

論文の内容の要旨

論文題目： Molecular Genetic Study of Motor Protein KIF1A

和訳： モーター分子 KIF1A 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 11 年 4 月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名： 董 銘

概要

キネシンスーパーファミリー1A (Kinesin Superfamily Protein 1A: KIF1A)は、神経系に多量に発現するモノマー型モーター分子であり、軸索中のシナプス小胞前駆体を順行性に輸送していると予想されているが、生体内での機能は十分にわかっていない。KIF1A を完全に欠失させたマウスは生後 24 時間以内に全て死亡してしまうため、成体における KIF1A の機能を解析することはこれまで不可能であった。そこで今回私は、KIF1A の発現が様々なレベルで低下した一連の KIF1A ミュータントマウス系統を作出し、発生・分化が十分に進んだ段階の神経細胞における KIF1A の機能解析を行った。これらのミュータントマウスは生後 5-7 月頃から運動ニューロンの変性と運動障害を呈した。運動障害は KIF1A の発現が低いものほど重症であった。この KIF1A ミュータントマウス系統は神経変性疾患と軸索輸送の関連を研究する上で有用なモデルマウスである。

序論

細胞は生命活動の基本的単位であり、細胞内では蛋白質の合成、脂質代謝及び物質輸送などが盛んに行われている。細胞内の物質輸送は細胞の活動にとって必須の役割を果たしており、従ってそのメカニズムを解明することは生命科学の普遍的命題に答えることになる。キネシンスーパーファミリー(Kinesin Superfamily)とダイニンスーパーファミリー(Dynein Superfamily)の一群が物質輸送を行っていることが現在までの研究で明らかにされてきたが、それぞれの分子の生理学的・細胞生物学的意味には不明な点が多い。KIF1A は神経系に特異的に発現するモノマー型順方向性モーター分子である。生体内での分子の機能をダイレクトに知るためには、ノックアウトマウスの解析が大変有用であるが、KIF1A を欠失したノックアウトマウスが生後 24 時間以内で死亡するため、成体マウスにおける機能は解析できなかった (Yonekawa et al., J. Cell Biol. 141: 431-41. 1998)。そこで今回私は、KIF1A の発現が様々なレベルで抑制された KIF1A ミュータントマウス系統の一群を作成し、分化が進んだニューロンにおける KIF1A の機能解析を試みた。

方法と結果

1. KIF1A hypomorph mutant の作成

まず、KIF1A ゲノム断片をクローニングし、制限酵素地図を作り、exon-intron 構造を決定した。次に KIF1A ゲノム断片に 3 ヲ所の loxP サイトとポジティブ・ネガティブセレクションマーカー遺伝子等を導入し、3 loxP タイプのターゲティングベクターを構築し、電気穿孔法により ES 細胞に導入した。薬剤耐性を指標として組み換え体を選別し、選別されたコロニーを個別に培養し、その一部より DNA を精製し、サザンブロットで相同組み換え体をスクリーニングした。こうして得られた組み換え体に Cre を一過性に発現させ、loxP サイトで組み替えをおこさせて薬剤耐性マーカーが除去されたクローン (II 型) を得た。この ES 細胞を受精後 3.5 日のマウス胚盤胞に微小ピペットを用いて注入し、偽

妊娠状態の仮親マウス子宮に移植し出産させた。ここで得られたキメラと野生型マウスを交配して得られる子孫の一部はⅡ型変異 KIF1A 遺伝子についてヘテロ接合体である(kif1a(Ⅱ/+))。ヘテロ接合体同士の交配によって kif1a(Ⅱ/Ⅱ)マウスを、また米川らによって作成された既存の kif1a null mutation のヘテロ接合体(kif1a+/-) との交配によって kif1a(Ⅱ/-)マウスを得た。

2. *Kif1a* 変異マウスの解析

Kif1a 変異マウスにおける KIF1A の発現量と運動障害の関連

Rotarod test を用いて検討したところ、kif1a(Ⅱ/Ⅱ), kif1a(-/+), kif1a(Ⅱ/-)の成績は、野生型 kif1a(+/+)と比較して低下しており、運動障害の存在が明らかになった。脊髄の KIF1A の発現量を比較すると、kif1a(Ⅱ/Ⅱ)は野生型の 68%, kif1a(-/+)は 56%, kif1a(Ⅱ/-)は 29%であった。Rotarod test の成績は KIF1A の発現量が低い系統ほど低下していた。そこで、最も成績の悪い kif1a(Ⅱ/-)マウスについて以後の詳細な解析を行った。脳（大脳+小脳）、坐骨神経においても、kif1a(Ⅱ/-)マウスの KIF1A 発現量は野生型の 30%以下に減少していた。ゲノム上の loxP の挿入部位近傍には AP-2 binding sequence が存在するため、この部位における transcriptional regulation を阻害し、結果として KIF1A の発現量の低下をきたしたと考えられる。

kif1a(Ⅱ/-)マウスの運動機能

kif1a(Ⅱ/-)マウスは生後 5-7 ヶ月頃から歩行障害が目立ち始める。Footprint を比較すると、歩幅の減少が明らかであった。Wire hanging test を行ったところ、kif1a Ⅱ/-マウスはワイヤーの上で姿勢を保持できず、筋力が低下していることが示唆された。また、fixed-bar test (静止した棒の上での姿勢保持)などのパフォーマンスも Rotarod 同様に低下していた。

kif1a(Ⅱ/-)マウスの組織病理学

kif1a(Ⅱ/-)マウスの坐骨神経及び脊髄において、径の大きな軸索の減少と変性像、spheroid body が認められた。spheroid body は下位の脊髄でより多数存在した。神経原性と考えられる筋萎縮が観察された。電子顕微鏡により、kif1a(Ⅱ/-)マウスの Motor neuron の細胞体及び軸索に膜小器官（ライソゾーム、ミトコンドリア、multivesicular body など）、細胞骨格要素（ニューロフィラメント）の

集積像が多数認められた。この所見は、*kif1a*(II/-)マウスの Motor neuron において、細胞内輸送、特に軸索輸送の障害が生じたことを示唆する。

結論及び考察

1. 発生・分化が進んだ段階のニューロンにおける *kif1a* 遺伝子の機能を検討するために、KIF1A hypomorph allele を持つマウス系統を作成し解析した。
2. これらの変異マウスは進行性の運動障害を呈した。KIF1A の発現量が低下している系統ほど障害は重篤であった。最も症状の重い *kif1a*(II/-)マウス系統では、KIF1A の発現量は野生型の 30%以下に減少していた。
3. 組織病理学的には、運動ニューロンの変性と筋線維の萎縮を認めた。神経細胞の細胞体及び軸索に膜小器官と細胞骨格要素(ニューロフィラメント)が集積していた。
4. 以上の結果は、この変異マウスの神経細胞に軸索輸送の障害が生じた結果、Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)などの運動ニューロン疾患 (Motor Neuron Disease)と類似した病態をきたしたことを示唆する。