

多選択性アミノ酸トランスポーターファミリー：LATファミリー

金井好克

アミノ酸トランスポーターにおける基質認識には、 α -アミノ基、 α -カルボキシル基、および側鎖の認識が要求されるため、その基質選択性は一般に狭いものとなる。しかし、輸送系Lトランスポーターは、アミノ酸類似薬物も含んだ比較的広い基質選択性を示す。これは、基質アミノ酸側鎖の認識が疎水性相互作用を頼りに行なわれるため、構造の異なる多くの可能性がありうることによる。LATファミリーは輸送系Lトランスポーターを基本型とし、それに側鎖結合に関する電荷認識が加わり、基質選択性の多様性を獲得したと想定される。各メンバー間の電荷認識の多様性に着目した構造機能相関の解析により、基質認識機序解明への手掛かりが得られていくものと期待される。

Key words トランスポーター アミノ酸 薬物輸送

はじめに

哺乳類のアミノ酸輸送システムは、基質となるアミノ酸分子の多様性を反映して、多種類のトランスポーターから構成されている¹⁾。一見複雑なこのシステムも少数の分子ファミリーから成り立っており、構造的に類似したトランスポーター分子が、輸送基質をオーバーラップさせながら多様な基質選択性をつくり出している²⁾。アミノ酸トランスポーターは、その基質認識に、 α -炭素の周辺の正電荷と負電荷(α -アミノ基と α -カルボキシル基)の認識と、側鎖の認識を加えた3点認識を必要とするため、それを満たす化合物の数は限られ、したがってその基質選択性は一般に狭いものとなる。しかし、そのなかでも、輸送系Lトランスポーターで代表されるLAT(L-type amino acid transporter)ファミリーは、多様な側鎖をもつアミノ酸を受け入れ、L-ドーパやメルファランなどのアミノ酸類似薬物も輸送する比較的広い基質選択性を示す。本稿では、この多選択性アミノ酸トランスポーターファミリーとしてのLATファミリーについて、その構造と機能的特徴について概説し、多選択性基質認識の成立の機序について考察したい。

I. LATファミリーの同定

1. アミノ酸輸送系

哺乳類のアミノ酸トランスポーターは、アミノ酸輸送系(amino acid transport system)として、1960年代から培養細胞や膜標本を用いて研究がなされ、アミノ酸分子の多様性を反映してさまざまな輸送系が記載されてきた¹⁾。それらは、輸送基質選択性とNa⁺依存性により表1のように分類されている。

アミノ酸トランスポーターの分子クローニングは、すでに細胞膜のウイルス受容体(ウイルスの細胞への感染のための足場)としてクローニングされていた14回膜貫通型の蛋白質が、Na⁺非依存性塩基性アミノ酸輸送系y⁺に相当するトランスポーター(cationic amino acid transporter 1; CAT 1)であることが1991年に明らかにされたことに始まる²⁾。その後、CAT 2~4に相当する塩基性アミノ酸トランスポーターが同定され、CATファミリーが確立された。CATファミリーは、本稿の主題で

表1 アミノ酸輸送系と対応するトランスポーター

アミノ酸輸送系	輸送基質	トランスポーター
中性アミノ酸輸送系		
Na ⁺ 依存性		
A	比較的広い基質選択性, N-メチルアミノ酸	ATA 1(2000), ATA 2(2000)
G	Gly, Sar	GLYT(1992)
B	広い基質選択性, 吸収上皮	
ASC	分枝側鎖, bulky な側鎖のないもの	ASCT1(1993), ASCT2(1996)
N	Gln, Asn, His	NAT 1(1999)
β -システム	β -Ala, Tau	Taut(1993)
B ⁰⁺	中性, 塩基性アミノ酸	ATB ⁰⁺ (1999)
y ⁺ L	中性, 塩基性アミノ酸	y ⁺ LAT 1/4F2hc(1998), y ⁺ LAT 2/4F2hc(1998)
Na ⁺ 非依存性		
L	広い基質選択性	LAT 1/4F2hc(1998), LAT 2/4F2hc(1998)
T	芳香族アミノ酸	TAT 1(2000)
b ⁰⁺	中性, 塩基性アミノ酸	BAT 1/rBAT(1999)
asc	分枝側鎖, bulky な側鎖のないもの	Asc-1/4F2hc(2000)
塩基性アミノ酸輸送系		
Na ⁺ 依存性		
B ⁰⁺	中性, 塩基性アミノ酸	ATB ⁰⁺ (1999)
Na ⁺ 非依存性		
y ⁺	塩基性アミノ酸	CAT 1, CAT 2, CAT 3, CAT 4(1991~1998)
b ⁰⁺	中性, 塩基性アミノ酸	BAT 1/rBAT(1999)
y ⁺ L	中性, 塩基性アミノ酸	y ⁺ LAT 1/4F2hc(1998), y ⁺ LAT 2/4F2hc(1999)
酸性アミノ酸輸送系		
Na ⁺ 依存性		
X ⁻ _{AG}	L-Glu, L/D-Asp	EAAC 1, GLT-1, GLAST, EAAT 4, EAAT 5 (1992~1998)
Na ⁺ 非依存性		
x ⁻ _c	シスチン/グルタミン酸交換輸送	xCT/4F2hc(1999)

ある LAT ファミリーとともに SLC (solute carrier) 7 ファミリーを形成する。CAT 1 の同定に続き、1992 年に Na⁺ 依存性酸性アミノ酸輸送系 X⁻_{AG} に相当するグルタミン酸トランスポーターが発見クローニングによって同定され、さらにその類縁蛋白質として、Na⁺ 依存性中性アミノ酸輸送系 ASC に相当するトランスポーターがクローニングされた³⁾。また、同時期に γ -アミノ酪酸トランスポーター類似の蛋白質として、Na⁺ 依存性のプロリントランスポーターとグリシントランスポーターがクローニングされ、1991 年~1993 年に第一次のアミノ酸トランスポーターのクローニングラッシュを迎えた²⁾。

