

新 制
薬
179

ペプチドトランスポータPEPT1及びPEPT2の  
構造・機能に関する研究

1999

寺 田 智 祐

ペプチドトランスポータPEPT1及びPEPT2の  
構造・機能に関する研究

1999

寺 田 智 祐

# 目 次

総 論 の 部	
緒 言	1
第 I 章 ラット PEPT1 及び PEPT2 の cDNA クローニング	3
第 1 節 ラット PEPT1 の構造・臓器分布及び機能特性	5
1-1 PEPT1 の構造	5
1-2 PEPT1 の臓器分布	6
1-3 PEPT1 の機能特性	7
第 2 節 ラット PEPT2 の構造・臓器分布及び機能特性	9
2-1 PEPT2 の構造	9
2-2 PEPT2 の臓器分布	11
2-3 PEPT2 の機能特性	12
第 3 節 考 察	14
第 II 章 PEPT1 及び PEPT2 の機能に関する比較解析	17
第 1 節 PEPT1 及び PEPT2 安定発現細胞の構築	17
第 2 節 PEPT1 及び PEPT2 の基質親和性並びに薬物認識特性	21
第 3 節 考 察	26
第 III 章 PEPT1 及び PEPT2 の構造・機能相関解析	29
第 1 節 PEPT1 及び PEPT2 における histidine 残基の機能的役割	29
第 2 節 PEPT1 における必須 histidine 残基の同定	32
第 3 節 キメラペプチドトランスポータの構築による薬物認識領域の検索	34
第 4 節 考 察	38
結 論	41
謝 辞	44

実 験 の 部	45
第 I 章 実験の部	45
第 II 章 実験の部	48
第 III 章 実験の部	49
論 文 目 録	52
引 用 文 献	53

# 総論の部

## 緒言

経口投与された薬物は、製剤の崩壊、薬物の放出、消化管液による薬物の溶解といった諸過程を経て、最終的に消化管より吸収され脈管系へ移行する<sup>1, 2)</sup>。薬物の腸管吸収は、経口投与された薬物のバイオアベイラビリティを規定する重要な過程の一つであり、ミクロ的には腸上皮細胞膜を介する膜輸送現象の集積されたものである。一般に薬物は、生体膜を構成する脂質二分子層を受動拡散によって透過するため、その透過速度は薬物固有のイオン化の程度や脂溶性といった物理化学的性質に大きく支配されている。一方、経口用 $\beta$ -ラクタム抗生物質のように低脂溶性であり、かつ生理的pHでイオン化しているにも関わらず良好な吸収性を示す薬物も存在する。これまで、著者らの研究室では、小腸並びに腎尿細管刷子縁膜小胞<sup>3-7)</sup>や培養細胞<sup>8-10)</sup>を用いた薬物輸送研究によって、経口用 $\beta$ -ラクタム抗生物質などペプチド類似薬物の吸収が、ペプチドトランスポータによって媒介されることを明らかにしてきた。

ペプチドトランスポータは、刷子縁膜を介した $H^+$ 勾配を駆動力として、タンパク質消化産物である小分子ペプチド（ジペプチド及びトリペプチド）を細胞内に能動輸送し、アミノ酸トランスポータと共にタンパク質の吸収や恒常性の維持に重要な役割を担っている（Figure）<sup>11, 12)</sup>。アミノ酸の種類を20種類としてもジ及びトリペプチドの数は、400並びに8,000種類になることから、ペプチドトランスポータは広範な基質認識性を有することとなる。従って、経口用 $\beta$ -ラクタム抗生物質<sup>3-10)</sup>や抗癌剤Bestatin<sup>13-15)</sup>など、構造的に小分子ペプチドと類似したペプチド類似薬物は、ペプチドトランスポータによって誤認識・輸送されるため、物理化学的性質から予測されるよりも高い消化管吸収性を示すと考えられている。一方、腎尿細管に発現するペプチドトランスポータは、糸球体濾液中の小分子ペプチドを再吸収しアミノ窒素の保持に寄与している<sup>16)</sup>。腎に発現しているペプチドトランスポータは、ペプチド類似薬物の再吸収を行いそれら薬物の生体内半減期の延長に関与している可能性がある<sup>7)</sup>。

この様に生理・薬物動態学的に重要とされるペプチドトランスポータは、機能面を中

心に幅広い解析が行われてきたが、その分子の実体は長らく不明であった。1994年、Fei<sup>17)</sup>らは、発現クローニングの手法を用いてウサギ小腸よりペプチドトランスポータ (PEPT1) のcDNAクローニングを行い一次構造等を明らかにした。しかし、ペプチド類似薬物の認識性や、ペプチドトランスポータの多様性に関しては不明の点が多かった。そこで著者は、小腸及び腎尿細管におけるペプチドトランスポータを介した薬物輸送の分子的解析を目的とし、ラットペプチドトランスポータのcDNAクローニングを試み、2種のトランスポータ (PEPT1及びPEPT2) の単離に成功した。第I章ではcDNAクローニングに基づくラットペプチドトランスポータの構造・臓器分布並びに輸送機能特性について検討した。さらに、第II章では両トランスポータの機能的相違点及び薬物認識能について比較精査し、最後に第III章でペプチドトランスポータの輸送機序解明の観点から、構造・機能相関に関する分子的解析を行った。

以下に得られた結果を論述する。

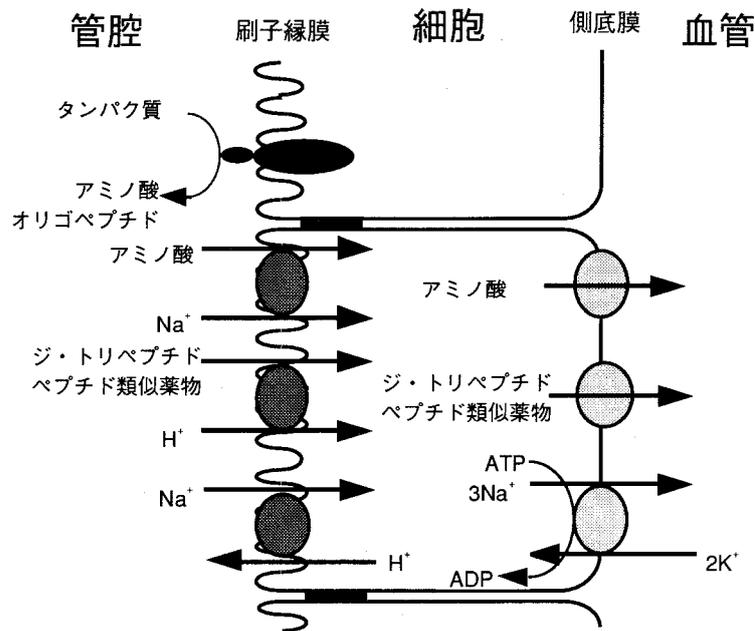


Figure Epithelial transport of protein-digestive products and peptide-like drugs.

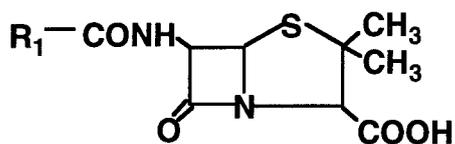
## 第 I 章 ラット PEPT1 及び PEPT2 の cDNA クローニング

経口用 $\beta$ -ラクタム抗生物質は、低脂溶性であり、かつ生理的 pH でイオン化しているにも関わらず良好な吸収性を示すことから、その腸管吸収には特殊輸送系の関与していることが示唆されてきた<sup>18-23)</sup>。その後、著者らの研究室における小腸並びに腎尿細管刷子縁膜小胞や培養細胞を用いた薬物輸送研究によって、 $H^+$ 勾配を駆動力とするペプチドトランスポータが $\beta$ -ラクタム抗生物質の刷子縁膜輸送を媒介していることが解明された<sup>3-10)</sup>。さらに、その他の薬物についても同様の検討がなされ、ペプチドトランスポータは、広範なペプチド類似薬物を輸送することが明らかになった。これらの薬物としては、 $\beta$ -ラクタム抗生物質<sup>3-10)</sup>、ジペプチド様抗癌剤 Bestatin<sup>13-15)</sup> 並びにアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害剤である captopril や enalapril<sup>24, 25)</sup> 等が含まれる (Fig. 1-1)。また、経口吸収性の低い薬物をアミノ酸修飾することによってペプチドトランスポータの基質とし、経口吸収性を改善する試みもなされている。本態性高血圧の治療薬である L- $\alpha$ -methyldopa を L-phenylalanine で修飾した L- $\alpha$ -methyldopa-L-phenylalanine<sup>27, 28)</sup> や、抗ウイルス剤 acyclovir に L-valine を結合させた valacyclovir<sup>29-31)</sup> 等が挙げられる (Fig. 1-1)。

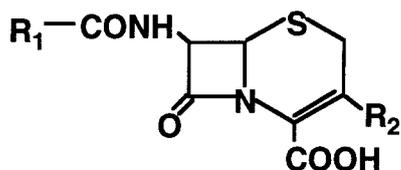
この様に薬物動態学的に重要とされるペプチドトランスポータは、機能面を中心に幅広い解析が行われてきたが、臓器間で基質認識性に相違点が認められるなど、トランスポータの多様性や臓器分布について不明の点も多く残されていた。従って、これらの問題点を解決するためには、ペプチドトランスポータの cDNA クローニングに基づく、単一分子レベルでの解析が必須であると考えられた。1994年、Fei ら<sup>17)</sup> は発現クローニングの手法を用いて、ウサギ小腸よりペプチドトランスポータ (PEPT1) の cDNA 単離に成功した。そこで著者は、ウサギ PEPT1 のアミノ酸配列を参考にして、ラットペプチドトランスポータの cDNA クローニングを試みた。本章では、2種のペプチドトランスポータ (PEPT1 及び PEPT2) の cDNA クローニングに基づく、両トランスポータの構造、臓器分布並びに輸送機能特性について詳細な検討を加えた。

$\beta$ -Lactam antibiotics<sup>3-10)</sup>

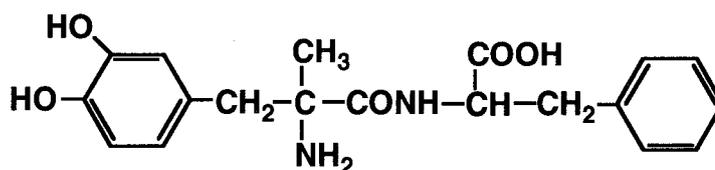
Penicillin



Cephalosporin

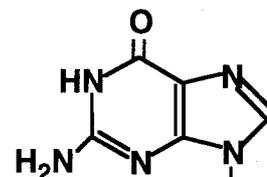


L- $\alpha$ -Methyldopa-L-phenylalanine<sup>27, 28)</sup>



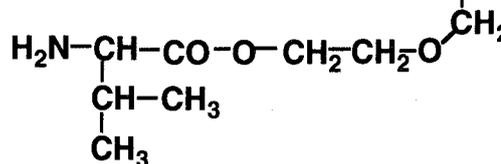
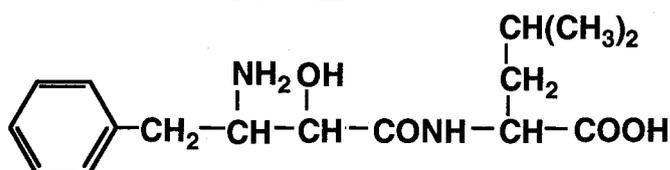
Antiherpetic agent<sup>29-31)</sup>

Valacyclovir



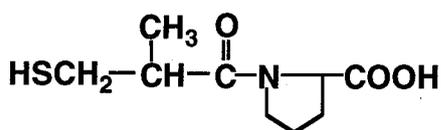
Antineoplastic drug<sup>13-15)</sup>

Bestatin

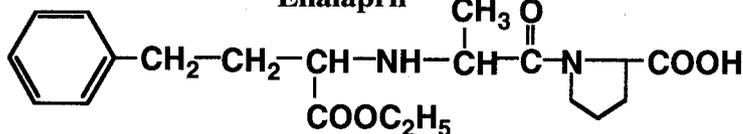


ACE inhibitors<sup>24, 25)</sup>

Captopril



Enalapril



Renin inhibitor<sup>26)</sup>

S 86 3390

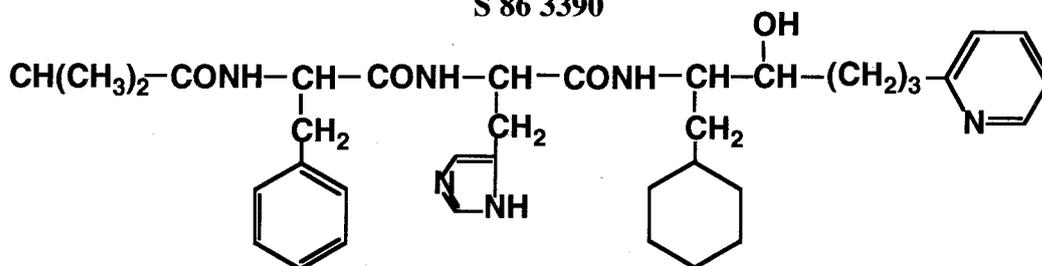


Fig. 1-1 Chemical structures of various peptide-like drugs.

## 第1節 ラットPEPT1の構造・臓器分布及び機能特性

### 1-1 PEPT1の構造

ウサギPEPT1のアミノ酸配列を参考にdegenerate primerを合成し、ラット腎mRNAを鋳型としてRT-PCRを行ったところ、2種類のPCR産物が得られた。これらのPCR産物をそれぞれプローブとして、ラット腎cDNAライブラリーをスクリーニングした結果、完全長のcDNA (PEPT1及びPEPT2 cDNA) の単離に成功した。ラットPEPT1 cDNAは2,921塩基対からなり、開始コドンとpoly (A)<sup>+</sup>末端を有していた。Open reading frameのシーケンスよりラットPEPT1は710個のアミノ酸からなり、ハイドロパシー解析の結果、12回膜貫通型タンパクであることが推定された。また、アミノ酸配列から予想される糖鎖結合部位が9番目と10番目の膜貫通領域に挟まれた細胞外ループに存在することが示唆された (Fig. 1-2)。

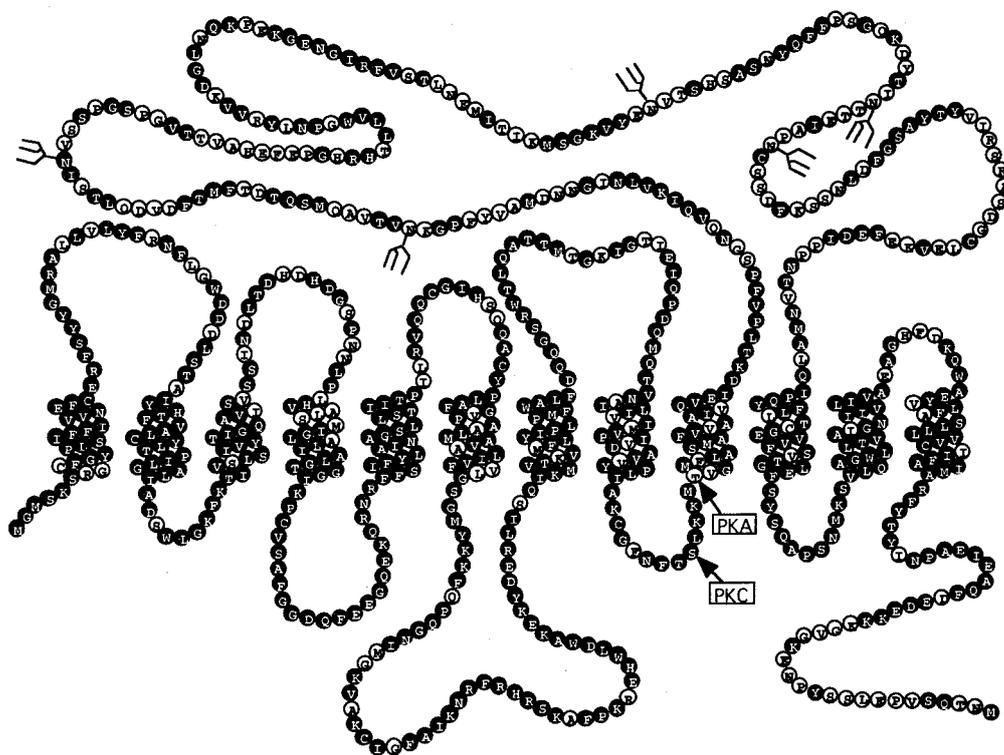
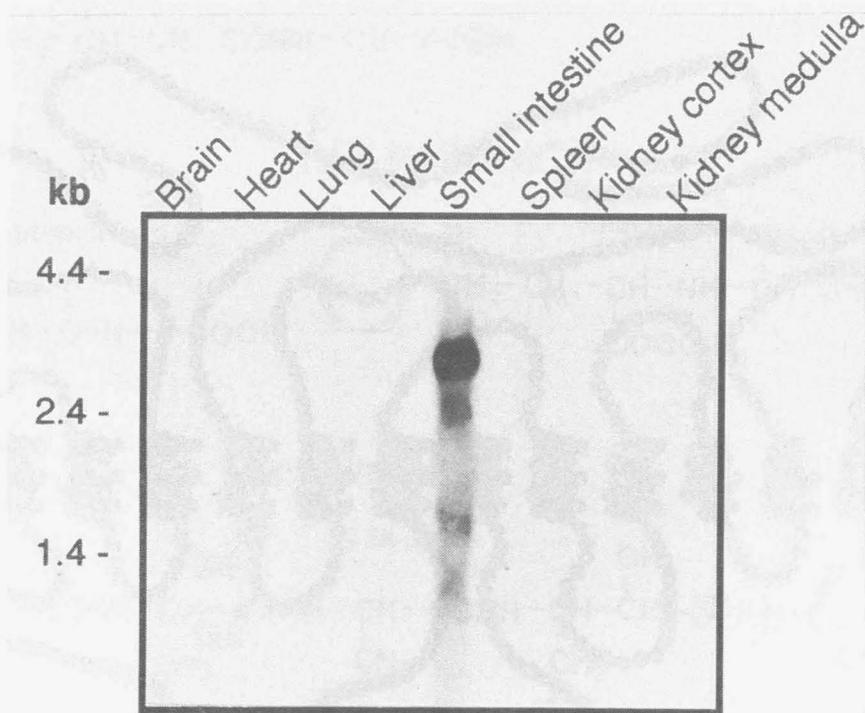


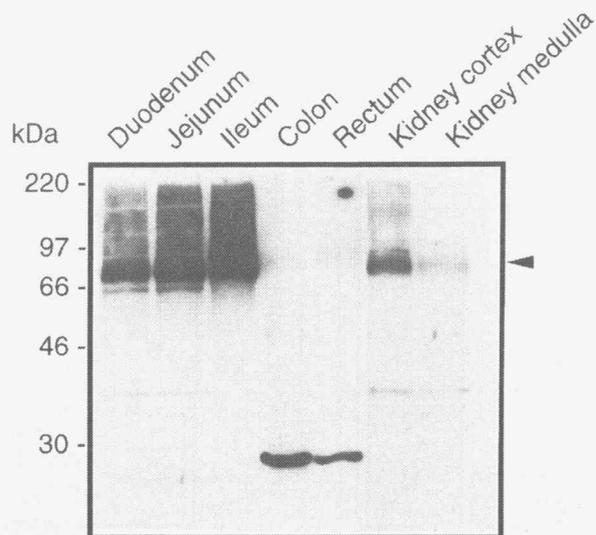
Fig. 1-2 Predicted secondary structure of rat PEPT1. • represents the identical amino acid residues among rat, rabbit and human PEPT1. PKA and PKC are the putative phosphorylation sites. Trees are the putative glycosylation sites.

## 1-2 PEPT1の臓器分布

ラットPEPT1 mRNAの臓器分布をノーザンブロットによって検討したところ、小腸にのみ約2.9kbのバンドが検出された (Fig. 1-3)。また特異的プライマーを用いたRT-PCRでは小腸以外に腎皮質及び腎髄質にも発現が認められた。ラットPEPT1に対する抗体を用いてウエスタンブロット分析を行った結果、ラットPEPT1 (75 kDa) は十二指腸、空腸及び回腸に強く発現していたが、結腸や直腸では検出されなかった (Fig.1-4)。また腎においても検出されたが、その発現量は小腸の各部位に比べて低いことがわかった (Fig.1-4)。さらに固定切片を用いた免疫組織染色によって、ラットPEPT1は小腸絨毛部の刷子縁膜に局在していることが示された。また腎では、近位尿細管上皮細胞の刷子縁膜に発現していることがわかった。これらの臓器分布や膜局在性は、これまで膜小胞系や培養細胞系で示唆されてきた知見と良く対応していた。



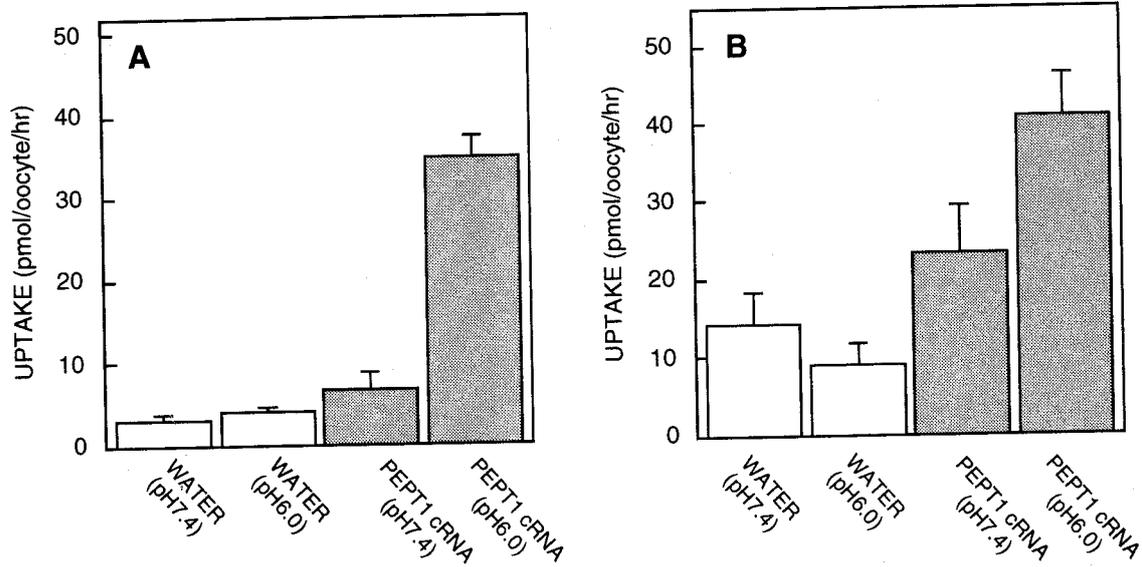
**Fig. 1-3 Northern blot analysis of rat PEPT1 mRNA in rat tissues.** Five  $\mu\text{g}$  of poly (A)<sup>+</sup> RNA from the indicated tissues was run in each lane and hybridized with the full length rat PEPT1 cDNA at high stringency.



