

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公開特許公報** ( A )

(11)特許出願公開番号

**特開2001 - 17174**

( P 2 0 0 1 - 1 7 1 7 4 A )

(43)公開日 平成13年 1月23日 (2001.1.23)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード <sup>*</sup>	(参考)
C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00	ZNA	A 4B024
C07K 14/47		C07K 14/47		4B063
16/18		16/18		4H045
C12Q 1/68		C12Q 1/68		A

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全11頁)

(21)出願番号	特願平11 - 187244	(71)出願人	396020800 科学技術振興事業団 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号
(22)出願日	平成11年 7 月 1 日 (1999.7.1)	(72)発明者	遠藤 仁 神奈川県相模原市由野台 1 - 23 - 7
		(72)発明者	関根 孝司 東京都立川市栄町 1 - 10 - 47
		(72)発明者	車 碩鎬 東京都三鷹市新川 3 - 11 - 4 サンループ ハウス201
		(74)代理人	100102668 弁理士 佐伯 憲生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】胎盤型有機アニオントランスポーターとその遺伝子

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、胎盤における有機アニオン輸送に関与する新規な有機アニオントランスポーター遺伝子およびその遺伝子がコードするポリペプチドである有機アニオントランスポーターを提供するものである。

【解決手段】 本発明は、胎盤型有機アニオントランスポーター O A T 4、より詳細には、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列、又は、その一部のアミノ酸配列が欠失し、他のアミノ酸で置換もしくは付加されてもよいアミノ酸配列を有する胎盤型有機アニオントランスポーター O A T 4 に関する。また、本発明は、前記した胎盤型有機アニオントランスポーター O A T 4 をコードする塩基配列又はそれとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を有するをコードする核酸、好ましくは D N A に関する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 胎盤型有機アニオントランスポーター OAT4。

【請求項 2】 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列、又は、その一部のアミノ酸配列が欠失し、他のアミノ酸で置換もしくは付加されてもよいアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載の胎盤型有機アニオントランスポーター OAT4。

【請求項 3】 エストロン硫酸、デヒドロエピアンドロステロン硫酸、及びノ又はオクラトキシン A を輸送する能力を有する請求項 1 又は 2 に記載の胎盤型有機アニオントランスポーター OAT4。

【請求項 4】 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列、又は、その一部のアミノ酸配列が欠失し、他のアミノ酸で置換もしくは付加されてもよいアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする塩基配列又はそれとストリンジентな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を有する核酸。

【請求項 5】 配列表の配列番号 1 で示される塩基配列を有する DNA である請求項 4 に記載の核酸。

【請求項 6】 配列表の配列番号 1 で示される塩基配列を有する DNA の連続する少なくとも 14 塩基またはその相補鎖よりなる核酸。

【請求項 7】 塩基の数が 20 以上である請求項 6 に記載の核酸。

【請求項 8】 請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の胎盤型有機アニオントランスポーター OAT4 をコードする遺伝子の存在を検出、同定又は定量するためのプローブとして使用されるための請求項 6 又は 7 に記載の核酸。

【請求項 9】 請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の胎盤型有機アニオントランスポーター OAT4 を認識し得る抗体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は有機アニオン（有機陰イオン）輸送に關する遺伝子と、その遺伝子がコードするポリペプチドに關する。より詳細には、本発明は、胎盤型有機アニオントランスポーター OAT4、それをコードする遺伝子、当該遺伝子を検出するためのプローブ、及び当該蛋白質を認識し得る抗体に關する。

## 【0002】

【従来の技術】腎臓や肝臓は、生体異物や薬物の代謝および体外排出に關して重要な役割を果たしている。腎臓の尿細管細胞は極性を有する上皮細胞であり、側底膜を介して血液と接し、種々の物質の受け渡しを行っている。有機アニオンの一部は、輸送担体（トランスポーター）により側底膜を介して腎臓に取り込まれ、また細胞内で代謝により産生された有機アニオンもトランスポーターにより排出されることがこれまでの生理学的な研究から予測されてきた。

【0003】有機アニオンは、薬物や環境毒素、またそれらの代謝物などの多くを含むことから、有機アニオン輸送系は、生体異物排泄系あるいは薬物輸送系としても広く知られてきた。尿細管細胞の有機アニオンの取り込みについては、これまで摘出臓器灌流法や単離細胞膜小胞系などを用いた実験系により研究されてきた。しかし従来の手法では、側底膜を介した有機アニオン輸送系について詳細に解析することは困難であり、トランスポーターそのものを単離して解析することが望まれてきた。

10 【0004】有機アニオン輸送は、腎臓や肝臓以外の組織においても行われている。胎盤は、胎児と母体との間で物質交換を活発におこなっている組織であり、糖やアミノ酸を含む生体必須物質はトランスポーターを介して、母体から効率良く胎児に輸送されている。一方、胎盤は胎児の外部環境に対する組織バリアーとしての役目も担っている。胎盤は、母体が摂取した生体異物の胎児への自由な移行に対して、ある種の制限を与えており、この機能の一部は、異物排泄トランスポーターによる胎児循環からの異物除去によるものと想定される。

20 【0005】さらに、胎児の体内においても種々の代謝反応がおこっており、その結果として有機アニオンが産生されている。胎児の解剖学的な特殊性から、こうした代謝物の排泄は主に胎盤を介している。有機アニオントランスポーターが胎盤に存在してこの役割を果たしていると考えるのは、合目的である。このように、胎盤における生体異物輸送（特に有機アニオン輸送）は、胎児の発育および遺伝毒性に關して重要な役割を担っていると考えられるにも関わらず、腎臓や肝臓以上にその輸送の詳細は不明である。

