

学位論文

Doctoral Thesis

腎臓発生に必須であるキネシン*Kif26b*の分子機構の解析
(Molecular mechanisms of *Kif26b* that is essential for kidney development)

阪 口 雅 司
Masaji Sakaguchi

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻代謝内科学

指導教員

荒木 栄一 教授
熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻代謝内科学

西中村 隆一 教授
熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻腎臓発生学

2011年3月

目次

1	要旨	2
2	学位論文の骨格となる参考論文	4
3	謝辞	5
4	略語一覧	6
5	背景	7
5-1	腎臓発生	7
5-2	腎臓発生と遺伝子 <i>Sall1</i>	9
5-3	<i>Kif26b</i> は <i>Sall1</i> 発現細胞に発現する	11
5-4	<i>Kif26b</i> は転写因子 <i>Sall1</i> によって制御される標的分子である	15
5-5	<i>Kif26b</i> ノックアウトマウス	17
6	実験の目的	20
7	実験方法	21
7-1	テトラサイクリン依存性 KIF26B 誘導 HEK293 細胞の樹立	21
7-2	マイクロアレイによる解析	21
7-3	ELISA 法による解析	21
7-4	ウェスタンブロット法	21
7-5	培養細胞による間接蛍光抗体染色法	22
7-6	パラフィン切片による間接蛍光抗体染色	22
7-7	<i>In situ hybridization</i>	23
7-8	FACS 解析	23
7-9	細胞のトリプシン処理と解離実験	23
7-10	基質-細胞接着アッセイ	23
7-11	細胞接着班アッセイ	23
7-12	GST pull-down アッセイ	24
7-13	免疫沈降法	24
7-14	siRNA	25
7-15	B lebbistatin 投与下の細胞培養	25
7-16	統計学的解析	25
7-17	配列一覧	26
8	実験結果	27
8-1	テトラサイクリン依存性 KIF26B 発現 HEK293 細胞の樹立	27
8-2	<i>Gdnf</i> の制御分子 <i>Pax2</i> , <i>Eya1</i> の遺伝子発現は変わらない	29
8-3	<i>Kif26b</i> はカドヘリン依存的な細胞接着を亢進する	31
8-4	免疫沈降法及び GST pull-down 法による結合蛋白の探索と同定	40
8-5	<i>Kif26b</i> 依存的な細胞接着の亢進は NMHC II との会合を介する	45
9	考察	51
10	後腎間葉における <i>Kif26b</i> の機能的モデル	54
11	結語	55
12	参考文献	56

1 要旨

〔背景〕 哺乳類の腎臓は、後腎間葉と尿管芽との相互作用によって形成される。腎臓形成に不可欠な Zn フィンガータンパク *Sall1* は後腎間葉に特異的に発現する。*Sall1*-GFP ノックインマウスの後腎間葉を用いたマイクロアレイによる解析から、キネシンファミリーに属する *Kif26b* (Kinesin family member 26B) 遺伝子が *Sall1* の直接の下流因子として見いだされた。*Kif26b* は後腎間葉に発現し、その欠失マウスでは、*Sall1* 欠失マウスと同様尿管芽の間葉へのひきよせが傷害されていた。これは、間葉の尿管芽を引き寄せる液性因子である *Gdnf* (*Glial cell line-derived neurotrophic factor*) の発現が維持されないためであると考えられる。しかし、この現象を説明する *Kif26b* の分子機構は未解明である。

〔目的〕 *Kif26b* による後腎間葉細胞の機能制御とその分子機構の解明を目的とした。

〔方法〕 *Kif26b* の細胞における機能を Tet-on 誘導システムを用いて解析した。KIF26B の会合分子を脳細胞及び腎臓由来細胞の可溶化物を免疫沈降法、pull down 法で抽出しプロテオミクス解析した。下流の分子として N-カドヘリンの機能を in vitro 細胞系及び *Kif26b* 遺伝子欠損マウスにおいて検証した。

〔結果〕 *Kif26b* の細胞内での機能を明らかにする為に、まずテトラサイクリン依存性に KIF26B を発現誘導する HEK293 細胞を樹立した。KIF26B の発現によって 24 時間以内に顕著な細胞形態の変化が認められ、N-カドヘリン依存的な細胞間接着亢進が促される事を見出した。逆に *Kif26b* 欠失マウスでは、尿管芽に接する間葉細胞の凝集が低下し、細胞間の N-カドヘリンの分布が障害されていた。C 端領域を除いた変異型 KIF26B Δ C をテトラサイクリン依存的に発現する HEK293 細胞では細胞接着の亢進が見られない事から、KIF26B の C 端側領域に細胞接着の亢進に関与する結合蛋白の存在が示唆された。この C 端領域に結合する分子を免疫沈降法及び GST-pull down 法にて探索を行い、NMHC II B を同定した。実際に NMHC II B は KIF26B の C 端領域に特異的に結合する分子である事が確認された。更に NMHC II 特異的阻害剤から、*Kif26b* によって誘導される細胞の接着が KIF26B と NMHC II B との結合に依存したものであることが明らかになった。*Kif26b* 欠失マウスの間葉細胞基底側では、*Gdnf* の維持に必要なインテグリン $\alpha 8$ の低下が見られたが、KIF26B 過剰発現 HEK293 細胞では基質への接着はむしろ低下した。

これらの培養細胞を用いた機能獲得(gain-of-function)及びノックアウトマウス

を用いた機能欠失(loss-of-function) 実験から、*Kif26b* は *NMHC II* を介して N-カドヘリンによる後腎間葉細胞の接着を制御し、二次的にインテグリン $\alpha 8$ 及び *Gdnf* の発現を維持していることが示唆される。

〔考察〕 今後 *Kif26b* の後腎間葉での機能を更に解明する上で、間葉中での *Kif26b* と *NMHC II* 分布の相関を解析すると共に、両者の遺伝学的関連についても検証する必要があると思われる。その為には、*NMHC II* の時期、空間特異的遺伝子欠失マウスの作成を行う事が有用と考えられる。

〔結論〕 KIF26B 発現培養細胞及び *Kif26b* 遺伝子欠損マウスの解析をする事で、KIF26B は *NMHC II* を介し間葉の細胞間接着分子 N-カドヘリン制御を担っている事が分かった。

2 学位論文の骨格となる参考論文

Yukako Uchiyama*, Masaji Sakaguchi*, Takeshi Terabayashi, Toshiaki Inenaga,
Shuji Inoue, Chiyoko Kobayashi, Naoko Oshima, Hiroshi Kiyonari,
Naomi Nakagata, Yuya Sato, Kiyotoshi Sekiguchi, Hiroaki Miki, Eiichi Araki,
Sayoko Fujimura, Satomi S. Tanaka, Ryuichi Nishinakamura

Kif26b, a kinesin family gene, regulates adhesion of the embryonic kidney
mesenchyme

Proc Natl Acad Sci U S A. 107: 9240-9245, 2010

(*equal contribution)

3 謝辞

本博士課程研究をすすめるにあたり、熊本大学大学院医学教育部代謝内科分野の荒木栄一教授には、大学院進学当初から終始ご指導、ご支援いただきましたこと心から感謝申し上げます。熊本大学発生医学研究所腎臓発生分野の西中村隆一教授には研究テーマの選択から研究に対する心構え、基礎的な実験の手技、理論そして独創的な発想に至るまでご指導いただいたことを深く感謝申し上げます。内山裕佳子博士研究員には研究協力をいただき、寺林健博士研究員には蛋白研究における手技についてご指導いただきましたこと感謝いたします。また時に熱心に議論する事で、非常に刺激的で充実した大学院生活を送る事ができました。細胞のトリプシン処理と細胞解離の実験については熊本大学発生医学研究所発生医学研究センターの初期発生分野の永渕昭良教授（現奈良県立医科大学生物教室教授）、大学院博士課程の大園一隆氏には、懇切丁寧にアドバイスを頂きました事を感謝いたします。更に会合蛋白のマスマスペクトロメトリー解析は、理化学研究所の新名主カオリ技術補佐員に協力して頂いた事を感謝いたします。また腎臓発生分野研究室の皆様には、様々な面で暖かくご支援いただきましたことにお礼申し上げます。田中聡助教、小林千余子助教には、激励を頂き感謝しております。

最後に四年間研究するにあたって、大きくサポートを下された家族に感謝します。

4 略語一覽

CHIP : Chromatin immunoprecipitation

Eya1 : eyes absent homolog 1

GDNF : Glial cell line-derived neurotrophic factor

GFP : Green Fluorescent Protein

GST : Glutathione S-transferase

HE : Hematoxylin Eosin

HEK293 : Human embryonic kidney cell line

HG : hindgut

Kif26b : kinesin family member 26B

MET : mesenchymal-to epithelial transition

MM : metanephric mesenchyme

NMHC II : non-muscle myosin heavy chain II

Npnt : nephronectin

RT-PCR : Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

Sall1 : sal-like protein 1

Six2 : Six oculis-related homeobox 2 homolog

siRNA : short interfering RNA

TBS : Tris Buffered Saline

UB : ureteric bud

WB : western blotting

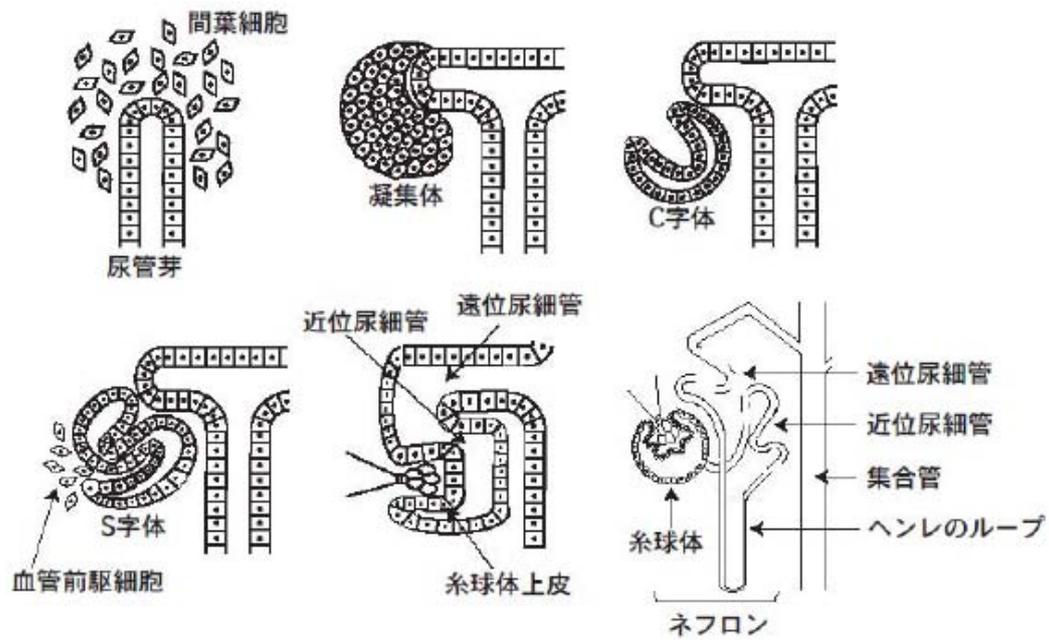
WD : wolffian duct

5 背景

5-1 腎臓発生

腎臓は中間中胚葉から発生し、前腎、中腎、後腎の3段階を経て形成される。ヒトを含めた哺乳類では前腎と中腎は発生期に退行し、最終的に後腎から腎臓が形成される。後腎の発生は後腎間葉とウォルフ管から伸びる尿管芽との相互作用に端を発する。相互作用の初期の過程では、間葉は尿管芽の先端周囲に凝集を起こし、また尿管芽は間葉へ侵入分岐を起こす。その後間葉由来の細胞は上皮化を起こし、近位尿細管、ヘンレ・ループ、遠位尿細管そして糸球体の一部へと分化し最終的に腎臓の機能単位であるネフロンを構成する(図1)。

後腎の発生には、後腎間葉から尿管芽へ、逆に尿管芽から後腎間葉への2方向のシグナルが重要である。前者のステップでは、後腎間葉から分泌されるGDNF(glial-cell-line-derived neurotrophic factor)が中心的な役割を果たす。GDNFはTGF- β (trans-forming growth factor- β)ファミリーに属する液性因子で、ウォルフ管に作用して尿管芽を形成・伸長させる機能を持つ。尿管芽にはGdnfの受容体分子であるRetとその共同受容体のGfra1(GDNF family receptor α 1)が発現しており、間葉で分泌されたGDNFは、このRetを介して尿管芽へ分化誘導シグナルを伝える。このGdnf-Ret/Gfra1分化誘導シグナルが伝達されないマウスでは尿管芽が形成されない。Pax2, Eya1といった転写因子はGdnfの発現を制御している。近年の研究からは、Gdnfの制御には転写因子以外の機構も関与している事が分かっている。細胞外マトリックス蛋白Nephronectinは尿管芽に発現し、後腎間葉で発現する受容体インテグリン α 8/ β 1のリガンドとして機能している。Nephronectinあるいはインテグリン α 8の欠失マウスでは、胎生11.5日の時期でのみGdnfの発現が一時的に低下し、尿管芽の分岐異常を起こし、その結果腎臓欠損を呈する(Linton *et al.*,2007)。つまりNephronectinはインテグリン α 8/ β 1を介してGdnfシグナルの維持に関与している事になる。しかしながらその詳細な制御機構は不明である。

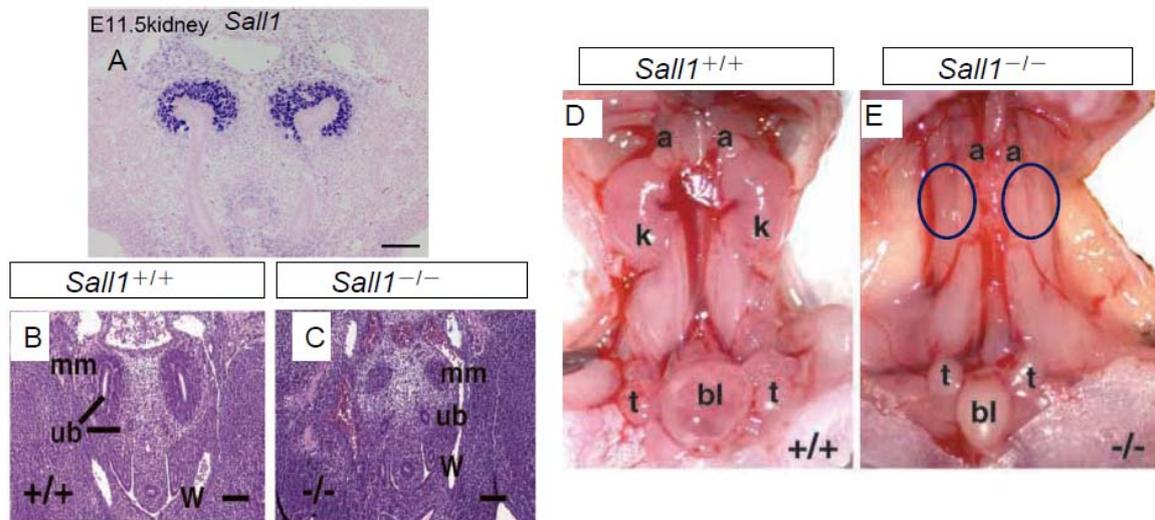


(図 1) 後腎発生の概略

後腎の形成は尿管芽と後腎間葉との相互作用から始まる。尿管芽は後腎間葉に侵入し、凝集した間葉を上皮性の管へと分化させる。その後後腎間葉由来の細胞はC字体、S字型を経て、糸球体や近位尿細管、遠位尿細管を形成する。

5-2 腎臓発生と遺伝子 *Sall1*

*Sall*ファミリー遺伝子はショウジョウバエからヒトまで保存されている Zincフィンガー蛋白であり、ヒト **SALL1** は **Townes-Brocks** 症候群の原因遺伝子として知られており、その変異では指、耳、肛門、腎臓、心臓に異常を呈する。またヒト **SALL1** のマウスホモログである *Sall1* は腎臓、中枢神経、耳胞、心臓、肢芽、肛門などで発現を認める。特に腎臓では、尿管芽が後腎間葉に侵入する以前であるマウス胎生 10.5 日から後腎間葉に強く発現する (図 2A)。そのノックアウトマウスの症状は腎臓に限局し、尿管芽が伸張せず (図 2B、C)、腎臓が完全に欠損するか痕跡的である (図 2D、E)。つまり *Sall1* は腎臓発生に重要かつ不可欠であることが証明されている (Nishinakamura *et al.*,2001)。



Nishinakamura *et al.*, 2001.

mm: 後腎間葉
 ub: 尿管芽
 W: ウォルフ管

(図2) 後腎間葉特異的に発現する **Sall1** は尿管芽の引き寄せに必須である

- A **Sall1** は後腎間葉特異的に発現する。
- B、C **Sall1** ノックアウトマウスでは、尿管芽の後腎間葉への侵入が障害される。
- D、E 生直後の **Sall1** ノックアウトマウスは、腎臓が完全に欠損するか痕跡的であり、**Sall1** が腎臓発生にきわめて重要であることが証明された。

