



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
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 2 6 7 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 兼囊 (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エクソン、第3エクソンの2つのエク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ニングした 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エクソン（エクソン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エクソンに隣接する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エク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、エクソンa～gからの転写産物が存在し、それと対照的に精巣では、エクソン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エク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エクソンと第3エクソンに、3'非翻訳領域は第3エクソンに、5'非翻訳領域は7種類の第1エク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エク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エク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エクソンと第3エクソンに、5'非翻訳領域は7種類の第1エクソンに存在した。各組織は、この多様な第1エク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エ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エク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思われる。