原著 1

近位尿細管管腔膜側に存在するヒト有機陰イオントランスポーターhOAT4 (human Organic Anion Transporter 4) における尿酸輸送の解析

木村 弘章¹⁾ 市田 公美¹⁾ 細山田 真²⁾
大野 岩男¹⁾ 遠藤 仁²⁾ 細谷 龍男¹⁾

要 約

有機陰イオントランスポーターのファミリーとしてhuman Organic Anion Transporter4 (hOAT4) が新たに同定され、免疫染色によって、hOAT4 がヒト腎臓近位尿細管上皮細胞の管腔側に局在していることを示した。さらにhOAT4安定発現細胞を作製し、親和性は低いものの尿酸輸送を確かめ、尿酸排泄促進薬の1部がその輸送を阻害することを示したものである。

緒 言

ヒトの腎臓における尿酸輸送は近位尿細管において再吸収と分泌をうけて、糸球体濾過された尿酸の約10%が排泄されている¹⁾。近位尿細管での尿酸輸送にトランスポーターの関与が示唆されているが、管腔膜側では、特にその分子の実態は未だあきらかになくなっていく尿酸排泄促進薬の作用点も不明のままである。

近位尿細管膜ベジクルを用いた生理学的な実験によって尿酸のトランスポーターは、管腔側と基底膜側にOH⁻/UA exchangerとCl⁻/UA exchangerの2種類のexchangerの存在が考えられている^{2,3)}。特に管腔側においてはUA/anion (ニコチン酸、乳酸、ピラジニカルボン酸) exchangerの存在が考えられている⁴⁾。また、管腔側と基底膜側にそれぞれ電位依存性チャネルの存在が考えられており、1997年に報告されたUAT (URATE TRANSPORTER) がその候補であると考えられている^{5,6)}。

尿酸は、有機陰イオンの1つであり、腎臓における尿酸分泌機構がパラアミノ馬尿酸 (以下 PAH) などの有機陰イオン排泄機構と一部共通である可能性が考えられていた。そこで、PAH を使用し発現クローニング方で同定された有機陰イオントランスポーターによる尿酸輸送解析がおこなわれた。現在までヒトに関しては、近位尿細管基底膜側に存在するヒト有機陰イオントランスポーターhOAT1, hOAT3が尿酸輸送をおこない、OH⁻/UA exchangerとして尿酸分泌をおこなっていることがわかっている⁷⁻¹¹⁾。

ヒト胎盤より有機陰イオントランスポーターファミリーとしてクローニングされたヒト有機陰イオントランスポーターhOAT4が腎臓に存在することが報告されている¹²⁾。hOAT4の輸送基質としてestrone sulfateなどの硫酸抱合体やdihydroepiandrosteroneなどの内因性物質の他、薬剤などの外因性物質が報告されている¹²⁾。

本研究に関して、hOAT4の腎臓での局在を免疫染色で明らかにし、hOAT4の安定発現細胞株を作出することにより、hOAT4の尿酸輸送活性を明らかにし、ヒト腎臓における尿酸輸送への関与、尿酸排泄促進薬の影響について検討した。

方 法

1) ヒト腎臓における免疫染色

使用された腎臓は、腎臓癌によって腎摘出術がおこなわれた患者に説明をし同意を得て使用した (承諾: 杏林大学IRB)。摘出腎の健常部位

1) 東京慈恵会医科大学腎臓・高血圧内科

2) 杏林大学医学部薬理

Hiroaki Kimura, kimiyoshi Ichida, Iwao Oono and
Tatsuo Hosoya
Makoto Hosoyamada and Hitoshi Endou

のみを2 μ mのスライスとして用いた。1次抗体としてヤギ血清ポリクローナル抗体、2次抗体としてhOAT4抗血清抗体1000倍(ラビットより作製)を用いた。また、コントロールとして2次抗体であるhOAT4抗血清抗体を用いず染色したものを作成した。

2) hOAT4安定発現細胞株の作出

hOAT4cDNA全長を含むインサートをpcDNA3.1にサブクローニングした。発現させる細胞として、SV40大型T抗原遺伝子導入トランスジェニックマウスの腎臓の近位尿管S2セグメント由来の不活化細胞株を用いた。

hOAT4cDNA-pcDNA3.1プラスミドをリポフェクション法により遺伝子導入を行い、G418を用いて選択を行い、hOAT4安定発現マウス近位尿管S2セグメント細胞を樹立した。Mockとして、pcDNA3.1プラスミドのみを導入したマウス近位尿管S2セグメント細胞を樹立して使用した¹³⁾。

