

## 사람 골모세포 FOB에서 아미노산 수송계 L의 발현 및 역할

김창현 · 박주철 · 김도경<sup>†</sup>

조선대학교 치과대학 구강생물학연구소

### Expression and Role of the System L Amino Acid Transporter in FOB Human Osteoblast Cells

Chang-Hyun Kim, Joo-Cheol Park and Do Kyung Kim<sup>†</sup>

Oral Biology Research Institute, College of Dentistry, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

#### Abstract

Amino acid transporters play an important role in supplying nutrition to normal and cancer cells for cell proliferation. Amino acid transport system L is a major nutrient transport system responsible for the Na<sup>+</sup>-independent transport of neutral amino acids including several essential amino acids. The system L is divided into two major subgroups, the L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and the L-type amino acid transporter 2 (LAT2). In the present study, we have examined the expression and functional characterization of system L amino acid transporters in FOB human osteoblast cells. RT-PCR and western blot analysis have revealed that the FOB cells expressed LAT1, LAT2 together with their associating protein 4F2hc. The uptakes of [<sup>14</sup>C]L-leucine by FOB cells are Na<sup>+</sup>-independent and almost completely inhibited by system L amino acid transporter selective inhibitor, 2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid (BCH). These results suggest that the transport of neutral amino acids including several essential amino acids for cellular nutrition into the FOB human osteoblast cells is mediated by system L amino acid transporters.

**Key words:** nutrition to cells, L-type amino acid transporters, FOB cells, essential amino acids, BCH

#### 서 론

아미노산은 단백질 합성의 기질이 되며, 효소, 호르몬 및 신경전달물질들의 합성에 필수적이다. 세포 안에서 필요한 아미노산은 세포막에 위치하고 있는 아미노산 수송체(amino acid transporter)를 통해 세포안으로 들어올 수 있다. 아미노산 수송체는 각기 그들이 수송하는 아미노산의 특성에 따라 중성, 염기성 및 산성아미노산 수송체로 분류되며, 세포 외액의 Na<sup>+</sup>에 대한 의존성에 따라 Na<sup>+</sup>-의존성 및 Na<sup>+</sup>-비의존성 수송체로 분류된다(1).

아미노산 수송계 L은 Na<sup>+</sup>-비의존적으로 중성아미노산을 수송하는 세포막 단백질로서 종양세포를 포함한 대부분의 세포에서 중성아미노산의 주 경로가 되는 아미노산 수송계로 알려져 있으며, 상피세포의 기저막측에 존재하여 소장과 신장신세포의 상피세포를 통한 중성아미노산의 흡수에 중요한 기능을 한다고 알려져 있다(1). 또한 아미노산 수송계 L은 중성아미노산 뿐만 아니라 L-dopa, melphalan 및 gabapentin 같은 아미노산 구조를 가진 약물들도 수송할 수 있으므로 약물 수송체로 간주되기도 한다(1-3).

1998년 Kanai 등(4)에 의해 아미노산 수송계 L의 첫 번째

아형인 L-type amino acid transporter 1(LAT1)이 C6 glioma 세포에서 동정되었다. LAT1은 세포막 단백질로서 Na<sup>+</sup>-비의존적으로 leucine, isoleucine, valine, phenylalanine, tyrosine, methionine, tryptophan 및 histidine 같은 구조가 큰 중성아미노산을 수송하는 특징을 가지고 있다(4-6). LAT1은 4F2 heavy chain(4F2hc)이라는 1회 세포막을 관통하는 막 단백질과 disulfide bond로 결합되어진 heterodimer형 단백질이며, LAT1이 기능을 수행하기 위해서는 보조인자 4F2hc의 존재가 필수적이라는 것이 보고되었다(4,5,7-10). 보조인자 4F2hc가 모든 정상 조직에서 발현되는 것과 대조적으로 LAT1은 뇌, 비장, 태반, 정소 등 그 발현하는 부위가 제한되어 있다(4-10). 또한 LAT1은 종양 세포에서 과발현되며, 종양세포의 계속되는 성장에 중요한 역할을 한다고 보고되었다(4,5,11,12).

한편, LAT1의 분자적 동정 후에 아미노산 수송계 L의 두 번째 아형인 L-type amino acid transporter 2(LAT2)가 동정되었다(7-15). LAT2는 구조적으로 LAT1과 매우 유사하며, Na<sup>+</sup>-비의존적으로 다수의 필수아미노산을 포함하는 중성 아미노산을 수송한다(7-15). LAT1이 구조가 큰 중성 아미노산만을 수송하는 특징을 보이는 반면, LAT2는 구조

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: kdk@chosun.ac.kr  
Phone: 82-62-230-6893

에 관계없이 중성아미노산을 모두 수송하는 넓은 기질특이성을 지니고 있다(14-16).

2-Aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid(BCH)는 아미노산 수송체 연구에 주로 이용되는 아미노산 수송계 L의 선택적 억제제이다(4,6,12,15). 아미노산 수송계 L이 leucine, isoleucine, valine, phenylalanine, threonine, methionine 및 histidine과 같은 필수아미노산을 포함한 중성아미노산을 수송하기 때문에, 만약 세포에서 아미노산 수송계 L이 BCH 같은 억제제에 의해 차단된다면 세포는 세포성장과 증식에 필수적인 필수아미노산이 고갈됨으로 큰 손상을 입을 것이다. 그러나 이러한 아미노산 수송억제에 의한 세포성장 억제 기전에 관한 실험적 자료는 거의 없다.

