

9434 腎近位尿細管Na⁺/グルタミン酸共輸送担体のcDNAクローニングおよびそのNa⁺再吸収における機能的役割の研究

助成研究者：金井 好克 (杏林大学 医学部)

共同研究者：遠藤 仁 (杏林大学 医学部)

細山田 真 (東京大学 医学部)

本研究は、腎におけるNa⁺総再吸収量の半分以上を担当する、近位尿細管のNa⁺/有機溶質共輸送系の分子の実体を明らかにし、そのNa⁺再吸収における役割の解明に貢献することを目的として、最近cDNAがクローニングされ始めたアミノ酸輸送系、特にグルタミン酸トランスポーターの腎近位尿細管での発現の分布、機能解析、さらには未知の関連遺伝子の探索を中心とした研究を行った。

ウサギ小腸からすでに単離されていたNa⁺依存性のグルタミン酸トランスポーターEAAC1をマウス腎からクローニングし、実際に腎に発現することを確認した。*in situ*ハイブリダイゼーションでは、EAAC1は、近位尿細管のS2分節からS3分節にかけて強く発現していることが示された。従って、大量のグルタミン酸輸送の行われているS1分節には、さらに未知のグルタミン酸トランスポーターが存在することが予想されたので、S1分節に存在するグルタミン酸トランスポーターのクローニングを試みた。

逆転写PCRを行ったところ、腎からは当初はEAAC1以外の増幅産物は得られなかったが、精巣からは、高率に新規のPCR産物T-1が得られた(その後の試行において腎からもT-1が低頻度ながら増幅されることが確認された)。T-1をプローブとしてマウス精巣から全長cDNAを単離した。このcDNAは、新規のNa⁺依存性中性アミノ酸トランスポーター(SNAT1)をコードしていた。SNAT1は、ノーザンプロットにより、腎にも発現することが示された。SNAT1は、その基質選択性から、Na⁺依存性中性アミノ酸輸送系ASCの一つのアイソフォームであると思われた。SNAT1は、グルタミン酸トランスポーターと類似の構造を持ち、興味深いことに、低レベルながらグルタミン酸を輸送した。腎には、低親和性のグルタミン酸トランスポーターが存在することが知られており、S1分節のグルタミン酸トランスポーターが低親和性である可能性が示唆されている。SNAT1が、S1のNa⁺依存性グルタミン酸輸送機構の分子の実体であるのか、あるいは、さらに別のグルタミン酸取り込み機構がS1に存在するのか、明らかにされなければならない。

9434 腎近位尿細管Na⁺/グルタミン酸共輸送担体のcDNAクローニングおよびそのNa⁺再吸収における機能的役割の研究

助成研究者：金井 好克 (杏林大学 医学部)

共同研究者：遠藤 仁 (杏林大学 医学部)

細山田 真 (東京大学 医学部)

1. 研究目的

Na⁺の体内への保持には、腎尿細管からの再吸収が重要な役割を果たしているが、この腎におけるNa⁺総再吸収の約50%以上が、近位尿細管において糖やアミノ酸などの有機溶質の輸送と共役する形で行われているとされている。本研究では、Na⁺依存性有機溶質輸送担体のうち、すでに近位尿細管での発現の局在、機能的役割が明らかにされているグルコース輸送担体の研究に引き続き、最近cDNAがクローニングされ始めたアミノ酸輸送担体、特にグルタミン酸輸送担体(以下グルタミン酸トランスポーターと表記)およびそのファミリーの近位尿細管における発現の局在、機能的役割、さらにNa⁺再吸収との関わりを明らかにすることを目的として研究を行った。

2. 研究方法

上記の研究目的を達成するために、以下の手順に従い研究を行った。

2.1 腎からのグルタミン酸トランスポーターのcDNAクローニング

グルタミン酸トランスポーターのアイソフォームのうち、腎に発現することがノーザンプロットから予想されていたEAAC1(1)の腎における発現を確認するために、マウス腎からのEAAC1のcDNAクローニングを行った。マウス腎からpoly(A)⁺RNAを抽出し、λZiplaxフェージライブラリーを作製した。ライブラリーのスクリーニングは、ウサギ小腸由来のEAAC1 cDNAをプローブとしてブランクハイブリダイゼーションを行った。陽性クローンはプラスミドpBluescriptにサブクローニングし、ジデオキシ法でシーケンシングを行った。

