

ヒト・ドリコールリン酸マンノース合成酵素に関する 物理的相互作用の解析

高橋 哲夫^{*1} 山田 直人^{*2} 栗本 昇^{*3}

Analyses on the Physical Interactions of the Human Dolichyl-Phosphate Mannose Synthase

by

Tetsuo TAKAHASHI^{*1}, Naoto YAMADA^{*2} and Noboru KURIMOTO^{*3}

(Received on Apr. 4, 2017 and accepted on Jul. 6, 2017)

Abstract

In eukaryotes, dolichyl-phosphate mannose (DPM) is an important compound for biosynthesis of glycoconjugates in the rough endoplasmic reticulum (rER). Thus, the dolichyl-phosphate mannose synthase (DPMS), which catalyzes the transfer of mannose from GDP-mannose (GDP-Man) to dolichyl-phosphate (Dol-P) to produce DPM is an essential enzyme for cellular viability. In this study, first we investigated the physical interactions among the three subunits, hDPM1, hDPM2 and hDPM3, which constitute the human DPMS, using the yeast split-ubiquitin system. The results indicated that both termini of hDPM3 might closely interact with the N-terminus of the hDPM1 and weakly interact with the N-terminus of hDPM2. Next, we explored the physical interactions of hDPM2 and hDPM3 with other enzymes involved in the assembly of dolichol-linked oligosaccharides (DLOs). The data obtained demonstrated that both hDPM2 and hDPM3 might interact with the human dolichyl-phosphate glucose synthase (hDPGS), dolichol kinase (hDK) and hALG9 mannosyltransferase. These observations will provide useful information for elucidation of the regulatory mechanism of glycosylation systems in the rER membrane.

Keywords: Dolichyl-phosphate mannose synthase, Dolichyl-phosphate mannose, Dolichol-linked oligosaccharide, Physical interaction, Yeast split-ubiquitin system

1. 緒論

真核生物の粗面小胞体(rough endoplasmic reticulum; rER)では、細胞の生存に必要な様々な種類の複合糖質(glycoconjugate)が生じており、それらの生合成に必要とされる糖転移酵素の大半はrER膜に局在している。4つの主だった複合糖質の生合成システム、すなわち蛋白質に対するN-グリコシル化、グリコシルホスファチジルイノシトール(glycosyl phosphatidyl inositol; GPI)アンカーの付加、O-マンノースの付加及びC-マンノースの付加にはドリコールリン酸マンノース(dolichyl-phosphate mannose; DPM)が必要不可欠である。このDPMの産生に働くのが本研究の対象とするDPM合成酵素(dolichyl-phosphate mannose synthase; DPMS)であり、本酵素は細胞質に存在する糖スクレオチドであるGDP-マンノース(GDP-Man)からマンノース残基をrER膜中に含まれるドリコールリン酸(Dol-P)に転移する反応を触媒している(Fig.1)。本酵素は酵母といった単細胞からヒトなどの動物細胞に至るまで真核細胞で広く進化上保存されているが、出芽酵母のように酵素蛋白質のアミノ酸配列情報が1遺伝子にコ

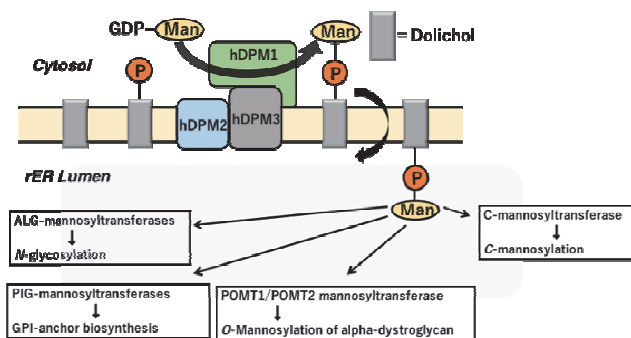


Fig. 1 Schematic presentation of structure and function of the human dolichyl-phosphate mannose synthase.

