



Title	Human N-acetylglucosaminyltransferase III gene is transcribed from multiple promoters
Author(s)	小山, 信人
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40362
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

氏 名 小 山 のぶ と

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 2 8 4 1 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 9 年 3 月 18 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 名 Human *N*-acetylglucosaminyltransferase III gene is transcribed from multiple promoters
(ヒト *N*-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII遺伝子は複数のプロモーターから転写される)

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 谷口 直之
(副査)
教 授 高井 義美 教 授 木下タロウ

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII (GnT-III) は糖蛋白N結合型糖鎖のトリマンノシルコアに GlcNAc 残基を β -1,4結合で転移し、バイセクト型糖鎖を合成する酵素である。ニワトリ輸卵管, ラット腎臓, ヒトBリンパ球, ヒト胎児肝臓等の組織で GnT-III は発現しているが, 各種癌細胞株, 急性転化した慢性骨髄性白血病患者の血清, 肝癌や肝硬変患者の血清と肝臓, 化学発癌させたラットの肝癌細胞等では発現量が著しく上昇する。一方, 肝芽腫細胞にB型肝炎ウイルスが感染した場合その発現量は減少する。

癌細胞表面の糖蛋白糖鎖の枝分かれ構造は悪性度と密接な関係があると考えられている。枝分かれの最初の反応は GnT-V が触媒するが, GnT-III によってバイセクト型となった糖鎖はもはや GnT-V の基質にはならない。高転移メラノーマ B16に GnT-III 遺伝子を導入して強制発現させ, 枝分かれ構造の少ない糖鎖を持つ細胞を作製してマウスに静注すると肺への転移が有意に減少する。

以上の事実から GnT-III 遺伝子の発現調節は非常に複雑な機構で行われていることが推察される。また, 癌の悪性度を理解する上で GnT-III 遺伝子の発現調節が重要な意味を持つと考えられる。本研究ではヒト GnT-III 遺伝子の転写調節機構を解析する目的で転写開始領域周辺のゲノム DNA と転写産物の構造解析を行った。

〔方法ならびに成績〕

KATO-III, MKN-45 (胃癌), Huh6 (肝芽腫), U937 (組織球白血病), G361 (メラノーマ), Colo201 (大腸癌), KURAMOCHI, A2780 (卵巣癌), Hep3B (肝癌) の各癌細胞から RNA を調製し, GnT-III cDNA をプローブとしてノーザンブロッティングを行った。いずれにおいても4.7 kb の mRNA に相当するシグナルが認められた。Huh6, Hep3B, U937での発現レベルは他の細胞に比べて低かったが, ラットのどの正常組織よりもはるかに高いレベルであった。

ヒト胎児肝臓 mRNA から得られた cDNA クローン, H15と H20の5'-非翻訳領域の DNA 塩基配列は異なっている。配列の異なる部分をプローブにしてヒトゲノムコスミドクローン hug3のサザンブロッティングを行ってマッピング

グを行ったところ翻訳領域を含むエクソン (exon 1) の他に H15 は 2 個 (H15 exon -2, -29 kb と H15 exon -1, -1 kb), H20 は 1 個 (H20 exon -1, -26 kb) のエクソンから成り立っていた。

翻訳領域の 5' 末端付近に相補的なプライマーを用いて成人脳 mRNA の 5'-RACE を行ったところ開始コドン付近でスプライシングが起こっていない mRNA (H204 mRNA) の存在が示唆された。H15, H20, H204 各 mRNA に特異的なプライマーを合成してプライマー伸長法でヒト胎児肝臓由来 GnT-III mRNA の 5' 末端付近を解析したところすべてのプライマーで明瞭なシグナルが得られた。H20 と H204 は単一の部位から転写が開始されていたが、H15 では分子量が最大約 200 塩基異なる数種類の mRNA に相当するシグナルが得られた。シグナルの強さからは H204 mRNA が最も多量に存在すると考えられた。上記のプライマーを用いて 5'-RACE を行ったところ、H15 の最も低分子の mRNA と H204 mRNA に相当する DNA 断片が得られた。H15 の他の mRNA と H20 mRNA に相当する DNA 断片は得られなかった。得られた DNA 断片の配列を決定したところプライマー伸長法の結果と合致した。

H15, H20, H204 の転写開始点付近から上流にかけての様々なサイズのゲノム DNA 断片の Huh6 細胞におけるプロモーター活性をルシフェラーゼ法によって測定した。H15 の転写開始点を含む 3.4 kb から 0.2 kb, H204 の転写開始点を含む 1.1 kb から 0.2 kb の各種サイズの DNA 断片はプロモーター活性を有していた。H20 転写開始点付近から上流 2.9 kb の DNA 断片はプロモーター活性を持たなかった。

H15, H20, H204 のどのプロモーター領域にも TATA box, CAAT box, GC box は見られなかった。AP2, F-ACT1, Myc の認識部位が H15, H204 両プロモーターの最小の DNA 断片に共通に含まれていた。H20 プロモーターは GC 含量が 80% を超え、転写促進因子である Sp1 と転写抑制因子である GCF の認識部位が数多く見られた。これらの mRNA の 5'-非翻訳領域は一般の哺乳類のそれに比べてかなり長く、安定な 2 次構造をとると予想された。

〔総括〕

ヒト胎児肝臓では GnT-III 遺伝子は最低 3 個のプロモーターから転写されており、各転写産物は異なったパターンでスプライシングを受けることが明らかになった。そのうち H15 と H204 プロモーターは転写開始点付近を含む約 200 bp まで切り縮めても Huh6 細胞で活性をもっており、AP2, F-ACT1, Myc 等の転写因子の関与の可能性が示唆された。H20 プロモーターの調節には Sp1 による正の制御と GCF による負の制御がともに関与していると考えられた。3 種類の mRNA はともに 5'-非翻訳領域で安定な 2 次構造を形成しうる。この様な 2 次構造は翻訳効率を低下させるとされており、異なるプロモーターからは 1 分子あたりの翻訳効率が異なる mRNA が転写されると考えられる。これは GnT-III 酵素活性と転写量が必ずしも比例関係にない (特に脳には活性がないが mRNA 量が多い) ことの原因であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

タンパク質の糖鎖の癌性変化は古くから知られており、近年それらを制御する糖転移酵素のいくつかが発見されてきた。中でも N-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) は、アスパラギン結合型糖鎖の分岐鎖構造を決定する糖転移酵素で、癌化に伴い活性化されるのみならず、特定の糖鎖をもつ癌細胞の転移を抑制したり、B 型肝炎ウイルスの発現を抑制するなど非常に多彩な生物学的活性を有する。しかし、癌化において、また組織特異的に遺伝子発現が制御されるメカニズムに関しては明らかでなかった。

本論文は、極めて複雑な GnT-III 遺伝子の転写産物の構造、上流域のゲノムの構造及びプロモーター活性を解析したものである。その結果、GnT-III 遺伝子が複数のプロモーターから転写されていること、複数のパターンでスプライシングを受けていること、GnT-III 遺伝子上流域のゲノム配列が肝芽腫細胞 HuH-6 でプロモーター活性を示すこと、GnT-III 遺伝子上流域のゲノム配列には転写効率を抑制する配列及び向上させる配列が含まれることなどを見いだした。これらの発見は、癌化に伴う糖鎖機能の解明へ多大に貢献すると考えられる。また臨床的にも、糖鎖のリモデリングによる癌やウイルス疾患治療の道を開く可能性がある。

以上の理由により申請者の論文は学位の授与に値するものと考えられる。