

助成番号 9943

マガキの海水環境適応における $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ 依存性トランスポーターの役割

助成研究者：豊原 治彦(京都大学 大学院農学研究科)

共同研究者：横山 芳博(神戸松蔭女子短期大学 生活科学部)

海産無脊椎動物細胞にみられる特異な海水浸透圧適応機構を明らかにする目的で、環境の $\text{Na}^+$ と $\text{Cl}^-$ 濃度に依存してアミノ酸を細胞内に取り込む活性を発現する $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ 依存性アミノ酸トランスポーターに注目し、その構造と海水環境適応における役割について検討した。実験材料としては、浸透圧変化の激しい河口域などに生息するにもかかわらず、移動能力をまったく持たないため、とりわけその能力に卓越していることが予想されるマガキを用いた。

マガキからクローニングされた $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ 依存性アミノ酸トランスポーターは、既知の脊椎動物由来のものと同様に12回膜貫通構造を有し、相同性検索ではヒトの $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ 依存性グリシントランスポーターと最も高い相同性(約43%)を示した。しかし、COS-7細胞での発現実験ではグリシン取り込み活性は認められず、グルタミン酸、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、チロシン、スレオニンなどに対して広範な取り込み活性を示した。また、この遺伝子の発現は、従来から予想されていた高浸透圧ストレスばかりでなく、全く予想されていなかった低浸透圧ストレスによって一層強く誘導された。これら結果から、今回クローニングされた広範な基質特異性を示す $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ 依存性アミノ酸トランスポーターが、マガキの海水浸透圧適応において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。



助成番号 9943

マガキの海水環境適応における $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ 依存性トランスポーターの役割

助成研究者：豊原 治彦 (京都大学大学院農学研究科)

共同研究者：横山 芳博 (神戸松蔭女子短期大学 生活科学部)

## 1. 研究目的

海洋に生息する生物のうち、海産哺乳類や魚類などの海産脊椎動物は内分泌系や神経系の働きにより環境浸透圧とは無関係に体液浸透圧をほぼ一定に保つことができる。したがって、海産脊椎動物では、直接海水と接する上皮細胞などをのぞき、体内の細胞の内部浸透圧は、外部環境の浸透圧変化に関わらず、体液と等しい 300 mOsm/kg 付近に保持されている。一方、多くの海産無脊椎動物ではこのような個体レベルの体液浸透圧調節機構が未発達なため、体液の浸透圧は刻一刻と変化する環境海水のそれに等しいものとなっている。そのため体液浸透圧変化によって細胞容積が変化するのを防ぐ目的で、多くの海産無脊椎動物は、生息環境の浸透圧に応答して細胞内部の浸透圧を常に調節していると考えられている。これらの海産無脊椎動物のうち、潮間帯、タイドプール、汽水域などに生息する固着性無脊椎動物は、とくに激しい浸透圧変化に暴露されることから、すぐれた細胞内浸透圧調節機構を備えていることが予想される。これまでの生理学的な研究から、これらの生物は細胞内のアミノ酸などの低分子代謝生成物（オスモライト）の蓄積量を変化させることで細胞内浸透圧を調節していることが明らかとなってきたが、その輸送機構についてはまったくわかっていない。

一方、最近の我々のコイやティラピアといった魚類の上皮細胞を用いた細

胞生物学的研究から、魚類の鰓や鱗などの上皮細胞においては $\text{Na}^+$ , $\text{Cl}^-$ 依存性トランスポーターファミリーに属するアミノ酸トランスポーターが細胞レベルの浸透圧調節において重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。

そこで本研究においては、魚類を対象としたこれまでの研究で得られた知見を生かして、魚類よりはるかに細胞レベルの浸透圧調節機構が重要であると予想される海産無脊椎動物の細胞レベルの浸透圧調節における $\text{Na}^+$ , $\text{Cl}^-$ 依存性トランスポーターの果たす役割について明らかにすることを目的とする。

