The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Inositol-deacylation of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins is mediated by mammalian PGAP1 and yeast Bst1p
Author(s)	田中, 聡
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45267
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　田中　聡（たなか　さとし）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学位記番号　第　18491　号

学位授与年月日　平成16年3月25日

学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当

医学系研究科分子病態医学専攻

学位論文名　Inositol-deacylation of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins is mediated by mammalian PGAP1 and yeast Bst1p
（GPIアンカー型タンパク質のイノシトール脱アシル化は、ほ乳類PGAP1および酵母Bst1pが担っている）

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〕

哺乳類細胞のグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）のイノシトール部分はGPI生合成の初期のステップでアシル化される。このステップはGPIの完成に必須である。アシル基はGPIがタンパク質に転移した直後、小胞体（ER）においてイノシトール部分から除去されるため、細胞表面のGPIアンカー型タンパク質はイノシトール部分にアシル基を持っていない。この脱アシル化に関与する哺乳類の遺伝子は同定されておらず、脱アシル化の生物学的意味は不明であった。本研究は哺乳類の脱アシル化酵素遺伝子の同定と脱アシル化の機能の解明を目標とした。

〔方法ならびに成績〕

（Ⅰ）哺乳類GPIイノシトール脱アシル化酵素遺伝子 *PGAP1* のクローニング

A）イノシトール脱アシル化活性を欠損したCHO細胞由来の細胞株（C10変異細胞株）をPI-PLCに対する抵抗性を指標として樹立した。C10変異細胞株をアルカリ・ヒドロキシルアミン処理しGPIアンカー型タンパク質のアシル基を除去した結果、C10変異細胞株のGPIアンカー型タンパク質はPI-PLC感受性になった。このことから、C10変異細胞株はイノシトール脱アシル化活性を欠損していることが確認できた。

B）C10変異細胞株とラットcDNAライブラリーを用い、発現クローニング法により *PGAP1* を責任遺伝子としてクローニングした。この遺伝子はリパーゼドメインを持つ922アミノ酸残基からなる膜タンパク質をコードすると予想された。本研究ではPGAP1について以下のことを明らかにした。1）PGAP1がERに存在すること（ショ糖密度勾配遠心によるオルガネラ分離法）。2）リパーゼドメインがER膜の内腔側に向いていること（蛍光抗体顕微鏡法）。基質となるGPIアンカー型タンパク質前駆体も内腔側に存在するため、このリパーゼドメインの向きは脱アシル化酵素の機能に適切である。3）リパーゼドメインの活性中心と予想されるセリンをアラニンに置換した変異型PGAP1は、脱アシル化活性を完全に失うこと。以上のことから、PGAP1はERの膜蛋白質であり、イノシトール脱アシル化酵素そのものであると考えられた。

（Ⅱ）イノシトール脱アシル化の意義の解析

A) DAF（GPI アンカー型タンパク質）の ER から Golgi 体への輸送速度を pulse-chase 法により解析した。ER 型 DAF（45 kDa）は Golgi 体に輸送され糖鎖修飾により完成型 DAF（75 kDa）となることから、完成型 DAF の量の増加速度を ER から Golgi 体への輸送速度の指標とした。C10 変異細胞株での完成型 DAF の増加速度は、この変異細胞株に *PGAP1* 遺伝子を相補した細胞株の約 1/3 であった。このことから、イノシトール脱アシル化は GPI アンカー型タンパク質を ER から Golgi 体へ速やかに輸送するために重要であることが明らかになった。

B) PGAP1 の酵母（*S. cerevisiae*）ホモログは Bst1p であった。*BST1* は COPⅡ依存輸送経路に関わる遺伝子として同定されていた。そのアミノ酸配列は PGAP1 に対し 18%の相同性を示し、リパーゼドメインも保持していた。*BST1* cDNA は C10 変異細胞株の PI-PLC に対する感受性を部分的に回復させた。酵母の *BST1* 欠損細胞株では GPI アンカー型タンパク質である Gas1p の ER から Golgi 体への輸送が遅れることが報告されていることから、イノシトール脱アシル化は酵母においても哺乳類と同様の意義を持つと考えられた。

〔総括〕

哺乳類細胞の GPI イノシトール脱アシル化酵素 PGAP1 をクローニングし、脱アシル化は GPI アンカー型タンパク質を ER から Golgi 体へ効率よく輸送するために重要であるを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

哺乳類細胞のグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）のイノシトール部分は GPI 生合成の初期のステップでアシル化される。このステップは GPI の完成に必須である。アシル基は GPI がタンパク質に転移した直後、小胞体（ER）においてイノシトール部分から除去されるため、細胞表面の GPI アンカー型タンパク質はイノシトール部分にアシル基を持っていない。この脱アシル化に関与する哺乳類の遺伝子は同定されておらず、脱アシル化の生物学的意味は不明であった。本研究は哺乳類の脱アシル化酵素遺伝子の同定と脱アシル化の意義の解明を目標とした。

イノシトール脱アシル化活性を欠損した細胞株（C10 細胞株）をホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C に対する抵抗性を指標として、CHO 細胞から樹立した。C10 細胞株を用い、発現クローニング法により *PGAP1* を責任遺伝子としてクローニングした。ラット PGAP1 はリパーゼドメインを持つ 922 アミノ酸残基からなる膜タンパク質で脱アシル化酵素そのものであると考えられた。また、脱アシル化は GPI アンカー型タンパク質を ER から Golgi 体へ効率よく輸送するために重要である事を明らかにした。

以上の成果は、GPI アンカー型タンパク質の発現に重要な酵素を同定したもので、学位に値する。