

Title	Genomic structure and promoter analysis of the human α 1,6-fucosyltransferase gene (FUT 8)
Author(s)	山口, 幸洋
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41790
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/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	やまぐちゆきひろ 山 口 幸 洋
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 15247 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 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	Genomic structure and promoter analysis of the human α 1, 6-fucosyltransferase gene (<i>FUT 8</i>) (ヒト α 1, 6フコース転移酵素遺伝子 (<i>FUT 8</i>) のゲノム構造とプロモーターの解析)
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】

α 1, 6フコース転移酵素 (α 1, 6 FucT) はアスパラギン結合型糖鎖の還元末端のGlcNAcにフコースを転移する糖転移酵素であり、この酵素の作用による α 1, 6フコシル化は最も重要な癌性変化の一つである。実際に、この糖鎖構造を持つフコシル化 α -フェクトプロテインは肝癌の鑑別診断に特に有用な腫瘍マーカーであることが知られており、また、慢性骨髄性白血病の血小板が増加する症例では本酵素活性血清レベルが上昇していることも報告されている。本酵素の発現上昇が多くの悪性腫瘍で増加すると考えられているだけでなく、癌における α 1, 6 FucTの発現増加による細胞表面の糖鎖構造の変化が浸潤能や転移能のような癌の悪性度とも関連があることも示唆されてきている。しかし、 α 1, 2や α 1, 3/4結合でフコースを転移する他のフコース転移酵素ファミリーと異なり、本酵素の遺伝子構造や発現制御機構は殆ど不明であるために、癌細胞における α 1, 6 FucT 遺伝子の発現増加がどのような機構によるものなのか明らかになっていなかった。そこで、本研究では、 α 1, 6 FucT の遺伝子発現調節機構を明らかにするため、本遺伝子のゲノム構造とプロモーター領域の解析を行った。さらに、これらの結果をもとにして、ESTデータベース上の配列から示唆されてきた alternative splicing によるバリエーションの cDNA クローニングも併せて行った。

【方法ならびに成績】

ヒト α 1, 6 FucT cDNA プローブを用いてヒトゲノムライブラリーから α 1, 6 FucT の遺伝子をクローニングし、各種制限酵素マップを作製すると共に、エキソン-イントロンの境界を決定した。その結果、ヒト α 1, 6 FucT の遺伝子は翻訳領域が8個のエキソンに分断されており、1~2個のエキソンでコードされている他のフコース転移酵素とは全く異なっていることが判った。また、5'非翻訳領域も複数のエキソンに分かれていた。本遺伝子の全長については、まだ一部、イントロンの距離が確定していないため詳細は不明であるが、少なくとも50kbp以上であると考えられる。得られたクローンのうちの10kbpのインサートをプローブとしてFISHによる染色体マッピングを行ったところ、ヒト α 1, 6 FucT の遺伝子は14q24.3に局在していることが判った。5'非翻訳領域の上流を含むクローンの解析及び α 1, 6 FucT を高発現する卵巣癌細胞SK-OV-3から抽出したRNAを用いて、5' rapid amplification cDNA end法、プライマー伸長法を行い、SK-OV-3細胞における α 1, 6 FucT遺伝子の転写開始点を決定した。ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイにより転写開始点上流約1 kbの領域にプロモーター活性があるこ

とを認めた。様々な deletion mutant を作製し、同様にレポーターアッセイを行ったところ、転写開始点から上流 800bp から 1000bp の間の領域に強い活性があった。この 200bp の領域には bHLH、GATA-1 等のモチーフが含まれていた。

splicing variant については、ヒト $\alpha 1, 6$ FucT の cDNA 断片を用いてヒト成人網膜の cDNA ライブラリーからポジティブクローンを 32 個得、さらに alternative splicing によって欠落すると考えられるエキソンの配列がネガティブとなるものをクローニングした。得られたクローンの 5' 端は、翻訳領域を完全には含んでいなかったが、翻訳開始コドンを含むエキソンの一部は含んでいた。この splicing variant は、7~8 番目のエキソンが欠落し、9 番目のエキソンにフレームシフトが起こった結果、308 アミノ酸残基からなっていた。

【総括】

現在、ヒトのフコース転移酵素の遺伝子 (*FUT*) に関しては他に $\alpha 1, 2$ FucT である *FUT 1* と *FUT 2* と、 $\alpha 1, 3$ FucT である *FUT 3*~7、9 の 8 種類が知られており、各々で高い相同性を有しているが、今回解析した $\alpha 1, 6$ FucT は他の FucT と比して cDNA やアミノ酸の相同性も乏しく遺伝子の構造も著しく異なっていた。また、データベース上に今回決めた転写開始点より上流に 2 種類の配列が登録されていることから、 $\alpha 1, 6$ FucT は少なくとも 3 種類の転写開始点を有し、組織の違いや癌等の疾病で使い分けられて、SK-OV-3 のような卵巣癌では今回同定した転写開始点が機能していることが示唆された。また、splicing variant で欠落したエキソン中には $\alpha 1, 2$ 及び $\alpha 1, 6$ FucT に共通なドナー基質 (糖ヌクレオチド) 結合モチーフが含まれているのでその産物は FucT 活性を有していないと考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究では、ヒト $\alpha 1, 6$ フコース転移酵素の遺伝子の構造、染色体 14q24.3 への局在を明らかにし、5' 上流領域の解析を行った。更に、スプライシングバリエーションのクローニングも行った。その結果、翻訳領域のエキソンが多数に分かれている等、本酵素は遺伝子構造が他のフコース転移酵素と大きく異なり、それらのプロトタイプ若しくは進化の早い時期に分かれた可能性も示唆された。また、本酵素の遺伝子は他の多くの糖転移酵素と同様に複数の転写開始点とプロモーターを有しており、また、組織の違いや癌等の疾患で使い分けられ機能しているものと考えられる。本酵素は現在知られている唯一の $\alpha 1, 6$ フコース転移酵素であり、その発現が癌転移に影響することから、今回得られた知見は単に $\alpha 1, 6$ フコース転移酵素の分子メカニズムの解明に貢献するだけでなく、各種疾患における本酵素の遺伝子の発現制御機構の解明に大きな糸口を与え、癌等の疾患の病態解明にも寄与するものである。よって本研究は博士 (医学) の学位授与に十分値する。