

9 6 4 0 K輸送を制御する pH センサー遺伝子のクローニング

助成研究者：鈴木 誠(自治医科大学 薬理学)
共同研究者：早川 洋(東京慈恵会医科大学)

目的；ある種の遺伝子の発現には、腎尿細管の管腔側の pH のみが影響することより、pH に特異に反応する受容体が存在すると考えられた。この受容体の候補遺伝子をクローニングするのが本研究の目的である。

方法；この反応は、ウサギ集合管の培養細胞をフィルター膜に培養した(分化を促進する)場合に認められることを利用して、受容体遺伝子の中より、分化した時のみに発現するものを検索した。7 回膜貫通型受容体、チロシンキナーゼ内在型受容体と、チロシンリン酸キナーゼ型 (TPTR) の受容体を培養条件の違いで、検討した。

結果；7 回膜貫通型受容体ではバゾプレッシン V2 受容体、チロシンキナーゼ内在型受容体では PDGF 受容体が認められたが、培養条件で発現する目的の遺伝子ではなかった。TPTR では、フィルター膜に培養したときのみ認められる新しいアミノ酸配列をもつ受容体の断片がクローニングされた。5'RACE, 3'RACE とブランクによるクローニングを行った結果 2409 bp の遺伝子が単離され、フィルター膜に培養したときのみ認められることとチロシンリン酸化に必要な共通配列を持っていることがわかった。(ただし、この遺伝子は、mouse より patent clone として登録されているものに一致した。)さらに 3070 bp の alternative splice form も白血球より単離報告されている。

結論；pH センサーが分化した細胞にのみ発現すると仮定して、候補の受容体遺伝子を単離した。その結果チロシンリン酸キナーゼ型 (TPTR) の受容体がクローニングされた。現在、細胞における pH 受容体として反応するか否か検討している。しかし、3070bp で報告された遺伝子も我々の遺伝子も 5' の開始部位が不明で、まだ 5' 側があるかどうか検討する必要があることに気づいた。この部分は細胞外 domain であるので、センサーとしての領域かもしれない。

9640 K輸送を制御する pHセンサー遺伝子のクローニング

助成研究者：鈴木 誠 (自治医科大学 薬理学)
共同研究者：早川 洋 (東京慈恵会医科大学)

目的；ある種の遺伝子の発現には、腎尿細管の管腔側の pH のみが影響することより、pH に特異に反応する受容体が存在すると考えられた。この受容体の候補遺伝子をクローニングするのが本研究の目的である。

方法；この反応は、ウサギ集合管の培養細胞をフィルター膜に培養した（分化を促進する）場合に認められることを利用して、受容体遺伝子の中より、分化した時のみに発現するものを検索した。7 回膜貫通型受容体、tyrosine kinase 内在型受容体と、tyrosine phosphatase (TPT)の受容体を培養条件の違いで、検討した。

結果；7 回膜貫通型受容体ではバズプレッシン V2 受容体、チロシンキナーゼ内在型受容体では PDGF 受容体が認められたが、培養条件で発現する目的の遺伝子ではなかった。TPT では、フィルター膜に培養したときにのみ認められる新しいアミノ酸配列をもつ受容体の断片がクローニングされた。5'RACE, 3'RACE とプラークによるクローニングを行った結果 2409 bp の遺伝子が単離され、フィルター膜に培養したときにのみ認められることと tyrosine phosphatase に必要な共通配列を持っていることがわかった。（ただし、この遺伝子は、mouse より patent clone として登録されているものに一致した。）さらに 3070 bp の alternative splice form も白血球より単離報告されている。

結論；pH センサーが分化した細胞にのみ発現すると仮定して、候補の受容体遺伝子を単離した。その結果チロシンリン酸キナーゼ型 (TPTR)の受容体がクローニングされた。現在、細胞における pH 受容体として反応するか否か検討している。しかし、3070bp で報告された遺伝子も我々の遺伝子も 5'の開始部位が不明で、まだ 5'側があるかどうか検討する必要があることに気づいた。この部分は細胞外 domain であるので、センサーとしての領域かもしれない。

