

(4)プロモーターシャットオフの細胞の表現型の解析

致死である *dcw1* Δ *dfg5* Δ 両破壊株の表現型を調べるため、プロモーターシャットオフの方法を採用することにした。すなわち、ガラクトース存在下で *DFG5* を発現するプラスミド(pYC2D)を保持した *dcw1* Δ *dfg5* Δ を作成することにした。この株をまずガラクトース含有培地で培養すると、この条件では *DFG5* は発現しているが、その後、グルコース含有培地に培養液を接種し、培養するとこの条件では *DFG5* は発現しないはずである。

目的の株を作成するため、まず 55FCY を pYC2D で形質転換した。55FCY に保持されている pRS424Y を除くため、生じたコロニーを 5-FAA を含む培地に接種した(Toyn et al., 2000)。このクローンを以後 56FCF と呼ぶ。56FCF の細胞を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、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、30°C で 48 時間培養した。ガラクトースで培養した細胞はコロニーを形成したが、グルコースで培養した細胞はコロニーを形成しなかった(Fig. 4-4B)。この結果は明確に、*dcw1* Δ *dfg5* Δ は *Dfg5p* が発現しているときのみ増殖できることを示している。*Dcw1p* と *Dfg5p* の両方を欠損している細胞は 1M ソルビトール存在下でも生育できなかった。次にこの *Dcw1p* と *Dfg5p* を枯渇させた細胞の表現型を詳しく調べた。ガラクトースを含む CSM-URA 培地で培養した後グルコースを含む CSM-URA 培地で培養し、経時的にサンプリングしてメチレンブルー染色法²⁹⁾で生菌率を調べると、グルコースで培養開始 16 時間後から急速に生菌率が下降し、25 時間後に細胞はすべて死滅した。そこで、グルコースに移してから 15 時間後の細胞を詳しく調べることにした。これらの細胞は、プロモーターが活性化された細胞、すなわちガラクトースを含む培地で培養された細胞に比べていくつかの細胞壁に関連する表現型を示した。微分干渉対照の光学顕微鏡で観察すると、プロモータをシャットオフした細胞は、プロモーターが活性化された細胞よりも丸く大きくなっていた(Fig. 4-4)。これは FACS を用いた forward light scatter でも確認された。Forward light scatter は細胞

の大きさを表す。プロモーターシャットオフの細胞は、プロモーターが活性化された細胞の約2倍の forward light scatter を持っていた。細胞壁に欠損がある細胞は丸く大きくなることが知られている(Vai et al., 1991)ので、この結果は、*dcw1* Δ *dfg5* Δ 両破壊株は欠損した細胞壁を持っていることを示唆している。プロモーターシャットオフの細胞を、キチンを染色するカルコフロールホワイトで染色すると、細胞表層全体が強く染まったのに対し、プロモーターが活性化された細胞では出芽痕の周りだけに強いシグナルがあった(Fig. 4-4)。この結果は、プロモーターシャットオフの細胞では、細胞壁が弱くなったためにキチンが増加し、キチンが脱局在したことを示している。

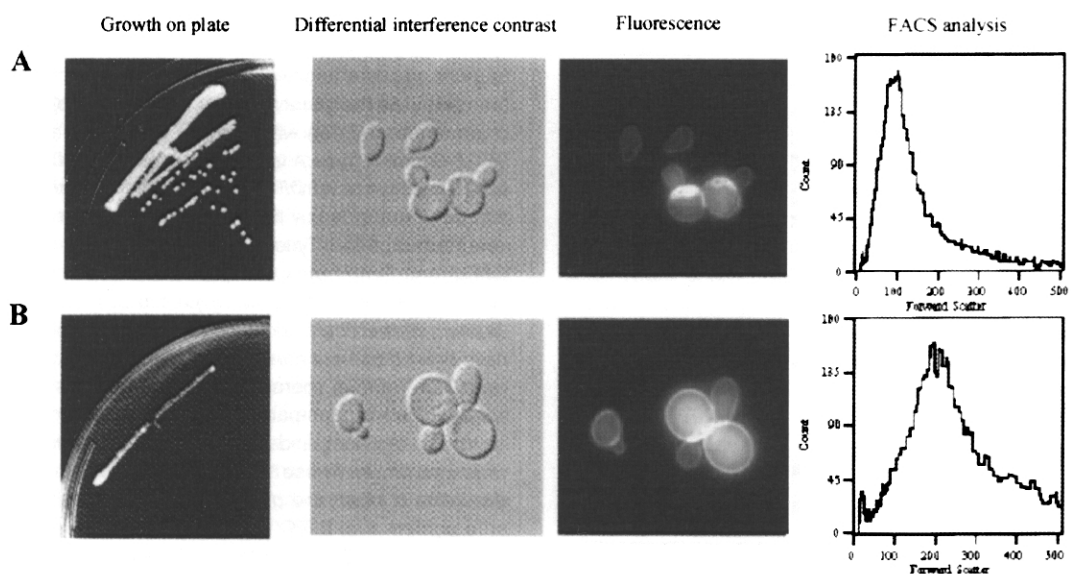


Fig. 4-4. Promoter shut-off cells show phenotypes of a defective cell wall.

Cells of the double disruptant of *dcw1Δ* and *dfg5Δ* harboring plasmid (*GAL^P::DFG5*) (56FCF) were incubated at 30 °C for 48 hours in CSM-URA containing galactose. An aliquot of the sample (0.2 ml) was used to inoculate 5ml CSM-URA containing galactose (A) or glucose (B) and the new cultures were incubated at 30 °C for 48 hours on plates (left panels) or for 15 hours in liquid culture (other panels). Growth on plates, differential interference contrast microscopy, fluorescence microscopy, and analysis of forward light scatter with FACS are shown.

そこで、キチンの含量を Ram らが報告している炭水化物の解析方法(Ram et al., 1998)により確認した。キチンの含量はグルコサミンの含量を測定することで求めた。ただし、この分解条件では、N-アセチルグルコサミンも脱アセチル化されてしまうため、グルコサミンと N-アセチルグルコサミンを区別することはできない。プロモーターシャットオフの細胞では、グルコサミンは細胞の炭水化物量全体の $5.71 \pm 0.51\%$ であったのに対し、プロモーターが活性化した細胞では、グルコサミンは炭水化物量全体の $2.76 \pm 0.36\%$ であった。この結果はプロモーターシャットオフの細胞でキチン含量が増えたことを明確に示している。キチンは細胞壁に欠損があると増えると報告されている(Shimizu et al., 1994; Ram et al., 1998; Popolo et al., 2001)ことから、この結果はプロモーターシャットオフの細胞が欠損した細胞壁を持っていることを示している。Dcw1p と Dfg5p が細胞壁の生合成に関与しているという本研究の仮説をさらに検証するため、GPI-CWP のひとつである Cwp1p (Shimoi et al, 1995)の細胞壁へのアンカリングを調べた。Cwp1p は野生株やプロモーターを活性化した細胞、*dcw1* 破壊株、*dfg5* 破壊株の培養上清では検出されなかったのに対し、プロモーターシャットオフの細胞の培養上清では検出された(Fig. 4-5)。この結果は、GPI-CWP の細胞壁へのアンカリングが *dcw1* Δ *dfg5* Δ では欠損していることを示している。以上のプロモーターシャットオフの細胞の解析から、Dcw1p と Dfg5p が細胞壁の生合成に関与していることが明らかとなった。

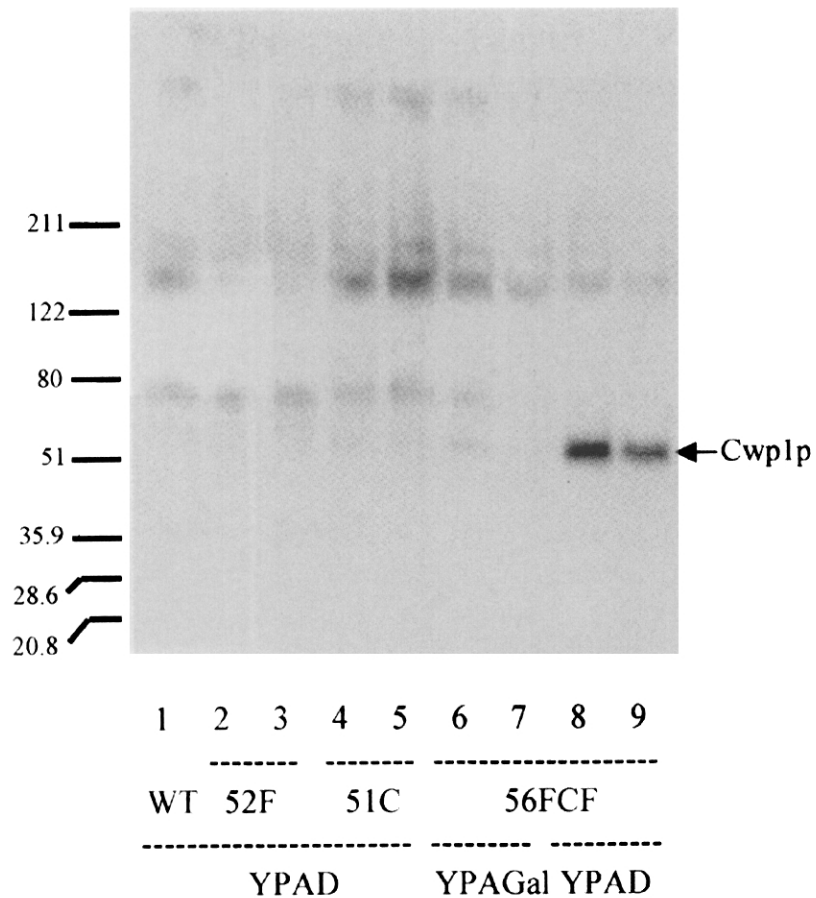


Fig. 4-5. Western analysis showing that Cwp1p is secreted into the culture supernatant in the double disruptant of *dcw1Δ* and *dfg5Δ*.

Lane 1, wild-type cells (YPH499); lanes 2 and 3, *dfg5Δ* (52F); lanes 4 and 5, *dcw1Δ* (51C), all incubated in YPAD. Lanes 6-9, disruptant of *dcw1Δ* and *dfg5Δ* harboring plasmid (*GAL^P::DFG5*) (56FCF). Cells were first incubated in YPAGal, aliquots of these cultures were used to inoculate duplicate YPAGal (lanes 6 and 7) and YPAD (lanes 8 and 9) cultures and the new cultures were incubated at 30 °C for 15 hours. Lanes were loaded with 10 μl culture supernatant, the gel was electrotransferred to a membrane, and the membrane was stained with an antiserum against Cwp1p. MW values (kDa) of standards are indicated at the left.

(5) Dcw1p-HA の生化学的解析

次に Dcw1p の N 末端に HA の 3 回繰り返しのエピトープを挿入することで、Dcw1p を生化学的に解析することとした。まず、*DCW1-HA* を含むプラスミド pRS416H を作成し、*dcw1* 破壊株に導入し 59SHY を得た。pRS416H は *dcw1* 破壊株のザイモリアーゼ高感受性を相補できたので、機能を保持していると考えられた。C 末端の解析から、Dcw1p は膜に局在する GPI アンカー型タンパク質であると考えられる。そこで、まず Dcw1p-HA の局在を調べた。59SHY の膜フラクションを調製し、そのままか endoglycosidase H あるいは N-glycanase で処理した後、HA に対する抗体を使ってウェスタン解析した(Fig. 4-6A)。膜フラクションに HA と反応する 80kDa のバンドが検出され、endoglycosidase H あるいは N-glycanase で処理した後は分子質量が 55kDa になったことから、膜に局在し、N 糖鎖を持つことが明らかとなった。この結果は、Dcw1p が 12 個の想定上の N 糖鎖結合部位を持つことと一致する。また、Dcw1p のタンパク質部分の計算上の分子質量は 49.5kDa であり、Dcw1p は多数のセリン・スレオニン残基を持つことから、Dcw1p は N 糖鎖だけではなく O 糖鎖も持つと考えられた。次に、Dcw1p が膜とどのように相互作用しているかを調べた。59SHY の膜画分を Triton X-100 あるいは PI-PLC バッファー中 37°C で 2 時間処理し、遠心し、上清と沈殿を HA 抗体でウェスタン解析した(Fig. 4-6B)。その結果、Dcw1p-HA はバッファー A で incubate したときは沈殿だけに検出されたが、detergent である TritonX-100 の存在下では上清に移行した。この結果は、Dcw1p が膜に局在していることを明確に示している。一方 1M NaCl や 0.2M Na₂CO₃ の存在下では Dcw1p は沈殿のみに検出されたことから、Dcw1p-HA は膜に弱い相互作用で結合しているわけではないことがわかった。PI-PLC で処理すると、Dcw1p-HA のシグナルは上清に検出されたことから、Dcw1p-HA は GPI アンカー型タンパク質であることが示された。これらの結果から、Dcw1p は N 糖鎖が付加しており、膜に GPI アンカーを通じて結合していることが示された。しかしながら、細胞壁にも少量の Dcw1p-HA がスメアなバンドとして検出された。

これらの結果は Gas1p と類似しており、Gas1p も N 糖鎖が結合した GPI アンカー型膜タンパク質であるが、細胞壁にも検出されている(De Sampaio et al., 1999)。

