

## Biosynthesis of Glycolipid Anchors in *Trypanosoma brucei*

*Trypanosoma brucei* における糖脂質アンカーの生合成

Mark C. FIELD and Anant K. MENON

Laboratory of Molecular Parasitology, The Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York, NY 10021, USA.

FAX:1-212-570-7845

Keywords: GPI-Anchor/Trypanosome/Glycosylation/Variant Surface Glycoprotein

### Introduction

Addition of a glycosylphosphatidylinositol (GPI) membrane anchor to a protein represents both a novel means for holding proteins to lipid bilayers and for attaching carbohydrate to a polypeptide (Cross 1990). For these reasons there has been considerable interest in this recently characterized post-translational modification. Since the first description of the structure of the GPI-anchor from *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein (VSG) (Ferguson *et al.* 1988), detailed structural data for several other protein anchors and related molecules have been reported from species ranging from protozoan parasites to mammals (reviewed most recently by Thomas *et al.* 1990). The wide range of species shown to make GPI-anchored proteins demonstrates that this post translational modification probably appeared early in eukaryote evolution. Using the African trypanosome as an experimental model system, a pathway for the biosynthesis of the VSG GPI-anchor has been proposed. In this review we shall briefly discuss the simplest model consistent with the data available and highlight some alternative models and undocumented aspects of the biosynthesis of the GPI-anchor in trypanosomes. Also we shall describe some recent data on the developmental regulation of GPI-anchor biosynthesis in different life stages of *T. brucei*.

### The Simplest Model

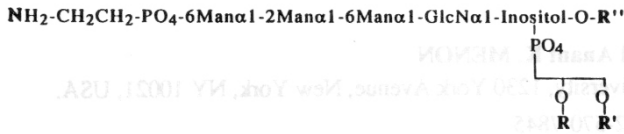
The common core of all GPI-anchors sequenced to date has the structure EthN-P-Man<sub>3</sub>GlcN-Inositol. The presence of additional substituents, e.g.,  $\alpha$ -galactose in some VSG variants (Ferguson *et al.* 1988), GalNAc and extra mannose and phosphoethanolamine in rat brain Thy-1 (Homans *et al.* 1988), has been reported but the function of these moieties remains unclear. Anchors with the minimal core structure have been identified in VSG from *T. brucei* (Ferguson *et al.* 1988) and gp63 from *Leishmania* (Schneider *et al.* 1990). Kinetic evidence suggests that the GPI-anchor is acquired in an early post-translational event involving replacement of a short carboxyl-terminal sequence in the target protein with a preformed glycolipid (Bangs *et al.* 1985, Ferguson *et al.* 1986). Preformed glycolipid precursors containing GPI-anchor components (e.g. mannose, ethanolamine) have been detected in bloodstream

### はじめに

蛋白質に対するGPI膜アンカーの付加反応は脂質二重層への蛋白質の埋まり込みの問題と、ポリペプチドに対する糖の結合という二つの新しい意味を持っている(Cross 1990)。これらの理由から、最近その特徴が明らかにされた、この翻訳後修飾に多くの興味を寄せられている。最初の*Trypanosoma brucei*のvariant surface glycoprotein(VSG)のGPIアンカーの構造についての報告以来(Fergusonら 1988)、原生動物の寄生虫からは乳類に至るまでの種から得られた、いくつかの蛋白質アンカーや関連分子についての詳細な構造データが報告されてきている(Thomasらの総説参照, 1990)。このように多くの種にわたってGPIアンカーがつくられるということは、このような翻訳後修飾が真核生物の進化の初期の段階で現れた可能性を示している。アフリカ産トリパノゾーマを実験的モデルシステムとして用い、VSGのGPIアンカー生合成の過程が提出されている。この総説において我々は今まで得られているデータを元にした最も簡潔なモデルについて簡単に述べると同時に、他のいくつかの異なったモデルとまだ出版されていない事柄についてもふれてみたい。また、*T. brucei*の異なった生活段階でのGPIアンカー生合成の発生活制御に関するいくつかの最近のデータについても述べたい。

### 最も簡潔なモデル

すべての配列が報告されているGPIアンカーの共通な骨格はEthN-P-Man<sub>3</sub>GlcN-Inositolという構造である。いくつかのVSG変異体においては $\alpha$ -ガラクトース等がさらに置換基として存在し(Fergusonら 1988)。またラット脳のThy-1においてはN-アセチルガラクトサミン、ヤマンノース、ホスホエタノールアミンの置換基がさらに存在する事(Homansら 1988)が報告されているが、これらの分子の役割については不明である。最小の骨格構造については、*T. brucei*のVSGや(Fergusonら 1988)*Leishmania*のgp63(Schneiderら 1990)のアンカーにおいて同定されている。生合成を時間的に追った研究によれば、初期の翻訳後修飾によりあらかじめ合成されている糖脂質が、目的の蛋白質の短いC末ペプチドと置き変わるによりGPIアンカーが結合する(Bangsら 1985, Fergusonら 1986)。GPIアンカーの構成成分(例えば、マンノース、エタノールアミン)を含む糖脂質前駆体はトリパノゾーマで同定されており(リビッドAとC; Krakowら 1986、リビッドP2とP3; Menonら 1988)、詳しく

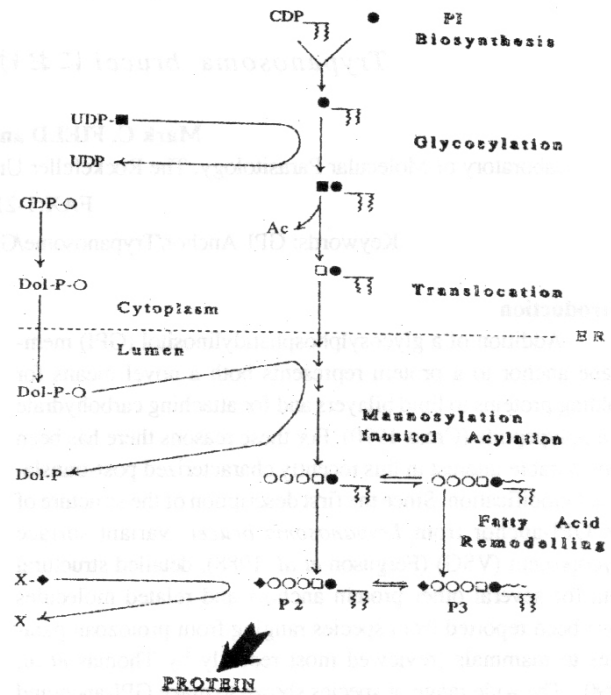


**Fig. 1. Schematic structure of the major GPI-anchor precursors in *T. brucei*.** P2 and P3 are seen in the mammalian bloodstream form, and PP1 in the procyclic (insect) form. P2; R = R' = myristate, P3; R = R' = myristate, R'' = palmitate, PP1; R = H, R' = stearate, R'' = palmitate. Fatty acid assignments for R'' and R' (PP1 only) made on the basis of metabolic labelling experiments only.

