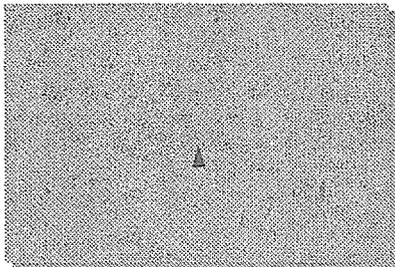


妊娠ラットにおけるT-2トキシンの 毒性に関する研究

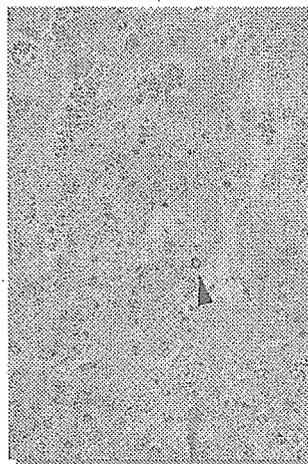
母体肝臓

肝細胞の単細胞壊死, T-2 toxin, 24 HAT



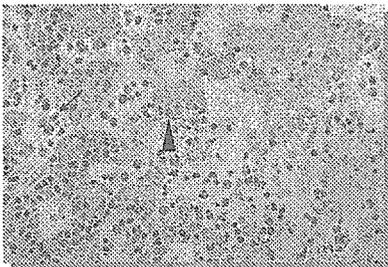
胎盤

栄養膜細胞の単細胞壊死
T-2 toxin, 24 HAT

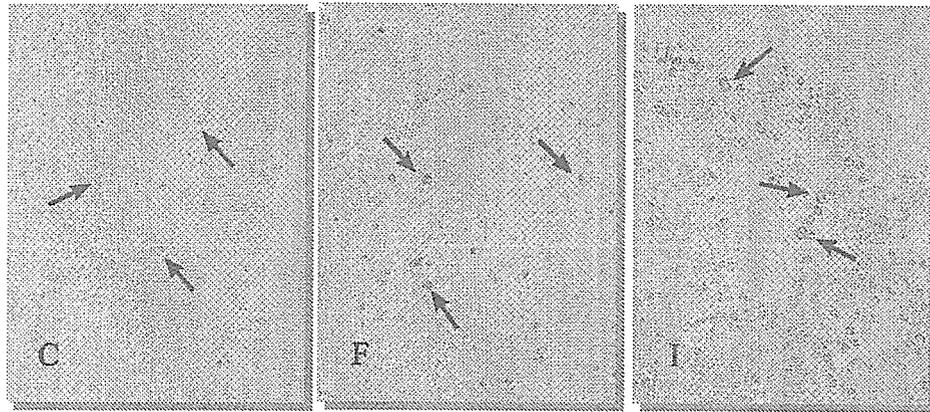


胎児肝臓

肝細胞と造血細胞の単細胞壊死, T-2 toxin, 48 HAT



TUNEL染色 12 HAT



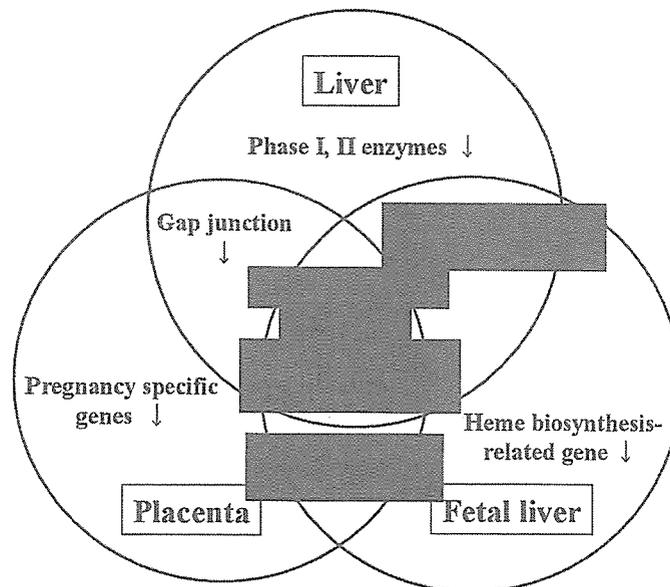
母体肝

胎盤

胎児肝

アポトーシス

Summary of Microarray Analysis



まとめ

T-2トキシンは母体肝、胎盤、胎児肝組織にアポトーシスをおこした。

マイクロアレイ解析によりこれら組織のアポトーシスは主に酸化ストレスによることが分かった。

酸化ストレスは細胞に脂質代謝障害を引き起こし、その結果アポトーシスがおこった。

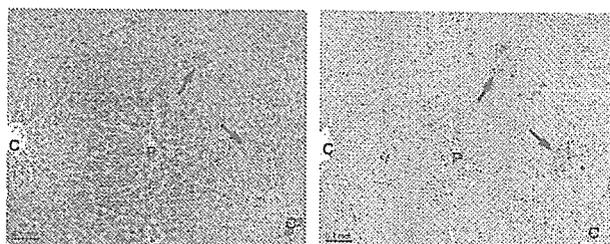
MAPKとc-jun経路の活性化がT-2とトキシン誘導アポトーシスの発生に関与している。

