

博士学位論文

論文題目

出芽酵母の細胞壁構成多糖
 β -1,6-glucan 合成関連遺伝子の解析

東京大学 大学院農学生命科学研究科

応用生命工学専攻

平成 18 年度博士課程 進学

氏 名 栗田 朋和

指導 教員 依田 幸司

略語表

aa	amino acid
amp	ampicillin
ATP	adenosine triphosphate
BSA	bovine serum albumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CFW	Calcofluor White
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
endo H	endoglycosidase H
ER	endoplasmic reticulum
ERAD	ER-associated degradation
FL	full length
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GFP	green fluorescent protein
GlcNAc	<i>N</i> -acetylglucosamine
GPI	glycosylphosphatidylinositol
GST	glutathione <i>S</i> -transferase
GTPase	guanosine triphosphatase
HA	hemagglutinin
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
IP	immunoprecipitation
Man	mannose

OD	optical density
ORF	open reading frame
PCR	polymerase chain reaction
pic	protease inhibitor cocktail
PIPES	piperazine- <i>N,N'</i> -bis(2-ethanesulfonic acid)
PM	plasma membrane
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
poly-K	poly-lysine
PVDF	polyvinylidene fluoride
SDS	sodium dodecylsulfate
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SGD	Saccharomyces genome database
SV	secretory vesicle
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline with Tween 20
TCL	total cell lysate
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-ethylenediamine
TFA	trifluoroacetic acid
TMD	transmembrane domain
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
TTC	2,3,5-triphenyltetrazolium chloride
UDP	uridine diphosphate
UPR	unfolded protein response
ura	uracil
YPD	Yeast proteome database

目 次

略語表

目次

序論 1

第一章 抗 Kre6 抗体の取得と Kre6 の細胞内局在

序 11

結果

1. Kre6-3HA の局在 14

2. 抗 Kre6 抗体の取得 18

3. Kre6 の間接蛍光観察 23

4. Kre6 の topology の検討 28

5. 蔗糖密度勾配遠心による Kre6 の局在の検討 30

6. 小胞体, 細胞質膜の marker タンパク質と Kre6 の共染色 35

7. Kre6 の免疫電子顕微鏡観察 40

8. Kre6 の極性生長部位局在の細胞壁への寄与 43

考察 50

第二章 Keg1 とその他の β -1,6-glucan 合成関連遺伝子の解析

序 54

結果	
1. <i>Keg1</i> 変異株の K1 killer toxin 感受性の解析	58
2. <i>Keg1</i> の局在の検討	60
3. <i>Keg1</i> と <i>Kre6</i> の物理的相互作用の検討	63
4. <i>KEG1</i> と <i>CNE1</i> 及び、その他の β -1,6-glucan 合成関連遺伝子との 遺伝学的、物理的相互作用の検討	66
5. <i>Keg1</i> を含む、 <i>Kre6</i> の局在、安定性に関わる因子の解析	73
考察	78
総括	82
実験材料と方法	91
参考文献	124
謝辞	131

序論

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞壁は、乾燥重量の 30%にあたる。細胞壁の組成の 85%は、多糖であり、15%はタンパク質が占める。多糖を構成している糖は、キチンの *N*-acetylglucosamine (GlcNAc)が 1-2%、マンナンタンパク質のマンナンが 10-20%、glucan を構成する glucose が 80-90%である [Lesage, 2006.], [Magnelli, 2002].

酵母細胞壁は二層に分かれ細胞の最表層部分はマンノースが結合したマンナンタンパク質の層があり、その内側に glucan 層が存在する。Glucan 層は 75%を占める主要な β -1,3-glucan と 25%を占め量的には少ないが重要な働きをする β -1,6-glucan の 2 種類の glucan により構成される。 β -1,3-glucan は、glucose が約 1500 残基結合した多糖である。 β -1,6-glucan は、glucose が約 350 残基結合した多糖であり、 β -1,3-glucan の糖鎖の 6 位の炭素に β -1,6-結合により繋がる。また、 β -1,6-glucan の 15%ほどは、 β -3,6 結合により繋がる分岐を持つ。この β -1,6-glucan は同時に細胞表層側の細胞壁マンナンタンパク質やキチンと共有結合して、それらを β -1,3-glucan に繋ぐ働きが有る為、細胞壁構造の維持、及び生育に必須である(Fig.A).

β -1,3-glucan 合成酵素 Fks1(FK506 Sensitivity 1)は最初 FK506 に対する高感受性変異株から同定された [Parent, 1993]. この表現型が現れるのは、次の機構によると考えられている。Fks1 には二重破壊で致死となるホモログの Fks2 があって、一方が機能を失っても致死にはならない。Fks2 は饑餓や孢子形成などで誘導されるが、その発現に必要な転写因子の活性化には FK506 が阻害するカルシニューリンが関わっている。fks1 欠損変異株は通常の培地では Fks2 の働きがあるので生育できるが、FK506 の存在により Fks1,Fks2 の両方の機能が不全になるため致命的になる。 β -1,3-glucan 合成酵素として同定されたのは、細胞の total

membrane からの β -1,3-glucan *in vitro* 合成系を応用し、大量の β -1,3-glucan を合成させ、その β -1,3-glucan(すなわち product)と一緒に合成酵素を取得しようという方法、product entrapment を用いて取得された [Inoue, 1995]. この方法で精製された β -1,3-glucan 合成酵素は、細胞質膜(Plasma Membrane, PM)に内在する活性 subunit である Fks1 と、それに結合する制御 subunit である Rho1 GTPase からなることが分かった.

この Fks1 の解析の知見、及び β -1,3-glucan 合成の *in vitro* 系は Fks1 を標的とする薬剤、ミカファンギンの開発に利用された[Fujie, 2000], [池田, 2005]. 病原性の真菌の引き起こす、真菌症は、水虫などの皮膚の表面に真菌が繁殖する表在性真菌症と肺などの体の内部で起こる深在性真菌症の 2 種類がある. 特に深在性真菌症は免疫力の低下した人が罹患する為、死に至る非常に恐ろしい感染症である. この真菌症の最大の問題は、真核細胞生物である為バクテリアに有効な抗生物質は効果が無く、真菌細胞の多くの細胞内機構は人と共通であるため、薬剤の標的に出来る分子種が少なく、重い副作用も出やすいことである. しかし、細胞壁は真菌間では保存性が高く、細胞壁の構成成分も種間で量比の差はあっても基本的に同じだが、人には細胞壁や glucan 合成酵素遺伝子のホモログを含め全く存在しない為、非常に有力な薬剤標的である. 完成したミカファンギンは真菌に対する有効性が高く、且つ副作用の少ない薬剤として用いられている. このように、真菌の細胞壁合成機構の解明は、抗真菌の薬剤開発に資するところが大きい.

出芽酵母の細胞壁を構成する多糖の内、存在する割合が最も少ないキチンは、*N*-acetylglucosamine (GlcNAc)が β -1,4 結合により約 150 残基結合した多糖である (Fig.A). キチンは細胞壁に剛性を与え、細胞の分裂時に母細胞と娘細胞の細胞質を分断する primary septum の構成多糖である. primary septum の合成は

Actomyosin ring(AMR)と協調して細胞質分裂を進める事も明らかとなった為、キチンは生存に不可欠である[Nishihama, 2009]. また、キチンは細胞壁の異常や様々なストレスによっても合成が昂進され、細胞壁の剛性をさらに高める事が知られている[Lesage, 2006].

キチンの合成酵素は三種類 Chs1, Chs2, Chs3 あることが明らかにされている. 細胞質分裂後に娘細胞と母細胞の最後の分断は, primary septum を特異的なキチナーゼで消化して行われるが, Chs1 は,その結果形成した出芽痕において, 過剰に失われたキチンを補う働きをする. Chs2 は bud neck にリクルートされ, primary septum の形成を行う. Chs3 は PM におけるキチンの合成と, primary septum の形成の前段階で形成されるキチンリングを合成する[Lesage, 2006].

Chs2 は bud neck, Chs3 は, PM, bud neck において UDP-GlcNAc を基質としてキチンの合成を行うが, Chs2, Chs3 とともに細胞周期やストレスなどに応答して本来働くべき場所へとリクルートされ, それ以外にも多くの Chs2, Chs3 タンパク質が小胞体(Endoplasmic Reticulum, ER)や Golgi 体, 輸送小胞などに存在する事が知られている[Chuang, 1996]. 特に Chs3 については ER から PM までの輸送に関わる多くの遺伝子について解析が行われ, それら遺伝子は単独の破壊でも Chs3 の輸送が出来ない為に細胞壁のキチンレベルの低下を起こす. それらの遺伝子は *CHS*(Chitin Synthase-related)と命名され解析された. 分泌経路途上におけるキチン合成酵素の局在は, PM や bud neck に輸送するためのリザーブと考えられ, ストレスなどの環境変化の素早く応答する生物学的な戦略と考えられている[Valdivia, 2003].

本研究の主題である β -1,6-glucan は, 細胞壁多糖の 12%を占め, キチンよりも遙かに多い[Lesage, 2006]. 細胞壁の β -1,6-glucan に結合して有害な細胞質膜孔を形成する K1 killer toxin は, β -1,6-glucan が減少した変異株に対しては作用できな

い. この K1 killer toxin に対する耐性化を付与する変異の原因遺伝子が β -1,6-glucan 合成関連遺伝子として *KRE*(Killer toxin REsistance)と命名されてきた. *KRE* 遺伝子以外にも変異により β -1,6-glucan 量が減少する遺伝子が見つまっている. その後の解析から、これらの遺伝子の産物の多くは分泌経路のさまざまなオルガネラに存在することが分かった. しかし Fks1 や Chs3 に構造的に似た PM に内在する β -1,6-glucan 合成酵素と思われる遺伝子産物は発見されなかった [Shahinian, 2000], [Pagé, 2003] (Fig.B).

植物の β -1,3-glucan を検出する抗 β -1,3-glucan 抗体が得られている. 多糖に対する抗体を得るためには、 β -1,3-glucan の断片のみでは抗原としての活性が弱く、抗体を作成出来なかった為、短い β -1,3-glucan 鎖を BSA に人工的に共有結合した物を抗原として作成された [Meikle, 1991]. 同じ方法で β -1,6-glucan に対する抗体も取得された. 市販の β -1,6-glucan である pustulan を TFA (trifluoroacetic acid)により加水分解し、ゲル濾過カラムにより分離して約 15 glucose 残基の β -1,6-glucan を調製し、BSA に結合して抗原とした. 作成された抗 β -1,6-glucan 抗体は特異的に β -1,6-glucan を検出できた [Montijn, 1994]. この抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察の結果、出芽酵母 *S.cerevisia* では β -1,6-glucan は PM の外側にしか検出されなかった [Montijn, 1999] (Fig.C-1). しかし、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* において同じ抗 β -1,6-glucan 抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察では Golgi 体に蛍光シグナルが検出された [Humbel, 2001]. この結果は、分裂酵母と出芽酵母で細胞壁の合成機構が異なるのか、出芽酵母でも検出されにくいだけで、細胞内部での β -1,6-glucan の合成が行われているのか、詳細は全くわかっていない. 生細胞に抗 β -1,6-glucan 抗体を処理し、次に 2 次抗体として BSA と結合した抗体を用いて、この時点で細胞壁に存在する β -1,6-glucan を抗体によりマスクした. この細胞が生長した後で、再度抗 β -1,6-glucan 抗体を処理し蛍光観察を行った. その結果、小さな芽において強い蛍光シグナルが検出された. この検討により新生

β -1,6-glucan の局在が明らかにされ、小さい芽で盛んに β -1,6-glucan 合成がされていることが明らかになった[Li, 2002](Fig.C-2).

β -1,6-glucan の *in vitro* 合成系は, Bussey のグループが出芽酵母の粗膜画分を酵素源とし, 基質として UDP-glucose を用いた系を報告したが[Vink, 2004], それに続く報告はなく, 筆者らの予備的検討においても十分な合成を認められなかった. 最近, Latgé のグループは, 膜画分では β -1,6-glucan は合成できず, 浸透圧ショックで作製した semi-intact cell でアルカリ不溶 β -1,3-glucan に結合した β -1,6-glucan が合成できたと報告し, インタクトな小胞を含むような高次の細胞の働きが β -1,6-glucan 合成に必要なことを示唆した[Aimanianda, 2009].

β -1,6-glucan 合成系における最大の問題は, PM の外側にしか β -1,6-glucan が検出されないにも拘らず, 変異により β -1,6-glucan が減少し且つ UDP-glucose を基質とする合成反応に関わりうるタンパク質が PM に発見されていない点にある[Shahinian, 2000]. 可能性として, 抗体に反応しない短い β -1,6-glucan が細胞内で作られて, PM の外側でつなぎ合わされ 350 残基の β -1,6-glucan となるか, 現在まで未解析, または既知だが局在が誤って認識されている PM タンパク質が UDP-glucose を用いて β -1,6-glucan を合成することが考えられる(Fig.B). その為, β -1,6-glucan 合成関連遺伝子産物の局在に関する正確な知見は, この合成系の解明に非常に重要である.

当研究室では, 分泌経路でのタンパク質輸送に関わる新規な重要因子の同定を目的として, 出芽酵母 *S.cerevisiae* の機能未知必須膜タンパク質の網羅的解析が試みられた. 真核生物の多くのタンパク質は ER の膜上において合成され, ER から Golgi 体へと輸送される過程で糖鎖やその他の修飾を受けて個々のタンパク質が正しい構造を形成し, 機能を発揮すべき正しい膜画分へと輸送される. このタンパク質の合成,修飾と分配を総称して分泌経路と言い, 真核生物の内膜系

の根幹に関わる重要な機構である。まず *S. cerevisiae* の機能未知必須遺伝子で膜貫通領域を持つと推定されるタンパク質をコードするものをデータベース(YPD [Yeast proteome database, www.proteome.com/databases/]および SGD [Saccharomyces genome database, www.yeastgenome.org/])を用いて選出し、それらタンパク質の局在を決定、分泌経路でのタンパク質輸送に関与する可能性のある ER, Golgi 体に局在するタンパク質を選択した。選んだ遺伝子について、error-prone PCR により温度感受性変異株を作製し、表現型や遺伝学的に関連する遺伝子をスクリーニングすることにより機能を推測、以降の解析を行った。

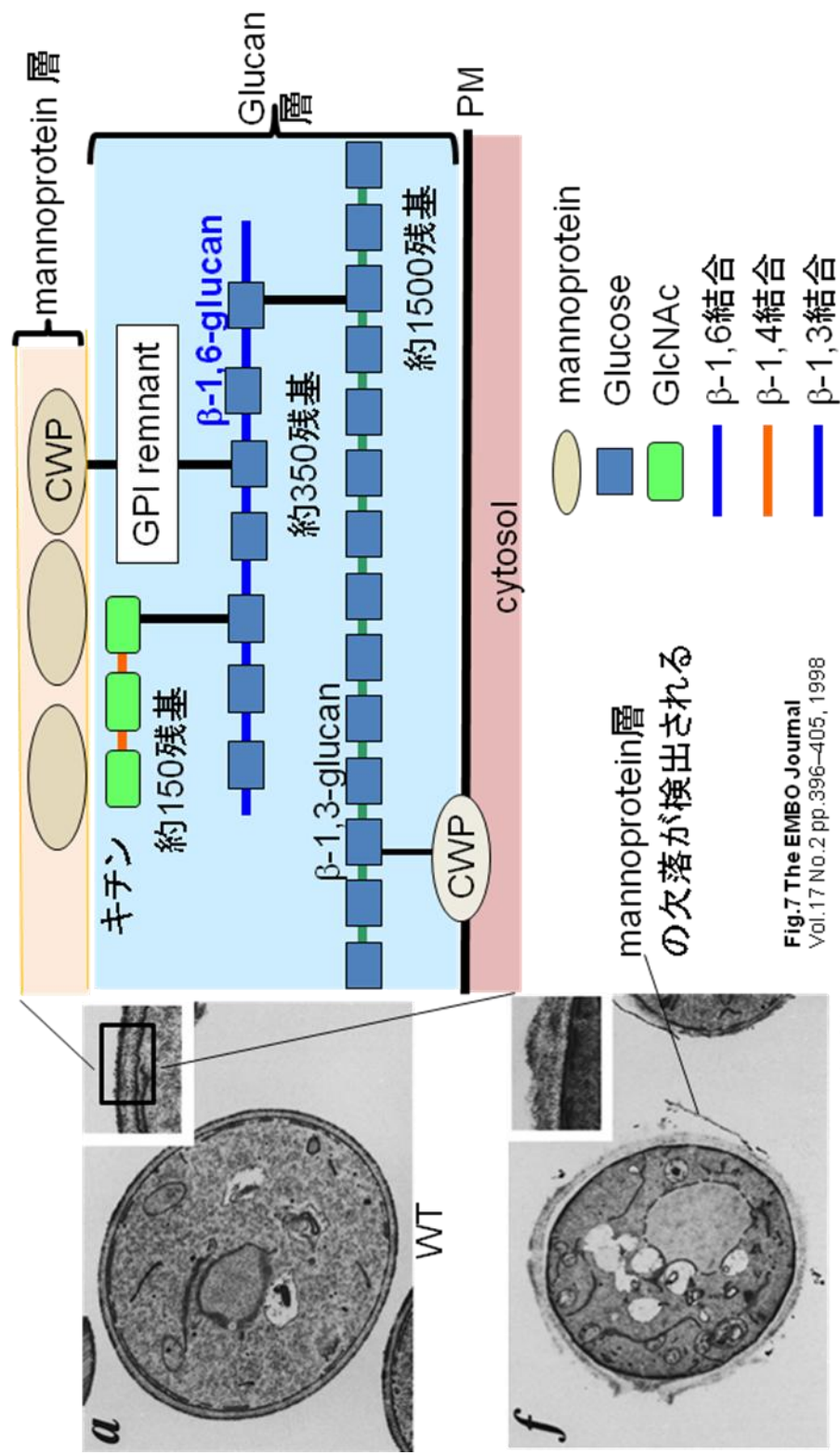
このような経緯により解析が行われた遺伝子の一つ、*YFR042w* は、中俣および筆者らの検討の結果、温度感受性変異株において、キチンに結合して生育を阻害する CFW(Calcofluor white)に対する高感受性を示し、サプレッサースクリーニングにより β -1,6-glucan 合成に関わるとされていた *Rot1* の過剰発現が温度感受性を回復させた。さらに、*YFR042w* の温度感受性変異株においてアルカリ不溶性の β -1,6-glucan の減少を見出し、また、 β -1,6-glucan 合成に重要な働きを持つと考えられる遺伝子産物、*Kre6*(後述)との結合も検出された。これらの知見を総合して *YFR042w* を β -1,6-glucan 合成に関わる新規必須遺伝子として *KEG1*(*Kre6* binding ER protein responsible for β -1,6-Glucan synthesis 1)と命名した。

Kre6 は、type II 膜タンパク質で遺伝子破壊により β -1,6-glucan が減少する。Family 16 glycoside hydrolase に相同性があり C 末端に UDP-glucose binding domain を持つ為、 β -1,6-glucan synthase の有力な候補タンパク質の一つである [Roemer, 1991] [Montijn, 1999].

本研究では、出芽酵母 *S. cerevisiae* の β -1,6-glucan 合成系の全容解明を目的とした。*Keg1* の解析の過程において、*Kre6* の局在が筆者らが以前に報告した ER とは異なる可能性が示された為、抗 *Kre6* 抗体を取得し、*Kre6* の真の局在に関する検討を行った。その結果、*Kre6* が β -1,6-glucan が盛んに合成されている小さな

芽に極性化して局在する免疫蛍光染色像が得られた。さらに蔗糖密度勾配遠心分画, 免疫電子顕微鏡観察による検討の結果から **Kre6** の大多数が **ER** に局在し, 一部は **PM** に局在すると考えられる結果を得た。次に **ER** 搬出シグナルと思われる配列を含む **N** 末端を切り縮めた変異 **kre6** を作出し, 変異タンパク質の局在と変異株の細胞壁の関連についての検討を行った。他方, **Kre6** と結合するとされていた **Keg1** についても局在や **Kre6** との結合を再検討し, さらに, **Kre6** 以外の β -1,6-glucan 合成に関わるとされる遺伝子との相互作用について検討した。その結果, **Keg1** は, **Kre6** の局在と安定性に必要である事, **Keg1** との遺伝学的, 物理的相互作用が検出された **Cne1** は, **Kre6** の局在に必要な事が示唆された。

Fig. A β -1,6-glucanは必須の細胞壁構成多糖である



$\Delta kre5$ (β -1,6-glucan欠損株)

Fig.B 出芽酵母の β -1,6-glucan合成系

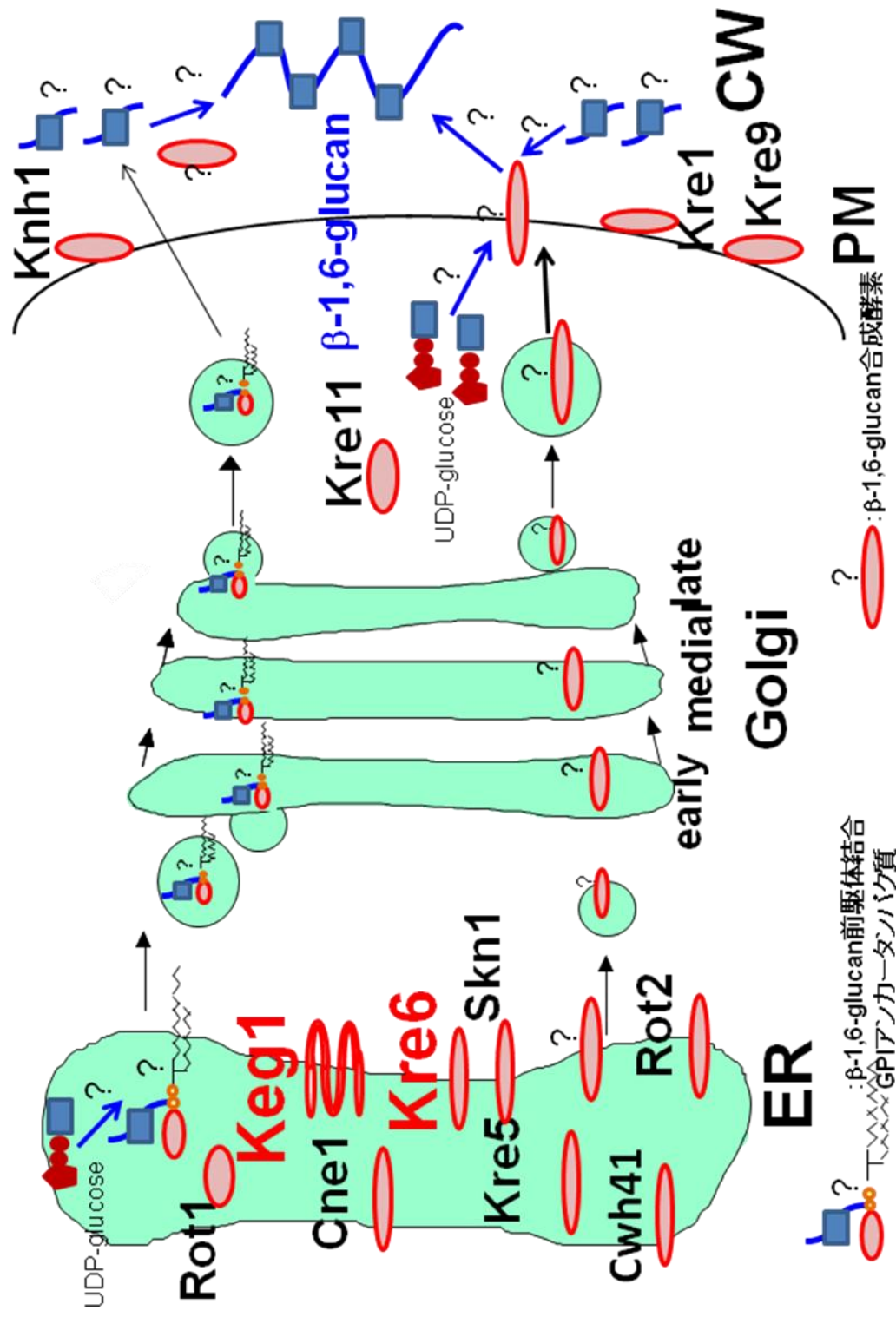
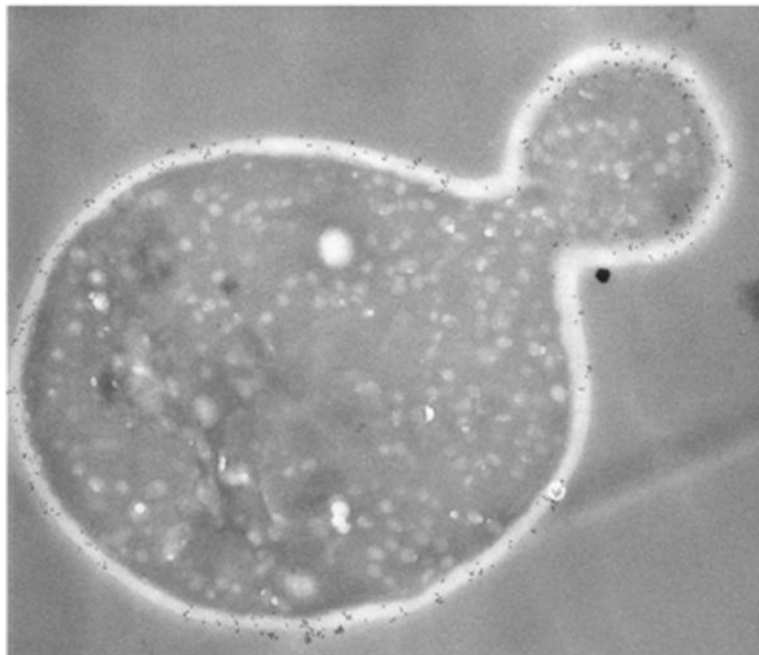


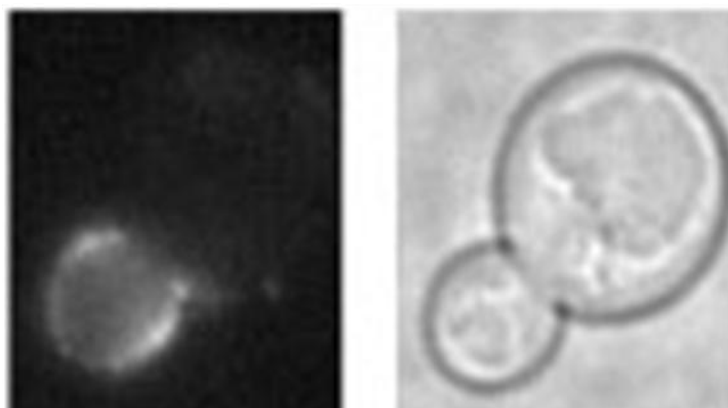
Fig.C β -1,6-glucanの局在

1



β -1,6-glucanの局在
Montijn *et al.*, J. Bacteriol.,
1999;181:7414-7420

2



新生 β -1,6-glucanの局在
Li *et al.*, Yeast 2002; 19: 1097-1112.

第一章 抗 Kre6 抗体の取得と Kre6 の細胞内局在

序

Bussey 等は β -1,6-glucan に結合して生育を阻害するタンパク質である K1 killer toxin に対する耐性を示す変異株から *KRE* (Killer toxin REsistance) と命名した一群の遺伝子を取得した。Kre6 は、そのようにして発見された遺伝子産物の一つである [Boone, 1990]。720aa, 一回膜貫通の膜タンパク質で、N 末端側の膜貫通領域の直前に極性の高いアミノ酸残基のある領域を有する事から、N 末端が細胞質を向いた type II の膜タンパク質と予想されていた。Kre6 の遺伝子破壊株は、K1 killer toxin に対する耐性、キチンに結合して生育を阻害する CFW に対する高感受性、アルカリ不溶性の β -1,6-glucan の減少を示す。このような表現型に加えて C 末端領域では Family 16 glycosyl hydrolase との相同性があり、UDP-glucose binding domain も見つかっている為、既存の β -1,6-glucan 合成に関わるとされる遺伝子の中でも、特に β -1,6-glucan 合成酵素本体である可能性が高いと考えられている [Roemer, 1991] [Montijn, 1999]。

Kre6 の局在に関する検討は、先には多コピープラスミドからの発現で early Golgi への局在が報告されたが [Roemer, 1994] [Li, 2002], 中俣と著者は low-copy のより自然な状態の Kre6 を用いた蛍光顕微鏡観察により、ER と思われるパターンが見られ、ER の必須タンパク質である Keg1 とも結合した事から、ER への局在を示唆した [Nakamata, 2007]。武内らは Rot1 が ER のシャペロンである事、この Rot1 とユビキチンリガーゼである Ubc7 が Kre6 の安定性に関わる事を示し、蔗糖密度勾配遠心分画の結果より Kre6 が ER と Golgi をリサイクルするタンパク質ではないかと議論している [Takeuchi, 2008]。

本研究では、染色体に組み込んだ *KRE6-3HA* の allele より発現させた遺伝子産物が β -1,6-glucan が盛んに合成されているとされている小さな芽に極性化した局在を示す事を発見した。 β -1,6-glucan の合成に関わるとされ、且つ小さな芽に極性化した局在を示す遺伝子産物の発見は初めてであり、出芽酵母における β -1,6-glucan 合成系の全容解明において決定的な情報を得られる可能性がある。そこで、この極性化の検出された C 末端 3HA 付加の コンストラクトの Kre6 の局在と機能性を確認し、さらに tag の影響を排す為、抗 Kre6 抗体の取得を行い、Kre6 の真の局在に関する検討を行った。

使用菌株

Strain	Genotype and plasmid
BY4741	<i>MATa</i> , <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
BY4742	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
KTY284	as BY4741, <i>KRE6-3HA LUE2</i>
KTY285	as KTY284, independent transformant
SAY181	<i>MATa his3Δ leu2Δ trp1Δ ura3Δ ypt11Δ::LEU2</i> <i>OCH1-3HA::HIS3 pRS73 (YPT11 TRP1 CEN)</i>
Y05574	as BY4741, <i>kre6Δ::kanMX4</i>
Y04773	as BY4741, <i>skn1Δ::kanMX4</i>
KSY466	as BY4742, <i>ura3-52::(YPT1_{promoter}-GFP-LIP1 URA3)</i>
YKY218	as BY4741, <i>ura3-52::(TPI_{promoter}-GFP-SNC1 URA3)</i>
YKY213	as BY4741, <i>ura3-52</i>
KTY604	as YKY213, <i>kre6Δ::kanMX4</i>
KTY626	as KTY604, <i>ura3-52::(KRE6_{promoter}-KRE6-3HA URA3)</i>
KTY628	as KTY604, <i>ura3-52::(KRE6_{promoter}-Δ137-KRE6-3HA URA3)</i>
KTY632	as KTY604, <i>ura3-52::(KRE6_{promoter}-Δ230-KRE6-3HA URA3)</i>
KTY630	as KTY604, <i>ura3-52::(KRE6_{promoter}-Δ248-KRE6-3HA URA3)</i>
NCYC232	K1 killer strain

結果

1.Kre6-3HA の局在の検討

KRE6 は破壊によって K1 killer toxin に耐性となる遺伝子として取得された [Roemer, 1991]. *Kre6* の局在についても Bussey 等のグループが解析を行い, *Kre6* の N 末端に HA, もしくは GFP を結合したコンストラクトの解析を行った [Roemer, 1994], [Li, 2002]. N 末端に tag のついた *Kre6* のコンストラクトを CEN plasmid 上で発現させると, 発現株の細胞破碎液の免疫ブロットではバンドが検出できるのにも関わらず, 蛍光顕微鏡観察で蛍光シグナルを観察できなかった. そこで 2 μ の plasmid による過剰発現により N 末端 tag を付加した *Kre6* を発現させ, early Golgi のマーカーである *Och1-3HA* との共染により, GFP-*Kre6* の局在を early Golgi と結論した [Li, 2002]. 前年に分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* において抗 β -1,6-glucan 抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察では Golgi 体に蛍光シグナルが検出されたことから [Humbel, 2001], この実験事実は, 広く受け入れられたが tag コンストラクトの *Kre6* の機能性の検討が無いなどの問題点があった. 中俣および著者の研究において ER の必須タンパク質である *Keg1* と Bussey 等と tag の位置が異なり, C 末端に 6 myc tag を付加した *Kre6* の結合が検出された [Nakamata, 2007]. この結果は, Genome wide の two-hybrid 解析により報告されていた [Uetz, 2000] 結果を裏付けるものであり, *Kre6* の ER 局在が考えられた. さらに, 間接蛍光観察と遠心分画による検討を行い *Kre6-6myc* が ER に局在すると考えられる結果を得たので, *Kre6* の ER 局在を主張した [Nakamata, 2007]. しかし Δ *kre6* 破壊株で発現した *Kre6-6myc* が, 破壊株の示す Calcofluor White (CFW) の高感受性を有る程度回復したが, 野生株レベルまで復元していないことから

