

아미노산 수송체 TAT1에 의한 방향족 아미노산의 수송특성

김윤배 · 최봉규* · 김종근** · 정규용* · 김명수 · 윤정훈 · 박주철 ·
국중기 · 정해만 · 김생곤 · 최은상 · 김원재*** · 김도경†

조선대학교 치과대학 구강생물학연구소, *원광대학교 의과대학 약리학교실,
전남대학교 의과대학 약리학교실, *전남대학교 치과대학 구강생리학교실

Transport Properties of Aromatic Amino Acids by Amino Acid Transporter TAT1

Youn Bae Kim, Bong Kyu Choi*, Jong Keun Kim**, Kyu Yong Jung*, Myong Soo Kim,
Jung Hoon Yoon, Joo Cheol Park, Joong Ki Kook, Hae Man Jung, Saeng Gon Kim,
Eun Sang Choe, Won Jae Kim*** and Do Kyung Kim†

Dept. of Oral Biology Research Institute, Chosun University College of Dentistry, Gwangju 501-759, Korea

*Dept. of Pharmacology, Wonkwang University School of Medicine, Iksan 570-749, Korea

**Dept. of Pharmacology, Chonnam National University Medical School, Gwangju 501-190, Korea

***Dept. of Oral Physiology, Chonnam National University School of Dentistry, Gwangju 501-190, Korea

Abstract

The T-type amino acid transporter 1 (TAT1) is a Na⁺-independent amino acid transporter which selectively transports aromatic amino acids subserving the amino acid transport system T. To understand the transport properties of aromatic amino acids by human TAT1 (hTAT1), we have examined the hTAT1-mediated aromatic amino acid transports using a *Xenopus laevis* oocyte expression system. When expressed in *Xenopus laevis* oocytes, hTAT1 induced L-[¹⁴C]tryptophan transport which was not dependent on Na⁺ or Cl⁻ in the medium. Uptake was time-dependent and exhibited a linear dependence on incubation time up to 30 min. The L-[¹⁴C]tryptophan uptake was highly inhibited by L-isomers of tryptophan, tyrosine and phenylalanine, whereas other L-amino acids did not inhibit hTAT1-mediated L-[¹⁴C]tryptophan uptake. The hTAT1 induced the relatively low-affinity transport of aromatic amino acids such as L-[¹⁴C]tryptophan, L-[¹⁴C]tyrosine and L-[¹⁴C]phenylalanine (K_m values: 450 ~ 750 μ M), consistent with the properties of classical amino acid transport system T. The L-[¹⁴C]tryptophan uptake did not show any remarkable pH dependence within the pH range of 5.5 to 8.5. The time-dependent efflux of L-[¹⁴C]tryptophan was detected from the oocytes expressing hTAT1, which was not affected by the presence or absence of L-tryptophan in the extracellular medium, indicating that hTAT1-mediated transport is due to the facilitated diffusion. Expression of hTAT1 in *Xenopus laevis* oocytes induced the transport of tryptophan, tyrosine and phenylalanine, indicating that hTAT1 is a transporter subserving system T. These results suggest that hTAT1 has essential roles in the absorption of aromatic amino acids from epithelial cells to the blood stream. Because hTAT1 is proposed to be crucial to the efficient absorption of aromatic amino acids from intestine and kidney, its defect such as blue diaper syndrome could be involved in the disruption of aromatic amino acid transport.

Key words: amino acid transporter, aromatic amino acid, facilitated diffusion, intestine, kidney

서 론

아미노산은 세포 내에서 단백질 합성의 기질이 될 뿐만 아니라, glucose, purine, pyrimidine 등 다양한 물질의 생합성에도 관여한다. 세포 내에서 필요한 아미노산은 아미노산 수송체 (transporter)를 통하여 이루어진다(1). 아미노산 수송체는 각기 그들이 수송하는 아미노산의 특성에 따라 중성, 염기성 및 산성 아미노산 수송체로 분류되며 세포외액의 나트륨 이온에 대한 의존성에 따라 나트륨 의존성 및 비의존성 수송체로 분류된다(1).

분자 생물학 기법이 급속도로 발달한 1990년대 이래, 고전적인 방법으로만 특성화되었던 아미노산 수송체들의 분자적인 실체가 분자 클로닝에 의해 드러나기 시작하였다(2-6). 방향족 아미노산만을 선택적으로 수송하는 아미노산 수송체 T는 그중에서도 가장 최근에 클로닝되어 분자적 특성이 밝혀졌다(6,7). 아미노산 수송체 T는 나트륨에 의존하지 않고 방향족 아미노산을 수송하는 수송체로서 쥐의 소장에서 처음으로 클로닝(6)이 되었으며 그 후 사람의 흉선에서 클로닝(7)이 되어 그 분자적 실체가 드러났다. TAT1(T-type amino acid transporter 1)이라 명명되어진 이 수송체는 12회의 세포막 관

†Corresponding author. E-mail: kdk@chosun.ac.kr
Phone: 82-62-230-6893. Fax: 82-62-232-6896

통 부위를 갖는 514개의 아미노산으로 구성되어졌고, *Xenopus laevis* oocyte에 발현시켰을 때 나트륨에 비의존적으로 tryptophan, phenylalanine과 tyrosine 같은 방향족 아미노산을 선택적으로 수송하는 특성을 보였으며(6), 이는 고전적인 방법으로 연구되어졌던 아미노산 수송체 T의 특성과 일치하는 것이었다(1,8-11).

