

장관세포인 HT-29에 존재하는 디펩티드수송체의 *Xenopus oocyte*에서의 발현

오두만[†] · 양재하*

대구효성가톨릭대학교 약학대학, *경산대학교 한의과대학
(1995년 10월 23일 접수)

Functional Expression of a Dipeptide Transporter Obtained from Intestinal HT-29 Cells Using *Xenopus Oocytes*

Doo-Man Oh[†] and Chae-Ha Yang*

College of Pharmacy, Catholic University of Taegu-Hyosung
* College of Oriental Medicine, Kyungsan University, Korea

(Received October 23, 1995)

Cloning the gene encoding a dipeptide transporter is necessary for understanding the absorption mechanism of peptides and peptide-like drugs in the gastrointestinal tract. Functional expression of a dipeptide transporter after microinjection into *Xenopus laevis* oocytes was performed using the mRNA purified from human intestinal HT-29 cells. Fifty nanoliters of purified mRNA (1 mg/mL) were microinjected into healthy oocytes followed by incubation for 4 days in order to express a dipeptide transporter. Functional expression was determined by a uptake assay using 10 Ci/mL [³H]-glycylsarcosine, a dipeptide substrate of the transporter. Seasonal variability and batch-to-batch variability were greater in summer. The usage of beveled micropipettes improves viability of oocytes at 4 days after microinjection. Expression of a dipeptide transporter in oocytes after microinjection of mRNA obtained from HT-29 cells was significantly larger than those after microinjection of water or mRNA obtained from the rabbit intestine.

Keywords—Expression, Intestinal cells, Microinjection, mRNA, Variability, *Xenopus laevis* frog

최근에 각광을 받고 있는 펩티드 및 펩티드 유사약 물들은 매우 유효한 치료제로서 생화학, 약물학, 합성 화학, 분자생물학 등과 같은 인접 학문의 발달에 따라 더욱 그 숫자가 증가하리라 사료된다. 그러나 펩티드약 물의 유효성은 유효농도를 치료부위에서 유지하기가 어려운 난점이 있다. 특히 경구로 투여된 후 위장관내 에서 흡수되는 과정에서 효소적이나 물리화학적으로 분해가 용이하기 때문에 펩티드약물의 개발에 큰 장애 가 되고 있다. 따라서 위장관에서의 펩티드의 흡수에 대한 메카니즘의 규명은 상업적으로 이용가능한 경구 투여용 펩티드약물을 설계하는데 필수불가결한 선결문 제이다.

많은 생물학적 활성을 가지고 있는 펩티드 혹은 펩 티드 유사물질은 구조적인 측면에서 분자량이 작은 식 이성 펩티드 (디펩티드 혹은 트리펩티드)와 비슷하기

때문에, 특수한 수송체에 의해 흡수가 되리라 여겨진 다.¹⁾ 식이성 펩티드의 일종이며 putative neu- rotransmitter인 카르노신이나 thyroliberin 등은 장 관에서 잘 흡수된다. 또한 구조적으로 디펩티드와 유사 한 베타락탐계 항생제들,²⁻⁴⁾ 캅토프릴과 같은 ACE 억 체제,^{5,6)} 레닌 억제제⁷⁾ 등도 내원성 디펩티드 수송체에 의해 능동적으로 흡수된다고 알려져 있다. 따라서 어떤 신약이 개발될 때, 장관흡수를 증진하기 위해서 디펩티 드 수송체의 substrate와 유사한 구조로서 개선시키는 방법도 아주 유망하리라 여겨진다.⁸⁾

일반적으로 분자량이 작은 펩티드의 수송체관여 (carrier-mediated) 흡수는 장관뿐 아니라 신장, 간장, 뇌, 근육 및 적혈구에서 두루 알려져 있다.^{9,10)} 그러나 펩티드수송을 위한 구조적인 특이성은 동일하지 않다.¹¹⁾ 또한 펩티드수송체는 동물과 사람에서 모두 아미노

[†]본 논문에 대한 문의는 이 저자에게로

산 수송체들과는 별도의 수송과정에 의해 펩티드들을 흡수하고 있고,^{1,11)} 수송농도 기울기에 의해 매개되는 cotransporter로서 알려져 있다.¹⁾ 또한 디펩티드 수송체는 자유 말단 카르복실기, 펩티드 결합, 광학이성체 L-형 등과 같은 구조적인 특이성을 가진 기질만을 흡수하는 수송체이다. 한편 측쇄에 α -아미노기가 존재하면 흡수를 최적화 하는데는 필요하지만 필수조건은 아니라는 것이 알려져 있다.⁴⁾ 이러한 수송체의 특성을 이용하면 난용성 약물의 흡수증진 및 치료효과를 높이기 위한 한 방법으로 사용될 수 있다. 디펩티드 수송체의 유전자가 구조규명이 되면, 수송체 그 자체의 여러가지 특성에 대한 직접적인 증거를 얻을 수 있으며, 분자생물학적인 기능이나 흡수 메커니즘에 대한 확실한 소견을 가지게 될 것이다.