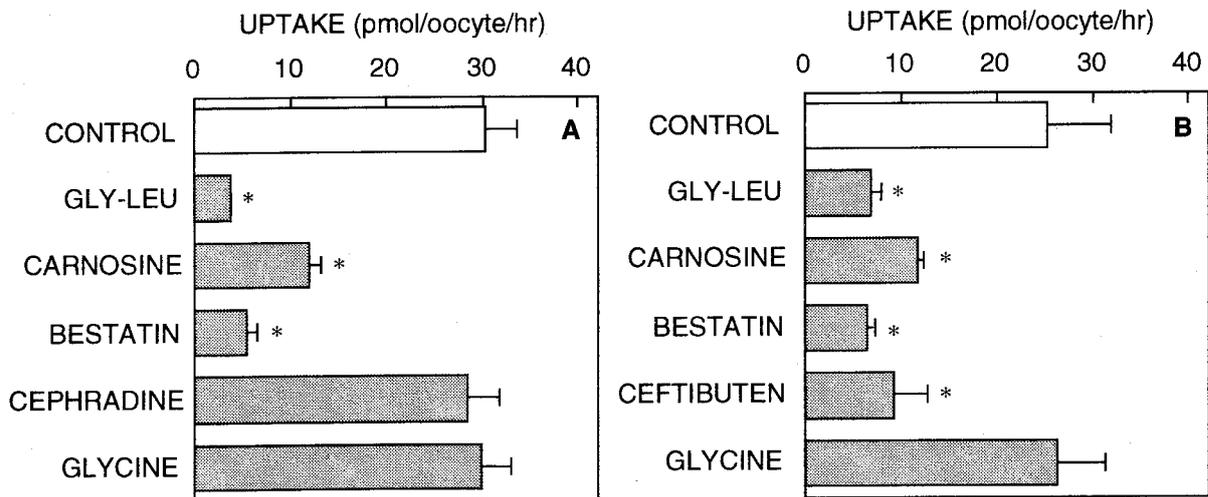
**Fig. 1-4 Immunoblot analysis of the rat digestive tract and kidney with anti-PEPT1 serum.** Twenty-five  $\mu\text{g}$  of membrane protein of each sample was separated by SDS-PAGE and subjected to immunoblotting.

### 1-3 PEPT1の機能特性

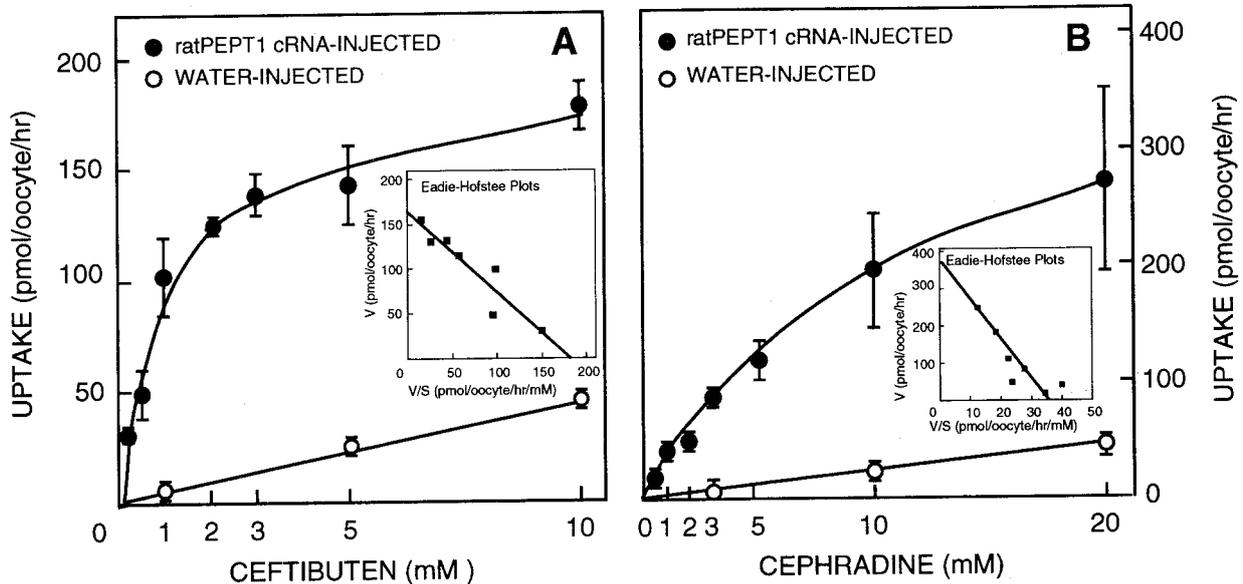
ラットPEPT1の輸送機能特性について調べるため、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて薬物取り込み実験を行った。取り込み実験の基質としては、既に膜小胞系や培養細胞系の検討から、ペプチドトランスポータの基質となることが報告されている、経口用 $\beta$ -ラクタム抗生物質ceftibuten並びにcephradineを用いた<sup>3, 4, 6, 8-10)</sup>。ラットPEPT1 RNA注入卵母細胞による両薬物の取り込み活性を測定したところ、いずれの薬物も水注入卵母細胞よりも取り込み量が上昇し、さらに内向き $\text{H}^+$ 勾配存在下で取り込みが促進された (Fig.1-5)。ceftibuten並びにcephradineの取り込みは過剰量のジペプチドやBestatinで阻害されたが、グリシンによる阻害効果は観察されなかった (Fig.1-6)。またceftibuten及びcephradine取り込みの濃度依存性を測定したところ、高濃度において飽和性が観察された。PEPT1を介した特異的な取り込み量に基づいて輸送パラメータを求めた結果、見かけの $K_m$ 値はそれぞれ0.9 mM (ceftibuten)、12 mM (cephradine)であった (Fig.1-7)。これらの結果は、PEPT1が両薬物の輸送担体として機能していることを強く示唆するものである。



**Fig. 1-5 Uptake of ceftibuten (A) and cephradine (B) by oocytes injected with water or rat PEPT1 cRNA.** Uptake by oocytes was assayed for 1 hr at 25°C in the presence of either ceftibuten (1 mM) or cephradine (3 mM). Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of three experiments. Four oocytes were used for each uptake experiment.



**Fig. 1-6 Effects of various compounds on the uptake of ceftibuten (A) and cephradine (B) into oocytes.** Uptake of ceftibuten (1 mM) or cephradine (3 mM) by oocytes was assayed for 1 hr at 25°C in the uptake medium (pH 6.0) containing each inhibitor (10 mM). Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of three experiments (four oocytes per experiment). \*P < .05, significant difference from control.



**Fig. 1-7 Concentration dependence of ceftibuten (A) and cephradine (B) uptake by oocytes.** Uptake of ceftibuten or cephradine was measured in the uptake medium (pH 6.0) at various concentrations (0.2-20 mM) for 1 hr at 25°C by oocytes injected with water (○) or rat PEPT1 cRNA (●). Inset shows Eadie-Hofstee plot of the uptake after correction for the nonsaturable component. Each point represents the mean ± S.E. of three experiments (four oocytes per experiment).

## 第2節 ラットPEPT2の構造・臓器分布及び機能特性

### 2-1 PEPT2の構造

腎cDNAライブラリーのスクリーニングによって得られたラットPEPT2 cDNAは、全長3,938塩基対からなり、開始コドンとpoly (A)<sup>+</sup>末端を有していた。Open reading frameには、729個のアミノ酸から構成される推定12回膜貫通型タンパクがコードされていた。ラットPEPT1とのアミノ酸相同性は48%であったが、推定膜貫通領域では高いアミノ酸保存性が見られた (Fig.1-8)。また、ラットPEPT1と同様に9及び10番目の膜貫通領域に挟まれた細胞外ループに、糖鎖結合部位の存在することがわかった。

rat PEPT1 1" MGMSKSRGCFGYEHLSTIFFIIVVNEFCERFSY  
 rat PEPT2 1' MNPFQKNESKETLFSVPSTEEMLRPPSPPKKSPKIFGSSYEVSIJAFIIVVNEFCERFSY  
M1

rat PEPT1 31" YGMFALLVLYFRNFIQWDDDLSTAIYHTFVALCYLTPILGALIADSWLGKFKTIIVLSLIV  
 rat PEPT2 61' YGMFAVLTLYFLYFLHWNEDISTSVYHAESSLCYFTPIILGAAIADSWLGKFKTIIVLSLIV  
M2

rat PEPT1 91" YTTGQAVISVSSINDLTDHHDGSPNNLP LHVALLSMIGIALIALGTGGIKPCVSAFGGDQ  
 rat PEPT2 121' YVLCGVFKSLGATPIIL-----GGKM-LHTILSLVGLSLIALGTGGIKPCVSAFGGDQ  
M3 M4

rat PEPT1 151" FEEGQEKQRNRFSSIFYLAINAGSLLSTIITPILRVQCCGIHSQAACYPLAFGVPAALMA  
 rat PEPT2 172' FEEHAEARTRYFSVFYLAINAGSLLSTIITPILR-GDVKCFGQD-CYALAFGVPEGLIMV  
M5 M6

rat PEPT1 211" VALIVFVVLGSGMYKKFQPOGNI MGKVAKCTGFALKNRFRHRSKAFPKREHWLDWAKEKYD  
 rat PEPT2 230' LALVVFAMGSKMYRKPPEEGNIVAQVIKCIWFALCNFRFRNRSGDLPKRQHWLDWAKEKYP

rat PEPT1 271" ERLISQIKMVTIKVMFLYIPLPMFWALFDQQSRWTLQATIMIGKIGTIEIQPDQMOTVNA  
 rat PEPT2 290' KHLIADV KALTRVLFYIPLPMFWALFDQQSRWTLQANKMNGDLGFFVLQPDQMOTVNP  
M7

rat PEPT1 331" ILLIVIMVHIVDAVVYPLIAKCGFNFTSLKMMIVGMFLASMAFVVAAIIVQVEIDKTLPVFHF  
 rat PEPT2 350' RLVLIFILHLRDLVYRLLSKCRINFSSLRKMAVGMILACIAFAVAALVETKINGMIHPQF  
M8 M9

rat PEPT1 391" SGNQVQIKVLNIGNNDMAV-YFPGKNVT-----VAQMSQIDTFMTFDVDQLT-SINVSSP  
 rat PEPT2 410' ASQEIFLQVLNLDAGDVKVTVLGSRRNNSLLVESVSSFQNTIHYSKLHLEAKSQDLHFHLK

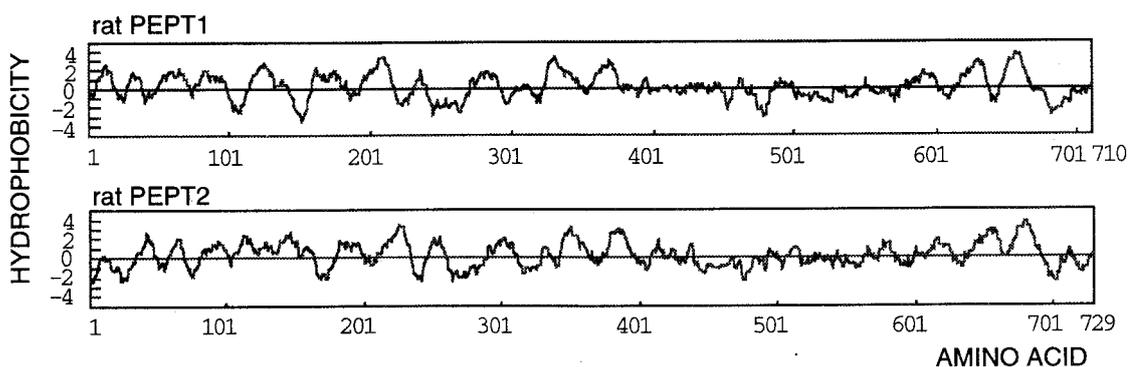
rat PEPT1 444" GSPGVTTVAHEFEFPGHRHTLLVWGP--NLYRVVKDGLNOKPEKGENGIRFVSTLNEMITII  
 rat PEPT2 470' YNSLSVHNDHSVVEKNCYQLLIHQDGESISSMLVKDTGIKPAANGMAAIRFINTLHKDLNI

rat PEPT1 502" KMSGKVEYEMVTSH-SASNYQFFPSGQKDYTTINTTEIAPNCSSDFKSSNLDFGSAYTYVIR  
 rat PEPT2 530' SLDTDAPLSV GKDYGVSAVRTVLRG--KYPVHCEIETEDKVFSS-LDLGQLDFGTTYLFVIT

rat PEPT1 561" SRASDGOLEVKEFEDIIPNTVNMALQIPQYFLITCGEVVFSVTGLEFSYSQAPSNMKSVEL  
 rat PEPT2 587' NITISQGLQAWKAEDIPVVKLSIAWQIPQYVIVTAAEVVMSVTGLEFSYSQAPSSMKSVEL  
M10

rat PEPT1 621" QAGWLLTVAIGNIIVLIVAEAGHFQKQWAEVVLASLLLVVCIIFAIMARFYTYINPAEI  
 rat PEPT2 646' QAAWLLTVAVGNIIIVLVAQFSGLA-QWAEFVLSCLLLLVVCLLFSVMAYYYVPLKSEDT  
M11 M12

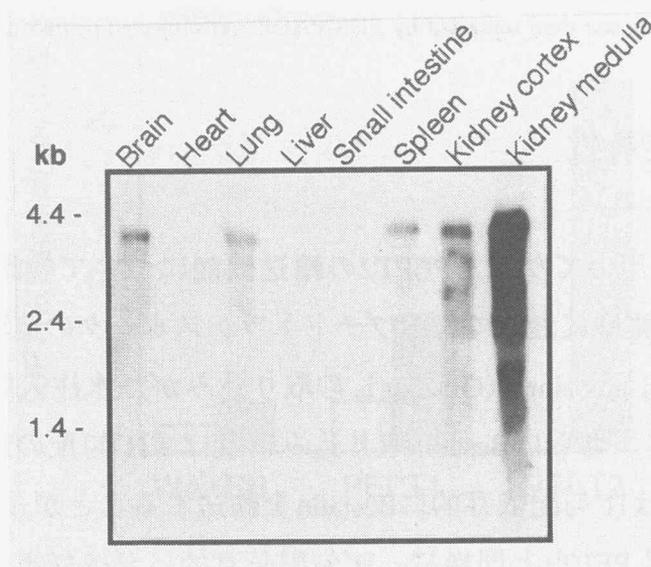
rat PEPT1 681" EAQFDEDEKKGKGVGKENPYSSLEPVSQTNM  
 rat PEPT2 705' REATDKQIPAVQGNMINLETKNTRL



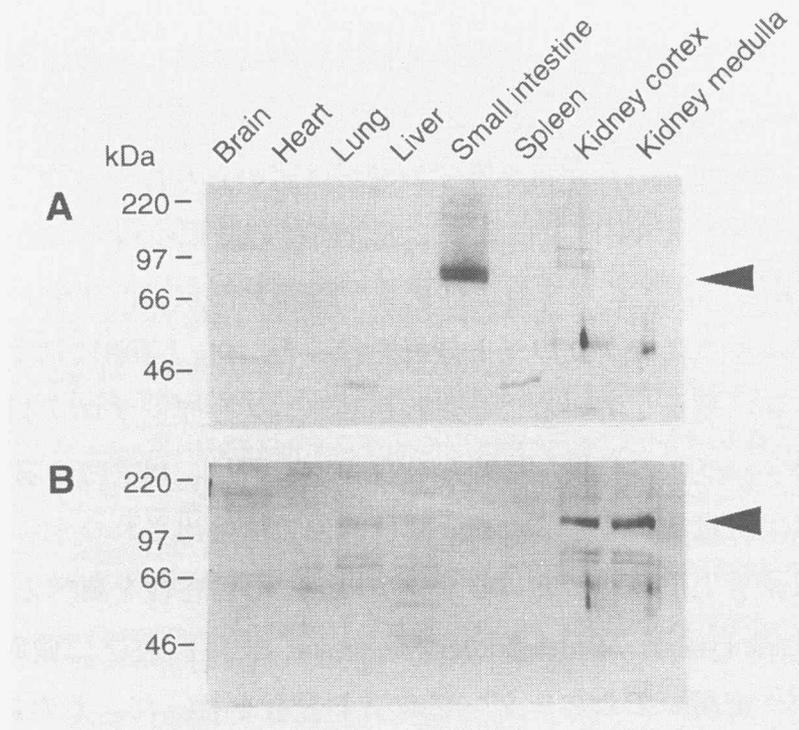
**Fig. 1-8 Comparison of deduced amino acid sequences (upper) and hydrophobicity plots (bottom) of the rat PEPT1 and PEPT2.** Amino acid identities in the sequences are boxed. Putative membrane-spanning  $\alpha$ -helices are underlined.

## 2-2 PEPT2の臓器分布

ノーザンブロット分析によって、ラットPEPT2 mRNAの臓器分布について調べた。その結果、ラットPEPT2 mRNAは腎（髄質部>皮質部）に最も多く発現しており、脳、肺、脾臓でもわずかに発現していたが、小腸での発現は認められなかった（Fig.1-9）。また特異的プライマーを用いたRT-PCRによっても、同様の結果が得られた。次に、ラットPEPT2 C末端部合成ペプチドに対する抗ペプチド抗体を作成し、ラット各組織より調製した形質膜に対するウエスタンブロット分析を行った。Fig.1-10Bに示すように、PEPT2タンパクは腎及び肺に発現していることがわかった。ノーザンブロットとは対照的に、脳においてPEPT2タンパクの発現が認められなかったのは、PEPT2の脳での発現量が低いことと発現部位が限定されているため、粗膜画分では検出されなかったものと推察された。次に、腎尿細管上皮細胞におけるラットPEPT2の局在性を調べるため、腎皮質部より同時調製した刷子縁膜（Brush-border Membrane: BBM）並びに側底膜（Basolateral Membrane: BLM）<sup>32)</sup>を用いてウエスタンブロット分析を行った。その結果、105 kDaのバンドが刷子縁膜にのみ検出された。



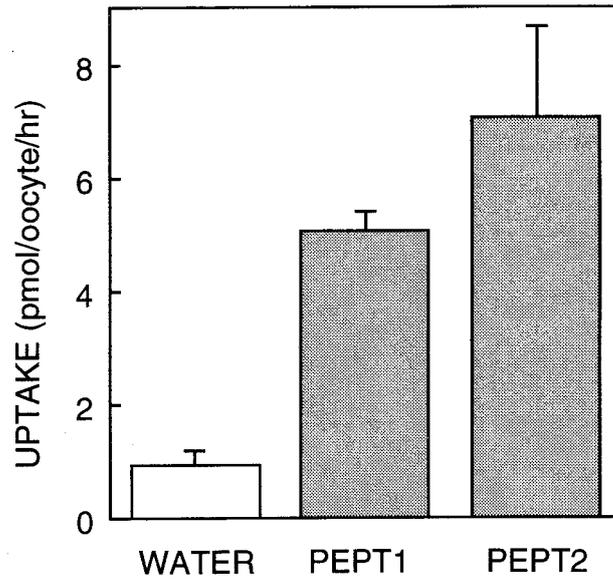
**Fig. 1-9 Northern blot analysis of rat PEPT2 mRNA in rat tissues.** Five  $\mu\text{g}$  of poly (A)<sup>+</sup> RNA from the indicated tissues was run in each lane and hybridized with the full length rat PEPT2 cDNA at high stringency.



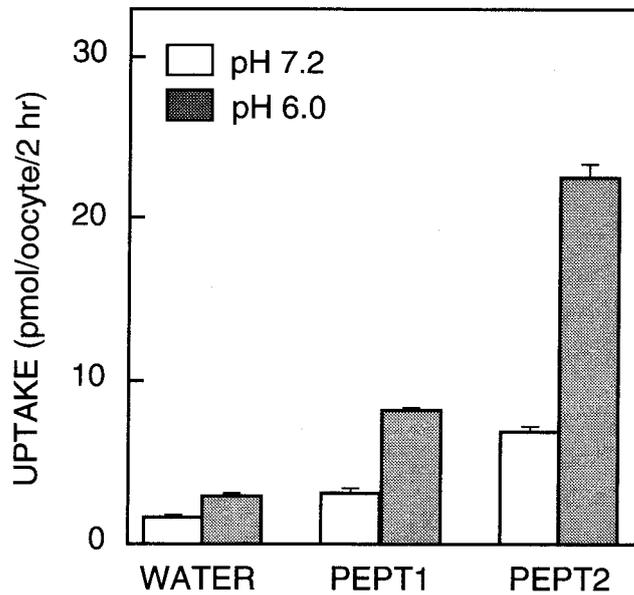
**Fig. 1-10 Immunoblot analysis of crude plasma membrane from rat tissues with anti-PEPT1 (A) and anti-PEPT2 serum (B).** Crude plasma membranes (25  $\mu$ g) from each tissue were separated by SDS-PAGE and subjected to immunoblotting.

### 2-3 PEPT2の機能特性

卵母細胞発現系を用いてラットPEPT2の輸送機能について検討したところ、ラットPEPT2 RNA注入卵母細胞において、ペプチドトランスポータの典型的基質で加水分解抵抗性ジペプチドglycylsarcosine (Gly-Sar)の取り込みが、水注入卵母細胞よりも顕著に増大した (Fig.1-11)。さらにBestatin取り込みに及ぼす $H^+$ 勾配の影響について調べたところ、ラットPEPT2は $H^+$ 勾配依存的にBestatinを輸送することが示された (Fig.1-12)。従ってラットPEPT2もPEPT1と同様に、 $H^+$ 勾配依存的にジペプチドやペプチド類似薬物を輸送することが機能的に実証された。



**Fig. 1-11** [<sup>14</sup>C]Gly-Sar uptake by oocytes injected with water, rat PEPT1 or rat PEPT2 cRNA. Uptake by oocytes was assayed for 2 hr at 25°C in the presence of 20 μM [<sup>14</sup>C]Gly-Sar. Each column represents the mean ± S.E. of four experiments. Four oocytes were used for each uptake experiment.



**Fig. 1-12** Effect of medium pH on [<sup>3</sup>H]Bestatin uptake by oocytes injected with water, rat PEPT1 or rat PEPT2 cRNA. Uptake by oocytes was assayed for 2 hr at 25°C in the presence of 30 μM [<sup>3</sup>H]Bestatin. Each column represents the mean ± S.E. of four experiments. Four oocytes were used for each uptake experiment.

### 第3節 考 察

本章では、PCR法を応用してラットペプチドトランスポータPEPT1及びPEPT2のcDNAクローニングを行い、両トランスポータ構造解析、臓器分布並びに輸送機能特性について検討を加えた。

#### 1. PEPT1及びPEPT2の構造

ラットPEPT1は、ヒト<sup>33)</sup>及びウサギ<sup>17)</sup> PEPT1とそれぞれ、83並びに77%のアミノ酸ホモロジーを示した。またラットPEPT2のヒト<sup>34)</sup>並びにウサギ<sup>35)</sup> PEPT2とのアミノ酸ホモロジーは、いずれも82%であった。いずれのトランスポータ間でも、膜貫通領域において高いアミノ酸相同性が観察された。ラットPEPT1及びPEPT2のアミノ酸ホモロジーは48%であり、機能的にもファミリーを形成していると考えられるが、ラット脳より単離されたペプチド/ヒスチジントランスポータ (PHT)<sup>36)</sup>は、両トランスポータとのホモロジーが低く、ファミリーを形成しているとは考えられていない。H<sup>+</sup>勾配を駆動力として、ジ・トリペプチドを細胞内に輸送するシステムは、哺乳動物のみならず、線虫<sup>37)</sup>やショウジョウバエ<sup>38)</sup>にも存在し、自然界に普遍的なシステムとして機能していることが推察される。またペプチドトランスポータファミリーは、PTRファミリーの一員を形成していることが報告されている<sup>39, 40)</sup>。

プロテインキナーゼA (PKA) 及びプロテインキナーゼC (PKC) によってリン酸化される部位が、アミノ酸配列上推定されている<sup>41)</sup>。そこで、ラットPEPT1及びPEPT2におけるこれらアミノ酸配列の検索を行ったところ、PEPT1ではPKA及びPKCによる推定リン酸化部位がそれぞれ1ヶ所ずつ、またPEPT2ではそれぞれ3ヶ所ずつ存在した。ヒトPEPT1発現細胞であるCaco-2を用いた検討により、ペプチドトランスポータはPKA<sup>42)</sup>及びPKC<sup>43)</sup>により輸送活性が調節されることが報告されており、これら推定リン酸化部位が直接リン酸化されることによって、輸送機能の調節に関与している可能性が考えられる。また、食餌中のタンパク量<sup>44)</sup>、培養液中のジペプチド濃度<sup>45)</sup>並びに薬剤性腸障害<sup>46)</sup>によるペプチドトランスポータの輸送活性調節において、PKAやPKCの関与していることが示唆されている。

## 2. PEPT1及びPEPT2の臓器分布

ラットPEPT1 mRNAの臓器分布を調べた結果、小腸及び腎に発現していることがわかった。Feiら<sup>17)</sup>は、ウサギPEPT1 mRNAが小腸、腎に加えて、肝臓並びに脳にも発現していることを報告している。これらの差異が種差によるものかどうかは不明である。一方ラットPEPT2 mRNAは腎、脳、肺、脾臓に発現しているが小腸には存在しないことが判明した。Döringら<sup>47)</sup>は、RT-PCRを用いた解析により、ウサギPEPT2 mRNAが腎、肺、脳、乳腺に発現していること、並びに弱いシグナルが様々な臓器で認められたことを報告している。従って、PEPT2はPEPT1と異なり多くの臓器、細胞に発現し、様々な生理的機能を果たしていることが推察される。単離肺細胞を用いた検討により、H<sup>+</sup>勾配を駆動力とするペプチドトランスポータが肺に発現し、肺の恒常性維持に関与しているという報告がなされている<sup>48)</sup>。また、乳腺細胞においてもペプチドトランスポータが、機能的に発現していることが示唆されている<sup>49)</sup>。

両トランスポータに対する特異抗体を用いて、PEPT1及びPEPT2の膜局在性について解析したところ、PEPT1は小腸及び腎の刷子縁膜に発現していること、並びにPEPT2は腎の刷子縁膜に局在していることが明らかとなった。従来、腎刷子縁膜小胞を用いた検討により、腎には2種のペプチドトランスポータの存在することが示唆されてきたが<sup>50-52)</sup>、今回の検討よりペプチドトランスポータの機能面における多様性を、分子レベルで実証することができたと考えられる。

## 3. PEPT1及びPEPT2の機能特性

これまで、小腸刷子縁膜小胞を用いた解析により、電荷の異なるβ-ラクタム抗生物質の輸送には、輸送特性の異なる2種のペプチドトランスポータが関与していることが示唆されてきた<sup>6, 53, 54)</sup>。しかし、小腸にはPEPT1のみ発現していることから、PEPT1単独で電荷の異なる多様な経口用β-ラクタム抗生物質の消化管吸収を媒介していることが推察される。実際、PEPT1発現卵母細胞を用いて得られたceftibutenのKm値 (0.9 mM) は、ラット小腸刷子縁膜小胞系 (0.17 mM)<sup>55)</sup> やラット小腸mRNA注入卵母細胞 (0.11 mM)<sup>56)</sup> から得られたKm値に比べて若干大きい値を示したが、培養腸上皮細胞Caco-2におけ

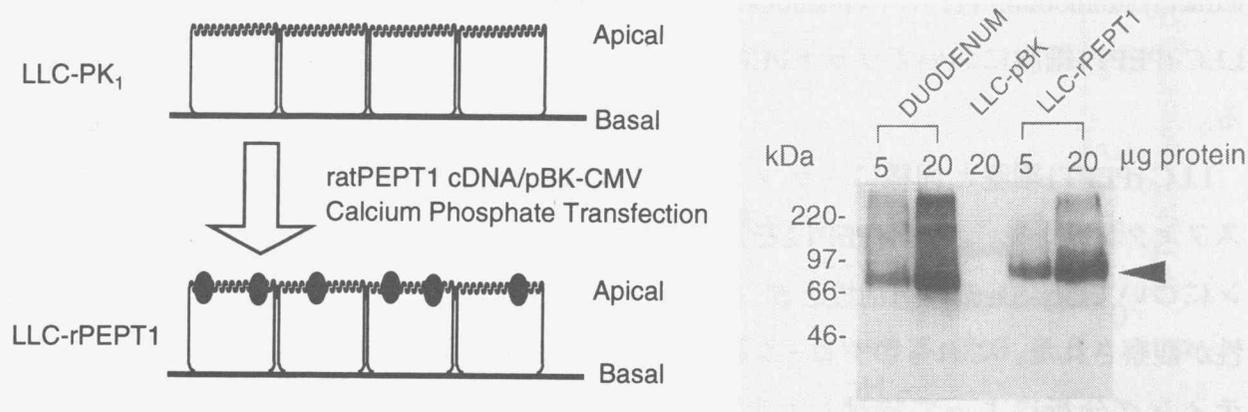
るKm値 (0.9 mM)<sup>8)</sup>と一致した。一方cephradineのKm値 (12 mM) は、膜小胞系 (9.4 mM)<sup>3)</sup>やCaco-2 (8.3 mM)<sup>8)</sup>で報告されている値とほぼ一致する値を示した。また、次章で述べるPEPT1安定発現細胞を用いたこれら薬物の輸送実験における阻害剤の効果やpH依存性の結果は、従来より膜小胞系や培養細胞系で報告されている知見とほぼ対応していた。以上の結果より、小腸刷子縁膜を介した電荷の異なる多様な経口用β-ラクタム抗生物質の輸送過程が、PEPT1のみによって説明し得ることが示唆された。また、Wenzelら<sup>57)</sup>は、電荷の異なる経口用β-ラクタム抗生物質 (アニオン型：cefixime並びに両性イオン型：cefadroxil) の輸送特性について、ウサギPEPT1発現卵母細胞並びにCaco-2細胞を用いて解析を行っている。その結果、小腸刷子縁膜小胞で観察された電荷の異なるβ-ラクタム抗生物質の輸送特性は、これら薬物の物理化学的特質に起因するものであることを示唆している。

## 第Ⅱ章 PEPT1及びPEPT2の機能に関する比較解析

第Ⅰ章においてクローニングしたラットPEPT1及びPEPT2は、約50%のアミノ酸ホモロジーを有し異なる臓器分布を示すこと、さらにジペプチドやペプチド類似薬物をH<sup>+</sup>勾配依存的に輸送することが明らかとなった。しかし、両トランスポータの機能的異同については不明の点が多く、薬物認識特性や輸送制御の分子機構など、両者の機能特性を比較解析する必要があると考えられた。そこで本章では、先ずペプチドトランスポータの簡便な機能評価系の確立を目的として、遺伝子導入に基づきラットPEPT1及びPEPT2安定発現上皮細胞を構築した。さらに構築したトランスフェクタントを用いて、両トランスポータの輸送特性並びにβ-ラクタム抗生物質の認識特性に関して比較精査した。

### 第1節 PEPT1及びPEPT2安定発現細胞の構築

ラットPEPT1 cDNAを動物細胞発現ベクターpBK-CMVにサブクローニングし、リン酸カルシウム共沈法により培養腎上皮細胞LLC-PK<sub>1</sub>にトランスフェクションした。G418耐性獲得を指標として選別した細胞の形質膜に対して、抗PEPT1抗体によるウエスタンブ



**Fig. 2-1 Construction of LLC-PK<sub>1</sub> cells stably transfected with rat PEPT1 cDNA.** Mammalian expression vector, pBK-CMV, inserted with rat PEPT1 cDNA was transfected into LLC-PK<sub>1</sub> cells by the CaPO<sub>4</sub>-coprecipitation method. G418-resistant cells were picked up, and PEPT1-expressing cells were selected by immunoblotting.

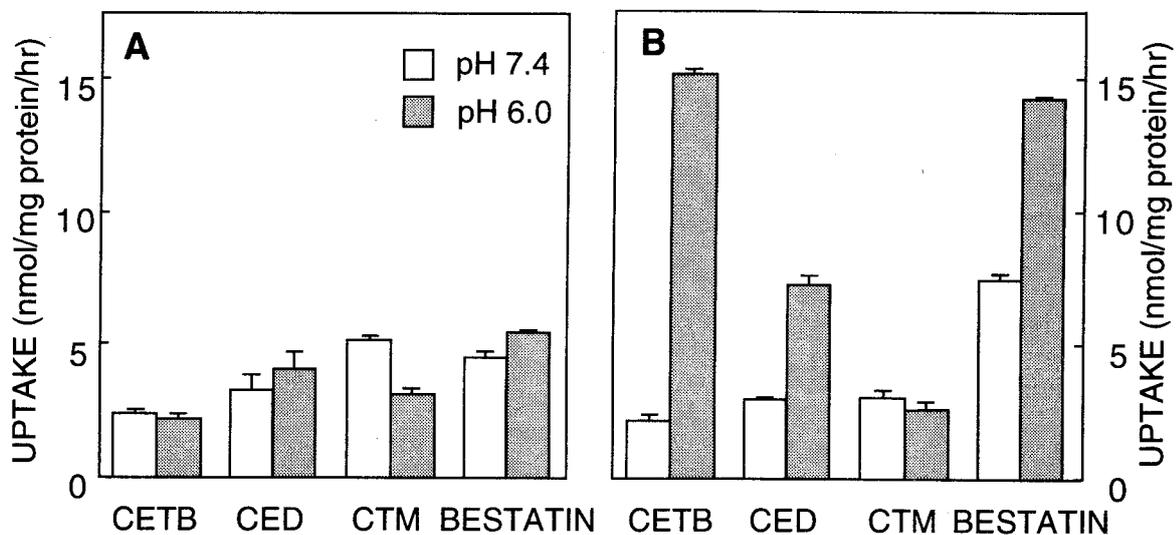
ロツティングを行ったところ、2種の細胞においてPEPT1タンパクの発現が認められた。そこで、最も発現量の多かったクローンを、LLC-rPEPT1細胞と命名した (Fig. 2-1)。対照として、ベクターのみをトランスフェクションしたLLC-pBK細胞も同時に作成した。

そこでこれらトランスフェクタントを用いて輸送実験を行った。Fig. 2-2に示すようにceftibuten、cephradine並びにBestatinのpH6.0における取り込みは、LLC-pBK細胞よりもLLC-rPEPT1細胞において顕著に増大した。またこれら薬物のH<sup>+</sup>勾配に依存した取り込み促進は、LLC-rPEPT1細胞において観察されたが、LLC-pBK細胞では観察されなかった。一方、ペプチドトランスポータの基質とはならないことが報告されている注射用β-ラクタム抗生物質cefotiamの取り込みは、LLC-rPEPT1細胞とLLC-pBK細胞の間で差は見られず、またpH依存性も認められなかった。

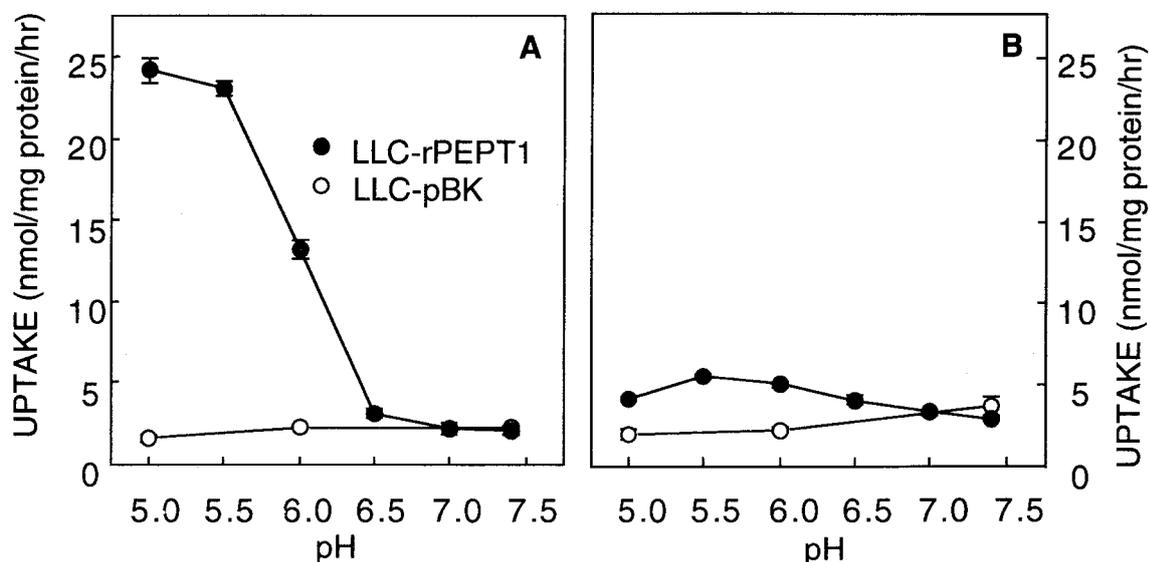
次に、ceftibutenとcephradine取り込みに及ぼすメデイウムpHの影響について調べた。その結果、LLC-rPEPT1細胞では、ceftibutenの取り込みが酸性pHで増大したのに対して、cephradineはpH5.5付近で最大輸送活性が観察された (Fig. 2-3)。一方、LLC-pBK細胞では、両薬物とも顕著なpH依存性は観察されなかった。

さらにceftibutenやcephradineの取り込みに及ぼす、種々化合物の共存阻害効果について検討を加えた。Fig. 2-4に示すように両薬物の取り込みは、過剰量のジペプチドやトリペプチド、並びに経口用β-ラクタム抗生物質、Bestatin及びcaptopril等のペプチド類似薬物の存在下で阻害された。しかし、アミノ酸であるglycineやカチオン性化合物tetraethylammonium (TEA)やcimetidineは、阻害効果を示さなかった。これらの結果は、LLC-rPEPT1細胞においてラットPEPT1が機能的に発現していることを示唆するものである。

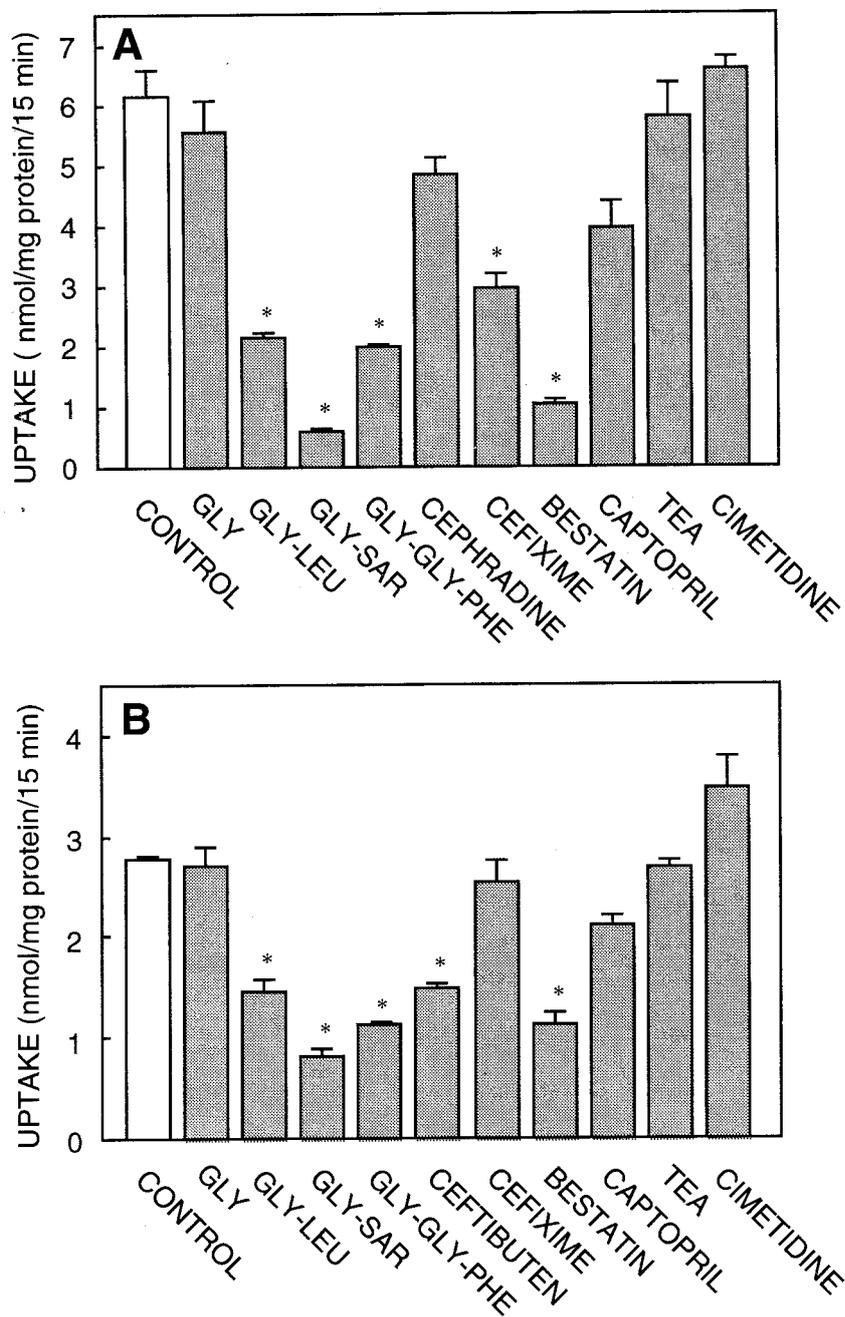
LLC-rPEPT1細胞と同様に、ラットPEPT2 cDNA挿入発現ベクターをLLC-PK<sub>1</sub>にトランスフェクションし、ラットPEPT2安定発現細胞の構築を試みた。約40種のG418耐性クローンについてGly-Sarの輸送活性を調べたところ、数種のクローンについて高い取り込み活性が観察された。これらのクローンにおけるラットPEPT2 mRNAの発現をノーザンブロット分析によって検討したところ、いずれのクローンにおいてもラットPEPT2 mRNAの発現が認められた。そこで、Gly-Sarの輸送活性が最も高かったクローンをLLC-rPEPT2細胞と命名し、以下の解析に用いた。



**Fig. 2-2 Uptake of  $\beta$ -lactam antibiotics and [ $^3$ H]Bestatin by LLC-pBK (A) and LLC-rPEPT1 cells (B).** The cell monolayers were incubated for 1 hr at 37°C in the incubation medium at pH 6.0 (shaded columns) or pH 7.4 (open columns) containing each drug (1 mM). Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of three monolayers. CETB, ceftibuten; CED, cephradine; CTM, cefotiam.



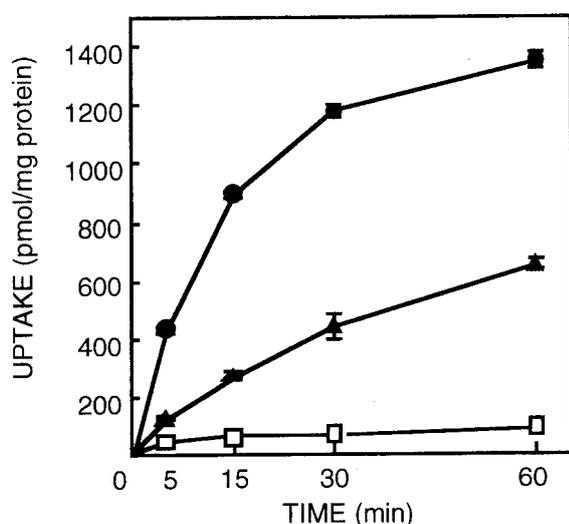
**Fig. 2-3 The pH dependence of ceftibuten (A) and cephradine (B) uptake by LLC-rPEPT1 and LLC-pBK cells.** LLC-rPEPT1 (●) or LLC-pBK cells (○) were incubated for 1 hr at 37°C with 1 mM ceftibuten or cephradine at various pH values. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of three monolayers. When the error bar is not shown, it is smaller than the symbol.



**Fig. 2-4** Effects of various compounds on ceftibuten (A) and cephradine (B) uptake by LLC-rPEPT1 cells. LLC-rPEPT1 cells were incubated for 15 min at 37°C with 1 mM ceftibuten (pH 6.0) or cephradine (pH 6.0) in the absence or presence of each inhibitor (10 mM), except for cimetidine and ceftibuten (5 mM). Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of three monolayers. GLY, glycine; GLY-LEU, glycyllucine; GLY-SAR, glycy sarcosine; GLY-GLY-PHE, glycyglycylphenylalanine; TEA, tetraethylammonium. \*P < .05, significant difference from control.

