



國立臺灣大學理學院化學系

碩士論文

Department of Chemistry

College of Science

National Taiwan University

Master Thesis

Tau 蛋白寡聚體的製備與特性研究

Preparation and characterization of Tau protein oligomers

許詠翔

Yung-Hsiang Hsu

指導教授：陳振中 博士

Advisor: Jerry Chun Chung Chan, Ph.D.

中華民國 111 年 9 月

September 2022



中文摘要



阿茲海默症目前仍是一種無法治療的神經退化性疾病，由過度磷酸化之 Tau 蛋白所形成的神經纖維糾結是其病理特徵之一。近年來有越來越多證據指出，僅神經纖維糾結的形成就足以導致神經退化。纖維形成之前的中間態寡聚體具有更強的細胞毒性，且 Tau 寡聚體可能在神經元之間傳遞並誘導相鄰細胞中的 Tau 蛋白錯誤折疊，這對於阿茲海默症的形成具有關鍵性的病理意義，而本研究的最終目標是開發抑制寡聚體形成或促進清除寡聚體的藥物。

目前對於 Tau 寡聚體的定義與大小仍不明確，以及寡聚體的不穩定性，使其難以研究。儘管過去研究中已經有不同方法來製備 Tau 寡聚體，但要製備與阿茲海默症患者構型相似的重組 Tau 寡聚體仍然是一個巨大的挑戰。現在用於探測 Tau 寡聚體構型的唯一可用工具是構型專一性抗體。

在本研究中，我們從大腸桿菌表達系統製備出非常高純度的 tau 蛋白 (2N4R, 441 aa)，並以肝素誘導 Tau 蛋白錯誤折疊，而肝素是一種已知能觸發 Tau 蛋白聚集的聚陰離子。我們優化了誘導條件，以最大化寡聚體的產率，透過粒徑篩析層析法 (SEC) 測定，並獲得了一段連續分佈的寡聚體，範圍從 300 KDa 到 3 MDa (7-mer 到 70-mer)，具有和阿茲海默症患者腦中寡聚體相似的構型抗原決定位，能被構型專一性 Tau 抗體 Alz-50、TOMA 和 T22 辨認。

在粒徑篩析層析光譜圖中，Tau 寡聚體波峰位置對應於斯托克斯半徑 (R_s) 18.0 nm，此 Tau 寡聚體在分析級超高速離心下，沉降曲線在 24.5S 左右達到峰值。且透過穿透式電子顯微鏡觀察到 Tau 寡聚體為顆粒狀聚集體，而不是棒狀原纖維。根據 Siegel-Monte 公式分析，我們製備佔比最多的寡聚體分子量為 1.85 MDa (~40 mer)，類似於從阿茲海默症患者腦中分離出的 Tau 寡聚體的大小。透過開發這些方法，我們以合理的產率獲得了毫克級約 20-40 個蛋白質分子組成的顆粒狀 Tau 寡聚體。它們具有類似於阿茲海默症患者大腦中發現的 Tau 寡聚體的構型抗原決定

位，這有助於未來針對 tau 寡聚體的藥物開發。

關鍵字：Tau 寡聚體、肝素、粒徑篩析層析法、構形辨識抗體、分析級超高速
離心、穿透式電子顯微鏡



Abstract



Alzheimer's disease (AD) is still an untreatable neurodegenerative disease. Neurofibrillary tangles (NFTs) formed by hyperphosphorylated tau protein is one of its key pathological features. In recent years, increasing evidence has shown that the formation of neurofibrillary tangles alone is sufficient to cause neurodegeneration. The oligomeric intermediates that precede fibril formation have stronger cytotoxicity, and tau oligomers may transmit between neurons and induce tau misfolding in neighboring cells, a key pathological process in the progression of AD. The ultimate goal of this study is to develop drugs that can inhibit oligomer formation or promote oligomer clearance.

At present, the definition of tau oligomers and their size range remain unclear. The instability of tau oligomers makes them difficult to study. Although different methods for preparing tau oligomers have been previously reported, it remains a great challenge to prepare recombinant tau oligomers with similar conformations as those found in AD patients. Currently, the only available tools to probe tau oligomer conformations are conformation-specific antibodies.

In this study, we started with very high purity tau proteins (2N4R, 441 aa) prepared from *E. coli* expression system. Tau misfolding was induced by heparin, a polyanion known to trigger tau aggregation. We optimized the induction condition to maximize the yield of oligomeric species, as determined by size-exclusion chromatography (SEC). We obtained a continuum of oligomeric species that range from 300 KDa to 3 MDa (7-mer to 70-mer), and they share conformational epitopes found on oligomers from AD patient brains, recognized by conformational tau antibodies Alz-50, TOMA, and T22.

The tau oligomer peak position in the SEC chromatogram corresponded to the Stokes radius (R_s) of 18.0 nm. When this peak fraction was submitted to analytical

ultracentrifugation, the sedimentation profile peaked around 24.5S. Under transmission electron microscopy, they appeared as granular aggregates rather than rod-like protofibrils. According to Siegel-Monte analysis, the most abundant species in our preparation has a molecular weight of 1.85 MDa (~40-mer), similar to the size of tau oligomers isolated from AD patient brains. By developing these protocols, we obtained granular tau oligomers with around 20-40 protein units at milligram scale with a reasonable yield. They carry conformational epitopes similar to tau oligomers found in AD patient brains, which is useful for future drug development targeting tau oligomers.

Keyword: Tau oligomer, heparin, size-exclusion chromatography, conformational antibody, analytical ultracentrifugation, transmission electron microscopy

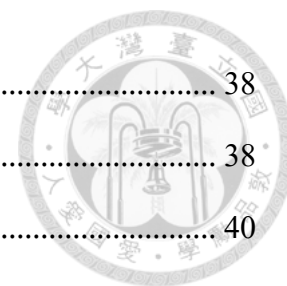
目錄



口試委員會審定書	I
中文摘要	II
Abstract	IV
圖目錄	IX
表目錄	XI
縮寫表	XII
第一章 緒論	1
1.1 阿茲海默症	1
1.1.1 阿茲海默症介紹	1
1.1.2 類澱粉蛋白假說	2
1.1.3 Tau 蛋白假說	4
1.2 Tau 寡聚體	5
1.2.1 Tau 寡聚體的重要性	5
1.2.2 Tau 蛋白的誘導方法	6
1.2.3 Tau 寡聚體大小	8
1.2.4 Tau 寡聚體的毒性	8
1.3 Tau 寡聚體的純化	9
1.3.1 蔗糖梯度離心法	9
1.3.2 粒徑排阻層析法	11
1.4 Tau 寡聚體的分析	11
1.4.1 Tau 寡聚體的尺寸及形貌	11
1.4.2 Tau 寡聚體鑑定	12
1.5 研究動機	13

第二章	實驗材料與方法	14
2.1	實驗材料與實驗儀器	14
2.1.1	化學藥品與試劑	14
2.1.2	耗材與套組	15
2.1.3	一級抗體	15
2.1.4	二級抗體	16
2.1.5	實驗儀器	16
2.2	Tau 蛋白的製備	17
2.3	Tau 蛋白的誘導條件	18
2.4	硫黃素螢光偵測	18
2.5	粒徑篩析層析法	19
2.5.1	製備級 SEC 管柱(HiPrep 16/60 Sephacryl S-500 HR).....	20
2.5.2	分析級 SEC 管柱(Agilent Bio SEC-5).....	21
2.6	斑點印跡法	22
2.7	動態光散射粒徑分析儀	24
2.8	穿透式電子顯微鏡	25
2.9	分析級超高速離心	26
2.10	Siegel-Monte 分析法	28
第三章	研究結果與討論	29
3.1	誘導 Tau 蛋白方法與鑑定	29
3.1.1	以肝素誘導 Tau 蛋白聚集	29
3.2	使用製備級 SEC 純化 Tau 聚集物	34
3.2.1	製備級 SEC.....	34
3.2.2	斑點印跡法鑑定	36
3.2.3	以動態光散射粒徑分析儀分析 Tau 聚集體	37

3.3 利用分析級 SEC 純化 Tau 聚集物	38
3.3.1 分析級 SEC	38
3.3.2 斑點印跡法鑑定	40
3.4 以分析級 SEC 分析寡聚體大小	42
3.5 Tau 寡聚體之 TEM 鑑定	43
3.6 以分析級超高速離心分析 Tau 寡聚體	45
3.7 以 Siegel-Monte 分析法分析 Tau 寡聚體	46
第四章 結論與未來展望	48
4.1 論文總結	48
4.2 未來展望	49
參考文獻	50
附錄	57
附錄 A 以製備級 SEC 管柱分離蛋白質標準品	57
附錄 B 以分析級 SEC 管柱分離標準品	59



圖目錄



圖 1.1 全球阿茲海默症患者的人口預測圖[4]	1
圖 1.2 前類澱粉蛋白質 (APP) 水解途徑示意圖[10]	3
圖 1.3 阿茲海默症之 Braak 分期[19]	4
圖 1.4 以蔗糖梯度離心純化人類額葉皮層 Tau 寡聚體之 AFM 圖[27]	5
圖 1.5 Tau 寡聚體可能對細胞所造成的影響[24]	9
圖 1.6 蔗糖梯度離心示意圖與各層蔗糖溶液之 AFM 圖[29]	10
圖 1.7 利用 ELISA 分析抗體 T22 與 TOMA 對 Tau 寡聚體之專一性	13
圖 2.1 ThT 分子與其螢光光譜	19
圖 2.2 SEC 示意圖	20
圖 2.3 Dot blot 流程示意圖	22
圖 2.4 TEM 明場與暗場成像原理	25
圖 2.5 AUC 之使用模式[57]	27
圖 3.1 在不同 pH 值下，以肝素誘導 Tau 蛋白聚集之 ThT 螢光分析	30
圖 3.2 以不同肝素比例誘導 Tau 蛋白聚集之 ThT 螢光分析	31
圖 3.3 提高 Tau 蛋白濃度之 ThT 螢光分析	32
圖 3.4 高離子強度對 Tau 蛋白聚集影響之 ThT 螢光分析	33
圖 3.4 利用肝素誘導之 Tau 蛋白聚集物經製備級 SEC 管柱之純化層析圖	35
圖 3.5 斑點印跡法鑑定製備級 SEC 純化後之 Tau 蛋白與其聚集物	36
圖 3.6 以 DLS 鑑定 Tau 蛋白聚集體	37
圖 3.7 利用肝素誘導之 Tau 蛋白聚集物經分析級 SEC 管柱之純化層析圖	39
圖 3.8 斑點印跡法鑑定分析級 SEC 純化後之 Tau 蛋白與其聚集體-第一組	41
圖 3.9 斑點印跡法鑑定分析級 SEC 純化後之 Tau 蛋白與其聚集體-第二組	41
圖 3.10 分析級 SEC 純化 Tau 寡聚體之層析圖	42

圖 3.11 經製備級 SEC 純化後 Tau 寡聚體之 TEM 影像.....	43
圖 3.12 經分析級 SEC 純化後 Tau 寡聚體之 TEM 影像	44
圖 3.13 AUC 之分子沉降係數分佈圖.....	45
圖 3.14 將經由分析級管柱之蛋白質標準品以沖提時間對 R_s 作圖.....	46
附圖 1 以製備級粒徑排阻層析管柱分離蛋白質標準品	57
附圖 2 以分析級粒徑排阻層析管柱分離標準品	59

表目錄



表 2.1 使用藥品與試劑	14
表 2.2 耗材與套組總覽	15
表 2.3 一級抗體	15
表 2.4 二級抗體	16
表 2.5 實驗儀器總覽	16
表 2.6 Tau 蛋白誘導條件	18
表 2.7 管柱規格	21
表 2.8 Dot blot assay 使用溶液之配方	23
表 2.9 蛋白質理論分子量與 Siegel-Monte 分析法推得之分子量比較	28
表 3.1 蛋白質標準品之分子量、沖提時間與 Stokes radius	47
附表 A.1 以製備級 SEC 分離不同蛋白質標準品之 Retention time	58
附表 B.1 以分析級 SEC 分離不同蛋白質標準品之 Retention time	60

縮寫表



縮寫	全名
A β	beta amyloid
AD	Alzheimer's disease
AFM	Atomic Force Microscope
APP	Amyloid Precursor Protein
AUC	Analytical ultracentrifugation
BSA	Bovine serum albumin
DLS	Dynamic light scattering
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Hep	Heparin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MOPS	4-Morpholinepropanesulfonic acid
NFTs	Neurofibrillary tangles
PBS	Phosphate buffered saline
PHFs	Paired helical filaments
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
PTA	Phosphotungstic acid
SEC	Size exclusion chromatography
TEM	Transmission electron microscopy
ThT	Thioflavin T

第一章 緒論



1.1 阿茲海默症

1.1.1 阿茲海默症介紹

西元 1906 年，德國的 Alois Alzheimer 醫師首次在失智症患者腦中發現腦部萎縮、斑塊沉積 (plaque deposit) 及神經元纖維纏結 (neurofibrillary tangles) 等特徵，後人便將此疾病命名為阿茲海默症 (Alzheimer's disease, AD)[1]。阿茲海默症是最常見的神經退化性疾病，在所有失智症病例中大約佔五至七成，早期病徵為短期記憶的喪失與認知能力下降[2]，隨著時間不斷惡化，患者可能會出現長期記憶喪失、語言能力喪失和行為障礙等症狀，最終因身體機能下降進而導致死亡。根據估計，在 2021 年罹患阿茲海默症在內的失智症總人口數超過 5500 萬，且是所有疾病中第七大死亡原因[3]，而隨著全球人口老化，預估 2050 年全球罹患阿茲海默症患者將會超過 1 億人[4]。

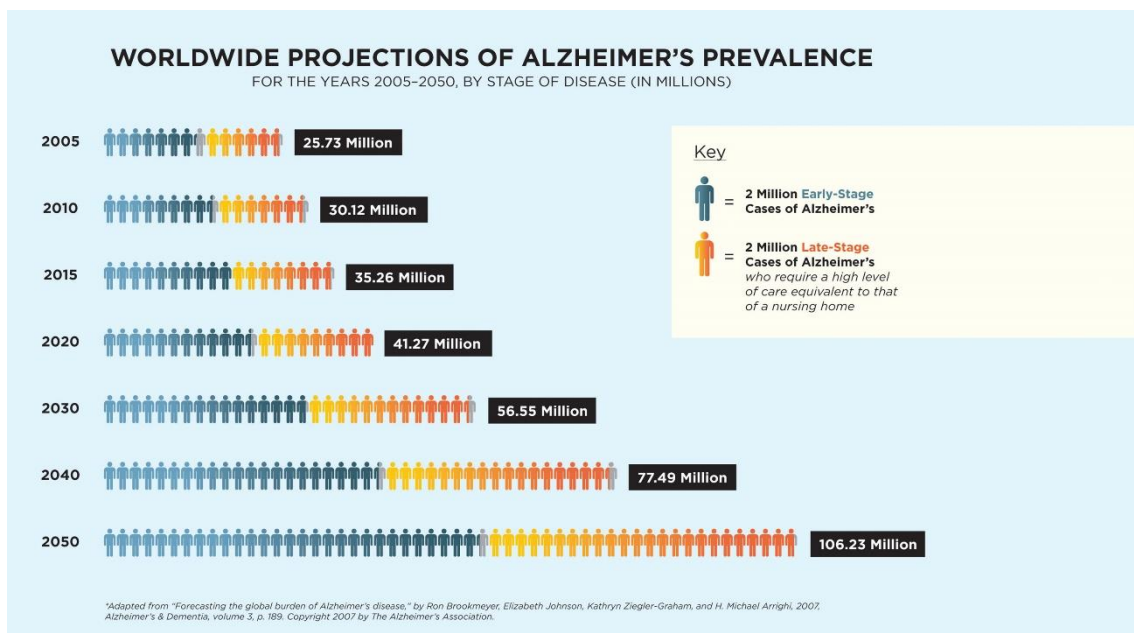


圖 1.1 全球阿茲海默症患者的口預測圖[4]



在阿茲海默症患者的大腦中尤其是海馬迴 (hippocampus) 以及皮質區會出現萎縮的現象[5]，且根據神經病理學的研究，常在患者腦中發現斑塊沉積與神經元纖維纏結，斑塊沉積是由乙型類澱粉蛋白 (beta amyloid, A β) 在細胞外聚集並形成難溶於水的沉積物，而神經元纖維纏結則是由過度磷酸化的 Tau 蛋白在細胞內聚集而成[6]。目前主要有兩種假說：類澱粉蛋白假說和 Tau 蛋白假說來嘗試解釋阿茲海默症的病因。

1.1.2 類澱粉蛋白假說

1984 年 Glenner 和 Wong 從斑塊沉積中純化出乙型類澱粉蛋白 (beta amyloid, A β) 並定出其胺基酸序列[7]，成為後人研究 A β 的開端。乙型類澱粉蛋白堆積是由前類澱粉蛋白質 (Amyloid Precursor Protein, APP) 錯誤剪切造成[8]，而 APP 有 2 種分解途徑：非澱粉樣蛋白水解和澱粉樣蛋白水解，正常代謝狀況為非澱粉樣蛋白水解途徑，APP 會被會被 α -分泌酶 (α -secretase) 與 γ -分泌酶 (γ -secretase) 剪切，此時產生的胜肽 (peptide) 不會聚集；若是經由澱粉樣蛋白水解途徑，APP 會被 β -分泌酶 (β -secretase) 與 γ -分泌酶剪切，而產生難以溶解的 A β 胜肽[9]，根據 γ -分泌酶切割位置的不同，形成不同胺基酸長度的 A β 胜肽，其中 A β_{40} 佔比最高，其次是 A β_{42} ，而乙型類澱粉蛋白堆積主要由 A β_{42} 組成[8]。

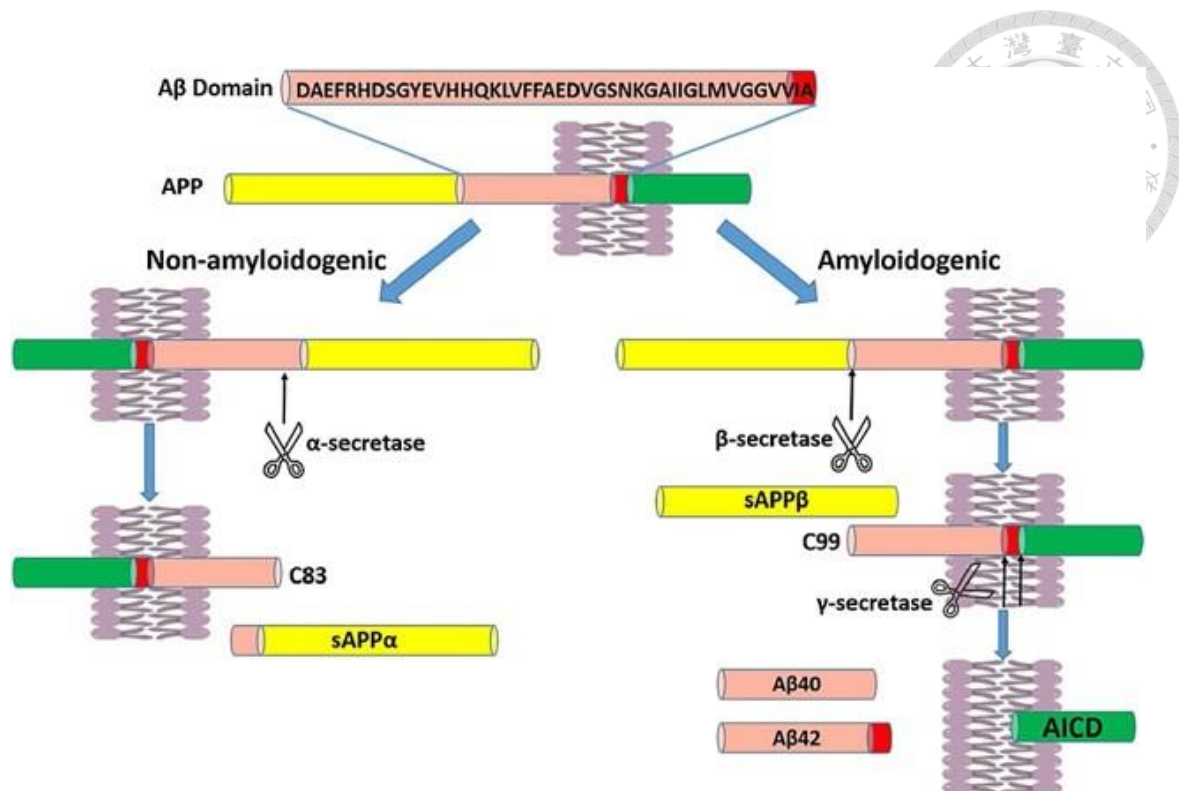


圖 1.2 前類澱粉蛋白質 (APP) 水解途徑示意圖[10]

