

マウス初期胚の発生・生存に関与する巨大核蛋白質
KIAA1440/Ints1 の機能解析

2008年

秦 利幸

目 次

目 次	- 1 -
略 号	- 2 -
要 旨	- 3 -
第 I 章 緒 言	- 5 -
第 II 章 材 料 ・ 方 法	- 9 -
第 III 章 結 果	- 19 -
第 IV 章 考 察	- 53 -
謝 辞	- 59 -
参 考 文 献	- 60 -
主 論 文 目 録	- 63 -

略 号

本論文で使用した主要な略号について記載した。

Open Reading Frame : ORF

Complementary DNA : cDNA

Embryonic day : E

Phosphate Buffered Saline : PBS

Polymerase Chain Reaction : PCR

Sodium Dodecyl Sulfate : SDS

Paraformaldehyde : PFA

Bovine Serum Albumin : BSA

Terminal dUTP Nick-End Labeling : TUNEL

4',6-diamidino-2-phenylindole : DAPI

Reverse Transcription : RT

Green Fluorescent Protein : GFP

Threshold Cycle : Ct

Horseradish Peroxidase : HRP

Maltose Binding Protein : MBP

Coomassie Brilliant Blue : CBB

Adenine : Ade

3-amino-1,2,4-triazole : 3-AT

Integrator subunit : Ints

Small nuclear RNA : snRNA

Ribosomal RNA : rRNA

Ribosomal Protein L7 : Rpl7

Inner Cell Mass : ICM

Trophectoderm : TE

Differential Interference Contrast : DIC

Messenger RNA : mRNA

Phase contrast : Ph

RNA polymerase II : RNAPII

C-terminal domain : CTD

Quantitative RT-PCR : qRT-PCR

要 旨

KIAA1440 蛋白質は 2222 アミノ酸残基からなる巨大蛋白質であり、後生動物において保存されている。機能が類推できるような既知のドメイン、モチーフを持たず、また、パラログも存在しない。KIAA1440^{-/-}は着床前胚期での胚性致死を示すことから、KIAA1440 蛋白質はマウス初期胚において他の蛋白質によって相補されることのない、高等真核生物特異的な機能を果たしていると考えられる。本研究では、遺伝子欠損マウスを中心に KIAA1440 遺伝子の機能解析を行なった。ICR マウスに純化された KIAA1440 遺伝子欠損マウスでは、KIAA1440^{-/-}は早期胚盤胞で発生を停止した。KIAA1440^{-/-}の桑実胚において E-cadherin 及びβ-catenin は細胞間接着部位に正しく局在しており、コンパクションは進行していることが確認された。KIAA1440^{-/-}は ICM と TE という2系譜の細胞へと分化し、胞胚腔を形成し始めた E3.0～E3.5 早期胚盤胞期で発生を停止しているものと考えられる。胚盤胞の *in vitro* 培養では KIAA1440^{-/-}は透明帯から孵化することなく死滅し、その生存能が失われていることが示された。生体内でも KIAA1440^{-/-}は透明帯から孵化ないまま死滅し、よって、着床せず、胚性致死という表現型を示しているものと思われる。TUNEL 法、DAPI による核染色、caspase 蛍光阻害剤による解析から、KIAA1440^{-/-}における細胞死にはアポトーシスが関与していることが明らかとなった。正常マウスの発生初期における KIAA1440 mRNA の発現パターンを知るために定量的 RT-PCR を行なったところ、胚盤胞では受精卵のおよそ 5.7 倍の KIAA1440 mRNA が存在しており、KIAA1440 が受精卵から胚盤胞にかけての初期胚において発現している遺伝子であることが確かめられた。GFP 融合型あるいはネイティブ型 KIAA1440 蛋白質の COS7 細胞での強制発現、及び、NIH 3T3 細胞における内在性蛋白質の解析から、KIAA1440 蛋白質は核に局在することが示された。KIAA1440 はマウス初期胚において、DNA の複製、組み換え、修復、あるいは、RNA の転写、プロセッシングといった何らかの核内イベントに関与していると考えられる。KIAA1440 蛋白質の欠損によりそういった細胞機能は影響を受け、KIAA1440^{-/-}では直接的、間接的に過剰なアポトーシスが誘導され、発生が停止しているものと考えられる。

KIAA1440 に関するこれらの知見を得た後に、Baillat らのグループにより核内に存在する新規機能複合体 Integrator に関する報告がなされた。Integrator は RNAPII CTD に結合している U snRNA 3'プロセッシングを行なう複合体であり、その最大サブユニットとして KIAA1440 が同定された。そこで、Integrator 複合体における KIAA1440 の役割について解析を行なった。まず、293 細胞を用いた共免疫沈降法からマウス KIAA1440 が RNAPII と結合することを確認した。酵母 Two-Hybrid システムにより、KIAA1440 は 901-1500 アミノ酸残基の領域で KIAA1287/Ints2 及び Ints8 と直接相互作用しうることが示された。2 番目巨大な Integrator サブユニットである KIAA1287/Ints2 と KIAA1440 が結合することで、巨大複合体である Integrator のフレームワークを形成しているかもしれない。定量的 RT-PCR により遺伝子欠損マウス胚盤胞における U2 snRNA の定量を行なったところ、KIAA1440^{-/-}において U2 snRNA primary transcript の蓄積及び mature transcript の減少が認められた。KIAA1440 蛋白質の欠損により、Integrator の snRNA 3'

プロセッシング活性が顕著に低下していることが示された。このことから、KIAA1440 蛋白質は *in vivo* において snRNA 3'プロセッシングに関与しており、KIAA1440^{-/-}ではその機能が低下することにより、胚性致死表現型が引き起こされているものと考えられる。KIAA1440 は Integrator という巨大蛋白質複合体の中で、フレームワーク形成というような他の蛋白質によって相補されることのない中心的な役割を果しているものと考えられる

第 I 章 緒 言

ゲノムプロジェクトを始めとした“包括的／網羅的”プロジェクトは現在盛んに行なわれており、ヒトやマウスなどのモデル生物に関するさまざまな生物学的情報が次々と蓄積・データベース化されている [1-4]。同時に、即蛋白質発現が可能な Open Reading Frame (ORF) コレクションや抗体などのバイオリソース・ツールの整備も進んでいる [5-8]。このような“遺伝子のカタログ化”と“-ome”解析は多くの新知見をもたらし、生物現象の解明に大きく寄与している。しかしながら、その一方で未だ機能が明らかとなっていない遺伝子が数多く残されているのも事実であり、それらの遺伝子の機能を効率良く解明していくことは現在の重要な課題の一つである。

生物を構成する細胞の中では蛋白質同士が適切な時空間で相互作用しており、これによりさまざまな細胞内現象が実現されている。この蛋白質同士の巧妙なネットワークを理解することが生物現象の理解へとつながっていく。効率的な遺伝子の機能解析を行なっていくためには、このネットワークの中心的役割をしている蛋白質の機能を優先的に解析していくことが重要であると考えられる。そうすることで、芋づる式に関連蛋白質の機能解析を行なうことができる可能性があるからである。

かずさ DNA 研究所ではこれまでに 2000 を超えるヒト complementary DNA (cDNA) を同定し、“KIAA”とそれに続く4桁の番号の遺伝子名で報告してきた (KIAA0001-KIAA2038) [9,10]。KIAA 遺伝子は“HUGE”データベースにおいて公開されている[11]。“HUGE”には各 KIAA 遺伝子の cDNA 配列／構造、アミノ酸配列／構造、組織分布などの情報が収められているほか、他公共データベースへのリンクから、より広範な情報を収集することができる。

KIAA 遺伝子の最大の特徴は、巨大な蛋白質をコードしているという点である(平均 cDNA 鎖長: 5.1 kb、平均アミノ酸残基数: 936 アミノ酸残基)。酵母 Two-Hybrid スクリーニングや Tandem Affinity Purification による解析から、KIAA 蛋白質を含む巨大蛋白質は“scaffold protein”として蛋白質間相互作用のハブ的役割を担っていることが示されている [12-15]。すなわち、巨大蛋白質は、蛋白質複合体の中心的役割、あるいは、蛋白質複合体同士を集合させる役割を果たしており、細胞内蛋白質間相互作用ネットワークにおいて、重要な役割を担っていると期待できる。つまり、KIAA 蛋白質のような巨大蛋白質は、遺伝子の機能解析を効率的に進めていくための優れた解析対象であると考えられる。

このような KIAA 遺伝子の機能解析を行なうために、KIAA 遺伝子欠損モデル、すなわち、KIAA 遺伝子ノックアウトマウスを用いた解析が行われた。蛋白質複合体が機能する時、そこには組織立てられた階層構造が存在し、複合体の機能・統合性などその本質に関わる重要な因子と、モジュレーターのようなやや重要でないものに分離されると一般に考えられている。上述のように蛋白質複合体のフレームワークとして機能する KIAA 蛋白質は、その前者である。従って、KIAA 蛋白質の欠損により蛋白質機能複合体は高効率で不活性化され、結果として、細胞／個体レベルにおいてははっきりとした表現型が高頻度で表れることが期待される (Fig. 1)。

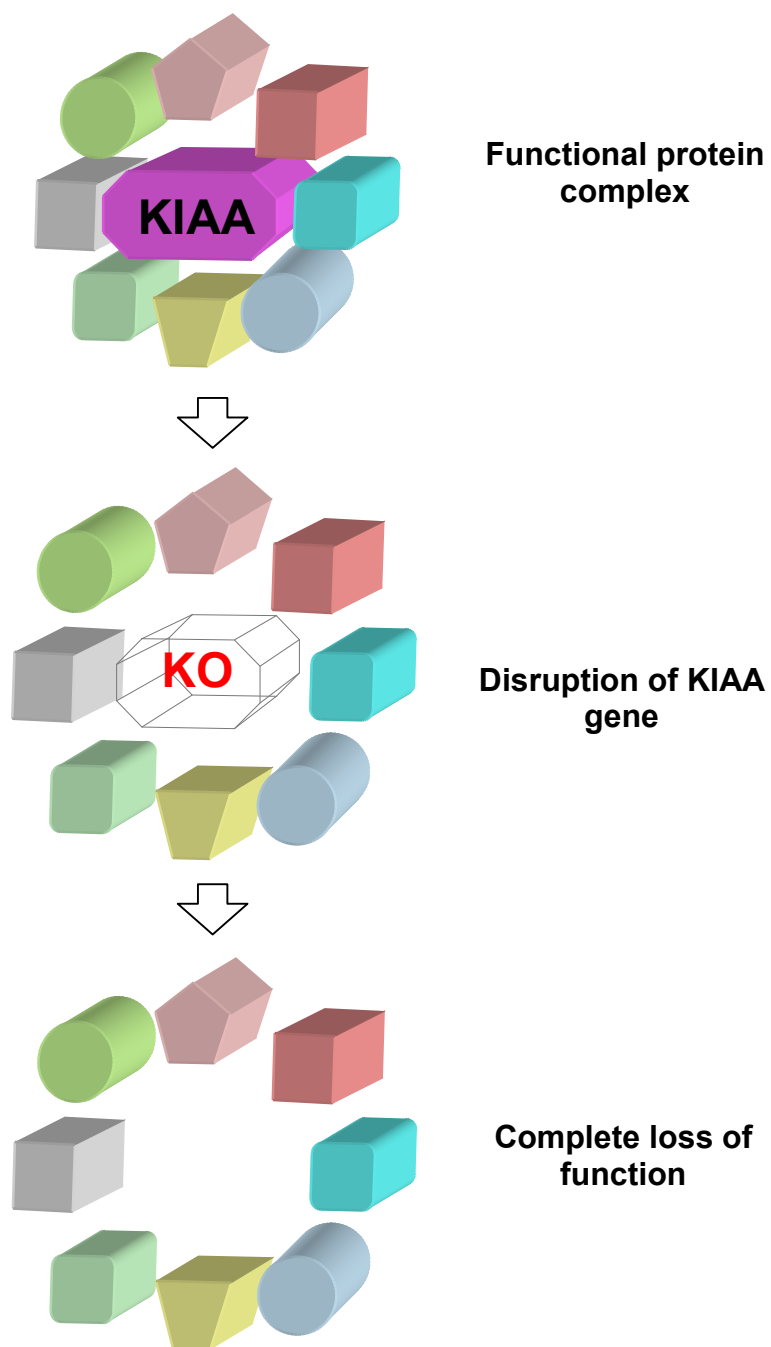


Fig. 1. Disruption of large proteins including KIAA proteins can lead to complete loss of protein complex function.

この仮説に従って、巨大蛋白質をコードする5種類の KIAA 遺伝子 (KIAA1409、KIAA1440、KIAA1447、KIAA1768、KIAA1276) の欠損マウスが実際に作成された [16]。その結果、5 系統中 3 系統という高い頻度で、明らかな表現型、発生異常を示す欠損マウスが得られた。KIAA1409 遺伝子欠損マウスは母乳を飲む能力を欠き、KIAA1447 遺伝子欠損マウスは後肢運動機能障害を示した。そして、KIAA1440 遺伝子欠損マウスは着床前胚期での胎性致死という表現型であった。

ヒト KIAA1440 遺伝子のマウスオースログであるマウス KIAA1440 遺伝子は 7070 bp の cDNA サイズを持ち、2222 アミノ酸残基もの巨大蛋白質をコードしている。これほどの巨大蛋白質でありながら、機能が類推できるような既知ドメイン・モチーフは存在せず、また、マウスの他の蛋白質に対する相同性も認められない。しかしながら、興味深いことに、進化的にヒト、ラット、マウス、フグ、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエなどの後生動物で、配列相同性と共にその大きな蛋白質サイズを維持したまま保存されている (Table 1)。パラログが一切存在しないことと考え合わせると、KIAA1440 は着床前胚において他の蛋白質では相補できないような、高等真核生物特異的な機能を果たしていることが期待される。本研究では、遺伝子欠損マウスの解析を主体として、巨大蛋白質をコードする KIAA1440 遺伝子の機能解析を行なった。

Table 1. Orthologous proteins of mouse KIAA1440 protein

Species	Accession No.	Length (aa*)	Identity
<i>M. Musculus</i>	BAF03197	2222	-
<i>H. Sapiens</i>	Q8N201	2190	90%
<i>R. Norvegicus</i>	XP_213717	2448	96%
<i>G. Gallus</i>	XP_414768	3288	84%
<i>T. Nigroviridis</i>	CAG12235	2070	75%
<i>D. Rerio</i>	XP_690622	2003	79%
<i>D. Melanogaster</i>	AAF47145	2053	38%
<i>C. Elegans</i>	AAB52443	1932	20%
<i>S. Pombe</i>	-	-	-
<i>S. Cerevisiae</i>	-	-	-

*aa: amino acid residues

第 II 章 材 料 ・ 方 法

II-1 KIAA1440 遺伝子欠損マウスの解析

II-1-1 マウス着床前胚の採取

KIAA1440 遺伝子欠損マウスは中山らによって作製された [16]。本研究では、その遺伝子欠損マウスを平均産仔数の多い ICR マウス (CLEA JAPAN, INC.) へと戻し交配して遺伝的背景を純化し、その N8-11 世代を実験に使用した。

KIAA1440^{+/-}の雌雄マウスを自然交配することで、KIAA1440^{+/+}、KIAA1440^{+/-}、KIAA1440^{-/-}の着床前胚を得た。雌マウスに膣栓が認められた日の正午を胎生 0.5 日 Embryonic day 0.5 (E0.5) とした。E2.75 に卵管を M2 培地 (Specialty Media) でかん流することにより桑実胚を、E3.5 に子宮をかん流することにより胚盤胞を、それぞれ採取した。リン酸緩衝生理食塩水 Phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後、それらの桑実胚、胚盤胞をガラス底ディッシュへと移し、OLYMPUS IX71 顕微鏡 (OLYMPUS Corp.) を用いて写真を撮影した。その後、各胚の遺伝子型を決定した。

II-1-2 胚の遺伝子型決定

胚の遺伝子型の決定は Polymerase Chain Reaction (PCR) により行なった。個々の胚、あるいは、胚盤胞の *in vitro* 培養から得られた細胞を 1 μ l の滅菌水が入ったチューブへと移し、3 μ l の溶解バッファー (0.05% ドデシル硫酸ナトリウム sodium dodecyl sulfate (SDS)、0.035 N NaOH) を加えた。95°C で 5 分インキュベートした後、溶解物を反応容量 50 μ l での *LA Taq* ポリメラーゼ (TaKaRa BIO INC.) を用いた PCR に供した。反応には 3 種類のプライマーを使用した。a, KIAA1440 upper (5'-TGTCCTACTCT CCTCAGGCCA T-3'); b, KIAA1440 lower (5'-AGTACAGCGT CAGAAGCGGT G-3'); c, neomycin (5'-CAGTCATAGC CGAATAGCCT C-3')。KIAA1440 遺伝子の野生型アレルはプライマー a と b、変異が導入されたアレルはプライマー a と c の組み合わせでそれぞれ検出される。PCR は、95°C、4 分、プレインキュベーション、続いて、95°C、20 秒、66°C、1 分、35 サイクルの条件で行なった。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で分離した後、エチジウムブロマイド染色により検出、遺伝子型の決定を行なった。

II-1-3 胚のホルマウント蛍光免疫染色法

採取した桑実胚を酸性 Tyrode 液で処理することで、透明帯を除去した。2% パラホルムアルデヒド paraformaldehyde (PFA)/ PBS で、室温、20 分間、固定処理を行なった後、0.25% Triton-X 100/ PBS 中に室温、10 分間、インキュベートすることで透過処理を行なった。続いて、3% 牛血清アルブミン Bovine

Serum Albumin (BSA)/ 0.01% Tween 20/ PBS で 1 時間、ブロッキング処理し、その後、胚をマウス抗 E-cadherin モノクローナル抗体(クローン 36、BD Bioscience)、あるいは、マウス抗 β -catenin モノクローナル抗体(クローン 14、BD Bioscience)と室温、1 時間、インキュベートした。1% BSA/ 0.01% Tween 20/ PBS を用いて、抗 E-cadherin 抗体は 2500 倍希釈、抗 β -catenin 抗体は 50 倍希釈して使用した。二次抗体には 1000 倍希釈した FluoroLink Cy3 標識ロバ抗マウス IgG (H&L)抗体 (GE Healthcare Bio-Science Corp.)を使用し、胚と室温、1 時間、インキュベートした。SlowFade Antifade medium (Invitrogen Corp.)へ胚を移し、OLMPUS IX71 蛍光顕微鏡で観察した。

II-1-4 胚盤胞の *in vitro* 培養

胚盤胞を採取後、M2培地、続いてES培地(15% KnockOut Serum Replacement, 2 mM Glutamax-I supplement, 1× MEM non-essential amino acids solution (Invitrogen Corp.), 0.1mM β -メルカプトエタノール (SIGMA)、50U/ml ペニシリン、50 μ g/ml ストレプトマイシン、 10^3 U/ml leukemia inhibitory factor ESGRO (Invitrogen Corp.)を含むKnockOut Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen Corp.))で洗浄した。個々の胚をゼラチンコーティング処理した細胞培養ディッシュへと移し、ES培地中、37°C、5% CO₂で72時間培養した。

II-1-5 TUNEL アッセイ

胚盤胞におけるアポトーシス細胞の検出は、Terminal dUTP Nick-End Labeling (TUNEL)に基づいた *in situ* Cell Death Detection Kit, TMR-red (Roche Diagnostics Corp.)を用いて行なった。ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼは、DNA のフリーな 3'-OH 末端に鋳型非依存的にヌクレオチドを重合する酵素である。TUNEL 法は、この酵素により DNA 末端を標識ヌクレオチドでラベルすることで、アポトーシスに伴う DNA 鎖切断を検出する方法である。

