

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26790030

研究課題名(和文) On Chip Detection of Tau Protein Using Microtubule Based Bioassay

研究課題名(英文) On Chip Detection of Tau Protein Using Microtubule Based Bioassay

研究代表者

TARHAN Mehmet・C (Tarhan, Mehmet Cagatay)

東京大学・生産技術研究所・研究員

研究者番号：50582839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、アルツハイマーのバイオマーカーとして知られるタウタンパク質を迅速で低コストに検出する方法について研究を行った。

まず、キネシン・微小管の移動機構を土台としたタウタンパク質を検出する4チャンネル集積マイクロチップを開発した。これにより、異なる濃度のタウタンパク質の同時検出が可能となった。また、このマイクロチップを用いて、異性体タウタンパク質も検出できることを示した。さらに、微量濃度の変性タウタンパク質の検出のために新しいプロトコルを開発した。本研究で開発した手法は、感度のさらなる向上、最適化ののちに、クリニカルサンプルを用いた試験にも適用できると考える。

研究成果の概要(英文)：This study shows that development novel tau detection method in an on-chip format. The proposed detection system is based on kinesin-coated bead motion along immobilized MTs. Chemically stabilized MTs (without tau) are used as the rail for kinesin motion. Kinesin molecules work collectively to move a bead along MTs. Kinesin molecule encountering a tau protein on the MT surface stops/detaches. Motion continues when another kinesin molecule starts moving. Such "switching" decreases bead velocity. Results could be achieved with the chip in a time and cost efficient way due to parallel processing. Moreover, a demonstration of an additional pre-incubation technique was introduced, which can solve the existing issues on detecting mutated tau. This novel technique can be used to amplify the sensitivity reaching the physiological levels. After necessary optimizations, clinical samples should be used to test the performance for demonstrating the diagnostic capabilities.

研究分野：バイオMEMS

キーワード：Protein detection On-chip detection Tau protein Microtubules Kinesin

1. 研究開発当初の背景

高齢化社会への移行と共に、アルツハイマー疾患や認知症に対する効果的な治療法の開発が望まれている。かつて、アルツハイマー疾患の治療の多くは、脳に不可逆的な収縮が起きてしまった後に、記憶テストなどの精神的退化を観察する方法などに限られていた。近年では、生体内イメージングと検出技術の発展により、顕著かつ信頼性の高い、タウタンパク質のようなアルツハイマー疾患のバイオマーカーの存在が明らかになっている。リン酸化タウタンパク質は、神経原繊維変化を生じさせ、神経伝達の機能障害を引き起こす。それゆえ、変性タウタンパク質の検出は、早期アルツハイマー疾患の治療において重要である。多くの患者に迅速な対応・治療をほどこすために、低コストかつ迅速な検出方法が望まれる。

2. 研究の目的

本研究では、生体の神経内にも存在する、微小管-キネシンモータータンパク質のシステムを土台とし、低コストで迅速なタウタンパク質の検出方法を提案する。キネシンには、観察のためにポリスチレンビーズを付加し、基板上に化学的に固定した微小管の上を、移動するキネシンの挙動を、ビーズを観察することにより検出する。健全な状態では、微小管表面にはタウタンパク質が付着しており、結果的にキネシンの移動の障害物となる。そのため、キネシンの動きが停止したり、キネシンが微小管から離れる場合もあるが、ビーズに付加した他のキネシン分子が微小管と反応し、移動を始める。このようなスイッチング動作により、一定距離におけるビーズの移動速度は、低下する(図1)。

3. 研究の方法

研究代表者はこれまで、フローセルを用いたタウタンパク質の検出方法について研究を行ってきた [1]。フローセルとは、カバーガラス 2 枚の間にスペーサーを挟んだ、バイオ実験における

簡便なテスト方法で、カバーガラスの隙間に試料を導入して実験に用いる。タウタンパク質異性体を使った濃度影響の評価により、仮説は検証できたが、フローセルの実験系では、複数の実験条件を同時に試すことができないなどの限界がある。

