

審査の結果の要旨

氏名 浦江 聖也

本研究は腎尿細管上皮及び腸管吸収上皮に発現する CUBN/AMN 受容体の細胞内輸送制御機構を明らかにするために、関連タンパク質の網羅的検索を行ったものであり、以下の結果を得ている。

1. SILAC 法を用いた AMN の結合蛋白の網羅的検索の結果、新たな結合蛋白として NVL が同定された。培養細胞を用いた強制発現系で、実際に AMN と NVL の結合が確認された。
2. AMN を発現しない培養細胞における NVL は核小体に主に局在しているが、AMN を培養細胞で強制発現させることにより、AMN 存在下では NVL が細胞質に移行することが示された。また組織染色により、AMN を発現している腎尿細管上皮細胞及び腸管上皮細胞では NVL は細胞質にも局在することが示された。さらに AMN 及び NVL を強制発現させた培養細胞で **proximity ligation assay** を行ったところ、両者が細胞質で結合していることが示された。
3. AMN の断片化したペプチドを用いた免疫沈降および **pull-down assay** により、NVL が AMN の細胞内領域と結合することが示された。さらに AMN の細胞内領域にある二つのエンドサイトーシスシグナルモチーフを変異させた人工蛋白質を用いた実験系により、NVL の結合及び細胞質への移行が AMN のエンドサイトーシスシグナルモチーフに依存していることが示された。
4. CUBN 及び AMN を培養細胞で発現させ、さらに NVL をノックダウンさせたところ、CUBN/AMN 受容体のエンドサイトーシスが阻害されたことから、NVL が CUBN/AMN 受容体のエンドサイトーシスを促進する役割を担っていることが示された。また同様の NVL をノックダウンさせた実験系において、CUBN/AMN 受容体のリガンド取込みを FITC-BSA を用いて観察した結果、NVL は CUBN/AMN 受容体によるリガンド取込みを促進する機能を有していることが示された。
5. 培養細胞で NVL をノックダウンさせたところ、AMN とアダプター分子 ARH の結合が促進されたことから、NVL は AMN と ARH の結合分離を促進させることが示された。

以上、本論文は CUBN/AMN 受容体の新規結合蛋白質として NVL を同定し、また NVL が CUBN/AMN 受容体及びそのリガンドのエンドサイトーシスを促進する機能を有することを明らかにした。本研究はこれまで未知であった CUBN/AMN 受容体のエンドサイトー

シス制御機構を明らかにし、また核小体蛋白による膜受容体輸送制御という新しい分子メカニズムを提唱しており、上皮細胞におけるエンドサイトーシス制御機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。