trypanosomes (Lipids A and C, Krakow *et al.* 1986, Lipids P2 and P3, Menon *et al.* 1988) and characterized in detail (Mayor *et al.* 1990 a, b, Fig. 1). P2 and P3 have a structure equivalent to a free GPI-anchor, with the amine of the ethanolamine underivatized. P3 differs from P2 solely by the presence of one or more fatty acid substituents on the inositol ring (Mayor *et al.* 1990b, see below). From these structural data the most obvious mechanism for the construction of the precursors would be by sequential glycosylation of phosphatidylinositol (PI), i.e. the addition of one glucosamine and three mannose residues followed by the addition of ethanolamine phosphate to the terminal mannose residue (Fig. 2). Glycolipids with the expected structures of intermediates on the pathway to construction of P2 and P3 were found in radiolabelling studies using crude lysates of *T. brucei* (Masterson *et al.* 1989, Menon *et al.* 1990a). These glycolipids contain glucosamine and zero to three mannose residues, apparently in the same linkages as seen in the VSG GPI-anchor and in P2 and P3 (Menon *et al.* 1990a). The glucosamine is derived from UDP-GlcNAc, and the first potential GPI-precursor is GlcNAc-PI, which is de-*N*-acetylated to GlcN-PI (Doering *et al.* 1989). All three of the mannose residues are derived from dolichol-P-mannose (dol-P-man, Menon *et al.* 1990b). The addition of ethanolamine phosphate to the Man<sub>3</sub> GPI-lipid appears to involve another lipid-linked donor, phosphatidyl-ethanolamine (AKM, S. Mayor, R.T. Schwarz, submitted). In addition to the glycosylation of the inositol, the fatty acids on the glycerol are altered (see below).

#### Other Aspects; Alternative Pathways and Topology of Glycosylation

The information outlined above provides evidence for a simple model for anchor biosynthesis. Except in the case of addition of GPI (P2 and P3) to polypeptide (S. Mayor, AKM,



**Fig. 2. Scheme for the biosynthesis of P2 and P3 GPIs in bloodstream trypanosomes.** In this model the GPI is translocated from the cytoplasmic face of the RER to the lumen as GlcN-PI. It is possible that the GPI in fact crosses the membrane at any point following synthesis of PI. The phospholipid is glycosylated and ethanolamine phosphate is added. Remodelling of the diglyceride and inositol acylation occur late in the sequence. PP1, the GPI in procyclics, is probably made by a similar pathway, with some alteration in the final phases.  
Key; ■; GlcNAc, ○; Mannose, □; GlcN, ◆; Ethanolamine phosphate, ●; Inositol, ●; Fatty acyl inositol, ●; Diacylglycerol.

調べられている(Mayerら 1990a, b, 図1)。P2とP3はエタノールアミンのアミンが置換されていない状態の、遊離のGPIアンカーと同じ構造を持っている。P3はイノシトール環に1つもしくはそれ以上の脂肪酸が置換されている点だけがP2と異なっている(Mayerら 1990b, 図1)。これらの構造データから推定される前駆体の作られる最も明かな過程は、PIの連続的なグリコシル化である。すなわち、まずグルコサミンが1つついて、つぎにマンノースが3つついて、そのほかにエタノールアミンリン酸がつくというものである(図2)。P2やP3の合成における中間体としての予想された構造を持つ糖脂質は、*T. brucei*の粗細胞溶解液を用いた放射性同位元素による標識実験により発見された(Mastersonら 1989, Menonら 1990a)。これらの糖脂質はグルコサミンと0から3つのマンノース残基を持っており、VSGのGPIアンカーやP2、P3におけるものと明らかに同じ結合構造を持っている(Menonら 1990a)。グルコサミンはUDP-N-アセチル

G.A.M. Cross, submitted, and see below) and the conversion of GlcNAc-PI to GlcN-PI (Doering *et al.* 1989), it has not been formally demonstrated that there is a true precursor-product relationship between the various structures identified, and we are left with an essentially static picture of steady-state levels of GPI-lipids in *T. brucei* membranes. With only this information, it is not possible to be confident that the suggested route for addition of monosaccharides to PI is correct or that it is the sole route by which P2 and P3 are built up. For example, it is a formal possibility that the species containing two mannose residues could be trimmed by an  $\alpha$ -mannosidase, with the subsequent addition of a dimannose saccharide. Whilst this is unlikely (most glycosylation reactions proceed by the addition of monosaccharide residues), such dol-P homopolymers have been detected in other systems (Spiro and Spiro, 1985). If mannosylation was to proceed exclusively by addition of single mannoses, it would be predicted that, under conditions of non-steady state labelling, the specific activity of the second mannose should be intermediate between that of the other two, as label would be diluted by pools of partially constructed GPI within the ER. However, methylation analyses show that the specific activity of the second (middle) mannose from ethanolamine-containing GPIs is lower than that of the first (linked to GlcN) (Menon *et al.* 1990b, MCF, AKM, G.A.M. Cross, submitted), consistent with a trimming and addition pathway rather than sequential addition. The trimming and addition model is not incompatible with the observations that dol-P- $^3\text{H}$ man labels all the mannose residues in P2 and P3, and therefore cannot be discounted. It has recently been shown that there exists more than one pathway for processing of glucosylated oligomannosidic glycans in mammalian cells (Moore and Spiro 1990), so the presence of more than one route for GPI-biosynthesis operating in the same cell remains a possibility.

Investigation of the biosynthesis of the  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PP-dol}$  donor for N-linked glycans has shown that UDP-GlcNAc can cross the ER membrane but GDP-Man cannot (Hirschberg and Snider 1987). In this case the GlcNAc residues are added to dol-P on the cytoplasmic face of the ER (Abeijon and Hirschberg 1990). The first five mannose residues are added from GDP-Man (Hirschberg and Snider 1987), and the lipid then crosses the ER membrane to the luminal leaflet where the last four mannose residues are added from dol-P-Man. Although dol-P-Man is formed from dol-P and GDP-Man in the cytoplasmic leaflet of the ER, it has been shown to partition into the luminal side (Hirschberg and Snider 1987).