ード化されているもの¹⁾と3遺伝子に分断されてコードされているもの²⁾に生物種により大きく分かれる。ヒトは後者であり、hDPM1、hDPM2及びhDPM3の3サブユニットがそれぞれの遺伝子から蛋白質に翻訳された後に、rER膜上で1つの複合体を形成することで酵素活性を発揮する³⁾。したがって、個々のサブユニットの状態では機能せず、どのサブユニットも酵素活性にとって不可欠であることが培養細胞の変異株を用いた研究により示されている^{4,5)}。hDPM1は触媒部位を有する触媒サブユニットであり、細胞質に局在する。hDPM2及びhDPM3は、

*1 工学部生命化学科准教授

*2 工学部生命化学科学部生

*3 工学研究科工業化学専攻修士課程

それぞれ 2 つの膜貫通ドメイン(TMD)を有する rER 膜局在蛋白質であり, hDPM1 に対する活性調節サブユニットとして機能している(Fig.1). 免疫抗体を用いた生化学的研究より 3 サブユニットの複合体形成は証明されているものの^{3,6)}, 物理的相互作用にあたりそれぞれのどの部位が重要であるかは示されていないことから, 本研究ではまずそれを解明すべく 3 サブユニット間の物理的相互作用の詳細を酵母 split-ubiquitin システム⁷⁾を用いて解析することにした.

我々はこれまでに蛋白質の *N*-グリコシル化に用いられるドリコール中間体 (Dolichol-linked oligosaccharide; DLO) の生合成に働く rER 膜局在糖転移酵素の間での協調作用を立証すべく, これらの酵素間の物理的相互作用を酵母 split-ubiquitin システムを利用して解析を行い, 今までに見出されていなかった多くの 2 種類糖転移酵素間での物理的相互作用を報告してきた⁸⁾. DLO 生合成において DPMS は, rER 内腔側で働く 3 種類のマンノース転移酵素(ALG3, ALG9, ALG12)に対してそれらが利用する供与待基質 DPM を提供する一方で, 自身の酵素反応に必要な Dol-P 基質に関して *N*-アセチルグルコサミン-1-リン酸転移酵素(*N*-acetylglucosamine-1-phosphate transferase; GPT)及びドリコールリン酸グルコース合成酵素(dolichyl-phosphate glucose synthase; DPGS)と競合関係にある. これらの事実は, DPMS も DLO 生合成関連酵素のどれかと密接に関わっていることを示唆している. そこで我々は本研究の後半で DPMS とこれらの酵素間の物理的相互作用の有無を検証することにした.

2. 酵母 split-ubiquitin システム用組換えプラスミドの調製及び解析手順

最初に hDPM2 及び hDPM3 について, *N*-末端または *C*-末端に Cub-LexA/VP16 を融合したベイト蛋白質を酵母細胞内の rER 膜で発現させるために各遺伝子をそれぞれ

ベクター pBT-N または pBT-STE にクローニングしたベイトコンストラクトを作製した⁹⁾. また hDPM1, hDPM2 及び hDPM3 について, *N*-末端または *C*-末端に NubG を融合したプレイ蛋白質を酵母細胞内の rER 膜で発現させるために各遺伝子をそれぞれベクター pPR-N または pPR-C にクローニングしたプレイコンストラクトを作製した⁹⁾. 各ベクターへのクローニング用の各遺伝子は Table 1 に示したフォワード(fw)プライマー及びリバース(rv)プライマー (全てグライナー・ジャパンにより受託合成)を用いた PCR により調製した. これらのプライマーの 5'末端側には, 4 種類のベクター(pBT-N, pBT-STE, pPR-N 及び pPR-C)に連結するために制限酵素認識 *Sfi* I 認識配列を含みそれぞれ異なる配列を付加した. PCR は KOD Plus Ver.2 (TOYOBO)及びヒト肝臓由来 cDNA プール(クロンテック)をそれぞれ酵素と鋳型 DNA として使用した. 増幅した DNA とベクターを制限酵素 *Sfi* I で処理した後, DNA リガーゼ(TOYOBO)によるライゲーション反応を行い, 大腸菌 JM109 を形質転換することで 10 種類の各コンストラクト(pPR-N-hDPM1, pPR-C-hDPM1, pBT-N-hDPM2, pBT-STE-hDPM2, pPR-N-hDPM2, pPR-C-hDPM2, pBT-N-hDPM3, pBT-STE-hDPM3, pPR-N-hDPM3, pPR-C-hDPM3)を作製した.

