

### 9533 腎でのNa<sup>+</sup>再吸収におけるNa<sup>+</sup>依存性中性/酸性アミノ酸輸送担体ファミリーの機能的役割の研究

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)

楯 直子 (杏林大学)

本研究は、腎におけるNa<sup>+</sup>総再吸収量の半分以上を担当する、近位尿細管のNa<sup>+</sup>/有機溶質共輸送系の分子の実体を明らかにし、そのNa<sup>+</sup>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、Na<sup>+</sup>依存性アミノ酸トランスポーターのファミリーとして現時点において確立されているNa<sup>+</sup>依存性中性/酸性アミノ酸輸送担体ファミリーの腎における発現の検討およびNa<sup>+</sup>共役の機序の解析を行った。

Na<sup>+</sup>依存性中性/酸性アミノ酸輸送担体ファミリーは、今のところ4種のグルタミン酸トランスポーター(酸性アミノ酸のトランスポーター)と2種の中性アミノ酸トランスポーターからなる。このファミリーの中性アミノ酸トランスポーターは、アラニン、セリン、スレオニン、システインなど側鎖に高度な分枝やbulkyな構造を持たないアミノ酸を基質とする輸送系ASCの性質を持つ。このうちわれわれが昨年度の研究の過程でマウス精巣から単離したNa<sup>+</sup>依存性中性アミノ酸トランスポーターASCT2は、ノーザンブロットでは腎にもその発現が認められたため腎での発現を確認する目的でヒト腎からのcDNAの単離を行った。

ヒト腎から単離したASCT2(hASCT2)と、ヒトテラトカルシノーマ細胞からクローニングしたASCT1(hASCT1)は、そのNa<sup>+</sup>共役の様式が大きく異なっていた。*Xenopus*卵母細胞に発現させるとASCT1、ASCT2共にスレオニンなどのアミノ酸基質に依存する<sup>22</sup>Na<sup>+</sup>取り込みを示すが、スレオニン取り込みのNa<sup>+</sup>濃度依存性はASCT1では、Hill係数が1.8であったのに対し、ASCT2ではHill係数は1.1で、ファミリーの他のメンバーと異なり1個のNa<sup>+</sup>と共役していることが示唆される。ASCT1は、溶液中のNa<sup>+</sup>をLi<sup>+</sup>で置換すると機能しないが、ASCT2はLi<sup>+</sup>を受け入れることができる。Na<sup>+</sup>をLi<sup>+</sup>で置換した溶液中では、ASCT2のLi<sup>+</sup>濃度依存性は明らかなS字状曲線を示す。これは、ASCT2においては恐らくアミノ酸残基の置換のために失われた第三のNa<sup>+</sup>結合部位がLi<sup>+</sup>を受け入れ得る状態になっていることを想像させる。。

グルタミン酸トランスポーターEAAC1に続き、中性アミノ酸トランスポーターASCT2の腎での発現が示された。ASCT2は、ファミリーの他のメンバーと異なったNa<sup>+</sup>共役の様式を示し、Na<sup>+</sup>結合部位の同定のために極めて有用な情報を提供した。



### 9533 腎でのNa<sup>+</sup>再吸収におけるNa<sup>+</sup>依存性中性/酸性アミノ酸輸送担体ファミリーの機能的役割の研究

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)

楯 直子 (杏林大学)

#### 1. 研究目的

Na<sup>+</sup>は、腎において尿細管から再吸収されることにより生体内に保持される。尿細管からの総Na<sup>+</sup>吸収の約50%以上は近位尿細管から主に糖やアミノ酸などの有機物と共輸送される形で再吸収されるとされているが、これは近位尿細管の有機物輸送担体の多くがNa<sup>+</sup>の電気化学ポテンシャルの勾配を利用して能動輸送を行っているためである。このような近位尿細管Na<sup>+</sup>依存性有機溶質輸送の分子機序の研究は、現在途についたばかりであり、今のところ、cDNAクローニングがなされ、尿細管分節への発現の局在の検討および詳細な機能解析がなされているのは、近位直尿細管に存在する高親和性Na<sup>+</sup>/グルコース共輸送担体及び曲尿細管の低親和性Na<sup>+</sup>/グルコース共輸送担体のみである。

