S1-05

小腸オリゴペプチドトランスポーターの組織・細胞内分布と薬物輸送特性

金沢大・薬 ○玉井 郁巳、林 喜代美、崔 吉道、辻 彰、
金沢大・医 東田 陽博、
徳島大・医 白神 俊幸、宮本 賢一、武田 英二

TISSUE- AND INTRA-CELLULAR DISTRIBUTION OF INTESTINAL OLIGOPEPTIDE TRANSPORTER AND ITS FUNCTIONAL CHARACTERIZATION

Ikumi TAMAI¹, Kiyomi HAYASHI¹, Yoshimichi SAI¹, Akira
TSUJI¹, Haruhiro HIGASHIDA², Toshiyuki SHIRAGA³, Ken-ichi
MIYAMOTO³ and Eiji TAKEDA³

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences and ²School of Medicine,
Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan and ³School of
Medicine, Tokushima University, Tokushima 770, Japan.

【目的】 β -ラクタム抗生物質には多くの誘導体が存在するが、側鎖 α 位にアミノ基を有するアミノ- β -ラクタム抗生物質をはじめとして、脂溶性が低いにもかかわらず消化管吸収性の良好な誘導体がある。このことから小腸上皮細胞において何らかの特殊輸送系、特にオリゴペプチド輸送系の関与が考えられ、多くの研究がなされてきた。近年、プロトン勾配を駆動力とするオリゴペプチド輸送担体PepTファミリーが米国Leibach等のグループや我々を含め、いくつかのグループによって、ウサギ、ヒトおよびラット小腸から相次いでクローニングされた(1-5)。これらの輸送担体は、Northern解析等により消化管以外の臓器にも発現していることが明らかにされているが(1-5)、ファミリーによって、また種によっても分布が異なり、消化管からの β -ラクタム抗生物質吸収への寄与を含め、その他の輸送への関与については、いまだ完全に明らかになっていない。本研究では、消化管からの β -ラクタム抗生物質吸収に対するオリゴペプチド輸送担体PepT1の寄与を明らかにする目的で、ラット小

腸から単離されたクローン、ラットPepT1の輸送特性を外来性遺伝子発現系を用いて解析した。また、本輸送系が経細胞輸送のいずれの過程に関与するかを明らかにする目的で、小腸上皮細胞における細胞内局在性および組織分布について免疫化学的手法等を用いた検討を加えた。

【方法】 ウサギPepT-1 (1) の塩基配列をプローブにそのラットホモログを小腸cDNAライブラリーから単離し、得られたクローンの輸送活性を、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた外来遺伝子発現系により評価した。ジペプチド、グリシルザルコシンの取り込みは放射性標識体を用いることにより、また薬物の定量はHPLCで行った。抗PepT1ポリクローナル抗体は以下のように作成した。PepT1のアミノ酸配列を基に抗原ペプチドを設計、合成した。合成ペプチドを*m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimide-esterによりキャリア蛋白 (keyhole limpet hemocyanin) と架橋し、50-100 μ gペプチド当量にアジュバントを加えエマルジョン化し約2週間おきにウサギに免疫した。その後、抗血清を得、適宜アフィニティカラム等により精製した。

【結果および考察】 ラットPepT1の[14 C]glycylsarcosineに対する輸送活性をアフリカツメガエル卵母細胞を用いて検討したところ、顕著なpH依存的輸送能を示した。その輸送は、種々のジ-およびトリペプチドによって阻害されたが、構成アミノ酸、およびテトラ-またはペンタペプチドによる阻害は見られなかった (図1)。従って、本輸送担体がジ-およびトリペプチドを特異的に認識するオリゴペプチドトランスポーターであることが示された。このラットPepT1の β -ラクタム抗生物質輸送能を、ジカルボン酸型および両性イオン型誘導体としてセフチブテンおよびセファドロキシルをそれぞれ選り検討したところ、いずれの基質に対してもpH依存的輸送活性が見られた。さらに、セフチブテンについてはトランス体とシス体で輸送活性に違いがあり、PepT1は立体選択性も有してい

図1 ラットPepT1による $[^{14}\text{C}]$ グリシルサルコシン取込みに対する阻害効果。

図2 抗PepT1抗体による空腸PepT1の免疫染色。左:抗PepT1抗血清, 右:正常血清, V:絨毛。

ることが示された。以上の結果より、単離したラットPepT1がオリゴペプチドおよび β -ラクタム抗生物質を輸送することが明らかとなった。

β -ラクタム抗生物質の小腸での輸送におけるPepT1の寄与について、小腸上皮全mRNAを卵母細胞に微注入し、PepT1翻訳開始領域に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果を検討したところ、セフトチブテンの輸送活性がほぼ対照群と同程度まで減少した。同様の結果はウサギ小腸mRNAによる輸送活性についても得られ、 β -ラクタム抗生物質の輸送にPepT1が非常に大きな役割を担っているものと考えられた。

PepT1の組織分布をNorthern解析により検討したところ、ウサギおよび

ヒトと同様、小腸および腎に多く発現していたが、ウサギおよびヒトとは異なり肝での発現は少なかった。小腸上皮細胞におけるPepT1の細胞内局在性および組織分布性について、PepT1に対するポリクローナル抗体を作成し、小腸上皮細胞の細胞分画および各組織切片固定標本との反応性を検討した。その結果、主に小腸上皮細胞刷子縁膜に存在することが示された(図2)。

以上、本輸送担体が、 β -ラクタム抗生物質の消化管吸収に大きな寄与を持つこと、更に消化管管腔から上皮細胞への吸収過程において機能している可能性が示唆された。

【ABSTRACT】 Function and tissue- and intra-cellular distributions of rat intestinal oligopeptide transporter, rat PepT1, cloned as a homologue of rabbit PepT1, were studied. Functional characteristics of a rat PepT1 were evaluated by measuring transport activities expressed in *Xenopus laevis* oocytes injected with complementary RNA for PepT1 synthesized by *in vitro* transcription. Rat PepT1 exhibited a pH-dependent transport of [^{14}C]glycylsarcosine and the transport was specifically inhibited by di- and tripeptides but not by their constitutive amino acids or tetra- and pentapeptides. Rat PepT1 also transported β -lactam antibiotics with pH-dependent and stereoselective manners. Furthermore, transport activities expressed in oocytes injected with intestinal total mRNA were abolished by the hybridization of the mRNA with an antisense oligonucleotide against PepT1. Polyclonal antibody against PepT1 was prepared and used for immunohistochemical analysis of PepT1. PepT1 was strongly detected in intestinal epithelium, especially in the brush-border side. Accordingly, PepT1 was shown to function in the uptakes of oligopeptides and peptide-like drugs from intestinal lumen to epithelial cells.

【REFERENCES】

- 1) Fei, Y.-J. *et al.*, *Nature*, **368**, 563-566 (1994).
- 2) Liang, R. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **270**, 6456-6463 (1995).
- 3) Liu, W. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1235**, 461-466 (1995).
- 4) 奥田真弘等、日本薬学会第115年会要旨集4、pp. 103 (1995).
- 5) Miyamoto, K. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, submitted.