S1-06

ペプチド輸送体を介する β -ラクタム系抗生物質輸送の
分子・細胞生物学的解析○齋藤秀之、寺田智祐、向井真由美、奥田真弘、乾 賢一
京大・医・病院薬剤部MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY OF β -LACTAM ANTIBIOTIC
TRANSPORT VIA PEPTIDE TRANSPORTERHideyuki SAITO, Tomohiro TERADA, Mayumi MUKAI, Masahiro OKUDA, and
Ken-ichi INUI

Department of Pharmacy, Kyoto University Hospital

【目的】小腸並びに腎尿細管の上皮細胞には、2~3個のアミノ酸からなるオリゴペプチドを能動的に輸送する H^+ 駆動型ペプチド輸送体が発現しており、タンパク質の吸収・恒常性維持に重要な役割を担っている。ペプチド輸送体は広範な基質認識能を有するため、 β -ラクタム系抗生物質やbestatin等のペプチド類似薬物を誤認識し輸送することが、膜小胞系や培養細胞系を用いた薬物輸送研究によって解明されてきた(1-4)。一方、荷電状態が異なったり多様な側鎖を持つ β -ラクタム系抗生物質が、同一のペプチド輸送体によって認識され得るのか、あるいは輸送体が複数種存在し、それぞれの基質認識性に合致した薬物の輸送を媒介しているのか不明の点も多い。さらに、腎特異的なペプチド輸送体の存在も示唆されていることから、ペプチド様薬物の吸収・排泄といった動態制御過程に多様なペプチド輸送体群の関与している可能性が推察される。本研究では、ペプチド輸送体を介する薬物輸送の分子機構論的解析を目的とし、ラットに発現しているペプチド輸送体のcDNAクローニングと、それに基づく構造解明、臓器分布並びに β -ラクタム系抗生物質の認識特性について検討を加えた。

【方法】Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)及びcDNAライブラリーのスクリーニング: ウサギ小腸オリゴペプチド輸送体PEPT1(5)のアミノ酸配列を基に degenerate primerを合成し、ラット組織mRNAを用いてRT-PCRを行った。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(λ gt22A)をスクリーニングし、最終的にラットPEPT1及びPEPT2 cDNAを単離した。各々の塩基配列は、pSPORT1にサブクローニングした後、合成primer及びSequenaseTMを用いて決定した。in vitroトランスレーション: ウサギ網状赤血球ライセートを用いて、ラットPEPT1 cRNAの³⁵S-methionine標識翻訳産物を電気泳動で分離後検出した。ノーザンブロット分析: ラットの各組織由来mRNAをホルムアルデヒド含有アガロースゲルで分離後、ナイロンメンブランにブロットイングし、³²P標識PEPT cDNAを用いてハイブリダイゼーションを行った。ウェスタンブロット分析: ラットPEPT1のC末端部合成ペプチドに対するウサギ抗血清並びにHRP標識二次抗体を用い、小腸及び腎皮質刷子縁膜に局在するPEPT1の免疫学的検出を行った。アフリカツメガエル卵母細胞翻訳系による輸送機能発現: ラットPEPT cDNAを鋳型として合成したcRNAを卵母細胞に注入後19℃で一定期間培養し、 β -ラクタム系抗生物質の取り込み活性を測定した。薬物の定量は除タンパク・抽出後、HPLCによって行った。

【結果・考察】ラットPEPT1の構造、臓器分布及び輸送機能(6): cDNAライブラリーより単離したラットPEPT1 cDNAは全長2,929 bpであり、open reading frameには710個のアミノ酸からなる12回膜貫通型タンパク質がコードされていた。ラットPEPT1とウサギ及びヒトPEPT1(7)との相同性を比較したところ、一致するアミノ酸はそれぞれ77%及び83%であったが、9番目と10番目の膜貫通 α -ヘリックス間に存在する細胞外ループの相同性はいずれも低いことがわかった(Fig. 1)。