지금까지 아미노산 수송체의 수송특성에 관한 연구는 아프리카 산 발톱개구리인 *Xenopus laevis*의 oocyte 내에 아미노산 수송체의 cRNA를 미세 주입하여 발현된 단백질을 이용하여 시행되어져 왔었다(4,5,17,18). 그러나 이 방법은 *Xenopus oocyte*가 화학물질에 손상을 입기 쉬워 다양한 화학물질의 시험이 어렵고, 시간과 금전적으로 많은 손실을 동반하며, 또한 진정한 포유동물에서의 실험결과를 얻기 어려우므로 *Xenopus oocyte* 실험계를 대체할 수 있는 포유동물 세포실험계의 개발이 필수적이다.

골육종은 미분화 중간엽 세포에서 직접 형성하는 비정형 유골 및 골 형성을 특징으로 하는 인구 100,000명 당 1명의 비율로 발생하는 가장 대표적이고 흔한 악성 골종양이다. 그럼에도 불구하고 골육종은 다른 악성종양에 비해 그 발생 기전 등 분자생물학적 접근이 가장 되어있지 않은 암 중의 하나이다. 더욱이 골육종 세포 뿐만 아니라 정상 골모세포에서도 세포 성장에 필수적인 아미노산을 공급하여 주는 아미노산 수송체에 관한 연구 또한 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구자들은 사람의 정상 골모세포 FOB를 이용하여 아미노산 수송계 L의 발현과 아미노산 수송계 L을 통한 아미노산의 수송특성을 밝혔기에 이 논문에 보고하고, LAT1, LAT2 및 4F2hc *in vitro* 연구에 FOB 세포의 유용성을 제시하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

[<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-Leucine은 Perkin Elmer Life Science Inc.(Boston,

MA, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 아미노산 및 기타 시약들은 analytical grade를 구입하여 사용하였다. Affinity-purified anti-LAT1, LAT2 및 4F2hc는 Kumamoto Immunochemical Laboratory, Transgenic Inc.(Kumamoto, Japan)로부터 제공받아 사용하였다.

실험에 이용된 사람 골모세포 FOB는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양받아, 성장배지(phenol red가 없는 DMEM과 F12의 1:1 혼합배지에 2.5 mM의 L-glutamine과 10%의 FBS를 혼합한 배지) 하에서 배양하였다.

### Total RNA 추출과 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR)

FOB 세포에서 TRI REAGENT kit(Molecular Research Center, Inc., Ohio, USA)를 이용하여 total RNA를 추출한 후, 자외선 분광기(UV spectrophotometer)를 이용하여 260 nm에서 흡광도를 측정, 추출된 RNA의 농도를 계산하였다. cDNA를 합성하기 위하여 5 µg의 total RNA를 reverse-transcriptase(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)와 oligo(dT) primer를 이용하여 42°C에서 60분간 역전사 반응을 시행하였다. 합성된 cDNA를 LAT1, LAT2 및 4F2hc의 primer(Table 1)를 이용하여 중합효소연쇄반응(PCR)을 시행하였다. PCR 반응 조건은 94°C에서 12분, 변성(denaturation)반응을 94°C에서 1분, 결합(annealing)반응을 50~55°C에서 1분, 중합(extension)반응을 72°C에서 1분간 30주기를 반복하고 마지막 중합반응은 72°C에서 30분간 연장하여 반응시켰다. 각 primer의 T<sub>m</sub> 값을 고려하여 LAT1과 4F2hc의 결합반응 온도는 55°C, LAT2의 결합반응 온도는 50°C로 시행하였다. RT-PCR후 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 각각의 PCR product를 확인하였다.

### Western blot analysis

FOB 세포에서 LAT1, LAT2 및 보조인자 4F2hc 단백질 발현을 확인하기 위하여 Western blot 분석을 시행하였다. FOB 세포에 trypsin-EDTA를 처리하여 tube에 모은 후 PBS를 이용하여 3회 세척하였다. 세포 pellet에 protein lysis buffer(1% NP-40, 50 mM Tris-HCl(pH 7.4), 120 mM NaCl, 10 mM EDTA, 5 mM AEBSF, 100 mM leupeptin, 2 µg/mL aprotinin)를 처리하여 4°C에서 10분간 반응시킨 후, Dounce homogenizer에 옮겨 10회 stroke하여 세포를 용해시켰다. 세포 용해물을 원심분리하고 상층액을 회수하

Table 1. Primer sequence for PCR

Primer Names	Sequence (5' → 3')	PCR Product (bp)
LAT1 (sense)	TTTCATCGCAGTACATCGTGG	536
LAT1 (antisense)	CCCAGGTGATAGTTCCCCGAA	
LAT2 (sense)	AGCCCTGAAGAAAGATCG	529
LAT2 (antisense)	TGCATATCTGTACAATCCCC	
4F2hc (sense)	TCGATTACCTGAGCTCTCTG	509
4F2hc (antisense)	GGGATTTTGTATGCTCCCCA	

여 단백질을 정량하였다.

FOB 세포의 단백질 30 µg에 5 µL의 SDS-PAGE sample buffer(60 mM Tris-HCl(pH 6.8), 2% SDS, 25% glycerol, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% Bromophenol blue)를 넣고 100°C에서 3분간 변성시킨 후에 SDS-polyacrylamide gel에서 2시간 전기영동을 시행한 다음 gel 안의 단백질을 XCell II™ Blot Module(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)에서 1시간 동안 100V로 PVDF membrane에 이동시켰다. Membrane은 3% fat-free dry milk-PBST buffer(PBS, 0.05% Tween-20)에서 18시간 동안 blocking한 후, PBST buffer로 5분간 3회 세척하였다. Affinity-purified rat anti-LAT1, LAT2 및 4F2hc는 3% fat-free dry milk-PBS buffer에 500배 희석하였으며, 이 용액에 membrane을 넣어 1시간 동안 반응시킨 후, PBST 용액을 이용하여 5분 간격으로 3회 세척하였다. Membrane을 anti-rat-horseradish peroxidase conjugated-secondary antibody 용액에 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후, PBST 용액을 이용하여 5분 간격으로 3회 세척하고 Enhanced chemiluminescence(ECL) detection kit(Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL, USA)를 사용하여 X-ray 필름(Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL, USA)에 감광하여 현상하였다.