30 【0006】本発明者らは、既に腎臓、肝臓、脳などにおいて中心的な役割を果たしている有機アニオントランスポーター OAT1 (J. Biol Chem 272 巻, 18526-9 頁, 1997)、OAT2 (FEBS letter 429, 179-182 頁, 1998)、および OAT3 (J. Biol Chem, 274 巻, 13675-13680 頁, 1999) を単離し報告してきた。また、これらについては、既に特許出願済みである。OAT1、OAT2 および OAT3 は化学構造の異なる多くの有機アニオンを輸送することの出来るトランスポーターであり、種々のアニオン性薬物の輸送も行っている。OAT1、OAT2 さらに OAT3 の単離、同定は有機アニオントランスポーターがファミリーを形成することを示している。このファミリーのメンバーは、腎臓や肝臓など生体異物の体外排出に中心的な役割を果たしている臓器のみならず、組織閉門を形成する脳にもその発現が認められる。

40 【0007】これらの事実から、本発明者らは、組織閉門の機能的単位および胎児の代謝物排泄経路として、胎盤における有機アニオントランスポーターの存在を予想し、胎盤に存在する新規な有機アニオントランスポーターを単離した。

## 【 0 0 0 8 】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、胎盤における有機アニオン輸送に関与する新規な有機アニオントランスポーター遺伝子およびその遺伝子がコードするポリペプチドである有機アニオントランスポーターを同定し、提供することにある。その他の目的については以下の記載より明白である。

## 【 0 0 0 9 】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、既に述べたように、3つの有機アニオントランスポーターOAT 1、OAT 2およびOAT 3を単離した。これらは相互に40%前後のアミノ酸配列の相同性を有している。これらの配列をもとに、ESTデータベース(expressed sequence tag data base)を検索し、OAT 1、2および3と相同性を有する新規cDNA断片を同定した。このcDNA断片を用いて、ヒト腎臓cDNAライブラリーよりこれまでに報告のない新規クローン(OAT 4)を同定した。そして、このものが胎盤型であることを確認した。

【 0 0 1 0 】したがって、本発明は、胎盤型有機アニオントランスポーターOAT 4に関し、より詳細には、本発明は、配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列、又は、その一部のアミノ酸配列が欠失し、他のアミノ酸で置換もしくは付加されてもよいアミノ酸配列を有する胎盤型有機アニオントランスポーターOAT 4に関する。本発明の胎盤型有機アニオントランスポーターOAT 4は、有機アニオンとしてエストロン硫酸、デヒドロエピアンドロステロン硫酸、及び/又はオクラトキシシンAなどの有機アニオンを取り込む能力を有する胎盤型有機アニオントランスポーターOAT 4である。

【 0 0 1 1 】また、本発明は、配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列、又は、その一部のアミノ酸配列が欠失し、他のアミノ酸で置換もしくは付加されていてもよいアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする塩基配列又はそれとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を有する核酸、好ましくはDNAに関し、前記した本発明の胎盤型有機アニオントランスポーターOAT 4をコードする遺伝子に関する。さらに、本発明は、配列表の配列番号1で示される塩基配列を有するDNAの連続する少なくとも14塩基以上、好ましくは20塩基以上、またはそれらの相補鎖よりなる塩基配列を有する核酸、好ましくはDNAに関し、当該DNAなどの核酸は前記本発明の胎盤型有機アニオントランスポーターOAT 4をコードする遺伝子を検出、同定又は定量するためのプローブとして有用である。また、本発明は、前記した本発明の胎盤型有機アニオントランスポーターOAT 4を認識し得る抗体にも関する。

【 0 0 1 2 】本発明の有機アニオントランスポーターOAT 4は、異なる化学構造を持った有機アニオンに対してこれらを輸送する(取り込む)能力を有する、広い範

囲の基質選択性を有するトランスポーターである。本発明の胎盤型有機アニオントランスポーターOAT 4は、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/又はオクラトキシシンAなどの有機アニオンを取り込む能力を有している。

【 0 0 1 3 】本発明者らは、既に本発明者らが単離したOAT 1、OAT 2およびOAT 3の塩基配列情報をもとに、公開されているEST データベースを探索したところ、OAT 1、OAT 2およびOAT 3と相同性を有する新規cDNA断片H 1 2 8 7 6を得た。このH 1 2 8 7 6を<sup>3 2</sup>Pでラベルしたプローブを用いて、既に構築してあったヒト腎臓cDNAライブラリーをスクリーニングした。この結果、有機アニオン輸送活性を持つ新規cDNA(hOAT 4 cDNA)を得た。得られたcDNA(OAT 4 cDNA)の塩基配列の決定は、特異的プライマーを用いて、自動シーケンサー(アプライドバイオシステム社製)により行い、配列表の配列番号1に示す塩基配列であることが分かった。

【 0 0 1 4 】得られたOAT 4が、有機アニオン輸送活性を持っていることを確認するために、関根らの方法(Sekine, T., et al. J Biol Chem 272巻、18526-9頁、1997年)に準じて、このcDNAを含むプラスミドからcRNA(cDNAに相補的なRNA)を調製し、これをアフリカツメガエルの卵母細胞に注入し、この卵母細胞について放射能標識された種々の有機アニオンおよび有機カチオンによる取り込み実験を行った。この結果を図1に示す。図1に示されるように、OAT 4を発現させた卵母細胞は<sup>3</sup>H-エストロン硫酸、<sup>3</sup>H-デヒドロエピアンドロステロン硫酸、及び<sup>3</sup>H-オクラトキシシンAの取り込みを示すことが判明した。これに対して代表的な有機カチオンである<sup>1 4</sup>C-TEA(テトラエチルアンモニウム)の取り込みは認められなかった。

【 0 0 1 5 】次に、前記したOAT 4 cRNAを注入した卵母細胞を用いて、本発明のOAT 4による種々の濃度におけるエストロン硫酸、デヒドロエピアンドロステロン硫酸の取り込み量の変化を調べ、有機アニオン輸送のミカエリスメンテン動力学試験を行った。この結果を図2に示す。この結果、本発明のOAT 4は、ある濃度までは濃度依存的に有機アニオンの取り込み量を増加させるものであることがわかった。そして、エストロン硫酸、デヒドロエピアンドロステロン硫酸の取り込みのKm値はそれぞれ $1.01 \pm 0.15 \mu\text{M}$ 、 $0.63 \pm 0.04 \mu\text{M}$ であった。

