



Title	GPI生合成の第1ステップを担うN-アセチルグルコサミン転移酵素の解析
Author(s)	渡邊, 玲香
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41646
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	渡邊玲香
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第14474号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学位論文名	GPI生合成の第1ステップを担うN-アセチルグルコサミン転移酵素の解析
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 竹田潤二

論文内容の要旨

【目的】

真核細胞の表面には、糖脂質であるグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)がC末端に共有結合しこれによって細胞膜に発現している蛋白質群が存在している。GPIの合成は小胞体で行われ、ホスファチジルイノシトール(PI)にUDP-GlcNAcからN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が転移する第1ステップからはじまる。ひきつづいて、脱アセチル化、マンノース及びエタノールアミンリン酸の付加がおこり、最後に完成型アンカー分子のアミノ基と蛋白質のC末端がアミド結合しGPIアンカー型蛋白質が完成する。これまでにGPIの生合成に関する遺伝子群は酵母及び乳類でクローニングされており、第1ステップのGlcNAcの転移に関しては、PIG-A, -H, -C, GPI1の4つの乳類の遺伝子がクローニングされている。PIG-Aは、バクテリアのGlcNAc転移酵素とホモジーを持つことから、触媒活性を持ちうることが類推されていた。しかしながらその他の遺伝子の産物は既存の蛋白質と相同性がなく、転移反応にどのように関与しているかは明らかになっていなかった。これらの遺伝子産物の解析が研究目的である。

【方法ならびに成績】

- PIG-A, -H, -C蛋白質の局在を解析する目的でGSTとの融合蛋白質を細胞内で発現させ、その融合蛋白質の局在を抗GST抗体を用いて、間接蛍光抗体法およびしょ糖密度勾配細胞分画法で検討した。その結果これらの蛋白質は全てGPI生合成の場である、小胞体に局在していることが明らかになった。
- 4つの遺伝子産物が小胞体で複合体を形成している可能性を検討した。それぞれの蛋白質をGSTもしくはFLAGとの融合蛋白質として共発現させた細胞を1%ジギトニンで可溶化後、抗FLAG抗体ビーズで免疫沈降し、抗GST抗体を用いて両者の蛋白の結合を調べた。その結果PIG-A, -H, GPI1はそれぞれ2つずつの組み合わせで結合すること、一方PIG-Cは、GPI1とのみ単独で結合し、PIG-A, -Hとはそれらの複合体と高い親和性を持つことがわかった。このことからこれらの4つの遺伝子産物は小胞体で複合体を形成し、全体でGlcNAc転移酵素として働いている可能性が示唆された。
- GPI生合成の第1ステップの反応が小胞体の細胞質側、内腔側のいずれで起こっているのかを明らかにする目的で、酵素の触媒部位を持つと考えられるPIG-A、およびPIG-Hについて小胞体でのトポロジーを解析した。PIG-

A, -H の N 末, C 末にそれぞれ GST が融合した融合蛋白質を発現している細胞からインタクトなマイクロソーム分画を回収し, 各融合蛋白質のプロテナーゼ K に対する抵抗性を解析した。その結果, PIG-A は触媒部位と考えられる部分を含めて N 末端からの蛋白質の大部分が小胞体の細胞質側に存在すること, さらに PIG-H については N 末, C 末の両端が細胞質側に存在していることが明らかになった。このことと, 第 1 ステップの産物である GlcNAc-PI が細胞質側を向いているとする Vidugiriene & Menon の結果より, GPI 生合成の第 1 ステップは小胞体の細胞質側で起こっていることが明らかになった。これまでに GPI 生合成のマンノース付加以後のステップ及び, 完成型 GPI が蛋白質に転移される反応は小胞体内腔側でおこることが明らかになっていることから, GPI 前駆体は生合成のいずれかのステップで膜をフリップしていることが明らかになった。

④ 小胞体に存在しているこの蛋白質複合体の GlcNAc 転移酵素としての活性を解析する目的で PIG-A, -H, -C, GPI 1 の GST 融合蛋白質をひとつずつ細胞内に発現させ, 細胞を 1% ジギトニンで可溶化後, GST タグを利用して複合体を部分精製した。この複合体に基質として放射活性を持つ UDP-[³H]-GlcNAc と PI を加えたところ, いずれの細胞から精製してきた複合体にもインビトロで GlcNAc 転移活性があることが明らかになった。さらにこの GlcNAc 転移酵素はダイズ由来の PI と比較してウシ由来の PI を効率よく基質とし, PI の脂肪酸部分に特異性を持っていることがわかった。

⑤ この GlcNAc 転移酵素複合体に次のステップで働く脱アセチル化酵素である PIG-L は含まれていないことが明らかになった。このことから GlcNAc 転移酵素が働く第 1 ステップと脱アセチル化酵素が働く第 2 ステップはそれぞれ独立した反応であることが明らかになった。

【総括】

GPI の生合成の第 1 ステップに関与している PIG-A, -H, -C, GPI 1 の蛋白質が全て GPI 生合成の場である小胞体に局在し, GlcNAc 転移酵素複合体を形成していることが明らかになった。さらに PIG-A, -H のトポロジーの解析より生合成第 1 ステップの GlcNAc の転移が小胞体の細胞質側で起こっていることが明らかになった。また, この GlcNAc 転移酵素は基質となる PI の脂肪酸部分に特異性を持つことが明らかになった。このために, 単純な GlcNAc の転移にこのような複雑な複合体構造の酵素が関与しているのかもしれない。

論文審査の結果の要旨

GPI アンカーは, 数多くの細胞表面蛋白質の膜への結合に用いられる糖脂質である。GPI アンカーの生合成はホスファチジルイノシトール (PI) に N-アセチルグルコサミンが結合する反応から始まる。このステップに従来 4 つの遺伝子が関係していることがわかつっていたが, 酵素の本体は不明であった。

本研究により, このステップを司る N-アセチルグルコサミン転移酵素が 4 つの蛋白質 PIG-A, -H, -C, GPI 1 の複合体であることが明らかになった。更に複合体のトポロジーの解析によりこの反応が小胞体細胞質側で起こっていることが明らかになった。また *in vitro* で酵素反応を解析することが可能になったので基質の特異性が調べられ, 本酵素は PI の脂肪酸部分に特異的を持つことも明らかになった。

本研究は, 主要な翻訳後修飾の一形式である GPI アンカーの生合成に関わる酵素の本体を明らかにしたもので, 学位に値する。