Uptake 실험

FOB 세포에서 아미노산 수송계 L의 수송특성을 조사하기 위해 Kim 등(19,20)의 방법을 이용하여 아미노산 uptake 실험을 시행하였다. 배양된 FOB 세포를 수집하여 24 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/well로 seed 한 후, 80~90% confluence 되었을 때 uptake를 시행하였다. 세포배양 plate의 성장배지를 제거한 뒤 세포를 standard uptake 용액(125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM HEPES, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.6 mM glucose, pH 7.4) 또는 Na<sup>+</sup>-free uptake 용액(125 mM choline-Cl, 4.8 mM KCl, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM HEPES, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.6 mM glucose, pH 7.4)을 이용하여 3회 세척한 후 37°C 및 얼음 위에서 10분간 전 배양하였다. 그 후, 용액을 [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine이 존재하는 uptake 용액으로 교체하여 1분 배양시켰으며, 반응의 정지를 위해 4°C의 같은 용액으로 3회 세척하였다. 세포를 0.1 N NaOH에 녹여 세포 안으로 uptake 되어진 방사능을 liquid scintillation spectrometry로 측정하였으며, 측정된 방사능을 pmol/mg protein/min으로 산출하였다. 본 uptake 실험에서 각각의 결과를 위해 각 군은 4~6 개의 FOB 세포가 존재하는 24 well plate를 사용하였으며, 각각의 결과를 mean±SEM(n=4~6)으로 표시하였다. 각 결과의 재현성을 확인하기 위하여 3회 이상 반복 실험을 시행하여 결과를 산출하였다.

FOB 세포에서 L-leucine uptake의 K<sub>m</sub>과 V<sub>max</sub>는 L-leucine 농도 3, 10, 30, 100, 300 및 1000에서 uptake를 시행하여 Eadie-

Hofstee equation을 이용하여 산출하였다.

FOB 세포에서 L-leucine의 수송을 억제하는 BCH의 IC<sub>50</sub>은 [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine 1 µM 존재 하에서 BCH의 농도 0, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 및 3000 µM에서 uptake를 수행하여 측정하였으며, BCH의 K<sub>i</sub> 값을 산출하기 위한 실험에서는 BCH 0과 100 µM 존재 하에서 [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine 농도 3, 10, 30, 100, 300 및 1000 µM에서 uptake를 시행하였다. FOB 세포에서 L-leucine 수송에 대한 BCH의 K<sub>i</sub> 값은 1/L-leucine 농도에 대한 1/L-leucine uptake율을 산출하여 double reciprocal plot 분석으로 계산하였다(K<sub>i</sub>=BCH 농도/(BCH 존재 하에서 L-leucine uptake의 K<sub>m</sub>/L-leucine uptake의 K<sub>m</sub>)-1).

아미노산 수송계 L에 의해 유도된 L-leucine uptake에 미치는 여러 아미노산들의 억제 효과를 보기 위해 30 µM의 [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine과 방사능이 표지되지 않은 아미노산 3 mM을 uptake 용액 내에 동시 투여하여 시행하였다.

통계처리

모든 실험결과는 mean±SEM으로 나타내었다.

결 과

FOB 세포에서 아미노산 수송계 L의 발현

FOB 세포에서 아미노산 수송계 L의 아형인 LAT1과 LAT2 및 그들의 보조인자 4F2hc의 mRNA 발현을 확인하기 위해, 각각의 primer(Table 1)을 이용하여 RT-PCR을 시행하였다. FOB 세포에서 LAT1, LAT2 및 4F2hc의 mRNA 발현을 모두 관찰할 수 있었으며, 수송계 L의 두 아형인 LAT1과 LAT2의 발현정도가 유사함을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

FOB 세포에서 LAT1, LAT2 및 4F2hc의 단백발현을 확인하기 위해, 각각의 항체를 이용하여 western blotting을 시행하여 단백질 발현유무와 발현정도를 관찰하였다. FOB 세포에서 LAT1과 LAT2 및 4F2hc에 대한 특이적인 단백질 밴드 40, 47 및 85 kDa에서 확인할 수 있었으며, 단백질 발현 정도도 mRNA의 발현정도와 같이 LAT1과 LAT2가 유사함을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

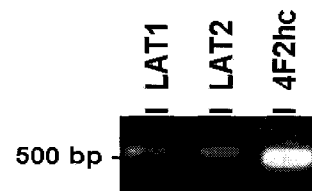
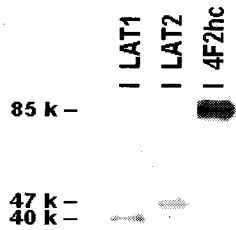


Fig. 1. Detection of LAT1, LAT2 and 4F2hc by RT-PCR in FOB human osteoblast cells.

The first stand cDNAs prepared from FOB cell total RNA were used as template for PCR amplification. The PCR products were electrophoresed on a 1.5% agarose gel and visualized with ethidium bromide. The LAT1-specific PCR product (536 bp), LAT2-specific PCR product (529 bp) and 4F2hc-specific PCR product (509 bp) were obtained from FOB cells.

