する方法を構築中である。

C-4. 血中オキシトシンの定量

出産直後の 4 系統のマウスにおける血中 Oxt 量を測定するため、Oxytocin ELISA キットによる測定法の条件検討を行った。まずは、標準溶液のみ測定し、測定方法の最適化を行った。再現性を確認するため、複数のセットずつ標準溶液を複製し測定したところ、高・低濃度に関わらず値が不安定な結果となった。現在、販売元とともに定量系の安定化を検討中である。

D. 考察

これまでの解析から、DKO マウスで認められた育児行動障害はオキシトシンの投与により改善されること、オキシトシン神経における興奮、分泌が低下していることが分かっている。しかし、出産～育児については複数の神経回路の機能が複雑にかかわることが想定されており、それらいずれかの機能不全で育児放棄となりうる。Tau および MAP2 の欠損が育児行動に与えるメカニズムについてもオキシトシン神経の機能障害が主要因である可能性とともに、別の神経の機能不全による影響がオキシトシン神経細胞の機能低下を引き起こしている可能性、さらには別の神経の機能不全が主要因であり、オキシトシン神経細胞の機能低下は行動障害の要因では無く、副次的現象の可能性も考えられる。DKO マウスの育児行動障害メカニズムとしてオキシトシン神経細胞の「機能障害」を原因として認めるには、①オキシトシンの発現自体の変化の有無、② その他、脳発生および構成細胞群およびそれを反映する mRNA 発現に顕著な差が無い事、③ Tau 欠損によるオキシトシン軸索輸送機構障害の有無、④ 血中オキシトシンの定量による DKO に特異的なオキシトシン分泌障害について検証する必要がある。

出産直後の 4 系統マウスの脳幹における RNA-seq 解析と Q-PCR を行った。その結果、オキシトシン mRNA に関しては有意な発現変動は認められなかった。これにより、DKO マウスに見られる育児放棄の原因はオキシトシンの発現異

常ではなく、その下流におけるオキシトシン神経細胞の興奮や輸送といった分泌機能不全である可能性が考えられる。加えて、RNA-seq 解析によって WT に対し DKO で発現変動する複数の mRNA を同定し、さらに DKO のみ発現減少する遺伝子には子育てに関するものが多く含まれていることを確認した。これより、DKO マウスが子育てを苦手とすることが、遺伝子発現にも表れていると考えられる。

また、オキシトシン神経細胞の軸索微小管の形態解析法を検討した。系の最適化により、WT マウスにおいて軸索微小管の明瞭な解析が可能となった。しかし、TKO マウス脳ではその輸送障害の影響か軸索中オキシトシンの蛍光が乏しく、オキシトシン軸索の特定が困難であった。今後は、オキシトシン神経特異的な蛍光タンパク発現を利用した新たな観察法の必要性が考えられる。

現在、GFP AAV ウイルスの作製を行い、マウスへの脳定位注入、感染による GFP の蛍光を観察している。オキシトシンプロモーターを組み込んだ GFP AAV ウイルスを作製し、室傍核への脳定位注入を行うことで、オキシトシンの蛍光が乏しいマウス系統でも軸索微小管の特定および観察が可能であると考えられる。さらに、室傍核への脳定位注入および DREADD-AAV ウイルスのオキシトシン神経細胞の特異的な感染によりその特異的な活性化も可能であると期待できる。それにより、オキシトシン神経細胞の活性化を行うことで DKO マウスの育児行動障害が改善すれば、育児放棄の原因がオキシトシンの分泌不全であることを解明できると考えている。

Tau-KO に依存して発現低下した遺伝子 X は Mapt と同じ chromosome 上にある。この発現変動については tau-KO 作成における off target、cis element による発現調節効果、X splicing variant の違い、RNA-seq データ解析上の問題など、様々な可能性が考えられた。世界的にも汎用されている tau-KO マウスであるため、この原因については今後も慎重に解析して行く必要がある。

E. 結論

育児行動障害に伴う Double-KO マウス脳において、mRNA の発現変動は小さいものの、育

児行動にかかわる遺伝子群への影響は認められた。一方、オキシトシン mRNA については発現変動が認められなかったことから double-KO マウスではオキシトシンの合成ではないと判断した。

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

1. タウ/MAP2 二重欠損マウスが呈する育児行動障害に対するオキシトシンの効果. 宮坂知宏, 謝策, 矢口花紗音, 植田結稀, 佐久間浩平, 堀部麻子, 原田彰宏. Neuro2022, 沖縄 (2022/7/2)
2. Tau / MAP2 二重欠損マウスにおける育児行動障害とその改善. 宮坂知宏. タウ研究会 2022, 奄美 (2022/8/20)

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし