

新 制
薬
174

腎局在性有機アニオントランスポータOAT-K1  
及びOAT-K2の構造・機能に関する研究

1998

増 田 智 先

腎局在性有機アニオントランスポータOAT-K1  
及びOAT-K2の構造・機能に関する研究

1998

増 田 智 先

# 目次

総論の部	
緒言 .....	1
第I章 ラット腎局在性有機アニオントランスポータOAT-K1のcDNAクローニング と構造・組織分布・細胞膜発現 .....	4
第1節 OAT-K1 cDNAのクローニング・構造 .....	5
第2節 OAT-K1 mRNAの組織・尿細管分布 .....	8
第3節 OAT-K1 タンパクの組織分布及び膜局在 .....	10
考 察 .....	13
第II章 OAT-K1の機能 .....	15
第1節 卵母細胞発現系を用いた機能解析 .....	17
第2節 OAT-K1 安定発現系による細胞膜発現と機能解析 .....	17
第3節 薬物相互作用に対する腎OAT-K1の関与 .....	26
第4節 OAT-K1 による薬物排出機能 .....	34
考 察 .....	36
第III章 広範な基質認識を示す腎局在性有機アニオントランスポータOAT-K2の cDNAクローニングと構造・組織分布及び機能解析 .....	42
第1節 OAT-K2 cDNAのクローニング・構造 .....	43
第2節 OAT-K2 mRNAの組織分布 .....	45
第3節 卵母細胞発現系を用いた機能解析 .....	46
第4節 OAT-K2 安定発現系を用いた機能解析 .....	47
考 察 .....	54
結論 .....	59
実験の部 .....	62
第1章 実験の部 .....	63
第2章 実験の部 .....	68
第3章 実験の部 .....	72
謝辞 .....	74
論文目録 .....	75
引用文献 .....	76

# 総論の部

## 緒言

腎臓は構造・機能の最小単位ネフロンと血管系より構成され、ネフロンは糸球体とそれに続く尿細管からなっている(1, 2)。特に尿細管上皮細胞は、形態的、機能的に非対称性(極性)を有しており、管腔側の刷子縁膜 (brush-border membrane) と、血管側の側底膜 (basolateral membrane) において、再吸収及び分泌といった方向選択的な物質輸送(経細胞輸送)を営んでいる(3) (Fig. 1.)。即ち糸球体濾液である原尿は、尿細管の各分節に特異的に発現している孔(チャンネル)並びに輸送体(トランスポータ)を介した糖質やアミノ酸など生体必須物質の再吸収、及び不要代謝物または老廃物などの分泌といった諸過程を経て、最終尿となり体外へ排泄される。従って生体に投与された薬物の腎挙動は、このような三つの過程(糸球体濾過、再吸収、尿細管分泌)の総和としてあらわれてくる。中でも尿細管分泌は、薬物の体内動態を支配する能動的な経上皮輸送過程であり、医薬品の有効性及び安全性に密接に関わる異物処理機構の一つとして位置付けられている。

イオン性薬物の尿細管分泌は、側底膜を介した血中から細胞内への取り込み、刷子縁膜を介する細胞内から管腔中への排出という二つの膜輸送過程を必要とする。一連の膜輸送過程は、両細胞膜に局在する特殊輸送系によって媒介されており、極めて効率の良い薬物

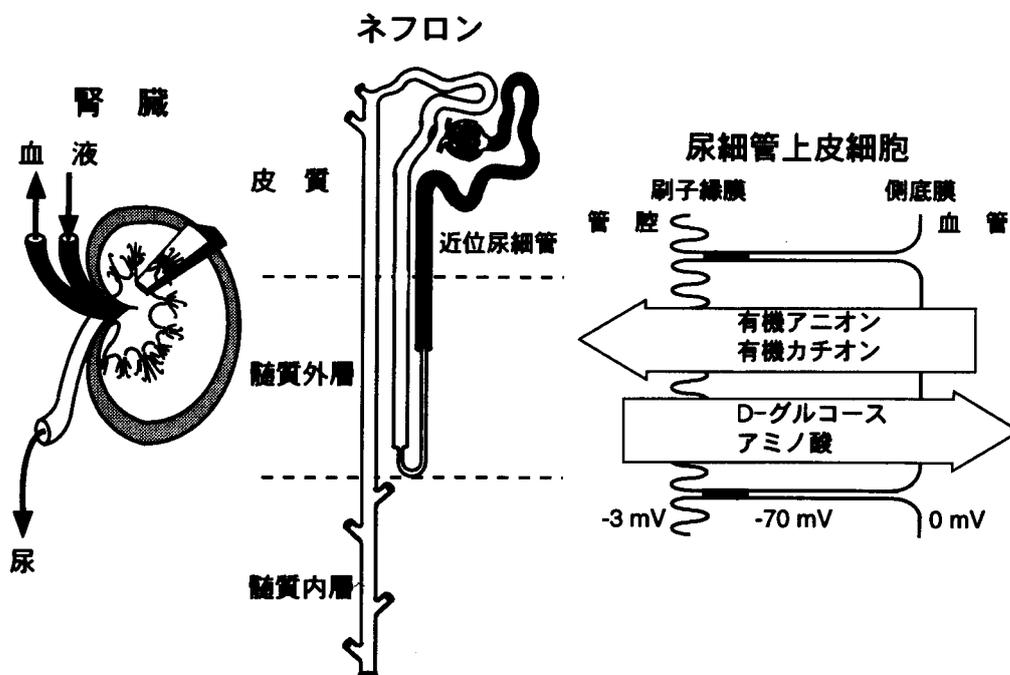


Fig. 1.

最終処理システムとして機能している。これらの輸送系は、主として基質の荷電状態を識別していることから、有機アニオン輸送系または有機カチオン輸送系に大別される(4)。これまで尿細管における薬物輸送研究は、腎クリアランス法、摘出腎灌流法、単離尿細管灌流法、腎皮質切片取り込み実験法を駆使し進められてきた。近年、膜小胞分離技術の確立及び輸送系を保持した株化上皮細胞の発見等によって、側底膜と刷子縁膜に局在する両輸送系の駆動力、エネルギー共役機構、基質認識特性の解析が飛躍的に進展し多くの基礎的情報が蓄積されつつある(5)。一方、これら両細胞膜に展開する薬物の経細胞輸送ネットワークを総合的に理解し、解明するためには単一分子レベルでのトランスポータ個々の活動を詳細に解析し、既に単離されている種々チャンネル及びトランスポータの機能情報を加味した巨視的な薬物の腎挙動を明確にする必要があると考えられる。

近年、ラット肝類洞側膜に発現するNa<sup>+</sup>非依存性有機アニオントランスポータoatp1のcDNAがクローニングされ、肝指向型アニオン性薬物の細胞内取り込みに寄与すること、その類縁遺伝子が腎にも発現していることが報告された(6)。そこで著者は、腎指向型アニオン性薬物の尿中排泄挙動を分子的に解明することを目的として、腎特異的な有機アニオントランスポータをコードするcDNAのクローニングを試みた。先ずoatp1のアミノ酸配列を参考に、PCR法を応用してラット腎cDNAライブラリーから2種の新規cDNAを単離した。得られたcDNAを用いて構造・機能特性について解析を行った結果、何れも腎のみに発現すること、一部のアニオン性薬物を認識するトランスポータであることが分かった。従って、これら2種のcDNAにコードされるタンパクをKidney Specific Organic Anion Transporter (OAT-K1、OAT-K2)と命名し、構造・組織分布及び機能特性について系統的な解析を行った。

以下、得られた結果を三章にわたり論述する。

なお本文中あるいは図表中で使用した略号は以下のとおりである。

AQP2:	aquaporin 2	MRP:	multidrug resistance related protein
BBM:	brush-border membrane	cMOAT (cMRP):	liver canalicular multispecific organic anion transporter
BLM:	basolateral membrane	MTX:	methotrexate
bp:	base pair(s)	NSAID:	nonsteroidal antiinflammatory drug
BSA:	bovine serum albumin	Ntcp:	rat sodium bile acid cotransporting polypeptide
BSP:	sulfobromophthalein	OAT-K1:	rat kidney specific organic anion transporter 1
DIDS:	4,4'-diisothiocyano-2,2'-disulfonilstilbene	OAT-K2:	rat kidney specific organic anion transporter 2
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle's medium	oatp1:	rat liver organic anion transporting polypeptide 1
DMSO:	dimethyl sulfoxide	oatp2:	rat brain organic anion transporting polypeptide 2
DTT:	dithiothreitol	OATP:	human liver organic anion transporting polypeptide
EDTA:	ethylenediaminetetraacetic acid	PAGE:	polyacrylamide gel electrophoresis
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay	PAH:	<i>p</i> -aminohippurate
FBP:	folate binding protein	PBS:	phosphate-buffered saline
FBS:	fetal bovine serum	PCR:	polymerase chain reaction
GAPDH:	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	PGE <sub>2</sub> :	prostaglandin E <sub>2</sub>
GLUT:	facilitative glucose transporter	PGT:	prostaglandin transporter
HEPES:	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid	PMSF:	phenylmethylsulfonyl fluoride
hFOLT:	human placental folate transporter	PVDF:	polyvinylidene difluoride
hIFC-1:	human intestinal folate carrier	RT:	reverse transcription
hMtxT:	human methotrexate transporter	SDS:	sodium dodecyl sulfate
IFC-1:	mouse intestinal folate carrier	TBS:	Tris-buffered saline
IgG:	$\gamma$ immunoglobulin	TCA:	taurocholate
kb:	kilobase	Tris:	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
LLC-OAT-K1:	LLC-PK1 cells stably transfected OAT-K1	VRC:	vanadyl ribonucleotide complex
LTC <sub>4</sub> :	leukotriene C <sub>4</sub>		
MBS:	modified Barth's solution		
MDCK-OAT-K1:	MDCK cells stably transfected OAT-K1		
MDCK-OAT-K2:	MDCK cells stably transfected OAT-K2		

## 第I章 ラット腎局在性有機アニオントランスポータOAT-K1のcDNAクローニングと構造・組織分布・膜局在

疾病の診断、治療、予防という今日の医療の中で、薬物療法の重要性は極めて高い。近年、強い薬理作用を持つ薬物が次々と開発され、優れた治療成績を残しているが、こうした薬物の中には使用方法を誤れば重篤な副作用を惹起するものも少なくない。薬物の体内動態を詳細に理解し、制御することは臨床におけるヒトでの薬理効果発現、副作用の回避並びに体内からの消失といった薬物治療諸過程の根幹を握ることであり、薬物の有効利用だけでなく新薬開発における構造的デザインの選択に重要な情報を与えるものと考えられる。

1923年、MarshallとVickers (7)は、糸球体濾過が起らない条件下で腎皮質尿細管が*in vivo*投与したフェノールレッドによって染色されることを見出し、尿細管における有機アニオン輸送機構の存在を初めて報告した。アニオン性の内因性物質及び薬物の腎挙動は今まで多様な実験手法を用いて解析がなされてきたが、薬物そのものを認識し、糸球体濾液中から血管への再吸収及び血中から尿中への分泌といった尿細管上皮細胞を介して営まれている、方向選択的な経細胞輸送を媒介するトランスポータ自身を単一分子レベルで把握・解析した情報は皆無に等しい。

1994年、Jaqueminら(6)によってラット肝臓の類洞側膜に存在するNa<sup>+</sup>非依存性有機アニオントランスポータ (organic anion transporting polypeptide: oatp1) のcDNAがクローニングされ、アニオン性の薬物並びに胆汁酸の肝胆系移行に関わることが示唆されている。そこで本章では、腎指向型アニオン性薬物を輸送基質とするトランスポータのcDNAクローニングを試みた。先ずoatp1の類縁遺伝子が腎臓にも発現していることに着目し、PCR法を応用して腎尿細管のみに発現する有機アニオントランスポータ関連cDNAのクローニングに成功した。得られたcDNAの翻訳領域には、oatp1とは異なるアミノ酸配列がコードされており、Kidney Specific Organic Anion Transporter (OAT-K1) と命名した。さらに、OAT-K1 mRNAのラット各組織及び尿細管各分節にわたる分布と、OAT-K1に対する特異抗体を用いたタンパクレベルでの膜局在について検討を加えた。

## 第1節 OAT-K1 cDNAのクローニング・構造

既に単離されている肝有機アニオントランスポータ、*oatp1*のアミノ酸配列を参考にして、2種類のオリゴヌクレオチドを合成し、ラット腎皮質由来poly(A)<sup>+</sup>RNAの逆転写により得られたfirst-stranded cDNAを鋳型として、PCR法による部分cDNAの増幅を行った。センス・プライマー、OATKS (5'-CCGAATTCTG(T/C)GC(A/C/T)TG(T/C)(T/C)T(A/G/T)AC-(A/C/T)AA-3') はOAT-K1アミノ酸配列のN末端から28 - 33番目に、アンチセンス・プライマー、OATKA (5'-CCGGATCCCCAT(A/G)AA(A/G)AA(A/G)TG(A/G/T)GG-3') はOAT-K1の106 - 111番目、即ち疎水性プロットより推測されるOAT-K1タンパクの膜貫通部位1 - 3番目に相当する部分に対応している。PCRによって得られたDNA断片のうち、塩基配列が*oatp1*と相同性を示すものを用い、ランダムプライム法によって<sup>32</sup>P]-dCTPで標識したものをプローブとして、ラット腎cDNAライブラリーをスクリーニングした。先ず、 $\lambda$ gt22Aベクターに導入した組み替えファージから*oatp1*とは異なる陽性クローン ( $\lambda$ OAT-K1) を単離した。これよりDNAを抽出した後、cDNAをプラスミドベクター pSPORT1にサブクローニングし、合成プライマーを用いてジデオキシ法により塩基配列を解析した。その結果、単離に成功した完全長OAT-K1 cDNAは*oatp1*とは異なること、遺伝子データベースを検索した結果OAT-K1は新規のcDNAであることが分かった。

Fig.I-1. に単離したOAT-K1 cDNAの塩基配列と、推定されるOAT-K1タンパクの一次構造を示す。OAT-K1 cDNAは、2,007塩基からなる翻訳領域と、5'側と3'側のそれぞれ158塩基、623塩基の非翻訳領域からなり、全長2,788塩基対から構成されることが分かった。また、3'側非翻訳領域最下流にはpoly Aが見出された。

cDNAの塩基配列から推定されるOAT-K1タンパクはアミノ酸669個からなり、その分子量は73,881であった。OAT-K1の一次構造上特徴的なコンセンサス配列が存在するか検索したところ、cAMP依存性リン酸化部位が、383、644番目のスレオニン残基と648番目のセリン残基に3ヶ所、プロテインキナーゼCによるリン酸化部位が、290、383、644番目のスレオニン残基に3ヶ所存在した(8) (Fig. I-2A.)。また、N-グリコシレーション部位が4ヶ所存在していた。またOAT-K1タンパクは、肝*oatp1*と72%、近年プロスタグランジントランスポータとして再認識された膜タンパクmatrinF/Gと35%の相同性を有しており(9, 10)、疎水性プロット (Fig. I-2B.) より推定される疎水性の強い $\alpha$ -ヘリックス領域が12本存在

