

及び [³H]dehydroepiandrosterone sulfate の取り込み率の変化を調べることにより、OAT7 のミカエリス-メンテン動力学試験を行った。その結果、 [³H]estrone sulfate 及び [³H]dehydroepiandrosterone sulfate の Km 値はそれぞれに対して $8.7 \pm 1.1 \mu\text{M}$ 、 $2.2 \pm 0.3 \mu\text{M}$ (平均 \pm 標準誤差) であった。

ヒト OAT7 遺伝子 cRNA を注入した卵母細胞による [³H]estrone sulfate の取り込み実験において、系への各種有機アニオン及び有機カチオン添加の影響を調べたところ、有機アニオン及び有機カチオンのうちで、estrone sulfate、dehydroepiandrosterone sulfate、及び β -estradiol sulfate によって有意な cis-阻害効果が観察された。加えて、Sulfobromophthalein (BSP)、及び Indocyanin green (ICG) によって有意な cis-阻害効果が観察された。

OAT7 は肝細胞側底膜 (類洞側膜) に存在する有機アニオントランスポーターであり、外来性異物やステロイドホルモンの硫酸抱合体を主に輸送基質とするものであることが明らかとなった。

D. 腎特異的プロスタグランジントランスポーターの同定。

SLC22 ファミリーの新規トランスポーターとして同定したマウス OAT-PG は、ヒト有機アニオントランスポーター OAT1 と 40%、ヒト有機アニオントランスポーター OAT2 と

38%、ヒト有機アニオントランスポーター OAT3 と 39%、ヒト有機アニオントランスポーター OAT4 と 43% のアミノ酸配列の相同性を有する、SLC22 ファミリーの有機アニオントランスポーター群に含まれる分子である。

OAT-PG の cDNA の断片を ³²P-dCTP でラベルしてプローブとして、マウス各組織から抽出した poly(A)⁺RNA を用いて、ノーザンブロットングを行なった。その結果、腎のみにハイブリダイゼーションバンドが検出され、OAT-PG が腎特異的に発現する遺伝子であることが明らかになった。

OAT-PG の予想されるアミノ酸配列に相当する合成オリゴペプチド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]。常法に従い、マウス腎パラフィン切片をペプチドアフィニティー精製抗 UST 6 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、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 OAT-PG 抗体 (1:100) で処理する実験も行った。その結果、腎近位尿細管細胞の血管側膜に染色が見られ、この染色は、抗原ペプチドの存在下で抗 OAT-PG ペプチドアフィニティー精製抗体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。

OAT-PG 遺伝子 cRNA 20ng をアフリカツメ

ガエル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。OAT-PG 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] プロスタグランジン E1 (1 nM)、[³H] プロスタグランジン E2 (1 nM)、[³H] プロスタグランジン D2 [³H] (1 nM)、及び プロスタグランジン F2 α (1 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] プロスタグランジン E1 (1 nM)、[³H] プロスタグランジン E2 (1 nM)、[³H] プロスタグランジン D2 (1 nM) 及び [³H] プロスタグランジン F2 α (1 nM) の取り込みは、OAT-PG 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。

OAT-PG の機能特性に関するより詳細な解析を施行する目的で、OAT-PG の cDNA を発現プラスミドベクター pcDNA3.1 にサブクローニングし、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 S2-OAT-PG 細胞を作出した。S2-OAT-PG 細胞は、OAT-PG cRNA を注入して発現させたアフリカツメガエル卵母細胞と同様に、[³H] プロスタグランジン E1 (1 nM)、[³H] プロスタグランジン E2 (1 nM)、[³H] プロスタグラ

ンジン D2 (1 nM) 及び [³H] プロスタグランジン F2 α (1 nM) の取り込み活性を示した。それぞれの取り込みの時間経過を測定したところ、1 分間は直線性を示すことが明らかになったため、取り込みの初速度を測定する目的で 30 秒を取り込み測定時間とした。各基質に対して輸送初速度の濃度依存性を検討したところ、Michaelis-Menten 型の飽和型の濃度依存性を示し、Eadie-Hofstee plot から、プロスタグランジン E1、プロスタグランジン E2、プロスタグランジン D2 及びプロスタグランジン F2 α のそれぞれについて、K_m が 163.6 \pm 0.61 nM (平均 \pm 標準誤差)、94.9 \pm 2.91 nM、113.4 \pm 6.05 nM、及び 374.4 \pm 17.93 nM、V_{max} が 5.91 \pm 0.24 fmol/mg protein/min、2.28 \pm 0.26 fmol/mg protein/min、2.05 \pm 0.39 fmol/mg protein/min、及び 6.51 \pm 0.46 fmol/mg protein/min と算出された。

S2-OAT-PG 細胞による [³H] プロスタグランジン E2 (1 nM) の取り込み実験において、系への各種有機アニオン及び有機カチオン添加の影響を調べたところ、有機アニオン及び有機カチオンのうちで、sulfobromophthalein (BSP) のみが 1 μ M の濃度で有意な cis-阻害効果を示した。また、濃度を高めることにより、フロセミド、インドメタシンをはじめとする多くの有機アニオンが、S2-OAT-PG 細胞による [³H] プロスタグランジン E2 の取り込みを阻害する

ことが明らかになった。

以上のように OAT-PG は腎近位尿細管の血管側膜に存在するプロスタグランジンに選択性のある有機アニオントランスポーターであり、薬物やその代謝産物を含む有機アニオンにも親和性を示すトランスポーターであることが明らかとなった。

E. 腎特異的硫酸抱合体トランスポーター Oat5 の同定。

Oat5 は、SLC22 ファミリーに属し、マウス、ラットに存在し、ヒトには見い出されない有機アニオントランスポーターである。Oat5 は、腎特異的な発現を示し、近位尿細管管腔側膜に存在する。Oat5 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、エストロン硫酸、デヒドロエピアンドロステロン硫酸、及びオクラトキシン A について輸送活性が確認された。それぞれ高親和性の輸送を示し、輸送の K_m は、エストロン硫酸に対して $23.6 \mu\text{M}$ 、オクラトキシン A に対して $0.3 \mu\text{M}$ である。Oat5 を介するエストロン硫酸の輸送は、種々の非ステロイド性抗炎症薬、sulfobromophthalein (BSP)、種々の硫酸抱合体で抑制された。この基質選択性は、ヒトにおける OAT4 や OAT7 に相当するものである。前述のように OAT7 は肝特異的な発現を示すが、OAT4 は腎近位尿細管管腔側膜に存在する。遺伝子配列上は、OAT4 に相当するトランスポーターはげっ歯類にはなく、また Oat5 に相当するトラ

ンスポーターはヒトにはない。従って、Oat5 は、げっ歯類において、ヒトにおける OAT4 の役割を果たす有機アニオントランスポーターであると考えられる。

F. 腎特異的ケトン体トランスポーター OATN1 の同定。

SLC22 ファミリーの代表的遺伝子である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、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及び EST (expressed sequence tag) データベースの BLAST 検索を行い、新規トランスポーター OATN1 (novel type organic anion transporter 1) を見い出した。

