

キュビリン断片およびアムニオンレス遺伝子を安定発現する
培養近位尿細管上皮細胞の樹立とその機能解析

鈴木哲世

新潟大学大学院医歯学総合研究科

生体機能調節医学専攻腎・膠原病内科学分野

(指導：成田一衛教授)

新潟医学会雑誌別刷 第126巻 第2号

(平成24年2月10日発行)

キュビリン断片およびアムニオンレス遺伝子を安定発現する 培養近位尿細管上皮細胞の樹立とその機能解析

鈴木 哲 世

新潟大学大学院医歯学総合研究科

生体機能調節医学専攻腎・膠原病内科学分野

(指導：成田一衛教授)

Establishment and Functional Analysis of a Proximal Tubule Cell Line
that Stably Express Cubilin Fragments and Amnionless

Akiyo SUZUKI

Division of Clinical Nephrology and Rheumatology

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Ichiei NARITA)

要 旨

腎臓の近位尿細管上皮細胞において、糸球体濾過タンパク質の再吸収（エンドサイトーシス）に重要な役割を担っている分子がメガリン、キュビリン、アムニオンレスである。メガリンは膜貫通領域を持つ巨大分子であるが、キュビリンは膜貫通領域を持たず、膜貫通領域を持つ分子であるアムニオンレスと結合し、複合体を形成する。メガリンとキュビリン-アムニオンレス複合体は互いに協調的に機能すると考えられているが、これらの分子間の相互作用を解析することは、近位尿細管上皮細胞のエンドサイトーシス機序の解明に重要である。そこで私は、FLAG タグ付きラットアムニオンレス（AMN-F）及びcMyc タグ付きのラットキュビリン断片（N末903アミノ酸）（Mini-CUB-C）をコードするcDNAをサブクローニングし、メガリンを発現するアムニオンレス及びキュビリンを発現しないラット近位尿細管由来細胞（IRPT細胞）に安定発現させた。この細胞を用いた免疫沈降反応において、Mini-CUB-CとAMN-Fは複合体を形成することが確認された。さらに免疫蛍光染色によって、Mini-CUB-Cが細胞膜表面でメガリンと共局在することが確認された。さらにこの細胞において、メガリンのリガンドであるラクトフェリンの細胞内取り込みが、対照のIRPT細胞に比較して有意に亢進すること

Reprint requests to: Akiyo SUZUKI
Division of Clinical Nephrology and
Rheumatology Niigata University Graduate
School of Medical and Dental Sciences
1-757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科生体機能調節医学
専攻腎・膠原病内科学分野 鈴木哲世

が認められた。これらの結果から、本細胞は、キュビリン-アムニオンレス複合体とメガリンの協調的なエンドサイトーシス機序を解析する上で有用なツールになることが示唆された。

キーワード：近位尿細管，メガリン，キュビリン，アムニオンレス，タンパク質再吸収，エンドサイトーシス

はじめに

腎臓の近位尿細管上皮細胞において、糸球体濾過タンパク質の再吸収に重要な役割を担う分子(エンドサイトーシス受容体)が、メガリン¹⁾とキュビリン²⁾⁻⁴⁾であり、両者は協同的に働くことが報告されている⁵⁾⁶⁾。メガリンは膜貫通領域を持つ巨大な受容体であるが、キュビリンは膜貫通領域を持たない²⁾。近年、キュビリンは膜貫通領域を持つ受容体アムニオンレスと結合して機能することが明らかになった⁷⁾⁸⁾。キュビリン-アムニオンレス複合体はキュバムとも呼ばれている⁸⁾。キュビリンとメガリンは糸球体を濾過したアルブミンをリソソームに運搬し代謝を促す⁹⁾¹⁰⁾。Genome-wide association study(全ゲノム相関解析)により、キュビリン遺伝子がアルブミン尿の発症に有意に相関するという知見が得られたことから、その重要性が明らかになった¹¹⁾。キュビリンはアルブミンの高親和性受容体として、メガリンは低親和性受容体として、互いに協調的に機能すると考えられている⁹⁾¹⁰⁾。ゆえに、これらの分子間の相互作用機序を明らかにすることは、アルブミン尿の発現機序の解明するうえで極めて重要である。