[Nakamata, 2007],

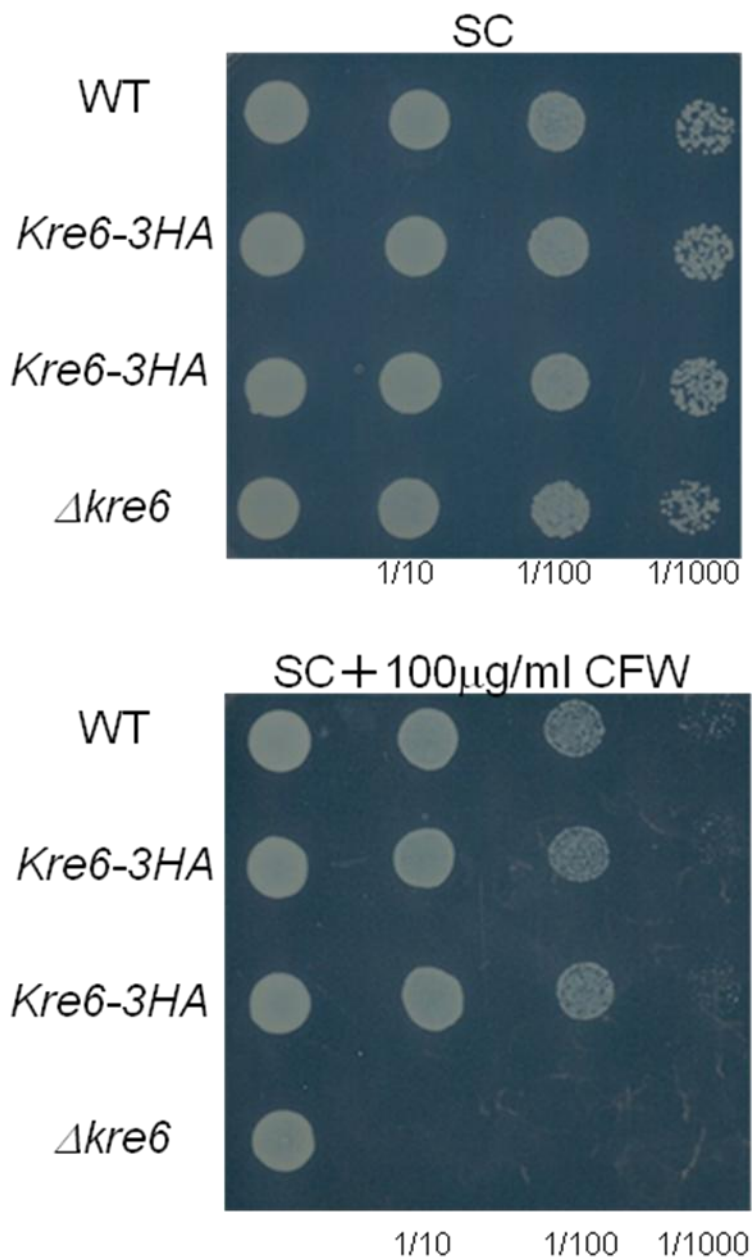


Figure 1-1. Kre6-3HA発現株はCFW感受性を相補する

WT (BY4741), *kre6*Δ (Y05574), BY4741に*KRE6-3HA*をintegrationした株(KTY284, KTY285, independent transformant)を100 μg/ml Calcofluor White (CFW) SC寒天培地における生育を検討した。

*Kre6-3HA*を*KRE6*のlocusから発現する株においてWTと同程度のCFWの感受性を検出した。

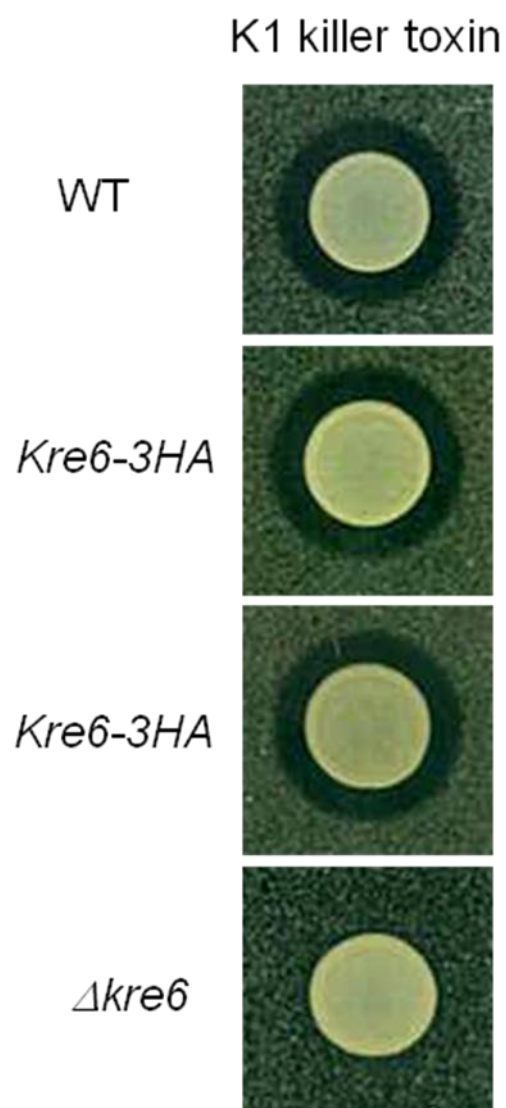


Figure 1-2. Kre6-3HA発現株はK1 killer toxinに感受性

WT (BY4741), $\Delta kre6$ (Y05574), *KRE6-3HA*(KTY284,285)の各株のK1 killer toxinに対する感受性の検討を行った。Kre6-3HAを発現する株は、WTと同程度のK1 killer toxinに対する感受性を示した。

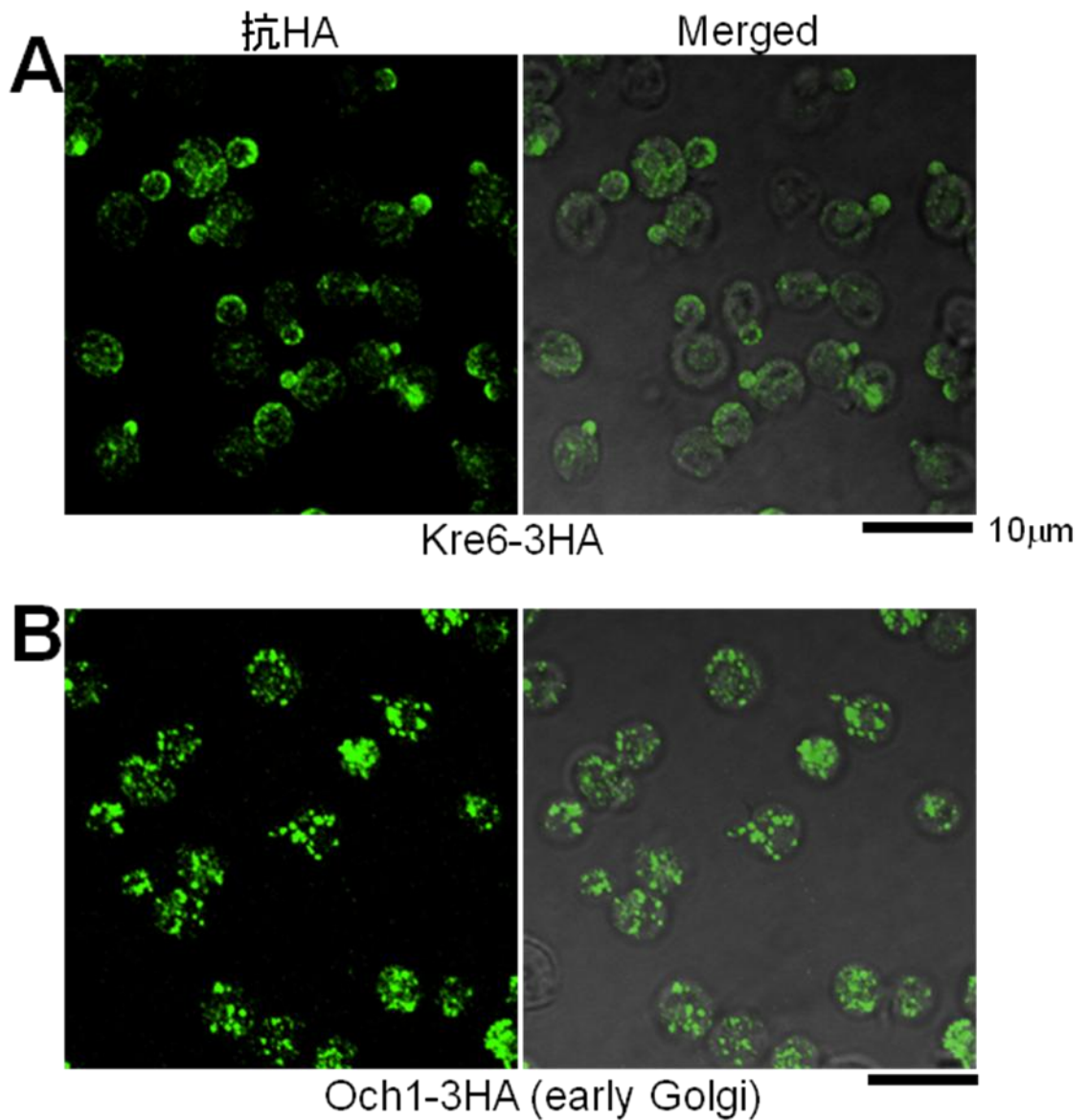


Figure 1-3. Kre6-3HAは、small budに極性化して局在する。

(A) Kre6-3HAをクロモソームより発現させた細胞(KTY284)を抗HA抗体により染色し、間接蛍光を顕微鏡で観察した。バーは10 μ mを示す。Kre6-3HAは小さい芽へ極性化した特徴的な局在が検出された。

(B) Och1-3HAをクロモソームより発現させた細胞(SAY181) [Arai, 2008]

Kre6 C 末端 6myc-tag 付加コンストラクトの機能性や局在に疑問を感じ,更に検討すべきと考えていた.

筆者がその後行った, Kre6 のホモログである Skn1 の解析の過程で Skn1 の C 末端に 3HA タグを付加したコンストラクトを Skn1 の locus で発現する株の作成に成功した. そこで, この Skn1-3HA の実験を行う上でのコントロールとして, 染色体上の *KRE6* の locus より発現し, C 末端に 3HA-tag を付加した Kre6 を発現する KTY284 を作製した. この株の解析の結果, 生育や CFW 感受性(Fig.1-1), K1 killer toxin の感受性(Fig.1-2)においても親株との差が無かったので, 従来の Kre6-6myc の tag 付加コンストラクトに比べより野生型に近い性質をもつと考えた.

この株と抗 HA 抗体を用いて Kre6-3HA の局在を観察したところ,驚いたことに,小さい芽をもつ細胞では,蛍光シグナルは娘細胞に集中して見られ,しかも芽の生長先端に濃縮されていた. 出芽直前の大型の細胞の一部では,細胞の一端に蛍光シグナルが集中しており,形態的に出芽予定部位に Kre6-3HA が濃縮されていると考えられた(Fig.1-3A). このプロファイルは中俣および著者らの報告した ER [Nakamata, 2007]とも, Bussey のグループの報告した early Golgi [Roemer, 1994][Li, 2002] (Fig. 1-3B)とも明らかに異なり, これまでに観察されたことのない局在であった. さらにこの分布は, late Golgi から細胞表層に極性化した分泌小胞の間接蛍光像によく似ていた[Valdez-Taubas, 2003]. また, 母細胞において微弱な ER と考えられることができる Kre6-3HA の蛍光も観察された.

2. 抗 Kre6 抗体の取得

前項に示したように, これまでに Kre6 の局在は, 発現量や付加する tag の種類, 位置により 3 種類もの異なる結果が報告されている. また Kre6-3HA の局

在にみられた小さな芽や出芽予定部位と思われる領域への集中は 抗 β -1,6-glucan 抗体を用いた新生の β -1,6-glucan の局在と一致し[Li, 2002], 且つ β -1,6-glucan 合成に関わるとされる遺伝子産物において初めての知見である. Kre6 が最も有力な β -1,6-glucan 合成酵素の候補でも有る為, この新規の局在が正しければ β -1,6-glucan 合成系を考える上で非常に重要な意味を持つ.

そこで, tag や発現条件等の影響を完全に排し, Kre6 の局在を完全に決定する目的で, Kre6 自身に対する抗体を作製する事とした. *S.cerevisiae* において *KRE6* には *SKN1* というパラログが存在する. Δ *skn1* 破壊株は Δ *kre6* 破壊株ほど顕著な欠損形質を示さないが, これらの二重破壊株が致死になること, *KRE6* の破壊による表現型を *SKN1* の low-copy (おそらくは発現量が数倍程度増えるだけで) 変異を抑制出来る事から, Skn1 は Kre6 と機能的に重複し Kre6 が主に機能していると考えられている[Roemer, 1993][Roemer, 1994][Li, 2002]. 両者は type II の膜タンパク質であると予想されており, アミノ酸配列は特に内腔にあると予想される約 500 アミノ酸の領域では 86% という高い相同性がある. 一方, 細胞質にあると考えられる N 末端の 137 アミノ酸では 32% と相同性が低いので (Fig.1-4A), 精製する段階での Kre6 断片の可溶性を考慮し, Kre6 の N 末端から 84 アミノ酸の部分ペプチドを Glutathion S-transferase(GST)との融合タンパク質として大腸菌で生産し, アフィニティ精製により GST-Kre6 断片を取得し (Fig.1-5), これを抗原タンパク質として 2羽のウサギに免疫した.

2羽のウサギの血清により免疫ブロットを行うと, どちらの血清からも野生型株と Δ *skn1* 株で等しく約 140kDa のバンドが検出され, Δ *kre6* 株ではこのバンドが見られなかったことから (Fig.1-4B), Kre6 に特異的な抗体が得られたと判断した. 抗体 1 は, 比較的高い位置にスミアなバンドと弱い非特異のバンドが検出され, Kre6 自体の反応は抗体 2 に比べると弱かった. 抗体 2 では, 抗体 1 に比べて強い Kre6 のバンドと 43kDa に比較的強い非特異のバンドを検出した

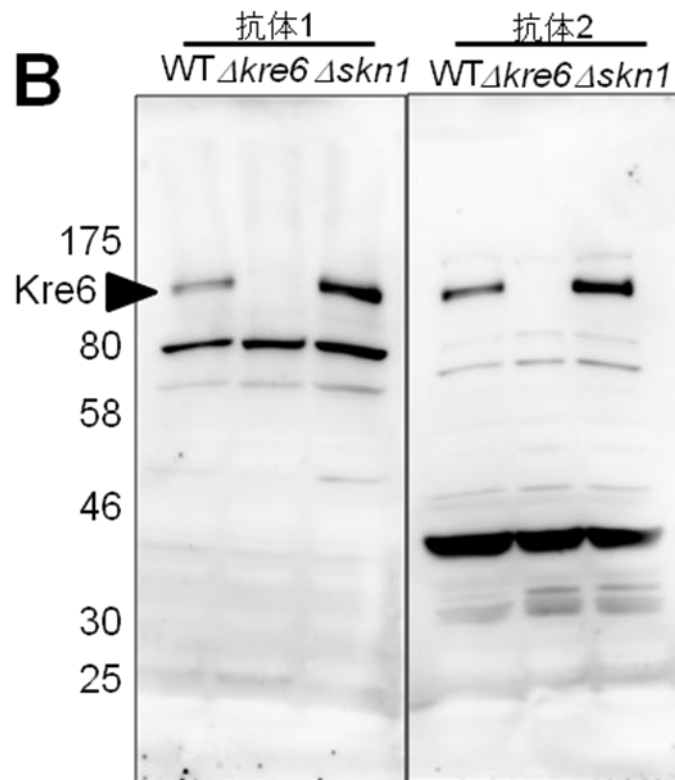
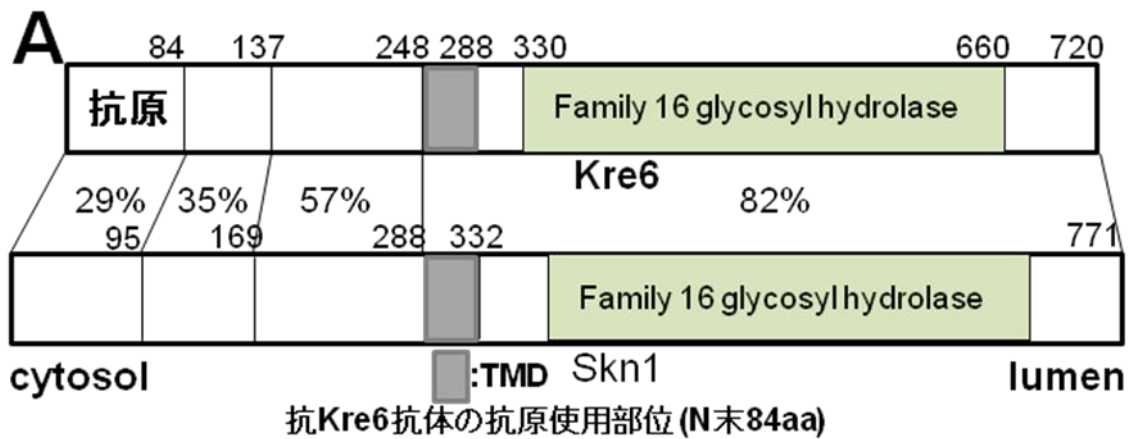


Figure1-4. 抗Kre6抗体は特異的にKre6を検出する.

(A) *Saccharomyces cerevisiae*にはKre6に相同性の高いSkn1が存在する為、抗Kre6抗体は、抗原としてSkn1との相同性の最も低いN末端の84aaを使用した。

(B) WT(BY4741), Δ kre6(Y05574), Δ skn1(Y04773)の各株をの細胞破砕液を調製、SDS-PAGEに供し、抗Kre6抗体(1/500希釈)により検出した。

Kre6と思われるbandを140kDaに検出した。またSkn1には反応しない特異性の高い抗体を取得出来た(抗体1,2ともアセトンパウダー処理後)。

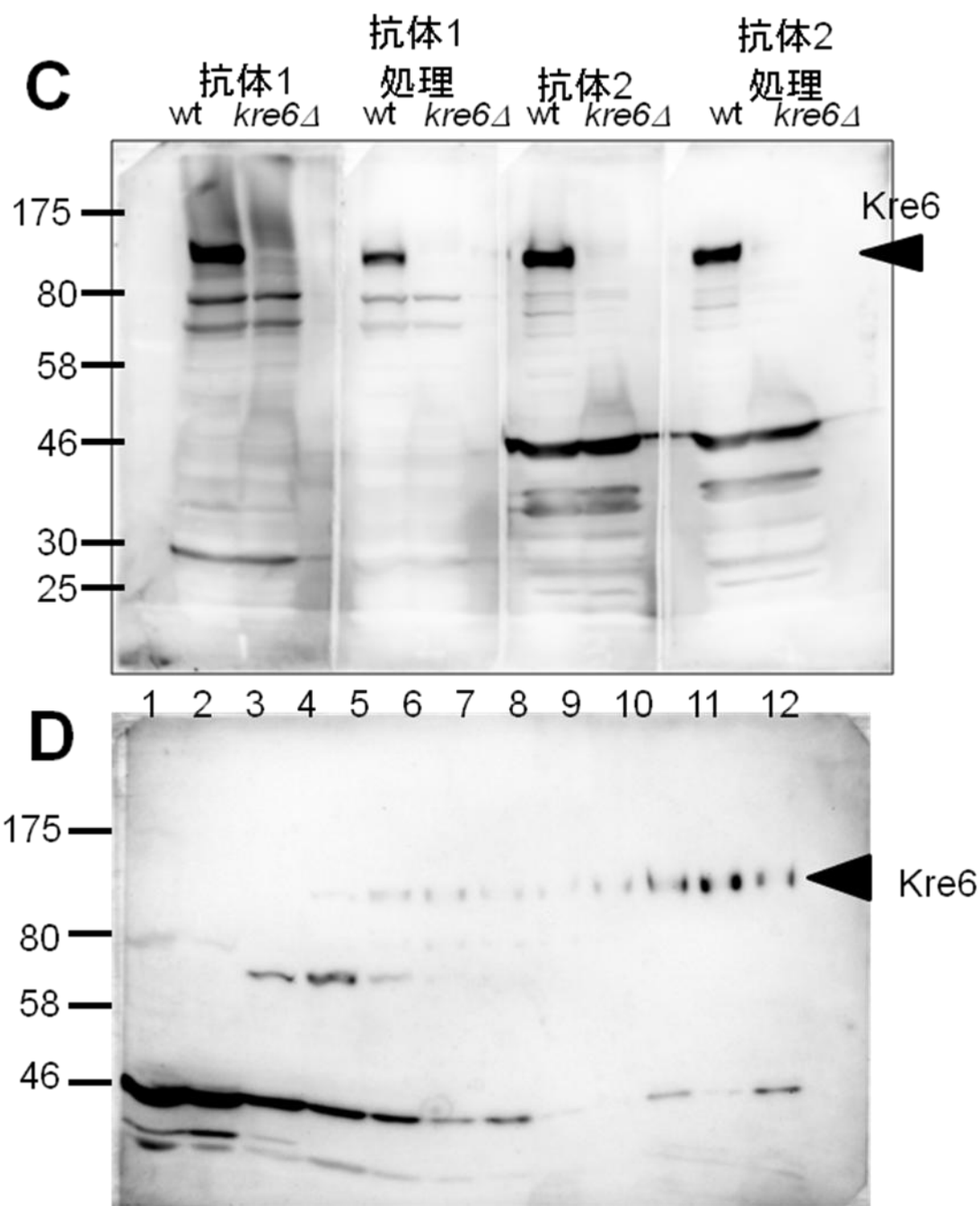


Figure1-4. 抗Kre6抗体は特異的にKre6を検出する.

(C) B)WT(BY4741), $\Delta kre6$ (Y05574), の各株をの細胞破砕液を調製, SDS-PAGEに供し, 抗Kre6抗体により検出した. 抗Kre6抗体をアセトンパウダー処理(method)した抗体と未処理の抗体で同じサンプルを免疫プロットしたメンブレンを検出した. アセトンパウダー処理により非特異のバンドは減ったが完全に無く成りしなかつた.

(D) WT(BY4741)蔗糖密度勾配遠心分画1:top-12bottom(60%), 抗体2で検出. 非特異のバンドは軽いtopに多く見られた.

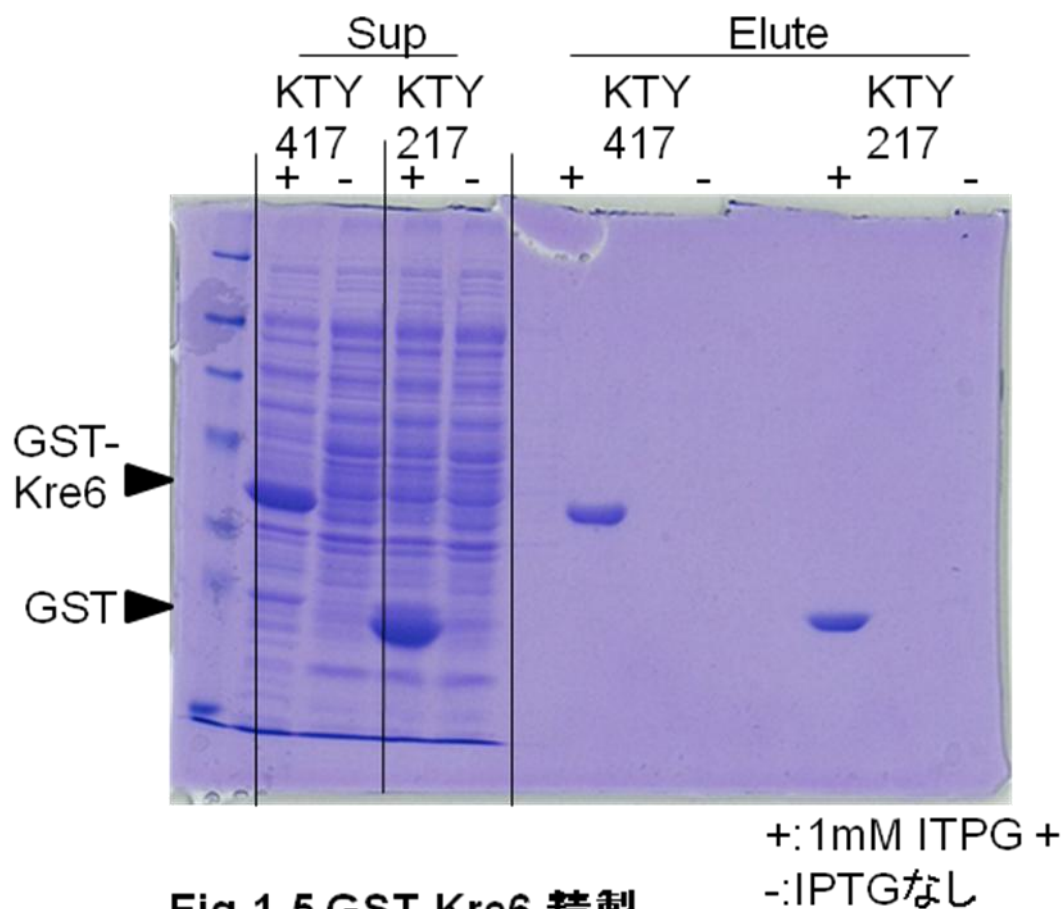


Fig.1-5 GST-Kre6 精製

KTY417: BL21+pKT73(GST-KRE6)

KTY217: BL21+pGEX4T-3(GST)

上記各株を用いた, KTY417, 1l LB-Am培養, KTY217 10ml 培養,
1mM final IPTG, 2hr 誘導後, STE-buffer + 1mM DTT, pica, PMSF 中
でSonication, 1min x 4 破碎, 15,000 x g 10min 遠心, 上清回収, 1/10量
10% Triton X-100 を加える. Glutathion-beads を加え, 4°C, 1hr 回転.
beads を洗った後, Elution buffer により抽出した.

GST-Kre6, Final 1.2ml Elute, 5.5µg/µl, total 5.72mg (抗原用 1.04ml あたり)
取得. SDS-PAGE 1/10 希釈で泳動

KTY217, 10ml 培養

Final 0.4µl Elute

(Fig.1-4C).

3. Kre6 の間接蛍光観察

取得できた抗 Kre6 抗体を用いた間接蛍光観察を試みた。2羽のウサギから取得した抗 Kre6 抗体は WT の細胞より抽出した細胞破碎液の免疫ブロットにおいて Kre6 以外の非特異のバンドも見られた(Fig.1-4C)。この抗体を用いて間接蛍光観察を行うと、 $\Delta kre6$ 株においても dot 状の非特異の蛍光シグナルが検出された(Fig.1-6C)。そこで、抗体精製によりこの非特異の蛍光シグナルを除去することとした。 $\Delta kre6$ 株より調製した細胞破碎液のタンパク質をアセトン変性した粉末であるアセトンパウダーを抗 Kre6 抗体に処理し、Kre6 以外のタンパク質に親和性のある抗体の除去を試みた。免疫ブロットしたメンブレンをアセトンパウダー処理した抗 Kre6 抗体により検出すると、減少した非特異のバンドもあるが、完全には無くならなかった(Fig.1-4C)が、抗体 2 に検出される 43kDa 付近の非特異のバンドは蔗糖密度勾配遠心分画(EDTA-)のサンプルを供した免疫ブロットにおいて可溶性画分に検出され、細胞内に分散しており、間接蛍光観察では影響が少ない事がわかった(Fig.1-4D)。しかし抗 Kre6 抗体を用いた間接蛍光観察において、細胞の存在しないスライドガラス上に強い dot 状の蛍光シグナルが検出されるなどの問題があった(Fig.1-6C)。そこで、間接蛍光観察に供す抗 Kre6 抗体(アセトンパウダー処理済み)の量を半分(1/200)に減らし、スライドガラスに菌体を固定する為に用いる poly-K(ポリリシン)の塗布を通常 2 回の所を 1 回に減らした。

以上のような点を改良した結果、アセトンパウダー処理をした抗体 2 を用いた間接蛍光観察において、細胞内部及び外部の dot 状の非特異の蛍光シグナルが大幅に減り、抗 Kre6 抗体による Kre6 の間接蛍光観察に成功した(Fig.1-6A)。抗

体 1 は、検出感度が元々弱く、しかし間接蛍光観察における非特異の dot 状の蛍光シグナルは抗体 2 と差が無かった事、アセトンパウダー処理後に間接蛍光観察をするにあたって、さらに検出感度の低下が見られた事から、以降の間接蛍光観察の検討は、すべてアセトンパウダー処理した抗 Kre6 抗体 2 を用いた。

抗 Kre6 抗体を用いた間接蛍光観察において、染色体上から Kre6-3HA を発現する細胞で抗 HA 抗体により検出された bud tip に集積する蛍光シグナルと同様の強く明るい霧状の蛍光シグナルが見られた。この局在は Kre6-3HA で見られたものと非常によく似ていた。しかし、抗 Kre6 抗体で検出した間接蛍光像では、HA 抗体を用いた場合では見られなかった分散したまばらなドットが観察された (Fig.1-6A)。少数の細胞内のドットは、 $\Delta kre6$ 破壊株の免疫染色でも見られるものと同じことから、少なくとも一部はこの抗体による非特異的な蛍光シグナルと考えられた (Fig.1-6B)。しかし、Kre6 自体が dot 状の局在も持つ場合、抗 Kre6 抗体の検討のみでは、非特異の蛍光シグナルと区別が出来ない。そこで、染色体上から Kre6-3HA を発現する細胞を、抗 Kre6 抗体と抗 HA 抗体で二重染色して観察する事で、抗 Kre6 抗体の非特異な蛍光シグナルと Kre6 の dot 状の蛍光シグナルを分ける事とした (Fig.1-7)。その結果、Bud tip に集積する傾向の蛍光シグナルは、両抗体ともに同じようにみられ、同じタンパク質を検出していると考えられた。他方、細胞質に分散している少数の強いドット状の蛍光シグナルは、抗 Kre6 抗体のみで検出する事が出来た為、少なくともこの検出感度で抗 Kre6 抗体を用いた時に見られる Kre6 の dot 状の蛍光シグナルは、抗体の非特異の蛍光シグナルであると結論づけた。

以上のような結果より Kre6 の局在は、小さな芽と出芽予定部位であると結論した。また Kre6 の C 末端への 3HA tag の付加は Kre6 の局在に影響が少ない事が示唆され、非特異的な蛍光シグナルがないという点で、Kre6-3HA 発現株の抗 HA 抗体による観察は有用であることが示された。

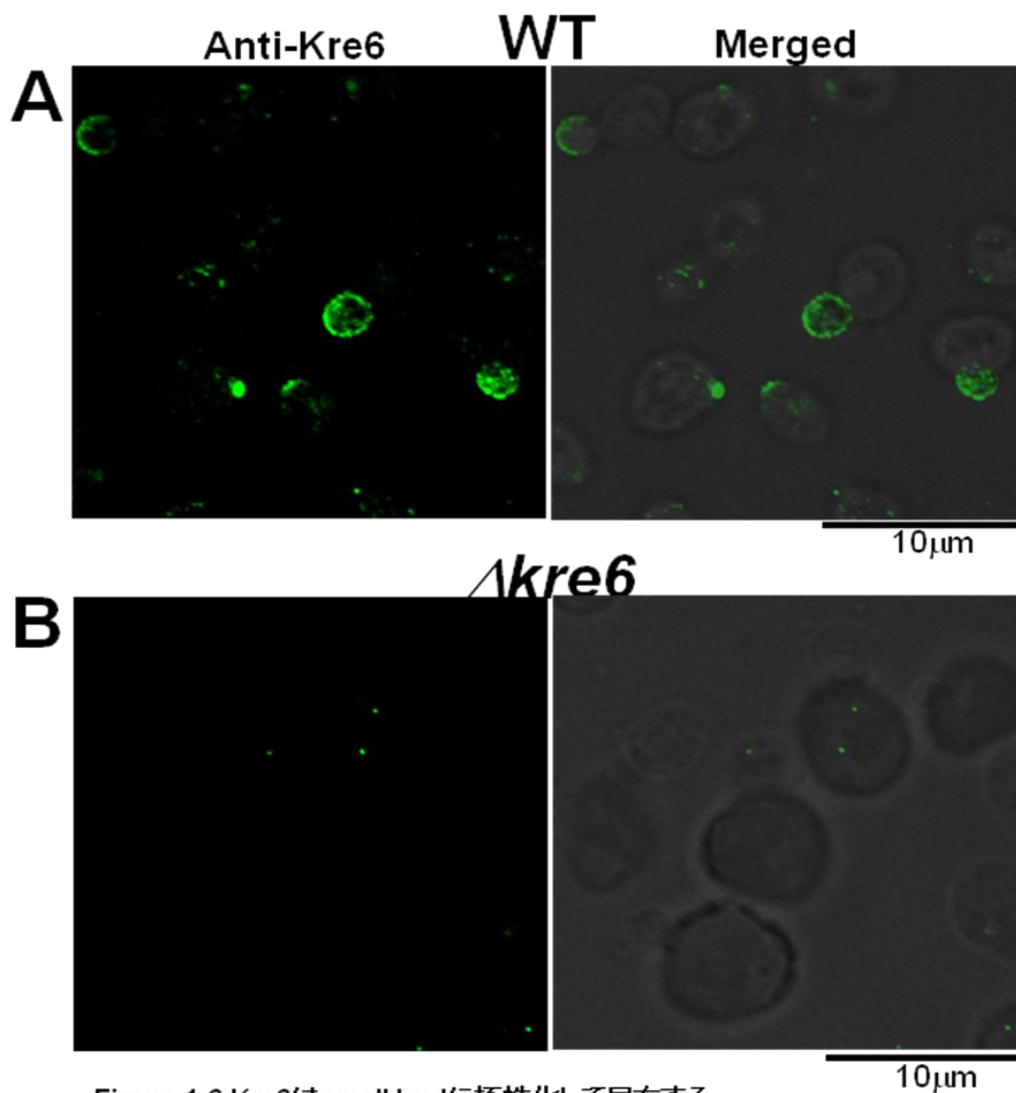


Figure.1-6 Kre6はsmall budに極性化して局在する

(A)WT(BY4741)を抗Kre6抗体(抗体2 アセトン/パウダー処理, 1/200)を用いて間接蛍光観察した.Kre6-3HAと同様にKre6はsmall budに極性化した局在を示した..