さらに, DPM2 及び DPM3 に関しては第 1 膜貫通ドメインのみを有し, 第 2 膜貫通領域と *C* 末端側の細胞質ループ領域を欠失した蛋白質(hDPM2S 及び hDPM3S)を発現するためのコンストラクト(pBT-N-hDPM2S, pBT-N-hDPM3S, pPR-N-hDPM2S 及び pPR-N-hDPM3S)も同様の手順により作成した¹⁰⁾.

なお,他の DLO 関連酵素に関しては, 各酵素の遺伝子からほぼ同様の手順により各コンストラクトの作製を既に完了している. 本研究では, ヒトのドリコールリン酸グルコース合成酵素(hDPGS), GlcNAc-1-リン酸転移酵

Table 1 PCR primers used in this study.

Primer name	Nucleotide sequence	Purpose
HsD1PN_fw	5'-tgtaatggccattacggccATGGCCTCCTTGGGAAGTCAGTCG-3'	PCR cloning of hDPM1 into pPR-N or pPR-C
HsD1PN_rv	5'-gcctttggccgaggcggccTTATGTAGTAGCAAAAAGAGTCAATAATC-3'	PCR cloning of hDPM1 into pPR-N or pPR-C
HsD2BP_fw	5'-tgtaatggccattacggccATGGCCACGGGGACAGACCAGGTG-3'	PCR cloning of hDPM2 into all type of vectors used
HsD2BP_rv	5'-gcctttggccgaggcggcCTGAGCCTTCTTGGTCACTCTCTTGG-3'	PCR cloning of hDPM2 into all type of vectors used
HsD3BP_fw	5'-tgtaatggccattacggccATGACGAAATTAGCGCAGTGGCTTTGG-3'	PCR cloning of hDPM3 into all type of vectors used
HsD3BP_rv	5'-gcctttggccgaggcggcCAGAAGCGCAGCCCCCTGCGGGC-3'	PCR cloning of hDPM3 into all type of vectors used
D2TM1_rv	5'-gcctttggccgaggcggcCTTGTGGATGACATGCTGACTG-3'	PCR subcloning of hDPM2 truncated version
D3TM1_rv	5'-gcctttggccgaggcggcGCGGGCAGTGGCCACAGG-3'	PCR subcloning of hDPM3 truncated version

素(hGPT), ドリコールキナーゼ(hDK1), 3 種類の DPM 依存性マンノース転移酵素(hALG3, hALG9 及び hALG12) の 6 種類の酵素に関する 9 種類のプレイコンストラクト (pPR-N-hDPGS, pPR-C-hDPGS, pPR-N-hGPT, pPR-C-hGPT, pPR-N-hDK1, pPR-C-hDK1, pPR-N-hALG3, pPR-N-hALG9, 及び pPR-N-hALG12) を使用した^{9,10)}。

次にこれらのベイト及びプレイコンストラクトを 1 つずつ組み合わせさせて酵母 NMY51 株を二重形質転換し, SD-LW 形質転換選択培地を用いて 30℃で 3 日間静置培養した。その後各 SD-LW 寒天培地上で得られた様々な種類のベイト/プレイ共発現株を相互作用検出用培地 (SD-LWH 及び SD-LWHA) に一定量ずつスポットし, 30℃で数日間(最大で 5 日間まで)培養しながら各プレート上での増殖性を経日的に観察した。

