

氏名 佐藤勝輝
 学位(専攻分野) 博士 (医学)
 学位記番号 論医博第1693号
 学位授与の日付 平成11年5月24日
 学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
 学位論文題目 4F2 (CD98) Heavy Chain Is Associated Covalently with an Amino Acid Transporter and Controls Intracellular Trafficking and Membrane Topology of 4F2 Heterodimer
 (4F2抗原H鎖はアミノ酸トランスポーターと会合し、細胞内輸送及び細胞膜における4F2抗原ヘテロダイマー形成を制御している。)

論文調査委員 (主査) 教授 月田承一郎 教授 淀井淳司 教授 湊長博

論文内容の要旨

4F2 (CD98) 抗原は胎児性癌抗原であり、活性化リンパ球を含むほとんどの増殖性細胞や癌細胞に発現される120 kDaの膜型糖蛋白質で、ジスルフィド結合した80 kDaのH鎖と37 kDaのL鎖より成る。H鎖の一次構造は既にそのcDNAクローニングより明らかとなっているが、L鎖についてはH鎖と共沈する分子として知られている以外、その構造についても全くわかっていなかった。4F2 H鎖が broad-specificity amino acid transporter (BAT) と30%の homology を持つことより、L鎖もアミノ酸輸送に関与する分子である可能性が疑われた。今回、抗マウス4F2抗原L鎖モノクローナル抗体を樹立し、4F2抗原の分子的性状を解析するとともに、この抗体を用いL鎖の遺伝子クローニングを行った。

4F2 L鎖は512アミノ酸より構成され、hydrophobicで、おそらくは12回膜貫通蛋白であると推定された。Gen Bank searchにてこのCDNAは最近報告されたラットL-type amino acid transporter-1 (LAT1)のマウスのcounterpartであることが明らかとなった。また、4F2 H鎖には2ヶ所のcysteine (103,325)があるが、各々をserineに置き換えたmutationを用い、L鎖とcotransfectしたところ、ジスルフィド結合に必要なのは103番目のcysteineであることが明らかとなった。

これまで4F2 H鎖cRNAを単独でXenopus oocytesに導入するとarginineのuptakeが上昇することが明らかとなっている。一方、4F2 L鎖cRNAを単独で導入してもleucineとarginineのナトリウム非依存性の取り込みはごく軽度の亢進を認めただけであった。さらに両者を導入するとナトリウム非依存性にleucineの取り込みの亢進が認められた。そして、種々のアミノ酸による阻害実験の結果より、4F2 L鎖は哺乳類細胞で機能的に同定されていたsystemLと呼ばれていたアミノ酸トランスポーターであることが明らかとなった。

次に4F2 H鎖、L鎖の発現様式を明らかにする目的でH鎖cDNA、L鎖cDNAを単独あるいは同時にCOS細胞に発現させた。H鎖は単独でも細胞膜表面に発現を認めるが、4F2 L鎖はH鎖を伴わなければ細胞膜表面には発現しないことが明らかとなった。さらに、4F2 H鎖がCOS細胞固有のL鎖と会合する可能性を否定するため、ジスルフィド結合できないH鎖(C103S)を用いて単独で発現させても細胞膜に発現を認めた。これをL鎖と共発現させると両者はジスルフィド結合ができないにもかかわらず、両者ともに細胞膜に発現を認めた。これらの結果はHeLa細胞を用いた免疫組織学的解析にて同様であった。以上より4F2 H鎖はL鎖を細胞膜へと誘導する分子であり、この際に両者のジスルフィド結合は必要でないことが明らかとなった。

正常マウスリンパ球においては4F2 H鎖、L鎖ともにConAによるmitogen刺激にてすみやかに誘導された。また、種々の癌細胞株においても両者はともに強く発現を認めた。成獣マウスにおけるmRNAの発現は両者ともにubiquitousに同程度認めたが、腎臓、小腸、肝臓においてはL鎖の発現が明らかに減弱していた。

4F2抗原の発現局在を胎児性癌細胞株 OTF 9 を用いて解析すると endogenous な 4F2H鎖は細胞-細胞間接着面に強く発現を認めた。この発現の局在が、カドヘリンの局在と同様であるため、E-カドヘリンのない線維芽細胞株 Lcell を用いて検討した。Lcell では 4F2H鎖は diffuse に発現していた。Lcell に stable にしカドヘリンあるいは N-カドヘリンを発現させた細胞株においては、4F2H鎖は細胞-細胞間接着面に局在し、カドヘリンと colocalize していた。免疫沈降ではいずれの細胞株においても H鎖は L鎖と会合を認めた。以上の結果より、カドヘリンによって細胞-細胞間接着が誘導されると、4F2H鎖は L鎖を伴って細胞-細胞間接着面の細胞膜に局在することが明らかとなった。最後に正常組織における 4F2H鎖の局在を検討した。マウス胎児の免疫組織学的解析では 4F2H鎖はほとんどの組織の上皮系細胞の表面に発現していた。小腸や腎臓のような極性のある上皮細胞においては、4F2H鎖の発現は細胞株において E-カドヘリンと colocalize しているのと同様に、lateral adhesion site に局在していた。また、4F2H鎖と L鎖はほとんどの組織で共に発現を認めるが、腎臓や小腸においては、H鎖は非還元状態にて 120 kDa のヘテロダイマーを形成して存在するにもかかわらず、その L鎖を抗 L鎖モノクローナル抗体では検出できないことがわかった。このことより、4F2L鎖には今回単離した L鎖以外にも複数存在する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

4F2抗原はリンパ球の活性化抗原として報告された分子であり、ほとんどの増殖性細胞や癌細胞に発現される膜型糖蛋白質で、80 kDa の H鎖と 37 kDa の L鎖より成る。H鎖の一次構造は既に明らかとなっているが、L鎖については全くわかっていなかった。今回、抗マウス 4F2抗原 L鎖モノクローナル抗体を樹立し、これを用い L鎖の遺伝子を単離し、4F2抗原の分子的、機能的性状を解析した。

4F2L鎖は最近報告されたラット L-type amino acid transporter-1 のマウスの counterpart であった。機能的解析より 4F2L鎖は哺乳類細胞で機能的に同定されていた system L と呼ばれていたアミノ酸トランスポーターであることが明らかとなった。両者の発現様式については、H鎖は単独でも細胞膜表面に発現を認めるが、L鎖は H鎖を伴わなければ細胞表面には発現しないこと、カドヘリンによって細胞-細胞間接着が誘導されると、H鎖は L鎖を伴って細胞-細胞間接着面の細胞膜に局在することが明らかとなった。また、H鎖と L鎖はほとんどの組織で共に発現を認めるが、腎臓や小腸においては H鎖は今回単離した L鎖以外の分子と会合している可能性が示唆された。

以上の研究は、細胞におけるアミノ酸輸送の解明に貢献し、細胞生物学の進展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 11 年 3 月 1 日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。