さらにキュビリン-アムニオンレス複合体(キュバム)は、ビタミンD結合タンパクなどのエンドサイトーシスにおいてもメガリンと協調的に働いている⁵⁾⁶⁾。一方、メガリンとキュバムは、それぞれが別個のリガンドと結合し(たとえばキュバムはビタミンB12-内因子結合体²⁾、免疫グロブリンL鎖¹²⁾、アポリポプロテインA-I¹³⁾などと結合する)、それらのエンドサイトーシスに関わっていることも知られており³⁾、両者の独立した機能と協調的な機能がどのように調節されているのか注目されている。

アムニオンレスは、粗面小胞体からゴルジ、細胞膜、さらにエンドソームへのキュビリンの輸送と、キュビリンのリガンド結合およびエンドサイトーシス機能の発現に関わることが知られている⁸⁾¹⁴⁾。しかし、キュビリンあるいはアムニオンレスとメガリンの相互関係の分子メカニズムは未だ十分に解明されていない。その大きな原因は、それらを解析するために有用な培養細胞系が知られていないことである。

そこで私は、遺伝子発現法を用いて、そのような細胞系を樹立し、メガリンとアムニオンレス及びキュビリンの相互関係の分子メカニズムを解明すべく、本研究を行った。

材料と方法

プラスミドの作製

1) FLAG タグ付きラットアムニオンレス cDNA の構築

ラット腎臓より ISOGEN (ニッポン・ジーン) を用いて抽出したトータル RNA を鋳型として、RT-PCR により、以下に示すプライマーを用いて、ラットアムニオンレスの全長配列を、3' 側に FLAG タグを付加した cDNA として増幅した(以下 AMN-F) (センス: ctctcgagagatgggtgcctgg, アンチセンス: cgcggtcctcacttgcctgcctccttgtagtgcgctctgcctctgctctccc)。これを制限酵素 Xho I 及び BamH I で消化後、レトロウイルスベクター pQCXIH (Clontech) に組み込んだ(以下 AMN-F/pQCXIH) (図 1A)。

2) cMyc タグ付きラットミニキュビリン cDNA の構築

上記と同様に、ラット腎臓 RNA を鋳型として、RT-PCR により、以下に示すプライマーを用いて、ラットキュビリンの開始コドンから 903 アミ

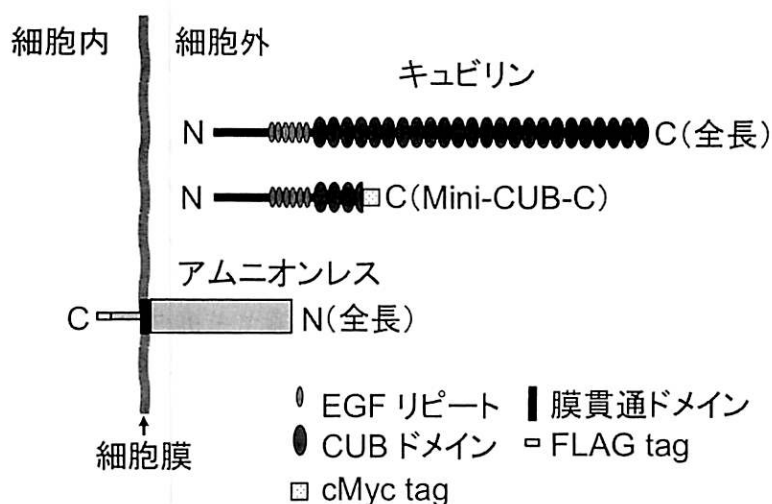


図1 遺伝子組み換え型ラットキュビリン及びアムニオンレスの構造

ラットキュビリンはN末端から27番目のCUBドメインまでが全長となるが、N末端から4番目のCUBドメインの途中まで(903アミノ酸)にcMyc-tagを付けたものをミニキュビリン(Mini-CUB-C)として発現させた。さらにラットアムニオンレスのC末端の停止コドン直前にFLAG-tagを付けたもの(AMN-F)を発現させた。

ノ酸までの領域を、ラットミニキュビリン cDNA として増幅した(センス: gagctggctgctgaggaa-catg, アンチセンス: gtcactgctgaacttagcc)。これを Spe I, Sal I で消化後、cMyc タグのアダプター(センス: ctgagcagaagcttataagcgaggagacctgtgag, アンチセンス: tcgactcacaggtcctcctcgttataagctt-ctgct)を組み込んだ。これを Sal I で消化後、平滑末端化し、さらに Not I で消化した。一方、pQCXIP ベクターを BamH I で消化後、平滑末端化し、Not I で消化した後、Myc タグ付きラットミニキュビリン(以下 Mini-CUB-C) cDNA を組み込んだ(以下 Mini-CUB-C/pQCXIP)(図 1B)。