최근에 디펩티드 수송체의 구조규명을 위한 노력이 이루어지고 있는데, Kramer 등^{12,13)}은 photoaffinity labelling method를 사용하여 분자량이 127 KDa인 단백질이 디펩티드수송체일 것으로 추정하고 있다. 토끼의 소장에서 분리정제된 디펩티드 수송체의 mRNA를 *Xenopus laevis*의 oocyte에 미세주사한 후 디펩티드 수송체의 발현을 성공시켰다.^{14,15)} 이러한 발현클로닝법(expression cloning method)은 막단백질을 분리정제하는 방법보다 훨씬 더 유용하며, Na^+ /glucose cotransporter,¹⁶⁾ GABA, 아미노산, 담즙산¹⁷⁾ 및 뉴클레오사이드수송체 등 많은 수송체 단백질들 및 수송체들¹⁸⁾이 oocyte를 사용한 발현클로닝법으로 유전자가 이미 규명이 되었다. 같은 방법으로 펩티드 수송체의 유전자도 규명되고 있으며, 최근에는 Caco-2 세포에서의 세팔렉신의 흡수를 봉쇄시키는 monoclonal antibody를 생산하여 사람 장관 펩티드 수송체를 규명하였다.¹⁹⁾ 이 유전자는 cadherin superfamily와 구조적으로 유사하며 transmembrane domain도 단지 하나만 확인된 것으로 보아, 비록 cephalixin이 디펩티드 수송체에 의해서도 흡수가 되지만, 전적으로 이것이 디펩티드 수송체의 유전자로 생각되기는 어렵다. 왜냐하면 이 유전자의 규명에 사용된 기질이 디펩티드가 아니고 cephalixin을 사용하였기 때문이라고 사료된다.

기능발현클로닝법(Functional expression cloning)에 의하면, 외원성 mRNA로부터 *Xenopus* oocyte에서의 기능발현이 가장 중요한 단계라고 한다.¹⁶⁾ 동물의 소장으로부터 얻은 mRNA를 이용하는 것 보다는, 사람으로부터 얻어진 mRNA를 이용하여 유전자 구조를 규명하게 되면, 인체의 디펩티드수송체에 대한 구조

를 결정할 수 있으리라 여겨진다. 사람으로부터 디펩티드수송체의 mRNA를 얻는 법은 직접 biopsy에 의해 장관의 점막세포로부터 분리정제하는 법, 정상 장관세포를 primary culture하여 증식 후 분리정제하는 법 및 장관 adenocarcinoma로부터 유도된 neoplastic epithelial cell을 배양하여 그것으로부터 분리정제하는 법이 있다. 그 중 마지막의 경우에 해당하는 Caco-2 세포이나 HT-29 세포는 쉽게 정상세포 배양에 의해 분화되기 때문에^{20,22)} 이러한 장관세포들을 사용하는 방법이 제일 용이하다고 생각된다.

사람의 장관 상피세포인 HT-29 세포도 Caco-2 세포와 유사한 성질을 가지고 있다. 즉 분화되어 microvilli와 enterocytes의 기능을 가지고 있다. Confluent monolayer는 세포간에 tight junction을 형성하며 여러가지 brush-border 표식효소들을 가지고 있다. 즉 알카린 포스파타제, 아미노펩티다제 등은 apical membrane에 있고, 트랜스페린이나 표피성장인자 등은 기저막 쪽에 존재한다. HT-29 세포는 특히 장관표피세포중에서 흡수세포뿐만 아니라 goblet cell도 배양이 가능하고 clone될 수 있다.^{23,24)} 이러한 클로닝은 모집단과는 달리 일반적인 세포배양에서 손쉽게 분화되며, *in vivo* 장관점막에서 발견되는 상태와 유사하게 두 clone의 비율을 조절하여 co-culture시킬 수 있기 때문에 *in vivo*와 유사한 monolayer를 얻을 수 있다.²⁵⁾