【 0 0 1 6 】本発明のOAT 4の有機アニオン輸送におけるナトリウム依存性を検討した。OAT 4によるエストロン硫酸の取り込みを、種々の細胞外陽イオンの存在下に実験した。結果を図3に示す。図3に示されるように、細胞外陽イオンとしてナトリウムイオン、コリンイオン及びリチウムイオンが存在するとOAT 4を介したエストロン硫酸の取り込み活性が認められ、細胞外ナト

リウムをリチウムおよびコリンに置換しても、OAT4を介したエストロン硫酸の輸送に変化は無く、OAT4が細胞外ナトリウム非依存性の有機アニオントランスポーターであることが明らかになった。

【0017】さらに、本発明のOAT4の基質選択性を検討するために、<sup>3</sup>H-エストロン硫酸の取り込み実験系において、系へ各種イオン性物質を添加し、その影響を調べた(阻害実験)。その結果を図4に示す。この結果、種々のアニオン性物質(プロベネシド、ペニシリンG、インドメタシン、イブプロフェン、ジクロフェナック、フロセミド、ブメタニド、プロモサルフォフタレイン、コール酸、タウロコール酸など)はOAT4による<sup>3</sup>H-エストロン硫酸の輸送を有意に阻害したが、テトラエチルアンモニウムのようなカチオン性物質および無機硫酸は阻害作用を示さなかった。以上の結果から、OAT4は多選択性有機アニオントランスポーターであることが判明した。

【0018】本発明のOAT4が、エストロン硫酸及びデヒドロエピアンドロステロン硫酸の二つの硫酸抱合体の取り込み活性を示したため、各種硫酸抱合体およびグルクロン酸抱合体がOAT4と相互作用を示すか否かを、阻害実験により調べた。結果を図5に示す。この結果、ミノキシジル硫酸を除く硫酸抱合体は全てOAT4と相互作用を示した。一方、グルクロン酸抱合体は、ナフチル グルクロナイド以外は、OAT4と弱い相互作用を示すのみであった。

【0019】次に、本発明のOAT4が、ヒト組織のどの部位に発現しているかをノーザンプロット解析により調べた。このノーザンプロットの結果を図6に示す。この結果、本発明のOAT4は腎臓および胎盤のみにおいて、強いバンドが検出され、本発明のOAT4が胎盤型のものであることが判明した。したがって、本発明のOAT4は、ヒトの胎盤型有機アニオントランスポーターであり、本発明においてはこれを胎盤型有機アニオントランスポーターOAT4という。

【0020】本発明のタンパク質としては、配列番号2で示されたアミノ酸配列を有するもののほか、例えば、配列番号2で示されたアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するものが挙げられる。アミノ酸が欠失、置換もしくは付加は、有機アニオン輸送活性が失われない程度であればよく、通常1~約110個、好ましくは1~約55個である。このようなタンパク質は、配列番号2で示されたアミノ酸配列と通常、~75%、好ましくは~90%のアミノ酸配列のホモロジーを有する。

【0021】本発明において、ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションは、通常、ハイブリダイゼーションを、5×SSC又はこれと同等の塩濃度のハイブリダイゼーション溶液中、37~42の温度条件下、約12時間行い、5×SSCまたはこれと同等の塩

濃度の溶液等で予備洗浄を行った後に、1×SSC又はこれと同等の塩濃度で洗浄を行うことにより実施できる。また、より高いストリンジェンシーを得るためには、洗浄を0.1×SSC又はこれと同等の塩濃度の溶液中で洗浄を行うことにより実施できる。本発明におけるストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションし得る核酸とは、前記した条件下でハイブリダイゼーションし得るものが包含される。

【0022】本発明の有機アニオントランスポーター及びその遺伝子は、ヒト以外に適当な哺乳動物の組織や細胞を遺伝子源として用いてスクリーニングを行うことにより単離取得することもできる。哺乳動物としては、イヌ、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、サル、ブタ、ウサギ、ラット、マウスなどの非ヒト動物を用いることもできる。遺伝子のスクリーニングおよび単離は、ホモロジースクリーニングおよびPCRスクリーニングなどにより好適に実施できる。得られたcDNAについては、常法により塩基配列を決定し、翻訳領域を解析して、これにコードされるタンパク質、即ちOAT4のアミノ酸配列を決定することができる。

【0023】得られたcDNAが有機アニオントランスポーター遺伝子のcDNAであること、即ち、cDNAにコードされた遺伝子産物が有機アニオントランスポーターであることは、例えば次のようにして検証することができる。得られたOAT4 cDNAから調製したcRNAを卵母細胞に導入して発現させ、有機アニオンを細胞内に輸送する(取り込む)能力を、適当な有機アニオンを基質とする通常の実験(Sekine, T.ら, J. Biol. Chem. 272巻, 18526-9頁, 1997)により、細胞内への基質取り込みを測定することにより確認できる。

【0024】また、前記した発現細胞に同様の取り込み実験を応用して、OAT4の輸送特性や基質特異性などを調べることができる。得られたOAT4遺伝子のcDNAを用いて、異なる遺伝子源で作製された適当なcDNAライブラリー又はゲノミックDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、異なる組織、異なる生物由来の相同遺伝子や染色体遺伝子等を単離することができる。

【0025】また、開示された本発明の遺伝子の塩基配列(配列番号1)に示された塩基配列、もしくはその一部)の情報に基づいて設計された合成プライマーを用い、通常のPCR法によりcDNAライブラリーから遺伝子を単離することが出来る。cDNAライブラリー及びゲノミックDNAライブラリー等のDNAライブラリーは例えば、「Molecular Cloning; Sambrook, J., Fritsch, E.F.およびManiatis, T.著、Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年に発刊」に記載の方法により調製することができる。あるいは、市販のライブラリーがある場合にはこれを用いてもよい。

