

発表番号 49 (0340)

クロライド輸送担体(DRA)の発現系の確立並びにその機能解析

助成研究者:林 久由(静岡県立大学食品栄養科学部生理学研究室)

共同研究者:鈴木裕一(静岡県立大学食品栄養科学部生理学研究室)

[目的]

体液の主要なイオンである Na^+ と Cl^- は、消化管より等張な NaCl の溶液として吸収されている。 NaCl 吸収の機序としては Na^+/H^+ 交換輸送担体並びに $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送担体が協同して働く事が想定されてきた。近年、先天性クロール下痢症患者の遺伝子解析より、**down-regulated in adenoma(DRA)**が、消化管で主要な $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送担体として機能していることが示された。しかし消化管上皮細胞を用いた実験では、**DRA** と同様の $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 輸送活性を持つ **AE(anion exchanger)**等が存在するため解析が複雑である。このため本研究では、**DRA** を発現させた細胞株を確立し、その輸送活性調節機序を明らかにすることを目的とした。

[方法]

ヒト cDNA library より **DRA** をクローニングし、ほ乳類発現ベクターにサブクローニングした。その際 **DRA** の N 末にヘマグルチニンエピトープ (**HA**) タグを挿入した。これを **CHO, HEK293, LLC-PK1** 細胞にトランスフェクションした。発現並びに細胞内局在を、抗 **HA** 抗体を用い、それぞれウェスタンブロット法並びに免疫蛍光染色後、共焦点顕微鏡で確かめた。またテトラサイクリンによる遺伝子発現誘導システムを用い、**HA-DRA** を任意に発現できる細胞系を確立した。

[結果並びに考察]

非上皮細胞である **CHO** 細胞に **DRA** を発現させた。ウェスタンブロット法で発現を確かめると、約 85, 90, 120kDa のバンドが観察された。高分子量側のバンドは **DRA** が糖鎖付加を受けたことによることが考えられたため、N 結合型糖鎖付加抑制剤であるツニカマイシンの効果を検討した。ツニカマイシンにより高分子量側の 2 つの主要なバンドは消失し、約 85kDa の低分子量側のバンドが強く現れ、**DRA** は多段階に糖鎖付加を受けることが示唆された。更に **DRA** の細胞内局在を共焦点顕微鏡で確かめると、**DRA** は細胞膜または細胞膜直下に強く発現していた。次に、上皮系細胞由来である **HEK293, LLC-PK1** 細胞に **DRA** を発現させた。その結果 **CHO** 細胞とほぼ同様の結果が得られたが、よく細胞が分化し極性のある **LLC-PK1** 細胞では、**DRA** は頂側膜に強く発現しており、アクチン構造との共発現も観察された。**DRA** の機能解析のため、安定形質発現株の単離を試みたが、何れの細胞においても、単離はできなかった。このためテトラサイクリンの添加により **DRA** が任意の時に発現させられる細胞株の樹立を試みた。得られた細胞株は、発現誘導前は **DRA** の発現がほとんど見られず、誘導後は **DRA** が多量に発現してくる理想的な細胞株であることが示された。得られた細胞を用い **DRA** の機能解析を行った。

14

助成番号 0340

クロライド輸送担体(DRA)の発現系の確立並びにその機能解析

助成研究者：林久由（静岡県立大学 食品栄養科学部 生理学研究室）

共同研究者：鈴木裕一（静岡県立大学 食品栄養科学部 生理学研究室）

目的

体液の主要なイオンである Na^+ と Cl^- は、消化管より等張な NaCl の溶液として吸収されている。この NaCl 吸収機序の調節は、体液の恒常性を維持する上で非常に重要である。腸管での NaCl の吸収機序としては Na^+/H^+ 交換輸送担体並びに $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送担体が協同して働く事が想定されてきた。 Na^+/H^+ 交換輸送担体については、NHE3 ノックアウトマウスの解析により NHE3 が NaCl 吸収を担う Na^+/H^+ 交換輸送担体であることが示され、また別の多くの研究により NHE3 の活性調節機序が明らかにされている(1)。一方 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送担体については、その分子実体は長らく明らかでなかったが、先天性クロール下痢症の患者の遺伝子解析より、Down-regulated in Adenoma (DRA) が消化管で主要な $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送担体として機能していることが示された(2-4)。しかし、消化管上皮細胞を用いた機能解析の実験では、機能的に同じ $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送体のアイソフォームが存在するため解析が困難である。従って、本研究では内因性の DRA を欠く細胞に DRA を発現させた細胞系を確立し、その輸送活性調節機序を明らかにすることを目的とした。

方法

細胞及び培地

本実験では HEK293、LLC-PK1、CHO 細胞を用いた。培地は 1:1 D-MEM/F-12 に 10%FBS を添加し、細胞は CO_2 インキュベーターで 5% CO_2 +95%air, 37°C 条件下で培養した。

ヒト DRA のクローニング

ヒト大腸 cDNA ライブラリーより、DRA を TA クローニング法を用いクローニングした。プライマーは sense primer AATGATTGAACCCCTTGGGAATCAGTA、anti-sense primer CATAGTCAGATGAAGATCCTTCTGAAT で増幅し、目的産物である 2.3kbp の DNA を得た。これを pGEM-Teasy にサブクローニングし、その後 N 末端にヘマグルチニンエピトープタグ (HA) が入る哺乳類発現ベクターの D-HA にサブクローニングした (HA-DRA)。得られた DRA の塩基配列を解析したところ、報告されているものと 2 箇所違いが見られたが、アミノ酸配列は完全に一致した。細胞へのトランスフェクションは Lipofectamine 2000 を用いた。

DRA 細胞外ループへの HA タグの導入

DRA の活性調節時に細胞表面上の DRA の総数を容易に測定できるようにするために想定

されている DRA の膜トポロジーの細胞外の第五番目のループに HA タグを導入することを試みた。DRA を N 末に myc タグが入る D-myc にサブクローニング後、BsmI で処理し、以下の DNA 断片をライゲーションした。

5'GTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCGCGGCCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCGCT3'

5'CGCGTAGTCGGGCACGTCGTAGGGGTAGGCCGCGGCCTAGTCGGGCACGTCGTAGGGGTACAG3'