ニトロフラゾン投与ラットの肝臓における変化

高用量NF

投与後3時間 グリコーゲン減少, 微小空胞化, 好酸性・PAS陽性滴状物単細胞壊死, 小壊死巣

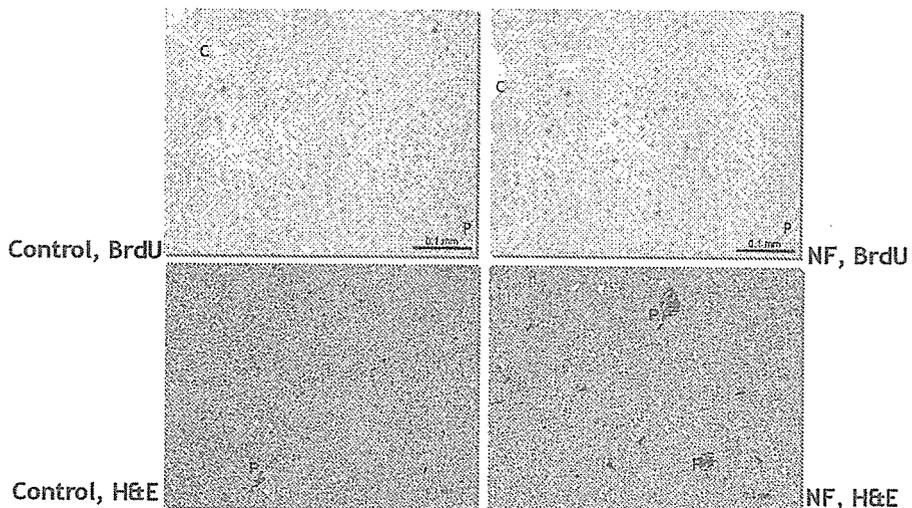
投与後6時間 Kupffer cell肥大, 時に細胞残渣の貪食像



NF, H&E

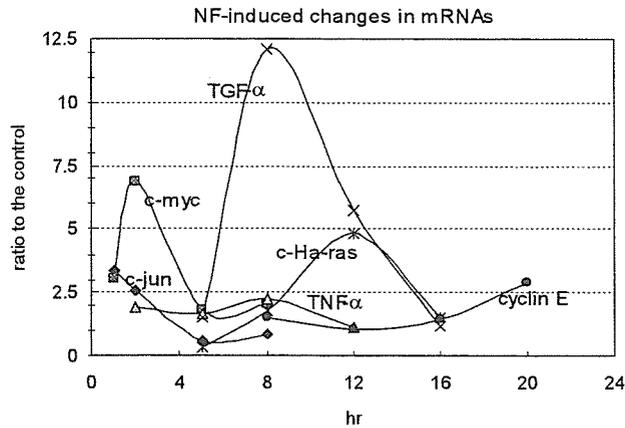
NF, PAS

低用量NF, 連続投与



BrdU取り込み細胞が増加、分裂像増(矢頭)。肝細胞傷害像はみられない。

肝細胞増殖因子の遺伝子発現動態



NFによる肝細胞増殖は NAC の前投与で抑制。
 NF単回投与後1, 2時間目に *c-jun*, *c-myc*が、8時間目にかけてTNF- α が、8-12時間目に*c-Ha-ras*が、16から20時間目にかけてcyclin Eが増加。
 HGF, EGFの増加はみられなかった。
 これらの遺伝子発現の増加は、NAC前投与により抑えられた。

まとめ

高用量のNF(致死量に近い500 mg/kg)をラットに単回経口投与すると散在性の肝細胞小壊死巣が形成された。

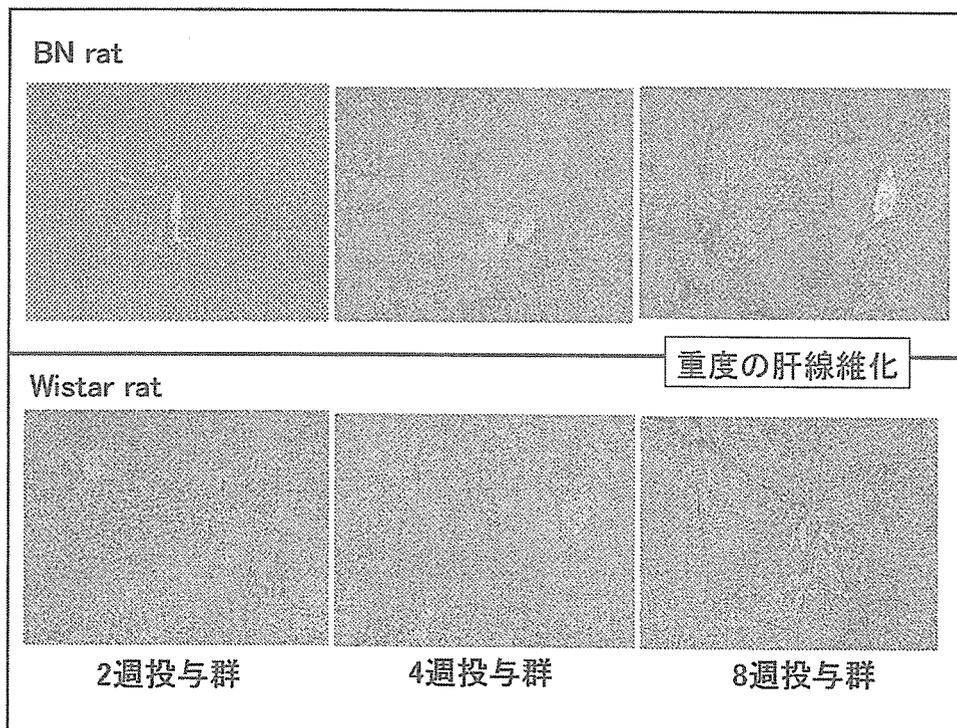
高用量NFは肝毒性物質としての作用を有し、肝細胞壊死にはフリーラジカルが関与

低用量のNFをラットに単回投与したところ、肝重量と肝細胞増殖は一過性に上昇した。

低用量NFはmitogen作用を有し、その作用は可逆的で連続投与してもある時点で停止

NFは高用量では肝障害物質として、低用量ではmitogenとして作用する。

ブタ血清誘発肝線維化モデルラットの 病態解析



Up-regulated genes

Genes	BN		Wistar		Accession No.
	2 weeks	4 weeks	2 weeks	4 weeks	
Cellular marker					
CD74 antigen (invariant polypeptide)	1.25		1.25		NM_013069.1
MHC class II alpha chain RT.D alpha	1.85		1.45		Y00480.1
MHC class II antigen RT1. B-1 beta-chain	1.15		1.45		AI715202
RT1.D beta chain	1.35		0.8		BI279526
RT1.Ma	1.6				BI301490
Cell proliferation					
growth response protein (CL-6)(LOC64194)	1.45				NM_022392
Inflammation					
orosomucoid 1 (Orm1)	1.6		1		NM_053288.1
T-kininogen, see also D11 Elh1 and D11 Mit	1.65				NM_012696.1
Stress / Cell damage					
lipopolysaccharide binding protein	3.25				BF289368