2.2 腎グルタミン酸トランスポーターEAAC1の機能および発現の組織分布の解析

EAAC1 cDNAより、*in vitro* 転写によりcRNAを合成し、*Xenopus* 卵母細胞に注入することによって発現させた。発現した機能の解析は、¹⁴C-グルタミン酸の取り込み、および電位固定法を用いた電気生理学的手法によって行った。

組織分布は、ノーザンプロットハイブリダイゼーション、*in situ* ハイブリダイゼーションにより検討した。ノーザンプロットでは、EAAC1 cDNAをプローブとして、組織由

米のpoly(A)'RNAの解析を行った。*in situ* ハイブリダイゼーションには、³⁵S-UTPの存在下で*in vitro* 転写を行うことによりRNAプローブを得、5μm厚の腎凍結切片を用いてハイブリダイゼーションを行った。

2.3 グルタミン酸トランスポーターファミリーの未知のメンバーのcDNAクローニング

腎に発現するグルタミン酸トランスポーターファミリーの未知のメンバーのクローニングを行うために、既知のメンバーの間で保存されているアミノ酸配列をもとにしてデザインしたオリゴDNAプライマーを用いて逆転写PCRを行った。PCR産物は、プラスミドにサブクローニングし、シーケンシングを行った。得られた新規のPCR産物は、³²Pで標識し、cDNAライブラリーのスクリーニングに用いた。全長cDNAは、*Xenopus* 卵母細胞に発現させ、放射能標識したアミノ酸およびその類似化合物の取り込みを指標に機能解析を行った。遺伝子発現の組織分布は、ノーザンブロットにより解析した。

3. 研究結果

3.1 腎からのグルタミン酸トランスポーター EAAC1 のcDNAクローニング

ウサギ小腸由来のグルタミン酸トランスポーター EAAC1 のcDNAをプローブとして、マウス腎由来のpoly(A)'RNAより作製したλZipLoxファージライブラリーをブランクハイブリダイゼーションによってスクリーニングし、マウス腎より陽性クローンMK-1を単離した。MK-1は、523アミノ酸残基からなる蛋白質(mEAAC1)をコードしていた。mEAAC1は、ウサギ小腸由来のEAAC1と89%のアミノ酸配列の相同性を有し、グルタミン酸トランスポーターのアイソフォーム間でアミノ酸配列の保存されていない、N-末端、C-末端、及び膜貫通領域3と4の間の細胞外ループ(2)においても、アミノ酸配列がよく保たれていた。疎水性プロットにおいてもウサギ小腸EAAC1と同一のパターンの疎水性を示した。

3.2 マウス腎グルタミン酸トランスポーター mEAAC1 の機能の解析

mEAAC1 cDNAからcRNAを合成し、*Xenopus* 卵母細胞に注入することにより発現させた。mEAAC1を発現した卵母細胞は、Na⁺依存性の¹⁴C-L-グルタミン酸とL-、D-アスパラギン酸の取り込みを示した(Fig. 1)。mEAAC1は、ウサギ小腸EAAC1と同様に起電性(1、3)であり、卵母細胞において電位固定下でL-グルタミン酸や他の基質を与えることにより内向き電流が観察された(Fig. 2)。Fig. 2に示すように、mEAAC1は、L-グルタミン酸、L-、D-アスパラギン酸の他、以前グルタミン酸取り込み阻害薬として知られていた-β-hydroxyaspartate、L-trans-pyrrolidine 2,4-dicarboxylate、L-α-amino adipateも内向き電流を流した。しかし、同様の取り込み阻害薬であるdihydrokainateはmEAAC1の基質とはならなかった(4、5)。これらの性質は、ウサ

ギ小腸由来の EAAC1 と基本的に一致するものであった。以上の結果より、mEAAC1 は構造的にも機能的にも、もともとはウサギ小腸からクローニングされた高親和性グルタミン酸トランスポーター EAAC1 と一致することが示され、EAAC1 が腎にも実際に発現することが確認された。

