

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞壁形成に
関わるタンパク質に関する研究

北垣 浩志

目次

第1章 序論

	ページ
1 酵母細胞壁について	1
(1) 酵母細胞壁の構造	
(2) 酵母細胞壁タンパク質について	
(3) 酵母細胞壁の生合成について	
(4) 酵母溶解酵素 <i>Rarobacter</i> protease I について	
2 本研究の概要	4

第2章 静置培養特異的酵母細胞壁タンパク質 Tir1p/Srp1p の同定と解析

	ページ
1 緒言	6
2 実験方法	6
3 結果	10
(1) 静置培養特異的細胞壁構造タンパク質	
(2) Scp100 のアミノ酸配列の解析	
(3) Tir1p/Srp1p の静置培養酵母細胞壁からの特異的検出	
(4) Tir1p/Srp1p の野生株の細胞壁からの検出	
(5) Scp100 の <i>tir1/srp1</i> 破壊株細胞壁からの検出	
(6) Tir1p/Srp1p のラミナリナーゼによる溶出	
(7) ラミナリナーゼ溶出 Tir1p/Srp1p の β -1,6-グルカン抗血清との反応	
(8) ラミナリナーゼ溶出 Tir1p/Srp1p の炭水化物組成解析	
(9) <i>TIR1/SRPI</i> mRNA の <i>ROX1</i> による制御	
4 考察	25
5 要約	29

第3章 定常培養期の主要な酵母細胞壁タンパク質 Sed1p の同定と解析

	ページ
1 緒言	30
2 実験方法	30
3 結果	34
(1) 細胞壁タンパク質のゲルろ過解析	
(2) Sed1p の精製と同定	
(3) <i>SEDI</i> の遺伝子破壊	
(4) Sed1p に付加した糖の解析	
(5) Sed1p のグルカナーゼによる溶出	
(6) <i>SEDI</i> の定常期の細胞での高発現	
(7) <i>sed1</i> 破壊株の定常期におけるザイモリアーゼ感受性	
4 考察	51
5 要約	55

第4章 酵母細胞壁生合成に関与する *DCW1* (*YKL046c*)と *DFG5* の同定と解析

	ページ
1 緒言	56
2 実験方法	57
3 結果	65
(1) データベース調査	
(2) <i>dfg5</i> 破壊株及び <i>ykl046c</i> 破壊株のサイモリアーゼ感受性の解析	
(3) <i>dcw1</i> Δ と <i>dfg5</i> Δ の合成致死性の検討	
(4) プロモーターシャットオフの細胞の表現型の解析	
(5) Dcw1p-HA の生化学的解析	
(6) Dcw1p-HA の局在性の解析	
4 考察	80
5 要約	82

第5章 温度感受性変異株 *dcw1* 及び *dfg5* 変異株の取得と解析

	ページ
1 緒言	83
2 実験方法	83
3 結果	88
(1) 37°Cで生育不可能な <i>DCW1</i> 及び <i>DFG5</i> 変異株の取得	
(2) 37°Cで培養した DC61 及び DF66 の形態の解析	
(3) DC61 の細胞周期の解析	
(4) DC61 の芽の細胞壁の解析	
(5) <i>DCW1</i> 及び <i>DFG5</i> mRNA の細胞周期及び増殖期依存的調節	
4 考察	102
5 要約	105

	ページ
文献	106
論文の要旨	120
発表論文	125
謝辞	127

略語表

CBB	Coomassie Brilliant Blue
CF	Calcofluor white
CFU	Colony Forming Unit
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indole
DIC	Differential Interference Contrast
5-FAA	5-Fluoroanthranilic acid
5-FOA	5-Fluoroorotic acid
GPI	グリコシルホスファチジルイノシトール
GPI-CWP	GPI アンカー型細胞壁タンパク質
MCB	<i>Mlu</i> I cell cycle box
PIR-CWP	PIR 型細胞壁タンパク質
PI-PLC	ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PNGase F	Peptide N-glycosidase F
RPI	<i>Rarobacter</i> protease I
SCB	Swi4p 依存的 cell cycle box
STRE	ストレス応答エレメント
SPB	Spindle pole body

第1章 序論

1 酵母細胞壁について

(1) 酵母細胞壁の構造

酵母細胞は、通常、細胞壁と呼ばれる機械的に強固な構造物によってその形態を保っている(Ballou et al., 1982; Peberdy et al., 1990; Cid et al., 1995)。細胞壁は細胞内外の浸透圧に耐え細胞内の環境を保護しているだけでなく、細胞外の情報を内部に伝えるインターフェースや化学反応のコンパートメンテーションの場を提供している。分類学的に酵母は子囊菌系酵母と担子菌系酵母に分けることができる(中瀬、1989)。両者は形態的には類似しているが、まったく異なる系統に属しているものと考えられている。子囊菌系酵母の中で最もよく知られている *Saccharomyces cerevisiae* は、酒類及びパンの製造に広く使われている産業上重要な酵母であるほか、分子遺伝学的な取扱いが容易なことから真核生物のモデルとして研究が進められている。

S. cerevisiae の細胞壁の主な成分はグルカン、マンナンタンパク質、キチンである(Cabib et al., 2001)。グルカンは β -1,6-結合の側鎖を持った β -1,3-グルカンから構成されており、細胞壁の基本骨格を成す。マンナンタンパク質はN結合糖鎖及びO結合糖鎖を持った糖タンパク質であり、細胞壁の最外層を形成している。N結合糖鎖はアスパラギン残基に結合したハイマンノース型のコア糖鎖に、他の高等真核生物には見られない外鎖と呼ばれるマンノース残基の繰り返し配列が結合した構造を持っている。その結果、N結合型糖鎖のマンノース残基数は数百に及んでいる。O結合糖鎖はスレオニン、セリンに1~5個のオリゴマンノースが結合したものである。キチンは主に出芽痕にリング状に、また一部は隔壁にディスク状に存在しているが、細胞壁が弱くなると細胞壁を補強するために細胞壁全体に分布する(Horisberger and Vonlanthen, 1977)。

(2) 酵母細胞壁タンパク質

細胞壁のマンナンタンパク質は、細胞壁に非共有結合でトラップされているものと、細胞壁に共有結合している細胞壁タンパク質に分けられる。細胞壁タンパク質は、細胞壁への結合の様式によって2つのクラスに分けられる。ひとつは、その C 末端にグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)に由来する構造を持ち(Lipke et al., 1989)、 β -1,6-グルカンを通じて β -1,3-グルカンに結合している(Kapteyn et al., 1996)。このクラスは GPI-CWP と呼ばれる。もうひとつのクラスの細胞壁タンパク質は、温和なアルカリに感受性の未知の構造の共有結合で細胞壁に結合している。このクラスの細胞壁タンパク質には Pir1p, Pir2p などが見出されていることから、PIR-CWP と呼ばれている(Mrsa et al., 1997; Kapteyn et al., 1999)が、PIR-CWP がどのような様式で細胞壁に共有結合しているかはまだ定説がない。GPI-CWP としては Cwp1p, Cwp2p と Tip1p が報告されている(Shimoi et al., 1995; van der Vaart et al., 1995)が、それらがどのように制御されていてその制御がどのような生物学的意義を持っているかはこれまでよくわかっていなかった。

(3) 細胞壁の生合成

細胞壁の構造のうち、 β -1,3-グルカンを合成する酵素は2つの相同な触媒サブユニット Fks1p (Douglas et al., 1994)、Fks2p (Zhao et al., 1998)と低分子量 GTPase である制御サブユニット Rho1p からなる(Qadota et al., 1996; Mazur and Baginsky, 1996)。Fks1p 及び Rho1p は芽の先端に局在し、芽の先端で β -1,3-グルカンの合成を行う(Mazur et al., 1996)。fks1 の温度感受性変異株では、芽の成長が小さいままで停止し、細胞壁チェックポイントにより細胞周期が DNA 合成の後、Spindle pole body (SPB) の分離の前で停止する(Suzuki et al., 2004)。一方、 β -1,6-グルカン合成を行う酵素の遺伝子については、キラー耐性変異株の研究から KRE 遺伝子が関与していると考えられている(Boone et al., 1990)が、KRE 遺伝子産物が β -1,6-グルカンの合成を行って

いるという直接的な酵素化学的データはまだ報告されていない。細胞壁や出芽位置でのキチンの合成には Chs3p (Cos et al., 1998)が、細胞壁の修復に働くキチンの合成には Chs1p (Cabib et al., 1989)が、隔壁の chitin disk の蓄積には Chs2p (Sburlati and Cabib, 1986; Orlean et al., 1987)が関与している。一方、Chs4p は Chs3p の活性化や輸送に関与することが報告されている(Ono et al., 2000)。GPI-CWP 型細胞壁タンパク質は、GPI アンカー型タンパク質として生合成され、分泌経路を経て細胞膜に輸送された後、GPI アンカーの脂肪酸と myo-inositol を失って細胞膜から遊離し、細胞壁の β -1,6-グルカンに転移すると考えられている(Lu et al., 1994, 1995)が、その詳しいメカニズムは不明である。

(4) 酵母溶解酵素 *Rarobacter* protease I (RPI)について

吉沢は清酒製造場などから排出される高濃度の有機物を含む廃水を酵母によって一次処理した後、活性汚泥処理することで、高負荷に耐えるとともに、負荷変動に強い廃水処理法を開発した(吉沢ら、1981)。本処理方法の一次処理で増殖した酵母が活性汚泥槽でどのように消長するかを検討した結果、酵母溶解菌 YLM-1 が検出された(蓮尾ら、1983, 1984a,b,c)。YLM-1 は通常の栄養培地に増殖せず、酵母処理において使用されている *Hansenula anomala* 生菌体の抽出液を添加すると生育を示す、新属新種の菌であり、*Rarobacter faecitabidus* という学名が提唱された(Yamamoto et al., 1988)。酵母の溶菌には、この菌の生産する1種類の β -1,3-グルカナーゼと2種類のプロテアーゼが作用していることが明らかになった(Shimoi et al., 1991a,b)。これらのうち主要な溶菌活性を示した *Rarobacter* protease I (RPI)は、N 末端側にトリプシン-キモトリプシン系に属するセリンプロテアーゼドメインを、C 末端側にマンノース結合ドメインを持つ新規なプロテアーゼであり、細胞壁タンパク質を切断して酵母を溶菌させると考えられた(Shimoi et al., 1992)。

2 本研究の概要

酵母溶解酵素である *Rarobacter* protease I (RPI)処理で細胞壁グルカンから遊離する 260kDa と 100kDa のタンパク質を精製した。アミノ酸配列を解析した結果、260kDa のタンパク質の配列は Sed1p の配列と一致し、100kDa のタンパク質の配列は Tir1p/Srp1p の配列と一致した。Tir1p/Srp1p は静置培養した細胞にのみ見いだされ、また *TIR1/SRPI* 遺伝子は静置培養特異的に発現し、Tir1p/Srp1p は β -1,6-グルカンに結合していると考えられたことから、Tir1p/Srp1p は静置培養特異的な細胞壁タンパク質であると考えられた。一方、*SED1* 遺伝子は定常培養期に多く発現し、Sed1p は定常期の細胞壁に多く見出され、この Sed1p は細胞壁から β -1,3-グルカナーゼにより抽出できたことから、Sed1p は定常培養期の主要な細胞壁タンパク質であると考えられた。また、Sed1p は定常期における溶解酵素に対する耐性に関与していた。

次に、酵母細胞壁の形成に関与する遺伝子として、*Bacillus circulans* の α -1,6-mannanase をコードする遺伝子とホモロジーを持つ遺伝子として酵母ゲノムデータベースから見出した *DCW1* と *DFG5* について解析した。これらの遺伝子は互いに相同であり、両方破壊すると致死であった。 $\Delta dcw1$ は溶解酵素に対して感受性であり、 $\Delta dcw1 \Delta dfg5$ も細胞壁が弱くなった表現型を示したことから、これらの遺伝子は細胞壁の生合成に関与していると考えられた。*DCW1* にエピトープタグを付加して解析したところ、Dcw1p は N 糖鎖を持った GPI アンカー型膜タンパク質であり、膜を含む細胞表層に局在していた。Dcw1p 及び Dfg5p の細胞壁生合成における詳細な役割について解析するため、温度感受性の *dcw1* 変異株を作成したところ、37°C で培養した *dcw1^{ts}* 株は異常な細胞壁を持った小さな芽の状態でも DNA 合成の後、SPB 分離の前で細胞周期を停止しており、細胞壁チェックポイントにより細胞周期を停止したと考えられた。事実、*DCW1* mRNA は G1 期に、*DFG5* mRNA は S 期に、また両者とも対数増殖期に多く蓄積しており、芽の形成に重要な時期に発現していた。温度感受性の *dfg5* 変異

株も同様の表現型を示したことから、Dcw1p 及び Dfg5p は芽の細胞壁の生合成に重要な役割を持つことと考えられた。

第2章 静置培養特異的酵母細胞壁タンパク質 Tir1p/Srp1p の同定と解析

1 緒言

酵母細胞壁タンパク質は性的凝集(Roy et al., 1991; Cappellaro et al., 1994)、ビール酵母の凝集(Teunissen et al., 1995)、宿主細胞への病原体としての接着(Wheeler et al., 2003)などに関わっており、細胞壁の中で重要な役割を担っているが、これまではその解析の難しさから解析が進んでいなかった。しかし、下飯らにより、RPI による細胞壁タンパク質の同定方法が開発された(Shimoi et al., 1995)後、Cwp1p, Cwp2p, Tip1p などいくつかの細胞壁タンパク質が同定されてくるようになった(van der Vaart et al., 1995)。しかし、これらの細胞壁タンパク質がどのような制御を受けているかはこれまでわかっていない。そこで、さまざまな培養条件下で培養した酵母細胞から細胞壁タンパク質を同定し、培養条件に応じて細胞壁タンパク質がどのように変わるかを調べることとした。

2 実験方法

(1)使用した培地

酵母の培養には YPAD(1% yeast extract, 2% bactopectone, 40 μ g/ml adenine, 2% glucose)か、あるいは *mnn9* 変異株には 10% (mass/volume)のソルビトールを添加した YPAD を用いた。大腸菌は 100 μ g/ml アンピシリンを含む 3%ブイオン培地で培養した。

(2)使用した酵母菌株

YPH499 (MATa *ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1- Δ 63 his3- Δ 200 leu2- Δ 1*)

(Sikorski and Hieter, 1989)及び LB2134-3B (MATa, *mnn9*) (Ballou et al., 1980)、ACN6 (MAT α , *ura3*, *lys2*, *ade2*, *trp1*, *his3*, *leu2*, Δ *tir1::HIS3*) (Kowalski et al., 1995)、KY934 (MATa, *his4*, *leu2*, *trp1*, Δ *rox1::LEU2*) (Balasubramanian et al., 1993)を用いた。

(3) 細胞壁の調製と RPI 処理

酵母を L 字管で 30°C において 48 時間培養し、そのうち 4ml を 500ml の培養フラスコに入った 200ml の主発酵培地に接種し、30°C で 30 時間、静置あるいはロータリーシェーカーで 120rpm の速さで振盪培養した。細胞を 1,500g で 5 分間遠心して回収し、1 mM の phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) で洗い、2 容量の 1mM PMSF を含む 10mM Tris/HCl pH 8.0 に懸濁した。1 容量のガラスビーズ (直径 0.45-0.50mm) を加え、ブラウンホモジェナイザーで 5 分間振盪することで細胞を破壊した。その後 5M LiCl と 1mM PMSF で洗い、3% SDS に懸濁して 100°C で 5 分間煮沸した。この SDS で抽出した細胞壁を 1mM PMSF で 5 回洗い、5 μ g/ml RPI を含む 50mM Tris/HCl pH 8.0 に懸濁し、30°C で 6 時間穏やかに振盪した。この液を 15,000g で 10 分間遠心し、上清を回収した。このサンプルの一部をゲルろ過に供した。

(4) Scp100 の精製

5ml の RPI あるいはラミナリナーゼで処理した細胞壁抽出液を Superdex200 ゲルろ過クロマトグラフィー (Pharmacia; 26mm \times 600mm) に供した。溶出液は 150mM NaCl と 0.05% アジ化ナトリウムを含む 10mM Tris/HCl pH 8.0、流速は 1ml/min とした。クロマトグラフィーを繰り返して Scp100 を含む画分を集めて凍結乾燥した。凍結乾燥した試料を 0.05% トリフルオロ酢酸に溶解し、TSKgel phenyl-5PW RP 逆相カラム (Tosoh) に供し、0.05% トリフルオロ酢酸を含む 5-80% アセトニトリルの linear gradient で溶出した。主要なピークを集めて凍結乾燥し、タンパク質濃度をブラッドフォード法 (Bradford,

1976)により bovine serum albumin を標準として測定した。

(5) SDS-PAGE とウェスタンブロット解析

タンパク質試料を Laemmli の方法(Laemmli, 1970)により SDS-PAGE(10-20% アクリルアミド勾配)に供し、Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250 (Bio-Rad)で染色するか、イモビロン P 膜(ミリポア)に 25mM Tris, 192mM グリシン、20%メタノールと 0.05%SDS の存在下 electroblot した。ブロットした膜は 1% BSA を含む 10mM Tris/HCl pH 8.0、150mM NaCl の溶液中室温で 30 分間ブロックし、次に 500 倍に希釈した β -1,6-グルカン抗体を含む 0.05% Tween20, 10mM Tris/HCl pH 8.0, 150mM NaCl 溶液あるいは 1000 倍に希釈したビオチンと結合させたコンカナバリン A (Seikagaku Kogyo)を含む 0.05% Tween20, 10mM Tris/HCl pH 8.0, 150mM NaCl の溶液中で室温において 30 分間振盪した。この膜を抗ウサギ抗体の二次抗体あるいはアビジンと結合させたアルカリ性ホスファターゼ(Zymed)による反応に供した。