MHC class II関連、炎症関連、ストレス／細胞傷害各因子の遺伝子が発現増加

Down-regulated genes

Genes	BN		Wistar		Accession No.
	2 weeks	4 weeks	2 weeks	4 weeks	
Amino acid metabolism					
ornithine aminotransferase	-1.35				L22655.1
Basal metabolism					
hepcidin antimicrobial peptide	-1.9				NM_053962.1
Carbohydrate metabolism					
glucokinase				-1.3	NM_012816.1
Transcription					
hepatocyte nuclear factor 3 gamma		-1.05			NM_017077.1
L-type pyruvate kinase	-1.25				MI7685.1
nuclear receptor subfamily 0				-1	NM_057133.1

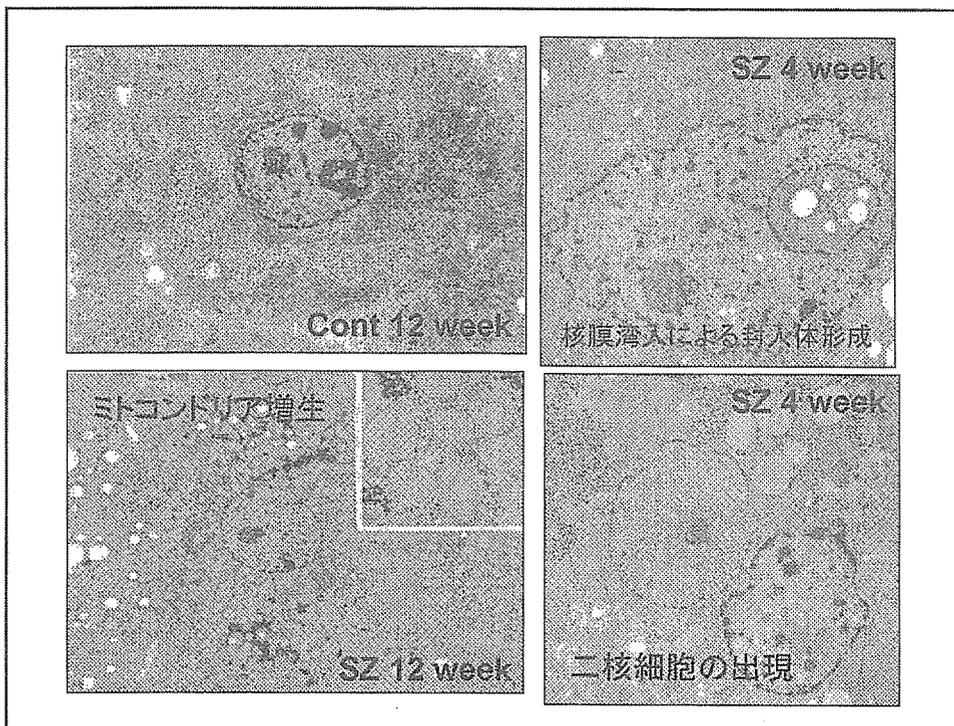
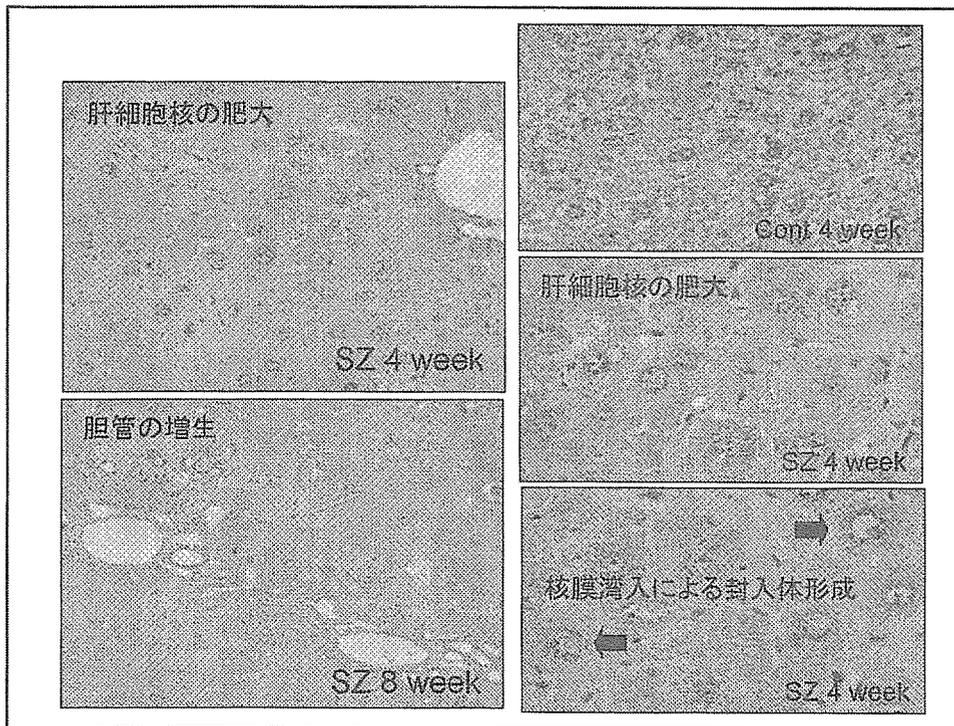
まとめ

