

博士学位論文

論文題目

出芽酵母分泌経路の機能未知必須膜タンパク質の解析

東京大学 大学院農学生命科学研究科

応用生命工学専攻

平成 18 年度博士課程 進学

氏 名 佐藤啓介

指導教員名 依田幸司

略語表

AbA	Aureobasidin A
ALP	alkaline phosphatase
amp	ampicillin
ATPase	adenosine triphosphatase
BSA	bovine serum albumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CDP-DAG	cytidyldiphosphate diacylglycerol
CFW	Calcofluor White
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase
CoA	coenzyme A
Con A	concanavalin A
CPY	carboxypeptidase Y
dATP	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	deoxycytidine triphosphate
dGTP	deoxyguanosine triphosphate
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	dithiothreitol
dTTP	deoxythymidine triphosphate
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGFP	enhanced green fluorescent protein
endo H	endoglycosidase H
ER	endoplasmic reticulum
EtN-P	phosphoethanolamine
ERAD	ER-associated degradation
5-FOA	5-Fluoroorotic Acid

GAP	GTPase activating protein
GDP	guanosine diphosphate
GDPase	guanosine diphosphatase
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GFP	green fluorescent protein
GlcN	glucosamine
GlcNAc	N-acetylglucosamine
GMP	guanosine monophosphate
GPI	glycosylphosphatidylinositol
GPI-MT	GPI-mannosyltransferase
GST	glutathione S-transferase
GTPase	guanosine triphosphatase
HA	hemagglutinin
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
his	histidine
IP	immunoprecipitation
IPC	inositol phosphorylceramide
lys	lysine
Man	mannose
met	methionine
MIPC	mannosylinositol phosphorylceramide
M(IP) ₂ C	mannosyl-diinositol phosphorylceramide
OD	optical density
ORF	open reading frame
PCR	polymerase chain reaction
pic	protease inhibitor cocktail
PI	phosphatidylinositol
PE	phosphatidylethanolamine

PGK	3-phosphoglycerate kinase
PIPES	piperazine- <i>N,N'</i> -bis(2-ethanesulfonic acid)
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PS	phosphatidylserine
PVDF	polyvinylidene fluoride
SDS	sodium dodecylsulfate
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SGD	Saccharomyces genome database
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline with Tween 20
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-ethylendiamine
TCL	total cell lysate
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
trp	tryptophan
TTC	2,3,5-triphenyltetrazolium chloride
UDP	uridine diphosphate
UPR	unfolded protein response
ura	uracil
YPD	Yeast proteome database

目次

第1章 緒論	1
第2章 Ynl158/Pga1 の解析	5
2-1 はじめに	5
使用菌株	7
2-2 結果	9
2-2-1 Pga1 は真菌類にホモログを持つ	9
2-2-2 Pga1 は小胞体に局在する膜貫通型糖タンパク質である	9
2-2-3 PGAI 温度感受性変異株の単離	10
2-2-4 <i>pgal-1</i> のタンパク質輸送に関する表現型	11
2-2-5 <i>pgal-1</i> 株では GPI アンカータンパク質への GPI 付加に 欠損がある	13
2-2-6 <i>pgal-1</i> 株は GPI 変異株に共通する表現型を示す	14
2-2-7 PGAI と GPII8 は互いの温度感受性変異の多コピー サプレッサーとなる	15
2-2-8 Pga1 は GPI-MT-II の新規サブユニットである	16
2-2-9 Pga1 は GPI-MT-II の活性に必須なサブユニットである	17
2-2-10 Pga1 は Gpi18 の安定性には関わっていない	19
2-2-11 GPII8 の哺乳類ホモログ PIG-V は Δ <i>pgal</i> の生育を相補する	19
2-3 考察	33
第3章 Ydr367w/Kei1 の解析	37
3-1 はじめに	37
使用菌株	40
3-2 結果	43
3-2-1 Kei1 は真菌類にのみホモログを持つ	43

3-2-2	Kei1 は late ゴルジエンドプロテアーゼ Kex2 の新規な基質タンパク質であり, 切断前・後ともに膜を貫通している	43
3-2-3	Kei1 は ER および medial Golgi に局在する	45
3-2-4	温度感受性変異アレル <i>kei1-1</i> の取得	46
3-2-5	<i>kei1-1</i> 株における CPY, Gas1 の輸送・修飾・プロセッシングは正常である	47
3-2-6	<i>kei1-1</i> 株の温度感受性に対する多コピーサプレッサースクリーニング	48
3-2-7	Kei1 は IPC シンターゼの新規サブユニットである	49
3-2-8	<i>kei1-1</i> 株では Aur1 はゴルジ体に安定に局在できず, 液胞へと運ばれる	51
3-2-9	Kei1C 末端部分の欠失により IPC シンターゼ複合体が液胞に運ばれる	52
3-2-10	Kei1 の C 末端部分は COPI コートマーとの結合能を有する	54
3-2-11	<i>kei1-1</i> 変異は IPC シンターゼの活性を顕著に低下させる	55
3-2-12	Kex2 による切断の有無は, IPC シンターゼの局在, サブユニット間の結合, そして酵素活性に影響を与えない	58
3-2-13	<i>kei1</i> 変異体は発現量が上昇している	58
3-3	考察	77
第 4 章 総括		87
実験材料と方法		90
参考文献		143
謝辞		155

緒論

真核生物は脂質二重膜からなるオルガネラを持つ。各オルガネラでは異なるタンパク質が働いており、また細胞外に輸送されるタンパク質もあるが、真核生物の殆どのタンパク質は核の周囲に存在する小胞体の膜上で合成される。そこで合成されたタンパク質を各オルガネラもしくは細胞外に運ぶ経路を総称して分泌経路と呼ぶ。小胞体は分泌経路のスタートとなるオルガネラで、小胞体膜上のリボソームで合成されたタンパク質の多くが小胞体内腔に転移され、シャペロンの助けを借りて適切な立体構造をとる(Kleizen and Braakman, 2004)。小胞体内腔に転移されたタンパク質のうち、小胞体で機能するものはそのまま留まるが、他のオルガネラで機能するものは輸送小胞に取り込まれ、多くの場合ゴルジ体を経て目的のオルガネラへと運ばれていく(Mellman and Warren, 2000; Palade, 1975)。このため、ゴルジ体はタンパク質の「仕分け」を行うオルガネラとして知られている。このように、タンパク質の折りたたみ・タンパク質の仕分けをする場として認知されている両オルガネラであるが、他にも細胞機能にとって欠かせない重要な反応を行っている。その代表的なものとして、「タンパク質の修飾」と「膜脂質の合成」が挙げられる。タンパク質の修飾は、タンパク質が正しい立体構造をとるため、また本来の機能を発揮するために欠かせない。小胞体ではジスルフィド結合が形成され、N 結合型糖鎖、O 結合型糖鎖のコア糖鎖の付加や GPI (Glycosylphosphatidylinositol) アンカーの付加が行われる(Sipos and Fuller, 2002)。ゴルジ体には様々な糖転移酵素が存在してゴルジ槽の成熟に伴って非常に大規模な糖鎖修飾がなされる。膜脂質は文字通り膜を構成する脂質で、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、ステロールの大きく分けて 3 種の脂質がある。全てのオルガネラは脂質二重膜でできており、オルガネラごとに特有の脂質分子種の構成があることが知られている。例えばスフィンゴ脂

質は細胞質膜で最も多い(Hechtberger et al., 1994). 脂質分子種の構成と膜の機能は密接に関連しており, 脂質の合成に少しでも異常をきたせばオルガネラの機能に大きな障害が出ることは想像に難くない. 小胞体ではリン脂質やセラミド合成が行われ, また, ゴルジ体でも重要な脂質の合成や修飾反応が行われている. このように, 小胞体とゴルジ体はタンパク質の通り道となるだけでなく, 細胞機能の根幹に関わる重要な生化学的反応が常に行われているオルガネラである.

本研究は, 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の機能未知必須膜タンパク質を網羅的に解析し, 小胞輸送など, 分泌経路でのタンパク質輸送に関わる新規な重要因子を同定することを目的としてスタートした. *S. cerevisiae* は, 真核生物の細胞生物学研究のモデル生物として最も広く使われている真核単細胞生物であり, 強力な遺伝学が適用可能であることを背景に, あらゆる研究分野において重要な成果の導出に貢献してきた. 1996年に真核生物で最も早くゲノムの全塩基配列が解読されて以降は, データベースが整備されたことも手伝い, 大規模なタンパク質機能解析が盛んに行われてきた. 特に, 全非必須遺伝子の破壊株コレクションが利用可能になったことはゲノムワイドな網羅的解析を可能にした. 一方で, 必須遺伝子についても, 遺伝子の完全破壊はできないものの, 例えば遺伝子を on/off 制御可能なプロモーターの支配下に置くなどして条件致死変異株のコレクションを作製し, それを使って網羅的な解析を行った報告が数多くなされている(Davierwala et al., 2005; Hazbun et al., 2003; Mnaimneh et al., 2004; Schuldiner et al., 2005). しかしながら, 機能の手がかりすら無いまま残された必須遺伝子がいまだ数多く存在するのが現状である. 本研究では, 酵母の遺伝学を最大限に活用するため, プロモーターによる発現制御ではなく, 温度感受性変異株を利用することにした. 温度感受性変異株は, 温度シフトという簡便な操作により短時間で表現型を観察できることに加え, 遺伝学的に関連する

遺伝子のスクリーニングに適しており、従来の網羅的解析と比べより多角的に機能に迫ることが出来る。

研究の方針は以下のように設定した。まず、*S. cerevisiae* の機能未知必須遺伝子で膜貫通領域を持つと推定されるタンパク質をコードするものをデータベース (YPD [Yeast proteome database, www.proteome.com/databases/] および SGD [Saccharomyces genome database, www.yeastgenome.org/]) を用いて選び出し、それらの局在を GFP などのタグを付けて顕微鏡観察により決定、研究対象を絞り込む。対象として選んだ遺伝子について、error-prone PCR により温度感受性変異株を作製し、表現型や遺伝学的に関連する遺伝子をスクリーニングすることにより機能を推測する。そして、その推測に基づき個々のタンパク質の機能解析を行い、機能を明らかにすることを最終目標とした。研究開始時点で機能未知であった候補遺伝子について、GFP タグを付加したタンパク質を各遺伝子の破壊株で発現させて局在を観察した結果、*YFR042w*, *YHR036w*, *YJL097c*, *YMR298w*, *YNL149c*, および *YNL158w* の 6 個がコードするタンパク質が小胞体に、*YBR070c* と *YDR367w* のコードするタンパク質がゴルジ体に局在している様子が観察された。本研究では、これらの遺伝子の温度感受性変異株の作製を試み、*YNL149c* 以外の 7 つの遺伝子について温度感受性変異株の取得に成功した。

本研究では、これらの遺伝子がコードするタンパク質のうち、*Ynl158w* と *Ydr367w* について特に詳しく解析した。*YNL158w* は本研究による解析途中、Davierwala らによる必須遺伝子の網羅的解析で *PGAI* と命名されたが、彼らの報告では小胞体で何らかの機能を果たしているだろうと推測するにとどまり、具体的な機能に迫る情報は得られていなかった (Davierwala et al., 2005)。本研究では温度感受性変異株の多コピーサプレッサーとして GPI の合成に必須な *GPI18* を同定し、さらに様々な角度からのアプローチにより、最終的に *Pga1* が *Gpi18* と複合体を形成して GPI 合成においてマンノース転移を行っていることを明ら

かにした。また、Ydr367w については、温度感受性変異株の多コピーサプレッサーとしてスフィンゴ脂質の合成に必須な *AURI* を同定し、IPC シンターゼの新規サブユニットであることを見出した。また、酵素を単離して活性測定する方法を確立し、Ydr367w が IPC シンターゼの活性に必須であることを明らかにした。

第2章 Ynl158/Pga1 の解析

2-1 はじめに

小胞体で行われる重要なタンパク質修飾反応に、GPI の付加がある。GPI は真核生物に広く見られる複合糖脂質である。その構造は種間を越えてよく保存されており、特に EtN-Man- α 1,2-Man- α 1,6-Man- α 1,4-GlcN- α 1,6-inositol- phosphatidic acid というコア構造は出芽酵母から哺乳類にいたるまで保存されている (Kinoshita and Inoue, 2000)。GPI の構造は 1980 年代に解析・同定が行われ、1988 年には *Trypanosoma brucei* の細胞表層糖タンパク質と哺乳類の Thy-1 糖タンパク質の構造が明らかにされた (Ferguson et al., 1988; Homans et al., 1988)。GPI の合成に直接関わる因子の同定は、CHO (チャイニーズ・ハムスターの卵巣) 細胞と出芽酵母でよく進んでいるが、研究が進展するにつれ、これまでに酵母で見ついている全ての因子について CHO 細胞にホモログが存在することが明らかになっている (Pittet and Conzelmann, 2007)。GPI の合成は小胞体膜の細胞質側で開始され、途中で内腔に転移され、そこでさらに修飾を受けて完成型となる。完成した GPI は、GPI トランスアミダーゼの基質となり、GPI 付加シグナルを持つタンパク質に転移される。GPI 付加シグナルは、タンパク質の C 末端側の疎水性領域とスペーサー、そして切断部位からなるが、いずれも保存された特定の配列は無い。GPI は GPI 付加シグナルと置き換わるようにタンパク質に転移されてタンパク質-GPI の複合体を形成する。GPI が付加したタンパク質は膜貫通領域を持たないため、代わりに GPI が膜に刺さる錨のような役割を果たすことから、GPI の修飾は一般的に GPI アンカーと呼ばれている (Englund, 1993)。

出芽酵母では、GPI 合成に関わる遺伝子は 20 以上同定・報告されており、ほとんどが生育に必須である。出芽酵母の GPI 生合成経路と、経路の中でこれまでに同定されたタンパク質を Fig. 2-1 に示した。出芽酵母の GPI には 4 つのマン

ノースが存在し、それぞれの糖転移を行う酵素を、付加する順番に従って GPI-MT (Mannosyl- Transferase)-I, II, III, IV と呼ぶ。GPI-MT-I は、Gpi14/Pbn1 複合体からなる酵素で、それぞれ哺乳類のホモログ PIG-M/PIG-X と機能的に対応している(Ashida et al., 2005; Maeda et al., 2001)。GPI-MT-II としては Gpi18 が報告されており、哺乳類ホモログ PIG-V が存在する(Fabre et al., 2005; Kang et al., 2005)。GPI-MT-III としては Gpi10 が、GPI-MT-IV としては Smp3 が報告されており、それぞれ哺乳類ホモログ PIG-B, hSMP3 と対応している(Grimme et al., 2001; Takahashi et al., 1996)。4 番目のマンノース付加は出芽酵母の生育に必須であり、GPI トランスアミダーゼもマンノース 3 つの GPI 前駆体は認識しないことが分かっているが、哺乳類ではマンノースが 3 つないし 4 つでタンパク質に転移される。4 つ目のマンノースを付加する *hSMP3* の発現レベルは組織によって異なる(Taron et al., 2004)。GPM-MT を構成するタンパク質のうち、Gpi14, Gpi18, Gpi10, Smp3 はいずれも複数回膜貫通タンパク質である。

YNL158w に付けられた *PGAI* という遺伝子名は、Davierwala らの必須遺伝子の網羅的解析により、プロモーターで発現を抑制した変異株において *Gas1* と *Pho8* のプロセッシングに欠損がある (*Processing of Gas1p and ALP I*) ことから付けられたものである(Davierwala et al., 2005)。本研究でも今後、*YNL158w* を *PGAI* と呼ぶ。しかし彼らはそれ以上踏み込んだ解析をしておらず、遺伝学的関連などから、何か小胞体で重要な機能を発揮しているのだろうと推測するにとどまっていた。また、その後新たな知見に関する報告も無い。本研究では、全く独立に *PGAI* を機能未知必須遺伝子として解析を進め、*pgal-1* の温度感受性に対する多コピーサプレッサーとして、*GPII8* を同定した。さらにこれらの翻訳産物である *Pgal* と *Gpi18* が免疫沈降によって共沈すること、および *pgal-1* 株ではマンノースが 1 つしか付加されていない GPI 中間体が蓄積することを見出し、*Pgal* が GPI-MT-II の活性に必須なサブユニットであることを明らかにした。

使用菌株

Strain	Genotype and plasmid
KA31a	<i>MATa, his3Δ leu2Δ trp1Δ ura3Δ</i>
BY4741	<i>MATa, his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
BY4743	<i>MATa/MATa, his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 met15Δ0/MET15 LYS2/lys2Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0</i>
KSY99	as BY4741, <i>MET15</i>
KSY33	as BY4741, <i>pga1Δ::kanMX4</i> , pKS5 (<i>CEN, URA3 PGA1-GFP</i>)
KSY63	as BY4741, <i>pga1Δ::kanMX4</i> , pKS22 (<i>CEN, URA3 PGA1-6myc</i>)
KSY216	as BY4741, <i>pga1Δ::kanMX4</i> , pKS38 (<i>CEN, HIS3 PGA1</i>), pKS128 (<i>CEN, URA3 GFP-GPI18</i>)
KSY217	as BY4741, <i>pga1Δ::kanMX4</i> , pKS110 (<i>CEN, HIS3 PGA1-6myc</i>), pKS128
KSY182	as KSY99, <i>pga1Δ::pga1-3 LEU2</i>
AKY19	as KSY99, <i>pga1Δ::pga1-1 LEU2</i>
KSY274	as KSY99, <i>pga1Δ::gpi18-3 LEU2</i>
KSY277	as KSY99, <i>pga1Δ::gpi18-6 LEU2</i>
KSY279	as KSY99, <i>gpi18Δ::P_{GAL1}-GPI18 LEU2</i>
KSY307	as KSY99, pKS128
KSY308	as KSY99, <i>gpi18Δ::P_{GAL1}-PGA1 LEU2</i> , pKS128
KSY309	as KSY99, <i>gpi18Δ::P_{GAL1}-PGA1 LEU2</i> , pKS128
KSY312	as AKY19, pKS128
KSY313	as KSY277, pKS128
YKI59	as KA31a, <i>erd1Δ</i>
YNY309	as KA31a, <i>sec12^{fs}</i>

使用菌株 (続き)

Strain	Genotype and plasmid
YNY401	as KA31a, <i>emp24</i> Δ
KSY269	as BY4741, <i>gpi7</i> Δ:: <i>kanMX4</i>
CAY341	as BY4743, <i>pga1</i> Δ:: <i>kanMX4/PGA1</i>
KSY223	as BY4743, <i>gpi18</i> Δ:: <i>kanMX4/GPI18</i>

2-2 結果

2-2-1 Pga1 は真菌類にホモログを持つ

YNL158w/PGAI は必須遺伝子で、その破壊株は通常の実験室培養条件においては生育できない(Duenas et al., 1999). Saccharomyces Genome Database (SGD) によると、Pga1 は、198 アミノ酸からなり、計算上の推定分子量は 22.383、等電点は 6.63 のタンパク質である。Kyte-Doolittle による疎水性プロット (Fig. 2-2B) の結果から、2つの膜貫通領域を持つと推定される。シグナルペプチド予測プログラム SignalP によると、N末端の膜貫通領域はシグナルペプチドとして機能し、23番目のアラニンと24番目のアスパラギンの間が切断部位として最も可能性が高いと予測された。SGD の PSI-BLAST サーチによると、ホモログは真菌類のみ存在し、高等真核生物には見当たらない (Fig. 2-2A).

2-2-2 Pga1 は小胞体に局在する膜貫通型糖タンパク質である

まず、Pga1 の局在をタグ付加により検討した。*PGAI* の C 末端に GFP を融合した構築を低コピープラスミドに乗せ、*PGAI/Δpga1* 二倍体に形質転換し、孢子形成させて四分子解析を行ったところ、このプラスミドは *Δpga1* の生育を相補した。この株を用いて、共焦点レーザー顕微鏡により Pga1-GFP の細胞内局在を観察した結果、二重のリング状の構造体への局在が観察された (Fig. 2-3A)。二重のリング、すなわち核の周囲と細胞質膜直下のリング状の構造は、出芽酵母においては小胞体に特徴的なパターンとして知られており、Pga1 は小胞体に局在していると推測された。そこで、小胞体局在を確かめるため、小胞体シャペロン Kar2 との共染色を行い、局在を比較した。Pga1-6myc を *Δpga1* で発現させ、抗 myc 抗体と抗 Kar2 抗体を用いて間接蛍光法により顕微鏡観察を行った。その結果、Pga1-6myc のリングと Kar2 のリングが重なり、Pga1 は確かに小胞体に局在していると考えられた (Fig. 2-3A)。遠心分画を行ったところ、Pga1-GFP は

P10 に主に回収された (Fig. 2-3B). この挙動は小胞体タンパク質 Scs2 と良く似ており, early ゴルジに局在する Van1 や late ゴルジに局在する Kex2 とは異なっていた (Fig. 2-3B). 以上のことから, Pgal の小胞体への局在が支持された.

次に, Pgal が疎水性プロットの予測どおり膜貫通型タンパク質であるか確かめるために, 可溶性試験を行った. Pgal-6myc を発現する株から lysate を調製し, 塩 (1 M NaCl), アルカリ (Na_2CO_3 , pH 11), Urea (2 M Urea), 界面活性剤 Triton X-100 (1% Tx-100) で処理した後, 超遠心を行い, 上清と沈殿に分けた. 膜貫通でなければ, 塩, アルカリ, Urea の処理によって膜から剥がれて上清に回収される. 結果として, Pgal-6myc は Tx-100 で処理して膜そのものを可溶化した場合のみ, 超遠心後の上清に回収された (Fig. 2-3C). よって, Pgal は確かに膜貫通型のタンパク質であることが分かった.

Pgal には 2 箇所の N 糖鎖付加コンセンサス配列 ($^{49}\text{Asn-Thr-Thr}$, $^{57}\text{Asn-Thr-Thr}$) があり, いずれも C 末端の膜貫通領域より N 末側の親水性領域に存在する. Pgal はシグナル配列を除けば一回膜貫通型であるので, これらの推定糖鎖付加部位が糖鎖修飾されているか調べることにより, トポロジーの情報を得ることができる. そこで, Pgal-6myc を発現する酵母から cell lysate を調製し, N 糖鎖を切断する酵素 endoglycosidase H (endo H) で処理し SDS-PAGE での挙動を観察した. その結果, endo H 処理により, Pgal-6myc の泳動度が上がるということが分かった (Fig. 2-3D). すなわち, Pgal は N 糖鎖付加されていることが分かり, 糖鎖付加部位が存在する親水性領域は小胞体内腔にあることが分かった.

2-2-3 *PGAI* 温度感受性変異株の単離

Pgal の機能を調べるため, error prone PCR により *PGAI* に変異を導入し, 温度感受性変異株の作製を試みた (具体的な方法は実験材料と方法参照). 結果として, 3 つの *PGAI* 温度感受性アレル (*pgal-1*, *pgal-2*, *pgal-3*) を取得した.

それぞれの変異によるアミノ酸置換は、*pgal-1* が F20I, M64T, T64P, D75G, I107F, N111S, T126A, Y144H, P152S, Y169H ; *pgal-2* が F36Y, I57T, Y95C, C100Y, N110S ; *pgal-3* が T74A, D92G, W101R, I107V, Q113R, T121A, T136A, N192S, L196P, K197E であった。これらの変異点は、いずれも単独で温度感受性をもたらすものではなく、複数の変異が集合的に作用して温度感受性を付与していると考えられた。今後の実験では、許容温度と制限温度での生育の差がもっともはっきりしていた *pgal-1* を主に用いて解析を行った。また、今後の解析のために、*pgal-1* と *pgal-3* の変異アリアルを野生株 BY4741 のクロモソームに組み込んだ株を作製した。

2-2-4 *pgal-1* のタンパク質輸送に関する表現型

小胞体に局在していたことから、Pga1 は小胞体で何らかの重要な機能を果たしていると考えられる。第一に、タンパク質輸送や糖鎖付加に関わっている可能性を考え、*pgal-1* 株で分泌タンパク質の輸送、修飾が影響を受けているか調べた。まず、パルスチェイス実験により、carboxypeptidase Y (CPY) と Gas1 の小胞体からゴルジ体の輸送効率を調べた (Fig. 2-4A)。CPY は液胞のプロテアーゼで、小胞体でコア糖鎖修飾を受けて p1 form となり、ゴルジ体に運ばれるとさらに糖鎖修飾を受けて分子量が大きくなる (p2 form)。その後、液胞に運ばれると液胞内プロテアーゼによる切断を受け成熟型となる (m form) (Van Den Hazel et al., 1996)。Gas1 は細胞質膜に豊富に存在する GPI アンカー膜タンパク質で、小胞体内腔に入ると N 末端のシグナルペプチドを切断され、N 糖鎖および O 糖鎖のコア糖鎖修飾を受け、105 kDa の proGas1 となる。proGas1 は C 末端のシグナルペプチドが切断され、代わりに GPI アンカーが付加される。GPI アンカーが付加された proGas1 は輸送小胞に乗り、ゴルジ体を經由して細胞質膜に運ばれるが、ゴルジ体でさらに糖鎖修飾を受けることにより 125 kDa の mature form とな

る(Nuoffer et al., 1993; Popolo and Vai, 1999). *pgal-1* 株では, CPY の輸送は許容温度・制限温度共に野生株と同程度の効率で行われていた. 一方, Gas1 については, 野生株では温度に関わらず大部分が 30 分で mature 型に変換されていたのに対し, *pgal-1* 株では 30 分後でも殆ど mature 型が検出されず, ER 型が蓄積していた. 対照として用いた *sec12^{Δs}* 株は小胞体からの輸送小胞の形成に欠損のある変異株で(Novick et al., 1980), 制限温度下では CPY, Gas1 ともに輸送が遅れていた.

ペリプラズムに輸送されるインベルターゼは, 小胞体でコア糖鎖修飾を受けてゴルジ体で大規模な糖鎖修飾を受ける(Novick et al., 1980). *pgal-1* 株ではインベルターゼの糖鎖修飾は野生株同様に行われていた (Fig. 2-4B). また, ゴルジ体から小胞体への逆行輸送に欠陥のある変異株では, 小胞体シャペロン Kar2 が培地に漏出してくることが知られている(Lewis et al., 1997). 制限温度での培養では溶菌が起こり漏出と区別できない可能性が考えられたので, 許容温度で検討を行った. 対照として用いた *Δerd1* は逆行輸送に欠損があることが知られており (Hardwick et al., 1990), 報告どおり Kar2 を培地に漏出していたが, *pgal-1* 株では Kar2 の培地への漏出は全く検出されなかった (Fig. 2-4C).

以上のことから, *pgal-1* 株では CPY やインベルターゼの輸送・修飾は問題なく行われ, 逆行輸送にも異常は無いが, GPI アンカータンパク質 Gas1 の輸送または修飾に欠損があると考えられた.

また, Davierwala らは, *PGAI* の発現抑制により, 液胞アルカリホスファターゼ Pho8 (alkaline phosphatase; ALP) の可溶性型が蓄積すると報告していた. そこで, *pgal-1* 株においても ALP を観察したところ, 特に制限温度下で強く可溶性型が蓄積することが分かった (Fig. 2-4D). この可溶性型 ALP がなぜ, どのように蓄積するのかはよく理解されていないが, *pgal-1* 株で観察された蓄積については, その変異により小胞体内が異常な状態となったことが原因になっている

るのではないかと推測している。

2-2-5 *pgal-1* 株では GPI アンカータンパク質への GPI 付加に欠損がある

pgal-1 株において、CPY とインベルターゼの輸送・修飾に異常が無いにもかかわらず、Gas1 の小胞体型が蓄積していた。GPI アンカータンパク質が小胞体から出るには、輸送小胞に積み込まれる必要があるが、ここに欠損が起きる原因として、2つの可能性が考えられた。1つは、GPI の付加が GPI アンカータンパク質の小胞体からの搬出に必要であることから、GPI の合成または付加に異常がある可能性(Doering and Schekman, 1996; Nuoffer et al., 1993)である。もう1つは、*Δemp24* 株のように、GPI アンカータンパク質の COPII 小胞への積み込みに欠損がある可能性である(Muniz et al., 2000; Schimmoller et al., 1995)。どちらの可能性が *pgal-1* 株における proGas1 の蓄積の原因となっているかを調べるために、Triton X-114 phase separation を行った (Fig. 2-5A)。Triton X-114 を含む溶液は、低温では均一な溶液となるが、約 25°C 以上で aqueous phase, detergent phase に分離し、親水性の高いタンパク質は aqueous phase に、疎水性の高いタンパク質は detergent phase に分けられる。GPI アンカー付加されるとタンパク質の疎水性が増し、GPI が付加された Gas1 の大部分は detergent phase に回収されることが知られている。一方、イノシトール合成欠損株では GPI の合成に欠損があり、GPI アンカーが付加されていない小胞体型 Gas1 が蓄積して、それらは aqueous phase に回収されることが報告されている(Doering and Schekman, 1996)。実際に、Figure 2-5A の lanes 1-3 に示すように、野生株において成熟型 Gas1 は殆ど detergent phase に回収された。*Δemp24* 株では GPI の付加に異常はないため、蓄積している小胞体型 Gas1 の大半に GPI が付加されていると考えられ、成熟型 Gas1 と同様 detergent phase に回収されると推測される。実際、*Δemp24* 株で検出された Gas1 は成熟型も小胞体型も大半が detergent phase に回収された (Fig. 2-5A,

lanes 4-6). このような条件下で検討した結果, *pgal-1* 株で蓄積している小胞体型 Gas1 は, 殆どが aqueous phase に回収された (Fig. 2-5A, lanes 7-9). このことから, *pgal-1* で蓄積した小胞体型 Gas1 の多くは GPI が付加されていないと考えられた.

pgal-1 株で Gas1 への GPI 付加に欠損があることがわかったが, Pga1 が GPI の合成や転移に関わるならば, Gas1 に限らず全ての GPI アンカータンパク質において GPI 付加の欠損が見られるはずである. 出芽酵母において, タンパク質に結合した形で検出されるイノシトールは全て GPI 由来であることから, GPI がターゲットタンパク質に組み込まれているかどうかは, タンパク質へのイノシトールの取り込みをチェックすることで判別することが出来る (Guillas et al., 2000). そこで, 野生株と *pgal-1* 株を myo-2-[³H]inositol で metabolic labeling し, 全タンパクの GPI アンカーの修飾を調べることにより, GPI 付加に欠損があるかどうか検証した. 主要な GPI アンカータンパク質は糖タンパク質であることを利用し, Con A Sepharose で濃縮したタンパク質について [³H]inositol の取り込みを調べた. その結果, Figure 2-5C に示すように, 制限温度で培養した *pgal-1* 株から回収した糖タンパク質に存在する [³H]inositol は, 許容温度で培養した場合や野生株と比べて, 顕著に少ないことが分かった. このとき, 全てのサンプルに含まれるタンパク質量がほぼ等量であることが CBB 染色から確認できた (Fig. 2-5B) よって, *pgal-1* 株では確かに GPI アンカーの合成またはターゲットタンパク質への転移に欠損があると考えられた.

2-2-6 *pgal-1* 株は GPI 変異株に共通する表現型を示す

pgal-1 株において general な GPI 付加欠損が見られたので, この株が GPI 変異株に共通して観察される表現型を示すか検討した. GPI 合成や転移に欠損のある変異株は, 一般的に細胞壁に欠陥が見られ, 生育欠損がある場合, 培地中にソ

ルビトールを加えて浸透圧を高めることで生育を部分的に回復できることが知られている。 *pgal-1* 株においても、36°C で培養した場合、1 M ソルビトールを YPD プレートに加えることで、コロニー形成の温度感受性が抑制されることを見出した (Fig. 2-6A)。細胞壁の欠損と関連して、GPI 変異株はキチンに結合して酵母の生育を阻害する薬剤 Calcofluor White (CFW) に高感受性となることが知られているが、*pgal-1* 株もやはり CFW に対して高感受性となっていた (Fig. 2-6C)。また、*pgal-1* 株を 34°C で培養した場合、小胞体シャペロン Kar2 の発現量が野生株と比べて増大することを見出した (Fig. 2-6B)。このことは、Unfolded Protein Response (UPR) が誘導されていることを示唆している。UPR の誘導も、GPI 変異株に共通して観察される現象である (Davydenko et al., 2005; Ng et al., 2000)。GPI アンカータンパク質が小胞体に蓄積する $\Delta emp24$ 株では Kar2 の増大は観察されなかったことから、UPR の誘導はタンパク質に付加されない GPI が小胞体中に蓄積していることが原因と考えられる。

以上のように、*pgal-1* 株が示す様々な表現型は、いずれも Pga1 が GPI の合成や転移に関与することを支持するものであった。

2-2-7 PGAI と GPI18 は互いの温度感受性変異の多コピーサプレッサーとなる

これまでの解析から、Pga1 が GPI の合成または転移で働くことが強く示唆されたが、GPI 合成は多くの反応から成立しており、Pga1 が具体的にどのステップで機能しているのかを決定するためにはさらに詳しい情報が必要であった。そこで、*pgal-1* 株の温度感受性を多コピー発現で抑制する遺伝子のスクリーニングを行った。*pgal-1* 株から作製した 2 μ プラスミドライブラリーを *pgal-1* 株に形質転換し、37°C で生育するコロニーを選択した。その中で、導入したプラスミドに依存して温度感受性が抑制されることが確かめられたものからプラスミドを回収し、インサートに含まれている遺伝子をシーケンシングにより同

定した。その結果、インサートに全長が含まれていた遺伝子のうち、その遺伝子単独でサプレッサー活性を発揮したものは *GPI18* のみであった (Fig. 2-7A)。

GPI18 は、Fabre らと Kang らにより、GPI-MT-II をコードする遺伝子として報告されていた (Fabre et al., 2005; Kang et al., 2005)。GPI-MT-II はドリコールリン酸マンノースからマンノースを GPI 前駆体 Man-GlcN-PI または Man[EtN-P]-GlcN-PI に付加する酵素である。このことから、*Pga1* は GPI 合成のマンノース付加で機能すると推測し、その他の GPI-MT をコードする遺伝子 *GPI14*, *PBN1*, *GPI10*, *SMP3* をそれぞれ *pgal-1* 株に多コピーで導入し、温度感受性が抑制されるか検証した。その結果、いずれの遺伝子もサプレッサー活性を持たないことが明らかとなった (Fig. 2-7B)。さらに、新たに *GPI18* の温度感受性変異株 *gpi18-6* を作製し、*PGAI* を多コピーで導入したところ、温度感受性が抑制された (Fig. 2-7A)。以上のことから、*GPI18* と *PGAI* の特異的な遺伝学的関連が明らかとなった。また、*GPI18* が Δ *pgal* の生育を相補できるか検討するため、*PGAI*/ Δ *pgal*::*KanMX4* 二倍体に 2μ -*GPI18* を導入し、胞子形成させて四分子解析を行った。その結果、*GPI18* の多コピー発現は Δ *pgal* の致死性を抑制しなかった (Fig. 2-7C)。このことから、*Pga1* は *Gpi18* に関係する必須の機能を果たしていることが強く示唆された。

2-2-8 *Pga1* は GPI-MT-II の新規サブユニットである

前項の結果から、*Pga1* が *Gpi18* に関係する必須な機能を持つことが推測されたことから、*Pga1* が *Gpi18* と *in vivo* で相互作用するのではないかと予想された。*GPI18* の N 末端に GFP を付加した構築は、タグを付けない場合と同等のサプレッサー活性を示したので、この構築を用いて *Gpi18* の局在などの検討を行った。GFP-*Gpi18* は遠心分画により主に P10 に回収されたことから、小胞体への局在が予測された (Fig. 2-8B)。顕微鏡観察の結果、GFP-*Gpi18* はやはり小胞体に局

在しており、Pga1-6myc と共局在していた (Fig. 2-8A). Gpi18 の可溶性を検討したところ、Pga1 と同様に Triton X-100 で処理した場合のみ超遠心の上清に回収され、膜貫通タンパク質であることが分かった (Fig. 2-8C). すなわち、Pga1 と Gpi18 は両者とも膜貫通タンパク質として小胞体に局在していることが分かった.

次に、免疫沈降により、GFP-Gpi18 と Pga1-6myc の *in vivo* での結合を検証した. 両者を発現する株から cell lysate を調製し、1% Triton X-100 で処理して膜を可溶化したものを超遠心に供した. 超遠心後の上清に、抗 myc 抗体を加え、Pga1-6myc を免疫沈降した. その結果、GFP-Gpi18 が効率よく共沈することが分かった (Fig. 2-8D). すなわち、Pga1-6myc と GFP-Gpi18 は *in vivo* で結合しており、Pga1 が GPI-MT-II のサブユニットであることが分かった.

2-2-9 Pga1 は GPI-MT-II の活性に必須なサブユニットである

Pga1 が GPI-MT-II のサブユニットであること、*pga1-1* は GPI アンカー欠損に起因すると考えられる表現型を示すことから、Pga1 が GPI-MT-II のサブユニットとして糖転移に必須な機能を持っていることが強く示唆された. *GPII8* の発現抑制を *GAL* プロモーターにより抑制した株は「lipid 004-1」という GPI 合成中間体を蓄積すること、そしてこの lipid 004-1 は Man[EtN-P]-GlcN-PI であることが報告されている (Fabre et al., 2005). そこで、*pga1-1* 株でも同じ GPI 中間体が蓄積しているか調べた. まず、*GPII8* を *GAL* プロモーターの制御下に置いた株 ($P_{GALI-GPII8}$) および *GPII8* の温度感受性変異株 (*gpi18-3*, *gpi18-6*) を作製した. $P_{GALI-GPII8}$ 株および野生株を、ガラクトース培地で培養した後、新しいガラクトース培地またはグルコース培地に植え継ぎ、20 時間後に回収した. それぞれの株から脂質を抽出して薄層クロマトグラフィー (TLC) で分離し、蓄積している GPI 中間体を検出した. その結果、グルコース培地で培養した $P_{GALI-GPII8}$

株でのみ顕著に増加が見られるバンドが検出され、これが lipid004-1 であると考えられた (Fig. 2-9A, lane 4). また、野生株, *pgal-1*, *gpi18-6* 株を培養し、25°C または 37°C で 20 分 pre incubation した後、 $[^3\text{H}]$ inositol で metabolic labeling し、同様に脂質を抽出して TLC で分析したところ、*pgal-1*, *gpi18-6* 株において、lipid004-1 と同じ移動度の中間体が蓄積していた (Fig. 2-9A, lanes 5-8). これらは、25°C で pre incubation した場合でも明らかに蓄積し、37°C ではさらに増加していたが、野生株においては温度に関わらず蓄積している様子は見られなかった (Fig. 2-9A, lanes 9 and 10). さらに、この中間体は他の *pgal* および *gpi18* 温度感受性変異アリアル (*pgal-3*, *gpi18-3*) においても蓄積し (Fig. 2-9B, lanes 7-10), 逆に GPI 生合成過程の最後のステップである 3 つ目の EtN-P 付加に欠損のある Δ *gpi7* では蓄積しなかった (Fig. 2-9B, lanes 3 and 4).

pgal-1 株に野生型 *PGAI* を導入した場合、許容温度においてはほぼ完全に lipid004-1 の蓄積は解消され、制限温度においても完全ではないが明らかな lipid004-1 蓄積の減少が見られた (Fig. 2-9C, lanes 1-4). *gpi18-6* に野生型 *GPII8* を導入した場合は、制限温度においても殆ど完全に蓄積が抑圧されていた (Fig. 2-9C, lanes 5-8). この結果から、それぞれの変異株で lipid004-1 が蓄積するのは当該遺伝子の変異が原因であることが保証され、すなわち *Pgal* が正しく機能することが *GPI-MT-II* の活性に重要であることが明らかとなった. ここで、*PGAI* を導入した *pgal-1* 株において、制限温度での lipid004-1 の蓄積が完全には解消されなかった. これは、*pgal-1* が co-dominant な変異であることが原因ではないかと考えられる. 例えば変異型 *Pgal* (*Pgal-1*) が *Gpi18* と結合してしまった分、正常な *Pgal* が結合できる *Gpi18* が減ってしまった可能性や、*Gpi18* には複数の *Pgal* が結合しており、1 つでも変異型 *Pgal* が結合していると不活性な *GPI-MT-II* になってしまう可能性が考えられる.