(6) 5-オキシプロリンアミノペプチダーゼ処理

精製したタンパク質(500pmol)を Prosorb 膜 (Perkin Elmer) にブロットし、0.5% (mass/vol.)ポリビニルピロリドン-40、100mM 酢酸溶液中 37°C で 30 分間反応させた。この膜を蒸留水で 10 回洗った後、50mM リン酸ナトリウム pH 7.0、10mM dithiothreitol、 $10 \mu\text{U}/\mu\text{l}$ の 5-オキシプロリンアミノペプチダーゼ (Takara) 中で 50°C において 5 時間反応させた。この膜を蒸留水で 3 回洗い、タンパクシークエンサーに供した。

(7) 細胞壁タンパク質のグルカナーゼ抽出

グルカナーゼ抽出は基本的に Van Rinsum らの論文の方法(Van Rinsum et al., 1991)に基づいて行った。すなわち、非共有結合で結合しているタンパク質や disulfide 結合で結合しているタンパク質を細胞壁から 2% SDS、10mM EDTA、40mM

dithiothreitol を含む 50mM Tris/HCl, pH 8.0 中で 100°Cにおいて 5 分間抽出し、遠心で沈殿を取り、1mM PMSF で 5 回洗い、50mM 酢酸ナトリウム pH 5.0、1mM PMSF 中で 50mU/ml のラミナリナーゼ(sigma)により 37°Cにおいて 30 分間あるいは 4 時間、15 時間処理した。反応溶液は 15,000g で 5 分間遠心し、上清をゲルろ過に供した。静置培養特異的なタンパク質を逆相クロマトグラフィーで精製した。

(8) 糖組成の解析

1nmol のタンパク質を 2M HCl と 2M トリフルオロ酢酸で 100°Cにおいて 4 時間反応させることで分解した。その後、鈴木ら(Suzuki et al., 1991)の方法により単糖の組成をピリジルアミノ化法で解析した。

(9) ノーザンプロット解析

Total RNA を酵母細胞からホットフェノール法で調製した(Kohrer and Domdey, 1991)。5 μ g の total RNA を 65°Cで 5 分間、50%ホルムアミド、0.16 容量のホルムアルデヒド(37%容量)、20mM MOPS, 5mM 酢酸ナトリウム、1mM EDTA pH 7.0 (MOPS バッファー)溶液中で変性させた。試料を 1.2%アガロース、MOPS バッファー、0.17 容量のホルムアルデヒド(37%容量)で電気泳動し、0.05M NaOH でナイロン膜(ハイボンド N+, Amersham Pharmacia)に転写した。*TIR1/SRPI* 遺伝子の 0.4-kb の *XbaI-StuI* 切断断片をプローブとして用いた。*ACT1* のプローブを、5'-AGGTTGCTGCTTTGGTTATT-3'と 5'-TAGAAACACTTGTGGTGAA-3'をプライマーとして PCR で合成した。プローブは ³²P でマルチプライミング法(Feinberg and Vogelstein, 1983)によりラベルし、50%ホルムアミド、2 \times SSPE (SSPE=180mM NaCl, 10mM sodium phosphate, 1mM EDTA pH 7.7)、5 \times Denhart's 溶液、20 μ g/ml の変性 salmon sperm DNA を含むバッファー中で膜にハイブリダイズさせた。この膜を 0.1% SDS を含む 2 \times SSPE で 2 回洗い、X-ray フィルムに expose した。

3 結果

(1) 静置培養特異的細胞壁構造タンパク質

まず、N 結合糖鎖の外鎖に由来する解析の困難さを克服するため、糖鎖不全 *mnn9* 変異株(Tsai et al., 1984)を使用することとした。静置培養あるいは振盪培養した *mnn9* 変異株由来の細胞壁から RPI により溶出させたタンパク質をゲルろ過解析したところ、全く異なるパターンが得られた。Fig. 2-1A のピーク 2 は振盪培養の細胞壁からは見出されず静置培養の細胞壁のみから見出されたことから、これを Scp100 (static culture specific protein of 100kDa)と名付けた。

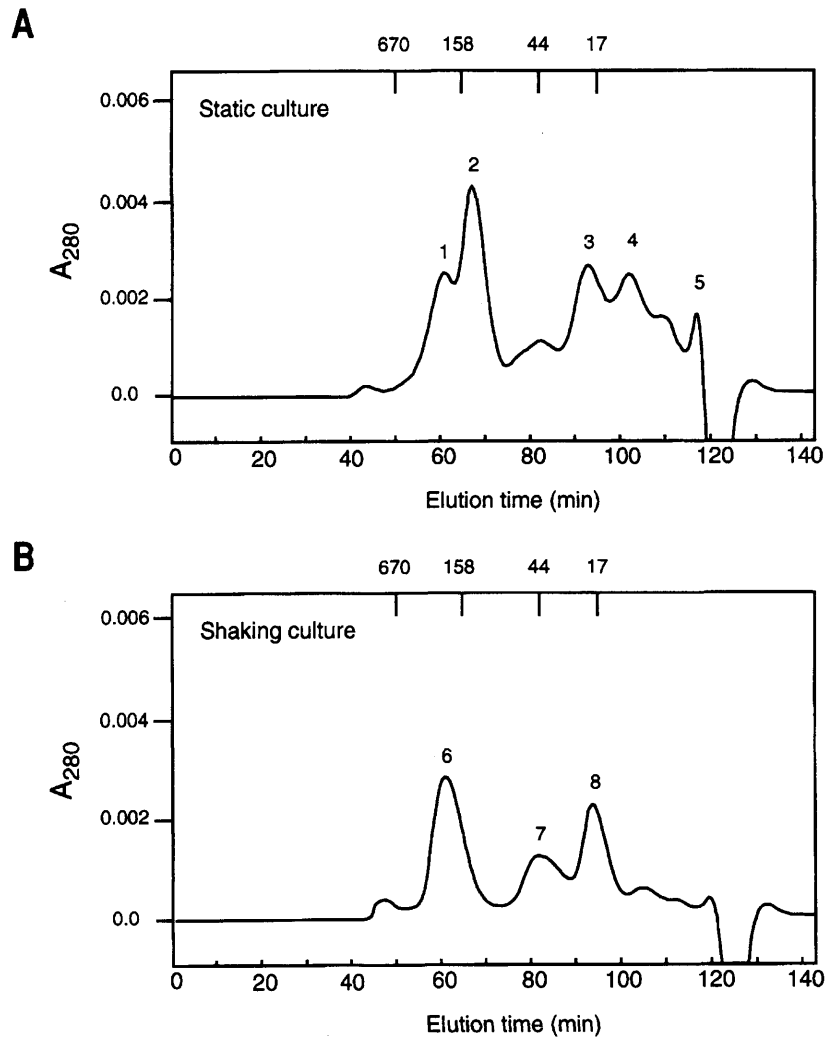


Fig. 2-1. Gel filtration analysis of cell wall proteins from *mnn9* cells. Yeast cells were cultured in YPAD medium with or without shaking for 30 h. The cell wall fraction was prepared and extracted with SDS to remove non-covalently bound proteins and incubated with RPI. The reaction mixture was centrifuged, and the supernatant containing approximately 1mg protein was fractionated by Superdex 200 gel filtration. (A) Cell wall proteins prepared from static culture cells. (B) Cell wall proteins prepared from shaking culture cells. Numbers at the top indicate molecular masses of standard proteins (kDa).

(2) Scp100 のアミノ酸配列の解析

ピーク 2 を逆相クロマトグラフィーに供したところ、ほぼ単一のピークになった(Fig. 2-2A)。このピークを回収し、2 μ g を SDS-PAGE に供した。このゲルを CBB で染色、あるいはブロットしてマンナンタンパク質を検出するコンカナバリン A でプローブしたところ、Scp100 は 100kDa の分子質量を持つ単一バンドの糖タンパク質であることが判明した。標準的な条件では、1000ml の培養液から 200 μ g の精製 Scp100 を得ることができた。Scp100 の N 末端アミノ酸配列は、恐らくブロック化のためにエドマン分解法では解読することができなかった。そこで、Scp100 を *Achromobacter* protease I で消化し、逆相クロマトグラフィーで精製し (Fig. 2-3)、分取したペプチドの配列を解読した (Table 2-1)。また同時に、消化していない Scp100 も 5-オキソプロリンアミノペプチダーゼで脱ブロック化して解読した。ピーク5以外のすべてのピークが *TIR1/SRP1* のコードするタンパク質の配列と一致した(Fig. 2-4)。

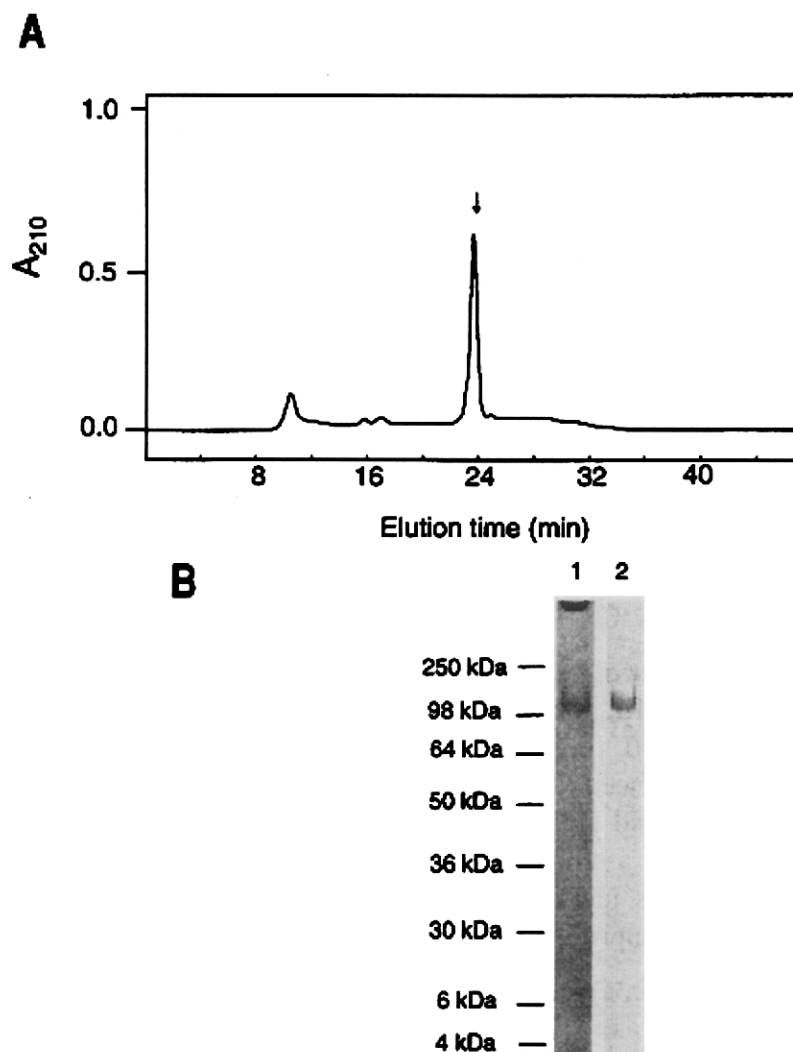


Fig. 2-2. Purification of the static culture-specific protein (Scp100). (A) Peak 2 in the gel filtration (Fig. 2-1A) of cell wall proteins prepared from the static culture was collected and fractionated by TSKgel phenyl-5PW RP reverse-phase chromatography with a linear gradient of 5-80% acetonitrile in 0.05% trifluoroacetic acid. The arrow indicates Scp100. (B) The purified protein ($2 \mu\text{g}$) was applied to SDS-PAGE (10 to 20% acrylamide gradient) and stained with Coomassie brilliant blue (lane 1) or transferred to a membrane and probed with concanavalin A conjugated with biotin and avidin conjugated with alkaline phosphatase (lane 2).

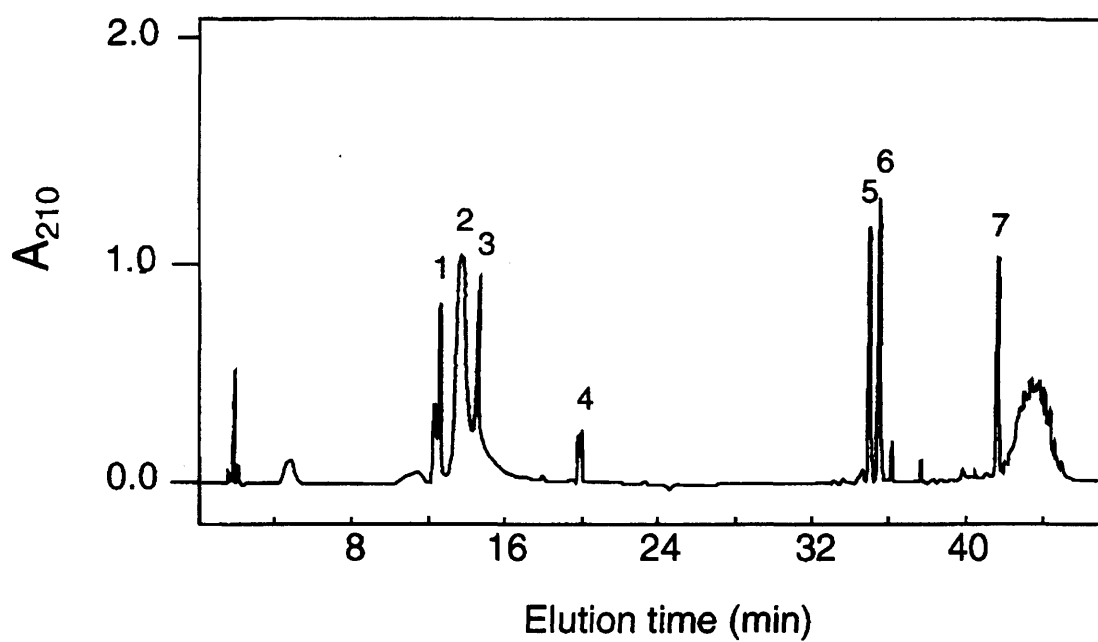


Fig. 2-3. HPLC chromatogram of Scp100 hydrolyzed with *Achromobacter* protease I. After Scp100 and *Achromobacter* protease I (200:1 by molar ratio) were incubated at 37 °C for 15 h, the hydrolysate was fractionated by μ Bondasphere C18 reverse-phase chromatography with a linear gradient of 5-50% acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid. Numbered peaks in the figure were collected and their amino acid sequences were determined.

```

      5   10  15  20  25  30
1  MAYTKIALFAAIAALASAQTODQINELNVI
      <-----*-----
31 LNDVKSHLOEYISLASDSSSGFSLSSMPAG
      -----7-----
61 VLDIGMALASATDDSYTTLYSEVDFAGVSK
      -----7----->
91 MLTMVPWYSSRLEPALKSLNGDASSSAAPS
      <-----6-----><-----2-----
121 SSAAPTSSAAPSSSAAPTSSAASSSSEAKS
      -----2-----><
151 SSAAPSSSEAKSSSAAPSSSEAKSSSAAPS
      -----1-----><-----1-----><-----1-----
181 SSEAKSSSAAPSSSTEAKITSAAPSSTGAKT
      -----><-----1-----><-----3-----><
211 SAISQITDGQIQATKAVSEQTENGAAKAFV
      -----4----->
241 GMGAGVVAAMLL

```

Fig. 2-4. Assignment of the sequences of Scp100 peptides to sequences within Tir1p/Srp1p. Amino acid sequences of Tir1p/Srp1p was obtained from the previous report (Kowarski et al., 1995). Scp100 fragments, corresponding to numbered peaks in Fig. 2-3, were sequenced (Table 2-1). Each of the determined sequences was found to correspond to a sequence within Tir1p/Srp1p (double-headed arrows below the amino acid sequence). The asterisk indicates a sequence which was identified after the N-terminus of Scp100 was deblocked with 5-oxoproline aminopeptidase.

Table 2-1. N-terminal amino acid sequences of peptides produced by *Achromobacter* protease I digestion of Scp100

Peptide	Sequence
Scp100	TQDQINELNVILNDVKXXLQEY
1	SSXAAPXXXEAK
2	SLNGDASSSAAPSSSAAPT SXAAPXXXAAPXXXAAXXXEAK
3	ITXAAPXXXGAK
4	TSAIXQI
5	-
6	MLTMVPWYXXRLEPALK
7	SHLQEYISLASDSSSGFSLSSMPAGVLDIGMALASATDDSYTTLYXEVDFAGVXX

Undigested Scp100 was directly sequenced after deblocking with 5-oxoproline aminopeptidase. The sequence of peptide 5 could not be determined.