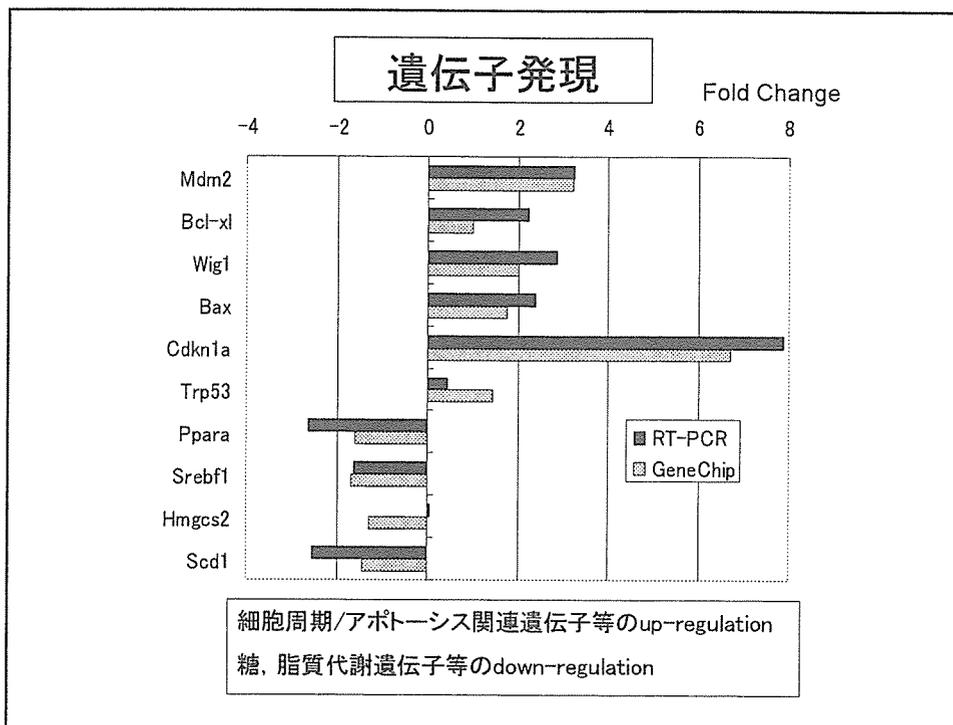
BNラット、Wistarラットともブタ血清投与で重度の肝線維化がおこった。

BNラットでは投与2週で、MHC class II関連、炎症関連、ストレス／細胞傷害各因子の遺伝子が発現増加。

Wistarラットでは投与4週で、MHC class II関連、炎症関連各因子の遺伝子が発現増加。

マウスにおけるストレプトゾトシン 誘発肝毒性の性状





まとめ

マウスにSZを投与すると、胆管上皮細胞の増生、肝細胞核の肥大、核膜湾入による封入体形成、クロマチン分布やサイズが異なる二核細胞の出現が観察された。

電顕観察では肝細胞のミトコンドリアが増生していた。

細胞周期/アポトーシス関連遺伝子等の発現増加と糖, 脂質代謝遺伝子等の発現減少がみとめられた。

総括

- 障害性肝病変では酸化ストレス関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子の発現増加、薬物代謝遺伝子の発現プロファイル変化がみとめられた。
- 母体肝、胎盤、胎児肝の遺伝子発現プロファイルに差があった。
- 妊娠、分娩、授乳の各期によっても遺伝子発現プロファイルが異なっていた。

化学物質による腎臓発現遺伝子の制御と機能調節に関する研究

分担研究者

平成 14 年度～15 年度：遠藤 仁 前・杏林大学医学部教授

平成 16 年度～18 年度：金井 好克 杏林大学医学部・教授

化合物の腎毒性にはトランスポーター(輸送体)介在毒性が重要な位置を占め、その *in vitro* の評価系の確立が、*in vivo* における化合物の腎毒性予測のために必須である。トランスポーターは、細胞膜あるいは細胞内膜系を介する物質の透過を媒介する膜タンパク質であり、糖やアミノ酸等の栄養素や、アニオン性、カチオン性薬物及び外来性異物、あるいは薬物、外来性異物の代謝物等の親水性化合物の経細胞膜輸送にとって必須の分子である。腎臓には、広い基質選択性を有し異物排除や、薬物やその代謝産物の排泄に関わる一群のトランスポーター(多選択性トランスポーター)が存在するが、その広い基質選択性のためにそれらが毒性物質の細胞内侵入の経路となる。そのため、トランスポーターの存在が特定の化学物質の腎毒性発現の重要な要因となる。このようなトランスポーターが媒介する毒性機構(トランスポーター介在毒性)が、種々の腎毒性物質の *in vivo* での毒性発現の背景にあり、その評価を *in vitro* で行い得る評価系は、化合物の腎毒性予測において必須のものとなる。その目的のためには、腎尿細管の多選択性トランスポーターの全分子を明らかにし、化学物質の尿細管細胞への侵入経路の全貌を明らかにすること、及びトランスポーター介在毒性に関する DNA マイクロアレイ解析を行い、毒性発現機序を明らかにすることが必要となる。本研究は、以上の2点を鑑み、腎尿細管の多選択性トランスポーターの全貌の解明、及びトランスポーター介在毒性の *in vitro* の評価系の確立を目的とした検討を行った。本研究により、腎近位尿細管の多選択性トランスポーターの全体像が把握され、トランスポーター介在毒性の *in vitro* の評価系が確立された。これを用い、腎毒性を惹起するモデル化合物としてのセファロリジンとオクラトキシン A の腎毒性発現に関わるパスウェイが明らかになった。

A. 研究目的：

腎毒性の発現には、腎毒性物質の細胞内への侵入が第一のステップとなるが、特に尿細管細胞は異物排泄のための多くのトランスポーターを備えているため、腎毒性発現にこれらのトランスポーターが重要な寄与をする。これらの代謝産物(有機酸等)や外来性異物の排出を担当するトランスポーターは、一般に特異性が低く多選択性トランスポーターと呼ばれ、多くの代謝産物や未知の外来性異物等にも対応できるようになっており、生体防御に適した特性を有

