

Title	Organization of the human N-acetylglucosaminyltransferase V gene
Author(s)	齊藤, 浩之
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/40438
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏 名	さい とう ひろ ゆき 齊 藤 浩 之
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 6 1 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 5 月 9 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	Organization of the human <i>N</i> -acetylglucosaminyltransferase V gene (<i>N</i> -アセチルグルコサミン転移酵素 V 遺伝子構造の決定)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 谷 口 直 之 (副査) 教 授 高 井 義 美 教 授 宮 坂 昌 之

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的) *N*-アセチルグルコサミン転移酵素群は複合型アスパラギン結合型糖鎖の分枝形成に関与する酵素群である。*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnT-V) は糖鎖の多分枝化をもたらす、悪性形質転換した細胞で本酵素の活性増加や本酵素が形成する β 1-6分枝構造の増加、高転移性細胞株の細胞表面糖鎖構造においても β 1-6分枝構造が増加していることが報告され、癌との関連が非常に注目されている。我々は本酵素の発現メカニズムを調べるため、ヒト肺小細胞癌細胞株 QG 細胞より酵素精製に成功し、続いてヒト胎児肝臓の cDNA ライブラリーより cDNA クローニングに成功した。今回はさらにゲノム DNA のクローニングを試み、遺伝子構造の決定とプロモーター領域の解析を行った。

(方法ならびに結果) ヒト末梢血ゲノム DNA ライブラリーを GnT-VcDNA をプローブとしてスクリーニングを行い12個の重なりのあるクローンを得た。得られたクローンについて *Eco*RI 消化及びサザンブロット解析により制限酵素地図を作成した。また、サザンブロット解析にて陽性であったフラグメントはプラスミドベクターにサブクローニングし、シーケンズによりエクソン-イントロン境界を決定した。イントロンの長さは、制限酵素地図とサブクローニングしたベクターをテンプレートとしてエクソンとエクソンあるいはベクターとエクソンというプライマーの組み合わせで PCR を行い決定した。解析の結果 GnT-V 遺伝子は少なくとも17のエクソンに分かれており、蛋白翻訳領域は16個のエクソンより成り立つことがわかった。しかし、クローン15 (エクソン11を含む) とクローン38 (エクソン12を含む) の2つのクローンに重なりがないことがわかったため、このクローンをそれぞれ様々な制限酵素で消化したところ、*Eco*RV, *Spe*I, *Nhe*I が共通して存在することがわかったため制限酵素地図を作成し、また genomicDNA を同じ酵素で消化後、エクソン11特異的プローブを使ってサザンブロット解析を行った結果、2つのクローンは7.6 kb 離れていることがわかった。以上より GnT-V 蛋白翻訳領域は16個のエクソンに分かれ、155 kb にわたって存在することが明らかになった。次に転写開始点を決定するため細胞株より抽出した RNA を用いて5'RACEを行った結果、GnT-V mRNA は細胞によって異なった5' 非翻訳領域が存在し、同一細胞においても複数存在することが明らかになった。また、mRNA は大きく分けてエクソン1の上流より転写されるタイプ、エクソン1より転写されるタイプ、エクソン

1をスプライスアウトしエクソン2の上流より転写されるタイプ、エクソン2より転写される4つのタイプが存在した。5'RACEの結果よりエクソン1の上流域およびイントロン1がプロモーターとして機能している可能性が考えられることから、これらをシーケンスにより解析した。エクソン1の上流域にはTATAボックスが存在し、AP-1, AP-2, NF-IL6などの転写因子のコンセンサス配列が存在した。イントロン1はTATAボックスを欠き、AP-2, LF-A1などのコンセンサス配列が存在した。いずれも組織特異的転写因子のコンセンサス配列が多く存在した。次に、エクソン1の上流域およびイントロン1が実際にプロモーターとして機能しているか調べるため、それぞれの領域をCATベクターにサブクローニングし、COS-1細胞を用いてCATアッセイを行った。ポジティブコントロールとしてSV40のプロモーターを持つベクターを使い、ネガティブコントロールとしてプロモーターを欠いたベクターを使用した。結果としてSV40のプロモーターより低い活性であったが、それぞれネガティブコントロールの13倍および10倍のプロモーター活性を持つことが明らかになった。

(総括) ヒトGnT-Vは16個のエクソンより成り155 kbにわたり存在することが明らかになった。GnT-Vには少なくとも2つのプロモーターが存在し、mRNAに細胞特異的発現がみられ、またプロモーター領域に組織特異的発現をする転写因子の配列が多く見られることから、GnT-Vは多重プロモーターを使い組織あるいは細胞特異的に発現している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は癌化や癌の転移に関与していると考えられている*N*-アセチルグルコサミン転移酵素V (GnT-V)の発現メカニズム解明のため酵素精製、cDNAクローニングの成功に続き遺伝子構造の決定とプロモーター領域の解析を行ったものである。申請者らはcDNAをプローブとしてヒト末梢血ゲノムDNAライブラリーをスクリーニングし、最終的に12個の重なりあうクローンを得た。これらを解析した結果GnT-Vは2番染色体に155 kbにわたり存在し、16個のエクソンより成り立つことが明らかになった。さらに、転写開始点決定のため5'RACEを施行したところGnT-V mRNAの5'非翻訳領域は実験に用いた細胞株において全く異なった構造をしており、GnT-Vは非常に複雑な発現をしていることがわかった。また、5'RACEの結果エクソン1の上流域およびイントロン1がプロモーターとして機能していると考えられたため、シーケンスにより解析した結果、前者はTATAボックス、AP-1をはじめ種々の組織特異的転写因子のコンセンサス配列が存在し、後者にもLF-A1をはじめとした配列が存在した。続いて2つの領域をそれぞれCATベクターに挿入しCATアッセイにてプロモーター活性があることを確認した。糖転移酵素遺伝子に関する報告が最近続々と発表されているが本研究によって明らかになった細胞特異的発現、多重プロモーターによる発現制御の可能性を示唆した報告はなく、今後糖転移酵素遺伝子発現に関する研究に新たな知見をもたらす基礎データとして価値があるものと判断される。以上より、本研究および論文は博士号の授与に値するものと考えられる。