3) コンフォーカルレーザー顕微鏡によるhOAT4安定発現細胞の免疫染色

hOAT4安定発現細胞をスライドガラス上で2~3日培養しコンフルエントになった状態で5%パラフォルムアルデヒドで固定した。hOAT4抗血清抗体(1000倍)を使用し蛍光色素としてcy3、核染色のための蛍光色素としてsyto13を用いた。X-Y平面とX-Z平面の2画面を示した。

4) 尿酸取り込み実験

hOAT4安定発現細胞とmock細胞を24穴プレートに2~3日培養しコンフルエントになった状態で取り込み実験を行った。1mMグルタミン、1mM乳酸、1mMピルビン酸を添加したハanks液pH7.4(127mM NaCl, 5.0mM KCl, 0.33mM Na₂HPO₄, 0.44mM KH₂PO₄, 0.8mM MgSO₄, 1.0mM MgCl₂, 10mM Tris)に置換してプレインキュベーションを行った後に、20 μ Mの¹⁴C-尿酸をトレーサーとして含む300 μ M尿酸を用いて取り込み実験を行った。37℃で10分間取り込みをおこなった後にice coldのハanks液にて3回洗浄した。1N NaOHにて細胞を溶解した後4NHClにて中和し、アクアゾールを添加してシンチレーシ

ョンカウンターで¹⁴C-尿酸取り込み量を測定した(mean $\pm$ SE, n=3)。

5) hOAT4のgenomic structureの決定

ゲノムデータベースリサーチより引用し、hOAT4のクロモゾーム上での局在とイントロエクソンジャンクションを決定した。

結 果

1) 免疫染色

Fig.1は、hOAT4蛋白がヒト腎臓近位尿管の管腔膜側に局在していることを示した。また、コントロールとしてhOAT4抗血清抗体を使用しなかったものは、染色が認められなかった(not shown)。Fig.2は、X-Z平面においてhOAT4安定発現細胞が、hOAT4蛋白を上皮側に発現していることを確かめ、トランスウエル等は使用せず、プレート上で上皮側で取り込み実験を行った。

Fig-1 Immunohistochemical analysis of hOAT4 in the kidney of human

The section (2 μ m) of human kidney were dewaxed, rehydrated and treated with 10% H₂O₂ for 10min to eliminate endogenous peroxidase activity. After rinsing in 0.05 M Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20, the sections were incubated with anti-hOAT4 antiserum (1:1000) overnight at 4°C. Thereafter, they were treated with Envision (+) rabbit peroxidase (DAKO, Carpinteria, CA) for 30 min. They were finally developed in 0.02% diaminobenzidine (DAB) with 0.02% H₂O₂. The sections were counterstained with hematoxylin and examined by light microscopy.

Fig-2 Confocal laser scanning micrographs of S2-hOAT4 cells transfected with hOAT4 cDNA constructs

Confocal laser scanning micrographs of S2-hOAT4 cells transfected with hOAT4 cDNA constructs, using the antiserum antibody with cy3 to detect hOAT4 protein (green fluorescence) and syto13 to stain nuclei (red fluorescence). A shows optical section in the xy-plane, whereas B shows the corresponding vertical section in the xz-plane.

2) hOAT4発現細胞による尿酸輸送の時間依存性と濃度依存性

300 μ Mの 14 C-尿酸を用いて、マウスS2細胞に発現したhOAT4による基質の取り込みの時間依存性をFig3に示した。hOAT4による尿酸の取り込みは10～25分までほぼ直線的に増加した。それ以降は取り込み速度は減少し、プラトーを示した。Fig.4にはhOAT4による尿酸の取り込みの濃度依存性を示した。Eadie-Hofstee plotで直線を示すところからミカエリス・メンテン型の濃度依存性の輸送を示し、トランスポーター輸送が行われているといえる。hOAT4による尿酸取り込みは、 K_m 値は $3779.6 \pm 78.0 \mu$ M、 V_{max} は $12118.0 \pm 97.0 \text{ pmol/mg protein/min}$ となった。

Fig-3 Time course of 14 C-urate uptake via hOAT4

Closed circles and square with solid lines represent 14 C-urate uptake in various uptake times by S2-hOAT4 cells and S2-pcDNA3.1 cells, respectively. The solution for urate uptake was Hank's buffer containing 300 μ M of cold urate and 20 μ M of 14 C-urate. The vertical axis on the left side represent urate uptake by the cells respectively. Each data was calibrated with average protein content of three other wells in the same 24-well plate used for uptake study.

