



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 志 榮
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。