

助成番号 9927

ナトリウム-重炭酸共輸送体ファミリーの解明

助成研究者：石橋 賢一 (自治医科大学 薬理学)

HCO₃ 共輸送体ファミリーは3つの陰イオン交換輸送体 (anion exchanger ; AE1-3) と4つの Na-HCO₃ 共輸送体 (NBC1-4) が現在同定されている。今回このファミリーの新規メンバーを検索した。

3つの新規メンバーをホモロジークローニングで同定した (NBC4, NBC5, NBC6 と暫定的によぶこととする)。部分配列をプローブにしたノーザンブロットの結果では NBC4 は脳と精巣に多く腎臓、肺にも発現している。NBC5 は腎にのみ発現していた。NBC6 は脳にのみ発現がみられた。NBC4 はのちに KIAA0739 として登録され、機能不明のまま NBC3 とよばれている。NBC6 はラットとヒトの脳の cDNA ライブラリーをスクリーニングしたが全長は得られなかった。

NBC5 はラットの腎 cDNA ライブラリーから全長を得た。NBC5 は 954 アミノ酸よりなる。NBC1 と 44%, AE1 と 33%の相同性があり、NBC5 は第3のグループに属することが示唆された。各ネフロンセグメントの RT-PCR では皮質集合管にのみ発現が見られた。また C-末側の細胞内ドメインの 15 アミノ酸の合成ペプチドに対する抗体による免疫組織染色では腎集合管の一部の細胞の管腔膜にそまった。ヒト胎児腎細胞に NBC5 を発現させるとナトリウム非依存性のクロライド/重炭酸交換輸送体の機能が示された。さらにそれは CO₂ のない状態でも 0.3 mM SITS の存在下でも抑制されなかった。ラットのモデル動物でのノーザンブロットの検討では NBC5 mRNA の発現はアシドーシス、アルカローシス、脱水でも増加した。したがって NBC5 は遺伝子レベルよりもタンパクの活性のレベルで生体の酸塩基ホメオスターシスに関与しているか、クロライドの吸収が主たる役割であることが示唆された。

助成研究者：石橋 賢一 (自治医科大学 薬理学)

1. 研究目的

HCO₃ 共輸送体ファミリーは3つの陰イオン交換輸送体 (anion exchanger 1-3) と4つの Na-HCO₃ 共輸送体 (NBC1-4) が現在同定されている。機能的にも Na と HCO₃ の共役の比から Na₂(HCO₃), Na₃(HCO₃)の少なくとも2つ以上の輸送体の存在が知られている。さらにクロライドと交換輸送するタイプも知られている。さらにはナトリウムのかわりにカリウムと共役するタイプも知られており、その分子的多様性から1つのファミリーを形成していると考えられる(1)。これまで腎臓での重炭酸の吸収、膵臓での重炭酸の分泌を中心に Na-HCO₃ 共輸送体の研究がすすめられてきたが、大腸や肝臓さらには神経系 (ニューロン、グリア、網膜) にも Na-HCO₃ 共輸送体が機能的に示されている。Na-HCO₃ 共輸送体が細胞内 pH だけでなく細胞内電位にも影響することは、Na-HCO₃ 共輸送体の神経系での役割を検討する際に重要である。神経系のような細胞間隙の限られた組織では Na-HCO₃ 共輸送体は細胞外 pH のコントロールにも重要な役割をはたしている可能性があり、その解明はニューロンの興奮性のコントロールにも関与しているかもしれない(2,3)。今回このファミリーの新規メンバーを検索した。

2. 研究方法

2.1 新規クローンの同定

申請者はすでに2つめの Na-HCO₃ 共輸送体 (NBC2) を同定し報告しているが(4)、これはすでに知られていた NBC1 の核酸配列をもとにジーンバンクの EST ライブラリー (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST>) を blast のプログラム (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) で検索するというものである。EST ライブラリーは cDNA の部分配列よりなるので偽遺伝子である可能性はほとんどない。一方、ゲノムライブラリー (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/HTGS>) をもとに blast のプログラムで検索する方法では偽遺伝子が混入する危険があるので注意が必要である。検索はインターネットを通じてコンピューター上でおこなった。

2.2 cDNA ライブラリーのスクリーニング

新規遺伝子が見つかったら、その EST クローンをゲノムシステムやレサーチジェネチックスから購入する。購入したクローンは両方向からシークエンスし、目的としているクローンであることを確認するとともに、イントロンお挿入など余計な配列がないことを確認する。ノーザンブロットで各組織での発現を確認し発現の多い組織の cDNA ライブラリーのファージブレイクを 32P アイソトープでラベルした EST クローンをプローブとしてスクリーニングして全長の cDNA を得る。