することから、OAT-K1は12回膜貫通型の糖タンパクであることが推察された。

```

-158                               CCACGCGTCCGCGGAGGTCGAGGCCGTCGCGTCCGCTGA
-120 GTTGTCCTGAAGCTCGGGTTAAGAGGGCTGTAAGAGCTGTTGGTAGTCATCCAAGTAG
-60  GCTGGTGGTTAGCAGTGGAAATTTAAAGTAGAGACATCATTAAAGAGTCAGAAGATCAAC
   1  ATGGGAGACCTTGAAGGGGGCTGCAACCCATGGGGCCGGATGCTTTGCCAAGATCAAG
   61  M G D L E K G A A T H G A G C F A K I K
  121  GTGTTTCTGATGGCATTAAATGTCATATGTATCCAAATCGCTATCAGGAACTTTTCATG
  21  V F L M A L T C A Y V S K S L S G T F M
  41  AGTTCCATGCTCACACAATAGAGAGACAATTCGGTATCCCCACAGCTATAGTTGGATTC
  181  S S M L T Q I E R Q F G I P T A I V G F
  61  ATCAATGGGAGCTTTGAGATAGGAAATCTTTTGTGATTATATTTGTGAGTATTTTGGGA
  241  I N G S F E I G N L L L I I F V S Y F G
  81  ATGAAACTGCACAGACTATCGTGATGGTGTGGATGTGCAGTTATGGGCCCTGGGTTGC
  301  M K L H R P I V I G V G C A V M G L G C
  101  TTCATAATATCACTACCTCATTCCICATGGGCCGATATGAATATGAAACAACGATTTTA
  361  F I T S L P H F L M G R Y E Y E T T I L
  121  CCTACAAGCACTTGTCTCAAACAGCTTCTTGTGTATGGAGAACCACCAAGCAGCCTTA
  421  P T S N L S S N S F L C M E N Q T Q T L
  141  AATCCAGCGCAAGCCAGCAGAGTGTGAAAGAAGTGAATCCTAATGATATAT
  481  N P A Q D P A E C V K E V K S L M W I Y
  161  GTACTGGTAGGAAATATATACGTGGAAATGGTGAACCTCCCATCATGCCCTGGGTGTT
  541  V L V G N I I R G I G E T P I M P L G G
  181  TCCTACATAGAAAATTTGCCAAATCTGAAAACCTCCTTTATACATTTGGAAATTTAGAA
  601  S Y I E N F A K S E N S P L Y I G I L F
  201  ACAGGAAAGATGATTGGCCCAATATTTGGGCTTTTGTGGATCCTTGTGCAAGCATT
  661  T G T A G A C A C A G G G T C T G A A T A C A G A T G A C C T A C C A C A T A T A C G C
  221  Y V D T G S V N T D D L T I T P T D I R
  721  TGGGTTGGTGGCTTGGTGGATCGGCTTTTGGTCTGTGCAGGAGTGAATATCCTGATTAGC
  241  W V G A W W I G F L V C A G V N I L I S
  781  ATTCCCTTTTCTTTTCCCAAACACTCCCAAAGGAAGGATTACAGGAAAATGTGGAT
  261  I P F F F F P K T L P K E G L Q E N V D
  841  GAACTGAAAATGCCAAGAGGAGACACAGAGAAAAGGCCAAGGAAGAAAACCCAGGGA
  281  G T E N A K E E S T E K R P R K K N R G
  901  ATCACTAAAGATTTCTTCCGTTCCGTAAGAGCCCTGTCCGCAACCCGATTTACATGCT
  301  I T K D F F P F L K S P V L Q P D L H A
  961  GTTCACCCCTTAAAGTGCTCCAGGTCATGCAATTAACATTTACTTTAGCTTCCCTGCCT
  321  V H P Y K V L Q V N A F N I Y F S L S E
  1021  AAGTACCTTGAACAATATGAAAATCCACTGCAGAGGTCATCTCCCTCATGGGTGTT
  341  K Y L E N Q Y G K S T A E V I F L H F
  1081  TATAACTACCTGCAATATGCAATGATATTAATGCTGGCTTCATGATGAAGAAATTC
  361  Y N L P A I C I G Y L I A G F M M K K F
  1141  AAGTCACTGTCAAGACGCTGCATTCCTCCGATTCGCTATCCTTGTCTGAATATAGT
  381  K I T V K T A A F L R F C L S L S E Y S
  1201  TTTGGTTTCTGTAACCTCCTAATTACCTGTGATAATGTCCCAGTTGCTGGTTGACTAAC
  401  F G F C N F L I P C D N V P V A G L T V
  1261  TCTTATGAAAGAGATCAGAAACCTCTATCTTGGAAAATAATGTTCTTGTGACTGCAAC
  421  S Y E R D Q K P L Y L E N N V L A D C N
  1321  CAAGGTGCAGCTGCTGACGAAAACATGGGATCCAGTGTGGAGACAATGGCCATAGCA
  441  T R C S C L T K T W D P V C G D N G L A
  1381  TACATGTCAGCTGCTCGCAGGCTGCGAGAAGTCTGTTGGAACCTGGAACCAAGATGGTG
  461  Y M S A C L A G C E K S V G T G T N M V
  1441  TTTACAATTGCAGCTGCATTCAGTCAACAGGAACTCGTCCGAGCTGGGCTGTGT
  481  F H N C S C I Q S P G N S S A V L G L C
  1501  AATAAAGGCCCGAGTGCACCAACAAGCTGCAGTACCTTTTAATACTATCAGGATTTCTC
  501  N K G P E C T N K L Q Y L L I L S G F L
  1561  AGTATCCTCTACTATTCGACGCCATACCTGGATACATGGTTTTTCTGAGGTGATCAAG
  521  S I L Y S F A A I P G Y M V F L R C I K
  1621  TCTGAAGAGAAGTCACTTGGGATTGGAATACATGATTTTGCATAAGAGTATTTGCTGGC
  541  S E E K S L G I G I H A F C I R V F A G
  1681  ATTCCAGCACCTATTTACTTTGGAGCTTTGATAGACAGAACCTGTTTACACTGGGAACT
  561  I P A P I Y F G A L I D R T C L H W G T
  1741  CAGAAATGTGGTGCGCCAGGCGCAGGATGTATGATATAAATAGCTTCAGGCGCATTTAC
  581  Q K C G A P G R R M Y D I N S F R R I V
  1801  CTGGGATGTCTGAGCTCTAAGAGGATCAAGCTATCTCCCTGCATTGTTATTGTAATA
  601  L G M S A A L R G S S Y L P A F V I V I
  1861  CTTACAAGGAGTTCCTCTCTCTGGGAAATCAACTCTCAGAAATGGAAATGTCAGAG
  621  L T R K F S L P G K I N S S E M E I A E
  1921  ATGAAGCTCAGAGAGAAGGAAAGCCAGTGCACAGATGTGCACAGAAATCCTAAGTTCAAG
  641  M K L T E K E S Q C T D V H R N P K F K
  1981  AATGATGGAGAAGTGAACCAAGCTGTAATGACTTTTCTACTGCTTGTGTAAGGCCAT
  661  N D G E L K T K L
  2041  GAACAGAATGCTAGAATTCAAAACACTTCACTTTTGAATCATGAGATAAACAACAGGAAT
  2101  GCTTAACTTTAAGAACCTCAACAATTAGTTTACACTCATGATAAAGTAGCATTTTTCAAT
  2161  GAGGCTGGTGTAGGACTTAAGTTTCCAGGATAGATTCTATAGAGACCCCCACATGT
  2221  AACATTAAGCTTCCCTTCAATGATCAAGGAAAGTATGATTTTCAAGATATCTCAAGT
  2281  AGCTTAAAGCCTAGTCTTAAACACTATTTCACTCTGTGAACTTATGTTTCGATGTGG
  2341  GGGGATTTAGAGAGACAAATATGCATTGTGGCTGTGCTCAGAAAAAATAAATAAATCT
  2401  ATTTCTTATGCACAAGCTGTCTGCATACGTTTATATCTAGAGTTATTAACCTTATT
  2461  TTTTATTTAGTCATGATGCTTCCGAGATAGACTTCTCTCATGTGCCATCTCTGTT
  2521  TTTAGTCCATTTTCTTACTTATGTACACATTTGATCATTTATCTTACAGTACTGAC
  2581  AAACCTGATCACATTATTAATAAATTCACATTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Fig. I-1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of rat OAT-K1. Nucleotides are numbered starting at the first residue of ATG initiation codon.

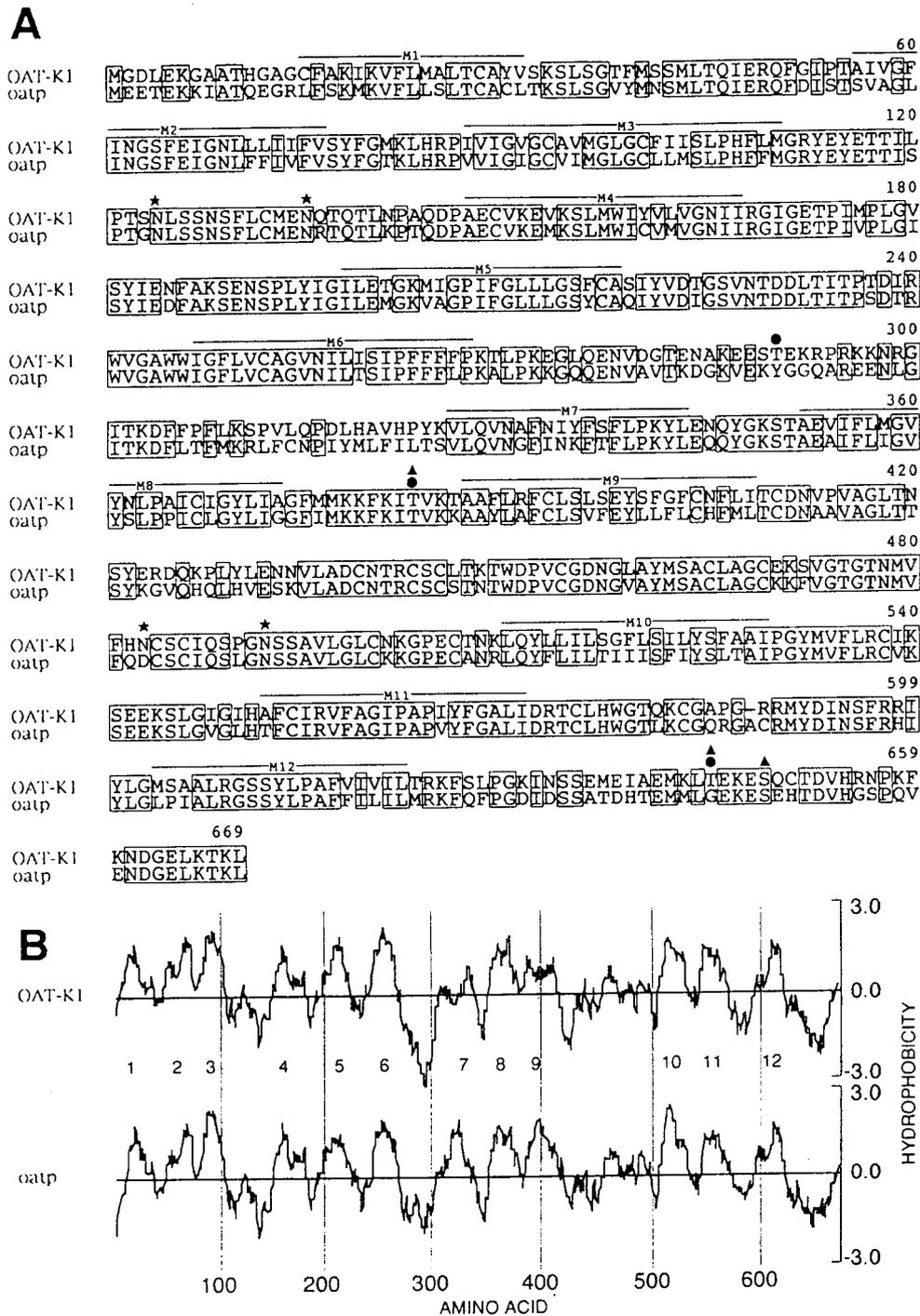


Fig. I-2. Comparison of the deduced amino acid sequences (A) and hydropathy plots (B) between rat OAT-K1 and rat oatp1. A. Conserved residues between two transporters are boxed. Putative membrane-spanning domains are lined over the sequence with number (M1 - M12), and potential *N*-linked glycosylation sites are indicated by asterisks. Potential protein kinase A phosphorylation sites (▲) and protein kinase C phosphorylation sites (●) are indicated. B, Kyte and Doolittle (11) hydropathy plots with a window of 13 amino acid residues. Numbers between plots indicate putative membrane-spanning regions.

## 第2節 OAT-K1 mRNAの組織・尿細管分布

ラットOAT-K1 mRNAの組織分布について、ノザンブロット法及びRT-PCR法により解析した。ラット各組織のpoly(A)<sup>+</sup>RNA 2.5 µgをホルムアミド含有変性アガロースゲルにより分離後、これをナイロンメンブランにトランスファーし、第1節で得られたOAT-K1 cDNAをランダムプライム法によって<sup>32</sup>P]-dCTPで標識したものをプローブとしてハイブリダイズするRNAを解析したところ、何れの条件下においても腎髄質及び皮質に約2.8kbの強いバンドが検出され、肝臓でも約4kbのバンドが認められた (Fig. I-3A.)。一方、oatp1またはOAT-K1に特異的なオリゴヌクレオチド・プライマーを作成し、ラット各組織のpoly(A)<sup>+</sup>RNA 1µgを逆転写することにより得られたfirst-stranded DNAを鋳型としてPCRを

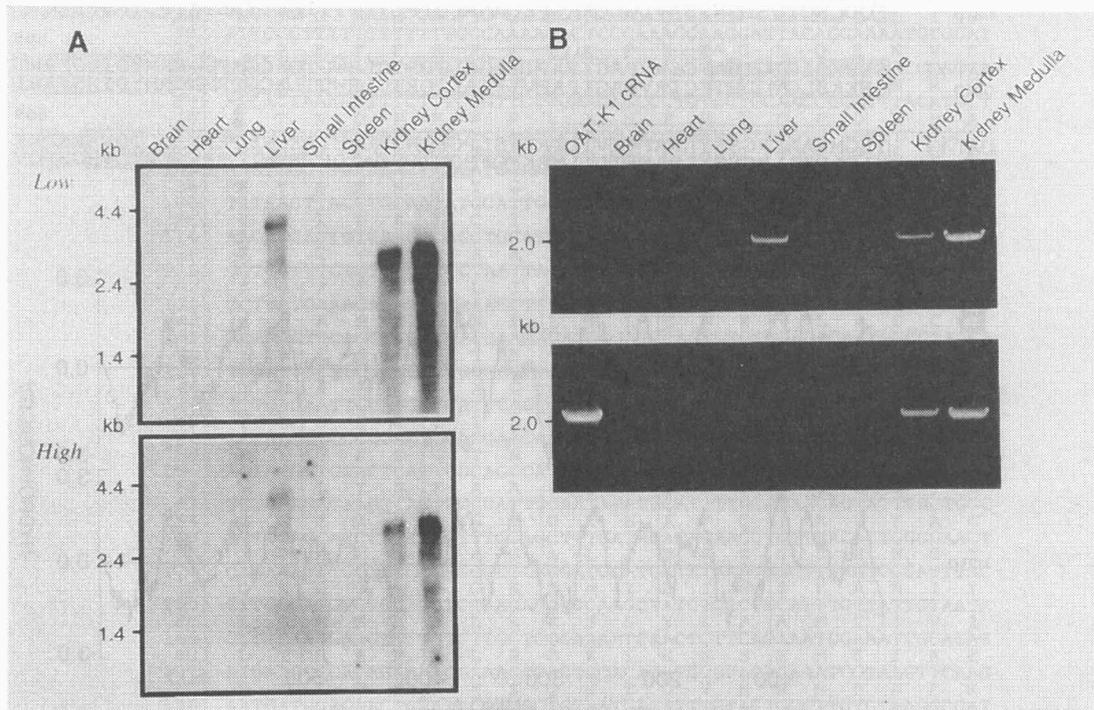


Fig. I-3. Northern blot analysis (A) and detection by PCR amplification (B) of OAT-K1 mRNA in rat tissues. A, poly(A)<sup>+</sup>RNA (2.5 µg) from the indicated tissues was electrophoresed, blotted and hybridized with the whole OAT-K1 cDNA as a probe at low stringency (upper) and high stringency (lower). B, poly(A)<sup>+</sup>RNA (1 µg) from the indicated tissues and of OAT-K1 cRNA (50 ng) were reverse transcribed, and the cDNA synthesized was amplified using a set of primers specific for the rat oatp (upper) or for the rat OAT-K1 (lower). The PCR products were separated by electrophoresis through 1% agarose gels and stained with ethidium bromide.

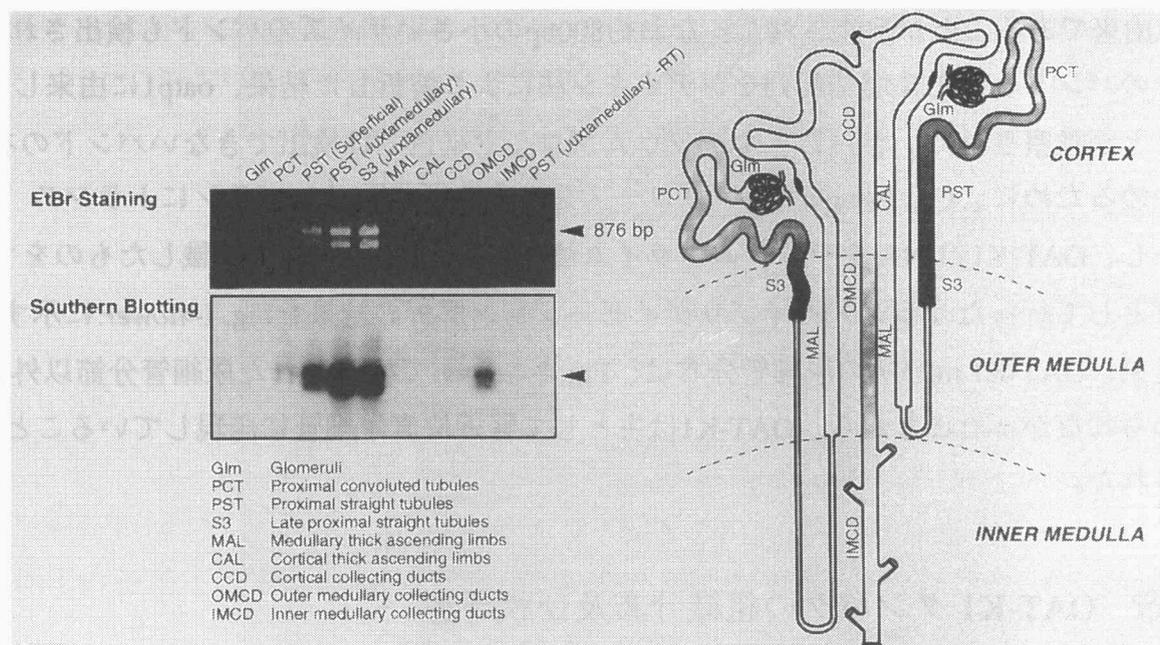


Fig. I-4. Detection of OAT-K1 mRNA in microdissected renal nephron segments by RT-PCR by agarose gels (*upper*) and autoradiograms of corresponding Southern blots (*lower*). Each PCR amplification (30 cycles) was performed using either 5 glomeruli or 2-mm length of renal tubule. *Upper*, after microdissection, 5 glomeruli or 2 mm of each dissected tubule segment were reverse-transcribed, and the cDNA synthesized was amplified using a set of primers for OAT-K1. The PCR products were separated by electrophoresis through 2% agarose gels and stained with ethidium bromide. *Lower*, the agarose gels were transferred onto a nylon membrane and hybridized with the [<sup>32</sup>P]dCTP-labeled rat OAT-K1 cDNA as a probe at high stringency.

行った結果、*oatp1*は肝臓及び腎臓に発現していること、OAT-K1は肝臓や他の臓器では検出されず腎特異的に発現していることが示唆された (Fig. I-3B.)。

OAT-K1 mRNAが腎特異的に発現していることが示唆されたため、次に、OAT-K1 mRNAの腎内分布について着目した (Fig. I-4.)。ラット左腎を脱血、コラゲナーゼ灌流して調製した腎切片より、マイクロダイセクション法(12)によって糸球体は5個、その他の尿細管については2 mmを単離した。単離尿細管各分節をトリトン可溶化後、逆転写することにより得られたfirst-stranded cDNAを鋳型として、OAT-K1に特異的なオリゴヌクレオチド・プライマーを用いたPCRを行った結果、OAT-K1 mRNA由来と考えられる876bpのバンドは近位直尿細管、及び近位直尿細管終末部 (S3) で最も強く検出された (Fig. I-4*upper*.)。また近位曲尿細管、髄質外層集合管にも検出された。さらに、逆転写酵素を含まない条件で増幅した結果シグナルが得られなかったことからこれら検出されたバンドは

mRNA由来であることが示唆された。なお約800bpの小さいサイズのコンドも検出されたが、そのコンドを抽出後塩基配列をジデオキシ法により解析した結果、*oatp1*に由来していることが推察された。さらに、エチジウムプロミド染色では検出できないコンドの有無を確かめるために、Fig. I-4upper.のアガロースゲルをナイロンメンブランにトランスファーし、OAT-K1 cDNA をランダムプライム法によって $[^{32}\text{P}]$ -dCTPで標識したものをプローブとして行ったサザン・ハイブリダイゼーション解析の結果をFig. I-4lower.に示す。この結果、OAT-K1 mRNAの尿細管分布は、Fig. I-4upper.で検出された尿細管分節以外には認められなかったことから、OAT-K1は主として腎近位直尿細管に発現していることが示唆された。

### 第3節 OAT-K1 タンパクの組織分布及び膜局在

第1節においてOAT-K1 cDNAから予想される翻訳OAT-K1の分子量は約74 kDaであること、第2節においてOAT-K1の発現組織分布は腎のみであることが示唆されたことから、タンパクレベルにおけるOAT-K1の組織分布について検討した。

ラットOAT-K1のcDNAより推定したアミノ配列から予想されるC末端側で、ラット*oatp1*とは異なる部分ペプチド (Thr651 - Leu665) を合成した。その合成ペプチドに対するウサギ抗血清を作製し、Sabolic (13) らの方法に従って精製したものを以降の解析に用いた。ラット各組織の粗ホモジネートを、最終的に10万g遠心によって分離し、その沈殿画分を粗細胞膜画分として調製した。それぞれの膜画分それぞれ50  $\mu\text{g}$ を還元条件下でSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) 後、ポリフッ化ビニリドン (PVDF) 膜にウエスタンプロットしたところ、腎のみに抗OAT-K1抗体に反応する約40 kDaのコンドが検出された(Fig. I-5A.)。このタンパクは、0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の合成ペプチドを用いてプレアブソープションした抗体に反応しなかったことから (Fig. I-5B.)、タンパクレベルにおいてもOAT-K1が腎のみに発現していることが示唆された。

次にOAT-K1タンパクの腎内における膜局在性について検討した。ラット腎尿細管刷子縁膜 (brush-border membrane: BBM) 並びに側底膜 (basolateral membrane: BLM) 画分は、Takanoら(14)の方法に従い皮質及び髓質から同時調製した。腎皮質及び髓質のBBM並びにBLMをタンパク量としてそれぞれ50  $\mu\text{g}$ を還元条件下 (Fig. I-6A.) でSDS-PAGEを行い、

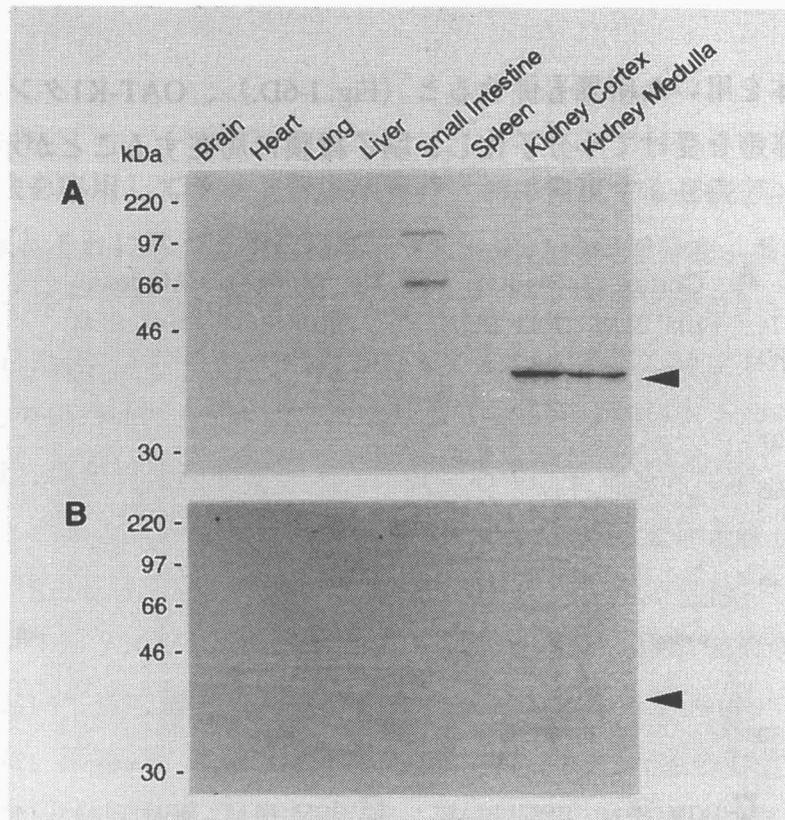
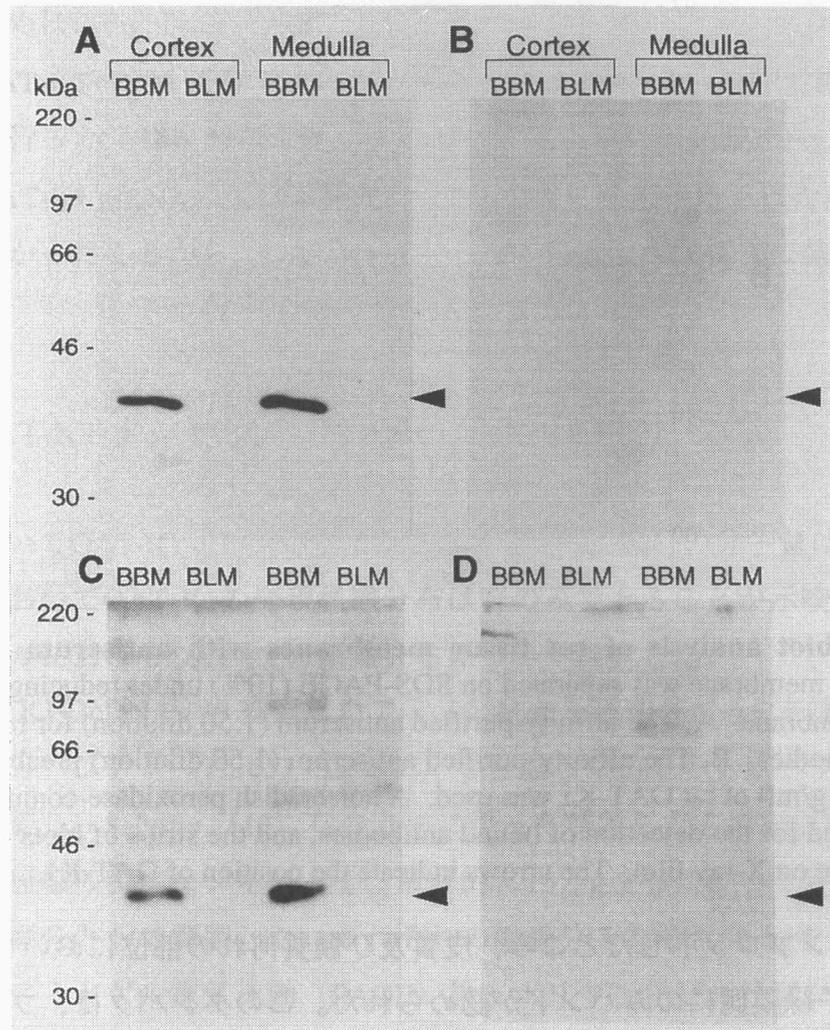


Fig. I-5. Western blot analysis of rat tissue membranes with antiserum for rat OAT-K1. Fifty  $\mu\text{g}$  of each membrane was separated on SDS-PAGE (10%) under reducing conditions and blotted on PVDF membrane. A, The affinity-purified antiserum (1:50 dilution) for rat OAT-K1 was used as primary antibodies. B, The affinity-purified antiserum (1:50 dilution) preabsorbed with the antigen peptide (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) of rat OAT-K1 was used. A horseradish peroxidase-conjugated antirabbit IgG antibody was used for the detection of bound antibodies, and the strips of blots were visualized by chemiluminescence on X-ray film. The arrows indicate the position of OAT-K1.

PVDF膜にウエスタンブロットしたところ、皮質及び髄質何れの部位においても側底膜側には検出されず刷子縁膜側にのみバンドが認められた。このタンパクは、プレアブソーブションした抗体には反応しなかったことから (Fig. I-6B.)、OAT-K1は腎尿細管刷子縁膜特異的に発現していることが示唆された。

OAT-K1タンパクの推定分子量が約74 kDaであることから、OAT-K1が、翻訳後何らかの分解等を受けて膜に発現することが推察される。腎刷子縁膜において検出された約40 kDaのOAT-K1タンパクは、翻訳後修飾の後、分子内S-S結合を介したネイティブな分子サイズとして発現している可能性も考えられるため、Fig. I-6A.及びI-6B.で用いたそれぞれの膜画分を非還元条件下でSDS-PAGE後、ウエスタンブロットしたところ、先の結果と同様、刷子縁膜の約40 kDaの位置にのみバンドが検出された (Fig. I-6.C)。なお、プレアブソー

プシオンした抗体を用いた結果も併せると (Fig. I-6D.)、OAT-K1タンパクは翻訳後限定分解等何らかの修飾を受けて小分子化し、刷子縁膜に局在することが示唆された。



**Fig. I-6. Western blot analysis under both reducing (A, B) and non-reducing (C, D) conditions of brush-border and basolateral membranes purified from either rat kidney cortex and medulla with antiserum for rat OAT-K1.** Fifty µg of each membrane was separated on SDS-PAGE (10%) and blotted on PVDF membrane. A and C, The affinity-purified antiserum (1:50 dilution) for rat OAT-K1 was used as primary antibodies. B and D, The affinity-purified antiserum (1:50 dilution) preabsorbed with the antigen peptide (0.5 µg/ml) of rat OAT-K1 was used. A horseradish peroxidase-conjugated antirabbit IgG antibody was used for the detection of bound antibodies, and the strips of blots were visualized by chemiluminescence on X-ray film. The arrows indicate the position of OAT-K1. *BBM*, brush-border membrane; *BLM*, basolateral membrane.

## 考察

本章では、PCR法を応用してラット腎尿細管特異的に発現する有機アニオントランスポータcDNAの単離とそれに基づく構造解析、及びmRNAの組織分布、特異抗体を用いたタンパクの分子サイズと局在部位について検討した。ラット腎cDNAライブラリーからクローニングに成功したcDNAは全長2,788bpから成る新規有機アニオントランスポータ、OAT-K1をコードしていた。

ラットOAT-K1は12回膜貫通型の糖タンパク質であると推定されたが、特異抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果は、分子量が約40 kDaと推定分子量よりも小さいサイズを示した。近年、Kanaiら(10)はラット核マトリクスに存在する機能不明タンパク、matrin F/G (9)をアフリカツメガエル卵母細胞発現系やヒト子宮癌由来株化細胞Helaを用いた一過性発現系において機能解析し、プロスタグランジントランスポータ (PGT) であることを再認識した。同時に、Kozak (15)のコンセンサス配列と照らし合わせた場合、翻訳開始点をmatrin F/G のcDNA クローニング時に推定されていた開始コドンよりも297塩基上流の方が適していることを提唱し、その上流側開始コドンより翻訳されたタンパクのみがPGTとして輸送活性を有していることを卵母細胞発現系を用いて証明している。一方、OAT-K1の翻訳開始点は、mRNA 5'末端から158塩基下流のAUGと予想され、より適した翻訳開始コドンは他に存在しないことから、OAT-K1は先ず約74kDaの翻訳領域全長のタンパクとして生合成され、限定分解等の修飾を受けた後、約40kDaの小分子型タンパクとして刷子縁膜に発現するものと推察される。

Bergwerkら(16)はラット肝oatp1有機アニオントランスポータに対する抗血清を用いた免疫組織化学的な解析により、oatp1タンパクの肝臓及び腎臓における膜局在性と分子サイズについて検討している。抗血清を用いたイムノブロッティングの結果、肝臓では推定分子量約74 kDaに対応する約80 kDaの単一なバンドとして類洞側膜特異的に検出されたが、腎臓では還元条件下約33 kDa及び約37 kDaのバンドが2種検出されている。非還元条件下で解析したところ、約80 kDaの肝臓で検出されたタンパクと同サイズのバンド1種のみが得られること、肝臓で検出されたシグナルは還元、非還元何れの条件下においても変化しなかったことから、腎特異的な翻訳後修飾機構の存在を示唆している。Angelettiら(17)は最近、ラット脈絡嚢上皮細胞にもoatp1が発現しており、約80 kDaの分子サイズを有するこ

とを報告している。これらの情報を考え合わせると、OAT-K1はmRNAから翻訳後、何らかの腎特異的なプロセッシング機構の中で限定分解等を受けて小分子化し、近位直尿細管刷子縁膜上に挿入されるものと推察される。

なお、抗OAT-K1抗体を用いて約40 kDaのOAT-K1タンパクを精製後、そのN末端配列をエドマン分解等により解析し、翻訳後切断部位を調べることによって、OAT-K1タンパクの膜ターゲティング機構に関する情報が得られるものと思われる。さらに、OAT-K1の小分子化を司る実体としての分解酵素の存在の有無やその発現臓器分布、切断アミノ酸配列等、OAT-K1タンパクの翻訳後膜局在化機構に関わる興味は尽きない。

OAT-K1 mRNAは腎臓、特に近位直尿細管に発現することが示されたことから、OAT-K1遺伝子のプロモーター領域の解析によりOAT-K1 mRNAの転写調節機構が明らかになるものと思われる。さらに解析モデルとしてOAT-K1を用い、染色体上のエクソン、イントロン部位を把握することによって、有機アニオントランスポータ・スーパーファミリーを構成する一連のトランスポータ群の同定と更なるスプライス・バリエーションをコードするcDNAの単離並びに染色体レベルにおける点変異など先天的遺伝子異常に基づく病態、機能障害の把握が可能になるものと考えられる。これらの情報を蓄積し、最終的には有機アニオントランスポータ群の機能的振り分け、即ちトランスポータ個々の、膜レベルから臓器レベル、さらに個体レベルといった発現並びに機能分布を精査、整理することによって薬物の体内動態を予測し、最も合理的な投与設計を構築するための有用な情報が得られるものと考えられる。

## 第 II 章 OAT-K1の機能

腎尿細管上皮細胞には、性質の異なる有機アニオントランスポータが複数種存在しており、生体必須物質の再吸収や、不要老廃物及び異物の尿中排泄を媒介することによって、厳密な制御を受けながら体循環血液の浄化に貢献している。一般に、代表的な有機アニオン輸送系の輸送基質として用いられてきたパラアミノ馬尿酸 (PAH) は、近位曲尿細管血管側側底膜で、細胞内  $\alpha$ -ケトグルタル酸との交換輸送によって尿細管上皮細胞内に取り込まれ(4, 18)、管腔側刷子縁膜では細胞内負の膜電位を駆動力として能動的に尿中排泄される(5, 19)。また刷子縁膜には、PAHや尿酸などの有機アニオン、Cl<sup>-</sup>やOH<sup>-</sup>といった無機アニオンを基質として認識しうる交換輸送系が存在していることが示されているが(20, 21)、この機構の生理的役割については不明である。

前章において有機アニオントランスポータOAT-K1は腎のみに発現しており、主として近位直尿細管刷子縁膜に局在することが明らかになった。本章では、OAT-K1が有機アニオントランスポータファミリーの一員として機能する膜タンパクであること、腎生理上重要な役割を担っていること、さらに薬物治療時の留意すべき相互作用発現に一部関与することを明らかにするため、アフリカツメガエル卵母細胞発現系及び培養腎上皮細胞へのcDNA導入に基づく安定発現系を用いて、OAT-K1の輸送機能及び基質認識特性について解析し、生理的役割について考察した。

ラット肝cDNAラブラリーよりアフリカツメガエル卵母細胞を用いた発現クローニング法によって単離されたoatp1は、肝移行性の代表的なアニオン性薬物であるスルホプロモフタレインやタウロコール酸を始めとする胆汁酸等のNa<sup>+</sup>イオン非依存的な取り込みを媒介するトランスポータである(22, 23)。最近では、ウアベインや17- $\beta$ -エストラジオールのグルクロン酸抱合体などステロイド骨格を持った物質も認識することが示唆された(24, 25)。また、肝oatp1と40%のアミノ酸相同性を示すトランスポータ、ラットPGTはプロスタグランジンE<sub>2</sub>をはじめとするアラキドン酸代謝物を基質として認識し、輸送する(26)。これらOAT-K1と相同性を示すトランスポータのmRNAは広範な組織分布を示しており、oatp1 mRNAは、肝臓>腎臓>脳、肺、骨格筋及び大腸に、PGT mRNAは肺>肝臓>腎臓、十二指腸、空腸、回腸、大腸及び目に発現することが示唆されている(6, 10)。一方、第一章で述べたようにOAT-K1は腎のみに発現することが示唆され、腎移行性及び腎排泄

TABLE II-I  
Examples of compounds which are excreted by the  
renal organic anion transport system

<i>Endogenous Compounds</i>	<i>Drugs</i>
Bile salts (27)	Acetazolamide (40)
Bilirubin (28)	P-Aminohippurate (5)
Cyclic AMP (29)	Cephalosporins (41)
Cyclic GMP (29)	Cisplatin (42)
Fatty Acid (30)	Ethacrynic acid (43)
Folic acid (31)	Furosemide (44)
Oxalate (32)	Indomethacin (45)
Prostaglandins (33)	Methotrexate (46)
Urate (34)	Penicillins (47)
	Probenecid (48)
<i>Drug Metabolites</i>	Salicylate (49)
Acetylated sulfonamide (35)	Sulfinpyrazone (50)
Acetylcystein conjugates (36)	Sulfonamides (51)
Gutathione conjugates (37)	
Prazionate (38)	
Sulfate conjugates (39)	

型アニオン性薬物の膜輸送を媒介するものと推察される。これまで種々の実験系を用いた解析により腎有機アニオン輸送系を介して排泄される物質、及びその輸送系に強く相互作用を示すものが数多く報告されている。TABLE II-Iに腎有機アニオン輸送系に関わるアニオン性生体内物質並びに外因性の薬物に関する情報をまとめた。

本章では、OAT-K1の有する薬物輸送機能に焦点を当て、種々の発現系を用いて評価した。さらに得られた結果を基にして、薬物療法時の相互作用発現機構に対するクローン化トランスポータOAT-K1の関与について検討を加えた。

## 第1節 卵母細胞発現系を用いた機能解析

*In vitro*合成したOAT-K1 mRNAまたは水を卵母細胞に注入し、18℃で1-3日間インキュベートした後、薬物輸送実験に用いた。Figure. II-1. に示すようにOAT-K1の輸送基質を検討した結果、肝oatp1の基質であるタウロコール酸 (TCA)、腎有機アニオン輸送系の典型的基質であるパラアミノ馬尿酸 (PAH) については対照との間に差が認められなかった。一方、メトトレキセート (MTX) 及び葉酸の取り込みに対照と比較して顕著な取り込み上昇が認められた。

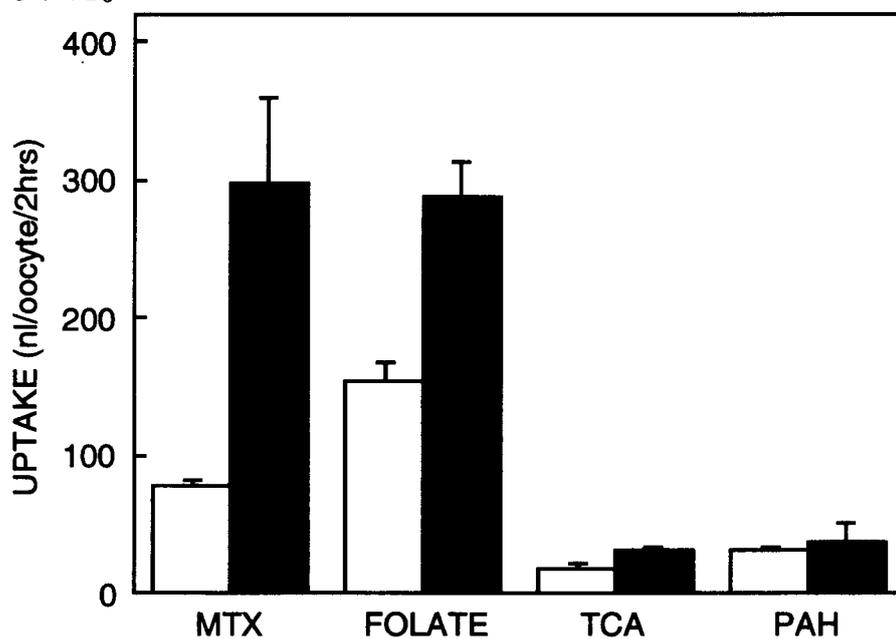


