

氏名 (本籍)	まつ 松	もと 本	やす 康	ひろ 浩
学位の種類	博 士 (薬 学)			
学位記番号	薬 博 第 277 号			
学位授与年月日	平 成 12 年 3 月 23 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専門課程	東北大学大学院薬学研究科 (博士課程) 分子生命薬学専攻			
学位論文題目	GP125/CD98 light chain (LC) 及び隣接分子の性状 解析			

(主 査)

論文審査委員	教授 榎 本 武 美	教授 大 泉	康
		教授 山 添	康

論文内容要旨

GP125/CD98は分子量85kDaのheavy chain (hc)と40kDaのlight chain (lc)がジスルフィド結合した細胞表面糖蛋白で、扁平上皮基底層などの増殖性組織、活性化リンパ球および癌細胞で強く発現していることから、細胞増殖、リンパ球活性化、細胞癌化に密接に関連した蛋白と推定される。実際、抗CD98hcモノクローナル抗体(mAb)は癌細胞増殖やリンパ球活性化を阻害し、CD98hc遺伝子導入はマウス線維芽細胞を悪性化するので、CD98は機能的にも重要な分子と考えられる。この他に、細胞凝集、細胞接着、アミノ酸輸送等との関連も報告されていることから、このような多様な役割をCD98がいかに演じ分けているのかは極めて興味深い。本研究ではCD98の構造機能相関の解明をめざし、CD98lcおよび隣接分子の解析を行った。

1) CD98hcとlcのmRNA発現の解析

最近、Mastroberardinoら、金井らのグループによりCD98lcの候補として中性アミノ酸輸送蛋白であるラットLAT1がアフリカツメガエル卵母細胞での発現クローニングにより同定された。LAT1はCD98hcと共発現により、輸送活性が見られること、さらにその発現は癌細胞以外に脳、脾臓、大腸、精巣、胎盤で見られることが分かっている。そこで本研究ではPTP-CRにてマウスLAT1cDNAをクローニングし、マウスCD98hcとlc(LAT1)のmRNA発現をRT-PCRにて比較した。その結果、LAT1mRNAはCD98hcとLAT1では、その発現パターンは必ずしも一致せず、hcと結合する複数のlcの存在が示唆された。その後、LAT1に加えてy+LAT1、y+LAT2、LAT2、xCT、lc6がCD98lcとして報告された。これら6種類のCD98lc蛋白ファミリーは単独でのアミノ酸輸送活性はなく、CD98hcとの会合によって輸送活性を持つこと、また一部のCD98lc蛋白については、その局在が単独では細胞質中、CD98hcと共発現によって細胞膜上に移行することが明らかにされている。y+LAT2とlc6を除くCD98lcファミリー4種間のアミノ酸配列の相同性を調べたところ、LAT1はLAT2と36.3%、y+LAT1と33.2%、xCTと26%の相同性があった。またCD98hcとジスルフィド結合するのに必要なシステイン残基について調べたところ、マウスLAT1の165番目のアミノ酸が他のCD98cファミリー分子と共通のシステイン残基だった。この箇所はN末から数えて2番目の細胞外領域にあたり、このシステイン残基とCD98hcがジスルフィド結合をしていると考えられる。

2) 新規のCD98LCを認識するmAbの作製と性状解析

当教室に置いていてもCD98lcの単離同定のため、抗CD98hc mAbを用いてCD98蛋白複合体を精製し、ラットCD98lc蛋白を分離している。本研究では、この蛋白をマウスに免疫し、その脾細胞とマウスミエローマ細胞をポリエチレングリコール法により融合し、無血清培地によりハイブリドーマを選別した。スクリーニングはWestern blotにより行い、3F2と6B4mAbの2種類の抗体を得た。これらのmAbは還元条件で40kDa、非還元条件で125kDaのバンドを検出し、さらにSandwich ELISA、マイクロビーズを用いたフ

