

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19590256

研究課題名（和文） 細胞膜型アミノ酸センサーの分子同定と機能解析

研究課題名（英文） Identification and functional characterization of plasma membrane amino acid sensors

研究代表者

金井 好克 (KANAI YOSHIKATSU)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60204533

研究成果の概要：哺乳類においては、細胞がアミノ酸供給量を感知する機構は明らかにされていない。本研究は、アミノ酸により哺乳類培養細胞に惹起される細胞増殖促進および p70S6 kinase のリン酸化には、アミノ酸トランスポーター阻害により抑制されるものと抑制されないものがあることを明らかにし、新たな細胞膜型アミノ酸センサーの存在を示した。また、細胞膜型アミノ酸センサーは Ca^{2+} シグナル系に連結する可能性を示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：アミノ酸、センサー、受容体、 Ca^{2+} シグナル、細胞膜

1. 研究開始当初の背景

細胞は、アミノ酸の供給量に応じて、タンパク質合成を含めた細胞内代謝を調節し、栄養環境に適応する機序を備えている。アミノ酸供給量と釣り合わないタンパク質合成や細胞増殖は、細胞内代謝の破綻を引き起こし、細胞死の引き金となる場合があるため、この代謝調節は細胞生存にとって極めて重要な意味を持つ。この代謝調節において、細胞へのアミノ酸供給量をモニターする感知機構が重要な位置を占めるため、このアミノ酸感知機構の研究は、多方面から進められてきた。

哺乳類においては、アミノ酸枯渇によりオートファジーが惹起されること、またアミノ酸に応答して種々の代謝調節が行われること、さらにアミノ酸に応答して mTOR (mammalian target of Rapamycin) 経路の活性が調節される等の観察に基づき、アミノ酸センサーの存在が想定されてきた。哺乳類におけるアミノ酸センサーの分子実体同定は、種々の観点から試みられており、一部において成果が得られたかに見えた。すなわち、2000 年に Ca^{2+} 感受性受容体が、多くのアミノ酸に対する応答能を有することが示され、

アミノ酸センサーの候補として可能性が指摘された。しかし、その発現部位とリガンド選択性から、古典的なアミノ酸センサーとは異なることが明らかになり、一般の細胞の代謝調節に働く哺乳類のアミノ酸センサーに関しては、分子的手掛かりが掴めていない。

2. 研究の目的

細胞は、アミノ酸の供給量に応じてタンパク質合成を含めた細胞内代謝を調節し、栄養環境に適応する代謝調節の機序を備えている。この代謝調節において、細胞へのアミノ酸供給量をモニターする感知機構（アミノ酸センサー）が重要な位置を占める。研究代表者らは、先行する研究の過程で、アミノ酸センサーには細胞内に存在するもの（細胞内アミノ酸センサー）と細胞表面に存在するもの（細胞膜型アミノ酸センサー）の2種があることを示唆する事実を見いだした。本研究は、その後者である細胞膜型アミノ酸センサーの実体を解明し、その機能的性質を明らかにしようとするものである。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた細胞膜型アミノ酸センサーの解析。

HeLa-S3細胞およびHEK293T細胞を16時間血清を除いた培地で培養し、その後2時間さらに血清およびアミノ酸を除いた培地で培養した。これらの細胞の細胞増殖速度に対するロイシン添加効果の濃度依存性を検討した。また、同様に処理し培養した細胞におけるp70S6 kinaseのリン酸化に対するロイシン添加効果の濃度依存性、時間依存性を検討した。p70S6 kinaseのリン酸化は、細胞溶解液の抗リン酸化p70S6 kinase抗体を用いたウェスタンブロットで評価した。さらに、同様に処理し培養した細胞にfluo-4負荷を負荷し、Ca²⁺動員を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(2) アフリカツメガエル卵母細胞への機能発現。

