



## Kif14 Mutation Causes Severe Brain Malformation and Hypomyelination

Fujikura, Kohei

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2015-03-06

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3277号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003277>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

(論文博士関係)

## 学位論文の内容要旨

### *Kif14* Mutation Causes Severe Brain Malformation and Hypomyelination

*Kif14* の変異は脳の形成異常と髓鞘低形成を引き起こす

(指導教員：神戸大学大学院医学研究科 勅坂敏朗教授)

藤倉 航平

#### (目的)

多種多様な神経細胞によって構成される脳の形態形成には、数多くの遺伝子が、ステージ特異的、細胞特異的に秩序だって発現することが必要不可欠である。本研究では、ノックアウトマウスの作製中に偶然、協調運動障害を示す新規突然変異マウスを見出し、系統を確立した。このマウスは單一座位劣性遺伝様式を示し、協調運動障害を特徴とすることから *laggard* (のろま) と命名した。この突然変異マウス *laggard* の表現型解析と遺伝子同定を通して、脳の形態形成を解明することを目的とした。

#### (方法)

##### Stationary Beam Test

P12の同腹マウスを5 cm幅の水平な台に置き、落下するのにかかる時間の計測を行った。

##### 実験動物の作出

突然変異マウス *laggard* は RA-RhoGAP ノックアウトマウスの作製中に偶然発見された。pCAGGS-Kif14 トランスジェニックマウスは、Kif14 cDNA の全長を pCAGGS ベクターにサブクローニングし、C57BL/6J の受精卵にマイクロインジェクションを行うことで得られた。Kif14 ノックアウトマウスは、C57BL/6J マウス由来の HK4i ES 細胞に exon 5 を Neomycin 耐性カセットで置換することで作出了した。

##### 連鎖解析と次世代シークエンス解析

マイクロサテライトマーカーおよびSNPマーカーを用いて連鎖解析を行った。得られた結果をLOD (Logarithm of Odds) score を算定し、連鎖が確認された領域に関して、Exome capture sequencingを行った。

##### 免疫抗体染色

マウスを4 %のパラホルムアルデヒドで還流固定した後、脳と脊髄を取り出し、各種抗体で固定染色を行った。抗Kif14抗体は、大腸菌に発現させたGST融合 *Mus musculus* Kif14 (aa 137-390)を抗原として、ウサギを用いることで得られた。

##### 電子顕微鏡

マウスを還流固定した後、脳と脊髄を取り出した後、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色を行い、TEMで観察を行った。

##### マイクロアレイ

Total RNAをP14マウスの大脳から抽出し、Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0で解析した。

#### (結果)

- ・新規突然変異マウス *laggard* は、小頭症、振戦、失調性歩行を示した。Stationary beam testにおいて、P12 変異マウスは 10 秒以上橋脚に乗り続けることは困難であった。*lag* 変異をホモに持つマウスは P21 までに全て死亡した。
- ・脳と脊髄の切片を抗 Myelin Basic Protein (MBP) 抗体で染色したところ、変異マウスの脳においては、小脳髓体の弱いシグナルを除いて、全て陰性であった。同様に脊髄においても、後索のわずかなシグナルを除いて、陰性であった。
- ・全脳のウエスタンブロッティング及びマイクロアレイ解析を行った結果、P14 変異個体ではオリゴデンドロサイトで優位に発現する遺伝子群が極端に減少していた。また視神経を電子顕微鏡で観察したところ、オリゴデンドロサイトの数は、正常個体と変異個体で大きな差はなかったが、P14 変異マウスの軸索ではミエリンが認められなかつた。
- ・変異個体の小脳では、プルキンエ細胞の整列が認められず、更に顆粒細胞層の形成及び顆粒細胞の軟膜側から髓質側への移動が障害されていた。またアポトーシスのマーカーである activated caspase-3 が顆粒細胞の軟膜側で極端に増加していた。
- ・変異個体の大脳では、Cux1 (2-4 層のマーカー) 陽性神経細胞の移動障害が認められ、層構造は乱れていた。
- ・胎児期の変異マウスに関して、BrdU の取り込み実験と TUNEL 染色を行ったところ、細胞増殖率の減少とアポトーシスの亢進を確認した。
- ・*Laggard* マウスの原因遺伝子の同定をポジショナルクローニングで行った。マイクロサテライトマーカー及び SNP マーカーによるマッピングを用いて、原因遺伝子は第 1 染色体上の約 1.2 センチモルガンの領域に位置することを明らかにし、当該ゲノム領域を次世代シークエンサーで解読し、*Kif14* の exon5 の acceptor site に G から A への 1 塩基置換を同定した。
- ・*Kif14* の 1 塩基置換によるスプライシングへの影響を調べるために、RT-PCR を行ったところ、*Kif14* のモータードメインの exon 5 の skipping を確認した。
- ・*Kif14* 抗体を作製し、Western blotting を行ったところ、変異マウスでは *Kif14* の発現量が大幅に低下していた。*Laggard* の原因遺伝子が *Kif14* であることは、トランジェニックマウスによる機能回復実験及びノックアウトマウスにより確認した。

