

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 張 松 柏

本研究はイノシトール三リン酸受容体 (IP<sub>3</sub>R) の C 末端細胞質内領域の機能を明らかにするため、IP<sub>3</sub>R タイプ 1 (IP<sub>3</sub>R1) の C 末端に結合する蛋白質を Yeast Two-Hybrid 法を用いて探索し、同定された細胞骨格を構成する蛋白質の 1 つである 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ものであり、下記の結果を得ている。

1. IP<sub>3</sub>R1 の C 末端細胞質内領域に結合する蛋白質を Yeast Two-Hybrid Assay 法を用いてヒト脳の cDNA ライブラリーを探索した結果、4.1N 蛋白質を IP<sub>3</sub>R1 の結合蛋白質として同定した。次に、4.1N と IP<sub>3</sub>R1 の結合を *in vitro* の結合実験で確認した。また、マウスの 4.1N cDNA をクローニングし、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 が *in vivo* においても結合することを確認した。さらに、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 IP<sub>3</sub>R1 と 4.1N の結合に必要なかつ充分であることが Yeast Two-Hybrid Assay 及び *in vitro* 結合実験で分かった。
2. MDCK 培養細胞において、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 の時には、IP<sub>3</sub>R1 は細胞質に局在し、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 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 の状態を問わず、4.1N と IP<sub>3</sub>R1 は MDCK 細胞において常に結合していることが分かった。
3. 4.1N と IP<sub>3</sub>R1 が confluent MDCK 細胞のどの領域に共局在するのかを検討するために、極性を獲得した confluent MDCK 細胞を抗 4.1N と抗 IP<sub>3</sub>R1 抗体及び抗 ZO-1 と抗 Na,K-ATPase 抗体を用いて免疫染色し、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。その結果、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。

4. 4.1N と IP<sub>3</sub>R1 の結合が、IP<sub>3</sub>R1 の側底膜領域へのトランスロケーションに関与しているかどうかを検討するため、様々な領域の IP<sub>3</sub>R1 を MDCK 細胞に発現させその局在を観察した結果、IP<sub>3</sub>R1 の 4.1N 結合領域が IP<sub>3</sub>R1 の **confluent MDCK 細胞の側底膜領域へのトランスロケーションに必要かつ充分であることが分かった**。また、様々な領域の 4.1N を MDCK 細胞に発現させその局在を観察した結果、膜結合領域を含む 4.1N の N 末端領域が 4.1N を **confluent MDCK 細胞の側底膜領域へのトランスロケーション** するに必要であり、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。次に、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。4.1N の C 末端領域断片と IP<sub>3</sub>R1 を MDCK 細胞に共発現すると、両者はともに細胞質と核に分布した。つまり、4.1N の C 末端領域断片は IP<sub>3</sub>R1 の側底膜領域へのトランスロケーションを阻害できることが分かった。これらの結果から、4.1N と IP<sub>3</sub>R1 の結合が 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。
5. 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、**confluent MDCK 細胞の内在性の及び強制発現させた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、また、および強制発現させた EGFP-SERCA2a (EGFP と SERCA2a の融合蛋白質)と DsRed-KDEL (DsRed と calreticulin の小胞体局在シグナルペプチドの融合蛋白質)は、どれも **confluent MDCK 細胞において細胞質に局在し、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。

以上、本論文は 4.1N 蛋白質が IP<sub>3</sub>R1 の C 末端細胞質内領域に結合する蛋白質であり、4.1N と IP<sub>3</sub>R1 の結合が極性を持つ犬腎臓上皮細胞である MDCK 細胞において、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ことを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、IP<sub>3</sub>R1 の膜領域へのトランスロケーションのメカニズムの解明に重要な貢献を為すと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。