(1)と同様に培養処理したHEK293T細胞からpoly(A)⁺RNAを抽出し、アフリカツメガエル卵母細胞に注入することによって発現させた。二電極電位固定法により卵母細胞を-60mVに電位固定し、ロイシン添加による電流変化を観察した。

4. 研究成果

(1) 培養細胞系における細胞膜型アミノ酸センサーの解析。

アミノ酸枯渇状態で維持したHeLa-S3細胞がロイシンを高親和性に感知し、ロイシンの濃度依存的に増殖速度を変えること、及び同細胞が、インヒビターBCHによるアミノ酸トランスポーターの抑制により、BCHの濃度依

存的にp70S6 kinaseのリン酸化で評価したmTORシグナル系の活性を変えることを見いだした。また、HEK293T細胞も同様に濃度依存的に細胞増殖およびp70S6 kinaseのリン酸化においてロイシンに応答するが、それはBCHにより影響を受けないことが明らかになった。これにより、従来から存在が指摘されていた細胞内アミノ酸センサーに加え、細胞膜型のアミノ酸センサーの存在に確証が与えられた。同時に、HEK293T細胞が細胞膜型アミノ酸センサーのモデル細胞としての適切であることが示されたことになる。さらに、アミノ酸枯渇状態で維持したHEK293T細胞およびHeLa-S3細胞は、ロイシン添加により細胞内Ca²⁺動員が起こることをCa²⁺感受性色素fluo-4負荷により明らかにした。これは、細胞膜型アミノ酸センサーは、Ca²⁺動員に導くことを示すものであり、Gタンパク質共役型受容体をはじめとするCa²⁺動員に関わる細胞膜受容体に属することを示唆するものである。Ca²⁺動員と上記p70S6 kinaseのリン酸化との関連性については今後の検討課題であるが、新しいシグナル系の存在を強く示唆す成果である。

(2) アフリカツメガエル卵母細胞を用いた機能発現。

飢餓状態で維持したHEK293細胞からpoly(A)⁺RNAを抽出し、アフリカツメガエル卵母細胞に注入することにより発現させ、膜電位固定下で細胞外から与えたロイシンに対する膜電流変化を検討したところ、ロイシンよる内向き電流が観察された。これは、細胞内Ca²⁺動員を生じる受容体はアフリカツメガエル卵母細胞に発現させると同様に細胞内Ca²⁺上昇を引き起こし、細胞膜のCa²⁺感受性Cl⁻チャネルを活性化するためと考えられる。これによりアフリカツメガエル卵母細胞に細胞膜型アミノ酸センサーを機能発現することが可能であることが示された。本成果は、同時に細胞膜型アミノ酸センサーの機能発現クローニングのための機能評価系や、細胞膜型アミノ酸センサーリガンドの研究あるいは作用薬物の探索のための評価系を提供するものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計32件)

1) Prognostic significance of l-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (CD98) expression in stage I pulmonary adenocarcinoma. Kaira K, Oriuchi N, Imai H, Shimizu K, Yanagitani N, Sunaga N, Hisada T, Ishizuka T, Kanai