1989 年，Yankner 等人發現 Aβ 具有神經毒性，且在阿茲海默症患者腦中能發現大量類澱粉蛋白沉澱[11]。於是在 1992 年，Hardy 和 Higgins 提出澱粉樣級聯假說 (amyloid cascade hypothesis)，認為 Aβ 失衡並在腦中沉積是導致阿茲海默症的關鍵步驟，並造成許多下游細胞和分子產生變化，例如：膠質細胞和星形細胞增生、神經萎縮等，甚至促使 Tau 蛋白過度磷酸化，使其在細胞內形成神經原纖維纏結 (neurofibrillary tangles)，最終導致神經細胞死亡。從造成早發性阿茲海默症的三種體染色體顯性突變：澱粉樣前體蛋白 (APP)、早老素 1 (PSEN1) 和早老素 2 (PSEN2) 皆與 Aβ 肽生成有關，似乎可以支持澱粉樣級聯假說[12]。然而，有越來越多研究顯示 Aβ₄₂ 寡聚體的細胞毒性比纖維更強，且能活化膠質細胞和星形細胞，甚至可能直接對神經突觸造成損傷[13]，讓這個假說將致病原因逐漸轉向可溶性的寡聚體。



1.1.3 Tau 蛋白假說

Tau 蛋白是一種微管相關蛋白，能夠調節微管蛋白的穩定性。在阿茲海默症患者腦中能觀察到神經元纖維纏結的病理特徵，其主要是由於 Tau 蛋白過度磷酸化後聚集所造成[14]。Tau 蛋白的病理學是根據 1991 年 Braak 和 Braak 以神經元纖維纏結的變化將阿茲海默症病程分為六個階段，先出現在橫內嗅皮質區 (transentorhinal cortex) (階段 I 和 II)，然後擴散到海馬迴與邊緣區域 (limbic region) (階段 III 和 IV)，最後是新皮質區 (neocortex) (階段 V 和 VI) [15]，阿茲海默症發病過程與 Tau 病理特徵的傳播方式與密切相關，而不是 A β 斑塊沉積[16]。此外，過去研究發現在偶發性阿茲海默症中，Tau 蛋白的病變比 A β 斑塊還要早形成，且磷酸化的 Tau 蛋白可能會促使 APP 產生 A β [17]。近幾年發現錯誤折疊的 Tau 蛋白能夠以類似普里昂蛋白 (prion-like) 傳播的方式，在神經細胞間傳播，並促使錯誤折疊的 Tau 蛋白聚集，最終導致神經原纖維纏結的形成[18]。

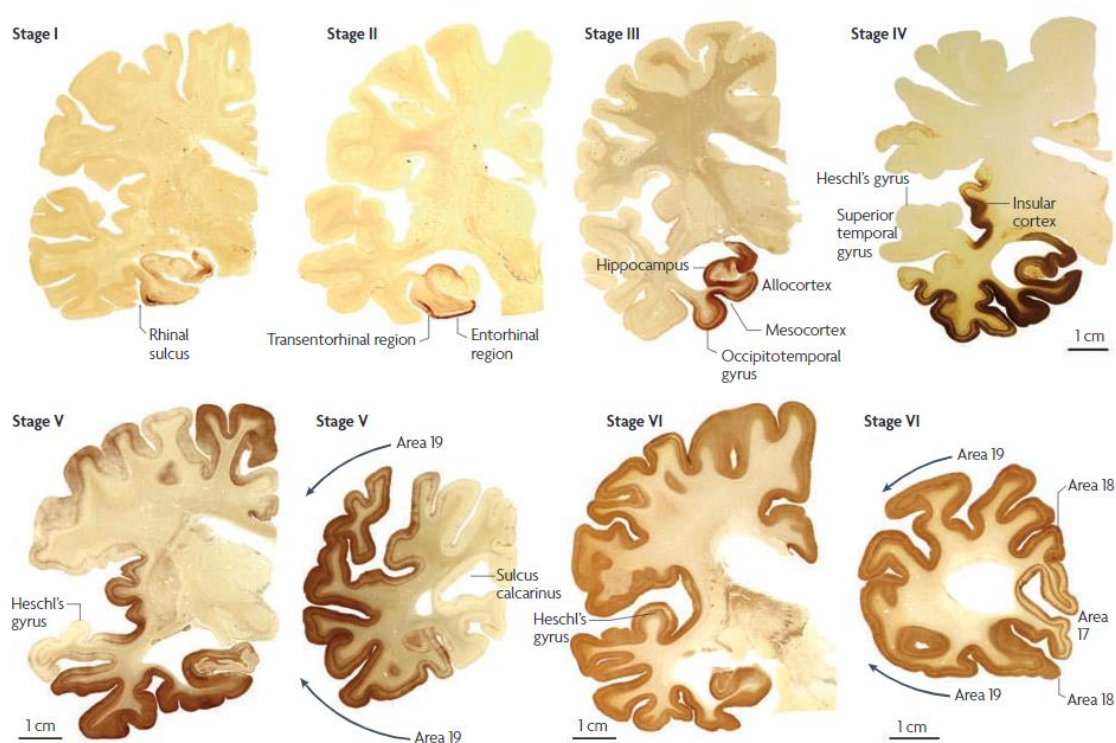


圖 1.3 阿茲海默症之 Braak 分期[19]



1.2 Tau 寡聚體

1.2.1 Tau 寡聚體的重要性

過去的研究認為神經元纖維纏結是造成神經毒性的原因，因為它們與認知能力下降和神經元缺損密切相關[20]。然而，在一些過度表達 Tau 蛋白的動物模型中，神經退化已在無神經元纖維纏結存在的情況下得到證實[21]。不溶性神經元纖維纏結的形成被認為是一種保護機制，而不是 Tau 蛋白病變（Tauopathies）中神經元死亡的必要前兆[22]。而神經系統中的 Tau 蛋白能以多種形式出現，發揮生理功能，但它也可以表現出病理活性[23]，近年來有越來越多證據指出，或許 Tau 寡聚體是神經退行性疾病中 Tau 蛋白的毒性形式[24]。Tau 寡聚體主要由高度磷酸化或病理性截短的 Tau 蛋白組成[25]，也觀察到由全長 Tau 蛋白所組成的高階寡聚體[26]。另外，在阿茲海默症患者的腦組織中還發現了由大約 40 個 Tau 蛋白分子組成的顆粒狀 Tau 寡聚體，並觀察到顆粒狀寡聚體在神經元纖維纏結形成之前就已經出現在神經元內，結果顯示寡聚體在阿茲海默症的早期階段就能被檢測到[27-29]

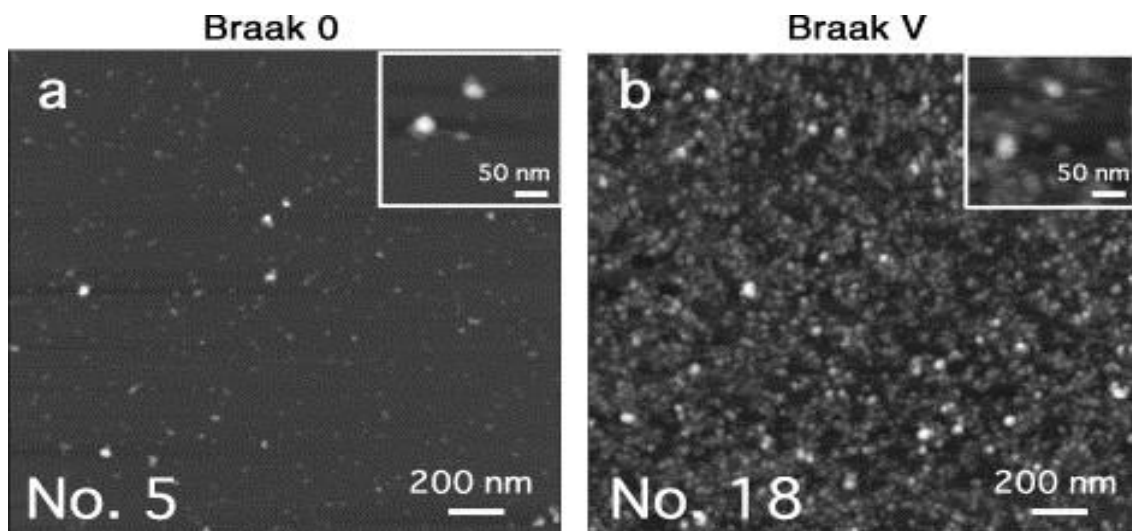


圖 1.4 以蔗糖梯度離心純化人類額葉皮層 Tau 寡聚體之 AFM 圖[27]

(a)為 Braak 階段 0 之大腦皮層純化後之 Tau 寡聚體；(b)為 Braak 階段 V 之大腦皮層純化後之 Tau 寡聚體。



1.2.2 Tau 蛋白的誘導方法

(A) 肝素誘導(Heparin-induced)

肝素是一種醣胺聚醣 (glycosaminoglycan)，為常見的硫酸乙醯肝素 (heparan sulfate) 的硫酸化類似物[30]，也是一種聚陰離子 (polyanion)。研究發現硫酸化的醣胺聚醣能夠活化磷酸化激酶 (kinase)來促使 Tau 蛋白磷酸化[31-33]，並聚集成類似 AD 患者腦中存在的 Tau 纖維結構[34]。從過去 in vitro 實驗中的結果發現，Tau 蛋白能透過其的正電荷區域-重複區域 (repeat domain) 與肝素的負電荷和進行靜電交互作用 (electrostatic interaction)，因此，Tau 蛋白的正電荷區域被肝素中和而降低淨電荷，穩定且提高 Tau 蛋白的聚合性[34, 35]。2007 年，Maeda 的團隊在 in vitro 環境下，成功利用肝素誘導全長 Tau 蛋白 (2N4R) 聚集成 Tau 寡聚體，在 37 °C 下，以 10 μ M 肝素誘導 10 μ M Tau 蛋白聚集[29]；另外，在 2012 年，Flach 等人一樣利用肝素誘導全長的 Tau 蛋白聚集，其使用較高的 Tau 蛋白濃度 (100 μ M) 與肝素濃度 (28.5 μ M) 進行誘導，透過 SEC 分離不同大小的 Tau 蛋白，並以層析圖的蛋白質波峰面積來量化不同種聚集的 Tau 蛋白相對含量，結果顯示 Tau 寡聚體含量在 6 小時後增加，並在 48 小時達到最大值[36]。

(B) 花生四烯酸誘導(Arachidonic acid-induced)

花生四烯酸是一種富含於大腦中的多元不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid)，1997 年，Wilson 與 Binder 發現花生四烯酸等長鏈的游離脂肪酸 (free fatty acids) 能在 in vitro 環境下使 Tau 蛋白聚集，利用花生四烯酸誘導全長的 Tau 蛋白 (2N4R) 聚集，在 37 °C 下培養 72 小時，並透過電子顯微鏡能觀察到 Tau 蛋白的絲狀結構[37]；在 1999 年，King 等人在室溫下，將花生四烯酸加入接近生理濃度的 Tau 蛋白 (2 μ M) 中發現可以誘導強烈的聚集反應，並透過 ThS 螢光分析結果，觀察其在幾分鐘內就導致 Tau 蛋白聚集[38]。2017 年，Kanaan 等人一樣利用花生四烯酸誘導 2 μ M Tau 蛋白，在室溫下誘導 6 至 18 小時後，再利用蔗糖梯度離心分

離不同大小的 Tau 聚集体，最後透過電子顯微鏡觀察 Tau 寡聚體會在 30%蔗糖溶液中[39]。



(C) RNA 誘導(RNA-induced)

1996 年，Kampers 等人發現 RNA 能在 in vitro 環境下誘導全長的 Tau 蛋白 (2N4R) 聚集成 PHFs (paired helical filaments) 結構，並認為 PHFs 組成與重複序列中的 Cys322 形成分子間雙硫鍵有關，且人腦中的六種 Tau 蛋白異構體都可以通過 RNA 誘導形成 PHF[40]；另外，在 2022 年，Zwierzchowski-Zarate 等人利用 Poly-A RNA 誘導 Tau 蛋白聚集，誘導一周後透過電子顯微鏡觀察到纖維結構[41]。

(D) A β ₄₂ 寡聚體誘導

2010 年，Lasagna-Reeves 等人利用交互引晶 (cross-seeding) 的方法，透過 A β ₄₂ 寡聚體誘導全長的 Tau 蛋白 (2N4R) 聚集，並經由粒徑排阻層析法分離不同大小的 Tau 蛋白，且純化後的 Tau 寡聚體細胞毒性明顯高於單體與纖維。且發現 A β ₄₂ 纖維與 A β ₄₂ 單體用相同的交互引晶方法培養並不能促使 Tau 蛋白聚集[42]。

(E) 剛果紅誘導(Congo Red-induced)

剛果紅是一種常見的小分子生物染色劑，在 2005 年，Chirita 等人利用剛果紅有效地誘導全長的 Tau 蛋白 (2N4R) 纖維化，並透過電子顯微鏡發現其形成較短 Tau 細絲[43]。在 2015 年，Liu 等人也利用剛果紅促使短片段的 Tau₂₄₄₋₃₇₂ 纖維化並形成細絲，並發現此聚集現象具有序列依賴性[44]。

(F) 其他誘導物質

其他能誘導 Tau 蛋白聚集的物質，包括聚陰離子，如聚穀氨酸(poly- glutamic acid)[45]、和一些脂肪酸，如亞麻油酸(linoleic acid)[46]；另外，一些染劑，如 thiazin red 也被發現能促使 Tau 蛋白纖維化[43]。



1.2.3 Tau 寡聚體大小

目前對 Tau 寡聚體大小仍未有明確的定義，主要還是依不同研究團隊而異。如 Maeda 的團隊，除了從人腦額葉皮質中純化出顆粒狀的 Tau 寡聚體，也在體外條件下誘導 Tau 蛋白聚集成顆粒狀的 Tau 寡聚體，兩者利用原子力顯微鏡 (Atomic Force Microscope, AFM) 下觀察直徑皆為 20 奈米左右，並透過蔗糖梯度離心法 (Sucrose gradient centrifugation) 發現體內和體外的顆粒狀 tau 寡聚體沉降係數相似[27]。Kayd 的團隊利用 A β 42 寡聚體進行交叉播種 (cross-seeding) 誘導 Tau 蛋白聚集，所誘導出的 Tau 寡聚體經西方墨點法與 (western blot) 與粒徑排阻層析法判斷為三聚體[47]。Patterson 的團隊，在阿茲海默病患的額葉中發現 180 kDa 的 Tau 寡聚體 (但其利用 SDS-PAGE 分離，並非實際大小)，另外也利用花生四烯酸 (arachidonic acid) 誘導出 Tau 寡聚體，並認為二聚體是聚集成 Tau 寡聚體前的一種中間體[48]。

1.2.4 Tau 寡聚體的毒性

在 2011 年，Lasagna-Reeves 等人將 Tau 寡聚體、Tau 纖維以及 Tau 單體分別注射到小鼠的海馬迴中，行為實驗結果觀察到注射 Tau 寡聚體的小鼠比注射纖維或單體的小鼠在研究熟悉的物體上所花費的時間較多，表示其記憶受損，無法識別熟悉的物體，此外，還利用免疫染色法來確認細胞毒性，實驗結果發現注射 Tau 寡聚體對於海馬迴確實具有很強的細胞毒性 (63% 的細胞顯示出受損跡象)，而注射 Tau 纖維雖然也顯示出一定程度的毒性 (不到 6.5%)，但遠低於 Tau 寡聚體所造成的細胞損傷[49]。另外，過去在早期阿茲海默症中發現到粒線體異常[50]，其可能在疾病進展中具有重要作用，而 Lasagna-Reeves 等人也確認了 Tau 寡聚體會降低 NADH-ubiquinone oxidoreductase (electron transport chain complex I) 的活性並活化與細胞凋亡之粒線體途徑相關的酵素 caspase-9，造成粒線體功能異常[49]。此外，過去研究發現 Tau 蛋白能存在於神經元細胞核中，且能保護 DNA 免受氧化壓力引起

的損傷、維持基因組的穩定性[51]與維持緻密的染色質結構[47]，而 Tau 寡聚體會使神經細胞的核膜不穩定並阻礙轉錄因子的運送，導致染色質結構受損、基因表達中斷[24, 47]，促使神經細胞死亡。

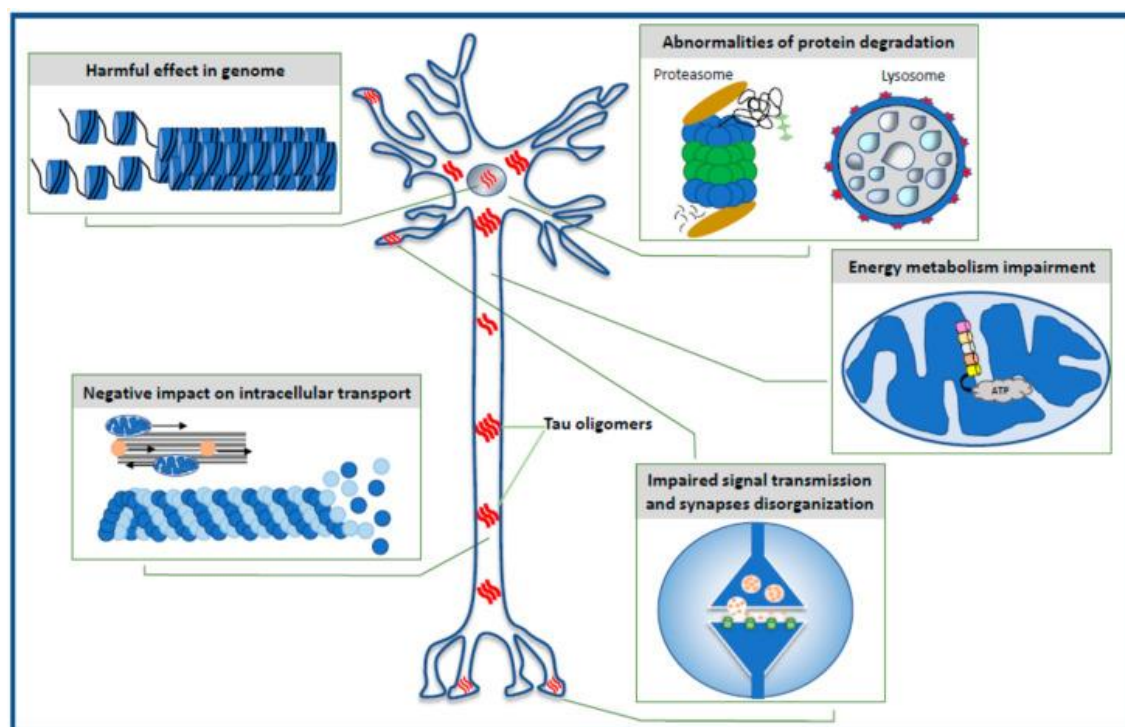


圖 1.5 Tau 寡聚體可能對細胞所造成的影響[24]

1.3 Tau 寡聚體的純化

1.3.1 蔗糖梯度離心法

蔗糖梯度離心法常用來分離不同大小的生物分子，如蛋白質、DNA、細胞胞器等，將樣品加入蔗糖梯度溶液上層，再利用離心力分離不同大小的物質，影響的因素包括分子量、形狀、密度等。過去曾有不同研究團隊利用蔗糖梯度離心法將 Tau 寡聚體分離出來，以 Maeda 團隊[29]為例，將用肝素誘導後的 Tau 聚集物加入已配置好蔗糖濃度梯度溶液的離心管，離心管中蔗糖溶液由上至下其濃度為低至高分

布 (20/30/40/50 %)，經過超高速離心 (200K xg)，使物質與蔗糖溶液沉降平衡後，分析不同蔗糖溶液層內的 Tau 蛋白，成功純化出顆粒狀的 Tau 寡聚體並發現大多位於 30 %蔗糖溶液層，後續 Kanaan 等人也利用同樣的方式成功純化出利用花生四烯酸誘導的 Tau 寡聚體[39]。

