

Title	内腔側に大きなドメインを持つ小胞体膜タンパク質であるPIG-BはGPIアンカー生合成の第3のマンノースの付加に関与する
Author(s)	高橋, 実
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39895
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	高橋実 ^{たかはしのみる}
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第12382号
学位授与年月日	平成8年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科病理系専攻
学位論文名	内腔側に大きなドメインを持つ小胞体膜タンパク質であるPIG-BはGPIアンカー生合成の第3のマンノースの付加に關与する
論文審査委員	(主査) 教授 木下タロウ (副査) 教授 谷口 直之 教授 岡本 光弘

論文内容の要旨

【目的】

真核生物の細胞表面蛋白質のなかに、GPIアンカーと呼ばれる糖脂質により膜に結合しているものが多数見つっている。酵母や原虫ではGPIアンカーが多く用いられ、その生合成の欠損は致死性である。哺乳動物細胞では、GPIアンカーが欠損しても増殖に影響を与えないが、個体レベルでは致死性であることが最近示されている。また難治血液疾患の発作性夜間血色素尿症は血液幹細胞でGPIアンカーが欠損する事により起こる。GPIアンカーは小胞体(E R)で生合成され、それには10前後の遺伝子が必要であるが、クローニングされているものは一部である。生合成はE Rの細胞質側で始まるが、できあがったアンカーは内腔側でペプチドに転移されると考えられるので、どこかのステップでフリップするはずである。本研究は、GPIアンカー生合成に働かぬ新しい遺伝子を単離し、その産物の性状を解析して生合成メカニズムをより詳しく理解することを目的としている。

【方法ならびに成績】

1. GPI-B遺伝子のクローニング

GPIアンカー生合成欠損株の相補性クラスBの細胞では、GPIアンカーに含まれる3つのマンノースのうち3番目の付加に異常があり、2つまで結合している中間体が蓄積している。このクラスBの異常を相補するcDNAをクローニングする目的で、まず、この細胞株からポリオーマウイルスのT抗原を発現している細胞株を作製した。これにポリオーマウイルスの複製開始点を持つ発現プラスミドで作製したヒト骨髓性白血病細胞株cDNAライブラリーを電気的に導入した。2日後にGPIアンカー型蛋白質であるThy-1の発現を回復した細胞をセルソーターで分離し、そこからプラスミドを回収した。この一連の操作を繰り返して、Thy-1の発現を回復させる活性のあるひとつのcDNAを得た。このcDNAは不完全長であったので、5'-RACE法により5'端領域をクローニングし、全長を得た。この全長cDNAをクラスBの細胞に導入すると正常レベルのThy-1の発現が回復した。またThy-1の発現が回復した細胞を³Hマンノースでラベルし、脂質画分を薄層クロマトグラフィーで解析すると、元の変異株で蓄積していた中間体が消失し、完成型GPIアンカーのスポットが出現した。これらの結果に基づき、GPIアンカー生合成のクラスBの異常を相補するということから、この遺伝子をGPI-B (Phosphatidylinositol glycan-class B)と命名した。PIG-B cDNAは1929bpの大きさで、予想されるGPI-B蛋白質は554アミノ酸からなることがわかった。既知のタンパク質とのホモロジーは認められなかった。

2. PIG-B蛋白質の細胞内局在解析

PIG-Bタンパク質がGPIアンカー生合成の行われているERに存在するか調べるために、N末端にタグとしてグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)を結合させた融合蛋白質(GST-PIGB)を変異株に恒常的に発現させた。この細胞にはThy-1の発現が回復していたので融合タンパク質が活性を有していることが確かめられた。この細胞から細胞質と膜画分を分離し、抗GST抗体を用いたウェスタンブロットでGST-PIGBを検出すると膜画分のみ90kDaの予想通りのバンドが確認された。さらに膜画分をショ糖濃度勾配遠心により細分化すると、GST-PIGBはERの酵素マーカーが濃縮されているフラクションに存在していた。以上のことより、PIG-BはERに存在する膜蛋白質であることがわかった。

3. PIG-B蛋白質のトポロジーと機能部位の解析

3番目のマンノースの付加がER膜のどちら側で起こるかを知らず、PIG-Bのトポロジーと機能部位を解析した。そのため、PIG-BのC末端にもGSTを結合させた融合蛋白質PIGB-GSTを作製し、変異株に発現させた。GST-PIGB、PIGB-GSTの発現している両細胞からマイクロソームを分離し、外からプロテナーゼKによる消化反応を行った。その結果、GST-PIGBは膜から消失し、PIGB-GSTは約80kDaの大きさになった。このことからPIG-BはC末端から85%がER内腔にあり、N末端の11%ぐらいが細胞質側にあるER膜蛋白質であることが分かった。このトポロジーはアミノ酸配列に基づく疎水性プロファイルから予想されるトポロジーと一致している。さらにN末端側の細胞質ドメインを欠いた変異蛋白 Δ 209PIGB-GSTをクラスBの変異株に発現させたところ、異常を完全に相補した。よってPIG-Bの活性部位はER内腔にあることが明らかとなった。この事はDoI-P-Manから供与される3番目のマンノースの付加はER内腔側で行われることを強く示唆している。

【総括】

GPIアンカー生合成の第3番目のマンノースの付加に関する新しいヒト遺伝子*PIG-B*をクローニングした。PIG-Bタンパク質は大部分がER内腔に存在するER膜蛋白質であることが示された。PIG-Bは膜貫通部位とER内腔部分のみで活性を示すことから、このGPIアンカー生合成の後期ステップがER内腔側で行われている可能性が強く示唆された。

論文審査の結果の要旨

真核細胞の多くの膜タンパク質の膜結合と細胞表面への発現にGPIアンカーと呼ばれる糖脂質が必須である。GPIアンカーは小胞体(ER)で合成された後、タンパク質に翻訳後修飾される。GPIアンカーの生合成はERの細胞質側で始まるが、できあがったアンカーは内腔側でタンパク質に転移されると考えられるので、どこかのステップで中間体がフリップするはずである。生合成には10前後の遺伝子が必要であるが、クローニングされているのは一部である。本研究は、GPIアンカーに含まれる3つのマンノースの3番目を転移するのに働く新しい遺伝子PIG-Bの単離を行い、その構造と細胞内での発現様式を解析したものである。その結果、PIG-Bタンパク質は内腔側に大きな活性ドメインを持つ小胞体膜タンパク質であることがわかった。この事は、2つのマンノースを含む中間体かそれ以前の段階でフリップが起こることを示している。本研究は、重要な糖脂質の生合成経路の新しい遺伝子を単離することにより生合成のトポロジーに関する新知見をもたらしたものであり、学位に値する。