

## 審査の結果の要旨

論文題目：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、細胞内では主に核内に分布し、また細胞質にも微量に存在するモーター蛋白質である。これまでに、KIF4 ホモログと想定される幾つかの蛋白質が同定されているが、それらは全て有糸分裂における染色体分離に関与する分裂モーターではないかと考えられてきた。しかしながら、私が所属する研究室で作られた KIF4 欠失細胞では有糸分裂に大きな異常はみられず、KIF4 は核内モーターとして新規の機能をもつ蛋白質ではないかと考えられた。そこで本研究では、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、PARP と同様に 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。これらの結果より、KIF4 は、DNA 損傷後、PARP の活性化によってクロマチン

へ招集される蛋白質であることが示され、細胞内での PARP との機能的関連性が示唆された。次に、KIF4 が PARP と結合することの意義について検証するため、KIF4 を過剰発現させた細胞における PARP 活性の変化について確認を行った。その結果、PARP 活性の有意な低下が確認された。一方、PARP 結合領域にあたる Tail domain を失失した KIF4 を発現させた場合、PARP 活性に影響はみられなかった。また、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、神経細胞 (immature neuron) において高い発現を示すことが知られている。immature neuron における KIF4 の生物学的機能について検証するため、KIF4 knockout ES 細胞より immature neuron 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 の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され、また KIF4 は同機構に対し、PARP 活性を制御することで抑制的な働きをもつことが示唆された。

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。本研究結果は、KIF4 がこれらの機構に深く関与している可能性を示し、また、モーター蛋白質の新たな機能的側面を提唱するものであり、学位授与に値すると思われる。