Fig. II-1. Uptake of anionic drugs by *Xenopus* oocytes. Uptake by oocytes was assayed for 2 hr at 25°C in incubation buffer containing 500 nM of [<sup>3</sup>H]MTX, 150 nM of [<sup>3</sup>H]folate, 500 nM of [<sup>3</sup>H]TCA and 15 μM of [<sup>14</sup>C]PAH 2 days after injection of 50 nl of water (open column) or *in vitro* transcribed rat OAT-K1 mRNA (closed column, 40 ng/oocyte). Each column represents the mean ± S.E. of three experiments. Three oocytes were used for each experiment.

## 第2節 OAT-K1安定発現系による膜発現と機能解析

### 2-1 OAT-K1安定発現LLC-PK<sub>1</sub>細胞による機能解析

第1節において卵母細胞発現系を用いて機能解析を行ったところ、OAT-K1はMTXや葉

酸を認識するトランスポーターであることが示唆された。本節では、先ず有機アニオン輸送活性を持たないブタ腎由来培養上皮細胞LLC-PK<sub>1</sub> (52)を宿主として、OAT-K1安定発現系を構築した。

プラスミドベクター (pSPORT1) に挿入されているOAT-K1cDNAを哺乳類発現ベクター (pBK-CMV) にサブクローニングした後、以下の実験に用いた。サブクローニングしたpBK-CMV/OAT-K1の5'及び3'末端の塩基配列を確認した後、リン酸カルシウム共沈法(53)によりLLC-PK<sub>1</sub>細胞にトランスフェクションした。pBK-CMV (54)にはネオマイシン耐性遺伝子がコードされていることから、G418耐性を示す細胞をクローニングした。得られた各細胞のpoly(A)<sup>+</sup>RNAを抽出し、RT-PCR及びノーザンブロットングによってOAT-K1 mRNA発現クローンを選別した。最終的に、<sup>3</sup>H]MTX取り込み活性の最も高いNo. 6の細胞をOAT-K1安定発現細胞、LLC-OAT-K1として以降の実験に用いた (Fig. II-2.)。また、対照として発現ベクターのみをトランスフェクションした細胞 (LLC-pBK) を用いた。なおG418耐性LLC-PK<sub>1</sub>細胞は、LLC-OAT-K1細胞を含め6クローン得られたが、総ての細胞においてOAT-K1 mRNAの発現と、MTX輸送活性の上昇を確認した。先ず抗OAT-K1抗体を用いたウエスタンブロットングを行い、OAT-K1のLLC-PK<sub>1</sub>におけるタンパクレベルでの発現を調べた。Figure II-3.に示すように、宿主細胞LLC-PK<sub>1</sub>及びLLC-pBK細胞には抗血

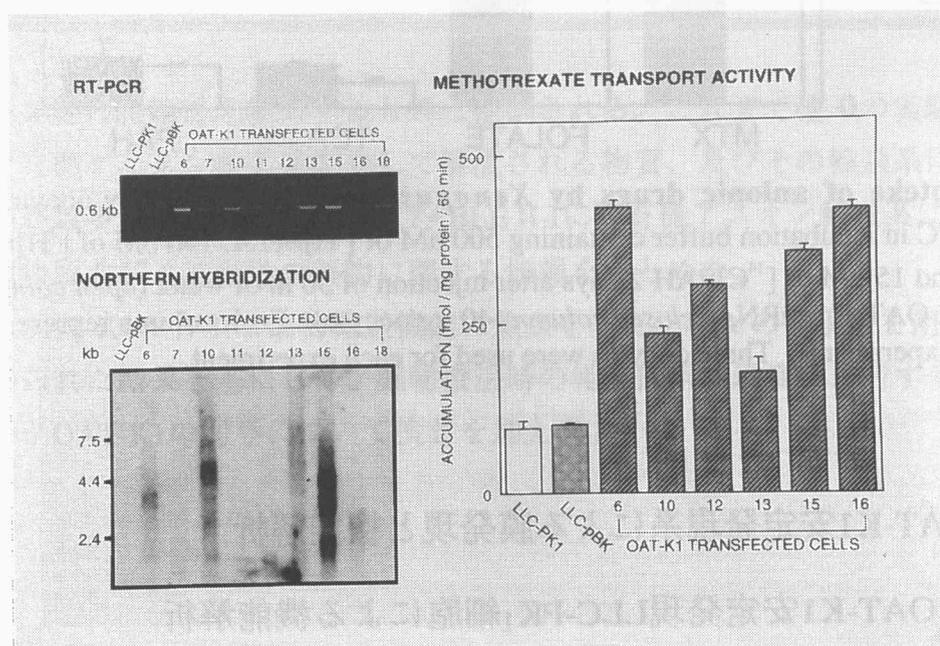
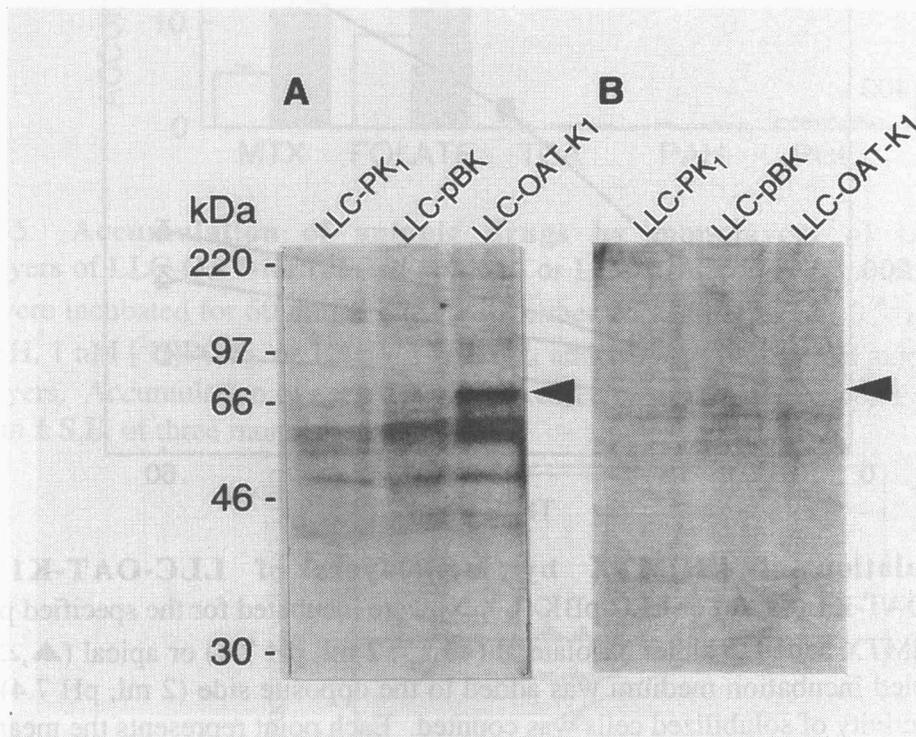


Fig. II-2. Screening of rat OAT-K1 stably transfected LLC-PK<sub>1</sub> cells.

清に反応するタンパクは認められなかったが、LLC-OAT-K1細胞にのみ約70 kDaのバンドが検出された。このタンパクは、抗原ペプチドで処理した抗血清を用いた場合、ほぼ消失することから、LLC-OAT-K1細胞においてOAT-K1が発現していることがタンパクレベルで確認された。なお検出されたタンパクの分子量はOAT-K1の推定分子量74 kDaに対応するものであった。



**Fig. II-3. Western blot analysis of crude plasma membrane fractions isolated from the LLC-PK<sub>1</sub>, LLC-pBK and LLC-OAT-K1 cells with antiserum for rat OAT-K1.** Fifty µg of each membrane was separated on SDS-PAGE (10%) and blotted on PVDF membrane. (A) The affinity-purified antiserum (1:50 dilution) for rat OAT-K1 was used as primary antibodies. (B) The affinity-purified antiserum (1:50 dilution) preabsorbed with the antigen peptide (0.5 µg/ml) of rat OAT-K1 was used. A horseradish peroxidase-conjugated antirabbit IgG antibody was used for the detection of bound antibodies, and the strips of blots were visualized by chemiluminescence on X-ray film.

次にLLC-OAT-K1細胞によるMTX取り込みの方向性について検討した。多孔性フィルター上に培養したLLC-OAT-K1細胞を用い、血管側側底膜に相当するBasal（側底膜）側並びに管腔側刷子縁膜に相当するApical（頂側膜）側からの<sup>3</sup>H]MTX取り込みを調べた。

Figure II-4.に示すように、頂側膜側からの<sup>3</sup>H]MTX取り込みはLLC-pBK細胞との間に差は

認められなかった。一方、LLC-OAT-K1細胞による側底膜側からの $[^3\text{H}]\text{MTX}$ 取り込みに著しい上昇が観察された。これらの結果より、LLC-pK<sub>1</sub>細胞においてOAT-K1は翻訳後の修飾を受けないネイティブなタンパクとして側底膜側に発現していることが示唆された。

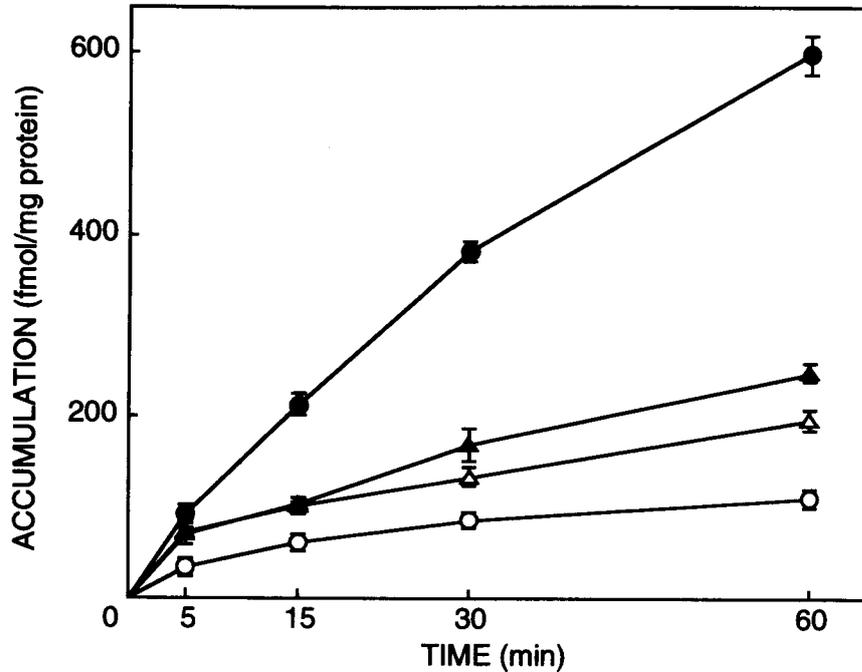


Fig. II-4. Accumulation of  $[^3\text{H}]\text{MTX}$  by monolayers of LLC-OAT-K1 cells. Monolayers of LLC-OAT-K1 (●,▲) or LLC-pBK (○,△) were incubated for the specified period at 37°C with 26 nM  $[^3\text{H}]\text{MTX}$  added to either basolateral (●,○; 2 ml, pH 7.4) or apical (▲,△; 2 ml, pH 7.4) side. Unlabeled incubation medium was added to the opposite side (2 ml, pH 7.4). After incubation, the radioactivity of solubilized cells was counted. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of three monolayers.

また、LLC-OAT-K1細胞の側底膜側からの種々アニオン性薬物の取り込み実験を行った (Fig. II-5.)。TCA、PAH、PGTの基質であるプロスタグランジンE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 及び肝有機アニオン輸送系の基質であるロイコトリエンC<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) についてはLLC-pBK細胞との間に差は見られなかった。一方、MTX及び葉酸の取り込みに顕著な上昇が認められ、卵母細胞で得られた結果と対応するものを得た。以降の実験ではMTXをOAT-K1の典型的基質として用いた。

次にLLC-OAT-K1細胞の側底膜側からのMTX取り込みの濃度依存性について検討したところ、基質の濃度上昇に伴って飽和性を示した (Fig. II-6.)。それぞれの濃度における取り込み量 (TOTAL) から、非標識MTX (1 mM) 共存下で取り込まれた量 (NONSPECIFIC

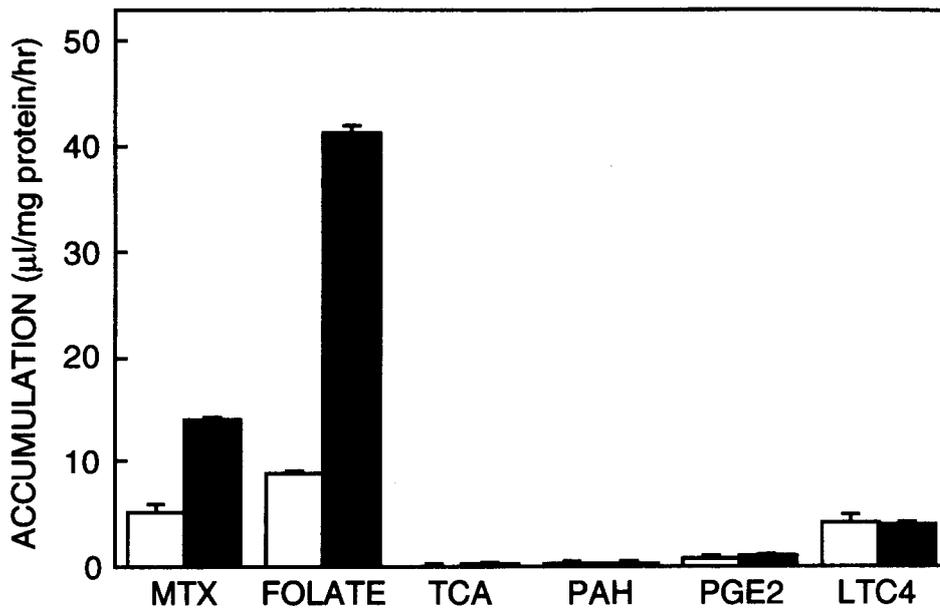


Fig. II-5. Accumulation of anionic drugs by monolayers of LLC-OAT-K1 cells. Monolayers of LLC-OAT-K1 (*closed column*) or LLC-pBK (*open column*) grown on membrane filters were incubated for 60 min at 37°C with either 26 nM [<sup>3</sup>H]MTX, 0.5 μM [<sup>3</sup>H]TCA, 18 μM [<sup>14</sup>C]PAH, 1 nM [<sup>3</sup>H]PGE<sub>2</sub>, or 1.3 nM [<sup>3</sup>H]LTC<sub>4</sub> added to the basolateral side (2 ml, pH 7.4) of the monolayers. Accumulation of each drug is expressed as uptake clearance. Each column represents the mean ± S.E. of three monolayers.

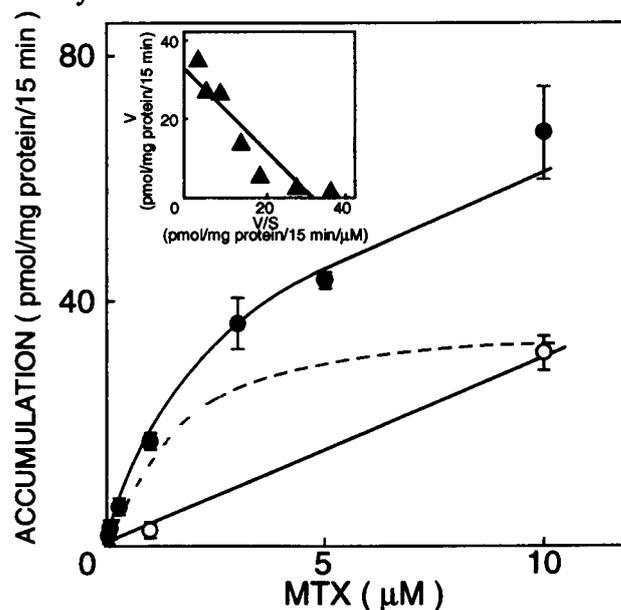


Fig. II-6. Concentration dependence of [<sup>3</sup>H]MTX accumulation by LLC-OAT-K1 cells. [<sup>3</sup>H]MTX accumulation was measured at various concentrations (0.05-10 μM) for 15 min at 37°C added to the basolateral side (2 ml, pH 7.4) of the monolayers in the absence (●) and presence (○) of 1 mM unlabeled MTX. Unlabeled incubation medium was added to the apical side (2 ml, pH 7.4). Broken line represents the specific component of MTX accumulation. Each point represents the mean ± S.E. of three monolayers.

)を差し引いて特異的な取込み量 (SPECIFIC) を算出した。得られたデータをミカエリス-メンテン式に当てはめて求められたKm値は1  $\mu$  M、Vmax値は31.7 pmol/mg protein/15 minであった。

さらにLLC-OAT-K1細胞の側底膜側からの $^3\text{H}$ MTX取り込みに及ぼす種々アニオン性薬物の共存阻害効果について検討を加えた (Fig. II-7.)。薬物は総て100  $\mu$  M共存下で比較検討した。この結果、非標識MTXが最も強い阻害効果を有していた。また、葉酸、肝oatp1の基質であるスルフォプロモフタレイン (BSP) 及びTCA、アニオン交換体の阻害剤であるDIDSも強い阻害効果を有していた。さらに腎有機アニオン輸送系に相互作用することが知られているプロベネシド、PAH、フロセミド、バルプロ酸も弱い阻害効果を有しており、OAT-K1を介した $^3\text{H}$ MTX取り込みは、構造的に多様な薬物の相互作用を受けることが示唆された。

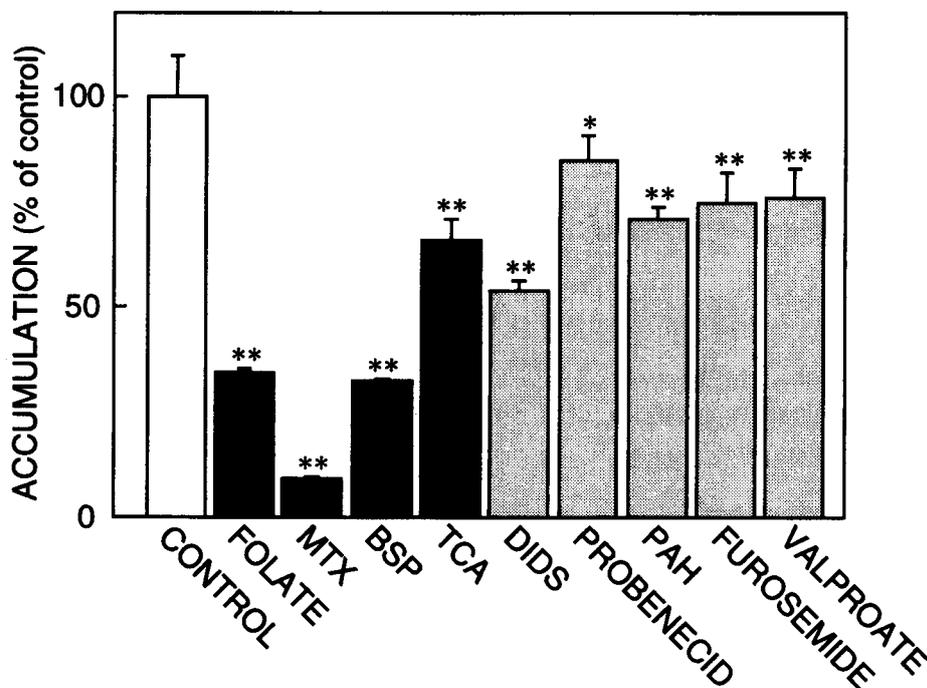


Fig. II-7. Effect of various anionic drugs on  $^3\text{H}$ MTX accumulation by LLC-OAT-K1 cells.  $^3\text{H}$ MTX accumulation by LLC-OAT-K1 cells from the basolateral side (26 nM; 2ml, pH 7.4) was measured for 15 min at 37°C in the absence (*control*) and presence of indicated drugs at a concentration of 100  $\mu$  M. Data are expressed as % of control value. Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of three monolayers. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.001$ , significant differences from control.

OAT-K1のホモログoatp1は肝類洞側膜において $\text{Na}^+$ 非依存性の有機アニオン細胞内取り込みを媒介していることが知られている(6)。そこでLLC-OAT-K1細胞の側底膜側からの

[<sup>3</sup>H]MTX取り込みに対する細胞外イオン、細胞内ATP枯渇並びに温度の影響について検討した (Fig. II-8.)。細胞外Na<sup>+</sup>イオン及びCl<sup>-</sup>イオンを置換した場合、細胞内ATPを枯渇させた場合共に顕著な影響は認められなかった。一方、取り込み温度を37℃から4℃にした場合、著しいMTX取り込み量の低下が観察された。

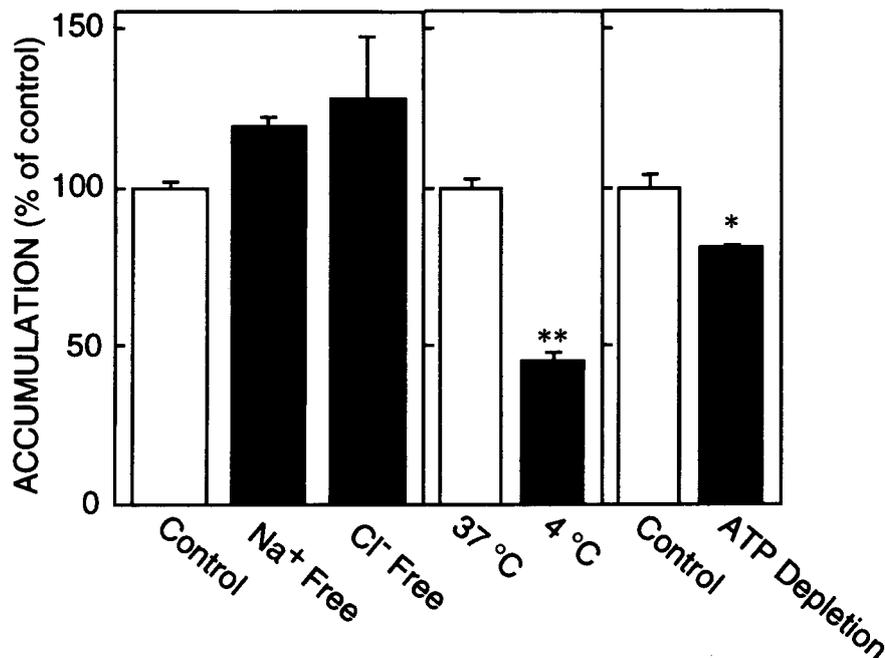


Fig. II-8. Effect of Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, temperature, and ATP depletion on [<sup>3</sup>H]MTX accumulation in LLC-OAT-K1 cells. LLC-OAT-K1 monolayers were preincubated at 37 °C for 10 min in either normal, Cl<sup>-</sup>-free, or Na<sup>+</sup>-free medium and incubated at 37 °C or 4 °C for 15 min with 26 nM [<sup>3</sup>H]MTX added to the basolateral side (2 ml, pH 7.4). For cellular ATP-depletion experiments, cells were preincubated at 37 °C for 20 min in the ATP-depletion medium and were incubated at 37 °C for 15 min with 26 nM [<sup>3</sup>H]MTX added to the basolateral side (2 ml, pH 7.4). Unlabeled incubation medium was added to the apical side (2 ml, pH 7.4). After incubation, the radioactivity of solubilized cells was determined. Each value represents the mean ± S.E. of three monolayers. \*, *p* < 0.05; \*\*, *p* < 0.001, significant differences from control.

## 2-2 OAT-K1安定発現MDCK細胞による機能解析

2-1において構築したLLC-OAT-K1細胞は、卵母細胞発現系で得られた結果と対応するMTX輸送活性を有していた。一方、抗血清を用いたところ約70 kDaのタンパクが検出されたこと、機能解析の結果からOAT-K1はLLC-PK<sub>1</sub>細胞の側底膜に局在することが示唆された。これらの結果は、第I章で得られた結果と矛盾するものであり、ラット腎刷子縁膜における小分子型OAT-K1タンパクは活性を保持しているのか否かについて解明する必要が生じた。そこで、イヌ腎由来上皮細胞MDCKを用いてOAT-K1発現細胞を作成し、特にOAT-K1タンパクの細胞膜発現について検討した。

LLC-OAT-K1作成時と同様にして、宿主細胞MDCKにpBK-CMV/OAT-K1をトランスフェクションした。Figure II-9.に示すようにG418耐性を示した細胞の中で<sup>3</sup>H]MTX取り込み活性の高いクローンから総RNAを抽出し、ノーザンブロッティングを行ってOAT-K1 mRNAの発現を確認した。これをOAT-K1安定発現MDCK細胞、MDCK-OAT-K1として以下の機能解析に用いた。なお発現ベクターのみを導入した細胞 (MDCK-pBK) を対照として用いた。次にMDCK-OAT-K1細胞による<sup>3</sup>H]MTX取り込みの方向性について解析したところ、LLC-OAT-K1細胞とは異なり頂側膜側からの取り込みに上昇が認められた。さらに抗

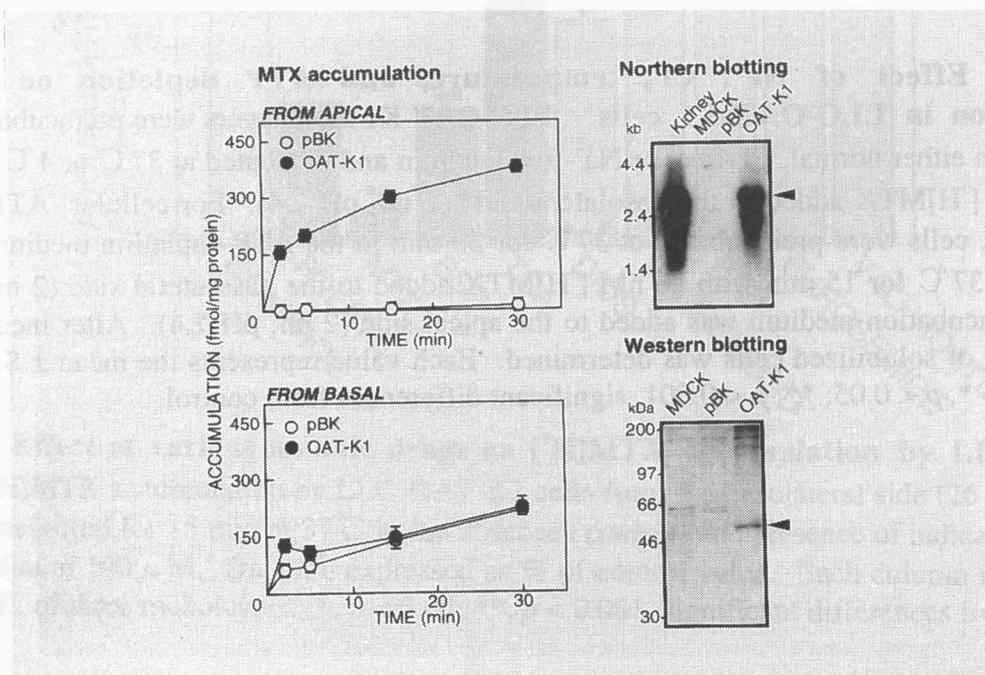


Fig. II-9. Construction of rat OAT-K1 stably transfected MDCK cells.

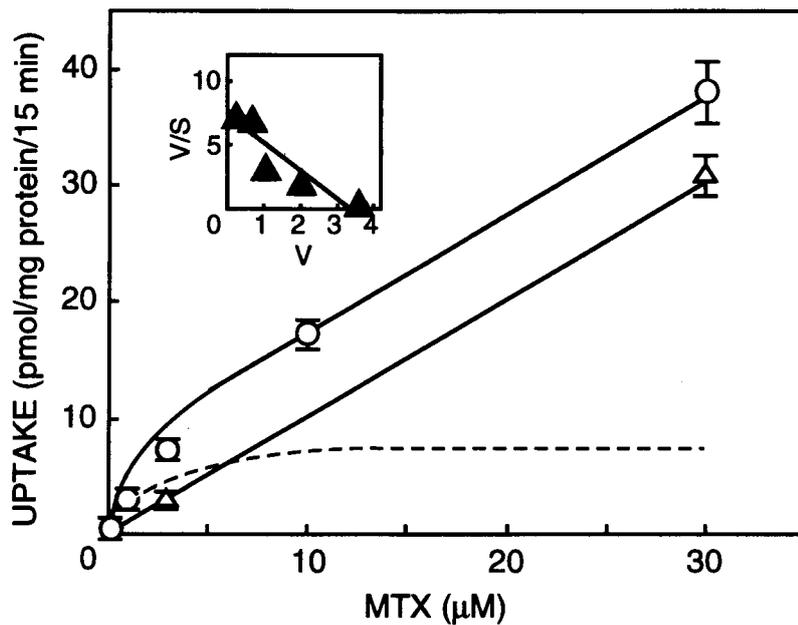


Fig. II-10. Concentration dependence of [<sup>3</sup>H]MTX accumulation by MDCK-OAT-K1 cells. [<sup>3</sup>H]MTX accumulation was measured at various concentrations (0.1-30 μM) for 15 min at 37°C (2 ml, pH 7.4) of the cells in the absence (●) and presence (○) of 1 mM unlabeled MTX. After incubation, the radioactivity of solubilized cells was determined. Broken line represents the specific component of MTX accumulation. Each point represents the mean ± S.E. of three dishes.

血清を用いたウエスタンブロッティングの結果、約50 kDaのタンパクがMDCK-OAT-K1細胞のみに検出された。この結果、OAT-K1がMDCK細胞では翻訳後の修飾を受けて低分子化した後、頂側膜側に発現することが示唆された (Figure II-9.)。従って以降の実験は、培養皿を用いてMDCK-OAT-K1細胞によるOAT-K1の機能解析を行った。

次にMDCK-OAT-K1細胞による頂側膜側からのMTX取り込みにおける濃度依存性について検討したところ、基質の濃度上昇に伴って飽和性を示した (Fig. II-10.)。それぞれの濃度における取り込み量 (TOTAL) から、非標識MTX (1 mM) 共存下で取り込まれた量 (NONSPECIFIC) を差し引いて特異的な取り込み量 (SPECIFIC) を算出した。得られたデータをミカエリス・メンテン式に当てはめて求められたKm値は2.1 μM、Vmax値は7.2 pmol/mg protein/15 minであった。この結果は、側底膜側からの[<sup>3</sup>H]MTX取り込みに顕著な上昇を示したLLC-OAT-K1細胞 (Fig. II-4) による[<sup>3</sup>H]MTX取り込みのKm値1.0 μM (Fig. II-6.) とほぼ対応するものであった。従って、約70 kDaの側底膜型OAT-K1並びに約50 kDaの頂側膜型OAT-K1は共に類似したMTX親和性を有することが示唆された。

さらにMDCK-OAT-K1細胞の[<sup>3</sup>H]MTX取り込みに及ぼす種々アニオン性薬物の共存阻害

効果について検討を加えた (Fig. II-11.)。薬物は総て100  $\mu$ M共存下で比較検討した。この結果、非標識MTXが最も強い阻害効果を有していた。また、葉酸、BSP、インドメタシンも強い阻害効果を有していた。さらにTCA及びPAHも弱い阻害効果を有しており、LLC-OAT-K1細胞の側底膜側からの $[^3\text{H}]$ MTX取り込みと対応する結果を得た。

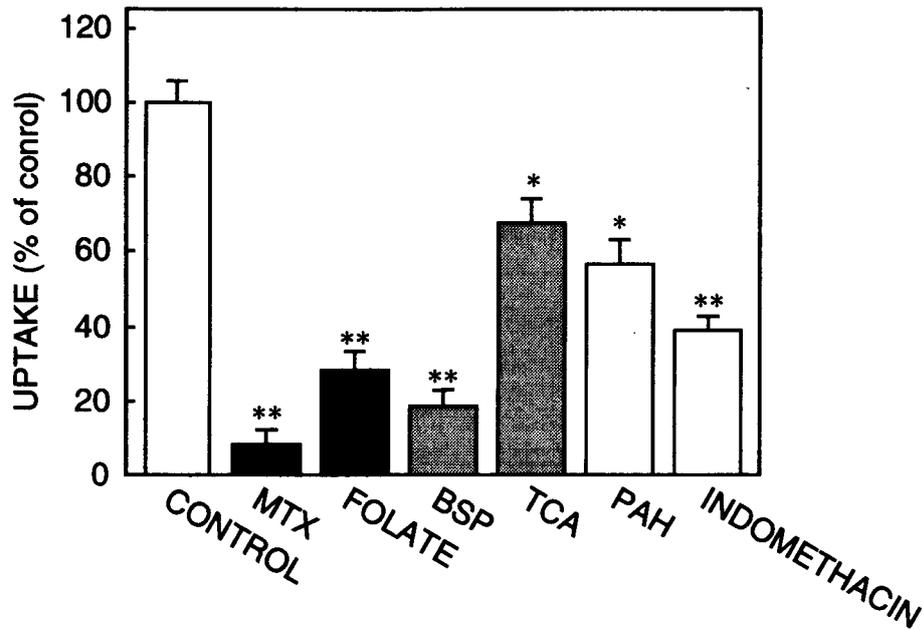


Fig. II-11. Effect of various anionic drugs on  $[^3\text{H}]$ MTX accumulation by MDCK-OAT-K1 cells.  $[^3\text{H}]$ MTX accumulation by MDCK-OAT-K1 cells (1  $\mu$ M; 2 ml, pH 7.4) was measured for 15 min at 37°C in the absence (*control*) and presence of indicated drugs at a concentration of 100  $\mu$ M. After incubation, the radioactivity of solubilized cells was determined. Data are expressed as % of control value. Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of three monolayers. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.001$ , significant differences from control.

### 第3節 薬物相互作用におけるOAT-K1の関与

Thyss (55)らの報告によると、MTXと非ステロイド性抗炎症剤 (NSAID) の併用で腎障害など重篤な毒性発現が認められた症例では、明らかな血中MTX濃度の上昇が観察されたが、毒性が発現しなかった患者におけるMTXの血中濃度推移は正常範囲内であった。この要因として、NSAID併用によるMTXの腎クリアランス低下が指摘されている。一方、Bossuyt (25)らはOAT-K1のホモログ肝oatp1がBSPやTCAなどの肝指向性有機アニオン

に加えて、ウアベインやジゴキシンなど中性の強心配糖体も基質として認識することを報告した。そこでOAT-K1によるMTX輸送に対するNSAID並びにステロイドの影響について検討を加えた。

先ずラット *in vivo* におけるMTXの組織移行特性について検討した。トレーサーレベルの $[^3\text{H}]$ MTXをラット左大腿静脈より瞬時投与し、5分及び30分後の血漿中並びに各組織中

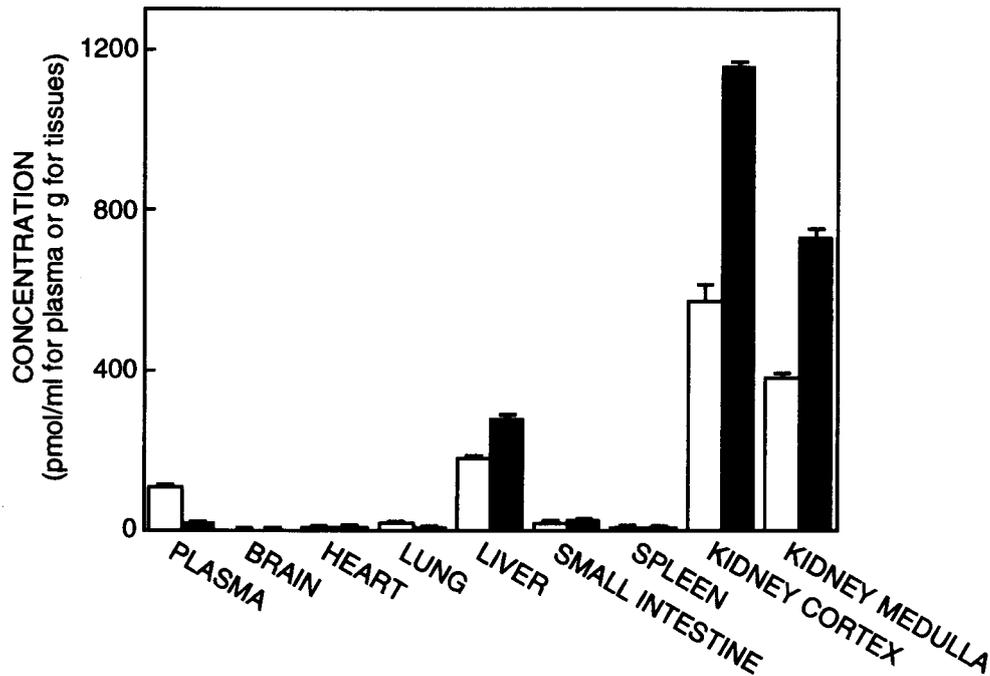


Fig. II-12. Tissue distribution of  $[^3\text{H}]$ MTX after the intravenous bolus administration. Five (open column) or thirty (closed column) minutes after the bolus administration of  $[^3\text{H}]$ MTX ( $5 \mu\text{mol/kg}$ ), plasma and each of several tissue samples were collected. Blood samples were obtained from aorta immediately before killing the rats, and then tissue samples were collected. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of four rats.

のMTX濃度を測定した。Figure II-12. に示すようにMTXは腎皮質及び腎髄質に高濃度に移行しており、5分後ではそれぞれ血漿中濃度の83倍、55倍であった。また、肝臓にも27倍の比率で分布していた。さらに30分後における組織中MTX濃度は腎皮質、腎髄質及び肝臓でそれぞれ血漿中濃度の923倍、584倍、224倍に著しく上昇していた。

次に、このMTX腎移行性に対するNSAIDの影響について検討した。トレーサーレベルの $[^3\text{H}]$ MTXを単独並びに $40 \mu\text{mol/kg}$ の非標識MTX、インドメタシン及びケトプロフェンと共にラット大腿静脈より瞬時投与し、5分後の $[^3\text{H}]$ MTXの血漿中濃度及び初期組織移行に対する影響を検討した。Figure II-13. に示すように $[^3\text{H}]$ MTXの血漿中濃度は、非標識MTX

の共存下で有意に上昇していた。また $[^3\text{H}]\text{MTX}$ の腎移行は、非標識 $\text{MTX}$ 併用によって最も強く低下すること、インドメタシン、ケトプロフェンの併用により顕著に減少していることが分かった。一方、肝移行に対する併用薬の影響は観察されなかった。

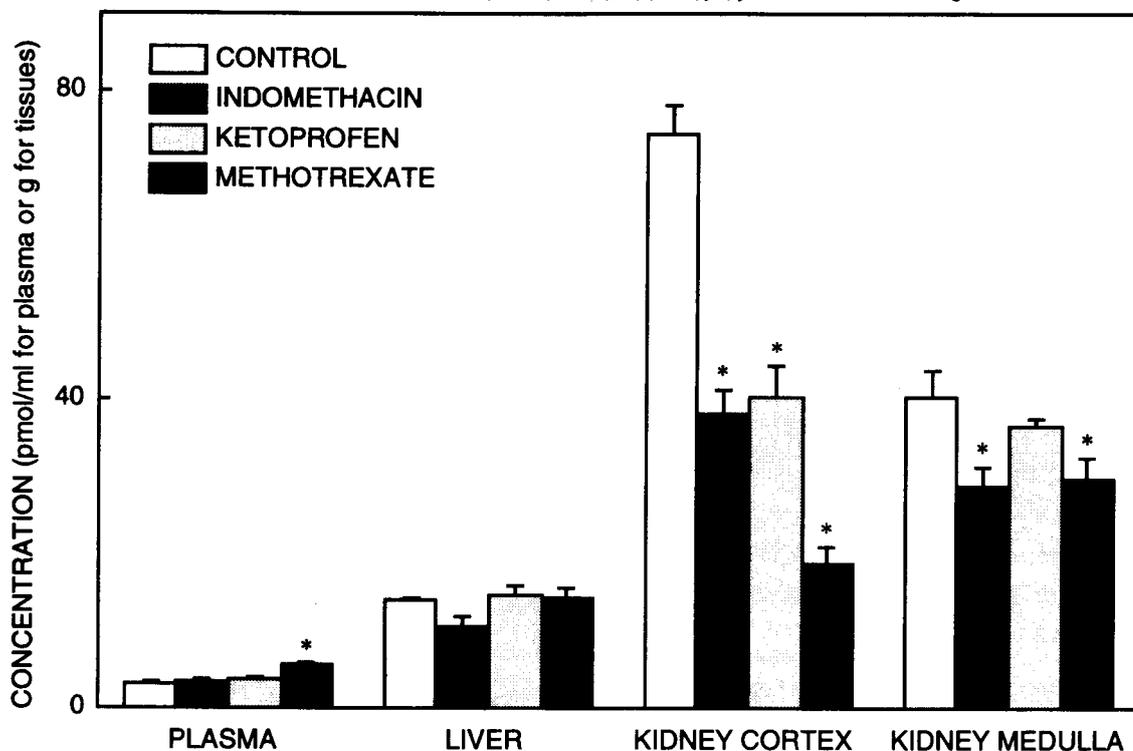


Fig. II-13. Effects of NSAID coadministration on tissue distribution of  $[^3\text{H}]\text{MTX}$  in rats. After the bolus administration of  $[^3\text{H}]\text{MTX}$  (2 nmol/kg) with or without each inhibitor (40  $\mu$  mol/kg), blood was obtained from the aorta immediately before sacrificing the rats and then the kidney and liver were excised. After homogenizing the tissues, the radioactivity associated with each sample was determined. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of three rats. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.001$ , significant differences from control values without inhibitor.

*In vivo*の結果より $\text{MTX}$ が高濃度に腎移行すること、その分布は非標識 $\text{MTX}$ 及び $\text{NSAID}$ 併用により顕著に低下することが示された。次に $\text{MTX}$ と $\text{NSAID}$ との相互作用に対する $\text{OAT-K1}$ の関与について検討した。LLC-OAT-K1細胞の側底膜側からの $[^3\text{H}]\text{MTX}$ 取り込みに及ぼす $\text{NSAID}$ の影響を調べた。Figure II-14 (A). に示すように $\text{OAT-K1}$ を介する $[^3\text{H}]\text{MTX}$ 取り込みはインドメタシン及びケトプロフェンの共存により強く阻害されることが示唆された。さらにFigure II-14 (B). に示すように種々の $\text{NSAID}$ 共存による影響について検討したところ、LLC-OAT-K1細胞の側底膜側からの $[^3\text{H}]\text{MTX}$ 取り込みはインドメタシン、フルフェナミック酸によって顕著に阻害されること、イブプロフェン、ケトプロフェン、フェニル

ブタゾンも阻害効果を有することが示された。一方、サリチル酸の共存下では $^3\text{H}$ MTX取り込みは減少傾向を示したが有意ではなかった。

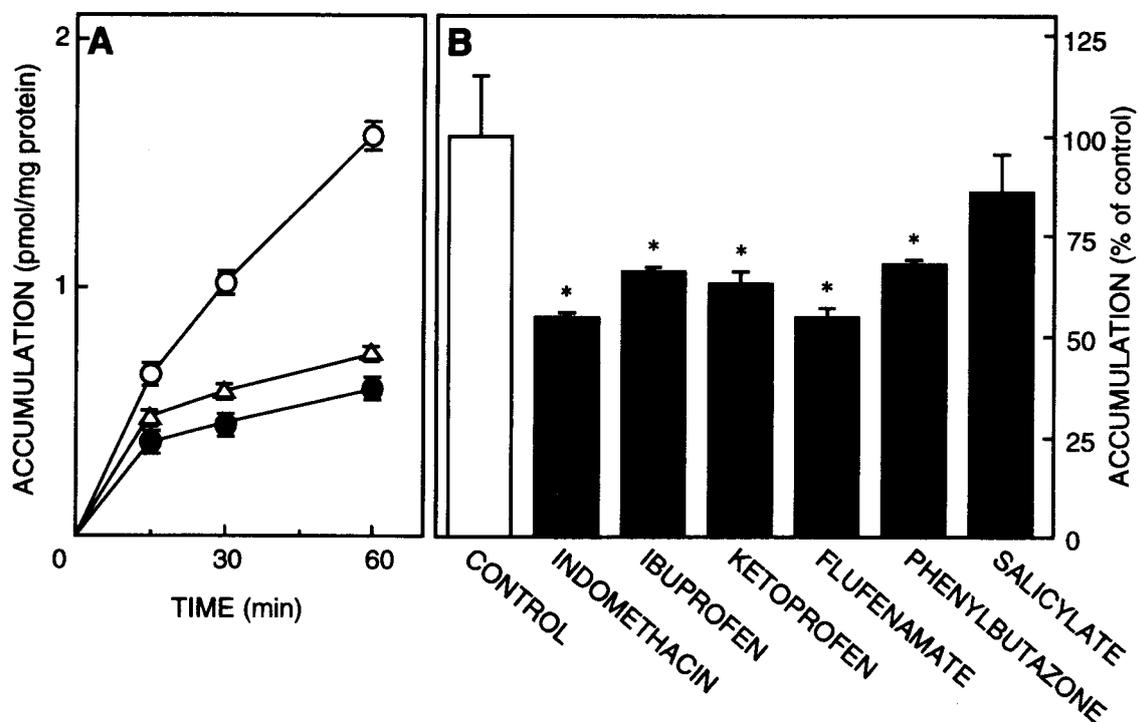


Fig. II-14. Effects of indomethacin and ketoprofen (A), and NSAIDs (B) on  $^3\text{H}$ MTX accumulation by LLC-OAT-K1 cells. (A)  $^3\text{H}$ MTX accumulations in the absence (O) and presence of indomethacin (●) and ketoprofen (Δ) at a concentration of 1 mM from the basolateral side (100 nM, pH 7.4) were measured for the specified periods at 37°C. (B)  $^3\text{H}$ MTX accumulations in the absence (*control*) and presence of indicated drugs at a concentration of 1 mM from the basolateral side (100 nM, pH 7.4) were measured for 15 min at 37°C. Unlabeled incubation medium (pH 7.4) without drugs was added to the apical side. Each point or column represents the mean  $\pm$  S.E. of three monolayers. \* $P < 0.05$ , significant difference from control.

そこでOAT-K1によるMTX輸送に対するNSAIDの阻害様式について解析した。LLC-OAT-K1細胞によるMTX取り込みの $K_m$ 値が $1 \mu\text{M}$ であることから、 $^3\text{H}$ MTX濃度は100 nM - 400 nMで検討した。インドメタシン及びケトプロフェンは0.5 mM及び1.0 mMを用い、得られた結果をDixon plot (56)により解析した (Fig. II-15.)。その結果、インドメタシンやケトプロフェンはOAT-K1を介するMTX輸送に対して拮抗阻害を示し、 $K_i$ 値はそれぞれ1.0 mM及び1.9 mMであった。

次にOAT-K1に対するステロイドの相互作用について検討した。先ずLLC-OAT-K1細胞の側底膜側からの $^3\text{H}$ MTX取り込みに及ぼすステロイド性薬物の影響を調べた。Figure II-

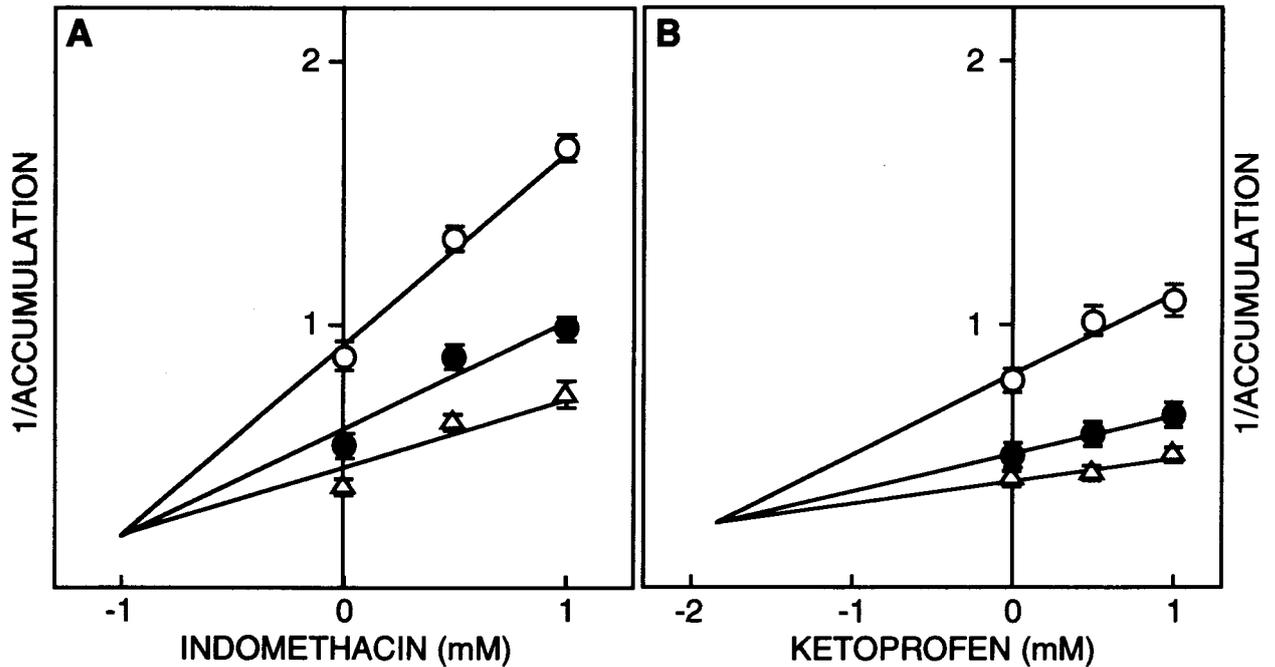


Fig. II-15. Dixon plots for inhibitory effects of indomethacin (A) and ketoprofen (B) on  $[^3\text{H}]\text{MTX}$  accumulation by LLC-OAT-K1 cells.  $[^3\text{H}]\text{MTX}$  accumulations at each concentration of 100 (O), 200 (●) or 400 nM ( $\Delta$ ) in the presence of 0.5 and 1 mM of indomethacin (A) or ketoprofen (B) from the basolateral side (pH 7.4) were measured for 15 min at 37 °C. Unlabeled incubation medium (pH 7.4) without drugs was added to the apical side. Data are expressed as 1/accumulation (pmol/mg protein/15 min). Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of three monolayers.

16 (A). に示すようにOAT-K1を介する $[^3\text{H}]\text{MTX}$ 取り込みはテストステロンの共存により強く阻害されることが示唆された。さらにFigure II-16 (B). に示すように種々のステロイド性薬物共存による影響について検討したところ、LLC-OAT-K1細胞の側底膜側からの $[^3\text{H}]\text{MTX}$ 取り込みはテストステロンによって顕著に阻害されること、スピロノラクトン、カンレノン酸、ジゴキシシン及びウアベインも強い阻害効果を有すること、プレドニゾロン、デキサメタゾン、エストリオールはいずれも弱い阻害効果を有することが示された。さらにOAT-K1によるMTX輸送に対するステロイド性薬物の阻害様式について解析した。 $[^3\text{H}]\text{MTX}$ 濃度はNSAIDの阻害様式の解析時と同様、100 nM - 400 nMで検討した。ジゴキシシン並びにテストステロンは50  $\mu\text{M}$ 及び100  $\mu\text{M}$ を用い、得られた結果をDixon plot (56)により解析した (Fig. II-17.)。その結果、テストステロンはOAT-K1によるMTX輸送に対して拮抗阻害を示し、 $K_i$ 値は73  $\mu\text{M}$ であった。一方、ジゴキシシンは非特異的な阻害を示していたことが推察された。

そこで阻害様式の解析に用いた薬物自身が、OAT-K1の基質である可能性について調べ

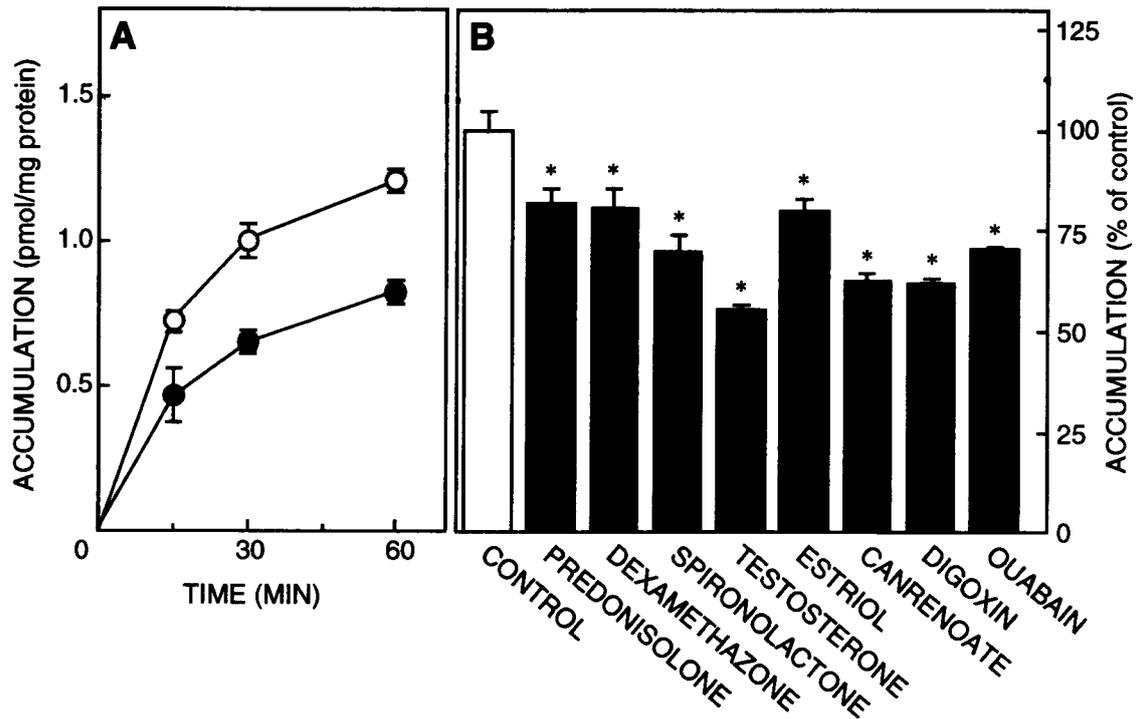


