

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2020

課題番号：16H04753

研究課題名(和文) GPIアンカー側鎖とフリーGPIの生理的・病理的意義の解明

研究課題名(英文) Physiological and pathological roles of GPI side chains and free GPI

研究代表者

木下 タロウ (Kinoshita, Taroh)

大阪大学・微生物病研究所・寄附研究部門教授

研究者番号：10153165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖脂質であるGPI(グリコシルホスファチジルイノシトール)は、タンパク質に結合して膜アンカーとして働くだけでなく、フリーの糖脂質としても存在している。GPI骨格は共通であるが、側鎖によって多様性が生まれる。GPI側鎖の生合成機構の解明とフリーGPIの動態と病理的意義の解明を研究目標とし、以下の成果を得た。(1)側鎖形成に働く2つの酵素を同定した。(2)GPIトランスアミダーゼ欠損細胞ではフリーGPIが細胞表面に発現することを示し、そのレベルをGPI生合成量の指標にすることにより、GPI生合成の制御機構の一端を明らかにした。また、フリーGPIの蓄積によって自己炎症が起こることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトが持つタンパク質の約160種には糖脂質であるGPI(グリコシルホスファチジルイノシトール)が結合しており、GPIによって細胞膜に係留されて機能している。GPIの生合成が異常になると先天性グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)欠損症や発作性夜間ヘモグロビン尿症と言った難病を発症する。GPIの糖鎖部分の骨格は共通構造をしているが、側鎖によって多様性が生まれる。しかし側鎖の生合成機構は未解明であった。また、GPIはタンパク質に結合しないフリーの糖脂質としても存在することが知られているが、その生理的意義や病理的意義は不明であった。本研究の成果はこれらの課題に一定の進展をもたらした。

研究成果の概要(英文)：Glycosylphosphatidylinositols (GPIs) are glycolipids that are attached to various proteins and act as their membrane anchors on the cell surface. GPIs also exist as free, non-protein linked glycolipids. The structure of core glycan part is conserved whereas side chains make variation. We aimed to clarify how GPI side chains are synthesized and to understand intracellular dynamics and pathological roles of free GPIs. We identified two enzymes that are involved in generation of a major side chain in mammalian GPI. Concerning free GPI, we found that GPIs synthesized in the endoplasmic reticulum of cells defective in GPI transamidase that transfers GPI to proteins, are transported to the cell surface. Using free GPI levels as a measure of GPI biosynthesis levels, we found a mechanism of GPI biosynthesis regulation. We also demonstrated that abnormally accumulated free GPIs cause autoinflammation.

研究分野：生化学

キーワード：糖脂質

1. 研究開始当初の背景

グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカーは真核生物の数多くの細胞表面タンパク質の膜結合構造として用いられる糖脂質である。ヒトにおいても150種類以上の種々の機能を持つタンパク質がGPIアンカー型タンパク質(GPI-AP)である。GPI-APは、膜ラフトに局在して機能を果たすこと、アンカー切断酵素による膜からの遊離が可能であること、極性細胞でのアピカル膜への選択的輸送等の特有の性状を持ち、これらの性状が糖脂質膜アンカーによってもたらされている。GPIの生合成が生体に必須であることは、GPI生合成遺伝子のノックアウトマウスが胚発生初期に致死になることからよく知られていた。さらに、近年GPI生合成遺伝子の低形成変異によって生合成量が低下することによって様々な症状を示す先天性GPI欠損症例が次々と見つかってきたことから、GPIアンカーの生理的意義の幅広さがより良く認識されるようになって来た。また、GPIアンカーの構造異常を起こす遺伝子変異によっても種々の症状を示す先天性疾患が引き起こされることから、GPIアンカーの量だけでなく微細構造も種々の生理機能に重要であることがわかりつつあった。