Blue diaper syndrome은 소장 상피에서 방향족 아미노산 특히 tryptophan의 흡수 장애로 인해 소아기에 나타나는 유전병으로 알려져 있고, 그 임상적 증상에는 식욕부진, 변비, 반복성 발열, 파란색 오줌, 빈혈, 저신장증 및 저체중증 등이 있으며 방향족 아미노산 수송체 T의 결여가 그 원인인 것으로 보고되었다(12,13). 방향족 아미노산의 상피수송 결여로 인하여 야기된다는 blue diaper syndrome의 병태생리학적 연구를 위해서는 사람 TAT1(hTAT1)의 분자적 실체를 규명하고, 아미노산 기질을 수송하는 그 수송특성을 밝히는 연구가 선행되어야 한다. 따라서 본 저자들은 *Xenopus laevis* oocyte를 이용하여 hTAT1에 의해 수송되는 방향족 아미노산들의 수송특성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

L-[¹⁴C]tryptophan, L-[¹⁴C]phenylalanine과 L-[¹⁴C]tyrosine은 Perkin Elmer(Boston, MA, USA)로부터 구입하여 사용하였고, mammalian expression vector pcDNA3.1(-)은 Invitrogen(Carlsbad, California, USA)에서 구입하여 사용하였으며 아미노산 및 기타시약들은 analytical grade를 구입하여 사용하였다.

실험동물은 아프리카산 발톱 개구리 *Xenopus laevis*를 사용하였다.

실험방법

Xenopus laevis oocyte를 이용한 아미노산의 수송특성을 조사하기 위한 실험은 Kanai 등(14)과 Utsunomiya-Tate 등(15)의 방법을 변형하여 시행하였다. Kim 등(7)의 방법에 의해 클로닝한 hTAT1 cDNA를 oocyte에서 발현시키기 위해 pcDNA3.1(-)에 subcloning하였다. Subclonig한 cDNA를 *EcoRI*으로 처리하여 선형화시킨 후 T7 RNA polymerase를 이용하여 시험관 내에서 전사시켜 cRNA를 제조하였다. *Xenopus laevis*에서 적출한 oocyte는 follicular layer를 제거하기 위해 collagenase A를 처리한 후 Barth's solution(88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.33 mM Ca(NO₃)₂, 5 mM HEPES, pH 7.5)에 보관하였다. Follicular layer가 제거된 oocyte에 시험관에서 전사시킨 hTAT1의 cRNA 25 ng을 미세 주입시키고, 2~3일간 18°C의 Barth's solution 내에서 배양시킨 후 아미노산 uptake 실험을 시행하였다.

Uptake 실험은 표준 용액(100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.4), 나트륨이 제거된 용액(100 mM choline chloride, 2 mM KCl, 1 mM CaCl₂,

1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.4) 및 염소가 제거된 용액(100 mM Na-gluconate, 2 mM K-gluconate, 1 mM Ca-gluconate, 1 mM Mg-gluconate, 10 mM HEPES, pH 7.4)을 실험 목적에 따라 변형하면서 사용하였다. 수송특성 중 pH 의존성을 조사하기 위한 완충액을 제조하기 위해 MES-NaOH(PH 5.5와 PH 6.0), PIPES-NaOH(PH 6.5와 PH 7.0), HEPES-NaOH(pH 7.5와 pH 8.0)와 Tris-HCl(PH 8.5)을 사용하였다.

Oocyte를 방사능이 표지된 아미노산이 포함된 500 μL의 실험용액이 든 24-well plate에 넣고 실온에서 그 실험목적에 따라 0.1 hr~2 hr 배양시켰으며, 반응의 정지를 위해 4°C의 찬 실험용액으로 수차례 수세하였다. 그후 oocyte를 10% SDS에 녹여 oocyte 안으로 uptake 되어진 방사능을 liquid scintillation spectrometry로 측정하였다. 예비실험의 결과 hTAT1에 의해 유도된 아미노산 L-[¹⁴C]tryptophan(1 mM)의 uptake가 배양 30 min에서 최대 uptake 결과를 보였으므로 본 논문에서의 시간 의존성 실험을 제외한 모든 uptake 실험은 30 min에서 시행하여 비교하였으며, 측정되어진 방사능은 pmol/oocyte/min으로 산출하였다.

아미노산 기질들의 K_m 과 V_{max} 는 아미노산 농도 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 및 10 mM에서 Eadie-Hofstee equation을 이용하여 산출하였다. hTAT1에 의해 uptake된 아미노산은 hTAT1 cRNA를 주입한 oocyte와 hTAT1 cRNA 대신 동량의 물을 주입한 대조 oocyte에서와의 차이로 결정되었다.

hTAT1에 의해 유도된 아미노산의 uptake에 미치는 여러 아미노산들의 억제 효과를 보기 위한 실험에서는 10 μM의 L-[¹⁴C]tryptophan과 방사능이 표지되지 않은 아미노산 10 mM을 실험용액 내에 동시 투여하여 시행하였다.

Oocyte내로 미세주입한 아미노산의 efflux 실험은 Fukasawa 등(16)과 Kanai 등(17)의 방법을 이용하여 시행하였다. L-[¹⁴C]tryptophan 100 nl(2 nci)를 oocyte 내로 미세 주입한 후 4°C의 실험용액으로 수차례 수세한 다음, 아미노산이 함유되어 있거나 되어있지 않은 실험용액이 들어있는 plate에 옮겨 2.5 min~90 min 배양시켰다. 그 후 실험용액 내로 efflux 되어 나온 아미노산과 oocyte내에 남아있는 아미노산을 liquid scintillation spectrometry로 측정하였으며 그 측정값을 % 방사능(% radioactivity)으로 산출하였다 (실험용액 내 또는 oocyte 내의 방사능 / (실험용액 내의 방사능 + oocyte 내의 방사능) × 100%)(16,17).