している。しかし、その広い基質選択性のために毒性物質の細胞内侵入の経路となるため、そのようなトランスポーターの存在が特定の化学物質の腎毒性発現の原因となる。従って、DNA マイクロアレイ解析による化学物質の腎毒性の評価において、化学物質の腎毒性発現に関わるトランスポーターの全遺伝子の機能と化学物質の腎毒性発現における役割に関する情報が必須のものとなる。そこで本研究においては、腎型多選択性トランスポーターのファミリーである SLC22 の機能未同定の遺伝子の機能解析

を先行させた。同時にアミノ酸トランスポーターの中にもトランスポーター介在毒性に寄与する腎近位尿細管の多選択性トランスポーターが存在するため、その分子同定も行った。

前述のように、腎毒性の発現には、腎毒性物質の腎尿細管細胞内への侵入が第一のステップとなる。腎毒性物質の多くは水溶性物質であり、それらは、腎尿細管細胞に取込まれ尿細管上皮細胞に毒性を発揮するとされる。従って、腎毒性物質の細胞内への取込みを媒介し、細胞内への取込みの律速過程となるトランスポーターが、特定の腎毒性物質の腎毒性発現の規定因子として重要な要素となる。このような、トランスポーターを介した毒性（トランスポーター介在毒性）は、種々の毒性物質において実証されているが、化合物の腎毒性においては、特にセフェム系抗生物質セファロリジン及びカビ毒であるオクラトキシン A において良く知られている。セファロリジン及びオクラトキシン A とともに、腎近位尿細管の血管側の SLC22 ファミリーの多選択性有機アニオントランスポーター OAT1 及び OAT3 を介して腎近位尿細管細胞へ取込まれ、これによって腎毒性を発揮する（添付図 3 及び 17）。本研究では、トランスポーター介在毒性の機序を明らかにし、*in vivo* の毒性発現における遺伝子変化を評価する *in vitro* のモデル系の構築とその評価の目的で、セファロリジン及びオクラトキシン A

のトランスポーター介在毒性に関する DNA マイクロアレイ解析を行い、腎毒性発現に関わるパスウェイを明らかにした。

B. 研究方法

(1) 腎尿細管多選択性トランスポーターの分子同定。

- 機能発現クローニング

機能発現クローニングは、タンパク質の機能を指標に cDNA ライブラリーのスクリーニングを行う遺伝子クローニング法であり、遺伝子配列情報に関する手がかりの全くないタンパク質の分子実体を明らかにするために有用な手法である。本研究では、腎での薬物及び毒性化合物の細胞膜輸送を担当する多選択性トランスポーターを明らかにするために、2通りの機能発現クローニングを行った。第一は、未だに分子実体未同定の腎近位尿細管管腔側のアニオン性薬物、毒性化合物、代謝産物の尿中へ排泄の出口である、電位差駆動型の有機アニオントランスポーターの同定を目指した発現クローニングであり、第二は、さらに未同定の分子種が存在すると予想される、アミノ酸型の薬物、毒性化合物の輸送経路となる輸送系 L アミノ酸トランスポーターの同定を目指した発現クローニングである。電位差駆動型の有機アニオントランスポーターの機能発現クローニングは、ブタ腎皮質 poly(A)⁺RNA を、輸送系 L アミノ酸トランスポーターの機能発現クローニングは、既

存の輸送系 L と異なった特性を示す、輸送系 L の活性をすでに同定しているヒト肝細胞腫細胞株 FLC4 の poly(A)⁺RNA を、出発材料として用いた。

機能発現クローニングにおいては、出発材料となる poly(A)⁺RNA を、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、¹⁴C-標識の基質の取り込みを検討した。基質の取り込みが検出されたため、分取ゲル電気泳動法により poly(A)⁺RN のサイズ分画を行ない、各画分をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、¹⁴C-標識の基質の取り込みのピーク活性を示す画分を決定した。¹⁴C-標識の基質の取り込みピーク活性を示す画分から cDNA を合成し、発現プラスミドベクター pSPORT1 に組み込み、発現プラスミドライブラリーを作製した。得られたライブラリーから 500 クローンずつをプールし、各プールからプラスミドを抽出して cRNA を合成し、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、¹⁴C-標識の基質の取り込み活性を測定した。取り込み活性の得られたプールをさらに 500 クローンずつサブグループに分け、同様の検討を行なった。

単離した cDNA は、ダイターミネーターサイクルシーケンシング法により塩基配列を決定し、アミノ酸配列を予想した。膜貫通部位の予想は、TopPred2、SOSUOI 等の膜貫通部位予想アルゴリズムによって行った。得られた cDNA のコードするトランスポーターに機能解析は、インビトロ転写により

cRNA を合成し、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、放射能標識基質の取り込み活性を測定することにより行った。

ゲノム情報を用いた細胞膜輸送体の同定
有機陽イオン、陰イオン、アミノ酸に関する既存のトランスポーターの塩基配列を用いて、公開されたヒトゲノム及びマウスゲノムシーケンスデータベースの BLAST 検索を行った。その結果得られた BLAST hit を用いて、全長 cDNA を単離した。全長 cDNA の単離は、ゲノム DNA から PCR により DNA 断片を増幅し、それをプローブとして cDNA ライブラリーを hybridization によりスクリーニングするか、あるいは全長 cDNA が、各種 EST (expressed sequence tag) プロジェクト等で入手可能な場合は、それを入手して利用した。

得られた全長 cDNA は、ダイターミネーターサイクルシーケンシング法により塩基配列を決定し、アミノ酸配列を予想した。膜貫通部位の予想は、TopPred2、SOSUOI 等の膜貫通部位予想アルゴリズムによって行った。得られた cDNA のコードするトランスポーターに機能解析は、インビトロ転写により cRNA を合成し、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、放射能標識基質の取り込み活性を測定することにより行った。