2.3 ノーザンブロット

マウスの各組織の total RNA 10 ug を 1.2%ホルムアミド変性アガロースゲルに電気泳動してナイロン膜にトランスファーした。さらにヒトやラットの各組織の polyA RNA 2 ug がすでに上記のようにトランスファーされているナイロン膜をクローンテックから購入した。これらの膜はランダムプライマーで 32P をラベルしたプローブを用いて、スタンダードの方法でハイブリダイゼーションをおこない、high strengency の条件で洗った。

2.4 ラットの腎ネフロンセグメントの RNA をもちいた RT-PCR

ラットの腎ネフロンセグメントを実体顕微鏡下に dissection し、逆転写酵素を用いて cDNA にし、NBC5 に特異的なプライマー (sense primer: aggcctctcgtgagagg, antisense primer: aatcgctgggtaccagc) を用いて PCR (94 度 1min, 60 度 1min, 72 度 1min を 30 サイクル) をおこなった。アガロースゲルにながして展開したあとアルカリ変性をさせ中和したあとナイロン膜に高塩溶液でトランスファーして、NBC5 のプローブをもちいたサザンブロット法で特異的なバンドを検出する。

2.5 ポリクローナル抗体の作成と免疫組織染色

NBC5 のカルボキシー末側細胞内ドメイン途中 15ヶの合成ペプチド (—EEETIPENRPEPEH—) を MAP 法にてつくり 2羽のウサギに免疫して、ポリクローナル抗体をつくった。抗原であるペプチドを固定した ELISA 法でタイターを測定し高いほうのウサギの血清を実験に用いた。比色計で 0.2 O.D の値になるときの希釈倍率は 64000 倍であった。一方ラット腎を PLP

NBC Family

	size of mRNA	amino acid	distribution
NBC1	7.5 kb	kNBC1=1035 pNBC1=1079 bNBC1=1094	kidney, colon, liver pancreas, heart brain, prostate
NBC2	8.5 kb	1018	retina, testis, spleen, muscle,colon,heart
NBC3	7.8 kb	1214	muscle, heart
NBC4	10 kb	1130 1044	brain,testis,kidney, lung,heart,pancreas
NBC5	3.2 kb	954	kidney
NBC6	6.5 kb	?	brain

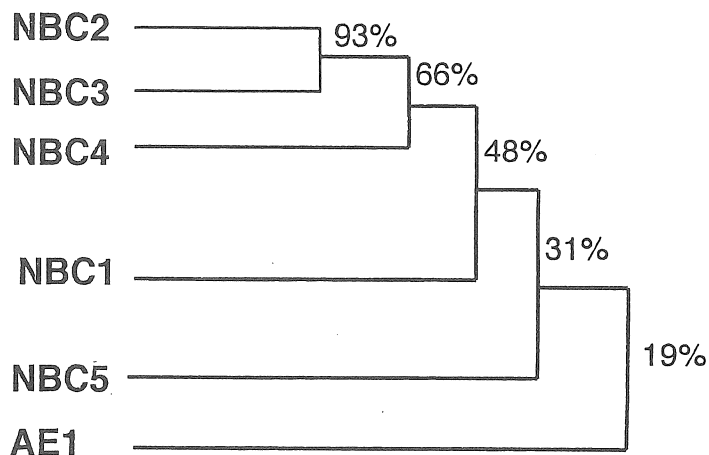


Fig. 1. Phylogenetic tree of 5 members of NBC family and anion exchanger 1(AE1). The program of DNAsis was used to compare the the amino acids sequences. NBC2 and NBC3 may come from same gene.

固定し、OPC コンバウンドに包埋してクリオスタットで8umの厚さにきってスライドグラスにくっつけた。一次抗体を500倍に希釈して37C 60min 反応させ、FITC ラベルした抗ウサギガンマグロブリン抗体を1000倍に希釈して室温で30分反応させ蛍光顕微鏡で検出した。

2.6 培養細胞へのNBC5の一過性発現

NBC5 を CMV プロモーターの下流にサブクローニングしリポフェクションにより human embryonic kidney cells (HEK cells)に一過性に発現させ、細胞内 pH を pH 感受性蛍光である BCECF の 440nm/500nm の吸光比でもとめた。

2.7 アシドーシス、アルカローシス、脱水ラットの作成

アシドーシスラット、アルカローシスラットはそれぞれ飲み水に 0.1M の塩化アンモニウム、重曹をとかし、一週間投与することで作成した。脱水ラットは2日間水を飲ませないことで作成した。それぞれの腎から total RNA を Isogen のキットをもちいて抽出しノーザンブロットで解析した。

