3. ジーンターゲット法による微小管関連蛋白タウ 欠失マウスの作成と解析

原 田 彰 宏^{1,3)} 大 口 恵 子¹⁾ 岡 部 繁 男¹⁾
久 野 淳 子²⁾ 池 上 司 郎⁴⁾ 寺 田 純 雄¹⁾
大 島 猛 史¹⁾ 佐 藤 玲 子¹⁾ 野 田 哲 生²⁾
廣 川 信 隆¹⁾

東京大学医学部 第一解剖¹⁾, 癌研究所細胞生物部²⁾, 東京大学薬学部 機能病態³⁾,
三菱化成生命研 脳神経科学部⁴⁾

Production and Analysis of Mice Deficient in Microtubule-Associated-Protein Tau

Akihiro HARADA,^{1,3)} Keiko OGUCHI,¹⁾ Shigeo Okabe,¹⁾
Junko KUNO,²⁾ Shiro IKEGAMI,⁴⁾ Sumio TERADA,¹⁾
Takeshi OHSHIMA,¹⁾ Reiko SATO-YOSHITAKE,¹⁾
Tetsuo NODA²⁾ and Nobutaka HIROKAWA¹⁾

*Department of Anatomy and Cell Biology, School of Medicine, University
of Tokyo,¹⁾ Department of Cell Biology, Cancer Institute,²⁾
Department of Neurobiology and Neuropathology, School
of Pharmacology, University of Tokyo,³⁾ Project Research
Center Project 4, Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences⁴⁾*

Summary

Considerable evidence supports the hypothesis that tau, one of the major neuronal microtubule-associated proteins (MAPs), is essential for neuronal cell morphogenesis and axonal maintenance. To examine this hypothesis in detail, we have produced mice lacking tau. Surprisingly, tau-deficient mice were viable and fertile. Histological and immunocytochemical examination of the nervous system in general revealed no abnormalities throughout development. Furthermore, selective axonal elongation was not affected in cultured neurons. We observed increase in another MAP which may partially compensate for the loss of tau. However, in some small caliber axons, decrease in microtubule (MT) stability was observed and MP organization was significantly changed. Our results argue against the hypothesized role of tau in neuronal cell morphogenesis but support its crucial role in the stabilization and organization of axonal MTs in a certain type of axons.

緒 言

タウ蛋白は、神経細胞内に特異的に存在する微小管関連蛋白 (MAPs) の一つで、主に軸索に存在する¹⁾。タウ蛋白には微小管結合能および、微小管重合促進能があり²⁾、軸索内で微小管間の架橋を形成すること³⁾が知られている。タウ蛋白の遺伝子 (cDNA) を非神経細胞に導入したところ、軸索中にみられるような微小管の束が形成された^{4,5)}。又、逆にタウ遺伝子のアンチセンス DNA を培養神経細胞に投与すると、軸索伸長だけを選択的に抑制することが分った⁶⁾。これらの

結果からタウ蛋白は、軸索伸長および軸索の構造維持に必須と考えられた。この推論を検討するため、我々は標的組換え法を用いてタウ遺伝子欠失マウスを作成した。その結果、タウ欠失マウスは外見上正常で、発育に問題なく、その神経系にも異常が認められなかった。さらに、タウ欠失マウスの培養神経細胞の軸索伸長にも異常が認められなかった。しかし、小脳の平行線維のような径の小さい軸索において微小管数・密度が低下しており、又、軸索中の微小管間の架橋数の著しい減少が認められた。さらに我々は、他の MAPs