(B)Δkre6(Y05574)を用いて同様の検討を行い,細胞内部に見えるdot状の非特異的なsignalを検出した..

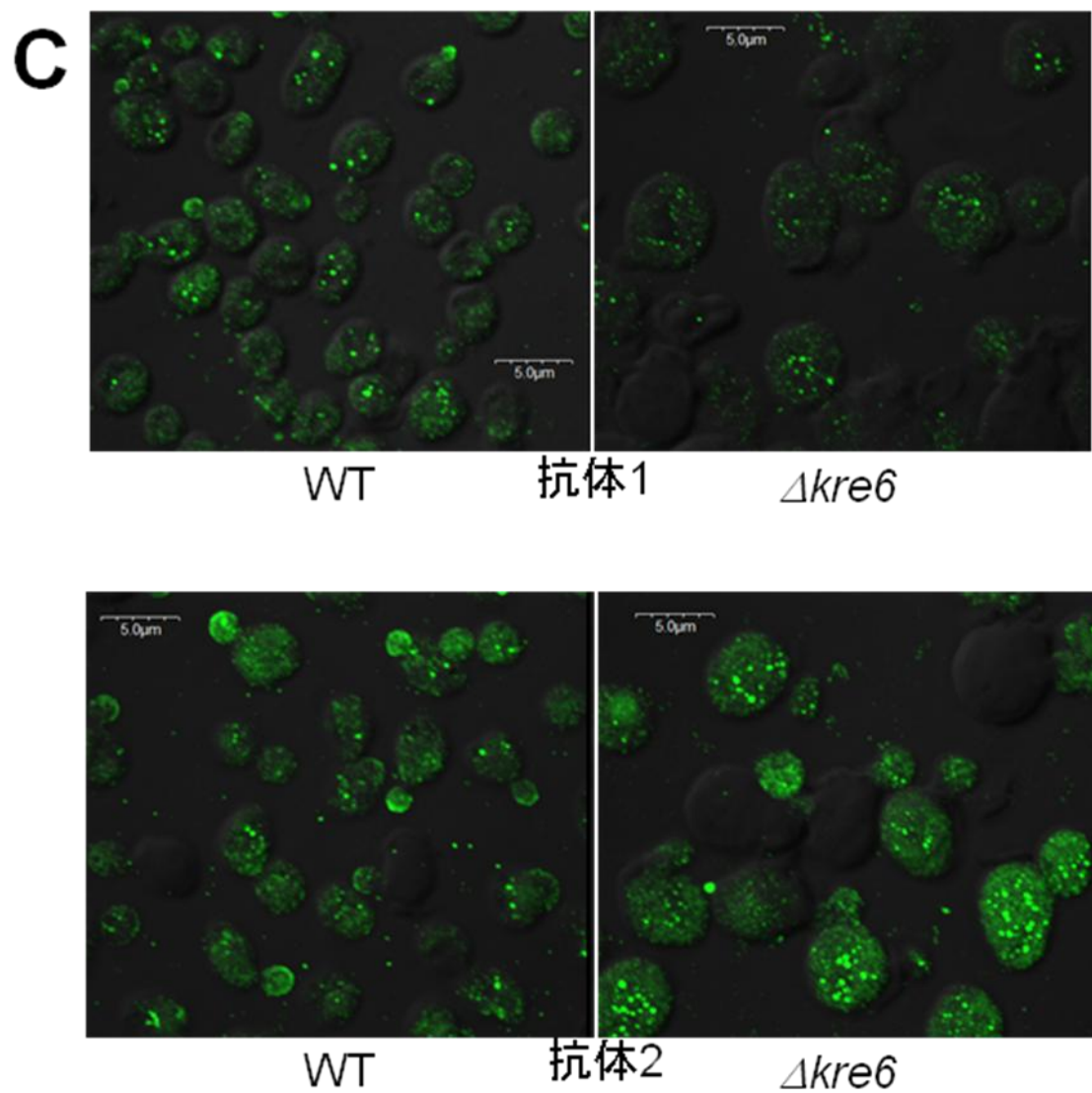


Figure.1-6 Kre6はsmall budに極性化して局在する
 (C) WT(BY4741), $\Delta kre6$ (Y05574)抗Kre6抗体1, 2を精製なして
 間接蛍光観察に用いた.
 細胞内外にdot状の非特異のシグナルを検出した.

Kre6-3HA発現株

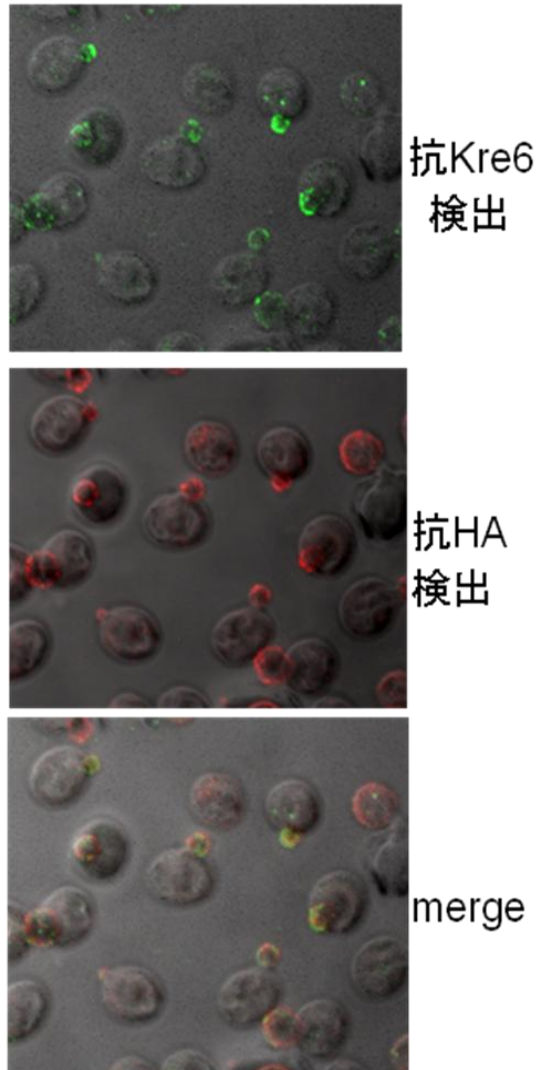


Figure1-7. Kre6-3HAはdot状の構造体に局在しない。

Kre6-3HA発現株(KTY284)を抗Kre6抗体,抗HA抗体を用いて共染色した。抗Kre6抗体,抗HA抗体ともにsmall budに極性化した局在を示し場所も一致した。抗Kre6抗体を用いた時に検出されたdot状の構造は抗HA抗体を用いた時には検出されず,抗Kre6抗体の非特異のシグナルと考えられた。

4. Kre6 の topology の検討

これまで Kre6 は、機能性がはっきりと確認された tag コンストラクトが殆ど存在せず、C 末端と N 末端の両方を特異的に検出する方法が無かった事から topology の検討は、アミノ酸配列からの予測によるものに留まっていた。N 末端側の膜貫通領域(TransMembrane Domain, TMD)の近傍の領域に親水性の高いアミノ酸残基が集中している為、N 末端が細胞質、C 末端が内腔の Type II の膜タンパク質であると考えられてきた[Roemer, 1991]. 本研究において、N 末端領域を特異的に検出できる抗 Kre6 抗体と C 末端 3HA-tag が共に機能的で有る事がこれまでの検討で明らかになり実験条件が整った。また、Kre6 の酵素活性部位と思われるのは、UDP-glucose binding domain や family 16 glycosyl hydrolase と相同性があり、Skn1 と良く似ている C 末端領域の向きは、Kre6 の機能を考える上で非常に重要である。

そこで、染色体上から 1 コピーで発現させた Kre6-3HA について、protease protection 法により、topology を解析した。その結果、Figure 1-8 が明らかに示すように、N 末端側 84 アミノ酸内にあるエピトープは、界面活性剤による膜の崩壊の有無に関らず proteinase K によって消化され、ウェスタンブロッティングで検出できなくなった。一方、C 末端側の HA エピトープは、界面活性剤の存在下では完全に分解消失して何もバンドが残らないが、界面活性剤非存在下では、細胞質側からの消化を受け、バンドの濃さが大幅に減少するとともに、膜により保護されていると考えられる 2 本の近接した部分断片のバンドが検出された (Fig.1-8)。分解されずに残っている一部の Kre6-3HA は、細胞の破壊で全体が膜画分に保護され、プロテアーゼによる消化が及ばないと考えられる。この結果より、Kre6 は配列から予想されるとおり、type II membrane protein であることが確

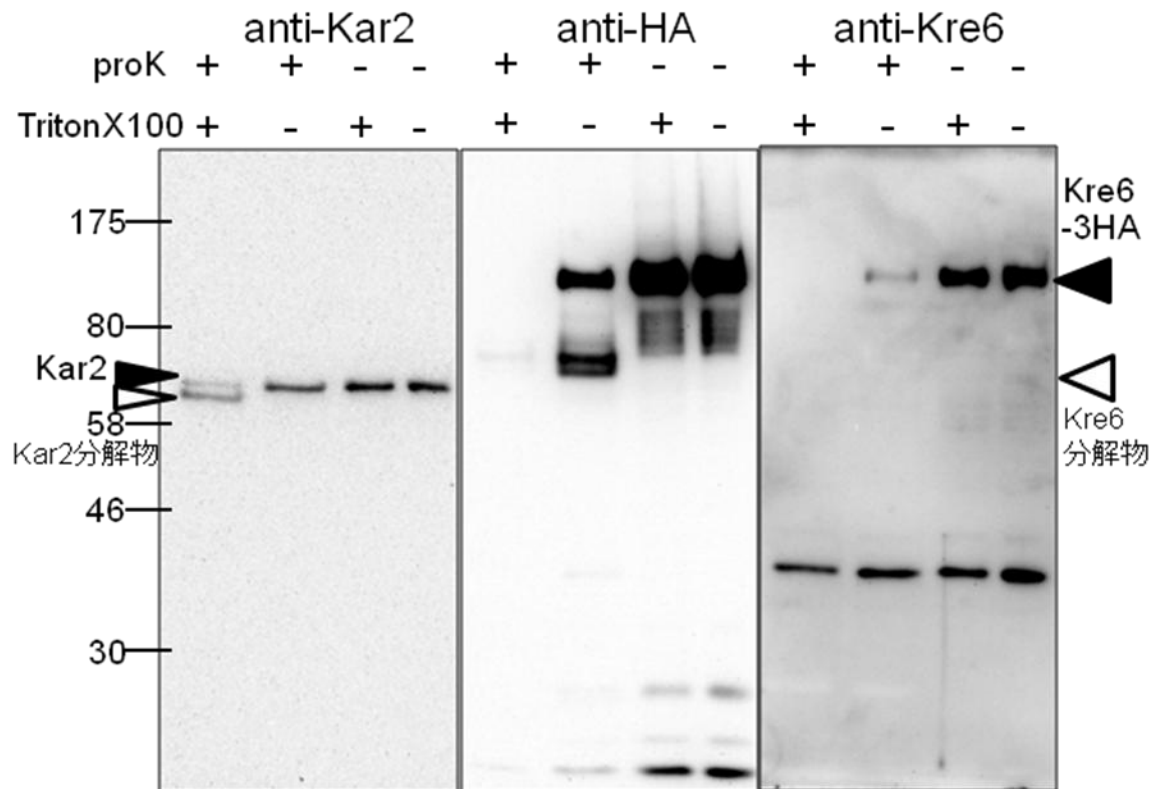


Figure1-8. Kre6-3HAはtype II 膜タンパク質

Kre6のC末端3HAtag version発現株(KTY284)より調製した細胞破碎液にprotease Kを処理し, 抗HA, Kre6, Kar2の各抗体により検出した.

Kre6-3HAのC末端を検出する抗HA抗体では, proK+, TritonX100- のlaneでKre6-3HAの分解物と思われるバンド(白△)が検出された. Kre6-3HAのN末端を検出する抗Kre6抗体では, そのような分解産物は検出されなかった. その為, Kre6-3HAはN末端が細胞質側に出たTypeII膜タンパク質と考えられた.

認された.

5. 蔗糖密度勾配遠心による Kre6 の局在の検討

Kre6の細胞内の局在,特に今回発見された小さな芽に極性化した局在においてKre6が濃縮される膜画分をより詳細に検討する目的で,18%-60%の蔗糖密度勾配を用いて,野生株の細胞破碎液を遠心分画に供し,抗Kre6抗体により検出した. Kre6はfractions 5-8に弱いピークと,比重の大きいfractions 10-12に他より強いピークが検出された(Fig.1-9A). Fraction 5-8の画分には,この遠心条件では, Golgi体やendosomeなどの輸送小胞が回収される. 一方,最大のピークであるfractions 10-12は, ER (Scs2)とPM (Gas1)をそれぞれの抗体で検出した結果と同様に, ERやPMが回収されるfractionである. 比重が小さいKre6の小さなピークfractions 5-7には, Scs2はまったく見られず, Gas1抗体でも, Kre6のようなピークは検出されなかった.

ERに多くの β -1,6-glucan合成関連遺伝子が見ついている事, PMの外側にしか β -1,6-glucanが検出されていない事を考えると, PMとERのどちらにKre6が局在しているのかを識別するのは β -1,6-glucan合成系を考える上で非常に重要である. 細胞破碎液にEDTAを加え, 二価カチオンをキレートするとERよりリボソームなどが離れることにより比重が小さくなり, ERとPMが密度勾配で分けられることが知られている[Powers, 1998]. そこで, 野生型株の細胞破碎液をEDTA存在下で分画し, PMとERの膜画分の分離を試みた. その結果, ER markerであるScs2は, EDTA非存在下ではbottomのfractions 10-12にピークがあったが, EDTA存在下では, fractions 6-9に大部分が移行しfractions 10-12には, Scs2はほとんど検出されなかった. PMのマーカであるGas1は, 比重の軽い画分にも存在が認められるが, やはりbottom fractionsに最も多く見られ, このことからPMの大部分

はEDTA存在下でもERとは異なりbottomまで沈降すると考えられる。この実験系においてKre6は、EDTA非存在下でfractions 10-12に最も多くみられたピークはEDTA存在下でも確かに存在するが、かなり少なくなり、大部分がfractions 6-9へシフトした(Fig.1-9B)。

この分画の結果は、Kre6の多くがERにあるという事を示している。この結果は、Nakamataらの報告と一致する[Nakamata, 2007]。しかし、EDTA非存在下の分画で、野生型のKre6が、Golgi体やendosomeなどの存在が予想される軽いfractions 5-8にも明らかに検出され、またEDTA存在下では、PMがあると予想される重いfractions 10-12に小さなピークを作っているという結果は、ER以外の、分泌小胞のような膜小胞やPMにも、一部のKre6が存在していることを示唆している。

同じ抗体による野生型細胞でのKre6の局在検討において、蔗糖密度勾配遠心分画では主たる存在領域がERと予想されるのに、間接蛍光免疫染色観察では典型的なERの像ではなく、小さな芽や出芽予定領域への集合が観察された。この見かけ上異なる結果の原因として、細胞周期の異なる多くの細胞を間接蛍光観察では個別に見ているが、蔗糖密度勾配遠心では、すべてまとめてしまうため、もし細胞周期によりKre6の局在が異なっても、全細胞における平均値として検出されているという違いが挙げられる。そのため、もしKre6が、ある短い間のみ小さな芽に高密度に集中して局在し、他の細胞周期では異なる局在をしていた場合、異なる細胞周期のcellが混在する蔗糖密度勾配遠心では小さな芽に高密度に集中してKre6が存在する膜画分を正確に検出できないと考えた。

この可能性は、細胞周期を同調させて小さな芽を持つ細胞を集めて分画すれば判断できると考えて、筆者は α -factorにより同調培養を行い、小さい芽を持つ細胞が多く含まれる培養液を調製し、その細胞を蔗糖密度勾配遠心分画に供することとした。その実験の過程で、 α -factorによる同調培養時にWTの細胞からKre6

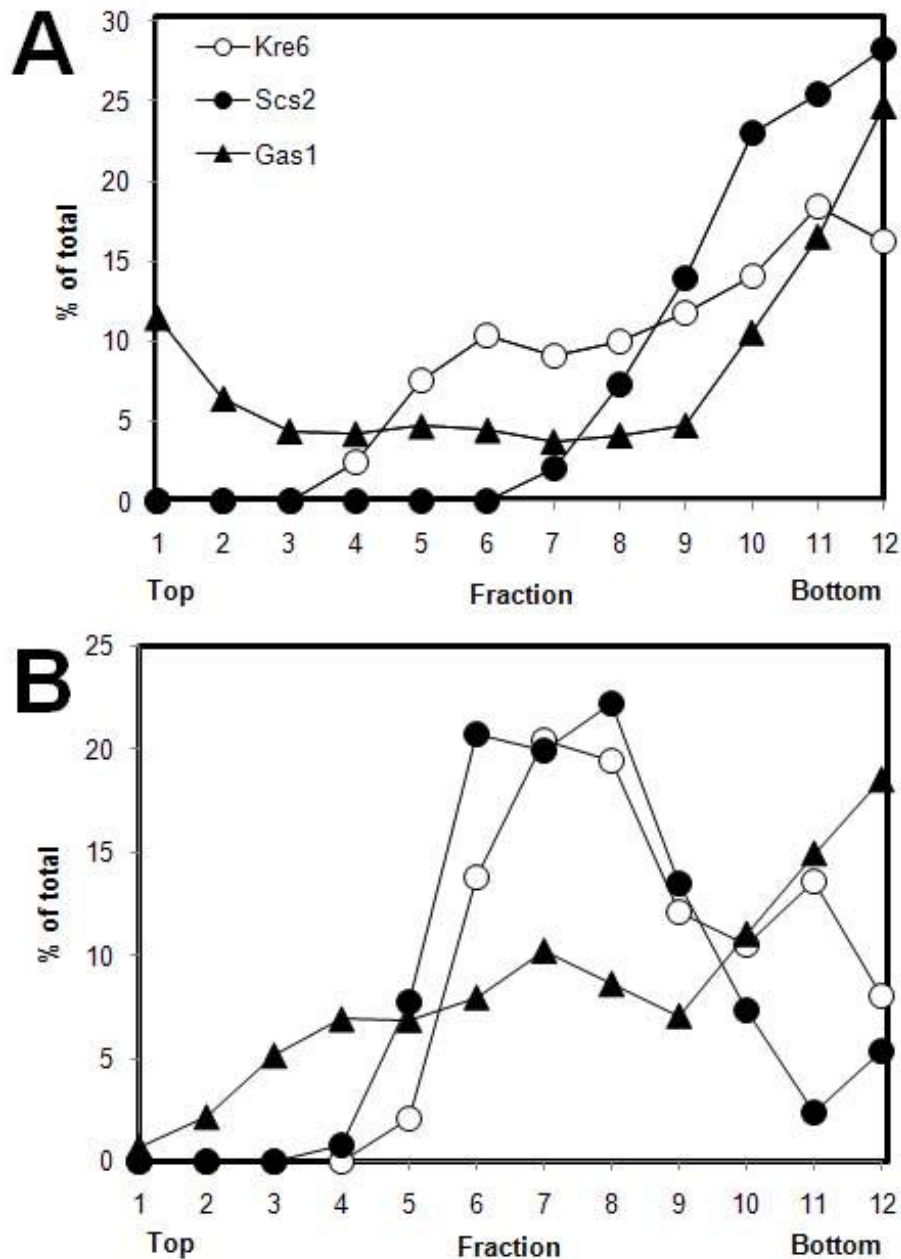
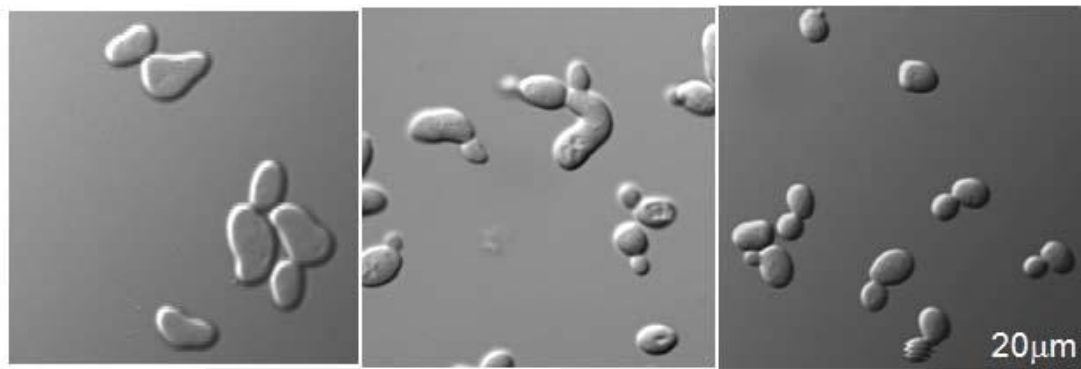


Figure.1-9 Kre6は多くのERへの局在と少量のPM,より軽い膜画分への局在を示す.

(A)WT(BY4741)より細胞破碎液を調製し18-60% sucrose stepに重層して遠心したtopより1-12fractionを回収し, SDS-PAGE, 各免疫プロットにより検出した.

(B)Aと同様の実験で, 懸濁したbuffer, sucrose stepに10mM EDTAを加えた. Scs2(ERマーカー), Gas1(PMマーカー)

EDTAなしの時はKre6はbottomのpeakと分泌小胞と思われる5-7のブロードなpeakを検出した. EDTA+の時はKre6は6-9のERと思われるpeakと10-12のPMと思われるpeakを検出した.



alpha 180min

release 100min

random culture

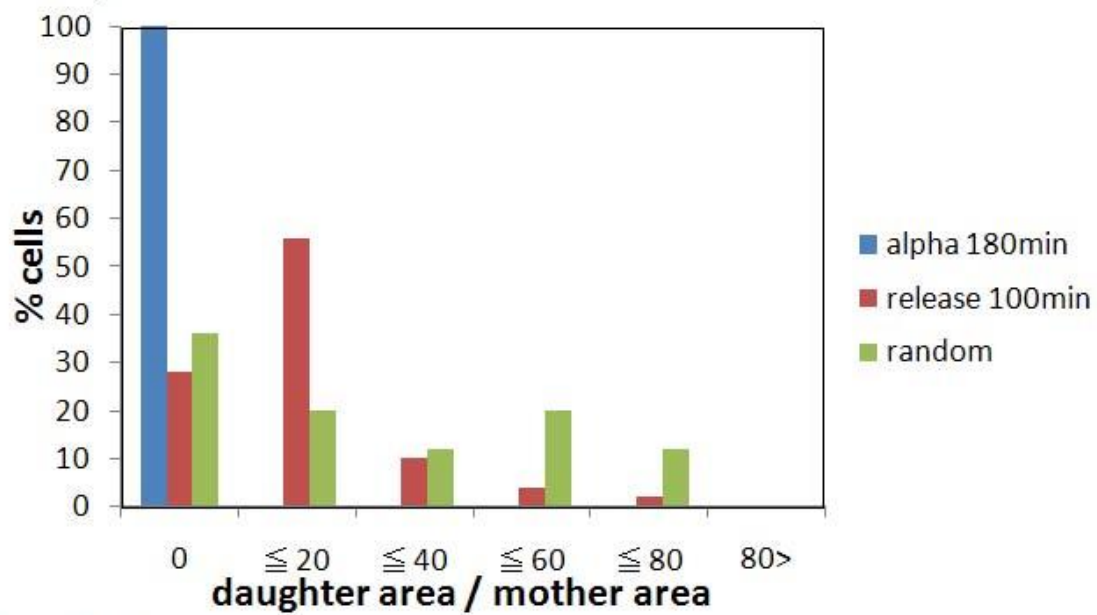


Figure1-10. 細胞同調の確認

WT(BY4741)に α -factorを加えて細胞同調し,YPDに戻してリリースした顕微鏡でbud sizeを見て適当なところで集菌,得られた菌体を顕微鏡観察しimage J,画像解析ソフトを用いてbud sizeを求めた.

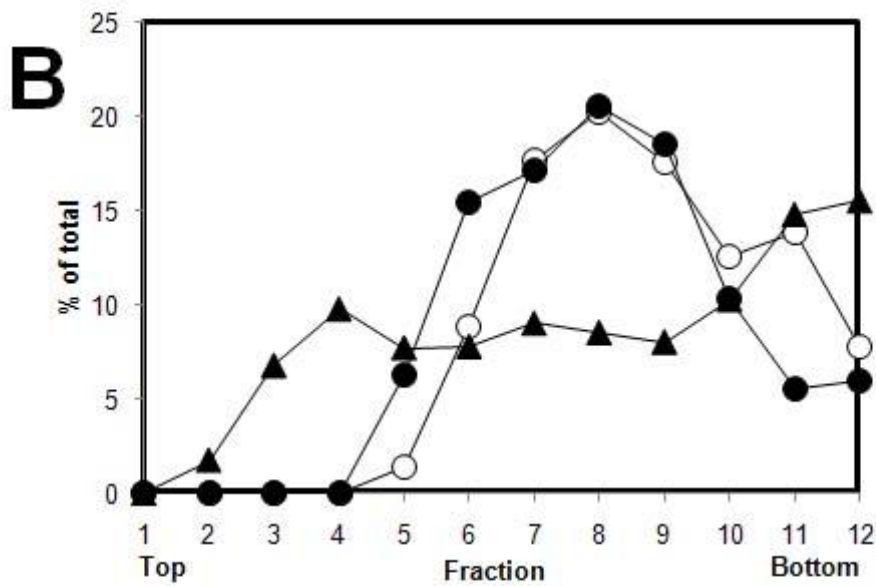
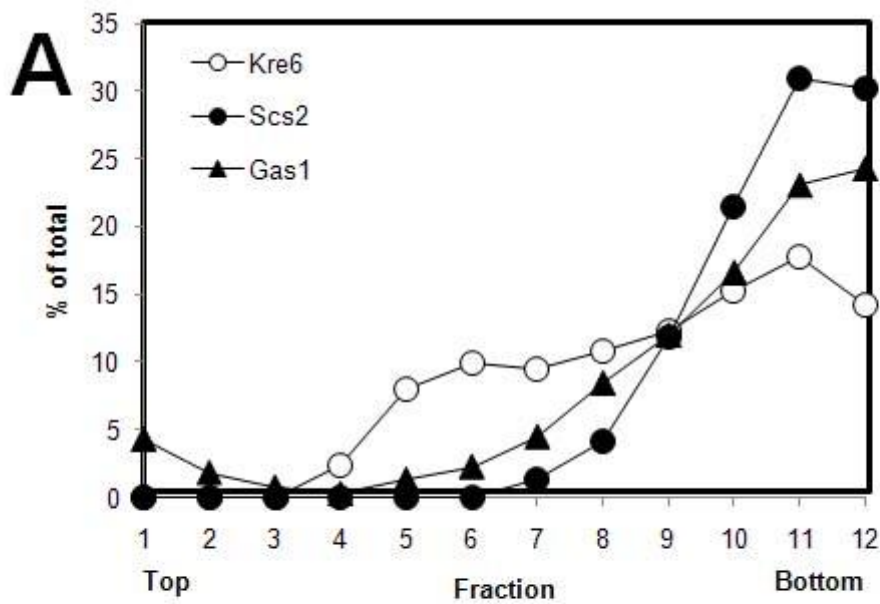


Figure1-11. small budを持つ細胞でもKre6の多数はERに局在する。

Fig1-10に示した同調した細胞を用いて, Fig.1-9に示した蔗糖密度勾配遠心を行った。

Scs2(ERマーカー), Gas1(PMマーカー)

Fig.1-9と同様にEDTAなしの時はKre6はbottomのpeakと分泌小胞と思われる5-7のブロードなpeakを検出した。EDTA+の時はKre6は6-9のERと思われるpeakと10-12のPMと思われるpeakを検出した。

タンパク質が、全く細胞から無くなってしまおうという事がわかった (data not shown). α -factor による細胞周期の停止からリリースすると Kre6 のタンパク質の量は徐々にもとのレベルに戻るが、リリース後すぐの培養液は使用できない事がわかった. 同調培養時にもシュムー形成などの形態変化が起こる為、細胞壁の合成は行われると思われる. この現象は、孢子形成時は、Kre6 ではなくマイナーな Skn1 が主に働く、という可能性と同調してから 3hr 後の細胞より調製した細胞破碎液であったため、細胞の生育が止まり、Kre6 が分解されてしまったという二通りの可能性が考えられるが詳細は明らかではない. 酵母細胞は、培養液中に常に Bar1 という α -factor の分解酵素を分泌している. その為菌体濃度が高い条件では、培地中に α -factor を加えても十分な作用を発揮しない. しかし本実験は、蔗糖密度勾配遠心に供す為、非常に多くの同調細胞を調製する必要がある. そこで、同調培養の容量を 2 倍に増やし、 α -factor からのリリース後すぐの細胞ではなく、2 cycle 目の細胞を使用することとした. その結果、Kre6 の細胞内の濃度も WT 近くまで回復し、蔗糖密度勾配遠心に足りる量の同調細胞を得ることに成功した (method 参照). このような手法により、全細胞の半分以上で娘細胞の大きさが母細胞の 20% 以下の芽を持つ細胞培養液を調製した (Fig.1-10). これから調製した細胞破碎液を同じく EDTA 土の 2 つの方法で分画した結果は、非同調培養の細胞で得た分画結果と、差が認められなかった (Fig.1-11A, B).

この結果より Kre6 は、小さな芽を持ち、間接蛍光観察において極性化した局在を検出するような細胞内においても、多数の Kre6 が ER に局在すると予想された.