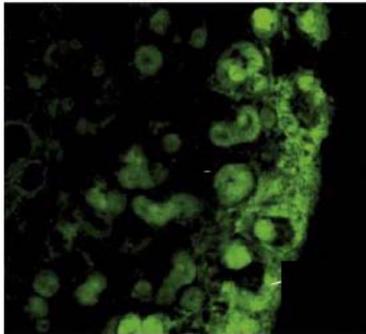
5-3 *Kif26b* は *Sall1* 発現細胞に発現する

Sall1 によって制御される腎臓形成の分子メカニズムを明らかにするために、*Sall1*-GFP ノックインマウスを作製し、GFP 蛍光を指標として後腎間葉細胞をフローサイトメトリー(FACS)で選別された。*Sall1*-GFP を強発現する分画の遺伝子をマイクロアレイにて解析し、GFP 陽性分画に特異的に発現が見られた遺伝子 *Kif26b* が同定された (Takasato *et al.*, 2004) (図 3)。

Kif26b は、キネシン(Kinesin)ファミリーに属するモーター蛋白質の一種である。マウス KIF26B は 2,112 アミノ酸をコードする蛋白質でヒト KIF26B と 87%の相同性を有する。キネシンファミリーにはヒトおよびマウスにおいて 45 種類のメンバーが存在する。これまで Kinesin ファミリー分子のいくつかは、Tubulin 分子の重合体である微小管と協同して働き、微小管上を移動するモータータンパク質として働く事が分かっている。細胞小器官、蛋白複合体、細胞分裂時の染色体などの輸送や、シグナル伝達など様々な機能に関わっている事が明らかにされている (Miki *et al.*,2005)。N 末端側にキネシンモータードメインを持つ KIF26B (図 4A) は KIF26A 分子と同じキネシン N-11 ファミリーに分類される (Miki *et al.*,2001) (図 4B)。マウス KIF26B 分子は全アミノ酸の比較では KIF26A と 47%の相同性しか有さないが、モータードメインの配列に関しては、67%の相同性を有し類似した配列を持つ。*Kif26b* 分子も *Kif26a* 分子と同様に微小管結合能は有しているものの、いずれの分子も ATPase 活性に必要なアミノ酸領域が保存されていない (図 4C)。この事から、*Kif26b* も *Kif26a* と同様に、従来の微小管上を移動するモータータンパク質キネシンとは異なった性質を有していると考えられる。

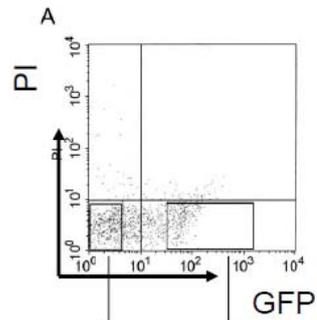
腎臓発生過程における *Kif26b* 遺伝子の発現様式を *in situ mRNA hybridization* を用いて観察した結果、*Kif26b* 遺伝子は胎生期 10.5 日目より後腎間葉に発現が見られた (図 5A)。胎生期 11.5 日目では、尿管芽を取り囲む様に後腎間葉特異的に発現している事が確認された (図 5B)。更に胎生 14.5 日目では、最外層の未分化な細胞群が存在する Nephrogenic zone に発現が確認され、*Six2* (*Sine oculis-related homeobox 2 homolog*) の発現パターンと極めて類似していた。*Sall1* は未分化な細胞群である Nephrogenic zone 以外の、C 字体、S 字体などのやや分化した細胞にも発現するが、この領域では *Kif26b* の発現は見られない (図 5C~F)。

Sall1-GFP ノックインマウス



後腎間葉での Sall1-GFP の発現

Cell sorting



マイクロアレイ解析

Kif26b

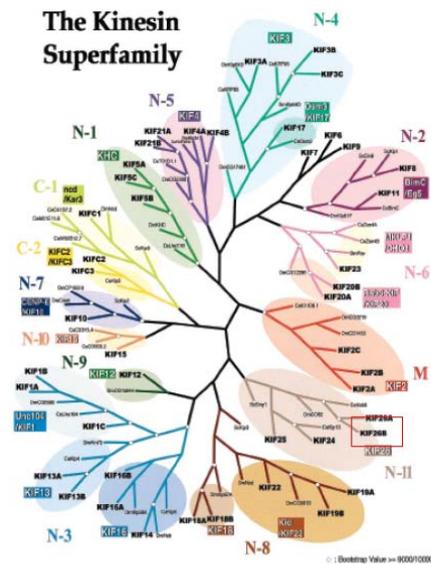
Takasato *et al.*, 2004

(図 3) *Kif26b* は *Sall1* 発現細胞から単離された *Sall1*-GFP ノックインマウスの GFP 蛍光を指標として後腎間葉細胞をフローサイトメトリー(FACS)で選別し、*Sall1*-GFP を強発現する分画の遺伝子をマイクロアレイにて解析した。GFP 陽性分画に特異的に発現する因子 *Kif26b* が同定された(Takasato *et al.*, 2004)。

A

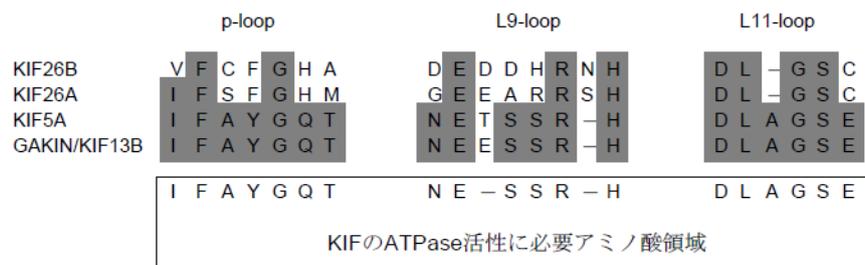


B



Miki et al., 2005

C

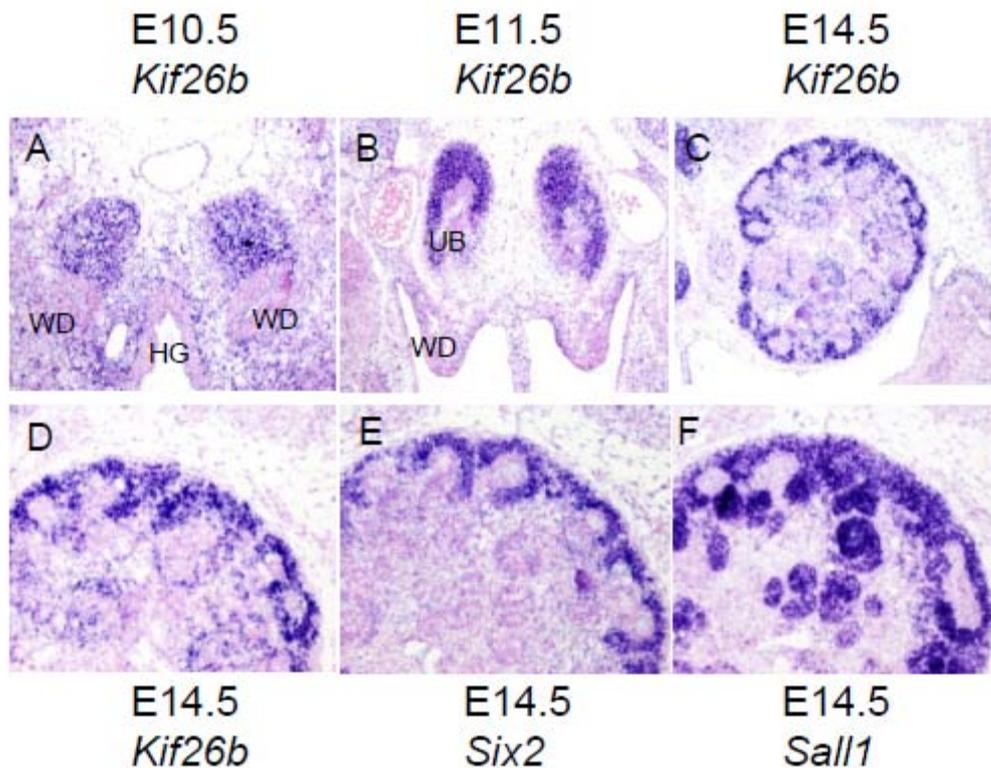


(図 4) KIF26B は N-11 ファミリーに属するキネシンである

A マウス KIF26B は 2,112 アミノ酸をコードする蛋白質で、N 末端側にキネシンモータードメインを持つ。

B キネシンスーパーファミリーには、ヒトおよびマウスにおいては 45 種類ものメンバーが存在する。KIF26B は、KIF26A 分子と同じキネシン N-11 ファミリーに分類される。

C KIF26B は KIF26A 分子同様に、ATPase 活性に必要なアミノ酸領域が保存されていない。

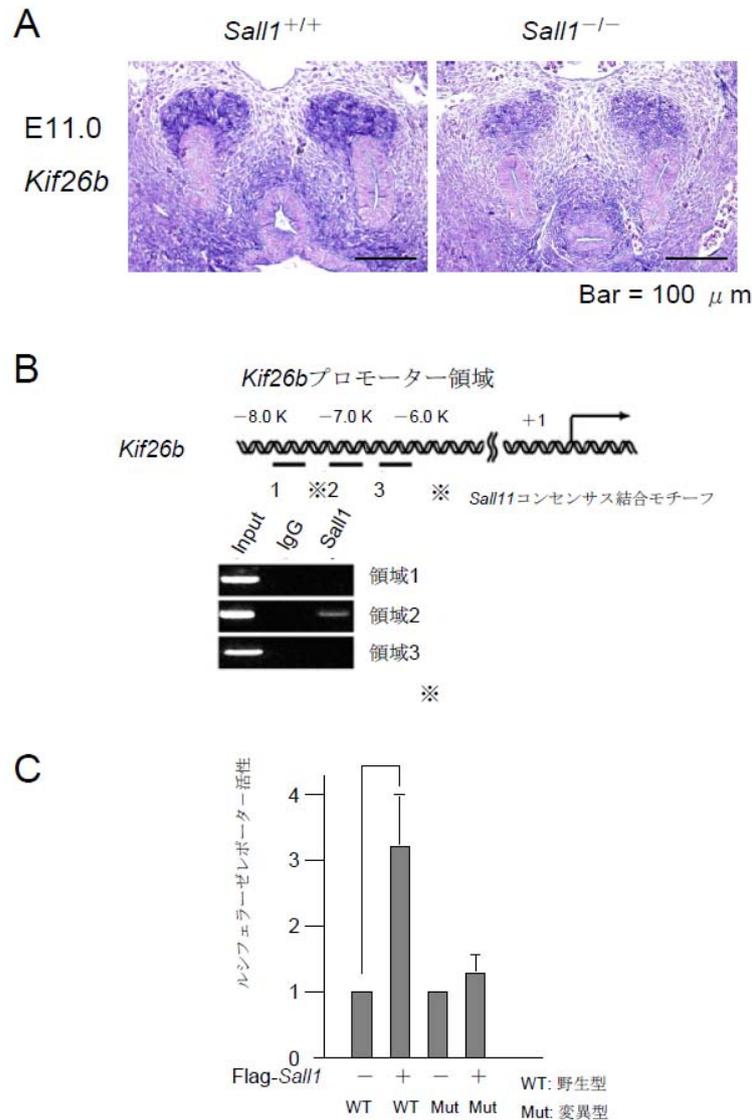


(図 5) *Kif26b* は腎臓発生期において後腎間葉特異的に発現する

- A *Kif26b* は胎生期 10.5 日目より後腎間葉に発現が見られる。
- B 胎生期 11.5 日目では、尿管芽を取り囲む様に後腎間葉特異的に発現する
- C~E 胎生 14.5 日目での、*Kif26b* の発現 (C、D) は最外層の未分化な細胞群が存在する Nephrogenic zone に発現が確認され *Six2* (*Sine oculis-related homeobox 2 homolog*) の発現パターン (E) と非常に似ている。また *Kif26b* は Nephrogenic zone 以外に、間質細胞に発現が見られた。
- F *Sall1* は未分化な細胞群である Nephrogenic zone 以外に、C 字体、S 字体とやや分化した細胞にも発現するがそれらの領域では *Kif26b* の発現は見られなかった。

5-4 *Kif26b* は転写因子 *Sall1* によって制御される標的分子である

Sall1 遺伝子と *Kif26b* 遺伝子の相関関係について解析がなされている。まず *Sall1* ノックアウトマウスを用いて、胎生期 11.5 日目における *Kif26b* の発現を *in situ mRNA* ハイブリダイゼーション法で解析すると *Kif26b* の著明な発現低下が見られた (図 6A)。また *Kif26b* のプロモーター領域において、*Sall1* 結合コンセンサス配列 ATAA (A/T) (A/T) (Yamashita et al.,2007) が多数存在した。胎生 14.5 日目の腎臓を用いこの領域に *Sall1* が結合するかを CHIP 解析にて検討した結果、コンセンサス配列が存在する領域に特異的に結合する事が確認された (図 6B)。更にルシフェラーゼ活性を用いた解析では、これらのコンセンサス配列を含む *Kif26b* のプロモーター領域 (ATG 開始コドンより 7160 から 7079 塩基上流の断片) を結合させたルシフェラーゼコンストラクトは、*Sall1* によって特異的に活性の上昇が見られ、*Sall1* 結合コンセンサス配列に変異を加えるとこの活性上昇は消失した (図 6C)。これらの結果から、*Kif26b* が *Sall1* の直接の標的である事が示唆された。

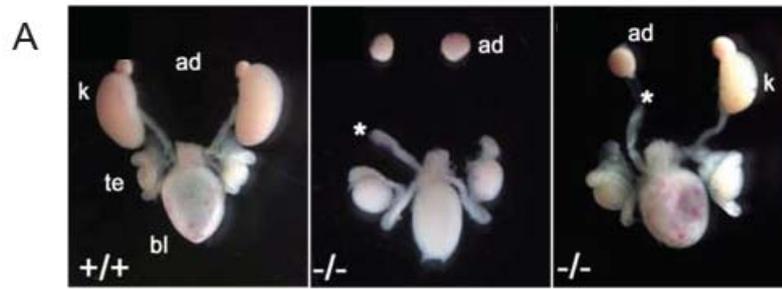


(図6) *Kif26b*は*Sall1*の直接の標的分子である

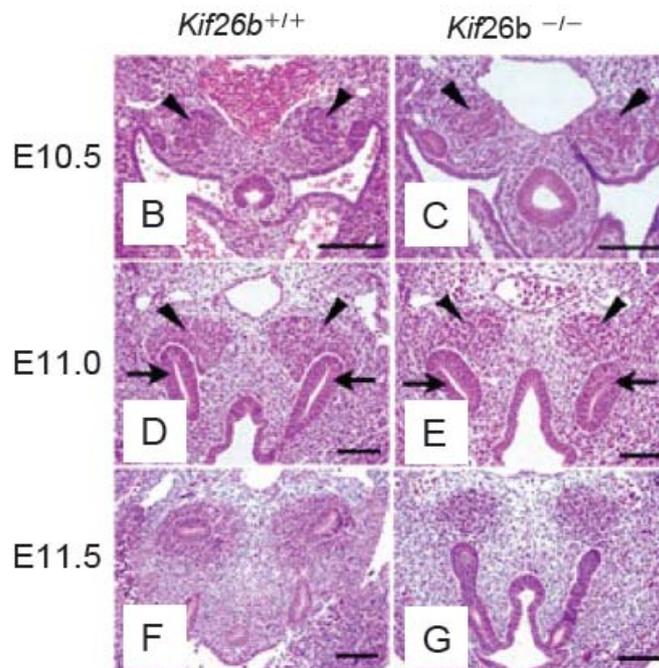
- A *Sall1* のノックアウトマウスでは、*Kif26b* の発現の著明な低下が見られる。
- B *Kif26b* の promoter 領域には多数の *Sall1* 結合 consensus sequence が存在し、CHIP 解析によって *Sall1* は *Kif26b* の promoter 領域 (領域 2) に結合する。
- C ルシフェラーゼ活性を用いた解析では、*Kif26b* のプロモーター領域 (ATG 開始コドンより 7160 から 7079 塩基上流の断片) の結合したルシフェラーゼコンストラクトは、*Sall1* によって特異的に活性の上昇が見られる。
- WT、Mut は *Sall1* の結合領域に変異を入れたものと入れていないものを示す。

5-5 *Kif26b* ノックアウトマウス

Kif26b 遺伝子の腎臓発生過程における役割を解析する為に、*Kif26b* 遺伝子 欠失マウスが作製された。*Kif26b* 遺伝子 欠失マウスは生直後に腎臓欠損によって死亡し (図 7A)、*Sall1* 欠失マウス同様、尿管芽の間葉への侵入が損なわれるという表現系を示す事が分かった (図 7B~G)。*Kif26b* ノックアウトマウスでの *In situ mRNA* ハイブリダイゼーションを用いた解析では、尿管芽が後腎間葉に侵入する胎生 11.5 日目において、後腎間葉における *Gdnf* の発現が低下している事が分かった (図 8A)。またその下流のシグナルである *Wnt11* や ERK のリン酸化の発現の低下がみられた。更に *Kif26b* ヘテロマウス (*Kif26b*^{+/-}) と *Gdnf* ヘテロマウス (*Gdnf*^{+/-}) を交配させ、ダブルヘテロマウス (*Kif26b*^{+/-} : *Gdnf*^{+/-}) における生直後の腎臓を観察し *Kif26b* と *Gdnf* の遺伝学的な相関を解析した結果ダブルヘテロマウス (*Kif26b*^{+/-} : *Gdnf*^{+/-}) では、*Kif26b* ノックアウトマウスで見られるような腎臓の低形成や欠損をより高頻度に呈する事が分かった (図 8B)。これらの結果から *Kif26b* ノックアウトマウスは、*Gdnf* の発現が損なわれる為、*Sall1* ノックアウトマウスと同様に尿管芽の侵入不全を来たしたものと考えられた (Nishinakamura *et al.*,2001)。



ad: 副腎, k: 腎臓, te: 精巣, bl: 膀胱.
asterisk: 尿管



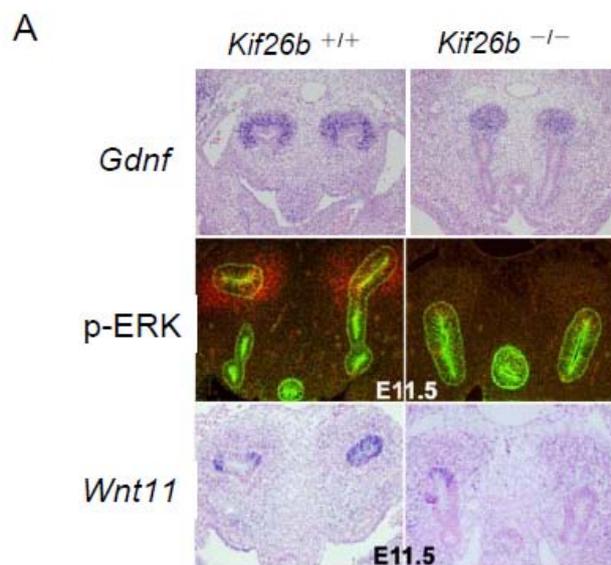
(図7) *Kif26b*ノックアウトマウスは、腎臓を欠損し尿管芽の後腎間葉への侵入が傷害される

A 生直後の *Kif26b* ノックアウトマウスは、両側ないし片側腎臓欠損を呈する。副腎、尿管、膀胱には異常を認めなかった。

B、C 胎生期 10.5 日目では、*Kif26b* ノックアウトマウスの後腎間葉は、HE 染色で観察され明らかな形成異常は認めない。

(スケールバー: 100 μ m.)