## 第2節 PEPT1及びPEPT2の基質親和性並びに薬物認識特性

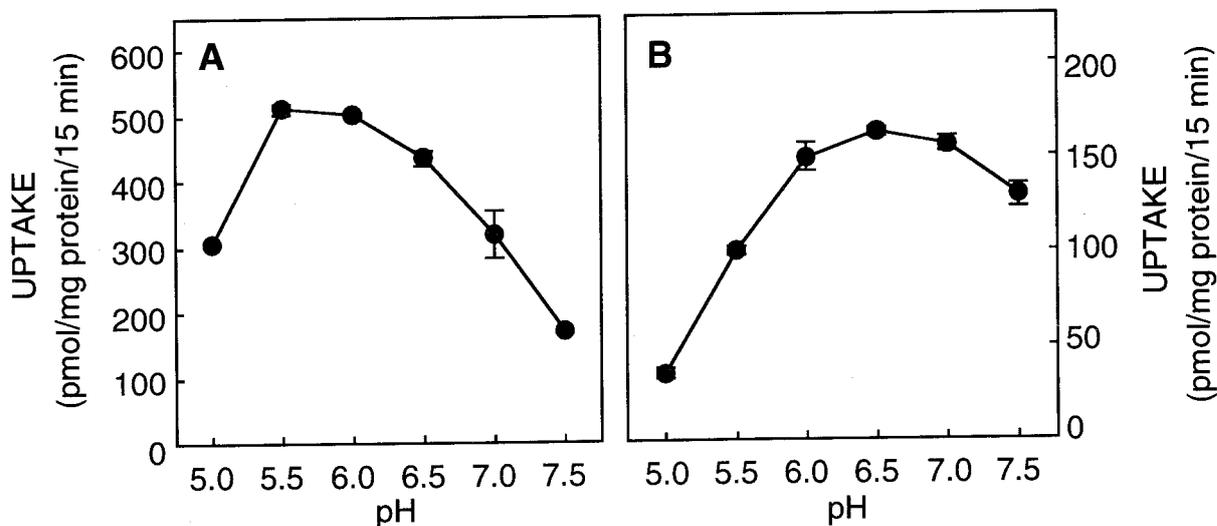
第1節で構築した、LLC-rPEPT1及びLLC-rPEPT2細胞を用いて、Gly-Sarの輸送特性について比較解析を行った。まず、両トランスフェクタントによるGly-Sar取り込みのタイムコースについて調べた。Fig. 2-5に示すようにLLC-pBK細胞ではGly-Sarの取り込み活性がほとんど観察されなかったのに対し、LLC-rPEPT1並びにLLC-rPEPT2細胞では時間依存的にGly-Sarの取り込み量が増大した。



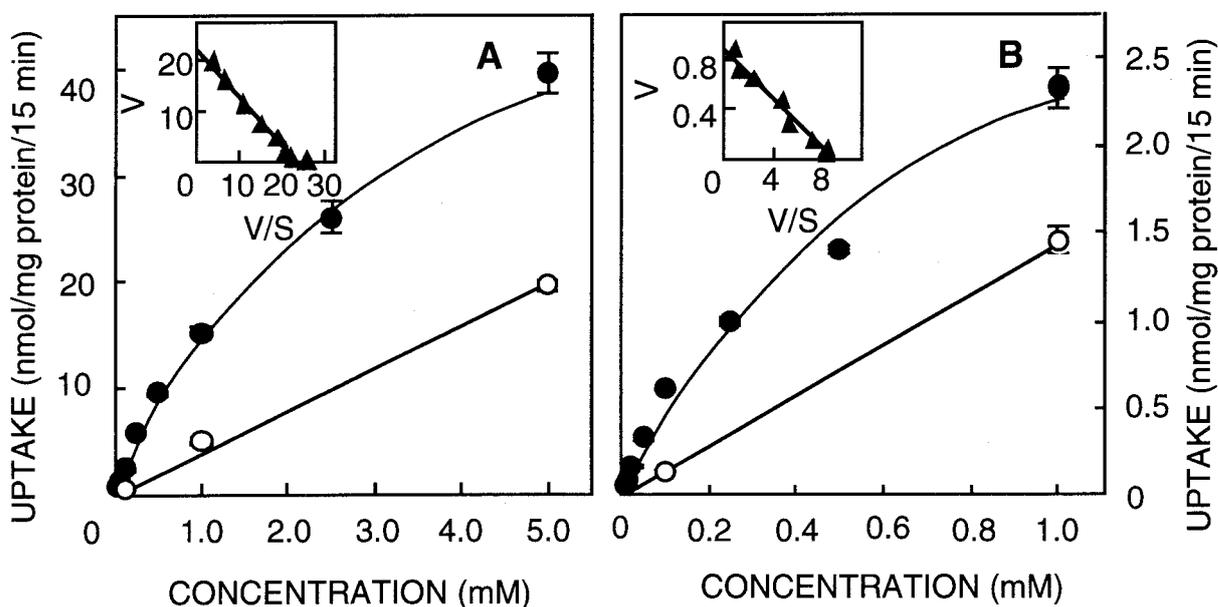
**Fig. 2-5 Time course of [<sup>14</sup>C]Gly-Sar uptake by LLC-rPEPT1 (●), LLC-rPEPT2 (▲), and LLC-pBK cells (□).** Each cell was incubated for specified periods at 37°C with incubation medium of pH 6.0 containing [<sup>14</sup>C]Gly-Sar (20 μM). Each point represents the mean ± S.E. of three monolayers. When the error bar is not shown, it is smaller than the symbol.

次に両トランスフェクタントによるGly-Sar取り込みのpH依存性を調べたところ、LLC-rPEPT1ではpH5.5付近に、また、LLC-rPEPT2ではpH6.5付近に最大輸送活性が観察された (Fig. 2-6)。従って両トランスポータは、Gly-Sar輸送に対して互いに異なる最適pHを有することが判明した。

両トランスポータに対するGly-Sarの輸送パラメータを求めるため、両トランスフェクタントによるGly-Sar取り込みの濃度依存性について検討した。過剰量の非標識Gly-Sar存在下で求まる非特異的な取り込み量を、全体の取り込み量から差し引くことによって、ペプチドトランスポータを介した特異的な取り込み量を求め、Eadie-Hofstee解析によって輸送パラメータを算出した。その結果、Gly-Sar取り込みの見かけのKm値は1.1 mM (PEPT1) 及び0.1 mM (PEPT2) と算出された (Fig. 2-7)。従ってPEPT2は、Gly-Sarに対して、PEPT1の約10倍高い親和性を有することがわかった。



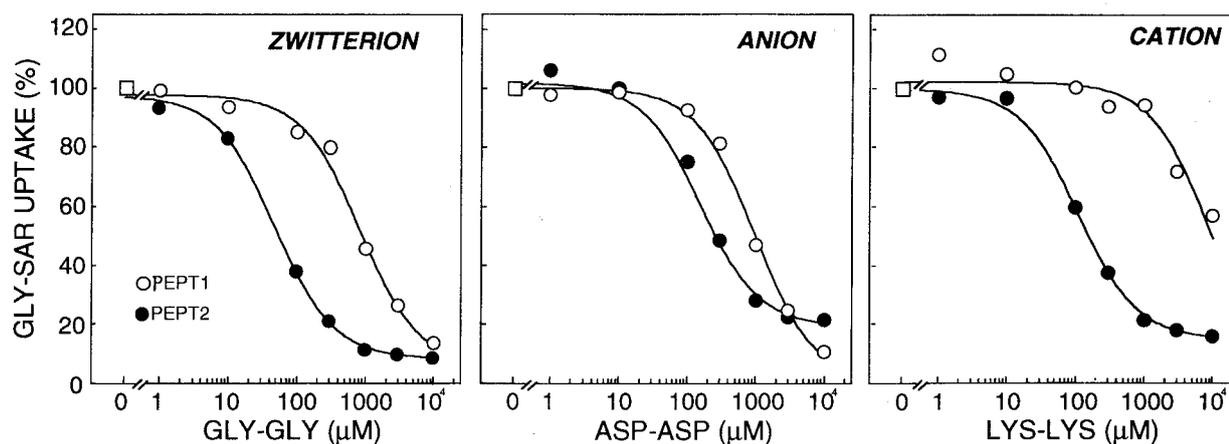
**Fig. 2-6** The pH dependence of  $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar uptake by LLC-rPEPT1 (A) and LLC-rPEPT2 cells (B). Each cell was incubated for 15 min at  $37^\circ\text{C}$  with incubation medium of various pHs containing  $20\ \mu\text{M}$   $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of three monolayers. When the error bar is not shown, it is smaller than the symbol.



**Fig. 2-7** Concentration dependence of  $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar uptake by LLC-rPEPT1 (A) and LLC-rPEPT2 cells (B).  $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar uptake by LLC-rPEPT1 and LLC-rPEPT2 cells was measured at various concentrations ( $20$ - $5,000\ \mu\text{M}$  for LLC-rPEPT1 and  $5$ - $1,000\ \mu\text{M}$  for LLC-rPEPT2 cells) for 15 min at  $37^\circ\text{C}$  in the absence (●) or presence (○) of  $10\ \text{mM}$  unlabeled Gly-Sar. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of three monolayers. When the error bar is not shown, it is smaller than the symbol. *Inset:* Eadie-Hofstee plots of the uptake after correction for the nonsaturable component; V, uptake rate (nmol/mg protein/15 min); S, Gly-Sar concentration (mM).

次に、PEPT1とPEPT2の基質親和性に関して詳細な検討を加えるため、両トランスフェクタントを介したGly-Sar取り込みに及ぼす、電荷の異なる種々ジペプチドの阻害効果について調べた。その結果、ジペプチドの荷電状態に関わらず、PEPT2においてより強い阻害効果が観察された (Fig. 2-8)。これらの阻害曲線を基に、種々ジペプチドのGly-Sar取り込みに対する $K_i$ 値を算出したところ、検討した全てのジペプチドに対してPEPT2が高親和性であった (Table 2-1)。従って、これらの結果はPEPT1が低親和性型、またPEPT2が高親和性型ペプチドトランスポーターであることを示唆するものである。

さらにPEPT1とPEPT2の薬物認識特性について比較精査するため、Gly-Sar取り込みに及ぼす種々 $\beta$ -ラクタム抗生物質共存の影響について検討した。Fig. 2-9には代表的な薬物の阻害曲線を示す。LLC-rPEPT1細胞における阻害効果の強さは、cyclacillin > ceftibuten > cefadroxilの順であった。一方、LLC-rPEPT2におけるGly-Sar取り込みは cefadroxil > cyclacillin > ceftibutenの順に阻害された。これらの阻害曲線を基に、種々薬物のGly-Sar取り込みに対する $K_i$ 値を算出した (Table 2-2)。その結果、アミノ $\beta$ -ラクタム抗生物質とBestatinはPEPT2に高い親和性を有することが判明した。一方、アニオン型 $\beta$ -ラクタム抗生物質であるceftibutenやcefixime等は、むしろPEPT1に対して高い親和性を示した。また、各 $\beta$ -ラクタム抗生物質の阻害効果の強さに両トランスポーター間で共通性が認められないことから、PEPT1とPEPT2は互いに異なる $\beta$ -ラクタム抗生物質の認識特性を有することが示唆された。

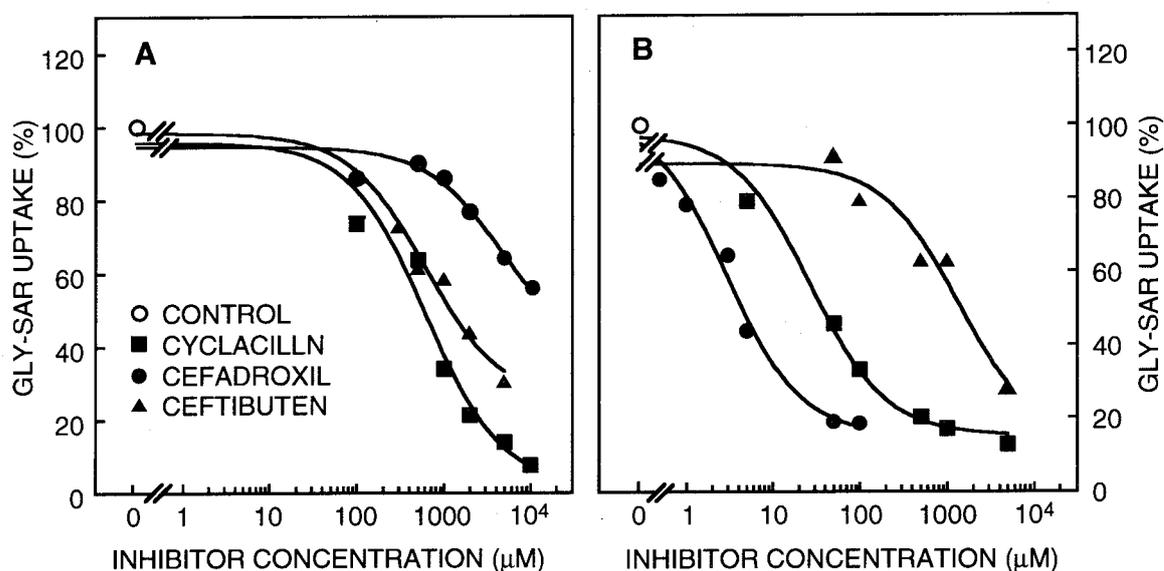


**Fig. 2-8 Inhibition of [ $^{14}$ C]Gly-Sar uptake by various dipeptides in LLC-rPEPT1 and LLC-rPEPT2 cells.** LLC-rPEPT1 (●) and LLC-rPEPT2 cells (○) were incubated for 15 min at 37°C with incubation medium containing [ $^{14}$ C]Gly-Sar (20  $\mu$ M) in the absence (□) or presence of increasing concentration of dipeptides. Each point represents the mean of two monolayers.

**Table 2-1. Inhibition constants ( $K_i$ ) of various dipeptides for Gly-Sar uptake by LLC-rPEPT1 and LLC-rPEPT2 cells**

Charges	Dipeptides	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	
		PEPT1	PEPT2
Zwitterion	Gly-Gly	880	50
	Gly-Asn	270	22
	Gly-Phe	170	8
	Phe-Gly	220	7
	Gly-Leu	110	6
	Gly-Tyr	210	14
Anion	Gly-Asp	300	60
	Asp-Gly	830	46
	Asp-Asp	990	150
Cation	Gly-His	1400	39
	Gly-Lys	2200	210
	Lys-Gly	910	21
	Lys-Lys	8000	96
	Carnosine ( $\beta$ -Ala-His)	8000	66

Each value is mean of two monolayers. LLC-rPEPT1 and LLC-rPEPT2 cells were incubated for 15 min at 37°C with incubation medium containing [ $^{14}\text{C}$ ]Gly-Sar (20  $\mu\text{M}$ ) in the presence of each dipeptide. The apparent inhibition constant ( $K_i$ ) values were calculated from the inhibition plots based on the transformed Michaelis-Menten equation using nonlinear least square regression analysis.



**Fig. 2-9 Inhibition of [ $^{14}\text{C}$ ]Gly-Sar uptake by  $\beta$ -lactam antibiotics in LLC-rPEPT1 (A) and LLC-rPEPT2 cells (B).** Each transfectant was incubated for 15 min at 37°C with incubation medium containing [ $^{14}\text{C}$ ]Gly-Sar (20  $\mu\text{M}$ ) in the absence (○) or presence of increasing concentration of cyclacillin (■), cefadroxil (●) and ceftibuten (▲). Each point represents the mean of two monolayers.

**Table 2-2. Inhibition constants ( $K_i$ ) of  $\beta$ -lactam antibiotics and Bestatin for Gly-Sar uptake by LLC-rPEPT1 and LLC-rPEPT2 cells**

PENICILLIN		CEPHALOSPORIN		BESTATIN	
DRUGS	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	$K_i$ ( $\mu$ M)		
			PEPT1	PEPT2	
AMPICILLIN		—	47800	669	
AMOXICILLIN		—	13000	179	
CYCLACILLIN		—	168	27	
CEPHALEXIN		CH <sub>3</sub>	4500	49	
CEFADROXIL		CH <sub>3</sub>	2170	3	
CEPHRADINE		CH <sub>3</sub>	8540	47	
-----					
CEFDINIR		CH=CH <sub>2</sub>	11900	20100	
CEFTIBUTEN		H	597	1340	
CEFIXIME		CH=CH <sub>2</sub>	6920	11900	
-----					
BESTATIN	—	—	505	20	

Each value is mean of two monolayers. LLC-rPEPT1 and LLC-rPEPT2 cells were incubated for 15 min at 37°C with incubation medium containing [<sup>14</sup>C]Gly-Sar (20  $\mu$ M) in the presence of each competitor. The apparent inhibition constant ( $K_i$ ) values were calculated from the inhibition plots based on the transformed Michaelis-Menten equation using nonlinear least square regression analysis.

## 第3節 考 察

本章では新たに構築したラットPEPT1及びPEPT2遺伝子導入発現細胞を用いて、両者の機能特性について比較精査した。これまでPEPT1及びPEPT2の遺伝子発現系については、卵母細胞発現系<sup>17, 58-60)</sup>、Hela細胞を用いた一過性の発現系<sup>61, 62)</sup>、並びに酵母<sup>47, 63, 64)</sup>を用いた発現系等多くの報告がなされている。本研究において構築したラットPEPT1及びPEPT2安定発現細胞は、永続的かつ簡便にペプチドトランスポータの機能評価を出来ることから、PEPT1及びPEPT2の評価系として非常に有用であると考えられる。

### 1. PEPT1及びPEPT2のジペプチドに対する親和性

両トランスポータに対するGly-Sar取り込みのKm値並びに種々ジペプチドのGly-Sar取り込みに対するKi値を比較した結果、PEPT1が低親和性型トランスポータ、PEPT2が高親和性型トランスポータであることが判明した。ヒトPEPT1及びPEPT2<sup>61)</sup>、またウサギPEPT1及びPEPT2<sup>58, 59)</sup>を用いた検討においてもPEPT1が低親和性型トランスポータ、PEPT2が高親和性型トランスポータであることが報告されている。PEPT1の主な発現部位が腸管であることを考えると、タンパク質分解産物である小分子ペプチドの吸収には、低親和性のPEPT1の方がPEPT2よりも効率的であると考えられる。また、循環血液中の小分子ペプチドの濃度は、個々の小分子ペプチドに対する正確な値は求められていないものの、nM~ $\mu$ Mの範囲であることが示唆されている<sup>65)</sup>。PEPT2は様々な臓器・細胞に発現し、循環血液中からの小分子ペプチドの取り込みに関与していることが推察されることから、PEPT2の臓器分布と高親和性トランスポータであることは生理的にも合目的性を示していると考えられる。

### 2. PEPT1及びPEPT2の腎における生理的意義

これまで腎臓においては、親和性の異なる2種類のトランスポータ（低親和性型及び高親和性型トランスポータ）が、ジペプチドや $\beta$ -ラクタム抗生物質の刷子縁膜輸送に関与していると示唆されてきた<sup>50-52, 66)</sup>。PEPT1及びPEPT2が腎尿細管上皮細胞の刷子縁膜

に発現していること（前章参照）と今回の結果を考えあわせると、腎における親和性の異なる2種のペプチドトランスポータが、それぞれPEPT1並びにPEPT2に対応するものと考えられた。従って、機能面で示唆されていたペプチドトランスポータの多様性を、分子レベルで明らかにすることが出来たと考える。また、両トランスポータの腎内分布に関しては、PEPT1が近位尿細管のS1部、またPEPT2がS3部に局在していることが最近報告されている<sup>67)</sup>。PEPT1及びPEPT2の機能と腎内分布の関係については、Na<sup>+</sup>/グルコーストランスポータ（SGLT）と類似しているものの<sup>68)</sup>、親和性の異なる2種のトランスポータの寄与については若干異なることが考えられる。すなわちグルコースの腎再吸収においては、糸球体濾過後、尿細管起始部に存在する高濃度のグルコースは、低親和性で輸送能の大きいSGLT2によって大部分が再吸収され、終末部で管腔内にわずかに残ったグルコースを高親和性のSGLT1が再吸収すると考えられている<sup>68)</sup>。一方小分子ペプチドの場合には、腎尿細管の灌流実験によって、Gly-Sarの再吸収は主に近位尿細管の終末部で起こることが報告されている<sup>69)</sup>。PEPT2が近位尿細管の終末部であるS3に局在していること<sup>67)</sup>、並びに*in situ* hybridizationの解析によって、PEPT2がPEPT1に比べて腎臓で非常に多く発現していること<sup>67)</sup>から、高親和性型トランスポータであるPEPT2が、主に小分子ペプチドの腎再吸収に寄与しているものと考えられる。

### 3. PEPT1及びPEPT2によるβ-ラクタム抗生物質の認識特性

両トランスポータのβ-ラクタム抗生物質の認識性に関しては、PEPT1がcyclacillin（アミノペニシリン）を、またPEPT2がcefadroxil（アミノセファロスポリン）を最も高い親和性で認識することが明らかとなった。同様の結果がヒトPEPT1及びPEPT2を用いた解析で報告されている<sup>62)</sup>。β-ラクタム抗生物質の両トランスポータに対する親和性を比較したところ、6あるいは7位の炭素にα-アミノ基を有するアミノβ-ラクタム抗生物質に対しては、PEPT2が高い親和性を示した。またβ位にアミノ基を有するBestatinもまたPEPT2に対して高い親和性を有していた。一方、7位の炭素にα-及びβ-アミノ基をもたないceftibutenやcefiximeに対しては、むしろPEPT1の方が高い親和性を示した。ペプチドトランスポータの生理的基質であり、α-アミノ基を有する多くのジペプチド、並びにβ-アミノ基を有するジペプチドcarnosineもまた、PEPT2に対して高親和性であったことから、

PEPT2に高親和性で認識されるためには、基質の $\alpha$ -あるいは $\beta$ -アミノ基が重要な構造的規定因子であることが示唆された (Table 2-3)。

**Table 2-3. Comparison of substrate affinity between PEPT1 and PEPT2**

<b>Substrates</b>	<b>Compounds</b>	<b>Substrate affinity</b>
<b>with the <math>\alpha</math>- or <math>\beta</math>-amino group</b>	dipeptides (except for carnosine) amino $\beta$ -lactams $R_1 - \overset{\text{NH}_2}{\underset{\alpha}{\text{C}}} - \text{CONH} - R_2$	<b>PEPT2 &gt; PEPT1</b>
	carnosine, Bestatin $R_1 - \overset{\text{NH}_2}{\underset{\beta}{\text{C}}} - \overset{\alpha}{\text{C}} - \text{CONH} - R_2$	
<b>without the <math>\alpha</math>- and <math>\beta</math>-amino group</b>	<b>ceftibuten cefixime</b>	<b>PEPT1 &gt; PEPT2</b>

これまで腎刷子縁膜小胞を用いた解析により、種々 $\beta$ -ラクタム抗生物質の6または7位側鎖の脂溶性が、ペプチドトランスポータに対する親和性決定に重要であると考えられてきた<sup>70)</sup>。ampicillinとamoxicillin及びcephalexinとcefadroxilの構造を比較すると、後者の方が6または7位フェニル環側鎖に水酸基が結合しているため水溶性が高いと考えられる。しかし、これら薬物間で*K<sub>i</sub>*値を比較すると、両トランスポータにおいて水溶性が高いと考えられるamoxicillinとcefadroxilの方がそれぞれ、ampicillinとcephalexinよりも高い親和性を示した。従って、フェニル環側鎖の水酸基が、両トランスポータに対する親和性の決定に重要な役割を担っていることが推察された。

