

審査の結果の要旨

氏名 楊 文星

本研究は新規キネシンスーパーファミリータンパク質である KIF12 の性質を明らかにするため、標的遺伝子組換え法を用いてノックアウトマウスを作成し、ノックアウト膵島ベータ細胞ならびにノックダウンベータ細胞株において KIF12 欠失の影響を細胞生物学的に解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. マウス ES 細胞における標的遺伝子組換え法により *Kif12* 遺伝子座に欠失を導入した相同組換え ES 細胞株を作成した。次にこれをマウス胚盤胞に注入しキメラマウスを得、これを掛け合わせることによって KIF12 欠失マウスを得た。
2. KIF12 タンパク質 C 末端の配列を有するペプチドを合成し、これをウサギに免疫することによって KIF12 タンパク質の特異抗体を得た。
3. KIF12 特異抗体を用いて KIF12 ノックアウトマウスと野生型マウスの各組織を免疫ブロットングによって解析することにより、KIF12 が膵島ベータ細胞ならびに腎臓に特異的に多く発現していることが示された。
4. KIF12 ノックアウトマウスと野生型マウスより膵島細胞の一次培養を行い、各種オルガネラマーカーでこれを間接蛍光抗体法によって染色したものをコンフォーカル蛍光レーザー顕微鏡にて観察したところ、KIF12 ノックアウト細胞では特異的にペルオキシゾームにおける ACAA1 酵素に対する染色シグナルの有意な減弱が示された。またこの減弱は *Kif12* cDNA を発現することによって補完されるので、この表現型は確かに *Kif12* 遺伝子の欠失によって生じたことが示された。
5. ペルオキシゾーム酵素量を調節する機能が知られているタンパク質に対してこれら膵島細胞を染色したところ、同様に KIF12 ノックアウト細胞における染色シグナルの有意な減弱が示された。またこの減弱は KIF12 cDNA を発現することによって補完されるので、この表現型は確かに *Kif12* 遺伝子の欠失によって生じたことが示された。
6. KIF12 とペルオキシゾームとの関係を生化学的に解析するため、*Kif12* 遺伝子の pol II miRNA 法によるノックダウンアデノウイルスベクターを構築した。このベクターをマウス膵島細胞株 MIN6 に強制発現させることによって、KIF12 タンパク量の有意な減少を得た。さらにこの miRNA 配列に抵抗性を持つ KIF12 発現ベクターをコドン置換

法によって構築した。これらのノックダウンベクターと発現ベクターの共発現によって、KIF12 タンパク量が野生型と同等レベルにまで回復することが示された。

7. MIN6 細胞における *Kif12* ノックダウン系をイムノブロットング法にて解析することにより、KIF12 タンパク質の不足によって特異的に S1 分画における調節タンパク質および Pex5 タンパク質のタンパク量および P2 分画における ACAA1 タンパク量が有意に減少することが示された。またこれらの減少は *Kif12* cDNA を発現することによって補完されるので、この表現型は確かに KIF12 タンパク質の不足によって生じたことが示された。
8. KIF12 タンパク質の不足による調節タンパク質の減少が転写レベルの調節によるものかを調べるため、上記ノックダウン系においてリアルタイム RT-PCR 法によって調節タンパク質遺伝子の転写量を測定した。その結果、野生型とノックダウン細胞では有意な差がないことが示された。
9. KIF12 タンパク質と調節タンパク質との特異的な分子間相互作用を免疫沈降法および近接ライゲーションアッセイ法を用いて解析した。その結果、これらのタンパク質が細胞質において分子複合体を形成していることが示され、この分子複合体形成が細胞質において直接調節タンパク質のタンパク量を制御していることが示唆された。

以上、本論文は新規に樹立した KIF12 ノックアウトマウスの臍島ベータ細胞ならびにベータ細胞株の KIF12 ノックダウン系において、KIF12 との分子複合体の形成による調節タンパク質量のモジュレーションを介したペルオキシゾーム酵素量の新規調節系を明らかにしたものである。本研究はこれまで未知に等しかったペルオキシゾーム酵素量の調節系について、キネシンスーパーファミリータンパク質の分子遺伝学の観点からまったく新しい経路の同定に至ったものであり、脂質糖代謝のシグナルネットワークの解析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。