본 논문에서의 uptake와 efflux 실험에서 각각의 결과를 위해 6~9개의 oocyte를 이용하였으며, 각각의 결과를 mean ± SE(n = 6~9)로 표시하였다. 각 결과의 재현성을 확인하기 위하여 각기 다른 *Xenopus laevis* oocyte를 이용하여 3회 이상 반복 실험을 수행하여 결과를 산출하였다.

결 과

hTAT1의 기능을 조사하기 위하여 hTAT1의 cRNA를 미세주입한 *Xenopus laevis* oocyte에서 방사능이 표지된 아미

노산의 uptake 실험을 시행하였다. *Xenopus laevis* oocyte에 hTAT1의 cRNA를 미세주입한 후 2~3일을 배양시킨 oocyte에서의 L-[¹⁴C]tryptophan uptake가 대조군으로서 동량의 물을 미세주입한 oocyte에서보다 약 11배가 많았다(Fig. 1). hTAT1에 의해 유도되는 L-[¹⁴C]tryptophan uptake는 배양시간 5 min부터 증가하기 시작하여 배양 30 min에 최대에 이르러 배양시간 2 hr까지 유지되었다(Fig. 2). hTAT1에 의해 유도된 L-[¹⁴C]tryptophan의 uptake가 배양 30 min에서 최대 uptake 결과를 보였으므로 본 논문에서 모든 uptake 실험은 배양 30 min에서 시행하여 비교하였다.

hTAT1에 의해 유도된 L-[¹⁴C]tryptophan의 uptake에 미치

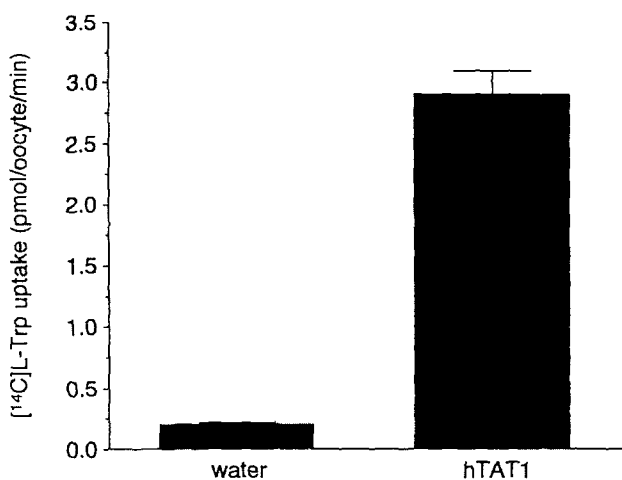


Fig. 1. Functional expression of human TAT1 (hTAT1) in *Xenopus laevis* oocytes. Uptake of L-[¹⁴C]tryptophan (1 mM) was measured on the *Xenopus laevis* oocytes injected with water or hTAT1 cRNA in the Na⁺-free uptake solution.

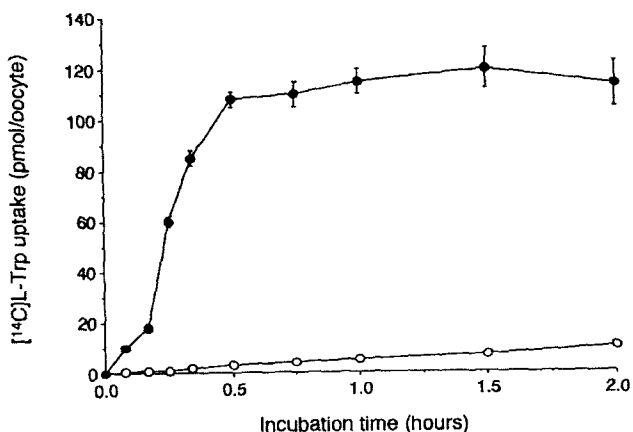


Fig. 2. Time course of hTAT1-mediated transport. Time course of L-[¹⁴C]tryptophan uptake by oocytes that express hTAT1 (●) by the control oocytes injected with water instead of hTAT1 cRNAs (○). Uptake of L-[¹⁴C]tryptophan (1 mM) was measured on the *Xenopus laevis* oocytes injected with water or hTAT1 cRNA at the incubation times 0.1, 0.15, 0.25, 0.3, 0.5, 1, 1.5 and 2 hr.

는 여러 이온들의 영향을 조사하기 위하여 실험용액내의 Na⁺을 choline chloride로 chloride를 gluconate로 치환하여 uptake 실험을 시행하여 보았다. Fig. 3에서 나타낸 바와 같이 hTAT1에 의한 L-[¹⁴C]tryptophan의 uptake는 Na⁺을 choline chloride로 치환했을 때에도, chloride를 gluconate로 치환했을 때에도 변화가 없었다.

hTAT1의 기질특이성을 시험하기 위하여, 10 μM L-[¹⁴C]tryptophan의 uptake를 10 mM의 아미노산들의 존재 하에서 측정하여 보았다. hTAT1에 의한 L-[¹⁴C]tryptophan의 uptake는 방향족 아미노산인 phenylalanine, tyrosine 및 tryptophan에 의해서는 억제되었지만, glycine, alanine, serine, threonine, cysteine, asparagine, glutamine, methionine, leucine, isoleucine, valine, histidine, aspartate, glutamate, lysine, arginine, proline 및 cystine에 의해서는 억제 되지 않았다(Fig. 4). 기질특이성을 확인하기 위한 억제 실험의 결과를 확인하기

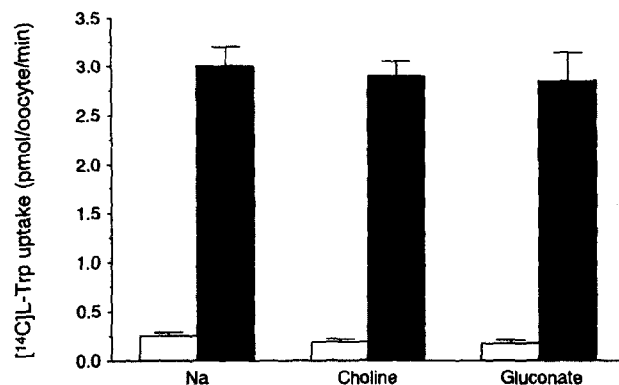


Fig. 3. Ion-dependence of hTAT1-mediated transport. hTAT1-mediated L-[¹⁴C]tryptophan uptakes (1 mM) measured in the standard uptake solution (Na) was compared with that measured in the Na⁺-free uptake solution (choline) and that measured in the Cl⁻-free uptake solution (gluconate) in oocytes that express hTAT1 (filled bars) by the control oocytes injected with water instead of hTAT1 cRNAs (open bars).