D、E 胎生期 11 日目、11.5 日目における、ノックアウトマウスの腎臓では尿管芽の後腎間葉への侵入が途絶える。(スケールバー: 100 μ m.)



B

遺伝子	腎臓の表現型			総計
	正常	低形成	欠損	
<i>Kif26b</i> ^{+/-}	50(100)	0(0)	0(0)	50(100)
<i>Gdnf</i> ^{+/-}	39(7.5)	4(7.7)	9(17.3)	52(100)
<i>Kif26b</i> ^{+/-} <i>Gdnf</i> ^{+/-}	24(46.2)	15(28.8)	13(25.0)	52(100)

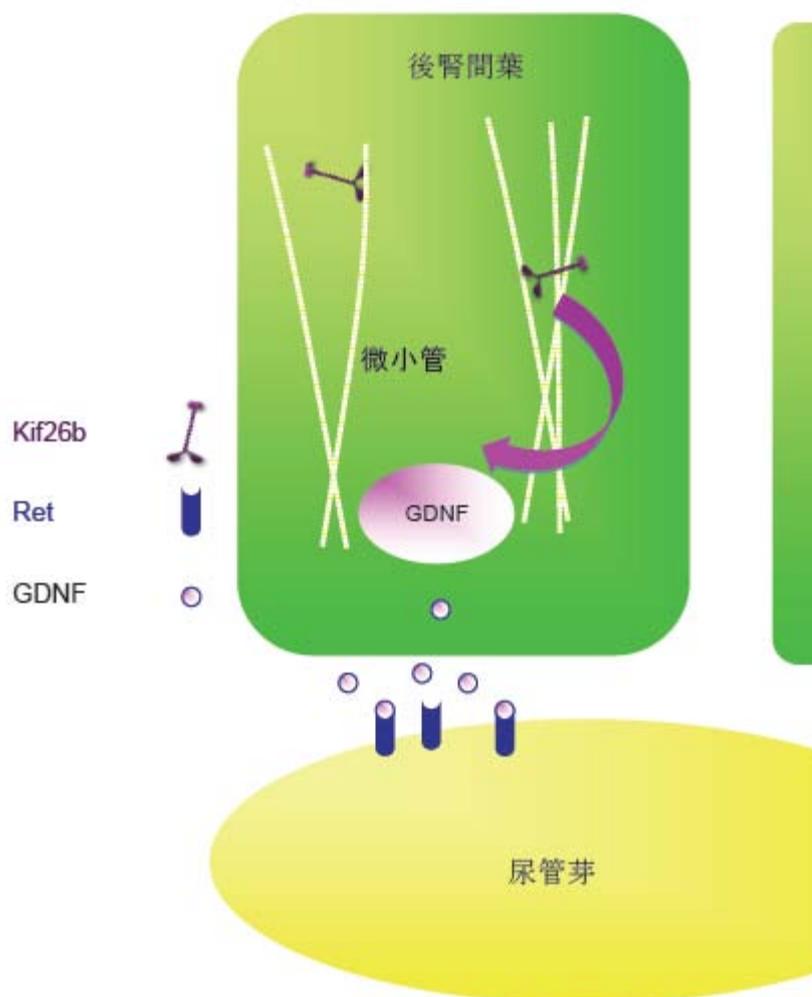
(図 8) *Kif26b* ノックアウトマウスの尿管芽侵入異常は、*Gdnf* 発現低下に起因する

A 胎生期 11.5 日目の *Kif26b* のノックアウトマウス腎臓では、*Gdnf* の発現及びその下流のシグナルである *Wnt11* や ERK のリン酸化の発現の低下がみられる。*Gdnf* 及び *Wnt11* は *in situ mRNA hybridization* にて解析した。p-ERK(赤)、pan-cytokeratin(緑)は免疫染色を行った。

B *Kif26b* ヘテロマウスと *Gdnf* ヘテロマウスを交配させ、ダブルヘテロマウスにおける生直後の腎臓を観察した。ダブルヘテロマウスは、各ヘテロマウスと比べ *Kif26b* ノックアウトマウスで見られるような腎臓の低形成や欠損が、より高頻度に見られた。

6 実験の目的

Kif26b による後腎間葉細胞の機能制御とその分子機構の解明を目的とした。



(図 9) *Kif26b* の後腎間葉における機能のモデル図

Kif26b 遺伝子欠失マウスは、尿管芽の間葉への侵入障害を引き起こし腎臓欠損を呈する。そのメカニズムとしておそらく間葉から分泌され尿管芽を引き寄せる液性因子である *Gdnf* の発現が腎臓発生の時期に維持されないためであると考えられた。しかし、この現象を説明する *Kif26b* の分子機構は未解明である。

7 実験方法

7-1 テトラサイクリン依存性 KIF26B 誘導 HEK293 細胞の樹立

Sall サイト及び NotI 制限酵素で処理し Flag タグを付加した *Kif26b* の cDNA 全長を、EcoRV サイト及び NotI サイトで処理した pcDNA5/FRT/TO vector に組み込み、pOG44 プラスミドとを、Flp-In T-Rex HEK293 細胞 (Invitrogen) にコトランスフェクションし、10%FCS 含 DMEM 培地で培養した。24 時間後に終濃度 100 µg/ml Hygromycin 及び 80 µg/ml Blasticidin を添加した 10%FCS 含 DMEM 培地に置換し、2~3 日に一度培地を交換しながら培養した。トランスフェクション後 10-14 日に Hygromycine 耐性細胞株 4 クローン (Tet on Flag-*Kif26b*) を得た。更に得られた細胞株を、テトラサイクリン 1 µg/ml によって 24 時間誘導をかけた 3 種の細胞株を Western blot 法で、抗 Flag 抗体を用いて蛋白質の発現を確認した。また Sal I サイト及び Mlu I サイトで制限酵素処理し *Kif26b* の C 端側を削った Flag-*Kif26b*△C の cDNA を、EcoRV サイトで処理した pcDNA5/FRT/TO vector に組み込み、上記方法と同様に Tet on Flag-*Kif26b*△C の細胞株を 5 クローン樹立した。テトラサイクリン 1 µg/ml によって 24 時間誘導をかけた 3 つの細胞株を Western blot 法で、抗 Flag 抗体を用いて蛋白質の発現を確認した。

7-2 マイクロアレイによる解析

テトラサイクリン依存性 *Kif26b* 誘導 HEK293 細胞をテトラサイクリン 1 µg/ml によって 24 時間発現誘導し、PBS で 1 回洗浄後細胞をトライゾール (Invitrogen) にて回収した。発現解析は Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix) にて行った。

7-3 ELISA 法による解析

テトラサイクリン依存性 *Kif26b* 誘導 HEK293 細胞をテトラサイクリン 1 µg/ml によって 24 時間発現誘導し、細胞上精中における GDNF 濃度を Emax ImmunoAssay Systems (Promega)を用いて測定した。

7-4 ウェスタンブロット法

HEK293、COS7 細胞もしくは生直後の腎臓を回収し、Lysis バッファー(50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 10% glycerol, protease inhibitor cocktail (Sigma) 中で、超音波処理を行って細胞を溶解した。15,000 rpm 10 分間遠心後の上清を SDS サンプルバッファーを添加し、95 °C で 5 分間過熱処理した。それぞれのサンプルを SDS 入りのポリアクリルアミドゲルに各ウェル当たり 70 µg の蛋白量で添加し、濃縮ゲルを 20 mA、分離ゲルを 30 mA で泳動し、転写はタンク式で、60V 2 時間通電した。転写された PVDF 膜は 3%スキムミルク入りの TBS (Tris Buffered Saline) でブロッキング処理を行った。その後 PVDF 膜を、一次抗体を 3%スキムミルク入りの TBS に希釈した溶液に浸し、4 °Cで一晩反応させた後、室温で 3%スキムミルク含 TBS で 10 分

間洗浄処理を三度行った。次に、それぞれの PVDF 膜を 3%スキムミルク含 TBS に二次抗体として HRP 標識したそれぞれの動物種の抗体を認識する抗体を希釈し液に浸し、ゆっくりと振盪させながら室温で一時間反応させた後、TBS-T で 10 分間洗浄処理を 3 度行った。それぞれの PVDF 膜を ECL Western Blotting Detection System Plus (Pharmacia)で化学発光させ、LAS3000 (富士フィルム) で検出した。抗体は、NMHC II b 抗体 (1000 倍希釈、SC-47205、Santa Cruz)、Dlg1 抗体 (1000 倍希釈、Cat # 610875、BD Transduction Laboratories)、Cask 抗体 (1000 倍希釈、Cat # 71-5000、Zymed)、Flag 抗体 (5000 倍希釈、F-3165、Sigma)、myc 抗体 (1000 倍希釈、SC-40、Santa Cruz) を用いた。

7-5 培養細胞による間接蛍光抗体染色法

細胞を 4%パラホルムアルデヒドで室温 10 分間固定した。0.1% TritonX-100 入り PBS を 3 回洗浄 (各 5 分) した後 1%BSA 入り PBS でブロッキング 1 時間行った。その後、各々の 1 次抗体を室温で 1 時間反応させた後、PBS で 3 回 (各 5 分) 洗浄した。そして Alexa488 あるいは Alexa594 で標識された二次抗体 (Invitrogen)を室温で 1 時間反応させた後、PBS で 3 回 (各 5 分) 洗浄を行った。なお、洗浄の最後のステップで DNA 特異的染色剤として DAPI を加えた。本論文における免疫染色では、 α tubulin 抗体 (100 倍希釈、T5168、Sigma)、N-cadherin 抗体 (100 倍希釈、SC-7939、Santa Cruz)、Kif26b 抗体 (500 倍希釈) を用いた。

7-6 パラフィン切片による間接蛍光抗体染色

胎生 10.5 日、10.75 日、11.0 日、11.5 日、12.5 日、14.5 日胎児および、生後 0 日に腎臓を摘出し、10% ホルマリン含 PBS で室温 3 日間固定した。その後、自動固定包埋装置 (サクラ真空自動固定包埋装置 VRX-23) を用いて、脱水・脱脂・パラフィン浸透し、パラフィンブロックを作成した。これを 6 μ m 厚に薄切してパラフィン切片を作成した。染色に際しキシレンによる脱パラフィン処理後に、抗原賦活化 (クエン酸バッファー pH6.0 にて熱処理 121 $^{\circ}$ C 5 分) を行った。ブロッキング (1% BSA 含 PBS、室温 30 分) 後に一次抗体 (4 $^{\circ}$ C、一晚) を反応させた。その後 PBS で 3 回洗浄し、二次抗体と反応 (室温、60 分) 後に、DNA 特異的染色剤として DAPI を加え封入を行った。用いた一次抗体とは以下の通りである。 α 8integrin 抗体 (Muller *et al.*,1997), N-cadherin 抗体 (Santa Cruz)。NMHC II B の免疫染色は、自動染色装置 (ディスカバリーシステム、ベンタナ) を用い、NBT/BCIP 発色法にて行った。NMHC II B 抗体 (Developmental studies Hybridoma bank) を用いた。

7-7 *In situ* mRNA ハイブリダイゼーション

パラフィン切片での *In situ* mRNA ハイブリダイゼーションを Discovery system (Ventana) を用いて行った。Pax2、Eya1、Gdnf のプローブは論文報告 (Kobayashi *et al.*,2007) に基づいて行った。

7-8 FACS 解析

KIF26B をテトラサイクリン依存的に発現誘導を行った。HEK293 細胞を 4°C 下で 30 分 Cell dissociation buffer (GIBCO) 処理により懸濁し、Normal mouse serum で再懸濁し 10 分ブロッキングをした。1%BSA を含む PBS に N-cadherin 抗体 (GC-4; Sigma) を希釈した溶液を添加し、4°C 20 分静置した。そして、細胞を PBS で 2 度洗浄した後に、1%BSA を含む PBS に Alexa647 を標識した抗マウス抗体 (BD Transduction Laboratories) を 4°C 20 分静置した。PBS で 2 回洗浄し、最後に 0.5µg/ml PI(Propidium Iodide)を含む、0.1%FCS/PBS で再懸濁し FACS 解析を行った。

7-9 細胞のトリプシン処理と解離実験

細胞は、(Takeichi 1977) に記載されたように、二種類の異なった方法でトリプシン処理を行った。HCMF液中の細胞を1 mM CaCl₂の存在下 (TC 処理) または1 mM EDTAの存在下 (TE処理) で0.01%のトリプシンで処理した。一般的にはカドヘリンはTC処理を行っても変化がないのに対して、TE処理を行うと分解される。細胞解離実験はHEK293細胞を6 cm dish に密にして培養し、TC処理、TE処理を行った後10 回ピペティング操作を行って細胞を解離させた (Nagafuchi *et al.*,1994)。細胞解離実験は細胞解離指数、カルシウム+で処理後の細胞塊数/カルシウム-で処理後の細胞塊数) で定量化した。HCMFの組成は以下の通りである (137 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 0.63 mM Na₂HPO₄ · 7H₂O, 5.5 mM グルコース, 10 mM HEPES, 14 µM フェノールレッドをpH 7.4で調整)

7-10 基質-細胞接着アッセイ

基質-細胞接着アッセイは、96 ウェルプラスチックディッシュプレートにフィブロネクティン (1 µg/ml) をコートし、各ウェルに 5X10⁴ の細胞を播き 1 時間培養を行った。各ウェルを洗浄し不接着細胞を除いた後蛍光強度を測定した。グラフは 3 回の独立した細胞解離実験から測定した平均値と標準誤差を示す。

7-11 細胞接着斑アッセイ

接着斑アッセイは、96 ウェルプラスチックディッシュプレートにフィブロネクティン (10 µg/ml) をコートし、各ウェルに 3X10⁴ の細胞を播き 6 時間培養を行った。Vinculin 抗体 (100 倍希釈、V9131、Sigma) で免疫染色を行い 30 個の細胞の接着斑を数えた。グラフは、1 細胞に検出される接着斑の数の平均値と標

準誤差を示す。

7-12 GST pull-down アッセイ

Kif26b の C 端側領域 (アミノ酸配列 1,737-2,112 aa) の断片を、GST の付加された発現ベクター (pGEX6P-1/Kif-k-c 端) に挿入し、大腸菌 (BL21(DE3)+Tig) にトランスフォームする。2ml の LB-Amp 培地に植菌し、アラビノース(2.0 mg/ml) 添加のもと 37 °C で一晩培養する。