## 2. 研究方法

### 2.1 材料

実験材料としては潮間帯，タイドプール，汽水域のいずれにも生息し，まったく移動能をもたないにもかかわらず高い浸透順応性を示すマガキ (*Crassostrea gigas*) を用いた。マガキは養殖業者より購入し，実験室において人工海水あるいは濾過滅菌した天然海水を用いて飼育した。浸透圧ストレスを与える実験は，人工海水を用いて行った。

### 2.2 $\text{Na}^+$ , $\text{Cl}^-$ 依存性トランスポーターの cDNA クローニングとその機能の検討

鰓，閉殻筋，外套膜からグアニジン塩化セシウム超遠心法により RNA を調製した。この RNA を用いて，すでにクローニングしたコイのタウリントランスポーターと，既知の哺乳類各種  $\text{Na}^+$ , $\text{Cl}^-$ 依存性トランスポーター遺伝子の塩基配列をもとに設計したプライマーを用いた RT-PCR 法により cDNA 断片を得た。得られた各クローンについてジデオキシ法により塩基配列を決定し，相同

性検索を行った。各クローンをプローブとして、2倍（高浸透圧）および1/2倍（低浸透圧）の海水による浸透圧ストレスを2, 8, 24時間与えた個体の鰓、外套膜、閉殻筋より抽出したRNAに対してノーザンブロット分析を行い、浸透圧変化に応答して発現に変化を示したひとつのクローンを選択し、そのクローンについて全長のクローニングを試みた。もっとも強い発現誘導が見られた1/2倍海水による浸透圧ストレスを与えた個体の鰓からλZAP IIを用いたcDNAライブラリーを作成し、PCR断片をプローブとしてスクリーニングを行い、全長を含むクローンを得た。その塩基配列を上記の方法で決定した。得られたクローンを発現ベクターに組み込みCOS-7に発現させ、トリチウム標識されたアミノ酸を用いて取り込み活性を検討した。

### 2.3 血リンパ浸透圧の測定

ノーザンブロット分析に供した個体の血リンパ液について、氷点降下型浸透圧計を用いて浸透圧を測定した。

## 3. 研究結果

### 3.1 浸透圧応答性トランスポーター遺伝子のクローニング

既知の哺乳類各種Na<sup>+</sup>,Cl<sup>-</sup>依存性トランスポーター遺伝子の塩基配列をもとに設計したプライマーを用いたRT-PCR法により10種類のクローンを得ることができた。相同性検索の結果から、ベタイン/GABAトランスポーター様トランスポーター、グリシントランスポーター様トランスポーター、コリントランスポーター様トランスポーターと想定された3クローンについて、それぞれのPCR断片をプローブとして、海水濃度の変化に応じた転写産物の発

現量の変化をノーザンブロット法で調べた。その結果、グリシントランスポーター様トランスポーターの発現が浸透圧変化に応答して変化することが示されたので、その cDNA 全長のクローニングを試みた。

PCR 断片をプローブとして、もっとも強い発現誘導が検出された 1 / 2 倍海水による低浸透圧ストレスを与えた個体の鰓から  $\lambda$ ZAP II を用いた cDNA ライブラリーを作成し、約 20 万個のプラークをスクリーニングした結果、6 個の陽性クローンが得られた。これらのうち全長約 4 kbp をコードすると予想される最長クローンについて全長の塩基配列を決定した。予想されるアミノ酸配列について疎水性プロット分析を行った結果、本クローンは 12 回膜貫通型タンパク質をコードすることが示唆された (Fig.1)。全長を用いた相同性検索の結果からも PCR 断片の場合と同様に、本トランスポーターはヒトの  $\text{Na}^+, \text{Cl}^-$  依存性グリシントランスポーターともっとも高い類似性を示した (Fig.2)。

