

## 論文の内容の要旨

論文題目 Gene targeting study of kinesin superfamily protein 16A, KIF16A

和訳 キネシンスーパーファミリー蛋白 16A, KIF16A 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13年4月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 黄 嘯

キネシンスーパーファミリータンパク質(KIFs)は、ATP の化学エネルギーを使って微小管上を移動する分子モーターのうち、もっとも大きな遺伝子スーパーファミリーを構成している。これらの KIFs は、よく保存されたモータードメインと、それぞれのファミリー間で相同性の少ないカーゴ結合領域がモジュールとして結合した形をしている。五十種類程度の KIF 遺伝子には、大きくわけて、N 末にモータードメインがあり微小管の(+)末端に向かって運動するグループ、C 末にモータードメインがあり微小管の(-)末端に向かって運動するグループ、そして分子の中央にモータードメインがあり主に微小管を脱重合する活性を持つグループの三種がある。そのいくつかについては、近年作製されたノックアウトマウス(KIF1A, KIF1B, KIF1C, KIF2A, KIF3A, KIF3B, KIF5A, KIF5B, KIF5C, KIFC2, KIFC3 など)の解析により、細胞内小器官やメッセンジャーRNA の輸送、細胞分裂、微小管の脱重合などの役割が示唆されている。たとえば、KIF1B ノックアウトマウスは神経難病の一種 CMT2A のモデルマウスであり、KIF3A あるいは KIF3B のノックアウトマウスは胎生の初期に左右軸などの発生異常を起こし、KIF2A のノックアウトマウスは神経細胞の軸索側枝の退縮の異常により大脳皮質や海馬の発生過程における細胞移動や神経細胞層の構築に変異をきたすことが判明した。しかしその他多くの KIF の機能にはまだ不明な部分が多い。

KIF16A は、キネシンモータードメインに共通するアミノ酸配列を用いて、マウス脳の cDNA ライブラリーから RT-PCR 法を用いて同定された新しい KIF 遺伝子である。分子進化的な解析によれば KIF1 や KIF13 と近縁な N-3 ファミ

リーのキネシンに分類され、また特異的な抗体によるイムノブロッティングにより、ほぼすべての組織に発現されていることが明らかとなっている。またその C 末には PIPs に結合すると考えられる PX ドメインを持つため、KIF16A はキネシンスーパーファミリーで唯一 sorting nexin (SNX) に分類されているが、その機能は不明である。今回、この KIF16A の生物学的重要性を調べるため、KIF16A のモータードメインの一部を Cre recombinase の発現によって条件特異的に欠失することのできる KIF16A のコンディショナル・アレルを相同組換え法によりマウス ES 細胞に導入した。このアレルのヘテロ接合体の ES 細胞を型のごとくマウスの胞胚腔に顕微注入しその胞胚を偽妊娠マウスの子宮に移植して 296 匹のキメラマウスを作製した。しかし、これらのキメラマウスを野生型と掛け合わせたところ、3505 匹の F1 世代のうち、KIF16A の組換えアレルを継承しえたものは一匹もなく、KIF16A の軽微なハプロインサフィシエンシーにより胚の発生が障害されたことが示唆された。

そこで、Cre/loxP テクノロジーを利用して、KIF16A のヘテロ組換えコンディショナルアレルをもった細胞株に対して Cre 発現ベクター、ターゲティングベクター、Cre 発現ベクターの順にトランスフェクションとサブクロニングを繰り返し、KIF16A アレルを完全に欠失したノックアウト ES 細胞株を樹立した。ノックアウト ES 細胞株は、コントロールと比較して外見上大きな異常はなく、また増殖の速度にも大きな差は認められなかった。

ところが、この KIF16A を欠失した ES 細胞株、あるいはその由来するヘテロ組換えコンディショナルアレル株あるいは野生型株をそれぞれ *in vitro* の環境で *embryoid body* を形成させ、三胚葉の初期分化を観察したところ、*embryoid body* 形成から 10 日程度の段階において、ノックアウト株の *embryoid body* の発育が有意に遅れていることが明らかとなった。そこで、固定標本をパラフィン包埋し切片を観察したところ、ノックアウト群では *cystic cavity* の周囲の塩基好性の外胚葉細胞による円柱上皮の形成がほとんど見られなかった。そこで、TUNEL 法によりこの切片を染色してみると、対象群では少数のアポトーシス細胞の点在が見られたが、ノックアウト群では、60%以上の *embryoid body* において、中心部の空隙の近傍に集積した細胞塊にアポトーシス像が観察された。

これらの観察により、KIF16A 遺伝子は、ES 細胞の *in vitro* 分化の過程において、外胚葉性の細胞系譜の分化あるいは維持に必須であることが明らかとなった。この表現型は、現在までの KIF ノックアウトマウスにおいてもっとも重篤であり、新しい KIF16A 遺伝子の初期発生過程における細胞内シグナル伝達の分子メカニズムへの深い関与が示唆される。初期外胚葉の分化過程においては、BMP、Ihh、FGF、dystroglycan などのシグナルの関与が明らかとなっているが、今回の結果は、これらのシグナル伝達メカニズムへの微小管系分子モ

ーターの重要な関与をはじめて強く示唆するものである。