採取した胚盤胞を ES 培地中で 12 時間培養した後、4% PFA/ PBS で 4°C、20 分間、固定処理し、続いて、0.2% Triton-X 100/ PBS で室温、10 分間、透過処理を行なった。蛍光色素 TMR-red でアポトーシス細胞を標識するために、胚を TUNEL 反応液中で 37°C、1 時間、インキュベートした。1 μ g/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)/ PBS で核 DNA 染色した後、胚を mounting medium へと移し、蛍光顕微鏡で観察した。

II-1-6 活性化カスパーゼ-3 の検出

胚盤胞細胞における活性化カスパーゼ-3 の検出は、Vybrant FAM Caspase-3 and -7 Assay Kit (Invitrogen Corp.)を用いて行なった。採取した胚盤胞を ES 培地中で 6 時間培養した後、カスパーゼ特異的蛍光阻害薬である FAM-DEVD-FMK caspase-3 and -7 reagent を含む ES 培地へと移し、37°C、1 時

間、インキュベートした。ES 培地で 3 回洗浄後、Apoptosis wash buffer で洗浄した。続いて、胚を 4% PFA/ PBS で室温、20 分間、固定処理し、さらに 0.25% Triton-X 100/ PBS で室温、10 分間、透過処理を行なった。DAPI で核染色した後、蛍光顕微鏡で観察した。

II-2 KIAA1440 の発現・細胞内局在

II-2-1 マウス着床前胚の採取

正常 ICR マウス(遺伝子欠損マウスでない)の雄雌マウスを自然交配し、着床前胚を得た。1 細胞期胚(E0.5)は卵管から採取した後、0.5 mg/ml ヒアルロニダーゼ液 (SIGMA)で処理して卵丘細胞を取り除いた。胚盤胞 (E3.5)は子宮から採取した。

II-2-2 定量的 Reverse Transcriptase (RT)- PCR によるマウス着床前胚における KIAA1440 遺伝子の発現解析

ICRマウスより採取した15-21個の1細胞期胚、あるいは、胚盤胞をtotal RNAの調製に使用した。胚をPBSで洗浄後、400 µlのTRIzol Reagent (Invitrogen Corp.)を用いてtotal RNAを抽出した。その際、キャリアとして100 µgのグリコーゲン、及び、外部標準物質として胚1個につき5 pgのGreen Fluorescent Protein (GFP) RNAを添加した。cDNA合成はTaqMan Reverse Transcription Reagent (Applied Biosystems)を用いたランダムプライミング法により行なった。胚1個、もしくは、2個に相当する逆転写反応産物をPCRに供した。また、標準物質には、KIAA1440遺伝子、あるいはGFP遺伝子がクローニングされたプラスミド、すなわち、ネイティブ型KIAA1440発現ベクター、及び、pcDNA-DEST53ベクター (Invitrogen Corp.)の希釈系列を使用した。

定量的リアルタイムPCRの検出装置にはABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied BioSystems)を使用した。反応は、SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)により行なった。使用したプライマーは次の通りである: a, KIAA1440 upper (5'-CATCATGGCG CACCTCTTCT C-3'); b, KIAA1440 lower (5'-AGCAGGATGA CCATGGCGTG-3'); c, GFP upper (5'-GAGTGCCATG CCCGAAGGTT A-3'); d, GFP lower (5'-CGTCTTG TAG TTCCCGTCAT C -3')。KIAA1440のプライマーセット (a及びb)は、ゲノムでなくcDNAだけを特異的に増幅するように、イントロンを挟んで設計してある。検体及び標準物質のPCRは全てtriplicateで行なった。PCR反応条件は次の通りである: プレインキュベーション(50℃、2分、95℃、10分); 増幅/定量プログラム(95℃、15秒、60℃、1分、50サイクル); 融解曲線プログラム(95℃、15秒、60℃、20秒、温度変化率1.75℃/分で60℃～95℃)。融解曲線分析により定量的RT-PCRの配列特異性の確認を行なった。threshold cycle (Ct)値はバックグラウンドを超える蛍光シグナルを示すサイクル数である。標準物質のCt値をその鋳型量に対してプロットすることにより標準

曲線を描き、そこから検体のKIAA1440 mRNA量、GFP RNA量を求めた。RNA抽出／逆転写反応効率を考慮するために、KIAA1440 mRNAの値を外部標準物質であるGFP RNAの値で標準化した。3回の独立した実験を行ない、その平均と標準偏差を算出した。

GFP RNAの調整は以下のように行なった。*Xho* I消化したpcDNA-DEST53を鋳型として、MEGAscript T7 Kit (Ambion, Inc.)により*in vitro*転写反応を行い、GFP RNAを合成した。精製後、260 nmの吸光度からその濃度を決定し、実験に使用した。

II-2-3 KIAA1440 発現ベクターの構築と細胞への導入

C末端、及び、N末端EGFP融合KIAA1440発現ベクターは、pEGFP-C3ベクター (Clontech Laboratories, Inc.)のEGFP遺伝子上流、あるいは、下流にKIAA1440 ORF (accession No. AB257854, 169-6834 bp)を挿入することにより構築した。ネイティブ型KIAA1440発現ベクターは、pEGFP-C3ベクターのEGFP遺伝子をKIAA1440 ORFに置き換えることにより作製した。対照用の空ベクターは、pEGFP-C3ベクターからEGFP遺伝子領域を取り除いたものである。

COS7細胞、NIH 3T3細胞は10%仔牛血清含有Dulbecco's Modified Eagle Mediumを用いて、37℃、5% CO₂の下に培養した。COS7細胞への遺伝子導入にはFuGENE 6 (Roche Diagnostics Corp.)、NIH 3T3細胞へはLipofectamine 2000 (Invitrogen Corp.)を使用した。

II-2-4 ウェスタンブロッティング

過剰発現系においては、遺伝子導入から48時間後に4x SDSサンプルバッファー (250 mM Tris-HCl (pH 6.8), 8% SDS, 28% グリセロール, 0.02% ブロモフェノールブルー, 20% β-メルカプトエタノール)で細胞を溶解した。内在性マウスKIAA1440の検出の際には、遺伝子導入を行っていないNIH 3T3細胞から細胞溶解物を調整した。

95℃、3分インキュベートした後、細胞溶解物を2-15%ポリアクリルアミド勾配ゲルで展開し、セミドライ式装置を用いて転写バッファー (0.1 M トリス, 0.192 M グリシン)中でPROTRAN85ニトロセルロースメンブラン(Schleicher & Schuell Bioscience, Inc.)へとブロットした。メンブランを1% Blocking Reagent (Roche Diagnostics Corp.) / PBSで室温、1時間ブロッキングした後、マウス抗GFPモノクローナル抗体 (クローンGF200, Nacalai Tesque, Inc.)、ウサギ抗マウスKIAA1440ポリクローナル抗体、あるいは、アフィニティー精製抗マウスKIAA1440抗体で室温、1時間インキュベートした。抗GFP抗体は2000倍、抗マウスKIAA1440抗体は10000倍に、1% BSA/ 0.1% tween 20/ PBSで希釈し使用した。続いて、0.1% tween 20/ PBSで5回メンブランを洗浄後、4000倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ Horseradish peroxidase (HRP)標識ヤギ抗マウスIgG (H+L)抗体 (Promega Corp.)、あるいは、2000倍希釈した標識ヤギ抗ウサギIgG (H+L)抗体 (Promega Corp.)と室温、1時間、インキュベートした。メンブランを洗浄し、ECL Plus

Western Blotting Detection System (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)と反応後、Imaging Analyzer LAS-1000plus、もしくは、LAS-3000mini (Fuji Photo Film Co., Ltd.)を用いてバンドを検出した。

II-2-5 GFP 融合 KIAA1440 蛋白質を用いた細胞内局在の解析

C末端、あるいは、N末端EGFP融合KIAA1440発現ベクターをCOS7細胞に導入し、48時間培養した。4% PFA/ PBSで室温、20分固定し、続いて、1% Triton-X 100/ PBSで室温、5分透過処理を行なった。1 μ g/ml DAPI/ PBSで核DNAを染色した後、蛍光顕微鏡を用いて観察を行なった。

II-2-6 蛍光免疫染色法による細胞内局在の解析

ネイティブ型KIAA1440発現ベクター、あるいは、空ベクターを導入し48時間培養したCOS7細胞、及び、遺伝子導入していないNIH 3T3細胞をI-1-5に従って、固定、透過処理した。10%正常ヤギ血清/ 1% BSA/ PBSで室温、1時間ブロッキングした後、1% BSA/PBSで300倍希釈した抗マウスKIAA1440抗体、あるいは、アフィニティー精製抗マウスKIAA1440抗体で室温、1時間反応した。一次抗体なし(1% BSA/ PBS)を陰性対照とした。続いて、1000倍希釈したFluoroLink Cy3標識ヤギ抗ウサギIgG (H&L)抗体 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)と室温、1時間反応させ、DAPIで核染色を行った後、蛍光顕微鏡で観察した。

II-2-7 抗マウス KIAA1440 ポリクローナル抗体の作成と精製

KIAA1440 の 241-544 アミノ酸残基をコードする cDNA 断片を 6x His タグ融合蛋白質発現ベクター pDEST17 (Invitrogen Corp.)、及び、マルトース結合蛋白質 Maltose binding protein (MBP)融合蛋白質発現ベクターpMAL-c2 (New England Biolabs)にサブクローニングし、抗原蛋白質発現ベクターを構築した。大腸菌株BL21でそれら抗原蛋白質を発現させ、ニッケルカラム、アミロースレジンを用いてそれぞれ精製した。

6x Hisタグ融合抗原をウサギに免疫し、抗マウスKIAA1440ポリクローナル抗体を得た。MBP融合抗原のアフィニティーカラムにより、抗血清の精製を行なった。アフィニティーカラムに抗体を反応させ、高塩濃度バッファー (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl)で洗浄した後、特異的抗体を 100 mM グリシン (pH 2.5)で溶出した。

II-3 HaloTag™テクノロジーを用いたポリクローナル抗体のアフィニティー精製 —スモールスケールの抗体精製を迅速に行うための方法の検討—

II-3-1 HaloTag™テクノロジーを用いたポリクローナル抗体のアフィニティー精製

MBP 融合蛋白質発現ベクターpMAL-c2 に KIAA1440 の 241-386 アミノ酸残基をコードする cDNA 断片をサブクローニングし、MBP 融合 KIAA1440 蛋白質発現ベクターを作成した。さらに、HaloTag 融合蛋白質発現ベクターpHT2 (Promega Corp.)由来の HaloTag 蛋白質をコードする cDNA を MBP と KIAA1440 の間に挿入し、これを MBP-HaloTag 融合 KIAA1440 蛋白質発現ベクターとした。

大腸菌株 DH10B に発現ベクターを導入し、培養した。対数増殖期に終濃度 0.3 mM イソプロピルチオ-β-D-ガラクトシドを加え、37℃、1 時間、蛋白質の発現を誘導した。菌体を回収、超音波破碎した後、18,500g で 4℃、30 分間遠心し、その上清を可溶性画分とした。可溶性画分 100 μl (培養 700 μl に相当する)を HaloLink Resin (50% suspension) 50 μl と室温、1 時間反応させた。HaloLink Resin は、BSA を含む洗浄バッファー (100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, 0.1% BSA) でブロッキング処理した後、結合バッファー (100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% NP-40) で平衡化したものを使用した。反応後の上清 10 μl を 10% SDS-PAGE にて展開し、Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色で蛋白質を検出した。融合蛋白質をカップリングした HaloLink Resin は洗浄バッファーで数回洗浄した後、抗 KIAA1440 抗血清との反応に供した。10 倍に希釈した抗 KIAA1440 抗血清 100 μl を Resin と 4℃、1 時間反応させた。続いて、高塩濃度バッファー (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl) で 3 回洗浄し、親和性・特異性の低い抗体を除去した。最後に、KIAA1440 特異的抗体を 100 mM グリシン (pH 2.5) で溶出した。精製した抗体は SDS-PAGE で展開後、CBB 染色あるいは HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG (H+L) 抗体によるウエスタンブロッティングで検出、確認を行なった。ウエスタンブロッティングには 1 レーン当たり、マウス全脳抽出物 100 μg を使用した。

II-4 Integrator サブユニットとしての KIAA1440

II-4-1 共免疫沈降法による KIAA1440 蛋白質の RNAPII との相互作用解析

N 末端 3xFLAG タグ融合 KIAA1440 発現ベクターは、p3xFLAG-CMV-7.1 ベクター (SIGMA) の 3xFLAG タグコード領域の下流に KIAA1440 ORF を挿入することにより構築した。Human embryonic kidney 293 細胞は 10% 仔牛血清含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium を用いて培養した。

播種した後、24 時間培養した HEK293 細胞に FuGENE 6 を用いて p3xFLAG-CMV-7.1 ベクター及びネイティブ型 KIAA1440 発現ベクターをそれぞれトランスフェクションし、さらに 24 時間培養した。冷 PBS で洗浄後、細胞を溶解バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% NP-40, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM

EGTA, protease inhibitor mixture Complete (Roche Diagnostics Corp.))に懸濁し、氷上30分インキュベートした。18,500gで4℃、30分遠心し、その上清を免疫沈降に供した。溶解バッファーで平衡化したProtein Gセファロースと4℃、2時間インキュベートし、非特異的な結合物を除去した。遠心して、セファロースを取り除いた上清を抗FLAG-M2モノクローナル抗体 (SIGMA)と4℃、3時間反応させた後、セファロースを加え、さらに1時間インキュベートした。遠心して回収したセファロースを溶解バッファーで5回洗浄したのち、2x SDSサンプルバッファーを加え、95℃、5分インキュベートして、結合蛋白質を溶出した。II-2-4の方法によりウエスタンブロッティングを行い、目的蛋白質の検出を行なった。抗FLAG-M2抗体、抗RNAポリメラーゼIIモノクローナル抗体 (8WG16) (Abcam plc.)、共に1000倍希釈で使用した。

II-4-2 酵母 Two-Hybrid システムによる Integrator サブユニットとの相互作用解析

MatchMaker Two-Hybrid System (Clontech Corp.)を解析に使用した。DNA 結合ドメイン融合蛋白質 (Bait) 発現ベクターには pAS2-1 ベクター、転写活性化ドメイン融合蛋白質 (Prey) 発現ベクターには pACT2 ベクターを用いた。KIAA1440 及び Integrator 各サブユニットの cDNA をこれらのベクターのマルチクローニングサイトに挿入した。KIAA1440 は蛋白質全長をコードするもの、あるいは約 600 アミノ酸残基ずつに断片化された蛋白質をコードするものを使用した。一方、KIAA1440 を除く Integrator サブユニットについては蛋白質全長をコードするものを使用した (Table 2, 3)。

AH109 株に酢酸リチウム法にて Bait ベクターと Prey ベクターを導入した。SD/-Trp/-Leu 寒天培地 (非選択培地) に播種し、30℃でインキュベートした。形成したコロニーを、X- α -Gal (Clontech Corp.) を塗布した SD/-Trp/-Leu/-Adenine (Ade)/-His/+15 mM 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT, SIGMA) 寒天培地 (選択培地) に画線培養し、30℃で～14 日間培養した。増殖し、かつ、青色に発色したものを陽性とした。

陰性コントロールには ORF が挿入されていない pAS2-1 ベクター、pACT2 ベクターを用いた。また、Bait ベクターのみを AH109 株に形質転換し、SD/-Trp/-Ade/-His/+15 mM 3-AT 寒天培地で培養することで self-activation の確認を行なった。

II-4-3 KIAA1440 遺伝子欠損マウス胚における U2 small nuclear RNA (snRNA)、18S ribosomal RNA (rRNA)、Ribosomal protein L7 (Rpl7) RNA の定量

KIAA1440^{+/-}の雌雄マウスを交配して得た胚盤胞をPBSで洗浄し、1つずつ0.2 mlチューブへ移した。キャリアであるGFP RNAを終濃度5 ng/ μ lになるように添加したCellsDirect Reagent (Invitrogen corp.)を加え、70℃、10分インキュベートして、ゲノムDNA及びtotal RNAを含む細胞溶解物を調整した。この細胞溶解物の1/3をPCRに使用し、各胚の遺伝子型を決定した。残りを定量的RT-PCRに供した。定量的の失活はEDTAを添加した後、80℃で10分インキュベートすることにより行なった。定量的RT-PCRはABI PRISM 7700 Sequence Detection Systemを用い、SuperScript IV Platinum SYBR Green One-Step

Table 2. Mouse Integrator genes used in Yeast Two-Hybrid screening

Integrator subunit	Other name	Accession No.	cDNA length (bp)	CDS (bp)
Ints1	mKIAA1440	AB257854	7070	169..6837
Ints2	mKIAA1287	AK129323	4481	347..3955
Ints3	-	NM_145540	4452	687..3812
Ints4	-	NM_027256	3201	88..2982
Ints5	mKIAA1698	BC039214	3289	65..3121
Ints6	DICE1	NM_008715	5019	455..3106
Ints7	-	NM_178632	3252	125..3025
Ints8	-	NM_178112	3404	120..3107
Ints9	D14Ert231e	NM_153414	2668	228..2291
Ints10	-	NM_027590	2410	67..2199
Ints11	Cpsf3l	NM_028020	2347	127..1929
Ints12	Phf22	NM_027927	3014	42..1427

*CDS region of each gene was cloned into pAS2-1 or pACT2 vectors.

*Ints : Integrator subunit.