ウェスタンブロットティング並びに免疫蛍光染色

細胞に DRA を一過性にトランスフェクションし、24-48 時間後に細胞を Laemmli Sample Buffer に直接溶かした。その後 SDS-PAGE で分離し、ニトロセルロースメンブレンに転写した。マウス抗 HA 抗体 (1:5,000、16B12, Babco) ついで HRP で標識したヤギ抗マウス抗体 (1:10,000、Pierce) で染色し ECL でシグナルを検出した。

DRA 発現の細胞内局在を調べるため、免疫蛍光染色を行った。トランスフェクション後、PBS で細胞を洗浄し、4%PFA で 15 分固定後、余分な PFA を除くため 100mM Glycine で 15 分インキュベーションした。その後、5% milk, 0.1% Triton-X 100 in PBS で 30 分ブロッキングと Permeabilization を行った。マウス抗 HA 抗体、続けて Alexa568 で標識したヤギ抗マウス抗体で染色した。アクチンは Alexa488 で標識した Phalloidin で可視化した。染色後細胞を PBS で洗浄し、DAKO mounting medium でスライドガラスの上に貼り付け、共焦点顕微鏡で蛍光像を得た。

糖鎖付加抑制実験

DRA-HA を細胞にトランスフェクションし、24 時間後にアスパラギン結合型糖鎖付加抑制剤である Tunicamycin を 5.0 μ g/ml の濃度で培地に添加し、24 時間培養した。その後細胞を Sample Buffer に溶かし、ウェスタンブロットティングを行った。

テトラサイクリンによる DRA 発現の誘導細胞の確立

テトラサイクリンの添加により目的蛋白の誘導発現が可能な系を用いて、DRA-HA が任意の時に発現する細胞株を樹立した。細胞株の樹立は Flip-In T-Rex Core Kit (Invitrogen) を用いた。細胞系の確立には連続した 2 回のプラスミドのトランスフェクションと、その後の選択薬剤存在下でのリミッティングダイリューション法により細胞のクローニングを行い 60 個のコロニーを単離し、テトラサイクリン誘導前には DRA の発現が低く、誘導後発現の高い 4 クローンを得た。

細胞内 pH 測定

細胞は円形の 25mm カバースリップ上に培養し、Flip-In CHO 細胞は実験開始 24 時間前に 3 μ g/mL テトラサイクリンを含む培地に交換した。10 μ M BCECF-AM を 10 分間負荷し、37°C に温めた標準代用液 (120mM NaCl, 25mM NaHCO₃, 5mM KCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 5% CO₂, 95%O₂ で通気) で灌流した。DRA の活性は標準代用液の Cl を gluconate で置換した、無 Cl 代用液で細胞を灌流し細胞をアルカリ化し、Cl を再添加した後の細胞の酸性化速度を測定した。細胞内 pH の校正は Nigericin High K 法を用いた。

結果及び考察

(1) ヒト DRA の発現の検証

クローニングしたヒト DRA の発現を、ウエスタンブロッティングで確かめた。最初は異種性にチャイニーズハムスター卵巣由来の非上皮細胞である CHO 細胞にトランスフェクションした。Fig.1A に示すように HA-DRA をトランスフェクトした細胞では、抗 HA 抗体に反応して 2 つの主要なバンド (約 90kDa と約 120kDa) と約 85 kDa の発現量の低いバンドが観察された。本来 DRA は大腸上皮細胞の頂端膜側に発現しているため(5)、非上皮細胞では発現が異なることが予想される。またチャイニーズハムスター卵巣細胞に異種性に発現させた場合と、本来のヒトでは異なることが考えられる。このため分化レベルが異なる、二つのヒト由来と豚由来の腎臓由来の上皮細胞に HA-DRA をトランスフェクションし、DRA の発現を比較検討した。ヒト胎児腎由来の上皮細胞であるが分化程度の低い HEK293 細胞に、HA-DRA をトランスフェクトした。CHO 細胞と同様に、3 つのバンドが観察された (Fig.1B)。次に、よく分化した細胞であり上皮イオン輸送のモデル細胞としてよく用いられている上皮細胞である LLC-PK1 (豚腎由来) に HA-DRA をトランスフェクトした。トランスフェクション効率は低かったため、低分子量側バンドは不鮮明であったが、CHO 細胞、HEK293 細胞と同様な、抗 HA 抗体に反応するバンドが 2 つ検出された (Fig.1C)。ヒト DRA は 764 アミノ酸より成る膜蛋白であり、アミノ酸組成から想定される分子量は 85 kDa である。DRA は Fig.1 に示すように 5 つの N-結合型糖鎖が付加する場所が想定されており、実際糖鎖付加修飾を受けることが示されている。このため、予想される分子量より高分子量側のバンドは、糖鎖付加の可能性があるため、アスパラギン結合型糖鎖付加抑制剤であるツニカマイシンの効果を検討した。CHO 細胞に HA-DRA をトランスフェクトし、ツニカマイシンを 5.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で培地に添加し、更に 24 時間細胞を培養し、その後細胞を回収した。ツニカマイシン添加により、約 120kDa と約 90kDa の発現レベルの高かったバンドは消失し、約 85 kDa の低分子量側のバンドが強く現れた (Fig.1D)。このことは HA-DRA の予想される分子量が 85 kDa であることより、一番低分子量の約 85 kDa のバンドは糖鎖修飾を受けていない蛋白であり、約 120kDa と約 90kDa のバンドは糖鎖修飾を受けた DRA であると考えられる。今回用いた 3 種類の動物種、細胞種、分化レベルの異なる細胞で同様に DRA は多段階に糖鎖付加を受けることが示され、DRA に対する糖鎖付加機構はかなり普遍的に存在していることが示唆された。しかし DRA の予想される糖鎖付加サイトのどの部分が糖鎖付加を受けるか、またその糖鎖の役割は何であるかなどはまだ明らかでない。次に DRA の細胞内分布を免疫蛍光により検証した。DRA は本来は極性のある消化管上皮細胞の頂端側微絨毛に強く発現していることが報告されている(5)。このため非上皮細胞である CHO 細胞と分化レベルの異なる上皮細胞では細胞内発現場所が異なることが考えられる。また消化管で $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送担体と協同して働く Na^+/H^+ 交換輸送担体 (NHE3) は細胞膜と細胞膜直下の膜小胞 (recycling endosome) に存在し、各種シグナルにより膜上の NHE3 の総数を変えるこ

