

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659052

研究課題名（和文）新しいカテゴリーの膜貫通型受容体 4F2hc のシグナル機構の解明

研究課題名（英文）Signaling mechanisms of a novel-type transmembrane receptor 4F2hc

研究代表者

金井 好克 (KANAI YOSHIKATSU)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60204533

研究成果の概要（和文）：細胞の活性化や腫瘍化に伴い発現の上昇する 1 回膜貫通型タンパク質 4F2hc のシグナル機構を明らかにする目的で、4F2hc を含む分子複合体の解析、リン酸化プロテオミクスによる網羅的シグナル解析を行い、4F2hc の細胞内結合タンパク質を探索した。その結果、4F2hc は CD147 とともに、複数のトランスポーターと複合体を形成すること、4F2hc・LAT1 複合体の刺激により MAP キナーゼ系に影響せず mTOR 系を活性化すること、4F2hc 細胞内結合タンパク質がシグナル伝達に寄与することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：To reveal the signaling mechanisms mediated by a single-membrane spanning protein 4F2hc upregulated on cellular activation and in cancer cells, we have analyzed molecular complexes involving 4F2hc, preformed comprehensive signaling-pathway analysis using phosphoproteomics and searched for proteins binding to the intracellular domain of 4F2hc. We have found that 4F2hc together with CD147 forms multimolecular complexes with several transporters, the stimulation of 4F2hc/LAT1 complex activate mTOR pathway without acting on MAPK pathway and an intracellular domain binding protein mediates 4F2hc signaling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	0	1,800,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	300,000	3,100,000

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：受容体、シグナル情報伝達系、輸送体、細胞増殖、リン酸化、細胞膜

1. 研究開始当初の背景

4F2hc は、細胞の活性化や腫瘍化に伴い発現の上昇する多機能性の 1 回膜貫通型タンパク質として知られるが、その機能の実体は捉えられていない。

4F2hc は、リンパ球の活性化抗原として見いだされ、腫瘍細胞に高発現する 1 回膜貫通

型のタンパク質である。その機能的な意義は長い間不明であったが、1998 年に研究代表者らは、アミノ酸トランスポーターとジスルフィド結合を形成し細胞膜移行を媒介する補助因子であることを明らかにした。ところが、その機能は単純なものでなく、さらに 4F2hc の発現が細胞増殖と相関することを見いだ

し、4F2hc をインスリンプロモーターにより膵臓ランゲルハンス島β-細胞に強制発現させるとランゲルハンス島の肥大とβ-細胞の増殖が起こることが明らかになった。また他のグループにより、培養細胞に過剰発現させることにより形質転換が惹起されること、インテグリンと結合すること、細胞融合を誘発することが示され、その多機能性がクローズアップされた。また、4F2hc の細胞外ドメインの結晶構造が発表されたが、糖鎖修飾酵素グリコシダーゼとの相同性のある活性中心に相当する部分が大きく開き、あたかも受容体となり得るかのような構造であった。しかし、以上のように細胞にとって重要な役割が示唆されながら、未だに4F2hc の機能の実体が捉えられておらず、細胞外から結合するリガンドも、細胞内のシグナル機構も明らかにされていない。

2. 研究の目的

4F2hc は、強制発現により p70 S6 kinase を賦活化し、また細胞増殖を促進することから、4F2hc が細胞外リガンドにより活性制御され細胞内結合タンパク質を介してシグナル系にリンクする膜貫通型受容体であると想定した。本研究は、そのシグナル機序を明らかにすることを目的として行われた。

3. 研究の方法

(1) 4F2hc を含む複合体の解析。

4F2hc を含む分子複合体を明らかにするために、HeLa S3 細胞に対して抗 4F2hc を用いて免疫沈降し、共沈降するタンパク質を質量分析により解析した。

(2) リン酸化プロテオーム解析。

リン酸化プロテオーム解析によりシグナルの全体像をとらえるため、定量型 質量分析計を用いた網羅的定量プロテオミクスを立ち上げ、解析に使用した。

(3) 4F2hc の細胞内結合タンパク質の同定。

4F2hc の N-末端の細胞内ドメインと Glutathione-S-transferase (GST) との融合タンパク質を用いたプルダウンアッセイによって、4F2hc の細胞内結合タンパク質を探索した。