ローサイトメトリー解析で mAb 認識抗原が CD98hc と会合していることが示された。また、パラホルムアルデヒド固定後、Triton X-100処理したヒト、マウスおよびラット癌細胞と mAb との反応性が認められたことより、今回作製した mAb の認識エピトープが動物種を越えて良く保存されていることが明らかとなった。細胞染色の結果、CD98hc と今回作製した mAb が認識する新規 lc は主に核周囲の細胞質で局在の一致が見られた。このことから CD98hc は LAT1 などの既知 lc を細胞質から細胞表面へ運ぶ単なるキャリアーとしての機能だけでなく、細胞質でも何らかの機能を担っている可能性が考えられる。新規 CD98lc 蛋白がアミノ酸輸送以外の役割をしている可能性も否定できない。また組織染色の結果から、lc が hc と単独（会合しない形）でも存在する可能性が示された。

精製40kDa 蛋白の部分アミノ酸配列 (L1) についてホモロジー検索を行った結果、グルタミン酸輸送蛋白の EAAC1 と約70%のホモロジーが見出された。L1 は LAT1, LAT2, y+LAT1, y+LAT2, xCT, lc6のいずれの既知 lc にも含まれない配列であり、新たな CD98lc の存在が強く示唆された。ところで、新規 lc は細胞質、特に核周囲に分布していることから、細胞膜上でアミノ酸トランスポーターとして機能している可能性以外に、小胞体膜上などでそれ以外の機能を担っている可能性も考えられる。

3) 新規 CD98lc および CD98hc 隣接分子の探索

今回作製した mAb を用いてヒト胎児脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、mAb と大腸菌蛋白との反応性が認められた。このことから mAb の認識エピトープが哺乳類だけでなく、微生物にも広く保存されている可能性が示された。そのため、今回作製した mAb を用いた認識抗原のクローニングには、微生物を用いた一般的な cDNA ライブラリーのスクリーニングは不適と判断した。

また、精製40kDa 蛋白の部分アミノ酸配列 (L1) を基に作製したアンチセンスオリゴヌクレオチドをプローブとして Northern blot を行った結果、大脳、肺、食道、腎（髄質）、胸腺、脾臓、子宮で21kb および 8 kb に強いシグナルが検出された脳での強い発見が認められたことから、ラット C6グリオーマ cDNA ライブラリーを用いてスクリーニングを行ったが、部分アミノ酸配列を含んだクローンは単離出来なかった。精製40kDa 蛋白の部分アミノ酸配列にはロイシンのような重複（縮重）コドンを持つアミノ酸が多く含まれていたことで、特異性が低いプローブとなってしまったため、擬陽性のクローンを拾ったと考えられる。

CD98のアミノ酸輸送以外の機能解明を目的にヒト CD98hc 全長あるいは細胞内領域を bait として two-hybrid system によるスクリーニングを試みたが、残念ながら、その解明に役立つような分子の同定には至らなかった。Two-hybrid system は酵母内に蛋白を発現させることから、細胞質蛋白や核内蛋白などの比較的親水性の高い蛋白の支配遺伝子はクローニングは難しかったと考えられる。また蛋白間相互作用には蛋白の二次構造も大きな要因になると思われ、今回用いたような短い断片（細胞内領域）では蛋白が相互作用できる構造を維持できなかった可能性も考えられる。

4) ヒト EAAC1 cDNA のクローニングおよび発現解析

精製40kDa 蛋白と EAAC1 との構造類似性が示唆された。そこで、EAAC1 の解析が新規 CD98lc の構造解明につながる可能性を考え、ヒト EAAC1 の PCR クローニングを行った。その結果、524アミノ酸のヒト EAAC1 (正常型) の他にアミノ酸31-77番目を欠く477アミノ酸の EAAC1 (欠失型) が見出された。この欠失型 EAAC1 はマウス、ラットでは認められないヒト特異的な分子種で、その発現パターンは正常型のものと同様一致していた。