TIR1/SRP1 は、これまでにグルコース(Marguet et al., 1986))やコールドショック(Kowalski et al., 1995)、嫌気(Donzeau et al., 1996)により誘導される遺伝子として見つかったものである。Tir1p/Srp1p には N 結合糖鎖のコンセンサス配列がない。本研究でも、N-glycosidase と endoglycanase H で反応させることにより、Scp100 に N 糖鎖がないことを確認した。これらの結果は、Scp100 が Tir1p/Srp1p であることを示している。Tir1p/Srp1p の 19 番目のグルタミンは成熟した Tir1p/Srp1p の N 末端と考えられ、これが5-オキシプロリンに修飾されたと考えられた。

(3) Tir1p/Srp1p の静置培養酵母細胞壁からの特異的検出

ピーク1 (Fig. 2-1A)とピーク6 (Fig. 2-1B) (共に 260kDa)を更に逆相クロマトグラフィーで精製した。これらのピークはほとんど単一のピークとして溶出し、アミノ酸配列を解析することで Sed1p であることがわかった。振盪培養のピーク7, 8も解析したが、Tir1p/Srp1p のピークとは一致しなかった。これらのことから、Tir1p/Srp1p は振盪培養した細胞には検出されないことが明らかとなった。

(4) Tir1p/Srp1p の野生株の細胞壁からの検出

野生株の酵母(YPH499)から調製した細胞壁タンパク質をゲルろ過解析したところ、やはり静置培養と振盪培養ではパターンが大きく異なっていた(Fig. 2-5A, B)。静置培養では(Fig. 2-5A)、ピーク9は *mnn9* の Scp100 と同じ溶出位置に観察された。この画分を精製し N 末端を5-オキシプロリンアミノペプチダーゼで脱ブロック化してから配列を解読したところ、TQDQINELNVILNDVKXXLQEYであり、Tir1p/Srp1pの配列と一致した。しかし、振盪培養から得られたピーク10のアミノ酸配列は Sed1p と、ピーク11のアミノ酸配列は Pir2p と、ピーク12のアミノ酸配列は Sed1p と、ピーク13のアミノ酸配列は Tip1p と一致し、どれも Tir1p/Srp1p とは一致しなかった。これらのことから、野生株の酵母でも Tir1p/Srp1p は存在し、静置培養特異的であることが明らかとなった。

(5) *tir1/srp1* 破壊株細胞壁における Scp100 の確認

静置あるいは振盪培養した *tir1/srp1* 破壊株から調製した細胞壁タンパク質のクロマトグラムを Fig. 2-5C と D に示す。Scp100 に一致するピークが静置・振盪培養両方に観察されるが、これらのピークを逆相クロマトグラフィーで解析したところ、全く異なるピークプロファイルが得られた(data not shown)。さらに、これらのピークのアミノ酸配列は Pir2p と一致し、Tir1p/Srp1p とは一致しなかった。これらのことから、*tir1/srp1* 破壊株では Scp100 は存在しておらず、Scp100 は Tir1p/Srp1p であることが明らかとなった。

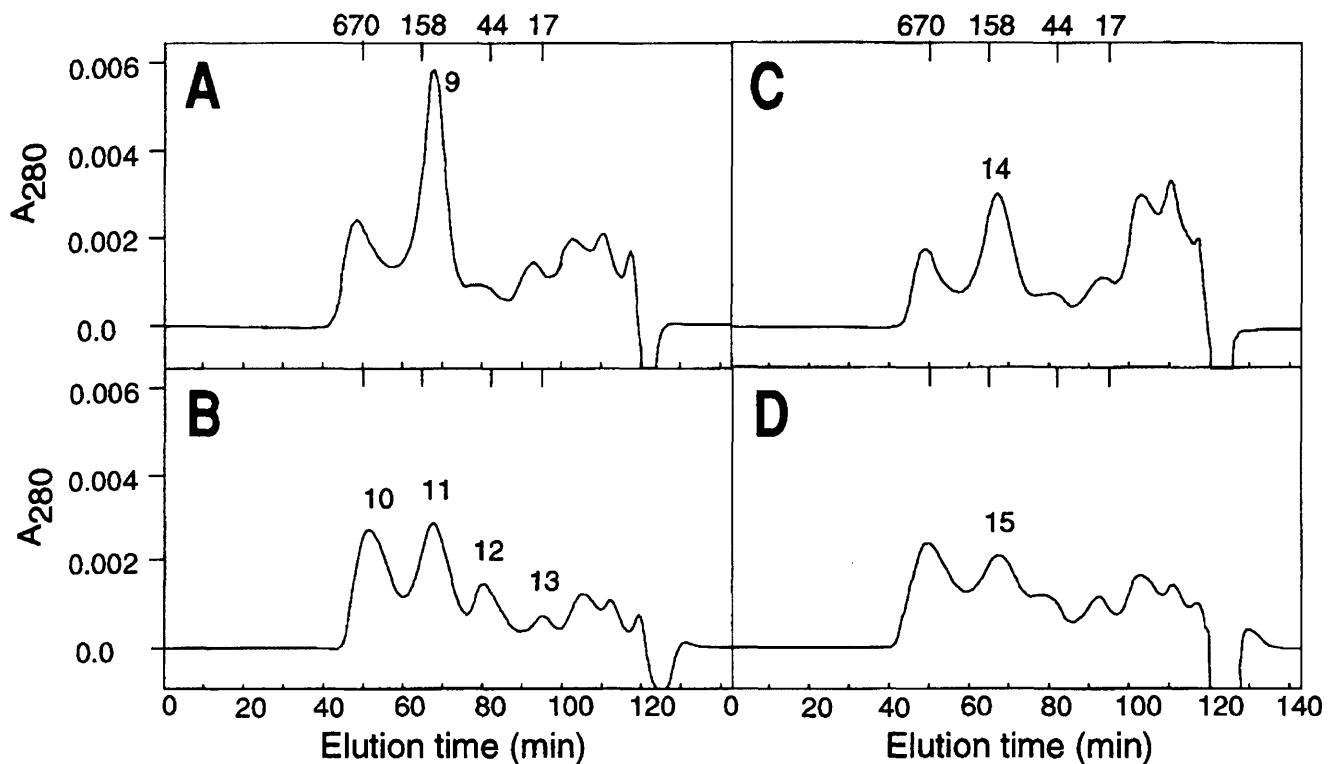


Fig. 2-5. Gel filtration analysis of cell wall proteins from the wild-type and *tir1/srp1* disruptant cells. Yeast cells were cultured in YPAD medium with or without shaking for 30 h. The cell wall was prepared and treated with SDS to remove non-covalently bound proteins and incubated with RPI. The reaction mixture was centrifuged, and the supernatant containing approximately 1 mg protein was fractionated by Superdex 200 gel filtration. Cell wall proteins were prepared from (A) wild-type (YPH499) cells, static culture, (B) wild-type cells, shaking culture, (C) *tir1/srp1* disruptant (ACN6) cells, static culture, (D) *tir1/srp1* disruptant cells, shaking culture. Numbers at the top indicate molecular masses of standard proteins (kDa).

(6) Tir1p/Srp1p のラミナリナーゼによる溶出

静置培養した YPH499 から SDS 処理して得た細胞壁を、 β -1,6-グルカナーゼと β -1,3-グルカナーゼの混合物であり、細胞壁から細胞壁タンパク質を溶出するラミナリナーゼで処理し、ゲルろ過で分画した。Scp100 に相当するピーク(Scp100*)が観察されたので、逆相クロマトグラフィーで精製した。精製した Scp100*は CBB 染色ゲルで単一のバンドになった(Fig. 2-6, lane 4)。Scp100*の N 末端残基を 5-オキシプロリンアミノペプチダーゼで脱ブロック化し、配列を解読した。その結果、TQDQINELNVILVDVKXXLQEY が得られ、Tir1p/Srp1p の配列と一致した。このことから、Tir1p/Srp1p はラミナリナーゼと反応させることで溶出されることが明らかとなり、構造細胞壁タンパク質であることが明確に示された。

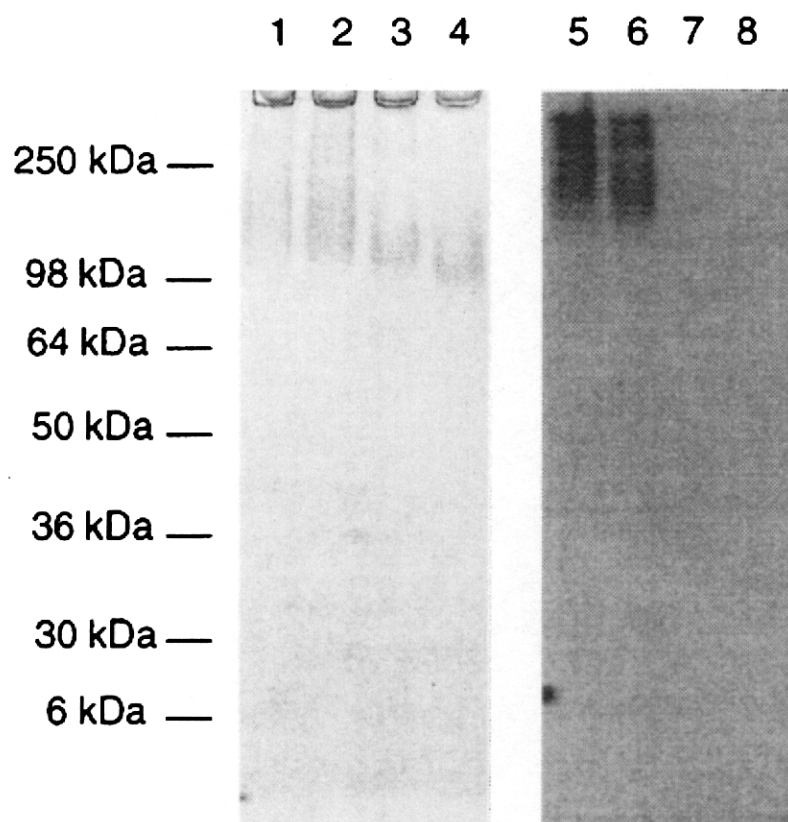


Fig. 2-6. Western blot analysis of Tir1p/Srp1p probed with antiserum to β -1,6-glucan. SDS-treated cell walls were incubated with laminarinase and Tir1p/Srp1p was purified as described in Materials and Methods. The purified Tir1p/Srp1p ($2 \mu\text{g}$) that was prepared by laminarinase treatment (lanes 1-3 and lanes 5-7) or RPI treatment (lanes 4 and 8) was applied to SDS-PAGE (10-20% acrylamide gradient). The gels was stained with Coomassie brilliant blue (lanes 1-4) or transferred to a membrane and probed with antiserum to β -1,6-glucan and secondary antibody to rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase (lanes 5-8). Incubation times of laminarinase were 0.5h (lanes 1 and 5), 4 h (lanes 2 and 6), and 15 h (lanes 3 and 7).

(7) ラミナリナーゼ溶出 Tir1p/Srp1p の β -1,6-グルカン抗血清との反応

Kapteyn らはラミナリナーゼで溶出した細胞壁タンパク質は β -1,6-グルカン抗血清と反応すると報告している(Kapteyn et al., 1996)。SDS 処理した細胞壁をラミナリナーゼで 30 分間、4 時間、15 時間、あるいは RPI で 6 時間反応させ、Tir1p/Srp1p をそれぞれの溶出液からゲルろ過と逆相クロマトグラフィーで精製した。それぞれの精製タンパク質の N 末端は脱ブロック化とシーケンスにより Tir1p/Srp1p であることを確認した。それぞれのタンパク質の 2 μ g を SDS-PAGE に供し、得られたゲルを CBB で染色するか(Fig. 2-6, lane1-4)、あるいは β -1,6-グルカン抗血清でイムノブロットした(Fig. 2-6, lane5-8)。ラミナリナーゼ処理 30 分間、4 時間の試料は β -1,6-グルカン抗血清と強く反応したが、ラミナリナーゼ 15 時間反応サンプルはわずかしら反応しなかった(Fig. 2-6, lane5-8)。30 分間、4 時間、15 時間反応させた試料の分子質量はそれぞれ 150kDa, 120kDa, 105kDa であった。これらのバンドの濃さと分子質量の違いは、ラミナリナーゼ反応時間の長さの違いによる Tir1p/Srp1p 結合グルカンの長さの違いと考えることができる。RPI 処理した Tir1p/Srp1p は抗血清とまったく反応せず(Fig. 2-6, lane 8)、分子質量もラミナリナーゼ処理のものよりも小さかった(Fig. 2-6, lane4)。しかし、これらのタンパク質の N 末端の配列は同一であった。これらの結果は、Tir1p/Srp1p の C 末端には β -1,6-グルカンが結合しており、RPI は細胞壁に結合した Tir1p/Srp1p の C 末端を切断することを示唆している。

(8) ラミナリナーゼ溶出 Tir1p/Srp1p の炭水化物組成解析

ラミナリナーゼで抽出した Tir1p/Srp1p はグルコースを含んでいたが、RPI で抽出した Tir1p/Srp1p はグルコースを含んでいなかった(Fig. 2-7)。すべての画分はマンノースを 1mol のタンパク質あたり 160mol 含んでいた。Tir1p/Srp1p は N 糖鎖結合のコンセンサス配列を持たないことから、これらのマンノースは Tir1p/Srp1p の Ser あるいは Thr に結合していると考えられる。ラミナリナーゼで抽出した Tir1p/Srp1p のグルコース含量はラミナリナーゼの反応時間が増えるに従い減少していた。これらの結果は、Fig. 2-6 の β -1,6-グルカン抗血清を用いた結果と一致するものである。これらの結果は、Tir1p/Srp1p が β -1,6-グルカンに共有結合しており、細胞壁からラミナリナーゼにより溶出されるということを明確に示している。

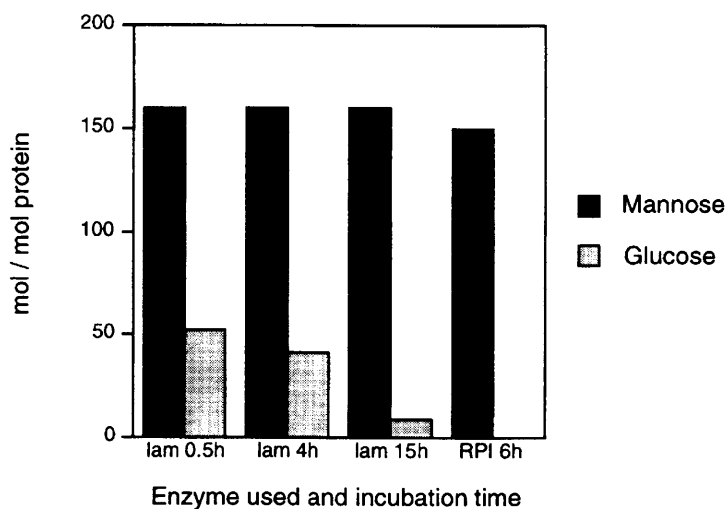


Fig. 2-7. Mannose and glucose composition of Tir1p/Srp1p. Tir1p/Srp1p was prepared by laminarinase (lam) or RPI treatment. Incubation times of enzyme treatments are indicated. The proteins (1nmol) were hydrolyzed in 2M HCl and 2M trifluoroacetic acid at 100°C for 4h. Monosacchride composition was determined by the pyridylation method of Suzuki et al (Suzuki et al., 1991).

(9) *TIR1/SRP1* mRNA の Rox1p による制御

Total cellular RNA を静置あるいは振盪培養の細胞から調製し、*TIR1/SRP1* をプローブにしてノーザンブロット解析を行った。*TIR1/SRP1* mRNA は静置培養の細胞にのみ見出され、振盪培養の細胞には見出されなかった(Fig. 2-8A)。低酸素条件下で発現するいくつかの遺伝子 Rox1p により調節されていることが知られている(Lowry and Zitomer, 1988)。そこで *rox1* 破壊株で *TIR1/SRP1* の発現を調べたところ、*rox1* 破壊株では静置培養のみならず、振盪培養でも *TIR1/SRP1* は発現していた(Fig. 2-8B, lane 2, 4)。これらの結果は、*TIR1/SRP1* は嫌気培養でのみ発現しており、その転写は Rox1p で制御されていることを示している。

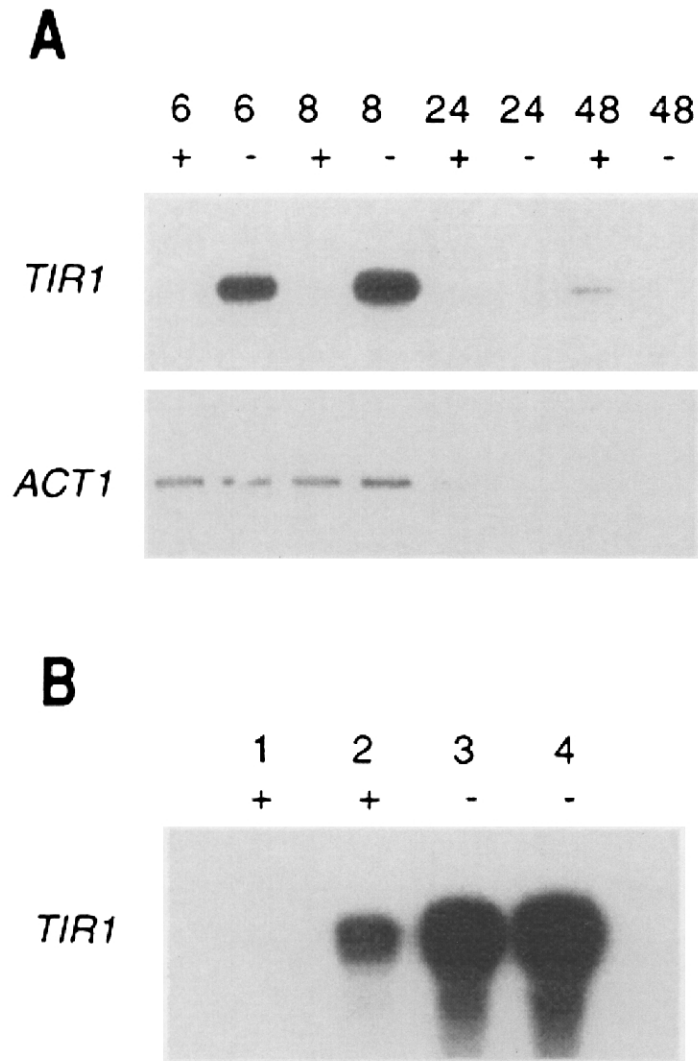


Fig. 2-8. Northern blotting analysis of *TIR1/SRPI*. (A) Wild-type yeast cells (YPH499) were cultured in YPAD medium with (+) or without (-) shaking at 30°C for the indicated time. Total RNA was extracted from the cells and the expression of *TIR1/SRPI* was analyzed by northern blotting. The expression of *ACT1* was also analyzed as a control gene. Top: *TIR1/SRPI*; bottom: *ACT1* as a control gene. Numbers at the top show culture time in hours. (B) Wild-type yeast cells (YPH499, lanes 1 and 3) and *rox1* disruptant cells (KY934, lanes 2 and 4) were cultured in YPAD medium with (+) or without (-) shaking at 30°C for 8 h. Total RNA was extracted from the cells and the expression of *TIR1/SRPI* was analyzed by northern blotting.

