

29-0535 W49-5

ヒトペプチドトランスポータ (hPEPT1) の転写制御における Sp1 の関与
○島倉 仁¹, 寺田 智祐¹, 桂 敏也¹, 乾 賢一¹ (¹京都大病院薬)

【目的】ペプチドトランスポータ (PEPT1) は、主として小腸に発現し、ジ・トリペプチド、さらにペプチド類似薬物等の吸収を担っている。PEPT1 の発現は食餌、ホルモン、ある種の薬剤によって変動することが知られているが、その分子機構はほとんど明らかでない。そこでヒト PEPT1 の転写制御に関する基礎的な知見を得ることを目的として、Caco-2 細胞を用いて各種検討を行った。

【方法】ヒト PEPT1 プロモーター領域 (転写開始部位の上流約 3kbp) は、human genomic DNA を鋳型として PCR により増幅し、pGL3basic ベクターにサブクローニングした。プロモーターの deletion construct は制限酵素処理により作製した。また、プロモーターの変異体は市販キットを用いて作製した。転写活性は、各 construct を Caco-2 細胞に一過性に発現させ、ルシフェラーゼアッセイにより測定した。

【結果および考察】今回クローニングしたプロモーター領域の deletion analysis の結果、転写開始部位の上流 21 から 172bp 間の領域が PEPT1 の転写活性に重要であることが明らかとなった。この領域には TATA box は存在せず、Sp1 が結合すると推定される GC-rich サイトが複数存在した。これら推定 Sp1 結合サイトにそれぞれ変異を導入することにより転写活性は低下し、また、Caco-2 細胞の核抽出液を用いたゲルシフトアッセイにより、推定 Sp1 結合サイトと Sp1 の結合が確認された。さらに、PEPT1 の転写活性は、Sp1 の過発現により上昇し、Sp1 と DNA との結合阻害剤である mithramycin A 処理により低下した。これらの結果から、ヒト PEPT1 の構成的発現には Sp1 が複数の結合部位を通して関与していることが示された。