5) tEAAC1 蛋白の解析および CD98と EAAC1 との相互作用の検討

欠失型 EAAC1 が蛋白として発現しているか否かを調べるため、抗 EAAC1 ペプチド mAb を作製した。作製した mAb を用いた Western blot 解析により、正常型 EAAC1 に相当する54kDa のバンドの他に欠失型に相当する50kDa のバンドも検出できたことから、欠失型 EAAC1 蛋白の存在が明らかとなり、この分子種が何らかの生理機能を担っていることをうかがわせた。また、抗 EAAC1 ペプチド mAb を用いた解析より、CD98hc と EAAC1 が会合している可能性も示唆された。以上、CD98hc が1種類ではなく多くのタイプのアミノ酸トランスポーターの制御に関わっていることが明らかとなってきた。その機構として、CD98hc は細胞が置かれている環境や状況に応じて会合する相手分子が異なることがあげられよう。

ここ最近、相次いで CD98lc が同定されたことで、CD98がアミノ酸トランスポーターとしての機能を司っていることは確実となったが、どのようなメカニズムでアミノ酸輸送を行っているのか、また CD98lc ファミリーはそれぞれ基質特異性の異なるアミノ酸輸送蛋白であることから、CD98hc は会合するlcをどのように使い分けるのかといった点は今後の重要な検討課題である。ところで、CD98のシグナル伝達系はほとんどわかっていない。アミノ酸輸送以外で最近明らかにされつつある多様な機能との関わりを解明するには CD98hc と相互作用する分子の同定が重要であり、今後はそのような分子の同定により、CD98の機能が理解されることが考えられる。それにより著者らが特に解明したいと考えてきた細胞癌化のメカニズム解明に一石が投じられることを期待する。

審査結果の要旨

GP125/CD98 は分子量85 kDa の heavy chain (HC) と40kDa の light chain (LC) がジスルフィド結合した細胞表面糖蛋白で、細胞増殖、リンパ球活性化、細胞癌化に密接に関連していると考えられている。この他に、細胞凝集、細胞接着、アミノ酸輸送等との関連も報告されており、CD98が多様な役割をいかに演じ分けているのかは極めて興味深い。本研究は CD98の機能解明をめざし、CD98LC 及び隣接分子の解析を行ったものである。

1) CD98HC と LCの mRNA 発現の解析

最近、CD98の LC として中性アミノ酸輸送蛋白の LAT1 がヒト及びラットで単離同定された。そこで、マウス LAT1 とマウス CD98HC の部分配列をプライマーとして RT-PCRを行うことにより、CD98HC、LC の mRNA の発現を解析した。両者とも癌細胞や胎児組織で高発現していたが、正常組織では HC と LC の発現が一致しないところがあることを示し、HC が複数の LC とヘテロダイマーを形成する可能性があることを明らかにした。

2) 新規 CD98LC を認識するモノクローナル抗体 (mAb) の作製と性状解析

既知のいずれの LC とも異なる精製 CD98LC 蛋白を免疫原にして、ラット及びヒットの40kDa の蛋白と特異的に反応する 2 種類の mAb を作製した。この抗体を用いて、CD98HC と、この LC の局在が主に核周辺で一致すること、LC が単独でも存在すること、組織間で LC の構造多様性があることを示した。

3) 新規 EAAC1 のクローニングと mRNA 発現パターンの解析

新規 LC 蛋白と細胞膜を10回貫通するグルタミン酸輸送蛋白 EAAC1 との相同性が見いだされた。そこで、ヒト EAAC1 の cDNA の PCR クローニングを行い、524アミノ酸をコードする既知の fEAAC1 に加えて、N 末端から最初の細胞外領域31-77番目のアミノ酸が欠失した tEAAC1 が存在することを見いだした。両者の発現パターンが種々の細胞で一致していたことにより、共通の転写制御機構の存在が示唆された。

4) tEAAC1 蛋白の解析、及び CD98 と EAAC1との相互作用の検討

新たに抗 EAAC1 ペプチド mAb を作製し、Western blot により EAAC1 に相当する55kDa とtEAAC1 の50kDa バンドを検出し、tEAAC1 が実際に蛋白として発現されていることを確認した。また、抗 CD98mAb 結合マイクロビーズと抗 EAAC1mAb を用いた解析により、CD98 と EAAC1 とが結合していることを明らかにした。

以上、本研究により新規 CD98LC が同定され、また、EAAC1 と CD98HCとの結合が示された。これは多機能分子 CD98の機能解明の突破口となりえる成果である。

よって、本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。