최근에는 HT29-H cell이 분화되어 goblet cell monolayer를 형성하여 mucin 분자를 분비하고 결국 mucus gel layer를 형성한다고 보고되어 있다.²⁶⁾ 이러한 세포들은 약물흡수에 대한 세포외성 점막장벽에 대한 모델로 응용되고 있다. HT-29 세포에서도 간접적으로 디펩티드 수송체의 존재가 알려져 있다.²⁷⁾

저자 등은 사람의 소장세포인 Caco-2 세포²⁸⁾에서 뿐만 아니라 HT-29 세포²⁹⁾에서, 다른 간접적인 기질(예, cephalixin등)이 아닌 디펩티드중의 하나인 glycylsarcosine을 사용하여 디펩티드수송체가 존재함을 보고하였으며, 토끼의 소장으로부터 얻어진 디펩티드 수송체의 mRNA를 *Xenopus* oocyte에 미세주입시켜 그 기능발현을 확인한 바 있다.¹⁵⁾ 따라서 본 연구에서는 사람의 장관세포 중의 하나인 HT-29 cell line을 이용하여 이 세포에 풍부하게 존재하는 디펩티드 수송체를 분리 정제하여 얻어진 mRNA를 남미원산인 개구리(*Xenopus laevis*)의 oocyte에 미세주사하여 디펩티드 수송체의 발현을 확인하고자 한다.

실험방법

재료 및 시약

Radiolabelled Glycylsarcosine ($[^3\text{H}]$ -Gly-Sar, 39 Ci/mmol)는 Amersham (Arlington Heights, IL)에서 주문하여 구입하였다. cold Gly-Sar, MES, Phosphate buffered saline (PBS), EDTA, 및 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 등은 Sigma (St. Louis, MO) 및 Gibco BRL (Grand Island, NY)에서 구입하였다. 다른 시약은 최소한 analytical grade 이상을 사용하였다. HT-29는 ATCC로부터 구입하였다.

장관세포로부터 디펩티드 수송체를 함유한 mRNA의 순수분리 정제

Total RNA의 분리—총 세포내 RNA는 각각의 세포들을 T150 플라스크에 3주 이상 키운 다음, Chomczynski and Sacchi의 방법³⁰⁾ 또는 Guanidium thiocyanide³⁰⁾에 의해 분리하였다. 비교실험을 위해 토끼의 소장의 점막세포로부터 같은 방법으로 총 RNA를 분리하였다.

mRNA의 분리정제—Poly A⁺ mRNA는 총 RNA로부터 상업용 키트 (Pharmacia LKB, Piscataway, NJ)를 사용하여 분리정제하였다. Northern blot에서 액틴 cDNA에 의해 뚜렷한 액틴 띠를 형성하는 mRNA만을 사용하여 펩티드 발현실험을 하였다 (미발표 결과).

*Xenopus oocyte*에서의 디펩티드수송체의 발현

개구리 알의 분리—남미원산인 *Xenopus laevis* 개구리 (*Xenopus One*, Ann Arbor, MI)를 0.15% tricaine이 든 용기내에서 약 20분 동안 방치하여 마취를 시켰다. 복부에 작은 incision을 하여 개구리알 (oocyte)를 꺼낸 후 modified Barth's solution으로 씻었다. 알의 덩어리로부터 기계적인 힘을 가해 손으로 하나하나 oocyte를 분리시켰다. 하룻밤을 배양액에서 배양시킨 후 현미경을 통하여 건강한 oocyte만을 선별하였다.

개구리알에 mRNA의 미세주사하는 방법—보통 정제된 mRNA 50 n^l (농도 1 mg/ml)를 oocyte의 vegetal hemisphere 쪽으로 특수하게 제조한 micropipette을 이용하고 micromanipulator (Sutter Instrument Co., Novato, CA)를 사용하여 미세주사하였다. 대조군으로서 DEPC로 처리한 물을 미세주사하여 발현의 정도를 비교하였다. 미세주사된 oocyte는 칼슘을 함유한 배양액 (5 mM HEPES/NaOH, 96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂)에

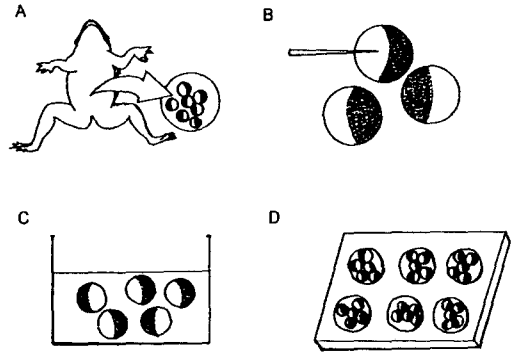


Figure 1—Method of functional expression of exogenous mRNA in *Xenopus laevis* oocytes: (A) Healthy oocytes were harvested from a female frog (B) mRNA was injected into oocytes with a micropipette (C) Microinjected oocytes were incubated in the Barth's solution for several days (D) Functional expressions of membrane proteins such as a dipeptide transporter were measured.