6. 小胞体、細胞質膜の marker タンパク質と Kre6 の共染色

同調細胞を用いた蔗糖密度勾配遠心分画の検討により、小さな芽を持ち、

Kre6が強く極性化した局在を持つ細胞内においてもKre6の多くがERに局在するとの結果を得た。しかし、このKre6に見える極性化した局在は、典型的なERのパターンとは明らかに異なる。この結果より最も単純に考えられるのは、Kre6が娘細胞や出芽予定部位の極性化したERに特異的に局在するのではないかとこの可能性であった。そこでこのKre6とERの関係を明らかにするため、ER膜に局在するセラミド合成酵素のsubunit, Lip1に蛍光標識をつけたGFP-Lip1をマーカーとして、野生株の染色体上に導入し、より詳細な観察を行った(Fig.1-12)。もし上記の仮定通りであればGFP-Lip1の典型的なdouble ringsのER像の一部とKre6の小さな芽の局在が重なるのではないかと考えた。

しかし実験の結果、GFP-lip1は、娘細胞のsizeが母細胞の20%以下の場合、娘細胞の中には微弱な蛍光シグナルしか検出されず、殆どすべてが母細胞の中に検出された。この現象は、ER inheritanceの解析を行った報告と一致するため、娘細胞におけるERの局在を捕らえられないという問題ではない[Fehrenbacher, 2002] [Estrada, 2003] [Du, 2006]。これに対して、Kre6はbudが全く発芽していないような細胞においては、細胞の一端、おそらく出芽予定部位を思われる領域に集中し、娘細胞のサイズが母細胞の20%以下の芽をもつ細胞でも極性化した特徴的な局在が検出された。この結果より、ERは娘細胞が母細胞のサイズの20%よりも大きくなってから娘細胞に移行しはじめるので、Kre6の出芽予定部位や小さな芽への移行はERのinheritanceに先行し、且つERの移行より前に娘細胞の中に見えるKre6の局在は、ERとは異なる場所にあると考えられた。この結果より細胞分画で、主たるピークのERに局在するKre6が間接蛍光観察では検出されにくい可能性が考えられた。ちいさい芽では β -1,6-glucanの合成が盛んに行われている事がわかっている為、何らかの β -1,6-glucanの合成に関わる遺伝子産物が局在していると考えられる。Kre6が β -1,6-glucan合成酵素の本体であると考えられる場合、ERがKre6が機能を発揮する場所とは考えられない。

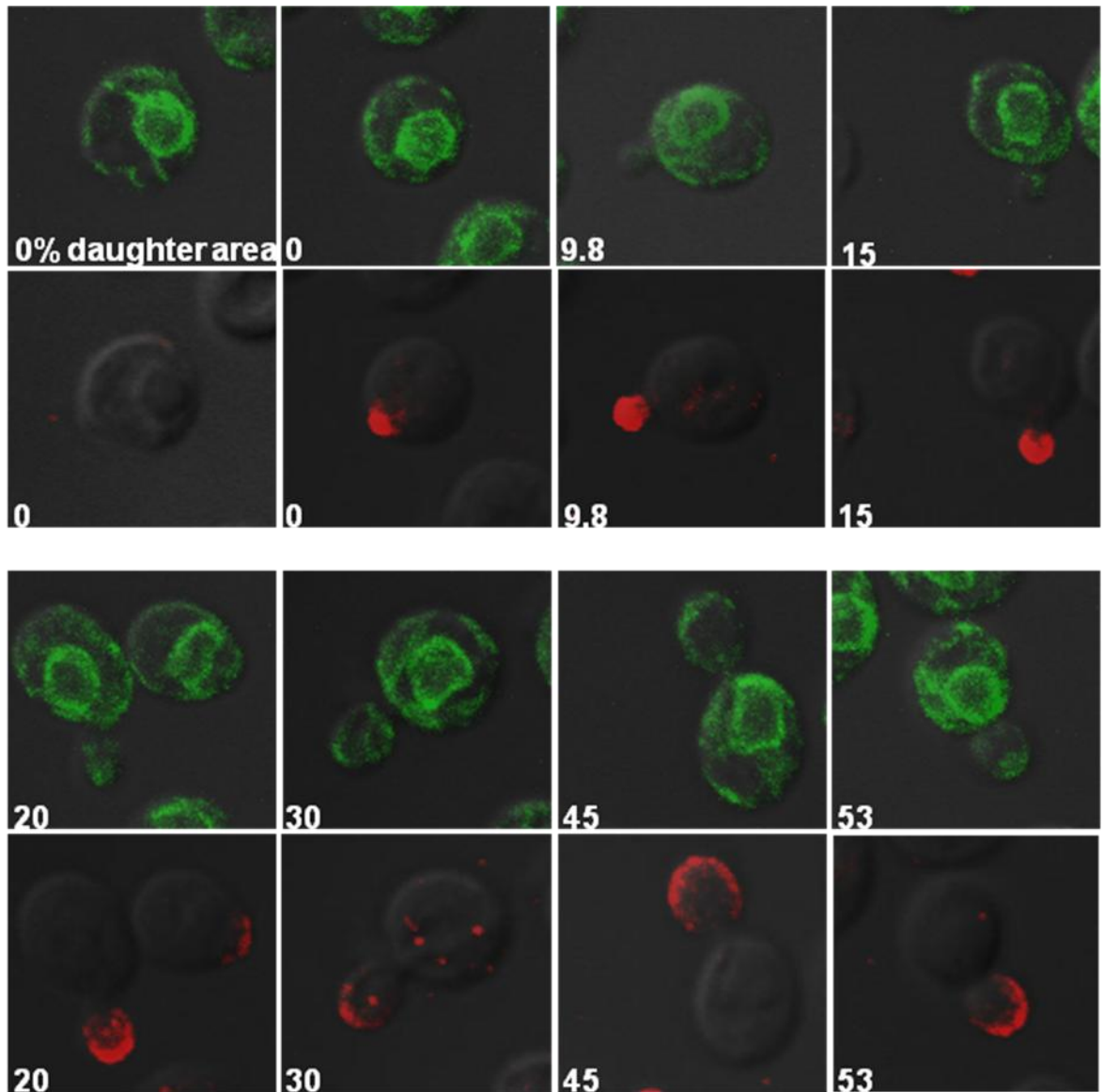


Figure1-12. Kre6のsmall budへの移行はER inheritanceに先行する.

ura3-52::GFP-LIP1(KSY466)をGFP, 抗Kre6抗体により間接蛍光観察, 得られた像を母細胞に対する娘細胞の面積の小さい順に並べた. budサイズが20%以下のcellではGFP-Lip1は殆ど娘細胞の内部に検出されぬが, Kre6はbudの無いcellにおいても出芽予定部位と思われる領域に局在が見られた.

上段panel:Lip1-GFP(ER), 下段panel:Kre6のbudにおける局在
(左下:% daughter area / mother area)

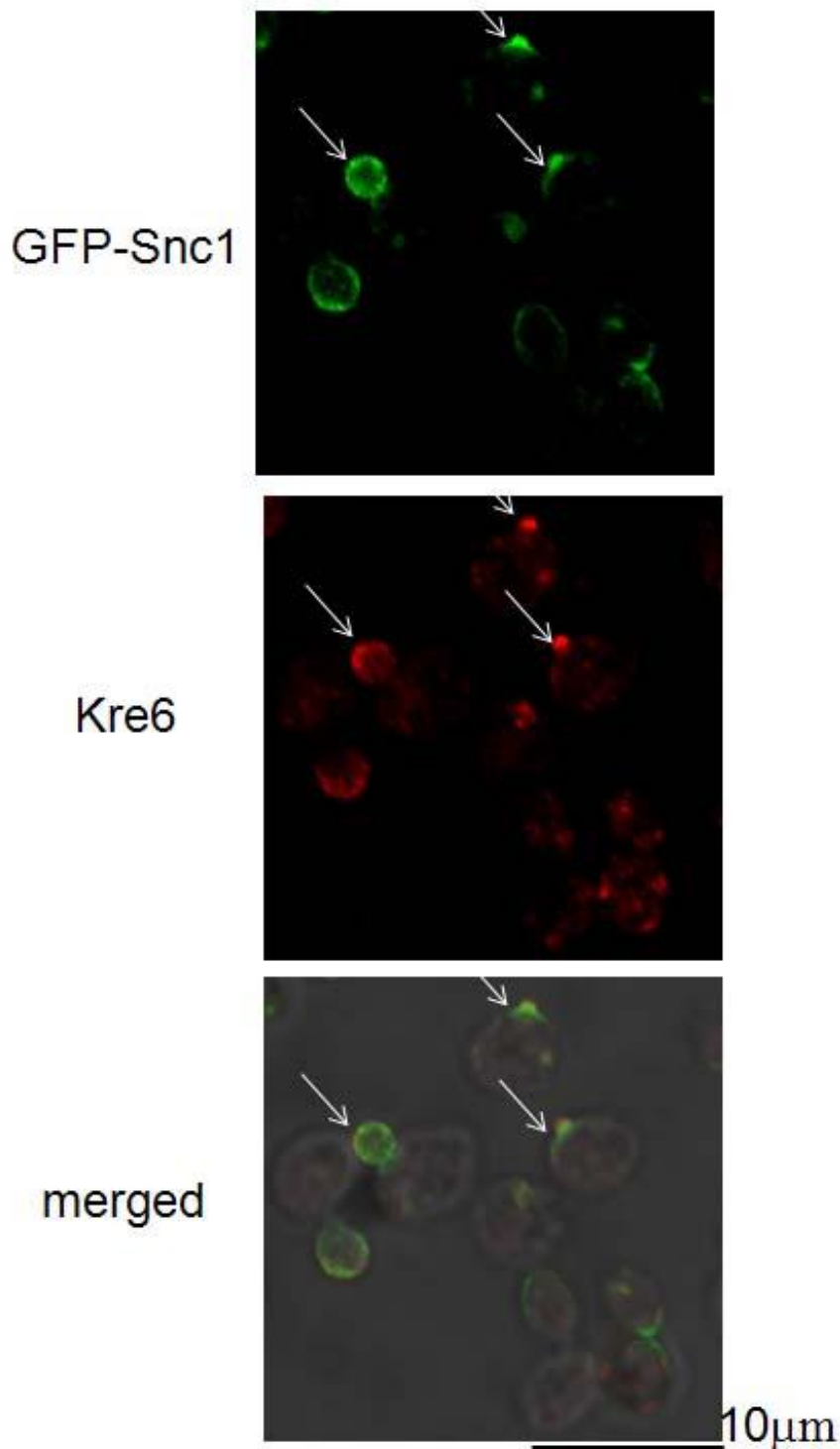


Figure 1-13 Kre6のsmall budの局在は極性化するPMのmarkerと一部重なる.

ura3-52::GFP-SNC1(YKY218)をGFP, 抗Kre6抗体により間接蛍光観察, GFP-Snc1, Kre6ともにsmall bud, 出芽予定領域にシグナルが検出され, 二種のシグナルの場所も良く一致した.

Kre6はGFP-Snc1と同じ, 極性化したPMに局在すると考えられた.

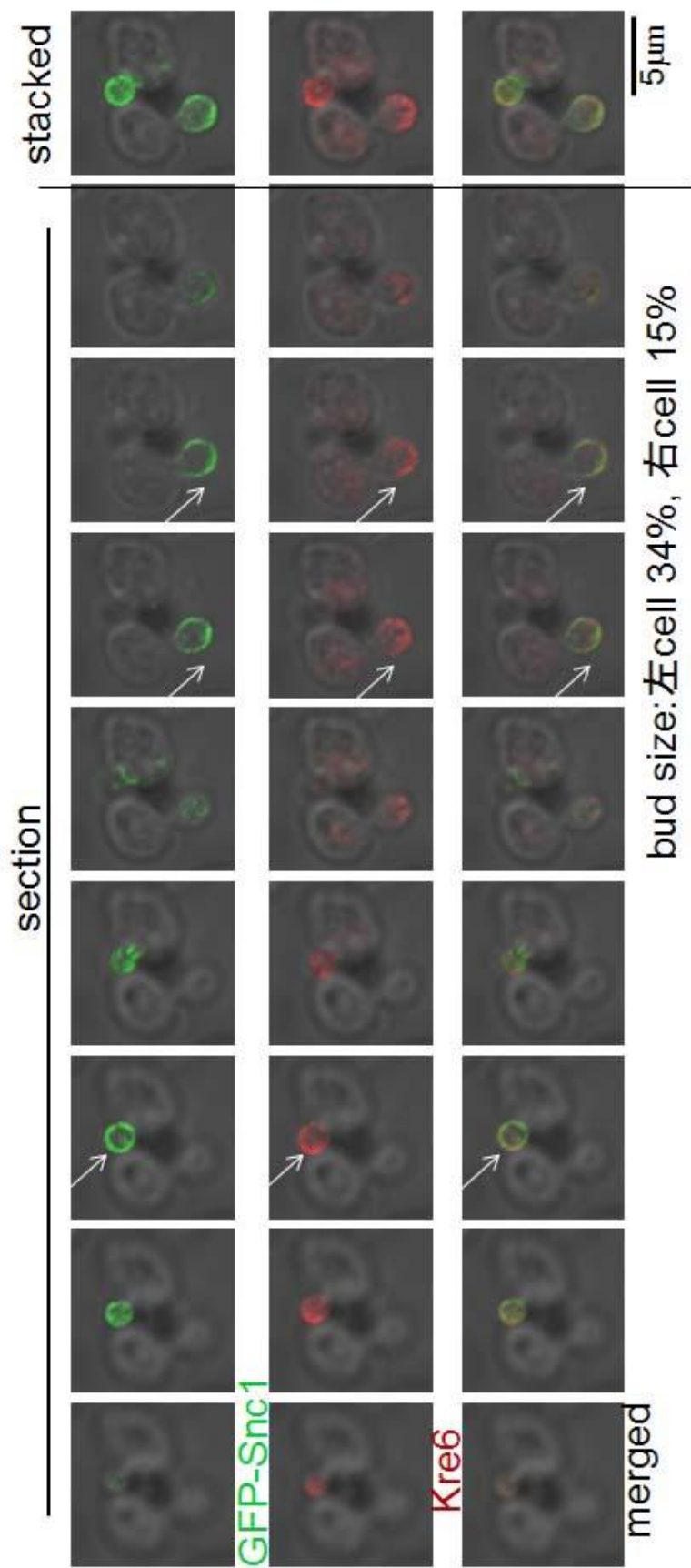


Figure 1-14. Kre6は、small bud内部、PMの直下の膜画分にも局在する。 *ura3-52::GFP-SNC1*(KTY218)をGFP, 抗Kre6抗体により共染した得られた像をsection毎に並べて示した。
 白矢印に示すようにGFP-Snc1がシャープに見えるsectionにおいてもKre6は内部に蓄積している様子が観察できた。この結果よりKre6は、PMと同時にその直下の膜画分に局在しているものと考えられた。

ERのマーカであるGFP-Lip1との共染でKre6の間接蛍光観察における極性化した局在はERではない事が示された為、蔗糖密度勾配遠心により検出されたマイナーなピークであるPMとその近傍にある膜画分について検討を行うこととした。細胞の生長部位にあるPMのマーカとして、GFP-Snc1を野生株の染色体に挿入して発現させた。GFP-Snc1はGolgiからPMへ輸送される分泌小胞のv-SNAREであり、PMとendosome、Golgi間をrecycleしているが、小さな芽のPMに極性化して局在する[Lewis, (2000)] [Gurunathan, (2000)] [Valdez-Taubas, J. (2003)].

実験の結果、GFP-Snc1は全体的にKre6の局在によく似ていた(Fig.1-13)。しかし共焦点顕微鏡の連続セクションを並べてみると、Cellのいちばん外側の輪郭部分でKre6とGFP-Snc1はよく一致しているが、cellの内部ではGFP-Snc1の蛍光シグナルよりも内側に、Kre6の蛍光シグナルが検出された(Fig.1-14)。このシグナルは、PMにKre6を輸送する途上の輸送小胞であり、EDTAの非存在下での蔗糖密度勾配遠心分画において見られたfraction5-8の弱いピークに相当するのではないかと考えた。

以上のような結果から、間接蛍光観察によりKre6の小さい芽や出芽予定領域と思われる局在はERでは無いこと、Kre6がPMに局在する事が示され、Kre6が輸送小胞にも局在する可能性が考えられた。

7. 免疫電子顕微鏡観察

これまでの検討から、母細胞のERやPMにはKre6は局在するのか、小さな芽のPMの直下の膜画分とはどのような構造体なのか、そして蔗糖密度勾配遠心より検出された大量のER局在のKre6はなぜ間接蛍光観察では強く見えないのか、といった問題が生じた。その問題を解決する目的で、電子顕微鏡観察[Takagi, 2003]

を行い、Kre6の局在する膜画分についてより微視的に調べる事とした。抗Kre6抗体は、細胞がないようなところにも非特異のsignalが多く見られたため、使うことができなかった。一方、抗HA抗体では、非特異的な蛍光シグナルはほとんど見られなかったため、染色体からKre6-3HAを発現する細胞の免疫電子顕微鏡観察を行った。良好な切片試料において、総計63の細胞について金コロイド粒子をその局在により以下に詳細を示す4つのカテゴリー(ER, PM, Secretory Vesicle:SV, Others:O)に分類し、細胞毎に各カテゴリーの金コロイド粒子数の割合を求めた。最後にそれを全細胞について平均化し標準偏差を求めた。

抗HA抗体の存在を示す金粒子は、細胞壁にはなく、細胞全体に見出された。金粒子の分布には、抗HA抗体の間接蛍光観察で見られたようなbud tipへの集中は認められず、芽をもつ細胞でも母細胞と娘細胞のあいだで大きな差は認められなかった(Fig. 1-15A)。これは電子顕微鏡に用いられるサンプルは切片であるため、間接蛍光観察のような切片で得られた像を重ね合わせた像とは異なる事、また、切断面が細胞の中心を切っているとは限らない為、bud tipに見える領域が本当にbud tipであるかどうかは定かではないという事が原因として考えられるが詳細は不明である。

大部分の金コロイド粒子は、細胞質に分散しており(66±13%, 1838 of 2807金コロイド粒子, Fig.1-15B, ER), 多くのものでリボソームの粒子が排除され存在しない領域の近傍に認められた。Kre6はtype II 膜タンパク質であるから、何らかの膜画分の上に存在するはずである。リボソームが排除される領域は、ERやGolgi体などの膜構造が存在するところと考えられる。本実験に用いた高圧凍結固定法は、現状において免疫電子顕微鏡の試料としては最も高感度に膜を検出する方法であるが、その方法でもPMの膜が薄く見える程度で、細胞内部の膜構造を明確には判定出来ない。蔗糖密度勾配遠心の結果から多数のKre6がER マーカーと同じ挙動をするという結果を踏まえると、これらの細胞質内に

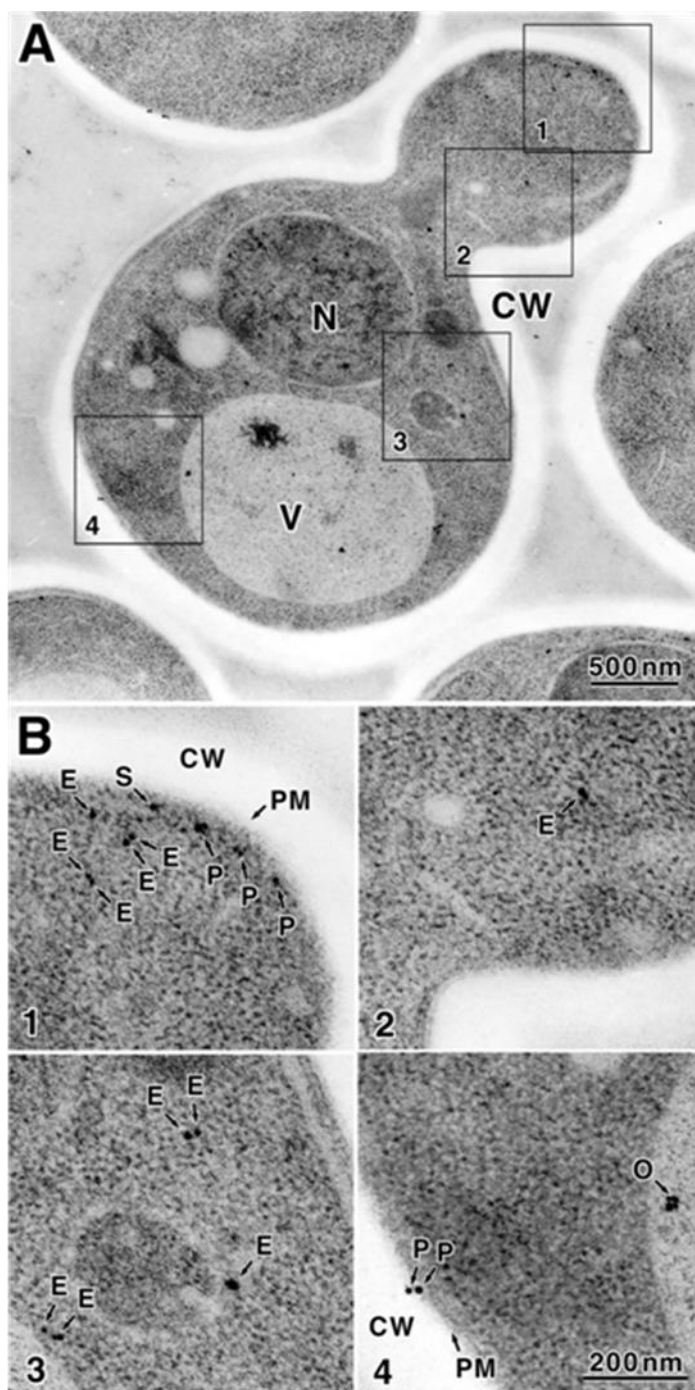


Figure.1-15 Kre6-3HAは、ER、PMとSVに局在する。

Kre6-3HA(KTY284)より免疫電子顕微鏡用の試料を作成、抗HA抗体を介して結合した金コロイド粒子によりKre6-3HAを検出した。(A)全体像、N:核、V:液胞、CW:細胞壁 (B)Aに示す1-4の領域を拡大した像 E:ER、P:PM、S:SV, secretory vesicle、o:others(核、液胞)の4種の局在を検出した、量的にはEが最も多かったがP、SVに局在する粒子も確かに検出された。

あるKre6は、ERに存在していると推定された。

次に721の金粒子($24 \pm 12\%$)が核や液胞の内部に見られた。Type II 膜タンパク質であるKre6の存在部位としては、この局在は考えにくく、また、核や液胞は構成タンパク質の電荷によって非特異的に金コロイド粒子を吸着し易いことから、これらは非特異的な金コロイドの吸着と考えた(Fig.1-15B, others)。

次に全63 cellsの中のほとんど(58cells, 92%)において、数は少ないがPM上及びごく近傍に金コロイド粒子が検出された。もしKre6-3HAがPMにあれば、抗原となる3HAはKre6のC末端についているので、PMの細胞外側面にあるPMの厚さとmAbなどの分子の長さを考慮すると、電子顕微鏡像で見えるPMの中心から35 nm以内にある金コロイド粒子は、PMに存在するKre6-3HAに結合した可能性がある[Fujimoto, 1997]。これらは248あった(10.1%, Fig.1-15B, PM+SV)。細胞の輪郭をなすPMの内側直下に、PMではない分泌小胞のような膜がある場合、その金コロイド粒子はどちらの膜のKre6-3HAに結合しているか判断できない。そのような金コロイド粒子が全体で135 ($5.6 \pm 6.2\%$)見られた(Fig.1-15B,SV)。この一部はPMのKre6-3HAと結合している可能性は除けない。そうではなく確実にPMに局在するKre6-3HAと判定された金コロイド粒子は113 ($4.5 \pm 5.5\%$)見られた(Fig.1-15B, PM)。SVとPMは、蔗糖密度勾配遠心分画で、それぞれ、EDTA を加えたときのfractions 5-7とEDTAを加えないときのfractions 10-12に回収されるKre6と考えられた。

8. Kre6 の極性生長部位局在の細胞壁への寄与

Kre6 の出芽予定領域や小さな芽への極性化した新規の局在を検出した。そこで、この新規の Kre6 の局在の生物学的な意味、すなわち、 β -1,6-glucan 合成にこの Kre6 の局在が必要なのか検討を行った。

方法としては、まずKre6のPMや分泌小胞と思われる極性化した局在を取れないKre6の構築を試みた。これまでに示したようにKre6のC末端の内腔側は機能重複があるSkn1と相同性が高く(Fig.1-4A), glycosyl hydrolaseとの相同性の高い領域でもある。その為、Kre6のC末端領域は酵素活性に必要な領域と考えられた。他方、N末端の細胞質側はSkn1との相同性も低く、ER搬出signalと思われるDXE [Epping, 2002]を多数有する点(Fig.1-16A), Sla1, Las17といったPMのタンパク質との結合が報告されている点[Li, 2002]を考慮するとKre6の正しい局在に必要な領域であると考えられた。そこでKre6のN末端の機能の解析を行っているLi *et al.*,の解析[Li, 2002]を参考に、N末端のSkn1と最も相同性の低い137aaを削った $\Delta 137kre6$ とN末端のTMDの直前までのすべての領域を削除した $\Delta 248kre6$ 、及びN末端のすべての領域が無くなった事によるタンパク質の安定性などの問題を考慮し、N末端DXEのある領域をすべて削った $\Delta 230kre6$ の各Kre6変異タンパク質の3種の変異タンパク質を作出する事とした。

N末端Truncated 変異タンパク質に解析の為にC末端に3HA-tagを付加して発現させたKre6を染色体上の*ura3-52 locus*より発現し、且つ元の*KRE6*を*kanMX4*遺伝子マーカーにより破壊して、変異*kre6*を唯一の*KRE6* alleleとして持つ各変異株を作出し、細胞破碎液をSDS-PAGEに供した(Fig.1-16B)。その結果、146-kDa (full-length Kre6), 82-kDa ($\Delta 137 kre6$), 73-kDa ($\Delta 230 kre6$), 68-kDa ($\Delta 248 kre6$)の各サイズの*kre6*変異タンパク質のバンドを検出した。

そこで、この変異*kre6*タンパク質が当初の目的通りにPMや小さな芽への極性化した局在を失っているのかという事を検討した。この変異タンパク質を発現する株より調製した細胞破碎液を蔗糖密度勾配遠心分画に供し、各変異*kre6*タンパク質の局在の検討を行った。その結果、EDTAを加えた遠心分画において、PMのピークと思われる10-12のピークがFull length(FL), $\Delta 137 kre6$,の各Kre6 コンストラクトにおいて検出された。これに対して $\Delta 230$, $\Delta 248$ の各*kre6*変異タンパク

質においてはPMのものと思われるピークは検出されなかった(Fig.1-17A,B). 抗HA抗体を用いた間接蛍光観察の結果, $\Delta 137 kre6$ 変異株において小さな芽に極性化する特徴的な局在がほとんど失われ, 少数の細胞において僅かに小さな芽の近傍の膜面分への局在が観察された. $\Delta 230 kre6$, $\Delta 248 kre6$ 各変異株においては $\Delta 137 kre6$ 変異株に僅かに見られた小さな芽への局在も完全に失われ, 細胞内の弱いdot状の構造体しか検出されなかった(Fig.1-18). これらの結果より $\Delta 137, \Delta 230, \Delta 248$ の各変異kre6タンパク質は, 目的通りPMや小さな芽への極性化して局在する機能が失われたものと判断した.

次にこのN末端truncated変異kre6を唯一のKre6遺伝子産物として持つ変異株の細胞について, K1 killer toxin感受性, CFW感受性の検討を行った. K1 killer toxinは β -1,6-glucanに結合し, 生育を阻害する毒性タンパク質であり, β -1,6-glucanが減少する変異株では耐性化する. その為, ある遺伝子の破壊や変異によりK1 killer toxin耐性になるかどうかは, β -1,6-glucan合成に関わるかどうかを判断する重要な指標とされている. $\Delta 137 kre6$ を持つ株は, K1 killer toxin生産株の周辺にクリアゾーンが観察出来るがWTやFLに比べて直径が小さく, K1 killer toxinにやや耐性化していた. この結果より, Kre6の特徴的な極性化した局在が細胞壁におけるKre6のFullの活性には必要であると考えられる. Calcofluor White(CFW)はキチンに結合して生育を阻害する薬剤である. キチンは, 細胞壁ストレスがかかると合成が亢進され細胞壁の剛性を上げる働きをする. その為, β -1,6-glucanの減少する $\Delta kre6$ 株では, 細胞壁におけるキチンの量が増加しCFWに対してWTよりも高感受性となる(Fig.1-19B, Nakamata, 2007). CFWの感受性解析の結果, $\Delta 137 kre6$ 株は, WTと同程度の感受性を示した. $\Delta 137 kre6$ はPMへの局在することが蔗糖密度勾配遠心により示されたが, 間接蛍光観察においてWTに見られる小さな芽や出芽予定部位への局在がほとんど失われていた.

$\Delta 230, \Delta 248 kre6$ を持つ株は, K1 killer toxin感受性の検討の結果, $\Delta kre6$ 株と同様

A

1 MPLRNL TETH NFSSTNL**DTD** GTGD**DHD**GAP LSSSPSFGQQ NDNSTNDNAG
 51 LTNPFMG**DE** **ESNARDG**ESL SSSVHYQPQG SDSSLLHDNS RLDLSQNKGV
 101 SDYKGYYSRN NSRAVSTAND NSFLQPPHRA IASSPSI¹³⁷NSN LSKNDILSPP
 151 **EFD**RYPLVGS RVTSM TQLNH HGRSPTSSPG NESSASFSSN PFLG**EQD**FSP
 201 FGGYPASSFP LMIDEK**EEDD** YLHNP**DPEE**E²³⁰ ARLDRRRFID DFKYMDKR²⁴⁸SA

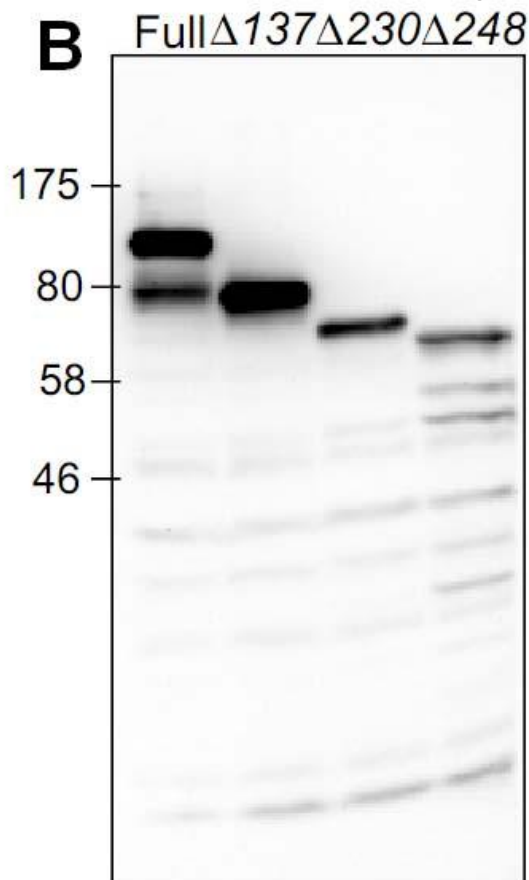


Figure 1-16. Kre6 N-terminus truncate versionの構築

FL:KTY626:*ura3-52::KRE6-3HA, Δkre6*

$\Delta 137$:KTY628:*ura3-52::Δ137-kre6-3HA, Δkre6*

$\Delta 230$:KTY632:*ura3-52::Δ230-kre6-3HA, Δkre6*

$\Delta 248$:KTY630:*ura3-52::Δ248-kre6-3HA, Δkre6*

(A)Kre6 N末端、(B)各株のSDS-PAGE, 抗HA抗体検出

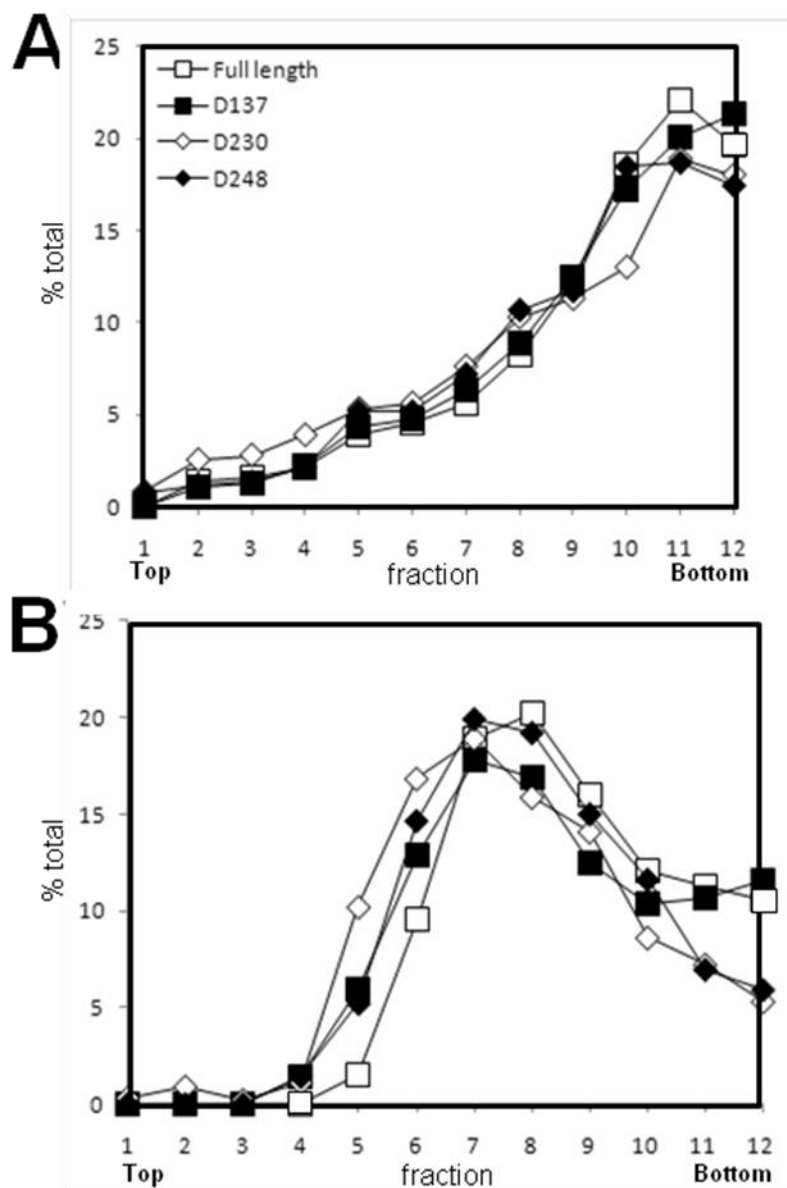


Figure 1-17. Kre6 N末端230, 248aa truncate Kre6-3HAは, PMの局在が減少する.

