

9636  $\text{Na}^+$ /アミノ酸共輸送系における $\text{Na}^+$ 共役の分子機序の解明

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)  
盾 直子(杏林大学 医学部)

本研究は、 $\text{Na}^+$ 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を解明することを目的として、 $\text{Na}^+$ 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 $\text{Na}^+$ 依存性中性/酸性アミノ酸トランスポーターのファミリーの基質認識と $\text{Na}^+$ 共役の機序の解析を行った。

$\text{Na}^+$ 依存性中性/酸性アミノ酸トランスポーターのファミリーは、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ASCT2(hASCT2:ヒト腎由来)とASCT1(hASCT1:ヒトテラトカルシノーマ細胞由来)は、57%のアミノ酸配列の相同性を有し、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。しかし、ASCT2は共通の輸送基質に加えてグルタミンも輸送するなどASCT1に比してより広い基質選択性を有していた。さらに両者は $\text{Na}^+$ 共役の様式が大きく異なっていた。ASCT1、ASCT2共にスレオニンなどのアミノ酸基質に依存する $^{22}\text{Na}^+$ 取り込みを示すが、スレオニン取り込みの $\text{Na}^+$ 濃度依存性は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 $\text{Na}^+$ と共役していることが示唆された。またASCT1は、溶液中の $\text{Na}^+$ を $\text{Li}^+$ に置換すると機能しないが、ASCT2は $\text{Li}^+$ を受け入れることができた。興味深いことに、ASCT1、ASCT2ともに、細胞外に輸送基質を与えることにより、細胞内からの基質アミノ酸の流出が観察された。このアミノ酸の流出は細胞外の $\text{Na}^+$ に依存せず、細胞外の基質濃度を上げることによって上昇した。従って、両者は、 $\text{Na}^+$ 駆動型のトランスポーターでありながら、アミノ酸交換輸送体としても機能すると考えられる。ASCT1、ASCT2の基質選択性と無機イオン依存性の違いに基づき、有機基質認識部位と $\text{Na}^+$ 結合部位の同定を目的としたキメラ解析が進行中である。この結果は、われわれがグルタミン酸トランスポーターにおいて行った、取り込み阻害薬ジヒドロカイニン酸感受性の決定に関わる領域のキメラ解析の結果と総合することにより、 $\text{Na}^+$ 依存性中性/酸性アミノ酸トランスポーターのファミリーの $\text{Na}^+$ と有機基質の透過機構を考察するうえで有用な情報を提供するものと考えられる。



9636  $\text{Na}^+$ /アミノ酸共輸送系における  $\text{Na}^+$ 共役の分子機序の解明

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)  
盾 直子 (杏林大学 医学部)

### 1. 研究目的

$\text{Na}^+$ 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 $\text{Na}^+$ 吸収の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が、これは近位尿細管の管腔側膜の有機物輸送体の多くが細胞膜を介する $\text{Na}^+$ 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。 $\text{Na}^+$ /有機溶質共輸送体においては、輸送体(トランスポーター)分子内に $\text{Na}^+$ 結合部位と有機基質結合部位があり、それぞれに $\text{Na}^+$ あるいは有機基質が結合するとトランスポーター蛋白のコンフォメーションが変化し、 $\text{Na}^+$ と有機基質は細胞内へと移行するとされている。しかし、有機基質認識部位及び $\text{Na}^+$ 結合部位は、いずれの $\text{Na}^+$ /有機溶質共輸送体においても同定されていない。

イオンチャネルの構造機能相関は、cDNAクローニングに続く部位特異的変異導入により明らかにされてきた。これは、イオンチャネルにおいては、蓄積された電気生理学的研究の成果に基づいた、チャネルの動作を記述するすぐれたモデルが存在するため、部位特異的変異体に検出された変化をそのモデルを参照して評価することが可能なためである。しかし、トランスポーターにおいては、そのようなトランスポーターの一般的構造を表象する機能的モデルはできあがっていない。従って、トランスポーターの構造機能相関の研究は、各トランスポーターあるいは、トランスポーターファミリーにおいて個別に行なわなければならないのが現状である。本研究では、申請者らが1995年度のソルト・サイエンス研究財団助成研究においてヒト腎からクローニングした $\text{Na}^+$ /中性アミノ酸共輸送体( $\text{Na}^+$ 依存性中性アミノ酸トランスポーター) ASCT1及びASCT2において、両者の基質認識及び $\text{Na}^+$ 共役の性質の違いに着目して、基質認識部位と $\text{Na}^+$ 結合部位を同定することを目的としたキメラ解析を行った。