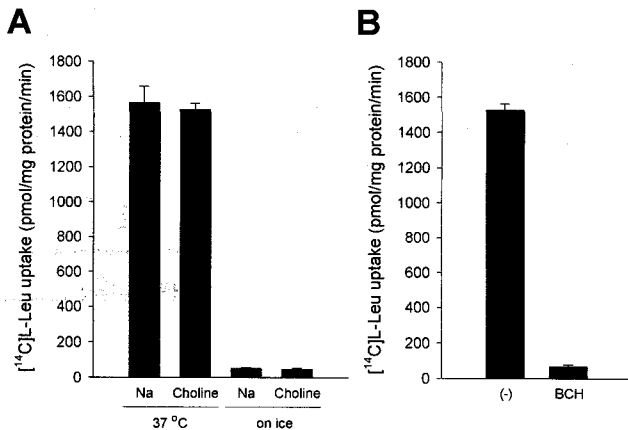


**Fig. 2. Western blot analysis of LAT1, LAT2 and 4F2hc in FOB cells.**

Western blot analyses were performed on the protein extracts prepared from FOB cells in the presence of 2-mercaptoethanol using anti-LAT1, anti-LAT2 and anti-4F2hc antibodies. For LAT1, LAT2 and 4F2hc, the 40 kDa-, 47 kDa- and 85 kDa-protein bands detected, respectively.

**[<sup>14</sup>C]L-Leucine 수송특성**

FOB 세포에서 L-leucine의 수송특성을 조사하기 위해, [<sup>14</sup>C]가 표지된 L-leucine의 uptake 실험을 시행하였다. FOB 세포를 37°C에서 [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine(30 μM)이 함유된 standard uptake 용액(Fig. 3A, Na) 또는 Na<sup>+</sup>-free uptake 용액(Fig. 3A, Choline)에 배양시킨 결과 [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine uptake를 볼 수 있었으며, [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine uptake 양은 standard uptake 용액과 Na<sup>+</sup>-free uptake 용액에서 차이를 보이지 않았다(Fig. 3A). 이 결과는 FOB 세포에서 L-leucine 수송은 주로 Na<sup>+</sup>-비의존적으로 이루어짐을 나타낸 것이므로, 본 논문의 모든 uptake 실험은 Na<sup>+</sup>-free uptake 용액에서 시행하여 비교하였다. Fig. 3A에서와 같이, 얼음위에서 FOB 세포를 [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine(30 μM)이 함유된 standard uptake 용액(Fig. 3A, Na, on ice) 또는 Na<sup>+</sup>-free uptake 용액(Fig. 3A, Choline, on ice)에 배양시킨 결과, [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine의 uptake를 볼 수



**Fig. 3. [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-Leucine uptake by FOB cells.** (A) Ion dependent of [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine transport. [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-Leucine (30 μM) uptake measured in the standard uptake solution (Na) was compared with the measured in the Na<sup>+</sup>-free uptake solution (Choline). The [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine transport measurements were performed at 37°C and on ice. (B) Inhibition of [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine transport by BCH, a specific inhibitor of system L. The [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine (30 μM) uptake was measured in the presence (BCH) or absence (-) of 3 mM BCH.

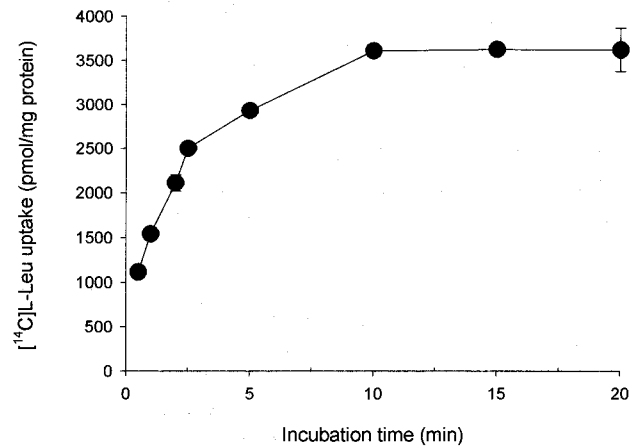
없었다(Fig. 3A). 얼음 위와 37°C에서의 [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine uptake 결과는 FOB 세포에서 L-leucine의 수송이 아미노산 수송체를 통해 이루어진다는 것을 시사한다. FOB 세포에서 [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine(30 μM) uptake는 아미노산 수송체 L의 선택적 억제제인 BCH 3mM에 의해 완전히 차단되었으며(Fig. 3B), 이 결과는 FOB 세포에서 [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine 수송이 아미노산 수송체 L을 통해 이루어짐을 시사한다. FOB 세포에서 [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine uptake의 time-course를 결정하기 위해 배양시간 0.5, 1, 2, 2.5, 5, 10, 15 및 20분에서 [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine uptake를 시행하였다. [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine(30 μM)의 uptake는 배양시간 의존적이었고 배양시간 2.5분까지 직선을 유지하였으며, 배양시간 10분에 최대에 이르러 배양시간 20분까지 유지되었다(Fig. 4). 따라서 본 논문에서의 모든 uptake 실험은 배양시간 1분에서 시행하였으며, 그 결과를 pmol/mg protein/min으로 산출하여 비교하였다.

Fig. 5와 같이 FOB 세포에서 [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine의 uptake는 포화되었으며, Michaelis-Menten Kinetics에 의해 K<sub>m</sub>은 약 116.11 μM(mean ± SEM, n=3), V<sub>max</sub>는 7890 pmol/mg protein/min(mean ± SEM, n=3)으로 산출되었다.

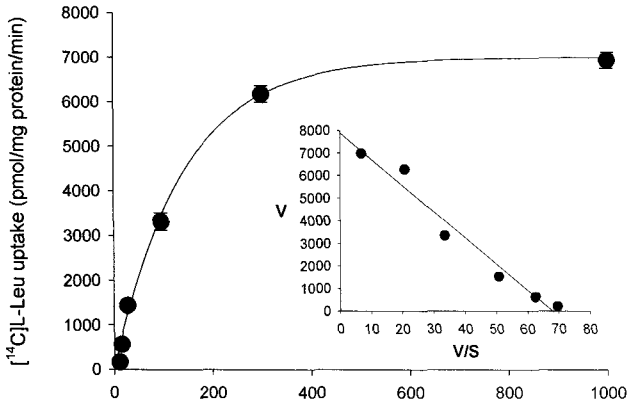
**L-Leucine 수송에 영향을 미치는 BCH의 효과**

FOB 세포에서 [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine의 수송에 미치는 BCH의 특성을 조사하기 위해, [<sup>14</sup>C]가 표지된 L-leucine의 uptake를 BCH 존재 하에 시행하였다. BCH 0, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 및 3000 μM은 [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine 1 μM의 uptake를 농도 의존적으로 억제하였으며, 그 IC<sub>50</sub>은 130.03 ± 6.89 μM(mean ± SEM, n=3)로 산출되었다(Fig. 6).

