

Title	GPI7 is the second partner of PIG-F and involved in modification of glycosylphosphatidylinositol
Author(s)	獅子王, 信江
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45412
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	し し おう のぶ え 獅 子 王 信 江
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 9 2 8 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 7 年 3 月 2 5 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	GPI7 is the second partner of PIG-F and involved in modification of glycosylphosphatidylinositol (GPI7はPIG-Fの第2のパートナーであり、グリコシル・フォスファチジル・イノシトールの修飾に関与している。)
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]

グリコシル・フォスファチジル・イノシトール (GPI) は補体制御因子や酵素、受容体などの GPI アンカー型タンパク質を細胞膜表面につなげる重要な糖脂質である。GPI は、10段階近い反応によってフォスファチジル・イノシトールをもとにマンノース (Man)、エタノールアミンリン酸 (EtNP) などが付加され合成される。GPI が蛋白質と結合するためには、3つの連なる Man のうち、3番目の Man (Man3) における EtNP の修飾が必要である。この反応は PIG-F と酵素 PIG-O の複合体が担い、この酵素複合体が GPI 中間体の一つである H6 の Man3 に EtNP を付加し、アンカーとして用いられる H7 を合成する。H7 はさらに2番目の Man (Man2) に EtNP が付加されて H8 になることが知られているが、この反応に関わる遺伝子は哺乳動物では未だ同定されていない。一方、酵母では Man2 への EtNP 付加に関する遺伝子として *GPI7* が同定されている。本研究では、*GPI7* のヒトホモログ human *GPI7* (*hGPI7*) をクローニングし、哺乳動物細胞における *hGPI7* の機能を解析することを目的とした。

[方法ならびに成績]

データベースを検索して酵母 *Gpi7p* と 26% の相同性を示すヒトの配列を *hGPI7* として同定し、PCR 等によりその cDNA の全長を得た。*hGPI7* は、N 末端に type I phosphodiesterase/nucleotide pyrophosphatase の保存領域、C 末端に複数膜貫通領域を持つ 983 アミノ酸残基からなる膜タンパク質と予想された。さらに、PIG-O と 26% の相同性が認められた。アミノ酸配列による情報から *hGPI7* は EtNP 転移酵素の可能性が示唆された。*hGPI7* が哺乳動物細胞における Man2 への EtNP 付加に関わるかどうかを明らかにするため、RNA 干渉法を用いて *hGPI7* の発現を抑え、GPI 中間体を解析した。まず、*hGPI7* に対する small interference hairpin RNA を発現する plasmid を HeLa 細胞にトランスフェクションし、*hGPI7* の発現をノックダウンした細胞株 (*hGPI7* KD) を樹立した。*hGPI7* KD 細胞では *hGPI7* の mRNA 量が対照細胞の 27% までに低下していた。次に、*hGPI7* KD 細胞をトリチウム Man を含む培地で培養した後、GPI 中間体を抽出して薄層クロマトグラフィーにより各 GPI 中間体におけるトリチウム Man の取り込み量を解析した。*hGPI7* KD 細胞では、対照細胞と比べて *hGPI7* の基質であると予想される H7 が 5 倍に増

加し、反応産物の H8 は減少していた。これらの結果から、hGPI7 は Man2 への EtNP 付加に関わることが示された。また、hGPI7 の細胞内局在をショ糖密度勾配超遠心分画法によりオルガネラを分離して調べたところ、他の GPI 生合成酵素群と同様に、小胞体に局在を認めた。

hGPI7 が PIG-O と相同性が高いことから、PIG-O と複合体をなす PIG-F が hGPI7 と結合するかどうかを調べた。タグを付加した hGPI7 と PIG-F を CHO 細胞に発現させ 1%ジギトニンで可溶化したのち、hGPI7 を免疫沈降した。PIG-F は hGPI7 と共沈した。また、PIG-F は PIG-O の発現を安定化するので、PIG-F が hGPI7 も同様に安定化するかどうかを調べた。PIG-F 欠損株を用いて、PIG-F 存在化と非存在下における hGPI7 の発現量を比較した。PIG-F 非存在下での hGPI7 の発現量は、PIG-F 存在下の半分以下であった。これらの結果より、hGPI7 は、PIG-F と結合して安定化されていることが示された。さらに、hGPI7 と PIG-F、PIG-O が一つの複合体を成しているかどうかを免疫沈降法によって調べたところ、PIG-O は hGPI7 と共沈しなかった。よって、hGPI7 と PIG-F、PIG-O と PIG-F という独立した複合体を形成していることが示された。

次に、hGPI7 と PIG-O が PIG-F との結合について競合するかどうかを調べた。一定量の PIG-O と PIG-F、および様々な量の hGPI7 を CHO 細胞に共発現させ、PIG-F と結合する PIG-O の量を免疫沈降法を用いて解析した。PIG-F と結合する PIG-O の量は hGPI7 のプラスミドが増加するに伴って減少していた。これらの結果より、hGPI7 と PIG-O は、PIG-F との結合を競合していることが示された。さらに、この競合が GPI 生合成に影響するかどうかを調べた。HeLa 細胞に hGPI7 を強制発現した時の GPI 中間体を解析したところ、PIG-O の基質である H6 が対照細胞よりも 2 倍多く増加していた。この結果は、hGPI7 の強制発現により PIG-O と PIG-F の複合体の量が減少し、そのことが H6 から H7 への反応効率を下げたと考えられる。これらのことから、hGPI7 の発現量が間接的に Man3 への EtNP 付加反応に影響を与えることが示唆された。

[総括]

哺乳動物細胞における第 2 マンノースへのエタノールアミンリン酸付加反応に関わる遺伝子 human *GPI7* を同定した。PIG-O と同様、hGPI7 は PIG-F と結合して安定化されているが、その結合は PIG-O と競合していた。この競合は GPI 生合成にも影響することがわかり、hGPI7 が第 3 マンノースへのエタノールアミンリン酸付加反応を調節しうる可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

グリコシルフォスファチジルイノシトール (GPI) のマンノース (Man) にはエタノールアミンリン酸 (EtNP) が付加される。本研究では、哺乳動物における 2 番目の Man (Man2) への EtNP 付加に関わる遺伝子として human *GPI7* (hGPI7) を同定し、その機能解析から GPI 生合成における新しい制御機構の可能性を見いだした。hGPI7 は、酵母において Man2 への EtNP 付加酵素としてすでに同定されている酵母 *Gpi7p* のアミノ酸配列をもとにヒト cDNA ライブラリーから単離された。RNA 干渉を用いて hGPI7 の発現を抑えることにより、Man2 に EtNP が付加された GPI 中間体の生合成量の低下を確認し、このことから単離された hGPI7 が Man2 への EtNP 付加酵素であることを示した。さらに、hGPI7 は 3 番目の Man (Man3) への EtNP 付加酵素である PIG-O と、両者の活性に必須な結合因子である PIG-F を競合的に取り合うことを明らかにし、この競合によって hGPI7 の発現量が Man3 への EtNP 付加反応に影響することを示した。

以上の成果は、哺乳動物における GPI 生合成の新しい遺伝子を同定し、GPI 生合成の新たな制御機構を発見したもので、学位に値すると認める。