

氏名	しま くら じん 島 倉 仁
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	論薬博第734号
学位授与の日付	平成19年1月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	ペプチドトランスポータ PEPT1 の転写制御機構に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 乾 賢一 教授 橋田 充 教授 佐治 英郎

論文内容の要旨

小腸上皮細胞に発現するペプチドトランスポータ1 (PEPT1, SLC15A1) は、膜を介した H⁺ 勾配を駆動力として、小分子ペプチド (ジペプチド及びトリペプチド) を細胞内に能動輸送する膜タンパク質であり、タンパク質の吸収に重要な役割を果たしている。また、PEPT1 は広範な基質認識特性を有することから、経口用 β -ラクタム抗生物質など、小分子ペプチドと構造的に類似した薬物を輸送し、薬物トランスポータとしても機能している。著者の所属研究室では、ラット PEPT1 及び PEPT2 をクローニングして以来、PEPT の構造・機能・遺伝子多型・発現調節に関する研究を展開してきた。このうち発現調節については、PEPT1 がホルモン、食餌、薬物、日周リズムなど、様々な因子によって、転写あるいは蛋白レベルで発現調節を受けることが、著者の所属研究室を初め多くの研究者から報告されている。しかしながら、PEPT1 の発現調節に大きく影響すると考えられる PEPT1 遺伝子の転写制御機構については未だほとんど解明されていない。

そこで著者は、ヒト PEPT1 のプロモーター領域をクローニングし、培養細胞を用いた *in vitro* でのプロモーター活性の評価、さらに *in vivo* における mRNA 発現解析などの手法を用い、小腸 PEPT1 の基礎転写及び組織特異的な転写制御に関わる分子機構について検討を行った。さらに、絶食時における PEPT1 発現誘導の制御機構についても解明を試み、以下の新知見を得た。

I. PEPT1 の基礎転写に関わる制御機構—転写因子 Sp1 の役割—

Caco-2 細胞を用いたレポーターアッセイ系によってヒト PEPT1 の転写活性を検討した。プロモーターの deletion analysis から、転写開始部位の-172位から-35位の領域が基礎転写活性に重要であること、この領域には転写因子 Sp1 が結合すると推測される GC ボックスが複数存在することが判明した。これら GC ボックスへの変異導入及び Caco-2 細胞の核抽出液を用いたゲルシフトアッセイによって、Sp1 が2ヶ所の GC ボックスと結合することが確認された。さらに、PEPT1 転写活性は、Sp1 結合阻害剤である mithramycin A によって低下する一方、Sp1 の過剰発現によって上昇した。以上の検討から、ヒト PEPT1 の基礎転写に重要なシスエレメントが初めて同定され、トランスファクターとして Sp1 が機能していることが明らかとなった。

II. PEPT1 の小腸特異的な発現に関わる転写制御機構—転写因子 Cdx2 の役割—

上述の通り、Sp1 はヒト PEPT1 の基礎転写に重要であるが、ユビキタスに発現する転写因子であるため、Sp1 によって PEPT1 の小腸特異的な発現を説明することは困難である。そこで、PEPT1 の小腸特異的な発現には組織特異的な転写因子が関与することを想定し、種々転写因子のスクリーニングを行った結果、小腸上皮細胞の分化や機能維持に重要な転写因子 Cdx2 が PEPT1 の転写活性を促進させることを見出した。しかし、PEPT1 プロモーターの Cdx2 反応領域は基礎転写に関わる Sp1 結合サイトと重複しており、これまで報告されている Cdx2 の標的遺伝子とは異なり、Cdx2 結合配列が存在しないことが判明した。Cdx2 の作用機序として、PEPT1 プロモーターに直接結合せず、Sp1 と物理的に相互作用することによって PEPT1 の転写活性を制御する可能性が示唆され、Cdx2 としては新規な機序と考えられた。また、腸上皮化生を発症したヒト胃粘膜組織においては、本来胃には発現の見られない PEPT1 が発現しており、Cdx2 と PEPT1 の mRNA 発

現レベルは良好な相関を示した。以上の結果から、Cdx2はSp1と相互作用することによって、PEPT1の小腸特異的な発現に主要な役割を果たしているものと考えられた。

Ⅲ. 絶食時における小腸 PEPT1 の発現誘導機構

絶食は小腸 PEPT1 の mRNA 及び蛋白レベルを上昇させ、PEPT1 の基質薬物の体内動態にも影響を及ぼすことが明らかとなっており、生理的及び薬物動態学的に重要な誘導因子である。そこで、絶食時における PEPT1 発現誘導機構について検討を行った。上述の Sp1 や Cdx2 は、絶食によってもそれら発現レベルに顕著な上昇が認められず、PEPT1 誘導には関与していないと考えられた。一方、肝臓において絶食に対する生体の適応反応に主要な働きをする転写因子として PPAR α が知られている。PPAR α は小腸にも発現していることから、PEPT1 誘導における PPAR α の関与を明らかにすることを試みた。48時間絶食させたラットでは、小腸 PEPT1 mRNA の発現量が通常の約 2 倍に上昇するが、このとき小腸 PPAR α mRNA 発現量の上昇及び PPAR α の内因性リガンドである血中遊離脂肪酸濃度の顕著な上昇を伴うことが確認された。Caco-2 細胞を PPAR α のリガンドである WY-14643 で処理したところ、PEPT1 mRNA レベルが上昇し、glycylsarcosine 取り込み活性も増大した。さらに、ラットに WY-14643 を経口投与した結果、小腸 PEPT1 の mRNA レベルが上昇した。最後に、PPAR α ノックアウトマウスでは小腸 PEPT1 の誘導は完全に消失したことから、PPAR α が絶食による小腸 PEPT1 誘導に主要な役割を果たしていることが明らかとなった。なお、今回得られた知見は、生体内空素の制御という観点から PPAR α の新たな機能を提唱するものと考えられる。

