

平成22年 5月 5日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20770101
 研究課題名(和文) 再構成系によるアミノ酸輸送複合体LAT1・4F2hcとインテグリンの相互作用解析
 研究課題名(英文) Study of functional and physical interactions between an amino acid transporter complex LAT1-4F2hc and Integrin by using Reconstituted proteoliposomes
 研究代表者
 永森 收志 (NAGAMORI SHUSHI)
 大阪大学・医学系研究科・助教
 研究者番号：90467572

研究成果の概要(和文)：必須アミノ酸を細胞内に取り込むための輸送体(トランスポーター)の一つであるLAT1(L-type amino acid transporter 1)はCD98/4F2hcと呼ばれる補助因子と結合し、その機能を発揮する。本研究ではLAT1の機能の詳細を解析する実験系を構築に成功し、補助因子がLAT1の活性に必要でないことを示した。さらにintegrin以外の補助因子結合タンパク質としてAnnexin IIを同定し、新しい制御機構の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：LAT1(L-type amino acid transporter 1) is one of the transporters which uptake essential amino acids. Expression of the function requires an interacting partner, CD98/4F2hc. In this study, a new experimental system has been developed to study LAT1-function in detail and it is shown that CD98/4F2hc is not essential for the function. Furthermore, Annexin II was identified as a CD98/4F2hc-binding protein beside integrin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物科学

キーワード：トランスポーター, プロテオリポソーム, 膜複合体, ガン

1. 研究開始当初の背景

| アミノ酸は、生体にとって重要な栄養素で

あり蛋白質生合成など多くの生体反応の基質として使われている。またシグナル分子としての役割も持ち、多様な生体反応に関与している。LAT1(L-type amino acid transporter 1)は、多くの必須アミノ酸を含む大型中性アミノ酸を Na⁺非依存的に輸送する System L アミノ酸輸送体(交換体)である。LAT1は、発生初期や悪性腫瘍細胞に多く発現している。このことから、LAT1は腫瘍細胞の成長・増殖過程において非常に重要な輸送体であると考えられている。実際、LAT1の発現抑制は抗腫瘍効果を示す。

12回膜貫通型蛋白質であるLAT1は、1回膜貫通型糖蛋白質である補助サブユニット(CD98/4F2hc)とジスルフィド結合を介して複合体を形成する。同様にSLC7ファミリーに含まれる類縁の複数のアミノ酸輸送体とともにHAT(heteromeric amino acid transporter)サブファミリーを形成している。いずれもヘテロ二量体を形成することによって特定の膜ドメインに局在し、はじめて機能を発現する。LAT1の細胞膜局在に4F2hcが必須な一方で、4F2hcがアミノ酸輸送にどのように関与するか明らかになっていなかった。また、4F2hcとインテグリンβサブユニットの相互作用も報告されていたことから、インテグリンを介した4F2hcによるアミノ酸輸送の制御が存在する可能性が示唆されていた。インテグリンは細胞接着や情報伝達に関与する重要な膜蛋白質複合体であるが、アミノ酸輸送とは直接関係ないと考えられていた。これらのことから、LAT1のアミノ酸輸送活性能そのものに対する4F2hcの関与、さらにはインテグリンを含むCD98/4F2hc結合タンパク質のアミノ酸輸送活性に対する関与を解析することは、膜輸送にのみならず癌や細胞接着を含む細胞生物学研究全体にとっても急務であった。

ところが、上記の課題を解決するために非常に有効である、トランスポーターの大量発現、精製、リボソームへの再構成的手法を用いた詳細な解析が、哺乳類の膜輸送体研究分野では、技術的に困難からほとんど行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、先述の課題を解決するためLAT1、4F2hc単体および複合体の発現系・精製法を開発し、さらに精製した輸送体蛋白質(トランスポーター)をリボソームに再構成し、プロテオリボソームでトランスポーターの輸送活性を測定する再構成系の構築を目

的とした。それによって他の因子の影響を除いた状態かつ生体膜内同様に脂質の存在下で蛋白質間相互作用や蛋白質機能が解析できることが期待された。さらには、インテグリン以外の相互作用タンパク質の探索を行い、蛋白質間相互作用がアミノ酸輸送活性に及ぼす影響を解析することを試みた。具体的には以下を本研究の目的とした。