There have been no studies of the topology of the glycosylation reactions leading to the formation of GPI. PI is synthesised from inositol and CDP-diglyceride on the cytoplasmic face of the RER (Bell *et al.*, 1981), and clearly the completed precursor must end up on the luminal face for addition to newly translocated polypeptide to occur. As UDP-GlcNAc, dol-P-

グルコサミンとして供給され、最初の予想されるGPI前駆体はGlcNAc-PIである。これが脱Nアセチル化によりGlcN-PIになる(Doeringら 1989)。3つのマンノース残基はすべてドリコール-P-マンノース (dol-P-man)から供給される(Menonら 1990b)。 $\text{Man}_3\text{GPI-lipid}$ に対するエタノールアミンリン酸の添加には他の脂質結合供給体であるホスファチジルエタノールアミンが関与している(AKM, S. Mayor, R.T. Schwarz, 投稿中)。イノシトールのグリコシル化にひきつづいてグリセロールの脂肪酸の変更が起こる(以下参照)。

他の考察 -他の経路とグリコシル化のトポロジー-

いままで述べた知見はアンカー生合成に対する簡潔なモデルに関する証明である。GPI (P2とP3)のポリペプチドに対する添加(S. Mayor, A.K.M., G.A.M. Cross, 投稿中、以下を参照)や、GlcNAc-PIのGlcN-PIへの変化の場合を除いて、種々の同定された構造間における、真の前駆体-生成物の関係は完全に証明されているわけではない。我々はいまだ*T. brucei*膜におけるGPI脂質の定常状態の最低限の静的見取り図の段階に留まっている。これらの知見のみによりPIに対する単糖の付加に対して予想されるこのような過程が正しいとか、P2やP3が合成される唯一の過程であるとかを確信することはできない。例えば、2つのマンノース残基を含む種類のものは、2つのマンノースが付加されたのちに、 $\alpha$ -マンノシダーゼにより切断される可能性もあるわけである。この可能性は確かに低いものではあるが(ほとんどのグリコシル化反応は単糖の付加によって起こる)、このような dol-P-ホモポリマーは他の系ではその存在が確認されている(Spiro & Spiro 1985)。もしマンノシル化がマンノース単糖の付加のみによって進行するとすると、非定常状態の取り込み条件であると仮定すれば、次のような予測がたてられる。すなわち、取り込みがER中にすでに存在する部分的に合成されたGPIにより薄められる事から、2つめのマンノースにおけるアイソトープの比活性は他の2つの中間の値になるはずである。しかしながら、メチル化による分析の結果では、エタノールアミンを含むGPIの2番目(中間)のマンノースの比活性は1番目(GlcNに結合している)のものより低い値であった(Menonら 1990b, MCF, AKM, G.A.M. Cross, 投稿中)。この結果は、連続的な結合のモデルよりも、切断-結合モデルの方に一致している。切断-結合モデルは dol-P- $^3\text{H}$ man によりP2とP3のすべてのマンノース残基がラベルされるという結果と矛盾するわけではない。従って、その可能性を否定する事はできない。最近、哺乳動物の細胞においてグリコシル化された、オリゴマンノースを含むグリカンの修飾過程に複数の経路が存在する事が報告されている(Moore & Spiro 1990)。従って、同じ細胞におけるGPI生合成に対して2つ以上の経路が存在する可能性も考えられるわけである。

N-結合糖鎖における $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PP-dol}$ 供与体の生合成に関する研究から、UDP-GlcNAcはERを透過できるがGDP-Manは透過できない事がわかった(Hirschberg & Snider 1987)。この系では、GlcNAc残基はERの細胞質側でdol-Pに結合する

Man and PE have access to both faces, addition of all the glycolipid headgroup substituents could occur on either side of the ER membrane. However, assuming that the enzymology of glycosylation is similar for both PI and dol-P, a single translocation for the growing GPI represents the most simple mechanism. It is possible that synthesis begins on the cytoplasmic face, by glycosylation of PI by UDP-GlcNAc and is followed by translocation to the ER luminal face, where three  $\alpha$ -mannose residues from dol-P-Man are then added. Until the relevant intermediates are localised to one or other face of the ER membrane, the step at which translocation takes place remains open to speculation.

Only a small fraction of the PI within the trypanosome cell is converted to GPI. The selection of specific PI for GPI assembly may be based on a structural feature (i.e., fatty acid composition), a membrane localisation effect (which could correlate with a structural subpopulation of PI) or stochastic selection. The observations that GPIs in *T. brucei* cannot be labelled with  $^3\text{H}$ -inositol in either the bloodstream or procyclic stage, whilst PI is efficiently labelled (our unpublished observations), suggests that a specific subpopulation of PI is utilized for GPI biosynthesis. In the case of the GPI-anchor from *Torpedo marmorata* the lipid composition is completely different to that of cellular PI, suggesting that a subpopulation is selected for GPI biosynthesis (Butikofer *et al.* 1990).

The mannosyltransferase activities within the ER lumen which are involved in construction of  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-dol}$ , are capable of synthesis of  $\text{Man}\alpha 1-2,3,6$  linkages, whilst the cytoplasmic transferases synthesise  $\text{Man}\alpha 1-2,3,6$  and  $\text{Man}\beta 1-4$  linkages. In the GPI-lipid glycan, the GlcN linkage to inositol and the  $\text{Man}\alpha 1-4$  linkage have not been seen in other lipid- or protein-linked glycans, whilst the  $\text{Man}\alpha 1-2,6$  linkages are common to the *N*-linked glycan pathway. It is not known if the same enzymes catalyze addition to GPI as well as dol-P linked species, but at least some of the ER glycosyltransferase activities involved in GPI synthesis must belong exclusively to this pathway. The influence of aglycons such as GlcN-PI and  $\text{GlcNAc}_2\text{-PP-dol}$  on the specificity of ER mannosyltransferases is uncharted at this time. In this regard, it should be borne in mind that the trypanosomatids have unique differences in their synthesis of *N*-linked glycans and subsequent processing of the glycans after they have become attached to protein (see Bosch *et al.* 1988 and references therein), so that an extrapolation from mammalian and avian systems (where most of the data on *N*-glycosylation have been obtained) to these organisms may not be warranted. However the core glycans of the GPI-anchors so far characterized are conserved between the protozoan parasites and mammals (e.g. VSG and Thy-1, Homans *et al.* 1988) so that at least some comparisons are valid, and the major features of the GPI biosynthetic pathway are probably conserved.