3. hDPMS を構成する 3 サブユニット間の物理的相互作用

酵母 split-ubiquitin システムは 2 つの膜間蛋白質間の物理的相互作用の有無を解析するために開発された, 酵母ツーハイブリット技法の一種である⁷⁾。本システムでは, 酵母細胞内で共発現させたベイトとプレイの 2 つの膜蛋白質において rER 膜の細胞質側に配向する末端にそれぞれ付加した Cub (ユビキチンの C 末端半分) と Nub (ユビキチンの N 末端半分) が細胞質側で再会合し split-ubiquitin を生じることでレポーター遺伝子 *HIS3* 及び *ADE2* の発現が誘導されてヒスチジンを欠如する最少栄養の合成培地 SD-LWH やヒスチジンとアデニンを欠如する最少栄養の合成培地 SD-LWHA 上で増殖可能となる性質を利用している。その際に陽性対照プレイの pAI-Alg5 に付加した野生型の NubI は Cub と自発的に再会合できるのでに対して, pPR-N または pPR-C ベクターに用意された変異型の NubG は Cub と再会合するためにベイト/プレイ膜蛋白質間の相互作用を必要とする⁷⁾。本研究で使用するベイトコンストラクトは全て, 陽性対照プレイの pAI-Alg5 の共発現によりレポーター遺伝子の発現誘導を生じることが事前に確認されており, 酵母細胞内において付加した Cub タグが細胞質に配向していることが保証されている。また用いた全てのプレイコンストラクトに関しても, ベイトコンストラクトで細胞質側への配向が確認された末端にのみ NubG タグを付加している⁸⁾。

hDPMS の 3 つのサブユニット間の物理的相互作用を酵母 split-ubiquitin システムにより解析した結果を Fig. 2 及び Fig.3 に示す。まず hDPM2 をベイトとして用いた場合, pBT-N-hDPM2 及び pBT-STE-hDPM2 のベイトコンストラクトはいずれも, 陰性対照プレイの pDL-Alg5(細胞質側に NubG タグを発現する)との共発現では相互作用検出用培地(SD-LWH 及び SD-LWHA)上での増殖性を生じず, 陽性対照プレイの pAI-Alg5(細胞質側に NubI タグを発現する)との共発現では両培地上での増殖性を生じることから(Fig.2A), ベイト膜蛋白質の hDPM2 の N 末端及び C 末端は細胞質側に配向していることが再び確認された。その上で pBT-N-hDPM2 / pPR-N-hDPM3 共発現株

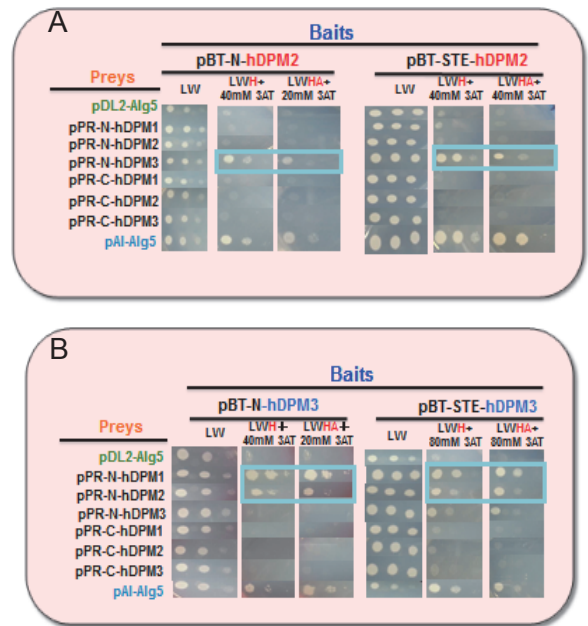


Fig. 2 Growth examination of co-transformants with bait / prey constructs. The hDPM2 and hDPM3 bait constructs were used in panel A and B, respectively.