【0026】本発明の有機アニオントランスポーター

(OAT4)は、例えば、有機アニオントランスポーターをコードするcDNAを用い、遺伝子組み換え技術により生産することができる。例えば、有機アニオントランスポーターをコードするDNA(cDNA等)を適当な発現ベクターに組み込み、得られた組み換えDNAを適当な宿主細胞に導入することができる。ポリペプチドを生産するための発現系(宿主ベクター系)としては、例えば、細菌、酵母、昆虫細胞および哺乳動物細胞の発現系等が挙げられる。このうち、機能タンパクを得るためには、昆虫細胞および哺乳動物細胞を用いることが望ましい。

【0027】例えば、ポリペプチドを哺乳動物で発現させる場合には、有機アニオントランスポーターをコードするDNAを、適当な発現ベクター(例えば、レトロウイルス系ベクター、パピローマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、SV40系ベクター等)中の適当なプロモーター(例えばSV40プロモーター、LTRプロモーター、エロンゲーション1プロモーター等)の下流に挿入して発現ベクターを構築する。次に、得られた発現ベクターで適当な動物細胞を形質転換して、形質転換体を適当な培地で培養することによって、目的とするポリペプチドが生産される。宿主とする哺乳動物細胞としては、サルCOS-7細胞、チャイニーズハムスターCHO細胞、ヒトHeLa細胞または、腎臓組織由来の初代培養細胞やブタ腎由来LLC-PK1細胞、フクロネズミ腎由来OK細胞等の細胞株が挙げられる。

【0028】有機アニオントランスポーターOAT4をコードするcDNAとしては、例えば、配列番号1に示される塩基配列を有するcDNAを用いることが出来るほか、前記のcDNAに限定されることなく、アミノ酸配列に対応するDNAを設計し、ポリペプチドをコードするDNAを用いることもできる。この場合、一つのアミノ酸をコードするコドンは各々1~6種類知られており、用いるコドンの選択は任意でよいが、例えば発現に利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現の高い配列を設計することができる。設計した塩基配列をもつDNAはDNAの化学合成、前記cDNAの断片化と結合、塩基配列の一部改変等によって取得できる。人為的な塩基配列の一部改変、変異導入は、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用して部位変異導入法(sitespecific mutagenesis)「Mark,D.F.ら、Proc Natl Acad Sci USA 第18巻、5662-5666頁、1984年」等により実施できる。

【0029】本発明の有機アニオントランスポーター遺伝子にストリンジントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド(オリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド)は、有機アニオントランスポーター遺伝子を検出するためのプローブとして使用できるほか、有機アニオントランスポーターの発現を変調させるために、例え

ばアンチセンスオリゴヌクレオチド、やりボザイム、デコイとして使用することもできる。このようなヌクレオチドとしては、例えば、配列番号1で示される塩基配列の中の通常、連続する14塩基以上の部分配列もしくはその相補的な配列を含むヌクレオチドを用いることができ、ハイブリダイズをより特異的とするためには、部分配列としてより長い配列、例えば20塩基以上あるいは30塩基以上の配列を用いても良い。

【0030】また、本発明の有機アニオントランスポーターまたは、これと免疫学的同等性を有するポリペプチドを用いて、その抗体を取得することが出来、抗体は、有機アニオントランスポーターの検出や精製などに利用できる。抗体は、本発明の有機アニオントランスポーター、その断片、またはその部分配列を有する合成ペプチド等を抗原として用いて製造できる。ポリクロナール抗体は、宿主動物(たとえば、ラットやウサギ)に抗原を接種し、免疫血清を回収する通常の方法により製造することができ、モノクロナール抗体は、通常のハイブリドーマ法などの技術により製造できる。

【0031】

【実施例】以下、実施例をもって本説明をさらに詳しく説明するが、これらの実施例は本発明を制限するものではない。なお下記実施例において、各操作は特に断りがない限り、「Molecular Cloning: Sambrook, J., Fritsch, E. F.およびManiatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年に発刊」に記載の方法により行うか、または、市販のキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

【0032】実施例1(多選択性有機アニオントランスポーター4(OAT4)cDNAの単離とその解析)既に本発明者らが単離したOAT1、OAT2およびOAT3の塩基配列情報をもとに、公開されているESTデータベースを探索した。この結果、OAT1、OAT2およびOAT3と相同性を有する新規cDNA断片H12876を得た。得られたH12876を<sup>32</sup>Pでラベルしたプローブを用いて、既に構築してあったヒト腎臓cDNAライブラリーをスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは、50%のハイブリダイゼーション用溶液中で一昼夜行い、その後フィルター膜は、50%で0.1xSSC/0.1%SDSで洗浄した。ハイブリダイゼーション溶液としては、50%ホルムアミド、5xstandard saline citrate(SSC)、3xデンハード液、0.2%SDS、10%硫酸デキストラン、0.2mg/ml変性サーモン精子DNA、2.5mMピロリン酸ナトリウム、25mM MES、0.01%Antifoam B(シグマ社製)を含むpH6.5の緩衝液を用いた。

【0033】ZipLox中に単離されたクローンは、in vivo excision法によりプラスミドベクター-pZLにさらにサブクローン化した。この結果、有機アニオ

ン輸送活性を持つ新規 cDNA (hOAT4 cDNA) が得られた。上記により得られた cDNA (OAT4 cDNA) の塩基配列の決定は、特異的プライマーを用いて、自動シーケンサー (アプライドバイオシステム社製) により行った。この塩基配列を配列表の配列番号 1 に示す。

#### 【0034】実施例 2 (OAT4 の機能の特定)

OAT4 cDNA を含むプラスミドから、T7 RNA ポリメラーゼを用いて、インビトロで cRNA (cDNA に相補的な RNA) を調製した (Sekine, T., et al. *J. Biol. Chem.* 272 巻、18526-9 頁、1997 年参照)。得られた cRNA を、既に報告されている方法に従い (Sekine, T., et al. *J. Biol. Chem.* 272 巻、18526-9 頁、1997 年)、アフリカツメガエルの卵母細胞に注入し、この卵母細胞について放射能標識された種々の有機アニオンおよび有機カチオンによる取り込み実験を行った。この結果、図 1 に示すように OAT4 を発現させた卵母細胞は  $^3\text{H}$ -エストロン硫酸、 $^3\text{H}$ -デヒドロエピアンドロステロン硫酸、 $^3\text{H}$ -オクラトキシン A の取り込みを示すことが判明した。これに対して代表的な有機カチオンである  $^1\text{-}^4\text{C}$ -TEA (テトラエチルアンモニウム) の取り込みは認められなかった。