3.3 高親和性グルタミン酸トランスポーター EAAC1 の組織分布および腎での発現の局在

Fig. 3 に示すように、mEAAC1 は、腎に極めて強く発現し、さらに脳、肺、小腸、大腸、精巣に中程度の発現が見られた。ウサギにおいては、小腸に最も強い発現が見られるが（1）、組織発現のパターンは、基本的には一致していた。腎における発現の局在を調べるために、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。近位尿細管の各分節への発現の局在を調べるために、分節特異的抗体の得られているラットの腎を用い、ラット EAAC1 cDNA から作製した RNA プローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。Fig. 4 に示すように皮質深層から髄質外層外帯にかけて強い発現が見られ、さらに髄質柱に相当するハイブリダイゼーションが見られた。皮質表層の発現は弱かった。髄質外層内帯および腎乳頭にはハイブリダイゼーションは見られなかったが、髄質内層に極めて弱い再現性のあるシグナルが検出された。隣接切片において行った分節特異的抗体を用いた免疫組織化学と、*in situ* ハイブリダイゼーションの結果を総合することにより、EAAC1 は S2 から S3 にかけて強く発現していることが明らかになった。

3.4 グルタミン酸トランスポーターファミリーの未知のメンバーの検索

EAAC1 の *in situ* ハイブリダイゼーションの結果より、腎に発現するグルタミン酸トランスポーターアイソフォームである EAAC1 は、近位尿細管の S2 分節から S3 分節にかけて発現が強く、大量のグルタミン酸輸送が行われるとされている S1 分節には低レベルにしか発現していないことが明らかになった。従って、S1 分節には、未知のグルタミン酸輸送機構が存在することが予想された。腎から調製した膜標本を用いた実験では近位尿細管には、低親和性のグルタミン酸トランスポーターが存在することを示唆する報告がなされており、近位直尿細管に存在する高親和性のグルタミン酸トランスポーターとともに、グルコース輸送系と同様な二段構えの再吸収機構を形成していると考えられている（6）。S2 から S3 にかけて強く発現する EAAC1 は、高親和性のトランスポーターであり、膜標本を用いた研究による報告と一致していた。そこで、S1 分節に発現する低親和性のグルタミン酸トランスポーターの分子的实际体を明らかにするために、その cDNA クローニングを試みた。

S1 に存在する未知のグルタミン酸トランスポーターが S2 から S3 にかけて存在する EAAC1 と類似の構造を持つという仮定のもとに、グルタミン酸トランスポーターファミ

リーの既知のメンバーの間で保存されているアミノ酸配列をもとにしてデザインしたオリゴ DNA プライマーを用いた逆転写 PCR を行った。腎とともに精巣を含む他のマウス組織由来の poly(A)⁺RNA を出発材料として用いた。PCR 産物のシーケンシングを行ったところ、腎から得られた PCR 産物は、第一回目の解析では、すべてが (10/10) EAAC1 であったが、精巣から T-1 と名付けた新規の PCR 産物が得られた (後の解析で腎からも低頻度ではあるが T-1 が得られることが確認されている)。そこで、マウス精巣の cDNA ライブラリーを作製し、T-1 をプローブとして全長 cDNA を得た。得られたクローンは、2,681bp の cDNA インサートを持ち、553 アミノ酸からなる新規の蛋白 (SNAT1: sodium-dependent neutral amino acid transporter 1) をコードしていた。

3.5 SNAT1 の機能的特徴

SNAT1 の機能は、*Xenopus* 卵母細胞に発現させることにより解析した。SNAT1 を発現した卵母細胞は、¹⁴C で標識したアラニンの取り込みを示し、この取り込みは濃度依存的であり、完全に細胞外の Na⁺ に依存するものであった (Fig. 5, 6)。SNAT1 の基質選択性を調べる目的で行った取り込み抑制実験においては、¹⁴C-アラニンの取り込みは、セリン、スレオニン、システイン、グルタミン、アスパラギンにより、強く抑制されたが、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、プロリン、ヒスチジン、シスチン、リジンには影響されなかった (Fig. 7)。メチオニン、ロイシン、グリシン、バリンは中程度の抑制効果を示した。興味深いことに、グルタミン酸は、わずかではあるが、再現性のある抑制効果を示した (Fig. 7)。SNAT1 の基質選択性は、さらに放射能標識アミノ酸の取り込みによっても検討した。SNAT1 は、アラニンの取り込み抑制実験から予想されたように、上記のアラニンの他、セリン、スレオニン、システイン、グルタミンなどを高親和性の基質 ($K_m \sim 20 \mu M$) として輸送し、さらにメチオニン、ロイシン、バリンを低親和性に輸送した ($K_m \sim 300 \sim 500 \mu M$) (Fig. 8)。さらに、わずかではあるが有意なグルタミン酸の輸送が観察された (Fig. 8)。