細胞培養と遺伝子導入

HEK273T 細胞は 10% FBS を含む Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen), Immortalized rat proximal tubule (IRPT) 細胞は 5% FBS, 0.1mM non-essential amino acids (Invitrogen) 及び 25mM HEPES (Invitrogen) を含む DMEM を用いて、37°C, 5% CO₂ 下にて培

養した。なお IRPT 細胞は、内因性にメガリンを発現するが、アムニオンレスとキュビリンを発現しないことを RT-PCR, ウェスタンブロットで確認している(データ示さず)。100mm ディッシュで 70~75% の細胞密度に培養した HEK273T 細胞に対し、ProFection Mammalian Transfection System - Calcium Phosphate (Promega) を用いたリン酸カルシウム法により、上述の AMN-F/pQCXIH または Mini-CUB-C/pQCXIP を、レトロウイルスパッケージングベクター pKat2¹⁵ と共に遺伝子導入(トランスフェクション)した。24 時間又は 48 時間後の培養上清(ウイルス粒子)を 0.2µm のフィルター (Millipore) を用いて濾過した後、Polybrene (Millipore) (8µg/ml) を加え、IRPT 細胞の培養上清中に添加した(インフェクション)。添加 24 時間後に Puromycin (Invivogen) (3µg/ml) (Mini-CUB-C/pQCXIP 用) 又は Hygromycin (Invitrogen) (500µg/ml) (AMN-F/pQCXIH 用) を培地に添加し、目的タンパク質を発現する細胞のみを選択した。

ウエスタンブロッティング

IRPT細胞を、タンパク分解酵素阻害剤 (Complete, Roche) を加えた細胞溶解液 (0.5% Triton-X, 150mM NaCl, 20mM HEPES, pH7.4) で溶解し、冷却遠心機にて10,000g, 4℃で15分間遠心し、上清 (ライセート) を回収した。回収したライセートタンパク質15 μ g相当量を、等量のサンプルバッファー (125mM Tris-HCl (pH6.8), 10% 2-メルカプトエタノール, 10% SDS, 0.5% BPB, 20% グリセロール) と共に98℃, 5分間加熱処理後、SDS-PAGEで分離し、PVDFメンブレン (Millipore) 上に転写した。転写したメンブレンをブロッキングバッファー (5% FBS, 0.05% Tween20 含有 TBS) で室温, 1時間処理し、その後一次抗体を室温, 2時間反応させた。FLAG タグ付きラットアムニオンレス (以下 AMN-F) はマウスモノクローナル抗 FLAG M2 抗体 (SIGMA, F3165) を、cMyc タグ付きラットミニキュベリン (以下 Mini-CUB-C) はマウスモノクローナル抗 cMyc 抗体 (BIOMOL) を、メガリンはウサギ抗ラットメガリン抗体¹⁶⁾ をそれぞれ用いて検出した。反応後ブロッキングバッファーで洗浄し、二次抗体として抗マウス IgG (BIORAD) 又は抗ウサギ IgG (Dako) を用い、室温で1時間反応させた。反応後ブロッキングバッファーで洗浄し、SuperSignal (Thermo SCIENTIFIC) と LumiVisionPRO (アイシン) を用いて検出した。

免疫沈降反応

ウエスタンブロッティングと同様に細胞ライセートを調整し、300 μ g 等量と3 μ gの抗体及び15 μ lの Protein A, G アガロースビーズ (Calbiochem) を混ぜ、4℃, 16時間反応させた後、3,000g, 4℃で1分間遠心し、アガロースビーズを回収した。細胞溶解液で3回洗浄後、サンプルバッファーを加えて98℃, 5分間加熱処理し、SDS-PAGEに展開した後、ウエスタンブロッティングにて解析した。