4. 研究成果

(1) 4F2hc を含む分子複合体。

抗 4F2hc を用いた免疫沈降により、4F2hc と共沈降するタンパク質を質量分析により解析したところ、以下のタンパク質が 4F2hc と複合体を形成することが示唆された：LAT1 (SLC7A5)、CD147、xCT (SLC7A11)、CD59、MCT1 (SLC16A1)、ASCT2 (SLC1A5)、MCT4 (SLC16A3)、Peptidyl-prolyl cis-trans

isomerase A。LAT1 については、ジスルフィド結合により 4F2hc と直接結合することは以前に明らかにしていたが、それに加えて、本研究により 4F2hc は、CD147、CD59 とともに、アミノ酸トランスポーターLAT1、xCT、ASCT2、モノカルボン酸トランスポーターMCT4 を含んだ大きな分子複合体を形成している可能性が提示された。このうち抗体が得られるものについて、複合体内に存在することを実証した。

(2) 細胞内シグナルの網羅的把握。

リン酸化プロテオーム解析を用いることで、4F2hc の活性化によってリン酸化が変動するタンパク質を網羅的に明らかにすることが可能となった。HeLa S3 細胞において、4F2hc と複合体を形成するアミノ酸トランスポーターLAT1 の基質ロイシンによって細胞を刺激した際、およびその阻害剤で処理した際の細胞を何も処理していない対照細胞と比較し、網羅的定量リン酸化プロテオミクスにより解析した。その結果、8,475 個のリン酸化ペプチド断片を同定できたが、そのうち 732 個がロイシンによってリン酸化が誘導され、43 個がロイシンによってリン酸化が低下した。リン酸化の上昇したペプチド断片のうち、490 個がロイシンによってリン酸化が誘導され阻害剤によって減少するもの、すなわち 4F2hc・LAT1 複合体の下流のリン酸化シグナルを反映するものとして特定された。そのなかには、p70S6K や 4EBP1 等で代表される mTOR シグナル系の分子群が含まれる。また、MAP キナーゼ経路のシグナル分子群は、リン酸化が変動しないことも明らかになった。

(3) 4F2hc の細胞内結合タンパク質。

シグナル経路への連結の機序を明らかにするために、プルダウンアッセイによって、4F2hc N-末端に結合するタンパク質を探索した。その結果、アネキシンが 4F2hc の細胞内ドメインに結合することが明らかになった。両者の結合は、共免疫沈降により確認された。アネキシンのノックダウンにより p70S6K のリン酸化が変化することから、このタンパク質間相互作用が 4F2hc を介するシグナルに寄与することが示唆された。

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 17 件)

1) Tanaka H., Takafuji K., Taguchi A., Wiryasermkul P., Ohgaki R., Nagamori S., Suh P-G., Kanai Y. Linkage of N-cadherin to Multiple Cytoskeletal Elements Revealed by a Proteomic Approach in Hippocampal Neurons.

Neurochem Int. in press. 2012 査読有

2) Wiryasermkul, P. Nagamori S, Tominaga H, Oriuchi N, Kaira K, Nakao H, Kitashoji T, Ohgaki R, Tanaka H, Endou H, Endo K, Sakurai H and Kanai Y. Transport of 3-fluoro-L- α -methyl tyrosine by tumor-pregulated amino acid transporter LAT1: a cause of the tumor uptake in PET. J Nucl Med, in press 2012 査読有

3) Chronic maternal infusion of full-length adiponectin in pregnant mice down-regulates placental amino acid transporter activity and expression and decreases fetal growth. Rosario FJ, Schumacher MA, Jiang J, Kanai Y, Powell TL, Jansson T. J Physiol. 590, 1495-1509, 2012 査読有

4) Correlation of L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression with triple negative breast cancer prognosis. Furuya M, Horiguchi J, Nakajima H, Kanai Y, Oyama T. Cancer Sci. 103(2), 382-389, 2012 査読有

5) Sex hormones induce a gender-related difference in renal expression of a novel prostaglandin transporter, OAT-PG, influencing basal PGE2 concentration. Hatano R, Onoe K, Obara M, Matsubara M, Kanai Y, Muto S, Asano S. Am J Physiol Renal Physiol. 302(3), 242-349, 2012 査読有

6) L-type amino acid transporter 1 (LAT1) expression in malignant pleural mesothelioma. Kaira K, Oriuchi N, Takahashi T, Nakagawa K, Ohde Y, Okumura T, Murakami H, Shukuya T, Kenmotsu H, Naito T, Kanai Y, Endo M, Kondo H, Nakajima T, Yamamoto N.