また、*pgal-1* 株および *gpi18-6* 株にそれぞれのサプレッサーとなる 2μ -*GPII8*

と 2μ -*PGAI* を導入し、蓄積する GPI 中間体を観察した。その結果、いずれのサブプレッサーの導入も制限温度下での lipid004-1 の蓄積を解消しなかった (Fig. 2-9D)。これは、蓄積の解消が判別できるほど GPI-MT-II が機能しなくても、ごく少量機能する GPI-MT-II があれば生育を相補できるからであると考えられる。実際、*PGAI* や *GPII8* を *GAL* プロモーターの制御下に置いた株は、グルコース培地上で致死とはならず、完全に抑制しきれずに発現される程度の量の GPI-MT-II で細胞は成育できることが示唆されている (data not shown)。

2-2-10 *Pga1* は *Gpi18* の安定性には関わっていない

GPI 合成で働くマンノース転移酵素のうち、GPI-MT-I も 2 つのサブユニットからなることが報告されており、哺乳類細胞では PIG-M と PIG-X が GPI-MT-I を形成している (Ashida et al., 2005)。PIG-M は複数回膜貫通型タンパク質、PIG-X は 1 回膜貫通のタンパク質であり、その構成は *Gpi18*-*Pga1* 複合体と良く似ている。PIG-X が PIG-M の安定化に寄与していると報告されていたため、*Pga1* も *Gpi18* の安定性に関わっている可能性を考え、*pgal-1* 株および *P_{GALI}-PGAI* 株における GFP-*Gpi18* の量を比較した。*pgal-1* 株は 37°C で 2 時間、*P_{GALI}-PGAI* 株は 20 時間グルコース培地で培養したが、それぞれ 25°C で培養した場合、ガラクトース培地で培養した場合と比較して GFP-*Gpi18* の量に変化はなかった (Fig. 2-10)。このことから、*Pga1* は GPI-MT-II の活性には必須であるが、その安定性には寄与していないと考えられた。

2-2-11 *GPII8* の哺乳類ホモログ PIG-V は *Appa1* の生育を相補する

出芽酵母でこれまで同定された GPI 合成に直接関わる遺伝子は、全て哺乳類にホモログが見つかっている (Pittet and Conzelmann, 2007) が、*PGAI* には哺乳類ホモログは存在しない。*Pga1* が出芽酵母の GPI 合成に特異的な機能を持っている

る可能性もあるが、基質が共通であること、他のステップではそのような酵母に特異的なタンパク質は見つかっていないことを考えると、哺乳類に Pga1 に相当するものが存在していると考えるのが妥当であると考えられた。その場合、一次配列上は似ていないが機能的には保存されている可能性と、Gpi18 の哺乳類ホモログである PIG-V が Gpi18 と Pga1 の機能を両方併せ持っている可能性が考えられた。前者が正しければ、*PIG-V* は Δ *pgal* の生育を相補できないが、後者が正しければ、*PIG-V* は Δ *pgal* の生育を相補できるはずである。そこで、FLAG を付加したヒト *PIG-V* 遺伝子を組み込んだ pRS316 ベース (*URA3* を含む) のプラスミド (pFLAG-hPIG-V) を *PGAI*/ Δ *pgal*::*KanMX4* 二倍体に導入し、胞子形成させ、四分子解析により生育が相補されるか検証した。このプラスミドは Δ *gpi18* 株の生育を相補することが報告されている (Kang et al., 2005)。 *URA3* が発現する細胞では 5-FOA が代謝され細胞毒性を示すので、生育のプラスミド依存性を検討できる。その結果、1 つの胞子囊の中の 4 つの四分子のうち、通常の生育のもの、明らかに生育の遅いものが 2 つずつ得られた (Fig. 2-11A, upper panel, 2, 4, 6, 8)。生育の遅い四分子は G418 耐性かつ 5-FOA 感受性で、pFLAG-hPIG-V に生育を依存している Δ *pgal* 株であると分かった (Fig. 2-11A, プレートの写真, 2, 4, 6, 8)。 *GPII8*/ Δ *gpi18* 二倍体に pFLAG-hPIG-V を導入して同様の実験を行ったところ、やはり 4 つの四分子のうち 2 つは生育が遅く、それらは pFLAG-hPIG-V に生育を依存している Δ *gpi18* 株であると分かった (Fig. 2-11B, 11, 12, 14, 15)。それぞれの遺伝子破壊株で、*PIG-V* による生育相補はほぼ同程度であった。*PIG-V* の低コピー発現で Δ *pgal* と Δ *gpi18* の生育が同程度に相補されたこと、*GPII8* の多コピー発現は Δ *pgal* の生育を全く相補しなかったことを合わせて考えると、Gpi18 の機能は Pga1 と重複しておらず、MPI-MT-II という酵素の中でそれぞれ必須な機能を担っているが、hPIG-V は両方のタンパク質の機能を併せ持っていると考えられる。すなわち、哺乳類における GPI-MT-II は PIG-V という 1 つ

のタンパク質であり、その機能は酵母における Gpi18 と Pga1 の 2 つのサブユニットからなる複合体に相当すると考えられた。

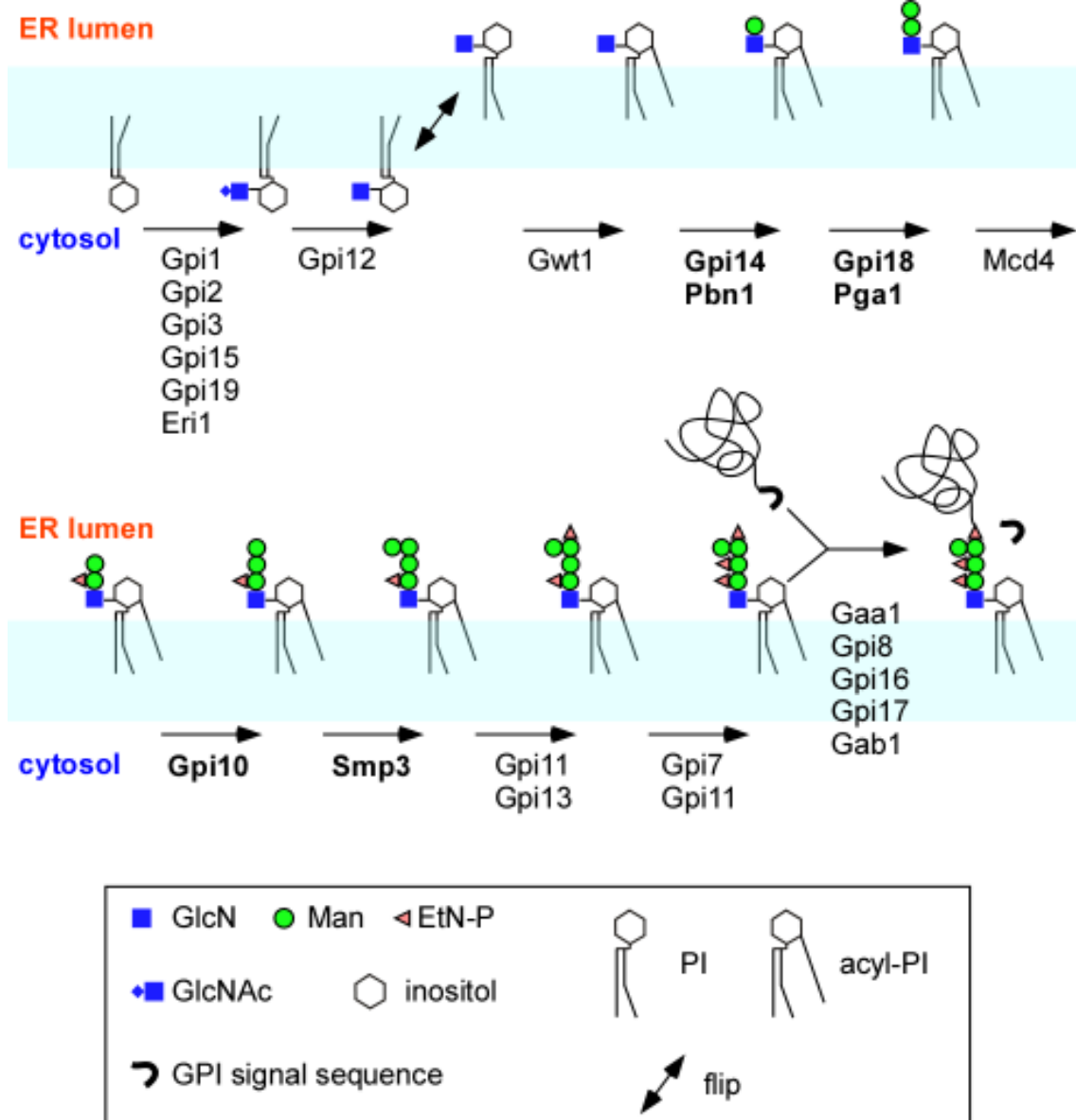


Figure 2-1 出芽酵母におけるGPIアンカーの生合成経路

出芽酵母のGPIがphosphatidylinositolから作られてタンパク質に転移されるまでの経路を示した。マンノース転移を行うタンパク質を太字で示してある。

A



B

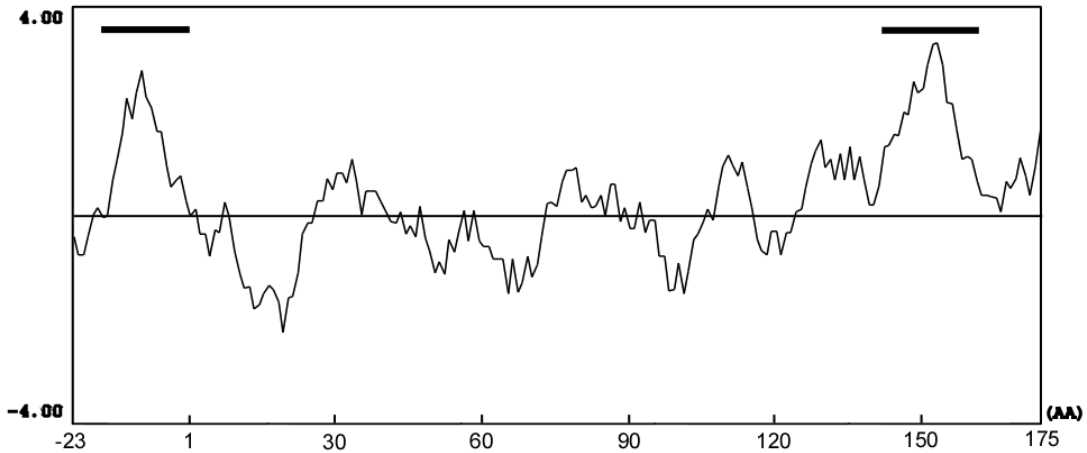


Figure 2-2 Pga1とそのホモログの配列及び疎水性プロット

(A) Pga1ホモログとのアミノ酸配列アラインメントを示した。2つの疎水性領域を配列の上部にバーで示した。シグナル配列の予測切断部位を矢頭で示した。相同アミノ酸は白抜き文字で示してある。(B) Kyte and Doolittleの方法による疎水性インデックスを示した。アミノ酸のwindow sizeは10に設定した。太線は疎水性領域を示す。

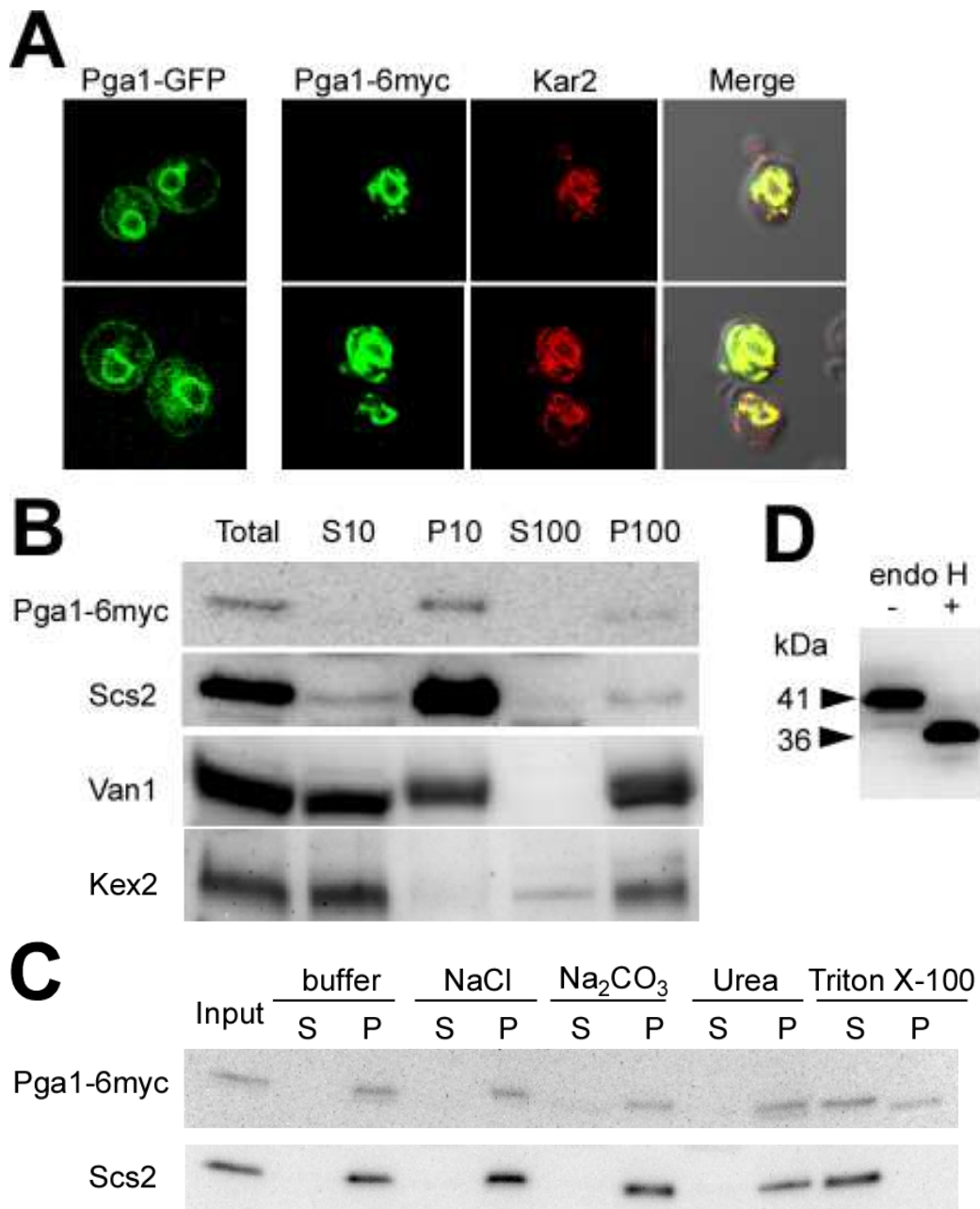


Figure 2-3 Pga1は小胞体の膜貫通型タンパク質である

PGA1-GFP (KSY33) または *PGA1-6myc* (KSY63) を CEN-plasmid で発現した。

(A) 共焦点レーザー顕微鏡で Pga1-GFP および Pga1-6myc の局在を観察した。

(B) Pga1-6myc 発現株 (KSY63) から Total cell lysate (Total) を調製し、10,000 g で 10 分間遠心を行い、沈殿 (P10) と上清 (S10) に分けた。S10 をさらに 100,000 g、1 時間遠心し、沈殿 (P100) と上清 (S100) に分けた。上清と等量になるように沈殿画分を B88 に懸濁し、SDS-PAGE を行い、ウェスタンブロッティングで各タンパク質を検出した。Pga1-6myc は主に P10 に回収された。Scs2 は小胞体、Van1 は early ゴルジ、Kex2 は late ゴルジの膜貫通タンパク質のマーカーとして用いた。

(C) Pga1-6myc と Scs2 の可溶性試験。1 M NaCl, 0.1 M Na₂CO₃, 2 M urea, 1% Triton X-100 で処理し、超遠心で上清 (S) と沈殿 (P) に分画した。SDS-PAGE で分離し、ウェスタンブロッティングで各タンパク質を検出した。

(D) Endoglycosidase H 処理前 (-) と後 (+) の Pga1-6myc を SDS-PAGE で分離し、ウェスタンブロッティングで検出した。検出されたバンドの分子量を示した。

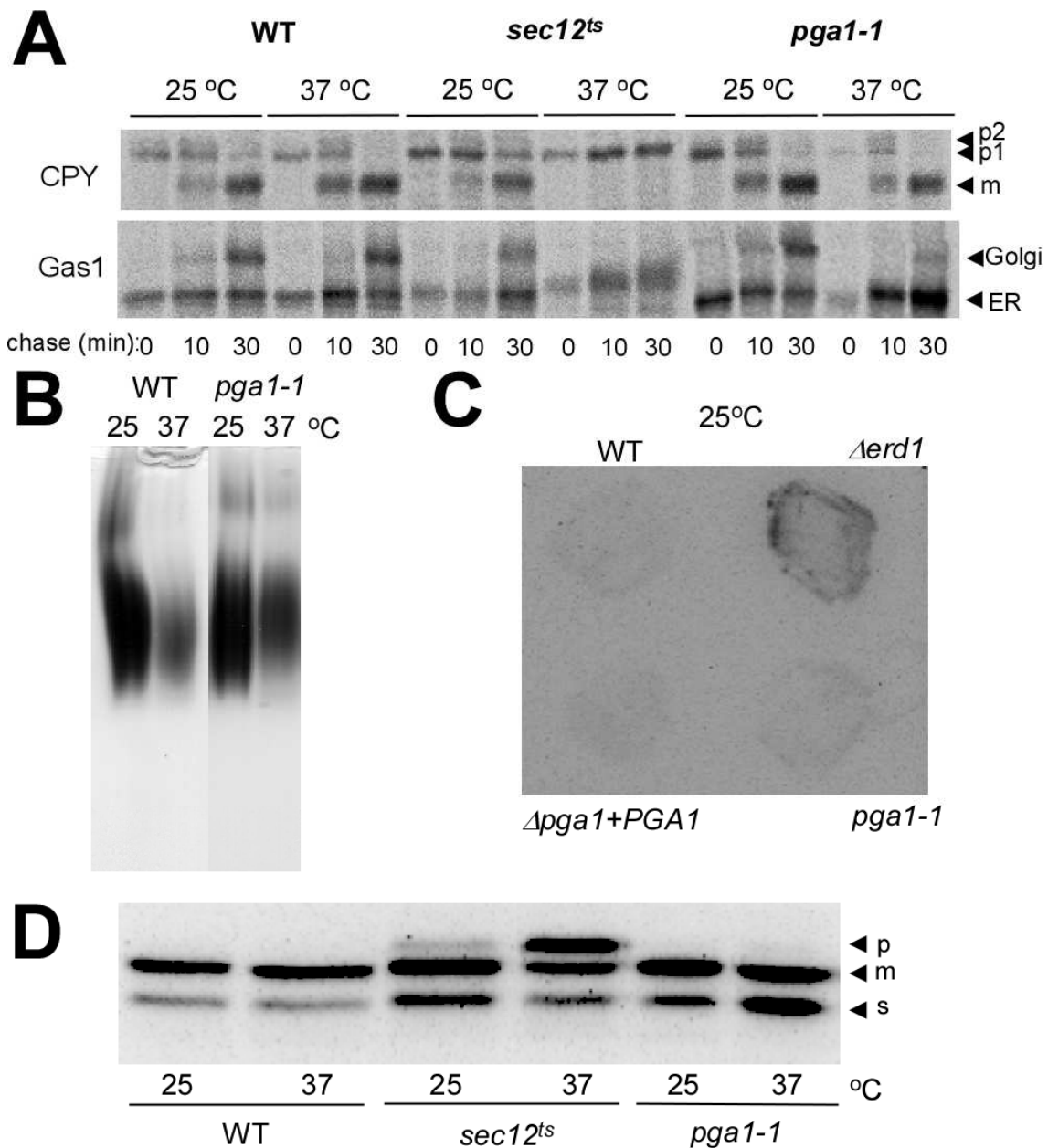


Figure 2-4 *pga1-1*株のタンパク質輸送に関する表現型

(A) CPYとGas1のパルスチェイス実験. 25°Cで培養した対数増殖期の細胞を25°Cおよび37°Cで30分pre-incubationした. それぞれTran^[35S]-labelで6分間タンパク質を標識した後, 表記の時間chaseし, 細胞を回収した. 細胞を破碎してCPYとGas1を免疫沈降してSDS-PAGEで分離, オートラジオグラフィーで検出した. *pga1-1*株ではGPIアンカータンパク質Gas1の輸送が遅れていた. ER, proGas1(105 kDa); Golgi, mature Gas1(125 kDa); p1, precursor CPY(小胞体型); p2, precursor CPY(ゴルジ体型); m, mature CPY(液胞型).

(B) 野生株と*pga1-1*株におけるインベルターゼのN糖鎖修飾をNative PAGE, 活性染色により検出した. 制限温度に移して2時間培養した株においても, 糖鎖修飾は正常であった.

(C) 野生株と*pga1-1*株の小胞体シャペロンKar2(Bip)の培地への漏出を検討した. YPDプレート上にstreakし, PVDF膜を重ねて25 °Cで12時間培養し, PVDF膜にトラップされたKar2をウェスタンブロットティングにより検出した.

(D) ALPのプロセッシングをSDS-PAGE, ウェスタンブロットティングにより観察した. 制限温度で2時間処理すると, *pga1-1*株ではsoluble ALPが蓄積していた. (p, precursor(ER) form; m, mature(vacuolar) form; s, soluble form of ALP)

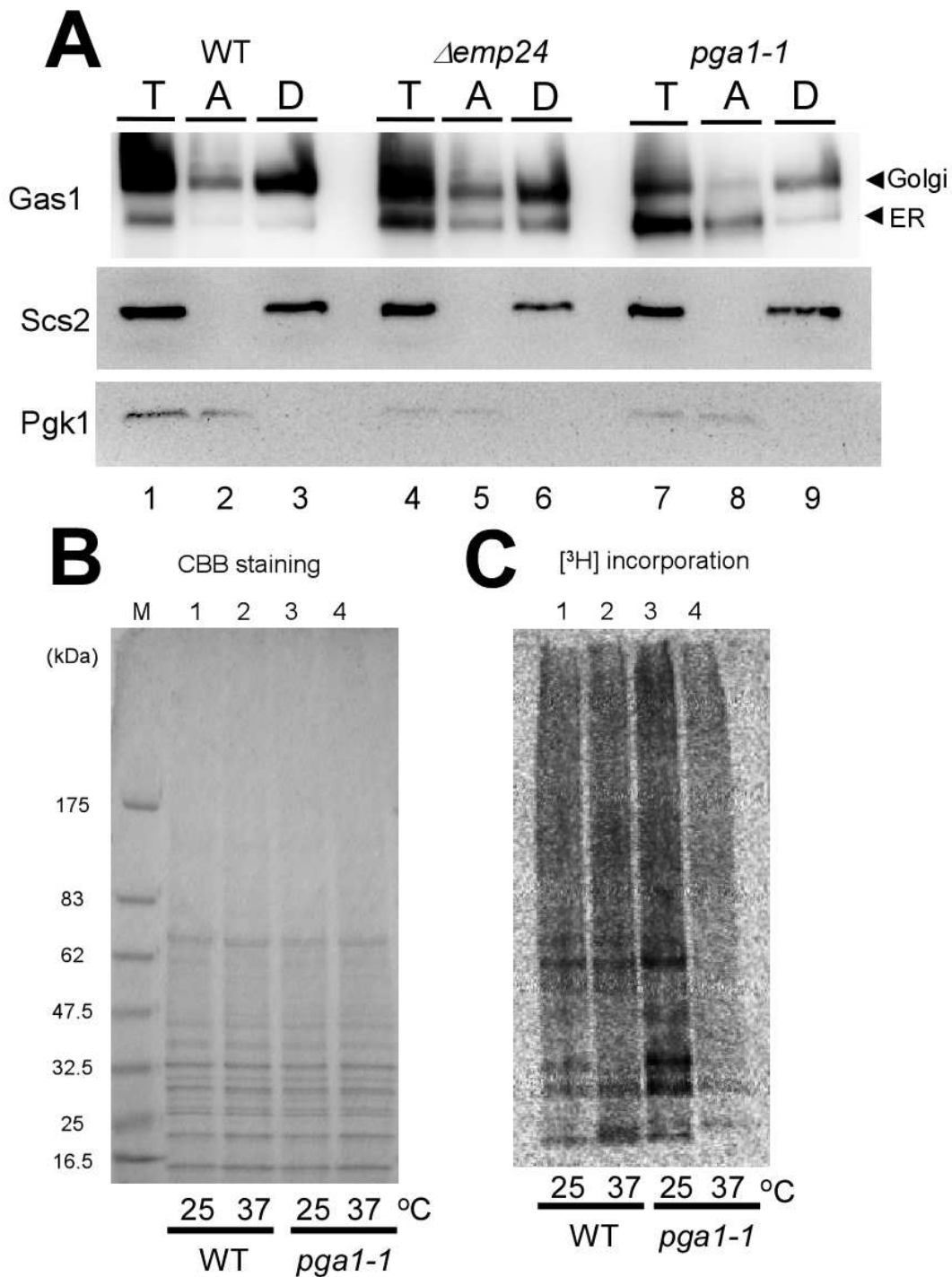


Figure 2-5 *pga1-1*はタンパク質へのGPI付加に欠損がある

(A) 34°Cで12時間培養した野生株と*pga1-1*株, $\Delta emp24$ 株からTotal cell lysateを調製し, 1% Triton X-114を加え, 層分離前(T)と分離後のAqueous phase(A)とDetergent phase(D)への各タンパク質の移行を観察した.

(B) (C) 野生株と*pga1-1*株を $[^3\text{H}]$ inositolでmetabolic labelingし, Con A sepharoseで濃縮した糖タンパク質に取り込まれた $[^3\text{H}]$ inositolを指標に, タンパク質へのGPIの転移をモニターした. 等量のタンパク質がロードされていることをCBB染色で確認した.

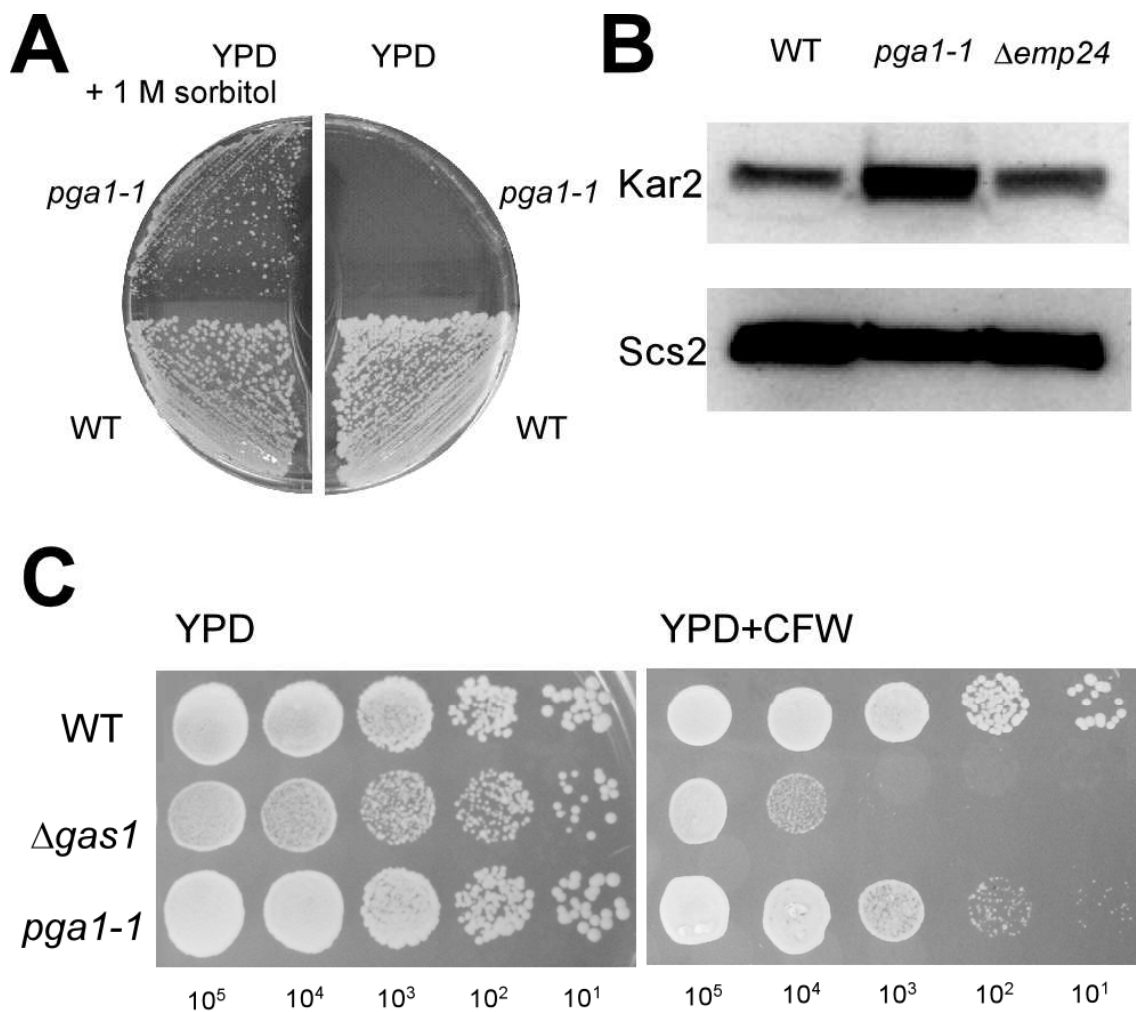


Figure 2-6 *pga1-1*株はGPI変異株に共通する表現型を示す

(A) 野生株と*pga1-1*株をYPD培地と1 M sorbitol添加YPD培地で36°Cで2日間培養した。*pga1-1*株の温度感受性は培地への1 M sorbitolの添加で部分的に抑制された。

(B) 34°Cで12時間培養した野生株と*pga1-1*株のKar2発現量を比較した。*pga1-1*株ではKar2の発現量が増加していた。

(C) SD寒天培地、および40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のCalcofluor Whiteを加えたSD寒天培地に10倍ごとの段階希釈で野生株と*pga1-1*株、 $\Delta gas1$ 株をスポットティングし、生育を30°Cで比較した。

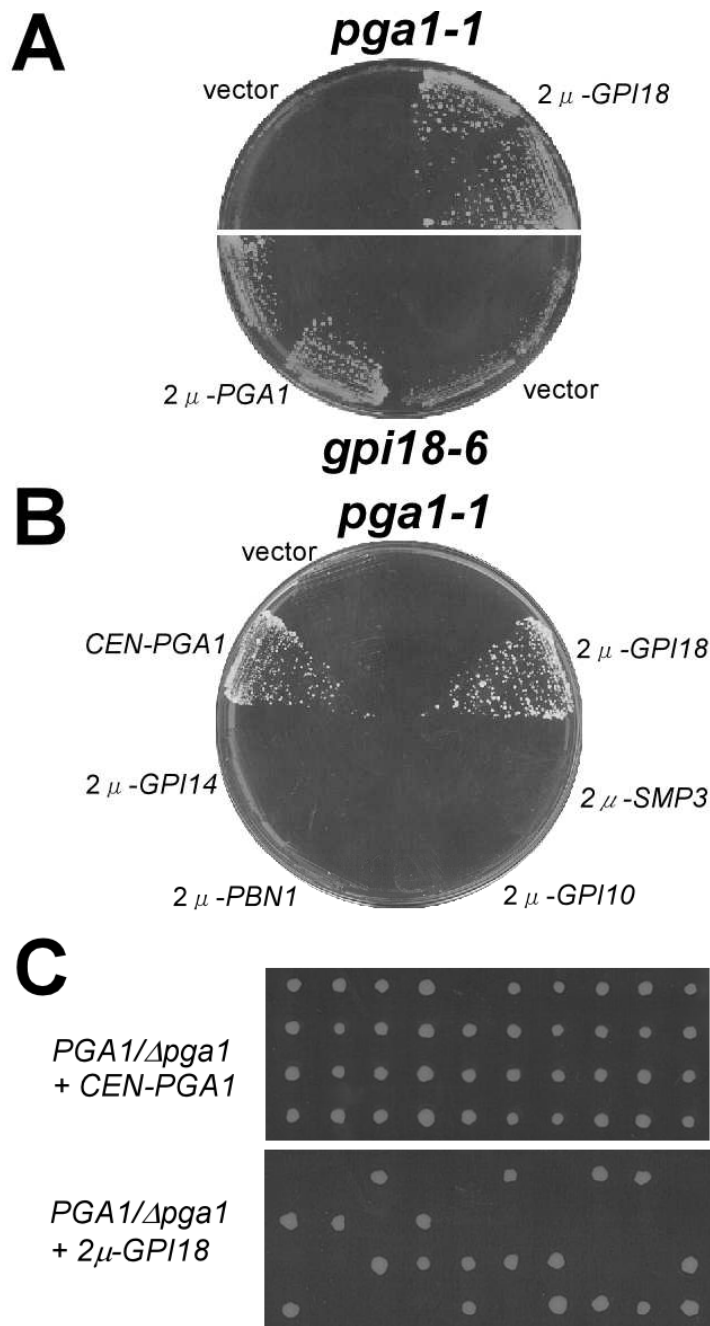


Figure 2-7 *PGA1*と*GPI18*は互いの温度感受性変異株の多コピーサプレッサーとなる

(A) *pga1-1*株に*GPI18*を, *gpi18-6*に*PGA1*を多コピーで導入し, YPDプレート上で37°C, 2日間培養した. いずれの場合も温度感受性が抑制された.

(B) 各遺伝子を*pga1-1*株に多コピーで導入し, YPDプレート上で37°C, 2日間培養した. *GPI18*以外の*GPI*-MTをコードする遺伝子は*pga1-1*の多コピーサプレッサーにはならなかった.

(C) *PGA1*/ Δ *pga1*::*kanMX4*二倍体(CAY341)にpRS416-*PGA1*またはpRS426-*GPI18*を形質転換し, 胞子形成させ, 四分子解析を行った. 25°Cの培養で, *GPI18*の多コピー発現は Δ *pga1*の致死性を抑制しなかった.

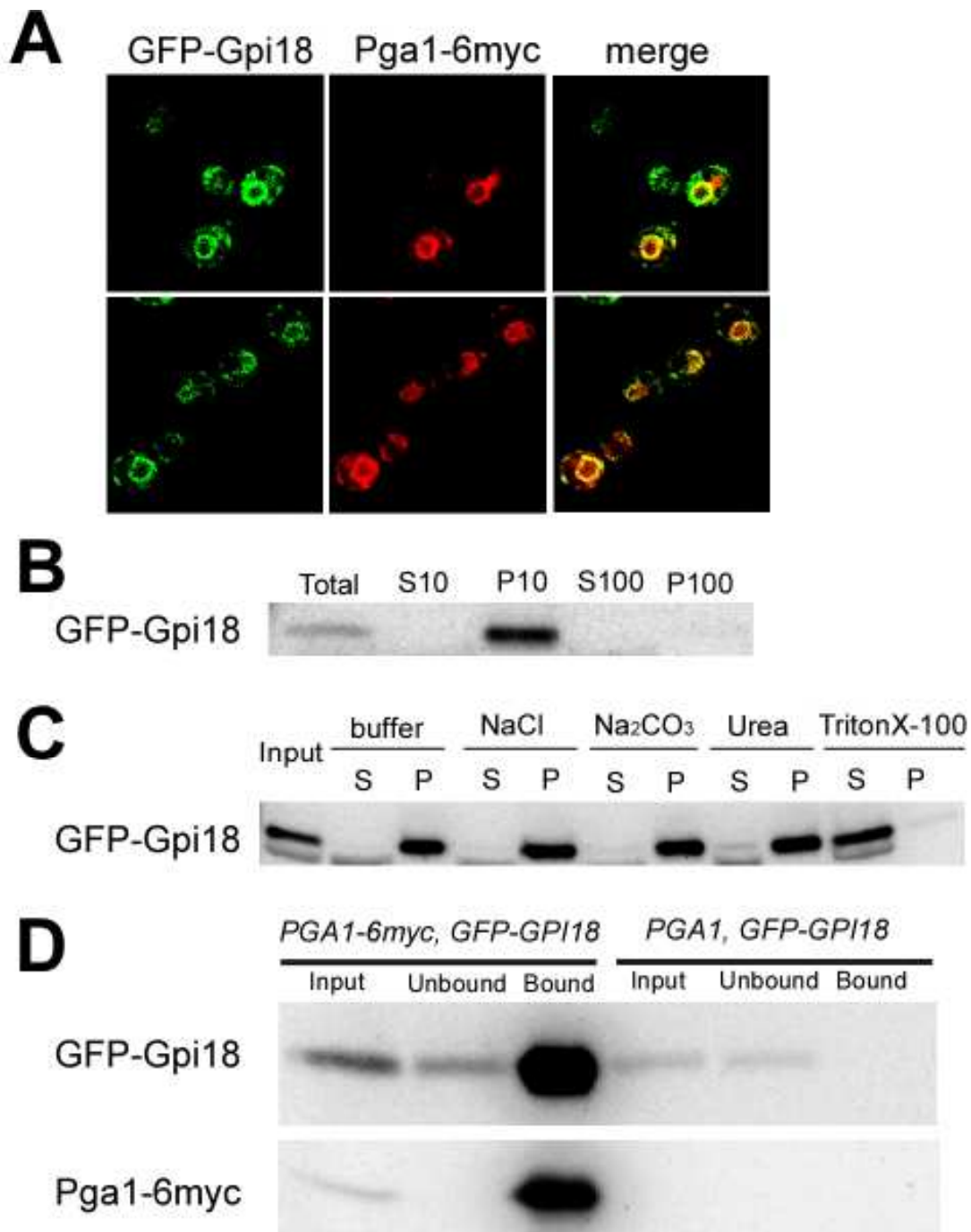


Figure 2-8 Pga1とGpi18は小胞体膜で相互作用している

(A) KSY217の共焦点レーザー顕微鏡による観察で、GFP-Gpi18の蛍光とPga1-6mycの間接蛍光 (Alexa568, anti-mouse)は小胞体上で重なった。

(B) Figure 2-3Bと同様に遠心分画を行った。GFP-Gpi18は主にP10に回収された。

(C) Figure 2-3Cと同様に可溶性試験を行った。GFP-Gpi18は膜貫通タンパク質である。

(D) *PGA1*または*PGA1-6myc*と、*GFP-GPI18*を共発現する株(KSY217)からlysateを調製し、膜を1% Triton X-100で可溶化して超遠心し、その上清から抗myc抗体で免疫沈降を行った。

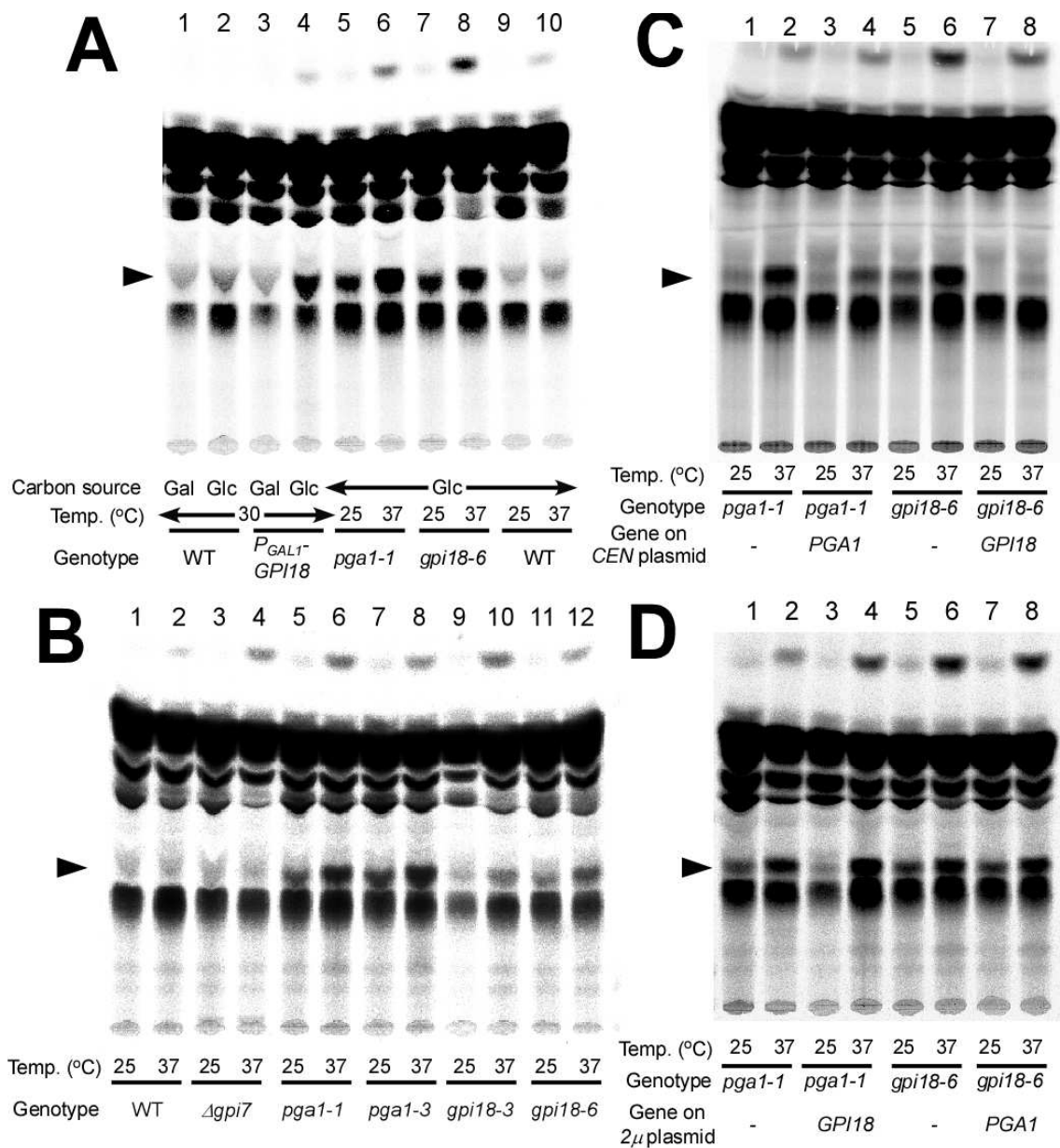


Figure 2-9 $pga1$ 変異株は $gpi18$ 変異株と同じGPI中間体を蓄積する

myo-2-[3 H]inositolで標識された脂質を抽出し、クロロホルム:メタノール:水(5:5:1)の展開溶媒でTLCによって分離し、オートラジオグラフィーで検出した。遺伝子をGALプロモーター制御下に置いた株は30°CでSDまたはSGで20時間培養し、温度感受性変異株ははじめ25°Cで培養し、25/37°Cに移して[3 H]inositolラベリングを行った。矢頭はマンノースが1つだけ付加されたGPI生合成中間体lipid004-1を示す。

(A) P_{GAL1} - $GPI18$ 株をSD培地で培養するとlipid004-1を蓄積し、 $pga1-1$ と $gpi18-6$ も同じGPI中間体を蓄積した。

(B) $pga1-1$ と $gpi18-6$ 以外の変異株($pga1-3$, $gpi18-3$)もlipid004-1を蓄積した。

(C) $pga1-1$ 株にPGA1を、 $gpi18-6$ 株にGPI18を低コピーで導入することでlipid004-1の蓄積が抑制された。

(D) $pga1-1$ 株にGPI18を、 $gpi18-6$ 株にPGA1を多コピーで導入しても、lipid004-1の蓄積は抑制されなかった。

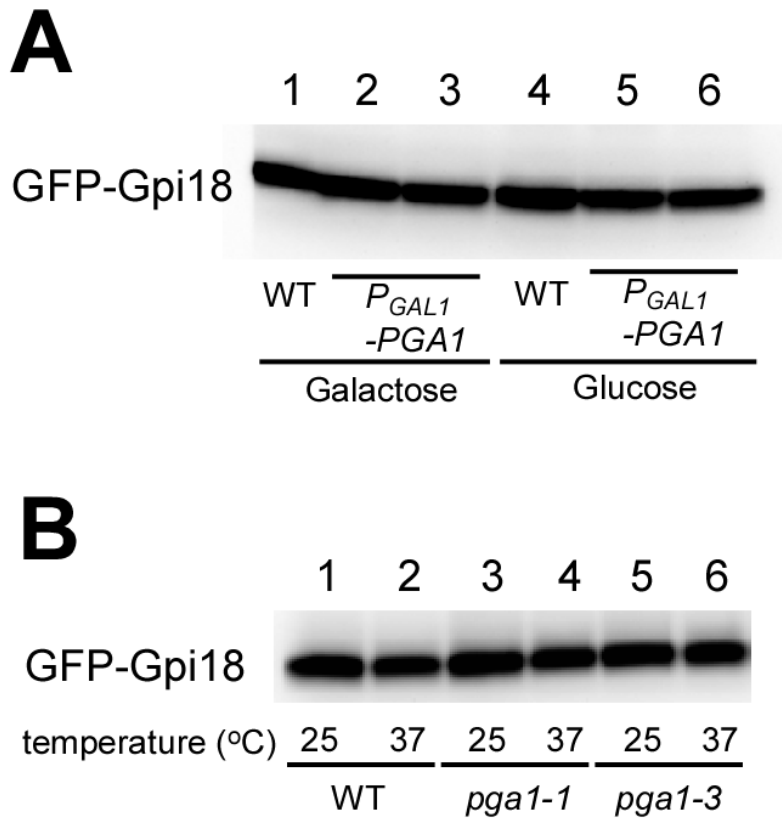


Figure 2-10 Pga1はGpi18の安定性には関わっていない

(A) GFP-Gpi18を野生株 (KSY307: lane1 and 4) または P_{GAL1} -*PGA1* 株 (KSY308: lane2 and 5, KSY309: lane3 and 6) で発現させ、SG または SD 培地で20時間培養した。Total cell lysateを調製し、SDS-PAGE, ウェスタンブロッティングでGFP-Gpi18を検出した。