免疫蛍光染色

AMN-F 及び Mini-CUB-C を安定発現する

IRPT細胞及び遺伝子未導入のIRPT細胞をカバーグラス (Fisherbrand) 上で培養後、4%パラホルムアルデヒドにて15分間固定し、ブロッキングバッファー (1% BSA, 0.07% Glycine 含有 PBS) で1時間処理した。その後抗 cMyc 抗体及び抗ラットメガリン抗体と室温, 2時間反応させた。ブロッキングバッファーで細胞を洗浄後、Alexa Flour 594 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Invitrogen, Life Technologies) 又は Alexa Flour 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen, Life Technologies) と室温で1時間反応させた。ブロッキングバッファーで細胞を洗浄し、FluoroMount (Diagnostic BioSystems) を用いてプレパラートに封入し、観察した。

ラクトフェリン, ラット血清アルブミン (RSA) の¹²⁵I 標識

ラクトフェリン (SIGMA) 及びラット血清アルブミン (RSA) (SIGMA) を IODO Beads (Thermo SCIENTIFIC) を用いて¹²⁵Iで標識し、遊離型の¹²⁵IはPD10カラム (GE Healthcare) を用いて除去した。標識の比活性はラクトフェリン, RSA 共に 1.6×10^6 cpm/ μ gであった。

ラクトフェリン, RSA の細胞取り込み・代謝評価

AMN-F 及び Mini-CUB-C を安定発現するIRPT細胞及び遺伝子未導入のIRPT細胞を、12穴プレートで100%の細胞密度になるまで、5% FBS, 0.1mM non essential amino acid (Invitrogen) 及び25mM HEPES (Invitrogen) を含むDMEMを用いて37℃, 5% CO₂下で培養後、FBSを含まない培地で16時間培養した。同じ培地で細胞を洗浄後、¹²⁵I標識したラクトフェリン又はRSAを100ng/ml濃度で培地に添加した。添加3時間後に培養上清を除去し、¹²⁵I標識ラクトフェリン又はRSAを取り込んだ細胞ライセートの放射活性を、オートウェルγシステム (日立アロカメディカル株式会社) を用いて測定した。

結 果

導入遺伝子の発現

AMN-F 及び Mini-CUB-C が、遺伝子導入の結果、IRPT 細胞に正しく発現されているかを確認するため、遺伝子導入された IRPT 細胞及び遺伝子未導入の IRPT 細胞のライセートに対し、抗 FLAG 抗体及び抗 cMyc 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。遺伝子導入された IRPT 細胞においては、それぞれの抗体で目的タンパク質のバンドが検出され、遺伝子未導入の IRPT 細胞においては検出されなかったことから、導入遺伝子は正しく発現されていることが確認された (図 2)。

AMN-F と Mini-CUB-C 及びメガリンとの複合体形成の解析

AMN-F 及び Mini-CUB-C が発現細胞において複合体を形成するかどうかを検討するため、AMN-F 及び Mini-CUB-C を発現する IRPT 細胞及び遺伝子未導入 IRPT 細胞のライセートを用いて、免疫沈降解析を行った。AMN-F と Mini-CUB-C のそれぞれに対して、抗 FLAG 抗体及び抗 cMyc 抗体を用いた免疫沈降反応により、両者のタンパク質の共沈を認めたことから、両者は複合体を形成することが確認された (図 2)。

しかし、AMN-F 及び Mini-CUB-C それぞれの免疫沈降反応において、内因性に発現しているメガリンとの共沈は確認できなかった (図 3)。また抗メガリン抗体を用いた免疫沈降反応においても AMN-F 及び Mini-CUB-C は内因性メガリンと共沈せず、メガリンとの複合体形成については確認できなかった (図 3)。

Mini-CUB-C とメガリンの細胞膜表面における共局在

AMN-F 及び Mini-CUB-C を発現する IRPT 細胞における Mini-CUB-C とメガリンの細胞内分布を、抗 cMyc 抗体及び抗メガリン抗体を用いて検討した。キュビリンはアムニオンレスと結合して細胞膜表面に局在することが知られてお

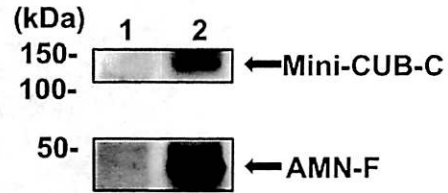


図 2 ウエスタンブロットによる遺伝子発現の確認

Mini-CUB-C の検出には抗 cMyc 抗体、AMN-F の検出には抗 FLAG 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。遺伝子未導入 IRPT 細胞 (1) および Mini-CUB-C、AMN-F 遺伝子導入 IRPT 細胞 (2) において、(1) では Mini-CUB-C 及び AMN-F のバンドが検出されていないのに対し、(2) では両者のバンドが検出され、導入遺伝子が発現していることが確認された。