とにより、そのイオン輸送を調節していることが示されている(1,7)。DRA は *in vitro* の実験より DRA の C 末端は NHERF と相互作用をすることが示されており(6)、NHE3 と同様に Ezrin などの蛋白を介してアクチンと相互作用することが想定される。以上のことより上記3種類の細胞に DRA をトランスフェクションし、DRA とアクチンを2重染色し、その細胞内局在を観察した。まず細胞極性の無い非上皮細胞の CHO 細胞に DRA を発現させた。DRA の発現は、皮質アクチンと一部で共局在が観察された。底の部分での DRA の発現は形質膜全体に一様に発現しており、アクチンのストレスファイバーと共発現は観察されなかった。また DRA は主に細胞膜または細胞膜直下に強く発現しており、細胞内には発現が観察されなかった(Fig.2B^{''})。次に、HEK293 細胞で同様に検討したが、ほぼ CHO と同様の結果であった。最後に LLC-PK-1 で DRA の細胞内局在を検討した。DRA は頂端側では、Fig.2F に見られるように微絨毛様の構造に発現が観察され、アクチンとかなりの割合で共局在が観察された。底の部分でのアクチンのストレスファイバーと共発現は観察されなかった。また DRA は主に細胞膜または細胞膜直下に強く発現しており、CHO、HEK と同様に細胞内には発現が観察されなかった(Fig.2F', F^{''})。いずれの細胞に於いても細胞内の顕著な DRA の発現は観察されず、NHE3 とは異なる活性調節機構であることが考えられたが、膜直下に DRA を含む recycling endosome が存在することも否定できなく、更なる検討が必要である。

(2) DRA の安定発現株の単離

CHO, HEK293, LLC-PK-1 では Fig.1,2 に示すように DRA の一過性発現が確かめられた。一過性の発現ではトランスフェクションされた細胞を同定し、DRA の機能を測定することは難しい為、安定形質発現株の単離を試みた。しかし何れの細胞でも、安定形質発現株の単離を試みるとトランスフェクション直後は DRA の発現は確認されたが、選択薬剤である G418 存在下で継代を数回行うとトランスフェクションされた細胞は薬剤耐性であるにも関わらず DRA の発現は観察されなくなった。このことは DRA を細胞に強制発現させるとその細胞が選択的になんらかの作用により除去されていると考えられた。実際 DRA は Down-regulated in Adenoma の名前が示すように、最初は癌抑制遺伝子として発見され(8)、実際大腸ガンではその遺伝子産物である DRA の発現は低下している(9)。このことより、株化細胞では同様に何らかの作用により安定的に発現しないと考えられた。一般に株化細胞では増殖能は pH の影響を受けることが知られているため、DRA のイオン輸送活性が影響したことが考えられるが、このことは細胞内 pH の測定やイオン輸送活性を持たない DRA 変異体などによる検討が必要である。最近、今回の結果と同様の報告がされたが(10)そのメカニズムについては検討されていない。

(3)細胞外ループへのエピトープタグの導入

DRA の活性調節時に細胞表面上の DRA の総数を容易に測定できるようにするために想定されている細胞外の第五番目のループに HA タグを導入することを試みた。DRA を N 末に myc タグが入る D-myc にサブクローニング後、BsmI サイトに DNA 断片を挿入し(myc-DRA-HA)、

DRAの想定される第5番目のループのアミノ酸の第451番目のサイトにHAタグを導入した(Fig.3A)。細胞にmyc-DRA-HAをトランスフェクション後にPFAで固定後、permeabilizeし抗myc抗体また抗HA抗体で染色後に、Alexa568で標識したヤギ抗マウス抗体で染色し可視化した。抗myc抗体では小胞体状の構造が観察されたが(Fig.3B,C)抗HA抗体では染色されなかった。また細胞を固定化しpermeabilizeする前に抗myc抗体また抗HA抗体で染色したが細胞表面上は染色されなかった。ウェスタンブロッティングを抗HA抗体で行うと、蛍光免疫と同様にかすかなバンドが、約85kDaに観察された。抗myc抗体で約80kDaのスミアなバンドが観察され、糖鎖付加を受けた高分子のバンドは観察されなかった。以上のことより、第451番目のサイトにHAタグを導入したDRAでは蛋白のフォールディングが正しく行われず、小胞体よりmyc-DRA-HAは出ることができず分解を受けていると考えられた。

(4) テトラサイクリンによるDRA発現の誘導

これまでの実験よりDRAの安定形質発現株の単離は非常に困難であると考えられたので、テトラサイクリンの添加によりHA-DRAが任意の時に発現させられる細胞株の樹立を試みた。細胞株の樹立はFlp-In T-Rex Core Kitを用いて行い、60クローンをクローニングし発現レベルから最終的に4クローンを選択した。そのうちのひとつのクローンの発現をウェスタンブロッティング、免疫蛍光染色で確かめた。テトラサイクリン3 μ g/ml存在下で、24時間培養したところ、ウェスタンブロッティング、免疫蛍光染色共にDRAの発現を確認する事が出来き(Fig.4D,E)、分子量、細胞内分布は一過性にDRAを発現させた場合と同じであった。

(5) DRAの機能の確認

Flp-In CHO細胞は内因性のCl⁻/HCO₃⁻交換活性が観察されたが、これは100 μ M DIDSで完全に抑制され恐らくAE2による活性と考えられた(Fig.5A)。テトラサイクリン3 μ g/ml存在下で、HA-DRAを誘導した細胞では100 μ M DIDS存在下でも灌流液からのCl除去で細胞内pHはアルカリ化し、Cl再添加で基線までの細胞内の酸性化が観察された。DRAは100 μ M DIDSでは活性は抑制されないことが報告されており、このため以下の実験では内因性のCl⁻/HCO₃⁻交換活性の混入を防ぐため100 μ M DIDSを灌流液に添加した。

(6) DRAの活性に対するアクチン重合阻害剤の作用

DRAは*in vitro*の実験よりDRAのC末端はNHERFと相互作用をすることが示されている(6)。NaCl吸収のためDRAと協同して働いているNHE3はNHERF並びにEzrinを介してアクチンと相互作用その活性が調節されていることが報告されている(7)。DRAとアクチンは共局在が観察されたため、NHE3と同様にアクチン骨格がDRAの活性に必要であることが考えられた。このため、アクチン重合阻害剤であるlatrunculin BのDRAの活性に対する作用を検討した。latrunculin Bで細胞を60分間処理をすると、アクチン骨格は壊され、凝集したアクチンが観察された。DRAはアクチンとの共局在が一部みられなくなった。この条