Fig.1 Targeted inactivation of the tau gene in ES cells and mice. (A) Targeting replacement-type vector, tau wild-type allele, and targeted allele after homologous recombination. The targeting vector contains a PGK-*neo* cassette (pPGKneopA) in the same transcriptional orientation as the tau gene and a PGK-*tk* cassette (pPGKtkpA) on the upstream side of the construct. The targeting vector was linearized with Sall before electroporation. (B) Genotype of a litter from heterozygous $\times$ heterozygous interbreeding ($\tau^{+/-} \times \tau^{+/-}$). Tail DNA was digested with BamHI and Southern blot analysis was performed with the 5'-flanking probe. Lanes 6 and 7 are wild-type ($\tau^{+/+}$) mice. Lanes 1, 3, 4, 5, 8, and 9 are heterozygous mutant ($\tau^{+/-}$) mice. Lane 2 is a homozygous mutant ($\tau^{-/-}$) mouse. WT, wild-type band; HR, homologous recombinant band. (C,D) Immunoblot Analysis of Microtubule-Associated Proteins (MAPs). Crude extracts from brain (cerebrum plus cerebellum) (C) were subjected to immunoblot analysis with antibodies against tau (C), MAP1A (D). (C) Tau protein was reduced by half in $\tau^{+/-}$ and was absent in $\tau^{-/-}$ mice. (D) MAP1A protein increased in amount in postnatal day 7 (P7) $\tau^{-/-}$ mice than in $\tau^{+/+}$ mice. Equivalent loadings of crude extract in each lane were confirmed by immunoblotting with an anti-NF-M antibody (see 'NF-M' in Fig.1C,D).

の一つである MAP1A がタウ欠失マウスで増加していることを発見した。この MAP1A の増加により、タウの機能が一部代償されている可能性がある。さらに、我々はタウ欠失がマウスの高次機能に与える影響をみるためタウ欠失マウスの学習・活動性・筋力等についてみたところ、筋力（瞬発力・持続力）の低下、活動性の軽度の低下、および活動パターンの異常が認められたが、学習等については異常が認められなかった。我々の結果から、タウは軸索伸長に必須ではないが、軸索中の微小管の安定性および構築に重要な役割を果たすことが考えられた。

実験材料・方法

タウ欠失マウスの作製：ターゲティングベクターは、129/Sv マウス由来のゲノム DNA を用い、翻訳開始コドン (ATG) を含むエクソン中に PGK neo を挿入し、ゲノム DNA の上流に PGK tk をつないで作製した⁹⁾ (Fig.1A)。常法通り ES 細胞に導入し、G418 (および FIAU) で選別後サザンブロットで相同組換え体を選別後、胚盤胞注入によってキメラを作成した⁹⁾。

ウェスタンブロッティング：脳の各部位（大脳・小脳・脊髄）を 25 mM Tris (pH 6.8) 2% SDS 中でホモジナイズ後、ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、常法通りにナイロンメンブランにトランスファーし、ウェスタンブロッティングを行った⁹⁾。定量は Fuji BAS-2000 で行った。使った抗体はタウ、MAP2、MAP1A、MAP1B、NF-L・M・H、シナプシンとチューブリンに対する抗体（抗血清）を用いた。

組織の観察には通常のヘマトキシリン-エオジン染色を用い、又、免疫組織化学には上記の抗体を用いて蛍光抗体法を行った。電顕による観察はカルノフスキーの固定液による漕流ののち、脱水、エポン包埋ののち、JEOL 1200EX を用いて行った⁹⁾。軸索の微小管の計測は、同齢の同腹のコントロールとミュータント間で比較し、充分固定の良いところを選んで行った。急速凍結ディープエッチ法は常法通り行った³⁾。

海馬神経細胞培養：パンカーらの方法に従って行った¹⁰⁾。

行動解析：棒渡り、懸垂テスト、金網に掴まらせるテスト、一般活動性、8 方向型放射状迷路は、文献に準じて行った¹¹⁾。

実験成績

タウ遺伝子の破壊のため、置換型ターゲティングベクターを作製した (Fig.1 A)。常法通り相同組換え体

の ES 細胞を選別し、生殖系列キメラを得ることができ、その F₁ 同士をかけ合せ F₂ について尾のゲノム DNA のサザンブロットを行った (Fig.1 B)。すると、マウス成体についても、ホモ接合体が存在した。