(B) GFP-Gpi18を野生株 (KSY307) または *pga1-1* 株 (KSY312), *pga1-3* 株 (KSY313) に発現させ、25°C で培養した後25°C または37°C でさらに2時間培養した。Total cell lysateを調製し、SDS-PAGE, ウェスタンブロッティングでGFP-Gpi18を検出した。

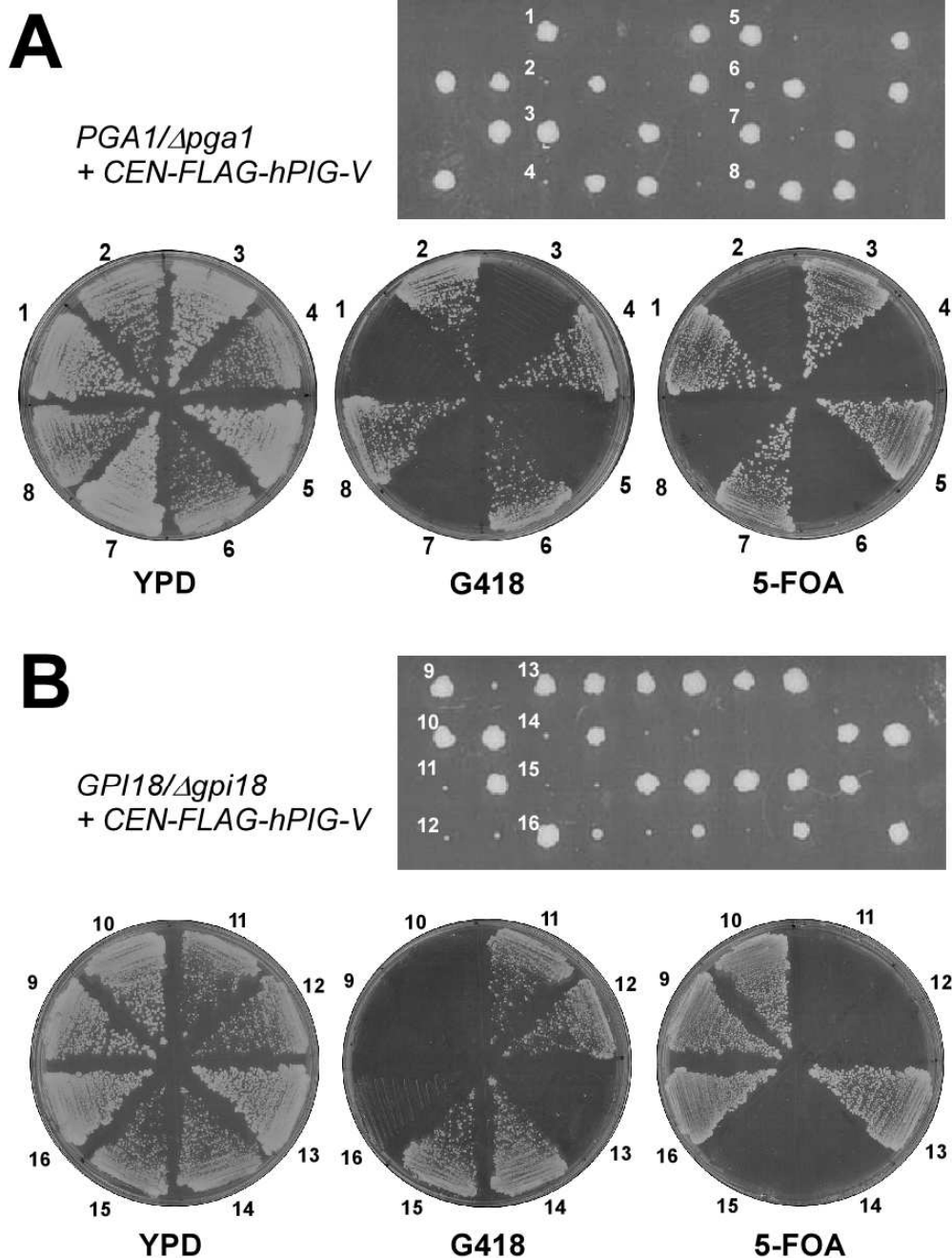


Figure 2-11 ヒトPIG-Vは $\Delta pga1$ と $\Delta gpi18$ の生育を同程度に相補する

(A) *PGA1/Δpga1::kanMX4*二倍体 (CAY341) に pFLAG-hPIG-V (*URA3* マーカー) を形質転換し、胞子形成させ、四分子解析を行った。番号を付けた四分子を G418 プレートおよび 5-FOA プレートにストリークし、25°C で 3 日間培養した。2, 4, 6, 8 は G418 プレートで生え 5-FOA プレートで生えられず、 $\Delta pga1::kanMX4$ に pFLAG-hPIG-V が相補された株、1, 3, 5, 7 は G418 プレートで生えられず 5-FOA プレートで生え、pFLAG-hPIG-V がなくても生育できる *PGA1* 株であると分かった。

(B) *GPI18/Δgpi18::kanMX4*二倍体 (KSY223) に pFLAG-hPIG-V を形質転換し、胞子形成させた。番号を付けた四分子の遺伝型を A と同様に確認した。11, 12, 14, 15 は $\Delta gpi18::kanMX4$ に pFLAG-hPIG-V が相補された株、9, 10, 13, 16 は *GPI18* 株であると分かった。

2-3 考察

本章では, *YNL158w (PGA1)* にコードされる機能未知必須膜タンパク質 *Pga1* について, 詳細な機能解析を行った. *PGA1* の温度感受性変異株は GPI アンカータンパク質 *Gas1* のプロセッシングが異常になっており (Fig. 2-4A), 変異株を用いて行った生化学的実験から, その異常が GPI の合成・転移の欠損に起因することが示唆された (Fig. 2-5 and 6). さらに, 温度感受性の多コピーサプレッサーとして, GPI-MT-II をコードすると報告されていた *GPI18* を同定し (Fig. 2-7), *pga1* 変異株と *gpi18* 変異株で同じ GPI 生合成中間体が蓄積することを見出した (Fig. 2-9). *Gpi18* と *Pga1* は小胞体に共局在するだけでなく, Triton X-100 で膜を可溶化した cell lysate からの免疫沈降で共沈し, 複合体を形成していた (Fig. 2-8). 以上の結果より, *Pga1* が GPI-MT-II の新規かつ必須なサブユニットであるという結論に達した.

GPI-MT-II におけるサブユニットの役割

Pga1 が GPI-MT-II のサブユニットであり, かつ活性に重要であるという点は本章における実験結果から明らかであるが, 酵素複合体においてどのような役割を担っているのかという疑問が残されている. *Pga1* は, シグナルペプチドを除くと膜貫通領域を 1 つのみ有する. 一方, 結合相手の *Gpi18* は 8 回の膜貫通領域を持つと推定されている. GPI-MT-II 以外の GPI-MT には, 糖転移酵素の活性に必要とされる DXD モチーフが存在し, DXD モチーフをもつタンパク質は全て複数回 (*Gpi14* が 7 回, *Gpi10* が 9 回, *Smp3* が 6 回) 膜貫通型である. CHO 細胞において, 2 つのサブユニットからなることが分かっている GPI-MT-I の場合, PIG-M (酵母では *Gpi14*) に DXD モチーフが存在する. もう一方のサブユニットである PIG-X (酵母では *Pbn1*) の分子機能は分かっていないが, PIG-X は PIG-M の安定性に重要であることが報告されている (Ashida et al., 2005). 複数

回膜貫通タンパク質と 1 回膜貫通タンパク質からなる複合体という点が Gpi18-Pga1 複合体と共通していたことから, Pga1 も Pbn1 と同様に, 結合相手である Gpi18 を安定化する役割を担っている可能性が推測されたが, *pga1-1* を制限温度で培養しても, あるいは *GAL* プロモーターにより *PGAI* の発現を抑制しても, Gpi18 の量に変化は見られなかった (Fig. 2-10). よって, Pga1 は GPI-MT-II が酵素として機能を発揮するための必須な役割を担っており, タンパク質としての安定性には寄与していないと考えられた.

PIG-V と Gpi18 が他の GPI-MT の複数回膜貫通タンパク質と違って DXD モチーフを持たないことは, GPI-MT-II には活性を担う他の未同定のサブユニットがあるのではないかと推測させる. しかしながら, これらのタンパク質は Pmt2 ファミリータンパク質 (Girrbach and Strahl, 2003) に共通して見られる構造的類似点を持っている. Pmt2 ファミリータンパク質は O-マンノース転移酵素であるが DXD モチーフを持たない. また, いずれも複数回膜貫通タンパク質である. このファミリーに属するタンパク質は, 小胞体内腔に面する 2 つの保存された親水性ループを持つ. 1 つは 1 番目と 2 番目の膜貫通領域の間に, もう 1 つは 5 番目と 6 番目の膜貫通領域の間に存在する. 前者のループには Pmt2 ファミリーに共通して Trp-Asp モチーフがあり, これは Gpi18, PIG-V にも存在する (それぞれ ⁶¹Trp-Asp と ⁶⁶Trp-Asp). CHO 細胞において, PIG-V の W66L あるいは D67A 変異によって, GPI 合成不全の表現型が観察されている (Kang et al., 2005) ことから, PIG-V は Pmt2 ファミリーに属する糖転移酵素であることが推察される. 以上のような構造的特徴から, GPI-MT-II は DXD モチーフ無しで糖転移活性を発揮できる酵素であると考えられる.

PIG-V と Pga1 の関係

Pga1 の GPI-MT-II における機能を考える上で, 最も注目すべき点は配列上の

ホモログが高等真核生物に存在しない点であろう。結合相手の Gpi18 や他の GPI-MT, さらには GPI 合成の最初のステップを行う PI-GlcNAc-transferase の 6 つのサブユニットや完成した GPI をタンパク質に転移する GPI-transamidase の 5 つのサブユニットにいたるまで, GPI 合成に直接関わるタンパク質はいずれも哺乳類にホモログを持つのに, Pga1 には真菌にしかホモログが存在しない。このステップでは真菌特有の必須な反応が行われている可能性も考えられたが, 基質が共通であること, 前後のステップで真菌特有のタンパク質が働いているという報告が無いことから, 配列上は似ていないが機能的には類似しているタンパク質が存在しているか, PIG-V に Pga1 の機能が含まれているか, いずれかであろうと考えた。そこで, ヒト PIG-V 遺伝子による Δ pgal および Δ gpi18 の生育相補試験を行った。結果として, PIG-V を低コピープラスミドで導入すると, いずれの破壊株の生育も同程度に相補した (Fig. 2-11)。一方, GPI18 を多コピーで導入しても, Δ pgal の生育は全く相補しなかった (Fig. 2-7C)。これらの結果を併せて考えると, Gpi18 には Pga1 の機能は含まれず, PIG-V は Gpi18 と Pga1 の両方の機能を持つ, すなわち哺乳類で 1 つのタンパク質として機能している GPI-MT-II は, 真菌類では 2 つのタンパク質から構成されていると考えられる。以上のように, PIG-V が Pga1 の機能を含むことが実験的に強く示唆されたものの, PIG-V と Pga1 との間に保存された配列は見つからなかった。ただ, PIG-V と Gpi18 の配列を比べると, 7 番目の膜貫通領域の両側に, Gpi18 では抜け落ちている親水性領域が存在する (Kang et al., 2005)。この部分の機能を Pga1 が行っている可能性が考えられる。同様の抜け落ちは *D. melanogaster* においても見られ, ショウジョウバエでは Pga1 の機能ホモログが存在する可能性がある (配列上のホモログは無い)。

※ 本章に記載した実験結果のうち, 2-2-1~2-2-8 の一部については 17 年度佐

藤修士論文において発表しているが、データの再現性の確認などを行って改めて掲載した。

第3章 Ydr367w/Kei1 の解析

3-1 はじめに

真核生物の膜脂質は、主に 3 つのグループ、すなわちグリセロリン脂質、ステロール、そしてスフィンゴ脂質から構成されている。量的に最も多いのが、グリセロールを骨格としたリン脂質である。エルゴステロールは真菌に特異的に見られるステロールで、動物細胞におけるコレステロールに相当する。スフィンゴ脂質はセラミドを基本骨格とするが、真菌においてはセラミドに行われる修飾がイノシトールリン酸を含んでおり、このタイプのスフィンゴ脂質は植物には見られるが、哺乳類には存在しない(Holthuis et al., 2001)。出芽酵母 *S. cerevisiae* のスフィンゴ脂質は IPC [Inositol phosphorylceramide], MIPC [Mannosylinositol phosphorylceramide], M(IP)₂C [Mannosyl diinositol phosphorylceramide] の 3 種からなる(Cowart and Obeid, 2007; Dickson, 2008)。 *S. cerevisiae* におけるスフィンゴ脂質生合成経路を Figure 3-1 に示した。セラミドはパルミトイル CoA とセリンから作られる「スフィンゴシン」と、パルミトイル CoA とマロニル CoA から作られる「長鎖脂肪酸 CoA」から、セラミドシンターゼ (Lag1, Lac1, Lip1) によって合成される(Guillas et al., 2001; Schorling et al., 2001; Vallee and Riezman, 2005)。長鎖脂肪酸は *S. cerevisiae* では基本的に C26 まで炭素鎖が伸長される。スフィンゴシンは、水酸基の数によってジヒドロスフィンゴシンとフィトスフィンゴシンの 2 種類が存在する。セラミドも水酸基の数・位置によって 4 タイプ存在するが、ここでは、それらをまとめてセラミドと称する。

小胞体で合成されたセラミドは、小胞輸送と小胞を介さない輸送のおそらく両方によりゴルジ体に運ばれ(Funato and Riezman, 2001) , セラミドに対する修飾は全てゴルジ体で行われる(Levine et al., 2000)。まず、ホスファチジルイノシトール (PI) からイノシトールリン酸がセラミドに付加され、IPC が作られる。

IPC はさらにマンノースを付加され、MIPC となる。MIPC には再びイノシトールリン酸が付加され、M(IP)₂C となる。この反応の中で、IPC の合成だけが生育に必須であることが分かっており、実際、IPC を合成する酵素（以降 IPC シンターゼと呼ぶ）をコードすると報告されている *AURI* の破壊は酵母細胞にとって致死となる。また、*Aur1* に作用して IPC シンターゼの活性を阻害する薬剤、Aureobasidin A (AbA) もごく低濃度で非常に強い細胞毒性を発揮する(Nagiec et al., 1997)。それに対し、その次の MIPC 合成反応を担う 3 種のタンパク質をコードする遺伝子 (*CSG1*, *CSG2*, *CSH1*) については、 $\Delta csg2$ および $\Delta csg1 \Delta sch1$ はカルシウムイオンに対して感受性になるものの、通常の培養条件では生育に影響は見られない(Uemura et al., 2003)。M(IP)₂C シンターゼをコードする *IPT1* に関しても、破壊株は野生株同様に生育する。 $\Delta aur1$ の致死性および AbA の高い細胞毒性は、スフィンゴ脂質の必須の機能と共に、セラミドの蓄積が細胞にとって致死的であるからだと考えられている。このことは、acyl-CoA 依存的セラミド合成酵素の活性に必須な *LAG1* と *LAC1* の二重破壊株が AbA に耐性となる (Schorling et al., 2001) ことから裏付けられている。なお、*S. cerevisiae* には acyl-CoA 非依存的なセラミド合成活性を逆反応活性として有する ceramidase をコードする遺伝子 *YPC1* と *YDC1* があり(Mao et al., 2000a; Mao et al., 2000b)、その活性により遺伝学的バックグラウンドによっては $\Delta lag1 \Delta lac1$ は致死とはならず、上記のような検討が可能となっている。

スフィンゴ脂質の機能には未知の部分が多いが、脂肪酸の転移酵素をコードする *SLC1* 遺伝子に変異を入れて (*slc1-1*)、グリセロリン脂質に C26 の脂肪酸鎖が導入されるように改変された変異株を用いた解析で、興味深い報告がされている(Dickson et al., 1990; Lester et al., 1993; Patton et al., 1992)。*Alc1* ではパルミチン酸転移酵素が作られなくなるので、セラミドおよびスフィンゴ脂質が全く合成されなくなり、培地中にフィトスフィンゴシンを添加しない限り致死となる

が、*Alc1* にさらに *slc1-1* 変異を加えるとフィトスフィンゴシンを添加しなくても生育できるようになる。この二重変異株は pH や温度変化などのストレスに高感受性となるが、培地中にフィトスフィンゴシンを添加するとそのような条件下でも生育を回復する。これらの観察から、スフィンゴ脂質は長鎖脂肪酸を含むリン脂質として生育に必須であること、ストレス条件下ではその環境に細胞を適応させるための正しい応答、すなわちシグナル伝達に必須であることが分かる。

本研究開始時点で、*Ydr367w* については「C 末端に 6myc を付加し、間接蛍光法で観察するとドット状に見える」ということしか分かっていなかった。また、網羅的局在解析で、C 末端に GFP を付加した場合、ゴルジ体様ドットが観察されるという報告がなされており (Huh et al., 2003), *Ydr367w-6myc* の間接蛍光が観察されたドット状の構造はおそらくゴルジ体であろうと考えられた。本研究では *Ydr367w* の機能解析を行うため、温度感受性変異株を作製、その温度感受性を多コピー発現で抑制する遺伝子 (多コピーサプレッサー) のスクリーニングを行い、非常に強いサプレッサー活性を発揮する *AUR1* 遺伝子を同定した。さらに、その後の解析で *Ydr367w* が late ゴルジで働くエンドプロテアーゼ *Kex2* の基質となること、*Aur1* と複合体を形成すること、IPC シンターゼの活性に必須であることを見出し、*YDR367w* を *KEII* (*K*ex2 cleavable protein *E*ssential for *I*PC synthesis *I*) と命名した。今後、*YDR367w* を *KEII* と表記する。

使用菌株

Strain	Genotype and plasmid
KA31a	<i>MATa, his3Δ leu2Δ trp1Δ ura3Δ</i>
BY4741	<i>MATa, his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
BY4743	<i>MATa/MATa, his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 met15Δ0/MET15 LYS2/lys2Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0</i>
KSY66	as BY4741, <i>kei1Δ::kanMX4</i> , pKS23 (<i>CEN, URA3 KEI1-GFP</i>)
KSY271	as BY4741, <i>kei1Δ::kei1-1 LEU2</i>
KSY431	as BY4741, <i>kei1Δ::kanMX4</i> , pKS243 (<i>CEN, HIS3 KEI1-GFP</i>)
KSY444	as BY4741, <i>kei1Δ::kanMX4</i> , pKS25 (<i>CEN, HIS3 KEI1</i>), pKS277 (<i>CEN, AUR1-3HA</i>)
KSY448	as BY4741, <i>kei1Δ::kanMX4</i> , pKS124 (<i>CEN, HIS3 KEI1-6myc</i>), pKS277 (<i>CEN, AUR1-3HA</i>)
KSY506	as BY4743, <i>kei1Δ::kanMX4/KEI1</i>
KSY507	as BY4741, <i>kei1Δ::kanMX4</i> , pKS301 (<i>CEN, HIS3 KEI1(intron removed)-GFP</i>)
KSY512	as BY4741, <i>aur1Δ::AUR1-GFP HIS3</i>
KSY513	as KSY271, <i>aur1Δ::AUR1-GFP HIS3</i>
KSY525	as BY4741, <i>aur1Δ::AUR1-3HA HIS3</i>
KSY527	as BY4741, <i>kei1Δ::KEI1-GFP URA3</i>
KSY530	as KSY271, <i>aur1Δ::AUR1-3HA HIS3</i>
KSY531	as BY4741, <i>aur1Δ::AUR1-3HA HIS3, keir1Δ::KEI1-GFP URA3</i>
KSY548	as BY4741, <i>kex2Δ::LEU2</i>
KSY571	as KSY512, <i>pep4Δ::LEU2</i>
KSY588	as KSY525, <i>kex2Δ::LEU2</i>
KSY603	as BY4741, <i>kei1Δ::kanMX4</i> , pKS352a (<i>CEN, HIS3 kei1-1-GFP</i>)
KSY604	as BY4741, <i>kei1Δ::kanMX4</i> , pKS352b (<i>CEN, HIS3 kei1-1-GFP</i>)

使用菌株 (続き)

Strain	Genotype and plasmid
KSY605	as BY4741, <i>kei1Δ::kanMX4</i> , pKS357a (<i>CEN, HIS3 kei1^{ΔC}-GFP</i>)
KSY606	as BY4741, <i>kei1Δ::kanMX4</i> , pKS357b (<i>CEN, HIS3 kei1^{ΔC}-GFP</i>)
KSY607	as BY4741, pKS342 (<i>CEN, URA3 kei1^{K141S}-GFP</i>)
KSY609	as BY4741, pKS344 (<i>CEN, URA3 kei1^{R135S}-GFP</i>)
KSY611	as BY4741, pKS346 (<i>CEN, URA3 kei1^{K131S}-GFP</i>)
KSY614	as KSY548, pKS342 (<i>CEN, URA3 kei1^{K141S}-GFP</i>)
KSY616	as KSY548, pKS344 (<i>CEN, URA3 kei1^{R135S}-GFP</i>)
KSY618	as KSY548, pKS346 (<i>CEN, URA3 kei1^{K131S}-GFP</i>)
KSY625	as BY4741, pKS355 (<i>CEN, URA3 KEI1-GFP</i>)
KSY627	as KSY548, pKS355 (<i>CEN, URA3 KEI1-GFP</i>)
KSY637	as BY4741, <i>kei1Δ::kanMX4</i> , pKS243 (<i>CEN, HIS3 KEI1-GFP</i>)
KSY638	as BY4741, <i>kei1Δ::kanMX4</i> , pKS243 (<i>CEN, HIS3 KEI1-GFP</i>)
KSY639	as BY4741, <i>kei1Δ::kanMX4</i> , pKS243 (<i>CEN, HIS3 kei1-1-GFP</i>)
KSY640	as BY4741, <i>kei1Δ::kanMX4</i> , pKS243 (<i>CEN, HIS3 kei1-1-GFP</i>)
KSY670	as KSY525, <i>kei1Δ::kanMX4</i> , pKS344 (<i>CEN, URA3 kei1^{R135S}-GFP</i>)
KSY672	as KSY525, <i>kei1Δ::kanMX4</i> , pKS353 (<i>CEN, URA3 kei1^{R135S}-GFP</i>)
KSY686	as BY4741, <i>kei1Δ::kanMX4</i> , <i>ura3-52::KEI1-GFP, URA3</i>
KSY688	as BY4741, <i>kei1Δ::kanMX4</i> , <i>ura3-52::kei1^{R135S}-GFP, URA3</i>
KSY689	as BY4741, <i>kei1Δ::kanMX4</i> , <i>ura3-52::kei1^{R135S}-GFP, URA3</i>
KSY692	as BY4741, <i>kei1Δ::kanMX4</i> , <i>ura3-52::kei1-1-GFP, URA3</i>
KSY694	as BY4741, <i>kei1Δ::kanMX4</i> , <i>ura3-52::kei1^{ΔC}-GFP, URA3</i>

使用菌株 (続き)

Strain	Genotype and plasmid
KSY696	as BY4741, <i>kei1Δ::kanMX4</i> , <i>ura3-52::KEI1-GFP</i> , <i>URA3</i>
KSY706	as BY4741, <i>kei1Δ::kanMX4</i> , pKS368 (<i>CEN</i> , <i>URA3 kei1^{R135S}</i>), <i>aur1Δ::AUR1-3HA HIS3</i>
KSY714	as KSY527, <i>kre2Δ::KRE2-3HA LEU2</i>
KSY719	as KSY66, <i>aur1Δ::AUR1-3HA HIS3</i>
KSY723	as BY4741, <i>kei1Δ::GFP-KEI1</i> , <i>URA3</i>
KSY725	as KSY723, <i>kre2Δ::KRE2-3HA LEU2</i>
KSY753	as BY4741, <i>ura3-52::GFP-kei1^{F103I}</i> , <i>URA3</i>
KSY771	as BY4741, <i>kei1Δ::kanMX4</i> , pKS380 (<i>CEN</i> , <i>LEU2 KEI1-GFP</i>), <i>aur1Δ::AUR1-3HA HIS3</i>
KSY773	as BY4741, <i>kei1Δ::kanMX4</i> , pKS381 (<i>CEN</i> , <i>LEU2 kei1^{F103I}-GFP</i>), <i>aur1Δ::AUR1-3HA HIS3</i>
KSY775	as BY4741, <i>kei1Δ::kanMX4</i> , pKS382 (<i>CEN</i> , <i>LEU2 kei1^{ΔC}-GFP</i>), <i>aur1Δ::AUR1-3HA HIS3</i>
THY4-2	as KA31a, <i>kre2Δ::KRE2-3HA LEU2</i>
YKI59	as KA31a, <i>erd1Δ</i>
YNY309	as KA31a, <i>sec12^{ts}</i>
YNY401	as KA31a, <i>emp24Δ</i>

3-2 結果

3-2-1 Kei1 は真菌類にのみホモログを持つ

Saccharomyces Genome Database (SGD) によると, Kei1 は, 221 アミノ酸からなり, 計算上の推定分子量は 25,484, 等電点は 8.06 のタンパク質である. Kyte-Doolittle による疎水性プロット (Fig. 3-2B) の結果から, 4つの膜貫通領域を持つと推定される. SGD の PSI-BLAST サーチによれば, ホモログは真菌類にのみ存在し, 哺乳類, 昆虫, 植物には見当たらない. *S. cerevisiae* の Kei1 と, 真菌類の他種で見つかった類似の配列を Figure 3-2A で比較した. 基本的に疎水性の高い残基が多い配列となっているが, 3番目と4番目の膜貫通領域の間および4番目の膜貫通領域の後からC末端まで, 比較的長い親水的な領域が存在する. 相同性を比較すると, 3番目と4番目の膜貫通領域の間のみが突出して相同性が低いことが分かり, この部分は機能的にあまり重要でないと推測される.

3-2-2 Kei1 は late ゴルジエンドプロテアーゼ Kex2 の新規な基質タンパク質であり, 切断前・後ともに膜を貫通している

これまでの解析で, Kei1 の C 末端に 6myc を付加して間接蛍光法で観察した場合, ドット状の構造体が染色されることを確認していた (平成 17 年度佐藤修士論文). Huh らによって行われた網羅的な局在解析で, C 末端に GFP を付加した構築で同様にドット状の構築が観察されていた (Huh et al., 2003) ので, 本研究においてもまずは C 末端に GFP を付加した構築をプラスミドに乗せて破壊株で発現させ, その挙動を観察した. Total Cell Lysate (TCL) を調製してタンパク質を SDS-PAGE で分離し, ウェスタンブロッティングで GFP を検出すると, 驚くべきことに, 泳動度が明らかに異なる 2 本のバンドが検出された (Fig. 3-3A). さらに, TCL を遠心により分画すると, 大きい分子量のバンドは P10 に多く回

収され、小さい分子量のバンドは P10・P100 にほぼ均等に回収された (Fig. 3-3A). P10 に多く回収されるパターンは ER の、P10・P100 に均等に回収されるパターンは early もしくは medial ゴルジに局在するタンパク質に見られるパターンである. このことから、Keil は細胞中で、大きさの異なる少なくとも 2 種類の形で存在し、かつそれらは細胞内の違うコンパートメントに局在する可能性が高いことが明らかとなった.

この結果から、2つの可能性が考えられた. 1つ目は、転写・翻訳開始点が複数あり、C 末端にタグを付けるとそれぞれに対応した長さの翻訳産物が GFP と融合した形で発現される、というものである. もうひとつは、プロセッシングを受け、切られたものは切られる前のものと異なる場所に存在する、というものである. まずは、1つ目の可能性から検証した. この遺伝子にはイントロンが含まれることから、転写開始点がこの前後で 2ヶ所ある可能性を考え、イントロン部分を削って、スプライシング無しで最初のメチオニンから終始コドンまでの mRNA ができるように設計し、C 末端に GFP が融合する構築でプラスミドから発現させた. その結果、やはり SDS-PAGE・ウェスタンブロット解析で 2本のバンドが出現し、イントロンの影響は全く無いことが明らかとなった (Fig. 3-3B). さらに、Miura らの転写産物解析 (Miura et al., 2006) および Zhang と Dietrich の転写開始点解析 (Zhang and Dietrich, 2005) からは、いずれも最初のメチオニンより前からの転写しか確認されておらず、転写開始点が複数存在する可能性は低いと考えられた.

そこで、もうひとつの可能性、すなわちプロセッシングを受けている可能性を考えた. この場合、分子量の大きなバンドは小胞体局在の、分子量の小さなタンパク質はゴルジ体局在の挙動を示すので、プロセッシングはゴルジ体で行われていると推測した. ゴルジ体でタンパク質をプロセッシングするものとして、late ゴルジに局在するエンドプロテアーゼ Kex2 が知られている (Fuller et al., 1989;

Redding et al., 1991). そこで、野生株および $\Delta kex2$ 株でプラスミドから Kei1-GFP を発現させ、SDS-PAGE・ウェスタンブロット解析を行った。その結果、小さい分子量のバンドが殆ど消失し、Kei1 が Kex2 の基質である可能性が示唆された (Fig. 3-3C)。Kex2 は、塩基性の残基を好んで認識することが知られており、特に、di-basic な配列 (KK, KR, RR) をよく認識することが *in vitro* の実験で明らかにされている (Rockwell and Fuller, 1998)。SDS-PAGE の泳動度から推定される分子量から、3 番目と 4 番目の膜貫通領域の間に Kex2 の認識部位があると推定したが、ここには di-basic な配列は存在しなかった。そこで、この領域に存在していた 3 つの塩基性残基、すなわち K131, R135, K141 をそれぞれセリンに置換し、C 末端に GFP を付加してプラスミドで発現させた。その結果、R135S のみ小さい分子量のバンドが殆ど消失した (Fig. 3-3C)。このことから、Kei1 はゴルジ体に運ばれた後 late ゴルジまで到達し、そこで R135 残基を Kex2 によって認識され、切断を受けていると考えられた。

ところで、疎水性プロットの予測どおりに膜貫通領域が存在するならば、Kei1 は Kex2 に切断された後も、N 末端・C 末端ともに膜貫通領域を持っているはずである。そこで、N 末端もしくは C 末端に GFP を付加した Kei1 に対して、可溶性試験を行った。その結果、どちらに GFP を付加した場合でも、Kex2 切断を受ける前・後ともに、塩・アルカリ・尿素処理では超遠心で完全に沈殿し、界面活性剤 Triton X-100 を加えて膜そのものを可溶化した場合だけ、超遠心の上清に回収された (Fig. 3-4)。よって、Kei1 は Kex2 による切断前・後共に、膜に貫通した形で存在していることが分かった。

3-2-3 Kei1 は ER および medial Golgi に局在する

Kei1 は late ゴルジの Kex2 によって切断されることが明らかとなったが、遠心分画の結果は、切断後の Kei1 が Kex2 のある late ゴルジではなく、early もしく

は medial ゴルジに局在していることを示唆していた。局在をより詳細に検討するために、*KEII-GFP* をクロモソーム上の *KEII* の locus に組み込み、自身のプロモーターで発現させ、顕微鏡観察と蔗糖密度勾配遠心を組み合わせて、*Kei1* の局在をより厳密に決定することを試みた。

まず、Conchon らの方法(Conchon et al., 1999)を参考にして、蔗糖密度勾配遠心により early medial late を異なるピークとして検出できるように蔗糖密度勾配を調製し、10,000 g の遠心で小胞体画分を除いた lysate を分画に供した。*Kei1-GFP* のピークを early ゴルジの t-SNARE である *Sed5*(Banfield et al., 1994)および late ゴルジの *Kex2* と比較した結果、*Kei1-GFP* のピークは *Sed5* と *Kex2* のいずれとも重ならなかった (Fig. 3-5A and B)。そこで、今度は medial ゴルジに局在すると報告されていた *Kre2-3HA*(Lussier et al., 1995)を共発現させ、同様に蔗糖密度勾配遠心で分画した。その結果、*Kei1-GFP* のピークと *Kre2-3HA* のパターンは非常に良く一致していた (Fig. 3-5A and B)。この構築の細胞を用いて、*Kre2-3HA* を間接蛍光法により *Kei1-GFP* と共染色して観察したところ、それぞれのドット状のシグナルが殆ど一致することが分かった (Fig. 3-5C, upper panel)。このことから、切断された *Kei1-GFP* が medial ゴルジに局在していると分かった。すなわち、*Kei1* は late ゴルジで *Kex2* により切断を受けた後、逆行輸送により medial ゴルジに運ばれ、その後はおそらく medial-late 間をリサイクルしているが、定常的には medial ゴルジに大部分が局在していると考えられる。また、*Kei1* の N 末端に GFP を付加すると、C 末端に付加した場合と比べて蛍光が見難くなるものの、*Kre2-3HA* との共局在は明確に観察することが出来た (Fig. 3-5C, lower panel)。よって、*Kei1* が *Kex2* に切断されてできた N 末端側と C 末端側は、両方とも大部分が medial ゴルジに局在しているものと考えられた。

3-2-4 温度感受性変異アリール *kei1-1* の取得

前項で、Keil が medial ゴルジに局在していることを示したが、機能に関する手がかりは全く得られていなかった。そこで、温度感受性変異株を作製し、表現型・遺伝学的関連からその機能を推測しようと考えた。PGAI のときと同様に、error-prone PCR により変異を導入し、25°C では野生株と変わらず生育するが 37°C では著しく生育に欠損がある株をスクリーニングした。結果として、プラスミド依存的に温度感受性を示す変異アリアルを 1 つ (*keil-1*) 取得することに成功した。*keil-1* の配列をシーケンスし、どこの塩基に変異が起きているか調べた。その結果、3 番目の膜貫通領域の直後に塩基置換があり、103 番目のフェニルアラニン残基がイソロイシン残基に変わり、さらに 192 番目のグルタミン酸の後に 1 塩基欠失によるフレームシフトが起こっており、そのため 193・194 番目のグルタミン・アスパラギン残基がリジン・スレオニン残基に変わっており、その後に終始コドンが位置するようになっていた (Fig. 3-6A)。すなわち、F103I・Q193K・N194T および C 末端 27 残基欠失が起きている事が分かった。これ以降は、後半の変異による Q193K・N194T・C 末端 27 残基欠失をまとめて ΔC と表記する。変異点が特定できたので、さらに F103I および ΔC それぞれの変異が単独で温度感受性を示すか調べた。その結果、片方だけでは温度感受性を発揮せず、両方の変異が合わさって初めて温度感受性を示すことが分かった (Fig. 3-6B)。

3-2-5 *keil-1* 株における CPY, Gas1, インベルターゼの輸送・修飾・プロセッシングは正常である

Keil がゴルジ体に局在することから、タンパク質の輸送や修飾に関して必要な機能を果たしている可能性が示唆された。そこで、野生株、*keil-1* 株を許容温度で培養した後制限温度に移すことで、CPY と Gas1 の挙動に変化が出るか観察した。しかしながら、いずれのタンパク質の挙動も野生株と比べて顕著な違い

は見られなかった (Fig. 3-6C and D). また, インベルターゼの糖鎖修飾にも異常は見られなかった (Fig. 3-6E). 以上の結果から, Kei1 の機能は糖鎖修飾やタンパク質輸送には関わっていないことが示唆された.

3-2-6 *kei1-1* 株の温度感受性に対する多コピーサプレッサースクリーニング

次に, 遺伝学的に関連する遺伝子は何かを調べるため, 温度感受性のサプレッサースクリーニングを試みた. まず, スクリーニングの効率を上げるため野生型の *KEI1* 遺伝子をライブラリーから除く目的で, *kei1-1* アリールをクロモソーム上に相同組み換えで導入した株 (KSY271) を作製した. その株からクロモソーム DNA を調製し, 制限酵素処理により断片化して多コピー発現プラスミドに組み込み, ライブラリーを作製した. 作製したライブラリーを KSY271 に形質転換し, 一晚許容温度 (26.5°C) でインキュベートした後, 制限温度 (37°C) に移して 3~4 日インキュベートした. 生えてきたコロニーを YPD プレートにストリークして許容温度・制限温度下での生育を確認し, 温度感受性が抑制されていた候補株からプラスミドを回収した. 各プラスミドのインサートの配列をシークエンスして, 全長が含まれていた遺伝子を調べた. その結果, *GDAI* を含むインサートが 30 個, *AURI* を含むインサートが 2 個, *PSDI* を含むインサートが 3 個, *SFHI* を含むインサートが 1 個, *FMP16*・*PAA1*・*IPT1*・*SNF11* を含むインサートが 2 個, それぞれ同定された.

GDAI は GDPase をコードしており, ゴルジ体におけるマンノース転移に重要な遺伝子である (Abeijon et al., 1993; Berninsone et al., 1994). *AURI* はセラミドにイノシトールリン酸を付加する酵素を (Levine et al., 2000; Nagiec et al., 1997), *PSDI* はホスファチジルセリン (PS) をホスファチジルエタノールアミン (PE) に変換する酵素をコードしている (Clancey et al., 1993). *SFHI* (*YKL091c*) がコードする Sfh1 は脂質転移タンパク質 Sec14 と高い相同性を示す (Li et al., 2000).

FMP16 は機能未知のミトコンドリアタンパク質を(Reinders et al., 2006), *PAA1* は polyamine acetyltransferase を(Liu et al., 2005), *IPT1* は MIPC にイノシトールリン酸を付加する M(IP)₂C 合成酵素を(Dickson et al., 1997), *SNF11* は SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体のサブユニットをコードしている(Treich et al., 1995). それぞれのサプレッサー候補遺伝子を PCR で増幅し, 多コピープラスミドに組み込んで, サプレッサー活性の再現性を検討した. *FMP16*, *PAA1*, *IPT1*, *SNF11* からは, コードするタンパク質の局在・機能が他の候補遺伝子と最も近いと考えられる *IPT1* がサプレッサー活性を持つと予測して, *IPT1* のみサプレッサー活性を検討した. その結果, *IPT1* 以外の遺伝子は再現性を確認することができた (Fig. 3-7A). 中でも, IPC 合成酵素をコードすると報告されていた *AUR1* が突出して高いサプレッサー活性を持っており, その活性は低コピーで *KEI1* 自身を発現させたときと同等であった. このような非常に強いサプレッサー活性から, $\Delta kei1$ の致死性も抑制するのではないかと推測して, $\Delta kei1/KEI1$ の 2 倍体に $2\mu\text{-}AUR1$ を導入して孢子形成させ, 四分子解析を行ったが, 1 孢子囊の 4 つの孢子のうち, 最大で 2 つしか生えてこなかった (Fig. 3-7B). よって, *AUR1* の多コピー導入は $\Delta kei1$ の生育を相補することはできないと分かった. *AUR1* の多コピー発現が, *kei1-1* の温度感受性は非常に良く抑制するものの, 遺伝子破壊の致死性は全く抑制しない, という事実から, *Kei1* と *Aur1* は, 共通の経路で必須な機能を果たしている可能性が高いと考えられた.

なお, *AUR1* 以外のサプレッサー遺伝子と *kei1-1* の関係については考察で検討する.

3-2-7 *Kei1* は IPC シンターゼの新規サブユニットである

前述したように, *AUR1* は, 小胞体から運ばれてきたセラミドにイノシトールリン酸を付加して IPC に変換する IPC シンターゼをコードすると報告されてい

る. Keil が Aur1 と共通の経路で機能しているなら, *keil-1* 株では IPC の合成に欠損があるはずであり, 細胞内にはセラミドが蓄積し, IPC 以降のスフィンゴ脂質が欠乏していると考えられる. この状態の細胞は, Aur1 の活性を阻害する薬剤 AbA に高い感受性を示すと予測される. 実際, SC 培地上で, *keil-1* 株は許容温度下では野生株と変わらない生育を示したが, 0.08 $\mu\text{g/ml}$ の AbA を培地に加えると, 野生株と比べて著しい生育の阻害が見られた (Fig. 3-8A). このことから, *keil-1* 株では IPC の合成に欠損があるという予測が支持された.

そこで, Keil も IPC シンターゼのコンポーネントとして機能しているのではないかと推測し, Aur1 との *in vivo* での結合を免疫沈降により検証した. *KEII* の C 末端に 6myc タグを付けて発現させ, さらに *AURI-3HA* を共発現させた株をスフェロプラスト化し, 1% Triton X-100 を含むバッファーで処理してスフェロプラストのバースト・膜の可溶化を行い, 超遠心を行った. その上清に抗 myc 抗体および Protein A Sepharose を加え, 免疫沈降を行った. その結果, Keil-6myc と Aur1-3HA が共沈することを見出した (Fig. 3-8B). さらに, *KEII-GFP* と *AURI-3HA* または *KRE2-3HA* を共発現する株から同様に 1% Triton X-100 で可溶化した lysate を調製し, 抗 HA 抗体で免疫沈降を行ったところ, Keil-GFP は Aur1-3HA と共沈しするが, 同じ medial ゴルジに局在する Kre2-3HA とは共沈しないことが分かった (Fig. 3-8C). また, Aur1-3HA と GFP-Keil についても同様に免疫沈降を行い, 切断後の N 末端側 Keil も Aur1-3HA と共沈することが確認できた (Fig. 3-8D). このことから, Keil は Aur1 と *in vivo* で結合し, IPC シンターゼ複合体を形成していると考えられた.

KEII-GFP, *AURI-3HA* 共発現株から lysate を調製し, 18%-60%蔗糖密度勾配遠心により分画を行い, Keil-GFP と Aur1-3HA の分布パターンを比較したところ, Kex2 切断後の Keil-GFP と Aur1-3HA の局在は一致し, 切断前の Keil-GFP は小胞体局在とゴルジ体局在の両方が混ざったようなパターンになった (Fig.