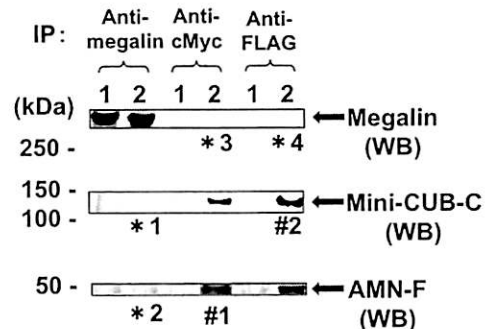


図 3 免疫沈降による相互作用の確認

遺伝子未導入 IRPT 細胞 (1)、Mini-CUB-C、AMN-F 遺伝子導入 IRPT 細胞 (2) のライセートについて、抗メガリン抗体を用いて免疫沈降 (IP) を行った沈降物に、抗メガリン抗体によるウエスタンブロット (WB) によってメガリンを検出したが、抗 cMyc 抗体及び抗 FLAG 抗体を用いた WB では、Mini-CUB-C、AMN-F の共沈を確認できなかった (*1, *2)。抗 cMyc 抗体で IP したものは、(2) において Mini-CUB-C と AMN-F が共沈することを確認できた (#1) がメガリンは共沈しなかった (*3)。抗 FLAG 抗体で IP したものにおいても、(2) においては Mini-CUB-C と AMN-F が共沈することを確認できた (#2) がメガリンは共沈しなかった (*4)。

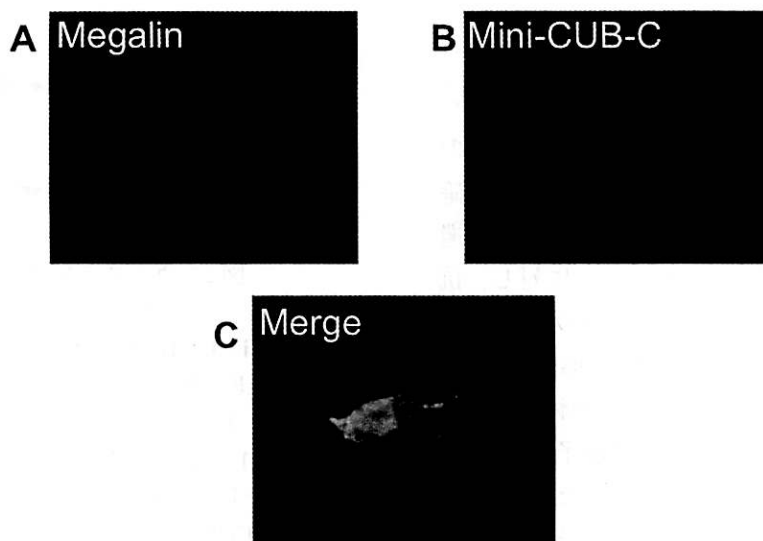


図4 免疫蛍光染色による細胞膜上の共局在の確認

Mini-CUB-C, AMN-Fを遺伝子発現したIRPT細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、細胞膜透過処理をせずに抗メガリン抗体(A)及び抗cMyc抗体(B)を反応させ、それぞれAlexa Flour 594標識ヤギ抗ウサギIgG抗体及びAlexa Flour 488標識ヤギ抗マウスIgG抗体を用いて染色した。それらの所見をマージさせた結果、細胞膜上においてメガリン及びMini-CUB-Cの共局在が認められた(C)。

