

## プロスタグランジン類の膜輸送に係わる新規ヒト型輸送担体 (Human Prostaglandin Carrier, hPrC) の単離と機能の特定

小林靖奈, 野島淳子, 大林真幸, 神山紀子, 山元俊憲\*

### Molecular Cloning and Functional Characterization of a Novel Gene Encoding Human Prostaglandin Carrier, hPrC

Yasuna KOBAYASHI, Junko NOJIMA, Masayuki OHBAYASHI,  
Noriko KOHYAMA, and Toshinori YAMAMOTO\*

Department of Clinical Pharmacy, School of Pharmacy, Showa University, 1-5-8 Hatanodai,  
Shinagawa-ku, Tokyo 142-8555, Japan

(Received March 28, 2011; Accepted July 11, 2011; Published online July 26, 2011)

In the present study, we isolated and determined the pharmacological characteristics of a novel gene encoding the human prostaglandin carrier (hPrC). The isolated cDNA consisted of 1431 base pairs that encoded a 477-amino acid protein, and we found that isolated hPrC does not belong to any drug transporter families. RT-PCR analysis revealed that the hPrC mRNA is expressed in various human tissues ubiquitously. When expressed in *Xenopus laevis* oocytes, hPrC mediated the transport of [<sup>3</sup>H] prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) in a sodium-independent manner. The uptake of [<sup>3</sup>H] PGE<sub>2</sub> was not *trans*-stimulated by PG analogous. Although there are several PG transporters such as multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4), organic cation transporter 1 (OCT1) [*solute carrier (SLC) 22A1*], organic anion transporter 1-3 (OAT1-3) [*SLC22A6-8*], OAT4 [*SLC11*], OATP-1 (LST-1) [*SLCO1B1*], OATP2B1 [*SLCO2B1*], OATP2A1 (PGT) [*SLCO2A1*], OATP4A1 (OATP-E) [*SLCO4A1*] have been isolated and well characterized, our findings suggest that hPrC functions as a novel transport peptide responsible for PG uptake. Our results should provide insight into the novel mechanism of the PG transport in the human body.

**Key words**—drug transporter; prostaglandin; organic solute

## 緒 言

薬物の体内動態は、吸収・分布・代謝・排泄の各ステップによって制御されるが、それらの過程には薬物トランスポーターの介在が必要である。

これまで様々なタイプの薬物トランスポーターが単離同定され、その多くは小腸、腎臓、肝臓、脳などに発現していることが明らかになっている。<sup>1,2)</sup> 当教室でもヒト肝臓、腎臓、胎盤、乳房などの組織から様々な薬物トランスポーター human organic anion transporter 2 (hOAT2 [*SLC22A7*]), human organic solute carrier protein 1 (hOSCP1), human nucleoside transporter 1 (hNNT1), lambda light chain of human immunoglobulin surface antigen-related gene (IgLC-rG) を単離し、その機能を報告してき

た。<sup>3-12)</sup>

プロスタグランジン類 (PGs) は陣痛発来や子宮収縮、月経周期に関与する。<sup>13-15)</sup> 主な産生部位は羊膜であるが、<sup>16)</sup> 分娩時には子宮、卵膜、胎盤から多量に産生され、最終産生物は PGE<sub>2</sub> である。<sup>17)</sup> また、医薬品としての PG 製剤は、治療的流産や分娩誘発目的あるいは抗炎症作用などを期待して様々な PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub> 製剤が臨床で使用されている。<sup>18)</sup> 生体内における PGs の役割は、作用部位又はその近接部位の細胞内酵素により合成された後、細胞外へ放出して細胞膜表面に存在する PG 受容体に結合することで多彩な生理作用を示す。PG 受容体は、いずれもリガンド結合部位が細胞表面に存在することから、細胞内で合成された PGs は、細胞膜を通過して一度細胞外に放出され、細胞膜表面に存在する PG 受容体に結合しなければならない。しかし、PGs は生理的 pH では陰性に帯電して

昭和大学薬学部臨床薬学教室

\*e-mail: yamagen@pharma.showa-u.ac.jp

おり、細胞膜の脂質二重層をほとんど通過することはできないため、この過程にトランスポーターの介在が考えられている。<sup>19,20)</sup>

これまで肺、肝臓、腎臓、膣、子宮、血液—脳関門、血液—網膜関門を含む様々な組織で PGs を輸送するトランスポーターの研究が進められてきた。<sup>21,22)</sup> 現在まで明らかになっている PG 輸送担体は、MRP4 [ABCC4],<sup>23)</sup> organic cation transporter 1/2 (OCT1/2 [SLC22A1/SLC22A2]), organic anion transporters (OAT1 [SLC22A6],<sup>24)</sup> OAT2 [SLC22A7], OAT3 [SLC22A8], OAT4 [SLC22A11]),<sup>25)</sup> organic anion transporting polypeptides (OATP2B1 [SLCO2B1], OATP1B1 [SLCO1B1], OATP3A1 [SLCO3A1], OATP4A1 [SLCO4A1], PGT [SLCO2A1]) が知られている。<sup>26,27)</sup> 特に PGT [SLCO2A1] は、PGs を選択的に輸送することが報告された。<sup>26)</sup> ヒトにおける PGT [SLCO2A1] の発現は脳、心臓、肺、胎盤、肝臓、骨格筋、脾臓、腎臓、膵臓、前立腺、卵巣、小腸、大腸など広範囲に発現しており、<sup>26)</sup> 基質には PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> などが報告されている。<sup>28)</sup> このように、多くの組織で多彩な生理作用を示す PGs は、恒常性の維持に必要な不可欠な物質であり、さらに生体の破綻に基づく病態の発生及び進展の過程においても重要である。したがって、PGs の体内挙動を分子レベルで把握することは重要である。<sup>20)</sup>