その後しばらくは、分子の実体解明の研究は停滞していたが、1998 年になり再び新たな展開をみせた。その契機となったのが、ヘテロ 2 量体構造をとる輸送系 L

トランスポーターの発見である (図 1)。このヘテロ 2 量体型トランスポーターの同定は、そのサブユニットとなる 1 回膜貫通型蛋白質がアミノ酸輸送活性化因子として発見されたことが契機となった。

2. 1 回膜貫通型アミノ酸輸送活性化因子の同定

腎由来のポリ (A)⁺RNA を *Xenopus* 卵母細胞に発現させると、シスチン、塩基性および中性アミノ酸の高い取込み活性を示す。この取込み活性を指標に腎 cDNA ライブラリーのスクリーニングが行なわれ、*Xenopus* 卵母細胞のアミノ酸取込みを亢進させる因子として、rBAT (related to b⁰⁺ amino acid transporter; 輸送系 b⁰⁺ 関連因子) が単離された²⁾。rBAT は、多数回の膜貫通構造をもつ一般のトランスポーターと異なり膜貫通部位を 1 つしかもたず (図 1)、加えて *Xenopus* 卵母細胞以外の発現系 (たとえば COS-7 細胞) ではアミノ酸取込み活性を誘発しないことから、それ自身はトラン

スポーターではなく、トランスポーターの活性化因子として位置づけられた。

rBAT の同定に伴い、すでにリンパ球の活性化抗原として知られていた 1 回膜貫通型蛋白質 4F2hc (4F2 抗原重鎖: CD98) が、rBAT と有意な相同性を示す (アミノ酸レベルで約 30%) ことが明らかになった²⁾。4F2hc は、分子量 85 K 以下の糖蛋白質であり、モノクローナル抗体によって初めて見いだされた当初から、糖付加を受けない約 40 K の蛋白質 (4F2 抗原軽鎖) とジスルフィド結合により連結して、ヘテロ 2 量体を形成することが知られていた。4F2 抗原は、細胞の活性化や腫瘍細胞増殖とのかかわりが示唆されてきたが、4F2 抗原軽鎖の実体が不明だったため、その機能的役割は明らかにされないままであった。4F2hc に rBAT との相同

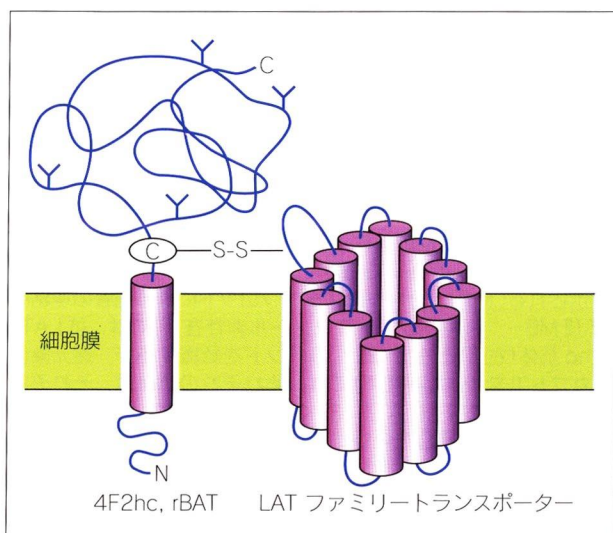


図1 ヘテロ2量体型アミノ酸トランスポーター
1回膜貫通型蛋白質4F2hcとrBATは、12回膜貫通型のLATファミリートランスポーターとジスルフィド結合を介して連結し、ヘテロ2量体を形成する。

性があることにより、4F2hcの*Xenopus*卵母細胞への発現実験が行なわれ、4F2hcがrBATと同様に*Xenopus*卵母細胞のアミノ酸取込みを活性化することが明らかにされた⁴⁾。ここに、4F2hcとrBATが、1回膜貫通型アミノ酸輸送活性化因子として確立され、両者ともに未知の膜蛋白質とヘテロ2量体を形成し、アミノ酸トランスポーターを構成するという作業仮説が設けられた(図1)²⁾。

3. 4F2hcと連結するトランスポーターの同定

1回膜貫通型アミノ酸輸送活性化因子と連結するトランスポーターの探索のために、4F2hcとラットグリオーマ細胞cDNAライブラリーの*Xenopus*卵母細胞への共発現による機能発現クローニングが行なわれ、4F2hcのパートナーとして、中性アミノ酸トランスポーターLAT1がクローニングされた⁵⁾。LAT1は、4F2hcと共発現させることにより、Na⁺非依存性に大型の中性アミノ酸を輸送する輸送系Lの活性を示す(図2a)。LAT1は512アミノ酸残基からなる疎水性の蛋白質であり、糖付加を受けず、4F2hcとジスルフィド結合により連結することが示され、LAT1が古典的4F2抗原軽鎖に相当するものであることが明らかにされた(図2b,c)⁵⁻⁷⁾。

4. ヘテロ2量体型アミノ酸トランスポーター

LAT1の同定を契機に、LAT1と類似構造をもつ蛋白質として、4F2hcと連結するアミノ酸トランスポーター数種と、rBATと連結するアミノ酸トランスポーター1種がつぎつぎに明らかにされ、ヘテロ2量体型アミノ酸トランスポーターからなるLATファミリーが確立された⁸⁾(図3)。LATファミリーのメンバーには、中性アミノ酸選択的な輸送系L(LAT1⁵⁻⁷⁾およびLAT2^{9,10)}、小型中性アミノ酸に選択性のある輸送系asc(Asc-1)¹¹⁾、中性および塩基性アミノ酸を輸送する輸送系y⁺L(y⁺LAT1およびy⁺LAT2)^{12,13)}、シスチンおよびグルタミン酸を基質とする輸送系x⁻c(xCT)¹⁴⁾、シスチン、塩基性および中性アミノ酸を輸送する輸送系b⁰⁺(BAT1, 別名b⁰⁺AT)^{15,16)}に相当するトランスポーターが含まれる。このうち、輸送系L, y⁺L, asc, x⁻cは、LAT1と同様に4F2hcとヘテロ2量体を形成するが、輸送系b⁰⁺はrBATとヘテロ2量体を形成することによって機能する(図3)。4F2hcとrBATは、それぞれが特定のトランスポーターと連結し、トランスポーターを細胞膜へ移行させるシャペロン様蛋白質である^{6,16)}。一般の細胞では、4F2hcのみが存在するが、腎尿細管上皮や小腸上皮などの極性細胞には両者が存在し、4F2hcは上皮細胞の血管側の細胞膜に、rBATは管腔側の細胞膜に存在している²⁾。したがって、4F2hcは上皮細胞の血管側の細胞膜へ、rBATは管腔側の細胞膜へトランスポーターを移送する働きをされると考えられる。