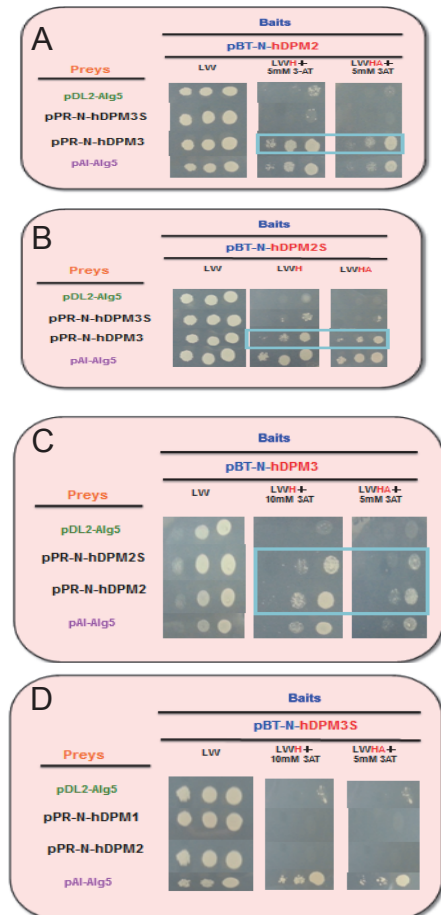


Fig. 3 Growth examination of co-transformants with bait / prey constructs. The hDPM2, hDPM2S, hDPM3 and hDPM3S bait constructs were used in panel A, B, C and D, respectively.

及び pBT-STE-hDPM2 / pPR-N-hDPM3 共発現株に関して SD-LWH 及び SD-LWHA 両培地上での増殖性が観察された(Fig.2A)。これらの結果から、hDPM2 の N 末端と C 末端両方は、hDPM3 の N 末端と物理的に相互作用していることが示唆された。従来の共免疫沈降法を用いた生化学的な解析の報告では、rER 膜局在サブユニットである hDPM2 は細胞質サブユニットである hDPM1 とは直接結合していないことが実証されていたが⁶⁾、酵母 split-ubiquitin システムによる今回の我々の解析でも hDPM2 ベイト / hDPM1 プレイの共発現株は SD-LWH 及び SD-LWHA 培地上で増殖性を示さなかった(Fig. 2A)。

次に、hDPM3 をベイトとして用いた場合でも、hDPM3 の N 末端及び C 末端は細胞質側に配向していることが pDL-Alg5 及び pAI-Alg5 の対照プレイとの共発現株の増殖性から再び確認された(Fig. 2A)。そして pBT-N-hDPM3 / pPR-N-hDPM1 共発現株及び pBT-N-hDPM3 / pPR-N-hDPM2 共発現株に関して SD-LWH 及び SD-LWHA 培地上で増殖性が見られたことから(Fig.2B)，hDPM3 の N 末端は、hDPM1 及び hDPM2 両方の N 末端と相互作用していることが示唆された。さらに、pBT-STE-hDPM3 / pPR-N-hDPM1 共発現株、pBT-STE-hDPM3 / pPR-N-hDPM2 共発現株でも同様の増殖性が見られたことから(Fig.2B)，hDPM3 の C 末端の方も、hDPM1 及び hDPM2 両方の N 末端と相互作用していることが示唆された。