複数の輸送系から成り立っているとされている近位尿細管のアミノ酸再吸収機構に関しては、1994年度のソルト・サイエンス研究財団助成研究により、Na<sup>+</sup>依存性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）EAAC1が、腎髄質外層外帯を中心に発現していることが示されたが、他の輸送系の分子の実体はいまだに不明のままである。われわれは、1994年度の研究の過程で、グルタミン酸トランスポーターに構造的に類似性のあるトランスポーターとして、輸送系ASC(1)の機能的性質を有するNa<sup>+</sup>依存性中性アミノ酸トランスポーターASCT2のcDNAをマウス精巣から単離した(2)。ASCT2のクローニングは、それに先立つ同じくASC系の機能を持つASCT1のヒト脳からのクローニング(3,4)と伴に、酸性アミノ酸トランスポーターのファミリーとして確立されたグルタミン酸トランスポーターファミリーをASC型Na<sup>+</sup>依存性中性アミノ酸トランスポーターを含む大きなアミノ酸トランスポーターファミリー（Na<sup>+</sup>依存性中性/酸性アミノ酸輸送担体ファミリー）へと拡張した。

本研究は、1994年度の研究の成果の上に、Na<sup>+</sup>依存性中性/酸性アミノ酸輸送担体ファミリーの腎近位尿細管でのNa<sup>+</sup>再吸収における役割を明らかにすることを最終的な目的として、腎からのcDNAクローニング、トランスポーター蛋白

の発現の局在の解析、Na<sup>+</sup> 共役の機序の解析を行った。

## 2. 研究方法

### 2.1 ヒト腎からの Na<sup>+</sup> 依存性中性アミノ酸トランスポーター ASCT2 の cDNA クローニング

ヒト腎 poly(A)<sup>+</sup> RNA (Clontech 社から購入) 1 µg より oligo(dT) をプライマーとして cDNA を合成し (GibcoBRL 社 SuperScript Choice System)、λZipLox EcoRI アーム (GibcoBRL 社) にライゲートすることにより λファ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、ニトロセルロース膜にブランクリフトし、マウス精巣由来 ASCT2 cDNA の BamHI 切断片 (約 1.5 kb) を <sup>32</sup>P でラベルしてプローブとして、常法に従ってブランクハイブリダイゼーションを行った。ニトロセルロース膜の洗浄は、0.1XSSC / 0.1% SDS、37 °C の条件下で行った。陽性ブランクは、LoxP 部位での相同組み換えを利用した *in vivo* excision によりプラスミド pZL1 に変換した。機能解析および DNA シーケンシングは pBluscript II SK<sup>-</sup> にサブクローニングして行った。

### 2.2 *Xenopus* 卵母細胞を用いた機能解析

mouse ASCT2、human ASCT2、あるいは human ASCT1 の cDNA が挿入された pBluscript II SK<sup>-</sup> を HindIII で切断し、T7 RNA ポリメラーゼによる *in vitro* 転写により cRNA を合成した。cRNA は *Xenopus* 卵母細胞に注入することによって発現させ、機能解析は、cRNA 注入後 40-50 時間で行った。発現した輸送機能は、<sup>14</sup>C で標識したアミノ酸の取り込みを指標に解析した。

アミノ酸取り込み測定は、NaCl 100 mM、KCl 2mM、CaCl<sub>2</sub> 1.6mM、MgCl<sub>2</sub> 1mM、HEPES 10mM/Tris ~5mM (pH 7.4) の溶液で行った。取り込みの Na<sup>+</sup> 濃度依存性の検討には、溶液中の NaCl の一部または全部を choline-Cl で置換した溶液を用いた。Li<sup>+</sup> の効果を調べる目的には、溶液中の NaCl を LiCl と choline-Cl で置換した溶液 (LiCl + choline-Cl = 100 mM) を用いた。アミノ酸取り込みは、60 分まで直線的に増加したため、30 分間の取り込みを液体シンチレーションカウンターで測定し、pmol/oocyte/min で表示した。取り込みの K<sub>m</sub> (Michaelis 定数) と V<sub>max</sub> は、濃度依存的な取り込み値から Eadie-Hofstee plot を用いて算出した。

<sup>22</sup>Na<sup>+</sup> の取り込み測定には、アミノ酸取り込み測定の場合と同様に取り込み測定を行ったが、*Xenopus* 卵母細胞は、1mM ouabain、0.1mM amiloride、0.1mM bumetanide を含んだ取り込み溶液中 (NaCl 20 mM、choline-Cl 80mM、KCl