### 2. 研究方法

## 2.1 Na<sup>+</sup> 依存性中性アミノ酸トランスポーター ASCT2 と ASCT1 の cDNA キメラの作製

ヒト腎由来 ASCT2 と ASCT1 の両者の cDNA をプラスミドベクター pBluescript II SK<sup>-</sup> のマルチクローニングサイトにタンデム (ASCT2 が 5' 側、ASCT1 が 3' 側) に挿入した。それを、両者の間に設定した制限酵素部位で切断し、相同組み換えを高頻度に起こす recA<sup>+</sup> 大腸菌株 JM101 あるいは NM522 に熱ショック法を用いて導入した (Fig. 1)。生成したコロニーからプラスミドを抽出し、制限酵素処理後のアガロース電気泳動で挿入 DNA のサイズを確認し、ASCT2 と ASCT1 のキメラが生成したときに予想されるサイズを示すもののみについてその後の解析を行った。

## 2.2 ASCT2/ASCT1 キメラの接合点の決定

キメラ cDNA のキメラ接合点は、ドットプロットハイブリダイゼーションと DNA シーケンシングによって決定した。ドットプロットハイブリダイゼーションには、ASCT2 及び ASCT1 の翻訳開始部位から終止コドンまでを均等に 4 分割する領域をそれぞれ PCR で増幅し、TA クローニングキット (インビトロゲン) を用いてプラスミドベクターにサブクローニングしたものから EcoRI により切り出した断片を<sup>32</sup>P Quick Prime kit (ファルマシア) を用いて<sup>32</sup>P で標識してプローブとして用いた。キメラ cDNA は、ニトロセルローロスフィルターにドットプロットし (8 枚のドットプロットを作製)、50% ホルムアミド中でハイブリダイゼーションを行った。フィルターの最終的な洗浄は、0.1XSSC/0.1%SDS、65°C で行った。

DNA シーケンシングは、ドットプロットハイブリダイゼーションの結果に基づいて予想された部位に最も近いと思われるプライマーを、予め ASCT2 および ASCT1 翻訳領域中 8ヶ所に設定したプライマーから選定し、dideoxy 法によって行った。

## 2.3 *Xenopus* 卵母細胞を用いた機能解析

生成したキメラ cDNA が挿入された pBluescript 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) の溶液中で行った。取り込みの  $\text{Na}^+$  濃度依存性の検討には、溶液中の  $\text{NaCl}$  の一部または全部を choline-Cl で置換した溶液を用いた。  $\text{Li}^+$  の効果を調べる目的には、溶液中の  $\text{NaCl}$  を  $\text{LiCl}$  で置換した溶液を用いた。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、 $\text{pmol/oocyte/min}$  で表示した。取り込みの  $K_m$  (Michaelis 定数) と  $V_{\text{max}}$  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。

### 3. 研究結果

#### 3.1 ASCT2 と ASCT1 機能的性質の比較

すでに 1995 年度の助成研究報告書に記したように、ASCT2 と ASCT1 は、基質選択性と  $\text{Na}^+$  依存性に関して異なった性質を示す。

ASCT2 と ASCT1 は、ともにアラニン、セリン、スレオニン、システンを高親和性の基質とするが、ASCT2 はより広い基質選択性を示し、加えてグルタミンも高親和性の基質とする (Table 1)。これに対して ASCT1 はグルタミンは全く輸送しない。

ASCT1 においては、スレオニン取り込みの  $\text{Na}^+$  依存性が S 字状カーブを示し、2つの  $\text{Na}^+$  結合部位を持つと考えられるが、ASCT2 のスレオニン取り込みの  $\text{Na}^+$  依存性は Michaelis-Menten 曲線に近似され、単一の  $\text{Na}^+$  結合部位を持つと考えられる (Fig. 2a)。さらに、ASCT2 は、細胞外の  $\text{Na}^+$  を  $\text{Li}^+$  に置換しても基質アミノ酸を輸送できるが、ASCT1 は、 $\text{Li}^+$  中ではアミノ酸を輸送できない (Fig. 2b)。

