

京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書

平成28年2月2日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団
会 長 辻 井 昭 雄 様

所属部局・研究科 工学研究科

職 名・学 年 教務補佐員

氏 名 Subramaniyan Parimalam Subhathirai

助 成 の 種 類	平成27年度・若手研究者在外研究支援・国際研究集会発表助成		
研 究 集 会 名	Neuroscience 2015 - Society for Neuroscience (第45回北米神経科学学会)		
発 表 題 目	微小管への結合性に基づくタウタンパク質の変異体および、3R型・4R型比のオンチップ検出		
開 催 場 所	McCormick Place (アメリカ合衆国 イリノイ州 シカゴ)		
渡 航 期 間	平成27年10月16日 ~ 平成27年10月24日		
成 果 の 概 要	タイトルは「成果の概要／報告者名」として、A4版2000字程度・和文で作成し、添付して下さい。「成果の概要」以外に添付する資料 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有()		
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	300,000円	
	使用した助成金額	283,354円	
	返納すべき助成金額	16,646円	
	助成金の使途内訳	交通費:124,020円	
		宿泊費(5泊):99,709円	
		日当(7日分):36,400円	
		参加登録料:23,225円	
	合計:283,354円		
当財団の助成について	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。)		

Grant Report

Name of the conference: Society for Neuroscience Annual meeting - Chicago, 2015

Presentation date and time: Oct 20, 2015, 08.00 AM - 12.00 AM

Paper title: On-chip detection of tau mutants and 3R:4R tau ratio based on tau's binding affinity to taxol stabilized microtubules.

Abstract: Introduction: Tau protein is a neuronal microtubule (MT) associated protein (MAP) which regulates MT-kinesin dependent fast axonal transportation. Point mutations in tau affecting the binding affinity to MT and splicing site mutation altering 3R:4R tau ratios are biomarkers for early onset of neurodegeneration. Here, we present an on-chip tau detection device comprising of a MT reservoir, channel and an arrowhead shaped collector region, to detect different 3R:4R ratio and major 2N4R mutations (V248L, G272V, P301L, V337M and R406W) using the MT-kinesin system. The detection is based on tau's isoform and mutant specific binding to taxol stabilized MTs, and their interference with kinesin-MT binding. An increase in tau decoration on MTs resulted in lowering of MT-kinesin binding, TAMRA-labeled stabilized MTs decorated with tau isoforms and mutants were assayed in kinesin coated microfluidic device. MTs binding and gliding in reservoir were concentrated at collector region for fluorescent intensity (FI) measurement. By measuring FI at collector we were able to detect the type of tau decorating the MTs, undecorated MTs were taken as control. We differentiated 1:0 vs 0:1 1:0 vs 1:3, 3:1 vs 1:1 and 3:1 vs 0:1 3R:4R tau ratios ($p < 0.05$), and the five mutants were differentiated from wild 2N4R.

Experimental method: Tau detection device was fabricated through UV-lithography technique. In brief, MT reservoir, channel and collector were micro fabricated on SU8 photo resist coated on a glass substrate. Wild and mutant tau (1 μ M) and different ratio 3R: 4R tau isoform (0:1, 1:3, 1:1, 3:1 and 1:0) were incubated with taxol-stabilized TAMRA-labeled MTs (0.5 μ M) at 37°C for 30 min off-chip. These MTs in motility solution were introduced into the device selectively coated with kinesin. The MTs binding and gliding in the reservoir region were concentrated into collector and FI images were acquired. Images were processed using ImageJ and FIs were plotted.

Results: FI at collector region were significantly ($p < 0.05$) lower for MTs decorated with 0:1 vs 1:0, 1:0 vs 1:3, 3:1 vs 1:1 and 3:1 vs 0:1 3R:4R respectively. Further, the FI at collectors of device assayed with 2N4R tau MTs were significantly lower than mutants. Among mutants, FI for P301L was highest followed by V337M, G272V, V248L and R406W.

Conclusion: We found that the kinesin-MT molecular system has a potential to differentiate 3R and 4R tau isoform as well as different 3R:4R ratios, and wild from mutant tau isoform. The degree to which mutations affect the tau binding strength can be determined through this method. The detection system can also be extended to analyze other MAPs and motor proteins.

Outcome of attending the conference:

1. I could talk and discuss about my work with researchers from both within and outside my research area.
2. I could have an overview of the entire Brain related research and the most recent development in various research theme.

学会名 : Society for Neuroscience Annual meeting - Chicago, 2015

発表日時 : 2015 年 10 月 20 日 8 時~12 時

論文名 : 微小管への結合性に基づくタウタンパク質の変異体および, 3R 型・4R 型比のオンチップ検出

要旨 : 微小管結合タンパク質の一つであるタウタンパク質は, 微小管 - キネシン間の相互作用に基づく軸索輸送を制御している. タウの微小管への結合性に影響を与える点変異, 及びアイソフォーム 3R 型と 4R 型の存在比を変化させるスプライシング部位での変異は, 神経変性の早期徴候を表すバイオマーカーである. われわれは微小管 - キネシン系を利用した微小流体デバイスによる, このようなタウの点変異及び異なるアイソフォーム比のオンチップ検出技術を提案する. 本デバイスは reservoir, channel, 矢尻形 collector の 3 つの部位から構成され, 流路はキネシンでコーティングされている. 検出はアイソフォーム及び変異型タウの, 微小管に対する特異的な結合, さらに微小管 - キネシン間結合への干渉の違いに基づいておこなう. 微小管に結合するタウの量が増えると, 微小管 - キネシン間の結合は抑制された. TAMRA で蛍光標識した微小管にタウを結合させデバイスへ導入すると, 微小管はキネシン上をグライディングし, collector 部で集積された. この collector 部における蛍光強度を測定することにより, 微小管に結合したタウの種類を検出した.

実験方法 : デバイスはフォトレジスト SU-8 を用いて, ガラス基板上に UV リソグラフィにより作製した. タウ (1 μM) は蛍光微小管 (0.5 μM) と混合し, 37°C で 30 分間インキュベートし結合させた. これをデバイスに導入し, collector 部で集積したものを撮影した. 蛍光強度は ImageJ を用いて解析した.

実験結果 : collector 部での蛍光強度は, アイソフォーム 3R 型:4R 型の存在比が 0:1 と 1:0, 1:0 と 1:3, 3:1 と 1:1, 3:1 と 0:1 のときにそれぞれ有意差があった ($p < 0.05$). また, 変異型タウをアッセイしたときの蛍光強度は野生型を用いたときに比べいずれも高かった. さらに変異型の中でも, P301L の蛍光強度は V337M, G272V, V248L, R406W よりも高かった.

結論 : われわれは, 微小管 - キネシン系を利用することで, タウのアイソフォーム存在比を, また野生型タウから変異型タウを区別することが可能であることを見出した. 変異がタウの結合強度に影響を与える度合いは, この手法により決定することが可能である. また, この検出方法は, 他の微小管結合タンパク質やモータータンパク質の分析に拡張することが可能である.

学会に参加した成果 :

1. 自分の研究領域の内外の研究者たちと討論をすることが出来た.
2. 脳全体に関する研究の大要及び様々な研究テーマの最新の進展を掴むことが出来た.