

[別紙1]

## 論文の内容の要旨

論文題目 Protein 4.1N Is Required for Translocation of Inositol 1,4,5-trisphosphate Receptor Type 1 to the Basolateral Membrane Domain in Polarized Madin-Darby Canine Kidney Cells

和 訳 極性を獲得した MDCK 培養細胞における、イノシトール三リン酸受容体タイプ 1 の 4.1N 蛋白質による、側底膜領域への局在化機構の解明

指導教官 御子柴 克彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成11年4月1日 入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 張 松柏

はじめに

イノシトール三リン酸 (以下  $IP_3$ ) 受容体 (以下  $IP_3R$ ) は、多くの細胞外刺激で産生される  $IP_3$  と特異的に結合して活性化され、細胞内カルシウムストアからカルシウムイオン(以下  $Ca^{2+}$ )を細胞質へ放出する  $IP_3$  依存的な  $Ca^{2+}$ 放出チャネルである。この  $IP_3/Ca^{2+}$ シグナル伝達は、興奮性、非興奮性を問わず広範な細胞の多彩な細胞機能に関与する。現在までに、3種類の異なる  $IP_3R$  タイプ ( $IP_3R1$ 、 $IP_3R2$ 、 $IP_3R3$ ) が存在することが知られている。 $IP_3R$  の構造および機能に関する解析は、これまで主に  $IP_3R1$  に関して行われている。 $IP_3R1$  は小脳プルキンエ細胞に圧倒的に多く発現しており、その他の脳領域でもニューロンに強く発現されている。非神経組織でも、多くの細胞、組織で発現が観察される。 $IP_3R1$  は 2749 アミノ酸からなり、分子量は 304–313 kDa の巨大蛋白質である。その構造は N 末端の 578 アミノ酸からなる  $IP_3$  結合領域、C 末端付近の 2276–2589 のアミノ酸の疎水性領域からなる 6 回膜貫通チャネル領域、中央部の 579–2275 のアミノ酸からなる  $Ca^{2+}$  や ATP 結合部位、cAMP 依存性キナーゼなどによるリン酸化部位などが存在する  $IP_3$  結合領域と膜貫通領域の

間に位置する調節領域と呼ばれる部分、その N 末端と C 末端は細胞質側に存在することが示されている。しかしながら、その 2590–2749 のアミノ酸からなる C 末端細胞質内領域の機能がまだ明らかにされていなかった。そこで、申請者はこの C 末端細胞質内領域の機能の解明するために、IP<sub>3</sub>R1 の C 末端に結合する蛋白質を Yeast Two-Hybrid で探索した。その結果、細胞骨格を構成する蛋白質の 1 つである 4.1N を IP<sub>3</sub>R1 の結合蛋白質として同定した。4.1N は、赤血球膜成分 4.1 蛋白質 (protein 4.1, 別名 band 4.1 或いは 4.1R) のホモログである。4.1R は、赤血球形態 (中窪み円盤状) の維持、狭い毛細血管を通過する際の変形能や膜安定性 (ちぎれにくさ) の維持に重要な役割を担うことが知られている。この 4.1 蛋白質は、キモトリプシンで限定分解により、30 kDa, 16 kDa, 10 kDa, 22-24 kDa の 4 つの領域に分かれる。N 末端側の 30 kDa 領域は、膜貫通蛋白質 [バンド 3 (band 3), グリコフォリン C (glycophorin C), CD44] が結合することが報告されており、膜結合領域と呼ばれる。また、10 kDa 領域にはスペクトリン (spectrin)/アクチン (actin) が、C 末端の 22-24 kDa 領域には密着結合領域 (tight junction) 蛋白質 ZO-1, ZO-2 などがそれぞれ結合することが報告されている。現在までのところ、3 つの 4.1 蛋白質アイソフォーム : 全組織型 4.1G、脳型 4.1B、神経型 4.1N が報告されているが、いずれも 4.1R の 30 kDa 膜結合領域、10 kDa スペクトリン/アクチン領域、22-24 kDa C 末端領域において高い相同性を保持していることが知られている。本研究で申請者は、4.1N と IP<sub>3</sub>R1 の結合及び MDCK 培養細胞における、この結合の生理的な意義の検討を行った。