Fig. II-16. Effects of testosterone (A), and steroids (B) on [<sup>3</sup>H]MTX accumulation by LLC-OAT-K1 cells. (A) [<sup>3</sup>H]MTX accumulations in the absence (O) and presence of testosterone (●) at a concentration of 100 μM from the basolateral side (100 nM, pH 7.4) were measured for the specified periods at 37°C. (B) [<sup>3</sup>H]MTX accumulations in the absence (*control*) and presence of indicated drugs at a concentration of 100 μM from the basolateral side (100 nM, pH 7.4) were measured for 15 min at 37°C. Unlabeled incubation medium (pH 7.4) without drugs was added to the apical side. Each point or column represents the mean ± S.E. of three monolayers. \*P < 0.05, significant difference from control.

た。LLC-pBK細胞並びにLLC-OAT-K1細胞の側底膜側からの5分における[<sup>3</sup>H]MTX、[<sup>14</sup>C]インドメタシン、[<sup>3</sup>H]ジゴキシン、[<sup>3</sup>H]テストステロンの取り込み量を測定した (TABLE II-II)。その結果、OAT-K1細胞による[<sup>3</sup>H]MTX取り込みに対してこれら見かけ上拮抗阻害を示した薬物の取り込みは、LLC-pBK細胞との間に差は認められなかった。

さらにOAT-K1によるMTX輸送に対するこれら薬物の阻害効果が、OAT-K1に特異的なものであるか否かについて検討した。LLC-PK<sub>1</sub>細胞には、腎近位尿細管に相当する方向選択的な有機カチオン輸送機構が発現しており、その典型的な基質テトラエチルアンモニウム (TEA) を用いた機能特性に関する多くの情報が存在する(57)。そこでLLC-OAT-K1細胞に備わる有機カチオン輸送系に対するこれら薬物共存の影響について調べた (TABLE II-III)。LLC-OAT-K1細胞の側底膜側からの[<sup>14</sup>C]TEA取り込みに対して非標識TEAが最も

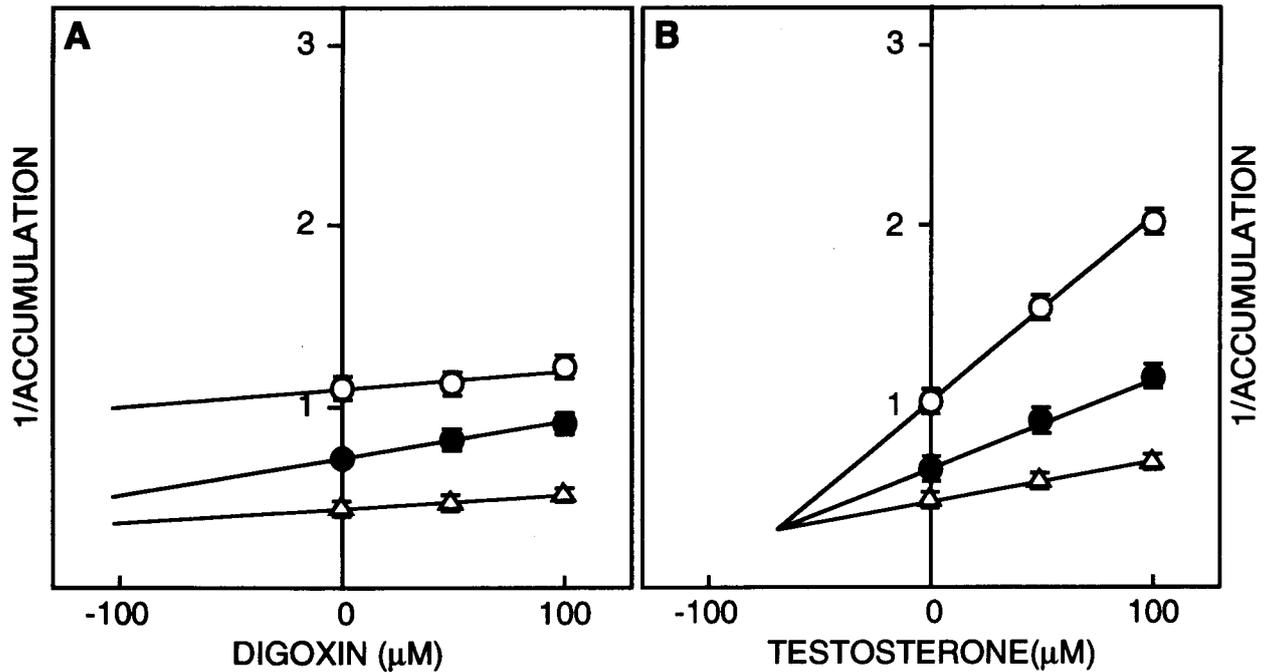


Fig. II-17. Dixon plots for inhibitory effects of digoxin (A) and testosterone (B) on [<sup>3</sup>H]MTX accumulation by LLC-OAT-K1 cells. [<sup>3</sup>H]MTX accumulation at each concentration of 100 (O), 200 (●) or 400 nM (Δ) in the presence of 50 and 100 μM of digoxin (A) or testosterone (B) from the basolateral side (pH 7.4) were measured for 15 min at 37 °C. Unlabeled incubation medium (pH 7.4) without drugs was added to the apical side. Data are expressed as 1/accumulation (pmol/mg protein/15 min). Each point represents the mean ± S.E. of three monolayers.

TABLE II-II  
Accumulation of methotrexate, indomethacin, digoxin and testosterone by LLC-OAT-K1 cells

[<sup>3</sup>H]Methotrexate (100 nM, 28.5 kBq/ml), [<sup>14</sup>C]Indomethacin (35 μM, 5.7 kBq/ml), [<sup>3</sup>H]digoxin (48 nM, 28.5 kBq/ml) and [<sup>3</sup>H]testosterone (8.5 nM, 28.5 kBq/ml) accumulated by LLC-OAT-K1 cells was measured for 5 min at 37°C. The accumulations are expressed as uptake clearance.

Drugs	Uptake Clearance	
	LLC-pBK	LLC-OAT-K1
	μl/mg protein/5 min	
[ <sup>3</sup> H]Methotrexate	1.6 ± 0.0	3.0 ± 0.2***
[ <sup>14</sup> C]Indomethacin	11.2 ± 0.3	9.7 ± 0.7
[ <sup>3</sup> H]Digoxin	3.5 ± 0.2	2.8 ± 0.2
[ <sup>3</sup> H]Testosterone	9.8 ± 0.4	10.7 ± 0.1

Each value represents the mean ± S.E. of three monolayers.

\*\*\*P < 0.001, significant difference from LLC-pBK.

強い阻害効果を有しており、LLC-OAT-K1細胞の側底膜側には宿主LLC-PK<sub>1</sub>細胞に備わる有機カチオン輸送機能が保持されていることが確認できた。OAT-K1による<sup>3</sup>H]MTX輸送に対して顕著な阻害効果を示した非標識MTX、インドメタシン及びケトプロフェンは何れもTEA取り込みに対する有意な阻害効果は示さなかった。一方、OAT-K1に対する非特異的な相互作用を示したジゴキシンや強い拮抗阻害作用を有するテストステロンは共にLLC-OAT-K1によるTEA輸送を有意に阻害した。

TABLE II-III  
Effects of NSAIDs and steroids on [<sup>14</sup>C]tetraethylammonium accumulation by LLC-OAT-K1 cells

[<sup>14</sup>C]Tetraethylammonium accumulation by LLC-OAT-K1 cells from the basolateral side (50 μM, 2 ml, pH 7.4) was measured for 15 min at 37°C in the absence (control) and presence of NSAIDs (1 mM) or steroids (100 μM). Unlabeled incubation medium without drugs was added to the apical side (2 ml, pH 7.4). After incubation, the radioactivity of solubilized cells was determined.

Drugs	Accumulation
	pmol/mg protein/15 min
Control	529.3 ± 44.5
Methotrexate	435.4 ± 27.8
Indomethacin	428.8 ± 9.5
Ketoprofen	435.2 ± 30.5
Digoxin	388.6 ± 2.1*
Testosterone	55.9 ± 0.5***
Tetraethylammonium	30.4 ± 0.6***

Each value represents the mean ± S.E. of three monolayers.

\*P < 0.05; \*\*\*P < 0.001, significant difference from LLC-pBK.

#### 第4節 OAT-K1によるMTX排出機能

ラット腎尿細管においてOAT-K1は刷子縁膜に局在することから、OAT-K1の生理機能として $[^3\text{H}]$ MTXの取り込み並びに排出といった2種の輸送方向が考えられる。そこで予めMTX取り込み活性が確認された卵母細胞を用いて、MTXの排出実験を行った (Fig. II-18.)。一定量のMTXを卵母細胞に注入して薬物を含まない緩衝液に置換後、それぞれの時間における卵母細胞内残存MTX量を測定した。この結果、図から明らかにOAT-K1発現卵母細胞におけるMTX排出活性は、対照に比べて顕著に高かった。従って、OAT-K1発現卵母細胞は、 $[^3\text{H}]$ MTXの取り込みと排出といった両方向性の輸送活性を示すことが分かった。

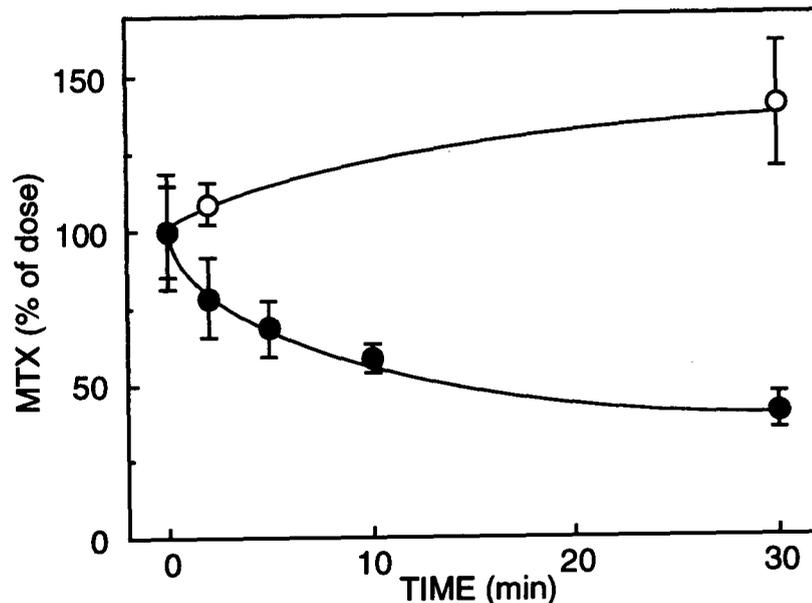


Fig. II-18. Efflux of  $[^3\text{H}]$ MTX by *Xenopus* oocytes. Efflux of  $[^3\text{H}]$ MTX by water (○) or *in vitro* transcribed rat OAT-K1 mRNA (●) injected oocytes was assayed for specified time at 25°C in incubation buffer immediately after load of 50 nl of  $[^3\text{H}]$ MTX solution (20  $\mu\text{M}$ ). Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of five experiments. An oocyte was used for each experiment.

さらに頂側膜側 (腎尿細管刷子縁膜に相当) にOAT-K1が局在することが示唆されたMDCK-OAT-K1細胞を用いてMTX排出活性について検討した (Fig. II-19 (A) and (B).)。MDCK-OAT-K1細胞及びMDCK-pBK細胞に37°C、15分間で各濃度 $[^3\text{H}]$ MTXを取り込ませた後、薬物を含まないメEDIUMに置換した。続いて一定時間インキュベートした後、細胞

内残存 $^3\text{H}$ MTX量を測定した。 $^3\text{H}$ MTX排出量は、取り込み終了直後の値をコントロールとして差し引くことによって求めた。MDCK-pBK細胞と比較して、MDCK-OAT-K1細胞による $37^\circ\text{C}$ 、15分間の取り込み量は、それぞれの濃度で2～5倍量であった。その結果、コントロールをそれぞれ100%として解析したところ、MDCK-OAT-K1細胞によるMTX排出活性は、 $1\ \mu\text{M}$ において著しく高かった。Figure II-19 (C)に示すように $1\ \mu\text{M}$ でのMDCK-OAT-K1細胞によるMTX排出速度定数は0.148と算出され、MDCK-pBK細胞 (0.01) と比較して約15倍高いことが示された。従ってMDCK-OAT-K1細胞によるMTX輸送は、取り込み並びに排出といった両方向性の輸送活性を示し、卵母細胞と対応する結果を得た。

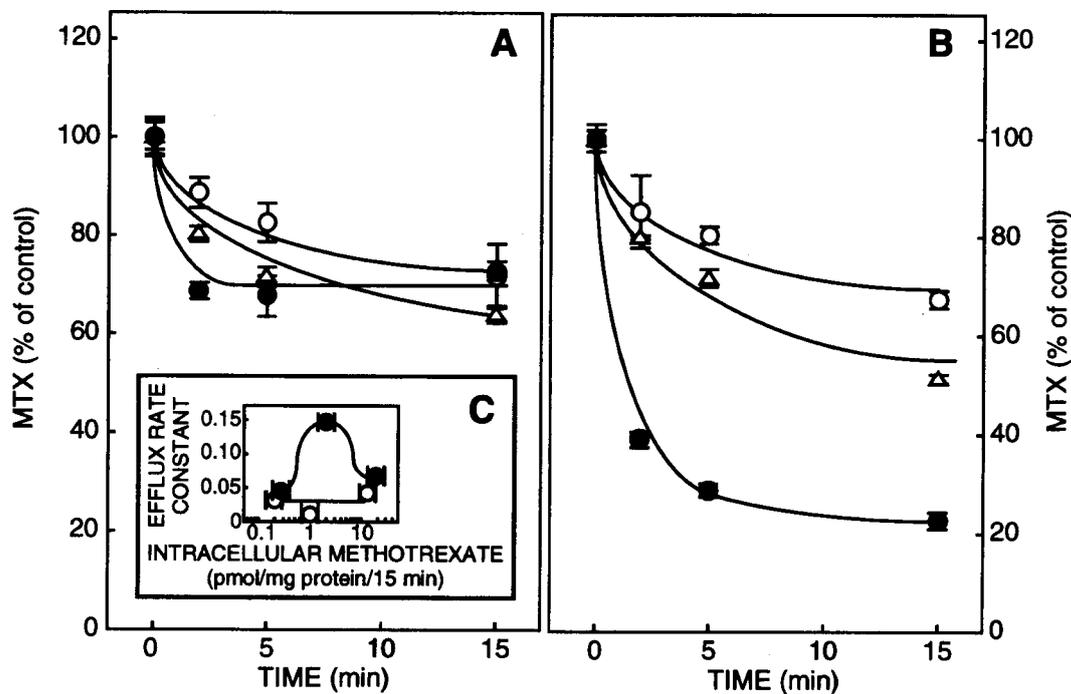


Fig. II-19.  $^3\text{H}$ MTX efflux by MDCK-pBK cells (A) and MDCK-OAT-K1 cells (B), and  $^3\text{H}$ MTX efflux rate constant (C) After the  $^3\text{H}$ MTX accumulation at each concentration of 0.1  $\mu\text{M}$  (○), 1  $\mu\text{M}$  (●) or 10  $\mu\text{M}$  (△) for 15 min at  $37^\circ\text{C}$  (2 ml, pH 7.4), wash each cells and incubate in efflux medium for the specified periods at  $37^\circ\text{C}$  (2 ml, pH 7.4).  $^3\text{H}$ MTX remaining in MDCK-pBK cells (A) and MDCK-OAT-K1 cells (B) were measured. (C). The efflux rate constant of MDCK-pBK cells (○) and MDCK-OAT-K1 cells (●) were derived by the integration plot of efflux curve at each concentration. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of three experiments.

## 考察

第II章において先ず、アフリカツメガエル卵母細胞を用いてクローン化トランスポータOAT-K1の薬物輸送活性について評価した。種々の薬物を用いた検討により、OAT-K1はMTXや葉酸を認識するトランスポータであることが示唆された。これらの結果は、OAT-K1 mRNA由来のタンパクが卵母細胞の細胞膜に挿入されること、トランスポータとして薬物輸送機能を有することを示すものである。

次に2種のOAT-K1安定発現細胞を作成し、機能解析を行った。抗血清を用いたタンパクレベルでの解析結果を併せて考えると、OAT-K1はLLC-PK<sub>1</sub>細胞ではネイティブなタンパクとして側底膜に発現しており、MDCK細胞では翻訳後の修飾を受け小分子化した後、頂側膜に局在することが示唆された (TABLE II-IV)。トランスポータの膜局在性につい

TABLE II-IV  
Comparison of molecular weight and membrane localization of the immunoreactive OAT-K1-related protein among rat kidney, LLC-OAT-K1 cells and MDCK-OAT-K1 cells

	LLC-OAT-K1	MDCK-OAT-K1	Rat Kidney
Molecular Weight (kDa)	70	50	40
Membrane Localization	Basolateral Membrane	Apical Membrane	Brush-border Membrane

てPascoeら(58)は、促進拡散系型グルコーストランスポータ (GLUT-1, -2, -3, -4 and -5) をMDCK細胞にトランスフェクションして調べている。*In vivo*では血管側に相当する側底膜に局在するトランスポータが、MDCK細胞においてGLUT1とGLUT2は側底膜に、GLUT3とGLUT5は頂側膜に発現することを示している。これは、同一のファミリーに属するトランスポータ間にいくつかの膜局在化機構が存在する可能性を示唆するものである。一方、腎髄質集合管の頂側膜に局在するバソプレッシン誘導性の水チャンネルAQP2をLLC-PK<sub>1</sub>細胞にトランスフェクションした場合、プロテインキナーゼAによる刺激の後、AQP2は頂側膜ではなく側底膜に発現することが示された(59)。この結果は、ラット及びヒトでは管腔側に局在するタンパクが、LLC-PK<sub>1</sub>細胞では血管側に相当する側底膜に誤挿入されることを示している。OAT-K1の膜局在化には、GLUTファミリーやAQP2で示唆されてい

る個々のトランスポータに特有な膜局在化機構が存在する可能性が考えられる。一方、肝 *oatp1* のように同一分子のトランスポータが、肝及び腎において局在性の異なる例も報告されている(16)。従ってOAT-K1の膜局在化機構は、タンパクの有するシグナルなどに依存することも考えられるが、その組織、即ちOAT-K1の発現する細胞に備わるプロセシング過程を含む膜局在化機構に強く影響を受けると推察される。なお本章において、抗OAT-K1抗血清を用いて検出されたタンパクが、LLC-PK<sub>1</sub>細胞の側底膜側及びMDCK細胞の頂側膜側、即ちMTX取り込みの上昇が認められた膜に発現することを確認する必要がある。また、2種の安定発現細胞並びに腎尿細管刷子縁膜で検出されたタンパクの糖鎖付加なども併せて解析することにより、OAT-K1の糖鎖付加も含めた小分子化と膜発現の関係が明らかになると考える。さらに本研究において腎特異的なプロセシング機構の存在が示唆された。その実体である修飾酵素の単離をはじめとした解析を展開することは、腎特有の膜タンパク局在化機構の解明に役立つこと、この修飾機構による種々トランスポータの細胞膜発現過程を標的とした新分野の薬物開発に応用性の高いことが推察される。

2種のトランスフェクタントLLC-OAT-K1細胞並びにMDCK-OAT-K1細胞を用いた機能解析の結果、OAT-K1 cDNA導入によりMTX及び葉酸の取り込みが顕著に上昇した。これらは卵母細胞発現系において得られた結果と対応するものであり、OAT-K1がMTX並びに葉酸を認識するトランスポータであることを示唆するものである。またOAT-K1を介するMTX輸送におけるKm値は2種の細胞においてそれぞれ1.0  $\mu$ M、2.1  $\mu$ Mと対応するものであった。さらにFigure II-20. に示すように、2種のトランスフェクタントにおけるMTX取り込みに及ぼす種々アニオン性薬物の有する共存阻害効果は良好な相関関係を示した。これらの結果より、OAT-K1タンパクは修飾、非修飾体共に類似したMTX輸送の親和性並びに薬物感受性を有していることが明らかになった。従って、OAT-K1タンパクの2種トランスフェクタント間における分子量の相違点は、主としてOAT-K1の細胞膜局在に寄与すること、OAT-K1のMTX輸送特性に対する影響は最小限であることが示唆された。

以上、OAT-K1は、LLC-PK<sub>1</sub>細胞には存在しないがラット腎及びMDCK細胞に備わる、翻訳後の小分子化修飾過程を含む膜局在化機構によって刷子縁膜並びに頂側膜に挿入されることが示唆された。

臨床においてMTXは白血病、乾癬並びにリュウマチ性関節炎など種々疾病の治療に繁用されおり(60 - 62)、ヒトではその大部分が未変化体として尿中排泄されることが知られている(46)。MTXの主な処理臓器が腎臓であることから、これまで種々の実験系を用いて

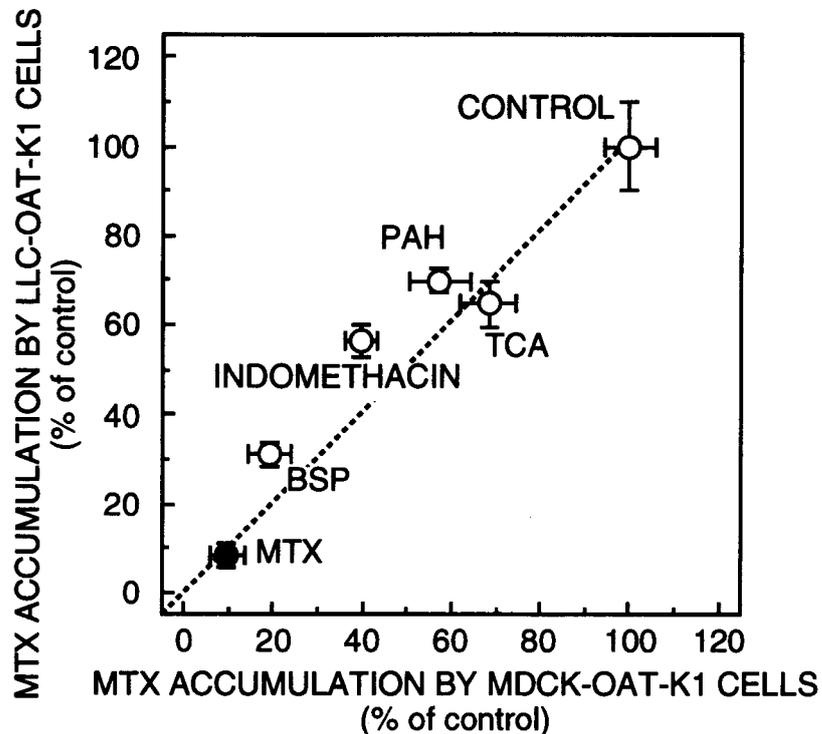


Fig. II-20. Comparison of inhibitory effects of several anionic compounds on [<sup>3</sup>H]MTX accumulation between by LLC-OAT-K1 cells and by MDCK-OAT-K1 cells.

MTX尿中排泄機構の研究がなされており、多くの情報が蓄積されている(63 - 69)。これらの解析結果からMTXは、尿細管側底膜側からその負電荷を認識する輸送系により濃縮的な細胞内取り込みを受けること(66, 70)、ウサギ単離尿細管を用いた研究においてMTXの尿細管移行は近位尿細管のS2及びS3分節、即ち近位尿細管曲部から直部にわたる範囲で高いことが示唆されている(65)。近位直尿細管にOAT-K1 mRNAが最も強く検出された結果は、OAT-K1が尿細管分節中、MTX濃縮活性の最も高い部位において機能していることを示唆するものである。一方、管腔側刷子縁膜にはATP依存性及び非依存性の少なくとも2種の輸送機構が存在し、MTXの尿細管分泌を媒介することが報告されており(64, 68, 69)、MTXの腎挙動は性質の異なる多くのトランスポーターによって制御されていると推察される。Bhandariら(71)らはラット腎刷子縁膜を用いてMTXの構造的類似薬物である葉酸の輸送機構について検討している。この結果、刷子縁膜は葉酸に対して特異的な結合と輸送を示す2種のコンポーネントを有すること、そのKm値はそれぞれ0.67  $\mu$ M及び1.1  $\mu$ Mであることを報告している。OAT-K1有機アニオントランスポーターのMTXに対するKm値は、

LLC-OAT-K1細胞では $1.0\ \mu\text{M}$ 、MDCK-OAT-K1細胞では $2.1\ \mu\text{M}$ であることから、腎刷子縁膜における高親和性の輸送機構の一部にOAT-K1が関与することを強く示唆するものである。

また、MTXは高濃度に腎移行する薬物であるが、一部肝移行して胆汁排泄を受ける(72)。HoneとReed(73)は肝側底膜小胞を用いた検討の結果、MTXはトランスポータ介在型の輸送機構によって小胞内に取り込まれること、 $\text{Na}^+$ や $\text{H}^+$ 勾配非依存性であること、起電性であること、さらに構造的に無関係なアニオン性の物質並びに葉酸誘導体によって阻害されることなどを報告している。肝類洞側膜にはOAT-K1のホモログ $\text{oatp1}$ が発現しており、MTXの肝組織移行を媒介すると考えられるが現時点におけるその情報は存在しない。一方、ヒト肝有機アニオントランスポータOATPはMTXを認識しないことから(25, 74)、ラット肝 $\text{oatp1}$ を介するMTXの細胞内取り込み機構の存在する可能性は低いと思われる。以上、これら肝類洞側膜におけるMTX輸送は、OAT-K1の有するMTX輸送特性と対応することが示されたが、OAT-K1は腎のみに発現することを考え併せると、肝類洞側膜には機能的にOAT-K1と類似する未知のトランスポータが発現していることが推察される。

OAT-K1の生理的役割を明確にするため、MTX療法時の薬物相互作用について着目した。*In vivo*組織分布実験において、大腿静脈より瞬時投与されたMTXは速やかに腎臓に分布すること、その移行性は非標識MTX、インドメタシン及びケトプロフェンの併用により顕著に低下することが示された。この結果は、臨床におけるMTXの腎クリアランス低下に起因する、MTXの血中濃度上昇と副作用発現といった現象を一部再現するものである。一方、MTXとNSAIDの併用によって発現する毒性は、MTXの蓄積に起因する腎毒性であることも報告されている(55, 75, 76)。これはNSAID併用によって腎移行するMTXの絶対量が減少するにもかかわらず、MTXの尿細管分泌がNSAIDによって強く阻害されており、管腔側刷子縁膜におけるMTXとNSAIDとの相互作用による腎毒性発現を示唆している。本研究において検討したNSAID（インドメタシンやケトプロフェン）はOAT-K1を介するMTX輸送に対して拮抗阻害を示したことから、OAT-K1はこの薬物相互作用の発現機構に少なくとも一部関与することが強く示唆された。

*In vivo*においてMTXの体内動態の制御に関わるトランスポータ並びに結合タンパクがいくつかクローニングまたは精製されており(77-87)、内因性物質葉酸と生体異物MTXの体内動態について解明されつつある。TABLE II-VにこれらMTXまたは葉酸を認識する「輸送担体」についてまとめた。特にMTXの腎挙動を制御すると考えられる種々膜タンパクは、それぞれ数pMから数百 $\mu\text{M}$ というMTXに対する $K_m$ 値を有しており、全体として許容

範囲の広いMTX輸送ネットワークを形成していることが推察される。したがって腎尿細

TABLE II-V  
Comparison of methotrexate and folate carriers which recently  
cloned and characterized

Carrier*	cDNA (bp)	Amino acid	M.W. (kDa)	Tissue**	Membrane	Km or Kd ( $\mu$ M)
OAT-K1	2,788	669	40 [74]	K	Brush-border	1.0 for MTX
IFC-1	2,274	512	[58]	SI,K,B,H,Li	-	2.0 for Folate
hIFC-1	2,644	591	[65]	P>SI>>Li>K	-	0.71 for Folate
hFOLT	2,175	590	[65]	P,Li>Ln	-	-
hMtxT	2,863	590	[64]	-	-	-
M-FBP	1,126	257	40 [30]	KB cells,P,B	-	-
FBP1	-	-	30	K	Brush-border	$4.2 \times 10^{-5}$ for Folate
cMOAT	4,918	1,541	190[173]	Li>K,D,I	Canalicular	296 for MTX

\*OAT-K1, kidney specific organic anion transporter ; IFC-1, mouse intestinal folate carrier (84); hIFC-1, human intestinal folate carrier (85); hFOLT, human placental folate transporter (82); hMtxT, human methotrexate transporter (81); M-FBP, rat renal membrane associated folate binding protein (77); FBP1, human folate binding protein from KB cells (78); cMOAT, rat canalicular multi-specific organic anion transporter (84, 86)

\*\*B, brain; D, dodenum; H, heart; I, ileum; K, kidney; Li, liver; Ln, lung; P, placenta; SI, small intestine

管上皮細胞の管腔側刷子縁膜に局在するOAT-K1は、主として数 $\mu$ Mの濃度領域においてMTXの腎挙動を制御するトランスポータであることが推察された。

これらの結果より、管腔側刷子縁膜において高親和性のMTX輸送をOAT-K1が媒介すること、MTXとNSAIDとの相互作用部位としてOAT-K1が関与することが示唆された。

卵母細胞並びにMDCK-OAT-K1細胞によるMTX排出活性の発見により、OAT-K1がラット腎刷子縁膜においてMTXの尿細管分泌を媒介するトランスポータであることが見出された。また、OAT-K1のホモログoatp1による肝指向型有機アニオンBSPの輸送は、HeLa細胞を用いた一過性発現系において取り込み及び排出の両方向性を示すことが明らかとなった(23)。さらに代表的な促進拡散系トランスポータであるGLUTグルコーストランスポータファミリーは、それぞれの発現する組織において膜内外の濃度に従ったD-グルコース輸送を示す(88, 89)。OAT-K1はこれらトランスポータなどのような促進拡散系トランス

ポータファミリーに属するものと考えられる。

これまでの結果から、OAT-K1有機アニオントランスポータは腎近位直尿細管の刷子縁膜局在性であること、MTXを認識すること、促進拡散系のトランスポータファミリーに属することが明らかになった。さらにOAT-K1によるMTX輸送が、取り込み並びに排出といった両方向性であることが示唆された。一方、高濃度に腎移行するMTXは、尿細管上皮細胞内から管腔側即ち、刷子縁膜を介する外向きMTX勾配を形成すると考えられる。OAT-K1は、その濃度勾配に従ったMTXの尿細管分泌を媒介するトランスポータであると示された。従来、刷子縁膜のPAHを典型的な基質とする腎有機アニオン輸送系によって、MTXは尿細管分泌を受けると考えられてきたが(66)、PAHを認識しない本トランスポータOAT-K1がMTXの尿細管分泌に少なくとも一部寄与していることが示唆された。この結果は、複数のタンパクから構成される腎尿細管刷子縁膜に展開する有機アニオントランスポータ・ネットワークの存在を支持すると共に、構造的にOAT-K1と相同性を示すタンパクを含む多くのトランスポータが、アニオン性薬物の尿中排泄に機能していることを示唆している。

以上、腎局在性有機アニオントランスポータOAT-K1は取り込みと排出の両方向性輸送能を有することが明らかになった。さらにOAT-K1の生理的役割について種々の発現系を用いて検討した結果、OAT-K1は腎尿細管刷子縁膜において葉酸の再吸収に一部関与すること、MTXの尿細管分泌を媒介することが示唆された (Fig.II-21)。従ってOAT-K1は、MTXの腎蓄積に起因する毒性の発現防御に関わるトランスポータであると考えられた。

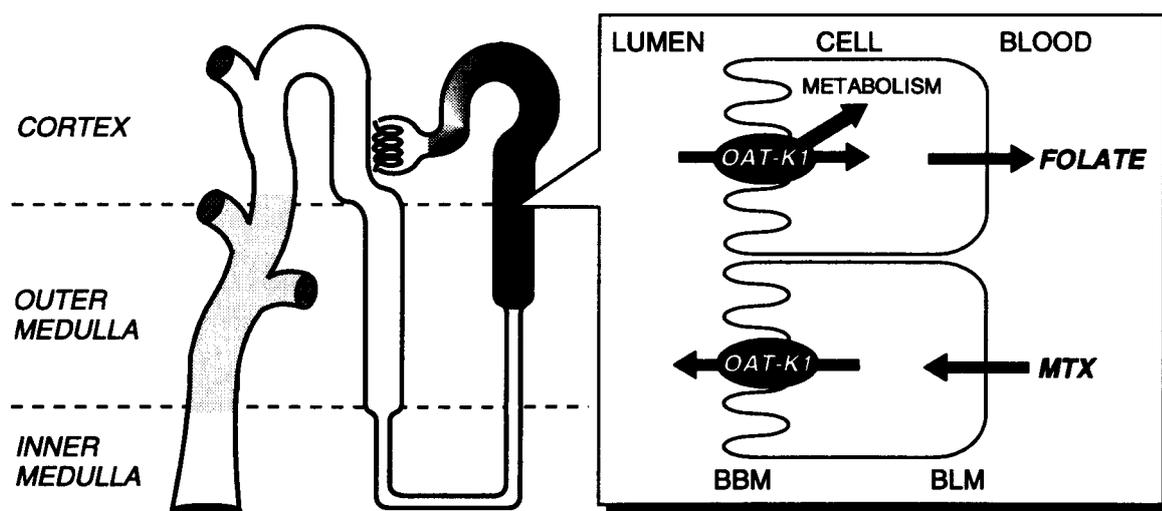


Fig. II-21 Typical diagram of OAT-K1

### 第III章 広範な基質認識を示す腎局在性有機アニオントランスポータ OAT-K2のcDNAクローニングと構造・組織分布及び機能解析

腎尿細管における有機アニオン分泌挙動は、生体外異物除去を司る腎臓の中心的な生理機能であり、主として機能面に焦点を当てた膜レベルから個体レベルに至る膨大な量の解析が進められている。尿細管の管腔側刷子縁膜及び血管側側底膜には構造的に多様な薬物の膜輸送を媒介するトランスポータが複数発現しており、薬物の体内動態を支配する極めて重要な生体側因子として位置付けられている(4)。第I章及び第II章で述べたように、腎局在性の新規有機アニオントランスポータOAT-K1は、MTXの尿細管分泌に関与することが示唆された。一方、腎有機アニオン輸送系の代表的な基質とされているPAHは、OAT-K1によるMTX輸送に対して有意な阻害効果を有していたが、OAT-K1の基質として認識されないことが示され、PAHをはじめとするアニオン性薬物の尿細管分泌を担う未知のトランスポータの存在することも示唆されている。従って、腎にはOAT-K1関連タンパクを含む多くのトランスポータが発現しており、広範なアニオン性物質の尿細管分泌を媒介していると考えられる(5, 19)。このように尿細管有機アニオン輸送系は複数種のトランスポータから構成されており、腎特有の「有機アニオン輸送ネットワーク」を形成していることが分子レベルにおいて指摘されている(19)。これら尿細管における薬物の処理機構、即ち生体異物の解毒機構を総合的に理解するためには、さらなるトランスポータタンパクの同定と統合による「有機アニオン輸送ネットワーク」の再構築が必要である。一方、基質特異性の低いNonspecificまたはMultispecificな薬物認識能を有することが尿細管有機アニオン輸送系の総合的特徴として知られており、クローン化トランスポータ個々の薬物認識機構の解明・整理による種々薬物の腎動態の掌握、それに基づく医薬品の有効利用は必要不可欠と考える。

本章では、Multispecificな基質認識を示す尿細管有機アニオン輸送系に属するトランスポータの実体解明を目的として、OAT-K1のcDNAクローニングと同時に単離された新規cDNAを用いて検討した。得られたcDNAのコードするタンパクをOAT-K2と名付け、その構造・組織分布・機能特性について解析を行った。

## 第1節 OAT-K2 cDNAのクローニング・構造

第I章で述べたように、肝oatp1のアミノ酸配列を参考にdegenerative PCRを行って得られたDNA断片を用い、ラット腎cDNAライブラリーをスクリーニングした結果、ラットOAT-K1 cDNAのクローニングに成功した。これと同時に、 $\lambda$ gt22Aベクターに導入した組み替えファージからoatp1及びOAT-K1とは異なる陽性クローン ( $\lambda$ OAT-K2) を単離した。これよりDNAを抽出した後、cDNAをプラスミドベクター pSPORT1にサブクローニングし、合成プライマーを用いジデオキシ法によって塩基配列を解析した。その結果、単離に成功した完全長OAT-K2 cDNAはOAT-K1及びoatp1とは異なる塩基配列から構成されること、遺伝子データベースを検索した結果OAT-K2は新規のcDNAであることが分かった。

単離されたOAT-K2 cDNAは、1,494塩基からなる翻訳領域と、5'側と3'側のそれぞれ563塩基、415塩基の非翻訳領域からなり、全長2,472塩基対から構成されることが分かった。また、3'側非翻訳領域最下流にはpoly Aが見出された。

cDNAの塩基配列から推定されるOAT-K2タンパクはアミノ酸498個からなり、その分子量は55,185であった。OAT-K2の一次構造上特徴的なコンセンサス配列が存在するか検索したところ、cAMP依存性リン酸化部位が、211、473番目のスレオニン残基と455、477番目のセリン残基に4ヶ所、プロテインキナーゼCによるリン酸化部位が、211、473番目のスレオニン残基に2ヶ所存在した(8) (Fig. III-1A)。また、N-グリコシレーション部位が、311、320番目のアスパラギン残基に2ヶ所存在していた。さらにOAT-K2タンパクは、ラットOAT-K1と91%、肝oatp1と65%、ヒトOATPと53%、最近ラット脳より単離されたNa<sup>+</sup>非依存性有機アニオントランスポーターoatp2と62%、ラットPGTと35%、ヒトPGTと31%のアミノ酸同性を有しており (Fig. III-1A)、疎水性プロット (Fig. III-1B) より推定される疎水性の強い $\alpha$ -ヘリックス領域が8本存在することから、OAT-K2は8回膜貫通型の糖タンパクであることが推察された。

**A**

Rat OAT-K2	1:MGDLEK---GAAT-HGAGCFAX-IX-VF--LMALT-C-A--YVSKLSLQTFMSSMLTQIERQFGI	53
Rat OAT-K1	1:MEETEK---KIAT-QEGRIFSK-MX-VF--LLELT-C-A--CLTKSLSGVYVYNSMLTQIERQFDI	53
Rat oatp1	1:MGTEK---RIET-HRIRCLSK-LX-MF--LLALT-C-A--FVSKLSLQSYVNSMLTQIERQFMI	53
Human OATP	1:MGKSEK---RVAT-HGVRCAF-IX-MF--LLALT-C-A--YVSKLSLQSYVNSMLTQIERQFGI	53
Rat oatp2	1:MGLLPKGARQGSSTSSVPRDRCPRSVFNKIVFVLCGLLQCLQLLYSAYFKSSLTTEKRFGL	65
Rat PGT	1:MGLLPKLGVSGSDTSTRAGRRCARSVFNGIKVFLVLCGLLQCLQLLYSAYFKSSLTTEKRFGL	65
Human PGT	1:MGLLPKLGVSGSDTSTRAGRRCARSVFNGIKVFLVLCGLLQCLQLLYSAYFKSSLTTEKRFGL	65
-----M1-----		
Rat OAT-K2	PTAIVGFGINGSFEIGNLLLIIFVSYFGMKLHRPVIIVGVCVAVMGLGCFIISLPHFLMGRYEVETTILPTSNLSSNSFLCMENQOTLNP-AQDPAECVKEVKSLMWIYLVGNIIIRGIGE	172
Rat OAT-K1	STSVAGLINGSFEIGNLPIIFVSYFGTKLHRPVIIVGICQVIMGLGCLLMSLPHFPMGRYEVETTISPTGNLSSNSFLCMENRQTLKP-TQDPAECVKEVKSLMWIYLVGNIIIRGIGE	172