Fig-4 Concentration dependence of 14 C-urate transport via hOAT4

Closed circle with solid line represent 14 C-urate via hOAT4 in various substrate concentrations. The uptakes were experimented at 37°C for 10min. The transport via hOAT4 was calculated by subtracting the uptakes by S2-pcDNA3.1 cells from the uptakes by S2-hOAT4 cells. Each point represents a data derived from three well. The lines were predicted using V_{max} and K_m values derived from Eadie-Hofstee plot analysis.

3) hOAT4発現細胞による尿酸輸送方向

Fig.5は、尿酸の取り込みがプラトーになる25分間 14 C-尿酸20 μ Mをプレインキュベーションし洗浄後更にハックス液に尿酸を加えたものと加えないもの (control) で10分間の取り込み量を比較し、effluxをみたが、controlの方が有意に取り込み量が多く、effluxはinfluxに比べ明かに少なかった。

Fig-5 Trans-stimulation effect of urate on ^{14}C -urate efflux from S2-hOAT4 expressing cells.

Cells were preloaded with ^{14}C -urate at a concentration of $20\ \mu\text{M}$ for 25min at 37°C (pH7.4), and then cells were washed and incubated with Hanks buffer in the absence (control) or presence of urate at a concentration of $20\ \mu\text{M}$. After the incubation, the ^{14}C -urate remaining in the cells was measured. Each point represents the mean $\pm$ S.E. for three monolayers.

4) hOAT発現細胞による尿酸の輸送の無機イオン及びpHによる影響

Fig.6に示す様にhOAT4による ^{14}C -尿酸取り込みは Na^+ 依存性と Cl^- 依存性はなかった。pHを下げ、シス側の OH^- イオン濃度を減少させると、尿酸の取り込みが有意に減少した。

Fig-6 Modulation of urate transport via hOAT4 by inorganic ions and pH dependency.

Modulation of $20\ \mu\text{M}$ ^{14}C -urate transport via hOAT4 by various ions was determined and expressed as percent of control uptake (mean $\pm$ SE, $n=3$). One hundred twenty-seven millimolar of sodium chloride in uptake solution was substituted with 127 mM of choline chloride or 127 mM of sodium gluconate as Na^+ -free uptake solution and Cl^- -free uptake solution, respectively. Hank's buffer adjusted to pH 6.0, 6.5 and 7.0 were used as the uptake solution of pH dependency.

5) hOAT4による尿酸輸送にたいする尿酸排泄抑制薬及び促進薬の影響

hOAT4による $300\ \mu\text{M}$ の尿酸の取り込みにおける IC_{50} はFig7より、小さい方から順にロサルタン $0.39\ \mu\text{M}$ 、プロベネシド $0.95\ \mu\text{M}$ 、ベンズブロマロン $4.8\ \mu\text{M}$ であった。

Fig-7 Inhibition of probenecid, benzbromarone and losartan to the ^{14}C -urate transport via hOAT4

Using $300\ \mu\text{M}$ of cold urate and $20\ \mu\text{M}$ of ^{14}C -urate, inhibition of urate transport via hOAT4 was studied and expressed as percent of the control. Closed circles were represented the inhibitions by benzbromarone. Opened circles were represented the inhibitions by probenecid. Opened square were represented the inhibitions by losartan. Each point represents a data derived from three wells. The lines were predicted on the hypothesis of competitive inhibition.

6) hOAT4遺伝子のゲノム構造

hOAT4のクロモゾーム局在は11q11であった。Fig8に示すようにhOAT4は、全長が15569bpであり、10個のエクソンと9個のイントロンから構成されている。start codonはエクソン1のなかにstop codonはエクソン10のなかに存在する (Table)。

Fig-8 Organization of hOAT4 gene

A GenBank database search with the nucleotide of human OAT4 cDNA revealed that the human gene coding for this transporter has been sequenced in its entirety. The gene is located on chromosome 11 and is 15569 kbp long. By aligning the nucleotide sequence of the cloned human OAT4 cDNA with the genomic sequence allowed us to deduce the exon-intron organization of the gene. The gene consists of 10 exons and 9 introns.