研究目的

我々は、K チャネルの遺伝子が、pH によって発現調節されている事を報告した [1,2]。この pH の作用は、腎尿管において、管腔側すなわち尿の pH として働く。実際培養細胞をフィルターメンブレンに培養して、細胞極性 (apical side, 上方が尿管管腔側、basolateral side, 膜に接着している側が血管側) を生じさせると、apical side の pH 変化に対してのみ mRNA の変化が認められる。また in vivo でも尿の pH の変化に応じて、mRNA の変化が認められる。この変化は、細胞をシャーレで培養する際、増殖期よりも confluent になって静止期になった場合で認められる。また collagen でシャーレをコートして、無血清培地にして静止期を誘導するようにすることも認められた。以上のことから、pH の変化は尿管管腔側で、感受され、その機構は細胞が分化し、極性を持ったときに発現するといえる。このことより、細胞に極性をつけたときに検出できる受容体の中に pH センサーがあるという仮説が成り立つ。そうでなければ管腔側のみの pH の変化を細胞が感受できないからである。

本研究はこの様な受容体があるという仮説に基づきその分子を明らかにすることである。この受容体は、全く新しい構造を有するより既存の受容体のファミリー構成員であってもよい。したがって今まで報告された受容体のホモロジーを手がかりにクローニングできるであろうと考えた。

研究方法

1. 培養細胞

ウサギ腎より皮質集合管を単離培養し、SV40 によって、不死化した細胞を作成した。細胞は HAMF12:MEM (1:1) に 10% FBS, 抗生物質を加えた培養液で、培養、維持する。分化を促進する場合は、FBS を含まず、insulin, cortisone, transferin を含む HAMF12:MEM (1:1) 培養液で培養する。この無血清培地で、細胞は増殖し少なくとも 1 週間は vivid に維持される。フィルターメンブレンは 35mm で、FBS 含培養液にて、均一に subculture 後無血清培地で維持すると極性を持つ分化した細胞が得られる。

2. RT-PCR (Reverse transcription Polymerase chain reaction)

細胞より、TRISOL (GIBCO, BRL, Bethesda) を用いて、RNA を抽出した後、polyA カラム (Pharmacia, USA) を用い、mRNA を単離した。RNA-PCR キット (Takara, Japan) を用いて、RT-PCR を行った。

各々の受容体にたいする Degenerative primers は

7 回膜貫通型受容体用

H007, GAGGATCCTGTYGYSATYGCIIITKGAYMGSTAC

H008, TCGAATTCWAGWAGGGCAGCCAGCAGAISRYGAA

TYROSINE KINASE 型受容体用

FW. CAYMGNGAYYTNGCNGCNMG

RV. CCRWANSWGGTNTGYAGNSW

TYROSINE PHOSPHATASE 型受容体用

I001, GAGGATCCGACTTCTGGMGRATGRTVTGG

I002, TCGAATTCCTCCYACWCCWGCCTGCARTG

を用いた。

逆転写の条件はキットに従った。一本鎖 DNA20 μ l 中 2 μ l をテンプレートとして PCR を行った (Ex Taq, Takara). 温度条件は

96C 3 min /1cycle

96C 30sec.

48C 1 min *

72C 1.5 min /20cycle

96C 30sec.

57C 1 min

72C 1.5 min /10cycle

72C 10 min であった。

*の温度は変化させた。

増幅された fragments は ECoRI/BAMHI 切断後 pBluescript (Stratagene) に subcloning した。クローニングされた断片はシーケンサー(ABI, 373S)を用いて塩基配列を決定し、BLAST program を用いて、ホモロジー検索を行った。

3. cDNA クローニング

プラークハイブリダイゼーションによるクローニング。マウス腎の cDNA ライブラリー(λ ZAPII, Stratagene)を用い、得られた断片をプローベにプラークハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションの条件は formamide 0%のハイブリダイゼーション液で、55C over night で行った。洗いは 2xSCC/0.5%SDS で 65C, 60min とした。ハイブリダイゼーションは 3rd まで行い positive plaque を得た。phage より plasmid への subcloning は rapid excision に沿って行った。

PCR によるクローニング。マウス腎の mRNA を用いて、得られた断片より作成した primer を用い 5'RACE(5'RACE kit, BRL)を行った。得られた増幅産物は T-overhang (TA cloning kit, Invitrogen)を利用して plasmid に subcloning した。

4. ノザーンハイブリダイゼーション

得られた cDNA または増幅産物が培養細胞を分化させたときにのみ認められるかを判定するため、ノザーンハイブリダイゼーションを行った。RNA は TRISOL によって、1 レーン 20 μ g 用いた。イブリダイゼーションの条件は formamide 20%のハイ