2mM、CaCl<sub>2</sub> 1.6mM、MgCl<sub>2</sub> 1mM、HEPES 10mM/Tris ~5mM (pH 7.4) に30分間放置し、その後それに<sup>22</sup>Na<sup>+</sup>を加えた取り込み溶液中での20分間の<sup>22</sup>Na<sup>+</sup>の取り込みを測定した。

### 2.3 ASCT2のヒトにおける発現の組織分布の検討

発現の組織分布の検討は、ノーザンブロットハイブリダイゼーションによって行った。ヒト組織由来のpoly(A)<sup>+</sup>RNA (Clontech社から購入) 1μgを1%アガロース/ホルムアルデヒドゲルで電気泳動し、ニトロセルロース膜にブロットティングした。ヒトASCT2 cDNAのNcoI切断片(約0.5 kb)を<sup>32</sup>P-dCTPの存在下でランダムプライム法により標識して、50%ホルムアミドを含むハイブリダイゼーション溶液中でハイブリダイゼーションを行った。ニトロセルロース膜の洗浄は、0.1XSSC/0.1% SDS、65°Cの条件下で行った。

### 2.4 グルタミン酸トランスポーターEAAC1蛋白の腎における発現の局在の検討

グルタミン酸トランスポーターEAAC1のC末端合成ペプチドに対して作製した特異抗体(Jeffery Rothstein博士からの供与)による、ラット腎凍結切片を用いた免疫組織化学を行った。

## 3. 研究結果

### 3.1 ヒト腎からのNa<sup>+</sup>依存性中性アミノ酸トランスポーターASCT2のcDNAクローニング

マウス精巣由来のNa<sup>+</sup>依存性中性アミノ酸トランスポーターASCT2のcDNAをプローブとして、ヒト腎由来のpoly(A)<sup>+</sup>RNAより作製したλZipLoxファージライブラリーをプラークハイブリダイゼーションによって240,000プラークをスクリーニングし、HK-1~5の5個の陽性クローンを単離した。それらは、制限酵素地図が一致したため5'-末端の伸長度を除いては同一のものと考え、最長のcDNAインサートを持つクローンHK-3(2.9 kb)をその後の解析に用いた。HK-3 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ると、<sup>14</sup>C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<sup>+</sup>に依存するものであった(Fig. 1)。

### 3.2 ヒトASC型トランスポーターhASCT2とhASCT1の基質選択性の比較

本研究によりヒト腎から得られたASCT2(hASCT2)と、ヒトテラトカルシノーマ細胞に発現するASC型トランスポーターのクローニングの過程で単離された

ASCT1 (hASCT1) を *Xenopus* 卵母細胞に発現させ、両者の基質選択性の違いを比較した。両者ともに一群のアミノ酸に対して Na<sup>+</sup> 依存性の取り込みを示した。hASCT2 は、アラニン、セリン、スレオニン、システイン、グルタミン、バリン、メチオニン、ロイシンなどを基質とし、その取り込みの K<sub>m</sub> は、それぞれ、36.2、37.4、35.7、34.6、33.6、210.7、287.7、163.9 μM であった。hASCT1 は、アラニン、セリン、スレオニン、システインおよびバリンを基質とし、その K<sub>m</sub> は、それぞれ、81.5、55.9、47.6、12.4、850.8 μM であった。hASCT1 は、hASCT2 が基質としたグルタミン、メチオニン、ロイシンは輸送しなかった。ASCT2 と ASCT1 では、輸送基質によって両者の親和性が大きく異なっていたため、以下の両者の機能特性の比較には、両者間で最も K<sub>m</sub> 値の近い基質であるスレオニンを使用した。

### 3.3 hASCT2 と hASCT1 の Na<sup>+</sup> 共役の様式の比較

ASCT2 および ASCT1 を介するアミノ酸の取り込みはともに細胞外の Na<sup>+</sup> に依存し、細胞外の Na<sup>+</sup> を除去すると取り込みは完全に抑えられた (ASCT2 に関しては Fig. 1a ; ASCT1 についても結果は同様)。両者とも細胞外のスレオニンに依存する <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> の取り込みを示した (Fig. 2c)。しかし、両者のスレオニン取り込みの Na<sup>+</sup> 濃度依存性には、大きな相違が見られた。ASCT2 を介するスレオニンの取り込みの Na<sup>+</sup> 濃度依存性は、Fig. 2a で示されるように Michaelis-Menten 曲線に良く近似されるものであり、Hill 係数は 1.1 と計算された。ASCT2 の Na<sup>+</sup> に対する K<sub>m</sub> は、スレオニン 20 μM の存在下において 2.4 mM であった。これに対して ASCT1 を介するスレオニン取り込みの Na<sup>+</sup> 濃度依存性は、S 字状曲線を示し (Fig. 2b)、Hill 係数は 1.8 であった。

