

## 審査の結果の要旨

氏名 田嶋麻紀子

本研究では、上皮細胞のtight junction (TJ) に局在して細胞接着に関与すると考えられている新規蛋白質junctional cell adhesion molecule 4 (JAM4) を題材に、JAM4の細胞内局在決定機序、およびその動員の機序を種々の組織で検討した。また、細胞接着においてJAM4が果たす役割についてさらに解析を進めた。その結果、下記の知見が得られている。

1. ラットの上皮組織で JAM4 の局在を調べたところ、これまで TJ に特異的に局在する蛋白質であると考えられていた JAM4 が、近位尿細管、空腸、回腸などでは頂側膜に検出されることを示した。特に、十二指腸の部位によって JAM4 の発現部位が異なる点は、本研究で初めて確認された。
2. 種々の細胞内ドメインを欠損したFLAG標識JAM4を発現するMDCK細胞のstable transformantを作成して各変異蛋白質の局在を調べたところ、蛋白質の全長を含むFLAG-JAM4-1、および細胞膜側の免疫グロブリン (Ig) 様ループを欠損するFLAG-JAM4-4は、tight junctionに集積してZO-1と局在を共にしたが、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。これは、tight junctionへのJAM4の動員は主にN末端側のIg様ループに依存し、PDZ結合モチーフは必要ではないことを示唆していた。
3. JAM4と結合することが知られているmembrane-associated guanylate kinase with inverted domain structure-1 (MAGI-1) はTJに局在する細胞膜裏打ち蛋白質であるが、N末端側のIg様ループを欠損したFLAG-JAM4-2を発現するMDCK細胞では、MAGI-1がTJと頂側膜のいずれにも検出された。また、green fluorescent protein (GFP) 標識MAGI-1を発現するMDCK細胞のstable transformantにFLAG-JAM4-1を一過性に導入すると、細胞質内や細胞接着部位にびまん性に分布していたGFP-MAGI-1が、FLAG-JAM4-1と共にTJに選択的に集積した。以上から、過剰発現したJAM4はMAGI-1の局在に影響を及ぼすことが明らかにされた。

4. JAM4が頂側膜に検出された回腸でMAGI-1の局在を確認すると、これまではTJまたは adherence junctionでの局在のみが報告されていたMAGI-1が頂側膜で検出された。しかし、回腸のMAGI-1は一部TJにも局在しており、*in vivo*でのMAGI-1の局在をJAM4のみが決定するのではないことが示唆された。
5. 各種FLAG標識JAM4を発現するL細胞を用いてaggregation assayを行ったところ、2つのIg様ループのいずれか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いた。このことから、JAM4のホモフィリックな*trans*の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。
6. 同じ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ところ、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。

本論文は、接着分子JAM4が組織によって特徴的な細胞内局在を示すことを明らかにし、JAM4が上皮細胞で担う作用について新たな示唆を与えるものであった。また、JAM4とMAGI-1の局在を*in vitro*および*in vivo*で比較し、MAGI-1の動員におけるJAM4の働きも示した。さらにJAM4の各Ig様ループの役割も明らかにされ、これはJAM4の細胞内targetingの機序を解明する上で重要な知見であった。以上の理由から、本論文の貢献は大きく、学位の授与に値するものと考えられる。