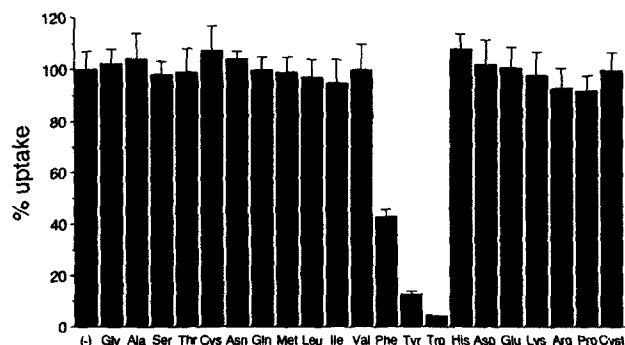


Fig. 4. Inhibition of hTAT1-mediated L-[¹⁴C]tryptophan uptake by L-amino acids. The hTAT1-mediated L-[¹⁴C]tryptophan uptake (10 μM) was measured in the presence of 10 mM non-radiolabeled indicated L-amino acids. The uptake was measured in the Na⁺-free uptake solution; the values are expressed as percent of the control L-tryptophan uptake in the absence of inhibitors ("(-)").

위하여 [14 C]으로 표지된 아미노산들의 uptake 실험을 시행하였다. Fig. 5에 나타낸 바와 같이 hTAT1에 의한 L-[14 C]phenylalanine, L-[14 C]tyrosine 및 L-[14 C]tryptophan의 uptake

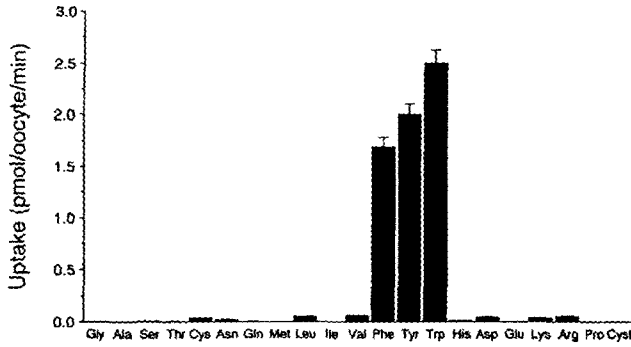


Fig. 5. hTAT1-mediated amino acid uptake. The uptakes of [14 C]labeled L-amino acids measured in the Na^+ -free uptake solution at the concentration of 1 mM.

를 볼 수 있었으며, 이 결과는 Fig. 4의 억제 실험과 상응함을 확인할 수 있었다. hTAT1에 의한 L-[14 C]tryptophan의 uptake는 포화되었으며, Michaelis-Menten kinetics에 의하여 K_m 치는 $452.2 \pm 27.8 \mu\text{M}$ (mean \pm SE, $n = 3$), V_{max} 값은 2.1 ± 0.3 pmol/oocyte/min (mean \pm SE, $n = 3$)로 산출되었다(Fig. 6). L-[14 C]tyrosine 및 L-[14 C]phenylalanine의 uptake 역시 포화되었으며 그 K_m 치는 tyrosine의 경우 $636.3 \pm 59.4 \mu\text{M}$ (mean \pm SE, $n = 3$)이었고(Fig. 7), phenylalanine의 경우 $740.5 \pm 96.7 \mu\text{M}$ (mean \pm SE, $n = 3$)이었다(Fig. 8). 그 V_{max} 값은 각각 2.7 ± 0.3 pmol/oocyte/min (tyrosine, mean \pm SE, $n = 3$) 및 3.2 ± 0.2 pmol/oocyte/min (phenylalanine, mean \pm SE, $n = 3$)이었다(Fig. 7과 Fig. 8).

hTAT1에 의한 L-[14 C]tryptophan의 uptake에 대한 pH의 효과를 시험한 결과 실험용액의 pH 5.5에서 8.5까지의 변화는 hTAT1에 의한 L-[14 C]tryptophan의 uptake에 별다른 영향을 미치지 못하였다(Fig. 9).