Rat oatp1	PTSLVGLINGSFEIGNLLLIIFVSYFGTKLHRPVIIVGICQVIMGLGCLLMSLPHFPMGRYEVETTISPTGNLSSNSFLCMENRQTLKP-TQDPAECVKEVKSLMWIYLVGNIIIRGIGE	172
Human OATP	PTSLVGLINGSFEIGNLLLIIFVSYFGTKLHRPVIIVGICQVIMGLGCLLMSLPHFPMGRYEVETTISPTGNLSSNSFLCMENRQTLKP-TQDPAECVKEVKSLMWIYLVGNIIIRGIGE	171
Rat oatp2	SSSSGLISSLNEISNATLIIFVSYFGSRVNRPRMIGIGLLLAAGAFVLTLPHPFLSEPYQYTLSTTDGNRS-SFQTDLCQKHGALPFSKCHSTVPDTHKETSLLWGLMVVAQLLAGIGT	184
Rat PGT	SSSSGLISSLNEISNATLIIFVSYFGSRVNRPRMIGIGLLLAAGAFVLTLPHPFLSEPYQYTLSTTDGNRS-SFQTDLCQKHGALPFSKCHSTVPDTHKETSLLWGLMVVAQLLAGIGT	184
Human PGT	SSSSGLISSLNEISNATLIIFVSYFGSRVNRPRMIGIGLLLAAGAFVLTLPHPFLSEPYQYTLSTTDGNRS-SFQTDLCQKHGALPFSKCHSTVPDTHKETSLLWGLMVVAQLLAGIGT	184
-----M2-----		
Rat OAT-K2	MPIMPLGVSYIENFAKSENSPLYIGILETGKMGIFPGLLLGSFPCASIVYDTGSVNTDDELITPTDIRWVGAWWIGFLVCAGVNLISIPFPFKPKLPKEGLQENVGDTENAKEEKHRE	120
Rat OAT-K1	T.V...I...D...M.VA...Y.Q...I...S.T...T...L.A...K.Q...AV.KDG.V...YCG	292
Rat oatp1	T.L...I...D...F...LV...AI...LI...A.S.N...IE...I...T...F...I...V.TA...L.N...ET.A.IIK.EN.D.QK	292
Human OATP	T...I...D...F...LV...AI...LI...A.S.N...IE...I...T...F...I...V.TA...L.N...ET.A.IIK.EN.D.QK	292
Rat oatp2	V.Q.F.I.VDD.EPT...S.FAIAVF.A.Y.VMLR.F.Y.R.D.ATVNL.S.G.P.I...L.L.ISS.FL.VT.L...RAM-SR.-A.R-SV.AEETMTEED	301
Rat PGT	V.Q.F.I.VDD.EPT...S.FAIAVF.A.Y.VMLR.F.Y.R.D.ATVNL.S.G.P.I...L.L.ISS.FL.VT.L...RAM-SR.-A.R-SV.AEETMTEED	301
Human PGT	V.Q.F.I.VDD.EPT...S.FAIAVF.A.Y.VMLR.F.Y.R.D.ATVNL.S.G.P.I...L.L.ISS.FL.VT.L...RAM-SR.-A.R-SV.AEETMTEED	301
Consensus	V...Q...F...I...V...D...D...E...P...T...S...F...A...I...A...V...F...A...Y...V...M...L...R...F...Y...R...D...A...T...V...N...L...S...G...P...I...L...L...I...S...S...F...L...V...T...L...R...A...M...S...R...-...A...R...S...V...A...E...E...T...M...T...E...E...D	302
-----M3-----		
Rat OAT-K2	KAKEEKGITKDF-PPFLKSLSCNPIYMLFTLISLVQNAPNIYFSLPKYLENQYKSTAEVIFLMGVYVNLPAICIGYLIAGFMKKFKITVKTAAFLAC-LSLSEYSPGFCNFLTIC	238
Rat OAT-K1	RPRKKN...PVQL.DLHAVHPYK...G.I.N.K.T...Q...O...I.S.S.S.A...I...S...P...L...G...I...K...V...R...V...F...L...L...F...L...H...M...L	410
Rat oatp1	Q.R.NL...-L.T.M.R.F...I.T...G.I.N.K.T...Q...O...I.S.S.S.A...I...S...P...L...G...I...K...V...R...V...F...L...L...F...L...H...M...L	410
Human OATP	E.V.K.Y...-L.M...I.V.I.F...V.N.M.I...M...Q...I.S.S.S.A...I...S...P...L...G...I...K...V...R...V...F...L...L...F...L...H...M...L	410
Rat oatp2	SRGSLMDFI.R.PRI...RL.MNPLFMLVLSQCTF-SSVIAGLST.N.F.K.ATA.YAN.I.AV...AAL.M.FG.I.L.R.VPPLQ.IPRV-ATIITISMILCVPL.FMG	419
Rat PGT	SRGSLMDFI.R.PCI...RL.MNSLFVLLVLAQCTF-SSVIAGLST.N.F.K.ATA.YAN.I.AV...AAL.M.FG.I.L.R.VPPLQ.IPRV-ATIITISMILCVPL.FMG	420
Human PGT	SRGSLMDFI.R.PCI...RL.MNSLFVLLVLAQCTF-SSVIAGLST.N.F.K.ATA.YAN.I.AV...AAL.M.FG.I.L.R.VPPLQ.IPRV-ATIITISMILCVPL.FMG	420
Consensus	S...R...G...S...L...M...D...F...I...R...P...R...I...R...L...M...N...P...L...F...M...L...V...L...S...Q...C...T...F...-S...S...V...I...A...G...L...S...T...N...F...K...A...T...A...Y...A...N...I...A...V...A...A...L...M...F...G...I...L...R...V...P...P...L...Q...I...P...R...V...-A...T...I...I...T...I...S...M...I...L...C...V...P...L...F...M...G	420
-----M4-----		
Rat OAT-K2	DNVAVGLTNSYERDQKPLYLENNVLDACNTRCSCLTKTWDPVCGDNGLAYMSACLACG-EKSVGT--GTNMVFNHCSCIQSPGNSSAVLGLNCKGPECTNKQYLLLSLGFSLIYLSFA	355
Rat OAT-K1	AA...T.KGV.HQ.HV.SK...S.N...V...-K.F...OD...L...L...A...R...P...T...I...I...L...T	527
Rat oatp1	E.SS.V.INT...GIPQD.V.DIP...VD.N.PS.I...N...S.L...-T.I...-I...Q...TS...D...D.SLM...F...AMS.FI.L	527
Human OATP	F...T...GV.HQ.V.K...N.S.N...O...S...D.A...F...I...A...I...G...C...F...I...L	526
Rat oatp2	STSA--EV-PPSTSS-SIHP-QSPA.RRD...PDSFFH...VE.V.P.H...SSINTSSEASKEPIYL...VSGGSA.QDR.MPHVLR-LLLPIS-F.SFAA.IACI-H	532
Rat PGT	STPT--EV-PPSTSS-SIHP-QSPA.RRD...PDSIFH...IE.L.P.H...SNINMSSATSKQLIYL...VTGGSA.AKTGSCVPCHFLLPAL-F.SFVS.IACI-H	533
Human PGT	STPT--EV-PPSTSS-SIHP-QSPA.RRD...PDSIFH...IE.L.P.H...SNINMSSATSKQLIYL...VTGGSA.AKTGSCVPCHFLLPAL-F.SFVS.IACI-H	533
Consensus	S...T...S...A...-...E...V...-...P...P...S...T...S...S...I...H...P...-...Q...S...P...A...R...R...D...P...D...S...F...F...H...V...E...V...P...H...S...S...I...N...T...S...S...E...A...S...K...E...P...I...Y...L...V...S...G...G...S...A...Q...D...R...M...P...H...V...L...R...-...L...L...P...I...S...-...F...S...F...A...A...I...A...C...I...-...H	533
-----M5-----		
Rat OAT-K2	AIPGMVFLRCIKSEKSLGIGIHAFICRVFAGIPAPIYFGALIDRTCLHWQTKC-GAGACRYDINSFRRIYLGMSAALRGSSYLPAFVIVILTRKPLGPKINSSEMEIAENKLE	474
Rat OAT-K1	V...V.L.T...V...OR...R...L...L...P...I...F...L...M...O...F...D...D...A...T...D...H...M...G	645
Rat oatp1	L...M...V.L.T...T...M.S...L...ES...I...S...T...Y...L...P...F...V...L...L...L...C...H...E...N...A...G...T...L...I...T...V...K	646
Human OATP	G...L...L...V.L.T...IL...E...R...L...P...A...F...V...L...R...T...Q...F...D...E...K...T...D...H	645
Rat oatp2	N-L.MV.VVND...V.VOPFLM.LL.WL...SLY.L...SS.VR.NYL...S.R...AY.NDAL.NR...LQMVKALGT.LL.F-S-W.MKKNKREYSLQENTSLI	643
Rat PGT	N-L.MV.VVND...V.VOPFLM.LL.WL...SLY.L...SS.VR.NYL...S.R...AY.NDAL.NR...LQMVKALGT.LL.F-S-W.MKKNKREYSLQENTSLI	643
Human PGT	N-L.MV.VVND...V.VOPFLM.LL.WL...SLY.L...SS.VR.NYL...S.R...AY.NDAL.NR...LQMVKALGT.LL.F-S-W.MKKNKREYSLQENTSLI	643
Consensus	N...-...L...M...V...V...V...N...D...V...V...O...P...F...L...M...L...L...W...L...S...L...Y...L...S...S...V...R...N...Y...L...S...R...A...Y...N...D...A...L...N...R...L...Q...M...V...K...A...L...G...T...L...L...F...-S...-W...M...K...K...N...K...R...E...Y...S...L...Q...E...N...T...S...L...I	643
-----M6-----		
Rat OAT-K2	KESQCTDVHRNPKPKNDGELKTKL	498
Rat OAT-K1	EH...GS.QVE	669
Rat oatp1	NE.K.IYOKSTVLK.D	670
Human OATP	E.E.L.-S.VTE	661
Rat oatp2	E.E.L.-S.VTE	661
Rat PGT	E.E.L.-S.VTE	643
Human PGT	E.E.L.-S.VTE	643
Consensus	E...E...L...-S...V...T...E	643

**B**

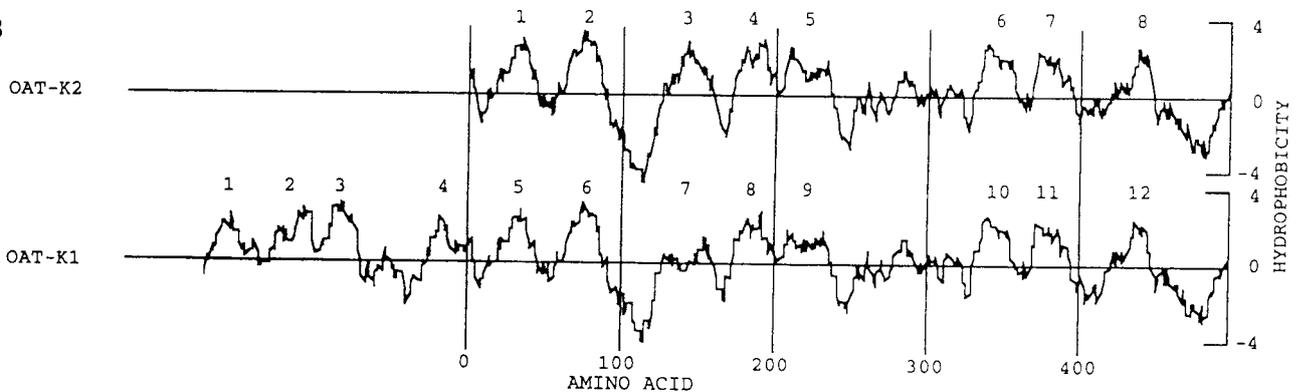


Fig. III-1. Comparison of the deduced amino acid sequences between 7 transporters belong to *oatp* genefamily (A) and hydropathy plots (B) between rat OAT-K2 and rat OAT-K1. A. Conserved residues between 7 transporters are indicated by stars. Putative membrane-spanning domains are lined over the sequence with numbers (M1 - M8), and potential N-linked glycosilation sites (○), potential protein kinase A phosphorylation sites (▲) and protein kinase C phosphorylation sites (●) are indicated. B, Kyte and Doolittle (11) hydropathy plots with a window of 13 amino acid residues. Numbers between plots indicate putative membrane-spanning regions.

## 第2節 OAT-K2 mRNAの組織分布

ラットOAT-K2 mRNAの組織分布について、ノザンブロット法及びRT-PCR法により解析した (Fig. III-2)。なお、すべての組織にほぼ均一に発現していることが示唆されているグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) を、試料とした各組織mRNAの陽性対照として同時検討した(82, 90)。ラット各組織のpoly (A)<sup>+</sup> RNA 3 µgをホルムアミド含有変性アガロースゲルにより分離後、これをナイロンメンブランにトランスファーし、第1節で得られたOAT-K2 cDNAをランダムプライム法によって<sup>[32P]</sup>-dCTPで標識したものをプローブとしてハイブリダイズするRNAを解析したところ、腎髄質及び皮質に約2.5kbの強いバンドが検出された (Fig. 2A)。またGAPDH cDNAをプローブとして用いた結果、すべての組織にシグナルが認められ、OAT-K2 mRNAが腎に強く発現していることが示唆された。さらに、OAT-K2またはGAPDHに特異的なオリゴヌクレオチド・プライ

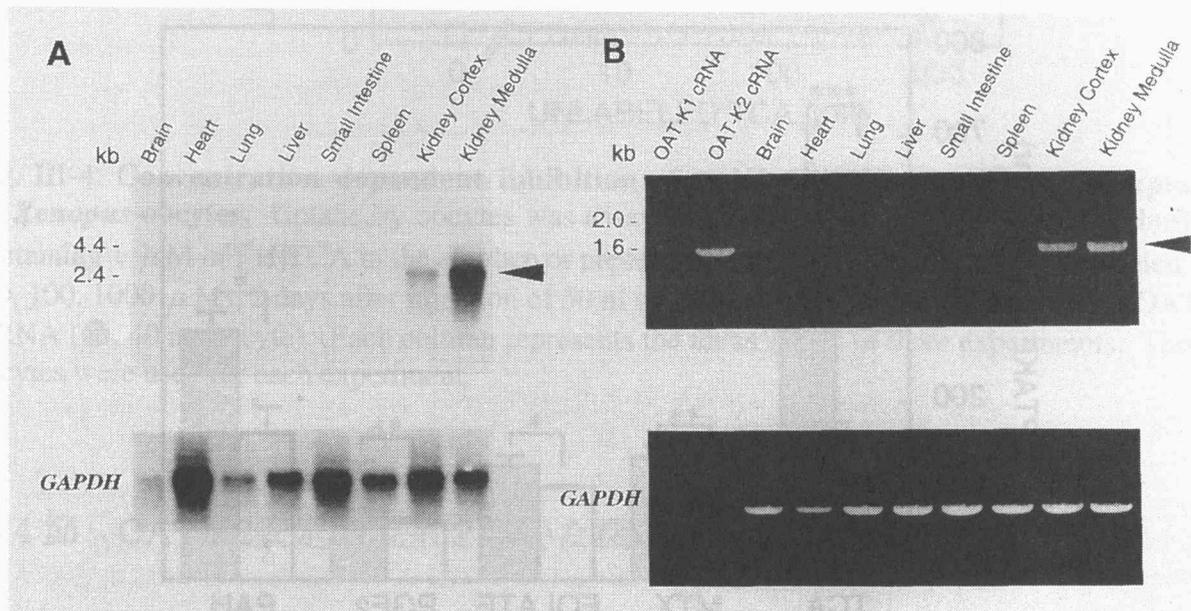


Fig. III-2. Northern blot analysis (A) and detection by PCR amplification (B) of OAT-K2 and GAPDH mRNA in rat tissues. A, poly(A)<sup>+</sup>RNA (3 µg) from the indicated tissues was electrophoresed, blotted and hybridized with the whole OAT-K2 cDNA (*upper*) or GAPDH cDNA (*lower*) as a probe at high stringency. B, poly(A)<sup>+</sup>RNA (1 µg) from the indicated tissues, of OAT-K1 cRNA (25 ng), OAT-K2 cRNA (25 ng) were reverse transcribed, and the cDNA synthesized was amplified using a set of primers specific for the rat OAT-K2 (*upper*) or for the rat GAPDH (*lower*). The PCR products were separated by electrophoresis through 1% agarose gels and stained with ethidium bromide.

マーを作成し、ラット各組織のpoly (A)<sup>+</sup> RNA 1 $\mu$ gを逆転写することにより得られたfirst-stranded DNAを鋳型としてPCRを行った結果、OAT-K2 mRNAは他の臓器では検出されず腎特異的に発現していることが明らかになった。一方、GAPDH mRNAはすべての組織において検出された (Fig. 2B)。

### 第3節 卵母細胞発現系を用いた機能解析

*In vitro*合成したOAT-K2 mRNAまたは水を卵母細胞に注入し、18 $^{\circ}$ Cで1-3日間インキュベートした後、薬物輸送実験に用いた。Figure.III-3. に示すようにOAT-K2の輸送基質を検討した結果、肝oatp1の基質であるTCA、OAT-K1の基質であるMTX及び葉酸、PGE<sub>2</sub>、PAHなど構造的に多様な薬物総ての取り込みについて、対照と比較して顕著な上昇が認められた。

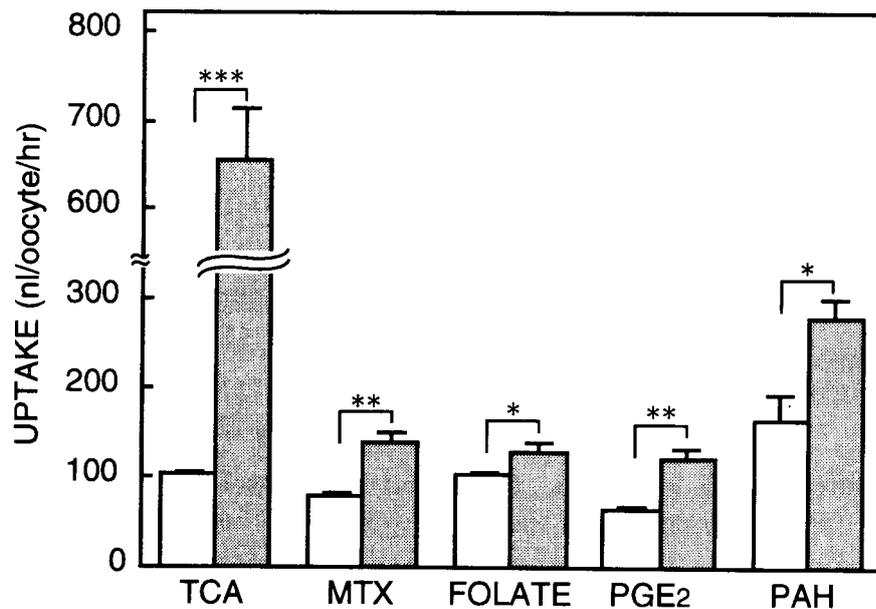


Fig. III-3. Uptake of anionic drugs by *Xenopus* oocytes. Uptake by oocytes was assayed for 1 hr at 25 $^{\circ}$ C in incubation buffer containing 1  $\mu$  M of [<sup>3</sup>H]TCA, 500 nM of [<sup>3</sup>H]MTX, 150 nM of [<sup>3</sup>H]folate, 5 nM of [<sup>3</sup>H]PGE<sub>2</sub> and 15  $\mu$ M of [<sup>14</sup>C]PAH, 2 days after injection of 50 nl of water (*open column*) or *in vitro* transcribed rat OAT-K2 mRNA (*closed column*, 40 ng/oocyte). Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of three experiments. Three oocytes were used for each experiment. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001, significant difference from the uptake by water injected oocytes.

さらにOAT-K2による種々アニオン性薬物の取り込み上昇が認められた卵母細胞を用いて、TCA取り込みの濃度依存性について検討した (Fig. III-4)。OAT-K2発現卵母細胞によるTCA取り込みは、共存非標識体濃度の上昇に伴って低下し、阻害定数 (IC<sub>50</sub>) は10  $\mu$  Mと算出された。一方、同時に行った水注入卵母細胞のTCA取り込みに影響が認められなかったことから、これらの結果がOAT-K2発現によることが示唆された。

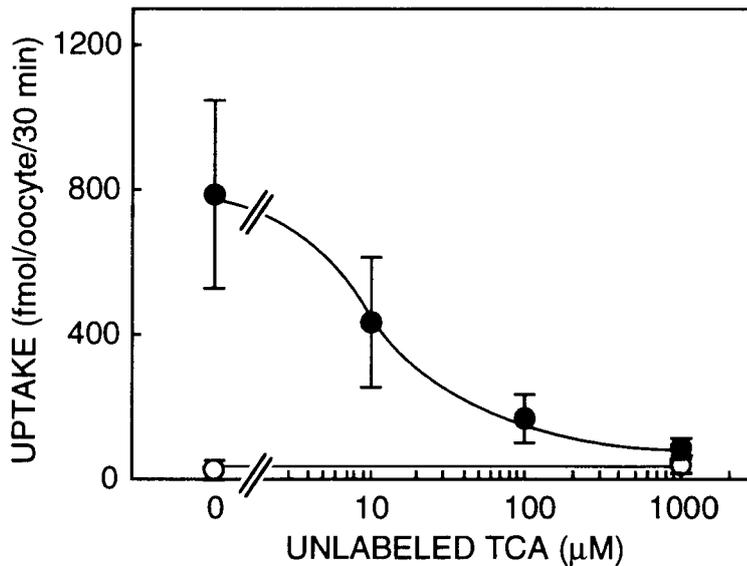


Fig. III-4. **Concentration dependent inhibition of unlabeled TCA on [<sup>3</sup>H]TCA uptake by *Xenopus* oocytes.** Uptake by oocytes was assayed for 30 min at 25°C in incubation buffer containing 1  $\mu$  M of [<sup>3</sup>H]TCA in the absence or presence of various concentrations of unlabeled TCA (10, 100, 1000  $\mu$  M), 2 days after injection of 50 nl of water (○) or *in vitro* transcribed rat OAT-K2 mRNA (●, 40 ng/oocyte). Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of three experiments. Three oocytes were used for each experiment.

#### 第4節 OAT-K2安定発現系を用いた機能解析

前節の卵母細胞による機能解析の結果から、OAT-K2はTCAを始めとする多様な薬物認識能を有するトランスポーターであることが示唆された。また、65%のアミノ酸相同性を示すOAT-K2のホモログ肝oatp1はTCAを始めとする広範な基質認識能を有することが知られている(25)。一方、91%の高いアミノ酸相同性を有するOAT-K1はMTXや葉酸を認識するが、TCA、PGE<sub>2</sub>及びPAHを輸送しないことが明らかになっている (第II章)。そこで卵母

細胞で得られた結果の評価及びOAT-K1の有する薬物輸送機能との比較を目的として、OAT-K2安定発現系を作成し、機能解析を行った。なお第II章においてOAT-K1の安定発現細胞で得られた知見をもとに、その膜局在性がラット腎組織との対応を示したMDCK細胞を選択し宿主細胞として用いた。

プラスミドベクター (pSPORT1) に挿入されているOAT-K2 cDNAを哺乳類発現ベクター (pBK-CMV) にサブクローニングした後、以下の実験に用いた。第II章と同様に、サブクローニングしたpBK-CMV/OAT-K2の5'及び3'末端の塩基配列を確認した後、リン酸カルシウム共沈法によりMDCK細胞にトランスフェクションした。Figure III-5.に示すようにG418耐性細胞の中から $[^3\text{H}]$ TCA取り込み活性の最も高いクローンをOAT-K2安定発現細胞、MDCK-OAT-K2として選別した。MDCK-OAT-K2細胞よりtotal RNAを抽出してノーザンブロットングを行い、OAT-K2 mRNAの発現を確認した。なお発現ベクターのみを導入した細胞 (MDCK-pBK) を対照として用いた。

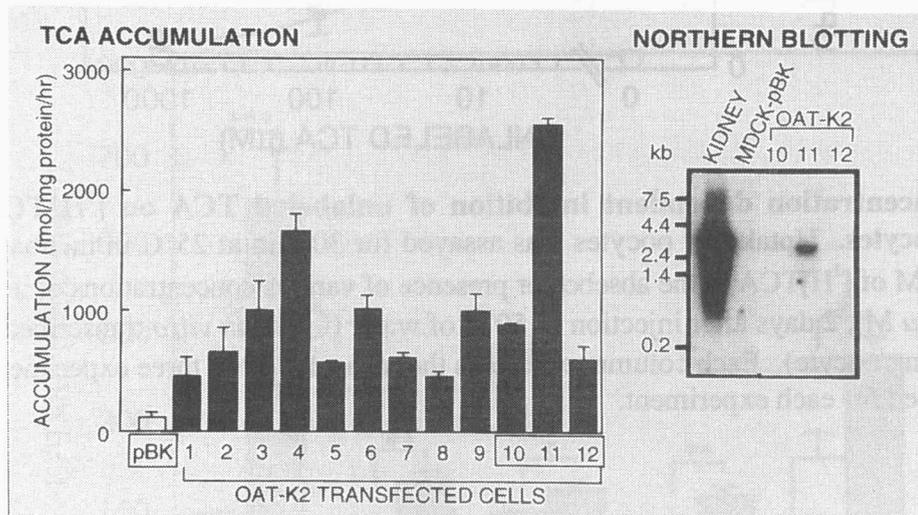


Fig. III-5. Construction of rat OAT-K2 stably transfected MDCK cells.

次に多孔性フィルター上に培養したMDCK-OAT-K2細胞による $[^3\text{H}]$ TCA取り込みの方向性について解析したところ、頂側膜側からの取り込みに顕著な上昇が認められた (Fig. III-6 (B))。さらに側底膜から頂側膜方向並びに頂側膜から側底膜方向への $[^3\text{H}]$ TCAの系細胞輸送を検討した結果、頂側膜から側底膜方向への輸送に上昇が認められたことから、OAT-K2はMDCK細胞の頂側膜側に発現していることが示唆された (Fig. III-6 (A))。従って以降の実験は、培養皿に播種したMDCK-OAT-K2細胞による機能解析を行った。

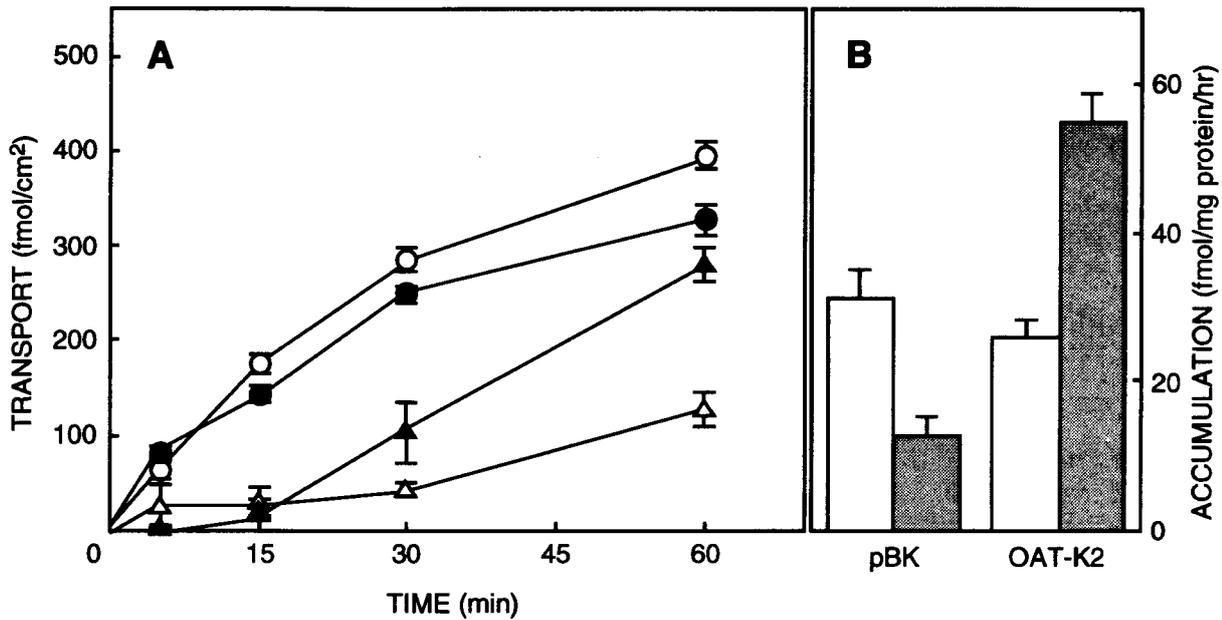


Fig. III-6. Transcellular transport (A) and intracellular accumulation (B) of [<sup>3</sup>H]TCA by MDCK-OAT-K2 monolayers. Monolayers of MDCK-OAT-K2 (●,▲) or MDCK-pBK (○,△) were incubated for 60 min at 37 °C with 250 nM [<sup>3</sup>H]TCA added to either basolateral (●,○; 2 ml, pH 7.4) or apical (▲,△; 2 ml, pH 7.4) side. Unlabeled incubation medium was added to the opposite side (2 ml, pH 7.4). Appearance of radioactivity on the opposite side (A) and accumulation (B) were measured. Each point or column represents the mean ± S.E. of three monolayers.

また、MDCK-OAT-K2細胞による種々アニオン性薬物の取り込み実験を行った (Fig. III-7.)。PAH、インドメタシン、テストステロン、及びジゴキシシンについては、MDCK-pBK細胞との間に差は見られなかった。一方、TCA、MTX及びPGE<sub>2</sub>など構造的に類似性を見ない薬物の取り込みに顕著な上昇が認められ、細胞卵母細胞で得られた結果と対応するものを得た。従ってOAT-K2は、Multispecificな薬物認識能を有することが示唆された。

次にMDCK-OAT-K2細胞によるTCA取り込みの濃度依存性について検討したところ、基質の濃度上昇に伴って飽和性を示した (Fig. III-8.)。それぞれの濃度における取り込み量 (TOTAL) から、非標識TCA (500 μM) 共存下で取り込まれた量 (NONSPECIFIC) を差し引いて特異的な取り込み量 (SPECIFIC) を算出した。得られた各濃度における取り込み量をミカエリス・メンテン式に当てはめて求められたKm値は10.3 μM、Vmax値は30.1 pmol/mg protein/15 minであった。したがって本安定発現系で得られたKm値は、卵母細胞発現系における1 μM [<sup>3</sup>H]TCA取り込みに対する非標識体の阻害定数 (10 μM) とほぼ一致するものであった。以降の実験では、TCAをOAT-K2の典型的な基質として用いた。

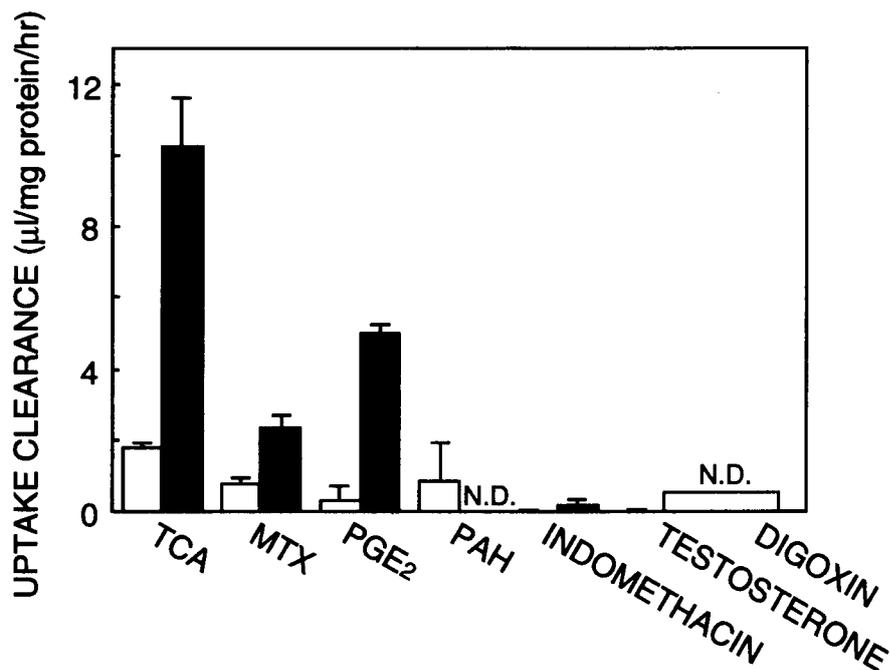


Fig. III-7. Accumulation of anionic drugs by MDCK-OAT-K2 cells. MDCK-OAT-K2 (hatched column) or MDCK-pBK (open column) cells grown on 35-mm culture dishes were incubated for 60 min at 37 °C with either 250 nM [<sup>3</sup>H]TCA, 0.5 µM [<sup>3</sup>H]MTX, 2.8 nM [<sup>3</sup>H]PGE<sub>2</sub>, 15 µM [<sup>14</sup>C]PAH, 1.5µM [<sup>14</sup>C]indomethacin, 1.1 nM [<sup>3</sup>H]testosterone, or 62.5 nM [<sup>3</sup>H] digoxin. Accumulation of each drug is expressed as uptake clearance. Each column represents the mean ± S.E. of three experiments. N.D., not detected

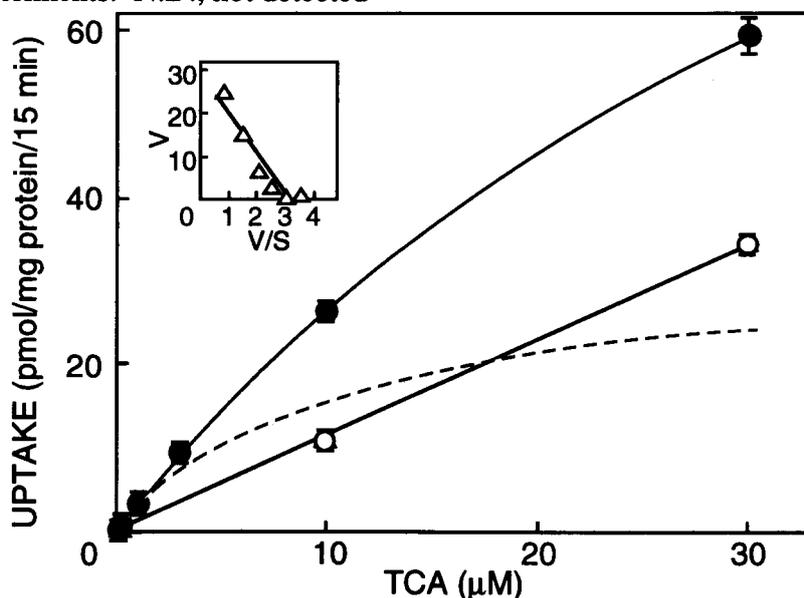


Fig. III-8. Concentration dependence of [<sup>3</sup>H]TCA accumulation by MDCK-OAT-K2 cells. [<sup>3</sup>H]TCA accumulation was measured at various concentrations (0.1-30 µM) for 15 min at 37 °C in the absence (●) and presence (○) of 500 µM unlabeled TCA. Broken line represents the specific component of TCA accumulation. Each point represents the mean ± S.E. of three experiments.

2種のOAT-K2発現系においてその基質認識の多様性が示唆されたことから、MDCK-OAT-K2細胞による $[^3\text{H}]\text{TCA}$ 取り込みに及ぼす種々アニオン性薬物の共存阻害効果について検討を加えた (Fig. III-9.)。薬物は総て $100\ \mu\text{M}$ 共存下で比較検討した。この結果、BSP及びインドメタシンが最も強い阻害効果を有していた。また、プロベネシド、MTX、フロセミド、両性イオンであるキノロン系抗菌剤レボフロキサシンも強い阻害効果を有していた。さらにDIDS、PAH及びベンジルペニシリンも弱い阻害効果を有していた。一方、バルプロ酸は、有意な阻害効果を有していなかった。

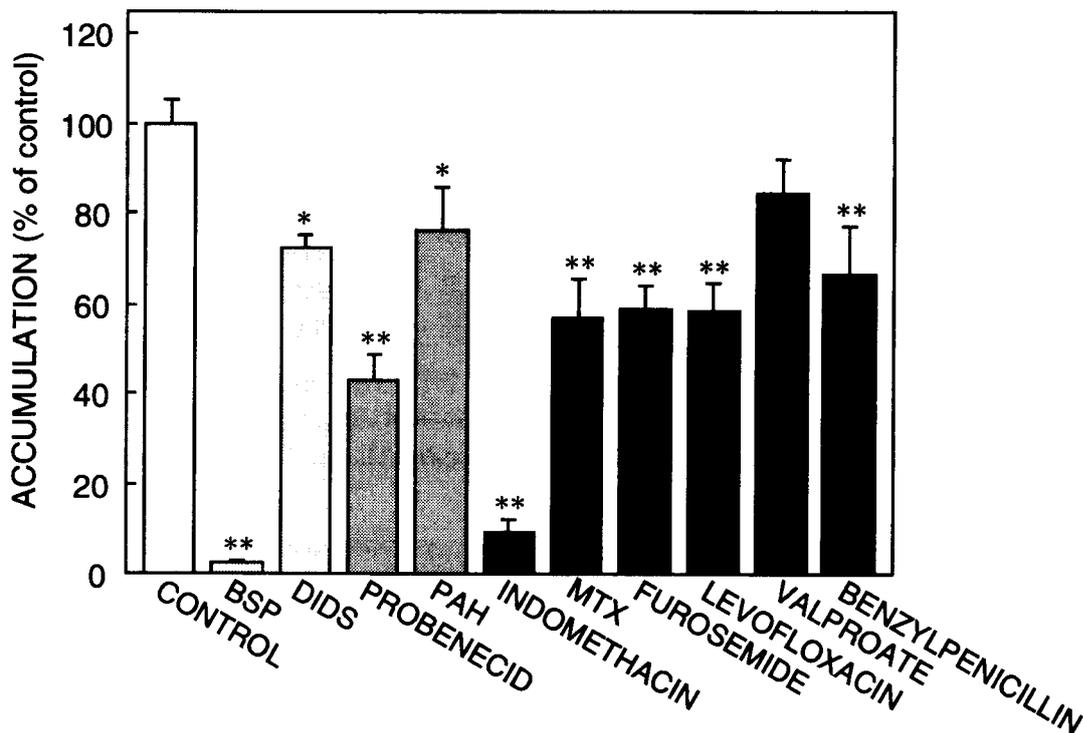


Fig. III-9. Effect of various anionic drugs on  $[^3\text{H}]\text{TCA}$  accumulation by MDCK-OAT-K2 cells.  $[^3\text{H}]\text{TCA}$  accumulation by MDCK-OAT-K2 cells ( $250\ \text{nM}$ ;  $2\ \text{ml}$ ,  $\text{pH}\ 7.4$ ) was measured for  $15\ \text{min}$  at  $37^\circ\text{C}$ . Data are expressed as % of control value. Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of three monolayers. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.001$ , significant differences from control.

次に胆汁酸誘導体の一つにTCAは含まれることから、MDCK-OAT-K2細胞による $[^3\text{H}]\text{TCA}$ 取り込みに及ぼす種々胆汁酸誘導体の共存阻害効果について検討を加えた (Fig. III-10.)。薬物は総て $100\ \mu\text{M}$ 共存下で比較検討した。この結果、用いた総ての胆汁酸誘導体は強い阻害効果を有していることが明らかになった。

さらにTCAの構造的特徴であるステロイド骨格に着目し、MDCK-OAT-K2細胞による

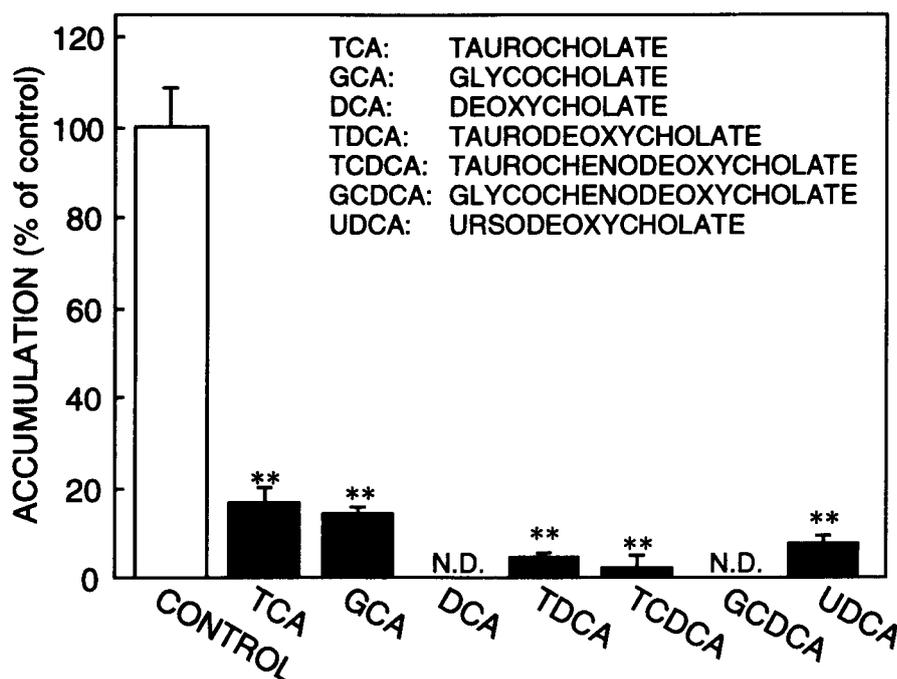


Fig. III-10. Effect of various bile acid analogues on [<sup>3</sup>H]TCA accumulation by MDCK-OAT-K2 cells. [<sup>3</sup>H]TCA accumulation by MDCK-OAT-K2 cells (250 nM; 2 ml, pH 7.4) was measured for 15 min at 37°C. Data are expressed as % of control value. Each column represents the mean ± S.E. of three monolayers. \*\*, *p* < 0.001, significant differences from control. N.D., not detected

[<sup>3</sup>H]TCA取り込みに及ぼす種々の強心配糖体並びにステロイドホルモンや薬物の共存阻害効果について検討を加えた (Fig. III-11.)。薬物は総て100 μM共存下で比較検討した。この結果、MDCK-OAT-K2細胞による[<sup>3</sup>H]TCA取り込みに対してジゴキシンやウアベインは強い阻害効果を有していること、その他のステロイドは総て顕著な阻害効果を有していることが明らかになった。

第2章で述べたようにOAT-K1はoatp1をはじめとするNa<sup>+</sup>非依存性のトランスポータファミリーに属することを明らかにした。そこでOAT-K2を介するTCA輸送のイオン依存性を調べるため、細胞外Na<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>イオンの影響について検討した (TABLE III-I)。MDCK-pBK細胞及びMDCK-OAT-K2細胞による[<sup>3</sup>H]TCA取り込みは、何れの条件下においても増加傾向を示したが有意な変化は認められなかった。したがって、OAT-K2はOAT-K1やoatp1などのNa<sup>+</sup>非依存性有機アニオントランスポータファミリーに属することが示唆された。

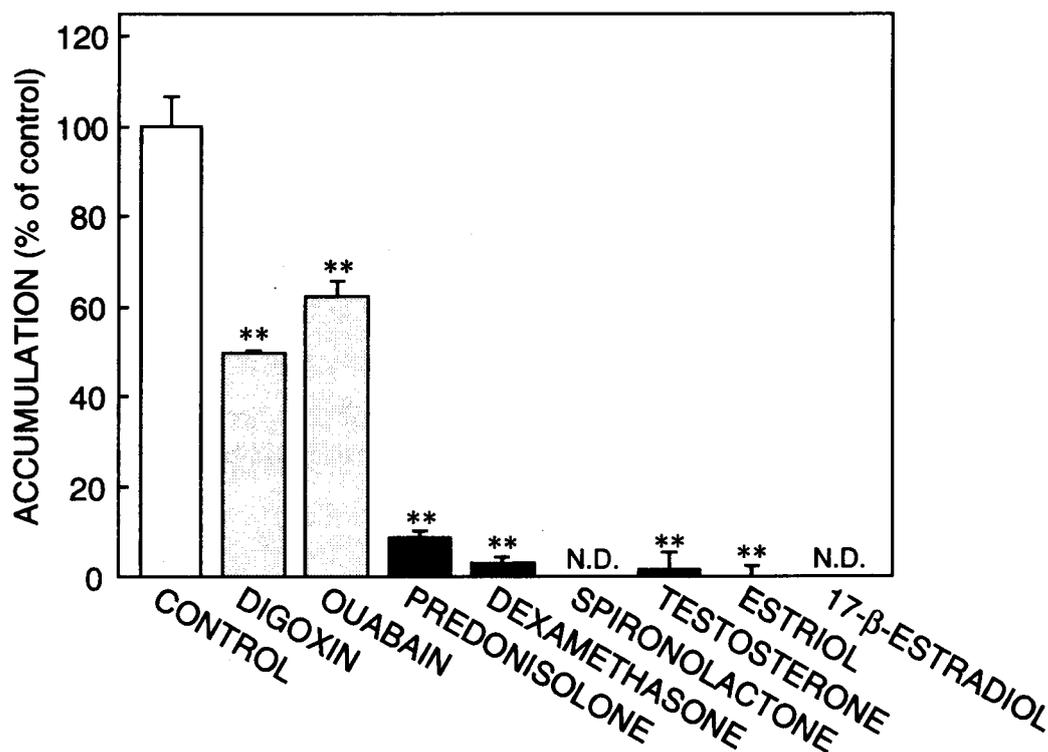


Fig. III-11. Effect of various steroids on [<sup>3</sup>H]TCA accumulation by MDCK-OAT-K2 cells. [<sup>3</sup>H]TCA accumulation by MDCK-OAT-K2 cells (250 nM; 2 ml, pH 7.4) was measured for 15 min at 37°C. Data are expressed as % of control value. Each column represents the mean ± S.E. of three monolayers. \*\*, *p* < 0.001, significant differences from control. N.D., not detected

TABLE III-I  
Effect of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> depletion on [<sup>3</sup>H]TCA accumulation by MDCK-OAT-K2 cells