Table 3. cDNAs coding KIAA1440 full length or fragmented proteins used in Yeast Two-Hybrid screening

	cDNA sequence (bp)	Protein sequence (aa)
Full length	169..6837	1..2222
Fragment 1	169..1968	1..600
Fragment 2	1069..2868	301..900
Fragment 3	1969..3768	601..1200
Fragment 4	2869..4668	901..1500
Fragment 5	3769..5568	1201..1800
Fragment 6	4669..6837	1501..2222

*cDNAs coding KIAA1440 full length or fragmented proteins were used. The indicated cDNA sequences of KIAA1440 (accession No. AB257854) were cloned into pAS2-1 or pACT2 vectors. These cDNAs code the regions of KIAA1440 protein that was shown in "Protein sequence" column.

qRT-PCR Kit (Invitrogen corp.),あるいは、TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagent Kit (Applied Biosystems)により行なった。使用したプライマーは次の通りである: a, U2 snRNA upper 1 (5'-CTCGGCCTTT TGGCTAAGAT-3'); b, U2 snRNA lower 1 (5'-CGTTCCTGGA GGTACTGCAA-3'); c, U2 snRNA upper 2 (5'-GGAAGTAGGA GTTGAATAG GAGCTT-3'); d, U2 snRNA lower 2 (5'-TAAAAAAGTT GGACTGCCCT ACA-3'); e, 18S rRNA upper (5'-GAGAAACGGC TACCACATCC-3'); f, 18S rRNA lower (5'-GGACACTCAG CTAAGAGCAT CG-3'); g, Rpl7 upper (5'-CTTTGTCATC AGAATTCGAG GTA-3'); h, Rpl7 lower (5'-TGCCATTGAA GATCTGTCTGA AG-3')。TaqMan MGB Probe (Applied Biosystems)は次の通りである: j, U2 snRNA TaqMan MGB probe RT-PCR に先立って、DNase I (TaKaRa BIO INC.)処理を行い、ゲノム DNA の分解を行なった。DNase I (5'-TCACCATGCT CTGACTTTAA A-3')。全 U2 snRNA transcript (mature+primary)はプライマーa 及び bを用いて SYBR Green 法により定量した。U2 snRNA primary transcript のみの定量はプライマーc 及び d、TaqMan MGB プローブ j を用いて TaqMan 法により行なった。18S rRNA はプライマーe 及び f、スプライシングを受けた成熟型 Rpl7 mRNA はプライマーg と h を用いて、それぞれ SYBR Green 法により定量した。

標準物質には、U2 snRNA、18S rRNA、Rpl7 のそれぞれの標的配列がクローニングされたプラスミドの希釈系列を使用し、その定量は triplicate で行なった。SYBR Green 法での PCR 反応条件は次の通りである:逆転写反応(55℃、5 分);プレインキュベーション(95℃、5 分);増幅/定量プログラム(95℃、15 秒、57℃、30 秒、68℃、30 秒、40 サイクル);融解曲線プログラム(95℃、15 秒、60℃、20 秒、温度変化率 1.75℃/分で 60℃~95℃)。TaqMan Probe 法の条件は次の通りである:逆転写反応(48℃、30 分);プレインキュベーション(95℃、10 分);増幅/定量プログラム(95℃、15 秒、60℃、1 分、50 サイクル)。

それぞれの標準曲線から検体の U2 snRNA、18S rRNA、Rpl7 RNA の量を求めた。U2 snRNA では 6 回の独立した実験において、15 個の KIAA1440^{+/+}、29 個の KIAA1440^{+/-}、11 個の KIAA1440^{-/-}(計 55 個)、18SrRNA では 4 回の独立した実験において、14 個の KIAA1440^{+/+}、27 個の KIAA1440^{+/-}、16 個の KIAA1440^{-/-}(計 57 個)、Rpl7 では 4 回の独立した実験において、12 個の KIAA1440^{+/+}、24 個の KIAA1440^{+/-}、12 個の KIAA1440^{-/-}(計 48 個)の解析をそれぞれ行ない、その平均値と標準偏差を算出した。有意差の検定は、t-test、あるいは、Welch's test により行なった。

第 III 章 結 果

III-1 KIAA1440 遺伝子欠損マウスの解析

KIAA1440 遺伝子欠損マウスは、KIAA1440^{-/-}において明らかな表現型が認められ、それは胚性致死であることが中山らによる先行研究で示されている [16]。E3.5 では各遺伝子型の胚はメンデルの法則にしたがった正常な頻度で認められたが、それ以降の E9.5、E11.5、E13.5 の発生ステージでは KIAA1440^{-/-}の胚は認められなかった。KIAA1440^{-/-}の E3.5 胚盤胞の形態を観察すると、それらは桑実胚で発生を停止していた。このような先行研究の結果を踏まえた上で、本研究では、KIAA1440 遺伝子の機能を探るために、KIAA1440 遺伝子欠損マウス胚の詳細な表現型解析を行なった。

III-1-1 早期胚盤胞期における KIAA1440^{-/-}の発生停止

中山らが使用した遺伝子欠損マウスは 129 マウスと C57BL/6J マウスの交雑種である [16]。遺伝子欠損マウスの多くはこの交雑種として作成され、実験に使用される。しかしながら、本研究では ICR マウスへと戻し交配し(N8-11)、実験に使用した。それは、ICR マウスは自然交配における平均胎仔数が多いため、着床前胚が効率良く得られ、解析に有利だからである。KIAA1440^{+/-}の雌雄マウスを交配し、胚盤胞(E3.5)、及び、桑実胚(E2.75)を得た。マウス初期胚は Fig. 2 のように発生を進めるので、桑実胚は卵管から、胚盤胞は子宮からそれぞれ採取した。個々の胚の形態を微分干渉顕微鏡にて観察後、PCRにより遺伝子型の決定を行なった。

E3.5 胚盤胞では、KIAA1440^{+/+}が 51 個(22%)、KIAA1440^{+/-}が 115 個(50%)、KIAA1440^{-/-}が 63 個(28%)であった。また、E2.75 では、KIAA1440^{+/+}が 14 個(21%)、KIAA1440^{+/-}が 32 個(48%)、KIAA1440^{-/-}が 21 個(31%)であった (Fig. 3)。このように E3.5 及び E2.75 では、各遺伝子型の胚はメンデルの法則に従った正常な頻度で認められた。E3.5 胚盤胞の発生ステージまでは KIAA1440^{-/-}が存在していることが確認された。

次に各遺伝子型の胚の形態の比較を行なった。E3.5において、KIAA1440^{+/+}及びKIAA1440^{+/-}は内部細胞塊 Inner Cell Mass (ICM) と栄養外胚葉 Trophectoderm (TE) がはっきりと認められ、胞胚腔は膨らんでいた。全体として胚体が大きくなりつつあり、透明帯を押し広げ拡張期胚盤胞へと正常に発生を進めている様子が観察された (Fig. 4a, b, a', b')。一方で、KIAA1440^{-/-}は ICM と TE が分かれつつあるものの、胞胚腔が小さく、胚全体としても小さい、すなわち、早期胚盤胞の形態を示していた (Fig. 4c, c')。また、KIAA1440^{-/-}では死んでいる、あるいは、死につつつあるように見える細胞も観察された。KIAA1440^{-/-}の約 60%は Fig. 4 のように早期胚盤胞の形態を示し、残り 40%については桑実胚の形態を示していた。これらの結果は、KIAA1440^{+/+}は KIAA1440^{+/+}と同様に正常に発生を進めるが、KIAA1440^{-/-}は発生を

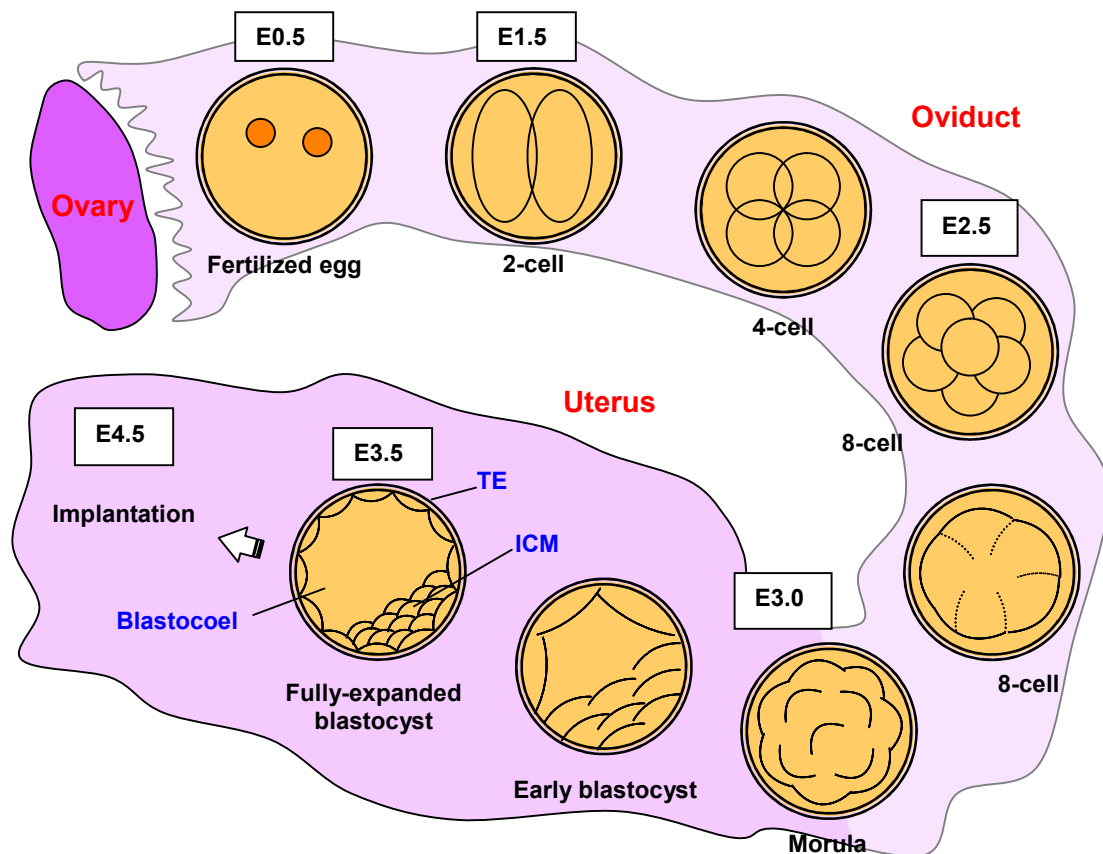


Fig. 2. Mouse early development.

Eggs ovulated from ovary are fertilized by sperm. Initially, fertilized egg develops in oviduct. It becomes 2-cell and 8-cell stage embryo with cleavage by embryonic day 1.5 (E1.5) and E2.5, respectively. "Compaction" occurs at late of 8-cell stage. Then, embryo starts to differentiate to inner cell mass and trophoblast, and becomes blastocyst in uterus by E3.5. Expanded blastocyst hatches from zona pellucida. Implantation occurs at E4.5.

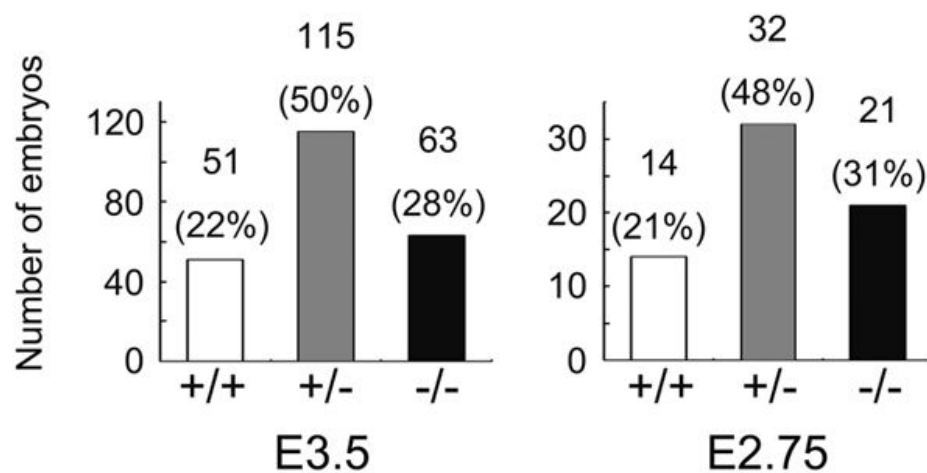


Fig. 3. Genotyping of preimplantation embryos from KIAA1440^{+/-} heterozygote intercrosses.

Embryos from KIAA1440^{+/-} heterozygote intercrosses were collected at either E2.75 or E3.5. The genotypes of each embryo were assessed by PCR. “+/+”, “+/-” and “-/-” correspond to “KIAA1440^{+/+}”, “KIAA1440^{+/-}” and “KIAA1440^{-/-}”, respectively. The number of embryos and the percentage of each genotype within the total number are indicated above each bar in the graphs.

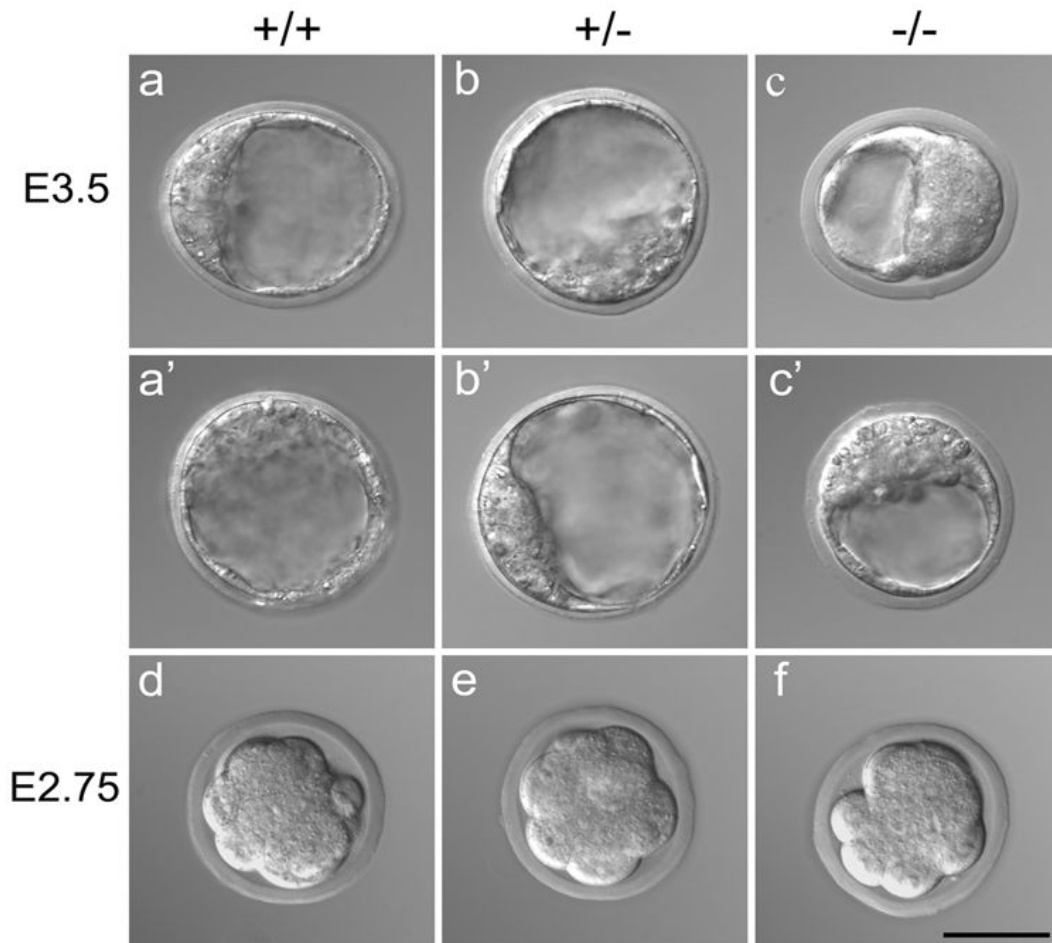


Fig. 4. Morphological analysis of preimplantation embryos from KIAA1440^{+/-} heterozygote Intercrosses.

The embryos were observed via differential interference microscopy. At the E3.5 blastocyst stage, KIAA1440^{-/-} embryos (c and c') showed abnormal morphologies compared to KIAA1440^{+/+} (a and a') and KIAA1440^{+/-} (b and b') embryos. In contrast, at the E2.75 morula stage, KIAA1440^{-/-} embryos (f) showed a normal morphology that was indistinguishable from KIAA1440^{+/+} (d) and KIAA1440^{+/-} (e) embryos. Scale bar, 50 μ m.

停止するという中山らの結果と一致した。KIAA1440^{-/-}の約 40%については中山らの結果と同様に桑実胚で発生を停止しており、約 60%についてはもう少し発生ステージの進んだ早期胚盤胞で発生を停止していたが、正常な胚盤胞を形成しないという点で再現される結果となった。一方、E2.75 桑実胚のステージでは、KIAA1440^{-/-}は KIAA1440^{+/+}、KIAA1440^{+/-}と同様に正常な形態を示し、発生を停止している様子は見られなかった (Fig. 4d-f)。

III-1-2 E2.75 桑実胚におけるコンパクションの解析

E2.75 桑実胚では KIAA1440^{-/-}においてはっきりとした形態の異常は観察されなかったが、発生を正常に進めているかどうかより詳細に調べるため、8 細胞期後期に起こるマウス初期発生における重要なイベントの一つであるコンパクションについて解析を行なった。すなわち、コンパクションに関わる細胞接着複合体の構成分子である E-cadherin、 β -catenin の免疫組織学的な検出を行なった。

E-cadherin は Ca^{2+} 依存性の細胞間接着分子であり、また、 β -catenin は E-cadherin を介した細胞接着の細胞質のアンカータンパク質として機能している。この E-cadherin による細胞接着は、コンパクションの維持と胞腔の形成において重要な役割を果していることが知られている [17-19]。

KIAA1440^{+/-}の雌雄マウスを交配して得た E2.75 桑実胚に対してホルマウント蛍光免疫染色法を行ない、E-cadherin、 β -catenin の検出を行なった。一次抗体に抗 E-cadherin 抗体あるいは抗 β -catenin 抗体、二次抗体に Cy3 標識抗体を用い、そのシグナルを観察した。観察後、個々の胚の遺伝子型を PCR により決定した (E-cadherin: n = 30, +/+ = 9, +/- = 14, -/- = 7; β -catenin: n = 14, +/+ = 3, +/- = 3, -/- = 8)。

まず、各胚の微分干渉像を比較すると、Fig. 4d-f の結果と同様に、KIAA1440^{+/+}及び KIAA1440^{+/-}と KIAA1440^{-/-}の間で違いは見られなかった (Fig. 5a-c, Fig. 6a-c)。いずれの胚においても、各割球同士が接着し、その境界が不明瞭になり始めている様子が観察された。次に、E-cadherin の Cy3 蛍光像を比較したところ、KIAA1440^{-/-}と KIAA1440^{+/+}及び KIAA1440^{+/-}の染色パターンに違いは見られなかった (Fig. 5d-f)。KIAA1440^{-/-}においても E-cadherin は細胞間接着部位に正常に局在していた。また、 β -catenin についても、KIAA1440^{+/+}及び KIAA1440^{+/-}と KIAA1440^{-/-}は同様の染色パターンを示し、 β -catenin も KIAA1440^{-/-}において細胞間接着部位に正しく局在していることが示された (Fig. 6d-f)。

このように、KIAA1440^{-/-}の桑実胚においても各割球同士の接着は起こっており、E-cadherin、 β -catenin といった細胞接着分子も細胞間接着部位に正しく局在していることが示された。このことから、KIAA1440^{-/-}はコンパクションを正常に進行しているものと考えられる。

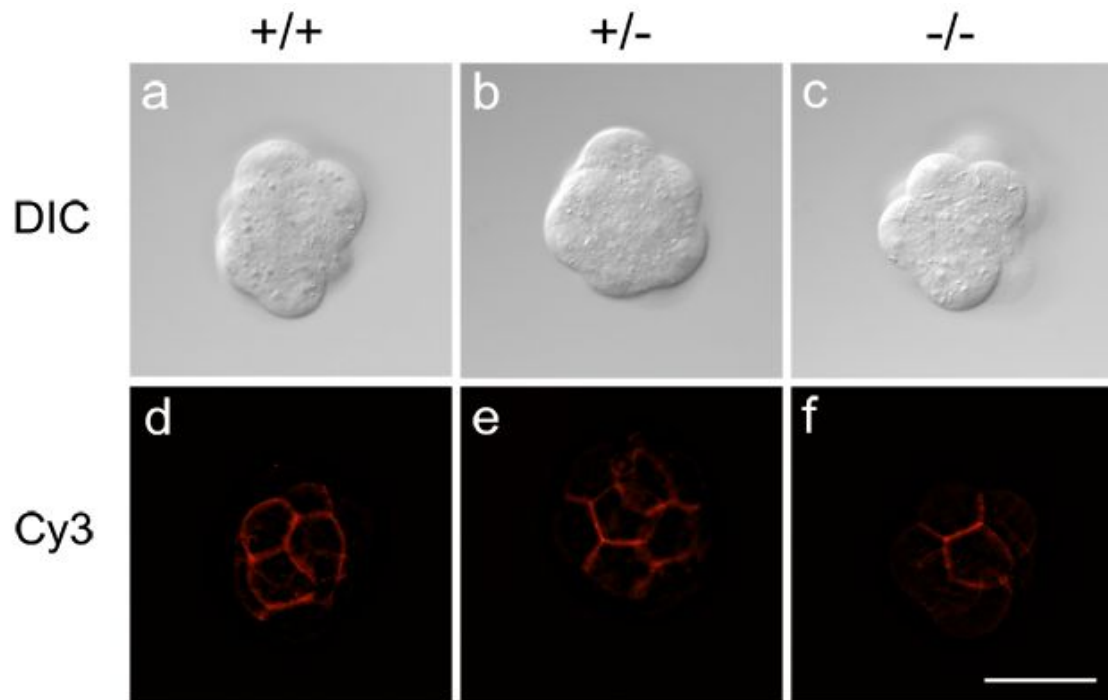


Fig. 5. Whole-mount immunofluorescent staining of E-cadherin at the E2.75 morula stage.