アミノ酸結合部位と Na<sup>+</sup> 結合部位間の相互作用を ASCT2 と ASCT1 で比較するために、スレオニン取り込みの K<sub>m</sub> 値への Na<sup>+</sup> 濃度の影響、および Na<sup>+</sup> の K<sub>m</sub> 値あるいは見かけ上の K<sub>0.5</sub> 値へのスレオニン濃度の影響を検討した。ASCT2 においては、Na<sup>+</sup> 濃度の変化はスレオニンの K<sub>m</sub> 値にはほとんど影響を与えなかったが、ASCT1 においては、Na<sup>+</sup> 濃度を 1-100 mM へ変化させると、スレオニンの K<sub>m</sub> 値は、~80-~50 μM へと変化した。また、ASCT2 においては、スレオニン濃度は Na<sup>+</sup> の K<sub>m</sub> 値にはほとんど影響を与えなかったが、ASCT1 においては、スレオニン濃度を 1-500 μM へ変化させると、Na<sup>+</sup> の K<sub>0.5</sub> 値は、~20-~3 mM へと変化した。

### 3.3 hASCT2 と hASCT1 の Li<sup>+</sup> 依存性の比較

Fig. 3a に示すように、細胞外の  $\text{Na}^+$  を完全に取り除き、 $\text{Li}^+$  に置換した溶液中でも ASCT2 はスレオニンの取り込みを示す。これに対して ASCT1 は、 $\text{Li}^+$  によってはスレオニンの取り込みを示さず、 $\text{Li}^+$  を共役イオンとしては受け入れないことになる。

ASCT2 における  $\text{Li}^+$  100 mM /  $\text{Na}^+$  0mM でのスレオニン取り込みは、Fig. 4a に示すように Michaelis-Menten 曲線に近似され、その  $K_m$  値は、 $\sim 350 \mu\text{M}$  であった。Fig. 4b に示すように、 $\text{Na}^+$  非存在下、スレオニン 1.5 mM を含む溶液中で測定した、ASCT2 を介するスレオニン取り込みの  $\text{Li}^+$  濃度依存性は明らかな S 字状曲線を示した。

### 3.4 ASCT2 のヒトでの発現の組織分布

Fig. 5 に示すように、ヒト組織由来の poly(A)<sup>+</sup>RNA を用いて行ったノーザンプロットでは、ヒトにおいては、2.9 kb のメッセージが発現していることが明らかになった。従って、得られた cDNA クローン HK-3 はほぼ全長の mRNA に対応していることになる。試みた poly(A)<sup>+</sup>RNA のうち、クローンが単離された腎の他、小腸、胎盤にも同程度の発現が見られる。興味深いことに、腫瘍細胞株であるテラトカルシノーマ細胞には強力な ASCT2 の発現が認められた。

### 3.5 グルタミン酸トランスポーター EAAC1 蛋白の腎尿細管での発現の局在の検討

EAAC1 の C-末端に対するのペプチド抗体を用いてラット腎での EAAC1 蛋白の発現の局在を検討した。EAAC1 蛋白は、近位尿細管 S2 分節から S3 分節にかけての管腔側膜に強い免疫染色が観察された。

## 4. 考察

本研究は、腎における  $\text{Na}^+$  総再吸収量の半分以上を担当する、近位尿細管の  $\text{Na}^+$  / 有機溶質共輸送系の分子の実体を明らかにし、その  $\text{Na}^+$  再吸収における役割を解明することを最終的な目的として、 $\text{Na}^+$  依存性中性 / 酸性アミノ酸輸送担体ファミリーのトランスポーターの腎からの cDNA クローニング、 $\text{Na}^+$  共役の機序の解析、トランスポーター蛋白の発現の局在の解析を行った。

ASCT2 は、昨年度の研究の過程でマウス精巢から単離したものであるが、マウスにおけるノーザンプロットでは、腎にもシグナルが認められていた(2)。そこで、腎に実際に ASCT2 が発現していることを証明するために、マウス cDNA をプローブとしてヒト腎 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。その結