3-8E). Aur1-3HA の分布には小胞体に存在する Kex2 切断前 Kei1-GFP の分布に対応するようなパターンは見られなかった. また, N 末端と C 末端, どちらに GFP を付けた場合でも, Kex2 切断前の Kei1 と切断後の Kei1 の両方が Aur1-3HA と共沈してきたが, 切断後の Kei1 の方が S に対する B の割合が高い (Fig. 3-8C&D). これらの結果を併せて考えると, Kei1 と Aur1 は主にゴルジ体で結合して複合体を形成していると考えられた.

3-2-8 *kei1-1* 株では Aur1 はゴルジ体に安定に局在できず, 液胞へと運ばれる

前項で, Kei1 が Aur1 と結合することを見出した. そこで, 温度感受性変異株では Aur1 に何らかの影響が出ているものと予測し, まず Aur1 の発現量と局在を観察することにした. Aur1-3HA の量を SDS-PAGE とウェスタンブロットで検討したところ, 許容温度で培養した細胞で, 明らかな量の減少が認められ, 制限温度で培養した場合には, さらに大幅な減少が認められた (Fig. 3-9A). この原因として, 小胞体から出られず小胞体関連分解 (ER-associated degradation; ERAD) によって分解されている, もしくはゴルジ体に運ばれたものの安定に存在できず, 液胞で分解されている, という 2 つの可能性を考えた. そこで, *kei1-1* 株と *AURI-GFP* 発現株を mating した株を孢子形成させて *AURI-GFP* を発現する *kei1-1* 株を得て, それをさらに $\Delta ubc7$, $\Delta doa10$, $\Delta hrd1$, $\Delta ubx2$ (以上 ERAD の変異株), $\Delta pep4$ (液胞プロテアーゼ欠損株) と掛け合わせた. それぞれの二倍体を孢子形成させて *AURI-GFP* を発現する *kei1-1* と各 deletion との二重変異株を取得し, 各株における Aur1-GFP の量を比べた. *UBC7* は主要なユビキチン結合酵素 (E2), *DOA10* と *HRD1* はそれぞれユビキチンリガーゼ (E3), そして *UBX2* は AAA₊ ATPase である Cdc48 を E3 と基質タンパク質にリクルートする膜タンパク質をコードしている (Bays et al., 2001; Carvalho et al., 2006; Neuber et al., 2005; Schubert and Buchberger, 2005). *PEP4* がコードするのは液胞のマスタープロテ

アーゼで、それ自身および他の液胞プロテアーゼをプロセッシングすることにより、活性型にする。よって、*PEP4* を破壊するとそれ以外の液胞プロテアーゼも活性化されず、液胞でのタンパク質分解が著しく抑制される(Van Den Hazel et al., 1996)。結果として、ERAD 変異株で野生株と同程度まで *Aur1-GFP* の量が回復する株は 1 つも無かったが、*Δpep4* においては明らかな量の回復が認められた (Fig. 3-9B)。さらに、*kei1-1Δpep4* 株において *Aur1-GFP* の蛍光を観察したところ、許容温度においてもゴルジ体の局在パターンを失い、Nomarski 像で窪んで見える構造、すなわち液胞に蓄積していることが分かった (Fig. 3-9C)。この蛍光は *KEI1Δpep4* 株では全く観察されなかったことから、*kei1-1* 変異によって *Aur1* がゴルジ体に安定して局在することが出来ず、液胞に運ばれて分解していることが明らかになった。

3-2-9 Kei1C 末端部分の欠失により IPC シンターゼ複合体が液胞に運ばれる

kei1-1 によって *Aur1* が液胞に運ばれてしまう原因として、いくつかの可能性が考えられる。まず、*Aur1* はゴルジ体において *Kei1* と結合していないとゴルジ体に安定に存在できないが、変異によって *Kei1* が小胞体から出られなくなり、*Aur1* が単独でゴルジ体に運ばれても留まらずに液胞に運ばれてしまう、という可能性が考えられる。2 つ目に考えられるのは、*Kei1* も *Aur1* もゴルジ体に運ばれるが、変異によって *Kei1* と *Aur1* の相互作用が弱くなっており、*Kei1* はゴルジ体に安定して留まっているが、*Aur1* は *Kei1* から遊離して液胞に運ばれてしまう可能性である。また、*Aur1* と *Kei1* の相互作用には影響が無いが、*kei1-1* 変異によって複合体全体としてゴルジ体への安定した局在ができなくなり、液胞に運ばれてしまうという可能性も考えられる。

まず、*KEI1* または *kei1-1* の C 末端に GFP をつないだもの（作られるタンパク質はそれぞれ *Kei1-GFP*、*Kei1-1-GFP* と表記する）をクロモソーム上の *ura3-52*

locus にインテグレートし、*Δkei1* 細胞で発現させた。*kei1-1-GFP* は、本来の終始コドンではなく変異によって導入された終始コドンと置き換えるように GFP をつなぐことで、C 末端に GFP が融合して発現されるようにした。許容温度で対数増殖期まで培養した後、一度集菌して 2 つに分け、片方をそのまま許容温度、片方は制限温度で 2 時間培養した。Kei1-GFP は温度シフトに関わらず、多くが Kex2 切断を受けた形で検出された (Fig. 3-10A)。一方、Kei1-1-GFP では、Kex2 切断後のもの、すなわちゴルジ体局在の Kei1-GFP の割合が減少しており、制限温度で培養した場合には殆ど検出されなくなっていた (Fig. 3-10B)。逆に、切断前の Kei1-1-GFP の量が増えており、これが遠心分画で P10 に回収された (Fig. 3-10B) ことから、小胞体に Kei1-1-GFP が多く存在していることが分かった。新しく合成された Kei1-1-GFP が小胞体に蓄積していると考えられ、「変異によって Kei1 が小胞体から出られなくなる」という第一の仮説が正しいと推測された。もし本当にこの仮説が正しいとすれば、この株で *PEP4* を破壊しても Kex2 切断後の Kei1-1-GFP は増えないはずである。そこで、両方の株に *Δpep4* を導入し、許容温度で培養した場合の Kei1-GFP と Kei1-1-GFP の量を観察した。その結果、予想に反して *Δpep4* 株で明らかに Kex2 切断後の Kei1-1-GFP の量が増えていた (Fig. 3-10C)。一方、Kei1-GFP の量や挙動に変化は見られなかった。この結果は、「Kei1-1-GFP はゴルジに運ばれているが留まらずに分解されている」ことを示しており、むしろ三番目の「Aur1 と Kei1 の相互作用には影響が無いが、*kei1-1* 変異によって複合体全体としてゴルジ体への安定した局在ができなくなり、液胞に運ばれてしまう」という仮説を支持するものである。すなわち、*kei1-1* 変異によって Kei1 のゴルジ体での安定性が失われることにより、IPC シンターゼ複合体がゴルジ体に局在できなくなり、液胞に運ばれて分解されていると考えられた。なお、Kei1-1-GFP の小胞体存在量が増えたことに関しては後に改めて検討した (3-2-13 参照)。

次に、*keil-1* の 2 つの変異 F103I と ΔC のうち、どちらが局在に重要なかを検討するために、*keil^{F103I}-GFP*、*keil^{AC}-GFP*、*GFP-KEI1*、*GFP-keil^{F103I}* をそれぞれ *ura3-52 locus* から $\Delta keil$ 細胞で発現させた。*keil^{AC}-GFP* も *keil-1-GFP* と同様、変異によって導入された終始コドンと置き換えるように GFP をつなぐことで、C 末端に GFP が融合して発現されるようにした。その結果、Keil^{AC}-GFP は Kex2 切断型が減少し、その減少は *Apep4* によって抑圧された (Fig. 3-10C)。一方、Keil^{F103I}-GFP の Kex2 切断型は減少せず、*Apep4* によって増加もしなかった (Fig. 3-10D)。また、GFP-Keil^{F103I} の Kex2 切断型は *Apep4* によって増加したが、全く同じ挙動が GFP-Keil においても観察され、この増加は F103I 変異の影響ではないと考えられた (Fig. 3-10E)。Keil の N 末端への GFP 付加がタンパク質の安定性に影響しているか、切断後の Keil の N 末側は C 末側に比べて安定性が低いのかもかもしれない。ただし、Kex2 切断後の Keil-GFP の減少は、 ΔC よりも *keil-1* において若干ではあるが大きい (Fig. 3-10C)。F103I 変異が ΔC と組み合わせることにより、タンパク質複合体としての立体構造などに影響があり、結果として Keil の切断後 C 末端側がより不安定になっている可能性がある。

さらに、 $\Delta keil$ に、*KEI1*、*keil^{F103I}*、*keil^{AC}* をそれぞれプラスミドで導入した株を 30°C で培養し、細胞数を合わせて集菌して TCL を調製、Aur1-3HA の量を比較した。その結果、*keil^{AC}* 相補株において、Aur1-3HA の減少が観察された (Fig. 3-10F)。以上の結果から、Keil の C 末端部分は Keil 自身の、ひいては結合相手の Aur1 の安定性に重要であると考えられた。

3-2-10 Keil の C 末端部分は COPI コートマーとの結合能を有する

前項の解析により、Keil の C 末端部分の欠失がゴルジ体への局在を不安定化していることが分かった。では、C 末端部分はどのように局在化に貢献しているのだろうか。Keil の C 末端部分と膜貫通領域を 1 つ挟んだところにある親水性

領域に Kex2 認識・切断部位がある。Kex2 による切断はゴルジ体内腔で行われるので、トポロジーを考えれば C 末端は細胞質に露出しているはずである。ゴルジ体の膜貫通タンパク質の細胞質に露出している部分が COPI コートマーと相互作用することにより COPI 小胞に乗り、ゴルジ体-小胞体間をリサイクルする、という例は多く知られている。特に、dilysine motif と呼ばれる KKXX または KXKXX というコンセンサス配列は、多くの小胞体膜タンパク質や early ゴルジ膜タンパク質の細胞質に面した C 末端に見られ、COPI コートマーと結合することが知られている。また、Rer1 や Erv25, Vrg4 といったタンパク質には dilysine motif は存在しないが、細胞質に露出している C 末端部分にはリジンのクラスターがあり、いずれも COPI コートマーと結合することが知られている(Abe et al., 2004; Belden and Barlowe, 2001; Sato et al., 2001)。そこで、Kei1 の場合も同様に C 末端部分で COPI コートマーと相互作用している可能性を考え、C 末端の親水性領域 (C 末端から 46 アミノ酸残基) を glutathione S-transferase (GST) と融合して大腸菌で大量発現し、可溶性画分から Glutathione sepharose により精製・回収し、1% Triton X-100 で膜を可溶化した酵母 lysate を用いて GST pull down assay を行った。その結果、COPI コートマーのサブユニットである、Ret1, Sec21 との結合を見出した (Fig. 3-10G)。Ret1 は α -COP, Sec21 は γ -COP である。複数のコートタンパク質との結合が見出されたことから、細胞質側に露出している Kei1 の C 末端部分は COPI と相互作用しており、IPC シンターゼのゴルジ体間のリサイクリングに貢献しているのではないかと考えられた。

3-2-11 *kei1-1* 変異は IPC シンターゼの活性を顕著に低下させる

これまでの実験により、Kei1 が Aur1 のゴルジ体局在に重要な働きをしていることが明らかとなったが、 ΔC だけでは全く温度感受性を示さないことから、*kei1-1* では IPC シンターゼの活性そのものに欠損があるのではないかと推測され

た。そこで、Keil が IPC シンターゼの活性に重要なサブユニットかどうかを検討するため、野生株と *keil-1* 株で IPC 合成能に差が無いかを検討した。まず、野生株と *keil-1* 株から膜画分を調製し、そこに C₆-NBD-ceramide を加えて、セラミドを IPC へ変換する酵素活性を比較した。C₆-NBD-ceramide はセラミドの蛍光基質アナログとして、酵母の IPC シンターゼの活性を *in vitro* で測定する際に一般的に用いられている試薬である (Aeed et al., 2004; Levine et al., 2000; Zhong et al., 1999)。活性測定の結果、許容温度で培養した細胞から調製した膜画分を用いて許容温度で反応させた場合には両方で活性の違いはあまり見られなかったが、菌体回収前に制限温度で 2 時間培養すると、*keil-1* 株から調製した膜画分の IPC 合成活性は、同様に培養した野生株の膜画分と比べて明らかに減少していた (Fig. 3-11A, lanes 6, 7, 10, 11)。この合成活性の低下は制限温度での反応でより顕著に観察された。また、許容温度で培養した細胞から調製した膜画分でも、NBD-ceramide を加える前に制限温度でインキュベーションすることにより、顕著に IPC 合成活性が低下していた (Fig. 3-11A, lanes 3, 5)。このことは、小胞体内のフォールディングが上手くいき、目的の場所に輸送された後も、その後の温度変化によって酵素複合体の立体構造あるいはサブユニット形成に異常が起きてしまい、活性を失ってしまったことを示唆している。

keil-1 株の膜画分の酵素活性は野生株のそれと比べて確かに下がっていたが、この結果からすぐに *keil-1* 株の IPC シンターゼは酵素活性が低下している、と結論付けることは出来ない。なぜなら、前項までに示したように *keil-1* 株においては Aur1 の量が減少するため、この系では細胞内のトータルの IPC 合成活性を比較することはできても、酵素そのものの活性を比較していることにはならないからである。よって、IPC シンターゼそのものの酵素活性を比較するためには、Aur1 の量を規定して酵素活性を計測する必要がある。はじめ、膜画分の量を調節して Aur1 の量を合わせようと試みたが、膜画分に基質の PI が含まれている

ために、単純に膜面分を増減させると基質の量も変わってしまい、活性を厳密に比較することが出来ないと考えられた。そこで、基質の量も規定するために、酵素そのものを単離することにした。具体的には、Aur1 の C 末端に HA タグを付加して発現させた酵母を培養して集菌、スフェロプラスト化し、バッファーで burst させて調製した lysate から抗 HA 抗体と Protein A Sepharose で Aur1 を免疫沈降することにより IPC 合成酵素を単離し、Protein A Sepharose に酵素を結合させた状態で酵素活性を測ることにした。免疫沈降産物を 1% Triton X-100 で 2 回、1 mM CHAPS で 3 回 wash し、そこに基質を加えて反応を行ったが、酵素活性は全く検出されなかった (data not shown)。条件検討の結果、Triton X-100 をごく微量加えることで酵素活性が検出されるようになった (Fig. 3-11B)。今後の実験では、検討した濃度の中で最も高い活性が見られた 0.05% に Triton X-100 の終濃度を固定して、酵素活性測定を行った。

まず、コントロールとして Kre2-3HA を免疫沈降した場合と活性を比較した。Figure 3-11C の左側のパネルに示すように、Kre2-3HA の免疫沈降産物からは IPC 合成活性は全く検出されず、一方 Aur1-3HA の免疫沈降産物を用いた場合は beads (Protein A Sepharose) の量に対応して合成活性も変化し、免疫沈降産物の IPC 合成活性を追跡できていることが分かった。そこで、Aur1 の量がほぼ等しくなるようにスケールを調節して野生株および *keil-1* 株を培養し、上記の系を使って IPC シンターゼの酵素活性を測定した。その結果、驚くべきことに、*keil-1* 株から単離した酵素は全く酵素活性を示さなかった (Fig. 3-11C, right panel)。免疫沈降で単離した状態と細胞由来の膜とでは、界面活性剤の有無など周囲の環境の違いにより酵素活性が変異に対してより高感受性になった可能性が考えられる。結論として、*keil-1* 変異によって IPC シンターゼの活性が、この反応系では生成物が検出されなくなるほど、著しく低下していることが分かった。

3-2-12 Kex2 による切断の有無は、IPC シンターゼの局在、サブユニット間の結合、そして酵素活性に影響を与えない

これまでの解析で、Kei1 は IPC シンターゼのサブユニットとして、その局在・酵素活性に重要であることを示してきた。しかし、Kei1 の重要な特徴である、「Kex2 によって切断される」ことが IPC シンターゼにとってどのような意味を持つのか、ということに関して知見は得られていない。もし、Kex2 の切断を受けるか否かで、IPC シンターゼの局在・活性に影響があるとすれば、酵母におけるスフィンゴ脂質合成が、Kex2 を介した制御を受けている可能性がある。そこで、Kex2 に切断されない変異型 *KEI1* (*kei1^{R135S}*) を用いて、それらの検討を行った。まず、Kei1^{R135S}-GFP の局在を調べた。その結果、顕微鏡観察ではドット状の局在が観察され (Fig. 3-12A)、また、蔗糖密度勾配遠心による分画でも、ゴルジ体局在に顕著な変化は見られなかった (Fig. 3-12B and C)。次に、Aur1-3HA との結合を免疫沈降により検証したが、切断されない Kei1 も切断されるものと同様に Aur1 と結合していた (Fig. 3-12D)。さらに、活性の検討を行ったが、R135S 置換変異株と野生株の IPC シンターゼの酵素活性は全く同等であった (Fig. 3-12E)。また、 Δ *kex2* から精製した IPC シンターゼも、野生株から精製したものと同程度の活性を示した (Fig. 3-12F)。以上のことから、Kex2 による切断は IPC シンターゼの局在・活性・サブユニット間の結合に影響を及ぼさないことが分かった。

3-2-13 *kei1* 変異体は発現量が上昇している

3-2-9 での検討において、Kex2 に切断されていない形の Kei1-GFP の量が、野生型 *KEI1* と *kei1-1* とで比較すると明らかに *kei1-1* の方が多かった。そこで、野生型 *KEI1*、*kei1^{F103I}*、*kei1^{ΔC}*、*kei1-1* の C 末端にそれぞれ GFP を融合して、 Δ *kei1* にプラスミド発現する構築を作製した。それらの株を許容温度で培養し、等量

の細胞数を回収して lysate を調製し、GFP のシグナルを SDS-PAGE, ウェスタンブロッティングにより比較した。その結果、Kei1-GFP と Kei1^{F103I}-GFP はほぼ同じ量・挙動を示したが、Kei1^{ΔC}-GFP は切断後の量が減少し、さらに Kei1-1-GFP は切断前のものが顕著に多く観察された (Fig. 3-13)。他のタンパク質の挙動や mRNA 量を見ていないため preliminary なデータではあるが、*kei1-1* 株では切断された Kei1 は大半が液胞に運ばれていることを考えると、*kei1-1* における *KEI1* の発現量はかなり上昇していると考えられる。このことから、IPC 合成の状態を細胞が感知し、Kei1 の発現を調節するメカニズムが存在することが示唆された。

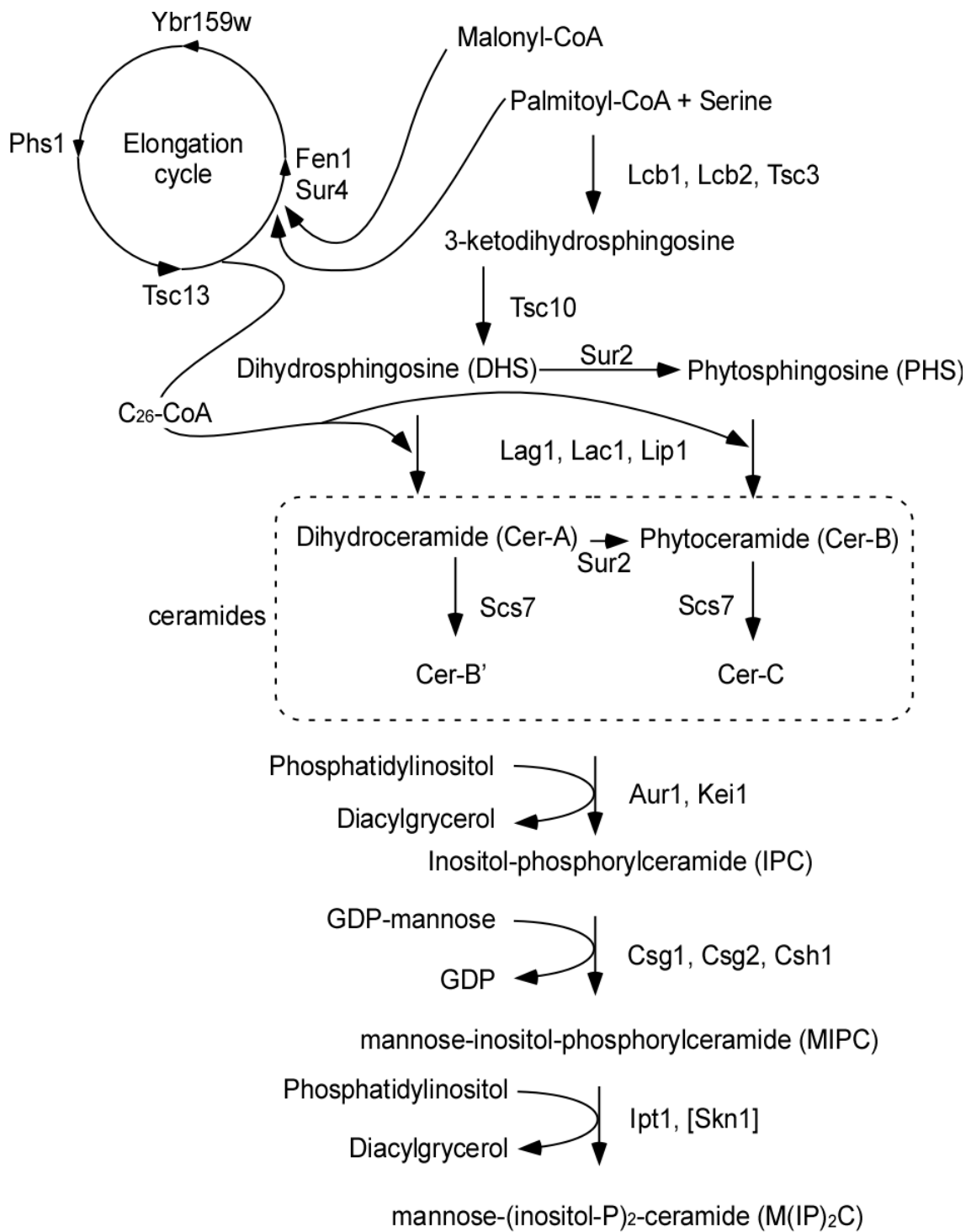


Figure 3-1 出芽酵母のスフィンゴ脂質生合成経路

出芽酵母のスフィンゴ脂質の生合成経路を示した。セラミドの合成までは小胞体で行われ、ゴルジ体に輸送されるとAur1を含むIPC合成酵素によってIPCに変換され、最終的にM(IP)₂Cにまで変換される。

A

```

S.c. 1:-----MRS-SLLTLPKSFLGFMPPLYLAVEIVLGISILNK-CSGAYGI
C.g. 1:-----MRL-NKISFPKSFFGFLPLYLGVEIVLGITILNK-CSGAYGI
V.p. 1:-----MN-INQELSRVKT-HYSNLPKRSFFGFLPLYIGVETVLGITILNK-CSGAYGI
A.g. 1: MRTLHQRPPEMRNIYSSLPTKSHSNMNLPKSFFGL-PLYIGVELSLGIAIFNKFC-GLFGL
K.l. 1:-----MQQOSNMVHLPQTFLSY-PLYIGVEVALGVLTFNKF-SGMYGV

41: LALFTGHPLDFMOWIAYLWSVF-TLIVF-SQGLYLHKPNLLVFSQICVLYTIDTISTCFFT
41: LALFTGHPLDYMOWISYLSVF-TLIVF-SQGLFMHKPKLIVFSQILVYFTADTVLTCEFFT
50: LALFTGHPLNVFQWVSYLWSVF-TLIIY-SQGLFQVHTPSLLTYSQIFVVFSEDTFLTCVFT
61: LALFTGHPLDILQWLFYLWS-FVTLVLYLH-GLMQIYQPRLAAYCLVLVYSTDITLTCLYT
42: LALFTGHPLDFVQWTFYIWSIF-CLVVFIS-GIRQVYKPNILLMSTVTFVFSVDTIIVSCIYC

101: LWFTTQWFTLEDTANIDGNNALQSNPISTGK-LTERGI--DISKQATSESYEYTMILITLV
101: LWFSAQWF--QSA-NEEKHETSA--PVGVSQ-NYRRST--DLASQASERYEYTVTMLFTLV
110: MIESSQWFTETGSGMSDGS-----GVD-----EYG-QGASETYEYTFILITVV
121: LWFTRGWFIDGDVGVATATAKEDDADATQGSV-TVENEP--VSH-QSASKSYEYAFMAFTLF
102: LWFTAVWFSQEGSTDVTDLKSAGTALGPAHEGTTSTISTKVDTSKSASSGYEFFLIILLITLV

160: SLIFRFYFNFILASFVQELLHHPKYLVDRDDVEQNLKKNKPIWKRLWAKSQKGCYKLCCKNLE
153: TLMFRMYFNFILASFVQELLRHPKYMVDODDVEQDLKKNKSAIKRWWIKSOKFCYKLCRHTLQ
151: ALVSRMYFNFILAAFNQELFLHPKYMVDFDDVEQDLKKNKIVQWWIKSKKSCYNLARHILT
177: ALSLRFYSNFLIASFVQRMFQHNKFAAGCDDVEQDLKHKSVAYRAYAKMQRWCYFLCRRYL-
162: PLAVRFYFNFI IIAFOQOLLRSCKFTFDONDIEVNLHNRNIFKWRVKFEKWCYFLCKRYL-

```

B

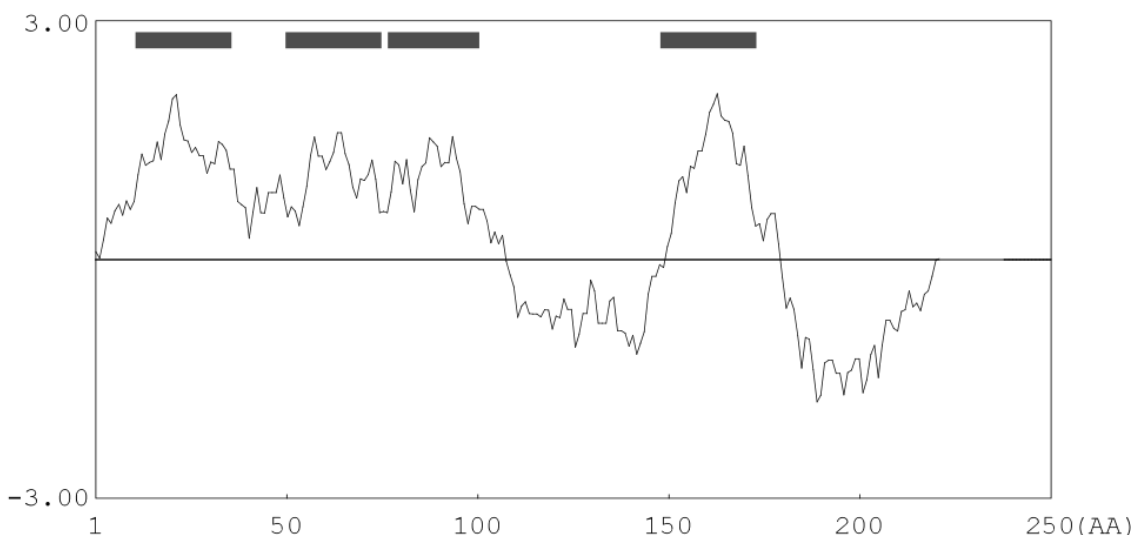


Figure 3-2 Kei1とそのホモログの配列及び疎水性プロット

(A) Kei1ホモログとのアミノ酸配列アラインメントを示した。相同アミノ酸は白抜き文字で示してある。配列の上部のバーは疎水性領域を示す。S.c.: *Saccharomyces cerevisiae*, C.g.: *Candida glabrata*, V.p.: *Vanderwaltozyma polyspora*, A.g. *Ashbya gossypii*, K.l.: *Kluyveromyces lactis*

(B) Kyte and Doolittleの方法による疎水性インデックスを示した。アミノ酸のwindow sizeは19に設定した。太線は疎水性領域を示す。

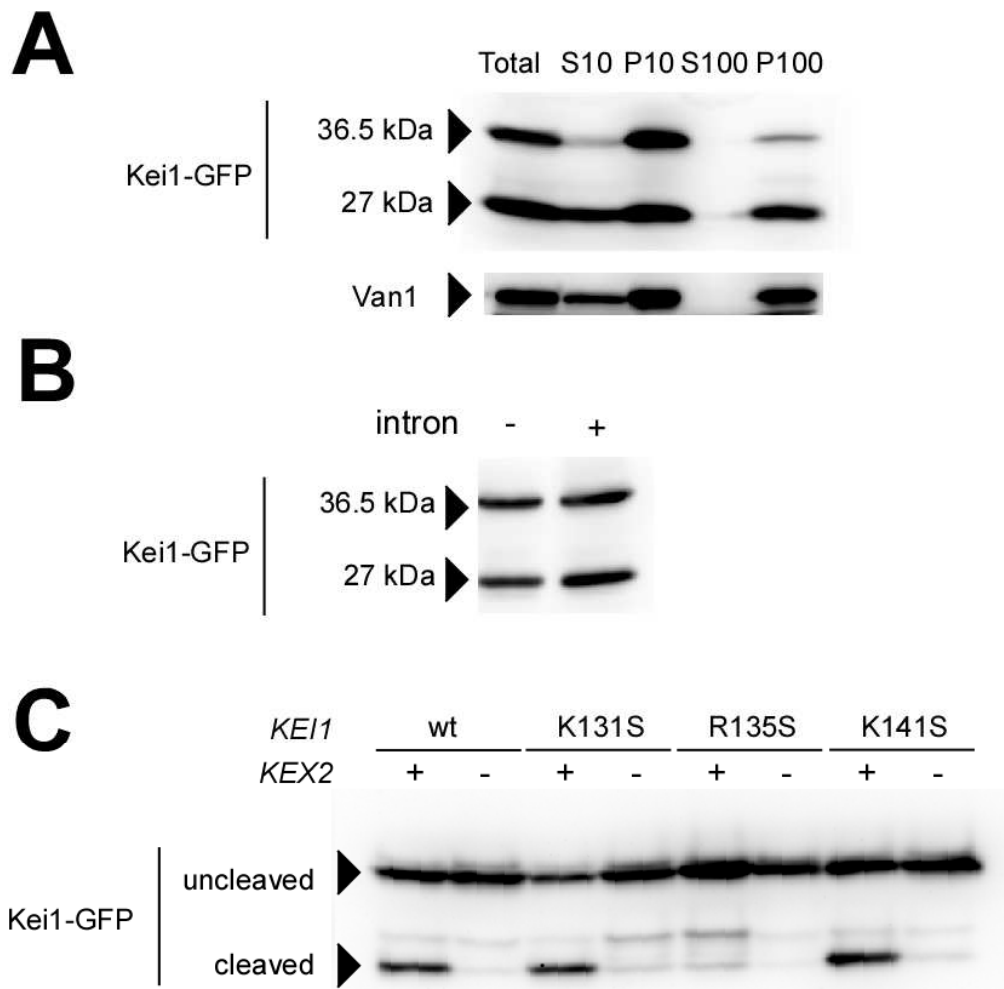


Figure 3-3 Kei1はKex2の新規基質タンパク質である

(A) *KEI1-GFP*をCEN-plasmidで発現させ (KSY431), SDS-PAGEで分離しウェスタンブロットティングで検出した. 36.5 kDaと27 kDaのバンドが現れ, 遠心分画で36.5 kDaのバンドは主にP10に, 27 kDaのバンドはP10とP100に均等に回収された. Van1はearlyゴルジの膜タンパク質.

(B) イントロン部分を削ってエキソンをつないだ構築で*KEI1-GFP*を発現させた(-, KSY507). lysateを調製し, SDS-PAGE, ウェスタンブロットティングでKei1-GFPを検出した. +はKSY431.

(C) 野生型, K131S変異型, R135S変異型, K141S変異型の*KEI1-GFP*をそれぞれBY4741(+)および Δ *kex2*株(-)で発現させた. SDS-PAGEで分離しウェスタンブロットティングでKei1-GFPを検出した.

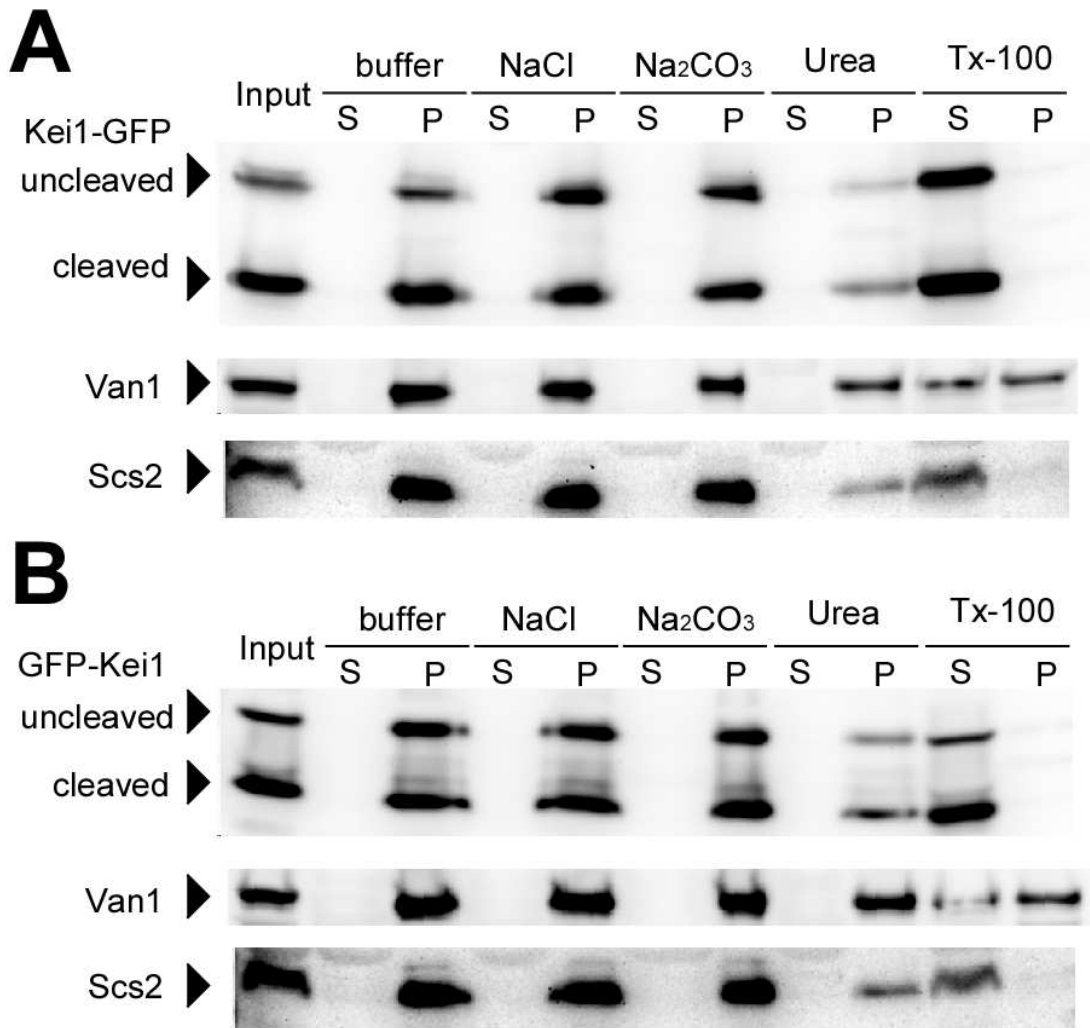


Figure 3-4 Kei1はKex2による切断前・後ともに、膜を貫通している

(A) Kei1-GFPの可溶性試験. KSY686から調製したlysateを1 M NaCl, 0.1 M Na₂CO₃, 2 M urea, 1% Triton X-100で処理し、超遠心で上清(S)と沈殿(P)に分画した. SDS-PAGE, ウェスタンブロッティングで各タンパク質を検出した. Van1はearlyゴルジの、Scs2は小胞体の膜貫通タンパク質.

(B) GFP-Kei1の可溶性試験. KSY723から調製したlysateをAと同様に各バッファーで処理し、超遠心で上清(S)と沈殿(P)に分画した.

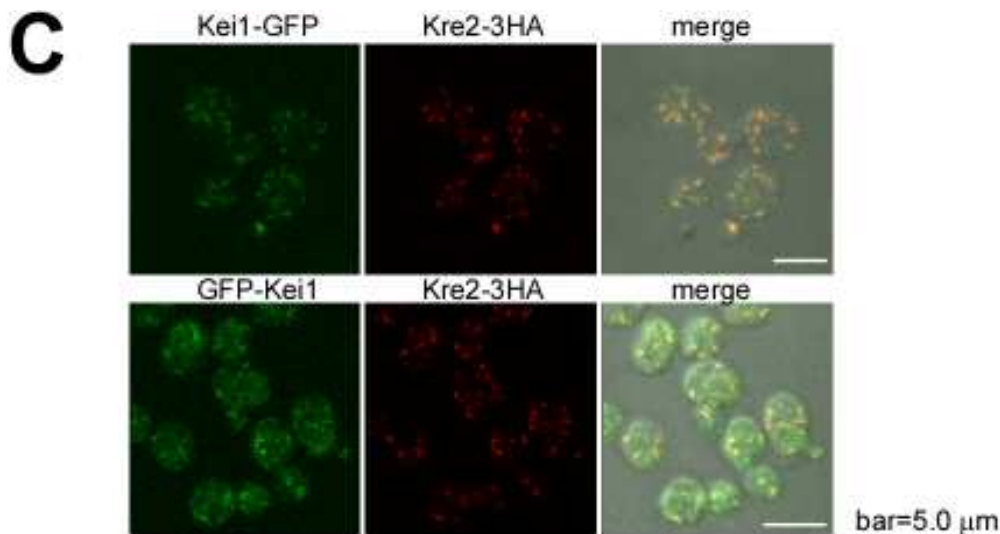
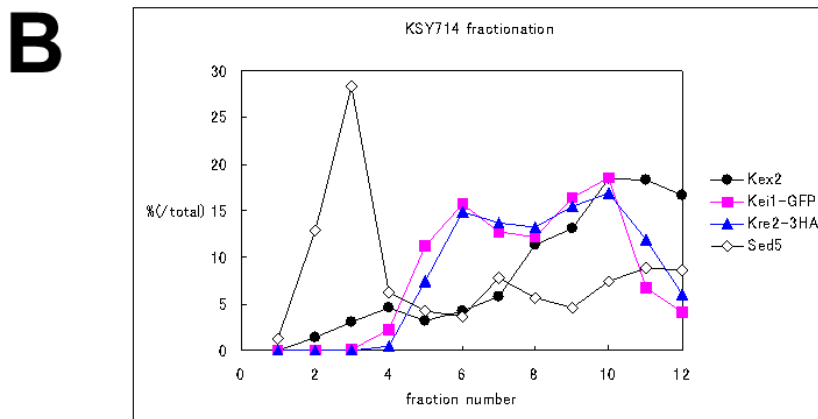
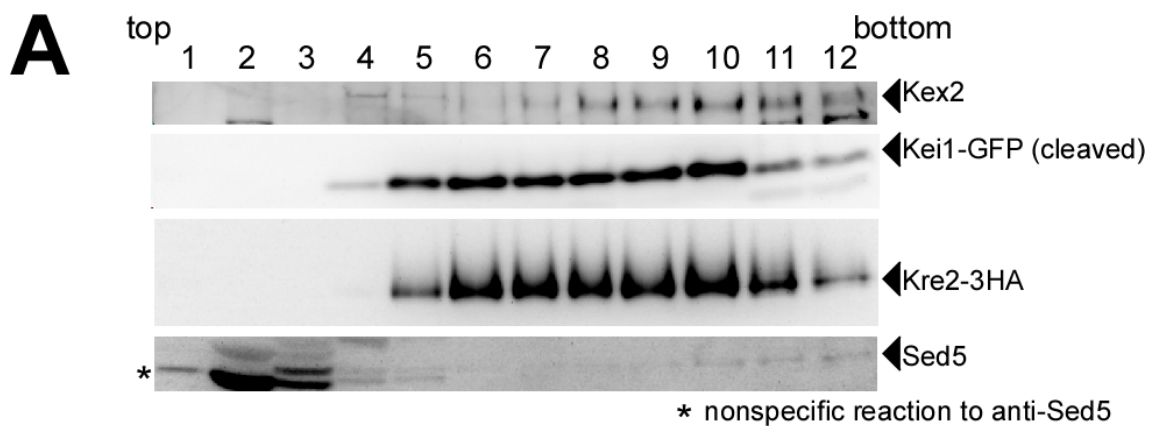


Figure 3-5 Kei1はmedialゴルジに局在する

(A) *KEI1-GFP*, *KRE2-3HA*を共発現する株(KSY714)からlysateを調製して、10,000 gで遠心して小胞体画分を除いた上清を22-60%蔗糖密度勾配に重層し、BECKMANのSW41Tiローターで36,700 rpmで16時間遠心し、上から12フラクション回収した。SDS-PAGE、ウェスタンブロッティングで各タンパク質を検出した。小胞体画分を除いたため全長Kei1-GFPは殆ど検出されなかったため、Kex2切断型のみ示した。Sed5はearlyゴルジの、Kex2はlateゴルジのマーカとして用いた。

(B) AをImage Jで数値化し、グラフにした。Kei1-GFPとKre2のピークは重なり、Sed5とKex2とは異なるパターンを示した。

(C) KSY714(upper panels), KSY725(lower panels)でGFPの蛍光とKre2-3HAの間接蛍光(Alexa568 anti-mouse)を観察した。