- LAT1・4F2hc単体および複合体の発現系および精製・再構成系の構築
- 精製蛋白質を用いた活性測定系の構築
- 再構成リボソームを用いたアミノ酸輸送活性の詳細な解析
- LAT1のアミノ酸輸送能に対する4F2hcの及ぼす影響の解明
- LAT1・4F2hc複合体の多量体形成がアミノ酸輸送活性に及ぼす影響の解析
- LAT1・4F2hc複合体とインテグリンの機能的相互作用の解析
- LAT1・4F2hc複合体に結合する新規蛋白質の探索とその解析

3. 研究の方法

(1)アミノ酸輸送体LAT1、4F2hcおよびLAT1・4F2hc複合体の精製とリボソームへの再構成系構築

発現系・大量発現系を哺乳類、昆虫、酵母や細菌の多様な系を用いて開発を進め、昆虫細胞にバキュロウイルスを用いた発現系で目的蛋白質の大量発現を行った。特に複合体を発現させる場合、LAT1と4F2hcがほぼ同程度同時に発現することが出来るように同一のプラスミド上にそれぞれの遺伝子を配置した。得られた大量発現細胞の全膜画分を分画し、様々な界面活性剤を用いてLAT1や4F2hcもしくはその複合体の最適可溶化条件の検討を行った。また発現系から得られた全膜画分を、最適な可溶化効率を示した界面活性剤を用いて可溶化し、さらにリボソームに再構成したプロテオリボソームを使った輸送活性測定系の開発を進めた。

タグ融合蛋白質を用いることでLAT1、4F2hc単体と複合体の精製法を確立し、SPA(Scintillation Proximity Assay)法を用いた可溶性精製蛋白質の活性測定系を開発した。精製蛋白質を用いた再構成プロテオリボソーム系による輸送測定系を開発し、アミノ酸輸送活性の詳細な解析を行った。

(2)LAT1・4F2hc複合体の蛋白質相互

作用解析

哺乳類細胞を用いた発現系で、LAT1・4F2hc 複合体が多量体形成を行うか解析した。さらに、新規結合蛋白質の探索を免疫沈降法及び GST-4F2hcN 末端融合蛋白質を用いたプルダウン法によって行った。結合蛋白質は、質量分析器 LC-MS を用いて同定した。同定した結合蛋白質と LAT1・4F2hc 複合体、インテグリンの機能的相互作用を免疫沈降法によって解析した。siRNA 法によりノックダウン実験を行い、結合蛋白質の機能を解析した。

4. 研究成果

(1) アミノ酸輸送体 LAT1、4F2hc および LAT1・4F2hc 複合体の精製とリポソームへの再構成系構築

アミノ酸輸送体 LAT1 単独および LAT1・4F2hc 複合体の精製とリポソームへの再構成系を構築しアミノ酸輸送活性の詳細を解析するため、発現系・大量発現系を昆虫細胞 Sf9 もしくは High five にバキュロウイルスで目的蛋白質を発現させる系を用いて開発を行った。その結果、LAT1 及び LAT1・4F2hc 蛋白質複合体の大量発現、精製蛋白質や粗精製膜面分を用いた再構成系構築に成功した。これによって、LAT1・4F2hc 複合体のアミノ酸輸送活性の詳細な解析が可能となった。SPA (Scintillation Proximity Assay) 法を用いた可溶性精製蛋白質の活性測定系を開発したことにより、可溶性状態において LAT1 単独で基質の一つであるロイシンへの結合活性を保持することがはじめて明らかになった。さらにこの成果により、LAT1 の阻害剤スクリーニングのハイスループット化が可能になり、新規 LAT1 阻害剤の探索、すなわち新しいタイプの抗がん剤のスクリーニングを迅速に行うことが出来るようになった。

(2) LAT1・4F2hc 複合体の蛋白質相互作用解析

培養細胞系を用いた LAT1・4F2hc 複合体の解析において、LAT1・4F2hc 複合体がさらに二量体以上の複合体を形成していることを示した。このことから、4F2hc 分子同士の結合及び解離が機能制御に関与していることが考えられる。また LAT1・4F2hc 複合体に結合する因子として、共免疫沈降法で得られた試料を質量分析器によって解析することで、Anexin II を同定した。さらに詳細を、GST-プルダウン法やキメラ蛋白質を用いた共免疫沈降法で解析した結果、Anexin II は 4F2hc の N 末端に結合していることが分かった。N 末端は LAT1・4F2hc 複合体とインテグリンの相互作用部位でもあることから、