#### 3.2 ASCT2/ASCT1 キメラの生成

制限酵素により ASCT2 cDNA と ASCT1 cDNA の間で切断したプラスミドを  $\text{recA}^+$  の大腸菌に感染させることにより生じたコロニーの約 60% が、相同組み換えがおこった場合に予想されるサイズの挿入 DNA を含んでいた。それを、ASCT2 及び ASCT1 の N-末端から C-末端にかけて 4 分割した領域に相当するプローブによりドットプロットを行うことにより、キメラ接合点を大まかにマップした。ASCT2 及び ASCT1 の翻訳領域に 8 箇所設定したシーケンシング用のプライマーのうち予想されるキメラ接合点に最も近いと思われるものをドットプロットの結果をもとにして選択し、そのプライマーを用いて DNA シーケンシングを行い、キメラ接合点を決定した。報告書作成時点では DNA シーケンシングが終了していないため、キメラ接合点は、ドットプロットの結果をもとにして、N-末

端から C- 末端にかけて A、B、C、D の4つの領域で表現した (Fig. 3)。

### 3.3 ASCT2/ASCT1 キメラのグルタミン輸送とスレオニン輸送の比較

生成したキメラは、*Xenopus* 卵母細胞に発現させると野性型と同様な  $\text{Na}^+$  依存性のスレオニンの取り込みを示した (Fig. 4)。さらにキメラのグルタミン輸送能を調べると、グルタミンを輸送するもの(例:キメラ HTJ58)としないもの(例:キメラ HTJ186)があることが明らかになった (Fig. 4)。Fig. 5 に示すように、領域 B や C に接合点を持つキメラは、すべてスレオニンのみ輸送する型のものであり、スレオニン及びグルタミンをとともに輸送するものは存在しなかった。スレオニン及びグルタミンをとともに輸送するキメラは、領域 D に接合点をもつものなかに存在した。

### 3.4 ASCT2/ASCT1 キメラの $\text{Li}^+$ 受容性

Fig. 6 に示すように、生成したキメラには、*Xenopus* 卵母細胞に発現させると、ASCT2 と同様に  $\text{Li}^+$  を共役イオンとして受け入れるもの(例:キメラ HTJ58、HTJ186)と、ASCT1 と同様に  $\text{Li}^+$  を共役イオンとして受け入れないもの(例:キメラ HTJ32)が存在した。

### 3.5 ASCT2/ASCT1 キメラの $\text{Na}^+$ 依存性

ASCT2/ASCT1 キメラのうち4つ (HTN10、HTJ32、HTJ58、HTJ186) を選択し、スレオニン ( $50 \mu\text{M}$ ) 取り込みの  $\text{Na}^+$  依存性を検討した。Fig. 7 に示すように、HTN10、HTJ58、HTJ186 は Michaelis-Menten 曲線に近似される ASCT2 型の  $\text{Na}^+$  依存性を示し、その Hill 係数は 1.0 と計算された。また、HTJ32 においては、スレオニンの取り込みは ASCT1 型の S 字状の  $\text{Na}^+$  依存性を示し、Hill 係数は 1.5 であった。

## 4. 考察

本研究は、 $\text{Na}^+$  共役トランスポーターにおける  $\text{Na}^+$  による有機基質輸送の駆動の機序を明らかにすることを最終的な目的として、 $\text{Na}^+$  依存性中性アミノ酸トランスポーター ASCT2 と ASCT1 の基質選択性と  $\text{Na}^+$  依存性の違いに着目してキメラ解析を行った。

ASCT2 と ASCT1 はスレオニン、アラニン、セリン、システンを共通の基質とするが、ASCT2 はさらにグルタミンを高親和性の基質とし、ASCT1 はグルタミンは全く輸送しない (Table 1、Fig. 4)。これは、両者の基質結合部位の形状が

基本的には類似しながらも、その基質アミノ酸側鎖認識部位に相違があることを意味している。両者の系統的なキメラ解析を行うことによりその基質アミノ酸側鎖認識部位を一次結合上にマッピングできると考え、RecA<sup>+</sup> *E.coli* による相同組み換えによって系統的に作製した ASCT2/ASCT1 キメラのグルタミン輸送活性を測定した。グルタミン輸送活性を示すキメラは領域 D に接合点を持つもののなかに存在し、他の領域に接合点を持つキメラはグルタミンは輸送しなかった。従って、基質アミノ酸側鎖認識部位は領域 D に存在すると考えられる。