件下で DRA の活性を測定すると、抑制は観察されなかった。

今後の課題

消化管での NaCl 吸収は様々な病態時や生理的条件下でその活性調節が行われていることが知られているが、この際の Cl の吸収の活性調節機序は明らかではなく、今回確立した細胞系を用いてそれら条件下で DRA の活性調節機序の検討が必要である。

参考文献

1. Hayashi H, Szaszi K, Grinstein S. Multiple modes of regulation of Na⁺/H⁺ exchangers. *Ann N Y Acad Sci.* 976:248-58. 2002
2. Hoglund P, Haila S, Socha J, Tomaszewski L, Saarialho-Kere U, Karjalainen-Lindsberg ML, Airola K, Holmberg C, de la Chapelle A, Kere J : Mutations of the Down-regulated in adenoma (DRA) gene cause congenital chloride diarrhoea. *Nat Genet.* 14, 316-9,1996
3. Schultheis PJ, Clarke LL, Meneton P, Miller ML, Soleimani M, Gawenis LR, Riddle TM, Duffy JJ, Doetschman T, Wang T, Giebisch G, Aronson PS, Lorenz JN, Shull GE. Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *Nat Genet.* 19:282-5 1998.
4. Melvin JE, Park K, Richardson L, Schultheis PJ, Shull GE. Mouse down-regulated in adenoma (DRA) is an intestinal Cl(-)/HCO₃(-) exchanger and is up-regulated in colon of mice lacking the NHE3 Na(+)/H(+) exchanger. *J Biol Chem.* 274, 22855-61, 1999.
5. Jacob P, Rossmann H, Lamprecht G, Kretz A, Neff C, Lin-Wu E, Gregor M, Groneberg DA, Kere J, Seidler U: Down-regulated in adenoma mediates apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in rabbit, rat, and human duodenum. *Gastroenterology.*122:709-24. 2002.
6. Lamprecht G, Heil A, Baisch S, Lin-Wu E, Yun CC, Kalbacher H, Gregor M, Seidler U: The down regulated in adenoma (dra) gene product binds to the second PDZ domain of the NHE3 kinase A regulatory protein (E3KARP), potentially linking intestinal Cl⁻/HCO₃⁻ exchange to Na⁺/H⁺ exchange. *Biochemistry.*41:12336-42. 2002.
7. Kurashima K, Szabo EZ, Lukacs G, Orłowski J, Grinstein S: Endosomal recycling of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 isoform is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem.*273:20828-36. 1998

8. Schweinfest CW, Henderson KW, Suster S, Kondoh N, Papas TS: Identification of a colon mucosa gene that is down-regulated in colon adenomas and adenocarcinomas. Proc Natl Acad Sci U S A.90:4166-70. 1993

9. Antalis TM, Reeder JA, Gotley DC, Byeon MK, Walsh MD, Henderson KW, Papas TS, Schweinfest CW:Down-regulation of the down-regulated in adenoma (DRA) gene correlates with colon tumor progression. Clin Cancer Res. 4:1857-63.(1998)

10. Chapman JM, Knoepp SM, Byeon MK, Henderson KW, Schweinfest CW: The colon anion transporter, down-regulated in adenoma, induces growth suppression that is abrogated by E1A.Cancer Res.62(20):5992.(2002)

11. Kurashima K, D'Souza S, Szaszi K, Ramjeesingh R, Orlowski J, Grinstein S: The apical Na(+)/H(+) exchanger isoform NHE3 is regulated by the actin cytoskeleton. J Biol Chem. ;274:29843-9. 1999