Further elaboration of the protein-linked GPI probably

(Abeijon & Hirschberg 1990). 最初の5つのマンノース残基はGDP-Manにより付加される(Hirschberg & Snider 1987)。次に脂質中間体はER膜を透過し、lumen側に運ばれ、そこで残りの4つのマンノース残基がdol-P-Manにより付加される。dol-P-Manはdol-PとGDP-ManによりERの細胞質側で形成されるが、lumen側に移動する事がわかっている(Hirschberg & Snider 1987)。

GPIの形成につながるグリコシル化のトポロジーに関する研究は行われていない。PIはRERの細胞質側でイノシトールとCDP-ジグリセライドから合成される(Bellら 1981)、そして、新たにlumen側に局在化されたポリペプチドに付加が起こるためには、最終的な脂質前駆体はlumen側に存在しなくてはならない。UDP-GlcNAc、dol-P-Man、PEはER膜のどちら側からも供給されるため、すべての糖脂質の極性基の付加はどちら側においても起こりうる。しかしながら、PIとdol-Pに対するグリコシル化の酵素反応が同じであると仮定すれば、GPI形成におけるトポロジー変化は1度きりであると仮定するのが最もすっきりした機構と言えるだろう。合成はまず細胞質側でのUDP-GlcNAcによるPIのグリコシル化で始まり、次にERのlumen側へのトポロジー変化が起こる。そして、引き続いてそこでdol-P-Manからの3つの $\alpha$ -マンノースの付加が起こる。対応する中間体がER膜のどちらに局在するのかがはっきりするまではどの段階でトポロジー変化が起こるかは仮説の域に留まっていると言えよう。

トリパノゾーマ細胞においては非常にわずかの部分のPIがGPIになる。GPI合成に利用される特定のPIを選択する基準は、その構造(例えば脂肪酸組成であるとか)、膜における局在化効果(これもPIの構造的な1グループと対応しているかも知れない)、あるいは、貯蔵のため選ばれた部分等に依存しているのかも知れない。*T. brucei*のGPIが血流中や前寄生期状態のいずれにおいても $^3\text{H}$ -イノシトールにより標識されない(我々の未発表データ)という事実は、GPI合成においてPIの特定の部分が利用されている事を示唆する。*Torpedo marmorata*のGPIアンカーの場合、脂肪酸の組成は細胞のそれとはまったく異なっている(Butikoferら 1990)。

ERのlumenにおいて $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-dol}$ の形成に関わっているマンノース転移酵素活性は $\text{Man}\alpha 1-2,3,6$ 結合の合成能を持っている。一方、細胞質のマンノース転移酵素は $\text{Man}\alpha 1-2,3,6$ 結合及び、 $\text{Man}\alpha 1-4$ 結合の合成能を持つ。GPI糖脂質においては、イノシトールに対するGlcNの結合や $\text{Man}\alpha 1-4$ 結合は他の脂質又は蛋白質結合糖鎖にはみられないが、 $\text{Man}\alpha 1-2,6$ 結合はN-結合糖鎖に共通のものである。GPIに対する付加においてもdol-P結合糖鎖の場合と同じ酵素が関与しているかどうかは判っていないが、少なくとも、GPI合成に関与しているERのいくつかのグリコシル転移酵素はもっぱらこの系に特異的であると考えられる。ERのグリコシル転移酵素の特異性に対するGlcN-PIや $\text{GlcNAc}_2\text{-PP-dol}$ などの基質の影響は現在判っていない。この点に関しては、トリパノゾーマ属はN-結合糖鎖の合成の過程やそれらが蛋白質に結合した後の糖鎖の修飾の過程にお



occurs as a late event (Bangs *et al.* 1988), and may take place within the Golgi cisternae. This location is consistent with the types of modifications seen, e.g. addition of galactose (VSG) and GalNAc (Thy-1), as it is known that galactosyltransferases and GalNAc transferases are present within the Golgi (Kornfeld and Kornfeld 1985). In the case of VSG, a variable number of  $\alpha$ -galactose residues are added to the core glycan at this stage. Similar to processing of *N* or *O*-linked glycans (Kornfeld and Kornfeld 1985), this results in microheterogeneity at a specific site, e.g. the major VSG 117 GPI-anchor species contains two to four  $\alpha$ -galactose residues (Ferguson *et al.* 1988). In addition, different VSG variants have a different overall number of  $\alpha$ -galactose residues, consistent with the view that the degree of processing is influenced by the polypeptide (Ferguson and Williams 1988). GPI-anchors from other proteins contain modifications other than  $\alpha$ -galactose, so that the cell type is also important in determining the final spectrum of structures present on the mature glycoprotein. However, as the data base of full GPI-anchor glycan structures is currently small it is not possible to draw detailed conclusions with regard to the control or importance of structural microheterogeneity.

In bloodstream form trypanosomes, a minor population of GPIs also contain  $\alpha$ -galactose substituents (S. Mayor, AKM, G.A.M. Cross, manuscript in preparation). Whilst the significance of this is unclear, one possibility is that the elaboration of these glycolipids is due to the escape of GPI, that have not been transferred to protein, from the ER to the Golgi, where they may then act as acceptors for glycosyltransferases. GPI headgroups larger than the core glycan have also been seen in procyclic form *T. brucei* (Field *et al.* submitted). In this regard it is interesting to note that ceramide-based glycolipids are synthesized in the Golgi, and are transported unidirectionally to the plasma membrane, and not back to the ER (van Meer 1989). A similar vectorial transport may affect GPIs that migrate into the Golgi, i.e. a retrieval pathway such as that seen for ER proteins (Pelham 1989) may not be present for glycolipids.

#### Fatty Acid Substituents; Remodelling and Inositol Acylation

The VSG anchor contains exclusively dimyristylglycerol (Ferguson *et al.* 1985), even though myristic acid is a rare fatty acid component of phospholipids in eukaryotic membranes. P2 and P3 (glycolipids A and C in Masterson *et al.* 1989) are the only GPIs to be labelled with  $^3\text{H}$ -myristate in a trypanosome *in vitro* system (Menon *et al.* 1990b), suggesting that the PI that is initially glycosylated is not dimyristylPI. It has subsequently been reported that the fatty acid at C1 of the glycerol is initially stearic acid (C18:0), but is remodelled to myristate in the mature GPI precursor P2 (Masterson *et al.* 1990). The original fatty acid at C2 of the glycerol has not been identified.

