

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 上野 仁之

本研究はキネシンスーパーファミリータンパク質群の一つであるマウスの **KIF16B** のクローニングおよびその機能解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. すでにサブクローニングされていた *Kif16b* 遺伝子のモータードメインの配列をプローブとして用い cDNA ライブラリーより *Kif16b* 遺伝子の全長 cDNA をクローニングしたのちその塩基配列を決定した。その塩基配列より予想されるアミノ酸配列を用い、**KIF16B** に 3 つの機能ドメイン（キネシンモータードメイン、FHA ドメイン、PX ドメイン）が存在することを発見した。
2. **KIF16B** の全長に His-Tag をつけたものを Baculovirus に組み込み、昆虫細胞 Hi5 で発現し、ニッケルカラムで精製したものを抗原として用いてウサギでポリクローナル抗体 anti-KIF16B を作成した。**KIF16B** が欠損した細胞と発現している細胞を Western blotting および蛍光抗体法に用いて観察したところ、いずれの場合も **KIF16B** が発現している細胞でのみ、シグナルが観測できた。このことによりこの抗体が特異的に **KIF16B** を認識することが示された。
3. **KIF16B** の細胞内での局在をみるために遠心分画法を行ったところ、**KIF16B** は比較的重い分画に存在していることが判った。さらに界面活性剤存在下、非存在下において Nycodenz による floating assay を行ったところ、界面活性剤非存在下でのみ比重の軽い分画にくることが判った。このことにより **KIF16B** は膜小胞や膜小器官に局在していることが示唆された。
4. **KIF16B** の微小管への結合能を AMP-PNP (ATP の加水分解しないアナログ) と ATP の存在下で調べたところ、AMP-PNP の存在下で微小管に強く結合し、ATP 存在下で微小管から解離することが示された。このことより

KIF16Bは微小管の上をATP依存的に滑走することが示唆された。

5. KIF16BのPXドメインにGSTをつけたものを発現させ各種のイノシトールリン脂質でドットプロットを行ったところ、KIF16Bは*in vitro*で特異的にPI(3)P, PI(5)P, PI(3,4)P, PI(3,5)Pに結合することが示された。またPI3Kの阻害剤であるWortmanninをかけたHeLa細胞でKIF16Bが膜小胞から解離するかを調べたところ、コントロールに用いたEEA-1は膜小胞から解離したが、KIF16Bは膜小胞に結合したままであった。このことよりKIF16BはPI3K非依存的に膜小胞に結合していることが示され、KIF16Bが膜小胞に結合するためには他にも結合因子があることが示唆された。
6. KIF16Bに直接結合するタンパク質を探索するためにYeast Two-Hybridをおこなったところ、Rab14がKIF16Bに直接結合することが示された。またHeLa細胞に活性型Rab14 (Rab14Q70L)と不活性型Rab14 (Rab14S25N)を発現させてKIF16Bと共免疫沈降をさせたところ活性型Rab14の場合でのみKIF16Bと共免疫沈降をすることが示された。このことによりKIF16BはRab14が活性型である時のみ結合することが示された。

以上、本論文はマウスのKIF16Bの全長のクローニングと機能解析が行われ、いままで明らかにされていなかったKIF16Bの基本的な機能について明らかにした。本研究はこれまで知られていなかった、KIF16BとRab14のactive formが直接結合することを判明し、Golgi-to-endosomesの輸送に関わっていることが示唆された。またキネシンスーパーファミリータンパク質とカーゴとの結合が脂質とタンパク質の両方によって行われていることを初めて示唆する研究であり、細胞内での物質輸送の制御の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位を授与するに値するものと考えられる。