#### (結論)

本研究では、協調運動障害を特徴とする新規突然変異マウス *laggard* を系統として確立し、表現型解析及び原因遺伝子の同定を行った。変異マウスにおける中枢神経系の形態異常として、ミエリン低形成、大脳のサイズ減少、大脳・

小脳・海馬の神経細胞の層構造の乱れを認めた。ポジショナルクローニングにより、*laggard* マウスの原因遺伝子として *Kif14* を同定した。*Kif14* 遺伝子が、胎生期から新生児期におけるミエリン形成、小脳皮質、大脳皮質及び海馬の神経細胞の層構造の形成に関与することを明らかにした。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第2139号	氏名	藤倉 航平
論文題目 Title of Dissertation	<p>Kif14 Mutation Causes Severe Brain Malformation and Hypomyelination</p> <p>Kif14の変異は脳の形成異常と髓鞘低形成を引き起こす</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 中村俊一</p> <p>副査 Vice-examiner 西尾久美</p> <p>副査 Vice-examiner 平島正則</p>		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

(目的)

多種多様な神経細胞によって構成される脳の形態形成には、数多くの遺伝子が、ステージ特異的、細胞特異的に秩序だって発現することが必要不可欠である。本研究では、ノックアウトマウスの作製中に偶然、協調運動障害を示す新規突然変異マウスを見出し、系統を確立した。このマウスは単一座位劣性遺伝様式を示し、協調運動障害を特徴とすることから *laggard* (のろま) と命名した。この突然変異マウス *laggard* の表現型解析と遺伝子同定を通して、脳の形態形成を解明することを目的とした。

(方法)

Stationary Beam Test

P12の同腹マウスを5cm幅の水平な台に置き、落下するのにかかる時間の計測を行った。

実験動物の作出

突然変異マウス *laggard* は RA-RhoGAP ノックアウトマウスの作製中に偶然発見された。pCAGGS-Kif14 トランスジェニックマウスは、Kif14 cDNA の全長を pCAGGS ベクターにサブクローニングし、C57BL/6J の受精卵にマイクロインジェクションを行うことで得られた。Kif14 ノックアウトマウスは、C57BL/6J マウス由来の HK4i ES 細胞に exon 5 を Neomycin 耐性カセットで置換することで作出了した。

連鎖解析と次世代シークエンス解析

マイクロサテライトマーカーおよび SNP マーカーを用いて連鎖解析を行った。得られた結果を LOD (Logarithm of Odds) score を算定し、連鎖が確認された領域に関して、 Exome capture sequencing を行った。

