

審査の結果の要旨

氏名 徐 方

本研究は神経細胞の発達・機能に重要な役割を果たす分子モーター、KIF1B β 遺伝子の動態と機能を解析するため、C57BL/6系マウス由来のES細胞RENKA株を用いてKIF1B β 遺伝子特異的なEGFPノックインマウスを作成し、その解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. KIF1B β 遺伝子の最終エクソンの終止コドンにEGFP cDNAを置換し、PGK-neo-polyAカセットをポジティブ・セレクション・マーカーとするターゲティングベクターを構築した。ES細胞内での相同組換え用の長腕はBACクローンより大腸菌内のRed/ETによる法による相同組換えにより、短腕はPCRによりサブクローニング。非相同組換えのクローンを排除するため、ネガティブ選択マーカーとしてpMC1-DT-Aも導入した。
2. このターゲティングベクターをRENKA株マウスES細胞に電気穿孔法にて導入してG418で選択後、96個のコロニーをピックアップし、これをサザンブロット法にてスクリーニングした。結果として、非常に高率に4個の相同組換え体を得ることができた。
3. この相同組換え体のES細胞を8細胞期のマウス胚にマイクロインジェクションし、キメラマウスを作成した。このキメラマウスをバッククロスしてヘテロ、ホモ接合体を得た。ヘテロとヘテロを交配した結果、43匹の野生型、69匹のヘテロ接合体、35匹のホモ接合体が生まれた。これはメンデル比にほぼ合致しており、ノックインマウスの致死性は検出されなかった。
4. 遺伝子組換えマウスの脳のライセートを用い、イムノブロットングを行った。ノックインされたKIF1B β のバンドは内在性バンドよりGFPに相当する分子量だけ上方にシフトしていることを示した。また、ヘテロ接合体においては、ノックインされたKIF1B β のバンドは内在性のKIF1B β バンドとほぼ同じ発現量であることを示した。
5. このノックインマウスを用い、形態学的な解析を行った。4週齢ホモ接合体と野生型マウス脳からそれぞれ急性スライスを作成し、LSM710/LSM780コンフォーカル顕微鏡(ZEISS)を用いて観察した。特に海馬の部分において、ノックイン切片に有意に明るいシグナルを検出した。マルチチャンネル分光ディテクターを用いてこの蛍光のスペクトル解析を行い、EGFPのエミッションピークと一致していることを示した。
6. ノックインマウスの海馬ニューロン細胞を初代培養し、スピニングディスク顕微鏡を用いてタイムラプスデータを得た。このカイモグラフを解析すると、軸索内を順方向に動いているKIF1B β 小胞の速度は、文献に報告された結果とほぼ一致していることを示した。

[課程－2]

以上、本論文はマウス C57BL/6 由来 ES 細胞を用い、相同組換えにより KIF1B β -GFP ノックインマウスを作成し、その遺伝学的、生化学的、形態学的解析を行い、このマウスが内在性の KIF1B β 分子を GFP 蛍光で標識した個体レベルのモデル系としての有効性を示した。本研究は、これまでよいモデル系が得られなかった個体レベルの分子モーターの発現・動態の解析に関して、ゲノム上に GFP を融合した初めてのノックインモデルを確立したものであり、脳の発生・高次機能・病態に重要な働きをもつ分子モーターの機能の解明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。