

Title	Cancer-associated Alternative Usage of Multiple Promoters of Human GalCer Sulfotransferase Gene
Author(s)	津田, 雅之
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/42557">http://hdl.handle.net/11094/42557</a>
DOI	
rights	
Note	

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

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

氏名	津田 雅之
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 15625 号
学位授与年月日	平成12年5月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学位論文名	Cancer-associated Alternative Usage of Multiple Promoters of Human GalCer Sulfotransferase Gene (ヒトガラクトシルセラミド硫酸転移酵素遺伝子多重プロモーターのがん特異的な選択的利用)
論文審査委員	(主査) 教授 和田 芳直  (副査) 教授 谷口 直之 教授 木下タロウ

### 論文内容の要旨

#### [目的]

硫酸化糖脂質は、糖鎖に硫酸基をもつ酸性糖脂質の総称である。硫酸化糖脂質は、ミエリン、精巣、腎臓、小腸などに豊富に存在し、硫酸基を介して細胞外マトリックスタンパク質や細胞接着分子などと相互作用し、さまざまな生理的機能を果たしていると考えられている。硫酸基の付加は、糖脂質硫酸転移酵素 (CST) によって触媒される。

ヒト腎がん組織では、正常腎組織と比べて著明な CST 活性の亢進に伴う硫酸化糖脂質の蓄積が認められる。CST 活性亢進の分子メカニズムを明らかにするために、我々は、腎がん細胞から CST を均一にまで精製し、アミノ酸配列の情報を基にヒト CST cDNA をクローニングした。この結果、腎がん細胞では正常腎近位尿細管細胞 (腎がん細胞の発生母体) や正常ヒト組織と比較して、CST mRNA が著明に発現していることがわかった。そこで、腎がん細胞における CST 遺伝子高発現のメカニズムを明らかにする目的で、ヒト CST ゲノム DNA の構造と、腎がん細胞と正常細胞における転写開始点を解析した。

#### [方法ならびに成績]

ヒト CST cDNA をプローブとして、ヒト胎盤ゲノムライブラリーからブランクハイブリダイゼーションよりスクリーニングを行った結果、cDNA 全長をカバーする2つのクローン、a-II と10-I を得た。CST 遺伝子は4つのエクソンからなり、翻訳領域は第3エクソンと第4エクソンに存在していた。また、得られたゲノム DNA クローンをプローブとして FISH 法により染色体マッピングを行った。その結果、ヒト CST 遺伝子は22q12 にマップされた。

次に、4種類のヒト腎がん細胞 (SMKT-R1,R2,R3,R4) と初代培養の正常腎近位尿細管細胞から抽出した mRNA を鋳型とした5'-RACE 法を行い、各細胞における CST mRNA の転写開始点を比較検討した。その結果、5'非翻訳領域に4種類の第1エクソン (exon 1a~1d) と2種類の第2エクソン (exon 2a, 2b) が見い出され、複数の転写開始点があることが示された。腎がん細胞ではこれら6種類の5'非翻訳領域のエクソンのスプライシングの違いによる10種類の転写物が見つかった。特に、exon 1c, exon 1d から開始された転写物が多く見つかった。一方、正常腎近位尿細管細胞では exon 1a から始まる1種類の転写物しか見つからなかった。

5'-RACE 法によって見い出された exon 1a と exon 1b はクローン化された断片 a-II と10-I には含まれなかったため、さらに上流のゲノム DNA のクローニングを行った。CST 遺伝子が22番染色体にマップされることがわかった

ことから、exon 1b をプローブとして22番染色体ライブラリーからスクリーニングを行った結果、exon 1a と exon 1b を含み、かつ a-II 断片とオーバーラップするクローン C-7 を得た。この結果は、染色体マッピングの結果と一致し、また、CST 遺伝子は exon 1a から exon 4 まで約 20 kb にわたって存在することが明らかとなった。

腎がん細胞では、正常腎近位尿細管細胞で使われていない転写開始点が主として用いられるようになることを5'-RACE 法により見出した。このことを確かめるために、4種類のヒト腎がん細胞と初代培養の正常腎近位尿細管細胞から抽出した mRNA を鋳型として、4つの各第1エキソン特異的なプライマーと共通の第3エキソンのプライマーを用いて、RT-PCR を行った。その結果、4種類の腎がん細胞ともに全ての第1エキソンが使われており、exon 1c と exon 1d から開始されるものが主要であった。これに対し、正常腎近位尿細管細胞では exon 1a と exon 1b しか使われておらず、大半が exon 1a から開始していた。この結果は、5'-RACE 法の結果と一致した。これらのことは、腎がん細胞では、CST 遺伝子はがん細胞特異的な転写調節を受けて、正常細胞とは異なる転写開始点から転写され、その結果著明に発現するようになると考えられた。

さらに、4つの第1エキソンの上流領域の塩基配列を決定し、コンピューター上で転写を調節するシスエレメントのホモロジー検索を行った。全てのプロモーターにおいて、TATA ボックスや CCAAT ボックスは存在しなかった。また、既存のがん特異的、腎特異的な転写調節因子が結合するエレメントは存在しなかったため、未知の転写調節因子が働いている可能性が考えられた。

5'非翻訳領域の違いが翻訳にどのような影響を与えるかを調べるために、翻訳領域は同一であるが第1エキソンの異なる4種のベクターを作製し、COS-1細胞にトランスフェクトした。発現させたタンパク質をウェスタンブロッティング法により検出したところ、全て同じサイズのバンドが得られた。しかし、exon 1b のみが他の exon 1 に比べて、タンパク量が少なかった。このことから、産生されるタンパク質は同一であるが、5'非翻訳領域の違いが翻訳効率に影響を与えていると考えられた。

#### [総括]

ヒト CST 遺伝子の構造を明らかにした。CST 遺伝子は4つのエキソンからなり、約20 kb にわたっていた。翻訳領域は第3エキソンと第4エキソンに存在していた。CST 遺伝子には複数の転写開始点が存在することを見出した。腎がん細胞では、正常腎細胞で使われていない転写開始点が主に用いられ、その開始点からの転写量が増加することにより、CST 遺伝子が高発現することを明らかにした。このことから、腎がん特異的な転写調節機構が存在す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、ミエリン、精巣、腎臓などに豊富に存在し、細胞外マトリックスタンパク質や細胞接着分子などと相互作用し、さまざまな生理的機能を果たしていると考えられている。硫酸基の付加は、ガラクトシルセラミド硫酸転移酵素 (CST) によって触媒される。

ヒト腎がん組織では、正常腎組織と比べて著しい CST 活性の亢進による硫酸化糖脂質の蓄積がみられるが、CST 活性の亢進は CST の転写レベルの増加による。本研究はヒト腎がん細胞における CST 遺伝子高発現の機構を明らかにする目的で、ゲノム DNA の構造と転写開始点を解析した。その結果、CST 遺伝子には複数の転写開始点が存在することを見出した。腎がん細胞では正常腎細胞で使われていない転写開始点が主に用いられ、その開始点からの転写量が増加することにより、CST 遺伝子が高発現することを明らかにした。このことは、腎がん細胞特異的な転写調節機構が存在することを強く示唆する。本研究は腎細胞がん化に伴うスルファチド高発現を遺伝子レベルで解析したもので、がんの特性を明らかにした点で学位の授与に値すると思われる。