また、野生型：ヘテロ接合体：ホモ接合体の比は 1 : 2 : 1 のメンデル比になったことから、ホモ接合体は特に成長に影響ないと考えられた。外見上も、ホモ接合体は野生型と区別がつかず、生殖能力にも異常は認められなかった。又、ヘマトキシリン-エオジン染色で各臓器を調べた結果、特に異常は認められなかった。ホモ接合体でタウ蛋白が欠失していることを確認するため、ウェスタンブロットを行ったところ (Fig. 1 C)、確かにホモ接合体ではタウ蛋白が欠失しており、さらにヘテロ接合体ではタウ蛋白が野生型の半分に減っていることが分った。他の細胞骨格蛋白について、その増減をしらべたところ、MAPs の一つである MAP1A の量が、野生型に比べ生後 7 日で 2 倍、14 日・成体で 1.3 倍に増加していることが明らかになった。さらに、これらの細胞骨格蛋白の分布に異常がみられるが、小脳の免疫組織化学を行ったが (Fig. 2) タウ以外は特に異常は認められなかった。我々は軸索内の微小管の構造などに変化がみられるかを電子顕微鏡を用いて観察したところ、小脳の顆粒細胞の軸索である平行線維において、微小管数の減少が認められた (Fig.3A, B, Table 1)。この微小管数の減少は軸索特異的で、小脳プルキンエ細胞の樹状突起では、減少は認められなかった。しかし、より径の太い軸索である視神経や、坐骨神経においては、微小管数の減少は認められなかった。次に軸索内での細胞骨格の構造変化をみるため、我々は小脳の平行線維を急速凍結ディープエッチ法^{10,11)}を用いて観察した (Fig.3 C-F)。野生型 (Fig.3 C) では微小管間に短い架橋が多数認められる（白矢印）のに対し、ホモ接合体 (Fig.3 D-F) ではその微小管間の架橋数は明らかに減少していることが分かった。しかし微小管と膜の間の架橋や、微小管とニューロフィラメント間の架橋には変化がない (Fig.3 D-F) ことから、タウは主に微小管間の架橋であると考えられた。

前述のようにタウは軸索伸長に必須と考えられていたことから、我々は海馬培養神経細胞の軸索伸長を観察した (Fig.4 A-C)。すると、コントロール (Fig.4 A) とホモ接合体 (Fig.4 B) との間で軸索伸長には差がないようにみえた。そこで、軸索を伸長している細胞の割合を時間を追って計測したところ¹²⁾、コントロ

Fig.2 Immunohistochemical staining of sections of adult $\tau^{+/+}$ and $\tau^{-/-}$ cerebellum. Comparable sagittal sections of $\tau^{+/+}$ (a, c, e, g, i, k, m) and $\tau^{-/-}$ (b, d, f, h, j, l, n) mice were reacted with antibodies against tau (a, b), MAP1A (c, d), MAP1B (e, f), MAP2 (g, h), tubulin (i, j), actin (k, l), NF-M (m, n). With tau-1 antibody, molecular layer and white matter are intensely stained in $\tau^{+/+}$ cerebellum (a). In $\tau^{-/-}$ cerebellum (b), staining was not observed. Staining was identical between $\tau^{+/+}$ and $\tau^{-/-}$ sections with antibodies against other cytoskeletal proteins (c-n).

Fig.3 (A,B) Decreased MT density in $\tau^{-/-}$ parallel fiber axons. Electron micrographs compare representative areas of molecular layer in cerebellum of (A) $\tau^{+/+}$ and (B) $\tau^{-/-}$ animals. Arrows indicate MTs in parallel fiber axons. The MT density was reduced in $\tau^{-/-}$ axons compared to $\tau^{+/+}$ axons. Bar, 300 nm. (C-F) Quick-frozen, Deep-etched parallel fiber axons of $\tau^{+/+}$ and a $\tau^{-/-}$ mouse. (C) A parallel fiber of a $\tau^{+/+}$ mouse. A few MTs run parallel to each other in the axon, and numerous short crossbridges between them are apparent (open arrows). Crossbridges between MTs and axonal plasma membrane are also apparent (arrows). (D-F) Parallel fibers of a $\tau^{-/-}$ mouse. (D) Two MTs (long open arrows) run parallel to each other for some distance without short crossbridges. Note that the crossbridges between MTs and axonal plasma membrane are still apparent (arrows). (E) Axons which contain only one MT are frequently observed (long open arrow). The crossbridges between MT and plasma membrane are also apparent (arrow). (F) A MT and a neurofilament (long open arrow) are running parallel in the axon. Crossbridges between MT and IF are evident (arrowheads). Bar, 100 nm.