加えて、発現プラスミドベクター pcDNA3.1 を用いてマウス腎近位尿細管由来 S2 細胞に遺伝子導入して安定発現細胞を作

出し、同様に輸送機能の解析を行った。目的トランスポーター遺伝子 cDNA を挿入した pcDNA3.1 及び対象として挿入 cDNA を持たない pcDNA3.1 ベクター (mock) を、リポフェクタミンを用いてリポソーム法により S2 細胞に導入した。遺伝子導入後、G418 存在下で培養し、遺伝子導入細胞を選択し、クローニングした。得られた細胞クローンから poly(A)⁺RNA を抽出し、RT-PCR 法により、導入トランスポーター遺伝子の安定発現を確認した。トランスポーター安定発現細胞は、24 穴プレートに 2 日間培養後、放射能標識基質の輸送活性測定に供した。輸送活性測定においては、放射能標識基質を培地中に添加し、細胞への取り込みを測定することにより、機能活性を評価した。放射能標識基質の細胞内への取り込みは、細胞をアルカリ溶解後、液体シンチレーションカウンターにより測定した。

トランスポーターの組織発現は、得られた cDNA を ³²P-dCTP でラベルし、ノーザンブロットを行うことにより評価した。また、予想されるペプチド配列に対するペプチド抗体を作製し、ウェスタンブロット、及び免疫組織化学的検討を行った。加えて、マウス腎凍結切片を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションによる遺伝子発現の組織内解析を行った。

広い基質選択性を示すアミノ酸輸送系 B⁰ に関しては、ゲノム情報を用いた *in silico* のポジショナルクローニングを行った。輸

送系 B⁰ の分子同定の目的で、その遺伝的欠損とされていた Hartnup 病の遺伝子座 5p15 においてトランスポーター遺伝子の BLAST 検索を行い、この領域においてトランスポーター遺伝子を探索した。得られた候補遺伝子の cDNA を腎由来の poly(A)⁺RNA を用いた RT-PCR により取得し、発現プラスミドベクター pcDNA3.1 にサブクローニングした。得られた全長 cDNA は、ダイターミネーターサイクルシーケンシング法により塩基配列を決定し、アミノ酸配列を予想した。機能解析はアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、放射能標識基質の取り込み活性を測定することにより行った。

-メタボローム解析を用いたトランスポーターの生体内での機能特定

SLC22 ファミリーのメンバーである OATN1 (ORCTL3) の機能同定は、メタボローム解析により行った。OATN1 の機能同定を目的としたメタボローム解析においては、OATN1 ホモノックアウトマウス及び野生型マウスの尿を採取し、キャピラリー電気泳動と質量分析を組み合わせた CE-MS 法を用いて解析した。尿中全化合物のプロファイリングを行い、ホモノックアウトマウスと野生型マウスで尿中排泄量に差のある化合物を検出した。

(2) セファロリジン及びオクラトキシン A の毒性評価

有機アニオントランスポーターOAT3安定発現S2細胞あるいはmock-S2細胞を、 2.5×10^3 /wellの密度で48穴プレートに蒔き、24時間後に化合物暴露を開始した。化合物暴露後、12、24、48、72、96時間後にMTTアッセイを行い、細胞毒性を評価した。セファロリジンは、0.2 mM、オクラトキシンAは1 μ M、OAT3インヒビターであるProbenecidは、0.01-0.5 mMを検討した。

(3) 遺伝子発現変動の解析

有機アニオントランスポーターOAT3安定発現S2細胞あるいはmock-S2細胞を、 6×10^5 /90 mm plateの密度で蒔き、24時間後に化合物暴露を開始した。化合物暴露後、12、24、36、48、60時間後にRNAを抽出し、Human Whole Genome (Amersham Biosciences)を用いて遺伝子発現を測定した。ハイブリダイゼーション、及び解析をCodeLinkシステムによって行った。

遺伝子発現変動解析は、腎毒性物質がトランスポーターを介して、あるいはトランスポーターを介さずに（細胞膜脂質二重層を直接透過して）遺伝子発現に影響を与えるため、図4に示すように、「未処理（対照）」群（図4のA）、「腎毒性物質処理」群（図4のB）、「腎毒性物質処理+トランスポーター抑制薬」群（図4のC）、「トランスポーター抑制薬」群（図4のD）のそれぞれに関して、マイクロアレイ解析を行い、各発現量を図4に提示する数式を用いて「ト

ランスポーター抑制薬により抑制される成分」を算出し、トランスポーター介在毒性に関わる遺伝子発現変動として評価とした。

図4に提示する数式から算出される遺伝子発現変動値のトランスポーター介在成分が2倍以上の変化を示した遺伝子群を対象とし、それらのパスウェイ解析と遺伝子のcis element解析を行った。転写領域解析は、K-mean クラスタ後、クラスタごとに解析した。各遺伝子の転写開始点上流1000塩基と下流100塩基を解析の対象とした。

(4) 遺伝子発現変動の半定量的及び定量的解析

DNA マイクロアレイにより遺伝子発現変動が認められた遺伝子に関して、サイクル数を至適としたRT-PCRによる半定量的PCR解析、及びTaqMan PCRによる定量的PCR解析を施行した。

TaqMan PCRには、Applied Biosystems社より購入した以下のTaqManプローブ及びプライマーを用いた。Nfe2l2: Assay ID Mm01275375_m1, Probe ID 359930, Amplicon length 61; Gclc: AssayID Mm00802655_m1, Probe ID 323718, Amplicon length 98; Gclm: AssayID Mm00514996_m1, Probe ID 436575, Amplicon length 76; Slc6a9: AssayID Mm00433662_m1, Probe ID 532295, Amplicon length 75; Slc7a11: AssayID Mm00442530_m1, Probe ID 473767,