FL:KTY626:ura3-52::KRE6-3HA, $\Delta kre6$

$\Delta 137$:KTY628:ura3-52:: $\Delta 137$ -kre6-3HA, $\Delta kre6$

$\Delta 230$:KTY632:ura3-52:: $\Delta 230$ -kre6-3HA, $\Delta kre6$

$\Delta 248$:KTY630:ura3-52:: $\Delta 248$ -kre6-3HA, $\Delta kre6$

Fig. 1-9に示した蔗糖密度勾配遠心を行った.

FL-Kre6-3HA, $\Delta 137$ kre6は, EDTA+の時はKre6は6-9のERと思われるpeakと10-12のPMと思われるpeakを検出した. 一方, $\Delta 230$, $\Delta 248$ kre6はbottomにpeakが検出されなかった.

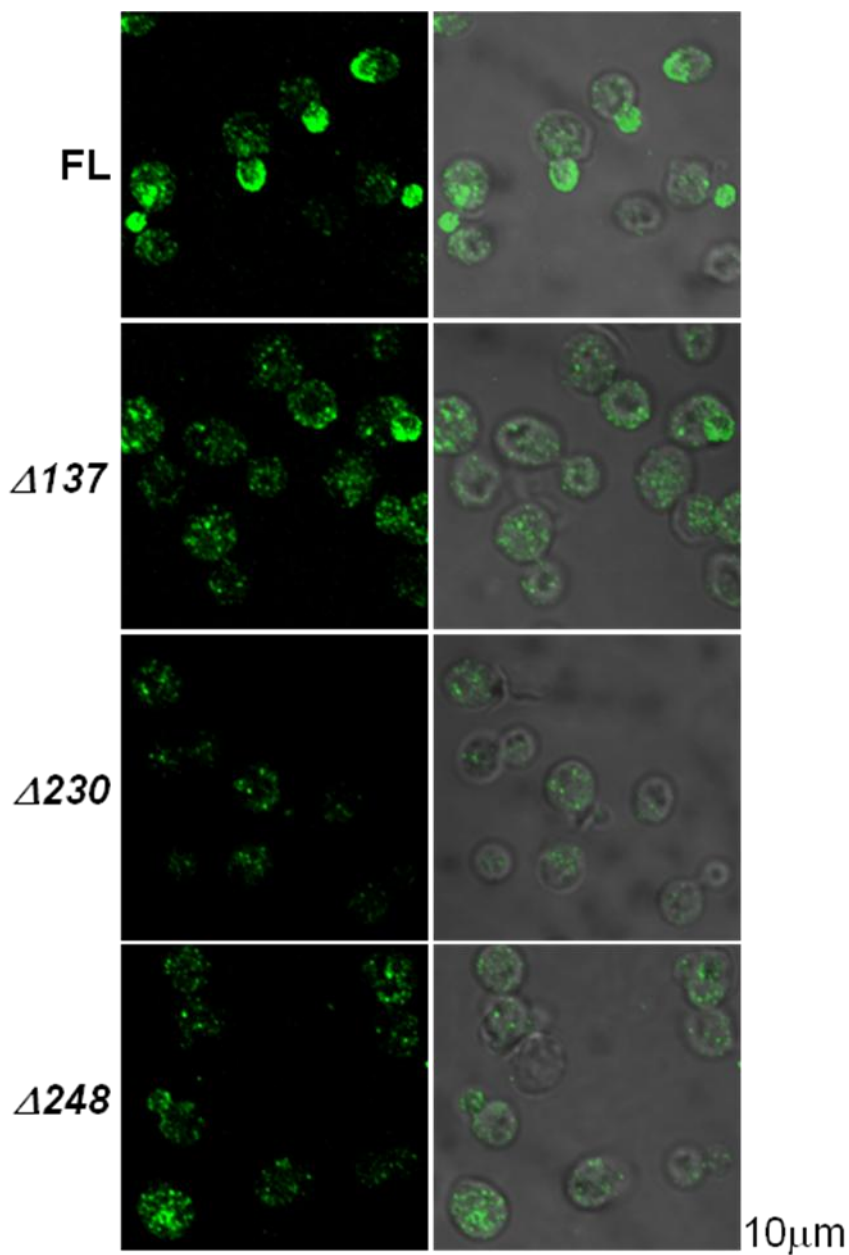


Figure 1-18. Kre6 N-terminus truncate versionは, small budへの極性化した局在を失う.

FL:KTY626:*ura3-52::KRE6-3HA, Δkre6*

Δ137:KTY628:*ura3-52::Δ137-kre6-3HA, Δkre6*

Δ230:KTY632:*ura3-52::Δ230-kre6-3HA, Δkre6*

Δ248:KTY630:*ura3-52::Δ248-kre6-3HA, Δkre6*

各株を抗HA抗体により間接蛍光観察.

FLは, small budに極性化した局在が見えたが, Δ137kre6では非常にシグナルが減少し僅かにsmall budへの局在が見えるのみであった. Δ230, Δ248kre6では, 完全に極性化した局在が失われた.

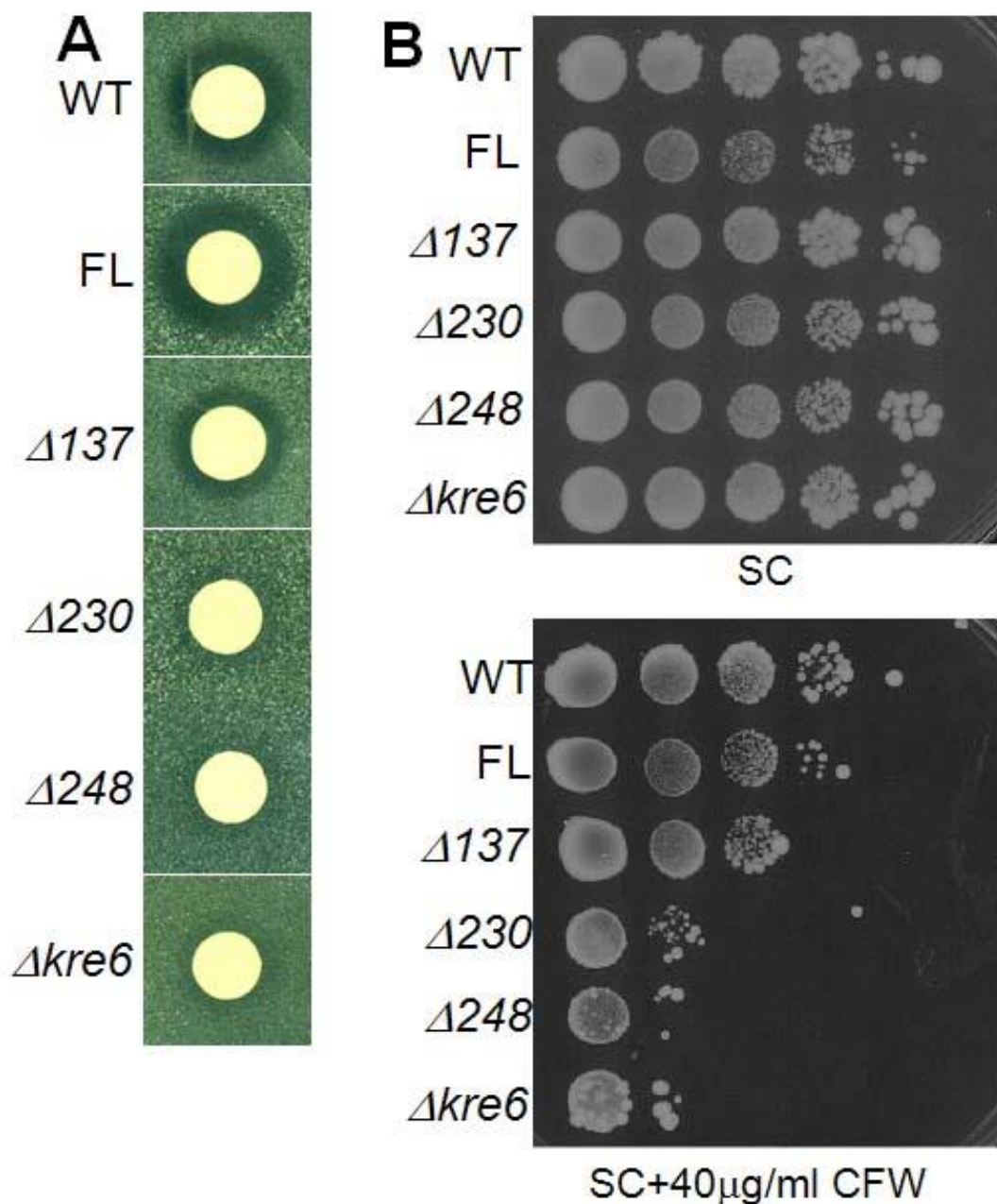


Figure 1-19. Kre6 N末端truncatелは、細胞壁変異を示す。

WT: YKY213

FL: KTY626

$\Delta 137$: KTY628

$\Delta 230$: KTY632

$\Delta 248$: KTY630

$\Delta kre6$: KTY604

(A)各株をLow-pH-YPD plate上に塗布しK1 killer 生産株(NCYC232)をspotした。

16 $^{\circ}$ Cで培養した時のK1 killer生産株の周囲のクリアゾーンの大きさを検討した。

(B)各株40 μ g/ml Calcofluor White (CFW) SC寒天培地にspotし生育を検討した。

$\Delta 137$ 株で弱いK1 killer 耐性, $\Delta 230$, $\Delta 248$ 株でK1 killer耐性とCFWの高感受性を検出した。

に全くクリアゾーンが検出されなかった(Fig.1-19A). CFWの感受性解析の結果も $\Delta 230, \Delta 248 kre6$ を持つ各株は, $\Delta kre6$ 株と同程度の高感受性が検出された(Fig.1-19B). この結果より, N末端 $\Delta 230, \Delta 248 kre6$ 変異タンパク質は, PMや小さな芽への極性化した局在を失い, 且つKre6の本来の機能も完全に失っていると考えられた.

以上の結果より, Kre6のN末端はKre6の小さい芽や出芽予定領域への局在に必要であることを示し, この局在出来ない変異タンパク質はKre6本来の機能を失う事を示唆した.

考察

PM に到達すると細胞外に出ると考えられる Kre6 の C 末端の領域には, glycosyl hydrolase との相同性の高い領域を持ち, UDP-glucose binding domain も検出されている為, β -1,6-glucan 合成酵素の最も有力な候補タンパク質の一つである. β -1,6-glucan は, 細胞壁多糖の 12%を占め, 細胞の生育に必須の構成成分であるにも関わらず, 合成の分子機構を始め合成の場所すら明らかになっていない. その為, Kre6 の酵素活性やその酵素が働く場所の知見は, これまでほとんど情報の無かった出芽酵母における β -1,6-glucan 合成系の解明を大幅に進める可能性がある. しかし Kre6 はこれまでに tag の種類や位置, 発現量等の異なる条件による検討によって, 3 種類もの異なる細胞内局在が議論された. そこで本研究では, Kre6 の tag や発現条件等の影響を排する為, 抗 Kre6 抗体を取得し, Kre6 の真の局在を明らかにしたいと考えた.

取得できた抗 Kre6 を用いた間接蛍光観察により, Kre6-3HA(Fig.1-3)と同様の小さな芽や出芽予定部位に極性化した局在が検出された(Fig.1-6). 蔗糖密度勾配遠心分画(Fig.1-9,11)と免疫電子顕微鏡観察(Fig.1-15)から Kre6 の局在は, 小さな

芽を持ち間接蛍光観察により極性化した局在が検出できる株でも、多数の Kre6 は ER に、ER よりも少数の Kre6 が他の PM や他の分泌小胞のような膜画分に局在するものと考えられた。ER のマーカーである GFP-Lip1 との共染により Kre6 の出芽予定部位や小さな芽への移行が ER の inheritance に先行し、且つ Kre6 の特徴的な局在が ER では無い事を示した(Fig.1-12)。極性化した PM のマーカーである GFP-Snc1 と Kre6 の共染色を行ったところ、細胞の外側の輪郭部分の PM で局在が一致した(Fig.1-13)。しかし、細胞内部の領域においては、GFP-Snc1 の存在しない部分にも Kre6 の蛍光シグナルが検出された為(Fig.1-14)、Kre6 の特徴的な極性化した局在は蔗糖密度勾配遠心や免疫電子顕微鏡観察から Kre6 の局在する場所としては ER よりもマイナーと思われる PM やその近傍の膜画分と考えられた。免疫電子顕微鏡観察において母細胞における細胞内部の膜画分にも多くの Kre6-3HA と思われる金コロイド粒子が検出されており、おそらくは Kre6 は母細胞も含めた ER 全体に局在するものと考えられた。この最も多くの Kre6 が局在すると考えられる ER のパターンが間接蛍光観察により検出しにくい理由は、現時点ではっきりしない。考えられる理由としては、PM や輸送小胞の Kre6 が多量体を形成するなど、ER に局在している場合と比べ濃縮され、局所的に Kre6 の濃度が ER よりも上がっている、もしくは、ER に局在する Kre6 には PM や輸送小胞に局在しているときには結合していない結合タンパク質があり、抗体が結合出来ないなどの可能性が考えられる。この現象についての考察は次章でも ER の Kre6 に結合する膜タンパクである Keg1 の解析の考察時に記すことにする。

次にこの新規の Kre6 局在の生物学的な意味の検討を行った。Kre6 の N 末端の細胞質側は ER 搬出 signal と思われる DXE [Epping, 2002]が多数存在する事 (Fig.1-16A)、PM のタンパク質との結合が報告されている[Li, 2002]事から Kre6 の正しい局在に必要な領域であると考えられた。そこで、Kre6 の N 末端をそれ

ぞれ 137, 230, 280 アミノ酸残基を削った変異 *kre6* タンパク質を作出し, 変異タンパク質の局在と変異タンパク質を発現する株の細胞壁の検討を行った. $\Delta 137kre6$ は間接蛍光観察により少数の細胞で *Kre6* の小さな芽への局在は PM の輪郭部分に極弱い蛍光シグナルが検出され(Fig.1-18), 蔗糖密度勾配遠心分画では PM のピークが検出されたが(Fig.1-17A,B), K1 killer toxin に弱い耐性化が見られた(Fig.1-19A). この結果より *Kre6* の小さな芽に強く極性化した局在は *Kre6* の Full の活性に必要と考えられた. ウェスタンブロッティングの結果より, $\Delta 137kre6$ のタンパク量は FL と同じか若干多く見える(Fig.1-16). PM への局在も確認されているにも関わらず, 間接蛍光観察において FL に比べ極性化した signal が弱い. この現象は, *Kre6* の特徴的な極性化した局在が PM だけでなく, 直下の膜画分にも多く存在する事を示すのかも知れない. *Kre6* の N 末端の PM 側の領域は PM のエンドサイトーシスに関わる *Sla1* や細胞極性に関わるアクチンパッチのタンパク質である *Las17* と結合する領域でも有る為, $\Delta 137kre6$ は PM への正しい輸送や保持に問題があるのかもしれない. 少なくとも N 末端の 137 アミノ酸の領域は *Kre6* の正しい局在と Full の活性には必要な領域であると考えられる. $\Delta 230, \Delta 248kre6$ は, 野生型の *Kre6* に観察される極性化した局在は全く失われて(Fig.1-18), 蔗糖密度勾配遠心分画においても PM のものと思われるピークは検出されなかった(Fig.1-17A,B). $\Delta 230, \Delta 248kre6$ 株は, K1 killer toxin 感受性解析において $\Delta kre6$ 株と同様に全くクリアゾーンが検出されなかった(Fig.1-19A). CFW 感受性解析でも $\Delta kre6$ 株と同程度の高感受性が検出された(Fig.1-19B). この結果より, N 末端 $\Delta 230, \Delta 248kre6$ 変異タンパク質は, PM や小さな芽への極性化した局在を失い, 且つ *Kre6* の本来の機能も完全に失っていると考えられた. この結果から, *Kre6* の N 末端側の領域は ER からの搬出に必要と考えられた. ウェスタンブロッティングの結果より, $\Delta 230, \Delta 248kre6$ 変異タンパク質は量の減少が見られ, タンパク質の安定性に問題がある事が考えられるが, この変異株の表

現型が $\Delta kre6$ 株と同程度で Kre6 本来の機能を全く失っていることを考慮すると、単にタンパク質が量的に少ない為に起こった現象とは考えにくい。その為、N 末端 $\Delta 230, \Delta 248 kre6$ 変異タンパク質は、本来働くべき場所に局在できない為に Kre6 の機能が失われたと結論づけた。

本研究では、Kre6は、この出芽予定部位や小さな芽に極性化する新規の局在を発見し、且つその局在がKre6の機能に必要な事を示した。それと同時に、おそらくKre6が機能を発揮する場所では無いと考えられるERにも大量に局在する事も明らかとなった。この特徴的な局在パターンは、キチン合成酵素のChs3に似ている。Chs3は、PMで酵素活性を持ちながらERから分泌経路の各膜面分にも存在する事が報告されている[Valdivia, 2003]。Schekmanらの熱心な研究により、Chs3は高温などのストレス条件下でキチンの合成を緊急に高めたい場合に即応出来るよう過剰量のChs3を細胞の内部で蓄えるという戦略を取っていると考えられ[Valdivia, 2003]、多くの局在に必要な制御に関わるタンパク質も発見、解析されている[Lesage, 2006]。 β -1,6-glucan合成に関わる機能が全くわかっていない多くの遺伝子産物も分泌経路に沿って発見されている。この β -1,6-glucan合成に関連があるとされる遺伝子の内の幾つかは、Kre6の輸送や成熟に関わるのかも知れない。いずれにしても本研究により β -1,6-glucanの合成に関わるとされる遺伝子産物の中で初めて小さな芽に極性化した局在を示すタンパク質を同定した。この知見は今後の出芽酵母における β -1,6-glucan合成に決定的に重要な情報であると考えられた。

第二章 *Keg1*とその他の β -1,6-glucan合成関連遺伝子の解析

序

β -1,6-glucan 合成に関わる遺伝子産物は、盛んに解析されてきたが、未だに合成酵素本体のような重要な遺伝子産物見つかっていない可能性がある。このような重要と思われる遺伝子産物の解析が進んでいない理由の一つとして、必須遺伝子の解析が難しいことにある。非必須遺伝子は網羅的な遺伝子破壊株が取得、解析されており、その結果は data base 上に公開されているが、必須遺伝子は遺伝子破壊株の取得が出来ない為に解析が進まない状況にあった。当研究室では、分泌経路でのタンパク質輸送に関わる新規な重要因子の同定を目的として、出芽酵母 *S.cerevisiae* の機能未知必須膜タンパク質の網羅的解析が試みられた。未解析の必須遺伝子について、GFP tag を付加して局在を観察し、分泌経路において機能する可能性の高い ER や Golgi 体に局在する遺伝子産物について、error-prone PCR により温度感受性変異株を作製し表現型やサプレッサースクリーニングにより機能を推測、以降の解析を行った。

YFR042w は、このような経緯により中俣および筆者らによって解析が開始された遺伝子である。*Yfr042w* は、200aa、推定4回膜貫通の必須遺伝子産物であり、温度感受性変異株の検討の結果、キチンに結合して生育を阻害する CFW (Calcofluor White) に対する感受性を示し、サプレッサースクリーニングにより β -1,6-glucan 合成に関わるとされていた *Rot1* の過剰発現により温度感受性の回復を示した。キチン合成の異常昂進も、細胞壁の異常を示す場合に起こる場合が報告されており、*Yfr042w* の機能を β -1,6-glucan 合成に関わる可能性が考えられた。さらに data base 上で *Yfr042w* との結合が報告されていた前章に解析を示した *Kre6* との結合を検出し、*YFR042w* の変異株の細胞壁の検討から、アルカリ不

溶性の β -1,6-glucan の減少が検出された。これらの知見を総合して *YFR042w* を β -1,6-glucan 合成に関わる新規必須遺伝子として *KEG1* (*Kre6 binding ER protein responsible for β -1,6-Glucan synthesis 1*) と命名した[Nakamata, 2007].

Keg1 は、これまで未解析の必須の β -1,6-glucan 合成に関わる遺伝子産物であり、 β -1,6-glucan 合成に重要な働きをされると考えられるが、具体的な機能については、まったく不明であった。さらに前章で示したように *Kre6* の局在が ER だけでなく、PM や輸送小胞にも局在することが明らかとなった。そこで本研究では、まず *Keg1* の局在と *Kre6* との結合を再検討した。それに加えて *Keg1* の機能を明らかにする目的で、*Kre6* 以外の β -1,6-glucan 合成関連遺伝子との物理的遺伝学的な相互作用についての検討を行い、*Keg1* が ER に局在する β -1,6-glucan 合成に関わる *Cne1* との合成生育阻害と結合を見出した。さらに *Keg1* は *Kre6* の局在と安定性に必要であることが明らかにした。

使用菌株

Strain	Genotype
BY4741	<i>MATa, his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
BY4741	<i>MATα, his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
Y05574	As BY4741, <i>kre6Δ::kanMX4</i>
KTY393	As BY4742, <i>ura3-52::GFP-KEG1</i>
KTY394	As BY4742, <i>ura3-52::GFP-KEG1</i>
KTY634	As KTY393, <i>MATa, keg1Δ::kanMX4</i>
KTY496	<i>keg1Δ::kanMX4, ura3-52::GFP-KEG1, KRE6-3HA</i>
KTY498	<i>keg1Δ::kanMX4, ura3-52::GFP-KEG1</i>
KTY500	<i>keg1Δ::kanMX4, ura3-52::GFP-keg1-1, KRE6-3HA</i>
KTY502	<i>keg1Δ::kanMX4, ura3-52::GFP-keg1-1</i>
KTY449	As BY4742, <i>KRE6-3HA</i>
KTY467	As BY4742, <i>keg1-1, KRE6-3HA</i>
KTY488	<i>pep4Δ::kanMX4, KRE6-3HA</i>
KTY486	<i>pep4Δ::kanMX4, keg1-1, KRE6-3HA</i>
KTY492	<i>ubc7Δ::kanMX4, KRE6-3HA</i>
KTY490	<i>ubc7Δ::kanMX4, keg1-1, KRE6-3HA</i>
KTY236	<i>keg1Δ/6myc-KEG1</i>
KTY316	<i>keg1Δ/6myc-KEG1, ROT2-3HA</i>
KTY333	<i>keg1Δ/6myc-KEG1, CWH41-3HA</i>
KTY379	<i>keg1Δ/6myc-KEG1, KRE5-3HA</i>
KTY331	<i>keg1Δ/6myc-KEG1, CNE1-3HA</i>

AKY17 As BY4741, *KEG1::keg1-1 LUE2*

KTY290 As BY4742, *KEG1::keg1-1 LUE2*

Y00349 As BY4741, *CNE1::kanMX4*

Y04395 As BY4741, *CWH41::kanMX4*

Y03369 As BY4741, *ROT2::kanMX4*

Y4796 As BY4741, *KRE11::kanMX4*

Y02098 As BY4741, *PEP4::kanMX4*

Y00597 As BY4741, *UBC7::kanMX4*

KTY284 As BY4741, *KRE6-3HA*

KTY342 *CNE1::kanMX4, keg1-1* (KTY290×Y00349の孢子)

NCYC232 K1 killer strain

結果

1. *Keg1* 変異株の K1 killer toxin 感受性の解析

K1 killer toxin は、 β -1,6-glucan に結合して、有害な細胞質膜孔を形成して生育を阻害する毒性タンパク質である。前章において論じたように細胞壁の β -1,6-glucan 量が低下する変異株では、K1 killer toxin に耐性となり、その β -1,6-glucan レベルの低下の原因遺伝子を *KRE* (Killer toxin *RE*sistance) と命名し、 β -1,6-glucan 合成に関わる遺伝子として同定した経緯が有る。その為、K1 killer toxin に対する耐性化は、或る遺伝子産物が β -1,6-glucan 合成に関わるかどうかを判断する重要な指標の一つである [Shahinian, 2000], [Pagé, 2003], [Lesage, 2006].

Keg1 の機能として β -1,6-glucan 合成に関わる可能性が考えられた為、*keg1* 温度感受性変異株の K1 killer toxin 感受性解析を行う事とした。*KEG1* は必須遺伝子であるため、これまで解析において 37°C で致死となる温度感受性変異株を作出していた [Nakamata, 2007]. 非制限温度である 25°C では WT との生育の差は殆ど見られず、制限温度である 37°C で完全に致死となる。K1 killer toxin は killer 因子と呼ばれる溶原性遺伝因子由来の毒性タンパク質である。この killer 因子は宿主である K1 killer 生産株を高温で培養すると宿主から抜けて、K1 killer toxin の活性が無くなることが報告されていた [Hodgson, 1995].

筆者の行った実験においても 30°C では WT でも全くクリアゾーンは検出されず K1 killer の活性が検出できなかった (data not shown). 一方で、25°C の非制限温度では *keg1-1* 株は、生育に強い影響は見られず、行った K1 killer toxin 感受性解析では、WT よりも若干耐性化していたが、顕著な影響はなかった (Fig.2-1A). 検定株を 25°C で培養後、K1 killer toxin の活性の強い 16°C で plate を培養し、

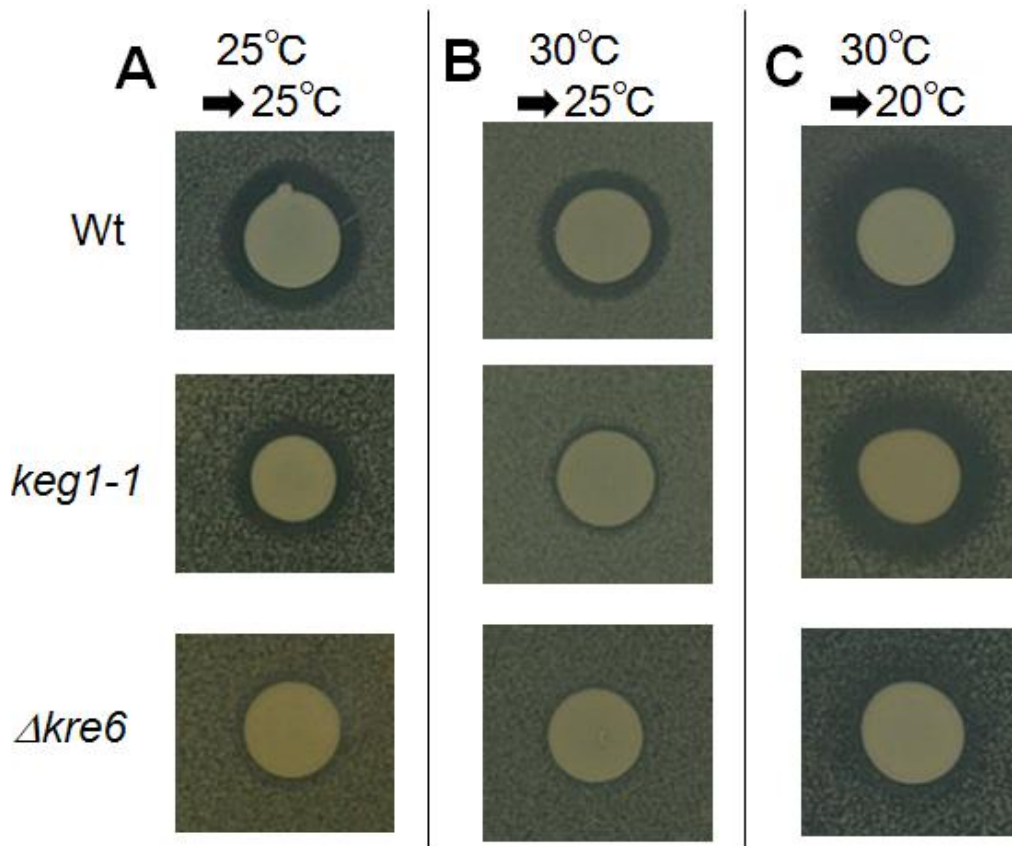


Figure 2-1 *keg1-1*変異株はK1 killer toxinに耐性である.

WT(BY4741), *keg1-1*(AKY17), $\Delta kre6$ (Y05574)の各検定株を上記の温度で前培養, Low-pH-YPD plateに塗布した. K1 killer生産株(NCYC232)をspotし,さらに培養した.

検定株を30°Cで前培養後にK1 killer株をspotし, 25°Cで培養したときにWTに比べ有意に*keg1-1*株の耐性化が見られた.

各panelの上の温度: 検定株の前培養の温度

➡killer株spot後の培養温度

WT と *keg1-1* 株の差を検討したが、WT と *keg1-1* 株のクリアゾーンに差は見られなかった(Fig.2-1C). そこで、検定株の前培養の温度を 30°C と高い温度で培養し、*keg1-1* 株の温度感受性変異形質をより強く発現させた条件で、同様の検討を行った。結果 WT は K1 killer 生産株の周囲にクリアゾーンを形成して感受性を示したが、*keg1-1* 株は、 $\Delta kre6$ 株と同程度の耐性を示した(Fig.1-2B).

