

論文内容の要旨

申請者氏名 城島 知子

LRP1B は、LDL 受容体ファミリーの一員である。この受容体ファミリーは、リポタンパク質等の細胞内取り込みを行い、脂質代謝に寄与するのみと考えられていたが、最近では細胞外からのシグナル伝達にも関与することが示唆されている。

そこで、申請者は LRP1B のシグナル伝達への関与を明らかにする目的で、LRP1B の細胞内ドメインに結合するタンパクの単離及び機能解析を行った。更に LRP1B の生体内における機能を調べる目的で、LRP1B 遺伝子欠損マウスの作製を行っている。

LRP1B 細胞内ドメイン結合タンパクの探索のために、Yeast two-hybrid スクリーニングを行った結果、JNK シグナル伝達経路の足場タンパクである JIP-1b と JIP-2、グルタミン酸受容体の内在化に関連している PICK1、ERK シグナル伝達経路の活性調節や転写調節に関わる RanBPM、細胞の移動に関与する Grb7 と、ジストロフィン複合体の構成因子である SNTG2 を同定した。PICK1, RanBPM, Grb7 及び SNTG2 は、これまでに LDL 受容体ファミリーとの相互作用が報告されていない結合タンパクであった。

LRP1B と JIP-1b, PICK1 或いは RanBPM との哺乳動物細胞内での結合を確認するため、HEK293T 細胞に過剰発現させ、免疫沈降法を行い、これらが細胞内で機能的に結合していることを確かめた。

また、申請者は、種々の欠失変異体やアミノ酸置換変異体の解析から、LRP1B は、C-末端の疎水性アミノ酸領域で PICK1 の PDZ ドメインと結合し、また NPxY モチーフで JIP-1b と結合することを明らかにした。

PICK1 の機能の 1 つは、結合タンパク質のリン酸化の調節である。まず LRP1B の細胞内ドメインがリン酸化されるかを検証するために、LRP1B 細胞内ドメインタンパク質を作製し、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ の存在下で組み換え体 PKC α と反応させることにより、*in vitro* でのリン酸化アッセイを行ったところ、LRP1B は、PKC α によりリン酸化されることを明らかにした。次に、PICK1 や、PICK1 に結合しない LRP1B の変異体を作製し、これらを用いて実験を行った結果、PICK1 は LRP1B と結合することにより、PKC α による LRP1B のリン酸化を阻害することが明らかになった。

また LRP1B の生体内における機能を調べるために、LRP1B 遺伝子欠損マウスの作製を行ったが、顕著な異常は観察されなかった。LRP1 や他の LDL 受容体ファミリーが、LRP1B の機能を補っている可能性が高い。

本研究では、LRP1B の細胞内ドメインに結合する 6 つのタンパクを新たに単離した。この結果は、LRP1B も他の LDL 受容体と同様に、細胞内ドメインを介したシグナル伝達に関与している可能性が強く示唆している。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 城島 知子

LDL 受容体ファミリーは、脂質の代謝のみでなく、シグナル伝達に関与していることが知られている。これまでに LDL 受容体ファミリーの細胞内領域に結合するタンパクの研究から、このファミリーのシグナル伝達への関与が解明されてきた。本研究は、LDL 受容体ファミリーの1つ LRP1B のシグナル伝達機構を解明することを目的として行われた。

マウス成体脳の cDNA library を使用し、酵母 two-hybrid system による LRP1B の細胞内ドメインと会合する分子のスクリーニングを行った。その結果、LRP1B の細胞内ドメインに結合するタンパクとして JIP-1b, PICK1, RanBPM, JIP-2, Grb7, SNTG2 の6つを新たに単離した。スクリーニングにより同定された JIP-1b と JIP-2 を除く PICK1, RanBPM, Grb7, SNTG2 に関しては、これまでに LDL 受容体ファミリーとの結合が報告されていない。申請者は LRP1B と JIP-1b, PICK1, RanBPM とが実際に哺乳動物細胞内で結合していることを免疫沈降法により証明している。新たに見つかったこれら結合タンパク質は、いずれも細胞内シグナル伝達に深くかかわっている点で非常に興味深い結果である。

さらに申請者は LRP1B とこれらのタンパク質との結合の生理的意義を確かめるため、さまざまな実験を行っている。なかでも、*in vitro* における PKC α による LRP1B リン酸化の結果、LRP1B はリン酸化されることを発見し、この LRP1B のリン酸化が、LRP1B と PICK1 間の結合により阻害されることを明らかにした。また LRP1B は PKC の活性化により、LRP1B の内在化が阻害された。この LRP1B の内在化は、PICK1 存在下で促進された。このことから、LRP1B と PICK1 間の結合は、LRP1B のリン酸化を調節し、結果的に LRP1B の内在化を調節していることが示唆された。これまでに LRP1B のリン酸化やその意味に関する報告はなく、今回の結果は LRP1B の内在化に関する新たな知見である。

以上のように、本論文は LDL 受容体ファミリーに結合する新たなタンパクを複数同定しており、結合タンパクが細胞内シグナル伝達に関わる重要なタンパクであったことから、LDL 受容体ファミリーのシグナル伝達における重要性を明らかにした。また、LRP1B と結合するタンパクの1つである PICK1 による LRP1B のリン酸化阻害と LRP1B の内在化調節を明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。