いて特徴的な違いを持っていることを心に止めておかねばならない(Boschら 1988及びその引用文献を参照)。従って、哺乳類や鳥類の系(N-グリコシル化に関するほとんどの結果はこれらの系で得られている)で得られた結果をトリパノゾーマにそのまま当てはめることはできないのかも知れない。とはいっても、GPIアンカーの骨格の糖鎖は、原生動物の寄生虫と哺乳類において、細部において多少の違いはあるにせよ、共通であることがすでに判っている事から、GPI合成経路の主な性質は共通であると考えられる。

蛋白質に結合したGPIのさらなる修飾は、これより後に、多分ゴルジ体で起こる(Bangsら 1988)。このことは、ガラクトース(VSG)やGalNAc(Thy-1)の付加等の観察される修飾のタイプが、ゴルジ体にガラクトース転移酵素やGalNAc転移酵素が存在するという事実と合致している(Kornfeld & Kornfeld 1985)。VSGの場合、この段階で種々の数の $\alpha$ -ガラクトースが付加される。N-又はO-結合糖鎖の修飾の場合と同様に、例えばVSG117の主たるGPIアンカーは2から4残基のガラクトースを持つというようなmicroheterogeneityを生み出す結果になっている。さらに、異なった種類のVSGは異なった $\alpha$ -ガラクトース残基数を持っているという事実は、修飾の程度はポリペプチドに影響されるという考え方と合致している(Ferguson & Williams 1988)。他の蛋白質のGPIアンカーは $\alpha$ -ガラクトース以外の修飾をもつ。だから、成熟糖蛋白質にみられる構造の最終的な型の決定においては細胞の種類もまた重要である。しかしながら、全GPIアンカー糖鎖構造のデータベースが現在非常に少ないことから、構造のmicroheterogeneityの調節や重要性に関するはっきりした結論を下すことは不可能である。

血液型トリパノゾーマにおいては、GPIの一部もまた $\alpha$ -ガラクトース残基をもっている(S Mayor, AKM, G.A.M. Cross, 投稿準備中)。このことの意味は不明であるけれども、一つの可能性としては、蛋白質に転移されなかったGPIがERからゴルジにのがれ、そこでグリコシル転移酵素の受容体として働くことにより、これらの糖脂質ができるというものである。骨格の糖鎖よりも大きなGPIの極性部分はprocyclic型の*T. brucei*においても観察される(Field *et al.* 投稿中)。この点に関しては、セラミド由来の糖脂質はゴルジで合成され、一方向的に細胞膜に移送され、ERには戻ってこない(van Meer, 1989)ということに注目すると良いであろう。同じ様な方向性をもった移送が、GPIがゴルジに移動する際にも働いているかもしれない。例えばER蛋白質の場合に観察されるような循環的な経路(Pelham 1989)は糖脂質の場合には存在しないのかもしれない。

#### 脂肪酸の置換; remodellingとイノシトールのアシル化

VSGアンカーはミスチン酸が真核細胞膜のリン脂質の組成としてはまれな脂肪酸であるにもかかわらず、例外なしにジミスチルグリセロールである(Fergusonら 1985)。P2とP3(糖脂質A及びC; Mastersonら 1989)はトリパノゾーマの*in vitro*の系で $^3\text{H}$ -ミスチン酸によってラベルされる唯一のGPIである

The mechanism for remodelling of the precursor involves the removal of the fatty acid at C2, followed by the addition of myristic acid in its place. The second fatty acid at C1, stearic acid, is similarly removed and replaced by myristate (Masterson *et al.* 1990). Therefore two lyso intermediates and a 1-stearyl, 2-myristyl species are produced during this process. A complication of this model involves the presence of the second GPI-lipid, P3 (Fig. 1). Like P2, P3 also contains only myristate in the glyceride portion (Mayor *et al.* 1990b) and therefore is also remodelled. However, the inositol residue in P3 may be labelled with palmitate.

P3, although present at levels comparable to P2 (Mayor *et al.* 1990a), is not found linked to VSG in the bloodstream trypanosome, despite being capable of transfer to VSG *in vitro* (S. Mayor, AKM, G.A.M. Cross, submitted). P3-type GPI-anchors do occur, e.g. in human erythrocyte acetylcholine esterase (Roberts *et al.* 1988) and the procyclic acidic repetitive protein (PARP) (Clayton and Mowatt 1989, our unpublished observations). It has been proposed that P3 functions during the remodelling process: the monomyristyl-P2 that must be generated during the exchange of the fatty acid at C1 would be quite polar and might not remain tightly associated with the ER membrane (Masterson *et al.* 1990). The inositol may then be acylated following the remodelling of the first fatty acid, and deacylated after completion of the second. Only a static picture of this process is available at present, and in the absence of kinetic data any proposal must remain hypothetical. Enzyme activities necessary for the remodelling (acyl-CoA transferase and phospholipase A1) have been described in *T. brucei* (Samad *et al.* 1988), although these enzymes have not been biochemically characterized in detail.

The acylation of the inositol could also be important in the selection of PI molecules for subsequent glycosylation (see above). The presence of the fatty acid could alter the conformation of the PI headgroup considerably, and therefore may provide a basis for the specificity of the UDP-GlcNAc: PI transferase reaction. Alternatively the acylation may facilitate the (probably) protein-mediated flip-flop of PI species so that the headgroup then faces the ER lumen. This latter possibility would also provide selectivity for the elaboration of the GPI headgroup, especially if the glycosylation reactions are all localized in the lumen.