#### 4. $\beta$ -ラクタム抗生物質のPEPT1に対する親和性と腸管吸収速度

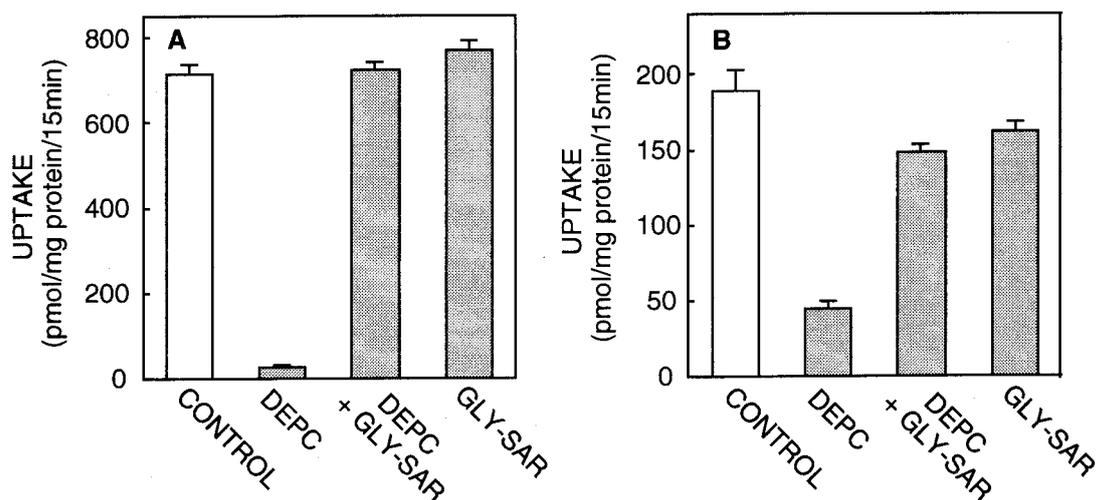
$\beta$ -ラクタム抗生物質のPEPT1に対する親和性の順序は、ラット小腸*in situ*連続灌流法<sup>20)</sup>により得られた、 $\beta$ -ラクタム抗生物質の吸収速度とよく対応した。また、 $\beta$ -ラクタム抗生物質の刷子縁膜輸送と吸収速度の間に良好な相関関係が観察されていることから<sup>71)</sup>、小腸PEPT1に対する種々 $\beta$ -ラクタム抗生物質の親和性の程度が、各薬物の吸収速度を規定している可能性が示唆された。

### 第Ⅲ章 PEPT1及びPEPT2の構造・機能相関解析

第Ⅱ章においてPEPT1及びPEPT2は、互いに異なる基質親和性や、薬物認識特性を有することが明らかとなった。しかし、両トランスポータの基質結合部位あるいは機能的相違点を規定するアミノ酸領域の同定など、輸送の分子機序に関する基礎的事項は不明の点が多い。そこで本章では、両トランスポータの構造・機能相関に焦点を当て、ペプチドトランスポータの薬物認識機構及び輸送機構を分子レベルで解析した。

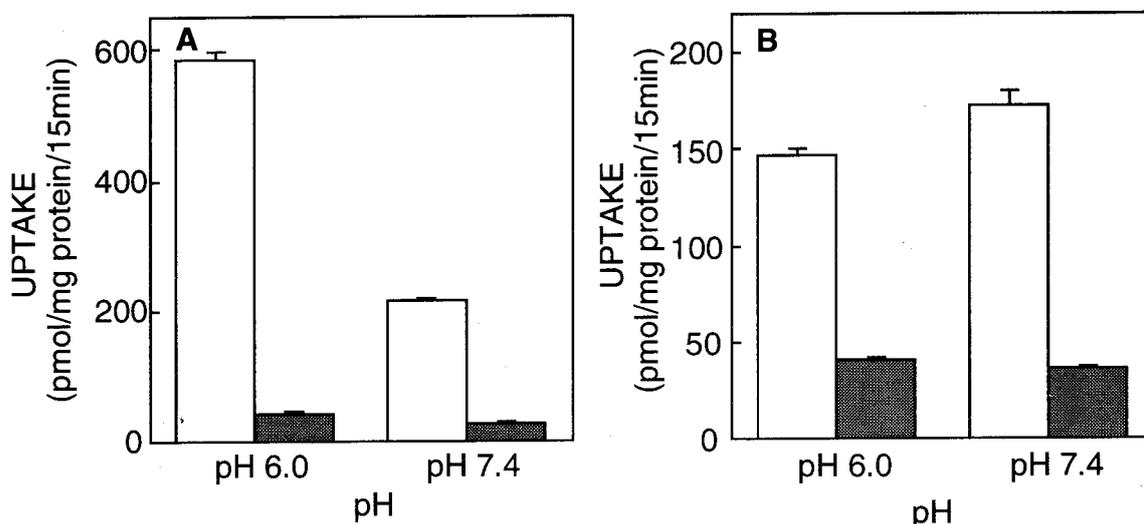
#### 第1節 PEPT1及びPEPT2におけるhistidine残基の機能的役割

これまで小腸や腎刷子縁膜小胞を用いた輸送実験により、ペプチドトランスポータタンパクに存在するhistidine残基が輸送機能に必須であることが報告されてきた<sup>72-74</sup>。そこでLLC-rPEPT1またはLLC-rPEPT2細胞の<sup>14</sup>C]Gly-Sar取り込みに及ぼす、histidine修飾剤diethylpyrocarbonate (DEPC)の影響について検討を行った。その結果、両トランスフェクタントにおける<sup>14</sup>C]Gly-Sar取り込みはDEPCによって顕著に阻害され、この阻害効果は過剰量の非標識Gly-Sar存在下で防御されることがわかった (Fig. 3-1)。



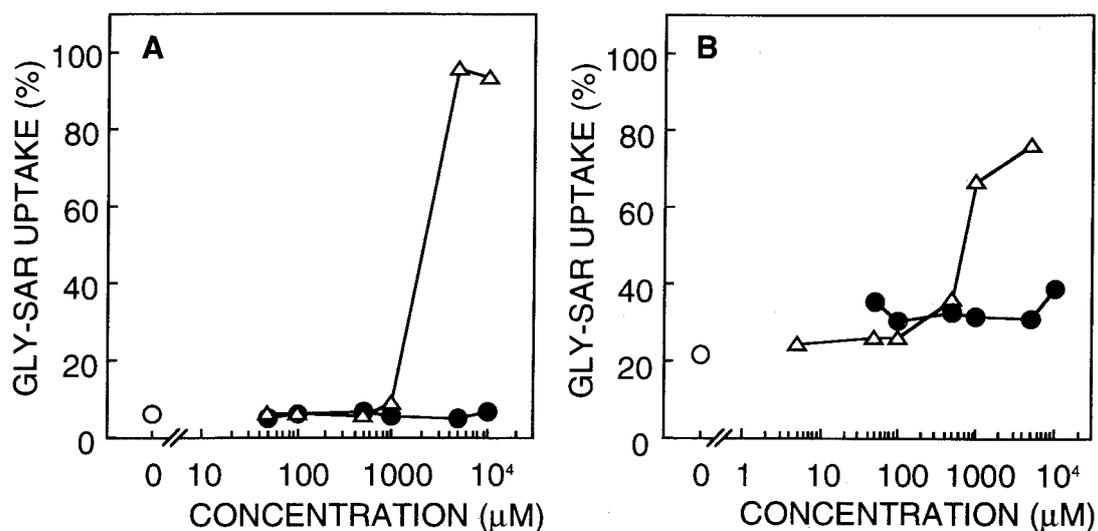
**Fig. 3-1** Effect of DEPC treatment on [<sup>14</sup>C]Gly-Sar uptake by LLC-rPEPT1 (A) and LLC-rPEPT2 cells (B). The cells were preincubated at 25°C for 10 min with 1 mM DEPC (pH 6.0) in the absence or the presence of Gly-Sar (10 mM). After preincubation, the cells were rinsed once with incubation medium and then incubated with [<sup>14</sup>C]Gly-Sar (20 μM, pH 6.0) for 15 min at 37°C. Each column represents the mean ± S.E. of three monolayers.

また、DEPCによる阻害効果は、Gly-Sar取り込みの際のH<sup>+</sup>勾配の有無に関わらず観察された (Fig. 3-2)。これらの結果は、ペプチドトランスポータの基質認識領域に histidine残基が存在することを示唆するものである。

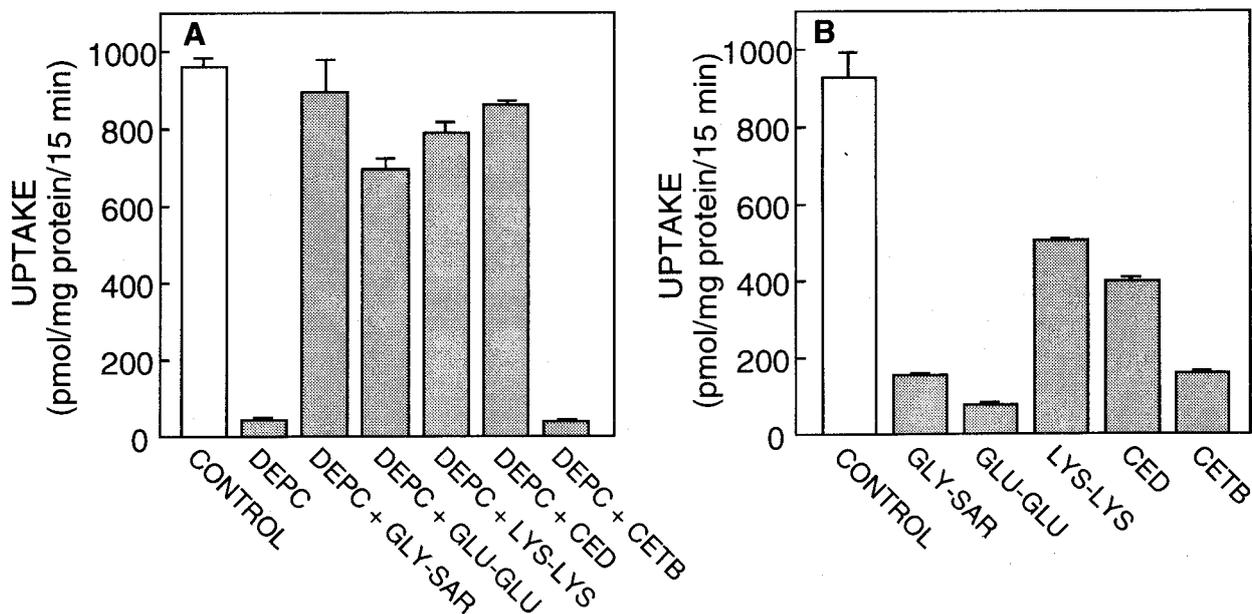


**Fig. 3-2** Effect of DEPC treatment on [<sup>14</sup>C]Gly-Sar uptake either at pH 6.0 or 7.4 by LLC-rPEPT1 (A) and LLC-rPEPT2 cells (B). The cells were preincubated at 25°C for 10 min with 1 mM DEPC (pH 6.0). After preincubation, the cells were rinsed once with incubation medium and then incubated with [<sup>14</sup>C]Gly-Sar (20 μM) at pH 6.0 or pH 7.4 for 15 min at 37°C. Each column represents the mean ± S.E. of three monolayers.

次に、DEPC処理のGly-Sar取り込み阻害に及ぼすβ-ラクタム抗生物質の影響について調べた。Fig. 3-3に示すように、DEPC処理によるGly-Sar取り込み阻害はcephradineが高濃度存在することによって防御されたが、ceftibutenによる防御効果は認められなかった。そこで、ceftibutenが防御効果を示さないことを解明するため、ceftibutenの物理化学的特質、すなわち、pH 6.0でアニオンとして存在し、7位の炭素にα-アミノ基を有しないという点に着目し、先ず防御効果に及ぼす基質の電荷の影響について検討した。その結果、LLC-rPEPT1細胞を介したGly-Sar取り込みのDEPC阻害は、電荷の異なる各種ジペプチドやcephradineによって防御されたのに対して、ceftibutenでは防御されなかった (Fig. 3-4A)。また、これらの基質は全てGly-Sar取り込みを阻害した (Fig. 3-4B)。従って、DEPC阻害に対する防御効果は、基質の電荷や親和性には依存しないことが明らかとなった。また、LLC-rPEPT2細胞でも同様の結果が得られた。

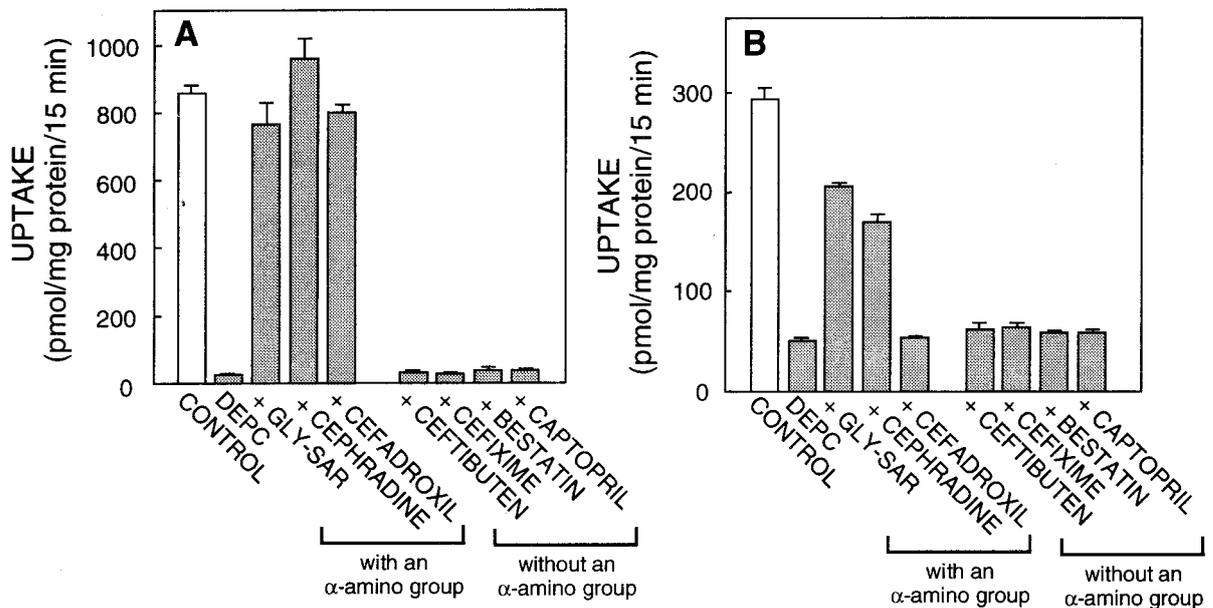


**Fig. 3-3** Effect of cephradine and ceftibuten concentration on the DEPC-induced inhibition of [<sup>14</sup>C]Gly-Sar uptake by LLC-rPEPT1 (A) and LLC-rPEPT2 cells (B). The cells were preincubated at 25°C for 10 min with 1 mM DEPC (pH 6.0) in the absence (○) or the presence of an increasing concentration of cephradine (△) and ceftibuten (●). After preincubation, the cells were rinsed once with incubation medium and then incubated with [<sup>14</sup>C]Gly-Sar (20 μM, pH 6.0) for 15 min at 37°C. Each point represents the mean of two monolayers except for the control.



**Fig. 3-4** Effect of various dipeptides with different charge, cephradine, and ceftibuten on the DEPC-induced inhibition of [<sup>14</sup>C]Gly-Sar uptake (A) and on [<sup>14</sup>C]Gly-Sar uptake (B) by LLC-rPEPT1 cells. A, LLC-rPEPT1 cells were preincubated at 25°C for 10 min with 1 mM DEPC (pH 6.0) in the absence or the presence of various substrates. After preincubation, the cells were rinsed once with incubation medium and then incubated with [<sup>14</sup>C]Gly-Sar (20 μM, pH 6.0) for 15 min at 37°C. B, LLC-rPEPT1 cells were incubated with [<sup>14</sup>C]Gly-Sar (20 μM, pH 6.0) for 15 min at 37°C in the absence or the presence of each inhibitor (10 mM). Each column represents the mean ± S.E. of three monolayers.

次に防御効果に及ぼす基質の $\alpha$ -アミノ基の影響について検討した。その結果、 $\alpha$ -アミノ基を有する基質では防御効果が観察されたのに対して、 $\alpha$ -アミノ基をもたない薬物は防御効果を示さなかった (Fig. 3-5)。PEPT2において cefadroxil が防御効果を示さなかったのは、cefadroxil が PEPT2 に対して非常に高い親和性 ( $K_i$  値 = 3  $\mu$ M) を有するため、DEPC 処理の洗浄後においても cefadroxil が残存し、Gly-Sar 取り込みを阻害したためと考えられる。従って、PEPT1 並びに PEPT2 の基質認識領域に存在する DEPC 感受性 histidine 残基は、基質の  $\alpha$ -アミノ基の認識部位として関与している可能性が示唆された。



**Fig. 3-5 Effect of various compounds on DEPC-induced inhibition of [ $^{14}$ C]Gly-Sar uptake by LLC-rPEPT1 (A) and LLC-rPEPT2 cells (B).** The cells were preincubated at 25°C for 10 min with 1 mM DEPC (pH 6.0) in the absence or the presence of each compound (10 mM). After preincubation, the cells were rinsed once with incubation medium and then incubated with [ $^{14}$ C]Gly-Sar (20  $\mu$ M, pH 6.0) for 15 min at 37°C. Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of three monolayers.

## 第2節 PEPT1における必須histidine残基の同定

ペプチドトランスポータの機能に必須であると考えられた histidine 残基の分子的同定を試みるため、ラット、ウサギ及びヒト PEPT1 並びに PEPT2 のアミノ酸配列を比較した。その結果、第2及び第4番目の推定膜貫通領域に存在する histidine 残基がいずれのトランスポータにも保存されていることがわかった (Fig. 3-6)。そこで、ラット PEPT1 に存在

するこれらhistidine残基 (H<sup>57</sup>並びにH<sup>121</sup>) を glutamine残基 (Q) に置換したhistidine変異体のcDNAを作成した。wild-typeまたはhistidine変異体PEPT1の合成RNAを卵母細胞に注入し、ceftibuten並びにGly-Sarの取り込み活性を測定したところ、いずれの輸送活性も消失した (Fig. 3-7)。histidine変異体における活性消失がPEPT1タンパクの合成低下あるいは膜へのターゲティング異常に起因する可能性が考えられたため、ラットPEPT1抗体を用いて卵母細胞切片の免疫染色を行った。Fig. 3-8に示すように、いずれの変異体においてもwild-typeと同程度に細胞膜に発現していることがわかった。従って、H<sup>57</sup>並びにH<sup>121</sup>はPEPT1の輸送活性あるいは基質認識に関与している可能性が示唆された。

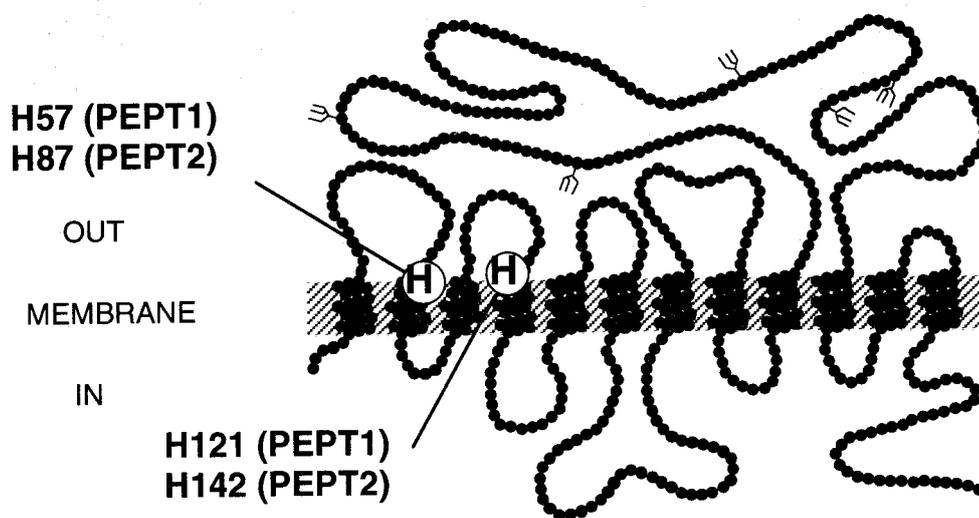


Fig. 3-6 Conserved histidine residues in rat, rabbit and human PEPT1 and PEPT2.

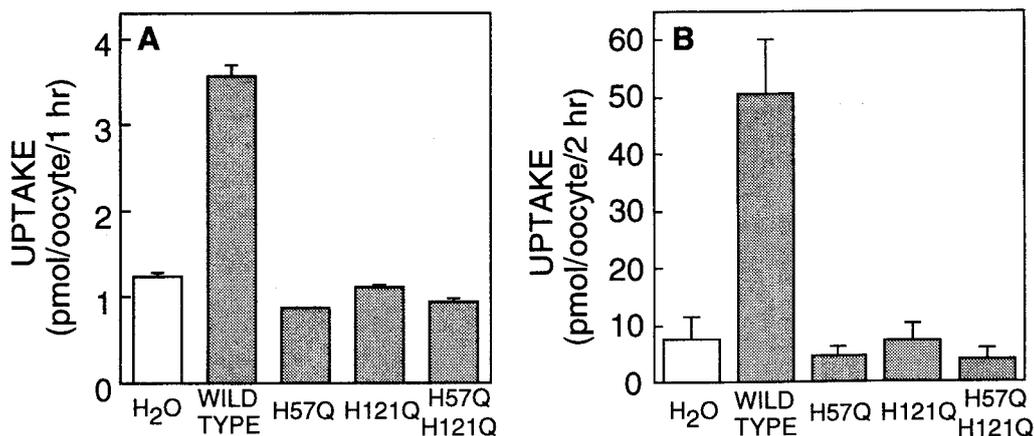
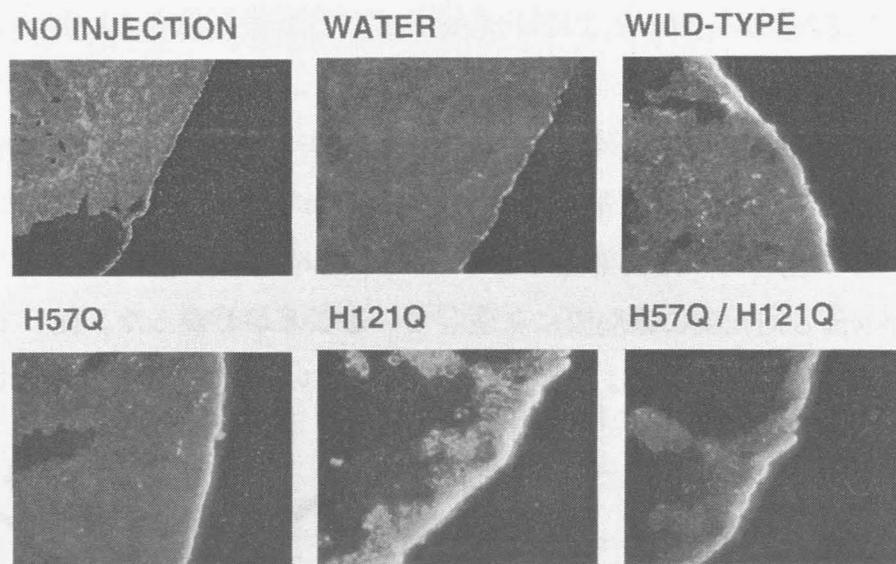


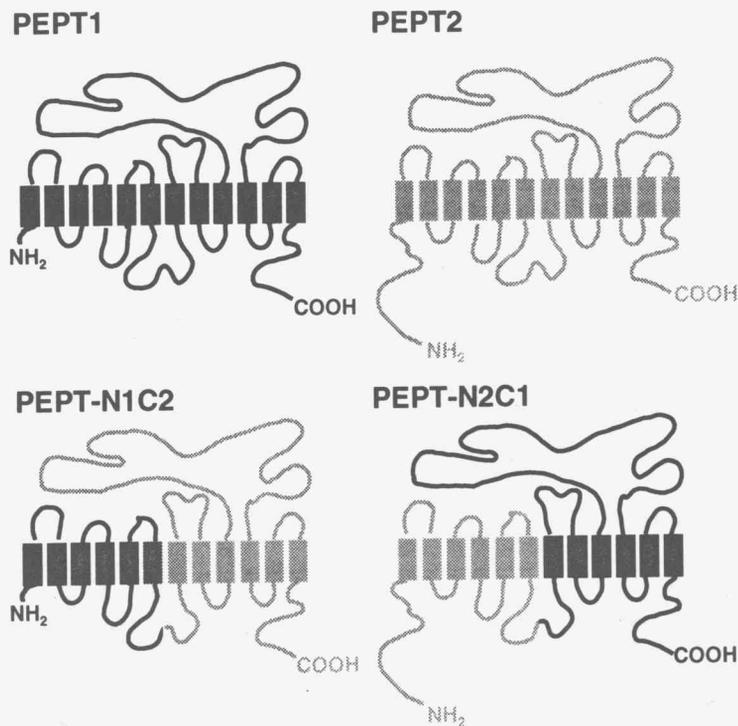
Fig. 3-7 [<sup>14</sup>C]Gly-Sar (A) and ceftibuten (B) uptake by oocytes expressing wild-type and histidine mutant rat PEPT1. Uptake by oocytes was assayed for 1 or 2 hr at 25°C in the presence of either [<sup>14</sup>C]Gly-Sar (20 μM) or ceftibuten (1 mM) at pH 6.0. Each column represents the mean ± S.E. of 3-5 experiments. Three ([<sup>14</sup>C]Gly-Sar) or four (ceftibuten) oocytes were used for each uptake experiment. H57Q, histidine 57→glutamine; H121Q, histidine 121→glutamine; H57Q/H121Q, histidine 57 and 121→glutamine.