### 3.2 発現の浸透圧応答性とその輸送機能の検討

高浸透圧ならびに低浸透圧による本遺伝子の発現誘導を、全長をプローブとしてノーザンブロット分析により検討した (Fig.3)。高浸透圧ストレスにより、鰓では 24 時間後に強い誘導が認められた。閉殻筋でも程度は弱いものの、同様の誘導が認められたが、外套膜では明瞭な誘導は認められなかった。一方、低浸透圧ストレスでは、鰓と外套膜において 8 時間以降に強い誘導が検出された。閉殻筋では 8 時間目に誘導が検出されたが、24 時間後には発現は元のレベルにまで低下していた。

同遺伝子の翻訳産物の真の輸送物質を知る目的で、同遺伝子を発現ベクタ

一 pcDNA3 に組み込み COS-7 にエレクトロポレーション法により導入した。相同性検索の結果からグリシンを輸送することが予想されたので、トリチウム標識したグリシンを用いてその取り込みを検討したが、意外にもグリシン取り込み活性は認められなかった。そこでトリチウム標識したアミノ酸混合物(アラニン, アルギニン, アスパラギン酸, グルタミン酸, グリシン, ヒスチジン, イソロイシン, ロイシン, リジン, フェニルアラニン, プロリン, セリン, スレオニン, チロシン, バリン)の取り込みを検討したところ, これらアミノ酸混合物に対して  $\text{Na}^+$  と  $\text{Cl}^-$  濃度に依存した取り込み活性が確認された。取り込みアミノ酸を同定するために, これらの放射性標識されたアミノ酸混合物に非標識のそれぞれのアミノ酸を添加し, 競合阻害による取り込みの低下を調べたところ, 非標識のグルタミン酸, フェニルアラニン, ロイシン, イソロイシン, チロシン, スレオニンを加えた場合に, 放射性標識アミノ酸混合物の取り込み低下が確認された。この結果は, 今回マガキからクローニングされたトランスポーターは, これらのアミノ酸に対して幅広い取り込み活性を持つ可能性を示唆していた。

### 3.3 血リンパの浸透圧変化

測定結果を Fig.4 に示した。1 / 2 倍海水で浸透圧ストレスを与えた場合には, 血リンパ液の浸透圧は2時間後には環境水とほぼ同じ浸透圧にまで低下していた。一方, 2倍海水で高浸透圧ストレスを与えた場合には, 8時間後に環境浸透圧と等しくなった。なお, 高浸透圧ストレスの場合には, マガキは殻を閉じることで浸透圧変化を避けようとするので, この実験ではペンチで殻に割れ目を入れることで, 殻を閉じても海水が殻の内部に侵入するよ

うに工夫した。実際、殻に割れ目を入れない場合には、24時間後でも10～20%程度の浸透圧上昇しかおこらなかった。

#### 4. 考察

細胞膜は半透膜としての性質をもつため、細胞外液の浸透圧変化に応じて細胞の容積は影響を受ける。たとえば浸透圧が上昇した場合には、瞬時に細胞内から細胞外へと水が放出され、細胞内外の浸透圧が等しくなる。この脱水反応により細胞は収縮するが、細胞容積の変化は多細胞生物にとって有害なことから、数分以内に  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ などの無機イオンが細胞内に流入し、細胞の容積はもとに戻る。しかし高濃度の  $\text{Na}^+$ は細胞にとって有害であることから、その後、数時間から数日をかけて徐々にアミノ酸などのオスモライトを細胞外から取り込むとともに、 $\text{Na}^+$ などを有害なイオンを細胞外へ放出する。この過程は「調節的な細胞容積の増加 (Regulatory Volume Increase)」とよばれている。一方、細胞外液の浸透圧が低下した場合には、反対に、瞬時に細胞外から細胞内へ水が流入し内外の浸透圧が等しくなるが、その結果、細胞容積は増加する。前述のように細胞容積の増加は生物にとって有害なことから、細胞は細胞内の無機イオン（おもに  $\text{K}^+$ や  $\text{Cl}^-$ ）およびアミノ酸などのオスモライトを細胞外へ放出することにより細胞容積をもとに戻す。この過程は「調節的な細胞容積の減少 (Regulatory Volume Decrease)」よばれている。