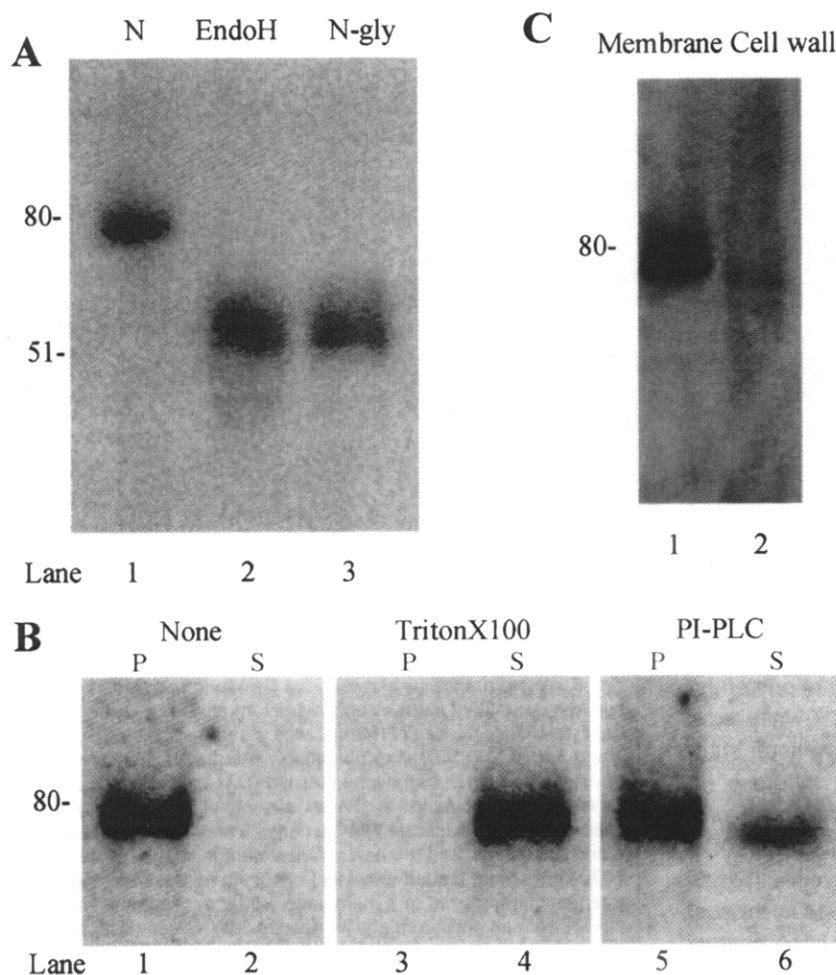


Fig. 4-6. Dcw1p-HA is an N-glycosylated, GPI-anchored membrane protein.

(A) The membrane pellet of *dcw1Δ* harboring pRS416 containing *DCW1-HA* (59SHY) was treated with Endoglycosidase H or N-glycanase (both Takara Shuzo). The pellet was then subjected to western analysis using anti-HA. Lane 1: Fraction not treated with Endoglycosidase H or N-glycanase, lane 2: Fraction treated with Endoglycosidase H, lane 3: Fraction treated with N-glycanase. MW values (kDa) of standards are indicated at the left. (B) The membrane fraction of *dcw1Δ* harboring pRS416 containing *DCW1-HA* (59SHY) was treated without Triton X-100 or PI-PLC (lanes 1 and 2), with

Triton X-100 (lanes 3 and 4) or with PI-PLC at 37 °C for 2 hours (lanes 5 and 6), centrifuged at 10,000 g for 20 min and fractionated into the precipitate (lanes 1, 3, and 5) and the supernatant (lanes 2, 4, and 6). The precipitate and the supernatant were subjected to western analysis using an antibody against HA. MW values (kDa) of standards are indicated at the left. (C) The membrane pellet and laminarinase-treated cell wall fraction of *dcw1Δ* harboring pRS416 containing *DCWI-HA* (59SHY) was analyzed by western analysis using an antibody against HA. Lane 1: the membrane pellet, lane 2: the cell wall fraction. Each lane contains approximately 5×10^5 cells.

(6) Dcw1p-HA の局在性の解析

次に Dcw1p-HA の細胞内の局在を HA 抗体で調べた。DCW1-HA を含む単コピープラスミドである pRS416H を持つ 59SHY の蛍光は弱すぎて正確な局在がわからなかった。このことは恐らく、DCW1 の発現が元々弱いせいだと考えられる。そこで、DCW1-HA を含むマルチコピープラスミドを持つ 60MHY を観察したところ、蛍光ははるかに強く局在を決定するのに十分な強さであった(Fig. 4-7)。Recombinant β -1,3-グルカナーゼである Quantazyme を用いると蛍光ははるかに強くなったことから、Dcw1p の主要な局在は細胞壁ではなく細胞膜であると考えられた。Dcw1p-HA の蛍光は細胞表層にパッチ状に観察された。このパターンは GFP を連結した細胞壁タンパク質でも観察されている(Ye et al., 2000; Ram et al., 1998)。核の周りにも強いシグナルが検出されたことから、小胞体にも一定の量が局在していることが示唆された。ただし、これは Dcw1p-HA を強発現しているために Dcw1p-HA の中間体が小胞体に滞留しているのかもしれない。Dcw1p-HA が GPI アンカー型膜タンパク質であること、細胞壁よりも細胞膜に多く検出されること、多くの研究が GPI アンカー型タンパク質が細胞膜(Roemer and Bussey, 1995; Popolo and Vai, 1999)か細胞壁(Shimoi et al., 1995; van der Vaart et al., 1995)に局在すると報告していることを合わせて考えると、Dcw1p は細胞膜に主に局在していると考えられる。

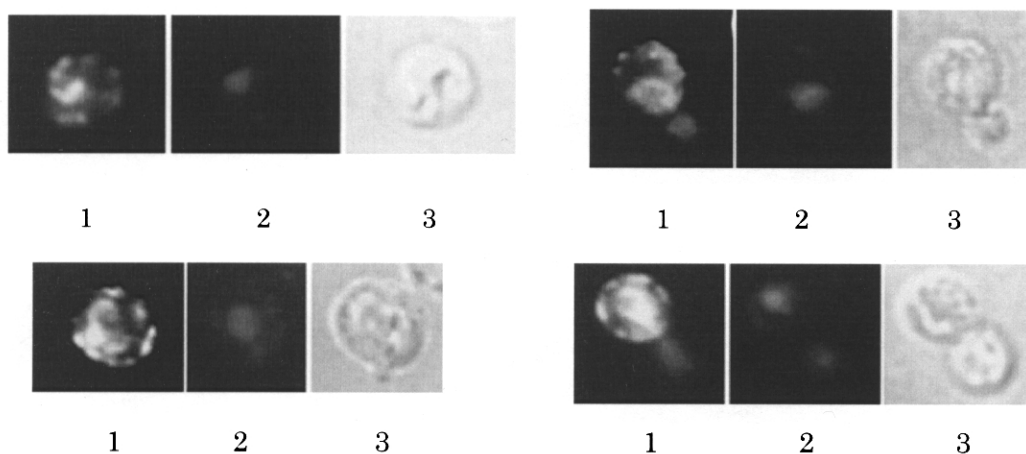


Fig. 4-7. Dcw1p⁻HA is localized on the cell surface.

The cells of *dcw1Δ* harboring pRS426 containing *DCWI-HA* (60MHY) were incubated to an OD₆₆₀ of approximately 1.0 in 5 ml CSM-URA at 30 °C. The cells were observed under a microscope (NIKON Eclipse 600, 100-fold objective) by immunofluorescence using the antibody against HA (panels 1), DAPI staining (panels 2) or by differential interference contrast (panels 3).

4 考察

dfg5 破壊株は酵母の糸状成長や細胞の極性化、伸長に欠損があると報告されている(Mosch and Fink, 1997)。しかしながら、Dcw1p (Ykl046cp)と Dfg5p の正確な役割はこれまでわかっていなかった。これまで多数の細胞壁が弱くなった変異株が取得されてきたにも関わらず、*DCW1* と *DFG5* が同定されてこなかったのは、これらが二つとも破壊されると明確な表現型が出ないためであったと考えられる。本章では、これらの遺伝子の産物の機能を明らかにするため、まず遺伝学的方法を用いた。その結果、両遺伝子の破壊は致死であり、*dcw1* 破壊株と *dcw1* Δ *dfg5* Δ 株は細胞壁が欠損した表現型を示すことが明らかとなった。また東京大学のグループも *dfg5* 破壊株で Cwp1p が高発現し、また細胞壁のマンナンタンパク質とグルカンのおおまかな比率を表す細胞壁の Mannose/Glucose 比が高いことを見出しており(Tomishige et al., 2003)、*dfg5* 破壊株の細胞壁が損傷していることを示唆するデータを得ている。これらのことから、Dcw1p 及び Dfg5p は細胞壁の生合成に関与すると考えられた。また Dcw1p-HA の生化学的な解析から、Dcw1p は N 糖鎖が結合した GPI アンカー型膜タンパク質で、細胞表層に局在すると考えられた。

細胞壁の生合成の経路は次の4つのステップを含む。すなわち、(i) β -1,3-グルカンの生合成、(ii) β -1,6-結合を通じた β -1,3-グルカンの分岐、(iii) β -1,3-グルカンの分岐鎖の伸長、(iv) β -1,3-グルカンの分岐の非還元末端を通じたキチンや β -1,6-グルカン、マンナンタンパク質など他のポリマーの cross linking、である。当初は Dcw1p と Dfg5p が、(iv) ステップのひとつである GPI-CWP が膜結合型から壁結合型に転移する反応に関与していると仮定した。しかしながら、まだこれらの遺伝子産物の酵素機能は明らかにはなっていない。*dcw1* Δ *dfg5* Δ は *gas1* 破壊株(Ram et al., 1998)といくつかの共通点がある。それは、キチン含量の増加であり、Cwp1p を培地中に分泌することであり、丸く大きな細胞形態である。*GAS1* もまた、GPI アンカー型タンパク質をコードし、

細胞壁の生合成に関与している。Gas1p はグルカノシルトランスフェラーゼであり、 β -1,3-グルカン分子を分子中で切断し、新しくできた還元末端を他の β -1,3-グルカンの非還元末端に β -1,3-グルカン結合で転移させる(Mouyna et al., 2000)。これはステップ(iii)に相当する。このように、Dcw1p と Dfg5p も、Gas1p のようにステップ(ii)から(iv)の、細胞壁構成分子の再構成に関与している可能性が高い。しかし、*dcw1* 破壊株の表現型のいくつかは、*gas1* 破壊株のものとは異なっているところがある。*dcw1* 破壊株はザイモリアーゼ高感受性でありカルコフロールホワイト感受性は有意に高くないの対し、*gas1* 破壊株はザイモリアーゼ耐性でありカルコフロールホワイトに高感受性である(Ram et al., 1998)。従って、Dcw1p 及び Dfg5p と、Gas1p は細胞壁の再構成の別のステップに関与していると考えられる。

DCW1 と *DFG5* のホモログは真菌全体に広く分布しており large family を構成している(Coutinho et al., 1999)。しかし、これらの遺伝子のうちまだ詳しく解析されたものはこれまでになく、まして細胞壁関連の遺伝子として見出されたものもない。これらの遺伝子のうち、少なくとも *Schizosaccharomyces pombe* の Q9P6I3 と O74556、*Neurospora crassa* の Q9C2J1、*Candida albicans* の Orf6.1293p と Orf6.7480p のコードする遺伝子産物は、N 末端と C 末端に疎水性領域を持つことから、GPI アンカー型タンパク質だと考えられ、Dcw1p や Dfg5p と似た機能を持つことが推察される。Dcw1p と Dfg5p は細胞壁の生合成経路のキー分子であると考えられ、細胞壁の生合成における Dcw1p と Dfg5p の役割を調べれば、真菌の細胞壁生合成における共通で重要なステップが明らかになり、真菌にだけ効果があり動物や植物には効果のない新たな抗真菌剤の開発が可能になると期待される。

5 要約

主要な酵母細胞壁タンパク質は GPI アンカータンパク質として合成され、細胞壁の β -1,6-グルカンに転移することが知られている。この転移を糖転移反応であると仮定し、*Bacillus circulans* の α -1,6-mannanase をコードする遺伝子とホモロジーのある酵母の遺伝子をゲノムデータベースから検索したところ、*YKL046c* と *DFG5* が見出された。これらの遺伝子は互いに相同であり、GPIアンカータンパク質に特徴的な構造を持っていた。*YKL046c* と *DFG5* の単独破壊株は生育可能であったが、 $\Delta ykl046c$ は細胞壁溶解酵素に感受性を示し、細胞壁が弱くなっていたことから、この遺伝子が細胞壁の生合成に関与していることが示唆された。そこで、*YKL046c* を *DCW1* (Defective Cell Wall)と命名した。 $\Delta dcw1 \Delta dfg5$ は致死であったことから、両遺伝子産物の機能は重複しており、細胞の増殖のためには少なくともひとつは必要であると考えられた。両方の遺伝子産物が欠損した細胞では、細胞は大きく丸くなり、細胞壁のキチン含量が多くなり、主要な細胞壁タンパク質である Cwp1p を培地に分泌した。Dcw1p 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、細胞表層を含む膜画分に局在していた。これらの結果から、Dcw1p と Dfg5p は GPI アンカー型膜タンパク質であり、細胞壁の通常の生合成に必要であることが示唆された。

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

1 緒言

前章で、Dcw1p と Dfg5p はどちらかがないと酵母は生育できないこと、これらのタンパク質は細胞壁の生合成に関与していること、Dcw1p は N 結合糖鎖を持った GPI アンカー型膜タンパク質であり細胞表層に局在することを明らかにした。またその後、アメリカ・コロンビア大学のグループが、*Candida albicans* でも Dfg5p が細胞膜と細胞壁に存在しており、アルカリの pH への適応に必要なことを報告している(Spreghini et al., 2003)。しかし、これらのタンパク質が細胞壁生合成のどのステップに関与しているかは明らかでなかった。これは、前章ではプロモーターシャットオフの細胞を使っており、*DFG5* の転写が停止してから分解して機能が完全になくなるまでに時間がかかりすぎたためだと考えられた。事実、この細胞はプロモーターシャットオフ後増殖の特定のフェーズで止まることなく 20 時間以上も死滅しなかった。そこで、Dcw1p と Dfg5p が細胞壁の生合成のどのステップに関与しているかをより明確にするため、より短時間で Dcw1p あるいは Dfg5p の機能が失われる変異株の取得を試みた。このような変異株を取得するため、*DCW1* 及び *DFG5* の温度感受性変異株を取得した。その結果、培養温度を上げてから 3 時間で表現型が観察しうる変異株を取得できた。本章では、この温度感受性 *dcw1* 及び *dfg5* 変異株の表現型について詳しく解析した結果について記述する。

