The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	PIG-V Involved in Transferring the Second Mannose in Glycosylphosphatidylinositol
Author(s)	姜, 志榮
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45402
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	姜（カン）　志榮（ジヨン）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　１９２８０　号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学　位　論　文　名	PIG-V Involved in Transferring the Second Mannose in Glycosylphosphatidylinositol （PIG-V は GPI マンノース転移酵素Ⅱである）
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の膜タンパク質の多くは GPI（Glycosylphosphatidylinositol）アンカーにより膜に結合している。GPI アンカーの基本構造は酵母や原虫から哺乳類に至るまで保存されており、ホスファチジルイノシトール（PI）にグルコサミン（GlcN）、３つのマンノース（Man）が順に結合し、最後のマンノースに付加したホスホエタノールアミン（EtNP）がタンパク質の C 末端と結合している。これまでに GPI アンカーの生合成に関わる 20 以上の PIG 遺伝子群が同定されている。GPI マンノース転移酵素遺伝子については、GPI マンノース転移酵素Ⅰ（GPI-MT-I、PIG-M）と GPI マンノース転移酵素Ⅲ（GPI-MT-III、PIG-B）はすでに報告されているが、GPI マンノース転移酵素Ⅱ（GPI-MT-II）についてはこれまで報告されてなかった。本研究では GPI-MT-II の遺伝子をクローニングし、機能を明らかにすることを目的とした。

（方法および成績）

既知の GPI 生合成遺伝子のミュータントの発生を抑えるために、８種の既知遺伝子と GPI アンカータンパク質のマーカーであるヒト CD59 と DAF を安定に発現する CHO D9WT 株を作製し、親株として用いた。EMS でこの親株を変異処理し、GPI アンカーを認識する細菌毒素 Aerolysin を用いて、細胞表面の GPI アンカー型タンパク質を欠損した変異株を分離した。それらのなかから、既知のどの遺伝子でも GPI アンカー型タンパク質の発現が回復しない新規の変異株 D9PA15.6 株を得た。欠損しているステップを明らかにするために、マンノースで細胞を代謝標識し、蓄積する GPI 中間体を TLC で解析したところ、マンノース１残基を含む GPI 中間体 H2（Man-GlcN-acyl-PI）と H5（EtNP-Man-GlcN-acyl-PI）の蓄積がみられ、D9PA15.6 株は２番目のマンノースの転移に関わる GPI-MT-II が欠損していることが明らかになった。

CD59 の回復を指標にした発現クローニング法により責任遺伝子 *PIG-V* をクローニングした。ヒト PIG-V は 493 アミノ酸からなり、８カ所の膜貫通領域を有している。PIG-V は ER に局在しており、N 末端は細胞質側に存在していた。ER 内腔側には生物種間でよく保存された領域が２カ所あり、機能発現に必須のアミノ酸残基が含まれている

ことをSite-directed mutagenesisにより明らかにした。これらの領域はどちらもERの内腔側に存在しており、内腔でのマンノース転移反応に重要な領域と考えられる。特に最初のER内腔ループに存在するAsp-67は、ドリコールリン酸糖供与体を基質とするERの糖転移酵素に共通する、酵素活性に必要なAsp残基に相当すると予想される。

出芽酵母のゲノム中にヒトPIG-Vと25%の相同性を有するORF YBR004cを見いだし*GPI18*と命名した。ヒトPIG-Vは出芽酵母中で機能を有していたので、両者は機能的ホモログであることが示された。GPIをタンパク質に転移するGPI transamidaseのコンポーネントの1つであるPIG-Uが欠損したCHO C311PA16細胞はH2やH5を含む様々なGPI中間体を蓄積するが、これにPIG-Vを過剰発現させると、H2が減少してH3(Man-Man-GlcN-acyl-PI)が増えることが明らかになった。これらの結果からPIG-VはGPI-MT-IIの本体であると考えられる。

PIG-Vは、既知の糖転移酵素とは一次配列上ほとんどホモロジーが認められず、新規の糖転移酵素ファミリー(GT family 76 in CAZY database)を形成することが認められた。

(総括)

GPI生合成に関わるマンノース転移酵素のうち、唯一未知であったGPI-MT-II遺伝子*PIG-V*を同定した。

論文審査の結果の要旨

真核生物の細胞表面の膜タンパク質の多くはGPIアンカーにより膜に結合している。GPIアンカーの基本構造は酵母や原虫から哺乳類に至るまで保存されており、その中には3つのマンノースが順に結合している。本研究ではGPIマンノース転移酵素IIの遺伝子をクローニングし、機能を明らかにすることを目的とした。

細胞表面のGPIアンカー型タンパク質を欠損した新規の変異株CHOD9PA15.6株をスクリーニングし、蓄積するGPI中間体の解析から、2番目のマンノースの転移に関わるGPIマンノース転移酵素IIが欠損していることが明らかになった。発現クローニング法により責任遺伝子*PIG-V*をクローニングした。ER内腔側には生物種間で保存された領域が2カ所あり、機能発現に必須のアミノ酸残基が含まれていた。GPI生合成に関わるマンノース転移酵素のうち、唯一未知であったGPI-MT-II遺伝子*PIG-V*を同定した。

以上の成果は、GPI生合成に関わる重要な酵素を同定したもので、学位に値するものと認める。