3. 研究結果

3.1 新規 NBC ファミリーメンバーの同定

EST ライブラリーを NBC1, NBC2, anion exchanger1-3 の核酸配列をもとに blast サーチすることによって、3つの新規メンバーが見つかった。それぞれの EST の accession number はこれらのクローンが未発表のため非公開としたい。暫定的に NBC4, NBC5, NBC6 と呼ぶことにする。NBC4 は肺、腎、脳、精巣などひろく発現がみられ NBC2 に 77% アミノ酸で相同であり NBC1 とは 57% 相同であった。NBC5 は腎にのみ発現がみられ、NBC2 と 52%, NBC1 と 36% 相同である。NBC6 脳にのみ発現がみられ、NBC2 に 78%, NBC1 に 46% 相同である。なお NBC1 と NBC2 は 53% 相同である。したがって NBC2 に良く似た NBC4, NBC6 は1つのサブファミリーを形成していると考えられる。これに対し NBC5 はまた別のサブファミリーを形成していると考えられる (Tab 1)。

3.2 全長クローンの解析

NBC4 はのちに KIAA0739 タンパクとして登録されたので全長をうる必要がなくなった。NBC6 は脳にしか発現がみられないのでクローンテックのヒト脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングしたがアミノ酸にしてカルボキシー末 640 残基までのクローンしかえられず、あと 500 残基つまり 1600bp ほどの核酸シークエンスが必要である。ラット脳 cDNA ライブラリーもスクリーニングしたがヒトより上流のクローンはえられなかった。ヒト脳 cDNA (ニッポンジーン) をもちいた 5' RACE もおこなったがそれらしいシークエンスはえられなかった。これはノーザンブロットで NBC6 の mRNA の大きさをみると 7kb とおおきいため逆転写が N 末までのびるのが難しいためと考えられる。ゲノムクローンをえて N 末をきめて PCR で cDNA の全長をうる方法もあるが、ゲノムプロジェクトで近い内にあきらかになるであろう。実際 c 末の部分はある登録されたゲノムクローンの N 末に一致している。

一方 NBC5 はラット腎 cDNA ライブラリーをスクリーニングして全長がえられた。3178bp よりなり、954 アミノ酸をコードしていた (GenBank accession number: AB024339)。ノーザンブロットで NBC5 の mRNA の大きさをみると 3kb くらいなのでえられたクローンはほぼ全長をカバーしているとみてさしつかえない。5' non-coding は 34bp で 3' noncoding は 280bp であった。上流の in-frame stop codon はないがはじめのメチオニンのコドンのまわりは aag ATG A であり Kozak の aac ATG A と似ており翻訳開始点と考えられる。ヒトの NBC5 (accession number: AB032762) のゲノムシークエンスがすでに登録されておりそれによるとここがやはり翻訳開始点になっている。ちなみにヒトでは第5染色体にマップされることになる。

3.3 NBC5 の構造

NBC5 の全長があきらかになったのであらためてホモロジー解析をしてみると、最も近いのはサンショウウオの NBC で 45%、NBC1 とは 44%、AE2 と 33% の同一性であった。NBC と AE ともそれほど近い関係にあるわけではなく第3のサブファミリーを形成している可能性がある (Fig. 1)。NBC5 の hydrophathy profile によれば 12ヶの膜貫通領域が存在する (Fig. 2)。N 末と C 末は細胞内にあると考えられ、N 末が C 末より長いのが特徴的である。その N 末にはプロテインキナーゼ A (PKA) でリン酸化されると思われる場所が 2つあった。さらに、ロイシンリピートとよばれる他の細胞内タンパクと結合すると考えられるドメインがみられた (Fig. 3)。

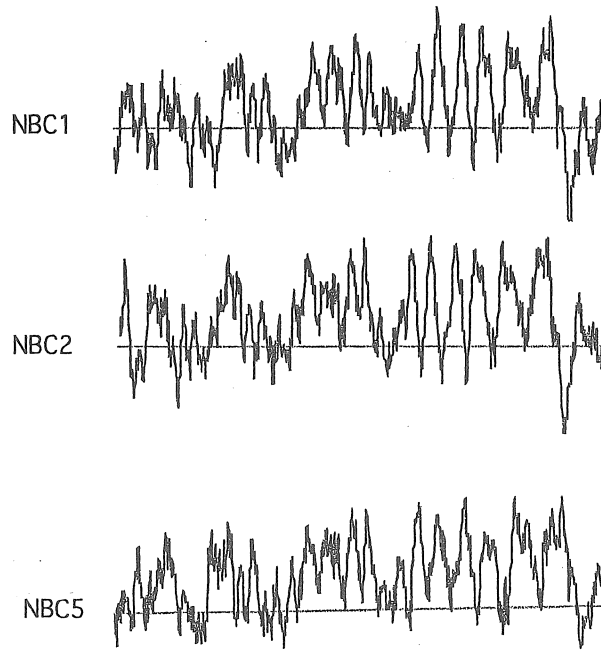


Fig. 2. Hydropathy analysis of representative NBC family members. The upper value represents the hydrophobicity. NBC5 has a shorter C-terminus than NBC1 and NBC2. Twelve transmembrane segments are present in each NBC.

