



本稿では、前回の研究を発展させて、種々の組織で JAM4 の細胞内局在を決定すると同時に、それを MAGI-1 の局在と比較した。また、JAM4 が tight junction に移動する機序、ならびに MAGI-1 の動員における JAM4 の作用を検討した。これに加えて、JAM4 の各 Ig 様ループが細胞接着に果たす役割の解明も試みた。

## 結果

ラットの上皮組織で JAM4 の局在を調べた。JAM4 は、十二指腸では ZO-1 と共に tight junction に局在していたが、空腸と回腸では主に頂側膜に検出された。顎下腺およびエックリン汗腺の JAM4 は上皮細胞の tight junction に局在していた。腎臓においては、集合管では tight junction、近位尿細管では頂側膜に JAM4 が検出された。

種々の FLAG 標識 JAM4 変異体を発現する Madine Darby canine kidney II (MDCK) 細胞の stable transformant を作成して各変異体の局在を調べた。蛋白質の全長を含む FLAG-JAM4-1 および細胞膜側の Ig 様ループを欠損する FLAG-JAM4-4 は、tight junction に集積して ZO-1 と局在を共にした。しかし、N 末端側の Ig 様ループを欠損している FLAG-JAM4-2 は大半が頂側膜に発現した。これらのデータは、tight junction への JAM4 の動員が N 末端側の Ig 様ループに依存することを表していた。MAGI-1 との相互作用ドメインである PDZ 結合モチーフを欠損する FLAG-JAM4-3 は tight junction に局在したことから、PDZ 結合モチーフは tight junction への動員に必要ではないと推測された。

次に、同じ stable transformant を用いて内在性の MAGI-1 の局在を確認した。野生型の MDCK 細胞と同様に、FLAG-JAM4-1 を発現する MDCK 細胞では MAGI-1 が tight junction に集積していた。FLAG-JAM4-2 を発現する MDCK 細胞では、tight junction と頂側膜のいずれにも MAGI-1 が検出された。この傾向は、FLAG-JAM4-2 が一過性に導入された場合に一層顕著になった。FLAG-JAM4-2 を発現していない MDCK 細胞では MAGI-1 が tight junction に認められたが、FLAG-JAM4-2 を発現する MDCK 細胞では MAGI-1 が頂側膜に動員された。green fluorescent protein (GFP) 標識 MAGI-1 を発現する MDCK 細胞の stable transformant では、GFP-MAGI-1 は細胞質内にびまん性に分布し、細胞接着部位にもわずかに集積した。この細胞に FLAG-JAM4-1 を導入したところ、GFP-MAGI-1 の信号は細胞質内から消失して tight junction に選択的に集積し、FLAG-JAM4-1 と局在を共にした。PDZ 結合モチーフを欠損する FLAG-JAM4-3 は GFP-MAGI-1 の局在に影響を及ぼさなかった。これらの観察から、過剰発現した JAM4 は MAGI-1 の動員に関与すると考えられ

た。しかし、JAM4がtight junctionに検出されないにもかかわらず、回腸のMAGI-1はtight junctionにも集積していた。これは、*in vivo*でのMAGI-1の局在がJAM4のみによって決定されるのではなく、MAGI-1をtight junctionに動員する蛋白質がJAM4以外にも存在する可能性を示唆する結果であった。

2つのIg様ループの役割を明確にするために、各種FLAG標識JAM4変異体を発現するL細胞のstable transformantを用いてaggregation assayを行った。FLAG-JAM4-1やFLAG-JAM4-3を発現する細胞では著明な凝集が認められた。しかし、いずれかのIg様ループを欠損した変異体を発現する細胞では凝集形成が抑制されており、JAM4のホモフィリックな相互作用には両方のIg様ループが必要であることが明らかにされた。続いて、これらのL細胞を架橋試薬で処理して、ウェスタンブロット法で2量体の形成状況を解析した。FLAG-JAM4-1、FLAG-JAM4-3、およびFLAG-JAM4-4は2量体を形成したが、N末端側のIg様ループを欠損するFLAG-JAM4-2は2量体を形成しなかった。これは、JAM4の*cis*の相互作用がN末端側のIg様ループに依存することを表していた。

## 結論

JAM4の局在は組織によって異なり、tight junctionと頂側膜のいずれの局在も生理的であると考えられた。N末端側のIg様ループを欠損する変異型JAM4は、tight junctionに動員されずに頂側膜に集積した。また、*trans*の相互作用には2つのIg様ループのいずれもが不可欠であったが、*cis*の相互作用にはN末端側のIg様ループのみが必要であった。以上の結果から、JAM4はまず頂側膜に移動し、次にN末端側のIg様ループによる分子間相互作用を介してtight junctionに動員される可能性が高いという結論が得られた。

JAM4は、L細胞の細胞接着部位にMAGI-1を動員し、MDCK細胞でMAGI-1を過剰発現させた場合にもMAGI-1をtight junctionに動員した。しかし、JAM4が存在しないにもかかわらず、回腸の上皮細胞では内在性のMAGI-1がtight junctionに集積していた。これらの観察から、MDCK細胞におけるMAGI-1の局在はJAM4によって決定されるが、*in vivo*でのMAGI-1の局在は必ずしもJAM4に依存しないことが明らかにされた。