ブリダイゼーション液で、45C over night で行った。洗いは 2xSCC/0.5%SDS 65C, 30min 0.1xSCC/0.5%SDS で 65C, 30min とした。

研究結果

1. RT-PCR による増幅産物

増殖期の培養細胞とフィルターメンブレン上に培養した分化した培養細胞について、3種類の受容体の degenerative primer sets を用い RT-PCR を行った。PCR の Annealing 温度は、60C より 47C まで 1C おきに変えて施行した。7回膜貫通型受容体用 primer sets では、バンドは検出されなかった。TYROSINE KINASE 型受容体用 primer sets では annealing 温度 53C より 47C において2つの条件の培養細胞から同様に増幅産物が検出された。Sequence の結果 PDGF 受容体が少なくとも1つは増幅された。TYROSINE PHOSPHATASE 型受容体用 primer sets では annealing 温度 48C より 47C において培養細胞からのみバンドが検出された。12本の異なる塩基配列を持った増幅産物 (TP1-12 と名付けた) のうち、蛋白の一部として、フレームがあうもの、TP6,9 の2つを図1に示した。両者は塩基配列上 64%、アミノ酸配列上 45% のホモロジーを有していた。TP6 は典型的なチロシンリン酸キナーゼ型の受容体と塩基配列上 36% アミノ酸配列上 57% 相同で、TP9 は同様にそれぞれ 45、58% であり、ファミリーの1つである可能性があった (図2)。TP9 はさらに S78086 と 98% 相同で、同じものと判断された。以上のことから TP6 及び 9 の2つのクローンが分化した細胞に発現している可能性が示された。

2. TP6,9 の発現

TP6,9 の2つが培養細胞の分化に伴って発現するか否かについて検討するためにノーザンブロットにて確認した。血清含の培養液にて培養された細胞と、無血清培地にてフィルターメンブレンに培養された細胞より RNA を調整した。TP6,9 によって発現を検討すると TP6 ではフィルターメンブレンに培養された細胞よりの RNA とのみハイブリされた (図3)。TP9 は発現量が少ないと判断された。

3. TP6 の cDNA

TP6 の配列より、マウス腎の cDNA ライブラリーをスクリーニングし 2 つの positive plaque を単離し、最長 2100bp の cDNA を得た (PTP6)。そのアミノ酸配列と hydrophobicity plot を図4に示す。PTP6 は 677 のアミノ酸をもち膜を1回貫通する構造を示した。Tyrosine-phosphate としての domain を持ち、あたらしいファミリーの一員と思われた。プローベは図4のイタリック部分に一致しており塩基配列は 90% 相同であった。しかし、ホモロジー検索の結果 I23846 2409 bp /26-JUL-1996/DEFINITION Sequence 2 from patent US 5538886. として報告されているものと同等であった。I23846 は PTP6 より図太字で表した部分、5' 上流が長く PTP6 の 5' 部が伸びていなかったことを示している。

Fig.1 Amplified fragments from polarized cells by degenerative primers for tyrosine phosphatase.

