

京都大学	博士（工学）	氏名	Subramaniyan Parimalam Subhathirai
論文題目	Study of Tau Protein's Effect on Microtubule-Kinesin Molecular System and Development of Tau Detection Microfluidic Device（タウタンパク質がキネシンと微小管の分子系に与える影響に関する研究およびタウタンパク質検出のための微小流体デバイスの開発）		
（論文内容の要旨） 本論文は、神経変性疾患のバイオマーカーであるタウタンパク質が細胞内物質輸送を担うキネシンモータータンパク質の運動に及ぼす影響を調べ、それを微小流体デバイスにおけるタウタンパク質の検出に利用する研究をまとめたものであり、4章から構成されている。 第1章は緒論であり、研究の背景と目的、および論文の構成が述べられている。 タウタンパク質が引き起こすとされる神経変性疾患と、我々の生活に及ぼす影響および社会的な損失について述べ、さらに、高度高齢化社会におけるその重要性について議論している。これまでの神経変性疾患における発生機序はアミロイド仮説とタウ仮説の二つであり、前者ではアミロイド前駆体タンパク質がアミロイドβの蓄積を引き起こしシナプスの破壊を通して疾患につながると考えられ、一方、タウ仮説ではその変異体や過リン酸化したタウタンパク質の蓄積によって神経原線維変化が起これと考えられている。後者ではタウタンパク質の蓄積により、本来軸索内の微小管構造を安定化する機能を有するタウタンパク質が、その機能を発揮せずに微小管の不安定化が生じることにより軸索輸送が阻害され、神経変性疾患につながると考えられている。これまで、アミロイド仮説に基づきアミロイドβの検出による診断が用いられてきたが、近年タウタンパク質がより早期に蓄積することがわかっており、タウタンパク質が信頼性の高いバイオマーカーであると考えられている。このような背景から、微小流体デバイスであるμTAS(micro Total Analysis Systems)を用いてタウタンパク質を検出することの意義および研究の概要を述べることにより、本論文が明らかにしようとする研究の学際的な意味と応用分野への位置づけを示している。 タウタンパク質は、スプライシングによって6つのアイソフォームを有し、微小管結合部位の違いによって3Rと4Rの2グループに分かれ、微小管に結合した際の突出部位の違いにより0N, 1N, 2Nの3グループに分かれる。疾患により、脳脊髄液内のタウタンパク質はこれらの総タウタンパク質量が増加し、過リン酸化したタウタンパク質が増加すること、さらに、3Rと4Rタウタンパク質の割合の変化が指標になることについて説明している。そして、これらの指標を検出する方法として、従来のELISAに加え電気化学的な方法などが報告されているが、タウタンパク質の機能という点に着目して検出することができていない。このため、キネシンー微小管系の運動アッセイを利用してタウタンパク質の機能の観点から検出する方法には優位性があるものの、微小管グライディングアッセイおよびビーズアッセイのいずれにおいてもその結果に一貫性が得られていない。そこで、これまでの方法の問題点を解決してタウタンパク質を機能の観点から検出する方法を創製することの重要性について述べ、研究において明らかにする内容と方法について述べている。 第2章では、キネシンを修飾したガラス上におけるタウタンパク質結合微小管の運動特性について、単位面積当たりの付着率、数密度、および運動速度の3つが評価指			