2 実験方法

(1) 酵母の株、培養条件

使用した酵母の株は Table 5-1 に示すとおりである。酵母の培養条件は前章の方法

に従った。

Table 5-1. Strains used in this chapter

Strain	Relevant genotype	Source
56FCF	$\Delta dcw1::HIS3 \Delta dfg5::HIS3$ pYC2- <i>DFG5</i>	This study
DC61	$\Delta dcw1::HIS3 \Delta dfg5::HIS3$ pRS405- <i>dcw1-3</i>	This study
DC62	$\Delta dcw1::HIS3 \Delta dfg5::HIS3$ pRS405- <i>dcw1-7</i>	This study
DC63	$\Delta dcw1::HIS3 \Delta dfg5::HIS3$ pRS405- <i>DCW1</i>	This study
DF64	$\Delta dcw1::HIS3 \Delta dfg5::HIS3$ pRS405- <i>dfg5-13</i>	This study
DF65	$\Delta dcw1::HIS3 \Delta dfg5::HIS3$ pRS405- <i>dfg5-17</i>	This study
DF66	$\Delta dcw1::HIS3 \Delta dfg5::HIS3$ pRS405- <i>dfg5-29</i>	This study
DF67	$\Delta dcw1::HIS3 \Delta dfg5::HIS3$ pRS405- <i>DFG5</i>	This study
DC68	pRS416Y (<i>DCW1</i>) in DC61	This study
DF69	pRS416Y (<i>DCW1</i>) in DF66	This study
DC70	<i>SPC42-GFP</i> in DC61	Adams and Kilmartin., 1999

All strains have a YPH499 (*MATa ura3 lys2 ade2 trp1 his3 leu2*) background (Sikorski and Hieter, 1989).

(2) 細胞周期の同調

既報(Lieberman, 2004)の方法を少し変えて行った。野生株を YPAD で前培養した後、12 時間以上かけて OD₆₆₀=0.3 まで培養し、hydroxyurea を加えて最終濃度 0.15M にし、30°C で 2 時間振盪培養し、冷やした蒸留水で洗い、YPAD で再び 30°C でさまざま時間振盪培養した。

(3) PCR mutagenesis とプラスミドの構築

DCW1 と *DFG5* の遺伝子に random mutation を Gene Morph PCR mutagenesis kit

(Stratagene)を用いて導入した。*Bam*HIで切断した*DCW1*あるいは*DFG5*をプライマー BamDCW1-1 と BamDCW1-2 あるいは BamDFG5-1 と BamDFG5-2 (Table 5-2)を使って mutagenic PCR で増幅し、*Bam*HI で切断して *Bam*HI で切断した pRS415 にライゲーションした(pRS415-*dcw1* or *dfg5*)。このプラスミドを大腸菌で増幅し、Wizard Midiprep で精製し、56FCF (*dcw1*Δ *dfg5*Δ pYC2-*DFG5*)に導入した。グルコース培地上で、25°Cではコロニーを形成するが 37°Cではコロニーを形成しなかった株を選抜し、5-FOA 培地上で選抜して、元々56FCF を生育可能にしていた pYC2-*DFG5*を脱落させた。選抜した株からプラスミドを抽出し、大腸菌で増やして精製し、*Bam*HI で切断して *Bam*HI で切断した pRS405 にライゲーションした(pRS405-*dcw1* or *dfg5*)。このプラスミドを56FCFに導入し、5-FOAで選抜した。SPBの構成成分である(Donaldson and Kilmartin., 1996)*SPC42-GFP*は Kilmartin 博士からの親切な贈り物である(Adams and Kilmartin., 1999)。

Table 5-2. Primers used in this chapter

Name	Nucleotide sequence (5'-3')
BamDCW1-1	CCCGGATCCTTGAACCTAAGATGATCTGGT
BamDCW1-2	CCCGGATCCCTTTTCTAGAGTCGTTCAA
BamDFG5-1	CCCGGATCCATGCGAAAGATGGTTGGATAA
BamDFG5-2	CCCGGATCCGGCTACCCGTAATCAAGTT
DCW1Probe-1	TGGTGGTGGTTTGAGGTGGCA
DCW1Probe-2	GAGCCAGCCAACAGCAAACCT
DFG5Probe-1	GATTGCGGCGAGGTTGGGCAG
DFG5Probe-2	GATTGCGGCGAGGTTGGGCAG
CLN2-1	GCTGAACCAAGACCCCGTATG
CLN2-2	GAAATTAAAGATGAGGCACTG
ACT1-1	AGGTTGCTGCTTTGGTTATT
ACT1-2	TTAGAAACACTTGTGGTGAA

(4) FACS 解析

細胞を YPAD 培地で $5-10 \times 10^6$ /ml まで 25°C において増殖させ、 37°C で 3 時間培養した。 1×10^7 個の細胞に相当する液を 1ml の 0.2M Tris-HCl (pH 7.5) で洗い、70% エタノール、0.2M Tris-HCl (pH 7.5) で固定した。 1ml の 0.2M Tris-HCl (pH 7.5) で洗い、1ml の 0.25mg/ml の RNase A (Wako) を含む 0.2M Tris-HCl (pH 7.5) に沈殿を懸濁し、 50°C で 1 時間反応させ、 $20 \mu\text{l}$ の 50mg/ml Proteinase K (Wako) と混ぜ、 50°C で 1 時間反応させ、 $10,000g$ で 2 分間遠心し、1ml の $16 \mu\text{g/ml}$ の propidium iodide を含む 0.2M Tris-HCl (pH 7.5) で懸濁し、室温において暗室で 30 分間反応させ、超音波処理し、フローサイトメトリー (Coulter, EPICS ELITE) で解析した (Howlett et al., 1999)。

(5) 細胞の染色と顕微鏡観察

細胞を YPAD で $5-10 \times 10^6$ /ml まで 25°C で培養した後、37°C で 3 時間培養し、4', 6-diamino-2-phenylindole (DAPI)か、カルコフローホワイト(Pringle et al., 1989)、ローダミン・ファロイジン(Benedetti et al., 1994)で染色した。間接免疫抗体染色は、抗チューブリンマウスモノクローナル抗体(Chemicon International)を 200 分の 1 の希釈で一次抗体として用いた。顕微鏡観察は CCD カメラ(ORCA-ER, 浜松)の附属した Nikon Eclipse E800 を用いて行い、画像処理は AQUA LITE (Hamamatsu)を用いて行った。

(6) 生菌率測定

細胞を上記のとおり培養し、集菌し、超音波処理し、蒸留水に懸濁した。5ml の 100mM Tris-HCl (pH 9.5)/100ml NaCl/5mM MgCl₂ を加え、33 μ l の nitro blue tetrazolium (50mg/ml, Promega)と 16.5 μ l の 5-bromo-4-chloro-3-indoryl-phosphate (50mg/ml, Promega)を加え溶液 A とした。500 μ l の溶液 A をとり、5ml の溶液 B (0.05M Tris-HCl, pH 9.5)と混ぜた。この液を細胞懸濁液と1:1で混ぜて顕微鏡で観察した(Cabib and Duran, 1975)。

(7) ノーザン解析

前章の方法に従い、CLN2-1 と CLN2-2 をプライマーとして PCR で増幅し、*Xho*I-*Hind*III で切断した 0.86kb の断片をプローブとして用いた。

(8) 統計解析

差の有意差の検定は、均等でない分散を持った集団に対する T 検定 (Welch 検定) を行った。

3 結果

(1) 37°Cで生育不可能な *DCW1* 及び *DFG5* 変異株の取得

25°Cでは *Dcw1p* と *Dfg5p* の機能が正常だが 37°Cでは急速に破壊される変異株を取得するため、変異の起きた *dcw1* と破壊された *dfg5*、あるいは破壊された *dcw1* と変異の起きた *dfg5* を持つ変異株の取得を試みた。これを達成するため、*DCW1* あるいは *DFG5* の変異対立遺伝子を mutagenic PCR で作成した。PCR で増幅した断片をプラスミドに挿入し、このプラスミドを *dcw1* Δ *dfg5* Δ に導入し、50コロニーを得た。この中から、グルコース培地上で 25°Cでは正常に生育するが 37°Cでは生育しないコロニーを 5 個選んだ(Fig. 5-1A, B)。これらの変異株の *DCW1* 及び *DFG5* の配列をシーケンスしたところ、3 個から 6 個の点変異が生じており、それらすべてがアミノ酸置換になっていた。見つかった変異を Site-directed mutagenesis により元の野生型の遺伝子にひとつずつ導入したが、どの変異も温度感受性の増殖をもたらさなかったことから、これらの変異は単一の変異ではなく、すべての変異が合わさってタンパク質の立体構造に変化を誘起し、温度感受性の増殖という表現型をもたらしていることが示唆された。これらの 5 個の変異株のうち、*dcw1-3* と *dfg5-29* のアレルを含む変異株(DC61 と DF66)が、温度による増殖の停止が最も明確だったため、以後の解析に用いた。これらの変異株は、野生型の *DCW1* を導入すると相補されることを確認した(Fig. 5-2A, B)。DC61 と DF66 はともに、1Mソルビトールを含む YPAD 培地に 37°Cでコロニーを形成した。このことから、DC61 と DF66 は細胞壁に欠損があるために 37°Cでは生育不可能であることが示唆された。DC61 と DF66 は 37°Cで 3 時間培養した後 25°Cに移すと再び増殖を開始した(Fig. 5-1C)。

Table 5-3. Estimated amino acid substitutions of Dcw1p or Dfg5p in the alleles of *dcw1* and *dfg5*

<u>Allele</u>	<u>Estimated amino acid substitutions</u>
<i>dfg5-13</i>	T244I, T358S, G452R
<i>dfg5-17</i>	L11I, M152V, Q154L, N273K, G276S, A414V
<i>dfg5-29</i>	S33R, L101I, N138K, P333S, G415S, G451C
<i>dcw1-3</i>	R17T, V235I, G367D
<i>dcw1-7</i>	A68V, T267M, T364I

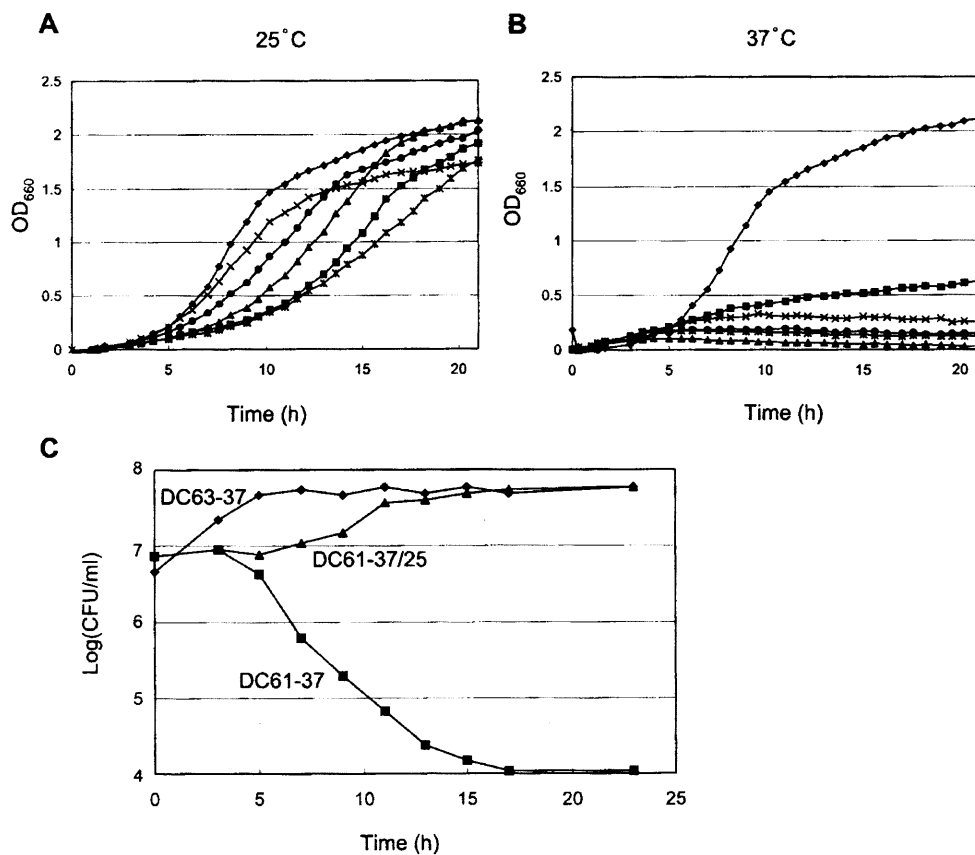


Fig. 5-1. *DCWI* and *DFG5* point mutants display temperature-sensitive growth.

(A, B) Cells were grown to saturation in 5 ml YPAD. An aliquot of the culture (0.2 ml) was used to inoculate 5 ml YPAD and the new culture was incubated at 25°C (A) or 37°C (B). Closed diamond; wild-type, open squares, DF64; closed squares, DF65; closed triangles, DF66; closed circles, DC61; open circles, DC62. Growth was scored with biophotorecorder (Advantec Toyo).

(C) Growth of DC63 and DC61 cells under different temperature regimes. Growth is expressed as the number of colony forming units (CFUs) per ml. All cells were initially incubated at 25°C to OD₆₆₀=0.5. DC63-37, DC63 (wild-type) cells incubated at 37°C; DC61-37, DC61 cells incubated at 37°C; DC61-37/25, DC61 cells incubated at 37°C for 3 hours and then transferred to 25°C.