本培養用の LB-Amp 培地 200 mL に前培養液の 2 mL を加え、本培養を 37 °C で開始し、600 nm の吸光度が 0.5 となったところで培養を中断し IPTG を最終濃度が 0.1 mM となるように本培養液に添加する。IPTG を添加後本培養を再開し 20 °C で 5 時間培養を行う。8,000 x g 4 °C 20 分間遠心して、培地を取り除く。冷やしておいた可溶化バッファー 10 ml (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail) に菌体を懸濁し、超音波処理をする。大腸菌より精製した GST 融合蛋白 0.5 mg~1.0 mg に、平衡化した Glutathione Sepharose4B beads を加え、4 °C で 2 時間回転し反応させる。反応後 Lysis Buffer 50 ml で計 5 回洗浄する。反応させたビーズを、内在性の GST を preclear した P0 マウスの腎臓や脳の Lysate を加え 4 °C で 2 時間反応させる。最終的に反応させたビーズを 3,000 rpm 5 分間 遠心にて上精を除き、可溶化バッファー で 5 回洗浄し、サンプルバッファーを添加し 95 °C で処理し溶出液を得た。尚ネガティブコントロールとして GST 融合蛋白のみ、GST 融合蛋白と Lysate そして GST-KIF26B 融合蛋白のみの計 3 セットを用いた。これらの溶出液を 5~10% プレキャストゲル (BioRad) へ添加し、電気泳動を行った。泳動後のゲルを、SilverQuest (Invitrogen) を用いて、銀染色を行った。特異的なバンドのみを切り出し、マススペクトロメトリー解析を行った。MASCOT 解析ソフト (Matrix Science) によるスコア 50 以上のものを図に記載した。

7-13 免疫沈降法

テトラサイクリン依存性 KIF26B 誘導 HEK293 細胞をテトラサイクリン 1 µg/ml によって 24 時間発現誘導し細胞を回収し、Lysis バッファー (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 10% グリセロール, protease inhibitor cocktail (Sigma) 中でソニケーション超音波処理を数回繰り返し細胞を溶解した。コントロールの野生株の HEK293 細胞とタンパク質濃度を同じに調整し、ビーズに非特異的に結合する夾雑物を除くために Agarose ビーズ (Sigma) を 4 °C で 1~2 時間反応させ、プレクリアを行った。次に FLAG-M2 ビーズ(Sigma) を細胞溶解液へ添加し 4 °C で 2 時間反応させた。反応させたビーズを、Lysis バッファーで 3 回洗浄を行い、サンプルバッファーを添加し 95 °C で処理し、溶出

液を得た。この免疫沈降複合体を SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ウエスタンブロットを行った。KIF26B と NMHC II B の結合領域の選定における免疫沈降については、Lipofectamin2000 (Invitrogen)を用いて CAG プロモーターで駆動する Flag-NMHC II b, myc-Kif26b, myc-Kif26b-C、myc-Kif26b Δ N ベクターを野生株の COS7 細胞にトランスフェクションし 48 時間後に細胞を Lysis バッファーで回収し上記方法と同じ手順を行った。内在性蛋白同士の結合の確認については、生直後の腎臓を回収し Lysis バッファー中で超音波処理を 5~10 回行い組織を可溶化させた。15,000 rpm、10 分間遠心し上清を回収しビーズに非特異的に結合する夾雑物を除くために Protein A Sepharose (Pierce) を 4 °C で 1 時間反応させ、プレクリアを行った。Kif26b 抗体を 2 μ g 添加し 4 °C で 2 時間反応させた。反応させた Protein A agarose を、Lysis バッファーで 3 回洗浄を行い、サンプルバッファーを添加し 95 °C でボイルし溶出液を得た。尚ネガティブコントロールとして正常ウサギ IgG (Santa Cruz)を用いた。

7-14 siRNA

N-cadherin に対する ON - TARGETplus SMARTpool siRNA を Dharmacon 社より購入した。テトラサイクリン依存性 Kif26b 誘導 HEK293 細胞に Dharma Fect transfection reagent (Dharmacon)を用いて、Opti MEM I medium (GIBCO) 中でトランスフェクションを行った。24 時間後に 0.05%トリプシン-EDTA を用いて細胞を懸濁し、培養液を加えてトリプシンを不活性化した。その後 6 well plate に 2×10^5 cell/ml をテトラサイクリン添加なし及びテトラサイクリン 1 μ g/ml 添加に分けて再培養を行った。

siRNA トランスフェクション後 72 時間後に培養細胞を光学顕微鏡 (OLMPUS TH4-100) にて観察し、N-cadherin 抗体を用いたウエスタンブロット法で siRNA の効率を確認した。

7-15 NMHCII 特異的阻害剤 (-)-blebbistatin 投与下の細胞培養

テトラサイクリン依存性KIF26B 誘導 HEK293 細胞を6 well plate に 2×10^5 cell/ml播きテトラサイクリン非存在下及びテトラサイクリン1 μ g/ml 存在下に分け、(-)-blebbistatin(Calbiochem) 100 μ g/mlを添加し48 時間培養した。尚ネガティブコントロールとして(+)-blebbistatin (Calbiochem) 100 μ g/mlを用いた。

7-16 統計学的解析

統計学的解析はStudent's testを用いて行った。

7-17 配列一覧

SiRNA に用いたオリゴヌクレオチド配列

ON – TARGETplus SMARTpool siRNA J – 01 1605 – 06 ,

CDHZ Target Sequence : GUGCAACAGUAUACGUUAA

ON – TARGETplus SMARTpool siRNA J – 01 1605 – 07 ,

CDHZ Target Sequence : GGACCCAGAUCGAUAUAUG

ON – TARGETplus SMARTpool siRNA J – 01 1605 – 08 ,

CDHZ Target Sequence : CAUAGUAGCUAAUCUAACU

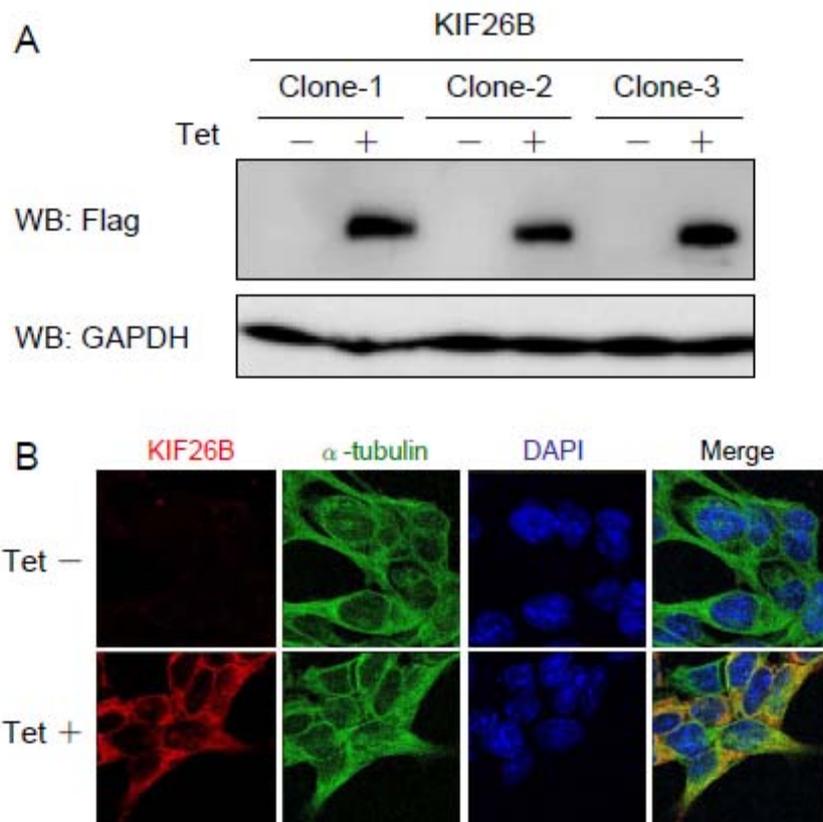
ON – TARGETplus SMARTpool siRNA J – 01 1605 – 09 ,

CDHZ Target Sequence : GACAGCCUCUUCUCA AUGU

8 実験結果

8-1 テトラサイクリン依存性 KIF26B 発現 HEK293 細胞の樹立

*Kif26b*分子が細胞内でどのような制御機構を有しているのかを解析するために、テトラサイクリン依存性 KIF26B 発現 HEK293 細胞由来株を作製した。樹立したクローン3つを、テトラサイクリン 1 $\mu\text{g/ml}$ によって 24 時間誘導し Western blot 法で、抗 Flag 抗体を用いて蛋白質の発現を確認した (図 10A)。また HEK293 細胞で発現誘導の見られた KIF26B は、免疫染色で細胞質内に局在する事が確認された (図 10B)。



(図 10) テトラサイクリン依存性 KIF26B 発現 HEK293 細胞の樹立

A HEK293 細胞に Flag-野生型 KIF26B を導入し、Hygromycin 及び Blasticidin にてセレクションを行いテトラサイクリン依存的に Flag-KIF26B を発現する細胞株を樹立した。樹立した 3 クローンを、抗 Flag 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

B テトラサイクリン依存性に野生型 KIF26B を HEK293 細胞に発現させ、24 時間後に抗 Kif26b/ α -tubulin 抗体を用いて免疫染色を行った。

8-2 *Gdnf* とその制御分子 *Pax2*, *Eya1* の遺伝子発現は変わらない

Kif26b 欠損マウスは、腎臓発生過程において *Gdnf* 発現低下に起因し尿管芽の後腎間葉への侵入が途絶え、腎臓欠損を呈する事が示唆された (図 7A)。背景の項目で記載した様に、腎臓発生の *Gdnf* の発現制御に関して、これまで *Pax2*, *Eya1* といった転写因子が報告されている。*Kif26b* 欠損マウスでの *Gdnf* の発現低下は、それらの遺伝子群の発現変化に伴うものであるかを検証した。

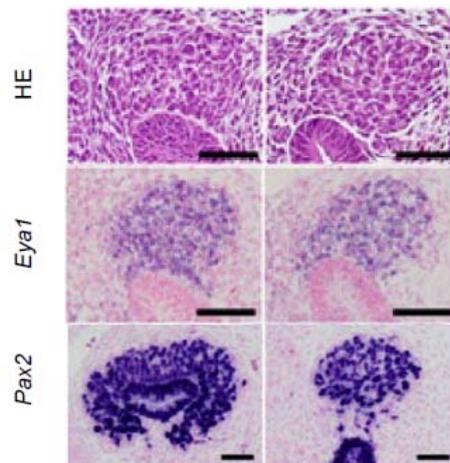
まず樹立したテトラサイクリン依存性 KIF26B 発現 HEK293 細胞に KIF26B を発現誘導したものとしていないものについて、マイクロアレイ解析を行い比較検証した。KIF26B が HEK293 細胞に発現誘導されても *Pax2* や *Eya1* には変化は見られなかった (図 11A)。更に *Kif26* 欠損マウスを用いた解析でも、胎生期 10.75 日目における *Pax2* や *Eya1* の発現は野生型マウスと比べて変化はなかった (図 11B)。これらの事からも *Gdnf* の発現低下は *Pax2* や *Eya1* といった転写因子の発現低下によるものではないと言える。

次に *Kif26b* が *Gdnf* の分泌制御に関わっているかどうかについて、樹立した細胞株を用いて ELISA 法にて検証した。HEK293 細胞上清中の GDNF の濃度は、KIF26B が発現誘導されても変化が見られない事が分かった (図 11C)。

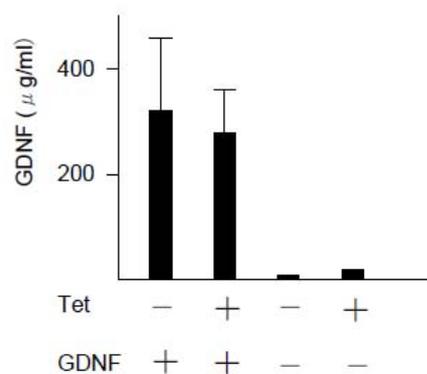
A

遺伝子名	p-value	シグナル強度	
		Tet-	Tet+
<i>Pax2</i>	0.967	33.8	20.8
<i>Eya1</i>	0.681	46.4	34.8

B



C



(図 11) *Gdnf* の制御分子 *Pax2*, *Eya1* に変化は見られない

A テトラサイクリン依存性 *Kif26b* 発現 HEK293 細胞における、遺伝子発現マイクロアレイを用いて解析した。Tet-はテトラサイクリン存在下 Tet+は非存在下を示す

B 胎生期 10.75 日目の *Kif26b* のノックアウトマウス腎臓では、*Gdnf* 制御転写因子 *Pax2*、*Eya1* の発現に変化は見られない。

C テトラサイクリンによってHEK293細胞に*Kif26b*を発現させても、HEK293細胞上清中のGDNF濃度に変化は見られない。図はELISA法にて解析した結果を示す。

8-3 *Kif26b*はN-カドヘリン依存的な細胞接着を亢進する

樹立した HEK293 細胞株は、テトラサイクリンによって野生型 KIF26B を誘導すると、テトラサイクリン非存在下の細胞と比較し顕著な細胞の凝集塊形成がみられた (図 12)。これは得られた 3 クローン全てにおいて、テトラサイクリン添加後 24 時間以内に起こる変化であった。また KIF26B の誘導がなされないコントロールの細胞株では、テトラサイクリンを添加しても見られない現象である事が確認された。これらの結果から *Kif26b* が細胞間接着もしくは細胞基質間接着の変化に関与しているのではないかと推測した。

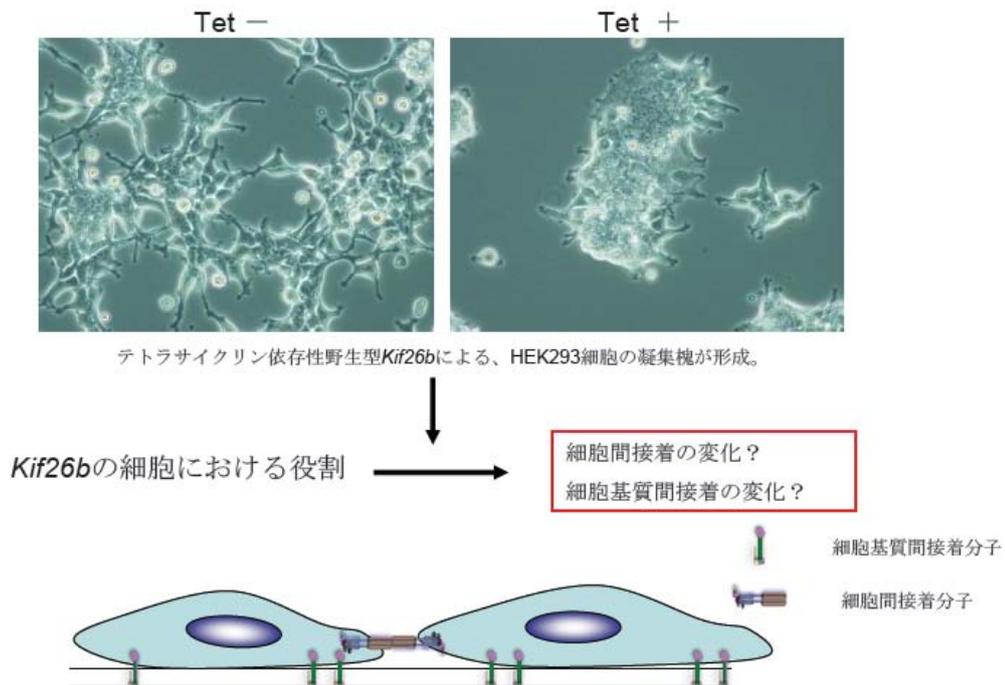
そこでまず細胞間接着が機能的に変化しているかを調べる為に KIF26B 発現細胞と発現のない細胞のトリプシン処理と解離実験を行った。カルシウム存在下における解離後の細胞の状態を比較すると、KIF26B を発現させた細胞では有意に細胞塊が維持されたままであった。一方カルシウム非存在下では、KIF26B を発現させても細胞凝集塊の解離状態に差は見られない事が分かった (図 13A)。この事から KIF26B によって誘導される凝集はカルシウム依存的な接着分子の関与が示唆された (図 13B)。また後腎間葉や HEK293 などの間葉細胞に発現の見られるカルシウム依存的接着分子 N-カドヘリンの発現分布について、テトラサイクリン依存性 KIF26B 誘導 HEK293 細胞の免疫染色及び N-カドヘリン抗体を用いた FACS 解析を行った。免疫染色の実験からは、KIF26B 発現に伴い細胞膜上に分布する N-カドヘリンのシグナル強度の上昇が見られた (図 14A)。また FACS 解析では、N-カドヘリンの膜上の分布量が上昇している事が確認された (図 14B)。これらの実験から *Kif26b* は N-カドヘリンの細胞膜上分布を増加させる機能を有するといえる。

次にこの N-カドヘリンの分布の変化が、実際細胞接着の亢進に機能的に関与しているかどうかを、N-カドヘリンの siRNA を導入実験にて検証を行った。N-カドヘリン siRNA を導入すると *Kif26b* による HEK293 細胞の凝集の亢進が抑制される事から、*Kif26b* による HEK293 細胞の凝集は、N-カドヘリン依存性の接着亢進によるものであることが示された (図 15)。細胞基質間接着の変化については、基質-細胞接着アッセイ及び細胞接着班アッセイを行い評価を行った。HEK293 細胞及び HeLa 細胞のいずれの培養細胞においても KIF26B 発現誘導を行うと細胞基質間接着の減弱及び接着班数の減少が確認された (図 16、17)。つまり KIF26B の発現誘導に伴い HEK293 細胞は細胞間接着の亢進及び細胞基質間接着の減弱がみられる事になる。