一方、GPI-AP特有の上記の性状が、タンパク質によっては必ずしも当てはまらない例も見られ、膜アンカーとしてのGPIの基本骨格だけでなく、側鎖の有無などGPI糖脂質の微細構造の多様性がそうした性状の違いに関連している可能性が出て来ていた。GPIの基本骨格の形成メカニズムは、我々の20年に及ぶ研究を中心に、その全体がほぼ解明された。しかし、GPIの微細構造の形成と多様性のメカニズムの研究は、まだ緒についたばかりであった。GPI-APの生物学的・医学的研究の基礎となる構造多様性の全体像を解明することが重要である。世界的にも、近年GPIアンカー研究が注目されており、J Biol Chem と並んで米国生化学分子生物学会の学会誌であるJ Lipid Res は、Thematic Review Series のテーマにGPIアンカーを取り上げた。

GPIアンカーの構造に多様性をもたらす要因の一つは、糖鎖の骨格に付加される側鎖である。プリオンなどいくつかのGPI-APの構造研究から第1マンノースにNアセチルガラクトサミン(GalNAc)が β 1,4結合した側鎖が知られていた。この側鎖は、さらに β 1,3ガラクトース(Gal)とシアル酸(Sia)が順に結合して伸長することも知られていた。しかしそれらの付加に必要な遺伝子群が未解明なため β GalNAc側鎖の生理的意義は不明であり、どれだけの多様性があるか、すなわち、どの組織のどのGPI-APにどの長さの側鎖が付加しているかについてもほとんどわかっていなかった。私たちは、 β GalNAcの付加に必要な遺伝子をクローニングすることに成功し、PGAP4と名付けたこの遺伝子が、 β GalNAc転移酵素の触媒成分であることを証明した。そして β GalNAc側鎖の生理的意義を解明するためPGAP4ノックアウトマウスの作製を準備していた。側鎖を伸長させる β GalNAc転移酵素さらにシアル酸転移酵素の遺伝子も未同定であった。

また、小胞体で生合成されたGPIは、GPIトランスアミダーゼによってタンパク質のC末端に付加される。この酵素は、PIGK、PIGS、PIGT、PIGU、GPAA1の5成分の複合体で、これらが欠損するとGPIはタンパク質に付加されず、フリーのGPIが蓄積する。フリーGPIの動態、蓄積が細胞に与える影響はわかっていなかった。私たちは、 β GalNAc側鎖を認識する抗体を用い、GPIトランスアミダーゼ欠損細胞では、フリーGPIが β GalNAc側鎖付加を受けた後、細胞表面に発現することを見いだした。一方、2013年、PIGT遺伝子が造血幹細胞で欠損することによって起こる非典型発作性夜間ヘモグロビン尿症を、私たちを含む共同研究グループが報告し、さらに新たな同症例を国内でも見いだしていた。非典型発作性夜間ヘモグロビン尿症患者は、じんましん、関節痛、非感染性髄膜炎といった、従来の発作性夜間ヘモグロビン尿症には見られない特異な炎症性症状を示し、PIGT変異で蓄積したフリーGPIが炎症性症状の原因であると推定された。これらの症状は、インフラマソームの構成因子であるNLRP3の変異によって起こる自己炎症性疾患と共通であり、非典型発作性夜間ヘモグロビン尿症においてもインフラマソームの活性化が疑われた。フリーGPIの細胞内動態を明らかにし、炎症を惹起するメカニズムにフリーGPIがどのように関与するかを明らかにすることが求められていた。

2. 研究の目的

本研究では以下の3つの目標を立て研究を進めた。(1)未解明のGPI側鎖形成機構を解明し、GPIアンカーの構造多様性の分子基盤を明らかにする。また、(2)GPI側鎖形成に働く遺伝子のノックアウトマウスを作製して解析し、加えて、これら遺伝子の変異で起こる疾患を発見して、GPI側鎖の生理的意義を解明する。さらに、(3)GPI側鎖研究から見いだした、タンパク質に結合していないフリーGPIの細胞内動態を明らかにする。そして、フリーGPIの異常蓄積が、新規GPI異常症である非典型発作性夜間ヘモグロビン尿症の自己炎症性症状を引き起こす機構