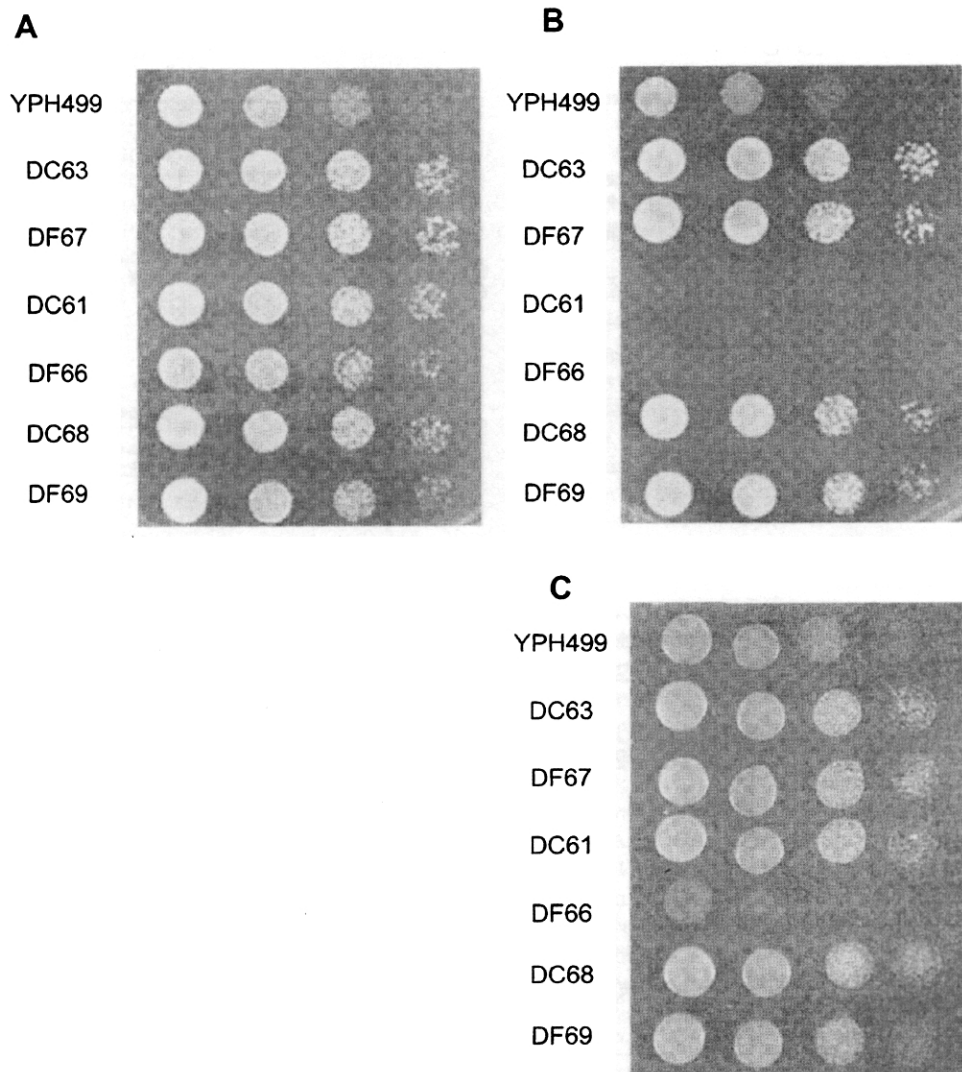


Fig. 5-2. Temperature sensitivity of DC61 and DF66 is rescued by osmotic support. (A, B, C) Mid-log phase cells were diluted to $OD_{660}=0.5$ and $5 \mu\text{l}$ of this suspension and three subsequent 10-fold serial dilutions were spotted onto YPAD agar (A, B) or YPAD agar containing 1 M sorbitol (C) (left to right). Growth was scored after 2 days at (A) 25°C or (B, C) 37°C .

(2) 37°Cで培養した DC61 及び DF66 の形態の解析

顕微鏡観察するのに適切な時間を決めるため、これらの細胞の生菌率を colony forming unit/ml で測定した。DC61 は 37°Cに移して 3 時間では生存率を維持したが、5 時間後には急速に死滅した(Fig. 5-1C)。DF66 も似た生育率の推移を示した。37°Cで 3 時間培養した時点が、これらの細胞は生存率を維持しながら、Dcw1p あるいは Dfg5p の破壊の影響が最もよく観察できる時点だと考え、この条件を以後の観察に用いた。この時点においては、37°Cで培養した DC61 と DF66 は 25°Cで培養したものよりも芽のある細胞が優位に($p < 0.05$)多かった(Fig. 5-3A,B)。この時点で、ほとんどの芽は単一の芽であった。25°Cで培養した DC61 の細胞においては、母細胞に対する娘細胞の面積の比は 20%から 80%であったのに対し、37°Cで培養した DC61 の細胞においては、ほとんどの娘細胞の面積は母細胞の面積の 20%以下であった (Fig. 5-3C)。野生株(DC63)においては、25°Cで培養しても 37°Cで培養しても母細胞と娘細胞の比は有意には変わらなかった。DF66 の母細胞と娘細胞の比も似た傾向を示した。これらの結果から、Dcw1p あるいは Dfg5p の酵素活性が枯渇した細胞では、芽の出現は正常だが、芽の成長が異常になっていることがわかった。

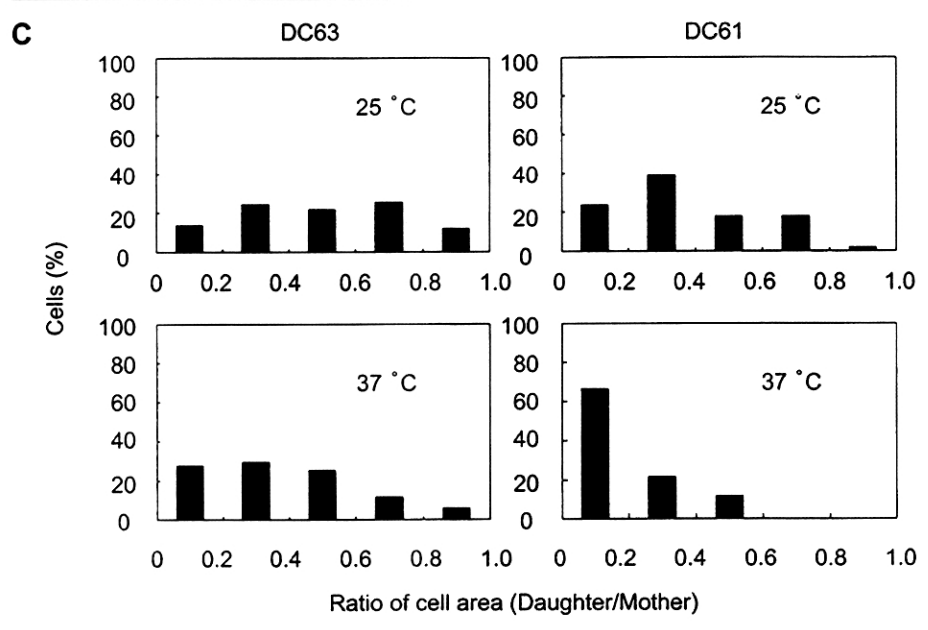
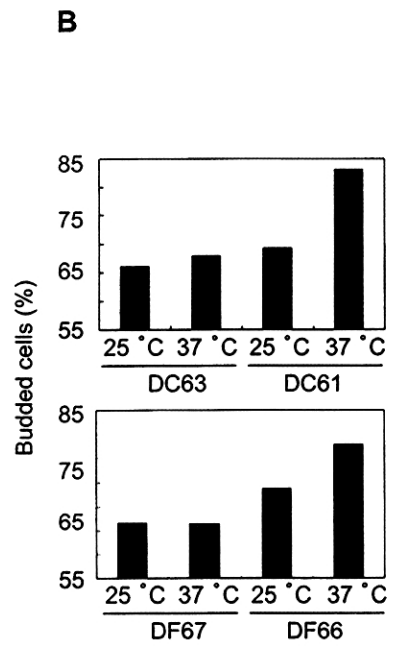
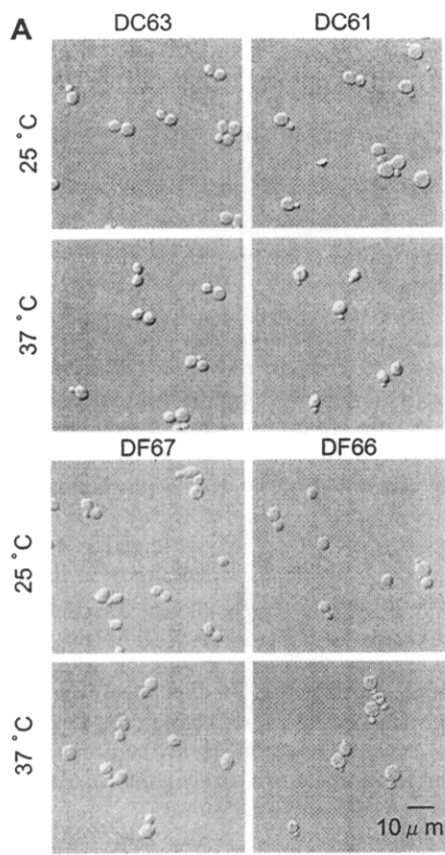


Fig. 5-3. DC61 and DF66 cells arrest growth with small buds when incubated at 37°C. The cells were grown to a density of $OD_{660}=0.5$ to 1.0 in YPAD medium at 25°C and incubated at 37°C for 3 h. (A) Morphology of DC63, DC61, DF66 and DF67 incubated at 25°C or 37°C for 3 h. (B) Ratio of cells with buds to total cells. (C) Distribution of bud area, expressed as a percent of mother cell area, for DC63 and DC61 cells incubated at 25°C and 37°C for 3h.

(3)DC61 の細胞周期の解析

これまでの結果から、DC61 を 37°C で培養すると、細胞周期が停止することが示唆された。そこでこのことを FACS 解析を使って確認することにした。*S. cerevisiae* の細胞周期は次のように進むことがわかっている。G1 期の終わりに、細胞が一定の大きさに達すると、芽の形成が始まる。芽の形成の初期においては、芽の形はほぼ球に近く、グルカンやマンナンタンパク質は球全体に均一に取り込まれる(Farkas et al., 1974)。S 期になると、DNA の複製が起こると同時に、芽が大きくなるに連れて極性のある先端成長が盛んになる(Cabib et al., 1982; De Nobel et al., 1991)。娘細胞の大きさが母細胞のほぼ 3 分の 1 になると、S 期が終わり、SPB が分離し、両極性の紡錘体が形成される(Byers et al., 1975)。娘細胞の大きさが母細胞のほぼ 3 分の 2 になると、再び細胞壁成分は娘細胞全体に均質に取り込まれるようになる。FACS 解析によると、37°C で培養した DC61 では、25°C で培養したものよりも、1N の DNA 含量を持った細胞が少なくなっていることがわかった(Fig. 5-4C)。DC63 では、37°C で培養した細胞と 25°C で培養した細胞で DNA 含量の割合に差は認められなかった。この結果から、DC61 は 37°C で培養すると、細胞周期が DNA の複製の後停止することがわかった。

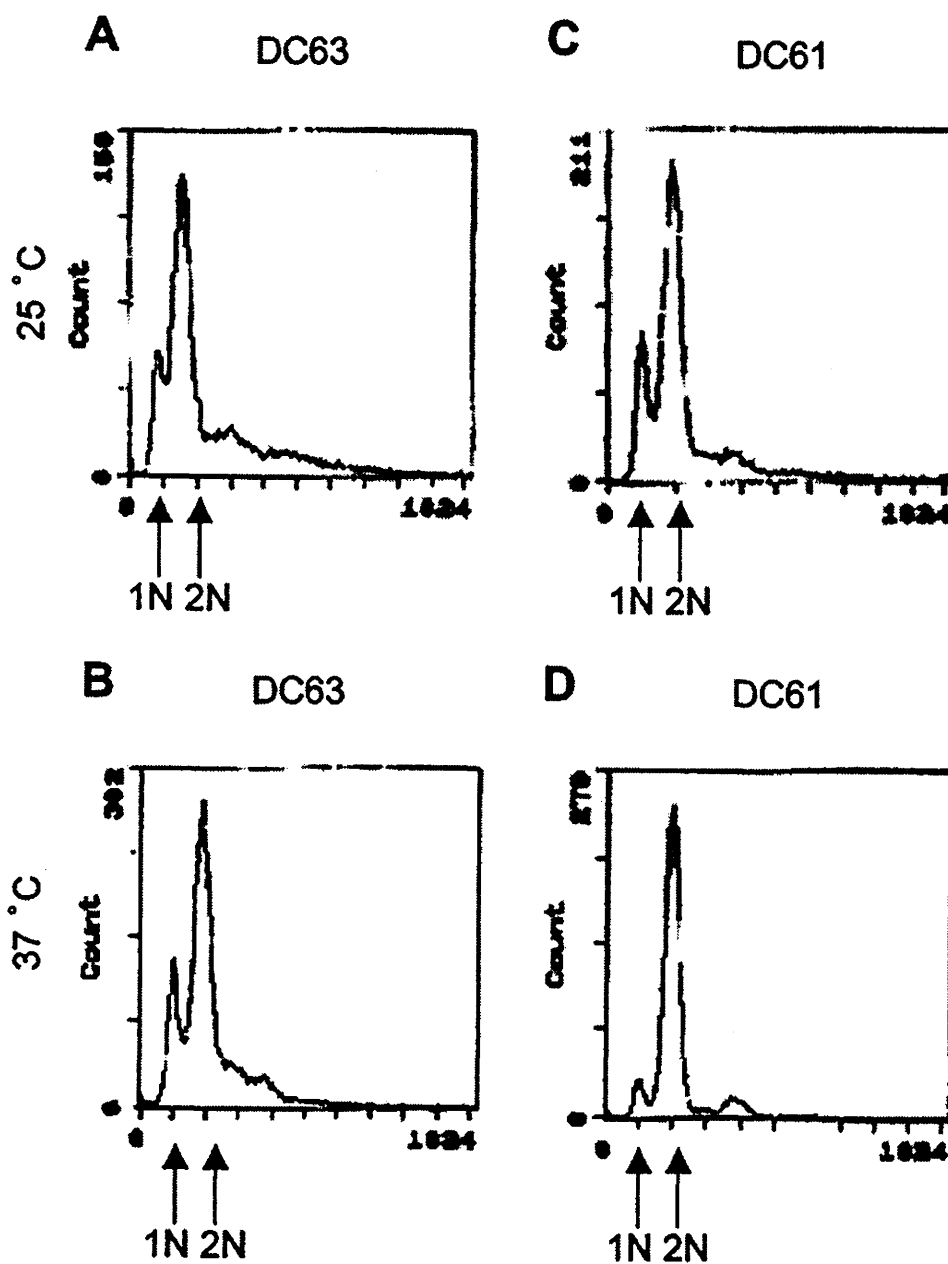


Fig. 5-4. DNA content of DC63 and DC61.