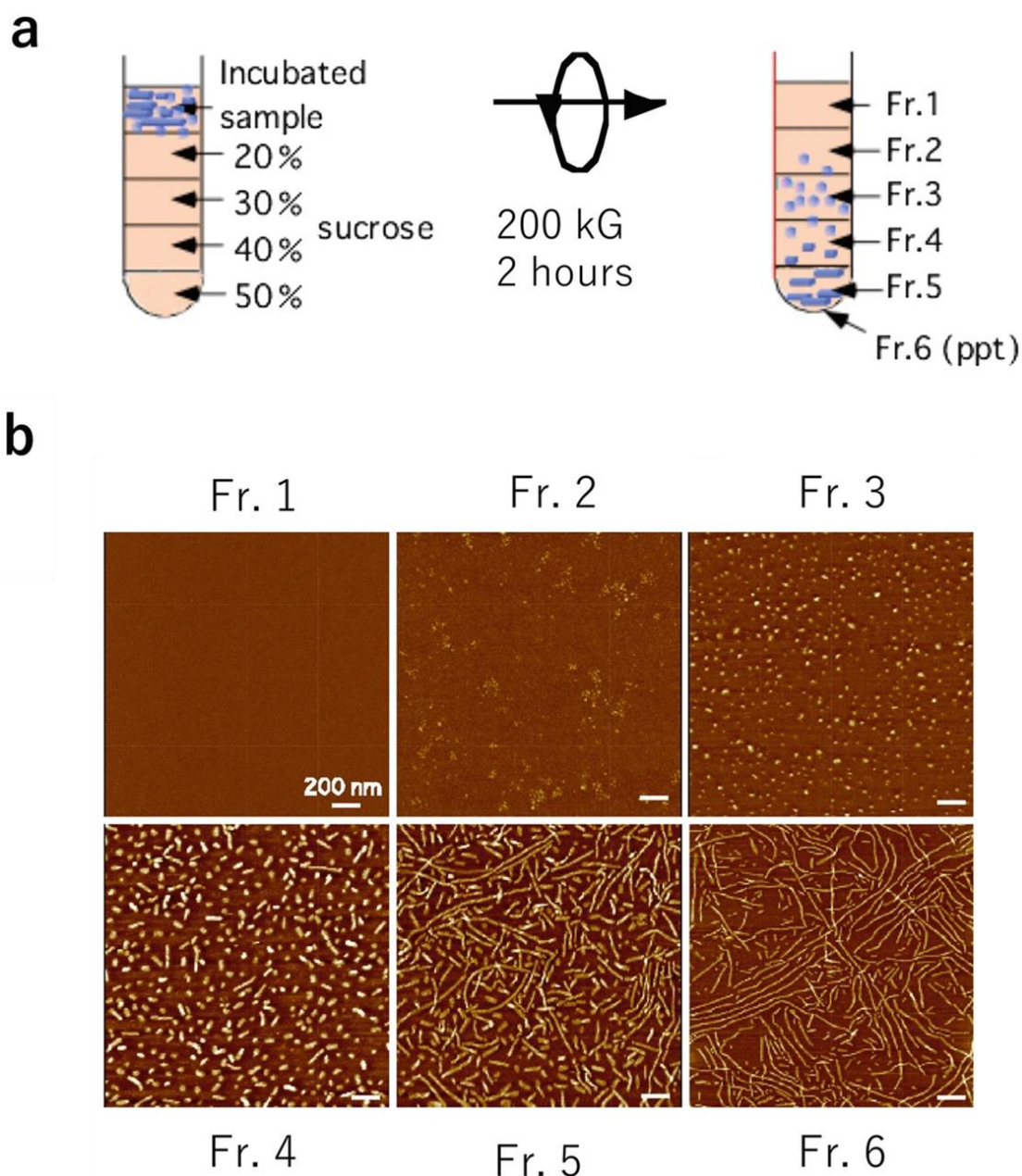


圖 1.6 蔗糖梯度離心示意圖與各層蔗糖溶液之 AFM 圖[29]

(a)將樣品透過不同蔗糖濃度(20/30/40/50 %)進行蔗糖梯度離心；(b)各層蔗糖溶之 AFM 圖，可觀察到聚集成不同結構的 Tau 蛋白聚集體，其中顆粒狀的 Tau 寡聚體主要位於 30 %的蔗糖溶液層。



1.3.2 粒徑排阻層析法

除了上述提到的蔗糖梯度離心法之外，另一種用來純化 Tau 寡聚體的方法是粒徑排阻層析法。以多孔材料 (porous materials) 作為固定相，液體作為流動相，而多孔材料的孔徑約在 50-2000 Å 左右；根據分子大小及形狀，利用多孔材料的分子篩選特性進行分離，大分子不易進入多孔材料內，因此會較早被沖提出來，小分子則較晚。Lasagna-Reeves 等人利用 A β 42 寡聚體交互引晶 Tau 蛋白進行誘導，並透過粒徑排阻層析法分離 Tau 寡聚體(三聚體)與 Tau 單體[42]；Flach 等人則利用肝素誘導 Tau 蛋白聚集，透過粒徑排阻層析法將 Tau 寡聚體(約 40 個單體大小)、Tau 單體等分離[36]。

1.4 Tau 寡聚體的分析

1.4.1 Tau 寡聚體的尺寸及形貌

現今對於 Tau 寡聚體大小及形貌分析主要透過原子力顯微鏡 (AFM) 與用穿透式顯微鏡 (TEM)，2006 年，Maeda 團隊將 Tau 寡聚體從阿茲海默症患者腦中純化後，以原子力顯微鏡進行分析，Tau 寡聚體尺寸落在 5-50 nm，平均約 20 nm[27]。Kanaan 等人利用花生四烯酸誘導 Tau 聚集，以蔗糖梯度離心法分離 Tau 寡聚體後利用穿透式顯微鏡分析大小，Tau 寡聚體尺寸落在 6-16 nm，平均約 12 nm[39]。另一個分析寡聚體大小的方法是動態光散射粒徑分析儀 (dynamic light scattering, DLS)，測量溶液中懸浮粒子粒徑大小，Flach 等人利用肝素誘導 Tau 聚集，並以粒徑排阻層析法純化 Tau 寡聚體後利用 DLS 測量粒徑大小，測得 Tau 寡聚體水合半徑約為 14 nm 左右[36]。



1.4.2 Tau 寡聚體鑑定

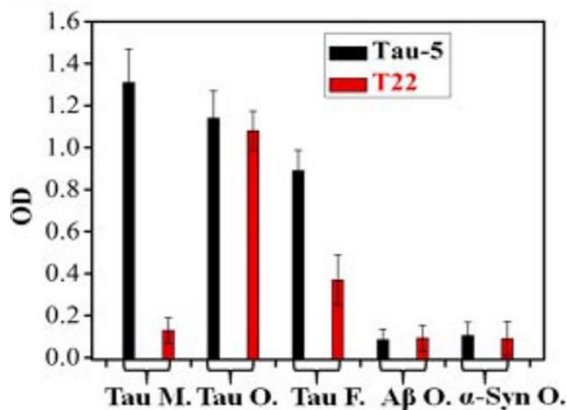
(A)鑑定方法

目前為止對於 Tau 寡聚體鑑定主要透過免疫分析法 (immunoassay)，如酵素免疫吸附測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、西方墨點法 (western blot assay) 和斑點印跡法 (dot blot assay) 等，皆是利用抗體和抗原之間的專一性，辨認樣品中的目標蛋白質或小分子。

(B)Tau 寡聚體抗體

目前能辨識 Tau 寡聚體的抗體有 TOC1、T22、TOMA 等；TOC1 由 Binder 團隊為了研究 Tau 蛋白的發病機制研發而成，其構型依賴之抗原決定位 (conformation-dependent epitope) 在 Tau(209-221)序列，且能選擇性辨認 Tau 蛋白的二聚體及寡聚體，不辨認單體及纖維[39]；T22 與 TOMA 皆為 Kaye 團隊所開發用來針對 Tau 寡聚體的抗體，T22 是以 A β ₄₂ 寡聚體誘導 Tau 蛋白聚集成 Tau 寡聚體做為抗原，以兔子為宿主開發而成的寡聚體抗體，其對 Tau 寡聚體具有構型專一性[6]；TOMA 則是以老鼠為宿主開發而成的寡聚體抗體，同樣對 Tau 寡聚體具專一性，不會辨認 Tau 單體、纖維、A β 單體以及 A β 寡聚體[38, 39]。另外，Davies 團隊製造的 Alz50 抗體能用來辨識 Tau 蛋白的構型改變 (conformation changes)，利用其能辨認不連續的 Tau 序列(2-10, 312-342)，來辨認 Tau 蛋白不正常的構型[40]。

(A)



(B)

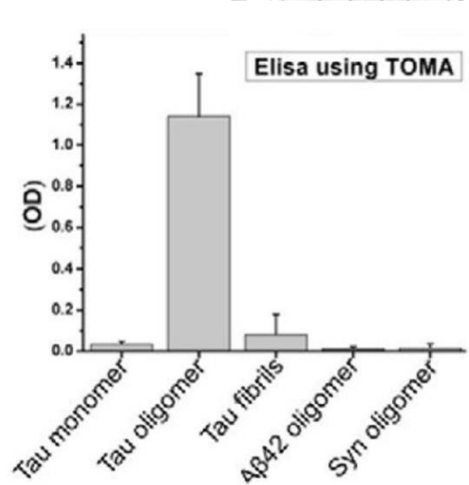


圖 1.7 利用 ELISA 分析抗體 T22 與 TOMA 對 Tau 寡聚體之專一性

(A)圖中抗體 Tau-5 能辨識所有的 Tau 蛋白，並與 Tau 寡聚體抗體 T22 比較，樣品分別為 Tau 單體、Tau 寡聚體、Tau 纖維、Aβ 寡聚體、α-synuclein 寡聚體[52]；(B)圖則是 Tau 寡聚體抗體 TOMA[53]。

1.5 研究動機

阿茲海默症是最常見的失智症，其主要病徵之一為過度磷酸化後的 Tau 蛋白異常堆積形成的神經元纖維纏結，導致神經突觸的損失，造成認知功能退化。近年來越來越多證據顯示，Tau 寡聚體比起神經元纖維纏結更具細胞毒性，其對於阿茲海默症的形成可能具有關鍵病理意義，但受限於寡聚體本身的不穩定性以及聚集型態的多樣性，目前仍未完全了解 Tau 寡聚體對阿茲海默症造成的影響。本研究嘗試利用不同誘導物促使 Tau 蛋白聚集形成寡聚體，並期望能建立一套製備 Tau 寡聚體的方法，透過不同抗體與分析技術來了解 Tau 寡聚體特性。

第二章 實驗材料與方法



2.1 實驗材料與實驗儀器

2.1.1 化學藥品與試劑

表 2.1 使用藥品與試劑

藥品名稱	廠牌	產品編號
Ethanol	Bioman	E23
Heparin	Sigma-aldrich	H3393
Methonal	Macron	MA-3016-68
MOPS	Sigma-aldrich	M1254-250G
PBS buffer, pH7.4 (10X)	Omics Bio	IB3011
TBS buffer (10X)	Omics Bio	IB3051
PMSF	Sigma-aldrich	P7626
Phosphotungstic acid	Sigma-aldrich	P4006
SEA blocking buffer	Thermo	37527
Sodium chloride	Bio basic	SB0476
Sodium hydroxide	Bio basic	SB0617
Thioflavin T	Sigma-aldrich	T3516-5G
Tween 20	Bio basic	TB0560



2.1.2 耗材與套組

表 2.2 耗材與套組總覽

名稱	廠牌	產品編號
0.2 μ m Syringe Filter	Sartorius Minisart RC4	17821
1 mL disposable syringe	Terumo	MDSS01S2613
10 mL disposable syringe	Terumo	MDSS10L
5mL Stainless Steel Sample Loop	Rheodyne	7755-029
96-well microplate	Thermo	442404
Black 96-well microplate	PerkinElmer	OptiPlate-96F
Nitrocellulose membrane	Odyssey	P/N 926-31092
Target Polyspring Insert	Thermo	C4010-630P
TEM 用鍍碳銅網	Ted Pella	01800-F
BCA protein assay kit	Thermo	23225
Gel filtration markers kit	Sigma-aldrich	MWGF1000

2.1.3 一級抗體

表 2.3 一級抗體

抗體名稱	Host	Clonality	廠牌/來源	產品編號
Alz50	Mouse	monoclonal	Dr. Peter Davies	-
DA9	Mouse	monoclonal	Dr. Peter Davies	-
DAKO	Rabbit	Polyclonal	Agilent	A0024
T22	Rabbit	Polyclonal	Sigma-Aldrich	ABN454

TOMA	Mouse	monoclonal	Sigma-Aldrich	MABN819
------	-------	------------	---------------	---------



2.1.4 二級抗體

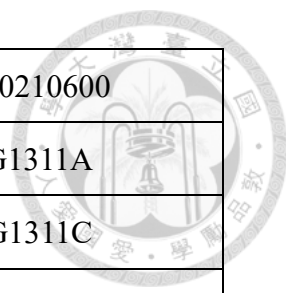
表 2.4 二級抗體

抗體名稱	Host	Conjugation	廠牌
anti-mouse IgM	Goat	Alexa Fluor 790	Jackson ImmunoResearch
anti-mouse IgG	Donkey	Alexa Fluor 680	Jackson ImmunoResearch
anti-rabbit IgG	Goat	Alexa Fluor 680	Jackson ImmunoResearch
anti-rabbit IgG	Donkey	Alexa Fluor 790	Jackson ImmunoResearch

2.1.5 實驗儀器

表 2.5 實驗儀器總覽

儀器名稱	廠牌	產品編號
Mill-Q 純水系統	ELGA	CLXXUVFM2
pH 計	EZ-DO	PL-700PV
穿透式電子顯微鏡	FEI Tecnai	G2 F20 S-TWIN
冷凍乾燥機	HCS	FD-1818
離心機	Thermo	Heraeus Megafuge 8R
真空濃縮裝置	TAITEC	VC-15S
多模式吸收&螢光光譜儀	BioTek	Synergy H1
近紅外光螢光多功能掃描儀	Li-cor	ODYSSEY CLx



UV-Vis 吸收儀	Thermo	840210600
高效能液相層析儀	Agilent	G1311A
高效能液相層析儀	Agilent	G1311C
數位迴轉式振盪器	YIH DER	TS 505D
乾浴器	Lawson	DHC-100
96 孔點轉漬裝置	Major Science	MDHM-96
動態光散射粒徑分析儀	Malvern Panalytical	Zetasizer Nano ZS
粒徑篩層析管柱	Cytiva	HiPrep 16/60 Sephacryl S-500 HR
粒徑篩層析管柱	Agilent	Bio SEC-5
分析式超高速離心機	Beckman	XL-A

2.2 Tau 蛋白的製備

經由實驗室所開發的 Tau 蛋白製備方法，以大腸桿菌表現目標蛋白，再經過破菌與管柱純化後，得到大量且高純度的 Tau 蛋白。先將帶有全長 2N4R Tau 蛋白基因之質體 (plasmid) 轉殖至勝任細胞-One Shot BL21 Star (DE3) 中，以 LB 培養基進行培養，待 OD₆₀₀ 值大於 0.8 時，加入 1mM IPTG 作為誘導物，促使大腸桿菌表現目標蛋白，接續誘導 4 小時後，於 4 °C，7500 xg 離心 10 分鐘，分離培養液使大腸桿菌終止蛋白表現；破菌方式則是將離心後的沉澱物(pellet)以 20mM Tris buffer (pH 9.0)回溶，先以沸水浴隔水加熱 10 分鐘，接著使用超聲波細胞震盪器震盪，最後同樣在沸水浴中隔水加熱 10 分鐘，於 4 °C，12000 xg 離心 1 小時後，收集上清液；純化方式則先利用陰離子交換管柱(HiTrap Q HP)來分離 Tau 蛋白，收集含有 Tau 蛋白之沖提液，冷凍乾燥並回溶後，再利用粒徑排阻層析管柱(HiLoad 16/600 Superdex 200 pg)獲得更高純度的 Tau 蛋白，最後將最終濃度調整至 4 mg/mL，保

存於 -80 °C。



2.3 Tau 蛋白的誘導條件

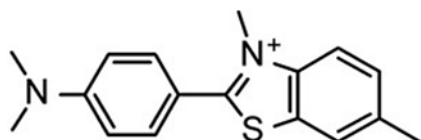
表 2.6 Tau 蛋白誘導條件

樣品	Tau 蛋白(μ M)	Heparin(μ M)	PMSF(mM)	NaCl(mM)
1	20	2.5	1	-
2	20	5	1	-
3	20	10	1	-
4	20	15	1	-
5	20	30	1	-
6	75	9.375	1	-
7	75	18.75	1	-
8	75	37.5	1	-
9	75	18.75	1	100

2.4 硫黃素螢光偵測

硫黃素 T (ThT) 是一種螢光分子，具有偵測 β 摺疊 (β -sheet) 的特性，被廣泛用來追蹤會產生 β -sheet 結構的類澱粉蛋白纖維與 Tau 蛋白纖維。而 ThT 分子中連接兩個基團的碳-碳單鍵能否自由旋轉為產生螢光的關鍵，一般狀態下分子本身的碳-碳單鍵能自由旋轉，產生螢光消光效應；當有 β -sheet 形成時，ThT 分子能嵌入其中，並限制碳-碳單鍵旋轉，再經由 440 nm 波長的光激發後，能發射出 490 nm 波長的螢光。

(A)



(B)

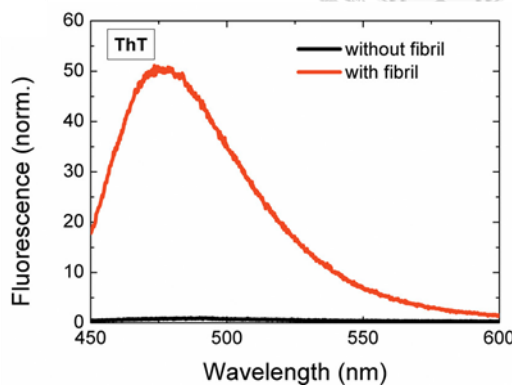


圖 2.1 ThT 分子與其螢光光譜

(A) ThT 分子結構[54]；(B) ThT 螢光光譜[55]。

在本研究中 ThT assay 皆以 5 uL ThT (75 uM) 與 100 uL 樣品置於 96 孔黑盤 (OptiPlate-96 Black, Black Opaque 96-well Microplate) 中，以多功能微量盤檢測儀進行偵測，若是長時間追蹤則會將之封膜。

2.5 粒徑篩析層析法

本研究使用粒徑排阻層析 (size exclusion chromatography, SEC) 管柱並與高效能液相層析儀連接來分離 Tau 蛋白寡聚體，主要使用兩支粒徑排阻層析管柱，一支為製備級 SEC 管柱-HiPrep 16/60 Sephacryl S-500 HR，另一支為分析級 SEC 管柱-Agilent Bio SEC-5。SEC 管柱內填充物為多孔材料並作為固定相，液體則作為流動相；根據分子大小及形狀，利用多孔材料的分子篩選特性進行分離，大分子不易進入多孔材料內，只流經多孔材料及管柱間的孔隙，因此會較早被沖提出來，小分子則會進入多孔材料內，而較晚被沖提出來。

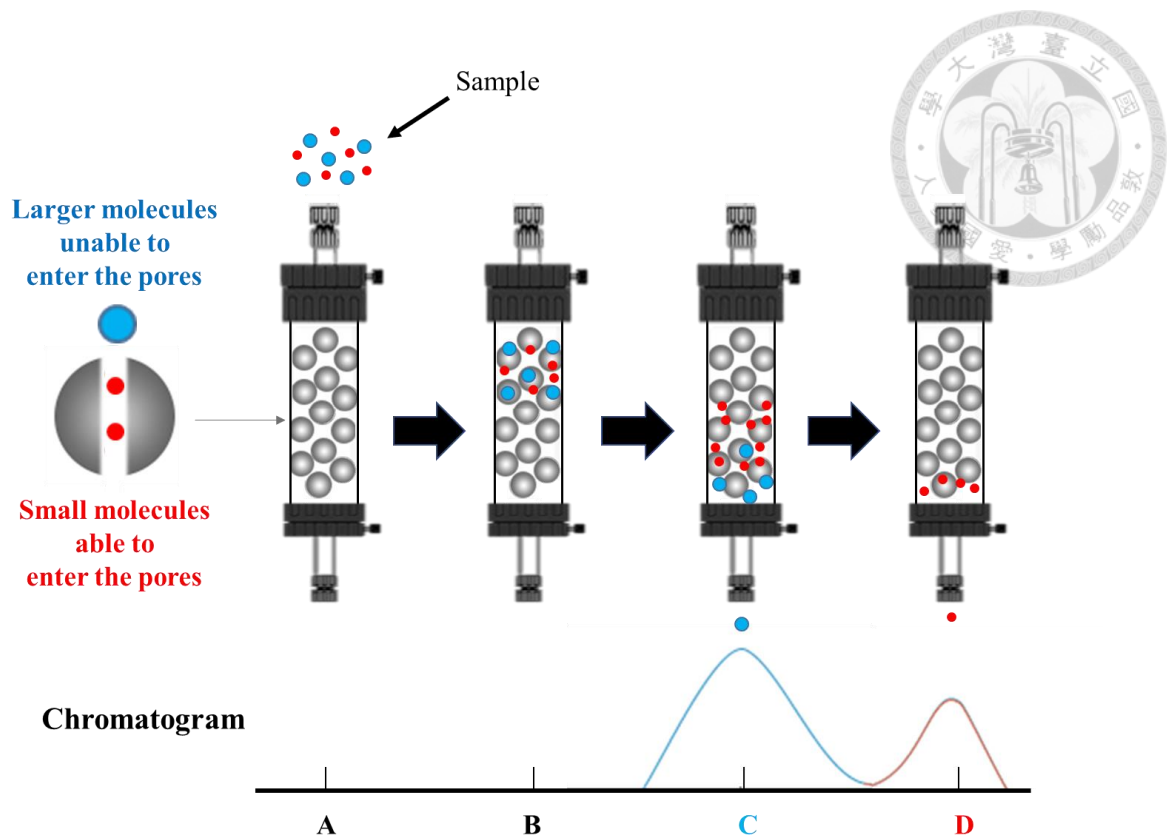


圖 2.2 SEC 示意圖

2.5.1 製備級 SEC 管柱(HiPrep 16/60 Sephacryl S-500 HR)