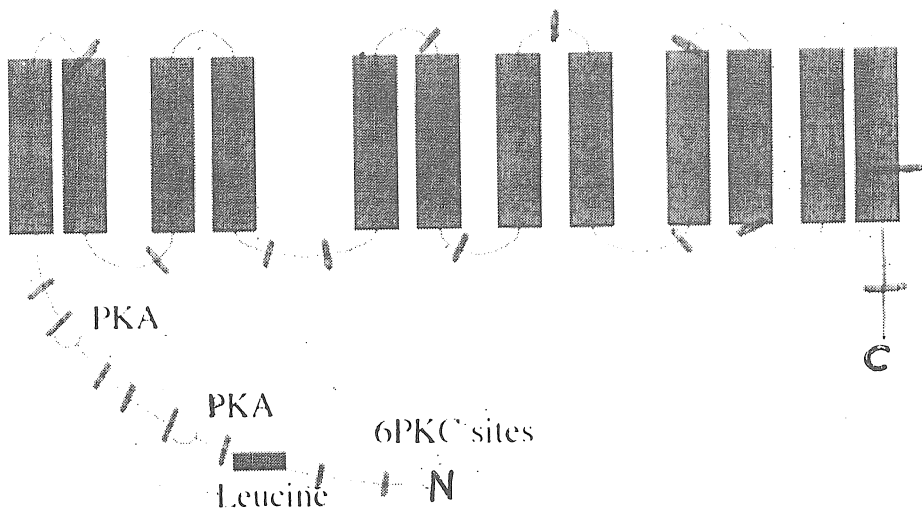


Fig. 3. Schematic drawing of the secondary structure of NBC5. Twelve transmembrane domains are shown with boxes. Two PKA sites in N-terminus are shown with circles. The exon-intron boundaries are shown with bars. A leucine zipper motif in N-terminus is shown with a box.

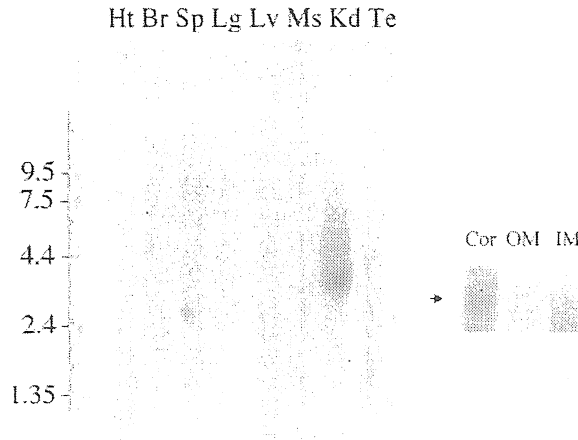


Fig. 4. Northern blot analysis of rat multiple tissue filter (Clontec) with NBC5 probe. NBC5 was expressed selectively in kidney (Kd). The right panel shows the expression in cortex but absent in outer medulla (OM) and inner medulla (IM) of rat kidney.

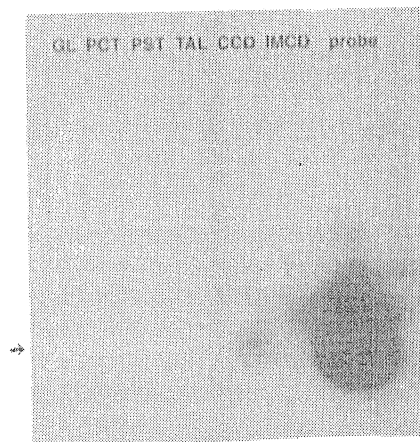


Fig. 5. RT-PCR of NBC5 in rat kidney nephron segments. "probe" represents the positive control using NBC5 plasmid DNA as a template. PCR products were electrophorased and blotted to be detected by Southern blot with ³²P-labeled rat NBC5 probe. Only cortical collecting duct (CCD) expressed NBC5.