Kif26b のノックアウトマウスにおいて胎生期 10.75 日目での間葉細胞の形態、細胞接着分子 N-カドヘリン及び、細胞基質間分子インテグリン $\alpha 8$ の発現について解析を行った。この時期では尿管芽に接する領域では、野生型の後腎間葉細胞

は、円柱状に密着して並んでいるのに対して、ノックアウトマウスの間葉ではそのような凝集が見られない (図 18A 矢頭)。またノックアウトマウスのこの領域では、側面の線状に見られる N-カドヘリンの発現が損なわれ不均一に分布していた (図 18B 上段矢頭)。つまり培養細胞及び *Kif26b* ノックアウトマウスの結果から、*Kif26b* が N-カドヘリンの膜上への分布にもたらす変化は相関していると言える。インテグリン $\alpha 8$ についても *Kif26b* ノックアウトマウスでは基底膜での発現現弱が見られた (図 18B 下段)。

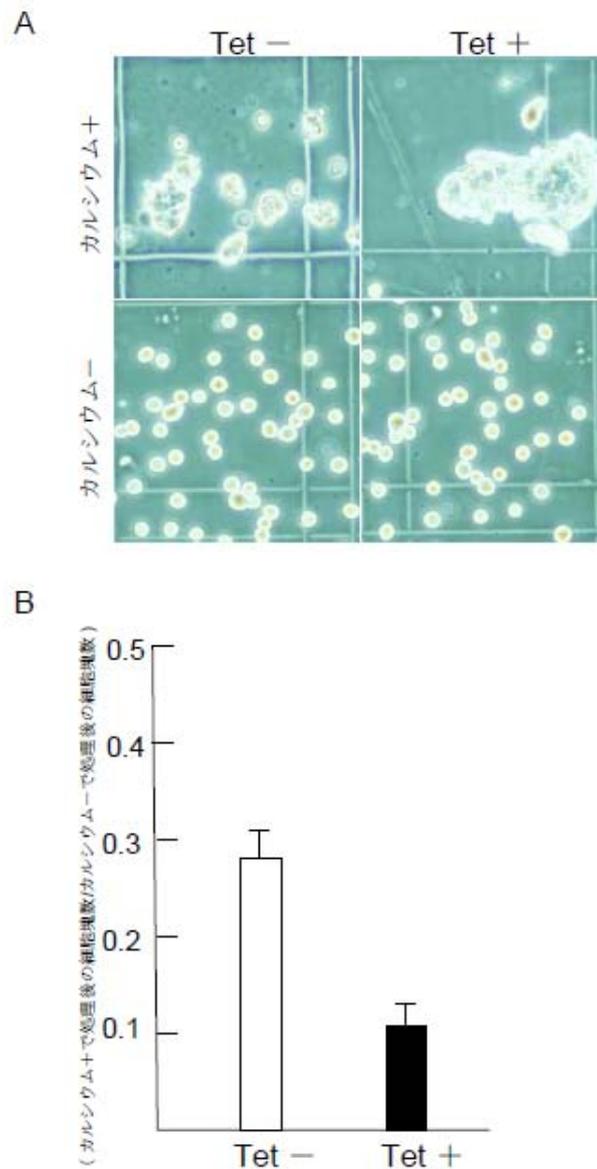
これらの培養細胞を用いた機能獲得 (gain-of-function) 及びノックアウトマウスを用いた機能欠失 (loss-of-function) 実験から、*Kif26b* は N-カドヘリンによる後腎間葉細胞の接着を制御し、二次的にインテグリン $\alpha 8$ の発現を維持していることが示唆される。



(図 12) **KIF26B** を発現させると **HEK293** 細胞は凝集塊を形成する

A テトラサイクリン依存性に野生型 **KIF26B** を **HEK293** 細胞に発現させると、24 時間後には細胞の凝集塊が形成される。

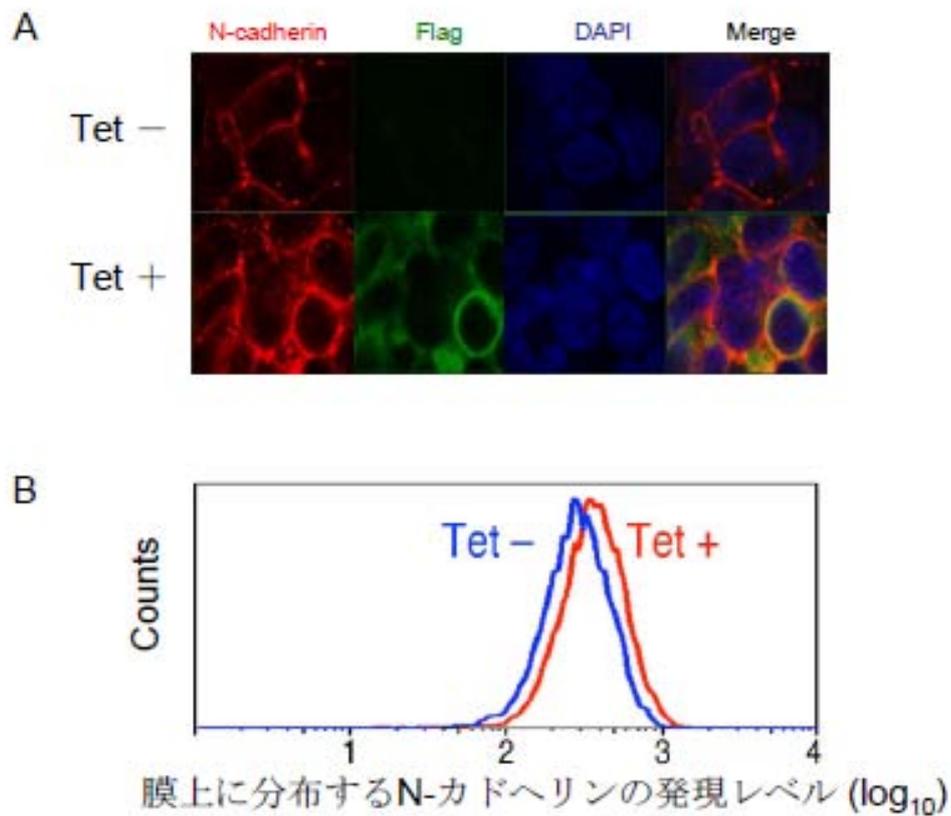
B 上記結果から *Kif26b* が細胞間接着もしくは細胞基質間接着の変化に関与しているのではないかと推測した。



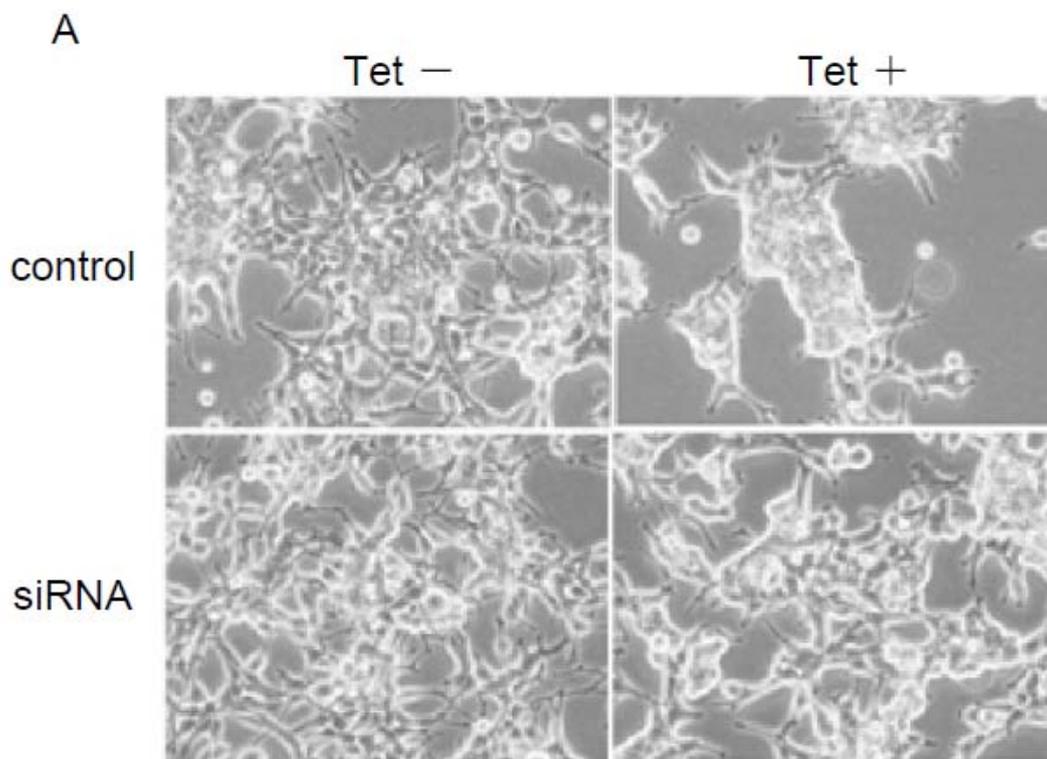
(図 13) **KIF26B** の発現によりカルシウム依存的な細胞接着の亢進が見られる

A テトラサイクリンにより **KIF26B** を誘導し、カルシウム非存在下及びカルシウム存在下におけるトリプシン処理と解離実験を行った。

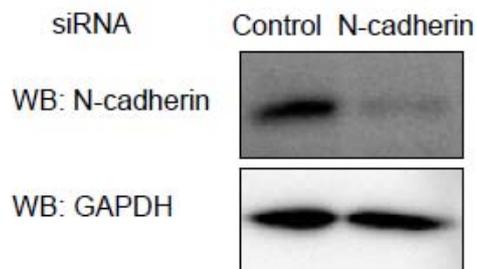
B グラフは3回の独立した細胞解離実験から測定した平均値と標準誤差を示す。細胞解離実験は細胞解離指数 (カルシウム+で処理後の細胞塊数/カルシウム-で処理後の細胞塊数) で定量化した。



(図 14) KIF26B を発現させると N-カドヘリンの膜上分布に増加が見られる。
 A テトラサイクリン依存性に野生型 KIF26B を HEK293 細胞に発現させ、抗 N-cadherin/Flag 抗体を用いて免疫染色を行った。
 B KIF26B をテトラサイクリン依存的に発現誘導を行い、N-cadherin 抗体 (GC-4; Sigma) を用いて N-カドヘリンの細胞膜上での分布を FACS にて解析を行った

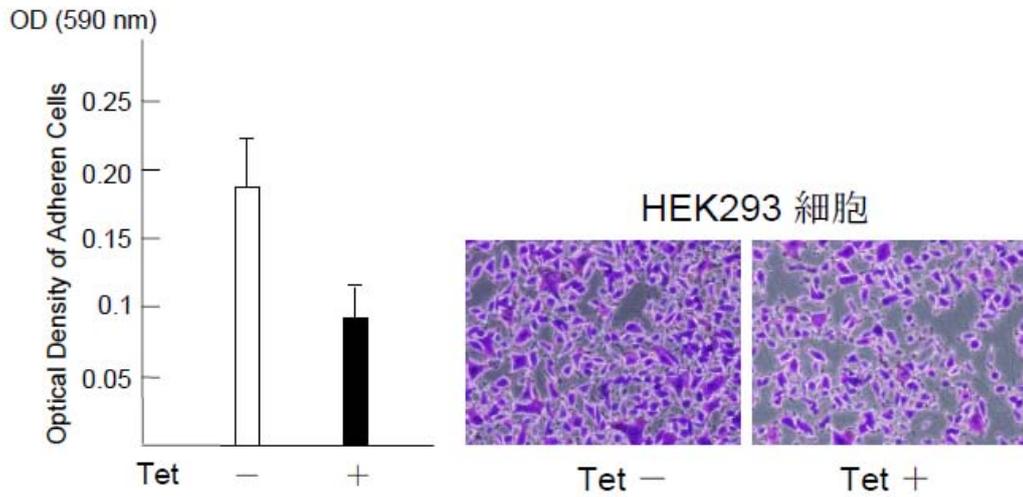


B

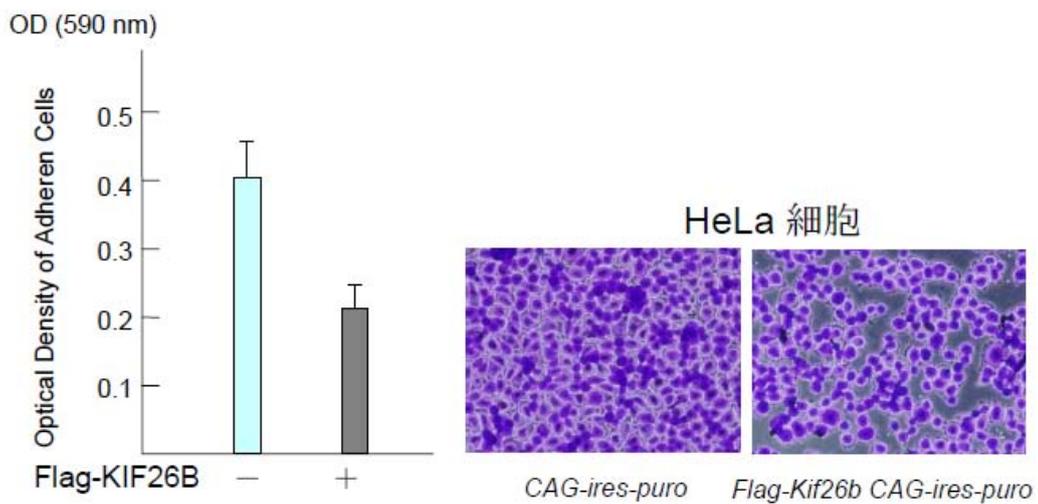


(図 15) **N-cadherin-siRNA** により **KIF26B** 依存性の細胞接着亢進が抑制される
A テトラサイクリン依存性 **KIF26B** 誘導 HEK293 細胞に **N-cadherin-siRNA** を導入した。導入 24 時間後に細胞を回収し、テトラサイクリン添加 (-) 及びテトラサイクリン $1 \mu\text{g/ml}$ 添加に分け、再び 48 時間培養を行った。
B 細胞を回収し **N-cadherin** 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。

A



B

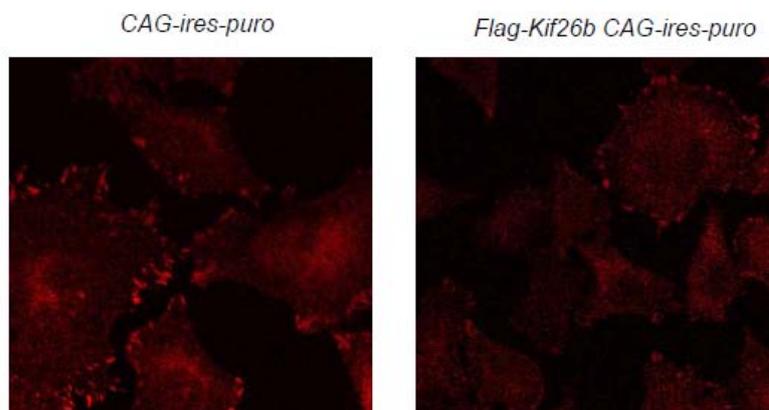


(図 16) 細胞-基質間接着は KIF26B の発現により減弱する

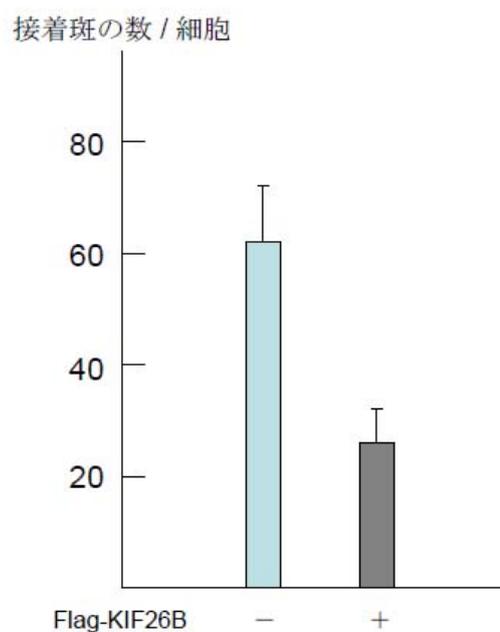
A、B 96 ウェルプラスチックディッシュプレートにフィブロネクティン ($1 \mu\text{g/ml}$) をコートし、各ウェルに 5×10^4 細胞を播き 1 時間培養を行った。各ウェルを洗浄し不接着細胞を除いた後蛍光強度を測定した。A は HEK293 細胞、B は HeLa 細胞での結果を示す。

