

29【P2】Ⅲ-250

ラット Reduced Folate Carrier (RFC)の血管側膜局在化モチーフの検索
○大和田 香¹, 伊藤 晃成¹, 堀江 利治¹ (千葉大院薬)

[目的]Reduced Folate Carrier (RFC)は小腸上皮、腎尿管上皮、肝細胞、網膜上皮細胞で発現し、これら極性細胞での発現方向は組織により異なる。これまで我々はラット RFC の C 末細胞質ドメインを 10 アミノ酸ずつ 60 個まで欠失した変異体 $\Delta C10\sim\Delta C60$ を作製し、イヌ腎臓由来 MDCKII 細胞における局在を観察することで、膜貫通部位近傍の R452~V472 が lateral 膜への局在に重要であることを報告してきた。今回この領域に着目し、モチーフの絞込みを行った。**[方法]**RFC の C 末細胞質部分の途中 10 アミノ酸ずつを欠失させた $\Delta C452-462$ 及び、 $\Delta C462-472$ を作製し、N 末へ GFP を付加した融合蛋白として MDCKII 細胞に導入した。共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて lateral 膜への局在効率を定量化した。ライゼートを用いて N-glycosidase F 処理し、糖鎖修飾の程度を評価した。**[結果・考察]**C 末細胞質ドメインを 50 アミノ酸以上欠失させることで糖鎖修飾が未熟な core-glycosylation form のみが検出され、これに伴い lateral 移行性も顕著に低下した (72.7%→34.0%)。 $\Delta C452-462$ 、 $\Delta C462-472$ はいずれも糖鎖修飾は野性型同様に見られたが、 $\Delta C462-472$ のみが lateral 膜に移行し、 $\Delta C452-462$ は細胞質に留まった。両者のアミノ酸比較から $\Delta C462-472$ では野性型の 461~464 に存在する QAQA 配列が保たれていた。野性型でこの部分を EGEG に置換したところ、糖鎖修飾に影響なく lateral 移行性のみが消失した。以上の結果より、小胞体からのゴルジへの移行には C 末細胞質領域にある程度の長さが必要であり、更にゴルジから lateral 膜への移行には 461~464 の QAQA 配列がモチーフとして働いている可能性が示された。