この結果より、*keg1* 温度感受性株が K1 killer toxin に耐性であることが示され、 β -1,6-glucan 合成に関わる可能性がより強く示唆された。同時に僅か 5°C の差で大きく細胞壁の状態を変化させた *keg1-1* 株は制限温度において非常に温度依存的な影響が出やすい株であると考えられた。

2. Keg1 の局在の検討

中俣と筆者は、*KEG1* の遺伝子産物は、前章で解析を行った *Kre6* と結合し、且つ β -1,6-glucan 合成に関わる必須遺伝子であると報告した[Nakamata, 2007]. しかし、*Keg1* と *Kre6* の結合の解析は、low-copy plasmid より発現する N 末端 GFP-tag 付き *Keg1* と、同じく low-copy plasmid により発現する C 末端 6myc-tag *Kre6* によって検討したものであり、蛍光顕微鏡観察では共に ER に局在するタンパク質のパターンを示した。

しかし、第一章で述べたように、その後、*Kre6-3HA* は間接蛍光観察により小さな芽に極性化した局在を示し(Fig.1-3A)局在が ER だけでなく、PM や分泌小胞にも局在する事が示された(Fig.1-9,11,13,14). そこで *Kre6* に結合するとされる *Keg1* についても局在について再度検討をする事とした。

URA3 マーカーを持つ pRS306 に *GFP-KEG1* コンストラクトを導入し、*ura3-52 locus* に integration する plasmid を作成した。この構築は、plasmid の *URA3* 遺伝子内部の *StuI* 制限酵素サイトで切断して形質転換することにより、染色体

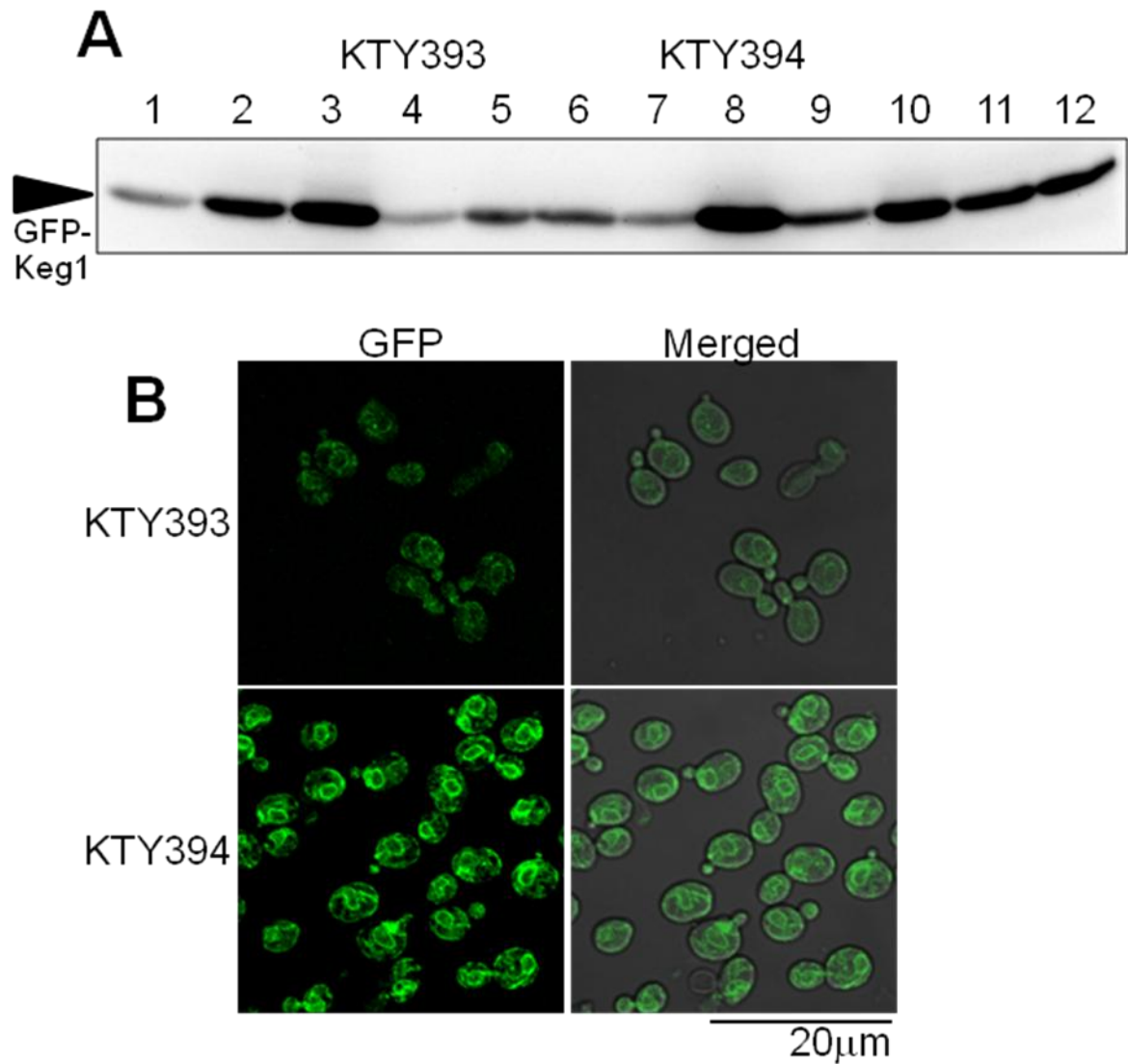


Figure 2-2 GFP-Keg1は発現量に依らずERに局在する.
 (A)発現量の異なる*ura3-52::GFP-KEG1*発現株を作成した.
 (B)Aに示したGFP-Keg1の発現量の少ないlane4の株(KTY393)と発現量の多いlane8の株(KTY394)の蛍光顕微鏡観察. 発現量に依らずGFP-Keg1のER局在が検出された.

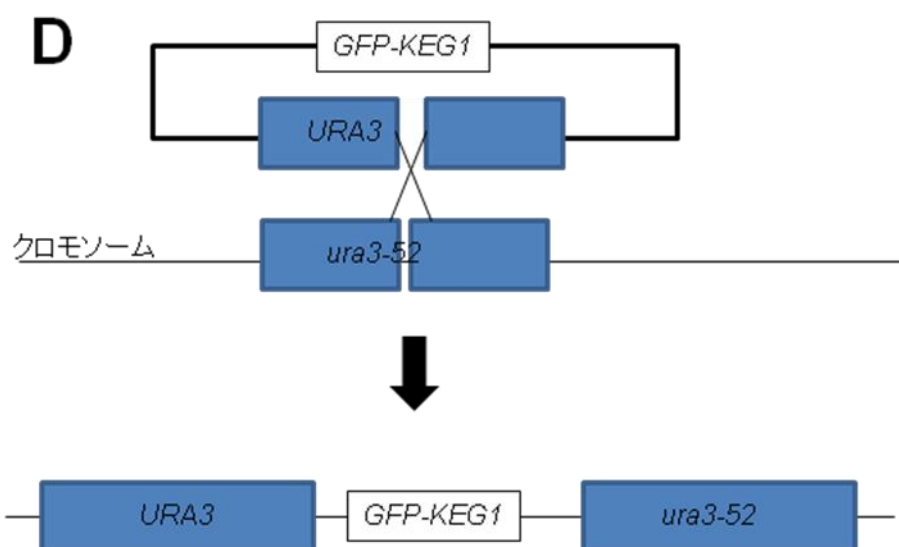
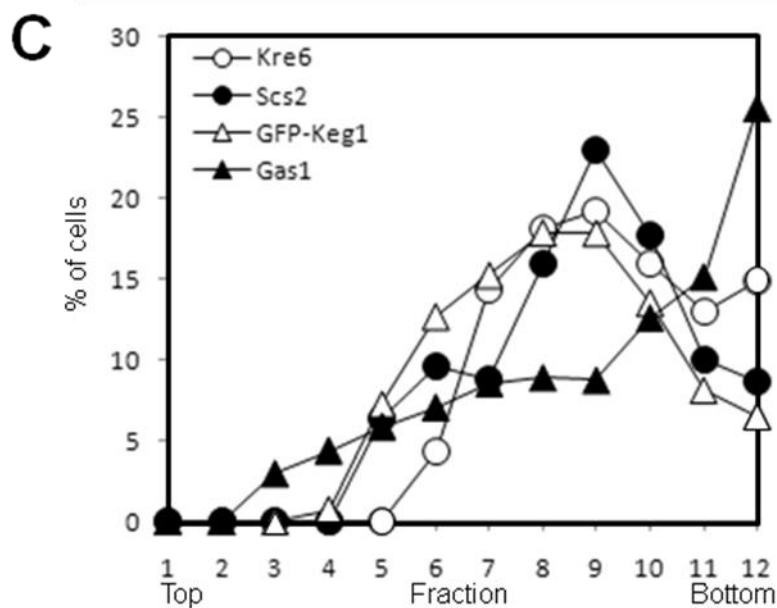


Figure 2-2 GFP-Keg1は発現量に依らずERに

局在する. (C)A, に示す発現量の少ない株KTY393と同じ発現量で *MATa*の株(KTY634)をもちいて細胞同調した培養液より EDTAを加えた蔗糖密度勾配遠心分画を行った.

PMのマーカであるGas1が集まる11-12のbottomのfractionにGFP-Keg1のピークは検出されなかった.

(D)*ura3-52* locusへのGFP-KEG1のintegrationの図.

plasmid挿入後の各マーカ配列は再度同じintegrationに使える為複数コピーが挿入される.

の *ura3-52 locus* に導入する事が出来る。 *ura3-52* は *URA3* の一部が欠損したマーカー遺伝子であるが、 *URA3* を制限酵素処理した plasmid を導入すると、 *URA3* の構造遺伝子中で相同組み替えが起こり、染色体に *GFP-KEG1 allele* を導入する事が出来るのである。この組み替えによって *Ura⁺* の表現型になるが、同時に組み替えによって新たに出来た *URA3 locus* は、同じ plasmid の組み替えの標的にもなりうるので、コピー数の異なる *GFP-KEG1* を染色体上に持つ株が作製できる (Fig.2-2D)。この手法を用いて、染色体上より発現し、コピー数の異なる *GFP-KEG1* を持つ株を作出した (Fig.2-2A)。作製した株のうち発現量の少ない株 Figure.2-2A の lane4:KTY393 と多い株 lane8:KTY394 のどちらの蛍光顕微鏡観察においても典型的な ER のパターンが観察された (Fig.2-2B)。この局在パターンは明らかに *Kre6* の局在とは異なっていた。次に KTY393 と発現量が同じで *MATa* の株を作出し細胞同調により小さな芽を集めた培養液を調製した。この培養液を EDTA を加えた蔗糖密度勾配遠心分画に供し解析を行った。*Kre6* は、PM のマーカーである *Gas1* の集まる bottom の 11-12 の fraction に小さなピークが検出された。これに対し *GFP-Keg1* は 11-12 の bottom にはピークは検出されなかった。*GFP-Keg1* と *Kre6* はともに ER のマーカーである *Scs2* と同じ 7-10 にメインのピークが検出された (Fig.2-2C)。

これらの結果から、*Keg1* は ER のみに局在していると考えられ、小さな芽に極性化した局在を持ち、ER と PM の両方に局在する *Kre6* とは異なると考えられた。

3. *Keg1* と *Kre6* の物理的相互作用の検討

Kre6-3HA は小さな芽に極性化して局在し間接蛍光観察では ER の局在はほとんど検出できない。一方で *GFP-Keg1* は典型的な ER のパターンを示すタンパク

質である。Kre6 は ER にも多く存在する事が示唆されているが、存在形態が異なる可能性が考えられる。この間接蛍光観察で明らかに異なる局在をする両タンパク質が以前に中俣及び筆者が示した結合をしているのか再検討した。

染色体上の *KRE6* 遺伝子に直接 tag 標識することにより Kre6-3HA を発現し、本来あった *KEG1* 遺伝子は破壊し *ura3-52* locus に挿入したタグ付き遺伝子から GFP-Keg1(KTY496)、または、GFP-keg1-1(KTY500)を発現する株を作製した。これらの株の細胞破砕液を抗 HA により免疫沈降し、SDS-PAGE と免疫ブロットにより GFP 融合タンパク質を検出した。その結果 Kre6-3HA を発現していない、KTY498 には見えない GFP-Keg1 のバンドが検出され Kre6-3HA と GFP-Keg1 の結合を検出した(Fig.2-3 lane, Bound 1, 2)。温度感受性の GFP-keg1-1 と Kre6 は結合が検出されたが、明らかに WT の Keg1 に比べ共沈する量が減っていた (Fig.2-3lane, Bound3,4)。

しかし、この結合が細胞を破砕した後に *in vitro* の条件で結合してしまった可能性が残っていた。そこで、Kre6-3HA のみ(KTY449)、GFP-Keg1 のみ(KTY498)、GFP-keg1-1 のみ(KTY502)を発現する株の細胞破砕液を混合して同様の沈降を試みた。結果として GFP-Keg1 と Kre6-3HA の結合は非常に弱く (Fig.2-3, Bound5)、GFP-keg1-1 と Kre6-3HA の結合は全く検出されなかった(Fig.2-3, Bound6)。この結果から GFP-Keg1 と Kre6-3HA の結合は、*in vivo* でおこり、実験上のアーティファクトでは無い事が示された。

この結果より蛍光観察により異なって見える Kre6-3HA と GFP-Keg1 の結合が示された。GFP-Keg1 が ER から搬出されるという知見は無い為、GFP-Keg1 と Kre6-3HA は ER で共局在している時のみ結合し、ER から搬出された Kre6 は Keg1 から離れているものと考えられた。

この後、Kre6 と Keg1 の結合の生物学的な意味についての検討を行ったが、同時に進めていた Keg1 と相互作用を示した ER タンパク質の Cne1 が Kre6 の局在

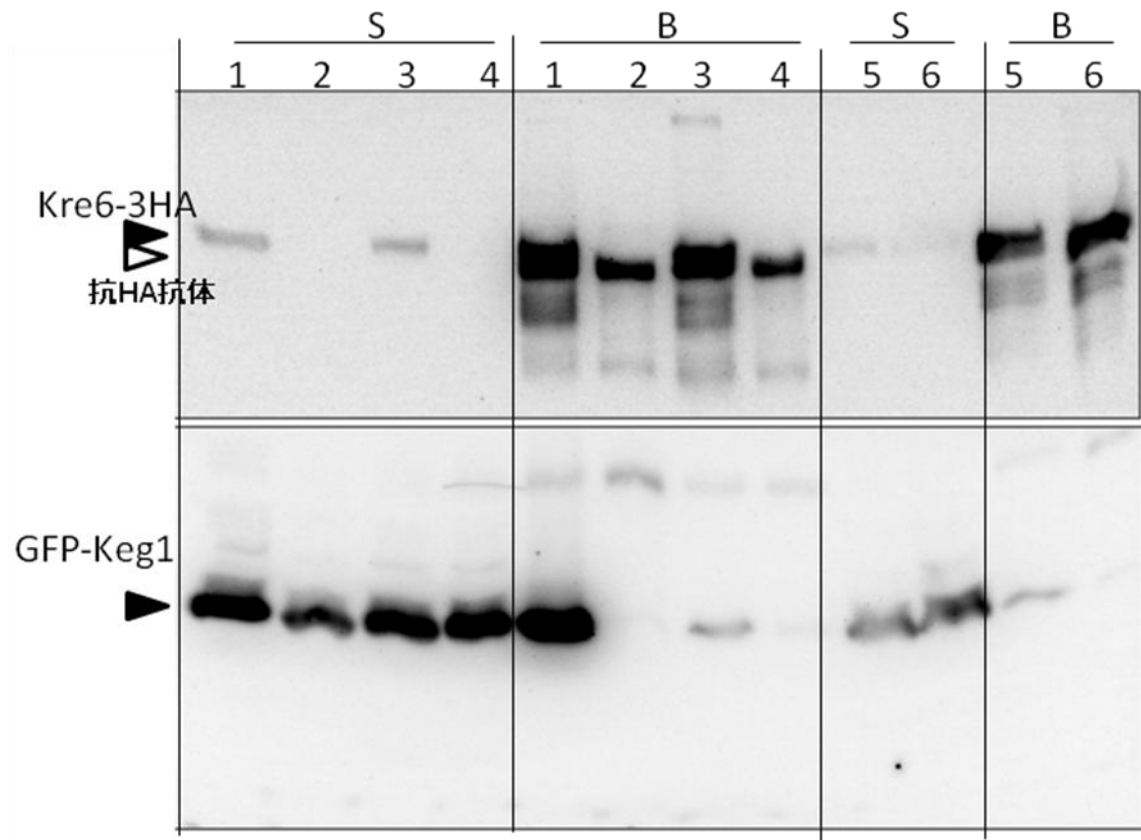


Figure.2-3 GFP-Keg1とKre6-3HAは *in vivo* で結合する

1:KTY496 *keg1Δ,ura3-52::GFP-KEG1, Kre6-3HA*

2:KTY498 *keg1Δ,ura3-52::GFP-KEG1*

3:KTY500 *keg1Δ,ura3-52::GFP-keg1-1, KER6-3HA*

4:KTY502 *keg1Δ,ura3-52::GFP-keg1-1,*

5:KTY498 lysate + KTY449(*KRE6-3HA*) lysate

6:KTY502 lysate + KTY449(*KRE6-3HA*) lysate

S: Start, U: Unbound, B: Bound

Kre6-3HAとGFP-Keg1(KTY496),または, GFP-keg1-1(KTY500)を

発現する株の細胞破砕液を1% Triton X-100により可溶化, 抗HAにより免疫沈降し, SDS-PAGEにより検出した.

上側のpanelが抗HA抗体, 下側のpanelが抗GFPにより検出.

極性化した局が見えるKre6-3HAとGFP-Keg1の結合を検出した(lane, Bound1).

GFP-keg1-1とKre6は弱い結合が見えたが, 明らかにWTのKeg1に比べ共沈する

量が減っていた(lane, Bound3). Kre6-3HAのみ(KTY449), GFP-Keg1のみ(KTY498),

GFP-keg1-1のみ(KTY502)を発現する株の細胞破砕液を混合して同様の沈降を試み

た. 結果結合が検出できなかった事から, このGFP-Keg1とKre6-3HAの結合は, *in vivo*

でおこり, 実験上のアーティファクトでは無い事が示された. 白arrow head:抗HA抗体

に影響する可能性が示された。そこで **Kre6** の局在や機能と **Keg1** の関連については **Keg1** と **Cne1** との解析を述べた後に論じる事とする。

4. **KEG1** と **CNE1** 及び, その他の β -1,6-glucan 合成関連遺伝子との遺伝学的, 物理的相互作用の検討

keg1-1 株の温度感受性を多コピー発現で回復させる遺伝子産物として ER のタンパク質である **Rot1** が同定されている[Nakamata, 2007]。 **Rot1** は破壊株において非常に強い生育の低下と β -1,6-glucan の低下を示すことから, β -1,6-glucan 合成関連遺伝子の一つと考えられた。しかし, **Takeuchi et al.**,は **Rot1** が ER のシャペロンである事, **Kre6**, **Kre5** の安定性に必要である事を示し, **Rot1** 変異株に見られる β -1,6-glucan の減少を **Kre6**, **Kre5** を介した間接的な影響であると結論した[Takeuchi, 2008]。この **Rot1** 以外にも ER において理由は不明だが, β -1,6-glucan 合成に影響する事が知られている遺伝子産物が同定されている[Shahinian, 2000]。それは **KRE5** (UGGT:UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase), **CNE1**(calnexin), **CWH41** (glucosidases I), **ROT2**(glucosidases II) の4種もその一部であるが, それらは相同性から quality control, 特に calnexin cycle に関連すると思われる遺伝子である[Shahinian, 2000] [Lesage, 2006]。筆者らは, これらの β -1,6-glucan 合成に関わるとされる遺伝子産物と **Keg1** は変異株の表現型が似ている為, 同一経路で協調して働く可能性を考えていた。同時に **Keg1** に関しては, アミノ酸配列などから機能を推測出来ないが, 相互作用する遺伝子が **Rot1** 以外にも見つければ, **Keg1** の機能に関する重要な知見を得られると考えて, **KEG1** と遺伝子産物が ER に局在する β -1,6-glucan 合成関連遺伝子との相互作用の検討を行う事とした(Fig.2-4)。その結果, **CWH41**, **ROT2**, **CNE1** と **KRE11** の各遺伝子と **KEG1** の二重変異株は 30°C の準許容温度で各単独の変異を持つ株よりも生育の低下を示し,

この事から *KEG1* と *CWH41*, *ROT2*, *CNE1* と *KRE11* との遺伝学的な相互作用が検出された。*KRE5* については、必須遺伝子である為、解析を行う事が出来なかった。*Kre11* は TRAPPII と呼ばれる late Golgi の GTPase に対する GEF 活性を持つタンパク複合体の subunit の一つである。しかし Golgi 膜にリクルートされていないときは、細胞質に局在し、ER の膜タンパク質ともアクセスし得るタンパク質である。*KRE11* 破壊株も K1 killer toxin 耐性となる。

次に *KRE5* (UGGT:UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase) , *CNE1*(calnexin), *CWH41* (glucosidases I), *ROT2*(glucosidases II)の4種の遺伝子産物のC末端に 3HA tag を付加し、6myc-Keg1 の発現する株に導入した。*Kre5* はC末端に HDEL と呼ばれる ER 保持シグナルを有する為、HDEL 配列の直前のアミノ酸と HDEL の間に 3HA tag を挿入した、*Kre5-3HA-HDEL*(以降は *Kre5-3HA* と表記する)を作製し免疫沈降による検討を行った。

その結果、細胞破碎液に Triton X-100 を加えた免疫沈降の条件では、これら4種のタンパク質と 6myc-Keg1 との結合は検出されなかった(data not shown)。そこで、界面活性剤を、digitonin に変えた。digitonin は TritonX-100 よりも膜を分解させる力が弱く、より微弱なタンパク質間相互作用を検出する事が出来る。その結果 *Cwh41-3HA*, *Rot2-3HA* は 6myc-Keg1 とまったく相互作用が検出されなかった(Fig.2-5)が、*Kre5-3HA* は digitonin 処理の場合にのみ非常に弱い結合が検出された(Fig.2-5,6)。

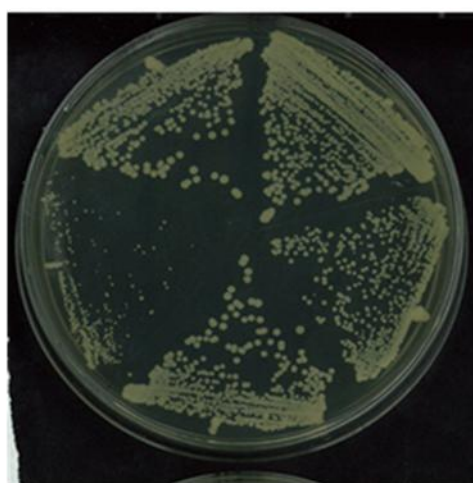
Cne1-3HA と 6myc-Keg1 との結合は、digitonin 処理した細胞破碎液より抗 HA 抗体を用いて沈降し、SDS-PAGE, 免疫ブロットにより検出した。その結果、*Cne1-3HA* と 6myc-Keg1 の結合を検出した(Fig.2-7)。 *Cne1-3HA* は beads との結合が強く boil をおこなわないと beads から離れなかった。しかし、*Cne1-3HA* を発現しない株(KTY236)では、その株も WT の *Cne1* は発現しているが、6myc-Keg1 は、沈降していない事から、6myc-Keg1 や *Cne1* が非特異に beads に結合するの



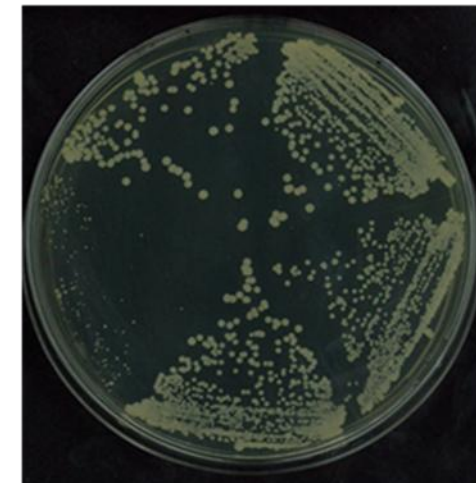
CNE1



CWH41



ROT2



KRE11 YPD 30°C 48hr

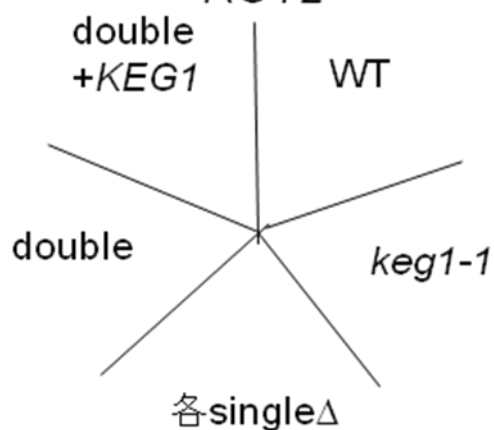


Figure 2-4. KEG1は多くの β -1,6-glucan合成関連遺伝子と遺伝学的な相互作用を示す.

CNE1: calnexin homologue

CWH41: Glucosidase I

ROT2: Glucosidase II

KRE11: TRAPP II component

上記各遺伝子破壊株と *keg1-1* 株の mating し diploid を作成, 四分子解析により, *KEG1* との相互作用を検討した. 二重変異株において生育遅延が検出され, *pCA69(cen-KEG1)* により相補出来た.

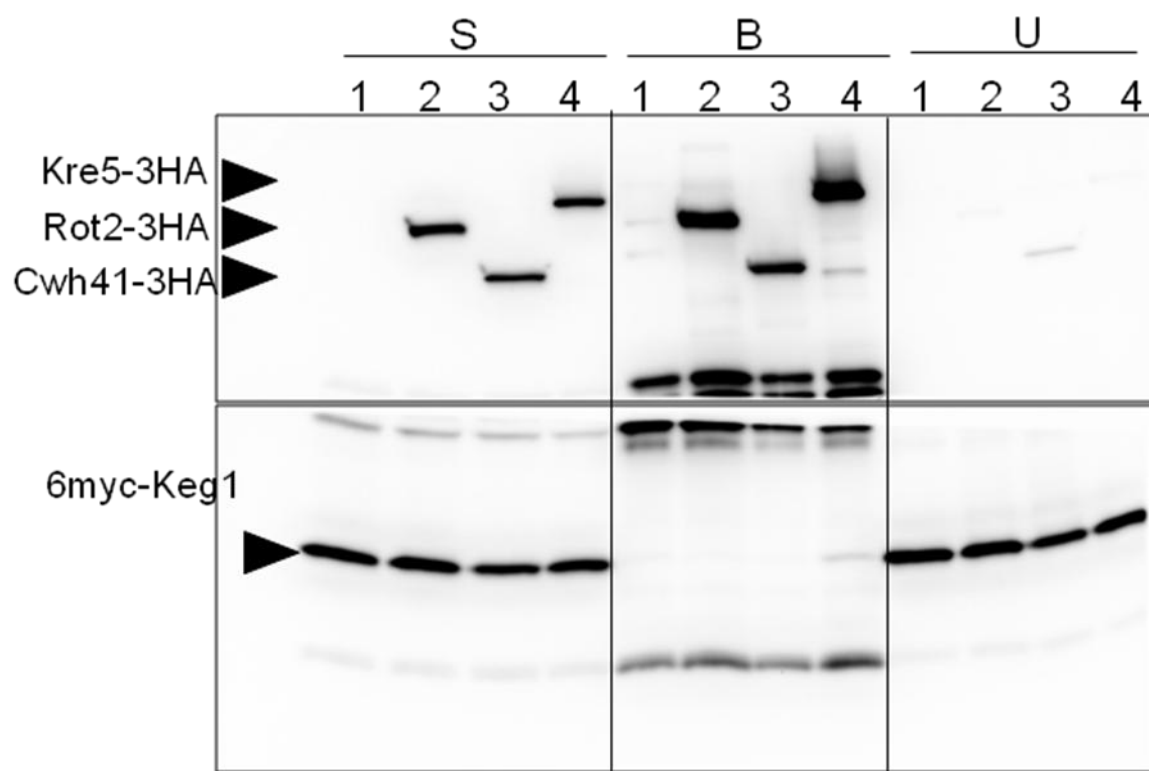


Figure.2-5 Keg1はRot2, Cwh41, Kre5と物理的な結合を示さない。

1:KTY236(*keg1Δ/6myc-KEG1*)

2:KTY316(*keg1Δ/6myc-KEG1, ROT2-3HA*)

3:KTY333(*keg1Δ/6myc-KEG1, CWH41-3HA*)

4:KTY379(*keg1Δ/6myc-KEG1, KRE5-3HA*)

各株の細胞破砕液を1% digitoninにより可溶化し、抗HA抗体により沈降し各サンプルをSDS-PAGEに供し、抗HA、抗myc免疫プロットにより検出した。

Kre5-3HAと6myc-Keg1との結合が痕跡量見られたが、その他の遺伝子産物については、結合が検出されなかった

S: Start, U: Unbound, B: Bound.

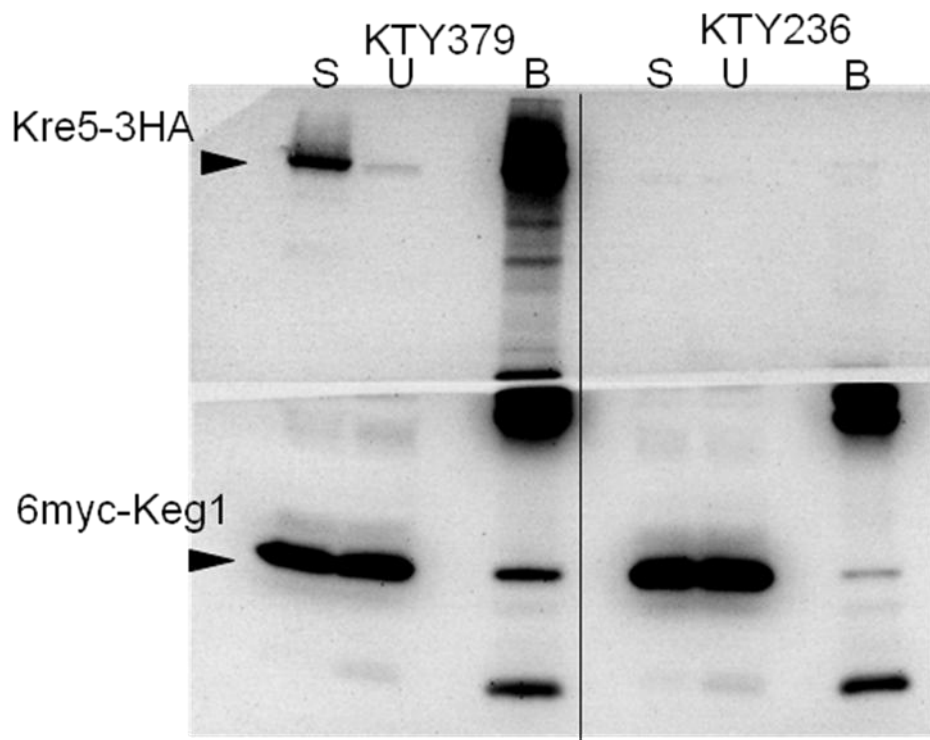


Fig.2-6 Kre5-3HAと6myc-Keg1は結合する.

KTY236(*keg1Δ/6myc-KEG1*)

KTY379(*keg1Δ/6myc-KEG1, KRE5-3HA*)

各株のFig.2-5の10倍量の細胞破碎液を1% digitoninにより可溶化し, 抗HA抗体により沈降し各サンプルをSDS-PAGEに供し, 抗HA, 抗myc免疫プロットにより検出した. Kre5-3HAと6myc-Keg1との結合が検出された.

S: Start, U: Unbound, B: Bound (S,Uは希釈した)

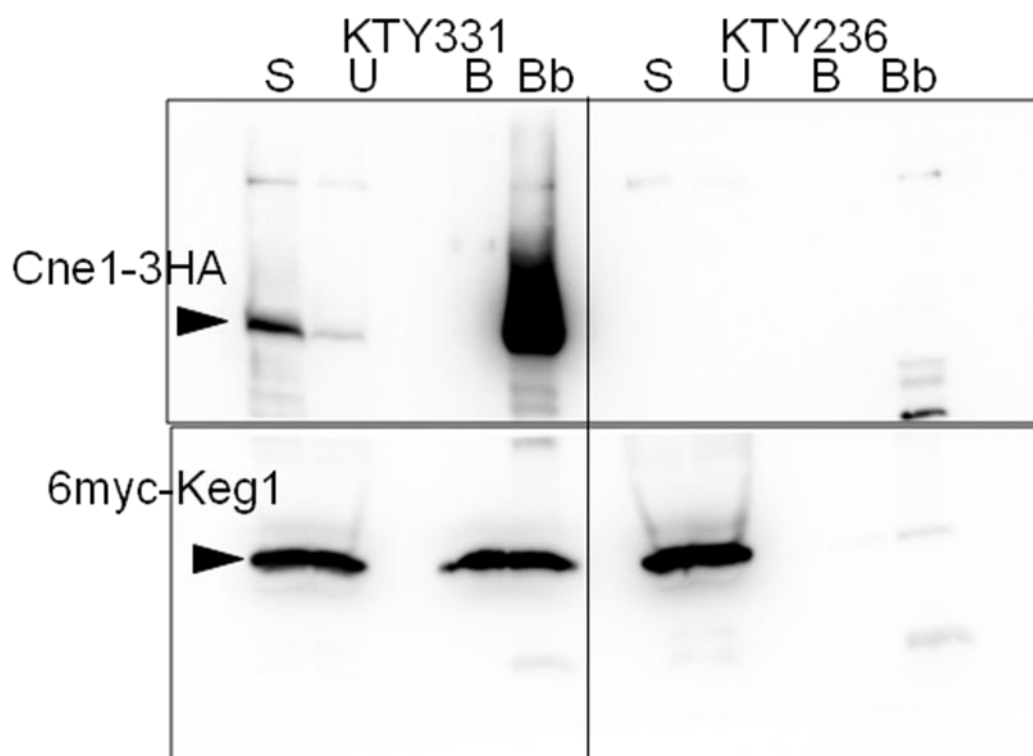


Figure.2-7 6myc-Keg1はCne1-3HAは物理的に結合する.

