

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目： **Molecular Genetic Study of Kinesin Superfamily Protein 26A (KIF26A)**

和訳：新規モーター分子 KIF26A の分子遺伝学的研究

指導教官 広川信隆 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

分子細胞生物専攻

氏名： 周 如賛

概要

分子モーターであるキネシンスーパーファミリータンパク (kinesin superfamily proteins、KIFs) は、近年、マウスで 45 種類あることが明らかになり、そのサブタイプによって、細胞内で多様な機能を持つことが分かってきた。KIF26A はキネシンスーパーファミリーの新しいメンバーであり、その機能は全く未知である。そこで、本研究では、生体内での機能を知るために KIF26A 遺伝子欠損マウスを作成し、解析した。

KIF26A 遺伝子欠損マウスは、巨大結腸 (megacolon) のため生後 2-4 週間で死亡した。遺伝子欠損マウスの腸の神経節においては、神経細胞の数は増大していたが、神経突起は逆に減少していた。KIF26A 遺伝子欠損マウスの神経節細胞を培養すると、突起伸張の抑制、成長円錐の異常拡張などの形態変化が認められた。また、GDNF (glia cell-derived neurotrophic factor) によって引き起こされる ERK リン酸化レベルの上昇が過度になっていることがわかった。以上から、KIF26A は、腸の神経発生を制御していること、その制御に GDNF シグナリングが関与していることが示唆された。

序論

細胞内物質輸送は、細胞の活動にとってファンダメンタルな役割を担っている。従って、この物質輸送のメカニズムを解明することは、細胞生物学の普遍的命題に答えることになるといえよう。これまでの研究により、キネシンスーパーファミリー(kinesin superfamily)が、細胞内物質輸送に重要な働きをしていることが明らかにされてきたが、個々の分子の生理学的・細胞生物学的役割については、まだまだ不明な点が多く残されている。そこで、本研究では、発生工学的手法であるマウスの標的遺伝子組み換え法(gene targeting)を用い、KIF26A 遺伝子欠損マウスを作製し、解析することを通じて、KIF26A の生体内での役割、及び細胞内での分子機能についての知見を得ようと試みた。

方法と結果

1. 遺伝子組み換え法を用いて *kif26a* 遺伝子欠損マウスを作製する。

kif26a 遺伝子欠損マウス作製のために、まず、①ES 細胞の genomic DNA を鋳型として PCR 法で KIF26A 遺伝子断片を得た。次に、②相同組み換えによって KIF26A 分子の ATP 結合領域である p-loop と IRES-LacZ-neo カセットが組み変わるよう targeting vector を作成した。③電気穿孔法により targeting vector を ES 細胞に導入して、薬剤耐性を指標として組み換え体を選別した。選別された組み換え colony をそれぞれ培養して、その一部より DNA を精製し、southern blotting 法により、相同組み換え体をスクリーニングした。④次にこの相同組み換え体をさらに培養して、受精後 3.5 日のマウス子宮から回収した blastocyst の胚盤腔に微小ピペットを用いて注入した。この胚盤胞を別途準備した偽妊娠状態の雌マウス子宮に移植し出産させた。⑤ここで得られたキメラマウスと野生型雌マウスを交配し、仔の遺伝子型を PCR 法あるいは southern blotting 法で検定し変異 ES 細胞の生殖細胞系列への寄与を確認した。さらに、変異を持つヘテロマウスどうしを掛け合わせるにより、KIF26A 遺伝子欠損ホモマウスを得ることに成功した。

2. 表現型についての解析。

kif26a 遺伝子欠損マウスは生後 1 週間頃から巨大結腸を呈し、生後 2 週間から 5 週間までに死亡した。生理学的には、腸のカルバコールに対する反応性が、過剰かつ延長していることが分かった。*kif26a* 遺伝子プロモーター下流につないだ LacZ の発現を調べたところ、KIF26A は、腸の神経節に発現していることが分かった。組織学的には、KIF26A 遺伝子欠損マウスの腸の神経節において、神経細胞の数は増大しているが、特に遠位結腸のアセチルコリンエステラーゼ陽性神経細胞は増え、神経突起は逆に減少していた。次に神経節細胞の初代培養を樹立し、細胞の形態を観察した。遺伝子欠損マウスの神経細胞の成長円錐は過度に拡張していて、その中の微小管は、通常のような tight array を形成せず、束

化が阻害されていた。次に、上記の表現型の分子機構を探るために、腸神経節の発生を制御されると言われている GDNF(glial cell-derived neurotrophic factor)シグナリングについて、検討した。その結果、GDNF シグナリング下流にある ERK リン酸化レベルが、遺伝子欠損マウスの細胞で過剰になっており、この pathway の脱抑制が起きていることが示唆された。

3. KIF26A の分子機能についての解析

kif26a 遺伝子欠損マウスは、GDNF-Ret pathway の脱抑制が起きていることが分かったから、KIF26A たんぱく質とこの pathway を構成する蛋白の関係について調べた。Yeast two-hybride と免疫沈降法で KIF26A と GDNF-Ret pathway の構成要素である GRB2 結合していることが観察した。

結論及び考察

1. 新規モーター分子 KIF26A 遺伝子欠損マウスを作成し解析した。
2. KIF26A は腸の神経節に発現した。
3. KIF26A 遺伝子欠損マウスは、巨大結腸のため生後 2-5 週で死亡した。
4. KIF26A 遺伝子欠損マウスの腸の神経節では、神経細胞の数が増加し、神経突起は未発達となった。
5. 3, 4, の表現型の原因として、GDNF signaling の関与が示唆された。
6. KIF26A は GDNF-Ret cascade の GRB2 と結合することが分かった。