4 考察

酵母細胞壁は水に不溶性であることから、細胞壁に共有結合した細胞壁タンパク質を溶出し、精製するために細胞壁溶解酵素が必要である。本研究ではこの目的のために、酵母溶解酵素である RPI (Shimoi et al., 1991a, b, 1992)を用いた。この酵素は、商業的に売られている他の溶解酵素と比べていくつかの利点がある。RPI は RPI 発現プラスミドを形質転換した大腸菌から得られ、プロテアーゼやグルカナーゼなど他の酵素を含まない。RPI は細胞壁タンパク質に特異的であり、反応溶液中の RPI の濃度は 5 μ g/ml と低いことから、細胞壁タンパク質を調製・精製するときに RPI の存在を無視できる。もうひとつの利点は、RPI の基質特異性が脂肪族アミノ酸に限定されている (Shimoi et al., 1991a)ので、抽出されたタンパク質がさらに分解されることがないことである。

これまでに Cwp1p, Cwp2p, Tip1p などの構造細胞壁タンパク質が同定されている (Shimoi et al., 1995; van der Vaart, 1995)が、静置培養特異的細胞壁タンパク質は見出されていない。本章では 100kDa の分子質量を持つ細胞壁タンパク質が静置培養特異的に見出されることを発見し、このタンパク質が *TIR1/SRPI* の遺伝子産物であることを明らかにした。Scp100 のプロテアーゼ消化物から得られたペプチドのすべてが Tir1p/Srp1p のものと一致した。Scp100 の N 末端のアミノ酸配列を N 末端を脱ブロック化した後に解読すると、想定上の成熟 Tir1p/Srp1p の N 末端配列と一致した。さらに、静置培養した *tir1/srp1* 破壊株の細胞壁から RPI により遊離した細胞壁タンパク質の該当するピークのアミノ酸配列は Pir2p と一致し、Tir1p/Srp1p に該当するピークは見出されなかった。Pir2p はその後他のグループにより、確かに細胞壁タンパク質であることが報告されている (Mrsa et al., 1997; Kapteyn et al., 1999)。

TIR1/SRPI はこれまでに、グルコース (Marguet et al., 1988)、コールドショック (Kowalski et al., 1995)、嫌気 (Donzeau et al., 1996)で誘導される遺伝子として同定され

ている。Tir1p/Srp1p はセリン・スレオニンリッチなタンパク質であり、254 アミノ酸からなり、その計算上の分子質量は 24,875Da であり、N 糖鎖結合のコンセンサス配列を持たない。*TIR1/SRPI* のコドンバイアスインデックス(Sharp and Cowe, 1991; Payne and Garrels, 1997)は 0.78 であり、この遺伝子は豊富に発現していることが示唆される。このタンパク質は N 末端と C 末端の両方に疎水性領域を持つことから、細胞膜に GPI アンカー型タンパク質として分泌され、細胞壁に転移されると考えられる(Nuoffer et al., 1991)。

本章で示した結果により、Tir1p/Srp1p が細胞壁に共有結合した構造細胞壁タンパク質であることが明らかとなった。まず、Scp100 は SDS 処理した細胞壁の RPI 抽出液から精製された。別の細胞壁タンパク質である Cwp1p もこの方法で同定された(Shimoi et al., 1995)。次に、Tir1p/Srp1p は細胞壁のラミナリナーゼ消化液からも見出された。3 番目に、ラミナリナーゼ消化液から精製された Tir1p/Srp1p は β -1,6-グルカン抗血清と反応した。4 番目に、ラミナリナーゼ消化液から精製された Tir1p/Srp1p はグルコースを含んでいた。これらの結果は、 β グルカンネットワークに共有結合した、これまで見つかっている細胞壁タンパク質に共通の性質である。Cwp1p, Cwp2p, Tip1p は SDS 処理細胞壁からのラミナリナーゼ抽出液から精製され、これらのタンパク質は β -1,6-グルカン抗体と反応した(van der Vaart et al., 1995)。Tip1p のアミノ酸配列は、Tir1p/Srp1p と類似している(Kowalski et al., 1995)。構造細胞壁タンパク質はグルコースだけでなくマンノースも含んでいることが報告されている(Montijn et al., 1994)。これらの細胞壁タンパク質は N-、C-末端に GPI アンカーの付加のシグナルであると考えられる疎水性領域を持っていることから、GPI アンカー型タンパク質として膜に分泌され、 β -1,3-グルカンに結合した β -1,6-グルカンに転移されるという仮説が考えられている(Lu et al., 1994, 1995)。Tir1p/Srp1p も GPI アンカー型タンパク質であると考えられる(Donzeau et al., 1996)ことから、同じように分泌され細胞壁グルカンにアンカーされていると考えられる。

Donzeau ら(Donzeau et al., 1996)は、Tir1p/Srp1p は細胞壁タンパク質ではなく、細胞膜に結合した GPI アンカー型タンパク質であると主張している。彼らは、エピトープタグを付加した Tir1p/Srp1p が、 β -1,3-グルカナーゼやプロテアーゼ、マンナーゼの混合物である(Kitayama et al., 1982)ザイモリアーゼで処理した細胞壁抽出液からウェスタン解析で見出されなかったとしている。この結果は本研究の結果とは異なるが、ザイモリアーゼに含まれるプロテアーゼの特異性が低いために、Tir1p/Srp1p が分解されてしまったために抗体と反応しなかったのかもしれない。あるいは、彼らの実験では *TIR1/SRP1* を高発現しているために Tir1p/Srp1p が膜に溜まってしまったのかもしれない。いずれにせよ、本研究の結果は、Tir1p/Srp1p が細胞壁タンパク質であることを明確に示している。

TIR1/SRP1 の発現は有酸素培養では厳密に抑制されているが、静置培養のような低酸素条件では誘導されてくる(Fig. 2-8A)。酵母細胞は嫌気培養あるいは低酸素条件では、少ない酸素を利用するために多くの遺伝子を誘導する。事実、酵母細胞はエルゴステロールと不飽和脂肪酸を補強しないと絶対嫌気条件では生育することができない。これらの脂肪の合成には酸素を必要とするからである。低酸素条件で発現するいくつかの遺伝子(*CYC7*, *COX5b*, *ERG11*, *OLE1*, *HEM13*, *ANB1*)は Rox1p repressor で制御されていることが知られている(Zitomer and Lowry, 1992)。本章では *TIR1/SRP1* の発現もまた Rox1p によって制御されていることをノーザン解析で示した(Fig. 2-8B)。Donzeau らは、*TIR1/SRP1* は低酸素で誘導されるが、Rox1p は無関係だとしている(Donzeau et al., 1996)。彼らは *rox1* 破壊株において *TIR1/SRP1* のプロモーター領域を lacZ と連結させレポーターとして用いている。本研究と彼らのデータが異なっていた理由はわからないが、*TIR1/SRP1* のコーディング領域が Rox1p による抑制に関与している可能性がある。Fantino らは *TIR1/SRP1* は downstream activating sequence をコーディング領域内に持ち、Rap1p による転写活性化に関与することを報告している(Fantino et al., 1992)。Rox1p による制御もまた、*TIR1/SRP1* のコーディング領域内の

配列を通して起きるのかもしれない。

TIR1/SRP1 の破壊株には明確な表現型が観察されない(Kowalski et al., 1995)ので、*Tir1p/Srp1p* の機能に関する明確な仮説はない。*tir1/srp1* 破壊株に明確な表現型が見られないのは、細胞壁タンパク質は高度に冗長性があるためだと考えられる。*Tir1p/Srp1p* は *Tir2p* と高い類似性があり(69.9%一致)、*Tip1p* (43.8%)、*Cwp1p* (34.7%) ともある程度の類似性がある。つまり、酵母細胞壁は多種類の細胞壁タンパク質を含むため、ひとつの細胞壁タンパク質がなくなっても他の細胞壁タンパク質により補償されてしまうということである。しかし、環境の酸素濃度の変化が細胞壁タンパク質に劇的な変化をもたらすのは、酵母細胞にとってなんらかの生理学的な要求があるためであり、*Tir1p/Srp1p* は低酸素条件下の酵母細胞でなんらかの役割を果たしていると考えられる。

5 要約

静置培養した *S. cerevisiae* の細胞の主要な細胞壁タンパク質として 100kDa のタンパク質を見出した。このタンパク質は振盪培養の細胞には見出されなかった。このタンパク質のアミノ酸配列は Tir1p/Srp1p のものと一致していた。*TIR1/SRP1* はこれまでにグルコース、コールドショックや嫌気培養で誘導される遺伝子として同定されており、細胞壁タンパク質ではなく細胞膜タンパク質であると信じられてきた。しかしながら、本章では β -1,3-グルカナーゼが細胞壁から Tir1p/Srp1p を溶出すること及び精製した Tir1p/Srp1p が β -1,6-グルカン抗血清と反応し、グルコースを含むことを見出した。これらの結果は、Tir1p/Srp1p が静置培養した酵母細胞における主要な細胞壁タンパク質であり細胞壁に β -1,6-グルカンを通じて結合していることを示唆している。*TIR1/SRP1* mRNA は静置培養でのみ転写され、その転写は Rox1p により制御されていた。

第3章 定常培養期の主要な酵母細胞壁タンパク質 Sed1p の同定と解析

1 緒言

前章では、酵母溶解菌 *Rarobacter facitabidus* 由来のプロテアーゼ RPI を用いて静置培養特異的細胞壁タンパク質を見出し、Tir1p/Srp1p と同定した。一方、振盪培養で酵母を培養したときにも、酵母細胞壁の厚さは前期と後期で大きく異なることが報告されている(de Nobel et al., 1990)。そこで本章では、同じく RPI を用いて、振盪培養で培養した酵母で酵母細胞壁がどのように変化するかを調べた。その結果、振盪培養の後期で多く発現する細胞壁タンパク質を見出し、Sed1p と同定した。このタンパク質を欠損した細胞では、細胞壁が弱くなっており、細胞壁溶解酵素ザイモリアーゼに対して弱くなっていた。これらのことから、Sed1p は振盪培養の後期において、酵母に剛性を与える構造タンパク質であることが明らかとなった。

2 実験方法

(1) 酵母の株と培地

酵母の株としては YPH499 (MATa *ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ 63 his3-Δ 200 leu2-Δ 1*)、YPH501 (MATa/α *ura3-52/ura3-52 lys2-801/lys2-801 ade2-101/ade2-101 trp1-Δ 63/trp1-Δ 63 his3-Δ 200/his3-Δ 200 leu2-Δ 1/ leu2-Δ 1*)(Sikorski and Hieter, 1989)と LB2134-3B (MATa, *mnn9*) (Ballou et al., 1980)を用いた。一般の酵母の培養には YPAD (1% yeast extract, 2% bactopectone, 40 μg/ml adenine, 2% glucose)、*mnn9* 変異株には 10% (mass/volume)のソルビトールを添加した YPAD を用いた。

(2) 細胞壁の調製と RPI 処理

前章の方法に従った。

(3) Sed1p の精製

5ml の RPI あるいはラミナリナーゼで処理した細胞壁抽出液を Superdex200 ゲルろ過クロマトグラフィー(Pharmacia; 26mm×600mm)に供した。溶出液は 150mM NaCl と 0.05% アジ化ナトリウムを含む 10mM Tris/HCl pH 8.0、流速は 1ml/min とした。クロマトグラフィーを繰り返し、Scp100 を含む画分を集めて凍結乾燥した。凍結乾燥した試料を 0.05% トリフルオロ酢酸に溶解し、TSKgel phenyl-5PW RP 逆相カラム(Tosoh)に供し、0.05% トリフルオロ酢酸を含む 5-80%アセトニトリルの linear gradient で溶出した。Sed1p を含む主要なピークを集めて凍結乾燥した。

(4) Sed1p のアミノ酸配列の解析

精製したタンパク質(2nmol)を 10pmol の *Achromobacter* protease I (Takara)を含む 10 mM Tris/HCl (pH 9.0)に溶かし、37°Cで 15 時間反応させた。0.1%のトリフルオロ酢酸で反応を停止した後、生じたペプチドを逆相クロマトグラフィー(μ ボンダスフェアー C₁₈ 100Å, Waters)に供し、0.1% トリフルオロ酢酸の存在下、5から40%のアセトニトリルの直線勾配で溶出した。生じたペプチドのアミノ酸配列は自動化プロテインシーケンサー(491 Procise, Perkin Elmer)によりエドマン分解法により決定した。また、精製したタンパク質(500pmol)をプロソープメンブレン(Perkin Elmer)にブロットし、0.5% (wt/v)ポリビニルピロリドン40と 100mM の酢酸で 37°Cにおいて 30 分間反応させた。この膜を蒸留水で 10 回洗い、50mM リン酸ナトリウム (pH 7.0)、10mM dithiothreitol の存在下、10mU/ml の pyroglutamate aminopeptidase (Takara)と 50°Cで 5 時間反応させた。この膜を蒸留水で 3 回洗いプロテインシーケンサーに供した。

(5) PNGase F 分解反応

精製タンパク質(10 μ g)を 0.5%SDS 存在下、10 分間煮沸して変性させた。1/10 容量の 0.5M リン酸ナトリウムバッファー(pH 7.5)と 10% Nonidet P-40 を加え、5,000U の peptide N-glycosidase F (PNGase F; New England Biolabs)で 37°Cにおいて 15 時間処理した。それぞれのサンプルを SDS-PAGE に供し、糖タンパク質を、コンカナバリン A をプローブとしたウェスタン解析で検出した。

(6) SDS-PAGE とウェスタン解析

前章の方法によった。

(7) *SED1* 遺伝子の破壊

SED1 遺伝子を 5'-TCATCTGTGTACACTAAGTAA-3' と 5'-AGTCCATAACAAGGAAGGTAA-3'をプライマーとしてPCRで増幅した。このPCR生産物を *EcoRI* と *BamHI* で切断し、3.3kb の *EcoRI/BamHI* 断片を *EcoRI* と *BamHI* で切断した pUC-118 に組み込んだ。できたプラスミド(pUC-*SED1*)を *KpnI* で切断し、T4 DNA polymerase で blunt end 化し、選択可能なマーカーである *LEU2* (Rothstein, 1991)を含む pUC-*LEU2*を *BamHI* で切断し、blunt end 化したものに組み込んだ。*SED1* 遺伝子の ORF の中央に *LEU2* 遺伝子を含む生じたプラスミドを *EcoRI* と *BamHI* で切断・線状化し、YPH501 に形質転換した(Becker et al., 1991)。LEU+の表現型を持つ形質転換体を回収し、ふたつの染色体上の *SED1* のうちひとつが破壊されていることをサザン解析により確認した。染色体 DNA をこれまで報告されている方法(Phillippsen et al., 1991)により単離し、*Hind III* で切断し、電気泳動し、膜に転写し、³²P でラベルしたプローブ(pUC-*SED1* の 3.3kb の *EcoRI/BamHI* 断片)で、5×SSPE、5×Denhart's 溶液、0.5% SDS, 20 μ g の超音波処理した salmon sperm DNA を含むハイブリダイゼーションバッファーの存在下、ハイブリダイズした。なお、1×SSPE は 0.18M

NaCl, 10mM NaH₂PO₄, 1mM EDTA (pH 7.7)である。65°Cで 20 分間、2×SSPE-0.1% SDS で 2 回洗った後、膜を X-ray film に暴露した。*SEDI/Δ*sed1*::LEU2*を持つ形質転換体を孢子形成させ、孢子を分離した。典型的な四分子から染色体 DNA を調製し、サザン解析により *SEDI* の破壊を確認した。

(8) Sed1p のエピトープ付加

pUC-*SEDI* より調製した一本鎖 DNA を、インフルエンザウィルス HA 12CA5 エピトープ

(5'-TCGACTACTTTGGCCTACCCATACGACGTCCCAGACTACGCTCAATTTTCCAACAGT-3':挿入された配列はアンダーラインされたところ) (Kolodziej et al., 1991) を含む合成オリゴヌクレオチドとアニールさせ、以後の反応は専用の反応キット(アマシヤム)により行った *Escherichia coli* JM109 を反応溶液で形質転換し、挿入された配列に含まれる *Aat*II 切断サイトのあるプラスミドを含む大腸菌クローンを検索した。候補となるプラスミドの DNA を 5'-CTTCTTCCACCGATGTCACCTT-3'をプライマーとしてシーケンスし、想定した mutation が挿入されているかを確認した。HA の挿入されたプラスミドの *Eco*RI/*Bam*HI 断片を *Eco*RI と *Bam*HI で切断した pRS426 に組み込み、生じたプラスミド(pRS426-HA::*SEDI*)で YPH499 を形質転換した。

(9) ノーザン解析

前章の方法で行った。

(10) ザイモリアーゼ感受性

酵母細胞を 30°Cで 6 時間と 48 時間、振盪培養した。細胞を回収し、水で洗い、0.1M のリン酸ナトリウムバッファー(pH 7.5)に懸濁した。20 μg/ml のザイモリアーゼ 20T (Seikagaku Kogyo)を加え、660nm における光学的密度を経時的に測定した。

3 結果

(1)細胞壁タンパク質のゲルろ過解析

最初に糖鎖不全 *mnn9* 変異株を細胞壁タンパク質の解析に用いた。上述したように、*mnn9* 変異株は N 糖鎖の外鎖を欠損しているため、細胞壁タンパク質の解析を容易にすることができる(Ballou et al., 1980)。SDS 抽出細胞壁から RPI により細胞壁タンパク質を遊離させ、ゲルろ過により解析した。同じサンプルを SDS-PAGE と CBB 染色で解析すると、Cwp1p だけを明確に観察することができた。しかし、ゲルろ過解析ではいくつかのタンパク質を観察できた (Fig. 3-1A)。これらの中で最も大きく最も多量にある、260kDa のタンパク質を詳しく解析することにした。

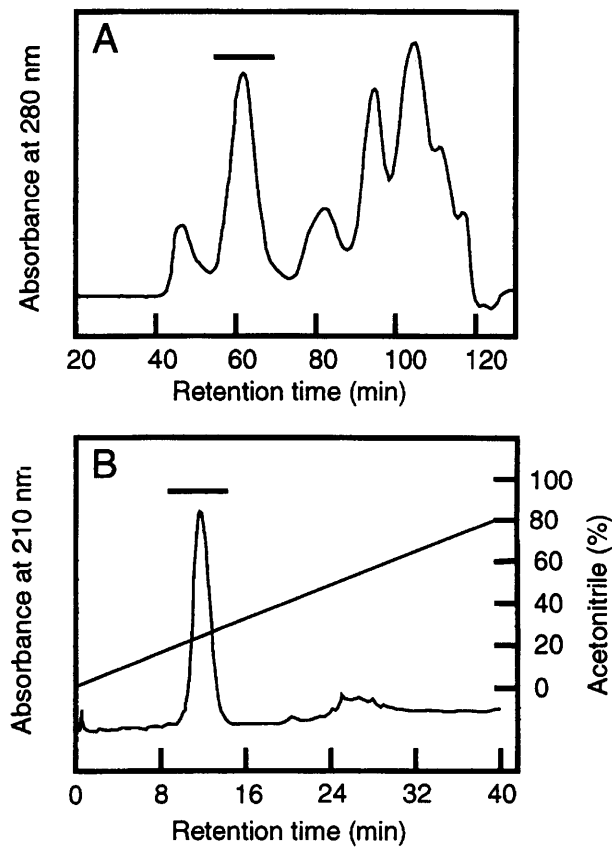


Fig. 3-1. Purification of a major cell wall protein by gel filtration and reverse-phase chromatographies. (A) Yeast cells (*mnn9*) were cultured in YPAD medium with shaking for 30 h. The cell wall fraction was prepared and treated with SDS to remove noncovalently bound proteins. Cell wall proteins were solubilized with RPI. After centrifugation, 5ml of the supernatant was applied to a Superdex 200 gel filtration column. The column was eluted isocratically with 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 150 mM NaCl and 0.05% sodium azide with a flow rate of 1ml/min. The protein peak indicated by the bar was collected and lyophilized. (B) The collected peak in panel A was further purified by TSKgel Phenyl-5PW RP reverse-phase chromatography with a linear gradient of 5 to 80% acetonitrile in 0.05% trifluoroacetic acid. The protein peak indicated by the bar (gp260) was collected and lyophilized.