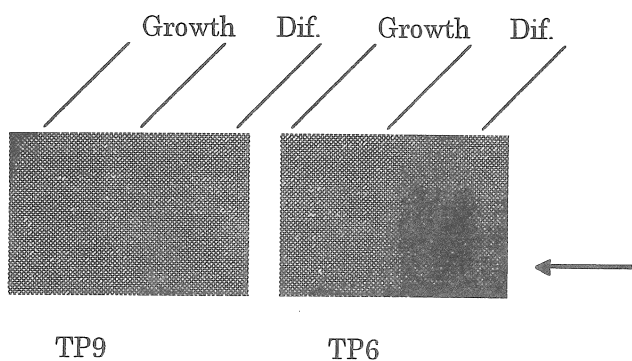
TP6	1 GAGGATCCGACTTCTGGCGAATGGTATGGGAGTGGA-AA-TCCTGCTCTA	50
TP9	1 GAGGATCCGACTTCTGGAGAATGATCTGGGAGA--ACAACCTCCA-C-C-A	50
51	T--TG-TAATGCTGACTGAGCTG-GAGGAGA-GAGGTCAGGAGAAGCGTG	100
51	TCGTGGTGATGCTCACAACTGCGCG-AGATG-GGCCGGGAGAAATGT-	100
101	C-CCAGTACTGGCCATCGGA----T-GGCAAATG-T----GT-CTTACG-	150
101	CACCAGTACTGGCCAGCAGAACGCTCGGCC--GCTACCAGTACTT-CGT	150
151	GA-G-ACATCACCGTGGAGCTCAAGAAGGA-AGAGGAATGGAG-AGCTAC	200
151	GGTGGAC--C-CCATGG--C-C--GA-GTATA-AC-A-TGCCCCAG-TAC	200
201	ACTG-TCCGAGACCTGCTTGTAGC-CAAC--A--CCAGGGAAAA-CAAGA	250
201	A-TCCTCCGGA---G-TTCAAGGTCA-CTGATGCCCGGGACGGTCA-GT	250
251	CCCGGGCAGATTCGACAGTCCACTTC-CATGGTTGGCC-GAGGTGGG-G	300
251	CCCGGACCG-TCCGCCAGTCCAGTTCACA-GACTGGCCAGAGCAAGGTG	300
301	ATCCCA-G-CGATGGCAAAGGCATGATCA---ACATCATTGCAGCC--G	350
301	-TGCCAAAGTCG--GGCGAGGC-T--TCATTGACTTCATCG--GCCAAG	350
351	TGCAGAAACAGCA-GCAGCAGT----C-AGGAAACCATCCCATCACAGTC	400
351	TGCACAAA-ACCAAGGAGCAGTTTGGCCAGGA--CGGGCCCATCTCCGTC	400
401	CATTGCAGTGCAGGAGTGGGAATTCGA.....	450
401	CATTGCAGTGCTGGAGTAGGAATTCG.....	450

The fragments were obtained as described in methods. Both strand of sequence was determined by a sequencer (ABI, 373S). Homology was sought by a program, DNAsis.

Fig.2 Alignment of the TPT related fragment and a reported (RATPTPRP).

RATPTPLRP	1	FGDFWRMVWE	QRSATVVMVT	RLEEKSRVKC	DQYWPNRGTE	TYGFIQVTLT	50
TP6A	1	GSDFWRMVWE	WKSCSIVMLT	ELEERGQEKR	AQYWPSDGKC	VLRRHHRGAQ	50
TP9A(S78086)	1	GSDFWRMIWE	NNSTIVVMLT	KLREMGREKC	HQYWPAERSA	RYQYFVVDPM	50
36 45 57, 58							
		60	70	80	90	100	
RATPTPLRP	51	DTMELATFCV	RTFSLHKNGS	SEKREVRHFQ	FTAWPDHGVP	EYPTPFLAFL	100
TP6A	51	EGRGMESYTV	RDLLVANTRE	NKTRADSTVP	LPWLAEVGIP	SDGKGMINII	100
TP9A(S78086)	51	AEYNMPQYIL	REFKVTDARD	GQSRTVRQFQ	FTDWPEQGVP	KSGEGFIDFI	100
		110	120	130	140	150	
RATPTPLRP	101	RRVKTCNPPD	AGPVV--VHC	SAGVGRT...	150
TP6A	101	AAVQKQQQS	GNHPIT-VHC	SAGVGNS...	150
TP9A(S78086)	101	GQVHKTKEQF	GQDGPISVHC	SAGVGNS...	150

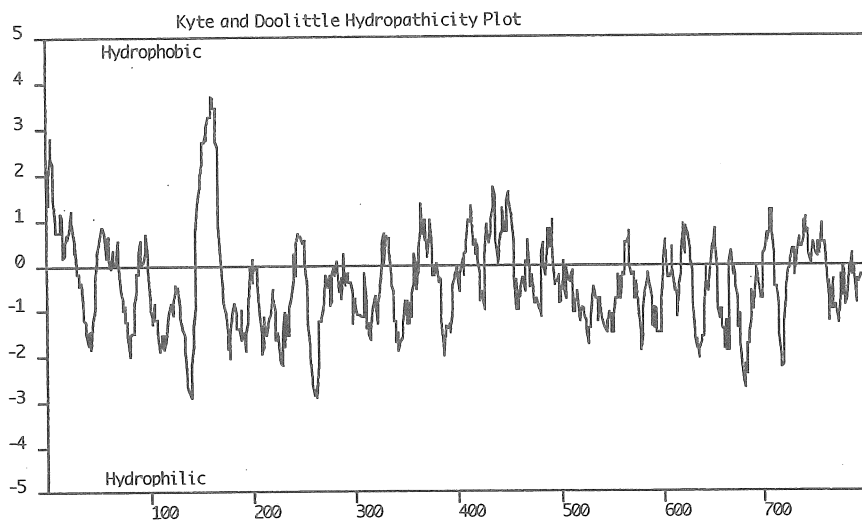
Fig.3 Northern blot analysis of TPT6,9 fragments hybridized to the RNA of collecting duct cells in different phase.



