

## 論文の内容の要旨

論文題目：**Functional analysis of KIF4 Through the Identification of its Binding Protein, PARP.**

和訳：**KIF4 結合蛋白質の同定とその解析**

指導教官：廣川 信隆 教授

東京大学大学院医学系研究科分子細胞生物学専攻

平成10年4月入学

医学博士課程

細胞生物学専攻

氏名： 緑川 良介

キネシンスーパーファミリー (KIFs) に属する KIF4 は、幼若期マウスの組織において発現が高く、細胞内では細胞質及び核内に分布するモーター蛋白質である。

本研究では、細胞内における KIF4 の機能について解析するため、マウスの脳懸濁液より KIF4 結合蛋白質の単離を試みた。

GST-Pull Down 法に基き、KIF4 C 末端に位置する Tail domain に対する結合蛋白質をスクリーニングしたところ、Poly-(ADP ribose) polymerase (PARP) が検出された。両蛋白質間の結合は、in vitro における結合実験及び免疫沈降法による in vivo 結合実験においても確認された。

PARP は核内 DNA 損傷時に DNA の損傷部位に結合し様々な核内蛋白質を Poly ADP-ribose 化することで DNA 修復機構の発動を誘導する酵素として知られている。マウス繊維芽細胞に対して DNA を損傷させたところ、損傷後、KIF4 のクロマチンに対する結合量の増大が確認され、その結合は PARP による Poly ADP-ribosylation 活性に依存することが明らかとなった。これらのことから、KIF4 は DNA 損傷により誘導される PARP の活性化に伴い、核内での分布を変化させる分子であることが確認された。

KIF4 の PARP 活性に対する影響について検証するため、KIF4 を NIH 3T3 細胞に過剰発現させたところ、PARP 活性の低下が確認された。KIF4 遺伝子を欠失させた ES 細胞 (KIF4 knockout ES 細胞) では、PARP 活性の増大がみられた。

これらの結果より、KIF4 は細胞内において PARP 活性に対する抑制的因子として機能する蛋白質であることが示唆された。

KIF4 は幼若期における神経組織において高い発現を示すことが知られている。幼若期の神経細胞における KIF4 の生物学的機能について解析するため、KIF4 knockout ES 細胞より幼若期の神経細胞を *in vitro* 分化誘導により作成した。これらの神経細胞に形態学的な異常は認められなかったが、培養液中の神経栄養因子あるいは KCl 除去により誘導されるアポトーシスに対し、耐性を示すことが確認された。また、このアポトーシス耐性は PARP 活性の上昇に起因することが確認された。

これまでに、高濃度 KCl の添加により過分極化処理を受けた神経細胞では PARP の活性化がおこることが知られている。過分極化された神経細胞では、アポトーシス抑制機構が発動される。本研究において、高濃度 KCl 存在下で培養した野生型神経細胞に対し PARP インヒビターを添加したところ、KCl 処理によるアポトーシス抑制効果が失われた。これらのことから、PARP 活性化は過分極化によるアポトーシス抑制機構に重要な役割を果たしていることが示唆された。

幼若期における神経組織では、神経活動に依存した神経細胞の生存及び淘汰がおこる。本研究結果より、KIF4 による PARP 活性の抑制化は、これらの機構に深く関与している可能性が示唆された。