DC63 and DC61 cells were grown to a density of $OD_{660}=0.5$ to 1.0 in YPAD medium at 25°C and the cells were incubated at 37°C for 3 h. The cells were fixed, stained with propidium iodide, and subjected to FACS analysis. (A) DC63, 25°C (B) DC63, 37°C (C)DC61, 25°C (D) DC61, 37°C.

次に DC61 の細胞周期についてより詳しく解析した。25°Cで培養した DC61 では、多くの細胞で核が bud-neck に近接していたが、37°Cで培養したものでは、核は bud-neck から離れていた(Fig. 5-5A)。伸長した紡錘体を持つ DC61 の割合は、25°Cでは35.8%だったが、37°Cでは9.8%だけだった(Fig. 5-5B)。この結果は、37°Cで培養した DC61 では、二極性の紡錘体が形成されていないことを示唆している。そこで、SPB の構成成分のひとつである Spc42p (Donaldson and Kilmartin., 1996)に GFP を連結した GFP-Spc42p を DC61 に形質転換した株(DC70)を観察して SPB の状態を調べることとした。GFP-Spc42pのドットが二つになっているものは、25°Cで培養した DC70 では44.6%であったのに対し、37°Cで培養した DC70 では11.6%に過ぎなかった(Fig. 5-5C)。これらの結果は37°Cで培養した DC70 では SPB の分離の前で細胞周期が停止していることを明確に示している。さらに、37°Cで培養した DC61 では、アクチンパッチが分散しており、細胞の極性が失われていた(Fig. 5-5D)。

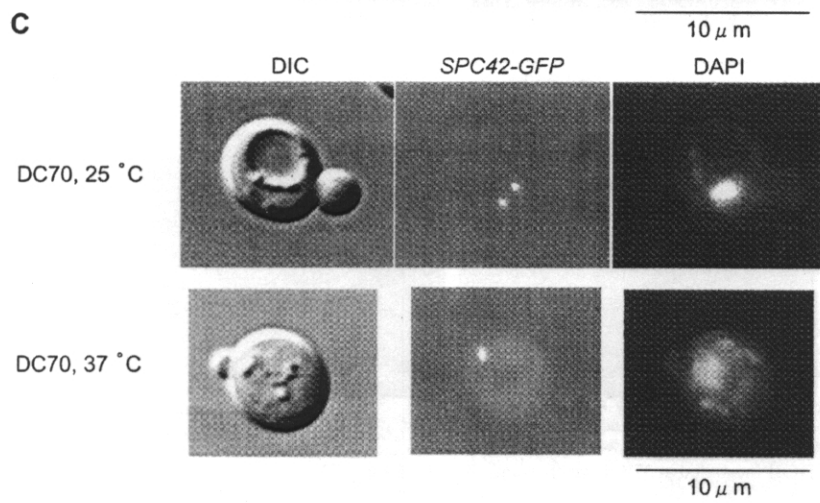
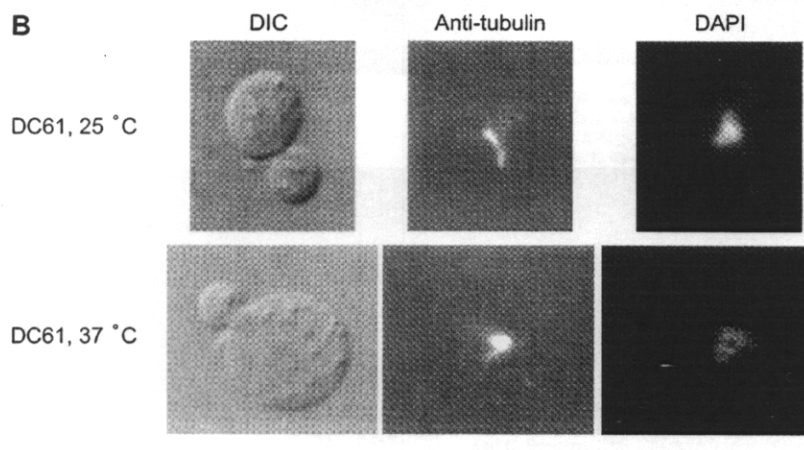
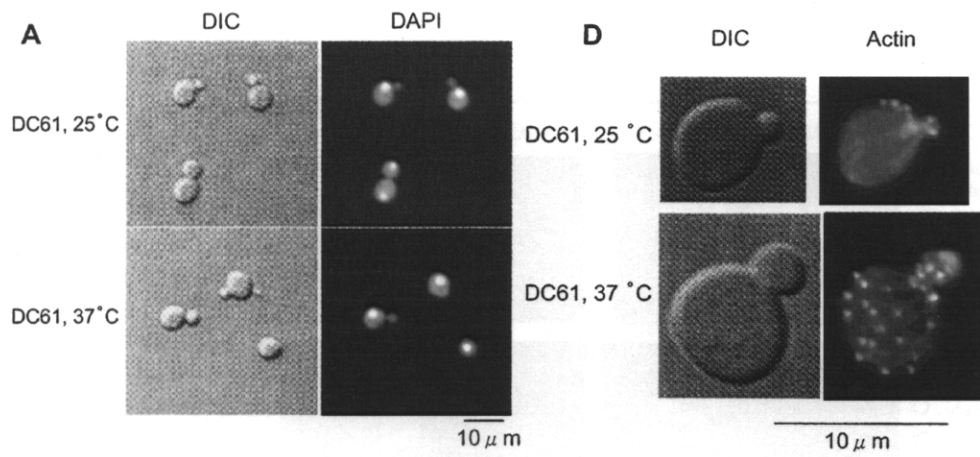


Fig. 5-5. DC61 cells are arrested prior to SPB separation and show actin delocalization when incubated at 37°C.

DC61 and DC70 cells expressing *SPC42-GFP* cells were grown to a density of $OD_{660}=0.5$ to 1.0 in YPAD medium at 25°C and incubated at 37°C for 3 h. (A) Nuclear morphology of DC61 cells incubated at 25°C or 37°C as shown by DAPI staining. (B) Microtubule morphologies of DC61 cells incubated at 25°C or 37°C visualized by staining with anti-tubulin antibody. (C) SPB separation in DC70 cells incubated at 25°C or 37°C. DAPI and tubulin or Spc42p were visualized at different excitation wavelengths. (D) Actin staining of DC61 cells incubated at 25°C or 37°C.

(4) DC61 の芽の細胞壁の解析

37°Cで培養した DC61 が異常な細胞壁を持つことを確かめるため、芽におけるキチンの局在を調べた。キチンを特異的に染色するカルコフロールホワイトを使って染色したところ、野生株や 25°Cで培養した DC61 では芽の根元だけしか染色されなかった (Fig. 5-6A, B)。しかし、37°Cで培養した DC61 では、小さな芽の先端だけが染色されていた。これらの結果から、37°Cで培養した DC61 では、芽の表層、特に先端でキチンが蓄積していることが明らかとなった。このことをさらに確かめるため、通常は液胞に封じ込められているアルカリ性ホスファターゼ活性の局在を 37°Cで培養した DC61 で調べたところ、いくつかの細胞の小さな芽にアルカリ性ホスファターゼの活性が見出された (Fig. 5-6C)。これらの結果から、37°Cで培養した DC61 は異常な細胞壁を持っていることが示された。

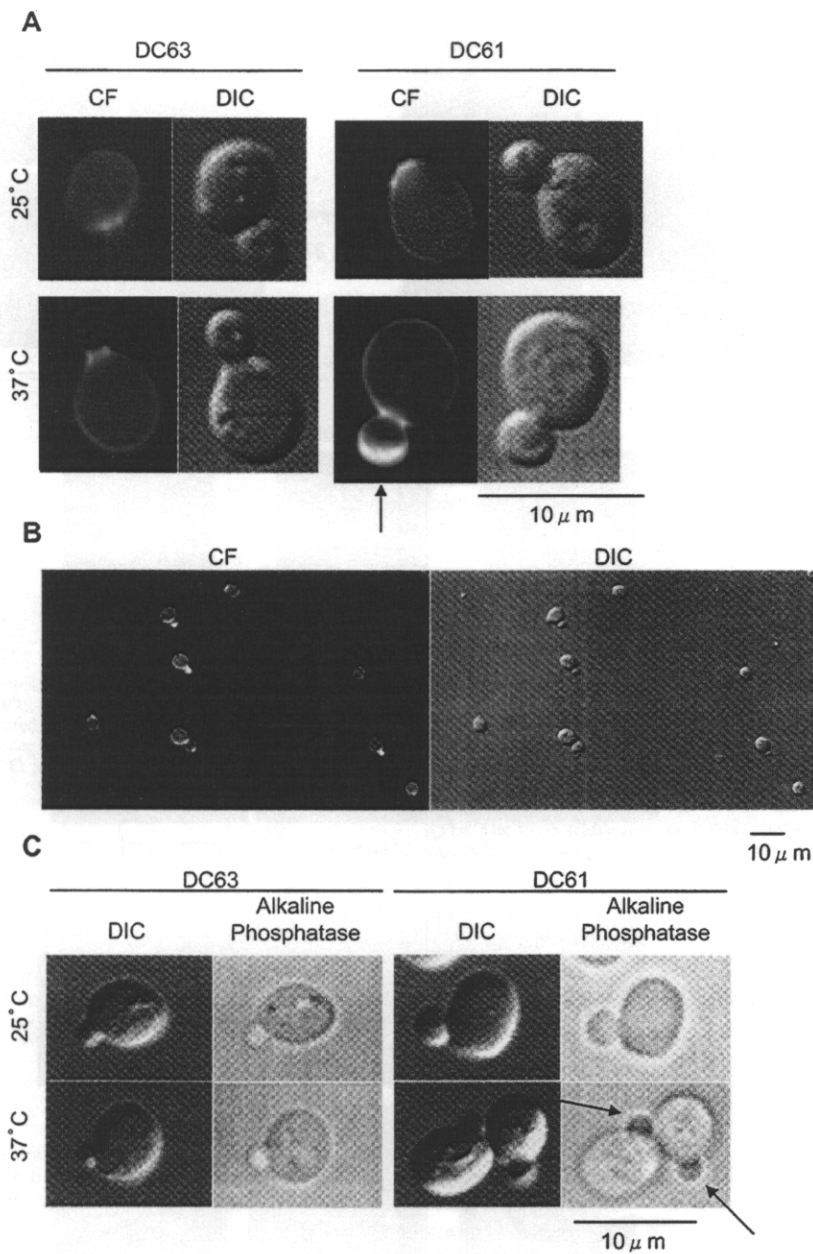


Fig. 5-6. Small buds of DC61 incubated at 37°C have aberrant cell walls.

(A, B) Chitin localization after Calcofluor staining. (A) DC63 and DC61 cells were incubated at 25°C to a density of $OD_{660}=0.5$ to 1.0 in YPAD medium, cells were incubated at 37°C for 3h, stained with Calcofluor white (CF) and observed under a fluorescence microscope. Arrows indicate the localization of chitin in DC61 cells incubated at 37°C. DIC, differential interference contrast. (B) The same view of DC61 incubated at 37°C with different magnification. (C) DC63 and DC61 were prepared as above, alkaline phosphatase substrate was added, and was observed under the microscope. Arrows indicate the localization of alkaline phosphatase activity in DC61 cells incubated at 37°C.