## 結 果

1) IP<sub>3</sub>R1 の C 末端細胞質内領域に結合する蛋白質の同定及び結合領域の決定  
IP<sub>3</sub>R1 の C 末端細胞質内領域 (IP<sub>3</sub>R1/CTT) に結合する蛋白質を Yeast Two-Hybrid Assay でヒト脳の cDNA ライブラリーを用いて探索した結果、4.1N 蛋白質の C 末端領域 (4.1N/CTD) を含んでいるクローンを同定した。そこで、GST-4.1N/CTD 融合蛋白質を作成し、GFP-IP<sub>3</sub>R1/CTT を発現する COS-7 細胞の細胞抽出液から GFP-IP<sub>3</sub>R1/CTT を pulldown した所で、4.1N/CTD と IP<sub>3</sub>R1/CTT の結合は *in vitro* の結合実験で確認した。次に、マウスの 4.1N cDNA を cloning し、4.1N を特異的に認識するポリクロナール抗体を作製した。抗 4.1N と抗 IP<sub>3</sub>R1 抗体を用いて、マウス全脳の抽出液から共免疫沈降を行った結果、IP<sub>3</sub>R1 と 4.1N はマウス脳内においても結合することを確認した。さらに再び Yeast Two-Hybrid Assay と pulldown 結合実験を用いて、それぞれの詳細な結合領域を同定した。その結果 : IP<sub>3</sub>R1 の C 末端の 14 アミノ酸と 4.1N の C 末端

の約 100 アミノ酸 (4.1N/CTD) が結合に必要なかつ充分であることが分かった。

## 2) MDCK 培養細胞を用いた、4.1N-IP<sub>3</sub>R1 相合作用の生理的な意義の検討

2.1) MDCK 細胞は極性を持つ犬腎臓上皮細胞である。まず、抗 4.1N と抗 IP<sub>3</sub>R1 抗体を用いて、免疫染色法により MDCK 細胞の内在性の 4.1N と IP<sub>3</sub>R1 の局在を観察した。その結果、MDCK 細胞が subconfluence (極性をまだ獲得していない) の時には、IP<sub>3</sub>R1 は細胞質に局在し、また 4.1N は細胞質と核に存在することが分かった。一方、MDCK 細胞が confluence (極性を獲得している) になると、4.1N と IP<sub>3</sub>R1 はともに、膜領域にトランスロケーションし、そこに共局在することが分かった。さらに免疫沈降法により、MDCK 細胞の subconfluence と confluence 状態を問わず、4.1N は抗 IP<sub>3</sub>R1 抗体で共免疫沈降され、MDCK 細胞において内在性の 4.1N と IP<sub>3</sub>R1 は常に結合していることが分かった。

2.2) 4.1N のホモログ 4.1R は、すでに confluent MDCK 細胞の密着結合領域に局在していることが報告されている。そこで、抗 4.1N と抗 IP<sub>3</sub>R1 抗体及び抗 ZO-1 と抗 Na,K-ATPase 抗体を用いて、極性を獲得していた confluent MDCK 細胞を免疫染色した後、共焦点顕微鏡を用いて、4.1N と IP<sub>3</sub>R1 の細胞内局在を観察した。4.1N と IP<sub>3</sub>R1 はともに ZO-1 が局在している密着結合領域に局在しているのではなく、Na,K-ATPase が局在している側底膜領域に局在していることが分かった。

2.3) 4.1N と IP<sub>3</sub>R1 の結合が、IP<sub>3</sub>R1 の側底膜領域へトランスロケーションに関与しているかどうかを検討するために、様々な領域の IP<sub>3</sub>R1 と GFP との融合蛋白質を MDCK 細胞に発現させ、その局在を観察した。その結果、MDCK 細胞が confluence になると、GFP-IP<sub>3</sub>R1/FL (GFP と IP<sub>3</sub>R1 全長の融合蛋白質) と GFP-IP<sub>3</sub>R1/18A10 (GFP と IP<sub>3</sub>R1 の C 末端の 14 アミノ酸の融合蛋白質) は側底膜領域に局在するが、GFP-IP<sub>3</sub>R1/Δ18A10 (GFP と C 末端の 14 アミノ酸を欠損した IP<sub>3</sub>R1 の融合蛋白質) は細胞質と核に分布し、側底膜領域に局在しないことが分かった。