海産無脊椎動物においては内分泌系や神経系といった個体レベルの高次の浸透圧応答機構が未発達であるため、Fig.4 に示したように海水環境の浸透圧変化に応じて体液浸透圧も変化する。そのため海水に直接接触している鰓や



外套膜のような器官ばかりでなく、体の内部にあり直接海水に接触しない閉殻筋のような器官を構成する細胞も自らに備わった浸透圧応答機構を用いて細胞容積の調節を行う必要がある。このような細胞レベルの浸透圧応答機構においては、次のような機構が働いているものと予想される。

- ① 何らかの未同定の浸透圧センサー（あるいは細胞容積センサー）が細胞外の浸透圧変化を感知する。
- ② その情報を細胞内シグナル伝達機構を介して核へと伝達する。
- ③ 浸透圧応答タンパク質をコードする遺伝子の転写が誘導され、その発現により浸透圧変化に適応する。

本研究結果から、マガキの鰓、外套膜、閉殻筋では、浸透圧変化に応答して12回膜貫通型タンパク質である  $\text{Na}^+, \text{Cl}^-$  依存性アミノ酸トランスポーター遺伝子の発現が誘導されることが明らかとなった。このトランスポーターはアミノ酸配列の比較からはヒトの  $\text{Na}^+, \text{Cl}^-$  依存性グリシントランスポーターと約43%の相同性を示したが、COS-7細胞を用いた一過性の発現実験ではグリシンの取り込みは検出されず、グルタミン酸、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、チロシン、スレオニンなどの各種アミノ酸を取り込む可能性が示唆された。この結果は、幅広い基質特異性を有する特異なトランスポーターが浸透圧変化に応答して発現していることが、マガキの幅広い浸透圧耐性の一因となっている可能性を示唆している。さらに興味深いことに、Fig.3に示したように、本遺伝子の転写は高浸透圧ストレスばかりでなく低浸透圧ストレスによっても誘導されることが明らかとなった。しかもその誘導の程度は明らかに低浸透圧ストレスの方が顕著であった。この事実は、これまで予想されてきた高浸透圧適応においてばかりではなく、低浸透圧適応におい

でも  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  依存性アミノ酸トランスポーターが重要な役割を果たしていることを示唆するものである。上述のように低浸透圧適応においては「調節的な細胞容積の減少 (Regulatory Volume Decrease)」の過程においてオスモライトであるアミノ酸を放出するため、細胞内への取り込みを担うアミノ酸トランスポーターの発現はこれまで不要なものと考えられてきた。しかし、本研究結果が示すように、低浸透圧適応においてこの遺伝子の強い発現誘導が見られるという事実は、この過程が単純なアミノ酸放出だけからなる反応ではなく、放出と取り込みのバランスのうえに成り立った複雑な反応である可能性を示している。

## 5. 今後の課題

海産無脊椎動物の高い浸透順応性については古くはボールドウィンの「比較生化学入門」に記述が見られ、またその高い浸透順応性が高校生物の教科書にも記載されているほど一般的な事実となっている。その機構については、細胞内外のアミノ酸や無機イオンなどのいわゆるオスモライトの環境浸透圧変化に伴う量的変化や、これらの成分の膜輸送のキネティクスをラジオアイソトープを用いて調べた生理学的研究は古くから多数あるものの、これらオスモライトのトランスポーターに注目した分子レベルの研究はこれまでまったくなされていない。本研究結果は、海産無脊椎動物の浸透圧適応、特に低浸透圧適応が従来考えられていたような単純なオスモライト放出だけによるものではない可能性を強く示唆している。今後は本遺伝子のプロモーター解析などによりその発現誘導機構を明らかにしていく必要があると考えられる。