考 察

・hOAT4による尿酸輸送

hOAT4の尿酸輸送はKm値からは、親和性が低いものとなっている。尿酸輸送方向は、hOAT4発現細胞による尿酸のTrans-stimulationからeffluxではなく、尿酸を尿細管内腔から細胞内に取り込む輸送方向であると考えられる。

つまり、4コンポーネントセオリーの尿酸輸送に関して¹⁴⁾、hOAT4は尿酸の再吸収が分泌後再吸収に関与していると考えられる。

・対向イオンの検討

ヒト腎臓の管腔膜側ベジクルを用いた実験では、管腔膜における尿酸取り込みはCl⁻イオンとのexchangerとOH⁻イオンとのexchanger機構が想定されている。外液のpHを低下させるとhOAT4による尿酸輸送は低下するので、hOAT4による尿酸輸送はpH依存性があるが、尿酸の解離係数の関係もあり複雑となっており、どのexchangerに相当するか更なる検討が必要と考えた。hOAT1の対向イオンは、 α -ケトグルタル酸であるが⁷⁾、hOAT3は対向イオンがなくfacilitated transporterとされている¹⁰⁾。hOAT4においても対向イオンに関して今後更なる検討が必要と考えた。

・hOAT4による尿酸輸送に対する尿酸排泄促進薬の影響

＜プロベネシド＞

プロベネシド2gの経口投与時のCmaxは、530 μ Mでありプロベネシドの蛋白結合率は、89%である。それゆえ、unbound steady-state Cmaxは、58.3 μ Mとなり、これが、プロベネシドの糸球体濾過直後の尿中最大濃度となる¹⁵⁾。hOAT4による尿細管細胞内への尿酸輸送はこのプロベネシドの濃度では完全に抑制される。このことが、プロベネシドの尿酸排泄促進作用に関与していると考えられる。

＜ベンズプロマロン＞

ベンズプロマロンは、主に肝代謝をうけるが、尿酸排泄促進作用は、未変化体にあると考えられている。ベンズプロマロン100mgの経口投与時のCmaxは3.5 μ Mであり、ベンズプロマロンの蛋白結合率は、96.3~98.3%である。それゆえ、unbound steady-state Cmaxは、0.13 μ Mとなり、これが、ベンズプロマロンの糸球体濾過直後の尿中最大濃度となる¹⁶⁾。hOAT4による尿細管細胞内への尿酸輸送はこのベンズプロマロンの濃度では完全に抑制されず、IC₅₀ values (=4.8 μ M)が、unbound steady-state Cmax values (=0.13 μ M)の5倍以上である¹⁷⁾。このことは、ベンズプロマロンの尿酸排泄促進作用にhOAT4による尿酸輸送は、あまり関与していないと考えられる。

＜ロサルタン＞

ロサルタンの尿酸排泄促進作用は、服薬後数時間で認められ未変化体にあると考えられている。ロサルタン200mgの経口投与時のCmaxは3.0 μ Mであり、ロサルタンの蛋白結合率は、98.6~98.8%である。それゆえ、unbound steady-state Cmaxは、0.042 μ Mとなり、これが、ロサルタンの糸球体濾過直後の尿中最大濃度となる。hOAT4による尿細管細胞内への尿酸輸送はこのロサルタンの濃度では完全に抑制されず、IC₅₀ values (=0.39 μ M)が、unbound steady-state Cmax values (=0.042 μ M)の5倍以上である¹⁶⁾。このことは、ベンズプロマロン同様にロサルタンの尿酸排泄促進作用にhOAT4による尿酸輸送

は、あまり関与していないと考えられる。

・hOAT4遺伝子に関して

有機陰イオントランスポーターファミリーのなかで尿酸輸送が確認されているhOAT1, hOAT3, hOAT4はすべてクロモゾームの11q11~13の近傍に存在している共通性があるが、ゲノム構造上はエクソンの数の相違などが認められる。

結 語

ヒト有機陰イオントランスポーターhOAT4は、近位尿細管腔膜側における尿酸輸送体の1つであり、尿酸排泄促進薬のなかでプロベネシドの作用点の1つと考えられる。尿酸排泄促進薬の作用点であり、hOAT4より尿酸輸送に親和性が高く、anionとexchangerになっているトランスポーターの存在が近位尿細管腔膜側では未だ不明のままであり、今後更なる解明が必要である。