- Y, Nakajima T, Mori M. Lung Cancer. (査読有) 2009, in press
- 2) Correlation of angiogenesis with (18) F-FMT and (18)F-FDG uptake in non-small cell lung cancer. Kaira K, Oriuchi N, Shimizu K, Ishikita T, Higuchi T, Imai H, Yanagitani N, Sunaga N, Hisada T, Ishizuka T, Kanai Y, Endou H, Nakajima T, Endo K, Mori M. Cancer Sci. (査読有) 2009, in press
- 3) Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (CD98) expression in early stage squamous cell carcinoma of the lung. Kaira K, Oriuchi N, Imai H, Shimizu K, Yanagitani N, Sunaga N, Hisada T, Ishizuka T, Kanai Y, Endou H, Nakajima T, Mori M. Cancer Sci. (査読有) 2009 in press
- 4) L-type amino-acid transporter 1 as a novel biomarker for high-grade malignancy in prostate cancer. Sakata T, Ferdous G, Tsuruta T, Satoh T, Baba S, Muto T, Ueno A, Kanai Y, Endou H, Okayasu I. Pathol Int. (査読有) 59:7-18. 2009
- 5) Posttranslational regulation of Abcc2 expression by SUMOylation system. Minami S, Ito K, Honma M, Ikebuchi Y, Anzai N, Kanai Y, Nishida T, Tsukita S, Sekine S, Horie T, Suzuki H. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. (査読有) 296:406-13. 2009
- 6) Evaluation of thoracic tumors with (18) F-FMT and (18)F-FDG PET-CT: a clinicopathological study. Kaira K, Oriuchi N, Shimizu K, Ishikita T, Higuchi T, Imai H, Yanagitani N, Sunaga N, Hisada T, Ishizuka T, Kanai Y, Endou H, Nakajima T, Endo K, Mori M. Int J Cancer. (査読有) 124:1152-60. 2009
- 7) System L amino acid transporter inhibitor enhances anti-tumor activity of cisplatin in a head and neck squamous cell carcinoma cell line. Yamauchi K, Sakurai H, Kimura T, Wiriyasermkul P, Nagamori S, Kanai Y, Kohno N. Cancer Lett. (査読有) 276:95-101. 2009
- 8) A novel role of the C-terminus of b^{0,+} AT in the ER-Golgi trafficking of the rBAT-b^{0,+} AT heterodimeric amino acid transporter. Sakamoto S, Chairoungdua A, Nagamori S, Wiriyasermkul P, Promchan K, Tanaka H, Kimura T, Ueda T, Fujimura M, Shigeta Y, Naya Y, Akakura K, Ito H, Endou H, Ichikawa T, Kanai Y. Biochem J. (査読有) 417:441-8. 2009
- 9) Regulation of placental amino acid transporter activity by mammalian target of rapamycin. Root S, Kanai Y, Prasad PD, Powell TL, Jansson T. Am J Physiol Cell Physiol. (査読有) 296:142-150. 2008
- 10) Establishment and characterization of mammalian cell lines stably expressing human L-type amino acid transporters. Morimoto E, Kanai Y, Kim do K, Chairoungdua A, Choi HW, Wempe MF, Anzai N, Endou H. J Pharmacol Sci. (査読有) 108:505-16. 2008
- 11) Characterization of amino acid transport system L in HTB-41 human salivary gland epidermoid carcinoma cells. Park NS, Kim SG, Kim HK, Moon SY, Kim CS, Cho SH, Kanai Y, Endou H, Kim do K. Anticancer Res. (査読有) 28:2649-55. 2008
- 12) Mutations in glucose transporter 9 gene SLC2A9 cause renal hypouricemia. Matsuo H, Chiba T, Nagamori S, Nakayama A, Domoto H, Phetdee K, Wiriyasermkul P, Kikuchi Y, Oda T, Nishiyama J, Nakamura T, Morimoto Y, Kamakura K, Sakurai Y, Nonoyama S, Kanai Y, Shinomiya N. Am J Hum Genet. (査読有) 83:744-51. 2008
- 13) L-glutamate enhances methylmercury toxicity by synergistically increasing oxidative

