The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of human N-acetyl glucosaminyltransferase III (GnT-III)
Author(s)	井原, 義人
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38955
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【12】

氏　　名	井　原　義　人（いはら　よしと）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　11250　号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学　位　論　文　名	cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of human N-acetyl glucosaminyltransferase Ⅲ（GnT-Ⅲ） **（ヒトN－アセチルグルコサミン転移酵素 Ⅲ（GnT-Ⅲ）のcDNAクローニング，活性発現，および染色体マッピング）**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　谷口　直之 （副査） 教　授　岡本　光弘　　教　授　中村　敏一

論　文　内　容　の　要　旨

［目的］

糖タンパク質や糖脂質の糖鎖構造は非常に多彩であり，発生，分化，癌化に伴い著しく変化することが知られている。N－アセチルグルコサミン転移酵素 Ⅲ（GnT-Ⅲ）は糖タンパク質アスパラギン（N）結合型糖鎖の分枝構造決定に関与する糖転移酵素の一つであり，最近，当教室でラット腎より初めて精製されcDNAもまたクローニングされた。GnT-Ⅲはヒト肝癌などある種の癌でその著しい活性化が報告されており，本酵素の活性化とそれに伴う糖鎖癌性変化の病態における意義が注目されてきたが，未だ遺伝子レベルでの解析は行われていない。そこで，本研究はヒトGnT-Ⅲの遺伝子を単離，解析することを目的として行われた。

［方法ならびに成績］

1．ヒトGnT-Ⅲ cDNAのクローニング：ラットGnT-Ⅲ cDNA HindⅢ断片をプローブとして，ヒト胎児肝細胞cDNAライブラリーをプラークハイブリダイゼーション法にてスクリーニングした。6クローンが得られ，制限酵素地図の作成後，一部オーバーラップする独立した3クローンについてそれぞれの制限酵素断片またはdeletion mutantを作成した。上記のようにして作ったcDNA断片を各々サブクローニングし，Sanger法にてセンス，アンチセンス両鎖について核酸配列の決定を行った。その結果，ヒトGnT-Ⅲのタンパク質コード領域は1593 bpで，これは531アミノ酸に相当した。ヒトGnT-ⅢはⅡ型膜結合タンパク質で，N結合型糖鎖付加サイトを4ヶ所持つことが予想された。ラットとの相同性は核酸配列で86%，アミノ酸配列で91%であり，特に膜貫通部位と活性触媒部位は2種間で非常によく保存されていることが判明した。

2．ヒトGnT-Ⅲ発現ベクターの作成と活性発現：クローンH20の5'側（0.8 Kbp）とH3の3'側（1.3 Kbp）をNot Iサイトで結合しSV40プロモーターを持つ発現ベクターPSVK3のEcoRI, XhoIサイトに挿入した。構築した発現ベクターpEX20cを電気穿孔法にてCOS-1細胞に導入し，2日後に細胞を集めホモジナイズ後GnT-Ⅲ活性を測定したところ，プラスミドの導入量に比例して著しい活性が観察された。このことから得られたクローンは確かにヒトGnT-Ⅲをコードしていることが明らかになった。

3．ヒトGnT-Ⅲゲノムクローンの単離と染色体マッピング：クローンH2をプローブとしてヒトゲノムコスミドライブラリーをコロニーハイブリダイゼーション法にてスクリーニングし，2クローン（Hug3, Hug5）を得た。両クローンについて制限酵素地図の作成，部分的核酸配列の決定を行ったところ，GnT-Ⅲのコード領域は単一のエクソ

ンに含まれていることが判明した。次に，両クローンをビオチン16dUTPラベルし，ヒト分裂中期染色体に対して蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH法）を行った。シグナルはFITC結合アビジンを加えることにより蛍光顕微鏡下で観察したところ，doublet signが1ヶ所に認められ，GnT-Ⅲは22q.13.1に局在することが判明した。

［総括］

ヒトGnT-ⅢのcDNAをクローニングし，酵素活性発現を行い，その核酸配列を決定した。この配列から，ヒトGnT-ⅢはⅡ型膜結合タンパク質であり，4つのN結合型糖鎖付加サイトを持つことが予想された。また，ヒトとラットではアミノ酸レベルで91％と非常に高い相同性のあることがわかった。ヒトゲノムの単離，部分的解析を行ったところ，本酵素のコード領域が単一エクソン内にあることが判明した。また，染色体マッピングにより本酵素が22q.13.1に局在することが明らかになった。このようにGnT-Ⅲ遺伝子が単離できたことで，今後，発生，分化，癌化に伴うGnT-Ⅲ活性発現制御の遺伝子レベルでの解析が可能となることが期待できる。

論文審査の結果の要旨

申請者らは先にラット腎臓からGnT-Ⅲを精製し，そのアミノ酸配列を基にcDNAクローニングに成功した。この結果はすでに発表されている。本論文では，ラットの配列を用いて，ヒトのcDNAライブラリーをスクリーニングし，ヒトの核酸配列を明らかにするとともに，発現実験を通じて得られたcDNAがGnT-Ⅲ活性を示すことを明らかにした。さらに，このcDNAに相補的な配列を持つゲノム断片を得，これを使って，GnT-Ⅲ遺伝子がヒト染色体22q.13.1に存在することを明らかにした。ラットとヒトのcDNA塩基配列の比較から，stem領域，C末端に変異が集中し，膜貫通領域と酵素活性を担うと考えられる領域が極めてよく保存されていることが明らかとなり，さらに他の糖転移酵素との間に類似の配列が無く，膜貫通領域もゴルジ局在の他の転移酵素と類似性の無いことを指摘している。糖鎖の種特異的発現，進化の過程での糖鎖発現の変化と新たな糖鎖発現能の獲得は，どの様な変異によりもたらされたかに答えることは，糖鎖生物学の重要な課題の一つであり，本論文はそれに至る基礎データとして価値があるものと判断される。また，本論文は日本生化学会の1993年度JB論文賞を授賞した。以上より，本研究および論文は博士の授与に値するものと考えられる。