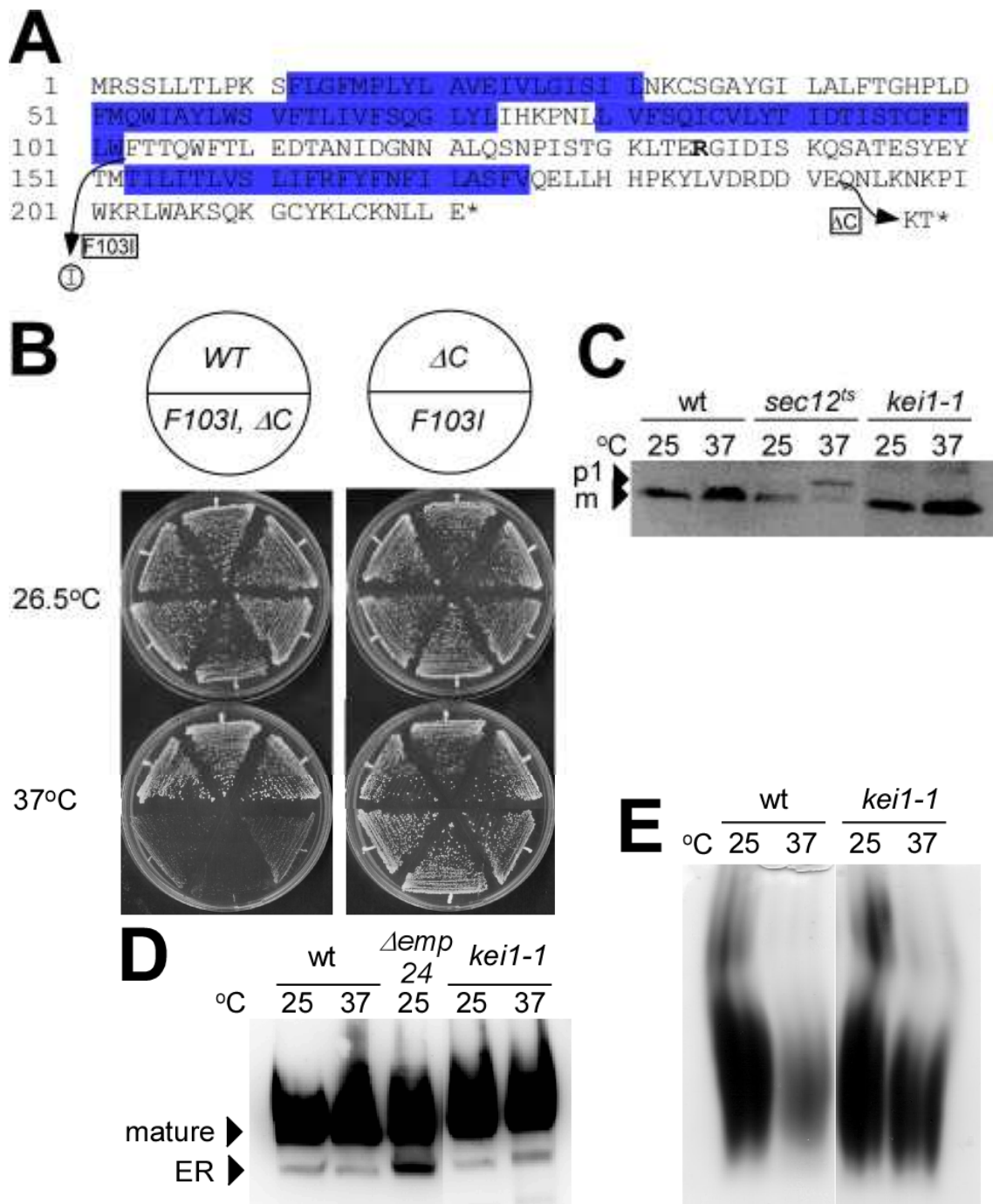


Figure 3-6 温度感受性変異株*kei1-1*の単離

(A) 単離した*kei1-1*の変異点を示した。F103Iと、Q193K・N194TおよびC末端27残基欠失(まとめてΔCと呼ぶ)の二箇所の変異が確認された。青の網掛けは疎水性領域を示す。また、Kex2認識部位のR残基を太字で示した。

(B) Δ*kei1*を*KEI1*, *kei1*^{F103I}, *kei1*^{ΔC}, *kei1-1*の低コピープラスミド(それぞれpKS25, pKS312, pKS313, pKSTS94)で相補し、26.5°Cと37°Cで2日間培養した。F103IとΔCは単独では温度感受性を示さなかった。

(C) 野生株(BY4741), *sec12*^{ts}株(YNY309), *kei1-1*(KSY271)でCPYのプロセッシングを検討した。

(D) 野生株(BY4741), Δ*emp24*株(YNY401), *kei1-1*(KSY271)でGas1のプロセッシングを検討した。

(E) 野生株(BY4741), *kei1-1*(KSY271)でインベルターゼの糖鎖修飾を検討した。

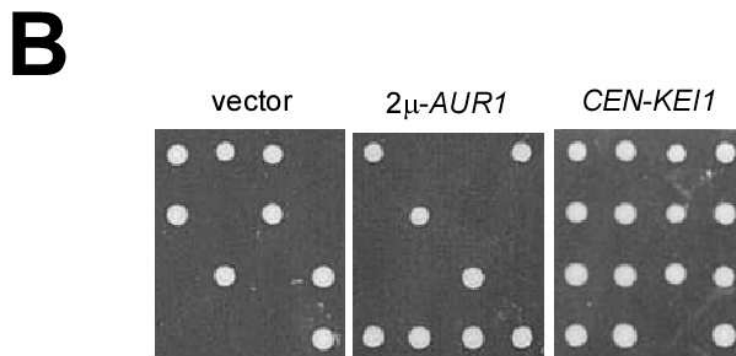
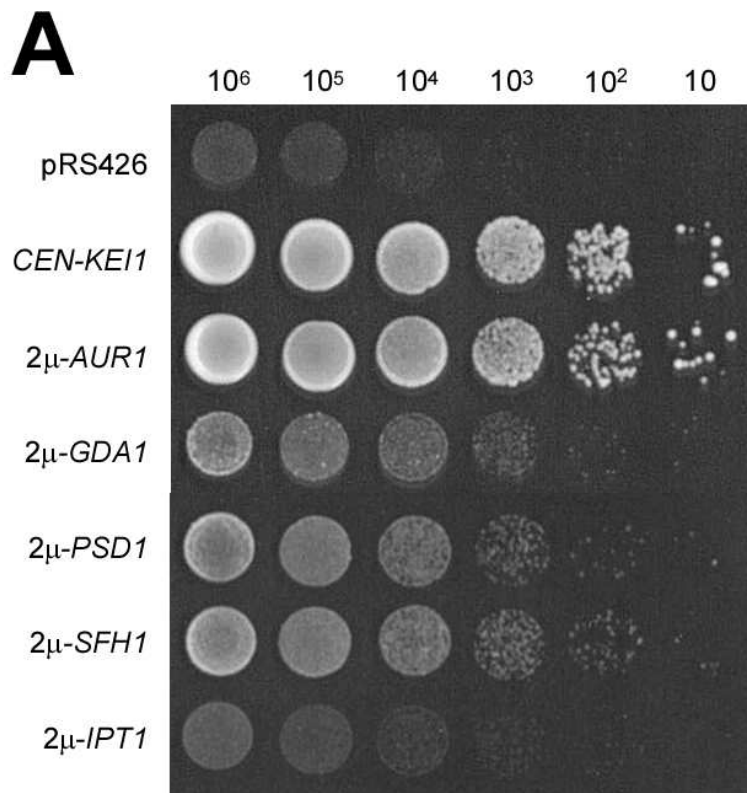


Figure 3-7 *kei1-1*の多コピーサプレッサーの同定

(A) *kei1-1*に*KEI1*を低コピーで、*AUR1*、*GDA1*、*PSD1*、*SFH1*、*IPT1*を多コピーで導入し、YPD寒天培地に10倍ごとの段階希釈でスポットティングし、37°Cで2日間培養した。

(B) *KEI1*/ Δ *kei1::kanMX4*二倍体(KSY506)にpRS416-*KEI1*(pKS23)またはpRS426-*AUR1*(pKS262)を形質転換し、胞子形成させ、四分子解析を行った。*AUR1*の多コピー発現は Δ *kei1*の致死性を抑制しなかった。

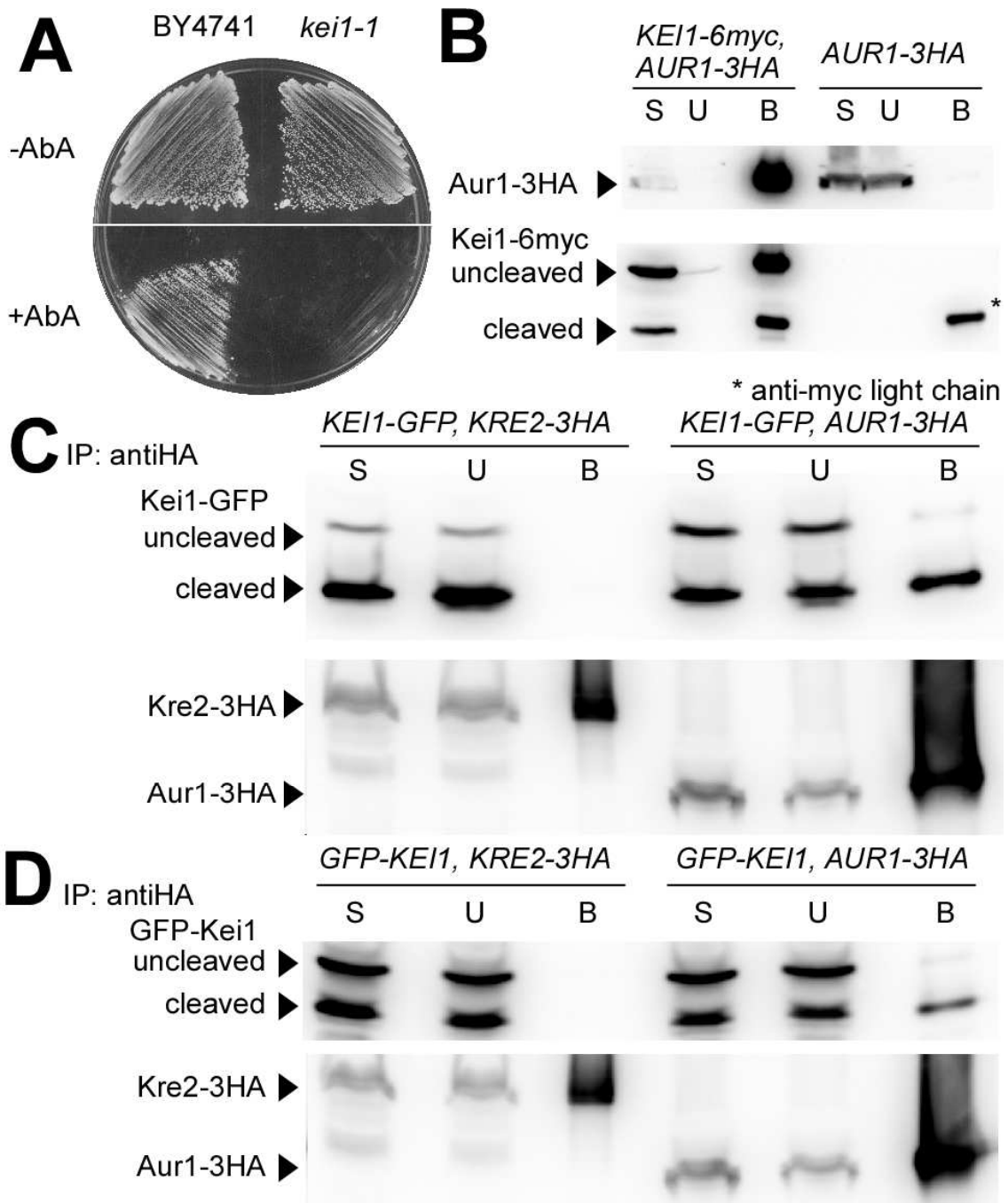


Figure 3-8 Kei1はIPCシンターゼのサブユニットである

(A) 野生株と*kei1-1*株をSC培地と0.08 $\mu\text{g/ml}$ Aureobasidin A添加SC培地で26.5°Cで2日間培養した。

(B) *KEI1*または*KEI1-6myc*と*AUR1-3HA*を共発現する株(それぞれKSY444, KSY448)からlysateを調製し、膜を1%Triton X-100で可溶化して超遠心し、その上清(S)から抗myc抗体で免疫沈降を行った。BはSの10倍濃縮になっている。U, Unbound; B, Bound

(C) *KEI1-GFP*と*AUR1-3HA*または*KRE2-3HA*を共発現する株(それぞれKSY531, KSY714)からlysateを調製し、膜を1%Triton X-100で可溶化して超遠心し、その上清(S)から抗HA抗体で免疫沈降を行った。BはSの10倍濃縮になっている。U, Unbound; B, Bound

(D) *GFP-KEI1*と、*AUR1-3HA*または*KRE2-3HA*を共発現する株(それぞれKSY721, KSY725)からCと同様に免疫沈降を行った。

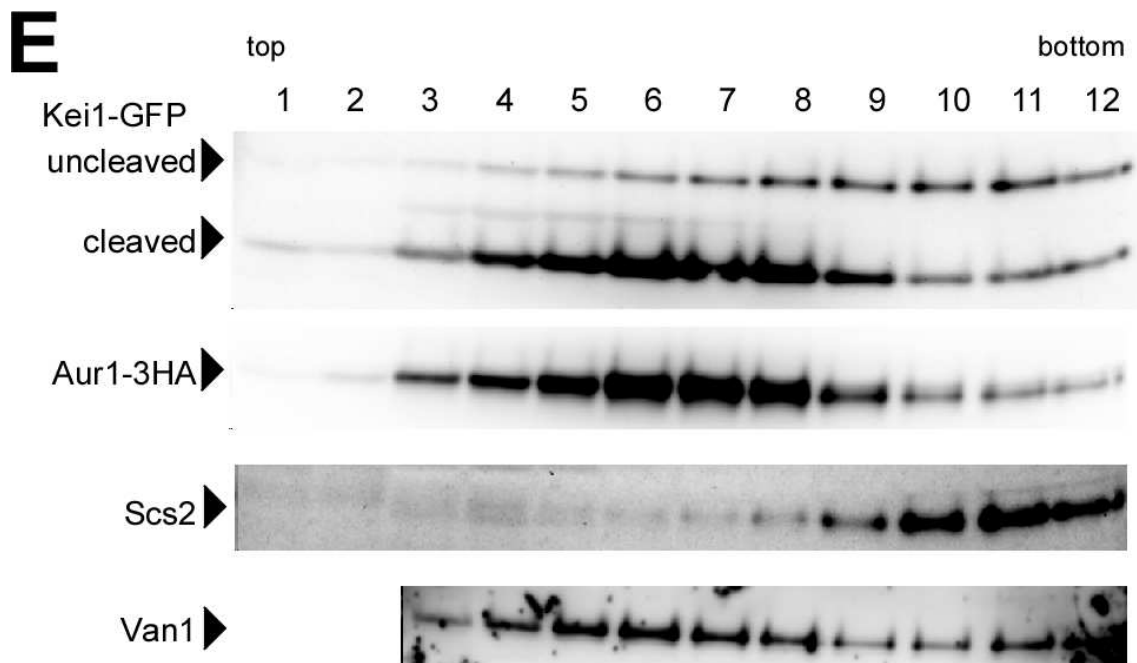


Figure 3-8 Kei1はIPCシンターゼのサブユニットである(続き)

(E) *KEI1-GFP*, *AUR1-3HA*を共発現する株(KSY531)からlysateを調製して, 18-60%蔗糖密度勾配に重層し, BECKMANのSW41Tiローターで35,000 rpmで2.5時間遠心し, 上から12フラクション回収した. SDS-PAGE, ウェスタンブロットティングで各タンパク質を検出した. Van1はearlyゴルジの, Scs2は小胞体タンパク質のマーカーとして用いた. Van1の1および2レーンは汚れてしまったので切っているが, Van1のシグナルは観察されなかった.

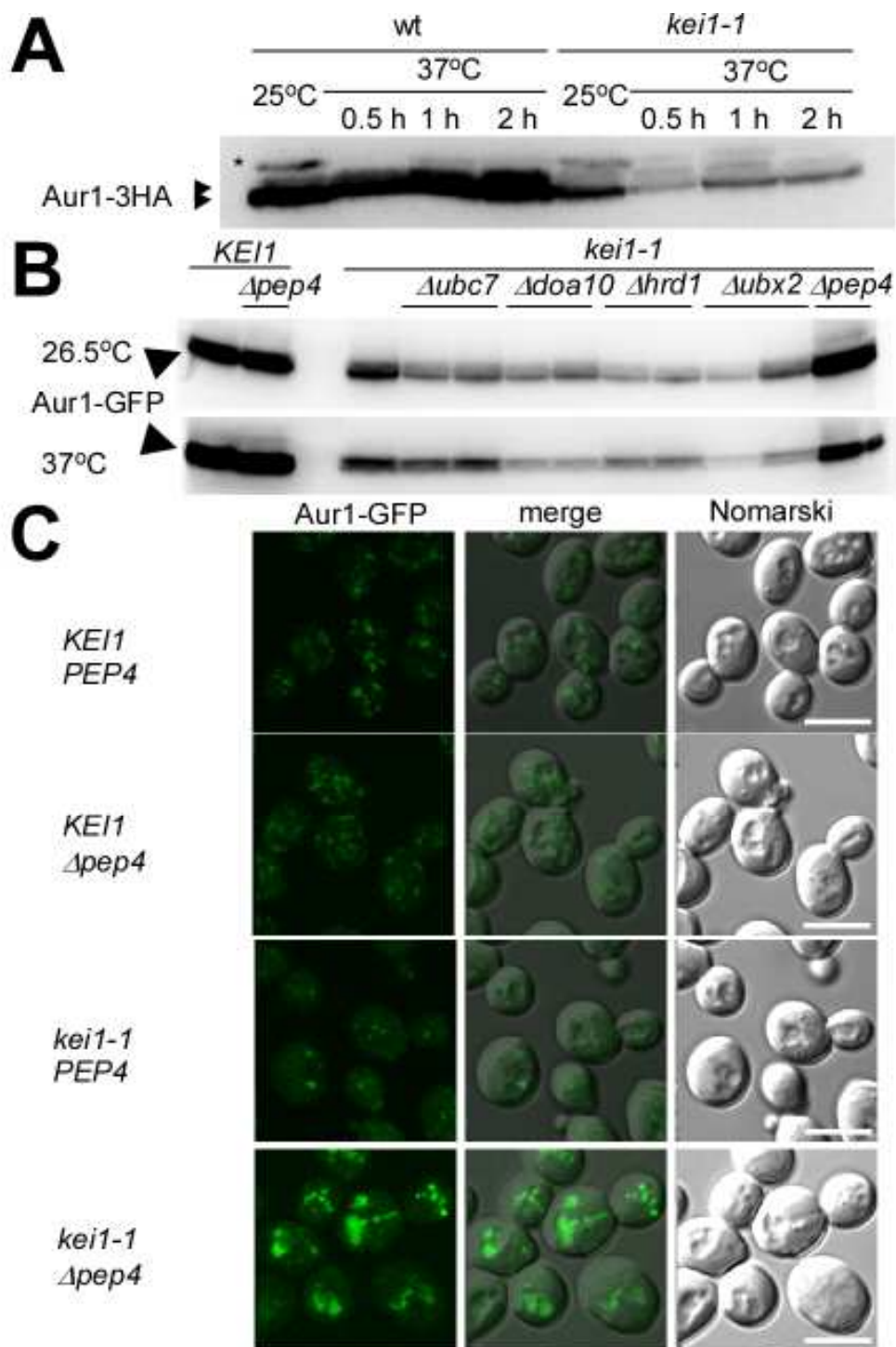


Figure 3-9 Aur1-GFPは*kei1-1*株で液胞に運ばれ分解される

(A) *AUR1-3HA*を発現する野生株(KSY525)および*kei1-1*株(KSY530)を26.5°Cで培養し、37°Cに移して0.5、1、2時間で回収してAur1-3HAの量を調べた。*non-specific reaction to anti-HA

(B) *AUR1-GFP*を発現する野生株(KSY512)と*kei1-1*株(KSY513)に $\Delta pep4$ を、*kei1-1*株(KSY513)にERADに欠損を起こす遺伝子破壊($\Delta ubc7$, $\Delta doa10$, $\Delta hrd1$, $\Delta ubx2$)を導入し、26.5°Cおよび37°Cで2時間培養してAur1-GFPの量を調べた。

(C) KSY512, KSY513, KSY571(*KEI1*, $\Delta pep4$, *AUR1-GFP*), KSY572(*kei1-1*, $\Delta pep4$, *AUR1-GFP*)を26.5°Cで培養し、共焦点レーザー顕微鏡でAur1-GFPの蛍光を観察した。bar = 5 μ m

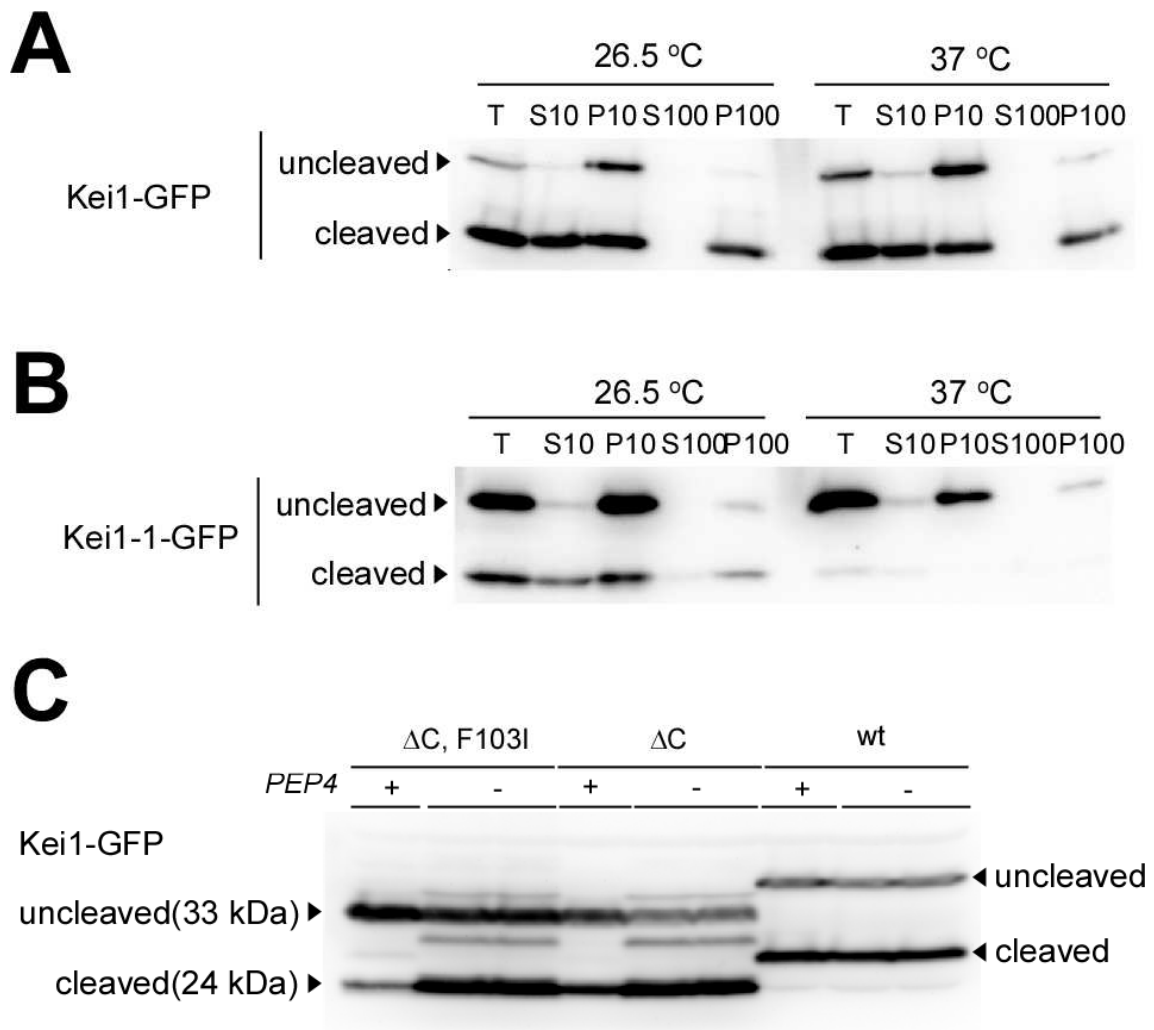


Figure 3-10 Kei1のC末端はゴルジ体局在に重要である

(A) *KEI1-GFP*発現株(KSY696)を26.5°Cで培養した後さらに26.5°Cまたは37°Cで2時間培養してlysateを調製, Figure 2-3Bと同様に遠心分画し, SDS-PAGE, ウェスタンブロッティングでKei1-GFPを検出した.

(B) *kei1-1-GFP*発現株(KSY692)を(A)と同様に培養してlysateを調製, Figure 2-3Bと同様に遠心分画し, SDS-PAGE, ウェスタンブロッティングでKei1-GFPを検出した.

(C) *KEI1-GFP*発現株(KSY686)および*kei1-1-GFP*発現株(KSY692), *kei1^{ΔC}-GFP*発現株(KSY694)(以上いずれも+), およびそれらに $\Delta pep4$ を導入した株(-)を26.5°Cで培養し, SDS-PAGE, ウェスタンブロッティングでKei1-GFPを検出した. -は $\Delta pep4$ 導入の形質転換で得た独立な2株について検討した.

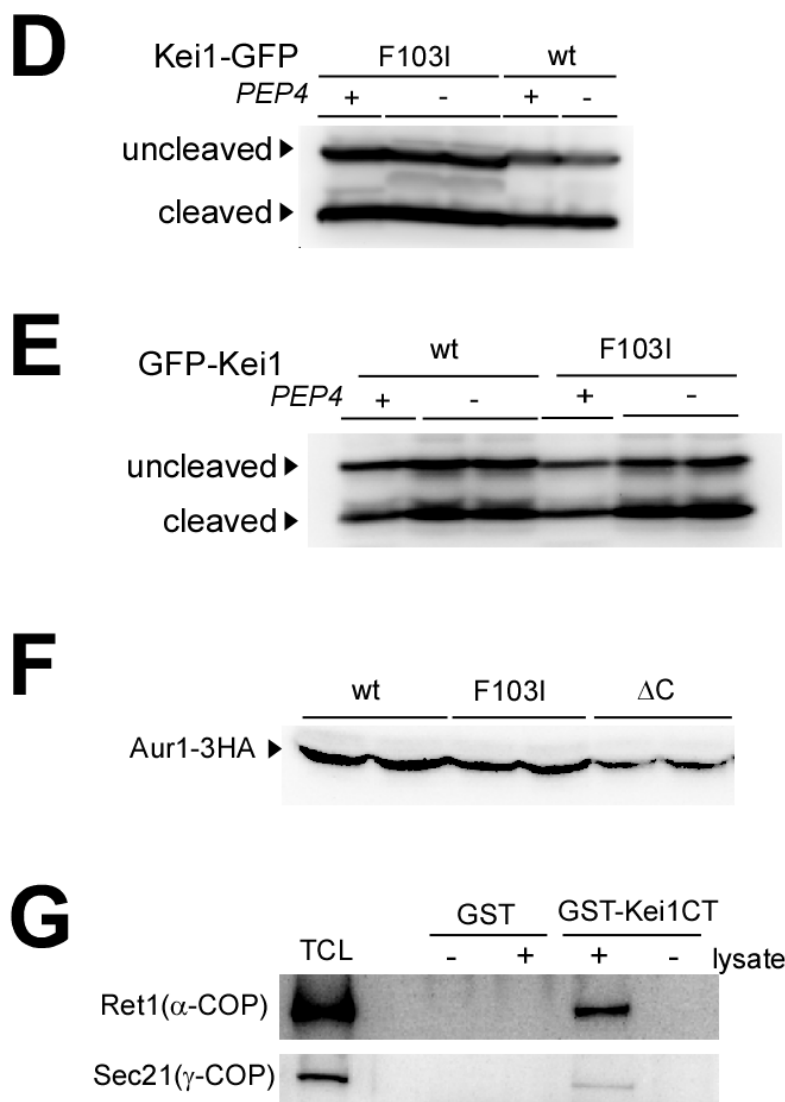


Figure 3-10 Kei1のC末端はゴルジ体局在に重要である(続き)

(D) *KEI1-GFP*発現株(KSY686), *kei1^{F103I}-GFP*発現株(KSY698), およびそれらに $\Delta pep4$ を導入した株(-)を26.5°Cで培養し, SDS-PAGE, ウェスタンブロッティングでKei1-GFPを検出した. F103Iについて -は $\Delta pep4$ 導入の形質転換で得た独立な2株について検討した.

(E) *GFP-KEI1*発現株(KSY723), *GFP-kei1^{F103I}*発現株(KSY753)およびそれらに $\Delta pep4$ を導入した株(-)でDと同様の検討を行った. -は $\Delta pep4$ 導入の形質転換で得た独立な2株について検討した.

(F) $\Delta kei1$ に*KEI1*(KSY771,772), *kei1^{F103I}*(KSY773,774), *kei1 ^{ΔC}* (KSY775,776)を相補した株に*AUR1-3HA*を発現させ, その量を比較した.

(G) GSTにKei1のC末端部分46アミノ酸を融合して大腸菌で大量発現させ, Glutathione sepharoseで精製し, BY4741のlysateと混合し, beadsからタンパク質を溶出してSDS-PAGEで分離, 表記タンパク質の抗体を用いてウェスタンブロッティングで検出した. -はlysate混合前, +はlysateと混合後のbeadsからの溶出サンプルを示す.

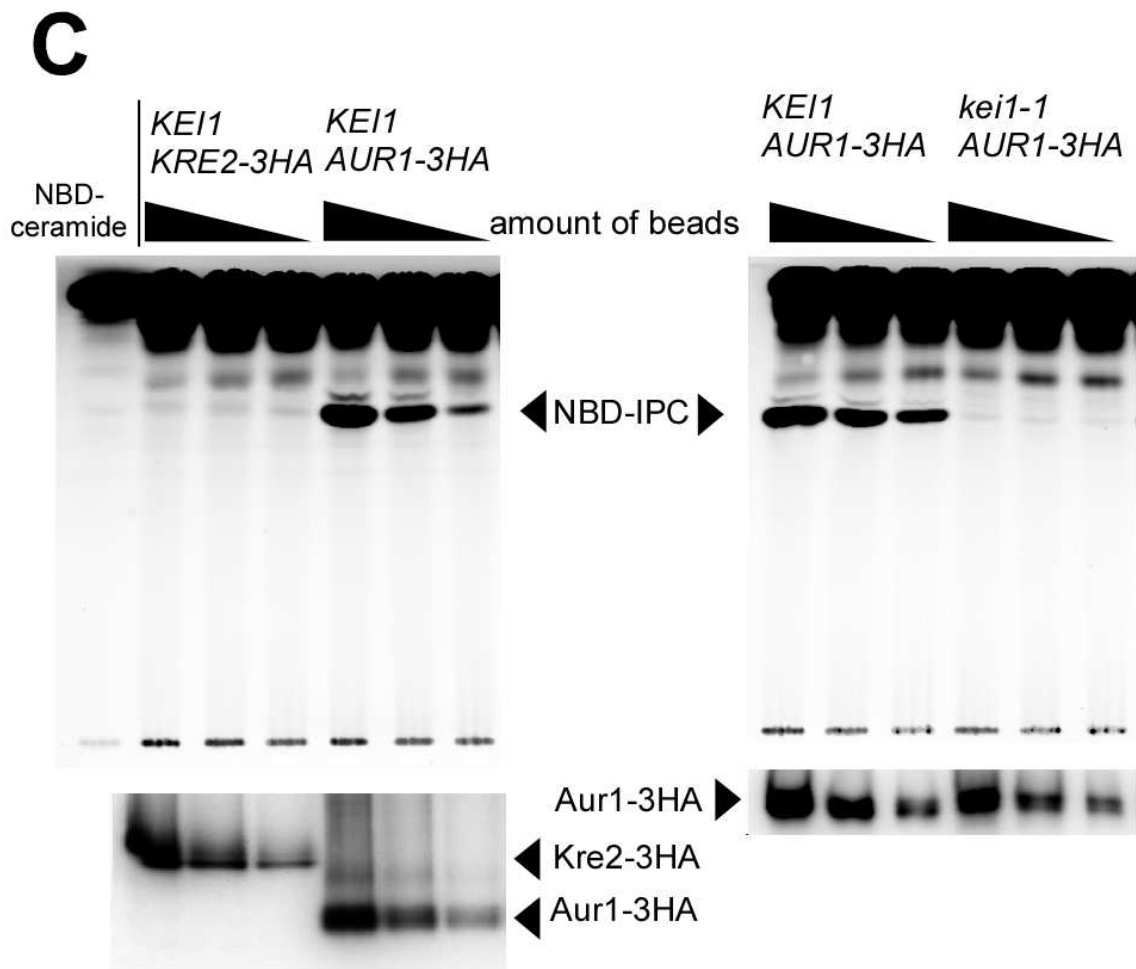


Figure 3-11 *kei1-1*変異によりIPCシンターゼの活性が低下する (続き)

(C) *KRE2-3HA*または*AUR1-3HA*を発現する野生株(THY4-2, KSY525)および*AUR1-3HA*を発現する*kei1-1*株(KSY530)から抗HA抗体で免疫沈降を行い, 免疫沈降産物のIPC合成活性を測定した. *kei1-1*株から精製したIPCシンターゼは殆ど活性を持っていなかった.

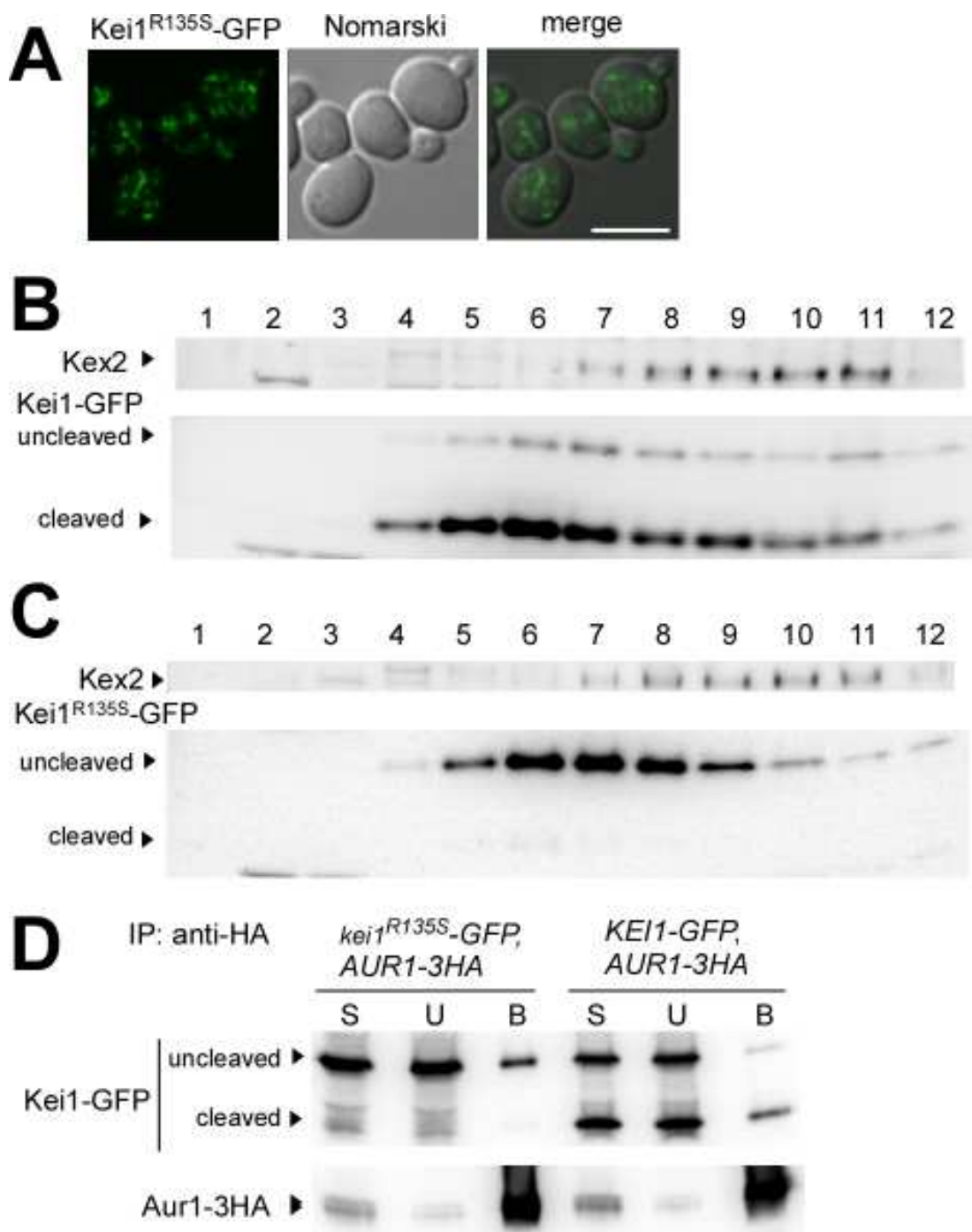


Figure 3-12 Kex2による切断は、IPCシンターゼの局在、サブユニット間の結合、酵素活性に影響しない

(A) *kei1^{R135S}-GFP*を発現する株(KSY688)を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。
 (B)(C) *KEI1-GFP*発現株(KSY686)および *kei1^{R135S}-GFP*を発現する株(KSY689)からlysateを調製し、10,000 gで遠心した上清を22-60%蔗糖密度勾配遠心で分画し、SDS-PAGE、ウェスタンブロットングで各タンパク質を検出した。
 (D) *AUR1-3HA*と、*KEI1-GFP*または*kei1^{R135S}-GFP*を共発現する株(それぞれKSY672, KSY670)からlysateを調製して1% Triton X-100で処理し、超遠心の上清(S)からAur1-3HAを免疫沈降してKei1-GFPの共沈を検討した。BはSの10倍濃縮になっている。U, Unbound; B, Bound

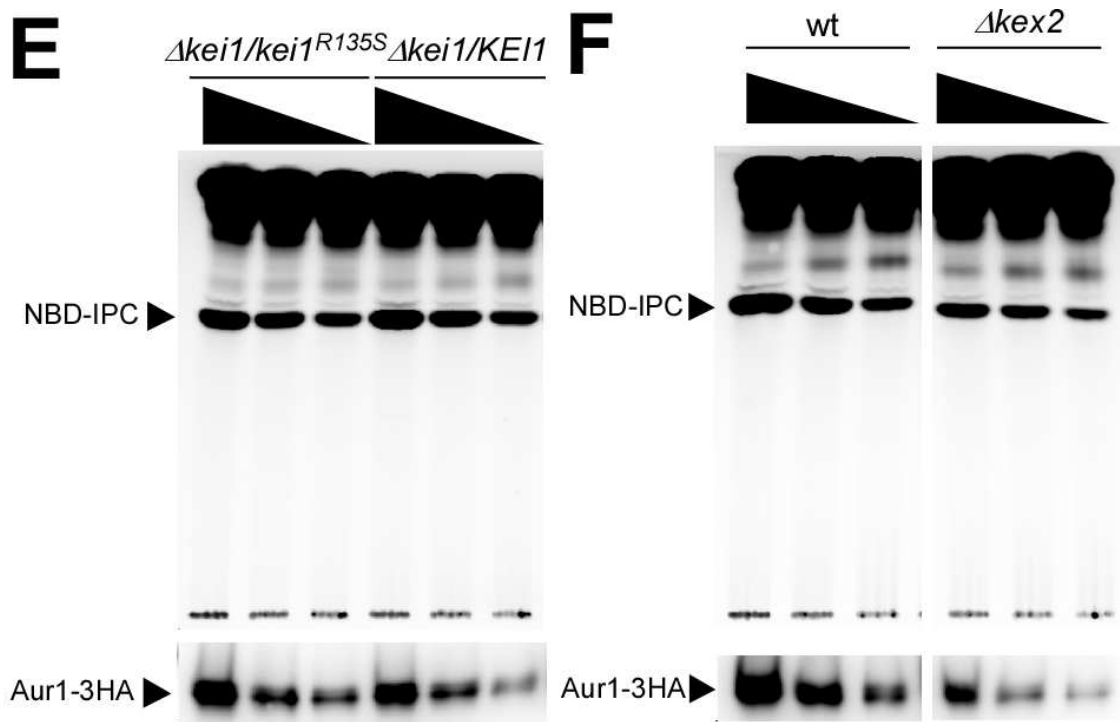


Figure 3-12 Kex2による切断は、IPCシンターゼの局在、サブユニット間の結合、酵素活性に影響しない(続き)

(E) $\Delta kei1/KEI1$ 株と $\Delta kei1/kei1^{R135S}$ 株に $AUR1-3HA$ を発現させ(それぞれKSY719, KSY706), 抗HA抗体で免疫沈降を行い, 免疫沈降産物のIPC合成活性を測定した.

(F) $AUR1-3HA$ を発現する野生株と $\Delta kex2$ 株(それぞれKSY525, KSY588)のlysateを1% Triton X-100で処理し, 抗HA抗体で免疫沈降を行い, 免疫沈降産物のIPC合成活性を測定した.

注) Fは3-11Cの右パネルと同じTLCプレート上で試験したため, Fのwtの図は再掲である.