以上の結果から、SNAT1 は、分枝側鎖を持たないアミノ酸やフェニルアラニンやヒスチジンにあるような bulky な側鎖を持たない中性アミノ酸を受け入れる基質結合部位を有することが示唆される。こういった基質選択性を持つアミノ酸輸送機構は、腹水癌細胞で最初に記述され、後に他の細胞にも存在することが確認された、Na⁺ 依存性中性アミノ酸輸送系 ASC (7) の基質選択性と一致する。従って、SNAT1 は、複数のアイソフォームからなると思われていた Na⁺ 依存性中性アミノ酸輸送系 ASC の一つのアイソフォームとしての位置を占めると思われる。

3.6 SNAT1 の構造

SNAT1 は、グルタミン酸トランスポーター（EAAC1, GLAST, GLT-1）（2）と40-44%のアミノ酸の相同性を示す。さらに、すでにクローニングされているASC型中性アミノ酸トランスポーターSAT1/ASCT1（8、9）と56-57%の相同性を有する。SNAT1は、553アミノ酸からなる疎水性の蛋白であり、Fig. 9aに示すように、1-6の明らかな膜貫通部位と思われる疎水性ドメインと、疎水性の小領域7、さらにそれに続く長い疎水性領域をその構造の中に持つ。この疎水性のパターンは、Fig. 9bに示すように、グルタミン酸トランスポーターの疎水性プロットと極めて類似するものであり、同様の三次構造をとっていることが予想される。SNAT1あるいは、グルタミン酸トランスポーターに見られるC-末端側の疎水性領域の伸長は、グルタミン酸トランスポーターファミリーに極めて特徴的な構造であり、この領域内のアミノ酸配列が高度に保存されていることから、基質の結合やトランスロケーションに関わる構造がこの部位に存在すると考えられる（2）。

3.7 SNAT1 の発現の組織分布

Fig. 10のノーザンブロットに示すように、SNAT1は、精巣の他、腎、大腸、肺、骨格筋に強い発現が見られた。各組織には、2.7 kbのサイズのmRNAが発現しており、このサイズは、SNAT1 cDNAのサイズ（2,681 bp）と一致していた。従って、ほぼ全長のmRNAに相当するcDNAが得られたことになる。

4. 考察

本研究は、腎におけるNa⁺総再吸収量の半分以上を担当する、近位尿細管のNa⁺/有機溶質共輸送系の分子の実体を明らかにし、そのNa⁺再吸収における役割の解明に貢献することを目的として、腎近位尿細管のNa⁺依存性グルコース輸送系の研究に引き続き、アミノ酸輸送系、特にグルタミン酸トランスポーターの腎近位尿細管での発現の分布、機能解析さらには、未知の関連遺伝子の探索を中心とした研究を行った。

今回、ウサギ小腸からすでに単離されていたグルタミン酸トランスポーターEAAC1が、マウス腎からクローニングされ、腎に発現するNa⁺依存性グルタミン酸トランスポーターであることが確認された。EAAC1は、近位尿細管では、S2分節からS3分節にかけて強く発現していたため、S1分節で糸球体ろ液中のグルタミン酸の90%以上が再吸収されるとする微小穿刺法による結果を説明できなかった。従って、S1分節には、未知のグルタミン酸トランスポーターが存在することが予想されたので、S1分節に存在するグルタミン酸トランスポーターのクローニングを試みた。

S1分節のグルタミン酸トランスポーターも、すでにクローニングされているグルタミン酸トランスポーターと類似の構造を持つという仮定のもとに逆転写PCRを行った。腎からは当初はEAAC1以外の増幅産物は得られなかったが、精巣から高率に新規のPCR