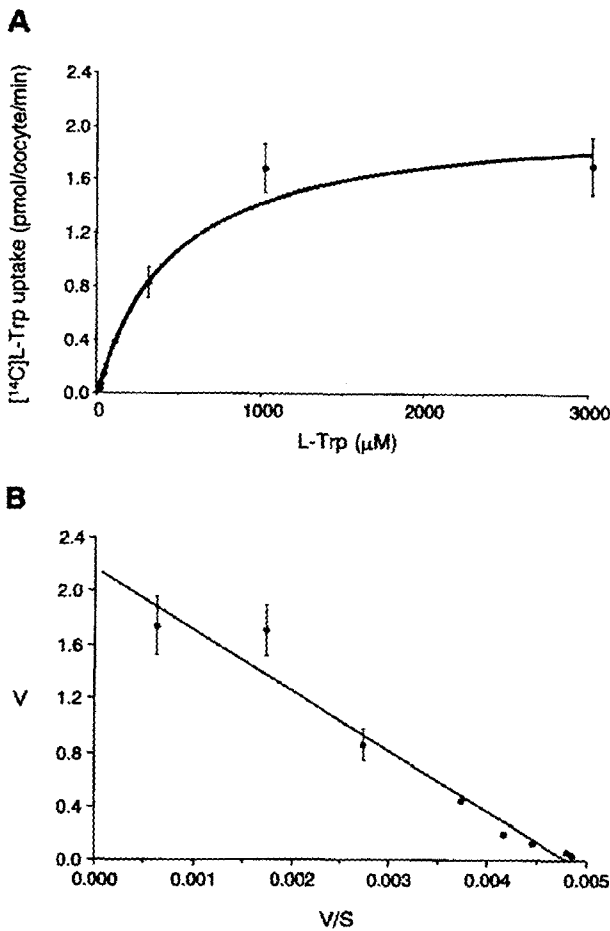


Fig. 6. Concentration dependence of hTAT1-mediated L-[14 C]tryptophan uptake.

(A) The hTAT1-mediated L-[14 C]tryptophan uptake by the oocytes expressing hTAT1 was plotted against L-tryptophan concentration. The L-tryptophan uptake was saturable and fit to the Michaelis-Menten curve. (B) Eadie-Hofstee plot of the L-tryptophan uptake on which kinetic parameters were determined.

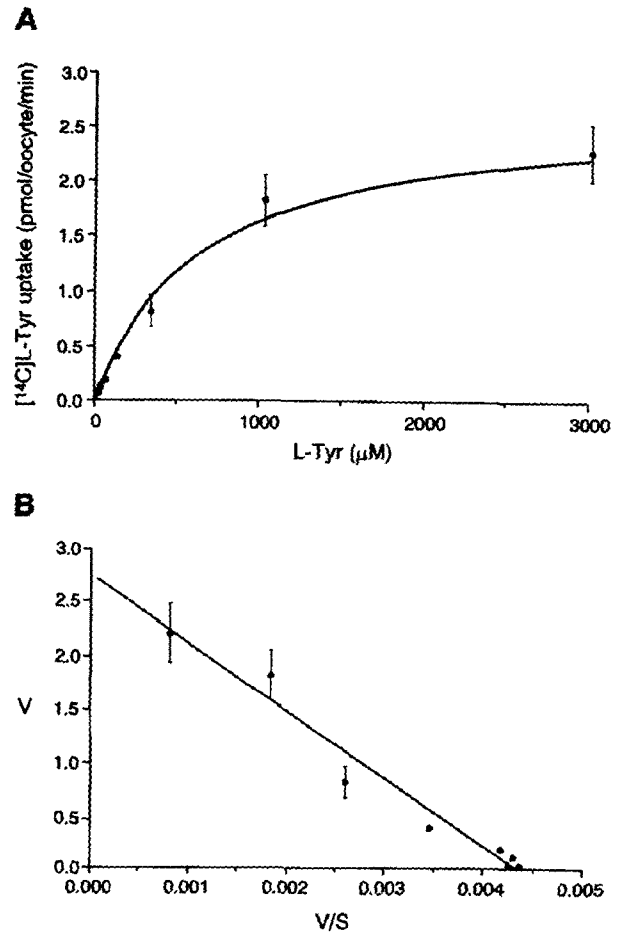


Fig. 7. Concentration dependence of hTAT1-mediated L-[14 C]tyrosine uptake.

(A) The hTAT1-mediated L-[14 C]tyrosine uptake by the oocytes expressing hTAT1 was plotted against L-tyrosine concentration. The L-tyrosine uptake was saturable and fit to the Michaelis-Menten curve. (B) Eadie-Hofstee plot of the L-tyrosine uptake on which kinetic parameters were determined.

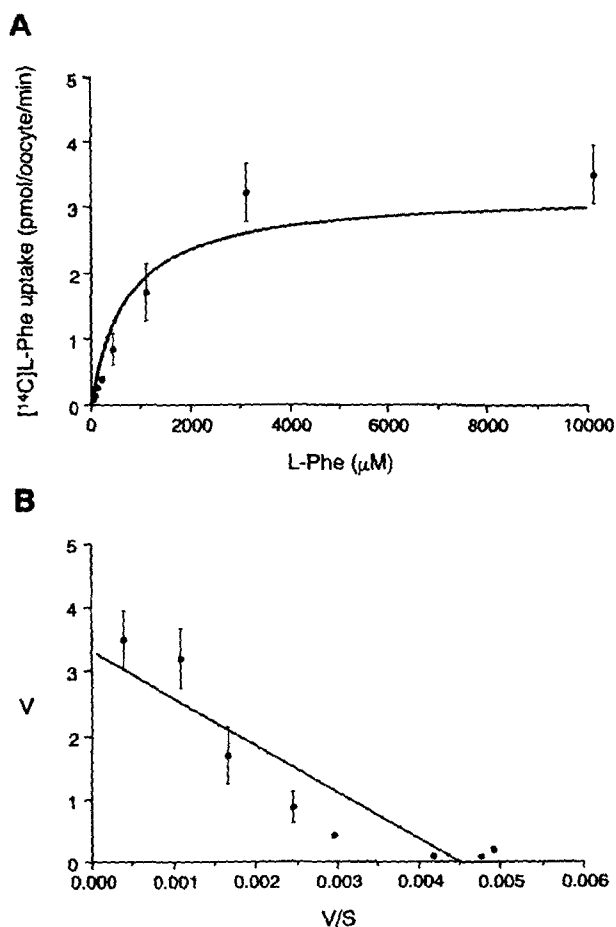


Fig. 8. Concentration dependence of hTAT1-mediated L-[¹⁴C]phenylalanine uptake.