3.4 NBC5 mRNA の組織分布。

ラットの組織の polyA RNA ののったフィルターでのノーザンブロットでは腎にのみ 3.3 kb のバンドをみとめた (Fig. 4)。ほかの組織には発現をみとめなかった。腎の皮質、髓質にわけて調べてみると皮質にのみ発現がみられた (Fig. 4)。どのネフロンセグメントに発現しているかを調べる目的で、ラットの糸球体 (GL)、近位直尿細管 (PCT)、近位直尿細管 (PST)、髓質部ヘンレ上行脚 (mTAL)、皮質部集合管 (CCD)、髓質部集合管 (IMCD) を dissection して NBC5 のプラスミドをポジティブコントロールとして RT-PCR をおこなった。PCR 産物をアガロースゲルに流してサザンブロットをしてみると CCD にのみバンドをみとめた (Fig. 5)。バンドのサイズもプライマーから予想されるもの (605bp) に一致していた。

3.5 NBC5 の免疫組織染色

ラット腎を NBC5 にたいするポリクローナル抗体で染めると皮質の集合管細胞に染まっていた。他のネフロンセグメントは染まっていなかった。拡大してみると管腔膜に限局して染まっていた。管腔に突出する細胞によくよく染まっていた (Fig. 6)。CCD では 40% が介在細胞でありその多くがベータータイプであるので NBC5 は主としてベーター介在細胞に発現していると考えられる。

3.6 NBC5 の機能

HEK 細胞に NBC5 を一過性に発現させ、その機能を細胞内 pH を測定することで調べてみた。溶液のナトリウムをコリンやリチウムに置換しても細胞内 pH は変化せず、NBC5 はナトリウムと HCO_3^- の共輸送はしないことがあきらかになった (Fig. 7)。他の NBC ではナトリウムフリーにすると細胞内 pH が低下するからである。一方溶液のクロライドをグルコネートに置換すると細胞内 pH は上昇した。これは $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送の機能があることを示しており、NBC5 は機能的にはバンド 3 のような anion exchanger のファミリーに近いことがあきらかになった。また $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ のない状態でも溶液のクロライドをのぞくと細胞内 pH はアルカリ化するので Cl^-/OH^- 交換輸送をしていると考えられる。なお、ベクターのみをトランスフェクトした HEK 細胞ではこれらの操作で細胞内 pH の変化をみとめていない。バンド 3 の $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送はスチルベン化合物で抑制されることが知られているが NBC5 の $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送は 0.3 mM SITS でも抑制されなかった。これはベーター介在細胞の管腔膜の $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送の特徴であり、このことから NBC5 がベーター介在細胞の管腔膜にある $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送体であることと矛盾しない。

3.7 アシドーシス、アルカローシス、脱水ラットでの NBC5 の発現

ベーター介在細胞の管腔膜にある $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送体は HCO_3^- を分泌することによってアルカローシスにならないようにしている。またクロライドの吸収に関与している可能性もある。アシドーシスのときには発現が抑制されている可能性もある。そこでアシドーシス、アルカローシス、脱水ラットでの NBC5 の発現をノーザンブロットでしらべてみた。アシドーシスとアルカローシスで NBC5 の発現はコントロールにくらべて増加した。また、脱水でも NBC5 の発現は増加していた (Fig. 8)。

4. 考察

今回の NBC ファミリーの検索で 3 つの新規メンバーがヒトにあることがわかった。そのうちの 1 つ (NBC4) はのちに他のグループによって登録されてしまったので今回はふれないうまく分布しており機能解析してみるとおもしろいかもしれない。実際 NBC4 の発現の多い培養細胞の機能が報告されており $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 共輸送の機能が示されている (5)。今一つ (NBC6) は脳に限局しており興味もたれるが残念ながら全長がえられていない。NBC4 も NBC6 も構造は NBC2 に似ており 1 つのサブグループを形成している。NBC2 は NBC1 とちがい電気的に中性の $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 共輸送であり (6)、NBC4 も NBC6 も電気的に中性の $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 共輸送である可能性がある。以前ニューロンで機能的に示されている電気的に中性の $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 共輸送の実体は NBC6 の可能性がある。NBC2 は電気的に中性だがナトリウムチャネルを活性化するユニークな作用もあるので興味もたれる。このナトリウムチャネルは NBC2 に内在するのか又は内因性のものを活性化するのか不明である。

NBC5 はその全長があきらかになり、機能、組織局在があきらかになったが非常に興味深いものであった。まず一次構造は HCO_3^- 輸送体スーパーファミリーのなかではもっとも小さく、また NBC のグループと AE のグループの中間に位置する。機能的には $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送で AE のグループに属する。ただし電気的に中性かどうかはまだ検討されていない。NBC5 は腎のみに発現しておりそれも CCD のベーター介在細胞の管腔膜に局在している。NBC5 はながらくその実体が不明であったベーター介在細胞の管腔膜の DIDS insensitive anion exchanger そのものであると考えられる (7,8)。この実体にかんしてはバンド 3 そのものとする報告があったが信じる人は少なかった (9)。したがっ



Fig. 6. Immunohistochemistry of rat kidney cortex with anti-rat NBC5 antibody. A polyclonal antibody against a synthetic peptide of C-terminus of rat NBC5 was detected by FITC-labeled anti-rabbit IgG. Cells of CCD expressed NBC5 at the apical membrane.