(2) Sed1p の精製と同定

このピークのフラクションを精製するため逆相クロマトグラフィーに供した(Fig. 3-1B)。このクロマトグラムはほとんど単一のピークになった。このピークを集め、このタンパク質の 10 μ g を SDS-PAGE に供した。ゲルを CBB で染色すると、バンドは観察されなかった。そこで、電気泳動が終わった後ゲルを膜に転写しコンカナバリン A でプローブした。その結果、単一だが、270kDa から 150kDa に分布するとてもスミアなバンドが観察された (Fig. 3-6, lane 1)。gp260 の N 末端のアミノ酸配列は、恐らく N 末端のブロックのためにシークエンスすることができなかった。そこで、gp260 を *Achromobacter* protease I により切断し、生じたペプチドを逆相クロマトグラフィーで精製した(Fig. 3-2)。精製したペプチドのアミノ酸配列を解析し、Fig. 3-3A に示すとおり決定した。他のピークのアミノ酸配列は決定することができなかった。gp260 自体も pyroglutamate aminopeptidase で脱ブロック化し、配列を決定した (Fig. 3-3A)。決定されたすべてのアミノ酸配列は Sed1p のものと相同性があったことから、gp260 は *SED1* の遺伝子産物であることが示唆された。

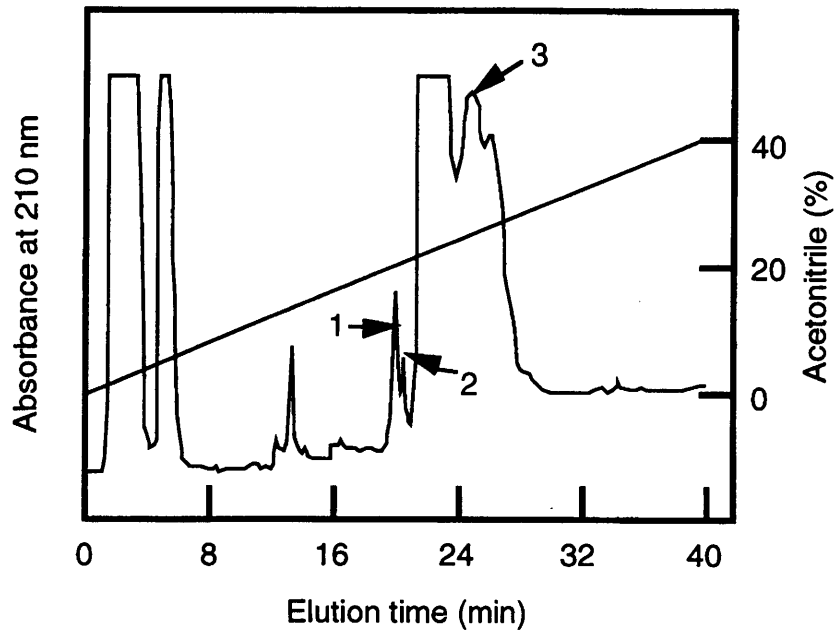


Fig. 3-2. Reverse-phase chromatography of hydrolysates of gp260 with *Achromobacter* protease I. After gp260 and *Achromobacter* protease I (200:1 by molar ratio) were incubated at 37°C for 15 h, the hydrolysate was fractionated with a μ Bondasphere C18 reverse-phase chromatography column with a linear gradient of 5 to 40% acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid. The numbered peaks were collected, and their amino acid sequences were determined.

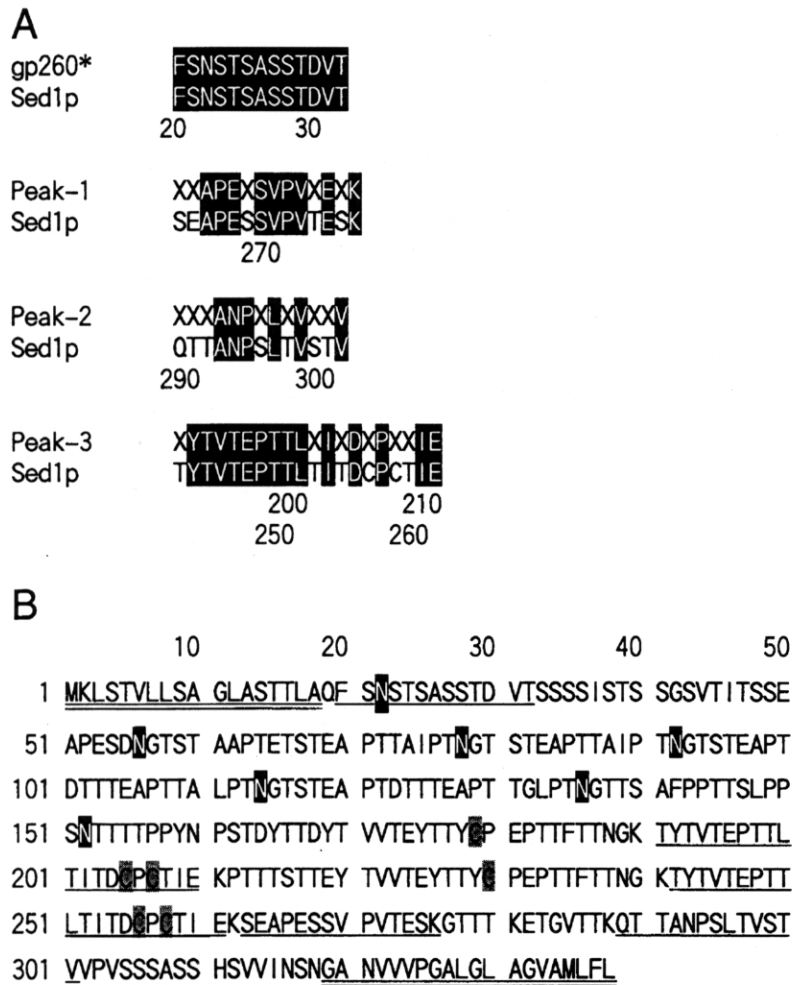


Fig. 3-3. Identification of gp260 as Sed1p. (A) Comparison of N-terminal and internal amino acid sequences of the numbered peaks in Fig. 3-2 were determined with a protein sequencer. X, unidentified amino acid; *, sequence identified after the N-terminus of gp260 was deblocked with pyroglutamate aminopeptidase. Numbers indicate the residue numbers of Sed1p. (B) Amino acid sequences of Sed1p obtained from the literature. Underlines indicate sequences that were obtained from sequencing gp260 and its fragments. Sequences with double underlines are terminal hydrophobic sequences. Putative N-glycosylation sites are designated as shadowed letters. Cysteine residues are shaded.

(3) *SED1* の遺伝子破壊

SED1 はこれまでに、分泌経路からの小胞体内腔のタンパク質の回収に欠陥を持つ *erd2* 変異のマルチコピーサプレッサーとして見出されている(Hardwick et al., 1992)。gp260 が *SED1* の遺伝子産物であることを確認するため、*SED1* の遺伝子破壊を行って細胞壁タンパク質を解析した。*SED1* (240bp) の coding region の一部を破壊し、*LEU2* 遺伝子と置換した(Fig. 3-4A)。

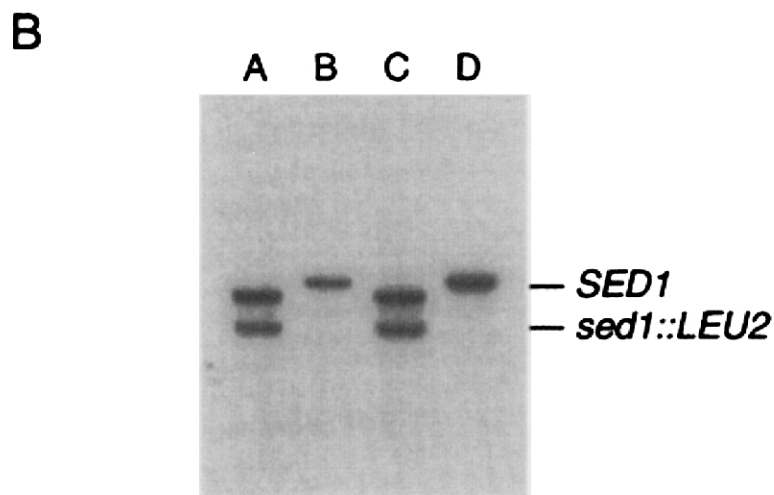
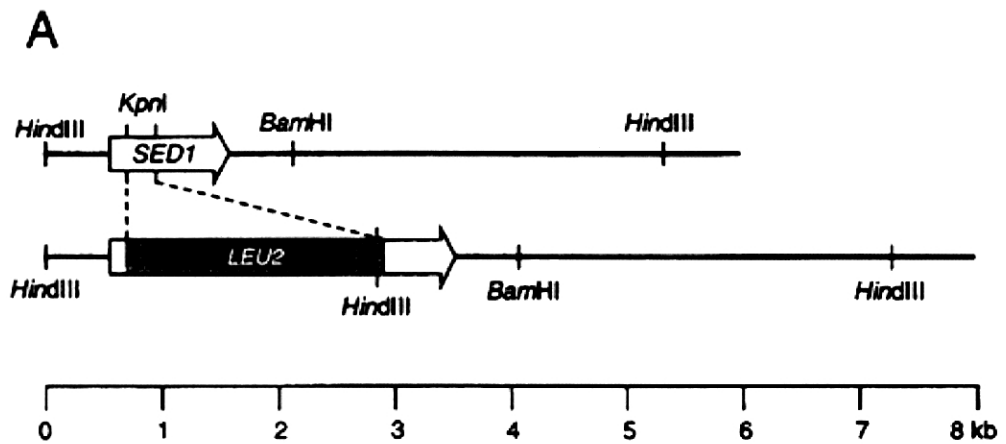


Fig. 3-4. Gene disruption of *SED1* gene. (A) Construction of *sed1::LEU2*. The 240-bp *KpnI* fragment of *SED1* was replaced with a DNA fragment containing *LEU2* as a selectable marker. The linearized DNA containing *sed1::LEU2* was used to transform a diploid strain (YPH501). (B) Southern blot analysis to confirm the gene disruption. Chromosomal DNAs from four haploid strains (A to D) from a representative ascus after sporulation of *SED1/sed1::LEU2* heterozygous diploid were digested with *HindIII* and probed with a 2.2-kb *EcoRI-BamHI* fragment of pUC-*SED1*.

得られた *sed1::LEU2* の DNA を野生二倍体株を形質転換するのに用いた。異型接合性の *SED1/sed1::LEU2* 二倍体株を孢子形成させ、四分子を分離した。すべての四分子は YPAD 培地上で生育可能であったことから、以前の報告どおり、*SED1* は栄養豊富な培地上では生育に必須でないと考えられた。典型的な子嚢から分離された4つの一倍体細胞をサザン解析すると、4つの一倍体細胞のうち2つが *sed1::LEU2* 対立遺伝子を持っていた(Fig. 3-4B)。同じ4つの一倍体細胞から RPI 処理により得た細胞壁タンパク質をゲルろ過により解析した(Fig. 3-5)。 *sed1* 対立遺伝子を持った細胞からのサンプルでは、主要なピークは *mnn9* 変異株よりも早く溶出した(Fig. 3-5B, D)。この 300kDa の分子質量を持つタンパク質を逆相クロマトグラフィーにより精製し、脱ブロック化の後アミノ酸配列を解析して、Sed1p であることを確認した。この Sed1p に一致したピークは、*sed1::LEU2* 対立遺伝子を持った細胞からのサンプルでは観察されなかった。これらの結果は、Sed1p が RPI により溶出される主要な細胞壁タンパク質であることを明確に示している。

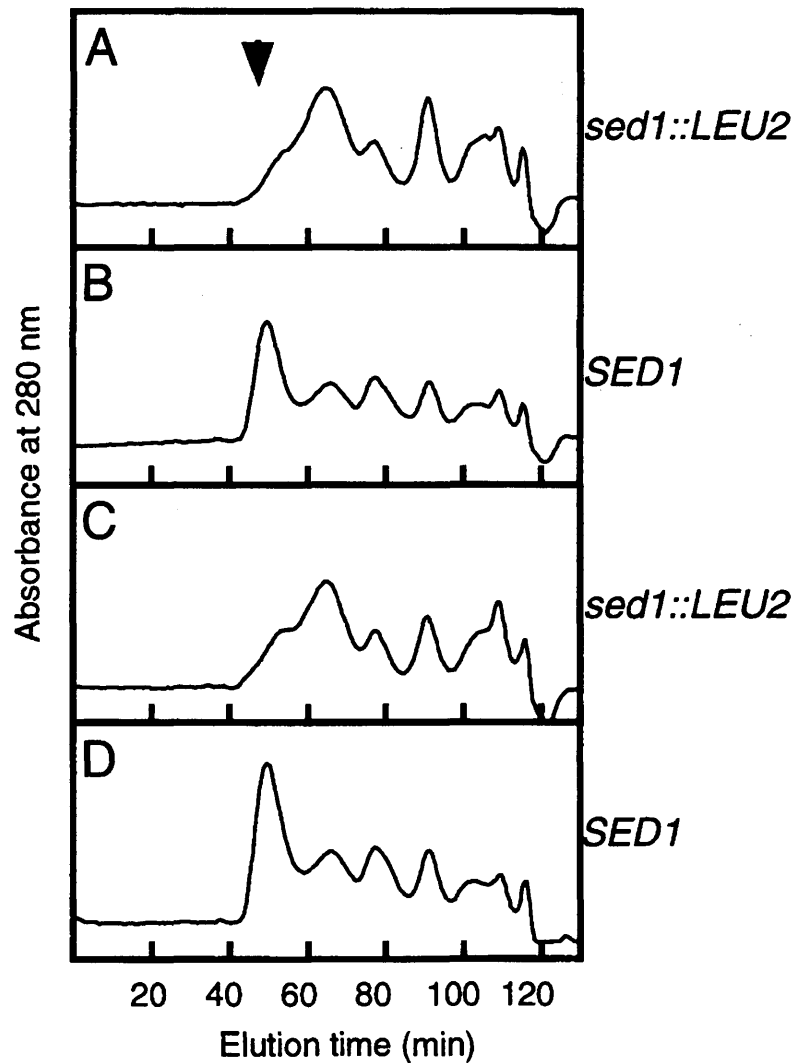


Fig. 3-5. Analysis of cell wall proteins prepared from wild-type and *sed1* disruptant cells. The same haploid strains (A to D) used for the Southern blot (Fig. 3-4B) were cultured in YPAD medium with shaking at 30°C for 30 h. The cell wall fractions were prepared and treated with SDS to remove noncovalently bound proteins. Cell wall proteins were solubilized with RPI, and the supernatants were analyzed by Supredex 200 gel filtration chromatography. The column was eluted isocratically with 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 150 mM NaCl and 0.05% sodium azide with a flow rate of 1ml/min. The arrow indicates the position of Sed1p in all panels.