(5) *DCW1* 及び *DFG5* mRNA の細胞周期及び増殖期依存的調節

これまでの結果は、*DCW1*と*DFG5*が細胞周期の進行に重要な役割を持つことを示している。そこで、これらの遺伝子の mRNA のレベルが細胞周期依存的に変わるかを調べた。*DCW1* の mRNA は G1 期に、*DFG5* の mRNA は S 期にピークがあった(Fig. 5-7B)。これらの結果は、*DCW1*と*DFG5*の mRNA レベルが細胞周期に応じて調節されていることを明確に示している。次に *DCW1*と*DFG5*のレベルが増殖期に応じて調節されているかを調べた。細胞壁の生合成に関与している遺伝子は、増殖期に依存して調節されていることが知られている。例えば、増殖や成長に必要な遺伝子は対数増殖期に(Zhao et al., 1998)、環境ストレスからの防護及び長期の生き残りに関わる遺伝子は定常期に発現する(Werner-Washburne et al., 1996)ことが知られている。そこでこれらの遺伝子の発現を調べたところ、*ACT1*とほとんど同じように、*DCW1*と*DFG5*は対数増殖期に最も発現することが明らかとなった(Fig. 5-5C)。*ACT1* は対数増殖期に多く発現することが知られている(Ludwig et al., 1982)。*Dcw1p*と*Dfg5p*が芽の形成に関与するという結果と符合することだが、これらの結果から、*DCW1*と*DFG5*は対数増殖期の成長に関与すると考えられる。

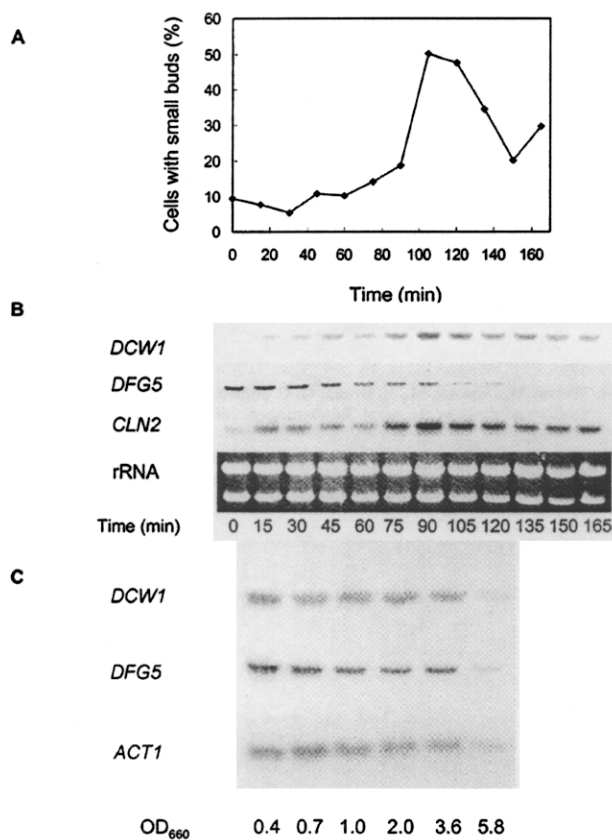


Fig. 5-7. Cell cycle- and growth phase-dependent regulation of *DCW1* and *DFG5* mRNAs.

(A), (B). Cell cycle-dependent regulation of *DCW1* and *DFG5* mRNAs. Wild-type cells were released from hydroxyurea-induced S arrest, incubated in YPAD and samples were taken at the times indicated.

(A) Budding index. Only the percentage of cells with small buds is shown.

(B) Northern analysis. RNA was prepared and used for Northern analysis of *DCW1* (upper panel), *DFG5* (middle panel) and *CLN2* (lower panel).

(C) Growth phase-dependent regulation of *DCW1* and *DFG5* mRNAs. Wild-type cells were grown to OD_{660} =0.4, 0.7, 1.0, 2.0, 3.6 and 5.8 in YPAD at 30°C. RNA was prepared and used for Northern analysis of *DCW1* (upper panel), *DFG5* (middle panel) and *ACT1* (lower panel).

4 考察

Dcw1p と Dfg5p が細胞壁の生合成に関与するということは前章の結果から示されていたが、具体的にこれらのタンパク質がどのステップに関与しているかは明らかではなかった。そこで本章では、非許容温度では生育が不可能な *dcw1-3*, *dfg5-29* 株を用いて解析を行い、これらの株が主に次の3つの表現型を示すことを明らかにした。すなわち、(i) 小さな芽での増殖停止、(ii) DNA の複製の後、SPB 分離の前での細胞周期の停止、(iii) 細胞壁の異常を示すキチンの集積とアルカリ性ホスファターゼの漏出、である。これらの結果は、Dcw1p と Dfg5p は成長中の細胞壁の生合成に関与することを示している。また、細胞壁合成に関与する遺伝子は G1 期及び S 期、対数増殖期に多く発現することが知られているが、*DCW1* と *DFG5* の mRNA レベルもそれぞれ G1 期、S 期にピークを持ち、両方とも対数増殖期に多いという結果が得られ、この仮説を支持している。細胞壁はグルカンやキチン、他のタンパク質など多くの成分から構成されている複雑な構成物であることから、芽の細胞壁に生合成にもたくさんの遺伝子が関与していると考えられる。本研究で明らかにした結果から、*DCW1* と *DFG5* はこれらの遺伝子のうちのふたつであると考えられる。

前章で示したプロモーターシャットオフの細胞と本章で示した温度感受性変異株の細胞の形態にはいくつか異なる点があった。プロモーターシャットオフの細胞では、細胞の形態が大きく丸くなっていた。一方、温度感受性変異株では、小さい芽が小さいままで成長を止めていた。この違いは、ふたつの変異株における、Dcw1p あるいは Dfg5p の酵素活性の減少の速度の違いで説明できる。プロモーターシャットオフの細胞では、Dfg5p の減少は、グルコース培地に移すと *DFG5* の転写が停止するだけなので、Dfg5p の分解にのみ依存すると考えられる。一方、温度感受性変異株では、培養温度を上げると、Dcw1p あるいは Dfg5p の酵素活性は急速に失われると考えられる。このことが、温度感受性変異株でより明確に表現型が見られた理由だと考えられる。プロモ

ーターシャットオフの細胞と温度感受性変異株の細胞とではこの他にも違いがあり、プロモーターシャットオフの細胞は浸透圧保護剤の存在下生育できないが、温度感受性変異株の細胞は生育できる。これは、プロモーターシャットオフの細胞においては Dfg5p の酵素活性はゆっくりしか減らないものの最終的には完全にゼロになるのに対し、温度感受性変異株の細胞では Dcw1p あるいは Dfg5p の酵素活性は急激に減るものの、最終的に酵素活性はわずかには残るためであると考えられる。

*DCW1*と*DFG5*の mRNA のピークは G1、S 期にあった。G1-S 移行に関与する遺伝子は SCB (Swi4p 依存的 cell cycle box)あるいは MCB (*MluI* cell cycle box)を ORF の上流に持っている(Iyer et al., 2001)。G1-S 移行イベントの中には、芽の成長、細胞壁の生合成、DNA の複製などがある(Ogas et al., 1991; Igual et al., 1996; Madden et al., 1997; Horak et al., 2002)。G1-S 期に発現する遺伝子のひとつとして *FKS1* があり、*FKS1*はその上流に SCB と MCB element を持つ。*FKS1*の mRNA は G1 期にピークを持ち、Fks1p は芽の細胞壁に生合成に関与している(Mazur et al., 1995)。*DCW1*もまた 2 個の SCB element と 2 個の MCB element を、*DFG5*も 1 個の SCB element をその ORF の上流に持つ (Table 5-4)。これらの結果は、Dcw1p と Dfg5p もまた、G1-S 期移行イベントである芽の細胞壁の生合成に関与することを示唆している。*dcw1* と *dfg5* の温度感受性変異株は似た表現型を示すことから、Dcw1p と Dfg5p は似た役割を持っていると考えられるが、発現時期の違いから、Dcw1p は G1 期での芽の成長のごく初期に、Dfg5p は芽がある程度大きくなってからの成長に関与すると考えられる。

Table 5-4. SCB and MCB elements upstream of *DCW1* and *DFG5*

Gene	Position	Sequence	Orientation	Element	Consensus
<i>DCW1</i>	-313	TACGAAA	reverse	SCB	CACGAAA
<i>DCW1</i>	-126	TACGAAA	forward	SCB	CACGAAA
<i>DCW1</i>	-704	ACGCGT	forward	MCB	ACGCGN
<i>DCW1</i>	-719	ACGCGA	forward	MCB	ACGCGN
<i>DFG5</i>	-230	CCCGAAA	forward	SCB	CACGAAA

The consensus sequence of SCB element is 5'-CACGAAA, 5'-NACGAAA or 5'-CNCGAAA (Ogas et al., 1991). N indicates any nucleotide.

鈴木らは、細胞壁の合成と細胞分裂とを調製する新しいチェックポイントを提唱している(Suzuki et al., 2004)。このチェックポイントは、細胞壁の合成の進行を監視し、細胞壁合成の欠損に应答して、DNA複製の後、SPBの分離の前で細胞周期を停止する。このチェックポイントは細胞壁の β -1,3-グルカン合成酵素をコードする *FKS1* (Douglas et al., 1994)に変異がある *fks1^{ts}* 株で発見された。*fks1^{ts}* 株の細胞周期の停止は *dcw1^{ts}* 株と驚くほど似ており、*dcw1^{ts}* 株もまた細胞壁チェックポイントによって細胞周期を停止していることが示唆される。細胞周期のほかにも、*dcw1^{ts}* 株は *fks1^{ts}* 株といくつかの表現型を共有している。それは、細胞の溶解、芽の先端へのキチンの蓄積、小さい芽での増殖停止(Garcia-Rodriguez et al., 2000)、である。Dcw1p は主に細胞膜に、部分的に細胞壁に局在していることから、Dcw1p と Dfg5p は Fks1p と同じように細胞表層で細胞壁成分の構築に関与すると考えられる。Dcw1p と Dfg5p はバクテリアのグリカナーゼとホモロジーがあることから、新しく合成された細胞壁成分の再構築に関与しているのかもしれない。しかしながら、Dcw1p と Dfg5p の正確な酵素機能はまだよくわかっていない。37°Cで培養した *dcw1^{ts}* 株あるいは *dfg5^{ts}* 株の細胞壁を詳しく調べることで、その酵素機能も明らかになると思われる。

5 要約

Dcw1p 及び Dfg5p の細胞壁生合成に関する機能をより詳細に解析するため、PCR でランダムに *DCW1* に変異を導入し、プラスミドに組み込んだ後、 $\Delta dcw1 \Delta dfg5$ に形質転換して温度感受性変異株 DC61 を単離した。DC61 を 37°C で培養すると、ほとんどの細胞は母細胞の 20% 以下の断面積しか持たない小さな芽の状態で増殖を止めていた。この結果は、37°C で培養した DC61 では細胞周期が停止していることを示唆していたため、DNA 含量を調べたところ、37°C で培養した DC61 では、1n DNA を持った細胞の割合が減少していたが、SPB は分離していなかった。また、細胞を DAPI 染色したところ、単核であった。このことから、37°C で培養した DC61 は DNA 合成の後、SPB 分離の前で細胞周期を停止していると考えられた。これらの小さな芽の表層にはキチンが集積し、芽は溶解を示したことから、芽の細胞壁が異常になっていると考えられた。また、*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すると考えられた。これらの結果から、Dcw1p と Dfg5p は、芽の細胞壁の生合成に重要な役割を持つことが示された。

3 文献

- Adams, I. R., Kilmartin, J. V. Localization of core spindle pole body (SPB) components during SPB duplication in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 1999; 145 (4):809-23.
- Balasubramanian, B., Lowry, C. V., Zitomer, R. S. The Rox1 repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic genes is a specific DNA-binding protein with a high-mobility-group motif. *Mol. Cell Biol.* 1993; 13 (10):6071-8.
- Ballou, L., Cohen, R. E., Ballou, C. E. *Saccharomyces cerevisiae* mutants that make mannoproteins with a truncated carbohydrate outer chain. *J. Biol. Chem.* 1980; 255 (12):5986-91.
- Ballou, C. E. in The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Metabolism and Gene Expression (Strathern, J. N., Jones, E. W. and Broach, J. R., eds.) *Cold Spring Harbor Laboratory*, New York, 1992 pp.335-360.
- Baudin, A., Ozier-Kalogeropoulos, O., Denouel, A., Lacroute, F., Cullin, C. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 1993; 21 (14):3329-30.
- Benedetti, H., Raths, S., Crausaz, F., Riezman, H.. The *END3* gene encodes a protein that is required for the internalization step of endocytosis and for actin cytoskeleton organization in yeast. *Mol. Biol. Cell* 1994; 5 (9):1023-37.
- Boone, C., Sommer, S. S., Hensel, A., Bussey, H. Yeast *KRE* genes provide evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly. *J. Cell Biol.* 1990; 110 (5):1833-43.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54.

- Byers, B., Goetsch, L. Behavior of spindles and spindle plaques in the cell cycle and conjugation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 1975; 124 (1):511–23.
- Cabib, E., Roberts, R., Bowers, B. Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 1982; 51:763–93.
- Cabib, E., Roh, D. H., Schmidt, M., Crotti, L. B., Varma, A. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J. Biol. Chem.* 2001; 276 (23):19679–82.
- Cabib, E., Sburlati, A., Bowers, B., Silverman, S. J. Chitin synthase 1, an auxiliary enzyme for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 1989; 108 (5):1665–72.
- Cappellaro, C., Baldermann, C., Rachel, R., Tanner, W. Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of a⁻ and alpha-agglutinin. *EMBO J.* 1994 Oct 17;13 (20):4737–44.
- Cappellaro, C., Hauser, K., Mrsa, V., Watzele, M., Watzele, G., Gruber, C., Tanner, W. *Saccharomyces cerevisiae* a⁻ and alpha-agglutinin: characterization of their molecular interaction. *EMBO J.* 1991; 10 (13):4081–8.
- Caro, L. H., Tettelin, H., Vossen, J. H., Ram, A. F., van den Ende, H., Klis, F. M. In silico identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1997; 13 (15):1477–89.
- Cid, V. J., Duran, A., del Rey, F., Snyder, M. P., Nombela, C., Sanchez, M. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 1995; 59 (3):345–86.
- Cos, T., Ford, R. A., Trilla, J. A., Duran, A., Cabib, E., Roncero, C. Molecular analysis of Chs3p participation in chitin synthase III activity. *Eur. J. Biochem.* 1998; 256 (2):419–26.