果、ヒト腎 ASCT2 (hASCT2) が単離され、ASCT2 が実際に腎に発現することが確認された。

ももとはヒト脳からクローニングされ（3、4）、われわれがヒトテラトカルシノーマ細胞からも単離した hASCT1 と比較して、hASCT2 は、次のようなきわだった特徴を持つ。

1) ASCT2 は、ASCT1 より広い基質選択性を持つ。ASCT2 は、グルタミンを高親和性の基質として受け入れるが、ASCT1 は、グルタミンは全く輸送しない。さらに、ASCT2 は、低親和性ながらメチオニンやロイシンといった長い側鎖を持った中性アミノ酸も受け入れることができる。これは、ASCT2 の基質結合部位が ASCT1 のそれよりも空間的な広がりを持っていることを示唆していると思われる。

2) ASCT2 も ASCT1 と同様、アミノ酸基質の輸送に伴い  $\text{Na}^+$  が輸送されるが、その共役比が異なっている。 $\text{Na}^+$  に対する Hill 係数が、ASCT1 では、1.8 であるのに対して、ASCT2 では 1.1 であったことから、ASCT1 は、ファミリーの他のメンバーであるグルタミン酸トランスポーターと同様、2 個の  $\text{Na}^+$  と共役しているのに対して、ASCT2 は、1 個の  $\text{Na}^+$  と共役していると考えられる。ASCT2 が  $\text{Na}^+$  に対して高親和性であることから、ファミリーの他のメンバーが持つ 2 個の  $\text{Na}^+$  結合部位(5)のうち、ASCT2 には高親和性部位のみが存在していると思われる。

3) ASCT2 は、ASCT1 やグルタミン酸トランスポーターで観察されるようなアミノ酸結合部位と  $\text{Na}^+$  結合部位間の相互作用 (5) が小さい。このことより、ASCT2 が欠いている第二の  $\text{Na}^+$  結合部位が、アミノ酸結合部位と  $\text{Na}^+$  結合部位間の相互作用を媒介する役割を果たしていると考えられる。

4) ASCT2 は、 $\text{Na}^+$  の代わりに  $\text{Li}^+$  を受け入れることができるが、ASCT1 は  $\text{Li}^+$  のみの溶液中では機能しない。この結果は、ASCT2 と ASCT1 に共通に存在する  $\text{Na}^+$  結合部位が  $\text{Li}^+$  を受け入れることができ、ASCT2 が欠いている第二の  $\text{Na}^+$  結合部位は  $\text{Li}^+$  を受け入れることができないと仮定すると解釈できる。

5) ASCT2 の  $\text{Na}^+$  濃度依存性は Michaelis-Menten 曲線に良く近似されるのに対して、 $\text{Li}^+$  濃度依存性は明らかまな S 字状曲線を示す。これは、ASCT2 で恐らくアミノ酸残基の置換のために失われている第二の  $\text{Na}^+$  結合部位がかえってそのアミノ酸置換のために  $\text{Li}^+$  を受け入れ得る状態にあり、そのために  $\text{Li}^+$  に対しては複数個の結合部位が存在する結果となっている可能性がある。

## 5. 今後の課題

本研究によって、 $\text{Na}^+$  依存性中性アミノ酸トランスポーター ASCT2 が腎に発現



することが実際に確認された。さらに ASCT2 は、そのNa<sup>+</sup> 共役の様式においてファミリーの他のメンバーと異なった際だった性質を有することが示された。ASCT2 とファミリーの他のメンバーの構造と機能を比較することにより、アミノ酸基質結合部位やNa<sup>+</sup> 結合部位を一次構造上で予想し、部位特異的変異導入によりその同定を目指すのが次の段階である。この成果は、Na<sup>+</sup> の重要な生理的役割の一つである有機物能動輸送の分子機序の理解に貢献するのみならず、Na<sup>+</sup> /有機溶質共輸送体のNa<sup>+</sup> の通路としての生体内のNa<sup>+</sup> フラックスにおける役割の解明を通じてNa<sup>+</sup> 恒常性さらには病態との関連などの研究への出発点となると思われる。