(4) Sed1p に付加した糖の解析

次に Sed1p がどのような糖の付加を受けているかを調べた。Sed1p のアミノ酸配列を Fig. 3-3B に示している。Sed1p は 338 アミノ酸から構成され、計算上の分子質量は 34,429Da である。Sed1p はスレオニン(29.3%)、セリン(12.4%)を豊富に含む。Sed1p は他の細胞壁タンパク質と同じように、GPI アンカー付加のための想定上のシグナル配列(Shimoi et al., 1995; van der Vaart et al., 1995)を含んでいる。しかし、Cwp1p や Tip1p, Tir1p/Srp1p などの他の細胞壁タンパク質とは異なり、Sed1p は4つのシステイン残基と 6 個の想定上の N 糖鎖結合部位を持つ。SED1 遺伝子のコドンバイアスは 0.705(Sharp and Cowe, 1991; Payne and Garrels, 1997)であることから、豊富に発現していることが考えられる。Sed1p の一次構造から、N 糖鎖と O 糖鎖の両方が結合していることが考えられる。そこで、*mnn9*破壊株と野生株から精製した Sed1p を、N 糖鎖を除去する PNGase F で処理した後 SDS-PAGE で解析したところ(Fig. 3-6)、野生株から得た Sed1p はとてもスミアなバンドになり、*mnn9*変異株のものよりも遅く泳動した。野生株と *mnn9* 変異株の両方で、PNGase F で処理すると分子質量の減少が認められた。特筆すべきなのは、PNGase F で処理した後も Sed1p のバンドはスミアだったことである。Sed1p にはセリンとスレオニンが豊富に含まれているので、O 糖鎖の多様性によるのだと考えられる。Sed1p のタンパク質部分の分子質量が 34,429Da しかないことを考えると、Sed1p には N 糖鎖と O 糖鎖が豊富に結合していると考えられる。

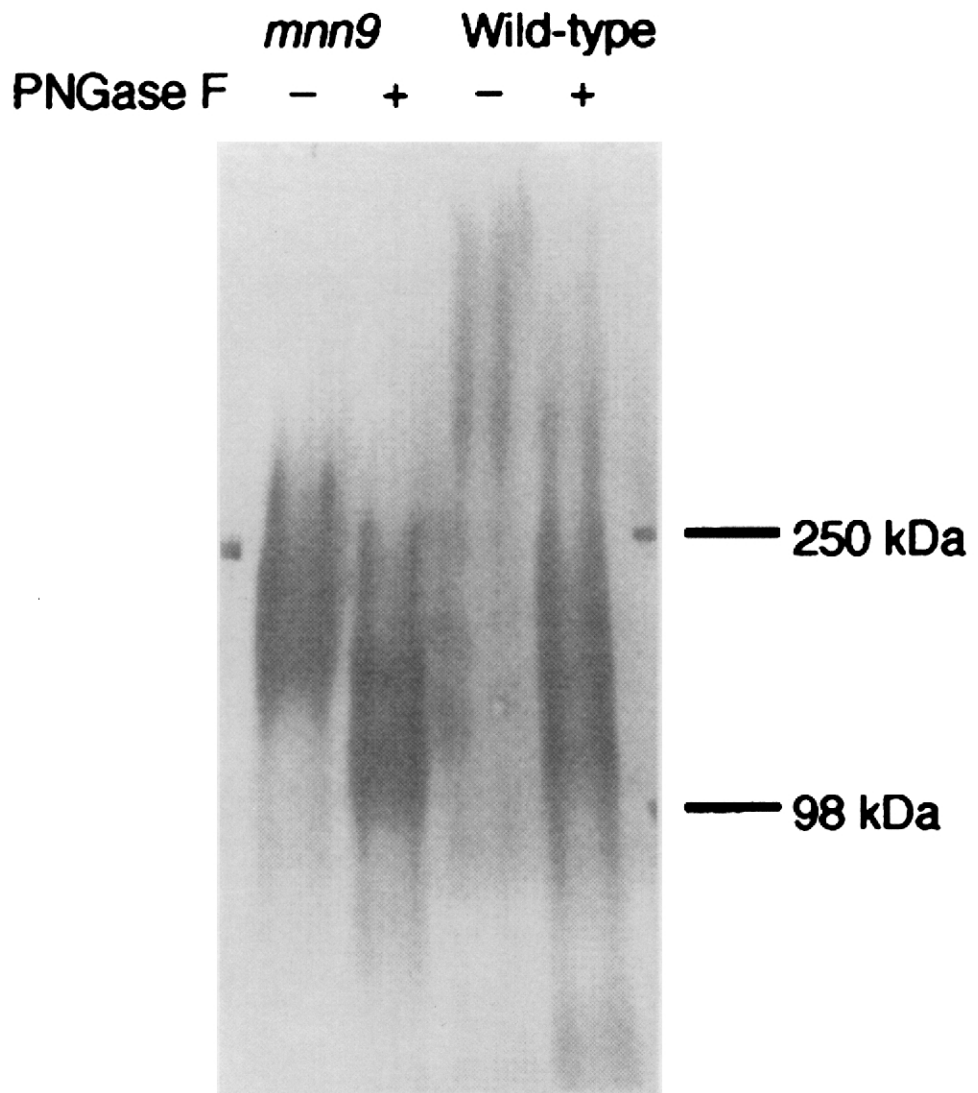


Fig. 3-6. N-glycosylation of Sed1p. The *mnn9* and wild-type cells (YPH499) were cultured in YPAD medium with shaking at 30°C for 30 h. The cell wall fractions were prepared and treated with SDS to remove noncovalently bound proteins. Cell wall proteins were solubilized with RPI, and the Sed1p fractions were purified by Supredex 200 gel filtration and TSKgel Phenyl-5PW RP reverse-phase chromatographies. The purified Sed1ps (10 μ g) were treated with PNGase F as described in Materials and Methods. Untreated and PNGase F-treated Sed1ps from the *mnn9* and wild-type cells were analyzed by SDS-PAGE (5 to 20% gel).

(5) Sed1p のラミナリナーゼによる溶出

Sed1p の局在を調べるため、インフルエンザウイルス HA 12CA5 エピトープを *SEDI* 遺伝子の想定上のシグナルペプチドをコードする配列のすぐ後ろに、オリゴヌクレオチドを利用した *in vitro* mutagenesis により導入した。HA タグを付加した Sed1p を含む酵母細胞から細胞壁を調製し、細胞壁の RPI 抽出物から Sed1p を精製した。このタンパク質の N 末端のアミノ酸配列は YPYDVDPDYAQFSNSTSASSTDV であり、HA タグが正常に成熟 Sed1p の N 末端に挿入され、また Sed1p の合成には影響がなかったことがわかった。HA タグを付加した Sed1p はラミナリナーゼ処理した細胞壁からも 600 から 300kDa の分子質量を持ったスミアなバンドとして観察された(Fig. 3-7, LAM)。一方、RPI で抽出した HA タグを付加した Sed1p はより早く泳動した(Fig. 3-7, RPI)。これらの結果から、Sed1p が構造細胞壁マンナンタンパク質であり、細胞壁グルカンに共有結合しており、SDS 処理した細胞壁からラミナリナーゼや RPI で切断することで遊離することがわかった。

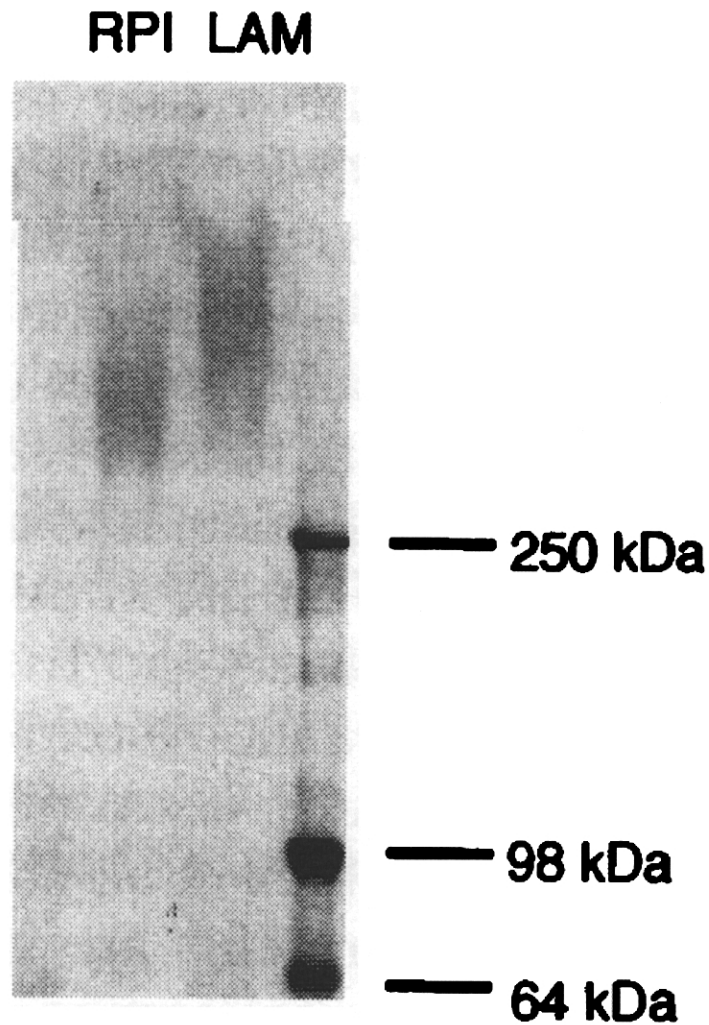


Fig. 3-7. Analysis of HA-tagged Sed1p. The cells containing pRS426-HA::SED1 were cultured in YPAD medium with shaking at 30°C for 30 h. The cell wall fraction was prepared and treated with SDS to remove noncovalently bound proteins. Cell wall proteins were solubilized with RPI or laminarinase and applied to SDS-PAGE (5 to 20 % gel). Proteins were transferred to a membrane and probed with anti-HA monoclonal antibody and anti-mouse immunoglobulin G secondary antibody conjugated with alkaline phosphatase. RPI, HA-Sed1p obtained by RPI extraction; LAM, HA-Sed1p obtained by laminarinase extraction.

(6) *SED1* の定常期の細胞での高発現

次に Sed1p が増殖に応じてどのように制御されているかを調べた。さまざまな増殖時間での Sed1p の量を SDS 処理した細胞壁の RPI 抽出物のゲルろ過解析により調べたところ、Sed1p は対数増殖期には比較的少ないが、培養時間に応じて増加することがわかった(Fig. 3-8)。細胞が定常期に入る培養 48 時間では、Sed1p は最も量の多い細胞壁タンパク質となった。定常期においては、Sed1p は RPI 抽出細胞壁タンパク質の約 30%を占めた。

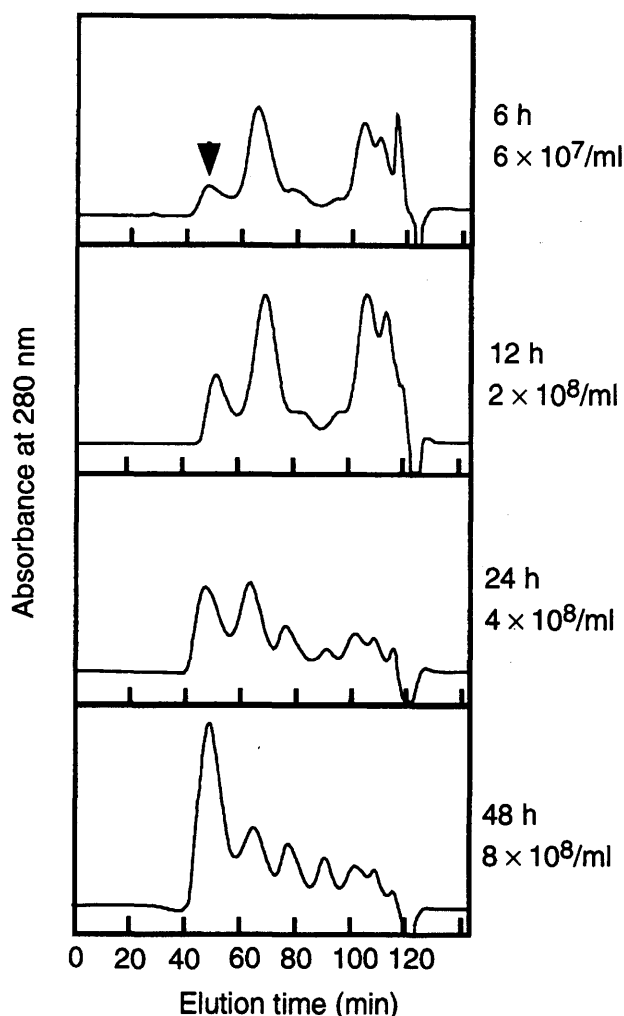


Fig. 3-8. Analysis of cell wal proteins with various culture times. Yeast cells (YPH499) were cultured in 1,000ml of YPAD medium with shaking at 30°C for the indicated culture time. The cell wall fractions were prepared and treated with SDS to remove noncovalently bound proteins. Cell wall proteins were solubilized with RPI, and the supernatants were analyzed by Supredex 200 gel filtration chromatography. The column was eluted isocratically with 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 150 mM NaCl and 0.05% sodium azide with a flow rate of 1ml/min. Each analyzed sample contained cell wal proteins extracted from approximately 2×10^{10} cells for each culture time. Cell numbers for each of the culture times are also indicated.

ノーザン解析によっても、*SEDI* の発現を調べた(Fig. 3-9)。*SEDI* の発現は対数増殖期には穏やかだったが、定常期(48時間)には6時間のときの2.7倍に増加した。定常期においては、*ACT1* の発現は弱くなった。*SEDI* は振盪培養でも静置培養でも発現していた。*TIR1/SRP1* で見られたような酸素依存的な発現抑制は見られなかった。この結果から、Sed1pは振盪培養の定常期に高発現していることが明らかとなった。

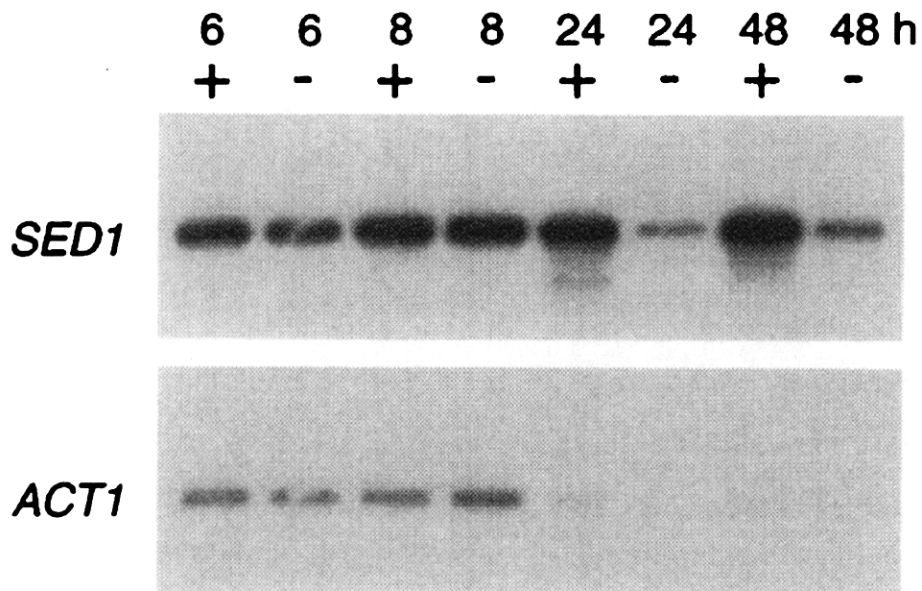


Fig. 3-9. Northern blotting analysis of *SEDI*. Wild-type yeast cells (YPH499) were cultured in YPAD medium with (+) or without (-) shaking at 30°C for the indicated time. Total RNA was extracted from the cells, and the expression of *SEDI* was analyzed by Northern blotting. The expression of *ACT1* as a control gene was also analyzed. Numbers above panel show culture times in hours.

(7) *sed1* 破壊株の定常期におけるザイモリアーゼ感受性

定常期の細胞は、細胞壁が対数増殖期の細胞よりも厚くなるため、溶解酵素に対して耐性になることが知られている(de Nobel et al., 1990)。定常期において *SED1* の発現が増加することから、*sed1* 破壊株の溶解酵素耐性を調べた。Fig. 3-4B のサザン解析で使ったのと同じ、異型接合性の二倍体の破壊株(*SED1/sed1::LEU2*)の代表的な子囊から分離した4つの一倍体株を培養してザイモリアーゼ感受性を調べた。対数増殖期においては、破壊株と野生株の感受性は同じレベルであった(Fig. 3-10A)。しかし、定常期においては、破壊株は野生株よりも感受性になっていた(Fig. 3-10B)。これらの結果は、Sed1p が定常期におけるザイモリアーゼ感受性への耐性に必要であることを示している。

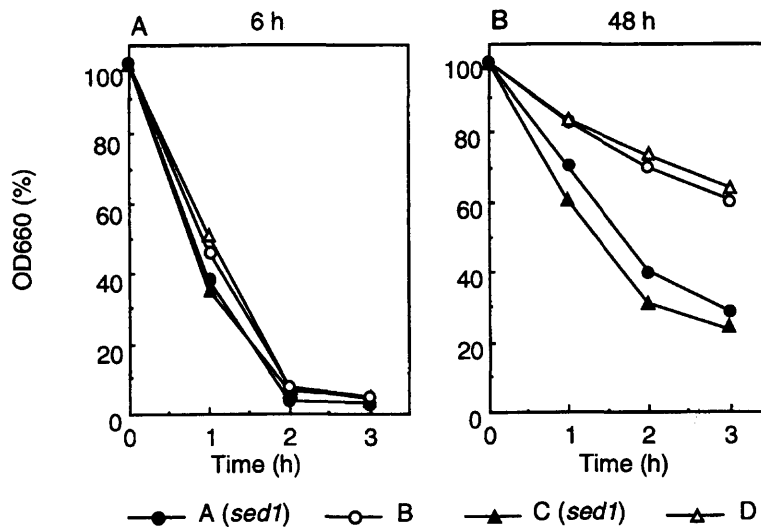


Fig. 3-10. Zymolyase sensitivity of the *sed1* disruptant. The same haploid strains (A [*sed1::LEU2*], B [*SED1*], C [*sed1::LEU2*], and D [*SED1*]) used for the Southern Blot (Fig. 3-4B) were cultured in YPAD medium with shaking at 30°C for 6 or 48 h. Cells were harvested, washed with water, and suspended in 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.5). After addition of 20 μ g of Zymolyase 20T per ml, the optical density of 660nm (OD660) was measured periodically.