HiPrep 16/60 Sephacryl S-500 HR 其分析範圍在 40-20000 kDa。進樣前會先用 0.22 μm 過濾膜過濾，以 20 mM MOPS, 20 mM NaCl(pH 7)為沖提液，流速為 1 mL/min 並在 280 nm 吸收波長下進行實驗。為預估在此條件下，蛋白沖提出來的時間所對應之分子量，因此使用蛋白質標準品：Thyroglobulin (669 kDa)、 β -Amylase(200 kDa)、Bovine Serum Albumin(66 kDa)和 Carbonic Anhydrase(29 kDa)，作為分子量參考依據。

2.5.2 分析級 SEC 管柱(Agilent Bio SEC-5)

Agilent Bio SEC-5 管柱其分析範圍可大於 10000 kDa。進樣前同樣會經 0.22 μm 過濾膜過濾，以 20 mM MOPS, 20 mM NaCl(pH 7) 為沖提液，流速為 0.5 mL/min 並在 280 nm 吸收波長下進行實驗。為預估在此條件下，蛋白沖提出來的時間所對應之分子量，因此使用蛋白質標準品：Thyroglobulin (669 kDa)、 β -Amylase(200 kDa)、Bovine Serum Albumin(66 kDa)和 Carbonic Anhydrase(29 kDa)，作為分子量參考依據。

表 2.7 管柱規格

管柱名稱	HiPrep 16/60 Sephacryl S-500 HR	Agilent Bio SEC-5
管柱型號	28935606	5190-2541
等級	製備級	分析級
管柱內徑×長度	16 mm × 600 mm	7.8 mm × 300 mm
填充物顆粒大小	avg. 50 μm	5 μm
填充物孔徑	N/A	2000 Å
分離範圍(kDa)	40-20000	> 10000

N/A 表示廠商未提供相關資訊

2.6 斑點印跡法

斑點印跡法 (dot blot assay) 是利用特定抗體能專一地辨認並結合其抗原之特性所衍生的技術。先以一級抗體與樣品中的目標蛋白結合，再加入帶有螢光基團的二級抗體使其與一級抗體作用，最後由二級抗體的螢光訊號來確定目標蛋白的有無。將硝酸纖維膜放入轉漬裝置內並安裝完成，並使用抽氣裝置抽氣，再將 30 μ L 樣品點在硝酸纖維膜上，抽氣 1 小時，以確保樣品被抽乾；取出硝酸纖維膜放入黑盒內，加入 5 mL blocking buffer，以 75 rpm 搖晃 30 分鐘後倒掉液體；接著加入含有一級抗體的溶液，以 75 rpm 搖晃 2 小時；再以 washing buffer (0.1% Tween 20 in PBS) 移除未鍵結的一級抗體，75 rpm 搖晃 10 分鐘後，倒掉換上新的 washing buffer，重複三次；加入 5 mL 含有二級抗體的溶液，以 75 rpm 搖晃 45 分鐘後，倒掉再用 washing buffer 清洗三次，移除多餘的二級抗體，最後保存在二次水中，於近紅外光螢光影像系統下檢測結果。

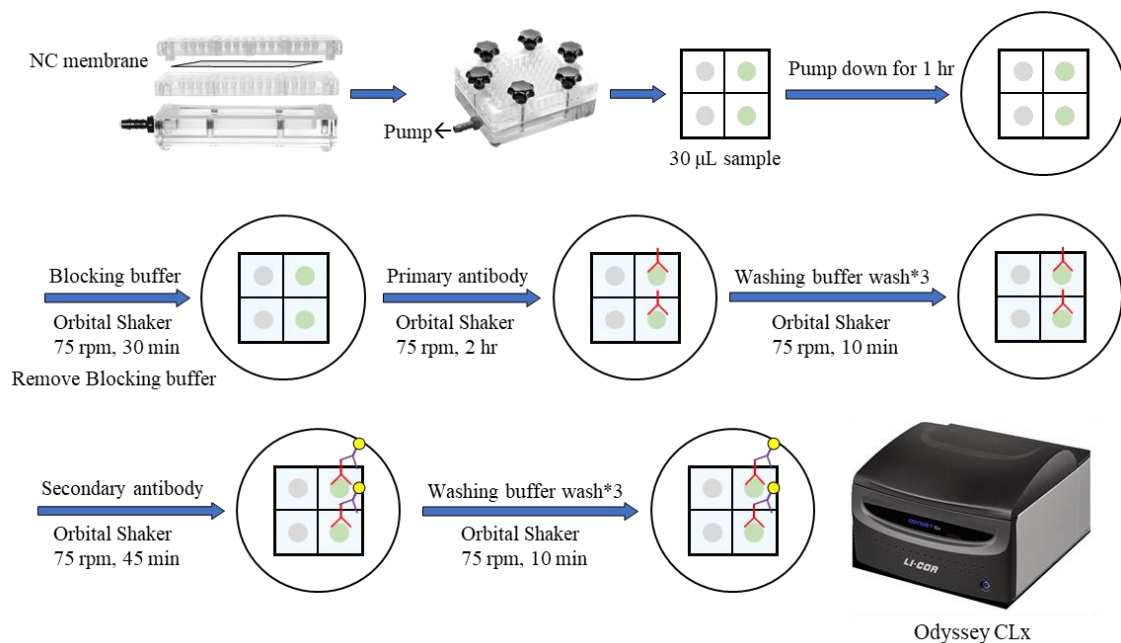


圖 2.3 Dot blot 流程示意圖

表 2.8 Dot blot assay 使用溶液之配方

溶液	配方				
Washing buffer	0.1% (v/v) Tween 20 in 1X PBS buffer				
Blocking buffer	50% (v/v) SEA Blocking Buffer + 50% (v/v) Washing Buffer				
Primary antibody	0.1 μ L Dako in 5mL blocking buffer	0.5 μ L DA9 in 5mL blocking buffer	2.5 μ L Alz50 in 5mL blocking buffer	5 μ L T22 in 5mL blocking buffer	5 μ L TOMA in 5mL blocking buffer
Secondary antibody	2.5 μ L anti-rabbit, Alexa Fluor 680 in 5mL blocking buffer	2.5 μ L anti- mouse, Alexa Fluor 680 in 5mL blocking buffer	2.5 μ L anti- mouse IgM, Alexa Fluor 790 in 5mL blocking buffer	2.5 μ L anti-rabbit, Alexa Fluor 680 in 5mL blocking buffer	2.5 μ L anti- mouse, Alexa Fluor 790 in 5mL blocking buffer

2.7 動態光散射粒徑分析儀

動態光散射粒徑分析儀 (dynamic light scattering, DLS) 是透過非侵入的方式，測量溶液中奈米懸浮粒子散射入射光的強度隨時間變化的關係，來計算溶液中懸浮粒子粒徑大小。由於奈米級的粒子會在水溶液中會做布朗運動，將粒子散射入射光的光強度與時間關係資訊轉換成自相關函數 (correlation function)，但自相關函數會隨時間作指數的衰減，衰減速率與粒子擴散速度(以擴散係數表示)，並根據 Stokes-Einstein 方程式，以擴散係數計算出粒子的水合直徑(hydrodynamic diameter, d_H)，而粒子的水合直徑會受其形狀、結構與離子強度等因素影響。

$$d_H = \frac{\kappa T}{6\pi\eta D}$$

(d_H ：水合直徑； κ ：波茲曼常數； T ：溫度； η ：溶液黏度係數； D ：擴散係數)

在數據分析上，以多分散係數 (Polydispersity index; Pdl) 做為分散度及均一程度的指標，對於一般奈米粒子而言， $Pdl < 0.1$ 才是單分散系統，但在評估逆相微胞系統時， $Pdl < 0.2$ 都稱之為單分散系統。

$$Pdl = \frac{\sigma^2}{Z_d^2}$$

(σ ：標準差； Z_d ：平均大小)

本研究之 DLS 結果，委由中央研究院生化所陳佩燁教授實驗室代測，並以 Malvern Zetasizer Nano ZS，於 25 °C、偵測角度為 90 度下進行測量，以儀器自動偵測掃描次數做三重複。



2.8 穿透式電子顯微鏡

穿透式電子顯微鏡 (Transmission Electron Microscopy, TEM) 以高壓電所產生的高能電子束作為光源，並將電子束穿透樣品，由於電子與樣品中的原子碰撞而產生不同程度之散射，其散射成像能用來觀察樣品結構及形貌；近年來，為提高 TEM 解析度，除了光學成像系統與儀器結構的升級外，縮短電子的波長為主要因素，透過提高加速電壓降低電子波長來獲得高解析度的影像，如今 TEM 解析度可達 0.1 nm 的尺度。

在 TEM 中可以獲得明場與暗場兩種影像，一般情況下會使用明場模式來成像。明場的影像由穿透過樣品而未散射的電子被偵測器接收所形成，會得到背景明亮而樣品反黑的影像；暗場的影像則是由受到樣品而散射的電子被偵測器接收所形成，會得到背景成黑色而樣品反白的影像。

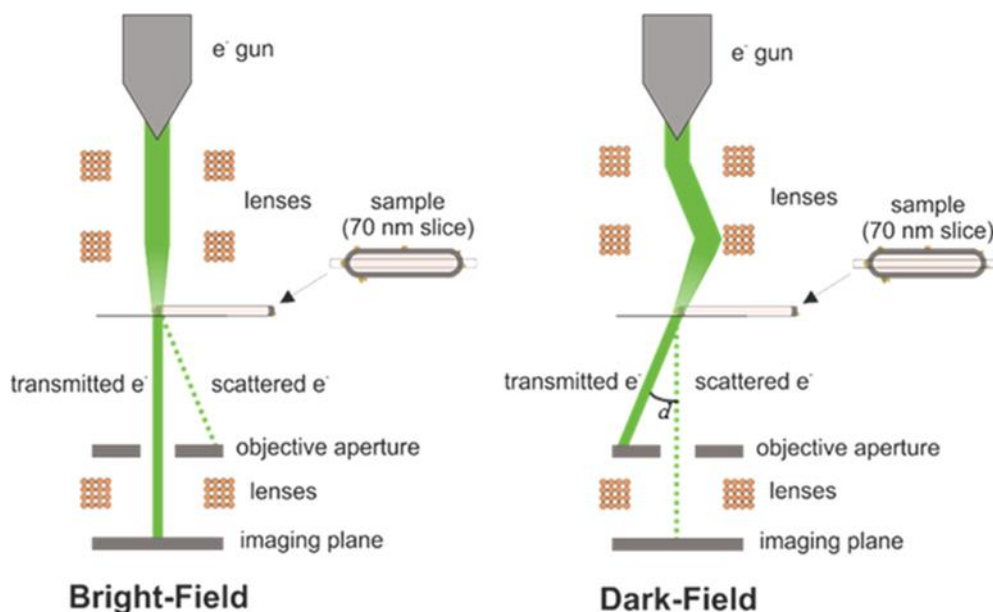


圖 2.4 TEM 明場與暗場成像原理

明場主要是偵測穿透過樣品的電子，而暗場則是偵測受樣品散射後的電子[56]。

本研究之 TEM 結果，委由中央研究院生化所陳佩燁教授實驗室代測，將樣品透過穿透式電子顯微鏡 (FEI Tecna G2 F20 S-TWIN) 進行觀察；TEM 點片步驟：將樣品滴在銅網 (200 mesh formvar-coated copper grid, Ted Pella Inc.) 上，靜置 5 分鐘，

以濾紙將多餘的液體吸乾後再用 TBS buffer 清洗；再點上負染劑 (2% phosphotungstic acid, PTA)，靜置 3 分鐘後，以濾紙吸除多餘的染劑，待隔夜風乾後即可利用穿透式電子顯微鏡觀察。



2.9 分析級超高速離心

分析級超高速離心 (analytical ultracentrifugation, AUC) 是一種在固定的重力場下，利用樣品在溶液中沉降的分佈，來推測樣品的分子量、大小及形狀甚至結合常數。AUC 基本使用模式可分為 SV (sedimentation velocity) 與 SE (sedimentation equilibrium) 兩種；SV 模式是對樣品施以強大的離心力，使溶液中的分子沉降到樣品槽底部，在離心過程中會產生明顯上下層的交界面，上層為所移除的分子，下層為沉降分子形成之均勻溶液，透過測量此交界面的移動速率，可推算出分子的沉降係數 (sedimentation coefficient)；在 SE 模式下，離心力會較 SV 模式來的小，但同樣足以使分子沉降，在離心過程中，分子會逐漸往樣品槽底部沉降，同時濃度會逐漸增加，但因分子會擴散，且擴散方向與沉降方向相反，經一段時間後兩種作用力會達成平衡，分子濃度分佈會呈單方向增加之趨勢，其所收集到的數據，會以不同模型 fitting。SV 模式可獲得沉降係數、分子大小與形狀等資訊；SE 模式則可獲得樣品的莫耳質量與結合常數。本研究之分析級超高速離心結果，委由中央研究院生化所何孟儒博士代測，透過分析式超高速離心機(Beckman XL-A)測量樣品沉降係數。

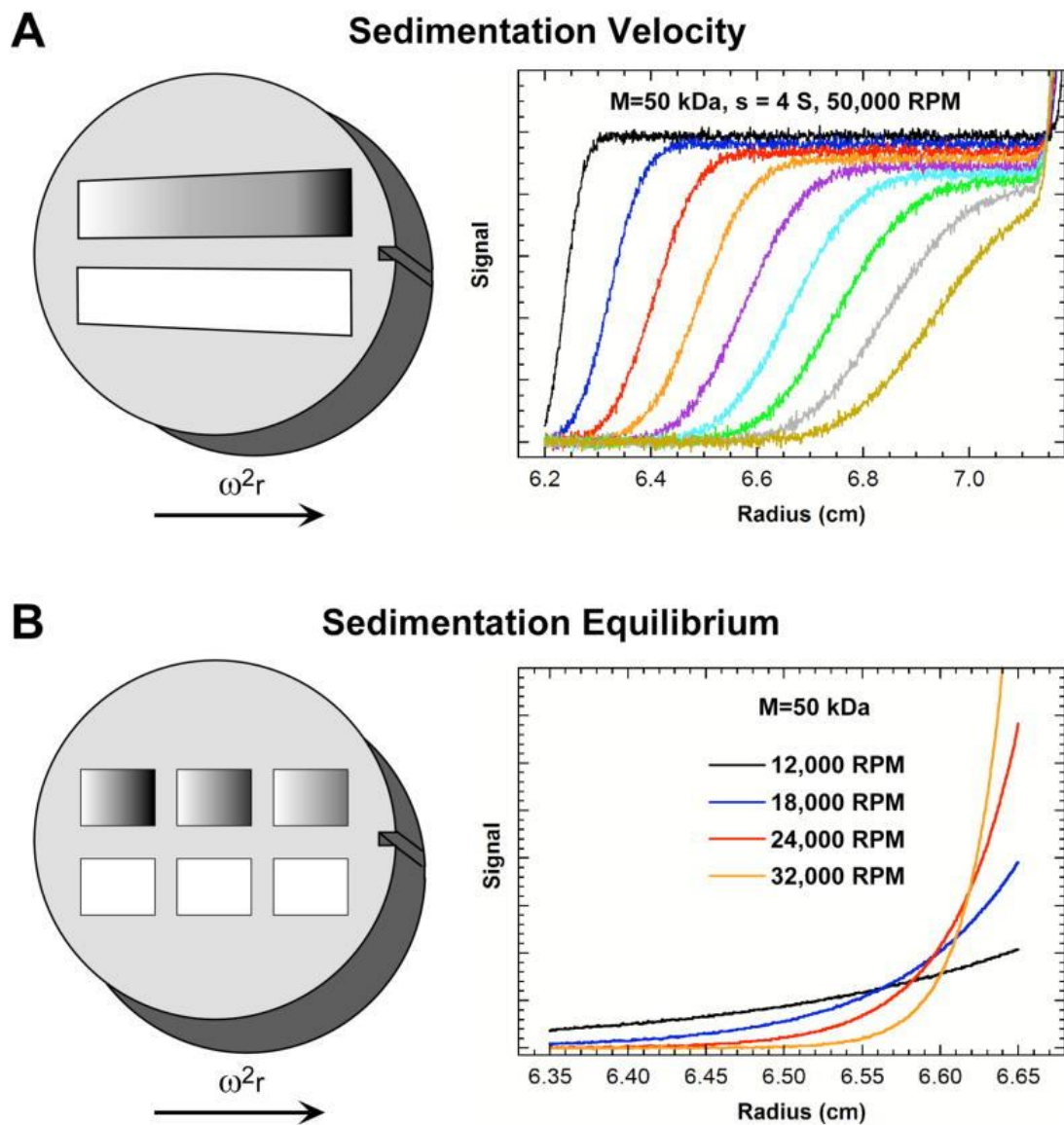


圖 2.5 AUC 之使用模式[57]

(A)SV 模式，通常有兩個扇形空間，黑灰色為代測樣品，白色則為 blank；右圖為沉降係數 4S 且分子量為 50kDa 之蛋白質以 50000 rpm 進行實驗，並以每 20 分鐘為間隔掃描一次所得到的濃度分佈圖；(B)SE 模式，通常有六個扇形空間，黑灰色為代測樣品，白色則為 blank；右圖為 4 種不同轉速所模擬出來的平衡濃度梯度。



2.10 Siegel-Monte 分析法

Siegel-Monte 分析法認為粒徑排阻層析不是以蛋白質分子量大小來分離蛋白質，而是根據摩擦係數來分離，但由於摩擦係數不是一個直觀的參數，因此通常用以 Stokes radius (R_s)作替代。

$$f = 6\pi\eta R_s$$

(f ：摩擦係數； η ：溶液黏度係數； R_s ：Stokes radius，單位 nm)

可以透過粒徑排阻層析法將蛋白質標準品的沖提時間與 R_s 做出趨勢線，再帶入未知蛋白質的沖提時間，求得 R_s 。並推導出公式，來推算未知蛋白質的分子量 [58]。

$$M = 4.205 * SR_s$$

(M ：理論分子量，單位 kDa； S ：沉降係數，單位 S)

表 2.9 蛋白質理論分子量與 Siegel-Monte 分析法推得之分子量比較

蛋白質	理論分子量(kDa)	Siegel-Monte 分析法 推得之分子量(kDa)
Ovalbumin hen egg	42,910	44,888
Albumin beef serum	69,322	68,667
Aldolase rabbit muscle	157,368	147,650
Catalase beef liver	239,656	247,085
Apo-ferritin horse spleen	489,324	451,449
Thyroglobulin bovine	606,444	679,107

第三章 研究結果與討論



3.1 誘導 Tau 蛋白方法與鑑定

為找出適合誘導 Tau 寡聚體的方法，參考文獻後本實驗利用肝素來誘導 Tau 蛋白聚集。利用不同條件進行誘導，並透過 ThT 螢光偵測法分析 Tau 蛋白聚集速率。

3.1.1 以肝素誘導 Tau 蛋白聚集

(一) 不同 pH 值

為找到以肝素誘導 Tau 蛋白聚集之合適 pH 值，參考文獻中利用肝素作為誘導 Tau 蛋白聚集之條件，在不同 pH 值下，以 10 μ M 肝素對 20 μ M Tau 蛋白進行誘導，並在 37 $^{\circ}$ C、200 rpm 震盪，量測 3 天以每 12 小時測一次 ThT 螢光強度。比較 pH 6、7、8 三種不同 pH 值，從圖 3.1 可以看到在 pH 6 下，ThT 螢光強度沒有明顯上升，而在 pH 7 與 8 下，ThT 螢光強度則有顯著上升，且在 pH 7 下螢光強度上升更快速、明顯，表示以肝素誘導 Tau 蛋白聚集，pH 7 為較佳的 pH 值；且肝素本身為直鏈陰離子多聚醣，改變 pH 值應該不太會影響肝素的帶電狀態，反而是 Tau 蛋白會更容易受 pH 值改變而影響其帶電狀態。