넣고 18°C로 적어도 3일 이상 배양시킨 후 펩티드수송체의 발현을 uptake assay로 확인하였다.

디펩티드 수송 실험—multiwell dish의 각 well에 10 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 의 $[^3\text{H}]$ -Gly-Sar를 함유한 uptake media (pH 5.5) 200 μl 를 넣고 oocyte를 5~7 개를 넣었다. oocyte는 1시간 동안 실온에서 배양시켰다. 배양은 ice-cold buffer로서 중지시키고, cold PBS로 여러번 씻은 후 scintillation vial에 옮긴 후 oocyte를 분쇄시켜 총 방사성량을 측정하였다 (Beckmann LS6000).

결과 및 고찰

외원성 mRNA를 translation시키기 위해 개구리알을 처음³²⁾ 사용한 이래로 *Xenopus laevis* oocyte를 이용한 기능발현법이 최근 많이 사용되고 있다.³³⁾ 개략적인 기능발현법을 Fig. 1에 나타내었다. 즉, female frog로부터 건강한 oocytes를 채취한 후, HT-29 세포나 토끼 소장에서 정제된 외원성 mRNA를 미세주입시켜 Barth's 용액에 수일간 배양시키면, oocytes 표면에 디펩티드 수송체와 같은 막단백질이 발현하게 된다. 발현의 정도를 보기 위해 적당한 기질을 사용하여 수송되는 정도를 측정하게 된다. 지난 수년간 이 방법에 의해 Na⁺/glucose cotransporter¹⁶⁾ 등이 클로닝되었음에도 불구하고, 이 방법의 가장 어려운 점은 기능발현을 위해 적어도 수일동안 oocyte를 배양시켜야 하는데, 그 기간 동안에 건강한 상태로 유지하기가 어렵다는 것이다. 동일한 개구리에서 1 주일 간격으로 oocyte를 채취한 후

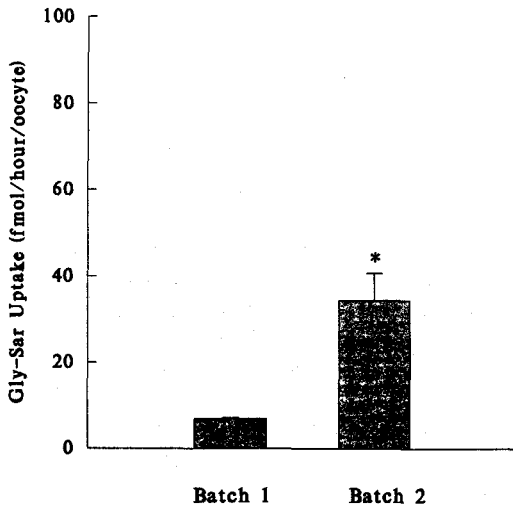


Figure 2—Batch-to-batch variation of functional expression of a dipeptide transporter in *Xenopus* oocytes. Oocytes were harvested from the same frog in two different days. Each value represents the mean \pm SE (n = 3 to 6, * p < 0.05).

디펩티드 수송체의 발현정도를 Fig. 2에 나타내었다. 기능발현의 정도는 유의성 있는 차이를 보여 ($p < 0.05$) 이러한 batch-to-batch 변동성 (variability)을 확인할 수 있었다. 따라서 비교실험을 행하여야 할 경우에는 동일 조건하에서 동일한 개구리알을 사용하여 같은 날에 시험해야 할 것으로 사료된다.

또한 변동성은 계절적인 요인에 의해 더욱 심해지는 경향이 있었다. 따라서 1년에 걸쳐 계절에 대한 디펩티드 수송체에 대한 기능발현을 실험하여 Fig. 3에 나타내었다. 계절성 변동성은 겨울에서 봄까지는 비교적 양호하다가 5월이 되면서 기능발현이 증가되고 그 변동성도 커졌다가 10월이 되면 다소 줄어들었다. 이러한 변동성은 실험실의 기온이 항상 실온으로 유지되었음을 감안할 때, 분명하지는 않지만 계절적인 요인으로 사료된다. 그 원인 중의 하나는 미세주사 후 배양되는 과정에서 발생하는 oocyte의 death 때문으로 여겨진다. 따라서 좀 더 재현성 있는 결과를 얻기 위해서는 이러한 변수들을 고려해야 하며, 특히 외인성 mRNA의 기능발현시에도 예외는 아니라고 사료된다.