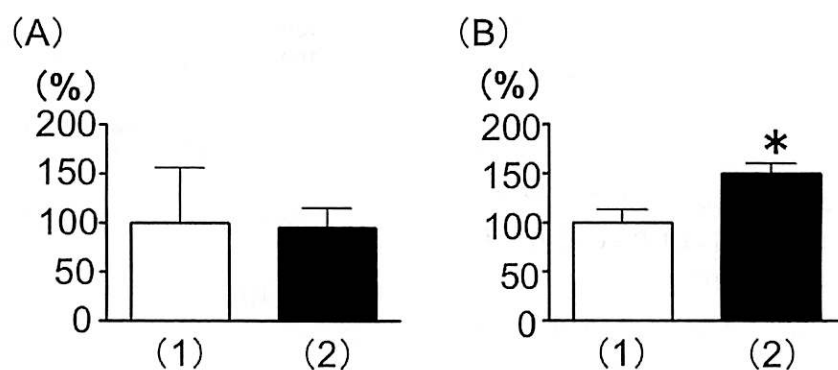


図5 ^{125}I 標識リガンドタンパク質の細胞取り込み

(A) 遺伝子未導入IRPT細胞(1), Mini-CUB-C, AMN-F遺伝子導入IRPT細胞(2)において、 ^{125}I 標識したラット血清アルブミン(RSA)の取り込みを示す細胞内取り込みカウントには、有意差が認められなかった。(B) 同様(1), (2)において、 ^{125}I 標識したラクトフェリンの細胞内取り込みカウントは、(2)において有意に高値を示した(* $p < 0.001$)。

り、メガリンも細胞膜表面において、それらと協同的な関係があることが知られている。今回の免疫蛍光染色では細胞膜に透過処理(permeabilization)を行っていないため、膜表面に局在してい

ない分子は染色されないが、Mini-CUB-C及びメガリンは細胞表面において染色され、さらに両者の細胞膜表面での共局在が確認された(図4)。

リガンドタンパク質の取り込みの解析

ラクトフェリンはメガリンの、RSAはメガリンおよびキュビリンのエンドサイトーシスリガンドである。AMN-F及びMini-CUB-Cを発現するIRPT細胞における¹²⁵I標識ラクトフェリン又はRSAの取り込み・代謝能について検討した。AMN-F及びMini-CUB-Cを発現している細胞では、発現していない細胞と比較して、¹²⁵I標識ラクトフェリンの細胞内取り込みカウントが有意に増加することが認められたが、¹²⁵I標識RSAにおいては細胞内取り込みカウントに差は認められなかった。このことから、IRPT細胞において、AMN-FとMini-CUB-Cの複合体は、ラクトフェリンの取り込みを促進するが、RSAの取り込みには寄与しないことが示された(図5)。

考 察

本研究において、私は、メガリンを発現するラット近位尿細管由来IRPT細胞に、FLAGタグ付きラットAMN-F及びcMycタグ付きラットMini-CUB-Cを発現させることに成功した。さらにAMN-FとMini-CUB-Cは複合体を形成すること、メガリンと同様に細胞膜表面に局在し、メガリンとの協調的なエンドサイトーシス機能に関わることを明らかにした。

AMN-Fは完全長の構造であったが、Mini-CUB-Cについては、C末側はCUBドメイン4の途中までの構造体であった(図1)。しかしそれでも両者の結合性が示されたことから、キュビリンがアムニオンレスと結合するために必要な構造はそのなかに含まれることが分かった。既報においても、キュビリンのアムニオンレスとの結合部位はN末端～74アミノ酸までEGF領域と推定されている¹⁴⁾。

さらに本研究において、AMN-FとMini-CUB-Cを発現するIRPT細胞のラクトフェリンの取り込みが、対照IRPT細胞と比較して亢進するが、RSAの取り込みは変化がないことが示された。アルブミンはメガリンとキュビリン共通のリガンドであることが分かっている¹⁷⁾。既報にお

いて、キュビリンのアルブミン結合領域はCUBドメイン6～8であると報告されている¹⁸⁾ことから、Mini-CUB-Cにはその結合領域が含まれないためにアルブミンの取り込みが亢進しなかった可能性がある。

そこで私は、CUBドメイン1～8まで、あるいはCUBドメイン1～13までを含むキュビリンのC末端にcMycタグを付けたcDNAを構築し、IRPT細胞にAMN-Fと共に発現させた。しかしこれらの細胞では、キュビリンタンパク質が二量体もしくは三量体を形成し、免疫沈降においてAMN-Fとも共沈しないという結果になった(データ示さず)。その理由は不明であるが、おそらく多量体を形成する過程でアムニオンレスとの結合領域がマスクされた可能性がある。