そこで本研究は、ヒト胎盤 cDNA library より機能未知の遺伝子を単離し、その解析と機能の特定を行うことを目的とした。

## 方 法

**1. 実験材料** BigDye<sup>®</sup> Terminator (v3.1) は、Applied Biosystems 社 (Tokyo, Japan) より購入した。M13 universal primer 及び BamHI は宝酒造株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。RT-PCR high-plus-kit は TOYOBO 株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。ヒト各組織 (脳、心臓、冠動脈、胸腺、乳房、肝臓、胃、小腸、大腸、腎臓、胎盤、精巣) の total RNA は BD CLONTECH 社 (Mountain View, CA, USA) より購入した。Collagenase A は Boehringer Mannheim 社 (Mannheim, Germany) より購入した。Clear-sol I はナカライテスク社 (Kyoto, Japan) より購入した。採卵用アフリカツ

メガエルは埼玉実験動物供給所株式会社 (Saitama, Japan) より購入した。PGE<sub>2</sub> [5,6,8,11,12,14,15-<sup>3</sup>H] (171 Ci/mmol) は室町薬品株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。その他の試薬はすべて試薬特級品を用いた。

## 2. 実験方法

**2-1. ライブラリーの構築** ヒト胎盤 poly (A) + RNA 2 μg に oligo dT 及び random hexamer を加え、添付のプロトコールに従ってヒト胎盤 cDNA ライブラリーを作製した。力価の測定は次のように行った。溶液を Phage dilution buffer にて希釈し、この液を Y1090ZL とともに混和し、Top agar (0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.2% MgCl<sub>2</sub>, 0.7% Seaem Agarose) とともに LB 培地 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.2% MgCl<sub>2</sub>, 1.5% bacto agar, 90 mm×15 mm) に播種し、37°C にて一昼夜培養した。

**2-2. cDNA の単離** LB 培地に、cDNA ライブラリーを 60000–80000 pfu/plate になるように播種し、37°C にてプラークを十分生育させ、ついでレプリカを作製した。スクリーニングに用いたプローブは hOSCP1 cDNA 全長を用いた。<sup>9)</sup> ニトロセルロースフィルターは、ハイブリダイゼーション溶液 (50% formamide, pH 6.5) にて 37°C で一晩ハイブリダイズした。0.1% SDS を含む 2×SSC で洗浄し、一昼夜フィルムを感光させた。得られた陽性シグナルに対応するプラークを拾い、単一クローンを得た。クローンは組み替えを行い、アンピシリンを含む LB 培地 (100 μg/ml) で一昼夜培養後、プラスミド DNA を得た。

**2-3. 塩基配列の決定** 塩基配列決定は、Big-Dye Terminator 法に従った。得られた cDNA 0.5 μg を BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit を用い、M13 universal プライマー又は得られた cDNA に特異的なプライマーを順次合成し、これを用いた。SigmaSpin<sup>™</sup> Post-Reader Clean-Up Columns を用いて精製した。その産物を Hi-Di Formamide 25 μl に懸濁後、Applied Biosystems 310 型 DNA 自動シーケンサーにより全塩基配列を決定した。

**2-4. RT-PCR 法による発現解析** ヒト各組織の total RNA を用い、RT-PCR にて解析を行った。プライマーの設計は、Primer3 Output (<http://>

www-genome.wi.mit.edu/genome\_software/other/primrt3.html) のサイトを用いて設計した。プライマーの配列は、reverse プライマー：5'-AAG-CGCATATGGAGCACTTT-3' で forward プライマー：5'-CGCCTGTCTTCTAGGAGGTG-3'。PCR 条件は以下に示した。①60°C, 30分×1 cycle, ②94°C, 2分×1 cycle, ③94°C, 1分→48°C, 1.5分×35 cycles, ④50°C, 10分×1 cycle, ⑤4°C。

**2-5. cRNA 合成と遺伝子発現 *Xenopus laevis* oocyte の作製** cDNA を *Bam*HI で消化した後、フェノール/クロロホルム抽出を行って cRNA 用テンプレートとした。T7 RNA polymerase を用いて cRNA を作製した。作製した cRNA の濃度は、1.0 μg/μl となるように調整した。アフリカツメガエルから抽出した卵母細胞は最終濃度 2 mg/ml となるように collagenase A を加え、OR2 溶液 (83 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, pH 7.5) 中で加え、室温で 1-2 時間振とうし、stage V-VI を選択して実験に供した。cRNA は実体顕微鏡下で 50 ng をマイクロインジェクションした。Gentamicin (50 μg/ml) を含む Barth's 溶液 (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.33 mM Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0.41 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.82 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 2.4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM HEPES, pH 7.5) にて 2 日間培養し、取り込み実験に用いた。機能解析は放射標識化合物を用い、Na<sup>+</sup> 依存性、pH 依存性、時間依存性、輸送方向の検索、対向基質の検索などについて検討した。

**2-6. [<sup>3</sup>H]PGE<sub>2</sub> の取り込み** 取り込み実験は ND96 溶液 (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, pH 7.5) を用いて室温にて行った。<sup>3</sup>H]PGE<sub>2</sub> は最終濃度が 2 nM となるように ND96 で調整した。卵母細胞とともに室温で 1 時間反応させた。反応停止は、氷冷 ND96 を加えた。停止後、3 個ずつバイアル瓶に移し、10% SDS 200 μl を加えて室温で 60 分間振とうして完全に溶解させた。Clear-sol I を加え、液体シンチレーションカウンターで卵母細胞内に取り込まれた放射活性を測定した。取り込み活性は検量線より算出し、fmol/oocyte/h で表示した。