Amplicon length 66。

(5) siRNA による遺伝子ノックダウン。
Nfe2l2 及び Nfkb1 の遺伝子ノックダウンを siRNA を用いて行った。60mm のディッシュに S2-OAT3 細胞を 1.6×10^5 個播き、24 時間後に siRNA を 50nM の濃度で LIPOFECTAMINE を用いて添加した。さらに 24 時間後にセファロリジン (0.2 mM) を添加し、12 時間培養後、RT-PCR 用に RNA を抽出した。また、セファロリジンの細胞毒性に対する遺伝子ノックダウンの効果の検討には、上記の siRNA 処理、セファロリジン添加後、細胞毒性を MTT アッセイにより経時的に評価した。

SiRNA は、Dharmacon 社から購入した以下のものを用いた。ON-TARGETplus Duplex J-040766-06-0005, Mouse NFE2L2, NM_010902

Nfe2l2 sense: uggaguaagucgagaaguguu

Nfe2l2 antisense: 5'-P
cacuucgacuuacuccau;

ON-TARGETplus Duplex J-047764-06-0005, Mouse NFKB1, NM_008689

Nfkb1 sense: ggaaacgccagaagcuuuuu

Nfkb1 antisense: 5'-P
auaagcuucuggcguuuuccuu;

Negative siRNA: siCONTROL Non-Targeting

siRNA #1 from Dharmacon:

5'-UAGCGACUAAACACAUCAA-3'

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒト個人を対象とした研究や、個々人の遺伝子の解析等は含まない。本研究は実験動物としてはアフリカツメガエル及びマウスのみを用い、その使用にあたっては諸規定に則り十分な配慮のもとに行った。

C. 研究結果

(1) 薬物及び毒性化合物の輸送に関わる腎尿細管多選択性有機アニオントランスポーターの分子同定 (図 1、2)。

A. 電位差駆動型の有機アニオントランスポーターの同定

電位差駆動型の有機アニオントランスポーターの同定に向けて、種々の動物種の腎臓から、刷子縁膜小胞を作製し、 ^{14}C -パラアミノ馬尿酸の取り込み能を測定することにより、ブタの腎皮質刷子縁膜小胞が最も高い ^{14}C -パラアミノ馬尿酸の取り込み活性を有することを明らかになった。この ^{14}C -パラアミノ馬尿酸の取り込みは、細胞外 K^+ 濃度を高めることによって上昇し、腎尿細管管腔側の膜電位駆動型有機アニオントランスポーターの性質と一致していた。従って、ブタの腎を発現クローニングの出発材料と決定し、ブタの腎皮質由来の poly(A)⁺RNA をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、 ^{14}C -パラアミノ馬尿酸の取り込みを測定したところ、刷子縁膜小胞で観察したと同様な、 K^+ 感受性の ^{14}C -パラアミノ馬尿酸取り込み活性をアフリカツメガエル卵母細胞発現系で再現できた。続いて、新鮮ブタの腎皮質から、400 μg に及ぶ大量の poly(A)⁺RNA を採取し、分取ゲル電気泳動法によりサイズ分画を行ない、アフリカツメ

ガエル卵母細胞に発現させ、1.7~2.2 kbの画分に¹⁴C-パラアミノ馬尿酸の取り込みのピーク活性を検出した。この画分のpoly(A)⁺RNAからcDNAを合成し、発現プラスミドベクターpSPORT1に組み込み、発現プラスミドライブラリーを作製した。得られたライブラリーから500クローンずつをプールし、各プールのcRNAを合成し、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、¹⁴C-パラアミノ馬尿酸の取り込み活性を測定した。16プールの解析を行い、対照と比較して有意な¹⁴C-パラアミノ馬尿酸の取り込み亢進を示すプールを見出し、そのプールから最終的に単一cDNAクローンを単離した。

単離したcDNAは、ダイターミネーターサイクルシーケンシング法により塩基配列を決定し、アミノ酸配列を予想した。その結果、得られたクローンは、1,867 bpの挿入cDNAを含み、DNAシーケンシングの結果467アミノ酸(OAT_v1; voltage-driven organic anion transporter 1と命名)をコードすることが明らかとなった。OAT_v1は、12回膜貫通型のタンパク質であり、これまでに同定されたトランスポーターとの比較により、SLC17ファミリーに属するトランスポーターと相同性を有するタンパク質であることが明らかになった。さらにアフリカツメガエル卵母細胞に発現させることにより機能解析を行い、OAT_v1がパラアミノ馬尿酸の他、尿酸、エストロン硫酸、エストラジオール-17β-グルクロナイド等を含んだ有機アニオンを広く輸送するトランスポーターであることが、明らかになった。さらに電気生理学的手法を用いて、OAT_v1を介する¹⁴C-パラアミノ馬尿酸の輸送は、

促進拡散型であり、膜電位により駆動されるものであることを示された。

B. 尿酸トランスポーターURAT1の同定。

腎には、さらに機能同定の多くの有機アニオントランスポーター類似の構造を持つ遺伝子が発現している。その機能を明らかにすることを目的としてヒトゲノム及びマウスゲノムシーケンスデータベースのBLAST検索を行い、10種を越える新規塩基配列を見出した。その全長cDNAをアフリカツメガエル卵母細胞に発現させて機能解析を行った結果、そのうちの1つが、永年に渡りその実体解明の待たれていた、腎での尿酸の再吸収を担当する腎近位尿細管管腔側の尿酸トランスポーターであることが明らかとなった。

ヒト有機アニオントランスポーターOAT4と相同性の高い配列として、12回膜貫通領域を有すると予想される555アミノ酸からなる新規タンパク質(URAT1: urate transporter 1と命名)が得られた。URAT1は、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させることにより、¹⁴C-尿酸を取り込むことが示された。尿酸取り込みのK_mは371 ± 28 μMで、輸送はNa⁺濃度、膜電位、pHのいずれにも非依存的であった。Northern Blot法による解析で、URAT1発現は成人および胎児腎臓に限局していることが明らかにされ、また抗ヒトURAT1抗体を用いた免疫組織染色像の観察で、URAT1は近位尿細管管