MDCK-OAT-K2 cells were preincubated at 37°C for 15 min in either normal, Na<sup>+</sup>-free, or Cl<sup>-</sup>-free medium and incubated at 37°C for 5 min with 250 nM [<sup>3</sup>H]TCA (2 ml, pH 7.4). Each value represents the mean ± S.E. of three experiments.

Treatment	[ <sup>3</sup> H]TCA accumulation	
	MDCK-pBK	MDCK-OAT-K2
	fmol/mg protein/5 min	
Control	459.5 ± 20.9	597.1 ± 31.3
Na <sup>+</sup> -free	482.3 ± 27.4	610.3 ± 2.7
Cl <sup>-</sup> -free	553.3 ± 28.6	684.4 ± 31.6

Each value represents the mean ± S.E. of three experiments.

## 考察

第III章では、OAT-K1 cDNAと共に単離されたOAT-K1関連cDNAを用いて解析を行った。このcDNAの翻訳領域には、構造上多様なアニオン性薬物の腎挙動に関与する新規有機アニオントランスポータのOAT-K2がコードされていた。塩基配列を解読した結果、OAT-K2はOAT-K1及びoatp1をはじめとするoatp遺伝子ファミリーに属する新規cDNAであることが分かった。またTABLE III-IIに示すように、アミノ酸配列の一次構造においてOAT-K2は他のoatp遺伝子ファミリーに属するトランスポータと相同性を有すること、特にOAT-K1とは高い相同性を示すことが分かった。

TABLE III-II  
Percentages of amino acid homologies between the transporters belong to  
oatp gene family

	OAT-K1	OAT-K2	oatp1	OATP	oatp2	rPGT
OAT-K2	91					
oatp1	72	65				
OATP	65	53	67			
oatp2	76	62	76	71		
rPGT	35	31	40	39	39	
hPGT	39	31	40	40	40	82

*Abbreviations:* OAT-K1, kidney specific organic anion transporter 1 (Fig. I-1), oatp1, rat liver organic anion transporting polypeptide 1 (6); OATP, human liver organic anion transporting polypeptide (74); oatp2, rat brain organic anion transporting polypeptide 2 (91); rPGT, rat prostaglandin transporter (10); hPGT human prostaglandin transporter (92)

第I章で述べたようにOAT-K1は翻訳後の修飾過程により約40 kDaの分子量を有するタンパクとして刷子縁膜に発現することが示唆された。一方、抗OAT-K1抗血清作成時に合成した抗原ペプチドのアミノ酸配列はOAT-K1 (Thr651 - Leu665) 及びOAT-K2 (Thr480 - Leu494) 間において同一であったことから、第I章のFig. I-6.で検出されたOAT-K1タンパクに相当するシグナルは、OAT-K1及びOAT-K2の両方に由来することが示唆された。したがってOAT-K2タンパクはOAT-K1と同様、腎尿細管刷子縁膜局在性のトランスポータであることが推察された。またFig. III-6.で明らかになったように、多孔性フィルター上に培養

したMDCK-OAT-K2細胞を用いた検討から、OAT-K2はMDCK細胞の頂側膜側すなわち尿細管の管腔側刷子縁膜に発現することが示唆された。この結果は、抗OAT-K1抗血清を用いて得られたシグナルに含まれると考えられるOAT-K2タンパクの発現と対応するものである。一方、検出されたタンパクの分子量は約40 kDaであり、OAT-K2の推定分子量約55 kDaよりも小さいことから、OAT-K2はOAT-K1と同様の翻訳後修飾過程により低分子化していることが推察された。またFig. III-12に示すように抗OAT-K1抗血清によって検出された約40 kDaのタンパクに相当するアミノ酸配列は、両トランスポータ間において極めて高い相同性を示している。今後、OAT-K1と比較的低い相同性を示すOAT-K2の推定第2及び第3膜貫通部位（OAT-K1の推定第6及び第7膜貫通部位に相当）に挟まれる細胞内ループを標的とした抗体を作成することにより、OAT-K1及びOAT-K2個々の膜局在を含めたタンパクレベルにおける解析が進行すると考えられる。また、OAT-K1の翻訳後小分子化修飾過程により切断され、現有の抗血清では検出できなかったN末端側分子の追跡及び解析によって、OAT-K1並びにOAT-K2の尿細管刷子縁膜上における分子構造が解明されることが考えられる。さらに第I章で述べたように、肝oatp1は腎において翻訳後の修飾過程を受け低分子化した後刷子縁膜に発現することが知られている(16)。これらoatp遺伝子ファミリーに属する3種のトランスポータが腎近位尿細管において受ける翻訳後の修飾過程及び膜局在化機構は、生体必須物質の再吸収並びに異物排泄といった腎特有の生理機能の研究・展開に新

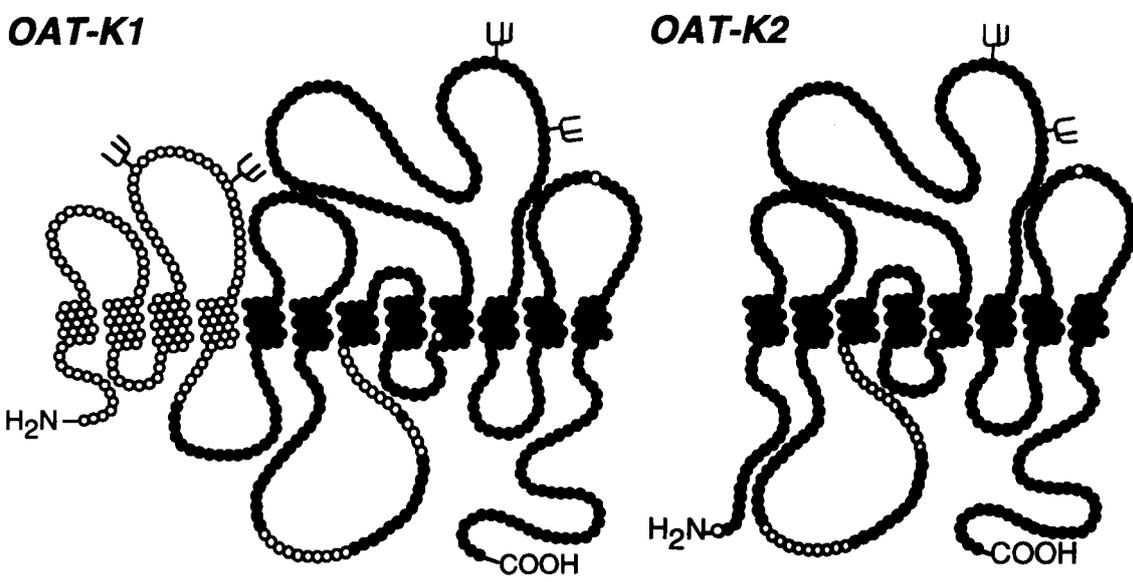


Fig. III-12. Predicted membrane topologies of OAT-K1 and OAT-K2. Closed circles represent an amino acid residue that corresponds to an identical residue each other. Open circles represent either amino acids not conserved between OAT-K1 and OAT-K2.

しい視点を与えるものとする。

以上、本章においてクローン化に成功した新規有機アニオントランスポータOAT-K2は腎局在性であることが明らかになった。またOAT-K2がOAT-K1と同様の翻訳後低分子化修飾過程を経て管腔側刷子縁膜に発現することが推察された。

アフリカツメガエル卵母細胞及びMDCK-OAT-K2細胞を用いた機能解析の結果は、OAT-K2がMultispecificな基質認識を示すトランスポータであることを示唆するものである。一方、OAT-K2 mRNA注入卵母細胞で認められたPAH取り込みの上昇は、MDCK-OAT-K2細胞では観察されなかった。この要因として、両発現系間における膜発現型OAT-K2の分子数の違い、OAT-K2の発現するそれぞれの膜環境によるOAT-K2分子の輸送活性の違いなどが考えられるが現在不明である。少なくともTCA、MTX及びPGE<sub>2</sub>をOAT-K2が認識することは、両発現系により対応する結果として示された。さらにMDCK-OAT-K2細胞によるTCA取り込みに及ぼす種々アニオン性薬物の示した共存阻害効果は、OAT-K2が構造的に多様な薬物を認識すること、さらにステロイド骨格を有する薬物の認識能が高いことなどOAT-K2の基質認識機構解明に役立つ情報を与えるものである。一方、OAT-K2に対する強い阻害効果を示した薬物の中には、テストステロンやインドメタシンなどOAT-K2の輸送基質として認識されないものが含まれており、OAT-K2の薬物認識部位と輸送経路との間には、異なる性質が存在することが推察された。

TCAをはじめとする胆汁酸誘導体にはデオキシコール酸やグリココール酸などほぼ完全に再吸収されるもの及びそのグルクロン酸並びに硫酸抱合体のように尿細管分泌を受けるものと大別される(93 - 97)。Wilsonら(27)の膜小胞系による検討から、腎尿細管刷子縁膜にはTCAなど胆汁酸輸送機構が存在すること、Na<sup>+</sup>-依存性及び-非依存性の少なくとも2種の輸送機構が存在することが示された。近年、ラット肝由来Na<sup>+</sup>依存性胆汁酸トランスポータNtcp (98, 99)並びにラット及びハムスターの回腸由来Na<sup>+</sup>依存性胆汁酸トランスポータISBT (or ASBT) のcDNAがクローニングされ、胆汁酸の腸肝循環に関する分子的解明が進展している(100 - 102)。またISBTの組織分布を調べた結果、mRNAレベルにおいて回腸>盲腸>腎臓に発現していることが報告されている(101)。従って腎刷子縁膜におけるNa<sup>+</sup>依存性胆汁酸輸送機構は主としてISBTが寄与すると推察されている(101)。一方、Na<sup>+</sup>非依存性の胆汁酸輸送機構については今日まで不明であった。本トランスポータOAT-K2はNa<sup>+</sup>非依存性のTCA輸送を示したことから、一部の胆汁酸の再吸収または抱合胆汁酸の尿細管分泌に関与することが推察される。

OAT-K2はTCAやMTXの他にPGE<sub>2</sub>も輸送基質として認識することが示された。この結果は、OAT-K2がPGE<sub>2</sub>をはじめとするオータコイドの腎動態に関わるトランスポータであることを示唆している。腎髄質乳頭部に存在する介在細胞において生合成されるPGE<sub>2</sub>は、血中へ分泌され集合管などに存在するEPレセプター群に相互作用した後(103, 104)、最終的に尿細管上皮細胞より尿中排泄されることが知られている(105)。この最終的なPGE<sub>2</sub>の尿細管分泌にOAT-K2が関与することが推察される。また薬物として静注されたPGE<sub>2</sub>は24時間以内に投与量の約60%が尿中排泄されること、ラット *in vivo*における検討からPGE<sub>2</sub>の尿中排泄はプロベネシドなど腎有機アニオン輸送系の代表的な阻害剤と強く相互作用することも報告されており(33)、近位直尿細管におけるPGE<sub>2</sub>の分泌機構に対するOAT-K2の関わりに興味をもたれる。一方、Kanaiら(10)によってPGTプロスタグランジントランスポータのmRNAは腎乳頭部に強く発現していることが示されたが、PGTの膜局在を含めた腎内分布については現在不明である。したがってPGTの媒介するPGE<sub>2</sub>輸送は、介在細胞から腎血管系への放出であるのか、または尿細管分泌を反映しているのかというその生理的役割については未解決である。最近、近位尿細管の側底膜型有機アニオントランスポータ (OAT-1 or ROAT1) のcDNAがクローニングされ、アニオン性薬物の腎移行性に関する分子的解明が進みつつある(106 - 108)。OAT-1はPGE<sub>2</sub>を輸送基質として認識することから、PGE<sub>2</sub>の尿細管上皮細胞を介する方向選択的な分泌機構には、側底膜側のOAT-1並びに刷子縁膜のOAT-K2が関与することが推察される(106)。

本トランスポータOAT-K2の生理的役割について、これまでの薬物輸送研究で得られたTCAなどの胆汁酸並びにPGE<sub>2</sub>の腎挙動に対するOAT-K2の関与も含めて述べてきたが、現在OAT-K2の生理的役割については不明の点が残っている。今後OAT-K2の主たる機能を見出し、薬物治療における合理的な投与設計の構築並びに新規薬物創造のための情報を提供することは、急務な研究課題と考える。

TABLE III-IIIに本章で得られた結果をまとめ、OAT-K1とOAT-K2の比較を行った。第II章でも述べたように、OAT-K2と高いアミノ酸相同性を示すホモログOAT-K1は、OAT-K2と同様MTXや葉酸を認識するが、TCA、PGE<sub>2</sub>及びPAHを認識しなかった。さらに取り込み並びに排出の両方向性輸送能を有する促進拡散系のトランスポータであることが示唆された。MDCK-OAT-K2細胞を用いたTCA輸送の解析結果から、OAT-K2はOAT-K1のように促進拡散系のトランスポータであることが示唆されたが、排出方向の輸送機能については

TABLE III-III  
Comparison of OAT-K1 with OAT-K2

	OAT-K1	OAT-K2
<i>cDNA</i>	2,788 bp	2,472 bp
<i>mRNA</i>	2.8 kb	2.5 kb
<i>Structure</i>		
Amino acid residue	669	498
Molecular weight (Predicted)	40 kDa (74 kDa)	— (55 kDa)
Homology with OAT-K1	—	91%
<i>Tissue distribution</i>	Kidney (Proximal straight tubule)	Kidney (Medulla > Cortex)
<i>Localization</i>	Brush-border membrane	Brush-border membrane
<i>Function</i>		
<i>Ion dependence</i>	Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> independent	Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> independent
<i>Substrates</i>	Methotrexate Folate	Methotrexate Folate Taurocholate Prostaglandin E <sub>2</sub> <i>p</i> -Aminohippurate

現在不明である。今後OAT-K2の薬物認識機構並びに輸送特性について詳細な解析が進むことにより、OAT-K2の生理的役割が明らかになると考えられる。さらにOAT-K1との構造的・機能的な比較解析を推進することによって、腎におけるOAT-Kトランスポータファミリーの生理機能が見出されるものとする。

以上、本章においてクローニングした新規腎局在性有機アニオントランスポータOAT-K2の、構造・組織分布・薬物輸送機能について解析し、その生理的役割について考察した。その結果、OAT-K2はOAT-K1と共に腎特有の有機アニオン輸送ネットワークに属すること、アニオン性薬物など異物除去に関わるトランスポータであることが推察された。

## 結 論

以上著者は三章にわたり、腎腎局在性有機アニオントランスポータOAT-K1及びOAT-K2の構造と機能に関する研究を行い、以下のような結論を得た。

### 第I章 ラット腎局在性有機アニオントランスポータOAT-K1のcDNAクローニングと構造・組織分布・細胞膜発現

腎指向型アニオン性薬物の尿中排泄挙動を分子的に解明することを目的として、腎特異的な有機アニオントランスポータのcDNAクローニングを試みた。ラット肝 *oatp1* のアミノ酸配列を参考にdegenerative PCRを行ったところ、*oatp1* と相同性を示すPCR断片を得た。これを用いてラット腎cDNAライブラリーをスクリーニングした結果、翻訳領域には*oatp1* と72%のアミノ酸相同性を示す新規有機アニオントランスポータOAT-K1をコードする完全長cDNAが単離された。ノーザンブロッティング及び単離ネフロン分節を用いたPCR解析によって、OAT-K1 mRNAは腎のみに発現しており、特に尿細管分節の近位直尿細管に強く発現していた。また、特異抗体を作成してウエスタンブロッティングを行ったところ、OAT-K1タンパクはmRNAと同様腎のみに発現すること、管腔側刷子縁膜に局在することが明らかになった。なお検出されたOAT-K1タンパクの分子量は約40kDaであり、その一次構造から推定される約74kDaよりも小さく、OAT-K1が細胞内で修飾を受けることが示唆された。

### 第II章 OAT-K1の機能

得られたOAT-K1の機能について、その膜局在化機構及び生理的役割も含めて検討した。まず卵母細胞発現系を用い、種々のアニオン性薬物を用いて輸送実験を行ったところ、MTX及び葉酸の顕著な取り込み上昇が認められた。次にブタ腎由来培養細胞LLC-PK<sub>1</sub>を用い構築したOAT-K1安定発現系は、卵母細胞発現系と同様にMTXを特異的に輸送すること、この輸送は細胞外Na<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>に非依存性であることが示された。また機能解析の結果から、OAT-K1はLLC-PK<sub>1</sub>細胞の側底膜に発現することが示唆された。さらに特異抗体を用いた解析より、OAT-K1は、その推定分子量に対応する約70kDaのタンパクとして発現することが確認された。一方、イヌ腎由来上皮細胞MDCKを用いてOAT-K1発現細胞を作成したところ、OAT-K1は約50kDaの小分子型として発現していること、機能解析より頂側膜側に発現することが示された。そこ

で2種のOAT-K1安定発現細胞によるMTX輸送について比較したところ、修飾、非修飾OAT-K1は、共に類似したMTX輸送の親和性並びに薬物感受性を有していることが分かった。従って、翻訳後の低分子化修飾過程は、OAT-K1の膜局在性に強く影響することが示唆された。これらの結果からOAT-K1は、LLC-PK<sub>1</sub>細胞には存在しないがラット腎及びMDCK細胞に備わる翻訳後修飾機構によって小分子化された後、頂側膜側に発現することが推察された。

また、MTX療法における相互作用として、NSAIDを併用した場合血中MTX濃度が上昇し、重篤な副作用の発現した症例が報告されている。そこでOAT-K1を介したMTX輸送に対するNSAIDの影響について、薬物相互作用の機構解明の観点から検討したところ、OAT-K1を介したMTX輸送に対して種々NSAIDは強い阻害効果を有すること、インドメタシン及びケトプロフェンは拮抗阻害を示し、Ki値はそれぞれ1.0 mM、1.9 mMであることが明らかになった。従って、MTXとNSAIDとの相互作用発現に少なくとも一部OAT-K1の関与することが示唆された。

そこでOAT-K1を介するMTX輸送の方向性について解析したところ、OAT-K1発現卵母細胞並びにMDCK-OAT-K1細胞において、速やかなMTX排出活性が観察された。従ってOAT-K1は、MTXの細胞内蓄積に起因する毒性発現の防御に寄与するトランスポータであることが推察された。

### 第Ⅲ章 広範な基質認識を示す腎局在性有機アニオントランスポータOAT-K2のcDNAクローニングと構造・組織分布及び機能解析

腎には、OAT-K1の類縁タンパクを含む未知の有機アニオントランスポータ群が発現しており、広範なアニオン性薬物の腎移行並びに尿細管分泌のネットワークを形成していると考えられる。そこでOAT-K1のcDNAと共に単離されたOAT-K2について構造・組織分布・機能解析を行った。その結果、OAT-K2はOAT-K1と91%のアミノ酸相同性を示すこと、OAT-K2 mRNAはOAT-K1と同様腎のみに発現することが示された。卵母細胞及び安定発現細胞MDCK-OAT-K2を用いて機能解析したところ、OAT-K2はTCA、MTX、PGE<sub>2</sub>など広範な基質認識特性を有するNa<sup>+</sup>非依存性の有機アニオントランスポータであることが示唆された。またOAT-K2によるTCA取り込みは、多様な構造のアニオン性薬物や種々の胆汁酸誘導体、ステロイドホルモン、強心配糖体の共存によって強く阻害された。従って、OAT-K2は構造的に多様な薬物の尿中排泄に関わるトランスポータであることが推察された。

以上、著者は2種の腎局在性有機アニオントランスポータOAT-K1及びOAT-K2のcDNAクローニングに初めて成功し、その全塩基配列とそれから推定される一次構造を明らかにした。さらに各々の生理的並びに薬物動態的役割について新知見を得た。本研究成果は、腎特有の有機アニオン輸送ネットワークを理解するための重要な基礎的知見であると共に、薬物の有効性・安全性の確保を目的とした合理的な投与設計構築にも有用な情報になると考える。

## 実験の部

### 試薬

#### Dupon New England Nuclear社

[<sup>3</sup>H]methotrexate (1,417.1 GBq/mmol), [<sup>3</sup>H]taurocholate (74.0 GBq/mmol), *p*-[glycyl-<sup>14</sup>C]aminohippurate (1.6 GBq/mmol), [14,15,19,20-<sup>3</sup>H]leukotriene C<sub>4</sub> (5,180.0 GBq/mmol), D-[<sup>14</sup>C]mannitol (2.0 GBq/mmol), [<sup>14</sup>C]tetraethylammonium (124.8 MBq/ml), [<sup>14</sup>C]indomethacin (825.1 MBq/ml), [1,2,6,7-<sup>3</sup>H]testosterone (3,222.7 GBq/mmol), [<sup>3</sup>H(G)]digoxin (592 GBq/mmol), D-[1-<sup>3</sup>H]mannitol (728.9 GBq/mmol)

#### Amersham社

[5,6,8,11,12,14,15(n)-<sup>3</sup>H]prostaglandin E<sub>2</sub> (6.70 TBq/mmol), [3',5',7,9-<sup>3</sup>H]folate (1.52 TBq/mmol), [<sup>3</sup>H]methotrexate (285.0 GBq/mmol)

#### Moravek Biochemical社

[3',5',7,9-<sup>3</sup>H]folate (1,232.1 GBq/mmol)

#### Sigma社

probenecid, DIDS, canrenoate, ouabain, taurochenodeoxycholate

#### 和光純薬工業

methotrexate, folate, valproate, indomethacin, ketoprofen, ibuprofen, flufenamate, phenylbutazone, dexamethasone, N-methyl-D-glucamine

#### ナカライテスク社

sulfobromophthalein, taurocholate, *p*-aminohippurate, furosemide, NaN<sub>3</sub>, 2-deoxy-D-glucose, digoxin, testosterone, prednisolone, spironolactone, estriol, benzylpenicillin, glycocholate, deoxycholate, taurodeoxycholate, glycochenodeoxycholate, ursodeoxycholate, 17-β-estradiol

その他の試薬は市販特級品を用いた。

## 第 I 章 実験の部

### 【1】 OAT-K1 cDNAのクローニング

#### 1-1. poly(A)<sup>+</sup>RNAの調製

腎皮質総RNAはChigwinら(109)の方法に従い、Wistar系雄性ラット (220 - 240 g) より抽出した。さらにオリゴdT-セルロース (Collaborative Research社) を用い、poly(A)<sup>+</sup>RNAを調製した(110)。

#### 1-2. RT-PCR

1  $\mu$ gのpoly(A)<sup>+</sup>RNAを鋳型としてavian myeloblastoma virus逆転写酵素 (Boehringer Mannheim社) を用い、first-stranded cDNAを合成した。得られたfirst-stranded cDNAを鋳型として、センス・プライマー (OATKS) 及びアンチセンス・プライマー (OATKA) を用いてPCRを行った。PCRは、10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、50 mM KCl、0.01% geratin、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、200  $\mu$  M dNTPの溶液に2種類のプライマーをそれぞれ2.5  $\mu$  M、調製first-stranded cDNA全量と、2.5 unitsのTaq DNA polymerase (宝酒造) を添加して100  $\mu$  lの系で反応を行った。PCRの反応は、Programmed Tempcontrol System (Astec社) を用い、変性 (94 $^{\circ}$ C, 1分)、アニーリング (50 $^{\circ}$ C, 1分)、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C, 2分) を1サイクルとして30サイクル繰り返した。

#### 1-3. 塩基配列決定

得られたPCR断片 (約270bp) を制限酵素EcoR I及びBam HIで切断し、予めEcoR I及びBam HIで切断したプラスミドベクターpSPORT1 (Life Technologies社) にサブクローニングした。サブクローン化したcDNAの塩基配列はdideoxy chain-termination法(111)に従い、ベクタープライマーあるいは合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして、修飾T7 DNAポリメラーゼのシーケンスキット (Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit, United States Biochemical社) を用いて行った。

#### 1-4. スクリーニング

ラット腎poly(A)<sup>+</sup>RNAは1-1.に準じて調製した。続いて1  $\mu$ gのpoly(A)<sup>+</sup>RNAを鋳型としてオリゴdTプライマーを用い、first-stranded cDNAを合成した。cDNAライブラリー ( $\lambda$ gt22A

)は、cDNAライブラリー合成キット (Superscript cDNA synthesis kit, Life Technologies社) を利用して作成した。大腸菌Y1090に感染させた組み替えファージをLBプレート (φ 150 mm) に一枚あたり10<sup>5</sup>個のプラークができるようにまき、37℃でインキュベートして生じたプラークをニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell, ビーエム機器社) に移し取る。1-3.で塩基配列を決定したcDNAをランダムプライム法(110)により[α-<sup>32</sup>P]dCTP (3,000 Ci/mmol, Amersham社) で標識し、これとニトロセルロース膜とをハイブリダイズさせた。プレハイブリダイゼーション (3時間) とハイブリダイゼーション (16時間) は42℃で、30% フォルムアミド、5 x SSPE (20 x SSPE; 3M NaCl, 0.2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.02M EDTA, pH 7.4) 、5 x Denhardt's solution、0.2% SDS、25 μg/ml 変性サケ精子DNAを含む溶液で行った。その後2 x SSC (20 x SSC; 3M NaCl, 0.3M Na<sub>3</sub> citrate) 、0.1% SDSで室温5分、10分、15分の計3回の洗浄を行って非特異的ハイブリダイゼーションによるバックグラウンドを除いた後、X線フィルム (Fuji RX film, 富士写真フィルム社) を用いて-70℃で一晩感光させた。得られた陽性ファージは、キャピラリーでプラークをpick-upし二次スクリーニングを行い最終的に単一のクローン(OAT-K1) とした。単離したcDNAは制限酵素Not I及びSal Iにより切断し、予めNot I及びSal I処理したpSPORT1ベクターにサブクローニングして以降の実験に用いた。

## 【2】 OAT-K1 mRNAの組織分布

### 2-1. ノーザンブロッティング

1-1.に準じてラット各組織から調製したpoly(A)<sup>+</sup>RNA各2.5 μgをフォルムアミド含有変性アガロースゲル (1%) 電気泳動によって分離し、これをナイロン膜にトランスファーした。全長OAT-K1 cDNAをランダムプライム法(110)により[α-<sup>32</sup>P]dCTP (3,000 Ci/mmol, Amersham社) で標識し、これとナイロン膜とをハイブリダイズさせた。プレハイブリダイゼーション (3時間) とハイブリダイゼーション (16時間) は42℃で、50% (*High stringency*) または30% (*Low stringency*) フォルムアミド、5 x SSPE、5 x Denhardt's solution、0.2% SDS、25 μg/ml 変性サケ精子DNAを含む溶液で行った。洗浄以降については、1-4.と同じ条件で行った。

### 2-2. OAT-K1 mRNA のin vitro転写

制限酵素Not I処理によって直鎖状にしたpSPORT1/OAT-K1を鋳型として、5'Cap (Cap

analog, STRATAGENE社) 存在下T7 RNA polymerase (Promega社) を用いて合成した。合成したmRNAは2-1.に準じて変性アガロースゲルで分離後、エチジウムブロミドで染色されたバンドの大きさを確認して以降の実験に用いた。

## 2-3. RT-PCR (ラット各組織におけるOAT-K1 mRNAの分布)

1-1.に準じてラット各組織から調製したpoly(A)<sup>+</sup>RNA各1  $\mu$ g並びに2-2.で合成したOAT-K1 mRNA 50 ngを用いて、1-2.に準じてRT-PCRを行った。なおPCRに用いたプライマーは以下の通りである。

for rat oatp

sense strand: 5'-GAAGCTGGAAACAATCAGAA-3' (bases 60 to 79)

antisense strand: 5'-GGAAGGGAAGTGTGCATTCT-3' (bases 2134 to 2153)

for rat OAT-K1

sense strand: 5'-GAGACATCATTAAGGAGTCA-3' (bases -30 to -11)

antisense strand: 5'-ACACAAGGCAGTAGAAAAGT-3' (bases 2013 to 2032)

PCRの反応は100  $\mu$ lの系で行い、変性 (94°C, 1分)、アニーリング (55°C, 1分)、伸長反応 (72°C, 2.5分) を1サイクルとして30サイクル繰り返した。

## 2-4. ラット腎尿細管分節の単離

ラット腎尿細管各分節の単離はNonoguchiら(12)の方法に従った。SPF-SD系雄性ラット (4 - 5週齢、80 - 100 g) をペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg, Nembutal, Abbott Laboratories社)、開腹し左腎を露出させる。下大動脈の左腎動脈分岐点直前頭部側にて結紮する。下大動静脈を左右分岐点直前頭部側にて結紮し、左腎動脈直下尾部側において血管に小孔を開ける。続いてその小孔よりポリエチレン医療用チューブ (PE-50, Becton Dickinson社) を挿入し、10 ml容量のシリンジを用いて過加圧にならないようにA液 (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM Ca lactate, 2 mM Na acetate, 5.5 mM D-glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4) 10 mlで左腎を前灌流する。灌流腎に鬱血等がないことを確認した後、B液 (1 mg/ml collagenase (type I, Sigma社), 1 mg/ml BSA (Sigma社), 10 mM VRC (Life Technologies社) 含有A液) 10 mlで灌流し、すばやく摘出する。腎皮質から髓質にわたる角度で切断して厚さ1~1.5 mmの腎切片を作る。得られた腎切片を100% O<sub>2</sub>を用いて酸素化しながらB液中で37°C、30分間の振盪後、氷冷A液で腎切片を洗浄し、シリコナイズした鋭利な針を用いて以下の尿細管各分節をそれぞれの構造的特徴を基に顕微

鏡で観察しながら分離する。

表層ネフロン； 糸球体、近位曲尿細管、近位直尿細管、髓質ヘンレ太い上行脚、皮質ヘンレ太い上行脚、皮質集合管、髓質外層集合管、髓質内層集合管

傍髓質ネフロン； 近位直尿細管、近位直尿細管終末部 (S3)

単離した各分節を糸球体は5個、その他の尿細管は2 mmを1サンプルとしてA2液 (1.7% Rnase inhibitor (Boehringer Mannheim社), 5 mM DTT (Promega社) 含有A液) 10  $\mu$ l入りのRT-PCR用チューブに移し4 $^{\circ}$ C、15,000回転で5分間遠心した後、その上清を取り除きOAT-K1 mRNAの検出に用いた。

## 2-5. RT-PCR (OAT-K1 mRNAの腎尿細管内分布)

2-4で得られた各尿細管分節を各チューブあたり3.5  $\mu$ lの可溶化液 (0.2% Triton X-100 (Sigma社), 1 U/ $\mu$ l Rnase inhibitor, 5 mM DTT) を加える。RT-PCRは1-2.に準じて行った。なおPCRに用いたプライマーは以下の通りである。

sense strand: 5'-GTAGACACAGGGTCTGTGAATACA-3' (bases 664 to 687)

antisense strand: 5'-AAGGTACTGCAGCTTGTGGTGCA-3' (bases 1516 to 1539)

PCRの反応は100  $\mu$ lの系で行い、変性 (94 $^{\circ}$ C, 1分)、アニーリング (55 $^{\circ}$ C, 1分)、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C, 1.5分) を1サイクルとして30サイクル繰り返した。

## 2-6. PCR産物の解析

2-5.で得られたPCR産物を2%アガロースゲルで分離後、エチジウムブロミド染色により検出した。さらにSambrookら(110)の方法に従い分離したPCR産物をナイロン膜 (Hybond-N, Amersham社) にトランスファーした。OAT-K1 cDNA全長を鋳型とした[ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP標識プローブの合成とそれに続くハイブリダイゼーション以降については1-4.と同じ条件で行った。