## 6. 文献

- (1) Christensen, HN: Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol.Rev.* 70: 43-77 (1990).
- (2) Utsunomiya-Tate, N, Endou, H, and Kanai, Y: Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na<sup>+</sup>-dependent neutral amino acid transporter. *J. Biol. Chem.* 271: 14833-14890 (1996).
- (3) Shafqat, S, Tamarappoo, BK, Kilberg, MS, et al.: Cloning and expression of a novel Na<sup>+</sup>-dependent neutral amino acid transporter structurally related to mammalian Na<sup>+</sup>/glutamate cotransporters. *J. Biol. Chem.* 268: 15351-15355 (1993).
- (4) Arriza, JL, Kavanaugh, MP, Fairman, WA, et al.: Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family. *J. Biol. Chem.* 268: 15329-15332 (1993).
- (5) Kanai, Y, Nussberger, S, Romero, MF, et al.: Electrogenic properties of the epithelial and neuronal high affinity glutamate transporter. *J. Biol. Chem.*, 270: 16561-16568 (1995).

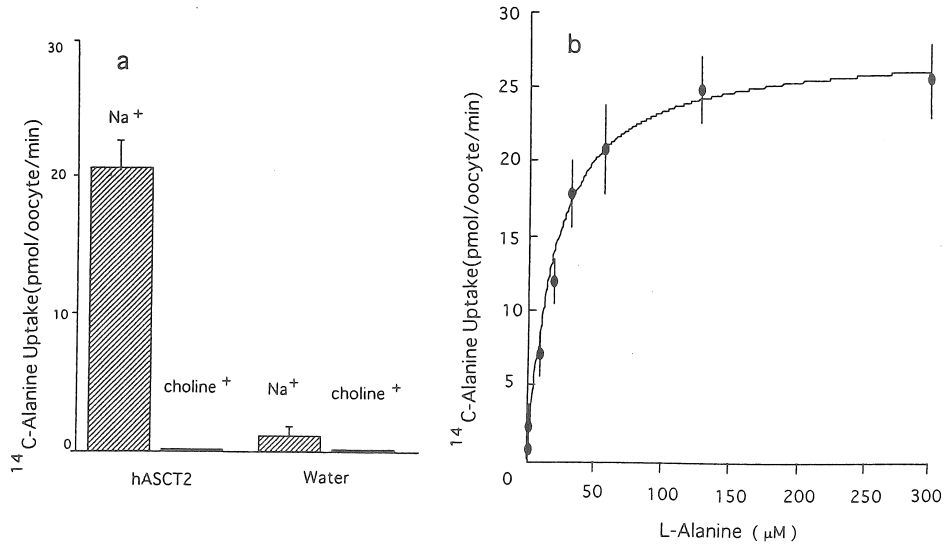


Fig. 1 a,  $\text{Na}^+$ -dependent  $^{14}\text{C}$ -alanine uptake in *Xenopus* oocytes which express hASCT2. The uptake for control oocytes which was injected with water is also shown. b, concentration dependence of alanine uptake.