ratPEPT1	1	MGMSKSRGCGYPLSIFFIIVNEFCERFSYGMRALLVLYFRNFLGWDDDLSTAIYHTFV	M1
rabbitPEPT1		...LS.....I.....I.....N..V.....	
humanPEPT1		...HSF.....I..I...T..IS..N.....	
ratPEPT1	61	ALCYLTPILGALIADSWLGKFKTIVSLSIYVTIGQAVISVSSINDLTDHHDGSPNNLPL	M2
rabbitPEPT1		A.....W.....T.L..V.E...NN..T.DS..V	M3
humanPEPT1		T.....N.....T.DS..V	
ratPEPT1	121	HVALSMIGLALIALGTGGIKPCVSAFGGDQFEEGQEQQRNRFSSIFYLAINAGSLLSTII	M4
rabbitPEPT1		...VC...L.....	M5
humanPEPT1		...V..L.....	
ratPEPT1	181	TPILRVQCGIHSQQACYPLAFGVPAALMAVALIVFVLGSGMYKKFQPQGTSSGKVAKCI	M6
rabbitPEPT1		..MV.....VK.....I..I...S...II.....K...NLS..V...	
humanPEPT1		..M.....K.....K...NIM.....	
ratPEPT1	241	GFAIKNFRHRSKAFPKREHWLDWAKEYDERLISQIKMVTKVMFLYIPLPMFWALFDQQ	M7
rabbitPEPT1		C.....Q.....A.....R.L.....	
humanPEPT1		R.....	
ratPEPT1	301	GSRWTLQATTMTGKIGTIEIQPDQMQTVNAILIVIMVPIVDVAVVYPLIAKGFNFTSLKK	M8
rabbitPEPT1		S.R..IL.....T...I.L...M.....L.....	
humanPEPT1		S...AL.....F...L.....	
ratPEPT1	361	MTVGMFLASMAFVVAIVQVEIDKTLPVFPSPGNQVQIKVLNIGNNDMAVYFPGKNVTVAQ	M9
rabbitPEPT1		..I.....A...L.....KA.E.....V.SEN.IISL..QT..LN.	
humanPEPT1		..A...V.....K..E.....T.NISL..EM..LGP	
ratPEPT1	421	MSQTDTFMTFDVDQLTSINVSSPGSPGVTTVAHEFEPGHRHTLLVWVGNLYRVVKDGLNQ	
rabbitPEPT1		...NE...NE.T...IT.-..Q-..MITPSL.A.Q.....A..N...N...T.	
humanPEPT1		...NA.....NK..R..I.....-..A.TDD.KQ.Q.....A..H.Q..T.	
ratPEPT1	481	KPEKGENGIRFVSTLNEMITIKMSGKVYENVTSHSASNYQFFSPGQKDYTINTTEIAPNC	
rabbitPEPT1		..SD.....N.YSQP.NVT.....HIA.YN..E...T..V.GF.VSSAG.SEQ.	
humanPEPT1		N.F..L...T.....A.IS.YN..T.....I.GF..SS...P.Q.	
ratPEPT1	541	SSDFKSSNLDFGSAYTYVIRSRASDGCLEVKEFEDIPPNTVNMAIQIPQYFLLTCGEVVF	M10
rabbitPEPT1		RR..E.PY.E.....L.T.Q.TG-.PQ.T.....M...W.....I.S....	
humanPEPT1		QPN.NTFY.E.....IVQ-.KN.S.PK..V....SA.....	
ratPEPT1	601	SVTGLEFSYSQAPSNMKSVLQAGWLLTVAIGNIIVLIVAEAGHFDKQWAEYVLFASLLLV	M11
rabbitPEPT1		..I.....V.....G..QIN.....I..A....	M12
humanPEPT1		V.....G..Q.S.....I..A....	
ratPEPT1	661	VCIIFAIMARFYTYINPAEIEAQFDEDEKKKGVGKENPYSSLEPVVSQTNM 710	
rabbitPEPT1		..V.....V.....E.....NPE.NDL.P..A.....Q.	
humanPEPT1		..V.....NRLE.S....FMSGAN..KQ.	

Fig. 1. ラット、ウサギ並びにヒトPEPT1のアミノ酸配列の相同性. ・はラットPEPT1と一致するアミノ酸を示す. アミノ酸配列上の実線(M1 - M12)は推定細胞膜貫通領域.

ラットPEPT1 cDNAを鋳型として合成したRNAを用いて*in vitro*トランスクリプションを行った結果、ラットPEPT1は分子量約75 kDaの糖タンパク質であることが示された。ノーザンブロット分析並びにRT-PCRによってPEPT1の臓器分布を調べた結果、PEPT1 mRNAの発現は小腸に最も多く、腎皮質でも若干認められた。そこで小腸及び腎皮質の刷子縁膜を分離精製

し、PEPT1に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、いずれの組織においても分子量75 kDaのバンドが検出された(Fig. 2)。また免疫染色によって、ラットPEPT1のcRNAを注入した卵母細胞膜上にPEPT1タンパク質の発現していることが確認された。ラットPEPT1 cRNA注入卵母細胞では、 H^+ 勾配存在下でceftibuten及びcephradineの取り込みが顕著に増大した。またこれら薬物の取り込み活性は、過剰量のジベプチド共存によって阻害された。ラットPEPT1発現卵母細胞を用いて、ceftibuten及びcephradine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結果、見かけの K_m 値はそれぞれ0.9 mM及び12 mMであった(Fig. 3)。従って、ceftibutenはラットPEPT1に対してcephradineよりも約14倍高い親和性を有することがわかった。