#### 【0035】

実施例 3 (OAT4 の有機アニオン輸送の動力学試験) OAT4 の有機アニオン輸送のミカエリスメンテン動力学試験を行った。種々の濃度のエストロン硫酸、デヒドロエピアンドロステロン硫酸の OAT4 による取り込み量の変化を調べることに、これらの基質の OAT4 による輸送の濃度依存性を検討した。放射能標識されたエストロン硫酸、デヒドロエピアンドロステロン硫酸の取り込み実験は、OAT4 cRNA を注入した卵母細胞を用い、前記記載方法に準じて実施した。この結果 (図 2)、エストロン硫酸、デヒドロエピアンドロステロン硫酸の取り込みの Km 値はそれぞれ  $1.01 \pm 0.15 \mu\text{M}$ 、 $0.63 \pm 0.04 \mu\text{M}$  であった。

#### 【0036】実施例 4 (OAT4 の有機アニオン輸送における陽イオン依存性試験)

OAT4 の有機アニオン輸送におけるナトリウム依存性を検討した。細胞外ナトリウムをリチウムおよびコリンに置換しても、OAT4 を介したエストロン硫酸の輸送に変化は無く、OAT4 が細胞外ナトリウム非依存性の有機アニオントランスポーターであることが明らかになった (図 3)。

【0037】OAT4 の基質選択性をさらに検討するために、OAT4 cRNA を注入した卵母細胞による  $^3\text{H}$ -エストロン硫酸の取り込み実験系において、系へ各種アニオン性物質を添加し、その影響を調べた (阻害実験)。 $^3\text{H}$ -エストロン硫酸の取り込み実験は、OAT4 cRNA を注入した卵母細胞を用い、前記記載方法に準じて実施した。500  $\mu\text{M}$  の各種化合物 (非標識)

の存在下および非存在下で、50 nM  $^3\text{H}$ -エストロン硫酸の取り込みを測定した。その結果、種々のアニオン性物質 (プロベネシド、ペニシリン G、インドメタシン、イブプロフェン、ジクロフェナック、フロセミド、ブメタニド、プロモサルフォフタレイン、コール酸、タウロコール酸など) は OAT4 による  $^3\text{H}$ -エストロン硫酸の輸送を有意に阻害した (図 3)。一方、テトラエチルアンモニウムのようなカチオン性物質および無機硫酸は阻害作用を示さなかった (図 4)。以上の結果から、OAT4 は多選択性有機アニオントランスポーターであることが判明した。

#### 【0038】実施例 5 (OAT4 の各種硫酸抱合体およびグルクロン酸抱合体の取り込み試験)

OAT4 がエストロン硫酸、デヒドロエピアンドロステロン硫酸の二つの硫酸抱合体の取り込み活性を示したため、各種硫酸抱合体およびグルクロン酸抱合体が OAT4 と相互作用を示すか否かを、阻害実験を用いて行った。図 5 に示す通り、ミノキシジル硫酸を除く硫酸抱合体は全て OAT4 と相互作用を示した。一方、グルクロン酸抱合体は、ナフチル グルクロナイド以外は、OAT4 と弱い相互作用を示すのみであった。

#### 【0039】実施例 6 (OAT4 遺伝子のノーザンブロットング解析)

ヒトの各組織における OAT4 遺伝子の発現 (ノーザンブロットング) の解析を行った。OAT4 cDNA の全長を  $^3\text{-}^2\text{P}$ -dCTP でラベルし、これをプローブとして用いて、ヒトの種々の組織から抽出した RNA をブロットングしたフィルター (クロンテック社製) のハイブリダイゼーションをおこなった。OAT4 cDNA 全長を含んだハイブリダイゼーション液で一晩ハイブリダイゼーションを行い、フィルターを 65 にて、0.1% SDS を含む  $0.1 \times \text{SSC}$  で洗浄した。ノーザンブロットの結果 (図 6)、腎臓および胎盤のみにおいて、強いバンドが検出された。なお、図 6 中のプロットは、左側から脳 (brain)、心臓 (heart)、骨格筋 (skeletal muscle)、結腸 (colon)、胸腺 (thymus)、脾臓 (spleen)、腎臓 (kidney)、肝臓 (liver)、小腸 (small intestine)、胎盤 (placenta)、肺 (lung)、末梢血白血球 (peripheral blood leukocytes) を示す。

#### 【0040】

【発明の効果】本発明は、新規な胎盤型有機アニオントランスポーター OAT4 及びそれをコードする遺伝子を提供するものである。トランスポーターはチャネルと同様に細胞の生命維持に必要な物質を取り込むための蛋白質であり、その異常は種々の疾患の原因となっている。とりわけ本発明の胎盤型有機アニオントランスポーター OAT4 は腎臓や胎盤に選択的に発現するものであり、この解明は各種腎疾患や胎児の生長異常などの予防治療に有用となるものである。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Japan Science And Technology Corporation