Embryos at E2.75 were stained with anti-E-cadherin antibody followed by Cy3-labeled secondary antibody. Differential interference contrast (DIC) images and Cy3 fluorescent images are shown. Cy3 fluorescent images were processed with the deconvolution algorithm using the SimplePCI program (Hamamatu Corp.). There were no detectable differences in the localization patterns of E-cadherin among the three genotypes. Scale bar, 50 μ m.

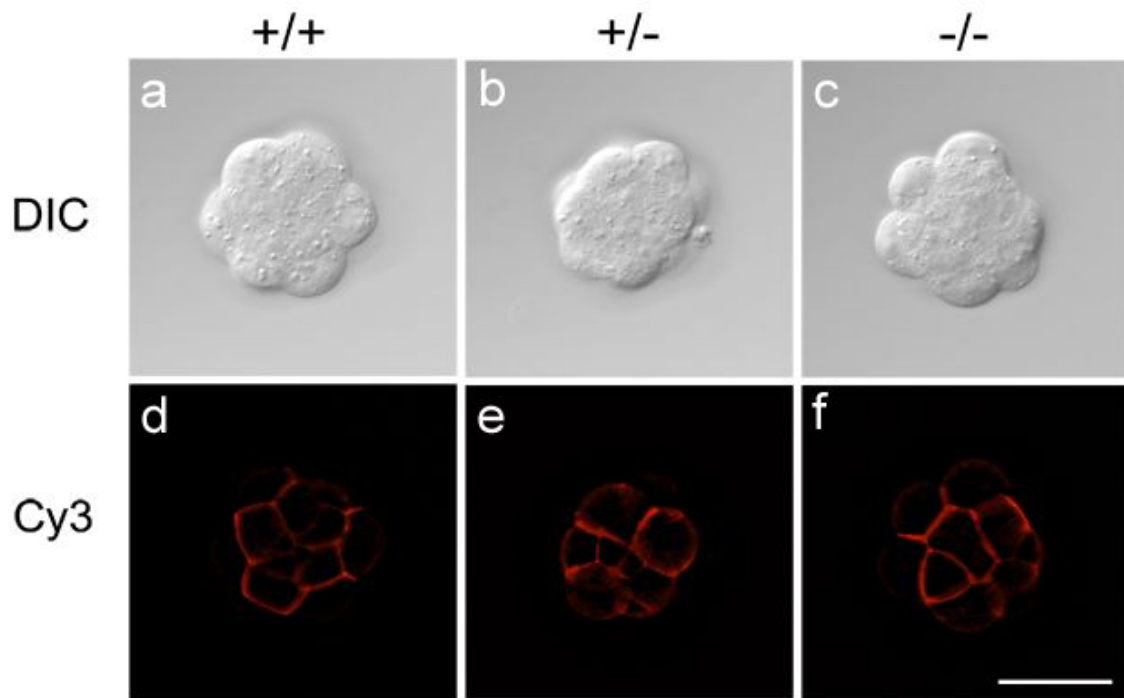


Fig. 6. Whole-mount immunofluorescent staining of β -catenin at the E2.75 morula stage.

Embryos at E2.75 were stained with anti- β -catenin antibody followed by Cy3-labeled secondary antibody. DIC and Cy3 fluorescent images are shown. There were no detectable differences in the localization patterns of β -catenin among the three genotypes as E-cadherin. Scale bar, 50 μ m.

III-1-3 胚盤胞の *in vitro* 培養

KIAA1440^{-/-}は E3.5 において早期胚盤胞の形態を示しており、拡張期胚盤胞まで発生を進めていない。これには発生が停止しているという他に、発生が遅延しているという可能性も考えられる。また、KIAA1440^{-/-}の胚盤胞では死んでいるような細胞も観察されることから(Fig. 4c'), KIAA1440^{-/-}の細胞は生存能を失っている可能性も考えられる。これらの事柄について検討するために、次に胚の *in vitro* での培養実験を行なった。

KIAA1440^{+/-}の雌雄マウスを交配し、E3.5 に胚盤胞を採取した。得られた胚を1つずつゼラチンコーティング処理された培養ディッシュへと移し、Leukemia Inhibitory Factorを添加したES培地中で、72時間、培養した。位相差顕微鏡にて胚の形態を観察した後に、個々の遺伝子型をPCRにより決定した(n = 42, +/+ = 12, +/- = 20, -/- = 10)。

KIAA1440^{+/+}及び KIAA1440^{+/-}の胚盤胞は主として透明体から孵化し、培養ディッシュ表面へと接着していた。これらは、TE由来の細胞はディッシュ表面に広がるように増殖し、そして、その上部にてICM由来の細胞が増殖するという正常な形態を示していた(Fig. 7a-b)。一方、KIAA1440^{-/-}の胚は全て透明体から孵化することなく、そのまま死滅していた(Fig. 7c)。

以上から、KIAA1440^{-/-}が E3.5 において早期胚盤胞の形態をしているのは、発生が遅延しているからではなく、発生を停止しているからであると考えられる。そして、その発生の停止は、KIAA1440^{-/-}の細胞の増殖能、生存能の低下が原因になっているものと思われる。

III-1-4 胚盤胞におけるアポトーシスの検出

KIAA1440^{-/-}の胚盤胞は *in vitro* の培養にて死滅することから、KIAA1440^{-/-}はその生存能を失っている可能性が考えられる。KIAA1440^{-/-}におけるこの細胞死にアポトーシスが関与しているかどうか、次に検討を行なった。

まず、アポトーシス細胞の特徴の一つである DNA の断片化を TUNEL 法により検出した。KIAA1440^{+/-}の雌雄マウスを交配し、E3.5 に胚盤胞を採取した。個々の胚をES培地で12時間培養した後に、TUNEL 法による解析に供した。微分干渉像、及び、蛍光像を観察した後、個々の胚の遺伝子型をPCRにより決定した(n = 41, +/+ = 12, +/- = 20, -/- = 9)。

各遺伝子型の胚の微分干渉像を比較すると、KIAA1440^{+/+}と KIAA1440^{+/-}が拡張期胚盤胞に発生を進めているのに対して、KIAA1440^{-/-}の胚はやはり早期胚盤胞期で発生を停止しており、それ以上発生を進めてはいなかった。また、KIAA1440^{-/-}では死んでいるような細胞が多く観察された(Fig. 8a-c)。

本実験における TUNEL 法では、アポトーシスに関連した DNA 鎖の切断が TMR-red の蛍光として検出される。TMR-red のシグナルを各遺伝子型で比較すると、KIAA1440^{+/+}と KIAA1440^{+/-}の間に差は見られず、共にシグナルが全く無い、あるいは少数のシグナルが観察されるだけであった。一方、

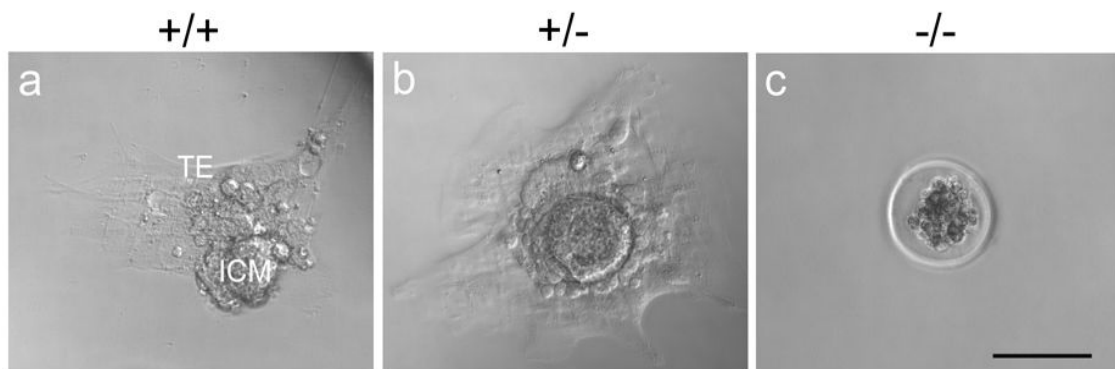


Fig. 7. Viability of KIAA1440^{-/-} blastocyst in *in vitro* culture.

Individual E3.5 embryos were cultured in gelatin-coated tissue culture plates containing ES medium, supplemented with leukemia inhibitory factor. After 72 h, the embryos were photographed with a phase-contrast microscope and genotyped by PCR. There were no differences detected in viability or development after the hatching of KIAA1440^{+/+} (a) and KIAA1440^{+/-} (b) explant. Moreover, the inner cell mass (ICM) was found to have propagated on the trophoblast (TE) cell spreads in these samples. KIAA1440^{-/-} embryos (c), however, were unable to hatch from the zona pellucida and appeared dead. Scale bar, 100 μ m.

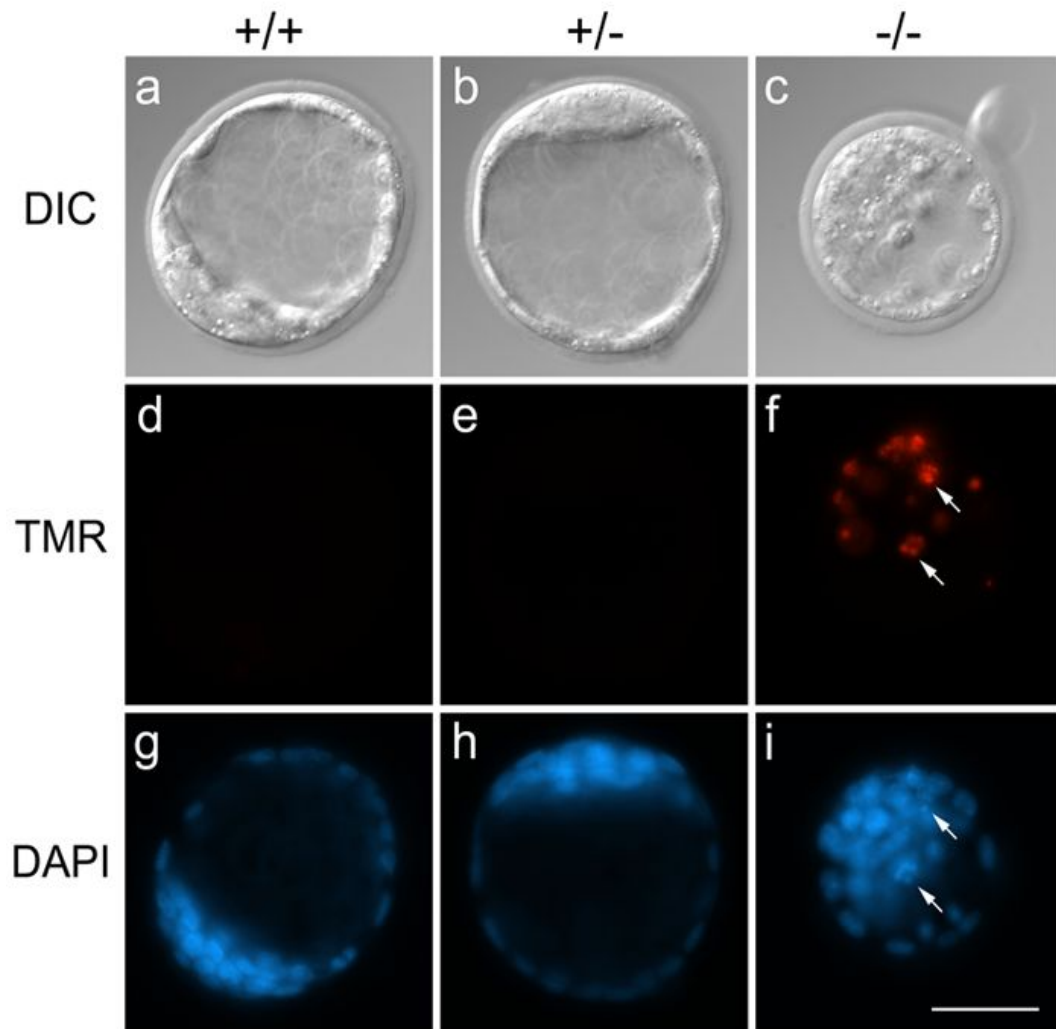


Fig. 8. Detection of apoptosis in E3.5 blastocyst cells by TUNEL analysis. Embryos isolated at E3.5 were cultured in medium for 12 h and subjected to TUNEL analysis. Differential interference contrast (DIC) images of these embryos after culturing are shown (a–c). Cells that underwent apoptosis were positively labeled with TMR-red fluorescence (d–f). Nuclear DNA was stained with DAPI (g–i). The arrows indicate condensation of chromatin. Scale bar, 50 μm .

KIAA1440^{-/-}では強いシグナルが数多く検出された (Fig. 8d-f)。さらに、KIAA1440^{-/-}の TMR-red のシグナルを発している細胞では、核の断片化、クロマチンの凝縮といったアポトーシス細胞特有の変化が起こっていることが、DAPI 染色により明らかとなった (Fig. 8f, i, arrow)。

続いて、アポトーシス細胞において活性化していることが知られているカスパーゼ-3/7 の検出を行なった[20]。KIAA1440^{+/-}の雌雄マウスを交配して得た胚盤胞を ES 培地で 6 時間培養した後、解析に供した。活性化型カスパーゼ-3/7 を共有結合的に FAM 蛍光色素で標識するカスパーゼ特異的蛍光阻害薬を用いて、カスパーゼ-3/7 の活性化の様子を観察した(n = 43, +/+ = 11, +/- = 23, -/- = 9)。

FAM のシグナルを各遺伝子型で比較すると、KIAA1440^{+/+}と KIAA1440^{+/-}の間に差は見られず、多くの場合、シグナルは検出されなかった。一方、KIAA1440^{-/-}においてはシグナルが多数検出された (Fig. 9d-f)。さらに、TUNEL 法の時と同様に、FAM シグナルが認められる細胞では核の断片化、クロマチンの凝縮が起こっていた。(Fig. 8f, i, arrow)。

以上の TUNEL 法、活性化カスパーゼ-3/7 の解析の結果から、KIAA1440^{-/-}の胚における細胞死には、アポトーシスが関与していることが示された。

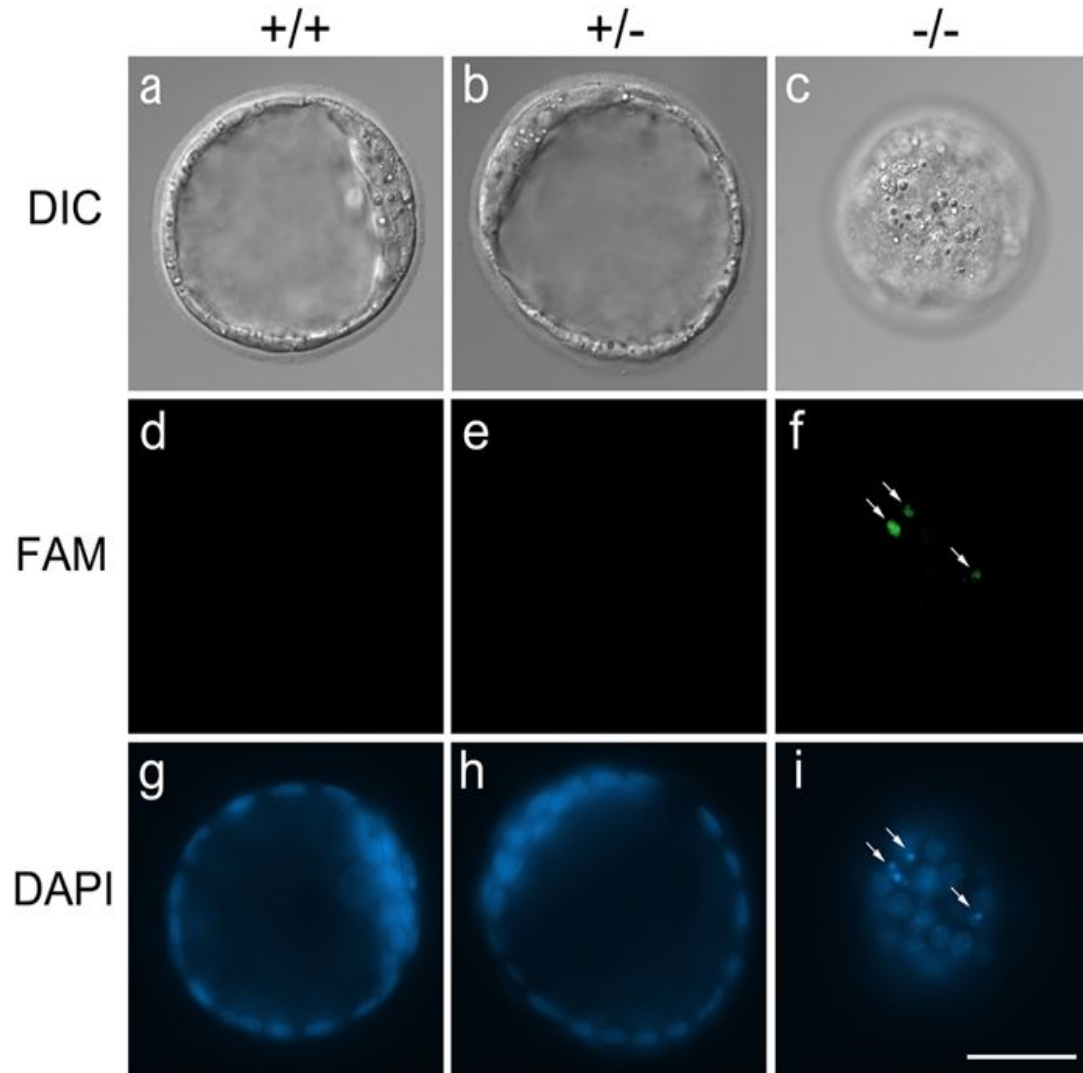


Fig. 9. Detection of activated caspase-3/7 in E3.5 blastocyst cells.

Embryos isolated at E3.5 were cultured in medium for 6 h. Differential interference images (DIC) of embryos after culturing are shown (a-c). Activated caspase-3/7 was detected by caspase 3/7-specific fluorescent inhibitor (d-f). All FAM fluorescent images shown were enhanced equally because of the relatively weak signals. Nuclear DNA staining was performed using DAPI (g-i). Scale bar, 50 μ m.

