

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21770140

研究課題名 (和文) GPI アンカー型タンパク質の輸送を制御する遺伝子の同定と機能解析

研究課題名 (英文) Identification of genes involved in
transport of GPI-anchored proteins

研究代表者

藤田 盛久 (FUJITA MORIHISA)

大阪大学・微生物病研究所・特任助教

研究者番号：30532056

研究成果の概要 (和文)：

細胞表面膜上には糖脂質グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) によって膜に結合する一群のタンパク質 (GPI アンカー型タンパク質) が存在し、様々な生命現象に重要な役割を担っている。本研究では、GPI アンカーの糖鎖構造を変化させる酵素 PGAP5 を同定し、この改変が GPI アンカー型タンパク質の小胞体からゴルジ体への輸送に必要であることを明らかにした。さらに、この GPI アンカーの構造変化は、タンパク質が小胞体出口部位へ濃縮されるための輸送シグナルとして機能していることを見出した。

研究成果の概要 (英文)：

Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchoring of proteins is a post-translational modification occurring in the endoplasmic reticulum (ER). Here, we established mutant cell lines that were selectively defective in transport of GPI-anchored proteins from the ER to the Golgi. We identified a responsible gene, designated *PGAP5* (post-GPI-attachment to proteins 5). *PGAP5* catalyzed the remodeling of the glycan moiety on GPI-APs. Our data demonstrate that GPI glycan acts as an ER-exit signal and suggest that glycan remodeling mediated by *PGAP5* regulates GPI-AP transport in the early secretory pathway

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：糖鎖生物学、タンパク質輸送

1. 研究開始当初の背景

細胞表面にはグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) とよばれる糖脂質によって修飾されたタンパク質が多く存在する

(哺乳動物には約 150 種類)。これらのタンパク質は GPI アンカー型タンパク質と呼ばれ、胚発生や免疫反応、神経形成において受容体や細胞接着因子などとして重要な役割を担

っている。小胞体で合成された GPI アンカー型タンパク質はゴルジ体を経由して細胞膜へ輸送される。GPI アンカー型タンパク質の特徴的な性質として、脂質ラフトと呼ばれる特殊な膜構造に濃縮されることが知られている (Brown et al. (1992) Cell 68: 533)。極性をもった細胞では、GPI アンカー型タンパク質はアピカル (頂端) 側へ特異的に輸送されるが、これはトランスゴルジネットワークからラフト依存的な輸送小胞に乗って運ばれている (Ikonen (2001) Curr. Opin. Cell Biol. 13: 470)。このように、GPI アンカーはタンパク質に特徴的な性質を付与し、タンパク質の輸送を制御している (Mayer et al. (2004) Nat. Rev. Mol Cell Biol. 5:110-20)。研究代表者はこれまでの研究で、GPI アンカー型タンパク質の輸送中に、GPI アンカー脂質の構造が変化していること、さらにそれが脂質ラフトへの濃縮に必須であることを突き止めている (Fujita et al., (2006) Mol. Biol. Cell 17: 5253)。しかしながら、GPI アンカーがどのように認識、選別されて輸送されるかについては未だ不明である。

2. 研究の目的

上記の問題を解決するため、本研究では GPI アンカー型タンパク質の細胞内輸送を制御する新規遺伝子を同定することを目的とした。研究代表者はこれまでに、GPI アンカー型タンパク質の輸送を経時的・定量的にモニターすることができる細胞株 (Maeda et al. (2008) Nat. Cell. Biol. 10: 1135) を用いて、変異株の取得を試み、GPI アンカー型タンパク質の輸送が特異的に遅延する新規変異株を取得している。本研究ではこの変異株の責任遺伝子を同定し、その機能を明らかにすることで GPI アンカー型タンパク質の輸送

機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究の目標を達成するために、以下のような方法で実験を行った。

- (1) 変異株責任遺伝子の発現クローニング：研究代表者が取得した GPI アンカー型タンパク質輸送異常変異株 (C19) に cDNA ライブラリーを導入し、レポーター GPI アンカー型タンパク質の輸送が野生株レベルに戻ることを指標にして、発現クローニングを行った。得られた cDNA について、変異株のゲノム上の責任遺伝子に変異があることを確認した。
- (2) 責任タンパク質の機能解析と変異株の性状解析：

「責任タンパク質の機能解析」では、① 責任タンパク質の細胞内における局在を蛍光顕微鏡および細胞分画で確認した。② GPI アンカー型タンパク質との結合を免疫沈降で確認した。③ 責任タンパク質の一次構造から酵素活性であると考えられたので、活性測定系を確立した。

- 「変異株の性状解析」では、④ 変異株の GPI アンカーの構造を質量分析装置により決定した。⑤ GPI アンカー型タンパク質の輸送を細胞生物学的 (蛍光顕微鏡による局在、輸送解析)、生化学的手法 (パルス・チェイス輸送アッセイ) を用いて詳細な解析をおこなった。
- (3) GPI アンカーの構造変化を認識するタンパク質の単離：