II. LATファミリーの基質選択性の多様性

1. 多選択性アミノ酸トランスポーターLAT1

アミノ酸輸送系Lは、分枝アミノ酸や芳香族アミノ酸などのbulkyな側鎖をもった中性アミノ酸をNa⁺非依存的に輸送するトランスポーターであり、個々の細胞に栄養としてのアミノ酸を供給する目的のほか、脳毛細血管内皮細胞や胎盤の合体体栄養細胞(syncytiotrophoblast)などに存在し、血液・脳関門や胎盤関門における上記アミノ酸の透過を担当している¹⁾。アミノ酸類似薬物であるL-ドーパ、 α -メチルドーパ、gabapentinの透過経路としても知られ、さらにパクロフェン、メルファラン、甲状腺ホルモンなどを受け入れるとされ、薬

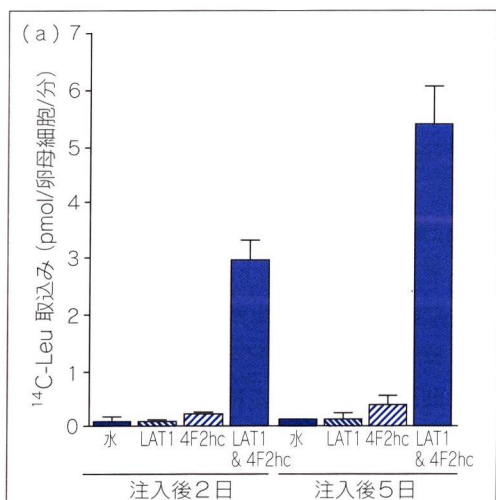


図2 LAT1 と 4F2hc による機能性トランスポーターの形成

(a) LAT1 と 4F2hc の共発現実験. *Xenopus* 卵母細胞に発現させ、¹⁴C-ロイシンの取込みを測定した. 共発現により大きな取込み活性がみられる. 対照として水を注入した卵母細胞(水), LAT1 のみを発現させた卵母細胞(LAT1), 4F2hc のみを発現させた卵母細胞(4F2hc), 共発現させた卵母細胞(LAT1&4F2hc)の比較. (b) *in vitro* 翻訳による糖付加の検討. 4F2hc に関しては, *in vitro* 翻訳により, 分子量 65 K の蛋白質が得られ, これは, ミクロソームの存在下で糖付加を受け, 78 K に移動する(右図). これは, エンドグリコシダーゼ H(EndoH)により, 糖鎖が除去され 65 K に戻る(右図). この反応条件下で, LAT1 に関しては 44 K の蛋白質が得られ, これはミクロソームの存在下でもサイズの移動がなく, LAT1 は糖付加を受けないことが示される(左図). (c) ウェスタンブロットによる両者の連結の検討. 非還元条件下(2 ME- : 2-メルカプトエタノール非存在下)では, 抗 LAT1 抗体(左図), 抗 4F2hc 抗体(右図)ともに 125 K のバンドを認識するが, 還元条件下(2 ME+ : 2-メルカプトエタノール存在下)では, それぞれの抗体は, それぞれの蛋白質の単量体に相当するバンド (LAT1 : 38 K, 4F2hc : 85 K) を認識する. LAT1 と 4F2hc は, ジスルフィド結合を介して連結することが示される.

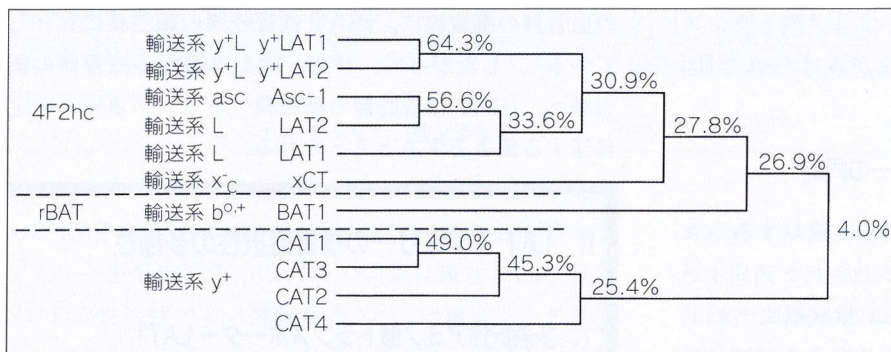
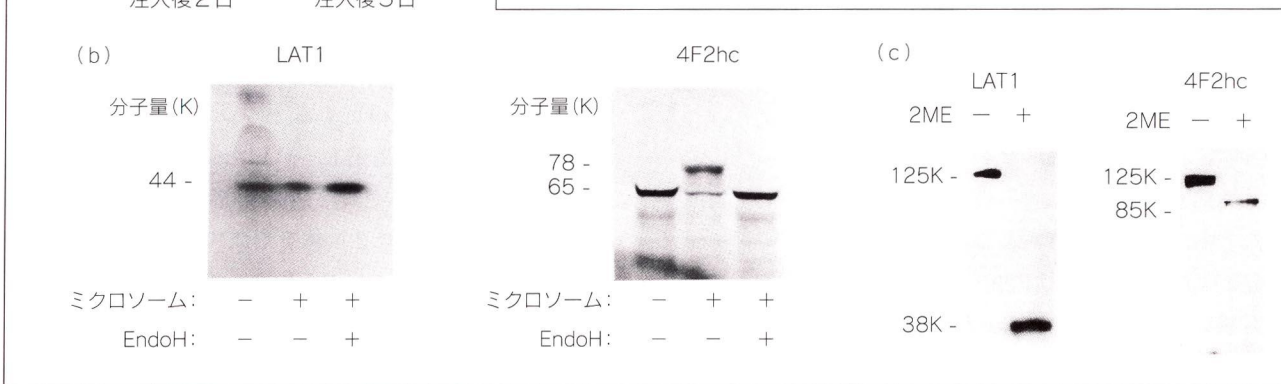


図3 SLC7 ファミリーの系統樹

輸送系 y⁺L, asc, L, x⁻c, b⁰⁺ に相当するトランスポーターを含む LAT ファミリーは, 4F2hc あるいは rBAT といった 1 回膜貫通型蛋白質とヘテロ 2 量体を形成することによって機能する. 輸送系 y⁺ に相当するトランスポーターからなる CAT ファミリーは, 単一の蛋白質で機能する. 数値はアミノ酸配列の相同性を示す.

