

論文の内容の要旨

論文題目： **Molecular Genetic Analysis of Kinesin Super Family Protein 2 (KIF2)**

和訳：キネシンスーパーファミリープロテイン2 (KIF2) の分子遺伝学的研究

指導教官：廣川 信隆 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成10年4月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名： 本間 典子

概要

キネシンスーパーファミリー (KIF) は、ATP を加水分解しながら微小管上を動くモーター蛋白群として単離精製され、機能解析がなされてきた。KIF2 は、その ATP 酵素活性部位を分子の中央にもつ、ユニークなサブファミリー (M-kinesins) に属する。過去の研究から、M-kinesins の蛋白質は、微小管の脱重合活性を持ち、細胞分裂期の紡錘体形成や細胞の突起形成に関与することが示唆されていた。しかし、KIF2 ではそれらの作用は未だ確認されておらず、また、生体内特に、発現の多い発生初期の脳における機能は不明であった。

今回、遺伝子標的組み換え法を用いて、KIF2 遺伝子欠損マウスを作製し、細胞および個体レベルにおける KIF2 の機能解析を行った。面白い事に、KIF2 遺伝子欠損マウスは生後一日以内に全て死亡し、その脳には、神経細胞移動の障害による、著明な層構造の形成異常と神経核の位置異常がみられた。また、本来主枝が優先して伸長するはずの軸索に、多くの側枝が発達していた。海馬の初代培養を用いた実験から、この側枝発達が、細胞移動の遅れの原因であることが分かってきた。さらに、微小管脱重合能について調べたところ、in vitro でのその作用は明らかであった。また、培養細胞においても、KIF2 遺伝子欠損マウスでは、微小管脱重合能の低い成長円錐が増加していた。以上のことが

ら、KIF2 は、神経系の発達における「側枝抑制因子」としての機能が示唆された。すなわち、KIF2 は、側枝の成長円錐において微小管を脱重合することによってその伸長を抑制するのである。その結果として主枝の優先的伸長を促し、細胞移動や形態形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

序論

神経発生において、神経細胞は、分裂を終えた場所から所定の場所に移動し、目的の場所に到着後、突起を伸長させて神経回路を形成していく。それぞれの過程で、神経細胞の突起は、必要に応じてその分枝を発達させたり、逆にその伸長を抑制したりする。特に軸索は、長く複雑な神経回路の形成や神経細胞の移動を可能にするため、その主枝を優先的に伸させる必要があると考えられてきた。こうした特徴ある神経細胞の形態形成においては、その構成に必要な要素が主枝に優先的に輸送される必要がある。しかし、特に軸索における物質輸送は微小管に依存していることを考慮すると、物質輸送に先んじて、微小管の organization が神経細胞の形態形成の鍵を握っている可能性がある。

一方、Kinesin Super Family (KIF) は、微小管上を ATP を加水分解することによって動くモーター分子群の一つである。KIF はさらにそのモーター領域 (ATP 結合領域) の分子内位置によって大きく3つの subfamily をなし、現在、総数45あることが知られている。それぞれのモーター分子はそれに応じた cargo を細胞体から末梢 (順行性) に運んだり、末梢から細胞体 (逆行性) に運んだりしていると考えられている。

今回我々は、これらの中で特に KIF2 に注目した。KIF2 は分子の中央にモーター領域を持つ、数少ない subfamily (M-kinesins) に属する。そのマウスにおける発現は全組織に及ぶが、特に脳に多く、続いて脾臓、胸腺、肺に多い。時期的には幼弱な神経細胞、特に成長円錐に多く発現していることが知られている。また、近年、他の M-kinesins が、ATP 依存性に微小管脱重合活性を有することが分かってきており、細胞内の微小管の organization に KIF2 が関与している可能性が示唆されていた。しかし、これらの研究はすべて、生化学的、もしくは継代培養細胞を用いたものであり、KIF2 の生体内における

機能の解明は重要な課題であった。今回、我々は、標的遺伝子組み換え法を用いて KIF2A 遺伝子欠損マウスを作製し、その生体内の機能の詳細な解析を行った。

方法と結果

1、KIF2 遺伝子欠損マウスの作製

KIF2 は ATPase であることから、ATP が結合する領域 (p-loop) の exon を欠損させるよう、ターゲティングベクターを作製した。Positive selection にはネオマイシン耐性遺伝子を、negative selection にはジフテリア毒素 A フラグメント遺伝子を用いた。ES 細胞は J1 株を用い、エレクトロポレーションにてベクターを導入後、単離培養し、サザンブロット法によって相同組み換え体を得た。組み換えが起こった ES 細胞を C57Bl/6 胚盤胞に打ち込み、キメラマウスを得、C57bl/6 の雄をかけ合わせてヘテロマウスを得た。このヘテロマウスは、雌雄共に外見上目立った異常は見られず、繁殖能も正常であった。