を解明して、病理的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

β GalNAc 側鎖を持つフリー-GPI に特異的に結合する T5 モノクローナル抗体をプローブとして用い、 β GalNAc 付加と β GalNAc へのガラクトース付加に働く遺伝子のスクリーニング法を構築し、実施した。

β GalNAc 側鎖の生理的意義を明らかにするため、PGAP4 遺伝子のノックアウトマウスを作製した。

PIGT 遺伝子変異および PIGB 遺伝子変異による発作性夜間ヘモグロビン尿症の GPI 欠損細胞と、モデル細胞として作製した PIGT ノックアウト THP1 細胞を用いて、補体の活性化とインフラマソームの活性化を解析した。

4. 研究成果

各項目について以下の成果を得た。

(1) GPI 側鎖の生合成機構の解明に関し、GPI 側鎖の N アセチルガラクトサミンとガラクトースを付加する酵素(PGAP4 と B3GALT4)を同定した。PGAP4 は3つの膜貫通ドメインを持つ特異なゴルジ体糖転移酵素であった (Hirata T et al, *Nat Commun*, 2018)。ガラクトースを付加する酵素は、GM1 ガングリオシド合成酵素で GPI に働く時にはラクトシルセラミドの存在が必要であることを見出した。2つの異なる基質に対してこの酵素の同じ活性部位が働くことと、さらに、酵素を過剰発現させればラクトシルセラミドがなくても GPI に働くことから、ラクトシルセラミドは酵素と GPI の相互作用を促進させると考えられた (Wang Y et al, *Nat Commun*, 2020)。側鎖末端のシアル酸に関しては、その結合形式も不明であったが、北大小林篤史博士、島津製作所西風隆司博士らとの共同研究を行い、プリオンタンパク質を用いて解析した結果、シアル酸 (N-アセチルノイラミン酸) がすべて α 2-3 結合していることを示した (Kobayashi A et al, *J Biol Chem*, 2020)。

(2) に関し、PGAP4 ノックアウトマウスを作製し、ホモマウスが一見正常に成長することを確認した。作製した PGAP4 ノックアウトマウスの性状解析を行った。

(3) フリー-GPI の細胞内動態に関し、フリー-GPI が一部の組織や細胞株の膜成分として存在していることを見いだした。また、GPI トランスアミダーゼ欠損細胞では N-アセチルガラクトサミン側鎖を持つフリー-GPI が、小胞体から輸送され細胞表面に発現すること、輸送過程でタンパク質に結合した GPI アンカーと同様に構造が成熟することを示した (Wang Y et al, *J Biol Chem*, 2019)。そして、細胞表面に発現したフリー-GPI のレベルを GPI 生合成量の指標にすることにより、GPI 生合成を制御するメカニズムにアプローチし得ることを見出した。その結果、小胞体関連分解系が GPI 生合成の抑制に関わっていること、小胞体関連分解系を破壊すると GPI 生合成が大きく上昇することを見出した。このことは、GPI 生合成を正に制御するメカニズムの存在を示している (Wang Y et al, *Nat Commun*, 2020)。