- Coutinho, P. M. and Henrissat, B. Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat and B. Svensson eds., *The Royal Society of Chemistry*, Cambridge, 1999 pp. 3-12.
- De Nobel, J. G, Klis, F. M., Ram, A., Van Unen, H., Priem, J., Munnik, T., Van Den Ende, H. Cyclic variations in the permeability of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1991; 7 (6):589-98.
- De Sampaio, G., Bourdineaud, J. P., Lauquin, G. J. A constitutive role for GPI anchors in *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall targeting. *Mol. Microbiol.* 1999; 34 (2):247-56.
- Donaldson, A. D., Kilmartin, J. V. Spc42p: a phosphorylated component of the *S. cerevisiae* spindle pole body (SPB) with an essential function during SPB duplication. *J. Cell Biol.* 1996; 132 (5):887-901.
- Donzeau, M., Bourdineaud, J. P., Lauquin, G. J. Regulation by low temperatures and anaerobiosis of a yeast gene specifying a putative GPI-anchored plasma membrane protein. *Mol. Microbiol.* 1996; 20 (2):449-59.
- Douglas, C. M., Foor, F., Marrinan, J. A., Morin, N., Nielsen, J. B., Dahl, A. M., Mazur, P., Baginsky, W., Li, W., el-Sherbeini, M. J., Clemas, A., Manadala, S. M., Frommer, B. R. and Kurtz, M. B. The *Saccharomyces cerevisiae* *FKS1* (*ETG1*) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3-beta-D-glucan synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1994; 91 (26):12907-11.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature* 1951; 168 (4265):167.
- Fankhauser, C. and Conzelmann, A. Purification, biosynthesis and cellular localization

- of a major 125-kDa glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane glycoprotein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 1991; 195 (2):439-48.
- Fantino, E., Marguet, D., Lauquin, G. J. Downstream activating sequence within the coding region of a yeast gene: specific binding in vitro of *RAP1* protein. *Mol. Gen. Genet.* 1992; 236 (1):65-75.
- Farkas, V., Kovarik, J., Kosinova, A., Bauer, S. Autoradiographic study of mannan incorporation into the growing cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 1974; 117 (1):265-9.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 1983; 132 (1):6-13.
- Fujii, T., Shimoi, H., Iimura, Y. Structure of the glucan-binding sugar chain of Tip1p, a cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999; 1427 (2):133-44.
- Garcia-Rodriguez, L. J., Trilla, J. A., Castro, C., Valdivieso, M. H., Duran, A., Roncero, C. Characterization of the chitin biosynthesis process as a compensatory mechanism in the *fks1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 2000; 478 (1-2):84-8.
- Hamada, K., Terashima, H., Arisawa, M., Kitada, K. Amino acid sequence requirement for efficient incorporation of glycosylphosphatidylinositol-associated proteins into the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 1998; 273 (41):26946-53.
- Hamada, K., Terashima, H., Arisawa, M., Yabuki, N., Kitada, K. Amino acid residues in the omega-minus region participate in cellular localization of yeast glycosylphosphatidylinositol-attached proteins. *J. Bacteriol.* 1999; 181

(13):3886-9.

蓮尾徹夫、斎藤栄一、佐藤太一、武藤俊昭、斎藤和夫、蓼沼誠、吉沢淑 活性汚泥槽における酵母の消長について、*醸協* 1983; 78:148-9

蓮尾徹夫、山本奈美、斎藤和夫、蓼沼誠 活性汚泥中の酵母溶解菌の分離とその性質、*醸協* 1984a; 79:510-516

蓮尾徹夫、藤川茂昭、山本奈美、斎藤和夫、蓼沼誠 活性汚泥中の酵母溶解菌増殖促進物質、*醸協* 1984b; 79:517-22

蓮尾徹夫、伊藤雅代、山本奈美、斎藤和夫、蓼沼誠、吉沢淑 酵母を用いた廃水処理における食物連鎖に関する一考察、*醸協* 1984c; 79:904-5

Hardwick, K. G., Boothroyd, J. C., Rudner, A. D., Pelham, H. R. Genes that allow yeast cells to grow in the absence of the HDEL receptor. *EMBO J.* 1992; 11 (11):4187-95.

Hartland, R. P., Fontaine, T., Debeaupuis, J. P., Simenel, C., Delepierre, M., Latge, J. P. A novel beta-(1-3)-glucanosyltransferase from the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *J. Biol. Chem.* 1996; 271 (43):26843-9.

Horak, C. E., Luscombe, N. M., Qian, J., Bertone, P., Piccirillo, S., Gerstein, M., Snyder, M. Complex transcriptional circuitry at the G1/S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 2002; 16 (23):3017-33.

Horisberger, M., Vonlanthen, M. Location of mannan and chitin on thin sections of budding yeasts with gold markers. *Arch. Microbiol.* 1977; 115 (1):1-7.

Howlett, N. G., Avery, S. V. Flow cytometric investigation of heterogeneous copper-sensitivity in asynchronously grown *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999; 176 (2):379-86.

Igual, J. C., Johnson, A. L., Johnston, L. H. Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase

- pathway for yeast cell integrity. *EMBO J.* 1996; 15 (18):5001-13.
- Iyer, V. R., Horak, C. E., Scafe, C. S., Botstein, D., Snyder, M., Brown, P. O.
Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF.
Nature 2001; 409 (6819):533-8.
- Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Vink, E., de la Cruz, J., Llobell, A., Douwes, J. E.,
Shimoi, H., Lipke, P. N., Klis, F. M. Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell
wall proteins through a phosphodiester-linked beta-1,3-/beta-1,6-glucan
heteropolymer. *Glycobiology* 1996; 6 (3):337-45.
- Kapteyn, J. C., Van Egmond, P., Sievi, E., Van Den Ende, H., Makarow, M., Klis, F.
M. The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the
construction of the yeast cell wall in wild-type cells and beta 1,6-glucan-deficient
mutants. *Mol. Microbiol.* 1999; 31 (6):1835-44.
- Kohrer, K., Domdey, H. Preparation of high molecular weight RNA. *Methods*
Enzymol. 1991; 194:398-405.
- Kollar, R., Reinhold, B. B., Petrakova, E., Yeh, H. J., Ashwell, G., Drgonova, J.,
Kapteyn, J. C., Klis, F. M., Cabib, E. Architecture of the yeast cell wall.
Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->3)-glucan, and chitin.
J. Biol. Chem. 1997; 272 (28):17762-75.
- Kolodziej, P. A., Young, R. A. Epitope tagging and protein surveillance. *Methods*
Enzymol. 1991; 194:508-19.
- Kowalski, L. R., Kondo, K., Inouye, M. Cold-shock induction of a family of
TIP1-related proteins associated with the membrane in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Microbiol. 1995; 15 (2):341-53.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227 (259):680-5.

- Lieberman, H. B. *Methods in Molecular Biology, Cell Cycle Checkpoint Control Protocols*, Humana Press Inc., 2004 p66.
- Lipke, P. N., Wojciechowicz, D., Kurjan, J. AG alpha 1 is the structural gene for the *Saccharomyces cerevisiae* alpha-agglutinin, a cell surface glycoprotein involved in cell-cell interactions during mating. *Mol. Cell Biol.* 1989; 9 (8):3155-65.
- Lowry, C. V., Zitomer, R. S. *ROX1* encodes a heme-induced repression factor regulating *ANB1* and *CYC7* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 1988; 8 (11):4651-8.
- Lu, C. F., Kurjan, J., Lipke, P. N. A pathway for cell wall anchorage of *Saccharomyces cerevisiae* alpha-agglutinin. *Mol. Cell Biol.* 1994; 14 (7):4825-33.
- Lu, C. F., Montijn, R. C., Brown, J. L., Klis, F., Kurjan, J., Bussey, H., Lipke, P. N. Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha-agglutinin and beta 1,6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Cell Biol.* 1995; 128 (3):333-40.
- Ludwig, J. R. 2nd, Foy, J. J., Elliott, S. G., McLaughlin, C. S. Synthesis of specific identified, phosphorylated, heat shock, and heat stroke proteins through the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 1982; 2 (2):117-26.
- Madden, K., Sheu, Y. J., Baetz, K., Andrews, B., Snyder, M. SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science* 1997; 275 (5307):1781-4.
- Marguet, D., Lauquin, G. J. The yeast *SRP* gene: positive modulation by glucose of its transcriptional expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986; 138 (1):297-303.
- Maruyama, Y., Nakajima, T. The *aman6* gene encoding a yeast mannan backbone degrading 1,6-alpha-D-mannanase in *Bacillus circulans*: cloning, sequence

- analysis, and expression. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000; 64 (9):2018-20.
- Mazur, P., Baginsky, W. In vitro activity of 1,3-beta-D-glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho1. *J. Biol. Chem.* 1996; 271 (24):14604-9.
- Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., el-Sherbeini, M., Clemas, J. A., Nielsen, J. B., Foor, F. Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol. Cell Biol.* 1995; 15 (10):5671-81.
- Montijn, R. C., van Rinsum, J., van Schagen, F. A., Klis, F. M. Glucomannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* contain a novel type of carbohydrate side chain. *J. Biol. Chem.* 1994; 269 (30):19338-42.
- Mosch, H. U., Fink, G. R. Dissection of filamentous growth by transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 1997; 145 (3):671-84.
- Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W. A., Diaquin, M., Popolo, L., Hartland, R. P., Latge, J. P. Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanoyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J. Biol. Chem.* 2000; 275 (20):14882-9.
- Mrsa, V., Seidl, T., Gentzsch, M., Tanner, W. Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1997; 13 (12):1145-54.
- 中瀬 崇 微生物分類学の新しい流れ、7. 酵母 *化学と生物* 1989; 27:332-9
- Nuoffer, C., Jenö, P., Conzelmann, A., Riezman, H. Determinants for glycosylphospholipid anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* GAS1 protein to the plasma membrane. *Mol. Cell Biol.* 1991; 11 (1):27-37.
- Nuoffer, C., Horvath, A., Riezman, H. Analysis of the sequence requirements for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 protein. *J. Biol. Chem.* 1993; 268 (14):10558-63.

- Ogas, J., Andrews, B. J., Herskowitz, I. Transcriptional activation of *CLN1*, *CLN2*, and a putative new G1 cyclin (*HCS26*) by *SWI4*, a positive regulator of G1-specific transcription. *Cell* 1991; 66 (5):1015-26.
- Ono, N., Yabe, T., Sudoh, M., Nakajima, T., Yamada-Okabe, T., Arisawa, M., Yamada-Okabe H. The yeast Chs4 protein stimulates the trypsin-sensitive activity of chitin synthase 3 through an apparent protein-protein interaction. *Microbiology* 2000; 146 (Pt 2):385-91.
- Orlean, P. Two chitin synthases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 1987; 262 (12):5732-9.
- Payne, W. E., Garrels, J. I. Yeast Protein database (YPD): a database for the complete proteome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25(1):57-62.
- Peberdy, J. F. in Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi (Kuhn, P. J., Trinci, A. P. J., Jung, M. J., Goosey, M. W. and Copping, L. G., eds) *Spring-Verlag*, Berlin 1990 pp5-30.
- Pierce, J. S. Institute of Brewing: Analysis committee measurement of yeast viability. *J. Inst. Brew.* 1970 76: 442-443.
- Popolo, L., Gualtieri, T., Ragni, E. The yeast cell-wall salvage pathway. *Med. Mycol.* 2001; 39:111-21.
- Popolo, L., Vai, M. The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999; 1426(2):385-400.
- Pringle, J. R. Staining of bud scars and other cell wall chitin with calcofluor. *Methods Enzymol.* 1991;194:732-5.
- Qadota, H., Python, C. P., Inoue, S. B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D. E., Ohya, Y. Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science* 1996; 272

(5259):279–81.

- Ram, A. F., Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Caro, L. H., Douwes, J. E., Baginsky, W., Mazur, P., van den Ende, H., Klis, F. M. Loss of the plasma membrane-bound protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of beta1,3-glucan into the medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity. *J. Bacteriol.* 1998; 180 (6):1418–24.
- Ram, A. F., Van den Ende, H., Klis, F. M. Green fluorescent protein-cell wall fusion proteins are covalently incorporated into the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1998; 162(2):249–55.
- Roemer, T., Bussey, H. Yeast Kre1p is a cell surface O-glycoprotein. *Mol. Gen. Genet.* 1995; 249 (2):209–16.
- Rothstein, R. Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. *Methods Enzymol.* 1991;194:281–301.
- Roy, A., Lu, C. F., Marykwas, D. L., Lipke, P. N., Kurjan, J. The *AGA1* product is involved in cell surface attachment of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion glycoprotein a-agglutinin. *Mol. Cell Biol.* 1991; 11 (8):4196–206.
- Sburlati, A., Cabib, E. Chitin synthetase 2, a presumptive participant in septum formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 1986; 261 (32):15147–52.
- Sharp, P. M., Cowe, E. Synonymous codon usage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1991; 7 (7):657–78.
- Shibata, N., Mizugami, K., Takano, K., Suzuki, S. Isolation of mannan-protein complexes from viable cells of *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A wild type and *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1 A-5 mutant strains by the action of Zymolyase-60,000. *J. Bacteriol.* 1983; 156 (2):552–8.
- Shimizu, J., Yoda, K., Yamasaki, M. The hypo-osmolarity-sensitive phenotype of the