グラフは 3 回の独立した再実験から測定した平均値と標準誤差を示す。

A



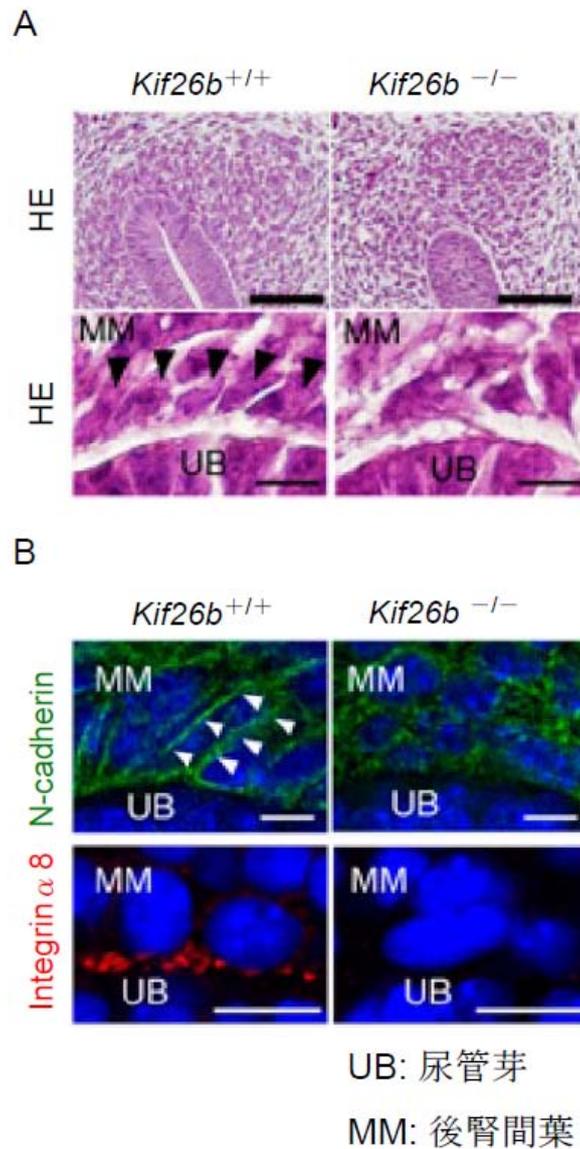
B



(図 17) **KIF26B** 発現により接着斑の数は減少する

A 96 ウェルプラスチックディッシュプレートにフィブロネクティン ($10 \mu\text{g/ml}$) をコートし、各ウェルに 3×10^4 細胞を播き 6 時間培養を行い、抗 Vinculin 抗体にて免疫染色を行った。

B グラフは 30 個の細胞の接着斑を数え、1 細胞あたりの接着斑の数の平均値と標準誤差を示す。



(図 18) 胎生期 10.75 日目の *Kif26b* ノックアウトマウス間葉は凝集異常を呈する

A *Kif26b* ノックアウトマウスでは胎生期 10.75 日目において、尿管芽に接する領域の後腎間葉で凝集異常を呈している事が HE 染色でみられる。

この領域は、野生株では後腎間葉は円柱状に密着して並んでいるのに対して、ノックアウトマウスの間葉では円柱状の並びが崩れている。

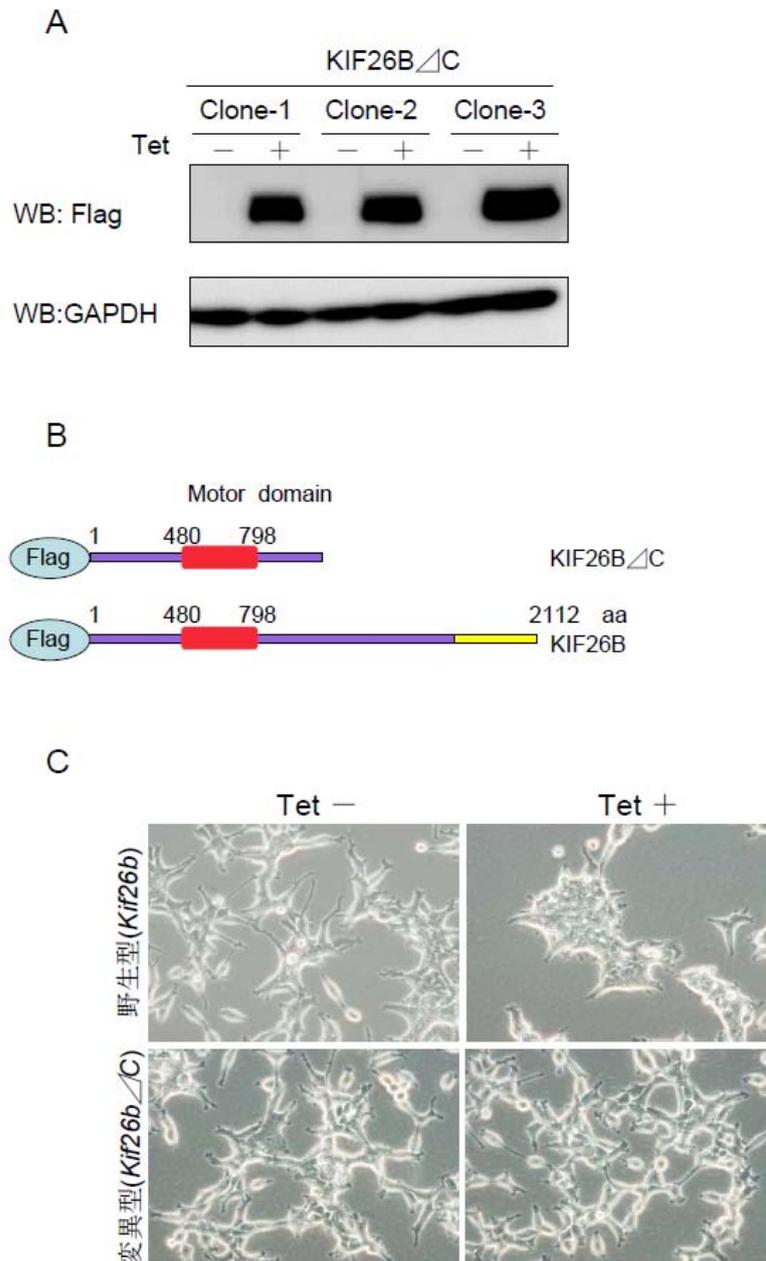
B 胎生期 10.75 日目のノックアウトマウスの間葉の凝集異常を呈する領域では、 $\alpha 8$ integrin 及び N-cadherin の分布異常がみられる。

8-4 免疫沈降法及び GST pull-down 法による結合蛋白の探索と同定

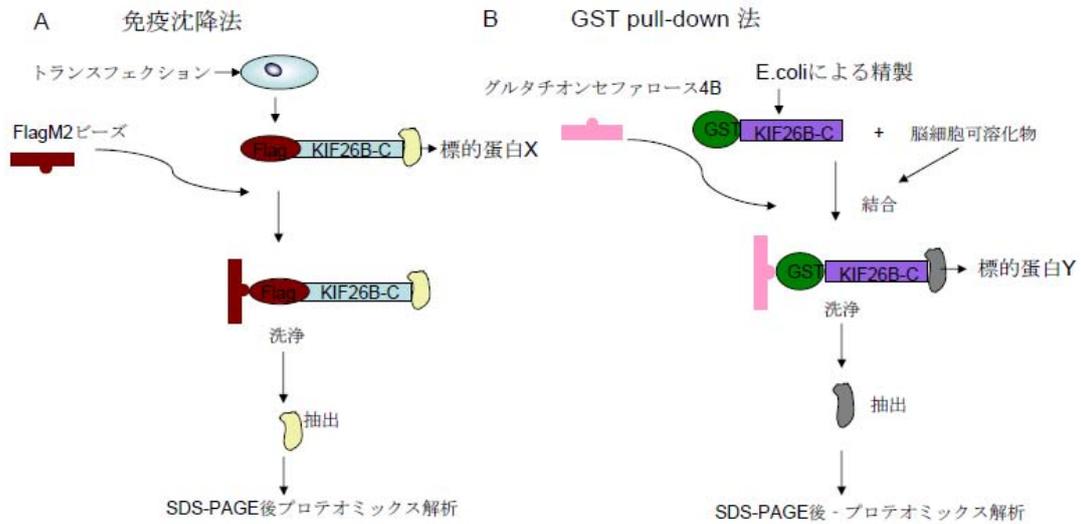
KIF4 や KIF13 といったキネシンにおいてモータードメインの対側に位置するテイルドメインに特異的蛋白が結合する事が報告されている (Midorikawa *et al.*,2006、Nakagawa *et al.*,2000)。KIF26B もモータードメインの対側に位置するテイルドメイン(C 端側)に何らかの特異的結合蛋白が存在すると推測される。そこで C 端領域を除いた変異型 KIF26B Δ C をテトラサイクリン依存的に発現する HEK293 細胞を作製した (図 18A、B)。変異型 KIF26B Δ C を発現させても、野生型 KIF26B で見られるような細胞の凝集は見られない事がわかった (図 18C)。この事は、KIF26B の C 端側領域に、細胞接着の亢進を起こしうる特異的結合蛋白が存在する可能性があると考えた。そこで KIF26B の C 端領域に結合する蛋白の同定を行う事を目的とし以下の 2 つの方法で探索する事とした。

まず、Flag-KIF26B-C を安定に発現する HEK293 細胞株を作製し、FlagM2 ビーズを用いた免疫沈降法① (図 19A) で、次に GST-KIF26B-C 融合蛋白を大腸菌で作製し、P0 マウスの脳細胞の可溶化物を反応させ、その後グルタチオンセファロースで沈降させる pull-down 法② (図 19B) を用いた。①での探索については内在性に結合する蛋白をスクリーニングできる為特異度の高い実験方法であると考えた。②については、過剰な蛋白を用いる事ができ、マウス生体内で発現する蛋白との結合をスクリーニング可能であり感度が高い実験方法といえる。①②の沈降物は銀染色を行い、各々コントロールの沈降物と比較し差のあるバンドを切り出し、マススペクトロメトリーを行った (図 20、21)。①②による解析で同定された蛋白をスコアの高い順にリストアップを行い細胞接着分子に関連が示唆されるものについて選択した。

①による結果から membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) 蛋白に属する DLG1, CASK 蛋白に着目した (図 20B)。これらはグアニル酸キナーゼ (GK) ドメインをもつ膜裏打ち蛋白であり、上皮細胞における細胞間接着との関連性が示唆される分子である (Laprise *et al.*,2004)。また②による結果からは NMHC II B に着目した (図 21B)。NMHC II はミオシン II サブファミリーの非筋型に分類され、細胞間接着分子 N-cadherin の局在をアクチンフィラメントの緊張を促す事で変化させる機能を有する (Conti *et al.*,2008)。



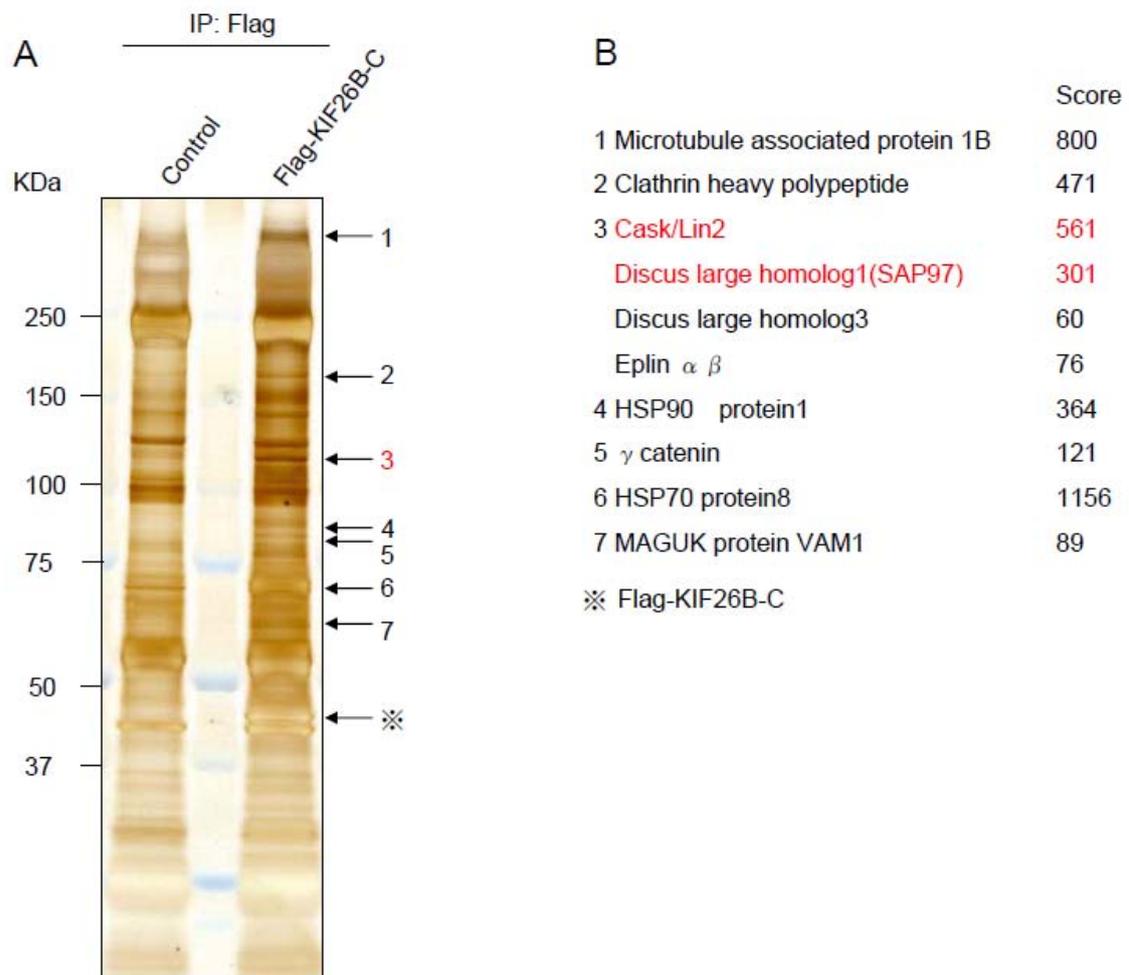
(図 19) C 端領域欠失 KIF26B Δ C では HEK293 細胞の接着亢進はみられない
A HEK293 細胞に Flag-変異型 KIF26B Δ C プラスミドを導入し、Hygromycin 及び Blasticidin にてセレクションを行い、テトラサイクリン依存的に KIF26B Δ C を安定的に発現する細胞株を樹立した。樹立した 3 クローンを、抗 Flag 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。
B、C テトラサイクリン依存性に野生型の KIF26B を HEK293 細胞に発現させると、24 時間後には細胞の凝集塊が形成される。一方変異型の KIF26B Δ C を発現させても HEK293 細胞に変化は見られない。



(図 20) KIF26B と結合する蛋白質の検索

A Flag-KIF26B-C を安定に発現する HEK293 細胞株を作製し、FlagM2 ビーズを用いた免疫沈降の模式図。

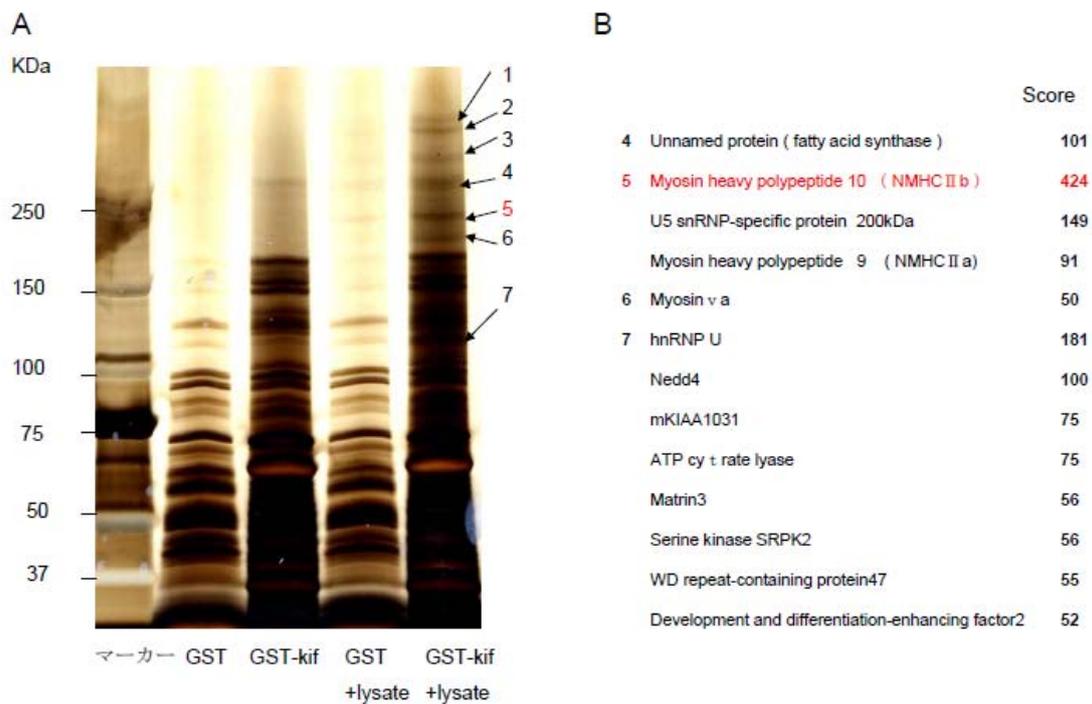
B GST-KIF26B-C 融合蛋白を大腸菌で作製し、P0 マウスの脳細胞の可溶化物を反応させ、その後グルタチオンセファロースで沈降させる pull-down 法の模式図。