産物 T-1 が得られた。腎においてもその後の試行において T-1 が低頻度ながら増幅されることが確認された。これは、腎では EAAC1 が極めて強く発現しているためであると思われる。T-1 をプローブとしてマウスの精巣から全長 cDNA を単離した。この cDNA は、新規の Na⁺ 依存性中性アミノ酸トランスポーター (SNAT1) をコードしていた。SNAT1 は、ノーザンブロットにより、腎にも発現することが示された。SNAT1 は、その基質選択性から、膜標本や培養細胞を用いた研究によってすでに記載されていた Na⁺ 依存性中性アミノ酸輸送系 ASC の一つのアイソフォームであると思われる。SNAT1 は、グルタミン酸トランスポーターと類似の構造を持ち、興味深いことに、低レベルながらグルタミン酸を輸送した。腎には、低親和性のグルタミン酸トランスポーターが存在することが知られており、S1 分節のグルタミン酸トランスポーターが低親和性である可能性が示唆されている。SNAT1 が、S1 のグルタミン酸輸送機構の分子の実体であるのか、あるいは、さらに別のグルタミン酸取り込み機構が S1 に存在するのか、明らかにされなければならない。

5. 今後の課題

SNAT1 が、S1 のグルタミン酸トランスポーターであるのか、あるいは、さらに別のグルタミン酸取り込み機構が S1 に存在するのかを明らかにするために、*in situ* ハイブリダイゼーションや SNAT1 の特異抗体を用いた免疫組織化学による発現の局在の決定がまず必要とされる。さらに単離ネフロン of S1 分節からの逆転写 PCR によって、より特異的に S1 に発現するファミリーのメンバーの解析を平行して進める必要がある。近位尿細管における有機溶質の輸送と共役する Na⁺ 輸送の機序、その調節機構、および各輸送系の Na⁺ 輸送における寄与を明らかにするために、さらに輸送系の分子の実体を明らかにしていく作業を続けていく必要があると思われる。

6. 文献

- (1) Kanai, Y & Hediger, MA (1992) *Nature* 360: 467-471.
- (2) Kanai, Y, Smith, CP & Hediger, MA (1993) *FASEB J.* 7: 1450-1459.
- (3) Kanai, Y, Nussberger, S, Romero, MF, et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, in press.
- (4) Kanai, Y, Stelzner, M, Nussberger, S, et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 20599-20606.
- (5) Arriza, JL, Fairman, WA, Wadiche, JI, et al. (1994) *J. Neurosci.* 14: 5559-5569.
- (6) Silbernagl, S (1979) *Klin. Wochenschr.* 57: 1009-1019.
- (7) Christensen, HN (1990) *Physiol. Rev.* 70: 43-77.
- (8) Shafiqat, JL, Tamarappoo, BK, Kilberg, MS, et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 15351-15355
- (9) Arriza, JL, Kavanaugh, MP, Fairman, WA, et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 15329-15332.

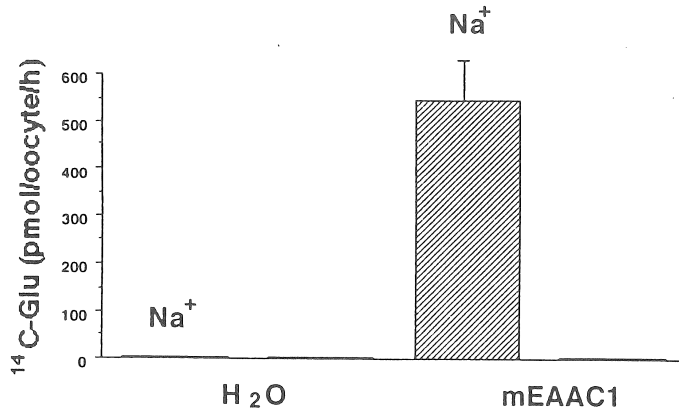


Fig. 1 Na⁺-dependent ¹⁴C-glutamate uptake in *Xenopus* oocytes which express high-affinity glutamate transporter mEAAC1. The uptake for control oocytes which was injected with water is also shown.

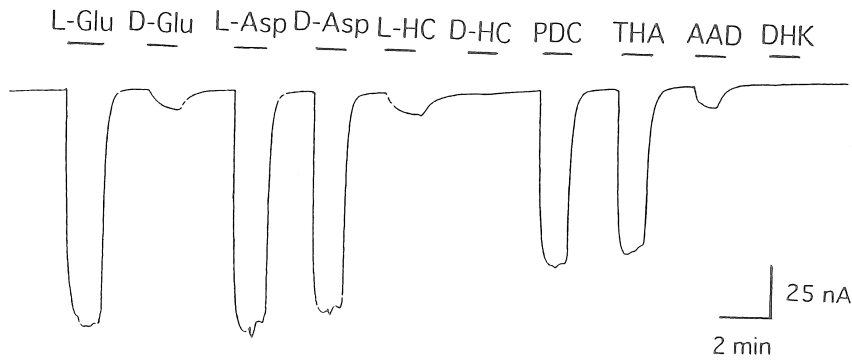


Fig. 2 Electrogenic transport of glutamate and its analogues by mEAAC1. HC: homocysteate, PDC: *L-trans*-pyrrolidine 2,4-dicarboxylate, THA: threo- β -hydroxyaspartate, AAD: L- α -aminoadipate, DHK: dihydrokainate