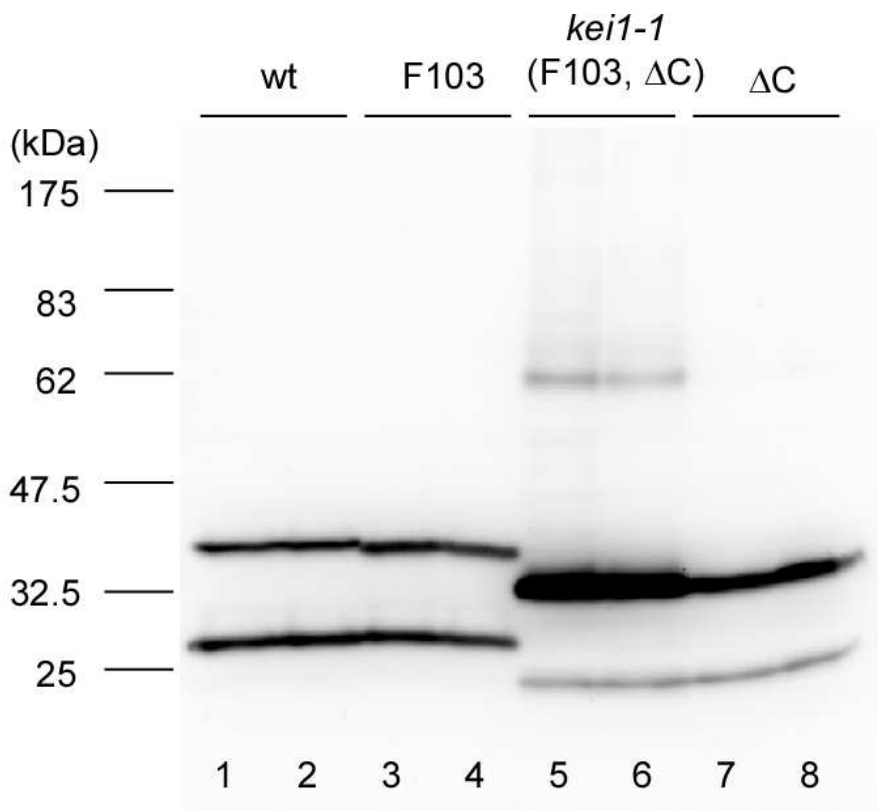


Figure 3-13 *kei1*変異体は発現量が上昇している

$\Delta kei1$ にKEI1-GFP (lane1:KSY637, lane2:638), *kei1*^{F103I}-GFP (lane3:KSY639, lane4:640), *kei1-1*-GFP (lane5:KSY603, lane6:604), *kei1* ^{ΔC} -GFP (lane7:KSY605, lane8:606)を相補して、各株を26.5°Cで培養してlysateを調製し、SDS-PAGE、ウェスタンブロッティングでKei1-GFPの量を比較した。他の3つのKEI1-GFPアリアルに比べ、*kei1-1*-GFPの発現量が顕著に増加していた。

3-3 考察

本章では、*YDR367w (KEII)* にコードされる機能未知必須膜タンパク質 *Kei1* について、詳細な機能解析を行った。*Kei1* は主にゴルジ体に局在するが、一部は小胞体に局在していた (Fig. 3-3&5)。小胞体に局在するものとゴルジ体に局在するものは SDS-PAGE での泳動度が異なり、検討の結果、135 番目のアルギニン残基を late ゴルジのエンドプロテアーゼ *Kex2* に認識されて切断されていることが分かった (Fig. 3-3)。また、温度感受性変異株 *kei1-1* を取得し、サプレッサースクリーニングを行った結果、脂質合成経路およびその周辺で働くタンパク質をコードする遺伝子がいくつか同定され、中でも *AUR1* が強い活性を持っていた (Fig. 3-7)。さらに、*Kei1* と *Aur1* は免疫沈降により共沈し (Fig. 3-8), *in vivo* で IPC シンターゼ複合体を形成していると考えられた。*kei1-1* 株では IPC シンターゼの活性が低下している (Fig. 3-11) と共にゴルジ体への局在も失われており (Fig. 3-9), *Kei1* が IPC シンターゼの活性と局在の両方に重要なサブユニットであると結論するに至った。

スフィンゴ脂質の恒常性における *Kei1* の役割

出芽酵母に限らず真核生物では、スフィンゴ脂質は細胞質膜に豊富に存在している。主に細胞質膜において、スフィンゴ脂質はコレステロールと共に「脂質ラフト」と呼ばれる膜ドメインを構成している。脂質ラフトは、スフィンゴ脂質とステロールからなる膜ドメインで、それらと親和性の高い膜タンパク質や GPI アンカータンパク質が集積して、グリセロリン脂質の二重膜上に浮かぶ「いかだ」のように存在していると考えられている。脂質ラフトは、最近まで「仮説」に過ぎずその存在も状況証拠からしか裏付けられていなかった(Munro, 2003)が、最近になって、スフィンゴ脂質に富んだ膜ドメインが実際に存在する様子が観察され、脂質ラフトが確かに存在することが確認された(Ishitsuka et al.,

2004; Sato et al., 2004). 脂質ラフトにある特定のタンパク質群が集合することにより、例えばシグナル伝達などが効率良く行われるようになるなど、脂質ラフトは細胞機能に重要な役割を果たしていると考えられている(Brown and London, 1998; Simons and Toomre, 2000). また、タンパク質の輸送の様々な段階においても重要な機能を果たしていることが明らかにされている(Ikonen, 2001). この脂質ラフトの形成にスフィンゴ脂質は必須である。また、セラミドおよびその誘導体は様々なシグナル伝達に関わっており、その量や局在も細胞内で厳密に制御されている必要があると考えられる。IPC シンターゼの消失や機能不全は、シグナル伝達を調節不能にし、さらに脂質ラフトが形成されなくなることによりタンパク質輸送や細胞質膜の機能に欠損が起これると考えられるため、細胞に深刻なダメージを与えたと考えられる。実際、*AUR1* や *KEI1* の破壊は細胞にとって致死である。このように、IPC の合成は細胞にとって極めて重要な反応であり、細胞の状態に応じて厳密に制御される必要があると考えられる。しかしながら、グリセロリン脂質の代謝系と比べてスフィンゴ脂質の代謝系の研究は歴史が浅く、合成に関わる遺伝子の同定は進んできたものの、その調節に関しては殆ど分かっていない。*Aur1* に関しても、抗真菌剤 *AbA* の標的タンパク質でありながら、遺伝子発現調節などに関する知見は全く無いのが現状である。*Kei1* は、IPC シンターゼの局在・活性の両方に重要なサブユニットであり、*in vivo* での IPC 合成活性の調節をする際の標的として適当であると考えられる。実際、 $\Delta kei1$ 株の生育を *KEI1-GFP* または *kei1-1-GFP* をプラスミドで相補させたとき、*Kei1-1-GFP* は *Kei1-GFP* と比べて明らかに多く作られていた (Fig. 3-13)。これは、変異により引き起こされた IPC 合成活性の低下を、おそらくセラミドの増加または IPC の減少として細胞が感知し、*KEI1* 発現を up-regulate したと考えられる。もちろん、mRNA の増加などの裏付けを取ることが必須であるが、このことは脂質の構成の変化を感知してそれを情報として転写につなげる経路の存

在を示唆している。スフィンゴ脂質がシグナル伝達を仲介することを示す知見は数多いが、現在までのところ、スフィンゴ脂質の構成の変化そのものを伝えるシグナル伝達は、殆ど報告が無い。細胞質膜のグリセロリン脂質の非対称性の変化による、スフィンゴイド塩基のトランスロカーゼ *Rsb1* の発現上昇が報告されている(Ikeda et al., 2008; Kihara and Igarashi, 2004)が、この例でも感知しているのはグリセロリン脂質の構成の変化であり、スフィンゴ脂質の組成や量の変化を転写制御につなげるシグナル伝達経路となると、少なくとも出芽酵母では例が無い。既知のシグナル伝達経路を利用しているのか、それとも未知のシグナル伝達経路が存在するのかは分からないが、セラミドもしくは IPC の量の変動がどこから何を介してどのように転写制御にまで伝えられているのか、非常に興味深い。

サプレッサー遺伝子に関する考察

kei1-1 温度感受性の多コピーサプレッサースクリーニングでは、*AURI* 以外にもサプレッサー活性を示す遺伝子をいくつか取得した (Fig. 3-7)。それらが温度感受性に対するサプレッサー活性にどのように関わっているか論じてみたい。

GDA1 は、ゴルジ体内腔に存在する GDPase をコードしている(Abeijon et al., 1993)。マンノース付加はゴルジ体で行われる主要な修飾反応の 1 つであるが、その基質は全て GDP-マンノースである。GDP-マンノースは細胞質で作られて、*VRG4/VIG4* にコードされる GDP-マンノーストランスポーターによってゴルジ体内腔に運ばれる(Abe et al., 1999; Dean et al., 1997)。各種糖転移酵素は GDP-マンノースを基質としてターゲットにマンノースを付加し、フリーの GDP が発生する。この GDP を加水分解して GMP に変えるのが GDPase である。GDP から GMP への変換はゴルジ体内腔における糖転移にとって非常に重要である。それは、GDP-マンノーストランスポーターがアンチポーターであり、GDP-マンノ-

スをゴルジ体内腔に運ぶ代わりに GMP をゴルジ体内腔から細胞質へと排出しているからである(Berninsone et al., 1994). すなわち, GDPase が無ければ GDP-マンノースはゴルジ体内腔に供給されないことになる. 逆に, GDPase が増えるとゴルジ体内腔の GMP が増加し, それに伴って GDP-マンノーストランスポーターが活性化し, GDP-マンノースの供給が増えるはずである. すなわち, *GDAI* の高発現は, ゴルジ体内腔のマンノース転移酵素の基質を増加させる. これが *kei1-1* のサプレッサー活性とどう繋がってくるかであるが, おそらく以下のようなメカニズムが働いているのではないかと推測される. *GDAI* の高発現によりゴルジ体内腔に GDP-マンノースが増えると, それを基質とする MIPC シンターゼが活性化され, IPC を MIPC に変換する. そうすると IPC が減少するが, 生成物の減少により IPC シンターゼの活性が高まる, もしくは IPC の減少が感知されて Aur1 もしくは Kei1 の発現が誘導されることにより, IPC シンターゼの量が増える. 他の可能性も考えられるだろうが, おそらくこのような仕組みでサプレッサー活性が生まれているのだろう. 極めて preliminary なデータではあるが, *AURI-GFP* をゲノムにインテグレートした *kei1-1* 株で *GDAI* を高発現させ, 許容温度で培養した後, 制限温度に 2 時間移すと, 高発現しなかった場合に比べて Aur1-GFP の量が多いこと, 同時に分解物と思われるものが蓄積することを観察している. このことは, *GDAI* の高発現により *AURI* の高発現を促したか, *GDAI* の高発現が *KEI1* の高発現を促し, そのために Aur1 の安定性が変化したか, もしくはその両方が起きている可能性を示唆している.

SFHI は, phospholipid transfer protein である Sec14 のホモログの 1 つをコードしている. Sfh1 は出芽酵母に 5 つある Sec14 ホモログの中で最も Sec14 に配列が似ているが, 生育を始め *sec14* 変異株の表現型を相補せず, さらに 5 つの中で唯一 *in vitro* の lipid transfer 活性が見られなかった(Li et al., 2000). さらにその局在は, 顕微鏡観察では核に多く観察され, lysate の遠心分画では膜画分に多く回

収されるという報告がなされている(Schnabl et al., 2003). 結局のところ Sfh1 は局在も分子としての機能もはっきりせず, 細胞内でどのような働きをしているかは未知のままである. この遺伝子が *kei1-1* のサプレッサーとなるには, 2 つの全く異なる可能性が考えられる. 1 つは, *in vitro* では見られなかった lipid transfer 活性が *in vivo* では発揮されており, PI をゴルジ体に運ぶことにより IPC シンターゼの基質を増やし, 活性をサポートしているというもの. もう 1 つは, Sfh1 がシグナル伝達に働いており, *SFHI* の高発現により何らかの形で *AURI* か *KEII*, もしくは両方の遺伝子の発現が上昇した, という可能性である. 前者の場合, 分画によって膜画分に回収された Sfh1 が lipid transfer 分子として機能していることを想定している. 後者の場合, Sfh1 は専ら核で働いており, 核で遺伝子発現制御の調節をしている可能性と, PI 4-kinase である Pik1 のようにゴルジ体と核とを行き来している(Demmel et al., 2008; Strahl et al., 2005)可能性が考えられる. ゴルジ体と核とを行き来している場合, Sfh1 は何らかのシグナルを受け取って核に移行し, 核でそのシグナルを転写制御系に受け渡していると考えられる. もしかすると, 再三その存在の可能性を指摘している「IPC の減少を遺伝子発現制御につなげる経路」で機能する分子かもしれない. Sec14 と高い相同性を持つことから, ゴルジ体でイノシトールリン酸を含んだスフィンゴ脂質に相互作用することは十分考えられ, IPC などの量が減少すると膜との相互作用が減少し核に移行する, といった性質を持っている可能性が考えられる.

PSDI は, ホスファチジルセリン (PS) をホスファチジルエタノールアミン (PE) に変換するホスファチジルセリン脱炭酸酵素をコードしている(Clancey et al., 1993). *PSDI* の高発現は PS の減少を引き起こすはずなので, 減った PS の合成のために CDP-DAG が使われてしまい, 同じ CDP-DAG から作られる PI の生合成が阻害され, 結果として IPC の合成も阻害される, というサプレッサー活性とは全く逆の効果が推測されてしまう. しかしながら, グリセロリン脂質の代

謝系は複雑に入り組んでおり、上記のような単純な推測とは全く異なる遺伝子発現の制御などが行われていると考えられる。詳しい検討をするのはここでは控えるが、そのような脂質代謝制御の結果として、PI の合成量が増え、IPC の合成を助ける結果になっているのではないかと推測される。

IPT1 がサプレッサー活性を示さなかったのは非常に意外な結果であった。*Ipt1* は *Aur1* と 27% のアミノ酸相同性を持ち、行う反応も *Aur1* と類似 (PI からのイノシトールリン酸の転移) しているからである (Dickson et al., 1997)。4 つの遺伝子が入ったプラスミドのサプレッサー活性は再現性があり、*IPT1* を単独でクローニングしたらサプレッサー活性を失ったことから、*IPT1* 以外の遺伝子がサプレッサー活性を持っていたか、クローニングした領域の外に *IPT1* のサプレッサー活性に重要な配列があったか、いずれかが可能性として考えられる。いずれの場合も、サプレッサー活性に必要なものとして有力な候補であると考えられるのは *SNF11* である。*Snf11* は SWI/SNF 複合体のサブユニットであり、転写制御に関わっている (Treich et al., 1995)。*SNF11* の多コピー導入により、*IPT1* もしくは *KE11*、*AUR1* の転写が活性化され、サプレッサー活性に繋がった可能性が推測される。スフィンゴ脂質の合成系が *Snf11* を含むクロマチンリモデリング複合体によって転写レベルで制御されているならば全く新規の知見であり、早急に検討を行うべきであろう。

COPI 小胞による IPC シンターゼのゴルジ体間リサイクリング

Ke11 の C 末端が COPI コートマーのサブユニットと *in vitro* で相互作用することを見出したことから、IPC シンターゼの局在は COPI 依存的に制御されている可能性が示唆された。ここでは IPC シンターゼのゴルジ体局在について考えてみたい。

結果の項でも述べたが、ゴルジ体局在を示す膜貫通タンパク質の C 末端が

COPI コートマーと相互作用する例はいくつか知られている。ただし、それらは全てゴルジ体-小胞体間をリサイクルしており、COPIに結合するもののゴルジ体間でリサイクルが完結している例は、少なくとも出芽酵母では知られていない。Kei1 が COPI 小胞に乗って小胞体まで運ばれているかは検討していないが、結合相手の Aurl は *sec block* 実験により小胞体には戻らないと報告されており (Levine et al., 2000), Kei1 もおそらく小胞体には戻らないのではないかと考えられる。Kei1 がゴルジ体間のみをリサイクリングしていることを確かめることが先決ではあるが、ここでは「Kei1 は小胞体には戻らない」ことを前提に議論を進める。ゴルジ体の特徴は、early, medial, late というサブコンパートメントに分かれ、それぞれの区画でタンパク質組成が異なることであるが、この区画化を説明するために長らく議論が続いていた (Barr, 2002; Puthenveedu and Linstedt, 2005)。しかし最近、cisternal maturation「槽成熟」と呼ばれるモデルが広く受け入れられている。実際に酵母の生細胞で槽が early から late に成熟する様子が観察されたためである (Losev et al., 2006; Matsuura-Tokita et al., 2006)。槽成熟モデルによれば、サブコンパートメント間で小胞による順行輸送は行われず、成熟度の高い槽から低い層へと逆行輸送によりタンパク質が送り返されることにより、槽が成熟していく。モデルを単純化して説明すると、例えば「late になろうとしている medial ゴルジ」は medial ゴルジのタンパク質を「medial ゴルジになろうとしている early ゴルジ」へと逆行輸送することで late ゴルジへと成熟していく。タンパク質の面から見れば、medial ゴルジのタンパク質は「late になろうとしている medial ゴルジ」から「medial ゴルジになろうとしている early ゴルジ」へ逆行輸送される、ということを繰り返して medial ゴルジ局在を維持し続ける、ということになる。Kex2 は late ゴルジに局在していることが分かっており、Kei1 が Kex2 に切断されることから、Kei1 は少なくとも Kex2 のいる late ゴルジには到達しているはずである。当初、Kex2 による切断が、Kei1 が逆行輸送されるこ

とに重要なのではないかと推測したが、蔗糖密度勾配遠心の結果からはそのような結果は得られなかった。Kex2 切断についてはまた後で論じることにする。Kei1 は Kex2 のいる late ゴルジ、もしくは late になろうとしている medial ゴルジまで槽成熟と共に運ばれるが、さらに成熟した槽には居ることが出来ず、medial ゴルジに送り返されると考えられる。槽成熟モデルでは、同じ成熟度の槽に局在するゴルジ体タンパク質は同じ COPI 小胞に乗せられてより early なゴルジ槽に運ばれるはずだが、Kei1 と非常に良い共局在を示した Kre2 は、Vps74 というレセプターを介して COPI 小胞に積み込まれ、ゴルジ体-小胞体間をリサイクルしている(Schmitz et al., 2008; Tu et al., 2008)。それに対して、Aur1 とおそらく Kei1 は小胞体には戻らない。すなわち、定常的に見れば同程度の成熟度のゴルジ体槽に局在していても、そのリサイクリング方式は全く違う可能性がある。もっと具体的に言えば、少なくとも顕微鏡観察や蔗糖密度勾配遠心分画レベルでは「ほぼ同一」であるゴルジ槽から出芽する COPI 小胞でも、小胞体に向かうものと、より成熟度の低いゴルジ槽に向かうもの、少なくとも二種類の COPI 小胞が存在している可能性が高い、ということである。他の生物では COPI に 2 つのタイプが存在することを報告している例はある(Donohoe et al., 2007; Moelleken et al., 2007)が、出芽領域が cis (early) と medial・trans (late) で分かれており、同じコンパートメントから明確に区別できる COPI 小胞が出芽するのを観察した例は無い。また、動物細胞の場合には COPI コートマーの γ ・ ζ サブユニットに 2 種類の isoform が存在し、isoform の組み合わせによって COPI の出芽領域が違うことが報告されている(Moelleken et al., 2007)が、出芽酵母の COPI コートマーのサブユニットはそれぞれ 1 つずつしか存在しない。COPI 小胞の行き先の違いを説明する最も明快な答えはそれぞれの COPI 小胞に存在する v-SNARE の違いであろうが、積荷タンパク質がどのようにして異なる v-SNARE のいる COPI 小胞に乗るのかを説明する知見は今のところ皆無である。medial

ゴルジから COPI 小胞に乗るタンパク質は、その細胞質に露出している部分のどこかで特定の v-SNARE と相互作用しているのかもしれない。もしくは、Kre2 の細胞質側 N 末端に結合する Vps74 のような COPI のアダプタータンパクが、特定の v-SNARE と相互作用しており、積荷の行き先を決めているのかもしれない。

Kex2 切断の意義

結果の項に示したように、Kei1 は late ゴルジのプロテアーゼ Kex2 に切断されるが、その切断不全変異 (R135S) は Kei1 の局在や IPC シンターゼの活性に影響を与えず、調べた限りでは切られなくなる以外何の表現型も示さなかった。他の真菌類の Kei1 ホモログの配列を見てみると、Kex2 の切断部位のある領域だけ突出して相同性が低いのが分かる (Fig. 3-2A)。さらに、アルギニン残基は *Candida glabrata* にしか見られず、*Vanderwaltozyma polyspora* に至ってはリジン残基すら存在しない。このことは、この領域が Kei1 タンパク質の機能にとって重要性が低く、同様に Kex2 による切断も重要性が低いことを示唆している。おそらく、Kei1 と Aur1 は Kex2 に切られる前に複合体を形成しており、複合体の状態では Kex2 による切断を受けるがコンフォメーションは殆ど変化せず、それゆえ酵素活性、局在等が Kex2 切断の有無の影響を受けなかったのであろう。Kex2 切断部位は進化の過程で後から偶然出現したもので、機能に影響がなかったことからそのまま残ってしまった、ということではないだろうかと推測している。

ただし、本研究では、ストレスのかからない条件下、栄養に富んだ培地で対数増殖を行っている細胞で全ての検討を行っている。Kex2 による切断をされるようになって、もし何らかの意味のある機能を獲得しているとするならば、それはストレス条件下や定常期の細胞において効果を発揮するものである可能性

が高いと考えられる。そのような条件下で特異的に発現されるタンパク質が、**Kex2** で切られた **Kei1** に作用して何か制御を行っている可能性は否定できない。

第4章 総括

本論文では、これまでまったく未知であった Pga1 と Kei1 の機能について詳細に検討し明らかになったことについて述べた。いずれも温度感受性変株を作製し、その多コピーサプレッサーを同定したことで機能に迫ることができ、表現型や機能の解析においても温度感受性を利用して決定的なデータを得ることができた。このことは、機能が全く未知のタンパク質の機能解析において、本研究でとった方針が有効であったことを示している。本研究は分泌経路に局在する膜タンパク質に絞って研究を行ったが、同様の方法で可溶性の必須タンパク質の機能解析も強力に行うことが出来ると考えられる。重要な生化学的反応に関わる新規タンパク質を同定したという成果はもちろんだが、機能未知必須遺伝子の研究における有効な研究手法を提示したという点でも本研究は非常に有意義であったと言えよう。

本論文ではその解析について触れることが出来なかったが、本研究はもともと小胞輸送など分泌経路で行われるタンパク質輸送に関して重要なタンパク質を同定することを目的に解析対象遺伝子をデータベースから絞り込み、最終的に *YBR070c*, *YDR367w*, *YFR042w*, *YHR036w*, *YJL097c*, *YMR298w*, *YNL149c*, *YNL158w* の計 8 個の必須遺伝子がコードする機能未知膜タンパク質の解析を目標として始まったプロジェクトである。*Yfr042w* については β -1,6-glucan 合成に重要な働きをしていることを見出し報告した(Nakamata et al., 2007)が、分子機能はまだ解明できておらず、その機能解析は現在研究室内で進行中である。*Ynl149c* に関しては本研究においても温度感受性変異株の作製すら思うように進まず、網羅的解析でも未だに殆ど手掛かりが得られていないという状況で、完全に機能未知のまま残されている。この研究プロジェクトを引き継ぐ人には是非とも攻略してほしい。一方で、それ以外のタンパク質は、本研究の進行中、別の研究グループにより機能が明らかにされた。これらについても少し触れて

みたい。YBR070c は ALG14 と命名され、そのコードするタンパク質は小胞体でコア N 糖鎖の合成を行う UDP-GlcNAc transferase のサブユニットであることが報告された(Bickel et al., 2005; Gao et al., 2005)。YHR036w は BRL1 と命名され、nuclear transport に関わる核膜タンパク質であると報告されている(Saitoh et al., 2005)。YJL097w は PHS1 と命名され、セラミドに組み込まれる脂肪酸鎖の elongation に必須な 3-hydroxyacyl-CoA dehydratase をコードしていた(Denic and Weissman, 2007)。YMR298w は LIP1 と命名され、セラミドシンターゼの必須なサブユニットをコードすることが報告された(Vallee and Riezman, 2005)。当初の目論見とは異なり、我々が解析した 3 つと、他の研究グループによって解析された 4 つ、結局どれもタンパク質輸送に直接関わるタンパク質ではなかったことになる。Schekman らによる sec mutant のスクリーニングなどにより、出芽酵母における輸送に必須な因子は既に殆ど同定されており、新たに発見するのは困難なのかもしれない。もし残っているとすれば、それらは膜貫通型ではないが、オルガネラや輸送小胞の膜に相互作用している、いわゆる「膜表在性」の性質を持つものだろう。今後、輸送に関わる必須な因子を同定するためには、そのようなタンパク質に狙いを定める必要がある。ただし、膜表在性かどうかを配列のみから判断するのは難しい。PI(4,5)P₂ に結合する PH ドメインなど、特定のドメインやコンセンサス配列もいくつか明らかになってはいるが、それらを持つタンパク質は既に解析の対象となっているだろう。新規な因子を見つけるためには、膜表在性タンパク質を選択して濃縮、同定できるような、新たな生化学的手法の開発が必要である。一方、生育に非必須ながらも輸送に重要な働きをしている未同定タンパク質、命名されてはいるが機能は全く分かっていないものはまだ多く残されていると考えられる。最近の例で言えば、Banfield らと Ferguson らによる Vps74 の機能解析(Schmitz et al., 2008; Tu et al., 2008)、Weissman らによる Get complex の同定(Schuldiner et al., 2008)などがある。新たな視点でス

クリーニングを行うことにより、タンパク質輸送に関わるタンパク質を同定し、輸送を制御する未知のメカニズムの発見につながる可能性は大いにある。

一方で興味深いのは、8つのうち3つ (*KEII*, *LIP1*, *PHS1*) がスフィンゴ脂質の合成に直接関わっていたことである。スフィンゴ脂質は、その機能や生合成経路など、近年ようやく詳しい解析が行われるようになったため、これらの重要タンパク質が未解析で残されていたのだろう。本論文では触れなかったが、我々は *LIP1* と *PHS1* の温度感受性変異株を取得している。*PHS1* の変異株ではセラミドの脂肪酸の長さが短くなっていると考えられ、*LIP1* の変異株ではセラミドの合成が欠損していると考えられる。IPC 合成に欠損のある *KEII* の変異株と共に、スフィンゴ脂質生合成経路の異なる段階での変異株が利用可能であることは、スフィンゴ脂質の研究、特に機能の解析を行う上で大きなアドバンテージになると考えられる。例えば、セラミドと IPC ではシグナル伝達においてどのような機能的差異があるのか、セラミドの脂肪酸鎖が短くなると脂質の性質や機能にどのような影響が出るのか、といったスフィンゴ脂質の本質に関わる解析が可能であろう。温度感受性変異株がさまざまな解析において強力な武器になるのは本論文中で示した通りである。考察で示した *SFHI* や *SNF11* との関連も含めて、スフィンゴ脂質が生理学的にどのような機能を果たしているのか、これらの変異株を利用して明らかにされていくことを期待したい。

実験材料と方法

抗体	由来	倍率*
抗 myc 抗体 (mouse monoclonal)	9E10D (Berkeley Antibody)	x1000
抗 HA 抗体 (mouse monoclonal)	12A5 (Berkeley Antibody)	x1000
抗 Kex2 抗体 (rabbit polyclonal)	研究室内で作製	x100
抗 Kar2 抗体 (rabbit polyclonal)	Gift from Dr. M. Tokunaga	x1000
抗 Van1 抗体 (rabbit polyclonal)	研究室内で作製	x1000
抗 Scs2 抗体 (rabbit polyclonal)	Gift from Dr. S. Kagiwada	x2000
抗 Gas1 抗体 (rabbit polyclonal)	研究室内で作製	x1000
抗 CPY 抗体 (rabbit polyclonal)	Rockland	x1000
抗 ALP 抗体 (mouse monoclonal)	1D3 (Molecular Probes)	x1000
抗 Sed5 抗体 (rabbit polyclonal)	研究室内で作製	x1000
抗 Ret1 抗体 (rabbit polyclonal)	Gift from Dr. P. Cosson	x1000
抗 Sec21 抗体 (rabbit polyclonal)	Gift from Dr. R. Duden	x1000
抗 PGK 抗体 (mouse monoclonal)	22C5 (Invitrogen)	x1000

*ウェスタンブロッティングの一次抗体として使用した時の希釈倍率

大腸菌生育培地

LB+amp

Yeast Extract (Becton Dickinson)	0.5 g
Tryptone Peptone (Becton Dickinson)	1 g
NaCl (国産化学)	0.5 g
Agar (国産化学)	1.5 g
イオン交換水	100 ml

上記を混合，オートクレーブ後，約 70°C に冷めてから 10 mg/ml アンピシリンナトリウム (SIGMA-ALDRICH) を 100 μ l 加えた．液体培地は上記から Agar を加えずに調製し，オートクレーブした．

酵母生育培地

YPD

Yeast Extract (Becton Dickinson)	1 g
Peptone (Becton Dickinson)	2 g
Glucose (国産化学)	2 g
イオン交換水	100 ml

固体培地のときは Agar (国産化学) を 1.5 g 加えた．

調製後オートクレーブした．

YPS 培地

Yeast Extract (Becton Dickinson)	1 g
Peptone (Becton Dickinson)	2 g
Sucrose (国産化学)	2 g
イオン交換水	100 ml

SD

Yeast nitrogen base w/o a.a. (Becton Dickinson)	0.17 g
硫酸アンモニウム (国産化学)	0.5 g
Glucose	2 g
イオン交換水	100 ml

固体培地のときは Agar (国産化学)を 1.5 g 加えた.

栄養要求性の選択に用いる場合は, 適宜, 塩基, カザミノ酸[Vitamin Assay Casamino Acids (Becton Dickinson)], アミノ酸を追加した.

5-FOA プレート

SD プレートの材料を半分の液量に溶解してオートクレーブ後, 50 ml のイオン交換水に 5-FOA (5-Fluoroorotic Acid, 和光純薬工業) を 0.1 g を溶解し, フィルター滅菌により加えた (100 ml の場合). 栄養要求性のある株を植菌する場合には, 適宜, 塩基, カザミノ酸[Vitamin Assay Casamino Acids (Becton Dickinson)], アミノ酸を追加した.

大腸菌からの plasmid 抽出

試薬

1) 1 M Tris-Cl (pH 8.0)

Tris (ナカライテスク)	12.1 g
イオン交換水	up to 100 ml

HCl (国産化学)で pH 8.0 に調整した.

2) 0.5 M EDTA (pH 8.0)

EDTA (国産化学)	18.6 g
イオン交換水	up to 100 ml

NaOH (国産化学)で pH 8.0 に調整した.

3) solution I

Glucose (国産化学)	1.8 g	(final 50 mM)
----------------	-------	---------------

1 M Tris-Cl (pH 8.0)	5 ml	(final 25 mM)
0.5 M EDTA (pH 8.0)	4 ml	(final 10 mM)
イオン交換水	up to 200 ml	

4) solution II

NaOH (国産化学)	1.6 g	(final 0.2 N)
SDS (和光純薬工業)	2.0 g	(final 1%)
イオン交換水	200 ml	

5) solution III

酢酸カリウム (国産化学)	58.9 g	(final 3 M)
イオン交換水	up to 200 ml	

酢酸 (国産化学)で pH 5.5 に調整した.

6) TE (pH 8.0)

1M Tris-Cl (pH 8.0)	2 ml	(final 10 mM)
0.5 mM EDTA (pH 8.0)	0.4 ml	(final 1 mM)
イオン交換水	up to 200 ml	

7) 3 M 酢酸ナトリウム

酢酸ナトリウム 3 水和物 (国産化学)	81.65g
イオン交換水	up to 200 ml

酢酸 (国産化学)で pH 5.2 に調整した.

方法

大腸菌のシングルコロニーを 2 ml の LB+amp 培地で 10~16 時間振盪培養し、4,500 g, 5 分遠心して集菌した。上清を除き, solution I 200 μ l を加えて懸濁し, solution II 400 μ l を加えて転倒混和し, さらに solution III 300 μ l 加えて転倒混和した後, 氷上で 10 分間静置した。15,000 g, 室温で 5 分間遠心した。上清 800 μ l を回収して 480 μ l のイソプロパノール (国産化学)を加えて混合し, 室温で 10 分間静置した。15,000 g, 4°C で 5 分間遠心し, 沈殿を 70%エタノール 500 μ l で洗浄し, 風乾した。沈殿を TE 200 μ l に溶解し, 3 M 酢酸ナトリウム 20 μ l を加えてよく混合した後, エタノール 1 ml を加えてよく混合し, 15,000 g, 4°C で 5 分間遠心した。上清を除き, 70% エタノールで洗浄し, 風乾した。沈殿を RNase 50 μ g/ml を加えた TE 30 μ l に溶解し, 65°C で 20 分間インキュベートした。インキュベート後のサンプルを回収プラスミドとした。

制限酵素処理

プラスミド DNA, 10 \times buffer, イオン交換水, 制限酵素で全量を 10 μ l にし, 37°C で 1 時間インキュベートすることで, 制限酵素処理を行った。制限酵素の種類によって反応温度, 10 \times buffer は最適のものを選択した。

アガロースゲル電気泳動

試薬

1) 50 \times TAE buffer

Tris	242 g
酢酸	57 ml
EDTA	37.2 g
イオン交換水	up to 1 L

2) TAE buffer

50×TAE buffer	200 ml
10 mg/ml Ethidium bromide solution (和光純薬工業)	100 μ l
イオン交換水	up to 10 L

3) 0.8% アガロースゲル

電気泳動用アガロース (岩井化学薬品)	0.8 g
TAE buffer	100 ml

電子レンジで加熱して溶解し、良く攪拌して型に流し込み、コームをさしてゲル化させた。

500 bp 以下の DNA を泳動する際にはアガロース濃度が 2.0% のゲルを使用した。

方法

アガロースゲルを TAE buffer で充たしたサブマリン式泳動槽(Mupid-2plus ミニゲル泳動槽; ADVANCE)にセットし、10×Loading buffer (Takara) 1 μ l を加えたサンプルと λ DNA マーカーをアガロースゲルにロードし、定電圧 100 V で泳動した。Loading buffer の Dye がゲルの 6 割まで達したところで泳動を止め、UV イルミネーター(フナコシ薬品)、撮影装置(ATTO)により、確認、記録、バンドの切り出しを行った。

λ DNA マーカーの作製

10×H buffer(Roche) 20 μ l とイオン交換水を加えて、 λ DNA (Takara)を 0.15 μ g/ μ l の濃度になるように 200 μ l 調製した。EcoRI (Roche), HindIII (Takara)を各 1 μ l ずつ加え一晩インキュベートした。イオン交換水 700 μ l, 10×Loading Buffer (Takara) 100 μ l を加え-20 °C で保存した。泳動の際は 5 μ l 用いた。

アガロースゲルからの DNA の回収

アガロースゲルからの DNA の回収は GENE CLEAN[®] III Kit (BIO 101 Systems) により行った。UV イルミネータで DNA を検出し、カッターで切り出した。ゲル重量の 3 倍量の NaI を加え、56°C でインキュベートしてゲルを溶解した。室温に冷やし、Glass Milk を 3 µl 加え、良く攪拌した。16,000 g で 10 秒間遠心し、上清を除いた。New Wash 500 µl で 2 回洗浄し、TE もしくは Elution Solution 10 µl を加え、良く懸濁した。16,000 g で 1 分間遠心して上清を回収し、DNA 溶液とした。NaI, Glass Milk, New Wash, Elution Solution は Kit に含まれるものを使用した。

DNA の ligation

vector DNA, insert DNA をアガロースゲルから回収し、各 8.5 µl を混合した。10×ligation buffer (Roche) 2 µl, T4 DNA ligase (Roche) 1 µl を加え、4°C で 1 時間インキュベートした。

大腸菌コンピテントセルの調製

試薬

1) SOB

Tryptone	4 g	(final 2%)
Yeast Extract	1 g	(final 0.5%)
1 M NaCl	2 ml	(final 10 mM)
1 M KCl	0.5ml	(final 2.5 mM)
イオン交換水	200 ml	

上記を混合してオートクレーブ後、個別にオートクレーブした下記を加えた。

1 M MgCl₂ 2 ml (final 10 mM)

1 M MgSO₄ 2 ml (final 10 mM)

2) TB

PIPES (同仁化学) 0.3 g (final 10 mM)

CaCl₂ 0.22 g (final 15 mM)

KCl 1.86 g (final 250 mM)

イオン交換水 100 ml

1 M KOH で pH を 6.7 に調整後，下記を加え，フィルター滅菌した．

MnCl₂4H₂O (国産化学) 1.09 g (final 55 mM)

方法

大腸菌 DH5 α を LB 2 ml, 37°C で一晩培養し，種菌とした．18°C に冷やした SOB 200 ml に種菌を 200 μ l 植菌し，18°C で二晩振盪培養した．OD₆₀₀=0.6 で回収し，5000 g, 4°C で 5 分間遠心して集菌し，氷冷した TB 30 ml で洗浄した．菌体を氷冷した TB 20 ml に懸濁し，DMSO を終濃度 7% になるように 1.4 ml 加えて良く懸濁した．1.5 ml チューブに 100 から 200 μ l ずつ分注し，液体窒素で凍結し，-80°C で保存した．

大腸菌の形質転換

凍結していたコンピテントセルを融解し，プラスミド溶液を 10 μ l 加えて良く混合し，氷上に 20 分間静置した．42°C で 30 秒間，熱ショックを与えてから LB-amp プレートに塗り広げた．

SDS-PAGE

試薬

1) 4×SDS-PAGE sample buffer

Tris	6% (0.6 g/10 ml)
HCl	3.5% (350 μ l/10 ml)
SDS	4% (0.4 g/10 ml)
Glycerol (国産化学)	40% (4 ml/10 ml)
2-メルカプトエタノール (和光純薬工業)	20% (2 ml/10 ml)

2) 分離ゲル溶液 (pH 8.8)

Tris 0.75 M (45.4 g/500 ml)

SDS 0.2% (1 g/500 ml)

HCl で pH を 8.8 に調整した.

3) 濃縮ゲル溶液 (pH 6.8)

Tris 0.25 M (18.1 g/500 ml)

SDS 0.2% (1 g/500 ml)

HCl で pH を 6.8 に調整した.

4) 30% アクリルアミド

Acrylamide (和光純薬工業) 30% (150 g/500 ml)

N,N'-Methylene-bis(acrylamide) (和光純薬工業) 0.8% (4 g/500 ml)

遮光して 4°C に保存した.

5) SDS-PAGE 泳動用バッファー

Tris	60 g/10 L
Glycine (日理化学)	288 g/10 L
SDS	10 g/10 L

方法

10% ポリアクリルアミドゲルの作製

分離ゲル溶液 3 ml, イオン交換水 1 ml, 30%アクリルアミド 2 ml を混合し, 10% 過硫酸アンモニウム(国産化学) 60 μ l, TEMED (和光純薬工業) 6 μ l を加えてよく混合し, 10 cm \times 10 cm \times 1 mm のゲル板を組み立て, 気泡が入らないように流し込み, エタノール 1 ml を重層した. ゲルが重合したら, エタノールを除き, 濃縮ゲル溶液 900 μ l, イオン交換水 600 μ l, 30%アクリルアミド 300 μ l を混合し, 10% 過硫酸アンモニウム 30 μ l, TEMED 3 μ l を加えてよく混合した. 分離ゲルの上に重層し, コームをセットし, ゲルが重合したらコームを抜いた. ラップで覆い, 4 $^{\circ}$ C で一晩重合させて使用した. 分離ゲルのアクリルアミド濃度は検出するタンパク質の分子量に応じて, 7.5%から 12.5%の間で作製した.

SDS-PAGE は Laemmli 法に基づき行った(Laemmli, 1970). サンプルは 4 \times SDS-PAGE sample buffer を加え, 2 分間煮沸した. サンプルをポリアクリルアミドゲルにロードし, 15 mA の定電流でゲルの下端に達するまで泳動した.

ウェスタンブロットティング

試薬

1) 10 \times TBS (pH7.4)

Tris	0.5 M (121.1 g/2 L)
NaCl	1.5 M (175.4 g/2 L)

HCl で pH を調整した.

2) TBST

10×TBS	100 ml
Tween 20 (シグマ アルドリッチ ジャパン)	0.5 ml
イオン交換水	900 ml

3) Anode buffer 1

Tris	300 mM (72.7 g/2 L)
メタノール	10% (200 ml/2 L)

4) Anode buffer 2

Tris	25 mM (6.06 g/2 L)
メタノール	10% (200 ml/2 L)

5) Cathode buffer

Tris	25 mM (6.06 g/2 L)
6-amino-n-capronic acid (SIGMA)	40 mM (10.5 g/2 L)
10% SDS	0.01% (2 ml/2 L)
メタノール	20% (400 ml/2 L)

6) 5% スキムミルク

スキムミルク (森永乳業)	2 g
TBST	40 ml

方法

ポリアクリルアミドゲルから PVDF 膜へのトランスファーは、セミドライ方式のプロッター(BE-320; BIO CRAFT)を用いて行った。泳動後のポリアクリルアミドゲルを Cathode buffer に浸し、5 分間振盪した。ゲルの大きさに切断した PVDF 膜 (ImmobilonTM-P; MILLIPORE)をメタノールに浸した後、Anode buffer 2 に浸し、5 分間振盪した。陰電極板を下にして、ゲルの大きさに切断したろ紙 (3MM Chr; Whatmann) 2 枚を Anode buffer 1 に浸して乗せ、その上に Anode buffer 2 に浸したろ紙を重ね、PVDF 膜、ゲル、Cathode buffer に浸したろ紙 2 枚を重ね、陽電極板を重ねた。1 mA/cm² の定電流で 50 分間トランスファーした。

トランスファー後の PVDF 膜を 5%スキムミルクに浸し、60 分間振盪してブロッキングした。一次抗体反応は 1%スキムミルク入りの TBST 6 ml に適当な抗体を希釈した溶液に浸して 60 分間振盪して行った。抗体溶液を回収し、TBST で 5 分 1 回、15 分 1 回、5 分 2 回洗浄した。二次抗体反応は 1%スキムミルク入りの TBST 6 ml に Peroxidase でラベルされた Goat 抗 Rabbit IgG (H+L)もしくは抗 mouse IgG (H+L) (Affinity Purified Antibody Peroxidase Labeled Goat anti-Rat (or Mouse) IgG (H+L) MSA Liquid Conjugate; Kirkegaard & Perry Laboratories)を 5000 倍に希釈し、PVDF 膜を浸して 30 分間振盪して行った。TBST で 5 分 1 回、15 分 1 回、5 分 2 回の洗浄の後、発光基質溶液(Supersignal^R West Pico; PIERCE) 1 ml に浸した。検出は、LAS-1000 plus (富士フイルム) の Chemiluminescence モードで行った。

glass beads 破碎による酵母 Total Cell lysate の調製

試薬

1) B88

HEPES (SIGMA) 10 mM

酢酸カリウム (国産化学)	500 mM
酢酸マグネシウム (国産化学)	5 mM
ソルビトール	200 mM

1M KOH で pH を 6.8 に調整した.

2) protease inhibitors cocktail (pic)

chymostatin (SIGMA)	5 mg
aprotinin (SIGMA)	5 mg
leupeptin (SIGMA)	5 mg
pepstatin A (SIGMA)	5 mg
antipain (SIGMA)	5 mg

50% イソプロパノール 10 ml

-20°C で保存した.

3) 500 mM PMSF

PMSF (和光純薬工業, 生化学用)	0.871 g
DMSO (国産化学)	10 ml

500 μ l ずつ分注し, -20°C で保存した.

4) 500mM benzamidine

benzamidine (SIGMA)	0.783 g
イオン交換水	10 ml

500 μ l ずつ分注し, -20°C で保存した.

方法

酵母を 10 ml の YPD (栄養要求性が必要な場合は適当な SD 培地) に植菌して適温で振盪培養し, $OD_{600}=0.8-1.0$ になったところで $OD_{600}=0.8 \times 10$ ml 相当の菌体を集菌(1,100g, 5min, 4°C)した. イオン交換水で洗浄後, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 1 µg/ml protease inhibitor cocktail を含む B88 Buffer 500 µl に懸濁した. 懸濁液に菌体破碎用ガラスビーズを 1 g 加え, MULTI-BEADS SHOKER (安井機械) を用いて 1 分破碎を 3 回繰り返した. それぞれの破碎の間には 1 分のインターバルを入れた. 破碎液を回収し, 700 g, 4 °C で五分間遠心分離して未破壊細胞を除き, Total cell lysate とした. SDS-PAGE に供する場合には, lysate 120 µl に 4x SDS PAGE sample buffer を 40 µl 加えて, SDS PAGE 用のサンプルとし, 10~20µl を SDS PAGE に供した. タンパク質のシグナルはウェスタンブロッティングで確認した.

GFP 融合タンパク質の顕微鏡観察

試薬

1) 1 M リン酸カリウム buffer (pH 7.5) stock solution

リン酸水素二カリウム(国産化学) 29.3 g

リン酸二水素カリウム(国産化学) 4.4 g

イオン交換水 up to 200 ml

調製後オートクレーブした.