이러한 문제점을 해결하기 위해 Tate 등³⁴⁾은 alkaline phosphatase를 발현의 정도를 알기 위한 내부 지시물질로서 사용하였으나, 그 자체의 발현의 변동성 때문에 정량성에는 한계가 있었다. 반면 Quick 등³⁵⁾은 개구리알의 viability는 보통의 식염수에 5% 말혈청을 첨가하여 oocyte를 배양하면 증가되었다는 보고를 하

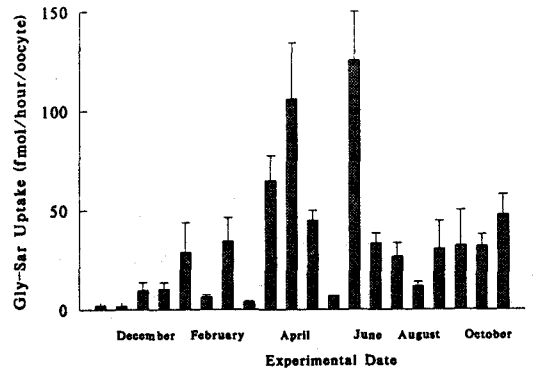


Figure 3—Seasonal variability of functional expression of a dipeptide transporter in *Xenopus* oocytes. Each value represents the mean \pm SE (n = 3 to 6).

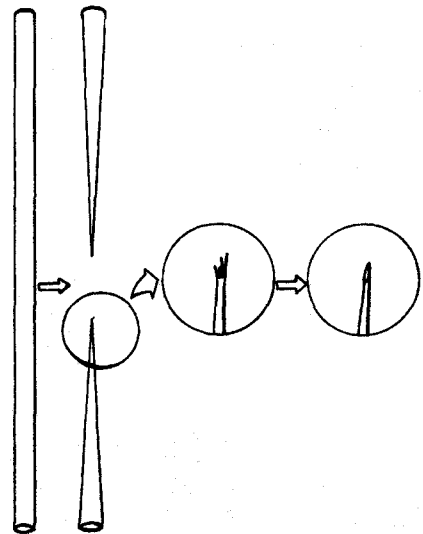


Figure 4—Preparation of micropipettes. A capillary with 0.5 mm internal diameter was pulled and cut. The tip of micropipettes was fine-tuned in the range of 20 μ m of outside diameter and beveled.

였다. 따라서 소혈청알부민을 첨가하여 미세주입시킨 oocyte를 배양하여 시도해 보았으나 4일 후 생존율의 개선은 유의성이 없었다(Fig. 5).

배양중 개구리알의 생존에 미치는 보다 중요한 요인은 미세주입시 세포막에 물리적으로 외상을 주게 되는데, 이 손상이 얼마나 잘 회복되느냐 하는 점이다. 따라서 가능한한 작은 구멍을 통해 외인성 mRNA를 주입시킬 수 있도록 micropipette의 제조시 주의를 가져야 한다(Fig. 4). 일반적으로 마이크로피펫의 외경은 25 μ m이하를 사용하며, Fig. 4에서 나타난 것처럼 끝을 잘 연마하여 미세주입에 사용하게 된다.³³⁾ 이와 같

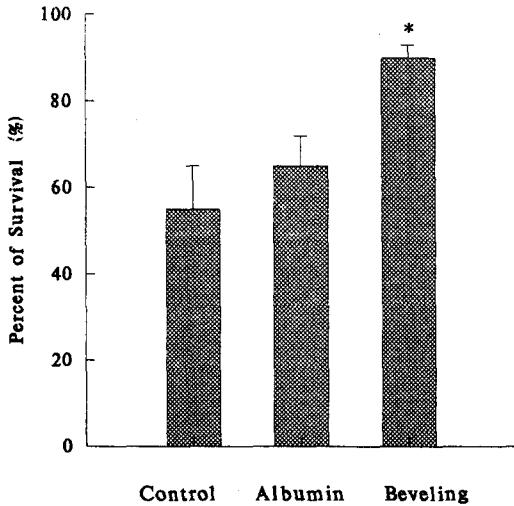


Figure 5—Viability of *Xenopus* oocytes at 4 days after microinjection. Treatment of oocytes with bovine serum albumin didn't improve the viability. There was a significant improvement on both viability and variability of expression (* $p < 0.05$). Each value represents the mean \pm SE ($n = 5$).