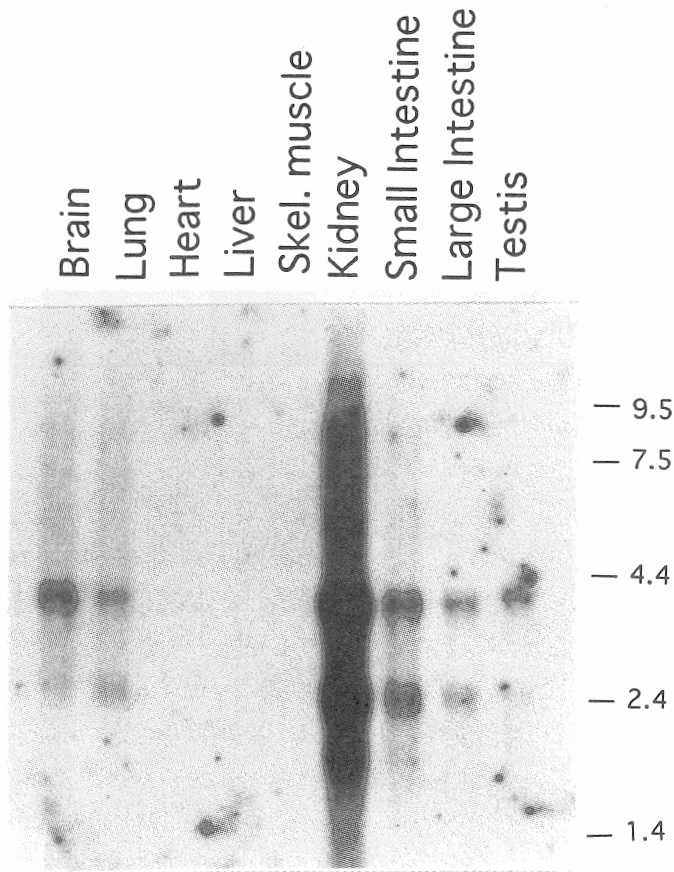


Fig. 3 Tissue distribution of expression of high-affinity glutamate transporter mEAAC1 in micc.

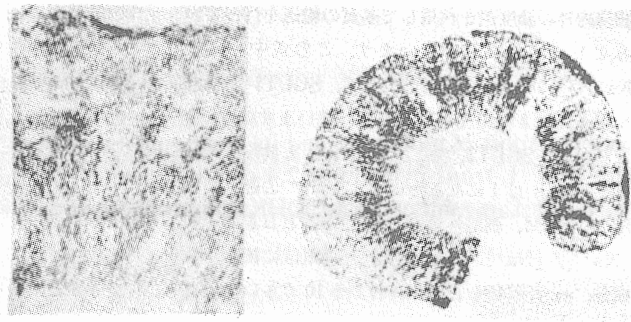


Fig. 4 Localization of expression of mEAAC1 in rat kidney with *in situ* hybridization. *Left*: high magnification view, *right*: low magnification view.

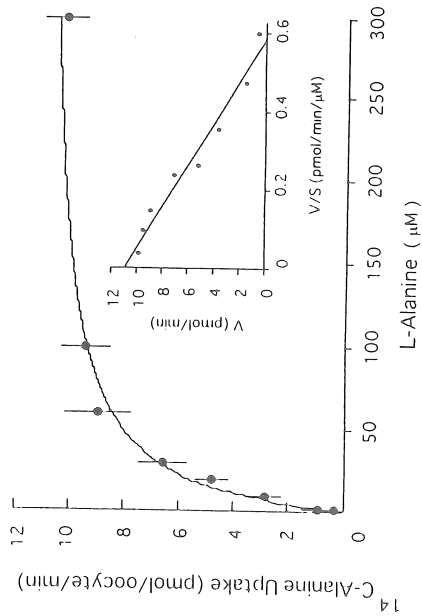


Fig. 6 Concentration dependency of alanine uptake by SNAT1 showing the saturable uptake typical of carrier-mediated transport. Inset: Eadie-Hofstee plot.