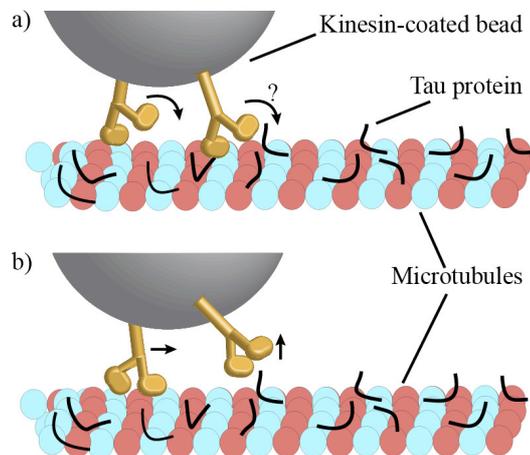


図 1: ビーズ付加キネシンの微小管上の移動において、タウタンパク質が与える影響。一定距離を移動する場合、キネシンの平均移動速度は低下する。

そこで本研究では、1つのマイクロチップ内で並行して複数条件を試験する方法を実施する。また、マイクロチップを土台とした実験系は、小型かつ低コストで作製可能であり、将来の医療診断へ応用できる可能性を持つ。

マイクロチップには、幅 $400\mu\text{m}$ の4本のチャンネルを集積し、同時に異なる4つの条件を評価することができるものとした。チャンネルのアウトレット側にシリコーンチューブを接続し、吸引により送液する。試料の調整は以下の通りである。あらかじめタウタンパク質と微小管を混合し、30分間6rpmの条件で振とうしながら 30°C 一定環境で培養する。また、不活性化したキネシン $30\mu\text{g}/\text{mL}$ をチャンネル内に導入し、10分間培養する。表面に不活性化キネシンが固定されたチャンネルに、培養したタウタンパク質/微小管混合溶液を導入し、チャンネル内に固定する。固定されなかった余剰な微小管を洗浄したのち、ポリスチレンビーズを付加したキネシンをチャンネル内に導入する。ここに、

1mMのATP溶液を加えて、キネシンの移動を開始させる。4チャンネル内の計測のためには、駆動をプログラムした電動ステージを利用した。ビーズの移動量(距離と移動時間)を統計的に解析した。

4. 研究成果

4 チャンネル集積マイクロチップを用いて、タウタンパク質濃度がキネシンの移動に与える影響を評価した。タウタンパク質が低濃度の場合、タウを含まないコントロール実験と比較して、移動速度の減少(低下)量は小さい結果となった。チャンネル内の微小管の配置密度が高いと、結果的にタウタンパク質が高濃度となり、この場合、コントロール実験と比較した速度減少量は、より大きいものとなった(図2)。

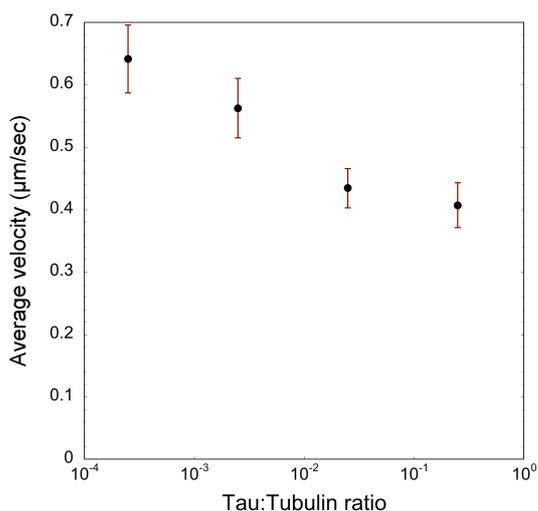


図 2: ビーズ付加キネシンの微小管上の移動におけるタウタンパク質の影響。ビーズの平均速度を算出することにより求めた。タウタンパク質濃度は、0.4nM-0.4μM の範囲である。(ANOVA 試験: $p < 0.001$) 高濃度タウタンパク質の場合は、タウが微小管に付加する量が多く、キネシンの移動を阻害する確率が増加する。その結果、高濃度タウタンパク質の場合は、キネシンの移動速度が低下する。

また、フローセルの実験系を用いて、タウ異性体の検出を行った(図3)。その結果、(1) 微小

管に対して、高濃度にタウタンパク質が付加した場合は付加量が少ない場合よりも、キネシンの移動速度は低下した。(2) プロジェクションドメイン(タウがキネシンと相互作用する部分)の短いタウタンパク質の場合、長いものと比較して、移動速度は低下した。

