

## 論文の内容の要旨

論文題目： Molecular Genetic Study of Kinesin Superfamily Protein, KIF17

和訳：モーター分子 KIF17 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 17 年 4 月入学

医学博士課程

分子細胞生物専攻

氏名： 尹 喜玲

## 概要

神経細胞は、シナプスで刺激を受け取る樹状突起と、刺激を他の神経細胞に伝える軸索の 2 種類の異なった突起を有する。樹状突起と軸索においてはそれぞれ異なった膜小器官および蛋白複合体のコンポーネントが順行性または逆行性に然るべき機能部位へ輸送される。この輸送は微小管をレールとして、キネシンスーパーファミリー蛋白と呼称される蛋白群によって行われる。神経伝達物質および神経伝達物質受容体もキネシンスーパーファミリー蛋白による輸送によって、各々シナプス前部あるいはシナプス後部に運ばれ、神経細胞の情報伝達に供される。多種類存在するキネシンスーパーファミリー蛋白のなかで、私は近年発見された KIF17 に注目して研究を進めている。KIF17 は神経細胞に多量に発現するキネシンスーパーファミリー蛋白であり、Lin10 (Mint1)、Lin2 (CASK)、Lin7 (VELIS/MALS) からなる蛋白複合体を介して樹状突起で NMDA 受容体の輸送を行うことが *in vitro* の実験から示唆されていた。しかしながら、KIF17 が生体内でいかなる機能を有しているかについて、詳細を調べるために、*in vivo* の実験が不可欠である。そこで今回、筆者は *kif17* 遺伝子欠損マウスを新たに作成し、解析した。

*Kif17* 遺伝子欠損マウスは、ケージ内環境においては一見正常に発育し、脳切片の明視野鏡検に於いても異常は認められなかったが、その神経細胞においては、シナプスへの

NMDA 受容体輸送が低下していること、その結果シナプスに含まれる NMDA 受容体サブユニットが減少していることが判明した。更に電気生理学的解析によって、長期増強の低下、CREB リン酸化の低下など、シナプスの活動依存的可塑性に関わるメカニズムに異常が見つかり、マウス個体の空間記憶の障害を招いていることが明らかになった。

## 序論

細胞内物質輸送は、細胞の活動にとって基本的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、未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、KIF17 遺伝子欠損マウスを作製し、解析することを通じて、KIF17 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 *kif17* 遺伝子欠損マウスを作製する。

*Kif17* 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 *kif17* 遺伝子断片を得た。次に、②相同組み換えによって KIF17 分子の ATP 結合領域である exon と PGK-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、サザン・ブロッティング法により、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 法あるいはサザン・ブロッティング法で検定し変異 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、*kif17* 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。

*Kif17* 遺伝子欠損マウスの脳組織の抽出液を用いてウェスタン・ブロッティングを行ったところ、NMDA レセプター受容体サブユニットの NR2A と NR2B の量が減っていた。次に *kif17* 遺伝子欠損マウス海馬ニューロンの初代培養細胞を作成し、NR2B-YFP 遺伝子

を導入してその動態を追跡したところ、NR2B の樹状突起内トランスポートが低下している所見を得た。マウス脳の急性スライスを使用した電気生理実験では、テタヌス刺激によって誘発される長期増強現象と、NMDA 受容体依存性興奮性シナプス後電流がノックアウトマウスのスライスで低下していた。また個体レベルでは空間記憶の獲得に遅延が認められた。神経刺激または空間記憶トレーニングによる CREB 活性化がノックアウトマウスでは不十分であった。

### 結論及び考察

1. モーター分子 *kif17* 遺伝子欠損マウスを作成し解析した。
2. *Kif17* 遺伝子欠損マウスでは NMDA 受容体の樹状突起内輸送が低下していた。
3. *Kif17* 遺伝子欠損マウス神経細胞では NMDA 受容体依存性の活動依存的可塑性が低下した。
4. *Kif17* 遺伝子欠損マウスは、空間記憶の獲得に障害が認められた。
5. 以上より、KIF17 が NMDA 受容体を樹状突起内で運ぶことを明らかにした。
6. また、分子モーターによるレセプター輸送が神経可塑性を維持するために必須のメカニズムであることを、初めて個体レベルで証明した。