Intron number	Exon	Intron(size)	Exon
1	446 CGT GGC CAA G R G Q	GTAGGGCCTCCCCAGAGCCACTGAGTCCCGTCACCTTGGAGGTCAGAGTCATGGATCA -(2741bp)- CGTGCCAGCCCTGTGATTTTCATACCCCCGAGCTGAGCCACTGCACCCTCCTCTTGCAG	TG GGA CCT GGT G P G
2	549 T CTC CTA CCG L L P	GTGAGTGCCTCCGCTCCTCCAGCCCCAGCTCCCTCAAACATTGTGTAAGACTATGGG -(2774bp)- ACGTCTCTCAGGGGCCCTCTCCAGGCCCGGTGCTTCTCTCTGTGACAGGTTTGGGAG	GTT TGG GAG G V W E
3	704 ACT GAC ACT GA T D T	GTGAGTCCCGGCTCAGCGCGCTCTGCCATGGGGCGGGGGTGCAGAGAGAAATGGGGCTCAG GCCGCGCATGAGGCCCTCAGCTGCACGTGTCTGCATCCTTCAG(108bp)	T GGT GGA GTG G G V
4	873 CT GAT ATC CTG D I L	GTGAGTATGATGTGGGACCTTTTCTTAGGAGACCCAGGGTGGGAGGGGAGCTTTCACCTTT -(1870bp)- CCCCGCCCCGGGGAGAGCCAGCGTGCACCTCCAGCTACACACCTGCCTCCTTACAG	GTG GCT GCC AG V A A
5	994 GAC CAT AGA G D H R	GTGAGATGCTCTGTCTGCGAGACTTGACCTGGGACAGGACGTGCATCAGGGATCATCC. -(793bp)- AGGGGGTGGGGCAGGGCCATTGCCCCATTCACGGTGGCCCCCATTTCTCCCGGAAG	GT GCT GAT GTC A D V
6	1110 CT GGT GGT GAA G G E	GTACGCGGCTCTGGTGTCCCTCCCCAAGGCGGGCTGGGACAGGCAGGAGGAGAGCTGG -(2261bp)- TGCTGTGGGGTGCCCTCTCCCGGCGAGGGCAGGAGCTGACTTCCAGCCTTCCCGCAG	TTT CTC TCT AT F L S
7	1325 GGT GCC GCA AG G A A	GTGAGGCAGGCGGACTGGGCGGTGGGACCGGGCCCTGCTTCCCCGCCACCCCACTGCTC. -(856bp)- TGACTAGCCCCCTGGGTACCCCTCCAGGGCAACCCCACTCTCAACCCCTTCTGTATCCCAAG	A TTT GCA GAC F A D
8	1434 AC GCC AGT GCG A S A	GTAGCTGGGCTGCAGGCCATGCCCGAGGGCCAGCGGGCCGTCTGAGAGGGCGGTGGG. -(873bp)- ATGTCTTCTGCCACAGGGCCAGCTGTACAGGGATCTGGGCCCTCCCTTCACCCACAG	GAT GAC AGC AG D D S
9	1641 CT GGA GAG CCA G E P	GTGAGTGACCTGTGATCCCTGGGATCGGGCTGGGCTTCTCCTGGGCCAAGATGGAGAC. -(1120bp)- CAAGCTCCGAGTACATACCCACTTCACACATGGCAGCTGCTTTTCTTTGGATTATTTAG	GAA ATC AAC AG E I N

Table Exon-intron junction structure of hOAT4 gene

Nucleotide sequence at the intron and exon boundaries are shown. Numbers shown above the nucleotide sequence are counted from the first ATG codon in the cDNA, and the deduced amino acids are indicated below the sequences. Intron sizes are indicated in parentheses. The sequences that agree with GT/AG consensus at the 5'- and 3'-splice junctions are indicated by bold letters.