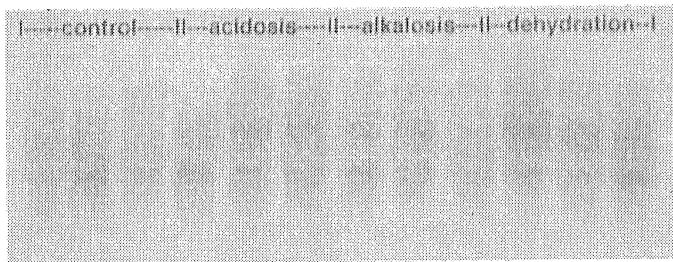
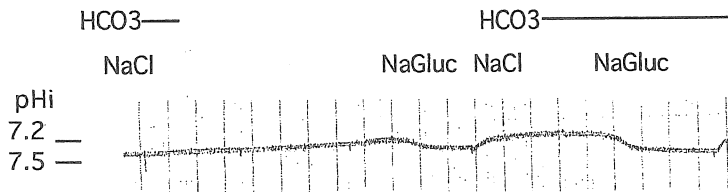
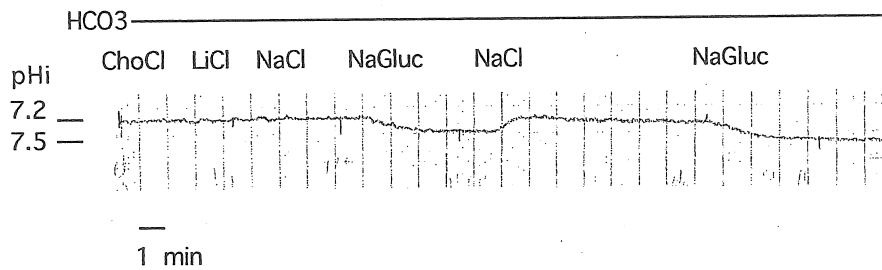


Fig. 8. Northern blot analysis of NBC5 in rat kidney. Rats were made acidosis and alkalosis by adding 100 mM NH₄CL and NaHCO₃ to drinking water for 7 days, respectively. Another set of rats were dehydrated for 48 hs. Total RNA (20 ug) of kidneys were loaded in each lane.

Fig. 7.

Intracellular pH of HEK cells transfected with NBC5 in expression vector



NBC5 in pCMV-SPORT was transiently transfected in HEK (Human Embryonic Kidney) cells. The intracellular pH (pHi) was measured by BCECF fluorescent dye.

Upper trace: Sodium replacement with choline or lithium did not change pHi.

However, Chloride replacement with gluconate increased pHi, suggesting the presence of functional Na-independent Cl/HCO₃ exchanger.

Lower trace: HCO₃ removal decreased pHi. Even in the absence of HCO₃, chloride removal with gluconate increased pHi, suggesting the Cl/OH mode of anion exchange.

Mock transfected HEK cells did not change pHi by these maneuvers.

てこれまで一次構造が NBC により近いので NBC5 とよんできたがナトリウム非依存性なので AE4 とよぶべきかもしれない。しかし AE1,2,3 は 60%以上の相同性があるのに対して、NBC5 は 30%程度の相同性しかなく AE4 とよぶのに躊躇せざるをえない。そこで NBC5 は HCO₃ 輸送体スーパーファミリーのなかでは新しいサブグループとして anion exchanger X1(AEX1)とよぶのがよいと考えられる。おそらく AEX1-4 くらいのアイソフォームが存在すると考えられる。たとえば HCO₃ を大量に分泌する膵臓の duct にはこのアイソフォームが存在している可能性がある。なぜならそこには AE が検出されていないからである。また duct 細胞の基底側膜に H ポンプが極在しており CCD のベータ一介在細胞とよく似た構造、機能をしているからでもある。