さらに本研究では、それぞれ hDPM2 及び hDPM3 の第 2 膜貫通領域及び C 末端細胞質ループ領域を欠失した hDPM2S 及び hDPM3S を発現するコンストラクトを作製し、物理的相互作用の解析を行った(Fig.3)。その結果、hDPM2S 及び hDPM3S の N 末端は、欠失操作によりその配向性に変化を生じない(すなわち依然として細胞質側に配向する)ことが、pDL-Alg5 及び pAI-Alg5 の対照プレイとの共発現株の増殖性から確認された(Fig. 3B 及び D)。加えて、pBT-N-hDPM3 / pPR-N-hDPM2S 共発現株及び pBT-N-hDPM2S / pPR-N-hDPM3 共発現株では増殖性が検出され、hDPM2S は依然として hDPM3 との相互作用を維持可能であることが示唆された(Fig.3B 及び C)。すなわちこれらの結果は、hDPM2 の N 末端側の第 1 膜貫通領域が、hDPM3 との相互作用に重要であることを示している。

一方で、hDPM3S のコンストラクトを使用した増殖検定では、hDPM1 及び hDPM2 との共発現株は SD-LWH 及び SD-LWHA 培地上で増殖性を全く示さなかった(Fig.3A, B 及び D)。これらの結果は、hDPM3 の第 2 膜貫通領域及び C 末端細胞質ループ領域のどちらかあるいは両方が他のサブユニットとの相互作用に必須であることを示唆している。

4. hDPMS と DLO 生合成関連酵素との物理的相互作用

続いて、DLO 生合成に働く 6 種類の糖転移酵素群をプレイとした場合の酵母 split-ubiquitin システムによる解析の結果を Fig. 4 及び Fig.5 に示す。用いたプレイコン

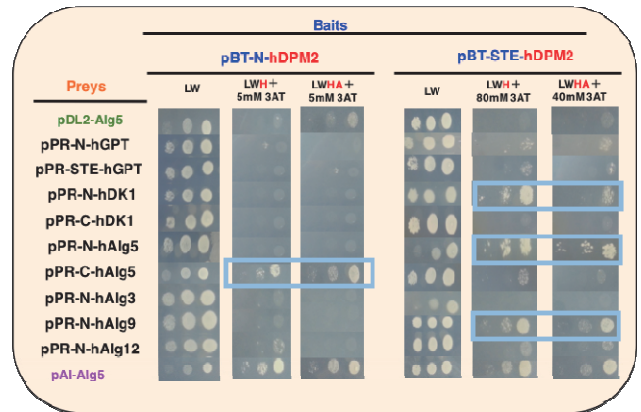


Fig. 4 Growth examination of co-transformants with bait / prey constructs. The hDPM2 bait constructs and prey constructs of various glycosyltransferases involved in DLO biosynthesis were used.

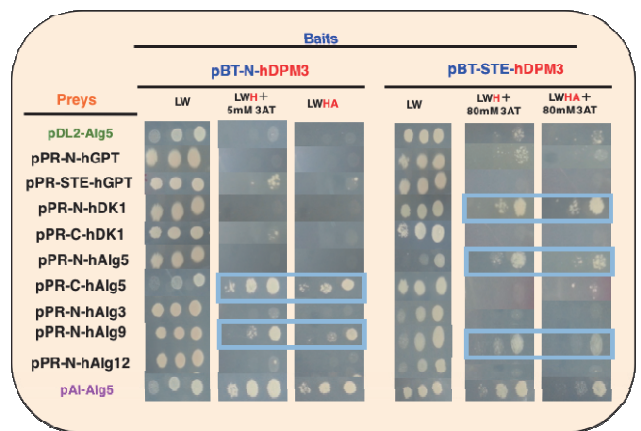


Fig. 5 Growth examination of co-transformants with bait / prey constructs. The hDPM3 bait constructs and prey constructs of various glycosyltransferases involved in DLO biosynthesis were used.