文 献

- 1) Boner G, Steele TH : Relationship of urate and p-aminohippurate secretion in man. *Am J Physiol* 225 : 100-104, 1973.
- 2) Kahn AM, Weinman EJ : Urate transport in the proximal tubule : in vivo and vesicle studies. *Am J Physiol* 249F (5Pt2) : 789-798, 1985.
- 3) Roch-Ramel F, Werner D, Guisan B : Urate transport in brush-border membrane of human kidney. *Am J Physiol* 266F (5Pt2) : 797-805, 1994.
- 4) Roch-Ramel F, Guisan B, Diezi J et al : Transport of urate and other organic anion by anion exchange in human renal brush-border membrane vesicles. *Cell Physiol Biochem* 6 : 60-71, 1996.
- 5) Leal-Pinto E, Tao W, Abramson RG et al : Molecular cloning and functional reconstitution of a urate transporter/channel. *J Biol Chem* 272 : 617-625, 1997.
- 6) Leal-Pinto E, Cohen BE, Abramson RG : Functional analysis and molecular modeling of a cloned urate transporter/channel. *J Membr Biol* 169 : 13-27, 1999.
- 7) Hosoyamada M, Sekine T, Endou H et al : Molecular cloning and functional expression of a multispecific organic anion transporter from human kidney. *Am J Physiol* 276 : 122-128, 1999.
- 8) 木村弘章, 遠藤仁, 細谷龍男 他 : 有機陰イオントランスポーターhOAT3における尿酸輸送の解析. *痛風と核酸代謝*. 24 : 115-121, 2000.
- 9) Kusuvara H, Sekine T, Endou H et al : Molecular cloning and characterization of a new multispecific organic anion transporter from rat brain. *J Biol Chem* 274 : 13675-13680, 1999.
- 10) Cha SH, Sekine T, Endou H et al : Identification and characterization of human organic anion transporter 3 expressing predominantly in the kidney. *Mol Pharmacol* 59 : 1277-1286, 2001.
- 11) JoAnne E, Steven M, Grassl E et al : Molecular cloning and characterization of two novel human renal organic anion transporters (hOAT1 and hOAT3) . *Biochem Biophys Res Commun* 255 : 508-514, 1999.
- 12) Cha SH, Sekine T, Endou H et al : Molecular cloning and characterization of multispecific organic anion transporter 4 expressed in the placenta. *J Biol Chem* 275 : 4507-4512, 2000.
- 13) Takeda M, Hosoyamada M, Endou H et al : Role of organic anion transporter 1 (OAT1) in cephaloridine (CER) -induced nephrotoxicity. *Kidney Int* 56 : 2128-2136, 2000.
- 14) Dennis JL, Leif BS : Renal handling of uric acid in normal and gouty subjects : evidence for a 4-component system. *Anal Rheum Dis* 39 : 173-179, 1980.
- 15) Nierenberg DW : Drug inhibition of penicillin tubular secretion . Concordance between in vitro and clinical findings. *J Pharmacol Exp Ther* 240 : 712-716, 1986.
- 16) Broekhuysen J, Pacco M, Hee MV et al : Metabolism of benzbromarone in man. *Europ J Clin Pharmacol* 4 : 125-130, 1972.
- 17) Roch-Ramel F, Guisan B, Diezi J : Effect of uricosuric and antiuricosuric agents on urate transport in human brush-border membrane vesicles. *J Pharmacol Exp Ther* 280 : 839-845, 1997.
- 18) Zhang L, Gorset W, Giacomini KM et al : Interactions of HIV protease inhibitors with a human organic cation transporter in a mammalian expression system. *Drug Metab Dispos* 28 : 329-334, 2000.

Urate transport via hOAT4

Hiroaki Kimura¹⁾ Kimiyoshi Ichida¹⁾ Makoto Hosoyamada²⁾
Iwao Oono¹⁾ Hitoshi Endou²⁾ Tatsuo Hosoya¹⁾

Background

It was reported that uric acid was reabsorbed into blood via a urate/anion exchange transporter across the renal apical and basolateral membranes. However, no apical membrane transporter for uric acid has yet been identified. In this study, we demonstrated that humanOAT4, which we cloned previously, is present in the renal apical membrane and mediates the transport of uric acid.

This is the first molecular demonstration of an uricosuric agent (such as probenecid, benzbromarone, and losartan) function for uric acid at the renal apical membrane. Furthermore, we clarified the exon-intron structure of humanOAT4 gene.

Methods

A mouse proximal tubule (S2) cell line stable expressing hOAT4 was established and used in this

study. The cellular uptake of ¹⁴C-urate was measured. The inhibition profiles of uricosuric drugs to urate transport via hOAT4 were clarified.

Results

The Km value of ¹⁴C-urate transport via hOAT4 was 3779.6 μ M. The Vmax value of ¹⁴C-urate transport via hOAT4 was 12118 pmol/mg protein/min (n=3). The inhibition (50%) concentration (IC₅₀) of urate transport via hOAT4 was losartan < probenecid < benzbromarone. The hOAT4 gene was interrupted by nine introns.

Conclusions

Using the first cloned human urate transporter in the apical membrane, we clarified the characteristics of urate transport via hOAT4 and the inhibition profile of uricosuric drugs.

1) Division of Nephrology and Hypertension, Jikei University School of Medicine

2) Division of Pharmacology, Kyorin University School of Medicine