## 6. 参考文献

1. E. ボールドウィン: 比較生化学入門, p.23-37, みすず書房 (1954).
2. Takeuchi K, Toyohara H, and Sakaguchi M: A hyperosmotic-stress-induced mRNA of carp cell encodes Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> dependent high affinity taurine transporter, *Biochem.Biophys.Acta.*, 1464, 219-230 (2000).
3. 竹内啓明, 豊原治彦: 浸透圧応答性遺伝子-タウリントランスポーターの機能-, 月刊海洋, 30, 107-112 (1998).
4. Palacin M, Estevez R, Bertran J, and Zorzano A: Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters, *Physiol. Rev.*, 78, 969-1054 (1998).

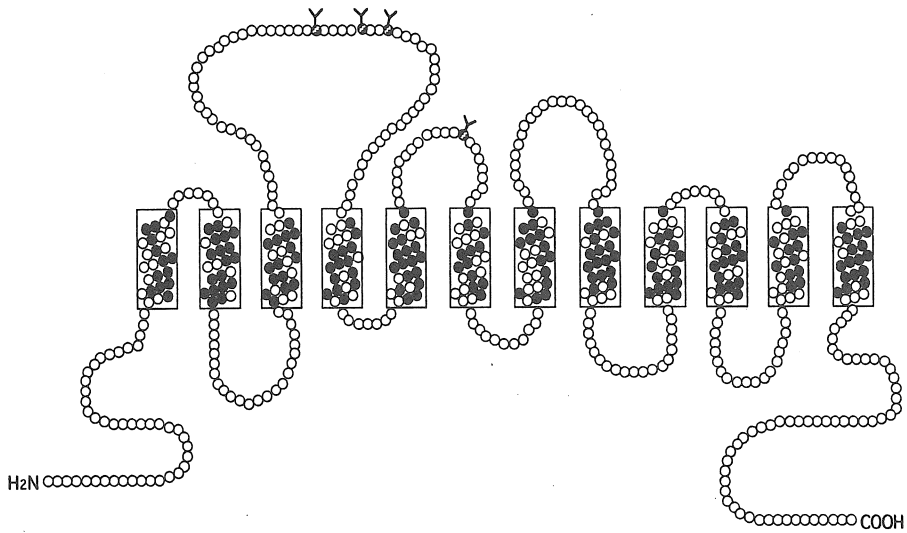


Fig.1 Putative topological structure of oyster  $\text{Na}^+, \text{Cl}^-$ -dependent amino acid transporter. Closed circle shows hydrophobic amino acid. "Y" shows putative glycosylation site.

