

Title	GPI生合成の第一段階のN-アセチルグルコサミン転移酵素複合体におけるGPI1の機能解析
Author(s)	洪, 栄振
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41831
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	洪 栄 振
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 15260 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 医学系研究科病理系専攻
学位論文名	GPI 生合成の第一段階の N-アセチルグルコサミン転移酵素複合体における GPI 1 の機能解析 (GPI 1 stabilizes an enzyme essential in the first step of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis)
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】

真核生物の膜表面蛋白質には、C末端が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) に結合することで、膜表面につき止められるものが多数存在している。GPI の骨格の基本構造は真核生物において保存されている。GPI 生合成の第一段階の N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 転移酵素複合体 (GPI-GnT) は、少なくとも四つの蛋白質、PIG-A、PIG-C、PIG-H 及び GPI 1 により形成されている。PIG-A、PIG-C および PIG-H には既に変異株が存在し、それらの細胞では GPI アンカー型蛋白質は細胞表面に発現できないことが知られている。しかし、GPI 1 には変異株が存在しておらず、酵母 Gpilp のホモログとしてクローニングされたため、GPI 1 の GPI-GnT における役割は明らかにされていなかった。本研究では、マウス F9 細胞の GPI 1 ノックアウト変異株を作製し、GPI-GnT における GPI 1 の機能の解明を行った。

【方法ならびに成績】

ヒトの GPI 1 の蛋白配列を基にマウスの cDNA を PCR 法によりクローニングした。ヒトとマウスの GPI 1 蛋白質は 581 アミノ酸からなり、互いに 89% のアミノ酸配列同一性を示した。この cDNA を用いてゲノム断片をクローニングし分析した結果、マウスの遺伝子は 11 個のエクソンを持ち、染色体の 17B に位置していることが明らかになった。マウス F9 細胞を用いこの遺伝子の 2 つのアレルを相同性組み替えにより破壊した。ノックアウト変異株では GPI 1 の mRNA が発現していないことが Northern blotting によって確認された。ノックアウト変異株での GPI アンカー型蛋白質の細胞表面への発現を FACS を用いて分析した。GPI アンカー型蛋白質の細胞表面への発現が認められない PIG-A、PIG-CZ 及び PIG-H 変異株と異なり、GPI 1 ノックアウト変異株では GPI アンカー型蛋白質の細胞表面への発現が認められた。しかし、野性型細胞に比べて大きく減少していた。GPI 1 の cDNA をノックアウト細胞に導入すると、GPI アンカー型蛋白質の細胞表面への発現が野性型細胞のレベルまで回復した。ノックアウト細胞において GPI-GnT 活性がどの程度残っているかを調べるために、細胞の lysate と microsome に UDP [³H] GlcNAc を加えて反応させ、産物である [³H] GlcNAc-PI を thin layer chromatography で分離し、その量を測定した。野性型細胞と異なって、ノックアウト細胞での [³H] GlcNAc-PI の量は測定できず in vitro での活性は認められなかった。これらの結果は、GPI 1 がなくても酵素活性は残っているが、極めて微弱であるため in vitro 系では検出できないことを示している。また、GPI 1 蛋白質は酵素活性に直接には関わっていないことを示唆している。GPI

1 蛋白質と GPI-GnT 複合体の他の蛋白サブユニットとの関係を調べるためエピトープで標識した PIG-A および PIG-C、PIG-H の間の結合を GPI 1 がある場合とない場合で免疫沈降法と Western blotting 法により分析した。GPI 1 がいない場合でも PIG-A と PIG-H は互いに結合したが、PIG-A と PIG-H の複合体への PIG-C の結合は検出されなかった。また、GPI 1 が存在しない場合の PIG-C と PIG-H の量は GPI 1 が存在する場合の 1/3 であったが、PIG-A の量は影響を受けなかった。

【総括】

GPI 1 ノックアウト細胞では *in vitro* の GPI-GnT 活性は検出されなかったが、GPI 1 アンカー型蛋白質の細胞表面への発現は有意であったことから、GPI 1 は GPI-GnT 酵素活性に必須ではないことが明らかになった。一方、GPI 1 が存在しない場合でも PIG-A と、PIG-H の複合体は検出されたが、全体の複合体は検出できないことと、PIG-C と PIG-H の蛋白発現が GPI 1 に依存していることは、GPI 1 が GPI-GnT 複合体を結びつけることにより活性を高めていることを示唆している。

論文審査の結果の要旨

細胞の表面膜蛋白質には、C末端が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) に結合することで、膜表面につなぎ止められるものが多数存在している。これらの蛋白質の発現に GPI の結合は必須である。GPI 生合成の第一段階の N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 転移酵素 (GPI-GnT) は、少なくとも四つの蛋白質、PIG-A、PIG-C、PIG-H 及び GPI 1 により形成されている。このうち、PIG-A、PIG-C および PIG-H は酵素活性に必須である事が知られていた。しかし、GPI 1 の役割は明らかにされていなかった。本研究では、マウス F9 細胞の GPI 1 ノックアウト変異株を作製し、GPI-GnT における GPI 1 の役割を解析した。

マウスの GPI 1 遺伝子をクローニングして構造を確認した後、マウス F9 細胞を用いてこの遺伝子の 2 つのアレルを相同性組み換えにより破壊した。GPI 1 ノックアウト細胞では *in vitro* の GPI-GnT 活性は検出感度以下であったが、GPI アンカー型蛋白質の細胞表面への発現は有意に残っていたことから、GPI 1 は GPI-GnT の酵素反応自体には必須でないことが明らかになった。GPI 1 が存在しない場合、PIG-A、PIG-H、PIG-C の 3 分子の複合体はほとんど検出できなかった。しかし、PIG-A と PIG-H の複合体は安定に形成された。この結果から、GPI 1 は PIG-A、PIG-H の複合体に PIG-C を結び付けて全体を安定化する事により酵素活性を高めている事がわかった。

本研究は GPI 生合成を開始する酵素複合体の安定化の分子機構を明らかにしたものであり、学位に値する。