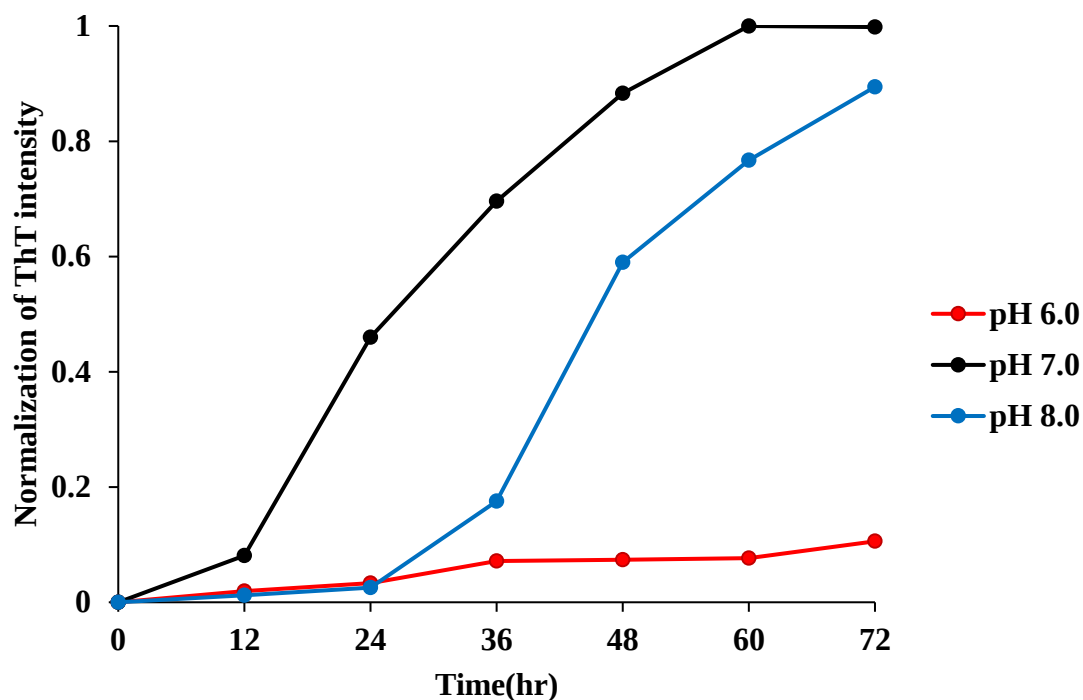


圖 3.1 在不同 pH 值下，以肝素誘導 Tau 蛋白聚集之 ThT 螢光分析

(二) 不同肝素濃度

為了解在 pH 7 條件下，不同肝素濃度對 Tau 蛋白聚集之影響，將 20 μM Tau 蛋白以不同濃度之肝素誘導，分別為 30、15、10、5、2.5 μM ，置於 96 孔盤中培養且以每 2 分鐘偵測一次 ThT 螢光強度。從圖 3.2 中能發現在 10 μM 與 5 μM 的肝素濃度下 ThT 螢光強度具有明顯上升趨勢，反觀其他肝素濃度下 ThT 螢光強度並沒有顯著變化，表示在特定肝素濃度誘導下，Tau 蛋白能聚集並形成 β -sheet 的結構，而過高或過低的肝素濃度皆會影響 Tau 蛋白的聚集，結果顯示在 20 μM Tau 蛋白濃度下，肝素濃度為 5 μM 時，具有最佳的誘導效果，即每 1 個肝素分子與 4 個 Tau 蛋白作用下具有最佳的誘導效果，而若以分子量來看，肝素分子量約為 18 kDa，4 個 Tau 蛋白分子與 1 個肝素分子的重量比值為 10.2。

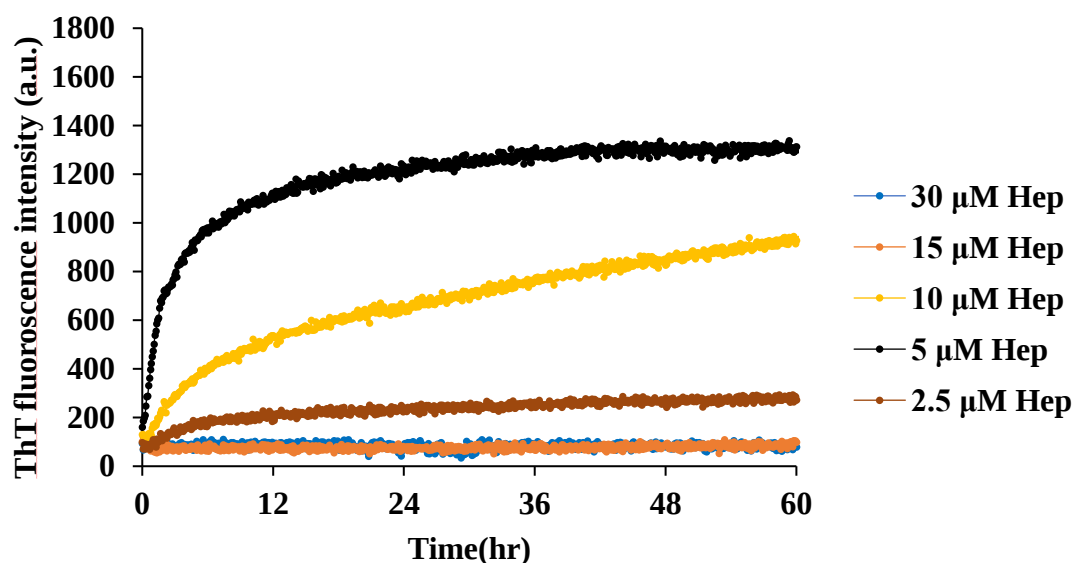


圖 3.2 以不同肝素比例誘導 Tau 蛋白聚集之 ThT 螢光分析
在 20 μM 之 Tau 蛋白濃度下以 30、15、10、5、2.5 μM 肝素濃度進行誘導。

(三) 提高 Tau 蛋白濃度

為了後續大量製備 Tau 寡聚體，本實驗嘗試提高 Tau 蛋白濃度，將 Tau 蛋白濃度從 20 μM 提高到 75 μM ，肝素濃度則以 37.5、18.75、9.375 μM 進行誘導，並以 ThT 螢光追蹤 60 小時。

此次實驗結果顯示在 75 μM Tau 蛋白濃度下，肝素濃度為 18.75 μM 時，ThT 螢光強度上升速度最為明顯，代表每 1 個肝素分子與 4 個 Tau 蛋白作用下具有最佳的誘導效果，與上述結果相同，其 ThT 螢光強度的上升趨勢也相似，皆在 24 小時後達到高峰，因此，可確認利用肝素誘導 Tau 蛋白聚集時，以 1 個肝素分子來誘導 4 個 Tau 蛋白聚集時，誘導效果最好。

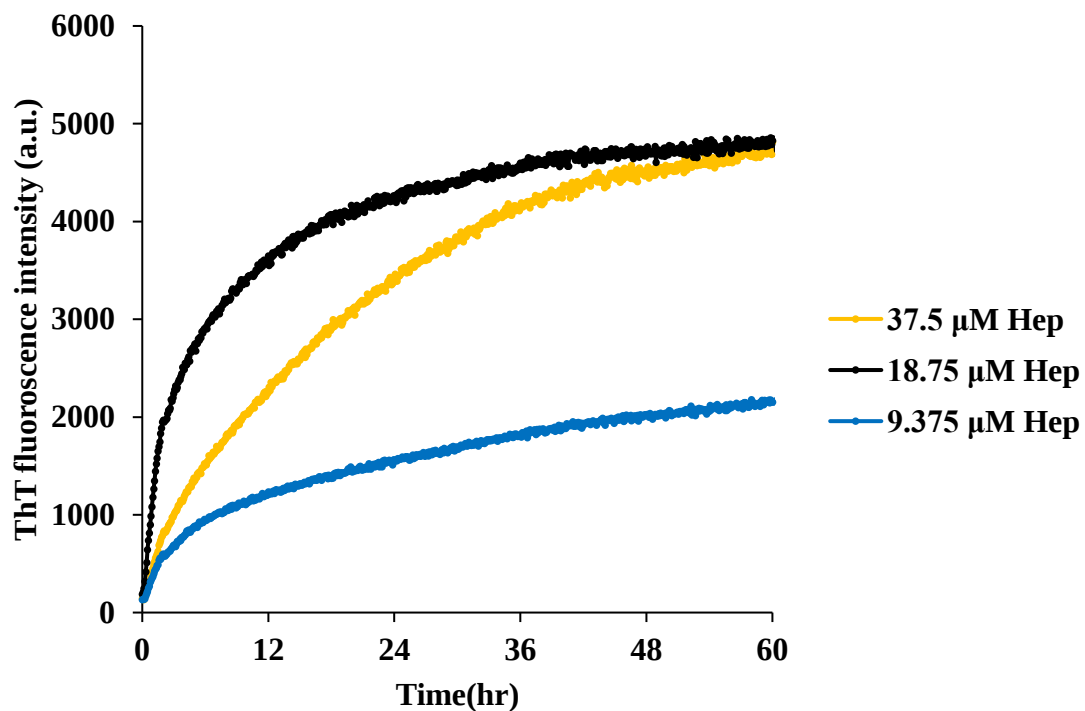


圖 3.3 提高 Tau 蛋白濃度之 ThT 螢光分析

提高 Tau 蛋白濃度至 75 μM ，並以三種肝素濃度 37.5、18.75、9.375 μM 進行誘導。

(四) 高離子強度

有文獻提到高離子強度可能會對 Tau 蛋白的誘導造成影響，而為確認高離子強度所造成之影響，本實驗以 75 μM Tau 蛋白濃度與 18.75 μM 肝素濃度 (Tau : Hep = 1:0.25) 來誘導 Tau 蛋白聚集，並以 100 mM NaCl 來模擬高離子強度，同樣以 ThT 螢光追蹤 60 小時。實驗結果顯示在高離子強度下 (100 mM NaCl)，Tau 蛋白會仍被肝素誘導而聚集但聚集速度會明顯減緩，代表高離子強度會遮蔽靜電吸引力，影響 Tau 蛋白與肝素之間的交互作用，且不利於 Tau 蛋白聚集。

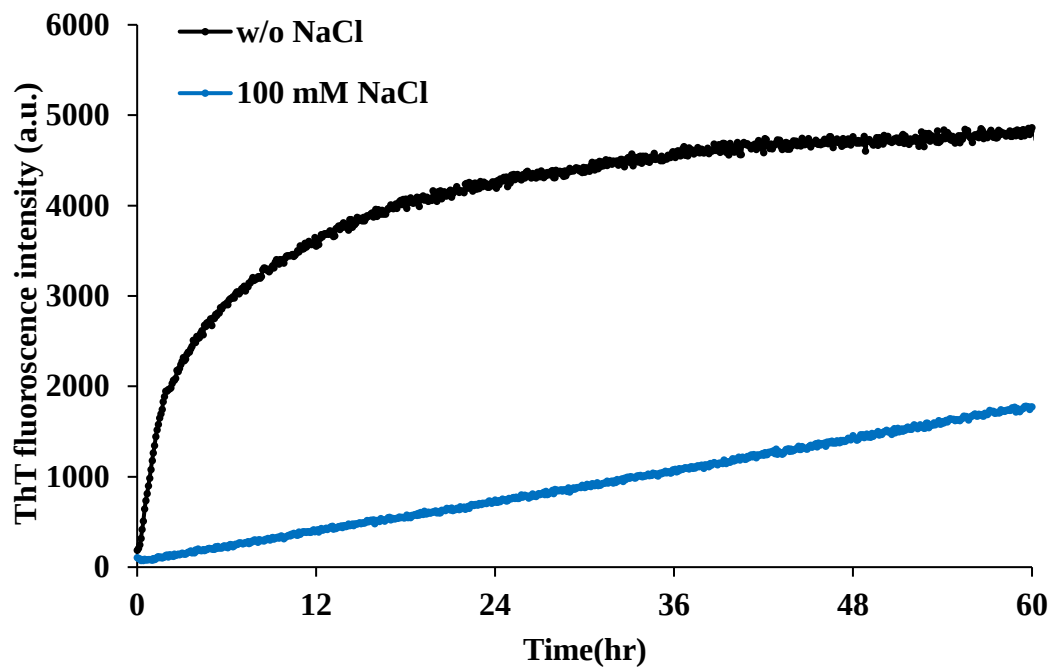


圖 3.4 高離子強度對 Tau 蛋白聚集影響之 ThT 螢光分析

Tau 蛋白濃度為 $75\ \mu\text{M}$ ，以 $18.75\ \mu\text{M}$ 的肝素濃度進行誘導，比較高離子強度(100 mM NaCl)對螢光強度之影響。

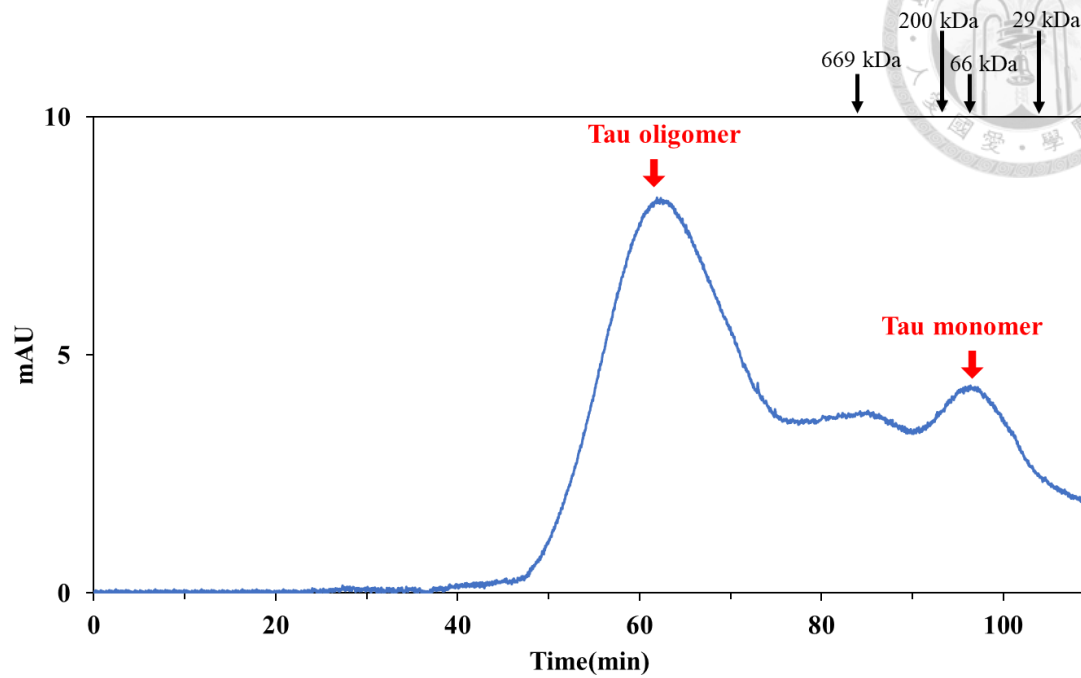
3.2 使用製備級 SEC 純化 Tau 聚集物

過去文獻中利用不同誘導物質與條件促使 Tau 蛋白聚集並產生不同類型的 Tau 寡聚體，而目前對 Tau 寡聚體大小的定義仍不明確。為了初步確認本研究所誘導的 Tau 蛋白聚集體大小，首先使用製備級 SEC 進行純化與分析。

3.2.1 製備級 SEC

本實驗分別利用肝素誘導 Tau 蛋白 6 小時與 36 小時，經由製備級 SEC 管柱 (HiPrep 16/60 Sephacryl S-500 HR) 純化，並利用蛋白質標準品做為分子量對照之依據。由層析圖中 66 kDa 的蛋白質標準品所沖提出的時間為 96 分鐘，可以合理推測 90 到 100 分鐘的波峰應為 45.9 kDa 的 Tau 蛋白單體；而在誘導 6 小時與 36 小時可觀察到 60 分鐘左右有一個波峰，由 669 kDa 的標準品所沖提出的時間為 84 分鐘，推測 60 分鐘之聚集物分子量應大於 669 kDa，並認為其應為 Tau 寡聚體；最後在誘導 36 小時中 40 分鐘有波峰出現但沒有在 6 小時出現，推估其應為較大的聚集體，如微纖維 (protofibril)。

(A)



(B)

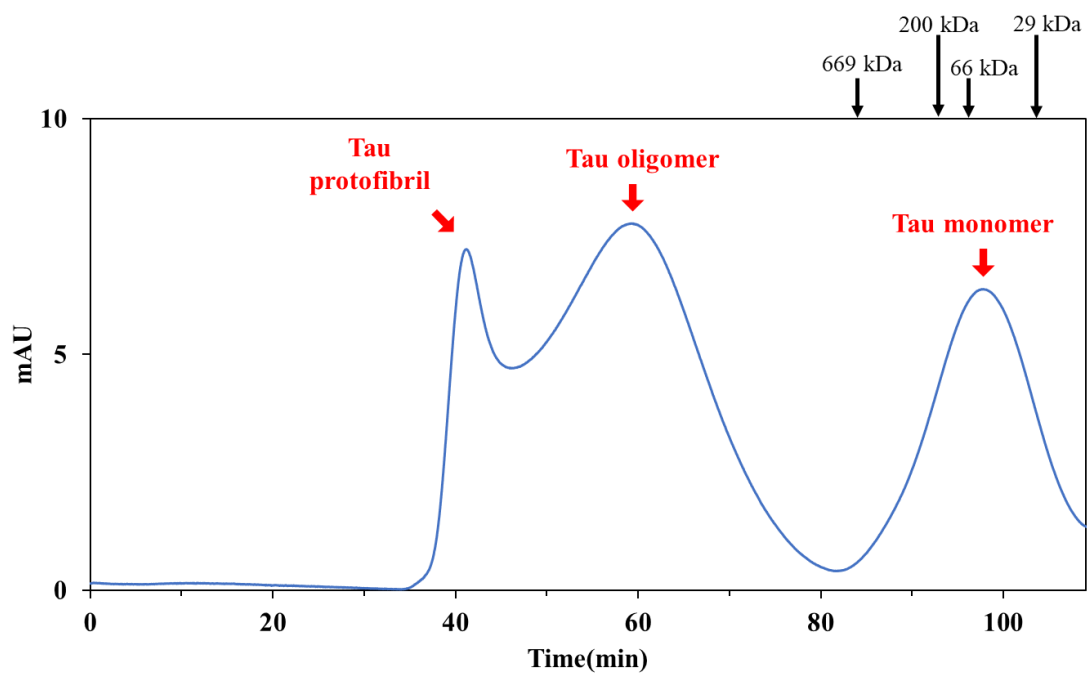


圖 3.4 利用肝素誘導之 Tau 蛋白聚集物經製備級 SEC 管柱之純化層析圖
(A)以肝素誘導 Tau 蛋白聚集 6 小時後，經製備級 SEC 管柱純化之層析圖；
(B)以肝素誘導 Tau 蛋白聚集 36 小時後，經製備級 SEC 管柱純化之層析圖。

3.2.2 斑點印跡法鑑定

為瞭解本實驗所誘導之 Tau 蛋白聚集後，經製備級 SEC 純化後 Tau 蛋白之辨認以及判斷其是否有錯誤摺疊之構型，將肝素誘導 36 小時之樣品經製備級 SEC 純化後分段收集並以斑點印跡法偵測 Tau 蛋白，分別使用兩種一級抗體 DAKO、Alz50 和帶有螢光基團的二級抗體辨認；DAKO 能辨認 total Tau 蛋白，而 Alz50 則辨認 Tau 蛋白錯誤摺疊之構型。

由斑點印跡法發現不論在第一個波峰（微纖維）37-47 分鐘、第二個波峰（寡聚體）47-57 與 57-67 分鐘、第三個波峰（Tau 蛋白單體）95-105 分鐘，皆有抗體 DAKO 的螢光訊號，抗體 Alz50 只有在第一個與第二個波峰有螢光訊號。而在未誘導的 Tau 蛋白單體下，抗體 DAKO 有螢光訊號，抗體 Alz50 則因單體無錯誤摺疊之構型所以沒有螢光訊號；在 negative control（BSA）中也確實沒有 Tau 蛋白訊號，代表經肝素誘導並純化後的 Tau 蛋白與聚集體確實能被 Tau 抗體專一地辨認，且 Tau 聚集體具有錯誤摺疊之構型。

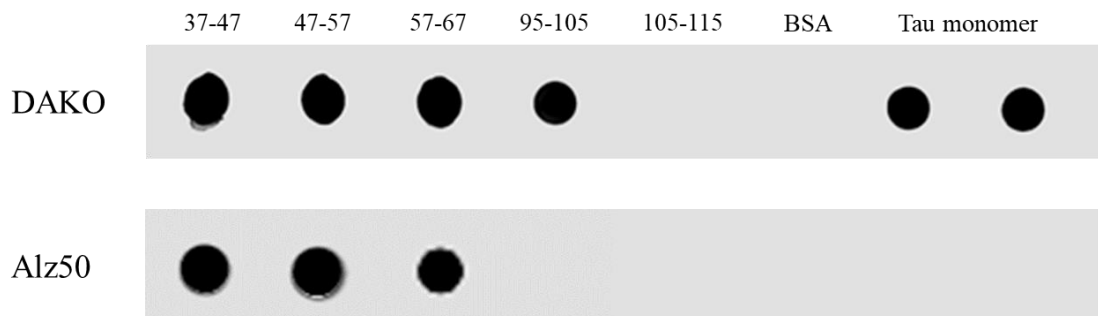


圖 3.5 斑點印跡法鑑定製備級 SEC 純化後之 Tau 蛋白與其聚集物

以 DAKO 與 Alz50 做為一級抗體之斑點印跡結果，樣品由左至右為分段收集製備級 SEC 之沖提液，分別是 37-47、47-57、57-67、95-105 分鐘，以及 negative control (BSA) 與 Tau 蛋白單體。



3.2.3 以動態光散射粒徑分析儀分析 Tau 聚集體

從動態光散射粒徑分析儀之結果圖可知經過製備級管柱純化後之 Tau 聚集體，其水合直徑確實隨著流出管柱的時間而逐漸減小，從 35-45 分鐘之沖提液的水和直徑約為 122.5 nm；45-55 分鐘之沖提液的水和直徑約為 93.1 nm；55-65 分鐘之沖提液的水和直徑約為 78.9 nm；65-75 分鐘之沖提液的水和直徑約為 76.1 nm，且 Pdl 都小於 0.2。由於 DLS 散射強度正比於 R 的 6 次方，且無法分辨之半徑差異在 2-3 倍以內的粒子，所以測量結果可能偏向混合物中半徑較大的粒子。