human	1	10	20	30	40	50	
oyster	1	MDCSAPKEMN	KLPANSPEAA	AAQSHPDGPC	APRTSPEQEL	AAAAAPPPPR	50
human	51	60	70	80	90	100	
oyster	51	VPRSASTGAQ	TFQSADARAC	EAERPGVGSC	KLSSPRAQAA	SAALRDIREA	100
human	101	110	120	130	140	150	
oyster	101	QSAQASPPPG	SSGPGNALHC	KIPSLRGPPEG	DANVSVGKGT	LERNNTPVVG	150
human	151	160	170	180	190	200	
oyster	151	WNMGQSTVV	LGTDGITSVL	PGSVATVATQ	EDEQGEDKA	RGNWSKLFDF	200
human	201	210	220	230	240	250	
oyster	201	ILSMVGYAVG	LGNVWRFPYL	AFQNGGGAFL	IPYLMHLALA	GLPIFFLEVS	250
human	251	260	270	280	290	300	
oyster	251	LQFASQGPV	SVWKAIPALQ	CGGIAMLIIS	VLIAIYNYVI	ICYTLPYLF	300
human	301	310	320	330	340	350	
oyster	301	SFVSVLPWGS	CNNPWNTPEC	KDKTKLLLDS	CVISDHPKIQ	IKNSTFCMTA	350
human	351	360	370	380	390	400	
oyster	351	YPNVTMVNFT	SLANKTFVSG	SEEFKRYFVL	KISAGIEYPG	EIRNPLALCL	400
human	401	410	420	430	440	450	
oyster	401	FLAWVIYAS	LAKGIKTSGL	VVYFATFPY	VVLVILLIRG	VTLPLGAGGI	450
human	451	460	470	480	490	500	
oyster	451	WYFITPKWEK	LTDATYWKDA	ATOIEFPLSA	AWGGLITLS	YNKFNHNCYR	500
human	501	510	520	530	540	550	
oyster	501	IYYLKPDFNK	LLEPRVWSDA	CTQIEYLSLA	CSGGMIAMS	YNKFKNCCYK	550
human	551	560	570	580	590	600	
oyster	551	YPEALTRPL	SPFWAIIFFL	MLLTLGLDTM	FASITETIVTS	ISDFEPKY-L	600
human	601	610	620	630	640	650	
oyster	601	RTHKPVFTLG	CCICFPIMGF	PMITOGGIYM	FQLVDTYAAS	YALVIAIIFE	650
human	651	660	670	680	690	700	
oyster	651	LVAISWIYGY	QRFCEDIEMM	IGFQPNIPWK	VCWAFVPTT	LTFILCFSPY	700
human	701	710	720	730	740	750	
oyster	701	QWEPMTYGSY	RYPNWSMLG	WMLACSIVW	IPIMFVIKMH	LAPGAFIERL	750
human	751	760	770	780	790	800	
oyster	751	KLVCSPPQDW	GPFLAQHRGE	RYKNMIDPLG	TSSLGLKLPV	KDLELGTQC	800
human	751	760	770	780	790	800	
oyster	751	REGVKPLXSW	G---LQKPTR	NLKYGHSVGT	ISQIAVRLPS	S.....	800

Fig.2 Amino acid alignment of oyster transporter and human  $\text{Na}^+, \text{Cl}^-$ -dependent glycine transporter.

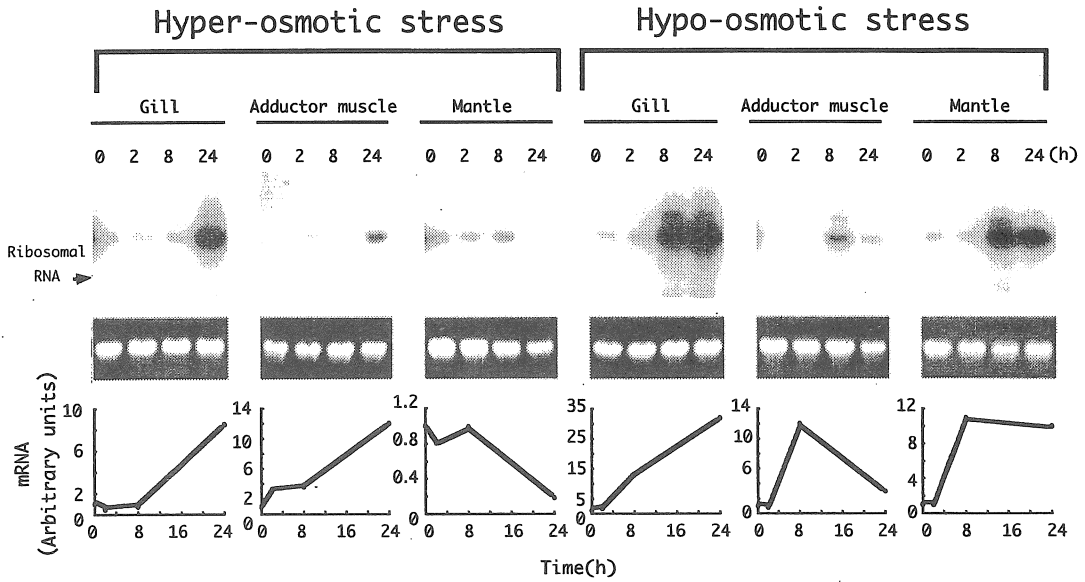


Fig.3 Northern blot analysis of oyster amino acid transporter expression.