III-2 KIAA1440 の発現・細胞内局在

遺伝子の発現パターン、あるいはその細胞内局在を知ることはその遺伝子の機能を探る上で重要である。しかしながら、KIAA1440 遺伝子のマウス初期胚における messenger RNA (mRNA) の発現パターン、KIAA1440 蛋白質の細胞内局在はこれまで明らかにされていなかった。

そこで、本研究ではマウス着床前胚における KIAA1440 mRNA の発現を定量的 RT-PCR により解析した。また、培養細胞における KIAA1440 蛋白質の細胞内局在を GFP 融合蛋白質、及び、抗 KIAA1440 ポリクローナル抗体を用いた蛍光免疫染色法により解析した。

III-2-1 マウス着床前胚における KIAA1440 遺伝子の発現

III-1 章で示されたように、KIAA1440 遺伝子欠損マウスの KIAA1440^{-/-} は早期胚盤胞期で発生を停止し、アポトーシスにより死滅する。従って、このステージにおいて KIAA1440 蛋白質は機能しているはずであり、mRNA の発現も起こっていると考えられる。KIAA1440^{-/-} の胚盤胞において KIAA1440 mRNA が発現していないことは確認されているが [16]、正常マウスの発生初期における KIAA1440 mRNA の発現パターンについては明らかにされていなかった。そこで、本研究では着床前胚から total RNA を抽出し、定量的 RT-PCR による解析を行なった。自律的な遺伝子発現がまだ起こっていないとされる1細胞期胚(受精卵)と、KIAA1440 遺伝子欠損マウスにおいて表現型が現れる胚盤胞を実験の対象とした。

正常 ICR マウスを自然交配させて得た E0.5 受精卵と E3.5 胚盤胞から、total RNA を抽出した。その際、RNA の回収率、逆転写反応の効率をモニターするために、胚1個当たり 5 pg の GFP RNA を添加した。ランダムプライミング法による逆転写反応を行ない cDNA を合成し、定量的リアルタイム PCR に供した。既知濃度のプラスミド DNA から描いた標準曲線により KIAA1440 mRNA 及び GFP RNA 量を算出後、GFP の値により KIAA1440 の値を標準化した。独立して行なった3回の実験の結果の平均値と標準偏差を示す (Fig. 10)。

結果、胚盤胞では受精卵のおよそ 5.7 倍の KIAA1440 mRNA が存在していることが明らかとなった。KIAA1440 が受精卵から胚盤胞にかけての初期胚において発現している遺伝子であるということが確かめられた。

III-2-2 KIAA1440 蛋白質の細胞内局在

マウス初期胚において KIAA1440 蛋白質がどのような細胞機能に関与しているかを推定するために、KIAA1440 蛋白質の細胞内局在について解析を行なった。

KIAA1440 遺伝子は 2222 アミノ酸残基からなる巨大蛋白質をコードしており、その推定分子量は 248 kDa である。本研究ではまず始めに、KIAA1440 蛋白質を EGFP 融合蛋白質として発現させ、細胞内局

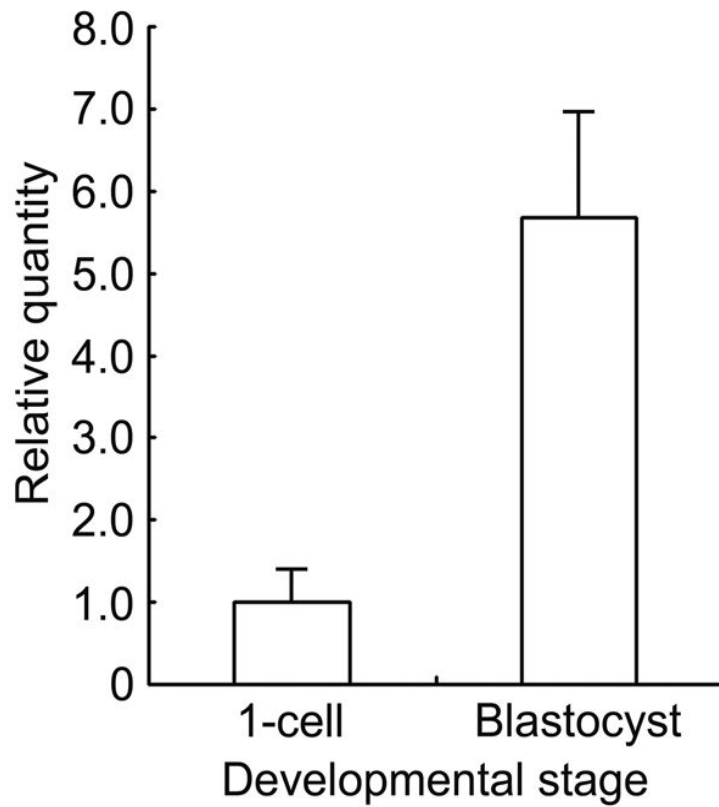


Fig. 10. Comparison of KIAA1440 mRNA levels at the preimplantation embryo stage in the wild type by real-time quantitative RT-PCR.

Total RNAs were prepared from E0.5 one-cell stage embryos and E3.5 blastocyst of wild-type ICR mice. Quantitative RT-PCR was performed with cDNA reverse-transcribed from the total RNA preparations. The data were normalized to the values of external control GFP RNA that was added into each sample prior to total RNA extraction. The relative expression levels of KIAA1440 mRNA in the blastocyst and one-cell stage embryo are shown. The mean values and standard deviations were obtained from three independent experiments.

在の解析を行なった。C 末端、N 末端 EGFP 融合型 KIAA1440 蛋白質を COS7 細胞で一過性に強制発現させ、その細胞溶解物を抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロッティングに供した。予想サイズである 275 kDa (248 kDa + EGFP 27 kDa) 付近に強くシングルバンドで検出され、分解等されずきちんと発現していることが確認できた。(Fig. 11A)。融合蛋白質の細胞内局在を蛍光顕微鏡にて観察したところ、主として核、核小体を除く核質に局在していた(Fig. 11B)。

続いて、EGFP がその融合蛋白質の細胞内局在に影響を与えている可能性を排除するために、タグ蛋白質が付加されていないネイティブ型 KIAA1440 蛋白質を用いて解析を行なった。COS7 細胞で一過性に過剰発現させたネイティブ型 KIAA1440 蛋白質を、作成した抗 KIAA1440 ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検出したところ、予測されるサイズにバンドが認められた (Fig. 12A)。同抗体を用いた蛍光免疫染色法を行なったところ、ネイティブ型 KIAA1440 蛋白質はやはり核に局在した (Fig. 12B)。

N 末端 EGFP 融合型、及び、ネイティブ型 KIAA1440 蛋白質の場合、核周囲に斑点状のシグナルを示す細胞も観察された。ゴルジ体様のシグナルであったが、これが過剰発現による人為的結果か、KIAA1440 蛋白質のもう1つの細胞内局在であるかということについては判断できなかった。

最後に、内在性 KIAA1440 蛋白質を検出するため、NIH 3T3 細胞を用いた解析を行なった。ネイティブ型 KIAA1440 蛋白質の検出に用いた抗 KIAA1440 ポリクローナル抗体を、さらにアフィニティー精製したものを抗体として用いた。KIAA1440 蛋白質 241-544 アミノ酸残基の領域を 6xHis タグと融合させたものが抗原としてウサギに免疫され、この抗体は作製された。今回、同アミノ酸残基領域を MBP 融合蛋白質として発現させ、精製し、抗 KIAA1440 ポリクローナル抗体のアフィニティー精製に使用した。

ウエスタンブロッティングにより内在性 KIAA1440 蛋白質の検出を行なったところ、ネイティブ型 KIAA1440 蛋白質と同じ、248 kDa 付近の予測サイズにバンドが認められた (Fig. 13A)。そして、蛍光免疫染色法により局在を調べたところ、核であることが明らかとなった(Fig. 13B)。

以上より、KIAA1440 は核に局在する巨大蛋白質である、ということが示された。

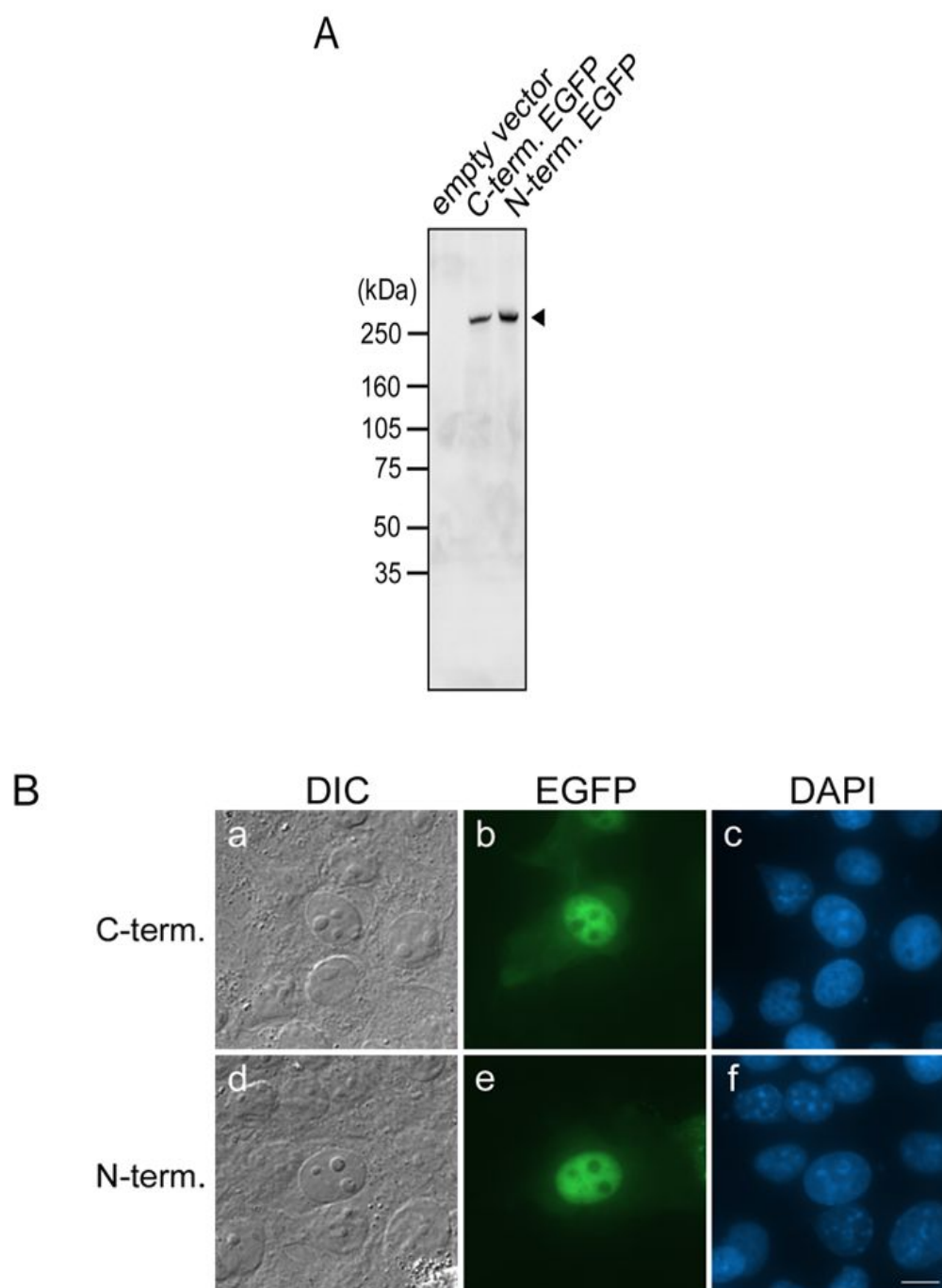


Fig. 11. The EGFP-fused KIAA1440 protein localizes in nucleus.

(A) C-terminal or N-terminal EGFP-fused KIAA1440 protein expression vectors, or an empty vector control, were transfected into COS7 cells. After 48 h, the cells were harvested and subjected to Western blotting with anti-GFP antibody. (B) The EGFP-fused KIAA1440 protein expression vectors were transfected into COS7 cells. After 48 h, differential interference contrast (DIC) images (a and d), EGFP fluorescent images (b and e) and DAPI fluorescent images (c and f) were observed. Scale bar, 10 μ m.

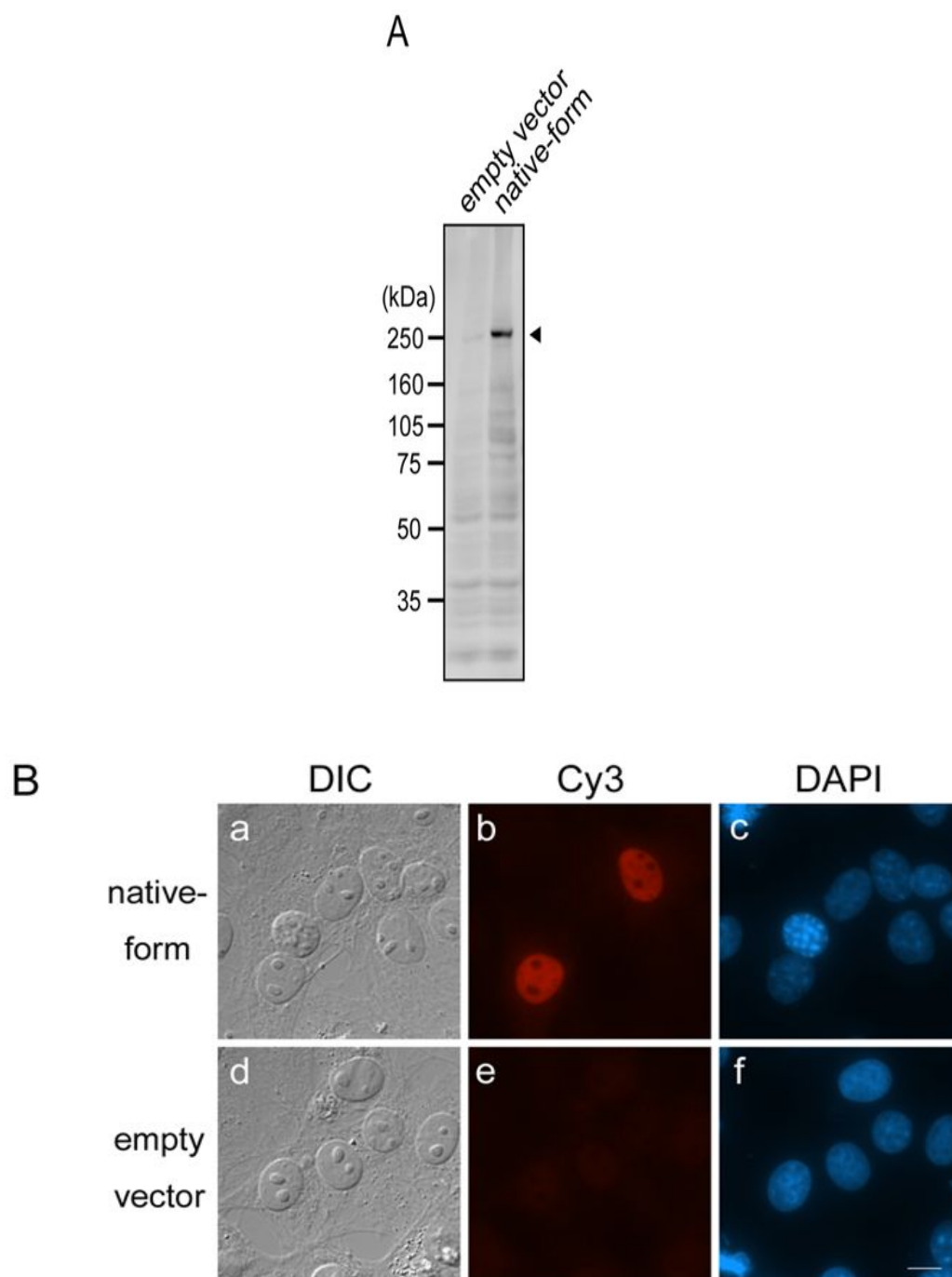


Fig. 12. The native-form KIAA1440 protein localizes in nucleus.

(A) A native-form KIAA1440 protein expression vector or empty vector was transfected into COS7 cells. After 48 h, the cells were harvested and subjected to Western blotting with anti-KIAA1440 polyclonal antibody. (B) A native-form KIAA1440 protein expression vector or empty vector was transfected into COS7 cells. After incubation for 48 h, mouse KIAA1440 protein was detected by immunofluorescent staining with anti-KIAA1440 antibody followed by Cy3-labeled secondary antibody. Differential interference contrast (DIC) images (a and d), Cy3 fluorescent images (b and e) and DAPI fluorescent images (c and f) were photographed. Scale bar, 10 μ m.

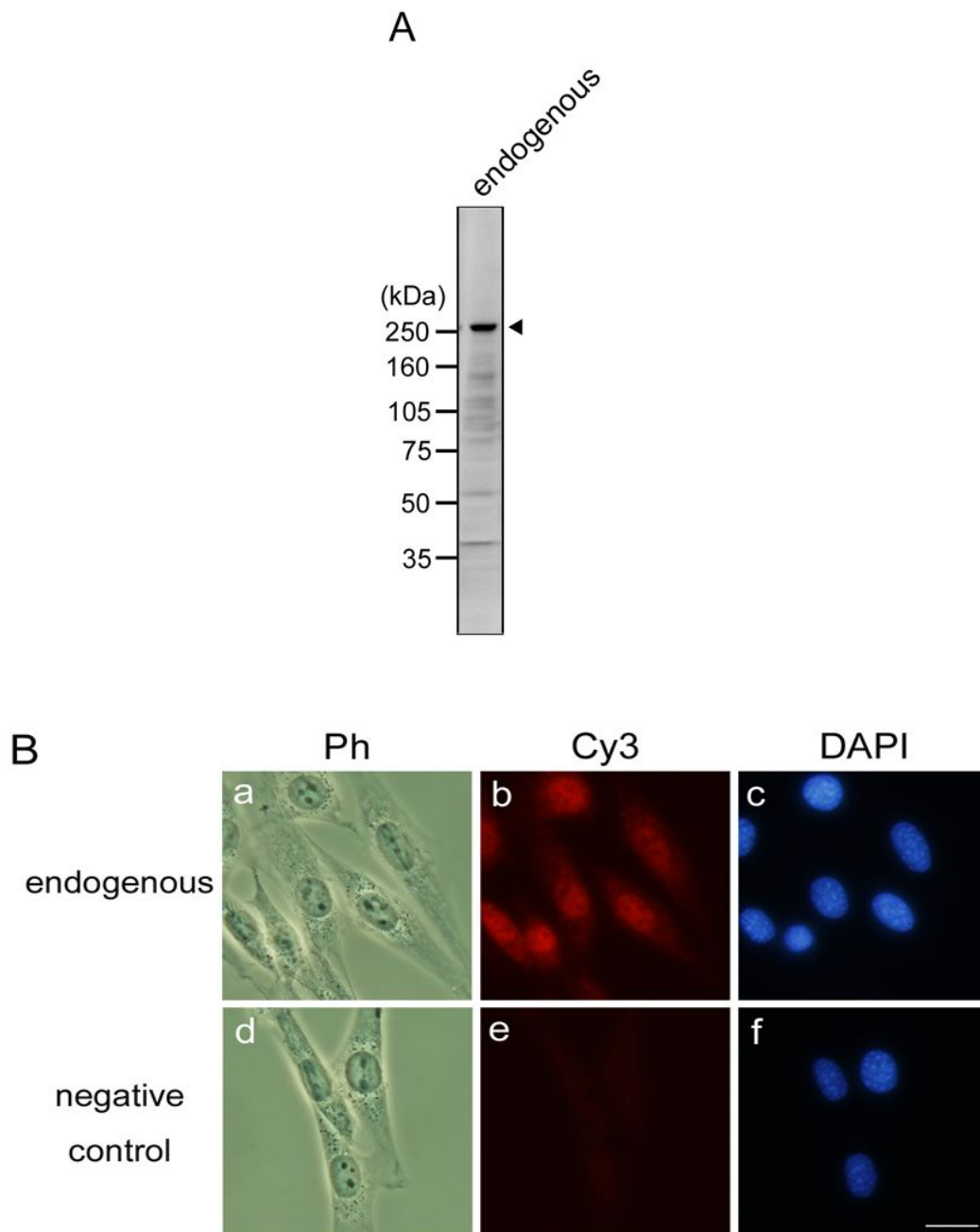


Fig. 13. The endogenous KIAA1440 protein predominantly localizes in nucleus.

(A) Whole-cell lysates prepared from NIH 3T3 cells were subjected to Western blotting with affinity-purified anti-KIAA1440 antibody. (B) Endogenous mouse KIAA1440 protein in NIH 3T3 cells was detected by immunofluorescent staining with affinity-purified anti-KIAA1440 antibody followed by Cy3-labeled secondary antibody. Negative controls were performed without primary antibody. Phase-contrast (Ph) images (a and d), and Cy3 (b and e) and DAPI (c and f) signals are shown. Scale bar, 20 μ m.