マウス OATN1 の cDNA を含むクローンについて、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、翻訳領域とそこにコードされるマウス OATN1 のアミノ酸配列を決定した。OATN1 は、SLC22 ファミリーの各有機アニオントランスポーターと 36% 程度の相同性を有していた。SOSUI アルゴリズムにより、12 の膜貫通領域が予想された。OATN1 の cDNA の断片を ^{32}P -dCTP でラベルしてプローブとして、マウス各組織から抽出した poly(A)⁺RNA を用いて、ノーザンブロッティングを行なったところ、腎特異的にハイブリダイゼーションバンドが検出された。マウス及びヒトゲノムを解析したところ、約 98% の相同性を

示す2つの遺伝子が、マウス、ヒトともに同一のゲノム上の locus にタンデムに並んで存在することが明らかとなった。

OATN1 の cDNA を鋳型として作製した DIG-標識 RNA プローブを用いて、マウス腎凍結切片に対して *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、腎髄質外層外帯から髓放線にかけて尿細管に一致して強い陽性シグナルが観察された。

OATN1 の予想されるアミノ酸配列に相当する合成オリゴペプチドに対する特異抗体を作製し、マウス腎凍結切片をペプチドアフィニティー精製抗 OATN1 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、100 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 OATN1 抗体 (1:100) で処理する実験も行った。その結果、*in situ* ハイブリダイゼーションの結果と一致し近位尿細管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 OATN1 ペプチドアフィニティー精製抗体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。OATN1 の染色は、腎近位尿細管細胞の管腔膜に限局し、OATN1 タンパク質は腎近位尿細管細胞管腔膜に存在することが明らかになった。

OATN1 遺伝子を S2 細胞に発現させた安定発現細胞 S2-OATN1 細胞を作製し、種々の有機アニオンの取り込みを測定した。その結果、OATN1 は、ニコチン酸、オルト酸、サ

リチル酸、プロスタグランジン E2 を取込み、オクラトキシン A、エストロン硫酸、タウロコール酸、尿酸、 α -ケトグルタル酸、パラミノ馬尿酸は、輸送しないことが明らかとなった。OATN1 は、さらにインドメタシン、ベンジル酸や、バニルマンデル酸、ホモバニル酸等のカテコールアミンの代謝物により強く抑制され、その基質結合部位は、これらの化合物を受け入れることが示唆された。この基質選択性は、古典的な生理学的研究によって記載された輸送系のそれに対応するものがなく、従って OATN1 の生体内での機能は、特定できない。そこで、OATN1 の生体内での機能を明らかにするために、ノックアウトマウスを用いたメタボローム解析を行った。

マウス OATN1 は、構造的には他の SLC22 ファミリーのメンバーと類似の膜貫通トポロジーを示すが、以前から SLC22 ファミリーに知られていた有機アニオントランスポーター (OAT) サブファミリー、有機カチオントランスポーター (OCT) サブファミリー、カルニチン/有機カチオントランスポーター (OCTN) サブファミリーのいずれにも属さず、新たなサブファミリーターを形成するものであった。

OATN1 の生体内での機能を明らかにすることを目的として、OATN1 のノックアウトマウスの表現型解析を行ったが、OATN1 のホモノックアウトマウスの通常観察からは明らかな表現型は得られなかった。そこで、

OATN1 が近位尿細管の管腔側のトランスポーターであることを考慮し、その機能状態は尿中排泄化合物に鋭敏に反映されるはずであるとの予想のもとに、ノックアウトマウスを用いた尿中化合物の網羅的解析を行い、野生型と違いのある化合物を調べることで OATN1 の生理機能を推察することを試みた。

尿中化合物を網羅的に分析するために、メタボローム解析の一つであるキャピラリー電気泳動と質量分析を組み合わせた CE-MS 法を用いた。尿中化合物の多数のピークから、野生型とノックアウトマウスで顕著な差が見られる 8 つのピークを見出し、そのうちの 하나가、精密分子量及びタンデム質量分析による化合物予測から β -ヒドロキシ酪酸と同定された。実際に放射能標識した β -ヒドロキシ酪酸を用いて、 β -ヒドロキシ酪酸が OATN1 によって輸送されることを S2-OATN1 細胞において実証した。

(2) 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ミノ酸トランスポーターの分子同定 (図 1、2)。

A. アミノ酸型薬物、毒性化合物の輸送経路となる新規輸送系 L アミノ酸トランスポーター LAT3 の同定。

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て行った。FLC4 細胞は、薬物トランスポーターとしてのアミノ酸輸送系 L の特性が他の細胞と著しく異なっており、FLC4 細胞には他の培養細胞株とは異なる新規アミノ酸トランスポーターが存在することを示す結果をすでに得ていた。その分子実体を明らかにする目的で、機能発現クローニングを行った。

FLC4 細胞の大量培養を行い、400 μ g 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、1.5~2.5 kb の画分に ¹⁴C-ロイシンの取り込みのピーク活性を検出した。上記の、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と同様に、この画分の poly(A)⁺RNA から cDNA を合成し、cDNA ライブラリーを作製し、アフリカツメガエル卵母細胞へ機能発現させて、最終的に単一 cDNA クローンを単離した。

得られたクローンは、2,525 bp の挿入 cDNA を含み、DNA シーケンシングの結果 559 アミノ酸 (LAT3; L-type amino acid transporter 3 と命名) をコードすることが明らかとなった。LAT3 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 (全 40 ファミリー) との相同性を有しない、新たなトランスポーターファミリーを形成するものであった。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、LAT3 が L-ドーパ等のアミノ酸類似薬物を含む中性アミノ酸を Na⁺非依存性に輸送する輸送系 L の特性を示すトランスポーターであることが明らかとなった。LAT3 の発見により、す

で明らかにされている輸送系 L アイソフォーム LAT1 及び LAT2 とは構造が大きく異なる新たな輸送系 L が存在することが実証されたことになる。

B. LAT3 類似の構造を持つ新規腎型アミノ酸トランスポーター LAT4 の同定。

FLC4 を用いた機能発現クローニングにより、新規の特性を持つ輸送系 L アミノ酸トランスポーター LAT3 が明らかになったが、ノーザンプロットの結果、LAT3 は腎における発現は、弱いものであった。そこで、FLC4 の塩基配列を用い、EST (expressed sequence tag) データベース、及び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、LAT3 類似の新規配列 (LAT4 と命名) が得られ、その全長 cDNA を入手し、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。LAT4 は、LAT3 と 58% の相同性を示すタンパク質であり、LAT3 とともに新たなトランスポーターファミリーを形成する。ノーザンプロットの結果、LAT4 は、腎臓、胎盤、脳、小腸において強く発現していることが明らかになり、免疫組織学的検討により、腎では近位尿細管の管腔側膜に存在することが示された。従って、LAT4 は、腎でのアミノ酸型薬物、毒性化合物の輸送に関わることが示唆される。

LAT3 及び LAT4 は、新規トランスポーターファミリーを構成し、HUGO human Gene

Nomenclature Committee により、SLC43 (solute carrier family 43) と命名された。

C. 多選択性アミノ酸輸送系 B⁰ の分子同定。

腎近位尿細管の管腔側に存在し、生理的には中性アミノ酸の原尿中からの再吸収を担当し、基質選択性が広いことより種々の毒性化合物の輸送に関わるとされているアミノ酸輸送系 B⁰ は、過去 15 年に及ぶ分子クローニングの努力にも関わらず、分子実体が明らかにされていなかった。輸送系 B⁰ の遺伝的欠損は、アミノ酸尿症の一つである Hartnup 病を惹起するとされていたため、ヒトゲノムデータベースを用い、Hartnup 病遺伝子座でトランスポーター遺伝子を探索する *in silico* のポジショナルクローニングを行った。