物トランスポーターとしても関心がもたれてきた.

単離された輸送系 L トランスポーターの第 1 のアイソフォームである LAT 1 は, ロイシン, イソロイシン, バリン, フェニルアラニン, チロシン, トリプトファン, メチオニン, ヒスチジンといった大型の中性アミノ酸を Na⁺ 非依存的に輸送する古典的な輸送系 L の活性を示す⁵⁾. これに対して, 第 2 のアイソフォーム LAT 2 は, LAT 1 の基質である大型の中性アミノ酸に加え, 小型のアミノ酸も含めた中性アミノ酸全般を輸送する広い基質

選択性を示す^{9,10)}. LAT 2 と高い相同性を有する Asc-1 は, 小型のアミノ酸を選択的に輸送する基質選択性を示す¹¹⁾. 類似構造をもつ LAT 1, LAT 2, Asc-1 に興味深い基質選択性の移行がみられ, 基結合部位の解析に有用な情報が与えられる.

LAT 1 の基質認識の機序を明らかにするために, どのような化合物が LAT 1 を介するアミノ酸の取込みに競合的に作用するかを検討した. その結果, N-メチル化やエステル化されたアミノ酸は, 基質としての活性を

失うことから、基質となるためには α -アミノ基と α -カルボキシル基が必要であることが明らかになった(図4 a)。さらにLAT1の基質認識には、側鎖の疎水性が重要な要因となると考えられる。これは、LAT1が、疎水性の bulky な側鎖をもつアミノ基を好むこと、そしてチロシンよりL-ドーパのほうが親和性が低く、また3-O-メチルドーパは、L-ドーパよりも親和性が高くなることから支持される(図4 a)。さらに、 α -メチルドーパや α -メチルチロシンも受け入れることから、 α -炭素周辺には α -メチル基を受け入れる空間的余裕があると考えられる(図4 a)。

LAT1は、前述のようにL-ドーパ、 α -メチルドーパ、 α -メチルチロシンを輸送するほか、gabapentinも輸送基質とし、これらの薬物の細胞膜の透過経路となる(図4 a)。gabapentinは、 α -アミノ酸の構造をもたない化合物で、LAT1の基質結合部位に受け入れられる唯一の化合物である(図4 b)。これは、gabapentinの分子内に存在する環状構造のため、gabapentinのアミノ基とカルボキシル基が、 α -アミノ酸の α -アミノ基と α -カルボキシル基に相当する空間的位置にくるためであると考えられている。また、LAT1を介する輸送は、 α -アミノ酸の構造をもち、チロシンを基本構造とする甲状腺ホルモンやフェニルアラニンの基本構造とする抗腫瘍薬メルファランにより、強く抑制される(図4 b)。しかし、甲状腺ホルモンとフェニルアラニンの輸送活性はきわめて低く、これらが基質結合部位に受け入れられながらも輸送活性が低いことは、それらの側鎖が大きすぎるためなのか、あるいは疎水性が高すぎるためなのか、今後の検討が必要とされる。

LAT1は最近、血液・脳関門を構成する脳毛細血管内皮細胞に4F2hcとともに存在することが示され、血液・脳関門トランスポーターとして位置づけられた(図5)¹⁷⁾。また、LAT1は誘導型のアイソフォームであり、リンパ球の活性化、ホルモンによる刺激などにより高度に発現が誘導され、さらに腫瘍細胞において高発現することから、細胞の需要に見合ったアミノ酸供給を達成するために、発現が調節されるトランスポーターであると考えられる³⁾。

LATファミリーに属するLAT1、LAT2、Asc-1は、中性アミノ酸を選択的に輸送するトランスポーターであるが、前述のようにいずれも基質選択性が広いことが特徴であり、とくにLAT1の基質結合部位は、アミノ酸