ASCT2 と ASCT1 には、その Na<sup>+</sup> 共役に興味深い違いがある。ASCT2 は、基質アミノ酸の取り込みの Na<sup>+</sup> 依存性が Michaelis-Menten 曲線に近似され、単一の Na<sup>+</sup> 結合部位を持つと考えられ、Na<sup>+</sup> に対して Km=2.5 mM と高親和性である。これに対して、ASCT1 は S 字状曲線に従う Na<sup>+</sup> 依存性を示し、2つの Na<sup>+</sup> 結合部位を持つと考えられる。また、ASCT2 は Li<sup>+</sup> を共役イオンとして受け入れるのに対し、ASCT1 は Li<sup>+</sup> を共役イオンとしては受け入れない。以上より、以下の仮説を設ける。すなわち、ASCT2 と ASCT1 は共通の Na<sup>+</sup> 結合部位 A を持ち、ASCT1 は加えて第二の Na<sup>+</sup> 結合部位 B を持つとする。A は ASCT2 の性質をそのまま反映するので、Na<sup>+</sup> に対して高親和性で、Li<sup>+</sup> を受け入れる。これに対して、Na<sup>+</sup> 結合部位 B は Na<sup>+</sup> に対して低親和性で、Li<sup>+</sup> を受け入れないとする。このように仮定することにより、Li<sup>+</sup> を受け入れる A と受け入れない B をともに持つ ASCT1 は、全体としては Li<sup>+</sup> 中では働かないことになり ASC トランスポーターの Li<sup>+</sup> 受容性を説明できる。ASCT2/ASCT1 キメラを解析することにより、両者の差異である Na<sup>+</sup> 結合部位 B をマッピングすることができるはずである。

ASCT2/ASCT1 キメラにから 4 つを選択し、その Li<sup>+</sup> 受容性と Na<sup>+</sup> 依存性を比較すると、Li<sup>+</sup> を受け入れ Na<sup>+</sup> 結合部位 B を欠いていると考えられるキメラは、その Na<sup>+</sup> 依存性が hyperbolic であり、Na<sup>+</sup> 結合部位を一つしか持たないと考えられる (HTN 10、HTJ 58、HTJ 186 : Table 2)。それに対して、Li<sup>+</sup> を受け入れず Na<sup>+</sup> 結合部位 B を有すると考えられるキメラは、その Na<sup>+</sup> 依存性は S 字状曲線に従い、Na<sup>+</sup> 結合部位を二つ持つと考えられる (HTJ 32 : Table 2)。HTJ 32 のキメラ接合点が領域 C にあり、HTN 10、HTJ 58、HTJ 186 のキメラ接合点は領域 D にある (Table 2) ことを考慮すると Na<sup>+</sup> 結合部位 B は領域 D 内にあることになる。これとグルタミン輸送の有無に関する結果を総合すると、HTN 10 や HTJ 58 のような Na<sup>+</sup> 共役が ASCT2 型のキメラは、グルタミンを輸送する ASCT2 型の基質選択性を示し、HTN 32 のような Na<sup>+</sup> 共役が ASCT1 型のキメラは、グルタミンを輸送しない ASCT1 型の基質選択性を示す (Table 2)。興味

深いのは HTJ 186 であり、これは、 $\text{Na}^+$  共役が ASCT2 型であるにもかかわらず、基質選択性はグルタミンを輸送しない ASCT1 型である (Table 2)。この事実から、HTJ 186 のキメラ接合点は、 $\text{Na}^+$  結合部位 B と基質アミノ酸側鎖認識部位の間にあり、前者が後者より、N-末端側にあると推論される。

## 5. 今後の課題

本研究はキメラ解析によって、ASC 型  $\text{Na}^+$  依存性中性アミノ酸トランスポーターの基質アミノ酸側鎖認識部位と  $\text{Na}^+$  結合のマッピングを行った。今後、さらに解析するキメラの例数を増やし、さらに DNA シーケンシングの結果によりキメラ接合点を決定することにより基質結合を一次構造上で限定する必要がある。その結果に基づき、部位特異的変異導入によりそれを検証するのが次の段階である。この成果は、 $\text{Na}^+$  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、 $\text{Na}^+$  / 有機溶質共輸送体の  $\text{Na}^+$  の通路としての生体内の  $\text{Na}^+$  フラックスにおける役割の解明を通じて  $\text{Na}^+$  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) Kanai, Y: Family of neutral and acidic amino acid transporters: molecular biology, physiology and medical implications. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 565-572 (1997).
- (2) Utsunomiya-Tate, N, Endou, H, and Kanai, Y: Cloning and functional characterization of a system ASC-like  $\text{Na}^+$ -dependent neutral amino acid transporter. *J. Biol. Chem.* 271: 14833-14890 (1996).
- (3) Kanai, Y: Substrate binding sites of glutamate transporters and structurally related neutral amino acid transporters. *Jpn. J. Physiol.* 47 (Suppl.1): S55-S56 (1997).