ラットPEPT2の構造及び臓器分布(8):

ラットPEPT2 cDNAは全長3,938 bpであり、729個のアミノ酸か

らなる12回膜貫通型タンパク質をコードするopen reading frameを有していた。ラットPEPT2とPEPT1間の相同性は48%であり、特に推定膜貫通領域では高いアミノ酸保存性が見られた(Fig. 4)。ラットPEPT2とヒトPEPT2(9)との相同性は82%であった。ノーザンブロット分析の結果、ラットPEPT2 mRNAは腎髄質に最も強く発現しており、脳及び肺でも検出されたが、小腸では認められなかった。

以上の結果から、ラットPEPT1は小腸並びに腎皮質の刷子縁膜に発現している分子量約75 kDaの12回膜貫通型タンパク質であること、アニオン型ceftibuten及び両性イオン型cephradineを基質として認識し、 H^+ 勾配依存的に輸送することが明らかとなった。またラッ

Fig. 2. ウェスタンブロッティングによるラット小腸及び腎尿管細管刷子縁膜におけるPEPT1の検出。

Fig. 3. ラットPEPT1 cRNA注入卵母細胞におけるceftibuten及びcephradine取り込みの濃度依存性。

トPEPT2は、PEPT1と共通のペプチド輸送体ファミリーに属する12回膜貫通型タンパク質であること、PEPT2 mRNAの臓器分布はPEPT1の場合とは異なり、腎にはほぼ特異的に発現していることがわかった。今後さらに、PEPT1とPEPT2の薬物認識、臓器分布、細胞膜局在性及び種差等の分子的解析を基盤とし、 β -ラクタム系抗生物質を含むペプチド類似薬物の吸収・分泌制御におけるペプチド輸送体群の薬物動態学的寄与を解明することによって、得られた情報を輸送体-薬物間相互作用の構造活性相関や製剤設計に還元し得るものと考ええる。

Fig. 4. ラットPEPT2の推定二次構造。●はラットPEPT1と一致するアミノ酸、○は異なるアミノ酸を示す。下図は両輸送体の疎水性プロット。

ABSTRACT A complementary DNA (cDNA) encoding the rat H^+ -coupled peptide transporter, designated PEPT1, was isolated, and the transport characteristics of orally active β -lactam antibiotics were assessed by measuring uptake into *Xenopus* oocytes expressing the rat PEPT1. The rat PEPT1 cDNA encoded a 710-amino acid protein with 77% and 83% identity to the rabbit PEPT1 and human PEPT1, respectively. The message for rat PEPT1 was 2.9 kilobases and was found predominantly in the small intestine, whereas reverse transcription-polymerase chain reaction amplification revealed that the message was expressed both in the small intestine and in the kidney cortex. The 75-kDa protein was identified by translation of *in vitro* synthesized transcript of rat PEPT1 cDNA using rabbit reticulocyte lysates and by Western blot analysis using a specific antibody against the rat PEPT1. When expressed in oocytes, rat PEPT1 stimulated the uptake of cefitibuten (anion) and cephadrine (zwitterion) in the presence of an inward H^+ gradient, and the expressed uptake was inhibited by excess dipeptides. Kinetic analysis revealed that cefitibuten has 14-fold higher affinity for the rat PEPT1 than cephadrine. Thus, the rat PEPT1 mediates H^+ -coupled uphill transport of the oral β -lactam antibiotics across the brush-border membranes of intestinal and renal proximal tubular cells. We also isolated a cDNA encoding another member of peptide transporter family, rat PEPT2. The rat PEPT2 consists of 729 amino acids with 48% amino acid identity to the rat PEPT1. In contrast to the rat PEPT1, mRNA expression of rat PEPT2 was predominant in the kidney medulla, and was also detected in the brain and lung tissues, but not in the small intestine. These peptide transporters should be responsible for intestinal absorption and/or for renal handling of peptide-like drugs such as β -lactam antibiotics.

REFERENCES (1) K. Inui *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **769**, 449 (1984) (2) T. Okano *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **261**, 14130 (1986) (3) A. Tsuji *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **241**, 594 (1987) (4) H. Saito and K. Inui, *Am. J. Physiol.*, **265**, G289 (1993) (5) Y.-J. Fei *et al.*, *Nature*, **368**, 563 (1994) (6) H. Saito *et al.*, submitted. (7) R. Liang *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **270**, 6456 (1995) (8) H. Saito *et al.*, submitted. (9) W. Liu *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1235**, 461 (1995)