**2-7. Na<sup>+</sup> 依存性** 単離した遺伝子を介した輸送が Na<sup>+</sup> 依存性であるか否かを明らかにするために、ND96 溶液の Na を、それぞれ choline chloride,

LiCl, mannitol, *N*-methyl-D-glucamine (NMDG) に当モル置換した溶液を作製して実験を行った。

**2-8. 時間依存性** 単離した遺伝子を介した輸送が時間依存性であるか否かを明らかにするために、2 nM [<sup>3</sup>H]PGE<sub>2</sub> を調製し、室温で 15, 30, 60, 90, 120, 150 分間反応させ、取り込み活性の経時変化を検討した。

**2-9. 阻害実験** 単離した遺伝子を介した [<sup>3</sup>H]PGE<sub>2</sub> の取り込み阻害実験は、2 nM [<sup>3</sup>H]PGE<sub>2</sub> を用いた。阻害物質として PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub> を使用し、最終濃度を 200 nM とした。

**2-10. *trans*-Stimulatory 効果** 単離した遺伝子を介した [<sup>3</sup>H]PGE<sub>2</sub> の取り込みが、輸送基質そのものを対向基質としているか否かを検討するために PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub> を用いて検討した。ストック溶液として PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub> を ND96 溶液で 2 μM となるように用時調製し、取り込み開始 1 時間前に最終濃度 200 nM となるように希釈して反応させた。ついで、2 nM [<sup>3</sup>H]PGE<sub>2</sub> と hPrC 発現卵母細胞とを 1 時間反応させた後、取り込み実験を行った。

## 結 果

単離した cDNA は、全長 2544 bp, タンパク翻訳領域 1431 bp, アミノ酸ペプチド数は 477 個を有していた (Fig. 1)。アミノ酸組成から算出したペプチドの分子量は 54.3 kDa であった。*N*-Glycosylation 部位は少なくとも細胞外に 1 ヲ所 (N<sup>215</sup>) 存在することが推定された。また、protein kinase C 結合部位は 9 ヲ所 (S<sup>7</sup>, T<sup>84</sup>, S<sup>148</sup>, S<sup>217</sup>, T<sup>295</sup>, T<sup>305</sup>, T<sup>331</sup>, S<sup>385</sup>, T<sup>416</sup>) 存在することが推定された。しかし、ATP などのヌクレオチド結合部位は存在しなかった。

単離した cDNA はヒトゲノム第 20 染色体短腕側 20p11.22 領域 (20p11.22) に局在していた (data not shown)。そのすぐ近傍には、*SLC24A3* (sodium/potassium/calcium exchanger, member 3), *RPL12L3* (ribosomal protein L12-like 3), *N*-acetyltransferase 5 (NAT5) が局在していた。さらに、Ras and Rab interactor 2 (RIN2) や機能未知の遺伝子 (CAB66858) と高い相同性を示した。また、単離した cDNA は RIN2 遺伝子の intron 部位 (intron 2) に存在していた。次に、Exon/Intron 配列