Table 1. Kinetic parameters of amino acid substrates

Amino acid	ASCT2		ASCT1	
	$K_m$	$V_{max}$	$K_m$	$V_{max}$
	$\mu\text{M}$		$\mu\text{M}$	
L-Threonine	35.7	(1.00)	47.6	(1.00)
L-Alanine	36.2	0.86	81.5	1.15
L-Serine	37.4	0.87	55.9	0.87
L-Cysteine	48.0	0.90	3.6	0.12
L-Glutamine	33.6	0.82	No transport	
L-Valine	211	1.12	850	1.12
L-Leucine	164	1.05	No transport	
L-Methionine	288	1.15	No transport	
L-Glycine	816	0.82	> 1 mM	
L-Glutamate	1950	0.86	No transport	

Table 2 Comparison of Na-coupling properties and substrate selectivity

Chimera	Li acceptance	Na dependence	Gln uptake
HTN10 (D)	+	hyperbolic	+
HTJ32 (C)	-	sigmoidal	-
HTJ58 (D)	+	hyperbolic	+
HTJ186 (D)	+	hyperbolic	-

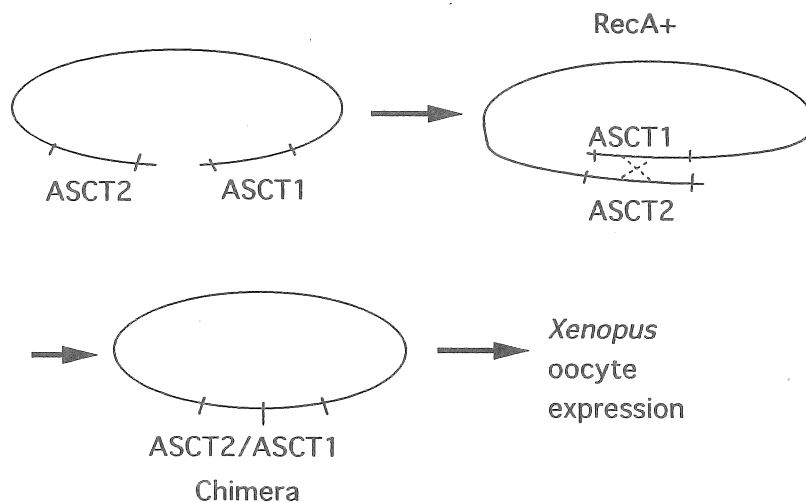


Fig. 1 Chimera construction procedure.