Hartnup 病遺伝子座の一つである 5p15 の領域で、Na⁺-依存性トランスポーターファミリーの BLAST 検索を行ったところ、Na⁺/Cl⁻依存性トランスポーターファミリー (SLC6) の exon が集積する部位を見出した。その exon を SLC6 のメンバーとの相同性から 4 つの exon cluster に分類し、EST (expressed sequence tag) データベースを検索したところ、そのうちの 1 つがドパミントランスポーター (SLC6A3) であり、他の 3 つが機能未同定の遺伝子であった。これらを実験的にアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、アミノ酸輸送活性を検討し、その

うちの1つ (*SLC6A19*) にアミノ酸輸送活性を見い出した。*SLC6A19*のコードするトランスporter (B⁰AT1) は、Na⁺依存性に中性アミノ酸全般を輸送する輸送系 B⁰に相当する基質選択性を示した。ロイシンに対する Km は、1.2mM であった。B⁰AT1 の発現は、ノーザンブロットにより腎と小腸に認められ、特異抗体を用いた免疫組織化学的検討により腎では近位尿細管の管腔側膜に局在することが確認された。

同定した輸送系 B⁰アミノ酸トランスporter B⁰AT1 は、その広い基質選択性のためアミノ酸類似の化合物を輸送すると推定される。本研究においては、B⁰AT1 がメチル水銀-システイン抱合体を輸送するかどうかを検討した。メチル水銀はチオール基と親和性があり、生体内ではシステインと非酵素的に容易に反応してシステイン抱合体として存在する。B⁰AT1 をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、¹⁴C 標識ロイシン取り込みに対するメチル水銀-システイン抱合体の抑制効果の検討、及び B⁰AT1 によるシステイン存在下で ¹⁴C 標識メチル水銀の取り込み測定を行った結果、B⁰AT1 がメチル水銀-システイン抱合体を輸送することが示された。

(3) セファロリジンのトランスporter 介在毒性

トランスporter 介在毒性を評価する *in vitro* のモデル系として、有機アニオント

ランスporter OAT3 安定発現 S2 細胞 (S2-OAT3 細胞) を用い、セファロリジンのトランスporter 介在毒性のパスウェイを決定することを目的とした一連の解析を行った。

S2-OAT3 細胞の培養開始から 24 時間後にセファロリジン (0.2 mM) 及び OAT3 インヒビターである Probenecid (0.1 mM) を添加し、その効果を検討した。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。0.2 mM のセファロリジン暴露に対して、OAT3 トランスporter インヒビター Probenecid は、濃度依存的な抑制効果を示したが、0.1 mM の Probenecid ではそれ自体の毒性がほとんど検出されず、セファロリジン (0.2 mM) の毒性を十分に抑制した (図 5)。以上のように、本評価系で、セファロリジンの OAT3 を介するトランスporter 介在毒性が検出できていることを確認した。以上により、トランスporter 介在毒性を評価する *in vitro* のモデル系として、有機アニオントランスporter OAT3 安定発現 S2 細胞 (S2-OAT3 細胞) が有用であることが明らかになった。

(4) セファロリジンのトランスporter 介在毒性の遺伝子的背景

上記で決定した条件(セファロリジン 0.2 mM に対して、Probenecid 0.1 mM) では、図 6 に示すように、セファロリジン暴露によ

り大きな遺伝子発現変動が観察されるが、これはトランスポーターインヒビターである Probenecid (0.1 mM) によって抑制された。Probenecid (0.1 mM) 自体では大きな遺伝子発現変動は誘発されなかった(図6)。この事実は、図5に示した細胞毒性についての検討結果と良く一致するものである。

トランスポーター介在毒性の遺伝子的背景を明らかにする目的で、図4に示すように、「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た。これは、暴露腎毒性化合物による遺伝子発現変動は、トランスポーターを介する成分とトランスポーターを介さない成分からなるため、純粋にトランスポーターを介する成分のみを抽出する必要があるからである。図4に提示する数式から算出される遺伝子発現変動値を対象として、以下の解析を行った。

図7に、セファロリジンによる発現変動のプロファイルを示す。12時間では発現変動する遺伝子の数とその程度は低いですが、24時間後より多くの遺伝子の大きな発現変動が観察されている。

12時間の時点で発現変動の見られた遺伝子に対して、パスウェイ解析を行った結果を図8の左に示す。この図には、発現変動の見られた遺伝子(青地に黄文字)から想定されるその発現変動の背景にある転写因子(白地に赤文字)も加えてある。図8の

右は、12時間の時点で発現変動の見られた遺伝子群(図8左)とパスウェイ解析によって関連付けられる36時間の時点で遺伝子発現変動を示す遺伝子群である。図8左と同様に、発現変動の背景にある転写因子も加えてある。

図8で示される遺伝子群を再度パスウェイ解析によって相互の関連性を図示したのが図9である。図9は、グルタチオン生成に関連する遺伝子群とストレス応答に関連する遺伝子群とからなる。グルタチオン生成に関連する遺伝子群には、酸化ストレスとの関連で発現が変動することが知られているものが含まれる。slc7a11はシスチントランスポーター、slc6a9はグリシントランスポーターであり、それぞれグルタチン生成の基質としてのシスチン(細胞内でシステインとなる)とグリシンを細胞に供給する。Gclc (glutamate-cysteine ligaseの catalytic subunit) と Gclm (glutamate-cysteine ligaseの modifier subunit) は、グルタチン生成に関わる酵素のサブユニットである。これらは、酸化ストレスに際して発現が上昇し、細胞がグルタチンを生成して、酸化ストレスに対抗するために必要な要素である(図10)。以上のように、セファロリジンにより酸化ストレスが細胞に生じていることが、遺伝子発現変動から推察される。

今回のマイクロアレイ解析から得られた遺伝子発現変動とパスウェイ解析、転写因

子解析から予想されるその背景にある転写因子に関して、半定量 RT-PCR により発現変動の確認を行ったところ、Gclm、Gclc、slc6a9、slc7a11、Nfe212、Myd116、Trp53、Ifi30 において、セファロリジン処理後の発現変動の応答の時間経過はそれぞれで異なるが、いずれにおいてもセファロリジンにより上昇し、さらに Probenecid を加えることによってその上昇が抑制されることが確認された。

酸化ストレスに応答したグルタチオン生成に深く関わると考えられる Gclm、Gclc、slc6a9、slc7a11、Nfe212 については、さらに TaqMan PCR による定量 PCR 解析を行った。図 1 1 に 4 時間における解析結果、図 1 2 に 1 2 時間における解析結果を示す。図 1 2 から明らかなように特に 1 2 時間においては、Gclm、Gclc、slc6a9、slc7a11、Nfe212 とともに、セファロリジン処理により遺伝子発現が有意に上昇しているが、これにさらに Probenecid を加えることによってその上昇が抑制されていることが確認された。

(5) セファロリジンのトランスポーター介在毒性の背景にある酸化ストレスの実証

以上より、セファロリジンのトランスポーター介在毒性の背景に酸化ストレスがあることが示されたが、それを実証する目的で、セファロリジンのトランスポーター介在毒性に対する抗酸化物質の効果を検討し