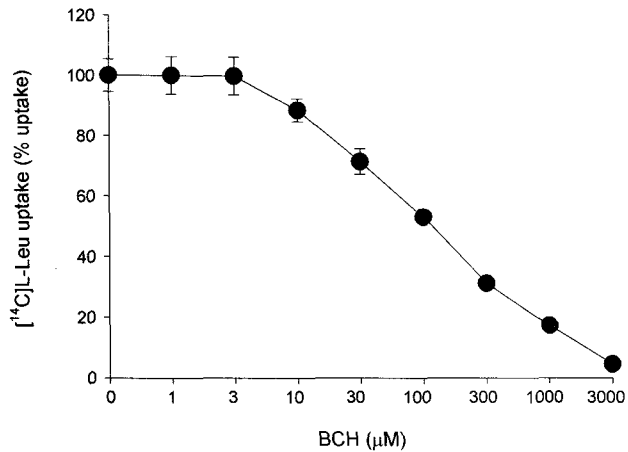
억제상수인 K<sub>i</sub> 값을 구하기 위해 BCH 0과 100 μM 존재 하에서 [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine 3, 10, 30, 100, 300 및 1000 μM의 uptake를 수행하였다. K<sub>i</sub> 값은 142.13 ± 18.12 μM(mean ± SEM, n=3)로 산출되었고(Fig. 7), 그 숫치가 IC<sub>50</sub> 값과 유사함을



**Fig. 4. Time course of [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine uptake by FOB cells.** The FOB cells were incubated in the Na<sup>+</sup>-free uptake solution containing 30 μM [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine for 0.5, 1, 2, 2.5, 5, 10, 15 and 20 min.



**Fig. 5. Concentration dependence of [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine uptake by FOB cells.**  
 The [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine uptake by FOB cells was measured for 1 min and plotted against <sub>L</sub>-leucine concentration. The <sub>L</sub>-leucine uptake was saturable and fit to the Michaelis-Menten curve ( $K_m=116.11 \mu\text{M}$  and  $V_{max}=7890 \text{ pmol/mg protein/min}$ ). The insert shows an Eadie-Hofstee plot of <sub>L</sub>-leucine uptake that was used to determine the kinetic parameters.

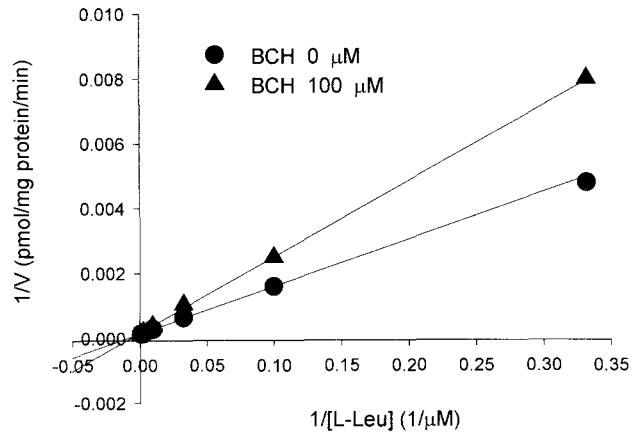


**Fig. 6. The concentration-dependent inhibition of [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine uptake by BCH in FOB cells.**  
 The [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine uptake (1  $\mu\text{M}$ ) was measured for 1 min in the  $\text{Na}^+$ -free uptake solution in the presence of various BCH concentrations and expressed as a percentage of control <sub>L</sub>-leucine uptake in the absence of BCH.

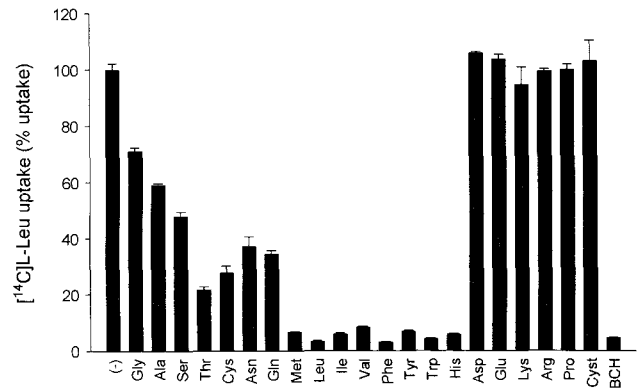
확인할 수 있었다. 또한 Fig. 7의 분석으로 <sub>L</sub>-leucine과 BCH가 동일한 수송체를 이용하여 FOB 세포 내로 이동을 하며, 서로 경쟁적 억제제로 작용하고 있음을 확인할 수 있었다.

**[<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-Leucine 수송과 다른 아미노산들과의 상호작용**

FOB 세포에서 [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine의 수송과 다른 아미노산들과의 상호작용을 조사하기 위하여 30  $\mu\text{M}$  [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine의 uptake를 방사선으로 표지되지 않은 아미노산들의 존재 하 (3 mM)에서 측정하였다. FOB 세포에서 [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine uptake는 glycine, alanine, serine, threonine, cysteine, asparagine, glutamine, methionine, isoleucine, valine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, histidine 및 BCH에 의해서는 억제되



**Fig. 7. Double reciprocal plot analysis of inhibitory effect of BCH on the [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine uptake in FOB cells.**  
 The [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine uptakes (3, 10, 30, 100, 300 and 1000  $\mu\text{M}$ ) were measured in the  $\text{Na}^+$ -free uptake solution in the presence (filled triangle) or absence (filled circle) of 100  $\mu\text{M}$  BCH in FOB cells.