2、KIF2 遺伝子欠損マウスのフェノタイプ

今回作製した KIF2 遺伝子欠損マウスは、生後一日以内にすべて死亡した。その脳を固定して形態観察したところ、神経細胞層の形成異常や顕著な神経核の位置異常が観察された。そこでまず、抗体や diI などの蛍光色素を用いて神経細胞および神経突起を可視化し、KIF2 を欠損したマウス脳における神経細胞の位置や移動状況を観察した。その結果、中枢神経系の各所で明らかな細胞移動の障害が認められた。特に細胞移動距離のもっとも長いといわれる顔面神経核では、その移動障害が特に重篤であった。面白い事に、KIF2 遺伝子欠損マウスでは、移動中および移動後の神経細胞の軸索に、異常に伸長した側枝が多く観察されていた。その上、移動障害を受けている細胞群の軸索束は、ひどくばらけてしまっていた。これらの結果から、突起形成異常と細胞移動障害には関連があることが示唆された。これらの現象は、脳より樹立した培養神経細胞においても同様に認められたため、我々は次に、初代神経培養細胞を用いて移動中の神経細胞の突起の変遷を観察した。その結果、KIF2 遺伝子欠損マウスの神経細胞では、神経突起、特に移動細胞の軸索の側枝が伸長し、その結果

として神経細胞の移動が障害を受けることが示唆された。細胞体の移動の様子をさらに観察した結果、KIF2 遺伝子を欠損した神経細胞の細胞体は、側枝が異常に発達してしまったために移動方向である主枝の選択が難しくなり、その分岐点で移動が障害されることが推測された。さらに、生化学的な解析から、KIF2 が ATP に依存して微小管を脱重合することも明らかになった。KIF2 が神経細胞の成長円錐に多く発現している事を考慮すると、KIF2 の神経発生における二つの機能の可能性が示唆された。一つは、KIF2 が軸索側枝の形成自体を抑制している可能性であり、他方は、KIF2 が軸索状の既存の成長円錐の伸長を抑制している可能性である。軸索の主枝上の成長円錐の数と側枝の長さを測定比較したところ、両遺伝子型の神経細胞の成長円錐の数に大きな変化はなく、側枝の長さのみに差がみられた。すなわち、KIF2 は成長円錐において、微小管を脱重合し、伸長すべきでない側枝の伸長を抑制している可能性が支持された。我々は最後に、アデノウイルスベクターを用いて GAP-tubulin を神経細胞に発現させ、成長円錐内での microtubule の脱重合能の解析を行った。もし KIF2 が成長円錐の中で微小管代謝に関わっているとすれば、KIF2 遺伝子を欠損した細胞の成長円錐では、微小管の脱重合速度が低下するはずである。結果は予想通りであった。

以上の結果から、KIF2 は、軸索の主枝上に形成された成長円錐において、微小管を脱重合することによって側枝の伸長を抑制する、側枝抑制因子であることが示唆された。この側枝抑制の結果として、KIF2 は主枝優先的な軸索の伸長を促進し、生体内においては、少なくとも脳における神経細胞の移動に重要な役割を持つことが提唱された。

結論及び考察

古くより、突起の伸長・退縮の際の細胞骨格変化や、突起伸長の方向を決定する分子メカニズムについては多くの研究がなされてきた。しかし、なぜ軸索が主枝優先的に伸長するのかについてはほとんど解明されていなかった。今回我々は、キネシンスーパーファミリープロテイン2 (KIF2) の遺伝子欠損マウスの解析を通して、主枝優先的な突起伸長のメカニズムとその個体における重要性を示唆した。まとめると以下のようなになる。

1. 神経系の形態形成とりわけ軸索突起形成において、KIF2A は側枝抑制の働きをする。また側枝には主枝の投射ミスを補償する役割もあることが知られている。面白いことに、その成長円錐は投射ミス等が生じるまえからあらかじめ備えられており、非常事態以外はその伸長が抑制されていると考えられている KIF2A 遺伝子欠損マウスでは成長円錐内での微小管代謝回転のバランスがくずれ、側枝の伸長抑制が解かれるため、神経突起、特に側枝の伸長が著しく増大すると考えられた。
2. KIF2A は、神経細胞の成長円錐において、微小管を脱重合する作用をもち、神経細胞形態形成に重要なはたらきを持つ。
4. 神経細胞が移動する際には、その進行方向に優位に伸長した突起に沿って移動する必要がある。その過程で側枝は退縮する必要があるが、側枝が異常に伸長してしまうと、優位な突起がなくなり、細胞体はその移動速度失う。
5. 伸長を抑制すべき成長円錐を認知するメカニズムや、微小管を脱重合するメカニズムについては、今後の研究を要する。
6. KIF2A が軸索伸長において側枝伸長抑制に関わっているとすれば、神経回路網の形成にも重要なはたらきをされると考えられるが、この解明にはさらなる解析を必要とする。