OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	cDNA Cloning, Genomic Cloning, and Tissue-Specific Regulation of Mouse GalCer Sulfotransferase
Author(s)	平原, 幸恵
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41738
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	平原幸恵（ひらはらゆきえ）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 15267 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科社会系専攻
学位論文名	cDNA Cloning, Genomic Cloning, and Tissue-Specific Regulation of Mouse GalCer Sulfotransferase （マウスガラクトシルセラミド硫酸転移酵素のcDNAおよびゲノムクローニングと組織特異的発現機構）
論文審査委員	（主査） 教授 森本 兼曩 （副査） 教授 谷口 直之　教授 和田 芳直

論文内容の要旨

【目的】

硫酸化糖脂質は、糖鎖部分に硫酸基がエステル結合した酸性糖脂質の総称である。硫酸化糖脂質は、細胞外マトリックス分子、細胞接着分子、血液凝固系、補体活性系、カチオン輸送系、微生物等と相互作用することにより、様々な生理的機能を果たしていると考えられる。硫酸化糖脂質の分布は、組織特異的であり、脳ミエリン鞘、精子、腎尿細管細胞、消化管上皮細胞に豊富に存在する。硫酸化糖脂質の発現は、その合成酵素である糖脂質硫酸転移酵素（CST）によって制御されている。最近、我々は、ヒト腎癌細胞株SMKT－R 3において、著しいCST活性亢進があることを見いだし、ヒト腎癌細胞株SMKT－R 3からCSTを精製し、初めてCSTのcDNAのクローニングに成功した。また、CST遺伝子の転写産物は、ヒト腎癌細胞で高発現しており、さらに、ヒト胃粘膜と腺癌でも検出された。組織特異的糖鎖構造は、それらの合成に関与する特異的な糖転移酵素群や、CSTのような糖鎖修飾酵素群の選択的発現により生じると考えられる。本研究では、マウスCSTゲノム構造解析を行い、マウスの各組織におけるCST遺伝子の発現パターン、さらに、CST遺伝子の組織特異的発現メカニズムを解析することにより、硫酸化糖脂質の組織特異的発現調節機構を明らかにすることを目的とする。

【方法ならびに成績】

ヒトCST cDNAの塩基配列を基にRNAプローブを作製し、マウス腎臓由来cDNAライブラリーからCST cDNAのクローニングを行った。得られたマウスCST cDNAをCOS 1細胞にトランスフェクトした結果、対照と比較して約30倍のCST活性を示し、ヒトCSTと同様にガラクトシルセラミド、ラクトシルセラミドの両者を良い基質とした。マウスCSTは、ヒトと同じく423個のアミノ酸から成り、84%の相同性を示した。マウス各臓器から抽出したmRNAに対するノーザンブロット解析、RT－PCR解析では、脳、腎臓、精巣、肝臓、小腸、胃、肺にCST mRNAの発現を認め、硫酸化糖脂質の発現臓器と一致していた。一方、各臓器におけるCST活性は、脳、腎臓、精巣で検出されたが、小腸、胃では検出できず、阻害活性がみられた。これは、小腸、胃ホモジェネートに硫酸化供与体であるPAPSを強力に分解する活性があるためと判明した。マウス各臓器における転写調節機構を解明するために、5'－RACE法により各組織からCST cDNAクローンを得た。その結果、翻訳領域が同じで、5'非翻訳領域の配列が異なる8種類の転写産物が検出された。さらに、転写産物の型は、組織により異なり、組織特異的な転写制御が示唆された。次に、マウスCST cDNAをプローブとし、マウス129SvJゲノムライブラリーより、CSTゲノムDNAのクロー