KTY331(*keg1Δ/6myc-KEG1, CNE1-3HA*)

KTY236(*keg1Δ/6myc-KEG1*)

各株の細胞破砕液を1%digitoninにより可溶化し,抗HA抗体により沈降し各サンプルをSDS-PAGEに供し,抗HA,抗myc免疫プロットにより検出した.

Cne1-3HAと6myc-Keg1との結合が検出された.

Elute: on ice 20min(B) or boil 1min(Bb)

S: Start, U: Unbound, B: Bound

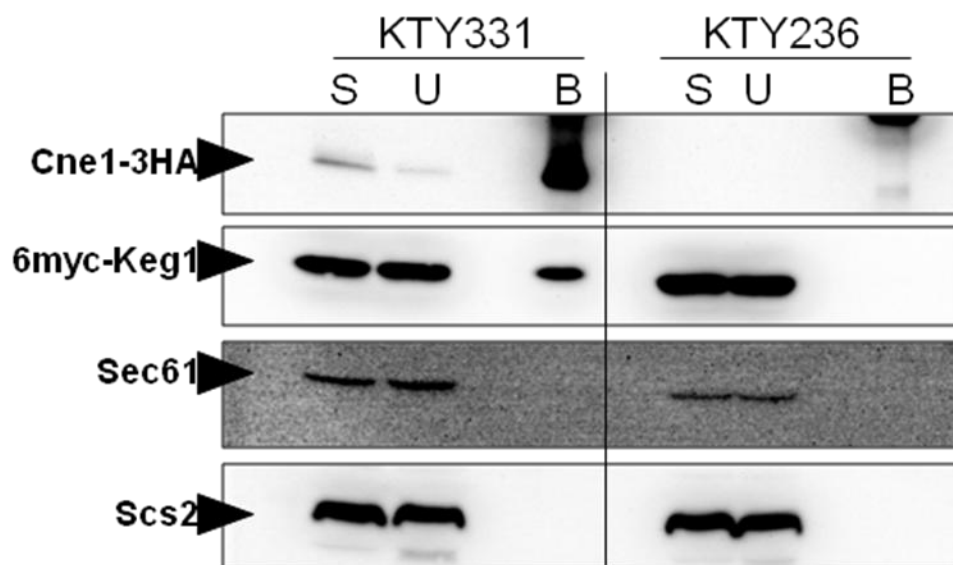


Figure.2-8 6myc-Keg1とCne1-3HAの結合は特異的である.

KTY331(*keg1*Δ/*6myc-KEG1*, *CNE1-3HA*)

KTY236(*keg1*Δ/*6myc-KEG1*)

各株の細胞破碎液を1%digitoninにより可溶化し,抗HA抗体により沈降し各サンプルをSDS-PAGEに供し,各抗体を用いて免疫プロットにより検出した.

Cne1-3HAと6myc-Keg1との結合が検出された.

Elute: on ice 20min(B) or boil 1min(Bb)

S: Start, U: Unbound, B: Bound

ではない事は示されており、実験的には問題ない。また、Cne1 は、ほ乳類で折り畳み不全のタンパク質の折り畳みをおこなうシャペロンの働きがあるタンパク質のホモログである為、Cne1-3HA が非特異的に ER のタンパク質と結合してしまう可能性が考えられた。そこで Figure2-7 と同じ実験を行い、SDS-PAGE、免疫ブロットで得られたメンブレンを ER の他のタンパク質を検出した。Sec61、Scs2 は共に ER のタンパク質として知られているが、6myc-Keg1 が沈降する条件で Cne1-3HA との共沈は検出されなかった(Fig.2-8)。以上の結果より、Cne1-3HA と 6myc-Keg1 は特異的に結合する事がわかった。

Cne1 と Keg1 はそれぞれ ER に局在し(Fig.2-2)、単独の変異でも β -1,6-glucan の減少が報告されている。二重変異株では 30°C で生育の低下が検出された(Fig.2-4)。Cne1 は Keg1 と協調して β -1,6-glucan 合成に関わる可能性がある。

5. Keg1 を含む、Kre6 の局在、安定性に関わる因子の解析

Kre6 と Keg1 は ER において結合し、Kre6 がおそらく機能を発揮すると思われる PM や分泌小胞では Keg1 は結合していない。 β -1,6-glucan が PM の外側にしか検出されない事から *KEG1* 変異株に見られる β -1,6-glucan の減少は *Rot1* と同じく Kre6 を介した影響かも知れない。*rot1* 変異株において Kre6 の安定性の低下がみられること、*keg1-1* 株の温度感受性を *ROT1* の多コピーで回復出来ることを考え合わせると、*keg1-1* 株の制限温度下で Kre6 の安定性が低下してしまうことが考えられた。

そこで *keg1-1* 変異株の Kre6 の安定性を検討することにした。制限温度下における *keg1-1* 変異株は致死となるため、さまざまな二次的な影響が考えられた。そこでより影響の弱い順許容温度(30°C, 27.5°C)における Kre6 タンパク量を調べることとし、loading コントロールとして Scs2 を用いた。

実験の結果、WT の株に比べ *keg1-1* の株では Kre6 の量が低下していた (Fig.2-9A,B). この Kre6 タンパク質の分解は、ER 関連分解 (ER-associated degradation, ERAD) のユビキチンリガーゼの E2-factor である *UBC7* の破壊により抑制された. この結果は *rot1* 変異株の解析を行った報告に一致し [Takeuchi, 2008], Kre6 が ERAD で分解されることを支持した.

さらに PM や endosome のタンパク質を分解する液胞のタンパク質分解酵素である *PEP4* 破壊株でも *UBC7* を破壊した時よりも効果は小さかったが、Kre6 の分解抑制が検出された (Fig.2-9A). さらに *keg1-1* 株においてサプレッサーである *ROT1* を過剰発現させると、Kre6 の安定化が認められた (Fig.2-9B). *CNE1* 破壊株においては、Kre6 の安定性の低下は認められなかった (Fig.2-9A).

ここまでの結果より *keg1-1* 株の制限温度における生育阻害を抑制する *Rot1* の過剰発現によって、Kre6 の安定化が見られたことから、Kre6 の安定性の低下が *keg1-1* の生育の低下に関わる可能性が考えられた. しかし *KRE6* は非必須遺伝子である為、そのみの影響で *keg1-1* 株が致死性を示すとは考えにくい、相関性が高く二重破壊を作ると致死的な影響を示す *Skn1* も Kre6 と同様の影響を受けて、*kre6,skn1* の二重破壊と同様の状況になるなどの可能性は考えられる.

そこで、Kre6 の分解抑制が出来た *ubc7* の破壊 allele と *keg1-1* の両方の変異を持つ株を作成し、制限温度での *keg1-1* 株の生育がわずかでも回復するのかを検討した. 結果、*keg1-1 Δ ubc7* 二重変異株は、同時に作成した *keg1-1 Δ pep4* 二重破壊株とともに制限温度で生育の回復が見られなかった (Fig.2-10).

この結果は、Kre6-3HA を量的に安定化させても *keg1-1* 株の生育を回復できないことを示している. 一つの可能性は、*keg1-1* を *ROT1* の多コピーで回復させる表現型も *Rot1* の Kre6 以外の標的、それには当然 *keg1-1* 自体も含まれるが、それに対する影響で回復しているのかもしれない. 一方で、Kre6 の折りたたみや成熟などに *Keg1* の機能が必須であり分解抑制によっても本来の機能を失った

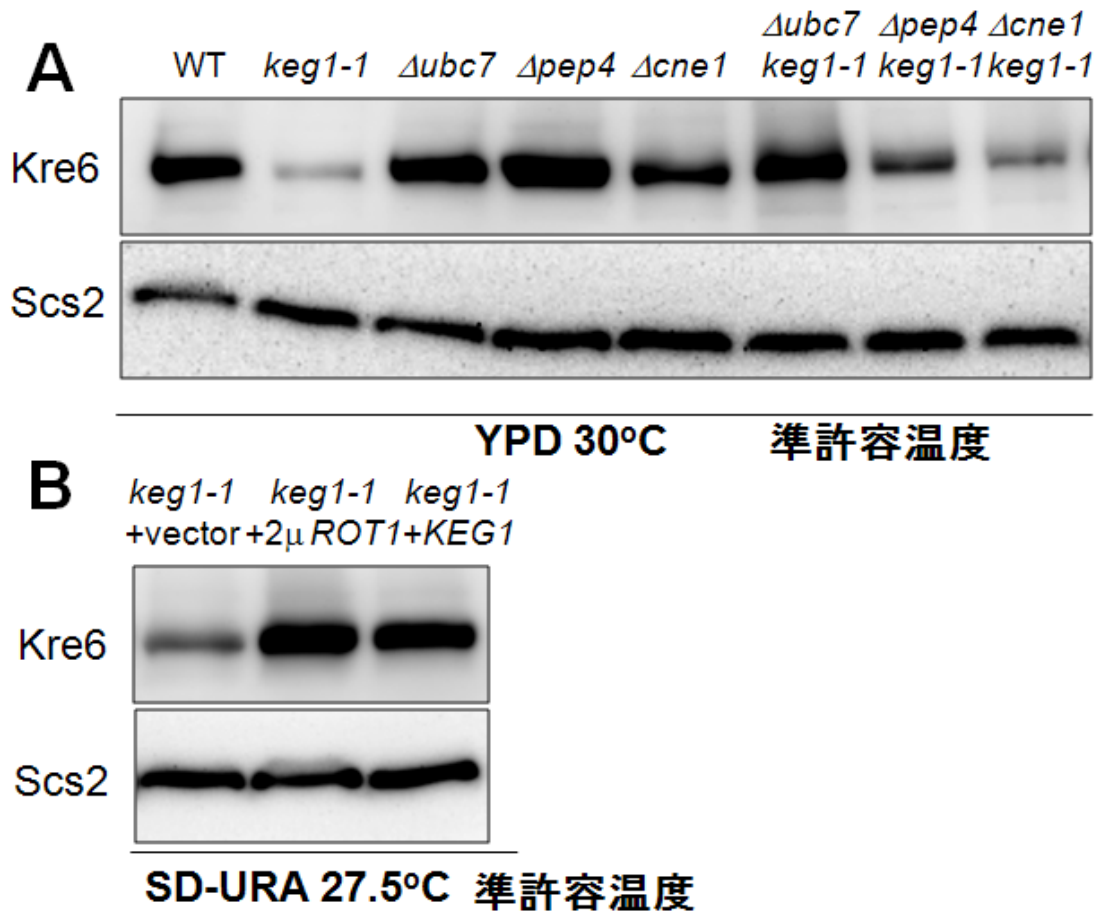


Figure.2-9 Kre6の*keg1-1*株において安定性が低下する.

(A)使用菌株左laneから

WT:BY4741

keg1-1:AKY17

Δ *ubc7*:Y00597

Δ *pep4*:Y02098

Δ *cne1*:Y00349

Δ *ubc7*, *keg1-1*:KTY490

Δ *pep4*, *keg1-1*:KTY486

Δ *cne1*, *keg1-1*:KTY342

keg1-1, *pep4* Δ :KTY638

keg1-1, *ubc7* Δ : KTY640

(B)使用菌株左laneから

keg1-1+pRS316: KTY205

keg1-1+pAK56: KNY15

keg1-1+pCA69: KTY203

各株25°C pre-culture, o/n, シフト30°C(A), or 27.5°C(B) 90min,

0.02ODunit/lane blots, Scs2 loading control

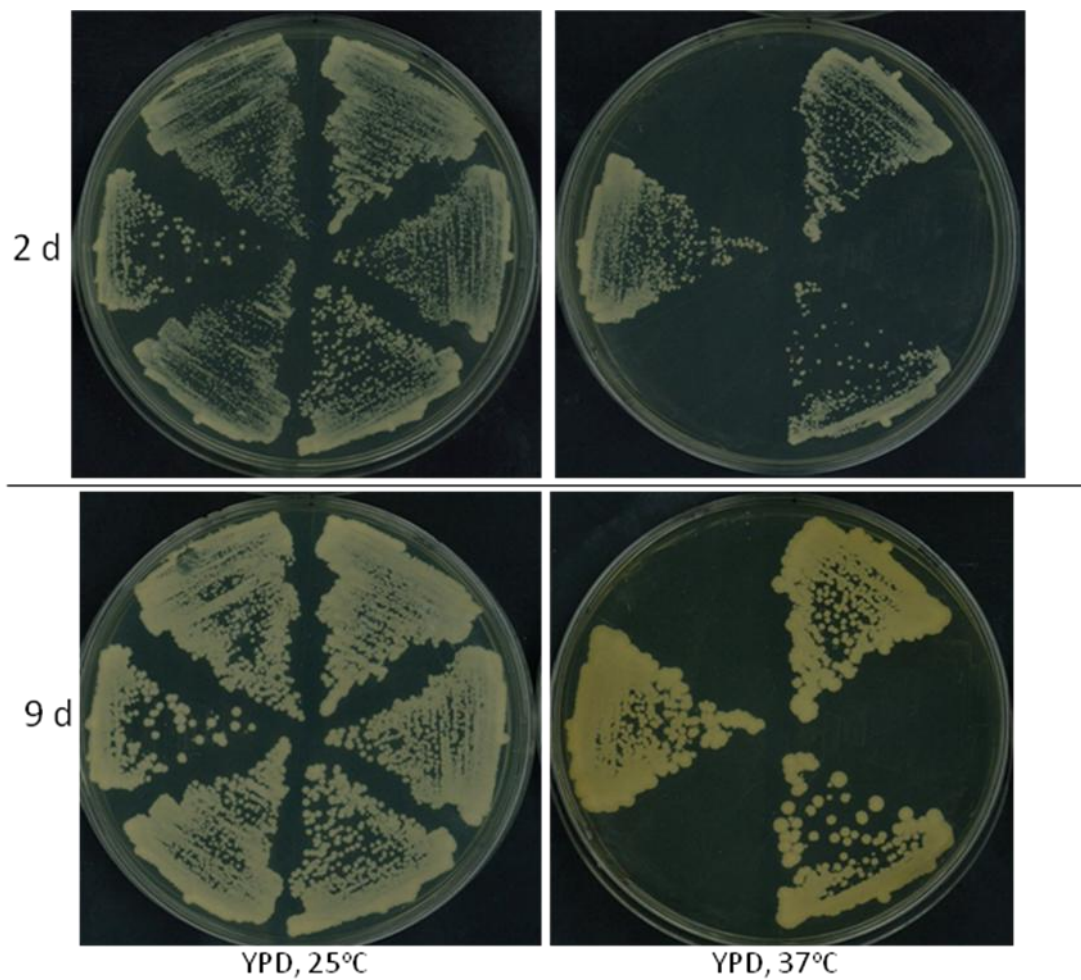
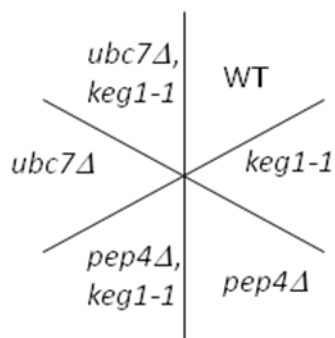
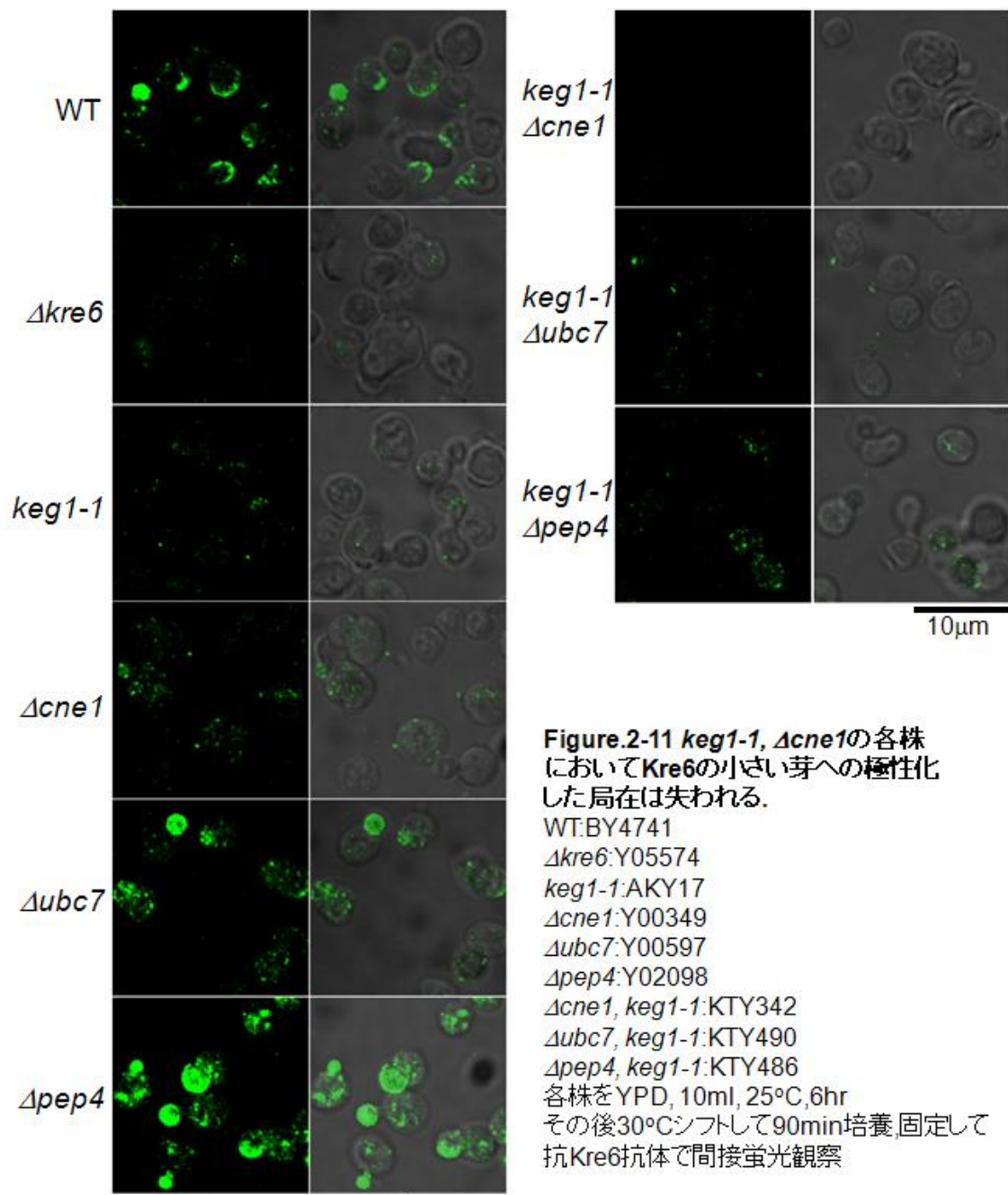


Figure2-10 *keg1-1*変異は, Kre6の安定化では相補出来ない.



WT: KTY449, *KRE6-3HA*
keg1-1: KTY467, *keg1-1, KRE6-3HA*
pep4Δ: KTY488, *pep4Δ, KRE6-3HA*
pep4Δ, keg1-1: KTY486, *pep4Δ, keg1-1, KRE6-3HA*
ubc7Δ: KTY492, *ubc7Δ, KRE6-3HA*
ubc7Δ, keg1-1: KTY490, *ubc7Δ, keg1-1, KRE6-3HA*
 上記各株をYPD plateにストリークし, 25°Cまたは37°Cにおいて培養した.
 37°Cに長期間生育させても*keg1-1*のalleleを持つ株はすべて生育出来ず, *UBC7, PEP4*の破壊によって*keg1-1*の生育に改善は見られなかった.



Kre6が細胞内に増加する場合は、制限温度下における生育を回復できない可能性がある。後者の場合、Kre6が本来の局在が失われている可能性があると考えて、*keg1-1* 株、*keg1-1 Δubc7* 二重変異株における Kre6 の局在の検討を試みた (Fig.2-11)。その結果、*keg1-1* では 30°C の順許容温度で Kre6 の極性化した局在が失われていた。このパターンは *UBC7* を破壊し、Kre6 タンパク質の分解抑制をした *keg1-1 Δubc7* 二重変異株でも検出され、WT に見える極性化した局在に戻らなかった。*PEP4* を破壊した株でも同様であった。*KEG1* と相互作用のあった *CNE1* の破壊株における Kre6 の局在の検討も試みた結果、*CNE1* は単独の破壊でも Kre6 の極性化した局在が失われた (Fig.2-11)。

以上の結果より、Keg1 は Kre6 の安定性に必要であることが示唆された。また、分解抑制が出来て細胞内で Kre6 タンパク質レベルが戻った株でも Kre6 の局在は戻らなかったことから、Kre6 の正しい局在にも Keg1 が必要である事が示された。Keg1 と結合し、 β -1,6-glucan 合成に関わる Cne1 も Kre6 の局在に必要な事が示唆された。

考察

Yfr042w は ER の必須タンパク質で、error-prone PCR で作製した温度感受性変異株において CFW の感受性、アルカリ不溶性の β -1,6-glucan の減少を示した。この温度感受性を多コピーで回復する遺伝子として *ROT1* が同定された。さらに β -1,6-glucan 合成に非常に重要な働きをするとされている Kre6 との結合が検出された為、*KEG1* (Kre6-binding ER protein responsible for β -1,6-Glucan synthesis 1) と命名した [Nakamata, 2007]。

本研究においては、まず β -1,6-glucan 合成への関連をより確実にする為 K1 killer toxin に対する感受性の解析を行い、検討の結果 $\Delta kre6$ と同じく *keg1-1* 変異株

も温度依存的にK1 killer toxinに耐性を示した(Fig.2-1).

次にこれまでERへの局在を示すと考えていたKre6の局在が再検討の結果、ちいさな芽に極性化した局在を持つことがわかった。その為、Kre6と結合するとされていた、Keg1の局在やKre6との結合にも疑問が生じた。そこで、GFP-Keg1は染色体よりlow-copy(KTY393)、high-copy(KTY394)で発現する株をそれぞれ作製し、蛍光顕微鏡観察により発現量に依らずERへの局在が検出された(Fig.2-2A,B)。細胞同調を行った培養液のEDTAを加えた蔗糖密度勾配遠心からもERのパターンを示し、PMのものと思われるピークが検出出来なかった為、これまで考えられていたのと同じくKeg1はERに局在すると思われた。

Keg1とKre6は蛍光観察で見える像が全く異なる。Kre6はERにも多量に局在する事が示唆されているが、Keg1とは状態が違う可能性がある。そこで、極性化した局在を示すKre6-3HAとGFP-Keg1を発現する株を用いて再度結合の検討を行った。結果、Kre6-3HAとGFP-Keg1の結合が検出され、GFP-keg1-1を発現する株では、Kre6-3HAとのGFP-keg1-1との結合が低下している可能性が示された(Fig.2-3)。

ここまでの結果からKre6はERに局在している時にKeg1と結合し、おそらくはKre6が機能を発揮しうるPMや分泌小胞に局在している時は、ERにのみに局在するKeg1とは結合していないと考えられた。

β -1,6-glucan は、PMの外側にしか検出されないにも関わらず、ERに局在するKeg1の変異株において β -1,6-glucanに影響が出るのは、Kre6を介した間接的な影響なのかも知れないと考えた。またkeg1-1株の温度感受性をRot1は多コピーで回復させる事[Nakamata, 2007], Rot1変異株において3HA-Kre6の減少が検出され、Ubc7, ユビキチンリガーゼを破壊する事で3HA-Kre6が安定化する事[Takeuchi, 2008]からkeg1-1株におけるKre6の減少が予想された。

そこで、keg1-1株の準許容温度におけるKre6の安定性の検討を試みた。結果

として, *keg1-1* 株において Kre6 の安定性が低下していた(Fig.2-9A,B). さらに $\Delta ubc7$, *keg1-1*, $\Delta pep4$, *keg1-1* の各二重変異株において, Kre6 の分解抑制が検出され, Rot1 の過剰発現により, Kre6 の安定化が見られた.

keg1-1 株の制限温度下における生育を回復させる Rot1 の過剰発現によって Kre6 の安定化検出された為, Kre6 の安定性が *keg1-1* 株の生育に関わる可能性が考えられた. しかし, $\Delta ubc7$, *keg1-1* の二重変異株は, 分解抑制により細胞内の Kre6 タンパク量は量的には回復している(Fig.2-9A,B)にも関わらず, 制限温度における生育の回復は検出されなかった(Fig.2-10). 間接蛍光観察でも $\Delta ubc7$, *keg1-1* の二重変異株は, WT に見える極性化した局在を検出できなかった(Fig.2-11). この現象は $\Delta pep4$, *keg1-1* の二重変異株でも同様であった.

この結果から, Keg1 は, Kre6 の安定性に必要であること, また, *keg1-1* において Kre6 の間接蛍光観察に見える極性化下局在は失われたことから, Kre6 の特徴的な局在に Keg1 が必要であることが示された. GFP-Keg1-1 と Kre6-3HA の結合が低下しているように見えた(Fig.2-3). この現象と Kre6 の局在の変化には相関があるのかわからないが, 現時点で考えられる Keg1 の機能として以下のものが挙げられる. まず Keg1 が Kre6 と結合して Kre6 折り畳みなどの成熟を行うシャペロンとしての機能や ERAD での分解の抑制し Kre6 を ER に貯蔵, 必要なときに ER から搬出する ER 搬出因子としての機能, または, Cne1 のような ER の他のタンパク質と Kre6 の相互作用に必要な足場としての機能が考えられる.

Calnexin cycleは, ERの内部でN糖鎖は, ドリコールリン酸に結合したコア糖鎖, GlcNAc₂Man₉Glc₃[以降Shahinian,1998,Fig.1参照]をアスパラギン残基に付加する, このコア糖鎖は, glucosidase I と glucosidase II が順番に glucose 残基を切断する事で, GlcNAc₂Man₉に変換される. この glucose 残基が切断されたコア糖鎖に UDP-glucose由来の glucose を付加するのが, UGGT (UGGT:UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase)である. この UGGT が修飾した glucose を持つ

GlcNAc₂Man₉Glc₁が結合したタンパク質はcalnexinの標的となり, calnexinに結合, 折りたたまれる. 折り畳みが正しいかどうかはUGGTが認識して, 折り畳み不全のタンパク質は, 再度glucoseが付加され, このタンパク質はERから搬出出来ない. 出芽酵母*S.cerevisiae* には, *KRE5* (UGGT:UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase), *CNE1*(calnexin), *CWH41* (glucosidase I), *ROT2*(glucosidase II) の4種のcalnexin cycleのplayerのホモログが揃っている. ERへのUDP-glucoseの輸送も報告されている[Castro, 1999]が, GlcNAc₂Man₉Glc₁が結合した変異タンパク質が見つからない事, UGGT活性が出芽酵母には検出されないことから, 出芽酵母にはcalnexin cycleは存在しないと考えられている[Fernandez, 1994]. 興味深いことに, これら4種のタンパク質は破壊や変異させると, β -1,6-glucanの減少が見られる β -1,6-glucan合成関連遺伝子である. この中で, Cne1はcalnexin と24%の相同性を示すtypeI膜タンパク質で, ERの局在が報告されている. ほ乳類細胞のcalnexinにおいてERへの保持に必要な配列を出芽酵母では失っている為, ERへの保持に何らかのタンパク質との結合が必要と考えられるが生化学的な知見はない[Parlati, 1995]. *in vitro*の実験で人工の変異タンパク質のfoldingを助ける働きが報告されているので, Cne1にもシャペロンとしての機能がある可能性がある[Kimura, 2005]. しかし, Cne1の出芽酵母における本来の役割や標的はよくわかっていない.

Cne1は, *keg1-1*と Δ *cne1*の二重変異株において合成生育遅延を示し(Fig.2-4), Cne1-3HAと6myc-Keg1の物理的な結合(Fig.2-7,8)も示された. β -1,6-glucan合成に関わるとされる遺伝子のなかで, Cne1と遺伝学的な相互作用を示すタンパク質は多く見つかっているが, 物理的な相互作用も同時に見つかったのは, Keg1が初めてである. また, Cne1の機能に関しても, Cne1の破壊株において, Kre6の局在に影響がでており, Cne1がKre6の折り畳みに関わる可能性が初めて示された. Cne1とKeg1のKre6や β -1,6-glucanに対する影響の検討は, ERに局在し, 且つ

β -1,6-glucan合成に関わるとされる一群の機能不明遺伝子の機能の解析に大きな影響を与える重要な知見を得られるかも知れない。

総括

本研究では、細胞壁の必須構成多糖である β -1,6-glucanの合成系の解明を目的に、主に β -1,6-glucanの合成に重要な働きがあると思われる2つの遺伝子産物、Kre6とKeg1の検討を中心に行った。

1章では、Kre6の真の局在についての検討を行った。ERに局在すると考えられていたKre6は、 β -1,6-glucanの最も有力な合成酵素の候補の一つと考えられているが、3種類もの異なる局在が報告されるなど結合tagの種類や位置、発現の方法により影響の受けやすい遺伝子産物であった。筆者は、Kre6を特異的に検出できる抗Kre6抗体を取得し、間接蛍光観察によりちいさな芽や出芽予定部位に極性化したKre6の真の局在を明らかにした(Fig.1-6A)。蔗糖密度勾配遠心分画(Fig.1-9,11)、免疫電子顕微鏡観察(Fig.1-15)、ER、PMのマーカールとの共染(Fig.1-12,13,14)により、Kre6の多数がERに局在し、PMや分泌小胞にもマイナーなKre6が局在する事、間接蛍光観察において極性化して見えるKre6はERではなくPMや輸送小胞である事を示した。Kre6のN末端のtruncated変異タンパク質の検討から、Kre6のN末端がERからの搬出や間接蛍光観察に見られる極性化した局在に必要であること(Fig.1-17,18)、この局在が変化したN末端truncated kre6タンパク質を持つ変異株に細胞壁の異常がみられ、Kre6の機能の低下が考えられた(Fig.1-19)。

2章では、Kre6に結合する必須遺伝子、Keg1の解析を中心に行った。中俣と筆者

らの検討の結果, **Keg1**はERへの局在と温度感受性変異株における細胞壁の異常, 温度感受性を多コピーで回復させる遺伝子として**ROT1**が同定され, ERに局在が見えるコンストラクトの**Kre6-6myc**との結合が検出された. **Rot1**, **Kre6**は共に β -1,6-glucanの合成に関わる遺伝子であると考えられていた為, **Keg1**が β -1,6-glucanの合成に関わると予想された. そこで**Keg1**の温度感受性変異株のアルカリ不溶性の β -1,6-glucan量の定量を行うと, β -1,6-glucan量の低下が検出された[Nakamata, 2007]. 本研究では, まず β -1,6-glucan 合成に関わる遺伝子かどうかの重要な指標であるK1 killer toxinに対する感受性の検討を**KEG1**の温度感受性変異株について行い, **Keg1**が β -1,6-glucan 合成に関わるとされ, これまでに同定されていた遺伝子群と同様の表現型を持つ事を確認した(Fig.2-1). 1章に示したように**Kre6**が小さい芽や出芽予定領域にも局在する事が明らかになった為, **Keg1**の局在と**Keg1**と**Kre6**との結合を再検討した. まず染色体より**GFP-Keg1**を発現する株を作成し, 蛍光顕微鏡観察, 蔗糖密度勾配遠心分画により, **GFP-Keg1**のER局在を確認した(Fig.2-2). 次に極性化した局在を観察出来る**Kre6-3HA**と**GFP-Keg1**の結合を再検討して間接蛍光観察においては異なる局在に見える両者のタンパク質が結合する事を示した(Fig.2-3). **Keg1**が**Kre6**の安定性に必要である事を示し(Fig.2-9A,B), **Keg1**の温度感受性変異株において**Kre6**の局在の変化が検出された(Fig.2-11). この変化は分解抑制によって**Kre6**を量的増やしても局在は回復せず(Fig.2-11), また**keg1-1**の高温における致死性を弱める事も出来なかった(Fig.2-10). この結果は, **Kre6**の安定性と局在の両方に**Keg1**が必要であることを示していると考えられた. **Keg1**はERに局在する β -1,6-glucan 合成に関わる遺伝子産物の**Cne1**との遺伝学的, 物理的な相互作用を検出した(Fig.2-4,7,8). この**Cne1**も**Kre6**の局在に必要な事が示唆された(Fig.2-11).