(図 21) **Flag-KIF26B-C** 安定発現 HEK293 細胞株を用いた免疫沈降

A **Flag-KIF26B-C** を発現する HEK293 細胞可溶化物を大量に作製し、FlagM2 ビーズを用いて免疫沈降を行った。沈降物を **SDS-PAGE** 解析し銀染色を行い、発現に差のあるバンドを切り出し、マスマスペクトロメトリー解析を行った。

B それぞれのバンドにおけるマスマスペクトロメトリー解析の結果を示す。



(図 22) GST-KIF26B 融合蛋白質を用いた KIF26B 結合蛋白質の解析

A 大腸菌で GST-KIF26B の C 端部分の 融合蛋白を安定に発現させ蛋白質を精製し、生直後マウスの脳、腎臓細胞の可溶化物と反応させ、その後グルタチオンセファロースで pull down 沈降を行った。沈降物を SDS-PAGE で分離した後銀染色を行い、発現に差のあるバンドを切り出し、マスペクトロメトリー解析を行った。

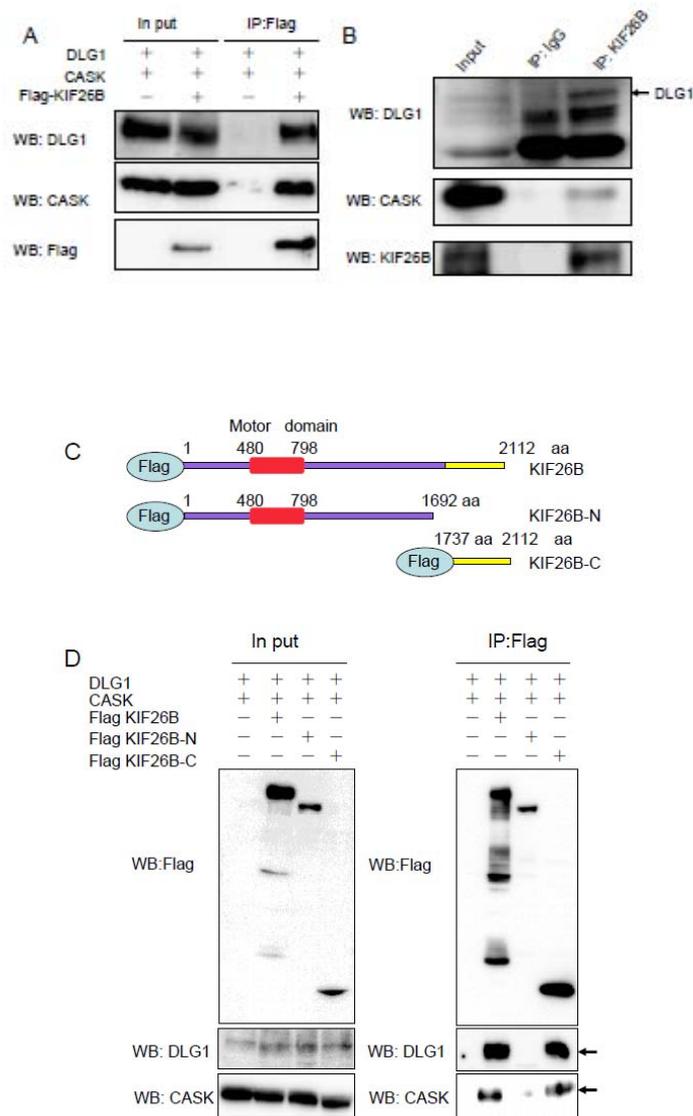
B それぞれのバンドにおけるマスペクトロメトリー解析の結果を示す。

8-5 *Kif26b* 依存的な細胞接着の亢進は NMHC II との会合を介する

免疫沈降法にて同定された CASK、DLG1 の蛋白が、実際に KIF26B と会合が見られるかの解析を行った。まず過剰発現における免疫沈降法を用いて CASK 及び DLG1 の KIF26B との共沈が起こる事を確認した (図 23A)。次に腎臓における内在性の KIF26B との結合についてを、腎臓組織のライセートを用い *kif26b* 抗体での免疫沈降によって明らかとした (図 23B)。更にこれらの結合が C 端領域 (図 23C) に特異的なものかについて、過剰発現による免疫沈降法を行った。実際 C 端領域を除いた KIF26B-N (図 23D 右パネルレーン 3 矢印) にはこれらの蛋白の共沈が見られないのに対して、KIF26B-C 端領域 (図 22D 右パネルレーン 4 矢印) では共沈が確認された。このことから、*Kif26b* の細胞接着亢進に関わる機能的ドメイン特異的に、これらの蛋白が結合する事が示された。更にこれらの結合蛋白が KIF26B と結合する事が、細胞接着亢進に関わっているかを検証した。培養細胞に *Dlg1* もしくは *Cask* の siRNA の導入を行ったが、*Kif26b* 発現誘導依存的な細胞接着の亢進には影響を与えなかった (図 24)。これらの結果から CASK 及び DLG1 の KIF26B との結合は、KIF26B 依存的な細胞接着亢進に機能的な影響を与えない事が示唆された。

次に GST-pull down 法によって 同定された NMHC II B の KIF26B との結合確認について CASK 及び DLG1 と同様に免疫沈降法による解析を行った。NMHC II B も KIF26B の過剰発現 (図 25A) 及び内在性の KIF26B (図 25B) と共沈する事が確認された。また C 端領域を除いた KIF26B-N (図 25D 右下パネルレーン 6 矢印) では NMHC II B の共沈が見られないのに対して、KIF26B-C 端領域 (図 25D 右下パネルレーン 6 矢印) では共沈が確認される事から、この結合は C 端領域特異的なものである事が分かった。次に NMHC II B が KIF26B と結合する事が細胞接着に関わっているかどうかを、培養細胞に NMHC II 阻特異的害剤を投与し検証をした。実際 NMHC II 特異的阻害剤 Blebbistatin 添加により *kif26b* 依存性の細胞接着の亢進が抑制される事が明らかとなった (図 26)。これらの結果より *kif26b* 依存的な細胞接着の亢進は NMHC II との結合を介する事が示された。また NMHC II B は胎生期腎臓の後腎間葉にも強く発現がみられた (図 27)。

これらの結果から *Kif26b* は NMHC II を介して N-カドヘリンによる後腎間葉細胞の接着を制御する事が示唆された (図 28)。



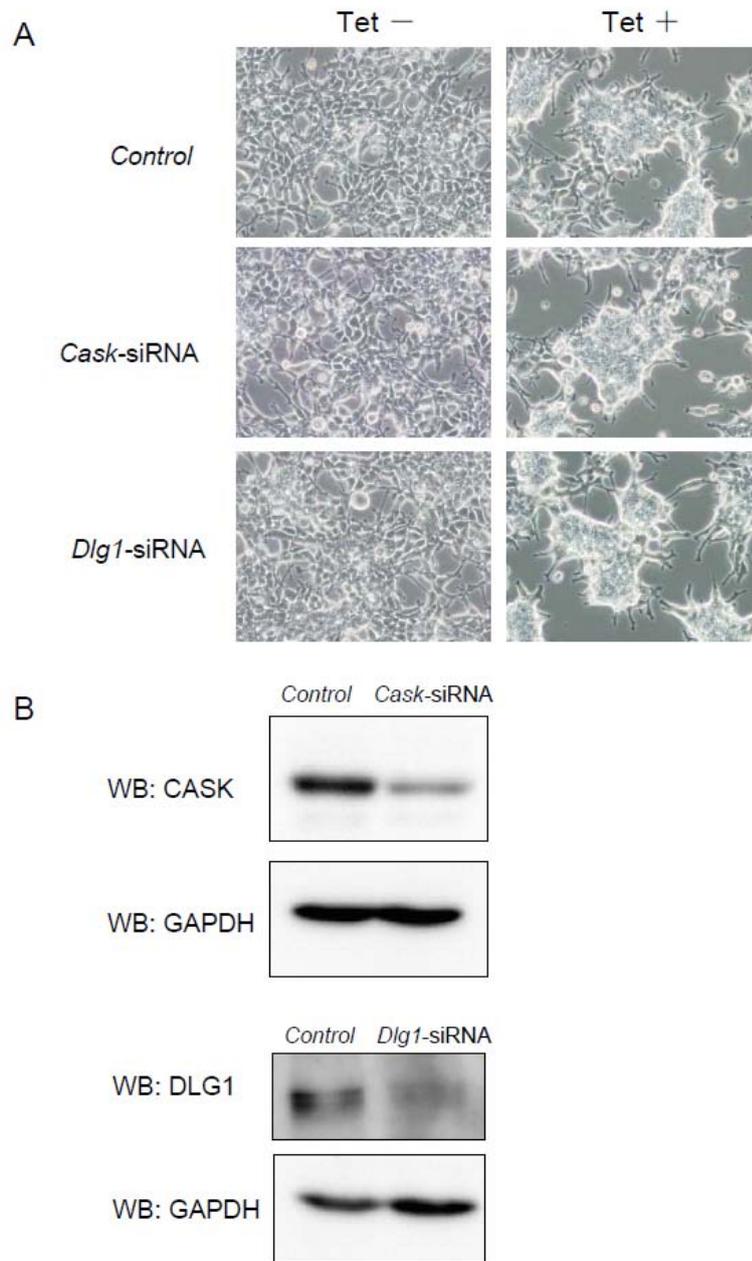
(図 23) 免疫沈降法により **CASK** 及び **DLG1** は **KIF26B** と共沈する

A HEK293 細胞に Flag-KIF26B を発現させた。細胞抽出液を回収し、Flag-M2 ビーズを用いて免疫沈降を行い、ウェスタンブロットにより沈降物を解析した。

B 生直後のマウス腎臓より細胞抽出液を回収し、Kif26b 抗体を用いて免疫沈降を行った。沈降物を SDS-PAGE により分離し、抗 Kif26b 抗体、抗 Dlg1 抗体及び抗 Cask 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

C *Kif26b* の全長及び変異体の模式図。*Kif26b* は N 端側にモータードメインを有する。

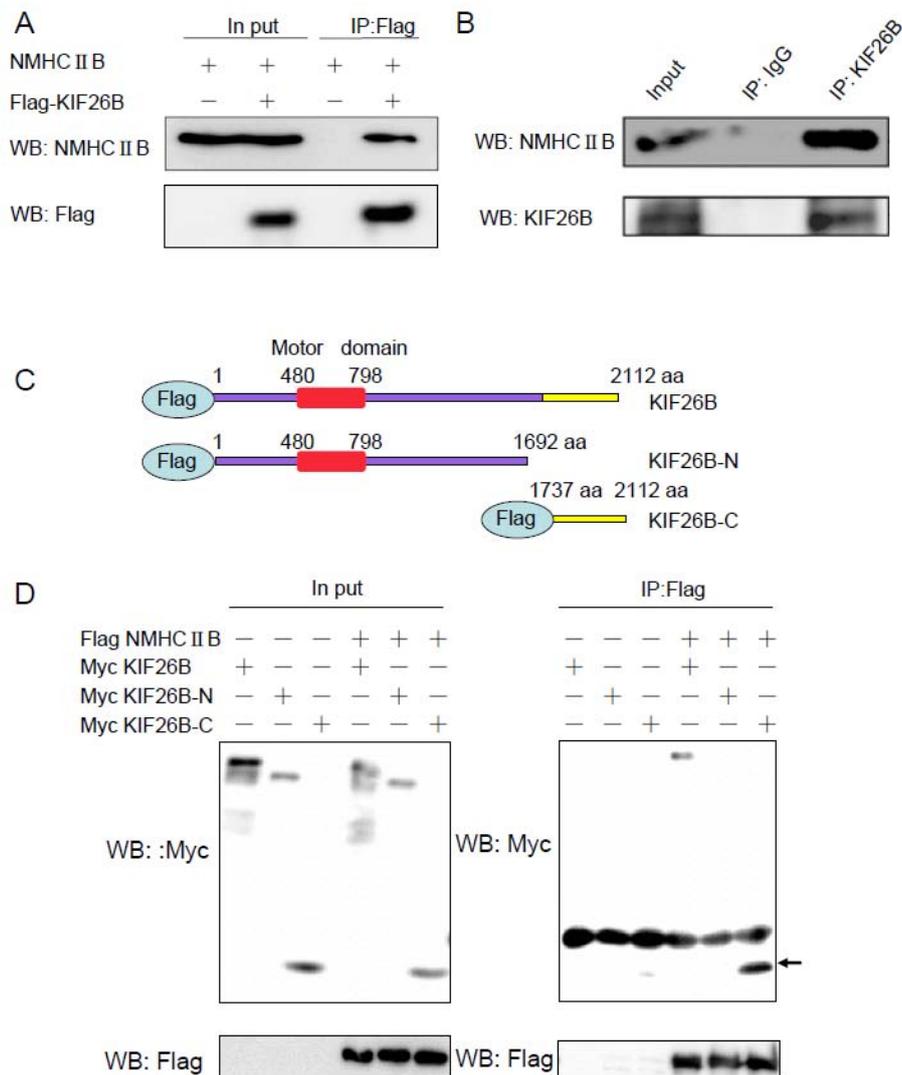
D Cos7 細胞に Flag タグ付の野生型及 KIF26B を発現させた。細胞抽出液を回収し、Flag-M2 ビーズを用いて免疫沈降を行い目的の抗体を用いてウェスタンブロットを行った



(図 24) KIF26B 依存性の細胞接着の変化は **Cask** あるいは **Dlg1-siRNA** 導入では抑制できない

A テトラサイクリン依存性 KIF26B 誘導 HEK293 細胞に **Cask** ないし **Dlg1-siRNA** を導入した。導入 24 時間後に細胞を回収し、テトラサイクリン添加 (−) 及びテトラサイクリン $1 \mu\text{g/ml}$ 添加に分け、再び 48 時間培養を行った。

B 細胞を回収し **Cask** 抗体、**Dlg1** 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。



(図 25) 免疫沈降法により NMHC II B は KIF26B と共沈する

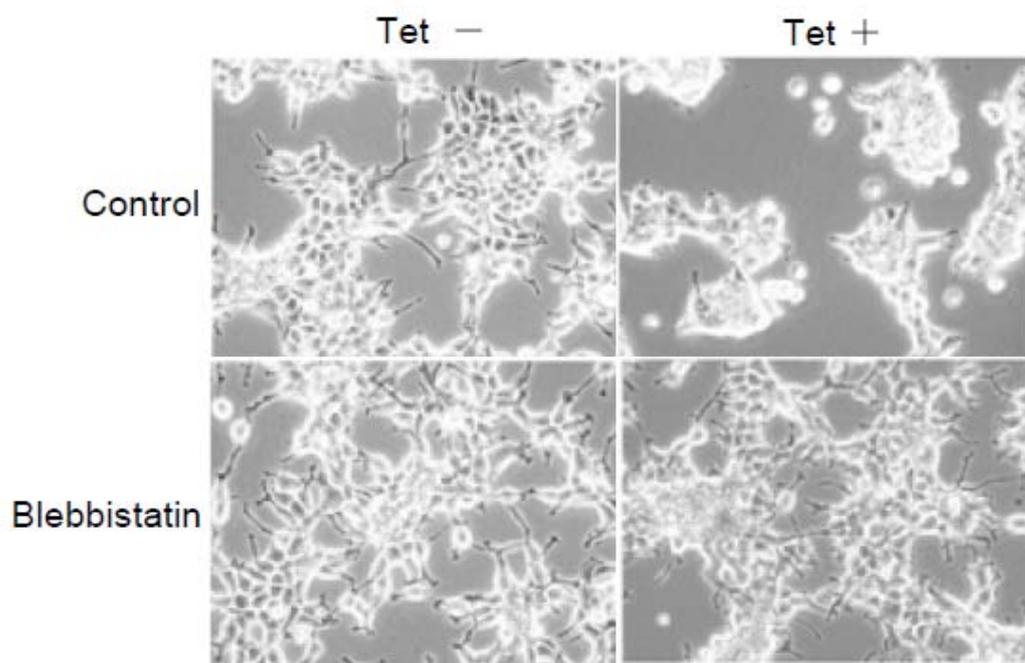
A HE K293 細胞に Flag タグ付きの野生型 KIF26B を発現させた。

細胞抽出液を回収し、Flag-M2 ビーズを用いて免疫沈降を行い目的の抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

B 生直後のマウス腎臓より細胞抽出液を回収し、Kif26b 抗体を用いて免疫沈降を行った。沈降物を SDS-PAGE により分離し、抗 Kif26b 抗体及び抗 NMHC II b 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