(A) The hTAT1-mediated L-[¹⁴C]phenylalanine uptake by the oocytes expressing hTAT1 was plotted against L-phenylalanine concentration. The L-phenylalanine uptake was saturable and fit to the Michaelis-Menten curve. (B) Eadie-Hofstee plot of the L-phenylalanine uptake on which kinetic parameters were determined.

hTAT1이 exchanger인지 facilitated transporter 인지 확인 하기 위하여 oocyte 내로 미리 주입한 L-[¹⁴C]tryptophan의 efflux를 tryptophan이 들어있는 실험용액과 들어 있지 않은 실험용액 내에서 시간별로 측정하여 보았다. Fig. 10에 나타낸 바와 같이 hTAT1의 cRNA를 미세주입한 oocyte에서 배양시간 의존적인 L-[¹⁴C]tryptophan의 efflux를 볼 수 있었으며, 이 배출은 oocyte 외용액의 tryptophan 존재 유무에는 영향을 받지 않았다. 이와 대조적으로 hTAT1 cRNA를 주입하지 않은 oocyte에서는 [¹⁴C]tryptophan의 efflux가 일어나지 않았다 (Fig. 10).

고 찰

본 연구에서 *Xenopus laevis* oocyte에 발현된 hTAT1은 시간-의존적 (Fig. 2), Na⁺-과 Cl⁻-비의존적 (Fig. 3)으로 방향

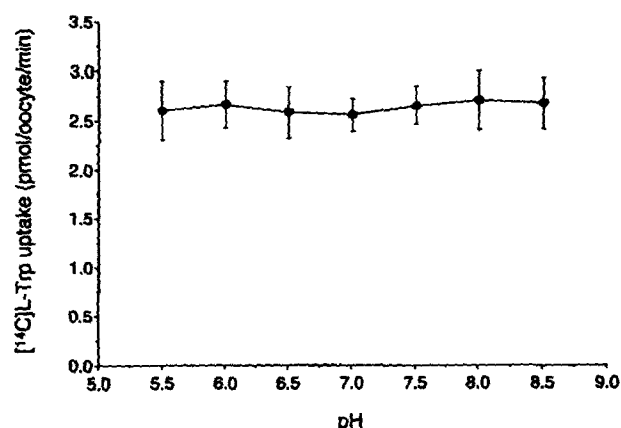


Fig. 9. pH-dependence of hTAT1-mediated transport. hTAT1-mediated L-[¹⁴C]tryptophan uptake (1 mM) was measured in Na⁺-free uptake solution of various pHs.

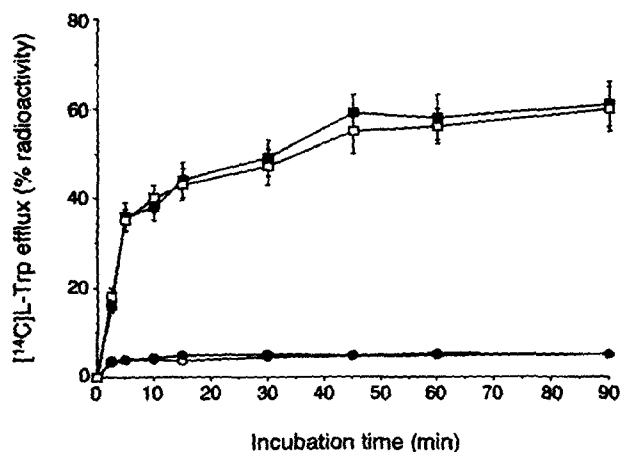


Fig. 10. Efflux of L-[¹⁴C]tryptophan via hTAT1.

The time-course of the levels of efflux of L-[¹⁴C]tryptophan via hTAT1 was determined on the oocytes expressing hTAT1 pre-injected with L-[¹⁴C]tryptophan. The efflux of radioactivity was measured from the oocytes expressing hTAT1 in Na⁺-free uptake solution containing 0 mM (open square) or 1 mM (closed square) of nonlabeled L-tryptophan. The efflux measurements were also performed for control oocytes injected with water instead of hTAT1 cRNA in Na⁺-free uptake solution containing 0 mM (open circle) or 1 mM (closed circle) of nonlabeled L-tryptophan. The values are expressed as a percentage of the total radioactivity loaded into the oocytes.

족 아미노산 tryptophan, phenylalanine 및 tyrosine을 uptake 하였다 (Fig. 5). hTAT1의 기질 특이성 및 이온 의존성에 대한 특성은 고전적인 방법으로 연구되어진 아미노산 수송체 T의 특성 (1,8-11) 및 흰쥐 소장으로부터 동정한 rat TAT1 (rTAT1)의 특성 (6)과 일치하였다. 또한 hTAT1은 rTAT1의 염기 배열을 이용하여 data base search의 방법으로 동정한 클론이며 rTAT1과 그 아미노산 배열이 84% 일치하였다 (7). 따라서 염기 배열의 상동성과 그 기능적 특성을 보아 hTAT1은 아미노산 수송체 T의 새로운 클론이며 rTAT1과는 중만 다른 같은 클론이라 볼 수 있겠다.

hTAT1에 의한 방향족 아미노산 tryptophan, phenylalanine 및 tyrosine의 수송 친화력이 약 450~750 μM (Fig. 6, Fig. 7과 Fig. 8)이었다. 이는 고전적인 방법으로 연구되어진 아미노산 수송계 T의 수송친화력 2~5 mM(8-11)과 rTAT1의 수송친화력 2.5~7 mM(6)보다 약 10 배정도 높음을 알 수 있었으며, 이 차이는 흰쥐와 사람 클론의 종 차이로 사료된다.