- stress. Amonpatumrat S, Sakurai H, Wiriyasermkul P, Khunweeraphong N, Nagamori S, Tanaka H, Piyachaturawat P, Kanai Y. J Pharmacol Sci. (査読有) 108:280-289. 2008
- 14) L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression in primary and metastatic sites of human neoplasms. Kaira K, Oriuchi N, Imai H, Shimizu K, Yanagitani N, Sunaga N, Hisada T, Tanaka S, Ishizuka T, Kanai Y, Endou H, Nakajima T, Mori M. Cancer Sci. (査読有) 99:2380-6. 2008
- 15) BCH, an inhibitor of system L amino acid transporters, induces apoptosis in cancer cells. Kim CS, Cho SH, Chun HS, Lee SY, Endou H, Kanai Y, Kim K. Biol Pharm Bull. (査読有) 31:1096-100. 2008
- 16) Functional and immunochemical characterization of a novel organic anion transporter Oat8 (Slc22a9) in rat renal collecting duct. Yokoyama H, Anzai N, Ljubojevic M, Ohtsu N, Sakata T, Miyazaki H, Nonoguchi H, Islam R, Onozato M, Tojo A, Tomita K, Kanai Y, Igarashi T, Sabolic I, Endou H. Cell Physiol Biochem. (査読有) 21:269-78. 2008
- 17) Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) in neuroendocrine tumors of the lung. Kaira K, Oriuchi N, Imai H, Shimizu K, Yanagitani N, Sunaga N, Hisada T, Kawashima O, Iijima H, Ishizuka T, Kanai Y, Endou H, Nakajima T, Mori M. Pathol Res Pract. (査読有) 204:553-61. 2008
- 18) Enhanced tumor growth elicited by L-type amino acid transporter 1 in human malignant glioma cells. Kobayashi K, Ohnishi A, Promsuk J, Shimizu S, Kanai Y, Shiokawa Y, Nagane M. Neurosurgery. (査読有) 62:493-503.2008
- 19) Roles of organic anion transporters in the renal excretion of perfluorooctanoic acid. Nakagawa H, Hirata T, Terada T, Jutabha P, Miura D, Harada KH, Inoue K, Anzai N, Endou H, Inui K, Kanai Y, Koizumi A. Basic Clin Pharmacol Toxicol. (査読有) 103:1-8.2008
- 20) Differential Expression of System L Amino Acid Transporters during Wound Healing Process in the Skin of Young and Old Rats. Jeong MJ, Kim CS, Park JC, Kim HJ, Ko YM, Park KJ et al. Biol Pharm Bull, (査読有) 31, 395-399. 2008
- 21) Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 expression in resectable stage I-III nonsmall cell lung cancer. Kaira K, Oriuchi N, Imai H, Shimizu K, Yanagitani N, et al. Br J Cancer (査読有) 98, 742-748. 2008
- 22) The Membrane-Spanning Domain of CD98 Heavy Chain Promotes α β 3 Integrin Signals in Human Extravillous Trophoblasts. Kabir-Salmani M, Fukuda MN, Kanai-Azuma M, Ahmad N et al. Mol Endocrinol (査読有) 22,707-715, 2008
- 23) メタボロミクスによるトランスporter研究の新展開, 金井好克, 実験医学 (査読無) 26, 18-23. 2008
- 24) 腎生理のトピックス : 特に遺伝子改変動物とシグナル系に関して, 金井好克, 日腎会誌 (査読無) 50,1-4. 2008
- 25) メタボロミクスによるトランスporter研究の新展開, 実験医学 (査読無) 26, 18-23. 2008
- 26) 腎生理のトピックス : 特に遺伝子改変動物とシグナル系に関して, 日腎会誌 (査読無) 50,1-4. 2008
- 27) Fluorine-18-alpha-methyltyrosine positron emission tomography for diagnosis and staging of lung cancer: a clinicopat

hologic study. Kaira K, Oriuchi N, Otani Y, Shimizu K, Tanaka S, et al. Clin Cancer Res (査読有) 13,6369-6378. 2007

28) Spermatogenesis in aged rats after prenatal 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl exposure. Wakui S, Takagi F, Muto T, Yokoo K, Hirono S, et al. Toxicology (査読有) 238,186-191. 2007

29) Expression of LAT1 predicts risk of progression of transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. Nakanishi K, Ogata S, Matsuo, H, Kanai Y, Endou H, et al. Virchows Arch (査読有) 451,681-690. 2007

30) Gene expression profiles in T24 human bladder carcinoma cells by inhibiting an L-type amino acid transporter, LAT1. Baniasadi S, Chairoungdua A, Iribe Y, Kanai Y, Endou H, et al, Arch Pharm Res (査読有) 30,444-445. 2007