5'	ATG GCG CCC CCC ATC AAG TCC AAA AAG AAA AGG AGC AGC TCC TTC GTG CTG CCC	54
	M A P C P I K S K K R S S F V L C P	
	AAG CTC GTC AAG TCC CAG CTG CAG AAG GTG AGC GGG GTG TTC AGC TCC TTC ATG	108
	K L V K S Q L Q K V S G V F S S F M	
	ACC CCG GAG AAG CGG ATG GTC CGC AGG ATG GCC GAG CTT TCC CGG GAC AAA TGC	162
	T P E K R M V R R I A E L S R D K C	
	ACC TAC TTC GGG TGC TTA GTG CAG GAC TAG GTG AGC TTC CTG CAG GAG AAC AAG	216
	T Y F G C L V D Y V S F L Q E N K	
	GAG TGC CAC GTG TCC AGC ACG GAC ATG CTG CAG ACC ATC CGG CAG TTC ATG ACC	270
	E C H V S S T D M L Q T I R G F M T	
	CAG GTC AAG AAC TAT TTG TCT CAG AGC TCG GAG CTG GAC CCC CCC ATC GAG TCG	324
	Q V K N Y L S Q S S E L D P P I E S	
	CTG ATC CCT GAA GAC CAA ATG GAT GTG GTG CTG GAA AAA GCC ATG CAC AAG TGC	378
	L I P E D V V L E K A M H K C	
	ATC TTG AAG CCC CTC AAG GGG CAT GTG GAG GCC ATG CTG AAG GAC TTT CAC ATG	432
	I L K P L K G H V E A M L K D F H M	
	GCC GAT GGC TCA TGG AAG CAA CTC AAG GAG AAC CTG CAG CTT GTG CGG CAG AGG	486
	A D G S W K Q L K E N L Q L V R Q R	
	AAT CCG CAG GAG CTG GGG GTC TTC GCC CCG ACC CCT GAT TTT GTG GAT GTG GAG	540
	N P Q E L G V T P D F V D V E	
	AAA ATC AAA GTC AAG TTC ATG ACC ATG CAG AAG ATG TAT TCG CCG GAA AAG AAG	594
	K I K V K F M T M Q K M Y S P E K K	
	GTC ATG CTG CTG CTG CGG GTC TGC AAG CTC ATT TAC ACG GTC ATG GAG AAC AAC	TMD1 648
	<u>V M L L L R V C K L I Y T V M E N N</u>	
	TCA GGG AGG ATG TAT GGC GCT GAT GAC TTC TTG CCA GTC CTG ACC TAT GTC ATG	702
	S G R M Y A D F L P V L T Y V M	
	GCC CAG TGT GAC ATG CTT GAA TTG GAC ACT GAA ATC GAG TAC ATG ATG GAG CTC	TMD2 756
	<u>A Q C D M L E L D T E I E Y M M E C L</u>	
	CTA GAC CCA TCG CTG TTA CAT GGA GAA GGA GGC TAT TAC TTG ACA AGC GCA TAT	810
	L D P S L L H G E G G Y Y L T S A Y	
	GGA GCA CTT TCT CTG ATA AAG AAT TTC CAA GAA GAA CAA GCA GCG CGA CTG CTC	864
	G A L S L I K N F E E A A A R L L	
	AGC TCA GAA ACC AGA GAC ACC CTG AGG CAG TGG CAC AAA CGG AGA ACC ACC AAC	918
	S S E T R D T L R Q W H K R R T T N	
	CGG ACC ATC CCC TCT GTG GAC GAC TTC CAG AAT TAC CTC CGA GTT GCA TTT CAG	972
	R T I P S V D D F Q N Y L R V A F Q	
	GAG GTC AAC AGT GGT TGC ACA GGA AAG ACC CTC CTT GTG AGA CCT TAC ATC ACC	1026
	E V N S G C T G K T L L V R P Y I T	
	ACT GAG GAT GTG TGT CAG ATC TGC GCT GAG AAG TTC AAG GTG GGG GAC CCT GAG	1080
	T E D V C Q I C A E K E A G V G G D P E	
	GAG TAC AGC CTC TTT CTC TTC GTT GAC GAG ACA TGG CAG CAG CTG GCA GAG GAC	1134
	E Y S L F L F V D E T W Q Q L A E D	
	ACT TAC CCT CAA AAA AAA TCA AGG CCG AGC TGC ACA GCC GAC CAC AGC CCC ACA	1188
	T Y P Q K K T S R S C T A D H S P T	
	TCT TCC ACT TTG TCT ACA AAC GCA TCA AGA ACG ATG CTT ATG GCA TCA TTT TCC	1242
	S S T L S T N A S R T I L M A S F S	
	AGA ACG GGG AAG AAG ACC TCA CCA CCT CCT AGA AGA CAG GCG GGA CTT CCC AGT	1296
	R T G K K T S P P P R R Q A G L P S	
	GGT GCA TCC AAA GGG GAG CTG GAA GCC TTG CCT TCC CGC TTC TAC ATG CTT GAG	1350
	G A S K G E L E A L P S R F Y M L E	
	CTT GAA AAG CAG TCA CCT CCT CGG GGA CCC CTC AGT GTG GTG ACT AAG CCA TCC	1404
	L E K Q S P P R G P L S V V T K P S	
	ACA GGC CAA CTC GGC CAA GGG CAA CTT TAG 3' 1431	
	T G Q L G Q G Q L *	

Fig. 1. Nucleotide and Deduced Amino Acid Sequences of the hPrC

The predicted amino acid sequences of single open reading frame are given. Putative transmembrane domains (TMD1, TMD2) are underlined.

について検討した。その結果を Fig. 2(A) に示した。Figure 2(A) に示すように、単離した cDNA は 5 個の exon と 4 個の intron により構成されていた。Table 1 は、推定される exon と intron のサイズとその splice junction の遺伝子配列を示したものである。

Figure 2(B) は分子系統樹解析の結果を示したものである。その結果、単離した cDNA は OAT, OCT, organic cation transporter novel (OCTN), OATP, PGT などのトランスポーターファミリーには属さないことが明らかになった。

膜貫通領域を推定するために、Kyte & Doolittle

Table 1. Exon/Intron Organization of the *hPrC* gene

No.	Length (bp)	Last amino acid in exon	5' Splice donor	Intron length (kb)	3' Splice acceptor
1	>346	D116	CAAATAG <b>gt</b> aagta	14.22	ttgg <b>cag</b> ATGTGGT
2	306	G218	AACTCAG <b>gt</b> gaggc	1.86	Ctct <b>cag</b> GGAGGAT
3	132	G262	GGAGAG <b>gt</b> aactg	4.37	tttt <b>cag</b> GAGGCTA
4	164	Q316	CTTCCAG <b>gt</b> tgca	3.78	cct <b>cag</b> AATTACC
5	>493				

Exon sequences are shown in capital letters, and intron sequences are in lowercase letters. Splice donors *gt* and splice acceptors *ag* are shown in bold.

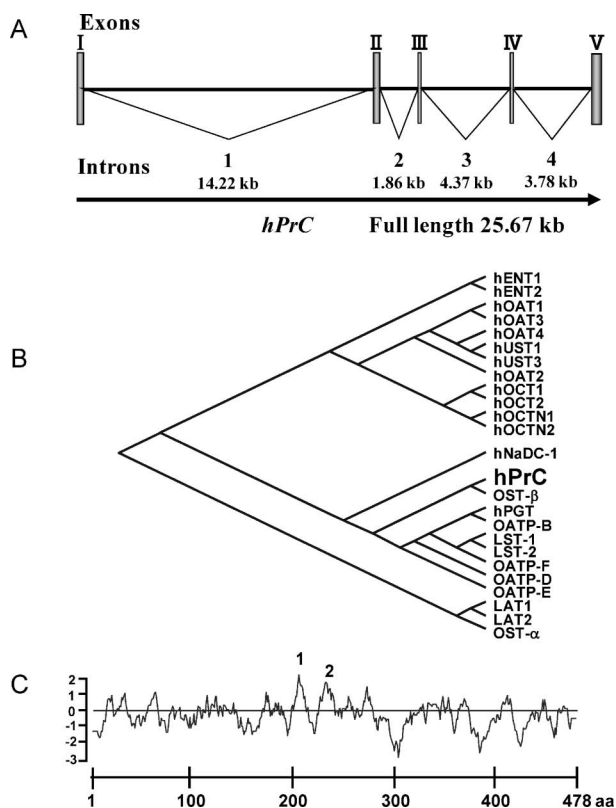


Fig. 2. Exon/Intron Organization, Phylogenetic Tree Analysis and Proposed Secondary Structure Model of the *hPrC* Gene