4 考察

この研究では、細胞壁タンパク質を検出するのに SDS-PAGE ではなくゲルろ過を用いた。この解析システムを用いて、振盪培養した細胞から主要な細胞壁タンパク質を分離し、Sed1p であると同定した。細胞壁タンパク質は糖を多量に付加しており CBB で染まりにくい(Frevert et al., 1985)ため、適切な抗体がなくては Cwp1p 以外の細胞壁タンパク質を SDS-PAGE で検出することは難しい。このゲルろ過法を用いることにより、前章で Tir1p/Srp1p を同定した。Fig. 3-5 で示したように、ゲルろ過は細胞壁タンパク質の解析プロファイルを得るのに適している。

Sed1p の C 末端は、heterologous reporter タンパク質と融合することにより細胞壁にターゲットされるという報告がこれまでにされていた(van der Vaart et al., 1996)。しかしながら、実際に Sed1p が細胞壁グルカンに結合した構造細胞壁タンパク質であるという証拠はこれまでなかった。この章では、Sed1p が細胞壁タンパク質であることを明確に示すことができた。まず、Sed1p は SDS 抽出細胞壁から、マンナンタンパク質特異的なプロテアーゼである RPI により溶出された。二つ目に、HA タグを付加した Sed1p は SDS 処理細胞壁から、 β -1,3-グルカナーゼと β -1,6-グルカナーゼの混合物であるラミナリナーゼにより溶出された。

Sed1p の N 末端と C 末端には疎水性領域があることから、Sed1p は GPI アンカータンパク質であると考えられる。GPI アンカー付加サイトの解析によれば、*S. cerevisiae* の GPI アンカー付加サイト(ω)は Asn か Gly であり(Nuoffer et al., 1991, 1993)、 $\omega+1$ と $\omega+2$ のアミノ酸は小さなアミノ酸に限ることがわかっている。このルールに従えば、Sed1p では Asn318 がもっとも可能性のある GPI アンカー付加部位である。GPI アンカー付加シグナルを持った細胞壁タンパク質はまず細胞膜に GPI アンカー型として分泌され、細胞壁の β -1,6-グルカン部位に結合するというモデルが提唱されている(Lu et al., 1994, 1995; Kapteyn et al., 1996)。しかし、細胞膜から細胞壁への転移の詳細なメ

カニズムはわかっていない。GPI アンカータンパク質を細胞膜と細胞壁に仕分けするメカニズムもまた未知である。

N 末端と C 末端を欠損した成熟型の Sed1p のタンパク質部分の分子質量は計算上は 30,819Da である。ゲルろ過や SDS-PAGE で分子質量がこれより大きかったのは、糖鎖のためだと考えられる。しかし、高度の糖鎖付加されたタンパク質は電気泳動上は変則的な性質を示すため、正確な分子質量は別の方法で決めなくてはならない。SDS-PAGE から判断される分子質量では、タンパク質部分は野生株では5%、N 糖鎖の外鎖が欠損した *mnn9* 変異株でも 14%に過ぎない(Ballou et al., 1980)。Sed1p は非常に多くの糖を含むので、典型的なマンナンタンパク質(Shibata et al., 1983; Frevet et al., 1985)であると考えられる。

Cwp1p, Cwp2p, Tip1p, Tir1p/Srp1p などのこれまでに同定された(Shimoi et al., 1995; van der Vaart et al., 1995)他の細胞壁タンパク質は O 糖鎖結合タンパク質であった。Cwp1p にはひとつだけ想定上の N 糖鎖結合配列があるが、PNGaseF で処理して SDS-PAGE で分子質量を見たところ N 糖鎖は付加していないようである(Shimoi et al., 1995)。一方、Sed1p には7個の想定上の N 糖鎖結合部位があり、N 糖鎖が多量に結合している。さらに、他の細胞壁タンパク質はセリンが豊富なのに、Sed1p はスレオニンが豊富である。Sed1p には4つのシステイン残基もあるが、他の細胞壁タンパク質にはシステイン残基はない。従って、Sed1p は N 糖鎖を持ち、システイン残基を通じて他のタンパク質と結合しうることから、他の細胞壁タンパク質とは異なるグループに所属すると考えられる。

SEDI は定常期に多く誘導され、定常期での最も多量な細胞壁タンパク質をコードしている(Fig. 3-8, 9)。これまで酵母は定常期には細胞壁が厚くなり対数増殖期の細胞よりも強くなることが知られている(Valentin et al., 1987; de Nobel et al., 1990)。プロテアーゼで細胞壁のマンナンタンパク質層を破壊することは、グルカナーゼでグルカン層を消化する前には必須であることから、厚いマンナンタンパク質層がグルカン層を

溶解酵素から守っていると考えられる。確かに、定常期の *sed1* 破壊株は野生株よりもザイモリアーゼに感受性であった。この結果は Sed1p が主要な細胞壁タンパク質であるということとも一致する。しかし *sed1* 破壊株は定常期において対数増殖期よりもザイモリアーゼに耐性であった。このことは、定常期における酵母細胞がザイモリアーゼ耐性になる要因は *SED1* の高発現だけではないことを示している。定常期に発現している他の遺伝子がザイモリアーゼ耐性に関わっているかもしれない。*TIP1* は定常期に発現する(Kondo et al., 1991)のでそのような遺伝子のひとつかもしれない。*FKS2* は、グルカン合成酵素の遺伝子であるが、栄養欠乏時にその発現が誘導されるので、それらの遺伝子のひとつかもしれない(Mazur et al., 1995)。

定常期の細胞は熱やエタノール、溶解酵素などの環境のストレスに強いことが知られている(Werner-Washburne et al., 1996)。定常期の細胞のストレス耐性にはさまざまな因子が関与している。もっとも知られているメカニズムは、利用可能な栄養が枯渇したときに起こる general stress response である。定常期にグルコースの濃度が下がると、RAS-cyclic AMP シグナル伝達経路を通じて protein kinase A の不活性化が起こる(Thevelein et al., 1994)。Protein kinase A が不活性化されることにより、多数のストレス応答エレメント(STRE)に支配された遺伝子の発現が活性化される。これらの遺伝子は、そのプロモーター領域に STRE と呼ばれる特徴的なシス因子を持っている(CCCCT あるいは AGGGG)(Varela et al., 1995)。実際に、*SED1* のプロモーター領域にも翻訳開始コドンから-84 塩基のところ AGGG が、-912 のところに CCCCT がある。従って、定常期に栄養の欠乏が起こることによって STRE を介した *SED1* の転写の活性化が起こると考えられる。

結論としては、Sed1p は定常期の細胞において主要な構造細胞壁タンパク質であり、定常期における細胞の防衛メカニズムに重要な役割を持っている。前章と本章で述べた研究により、酵母の構造細胞壁タンパク質は環境の変化に応じてダイナミックに変わることが明らかとなった。酵母の増殖やストレス応答における細胞壁の再構成をより

明らかにするためには、細胞壁タンパク質やグルカン、キチンの合成がどのようにコントロールされているかを調べる必要があるだろう。

5 要約

酵母溶解酵素である *Rarobacter* protease I と反応させることにより、振盪培養した酵母の細胞壁から 260kDa の構造細胞壁タンパク質を精製した。アミノ酸配列の解析から、このタンパク質は *SED1* 遺伝子の産物であることが明らかとなった。*SED1* はこれまでに、分泌経路からの小胞体内腔のタンパク質の回収に欠陥を持つ *erd2* 変異のマルチコピーサプレッサーとして見出されている。Sed1p はセリンとスレオニンに富み、他の細胞壁タンパク質と同じように GPI アンカーを付加するための想定上のシグナル配列を含んでいる。しかしながら、他の細胞壁タンパク質とは異なり、Sed1p は6個のシステインと7個の想定上の N 糖鎖結合部位を含むことから、細胞壁タンパク質の新しいファミリーに属することが示唆された。エピトープタグを付加した Sed1p はイムノブロット解析で細胞壁の β -1,3-グルカナーゼ抽出画分に見出されたことから、Sed1p はグルカナーゼで抽出可能な細胞壁タンパク質であると考えられた。*SED1* mRNA の発現は定常培養期で増加し、それに付随して細胞壁の Sed1p 含量も増加していた。*SED1* を破壊しても、対数増殖期の細胞には効果がなかったが、定常培養期の細胞は溶解酵素感受性になった。これらの結果は、Sed1p が定常培養期における主要な構造細胞壁タンパク質のひとつであり、定常培養期における溶解酵素に対する耐性に必要であることを示している。

第4章 酵母細胞壁生合成に関与する *DCW1* (*YKL046c*)と *DFG5* の同定と解析

1 緒言

第2章と第3章では、酵母細胞壁形成に関わるタンパク質として、構造細胞壁タンパク質に着目して研究を行った成果を記述した。第4章と第5章では、細胞壁形成に関わるタンパク質として、バクテリアの α -1,6-mannanase と相同性を持つタンパク質をコードする酵母の遺伝子について解析した研究について記述する。

GPI アンカー型細胞壁タンパク質は、GPI アンカー型タンパク質として合成され分泌経路を経て膜まで到達した後、細胞壁の β -1,6-グルカンに転移すると考えられている(Lu et al., 1994, 1995)。この過程で GPI アンカーはグルコサミンとホスファチジルイノシトールを失い、ホスフォエタノールアミンと数個のマンノースだけが残った状態でタンパク質と β -1,6-グルカンを結合させる(Kollar et al., 1997; Fujii et al., 1999)。この転移に関わるタンパク質を明らかにするため、GPI アンカー部分のマンノースとグルコサミンの間を切断する酵素が β -1,6-グルカンへの転移を行っているかと仮定した。バクテリアで見出された α -1,6-mannanase の遺伝子 *aman6* (Maruyama and Nakajima, 2000)とホモロジーのある ORF を酵母のゲノムデータベースから検索したところ、互いに相同な遺伝子である *YKL046c* と *DFG5* を見出した。*YKL046c* はこれまでに系統的な遺伝子破壊の実験から、破壊株が致死でないということだけが報告されている(Winzeler et al., 1999; Wysocki et al., 1999)が、その他の情報は報告されていない。*dfg5* 破壊株も致死ではないとして報告されており(Mosch and Fink, 1997; Winzeler et al., 1999; Wysocki et al., 1999)、またその破壊株は糸状成長に欠損があることが報告されている(Mosch and Fink, 1997)。本章ではこれらの遺伝子とその遺伝子産物について調べた結果について記述する。

2 実験方法

(1) 酵母の株と培養条件

酵母の株として用いたものは Table. 4-1 に示した。酵母の株は 30°C で3つのタイプの培地で培養した。YPAD (1% yeast extract, 2% bactopectone, 40 μ g/ml adenine, 2% glucose)か、YPAGal (1% yeast extract, 2% bactopectone, 40 μ g/ml adenine, 2% galactose)、CSM (0.67% yeast nitrogen base without amino acids (Difco), 0.01% adenine sulfate, 0.2% complete supplement mixture without amino acids (BIO101), 2% グルコース)である。CSM で除いたアミノ酸は本文に示してあり、糖は場合によっては 2%グルコースの代わりにガラクトースを用いた。大腸菌 JM109 はプラスミド DNA を調製するのに、DM1 は非メチル化プラスミド DNA を調製するのに用いた。大腸菌は形質転換体を選択するため、37°C で 100 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 培地で培養した。5-fluoroorotic acid (5-FOA)耐性株を選択するために、0.67%bacto-yeast nitrogen base, 0.2% complete supplement mixture without uracil (BIO101), 2%グルコース、50 μ g/ml uracil、0.1% 5-FOA と 2%寒天を用いた。5-fluoroanthranilic acid (5-FAA)耐性株を選択するためには、0.67%bacto-yeast nitrogen base, 0.2% complete supplement mixture without tryptophan (BIO101), 2%グルコース、100 μ g/ml tryptophan、0.05% 5-FAA と 2%寒天を培地として用いた。

Table 4-1. Yeast strains used in this chapter

Strain	Genotype	Source
YPH499	<i>MATa ura3 lys2 ade2 trp1 his3 leu2</i>	Sikorski and Hieter, 1989
YPH500	<i>MATα ura3 lys2 ade2 trp1 his3 leu2</i>	Sikorski and Hieter, 1989
50C	<i>MATa dcw1::HIS3</i> in YPH499	This work
51C	<i>MATα dcw1::HIS3</i> in YPH500	This work
52F	<i>MATa dfg5::HIS3</i> in YPH499	This work
53FC	<i>MATa/α DCW1/dcw1::HIS3 DFG5/dfg5::HIS3</i> in YPH499/YPH500	This work
54F	<i>MATa/α DCW1/ dcw1::HIS3 DFG5/dfg5::HIS3</i> pRS416Y in YPH499/YPH500	This work
55FCY	<i>MATa dcw1::HIS3 dfg5::HIS3</i> pRS424Y in YPH499/YPH500	This work
56FCF	<i>MATa dcw1::HIS3 dfg5::HIS3</i> pYC2D in YPH499/YPH500	This work
57S	<i>MATa dcw1::HIS3</i> pRS416 in YPH499	This work
58SY	<i>MATa dcw1::HIS3</i> pRS416Y in YPH499	This work
59SHY	<i>MATa dcw1::HIS3</i> pRS416H in YPH499	This work
60MHY	<i>MATa dcw1::HIS3</i> pRS426H in YPH499	This work

Table 4-2. Primers used in this chapter

<u>Name</u>	<u>nucleotide sequence (5'-3')</u>
YKL046c-1	TTCTGAGCTTTCTTTCTTTTCAGTCTGTTTTAAAAACGAACACATAAAACTCTTGGCCTCCTCTAG
YKL046c-2	TTTTTTCATTTTTCATTTATGGAAATGTTAAGCTTTCATAAGTTCTGCATCGTTCAGAATGACACG
YKL046c-3	TCTTTTGGACTGCCTGAACAT
YKL046c-4	GCACTGGTGAACAAAACAAA
XBAIHA-FW	CCCTCTAGATTACCCATACGATGTTCTGA
XBAIHA-RV	CCCTCTAGAAGAGCGTAATCTGGAACGTCA
DFG5-1	TGTTATATAGGACGAACAAATTAGAACGAAATCATATCCAGAACGCAGATCTCTTGGCCTCCTCTAG
DFG5-2	GCCTAAATATTAGAATAACAATAAAATTTTTTGGAGCCTAGTTTGACACATTCGTTTCAGAATGACACG
DFG5-3	ATGCGAAAGATGGTTGGATAA
DFG5-4	TTGCATTGATTTTCTTTAGCC
DFG5-5	CCCGGATCCATGATCGTCAATATTAGTGCG
DFG5-6	CCCGTCGACTTAACCTTTCTTAATGTTAAATT

Table 4-3. Plasmids used in this chapter

Plasmid	Marker	Relevant characteristics	Source
pRS416	<i>URA3</i>		Sikorski and Hieter, 1989
pRS426	<i>URA3</i>		Sikorski and Hieter, 1989
pRS424	<i>TRP1</i>		Sikorski and Hieter, 1989
pRS416D	<i>URA3</i>	pRS416 containing <i>DFG5</i>	This work
pRS416Y	<i>URA3</i>	pRS416 containing <i>YKL046c</i>	This work
pRS424Y	<i>TRP1</i>	pRS424 containing <i>YKL046c</i>	This work
pYC2/CT	<i>URA3</i>		Invitrogen
pYC2D	<i>URA3</i>	pYC2/CT containing <i>DFG5</i> under the control of the <i>GAL1</i> promoter	This work
pRS416H	<i>URA3</i>	pRS416 containing 3×HA-tagged <i>YKL046c</i>	This work
pRS426H	<i>URA3</i>	pRS426 containing 3×HA -tagged <i>YKL046c</i>	This work

(2) *YKL046c* と *DFG5* の破壊

遺伝子破壊はワンステップ遺伝子置換法(Baudin et al., 1993)で行った。この実験で使った PCR プライマーとプラスミドは Table. 4-2 と 4-3 に示すとおりである。*YKL046c* の ORF の 5' と 3' の隣接する領域に挟まれた *HIS3* マーカーを含む断片をプライマー YKL046c-1, -2 を使って増幅した。同じように、*DFG5* の ORF の 5' と 3' の隣接する領域に挟まれた *HIS3* マーカーを含む断片をプライマー DFG5-1, -2 を使って増幅した。YPH499 を *ykl046c::HIS3* で形質転換し(50C)、YPH500 を *ykl046c::HIS3* で形質転換し(51C)、あるいは YPH499 を *dfg5::HIS3* で形質転換した(52F)。遺伝子が破壊されていることを、プライマー YKL046c-3, -4 あるいは DFG5-3, -4 を使った PCR で確認した。51C と 52F を交配し異型接合性の二倍体株として用いた(*YKL046c/ykl046c, DFG5/dfg5*) (53FC)。

(3) プラスミドの構築

プライマーDFG5-3,-4 を使って PCR で *DFG5* を含む断片を増幅した。この断片を *Sma*I 切断 pRS416 に組み込み pRS416D を得た。*DFG5* の ORF を DFG5-5,-6 で増幅した。増幅断片と pYC2/CT (Invitrogen) を *Bam*HI と *Xho*I で切断し、ライゲーションして pYC2D を得た。*YKL046c* の ORF を含む断片を YKL046c-3, -4 をプライマーとして PCR 増幅し、*Sma*I 切断 pRS424 に組み込んで pRS424Y を得た。同じ断片を *Xba*I サイトをつぶした pRS416 の *Sma*I サイトに組み込み pRS416Y を得た。Influenza virus haemagglutinin (HA) の 3 回繰り返しの配列 (5'-TACCATACGATGTTCCCTGATATGCGGGCTATCCCTATGACGTCCCGGACT ATGCAGGATCCTATCCATATGACGTTCCAGATTACGCT-3') を XBAIHA-FW と XBAIHARV をプライマーとして PCR 増幅し、得た増幅断片と pRS416Y を *Xba*I で切断してライゲーションし pRS416H を得た。このプラスミドを *Eco*RI と *Sac*I で切断してサブクローニングし、*Eco*RI と *Sac*I で切断した pRS426 に組み込んで pRS426H を得た。

(4) ザイモリアーゼ感受性試験

細胞を 30°C において 48 時間 YPAD で静置培養し 3,000g で 5 分間遠心し沈殿を一回蒸留水で洗い 25 μ g/ml のザイモリアーゼ 20T (Seikagaku Kogyo) と 10% エタノールを含む 5ml の 0.1M リン酸バッファー (pH 7.5) に懸濁した。30°C で automatic absorbance recorder (Advantec toyo) を用いて OD₆₆₀ の吸光度を経時的に 500 分間モニタした。

(5) 培養上清の Cwp1p の解析

YPH499、50C、52F の細胞は 5ml の YPAD で 30°C において 48 時間前培養した。0.2ml の培養液を取って 5ml の新たな YPAD に接種し OD₆₆₀ が約 1 になるまで培養した。56FCF の細胞は YPAGal で 30°C において 48 時間培養し、培養液 0.2ml を 5ml の新たな YPAGal か YPAD に接種し、30°C で 15 時間培養した。培養液上清 10 μ l を