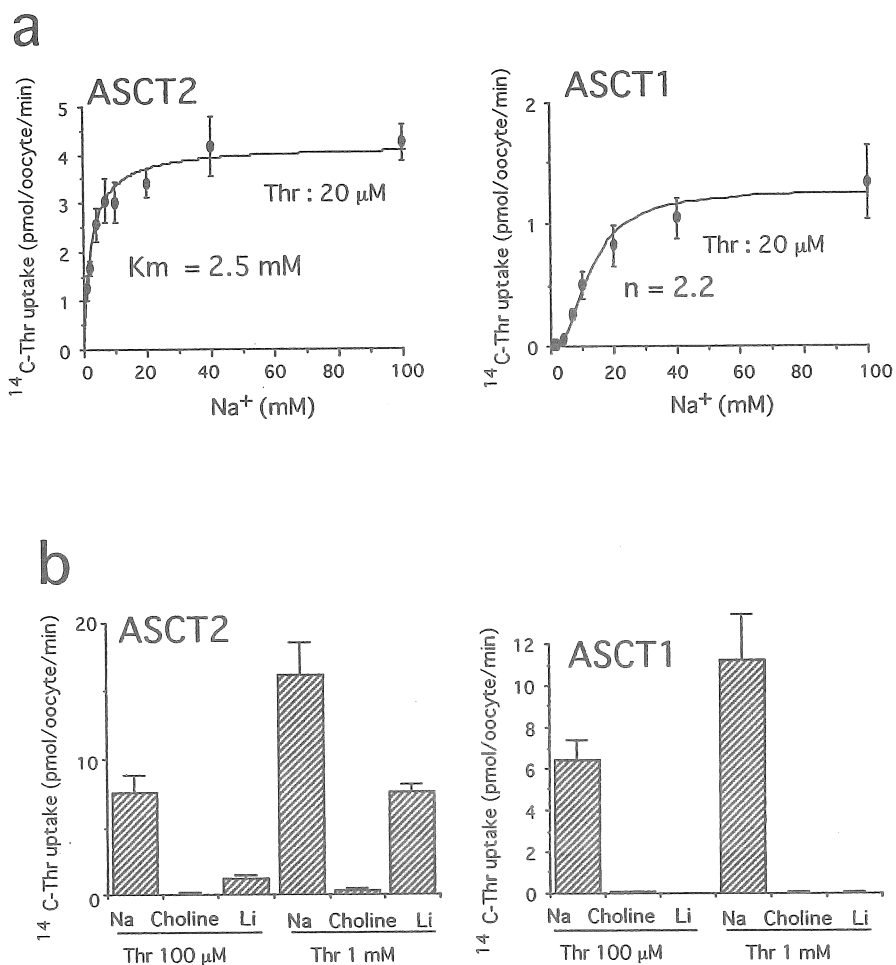


Fig. 2 Comparison of  $\text{Na}^+$ -dependence (a) and  $\text{Li}^+$ -acceptance between ASCT2 and ASCT1.

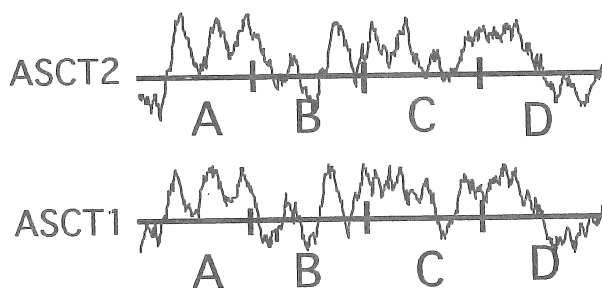


Fig. 3 Division of ASCT polypeptides into four parts based on dot blot hybridization.

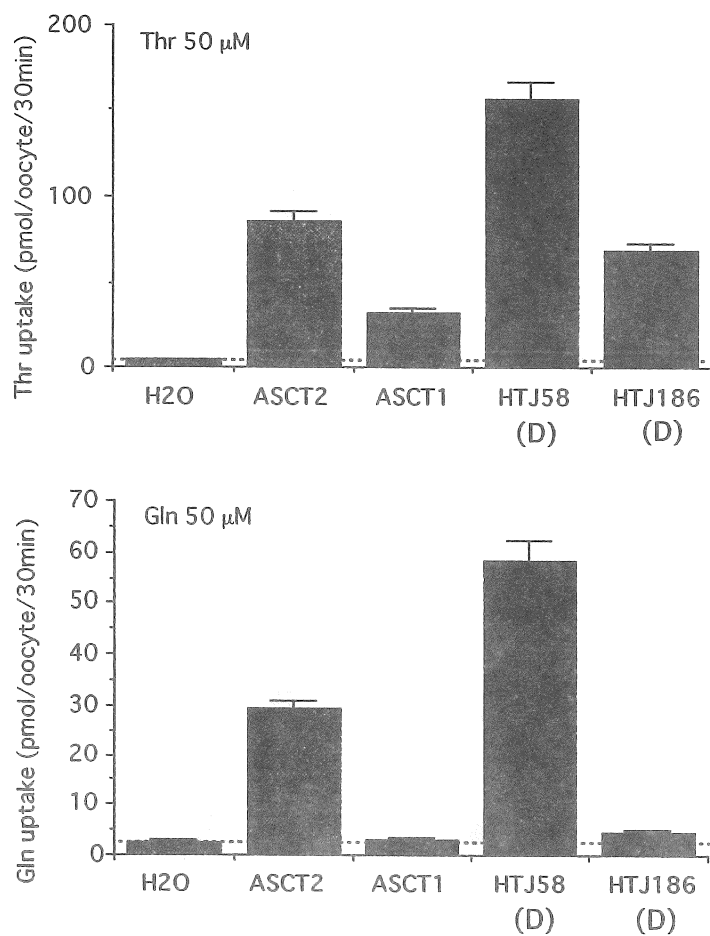


Fig. 4 Comparison of threonine uptake (upper) and glutamine uptake (lower) of chimeras.

