

Title	GPIアンカー生合成系で脱アセチル化反応に関わる新規遺伝子PIG-Lのクローニング
Author(s)	中村, 宣雄
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39996
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	中 村 宣 雄
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 13009 号
学位授与年月日	平成9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	GPI アンカー生合成系で脱アセチル化反応に関わる新規遺伝子 PIG - L のクローニング
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 越智 隆弘

論文内容の要旨

【目的】

真核生物の膜蛋白質の中には、ペプチドのC末端に結合したグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーと呼ばれる糖脂質によって膜に結合している一群があり、ほ乳類では現在までに50種類以上の GPI アンカー蛋白質が知られている。GPI アンカーは小胞体で生合成される。この生合成経路のうち、最初のステップであるN-アセチルグルコサミンの転移反応には発作性夜間血色素尿症の原因遺伝子 PIG - Aをはじめ PIG - H, - Cなどの遺伝子関わっていることが知られているが、2番目のステップである脱アセチル化反応 (N-アセチルグルコサミン-PIをグルコサミン-PIに変換する過程) に関わる遺伝子はこれまで同定されていなかった。私は CHO 細胞変異株を用いてこのステップに関わる遺伝子の cDNA をクローニングした。

【方法ならびに成績】

1. GPI アンカー欠損変異細胞株の樹立および相補性解析

CHO 細胞に GPI アンカー型蛋白質である DAF 及び CD59 の cDNA を導入してこれらを恒常的に高発現する細胞をセルソーターにて回収した。この細胞に Ethyl Methane - sulfonate を作用させて突然変異を誘発し、DAF, CD59 とも発現が見られなくなった細胞をセルソーターにて集め、クローン化して変異細胞株を46クローン樹立した。この変異株が GPI アンカー生合成系のどのステップの異常を持つかを知るためにクラス A, B, C, E, F, H 変異株および脱アセチル化のステップに障害を持つ変異株との細胞融合による相補性解析を行った。その結果、大多数は同じクラス、すなわち脱アセチル化のステップに障害を持つ細胞株であることがわかった。

2. 変異細胞株を用いた相補遺伝子の発現クローニング

この細胞にラット C 6 グリオーマ由来の cDNA ライブラリーを導入して DAF, CD59 とも発現回復した細胞をセルソーターで集め、そこからプラスミドを回収した。この操作を繰り返すことによりこの細胞株の変異を相補する cDNA クローンを得た。これを PIG - L と命名した。PIG - L cDNA は1903塩基対よりなり、252アミノ酸残基からなる蛋白質をコードすることが予想された。また PIG - L cDNA は既存の脱アセチル化のステップに障害を持つ細胞株の変異も相補することが確かめられた。データベース上に PIG - L 類似の蛋白質はなく、脱アセチル化酵素活性を持つかどうかは今のところ不明である。

3. 遺伝子産物の細胞内局在

PIG-L cDNA の翻訳領域と予想されるN末端, C末端にそれぞれFLAG-tagを挿入したcDNAを変異細胞株に導入して融合蛋白質を発現させ, この細胞を用いてしょ糖密度勾配細胞分画法および抗FLAG抗体を用いたWestern-blotting法を行い遺伝子産物の細胞内局在を調べた。その結果, この蛋白質は主に小胞体膜上に存在することがわかった。さらにproteinase Kによる消化実験を行いPIG-L蛋白質の小胞体膜上での向きを調べたところ, PIG-L蛋白質はその大部分が細胞質側に存在することがわかった。

【総括】

GPIアンカー生合成経路の中でまだ遺伝子がわかっていないステップの解明をめざして, CHO細胞変異株を樹立した。既存の変異株との細胞融合による相補性解析の結果, この変異株はGPIアンカー生合成経路の2番目のステップである脱アセチル化に障害を持つことがわかった。この変異株を用いて脱アセチル化反応に関わる遺伝子PIG-LのcDNAをクローニングした。PIG-L cDNAは1903塩基対よりなり, 252アミノ酸残基からなる蛋白質をコードすることが予想された。PIG-L蛋白質はGPIアンカー生合成の場である小胞体膜に存在する蛋白質であった。また, 細胞質側にその大部分が存在したので, N-アセチルグルコサミン-PIとグルコサミン-PIが細胞質側を向いているというMenonらの結果と合わせ, 第2ステップは小胞体の細胞質側で行われると考えられた。

論文審査の結果の要旨

膜蛋白質の中には, ペプチドのC末端に結合したグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカーと呼ばれる糖脂質によって膜に結合している一群があり, ほ乳類では現在までに50種類以上が知られている。GPIアンカーは小胞体で生合成される。この生合成経路のうち, 2番目のステップであるN-アセチルグルコサミン-PIをグルコサミン-PIに脱アセチル化する過程に関わる遺伝子はこれまで同定されていなかった。本研究はCHO細胞変異株を作成し, それを用いてこのステップに関わる遺伝子のcDNAをクローニングしたものである。

樹立したCHO細胞のGPIアンカー欠損変異株は2番目のステップに障害を持つことがわかった。この変異株を相補するcDNAをクローニングしPIG-L cDNAと名付けた。PIG-L cDNAは252アミノ酸残基からなる新規の蛋白質をコードすることが予想された。PIG-L蛋白質はGPIアンカー生合成の場である小胞体膜に存在する蛋白質で, 細胞質側にその大部分が存在した。N-アセチルグルコサミン-PIとグルコサミン-PIが細胞質側を向いているというMenonらの結果と合わせ, 第2ステップは小胞体の細胞質側で行われると考えられた。

本研究は, GPIアンカー生合成に働く新規遺伝子をクローニングし, さらにGPIアンカーの膜トポロジーに新しい知見をもたらしたもので学位に値する。