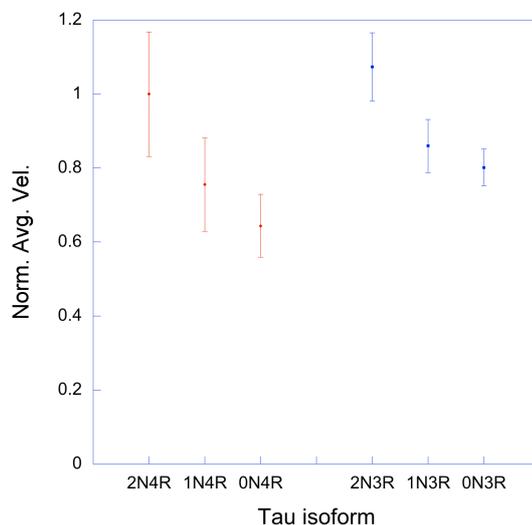


図 3: タウタンパク質異性体の種類(タウタンパク質とキネシンの相互作用に関わる)によるキネシンの移動速度。プロジェクションドメインの短いタウほど速度が遅い(2N4R, 1N4R, 0N4R の3点、2N3R, 1N3R, 0N3R の3点をそれぞれ比較した結果. N の前の数字が大きいほどプロジェクションドメインが長い)。

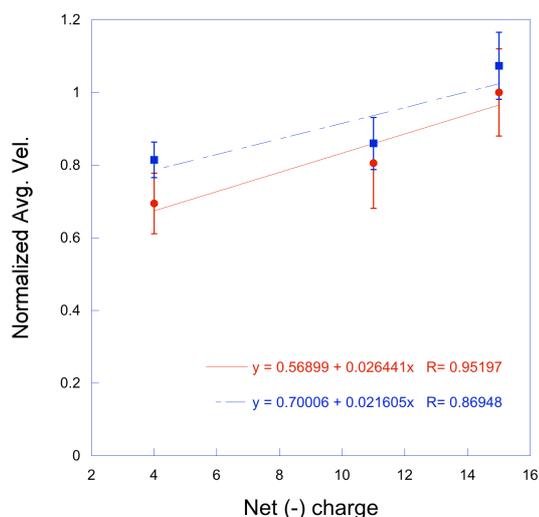


図 4: タウタンパク質異性体の種類(タウタンパク質と微小管の相互作用に関する)によるキネシンの移動速度。青: 3R 異性体, 赤: 4R 異性体。

タウと微小管の相互作用に関わる構造部分について、4R 異性体の方が3R 異性体よりも長い。4R 異性体は、より微小管に強固に付加し、キネシンの移動を阻害すると考えられる。一方で、タウタンパク質が持つ電気特性(電氣的に負に帯電)は、タウと微小管の相互作用に寄与しており、これがキネシンの移動に影響する。

さらに、変性タウタンパク質を検出する方法として新しいプロトコルを考案した。変性タウタンパク質は、もともと微小管に付加しにくい性質を持っているために、検出は困難である。そこで、あらかじめ健常タウタンパク質と変性タウを混合して、6 rmp の振とうを加えながら 37°C において 8 時間培養し、これを試験試料とした。タウタンパク質は、プリオンと類似した特徴を持つことが報告されているため、混合溶液中の変性タウは、健常タウに影響を与え、全体の健常タウの濃度を下げる。混合溶液の変性タウ濃度は、もとの変性タウ濃度と相関を有する。図 5 は、健常タウ濃度を一定にして、濃度の異なる変性タウを加えた試料を測定した実験結果である。変性タウタンパク質の濃度ごとに、顕著な差が表れている。