**Fig. 8. Inhibition of [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine uptake by amino acids in FOB cells.**  
 The [<sup>14</sup>C]<sub>L</sub>-leucine uptake (30  $\mu\text{M}$ ) was measured in the presence of 3 mM nonradiolabeled indicated <sub>L</sub>-amino acids and system L specific inhibitor BCH.

었으나, aspartate, glutamate, lysine, arginine, proline 및 cystine에 의해서는 억제되지 않았다(Fig. 8).

**고 찰**

본 연구에서 사람 정상 골모세포주인 FOB 세포를 이용하여 아미노산 수송체 L의 발현과 기능적 특성을 조사하였다. RT-PCR 기법을 이용한 아미노산 수송체 L의 mRNA의 발현을 조사하는 실험을 통해 FOB 세포에서 아미노산 수송체 L의 아형들인 LAT1과 LAT2 및 그들의 보조인자 4F2hc의 발현을 관찰할 수 있었으며, LAT1과 LAT2의 발현정도가 유사함을 확인할 수 있었다(Fig. 1). FOB 세포의 단백을 이용한 western blot 분석에서도 LAT1, LAT2 및 4F2hc의 단백질발현을 확인할 수 있었으며, 단백질의 발현정도도 mRNA의 발현정도와 같이 LAT1과 LAT2가 유사함을 확인할 수

있었다(Fig. 2). 본 실험결과로 FOB 세포에서 중성아미노산의 수송에는 아미노산 수송체 L의 아형들인 LAT1과 LAT2가 모두 중요한 역할을 할 것이라는 것을 예상할 수 있다. 그러나 이 실험결과는 사람의 정상 구강상피세포와 흰쥐의 정상 교세포에서는 아미노산 수송체 L 중에서 LAT2만 발현하며, 사람의 구강암 세포주와 흰쥐의 교세포 중에서는 아미노산 수송체 L 중에서 LAT1만 발현한다는 것을 확인한 다른 문헌들(21,22)의 결과와는 차이가 있었다. LAT1은 정상 조직에서는 그 발현하는 부위가 제한되어 있고 종양세포에서 과발현되며, 종양세포의 계속되는 성장에 중요한 역할을 한다고 보고된 바 있다(4,5,11,12). 반면에 LAT2는 주로 정상조직에서 발현하여 정상조직의 성장 및 증식에 중요한 역할을 한다고 보고된 바 있다(14-16,21,22). 그러나 본 논문의 사람의 정상 골모세포주인 FOB는 사람의 정상 구강상피세포와 흰쥐의 정상 교세포에서와는 달리 아미노산 수송체 L의 두 아형인 LAT1과 LAT2가 모두 발현하였다. 따라서 FOB 세포에서 중성아미노산을 수송하는 주된 아미노산 수송체가 무엇인지를 확인하기 위하여, 중성아미노산 중에서 실험적으로 가장 많이 이용되는 L-leucine을 이용하여 uptake 실험을 시행하였다.

FOB 세포에서 L-leucine uptake는  $\text{Na}^+$ -비의존적이었으며, 아미노산 수송체 L의 선택적 차단제인 BCH에 의해 완전히 차단되었다(Fig. 3). BCH는 아미노산 구조를 가진 화합물로서 아미노산 수송체 L의 선택적 차단제이며(4-6), 중성과 염기성 아미노산을 수송하는  $\text{Na}^+$ -의존적 아미노산 수송체  $\text{ATB}^{0,+}$  (amino acid transporter  $\text{B}^{0,+}$ )의 약한 차단제이다(19). 그러나  $\text{Na}^+$ 이 존재하지 않은 조건에서 BCH는 아미노산 수송체 L만을 선택적으로 차단한다. 따라서 FOB 세포에서 L-leucine 수송에는 아미노산 수송체 L이 중요한 기능을 하고 있다고 할 수 있다.

FOB 세포에서 L-leucine uptake의 time course를 결정하기 위하여, 배양시간 0~20분에서  $[^{14}\text{C}]_{\text{L}}$ -leucine uptake를 시행한 결과, L-leucine uptake는 배양시간에 의존적이었고 배양시간 2.5분까지 직선을 유지하였으며, 배양시간 10분에 최대에 이르러 배양시간 20분까지 유지되었다(Fig. 4). 따라서 이 연구에서는 아미노산 수송이 직선을 유지하는 배양시간 2.5분 이내에서 실험이 가장 용이한 1분을 배양시간으로 선택하여 실험을 수행하였다.