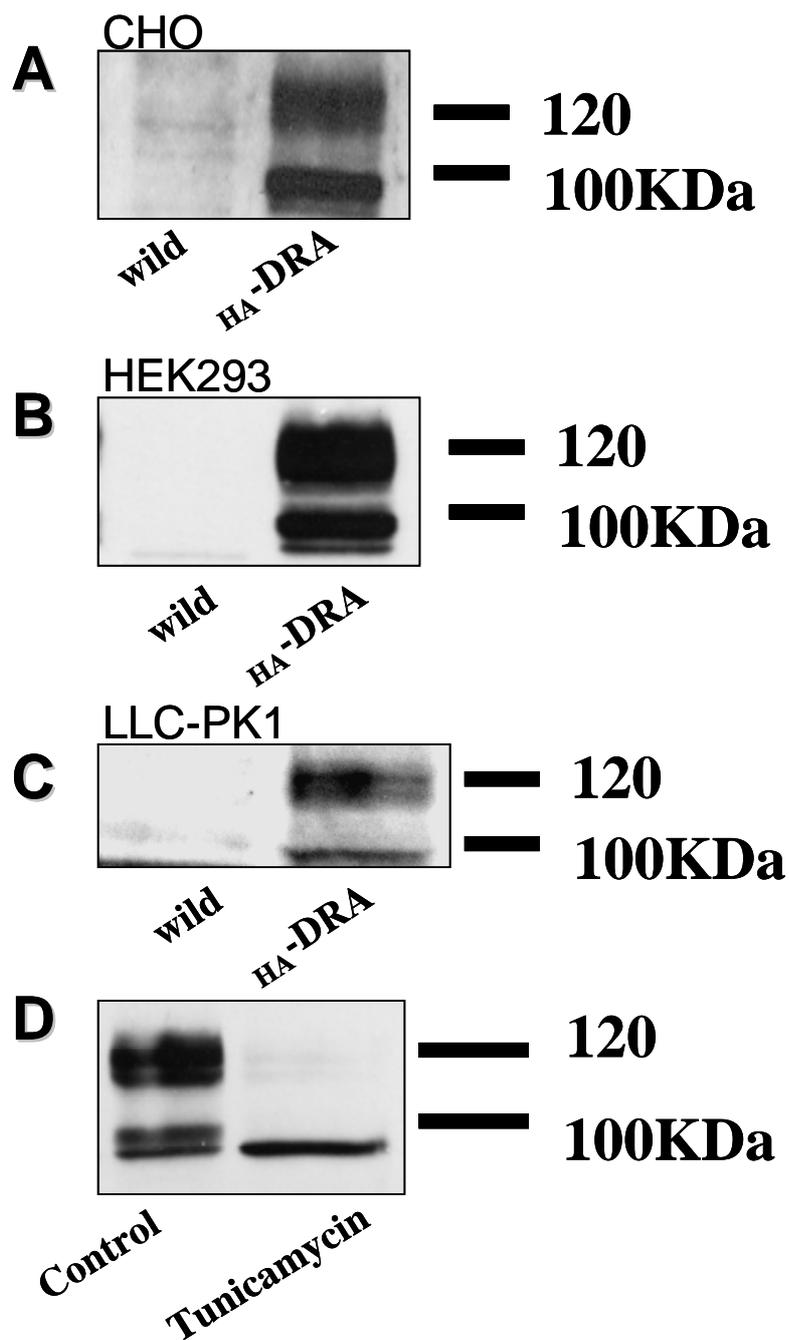


Fig.1 HA-DRAの発現

各細胞にHA-DRAをリボソーム法でトランスフェクションした後、細胞をサンプルバッファに溶かした。SDS-PAGE後、ニトロセルロース膜にトランスファーし、マウス抗HA抗体並びにHRPでラベルされた抗マウス抗体で膜を染色し、ECLでHA-DRAを検出した。D, DRAの発現に対するツニカマイシンの効果。CHO細胞にHA-DRAをリボソーム法でトランスフェクションし、24時間後ツニカマイシンを5.0 μ g/mlの濃度で培地に添加し、更に24時間細胞を培養し、細胞を直接サンプルバッファに溶かし、ウェスタンブロッティングした。

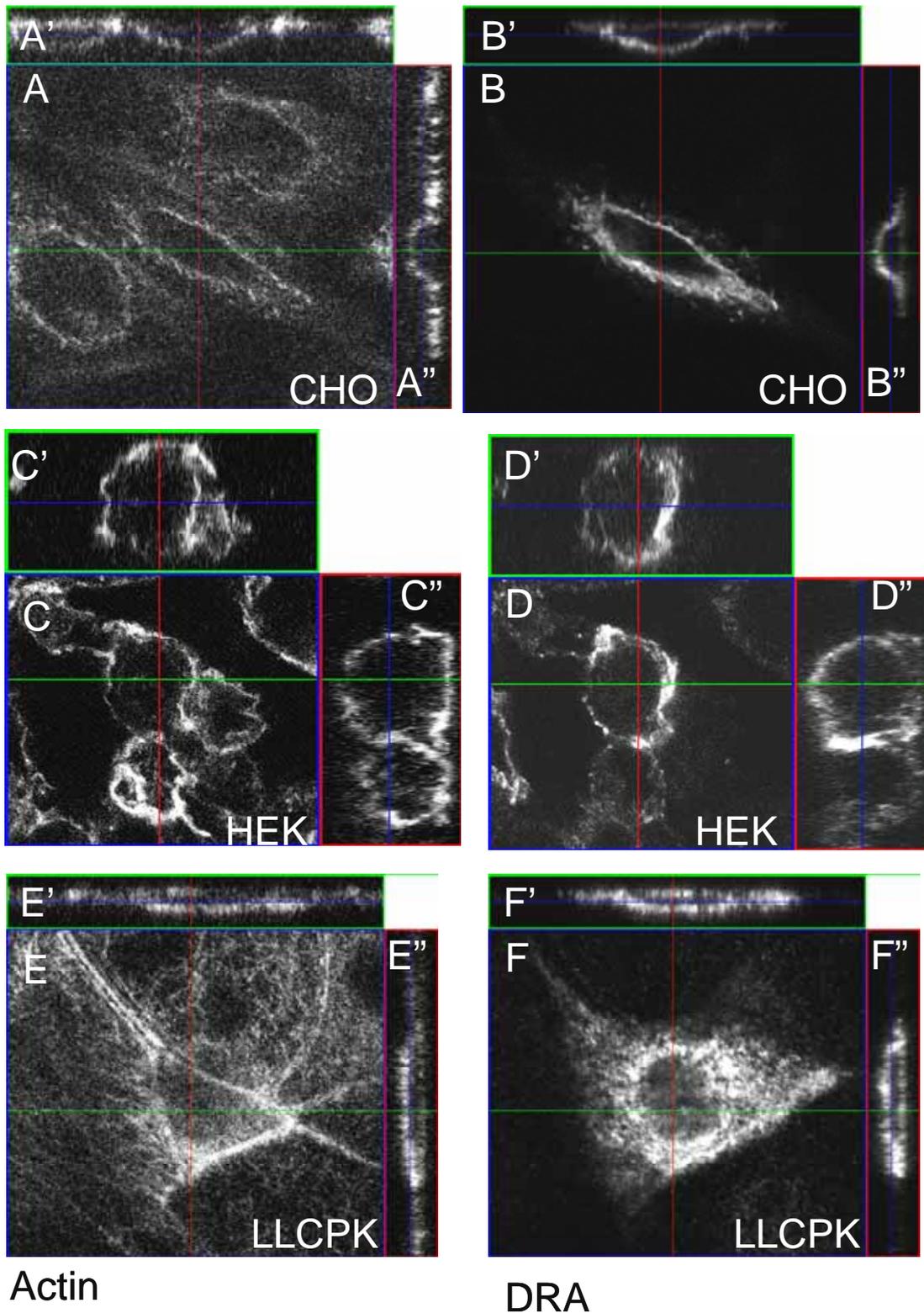


Fig. 2 各細胞におけるHA-DRAの細胞内分布

各細胞にHA-DRAをリポソーム法でトランスフェクションした後、細胞をPFAで固定、0.1%Tritonでpermeabilizationし、Actin(A,C,E)はAlexa488で標識phalloidinでHA-DRA(B,D,F)はマウス抗HA抗体並びにAlexa568で標識したヤギ抗マウス抗体で染色し可視化した。A',A'' B',B'' C',C'' D',D'' E',E'' F',F''はそれぞれのZ軸での断面像を示す。