Anticancer Res. 31(12):4075-4082, 2011 査読有

7) Pathogenic GLUT9 mutations causing renal hypouricemia type 2 (RHUC2). Kawamura Y, Matsuo H, Chiba T, Nagamori S, Nakayama A, Inoue H, Utsumi Y, Oda T, Nishiyama J, Kanai Y, Shinomiya N. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 30(12), 1105-1111, 2011 査読有

8) Identification of ABCG2 dysfunction as a major factor contributing to gout. Matsuo H, Takada T, Ichida K, Nakamura T, Nakayama A, Takada Y, Okada C, Sakurai Y, Hosoya T, Kanai Y, Suzuki H, Shinomiya N. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids., 30(12), 1105-11, 2011 査読有

9) ABCG2 is a high-capacity urate transporter and its genetic impairment increases serum uric acid levels in humans. Nakayama A, Matsuo H, Takada T, Ichida K, Nakamura T, Ikebuchi Y, Ito K, Hosoya T, Kanai Y, Suzuki H, Shinomiya N. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids., 30(12), 1091-7, 2011 査読有

10) Relationship between LAT1 expression and response to platinum-based chemotherapy in non-small cell lung cancer patients with postoperative recurrence. Kaira K, Takahashi T, Murakami H, Shukuya T, Kenmotsu H, Naito T, Oriuchi N, Kanai Y, Endo M, Kondo H, Nakajima T, Yamamoto N.

Anticancer Res. 31(11), 3775-82. 2011, 査読有

11) A seven-transmembrane receptor that mediates avoidance response to dihydrocaffeic acid, a water-soluble

repellent in *Caenorhabditis elegans*. Aoki R, Yagami T, Sasakura H, Ogura K, Kajihara Y, Ibi M, Miyamae T, Nakamura F, Asakura T, Kanai Y, Misu Y, Iino Y, Ezcurra M, Schafer WR, Mori I, Goshima Y. *J Neurosci.*, 31(46), 16603-10, 2011 査読有

12) LAT1 expression is closely associated with hypoxic markers and mTOR in resected non-small cell lung cancer. Kaira K, Oriuchi N, Takahashi T, Nakagawa K, Ohde Y, Okumura T, Murakami H, Shukuya T, Kenmotsu H, Naito T, Kanai Y, Endo M, Kondo H, Nakajima T, Yamamoto N. *Am J Transl Res.*, 3(5), 468-78. 2011 査読有

13) Transportsomes and channelsomes: are they functional units for physiological responses? Mori Y, Kiyonaka S, Kanai Y. *Channels (Austin)*. 5(5), 387-390, 2011 査読有

14) Role of amino acid transporter LAT2 in the activation of mTORC1 pathway and the pathogenesis of crescentic glomerulonephritis. Kurayama R, Ito N, Nishibori Y, Fukuhara D, Akimoto Y, Higashihara E, Ishigaki Y, Sai Y, Miyamoto K, Endou H, Kanai Y, Yan K. *Lab Invest.* 91(7), 992-1006, 2011 査読有

15) 金井好克: 生体膜トランスポーター研究の現状と展望、*膜* 36: 128-138, 2011 査読有

16) 金井好克: 開発中の次世代の治療薬: SGLT阻害薬、*Mebio* 28: 111-117, 2011 査読無

17) 金井好克: 神経伝達物質トランスポーターの新展開、*脳* 21 14:302-304, 2011 査読無

[学会発表] (計 18 件)

1) 金井好克: Proteomics and metabolomics approaches to membrane transporters: Comprehensive analysis of epithelial transport function., 2012 International Symposium on Pharmacogenomics: "One Step Toward Personalized Medicine", 2012 年 1 月 30 日, Seoul, Korea