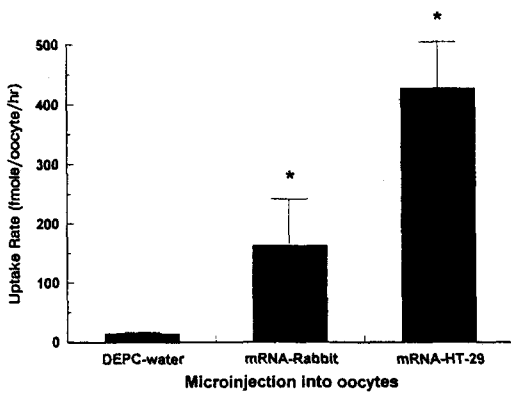


Figure 6—Functional expression of a dipeptide transporter in *Xenopus* oocytes after microinjections of DEPC-treated water, mRNA from the rabbit intestine, and mRNA from HT-29 cells. Each value represents the mean \pm SE ($n = 5$ to 7, * $p < 0.05$).

이 제조된 마이크로피펫을 사용하여 디펩티드 수송체의 발현을 보았을 때, 4일 후 생존율은 55%로서 90%로 현저히 증가하였다(Fig. 5). 생존율의 증가 뿐 아니라 대조군과 비교시 표준오차가 훨씬 작은 것으로 보아 variability도 개선되었음을 알 수 있다($p < 0.05$).

최근에 디펩티드 수송체에 대한 구조규명의 목적으로 유전자클로닝이 활발히 연구되고 있으며, Dantzig 등¹⁹⁾은 Caco-2 세포로부터 한 개의 transmembrane domain을 가지고 있는 분자량 약 92 kDa인 디펩티드

수송체의 아미노산 배열순서를 발표하였다. 반면 Fei 등³⁶⁾은 토끼의 소장으로부터 얻은 cDNA library로부터 12개의 transmembrane domain을 가지고 있는 분자량 약 71 kDa인 디펩티드 수송체의 아미노산 배열순서를 보고하여 논란이 되고 있다. 이어서 흰쥐^{37,38)}와 사람³⁹⁾에 있어서도 동일한 크기의 디펩티드 수송체가 클로닝되었다. 만약에 Caco-2 세포나 HT-29 세포로부터 mRNA를 얻어서 기능발현클로닝법을 사용하게 되면 규명된 두개의 유전자가 동일한 기능 즉, 디펩티드를 수송하는 지를 확인 할 수 있으리라 사료된다. 동일한 기능을 가진 두 개의 다른 수송단백질이 존재하는 지를 알기 위한 과정 중에서 가장 중요한 단계는 과연 소장 암세포에서 정제된 외원성 mRNA가 성공적으로 translation되어 기능이 발현되느냐 하는 것이다. Fig. 6에서는 음성콘트롤로서 DEPC로 처리한 물을 개구리 알에 미세 주입하고, 양성콘트롤로서는 토끼소장에서 얻은 mRNA를 주사하여 HT-29 세포로부터 분리정제된 mRNA를 미세주사한 결과와 비교하였다. 외원성 mRNA는 둘 다 현저한 디펩티드 기능발현을 보였으며, HT-29 세포로부터 얻어진 mRNA가 약 두배이상 유의성있게 더 높았다.

결론적으로 *Xenopus* oocyte에서의 디펩티드 수송체의 기능발현은 연중 매우 변동이 심했으며, 특히 여름에 변동률이 심했다. 소혈청알부민을 첨가한 배양액에서 미세주입 후 개구리알의 생존율은 개선되지 않았으나, 마이크로피펫을 연마하여 끝을 부드럽게 한 것을 사용함으로써 생존율은 현저히 개선되었다. HT-29 세포로부터 분리정제된 mRNA를 oocyte에 미세주입 후, 현저한 발현을 보였다. 따라서 유전자 규명을 위해 필요한 mRNA를 사람의 장관세포로부터 배양하여 다량을 손쉽게 얻어내어 사람의 디펩티드수송체에 대한 연구에 도움이 되리라 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 1995년도 한국과학재단에서 지원한 핵심 전문연구비 (과제번호 951-0710-072-1)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) D.M. Matthews, Mechanisms of peptide transport, *Beitr. Infusionsther. Klin. Ernahr.*, **17**, 6-53