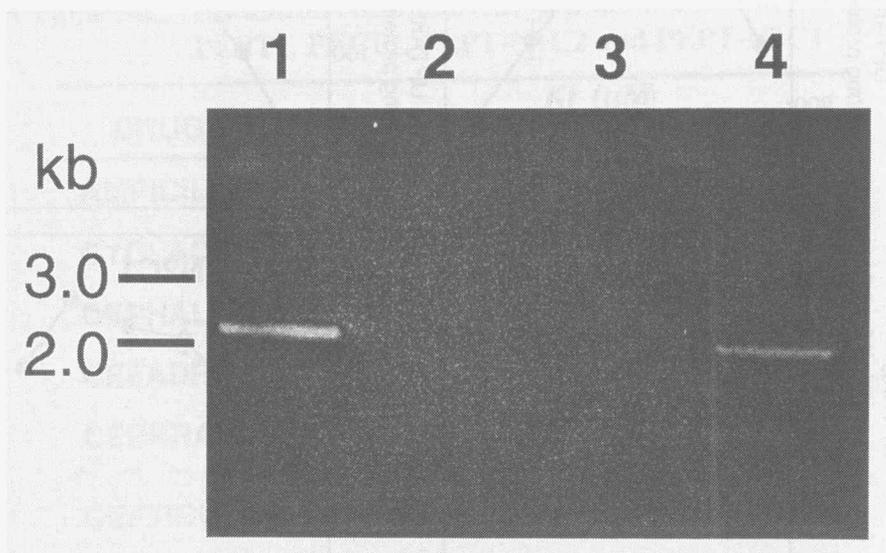
**Fig. 3-8 Expression of wild-type and histidine mutant PEPT1 transporter proteins in oocytes.** Oocytes were injected with 50 nl of water or cRNA (20 ng) of wild-type or mutant rat PEPT1. Two days after injection, oocytes were fixed, frozen, sectioned, and stained. The antiserum (1:100 dilution) for rat PEPT1 was used as the primary antibody. FITC-labeled goat anti-rabbit IgG (5  $\mu$ g/ml) was used for detection of bound antibodies. Abbreviation for each mutant is the same as described in Fig. 3-7.

### 第3節 キメラペプチドトランスポータの構築による薬物認識領域の検索

ペプチドトランスポータにおける薬物認識領域の検索を目的に、PEPT1/PEPT2キメラトランスポータの構築を試みた。キメラトランスポータは第6及び7膜貫通領域に挟まれた細胞内ループで接合し、N末端がPEPT1、C末端がPEPT2のキメラをPEPT-N1C2、その逆のキメラをPEPT-N2C1と命名した (Fig. 3-9)。両キメラトランスポータの輸送機能を解析するためLLC-PK<sub>1</sub>細胞を用いて安定発現細胞を作成した (LLC-N1C2及びLLC-N2C1細胞)。両トランスフェクタントより抽出したmRNAを鋳型としてRT-PCRを行ったところ、両トランスフェクタントにおいて特異的なキメラトランスポータの発現が確認された (Fig. 3-10)。そこで両安定発現細胞におけるGly-Sar取り込みのタイムコースを測定した結果、LLC-N1C2細胞では15分まで、またLLC-N2C1細胞では60分まで直線性が認められた。従って、以後の検討ではこれらの時間を取り込み時間とした。

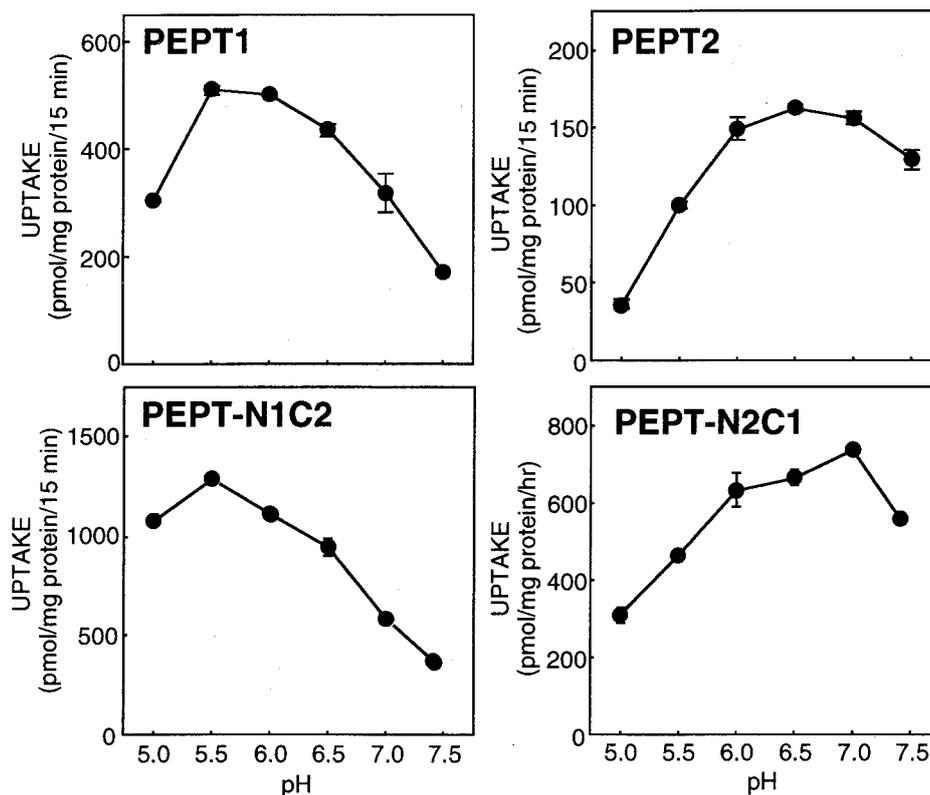


**Fig. 3-9 Schematic representation of PEPT1 (black), PEPT2 (gray), and constructed chimeras.** All the proteins are represented as possessing twelve putative membrane-spanning domains with their COOH and NH<sub>2</sub> termini within the cytoplasm. The chimera with transmembrane domains 1-6 of PEPT1 and 7-12 of PEPT2 was designated as PEPT-N1C2, and the reciprocal chimera was named as PEPT-N2C1.

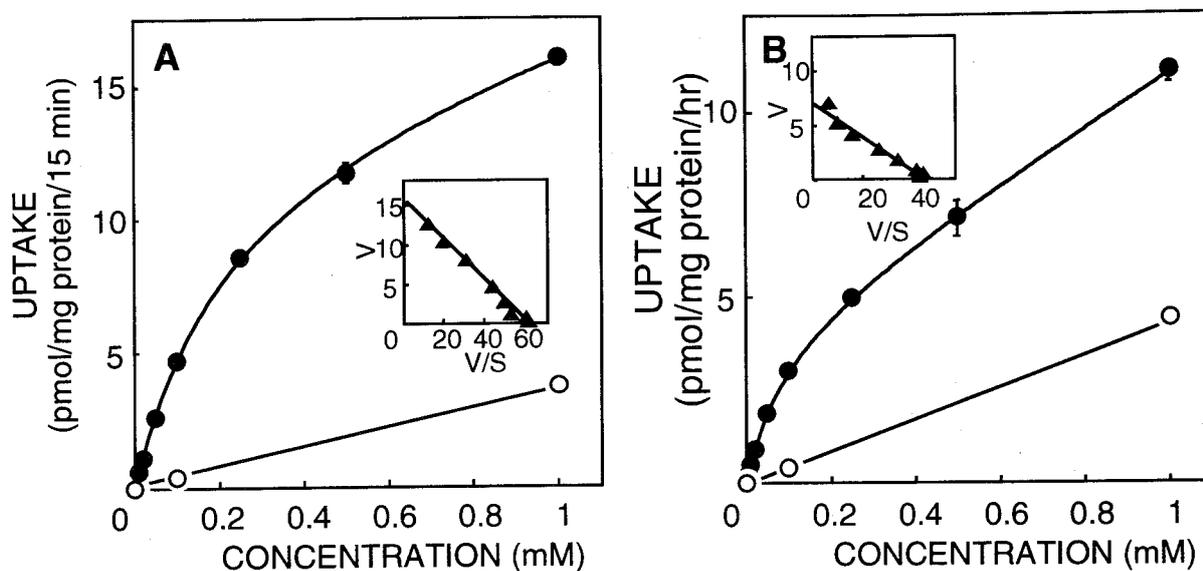


**Fig. 3-10 Expression of PEPT-N1C2 and PEPT-N2C1 mRNA in transfectants.** Total RNA isolated from LLC-N1C2 and LLC-N2C1 cells was reverse transcribed. The synthesized PEPT-N1C2 cDNA (lanes 1 and 2) and PEPT-N2C1 cDNA (lanes 3 and 4) were amplified with sets of primers as follows: lane 1 and 3, sense and antisense primers were used for PEPT1- and PEPT2-specific sequences, respectively; lane 2 and 4, sense and antisense primers were used for PEPT2- and PEPT1-specific sequences, respectively. The junction sites of chimeric cDNAs were included between the sense and antisense primers. PCR products were analyzed on agarose gels stained with ethidium bromide.

先ず両トランスフェクタントによるGly-Sar取り込みのpH依存性を調べた。その結果、LLC-N1C2細胞ではpH5.5付近に輸送至適pHが認められたのに対して、LLC-N2C1細胞ではpH7.0付近に最大輸送活性が観察された (Fig. 3-11)。従って、PEPT-N1C2はPEPT1と、またPEPT-N2C1はPEPT2と類似のpHプロファイルを有することが判明した。また両トランスフェクタントによるGly-Sar取り込みの濃度依存性を測定し輸送パラメータを求めたところ、見かけのKm値はそれぞれ0.25 mM (PEPT-N1C2) 並びに0.15 mM (PEPT-N2C1) と算出された (Fig. 3-12)。さらに両キメラペプチドトランスポータを介したGly-Sar取り込みに対する、種々β-ラクタム抗生物質の*K<sub>i</sub>*値を算出した (Table 3-1)。その結果、PEPT-N1C2とPEPT1はα-アミノ基を持たないceftibutenやcefiximeに対して、またPEPT-N2C1とPEPT2は、アミノセファロスポリンやアミノペニシリンに対して高い親和性を示した。従って、PEPT-N1C2とPEPT-N2C1はそれぞれ、PEPT1及びPEPT2と類似の薬物認識特性を有していることが示唆された。



**Fig. 3-11 pH-dependence of [<sup>14</sup>C]Gly-Sar uptake by LLC-rPEPT1, -rPEPT2, -N1C2, and -N2C1 cells.** Figures for PEPT1 and PEPT2 were taken from Fig. 2-6. LLC-N1C2 and LLC-N2C1 cells were incubated for 15 and 60 min at 37°C with incubation medium at various pHs containing 20 μM [<sup>14</sup>C]Gly-Sar. Each point represents the mean ± S.E. of three monolayers.



**Fig. 3-12** Concentration dependence of [<sup>14</sup>C]Gly-Sar uptake by LLC-N1C2 (A) and LLC-N2C1 cells (B). [<sup>14</sup>C]Gly-Sar uptake by LLC-N1C2 and LLC-N2C1 cells was measured at various concentrations for 15 and 60 min, respectively, at 37°C in the absence (●) or presence (○) of 10 mM unlabeled Gly-Sar. Each point represents the mean ± S.E. of three monolayers. *Inset:* Eadie-Hofstee plots of the uptake after correction for the nonsaturable component; V, uptake rate (nmol/mg protein/15 min or hr); S, Gly-Sar concentration (mM).

**Table 3-1.** Inhibition constants (*K<sub>i</sub>*) of β-lactam antibiotics for PEPT1, PEPT2, PEPT-N1C2 and PEPT-N2C1

DRUGS	<i>K<sub>i</sub></i> (μM)			
	PEPT1	PEPT2	N1C2	N2C1
AMPICILLIN	47,800	669	749	740
CYCLACILLIN	168	27	78	33
CEPHALEXIN	4,500	49	174	82
CEFADROXIL	2,170	3	65	3
CEPHRADINE	8,540	47	158	58
CEFTIBUTEN	597	1,340	292	1,100
CEFIXIME	6,920	11,900	3,770	4,630

*K<sub>i</sub>* values for PEPT1 and PEPT2 were taken from Table 2-1. Each value for PEPT-N1C2 and PEPT-N2C1 is mean of two monolayers. LLC-N1C2 and LLC-N2C1 cells were incubated for 15 and 60 min, respectively, at 37°C with incubation medium containing [<sup>14</sup>C]Gly-Sar (20 μM) in the presence of each competitor. The apparent inhibition constant (*K<sub>i</sub>*) values were calculated from the inhibition plots based on the transformed Michaelis-Menten equation using nonlinear least square regression analysis.

## 第4節 考 察

これまで、*lac permease*<sup>75)</sup>、*vesicular amine transporter (VMCT)*<sup>76)</sup> 及び  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger (NHE1)<sup>77)</sup> など、 $\text{H}^+$ 勾配と共役するトランスポータにおいてhistidine残基の重要性が示唆されてきた。すなわち、*lac permease*やVMCTではhistidine残基は $\text{H}^+$ の移動に関与し、NHE1では阻害剤の結合部位であると報告されている。 $\text{H}^+$ 勾配を駆動力とするペプチドトランスポータにおいても、histidine残基は輸送機能に必須であることが主に刷子縁膜小胞を用いた解析から示唆されてきた<sup>72-74)</sup>。そこでクローン化されたペプチドトランスポータにおいても、histidine残基が機能的な重要性を保持しているかどうかを検討するため、DEPCの影響と部位特異的変異体の作成に基づく輸送機能の変化について調べた。さらにキメラペプチドトランスポータを構築し、ペプチドトランスポータの機能領域の検索と共に、必須histidine残基との関連性についても検討を加えた。

### 1. PEPT1及びPEPT2におけるhistidine残基の役割

第1節においてペプチドトランスポータのDEPC感受性histidine残基は、 $\text{H}^+$ の結合部位ではなく、基質の結合部位として機能していることが明らかになった。さらに種々の基質によるDEPC阻害に対する防御効果の結果より、DEPC感受性histidine残基は基質の $\alpha$ -アミノ基の結合部位として寄与していることが示唆された。DEPCの反応性に関して、histidine残基のイミダゾール環がプロトン化していない状態の時のみ、DEPCは反応可能であると報告されている<sup>78)</sup>。従って、防御実験では基質の $\alpha$ -アミノ基がイミダゾール環と水素結合を形成することによってイミダゾール環がプロトン化され、DEPCによる反応を受けなくなったものと推察される。一方、 $\alpha$ -アミノ基を持たない薬物の場合には、上記のような反応は起こり得ず、DEPCによる阻害効果が観察されたものと推定される。

作成したhistidine変異体の機能を調べたところ、第2及び第4番目の膜貫通領域の表層に存在するhistidine残基が、輸送機能に必須であることが判明した。一方、Feiら<sup>79)</sup>はヒトPEPT1及びPEPT2を用いた電気生理学的な解析によって、第2番目に存在するhistidine残基は輸送機能に重要な役割を担っているが、第4番目に存在するhistidine残基は輸送機能に必須でないと報告している。このような矛盾点が、種差によるものか実験手法の差に

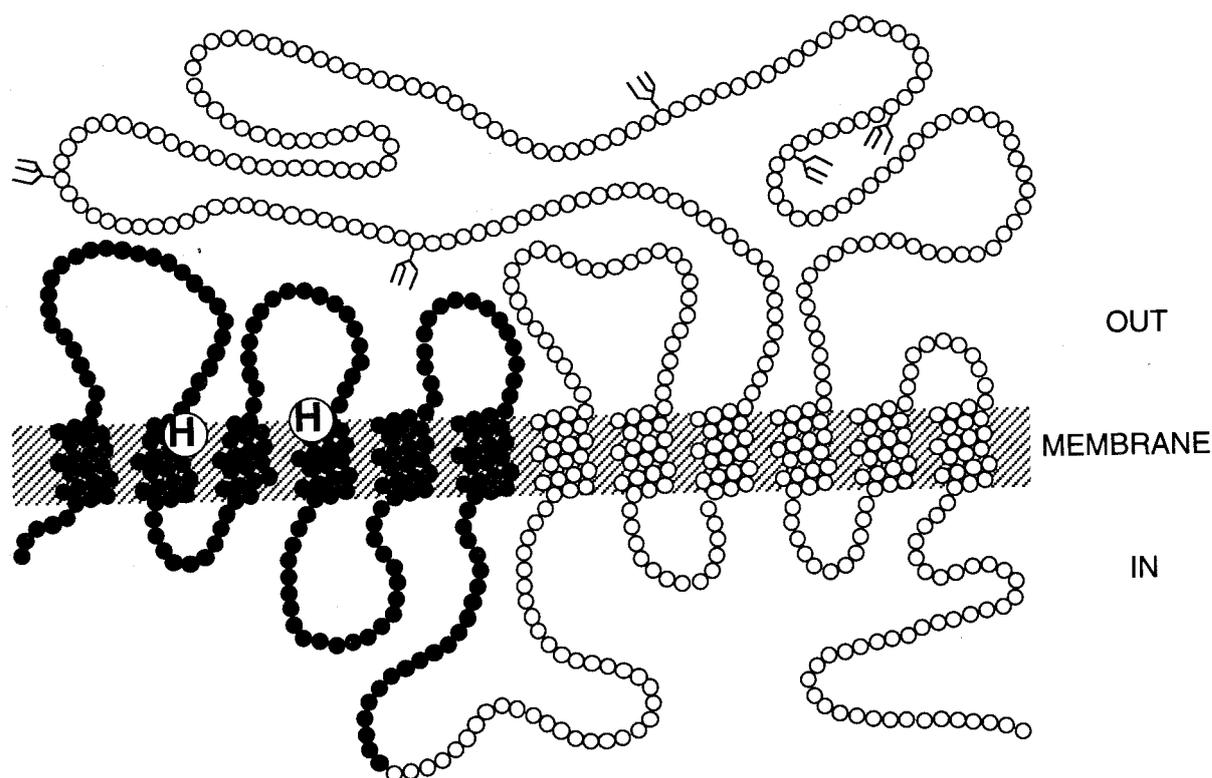
よるものかは不明である。しかしSteelら<sup>80)</sup>は、卵母細胞発現系を用いた電気生理学的解析より、少なくとも2つの必須histidine残基すなわち、基質結合部位とH<sup>+</sup>結合部位が、ペプチドトランスポータの輸送機構に必須であることを報告している。また、ヒトPEPT1発現卵母細胞を用いた輸送モードに関する研究により、Mackenzieら<sup>81)</sup>は、H<sup>+</sup>が先ずトランスポータに結合し、続いて基質が結合するという輸送機序を提案している。DEPCの防御実験より、プロトン化したイミダゾール環には基質の $\alpha$ -アミノ基が反応しないと示唆されたことから、Mackenzieら<sup>81)</sup>の実験結果を説明するためには、少なくとも2つのhistidine残基が必要と考えられる。

## 2. PEPT1及びPEPT2の機能領域の同定

構築したPEPT-N1C2とPEPT-N2C1は、Gly-Sar取り込みのpH依存性や薬物認識特性に関して、それぞれPEPT1並びにPEPT2と類似の輸送特性を示した。これらの表現系は構築したキメラのN末端側のトランスポータに由来することから、H<sup>+</sup>の結合部位や薬物認識領域がN末端側半分の領域、すなわち推定膜貫通領域1-6の間に存在する可能性が示唆された (Fig. 3-13)。この結果は、上述した2つの必須histidine残基が、膜貫通領域1-6の間に含まれることとよく対応していた。さらに、ヒトPEPT1の3次元構造に関するコンピューターシミュレーションと変異トランスポータの作成によって、第5番目の推定膜貫通領域に存在する157番目のtyrosine残基が輸送機能必須であることが報告されており<sup>82)</sup>、今回の結果とよく一致するものと考えられる。またDöringら<sup>83)</sup>は、ウサギPEPT2/PEPT1のキメラ構築と機能解析により、推定膜貫通領域1-9にPEPT2の輸送特性を規定するアミノ酸領域の存在することを報告しているが、今回の結果は、Döringらの報告よりもさらに狭い領域の同定に成功したと考えられる。

Gly-Sar取り込みのKm値や各 $\beta$ -ラクタム抗生物質のGly-Sar取り込みに対するKi値を、野生型並びにキメラペプチドトランスポータ間で比較したところ、PEPT-N2C1とPEPT2はよく一致していたが、PEPT-N1C2はPEPT1よりも高い基質親和性を示した。従って、PEPT2のC末端領域にも、基質親和性に影響を及ぼすアミノ酸領域の存在することが推察された。本研究において、PEPT1及びPEPT2の基質認識部位が推定膜貫通領域1-6の間に存在することが判明したことから、基質認識部位と基質親和性を支配する部位が異な

ることが示唆された。この様な例は、 $\text{Na}^+$ /ジカルボン酸トランスポータと $\text{Na}^+$ /硫酸トランスポータ間で作成した、キメラトランスポータを用いた検討により報告されている<sup>84)</sup>。また、いくつかのトランスポータにおいては、複数のアミノ酸領域が基質親和性に影響を及ぼすとの報告がある<sup>85-87)</sup>。今後、PEPT2に存在する基質親和性に影響を及ぼすアミノ酸領域を同定することによって、PEPT1並びにPEPT2の輸送メカニズムの理解が、より進展するものと考えられる。



**Fig. 3-13 Proposed model of the structural domains responsible for  $\text{H}^+$ -binding and substrate recognition of rat PEPT1 and PEPT2.** The analysis with chimeric peptide transporters showed that N-terminal halves (●) were important for  $\text{H}^+$ -binding and substrate recognition. "H" represents the essential histidine residues located at the transmembrane domains 2 and 4.