Cwp1p に対する抗体(Shimoi et al., 1995)を用いてウェスタン解析した。

(6) ガラクトースで制御された細胞の解析

56FCF の細胞を 5ml のガラクトースを含む CSM-URA 培地で 30°Cにおいて 48 時間培養し、この培養液 0.2ml を 5ml の新たなガラクトースあるいはグルコースを含む CSM-URA 培地に接種して 30°Cで 15 時間培養した。細胞を数秒間超音波処理し、10,000g で 1 分間遠心し、1ml の蒸留水で 2 回洗い、0.8ml の蒸留水に懸濁し、0.2ml の 1%カルコフロールホワイトに混ぜ、室温で暗いところに 5 分間置き、数秒間超音波処理し、微分干渉対照顕微鏡あるいは蛍光顕微鏡で観察した(Nikon, Eclipse 600、1000 倍)。Forward light scatter は FACS (Coulter, EPICS ELITE) で測定した(Howlett et al., 1999)。

(7) 炭水化物の解析

炭水化物の解析は基本的に Ram らの方法(Ram et al., 1998)によった。56FCF の細胞を 5ml の YPAGal で 30°Cにおいて 48 時間培養し、培養液 0.2ml を 5ml の新たな YPAGal あるいは YPAD に接種し、30°Cで 15 時間培養した。細胞を 6,000g で 5 分間遠心し、一回蒸留水で洗い、細胞壁を第 2 章の方法により調製した。この細胞壁を 1M トリフルオロ酢酸 (TFA)に懸濁し、100°Cで 4 時間反応させ、evaporate し、100 μ l の蒸留水に懸濁し、10 μ m のフィルター (Millipore) でろ過した。このろ過液の炭水化物含量をフェノール硫酸法(Dubois et al., 1951)で測定し、5nmol に相当する炭水化物を Carbopac PA1 を使った Dionex carbohydrate analysis system (Hartland et al., 1996) により解析した。

(8) Dcw1p-HA の脱グリコシル化

Dcw1p-HA に N 糖鎖が結合しているかを調べるため、59SHY の細胞を 5ml の

CSM-URA で 30°Cにおいて 48 時間培養した。培養液 0.2ml を新たな 5ml の CSM-URA に接種し、30°Cで OD₆₆₀ が1-2になるまで培養した。細胞を 3,000g で 5 分間遠心し、一回蒸留水で洗い、LY バッファー(50mM Tris-HCl, pH 7.5, 5mM EDTA, 150mM NaCl, protease inhibitor Complete (Roche Diagnostics))に懸濁し、上記の方法によりガラスビーズで破碎した。破碎液を 200g で1分間遠心し、上清を集めて 10,000g で 20 分間遠心した。沈殿は膜画分を含むことを確認した。膜画分を 100 μ l の LY バッファーに懸濁し、この液の 10 μ l を 5 μ l の endoglycosydase H あるいは N-glycanase (Takara)、5 μ l の NE バッファーと 30 μ l の蒸留水と混ぜて 37°Cにおいて一晩反応させ、5 μ l の endoglycosydase H あるいは N-glycanase を追加で加えてさらに 37°Cにおいて 1 時間反応させた。

(9) Dcw1p-HA の PI-PLC と TritonX-100 処理

Dcw1p が膜に結合しているかどうかを調べるため、59SHY の膜画分をバッファーA (20mM Tris-HCl, pH 7.5, 2mM EDTA, 1mM DTT)あるいは TritonX-100 バッファー (20mM Tris-HCl, pH 7.5, 2mM EDTA, 1mM DTT, 2% TritonX-100)、ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C (PI-PLC)バッファー(20mM Tris-HCl, pH 7.5, 2mM EDTA, 1mM DTT, 50U/ml PI-PLC from *Bacillus cereus* (Sigma))に懸濁し、37°Cにおいて 2 時間反応させ、10,000g で 20 分間遠心した。

(10) 細胞壁画分のラミナリナーゼ処理

上記の方法で調製した 59SHY の細胞壁(5×10^5 細胞に相当)を 100mM 酢酸ナトリウム, pH 5.5, 1mM EDTA, 1mM PMSF, protease inhibitor Complete (Roche Diagnostics)と 250mU/ml のラミナリナーゼ(Sigma)の入った液に懸濁し、37°Cで 1 時間反応させ、250mU/ml のラミナリナーゼを追加で加えてさらに 1 時間 37°Cにおいて反応させた。

(11) ウェスタンブロット解析

第 1 章の方法に従った。

(12) Dcw1p の間接抗体蛍光法

58SY、59SHY、60MHY の細胞を 5ml の CSM-URA で 30°C において 48 時間培養し、培養液 0.2ml を新たな 5ml の CSM-URA に接種して OD₆₆₀ が約 1 になるまで 30°C で培養した。ホルムアルデヒドを最終濃度で 4% になるように培養液に加え、30°C で 1 時間培養した。この細胞を SHA バッファー (1M sorbitol, 0.1M Na-Hepes, pH 7.5, 5mM NaN₃) に懸濁し、約 5×10^7 個の細胞を 20U/ml の Quantazyme (Quantum)、0.2% メルカプトエタノールを加えてトータル 100 μ l の容量で 30°C において一時間反応させた。次に細胞を PBS-BSA (10mM グリシンと 0.1% BSA を含む PBS) に懸濁して 30°C で 10 分間反応させ、マウスモノクローナル HA 抗体 (PBS-BSA に 300 倍希釈、Roche Diagnostcs) で 30°C において 12 時間反応させ、5ml の PBS-BSA で 3 回洗い、FITC 結合の抗マウス IgG 抗体 (Gibco BRL; PBS-BSA に 500 倍希釈) に懸濁して 30°C で 12 時間反応させ、5ml の PBS-BSA で 3 回洗い、1ml の 1 μ g/ml 4',6-diamidino-2-phenyl-indole (DAPI) に懸濁し、10 分間室温で暗い場所に置き、PBS で洗い、ポリリジンでコートしたスライド (Biocoat, Becton Dickinson) に固定化し、微分干渉対照と蛍光顕微鏡で観察した。

3 結果

(1) データベース調査

Bacillus circulans の α -1,6-mannanase の遺伝子(*aman6*) (Maruyama and Nakajima, 2000)と相同性のある ORF を酵母ゲノムデータベースから検索したところ、その遺伝子産物のアミノ酸配列が互いに 54%一致する *YKL046c* と *DFG5* を見出した。アミノ酸レベルでは、*aman6* 遺伝子産物との一致度は Ykl046cp で 22%、Dfg5p で 26%とあまり高くはなかったが、他の真菌に *YKL046c* と高い相同性を持つ多数のパラログがある (Coutinho and Henrissat, 1999)ことから、真菌の生理に重要な遺伝子であると考え、解析を行うこととした。Ykl046cp と Dfg5p の Hydropathy plot を調べたところ、N 末端と C 末端に疎水性の高い領域があることから、GPI アンカー型タンパク質である可能性が考えられた。Ykl046cp と Dfg5p の maximum matching を行ったところ、推定 ω サイトの N 末端側に Ykl046cp では 2 個、Dfg5p では 3 個の塩基性アミノ酸があり (Caro et al., 1997)、かつ ω -4, -5 に V や I がなく、 ω -2 に V, Y がない (Fig. 4-1) ことから、細胞壁タンパク質ではなく、細胞膜タンパク質である (Hamada et al., 1998, 1999) ことが考えられた。これらの性質は Gas1p (Fankhauser and Conzelmann, 1991; Nuoffer et al., 1991, Popolo and Vai, 1999) や Kre1p (Roemer and Bussey., 1995) などの他の GPI アンカー型膜タンパク質と同じであることから、Ykl046cp と Dfg5p は GPI アンカー型膜タンパク質であると考えられた。

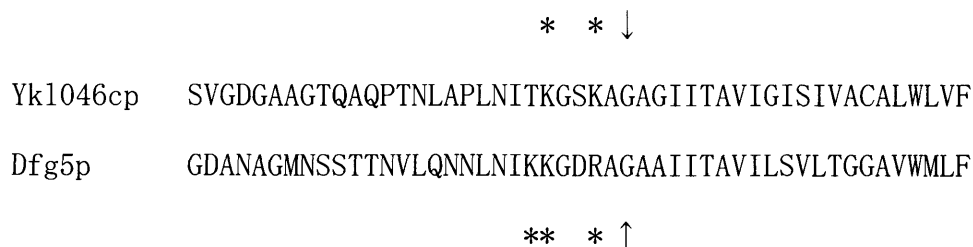


Fig. 4-1. C-terminal amino acid sequences of Ykl046cp and Dfg5p. Arrows show the putative ω -sites, and asterisks show the basic amino acids on the N-terminal side of the ω -site.

(2) *dfg5*破壊株及び *ykl046c*破壊株のザイモリアーゼ感受性の解析

Ykl046cp と *Dfg5p* の役割を明らかにするため、*ykl046c* (51C)と *dfg5* (52F)の破壊株を作成しその性質を調べた。これまでの報告(Mosch and Fink, 1997; Winzeler et al., 1999; Wysocki et al., 1999)どおり、両方の破壊株は YPAD や CSM の培地では正常に成長し正常の形態を持っていた。これらの破壊株をカルコフロールホワイトテストや酸性フォスファターゼの輸送テストで調べても、細胞壁が弱いとする有意な結果は得られなかった。しかし、ザイモリアーゼ感受性を調べると、*dfg5* 破壊株は野生株とは有意に変わらなかったものの、*ykl046c* 破壊株は野生株よりも有意に高感受性であった (Fig. 4-2A)。この結果は、*ykl046c* 破壊株は細胞壁が弱くなっていることを示していることから、*YKL046c*を *DCW1* (Defective Cell Wall)と名づけた。

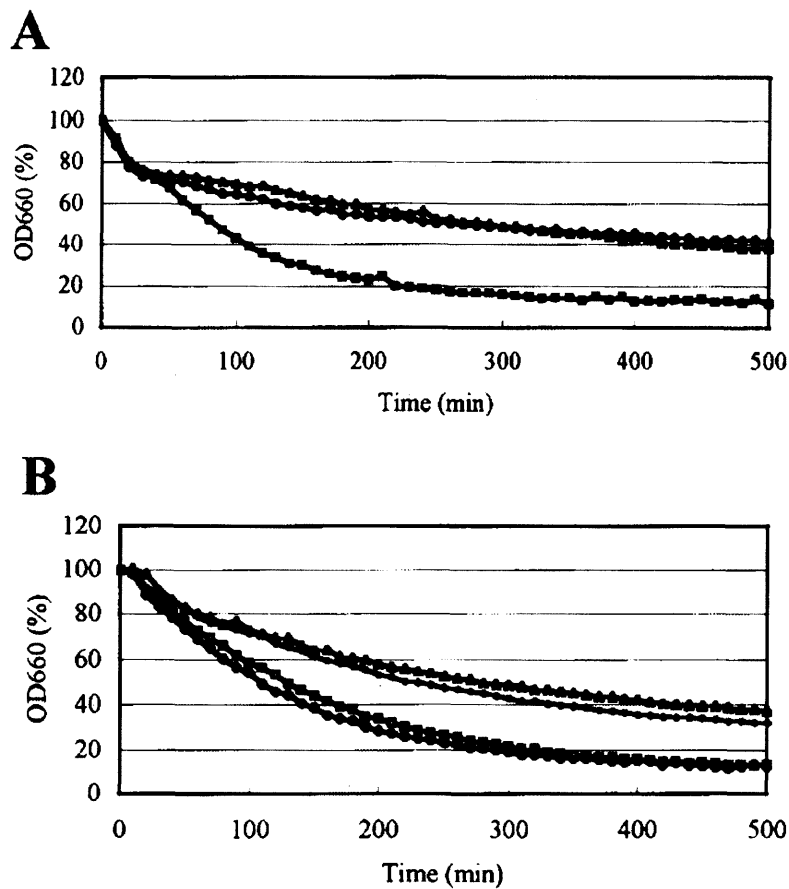


Fig. 4-2. The *ykl046c* disruptant is Zymolyase hypersensitive.

The cells were incubated in YPAD for 48 hours without shaking and subjected to a Zymolyase sensitivity test. (A) Zymolyase sensitivities of *ykl046cΔ* (51C) (closed square), *dfg5Δ* (52F) (closed diamond), and the wild-type cells (YPH499) (closed triangle). (B) Zymolyase sensitivities of disruptants of *ykl046cΔ* (51C) (closed diamond), *ykl046cΔ* harboring pRS416 (57S) (open square), *ykl046cΔ* harboring pRS416 containing *YKL046c* (58SY) (open triangle) and *ykl046cΔ* harboring pRS416 containing 3×HA-tagged *YKL046c* (59SHY) (closed circle).

(3) *dcw1* Δ と *dfg5* Δ の合成致死性の検討

Dcw1p と *Dfg5p* が互いに相同であることを考えると、これらの機能が重複しているために単独破壊株の性質が明確に出ない可能性が考えられた。そこで、*dcw1* と *dfg5* の両破壊株を作成することにした。51C と 52F を交配し、生じた異型接合性の二倍体(53FC)を孢子形成させ、四分子解析を行った。16 個の四分子を解析したところ、2 個の四分子は 4 個の孢子とも生育可能であった(タイプ A)。11 個の四分子は 3 つの生育可能な孢子と 1 個の生育不可能な孢子に分離した(タイプ B)。3 個の四分子は 2 個の生育可能な孢子と 2 個の生育不可能な孢子に分離した(タイプ C)。これらの孢子の遺伝子型を YKL046c-3,-4 あるいは DFG5-3, -4 をプライマーにした PCR で解析したところ、タイプ A の四分子は 2 個の *DCW1 dfg5* の孢子と 2 個の *dcw1 DFG5* の孢子を含んでおり、parental ditype の分離をしたことが示唆された。タイプ B の四分子は 1 個の *DCW1 DFG5*、1 個の *DCW1 dfg5* と 1 個の *dcw1 DFG5* の孢子を含んでおり、tetratype の分離をしたことが示唆された。タイプ C の四分子は *DCW1 DFG5* の孢子だけを含んでいることから、non-parental ditype の分離をし、*dcw1 dfg5* の孢子は生育できなかつたことが示唆された。これらの結果は、*dcw1* と *dfg5* の破壊は合成致死であることを示唆するものであった。

このことを確認するため、53FC を pRS416Y(*DCW1* を持ったプラスミド)で形質転換して 54F を得た。54F を孢子形成させ、四分子解析を行った。今度は、恐らくプラスミド上に機能的な *DCW1* があるために、すべての孢子が生育してきた(Fig. 4-3A)。これらのコロニーを 5-フルオロ酢酸(5-FOA)を含む培地にレプリカすると、いくつか生育してこないコロニーがあった(Fig. 4-3B)。これら生育してこなかった元のコロニーの遺伝子型を PCR で解析すると、*dcw1 dfg5* であった(Fig. 4-3C)。これらの結果から、*dcw1* Δ と *dfg5* Δ は合成致死であると結論した。

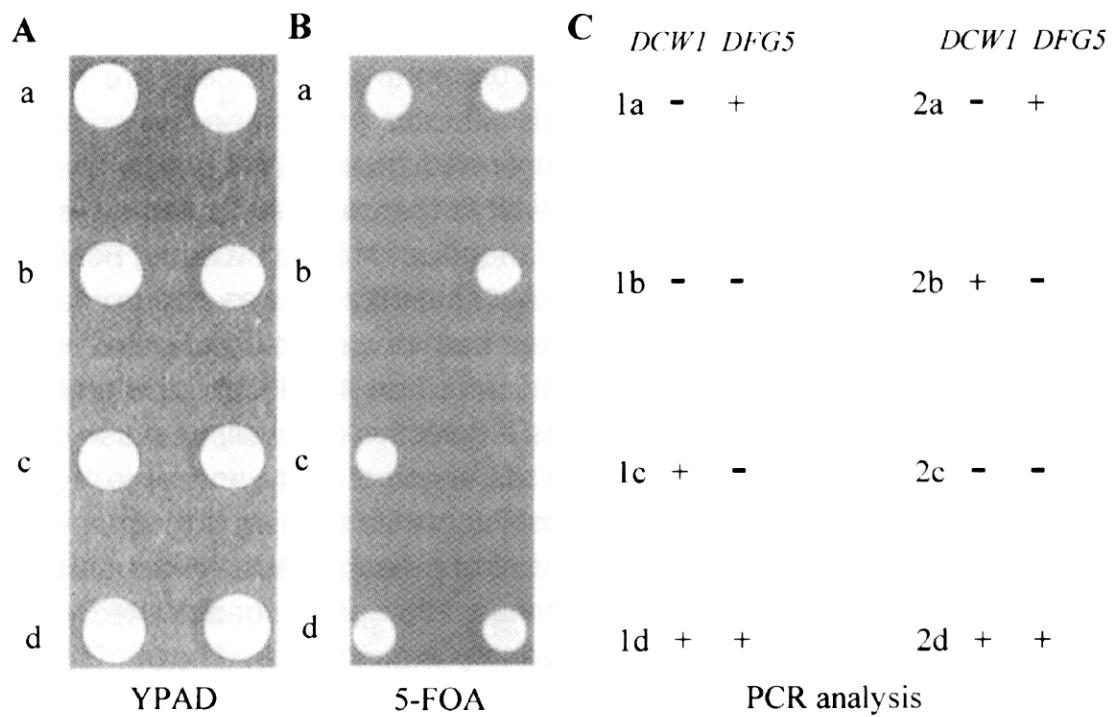


Fig. 4-3. The *dcw1* and *dfg5* double disruptant is lethal.

Heterozygous diploid cells (*DCW1/dcw1, DFG5/dfg5*) transformed with pRS416H which harbored *DCW1* were sporulated and subjected to tetrad analysis. The colonies were replica-plated to (A) YPAD medium and (B) 5-FOA medium. (C) PCR analysis of *DCW1* and *DFG5*.