Table 1 Quantification of MT Number and Density in Parallel Fiber Axons of Homozygous Mutant and Control Mice

Diameter ^b	50-99 nm			100-149 nm		
	No. of MTs	MT density ^c	No. of Axons	No. of MTs	MT density ^c	No. of Axons
T3-1 ^a +/+	2.00*	3.38	71	2.23	1.79	56
-/-	1.69	2.98	29	2.00	1.65	19
T3-2 ^a +/+	2.18***	3.34*	38	2.37***	1.86**	51
+/-	1.85*	2.98	26	2.41***	1.88**	27
-/-	1.54	2.72	39	1.67	1.36	33
U5 ^a +/+	2.04**	3.55**	23	2.20	1.67	20
+/-	1.61	2.91*	61	2.16	1.65	31
-/-	1.42	2.04	12	1.87	1.40	31

^aMouse lines derived from two different ES cell clones (T3 and U5) were examined. Two sets of experiments (T3-1,2) were performed from the T3 derived mouse line and one set (U5) was performed from the U5 derived mouse line. In one set of experiments age-matched littermate mice were used.

^bAxons were divided into two groups (50-99 and 100-149 nm) according to their shorter diameter.

^cMTs/10⁴ nm².

The number of MTs and MT densities in this table are averaged from axons whose numbers are indicated in the third column (No. of Axons). Student's t-test was used to determine the significance of the changes. * Different from the values of -/- at $p < 0.05$, ** Different from the values of -/- at $p < 0.01$, *** Different from the values of -/- at $p < 0.001$

ールとホモ接合体の間で、全く差が認められなかった (Fig.4C)。このことから、タウは軸索伸長に必須ではないことが明らかとなった。

次に我々は、タウの欠失がマウスの高次機能に与える影響をみるため、行動学的解析を行った。まず、タウ欠失マウスにおいて、小脳の平行線維に形態的变化が認められたことから、小脳機能を調べるため、マウスを幅の狭い板や丸い棒の上を渡らせるテストを行ったが、ホモ接合体もコントロールと同じく、下におちることなくテストを遂行できた。又飼育中に若干の筋力低下を疑わせる所見が観察されたため、筋力テストをさらに詳しく行った。まず、瞬発力を主体とした筋力をみるテストである懸垂テストを行った (Fig.5)。これはマウスを前足だけでワイヤーにつかまらせ 20 秒以内に後ろ足をワイヤーにかけられるか否かをみるテストだが、野生型で 100% の個体が成功したのに対し、ホモ接合体では約 30% の個体しか成功しなかった。次に持続力をみるテストとして金網につかまらせ 20 秒のくらい長い時間つかまっていられるかを測定したところ (Fig.6)、野生型では、20 分以上つかまっていたことができたのに対し、ホモ接合体では、約 10 分しか

つかまることができなかった。次に一般的活動性および活動パターンと学習について調べた。一般的活動性については、ホモ接合体で若干の低下がみられたが、野生型に比べ有意差はなかった。活動パターンについても、ホモ接合体の一部については、野生型と変わりなく、オープンフィールド箱をまんべんなく動き回ったが、一部のホモ接合体については、ある一部の場所だけを動き回る傾向がみられた (Fig.7)。学習について我々は 8 方向型放射状迷路を行ったが、特に、野生型とホモ接合体の間で学習能力に有意差は認められなかった。これらの結果から、タウ欠失が何らかの形で筋力や活動性やパターンに関係している可能性が示唆された。

考 案

結論として、タウは軸索伸長に必須ではないが、小脳の平行線維中の微小管の安定性と微小管間の架橋の形成に重要な役割を果たすことが明らかとなった。微小管の安定性に関しては我々は二つの一見異なる結果を得た。一方でタウは微小管の安定性に影響しないというもので、これはホモ接合体において①視神経や坐骨神経において微小管数に変化がみられないこと、②後

C

Hippocampus without nocodazole

Fig.4 Axonal elongation of hippocampal neurons. (A)(B) Phase micrographs of hippocampal cells in culture at 1.0 day after plating. (A) Control ($\tau^{+/-}$) cells. (B) $\tau^{-/-}$ cells. Some cells are at stage 3 of development (stage of axonal elongation) (arrows). Some stage 2 (stage of minor processes) cells are also present (arrowheads). Note that there is no significant difference in cell polarization between (A) and (B). (C) Hippocampal neurons from $\tau^{+/-}$ ($n=3$; mean $\pm$ SD) ($\square$) and $\tau^{-/-}$ ($n=3$) ($\diamond$) mice were photographed and the percentage of cells in stage 3 was measured.