아미노산 수송체의 수송특성에 관한 연구는 *Xenopus*라는 아프리카산 발톱개구리의 oocyte 내에 아미노산 수송체

cRNA를 미세 주입하여 발현된 단백질을 이용하여 주로 시행되어 왔었다. *Xenopus* oocyte는 손상을 입기 쉬워 다양한 화학물질의 실험이 어렵고 시간과 금전적으로 많은 손실을 동반한다는 단점이 있지만, 포유동물 세포들과는 달리 내재성 아미노산 수송체의 발현이 극단적으로 미약하여 미세주입한 아미노산 수송체만의 수송특성을 확인할 수 있다는 큰 장점이 있다. FOB 세포에서 L-leucine의 uptake는 포화되었으며, Michaelis-Menten Kinetics에 의한  $K_m$  값은 약 116  $\mu\text{M}$ 이었다(Fig. 5). 이전 문헌들의 *Xenopus* oocyte expression system 방법에 의한 *Xenopus* oocyte에서 human LAT1(5)과 human LAT2(14)의 cRNA를 미세주입하여 얻은 L-leucine uptake의  $K_m$  값은 각각 19  $\mu\text{M}$ 과 220  $\mu\text{M}$ 이었다. 본 연구에서 FOB 세포에 의한 L-leucine uptake의  $K_m$  값을 앞에서 언급한 *Xenopus* oocyte에서 발현시킨 LAT1(5)과 LAT2(14)의  $K_m$  값과 비교하였을 때, 거의 중간값이라는 것을 알 수 있다. FOB 세포는 LAT1과 LAT2가 모두 발현하며, FOB 세포에서 L-leucine uptake의  $K_m$  값을 이전 논문들(5,14)에서의 결과와 비교하였을 때, FOB 세포에서 L-leucine을 포함한 중성 아미노산의 수송에는 아미노산 수송체 L의 두 아형인 LAT1과 LAT2가 모두 중요한 역할을 한다고 말할 수 있다.

FOB 세포에서 아미노산 수송체 L의 선택적 억제제인 BCH는 L-leucine uptake를 농도 의존적으로 억제하였고, 그  $IC_{50}$  값은 약 130  $\mu\text{M}$ (Fig. 6)이었으며  $K_i$  값은 약 142  $\mu\text{M}$ (Fig. 7)로 산출되었다. FOB 세포에서의 이 결과들을 LAT2만 특이적으로 발현하는 사람의 정상 구강상피세포와 흰쥐의 신경교세포, LAT1만 특이적으로 발현하는 사람의 구강암 세포주와 흰쥐의 교세포중에서 아미노산 수송체 L의 특성을 조사한 이전 문헌들의 결과(사람 정상 구강상피 세포의  $IC_{50}$ 와  $K_i$ , 152  $\mu\text{M}$ 과 125  $\mu\text{M}$ ; 사람 구강암 세포주의  $IC_{50}$ 와  $K_i$ , 70  $\mu\text{M}$ 과 68  $\mu\text{M}$ ; 흰쥐 신경교 세포의  $IC_{50}$ 와  $K_i$ , 270  $\mu\text{M}$ 과 228  $\mu\text{M}$ ; 흰쥐 교세포종의  $IC_{50}$ 와  $K_i$ , 73  $\mu\text{M}$ 과 55  $\mu\text{M}$ ) (21,22)와 비교하여 볼 때, FOB 세포에서의  $IC_{50}$  값(130  $\mu\text{M}$ )과  $K_i$  값(142  $\mu\text{M}$ )은 LAT1과 LAT2의 특성을 모두 포함한다고 볼 수 있다(Table 2). 또한 본 논문의 결과로 FOB 세포에서 BCH가 중성 아미노산인 L-leucine과 동일한 수송체를 이용하여 세포 내로 이동하며, 서로 경쟁적인 억제제로 작용을 하고 있음을 확인할 수 있었다.

FOB 세포에서 아미노산들에 의한 L-leucine uptake의 억제 실험 결과(Fig. 8)는 *Xenopus* oocyte를 이용한 human

Table 2. Comparisons of kinetic parameters for L-leucine uptake

Cell names	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )
FOB cells (human normal osteoblast cells)	116	130	142
Glial cells (rat normal astrocytes)	224	270	228
C6 glioma cells (rat glioma cells)	52	73	55
Keratinocytes (human normal oral keratinocytes)	125	152	125
KB cells (human oral squamous carcinoma cells)	65	70	68

문 헌

LAT1(5), rat LAT1(4), human LAT2(14) 및 rat LAT2(15)의 특성을 모두 포함하고 있었다. 즉, FOB 세포에서는 LAT1의 특성인 구조가 큰 중성아미노산(methionine, isoleucine, valine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, histidine)도 LAT2의 특성인 구조가 다소 작은 중성아미노산(glycine, alanine, serine, threonine, cysteine)도 모두 L-leucine uptake를 억제하였다. 본 연구의 FOB 세포에서 여러 아미노산들에 의한 [<sup>14</sup>C]L-leucine uptake의 억제 경향, 아미노산 수송체의 발현을 확인한 실험결과와 이전 문헌들(4,5,14,15,21,22)에서의 실험결과를 같이 고찰하여 볼 때, FOB 세포에서 L-leucine의 수송은 아미노산 수송계 L의 두 아형인 LAT1과 LAT2 모두에 의해 이루어지고 있는 것으로 사료된다. 특히 FOB 세포에서의 이러한 실험결과들은 FOB 세포가 아미노산 수송계 L의 특성을 연구하는데 하나의 좋은 실험체가 될 수 있다는 것을 시사하고 있다.

결론적으로 본 연구의 결과로서 사람의 정상 골모세포주인 FOB에서 중성아미노산 수송계 L의 아형인 LAT1과 LAT2 및 그들의 보조인자 4F2hc의 발현을 확인하였으며, LAT1과 LAT2 모두를 통해 L-leucine을 포함한 중성아미노산 수송이 이루어지고 있다는 것을 확인할 수 있었다. 이는 FOB 세포에서 세포성장 및 증식을 위한 중성아미노산의 수송에는 아미노산 수송계 L의 발현이 필수적이라는 것을 시사하고 있다.