免疫抗体染色

マウスを 4 % のパラホルムアルデヒドで還流固定した後、脳と脊髄を取り出し、各種抗体で固定染色を行った。抗 Kif14 抗体は、大腸菌に発現させた GST 融合 Mus musculus Kif14 (aa 137-390) を抗原として、ウサギを用いることで得られた。

電子顕微鏡

マウスを還流固定した後、脳と脊髄を取り出した後、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色を行い、TEM で観察を行った。

マイクロアレイ

Total RNA を P14 マウスの大脳から抽出し、Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0 で解析した。

(結果)

・新規突然変異マウス *laggard* は、小頭症、振戦、失調性歩行を示した。Stationary beam testにおいて、P12 変異マウスは 10 秒以上橋脚に乗り続けることは困難であった。 *lag* 変異をもつマウスは P21 までに全て死亡した。

・脳と脊髄の切片を抗 Myelin Basic Protein (MBP) 抗体で染色したところ、変異マウスの脳においては、小脳髓体の弱いシグナルを除いて、全て陰性であった。同様に脊髄においても、

後索のわずかなシグナルを除いて、陰性であった。

- ・全脳のウェスタンプロッティング及びマイクロアレイ解析を行った結果、P14変異個体ではオリゴデンドロサイトで優位に発現する遺伝子群が極端に減少していた。また視神經を電子顕微鏡で観察したところ、オリゴデンドロサイトの数は、正常個体と変異個体で大きな差はなかったが、P14変異マウスの軸索ではミエリンが認められなかつた。
- ・変異個体の小脳では、ブルキンエ細胞の整列が認められず、更に顆粒細胞層の形成及び顆粒細胞の軟膜側から髓質側への移動が障害されていた。またアポトーシスのマーカーである activated caspase-3 が顆粒細胞の軟膜側で極端に増加していた。
- ・変異個体の大脳では、Cux1 (2-4層のマーカー) 陽性神経細胞の移動障害が認められ、層構造は乱れていた。
- ・胎児期の変異マウスに関して、BrdUの取り込み実験とTUNEL染色を行ったところ、細胞増殖率の減少とアポトーシスの亢進を確認した。
- ・*Laggard*マウスの原因遺伝子の同定をポジショナルクローニングで行った。マイクロサテライトマーカー及びSNPマーカーによるマッピングを用いて、原因遺伝子は第1染色体上の約1.2センチモルガンの領域に位置することを明らかにし、当該ゲノム領域を次世代シークエンサーで解読し、*Kif14*のexon5のacceptor siteにGからAへの1塩基置換を同定した。
- ・*Kif14*の1塩基置換によるスプライシングへの影響を調べるために、RT-PCRを行ったところ、*Kif14*のモータードメインのexon 5のskippingを確認した。
- ・*Kif14*抗体を作製し、Western blottingを行ったところ、変異マウスでは*Kif14*の発現量が大幅に低下していた。*Laggard*の原因遺伝子が*Kif14*であることは、トランスジェニックマウスによる機能回復実験及びノックアウトマウスにより確認した。

#### (結論)

本研究では、協調運動障害を特徴とする新規突然変異マウス *laggard*を系統として確立し、表現型解析及び原因遺伝子の同定を行った。変異マウスにおける中枢神経系の形態異常として、ミエリン低形成、大脳のサイズ減少、大脳・小脳・海馬の神経細胞の層構造の乱れを認めた。ポジショナルクローニングにより、*laggard*マウスの原因遺伝子として*Kif14*を同定した。*Kif14*遺伝子が胎生期から新生児期におけるミエリン形成、小脳皮質、大脳皮質及び海馬の神経細胞の層構造の形成に関与することが示唆された。

以上、本研究は、*Kif14*がミエリン形成、小脳皮質、大脳皮質及び海馬の神経細胞の層構造の形成に関与することを明らかにしたものであり、脳の形態形成の分子メカニズムを明らかにする上で重要な示唆を与えるものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。