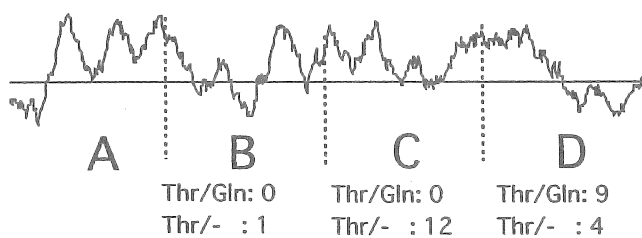


Fig. 5 Threonine/glutamine transport map. Thr/Gln: chimeras which transport both Thr and Gln. Thr/-: chimeras which transport Thr but not Gln.

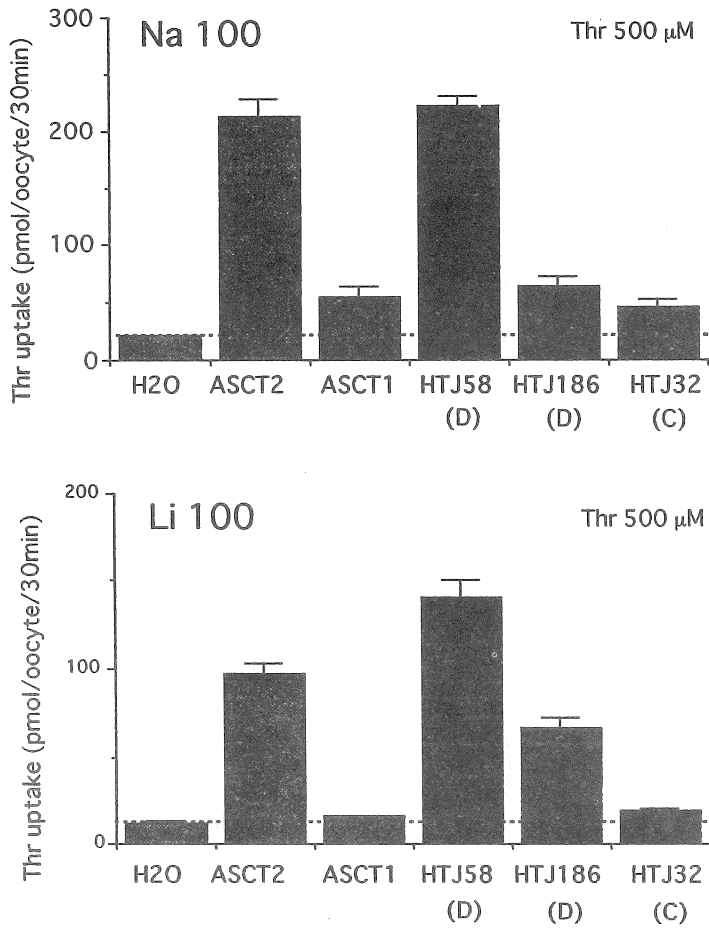


Fig. 6 Comparison of threonine uptake in 100 mM Na<sup>+</sup> (upper) and that in 100 mM Li<sup>+</sup> (lower).

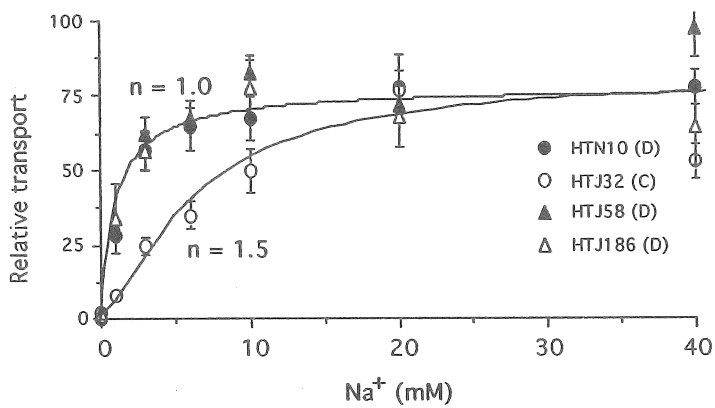


Fig. 7 Na<sup>+</sup> concentration-dependence of threonine uptake of four selected chimeras.