III-3 HaloTag™ テクノロジーを用いたポリクローナル抗体のアフィニティー精製 —スモールスケールの抗体精製を迅速に行うための方法の検討—

III-2 章では KIAA1440 蛋白質の細胞内局在を知るために抗体を用いて実験を行なった。アフィニティー精製した抗 KIAA1440 ポリクローナル抗体は NIH 3T3 細胞の内在性 KIAA1440 蛋白質を検出することができたが、より特異性・親和性の高い抗体を手に入れることができれば、機能解析を進めて行く上でとても有用なツールとなる。

本研究のみならず、特異的抗体は蛋白質の機能解析を行なう上で非常に強力なツールとして使用されている。抗体を得るための方法の一つとして、ウサギから抗血清を得る方法がある。これは目的の蛋白質の全長、あるいは、断片をタグ融合蛋白質として大腸菌等で発現させ精製し、抗原としてウサギに免疫して、その抗血清を得る方法である。このように作成した抗体はいつも高い特異性・親和性を持っているわけではないので、アフィニティー精製がしばしば行われる。アフィニティー精製では、まず、抗体精製の抗原がレジンのような固相支持体（例えば、HiTrap NHS-activated HP Columns (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)など）に共有結合的にカップリングされる。そして、このアフィニティーレジンと抗血清を反応させた後、親和性、特異性の低い抗体を洗浄により除去することで、特異的抗体のみを得ることができる。

この方法は一般的に広く行われている優れた方法であるが、大量の精製用抗原が必要であり、また、煩雑な工程である抗原の固相支持体への結合を行なわなければならない。そこで本研究では、HaloTag™ テクノロジーを用いることにより、スモールスケールでの抗体精製を迅速、簡便に行うための方法の検討を行なった (Fig. 14)。

HaloTag™ テクノロジーはPromega社によって開発された蛋白質のtagging技術である。Rhodococcus rhodochrous 由来の単量体ハロアルカンデハロゲナーゼの変異体であるHaloTag蛋白質は、HaloTagリガンドと共有結合的に結合する。HaloLink ResinはHaloTagリガンドが結合したレジンである。HaloTag融合蛋白質を発現させた大腸菌抽出物とこのHaloLink Resinと反応させることにより、HaloTag蛋白質の精製とレジンへのカップリングを同時に行なうことができる。つまり、抗原蛋白質の精製、レジンへのカップリングという2つのステップを別々に行なわなければならない従来の方法に比べ、迅速、簡便に抗体精製のためのアフィニティーレジンを調整することができる (Fig. 14)。また、HaloLink Resinによる方法では少量の大腸菌抽出物があれば十分である。

本研究では、抗KIAA1440抗血清を対象として、HaloTag™ テクノロジーによる抗体の精製とその評価を行なった。

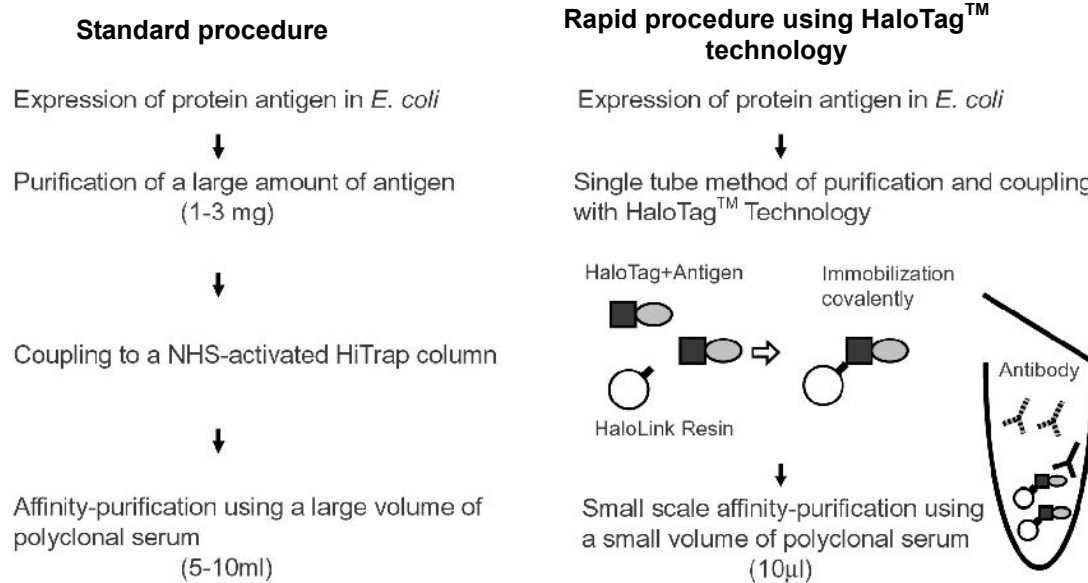


Fig. 14. Comparison between a standard immunoaffinity purification procedure and a rapid HaloTag™ procedure.

III-3-1 HaloTagTMテクノロジーを用いたポリクローナル抗体のアフィニティー精製

大腸菌で MBP-HaloTag 融合 KIAA1440 蛋白質、MBP 融合 KIAA1440 蛋白質をそれぞれ発現させ、超音波破碎後、遠心し、可溶性分画を得た。可溶性分画 100 μ l (培養 700 μ l に相当) を HaloLink Resin 50 μ l と室温、1 時間反応させた後、上清 10 μ l を SDS-PAGE に供した (Fig. 15A)。HaloLink Resin に結合すればこの上清に含まれる MBP 融合 KIAA1440 蛋白質の量は減少するはずであるが、反応前後において、MBP 融合 KIAA1440 のバンドにはっきりとした変化は観察されなかった (Fig. 15A, lane 1, 3, filled arrowhead)。このことから、HaloLink Resin に結合した MBP-HaloTag 融合 KIAA1440 蛋白質はそれほど多くなかったと思われる。HaloTag 蛋白質とそれに融合させる蛋白質の間には [Ser-Gly⁴] リピートのようなポリリンカー配列を挿入することが推奨されているが、今回そういった配列は使用しなかった。これにより立体障害が生じ、HaloTag 蛋白質の HaloLink Resin への結合活性が少し低下してしまったのかもしれない。HaloTagTM 融合蛋白質とカップリングした HaloLink Resin を 10 倍に希釈した抗 KIAA1440 抗血清 100 μ l と 4°C、1 時間反応させ、高塩濃度バッファーで親和性、特異性の低い抗体を洗浄・除去した後、特異的抗体を溶出した。溶出物を SDS-PAGE にて確認したところ、MBP-HaloTag 融合 KIAA1440 蛋白質をカップルさせたレジンでのみバンドが認められた (Fig. 15A, lane 5, 6, arrow)。また、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体によるウェスタンブロッティングを行なったところ、MBP-HaloTag 融合 KIAA1440 蛋白質の方でより強いバンドが認められ、ウサギ IgG 抗体が精製されていることが確認できた (Fig. 15B, arrow)。最後に、この精製された抗体の反応特異性の評価を行なうために、マウス全脳抽出物 100 μ g を使用したウェスタンブロッティングを行なった。その結果、精製抗体では未精製抗体に比べて非特異的なバンドが減少していることが確認できた (Fig. 16, open triangles)。以上より、HaloTagTM テクノロジーを用いた方法により、特異的抗体の精製が行えることが示された。

本研究で行なった HaloTagTM テクノロジーによる方法は、HiTrap NHS-activated HP Columns などの固相支持体に精製用抗原をカップリングさせる従来の方法に比べて、簡便、迅速に抗体の精製を行なうことができる。HaloTagTM テクノロジーを用いることにより、HaloTag 融合蛋白質 (抗原蛋白質) の精製とレジンへのカップリングを同時に行なうことができるからである。また、従来、1~3 mg という大量の抗原蛋白質が必要であったのに対して、本法では 1 ml 以下という少量の大腸菌からの抽出物でも抗体の精製を行なうことができる。

しかし、一方で、従来の方法では 1 度に 5~10 ml の精製抗体を得られるのに対して、本法では 10 μ l ほどしか得ることができない。スタートの大腸菌抽出物の量、カップリングに使用する HaloLink Resin の量をスケールアップすることにより精製できる抗体の量を増やすことももちろんできるが、簡便、迅速に行えるということから、従来の方法と異なった目的、用途での使用に適していると思われる。

抗体を精製する際には一般に免疫したのと同じ抗原蛋白質を使用するが、原理的には免疫に使用した抗原の一部分だけを用いて精製することも可能である。例えば、抗原の中に特異性の低い領域が存在していた場合、この部位を除いたものを抗原として使用し、抗体の精製を行なえば、より特異性の高い

抗体を得ることができる (Fig. 17)。最も高い特異性を示す抗原部分を同定するための予備検討は、大量の抗体を精製するようなラージスケールで行う必要はない。すなわち、スモールスケールで簡便、迅速に行えるのが望ましく、これにはHaloTagTMテクノロジーを用いた本法が非常に適していると考えられる。

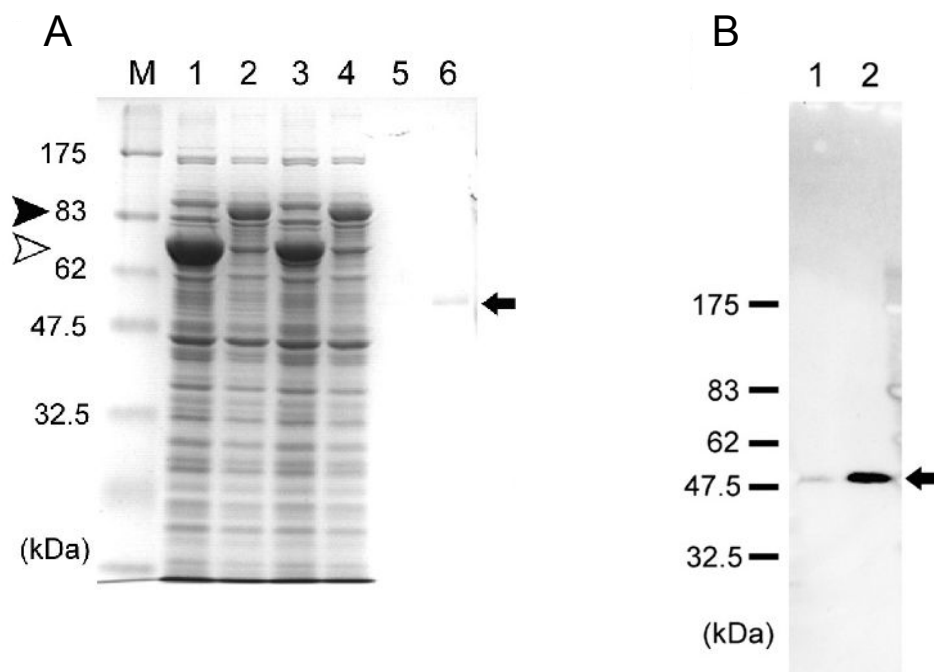


Fig. 15. Purification of specific antibody using HaloTag™ technology.

(A) SDS-PAGE of eluates (10 μ l each) from immunoaffinity resins containing either HaloLinked Resin-coupled MBP-HaloTag or HaloLinked Resin-coupled MBP-HaloTag-KIAA1440. After 10% SDS-PAGE, gels were stained with CBB. Lane 1, MBP-HaloTag (soluble fraction) overexpressed in *E. coli*; lane 2, MBP-HaloTag-KIAA1440 (soluble fraction) overexpressed in *E. coli*; lane 3, unbound fraction from the HaloLinked Resin-coupled MBP-HaloTag column after the HaloLink Resin reaction; lane 4, unbound fraction from the HaloLinked Resin-coupled MBP-HaloTag-KIAA1440 column after the HaloLink Resin reaction; lane 5, bound fraction eluted with 100 mM glycine (pH 2.5) after immunoaffinity purification using the HaloLinked Resin-coupled MBP-HaloTag column; lane 6, bound fraction eluted with 100 mM glycine (pH 2.5) after immunoaffinity purification using the HaloLinked Resin-coupled MBP-HaloTag-KIAA1440 column. Open and filled arrowheads point to MBP-HaloTag and MBP-HaloTag-KIAA1440, respectively. Arrow points to the heavy chains of antibodies affinity-purified by our rapid single-tube method (lane 6). (B) Aliquots (1 μ l each) of the glycine buffer-eluted antibodies, themselves, from either HaloLinked Resin-coupled MBP-HaloTag (lane 1) or HaloLinked Resin-coupled MBP-HaloTag-KIAA1440 (lane 2) were also detected by incubating the membranes with HRP-conjugated anti-rabbit IgG followed by ECL Plus detection system. Arrow points to the heavy chains of antibodies affinity-purified by our rapid single-tube method (lane 2).

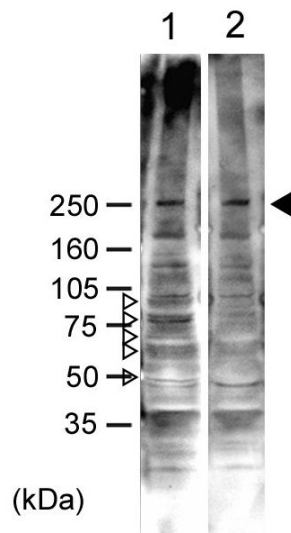


Fig. 16. Assessment of antibody purified by HaloTag™ technology.

Specificity analysis of polyclonal antibodies affinity-purified using a HaloLink Resin. Mouse whole brain extracts (100 μ g) were separated by 2–15% gradient SDS-PAGE. Separated proteins were transferred onto nitrocellulose membranes. Immunoblot of mouse whole brain extracts immunostained with polyclonal anti-mKIAA1440 serum (lane 1) or eluate from HaloLinked Resin-coupled MBP-HaloTag-KIAA1440 (lane 2). Immunoreactive complexes were detected by treating the membranes with HRP-conjugated anti-rabbit IgG followed by the ECL plus detection system. The closed triangle points to the expected molecular weight of fulllength mouse KIAA1440 protein. Open triangles point to some typical cross-reactive bands.

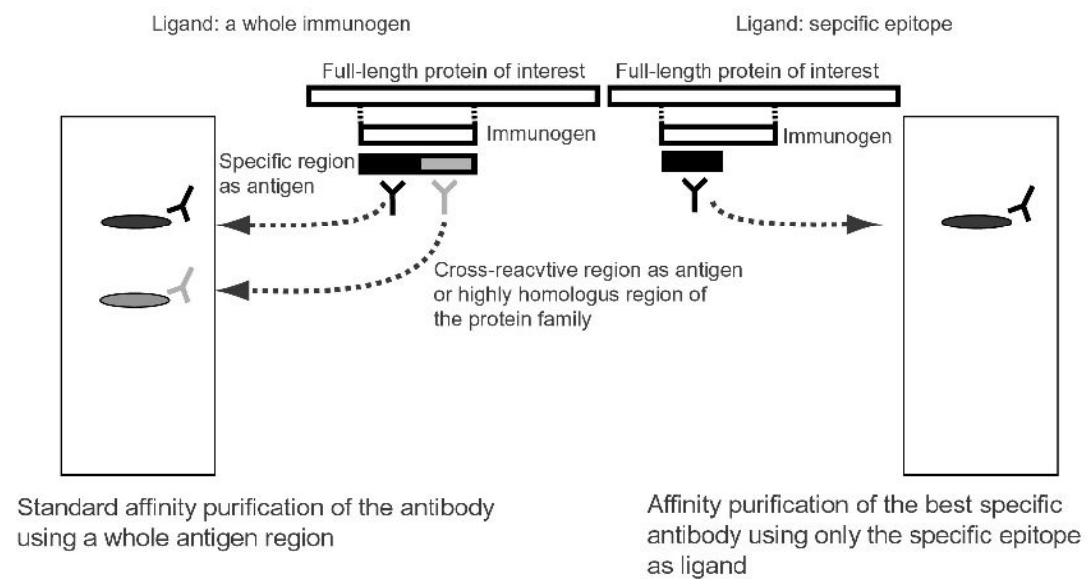


Fig. 17. Schematic diagram showing the importance of surveying suitable antigenic determinants or epitopes for use in immunoaffinity purification to obtain high affinity, high specificity antibodies against a protein of interest from a polyclonal pool of antibodies.

III-4 Integrator サブユニットとしての KIAA1440

本研究では、KIAA1440 遺伝子欠損マウスの詳細な表現型解析、KIAA1440 mRNA のマウス初期胚における発現、培養細胞における KIAA1440 蛋白質の細胞内局在の解析を行なってきた。これらの知見を得た後に、Baillat らのグループにより新しい機能複合体である Integrator に関する報告がなされた [21]。核内に存在するこの Integrator 複合体を質量分析法により解析したところ、12 個のサブユニットからなり (Table 4)、そして、そのサブユニットの1つが KIAA1440 であるという報告であった。培養細胞を用いた RNA 干渉実験より Integrator は U1/2 small nuclear RNA (snRNA) の成熟化を行なう機能複合体であること、また、Integrator は RNA ポリメラーゼ II (RNA polymerase II, RNAPII) の C 末端ドメイン (C-terminal domain, CTD) に結合することも示された (Fig. 18)。

このような Integrator の機能は、本研究で明らかにされた KIAA1440 蛋白質の細胞内局在と一致する。そこで、本研究ではマウス KIAA1440 が RNAPII と相互作用することを確認した後に、KIAA1440 の Integrator 複合体中での役割を探るための詳細な解析を行なった。すなわち、Baillat らの質量分析法による解析で明らかにされなかった KIAA1440 蛋白質と Integrator サブユニットとの直接的な相互作用の解析を酵母 Two-Hybrid システムにより行なった。また、KIAA1440 蛋白質の欠損が生体内において Integrator 複合体の機能にどのような影響を与えるのかということを確認するために、KIAA1440 遺伝子欠損マウスを用いた実験を行なった。

III-4-1 共免疫沈降法による KIAA1440 蛋白質の RNAPII との相互作用解析

Integrator 複合体は CTD を介して RNAPII と相互作用することが Hela 細胞を用いた実験により示されている [21]。KIAA1440 蛋白質と Integrator 複合体の細胞内局在は一致するが、KIAA1440 が Integrator サブユニットとして本当に機能しているのか、このことを確認するために、本研究ではまずマウス KIAA1440 蛋白質と RNAPII との相互作用を解析した。

N 末端 FLAG タグ融合 KIAA1440 蛋白質、及び、陰性対象としてネイティブ型 KIAA1440 蛋白質を 293 細胞で一過性に強制発現させ、細胞溶解物を調整し、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行なった。免疫沈降物を抗 RNAPII 抗体、及び、抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロットに供した。

その結果、対照であるネイティブ型 KIAA1440 のサンプルでは RNAPII のバンドが認められないのに対して、FLAG タグ融合 KIAA1440 では RNAPII のバンドがはっきりと認められた (Fig. 19)。共免疫沈降法により、マウス KIAA1440 蛋白質と RNAPII が相互作用を確認することができた。

III-4-2 酵母 Two-Hybrid システムによる KIAA1440 と Integrator サブユニットとの相互作用解析

Baillat らは核抽出物より分離した Integrator 複合体を質量分析法により解析した。この方法では

Table 4. Subunits of human “Integrator” complex

Protein Name	Other Name	Accession No.
Int1	KIAA1440	BAA92678
Int2	KIAA1287	NP_065799
Int3	FLJ21919	NP_075391
Int4	hCG12113	NP_291025
Int5	KIAA1698	BAB21789
Int6	DICE1	NP_036273
Int7	DKFZp434b168	NP_056249
Int8	Kaonashi1	BAD10863
Int9	FLJ10871	NP_060720
Int10	FLJ10569	NP_060612
Int11	FLJ20542	NP_060341
Int12	SBBI22	NP_065128

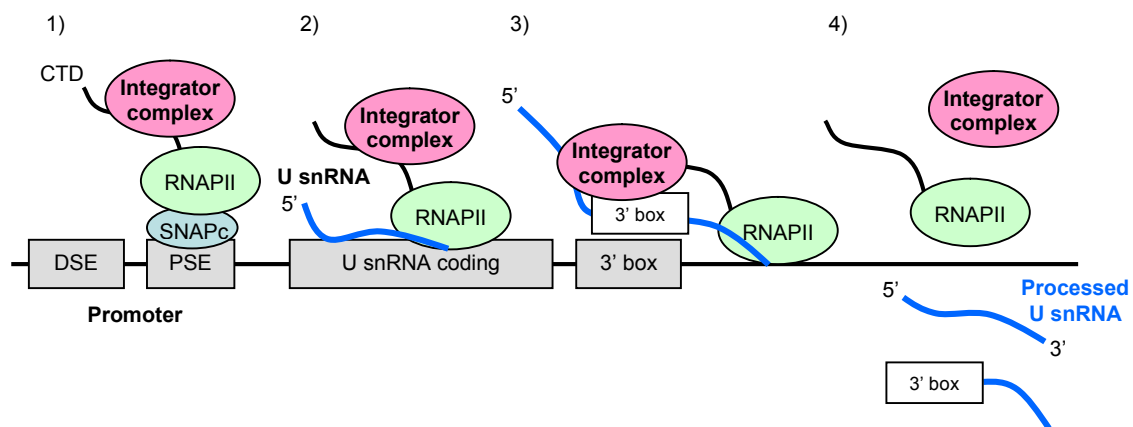


Fig. 18. The mechanistic model of 3' box-dependent U snRNA processing by Integrator complex.