次に、フリー-GPI の蓄積の病理学的意義について検討した。PIGT 遺伝子変異による発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PIGT-PNH) の異常細胞では、N-アセチルガラクトサミン側鎖を持つフリー-GPI が細胞表面に高レベルで発現していること、異常細胞ではインフラマソームが容易に活性化されること、血中 IL18 が高値であることを見出した。THP-1 細胞を用いて培養細胞モデルを作製し検討した結果、PIGT-KO 細胞では、補体レクチン経路の活性化が進行し C4 と C3 の断片や膜侵襲複合体が高レベル結合し、それに応じて IL1 β が放出されることを見出した。これらは、フリー-GPI の蓄積を起こす PIGT-PNH において、自己炎症が補体とインフラマソームの過剰な活性化によっていることを示している (Hoechsmann B et al, *J Clin Invest*, 2019)。さらに、生合成経路で3つ目のマンノースの転移に働く PIGB 遺伝子の変異による発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PIGB-PNH) の症例をオランダの研究グループとの共同研究で見出し報告した。この症例でも PIGT-PNH と同様血中 IL18 が上昇し、自己炎症症状が見られた (Langemeijer S et al, *Blood Adv*, 2020)。このことは PIGB 欠損細胞で蓄積するマンノース2つを持つ GPI 中間体が小胞体から細胞表面に輸送され、病態に関与することを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 7件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Hochsmann B, Murakami Y, Osato M, Knaus A, Kawamoto M, Inoue N, Hirata T, Murata S, Anliker M, Eggermann T, Jager M, Floettmann R, Hollein A, Murase S, Ueda Y, Nishimura J-i, Kanakura Yuzuru, Kohara Nobuo, Schrezenmeier Hubert, Krawitz Peter M., Kinoshita Taroh	4. 巻 129
2. 論文標題 Complement and inflammasome overactivation mediates paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with autoinflammation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 5123 ~ 5136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI123501	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Wang Yicheng, Maeda Yusuke, Liu Yi-Shi, Takada Yoko, Ninomiya Akinori, Hirata Tetsuya, Fujita Morihisa, Murakami Yoshiko, Kinoshita Taroh	4. 巻 11
2. 論文標題 Cross-talks of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis with glycosphingolipid biosynthesis and ER-associated degradation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-14678-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Murakami Y, Nguyen TTM, Baratang N, Raju PK., Knaus A, Ellard S, Altmuller J, Verma I C., Maier EM., Haack TB., Israni A, Baptista J, Gunning A, Rosenfeld JA., Liu P, Miyatake S, Matsumoto N, Krawitz PM., Rossignol E, Kinoshita T, Campeau PM, et al.	4. 巻 105
2. 論文標題 Mutations in PIGB Cause an Inherited GPI Biosynthesis Defect with an Axonal Neuropathy and Metabolic Abnormality in Severe Cases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The American Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 384 ~ 394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajhg.2019.05.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Knaus Alexej, Kortum Fanny, Kleefstra Tjitske, Stray-Pedersen Asbjorg, Dukic Dejan, Murakami Yoshiko, Gerstner Thorsten, van Bokhoven Hans, Iqbal Zafar, Horn Denise, Kinoshita Taroh, Hempel Maja, Krawitz Peter M.	4. 巻 105
2. 論文標題 Mutations in PIGU Impair the Function of the GPI Transamidase Complex, Causing Severe Intellectual Disability, Epilepsy, and Brain Anomalies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The American Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 395 ~ 402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajhg.2019.06.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Wang Yicheng, Hirata Tetsuya, Maeda Yusuke, Murakami Yoshiko, Fujita Morihisa, Kinoshita Taroh	4. 巻 294
2. 論文標題 Free, unlinked glycosylphosphatidylinositols on mammalian cell surfaces revisited	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 5038 ~ 5049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.007472	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kinoshita Taroh	4. 巻 55
2. 論文標題 Congenital Defects in the Expression of the Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Complement Regulatory Proteins CD59 and Decay-Accelerating Factor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Seminars in Hematology	6. 最初と最後の頁 136 ~ 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.seminhematol.2018.04.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirata Tetsuya, Mishra Sushil K., Nakamura Shota, Saito Kazunobu, Motooka Daisuke, Takada Yoko, Kanzawa Noriyuki, Murakami Yoshiko, Maeda Yusuke, Fujita Morihisa, Yamaguchi Yoshiki, Kinoshita Taroh	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of a Golgi GPI-N-acetylgalactosamine transferase with tandem transmembrane regions in the catalytic domain	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-02799-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Atsushi, Hirata Tetsuya, Nishikaze Takashi, Ninomiya Akinori, Maki Yuta, Takada Yoko, Kitamoto Tetsuyuki, Kinoshita Taroh	4. 巻 295