## 【3】 OAT-K1タンパクの組織分布及び膜局在

### 3-1. ペプチドの合成とコンジュゲート作成

OAT-K1のアミノ酸配列を基に、C末端側のペプチド (H<sub>2</sub>N-TDVHRNPKFKNDGEL-COOH) をN末端側をシステインとして作成した (ペプチド研)。続いてヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanin (Calbiochem-Behring社)) を用い、このペプチドとのコンジュ

ゲートを作成した。アミノ酸組成に基づく分析の結果、ヘモシアニン1 mgあたり150 - 163 molのペプチドが含まれていることが分かった。コンジュゲートは1 mlずつ10本に分注し凍結保存した。

### 3-2. 免疫

コンジュゲートはFreund完全アジュバント (Difco社) を用いて均一なエマルジョンを作った。雄性ニュージーランド白色家兎 (2.5 kg) の前免疫血清を採取後、1 mg/羽の割合で2週間間隔で免疫した。各免疫時に採血し、ELISA法により抗体価の解析を行った。最終的に十分な抗体価が得られた後、全採血して抗血清として凍結保存した。

### 3-3. ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

Laemmli (112)の方法に従って行った。分子量マーカーには、Rainbow™ colored protein molecular weight markers [myosin (220,000), phosphorylase b (97,400), BSA (66,000), ovalbumin (46,000), carbonic anhydrase (30,000), trypsin inhibitor (21,500), lysozyme (14,300)] (Amersham社) を使用した。

### 3-4. 抗体の精製

抗体の精製はSabolicら(13)の方法に準じて行った。2-7.で合成した抗原ペプチドを15% SDS-PAGEで分離後、200 mA定電流下で30分間PVDF膜 (Immobilon, Millipore社) にsemi-dry electroblottingにより電氣的にトランスファーした。抗原ペプチドの位置確認をした後、切り取り、0.1% Tween 20含有トリス緩衝生理食塩水 (TBS-T; 20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5) 中で洗浄した。5% スキムミルク (Difco社) を含むTBS-Tで2時間ブロッキング、抗血清と4℃で一晩インキュベートした後、TBS-Tで洗浄した。次にこのPVDF切片を0.1 Mクエン酸緩衝液 (pH 2.0) 中で1分間攪拌した後、溶出した抗体を1 M Tris-HCl緩衝液 (pH 10.5) を用いて中和した。

### 3-5. ウェスタンブロッティング

ペントバルビタール麻酔下Wistar系雄性ラット (220 - 230 g) から各組織を取り出し、粗細胞膜画分をOgiharaら(113)の方法に従って調製した。ラット腎刷子縁膜及び側底膜の調製はTakanoら(41)の方法に従って同時調製した。膜サンプルはSDS-sample buffer (2% SDS, 125 mM Tris, 20% glycerol, ± 5% β-mercaptoethanol) に可溶化し2-9.と同じ条件で分離し

た。2-10.と同じ条件でPVDF膜 (Hybond-PVDF, Amersham社) にタンパクをトランスファー後、TBS-Tでリンスした。次に5%スキムミルク含有TBS-Tで室温2時間ブロッキングした後、5%スキムミルク含有TBS-Tで希釈した精製済抗血清 (1:50) と4℃、一晚反応させ、その後TBS-Tで15分、3回膜を洗浄した。そしてECL化学発光キット (Amersham社) を用いてX線フィルムに感光させた。なお還元及び非還元条件下はSDS-sample bufferに5%  $\beta$ -mercaptoethanolを加えるか否かによって行った。

### 3-6. タンパク定量

タンパク質濃度の定量は、Bradford (114)の方法に従い、 $\gamma$ -グロブリンを用いた検量線より算出した。

## 第II章 実験の部

### 【1】 卵母細胞を用いた機能解析

#### 1-1. 卵母細胞の調製

健康状態の良いアフリカツメガエル (浜松生物教材) を選別し、水中に約40分間放置して冷却による麻酔の後、氷上にて開腹した。卵塊を取り出してMBS緩衝液 (modified Barth's solution; 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM HEPES, 0.82 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.33 mM Ca(NO<sub>3</sub>), 0.41 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mg/l penicillin, 10 mg/l streptomycin, pH 7.5) を満たした $\phi$  60 mmの培養皿に移し、数回MBSで洗浄する。顕微鏡下個々の卵母細胞が露出するように卵胞をピンセットで開き、その際壊れた卵母細胞を取り除く。次に0.4%コラゲナーゼ (type IA, Sigma社) 含有MBSで1時間室温で反応させる。さらに同液で約1時間反応させた後、卵母細胞をMBSで数回洗浄する。卵胞から離れた卵母細胞の中から、褐色の動物極と卵白色の植物極との境界線が明確なものを選別して新しい $\phi$  60 mmの培養皿に取り分ける。さらに数回MBSで洗浄後、18℃で一晩放置する(115)。

#### 1-2. 卵母細胞発現系による取り込み実験

調製済卵母細胞をMBSで浸した滅菌ガーゼに取る。先端径が25 - 35  $\mu$  mのガラス針をマイクロインジェクターに取り付け、50 nl/卵母細胞となるように水または2-2.で調製した

OAT-K1 mRNA (400 ng/ $\mu$ l) を個々の卵母細胞に注入する。卵母細胞はMBSで18℃、2-3日間インキュベート後、輸送実験に用いた。薬物輸送実験は1.5 ml容量のマイクロチューブを用いて、1サンプルあたり3-4個の卵母細胞を使用して行った。RI標識薬物をoocyte uptake buffer (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris - HCl, pH 7.5) に希釈し、卵母細胞と一定時間反応後、氷冷したoocyte uptake bufferで3回洗浄して反応を停止した。取り込み量の評価は卵母細胞を10% SDSで可溶化後、ACSII (Amersham社) を用いて液体シンチレーション法により個々の放射活性を測定した。

#### 1-4. LLC-OAT-K1細胞の作成

pSPORT1/OAT-K1並びに哺乳類発現プラスミドベクターpBK-CMV (STRATAGENE社) を制限酵素Not I及びSal Iで切断し、1%アガロースゲルで分離後prep-A-gene DNA精製キット (Bio-Rad社) を用いて抽出した。このOAT-K1 cDNAをT4 DNA ligase (Life Technologies社) を用いてpBK-CMVにサブクローニングし、OAT-K1 cDNAの塩基配列を1-3.に従って確認した。得られたプラスミドpBK-CMV/OAT-K1をOAT-K1安定発現系作成に用いた。

ブタ腎上皮由来LLC-PK<sub>1</sub>細胞 (American Type Culture Collection, ATCC) は、10% FBS (Whittaker Bioproducts社) 含有DMEM (Life Technologies社) で、5% CO<sub>2</sub>-95% air、37℃の環境下で培養した。6-8日ごとに、0.05%トリプシン、0.02% EDTA (Life Technologies社) で細胞を剥離し継代した。10  $\mu$  gのpBK-CMV/OAT-K1またはpBK-CMVをLLC-PK<sub>1</sub>細胞にリン酸カルシウム共沈法(53)によってトランスフェクションした。即ち、40~60% confluentに増殖した細胞に、CaPO<sub>4</sub>-DNA共沈物を細胞培養液上清に滴下し、15時間後培養液を交換した。さらに48時間後数枚の培養皿に分け、1 mg/mlのG418 (Life Technologies社) 存在下約2週間培養した。pBK-CMVはネオマイシン耐性遺伝子を有することから、これを選別マーカーとした。その結果、G418耐性細胞が12クローン得られた。RT-PCR及びノーザンブロッティングはそれぞれ1-2.及び2-1.に従った。OAT-K1 mRNAの発現が確認された6クローンについてMTX取り込み活性 (1-5.に従った) を指標として、最終的にOAT-K1安定発現細胞LLC-OAT-K1を獲得した。なおpBK-CMVのみをトランスフェクションした細胞、LLC-pBKを対照として用いた。

#### 1-5. LLC-OAT-K1細胞による薬物輸送実験

LLC-OAT-K1細胞またはLLC-pBK細胞をポリカーボネート膜Transwell™ ( $\phi$  24 mm (code.

3414),  $\phi$  12 mm (code. 3402), Costar社) 上に $5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>で播種した。培養液は側底膜側に2.6 ml ( $\phi$  24 mm) または1.0 ml ( $\phi$  12 mm)、頂側膜側に1.5 ml ( $\phi$  24 mm) または0.33 ml ( $\phi$  12 mm) を添加し、5% CO<sub>2</sub>-95% air、37°Cの環境下8日間培養した。培養液は1日おきに交換した。薬物輸送実験はSaitoら(57)の方法に準じて行った。即ち、トレーサー薬物を含まないuptake buffer (5 mM D-glucose含有PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline; 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4)) で37°C、10分間プレインキュベート後側底膜側または頂側膜側の何れかにRI標識した薬物を含むuptake bufferに置換した。反対側のuptake bufferも同時に置換した。一定時間反応させた後、経細胞輸送量は反対側のuptake bufferを採取することにより、細胞内蓄積量は氷冷uptake bufferで洗浄後、1 N NaOHで細胞を溶解することにより各サンプルを回収し、液体シンチレーション法によって測定した。またNa<sup>+</sup>-freeメデイウムはNaClとNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>をそれぞれN-methyl-D-glucamineとK<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>に、Cl<sup>-</sup>-freeメデイウムはNaCl、KCl、CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>をそれぞれsodium gluconate、potassium gluconate、calcium gluconate、MgSO<sub>4</sub>に置換して調製した(57)。さらにATP枯渇条件は、20 mM 2-deoxy-D-glucose及び10 mM NaN<sub>3</sub>含有PBSで20分間、37°Cで細胞を前処理して作成した(116)。

#### 1-6. MDCK-OAT-K1細胞の作成

イヌ腎上皮由来MDCK細胞 (American Type Culture Collection, ATCC) 10%FBS含有DMEMで5% CO<sub>2</sub>-95% air、37°Cの環境下で培養した。6-8日ごとに、0.1%トリプシン、0.04% EDTAで細胞を剥離し継代した。pBK-CMV/OAT-K1またはpBK-CMVのトランスフェクションは、1-4.に従った。なお選別に用いたG418の濃度は0.5 mg/mlとして約2週間培養した結果、G418耐性を示す5クローンが得られた。最もMTX取り込み活性 (1-7.に従った) の高いものをMDCK-OAT-K1細胞として、OAT-K1 mRNAの発現を検討した。RT-PCR及びノーザンブロッティングをそれぞれ1-2.及び2-1.に従って行ったところ、OAT-K1 mRNAの発現が確認された。なおpBK-CMVのみをトランスフェクションした細胞、MDCK-pBKを対照として用いた。

#### 1-7. MDCK-OAT-K1細胞による薬物輸送実験

MDCK-OAT-K1細胞並びにMDCK-pBK細胞をTranswell™に播種し用いる場合は、1-5.と同じ条件で行った。実験は播種後5日目で行った。また、両細胞を $\phi$  35 mm培養皿に $2 \times 10^5$

cell/cm<sup>2</sup>で播種した。培養液は2 mlを添加し、5% CO<sub>2</sub>-95% air、37℃の環境下5日間培養した。培養液は2日おきに交換した。薬物取り込み実験は、以下のようにして行った。トレーサー薬物を含まないuptake buffer (5 mM D-glucose含有PBS) 2 mlで洗浄し、0.8 ml、15分間37℃でプレインキュベート後、RI標識薬物を含むuptake bufferに置換した。一定時間反応させた後、氷冷1% BSA含有uptake bufferで1回、BSAを含まないuptake bufferで3回洗浄して、0.5 N NaOHで細胞を溶解した。液体シンチレーション法により細胞内取り込み量を測定した。また薬物排出実験は、取り込み実験の手順に従って薬物を予め負荷し、洗浄後薬物を含まない1% BSA含有PBSに置換後さらに一定時間インキュベートした。実験終了時に細胞を洗浄し、0.5 N NaOHに溶解して細胞内残存薬物量を測定した。なお排出量は取り込み実験のみを行った場合の細胞内蓄積量を100%として百分率で表した。

#### 1-8. 細胞膜画分の調製

各遺伝子導入細胞 (LLC-OAT-K1、LLC-pBK、MDCK-OAT-K1、MDCK-pBK) の細胞膜画分はconfluentに達した細胞をPBSで洗浄、ホモジネート調整後、3-5.に準じて行った。

#### 1-9. ラット *in vivo* におけるMTXの組織移行特性

Wistar系雄性ラット (220 - 240 g) をペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg) ラット左脚部の大腿動脈及び大腿静脈にポリエチレン医療用チューブ (PE-50) 挿入し、MTX瞬時投与実験を行った(66)。[<sup>3</sup>H]MTXを静脈側のチューブより投与して一定時間の後、動脈側のチューブより粉末ヘパリン (ナカライ社) 入り1.5 ml容量のマикроチューブ (岩城硝子) に採血した。続いて速やかに断頭、脱血し、各組織 (脳、心臓、肺、肝臓、小腸 (粘膜部)、脾臓、腎皮質、腎髄質) を取り出した。血液サンプルは室温、10,000回転の遠心後の上清、即ち血漿を調製した。組織サンプルは秤量後、氷冷下25 W/V%ホモジネートを生理食塩水を用いて調製し、組織移行[<sup>3</sup>H]MTX定量用サンプルとした。定量は血漿及びホモジネートを各100 μlを測定用バイアルに取り、0.5 mlのNCS tissue solubilizer (Amersham社) を加え50℃、2時間振盪することにより均一な溶液とした。これにACSIIを加え、液体シンチレーション法によって放射活性を測定した。なおNSAID同時投与実験はこれに準じて行った。

### 第III章 実験の部

#### 【1】 OAT-K2 cDNAのクローニング・構造

第I章と同じ条件にて行った。

#### 【2】 OAT-K2 mRNAの組織分布

##### 2-1. ノーザンブロッティング

第I章 1-1. に準じてラット各組織から抽出したpoly(A)<sup>+</sup>RNA各3 $\mu$ gを第I章 2-1. に従って電気泳動によって分離し、これをナイロン膜にトランスファーした。全長OAT-K2 cDNAをランダムプライム法(110)により [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (3,000 Ci/mmol, Amersham社) で標識し、これとナイロン膜とをハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション以下は、第I章 2-1. と同じ条件で行った。

##### 2-2. OAT-K2 mRNAの*in vitro*転写

pSPORT1/OAT-K2を鋳型として第I章2-2. と同じ条件で行った。

##### 2-3. RT-PCR

第I章2-2. に準じて行った。なおPCRに用いたプライマーは以下の通りである。

for rat OAT-K2

sense strand: 5'-GAACATCACTGCCAATGGAA-3' (bases -399 to -380)

antisense strand: 5'-ACACAAGGCAGTAGAAAAGT-3' (bases 1501 to 1520)

for rat GAPDH

sense strand: 5'-CGGCCTCGTCTCATAGACAA-3' (bases 10 to 29)

antisense strand: 5'-TGGTCCAGGGGTTTCTTACT-3' (bases 1028 to 1047)

PCRの反応は100 $\mu$ lの系で行い、変性 (94 $^{\circ}$ C, 1分)、アニーリング (58 $^{\circ}$ C, 1分)、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C, 2.5分) を1サイクルとして30サイクル繰り返した。

#### 【3】 卵母細胞発現系を用いた機能解析

第I章と同じ条件にて行った。

#### 【4】 OAT-K2安定発現系を用いた機能解析

OAT-K2 cDNAをpBK-CMV哺乳類発現ベクターにサブクローニングした後、MDCK細胞にトランスフェクションした。以下、安定発現細胞MDCK-OAT-K2の作成並びに薬物輸送実験については、第II章と同じ条件で行った。

## 謝 辞

終わりに臨み、本研究に際して終始御懇篤なるご指導、御鞭撻を賜りました京都大学医学部 乾 賢一教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また、多くの有益な御指導と御助言を戴いた京都大学医学部 橋本征也助教授、同 齋藤秀之講師、並びに同附属病院薬剤部諸氏に深謝致します。さらに、腎尿細管各分節の単離にあたり、技術、試料を御提供くださり、貴重な御助言を戴いた熊本大学医学部 富田公夫教授、同 野々口博史講師に感謝致します。

最後になりましたが、本研究の実験の一部に御協力戴いた茨本浩嗣修士、竹内綾子学士に深く感謝します。

## 論文目録

本研究の内容は一部以下の論文に発表した。

Cloning and functional characterization of a novel rat organic anion transporter mediating basolateral uptake of methotrexate in the kidney

J. Biol. Chem. 271, 20719-20725 (1996)

mRNA distribution and membrane localization of the OAT-K1 organic anion transporter in rat renal tubules

FEBS Lett. 407, 127-131 (1997)

Interactions of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with rat renal organic anion transporter, OAT-K1

J. Pharmacol. Exp. Ther. 283, 1039-1042 (1997)

## 引用文献

1. Tisher, C. C.: Anatomy of the kidney, In *The kidney*, ed. by B.B. Brenner and F.C.J. Rector., pp. 3-75, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1981
2. Maffly, R. H.: The body fluids, In *The kidney*, ed. by B.B. Brenner and F.C.J. Rector., pp. 76-115, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1981
3. Hebert, S. C., Schafer, J. A., and Andreoli, T. E.: Principles of membrane transport, In *The kidney*, ed. by B.B. Brenner and F.C.J. Rector., pp. 116-143, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1981
4. Ullrich, K. J.: Specificity of transporters for 'organic anions' and 'organic cations' in the kidney. *Biochim. Biophys. Acta* **1197**: 45-62, 1994.
5. Pritchard, J. B., and Miller, D. S.: Mechanisms mediating renal secretion of organic anions and cations. *Physiol. Rev.* **73**: 765-796, 1993.
6. Jacquemin, E., Hagenbuch, B., Stieger, B., Wolkoff, A. W., and Meier, P. J.: Expression cloning of a rat liver Na<sup>+</sup>-independent organic anion transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 133-137, 1994.
7. Marshall, E. K., and Vickers, J. L.: The mechanism of the elimination of phenolsulfonphthalein by the kidney; a proof of secretion by the convoluted tubules. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **34**: 1-7, 1923.
8. Kennelly, P. J., and Krebs, E. G.: Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **266**: 15555-15558, 1991.
9. Hakes, D. J., and Berezney, R.: Molecular cloning of matrin F/G: a DNA binding protein of the nuclear matrix that contains putative zinc finger motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 6186-6190, 1991.
10. Kanai, N., Lu, R., Satriano, J. A., Bao, Y., Wolkoff, A. W., and Schuster, V. L.: Identification and characterization of a prostaglandin transporter. *Science* **268**: 866-869, 1995.
11. Kyte, J., and Doolittle, R. F.: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132, 1982.
12. Nonoguchi, H., Knepper, M. A., and Manganiello, V. C.: Effects of arterial natriuretic factor on cyclic guanosine monophosphate and cyclic adenosine monophosphate accumulation in microdissected nephron segments from rats. *J. Clin. Invest.* **79**: 500-507, 1987.
13. Sabolic, I., Valenti, G., Verbavatz, J.-M., Van Hoek, A. N., Verkman, A. S., Ausiello, D. A., and Brown, D.: Localization of the CHIP28 water channel in rat kidney. *Am. J. Physiol.* **263**: C1225-C1233, 1992.
14. Takano, M., Okano, T., Inui, K., and Hori, R.: Transport of cephalosporin antibiotics in renal basolateral membranes. *J. Pharm. Pharmacol.* **41**: 795-796, 1989.
15. Kozak, M.: An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* **15**: 8125-8148, 1987.

16. Bergwerk, A. J., Shi, X., Ford, A. C., Kanai, N., Jacquemin, E., Burk, R. D., Bai, S., Novikoff, P. M., Stieger, B., Meier, P. J., Schuster, V. L., and Wolkoff, A. W.: Immunologic distribution of an organic transport protein in rat liver and kidney. *Am. J. Physiol.* **271**: G231-G238, 1996.
17. Angeletti, R. H., Novikoff, P. M., Juvvadi, S. R., Fritschy, J., Meier, P. J., and Wolkoff, A. W.: The choroid plexus epithelium is the site of the organic anion transport protein in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 283-286, 1997.
18. Shimada, H., Moewes, B., and Burckhardt, G.: Indirect coupling to Na<sup>+</sup> of *p*-aminohippuric acid uptake into rat renal basolateral membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* **253**: F795-F801, 1987.
19. Ullrich, K. J.: Renal transporters for organic anions and organic cations. Structural requirements for substrates. *J. Membrane Biol.* **158**: 95-107, 1997.
20. Steffens, T. G., Holohan, P. D., and Ross, C. R.: Operational modes of the organic anion exchanger in canine renal brush-border membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* **256**: F596-F609, 1989.
21. Ohoka, K., Takano, M., Okano, T., Maeda, S., Inui, K., and Hori, R.: *p*-Aminohippurate transport in rat renal brush-border membranes: a potential-sensitive transport system and an anion exchanger. *Biol. Pharm. Bull.* **16**: 395-401, 1993.
22. Kullak-Ublick, G., Hagenbuch, B., Stieger, B., Wolkoff, A. W., and Meier, P. J.: Functional characterization of the basolateral rat liver organic anion transporting polypeptide. *Hepatology* **20**: 411-416, 1994.
23. Shi, X., Bai, S., Ford, A. C., Burk, R. D., Jacquemin, E., Hagenbuch, B., Meier, P. J., and Wolkoff, A. W.: Stable inducible expression of a functional rat liver organic anion transport protein in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 25591-25595, 1995.
24. Kanai, N., Lu, R., Bao, Y., Wolkoff, A. W., Vore, M., and Schuster, V. L.: Estradiol 17 $\beta$ -glucuronide is a high-affinity substrate for oatp organic anion transporter. *Am. J. Physiol.* **270**: F326-F331, 1996.
25. Bossuyt, X., Müller, M., Hagenbuch, B., and Meier, P. J.: Polyspecific drug and steroid clearance by an organic anion transporter of mammalian liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **276**: 891-896, 1996.
26. Itoh, S., Lu, R., Bao, Y., Morrow, J. D., Roberts, J., and Schuster, V. L.: Structural determinants of substrates for the prostaglandin transporter PGT. *Mol. Pharmacol.* **50**: 736-742, 1996.
27. Wilson, F., Burckhardt, G., Murer, H., Rumrich, G., and Ullrich, K. J.: Sodium-coupled taurocholate transport in the proximal convolution of the rat kidney in vivo and in vitro. *J. Clin. Invest.* **67**: 1141-1150, 1981.
28. Baines, A. D., Gottschalk, C. W., and Lassier, W. E.: Microinjection study of *p*-aminohippurate excretion in rat kidneys. *Am. J. Physiol.* **214**: 703-709, 1968.

29. Coulson, R.: Metabolism and excretion of exogenous adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate. Studies in the isolated perfused rat kidney and in the intact rat. *J. Biol. Chem.* **251**: 4958-4967, 1976.
30. Barac-Nieto, M., and Cohen, J. J.: Non-esterified fatty acid uptake by dog kidney. Effects of probenecid and chlorothiazide. *Am. J. Physiol.* **215**: 98-107, 1968.
31. McMartin, K. E., Morshed, K. M., Hazen-Martin, D. J., and Sens, D. A.: Folate transport and binding by cultured human proximal tubule cells. *Am. J. Physiol.* **263**: F841-F848, 1992.
32. Borsatti, A.: Calcium oxalate nephrolithiasis: defective oxalate transport. *Kidney Int.* **39**: 1283-1288, 1991.
33. Haylor, J., Towers, J. D., Thewles, A., and Lote, C. J.: Effect of probenecid on the urinary excretion of TXB<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub> in the anaesthetised rat. *Prostagland. Leuk. Essent. Fatty* **39**: 323-328, 1990.