さらに、AMN-FとMini-CUB-Cの複合体が、メガリンと免疫蛍光染色上は共局在することが認められるものの、免疫沈降反応では結合性が認められなかった。このことは、キュビリンのメガリン結合領域がこの構築内には含まれていない可能性も示唆される。あるいはキュビリンとメガリンの相互作用には他のアダプター分子が必要で、それがIRPT細胞内には存在しないという可能性もある。また免疫沈降反応における界面活性剤などにより、その結合性が阻害された可能性も残っている。

本研究において、AMN-FとMini-CUB-Cの複合体を発現するIRPT細胞が、メガリンのリガンドであるラクトフェリン¹⁷⁾の細胞取り込みを亢進させたことから、直接キュビリンとメガリンの強固な結合性が認められなくとも、両者の間に機能的な協調性が存在し、キュビリン・アムニオンレスがメガリンを介するエンドサイトーシス機能を制御している可能性が示唆された。

以上、私は、AMN-FとMini-CUB-Cの複合体を発現するIRPT細胞を構築することによって、キュバム機能を解析するためのひとつの有用なツールを開発した。今後はさらに完全長に近いキュビリンを正確に発現させることが課題と考えられる。

結 論

私は、FLAG タグ付きラットアムニオンレス (AMN-F) 及び cMyc タグ付きのラットキュビリン断片 (N 末 903 アミノ酸) (Mini-CUB-C) を発現するラット近位尿細管由来細胞 (IRPT 細胞) を構築した。それらの発現産物は互いに結合し、メガリンのリガンドであるラクトフェリンの取り込みを亢進させた。メガリンと AMN-F 又はメガリンと Mini-CUB-C の直接的な結合性は認められなかったが、AMN-F/Mini-CUB-C 複合体はメガリンのエンドサイトーシス機能を制御している可能性が示唆された。本研究結果は、近位尿細管細胞における糸球体濾過タンパク質の再吸収の機序の解析に寄与すると考えられる。

謝 辞

最後に、本研究において御指導を賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科腎・膠原病内科学分野 成田一術教授、ならびに機能分子医学講座 斎藤亮彦特任教授に深謝致します。

参 考 文 献

- 1) Saito A, Pietromonaco S, Loo AK and Farquhar MG: Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalin," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*.91: 9725 - 9729, 1994.
- 2) Moestrup SK, Kozyraki R, Kristiansen M, Kaysen JH, Rasmussen HH, Brault D, Pontillon F, Goda FO, Christensen EI, Hammond TG and Verroust PJ: The intrinsic factor - vitamin B12 receptor and target of teratogenic antibodies is a megalin - binding peripheral membrane protein with homology to developmental proteins. *J Biol Chem*.273: 5235 - 5242, 1998.
- 3) Christensen EI and Birn H: Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*.3: 256 - 266, 2002.
- 4) Kozyraki R and Gofflot F: Multiligand endocytosis and congenital defects: roles of cubilin, megalin and amnionless. *Curr Pharm Des*.13: 3038 - 3046, 2007.
- 5) Nykjaer A, Fyfe JC, Kozyraki R, Leheste JR, Jacobsen C, Nielsen MS, Verroust PJ, Aminoff M, de la Chapelle A, Moestrup SK, Ray R, Gliemann J, Willnow TE and Christensen EI: Cubilin dysfunction causes abnormal metabolism of the steroid hormone 25 (OH) vitamin D (3). *Proc Natl Acad Sci U S A*.98: 13895 - 13900, 2001.
- 6) Willnow TE and Nykjaer A: Pathways for kidney-specific uptake of the steroid hormone 25-hydroxyvitamin D3. *Curr Opin Lipidol*.13: 255 - 260, 2002.
- 7) Fyfe JC, Madsen M, Hojrup P, Christensen EI, Tanner SM, de la Chapelle A, He Q and Moestrup SK: The functional cobalamin (vitamin B12) - intrinsic factor receptor is a novel complex of cubilin and amnionless. *Blood*.103: 1573 - 1579, 2004.
- 8) Strobe S, Rivi R, Metzger T, Manova K and Lacy E: Mouse amnionless, which is required for primitive streak assembly, mediates cell - surface localization and endocytic function of cubilin on visceral endoderm and kidney proximal tubules. *Development*.131: 4787 - 4795, 2004.
- 9) Cui S, Verroust PJ, Moestrup SK and Christensen EI: Megalin/gp330 mediates uptake of albumin in renal proximal tubule. *Am J Physiol*.271: F900 - 907, 1996.
- 10) Birn H, Fyfe JC, Jacobsen C, Mounier F, Verroust PJ, Orskov H, Willnow TE, Moestrup SK and Christensen EI: Cubilin is an albumin binding protein important for renal tubular albumin reabsorption. *J Clin Invest*.105: 1353 - 1361, 2000.
- 11) Boger CA, Chen MH, Tin A, Olden M, Kottgen A, de Boer IH, Fuchsberger C, O'Seaghdha CM, Pattaro C, Teumer A, Liu CT, Glazer NL, Li M, O'Connell JR, Tanaka T, Peralta CA, Kutalik Z, Luan J, Zhao JH, Hwang SJ, Akyzbekova E, Kramer H, van der Harst P, Smith AV, Lohman K, de Andrade M, Hayward C, Kollerits B, Tonjes A, Aspelund T, Ingelsson E, Eiriksdottir G, Launer LJ, Harris TB, Shuldiner AR, Mitchell BD, Arking DE, Franceschini N, Boerwinkle E, Egan J,