&lt;120&gt; Placenta type organic anion transporter and its gene

&lt;130&gt; PA900382

&lt;160&gt; 2

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2210

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 1

```

gttccaaca gcagttaggt cagcagtccg ctccagccgag gcagctctgt tcatggcggt 60
ctcgaagctc ttggagcaag cgggaggcgt gggcctcttc cagaccctgc aggtgctcac 120
cttcatctc ccctgcctca tgataccttc ccagatgctc ctggagaact tctcagccgc 180
catcccaggc caccgatgct ggacacacat gctggacaat ggctctgcgg ttccacaaa 240
catgaccccc aaggcccttc tgaccatctc catcccgcc ggcccccaacc aggggccccca 300
ccagtggcgc cgcttccgcc agccacagtg gcagctcttg gacccaatg ccacggccac 360
cagctggagc gaagctgaca cggagccgtg tgtggacggc tgggtctatg accgcagcgt 420
cttcacctcc accatctgg ccaagtggga cctgggtgtc agctcccagg gcttgaagcc 480
cctaagccag tccatcttca tgtccggat cctgggtggc tcctttatct ggggctcct 540
ctcctaccgg ttgggagga agccgatgct gagctggtgc tgccctcagt tggcctggc 600
gggcaccagc accatcttcg ccccaacatt cgtcatctac tgcggcctgc ggttcgtggc 660
cgcttttggg atggccggca tctttctgag ttactgaca ctgatggtg agtggaccac 720
gaccagcagg agggcggta ccatgacggt ggtgggatgt gccttcagcg caggccaggc 780
ggcgctgggc ggcctggcct ttgccctgcg ggactggagg actctccagc tggcagcatc 840
agtgcccttc ttgccaatc ccctgatatc ctggtggctg ccagaatccg cccggtggct 900
gattattaag ggcaaacag accaagcact tcaggagctc agaaagggtg ccaggataaa 960
tgccacaag gagccaaga acctgacct agaggctctg atgtccagcg tgaaggagga 1020
ggtggcctct gcaaggagc cgcggtcggg gctggacctg ttctgctgct ccgtgctccg 1080
ctggaggagc tgcgcatgc tgggtggtgaa ttctctcta ttgatctcct actatgggct 1140
ggtcttcgac ctgcagagcc tgggcccgtg catcttcctc ctccaggccc tcttcggggc 1200
cgtggacttc ctgggcccgg ccaccactgc cctcttgctc agtttctctg gccgccgac 1260
catccaggcg ggttcccagg ccatggccgg cctcgccatt ctagccaaca tgcctgctgc 1320
gcaagatttc agaccctgc gtgtggtctt tgctgtgctg ggaaaggat gtttgggat 1380
aagcctaacct gcctacca tctacaaggc tgaactctt ccaacgccag tgcggatgac 1440
agcagatggca ttctgata cagtggccg gctgggggct atgatgggtc ccctgatcct 1500
gatgagccgc aagccctgc ccctgctgcc tcctctcctc tatggcgta tctccattgc 1560
ttccagcctg ttgtgctgt tcttctccc ggagaccag ggacttccgc tccctgacac 1620