NBC5 の生理的役割を類推する目的でモデルラットでその発現をしらべたが、脱水で発現が増えるのはクロライド吸収が大切なやくわりであることがわかる。これを示唆する形態学的な報告もある(10)。これに対してアシドーシスとアルカローシスとともに発現が増えたということ、とくにアシドーシスで明確な発現の抑制がかからなかったのは acid-base ホメオスターシスに NBC5 が関与する部分は小さいためかもしれない。これはこれまでの多くの報告が acid-base ホメオスターシスに重要であることを示しているのと違っている(11,12)。NBC5 の役割の主体はクロライドの吸収にあるとすれば、管腔に分泌された重炭酸はすみやかに H ポンプによる酸分泌で中和されネットとしてクロライドの吸収になると考えられる。HCO₃ の分泌は管腔局所での H ポンプによる pH 低下をふせぎ H ポンプの機能維持に働いているのかも知れない。そのためアシドーシスで H ポンプが十分働かなくてはいけない時も NBC5 の発現は増えてくると考えられる。そのほかにも局所の pH がアルカリ化することで分泌/吸収が調節される物質の輸送に NBC5 が関与している可能性がある。たとえば pH 感受性カリウムチャネルやアンモニアの輸送などが考えられる。今後管腔局所の pH のレギュレーターとしての NBC5 の役割が検討されなければならない。

5. 今後の課題

NBC5 に関してはツメガエル卵の系などに発現させて電気的中性かどうかなど機能の解析をすすめる。細胞内局在やトラフィッキングで膜への移行が acid-base の状態で調節をうけている可能性がある。現在は否定されているが acid-base の状態で介在細胞の極性がかわるといわれたことがあった(13)。しかし現在でもこの説を指示する所見もあり、細胞生物学的にも興味ある問題である(14)。NBC5 の N 末に細胞内タンパクと結合しそうなドメインがあったり PKA のリン酸化部位があるので、この部分に結合するタンパクを two-hybrid 法でクローニングするのもおもしろい(15)。またリン酸化によって機能や発現に変化がみられるかどうか、またリン酸化する生理的刺激はなにかを同定するのも重要である(16)。また NBC5 を欠損するノックアウトマウスをつくることで NBC5 の生理的やくわりがはっきりになる可能性がある。もしクロライドの吸収が主であるなら低血圧になるであろう。その場合は Liddle 症候群のように NBC5 の機能亢進で高血圧となりうるので高血圧の原因遺伝子として注目する必要がある。一方 acid-base が主であるなら重炭酸の分泌がへってアルカローシスになるであろう。また局所のアルカリが維持できないことによる思いもかけない分泌/吸収障害が明らかになる可能性がある。

最後に脳に限局している NBC6 の全長をクローニングして構造機能をあきらかにすることは冒頭にのべたような神経系での NBC の役割を明らかにできるという点でも興味深い。

6. 文献

- 1) Soleimani M, Burnham CE : Physiologic and molecular aspects of the Na⁺:HCO₃⁻ cotransporter in health and disease processes. *Kidney Int.* 2000 Feb;57(2):371-84.
- 2) Schwiening, C. J. & Boron, W. F. Regulation of intracellular pH in pyramidal neurons from the rat hippocampus by Na-dependent Cl⁻/HCO₃⁻ exchange. *J. Physiol.* 475, 59-67 (1994).
- 3) Aickin, C. C. Regulation of intracellular pH in the smooth muscle of guinea-pig ureter: Na dependence. *J. Physiol.* 479, 301-316 (1994).
- 4) Ishibashi K, Sasaki S, Marumo F. :Molecular cloning of a new sodium bicarbonate cotransporter cDNA from human retina. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 May 19;246(2):535-8.
- 5) Amlal H, Burnham CE, Soleimani M.: Characterization of Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter isoform NBC-3. *Am J Physiol.* 1999 Jun;276(6 Pt 2):F903-13
- 6) Choi I, Aalkjaer C, Boulpaep EL, Borob WF : An electroneutral sodium/bicarbonate cotransporter NBCn1 and associated sodium channel. *Nature* 405, 571 - 575 (2000)
- 7) Furuya H, Breyer MD, Jacobson HR.: Functional characterization of alpha- and beta-intercalated cell types in rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol.* 1991 Sep;261(3 Pt 2):F377-85.