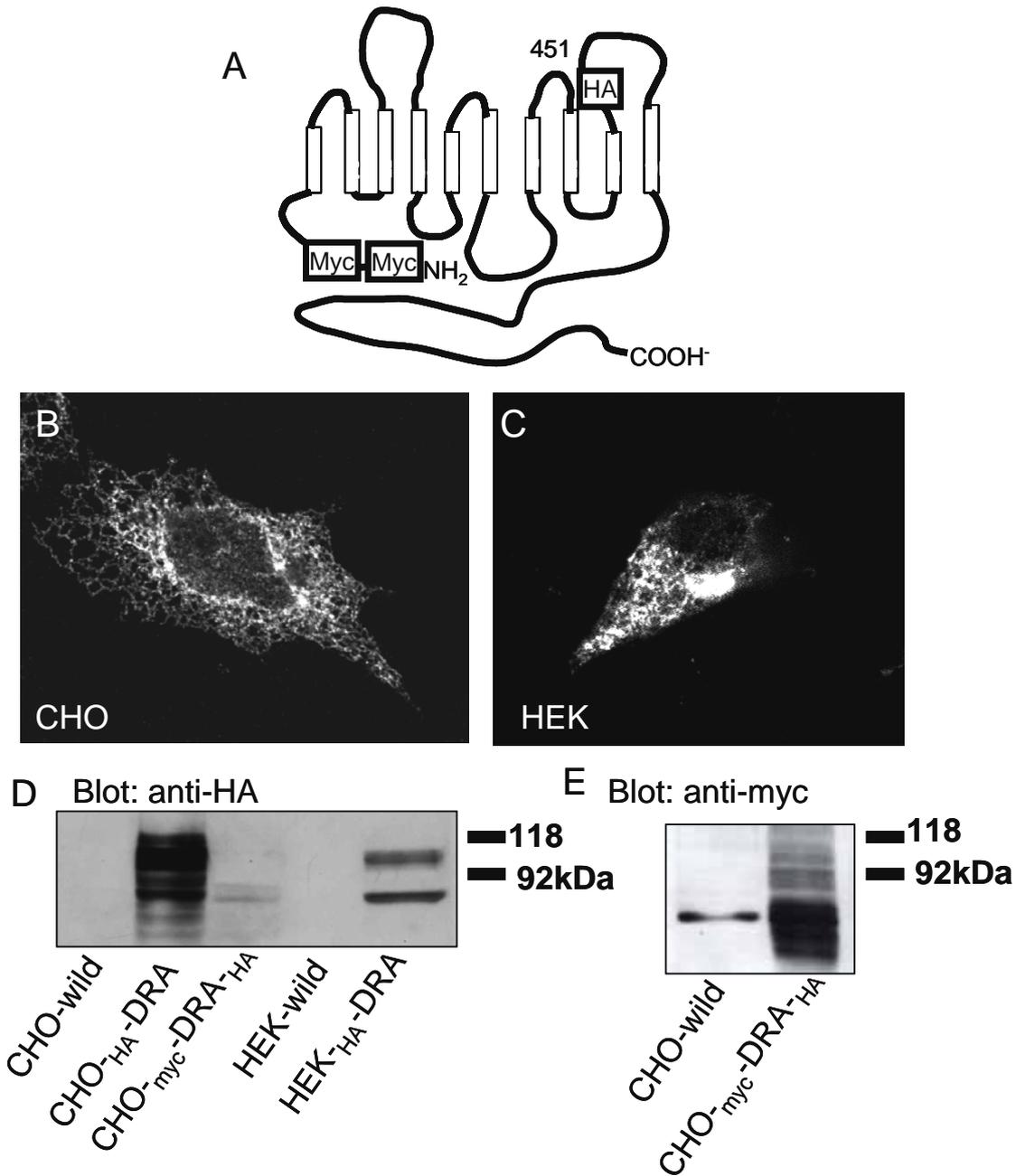


Fig.3 細胞外ループへのエピトープタグの導入

A, 想定されているDRAの膜トポロジー。想定されている細胞外の第5番目のループにHAタグを導入した。
 B, myc-DRA-HA をCHO(B),HEK293(C)にトランスフェクションし、細胞をPFAで固定、0.1%Triton で permeabilizationし、myc-DRA-HA はマウス抗myc抗体並びにAlexa568で標識したヤギ抗マウス抗体で染色し可視化した。各細胞にmyc-DRA-HAをリボソーム法でトランスフェクションした後、細胞をサンプルバッファに溶かし、SDS-PAGE後、ニトロセルロース膜にトランスファーし、マウス抗HA抗体(D)並びにマウス抗myc抗体で染色後、HRPでラベルされた抗マウス抗体で膜を染色し、ECLでDRAを検出した。