# 結 論

以上三章にわたり、著者はペプチドトランスポータPEPT1及びPEPT2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PEPT1及びPEPT2のcDNAクローニング

ウサギPEPT1のアミノ酸配列を参考にdegenerate primerを作成し、ラット腎mRNAを鋳型としてRT-PCRを行ったところ、2種類のPCR産物が得られた。これらのPCR産物をそれぞれプローブとして腎cDNAライブラリーをスクリーニングした結果、ラットPEPT1及びPEPT2 cDNAの単離に成功した。ラットPEPT1及びPEPT2は、それぞれ710個並びに729個のアミノ酸から成る推定12回膜貫通型タンパクであり、互いに約50%のアミノ酸ホモロジーを有していた。PEPT1は小腸上皮細胞の刷子縁膜に局在し、腎にも少し発現が観察された。一方、PEPT2は腎尿細管上皮細胞の刷子縁膜に多く発現し、脳、肺、脾臓においてもわずかに発現が認められた。卵母細胞発現系を用いた機能解析により、両トランスポータは、 $H^+$ 勾配依存的に加水分解抵抗性ジペプチドであるglycylsarcosine (Gly-Sar) や、ペプチド類似薬物を輸送することが判明した。

## 第 II 章 PEPT1及びPEPT2の機能に関する比較解析

PEPT1並びにPEPT2の機能特性を比較解析するため、両トランスポータの安定発現上皮細胞を新たに確立した。両トランスフェクタントを用いて、Gly-Sar取り込みのpHプロファイルを調べたところ、PEPT1ではpH5.5、またPEPT2ではpH6.5付近に最大輸送活性が観察された。また、両トランスフェクタントによるGly-Sar取り込みの濃度依存性は飽和性を示し、見かけの $K_m$ 値は、1.1 mM (PEPT1) 並びに0.1 mM (PEPT2) と算出された。さらに種々ジペプチドのGly-Sar取り込みに対する阻害曲線を基に $K_i$ 値を算出した

ところ、検討した全てのジペプチドにおいてPEPT2の方が高親和性であった。従って、PEPT1が低親和性型、またPEPT2が高親和性型ペプチドトランスポータであることが判明した。この結果は、親和性の異なるPEPT1並びにPEPT2が、異なる腎内分布を示すことによって、効率的な小分子ペプチドの再吸収を営んでいることを示唆するものである。同様に、種々経口用 $\beta$ -ラクタム抗生物質の両トランスポータに対する親和性を比較したところ、PEPT2は $\alpha$ -アミノ基を有するアミノ $\beta$ -ラクタム抗生物質に、PEPT1はceftibutenやcefixime等、 $\alpha$ -アミノ基を持たない $\beta$ -ラクタム抗生物質に対して、高い親和性を有することがわかった。以上の結果より、PEPT1とPEPT2は互いに異なる輸送機能特性や薬物認識能を有していることが判明した。

### 第Ⅲ章 PEPT1及びPEPT2の構造・機能相関解析

これまで刷子縁膜小胞を用いた輸送実験により、ペプチドトランスポータタンパクに存在するhistidine残基が、輸送機能に必須であることが報告されてきた。そこで、PEPT1並びにPEPT2に及ぼす、histidine修飾剤diethylpyrocarbonate (DEPC)の影響について調べた。その結果、DEPC処理によって、両トランスポータを介したGly-Sar取り込みは顕著に阻害された。またDEPC処理に及ぼす様々な基質の防御実験によって、DEPC感受性histidine残基は、基質の $\alpha$ -アミノ基の認識部位として関与していることが判明した。そこでこれらのhistidine残基の同定を試みるため、PEPT1の第2及び第4番目の推定膜貫通領域に存在する保存性histidine残基 (His<sup>57</sup>並びにHis<sup>121</sup>)の変異トランスポータを作成し、機能解析を行った。その結果、変異トランスポータの細胞膜発現に異常は認められなかったものの、Gly-Sar輸送活性はほぼ完全に消失した。これらの結果は、His<sup>57</sup>並びにHis<sup>121</sup>が、基質の $\alpha$ -アミノ基の認識部位並びに駆動力であるH<sup>+</sup>の結合部位として機能している可能性を示唆するものである。さらにPEPT1、PEPT2間でキメラトランスポータを構築し輸送特性を調べたところ、膜貫通領域1-6の間に基質認識領域の存在することが判明した。この結果は、前述のhistidine残基の機能的な重要性と良く対応していた。また、PEPT2の高親和性を規定するアミノ酸領域が、PEPT2のC末端側にも存在している可能性が、キメラペプチドトランスポータを用いた解析より示唆された。

以上、著者は2種のラットペプチドトランスポータ PEPT1並びにPEPT2のcDNAクローニングに成功し、両トランスポータの薬物認識特性や輸送機構についてタンパク分子レベルで明らかにすることができた。これらの研究成果は、ペプチド類似薬物の体内動態制御過程の分子的解明のみならず、ペプチドトランスポータを標的とする医薬品分子設計や製剤開発など臨床応用面に対しても、有用な基礎的情報を提供し得るものと考ええる。また、タンパク質の吸収や恒常性維持などにおける、ペプチドトランスポータの生理及び栄養学的役割を理解するための、重要な知見になり得ると考える。

## 謝 辞

終わりに臨み、本研究に際して終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学 乾 賢一 教授 に衷心より深甚なる謝意を表します。また、種々の有益な御助言と御指導を戴いた京都大学 橋本征也 助教授、同 齋藤秀之 講師 に深謝します。さらに、数々の有益な御助言を戴いた京都大学医学部附属病院薬剤部諸氏、並びに実験の一部に御協力戴いた 向井真由美 修士、澤田京子 学士 に心から感謝し厚く御礼申し上げます。

# 実験の部

## 第 I 章 実験の部

### [1-1] 試薬

[<sup>3</sup>H]Bestatin及び非標識Bestatinは日本化薬、ceftibutenは塩野義製薬、cephradineは三共より供与されたものを用いた。[<sup>14</sup>C]glycylsarcosine (Gly-Sar) は第一化学薬品のもの、非標識glycylsarcosineはSigma社のもの、glycylleucine及びcarnosineはペプチド研究所のもの、2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (TRIS)、2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) はナカライテスク社のもの、その他の試薬は市販品特級を用いた。

### [1-2] PEPT1及びPEPT2のcDNAクローニング

#### (a) RNAの抽出と精製

SD系雄性ラットの各臓器より、チオシアン酸グアニジン法によって全RNAを抽出した<sup>87)</sup>。poly (A)<sup>+</sup>RNAはoligo (dT)-cellulose (Collaborative Research Inc.社) アフィニティークラムクロマトグラフィーを用いて分離精製した<sup>88)</sup>。

#### (b) RT-PCR法

Feiら<sup>17)</sup>によってウサギ小腸からクローニングされたペプチドトランスポータ (PEPT1) のアミノ酸配列を参考にして、degenerate primer (sense strand, 5'-CCGTCGACTT(T/C)TT(T/C)AT(T/C)GTNGTNAA-3'; anti sense strand, 5'-CCGCGGCCG-CAC(A/G)CA(A/G/T)GG-(T/C)TT(A/G)ATNCC-3') を化学合成した。PCRの鋳型として使用したfirst-strand cDNAは、ラット腎皮質より精製したmRNAを逆転写酵素 (Boehringer Mannheim社) と42℃、60分間反応させることによって作成した。PCR法はdegenerate primer (5 μM) を用い、変性 (94℃、1分)、アニーリング (50℃、1分)、伸長反応 (72℃、3分) を1サイクルとし30サイクル繰り返した。

#### (c) 塩基配列決定

得られたPCR産物を制限酵素*Not I*及び*Sal I*で切断し、予め*Not I*及び*Sal I*で切断したプラスミドベクターpSPORT1 (GIBCO社) にサブクローニングした。挿入cDNAの塩基配列はジデオキシ法に従い、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クエンスキット (Sequenase Ver. 2.0 DNA Sequencing Kit, United States Biochemical社) を用いて行った。

#### (d) cDNAライブラリーの作成とスクリーニング

ラット腎cDNAライブラリーは、cDNA合成キット $\lambda$ gt22A (GIBCO社) によって作成されたものを使用した<sup>89)</sup>。[1-2] (c) で塩基配列を決定しウサギPEPT1と相同性を示したPCR産物をプローブとして、ラット腎cDNAライブラリーをハイブリダイゼーション法によってスクリーニングし、ラットPEPT cDNAを単離した。全長cDNAの塩基配列はpSPORT1 (*Not I*, *Sal I*) にサブクローニングした後、[1-2] (c) に準じて決定した。

#### [1-3] PEPT1及びPEPT2の組織分布及び膜局在

##### (a) ノーザンブロット分析

ラット各組織由来mRNA (5  $\mu$ g) をホルムアルデヒド含有アガロースゲル (1%) 電気泳動によって分離後、ナイロンメンブランにブロッティングを行い、<sup>32</sup>P標識PEPT cDNAとハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションは42°Cで16時間、50%ホルムアミド、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 Denhart's solution、0.2% SDS、10 mg/ml変性サケ精子DNAを含む溶液で行った。洗浄によってメンブランの非特異的バックグラウンドを取り除いた後、X線フィルムに感光させバンドを検出した。

##### (b) ウエスタンブロット分析

ラットPEPTのC末端合成ペプチド (15アミノ酸) をKeyhole Limpet Hemocyaninに架橋後、常法に従ってウサギに免疫し抗体を作成した。ラット小腸、大腸、並びに腎から調製した形質膜をSDS-PAGE (10%) により分離後、PVDFメンブラン (Amersham社) にタンパクをトランスファーした。トランスファー後、PVDFメンブランのブロッキング及び洗浄を行い、ラットPEPT抗体と25°Cで1時間反応させ、HRP標識2次抗体を用いた

化学発光によってシグナルを検出した。

#### [1-4] アフリカツメガエル卵母細胞を用いたPEPT1及びPEPT2の輸送機能解析

##### (a) 卵母細胞の調製

アフリカツメガエル（浜松生物教材）を水中に放置し、冷却による麻酔後氷上にて開腹した。卵塊をMBS緩衝液（modified Barth's solution; 88 mM NaCl、1 mM KCl、2.4 mM NaHCO<sub>3</sub>、0.82 mM MgSO<sub>4</sub>、0.33 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、0.41 mM CaCl<sub>2</sub>、10 mg/l penicillin、10 mg/l streptomycin、pH 7.5）を満した培養皿に移し、個々の卵母細胞が露出するように卵胞を開いた後、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た。さらに同液で約1時間反応させた後、卵母細胞をMBSで数回洗浄し18℃で1晩放置した。

##### (b) β-ラクタム抗生物質、[<sup>14</sup>C]Gly-Sar及び[<sup>3</sup>H]Bestatinの取り込み実験

*Not I*により3'末端部位を切断したラットPEPT cDNAを鋳型として、5'Cap（Cap analog、STRATAGENE社）存在下、T7RNAポリメラーゼ（Promega社）を用いてRNAを合成した。3-1で調製した卵母細胞に、顕微鏡下マイクロインジェクターに取り付けたガラス針（先端径、25-35μm）を用いて、水（50 nl）または合成RNA（20 ng）を注入し、18℃で2日間培養した。取り込み実験は1.5 ml容量のマイクロチューブに、1サンプルあたり3-4個の卵母細胞を用いて行った。Uptake Buffer（100 mM NaCl、2 mM KCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM MES（pH 6.0） or TRIS（pH 7.4））で調製した各基質を、卵母細胞と一定時間インキュベートし、氷冷Uptake Bufferで卵母細胞を3回洗浄することによって反応を停止した。β-ラクタム抗生物質の定量は、抽出液（ceftibuten: 0.05%臭化テトラブチルアンモニウム含有 50 mM 酢酸アンモニウム / メタノール=50:50、cephradine: 0.6% 過塩素酸）で卵母細胞をホモジネート後、遠心分離（13,000 rpm、10 min）により得られた上清をMillipore filter（SJGVL、0.22 μm）で濾過し、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によって行った。[<sup>14</sup>C]Gly-Sar及び[<sup>3</sup>H]Bestatinの定量は、10% SDSで卵母細胞を可溶化後、放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

##### (c) β-ラクタム抗生物質の定量法

β-ラクタム抗生物質の定量はHPLCにより行った。HPLCにはLC-10A（島津製作所）、

検出器には紫外分光光度計SPD-6A（島津製作所）、積分器にはクロマトパックC-R1A（島津製作所）を用いた。固定相としてZorbax ODSカラム（15 cm x 4.6 mm）を用い、カラム温度45℃、流速0.7-1.0 ml/minとした。検出波長はceftibuten、cephradine共に262 nmで行った。移動相は、ceftibuten: 0.05%臭化テトラブチルアンモニウム含有 50 mM酢酸アンモニウム / メタノール=80:20、cephradine: 30 mMリン酸緩衝液（pH 7.0） / メタノール=70:30とした。

## 第Ⅱ章 実験の部

### [2-1] 試薬

amoxicillin、cefдинir、cefiximeは藤沢薬品、cefotiam、cyclacillinは武田薬品、cephalexinは塩野義製薬、cefadroxilはBristol-Myers Squibbより供与されたものを用いた。ampicillinはSigma社のもの、N-2-hydroxyethylpiperadine-N'-2-ethanesulfonic acid（HEPES）はナカライテスク社のもの、その他の試薬は市販品特級を用いた。

### [2-2] ラットPEPT1及びPEPT2安定発現細胞の構築

ブタ腎由来LLC-PK<sub>1</sub>細胞（ATCC CRL-1392）は、10%FBS（Whittaker Bioproduct社）含有DMEM（Life Technologies社）で、5% CO<sub>2</sub>-95% air、37℃で培養した<sup>90)</sup>。動物細胞発現ベクターpBK-CMV（STRATAGENE社）にサブクローニングしたラットPEPT1またはPEPT2 cDNA（10 μg）を、LLC-PK<sub>1</sub>細胞にリン酸カルシウム共沈法によってトランスフェクションした。すなわち、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摘下し、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希釈・分配し、1 mg/mlのG418（GIBCO社）存在下で約2週間培養した。G418耐性獲得細胞を選別した後、ウエスタンブロッティング、ノーザンブロッティング及びGly-Sarの輸送活性を指標としてPEPT1及びPEPT2発現クローン（LLC-rPEPT1、LLC-rPEPT2細胞）を単離した。また対照として、ベクターのみをトランスフェクションしたLLC-pBK細胞も同時に作成した。

### [2-3] 安定発現細胞によるPEPT1及びPEPT2の輸送機能解析

(a)  $\beta$ -ラクタム抗生物質及び $[^{14}\text{C}]\text{Gly-Sar}$ の取り込み実験

LLC-rPEPT1、LLC-rPEPT2またはLLC-pBK細胞を60 mm (35 mm) 培養皿に $50 \times 10^5$  cells/dish ( $20 \times 10^5$  cells/dish) で播種し、6~7日間培養した細胞を取り込み実験に用いた。取り込み実験に用いたIncubation Mediumの組成を以下に示す。Incubation Medium: 145 mM NaCl、3 mM KCl、1 mM  $\text{CaCl}_2$ 、0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、5 mM D-glucose、5 mM MES (pH 6.0) or HEPES (pH 7.4)。取り込み実験は培養液を除去後、5 ml (2 ml) のIncubation Medium (pH 7.4) で細胞を洗浄し、2 ml (1 ml) のIncubation Medium (pH 7.4) で $37^\circ\text{C}$ 、10分間インキュベートした。その後基質を含むIncubation Medium (pH 6.0) に置換し、 $37^\circ\text{C}$ で一定時間インキュベート後、5 ml (2 ml) の氷冷Incubation Medium (pH 7.4) で2回洗浄することによって反応を停止した。 $\beta$ -ラクタム抗生物質の場合は、抽出液 (ceftibuten: 0.05% 臭化テトラブチルアンモニウム含有 50 mM 酢酸アンモニウム / メタノール=50:50、cephradine、リン酸緩衝液 (pH 7.0) / メタノール=50:50) を細胞に添加し、室温で1時間放置した。抽出液を遠心分離 (10,000 rpm、15 min) し上清をMillipore filter (SJGVL、 $0.22 \mu\text{m}$ ) で濾過後、HPLCのサンプルとした。沈殿物は1N NaOHで可溶化後、タンパク定量用に用いた。 $[^{14}\text{C}]\text{Gly-Sar}$ の定量は、1N NaOHで細胞を可溶化後、放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

(b)  $\beta$ -ラクタム抗生物質の定量

実験の部、第I章[1-4] (c) と同じ条件で行った。但しcefotiamはcephradineと同一条件で測定した。

(c) タンパク定量

タンパク質濃度の定量は、Bradford<sup>91)</sup>の方法に従い、 $\gamma$ -globulinをスタンダードとして測定した。

### 第三章 実験の部

#### [3-1] 試薬

diethylpyrocarbonate (DEPC) はナカライテスク社のもの、その他の試薬は市販品特級

を用いた。

### [3-2] PEPT1及びPEPT2におけるhistidine残基の機能的役割に関する解析

LLC-rPEPT1及びLLC-rPEPT2細胞を、DEPC処理用緩衝液（1 mM DEPC、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 6.0）で、25℃、10分間処理し、洗浄後[<sup>14</sup>C]Gly-Sarの取り込み実験を、第II章 [2-3] に準じて行った。

### [3-3] ラットPEPT1における必須histidine残基の同定

#### (a) ラットPEPT1 histidine mutant cDNAの作成

ラットPEPT1の57並びに121番目のhistidine残基（H）をglutamine残基（Q）に置換したhistidine mutant cDNAはPCR-mutagenesisの手法を用いて作成した。先ず、pSPORT1のSal I及びNot Iのクローニングサイトに挿入されているラットPEPT1を鋳型として、変性（94℃、1分）、アニーリング（55℃、2分）、伸長反応（72℃、2.5分）、30サイクルの条件で、第1PCR反応を行った。以下に用いた2組のprimerを示す。

1) T7 promoter primrerとmNOT primer（5'-GGATCCTCTAGAGCGTCCGC-3'）（Not Iの制限酵素サイトを消失させるprimer）

2) SP6 promoter primrerとmutagenic primer（H57Q: 5'-GCCATCTACCAAACGTTTGT-3'  
またはH121Q: 5'-CTTCCTTTGCAGGTAGCACT-3'）（太字：塩基の変異）

1及び2で得られた2種のPCR産物を混合・アニーリングし、第2PCRの鋳型とした。第2PCRは第1PCRと同様の反応条件で行い、primerはT7 promoter primrerとSP6 promoter primrerを用いた。H57QとH121Qの2つの変異を導入したcDNAは、H121Qを鋳型として上記と同様の条件で作成した。

#### (b) 卵母細胞発現系を用いたラットPEPT1 histidine mutantの輸送機能解析

(a) で作成したラットPEPT1 histidine mutant cDNAの塩基配列を確認後、[<sup>14</sup>C]Gly-Sarまたはceftibutenの取り込み実験を、第I章[1-4]に準じて行った。

#### (c) 卵母細胞の免疫染色

wild-type PEPT1または PEPT1 histidine mutant発現卵母細胞を3%パラホルムアルデヒド溶液で固定(4℃、1時間)後、30%スクロース溶液で浸漬した(4℃、18時間)。卵母細胞切片(8 μm)の作成、風乾、洗浄の操作を行い、非特異的な反応を抑えるため10%ヤギ血清で10分間処理した後、ラットPEPT1抗体(1:100)で4℃、12時間インキュベートした。洗浄後、FITC標識2次抗体と反応させ、蛍光顕微鏡を用いて写真撮影を行った。

### [3-4] キメラペプチドトランスポータの構築による薬物認識領域の検索

#### (a) ラットPEPT1/PEPT2キメラトランスポータcDNAの作成

キメラペプチドトランスポータcDNAは、ラットPEPT1またはPEPT2 cDNA/pSPORT1 (*Sal* I, *Not* I) を用いて作成した。ラットPEPT1 cDNAに、*Nde* Iの制限酵素サイトを導入するため、*Nde* Iサイト含んだ合成プライマーを用いてPCRを行った。以下に用いた2組のprimerを示す。

1) T7 promoter primerとprimer 1 (5'-AAGCATATGCACTTGGCCACTTTGCCCATG-3')

(太字：*Nde* Iの制限酵素サイト、下線部：変異した塩基)

2) M13 primerとprimer 2 (5'-GTGCATATGCTTTGCCATCAAAAACAGGTT-3')

(太字：*Nde* Iの制限酵素サイト、下線部：変異した塩基)

1) で得られたフラグメントを*Sal* I及び*Nde* Iで切断後、ラットPEPT2 cDNAの*Sal* I及び*Nde* Iサイトに挿入し、PEPT-N1C2 cDNAと命名した。同様に2) で得られたフラグメントは*Nde* I及び*Not* Iで処理し、ラットPEPT2 cDNAの対応するサイトに挿入した(PEPT-N2C1 cDNA)。

#### (b) キメラペプチドトランスポータ安定発現細胞の構築と機能解析

キメラペプチドトランスポータcDNAの塩基配列を確認後、実験の部、第II章[2-2]と同様の条件で両キメラトランスポータの安定発現細胞を作成した。PEPT-N1C2安定発現細胞をLLC-N1C2細胞、PEPT-N2C1安定発現細胞をLLC-N2C1細胞と命名し、機能解析は実験の部、第II章[2-3]に準じて行った。

## 論文目録

本研究の内容は、以下の論文に発表した。

Cloning and characterization of a rat H<sup>+</sup>/peptide cotransporter mediating absorption of  $\beta$ -lactam antibiotics in the intestine and kidney.

*J. Pharmacol. Exp. Ther.* **275**: 1631-1637, 1995.

Molecular cloning and tissue distribution of rat peptide transporter PEPT2.

*Biochim. Biophys. Acta* **1280**: 173-177, 1996.

Identification of the histidine residues involved in substrate recognition by a rat H<sup>+</sup>/peptide cotransporter, PEPT1.

*FEBS Lett.* **394**: 196-200, 1996.

Characterization of stably transfected kidney epithelial cell line expressing rat H<sup>+</sup>/peptide cotransporter PEPT1: Localization of PEPT1 and transport of  $\beta$ -lactam antibiotics.