野生株および GPI アンカー型タンパク質輸送変異株を用いて、輸送レポータータンパク質 (VFG-GPI) と野生株特異的に共沈降するタンパク質を質量分析装置により同定した。

4. 研究成果

GPI アンカー型タンパク質の小胞体からゴルジ体への輸送が選択的に遅れる変異株

(C19) を用いて、発現クローニングにより責任遺伝子の同定を試みた。その結果、機能未知の新規遺伝子を取得し、PGAP5 (Post-GPI Attachment to Protein 5) と名付けた。PGAP5 を変異株に発現させることにより、GPI アンカー型タンパク質の輸送を回復させることができた。次に、変異株ゲノム上の PGAP5 変異を確認し、PGAP5 が変異株の責任遺伝子であることを明らかにした。

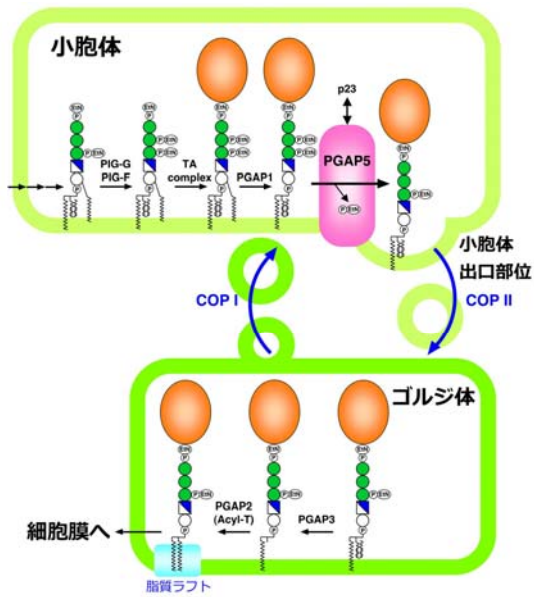


図1 : GPIアンカー型タンパク質の小胞体-ゴルジ体間の輸送と PGAP5の働き

PGAP5 は膜タンパク質をコードしており、ルーメン側にリン酸エステラーゼ・モチーフを有していた。このモチーフに保存されたアミノ酸を置換すると変異株の GPI アンカー型タンパク質の輸送遅延を回復させることができないことから、PGAP5 の機能に必須であることが示唆された。GPI アンカー糖鎖の構造を質量分析装置で解析した結果、野生株では GPI アンカー糖鎖の2つ目のマンノースに付加された側鎖エタノールアミンリン酸が除去されているのに対して、PGAP5 変異株では側鎖エタノールアミンリン酸が付加されたままであることが分かった。さらに、精製タンパク質を用いた酵素活性測定系を構築し、

PGAP5 が側鎖エタノールアミンリン酸の除去を行う酵素本体であることを明らかにした (図1)。これらのことから PGAP5 は GPI 糖鎖部分の構造を改変する活性を有しており、この反応が GPI アンカー型タンパク質の小胞体からゴルジ体への輸送に密接に関与していることが明らかとなった (Fujita et al. (2009) Cell, 139:352)。これらの結果は、真核生物で広く保存された翻訳後修飾である GPI アンカーの糖鎖構造が一群の膜タンパク質の輸送を調節しているという点で、小胞輸送における積み荷選別機構に新たな知見を提示するものがある。

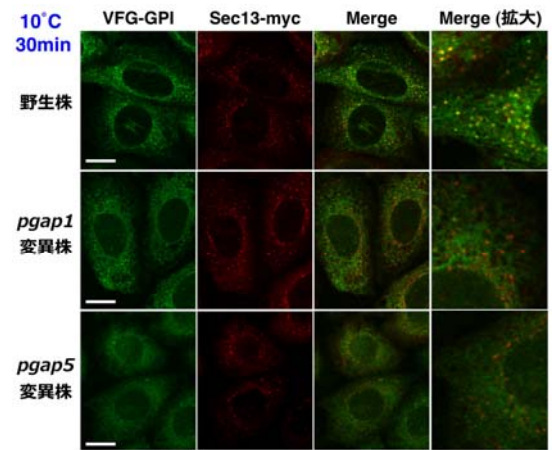


図2 : GPIアンカー型タンパク質の小胞体出口部位 (ERES) へのソーティング pgap1、pgap5変異株ではERESへのソーティングに欠損がある

上記解析中に、別の輸送遅延変異株として PGAP1 が欠損した変異株を新たに取得した。PGAP1 は小胞体において、GPI アンカーがタンパク質に付加された後、イノシトール残基に付加されているアシル基を除去する酵素である。この PGAP1 変異株においても GPI アンカー型タンパク質の小胞体-ゴルジ体間の輸送が顕著に遅延していた。研究代表者は PGAP1 および PGAP5 による GPI アンカーの2つの構造変化 (イノシトール脱アシル化、側鎖エタノールアミンリン酸の除去) が、どのようにタンパク質の輸送に関与しているか、