A, Exon/Intron Organization; The gene coding for *hPrC* contains 5 exons and total size of ~25.67 kb. B, Phylogenetic tree of the member of various human transporter gene families. hPGT, human prostaglandin transporter; OATP, organic anion transporting polypeptide; LST, human liver-specific transporter; hOAT, human organic transporter; hOCT, human organic cation transporter; hOCTN, human organic cation transporter novel; hENT, human equilibrative nucleoside transporter; hNaDC-1, Na<sup>+</sup>/dicarboxylate cotransporter; LAT, L-type amino acid transporter; OST, organic solute transporter; hUST, human uronyl 2-sulfotransferase. C, Proposed secondary structure model of the *hPrC* by Kyte & Doolittle hydropathy plot analysis. *hPrC* contains 2 transmembrane domains.

hydropathy analysis (Window 9), SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>), Rose, Janin, TMPred ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)) の各種アルゴリズムに従って解析し

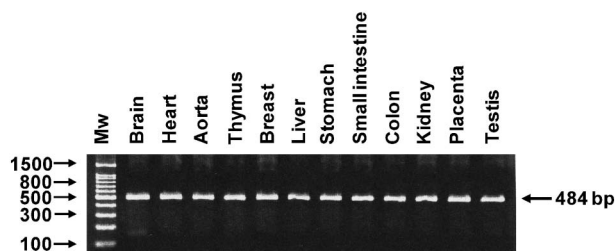


Fig. 3. RT-PCR Analysis of the *hPrC* Gene Expression in Various Human Tissues

A 484 bp transcript was detected in the brain, heart, aorta, thymus, breast, liver, stomach, small intestine, colon, kidney, placenta and testis.

た。その結果、単離した遺伝子は少なくとも2回膜貫通領域を有することが推定された [Fig. 2(C)].

次に、RT-PCR法にてヒト各組織の mRNA 発現分布を検討した。Figure 3 に示すように、検討したすべての組織 (脳、心臓、心血管、胸腺、乳房、肝臓、胃、小腸、結腸、腎臓、胎盤、精巣) でほぼ同程度のバンド (484 bp) が確認された。

Figure 3 の結果から、単離した遺伝子は生体にとって重要な機能を有することを示唆するものと考えられた。そこで、全身各組織に分布しており、かつ、多彩な生理作用をもつ PGs に着目した。PGs の中でも PGE<sub>2</sub> は、医薬品としても臨床で使用されていることから、単離した遺伝子を介した [<sup>3</sup>H] PGE<sub>2</sub> の取り込み実験を行った。その結果を Fig. 4 に示した。Fig. 4(A) に示すように、 [<sup>3</sup>H] PGE<sub>2</sub> の取り込みは対照と比べ、約2倍の有意な取り込みが認められた。そこで、 [<sup>3</sup>H] PGE<sub>2</sub> を基質として以降の機能解析に用いることとし、これ以降の実験では、本遺伝子をヒト型 Prostaglandin Carrier (*hPrC*) と呼ぶこととした。

PGT は、Na<sup>+</sup> 非依存性であることが報告されている (Chan *et al.*, 1998)。そこで、*hPrC* が Na<sup>+</sup> 依

