

Title	Implication of lipid moiety in oligomerization and immunoreactivities of GPI-anchored proteins
Author(s)	成, 智賢
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59774
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	成智賢 (Jihyou Seong)
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 25891 号
学位授与年月日	平成 25 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科予防環境医学専攻
学位論文名	Implication of lipid moiety in oligomerization and immunoreactivities of GPI-anchored proteins (GPI アンカーの脂質リモデリングは多量体形成により GPI アンカー型タンパク質の免疫反応性を亢進する)
論文審査委員	(主査) 教授 木下 タロウ (副査) 教授 岡部 勝 教授 竹田 潤二

論文内容の要旨

〔目的(Purpose)〕

Fatty acid remodeling of glycosylphosphatidylinositol (GPI) is critical for accumulation of GPI-APs in lipid rafts where (glyco) shingolipids and cholesterol are enriched in a liquid-ordered manner. Before remodeling, most of GPI anchors contain an sn-2 unsaturated fatty acid. A Golgi membrane protein PGAP3 is required for production of lyso-GPI by cleavage of the sn-2 unsaturated fatty acid. Another Golgi membrane protein PGAP2 is involved in reacylation of the sn-2 position with a stearic acid. Thus, this fatty acid remodeling, that produces GPI-APs possessing two straight saturated fatty acid chains. In PGAP3 deficient mouse embryonic fibroblasts (MEFs), GPI-APs that have not undergone fatty acid remodeling exhibit reduced immunoreactivities in Western blotting compared to normal remodeled GPI-APs. In contrast, immunostaining in flow cytometry and immunoprecipitation did not show significant differences between remodeled and unremodeled GPI-APs. Here, we focused on the mechanism of differential immunoreactivities between remodeled and unremodeled GPI-APs.

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

- 1) MEFs were isolated from PGAP3 knockout mice. Lysate was fractionated with cold 1% Triton-X100. Majority of GPI-APs in KO cells exist in detergent soluble fraction.
- 2) HA- placental alkaline phosphatase (PLAP) expressing MEFs were infected with PGAP3 or control vector, retrovirally. Western blot and flow cytometry of GPI-APs were performed against HA or PLAP. Flow cytometry data exhibited no significant differences from remodeled and unremodeled cells against HA and PLAP antibodies. When western blotting was performed against PLAP, PGAP3 KO cells exhibited reduced signal, whereas HA antibody detected similar amount of HA-PLAP. The enzymatic activity of PLAP was measured using whole cell lysate from both cells. The activities were not affected by differences in GPI-anchor.
- 3) Western blotting of EGFP-Flag-CD59 fusion protein against anti-EGFP and -Flag still

exhibited the reduced signals in KO cells.

- 4) To increase avidity of antibody, 1st and 2nd antibodies were mixed and applied to the Western blotting. The premixed antibody equalized the band intensity. Also, Fab fragment equalized the intensity of remodeled and unremodeled GPI-APs.
- 5) Therefore, the results through 1) to 4) indicate that GPI portion does not affect protein conformation, but there is evidence that GPI-APs oligomerize by hydrophobicity of their anchor with saturated two fatty acid chains. To confirm differential formation of oligomers in vivo, HA-Thy1 was chemically cross-linked. KO cells failed to make cross-linking efficiently.
- 6) To further ensure the significance in physiology the cells were treated with GPI-binding bacterial toxin, aerolysin, the toxin equally bound to both cells but LD₅₀ of KO cell is two fold higher than that of wild type.

〔総括(Conclusion)〕

This study revealed significant aspect of GPI-remodeling in accelerating oligomerization by GPI-GPI interactions. Also this study provides technical information for comparing the amount of proteins harboring different type of GPIs.

論文審査の結果の要旨

グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー (GPIアンカー) は、多くの細胞表面タンパク質のカルボキシ末端に結合し、膜アンカー構造として機能する糖脂質である。GPIアンカーに含まれるリン脂質部分は生合成過程での脂肪酸リモデリングによって2本の脂肪酸鎖ともが飽和鎖になる。脂肪酸リモデリングに必要なPGAP3遺伝子の欠損細胞では1本が不飽和鎖のまま残る。1本の脂肪酸鎖が飽和であるか不飽和であるかだけが異なるGPIアンカータンパク質をウェスタンブロットイングで比較解析したときに、不飽和鎖を持つタンパク質がほとんど検出できなくなる特異な現象が知られていた。本研究は、この現象に着目し、そのメカニズムを解析した結果、脂肪酸リモデリングによって2本ともが飽和鎖になったGPIアンカータンパク質は、オリゴマーになりやすいこと、1本が不飽和鎖のままのGPIアンカータンパク質はオリゴマーになりにくいこと、プロット膜上で単量体として存在することにより抗体での検出効果が著しく低下することを示した。さらに、細胞膜においても正常に脂肪酸リモデリングを受けたGPIアンカータンパク質は2量体になっている割合が高いことを示した。また、GPIアンカーに結合後、重合によってチャンネルを形成し細胞を溶解させる細菌毒素であるエロリジンに対して、正常細胞は、脂肪酸リモデリング欠損細胞より感受性が高いことを見出し、GPIアンカータンパク質のオリゴマー形成が生物学的効果を持つことも示した。

本研究は、タンパク質GPIアンカーの脂質構造がタンパク質の特性に与える影響を明らかにした新規性の高いものであり、学位に値するものと認める。