ニングを行い、全塩基配列を決定した。マウスCST遺伝子は、約20kbに及び、翻訳領域は第2エキソン、第3エキソンの2つのエキソンにコードされていた。先に述べた5'非翻訳領域の配列全てと、3'非翻訳領域の配列もクローン化したCSTゲノムDNA上に存在した。また、5'非翻訳領域は、7種類の第1エキソン（エキソンa ～g）にコードされ、複数の転写開始点が存在した。これらの結果は、マウスCST遺伝子が、第1エキソンに隣接する7種類の異なるプロモーターを持ち、多様な5'非翻訳領域の選択的スプライシングにより8種類の転写産物を産生することを示していた。このことを確かめるために、マウス各臓器から抽出したmRNAに対し、7種類の第1エキソン特異的な順方向プライマーと、全転写産物に共通する翻訳領域内の逆方向プライマーを用いて、RT－PCR解析を行った。その結果、CST転写産物のパターンは各臓器によって異なり、胃では、エキソンa～gからの転写産物が存在し、それと対照的に精巣では、エキソンfからの転写産物のみが存在した。これらの結果から、CST遺伝子の組織特異的発現は、5'非翻訳領域をコードする第1エキソンに隣接する組織特異的プロモーターの選択的な利用によるものであることが示唆された。

【総括】

ヒトCST cDNAの塩基配列を基に、マウス腎臓由来cDNAライブラリーからCST cDNAクローンを単離した。マウスCSTは、ヒトと同じく423個のアミノ酸から成り、84%の相同性を示した。CST mRNAの発現は、脳、腎臓、精巣、肝臓、小腸、胃、肺に認められ、硫酸化糖脂質の発現組織と一致していた。各組織から得たCST cDNAには、7種類の5'非翻訳領域が存在した。マウスCST遺伝子は約20kbにおよび、翻訳領域は第2エキソンと第3エキソンに、3'非翻訳領域は第3エキソンに、5'非翻訳領域は7種類の第1エキソンにコードされていた。各組織のCST転写産物は、多様な第1エキソンの選択的利用により、組織特異的にスプライシングされていた。以上より、CST遺伝子の組織特異的発現は、多重第1エキソンに隣接する多重プロモーターの選択的利用によっておこることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

硫酸化糖脂質は、組織特異的に分布しており、脳ミエリン鞘、精子、腎尿細管細胞、消化管上皮細胞に豊富に存在している。また、これらの組織において細胞外マトリックス分子や細胞接着分子、カチオン輸送系、血液凝固系、補体活性系、微生物と相互作用することにより様々な生理的機能を果たしている。このような硫酸化糖脂質の生理機能は、硫酸化糖脂質合成酵素であるガラクトシルセラミド硫酸転移酵素（CST）が組織特異的に発現調節されて可能になると考えられる。これまでに、本学生を含むグループは著しいCST活性亢進が見られるヒト腎癌細胞株からCSTを精製しcDNAのクローニングに成功した。本研究は、硫酸化糖脂質の組織特異的発現調節機構を明らかにするために、マウスCST遺伝子をクローニングし、その組織特異的発現機構を解析したものである。マウスCSTは、ヒトと同じく423個のアミノ酸からなり、84%の相同性を示した。マウスCST mRNAの発現は、脳、腎臓、精巣、肝臓、小腸、胃、肺に認められ、硫酸化糖脂質の発現組織と一致した。マウスCST遺伝子はゲノム上約20kbにおよび、翻訳領域は第2エキソンと第3エキソンに、5'非翻訳領域は7種類の第1エキソンに存在した。各組織は、この多様な第1エキソンの選択的利用により様々な組み合わせのCST遺伝子スプライスバリアントを発現していた。これらの結果から、CST遺伝子の組織特異的発現は、多重第1エキソンに隣接する多重プロモーターの選択的利用によって制御されていることが明らかとなった。そして、硫酸化糖脂質の組織特異的発現にはCST遺伝子の組織特異的な発現調節機構が関与していると考えられた。

腎癌細胞に見られる硫酸化糖脂質の増加は、癌細胞の増殖・浸潤に関係していることが示唆されている。また、ミエリン鞘における硫酸化糖脂質発現異常は痙性麻痺の、精巣における硫酸化糖脂質の欠損は無精子症の原因となる可能性が推察されることから、本研究はこれらの疾患研究に分子生物学的基盤を与えたという観点からも学位の授与に値すると考えられる。