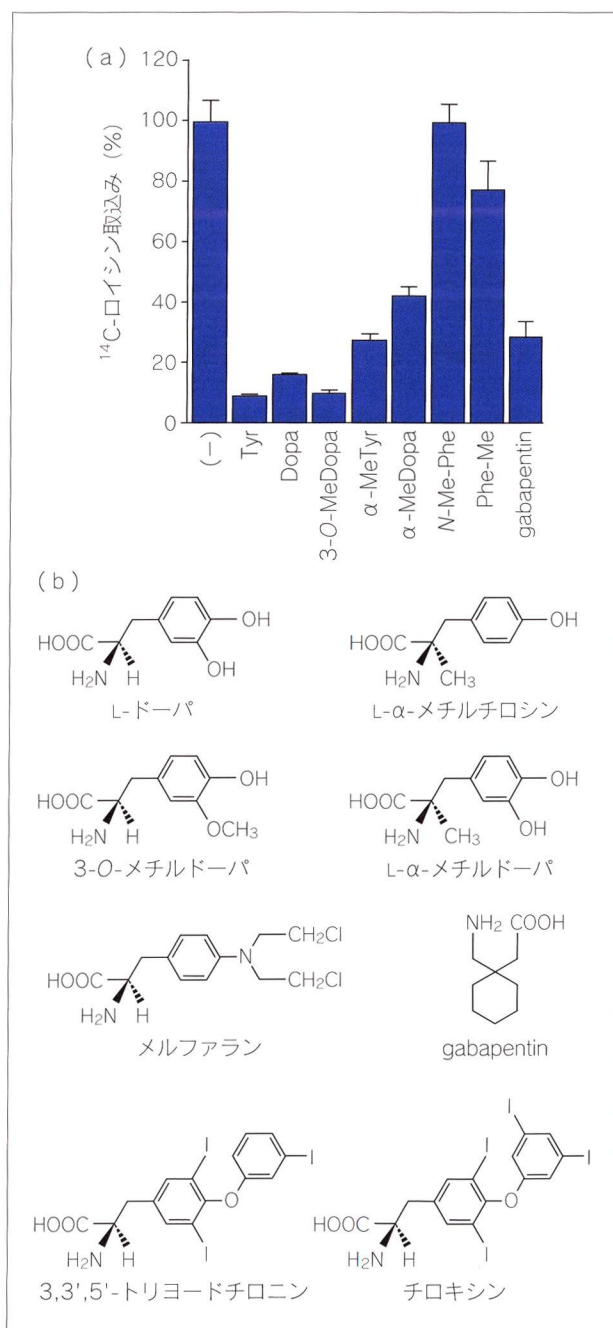


図4 アミノ酸類似化合物のLAT1への作用

(a) LAT1を *Xenopus* 卵母細胞に発現させ、 ^{14}C -ロイシン(20 μM)の取込みに対する非標識アミノ酸類似化合物(2 mM)添加の影響を検討した。LAT1を介するロイシンの取込みは、L-ドーパ(Dopa)、3-O-メチルドーパ(3-O-MeDopa)、 α -メチルチロシン(α -MeTyr)、 α -メチルドーパ(α -MeDopa)、gabapentinによって有意に抑制された。N-Me-Phe: N-メチルフェニルアラニン、Phe-Me: フェニルアラニンメチルエステル。(b) LAT1の基質結合部位に受け入れられるアミノ酸類似構造をもつ薬物。

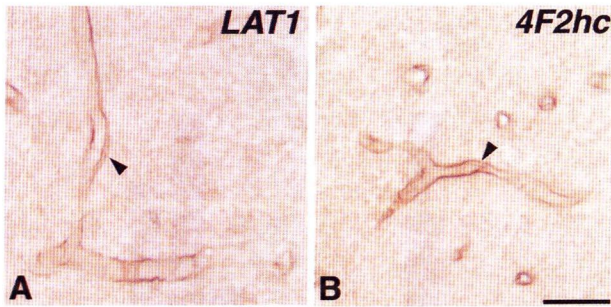


図5 血液・脳関門におけるLAT1の存在

ラット脳におけるLAT1(A)および4F2hc(B)の免疫組織化学。LAT1, 4F2hcともに、血液・脳関門を構成するラット脳毛細血管内皮細胞に共存することが示される。両者ともに、内皮細胞の管腔側および脳側の細胞膜に存在する(図中の矢じり)。

以外に甲状腺ホルモンやメルファランのような大型の側鎖をもつアミノ酸類似化合物も受け入れる。この広い基質選択性は、LAT1による基質認識が、 α -炭素周辺の正電荷と負電荷(α -アミノ基と α -カルボキシル基による)、およびある程度の大きさをもった疎水性基(中性アミノ酸やその類似化合物の側鎖による)の三者の認識により行なわれることによる(図6a)。この要請を満たす化合物は、疎水性側鎖にさまざまなものが可能であることから多種存在するため、広い基質選択を示すことになる。

2. 輸送系 y^+L の無機イオンに依存した基質選択性の拡張

LATファミリーに属する y^+LAT1 と y^+LAT2 は、輸送系 y^+L の機能的性質を有するトランスポーターである^{12,13}。輸送系 y^+L は、塩基性アミノ酸と中性アミノ酸の一部(ロイシン, イソロイシン, グルタミンなど)を輸送する¹⁸。輸送系 y^+L においては、塩基性アミノ酸の輸送は Na^+ に依存しないが、中性アミノ酸の輸送は Na^+ に依存するという奇妙な Na^+ 依存性を示す(図7)¹⁸。LATファミリーは、基本的には Na^+ 非依存性トランスポーターのファミリーであるので、この輸送系 y^+L の Na^+ 依存性は、きわめて例外的である。

輸送系 y^+L の第1のアイソフォーム y^+LAT1 を、*Xenopus* 卵母細胞に発現させて Na^+ の効果を検討したところ、 Na^+ は中性アミノ酸の基質結合部位への親和性を高めるとともに、実際に中性アミノ酸とともに輸送されることが明らかになった¹⁸。塩基性アミノ酸の輸送には Na^+ はまったく関与しない。したがって、 y^+LAT1 の基質結合部位は、基本的には側鎖に正電荷をもつアミノ酸(塩基性アミノ酸)を受け入れるための構造をしていると考えられる(図6c)。中性アミノ酸に対しては、 Na^+ がおそらく塩基性アミノ酸側鎖の正電荷の代役をし、基質結合部位において Na^+ と共存することにより、中性アミノ酸が、塩基性アミノ酸として認識され基質結合部位に受け入れられると考えられる(図6d)。興味深いことに、 y^+LAT1 は Na^+ のみでなく、 H^+ や Li^+ も受け入