- Hernandez D, Reilly M, Townsend RR, Lumley T, Siscovick DS, Psaty BM, Kestenbaum B, Haritunians T, Bergmann S, Vollenweider P, Waeber G, Mooser V, Waterworth D, Johnson AD, Florez JC, Meigs JB, Lu X, Turner ST, Atkinson EJ, Leak TS, Aasarod K, Skorpen F, Syvanen AC, Illig T, Baumert J, Koenig W, Kramer BK, Devuyst O, Mychaleckyj JC, Minelli C, Bakker SJ, Kedenko L, Paulweber B, Coassin S, Endlich K, Kroemer HK, Biffar R, Stracke S, Volzke H, Stumvoll M, Magi R, Campbell H, Vitart V, Hastie ND, Gudnason V, Kardina SL, Liu Y, Polasek O, Curhan G, Kronenberg F, Prokopenko I, Rudan I, Arnlov J, Hallan S, Navis G, Parsa A, Ferrucci L, Coresh J, Shlipak MG, Bull SB, Paterson NJ, Wichmann HE, Wareham NJ, Loos RJ, Rotter JI, Pramstaller PP, Cupples LA, Beckmann JS, Yang Q, Heid IM, Rettig R, Dreisbach AW, Bochud M, Fox CS and Kao WH: CUBN is a gene locus for albuminuria. *J Am Soc Nephrol*.22: 555 - 570, 2011.
- 12) Batuman V, Verroust PJ, Navar GL, Kaysen JH, Goda FO, Campbell WC, Simon E, Pontillon F, Lyles M, Bruno J and Hammond TG: Myeloma light chains are ligands for cubilin (gp280). *Am J Physiol*.275: F246 - 254, 1998.
- 13) Kozyraki R, Fyfe J, Kristiansen M, Gerdes C, Jacobsen C, Cui S, Christensen EI, Aminoff M, de la Chapelle A, Krahe R, Verroust PJ and Moestrup SK: The intrinsic factor - vitamin B12 receptor, cubilin, is a high - affinity apolipoprotein A - I receptor facilitating endocytosis of high - density lipoprotein. *Nat Med*.5: 656 - 661, 1999.
- 14) Coudroy G, Gburek J, Kozyraki R, Madsen M, Trugnan G, Moestrup SK, Verroust PJ and Maurice M: Contribution of cubilin and amnionless to processing and membrane targeting of cubilin - amnionless complex. *J Am Soc Nephrol*.16: 2330 - 2337, 2005.
- 15) Finer MH, Dull TJ, Qin L, Farson D and Roberts MR: kat: a high - efficiency retroviral transduction system for primary human T lymphocytes. *Blood*.83: 43 - 50, 1994.
- 16) Hosaka K, Takeda T, Iino N, Hosojima M, Sato H, Kaseda R, Yamamoto K, Kobayashi A, Gejyo F and Saito A: Megalin and nonmuscle myosin heavy chain IIA interact with the adaptor protein Disabled - 2 in proximal tubule cells. *Kidney Int*.75: 1308 - 1315, 2009.
- 17) Christensen EI and Birn H: Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*.280: F562 - 573, 2001.
- 18) Yammani RR, Seetharam S and Seetharam B: Identification and characterization of two distinct ligand binding regions of cubilin. *J Biol Chem*. 276: 44777 - 44784, 2001.

(平成 23 年 8 月 19 日受付)