Flip-In CHO

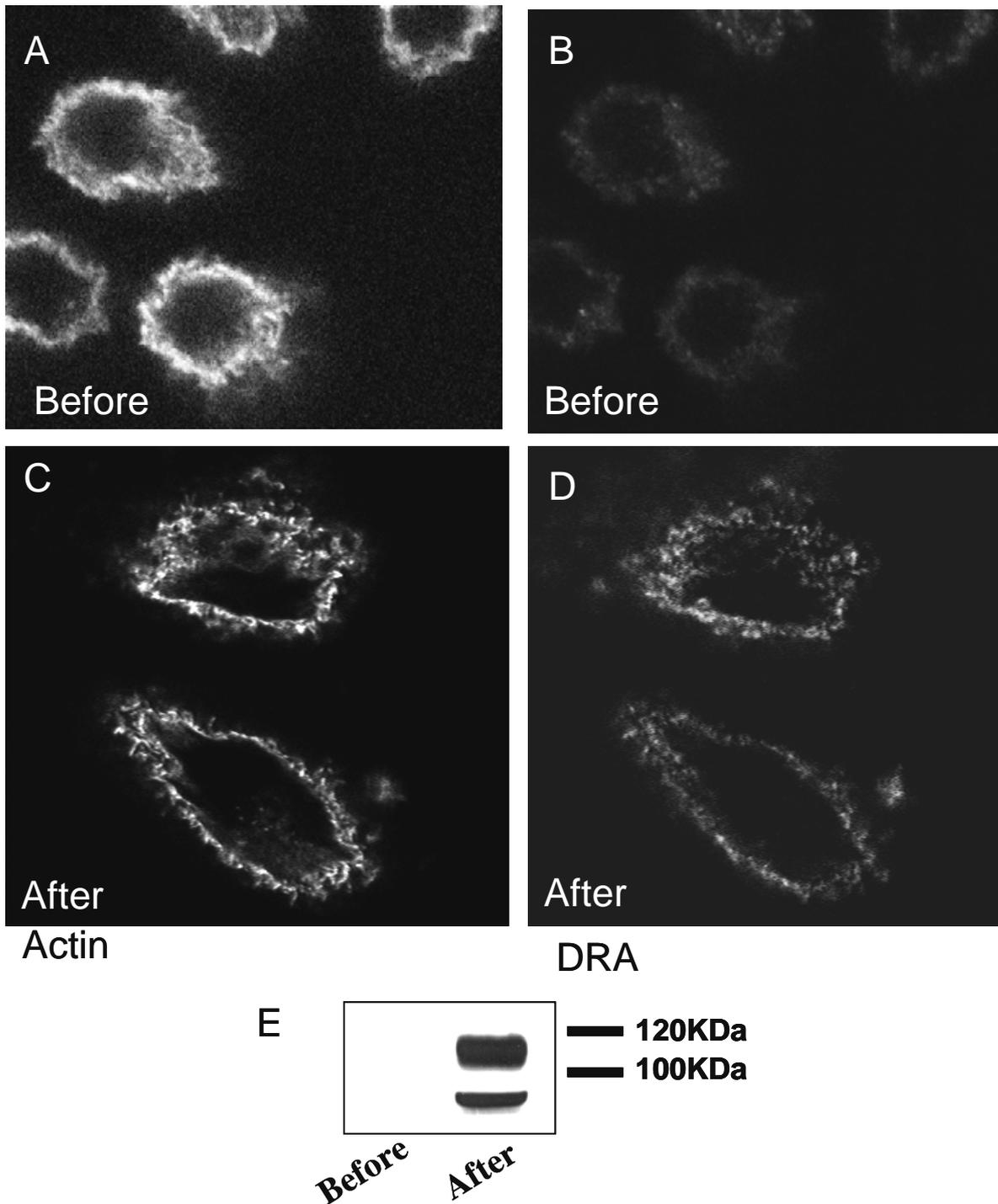


Fig.4 Flip-In CHO細胞におけるテトラサイクリンによるHA-DRAの発現誘導

テトラサイクリンで制御されるプロモーター下にHA-DRAが導入されたCHO細胞を、3 μ g/mLテトラサイクリンで24時間培養し、HA-DRAを誘導した。細胞をPFAで固定、0.1%Tritonでpermeabilizationし、HA-DRA(C,D)はマウス抗HA抗体並びにAlexa568で標識したヤギ抗マウス抗体で染色し可視化した。Actin(A,C)はAlexa488で標識したphalloidinで可視化した。HA-DRAの発現をウエスタンブロッティングで確かめた(E)。

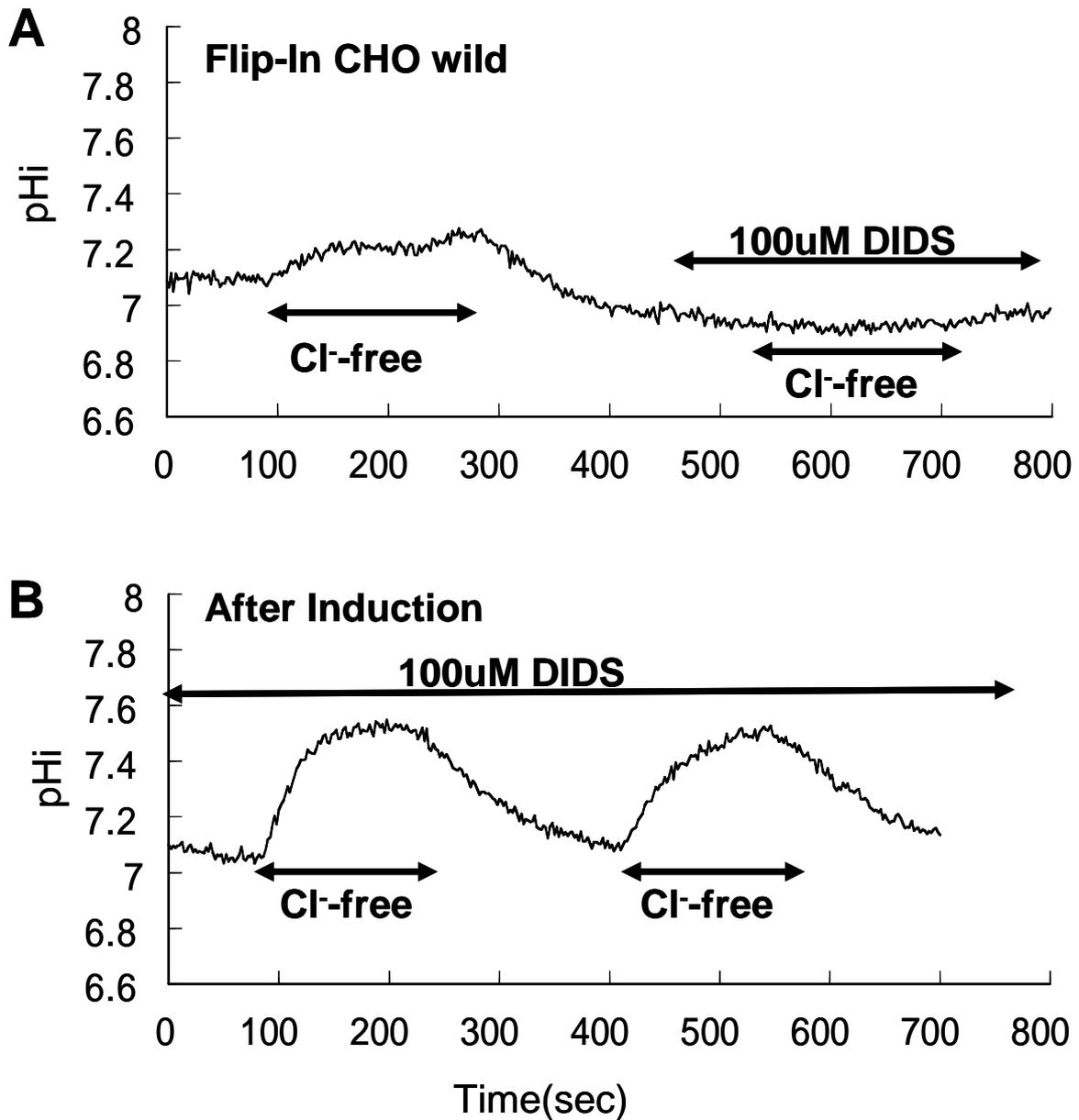


Fig.5 Flip-In CHO細胞におけるテトラサイクリンによるHA-DRAの機能発現

細胞にpH感受性蛍光色素BCECFを負荷し細胞内pHを測定した。HA-DRAが導入されたCHO細胞は、3 μ g/mLテトラサイクリン存在下で24時間培養し、HA-DRAを誘導した。A, HA-DRAをトランスフェクトしていないFlip-In CHO細胞。内因性のCl⁻/HCO₃⁻活性は100 μ M DIDSで抑制された。B, HA-DRA誘導後。HA-DRAの活性は100 μ M DIDSで抑制されなかった。