1) The Integrator complex interacts with C-terminal domain (CTD) of RNA polymerase II (RNAPII) at the promoter of snRNAs genes. 2) The Integrator complex travels with RNAPII until transcription of the 3' box. 3) RNA processing occurs after interaction of Integrator with the 3' box. 4) Termination occurs after release of the Integrator complex and the cleaved snRNA. DSE: distal promoter element, PSE: proximal promoter element.

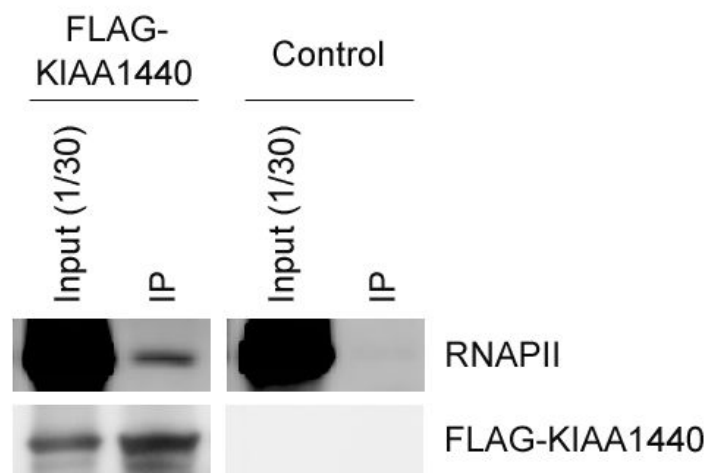


Fig. 19. Mouse KIAA1440 protein interacts with endogenous RNA polymerase II in 293 cell.

N-terminal 3xFLAG-fused KIAA1440 protein expression vectors or native-form KIAA1440 expression vector (as negative control) were transfected into 293 cells. After 24 h, the cells were harvested and subjected to coimmunoprecipitation analysis. Lysates were incubated with anti-FLAG M2 monoclonal antibody and Protein G-coupled sepharose beads. Precipitates were subjected to western blot analysis using anti-RNA polymerase II monoclonal antibody or anti-FLAG M2 monoclonal antibody. One thirtieth of the lysates that used in immunoprecipitation were loaded on input lanes.

Integrator を構成する各サブユニットを同定することはできるが、どのサブユニット同士が直接相互作用しているかということに関する情報は得られない。そこで、本研究では KIAA1440 蛋白質と Integrator サブユニットとの直接的な相互作用を調べるため、酵母 Two-Hybrid システムによる解析を行なった。

酵母 Two-Hybrid システムにはクロンテック社の MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System を用いた。Two-Hybrid システムは、DNA 結合ドメインに融合した Bait 蛋白質と転写活性化ドメインと融合した Prey 蛋白質が相互作用するとレポーター遺伝子の発現が起こることを利用して蛋白質の相互作用を検出する方法である。本研究では、*HIS3*、*ADE2*、*LacZ* 遺伝子をレポーター遺伝子とした。すなわち、X- α -Gal を塗布した SD/-Trp/-Leu/- Ade/-His/+15 mM 3-AT 寒天培地に画線培養した時に、増殖し、かつ、青色に発色したものを陽性とした。

Bait に KIAA1440 蛋白質の全長をコードする cDNA、あるいは、約 600 アミノ酸ずつに断片化された蛋白質をコードする cDNA (Table 4)、Prey に Integrator サブユニット 12 蛋白質の全長をコードする cDNA を用いて、スクリーニングを行なった。その結果を Table 5 に示す。陽性を示したものについては、Bait と Prey を入れかえ確認実験を行なった。Ints2 は Bait にすると self-activation を示してしまい、評価することができなかったが、Ints8 に関しては入れかえる前と同じ陽性の結果を得た。

すなわち、KIAA1440 全長蛋白質は Ints2 と、KIAA1440 Fragment 4(901-1500 アミノ酸残基をコードする)は Ints2 及び Ints8 と相互作用し得ることが示された。

III-4-3 KIAA1440 遺伝子欠損マウス胚における U2 snRNA プロセシング活性の解析

Integrator 複合体の最大サブユニットである KIAA1440 蛋白質の欠損は Integrator にどのような影響を与えるのか、すなわち、Integrator 複合体の機能とされる U snRNA プロセシング活性はどのように変化するのか、このことを検討するために KIAA1440 遺伝子欠損マウスを用いた解析を行なった。

U snRNA プロセシング活性の変化を捉えるために U2 snRNA transcript の定量を行なった。U2 snRNA のプロセシングは Fig. 20A のように行われる。U2 snRNA は RNAPII によってまず非常に長い 3'末端配列を持つ Primary transcript として転写された後、3' box と呼ばれる配列の前でプロセシングされ、Mature transcript になる。Integrator はこのプロセシングを行なう複合体だとされている。Fig. 20A で示されたプライマー a と b を用いた PCR では、Mature 及び Primary transcript、すなわち、全 snRNA transcript が検出される。一方、プライマー c と d による PCR では Primary transcript のみが検出される。これら Mature 及び Primary transcript の量が、遺伝子欠損マウス胚においてどう変化しているかを定量的 RT-PCR により解析した。

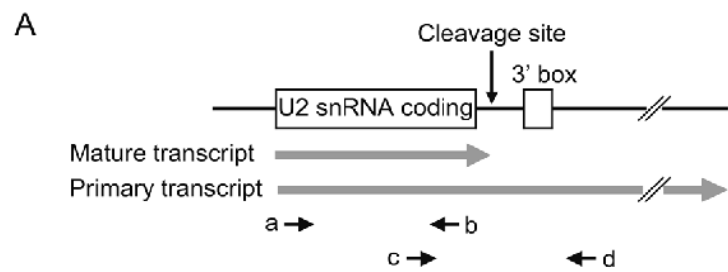
定量的 RT-PCR に用いるサンプルの調整は次のように行なった。KIAA1440^{+/-}の雌雄マウスを交配することにより得た E3.5 胚盤胞を1つずつ溶解し、lysate を調整した。その 1/3 はゲノム DNA として遺伝子型を決定するための PCR に用いた。残りの 2/3 は DNase 処理後、total RNA として U2 snRNA の定量的 RT-PCR に使用した。このようにすることで、各胚における snRNA プロセシングの様子をその遺伝子

Table 5. Analysis of interaction of KIAA1440 with Integrator subunits.

	Ints1 (KIAA1440)	Ints2	Ints3	Ints4	Ints5	Ints6
Full length	-	+	-	-	-	-
Fragment 1	-	-	-	-	-	-
Fragment 2	-	-	-	-	-	-
Fragment 3	-	-	-	-	-	-
Fragment 4	-	+	-	-	-	-
Fragment 5	-	-	-	-	-	-
Fragment 6	-	-	-	-	-	-

	Ints7	Ints8	Ints9	Ints10	Ints11	Ints12
Full length	-	-	-	-	-	-
Fragment 1	-	-	-	-	-	-
Fragment 2	-	-	-	-	-	-
Fragment 3	-	-	-	-	-	-
Fragment 4	-	+	-	-	-	-
Fragment 5	-	-	-	-	-	-
Fragment 6	-	-	-	-	-	-

*Bait and prey vectors were cotransformed into yeast AH109 strain by lithium acetate method. First, transformants were selected on SD/-Trp/-Leu plate. Next, formed colonies were streaked on SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His/+15 mM 3-AT agarose plate containing X- α -gal and incubated at 30°C for ~14 days. Blue-coloring clones that could grow on the plate were determined as positive.



(continued)

(continued)

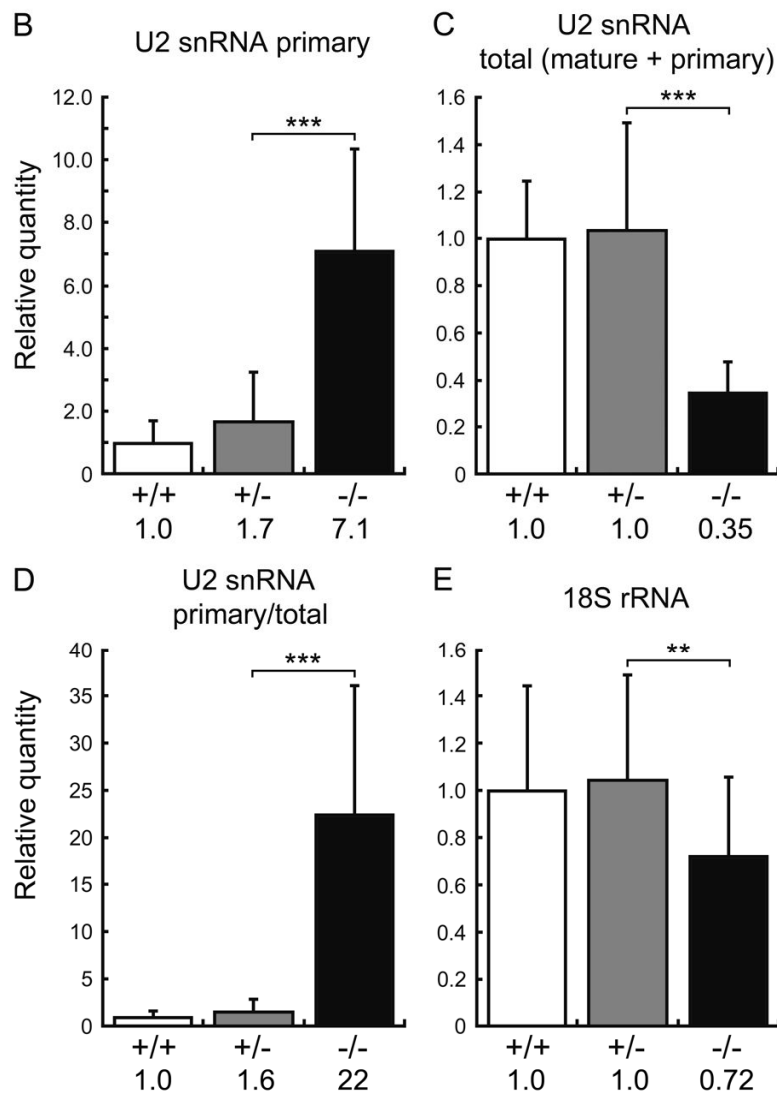


Fig. 20. Quantitative analysis of U2 snRNA in E3.5 blastocyst.

(A) Schematic diagrams showing the structure of the U2 snRNA gene. The genomic structure of the U2 snRNA gene is indicated at the top. The primary transcript is cleaved just before the 3' box. The primers used are represented by small black arrows. Total (mature+primary) transcript were amplified with primers a and b, and primary transcript were amplified with primers c and d. (B-E) quantitative RT (qRT)-PCR of U2 snRNAs and 18S rRNAs in blastocyst. Each genomic DNA for genotyping and total RNAs for qRT-PCR were prepared from individual blastocyst derived from KIAA1440^{+/-} intercrosses. The relative quantities of each type of transcript relative to the average of transcript from wild-type blastocyst are shown (B, U2 primary; C, U2 total; E, 18S rRNA). (D) The ratio of primary U2 transcript to total transcript was calculated by dividing the number of primary transcript by the number of total transcript, and is shown as the relative ratio to that calculated from the wild type. The means and standard deviations were obtained from 55 (U2 snRNA) and 57 (18S rRNA) embryos. The mean values are indicated below the graphs. Two and three asterisks indicate $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively.

型と共に知ることができる。18S rRNA も同様に測定した。U2 snRNA では、+/+ = 15、+/- = 29、-/- = 11、計 55 個、18S rRNA では、+/+ = 14、+/- = 27、-/- = 16、計 57 個の胚を用いて実験を行なった。

結果を Fig. 20B-E に示す。KIAA1440^{-/-}の胚盤胞では、KIAA1440^{+/+}の約 7.1 倍の Primary transcript が検出された (Fig. 20B)。一方、全 U2 snRNA transcript (Mature + Primary)は KIAA1440^{-/-}において KIAA1440^{+/+}の約 35%にまで減少していた(Fig. 20C)。今回の定量的 RT-PCR において、標準物質であるプラスミド DNA の希釈系列の値から U2 snRNA の全 transcript と Primary transcript のコピー数を算出したところ、全 transcript は Primary transcript の約 10³ 倍存在していた。すなわち、今回測定した全 U2 snRNA transcript は、ほぼ Mature transcript の量に等しいと考えられる。従って、KIAA1440^{-/-}の胚盤胞には KIAA1440^{+/+}の 35%ほどしか、Mature transcript が存在しないことになる。

しかし、Fig. 4a, a', c, c'で比較するとわかるように、KIAA1440^{-/-}の胚盤胞は KIAA1440^{+/+}よりも小さい。すなわち、胚1個当たりの total RNA 量が異なることになる。そこで、18S rRNA 量を測定し、この値で標準化を行なった。18S rRNA は RNA ポリメラーゼ I によって転写され、U snRNA が関与する pre-mRNA スプライシングとは異なる経路でプロセッシングされる [22]。このことから、Integrator サブユニットの欠損を受けにくく、total RNA の量をより正確に反映していると考えられたので、今回、標準化のための転写物として採用した (Fig. 20E)。18S rRNA で標準化したところ、KIAA1440^{-/-}における全 U2 snRNA transcript (≡ Mature transcript) は KIAA1440^{+/+}の約 48%であった。KIAA1440^{-/-}ではやはり Mature transcript の減少が起こっているようである。

全 U2 snRNA transcript に含まれる Primary transcript の存在率で比較してみると、KIAA1440^{-/-}は KIAA1440^{+/+}の約 22 倍の値を示し、KIAA1440^{-/-}において Primary transcript が顕著に蓄積していることが示された (Fig. 20D)。

以上から、KIAA1440^{-/-}の胚盤胞では Primary transcript の蓄積、Mature transcript の減少が起こっており、KIAA1440 蛋白質の欠損により Integrator 複合体の U2 snRNA プロセッシング活性が顕著に低下していることが明らかとなった。

第 IV 章 考 察

2222 アミノ酸残基からなる巨大蛋白質 KIAA1440 の欠損マウスのホモ遺伝子型は胚性致死を示すことが先行研究により明らかにされていた [16]。そこで、本研究では主として遺伝子欠損マウスを用いた実験を行うことにより、その詳細な機能の解析を試みた。

まず、KIAA1440 遺伝子の機能に関する手掛かりを得るために、KIAA1440 遺伝子欠損マウスのより詳細な表現型解析を行なった。最初に、E3.5 及び E2.5 における KIAA1440 遺伝子欠損マウス胚の遺伝子型の検定、形態の観察を行なった。これらのステージにおいて各遺伝子型はメンデルの法則にしたがった正常な頻度で存在していたが、E3.5 では形態の異常が認められ、KIAA1440^{-/-}の胚の約 40%は桑実胚、そして、約 60%は早期胚盤胞期で発生を停止していた。正常な胚盤胞まで発生を進めないという点で中山らによる先行研究と同様の結果を得ることができた。しかし、約 60%のものが早期胚盤胞まで発生を進めていたことに関しては、桑実胚で発生を停止するとして先行研究と異なる結果となった。これは遺伝的背景の違いが原因だと考えられる。

中山らは、遺伝子欠損マウスを作製した際に一般に得られる 129 マウスと C57BL/6J マウスの交雑種を実験に使用したが、本研究では ICR マウスへと戻し交配したものを使用した。すなわち、実験に使用しているマウスの系統が、先行研究と本研究とで異なっているのである。遺伝的背景が遺伝子欠損マウスの表現型に影響を与えることは一般によく知られていることであり、Epidermal growth factor (EGF)受容体欠損マウスはその例の1つである。129/Sv-CF1 マウスの遺伝的背景の場合は着床前での胚性致死、129/Sv マウスの場合は妊娠中期での胚性致死、129/Sv-CD1 及び C57BL/6J マウスの場合は妊娠後期での胚性致死を示す [23]。このような遺伝的背景による表現形の多様性は、”modifier gene”の存在を示唆している。すなわち、KIAA1440 遺伝子はそれ単体で機能するのではなく、modifier gene と相互作用し機能している可能性が考えられる。modifier gene の発現パターン等がマウス系統間により微妙に異なっていることにより、KIAA1440^{-/-}の表現型に多様性が生まれているのかもしれない。

E2.75 のステージでは、KIAA1440^{-/-}は KIAA1440^{+/-}、KIAA1440^{+/-}と同様に正常な形態を示し、発生を停止・遅延している様子は見られなかった。また、各割球同士の接着は起こっており、E-cadherin、 β -catenin といった細胞接着分子も細胞間接着部位に正しく局在していることから、KIAA1440^{-/-}がコンパクションを正常に進行していることが示された。これらのことから、KIAA1440^{-/-}は ICM と TE という2つの系譜の細胞へと分化し、胞胚腔を形成し始めた早期胚盤胞期、E3.0～E3.5 のステージで発生を停止してしまうものと考えられる。

KIAA1440 遺伝子欠損マウスの E3.5 胚盤胞の *in vitro* 培養実験では、KIAA1440^{-/-}は透明体から孵化することなくそのまま死滅した。このことから、KIAA1440^{-/-}は発生を遅延しているわけではなく停止しており、また、その細胞生存能が失われていることが示された。おそらく生体内でも KIAA1440^{-/-}の胚盤胞は透明帯から孵化ないまま死滅し、よって、着床せず、胚性致死という表現型を示しているものと思われる。

TUNEL 法、DAPI による核 DNA 染色、caspase 蛍光阻害剤による解析の結果、KIAA1440^{-/-}の胚では DNA 鎖切断、クロマチンの凝縮、caspase-3/7 の活性化が顕著に起こっており、KIAA1440^{-/-}における細胞死にはアポトーシスが関与していることが明らかとなった。正常な胚発生においてもアポトーシスは起きているが [24,25]、KIAA1440^{-/-}では KIAA1440 蛋白質の欠損により、直接的、あるいは、間接的に過剰なアポトーシスが誘導されているようである。