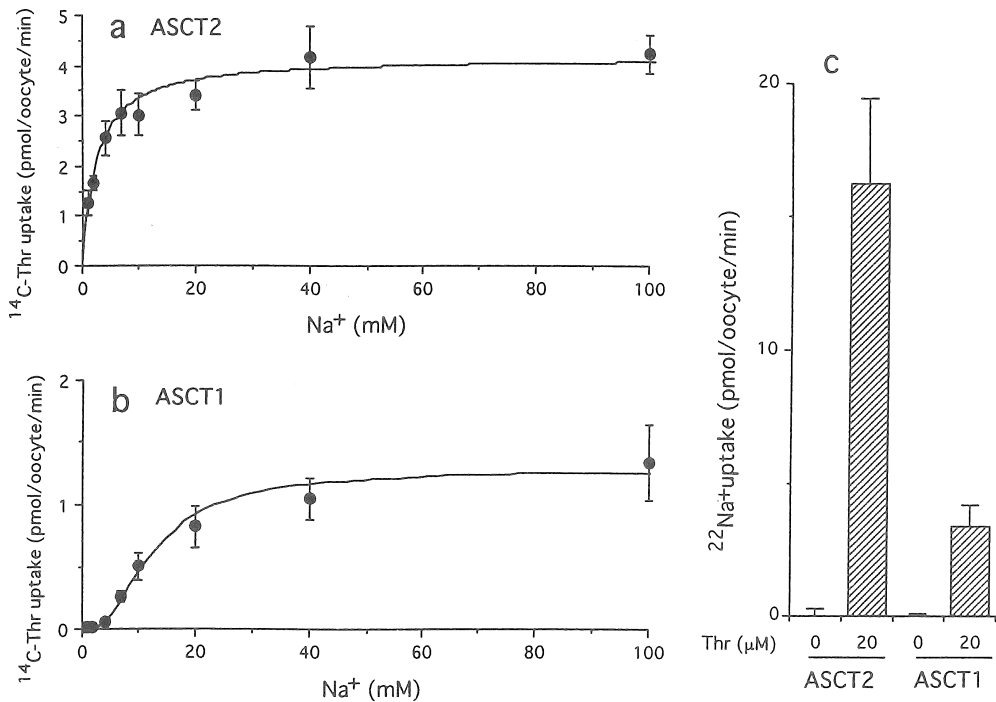


Fig. 2 a,  $\text{Na}^+$  concentration dependence of threonine uptake in hASCT2 (a) and hASCT1 (b). c,  $^{22}\text{Na}^+$  uptake in the presence or absence of threonine (20  $\mu\text{M}$ ) for hASCT2 and hASCT1.

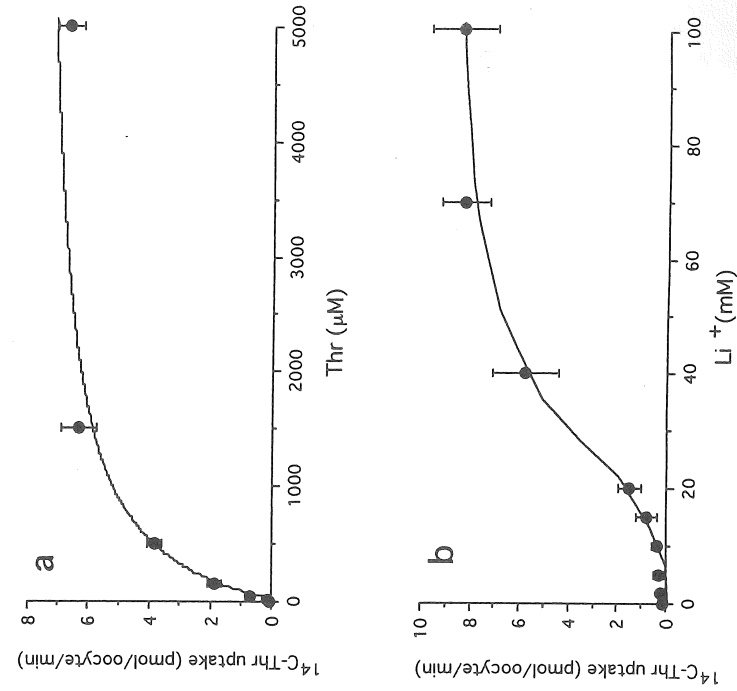


Fig. 4 Concentration dependence of threonine uptake in the uptake solution containing 100mM  $\text{Li}^+$  and 0mM  $\text{Na}^+$ .

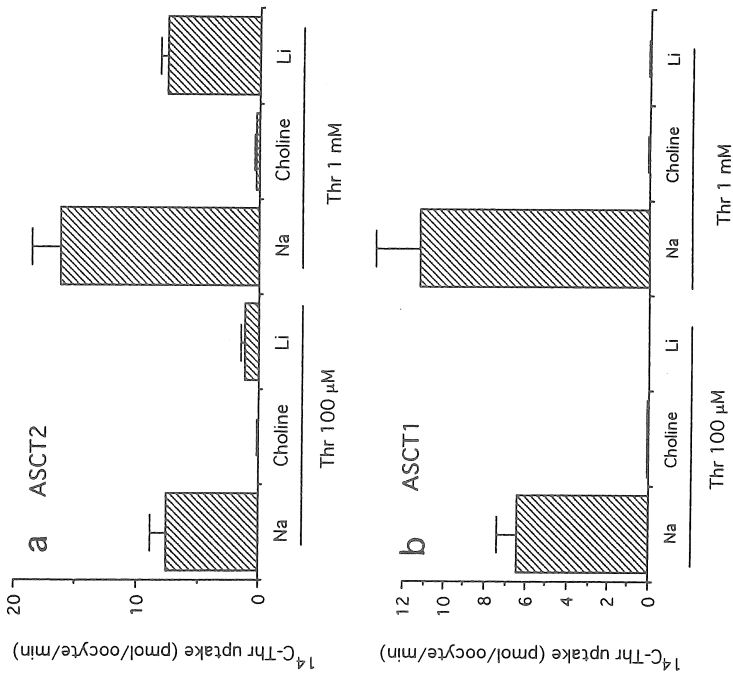


Fig. 3 The effects of replacement of  $\text{Na}^+$  with  $\text{choline}^+$  or  $\text{Li}^+$  for hASCT2 (a) and hASCT1 (b). Threonine uptake was measured at 100  $\mu\text{M}$  and 1 mM.