た。図 1 3 に示すように、MTT アッセイで評価したセファロリジンの S2-OAT3 細胞に対する毒性は、抗酸化作用のある N-アセチルシステイン及び alpha-トコフェロールによって抑制され、セファロリジン毒性の背景に酸化ストレスがあることが確認された。

この条件下で、抗酸化物質によるセファロリジン毒性の軽減にともない、セファロリジンによる遺伝子発現が変化するかどうかを検討した。その結果を、図 1 4 に定量 PCR として示すが、特に N-アセチルシステインによって、セファロリジンによって亢進した遺伝子発現が抑制されることが明らかになった。このように遺伝子発現変動を指標としても、セファロリジンのトランスポーター介在毒性の背景に酸化ストレスがあることが実証されたことになる。

(6) セファロリジン処理による遺伝子発現変動の背景に同定された転写因子の役割の検討

図 9 に示すように、セファロリジン処理による遺伝子の発現変動の背景に種々の転写因子が想定される。このうち、酸化ストレスに応答して細胞の防御に働くグルタチオン生成系の遺伝子を発動する位置に想定されている転写因子として Nfe212 と Nfkb1 に着目して、その siRNA によるノックダウンを行い、これらの転写因子のセファロリジンに対する細胞応答における意義を検討した。

Nfkb1 のノックダウンは細胞死をまねき今回の目的における解析が行い得なかったが、Nfe2l2 のノックダウンにより、図 1 5 に示すように、セファロリジンによる遺伝子発現変動の程度が軽減されることが示された。同時に、Nfe2l2 のノックダウンは、図 1 6 に示すように、セファロリジンの細胞毒性を増強することも明らかになった。これは、Nfe2l2 が、セファロリジンによって惹起される酸化ストレスに应答して細胞がグルタチン生成系を発動して自己防御するために重要な転写因子であることを示すものである。

(6) オクラトキシン A のトランスポーター介在毒性の背景にある遺伝子発現変動

オクラトキシン A もセファロリジンと同様に有機アニオントランスポーター OAT1 及び OAT3 によって細胞内に取込まれ、毒性を発揮する (図 1 7)。

OAT3 安定発現 S2 細胞を用いて、オクラトキシン A の毒性及び OAT3 インヒビターである Probenecid の効果を検討した。細胞の培養開始から 24 時間後に化合物暴露を開始し、化合物暴露後、12、24、36、48、120 時間後に MTT アッセイを行い、細胞毒性を評価したところ、オクラトキシン A は、濃度依存的、時間依存的な毒性を示した。トランスポーター介在毒性を検討する目的で、トランスポーターインヒビターで毒性が十分抑制される化合物濃度として、オクラト

キシシン A は 1 μ M に決定した。

この濃度のオクラトキシン A に対して、OAT3 トランスポーターインヒビター Probenecid は、濃度依存的な抑制効果を示した。0.1 mM の Probenecid ではそれ自体の毒性がほとんど検出されず、オクラトキシン A (1 μ M) の毒性を十分に抑制した。

上記で決定した条件 (オクラトキシン A 1 μ M に対して、Probenecid 0.1 mM) では、セファロリジンの場合 (図 6) と同様、オクラトキシン A 暴露により大きな遺伝子発現変動が観察されるが、これはトランスポーターインヒビターである Probenecid (0.1 mM) によって抑制された。この事実は、オクラトキシン A の細胞毒性についての検討結果と良く一致するものである。

オクラトキシン A のトランスポーター介在毒性の遺伝子的背景を明らかにする目的で、図 4 に示すように、「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た。これは、暴露腎毒性化合物による遺伝子発現変動は、トランスポーターを介する成分とトランスポーターを介さない成分からなるため、純粹にトランスポーターを介する成分のみを抽出する必要があるためである。図 4 に提示する数式から算出される遺伝子発現変動値を対象として解析を行った。

オクラトキシン A のトランスポーター介在毒性において発現変動が見られた遺伝子

に関して、パスウェイ解析を行った結果を図18に示す。これらの図には、発現変動の見られた遺伝子(図18黒文字)から想定されるその発現変動の背景にある転写因子(赤文字)も加えてある。

D. 考察

トランスポーターは、もともとは細胞が栄養素を取り込み、代謝産物や異物を排泄するために成立し、進化してきたものと考えられる。従って、トランスポーターの第一の役割は、「個々の細胞の生存維持」であり、生存に必要な栄養素(糖、アミノ酸、脂肪酸、ヌクレオシド、ビタミン等)の細胞への供給、及び代謝産物(有機酸、尿酸等)や外来性異物の排出を行うことである。細胞への栄養素の供給を担当するトランスポーターは、一般に特異性が高く、必要な栄養素を必要だけ取り込むのに適している。これに対して、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、限られた分子種で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。

この広い基質選択性は、時にはむしろわざわざ細胞障害の誘因となることがある。それは、トランスポーターが毒性化学物質通過の経路となり、トランスポーターが存在するためにかえってその毒物に対する感受性が賦与される場合である。その顕著な例

が MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin)によって惹起されるパーキンソン症候群である。MPTPは脳内で酸化され MPP⁺

(1-methyl-4-phenylpyridinium)となり、これがドパミントランスポーターの基質となるためドパミントランスポーターが存在するドパミン作動性神経終末から取り込まれてドパミン作動性神経細胞を破壊する。また、薬物の細胞毒性も、細胞が特定の薬物を輸送することにより生じる場合がある。その例として、セファロリジン腎障害があげられる。セファロsporin系抗生物質であるセファロリジンの腎毒性は、近位尿細管の血管側の有機アニオントランスポーターを介して、セファロリジンが尿細管上皮細胞に取り込まれることによって生じる。また、メチル水銀は、生体内でシステインと結合してメチオニン類似の構造を取るため、アミノ酸トランスポーターを介して体内に分布し細胞内に取り込まれ、毒性を発揮する。このようにトランスポーターが存在することが細胞毒性発現の原因となることがある(トランスポーター介在毒性、Transporter-mediated toxicity)。

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、一般に上述の特異性の低い多選択性トランスポーターであり、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。こ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重要な因子となる。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

ーターの全遺伝子の機能と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ため、本研究は、腎近位尿細管の多選択性トランスポーターの分子同定を先行させた。

本研究において、明らかにした腎近位尿細管の多選択性トランスポーターは、有機アニオントランスポーターとして、近位尿細管管腔側電位依存性有機アニオントランスポーターOATv1、尿酸トランスポーターURAT1、多選択性有機アニオントランスポーターOat5、腎特異プロスタグランジントランスポーターOAT-PG、ケトン体再吸収に働く有機アニオントランスポーターOATN1、アミノ酸トランスポーターとして、Hartnup 病原因遺伝子でありメチル水銀の吸収に関わる近位尿細管管腔側 Na^+ 依存性輸送系 B^0 トランスポーター B^0AT 、 Na^+ 非依存性輸送系LトランスポーターLAT4である。加えて、肝臓に発現する有機アニオントランスポーターOAT7も本研究により同定された。以下にそれぞれの個々の性質と意義について、概説する。

OATv1：電位差駆動型の有機アニオントランスポーターOATv1は、薬物及び外来性異物の腎排泄を担当する腎近位尿細管管腔側の有機アニオントランスポーターであり、この管腔側有機アニオントランスポーターのクローニングは、薬物や外来性異物の尿細管腔への排泄の直接の経路に位置する重要な分子の発見である。これにより、多くの研究者の永年の努力にも関わらず分子実体が明らかにされていなかった、薬物及び外来性異物の腎排泄を担当する