ストラクトにおいて NubG タグを付加した末端は、Cub タグを付加した各ベイトコンストラクトと対照プレイ (pDL-Alg5 または pAI-Alg5) の共発現株の解析により rER 膜の細胞質側に配向することが既に確認されている⁸⁾。

hDPM2 をベイトコンストラクトに使用した場合、pBT-N-hDPM2 / pPR-C-hDPGS 共発現株、pBT-STE-hDPM2 / pPR-N-hDK1 共発現株、pBT-STE-hDPM2 / pPR-N-hDPGS 共発現株及び pBT-STE-hDPM2 / pPR-N-hAlg9 共発現株で SD-LWH 及び SD-LWHA 培地上での増殖性が見られた(Fig.4)。これらの結果から、hDPM2 の N 末端は hDPGS の C 末端と、また hDPM2 の C 末端は、hDK1、hDPGS、及び hALG9 の N 末端と相互作用していることが示唆された。

次に hDPM3 をベイトコンストラクトに使用した場合、pBT-N-hDPM3 / pPR-C-hDPGS、pBT-N-hDPM3 / pPR-N-hAlg9 共発現株、pBT-STE-hDPM3 / pPR-N-hDK1、pBT-STE-hDPM3 / pPR-N-hDPGS 及び pBT-STE-hDPM3 / pPR-N-hAlg9 共発現株で増殖性が見られた(Fig.5)。これらの結果から、hDPM3 は両末端付近を介して hDPGS 及び hALG9 と密接に相互作用し、N 末端はさらに、hDK1 と相互作用していることが示唆された。

以上の結果をまとめると、hDPM2 及び hDPM3 の両者とも hDK1, hDPGS 及び hALG9 と rER 膜上で密接に関連していることが示唆された。hDPMS 酵素複合体において、触媒部位は細胞質に存在する hDPM1 中に含まれるが、rER 膜に局在する hDPM2 及び hDPM3 は、本酵素の受容体基質であり rER 膜中に存在する Dol-P を確保することに働いている。この Dol-P を産生するのが hDK1 であることから rER 膜中で生合成された Dol-P を効率よく利用するために、hDPM2/hDPM3 複合体は hDK1 近傍に存在することが本実験結果から想定される。また、hDPGS も DK1 が産生する Dol-P を受容体基質として利用しつつ、hDPMS と強調して DLO 生合成後半で働く糖転移酵素群に基質(DPM 及び DPG)を提供する必要があることから、hDPGS との物理的相互作用は極めて合理的と考えられる。

さらに本研究結果より、DPM を利用する 3 種類のマンノース転移酵素(hALG3, hALG9, 及び hALG12)の中で hDPM2 及び hDPM3 は、hALG9 に対してのみ特異的に相互作用していることが示唆された。特に hDPM3 に関しては、両末端とも hALG9 に対する相互作用が検出されたことから、hDPM3 は hALG9 に対して hDPM2 よりも近傍に局在していることが想定される。我々の従来の解析結果では、hALG3, hALG9, 及び hALG12 の 3 酵素間では hALG3 と hALG9 間及び hALG9 と hALG12 間には強い相互作用が検出されたが、hALG4 と hALG12 間には弱い相互作用しか検出されなかった⁸⁾。これらの観察結果は、3 酵素が hALG9 を中心に複合体を形成している可能性を示唆している。今回の結果と併せて考えると、hDPMS は、この hALG3 / hALG9 / hALG12 複合体の中でも中心的な hALG9 に対して特異的に相互作用することで、糖供与体基質となる DPM を効率よく提供している可能性が考えられる。

5. 結論

本研究では真核生物全般に渡り rER での糖鎖生合成に重要な役割を果たす酵素の一つである DPMS のヒト酵素(hDPMS)を研究対象とした。hDPMS は 3 種類のサブユニット hDPM1, hDPM2 及び hDPM3 から構成される複合体として酵素活性を発揮することから、その酵素活性の調節機構の解明を目的として酵母 split-ubiquitin システムを利用して、3 つのサブユニット間の物理的相互作用と他の DLO 生合成関連酵素との物理的相互作用の詳細を解析した。その結果、以下の可能性を強く示唆する知見が得られた。

- ・ hDPMS の 3 つのサブユニット間では、hDPM3 を中心として酵素複合体を形成しており、特に hDPM3 の第 2 膜貫通領域及び C-末端細胞質ループ領域は、hDPM1 及び hDPM2 との相互作用に不可欠である。