解析を行った。その結果、PGAP1 および PGAP5 欠損細胞では小胞体において COPII 小胞が形成され、タンパク質が輸送される部位「小胞体出口部位 (ER-exit sites)」へ GPI アンカー型タンパク質が濃縮されないを明らかにした。このことから、小胞体における GPI アンカーの構造変化は、ER-exit sites へのソーティングに必要であることが示された (図 2)。

そこで、野生株と PGAP1、PGAP5 変異細胞株を用いて、GPI アンカー型タンパク質に結合するタンパク質を質量分析により同定した。その結果、p23、p24 と呼ばれるタンパク質が野生株特異的に GPI アンカー型タンパク質と共沈することが分かった。p23、p24 は p24 ファミリーと呼ばれるタンパク質で、ファミリー間で複合体を形成し、小胞体とゴルジ体をリサイクリングするタンパク質である。これまでに出芽酵母のホモログが GPI アンカー型タンパク質 Gas1p の輸送に関与していることが分かっていたが、その詳細については明らかでなかった。我々の結果は、p23、p24 が構造変化 (リモデリング) した GPI アンカー特異的にタンパク質と結合し、輸送を行うカーゴレセプターとして機能していることを示すものである。現在、GPI アンカー型タンパク質の小胞体-ゴルジ体間の輸送における p24 ファミリータンパク質の役割をさらに検討している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

① Yuri Nakano, Morihisa Fujita, Kazutoyo Ogino, Louis Saint-Amant, Taroh Kinoshita, Yoichi Oda and Hiromi Hirata.,

Biogenesis of GPI-anchored proteins is essential for surface expression of sodium channels in zebrafish Rohon-Beard neurons to respond to mechanosensory stimulation. *Development* (2010) 137:1689-1698., 査読有

② Morihisa Fujita and Taroh Kinoshita., Structural remodeling of GPI anchors during biosynthesis and after attachment to proteins.

FEBS Lett. (2010) 584:1670-1677., 査読有

③ Morihisa Fujita, Yusuke Maeda, Moonjin Ra, Yoshiki Yamaguchi, Ryo Taguchi and Taroh Kinoshita.,

GPI-glycan remodeling by PGAP5 regulates transport of GPI-anchored proteins from the ER to the Golgi.

Cell (2009) 139:352-365., 査読有

[学会発表] (計 10 件)

① 藤田盛久、前田裕輔、木下タロウ. 小胞体における GPI アンカー型タンパク質の選別輸送機構,

BMB2010,

2010. 12. 7, 神戸市 (兵庫県)

② Morihisa Fujita and Taroh Kinoshita. Sorting of GPI-anchored proteins at the ER-exit site,

EMBO conference series: Towards a comprehensive understanding of endoplasmic reticulum functions,

2010. 10. 3 - 8, Girona (Spain)

③ Morihisa Fujita.

Sorting, trafficking and remodeling of

GPI-anchored proteins,
The 4th International Symposium of WPI
IFReC "Immunology at the Forefront",
2010. 6. 2, 吹田市 (大阪府)

④ 藤田盛久

GPI アンカー型タンパク質の輸送を制御する
糖鎖リモデリング

第7回 糖鎖科学コンソーシアムシンポジ
ウム、

2009. 12. 8、豊中市 (大阪府)

⑤ 藤田盛久、前田裕輔、羅紋眞、山口芳樹、
田口良、木下タロウ

GPI アンカーの構造変化によるタンパク質輸
送の制御

第82回 日本生化学会大会、

2009. 10. 22、神戸市 (兵庫県)

⑥ Morihisa Fujita, Yusuke Maeda, Moonjin
Ra, Yoshiki Yamaguchi, Ryo Taguchi, and
Taroh Kinoshita.

GPI-glycan remodeling by PGAP5 regulates
transport of GPI-anchored proteins from
the ER,

FASEB Summer Research Conferences:
Protein lipidation, signaling and
membrane domains,

2009. 7. 26-31, Saxtons River, Vermont
(USA)

[図書] (計2件)

① 藤田盛久、木下タロウ

GPI 付加によるタンパク質選別輸送・局在の
調節

実験医学増刊・分子から個体へと深化する脂
質生物学 (2010) 85 - 91

② 神澤範行、藤田盛久、木下タロウ

GPI アンカーの脂質・糖鎖リモデリング
実験医学 Vol. 28, No. 8 (2010) 1251-1256

[その他]

ホームページ等

[http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/me
n-eki-huzen/](http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/men-eki-huzen/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 盛久 (Fujita Morihisa)

大阪大学・微生物病研究所・特任助教
研究者番号：30532056