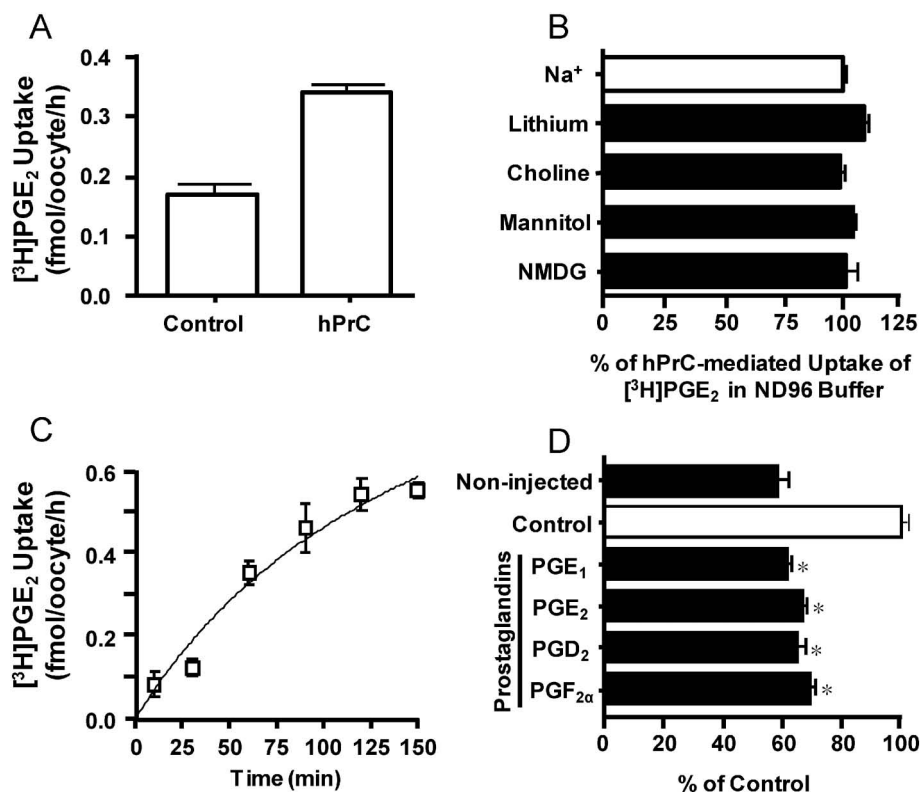


Fig. 4. Functional Characterization of hPrC in *Xenopus laevis* Oocyte

A, Uptake of [ $^3\text{H}$ ] prostaglandin  $\text{E}_2$  via hPrC-expressing oocytes. B, Effect of extracellular cation on [ $^3\text{H}$ ]  $\text{PGE}_2$  in oocyte expressing hPrC. The uptake rates of [ $^3\text{H}$ ]  $\text{PGE}_2$  (2 nM) by control or hPrC-expressing oocytes for 1 h were measured in the presence or absence of extracellular  $\text{Na}^+$ . Extracellular  $\text{Na}^+$  was replaced with an equimolar concentration of Lithium $^+$ , choline $^+$ , mannitol and NMDG. C, Time-dependent transport of [ $^3\text{H}$ ]  $\text{PGE}_2$  in oocytes expressing hPrC. The uptake of 2 nM [ $^3\text{H}$ ]  $\text{PGE}_2$  in oocyte expressing hPrC was measured during 2.5 h of incubation. Transport activity was determined by subtraction of the uptake rate in control oocytes from that of in hPrC-expressing oocytes. D, Inhibition of hPrC-mediated the uptake of [ $^3\text{H}$ ] prostaglandin  $\text{E}_2$  by various prostaglandin analogues. The uptake of [ $^3\text{H}$ ]  $\text{PGE}_2$  (2 nM) by hPrC-expressing oocytes or non-injected oocytes for 1 h were determined in the absence or presence of inhibitors (200 nM). The values were expressed as a percentage of hPrC-mediated [ $^3\text{H}$ ]  $\text{PGE}_2$  uptake without inhibitors (open column) (mean  $\pm$  S.E.;  $n=3-5$ ).  $\text{PGE}_2$ , prostaglandin  $\text{E}_2$ ; hPrC, human prostaglandin carrier.

存性の輸送を示すか否かを検討した。その結果を Fig. 4 (B) に示した。Figure 4 (B) に示すように、hPrC を介した [ $^3\text{H}$ ]  $\text{PGE}_2$  の輸送は、 $\text{Na}^+$  非存在下 (choline $^+$ ,  $\text{Li}^+$ , mannitol, NMDG) でもほぼ同程度の輸送活性が得られた。以上の結果から、hPrC は  $\text{Na}^+$  非依存性であることが明らかとなった。

次に、hPrC を介した [ $^3\text{H}$ ]  $\text{PGE}_2$  の輸送の時間依存性について検討した。Fig. 4 (C) に示すように、[ $^3\text{H}$ ]  $\text{PGE}_2$  は hPrC を介して時間依存的に取り込まれた。

hPrC の詳細な基質認識性を検討するために、hPrC を介した [ $^3\text{H}$ ]  $\text{PGE}_2$  取り込みが種々の PGs 存在下で阻害されるか否かを実験した。その結果、Fig. 4 (D) に示したように、阻害剤非存在下での [ $^3\text{H}$ ]  $\text{PGE}_2$  の取り込みを 100% としたとき、hPrC を介した [ $^3\text{H}$ ]  $\text{PGE}_2$  の取り込みは種々の PGs 存在

下で有意に阻害された。

hPrC を介した [ $^3\text{H}$ ]  $\text{PGE}_2$  の輸送が PGs 自身を駆動力にしているのか否かを検討するために、 $\text{PGE}_1$ ,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  を preloading して検討した。Figure 5 に示すように、hPrC は  $\text{PGE}_1$ ,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  存在下において取り込み活性の増加は認められなかった。

## 考 察

本研究はヒト胎盤 cDNA library より新規遺伝子を単離し、その機能の特定を行ったものである。機能解析の結果、[ $^3\text{H}$ ]  $\text{PGE}_2$  輸送することが明らかとなり、本研究ではこの遺伝子をヒト型 prostaglandin carrier (hPrC) と命名した。

単離した hPrC cDNA 全長の配列を NCBI の BLAST $^{\text{®}}$ にて検索した結果、hPrC はヒト第 20 染色体短腕側 p11.22 に局在していた。この近傍には、

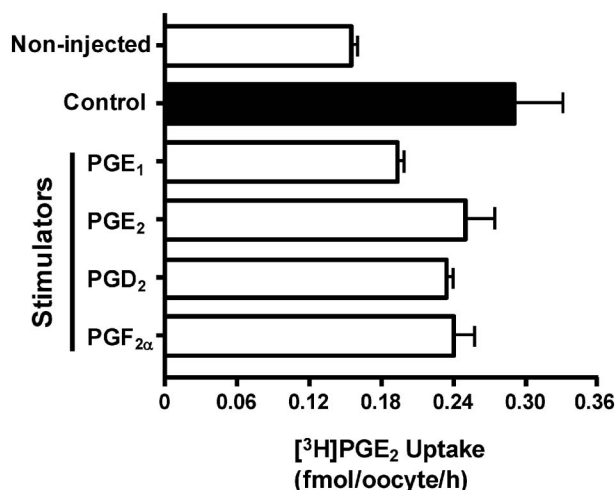


Fig. 5. *trans*-Stimulatory Effect of Various Prostaglandins on the Uptake of [<sup>3</sup>H] PGE<sub>2</sub> via hPrC Expressing Oocytes

The uptake of [<sup>3</sup>H] PGE<sub>2</sub> (2 nM) by hPrC-expressing oocytes or non-injected oocytes for 1 h were determined in the absence or presence of various prostaglandins (200 nM). The values were expressed as a percentage of hPrC-mediated [<sup>3</sup>H] PGE<sub>2</sub> uptake without stimulators (closed column) (mean ± S.E.; n=3-5).