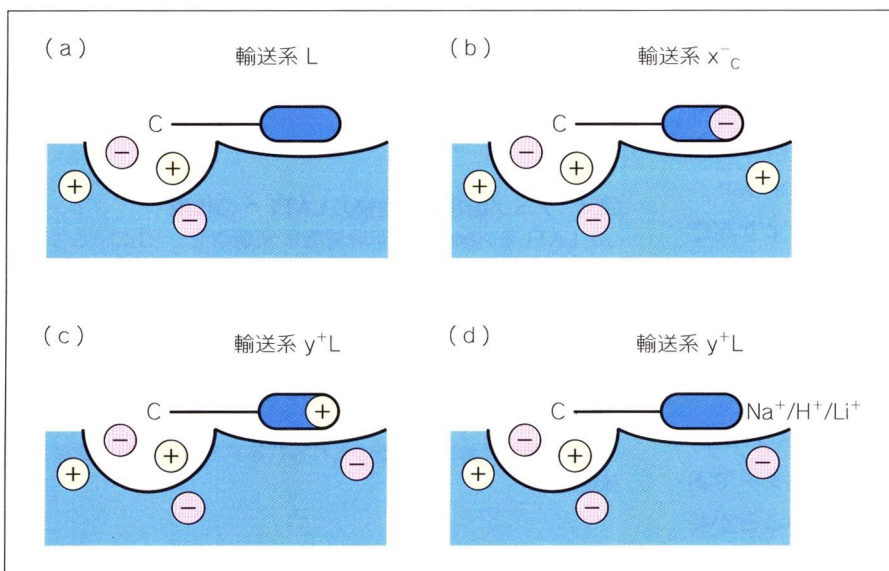


図6 LATファミリーの基質認識の機序

輸送系L, x_c^- , y^+L の基質認識機序の比較。輸送系Lは、疎水性側鎖を認識する基質結合部位をもち(a)、これに負電荷認識部位が加わり輸送系 x_c^- が成立したと考えられる(b)。輸送系 y^+L は、基質アミノ酸側鎖認識部位が正電荷を受け入れるような構造をもち、したがって塩基性アミノ酸の認識には Na^+ を必要としないが(c)、中性アミノ酸は Na^+ , H^+ , あるいは Li^+ と共存することにより基質結合部位に受け入れられる(d)。

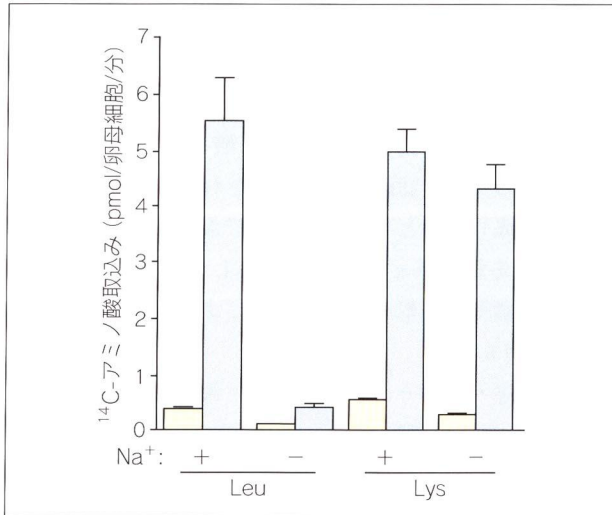


図7 輸送系 y^+L を介するアミノ酸の取込み

y^+LAT1 を *Xenopus* 卵母細胞に発現させ、 ^{14}C -ロイシンおよび ^{14}C -リシンの取込みに対する Na^+ の影響を検討した。ロイシンの取込みは、 Na^+ に依存するが、リシンの取込みは Na^+ の有無に影響されない。□: y^+LAT1 発現卵母細胞, □: 対照(y^+LAT1 非発現卵母細胞)。

れる¹⁸⁾。したがって、 y^+LAT1 の基質アミノ酸側鎖結合部位は、正電荷をもつ塩基性アミノ酸側鎖、あるいは特定の1価無機陽イオンを伴った中性アミノ酸側鎖を受け入れると結論できる(図6c, d)。 Na^+ の存在下であっても、 y^+LAT1 の基質結合部位が受け入れる中性アミノ酸は、前述のように少数のもの(ロイシン、イソロイシン、グルタミンなど)に限られる¹⁸⁾。これは、 y^+LAT1 の側鎖結合部位の正電荷認識部位が、 α -炭素からそれら基質となる中性アミノ酸側鎖の長さに相当する距離にあることを想像させる。

輸送系 y^+ に相当する CAT ファミリーは、14回膜貫通型の Na^+ 非依存性塩基性アミノ酸トランスポーターからなるが、LAT ファミリーと類似の構造をもち(30%程度の相同性)、LAT ファミリーとともに SCL7 ファミリーを形成する(図3)。CAT ファミリーのトランスポーターは、LAT ファミリーとは異なり、単一の蛋白質で輸送機能を発揮する。CAT ファミリーのトランスポーターは、前述のように塩基性アミノ酸を選択的に輸送するが、興味深いことに中性アミノ酸のうちホモシステインを Na^+ の存在下で基質として受け入れる¹⁹⁾。これは、類似の構造をもち、基本的にはともに塩基性アミノ酸のトランスポーターである y^+ と y^+L の基質認識部位の構造の類似性を示唆するものである。

y^+LAT1 においては、中性アミノ酸の輸送と共役する1価陽イオンの見かけ上の親和性は、 $H^+ > Li^+ > Na^+ \gg K^+$ の順である。 Na^+ /グルコーストランスポーターにおいても、 Na^+ の非存在下でも低レベルのグルコースの取込みを示すことから、 H^+ が Na^+ の代わりにしうることが明らかにされた²⁰⁾。そこにおいても、親和性は H^+ のほうが Na^+ より高く、両者は興味深い共通性がある。

また、 Na^+ 依存性酸性アミノ酸輸送系 X^-_{AG} に相当するグルタミン酸トランスポーターや、それと類似の構造をもつ Na^+ 依存性中性アミノ酸輸送系 ASC に相当するトランスポーター(ASCT1 および ASCT2) においては、 Na^+ のみに特異的な Na^+ 結合部位と、 Na^+ のみでなく Li^+ も受け入れる Na^+ 結合部位が存在する²¹⁾。 y^+LAT1 の Na^+ 受容部位の性質は、無機陽イオンに対する選択性の低い Na^+ 結合部位の性質に類似している。分子進化の過程で Na^+ 非依存性トランスポーターから Na^+ 依存性トランスポーターが成立したと想定したとき、 y^+LAT1 は、その兩者をつなぐ重要な手掛かりを与えてくれるものと思われる。

y^+LAT1 の一見奇妙な Na^+ 依存性は、 y^+LAT1 が腎尿細管や小腸からの塩基性アミノ酸の吸収(経上皮輸送)において、上皮細胞の血管側膜の塩基性アミノ酸の出口として機能するための重要な性質となっている。塩基性アミノ酸は、分子全体として正電荷を帯びているため、負電位の細胞内から細胞外へ出るためには、電氣的勾配に逆らって輸送されなければならない。 y^+LAT1 は交換輸送体(exchanger)であり¹⁸⁾、細胞内では Na^+ 濃度が低いため、基質結合部位に中性アミノ酸を結合できず、そのため塩基性アミノ酸が選択的に受け入れられる。これに対して細胞外では、十分 Na^+ 濃度が高く、中性アミノ酸も塩基性アミノ酸も同程度に受け入れられるため、この交換輸送体を介して、細胞内の塩基性アミノ酸と細胞外の中性アミノ酸および塩基性アミノ酸が交換されることになる。したがって、総体として塩基性アミノ酸が細胞外に出ることになる。 y^+LAT1 の遺伝的欠損は蛋白質不耐性リシン尿症を発症することからも、このトランスポーターの塩基性アミノ酸再吸収における重要性が理解される²²⁾。