요 약

사람의 정상 골모세포 FOB에서 아미노산 수송계 L의 발현 및 이들 수송계 L을 통한 아미노산 수송특성을 밝히기 위하여, FOB 세포에서 RT-PCR, western blot 분석 및 아미노산 uptake 실험 등을 수행하여 다음과 같은 결과들을 얻었다. FOB 세포에서 아미노산 수송계 L의 두 아형인 LAT1, LAT2 및 그들의 보조인자 4F2hc의 발현을 확인할 수 있었다. FOB 세포에서 L-leucine의 수송은 Na<sup>+</sup>-비의존적이었다. FOB 세포에서 L-leucine의 수송은 아미노산 수송계 L의 선택적 억제제인 BCH에 의해 완전히 차단되었다. FOB 세포에서 여러 아미노산들에 의한 L-leucine 수송억제 실험결과는 *Xenopus* oocyte에서 시행되어 보고되어진 LAT1과 LAT2 수송억제 실험결과의 특성을 모두 포함하였다. 본 연구의 결과로 사람의 정상 골모세포주인 FOB에서는 세포성장 및 증식을 위한 중성아미노산의 수송에 아미노산 수송계 L의 두 아형인 LAT1과 LAT2가 중요한 역할을 하고 있음을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업(A050142)의 지원에 의하여 이루어진 것이며, 그 지원에 감사드립니다.

1. Christensen HN. 1990. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev* 70: 43-77.
2. Gomes P, Soares-da-Silva P. 1999. L-DOPA transport properties in an immortalised cell line of rat capillary cerebral endothelial cells, RBE 4. *Brain Res* 829: 143-150.
3. Lakshmanan M, Goncalves E, Lessly G, Foti D, Robbins J. 1990. The transport of thyroxine into mouse neuroblastoma cells, NB41A3: the effect of L-system amino acids. *Endocrinology* 126: 3245-3250.
4. Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, Uchino H, Takeda E, Endou H. 1998. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem* 273: 23629-23632.
5. Yanagida O, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim DK, Segawa H, Nii T, Cha SH, Matsuo H, Fukushima J, Fukasawa Y, Tani Y, Taketani Y, Uchino H, Kim JY, Inatomi J, Okayasu I, Miyamoto K, Takeda E, Goya T, Endou H. 2001. Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1514: 291-302.
6. Uchino H, Kanai Y, Kim DK, Wempe MF, Chairoungdua A, Morimoto E, Anders MW, Endou H. 2002. Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): insights into the mechanisms of substrate recognition. *Mol Pharmacol* 61: 729-737.
7. Mastroberardino L, Spindler B, Pfeiffer R, Skelly PJ, Loffing J, Shoemaker CB, Verrey F. 1998. Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature* 395: 288-291.
8. Pfeiffer R, Spindler B, Loffing J, Skelly PJ, Shoemaker CB, Verrey F. 1998. Functional heterodimeric amino acid transporters lacking cysteine residues involved in disulfide bond. *FEBS Lett* 439: 157-162.
9. Mannion BA, Kolesnikova TV, Lin SH, Wang S, Thompson NL, Hemler ME. 1998. The light chain of CD98 is identified as E16/TA1 protein. *J Biol Chem* 273: 33127-33129.
10. Nakamura E, Sato M, Yang H, Miyagawa F, Harasaki M, Tomita K, Matsuoka S, Noma A, Iwai K, Minato N. 1999. 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *J Biol Chem* 274: 3009-3016.
11. Sang J, Lim YP, Panzica M, Finch P, Thompson NL. 1995. TA1, a highly conserved oncofetal complementary DNA from rat hepatoma, encodes an integral membrane protein associated with liver development, carcinogenesis, and cell activation. *Cancer Res* 55: 1152-1159.
12. Wolf DA, Wang S, Panzica MA, Bassily NH, Thompson NL. 1996. Expression of a highly conserved oncofetal gene, TA1/E16, in human colon carcinoma and other primary cancers: homology to *Schistosoma mansoni* amino acid permease and *Caenorhabditis elegans* gene products. *Cancer Res* 56: 5012-5022.
13. Verrey F, Meier C, Rossier G, Kuhn LC. 2000. Glycoprotein-associated amino acid exchangers: broadening the range of transport specificity. *Pflugers Arch* 440: 503-512.
14. Pineda M, Fernandez E, Torrents D, Estevez R, Lopez C, Camps M, Lloberas J, Zorzano A, Palacin M. 1999. Identification of a membrane protein, LAT-2, that co-expressed with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small large zwitterionic

- amino acids. *J Biol Chem* 274: 19738-19744.
15. Segawa H, Fukasawa Y, Miyamoto K, Takeda E, Endou H, Kanai Y. 1999. Identification and functional characterization of a Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J Biol Chem* 274: 19745-19751.
  16. Rossier G, Meier C, Bauch C, Summa V, Sordat B, Verrey F, Kuhn LC. 1999. LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J Biol Chem* 274: 34948-34954.
  17. Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y. 1996. Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na<sup>+</sup>-dependent neutral amino acid transporter. *J Biol Chem* 271: 14883-14890.
  18. Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y. 1997. Tissue specific variants of glutamate transporter GLT-1. *FEBS Lett* 416: 312-316.
  19. Kim DK, Kanai Y, Choi HW, Tangtrongsup S, Chairoungdua A, Babu E, Tachampa K, Anzai N, Iribe Y, Endou H. 2002. Characterization of the system L amino acid transporter in T24 human bladder carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1565: 112-121.
  20. Kim DK, Yoon JH, Jeon JE, Lee SH. 2004. Expression and functional characterization of neutral amino acid transporter in Hep2 human head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oral Biol* 29: 51-58.
  21. Yoon JH, Kim IJ, Kim H, Kim HJ, Jeong MJ, Ahn SG, Kim SA, Lee CH, Choi BK, Kim JK, Jung KY, Lee SU, Kanai Y, Endou H, Kim DK. 2004. Amino acid transport system L is differently expressed in human normal oral keratinocytes and human oral cancer cells. *Cancer Lett* 222: 237-245.
  22. Kim DK, Kim IJ, Hwang SA, Kook JH, Lee MC, Shin BA, Bae CS, Yoon SH, Ahn SG, Kim SA, Kanai Y, Endou H, Kim JK. 2004. System L-amino acid transporters are differently expressed in rat astrocyte and C6 glioma cells. *Neuroscience Res* 50: 437-446.

(2005년 8월 4일 접수; 2005년 9월 22일 채택)