- (1987).
- 2) T. Okano, K. Inui, H. Maegawa, M. Takano and R. Hori, H^+ coupled uphill transport of aminocephalosporins via the dipeptide transport system in rabbit intestinal brush-border membranes, *J. Biol. Chem.*, **261**, 14130-14134 (1986).
 - 3) D.-M. Oh, P. J. Sinko and G. L. Amidon, Characterization of the oral absorption of several aminopenicillins: Determination of intrinsic membrane absorption parameters in the rat intestine *in situ*, *Int. J. Pharm.*, **85**, 181-187 (1992).
 - 4) D.-M. Oh, P. J. Sinko and G. L. Amidon, Characterization of the oral absorption of some β -lactams: effect of an α -amino side chain group, *J. Pharm. Sci.*, **82**, 897-900 (1993).
 - 5) M. Hu and G. L. Amidon, Passive and carrier-mediated intestinal absorption components of captopril, *J. Pharm. Sci.*, **77**, 1007-1011 (1988).
 - 6) D. I. Friedman and G. L. Amidon, Passive and carrier-mediated intestinal absorption components of two angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor prodrugs in rats: Enalapril and fosinopril, *Pharm. Res.*, **6**, 1043-1047 (1989).
 - 7) W. Kramer, F. Girbig, U. Gutjahr, H. Kleemann, I. Leipe, H. Urbach and A. Wagner, Interaction of renin inhibitors with the intestinal uptake system for oligopeptides and β -lactam antibiotics, *Biochim. Biophys. Acta*, **1027**, 25-30 (1990).
 - 8) H.D. Kleinert, S.H. Rosenberg, W.R. Baker, H.H. Stein, V. Klinghofer, J. Barlow, K. Spina, J. Polakowski, P. Kovar, J. Cohen and J. Denissen, Discovery of a peptide-based renin inhibitor with oral bioavailability and efficacy, *Science*, **257**, 1940-1943 (1992).
 - 9) W. A. Banks, A. J. Kastin, E. A. Michals, and C. M. Barrera. Stereospecific transport of Tyr-MIF-1 across the blood-brain barrier by peptide transport system-1, *Brain Res. Bull.*, **25**, 589-592 (1990).
 - 10) H. Lochs, E. L. Morse, and S. A. Adibi. Uptake and metabolism of dipeptides by human red blood cells, *Biochem. J.*, **271**, 133-137 (1990).
 - 11) D. M. Matthews. Absorption of peptides by mammalian intestine. In *Peptide Transport in Protein Nutrition* (D.M. Matthews and J.W. Payne, eds.). North-Holland, Amsterdam, pp. 61-146 (1975).
 - 12) W. Kramer, F. Girbig, I. Leipe and E. Petzoldt, Direct photoaffinity labelling of binding proteins for β -lactam antibiotics in rabbit intestinal brush border membranes with [3H] benzylpenicillin, *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 2427-2435 (1988).
 - 13) W. Kramer, C. Dechent, F. Girbig, U. Gutjahr and H. Neubauer, Intestinal uptake of dipeptides and β -lactam antibiotics. I. The intestinal uptake system for dipeptides and β -lactam antibiotics is not part of a brush border membrane peptidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1030**, 41-49 (1990).
 - 14) Y. Miyamoto, Y. G. Thompson, E. F. Howard, V. Ganapathy and F. H. Leibach, Functional expression of the intestinal peptide-proton co-transporter in *Xenopus* oocyte, *J. Biol. Chem.*, **266**, 4742-4745 (1991).
 - 15) D.-M. Oh, G. L. Amidon and W. Sadée, Functional expressions of endogenous dipeptide transporter and exogenous proton/peptide cotransporter in *Xenopus* oocyte, *Arch. Pharm. Res.*, **18**, 12-17 (1995).
 - 16) M.A. Hediger, M.J. Coady, T.S. Ikeda, and E.M. Wright, Expression cloning and cDNA sequencing of the Na^+ /glucose co-transporter, *Nature*, **330**, 379-381 (1987).
 - 17) B. Hagenbuch, B. B. Stieger, M. Foguet, H. Lubbert, and P. J. Meier, Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na^+ /bile acid cotransport system, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **88**, 10629-10633 (1991).
 - 18) E. Sigel, Use of *Xenopus* oocyte for the functional expression of plasma membrane proteins, *J. Membr. Biol.*, **117**, 201-221 (1990).
 - 19) A.H. Dantzig, J. Hoskins, L.B. Tabas, S. Bright, R.L. Shepard, I.L. Jenkins, D.C. Duckworth, J.R. Sportsman, D. Mackensen, P.R. Rostek Jr. and P.L. Skatrud, Association of intestinal peptide transport with a protein related to the cadherin superfamily, *Science*, **264**, 430-433 (1994).
 - 20) I.J. Hidalgo and R.T. Borchardt, Transport of bile acids in a human intestinal epithelial cell line, Caco-2, *Biochim. Biophys. Acta*, **1035**, 97-103 (1990).
 - 21) A. R. Hilgers, R. A. Conradi and P. S. Burton, Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa, *Pharm. Res.*, **7**, 902-910 (1990).