The function of VSG GPI-glycan elaboration and the remodelling of the fatty acid substituents of the precursor P2 is as yet unclear. In other GPI-anchors analysed to date, (Thy-1 (Homans *et al.* 1988), human and bovine erythrocyte acetylcholine esterase (Roberts *et al.* 1988), and gp63 from *Leishmania* (Schneider *et al.* 1990)) there is no specific requirement for either a single or a highly restricted glyceride moiety in terms of alkyl or acyl substituents, and therefore the specificity seen in VSG cannot be a requirement of GPI-anchors *per se*. In

(Menonら 1990b)。このことは、最初にグリコシル化される PI がジミリスチルPIではないことを示している。グリセロールの C1の脂肪酸は最初ステアリン酸である(C18:0)が、成熟GPI前駆体P2においてはミリスチン酸に置き換えられる(Mastersonら, 1990)。グリセロールのC2の最初の脂肪酸が何であるのかは同定されていない。

前駆体のremodellingの機構は、C2の脂肪酸の除去が起こり、次いでそこにミリスチン酸が付加されるというものである。C1における2番目の脂肪酸であるステアリン酸も同様に除去され、ミリスチン酸に置き換えられる(Mastersonら, 1990)。従って2つのリン中間体と、1-ステアリル、2-ミリスチルなる分子種がこの過程で生成する。このモデルの完成には、2番目のGPI脂質P3(図1)の存在が関与する。P2やP3と同様にグリセライド部分にはミリスチン酸のみを含む(Mayorら 1990b)。そして、それゆえに同じ様に置換されている。しかし、P3のイノシトール残基は、パルミチン酸でラベルされるかもしれない。

P3はP2と同じ程度の量が存在する(Mayorら 1990a)。in vitroではVSGに転移されるにもかかわらず(S. Mayor, AKM, G.A.M. Cross, 投稿中)、血流中のトリパノゾームではVSGに結合された形では発見されない。P3-タイプのGPIアンカーは、例えばヒト赤血球のアセチルコリンエステラーゼ(Robertsら 1988)、procyclic酸性repetitive蛋白質(PARP)(Clayton & Mowatt 1989)等のように実際に存在する。P3はremodellingの過程において機能すると考えられている。C1の脂肪酸の置換の過程で生成すると考えられるモノミリスチル-P2は非常に極性が高く、ER膜に強く結合した状態で存在できないかもしれない(Mastersonら 1990)。従ってイノシトールは最初の脂肪酸のremodellingにひきつづいてアシル化され、2番目のアシル化が完成した後に脱アシル化されるのかもしれない。現在この過程については静的な知見が得られているだけで、速度論的なデータがない状態なので、そのような考えも仮説の域にとどまっている。remodellingに必要な酵素活性(acyl-CoA転移酵素とホスホリパーゼA1)は *T. brucei*において報告されている(Samadら 1988)が、これらの酵素についての生化学的な性質は明らかにされていない。

イノシトールのアシル化はまた後に続くグリコシル化を受けるPI分子の選択に際しても重要であるかもしれない(前を参照)。脂肪酸の存在はPI極性基の立体構造を変え、それが、UDP-GlcNAc: PI 転移酵素反応の特異性における重要な因子になっているかもしれない。また、アシル化は(おそらく)蛋白質により仲介されるERのlumen側にPI極性基が位置するように引き起こされるPI分子種のフリップ-フロップに影響するかもしれない。後者の可能性は特にグリコシル化反応がすべてlumenで起こると仮定した場合には、GPI極性基の伸長の際の選択性への関与にも関係している。

VSGのGPI-グリカンの生合成とP2前駆体の脂肪酸置換のremodellingとの関係は、いまだ明らかになっていない。他の分析が行われたGPI-アンカー[ヒトThy-1(Homansら 1988)、牛赤血球アセチルコリンエステラーゼ(Robertsら 1988)、リュース

fact, such a restriction cannot even be extended to other GPI-anchored proteins in *T. brucei* as different fatty acids are present on PARP (MCF and M.A.J. Ferguson, unpublished observation, see below), and therefore this peculiarity is restricted to VSG and its precursors and suggests functional importance.

The picture is made more complex in the bloodstream trypanosome by the presence of other GPI-species with acyl-inositol, at comparatively low levels, that are equivalent to the di- and trimannosylated species probably involved in the synthesis of P2 (Masterson *et al.* 1989, Menon *et al.* 1990, Fig. 2). The presence of these species may indicate that the synthesis of P2 and P3 is separate, perhaps diverging at the monomannosyl species or even earlier. Alternatively the acyl group on the inositol may be capable of being added and removed so that P2 and P3, and their respective precursors, are in equilibrium. It is also plausible that the presence of the smaller P3-type GPIs (see also a recent report of GlcN-acyl PI in *Saccharomyces cerevisiae* (Orlean 1990)) represents the promiscuity of the inositol acylase, and is not physiologically relevant. The control of the level of the P2 and P3 type of GPI precursors may be under developmental regulation, and is discussed in the next section.

#### Developmental Regulation

During the spread of infection *T. brucei* are taken from the blood of an infected mammal by Tsetse flies (*Glossina* spp.). The parasite undergoes significant biochemical and morphological alterations in the insect host. PARP and VSG are developmentally restricted in their expression, the former only seen on procyclic cells, and the latter only on bloodstream form (Roditi *et al.* 1989). It is important to realise that the environment that the trypanosome encounters in the insect host is vastly different from that in the mammalian bloodstream, not least of which is a 10 °C drop in temperature.

The GPI-anchor of PARP is PI-PLC resistant, suggesting a P3-type anchor structure (Clayton and Mowatt 1989). It is possible that an alteration in GPI biosynthesis accompanies the bloodstream to procyclic form transformation, but the presence of both P2 and P3 in bloodstream form trypanosomes is consistent with the alternative hypothesis that the specificity of the transferase responsible for adding the GPI to protein may be altered, so that P3 anchors are transferred in procyclic cells.

A GPI-lipid, PP1, with a structure similar to P3, has been identified in cultured procyclic (insect stage) cells (Field *et al.* submitted). PP1 contains an ethanolamine-phosphoglycerol and a palmitic acid substituent on the inositol ring identical to P3. However, the glyceride structure is very different to P3. PP1 lacks a fatty acid at the C2 of the glycerol, and has stearic acid at C1 (Fig. 1). Also procyclic cells are devoid of PI-PLC sensitive GPI species, so that a P2-type of GPI is not made by these cells (Field *et al.* submitted).