- 8) Emmons C. :Transport characteristics of the apical anion exchanger of rabbit cortical collecting duct beta-cells. *Am J Physiol.* 1999 Apr;276(4 Pt 2):F635-43.
- 9) van Adelsberg JS, Edwards JC, al-Awqati Q.: The apical Cl/HCO₃ exchanger of beta intercalated cells. *J Biol Chem.* 1993 May 25;268(15):11283-9.
- 10) Kim J, Welch WJ, Cannon JK, Tisher CC, Madsen KM.: Immunocytochemical response of type A and type B intercalated cells to increased sodium chloride delivery. *Am J Physiol.* 1992 Feb;262(2 Pt 2):F288-302
- 11) Milton AE, Weiner ID.: Regulation of B-type intercalated cell apical anion exchange activity by CO₂/HCO₃⁻. *Am J Physiol.* 1998 Jun;274(6 Pt 2):F1086-94.
- 12) Tsuruoka S, Schwartz GJ. : Adaptation of rabbit cortical collecting duct HCO₃⁻ transport to metabolic acidosis in vitro. *J Clin Invest.* 1996 Feb 15;97(4):1076-84.
- 13) Al-Awqati Q.: Plasticity in epithelial polarity of renal intercalated cells: targeting of the H(+)-ATPase and band 3. *Am J Physiol.* 1996 Jun;270(6 Pt 1):C1571-80.
- 14) Chen J, Vijayakumar S, Li X, Al-Awqati Q. : Kanadaptin is a protein that interacts with the kidney but not the erythroid form of band 3. *J Biol Chem.* 1998 Jan 9;273(2):1038-43.
- 15) Chen J, Vijayakumar S, Li X, Al-Awqati Q. : Kanadaptin is a protein that interacts with the kidney but not the erythroid form of band 3. *J Biol Chem.* 1998 Jan 9;273(2):1038-43.
- 16) Emmons C, Stokes JB.: Cellular actions of cAMP on HCO₃⁻-secreting cells of rabbit. CCD: dependence on in vivo acid-base status. *Am J Physiol.* 1994 Apr;266(4 Pt 2):F528-35.

Molecular Cloning of a New anion exchanger Selectively Expressed in Rat Kidney.

Kenichi Ishibashi
Department of Pharmacology, Jichi Medical School.

Summary

A family of HCO₃ transporter (solute carrier family 4A, SLC4A) have been identified that include three anion exchangers (AE) 1-3 (SLC4A1-3) and four Na/HCO₃ cotransporters (NBC) 1-4 (SLC4A6-9). In the kidney, NBC1 functions as HCO₃ absorption at proximal tubule and AE1-3 function as HCO₃ absorption at collecting duct. However, the molecular identity of HCO₃ transporter at apical membrane of beta intercalated cells to secrete HCO₃ at cortical collecting duct (CCD) is currently unknown.

Here, we report the cloning of a new gene of NBC subfamily (NBC5) from rat kidney by homology cloning. EST-data base was screened with NBC sequences. Three new NBC sequences were identified. They are tentatively named NBC4, NBC5, and NBC6. NBC4 was ~60% identical with NBC2 and widely expressed and later deposited in GeneBank as KIAA0739 by Kazusa DNA research EST project. NBC5 had lowest identity with NBC1 in three and was selectively expressed in the kidney. NBC6 was ~70% identity and predominantly expressed in the brain. To obtain the full length of NBC6, rat and human brain cDNA libraries were screened with NBC6 EST clone. However, the full length was not obtained.

On the other hand, the full length of NBC5 was obtained by screening a rat kidney cDNA library. NBC5 is composed of 954 amino acids with 44% identity with NBC1 and 33% identity with AE1. NBC5 has putative 12 transmembrane domains.

In Northern blot, NBC5 was selectively expressed in kidney (3.3kb) and absent in other tissues (heart, brain, spleen, lung, liver, muscle, testis). In RT-PCR of nephron segments, NBC5 was expressed at Cortical Collecting Duct (CCD) and virtually absent in glomeruli, proximal tubules, thick ascending limb of Henle and inner medullary collecting ducts.

Using carboxy-terminus 15 amino acid peptide sequence of NBC5, a polyclonal antibody was produced in rabbit. Immunohistochemistry of rat kidney revealed that NBC5 was expressed at the apical membrane of some restricted cells in CCD.

NBC5 was subcloned in expression vector under the control of CMV promotor. In the transfection of NBC5 in human embryonic kidney (HEK) cells, Cl removal alkalized the cell but Na removal did not change cell pH. In mock transfected cells did not change cell pH to the either procedure. This pH change was not inhibited by removal of ambient HCO₃ nor 0.1 mM SITS. The result indicated the the function of NBC5 is Cl/OH exchange and it is Na independent.

To gain the insight into the physiological roles of NBC5, three kind of rat models were tested for the expression of NBC5. Acidosis and alkalosis models were produced by adding 0.1 M NH₄Cl or NaHCO₃ to the drinking water for 7 days, respectively. The dehydrated rats were produced by depriving water for 2 days. In each animal model, the expression of NBC5 mRNA was increased by 1.5-3 times higher than control. The result indicated some role of NBC5 in acid-base regulation and volume regulation. As NBC5 was stimulated in both acidosis and alkalosis, the functional regulation of its activity is more likely than the number of transporters.

In summary, we have identified a new anion exchanger of CCD. NBC5 may be a bona fide HCO₃ transporter at apical membrane of beta intercalated cells. Its lower homology with other NBCs may indicate that NBC5 may comprise the third subfamily in HCO₃ transporter superfamily (SLC4A). Further analysis of other members of SLC4A will reveal the new mechanism of cellular pH regulation in our body.