新生児黄疸, 肺動脈弁狭窄症, アラジル・ワトソン症候群, 脳動脈性アミロイドーシスなどの遺伝病に関与する配列が局在していた。また, その上流及び下流には *SLC24A3*, *RPL12L3*, *NAT5* が局在していた。さらに hPrC は, RIN2 や機能未知の遺伝子 (GenBank accession number, CAB66858) と高い相同性を示した。RIN2 は NT\_011387, AB060339.1, AK026753.1, AK130346, AL136924, BC034698, BC128065, CR617469, M37190, NM\_018993 など計 10 遺伝子が類似遺伝子として登録されているが, いずれの遺伝子とも一致しなかった。そこで分子系統樹解析を行った結果, hPrC は代表的な薬物トランスポーター群の OATP, OAT, OCT/OCTN の各 family には属さない遺伝子であることが明らかとなった。

一般に, 薬物トランスポーターの多くは 10-12 回膜貫通型を示すことが明らかになっている。<sup>29)</sup> 当教室では, これまでに hOSCP1, RPL3, IgLC-rG, hNT1 は少なくとも 1-3 回膜貫通部位を有することを報告している。そこで hPrC の二次構造を推定するために, 各種膜貫通予測アルゴリズム (Kyte & Doolittle, SOSUI, TMpred, Janin, Rose) を用いて検討した。その結果, hPrC は少なくとも 2 回膜貫通型であることが推定された。

Ost $\alpha$  は Ost $\beta$  と二量体を形成することで輸送活性

を最大に発揮することが明らかにされていることから, この 2 つのタンパク質は輸送活性を最大限に発揮するために必要である。<sup>30)</sup> しかしながら, 現時点では成熟した hPrC 蛋白が単体で機能しているのか, あるいはダイマーやヘテロダイマーなどの多量体を形成しているのか, 又は卵母細胞内の未同定のタンパク質と結合することで輸送活性を発揮しているのか不明である。この点に関しては, 今後の研究課題である。哺乳動物細胞に本遺伝子を導入し, 検討する必要があるかもしれない。

hPrC の組織分布を明らかにするために, RT-PCR 法により解析した。その結果, hPrC は検討したすべての組織にほぼ同程度発現していた。これまで, ヒト各組織に発現するトランスポーターとして, OCTN1/2 [*SLC22A1/2*] や amino acid transporter family [*SLC2A*], Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger family [*SLC9*], proton coupled metal ion transporter family [*SLC10*], monocarboxylate transporter family [*SLC16A1*], folate/thiamine transporter family [*SLC191/2*], Na/Pi cotransporter family [*SLC20*], OATP family [*SLCO3A1/4A1*] などが報告されている。これらのトランスポーターは, カルニチン, アミノ酸, TCA サイクルの中間代謝物, リン, 胆汁酸及びその抱合体など, 生体の恒常性の維持に必要な物質の輸送に係わっている。hPrC mRNA は, すべての組織でその発現が認められたことから, この遺伝子は全身に作用するような物質を輸送する可能性が示唆された。糖やアミノ酸以外に全身に作用する物質には PGs が知られているので,<sup>30)</sup> 本研究では PGs の中でも医薬品としても使用されている PGE<sub>2</sub> に着目し, hPrC が PGE<sub>2</sub> を輸送するか否かを検討するために, アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて取り込み実験を行った。その結果, hPrC を介して有意な取り込み活性が認められた。したがって, hPrC は [<sup>3</sup>H] PGE<sub>2</sub> の膜輸送に関与していると考えられたため, 以降の解析には [<sup>3</sup>H] PGE<sub>2</sub> を用いることにした。なお, 結果には示さないが, [<sup>3</sup>H] PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  も hPrC を介して輸送された。

hPrC を介した輸送機能を特定するために, Na<sup>+</sup> 依存性, 時間依存性, *cis*-阻害実験, *trans*-stimulatory 効果実験を行った。その結果, hPrC を介した [<sup>3</sup>H] PGE<sub>2</sub> の輸送は Na<sup>+</sup> 非依存的であった。また, [<sup>3</sup>H] PGE<sub>2</sub> の取り込み活性は時間依存的であった。

このことは、PGE<sub>2</sub>がhPrC発現卵母細胞の膜に結合するばかりではなく、細胞膜を通過して細胞内に輸送されることを示唆するものと考えられる。次に、hPrCが他のPGs輸送基質とするか否かについて、cis阻害実験を行った。その結果、hPrCを介した<sup>3</sup>H]PGE<sub>2</sub>の取り込みは、PGE<sub>1</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGD<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub>によって阻害された。このことは、検討したすべてのPGsがhPrCの基質になり得ることを示している。Luらの報告によると、PGs存在下ではPGTを介した<sup>3</sup>H]PGE<sub>2</sub>の取り込み活性が低下したことから、PGTの基質にはその他のPGsもなり得ることを示唆している。<sup>26)</sup>また、乳酸はPGTを介した<sup>3</sup>H]PGE<sub>2</sub>の取り込み駆動力になっていることも明らかにされていることから、<sup>20)</sup>今後、hPrCを介した<sup>3</sup>H]PGE<sub>2</sub>の輸送に乳酸が関与するか否かについて検討が必要である。