腎近位尿細管管腔側の有機アニオントランスポーターの分子実体解明が実現されたことになる。

URAT1：ヒト及び霊長類は、尿酸酸化酵素（ユリケース）を欠損しているため、有機酸である尿酸はプリン代謝の最終代謝産物となり、主に腎臓より排泄される。またヒト腎臓には尿酸の再吸収に働くurate/anion exchangerが存在するため、腎臓の尿酸輸送は再吸収優位であり、他の哺乳類と比べ血中尿酸値が高いことが知られている。このため尿酸排泄低下は高尿酸血症・痛風の原因となり、腎臓の尿酸排泄亢進が腎性低尿酸血症の成因となる。これらの病態に尿酸トランスポーターが深く関わっていると考えられていたが、これまでその分子実体は明らかでなかった。本研究により、この腎臓の尿酸輸送の分子メカニズムの分子実体がURAT1として明らかにされた。

OAT7：OAT7は、肝細胞側底膜（類洞側膜）に存在する有機アニオントランスポーターであり、外来性異物やステロイドホルモンの硫酸抱合体を主に輸送基質とするものである。OAT7は、肝細胞内で生成したステロイドホルモン、薬物あるいは生体異物等の硫酸抱合体の血液中への移行を司るトランスポーターであると考えられる。OAT7を介して血中に放出された硫酸抱合体は、腎近位尿細管血管側膜に存在する有機アニオントランスポーターOAT3により尿細管上皮細

胞内に取り込まれ、管腔側の OATv1 によって尿中に排泄されると想定される。OAT7 は、薬物やステロイドホルモンの代謝物の肝代謝と腎排泄を繋ぐトランスポーターとして位置付けられる。

Oat5: Oat5 は、SLC22 ファミリーに属し、マウス、ラットに存在し、ヒトには見い出されない有機アニオントランスポーターであり、腎近位尿細管管腔側膜に存在し、エストロン硫酸をはじめとする硫酸抱合体を輸送する。アミノ酸配列上は OAT4 とは相同性は高いとは言えないが、存在部位、機能等から、ヒトにおける OAT4 の役割を果たす有機アニオントランスポーターであると考えられる。

OAT-PG : SLC22 ファミリーに関して、ゲノム情報の BLAST 検索を行い、腎尿細管血管側に発現する腎特異的プロスタグランジントランスポーター OAT-PG を明らかにした。OAT-PG は、有機アニオンのうちでもプロスタグランジン E2、D2、F2 α を特異的に輸送するトランスポーターであり、すでに知られていた SLC21 (別名 SLC0) ファミリーに属するプロスタグランジントランスポーター PGT とは全く構造が異なる。SLC22 ファミリーに属する OAT1、OAT2、OAT3、OAT4 をはじめとする多くのものがプロスタグランジンの輸送活性を示すが、プロスタグランジン特異的であるのは、OAT-PG がはじめてである。OAT-PG は、腎近位尿細管の血管側に存在することから、恐らく遠位尿細管上皮細胞で産生され血管側に放出され、尿細管-糸球体フィードバックのために機能したプ

ロスタグランジンを回収し、シグナルを終結させるために働いている可能性が示唆される。

OAT-N1 : OATN1 (ORCTL3) は、in vitro の安定発現細胞を用いて検出した輸送機能が、従来の生理学的研究において記載された古典的輸送系のなかに対応するものがなく、その生理的意義が不明であったものである。そこで、その機能を明らかにする目的で、OATN1 のノックアウトマウスを用い、ノックアウト表現型から OATN1 の生体内での機能を明らかにすることを目的とした表現型解析を行った。

OATN1 のホモノックアウトマウスは、通常観察からは明らかな表現型は得られなかったため、OATN1 が管腔側のトランスポーターであることを考慮し、その機能状態は尿中排泄化合物に鋭敏に反映されるはずであるとの予想のもとに、ノックアウトマウスを用いた尿中化合物の網羅的解析を行い、野生型と違いのある化合物を調べることにより OATN1 の生理機能を推察することを試みた。

尿中化合物の網羅的解析には、メタボローム解析の一つであるキャピラリー電気泳動と質量分析を組み合わせた CE-MS 法を用いた。CE-MS 法は、微量試料でも解析が可能であり、マウス尿などの成分分析にも効果的である。また、電荷を持った低分子化合物がその対象となり、これは、トランスポーター、特に有機イオントランスポーターの基質の測定に適している。CE-MS 法を用いることにより、従来技術的に不可能であった尿中全化合物の定量的把握が可能

になりつつある。

CE-MS 法によるメタボローム解析により、 β -ヒドロキシ酪酸が OATN1 の生体内での輸送基質として同定された。 β -ヒドロキシ酪酸は、アセト酢酸、アセトンと共にケトン体に属するもので、飢餓や糖尿病に伴い、脂肪酸の β 酸化が亢進した際に主に肝臓で作られ、肝外組織へ運ばれて取り込まれ、ATP 合成を行うためのアセチル CoA の材料になる。

従って、OATN1 は、ケトン体の renal handling に重要な役割をはたしていると予想されるため、その役割を明らかにするために糖尿病マウス（血中のケトン体濃度を上昇させた状態）を用いた予備的検討をすでに行っている。Alloxan 処理により糖尿病状態（ケトン体が高濃度に血中に存在する状態）を惹起すると、OATN1 ノックアウトマウスにおいて多量のケトン体が尿中に排泄されることが明らかになった。OATN1 は飢餓や糖尿病においてエネルギー源となるケトン体の再吸収を担っていると考えられる。

本研究により、腎尿細管に未だに数多く残されている機能未同定のトランスポーターの機能特定に、CE-MS 法による遺伝子ノックアウトマウスのメタボローム解析が有用であるが示された。また機能活性が示されているトランスポーターであっても、従来の研究の手技上の制約からそれが本来の生体内での機能を反映しているものかどう

かは定かでないことから、本手法は、それらも含めて、腎尿細管トランスポーターの生理機能の解明あるいは再評価のための必須の情報を提供するものと期待される。

LAT3 及び LAT4: 新規輸送系 L アミノ酸トランスポーターLAT3 及び LAT4 は、既知の系 L アミノ酸トランスポーターLAT1 及び LAT2 とは異なる構造と機能特性を有しているものであり、これにより新たなトランスポーターファミリー (SLC43: solute carrier family 43) が確立された。特に LAT4 は、腎では近位尿細管の管腔側膜に存在するものであり、腎尿細管でのアミノ酸型薬物、毒性化合物の輸送経路となると考えられる。

B⁰AT1: Hartnup 病の原因遺伝子として同定した B⁰AT1 は、広い基質選択性を有する Na⁺依存性中性アミノ酸トランスポーターであり、小腸上皮及び腎近位尿細管の管腔側膜に存在し、生理的には小腸上皮及び腎近位尿細管からの基質アミノ酸の吸収を担当する。しかし、その広い基質選択性のためアミノ酸類似の化合物を輸送し、それが化学物質の腎毒性の発現に寄与する可能性が指摘されている。メチル水銀はチオール基と親和性があり、生体内ではシステインと非酵素的に容易に反応してシステイン抱合体として存在するが、本研究において、B⁰AT1 がメチル水銀-システイン抱合体を輸送することが明らかになった。