2. 論文標題 2,3 linkage of sialic acid to a GPI anchor and an unpredicted GPI attachment site in human prion protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 7789 ~ 7798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013444	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Lee Gun-Hee, Fujita Morihisa, Nakanishi Hideki, Miyata Haruhiko, Ikawa Masahito, Maeda Yusuke, Murakami Yoshiko, Kinoshita Taroh	4. 巻 295
2. 論文標題 PGAP6, a GPI-specific phospholipase A2, has narrow substrate specificity against GPI-anchored proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 14501 ~ 14509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.014643	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Guo Xin-Yu, Liu Yi-Shi, Gao Xiao-Dong, Kinoshita Taroh, Fujita Morihisa	4. 巻 295
2. 論文標題 Calnexin mediates the maturation of GPI-anchors through ER retention	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 16393 ~ 16410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.015577	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nguyen Thi Tuyet Mai, Murakami Yoshiko, Ververi Athina, DeVile Catherine, Male Alison, Efthymiou Stephanie, Maroofian Reza, Kinoshita Taroh, Campeau Philippe M.	4. 巻 106
2. 論文標題 Bi-allelic Variants in the GPI Transamidase Subunit PIGK Cause a Neurodevelopmental Syndrome with Hypotonia, Cerebellar Atrophy, and Epilepsy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The American Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 484 ~ 495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajhg.2020.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 11件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Taroh Kinoshita
2. 発表標題 Side-chain modification of mammalian GPI-anchors
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Carbohydrates (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taroh Kinoshita
2. 発表標題 Regulation of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis
3. 学会等名 International Symposium on Glycoconjugates (Glyco 25) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taroh Kinoshita
2. 発表標題 Quantity control of GPI biosynthesis
3. 学会等名 42nd Annual Meeting of The Molecular Biology Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taroh Kinoshita
2. 発表標題 Glycosylphosphatidylinositol: glycan and phospholipid in one molecule
3. 学会等名 RIKEN International Symposium on Glyco-lipidologue (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Taroh Kinoshita
2. 発表標題 Basic science and potential treatment of GPI disorders
3. 学会等名 SBP Medical Discovery Institute Rare Disease Day Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Taroh Kinoshita
2. 発表標題 Interactions between GPI-anchor biosynthesis and glycosphingolipid biosynthesis
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Glycobiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平田哲也、木下タロウ
2. 発表標題 立体構造モデルに基づいたGPI-GalNAc 転移酵素PGAP4によるGPI側鎖合成機構
3. 学会等名 第35回日本糖質学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 王 宜成、木下タロウ
2. 発表標題 Free glycosylphosphatidylinositols are abnormally accumulated on the cell surface of GPI-transamidase-deficient mammalian cells
3. 学会等名 第89回日本生化学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Taroh Kinoshita
2. 発表標題 Molecular pathogenesis of GPI anchor deficiencies
3. 学会等名 Mexican Society of Human Genetics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Taroh Kinoshita
2. 発表標題 Cross-talk of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis with glycosphingolipid biosynthesis
3. 学会等名 Society for Glycobiology 2020 Virtual Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木下タロウ
2. 発表標題 補体とGPIアンカーに出会って
3. 学会等名 第73回日本細菌学会関西支部会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木下タロウ
2. 発表標題 GPIアンカー欠損症の分子病態
3. 学会等名 名城大学難治疾患研究センターセミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木下タロウ
2. 発表標題 小胞体におけるGPI生合成の制御
3. 学会等名 大阪大学タンパク研セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学微生物病研究所・難病解明寄附研究部門
http://yabumoto.biken.osaka-u.ac.jp

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	村上 良子 (Murakami Yoshiko) (00304048)	大阪大学・微生物病研究所・寄附研究部門教授 (14401)	
連携研究者	田島 優子 (Tashima Yuko) (10423104)	大阪大学・微生物病研究所・助教 (14401)	平成28年度のみ

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------