최근 많은 아미노산 수송체들이 아미노산 기질들을 상호 교환하는 방식에 의해 아미노산을 uptake하는 exchanger라고 알려져 왔다(2,18-22). 그러나 Fig. 10에 나타낸 바와 같이 *Xenopus laevis* oocyte 내에 미리 주입된 L-[^{14}C]tryptophan의 hTAT1에 의한 efflux가 세포외의 L-tryptophan의 존재 유무에 관계없이 일어났으며, 또 세포외의 L-tryptophan에 의해 미리 oocyte내로 주입된 L-[^{14}C]tryptophan의 efflux가 증가되지 않았다. 이는 지금까지 exchanger로 보고된 아미노산 수송체 LAT1(L-type amino acid transporter 1)(2)과 y⁺LAT1(y⁺L-type amino acid transporter 1)(17)의 수송특성과 전혀 다른 것을 보여 주는 것이며, 또한 흰쥐에서 동정된 rTAT1(6)과 동일하다고 할 수 있다. 따라서 hTAT1에 의한 방향족 아미노산의 수송은 아미노산 기질의 교환이 아닌 facilitated diffusion이라고 사료된다.

아미노산 수송계 T의 존재가 사람의 적혈구 세포에서 처음으로 발표(8)된 이래 많은 연구자들에 의해 태반 및 간 등 여러 조직 및 세포주들에서 수송계 T의 기능적 특성들이 보고되어졌다(23,24). Salter 등(23)은 분리된 쥐의 간세포에서 방향족 아미노산들의 수송을 수송계 T가 대부분 담당하고 있음을 보고하였고, Kudo와 Boyd(24)는 아미노산 수송계 T가 사람 태반의 기저층막에 존재하며 방향족 아미노산을 수송한다고 보고하였다. 수송계 T의 간과 태반에서의 존재 및 기능을 밝힌 이들의 연구는 이 기관들에서 수송계 T가 중요한 역할을 하고 있음을 증명하는 것이다. 그러나 이들의 연구는 분자적인 실체가 전혀 밝혀지지 않았던 때 단지 어떤 수송계의 존재 및 특성만을 밝힌 것으로, 간 및 태반을 이용한 실험의 결과에는 수송계 T만의 기능 외에 내재적으로 존재하는 다른 중성 아미노산 수송계의 기능도 어느 정도 포함되어 있을 가능성이 크다. 그러나 아미노산 수송계 T의 분자적 실체가 최근에 밝혀져 그 기능 및 특성에 관한 정보는 현재 미비한 실정이며, 단일클론의 기능에 대한 연구는 필수적이라고 사료된다.

Kim 등(6)의 이전 연구에서 흰쥐의 소장 상피세포의 기저층막에 TAT1이 존재함을 밝혔다. 또 소장과 신세뇨관 상피세포의 기저층막에는 아미노산 수송계 L 중 LAT2(L-type amino acid transporter 2)가 존재하여 상피세포로부터 혈류로 방향족 아미노산을 포함한 중성 아미노산을 수송하는 기능을 하고 있다(3,4). 또한 TAT1도 기저층막에 존재하는 facilitative transporter로서 상피세포로부터 혈류로 방향족 아미노산을 수송하는 기능을 가지고 있다(6). LAT2가 방향족 아미노산을 포함한 모든 중성 아미노산을 수송하는 넓은 기질 선택성을 가지고 있으므로 그 기질들 사이의 경쟁이 유발되리라 생각된다

다(3,4). 따라서 TAT1은 상피세포로부터 혈류로 방향족 아미노산만을 수송하는데 있어서 효율적인 또 하나의 수송계라고 생각할 수 있다. 따라서 본 연구의 결과로 hTAT1이 방향족 아미노산을 상피세포로부터 혈류로 수송하는 중요한 기능을 하고 있음을 예상할 수 있으며, 이 유전자의 결여는 blue diaper syndrome 같은 생체 내 방향족 아미노산 흡수의 장애로 인해 야기되는 여러 증상의 원인이 될 것으로 사료된다.

요 약

hTAT1에 의해 수송되는 방향족 아미노산들의 수송특성을 밝히기 위해 hTAT1의 cRNA를 미세주입한 *Xenopus laevis* oocyte에서 hTAT1에 의해 유도되는 방향족 아미노산의 uptake를 여러 조건 하에서 관찰하였다. hTAT1은 L-[^{14}C]tryptophan의 uptake를 유도하였으며, 그 uptake는 Na^+ 과 Cl^- 의존적이었다. hTAT1은 L-[^{14}C]tryptophan의 uptake를 시간-의존적으로 유도함을 알 수 있었다. hTAT1에 의한 L-[^{14}C]tryptophan의 uptake는 방향족 아미노산인 phenylalanine, tyrosine 및 tryptophan에 의해서 억제되었으며, hTAT1에 의한 아미노산들의 uptake 실험에서 L-[^{14}C]phenylalanine, L-[^{14}C]tyrosine 및 L-[^{14}C]tryptophan의 수송을 확인하였다. hTAT1에 의한 L-[^{14}C]tryptophan의 uptake는 포화되었으며, K_m 치는 $452.2 \pm 27.8 \mu\text{M}$, V_{max} 값은 $2.1 \pm 0.3 \text{ pmol/oocyte/min}$ 이었다. L-[^{14}C]tyrosine 및 L-[^{14}C]phenylalanine의 K_m 치는 각각 $636.3 \pm 59.4 \mu\text{M}$ 과 $740.5 \pm 96.7 \mu\text{M}$ 이었다. 실험용액의 pH 5.5에서 8.5까지의 변화는 hTAT1에 의한 L-[^{14}C]tryptophan의 uptake에 별다른 영향을 미치지 못하였다. hTAT1의 cRNA를 미세주입한 oocyte에서 배양시간 의존적인 L-[^{14}C]tryptophan의 efflux를 볼 수 있었으며, 이 efflux는 oocyte 외 용액의 tryptophan 존재 유무에는 영향을 받지 않았다. 따라서 본 연구의 결과로 hTAT1이 상피세포로부터 혈류로의 방향족 아미노산의 수송에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2002년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었으며 그 지원에 감사드립니다.