2.4) 4.1N のどの領域がその側底膜領域へのトランスロケーションに重要であるかを検討した。Venus (YFP の改良型である蛋白質) と 4.1N 融合蛋白質を MDCK 細胞に発現して、MDCK 細胞が confluence になると、Venus-4.1N/FL (Venus と 4.1N 全長の融合蛋白質) と Venus-4.1N/ΔCTD (Venus と C 末端領域を欠損した 4.1N 断片の融合蛋白質) はともに側底膜領域へのトランスロケーションが観察された。一方、Venus-4.1N/CTD (Venus と 4.1N の C 末端領域断片の融合蛋白質) は細胞質と核に分布し、側底膜領域へトランスロケーションしないことが分かった。この結果から、膜結合領域を含む 4.1N の N 末端領域が 4.1N

を **confluent MDCK 細胞** の側底膜領域にトランスロケーションすることに必要であり、C 末端領域断片だけでは **confluent MDCK 細胞** の側底膜領域にトランスロケーションできないということが分かった。

2.5) 4.1N の C 末端領域断片が IP<sub>3</sub>R1 の **confluent MDCK 細胞** 側底膜領域へのトランスロケーションを阻害できるかどうかを検討した。Venus-4.1N/FL と IP<sub>3</sub>R1 を共発現すると、両者はともに側底膜領域へトランスロケーションした。Venus-4.1N/CTD と IP<sub>3</sub>R1 を共発現すると、両者はともに細胞質と核に分布した。Venus と IP<sub>3</sub>R1 を共発現すると、Venus は細胞質と核に分布したが、IP<sub>3</sub>R1 は側底膜領域にトランスロケーションした。ここで、4.1N/CTD は IP<sub>3</sub>R1 の側底膜領域へのトランスロケーションが阻害できることが分かり、4.1N が IP<sub>3</sub>R1 の側底膜領域へのトランスロケーションに必要であることが分かった。

2.6) IP<sub>3</sub>R1 は主に小胞体に存在する。そこで、**confluent MDCK 細胞** での小胞体の局在を検討するために、他の小胞体蛋白質の局在を免疫染色で観察した。その結果、内在性の calnexin と calreticulin などは **confluent MDCK 細胞** においても、細胞質に局在し、側底膜領域にトランスロケーションしないことが分かった。さらに、EGFP-SERCA2a (EGFP と SERCA2a の融合蛋白質) と DsRed-KDEL (DsRed・calreticulin の小胞体局在シグナルペプチドの融合蛋白質) を MDCK 細胞に発現した結果、これらの蛋白質も、**confluent MDCK 細胞** において、側底膜領域へトランスロケーションしないことが分かった。

## 結 論

- 1) 4.1N は IP<sub>3</sub>R1 に結合する。この結合は Yeast Two-Hybrid Assay と *in vitro* 及び *in vivo* での様々な結合実験で確認された。
- 2) IP<sub>3</sub>R1 の C 末端の 14 アミノ酸と 4.1N の C 末端の約 100 アミノ酸は IP<sub>3</sub>R1 と 4.1N の結合に必要かつ充分である。
- 3) MDCK 細胞では、subconfluence (極性をまだ獲得していない) と confluence (極性を獲得している) の状態を問わず、4.1N と IP<sub>3</sub>R1 が常に結合する。
- 4) 4.1N のホモログである 4.1R は **confluent MDCK 細胞** の密着結合に局在するが、4.1N と IP<sub>3</sub>R1 は、MDCK 細胞が confluence になると、ともに側底膜領域にトランスロケーションする。またこの時、他の小胞体蛋白質は細胞質に局在する。
- 5) 4.1N の **confluent MDCK 細胞** での側底膜領域へのトランスロケーションには、膜結合領域を含む N 末端部分が重要である。
- 6) 4.1N が IP<sub>3</sub>R1 の **confluent MDCK 細胞** での側底膜領域へのトランスロケーションには必要である。