The phospholipid moiety in the GPI-anchor of PARP is

マニアのgp63(Schneiderら 1990)]においては、アルキルまたはアシル置換基といった部分に関しての、単一のまたは高度に限定されたグリセリド分子への特定の要求性は見つかっていない。それゆえに、VSGにおいて観察される特異性は、GPIアンカーそれ自体の要求性とはいえない。事実、そのような限定は、PARPには異なった脂肪酸が存在すること(MCF & M.A.J. Ferguson 未発表データ、以下を見よ)を見ても分かるとおり、*T. brucei*の他のGPIアンカー蛋白質にさえ当てはめることはできない。それゆえに、この特徴はVSG及びその前駆体のみに限定されており、その機能における重要性を示唆している。

血流中のトリパノゾーマの場合は比較的低レベルではあるが、アシル化されたイノシトールを持つ他のGPI種の存在により、事情はもっと複雑である。それらは多分P2の合成に関与する2つまたは3つのマンノース残基をもつ種に対応している(Mastersonら 1989, Menonら 1990, 図2)。これらの種が存在するという事実は、P2とP3の合成が、多分モノマンノシル型の時点またはもっと早い時点で分離した、別の経路である可能性を示している。一方、イノシトールのアシル基は、P2またはP3とそれらの前駆体が平衡になるように付加されたり、除去されることができのかもしれない。また、小さなP3タイプのGPI(*Saccharomyces cerevisiae*におけるGlcN-acyl PIに関する最近の報文を参照)(Orlean 1990)が、イノシトールアシラーゼの無差別的な作用を反映しており、生理的な寄与は少ない、という説ももっともらしい話ではある。GPI前駆体におけるP2およびP3タイプの量的な制御は発生制御のもとにおこなわれている可能性もあり、次の項で述べたい。

#### 発生の制御

感染の拡大においては、ツエツエバエ (*Glossina* 属)による、感染した哺乳動物の血液からの*T. brucei*の摂取がおこる。寄生虫は昆虫宿主の体内で有意の生化学的、形態学的変化をおこさう。PARPとVSGは発生段階においてその発現が制限されている。前者はprocyclic細胞にのみ存在するが、後者は血流型にのみ存在する(Roditi ら 1989)。昆虫宿主体内のトリパノゾーマが哺乳動物血流中のものとは、はるかに隔たった環境、すなわち少なくとも10 °Cも低い環境におかれていることを理解しておくことが大事である。

PARPのGPI-アンカーはPI-PLC抵抗性であり、このことはP3タイプのアンカー構造であることを示している。血流型からprocyclic型への形態変化にともなって、GPI生合成の変化が起こるといことも考えられる。しかし、血流型のトリパノゾーマにおいてP2とP3の両方が存在するという事は、GPIを蛋白質に付加する転移酵素の特異性が、例えばP3アンカーはprocyclic細胞において転移されるといふふうに変化する、というもう一つの仮説と合致している。

GPI脂質であるPP1はP3と類似した構造を持っており、培養procyclic細胞(昆虫段階)中で同定されている(Field *et al.* 投稿中)PP1はP3と同様にエタノールアミンリン酸化糖鎖およびイノシ



structurally similar to the phospholipid in PP1. Identical lipid fragments are released from PARP and PP1 by GPI-PLD and nitrous acid treatment, and the fatty acid composition at the two sites of fatty acylation are also the same (Field *et al.* submitted, and our unpublished observations). This evidence strongly suggests that PP1 is the precursor of the PARP anchor and that this anchor is very different from that on VSG.

Thus in contrast to the bloodstream form trypanosome, the procyclic cell produces GPI-lipids that are exclusively of the acyl-inositol (P3) type. The absence of myristic acid in the glyceride of PP1 shows that the remodelling process seen for P2 and P3 does not occur in the procyclic, and therefore is developmentally regulated. In this regard it is interesting to note that the fatty acid identified at the C1 of the glycerol in both PP1 and unremodelled P2/P3 is the same, i.e. stearate. PP1 resembles an aborted remodelling intermediate, in that the fatty acid at C2 is not present. There is currently no information about biosynthesis of PP1, and it is not known if PP1 is synthesised from a diacyl-PI or if the lyso structure is produced early or late in the pathway. The enzyme responsible for the putative deacylation of PP1 may or may not be the same as that acting on P2 and P3 during remodelling.

A further complication, with respect to the presence of both P2 and P3 in bloodstream trypanosomes, is the observation that P2, P3 and PP1 can be transferred to VSG in an *in vitro* system (S. Mayor, AKM, G.A.M. Cross, submitted). Whilst PP1 is not strictly relevant in this context as it is not present in bloodstream ER membranes, its transfer competence demonstrates that there is no requirement for dimyristoylglycerol-containing GPIs for addition to VSG. The ability of P3 to be transferred, despite the observation that no such GPI-anchor is seen on VSG *in vivo* is an enigma. Explanations for this could include either the loss of a cofactor in the *in vitro* system, which restricts transfer to P2, the sequestration of P3 *in vivo* in a compartment that is separate to that where transfer occurs, or the rapid inositol deacylation of a P3-type GPI-anchor following addition to protein. At present, it remains to be shown whether P2 and P3 are in equilibrium *in vivo*. In conclusion we suggest that the control of inositol deacylation is under developmental regulation.

### Concluding Remarks

The African trypanosome has provided an excellent system for the study of GPI-anchor biosynthesis. Investigations using the bloodstream form have detailed the structures of a mature GPI-anchor and its biosynthetic precursors, and in the procyclic form evidence for developmental regulation of GPI biosynthesis has emerged. At least two reactions in the pathway of GPI assembly involve lipid donors of GPI components, with implications for the membrane topology of the assembly process. However, descriptions of the subcellular membrane

トール環上にパルミチン酸残基を持っている。しかしながら、グリセライドの構造はP3と非常に異なっている。PP1はグリセロールのC2位の脂肪酸が欠けており、C1にはステアリン酸を持っている(図1)。また、procyclic細胞はPI-PLC感受性のGPI種を持っていない。そのため、P2タイプのGPIはこれらの細胞では合成されない(Field *et al.* 投稿中)。

PARPのGPIアンカーのリン脂質分子は構造的にはPP1のリン脂質と同じである。PARPとPP1からGPI-PLDや亜硝酸処理により同一の脂質成分が遊離される。そして、脂質アシル化の2つの部位の脂質組成もまた同じである(Field *et al.* 投稿中、及び我々の未発表データ)。この事実は、PP1がPARPアンカーの前駆体であることと、このアンカーはVSGのそれとは非常に異なっていることを強く示唆している。

このように、血流型トリパノゾーマに比して、procyclic細胞は、例外なくアシル-イノシトール(P3)タイプのGPI脂質を合成する。PP1のグリセライドにミリスチン酸がないことは、P2およびP3へのremodellingはprocyclicではおこらないということ、そのために発生的に制御されているということを示している。この点に関して、PP1とremodellされていないP2/P3におけるグリセロールのC1位の同定された脂肪酸は、同じステアリン酸であるということは興味深い。PP1はC2位における脂肪酸が存在しない型の、remodellingの中間体と似ている。PP1の生合成については、現在ほとんど何の報告もなされていない。また、PP1がジアシルPIから生成するのかどうか、そしてリゾ体の生合成が過程の早い時点で起こるのか、遅く起こるのかについても分かっていない。PP1の予想される脱アシル化に関する酵素が、P2やP3のremodellingに作用する酵素と同じかどうかははっきりしていない。