문 헌

- Christensen HN. 1990. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev* 70: 43-77.
- Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, Uchino H, Takeda E, Endou H. 1998. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem* 273: 23629-23632.
- Pineda M, Fernandez E, Torrents D, Estevez R, Lopez C, Camps M, Lloberas J, Zorzano A, Palacin M. 1999. Iden-

- tification of a membrane protein, LAT-2, that co expressed with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small large zwitterionic amino acids. *J Biol Chem* 274: 19738-19744.
4. Segawa H, Fukasawa Y, Miyamoto K, Takeda E, Endou H, Kanai Y. 1999. Identification and functional characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J Biol Chem* 274: 19745-19751.
 5. Verrey F, Jack DL, Paulsen IT, Saier MH Jr, Pfeiffer R. 1999. New glycoprotein-associated amino acid transporters. *J Membrane Biol* 172: 181-192.
 6. Kim DK, Kanai Y, Chairoungdua A, Matsuo H, Cha SH, Endou H. 2001. Expression cloning of a Na⁺-independent aromatic amino acid transporter with structural similarity to H⁺/monocarboxylate transporters. *J Biol Chem* 276: 17221-17228.
 7. Kim DK, Kanai Y, Matsuo H, Kim JY, Chairoungdua A, Kobayashi Y, Enomoto A, Cha SH, Goya T, Endou H. 2002. The human T-type amino acid transporter-1: characterization, gene organization and chromosomal location. *Genomics* 79: 95-103.
 8. Rosenberg R, Young JD, Ellory JC. 1980. L-tryptophan transport in human red blood cells. *Biochim Biophys Acta* 598: 375-384.
 9. Vadgama JV, Christensen HN. 1985. Discrimination of Na⁺-independent transport systems L, T and ASC in erythrocytes. *J Biol Chem* 260: 2912-2921.
 10. Van Winkle LJ, Campione AL, Gorman JM. 1988. Na⁺-independent transport of basic and zwitterionic amino acids in mouse blastocysts by a shared system and by processes which distinguish between these substrates. *J Biol Chem* 263: 3150-3163.
 11. Van Winkle LJ, Mann DF, Campione AL, Farrington BH. 1990. Transport of benzenoid amino acids by system T and four broad scope systems in preimplantation mouse conceptuses. *Biochim Biophys Acta* 1027: 268-277.
 12. Baron DN, Dent CE, Harris H, Hart EW, Joseph JB. 1956. Hereditary pellagra-like skin rash with temporary cerebellar ataxia, constant aminoaciduria, and other bizarre biochemical features. *Lancet* 2: 421-428.
 13. Drummond KN, Michael AF, Ulstrom RA, Good RA. 1964. The blue diaper syndrome: Familial hypercalcaemia with nephrocalcinosis and indicanuria. *Am J Med* 37: 928-948.
 14. Kanai Y, Stelzner M, Nussberger S, Khawaja S, Hebert SC, Smith CP, Hediger MA. 1994. The neuronal and epithelial human high affinity glutamate transporter: insight into structure and mechanisms of transport. *J Biol Chem* 269: 20599-20606.
 15. Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y. 1996. Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na⁺-dependent neutral amino acid transporter. *J Biol Chem* 271: 14883-14890.
 16. Fukasawa Y, Segawa H, Kim JY, Chairoungdua A, Kim DK, Matsuo H, Cha SH, Endou H, Kanai Y. 2000. Identification and characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter that associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids. *J Biol Chem* 275: 9690-9698.
 17. Kanai Y, Fukasawa Y, Cha SH, Segawa H, Chairoungdua A, Kim DK, Matsuo H, Kim JY, Miyamoto K, Takeda E, Endou H. 2000. Transport properties of a system y^L neutral and basic amino acid transporter. Insights into the mechanisms of substrate recognition. *J Biol Chem* 275: 20787-20793.
 18. Hediger MA, Mendlein J, Lee H-S, Wright EM. 1991. Biosynthesis of the cloned intestinal Na⁺/glucose cotransporter. *Biochim Biophys Acta* 1064: 360-364.
 19. You G, Smith CP, Kanai Y, Lee WS, Stelzner M, Hediger MA. 1993. Cloning and characterization of the vasopressin-regulated urea transporter. *Nature* 365: 844-847.
 20. Fei YJ, Kanai Y, Nussberger S, Ganapathy V, Leibach FH, Romero MF, Singh SK, Boron WF, Hediger MA. 1994. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature* 368: 563-566.
 21. Kanai Y, Nussberger S, Romero MF, Boron WF, Hebert SC, Hediger MA. 1995. Electrogenic properties of the epithelial and neuronal high affinity glutamate transporter. *J Biol Chem* 270: 16561-16568.
 22. Rossier G, Meier C, Bauch C, Summa V, Sordat B, Verrey F, Kuhn LC. 1999. LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J Biol Chem* 274: 34948-34954.
 23. Salter M, Knowles RG, Pogson CI. 1986. Transport of the aromatic amino acids into isolated rat liver cells. Properties of uptake by two distinct systems. *Biochem J* 233: 499-506.
 24. Kudo Y, Boyd CA. 1990. Human placental L-tyrosine transport: a comparison of brush-border and basal membrane vesicles. *J Physiol* 426: 381-395.

(2002년 6월 26일 접수; 2002년 10월 9일 채택)