31) Novel liver-specific organic anion transporter OAT7 that operates the exchange of sulfate conjugates for short chain fatty acid butyrate. Shin HJ, Anzai N, Enomoto A, He X, Kim do K, Endou, et al. Hepatology (査読有) 45,1046-1055. 2007

32) Renal expression of organic anion transporter OAT2 in rats and mice is regulated by sex hormones. Ljubojevic M, Balen D, Brrljak D, Kusan M, Anzai N, et al. Am J Physiol Renal Physiol. (査読有) 292,361-372. 2007

[学会発表] (計 11 件)

1) 金井好克、Transportsomes in cellular function. 特定領域研究「膜輸送複合体」平成 20 年度公開シンポジウム、2009 年 1 月 28 日、京都市

2) 金井好克、New aspects of organic anion transport in renal tubular epithelia. 2009 IUPS International Conference of Physiological Sciences, 2009 年 1 月 16 日、Busan, Korea

3) 金井好克、メタボロミクスによるトランスポーターの生体内機能の解明、BMB 2008、平成 20 年 12 月 11 日、神戸市

4) 金井好克、トランスポーターの生体内機能の理解に向けてーメタボロミクス技術がトランスポーター研究にもたらすものー、トランスポーターワークショップ、2008 年 11 月 15 日、鶴岡市

5) 波多野亮、金井好克、Prostalandin (PG) 輸送体 OAT-PG/Prostaglandin 代謝酵素 15-PGDH 分子複合体の腎皮質局所 PGE2 クリアランスにおける役割、第 114 回日本薬理学会近畿部会、2008 年 11 月 14 日、神戸市

6) 金井好克、メタボロミクスによるトランスポーター機能の解析、トランスポーターワークショップ、2008 年 10 月 31 日、鶴岡市

7) 波多野亮、金井好克、腎皮質におけるプロスタグランジン E2 局所クリアランス機構の尿細管-糸球体フィードバックにおける役割の検討、第 14 回分子腎臓研究会、2008 年 9 月 6 日、東京都

8) 金井好克、アミノ酸輸送と細胞機能、アミノ酸学会第 2 回夏のシンポジウム、2008 年 8 月 31 日、松山市

9) 永森收志、金井好克、*C.elegans* amino acid transporter-6 (AAT-6), which does not possess a conserved cysteine, requires non-SS interaction with glyco-protein ATG-1 for the function. Gordon Research Conference Membrane Transport. Gordon

Research Conference Membrane Transport ,
2008 年 7 月 22 日、Lucca, Italy

10) 波多野亮、金井好克、新規腎特異的プロスタグランジン輸送体 OAT-PG の同定と生理機能の検討、生理研研究会『上皮膜輸送制御の分子機構：体内環境恒常性維持機構解明を目指して』2008 年 7 月 16 日、岡崎市

11) 波多野亮、金井好克、腎特異的 Prostaglandin 輸送体 OAT-PG と Prostaglandin 代謝酵素 15-PGDH の近位尿細管側基底膜側における機能共役について、第 113 回日本薬理学会近畿部会、2008 年 6 月 20 日、岡山市

[図書] (計 2 件)

1) 金井好克、Annual Review 腎臓、「腎尿細管における Mg²⁺輸送」(分担執筆)中外医学社, 2009

2) 金井好克、アミノ酸トランスポーター：過去、現在、そして未来へ「トランスポータ科学最前線」(分担執筆)京都廣川書店, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金井 好克 (KANAI YOSHIKATSU)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：60204533

(2) 研究分担者

研究者番号：30439187
永森 收志 (NAGAMORI SHUSHI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：90467572

(3) 連携研究者

平田 拓 (HIRATA TAKU)
杏林大学・医学部・助教
研究者番号：60372918
福富 俊之 (FUKUTOMI TOSHIYUKI)
杏林大学・医学部・助教
研究者番号：30439187