

Title	Transcriptional Regulation of the N-Acetylglucosaminyl-transferase V Gene in Human Bile Duct Carcinoma Cells (HuCC-T1) Is Mediated by Ets-1
Author(s)	康, 如君
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40769">https://hdl.handle.net/11094/40769</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	かん 康 如 君
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 3 6 8 4 号
学位授与年月日	平成10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	Transcriptional Regulation of the N-Acetylglucosaminyltransferase V Gene in Human Bile Duct Carcinoma Cells (HuCC-T1) Is Mediated by Ets-1 (ヒト胆管癌細胞 (HuCC-T1) における Ets-1 によるヒト N-アセチルグルコサミン転移酵素-V (GnT-V) の転写調節)
論文審査委員	(主査) 教授 谷口 直之  (副査) 教授 高井 義美 教授 中村 敏一

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

細胞の癌化に伴い糖蛋白質の糖鎖構造に変化が見られることが知られている。これら一つ一つの糖鎖は固有の糖転移酵素により生合成される。N-アセチルグルコサミン転移酵素-V (GnT-V) は糖蛋白質N結合型糖鎖のトリマンノースコアに $\beta$ 1-6GlcNAcを転移し、三本鎖糖鎖を合成する酵素である。癌細胞表面の存在する糖蛋白質の糖鎖の枝分かれ構造が癌の悪性度と密接な関係があること、転移能の高い細胞癌にはGnT-Vの産物である $\beta$ 1-6Branch構造が非常に多いことが知られている。また、GnT-V活性の低い正常上皮細胞にGnT-V遺伝子を強制発現させると、細胞の浸潤能が増加し接触阻害のかからないことが報告されている。つまり、GnT-Vにより改変された糖鎖が細胞の形質転換に深く関与すると考えられる。われわれの教室では、ヒト肺癌細胞の培養上清からGnT-Vを分離精製し、そのcDNAクローニングに成功した。さらに、ヒトGnT-Vのゲノムを解析した結果、ヒトGnT-V遺伝子は17以上のエクソンに分かれており、細胞特異的な5'非翻訳領域を持つことがわかった。本研究ではヒトGnT-V遺伝子の転写調節機構を知るため、ヒト胆管癌細胞 (HuCC-T1) を用いて、その転写開始点上流域における転写活性化エレメントとその活性化因子の解析を行った。

#### 【方法ならびに成績】

GnT-Vのゲノムを解析した結果、ヒト胆管癌細胞 (HuCC-T1) において、GnT-V遺伝子は二つの転写開始点から転写が行われ、その上流はプロモーターとして働いていることがわかった。この領域に転写活性化及び抑制エレメントが存在しているかどうかを調べるため、Nested deletion法によりDeletion mutantを作成し、Luciferase reporter vectorに組み込んだものを、Lipofectoamine法を用いてHuCC-T1細胞にトランスフェクションした。この時 $\beta$ -Galactosidase発現ベクターをコトランスフェクションすることによって補正を行い、ルシフェラーゼ活性測定により転写活性を検討した。その結果、転写開始点より-1460bpから-710bpまでと-362bpから-243bpまではPositive regulatory elementとして働いていることがわかった。その配列を詳細に解析したところ、癌転移に関連する転写因子として知られているEts-1蛋白質の結合コンセンサス配列 (5'-GGA-3') が含まれていた。この配列にEts-1蛋白質が結合するかどうかを知るため、Gel shift assayを行った。その結果、Ets-1蛋白質がGnT-V遺伝子上流の二つのEts binding site (-728, -266) と結合することを確認した。次に実際、Ets-1蛋白質がGnT-V遺伝子の転

写を制御しているかどうかを知るため、胆管癌細胞 HuCC-T1 に ets-1 遺伝子または ets-1 のアンチセンス遺伝子と GnT-V 遺伝子の5'非翻訳領域の Positive regulatory element を含んだ Luciferase reporter vector をコトランスフェクションして、転写活性を測定した。転写開始点より上流-1460bp から-440bp までをサブクローニングしたベクター pGV-1460/-440 では、HuCC-T1 細胞内因性の Ets-1 蛋白質によって転写活性が増加され、ets-1 のアンチセンス遺伝子とコトランスフェクションすることによって阻害された。一方、転写開始点より上流-362bp から+23までをサブクローニングしたベクター pGV-362/+23 では、内因性の Ets-1 蛋白質による転写が促進されず、外来性の ets-1 遺伝子をトランスフェクションすることによって促進された。これらの実験より、Ets-1 蛋白質が GnT-V 遺伝子の発現を転写レベルで促進することを証明した。

#### 【総括】

本研究では、糖蛋白N結合型糖鎖の $\beta$ 1-6Branch 構造を生合成する酵素であるN-アセチルグルコサミン転移酵素-V について、その転写調節機構を検討した。ヒト胆管癌細胞 (HuCC-T1) において、GnT-V は二つの転写開始点から転写され、そのプロモーター領域には二つの Positive regulatory element が存在し、ets-1 蛋白質はそこに存在する Ets binding site に結合し、その転写活性を促進することを見出した。今後、癌の転移に Ets-1 蛋白質の発現が GnT-V の発現を介してどのように影響しているか興味を持たれる。

#### 論文審査の結果の要旨

癌細胞表面に存在する糖蛋白質の糖鎖の枝分かれ構造が癌の悪性度と密接な関係があること、転移能の高い癌細胞にはN-アセチルグルコサミン転移酵素-V (GnT-V) の産物である $\beta$ 1-6Branch 構造が非常に多いことが知られているが、その原因についてはよくわかっていない。申請者は、ヒト GnT-V のゲノムを解析した結果からヒト GnT-V 遺伝子の転写調節機構に注目した。まず、ヒト胆管癌細胞 (HuCC-T1) において、GnT-V 遺伝子は二つの転写開始点を決定した。その上流のプロモーター活性を検討した。この領域に転写活性化及び抑制エレメントの存在について検討した。さらに、転写活性化エレメントを解析し、初めて癌転移に関連する転写因子として知られている Ets-1 蛋白質の結合コンセンサス配列 (5'-GGA-3') の存在を確認した。その結果、Ets-1 蛋白質が GnT-V 遺伝子上流の二つの Ets binding site (-728, -266) と結合し、Ets-1 蛋白質が GnT-V 遺伝子の発現を転写レベルで促進することを初めて報告した。このことは転移性癌の糖蛋白N結合型糖鎖の $\beta$ 1-6Branch 構造が多いことの原因を考える上で大変興味深い。本研究は、これからの糖蛋白N結合型糖鎖の $\beta$ 1-6Branch 構造と癌の転移の関係に一つの原因を明らかにしたので、本論文は学位授与に値すると考えられる。