以上、著者は PEPT1 の転写制御機構の解明を試み、基礎転写には Sp1 が、小腸特異的な発現には Cdx2 が主要な役割を果たしていることを明らかにした。また、絶食時における PEPT1 発現誘導は PPAR α を介していることも示した。本研究成果は、PEPT1 発現調節機構の更なる解明など、基礎研究を展開する上で基盤として資するばかりでなく、医薬品の適正使用や小腸機能障害時における適切な栄養療法の開発といった応用研究にも貢献するものとする。

論文審査の結果の要旨

小腸上皮細胞の刷子縁膜に発現するペプチドトランスポーター 1 (PEPT1, SLC15A1) は、小分子ペプチド (ジペプチド及びトリペプチド) やペプチド類似薬物の細胞内取り込みを媒介し、生理・薬物動態学的に重要な役割を果たしている。これまで、PEPT1 がホルモン、食餌、薬物、日周リズムなど、様々な因子によって発現調節を受けることが報告されているが、PEPT1 遺伝子の転写制御機構についてはほとんど解明されていなかった。そこで申請者は、PEPT1 の基礎転写及び組織特異的な転写制御に関わる分子機構について検討を加えるとともに、絶食時における PEPT1 発現誘導の制御機構についても解明を試み、以下の新知見を得た。

Caco-2 細胞を用いたレポーターアッセイ系によって、ヒト PEPT1 の基礎転写活性には、-172位から-35位の領域が重要であることを明らかにした。この領域には転写因子 Sp1 が結合すると推測される GC ボックスが複数存在し、ゲルシフトアッセイや Sp1 過剰発現実験によって、Sp1 がこの領域に結合し、プロモーター活性を促進させることが分かった。以上の検討から、ヒト PEPT1 の基礎転写に重要なシスエレメントが初めて同定され、トランスファクターとして Sp1 が機能していることがわかった。

Sp1 はヒト PEPT1 の基礎転写に重要であるが、ユビキタスに発現する転写因子であるため、Sp1 によって PEPT1 の小腸特異的な発現を説明することは困難である。そこで、小腸特異的な転写因子が PEPT1 の発現に関与していることを想定し、種々転写因子のスクリーニングを行った。その結果、小腸上皮細胞の分化や機能維持に重要な転写因子 Cdx2 が PEPT1 の転写活性を促進させることがわかった。Cdx2 は PEPT1 プロモーターに直接結合せず、Sp1 と物理的に相互作用することによって、間接的に PEPT1 の転写活性を制御していることが、免疫沈降や ChIP アッセイによって示された。また、腸上皮化生を発症したヒト胃粘膜組織においては、本来胃には発現の見られない PEPT1 が発現しており、Cdx2 と PEPT1 の mRNA 発現レベルは良好な相関を示した。従って、Cdx2 の役割が *in vivo* で確認された。以上の結果から、Cdx2 は Sp1 と相互作用することによって、PEPT1 の小腸特異的な発現に主要な役割を果たしていることが判明した。

絶食は小腸 PEPT1 の mRNA 及び蛋白レベルを上昇させ、PEPT1 の基質薬物の体内動態にも影響を及ぼすことが明らかにされており、生理的及び薬物動態学的に重要な誘導因子である。そこで、絶食時における PEPT1 発現誘導機構につい

て、肝臓で絶食時の適応因子として役割の確立している核内受容体 PPAR α に焦点を当て検討を行った。その結果、48時間絶食させたラットでは、小腸 PEPT1 mRNA の発現量が通常の約 2 倍に上昇するが、このとき小腸 PPAR α mRNA 発現量の上昇及び PPAR α の内因性リガンドである血中遊離脂肪酸濃度の顕著な上昇を伴うことが確認された。ラットに PPAR α のリガンドである WY-14643 を経口投与した結果、小腸 PEPT1 の mRNA レベルが上昇した。さらに、PPAR α ノックアウトマウスでは小腸 PEPT1 の誘導は完全に消失したことから、PPAR α が絶食による小腸 PEPT1 誘導に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

以上の研究は、PEPT1 の基礎転写、小腸特異的な発現並びに絶食による発現誘導の分子機構を初めて明らかにしたものであり、PEPT1 の発現調節機構の解明において、極めて重要な知見を含んでいる。これらの研究成果は、医薬品の適正使用や小腸機能障害時における適切な栄養療法の開発にも貢献すること大であり、薬物動態学の発展に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成18年12月12日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。