Anexin II 制御に関与している可能性が示唆された。また、ノックダウン実験により、Anexin II が細胞内リン酸化シグナルを制御していることを示す結果を得た。また、LAT1 の C 末端に結合する蛋白質も得られている。今後、これらの蛋白質の相互作用を多面的に解析することで LAT1・4F2hc 複合体の新たな機能が明らかになると期待される。これらをまとめたものが図 1 である。

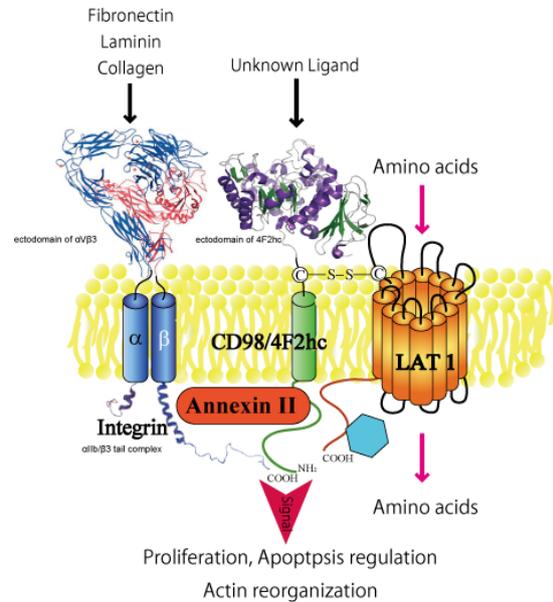


図 1 LAT1・4F2hc 複合体と結合蛋白質

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 5 件)

- 1) A novel transporter of SLC22 family specifically transports prostaglandins and co-localizes with 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in renal proximal tubules. Shiraya K, Hirata T, Hatano R, Nagamori S, Wiriyasermkul P, Jutabha P, Matsubara M, Muto S, Tanaka H, Asano S, Anzai N, Endou H, Yamada A, Sakurai H, Kanai Y. *J Biol Chem.* (査読有) May 6, 2010 (Epub. ahead of print)
- 2) 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
- 3) A novel role of the C-terminus of b⁰+AT in the ER-Golgi trafficking of the rBAT-b⁰+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) 417:441-448.2009
 - 4) 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: 744-751. 2008
 - 5) 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

[学会発表] (計9件)

- 1) 永森收志他、癌特異的アミノ酸トランスポーターLAT1 を介した PET リガンド L-[3-F]-α-methyltyrosine (FAMT) の輸送キネティクス、第83回日本薬理学会年会、2010年3月18日、大阪府・大阪市
- 2) Pattama Wiriyasermkul, 永森收志他、The substrate recognition for PET ligands by L-type amino acid transporter 1 (LAT1), a key transporter for cancer cell growth、第32回日本分子生物学学会、2009年12月12日、神奈川県・横浜市
- 3) 永森收志他、メタボロミクスを用いた新規有機アニオントランスポーターOatn1の生体内における機能の解析、第116回日本薬理学会近畿部会、2009年11月13日、滋賀県・大津市
- 4) Pattama Wiriyasermkul, 永森收志他、Characterization of substrate recognition site in L-type Amino acid transporter 1 (LAT1)、The 36th congress of International Union of Physiological Sciences、2009年7月31

- 日、京都府・京都市
- 5) K.Promchan, K.Takafuji, T.Kimura, S.Nagamori, Y.Kanai、Annexine A2-P11 Complex Interacts with CD98hc、The 36th congress of International Union of Physiological Sciences、2009年7月31日、京都府・京都市
 - 6) 永森收志他、Characterization of an orphan transporter in SLC 7 family、The 36th congress of International Union of Physiological Sciences、2009年7月31日、京都府・京都市
 - 7) 永森收志他、腫瘍細胞型アミノ酸トランスポーターLAT1を介したPETリガンドL-[3-F]-α-methyltyrosine (FAMT)の輸送キネティクス、第115回日本薬理学会近畿部会、2009年6月26日、石川県・金沢市
 - 8) 永森收志他、Substrate recognition of L-type amino acid transporter 1, LAT1, and transport kinetics of its PET ligand L-[3-F]-α-methyltyrosine, FAMT, Gordon Research Conference: Mechanisms Of Membrane Transport、2009年6月15日、米国・メイン州ウオータービル
 - 9) 永森收志他、*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、イタリア Lucca

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：