3. 輸送系 x^-_c と輸送系 $b^{0,+}$

LAT ファミリーには、さらに異なった基質選択性を示す xCT と、BAT1 (別名 $b^{0,+}AT$) がある。 xCT は

4F2hc と連結するトランスポーターであり、輸送系 x^{-c} に相当する基質選択性を示す¹⁴⁾。すなわち、xCT はシスチンとグルタミン酸を輸送基質とする交換輸送体であり、通常は細胞内のグルタミン酸を放出し、細胞外のシスチンを取り込む形で機能する。細胞内に取り込まれたシスチンは、システインに還元されグルタチオン生成の基質となる。xCT の発現は細胞への酸化的ストレス付加により誘導され、xCT は酸化的ストレスに対する細胞保護因子として位置づけられる¹⁴⁾。

xCT は、シスチンおよび酸性アミノ酸であるグルタミン酸および L- α -アミノアジピン酸を基質とするが、アスパラギン酸の輸送活性は低い¹⁴⁾。したがって、xCT の側鎖結合部位の負電荷認識部位は α -炭素から一定の距離にあり、グルタミン酸とより側鎖の長い L- α -アミノアジピン酸は側鎖末端の負電荷はそれと相互作用できるが、アスパラギン酸は側鎖が短いため受け入れられないと考えられる(図 6 b)。また、シスチンは分子内の 2 つのカルボキシル基間の距離が、xCT の基質となる酸性アミノ酸のそれと同程度であり、カルボキシル基の 1 つが側鎖結合部位に受け入れられることにより、シスチンは xCT により酸性アミノ酸として認識されて輸送されることが考えられる(図 6 b)。

輸送系 $b^{0,+}$ に相当する BAT 1 は、いままでに同定されている LAT ファミリーのメンバーのうちで、唯一 rBAT と連結するトランスポーターである^{15,16)}。BAT 1 は、シスチン、塩基性および中性アミノ酸を輸送するトランスポーターであり、その遺伝的欠損は、腎尿細管からのシスチン再吸収障害であるシスチン尿症を発症する¹⁶⁾。また、輸送系 y^{+L} と同様、塩基性および中性アミノ酸を輸送する基質選択性を示すが、輸送系 y^{+L} とは異なり中性アミノ酸の輸送に Na^{+} を要求せず、輸送系 y^{+L} とは異なった側鎖認識を行なうと考えられる¹⁵⁾。

4. LAT ファミリーの基質選択性の多様性はどのようにして成立したか？

LAT ファミリーと CAT ファミリーからなる SLC 7 ファミリーは、疎水性側鎖と基質結合部位の相互作用を基質認識に要求する輸送系 L (LAT 1 および LAT 2) を基本型とし(図 6 a)、他のトランスポーターがそれから派生したと仮定すると、多様な基質選択性の成立に対するひとつの解釈が与えられる。すなわち、輸送系 L の側鎖結合部位の特定の箇所に正電荷認識部位が形成され

ることにより輸送系 y^{+} (CAT ファミリー) が成立し、さらに無機陽イオンを伴った一部の中性アミノ酸側鎖も受け入れられる形で正電荷認識部位が形成され輸送系 y^{+L} が作られ(図 6 c, d)、中性アミノ酸に対する親和性を残しながら正電荷認識部位が形成されることにより輸送系 $b^{0,+}$ が成立したと考えることができる。酸性アミノ酸を輸送する輸送系 x^{-c} は、輸送系 L の側鎖結合部位に負電荷認識部位が形成されることにより成立したと想定される(図 6 b)。

すでに述べたように、側鎖認識に電荷認識が要求される輸送系 y^{+L} や輸送系 x^{-c} においては、その基質選択性から、それらの側鎖結合部位の電荷認識部位は、 α -炭素から一定の距離にあると考えられる。したがって、電荷をもった酸性アミノ酸残基や塩基性アミノ酸残基が、電荷認識部位を構成している可能性が考えられ、LAT ファミリーのメンバー間でのアミノ酸配列の比較が、側鎖の電荷認識部位の同定に有用な情報を与えてくれるものと期待される。

生体内での低分子化合物と蛋白質の相互作用の原形は、疎水性低分子化合物の、蛋白質分子の疎水性ポケットへの疎水性相互作用を介する結合であると考えられる。これは、多くの疎水性薬物が血漿蛋白質であるアルブミンと結合して存在することを一例とし、生体内でみられるいわゆる非特異的反応の一つである。この場合、蛋白質分子の疎水性ポケットは、その“基質”認識を化合物との疎水性相互作用のみに頼るため、その対象となる化合物は多く、きわめて広い“基質”選択性を示すことになる。

疎水性相互作用にさらに単一電荷の認識が加わったものが、次の段階の基質認識機構となる。これは、有機アニオントランスポーターファミリーや有機カチオントランスポーターファミリーにみられ、それぞれ疎水性相互作用と負電荷あるいは正電荷の認識により基質認識が行なわれる(本特集他稿参照)。この場合、蛋白質分子と低分子化合物の電気的相互作用を伴うため、蛋白質分子にコンフォメーション変化を効率よく起こすことが可能になる。単一電荷の認識の場合、疎水性部分と単一電荷から構成される化合物は多数存在するため、この場合も広い基質選択性を示すことになる。

さらに、 α -炭素の周辺の正電荷と負電荷(α -アミノ基と α -カルボキシル基)の認識と、側鎖の認識といった 3 点認識が成立すると、この条件を満たす化合物はアミ

ノ酸に限られ、アミノ酸トランスポーターが形成される。LATファミリーのLAT1およびLAT2においては、側鎖認識が低分子化合物/蛋白質相互作用の原形である疎水性相互作用を頼りに行なわれており、そのため中性アミノ酸に対する広い基質選択性を示す。SLC7ファミリーでは、これに側鎖結合に関する電荷認識が加えられ基質選択性が多様化していったと想定される。