*J. Pharmacol. Exp. Ther.* **281**: 1415-1421, 1997.

Recognition of  $\beta$ -lactam antibiotics by rat peptide transporters, PEPT1 and PEPT2, transfected in LLC-PK<sub>1</sub> cells.

*Am. J. Physiol.* **273**: F706-F711, 1997.

Interaction of  $\beta$ -lactam antibiotics with histidine residue of rat H<sup>+</sup>/peptide cotransporters, PEPT1 and PEPT2.

*J. Biol. Chem.* **273**: 5582-5585, 1998.

The N-terminal halves of rat H<sup>+</sup>/peptide cotransporters are responsible for their substrate recognition.

Submitted.

## 引用文献

1. "最新生物薬剤学"、栗津荘司、小泉 保編、南江堂、1991.
2. "臨床薬物動態学"、加藤隆一、南江堂、1998.
3. Okano, T., Inui, K., Maegawa, H., Takano, M. and Hori, R.: H<sup>+</sup> coupled uphill transport of aminocephalosporins via the dipeptide transport system in rabbit intestinal brush-border membranes. *J. Biol. Chem.* **261**: 14130-14134, 1986.
4. Okano, T., Inui, K., Takano, M. and Hori, R.: H<sup>+</sup> gradient-dependent transport of aminocephalosporins in rat intestinal brush-border membrane vesicles: Role of dipeptide transport system. *Biochem. Pharmacol.* **35**: 1781-1786, 1986.
5. Tsuji, A., Terasaki, T., Tamai, I. and Hirooka, H.: H<sup>+</sup> gradient-dependent and carrier-mediated transport of cefixime, a new cephalosporin antibiotic, across brush-border membrane vesicles from rat small intestine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **241**: 594-601, 1987.
6. Muranushi, N., Yoshikawa, T., Yoshida, M., Oguma, T., Hirano, K. and Yamada, H.: Transport characteristics of ceftibuten, a new oral cephem, in rat intestinal brush-border membrane vesicles: relationship to oligopeptide and amino  $\beta$ -lactam transport. *Pharm. Res.* **6**: 308-312, 1989.
7. Inui, K., Okano, T., Takano, M., Saito, H. and Hori, R.: Carrier-mediated transport of cephalixin via the dipeptide transport system in rat renal brush-border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **679**:449-454, 1984.
8. Inui, K., Yamamoto, M. and Saito, H.: Transepithelial transport of oral cephalosporins by monolayers of intestinal epithelial cell line Caco-2: Specific transport systems in apical and basolateral membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **260**: 195-201, 1992.
9. Matsumoto, S., Saito, H. and Inui, K.: Transcellular transport of oral cephalosporins in human intestinal epithelial cells, Caco-2: Interaction with dipeptide transport system in apical and basolateral membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270**: 498-504, 1994.
10. Matsumoto, S., Saito, H. and Inui, K.: Transport characteristics of ceftibuten, a new cephalosporin antibiotic, via the apical H<sup>+</sup>/dipeptide cotransport system in human intestinal cell line Caco-2: regulation by cell growth. *Pharm. Res.* **12**: 1483-1487, 1995.
11. Leibach, F.H. and Ganapathy, V. : Peptide transporters in the intestine and the kidney. *Annu. Rev. Nutr.* **16**: 99-119, 1996.
12. Christensen, N.H.: Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol. Rev.* **70**: 43-77, 1990.
13. Tomita, Y., Katsura, T., Okano, T., Inui, K. and Hori, R.: Transport mechanisms of bestatin

- in rabbit intestinal brush-border membranes: role of H<sup>+</sup>/dipeptide cotransport system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **252**: 859-862, 1990.
14. Inui, K., Tomita, Y., Katsura, T., Okano, T., Takano, M. and Hori, R.: H<sup>+</sup> coupled active transport of bestatin via the dipeptide transport system in rabbit intestinal brush-border membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **260**: 482-486, 1992.
  15. Saito, H. and Inui, K.: Dipeptide transporters in apical and basolateral membranes of the human intestinal cell line Caco-2. *Am. J. Physiol.* **265**: G289-G294, 1993.
  16. Silbernagl, S.: The renal handling of amino acids and oligopeptides. *Physiol. Rev.* **68**: 911-1007, 1988.
  17. Fei, Y.-J., Kanai, Y., Nussberger, S., Ganapathy, V., Leibach, F.H., Romero, M.F., Singh, S.K., Boron, W.F. and Hediger, M.A.: Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature (Lond.)* **368**: 563-566, 1994.
  18. Dixon, C. and Mizen, L.W.: Absorption of amino penicillins from everted rat intestine. *J. Physiol. (Lond.)* **269**: 549-559, 1977.
  19. Kimura, T., Endo, H., Yoshikawa, M., Muranishi, S. and Sezaki, H.: Carrier-mediated transport systems for aminopenicillins in rat small intestine. *J. Pharmacobio-Dyn.* **1**: 262-267, 1978.
  20. Tsuji, A., Nakashima, E., Kagami, I. and Yamana, T.: Intestinal absorption mechanism of amphoteric  $\beta$ -lactam antibiotics I: Comparative absorption and evidence for saturable transport of amino- $\beta$ -lactam antibiotics by in situ rat small intestine. *J. Pharm. Sci.* **70**: 768-772, 1981.
  21. Kimura, T., Yamamoto, T., Mizuno, M., Suga, Y., Kitade, S. and Sezaki, H.: Characterization of aminocephalosporin transport across rat small intestine. *J. Pharmacobio-Dyn.* **6**: 246-253, 1983.
  22. Nakashima, E., Tsuji, A., Mizuno, H. and Yamana, T.: Kinetics and mechanism of *in vitro* uptake of amino- $\beta$ -lactam antibiotics by rat small intestine and relation to the intact-peptide transport system. *Biochem. Pharmacol.* **33**: 3345-3352, 1984.
  23. Nakashima, E. and Tsuji, A.: Mutual effects of amino- $\beta$ -lactam antibiotics and glycyglycine on the transmural potential difference in the small intestinal epithelium of rats. *J. Pharmacobio-Dyn.* **8**: 623-632, 1985.
  24. Hu, M. and Amidon, G.L.: Passive and carrier mediated intestinal absorption components of captopril. *J. Pharm. Sci.* **77**: 1007-1011, 1988.
  25. Swaan, P.W., Stehouwer, M.C. and Tukker, J.J.: Molecular mechanisms for the relative binding affinity to the intestinal peptide carrier. Comparison of three ACE inhibitors: enalapril, enalaprilat, and lisinopril. *Biochim. Biophys. Acta* **1236**: 31-38, 1995.
  26. Kramer, W., Girbig, F., Gutjahr, U., Kleemann, H.-W., Leipe, I., Urbach, H. and Wagner,

- A.: Interaction of renin inhibitors with the intestinal uptake system for oligopeptides and  $\beta$ -lactam antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta* **1027**: 25-30, 1990.
27. Hu, M., Subramanian, P., Mosberg, H.I. and Amidon, G.L.: Use of the peptide carrier system to improve the intestinal absorption of L-alpha-methyldopa: carrier kinetics, intestinal permeabilities, and in vivo hydrolysis of dipeptidyl derivatives of L-alpha-methyldopa. *Pharm. Res.* **6**: 66-70, 1989.
  28. Tsuji, A., Tamai, I., Nakanishi, M. and Amidon, G.L.: Mechanism of the absorption of the dipeptide  $\alpha$ -methyldopa-phe in intestinal brush border membrane vesicles. *Pharm. Res.* **7**: 308-309, 1990.
  29. Han, H.-K., de Vruet, R.L.A., Rhie, J.K., Covitz, K.-M.Y., Smith, P.L., Lee, C.P., Oh, D.-M., Sadée, W. and Amidon, G.L.: 5'-Amino acid esters of antiviral nucleotides, acyclovir, and AZT are absorbed by the intestinal PEPT1 peptide transporter. *Pharm. Res.* **15**: 1154-1159, 1998.
  30. Ganapathy, M.E., Huang, W., Wang, H., Ganapathy, V. and Leibach, F.H.: Valacyclovir: a substrate for the intestinal and renal peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**: 470-475, 1998.
  31. DE Vruet, R.L.A., Smith, P.L. and Lee, C.-P.: Transport of L-valine-acyclovir via the oligopeptide transporter in the human intestinal cell line, Caco-2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **286**: 1166-1170, 1998.
  32. Takano, M., Okano, T., Inui, K. and Hori, R.: Transport of cephalosporin antibiotics in renal basolateral membranes. *J. Pharm. Pharmacol.* **41**: 795-796, 1989.
  33. Liang, R., Fei, Y.-J., Prasad, P.D., Ramamoorthy, S., Han, H., Yang-Feng, T.L., Hediger, M.A., Ganapathy, V. and Leibach, F.H.: Human intestinal H<sup>+</sup>/peptide cotransporter. Cloning, functional expression, and chromosomal localization. *J. Biol. Chem.* **270**: 6456-6463, 1995.
  34. Liu, W., Liang, R., Ramamoorthy, S., Fei, Y.-J., Ganapathy, M.E., Hediger, M.A., Ganapathy, V. and Leibach, F.H.: Molecular cloning of PEPT2, a new member of the H<sup>+</sup>/peptide cotransporter family, from human kidney. *Biochim. Biophys. Acta* **1235**: 461-466, 1995.
  35. Boll, M., Herget, M., Wagener, M., Weber, W.M., Markovich, D., Biber, J., Clauss, W., Murer, H. and Daniel, H.: Expression cloning and functional characterization of the kidney cortex high-affinity proton-coupled peptide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 284-289, 1996.
  36. Yamashita, T., Shimada, S., Guo, W., Sato, K., Komura, E., Hayakawa, T., Takagi, T. and Tohyama, M.: Cloning and functional expression of a brain peptide/histidine transporter. *J. Biol. Chem.* **272**: 10205-10211, 1997.

37. Fei, Y.-J., Fujita, T., Lapp, D.F., Ganapathy, V. and Leibach, F.H.: Two oligopeptide transporters from *Caenorhabditis elegans*: molecular cloning and functional expression. *Biochem. J.* **332**: 565-572, 1998.
38. Roman, G., Meller, V., Hang K. and Davis, R.L.: The *opt1* gene of *Drosophila melanogaster* encodes a proton-dependent dipeptide transporter. *Am. J. Physiol.* **275**: C857-C869, 1998.
39. Paulsen, I.T. and Skurray, R.A.: The PTR family of transport proteins. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 404, 1994.
40. Steiner, H.Y., Naider, F. and Becker, J.M.: The PTR family: a new group of peptide transporters. *Mol. Microbiol.* **16**: 825-834, 1995.
41. 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.
42. Muller, U., Brandsch, M., Prasad, P.D., Fei, Y.-J., Ganapathy, V. and Leibach, F.H.: Inhibition of the H<sup>+</sup>/peptide co-transporter in the human intestinal cell line Caco-2 by cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218**: 461-465, 1996.
43. Brandsch, M., Miyamoto, Y., Ganapathy, V. and Leibach, F.H.: Expression and protein kinase C-dependent regulation of peptide/H<sup>+</sup> co-transport system in the Caco-2 human colon carcinoma cell line. *Biochem. J.* **299**: 253-260, 1994.
44. Erickson, R.H., Gum Jr., J.R., Lindstrom, M.M., McKean, D. and Kim, Y.S.: Regional expression and dietary regulation of rat small intestinal peptide and amino acid transporter mRNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**: 249-257, 1995.
45. Walker, D., Thwaites, D.T., Simmons, N.L., Gilbert, H.J. and Hirst, B.H.: Substrate upregulation of the human small intestinal peptide transporter, hPepT1. *J. Physiol. (Lond.)* **507**: 697-706, 1998.
46. Tanaka, H., Miyamoto, K., Morita, K., Haga, H., Segawa, H., Shiraga, T., Fujioka, A., Kouda, T., Taketani, Y., Hisano, S., Fukui, Y., Kitagawa, K. and Takeda, E.: Regulation of the PepT1 peptide transporter in the rat small intestine in response to 5-fluorouracil-induced injury. *Gastroenterology* **114**: 714-723, 1998.
47. Döring, F., Walter, J., Will, J., Föcking, M., Boll, M., Amasheh, S., Clauss, W. and Daniel, H.: Delta-aminolevulinic acid transport by intestinal and renal peptide transporters and its physiological and clinical implications. *J. Clin. Invest.* **101**: 2761-2767, 1998.
48. Meredith, D. and Boyd, C.A.R.: Dipeptide transport characteristics of the apical membrane of rat lung type II pneumocytes. *Am. J. Physiol.* **269**: L137-L143, 1995.
49. Shennan, D.B., Calvert, D.T., Backwell, F.R.C. and Boyd, C.A.R.: Peptide aminonitrogen transport by the lactating rat mammary gland. *Biochim. Biophys. Acta* **1373**: 252-260, 1998.
50. Miyamoto, Y., Coone, J.L., Ganapathy, V. and Leibach, F.H.: Distribution and properties of

- the glycylsarcosine-transport system in rabbit renal proximal tubule. *Biochem. J.* **249**: 247-253, 1988.
51. Daniel, H., Morse, E.L. and Adibi, S.A.: The high and low affinity transport systems for dipeptides in kidney brush border membrane respond differently to alterations in pH gradient and membrane potential. *J. Biol. Chem.* **266**: 19917-19924, 1991.
  52. Naasani, I., Sato, K., Iseki, K., Sugawara, M., Kobayashi, M. and Miyazaki, K.: Comparison of the transport characteristics of ceftibuten in rat renal and intestinal brush-border membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1231**: 163-168, 1995.
  53. Inui, K., Okano, T., Maegawa, H., Kato, M., Takano, M. and Hori, R.: H<sup>+</sup>-coupled transport of p.o. cephalosporins via dipeptide carriers in rabbit intestinal brush-border membranes: difference of transport characteristics between cefixime and cephadrine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **247**: 235-241, 1988.
  54. Sugawara, M., Iseki, K., Miyazaki, K., Shiroto, H., Kondo, Y. and Uchino, J.: Transport characteristics of ceftibuten, cefixime and cephalixin across human jejunal brush-border membrane. *J. Pharm. Pharmacol.* **43**: 882-884, 1991.
  55. Yoshikawa, T., Muranushi, N., Yoshida, M., Oguma, T., Hirano, K. and Yamada, H.: Transport characteristics of ceftibuten (7432-S), a new oral cephem, in rat intestinal brush-border membrane vesicles: Proton-coupled and stereoselective transport of ceftibuten. *Pharm. Res.* **6**: 302-307, 1989.
  56. Tamai, I., Tomizawa, N., Kadowaki, A., Terasaki, T., Nakayama, K., Higashida, H. and Tsuji, A.: Functional expression of intestinal dipeptide/ $\beta$ -lactam antibiotic transporter in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem. Pharmacol.* **48**: 881-888, 1994.
  57. Wenzel, U., Gebert, I., Weintraut, H., Weber, W.-M., Clauß, W. and Daniel, H.: Transport characteristics of differently charged cephalosporin antibiotics in oocytes expressing the cloned intestinal peptide transporter PepT1 and in human intestinal Caco-2 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **277**: 831-839, 1996.
  58. Amasheh, S., Wenzel, U., Boll, M., Dorn, D., Weber, W.-M., Clauss, W. and Daniel, H.: Transport of charged dipeptides by the intestinal H<sup>+</sup>/peptide symporter PepT1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Membrane Biol.* **155**: 247-256, 1997.
  59. Amasheh, S., Wenzel, U., Weber, W.-M., Clauss, W. and Daniel, H.: Electrophysiological analysis of the mammalian renal peptide transporter expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Physiol. (Lond.)* **504**: 169-174, 1997.
  60. Wang, H., Fei, Y.-J., Ganapathy, V. and Leibach, F.H.: Electrophysiological characteristics of the proton-coupled peptide transporter PEPT2 cloned from rat brain. *Am. J. Physiol.* **275**: C967-C975, 1998.

61. Ramamoorthy, S., Liu, W., Ma, Y.-Y., Yang-Feng, T.L., Ganapathy, V. and Leibach, F.H.: Proton/peptide cotransporter (PEPT2) from human kidney: functional characterization and chromosomal localization. *Biochim. Biophys. Acta* **1240**: 1-4, 1995.
62. Ganapathy, M.E., Brandsch, M., Prasad, P.D., Ganapathy, V. and Leibach, F.H.: Differential recognition of  $\beta$ -lactam antibiotics by intestinal and renal peptide transporters, PEPT1 and PEPT2. *J. Biol. Chem.* **270**: 25672-25677, 1995.
63. Döring, F., Theis, S. and Daniel, H.: Expression and functional characterization of the mammalian intestinal peptide transporter PepT1 in the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**: 656-662, 1997.
64. Döring, F., Michel, T., Rösel, A., Nickolaus, M. and Daniel, H.: Expression of the mammalian renal peptide transporter PEPT2 in the yeast *Pichia pastoris* applications of the yeast system for functional analysis. *Mol. Membr. Biol.* **15**: 79-88, 1998.
65. Daniel, H. and Herget, M.: Cellular and molecular mechanisms of renal peptide transport. *Am. J. Physiol.* **273**: F1-F8, 1997.
66. Ries, M., Wenzel, U. and Daniel, H.: Transport of cefadroxil in rat kidney brush-border membranes is mediated by two electrogenic  $H^+$ -coupled systems.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **271**: 1327-1333, 1994.
67. Smith, D.E., Pavlova, A., Berger, U.V., Hediger, M.A., Yang, T., Huang, Y.G. and Schnermann, J.B.: Tubular localization and tissue distribution of peptide transporters in rat kidney. *Pharm. Res.* **15**: 1244-1249, 1998.
68. Hediger, M.A. and Rhoads, D.B.: Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters. *Physiol. Rev.* **74**: 993-1026, 1994.
69. Silbernagl, S., Ganapathy, V. and Leibach, F.H.:  $H^+$  gradient-driven dipeptide reabsorption in proximal tubule of rat kidney. Studies in vivo and in vitro. *Am. J. Physiol.* **253**: F448-F457, 1987.
70. Daniel, H. and Adibi, S.A.: Transport of  $\beta$ -lactam antibiotics in kidney brush border membrane. Determinants of their affinity for the oligopeptide/ $H^+$  symporter. *J. Clin. Invest.* **92**: 2215-2223, 1993.
71. Hori, R., Okano, T., Kato, M., Maegawa, H. and Inui, K.: Intestinal absorption of cephalosporin antibiotics: correlation between intestinal absorption and brush-border membrane transport. *J. Pharm. Pharmacol.* **40**: 646-647, 1988.
72. Miyamoto, Y., Ganapathy, V. and Leibach, F.H.: Identification of histidyl and thiol groups at the active site of rabbit renal dipeptide transporter. *J. Biol. Chem.* **261**: 16133-16140, 1986.
73. Kato, M., Maegawa, H., Okano, T., Inui, K. and Hori, R.: Effect of various chemical modifiers on  $H^+$  coupled transport of cephradine via dipeptide carriers in rabbit intestinal brush

- border membranes: role of histidine residues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **251**: 745-749, 1989.
74. Kramer, W., Girbig, F., Petzoldt, E. and Leipe, I.: Inactivation of the intestinal uptake system for  $\beta$ -lactam antibiotics by diethylpyrocarbonate. *Biochim. Biophys. Acta* **943**: 288-296, 1988.
  75. Kaback, H.R.: Site-directed mutagenesis and ion-gradient driven active transport: On the path of the proton. *Annu. Rev. Physiol.* **50**: 243-256, 1988.
  76. Shirvan, A., Laskar, O., Steiner-Mordoch, S. and Schuldiner, S.: Histidine-419 plays a role in energy coupling in the vesicular monoamine transporter from rat. *FEBS Lett.* **356**: 145-150, 1994.
  77. Wang, D., Balkovetz, D.F. and Warnock, D.G.: Mutational analysis of transmembrane histidines in the amiloride-sensitive  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger. *Am. J. Physiol.* **269**: C392-C402, 1995.
  78. Miles, E.W.: Modification of histidyl residues in proteins by diethylpyrocarbonate. *Methods Enzymol.* **47**: 431-442, 1977.
  79. Fei, Y.-J., Liu, W., Prasad, P.D., Kekuda, R., Oblak, T.G., Ganapathy, V. and Leibach, F.H.: Identification of the histidyl residue obligatory for the catalytic activity of the human  $\text{H}^+$ /peptide cotransporters PEPT1 and PEPT2. *Biochemistry* **36**: 452-460, 1997.
  80. Steel, A., Nussberger S., Romero, M.F. Boron, W.F., Boyd, C.A.R. and Hediger, M.A.: Stoichiometry and pH dependence of the rabbit proton-dependent oligopeptide transporter PepT1. *J. Physiol. (Lond.)* **498**: 563-569, 1997.
  81. Mackenzie, B., Loo, D.D.F., Fei, Y.-J., Liu, W., Ganapathy, V., Leibach, F.H. and Wright, E.M.: Mechanisms of the human intestinal  $\text{H}^+$ -coupled oligopeptide transporter hPEPT1. *J. Biol. Chem.* **271**: 5430-5437, 1996.
  82. Yeung, A.K., Basu, S.K., Wu, S.K., Chu, C., Okamoto, C.C., Hamm-Alvarez, S.F., von Grafenstein, H., Shen, W.-C., Kim, K.-J., Bolger, M.B., Haworth, I.S., Ann, D.K. and Lee, V.H.L.: Molecular identification of a role for tyrosine 167 in the function of the human intestinal proton-coupled dipeptide transporter (hPEPT1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **250**: 103-107, 1998.
  83. Döring, F., Dorn, D., Bachfischer, U., Amasheh, S., Herget, M. and Daniel, H.: Functional analysis of chimeric mammalian peptide transporter derived from the intestinal and renal isoforms. *J. Physiol. (Lond.)* **497**: 773-779, 1996.
  84. Pajor, A.M., Sun, N., Bai, L., Markovich, D. and Sule, P.: The substrate recognition domain in the  $\text{Na}^+$ /dicarboxylate and  $\text{Na}^+$ /sulfate cotransporter is located in the carboxy-terminal portion of the protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1370**: 98-106, 1998.
  85. Buck, K.J. and Amara, S.G.: Chimeric dopamine-norepinephrine transporters delineate

- structural domains influencing selectivity for catecholamines and 1-methyl-4-phenylpyridinium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 12584-12588, 1994.
86. Peter, D., Vu, Trung. and Edwards, R.H.: Chimeric vesicular monoamine transporters identify structural domains that influence substrate affinity and sensitivity to tetrabenazine. *J. Biol. Chem.* **271**: 2979-2986, 1996.
  87. 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.
  88. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.: Extraction, purification, and analysis of messenger RNA from eukaryotic cells. *In Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., pp.7.26-7.29, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
  89. Uchida, S., Sasaki, S., Furukawa, T., Hiraoka, M., Imai, T., Hirata, Y. and Marumo, F.: Molecular cloning of a chloride channel that is regulated by dehydration and expressed predominantly in kidney medulla. *J. Biol. Chem.* **268**: 3821-3824, 1993.
  90. 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.
  91. 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.