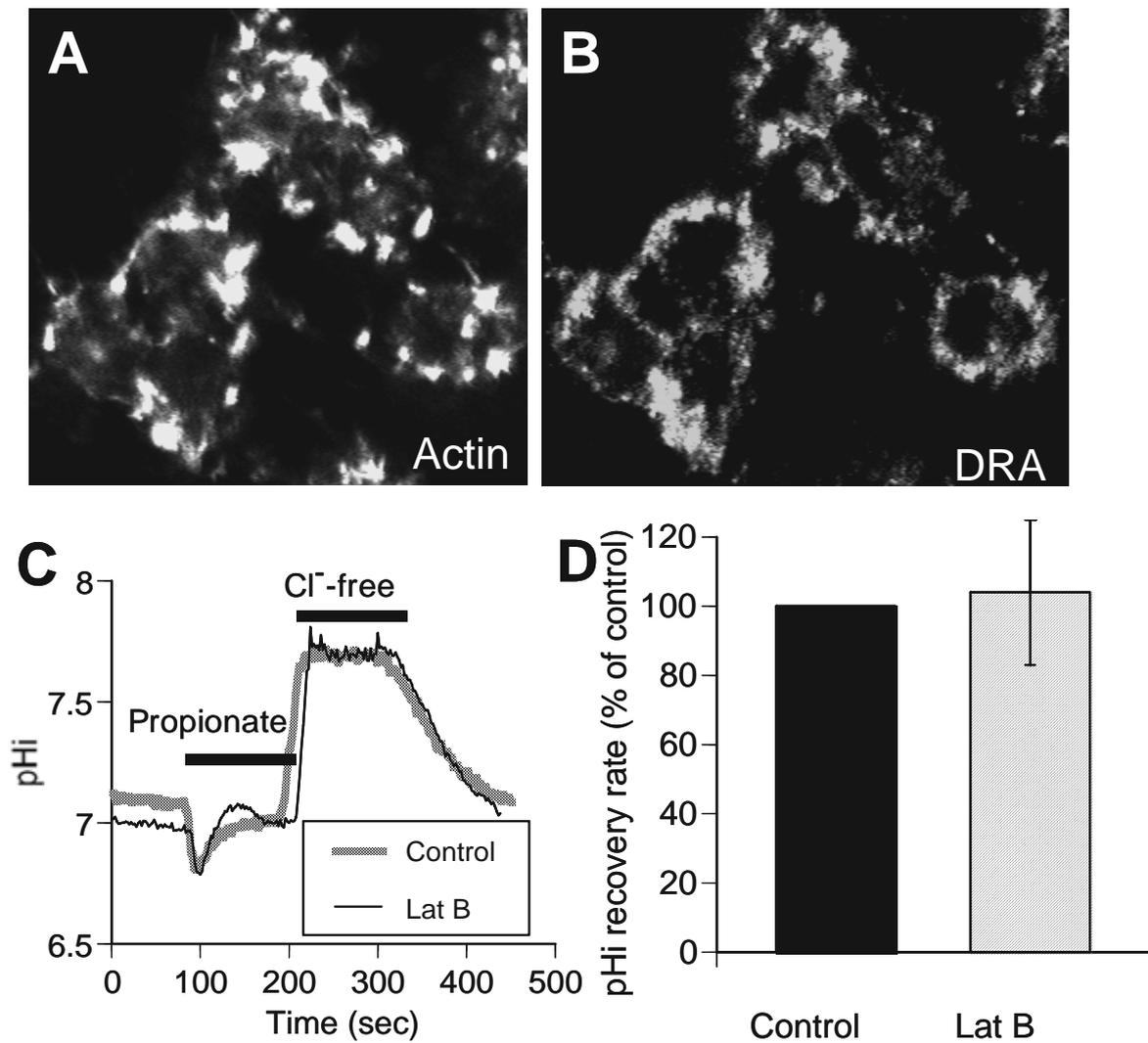


Fig.6 DRAのCl/HCO₃交換活性に対するラトランクリンBの作用

アクチン重合阻害剤である10 μ MラトランクリンBで60分間インキュベーションし、細胞をPFAで固定し、Fig.4と同様に染色した(A,B)。10 μ MラトランクリンBで処理し、細胞を20mM propionateと無Cl代用液でアルカリ化し再びClを灌流液に添加しDRAの活性を測定した。典型例(C)および

まとめ(D)。

Establishment and characterization of cells stably expressing DRA

Hisayoshi Hayashi and Yuichi Suzuki

Laboratory of Physiology, School of Nutritional Sciences, University of Shizuoka

Summary

It has been conceived that NaCl absorption in the gastrointestinal tract is mediated by coupled Na^+/H^+ and $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchangers. NHE3 is a major Na^+/H^+ exchanger contributing to NaCl absorption; however, the molecular identity of the $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger involved in NaCl absorption is uncertain. Recent studies have suggested that Down-regulated in adenoma (DRA, also called Slc26a3) is a major $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger in the colon. Since multiple isoforms of the $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger are co-expressed in an intact colonic cell, complicating the functional analysis of an individual isoform, we used heterologous transfection of DRA into cell lines. We generated a construct encoding the DRA tagged with the hemagglutinin (HA) epitope and transiently transfected the cells with this construct. The expression of the HA-tagged DRA by immunoblotting was verified. Two immunoreactive bands were detected in the transfected cells: a major protein of 120 kDa, probably glycosylated DRA, and a smaller band of 90 kDa, which is probably un-glycosylated DRA. This assumption was validated by treatment of the cells with an *N*-glycosylation inhibitor resulting in the disappearance of the higher molecular band. The subcellular localization of DRA was assessed by immunofluorescence experiments; DRA was found almost exclusively in the surface membrane. Since DRA expression was not stable and disappeared over weeks, we established the cells stably expressing DRA by using inducible gene expression systems. When the cells were induced DRA, the cells were conferred DIDS insensitive $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange activity. Immunofluorescence experiments showed that colocalization of actin and DRA. DRA associates with regulatory factors called NHERF. In addition, this factor interacts with the cytoskeletal protein ezrin, which in turn binds to actin. The possible linkage of DRA with the cytoskeleton prompted us to test the effect of actin-modifying agents on DRA activity. However, latrunculin B, which interferes with actin polymerization, did not affect DRA activity.