- ・ rER 膜において hDPMS は DLO 生合成後期に働く hDK1, hDPGS 及び hALG9 と物理的に相互作用することにより、効率良く DLO 生合成の調節を行っている。

hDPMS は、rER での DLO 以外の糖鎖生合成システムに働く酵素とも物理的に相互作用している可能性が十分に考えられる酵素である¹¹⁾。rER での各タイプの糖鎖がどのような割合で生合成されるのか、またその比率を変更するような調節機構が存在するのかどうかを解明するために、本研究で得られた知見は有用な情報になると考えられる。今後、酵母 split-ubiquitin システムを利用して hDPMS と他の糖鎖生合成システムの酵素との物理的相互作用の解析を進めていきたい。

謝辞

本研究の一部は、平成21年度東海大学総合研究機構研究奨励補助金計画「真核細胞の粗面小胞体膜における糖転移酵素ネットワークの解析」の研究援助を頂きました。関係者の方々に深く御礼を申し上げます。

参考文献

- 1) P. Orlean, C. Albright and P.W. Robbins, Cloning and sequencing of the yeast gene for dolichol phosphate mannose synthase, an essential protein, J. Biol. Chem. Vol. 263, pp.17499-17507 (1988).
- 2) P.A. Colussi, C.H. Taron, J.C. Mack and P. Orlean, Human and *Saccharomyces cerevisiae* dolichol phosphate mannose synthases represent two classes of the enzyme, but both function in *Schizosaccharomyces pombe*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 94, pp.7873-7878 (1997).
- 3) Y. Maeda, S. Tanaka, J. Hino, K. Kangawa and T. Kinoshita, Human dolichol-phosphate-mannose synthase consists of three subunits, DPM1, DPM2 and DPM3, EMBO J. Vol. 19, pp.2475-2482 (2000).
- 4) S. Tomita, N. Inoue, Y. Maeda, K. Ohishi, J. Takeda and T. Kinoshita, A homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Dpm1p is not sufficient for synthesis of dolichol-phosphate-mannose in mammalian cells, J. Biol. Chem. Vol. 273, pp.9249-9254 (1998).
- 5) Y. Maeda, S. Tomita, R. Watanabe, K. Ohishi and T. Kinoshita, DPM2 regulates biosynthesis of dolichol phosphate-mannose in mammalian cells: correct subcellular localization and stabilization of DPM1, and binding of dolichol phosphate, EMBO J. Vol. 17, pp.4920-4929 (1998).
- 6) H. Ashida, Y. Maeda and T. Kinoshita, DPM1, the catalytic subunit of dolichol-phosphate mannose synthase, is tethered to and stabilized on the endoplasmic reticulum membrane by DPM3, J. Biol. Chem. Vol. 281, pp.896-904 (2006).
- 7) N. Johnsson and A. Varshavsky, Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 91, No.22, pp.10340-10344 (1994).

- 8) T. Takahashi and X.-D. Gao, Physical interactions among human glycosyltransferases involved in dolichol-linked oligosaccharide biosynthesis, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* Vol. 24, No.136, pp.65-77 (2012).
- 9) 栗本昇, 酵母分割ユビキチンシステムを用いたヒトドリコールリン酸マンノース合成酵素に関する物理的相互作用の解析, 平成23年度東海大学大学院修士論文 (2012).
- 10) 山田直人, 酵母split-ubiquitinシステムを用いたヒトドリコールリン酸マンノース合成酵素及びヒトドリコールリン酸グルコース合成酵素に関する物理的相互作用の解析, 平成26年度東海大学工学部生命化学科卒業論文 (2015).
- 11) Y. Maeda and T. Kinoshita, Dolichol-phosphate mannose synthase: structure, function and regulation, *Biochim. Biophys. Acta* Vol. 1780, pp.861-868 (2008).