S1-07

ペプチドトランスポータの薬物認識機構に関する
分子・細胞生物学的解析○寺田智祐、高橋一栄、中村暢彦、齋藤秀之、乾 賢一
京大・医・病院薬剤部MOLECULAR AND CELL BIOLOGICAL ANALYSES OF DRUG RECOGNITION
BY RAT PEPTIDE TRANSPORTERSTomohiro TERADA, Kazushige TAKAHASHI, Nobuhiko NAKAMURA,
Hideyuki SAITO, and Ken-ichi INUI
Department of Pharmacy, Kyoto University Hospital

【目的】小腸や腎尿細管上皮細胞に発現するH⁺駆動型ペプチドトランスポータは、経口用β-ラクタム抗生物質などのペプチド類似薬物の輸送担体として機能しており、薬物動態学的に重要な役割を担っている¹⁻³⁾。我々は2種のラットH⁺駆動型ペプチドトランスポータ(PEPT1及びPEPT2)のcDNAクローニングと、それに基づく構造・機能並びに臓器分布に関する比較解析を行ってきた⁴⁻⁶⁾。一方、両トランスポータの機能的相違点や、β-ラクタム抗生物質の腎動態制御における役割など、不明の点が残されている。そこで本研究では、遺伝子導入に基づくPEPT1及びPEPT2安定発現上皮細胞を確立し、薬物認識特性の比較精査を行うとともに、ラット腎尿細管刷子縁膜におけるβ-ラクタム抗生物質輸送との相関について検討を加えた。

【方法】ラットPEPT安定発現系による輸送機能発現:リン酸カルシウム共沈法によって、ラットPEPT1またPEPT2 cDNA挿入発現ベクターを培養腎上皮細胞LLC-PK₁にトランスフェクションした。遺伝子導入細胞はG418耐性獲得をマーカーとして選別し、最終的に[¹⁴C]Glycylsarcosine (Gly-Sar)輸送活性を指標として安定発現細胞(LLC-rPEPT1及びLLC-rPEPT2細胞)を単離した⁷⁻⁸⁾。単層培養したPEPT発現細胞を用いて、Gly-Sar取り込み活性、及び種々薬物共存による競合阻害について検

討した。ラット腎皮質刷子縁膜小胞による輸送機能解析: Mg²⁺沈殿法によって調製したラット腎皮質刷子縁膜小胞(BBMV)を用い、Gly-Sarの輸送特性について調べた。

【結果・考察】ウエスタンブロッティングの結果、ラット腎皮質刷子縁膜にはPEPT1(75kDa)並びにPEPT2(105kDa)の発現が認められた。腎BBMV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結果、高親和性型並びに低親和性型の2種のペプチドトランスポータの介在することが示唆された。そこで、LLC-rPEPT1及びLLC-rPEPT2細胞におけるGly-Sarの輸送パラメータを算出した結果、PEPT2はPEPT1に比べて高親和性であることがわかった(Fig. 1)。BBMVを用いて得られた2つのK_m値と各安定発現細胞より得られたK_m値がそれぞれ対応した値を示したことから、膜小胞系により示された低親和性トランスポータがPEPT1であり、高親和性トランスポータがPEPT2であることが示唆された⁸⁾。

Fig. 1. LLC-rPEPT1並びにLLC-rPEPT2細胞におけるGly-Sar取り込みの濃度依存性.

次にGly-Sar取り込み (20 μM) に及ぼす種々 β -ラクタム抗生物質共存の影響について検討を行った。LLC-rPEPT1細胞における阻害の強さは、cyclacillin > ceftibuten > cefadroxilの順であり、一方LLC-rPEPT2細胞では、cefadroxil > cyclacillin > ceftibutenの順であった (Fig. 2)。種々 β -ラクタム抗生物質の阻害

Fig. 2. LLC-rPEPT1並びにLLC-rPEPT2細胞によるGly-Sar取り込みに及ぼす β -ラクタム抗生物質の阻害曲線。

定数 (K_i 値) を阻害曲線より算出しPEPT1とPEPT2間で比較した結果、 α -アミノ基を有する β -ラクタム抗生物質に対しては、PEPT2の方がより高い親和性を示し、一方 α -アミノ基を持たないceftibutenやcefiximeに対してはPEPT1の方が高い親和性を有することが判明した⁸⁾。また一部の薬物を除いてラットPEPT1から求められた K_i 値は、ヒト腸由来の培養上

皮細胞Caco-2 (ヒトPEPT1発現細胞) より算出された K_i 値とほぼ対応していた。一方腎BBMVにおけるGly-Sar取り込みはcefadroxil > cyclacillin > ceftibutenの順に阻害され、LLC-rPEPT2細胞と同様のパターンを示した。PEPT安定発現細胞並びにBBMVにおいて得られた種々 β -ラクタム抗生物質の K_i 値を比較解析したところ、BBMVにおける K_i 値はPEPT1よりもPEPT2の K_i 値と良い相関を示した。従ってこれらの β -ラクタム抗生物質は低濃度域においては尿細管刷子縁膜に発現するPEPT2と強く相互作用することが示された。さらに化学修飾並びに点変異導入法によって、第2及び4膜貫通ドメインに位置する保存性ヒスチジン残基がPEPT1の多様な薬物認識機構に関わっている可能性が示された⁹⁾。

今後PEPT1並びにPEPT2の輸送活性調節機構、基質認識領域の検索及び種差に関する分子解析を展開することによって、ペプチド類似薬物の体内動態制御機構、並びにペプチドトランスポーターをターゲットとする医薬品分子設計や製剤開発に新たな情報を提供し得るものと考えられる。

ABSTRACT PEPT1 and PEPT2 are H^+ -coupled peptide transporters expressed preferentially in the intestine and kidney, respectively, which mediate uphill transport of oligopeptides and peptide-like drugs such as β -lactam antibiotics. In the present study, we have compared the recognition of β -lactam antibiotics by LLC-PK₁ cells stably transfected with rat PEPT1 or PEPT2 cDNA. Among the examined drugs, cyclacillin (aminopenicillin) and cefadroxil (aminocephalosporin) showed the most potent inhibitory effects on glycylsarcosine uptake in PEPT1- and PEPT2-expressing cells, respectively. Comparison of the K_i values of β -lactam antibiotics between PEPT1- and PEPT2-expressing cells suggested that PEPT2 had a much higher affinity for β -lactam antibiotics with an α -amino group. We have examined interactions of β -lactam antibiotics with rat renal brush-border membrane vesicles, in which PEPT1 and PEPT2 appeared to be coexpressed. The apparent K_i values of the antibiotics for glycylsarcosine transport were closely correlated with those in the PEPT2-expressing cells, suggesting that β -lactam antibiotics interact predominantly with PEPT2 rather than PEPT1 in renal brush-border membranes. In conclusion, 1) PEPT1 and PEPT2 show different recognitions of β -lactam antibiotics, and 2) β -lactam antibiotics predominantly interact with renal PEPT2 at pharmacological concentrations.

REFERENCES (1) T. Okano *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **261**, 14130 (1986) (2) K. Inui *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **261**, 195 (1992) (3) S. Matsumoto *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **270**, 498 (1994) (4) H. Saito *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**, 1631 (1995) (5) H. Saito *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1280**, 173 (1996) (6) H. Ogihara *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **220**, 848 (1996) (7) T. Terada *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **281**, 1415 (1997) (8) T. Terada *et al.*, *Am. J. Physiol.*, in press. (9) T. Terada *et al.*, *FEBS Lett.*, **394**, 196 (1996)