さて、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が、腎毒性物質の多くは水溶性物質であり、それらは、腎尿細管細胞の血管側から取込まれ、管腔側から尿中に排泄される過程で、尿細管上皮細胞に毒性を発揮する。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が、このようなトランスポーター介在毒性の例として、セファロリジンとオクラトキシン A を対象として解析した。

セファロリジン及びオクラトキシン A は、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、腎毒性を惹起する。培養細胞系に高濃度の化合物を用いると、種々の非選択的な経路を経て毒性を発揮するが、実際の *in vivo* での毒性は、多くのアニオン系の腎毒性物質が有機アニオントランスポーターへの親和性のため選択的に尿細管細胞に取込まれて、比較的低濃度域で発生する毒性が临床上問題となる。従って、多くの *in vitro* の毒性実験が扱っている高濃度暴露によって生じる細胞毒性は、実際の生体内で生じる毒性を反映しているとは言い難い。そこで、本研究は、毒性物質が高親和性にトランスポーターによって選択的に輸送されることにより毒性を発揮する系を *in vitro* で構築し、その系を用いて腎毒性化合物の毒性評価と、その毒性発現機序の検討を行うこととした。この方針のもとに、本研究において、腎毒性物質として知られる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を *in vitro* で検討した。

本研究においては、OAT3 をマウス腎近位尿細管由来 S2 細胞に安定発現させた S2-OAT3 細胞を用い、トランスポーター介在毒性評価を行い、マイクロアレイ解析を行ったところ、腎毒性物質によって惹起される遺伝子発現変動が、トランスポーターインヒビターにより抑制されることが確認され、遺伝子発現変動の観点からも、本評価系がトランスポーター介在毒性評価系として適したものであることが検証された。

本評価系において、セファロリジンにより、特にグルタチオン生成系の遺伝子発現亢進と細胞のストレス応答に関する遺伝子の発現亢進が観察された。これは、セファロリジン細胞毒性の背景に酸化ストレスがあることを示唆し、従来セファロリジン毒性の細胞内機序に関する仮説を網羅的解析の観点から実証するものである。本研究では、さらにセファロリジン細胞毒性の背景に酸化ストレスがあることを確認するために、セファロリジン細胞毒性に対する抗酸化物質の効果を検討した。抗酸化物質は、セファロリジン細胞毒性を軽減し、セファロリジンによる遺伝子発現変動を低下させることが明らかになった。これにより、酸化ストレスがセファロリジン細胞毒性の背景にあることについてのさらなる確証が得られたことになる。

本研究により、セファロリジンにより発現変動する遺伝子群の背景に種々の転写因子が想定された。本研究では、酸化ストレスに応答して細胞防御に働くグルタチン生成系の遺伝子を発動する位置に想定された転写因子について、siRNA によるノックダ

ウンを行ったが、そのうち Nfe212 のノックダウンがセファロリジンによる遺伝子発現亢進の程度を軽減させることが明らかになった。さらに、Nfe212 のノックダウンは、セファロリジンの細胞毒性を増強することも明らかになった。これは、Nfe212 が、セファロリジンによって惹起される酸化ストレスに応答して、細胞がグルタチン生成系を発動して自己防御するために重要な転写因子であることを示すものである。

E. 結論

化合物の腎毒性にはトランスポーター介在毒性が重要な位置を占め、トランスポーター介在毒性に関わる腎尿細管の多選択性トランスポーターの全貌の把握と、トランスポーター介在毒性の *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に必須である。本研究は、有機アニオントランスポーター及びアミノ酸トランスポーターに属する多選択性トランスポーターの分子同定を行い、想定される腎尿細管の多選択性トランスポーターのほぼ全体像を明らかにした。また、本研究は、腎有機アニオントランスポーター安定発現細胞を用いて、トランスポーター介在毒性を *in vitro* で再現できる評価系を確立した。これを用いマイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現変動の観点から、セファロリジンのトランスポーター介在毒性には酸化ストレスがその背景にあることを示し、さらに抗酸化物質の遺伝子発現への効果を検討し、これを実証した。また、セファロリジンによる遺伝子発現変動の背景に想定される転写因子のうち、Nfe212 がセファロリジンに

よる酸化ストレスに対する細胞の自己防御において重要な役割を果たすことを明らかにした。

F. 健康危機情報

特記すべきこと無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Babu, E., Takeda, T., Narikawa, S., Kobayashi, Y., Yamamoto, T., Cha, S.H., Sekine, T., Sakhisekaran, D. and Endou, H.: Human organic anion transporters mediate the transport of tetracycline. *Jpn. J. Pharmacol.* 88:69-76, 2002
2. Kobayashi, Y., Hirokawa, N., Ohshiro, N., Sekine, T., Sasaki, T., Tokuyama, S., Endou, H. and Yamamoto, T.: Differential gene expression of organic anion transporters in male and female rats. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 290: 482-487, 2002
3. Uchino, H., Kanai, Y., Kim D.K., Wenpe, M.F., Chairoungdua, A., Morimoto, E., Anders, M.W. and Endou, H.: Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): Insights into the mechanisms of substrate recognition. *Mol. Pharmacol.* 61:729-737, 2002
4. Takeda, M., Khamdang, S., Narikawa, S., Kimura, H., Kobayashi, Y., Yamamoto, T., Cha, S.H., Sekine, T. and Endou, H.: Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal antiviral transport. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300(3): 918-924, 2002
5. Kimura, H, Takeda M, Narikawa S, Enomoto A, Ichida, K and Endou H.: Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate

- renal transport of prostaglandins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301(1):293-298, 2002
6. Kojima R, Sekine T, Kawachi M, Cha S.M., Suzuki Y and Endou H.: Immunolocalization of multispecific organic anion transporters, OAT1, OAT2 and OAT3 in rat kidney. *J Am Soc Nephrol.* 13:848-857, 2002.
 7. Takeda M, Babau E, Narikawa S and Endou H.: Interaction of human organic anion transporters with various cephalosporin antibiotics. *Eur. J. Pharmacol.* 438: 137-142, 2002
 8. Hasegawa M., Kusuhara H, Sugiyama D, Ito K, Ueda S, Endou H and Sugiyama Y.: Functional involvement of rat organic anion transporter 3 (rOAT3; slc 22a8) in the renal uptake of organic anions. *J. Pharmacol. Exp Ther*, 300(3): 647-753, 2002
 9. Nagata Y., Kusuhara H., Endou H. and Sugiyama Y.: Expression and functional characterization of rat organic anion transporter 3 (rOat3) in the choroid plexus. *Mol. Pharmacol.* 51(5): 982-988, 2002
 10. Enomoto A., Takeda M, Shimoa M, Narikawa S, Kobayashi Y, Kobayashi Y, Yamamoto T, Skine T, Cha SH, Niwa T and Endou H: Interaction of human organic anion transporters 2 and 4 with organic anion transport inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Thera*, 301(3): 797-802, 2002.
 11. Jung KY, Takeda m, Shimoda M, Narikawa S, Tojo A, Kim DK, Chairoungdua A, Choi BK, Kusuhara H, Sugiyama Y, Sekine T and Endou H: Involvement of rat organic anion transporter 3 (rOAT3) in cephaloridine-induced nephrotoxicity: In comparison with rOAT1. *Life Sci.* 80: 1861-1874, 2002
 12. Enomoto, A., Kimura, H., Chairoungdua, A., Shigeta, Y., Jutabha, P., Cha, S.H., Hosoyamada, M., Takeda, M., Sekine, T., Igarashi, T., Matsuo, H., Kikuchi, Y., Oda, T., Ichida, K., Hosoya, T., Shimokata, K., Niwa, T., Kanai Y. and Endou, H.: Molecular identification of a renal urate-anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* 417(6887): 447-452, 2002.
 13. Hosoya K, Tomi M, Ohtsuki S, Takanaga H, Saeki S, Kanai Y, Endou H, Naito M, Tsuruo T. and Terasaki T.: Enhancement of L-cystine transport activity and its relation fo xCT gene induction at the blood-brain barrier by diethyl maleate treatment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302(1): 225-231, 2002.
 14. Kobayashi Y Ohshiro N, Shibusawa A, Sasaki T, Tokuyama S, Sekine T, Endou H. and Yamamoto T: Isolation, characterization and differential gene expression of mutispecific organic anion transporter 2 n mice. *Mol. Pharmacol.* 62: 7-14, 2002.
 15. Babu E, Takeda M, Narikawa S, Kobayashi Y, Enomoto A, Tojo A, Cha SH, Sekine T, Shkthisekaran D and Hitoshi Endou: Role of human organic anion transporter 4 in the transport of ochratoxin A. *Biochim Biophys. Acta.* 1590: 64-75, 2002
 16. Takeda M, Khamdang S, Narikawa S, Kimura H, Hosoyamada M, Cha SH, Sekine T. and Endou H.: Characterization of methotrexate transport and its drug interactions with human organic anion transporters. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 302(2): 666-671, 2002.
 17. Enomoto A, Takeda, M, Tojo A, Sekine T, Cha SH, Khamdang S, Takayama F, Aoyama I, Nakamura S, Endou H and Niwa T; Role of organic anion transporters in the tubular transport of indoxyl sulfate and the induction of its nephrotoxicity. *J. Am Soc Nephrol.* 13: 1711-1720, 2002.
 18. Enomoto A, Michael F, Wempe, Tsuchida H, Shin HJ, Cha SH, Anzai N, Goto A, Sakamoto A, niwa T, Kanai Y, Anders MW and Endou H: Molecular identification of a novel carnitine transporter specific of human testis. *J. Biol. Chem.* 277(39): 36262-26271, 2002
 19. Khamdang S, Takeda M, Noshiro R,

- Narikawa S, Enomoto A, Anzai N, Piyachaturawat P and Endou H: Interactions of human organic anion transporters and human organic cation transporters with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303(2): 534-5392, 2002
20. Mukobata S, Hibino T, Sugiyama A, Urano Y, Inatomi A, Kanai Y, Endou H and Tashio R: M6a acts as a nerve growth factor-gated Ca²⁺ channel in neuronal differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 297(4): 722-728, 2002
 21. Matsuo, H., Kanai, Y., Kim, J.Y., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Inatomi, J., Shigeta, Y., Ishimine, H., Chekuntode, S., Tachampa, K., Choi, H.W., Babu, E., Fukuda, J. and Endou, H.: Identification of novel Na⁺-independent acidic amino acid transporter with structural similarity to the member of heterodimeric amino acid transporter family associated with unknown heavy chains. *J. Biol. Chem.* 277(3): 21017-21026, 2002.
 22. Ichida, K., Hosoyamada, M., Kimura, H., Takeda, M., Utsunomiya, Y., Hosoya, T., Endou, H.: Urate transport via the human PAH transporter hOAT1 and its gene structure. *Kidney International* 63: 143-155, 2003
 23. Khamdang, S., Takeda, M., Babu, E., Noshiro, R., Onozato, M.L., Tojo, A., Enomoto, A., Huang, X.L., Narikawa, S., Anzai, N., Piyachaturawat, P. and Endou, H.: Interaction of human and rat organic anion transporter 2 with various cephalosporin antibiotics. *Eur. J. Pharmacol.* 465: 1-7, 2003
 24. Okubo, M., Yamada, K., Hosoyamada, M., Shibasaki, T. and Endou, H.: Cadmium transport by human Nramp 2 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 187: 162-167, 2003
 25. Enomoto, A., Takeda, M., Taki, K., Takayama, F., Noshiro, R., Niwa, T. and Endou, H.: Interactions of human organic anion as well as cation transporters with indoxyl sulfate. *Euro. J. Pharmacol.* 466: 13-20, 2003
 26. Satoh, H., Moriyama, N., Hara, C., Yamada, H., Horita, S., Kunimi, M., Tsukamoto, K., Iso-o, N., Inatomi, J., Kawakami, H., Kudo, A., Endou, H., Igarashi, T., Goto, A., Fujita T and Seki G: Localization of Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter (NBC-1) variants in rat and human pancreas. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284: C729-C737, 2003
 27. Kanai, Y. and Endou, H.: Functional properties of multispecific amino acid transporters and their implications to transporter-mediated toxicity. *J. Toxicol. Sci.* 28: 1-17, 2003
 28. Hasegawa, M., Kusuhara, H., Endou, H. and Sugiyama, Y.: Contribution of organic anion transporters to the renal uptake of anionic compounds and nucleoside derivatives in rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305(3): 1087-1097, 2003
 29. Jutabha, P., Kanai, Y., Hosoyamada, M., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Iribe, Y., Babu, E., Kim, J.Y., Anzai, N., Chatsudhipong, V. and Endou, H.: Identification of a novel voltage-driven organic anion transporter present at apical membrane of renal proximal tubule. *J. Biol. Chem.* 278(30): 28930-27938, 2003
 30. Hosoya K, Tomi M, Ohtsuki S, Takanaga H, Saeki S, Kanai Y, Endou H, Naito M, Tsuruo T, Terasaki T. : Enhancement of L-cystine transport activity and its relation to xCT gene induction at the blood-brain barrier by diethyl maleate treatment. *J Pharmacol Exp Ther.* Jul;302(1):225-31, 2002
 31. Tanaka M, Itoh K, Matsushita K, Matsushita K, Wakita N, Adachi M, Nonoguchi H, Kitamura K, Hosoyamada M, Endou H, Tomita K.: Two male siblings with hereditary renal hypouricemia and exercise-induced ARF. *Am J Kidney*
 32. Babu E, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim do K, Iribe Y, Tangtrongsup S, Jutabha P, Li Y, Ahmed N, Sakamoto S, Anzai N,