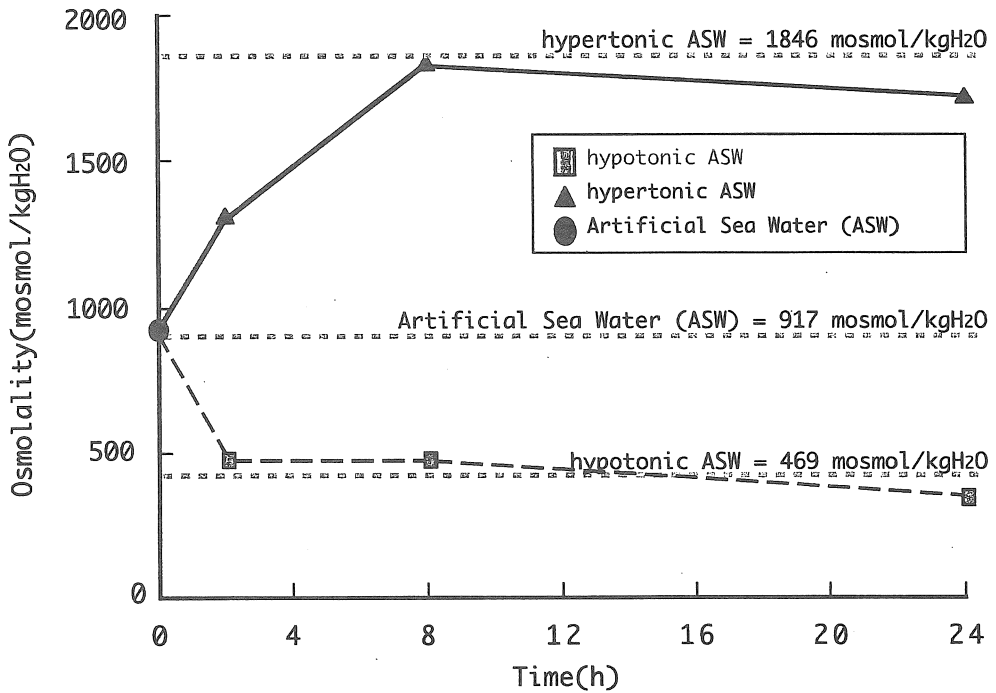


Fig.4 Change in the osmolality of hemolymph.

## Implication of Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>-Dependent Amino Acid Transporter in Sea Water Adaptation of Oyster

Haruhiko Toyohara and \*Yoshihiro Yokoyama

Graduate School of Agriculture, Kyoto University

\*Kobe Shoin Women's College

### Summary

Highly developed cellular osmo-responsive mechanism equipped with marine invertebrates was studied by using oyster (*Crassostrea gigas*), because they are supposed to have exclusively efficient cellular osmo-responsive mechanism. In the present study, we focussed on a Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>-dependent amino acid transporter that intakes amino acids from extracellular fluids into cells to maintain cell volume constant under various osmotic condition.

A Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>-dependent amino acid transporter cDNA was cloned from oyster gill. The transporter has twelve-transmembrane structure commonly seen in vertebrates counterparts. The oyster transporter showed the highest homology with human glycine transporter. In the transient expression experiment in COS-7 cells, however, no intake activity was observed for glycine, while considerable activities were detected for glutamic acid, phenylalanine, leucine, isoleucine, tyrosine, and threonine. Remarkable induction of mRNA under hypo-osmotic as well as hyper-osmotic conditions strongly suggests that the oyster transporter cloned in the present study plays a crucial role in the osmotic adaptation in the sea water.