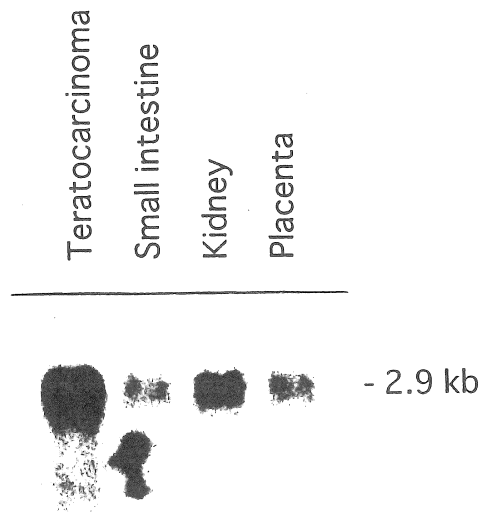


Fig. 5 Tissue distribution of expression of hASCT2 in human.

**The role of Na<sup>+</sup>-dependent neutral and acidic amino acid transporter family in Na<sup>+</sup>-reabsorption in kidney**

Yoshikatsu Kanai, Naoko Utsunomiya-Tate and Hitoshi Endou  
Department of Pharmacology and Toxicology  
Kyorin University School of Medicine

Summary

Na<sup>+</sup>-coupled organic solute transport plays important roles in the reabsorption of Na<sup>+</sup> from the proximal tubules of kidney. For the understanding of the mechanisms of the coupling of Na<sup>+</sup> transport to the organic solute transport and of the actual contribution of the Na<sup>+</sup>-coupled organic solute transport to Na<sup>+</sup> reabsorption, it is necessary to isolate cDNA clones coding for the transporters which would be quite useful tools to investigate their transport properties and the exact location of expression. The molecular nature of Na<sup>+</sup>-dependent amino acid transport systems has been elusive for many years; however, recent cloning studies have established a family of Na<sup>+</sup>-dependent neutral and acidic amino acid transporters. In this family, glutamate transporter EAAC1 and neutral amino acid transporter ASCT2 are expressed in kidney.

We isolated ASCT2 cDNA from human kidney. The comparison of human ASCT2 (hASCT2) with a neutral amino acid transporter human ASCT1 (hASCT1) which we obtained from teratocarcinoma cells revealed important properties of Na<sup>+</sup> binding sites. The Hill coefficient of Na<sup>+</sup>-dependence of threonine uptake was 1.8 for ASCT1, whereas that for ASCT2 was 1.1, indicating that ASCT2 couples to a single Na<sup>+</sup> transport, which is distinct from the other members of the family that couple to two Na<sup>+</sup>. The Na<sup>+</sup> binding site of ASCT2 is capable of accepting Li<sup>+</sup> instead of Na<sup>+</sup>, although the affinity for amino acid substrates becomes ~10 times lower in Li<sup>+</sup>. In contrast, ASCT1 does not operate in Li<sup>+</sup>. Surprisingly, ASCT2-mediated threonine uptake exhibited a sigmoidal dependence on Li<sup>+</sup>. This suggests that the "residual" Na<sup>+</sup>-binding site of ASCT2 which corresponds to the 2nd Na<sup>+</sup> binding site in the other members of the family and does not accept Na<sup>+</sup> anymore in ASCT2 probably because of replacement of amino acid residues has acquired the structure to accept Li<sup>+</sup>.

Based on the comparison of ASCT2 with the other members of Na<sup>+</sup>-dependent neutral and acidic amino acid transporter family, it would be feasible to design site-directed mutagenesis studies to determine the Na<sup>+</sup> binding sites and to understand the mechanisms of Na<sup>+</sup> drive in the Na<sup>+</sup> cotransport which is one of the important physiological roles of Na<sup>+</sup> in animal body.