

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 王 碩

本研究は高等動物初期発生過程において器官や組織の形成、運命決定などの重要な役割を演じていると思われる分子モーターKIF3Bの発生生物学的・細胞生物学的意義を解析するため、マウスES細胞のジーンターゲティングを用いてKIF3B機能低下マウスを作成し、その解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. KIF3B 遺伝子を部位・時期特異的に破壊するため、長大な第一エクソンに loxP 配列を挿入し、また、第一イントロンに loxP でサンドイッチした最終エクソンの終止コドンに EGFPcDNA に置換、floxed SA-IRES-βgeo-polyA カセットをポジティブ・セレクション・マーカーとするコンディショナル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と短腕はラムダファージ cDNA クローンより増幅した。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-DTA も導入した。
2. このターゲティングベクターを J1 株マウス ES 細胞に電気穿孔法にて導入して G418 で選択後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 細胞を胎胚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 KIF3B-3loxP アリルのヘテロ、ホモ接合体を得た。ヘテロとヘテロを交配した結果、胎生 10.5 日の段階にてホモ接合体はメンデル比を下回る 10%程度しか生存していなかった。
4. ホモ接合体マウスの胎児のライセートを用い、イムノブロットングを行った。KIF3B の量は大幅に減少し、結合タンパクである KIF3A, KAP3 の発現量も減少していた。
5. ホモ接合体の RT-PCR 法による解析により、Kif3b 遺伝子が、第一イントロンに挿入したスプライスアクセプター付きのポジティブセレクションカセットにより遺伝子トラップされ、全長のメッセンジャーの発現が減少して機能低下マウスを結果したものであることが予測された。
6. このノックインマウスを用い、形態学的な解析を行った。以前発表された Kif3b ノックアウトマウスでは、線毛の欠損、左右軸決定異常、神経管形成異常、心肥大、成長遅延及び胎生致死などの重篤な表現形を示す。これとは異なり、この機能低下マウスにおいては、内臓の左右軸の決定は正常に行われていた。
7. 内臓の左右軸は、ノードにおける線毛の回転により、ノード腹側表面の胚体外液の左向

きの流れ、ノード流を生じることにより生じることが予測されている。そこで、走査型電子顕微鏡を用いて、腹側ノードにおける線毛の発生を確認したところ、線毛の発生はほぼ正常に起こっていた。このことから、この機能低下マウスにおいては、ノード線毛の発生に十分な量の **KIF3B** タンパクの発現は確保されており、その結果として、ノード線毛を介した左右軸の決定は正常に行われたものと考えられた。

8. ところが、手指の発生を観察してみると、ホモ接合体のほぼすべての個体において、多指症が観察された。
9. 手の原基において、特異的な抗アセチル化チューブリン抗体を用いた **whole mount immunohistochemistry** 法によって線毛を蛍光染色してみると、それぞれの細胞の大きさの若干の拡大が見られたが、細胞あたりの線毛の量はほぼ変化していなかった。
10. したがって、この機能低下マウスは、線毛のあきらかな低形成を示さない多指症のモデルマウスとして、モルフォゲンのシグナル伝達機構を研究するための新しいモデルになりうると考えられる。

以上、本論文はマウス **ES** 細胞を用い、相同組換えにより **KIF3B** 機能低下マウスを作成し、その遺伝学的、生化学的、形態学的解析を行い、線毛の明らかな形態異常を示さない多指症を示す個体レベルの発生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 **KIF3B** 分子モーターの解析のために、ユニークな方法で機能低下モデルを確立したものであり、個体発生・脳の高次機能・病態など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。