より複雑な事には、血流型トリパノゾーマに P2およびP3両方が存在することに関して、P2、P3及びPP1が *in vitro* システムでVSGに転移されうるという事実である (S.Mayorら 投稿中)。PP1は、それが血流中ER膜に存在しないという点においては厳密には適当でないかもしれないが、その競合的な転移はVSGへの付加においてジミリスチルグリセロールを含むGPIに対する要求性がないことを示している。P3が転移される能力は、*in vivo* ではそのようなGPIアンカーは見られないことからすれば、謎である。これに対する説明には、*in vitro* システムではP2に対する限定的な転移を行わせるような補助因子が失われたためであるとか、P3は*in vivo* では、転移が起こるような場所から隔離されて別の場所に押し込められているためであるとか、蛋白質に付加された後、急速にP3タイプのGPIアンカーのイノシトールの脱アシル化がおこるなどの理由が考えられる。現在、P2とP3が*in vivo* で平衡状態にあるかどうかは明かになっていない。結論として、われわれは、イノシトールの脱アシル化のコントロールは発生制御のもとに行われているということを示唆しておきたい。

おわりに

アフリカ産トリパノゾーマはGPIアンカーとその生合成の



localization of individual biosynthetic steps and the distribution of lipid intermediates still need to be obtained, and questions concerning the role of inositol acylation and the enzymology and control of GPI biosynthesis remain to be explored.

#### Acknowledgements

We thank S. Mayor for communicating unpublished data. This investigation was supported by NIH grant # AI21531 to G.A.M. Cross. We thank I. Curtis, B. Dylan and R. Wagner for stimulation.

#### References

- Abeijon, C., and Hirschberg, C.B., (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 14691-14695  
 Bangs, J., Hereld, D., Krakow, J., Hart, G., and Englund, P.T., (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 3207-1321  
 Bangs, J.D., Doering, T.L., Englund, P.T., and Hart, G.W., (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 17697-17705  
 Bell, R.M., Ballas, L.M., and Coleman, R.A., (1981) *J. Lipid Res.* **22**, 391-403  
 Bosch, M., Trombetta, S., Engstrom, U., and Parodi, A.J., (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 17360-17365  
 Butikofer, P., Kuypers, F.A., Shackleton, C., Brodbeck, U., and Steiger, S., (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 18983-18987  
 Clayton, C.E., and Mowatt, M.R., (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 15088-15093  
 Cross, G.A.M., (1990) *Ann. Rev. Cell Biol.* **6**, 1-39  
 Doering, T., Masterson, W., Hart, G.W., and Englund, P.T., (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 611-614  
 Ferguson, M.A.J., Duszenko, M., Overath, P., and Cross, G.A.M., (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 356-362  
 Ferguson, M.A.J., and Williams, A., (1988) *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 285-320  
 Ferguson, M.A.J., Homans, S.W., Dwek, R.A., and Rademacher, T.W., (1988) *Science* **239**, 753-759  
 Field, M. C., Mennon, A. K., and Cross, G. A. M., (1991) *J. Biol. Chem.* **266** in press.  
 Hirschberg, C.B., and Snider, M.D., (1987) *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 63-87  
 Krakow, J., Hereld, D., Bangs, J., Hart, G.W., and Englund, P.T., (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 12147-12153  
 Kornfeld, R., and Kornfeld, S., (1985) *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 631-664  
 Masterson, W.J., Doering, T., Hart, G.W., and Englund, P.T., (1989) *Cell* **56**, 793-800  
 Masterson, W.J., Raper, J., Doering, T., Hart, G.W., and Englund P.T., (1990) *Cell* **62**, 73-80  
 Mayor, S., Menon, A.K., Ferguson, M.A.J., Dwek, R.A., Cross, G.A.M., and Rademacher, T.W., (1990a) *J. Biol. Chem.* **265**, 6164-6173  
 Mayor, S., Menon, A.K., and Cross, G.A.M., (1990b) *J. Biol. Chem.* **265**, 6174-61781  
 McConville, M.J., Homans, S.W., Thomas-Oates, J.E., Dell, A., and Bacic, A., (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 7385-7394  
 Menon, A.K., Mayor, S., Ferguson, M.A.J., Duszenko, M., and Cross, G.A.M., (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 1970-1977  
 Menon, A.K., Schwarz, R.T., Mayor, S., and Cross, G.A.M., (1990a) *J. Biol. Chem.* **265**, 9033-9042  
 Menon, A.K., Mayor, S., and Schwarz, R.T., (1990b) *EMBO J.* **9**, 4249-4258  
 Moore, S.E.H., and Spiro, R.G., (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 13104-13112  
 Orlean, P., (1990) *Mol. Cell Biol.*, **10** 5796-5805  
 Pelham, H.R., (1989) *EMBO J.* **11**, 3171-3178  
 Roberts, W.L., Santikarn, S., Reinhold, V.N., and Rosenberry, T.L., (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 18776-18784  
 Roditi, I., Schwarz, H., Pearson, T.W., Beecroft, R.P., Liu, M.K., *et al.* (1989) *J. Cell Biol.* **108**, 737-746  
 Samad, A., Licht, B., Stalmach, M.E., and Mellors, A., (1988) *Mol. Biochem. Parasitol.* **29**, 159-169  
 Schneider, P., Ferguson, M.A.J., McConville, M.J., Mehlert, A., Homans, S.W., and Bordier, C., (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 16955-16964  
 Spiro, M.J., and Spiro, R.G., (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 5808-5815  
 Thomas, J.T., Dwek, R.A., and Rademacher, T.W., (1990) *Biochemistry* **29**, 5413-5422  
 van Meer, G., (1989) *Ann. Rev. Cell Biol.* **5**, 247-275

研究に非常に有効な系であるといえる。血流型を用いた研究は成熟型GPIアンカーとその生合成における前駆体の詳細な構造を提供し、procyclic型における研究は、GPI生合成における発生的制御の存在することを明かにした。GPI生合成の過程には、生合成過程における膜のトポロジーと密接にかかわり合いながら、少なくとも2つの反応に、GPI成分の脂質結合供与体が関与している。しかしながら、個々の生合成過程が、膜のどの部位で行われているかについての詳細や、脂質中間体の分布についての詳細を得ることが、これからの課題である。また、イノシトールのアシル化やGPI生合成の酵素化学や制御についても明かにすべき問題として残されている。

名古屋大学 薬学部製薬学科

田口 良 訳