2) 0.1 M リン酸カリウム buffer (pH 7.5)

1 M リン酸カリウム buffer (pH 7.5)を 10 倍に希釈した.

3) 10% パラホルムアルデヒド

0.1 M リン酸カリウム buffer (pH 7.5) 1 ml

パラホルムアルデヒド(組織固定用; 和光純薬工業) 0.1 g

90°C に設定したヒートブロックで加熱し溶解した.

方法

10ml の YPD または SD 培地で $OD_{600} = 1.0$ まで培養した. 培養液 750 μl を回収し, 10% パラホルムアルデヒド 250 μl を加え, 30 秒間転倒混和した. 500 g, 室温で 5 分間遠心して集菌し, 0.1 M リン酸カリウム buffer 320 μl に懸濁した. 10% パラホルムアルデヒド 180 μl を加え, 室温で 15 分間穏やかに振盪して細胞を固定した. 500 g, 室温で 5 分間遠心して集菌し, 0.1 M リン酸カリウム buffer 500 μl で 3 回洗浄し, 0.1 M リン酸カリウム buffer 10 μl に懸濁し, 固定細胞とした. slide glass (Pre-Cleaned, 76×26 mm, Thickness 1 mm 白縁磨フロスト; 岩城硝子) に PAP PEN (LIQUID BLOCKER SUPER PAP PEN; 大道産業) で約 15×15 mm 四方の土手を作り, よく乾かした. 土手の内側に Polylysine 1 μl を滴下し, チップの側面で塗り伸ばした. Polylysine を乾燥させた後, 100 μl の滅菌水で 3 回洗浄し, 乾燥させた. 固定した細胞 2.2 μl を滴下し, cover glass (18×18 mm, Thickness 0.13-0.16 mm; 岩城硝子) を被せた. 8 つ折りにしたキムワイプを cover glass の上に乗せてしっかりと押さえた後, マニキュアでシールした.

顕微鏡は共焦点レーザー顕微鏡 (FV-500; Olympus) を使用し, 対物レンズは 60× (Plan APO ×60 Oil; Olympus) または 100× (Plan APO ×100 Oil; Olympus) を使用し, ズーム倍率は 2 倍もしくは 5 倍で画像を取り込んだ. GFP 融合タンパクの蛍光は Multi-Argon レーザを使い, EGFP filter set を使用した. 画像の取り込みは Kalman filter を使い 3 から 5 回積算して, ノイズを減少させた. 3 次元投影するときは, 0.25 μm 間隔で Z 軸の幅が 8 μm の画像を投影した. 画像は Photoshop ver.5 (Adobe) のレベル補正でコントラストの調節, 解像度調整で画像サイズの変更を行った.

間接蛍光抗体染色による顕微鏡観察

試薬

1) 1M リン酸カリウム buffer (pH 7.5) stock solution

リン酸水素二カリウム(国産化学)	29.3 g
リン酸二水素カリウム(国産化学)	4.4 g
イオン交換水	up to 200 ml

調製後オートクレーブした。

2) 0.1 M リン酸カリウム buffer (pH 7.5)

1 M リン酸カリウム buffer (pH 7.5)を 10 倍に希釈した。

3) 10% パラホルムアルデヒド

0.1 M リン酸カリウム buffer (pH 7.5)	10 ml
-------------------------------	-------

パラホルムアルデヒド(組織固定用; 和光純薬工業)	1 g
---------------------------	-----

100°C の湯浴で加熱し溶解した。

4)ソルビトール (関東化学 鹿 1 級)	2.19 g
-----------------------	--------

1 M リン酸カリウム buffer (pH 7.5)	1 ml
-----------------------------	------

イオン交換水	up to 10 ml
--------	-------------

5) SPP w/ DTT

DTT	15.4 mg
-----	---------

SPP	1 ml
-----	------

6) SPP w/ NH₄Cl

塩化アンモニウム (国産化学) 26.7 mg

SPP 1 ml

7) 10×TBS (0.5 M Tris-Cl, 1.5 M NaCl)

Tris 60.6 g

NaCl 87.7 g

イオン交換水 up to 1 L

HCl で pH 7.4 に調整し, オートクレーブした.

8) TBST

10×TBS 100 ml

Tween 20 (SAJ 1 級 シグマアルドリッチジャパン) 0.5 ml

イオン交換水 up to 1 L

9) TBST block

TBST 100 ml

スキムミルク (森永乳業) 1 g

albumin, bovine (SIGMA) 100 mg

10) 一次抗体

各種 1 次抗体を以下の倍率で TBST block に希釈して使用した.

rabbit anti-Kar2 polyclonal antibody 1 μl

mouse anti-myc monoclonal antibody (9E10) 0.5 μl

mouse anti-HA monoclonal antibody (12A5) 1 μl

TBST block 100 μ l

11) 二次抗体

各種 2 次抗体を以下の倍率で TBST block に希釈して使用した.

Texas Red Goat anti-Rabbit IgG H+L (invitrogen) 0.5 μ l

Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse IgG (invitrogen) 0.5 μ l

Alexa Fluor 568 Goat anti-mouse IgG (invitrogen) 0.5 μ l

TBST block 100 μ l

12) マウンティング溶液

p-phenyldiamine (和光純薬工業) 20 mg

10 \times PBS 2 ml

0.1N NaOH 5 μ l

グリセロール (国産化学) 18 ml

-80 $^{\circ}$ C に遮光保存した.

方法

適当な液体培地 10 ml で OD₆₀₀ = 1.0 まで培養した. 培養液 7.5 ml を回収し, 10% パラホルムアルデヒド 2.5 ml を加え, 30 秒間転倒混和した. 500 g, 室温で 5 分間遠心して集菌し, 0.1 M リン酸カリウム buffer 3.2 ml に懸濁した. 10% パラホルムアルデヒド 1.8 ml を加え, 室温で 15 分間穏やかに振盪して細胞を固定した. 500 g, 室温で 5 分間遠心して集菌し, 0.1 M リン酸カリウム buffer 1 ml で 3 回, SPP 1 ml で 1 回洗浄した. 細胞を SPP 500 μ l に懸濁し, 100 μ l を別のチューブに移し, 500 g, 室温で 5 分間遠心して集菌し, SPP w/ DTT 100 μ l に懸濁し, lyticase 10 μ l を加え, 30 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートした. 酵素処理後, 1 μ l を slide glass

(Pre-Cleaned, 76×26 mm, Thickness 1 mm 白縁磨フロスト; 岩城硝子)にとり cover glass (18×18 mm, Thickness 0.13-0.16 mm; 岩城硝子)をかぶせ、顕微鏡で観察しながら滅菌水を滴下し、細胞がほぼ完全に burst するのを確認した。500 g, 室温で 5 分間遠心して集菌し, SPP w/ NH₄Cl 100 μl で 1 回, SPP 100 μl で 1 回洗浄し, SPP 100 μl に懸濁し, 固定細胞とした。slide glass に PAP PEN (LIQUID BLOCKER SUPER PAP PEN; 大道産業)で約 15×15 mm 四方の土手を作り, よく乾かした。土手の内側に Polylysine 1 μl を滴下し, チップの側面で塗り伸ばした。Polylysine を乾燥させた後, 100 μl の滅菌水で 3 回洗浄し, 乾燥させた。固定した細胞 100 μl を滴下し, 土手の内側にまんべんなく行き渡らせ, 室温で 20 分間静置した。上清をアスピレーターで除き, 室温に 10 分間静置した。100 μl の SPP で 2 回 wash し, 10 分ほど風乾した。-20°C に冷やしたメタノールに浸し, -20°C で 6 分間静置し, 次に-20°C に冷やしたアセトンに浸し, -20°C で 30 秒間静置した。slide glass を取り出し, 良く乾燥させた。TBST block 100 μl を滴下し, 乾燥を防ぐために, 水で湿らせたキムワイプを敷いたプラスチックケースに入れて蓋をして室温で 30 分間静置した。blocking 後, 上清をアスピレーターで除き, 一次抗体を 10 μl 滴下し, 全体に行き渡らせた後, 同様にプラスチックケースに入れて 4°C で一晩静置した。上清をアスピレーターで除き, TBST block で 3 回洗浄し, 二次抗体 10 μl を滴下し, 室温で遮光し, プラスチックケースに入れて 2 時間静置した。上清をアスピレーターで除き, TBST block で 3 回, TBST で 1 回洗浄し, 上清をアスピレーターで完全に除き, マウンティング溶液 3 μl を滴下し, cover glass を被せた。8 つ折りにしたキムワイプを cover glass の上に乗せてしっかりと押さえた後, マニキュアでシールした。

顕微鏡は共焦点レーザー顕微鏡 (FV-500; Olympus)を使用し, 対物レンズは 100 倍 (Plan APO ×100 Oil; Olympus) を使用し, ズーム倍率は 2 倍または 3 倍で画像を取り込んだ。GFP 融合タンパクの蛍光は Multi-Argon レーザを使い, EGFP

filter set を使用した. Texas Red でラベルされた二次抗体を使用したときは HeNe-Green レーザーを使い, Texas Red filter set を使用した. Alexa Fluor でラベルされた二次抗体を使用したときは適当なレーザーを使い, それぞれに適した filter set を使用した. 共染色したときは sequential mode を使った. 画像の取り込みは Kalman filter を使い 3 回積算して, ノイズを減少させた. 3 次元投影するときは, 0.25 μm 間隔で Z 軸の幅が 8 μm の画像を投影した. 画像は Photoshop ver.5 (Adobe) のレベル補正でコントラストの調節, 解像度調整で画像サイズの変更, レイヤーオプションのスクリーンにより merge 画像の作製を行った.

温度感受性変異株取得スクリーニング

方法

温度感受性変異株の取得を目指す遺伝子を X とする. まず X を含む DNA fragment を Error-prone PCR で増幅した. Error-prone PCR は, 滅菌水 11.5 μl , 10x PCR buffer (TaKaRa) を 5 μl , 10 mM dTTP/dCTP/dGTP を各 5 μl , 2 mM dATP を 5 μl , 25 mM MgCl_2 を 10 μl , template (target の領域が 10 ng/ μl) を 1 μl , 100 pmol/ μl の primer を 1 μl ずつ加え, total 50 μl とし, Taq Polymerase (TaKaRa) で行った. プログラムは Taq polymerase の推奨のものに従った. 変異導入率を変動させるときは, MgCl_2 を一部 (1/50 もしくは 1/10) MnCl_2 に変えることで変異導入率を上げた. DNA 断片を pRS313 に ligation して挿入し, 大腸菌に形質転換した. insert が 8 割以上入っていることを確認し, 約 10 万コロニーからプラスミド DNA を回収してミニライブラリーを作製した. これを Δx ; pRS316- X 株 (1 倍体) に形質転換し, SD-His プレートにまき, 25°C で 3 日間培養した. このとき, 現れるコロニーは 1 プレートあたり 200 程度となるように調節した. SD-His プレートから滅菌済ビロード布を用いて 5-FOA プレートにレプリカした. これを 25°C で 1 日培養し, 20 $\mu\text{g/ml}$ のフロキシシン B (和光純薬工業) を加えた YPD プレートに

再度レプリカして 25°C で 12 時間培養した後, 37°C で 10~16 時間培養し, 赤く染まったコロニーから菌体を取り, YPD プレート上でアイソレーションした. 25 °C および 37 °C での成育を比較し, 生育に明確な差があるものを温度感受性変異株候補とした. この株からプラスミドを回収し, 再び Δx ; pRS316-*X* 株に形質転換して, 温度感受性が回収したプラスミドに依存していることを確認し, 依存性を確認できたプラスミドに含まれる変異 *X* を *X* の温度感受性変異アレルとした.

温度感受性変異株の多コピーサプレッサースクリーニング

A) クロモソームの調製

試薬

1) Sorbitol solution

ソルビトール	21.86 g (final 1.2 M)
1 M Tri-Cl (pH 7.5)	5 ml (final 50 mM)
0.5 M EDTA	20 ml (final 100 mM)

イオン交換水で 100 ml にメスアップし, オートクレーブした.

2) EDTA solution

1 M Tris-Cl (pH 7.5)	0.25 ml (final 10 mM)
0.5 M EDTA	5 ml (final 100 mM)
イオン交換水	20 ml

調製後, オートクレーブした.

3) proteinase K solution

Proteinase K (Roche Applied Science) 20 mg

イオン交換水 1 ml

方法

1 L で培養した酵母を集菌し，イオン交換水で 1 回 wash した．10 ml の Sorbitol solution に懸濁し，zymolyase (生化学工業) の懸濁液 (10 mg/ml) を 500 μ l 加えて 37°C で 20 分間 incubation した．10% SDS を 1 ml, proteinase K solution を 500 μ l 加え，37°C で 6 時間 incubation した．2 倍量のフェノール・クロロホルムを加えて二層分離し，回収した水層に 20 ml の ice-cold エタノールを加えた．パスツールピペットで DNA を回収し，70%エタノールで 1 回 wash して EDTA solution 5 ml に溶解した．RNase 溶液 (10 mg/ml) を 10 μ l 加え，37°C で 2 時間 incubation した．2 倍量のフェノール・クロロホルムを加えて二層分離し，回収した水層に 10 ml の ice-cold エタノールを加えた．パスツールピペットで DNA を回収し，70%エタノールで 1 回 wash して EDTA solution 2 ml を加え，完全に溶けるまで 37°C で incubation した．4 ml の ice-cold エタノールを加え，パスツールピペットで DNA を回収し，70%エタノールで 1 回 wash して TE 1 ml を加えて溶解した．65°C で 10 分間 incubation した．

B) DNA の Sau3A 処理

方法

A で調製した DNA を 3 μ g/ μ l に希釈した．以降の操作は，37°C に移すまでは氷上で行った．DNA 溶液 60 μ l, Roche の A buffer 18 μ l, 滅菌水 101 μ l の溶液を 1 本 (①), DNA 溶液 30 μ l, Roche の A buffer 9 μ l, 滅菌水 51 μ l の溶液を 9 本 (②～⑩) 作製した．①に Roche の Sau3A を 1 μ l 加えて懸濁し，90 μ l をとって②に懸濁した．同様の操作を②から③，③から④と続け，⑨から⑩まで行った．①

～⑩を 37°C に移し, 15 分間 incubation した. 4 μ l の 0.5 M EDTA を加え, 反応を停止した. アガロースゲル電気泳動に供し, DNA のサイズの分布を確認し, 5 kbp～10 kbp に多く分布していた画分を回収した.

C) 蔗糖密度勾配遠心による分画

試薬

1) 2x buffer

1 M Tris-Cl (pH7.6) 4 ml

0.5 M EDTA 2 ml

NaCl 11.69 g

イオン交換水で 100 ml にメスアップした.

2) 10% sucrose solution

2x buffer 50 ml

sucrose 10 g

イオン交換水で 100 ml にメスアップし, オートクレーブした.

3) 40% sucrose solution

2x buffer 50 ml

sucrose 40 g

イオン交換水で 100 ml にメスアップし, オートクレーブした.

方法

12 ml の 10%-40% 蔗糖密度勾配をグラディエントメーカー (GR-40,

ADVANTEC) を用いて Ultra-Clear Centrifuge Tube (BECKMAN, 14 x 95 mm) に作製した。B で回収した DNA 画分を 65°C で 10 分間 incubation し、蔗糖密度勾配の上に重層した。BECKMAN COULTER の SW41Ti ローターにセットし、18°C, 25,000 rpm (77,175 g) で 20 時間遠心した。遠心後の溶液を、perista pump を用いて上から 500 μ l ずつ 24 画分回収した。各画分 5 μ l をアガロースゲル電気泳動に供し、DNA のサイズの分布を確認し、5 kbp~10 kbp に分布していた画分を 170 μ l ずつ 3 本にわけ、330 μ l の滅菌水と 1 ml のエタノールを加えて-20°C で一晩 incubation した。16,000 g, 4°C で 15 分遠心し、上清を除き、沈殿を 70%エタノールで 1 回 wash し、50 μ l の TE に溶解した。

D) ベクターとのライゲーションおよびライブラリーの調製

2 μ l の pRS426 (0.1 μ g/ μ l) を、Roche の BamHI で 2 時間、37°C で処理した。反応液に、100 倍に希釈した CIAP (Roche, 1 u/ μ l) を 1 μ l 加えて 37°C で 30 分間 incubation した。65°C で 20 分間 incubation し、エタノール沈殿で DNA ペレットを得た。DNA ペレットは 10 μ l の TE に溶解した。このベクター 5 μ l と C で調製した DNA 12 μ l, 10x ligation buffer (Roche), T4 DNA ligase (Roche) を混合し、4°C で一晩 incubation した。反応液を大腸菌コンピテントセルに形質転換し、ミニプレップによりインサートの挿入効率およびインサートサイズの確認を行った。半分以上のプラスミドに 5 kbp 以上のインサートが挿入されていたものに関して、エレクトロポレーションにより多数の形質転換体を得た (KSY271 の場合約 54000 個)。これらの形質転換体からプラスミドを回収し、ライブラリーとした。

E) サプレッサーのスクリーニング

温度感受性変異株に D で調製したライブラリーを形質転換し、25°C で一晩培養

した後、37°Cで2~4日培養した。形成されたコロニー（KSY271の場合、14万コロニーに対して160個）をYPDプレートにストリークし、親株と比べて生育が良かったものからプラスミドを回収した。インサートが入っていること、当該遺伝子自身が入っていないことを制限酵素処理とPCRで確認し、再び親株に形質転換し、サプレッサー活性の再現性を確認した。再現性があったプラスミドについて、シーケンスによりインサートの両端の配列を読み、インサートに入っている遺伝子を同定した。

培地に漏出する Kar2 の検出

酵母をYPDプレート上にstreakし、PVDF膜を重ねて25°Cで12時間培養した。PVDF膜をイオン交換水でよく洗って菌体を除き、抗Kar2抗体を用いたウェスタンブロッティングによりKar2を検出した。

インベルターゼ活性染色

試薬

1) Solution A

sorbitol	2.25 g
300mM NaN ₃	167 μl
1M Tris-Cl (pH8.0)	500 μl
β-Mercaptoethanol	20 μl

10 ml にメスアップした後、Zymolyase を 5 mg を加えた。

2) Solution B

1M Tris-Cl (pH7.5)	500 μl,
--------------------	---------

TritonX-100	20 μ l
イオン交換水	10 ml

3) Native PAGE 用 4 \times sample buffer

グリセロール	4 g
1M Tris-Cl (pH6.8)	200 μ l (final 50 mM)
イオン交換水	up to 10 ml

BPB を少量加えて色を付けた.

4) Native PAGE ゲル

Stock Tris buffer	3 ml
30% アクリルアミド	7 ml
イオン交換水	19.5 ml
10% 過硫酸アンモニウム	400 μ l
TEMED	40 μ l

Native PAGE ゲルは 16 cm \times 16 cm \times 1 mm のガラス板に作製した.

5) Stock Tris buffer

Tris	9.69 g
------	--------

塩酸で pH7.3 に調整し, イオン交換水で 100 ml にメスアップした.

7) sucrose 溶液

sucrose (国産化学)	0.1 M (3.4 g/100 ml)
酢酸ナトリウム	0.1 M (0.82 g/100 ml)

酢酸で pH 5.1 に調整し, イオン交換水で 100 ml にメスアップした.

8) chromophore solution

NaOH	1 g
イオン交換水	50 ml

上記の水溶液を作製後、2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride (TTC) (和光純薬工業) を 50 mg 加えて溶解した。

方法

YPD 10 ml で $OD_{600}=0.5$ まで培養した。1,000 g, 室温, 5 分間の遠心で集菌し, 2 等分して 2 本の YPD 10 ml に懸濁し, 誘導するときの温度で 30 分培養した。1,000 g, 室温, 5 分間の遠心で集菌し, YPS 1 ml で洗浄した。YPS 10 ml に懸濁し, 25°C または 37°C で 3 時間培養した。集菌し, Solution A 200 μ l に懸濁した。37°C で 30 分間インキュベートし, 16,000 g, 4°C で 10 分間遠心し, 上清を回収した。上清 160 μ l を別のチューブに移し, 45 μ l を Native PAGE 用 4 \times sample buffer 15 μ l と混合し, ペリプラズム画分とした。上清を完全に除き, pellet を 200 μ l の Solution B に懸濁した。30°C で 30 分インキュベートしてよく懸濁し, 45 μ l を Native PAGE 用 4 \times sample buffer 15 μ l と混合し, インターナル画分とした。それぞれの画分を 50°C で 10 分間インキュベートしてインベルターゼを単量体化し, 電気泳動用のサンプルとした。Native PAGE ゲルにロードし, 10 mA の定電流で 12 時間泳動した。泳動が終了したゲルを 100 ml の sucrose 溶液に浸し, 4°C で 10 分間穏やかに振盪した。37°C に温めた sucrose 溶液に交換し, 10 分間穏やかに振盪した。sucrose 溶液を除き, イオン交換水 200 ml で 2 回振盪して洗浄した。chromophore solution 50ml に浸し, 70°C で穏やかに振盪して染色した。適度なところで室温の 10%酢酸に浸し, 染色を停止した。イオン交換水に浸し, 5 分間振盪した後,

スキャナーで画像データとして取り込んだ.

膜タンパク質の膜からの可溶化

試薬

1) ソルビトールバッファー

KH_2PO_4 (国産化学)	2.18 g
K_2HPO_4 (国産化学)	14.6 g
Sorbitol (関東化学)	218.5 g
MgCl_2 (国産化学)	203 mg
イオン交換水	up to 1 L

2) B88

HEPES	10 mM
酢酸カリウム	150 mM
酢酸マグネシウム	5 mM
ソルビトール	200 mM

1M KOH で pH を 6.8 に調整した.

3) 2×B88

HEPES	20 mM
酢酸カリウム	300 mM
酢酸マグネシウム	10 mM
ソルビトール	400 mM

1M KOH で pH を 6.8 に調整した.

4) B88 w/pic

B88 1 ml

pics 2 μ l

PMSF 2 μ l

使用直前に調製した.

5) B88 w/ 2% Triton X-100

2×B88 5 ml

10% Triton X-100 2 ml

イオン交換水 3 ml

使用直前に, pics (2 μ l/1 ml)と PMSF (2 μ l/1 ml)を加えた.

6) B88 w/ 200 mM Na₂CO₃

2×B88 5 ml

Na₂CO₃ 0.21 g

イオン交換水 up to 10ml

使用直前に, pics (2 μ l/1 ml)と PMSF (2 μ l/1 ml)を加えた.

7) B88 w/ 4 M Urea

2×B88 5 ml

Urea 2.4 g

イオン交換水 up to 10ml

使用直前に, pics (2 μ l/1 ml)と PMSF (2 μ l/1 ml)を加えた.

8) 4×SDS-PAGE sample buffer (SDS-PAGE 参照)

方法

酵母を適当な液体培地 100ml で OD₆₀₀=1.0 まで培養した。集菌し、ソルビトールバッファで洗浄し、ソルビトールバッファ、5 ml に懸濁した。2-メルカプトエタノール 30 μl を加え、30°C で 10 分間インキュベートした。lyticase 100 μl を加え、30°C で 30 分間インキュベートした。1,000 g, 室温で 5 分間遠心して集菌し、ソルビトールバッファで 2 回洗浄した。スフェロプラストを氷上で冷却し、氷冷した B88 w/pics を 5 ml 加え懸濁した。氷上に 5 分間静置し、1,000 g, 4°C で 5 分間遠心して上清を回収し、lysate とした。lysate を 500 μl ずつ 1.5 ml チューブ 4 本に分注し、それぞれに B88 w/ pics, B88 w/ 2% Triton X-100, B88 w/ 100 mM Na₂CO₃, B88 w/ 4 M Urea を 500 μl ずつ加え、よく混合して氷上で 20 分間インキュベートした。800 μl を超遠心用 1.5 ml チューブに移し、100,000 g, 4°C で 1 時間遠心した。上清を 90 μl 回収し、supernatant fraction (S) とした。上清を完全に除き、沈殿に B88, B88 w/ 1% Triton X-100, B88 w/ 100 mM Na₂CO₃, B88 w/ 2 M Urea 各 50 μl を加え、bath sonic で超音波を当てて懸濁した。同じバッファを更に 750 μl 加えてよく混合し、90 μl を回収して precipitate fraction (P) とした。それぞれに 4×SDS-PAGE sample buffer を 30 μl 加えて 2 分間煮沸し、SDS-PAGE に供し、適当な抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

遠心分画

試薬

膜タンパク質の膜からの可溶化 参照

方法

酵母を適当な液体培地 100 ml で OD₆₀₀=1.0 まで培養した。集菌し、ソルビトールバッファーで洗浄し、ソルビトールバッファー、5 ml に懸濁した。2-メルカプトエタノール 30 µl を加え、30°C で 10 分間インキュベートした。lyticase 100 µl を加え、30°C で 30 分間インキュベートした。1,000 g, 室温で 5 分間遠心して集菌し、ソルビトールバッファーで 2 回洗浄した。スフェロプラストを氷上で冷却し、氷冷した B88 w/pics を 1 ml 加え懸濁した。氷上に 5 分間静置し、1,000 g, 4°C で 5 分間遠心して上清を回収した。さらに、氷冷した B88 w/pics を 500 µl 加え懸濁し、1,000 g, 4°C で 5 分間遠心して上清を回収し、先程回収した上清と混合して lysate とした。lysate 800 µl を 10,000 g, 4°C で 10 分間遠心し、上清 630 µl をさらに 100,000 g, 4°C で 1 時間遠心した。上清 120 µl に 4x SDS PAGE sample buffer を 40 µl 加えて、cytosol 画分とした。10,000 g の遠心の pellet に 1x SDS PAGE sample buffer を 800 µl 加えて、p10 画分とした。100,000 g の遠心の pellet に 1x SDS PAGE sample buffer を 630 µl 加えて、p10 画分とした。それぞれの画分を SDS-PAGE に供した。タンパク質のシグナルはウェスタンブロッティングで確認した。

免疫沈降

試薬

- 1) ソルビトールバッファー (膜タンパク質の膜からの可溶化参照)
- 2) B88 w/ pics (膜タンパク質の膜からの可溶化参照)

3) B88 w/ 1% Triton X-100

B88 9 ml

10% Triton X-100 1 ml

4) 4×SDS-PAGE sample buffer (SDS-PAGE 参照)

方法

SD 50 ml で OD₆₀₀=1.0 まで培養した。1,000 g, 室温で 5 分間遠心して集菌し, ソルビトールバッファーで洗浄した。ソルビトールバッファー 1 ml に懸濁し, 2-メルカプトエタノール 6 µl を加え, 30 °C で 10 分間インキュベートした。lyticase 50 µl を加え, 30 °C で 30 分間インキュベートし, 細胞をスフェロプラストにした。1,000 g, 室温で 5 分間遠心して集菌し, ソルビトールバッファーで 2 回洗浄し, -80 °C で凍結した。氷上で融解し, B88 w/pics を 1 ml 加えて懸濁してスフェロプラストを burst させた。氷上に 5 分間静置した後, 1,000 g, 4 °C で 5 分間遠心した。上清を別のチューブに回収し, 沈殿に 500 µl の B88 w/ pics を加え, 懸濁した。1,000 g, 4 °C, 5 分間遠心し, 上清を先程の上清と併せた。この上清から 1350 µl を別のチューブに移し, 10% Triton X-100 を 150 µl 加え, 氷上で 10 分間静置した後, 16,000 g, 4 °C で 10 分間遠心した。上清 1200 µl を超遠心用の 1.5 ml チューブに回収し, 100,000 g, 4 °C で 1 時間遠心した。上清を 1 ml 回収し, 抗 myc 抗体(H)を 50 µl 加え, 4 °C で 1 時間転倒混和した。Protein A Sepharose (Protein A Sepharose™ 4 Fast Flow; Amersham Biosciences) 20 µl(1:1 slurry)を B88 w/ Triton X-100 で 3 回洗浄した。1 時間転倒混和したサンプルを, 洗浄した Protein A Sepharose の入ったチューブに全量移し, 4 °C で一晩転倒混和した。16,000 g, 4 °C で 10 秒間の遠心で Protein A Sepharose を B88 w/ Triton X-100 で 5 回洗浄した。Protein A Sepharose に 1x SDS-PAGE sample buffer を 50 µl 加え, 氷上で 5 分間イ

ンキュベートした。16,000 g, 4 °C, 10 秒間遠心し, 上清を 40 µl 回収した。これをもう一度繰り返し, 上清を併せ, 泳動用サンプルとした。

Triton X-114 phase separation

試薬

- 1) B88 (glass beads 破砕による酵母 Total Cell lysate の調製 参照)

- 2) protease inhibitors cocktail (pic) (glass beads 破砕による酵母 Total Cell lysate の調製 参照)

- 3) 500 mM PMSF (glass beads 破砕による酵母 Total Cell lysate の調製 参照)

- 4) 500mM benzamidine (glass beads 破砕による酵母 Total Cell lysate の調製 参照)

方法

目的のタンパク質を発現する酵母 YPD 液体培地で 25°C で前培養し, 対数増殖期まで増殖したら, 新しい YPD 液体培地に培養終了後に OD₆₀₀=1.0 になるように植菌し, 34°C で 12 時間培養した。OD₆₀₀=0.8 x10 ml 相当の菌体を集菌(1,100 g, 5min, 4°C)した。イオン交換水で洗浄後, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 1 µg/ml protease inhibitor cocktail を含む ice cold B88 Buffer 500 µl に懸濁した。懸濁液に菌体破砕用ガラスビーズを 1 g 加え, MULTI-BEADS SHOKER (安井機械) を用いて 1 分破砕を 3 回繰り返した。それぞれの破砕の間には 1 分のイン

ターバルを入れた。破碎液を回収し、1000 g, 4 °C で 5 分間遠心分離して未破壊細胞を除き、Total cell lysate (TCL) とした。TCL 135 μ l に 10% Triton X-114 (Polyoxyethylene(8) Octylphenyl Ether, 和光純薬工業)を加えてよく懸濁し、氷上で 30 分間、時々攪拌しながら incubation した。10,000 g, で 10 分間、4 °C で遠心し、上清を 130 μ l 回収した。そのうち 45 μ l を 4x SDS-PAGE sample buffer 15 μ l と懸濁し、Total とした。残りを 32 °C で 5 分間 incubation し、16,000 g で 20 秒、室温で遠心した。上清を 72 μ l 回収して別のチューブに移した (*). 残ったものから上清をよく除き、油状沈殿を得た。そこに、Tx-114 で飽和させた B88 buffer 77 μ l を加え、on ice で 30 分 incubation した。32 °C で 5 分間 incubation し、16,000 g で 20 秒、室温で遠心した。上清をしっかりと除き、Tx-114 で飽和させた B88 buffer 77 μ l を加え、on ice で 5 分 incubation した。そのうち 45 μ l を 4x SDS-PAGE sample buffer 15 μ l と懸濁し、detergent 画分とした。(*) のチューブに 8 μ l の 10% Tx-114 を加えてよく懸濁し、氷上で 30 分間 incubation した。32 °C で 5 分間 incubation し、16,000 g で 20 秒、室温で遠心した。上清 63 μ l に 7 μ l の 10% Tx-114 を加えてよく懸濁し、氷上で 30 分間 incubation した。32 °C で 5 分間 incubation し、16,000 g で 20 秒、室温で遠心した。上清 45 μ l に 5 μ l の 10% Tx-114 を加え、on ice で 5 分 incubation した。そのうち 45 μ l を 4x SDS-PAGE sample buffer 15 μ l と懸濁し、Aqueous 画分とした。SDS-PAGE に供する前に、全てのサンプルを 2 分間 boil した。

CPY, Gas1 のパルスチェイス

試薬

1) 低 SO₄ 培地

Yeast Nitrogen Base	0.17 g
NH ₄ Cl	0.4 g
Glucose	5 g
100 mM 硫酸アンモニウム	0.2 ml
0.2% Adenine 塩酸塩	1 ml
0.2% Uracil	1 ml
1% Tryptophan	0.2 ml
1% Histidine	0.2 ml
イオン交換水	100 ml

調製後 10 ml ずつ L 字管に分注し、オートクレーブした。

2) SD- SO₄ 液体培地

Yeast Nitrogen Base	0.17 g
NH ₄ Cl	0.4 g
Glucose	5 g
0.2% Adenine 塩酸塩	1 ml
0.2% Uracil	1 ml
1% Tryptophan	0.2 ml
1% Histidine	0.2 ml
イオン交換水	100 ml

調製後 10 ml ずつ L 字管に分注し、オートクレーブした。

3) Chase solution

Yeast Nitrogen Base	0.17 g
硫酸アンモニウム	0.5 g

カザミノ酸	0.5 g
Glucose	2 g
0.2% Adenine 塩酸塩	1 ml
0.2% Uracil	1 ml
1% Tryptophan	0.2 ml
1% Histidine	0.2 ml
イオン交換水	100 ml

調製後 10 ml ずつ L 字管に分注し，オートクレーブした．

4) TBS

10xTBS（ウェスタンブロッティング 参照）をイオン交換水で 10 倍に希釈して調製した．

5) protease inhibitors cocktail (pic)（glass beads 破砕による酵母 Total Cell lysate の調製 参照）

6) 500 mM PMSF（glass beads 破砕による酵母 Total Cell lysate の調製 参照）

7) 500mM benzamidine（glass beads 破砕による酵母 Total Cell lysate の調製 参照）

方法

目的のタンパク質を発現する酵母 YPD 液体培地で 25°C で前培養し，対数増殖期まで増殖したら，低 SO₄ 液体培地に植菌した．OD₆₀₀=1.0 で集菌し，7.5 OD unit の細胞を集菌して 1 本のチューブに集め，100 μl の SD- SO₄ 液体培地に懸濁

し、50 ml γ 線滅菌チューブ内で振盪しながら 25/37°C で 30 分 incubation した。Tran[³⁵S]-label (MP Biomedicals) を 30 μ l/tube 加えそのまま 6 分間 25/37°C で incubation して pulse を行い、1.5 ml の Chase solution を加え、chase を開始した。chase は 0, 10, 30 分後に 500 μ l を回収し、final 10 mM となるように NaN₃ を加えることで終了した。5 分間氷上で incubation し、16,000 g で 15 秒、4°C で遠心し、上清を除去した。500 μ l の ice-cold 10 mM NaN₃ に懸濁し、16,000 g で 15 秒、4°C で遠心し、上清を除去した。1% SDS, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 1 μ g/ml protease inhibitor cocktail を含む ice-cold TBS 200 μ l に懸濁し、glass beads 200 mg の入った 1.5 ml tube に移し、30 秒 x4 回 vortex した。そのまま heat block で 5 分間 100 °C で incubation した。2% TritonX-100, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 1 μ g/ml protease inhibitor cocktail を含む TBS を 800 μ l 加えて攪拌した。16,000 g で 5 分間、4°C で遠心し、上清 800 μ l を回収した。抗 CPY 抗体を加え、4°C で一晩転倒混和した。Protein A Sepharose を 1% Triton X-100 を含む TBS で 3 回 wash して加え、室温で 2 時間転倒混和した。16,000 g で 15 秒、室温で遠心し、上清を回収した。回収した上清に抗 Gas1 抗体を加え、同様の操作を行った。免疫沈降後の Protein A Sepharose を 1% Triton X-100 を含む TBS で 4 回 wash し、上清をしっかりと除き、50 μ l の 1x SDS-PAGE sample buffer を加え、heat block で 5 分間 100 °C で incubation した。攪拌し、16,000 g で 15 秒、室温で遠心し、上清を 40 μ l 回収した。7.5 %ゲルで SDS-PAGE を行い、泳動後のゲルは 25%isopropyl alcohol/10%酢酸で固定して Amplify (Amersham) に浸した後、ゲルドライヤーで乾燥した。乾燥したゲルをラップに包み、Imaging Plate (富士フィルム) と重ねて 1 週間ほど露光し、³⁵S で標識された CPY および Gas1 を BAS-3000 (富士フィルム) で検出した。

myo-2-[³H]Inositol メタボリックラベリングによる GPI 中間体の解析

試薬

1) 50x YNB-inositol solution

以下のものをイオン交換水に溶解し、200 ml にメスアップしてオートクレーブした。

Monopotassium Phosphate	10 g
Magnesium Sulfate	5 g
Sodium Chloride	1 g
Calcium Chloride	1 g
Boric Acid	5 mg
Niacin	4 mg
Manganese Sulfate	4 mg
Pyridoxine HCl	4 mg
Zinc Sulfate	4 mg
Thiamine HCl	4 mg
Calcium Pantothenate	4 mg
Ferric Chloride	2 mg
Sodium Molybdate	2 mg
Riboflavin	2 mg
p-Aminobenzoic Acid	2 mg
Potassium Iodide	1 mg
Copper Sulfate	0.4 mg
Folic Acid	0.2 mg

Biotin 2 mg

2) SC

Glucose	2 g
硫酸アンモニウム	0.5 g
Yeast Nitrogen Base	0.17 g
カザミノ酸	0.2 g
0.2% Adenine 塩酸塩	1 ml
0.2% Uracil	1 ml
1% Tryptophan	0.2 ml
1% Histidine	0.2 ml
イオン交換水	100 ml

調製後、坂口フラスコに 50 ml ずつ、または L 字管に 10 ml ずつ分注し、オートクレーブした。

3) SC-inositol

glucose	2 g
硫酸アンモニウム	0.5 g,
50x YNB-inositol solution	2 ml
カザミノ酸	0.2 g
0.2% Adenine 塩酸塩	1 ml
0.2% Uracil	1 ml
1% Tryptophan	0.2 ml
1% Histidine	0.2 ml
イオン交換水	100 ml

調製後オートクレーブした。

4) SG

SC の glucose を galactose に変えたもの。

5) SG-inositol

SC-inositol の glucose を galactose に変えたもの。

方法

温度感受性変異株について検討するときは、YPD 液体培地 10 ml 中、25°C で前培養した細胞を、SC 液体培地 50 ml に植菌し、一晩培養して OD₆₀₀=1.0 で集菌した。SC 1 ml で 1 回、SC-inositol で 1 回 wash し、SC-inositol 2.4 ml に懸濁して 50 ml の γ 線滅菌チューブ内で 25°C で 30 分間振盪した。1.3 ml を別の γ 線滅菌チューブに入れて 37°C に移し、各々 20 分間振盪した。それぞれのチューブに 40 μ Ci の myo-2-[³H]Inositol (American Radiolabeled Chemicals) を加え、そのまま 90 分間振盪した後集菌した。10 mM となるように 60 mM NaN₃ を加えて懸濁し、氷上に 5 分静置した。16,000 g, 4°C で 15 秒遠心して集菌し、さらに ice-cold 10 mM NaN₃ で 2 回 wash した。上清をしっかりと除き、クロロホルム：メタノール (1:1) を 500 μ l 加えてよく懸濁し、2 ml screw cap tube に移し、0.5 g の glass beads を加え、4°C で vortex を 1 分 x10 回行った。15,000 g, 4°C で 1 分遠心して上清を 1.5 ml チューブに回収した。残った cell debris と glass beads にクロロホルム：メタノール：水 (10:10:3) を 300 μ l 加え、1 分間 4°C で vortex した。15,000 g, 4°C で 1 分遠心して上清を先ほど回収した上清に加え、減圧乾燥して沈殿を得た。この沈殿を 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 mM EDTA に飽和したブタノール 150 μ l に溶解し、75 μ l のブタノール飽和水を加えて 1 分室温で vortex した。15,000 g, 4°C

で1分遠心して上清を回収した。回収した上清に10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1mM EDTA に飽和したブタノール 75 μ l を加え, 1分室温で vortex した。15,000 g, 4°C で1分遠心して上清を回収し, これを再び減圧乾燥した。沈殿をクロロホルム : メタノール : 水 (10:10:3) を 25 μ l に溶解し, TLC プレートにスポットした。よく乾かし, クロロホルム : メタノール : 水 = 5:5:1 で展開した。Imaging plate に 3~5 日間露光し, BAS-3000 で検出した。GAL プロモーターで遺伝子発現を制御した株については, YPG (YPD の glucose を galactose に変えたもの) 寒天培地から SC または SG 液体培地 10 ml に植菌し, 30°C で一晩 (16~20 時間) 培養して OD₆₀₀=1.0 で集菌した。SC または SG 液体培地 1 ml で 1 回, SC-inositol で 1 回 wash し, SC-inositol または SG-inositol 2 ml に懸濁して 50 ml の γ 線滅菌チューブ内, 30°C で 50 分間振盪した。それぞれのチューブに 15 μ Ci の myo-2-[³H]Inositol を加え, そのまま 100 分間振盪した後集菌した。ラベリング後の細胞は温度感受性変異株の場合と同様に処理し, 脂質を抽出後, TLC で分離してオートラジオグラフィで検出した。

myo-2-[³H]Inositol メタボリックラベリングによるタンパク質への GPI 付加の解析

試薬

- 1) SC (myo-2-[³H]Inositol メタボリックラベリングによる GPI 中間体の解析 参照)
- 2) SC-inositol (myo-2-[³H]Inositol メタボリックラベリングによる GPI 中間体の解析 参照)

3) 1 M Tris-Cl (pH 6.8)

Tris (ナカライテスク) 12.1 g

イオン交換水 up to 100 ml

HCl (国産化学)で pH 6.8 に調整した.