- Saccharomyces cerevisiae hpo2* mutant is due to a mutation in *PKC1*, which regulates expression of beta-glucanase. *Mol. Gen. Genet.* 1994; 242 (6):641–8.
- Shimoi, H., Tadenuma, M. Characterization of *Rarobacter faecitabidus* protease I, a yeast-lytic serine protease having mannose-binding activity. *J. Biochem (Tokyo)* 1991a; 110 (4):608–13.
- Shimoi, H., Muranaka, Y., Sato, S., Saito, K. and Tadenuma, M. Purification of the enzymes responsible for the lysis of yeast cells by *Rarobacter faecitabidus*. *Agric. Biol. Chem.* 1991b; 55, 371–378.
- Shimoi, H., Iimura, Y., Obata, T., Tadenuma, M. Molecular structure of *Rarobacter faecitabidus* protease I. A yeast-lytic serine protease having mannose-binding activity. *J. Biol. Chem.* 1992; 267 (35):25189–95.
- Shimoi, H., Iimura, Y., Obata, T. Molecular cloning of *CWPI*: a gene encoding a *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein solubilized with *Rarobacter faecitabidus* protease I. *J. Biochem. (Tokyo)* 1995; 118 (2):302–11.
- Sikorski, R. S., Hieter, P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 1989; 122 (1):19–27.
- Spreghini, E., Davis, D. A., Subaran, R., Kim, M., Mitchell, A. P. Roles of *Candida albicans* Dfg5p and Dcw1p cell surface proteins in growth and hypha formation. *Eukaryot. Cell* 2003; 2 (4):746–55.
- Suzuki, J., Kondo, A., Kato, I., Hase, S. and Ikenaka, T. Analysis by high-performance anion-exchange chromatography of component sugars as their fluorescent pyridylamino derivatives. *Agric. Biol. Chem.* 1991; 55:283–284.
- Suzuki, M., Igarashi, R., Sekiya, M., Utsugi, T., Morishita, S., Yukawa, M. and Ohya, Y. Dynactin is involved in a checkpoint to monitor cell wall synthesis in

- Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Cell Biol.* 2004; 6(9):861–71.
- Teunissen, A. W., Steensma, H. Y. Review: the dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family. *Yeast* 1995; 11 (11):1001–13.
- Thevelein, J. M. Signal transduction in yeast. *Yeast* 1994; 10 (13):1753–90.
- Tomishige, N., Noda, Y., Adachi, H., Shimoi, H., Takatsuki, A., Yoda, K. Mutations that are synthetically lethal with a *gas1*Δ allele cause defects in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics.* 2003; 269 (4):562–73.
- Toyn, J. H., Gunyuzlu, P. L., White, W. H., Thompson, L. A., Hollis, G. F. A counterselection for the tryptophan pathway in yeast: 5-fluoroanthranilic acid resistance. *Yeast* 2000; 16 (6):553–60.
- Tsai, P. K., Frevert, J., Ballou, C. E. Carbohydrate structure of *Saccharomyces cerevisiae mnn9* mannoprotein. *J. Biol. Chem.* 1984; 259 (6):3805–11.
- Vai, M., Gatti, E., Lacana, E., Popolo, L., Alberghina, L. Isolation and deduced amino acid sequence of the gene encoding gp115, a yeast glycosphospholipid-anchored protein containing a serine-rich region. *J. Biol. Chem.* 1991; 266 (19):12242–8.
- Valentin, E., Herrero, E., Rico, H., Miragall, F., Sentandreu, R. Cell wall mannoproteins during the population growth phases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 1987; 148 (2):88–94.
- van der Vaart, J. M., Caro, L. H., Chapman, J. W., Klis, F. M., Verrrips, C. T. Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 1995; 177 (11):3104–10.
- van der Vaart, J. M., van Schagen, F. S., Mooren, A. T., Chapman, J. W., Klis, F. M., Verrrips, C. T. The retention mechanism of cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Wall-bound Cwp2p is beta-1,6-glucosylated. *Biochim. Biophys. Acta.*

- 1996; 1291 (3):206-14.
- Van Rinsum, J., Klis, F. M., van den Ende, H. Cell wall glucomannoproteins of *Saccharomyces cerevisiae mnn9*. *Yeast* 1991; 7 (7):717-26.
- Varela, J. C., Praekelt, U. M., Meacock, P. A., Planta, R. J., Mager, W. H. The *Saccharomyces cerevisiae HSP12* gene is activated by the high-osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A. *Mol. Cell Biol.* 1995; 15 (11):6232-45.
- Werner-Washburne, M., Braun, E. L., Crawford, M. E., Peck, V. M. Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 1996; 19(6):1159-66.
- Wheeler, R. T., Kupiec, M., Magnelli, P., Abeijon, C., Fink, G. R. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant with increased virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2003; 100 (5):2766-70.
- Winzler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J. D., Bussey, H., Chu, A. M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S. W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S. H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J. H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Davis, R. W., et al. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 1999; 285 (5429):901-6.
- Wysocki, R., Van Dyck, E., Fairhead, C., Foury, F. Mass-murdering: deletion of twenty-three ORFs from *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XI reveals five genes essential for growth and three genes conferring detectable mutant phenotype. *Gene* 1999; 229 (1-2):37-45.
- Yamamoto, N., Sato, S., Saito, T., Hasuo, T., Tadenuma, M., Suzuki, K., Tamaoka, J., Komagata, K. *Rarobacter faecitabidus* gen. nov., sp. Nov., a yeast-lysing coryneform bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1998; 38:7-11.

Ye, K., Shibasaki, S., Ueda, M., Murai, T., Kamasawa, N., Osumi, M., Shimizu, K., Tanaka, A. Construction of an engineered yeast with glucose-inducible emission of green fluorescence from the cell surface. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000; 54 (1):90-6.

吉沢淑、酵母を用いる食品工業廃水新処理法の開発、*農化* 1981; 55: 705-711

Zhao, C., Jung, U. S., Garrett-Engele, P., Roe, T., Cyert, M. S., Levin, D. E. Temperature-induced expression of yeast *FKS2* is under the dual control of protein kinase C and calcineurin. *Mol. Cell Biol.* 1998; 18 (2):1013-22.

Zitomer, R. S., Lowry, C. V. Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 1992;56 (1):1-11.

論文の要旨

酵母はその細胞の外側に強固な細胞壁を持っている。酵母細胞壁は酵母を外界の環境から守ると同時に、外界の情報を酵母細胞に伝えるインターフェースでもある。また醸造においても、酵母細胞壁は清酒酵母の高泡形成能やビール酵母の凝集性などに関与し、重要な役割を有している。本研究では、酵母の静置培養特異的細胞壁タンパク質として Tirlp/Srplp を、定常培養期において主要な細胞壁タンパク質として Sed1p を同定し、Sed1p が定常培養期において溶解酵素に対する耐性に関与していることを明らかにした。また、*DCW1* 及び *DFG5* の遺伝子産物は GPI アンカー型膜タンパク質であり、芽の細胞壁の生合成に重要な役割を持つことを明らかにした。

1 静置培養特異的細胞壁タンパク質 Tirlp/Srplp の同定と解析(1)

静置培養した酵母の細胞壁グルカンから酵母溶解酵素である *Rarobacter protease I* 処理で遊離する 100kDa のタンパク質を精製した。このタンパク質は、振盪培養した酵母からは見いだされなかった。このタンパク質のアミノ酸配列を決定したところ、*TIR1/SRPI* 遺伝子がコードするタンパク質であった。*TIR1/SRPI* はこれまでにグルコース、低温ショックあるいは嫌気培養で誘導される遺伝子として見つかっており、その産物は細胞壁タンパク質ではなく細胞膜タンパク質であると考えられてきた。しかしながら、Tirlp/Srplp は β -1,3-グルカナーゼ処理によって細胞壁から溶出され、精製した Tirlp/Srplp は β -1,6-グルカンに対する抗体と反応し、グルコースを含んでいた。これらのことから、Tirlp/Srplp は静置培養された酵母における主要な細胞壁タンパク質のひとつであり、細胞壁に β -1,6-グルカンを通じて結合していることが示唆された。

TIR1/SRPI 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。以上のことから、Tir1p/Srp1p は静置培養特異的細胞壁タンパク質であることが示された。

2 定常培養期の主要細胞壁タンパク質 Sed1p の同定と解析 (2)

上記と同様の方法により、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 *SEDI* 遺伝子の産物であることが明らかとなった。*SEDI* 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グリコシルホスファチジルイノシトール (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 は免疫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。*SEDI* 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。*SEDI* 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。

3 細胞壁生合成に関与する *DCW1* (*YKL046c*) と *DFG5* の同定と解析 (3)

主要な酵母細胞壁タンパク質は GPI アンカータンパク質として合成され、細

胞壁の β -1,6-グルカンに転移することが知られている。この転移を糖転移反応であると仮定し、*Bacillus circulans*の α -1,6-mannanaseをコードする遺伝子とホモロジーのある酵母の遺伝子をゲノムデータベースから検索したところ、*DFG5*と*YKL046c*が見出された。これらの遺伝子は互いに相同であり、GPI アンカータンパク質に特徴的な構造を持っていた。*DFG5*と*YKL046c*の単独破壊株は生育可能であったが、 $\Delta yk1046c$ は細胞壁溶解酵素に感受性を示し、細胞壁が弱くなっていたことから、この遺伝子が細胞壁の生合成に関与していることが示唆された。従って、*YKL046c*を*DCW1* (Defective Cell Wall)と命名した。 $\Delta dcw1$ $\Delta dfg5$ は致死であったことから、両遺伝子産物の機能は重複しており、細胞の増殖のためには少なくともひとつは必要であると考えられた。両方の遺伝子産物が欠損した細胞では、細胞は大きく丸くなり、細胞壁のキチン含量が多くなり、主要な細胞壁タンパク質であるCwp1pを培地に分泌した。Dcw1p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、細胞表層を含む膜画分に局在していた。これらの結果から、Dcw1pとDfg5pはGPIアンカー型膜タンパク質であり、細胞壁の通常の生合成に必要であることが示唆された。

4 温度感受性 *dcw1* 変異株の取得と解析 (4)

Dcw1p及びDfg5pの細胞壁生合成に関する機能をより詳細に解析するため、PCRでランダムに*DCW1*に変異を導入し、プラスミドに組み込んだ後、 $\Delta dcw1$ $\Delta dfg5$ に形質転換して温度感受性変異株DC61を単離した。DC61を37°Cで培養すると、ほとんどの細胞は母細胞の20%以下の断面積しか持たない小さな芽の状態を増殖を止めていた。この結果は、37°Cで培養したDC61は細胞周期のアレストを起こしていることを示唆していたため、DNA含量を調べたところ、37°Cで培養したDC61では、1n DNAを持った細胞の割合が減少していたが、Spindle pole body

(SPB)は分離していなかった。また、細胞を DAPI 染色したところ、単核であった。このことから、37°Cで培養した DC61 は DNA 合成の後、SPB 分離の前で細胞周期を停止していると考えられた。これらの小さな芽の表層にはキチンが集積し、芽は溶解を示したことから、芽の細胞壁が異常になっていると考えられた。また、*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すると考えられた。これらの結果から、Dcw1p と Dfg5p は、芽の細胞壁の生合成に重要な役割を持つことが示された。

5 結論

酵母溶解酵素である *Rarobacter protease I* 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 Tirlp/Srplp の配列と一致した。*TIR1/SRPI* 遺伝子は静置培養特異的に発現し、Tirlp/Srplp 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、Tirlp/Srplp 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、*SEDI* 遺伝子は定常培養期に多く発現し、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。

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* について詳しく調べた。その結果、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は 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。このことから、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が明らかとなった。

本研究により、酵母細胞壁タンパク質が培養条件に応じてダイナミックに変化すること及び、新規な GPI アンカー型膜タンパク質である Dcw1p と Dfg5p が芽の細胞壁の生合成に関与することが明らかとなった。今後、酵母細胞壁タンパク質が培養条件に応じて変化する生理学的な役割を明らかにするため、培養条件特異的酵母細胞壁タンパク質がどのような成分と相互作用し細胞壁の構造を形成しているか、また Dcw1p 及び Dfg5p の細胞壁の形成における役割を明らかにするため、大量発現系を用いて Dcw1p 及び Dfg5p を高発現し、どのような酵素作用を持つか、*dcw1* Δ *dfg5* Δ 破壊株の細胞壁画分にその酵素を作用させたときに細胞壁画分にどのような変化があるかなどを調べる必要があると考えられる。

発表論文

(1)

Hiroshi Kitagaki, Hitoshi Shimoi, and Kiyoshi Itoh

Identification and analysis of a static culture-specific cell wall protein, Tir1p/Srp1p in

Saccharomyces cerevisiae

European Journal of Biochemistry, **249**, 343–349 (1997)

(2)

Hitoshi Shimoi, Hiroshi Kitagaki, Hisanobu Ohmori, Yuzuru Iimura, and Kiyoshi Ito

Sed1p is a major cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase

and is involved in lytic enzyme resistance.

Journal of Bacteriology, **180**, 3381–3387 (1998)

(3)

Hiroshi Kitagaki, Wu Hong, Hitoshi Shimoi, and Kiyoshi Ito

Two homologous genes, *DCW1* (*YKL046c*) and *DFG5*, are essential for cell growth and

encode GPI-anchored membrane proteins required for cell wall biogenesis in

Saccharomyces cerevisiae.

Molecular Microbiology, **46**, 1011–1022 (2002)

(4)

Hiroshi Kitagaki, Kiyoshi Ito, and Hitoshi Shimoi

A temperature-sensitive *dcw1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* is cell-cycle arrested with small buds which have aberrant cell walls.

Eukaryotic Cell, 3 (5), 1297–1306 (2004)

謝辞

本研究を行うにあたり、終始御指導、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教授、依田幸司博士に深く感謝申し上げます。

本研究は独立行政法人酒類総合研究所において、酒類理化学研究室長、伊藤清博士及び遺伝子工学研究室長、下飯仁博士の御指導の下行われたものであります。また多くの共同研究者、特に、山梨大学大学院教授、飯村穰博士、環境保全研究室主任研究員、藤井力氏、研究企画室主任研究員、岩下和裕博士、重点支援研究協力員、呉洪博士、亀齢酒造株式会社、大森久信氏の各氏他、たくさんの皆様に貴重な御助言及び御援助を頂きました。ここに深謝いたします。

また、この研究を続けるに当たり、東京大学大学院農学生命科学研究科教授、北本勝ひこ博士及び日本大学生物資源科学部教授、山崎真狩博士、その他、大学時代、大学院時代、国税庁のたくさんの皆さんに終始お励ましのお言葉をいただきました。ここに厚く感謝申し上げます。

平成 16 年 9 月 著者