- 22) A. H. Dantzig and L. Bergin, Uptake of the cephalosporin, cephalixin, by a dipeptide transport carrier in the human intestinal cell line, Caco-2, *Biochim. Biophys. Acta*, **1027**, 211-217 (1990).
- 23) C. Huet, C. Sahuquillo-Merino, E. Coudrier and D. Louvard, Absorptive and mucus-secreting subclones isolated from a multipotent intestinal cell line (HT-29) provide new models for cell polarity and terminal differentiation, *J. Cell. Biol.*, **105**, 345-357 (1987).
- 24) T. E. Phillips, C. Huet, P. R. Bilbo, D. K. Podolsky, D. Louvard and M. R. Neutra, Human intestinal goblet cells in monolayer culture: characterization of a mucus-secreting subclone derived from the HT29 colon adenocarcinoma cell line, *Gastroenterology*, **94**, 1390 (1988).
- 25) L. Gonzales-Mariscal, B. Chavez del Ramirez, A. Lazaro and M. Cereijido, Establishment of tight junctions between cells from different animal species and different sealing capacities, *J. Membr. Biol.*, **107**, 43 (1989).
- 26) A. Wikman, J. Karlsson and P. Artursson, Characterization of thickness and surface coverage of the mucus gel layer produced by a human intestinal goblet cell line (HT-29-gluc-H), *Pharm. Res.*, **7**, s117 (1990).
- 27) A.H. Dantzig and L. Bergin, Carrier-mediated uptake of cephalixin in human intestinal cells, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **155**, 1082-1087 (1988).
- 28) D.-M. Oh, Uptake of glycylsarcosine in the human intestinal cells, Caco-2, *Res. Bull. of Hyosung Women's Univ.*, **47**, 479-489 (1993).
- 29) D.-M. Oh, Uptake of a dipeptide by the dipeptide transporter in the HT-29 intestinal cells, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **25**, 137-143 (1995).
- 30) P. Chomczynski and N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* **162**, 156-159 (1987).
- 31) T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982).
- 32) J.B. Gurdon, C.D. Lane, H.R. Woodland and G. Marbaix, Use of frog eggs and oocyte for the study of messenger RNA and its translation in living cells, *Nature*, **233**, 177-182 (1971).
- 33) A. Colman, Translation of eukaryotic messenger RNA in *Xenopus* oocyte: In *Transcription and Translation: a practical approach*, B. D. Hames and S.J. Higgins (Ed), IRL Press, Oxford, UK, pp. 271-302 (1984).
- 34) S.S. Tate, R. Urade, R. Micanovic, L. Gerber and S. Udenfriend, Selected alkaline phosphatase: an internal standard for expression of injected mRNAs in the *Xenopus* oocyte, *FASEB J.*, **4**, 227-231 (1990).
- 35) M.W. Quick, J. Naeve, N. Davidson and H. A. Lester, Incubation with horse serum increases viability and decreases background neurotransmitter uptake in *Xenopus* oocyte, *Biotechniques*, **13**, 358-360 (1992).
- 36) Y.-J. Fei, Y. Kanai, S. Nussberger, V. Ganapathy, F.H. Leibach, M.F. Romero, S.K. Singh, W.F. Boron and M.A. Hediger, Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter, *Nature*, **368**, 563-566 (1994).
- 37) K.-I. Inui, H. Saito, M. Okuda and T. Terada, Cloning and expression of rat H⁺/dipeptide cotransporter for intestinal absorption of β -lactam antibiotics, *Pharm. Res.*, **12**, s350 (1995).
- 38) K. Hayashi, Y. Sai, I. Tamai, H. Higashijida, T. Shiraga, K. Miyamoto, E. Takeda and A. Tsuji, Cloning of oligopeptide transporter and hybrid-depletion of intestinal transporter of peptide-like drugs, *Pharm. Res.*, **12**, s351 (1995).
- 39) R. Liang, Y.J. Fei, P.D. Prasad, S. Ramamoorthy, H. Hans, T.L. Yang-Feng, M. A. Hediger, V. Ganapathy and F.H. Leibach, Human intestinal H⁺/peptide cotransporter, *J. Biol. Chem.*, **270**, 6456-6463 (1995).