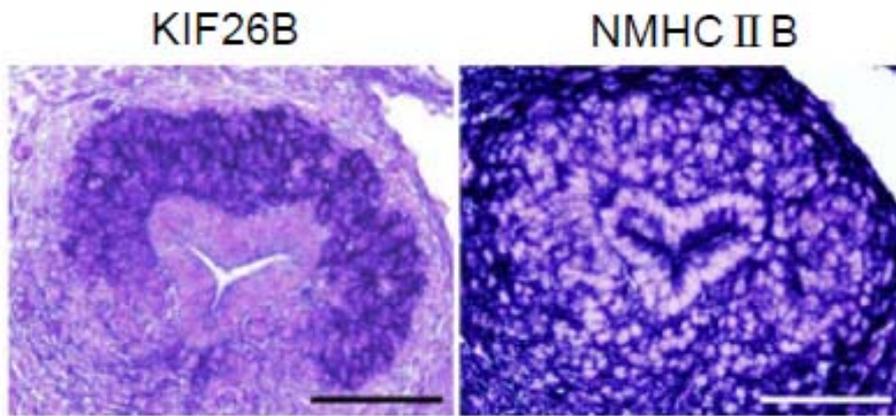
C *Kif26b* の全長及び変異体の模式図。*Kif26b* は N 端側にモータードメインを有する。

D Cos7 細胞に Flag タグ付きの NMHC II B と Myc タグ付の野生型及び変異型 KIF26B を発現させた。細胞抽出液を回収し、Flag-M2 ビーズを用いて免疫沈降を行い目的の抗体を用いてウェスタンブロットを行った



(図 26) NMHC II 特異的阻害剤 **Blebbistatin** により **KIF26B** 依存性の細胞接着は抑制される

NMHC II 特異的阻害剤(-)-blebbistatin 添加の元、テトラサイクリン依存性 KIF26B 誘導 HEK293 細胞を、テトラサイクリン非存在下及びテトラサイクリン 1 μ g/ml 添加に分け 48 時間培養を行った。



(図 27) **NMHC II B** は腎臓発生器において後腎間葉に発現が見られる
NMHC II B は、腎臓発生過程胎生期 11.0 日目の後腎間葉に発現する。

9 考察

HEK293 細胞において、KIF26B の発現に伴い N-カドヘリン依存的な細胞間接着の亢進が促される事が見出された。遺伝子欠損マウス間葉細胞の細胞間に発現する N-カドヘリンの分布異常が認められた。更に *Kif26b* 会合分子として *NMHC II B* を同定し、*Kif26b* による細胞間接着の亢進が *Kif26* と *NMHC II b* との結合に依存することを示した。これらの結果から、*Kif26b* は *NMHC II b* ミオシンを介して N-カドヘリンによる後腎間葉細胞の接着を制御する事が示唆された (図 27)。

Kif26b と *NMHC II* 経路

本研究で、微小管結合タンパクであるキネシンファミリーに属する KIF26B とアクチン結合タンパクである NMHC II B が相互作用する事で細胞間接着に影響を与えている事が明らかになった。この結果は、微小管とアクチン繊維といった異なった細胞骨格同士に *Kif26b* と *NMHC II b* 分子を介した連結がある事を示唆したものであり、興味深い成果と思われる。これまでもキネシンファミリーに属する KhcU とミオシンファミリーに属する MyoVA との相互作用が報告されており (Mehta et al.,2000)、これらの分子の解析から「微小管とアクチン繊維の細胞骨格同士の intersection のモデル」が提唱されている (Ali et al.,2007)。本研究の結果は、後腎間葉細胞内においても微小管及びアクチン繊維に intersection が存在する事を支持するものと考えられる。

NMHC II は、ミオシンモーターに属する分子であり、25 以上の異なったクラスに分類されるうちのミオシン II サブファミリーの非筋型に分類される。NMHC II は、哺乳類では NMHC II A、NMHC II B、NMHC II C の 3 つのアイソフォームがあり、すべて細胞間接着に機能することが明らかにされている。機能的にはアクチンフィラメントの緊張を促す事で、カドヘリンなどの細胞接着分子の局在変化をもたらすと考えられている (Conti et al.,2008)。ノックアウトマウスを用いた解析では、*NMHC II a* 欠損マウスは、細胞接着が損なわれ visceral endoderm の形成に異常を呈する (Conti et al.,2004)。また *NMHC II b* の欠損マウス及び変異型マウスはカドヘリンによる細胞間接着が損なわれ、水頭症や心臓形成の異常を呈する事が分かっている (Ma et al.,2007)。これらの事からも *Kif26b* ノックアウトマウス間葉における N-カドヘリンの分布異常は *NMHC II* を介した変化である可能性がある。よって腎臓における *Kif26B-NMHC II* 経路を更に解析する上で、*NMHC II* の腎臓特異的な欠失マウスの作成をする価値があると考えられる。

また同じキネシン-11 ファミリーに属す出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の分子である Smy1p も、ミオシンファミリーに属する Myo2p との

結合が示されており機能的に相補的代償を行っている事がわかっている (Beningo et al., 2000)。これらの結果は *Kif26b* と *NMHC II* の関連性を更に解明する上でも非常に重要な情報であると考えられる。今後 *Kif26b* と *NMHC II* の関連性を解析する上で、まず *Kif26b* ノックアウトマウスでの *NMHC II* の発現分布について詳細に解析をする必要がある。

腎臓形成における *Kif26b* とインテグリン $\alpha 8$

近年の研究からは、受容体インテグリン $\alpha 8/\beta 1$ のリガンドである Nephronectin あるいはインテグリン $\alpha 8$ の欠失マウスでは、胎生 11.5 日の時期でのみ *Gdnf* の発現が一時的に低下し、尿管芽の分岐異常を起こし、その結果腎臓欠損を呈する事が分かっている。つまり Nephronectin はインテグリン $\alpha 8/\beta 1$ を介して *Gdnf* シグナルの維持に関与している事になる。これらの報告からも、*Kif26b* ノックアウトマウスにおける *Gdnf* の維持の欠落は、インテグリン $\alpha 8$ の発現変化が起こるからであると考えられた。しかしながら本研究における培養細胞を用いた機能獲得 (gain-of-function) の実験では、KIF26B の誘導によってむしろ基質間接着の減弱および接着班数の減少が見られた。細胞基質間接着への影響が *in vitro* 細胞の発現上昇と *in vivo* 臓器における発現欠損では必ずしも一致したものではなかった。

他臓器においては N-カドヘリンの発現変化による臓器形成にもたらす報告がなされて来ている。心臓臓器における前後軸、背腹側軸形成にあたって、カルシウム依存的な細胞間接着 N-カドヘリンと細胞基質間接着分子とのネットワークが重要である事が指摘されている (Linask et al., 2005)。腹側心臓前方領域は、発生段階で細胞間及び細胞基質間の両者のシグナルを同時に受け発生が進展する。実際にいずれの片方のシグナルに異常を呈する変異型マウスでは、相互に両者のシグナル伝達に影響を与え心臓形成不全を呈する事が分かっている。N-カドヘリンは細胞内分子 β -カテニンと結合し、フォーカル adhesion 領域ではフィブロネクチンなどの細胞外器質タンパクがインテグリンと結合する。これらの細胞間接着分子及び細胞基質間接着分子のいずれもが細胞内でアクチン繊維と連結し、アクチン繊維を介する細胞内外へのシグナル伝達を担う。このような細胞間接着分子及び細胞基質間接着分子のアクチン繊維を介したクロストークが重要であり、協調的にシグナル伝達を行っていると考えられる。これらの事からも、*Kif26b* の機能獲得 (gain-of-function) 及び機能欠失 (loss-of-function) 実験における細胞基質間接着への変化は、アクチン繊維を介した細胞間接着分子 N-カドヘリンの変化に伴う下流の変化ではないかと想定できる (図 28)。

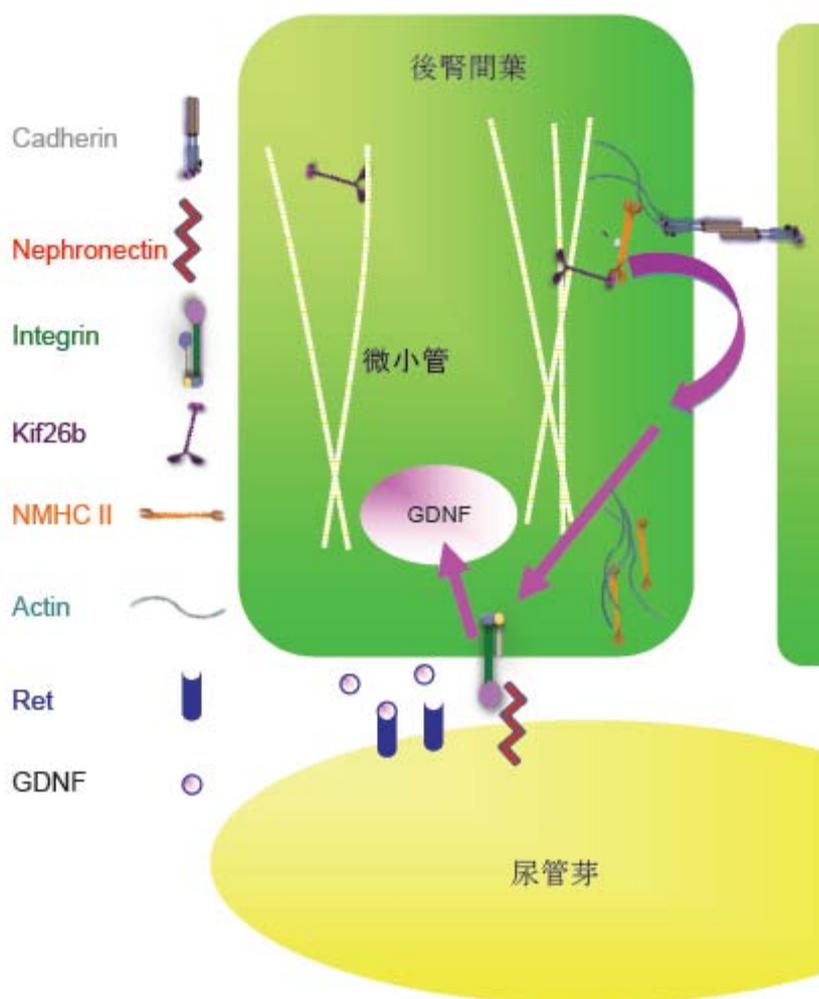
しかしながらテトラサイクリン依存性 KIF26B 誘導 HEK293 細胞はインテグリン

ン $\alpha 8$ を発現していない。一方 *Kif26b* 欠失マウス間葉での接着性は *in vitro* のような機能的な確認はできていない。これらの事から、*Kif26b* による細胞基質間接着への直接制御も否定はできない。今後 *Kif26b* 分子とインテグリン $\alpha 8$ の関連性を検証する為には、ロックアウトマウスの後腎間葉細胞を用い、*Kif26b* 及びインテグリン $\alpha 8$ の変化をより詳細に解析する事が重要である。また同時に後腎間葉の細胞基質間接着の変化を機能的に評価することも必要である。

キネシン N-11 ファミリーに属する *Kif26b* と *Kif26a*

Kif26b と同じキネシン-11 ファミリーに属し哺乳類で同定されている *Kif26a* 分子についても近年報告がなされている。*Kif26a* ロックアウトマウスでは神経節の過形成及び巨大腸を呈する表現型を示す。これは、*Kif26a* が *Grb2* と結合する事で GDNF-Ret シグナルの下流 ERK/AKT を抑制するためである(Zhou et al.,2009)。*Kif26b* も腸管神経節に同様に発現が確認されるが、*Kif26a* は後腎間様にみられない。この事から機能的相補性については、腎臓以外の臓器において未解明だが、少なくとも後腎間様においては無いといえる。また、*Kif26b* は Ret が発現する尿管芽には発現が無く、GDNF を発現する後腎間葉に発現する。実際 *Kif26b* 欠失マウス後腎間葉では、*Kif26a* 欠失マウスで見られる様な ERK/AKT のリン酸化の上昇が見られない。これらの事から *Kif26b* が *Kif26a* と異なった分子メカニズムを有すると言える。しかしながら *Kif26b* は *Kif26a* と共通した点も見られる。モータードメインの配列に関しては、マウス KIF26A は全アミノ酸の比較では KIF26B と 67%の相同性を有し類似した配列を持つ。*Kif26b* 分子も *Kif26a* 分子と同様に微小管結合能は有しているものの、ATPase 活性を持たない配列パターンを示している。このことは微小管上を走行し結合タンパクを輸送する従来のキネシンとは異なる事を示している。また *Kif26b* と結合する NMHC II も、アクチン上を走行をしないミオシンとして分類されている事から、*Kif26b* と NMHC II は、アクチンと微小管を連結する働きを担っている可能性が考えられる。

10 後腎間葉における *Kif26b* の機能的モデル



(図 28) 後腎間葉における *Kif26b* の機能的モデル図

Kif26b は *NMHC II* を介して N-カドヘリンによる後腎間葉細胞の接着を制御し、二次的にインテグリン $\alpha 8$ 及び *Gdnf* の発現を維持していることが示唆される。

11 結語

KIF26B 発現培養細胞及び *Kif26b* 遺伝子欠損マウスの解析をする事で、KIF26B はNMHC II を介し間葉の細胞間接着分子 N-カドヘリン制御を担っている事が分かった。今後 *Kif26b* の後腎間葉での機能を更に解明する上で、間葉中での *Kif26b* と *NMHC II* 分布の相関を解析すると共に、両者の遺伝学的関連についても検証する必要があると思われる。その為には、*NMHC II* の時期、空間特異的遺伝子欠失マウスの作成を行う事は有用と考えられる。

12 参考文献

Ali MY, et al. (2007) Myosin Va maneuvers through actin intersections and diffuses along microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (11):4332-4336..

Beningo KA, Lillie SH, Brown SS (2000) The yeast kinesin-related protein Smy1p exerts its effects on the class V myosin Myo2p via a physical interaction. *Mol Biol Cell* 11:691–702.

Conti MA, Even-Ram S, Liu C, Yamada KM, Adelstein RS (2004) Defects in cell adhesion and the visceral endoderm following ablation of nonmuscle myosin heavy chain II-A in mice. *J Biol Chem* 279:41263–41266.

Conti MA, Adelstein RS (2008) Nonmuscle myosin II moves in new directions. *J Cell Sci* 121:11–18.

Kobayashi H, Kawakami K, Asashima M, Nishinakamura R (2007) Six1 and Six4 are essential for Gdnf expression in the metanephric mesenchyme and ureteric bud formation, while Six1 deficiency alone causes mesonephric-tubule defects. *Mech Dev* 124:290–303.

Laprise P, Viel A, Rivard N. (2004) Human homolog of disc-large is required for adherens junction assembly and differentiation of human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 279(11):10157-10166.

Linask KK, Manisastry S, Han M (2005) Cross talk between cell-cell and cell-matrix adhesion signaling pathways during heart organogenesis: Implications for cardiac birth defects. *Microsc Microanal* 11:200–208.

Linton JM, Martin GR, Reichardt LF (2007) The ECM protein nephronectin promotes kidney development via integrin $\alpha 8\beta 1$ -mediated stimulation of Gdnf expression. *Development* 134:2501–2509.

Ma X, Bao J, Adelstein RS (2007) Loss of cell adhesion causes hydrocephalus in nonmuscle myosin II-B-ablated and mutated mice. *Mol Biol Cell* 18:2305–2312.

Mehta AD, et al. (1999) Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature*. (6744):590-593.

Midorikawa R, Takei Y, Hirokawa N (2006) KIF4 motor regulates activity-dependent neuronal survival by suppressing PARP-1 enzymatic activity. *Cell* 125:371-83.

Miki H, Okada Y, Hirokawa N (2005) Analysis of the kinesin superfamily: Insights into structure and function. *Trends Cell Biol* 15:467–476.

Miki H et al, (2001) All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:7004-7011

Müller U, et al. (1997) Integrin $\alpha 8\beta 1$ is critically important for epithelial-mesenchymal interactions during kidney morphogenesis. *Cell* 88:603–613.

Nagafuchi A, Ishihara S, Tsukita S (1994) The roles of catenins in the cadherin-mediated cell adhesion: Functional analysis of E-cadherin-alpha catenin fusion molecules. *J Cell Biol* 127:235–245.

Nakagawa T. et al, (2000) A novel motor, KIF13A, transports mannose-6-phosphate receptor to plasma membrane through direct interaction with AP-1 complex. *Cell* 103:537-540.

Nishinakamura R. (2008) Stem cells in the embryonic kidney. *Kidney Int* 73:913–917.

Nishinakamura R, et al. (2001) Murine homolog of SALL1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development. *Development* 128:3105–3115.

Takasato M, et al. (2004) Identification of kidney mesenchymal genes by a combination of microarray analysis and Sall1-GFP knockin mice. *Mech Dev* 121:547–557.

Takeichi M. (1977) Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol* 75:464-474.

Yamashita K, Sato A, Asashima M, Wang PC, Nishinakamura R (2007) Mouse homolog of SALL1, a causative gene for Townes-Brocks syndrome, binds to A/T-rich sequences in pericentric heterochromatin via its C-terminal zinc finger domains. *Genes Cells* 12:171-82.

Zhou R, Niwa S, Homma N, Takei Y, Hirokawa N (2009) KIF26A is an unconventional kinesin and regulates GDNF-Ret signaling in enteric neuronal development. *Cell* 139:802–813.