tatccaggacc tggagagcc agaaatcaac agcagcccag ggcaaccgac aagaggccgt 1680
cactgtgaaa gtacctgc tctagaaat gtgctgcat ggagcccctt tagtcaaaga 1740
ctcctggaaa ggagtgcct ctctccaat cagagcgtgg aggcgagttg ggcgacttca 1800
agggcctggc atggcagag ccaggcagcc gtggccgagt ggacagcgtg gccgtctgct 1860
gtggctgaag gcagcttcca cagctcactc ctcttctccc tgccctgatc agattcccca 1920
ccttaccggt gccctacag agcctgtgca gatggccatg cccaaccaat aacgagacgg 1980
tccccctccc tttccctgcc aggctcatgt ctttacacct tcaactcagc acgccaacca 2040
gagactgggt tccaatctca ccccaccaca tacagagccc tcatctgtga aatgagaatg 2100
atcacgtgac ccacccccca gggcaggat cagggtgaac tgatcttagc accggccaaa 2160
taaatggaac ctgctgagag agctgccaga taaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2210

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 550

13	
<212>	PRT
<213>	Human
<400>	2
Met Ala Phe Ser Lys Leu Leu Glu Gln Ala Gly Gly Val Gly Leu	15
Phe Gln Thr Leu Gln Val Leu Thr Phe Ile Leu Pro Cys Leu Met	30
Ile Pro Ser Gln Met Leu Leu Glu Asn Phe Ser Ala Ala Ile Pro	45
Gly His Arg Cys Trp Thr His Met Leu Asp Asn Gly Ser Ala Val	60
Ser Thr Asn Met Thr Pro Lys Ala Leu Leu Thr Ile Ser Ile Pro	75
Pro Gly Pro Asn Gln Gly Pro His Gln Cys Arg Arg Phe Arg Gln	90
Pro Gln Trp Gln Leu Leu Asp Pro Asn Ala Thr Ala Thr Ser Trp	105
Ser Glu Ala Asp Thr Glu Pro Cys Val Asp Gly Trp Val Tyr Asp	120
Arg Ser Val Phe Thr Ser Thr Ile Val Ala Lys Trp Asp Leu Val	135
Cys Ser Ser Gln Gly Leu Lys Pro Leu Ser Gln Ser Ile Phe Met	150
Ser Gly Ile Leu Val Gly Ser Phe Ile Trp Gly Leu Leu Ser Tyr	165
Arg Phe Gly Arg Lys Pro Met Leu Ser Trp Cys Cys Leu Gln Leu	180
Ala Val Ala Gly Thr Ser Thr Ile Phe Ala Pro Thr Phe Val Ile	195
Tyr Cys Gly Leu Arg Phe Val Ala Ala Phe Gly Met Ala Gly Ile	210
Phe Leu Ser Ser Leu Thr Leu Met Val Glu Trp Thr Thr Thr Ser	225
Arg Arg Ala Val Thr Met Thr Val Val Gly Cys Ala Phe Ser Ala	240
Gly Gln Ala Ala Leu Gly Gly Leu Ala Phe Ala Leu Arg Asp Trp	255
Arg Thr Leu Gln Leu Ala Ala Ser Val Pro Phe Phe Ala Ile Ser	270
Leu Ile Ser Trp Trp Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Leu Ile Ile	285
Lys Gly Lys Pro Asp Gln Ala Leu Gln Glu Leu Arg Lys Val Ala	300