- Nagamori S, Endou H.: Identification of a novel system L amino acid transporter structurally distinct from heterodimeric amino acid transporters. *J Biol Chem.* 2003 Oct 31;278(44):43838-45. Epub 2003 Aug 20.
33. Kim GH, Na KY, Kim SY, Joo KW, Oh YK, Chae SW, Endou H, Han JS.: Up-regulation of organic anion transporter 1 protein is induced by chronic furosemide or hydrochlorothiazide infusion in rat kidney. *Nephrol Dial Transplant.* 2003 Aug;18(8):1505-11., 2003
34. Alebouyeh M^{1,2}, Takeda M¹, Onozato ML³, Tojo A³, Noshiro R¹, Hasannejad H¹, Inotaomi J³, Narikawa S⁴, Huang XL⁴, Khamdang¹, Anzai N¹, and Endou H¹: (¹Department of Pharmacology and Toxicology, Kyorin University School of Medicine, Tokyo 181-8611, Japan, ²Neuroscience Research center, Shahid Beheshti University Medical Sciences, Tehran, Iran, ³Department of Nephrology and Endocrinology, University of Tokyo, Tokyo 113-8655, Japan, ⁴Kobuchizawa Laboratories, Fuji Biomedixs Co., Yamanashi 408-0044, Japan): Expression of human organic anion transporters in the choroid plexus and their interactions with neurotransmitter metabolites. *J Pharmacol sci.* 93:430-436, 2003
35. Yoon JH, Kim YB, Kanai Y, Endou H. and Kim DK: Sequential Increases in 4F2hc expression during DMBA-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Anticancer Res.* 23:3877-3882, 2003.
36. Takeda M, Noshiro R, Onozato ML, Tojo A, Hasannejad H, Huang XL, Narikawa S and Endou H.: Evidence for a role of human organic anion transporters in the muscular side effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.* 483: 133-138, 2004.
37. Sakata T, Anzai N, Shin HJ, Noshiro R, Hirata T, Yokoyama H, Kanai Y and Endou H.: Novel single nucleotide polymorphisms of organic cation transporter 1 (*SLC22A1*) affecting transport functions. *Biochem Biophys Res Comm.* 313: 789-793, 2004.
38. Koepsell H, Endou H.: The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch.* 447: 666-676, 2004.
39. Verrey F, Closs EI, Wagner CA, Palacin M, Endou H, Kanai Y.: CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch.* 447:532-542, 2004.
40. Hasannejad H, Takeda M, Taki K, Jung SH, Babu E, Jutabha P, Khamdang S, Aleboye M, Onodera ML, Tojo A, Enomoto A, Anzai N, Narikawa S, Huang, XL, Niwa T, Endou H.: Interactions of human organic anion transporters with diuretics. *J Pharmacol Exp Ther.* 308(3): 1021-1029, 2004.
41. 遠藤 仁, 宮崎博喜, 安西尚彦: 新規尿酸トランスポーターURT1 の同定と尿酸研究の現状. *蛋白質核酸酵素*, 48(1): 18-25, 2003
42. 遠藤 仁: サイエンスエッセイ. *日薬雑誌* 121: 196, 2003
43. Khamdan S, Takeda M, Shimoda M, Noshiro Ri, Narikawa S, Huang XL, Enomoto A, Piyachaturawat P and Hitoshi E: Interactions of human- and rat-organic anion transporters with pravastatin and cimetidine. *J. Pharmacol Sci.* 94: 197-202, 2004.
44. Ekaratanawong S, Anzai N, Jutabha P, Miyazaki H, Noshiro R, Takeda M, Kanai and Endou H.: Human organic anion transporter 4 is a renal apical organic anion / dicarboxylate exchanger in the proximal tubules. *J Pharmacol Sci* 94:297-304, 2004.
45. Hosoyamada M, Kimiyoshi I, Enomoto A, Hosoya T, and Endou H: Function and localization of urate transporter 1 in mouse kidney. *J Am Soc Nephrol* 15: 261-268, 2004.
46. Yoon JH, Kim YB, Kim MS, Park JC, Cook JK, Kook KK, Jung HM, Kim SG, Yoo H, Ko YM, Lee SH, Kim BY, Chun HS, Kanai Y, Endou H and Kim DK:

- Expression and functional characterization of the system L amino acid transporter in KB human oral epidermoid carcinoma cells. *Cancer Lett.* 205: 215-226, 2004.
47. Park JC, Kim YB, Yoon H, Kim HJ, Kim SN, Kanai Y, Endou H and Kim DK: Preferential expression of L-type amino acid transporter 1 in ameloblasts during rat tooth development. *Anat Histol Embryol* 33:119-124, 2004.
 48. Ishikawa T, Tsuji A, Inui K, Sai Y, Anzai N, Wada M, Endou H and Sumino Y: The genetic polymorphism of drug transporters: functional analysis approaches. *Pharmacogenomics* 5(1): 67-99, 2004.
 49. Inatomi J, Horita S, Braverman N, Sekine T, Yamada H, Suzuki Y, Kawahara K, Moriyama N, Kudo A, Kawakami H, Shimadzu M, Endou H, Fujita T, Seki G, Igarashi T.: Mutation and functional analysis of *SLC4A4* in a patient with proximal renal tubular acidosis. *Pfluegers Arch-Eur. J. Physiol.* 448: 438-444, 2004.
 50. Ichida K, Hosoyamada M, Hisatome I, Enomoto A, Hikita M, Endou H and Hosoya T: Clinical and molecular analysis of patients with renal hypouricemia in Japan-influence of URAT1 gene on urinary urate excretion. *J Am Soc Nephrol* 15:164-173, 2004.
 51. Iwai N, Mino Y, Hosoyamada M, Tago N, Kokubo Y and Endou H.: A high prevalence of renal hypouricemia caused by inactive *SLC22A12* in Japanese. *Kidney Int.* 66:935-944, 2004.
 52. Hassannejad H, Takeda M, Narikawa S, Huang XL, Enomoto A, Taki K, Niwa T, Shin HJ, Onozato ML, Tojo A and Endou H: Human organic cation transporter 3 mediates the transport of antiarrhythmic drugs. *Euro J Pharmacol.* 499: 45-51, 2004.
 53. Anzai N, Miyazaki H, Noshiro R, Khamdang S, Chairoungdua A, Shin HJ, Enomoto A, Sakamoto S, Hirata T, Tomita K, Kanai Y and Endou H: The multivalent PDZ domain-containing protein PDZK1 regulates transport activity of renal urate-anion exchanger URAT1 via its C terminus. *J Biol Chem* 279(44): 45942-45950, 2004.
 54. Miyazaki H, Sekine T and Endou H: The multispecific organic anion transporter family: properties and pharmacological significance. *Trends Pharmacol Sci.* 25(12): 654-662, 2004.
 55. Nishibori Y, Liu L, Hosoyamada M, Endou H, Kudo A, Takenaka H, Higashihara E, Bessho F, Takahashi S, Kershaw D, Ruotsalainen V, Tryggvason K, Khoshnoodi J, Yan K: Disease-causing missense mutations in NPHS2 gene alter normal nephrin trafficking to the plasma membrane. *Kidney Int.* 66: 1755-1765, 2004.
 56. Nozaki Y, Kusuhara H, Endou H and Sugiyama Y: Quantitative evaluation of the drug-drug interactions between methotrexate and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the renal uptake process based on the contribution of organic anion transporters and reduced folate carrier. *J Pharmacol Exp Ther.* 309(1): 226-234, 2004.
 57. Nagata Y, Kusuhara H, Imaoka T, Endou H and Sugiyama Y: Involvement of rat organic anion transporter 3 in the uptake of an organic herbicide, 2,4-dichlorophenoxyacetate, by the isolated rat choroids plexus. *J Pharm Sci* 93(11): 2724-2732, 2004.
 58. Kikuchi R, Kusuhara H, Abe T, Endou H and Sugiyama Y.: Involvement of multiple transporters in the efflux of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coA reductase inhibitors across the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther.* 311(3): 1147-1153, 2004.
 59. Nagata Y, Kusuhara H, Hirono S, Endou H and Sugiyama Y: Carrier-mediated uptake of H₂-receptor antagonists by the rat choroids plexus: involvement of rat organic anion transporter 3. *Drug Metab. Dispos.* 32: 1040-1047, 2004.