2) 金井好克: アミノ酸の細胞取込み機構とエイジング、第28回臨床フリーラジカル会議、2012年1月20日、亀岡

3) 金井好克: アミノ酸誘導体によるトランスポーターを標的とした癌の PET 診断と癌抑制薬、新アミノ酸分析研究会第一回学術講演会、2011 年 12 月 9 日、東京

4) 金井好克: 輸送体と疾患、第 51 回茨城腎研究会講演会、2011 年 11 月 29 日、つくば

5) 金井好克: アミノ酸化合物による腫瘍特異性の高い PET 診断とトランスポーター抑制の抗腫瘍効果、ランチョンセミナー「アミノ酸が未来を造る」、第 33 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2011 年 11 月 24 日、岡山

6) 金井好克: 癌のアミノ酸トランスポーターと代謝制御、シンポジウム「がんの代謝制御」、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 24 日、京都

7) 金井好克: Usefulness of metabolomics in the analysis of *in vivo* function of transporters, International Forum on the Development of Traditional Chinese Medicine, 2011 年 9 月 21 日、Tianjin, China

8) 金井好克: Metabolomics and proteomics in transporter research in relevance to DMPK study, 2011 ISSX/CSSX Workshop-Optimization of ADMET/DMPK Research Capacity, 2011年9月18日、Tianjin, China

- 9) 金井好克: アミノ酸トランスポーターと疾患: 特別講演 シスチン尿症と悪性腫瘍を中心に、日本尿路結石症学会第21回学術集会、2011年8月26日、千葉
- 10) 金井好克: 網羅的プロテオミクスが明らかにする栄養摂取、病態、加齢等による栄養動態変動の機序、第1回生活習慣病予防のための機能性食品開発に関する研究会、2011年7月25日、大阪
- 11) 金井好克: “Transportsome”, the multi-molecular assemblies for transport-transport and transport-metabolism couplings. Symposium Bio-inspired Materials and Functionalities, 2011年6月22日, Groningen, The Netherlands
- 12) 金井好克: アミノ酸の細胞への取り込み機構と加齢、シンポジウム「筋萎縮と同化・異化作用」、第11回日本抗加齢学会総会、2011年5月27日、京都
- 13) 金井好克: 悪性腫瘍のトランスポーター: その診断・治療の分子標的としての意義、シンポジウム「トランスポーターからみた医薬品安全性評価」、第18回HAB研究機構学術年会、2011年5月20日、東京
- 14) 金井好克: 薬理学からみた脳卒中、ランチョンセミナー、第52回日本神経学会学術大会、2011年5月18日、名古屋
- 15) 金井好克: 特別講演 生体膜トランスポーター研究の現状と展望、日本膜学会第33年会、2011年5月12日、東京
- 16) 金井好克: Tumor imaging and development of potential anti-tumor therapeutics targeting an amino acid transporter., 4th Asia Pacific Regional ISSX Meeting, 2011年4月23日、Tainan, Taiwan
- 17) 金井好克: Transport-metabolism coupling mediated by transportsomes in

epithelial cells., *Frontiers in Epithelial Transport* 2011, 2011年4月15日、Seoul, Korea

18) 金井好克: トランスポーターと体内物質動態、シンポジウム「チャネル・トランスポーターによる生体機能制御とその破綻」、第28回日本医学会総会、2011年4月9日、東京

[図書] (計3件)

- 1) 金井好克: 栄養素トランスポーター: その研究の進展と今後の課題、pp.153-161
書籍名: 栄養・食品機能とトランスポーター
竹谷豊・薩秀夫・伊藤美紀子・武田英二編 建帛社 : 2011, 総ページ数: 291
- 2) 金井好克: アミノ酸輸送体とその異常、pp.258-262 書籍名: 小児腎臓病学 飯島一誠・薩秀夫・関根孝司・金子一成編 診断と治療社 2011 総ページ数: 459
- 3) 金井好克: ハルトナップ (ハートナップ) 症候群、pp.527-527 症候群ハンドブック 井村裕夫・福井次矢・辻省次編 中山書店 2011 総ページ数: 757

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

大垣 隆一 (OHGAKI RHUICHI)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 20467525