

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 周 如 贇

本研究はキネシスーパーファミリー(kinesin superfamily proteins, KIFs)の新しいメンバーである KIF26A の生体内での役割、及び細胞内での分子機能を明らかにするため、KIF26A 遺伝子欠損マウスを作成し、解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 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。電気穿孔法により **targeting vector** を ES 細胞に導入し、次に分離した相同組み換え体をさらに培養して、blastocyst の胚盤腔に注入し、キメラマウスを得た。キメラマウスから数度の掛け合わせにより KIF26A 遺伝子欠損ホモマウスを得た。
2. 胎生 14.5 日と生後 12 日における KIF26A の発現を検討したところ、腸の神経節に発現していることが分かった。
3. *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。
4. *kif26a* 遺伝子欠損マウスの表現型についてさらに解析した。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。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、神経細胞の数が増大していた。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の増加は顕著であった。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。
5. 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。
6. KIF26A と GDNF-Ret pathway を構成する蛋白の関係について調べた。Yeast two-hybrid と免疫沈降法で KIF26A と GDNF-Ret pathway の重要な構成要素である GRB2 が結合していることが示された。

以上、本論文はキネシンスーパーファミリーの新しいメンバーである **KIF26A** 遺伝子欠損マウスの作成と解析を通じ、**KIF26A** が **GRB2** と結合し、**GDNF-Ret pathway** を抑制的に制御すること、また **KIF26A** の欠失により、腸神経節の過形成による巨大結腸が発生することを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、**KIF26A** の特異な役割を明らかにしたのみならず、ヒルシュスプルング病などのヒト巨大結腸症の病態機序の解明ひいては治療法の開発に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。