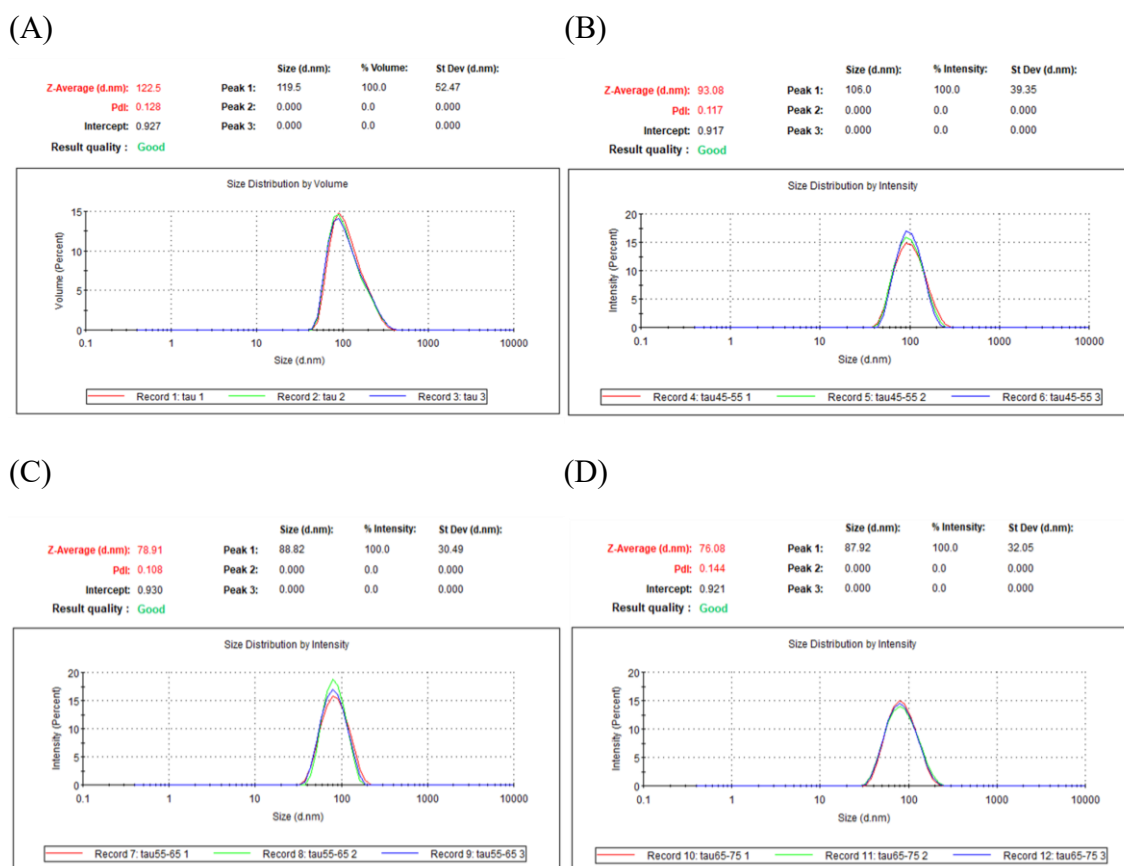


圖 3.6 以 DLS 鑑定 Tau 蛋白聚集體

(A)樣品為製備級 SEC 之 35-45 分鐘沖提液；(B)為 45-55 分鐘沖提液；(C) 為 55-65 分鐘沖提液；(D)為 65-75 分鐘沖提液。

3.3 利用分析級 SEC 純化 Tau 聚集物

為了更進一步分析 Tau 寡聚體大小，從上述製備級 SEC 層析圖中觀察到誘導之 Tau 寡聚體大小應大於 669 kDa，因此本研究挑選了分析級 SEC (Agilent Bio SEC-5)，其分析的範圍超過 10000 kDa。

3.3.1 分析級 SEC

同樣利用肝素分別誘導 Tau 蛋白 6 小時與 36 小時並透過分析級 SEC 純化，並利用蛋白質標準品做為分子量對照之依據。分子量 66 kDa 的蛋白質標準品約在 20 分鐘左右被沖提出來，因此推測 20 分鐘後的波峰為 Tau 蛋白單體；在誘導 6 小時可以發現 16-17 分鐘有明顯的波峰而在誘導 36 小時此波峰減弱，推測其應為 Tau 寡聚體；在誘導 36 小時可觀察到 12 分鐘左右有一個明顯波峰，但在誘導 6 小時較不明顯，推測其應為微纖維 (protofibril)。

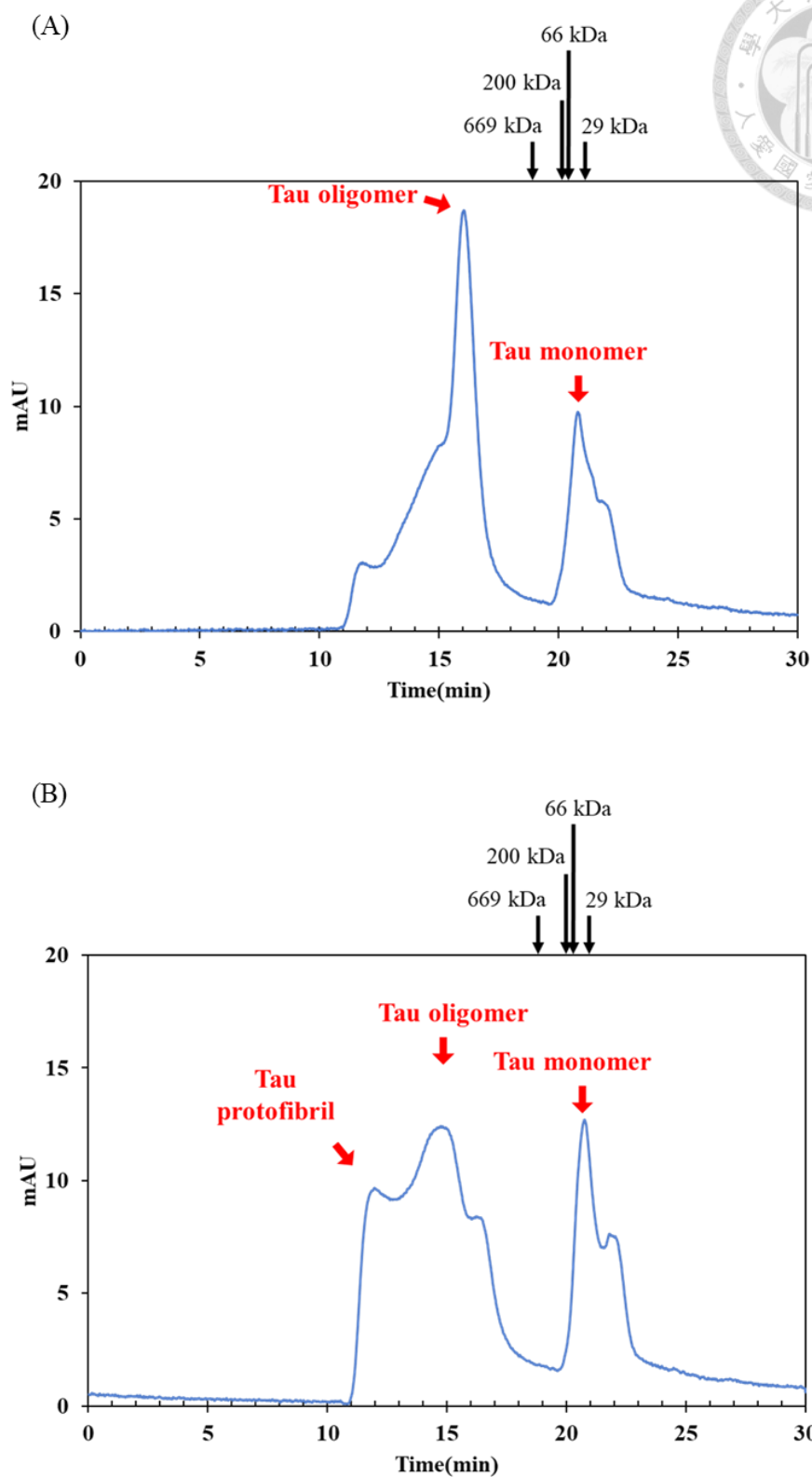


圖 3.7 利用肝素誘導之 Tau 蛋白聚集物經分析級 SEC 管柱之純化層析圖
(A)以肝素誘導 Tau 蛋白聚集 6 小時後，經分析級 SEC 管柱純化之層析圖；
(B)以肝素誘導 Tau 蛋白聚集 36 小時後，經分析級 SEC 管柱純化之層析圖。



3.3.2 斑點印跡法鑑定

為確認所誘導之 Tau 寡聚體是否具有能被寡聚體抗體辨認的特性，將肝素誘導 6 小時之樣品經分析級 SEC 純化後分段收集，並以二重複斑點印跡法偵測 Tau 蛋白，除了 DAKO 與 Alz50，另外使用其他 Tau 蛋白的一級抗體：DA9、T22、TOMA，其中 DA9 能辨認 total Tau 蛋白，而 T22 與 TOMA 則是辨認 Tau 寡聚體之抗體。對照層析圖中從 12 分鐘開始有波長 280 nm 吸收訊號，而 20-21 分鐘為 Tau 蛋白單體被沖提出的時間，抗體 DAKO 與 DA9 在 12-21 分鐘皆有螢光訊號，與層析圖對照，發現層析圖在 18-19 分鐘時吸收值已下降，但在斑點印跡法結果中仍具有一定強度，推測是因樣品經過 UV 偵測器後，還需經一段管線，所造成的時間延遲。而抗體 Alz50 訊號集中在 13-20 分鐘且對 Tau 單體沒有訊號，辨認 Tau 寡聚體的抗體 T22 同樣對單體沒有訊號且訊號集中在 13-20 分鐘，且 15-18 分鐘螢光強度較強，而另一個寡聚體抗體 TOMA，螢光強度集中在 15-19 分鐘，且同樣對單體沒有訊號。接著比較抗體 T22 與 TOMA，13-14 分鐘與 19-20 分鐘，T22 螢光強度較 TOMA 強，代表 T22 所能辨認的寡聚體大小較 TOMA 更廣。在經過 6 小時肝素誘導的 Tau 蛋白，除了形成不同大小的聚集體外，Tau 蛋白寡聚體主要集中在 14-20 分鐘，且 15-18 分鐘最為明顯，與層析圖的吸收強度吻合。

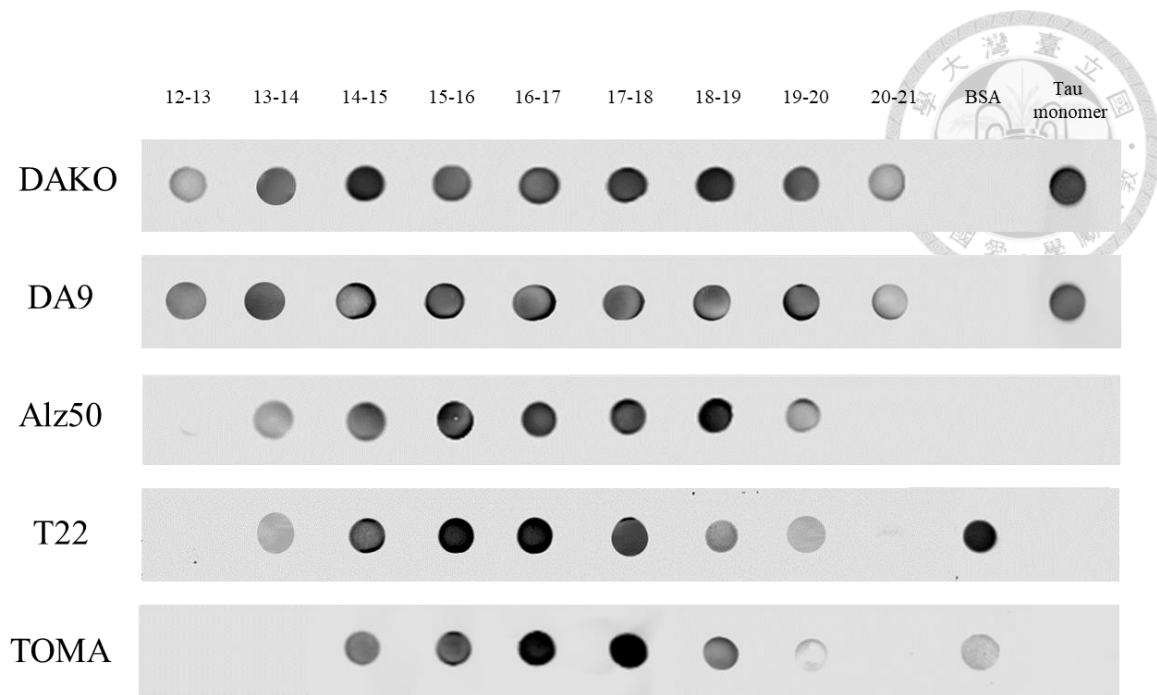


圖 3.8 斑點印跡法鑑定分析級 SEC 純化後之 Tau 蛋白與其聚集體-第一組
將肝素誘導 6 小時的 Tau 蛋白聚集體，經由分析級 SEC 純化並分段收集其沖提液，再以不同抗體來鑑定 Tau 蛋白。

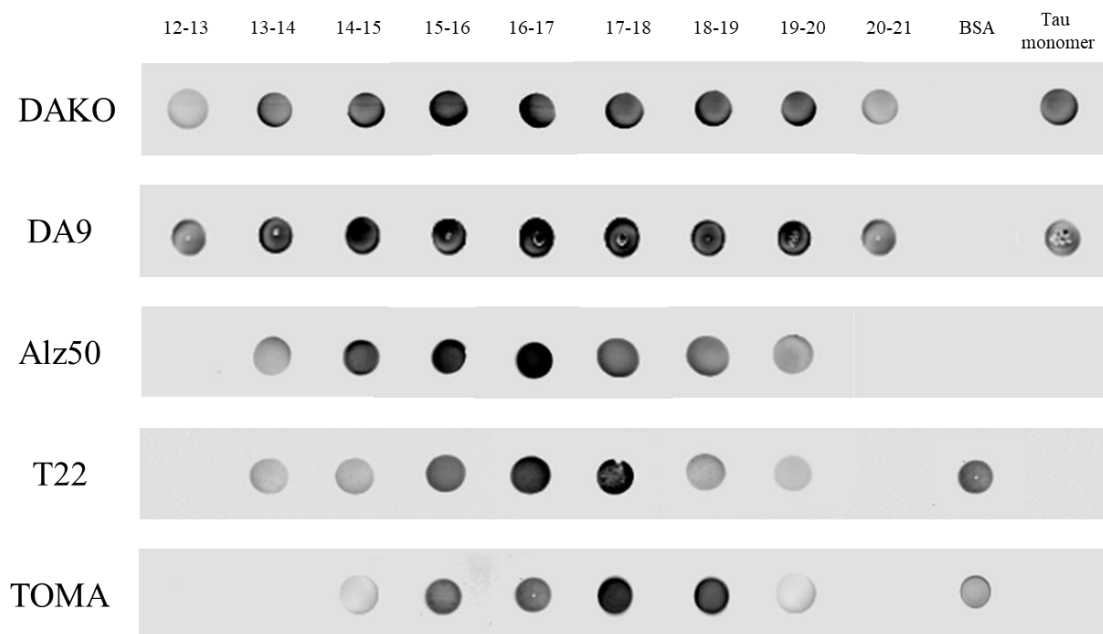


圖 3.9 斑點印跡法鑑定分析級 SEC 純化後之 Tau 蛋白與其聚集體-第二組
同樣以肝素誘導 6 小時的 Tau 蛋白聚集體，經由分析級 SEC 純化並分段收集其沖提液，再以不同抗體來鑑定 Tau 蛋白。

3.4 以分析級 SEC 分析寡聚體大小

為進一步分析 Tau 寡聚體大小，將經過肝素誘導 6 小時後的 Tau 聚集體，先利用製備級 SEC (HiPrep 16/60 Sephacryl S-500 HR) 純化後，收集主要為寡聚體波峰之沖提液，再立刻將 Tau 寡聚體打入分析級 SEC (Agilent Bio SEC-5)。從層析圖結果判斷 Tau 寡聚體約在 16.0 分鐘左右被沖提出來，而分子量為 2000 kDa 之標準品被沖提出時間為 16.0 分鐘，可推測純化後的 Tau 寡聚體約為 2000 kDa 左右。

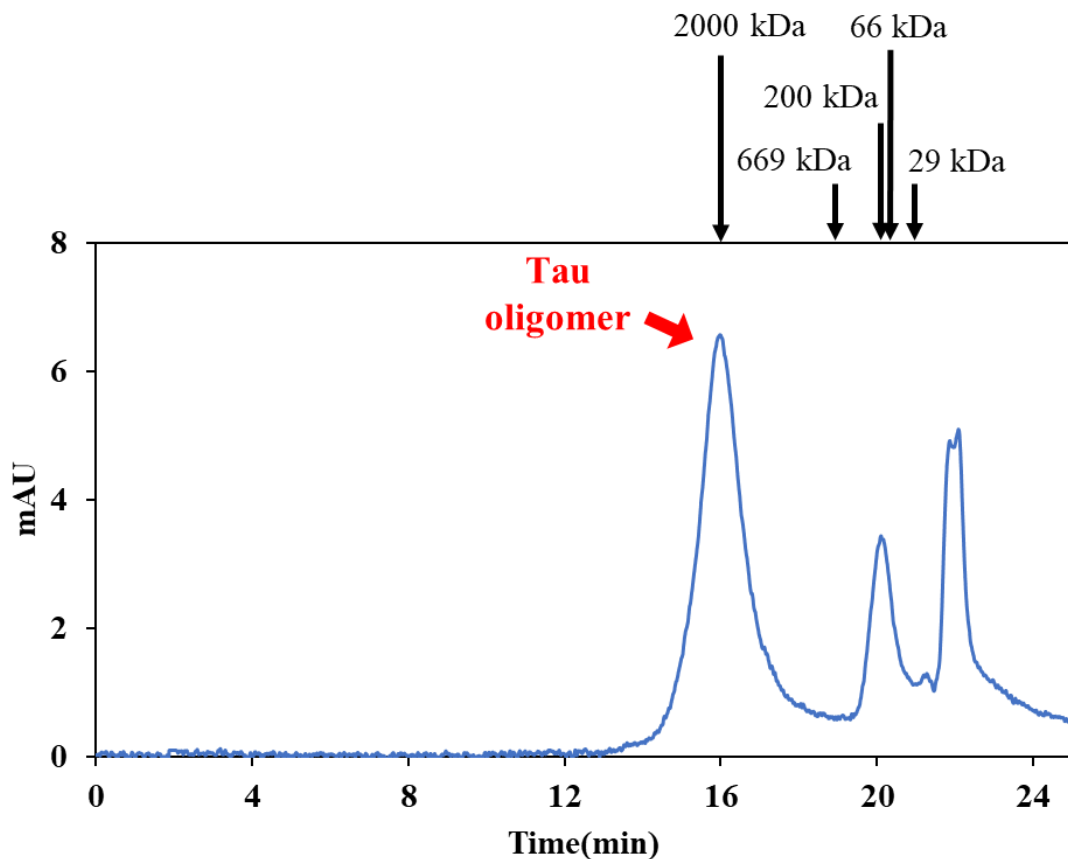


圖 3.10 分析級 SEC 純化 Tau 寡聚體之層析圖

經由製備級 SEC 純化後之 Tau 寡聚體，再以分析級 SEC 純化之層析圖。

3.5 Tau 寡聚體之 TEM 鑑定

為確認 Tau 寡聚體之形貌，以 TEM 鑑定 Tau 寡聚體樣品。將肝素誘導 36 小時之樣品經由製備級 SEC 純化，收集 48-60 分鐘與 60-70 分鐘之沖提液，以 TEM 觀察其形貌，發現在 48-60 分鐘的 Tau 蛋白聚集體有些成纖維狀的結構，而 60-70 分鐘則為較小的顆粒狀寡聚體。