Arg Ile Asn Gly His Lys Glu Ala Lys Asn Leu Thr Ile Glu Val	315
Leu Met Ser Ser Val Lys Glu Glu Val Ala Ser Ala Lys Glu Pro	330
Arg Ser Val Leu Asp Leu Phe Cys Val Pro Val Leu Arg Trp Arg	345
Ser Cys Ala Met Leu Val Val Asn Phe Ser Leu Leu Ile Ser Tyr	360
Tyr Gly Leu Val Phe Asp Leu Gln Ser Leu Gly Arg Asp Ile Phe	375
Leu Leu Gln Ala Leu Phe Gly Ala Val Asp Phe Leu Gly Arg Ala	390
Thr Thr Ala Leu Leu Leu Ser Phe Leu Gly Arg Arg Thr Ile Gln	405
Ala Gly Ser Gln Ala Met Ala Gly Leu Ala Ile Leu Ala Asn Met	420
Leu Val Pro Gln Asp Leu Gln Thr Leu Arg Val Val Phe Ala Val	435
Leu Gly Lys Gly Cys Phe Gly Ile Ser Leu Thr Cys Leu Thr Ile	450
Tyr Lys Ala Glu Leu Phe Pro Thr Pro Val Arg Met Thr Ala Asp	465
Gly Ile Leu His Thr Val Gly Arg Leu Gly Ala Met Met Gly Pro	480
Leu Ile Leu Met Ser Arg Gln Ala Leu Pro Leu Leu Pro Pro Leu	495
Leu Tyr Gly Val Ile Ser Ile Ala Ser Ser Leu Val Val Leu Phe	510
Phe Leu Pro Glu Thr Gln Gly Leu Pro Leu Pro Asp Thr Ile Gln	525
Asp Leu Glu Ser Gln Lys Ser Thr Ala Ala Gln Gly Asn Arg Gln	540
Glu Ala Val Thr Val Glu Ser Thr Ser Leu *	550

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、本発明 OAT4 をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させた時の、有機アニオン取り込み活性を示すものである。

【図 2】図 2 は、本発明 OAT4 を発現させた卵母細胞を用いたエストロン硫酸、デヒドロエピアンドロステロン硫酸の輸送の動力学試験の結果を示すものである。

【図 3】図 3 は、本発明 OAT4 を発現させた卵母細胞を用いたエストロン硫酸の輸送における各種陽イオンの存在による影響を示したものである。

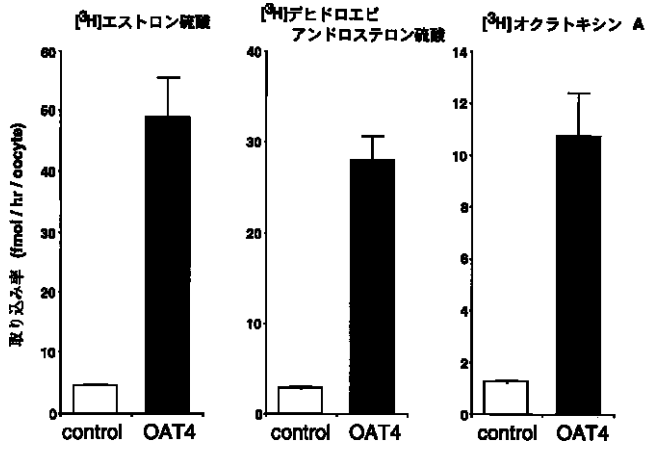
【図 4】図 4 は、本発明の OAT4 の有機アニオン輸送における、各種有機物質の阻害作用の試験の結果を示すものである。

【図 5】図 5 は、各種硫酸抱合体およびグルクロン酸抱合体による、OAT4 の輸送阻害試験の結果を示すものである。

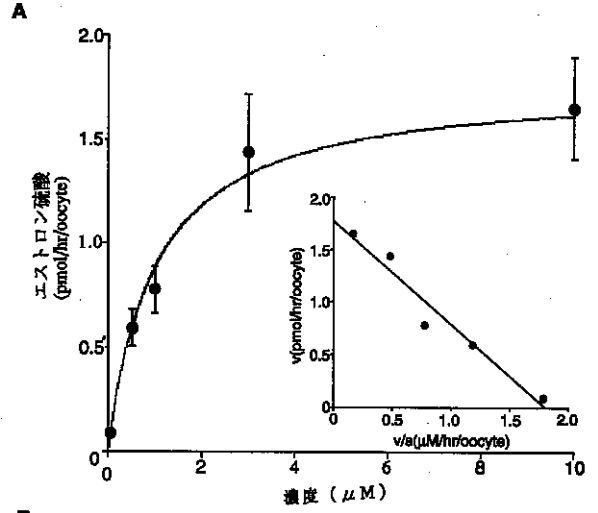
【図 6】図 6 は、本発明の OAT4 遺伝子のノーザンブロット解析の結果を示す図面に代わる写真である。



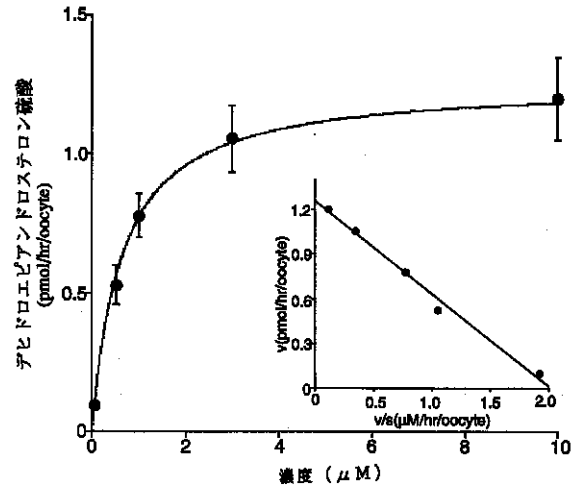
【 図 1 】



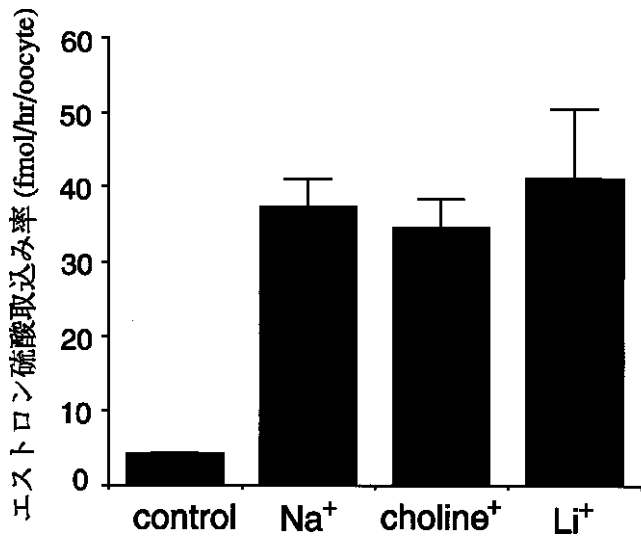
【 図 2 】



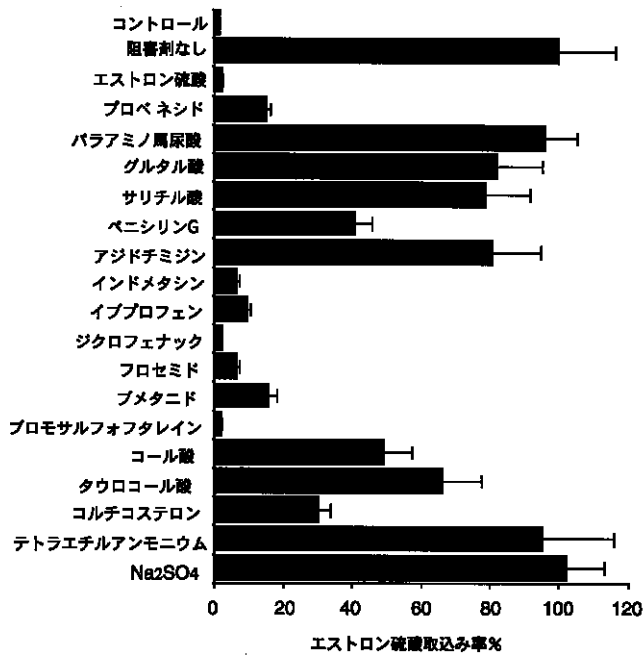
B



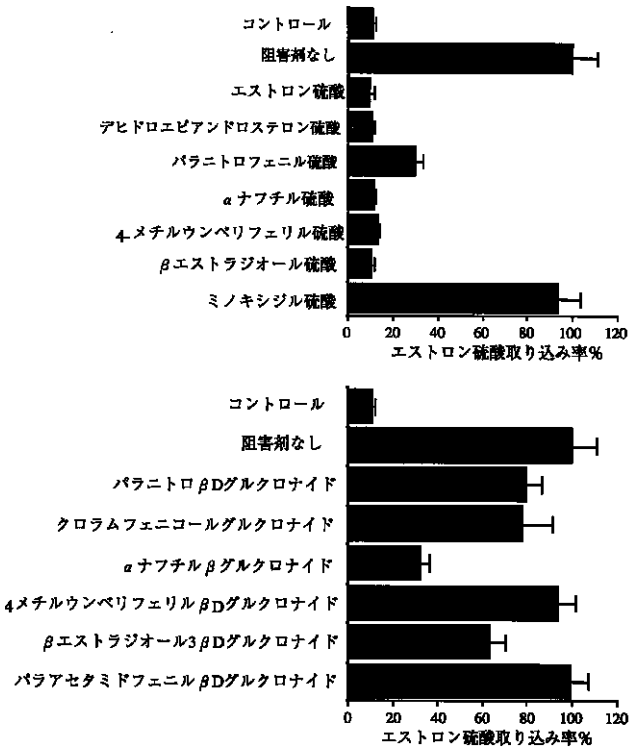
【 図 3 】



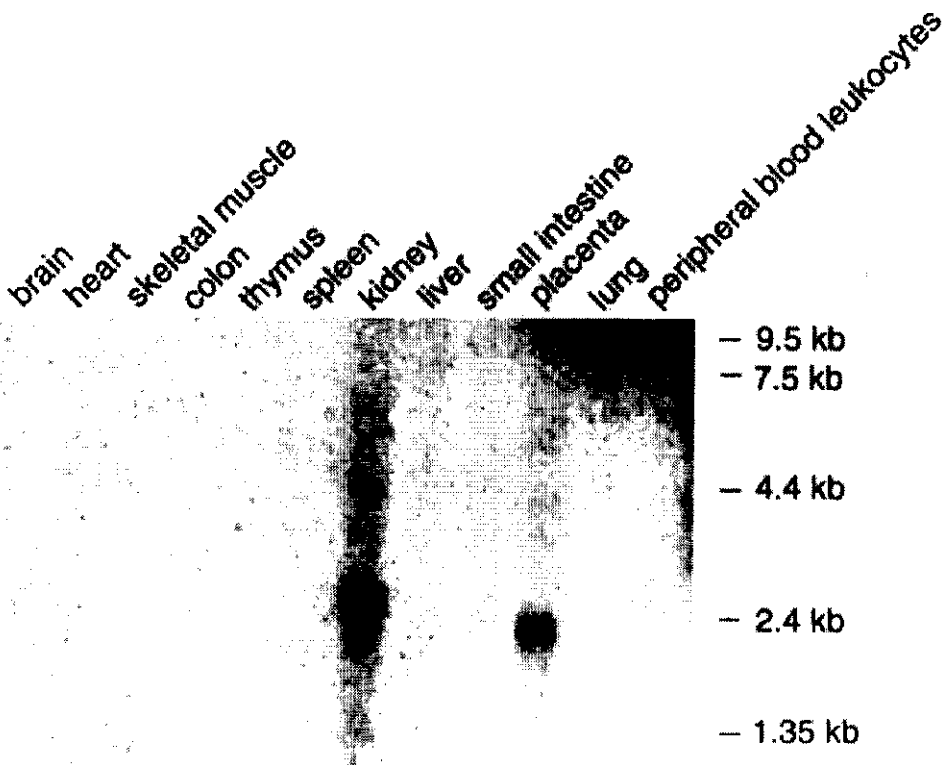
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA80 CA11 DA02 GA12  
4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ03 QQ53  
QR55 QS34  
4H045 AA10 AA11 BA10 CA40 DA75  
EA50 FA72 FA74