The cell were grown in FBS media (Growth) or membrane support with serum free media (Dif). RNA were extracted using trisol (GIBCO). The fragments related tyrosine phosphatase TP6 and TP9 were hybridized. Arrow indicates 2.8 Kb.

Fig.4 Cloned amino acid alignment by TP6 and hydropathy.

MDSWFILVLL GGLICVSAN NATTVAPSVG ITRLINSSTA EPVKEEAKTS
 NPTSSLTSLV VAPTFSPNIT LGPTYLTTVN SSDSDNGTTR TASTNSIGIT
 ISPNGTWLPD NQFTDARTEP WEGNSSTAAT TPETFPPSGN SDSKDRRDET
PIIAVMVALS SLLVIVFIII VLYMLRFKKY KQAGSHSNF RLSNGRTEDV
 EPQSVPLLAR SPSTNRKYPP LPVDKLEEEI NRRMADDNKL FREEFNALPA
 CPIQATCEAA SKEENKEKNR YVNILPYDHS RVHLTPVEGV PDSYINASF
 INGYQEKNKF IAAQGPKEET VDNFWRMIWE QNTATIVMVT NLKERKECKC
 AQYWPDQGCW TYGNIRVSVE DVTVLVDYTV RKFCIQVVDG MTNRKPQRLLI
 TQHFHTSWPD FGVFPTPIGM LKFLKKVKAC NPQYAGAIIV HCSAGVGRGTG
 TFVVIDAMLD MMHTERKVDV YGFVSRIRAQ RCQMVTDMQ YVFIYQALLE
 HYLYGDTELE VTSLETHLQK IYNKIPGTSN NGLEEEFKKL TSIKIQNDKM
 RTGNLPANMK KNRVLQIIPY EFNRVIPVK RGEENTDYVN ASFIDGYRQK
 DSYIASQGPL LHTIEDFWRM *IWEWKSCSIV* MLTELEERGQ *EKCAQYWPSD*
GLVSYGDITV ELKKEEES YTVRDLVTN *TRENKSRQIR* *QFHFHWPEV*
GIPSDGKGM *SIIAAVQKQQ* *QQSGNHPITV* *HCSAGAGRTG* TFCALSTVLE
 RVKAEGILDV FQTVKSLRLQ RPHMVQTLEQ YEFQYKVVQE YIDAFSDYAN
 FK·



The cDNA matched to TP6 (*italic*) was cloned and shown. Additional 5' amino acid by I23846 is indicated as **bold**. Predicted transmembrane segment is underlined. Hydropathy (lower panel) is determined by Kyte and Doolittle with a window of 12.

考察

pH センサーの存在を仮定して、TYROSINE PHOSPHATASE 型の受容体をクローニングした [3,4]。Ca センサーと呼ばれる 7 回膜貫通型の受容体がクローニングされイオンに対する受容体が注目されている [5]。この遺伝子は細胞外に長いイオン感受性のドメインをもち NMDA 受容体とよくにている。K チャネルの発現を左右させた pH の作用は、腎尿細管においては、管腔側すなわち尿の pH として働く。しかも培養細胞をフィルターメンブレンに培養して、細胞極性を生じさせ分化したと考えられる場合による。以上のことから、pH の変化を感受する受容体もあると仮定し、あるとすれば分化した細胞で発現しているはずであるという仮説に基づいて研究を進めた。また若干の追加実験の結果 pH センサーは HCO₃ センサーである可能性があることを突き止めている。