## The molecular mechanisms of Na<sup>+</sup>-coupling of Na<sup>+</sup>/amino acid co-transporters

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

### Summary

For the understanding of the mechanisms of coupling of Na<sup>+</sup> transport to the organic solute transport, we have performed structure-function analyses of Na<sup>+</sup>-dependent neutral amino acid transporters ASCT1 and ASCT2.

ASCT1 and ASCT2 belong to the Na<sup>+</sup>-dependent neutral and acidic amino acid transporter family which includes glutamate transporters and ASC transporters. ASCT1 and ASCT2 exhibit 57% amino acid sequence identity with each other. Both transported alanine, serine, threonine and cysteine as common substrates; however they still exhibited different functional properties. ASCT2 transported glutamine as a high-affinity substrate, whereas ASCT1 did not transport glutamine. This suggests that substrate binding sites of ASCT1 and ASCT2 are different in their interaction with substrate amino acid side chains. In order to identify the exact site to recognize substrate amino acid side chains we have performed chimera analyses based on the differential substrate selectivity in ASCT1 and ASCT2. ASCT2/ASCT1 chimeras (N-terminus ASCT2/C-terminus ASCT1) were constructed by homologous recombination of their cDNAs in *recA*<sup>+</sup> *E. coli*. cRNAs were *in vitro* synthesized from the chimera cDNAs and expressed in *Xenopus laevis* oocytes. Among 26 functional chimeras analyzed, 9 chimeras transported both threonine and glutamine, whereas others transported only threonine. All the chimeras which transported both threonine and glutamine possessed chimera points in the highly conserved long hydrophobic stretch close to C-terminus, suggesting that the site of recognition of substrate amino acid side chains lies in this region.

The Hill analyses of Na<sup>+</sup>-dependent amino acid transports revealed that ASCT2 couples to the co-transport of single Na<sup>+</sup>, whereas ASCT1 couples to at least two Na<sup>+</sup>. ASCT2 was high affinity to Na<sup>+</sup> with a Km value of 2.5 mM for Na<sup>+</sup>. ASCT2 accepted Li<sup>+</sup> instead of Na<sup>+</sup> whereas ASCT1 did not work in LiCl solution without Na<sup>+</sup>. Thus, two Na<sup>+</sup>-binding sites were postulated: "Na<sup>+</sup>-binding site A" which is common to both ASCT2 and ASCT1 and "Na<sup>+</sup>-binding site B" which exists only in ASCT1. "Na<sup>+</sup>-binding site A" is high-affinity to Na<sup>+</sup> and accepts Li<sup>+</sup>. On the other hand, "Na<sup>+</sup>-binding site B" is low-affinity and does not accept Li<sup>+</sup>. Thus, the analyzing ASCT2/ASCT1 chimeras would enable us to identify the structure responsible for the differential Na<sup>+</sup>-coupling between ASCT2 and ASCT1, that is, the "Na<sup>+</sup> binding site B". The ASCT2/ASCT1 chimeras were first analyzed in the view of Li<sup>+</sup> acceptance. Among 26 functional chimeras analyzed, 10 chimeras transported threonine in Li<sup>+</sup>. All the chimeras which accepted Li<sup>+</sup> possessed chimera points in the long hydrophobic stretch, indicating that the "Na<sup>+</sup>-binding site B" is mapped close to the proposed amino acid side chain recognition site. Na<sup>+</sup>-dependence of four selected chimeras were analyzed. One exhibited sigmoidal dependence on Na<sup>+</sup> and the rest of three showed hyperbolic dependence on Na<sup>+</sup>. We found an interesting chimera (HTJ 186) which accepted Li<sup>+</sup> and showed hyperbolic dependence on Na<sup>+</sup> (ASCT2 type Na<sup>+</sup>-coupling), whereas did not transport glutamine (ASCT1 type substrate selectivity). This indicates that the chimera point of HTJ 186 lies between the "Na<sup>+</sup>-binding site B" and the substrate amino acid side chain recognition site. In the extension of this chimera study would it be possible to identify the sites responsible for the substrate recognition and for the interaction with Na<sup>+</sup>.