正常マウスの初期胚における KIAA1440 mRNA の発現は今まで明らかにされていなかったが、今回、KIAA1440 mRNA は受精卵から胚盤胞にかけておよそ 5.7 倍に増加していることが明らかとなった。1 細胞期胚において転写は不活性な状態にあり、多くの遺伝子はゲノムの活性化が起こる 2 細胞期から転写される [26,27]。1 細胞期胚に存在するのは母性的 mRNA であり、その多くは 2 細胞期に分解される。従って、今回、1 細胞期胚で検出されたのは母性的 KIAA1440 mRNA であり、胚盤胞に存在するのは胚自身によって新たに合成されたものであると考えられる。このことは、KIAA1440 遺伝子は胚盤胞期にかけたステージにおいて発現しており、マウス初期胚の発生・生存に不可欠な遺伝子であることを強く支持している。

蛋白質の細胞内局在を知ることは遺伝子の機能を推測する上で重要である。そこで、培養細胞を用いて、KIAA1440 蛋白質の細胞内局在を解析した。N 末端/C 末端 EGFP 融合蛋白質、ネイティブ型蛋白質の COS7 細胞における一過性の強制発現では、KIAA1440 蛋白質は核への局在を示した。さらに、NIH3T3 細胞における内在性マウス KIAA1440 蛋白質の解析においても、KIAA1440 蛋白質は核に局在していることが示された。これらのことから、KIAA1440 蛋白質はマウス初期胚において、DNA の複製、組み換え、修復、あるいは、RNA の転写、プロセッシングといった何らかの核内イベントに関与していることが示唆された。

Baillat らは RNAPII の CTD に結合し、U snRNA のプロセッシングに関与する Integrator 複合体を質量分析法により解析した [21]。12 サブユニットからなるこの Integrator 複合体の最大サブユニットとして KIAA1440 が同定された。Integrator は核に存在し、これは本研究で明らかにされた KIAA1440 の細胞内局在と一致する。本研究では、KIAA1440 が Integrator サブユニットとして本当に機能しているのか、もし機能しているならばどのような役割を担っているのか検討を行なった。

最初に、マウス KIAA1440 蛋白質と RNAPII との相互作用を、293 細胞を使った共免疫沈降法により解析したところ、その相互作用が確認された。続いて、KIAA1440 蛋白質の各 Integrator サブユニットとの直接的な相互作用を調べるために、酵母 Two-Hybrid システムによる解析を行なった。その結果、KIAA1440 蛋白質 は 901-1500 アミノ酸残基の領域にて Ints2、Ints8 と相互作用し得ることが示された。*in silico*での解析において KIAA1440 には既知のドメイン、モチーフは予測されないため、この 901-1500 アミノ酸残基の領域に今までに明らかにされていない新規の蛋白質結合ドメイン、モチーフが存在している可能性が示唆される。ただし、Ints2 は Bait にした場合 self-activation を示すので、self-activation の原因となっている蛋白質領域を同定し、その部分を除いたコンストラクトを用いて、再度確認実験をする必要があると思われる。

KIAA1440 と Ints8 の相互作用は KIAA1440 Fragment 4 でのみ認められ、KIAA1440 全長蛋白質では認められなかった。その理由の1つとして次のことが考えられる。901-1500 アミノ酸残基の断片である Fragment 4 では Ints8 との相互作用ドメインが露出しており相互作用できるが、全長蛋白質では立体構造的にその相互作用ドメインが隠れているために相互作用できない、というものである。その場合、生体内で KIAA1440 と Ints8 が相互作用するには KIAA1440 蛋白質がその立体構造を変化するために何らかの修飾を受ける必要があると思われる。一方、KIAA1440 全長蛋白質が Ints2 とは相互作用することから、KIAA1440 の Ints2 と Ints8 との相互作用ドメインは Fragment 4 内の異なる領域に存在しているのかもしれない。Ints2 は KIAA 遺伝子であり、KIAA1287 として報告されている [28]。KIAA1287 は 1202 アミノ酸残基からなり、KIAA1440 に次いで 2 番目巨大な Integrator サブユニットである。その機能は明らかになっていないが、KIAA1440 と結合することで、2 MDa もの巨大複合体である Integrator のフレームワークを形成しているかもしれない。Ints8 に関しては Kaonashi1 という遺伝子名がつけられているものの、その機能は分かっていない。

最後に、Integrator 複合体の最大サブユニットである KIAA1440 蛋白質の欠損により Integrator はどのような影響を受けるのか、その機能とされる U snRNA プロセッシング活性はどのように変化するのか、ということを検討するために KIAA1440 遺伝子欠損マウスを用いた解析を行なった。その結果、KIAA1440^{+/+}の胚盤胞と比較すると KIAA1440^{-/-}では、Primaty transcript が蓄積し、また、Mature transcript が減少していることが明らかとなった。すなわち、KIAA1440 の欠損により、Integrator の機能は著しく失われていることが示された。in vivo において KIAA1440 は確かに U2 snRNA 3'末端プロセッシングに関与しており、この機能が失われることにより KIAA1440^{-/-}の胚盤胞の発生停止、細胞死という表現型が現れているものと考えられる。

Integrator 複合体によってプロセッシングされる U1/U2 snRNA は、pre-mRNA のプロセッシングに関与するスプライセオソームのコンポーネントである [29,30]。U1/U2 snRNA は RNAPII によって short nonpolyadenylated 3'-extended precursor として転写される。続いて、snRNA precursor は、成熟した snRNA の 3'末端から 9-19 塩基下流に位置する 3' box と呼ばれる cis-acting sequence に依存したプロセッシングを受ける [31,32]。この 3'末端プロセッシングには、RNAPII の CTD 及びそれと直接相互作用している複合体が重要な役割を果たしていることが知られていたが[33-35]、その複合体の実体は明らかにされていなかった。Baillat らは核内に存在する巨大複合体 Integrator を同定し、この複合体が U1/U2 snRNA 遺伝子領域にリクルートされていること、また、RNA 干渉実験による解析から snRNA 3'末端プロセッシングに関与していることを明らかにし [21]、Integratorこそ RNAPII の CTD に結合しているプロセッシング複合体の正体であるとした。

質量分析法による解析の結果から、Integrator は 12 のサブユニットから成り、そして、その最大サブユニットが KIAA1440 であることが示された。本研究は、「巨大蛋白質は蛋白質複合体の中心的役割を果たしている。よって、その欠損により蛋白質機能複合体は高効率で不活性化され、結果として、細胞／個体レベルにおいてははっきりとした表現型が高頻度で表れる」という仮説の下にもともと始められたものであ

る。KIAA1440 が実際に Integrator という巨大機能複合体の最大サブユニットであったことは、この仮説とよく一致している。

KIAA1440^{-/-}の E3.5 胚盤胞では、KIAA1440 蛋白質の欠損により、Integrator の U2 snRNA プロセッシング活性が顕著に低下しているが、このことと KIAA1440^{-/-}の表現型はどのように結びついているのだろうか。KIAA1440^{-/-}胚が発生／細胞増殖を停止し、細胞死に至るシナリオとして次のようなものが考えられる。

- 1) KIAA1440 蛋白質の欠損による Integrator 複合体の活性の低下
- 2) 成熟型 U snRNA の減少とそれによるスプライセオソームの機能低下
- 3) イントロンを含む pre-mRNA の蓄積、及びスプライシングされた成熟型 mRNA の減少
- 4) *de novo* 蛋白質合成の停止
- 5) 胚の発生、生存などに関与する様々な細胞機能の破綻

KIAA1440^{-/-}では過剰なアポトーシスが起きているが、これには新規 *de novo* 蛋白質合成の停止による抗アポトーシス蛋白質 (Bcl-2 など) の減少が関連しているかもしれない。また、胚盤胞では広範な遺伝子発現が起こることが知られている。そのため、このような蛋白質合成停止の影響を受けやすく、それが KIAA1440^{-/-}の早期胚盤胞での発生停止につながっている可能性が考えられる。

KIAA1440^{-/-}の U2 mature transcript 量は KIAA1440^{+/+}のおよそ半分程度に減少しているが、では、KIAA1440^{-/-}胚において実際に pre-mRNA スプライシング能は低下しているのだろうか。このことを調べるために遺伝子欠損マウス E3.5 胚盤胞を用いて、ハウスキーピング遺伝子である Ribosomal protein L7 (Rpl7) mRNA の定量を行なった。エキソンジャンクション上にプライマーを設計し、スプライシングを受けた成熟型 Rpl7 mRNA のみを検出・定量したところ、18S rRNA で標準化した場合、KIAA1440^{+/+}と KIAA1440^{-/-}の間に差は認められなかった (Table 6)。KIAA1440^{-/-}において、スプライシングを受けた Rpl7 mRNA は KIAA1440^{+/+}と同程度存在していることになる。このことから、KIAA1440^{-/-}胚では、全ての mRNA ではなく、ある特定の mRNA、すなわち、スプライシング能の低下に対して感受性の高い mRNA が優先的に影響を受けているという可能性が考えられる。マウス初期胚の発生・生存に関わる遺伝子の中で、turn over の速い mRNA や、発現コピー数の少ない希少な mRNA などがその候補として考えられる。

KIAA1440 蛋白質の欠損は U snRNA 3' プロセッシングに影響を与えたが、Integrator サブユニットの多くについては、その機能はまだ明らかにされていない。Ints6 蛋白質は、非小細胞性肺がんの腫瘍抑制因子、DICE1 として元々発見されたものであり、核への局在することが明らかにされている [36,37]。Ints9/RC-74 と Ints11/RC-68 は、それぞれ cleavage and polyadenylation specificity factor CPCF-100、CPCF-73 にそれぞれ配列相同性を示す。Ints11 は RNA 特異的エンドヌクレアーゼの機能を持つと予測されている β -lactamase ドメインを有することから、Integrator 複合体の触媒サブユニットではないかと考えられている [21]。Ints9 は核への、Ints11 は優先的な核への局在を示すことがそれぞれ明らかにされている [38]。Ints6、Ints9、Ints11、そして、KIAA1440 はいずれも核に局在し、これは Integrator の局在性に一致する。

Table 6. Quantitative analysis of mature Rpl7 mRNA in E3.5 blastocyst

Genotype	Relative quantity of mature Rpl7 mRNA	After normalization by 18S rRNA
+/+	1.00 ± 0.25	1.00 ± 0.25
+/-	0.98 ± 0.27	0.93 ± 0.26
-/-	0.82 ± 0.32	1.14 ± 0.44

*Genomic DNAs for genotyping and total RNAs for qRT-PCR were prepared from individual blastocysts derived from KIAA1440^{+/-} intercrosses. The relative quantities of mature Rpl7 mRNA to the average of transcript from wild-type blastocyst are shown. The means and standard deviations were obtained from 48 embryos.

U1/2 snRNA は 2 細胞期から胚盤胞期のマウス初期胚において、3～10 倍に増加することが知られているが [39]、snRNA 3'末端プロセシング活性が同時期にどのように変化するかということに関しては明らかにされていない。KIAA1440^{-/-}胚盤胞におけるスプライセオソームからの U2 snRNA の欠損は直接的、あるいは、間接的にアポトーシスを引き起こし、そして、胚の発生は停止する。しかしながら、KIAA1440 が U1/2 snRNA 以外の RNA プロセシングに関与している、あるいは、RNA プロセシングとは異なる経路で胚発生に直接的に関わっている可能性を排除することはできなかった。

本研究では、KIAA1440 遺伝子欠損マウスを中心に解析を行ってきた。KIAA1440 蛋白質は Integrator という蛋白質複合体において、フレームワークのような他の蛋白質によって相補されることのない重要な役割を果たしているものと考えられる。Integrator サブユニットの哺乳動物の遺伝子欠損モデルを用いた実験はこれが初めてである。今後、KIAA1440 が Integrator 複合体内で果たしている役割についての詳細な解析が期待される。

謝 辞

本研究を行うにあたり、多大なる御指導と御助言を賜りました千葉大学大学院医学薬学府遺伝子創薬学研究室 中山 学 客員教授(かずさ DNA 研究所ヒトゲノム応用研究部)に心から感謝の意を表します。

また、本研究の機会を与えて頂き、御指導と御助言を頂きました千葉大学大学院医学薬学府遺伝子創薬学研究室 小原 収 客員教授(かずさ DNA 研究所ヒトゲノム応用研究部部長)に深く感謝致します。

そして、本研究に際し、常に御指導、御協力を賜りましたかずさ DNA 研究所ヒトゲノム応用研究部 長瀬 隆弘 先生、ヒトゲノム応用研究部の皆様には感謝の念が絶えません。本当にありがとうございました。

参 考 文 献

1. International Human Genome Sequencing Consortium, Finishing the euchromatic sequence of the human genome, *Nature* 431 (2004) 931-945.
2. Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., et al., The sequence of the human genome, *Science* 291 (2001) 1304-1351.
3. Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., et al., Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome, *Nature* 420 (2002) 520-562.
4. Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., et al., Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature* 409 (2001) 860-921.
5. Gerhard, D. S., Wagner, L., Feingold, E. A., et al., The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC), *Genome Res.* 14 (2004) 2121-2127.
6. Nakajima, D., Saito, K., Yamakawa, H., et al., Preparation of a set of expression-ready clones of mammalian long cDNAs encoding large proteins by the ORF trap cloning method, *DNA Res* 12 (2005) 257-267.
7. Koga, H., Shimada, K., Hara, Y., et al., A comprehensive approach for establishment of the platform to analyze functions of KIAA proteins: generation and evaluation of anti-mKIAA antibodies, *Proteomics* 4 (2004) 1412-1416.
8. Koga, H., Yuasa, S., Nagase, T., et al., A comprehensive approach for establishment of the platform to analyze functions of KIAA proteins II: public release of inaugural version of InGaP database containing gene/protein expression profiles for 127 mouse KIAA genes/proteins, *DNA Res.* 11 (2004) 293-304.
9. Nomura, N., Miyajima, N., Sazuka, T., et al., Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. I. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1, *DNA Res.* 1 (1994) 27-35.
10. Nagase, T., Kikuno, R., Ohara, O., Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XXII, The complete sequences of 50 new cDNA clones which code for large proteins, *DNA Res.* 8 (2001) 319-327.
11. Kikuno, R., Nagase, T., Nakayama, M., et al., HUGE: a database for human KIAA proteins, a 2004 update integrating HUGEppi and ROUGE, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) D502-D504.
12. Nakayama, M., Kikuno, R., Ohara, O., Protein-protein interactions between large proteins: two-hybrid screening using a functionally classified library composed of long cDNAs, *Genome Res.* 12 (2002) 1773-1784.
13. Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., et al., A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nature* 403 (2000) 623-627.
14. Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., Sakaki, Y., A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 4569-4574.
15. Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., et al., Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes, *Nature* 415 (2002) 141-147.
16. Nakayama, M., Iida, M., Koseki, H., Ohara, O., A gene-targeting approach for functional characterization of KIAA genes encoding extremely large proteins, *FASEB J.* 20 (2006) 1718-1720.

17. Larue, L., Ohsugi, M., Hirchenhain, J., Kemler, R., E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophoctoderm epithelium, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 8263-8267.
18. Riethmacher, D., Brinkmann, V., Birchmeier, C., A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 855-859.
19. Aberle, H., Schwartz, H., Kemler, R., Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function, *J. Cell Biochem.* 61 (1996) 514-523.
20. Kidd, V. J., Proteolytic activities that mediate apoptosis, *Annu. Rev. Physiol.* 60 (1998) 533-573.
21. Baillat, D., Hakimi, M. A., Naar, A. M., Shilatifard, A., Cooch, N., Shiekhattar, R., Integrator, a multiprotein mediator of small nuclear RNA processing, associates with the C-terminal repeat of RNA polymerase II, *Cell* 123 (2005) 265-276.
22. Nazar, R. N., Ribosomal RNA processing and ribosome biogenesis in eukaryotes, *IUBMB Life* 56 (2004) 457-465.
23. Joyner A. L., Gene targeting, A practical approach, Second Edition, in: Hames D. (Ed.), *The Practical Approach Series*, Oxford University Press, New York, 2000, pp. 260-271.
24. Sanders, E. J., Wride, M. A., Programmed cell death in development, *Int. Rev. Cytol.* 163 (1995) 105-173.
25. Pampfer, S., Donnay, I., Apoptosis at the time of embryo implantation in mouse and rat, *Cell Death Differ.* 6 (1999) 533-545.
26. Flach, G., Johnson, M. H., Braude, P. R., Taylor, R. A., Bolton, V. N., The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo, *EMBO J.* 1 (1982) 681-686.
27. Latham, K. E., Mechanisms and control of embryonic genome activation in mammalian embryos, *Int. Rev. Cytol.* 193 (1999) 71-124.
28. Nagase, T., Ishikawa, K., Kikuno, R., Hirose, M., Nomura, N., Ohara, O., Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XV. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins *in vitro*, *DNA Res.* 6 (1999) 337-345.
29. Jurica, M. S., Moore, M. J., Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins, *Mol. Cell.* 12 (2003) 5-14.
30. Valadkhan, S., snRNAs as the catalysts of pre-mRNA splicing, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9 (2005) 603-608.
31. Hernandez, N., Formation of the 3' end of U1 snRNA is directed by a conserved sequence located downstream of the coding region, *EMBO J.* 4 (1985) 1827-1837.
32. Yuo, C. Y., Ares, M. Jr., Weiner, A. M., Sequences required for 3' end formation of human U2 small nuclear RNA, *Cell* 42 (1985) 193-202.
33. Medlin, J. E., Uguen, P., Taylor, A., Bentley, D. L., Murphy, S., The C-terminal domain of pol II and a DRB-sensitive kinase are required for 3' processing of U2 snRNA, *EMBO J.* 22 (2003) 925-934.
34. Uguen, P., Murphy, S., The 3' ends of human pre-snRNAs are produced by RNA polymerase II CTD-dependent RNA processing, *EMBO J.* 22 (2003) 4544-4554.
35. Jacobs, E. Y., Ogiwara, I., Weiner, A. M., Role of the C-terminal domain of RNA polymerase in U2 snRNA transcription and 3' processing, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 846-855.
36. Wieland, I., Ropke, A., Stumm, M., Sell, C., Weidle, U. H., Wieacker, P. F., Molecular characterization of the DICE1 (DD 156) tumor suppressor gene in lung carcinoma cells, *Oncol. Res.* 12 (2000) 491-500.
37. Wieland, I., Sell, C., Weidle, U. H., Wieacker, P., Ectopic expression of DICE1 suppresses tumor cell growth, *Oncol. Rep.* 12 (2004) 207-211.

38. Dominski, Z., Yang, X. C., Purdy, M., Wagner, E. J., Marzluff, W. F., A CPSF-73 homologue is required for cell cycle progression but not cell growth and interacts with a protein having features of CPSF-100, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 1489-1500.
39. Dean, W. L., Seufert, A. C., Schultz, G. A., et al., The small nuclear RNAs for pre-mRNA splicing are coordinately regulated during oocyte maturation and early embryogenesis in the mouse, *Development* 106 (1989) 325-334.

主 論 文 目 録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

- 1) Hata, T., Nakayama, M., Targeted disruption of the murine large nuclear KIAA1440/Ints1 protein causes growth arrest in early blastocyst stage embryos and eventual apoptotic cell death, Biochim. Biophys. Acta.-Molecular Cell Research 1773 (2007) 1039-1051.
- 2) Hata, T., Nakayama, M., Rapid single-tube method for small-scale affinity purification of polyclonal antibodies using HaloTag™ Technology, J. Biochem. Biophys. Methods 70 (2007) 679-682.

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学大学院客員教授（薬学研究院） 理学博士 小原 収

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 小林 弘

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 山口 直人