以上、本研究で単離したhPrCはPGE<sub>2</sub>を細胞外から細胞内へ輸送するキャリアータンパクであり、分子系統樹解析及び機能解析の結果、PGsの輸送に係わる新規輸送担体であることが明らかになった。薬物トランスポーターの一般的な特徴として基質多選択性が挙げられるが、hPrCもPGs以外の薬物を輸送する可能性があるため、この点に関しては今後の検討課題である。本研究成果は、PGsの経細胞膜輸送に関し、PGT、OAT、OATP以外のメカニズムが存在する可能性を提唱するものであり、今後更なる詳細な研究が必要である。

**謝辞** 本研究は、私立大学戦略基盤形成支援事業ハイテクリサーチセンター整備事業(H19-H23)(文部科学省)及び財団法人臨床薬理研究振興財団研究奨励金(H21)より助成を受けて実施したものである。

## REFERENCES

- 1) Mizuno N., Sugiyama Y., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **17**, 93–108 (2002).
- 2) Mizuno N., Niwa T., Yotsumoto Y., Sugiyama Y., *Pharmacol. Rev.*, **55**, 425–461 (2003).
- 3) Kobayashi Y., Ohshiro N., Shibusawa A., Sasaki T., Tokuyama S., Sekine T., Endou H., Yamamoto T., *Mol. Pharmacol.*, **62**, 7–14 (2002).
- 4) Kobayashi Y., Hirokawa N., Ohshiro N.,

- Sekine T., Sasaki T., Tokuyama S., Endou H., Yamamoto T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **290**, 482–487 (2002).
- 5) Kobayashi Y., Ohshiro N., Tsuchiya A., Kohyama N., Ohbayashi M., Yamamoto T., *Drug Metab. Dispos.*, **32**, 479–483 (2004).
- 6) Kobayashi Y., Ohbayashi M., Kohyama N., Yamamoto T., *Eur. J. Pharmacol.*, **524**, 44–48 (2005).
- 7) Kobayashi Y., Sakai R., Ohshiro N., Ohbayashi M., Kohyama N., Yamamoto T., *Drug Metab. Dispos.*, **33**, 619–622 (2005).
- 8) Kobayashi Y., Ohshiro N., Sakai R., Ohbayashi M., Kohyama N., Yamamoto T., *J. Pharm. Pharmacol.*, **57**, 573–578 (2005).
- 9) Kobayashi Y., Shibusawa A., Saito H., Ohshiro N., Ohbayashi M., Kohyama N., Yamamoto T., *J. Biol. Chem.*, **280**, 32332–32339 (2005).
- 10) Umemoto T., Kobayashi Y., Suzuki M., Sanada Y., Yamamoto Y., *Life Sci.*, **84**, 45–51 (2009).
- 11) Kobayashi Y., Umemoto T., Ohbayashi M., Kohyama N., Sanada Y., Yamamoto T., *Drug Metab. Dispos.*, **38**, 1427–1435 (2010).
- 12) Kobayashi Y., Kawakami K., Ohbayashi M., Kohyama N., Yamamoto T., *J. Toxicol. Sci.*, **35**, 827–834 (2010).
- 13) Hertelendy F., Woods R., Jaffe B. M., *Prostaglandins*, **3**, 223–227 (1973).
- 14) Satoh K., Yasumizu T., Fukuoka H., Kinoshita K., Kaneko Y., Tsuchiya M., Sakamoto S., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **133**, 886–890 (1979).
- 15) MacDonald P. C., Casey M. L., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **76**, 1332–1339 (1993).
- 16) Whitsett J. A., *J. Pediatr.*, **96**, 600–603 (1980).
- 17) Mitchell M. D., Bibby J., Hicks B. R., Turnbull A. C., *Prostaglandins*, **15**, 377–382 (1978).
- 18) Smith W. L., *Biochem. J.*, **259**, 315–324 (1989).
- 19) Chan B. S., Satriano J. A., Pucci M., Schuster V. L., *J. Biol. Chem.*, **273**, 6689–6697 (1998).
- 20) Chan B. S., Endo S., Kanai N., Schuster V. L., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **282**, 1097–1102 (2002).
- 21) Schuster V. L., *Annu. Rev. Physiol.*, **60**, 221–



- 242 (1998).
- 22) Schuster V. L., *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **68**, 633–647 (2002).
- 23) Reid G., Wielinga P., Zelcer N., van der Heijden I., Kuil A., de Haas M., Wijnholds J., Borst P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 9244–9249 (2003).
- 24) Sekine T., Watanabe N., Hosoyamada M., Kanai Y., Endou H., *J. Biol. Chem.*, **272**, 18526–18529 (1997).
- 25) Kimura H., Takeda M., Narikawa S., Enomoto A., Ichida K., Endou H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **301**, 293–298 (2002).
- 26) Lu R., Kanai N., Bao Y., Schuster V. L., *J. Clin. Invest.*, **98**, 1142–1149 (1996).
- 27) Tamai I., Nezu J., Uchino H., Sai Y., Oku A., Shimane M., Tsuji A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **273**, 251–260 (2000).
- 28) Kanai N., Lu R., Satriano J. A., Bao Y., Wolkoff A. W., Schuster V. L., *Science*, **268**, 866–869 (1995).
- 29) Sugiyama Y., Maeda K., *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **125**, 178–184 (2005).
- 30) Dawson P. A., Hubbert M., Haywood J., Craddock A. L., Zerangue N., Christian W. V., Ballatori N., *J. Biol. Chem.*, **280**, 6960–6968 (2005).