4) lysis buffer

1 M Tris-Cl (pH 6.8) 5 ml (final 50 mM)

0.5 mM EDTA (pH 8.0) 1 ml (final 5 mM)

SDS 1 g (final 1%)

2-メルカプトエタノール 1 ml (final 1%)

イオン交換水 up to 100 ml

5) Con A buffer

1 M Tris-Cl (pH 7.5) 2.5 ml (final 50 mM)

1 M NaCl 25 ml (final 500 mM)

1 M CaCl₂ 50 μ l (final 1 mM)

1 M MgCl₂ 50 μ l (final 1 mM)

1 M MnCl₂ 50 μ l (final 1 mM)

Triton X-100 0.5 g (final 1%)

イオン交換水 up to 50 ml

方法

YPD 液体培地 10 ml で前培養した細胞を, SC 液体培地 50 ml に植菌し, 一晚培養して OD₆₀₀=0.5 で集菌した. SC-inositol で 3 回 wash し, SC-inositol 2.5 ml に懸濁し, 1 ml ずつ 2 本の 50 ml の γ 線滅菌チューブに移し, 25 °C で 30 分間振盪し

た. 片方を 37°C に移し, 各々 120 分間振盪した. それぞれのチューブに 120 μ Ci の myo-2-[³H]Inositol を加え, そのまま 30 分間振盪した. 各チューブに新たに 0.5 ml の SC-inositol を加え, さらに 90 分間振盪した. 集菌し, イオン交換水で 2 回 wash した. 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 1 μ g/ml protease inhibitor cocktail を含む lysis buffer 200 μ l に懸濁し, glass beads 0.2 g を加えて 4°C で vortex (1 分 x4 回) した. 軽く遠心し, 100 °C の heat block で 5 分間 incubation した. 室温に戻してから, 1 ml の Con A buffer を加えてよく混ぜ, 15,000 g, 4°C で 5 分遠心した. 上清を 1 ml 回収し, 1.5 ml チューブ 3 本に 330 μ l ずつ分注した. 各チューブに 1 ml の Con A buffer を加えて懸濁した. Con A Sepharose (GE Healthcare, Con A Sepharose™4B) 100 μ l (1:1 slurry) を Con A buffer で 3 回 wash して 3 本に分け, それぞれ懸濁液に加え, 4°C で一晩転倒混和した. 500 g, 4°C で 5 分間遠心し, 上清を除去した. Con A Sepharose を Con A buffer で 3 回 wash し, よく上清を除いた後, 70 μ l の 1x SDS-PAGE sample buffer に懸濁して 5 分間 boil した. 1,000 g, 室温で 5 分間遠心して上清を 50 μ l 回収し, 4-20%のグラディエントゲル (コスモ・バイオ) を用いて SDS-PAGE に供した. ゲルドライヤーで乾燥し, Imaging plate で 1 週間ほど露光して BAS-3000 で検出した.

early ゴルジと late ゴルジを分離する蔗糖密度勾配遠心 (22%-60%)

試薬

1) 10x buffer

Hepes 2.383 g (final 100 mM)

1 M MgCl₂ 1 ml (final 10 mM)

1 M KOH で pH を 7.6 に合わせ, イオン交換水で 100 ml にメスアップしてオートクレーブした.

2) sucrose buffer

wt/wt %	Sucrose (g)	イオン交換水(g)	10x buffer(g)	載せる量(ml)
60	24	12	4	1
40	12	14	4	1
37	11.746	16.83	3.17	1.2
34	10.303	16.97	3.03	1.8
32	9.412	17.06	2.94	2
29	8.169	17.18	2.82	1.8
27	7.397	17.26	2.74	1.2
22	5.641	17.44	2.56	1

上記の表の通りにそれぞれの材料を混合して各濃度の sucrose buffer を作製した。

方法

坂口フラスコで 100 ml の液体培地で培養し、 $OD_{600} \sim 0.9$ で回収、約 80 OD cells を 50 ml tube に移し、1,000 g で 5 分遠心して集菌した。500 μ l of ice-cold 10 mM NaN_3 で wash し、1.5 ml tube に移した。1 ml の ice-cold 10 mM NaN_3 に懸濁し、氷上で 30 分間 incubation した。16,000 g, 4°C で 30 秒遠心し、上清を除いた。1 ml の sorbitol buffer に懸濁、6 μ l of 2-ME, 1 μ l of 1 M $MgCl_2$ を加えて懸濁し、30 °C で 10 分間 incubation した。lyticase 100 μ l を加え、30 °C で 45 分間 incubation した。5,000 g で 5 分間 4°C で遠心して集菌した。ice-cold sorbitol buffer で 3 回 wash (5,000 g, 5 分, 4°C) した後、5,000 g, 4°C で 5 分間遠心して上清を完全に除いた。

スフェロプラストは使用直前まで-75°Cで保存した。スフェロプラストを解凍して、1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 1 µg/ml protease inhibitor cocktail を含む 1 ml の B88 に懸濁し 4°C で 30 分間転倒混和した。homogenizer で 20 ストロークし、スフェロプラストをバーストさせた。1000 g, 4°C で 5 分間遠心し、上清 650 µl を回収し、別の tube に移した。元の tube に 450 µl の B88w/pics を加えて懸濁し、1000 g, 4°C で 5 分間遠心した。上清を 450 µl 回収し、先の上清を回収した tube に加えてよく混ぜた。10,000 g, 4°C で 10 分間遠心し、上清を 1 ml 回収した。試薬の項に示した量の各濃度の sucrose buffer を氷上で冷却し、Ultra-Clear Centrifuge Tube (BECKMAN, 14 x 95 mm) にパスツールピペットで積み上げて蔗糖密度勾配を作製した。完成した蔗糖密度勾配にパスツールピペットで先の遠心上清を重層した。チューブを SW41Ti ローターにセットし、36,700 rpm, 4°C で 16 時間遠心した。遠心終了後、上から 1 ml ずつ回収し、12 画分回収した。各画分をよく vortex して 90 µl とり、30 µl の 4x SDS-PAGE sample buffer と混ぜて泳動用サンプルとした。

Total cell lysate からの蔗糖密度勾配遠心 (18%-60%)

試薬

1) 10x buffer

Hepes 2.383 g (final 100 mM)

1 M MgCl₂ 1 ml (final 10 mM)

1 M KOH で pH を 7.6 に合わせ、イオン交換水で 100 ml にメスアップしてオートクレーブした。

2) sucrose buffer

wt/wt %	Sucrose (g)	10x buffer(ml)	載せる量(ml)
60	24	4	1
54	21.6	4	1
50	20	4	1
46	18.4	4	1
42	16.8	4	1
38	15.2	4	1
34	13.6	4	1
30	12	4	1
26	10.4	4	1
22	8.8	4	1
18	7.2	4	1

上記の表の通りに 10x buffer と sucrose を加え、イオン交換水で 40 ml にメスアップし、各濃度の sucrose buffer を作製した。

方法

坂口フラスコで 100 ml の液体培地で培養し、 OD_{600} ~0.9 で回収、約 80 OD cells を 50 ml tube に移し、1,000 g で 5 分遠心して集菌した。500 μ l of ice-cold 10 mM NaN_3 で wash し、1.5 ml tube に移した。1 ml of ice-cold 10 mM NaN_3 に懸濁し、氷上で 30 分間 incubation した。16,000 g, 4°C で 30 秒遠心し、上清を除いた。1 ml の sorbitol buffer に懸濁し、6 μ l of 2-ME, 1 μ l of 1 M $MgCl_2$ を加えて懸濁し、30 °C で

10 分間 incubation した. lyticase 100 μ l を加え, 30 $^{\circ}$ C で 45 分間 incubation した. 5,000 g で 5 分間 4 $^{\circ}$ C で遠心して集菌した. ice-cold sorbitol buffer で 3 回 wash (5,000 g, 5 分, 4 $^{\circ}$ C) した後, 5,000 g, 4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心して上清を完全に除いた. スフェロプラストは使用直前まで -75 $^{\circ}$ C で保存した. スフェロプラストを解凍して, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 1 μ g/ml protease inhibitor cocktail を含む 1 ml の B88 に懸濁し 4 $^{\circ}$ C で 30 分間転倒混和した. homogenizer で 20 ストロークし, スフェロプラストをバーストさせた. 1000 g, 4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心し, 上清 650 μ l を回収し, 別の tube に移した. 元の tube に 450 μ l の B88w/pics を加えて懸濁し, 1000 g, 4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心した. 上清を 450 μ l 回収し, 先の上清を回収した tube に加えてよく混ぜた. 1,000 g, 4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心し, 上清を 1 ml 回収した. 各濃度の sucrose buffer を 1 ml ずつ氷上で冷却し, Ultra-Clear Centrifuge Tube (BECKMAN, 14 x 95 mm) にパスツールピペットで積み上げて蔗糖密度勾配を作製した. 完成した蔗糖密度勾配にパスツールピペットで先の上清を重層した. チューブを SW41Ti ローターにセットし, 35,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C で 2.5 時間遠心した. 遠心終了後, 上から 1 ml ずつ回収し, 12 画分回収した. 各画分をよく vortex して 90 μ l とり, 30 μ l の 4x SDS-PAGE sample buffer と混ぜて泳動用サンプルとした.

膜画分の IPC synthase activity *in vitro* assay

試薬

1) membrane buffer

sucrose	8.558 g	(final 250 mM)
HEPES	0.2383 g	(final 10 mM)
0.5 M EDTA	200 μ l	(final 1 mM)

1 M KOH で pH 7.2 に調整し, 100 ml にメスアップしてオートクレーブした.

2) reaction mix

membrane buffer	1500 μ l
BSA, fatty acid free (SIGMA)	100mg/ml stock から 150 μ l (final 10 mg/ml)
CHAPS (同仁化学研究所)	123 mg/ml stock から 15 μ l (final 2 mM)
MnCl ₂	1 M stock から 3 μ l (final 2 mM)
MgCl ₂	1 M stock から 3 μ l (final 2 mM)

以上をよく混合して調製した. (25 反応分)

方法

A) 膜画分の調製

25°C で酵母を前培養し, そこから 50 ml の YPD に植菌, OD₆₀₀=1.0 まで 25°C で培養した. 集菌して 2 本に分け, それぞれ 50 ml YPD に植菌し, 片方は 25°C, 片方は 37°C で 2 時間培養した. 1000 g, 室温で 5 分間遠心して集菌し, イオン交換水で 1 回 wash した. 0.5 ml の ice-cold B88 で wash し, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 1 μ g/ml protease inhibitor cocktail を含む 1 ml の ice-cold B88 に懸濁した. 懸濁液に菌体破碎用ガラスビーズを 1 g 加え, MULTI-BEADS SHOKER を用いて 1 分破碎を 3 回繰り返した. それぞれの破碎の間には 1 分のインターバルを入れた. 破碎液を出来るだけ多く回収し (*), 残った cell debris とガラスビーズにさらに 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 1 μ g/ml protease inhibitor cocktail を含む 1 ml の ice-cold B88 を加えよく攪拌し, 出来るだけ多く回収し, *と合わせた. 1,000 g, 4°C で 10 分間遠心分離して未破壊細胞を除き, 上清 1 ml を回収した. 超遠心用 tube (swing, 2 ml) に 100 μ l の 60% sucrose を入れ, その上に回収した cell lysate を載せ, 超遠心 (TLS-55 ローター, 100 000 g, 30 分) した. 上

清を 950 μ l 除去し，残った膜面分に 850 μ l の 1 μ g/ml protease inhibitor cocktail を含む 850 μ l の ice-cold B88 を加え，60 μ l ずつ 16 本のチューブに分注し，液体窒素で凍らせた．

B) 反応と TLC

調製した膜面分と reaction mix を 60 μ l ずつ混ぜ，30 分指定の温度で pre-incubation を行った．このとき，Aureobasidin A 処理するものは，Aureobasidin A (TAKARA) を終濃度 10 μ g/ml となるように 5 mg/ml stock から加えた．反応は，C₆-NBD-ceramide (Molecular Probes) を 1 mM stock から 0.6 μ l 加えることで開始し，指定の温度で 1 時間行った．400 μ l のクロロホルム：メタノール：1 M HCl (4:10:1) を反応液に加え，反応を終了した．30 秒ほど vortex した後，さらに 50 μ l の 1 M HCl，100 μ l のクロロホルムを加え，さらに 30 秒ほど vortex した．16,000 g，室温で 5 分間遠心し，クロロホルム層を回収，speed-vac により減圧乾燥した．沈殿は 15 μ l のクロロホルムに溶解し，TLC で分離した．TLC の展開はクロロホルム：メタノール：30 mM 塩化カリウム (11:9:2) の展開溶媒で行った．NBD の蛍光の検出は，LAS-1000 plus の Fluorescence モードで行った．

免疫沈降産物の IPC synthase activity *in vitro* assay

試薬

- 1) ソルビトールバッファー (膜タンパク質の膜からの可溶化参照)
 - 2) B88 w/ pics (膜タンパク質の膜からの可溶化参照)
 - 3) B88 w/ 1% Triton X-100
- B88 9 ml

10% Triton X-100 1 ml

4) membrane buffer (膜画分の IPC synthase activity *in vitro* assay 参照)

5) reaction mix for IP

membrane buffer 2700 μ l

BSA, fatty acid free (SIGMA) 100mg/ml stock から 135 μ l (final 5 mg/ml)

CHAPS (同仁化学研究所) 123 mg/ml stock から 13.5 μ l (final 1 mM)

MnCl₂ 1 M stock から 5.4 μ l (final 2 mM)

MgCl₂ 1 M stock から 5.4 μ l (final 2 mM)

以上をよく混合し、40 μ l の stock solution (10 mg/ml) を減圧乾燥して得た PI (L- α -Phosphatidylinositol ammonium salt from bovine liver, SIGMA) をソニケーションにより溶解した。最後に、10% Tx-100 を 14.5 μ l 加えてよく混合した。(21 反応分)

方法

酵母細胞を YPD 液体培地中、26.5°C で OD₆₀₀=1.0 まで培養した。1,000 g, 室温で 5 分間遠心して集菌し、ソルビトールバッファーで洗浄した。細胞 100 OD unit につき、ソルビトールバッファー 1 ml に懸濁し、2-メルカプトエタノール 6 μ l, 1 M MgCl₂ 1 μ l を加えてよく混ぜ、30°C で 10 分間インキュベートした。lyticase 50 μ l を加え、26.5 °C で 45 分間インキュベートし、細胞をスフェロプラストにした。1,000 g, 4°C で 5 分間遠心して集菌し、ソルビトールバッファーで 3 回洗浄し、-80°C で凍結した。氷上で融解し、1% TritonX-100 を含む ice-cold B88 w/pics を 1 ml 加えて懸濁してスフェロプラストを burst させた。さらに 4°C で 30 分間転倒混和した後、16,000 g, 4°C で 5 分間遠心した。上清 1 ml を超遠心用の 1.5 ml

チューブに回収し, 100,000 g, 4°C で 1 時間遠心した. 上清を 800 μ l 回収し, B88 w/ Triton X-100 で 3 回洗浄した Protein A Sepharose 20 μ l(1:1 slurry)を加え, 4°C で 30 分間転倒混和した. Protein A Sepharose を除き, 抗 HA 抗体を 3 μ l 加え, 4°C で 1 時間転倒混和した. B88 w/ Triton X-100 で 3 回洗浄した Protein A Sepharose 200 μ l(1:1 slurry)を加え, 4°C で一晩転倒混和した. 16,000 g, 4°C で 10 秒間の遠心で Protein A Sepharose を B88 w/ Triton X-100 で 2 回洗浄し, B88 w/ 1 mM CHAPS で 3 回洗浄した. 1 ml の B88 w/ 1 mM CHAPS に懸濁し, 500 μ l, 250 μ l, 125 μ l に分注した. 上清を 500 g, 4°C で 30 秒遠心して除き, reaction mix for IP を 120 μ l 加えた. 26.5 °C で 30 分間転倒混和した. 反応は, C₆-NBD-ceramide (Molecular Probes) を 1 mM stock から 0.6 μ l 加えることで開始し, 26.5 °C で 1 時間行った. 400 μ l のクロロホルム : メタノール : 1 M HCl (4:10:1) を反応液に加え, 反応を終了した. 30 秒ほど vortex した後, さらに 50 μ l の 1 M HCl, 100 μ l のクロロホルムを加え, さらに 30 秒ほど vortex した. 16,000 g, 室温で 5 分間遠心し, クロロホルム層 (下層) を回収, speed-vac により減圧乾燥した. 沈殿は 15 μ l のクロロホルムに溶解し, TLC で分離した. TLC の展開はクロロホルム : メタノール : 30 mM 塩化カリウム (11:9:2) の展開溶媒で行った. NBD の蛍光の検出は, LAS-1000 plus の Fluorescence モードで行った.

GST 融合タンパク質の精製

試薬

STE buffer

1 M Tris-Cl (pH8.0)	2 ml	(final 10 mM)
NaCl	1.75 g	(final 150 mM)
500 mM EDTA	0.4 ml	(final 1 mM)

イオン交換水 up to 200 ml

2) 100 mM DTT

DTT 17.42 mg

イオン交換水 1 ml

3) 10% TritonX-100

TritonX-100 10 g

イオン交換水 90 ml

調整後, オートクレーブ

4) PBS (10mM Phosphate Buffered Saline)

PBS 用粉末 (SIGMA) 1 袋

イオン交換水 up to 1L

調整後, オートクレーブ

方法

目的のプラスミドを形質転換した大腸菌を 2 ml LB-amp 液体培地で, 37°C で前培養した. 本培養用の LB-amp 液体培地に 1%植菌し, 37°C で 2 時間振盪培養後, IPTG を 1 mM になるように添加し, 引き続き 37°C で 2 時間, 振盪培養した. 集菌(4,000 g, 5 min, 4°C)した菌体を, 100 ml の培養液あたり 1ml STE buffer で 1 回洗浄後, 再び 1 ml STE buffer で懸濁した. そこに, 使用直前に調製した 20 mg/ml lysozyme を 5 μ l 加え, 氷上で 20 分間静置した. 1 mM DTT を 10 μ l, 100 mM PMSF を 10 μ l, 1 μ g/ml protease inhibitor cocktail を 2 μ l 加え, 懸濁した. この溶液を氷上で 1 分間, 超音波処理して細胞を破砕した. 15,000 g, 4°C で 5 分間遠心して

900 μ l の上清を得た. この上清に 10% TritonX-100 を 100 μ l 加え, 氷冷 PBS 500 μ l で 5 回洗浄した Glutathione sepharose beads を 20 μ l 加え, 4°C で 120 分間転倒混和した. 500 g, 4°C で 30 秒遠心し, 上清を取り除いた. Beads を氷冷 PBSw/ 1% Tx-100 500 μ l で 5 回洗浄した. 半分に分け, 片方を GST pull down assay に供した.

GST pull down assay

BY4741 を 10 ml YPD, 30°C で培養し, $OD_{600}=1.0$ で集菌し, Total Cell lysate を調製した. 9 分の 1 量の 10% TritonX-100 と 100 分の 1 量の 100 mM DTT を加え, よく懸濁した. GST 融合タンパク質を結合させた Glutathione sepharose beads を加え, 4°C で 120 分転倒混和した. 上清を取り除き, 500 μ l の 1% TritonX-100 を含む B88 buffer で 5 回洗浄後した. 洗浄後の beads および BY4741 の TCL と混合していない GST 融合タンパク質を結合させた beads をそれぞれ 50 μ l の 1 \times sample buffer に懸濁し, 1 分間煮沸した. 16,000 g で遠心し, 上清を 40 μ l 回収し, bound とした. bound 10 μ l を SDS-PAGE し, 抗 Ret1 抗体および抗 Sec21 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った.

参考文献

- Abe, M., Hashimoto, H. and Yoda, K. (1999) Molecular characterization of Vig4/Vrg4 GDP-mannose transporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, **458**, 309-312.
- Abe, M., Noda, Y., Adachi, H. and Yoda, K. (2004) Localization of GDP-mannose transporter in the Golgi requires retrieval to the endoplasmic reticulum depending on its cytoplasmic tail and coatomer. *Journal of Cell Science*, **117**, 5687-5696.
- Abeijon, C., Yanagisawa, K., Mandon, E.C., Hausler, A., Moremen, K., Hirschberg, C.B. and Robbins, P.W. (1993) Guanosine diphosphatase is required for protein and sphingolipid glycosylation in the Golgi lumen of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*, **122**, 307-323.
- Aeed, P.A., Sperry, A.E., Young, C.L., Nagiec, M.M. and Elhammer, A.P. (2004) Effect of membrane perturbants on the activity and phase distribution of inositol phosphorylceramide synthase; development of a novel assay. *Biochemistry*, **43**, 8483-8493.
- Ashida, H., Hong, Y., Murakami, Y., Shishioh, N., Sugimoto, N., Kim, Y.U., Maeda, Y. and Kinoshita, T. (2005) Mammalian PIG-X and yeast Pbn1p are the essential components of glycosylphosphatidylinositol-mannosyltransferase I. *Molecular Biology of the Cell*, **16**, 1439-1448.
- Banfield, D.K., Lewis, M.J., Rabouille, C., Warren, G. and Pelham, H.R. (1994) Localization of Sed5, a putative vesicle targeting molecule, to the cis-Golgi network involves both its transmembrane and cytoplasmic domains. *Journal of Cell Biology*, **127**, 357-371.
- Barr, F.A. (2002) The Golgi apparatus: going round in circles? *Trends in Cell Biology*, **12**, 101-104.
- Bays, N.W., Gardner, R.G., Seelig, L.P., Joazeiro, C.A. and Hampton, R.Y. (2001) Hrd1p/Der3p is a membrane-anchored ubiquitin ligase required for ER-associated degradation. *Nature Cell Biology*, **3**, 24-29.
- Belden, W.J. and Barlowe, C. (2001) Distinct roles for the cytoplasmic tail sequences of Emp24p and

- Erv25p in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 43040-43048.
- Berninsone, P., Miret, J.J. and Hirschberg, C.B. (1994) The Golgi guanosine diphosphatase is required for transport of GDP-mannose into the lumen of *Saccharomyces cerevisiae* Golgi vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 207-211.
- Bickel, T., Lehle, L., Schwarz, M., Aebi, M. and Jakob, C.A. (2005) Biosynthesis of lipid-linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*: Alg13p and Alg14p form a complex required for the formation of GlcNAc(2)-PP-dolichol. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 34500-34506.
- Brown, D.A. and London, E. (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual Review of Cell & Developmental Biology*, **14**, 111-136.
- Carvalho, P., Goder, V. and Rapoport, T.A. (2006) Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins. *Cell*, **126**, 361-373.
- Clancey, C.J., Chang, S.C. and Dowhan, W. (1993) Cloning of a gene (PSD1) encoding phosphatidylserine decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae* by complementation of an *Escherichia coli* mutant. *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 24580-24590.
- Conchon, S., Cao, X., Barlowe, C. and Pelham, H.R. (1999) Got1p and Sft2p: membrane proteins involved in traffic to the Golgi complex. *EMBO Journal*, **18**, 3934-3946.
- Cowart, L.A. and Obeid, L.M. (2007) Yeast sphingolipids: recent developments in understanding biosynthesis, regulation, and function. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1771**, 421-431.
- Davierwala, A.P., Haynes, J., Li, Z., Brost, R.L., Robinson, M.D., Yu, L., Mnaimneh, S., Ding, H., Zhu, H., Chen, Y., Cheng, X., Brown, G.W., Boone, C., Andrews, B.J. and Hughes, T.R. (2005) The synthetic genetic interaction spectrum of essential genes. *Nature Genetics*, **37**, 1147-1152.
- Davydenko, S.G., Feng, D., Jantti, J. and Keranen, S. (2005) Characterization of GPI14/YJR013w mutation that induces the cell wall integrity signalling pathway and results in increased protein production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **22**, 993-1009.

- Dean, N., Zhang, Y.B. and Poster, J.B. (1997) The VRG4 gene is required for GDP-mannose transport into the lumen of the Golgi in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 31908-31914.
- Demmel, L., Beck, M., Klose, C., Schlaitz, A.L., Gloor, Y., Hsu, P.P., Havlis, J., Shevchenko, A., Krause, E., Kalaidzidis, Y. and Walch-Solimena, C. (2008) Nucleocytoplasmic shuttling of the Golgi phosphatidylinositol 4-kinase Pik1 is regulated by 14-3-3 proteins and coordinates Golgi function with cell growth. *Molecular Biology of the Cell*, **19**, 1046-1061.
- Denic, V. and Weissman, J.S. (2007) A molecular caliper mechanism for determining very long-chain fatty acid length. *Cell*, **130**, 663-677.
- Dickson, R.C. (2008) Thematic review series: sphingolipids. New insights into sphingolipid metabolism and function in budding yeast. *Journal of Lipid Research*, **49**, 909-921.
- Dickson, R.C., Nagiec, E.E., Wells, G.B., Nagiec, M.M. and Lester, R.L. (1997) Synthesis of mannose-(inositol-P)₂-ceramide, the major sphingolipid in *Saccharomyces cerevisiae*, requires the IPT1 (YDR072c) gene. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 29620-29625.
- Dickson, R.C., Wells, G.B., Schmidt, A. and Lester, R.L. (1990) Isolation of mutant *Saccharomyces cerevisiae* strains that survive without sphingolipids. *Molecular & Cellular Biology*, **10**, 2176-2181.
- Doering, T.L. and Schekman, R. (1996) GPI anchor attachment is required for Gas1p transport from the endoplasmic reticulum in COP II vesicles. *EMBO Journal*, **15**, 182-191.
- Donohoe, B.S., Kang, B.H. and Staehelin, L.A. (2007) Identification and characterization of COPIa- and COPIb-type vesicle classes associated with plant and algal Golgi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 163-168.
- Duenas, E., Revuelta, J.L., del Rey, F. and Vazquez de Aldana, C.R. (1999) Disruption and basic phenotypic analysis of six novel genes from the left arm of chromosome XIV of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **15**, 63-72.

- Englund, P.T. (1993) The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annual Review of Biochemistry*, **62**, 121-138.
- Fabre, A.L., Orlean, P. and Taron, C.H. (2005) *Saccharomyces cerevisiae* Ybr004c and its human homologue are required for addition of the second mannose during glycosylphosphatidylinositol precursor assembly. *FEBS Journal*, **272**, 1160-1168.
- Ferguson, M.A., Homans, S.W., Dwek, R.A. and Rademacher, T.W. (1988) Glycosyl-phosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. *Science*, **239**, 753-759.
- Fuller, R.S., Brake, A. and Thorner, J. (1989) Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca²⁺-dependent serine protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, 1434-1438.
- Funato, K. and Riezman, H. (2001) Vesicular and nonvesicular transport of ceramide from ER to the Golgi apparatus in yeast. *Journal of Cell Biology*, **155**, 949-959.
- Gao, X.D., Tachikawa, H., Sato, T., Jigami, Y. and Dean, N. (2005) Alg14 recruits Alg13 to the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum to form a novel bipartite UDP-N-acetylglucosamine transferase required for the second step of N-linked glycosylation. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 36254-36262.
- Girrbach, V. and Strahl, S. (2003) Members of the evolutionarily conserved PMT family of protein O-mannosyltransferases form distinct protein complexes among themselves. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 12554-12562.
- Grimme, S.J., Westfall, B.A., Wiedman, J.M., Taron, C.H. and Orlean, P. (2001) The essential Smp3 protein is required for addition of the side-branching fourth mannose during assembly of yeast glycosylphosphatidylinositols. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 27731-27739.
- Guillas, I., Kirchman, P.A., Chuard, R., Pfefferli, M., Jiang, J.C., Jazwinski, S.M. and Conzelmann, A. (2001) C26-CoA-dependent ceramide synthesis of *Saccharomyces cerevisiae* is operated by

- Lag1p and Lac1p. *EMBO Journal*, **20**, 2655-2665.
- Guillas, I., Pfefferli, M. and Conzelmann, A. (2000) Analysis of ceramides present in glycosylphosphatidylinositol anchored proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Enzymology*, **312**, 506-515.
- Hardwick, K.G., Lewis, M.J., Semenza, J., Dean, N. and Pelham, H.R. (1990) ERD1, a yeast gene required for the retention of luminal endoplasmic reticulum proteins, affects glycoprotein processing in the Golgi apparatus. *EMBO Journal*, **9**, 623-630.
- Hazbun, T.R., Malmstrom, L., Anderson, S., Graczyk, B.J., Fox, B., Riffle, M., Sundin, B.A., Aranda, J.D., McDonald, W.H., Chiu, C.H., Snyderman, B.E., Bradley, P., Muller, E.G., Fields, S., Baker, D., Yates, J.R., 3rd and Davis, T.N. (2003) Assigning function to yeast proteins by integration of technologies. *Molecular Cell*, **12**, 1353-1365.
- Hechtberger, P., Zinser, E., Saf, R., Hummel, K., Paltauf, F. and Daum, G. (1994) Characterization, quantification and subcellular localization of inositol-containing sphingolipids of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, **225**, 641-649.
- Holthuis, J.C., Pomorski, T., Raggars, R.J., Sprong, H. and Van Meer, G. (2001) The organizing potential of sphingolipids in intracellular membrane transport. *Physiological Reviews*, **81**, 1689-1723.
- Homans, S.W., Ferguson, M.A., Dwek, R.A., Rademacher, T.W., Anand, R. and Williams, A.F. (1988) Complete structure of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of rat brain Thy-1 glycoprotein. *Nature*, **333**, 269-272.
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S. and O'Shea, E.K. (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, **425**, 686-691.
- Ikeda, M., Kihara, A., Denpoh, A. and Igarashi, Y. (2008) The Rim101 pathway is involved in Rsb1 expression induced by altered lipid asymmetry. *Molecular Biology of the Cell*, **19**, 1922-1931.
- Ikonen, E. (2001) Roles of lipid rafts in membrane transport. *Current Opinion in Cell Biology*, **13**, 470-477.

- Ishitsuka, R., Yamaji-Hasegawa, A., Makino, A., Hirabayashi, Y. and Kobayashi, T. (2004) A lipid-specific toxin reveals heterogeneity of sphingomyelin-containing membranes. *Biophysical Journal*, **86**, 296-307.
- Kang, J.Y., Hong, Y., Ashida, H., Shishioh, N., Murakami, Y., Morita, Y.S., Maeda, Y. and Kinoshita, T. (2005) PIG-V involved in transferring the second mannose in glycosylphosphatidylinositol. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 9489-9497.
- Kihara, A. and Igarashi, Y. (2004) Cross talk between sphingolipids and glycerophospholipids in the establishment of plasma membrane asymmetry. *Molecular Biology of the Cell*, **15**, 4949-4959.
- Kinoshita, T. and Inoue, N. (2000) Dissecting and manipulating the pathway for glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, **4**, 632-638.
- Kleizen, B. and Braakman, I. (2004) Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum.[erratum appears in *Curr Opin Cell Biol.* 2004 Oct;16(5):597]. *Current Opinion in Cell Biology*, **16**, 343-349.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lester, R.L., Wells, G.B., Oxford, G. and Dickson, R.C. (1993) Mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae* lacking sphingolipids synthesize novel inositol glycerophospholipids that mimic sphingolipid structures. *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 845-856.
- Levine, T.P., Wiggins, C.A. and Munro, S. (2000) Inositol phosphorylceramide synthase is located in the Golgi apparatus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, **11**, 2267-2281.
- Lewis, M.J., Rayner, J.C. and Pelham, H.R. (1997) A novel SNARE complex implicated in vesicle fusion with the endoplasmic reticulum. *EMBO Journal*, **16**, 3017-3024.
- Li, X., Routt, S.M., Xie, Z., Cui, X., Fang, M., Kearns, M.A., Bard, M., Kirsch, D.R. and Bankaitis, V.A. (2000) Identification of a novel family of nonclassic yeast phosphatidylinositol transfer proteins

- whose function modulates phospholipase D activity and Sec14p-independent cell growth. *Molecular Biology of the Cell*, **11**, 1989-2005.
- Liu, B., Sutton, A. and Sternglanz, R. (2005) A yeast polyamine acetyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 16659-16664.
- Losev, E., Reinke, C.A., Jellen, J., Strongin, D.E., Bevis, B.J. and Glick, B.S. (2006) Golgi maturation visualized in living yeast. *Nature*, **441**, 1002-1006.
- Lussier, M., Sdicu, A.M., Ketela, T. and Bussey, H. (1995) Localization and targeting of the *Saccharomyces cerevisiae* Kre2p/Mnt1p alpha 1,2-mannosyltransferase to a medial-Golgi compartment. *Journal of Cell Biology*, **131**, 913-927.
- Maeda, Y., Watanabe, R., Harris, C.L., Hong, Y., Ohishi, K., Kinoshita, K. and Kinoshita, T. (2001) PIG-M transfers the first mannose to glycosylphosphatidylinositol on the luminal side of the ER. *EMBO Journal*, **20**, 250-261.
- Mao, C., Xu, R., Bielawska, A. and Obeid, L.M. (2000a) Cloning of an alkaline ceramidase from *Saccharomyces cerevisiae*. An enzyme with reverse (CoA-independent) ceramide synthase activity. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 6876-6884.
- Mao, C., Xu, R., Bielawska, A., Szulc, Z.M. and Obeid, L.M. (2000b) Cloning and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* alkaline ceramidase with specificity for dihydroceramide. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 31369-31378.
- Matsuura-Tokita, K., Takeuchi, M., Ichihara, A., Mikuriya, K. and Nakano, A. (2006) Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation. *Nature*, **441**, 1007-1010.
- Mellman, I. and Warren, G. (2000) The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell*, **100**, 99-112.
- Miura, F., Kawaguchi, N., Sese, J., Toyoda, A., Hattori, M., Morishita, S. and Ito, T. (2006) A large-scale full-length cDNA analysis to explore the budding yeast transcriptome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 17846-17851.

- Mnaimneh, S., Davierwala, A.P., Haynes, J., Moffat, J., Peng, W.T., Zhang, W., Yang, X., Pootoolal, J., Chua, G., Lopez, A., Trochesset, M., Morse, D., Krogan, N.J., Hiley, S.L., Li, Z., Morris, Q., Grigull, J., Mitsakakis, N., Roberts, C.J., Greenblatt, J.F., Boone, C., Kaiser, C.A., Andrews, B.J. and Hughes, T.R. (2004) Exploration of essential gene functions via titratable promoter alleles. *Cell*, **118**, 31-44.
- Moelleken, J., Malsam, J., Betts, M.J., Movafeghi, A., Reckmann, I., Meissner, I., Hellwig, A., Russell, R.B., Sollner, T., Brugger, B. and Wieland, F.T. (2007) Differential localization of coatamer complex isoforms within the Golgi apparatus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 4425-4430.
- Muniz, M., Nuoffer, C., Hauri, H.P. and Riezman, H. (2000) The Emp24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles. *Journal of Cell Biology*, **148**, 925-930.
- Munro, S. (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*, **115**, 377-388.
- Nagiec, M.M., Nagiec, E.E., Baltisberger, J.A., Wells, G.B., Lester, R.L. and Dickson, R.C. (1997) Sphingolipid synthesis as a target for antifungal drugs. Complementation of the inositol phosphorylceramide synthase defect in a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by the AUR1 gene. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 9809-9817.
- Nakamata, K., Kurita, T., Bhuiyan, M.S., Sato, K., Noda, Y. and Yoda, K. (2007) KEG1/YFR042w encodes a novel Kre6-binding endoplasmic reticulum membrane protein responsible for beta-1,6-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 34315-34324.
- Neuber, O., Jarosch, E., Volkwein, C., Walter, J. and Sommer, T. (2005) Ubx2 links the Cdc48 complex to ER-associated protein degradation. *Nature Cell Biology*, **7**, 993-998.
- Ng, D.T., Spear, E.D. and Walter, P. (2000) The unfolded protein response regulates multiple aspects of secretory and membrane protein biogenesis and endoplasmic reticulum quality control. *Journal*

- of Cell Biology*, **150**, 77-88.
- Novick, P., Field, C. and Schekman, R. (1980) Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell*, **21**, 205-215.
- Nuoffer, C., Horvath, A. and Riezman, H. (1993) Analysis of the sequence requirements for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 protein. *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 10558-10563.
- Palade, G. (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*, **189**, 347-358.
- Patton, J.L., Srinivasan, B., Dickson, R.C. and Lester, R.L. (1992) Phenotypes of sphingolipid-dependent strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, **174**, 7180-7184.
- Pittet, M. and Conzelmann, A. (2007) Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1771**, 405-420.
- Popolo, L. and Vai, M. (1999) The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1426**, 385-400.
- Puthenveedu, M.A. and Linstedt, A.D. (2005) Subcompartmentalizing the Golgi apparatus. *Current Opinion in Cell Biology*, **17**, 369-375.
- Redding, K., Holcomb, C. and Fuller, R.S. (1991) Immunolocalization of Kex2 protease identifies a putative late Golgi compartment in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*, **113**, 527-538.
- Reinders, J., Zahedi, R.P., Pfanner, N., Meisinger, C. and Sickmann, A. (2006) Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *Journal of Proteome Research*, **5**, 1543-1554.
- Rockwell, N.C. and Fuller, R.S. (1998) Interplay between S1 and S4 subsites in Kex2 protease: Kex2 exhibits dual specificity for the P4 side chain. *Biochemistry*, **37**, 3386-3391.
- Saitoh, Y.H., Ogawa, K. and Nishimoto, T. (2005) Br11p -- a novel nuclear envelope protein required for nuclear transport. *Traffic*, **6**, 502-517.

- Sato, K., Sato, M. and Nakano, A. (2001) Rer1p, a retrieval receptor for endoplasmic reticulum membrane proteins, is dynamically localized to the Golgi apparatus by coatamer. *Journal of Cell Biology*, **152**, 935-944.
- Sato, S.B., Ishii, K., Makino, A., Iwabuchi, K., Yamaji-Hasegawa, A., Senoh, Y., Nagaoka, I., Sakuraba, H. and Kobayashi, T. (2004) Distribution and transport of cholesterol-rich membrane domains monitored by a membrane-impermeant fluorescent polyethylene glycol-derivatized cholesterol. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 23790-23796.
- Schimmoller, F., Singer-Kruger, B., Schroder, S., Kruger, U., Barlowe, C. and Riezman, H. (1995) The absence of Emp24p, a component of ER-derived COPII-coated vesicles, causes a defect in transport of selected proteins to the Golgi. *EMBO Journal*, **14**, 1329-1339.
- Schmitz, K.R., Liu, J., Li, S., Setty, T.G., Wood, C.S., Burd, C.G. and Ferguson, K.M. (2008) Golgi localization of glycosyltransferases requires a Vps74p oligomer. *Developmental Cell*, **14**, 523-534.
- Schnabl, M., Oskolkova, O.V., Holic, R., Brezna, B., Pichler, H., Zagorsek, M., Kohlwein, S.D., Paltauf, F., Daum, G. and Griac, P. (2003) Subcellular localization of yeast Sec14 homologues and their involvement in regulation of phospholipid turnover. *European Journal of Biochemistry*, **270**, 3133-3145.
- Schorling, S., Vallee, B., Barz, W.P., Riezman, H. and Oesterhelt, D. (2001) Lag1p and Lac1p are essential for the Acyl-CoA-dependent ceramide synthase reaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, **12**, 3417-3427.
- Schuberth, C. and Buchberger, A. (2005) Membrane-bound Ubx2 recruits Cdc48 to ubiquitin ligases and their substrates to ensure efficient ER-associated protein degradation. *Nature Cell Biology*, **7**, 999-1006.
- Schuldiner, M., Collins, S.R., Thompson, N.J., Denic, V., Bhamidipati, A., Punna, T., Ihmels, J., Andrews, B., Boone, C., Greenblatt, J.F., Weissman, J.S. and Krogan, N.J. (2005) Exploration of

- the function and organization of the yeast early secretory pathway through an epistatic miniarray profile. *Cell*, **123**, 507-519.
- Schuldiner, M., Metz, J., Schmid, V., Denic, V., Rakwalska, M., Schmitt, H.D., Schwappach, B. and Weissman, J.S. (2008) The GET complex mediates insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. *Cell*, **134**, 634-645.
- Simons, K. and Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction.[erratum appears in Nat Rev Mol Cell Biol 2001 Mar;2(3):216]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **1**, 31-39.
- Sipos, G. and Fuller, R.S. (2002) Separation of Golgi and endosomal compartments. *Methods in Enzymology*, **351**, 351-365.
- Strahl, T., Hama, H., DeWald, D.B. and Thorner, J. (2005) Yeast phosphatidylinositol 4-kinase, Pik1, has essential roles at the Golgi and in the nucleus. *Journal of Cell Biology*, **171**, 967-979.
- Takahashi, M., Inoue, N., Ohishi, K., Maeda, Y., Nakamura, N., Endo, Y., Fujita, T., Takeda, J. and Kinoshita, T. (1996) PIG-B, a membrane protein of the endoplasmic reticulum with a large luminal domain, is involved in transferring the third mannose of the GPI anchor. *EMBO Journal*, **15**, 4254-4261.
- Taron, B.W., Colussi, P.A., Wiedman, J.M., Orlean, P. and Taron, C.H. (2004) Human Smp3p adds a fourth mannose to yeast and human glycosylphosphatidylinositol precursors in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 36083-36092.
- Treich, I., Cairns, B.R., de los Santos, T., Brewster, E. and Carlson, M. (1995) SNF11, a new component of the yeast SNF-SWI complex that interacts with a conserved region of SNF2. *Molecular & Cellular Biology*, **15**, 4240-4248.
- Tu, L., Tai, W.C., Chen, L. and Banfield, D.K. (2008) Signal-mediated dynamic retention of glycosyltransferases in the Golgi. *Science*, **321**, 404-407.
- Uemura, S., Kihara, A., Inokuchi, J. and Igarashi, Y. (2003) Csg1p and newly identified Csh1p function in mannosylinositol phosphorylceramide synthesis by interacting with Csg2p. *Journal of*

Biological Chemistry, **278**, 45049-45055.

Vallee, B. and Riezman, H. (2005) Lip1p: a novel subunit of acyl-CoA ceramide synthase. *EMBO Journal*, **24**, 730-741.

Van Den Hazel, H.B., Kielland-Brandt, M.C. and Winther, J.R. (1996) Review: biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. *Yeast*, **12**, 1-16.

Zhang, Z. and Dietrich, F.S. (2005) Mapping of transcription start sites in *Saccharomyces cerevisiae* using 5' SAGE. *Nucleic Acids Research*, **33**, 2838-2851.

Zhong, W., Murphy, D.J. and Georgopapadakou, N.H. (1999) Inhibition of yeast inositol phosphorylceramide synthase by aureobasidin A measured by a fluorometric assay. *FEBS Letters*, **463**, 241-244.

謝辞

本研究を行う機会を与えて頂き、常に御指導、御鞭撻を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 分子生命工学研究室教授、依田幸司博士に心から感謝いたします。

有益な御意見、御助言を数多く頂き、本研究の遂行を支えてくださった東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 分子生命工学研究室準教授、足立博之博士に心から感謝いたします。

本研究の遂行において、計画の方向性から具体的な実験方法に至るまで親身の御指導を頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 分子生命工学研究室助教、野田陽一博士に心から感謝いたします。

GPI アンカー中間体の解析法について御助言をいただきました、独立行政法人産業技術総合研究所評価部首席評価役、地神芳文博士、独立行政法人産業技術総合研究所糖鎖医工学研究センター主任研究員、横尾岳彦博士、東京薬科大学生命科学部助教、梅村真理子博士に心から感謝いたします。

ヒト *PIG-V* 遺伝子発現プラスミドを御供与くださいました、大阪大学微生物病研究所教授、木下タロウ博士に心から感謝いたします。

Aureobasidin A 感受性の評価方法について御助言をいただきました、広島大学大学院生物圏科学研究科 生物機能開発学専攻、梶原健太郎氏に心から感謝いたします。

毎日の研究生生活の中で、数々の御助言をいただきました、荒井斉介博士に心から感謝いたします。

一日のうち大半の時間を共に過ごし、公私共に大変お世話になりました、栗田朋和氏、井上一郎氏、原武浩氏をはじめ、分子生命工学研究室のみなさんおよび卒業生の方々に心から感謝いたします。

最後に、大学院での研究生生活をあらゆる面で支えてくださった家族に心から感謝いたします。