RT-PCR の結果 G 蛋白内在性の 7 回膜貫通型の受容体は検出できなかった。しかし、本来 K チャネルの発現は cAMP, cGMP, Protein kinaseC にも反応しなかったので、Ca センサーと同様に pH センサーが 7 回膜貫通型の受容体である可能性は少なかった。むしろ本研究の結果のように 1 回膜貫通型の受容体である、TYROSINE KINASE や TYROSINE PHOSPHATASE 型受容体が pH との関係を求める上では興味がある。TYROSINE PHOSPHATASE は TYROSINE KINASE とは拮抗し、細胞の分化誘導に関与する。したがって cell-cycle に関係すると考えられる。Cell cycle と pH との関係もよく知られており、細胞内がアルカリ化することと増殖の開始が関係していることは多くの研究がある。また本来 TYROSINE PHOSPHATASE は細胞外のマトリックスなどとの接着がシグナルになると考えられているが明らかにラジンドはない。以上のことから TYROSINE PHOSPHATASE 型の受容体が HCO₃ を感受してもいいかもしれない。

今後の課題

本研究では新しい TYROSINE PHOSPHATASE の遺伝子をクローニングし得たかにおもえたが一步及ばなかった。また報告にある TPT6 の相同遺伝子、I23846 は TPT6 に比べ 5' 側に長く伸びており、我々のクローニングしたものが完全長ではなかったといえる。しかし、I23846 もさらに 5' 側がある可能性がある。これはさらに細胞外ドメインがあることであり、イオンに対するセンサーがあっても良い。したがって今後この上流を調べ完全長の cDNA をクローニングする必要がある。しかし 5'RACE の結果では更なる上流は得られていないので、ライブラリーを作り直す必要があるかもしれない。

完全長が得られた場合、細胞での発現実験が必要と考えられる。

文献

1. Masato Ikeda, Mitunobu Murata, Taku Miyoshi, Kaichirou Tamba, Shigeaki Muto, Masashi Imai, and Makoto Suzuki. Transcriptional activation of RACTK1 channel gene by apical alkalization in renal cortical collecting duct cells. *J.Clin.Invest.* 98: 474-481, 1996.
2. Suzuki, M., Miyazaki, K., Ikeda, M., Hayakawa, H., Ogawa, A., Kawaguchi, Y. and Sakai, O. : Cloning of a pH-sensitive K⁺ channel possessing two transmembrane segments. *Nature* 367: 642-645, 1994.
3. Sjoberg-ER; Chammas-R; Ozawa-H; Kawashima-I; Khoo-KH; Morris-HR; Dell-A; Tai-T; Varki-A. Expression of de-N-acetyl-gangliosides in human melanoma cells is induced by genistein or nocodazole. *J-Biol-Chem.* 1995 Feb 17; 270(7): 2921-30
4. Matthews,R.J., Cahir,E.D. and Thomas,M.L. Identification of an additional member of the protein-tyrosine-phosphatase family: Evidence for alternative splicing in the tyrosine phosphatase domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 4444-4448 (1990)
5. Brown-EM; Hebert-SC. A cloned Ca(2⁺)-sensing receptor: a mediator of direct effects of extracellular Ca²⁺ on renal function? *J-Am-Soc-Nephrol.* 1995 Dec; 6(6): 1530-40

TRIAL TO CLONE A PH - SENSING RECEPTOR

Cloning of a receptor expressed only in differentiated renal tubular cells.

MAKOTO SUZUKI, HIROSHI HAYAKAWA,

Department of Pharmacology, Jichi Medical School

SUMMARY

Alteration of pH induced a mRNA in some cells but it is quite selective to the polarity of the cells and differentiation of the cells. Therefore, we assumed the presence of pH (HCO₃) sensing receptor in these cell and tried to isolate the cDNA. Degenerative primer sets were constructed to G-protein coupled receptor, tyrosine kinase type receptor and tyrosine phosphatase type receptor. Amplified fragments were sought in the latter two type receptors, however, the tyrosine kinase type receptor was expressed in both differentiated and growth phase of the cells. Northern blot analysis showed the presence of a fragment of tyrosine PHOSPHATASE type receptor in the differentiated cells but not in growing cells. Thus we cloned a tyrosine phosphatase type of receptor. A cDNA encoding a new alignment of amino acids was isolated but the isoform was reported just before our publication. The cDNA encodes characteristics of the tyrosine phosphatase with one transmembrane segment. Further analysis was required more 5' stretched extracellular region, which may sense extracellular HCO₃.