34. Lang, F.: Renal handling of urate, In *Renal transport of organic substances*, ed. by R. Greger, F. Lang, and S. Silbernagl., pp. 234-261, Springer Verlag, Berlin, 1981
35. Arita, T., Hori, R., Takada, M., Akuzu, S., and Misawa, A.: Transformation and excretion of drugs in biological systems. VII. Effect of biotransformation in renal excretion of sulfonamides. *Chem. Pharm. Bull.* **20**: 570-580, 1972.
36. Scheffer, V. H., and Stevens, J. L.: Mechanism of transport for toxic cysteine conjugates in rat kidney cortex membrane vesicles. *Mol. Pharmacol.* **32**: 293-298, 1987.
37. Newton, J. F., Hoefle, D., Gemborys, M. W., Mudge, G. H., and Hook, J. B.: Metabolism and excretion of a glutathione conjugate of acetaminophen in the isolated perfused rat kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **237**: 519-524, 1986.
38. Fanelli, G. M., and Weiner, I. M.: Pyrazionate excretion in the chimpanzee: Relation to urate disposition and the actions of uricosuric drugs. *J. Clin. Invest.* **52**: 1946-1957, 1973.
39. Watrons, W. M., May, D. G., and Fujimoto, J. M.: Mechanism of the renal tubular transport of morphin and MES in the chicken. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **172**: 224-229, 1970.
40. Weiner, I. M., Washington, J. A. I., and Mudge, G. H.: Studies on the renal excretion of salicylate in the dog. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **105**: 284-297, 1959.
41. Takano, M., Inui, K., Okano, T., Saito, H., and Hori, R.: Carrier-mediated transport systems of tetraethylammonium in rat renal brush-border and basolateral membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **773**: 113-124, 1984.
42. Caterson, R., Etheredge, S., Snitch, P., and Duggin, G.: Mechanisms of renal excretion of cisdichlorodiamine platinum. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **41**: 255-264, 1983.
43. Odland, B.: Relation between tubular secretion and effects of five loop diuretics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **211**: 238-244, 1979.

44. Bowman, R. H.: Renal secretion of [<sup>35</sup>S]furosemide and its depression by albumin binding. *Am. J. Physiol.* **229**: 93-98, 1975.
45. de Zeeuw, D., Jacobson, H. R., and Brater, D. C.: Indomethacin secretion in the isolated perfused proximal straight rabbit tubule. Evidence for two parallel transport mechanisms. *J. Clin. Invest.* **81**: 1585-1592, 1988.
46. Shen, D. D., and Azarnoff, D. L.: Clinical pharmacokinetics of methotrexate. *Clin. Pharmacokinet.* **3**: 1-13, 1978.
47. Sjövall, J., Westerlund, D., and Alván, G.: Renal excretion of intravenously infused amoxycillin and ampicillin. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **19**: 191-201, 1985.
48. Dayton, P. G., Yü, T. F., Chen, W., Berger, L., West, L. A., and Gutman, A. B.: The physiological disposition of probenecid, including renal clearance in man, studied by an improved method for its estimation in biological material. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **140**: 278-286, 1963.
49. Schild, L., and Roch-Ramel, F.: Transport of salicylate in proximal tubule (S2 segment) isolated from rabbit kidney. *Am. J. Physiol.* **254**: F554-F561, 1988.
50. Lentjes, E. W. G. M., Russel, F. G. M., and Van Ginneken, C. A. M.: Renal clearance of sulphinpyrazone in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **31**: 473-478, 1986.
51. Owada, E., Takahashi, K., Hori, R., and Arita, T.: Transformation and excretion of drugs in biological systems. X. Renal excretion mechanisms of sulfonamides in rabbits. *Chem. Pharm. Bull.* **22**: 594-600, 1974.
52. Hori, R., Okamura, M., Takayama, A., Hirozane, K., and Takano, M.: Transport of organic anion in the OK kidney epithelial cell line. *Am J Physiol* : 1993.
53. Gu, H., Wall, S. C., and Rudnick, G.: Stable expression of biogenic amine transporters reveals differences in inhibitor sensitivity, kinetics, and ion dependence. *J. Biol. Chem.* **269**: 7124-7130, 1994.
54. Brewer, C. B.: Cytomegalovirus plasmid vectors for permanent lines of polarized epithelial cells. *Meth. Cell Biol.* **43**: 233-245, 1994.
55. Thyss, A., Milano, G., Kubar, J., and Namer, M.: Clinical and pharmacokinetic evidence of a life-threatening interaction between methotrexate and ketoprofen. *Lancet* **1**: 256-258, 1986.
56. Dixon, M.: The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem. J.* **55**: 170-171, 1953.
57. Saito, H., Yamamoto, M., Inui, K., and Hori, R.: Transcellular transport of organic cation across monolayers of kidney epithelial cell line LLC-PK<sub>1</sub>. *Am. J. Physiol.* **262**: C59-C66, 1992.
58. Pascoe, W. S., Inukai, K., Oka, Y., Solt, J. W., and James, D. E.: Differential targeting of facilitative glucose transporters in polarized epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **271**: C547-C554, 1996.

59. Katsura, T., Verbavatz, J., Farinas, J., Ma, T., Ausiello, D. A., Verkman, A. S., and Brown, D.: Constitutive and regulated membrane expression of aquaporin 1 and aquaporin 2 water channels in stably transfected LLC-PK<sub>1</sub> epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 7212-7216, 1995.
60. Frei, E., Jaffe, N., Tattershall, M. H. N., Pitman, S., and Parker, L.: New approaches to cancer chemotherapy with methotrexate. *N. Engl. J. Med.* **292**: 846-851, 1975.
61. Jackson, R. C.: Biological effects of folic acid antagonists with antineoplastic activity. *Pharmac. Ther.* **25**: 61-82, 1984.
62. Bannwarth, B., Péhourcq, F., Schaefferbeke, T., and Dehais, J.: Clinical pharmacokinetics of low-dose pulse methotrexate in rheumatoid arthritis. *Clin. Pharmacokinet.* **30**: 194-210, 1996.
63. Nierenberg, D. W.: Competitive inhibition of methotrexate accumulation in rabbit kidney slices by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **226**: 1-6, 1983.
64. Corrocher, R., Abramson, R. G., King, V. F., Schreiber, C., Dikman, S., and Waxman, S.: Differential binding of folates by rat renal cortex brush border and basolateral membrane preparations. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **178**: 73-84, 1985.
65. Besseghir, K., Mosig, D., and Roch-Ramel, F.: Transport of methotrexate by the *in vitro* isolated rabbit proximal tubule. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **250**: 688-695, 1989.
66. He, Y., Tanigawara, Y., Yasuhara, M., and Hori, R.: Effect of folinic acid on tissue residence and excretion of methotrexate in rats. *Drug Metab. Dispos.* **19**: 729-734, 1991.
67. Statkevich, P., Fournier, D. J., and Sweeney, K. R.: Characterization of methotrexate elimination and interaction with indomethacin and flurbiprofen in the isolated perfused rat kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **265**: 1118-1124, 1993.
68. Masereeuw, R., Russel, F. G. M., and Miller, D. S.: Multiple pathways of organic anion secretion in renal proximal tubule revealed by confocal microscopy. *Am. J. Physiol.* **271**: F1173-F1182, 1996.
69. Morshed, K. M., Ross, D. M., and McMartin, K. E.: Folate transport proteins mediate the bidirectional transport of 5-methyltetrahydrofolate in cultured human proximal tubule cells. *J. Nutr.* **127**: 1137-1147, 1997.
70. Bourke, R. S., Chheda, G., Bremer, A., Watanabe, O., and Tower, D. B.: Inhibition of renal tubular transport of methotrexate by probenecid. *Cancer Res.* **35**: 110-116, 1975.
71. Bhandari, S. D., Joshi, S. K., and McMartin, K. E.: Folate binding and transport by rat kidney brush-border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **937**: 211-218, 1987.
72. Kates, R. E., and Tozer, T. N.: Biliary secretion of methotrexate in rats and its inhibition by probenecid. *J. Pharm. Sci.* **65**: 1348-1352, 1976.
73. Horne, D. W., and Reed, K. A.: Transport of methotrexate in basolateral membrane vesicles from rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**: 121-128, 1992.

74. Kullak-Ublick, G. A., Hagenbuch, B., Stieger, B., Schteingart, C. D., Hofmann, A. F., Wolkoff, A. W., and Meier, P. J.: Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. *Gastroenterology* **109**: 1274-1282, 1995.
75. Frenia, M. L., and Long, K. S.: Methotrexate and nonsteroidal antiinflammatory drug interactions. *Ann. Pharmacother.* **26**: 234-237, 1992.
76. Kremer, J. M., and Hamilton, R. A.: The effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on methotrexate (MTX) pharmacokinetics: impairment of renal clearance of MTX at weekly maintenance doses but not at 7.5 mg. *J. Rheumatol* **22**: 2072-2077, 1995.
77. Selhub, J., and Franklin, W. A.: The folate-binding protein of rat kidney. *J. Biol. Chem.* **259**: 6601-6606, 1984.
78. Elwood, P. C.: Molecular cloning and characterization of the human folate-binding protein cDNA from placenta and malignant tissue culture (KB) cells. *J. Biol. Chem.* **264**: 14893-14901, 1989.
79. Brigle, K. E., Westin, E. H., Houghton, M. T., and Goldman, I. D.: Characterization of two cDNAs encoding folate-binding proteins from L1210 murine leukemia cells. *J. Biol. Chem.* **266**: 17243-17249, 1991.
80. Williams, F. M. R., Murray, R. C., Underhill, T. M., and Flintoff, W. F.: Isolation of a hamster cDNA clone coding for a function involved in methotrexate uptake. *J. Biol. Chem.* **269**: 5810-5816, 1994.
81. Williams, F. M. R., and Flintoff, W. F.: Isolation of a human cDNA that complements a mutant hamster cell defective in methotrexate uptake. *J. Biol. Chem.* **270**: 2987-2992, 1995.
82. Prasad, P. D., Ramamoorthy, S., Leibach, F. H., and Ganapathy, V.: Molecular cloning of the human placental folate transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **206**: 681-687, 1995.
83. Paulusma, C. C., Bosma, P. J., Zaman, G. J. R., Bakker, C. T. M., Otter, M., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Borst, P., and Oude Elferink, R. P. J.: Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* **271**: 1126-1128, 1996.
84. Said, H. M., Nguyen, T. T., Dyer, D., Cowman, K. H., and Rubin, S. A.: Intestinal folate transport: identification of a cDNA involved in folate transport and the functional expression and distribution of its mRNA. *Biochim. Biophys. Acta* **1281**: 164-172, 1996.
85. Nguyen, T. T., Dyer, D. L., Dunning, D. D., Rubin, S. A., Grant, K. E., and Said, H. M.: Human intestinal folate transport: cloning, expression, and distribution of complementary RNA. *Gastroenterology* **112**: 783-791, 1997.
86. Masuda, M., Iizuka, Y., Yamazaki, M., Nishigaki, R., Kato, Y., Ni'inuma, K., Suzuki, H., and Sugiyama, Y.: Methotrexate is excreted into bile by canalicular multispecific organic anion transporter in rats. *Cancer Res.* **57**: 3506-3510, 1997.

87. Schaub, T. P., Kartenbeck, J., König, J., Vogel, O., Witzgall, R., Kritz, W., and Keppler, D.: Expression of the conjugate export pump encoded by the *mrp2* gene in the apical membrane of kidney proximal tubules. *J. Am. Soc. Nephrol.* **8**: 1213-1221, 1997.
88. Silverman, M.: Structure and function of hexose transporters. *Ann. Rev. Biochem.* **60**: 757-794, 1991.
89. Mueckler, M.: Facilitative glucose transporters. *Eur. J. Biochem.* **219**: 713-725, 1994.
90. Tso, J. Y., Sun, X. -H., Kao, T. -H., Reece, K. S., and Wu, R.: Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: Genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res.* **13**: 2485-2502, 1985.
91. Noé, B., Hagenbuch, B., Stieger, B., and Meier, P. J.: Isolation of a multispecific organic anion and cardiac glycoside transporter from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 10346-10350, 1997.
92. Lu, R., Kanai, N., Bao, Y., and Schuster, V. L.: Cloning, in vitro expression, and tissue distribution of a human prostaglandin transporter cDNA (PGT). *J. Clin. Invest.* **98**: 1142-1149, 1996.
93. Summerfield, J. A., Cullen, J., Barnes, S., and Billing, B. H.: Evidence for renal control of urinary excretion of bile acids and bile acid sulphates in the cholestatic syndrome. *Clin. Sci. Mol. Med.* **52**: 51-65, 1977.
94. Barnes, S., Gollan, J. L., and Billing, B. H.: The role of tubular reabsorption in the renal excretion of bile acids. *Biochem. J.* **166**: 65-73, 1977.
95. Strange, R. C.: Hepatic bile flow. *Physiol. Rev.* **64**: 1055-1102, 1984.
96. Chitranukroh, A., Taggart, G., and Billing, B. H.: Enhancement of the urinary excretion of non-sulphated and sulphated radioactive bile acids by sodium acetate in the bile duct obstructed rat. *Clin. Sci.* **68**: 63-70, 1985.
97. Zins, G. R., and Weiner, I. M.: Bidirectional transport of taurocholate by the proximal tubule of the dog. *Am. J. Physiol.* **215**: 840-845, 1968.
98. Hagenbuch, B., Stieger, B., Foguet, M., Lübbert, H., and Meier, P. J.: Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na<sup>+</sup>/bile acid cotransport system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10629-10633, 1991.
99. Meier, P. J.: Molecular mechanisms of hepatic bile salt transport from sinusoidal blood into bile. *Am. J. Physiol.* **269**: G801-G812, 1995.
100. Wong, M. H., Oelkers, P., Craddock, A. L., and Dawson, P. A.: Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J. Biol. Chem.* **269**: 1340-1347, 1994.
101. Shneider, B. L., Dawson, P. A., Christie, D. M., Hardikar, W., Wong, M. H., and Suchy, F. J.: Cloning and molecular characterization of the ontogeny of a rat ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J. Clin. Invest.* **95**: 745-754, 1995.

102. Hagenbuch, B.: Molecular properties of hepatic uptake systems for bile acids and organic anions. *J. Membrane Biol.* **160**: 1-8, 1997.
103. Negishi, M., Sugimoto, Y., and Ichikawa, A.: Molecular mechanisms of diverse actions of prostanoid receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1259**: 109-120, 1995.
104. Breyer, M. D., Jacobson, H. R., and Breyer, R. M.: Functional and molecular aspects of renal prostaglandin receptors. *J. Am. Soc. Nephrol.* **7**: 8-17, 1996.
105. Irish, J. M., and Grantham, J. J.: Renal handling of organic anions and cations, In *The kidney* ed. by B.M. Brenner and F.C.J. Rector., pp. 619-649, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1981
106. Sekine, T., Watanabe, N., Hosoyamada, M., Kanai, Y., and Endou, H.: Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter. *J. Biol. Chem.* **272**: 18526-18529, 1997.
107. Sweet, D. H., Wolff, N. A., and Pritchard, J. B.: Expression cloning and characterization of ROAT1. *J. Biol. Chem.* **272**: 30088-30095, 1997.
108. Wolff, N. A., Werner, A., Burkhardt, S., and Burkhardt, G.: Expression cloning and characterization of a renal organic anion transporter from winter flounder. *FEBS Lett.* **417**: 287-291, 1997.
109. Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J., and Rutter, W. J.: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**: 5294-5299, 1979.
110. Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
111. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467, 1977.
112. Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685, 1970.
113. Ogiwara, H., Saito, H., Shin, B.-C., Terada, T., Takenoshita, S., Nagamichi, Y., Inui, K., and Takata, K.: Immuno-localization of H<sup>+</sup>/peptide cotransporter in rat digestive tract. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**: 848-852, 1996.
114. Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254, 1976.
115. Saito, H., Ishii, T., and Inui, K.: Expression of human intestinal dipeptide transporter in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem. Pharmacol.* **45**: 776-779, 1993.
116. Sippel, C. J., McCollum, M. J., and Perlmutter, D. H.: Bile acid transport by the rat liver canalicular bile acid transport/ecto-ATPase protein is dependent on ATP but not on its own ecto-ATPase activity. *J. Biol. Chem.* **269**: 2820-2826, 1994.