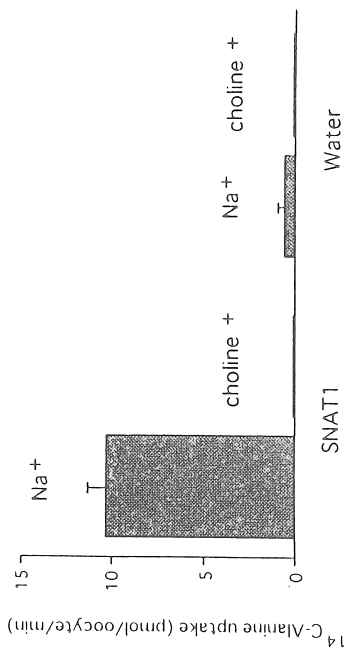


Fig. 5 Na⁺-dependent ¹⁴C-alanine uptake in *Xenopus* oocytes which express Na⁺-dependent neutral amino acid transporter SNAT1.

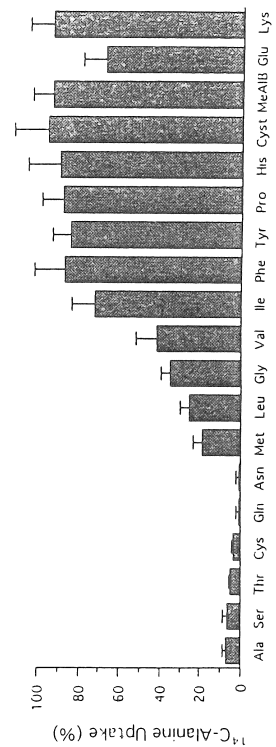


Fig. 7 Inhibition of alanine uptake by excess of amino acids and related compounds. The alanine (10 μM) uptakes in the presence of 1mM amino acids and related compounds are shown. MeAIB: α-(aminomethyl)isobutyric acid.

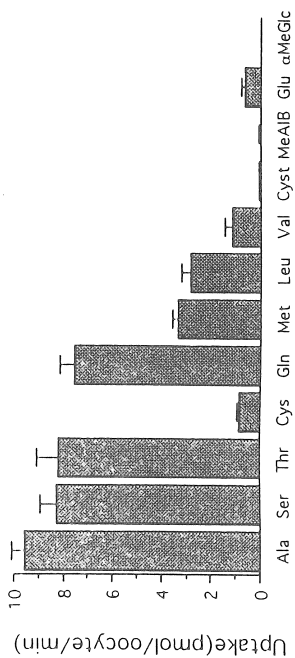


Fig. 8 Uptakes of amino acids and related compounds. Concentration of amino acids used were 100 μM. MeAIB: α-(aminomethyl)isobutyric acid, αMeGlc: α-methyl-D-glucopyranoside.

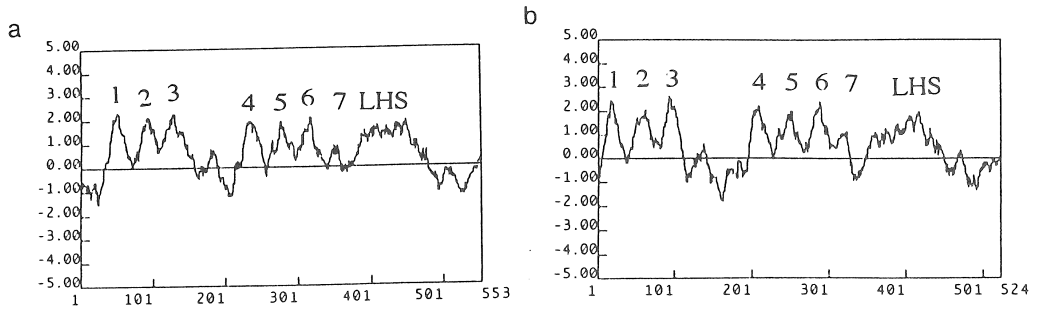


Fig. 9 Hydrophobicity plots of SNAT1 (a) and EAAC1 (b). LHS: long hydrophobic stretch