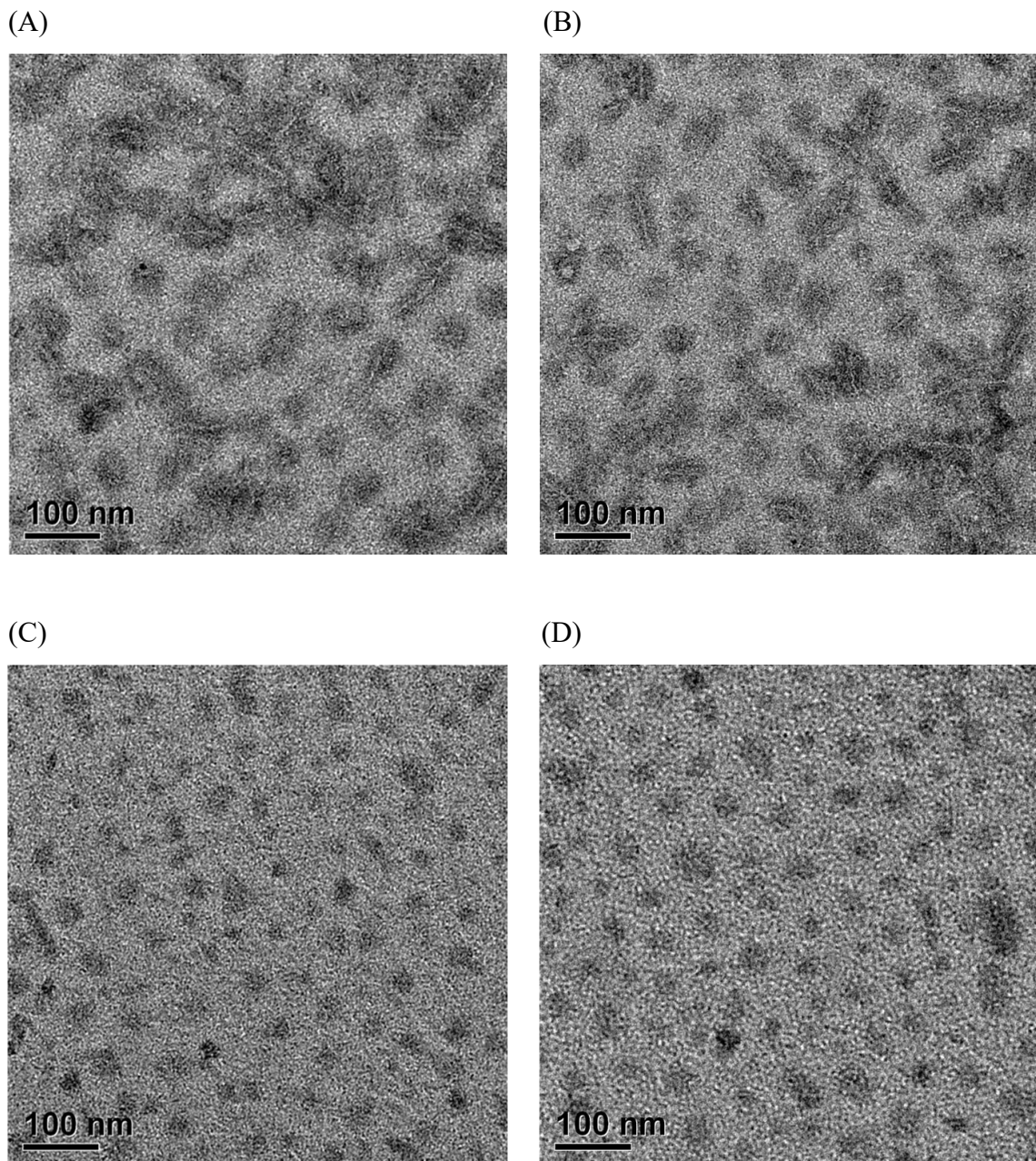


圖 3.11 經製備級 SEC 純化後 Tau 寡聚體之 TEM 影像
(A)(B)樣品為製備級 SEC 之 48-60 分鐘沖提液；(C)(D)為 60-70 分鐘沖提液。

而經分析級 SEC 純化後的 Tau 寡聚體，以 TEM 觀察，亦發現較早被沖提出的 Tau 蛋白聚集體具有纖維狀的結構，而 16.5-17.5 分鐘之寡聚體為較小的顆粒狀結構。

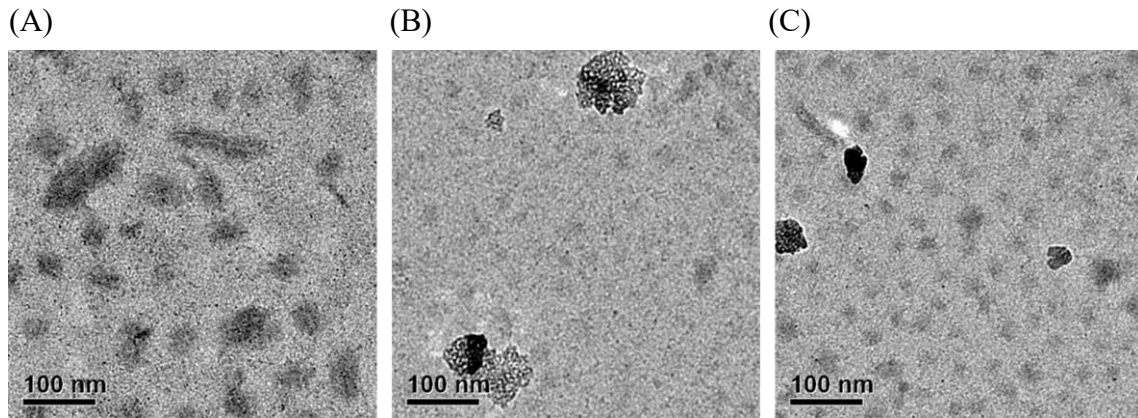


圖 3.12 經分析級 SEC 純化後 Tau 寡聚體之 TEM 影像

(A)樣品為分析級 SEC 之 14.5-15.5 分鐘沖提液；(B)為 15.5-16.5 分鐘沖提液；(C)為 16.5-17.5 分鐘沖提液。

3.6 以分析級超高速離心分析 Tau 寡聚體

為確認寡聚體大小，本研究嘗試另一種分析寡聚體大小的方法-分析級超高速離心(AUC)，能透過其沉降係數分佈進而推估蛋白質大小。而為達到儀器 AUC 偵測要求，須將經過分析級 SEC 純化後的 Tau 寡聚體收集液進行離心濃縮，並測量 UV₂₈₀ 吸收，確認吸收值大於 0.3 才能上機。結果顯示寡聚體大小分布並不集中，推測寡聚體雖經過分析級 SEC 純化，但可能受超高速離心影響，而改變聚集狀況，導致結果顯示其大小分布不均；而沉降係數分佈強度最高的位置約為 24.5S，界於 20 S 蛋白酶體（750 kDa）與 26 S 蛋白酶體（2500 kDa）之間，若以另一種已知的 α -水晶体蛋白其分子量為 800kDa，沉降係數為 22 S[59]，來推測 24.5S 寡聚體分子量大約為 1800 kDa。

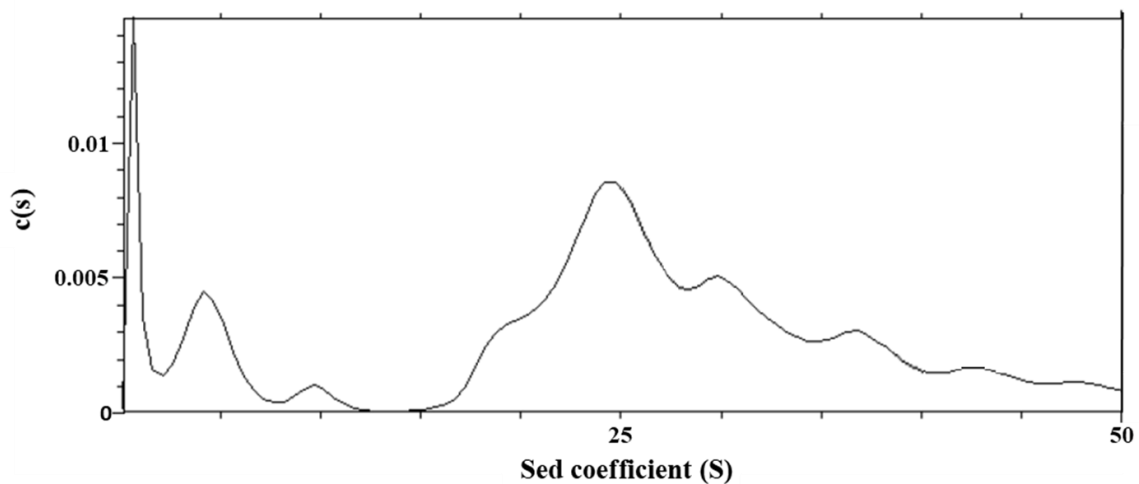


圖 3.13 AUC 之分子沉降係數分佈圖

3.7 以 Siegel-Monte 分析法分析 Tau 寡聚體

單純以 SEC 沖提時間或 AUC 測得之沉降係數，都無法正確求出分子量，因為缺乏蛋白質的形狀資訊。但是 Siegel-Monte 分析法[58]認為粒徑排阻層析法是利用蛋白質的摩擦係數使其分離，而其摩擦係數通常以 Stokes radius (R_s , nm)作替代，單位為 nm，並推導出公式 $M=4.205 S * R_s$ ， M 代表理論分子量，單位為 kDa， S 代表沉降係數，單位為 S。因此可以透過蛋白質標準品的沖提時間與其 Stokes radius 做出趨勢線，帶入未知蛋白質的沖提時間，求得其 Stokes radius。將寡聚體沖提液的時間(16.0 min)帶入趨勢線，可求得寡聚體的 R_s 為 18.0 nm，而由分析級超高速離心所測得的沉降係數約為 24.5S，帶入公式，可得寡聚體分子量為 1850 kDa，約為 40 個 Tau 聚體。

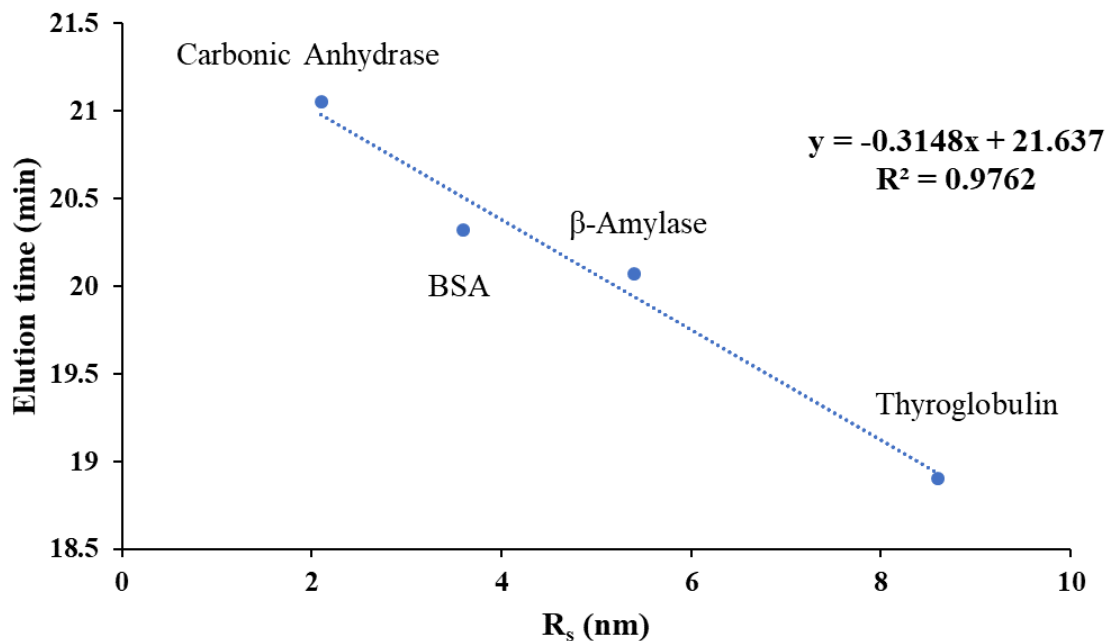


圖 3.14 將經由分析級管柱之蛋白質標準品以沖提時間對 R_s 作圖

表 3.1 蛋白質標準品之分子量、沖提時間與 Stokes radius

蛋白質標準品	分子量 (kDa)	沖提時間 (min)	Stokes radius (nm)
Thyroglobulin	669	18.9	8.6
β -Amylase	200	20.1	5.4
BSA	66	20.3	3.6
Carbonic Anhydrase	29	21.1	2.1

第四章 結論與未來展望



4.1 論文總結

本研究使用實驗室所開發的全長 (2N4R) Tau 蛋白純化方法，利用大腸桿菌大量表現，並使用管柱層析法純化全長 (2N4R) Tau 蛋白，以此作為研究 Tau 蛋白寡聚體的開端。

為了製備 Tau 寡聚體，本實驗利用聚陰離子肝素來促使 Tau 蛋白聚集，並以硫黃素螢光偵測法追蹤 Tau 蛋白聚集現象，在確定適合肝素誘導的 pH 值下，提高 Tau 蛋白與肝素濃度以獲得更高產率的 Tau 寡聚體，並觀察到 Tau 蛋白分子與肝素分子個數比為 4 比 1 時，具有最好的誘導效果；且在高離子強度下，會妨礙肝素誘導 Tau 蛋白聚集速度。

為了研究 Tau 寡聚體大小與特性，先使用製備級 SEC 純化經肝素誘導後的 Tau 寡聚體，並透過斑點印跡法偵測沖提液中的 Tau 蛋白，觀察到除了單體外，微纖維與寡聚體具有 DAKO 螢光訊號，同時也有 Alz50 的螢光訊號，代表我們所誘導的 Tau 蛋白聚集體具有錯誤摺疊之構型；也利用分析級 SEC 來純化 Tau 寡聚體，除了以能被通用型 Tau 蛋白抗體 DAKO、DA9 辨認外，也利用能被 Tau 寡聚體之抗體 T22 和 TOMA 辨認，也觀察到 T22 與 TOMA 對微纖維與單體沒有螢光訊號，而對 Tau 寡聚體有螢光訊號，代表抗體 T22 與 TOMA 對於我們所誘導的 Tau 蛋白聚集物確實具有辨認的效果。將由製備級 SEC 純化佔比最多的 Tau 寡聚體，再經由分析級 SEC 純化，並與分子量為 2000 kDa 之標準品比較，兩者被沖提出的時間相似，推論本實驗所誘導之 Tau 寡聚體其分子量約為 2000 kDa 左右，並推測寡聚體的斯托克斯半徑為 18.0 nm；透過分析級超高速離心分析 Tau 寡聚體，最常見的聚集體的其沉降係數為 24.5S，透過 Siegel-Monte 分析法推得此寡聚體較準確的分子量為 1.85 MDa，相當於 40 聚體；而 TEM 影像顯示所純化之寡聚體為顆粒狀之

結構，非棒狀或纖維結構，與 2006 年，Maeda 團隊從阿茲海默症患者腦中純化之 Tau 寡聚體相比，利用 AFM 觀察，同樣呈現顆粒狀結構，並推測其大小約為 40 聚體，代表我們所純化之 Tau 寡聚體與阿茲海默症患者腦中的 Tau 寡聚體，在形狀與大小上具有一定的相似度。

4.2 未來展望

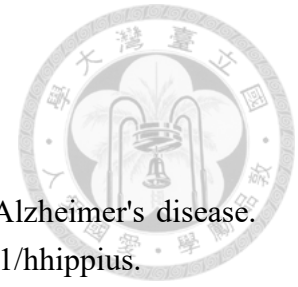
本研究利用肝素誘導 Tau 蛋白聚集，並成功純化出 Tau 寡聚體，也確認所純化佔比最多之寡聚體約為 40 個 Tau 蛋白組合而成之聚體，此結果或許對於 Tau 寡聚體的研究開啟另一個開端。

本研究製備出的 Tau 寡聚體為較多聚體之寡聚體，而過去文獻研究中也發現有較少聚體的 Tau 寡聚體存在，後續也許可以透過逆向微胞技術來產生一個受限的物理空間，嘗試獲得較小聚體的 Tau 寡聚體，並與較大的寡聚體作性質與結構之比較。

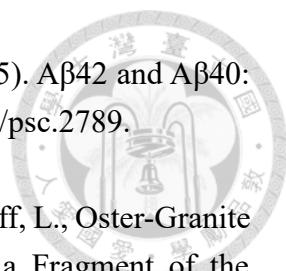
本研究純化後的 Tau 寡聚體能被 Tau 寡聚體抗體 T22 與 TOMA 所辨認，代表其具有類似於阿茲海默症患者大腦中發現的 Tau 寡聚體之構型，而近年研究顯示寡聚體比纖維更具有細胞毒性，因此後續可測試所純化出的 Tau 寡聚體之細胞毒性。

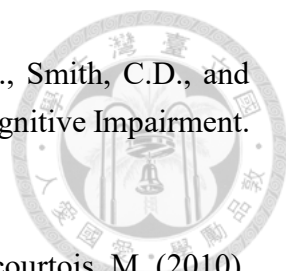
本研究的終極目標為研發 Tau 寡聚體抗體，若確認所製備出的 Tau 寡聚體確實具有細胞毒性後，利用其產生抗體並篩選適合治療的藥物，後續需進一步了解抗體與寡聚體結構之相互作用，以提高藥效並降低副作用，期待未來能透過此方式來找到治療阿茲海默症之解藥。

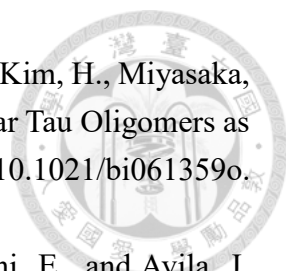
參考文獻



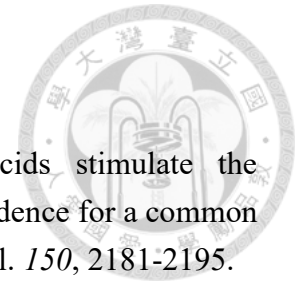
1. Hippus, H., and Neundörfer, G. (2003). The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin. Neurosci.* 5, 101-108.10.31887/dcns.2003.5.1/hhippius.
2. Hyman, B.T. (1997). The Neuropathological Diagnosis of Alzheimer's Disease: Clinical-Pathological Studies. *Neurobiol. Aging* 18, S27-S32.10.1016/s0197-4580(97)00066-3.
3. Alzheimer's Disease International, M.U. (2021). World Alzheimer Report 2021- Journey through the diagnosis of dementia.
4. Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K., and Arrighi, H.M. (2007). Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers. Dement.* 3, 186-191.10.1016/j.jalz.2007.04.381.
5. Pini, L., Pievani, M., Bocchetta, M., Altomare, D., Bosco, P., Cavedo, E., Galluzzi, S., Marizzoni, M., and Frisoni, G.B. (2016). Brain atrophy in Alzheimer's Disease and aging. *Ageing Res. Rev.* 30, 25-48.10.1016/j.arr.2016.01.002.
6. Masters, C.L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C.C., Sperling, R.A., and Cummings, J.L. (2015). Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Dis. Primers* 1, 15056.10.1038/nrdp.2015.56.
7. Glenner, G.G., and Wong, C.W. (1984). Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 885-890.10.1016/S0006-291X(84)80190-4.
8. Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E., and Hyman, B.T. (2011). Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 1, a006189-a006189.10.1101/cshperspect.a006189.
9. Nicolas, M., and Hassan, B.A. (2014). Amyloid precursor protein and neural development. *Development* 141, 2543-2548.10.1242/dev.108712.

- 
10. Qiu, T., Liu, Q., Chen, Y.-X., Zhao, Y.-F., and Li, Y.-M. (2015). A β 42 and A β 40: similarities and differences. *J. Pept. Sci.* 21, 522-529.10.1002/psc.2789.
 11. Yankner Bruce, A., Dawes Linda, R., Fisher, S., Villa-Komaroff, L., Oster-Granite Mary, L., and Neve Rachael, L. (1989). Neurotoxicity of a Fragment of the Amyloid Precursor Associated with Alzheimer's Disease. *Science* 245, 417-420.10.1126/science.2474201.
 12. Karran, E., Mercken, M., and Strooper, B.D. (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 698-712.10.1038/nrd3505.
 13. Selkoe, D.J., and Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* 8, 595-608.10.15252/emmm.201606210.
 14. Mandelkow, E.-M., and Mandelkow, E. (1998). Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* 8, 425-427.10.1016/S0962-8924(98)01368-3.
 15. Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82, 239-259.10.1007/bf00308809.
 16. Kametani, F., and Hasegawa, M. (2018). Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci.* 12, 25-25.10.3389/fnins.2018.00025.
 17. Paspalas, C.D., Carlyle, B.C., Leslie, S., Preuss, T.M., Crimins, J.L., Huttner, A.J., Dyck, C.H., Rosene, D.L., Nairn, A.C., and Arnsten, A.F.T. (2018). The aged rhesus macaque manifests Braak stage III/IV Alzheimer's-like pathology. *Alzheimers. Dement.* 14, 680-691.10.1016/j.jalz.2017.11.005.
 18. Hasegawa, M. (2016). Molecular Mechanisms in the Pathogenesis of Alzheimer's disease and Tauopathies-Prion-Like Seeded Aggregation and Phosphorylation. *Biomolecules* 6, 24.10.3390/biom6020024.
 19. Kretschmar, H. (2009). Brain banking: opportunities, challenges and meaning for the future. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 70-78.10.1038/nrn2535.