■ おわりに

アミノ酸は細胞にとって必須の栄養素であり、多種類のアミノ酸を細胞が栄養素として均等に取り込むという目的は、基質選択性の広いアミノ酸トランスポーターの存在により容易に達成される。これは、 α -炭素周辺の正電荷と負電荷の認識を必須の要請事項とし、側鎖認識に多くの可能性をもたせたLATファミリーの成立により実現された。LATファミリーは、前述したように、もともとは疎水性側鎖と側鎖結合部位の疎水性相互作用により側鎖認識が行なわれる輸送系Lトランスポーターを基本型とすると考えられる。有機アニオントランスポーターであるOATファミリー(本特集他稿参照)においても、負電荷の認識とともに、疎水性相互作用が基質認識の重要な要素となっていると考えられ、この基質認識の要請事項の単純さのためにその条件を満たす化合物は多数存在し、多選択性が実現される。LATファミリーにおいては、構造的に類似した各メンバー間に、側鎖の電荷認識に関して際立った多様性があるが、この特徴を利用して、各メンバー間のアミノ酸配列の違いに着目した構造機能相関の解析が可能であり、この方向性の研究により基質認識の機序も解明への手掛かりが得られていくと期待される。

文 献

- Christensen, H. N. : *Physiol. Rev.*, **70**, 43-77 (1990)
- Palacin, M., Estevez, R., Bertran, J., Zorzano, A. : *Physiol. Rev.*, **78**, 969-1054 (1998)
- Kanai, Y. : *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 565-572 (1997)
- Wells, R. G., Lee, W. S., Kanai, Y., Leiden, J. M., Hediger, M. A. : *J. Biol. Chem.*, **267**, 15285-15288 (1992)
- Kanai, Y., Segawa, H., Miyamoto, K., Uchino, H., Takeda, E., Endou, H. : *J. Biol. Chem.*, **273**, 23629-23632 (1998)
- Mastroberardino, L., Spindler, B., Pfeiffer, R., Skelly, P. J., Loffing, J., Shoemaker, C. B., Verrey, F. : *Nature*, **395**, 288-291 (1998)
- Mannion, B. A., Kolesnikova, T. V., Lin, S.-H., Thompson, N. L., Hemler, M. E. : *J. Biol. Chem.*, **273**, 33127-33129 (1998)
- Verrey, F., Jack, D. L., Paulsen, I. T., Saier, J.M.H., Pfeiffer, R. : *J. Membrane Biol.*, **172**, 181-192 (1999)
- Pineda, M., Fernandez, E., Torrents, D., Estevez, R., Lopez, C., Camps, M., Lloberas, J., Zorzano, A., Palacin, M. : *J. Biol. Chem.*, **274**, 19738-19744 (1999)
- Segawa, H., Fukasawa, Y., Miyamoto, K., Takeda, E., Endou, H., Kanai, Y. : *J. Biol. Chem.*, **274**, 19745-19751 (1999)
- Fukasawa, Y., Segawa, H., Kim, J. Y., Chairoungdua, A., Kim, D. K., Matsuo, H., Cha, S. H., Endou, H., Kanai, Y. : *J. Biol. Chem.*, **275**, 9690-9698 (2000)
- Torrents, D., Estevez, R., Pineda, M., Fernandez, E., Lloberas, J., Shi, Y.-B., Zorzano, A., Palacin, M. : *J. Biol. Chem.*, **273**, 32437-32445 (1998)
- Pfeiffer, R., Rossier, G., Spindler, B., Meier, C., Kuhn, L., Verrey, F. : *EMBO J.*, **18**, 49-57 (1999)
- Sato, H., Tamba, M., Ishii, T., Bannai, S. : *J. Biol. Chem.*, **274**, 11455-11458 (1999)
- Chairoungdua, A., Segawa, H., Kim, J.Y., Miyamoto, K., Haga, H., Fukui, Y., Mizoguchi, K., Ito, H., Takeda, E., Endou, H., Kanai, Y. : *J. Biol. Chem.*, **274**, 28845-28848 (1999)
- International Cystinuria Consortium : *Nature Genet.*, **23**, 52-57 (1999)
- Matsuo, H., Tsukada, S., Nakata, T., Chairoungdua, A., Kim, D. K., Cha, S. H., Inatomi, J., Yorifuji, H., Fukuda, J., Endou, H., Kanai, Y. : *Neuroreport*, **11**, 3507-3511 (2000)
- Kanai, Y., Fukasawa, Y., Cha, S. H., Segawa, H., Chairoungdua, A., Kim, D. K., Matsuo, H., Kim, J. Y., Miyamoto, K., Takeda, E., Endou, H. : *J. Biol. Chem.*, **275**, 20787-20793 (2000)
- Wang, H., Kavanaugh, M. P., North, R. A., Kabat, D. : *Nature*, **352**, 729-731 (1991)
- Hirayama, B. A., Loo, D.D.F., Wright, E. M. : *J. Biol. Chem.*, **269**, 21407-21410 (1994)
- Grunewald, M., Kanner, B. I. : *J. Biol. Chem.*, **270**, 17017-17024 (1995)
- Torrents, D., Mykkanen, J., Pineda, M., Feliubadalo, L., Estevez, R., de Cid, R., Sanjurjo, P., Zorzano, A., Nunes, V., Huoponen, K., Reinikainen, A., Simell, O., Savontaus, M. L., Aula, P., Palacin, M. : *Nature Genet.*, **21**, 293-296 (1999)

金井好克

略歴：1984年群馬大学医学部卒業，1988年東京大学大学院医学系研究科修了，東京大学助手，ハーバード大学博士研究員，杏林大学講師を経て，1996年より杏林大学助教授。1998年より科学技術振興事業団さきがけ研究21研究者(兼務)。
研究テーマ：トランスポーターの分子生物学，分子薬理学。
関心事・抱負：トランスポーターをとりまく蛋白質間相互作用を明らかにし，細胞をこえたシグナルの流れを見ていくなかで，“組織の分子生物学”の構築に貢献したい。