根神経節において、微小管のターンオーバーに変化がみとめられないこと（今回未提出のデータ）、③微小管脱重合剤であるノコダゾール存在下で海馬培養神経細胞の軸索形成・維持に異常が認められないこと、によって支持される。その一方で、全チューブリン量が変わらないが、小脳の微小管数が減少するという現象

がみられた。（これからチューブリン（モノマー）と微小管（ポリマー）間の平衡がタウ不在下でチューブリンの方に傾いたと考えられるのだが）これらの矛盾は、おそらく、細い軸索中ではタウが全 MAPs の中で大きな割合を占めるのに対し、太い軸索中ではタウ以外の MAPs (MAP1A・1B など) の割合が大きくな

Fig.5 Percent of the mice succeeding in traction test. Both forelimbs were placed on the wire and if they place their hindlimbs on the wire within two minutes they are considered to succeed in the task. The percent of wild-type (+/+), heterozygote (+/-), and homozygote (-/-) was shown as vertical bars (filled bars, males; open bars, females).

Fig.6 Time till falling off an inclined (80°-85°) screen. The time of wild-type (+/+), heterozygote (+/-), and homozygote (-/-) was shown as vertical bars (filled bars, males; open bars, females).

Fig.7 Moving pattern of wild-type mice (A,B) and homozygotes (C,D) in an open field box.

るためタウの欠失だけでは微小管に大きな影響が及ばないからと考えることができる。さらにタウ欠失マウスにおいて MAP1A の量の増加がみられることから、この MAP1A の増加がタウ欠失を代償していることも考えられる。又、今回の実験からタウが軸索伸長に必須であるというアンチセンス DNA による推論⁹⁾が否定されたわけであるが、その原因としてはアンチセンス DNA がタウ合成を阻害するだけでなく、他の軸索伸長に重要な経路を阻害している可能性が考えられる。最後に、タウ欠失マウスの筋力低下（や活動性および活動パターンの異常）についてはその原因は不明であるが、マウスの筋肉量や ATPase などを用いた組織化学では、速筋・遅筋の比に大きな差は認められないため、神経原性である可能性もある。

文 献

- 1) Olmsted, J.B. : *A. Rev. Cell. Biol.*, **2**, 421 (1986)
- 2) Cleveland, D.W., Hwo, S.Y. and Kirschner,

- M.V. : *J. Mol. Biol.*, **116**, 207 (1977)
- 3) Hirokawa, N., Shiomura, Y. and Okabe, S. : *J. Cell Biol.*, **107**, 1449 (1988)
- 4) Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N.J. and Hirokawa, N. : *Nature*, **360**, 674 (1992)
- 5) Kanai, Y. et al. : *J. Cell Biol.*, **109**, 1173 (1989)
- 6) Caceres, A. and Kosik, K.K.S. : *Nature*, **343**, 461 (1990)
- 7) Thomas, K.R. and Capecchi, M.R. : *Cell*, **51**, 503 (1987)
- 8) Bradley, A. : In *A Practical Approach* (Robertson, E.J. ed.), IRL, Oxford, pp. 113-152 (1987)
- 9) Harada, A., Sobue, K. and Hirokawa, N. : *Cell Struct. Funct.*, **15**, 329 (1990)
- 10) Goslin, K. and Banker, G. : In *Culturing Nerve Cells*, MIT Press, Cambridge, pp. 251-282 (1991)
- 11) 二木宏明, ほか : 生体の科学, **45**, 418 (1994)
- 12) Dotti, C.G., Sullivan, C.A. and Banker, G. : *J. Neurosci.*, **8**, 1454 (1988)