京都大学	博士（工学）	氏名	Subramaniyan Parimalam Subhathirai
標として有用であることを提案、実証した上でその有効性に関して考察している。 これまで、タウタンパク質の検出には様々な評価指標が用いられてきたが、アイソフォームや変異体の違いによる評価指標の差異が有意でなく、一貫してすべてのアイソフォームについての測定が実施できていないなどの問題があった。そこで、6種類のアイソフォームと疾患に直結すると言われる5種類の主要な変異体について、3つの評価指標について網羅的に評価している。特に、付着率と数密度については微小管の長さが影響することが懸念されているため、微小管の長さが付加するタウタンパク質の種類に依存しないことを示すとともに、アッセイ開始後5分でタウタンパク質の違いを検出できることを野生型の2N4Rと変異型のV337Mを用いて示している。この結果を参考に他のアイソフォームと変異体についても評価し、3Rタウタンパク質の場合4Rタウタンパク質に比べ微小管の付着率、数密度、速度いずれの指標も有意に大きくなり、微小管結合部位の違いを検出できることを示している。さらに、2N3Rと2N4Rの存在比に応じて数密度が変化することも示しており、それらの比までを定量できる点で重要な知見を得ている。同等の手法を変異体にも適用することで、付着率と数密度によって変位の位置の違いに応じて2グループに分離することができたが、速度によってはこれらの違いを検出することができないことを示している。最後に、本手法の検出限界が3Rタウタンパク質は100 nM、4Rタウタンパク質は10 nMであることを計測しており、これらの結果を従来研究と比較および考察して提案した方法の有効性・優位性に関して述べている。 第3章では、第2章で有効性を確認した3つの評価指標を活かしてタウタンパク質を検出するために、微小流体デバイスの設計、最適化、検出の実証とその詳細な考察を行っている。 微小流体デバイスは、キネシン修飾したガラス上に微小管の付着を促すリザーバ、微小管運動を一方向に規定するマイクロチャネル、そして微小管の蛍光強度を検出する回収部（検出部）からなる。この設計は、タウタンパク質の付着によりリザーバで付着率と数密度の差が、そしてチャネルで速度差が反映されるように設計したものである。ガラス基板の上にアルミニウムとSU-8の二層をパターニングして微小管のアッセイエリアを製作し、アルミニウムのエッチングの際にわずかなオーバーエッチングをおこなうことでSU-8構造を突出させることが微小管の運動をガラス表面のアッセイエリア内に留め、外部への流出を防ぐ方法だと述べている。まず、2N4Rタウタンパク質の検出が5分でおこなえることを確認した後、3Rタウタンパク質と4Rタウタンパク質の比、変異体の違い、検出限界について調べている。具体的には、3Rが4Rの3倍以上存在する場合を検出できることを示し、変異体については第2章よりも感度が上昇し3グループに分けられることを示している。さらに、2N4Rについて検出限界が100 nMであることを示している。設計した微小流体デバイスを用いて、蛍光強度のみからタウタンパク質のアイソフォームや変異体を検出できることを実証している。 第4章は結論であり、本論で得られた成果について要約するとともに、将来への展望について記述している。			

氏 名

Subramaniyan
Parimalam
Subhathirai

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、神経変性疾患のバイオマーカーであるタウタンパク質が細胞内物質輸送を担うキネシンモータータンパク質の運動に及ぼす影響を調べ、それを微小流体デバイスにおけるタウタンパク質の検出に利用するものであり、アミロイド β に代わる神経変性疾患の早期検出に貢献するものである。得られた主な成果は次のとおりである。

1. タウタンパク質はアルツハイマー病やピック病などタウ関連疾患を発症することが知られている。正常なタウタンパク質は *in vivo* においては微小管に結合することでその構造を安定化するが、*in vitro* ではタキソールで安定化した微小管に結合するとキネシンの運動を阻害する。この理解は確立しているにも関わらず、キネシンを修飾したガラス上へのタウタンパク質付着微小管の数密度や運動速度への影響については一貫した結果が得られていない。そこで、全てのアイソフォームと代表的な変異体の影響について網羅的に調べ、微小管結合部位の長さや変位の部位に応じて数密度と速度が変化することを示した。これは、数密度や速度の違いを検出パラメータとして利用できることを示したものである。
2. タウタンパク質の検出デバイスの開発が 2 つめの成果である。キネシンコートガラス上への微小管付着量の差を増大させるためのリザーバ、速度差を増大させるためのマイクロチャネル、微小管を濃縮するための検出部（濃縮部）からなるデバイスを作製し、6 つの検出部を用いて並列に蛍光強度の上昇からアイソフォームの混合比や変異体の違いまで検出できることを示した。単に、タウタンパク質の有無を検出するだけでなく、そのキネシンの運動特性への影響というタンパク質の機能の観点からオンチップで評価することで、バイオマーカーとしてのタウタンパク質を検出できることを実証した成果である。

本論文は、タウタンパク質の検出について微小管のグライディングアッセイ系を利用することの有用性を実験的に示したものであり、学術上、實際上寄与するところが少ない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 28 年 6 月 20 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公開可能日：2016 年 10 月 24 日以降