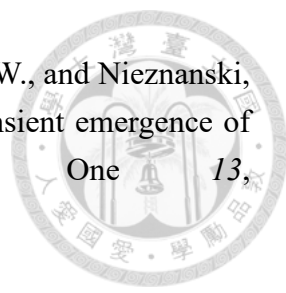
- 
20. Markesbery, W.R., Schmitt, F.A., Kryscio, R.J., Davis, D.G., Smith, C.D., and Wekstein, D.R. (2006). Neuropathologic Substrate of Mild Cognitive Impairment. *Arch. Neurol.* 63, 38.10.1001/archneur.63.1.38.
 21. Feuillette, S., Miguel, L., Frébourg, T., Campion, D., and Lecourtois, M. (2010). *Drosophila* models of human tauopathies indicate that Tau protein toxicity in vivo is mediated by soluble cytosolic phosphorylated forms of the protein. *J. Neurochem.* 113, 895-903.10.1111/j.1471-4159.2010.06663.x.
 22. J. Bonda, D., J. Castellani, R., Zhu, X., Nunomura, A., Lee, H.G., Perry, G., and A. Smith, M. (2011). A Novel Perspective on Tau in Alzheimers Disease. *Curr. Alzheimer Res.* 8, 639-642.10.2174/156720511796717131.
 23. Mroczko, Groblewska, and Litman, Z. (2019). The Role of Protein Misfolding and Tau Oligomers (TauOs) in Alzheimer ´ s Disease (AD). *Int. J. Mol. Sci.* 20, 4661.10.3390/ijms20194661.
 24. Niewiadomska, G., Niewiadomski, W., Steczkowska, M., and Gasiorowska, A. (2021). Tau Oligomers Neurotoxicity. *Life* 11, 28.10.3390/life11010028.
 25. Zilka, N., Filipcik, P., Koson, P., Fialova, L., Skrabana, R., Zilkova, M., Rolkova, G., Kontsekova, E., and Novak, M. (2006). Truncated tau from sporadic Alzheimer's disease suffices to drive neurofibrillary degeneration in vivo. *FEBS Lett.* 580, 3582-3588.10.1016/j.febslet.2006.05.029.
 26. Sahara, N., Maeda, S., Murayama, M., Suzuki, T., Dohmae, N., Yen, S.-H., and Takashima, A. (2007). Assembly of two distinct dimers and higher-order oligomers from full-length tau. *Eur. J. Neurosci.* 25, 3020-3029.10.1111/j.1460-9568.2007.05555.x.
 27. Maeda, S., Sahara, N., Saito, Y., Murayama, S., Ikai, A., and Takashima, A. (2006). Increased levels of granular tau oligomers: An early sign of brain aging and Alzheimer's disease. *Neurosci. Res.* 54, 197-201.10.1016/j.neures.2005.11.009.
 28. Maeda, S., and Takashima, A. (2019). *Tau Oligomers*. (Springer Singapore), pp. 373-380.10.1007/978-981-32-9358-8_27

- 
29. Maeda, S., Sahara, N., Saito, Y., Murayama, M., Yoshiike, Y., Kim, H., Miyasaka, T., Murayama, S., Ikai, A., and Takashima, A. (2007). Granular Tau Oligomers as Intermediates of Tau Filaments. *Biochemistry* 46, 3856-3861.10.1021/bi061359o.
30. Pérez, M., Valpuesta, J.M., Medina, M., Montejo De Garcini, E., and Avila, J. (2002). Polymerization of τ into Filaments in the Presence of Heparin: The Minimal Sequence Required for τ - τ Interaction. *J. Neurochem.* 67, 1183-1190.10.1046/j.1471-4159.1996.67031183.x.
31. Mawal-Dewan, M., Sen, P.C., Abdel-Ghany, M., Shalloway, D., and Racker, E. (1992). Phosphorylation of tau protein by purified p34cdc28 and a related protein kinase from neurofilaments. *J. Biol. Chem.* 267, 19705-19709.10.1016/S0021-9258(18)41832-7.
32. Brandt, R., Lee, G., Teplow, D.B., Shalloway, D., and Abdel-Ghany, M. (1994). Differential effect of phosphorylation and substrate modulation on tau's ability to promote microtubule growth and nucleation. *J. Biol. Chem.* 269, 11776-11782.10.1016/S0021-9258(17)32639-X.
33. Hasegawa, M., Jakes, R., Crowther, R.A., Lee, V.M.Y., Ihara, Y., and Goedert, M. (1996). Characterization of mAb AP422, a novel phosphorylation-dependent monoclonal antibody against tau protein. *FEBS Lett.* 384, 25-30.10.1016/0014-5793(96)00271-2.
34. Goedert, M., Jakes, R., Spillantini, M.G., Hasegawa, M., Smith, M.J., and Crowther, R.A. (1996). Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature* 383, 550-553.10.1038/383550a0.
35. Mukrasch, M.D., Biernat, J., Von Bergen, M., Griesinger, C., Mandelkow, E., and Zweckstetter, M. (2005). Sites of Tau Important for Aggregation Populate β -Structure and Bind to Microtubules and Polyanions. *J. Biol. Chem.* 280, 24978-24986.10.1074/jbc.m501565200.
36. Flach, K., Hilbrich, I., Schiffmann, A., Gärtner, U., Krüger, M., Leonhardt, M., Waschipky, H., Wick, L., Arendt, T., and Holzer, M. (2012). Tau Oligomers Impair Artificial Membrane Integrity and Cellular Viability. *J. Biol. Chem.* 287, 43223-

43233.10.1074/jbc.m112.396176.



37. Wilson, D.M., and Binder, L.I. (1997). Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 150, 2181-2195.
38. King, M.E., Ahuja, V., Binder, L.I., and Kuret, J. (1999). Ligand-Dependent Tau Filament Formation: Implications for Alzheimer's Disease Progression. *Biochemistry* 38, 14851-14859.10.1021/bi9911839.
39. Combs, B., Tiernan, C.T., Hamel, C., and Kanaan, N.M. (2017). Chapter 3 - Production of recombinant tau oligomers in vitro. In *Methods in Cell Biology*, Volume 141, S.C. Feinstein and N.E. LaPointe, eds. (Academic Press), pp. 45-64.10.1016/bs.mcb.2017.06.005
40. Kampers, T., Friedhoff, P., Biernat, J., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1996). RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS Lett.* 399, 344-349.10.1016/s0014-5793(96)01386-5.
41. Zwierchowski-Zarate, A.N., Mendoza-Oliva, A., Kashmer, O.M., Collazo-Lopez, J.E., White, C.L., and Diamond, M.I. (2022). RNA induces unique tau strains and stabilizes Alzheimer's disease seeds. *J. Biol. Chem.*, 102132.10.1016/j.jbc.2022.102132.
42. Lasagna-Reeves, C.A., Castillo-Carranza, D.L., Guerrero-Muñoz, M.J., Jackson, G.R., and Kaye, R. (2010). Preparation and Characterization of Neurotoxic Tau Oligomers. *Biochemistry* 49, 10039-10041.10.1021/bi1016233.
43. Chirita, C.N., Congdon, E.E., Yin, H., and Kuret, J. (2005). Triggers of Full-Length Tau Aggregation: A Role for Partially Folded Intermediates. *Biochemistry* 44, 5862-5872.10.1021/bi0500123.
44. Liu, X.L., Hu, J.Y., Hu, M.Y., Zhang, Y., Hong, Z.Y., Cheng, X.Q., Chen, J., Pang, D.W., and Liang, Y. (2015). Sequence-dependent abnormal aggregation of human Tau fragment in an inducible cell model. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1852, 1561-1573.10.1016/j.bbadis.2015.04.015.

- 
45. Nizynski, B., Nieznanska, H., Dec, R., Boyko, S., Dzwolak, W., and Nieznanski, K. (2018). Amyloidogenic cross-seeding of Tau protein: transient emergence of structural variants of fibrils. *PLoS One* 13, e0201182.10.1371/journal.pone.0201182.
 46. Montgomery, K.M., Carroll, E.C., Thwin, A., Hodges, P., Southworth, D.R., and Gestwicki, J.E. (2022). The chemical features of polyanions modulate Tau aggregation and conformational states. *bioRxiv*.10.1101/2022.07.28.501920
 47. Mansuroglu, Z., Benhelli-Mokrani, H., Marcato, V., Sultan, A., Violet, M., Chauderlier, A., Delattre, L., Loyens, A., Talahari, S., Bégard, S., et al. (2016). Loss of Tau protein affects the structure, transcription and repair of neuronal pericentromeric heterochromatin. *Sci. Rep.* 6, 33047.10.1038/srep33047.
 48. Patterson, K.R., Remmers, C., Fu, Y., Brooker, S., Kanaan, N.M., Vana, L., Ward, S., Reyes, J.F., Philibert, K., Glucksman, M.J., et al. (2011). Characterization of Prefibrillar Tau Oligomers in Vitro and in Alzheimer Disease. *J. Biol. Chem.* 286, 23063-23076.10.1074/jbc.m111.237974.
 49. Lasagna-Reeves, C.A., Castillo-Carranza, D.L., Sengupta, U., Clos, A.L., Jackson, G.R., and Kaye, R. (2011). Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. *Mol. Neurodegener.* 6, 39.10.1186/1750-1326-6-39.
 50. Mutisya, E.M., Bowling, A.C., and Beal, M.F. (2002). Cortical Cytochrome Oxidase Activity Is Reduced in Alzheimer's Disease. *J. Neurochem.* 63, 2179-2184.10.1046/j.1471-4159.1994.63062179.x.
 51. Sultan, A., Nessler, F., Violet, M., Bégard, S., Loyens, A., Talahari, S., Mansuroglu, Z., Marzin, D., Sergeant, N., Humez, S., et al. (2011). Nuclear Tau, a Key Player in Neuronal DNA Protection. *J. Biol. Chem.* 286, 4566-4575.10.1074/jbc.m110.199976.
 52. Lasagna-Reeves, C.A., Castillo-Carranza, D.L., Sengupta, U., Sarmiento, J., Troncoso, J., Jackson, G.R., and Kaye, R. (2012). Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. *FASEB J.* 26, 1946-1959.10.1096/fj.11-199851.

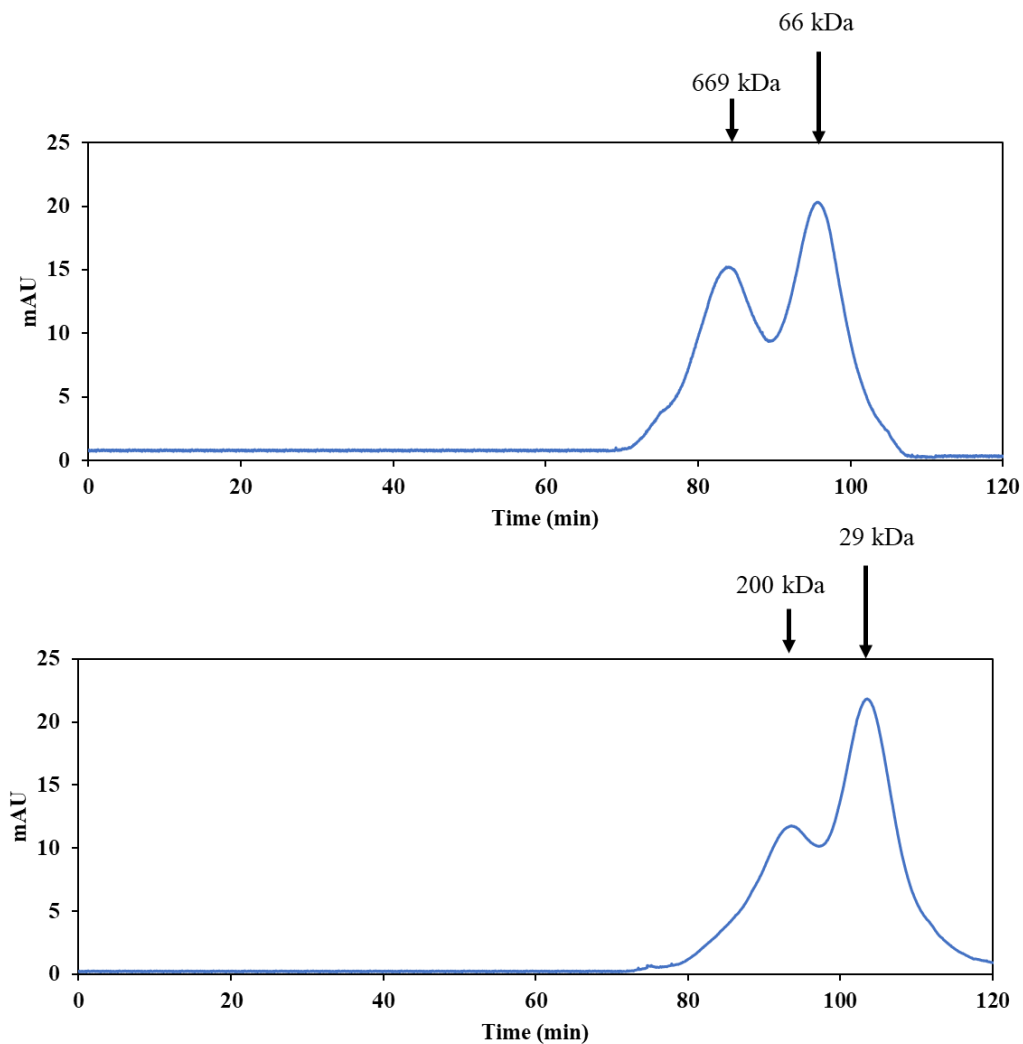
53. Castillo-Carranza, D.L., Sengupta, U., Guerrero-Munoz, M.J., Lasagna-Reeves, C.A., Gerson, J.E., Singh, G., Estes, D.M., Barrett, A.D.T., Dineley, K.T., Jackson, G.R., et al. (2014). Passive Immunization with Tau Oligomer Monoclonal Antibody Reverses Tauopathy Phenotypes without Affecting Hyperphosphorylated Neurofibrillary Tangles. *J. Neurosci.* 34, 4260-4272.10.1523/jneurosci.3192-13.2014.
54. Zsila, F., Samsonov, S.A., and Maszota-Zieleniak, M. (2020). Mind Your Dye: The Amyloid Sensor Thioflavin T Interacts with Sulfated Glycosaminoglycans Used To Induce Cross- β -Sheet Motifs. *J. Phys. Chem. B* 124, 11625-11633.10.1021/acs.jpcc.0c08273.
55. Hsu, J.C.C., Chen, E.H.L., Snoeberger, R.C., Luh, F.Y., Lim, T.S., Hsu, C.P., and Chen, R.P.Y. (2013). Thioflavin T and Its Photoirradiative Derivatives: Exploring Their Spectroscopic Properties in the Absence and Presence of Amyloid Fibrils. *J. Phys. Chem. B* 117, 3459-3468.10.1021/jp309331u.
56. Klein, N.D., Hurley, K.R., Feng, Z.V., and Haynes, C.L. (2015). Dark Field Transmission Electron Microscopy as a Tool for Identifying Inorganic Nanoparticles in Biological Matrices. *Anal. Chem.* 87, 4356-4362.10.1021/acs.analchem.5b00124.
57. Cole, J.L., Lary, J.W., P Moody, T, and Laue, T.M. (2008). Analytical ultracentrifugation: sedimentation velocity and sedimentation equilibrium. *Methods Cell Biol.* 84, 143-179.10.1016/s0091-679x(07)84006-4.
58. Erickson, H.P. (2009). Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biol. Proced. Online* 11, 32-51.10.1007/s12575-009-9008-x.
59. Ryazantsev, S.N., Poliansky, N.B., Chebotareva, N.A., and Muranov, K.O. (2018). 3D structure of the native α -crystallin from bovine eye lens. *Int. J. Biol. Macromol.* 117, 1289-1298.10.1016/j.ijbiomac.2018.06.004.

附錄



附錄 A 以製備級 SEC 管柱分離蛋白質標準品

為分析 Tau 寡聚體分子量，本研究使用製備級粒徑排阻層析管柱(HiPrep 16/60 Sephacryl S-500 HR) 搭配高效能液相層析系統，在流速 1 mL/min，以 280 nm 吸收波長下進行實驗。為預估在此條件下，蛋白質沖提出的時間所對應之分子量，因此使用不同蛋白質標準品:Thyroglobulin (669 kDa)、 β -Amylase(200 kDa)、Bovine Serum Albumin(66 kDa)與 Carbonic Anhydrase(29 kDa)。



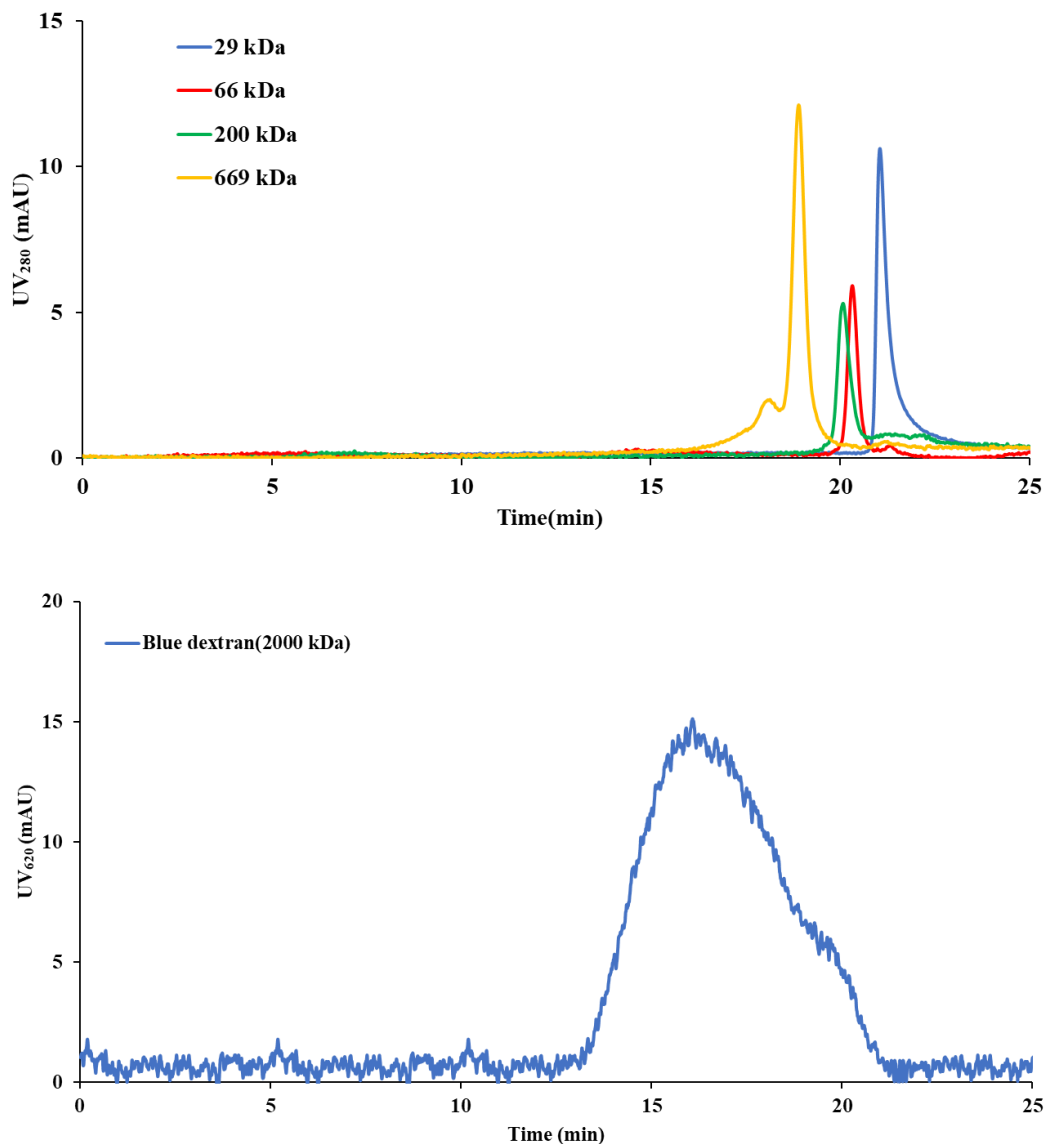
附圖 1 以製備級粒徑排阻層析管柱分離蛋白質標準品

附表 A.1 以製備級 SEC 分離不同蛋白質標準品之 Retention time

Protein standard	Molecular weight (kDa)	Retention time (min)
Carbonic Anhydrase	29	103.5
Bovine Serum Albumin	66	96
β -Amylase	200	93
Thyroglobulin	669	84

附錄 B 以分析級 SEC 管柱分離標準品

為分析 Tau 寡聚體分子量，本研究使用分析級粒徑排阻層析管柱(Agilent Bio SEC-5) 搭配高效能液相層析系統，在流速 0.5 mL/min，以 280 nm 吸收波長下進行實驗。為預估在此條件下，蛋白質沖提出的時間所對應之分子量，因此使用不同蛋白質標準品:Thyroglobulin (669 kDa)、 β -Amylase(200 kDa)、Bovine Serum Albumin(66 kDa)與 Carbonic Anhydrase(29 kDa)，另外使用 2000 kDa 的 Blue dextran 作為標準品，並以 620 nm 為吸收波長。



附圖 2 以分析級粒徑排阻層析管柱分離標準品

附表 B.1 以分析級 SEC 分離不同蛋白質標準品之 Retention time

Protein standard	Molecular weight (kDa)	Retention time (min)
Carbonic Anhydrase	29	21.1
Bovine Serum Albumin	66	20.3
β -Amylase	200	20.1
Thyroglobulin	669	18.9
Blue dextran	2000	16.0