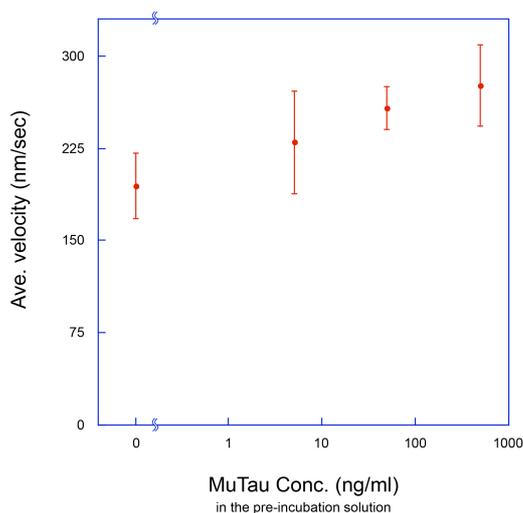


図 5: あらかじめ培養する手法を用いた実験、変性タウタンパク質濃度と移動速度の関係。事前に培養することにより、検出不可能であった変性タウタンパク質を検出した。

本研究では、これまで用いていたフローセルに

よるタウタンパク質の検出を、小型かつ汎用性の高いマイクロチップに集積し、複数試料を同時に測定することが可能となった。これは測定時間の短縮にも寄与する。さらに、初期のマイクロチップを用いた手法では測定不可能であった変性タウタンパク質の検出について、試料をチップに導入する前に培養する手順を加えることで、検出が可能となった。さらに感度を向上させることができれば、生理学的レベルの研究に応用できると考える。また、最適化により、脳脊髄液などの臨床サンプルを試験できる可能性もある。

<引用文献>

[1] M. C. Tarhan, et al., Biosensing MAPs as ‘‘roadblocks’’: kinesin-based functional analysis of tau protein isoforms and mutants using suspended microtubules (sMTs), *Lab Chip*, Vol. 13, pp. 3217-3224, 2013.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) S. P. Subramaniyan, M. C. Tarhan, S. L. Karsten, H. Fujita, H. Shintaku, H. Kotera and R. Yokokawa, On- chip microtubule gliding assay for parallel measurement of tau protein species, *Lab On Chip*, DOI: 10.1039/C5LC01486G, 2016.

(2) G. Perret, P. Ginet, M. C. Tarhan, A. Baccouche, T. Lacornerie, M. Kumemura, L. Jalabert, F. Cleri, E. F. Lartigau, B. J. Kim, S. L. Karsten, H. Fujita, Y. Rondelez, T. Fujii and D. Collard, Nano systems and devices for applications in biology and nanotechnology, *Solid- State Electronics*, Vol. 115, pp. 66-73, doi:10.1016/ j.sse.2015.08.019, 2016.

(3) S. L. Karsten, M. C. Tarhan, L. C. Kudo, D. Collard and H. Fujita, Point- of- Care (POC) Devices by Means of Advanced MEMS, *Talanta*, Vol. 145, pp. 55-59, doi:10.1016/ j.talanta.2015.04.032, 2015.

[学会発表] (計 4 件)

(1) Y. Tauran, M. C. Tarhan, N. Lafitte, L. Jalabert, B.J. Kim, H. Fujita, A.W. Coleman and D. Collard, SNTs Combined to a Microfluidic Device for Monitoring the Mechanical Effects of Metal Cations on DNA, International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences [国際学会], 2015年10月25日~ 2015年10月29日, Gyeongju, Korea.

(2) G. Perret, N. Lafitte, M. C. Tarhan, L. Jalabert, M. Kumemura, T. Lacornerie, E. Lartigau, F. Cleri, H. Fujita and D. Collard, 3D Humidity Imager in Micro Environment Based on DNA Conductivity and Rigidity Measured by Silicon Nano Tweezers, IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems [国際学会], 2016年01月24日~ 2016年01月28日, Shanghai, China.

(3) M. C. Tarhan, G. Perret, N. Lafitte, M. Kumemura, L. Jalabert, Y. Takayama, S. L. Karsten, H. Fujita and D. Collard, Manipulating Different Biological Samples by Silicon Nanotweezers, International Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology [国際学会], 2016年04月20日~ 2016年04月22日, Seoul, Korea.

(4) Gregoire Perret, M. C. Tarhan, Nicolas Lafitte, Laurent Jalabert, M. Kumemura, T. Lacornerie, E. Lartigau, F. Cleri, H. Fujita and D. Collard, DNA mechanical characterization inside biological buffer by the Double- Actuator Silicon Nano Tweezers, Asia-Pacific Conference on Transducers and Micro-Nano Technology [国際学会], 2016年06月26日~ 2016年06月29日, anazawa bunka hall, Kanazawa, Japan.4

[図書] なし

[知的財産権] なし

[その他] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

TARHAN Mehmet・C (Tarhan, Mehmet Cagatay)

東京大学・生産技術研究所・研究員
研究者番号:50582839