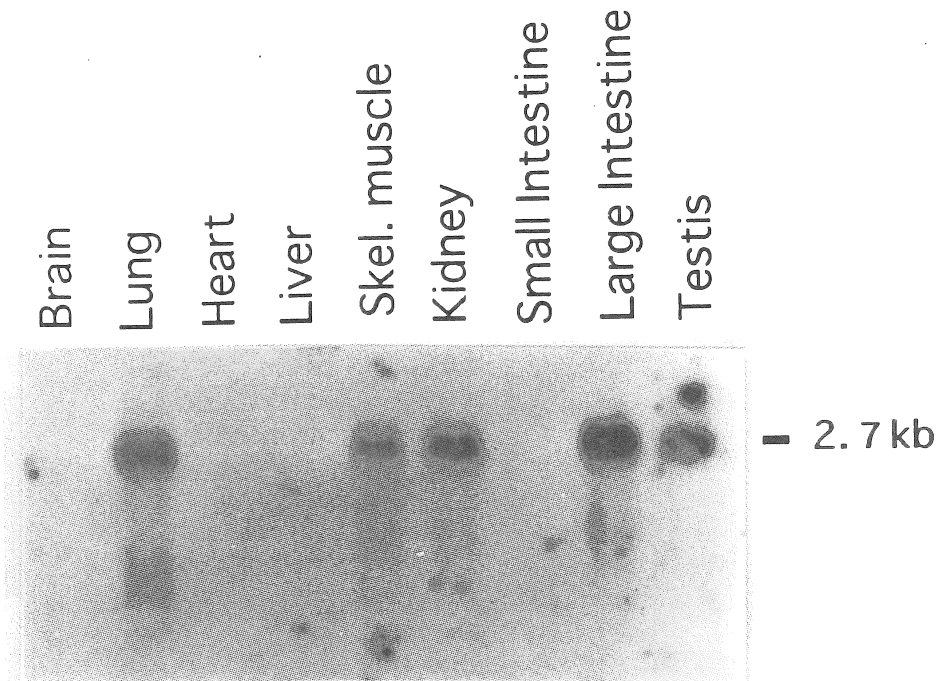


Fig. 10 Tissue distribution of expression of Na⁺-dependent neutral amino acid transporter SNAT1 in mice.

cDNA cloning of kidney proximal tubule Na⁺-dependent glutamate transporters and the appraisal of their roles in Na⁺-reabsorption

Yoshikatsu Kanai and Hitoshi Endou

Department of Pharmacology and Toxicology, Kyorin
University School of Medicine

Makoto Hosoyamada

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine,
University of Tokyo

Summary

Na⁺-coupled organic solute transport plays important roles in the reabsorption of Na⁺ from proximal tubules in kidney. For the understanding of the mechanisms of the coupling of Na⁺ transport and organic solute transport, the mechanisms of regulation of function, and the actual contribution of the Na⁺-coupled organic solute transport to Na⁺ reabsorption, it is necessary to reveal molecular nature of Na⁺-dependent organic solute transport systems. In this study, we have focused on Na⁺-dependent glutamate transport systems which are responsible for the Na⁺-coupled reabsorption of glutamate and aspartate from proximal tubule.

We screened mouse kidney cDNA library using rabbit intestine high-affinity glutamate transporter EAAC1 cDNA as a probe and isolated an EAAC1 cDNA to confirm that EAAC1 is an isoform of glutamate transporter which is expressed in kidney. The tubular distribution of expression of EAAC1 in proximal tubules was determined with *in situ* hybridization to be localized mainly in S2 and S3 segments. This was inconsistent with the results from micropuncture experiments which showed that more than 90% of glutamate disappeared from tubular fluid at S1 segment, suggesting the existence of additional glutamate transporter isoforms in S1 segment.

In order to clone a S1 segment glutamate transporter, we performed RT-PCR. The novel PCR product obtained from mouse testis (and kidney) was used to isolate full length cDNA. The cDNA from mouse testis encoded a novel Na⁺-dependent neutral amino acid transporter (SNAT1). SNAT1 was shown to be expressed also in kidney. SNAT1 has a structure related to glutamate transporters and exhibited low level of glutamate transport. It has to be determined whether SNAT1 is a S1 segment glutamate transporter or other unknown transporters exist in S1 segment.