腔側膜に存在することが確認された。URAT1 を介する尿酸の取り込みは、乳酸、nicotinate、pyrazinoic acid などの有機アニオンによって抑制されたが、OAT の代表的基質である PAH によっては抑制されなかった。尿酸排泄促進作用を持つ Probenecid など尿酸の取り込みを抑制し、中でも Benzbromarone は最も強力な抑制効果を示した。これらの特徴はこれまでに報告されているヒト近位尿細管管腔側膜の尿酸輸送の特徴に一致していた。URAT1 発現アフリカツメガエル卵母細胞に注入された ^3H -nicotinate の流出は、細胞外尿酸の存在により促進されたため、URAT1 の尿酸輸送は有機アニオンとの交換輸送により行われると考えられた。以上より、URAT1 はこれまでにその存在の推定されていた腎臓の尿酸再吸収に関わる urate/anion exchanger の分子実体であると思われた。

さらに、運動誘発性急性腎不全と慢性腎機能不全を症状とする突発性腎性低尿酸血症患者の URAT1 の遺伝子変異 W258stop、T217M、E298D の変異を cRNA として導入したアフリカツメガエル卵母細胞の尿酸輸送は著明に低下しており、URAT1 の変異が突発性腎性低尿酸血症の一因であることが明らかにされた。

C. 硫酸抱合体を選択的に輸送する有機アニオントランスポーターOAT7 の同定。

有機アニオントランスポーターOAT1 の翻

訳領域の塩基配列を用いて EST (expressed sequence tag) データベースの検索を行い、OAT1 類似配列 GenBank™/EBI/DDBJ accession No. AA705512 を見出した。

これに相当する配列を逆転写-PCRにより増幅し、その増幅産物を ^{32}P -dCTP でラベルしてプローブとして、cDNA ライブラリーをスクリーニングした。得られたクローンすなわち、ヒト OAT7 の cDNA を含むクローンについて、塩基配列決定のための合成プライマーを用いてダイターミネーターサイクルシーケンシング法 (Applied Biosystems 社) により、cDNA の塩基配列を決定した。これにより、ヒト OAT7 遺伝子の塩基配列が得られた。また、cDNA の塩基配列を常法により解析して、cDNA の翻訳領域とそこにコードされるヒト OAT7 のアミノ酸配列を決定した。OAT7 は、ヒト有機アニオントランスポーターOAT1 と 42%、ラット有機アニオントランスポーターOAT2 と 35%、ヒト有機アニオントランスポーターOAT3 と 41%、ヒト有機アニオントランスポーターOAT4 と 46% のアミノ酸配列の相同性を有していた。TopPred2 アルゴリズムにより、OAT7 のアミノ酸配列を解析した結果、112 の膜貫通領域 (membrane-spanning domain) が予想された。また、第1の親水性ループに糖鎖付加部位、第2、第4、第6の親水性ループにプロテインキナーゼ C 依存性のリン酸化部位と考えられる部位があった。

OAT7 の cDNA の全長を EcoRI で切り出し、

³²P-dCTP でラベルしてプローブとして、Human Blot (クロンテック社) 用いて、添付のプロトコールに従い、ハイブリダイゼーションを行なった。ノーザンブロッティングの結果、肝のみにおいて 2.4、3.0、及び 4.4 kb 付近にバンドが検出された。また、胎児組織のノーザンブロッティングにおいて、胎児肝、胎児腎、胎児肺、胎児脳を比較したが、胎児肝にのみ発現が検出された。バンドのサイズは、成体肝のものと同じであった。

ヒト OAT7 の 542-552 に相当する合成オリゴペプチド [CKQEDPRVEVTQ] に対する特異抗体を Altman らの方法に準じて作製した [Altman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 第 81 巻、2176-2180 項、1984 年]。N-末端のシステイン残基は、KLH コンジュゲーションのために導入した。ヒト肝全タンパク質及ヒト肝タンパク質膜画分 (ともに BIOCHAIN 社から購入) を、SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、Hybond-P PVDV トランスファー膜にブロッティングし、ペプチドアフィニティー精製抗 OAT7 抗体 (1:100) で処理した。その結果、ヒト肝全タンパク質及ヒト肝タンパク質膜画分ともに、抗 OAT7 抗体によって、50 kDa 付近にバンドが検出された。さらに、常法に従い、ヒト肝パラフィン切片 (BIOCHAIN 社から購入) をペプチドアフィニティー精製抗 OAT7 抗体 (1:100) で処理後、ジアミノベンチジンで発色した。また、染色の特異

性を検討する目的で、200 µg/ml の抗原ペプチドの存在下でペプチドアフィニティー精製抗 OAT7 抗体 (1:100) で処理する実験も行った。その結果、肝細胞に染色が見られ、この染色は、抗原ペプチドの存在下で抗 OAT7 抗血清を作用させた場合には検出されず、染色の特異性が示された。OAT7 の染色は、肝細胞の側底膜に局限し、OAT7 タンパク質は肝細胞側底膜 (類洞側膜) に存在することが明らかになった。

ヒト OAT7 遺伝子 cRNA 20ng を卵母細胞に注入することによって発現させ、3 日間培養した。ヒト OAT7 遺伝子 cRNA を注入した卵母細胞及び対照として水を注入した卵母細胞について、基質として [³H]estrone sulfate (50 nM) 及び [³H]dehydroepiandrosterone sulfate (100 nM) を含む ND96 溶液 [96 mM 塩化ナトリウム、2 mM 塩化カリウム、1.8 mM 塩化カルシウム、1 mM 塩化マグネシウム、5 mM HEPES、pH7.4] 中にて卵母細胞を 60 分間放置して、細胞内に取り込まれた放射能のカウントで基質の取り込み率を測定した。その結果、[³H]estrone sulfate の取り込み、及び [³H]dehydroepiandrosterone sulfate の取り込みは、OAT7 を発現させた卵母細胞では、対照として水を注入した卵母細胞に比し、有意に高値を示した。

基質 [³H]estrone sulfate 及び [³H]dehydroepiandrosterone sulfate の濃度の違いによる基質 [³H]estrone sulfate