Kre6が機能を発揮するのは, PMや分泌小胞でと考えられるが, おそらくは本

来働くべき場所では無いERにも最大量のKre6が局在している事が示された。このERのKre6は、おそらくはリザーバーと思われる。このような過剰のタンパク質群を本来働く以外の場所に持つという特徴的な局在は、キチンの合成酵素のChs3に似ている。Chs3は、PM ,bud neckでUDP-GlcNAc を基質としてキチンを合成する酵素の本体であるが、本来働くPMやbud neck以外にもERやその他の分泌経路にも存在する。このChs3をEDTAを加えた遠心分画により検出するとChs3はPMではなくERにメインのピークが来る事が報告された[Valdivia, 2003]。Chs3の例のように、あるタンパク質の局在において量的に最も多く局在している場所が、必ずしもそのタンパク質が機能を発揮する場所とは限らない。Chs3特徴的な輸送の制御には多くのタンパク質が関わっているが、これらタンパク質の遺伝子破壊により細胞のキチンレベルが下がる為*CHS*(CHitin Synthase-related)と命名された。このようなタンパク質の一つChs7はERに局在してChs3のERからの搬出するexport factorと過剰のChs3をERに留めるlimiting factorの両方の働きがある事がわかっている[Trilla, 1999]。さらに窒素饑餓等の条件でPMに輸送されるアミノ酸トランスポーターであるGap1とそのER export factor, Shr3の研究からChs7は単にChs3をERから搬出するのではなく、ER内でChs3が凝集するのをChs7が結合してシャペロン様の働きをして防ぐと考えられている[Kota,2005]。このChs7は7回膜貫通の膜タンパク質であるが、同じ働きがあるとされるShr3は210aa, 4回膜貫通タンパク質で、200aa, 4回膜貫通タンパク質であるKeg1とサイズや形も近い。この種のタンパク質は構造に類似性があるらしく、同じような機能を有していても相同性では殆どみつからない。この事からKeg1の現状予想される機能の一つとして、Kre6のER export factorの可能性が考えられる。Keg1と結合する、シャペロン様の機能を有する可能性のあるCne1もKeg1と協調してKre6のfoldingやER内部での凝集を防いでいるのかもしれない。ERに局在するKre6が間接蛍光観察で検出しにくく、PMや分泌小胞に局在するKre6が強い蛍光シグナル

を検出するが、そのようなKre6の間接蛍光のパターンはERにおいてKeg1と結合している事が影響するのかもしれない。またKre6と結合が弱っていた*keg1-1*株やその他のKre6の極性化した局在の見えない変異株の内部において見える弱いdot状の構造は、ERで異常凝集したKre6が見えているのかも知れない。このようなモデルは、蔗糖密度勾配遠心により分離したfractionをblue native PAGEに供すなどの実験により局在の異なるKre6の多量体解析が待たれる所である。

Kre6 の N 末端の細胞質側の Truncated 変異タンパク質の SDS-PAGE, 免疫ブロットの結果, FL:146kDa, Δ137kre6:82kDa, Δ 230kre6:73kDa, Δ 248kre6:68kDa, の各サイズの Kre6 の band が検出された。Kre6 はアミノ酸配列から予想されるサイズが 81kDa にも関わらず, 細胞破碎液からは 140kDa のバンドが検出され, 非常に多くの修飾を受ける事が予想される。これまでにリン酸化と N 糖鎖が付く事はわかっていたが[Roemer, 1994], [Takeuchi, 2008], その位置や場所に関する生化学的な知見は無かった。FL と Δ 137kre6 では削れた事によるアミノ酸のサイズが 14.7kDa にも関わらず, 約 64kDa も下がっている。これはこの N 末端の 137aa において非常に多くの修飾がなされていると考えられる。Δ137- Δ230kre6, Δ137-Δ248kre6 の下がりかたは, アミノ酸残基のサイズと概ね一致する為, この領域にはあまり修飾等はないようだ。Δ 137, Δ230, Δ248kre6 は共通して 11-13kDa 程度アミノ酸配列のサイズより大きく, 内腔における修飾と考えられる。この為, N 末端の 137aa の領域について database でリン酸化 site を検索してみた所, 非常に多く見つかった。Kre6 と cytosol のリン酸化酵素である Pkc1 との遺伝学的な相互作用も報告されており[Roemer, 1994], N 末端の 137aa の領域は, リン酸化により Kre6 の活性や局在を制御している可能性が考えられた。

PMのendocytosis関連遺伝子である*END3*, *SLA1*, アクチンパッチのタンパク質

で細胞極性に関わる*LAS17*, *VRP1*の変異株において、細胞壁 β -1,6-glucanの増加が検出されている[Page, 2003]. また, Δ *end3*や Δ *sla1*破壊株においては, PMの生長端のタンパク質のmislocalizeと細胞壁が多重に合成される異常な形態が報告されている[Ayscough, 1999] [Tang, 2000]. この知見は β -1,6-glucan合成がendocytosisや細胞極性に拘る遺伝子産物によって大きな影響を受けることを意味する. おそらく, PMの酵素は, アクチン依存の輸送系で小胞に乗ってPMまで運ばれ, PMで働き, 役目を終えると, endocytosisによって小胞に取り込まれ, 次の作業場所に移動するというサイクルを繰り返し, 細胞の極性生長を維持すると考えられる. 本研究は, 初めてKre6の極性生長端やPMへの局在を示した. Kre6は, 既に先に示した*Slal*や*Las17*とのN末端で結合が報告されている[Li, 2002]. その為, このKre6のN末端はKre6のERからの搬出だけでなく, PMへの極性生長端への輸送やPM, またはその近傍の膜面分への保持に必要なのかも知れない. PMにおけるendocytosis関連遺伝子の β -1,6-glucanの増加にも, Kre6がPMに蓄積することの影響を調べる必要があるだろう. *Keg1*との遺伝学的な相互作用を示したKre11は, 単独の遺伝子破壊で β -1,6-glucanの減少とK1 killer toxinの耐性を示す[Brown, 1993]. *Keg1*以外にもKre6をはじめ多くの β -1,6-glucan合成に関わるとされる遺伝子との遺伝学的な相互作用が既に報告されている. しかし問題なのは, Kre11がどのように β -1,6-glucan合成に関わるのかという点である. Kre11は, *Ypt31*, *Ypt32*というlate Golgi膜から出芽する輸送小胞の形成に関わるGTPaseのGEFであるTRAPP II complexのsubunitであるが, TRAPP IIの他のcomplexには特に β -1,6-glucan合成に関わると考えられるような表現型や遺伝学的な相互作用は検出されていない. *Ypt31*, *Ypt32*の形成する輸送小胞は極性生長部位に輸送される事もわかってきているため, TRAPP II自体が β -1,6-glucan合成に影響を与えるという現象には疑問は少ないが, Kre11が特異的に β -1,6-glucan合成に影響するのは, その原因を現在のところ全くわかっていない[Liang, 2007]. 少なくともKre11が

TRAPPIIのsubunitとしての働きで β -1,6-glucanの合成系に影響を与えるとは考え難い。最近オートファゴソームの形成に関わるTRAPPIII complexが報告された[Lynch-Daya, 2010]。TRAPPIIIに必要なsubunitであるTrs85を破壊してもTRAPPI,IIに影響しない事もわかっている為、Kre11についても、もしかしたら β -1,6-glucanに関連するこれまで知られていないTRAPP complexとしての機能を有するのかも知れない。

Kre6のglycoside hydrolaseに相同性のあるC末端の内腔の領域はPMに移行したときには、細胞外に向くことになる。UDP-glucoseが使用されて β -1,6-glucanの合成が行われている可能性が*in vitro*系の検討により示されているが、この状態では、UDP-glucoseとKre6のC末端が反応出来ない。 β -1,6-glucanは、細胞外のみ抗体で検出されると報告されているが、抗体で検出できないような低分子の β -1,6-glucanが予め細胞内でUDP-glucoseから作られて、それが細胞外でtransglycosilationにより伸長する可能性は残されている。Kre6はそのような反応に関与している可能性は未検討である。

他方で、UDP-glucoseを使用して作られた β -1,6-glucanをPMの外側に輸送するtransporterが見つからない。Fks1やChs3などの細胞質の糖ヌクレオチドを使用して多糖を合成するPMのタンパク質は、合成した多糖を細胞質膜へ輸送する為、非常に多くの膜貫通領域を持つ(Fks1:13回, Chs3:6回膜貫通タンパク質)。Kre6は1回膜貫通であるため、Kre6がPMの外側に β -1,6-glucanを輸送する事は考えにくい。 β -1,6-glucan合成のもう一つの可能性として、 β -1,6-glucanはKre6を含む輸送小胞の内部で合成され、PMとの融合によって分泌という形で細胞質膜の外部に輸送されるというモデルも考えられる。ERの内部にはUDP-glucoseが輸送されることが報告されている為[Castro, 1999]、輸送小胞の内部にもUDP-glucoseが存在する可能性があり、またKre6の酵素活性部位と思われるC末端領域と同じ所に存在することになる。PMに融合したKre6はすぐにエンドソームに回収されて

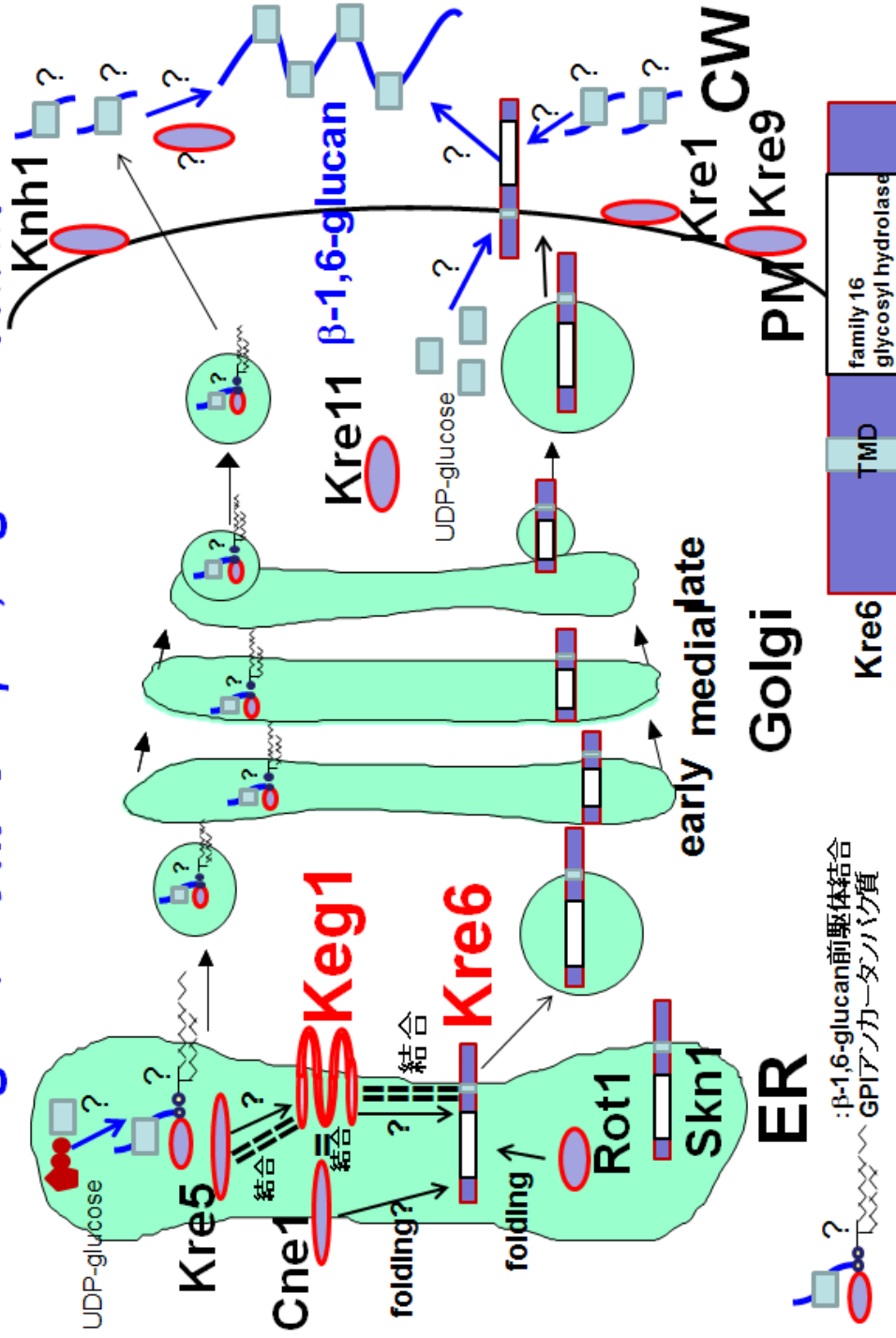
late-Golgiに輸送されER由来のUDP-glucoseに富んだ小胞に再度送られるのかもしれない。Snc1よりもPMからの回収が早い為により細胞の内部で強く蛍光シグナルが見え、PMに輸送されるのにも関わらず極性化した局在が見えにくい。Δ137kre6はこのPMからのリサイクルに影響があるのかもしれない。筆者は、クラスリンの軽鎖CLC1の破壊株においてKre6の極性化した局在が全く無くなる事も発見しており(data not shown), Golgi体やPMからの輸送に影響があると、Kre6の極性化した局在が失われる事は発見している。CLC1破壊株はK1 killer toxinに耐性を示している[Pagé, 2003]。いずれの可能性にしろ今後のKre6のPMへの輸送機構とβ-1,6-glucan合成への関わりのさらに詳しい検討は、重要な課題である。

β-1,6-glucanの*in vitro*合成系は、Busseyのグループが膜画分を用いた系を報告したが[Vink, 2004],Latgéのグループは、膜画分ではβ-1,6-glucanは合成できず、浸透圧ショックで作製したsemi-intact cellでアルカリ不溶β-1,3-glucanに結合したβ-1,6-glucanが合成できたと報告し、インタクトな小胞を含むような高次の細胞の働きがβ-1,6-glucan合成に必要なことを示唆した[Aimanianda, 2009]。筆者らもUDP-¹⁴C-glucoseを用いてERを含む膜画分よりβ-1,6-glucanを合成する*in vitro*合成系の構築を試みたが、成功しなかった。Latgéのグループが報告したsemi-intact cellを用いた実験においてRIの取り込みを確認した。しかしLatgéのグループは、66%エタノールに不溶性の画分より分析を行っているが、筆者らの*in vitro*合成系において出来たUDP-¹⁴C-glucose由来の合成産物の多くは66%エタノール可溶性の物質であった(data not shown)。種々の検討により少なくともβ-1,3-glucanが含まれる事は示されたが、β-1,6-glucanについては、実験的な問題があり検討出来なかった。ごく最近、細胞質から低分子のβ-1,6-glucanを検出したという報告がある[Hosomi, 2010]。彼らは細胞破砕液を66%で抽出してタンパク質と短い糖鎖の分離を行い、解析に用いている。もしかしたら、筆者らの研

究で検出された UDP-¹⁴C-glucose 由来の合成産物は彼らの検出した短い細胞内部のβ-1,6-glucan かも知れない.

いずれにしてもβ-1,6-glucan 合成系における最も重要な問題である, 「PM の外側にあるβ-1,6-glucan」と「細胞の内部にあるβ-1,6-glucan の合成に関わる遺伝子産物」の関わり的一端が本研究の Kre6, Keg1 の解析により明らかにされた. 今後のさらなる解析によって, 出芽酵母におけるβ-1,6-glucan 合成系の全容解明が期待される(Fig.D).

Fig.D 出芽酵母の β -1,6-glucan合成系



*Nakamata, K., Kurita, I., Bhuiyan, M.S., Sato, K., Noda, Y. and Yoda, K. (2007) *J Biol Chem* 282, 34315–34324.

*Kurita, I., Noda, Y., Takagi, T., Osumi, M., and Yoda, K. (2010) *J Biol Chem*, in press

実験材料と方法

抗体

抗体	由来	倍率*
抗 HA 抗体 (mouse monoclonal)	12A5 (Berkeley Antibody)	x1000
抗 Kre6 抗体 (rabbit polyclonal)	研究室内で作製	x500
抗 Scs2 抗体 (rabbit polyclonal)	Gift from Dr. S. Kagiwada	x2000
抗 Gas1 抗体 (rabbit polyclonal)	研究室内で作製	x1000
抗 GFP 抗体 (rabbit polyclonal)	研究室内で作製	x1000
抗 PGK 抗体 (mouse monoclonal)	22C5 (Invitrogen)	x1000

* ウェスタンブロッティングの一次抗体として使用した時の希釈倍率

大腸菌生育培地

LB+amp

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

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

酵母生育培地

YPD

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

固体培地のときは Agar (国産化学)を 1.5 g 加えた.

調製後オートクレーブした.

SD

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

固体培地のときは Agar (国産化学)を 1.5 g 加えた.

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

SC + Calcofluor White plate

1)SC

Yeast nitrogen base w/o a.a. and a.s. (Becton Dickinson)	0.17 g
硫酸アンモニウム (国産化学)	0.5 g
Vitamin Assay Casamino Acids	0.2 g
Adenine	2 mg
L-Histidine	20 mg

L-Tryptophan	20 mg
Uracil	2 mg
イオン交換水	40 ml

2)agar

glucose	2 g
Agar (国産化学)	1.5 g
イオン交換水	60 ml

3)10 mg/mlCalcofluor White solution

FLUORESCENT BRIGHTENER 28 (SIGMA)	12 mg(10mg/ml final)
1M Tris-HCl (pH8.0)	400 μ l
100% Ethanol	400 μ l
イオン交換水	400 μ l

56°Cで5分間インキュベートし、時々振り混ぜる。

CFW solution を 1ml/100 ml SC(AC 後, 1+2) に加える.

SC+CFW 100 μ g /ml plate として使用.

CFW, Final 40 μ g の時は下記

(FLUORESCENT BRIGHTENER 28 (SIGMA)	4.8mg(4mg/ml final))
------------------------------------	-----------------------

Low-pH YPD plate (pH4.5)

1)YPD

Yeast Extract (Becton Dickinson)	2 g
----------------------------------	-----

Peptone (Becton Dickinson)	4 g
glucose (国産化学)	4 g
イオン交換水	175 ml
Agar (国産化学)	1.5 g

2)クエン酸-リン酸 buffer

K_2HPO_4	5.2575 g/10ml
Citric acid	7.075g/10ml

K_2HPO_4 , Citric acid を別々にイオン交換水で溶かしてから混ぜる.

Up to 25ml

AC 後に 1)と 2)を混ぜて Low-pH YPD plate とした.

大腸菌からの plasmid 抽出

試薬

1 M Tris-Cl (pH 8.0)

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

HCl (国産化学)で pH 8.0 に調製した.

0.5 M EDTA (pH 8.0)

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

NaOH (国産化学)で pH 8.0 に調製した.

solution I

glucose (国産化学)	1.8 g	(final 50 mM)
1 M Tris-Cl (pH 8.0)	5 ml	(final 25 mM)
0.5 M EDTA (pH 8.0)	4 ml	(final 10 mM)
イオン交換水	up to 200 ml	

solution II

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

solution III

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

酢酸 (国産化学)で pH 5.5 に調製した.

TE (pH 8.0)

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

3 M 酢酸ナトリウム

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

酢酸 (国産化学)で pH 5.2 に調製した.

方法

大腸菌のシングルコロニーを 2 ml の LB+amp 培地で 10~16 時間振盪培養し、4,500 g, 5 分遠心(Kubota 3500)して集菌した。上清を除き, solution I 200 μ l を加えて懸濁し, solution II 400 μ l を加えて転倒混和し, さらに solution III 300 μ l 加えて転倒混和した後, 氷上で 10 分間静置した。15,000 g, 室温で 5 分間遠心(Kubota 3500)した。上清 800 μ l を回収して 480 μ l のイソプロパノール (国産化学)を加えて混合し, 室温で 10 分間静置した。15,000 g, 4 °C で 5 分間遠心(Kubota 3500, 以下 1.5ml 以下のスケールはすべてこの遠心機)し, 沈殿を 70%エタノール 500 μ l で洗浄し, 風乾した。沈殿を TE 200 μ l に溶解し, 3 M 酢酸ナトリウム 20 μ l を加えてよく混合した後, エタノール 1 ml を加えてよく混合し, 15,000 g, 4 °C で 5 分間遠心した。上清を除き, 70% エタノールで洗浄し, 風乾した。沈殿を RNase 50 μ g/ml を加えた TE 30 μ l に溶解し, 65 °C で 20 分間インキュベートした。インキュベート後のサンプルを回収プラスミドとした。

制限酵素処理

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

アガロースゲル電気泳動

試薬

50 \times TAE buffer

Tris	242 g
酢酸	57 ml
EDTA	37.2 g

イオン交換水 up to 1 L

TAE buffer

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

0.8% アガロースゲル

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

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

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

方法

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

λ DNA マーカーの作製

10×H buffer(Roche) 20 μ l とイオン交換水を加えて、 λ DNA (Takara)を 0.15 μ g/ μ l の濃度になるように 200 μ l 調製した。EcoRI (Roche), HindIII (Takara)を各 1 μ l

ずつ加え一晩インキュベートした。イオン交換水 700 μ l, 10 \times Loading Buffer (Takara) 100 μ l を加え-20 $^{\circ}$ C で保存した。泳動の際は 5 μ l 用いた。

アガロースゲルからの DNA の回収

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

DNA の ligation

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

大腸菌コンピテントセルの調製

試薬

SOB

Tryptone	4 g	(final 2%)
Yeast Extract	1 g	(final 0.5%)
1 M NaCl	2 ml	(final 10 mM)
1 M KCl	0.5ml	(final 2.5 mM)

イオン交換水 200 ml

上記を混合してオートクレーブ後、個別にオートクレーブした下記を加えた.

1 M MgCl₂ 2 ml (final 10 mM)

1 M MgSO₄ 2 ml (final 10 mM)

TB

PIPES (同仁化学) 0.3 g (final 10 mM)

CaCl₂ 0.22 g (final 15 mM)

KCl 1.86 g (final 250 mM)

イオン交換水 100 ml

1 M KOH で pH を 6.7 に調製後、下記を加え、フィルター滅菌した.

MnCl₂4H₂O (国産化学) 1.09 g (final 55 mM)

方法

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

大腸菌の形質転換

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

SDS-PAGE

試薬

4×SDS-PAGE sample buffer

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

分離ゲル溶液 (pH 8.8)

Tris	0.75 M (45.4 g/500 ml)
SDS	0.2% (1 g/500 ml)

HCl で pH を 8.8 に調製した.

濃縮ゲル溶液 (pH 6.8)

Tris	0.25 M (18.1 g/500 ml)
SDS	0.2% (1 g/500 ml)

HCl で pH を 6.8 に調製した.

30% アクリルアミド

Acrylamide (和光純薬工業)	30% (150 g/500 ml)
<i>N,N'</i> -Methylene-bis(acrylamide) (和光純薬工業)	0.8% (4 g/500 ml)

遮光して 4°C に保存した.

SDS-PAGE 泳動用バッファー

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

方法

10% ポリアクリルアミドゲルの作製

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

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

ウェスタンブロットティング

試薬

10 \times TBS (pH7.4)

Tris	0.5 M (121.1 g/2 L)
------	---------------------

NaCl 1.5 M (175.4 g/2 L)

HCl で pH を調製した.

TBST

10×TBS 100 ml

Tween 20 (シグマ アルドリッチ ジャパン) 0.5 ml

イオン交換水 900 ml

Anode buffer 1

Tris 300 mM (72.7 g/2 L)

メタノール 10% (200 ml/2 L)

Anode buffer 2

Tris 25 mM (6.06 g/2 L)

メタノール 10% (200 ml/2 L)

Cathode buffer

Tris 25 mM (6.06 g/2 L)

6-amino-n-capronic acid (SIGMA) 40 mM (10.5 g/2 L)

10% SDS 0.01% (2 ml/2 L)

メタノール 20% (400 ml/2 L)

5% スキムミルク

スキムミルク (森永乳業) 2 g

TBST 40 ml

方法

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

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

glass beads 破砕による酵母 Total Cell lysate の調製

試薬

B88

HEPES (SIGMA) 20 mM

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

1M KOH で pH を 6.8 に調製した.

protease inhibitors cocktail (pic)

chymostatin (SIGMA)	5 mg
aprotinin (SIGMA)	5 mg
leupeptin (SIGMA)	5 mg
pepstatin A (SIGMA)	5 mg
antipain (SIGMA)	5 mg
50% イソプロパノール	10 ml

-20°C で保存した.

500 mM PMSF

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

500 μ l ずつ分注し, -20°C で保存した.

500mM benzamidine

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

500 μ l ずつ分注し, -20°C で保存した.

方法

酵母を 10 ml の YPD (栄養要求性が必要な場合は適当な SD 培地) に植菌して適温で振盪培養し, $OD_{600}=0.8-1.0$ になったところで $OD_{600}=0.8 \times 10$ ml 相当の菌体を集菌(1,100g, 5min, 4°C, Kubota 5930, 1.5ml 以上の場合は断らない時はすべてこの遠心機)した. イオン交換水で洗浄後, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 1 μ g/ml protease inhibitor cocktail を含む B88 Buffer 500 μ l に懸濁した. 懸濁液に菌体破碎用ガラスビーズを 1 g 加え, MULTI-BEADS SHOKER (安井機械) を用いて 1 分破碎を 3 回繰り返した. それぞれの破碎の間には 1 分のインターバルを入れた. 破碎液を回収し, 700 g, 4°C で五分間遠心分離して未破壊細胞を除き, Total cell lysate とした. SDS-PAGE に供する場合には, lysate 120 μ l に 4x SDS PAGE sample buffer を 40 μ l 加えて, SDS PAGE 用のサンプルとし, 10~20 μ l を SDS PAGE に供した. タンパク質のシグナルはウェスタンブロッティングで確認した.

GFP 融合タンパク質の顕微鏡観察

試薬

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

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

調製後オートクレーブした.

0.1 M リン酸カリウム buffer (pH 7.5)

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

10% パラホルムアルデヒド

0.1 M リン酸カリウム buffer (pH 7.5) 1 ml

パラホルムアルデヒド(組織固定用; 和光純薬工業) 0.1 g

90°C に設定したヒートブロックで加熱し溶解した.

方法

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

顕微鏡は共焦点レーザー顕微鏡 (FV-500; Olympus) を使用し, 対物レンズは 60× (Plan APO ×60 Oil; Olympus) または 100× (Plan APO ×100 Oil; Olympus) を使用し, ズーム倍率は 2 倍もしくは 5 倍で画像を取り込んだ. GFP 融合タンパクの蛍光は Multi-Argon レーザーを使い, EGFP filter set を使用した. 画像の取り込みは Kalman filter を使い 3 から 5 回積算して, ノイズを減少させた. 3 次元投影するときには, 0.25 μ m 間隔で Z 軸の幅が 8 μ m の画像を投影した. 画像は

Photoshop ver.5 (Adobe)のレベル補正でコントラストの調節, 解像度調製で画像サイズの変更を行った.

間接蛍光抗体染色による顕微鏡観察

試薬

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

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

調製後オートクレーブした.

0.1 M リン酸カリウム buffer (pH 7.5)

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

10% パラホルムアルデヒド

0.1 M リン酸カリウム buffer (pH 7.5)	10 ml
パラホルムアルデヒド(組織固定用; 和光純薬工業)	1 g

100°C の湯浴で加熱し溶解した.

SPP

ソルビトール (関東化学 鹿 1 級)	2.19 g
1 M リン酸カリウム buffer (pH 7.5)	1 ml
イオン交換水	up to 10 ml

SPP w/ DTT

DTT	15.4 mg
SPP	1 ml

SPP w/ NH₄Cl

塩化アンモニウム (国産化学)	26.7 mg
SPP	1 ml

10×TBS (0.5 M Tris-Cl, 1.5 M NaCl)

Tris	60.6 g
NaCl	87.7 g

イオン交換水 up to 1 L

HCl で pH 7.4 に調製し，オートクレーブした。

TBST

10×TBS	100 ml
Tween 20 (SAJ 1 級 シグマアルドリッチジャパン)	0.5 ml
イオン交換水	up to 1 L

TBST block

TBST	100 ml
スキムミルク (森永乳業)	1 g
albumin, bovine (SIGMA)	100 mg

一次抗体

各種 1 次抗体を以下の倍率で TBST block に希釈して使用した.

rabbit anti-Kre6 polyclonal antibody	0.5 μ l
mouse anti-HA monoclonal antibody (12A5)	1 μ l
TBST block	100 μ l

二次抗体

各種 2 次抗体を以下の倍率で TBST block に希釈して使用した.

Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse IgG (invitrogen)	0.5 μ l
Alexa Fluor 488 Goat anti-rabbit IgG (invitrogen)	0.5 μ l
Alexa Fluor 568 Goat anti-rabbit IgG (invitrogen)	0.5 μ l
TBST block	100 μ l

マウンティング溶液

p-phenyldiamine (和光純薬工業)	20 mg
10 \times PBS	2 ml
0.1N NaOH	5 μ l
グリセロール (国産化学)	18 ml

-80 $^{\circ}$ C に遮光保存した.

方法

適当な液体培地 10 ml で OD₆₀₀ = 1.0 まで培養した. 培養液 7.5 ml を回収し, 10% パラホルムアルデヒド 2.5 ml を加え, 30 秒間転倒混和した. 500 g, 室温で 5 分間遠心して集菌し, 0.1 M リン酸カリウム buffer 3.2 ml に懸濁した. 10% パラホルムアルデヒド 1.8 ml を加え, 室温で 15 分間穏やかに振盪して細胞を固定した.

500 g, 室温で5分間遠心して集菌し, 0.1 M リン酸カリウム buffer 1 ml で3回, SPP 1 ml で1回洗浄した. 細胞を SPP 500 μ l に懸濁し, 100 μ l を別のチューブに移し, 500 g, 室温で5分間遠心して集菌し, SPP w/ DTT 100 μ l に懸濁し, lyticase 10 μ l を加え, 30°C で15分間インキュベートした. 酵素処理後, 1 μ l を slide glass (Pre-Cleaned, 76×26 mm, Thickness 1 mm 白縁磨フロスト; 岩城硝子)にとり cover glass (18×18 mm, Thickness 0.13-0.16 mm; 岩城硝子)をかぶせ, 顕微鏡で観察しながら滅菌水を滴下し, 細胞がほぼ完全に burst するのを確認した. 500 g, 室温で5分間遠心して集菌し, SPP w/ NH₄Cl 100 μ l で1回, SPP 100 μ l で1回洗浄し, SPP 100 μ l に懸濁し, 固定細胞とした. slide glass に PAP PEN (LIQUID BLOCKER SUPER PAP PEN; 大道産業)で約 15×15 mm 四方の土手を作り, よく乾かした. 土手の内側に Polylysine 1 μ l を滴下し, チップの側面で塗り伸ばした. Polylysine を乾燥させた後, 100 μ l の滅菌水で3回洗浄し, 乾燥させた. 固定した細胞 100 μ l を滴下し, 土手の内側にまんべんなく行き渡らせ, 室温で20分間静置した. 上清をアスピレーターで除き, 室温に10分間静置した. 100 μ l の SPP で2回 wash し, 10分ほど風乾した. -20°C に冷やしたメタノールに浸し, -20°C で6分間静置し, 次に-20°C に冷やしたアセトンに浸し, -20°C で30秒間静置した. slide glass を取り出し, 良く乾燥させた. TBST block 100 μ l を滴下し, 乾燥を防ぐために, 水で湿らせたキムワイプを敷いたプラスチックケースに入れて蓋をして室温で30分間静置した. blocking 後, 上清をアスピレーターで除き, 一次抗体を10 μ l 滴下し, 全体に行き渡らせた後, 同様にプラスチックケースに入れて4°C で一晩静置した. 上清をアスピレーターで除き, TBST block で3回洗浄し, 二次抗体10 μ l を滴下し, 室温で遮光し, プラスチックケースに入れて2時間静置した. 上清をアスピレーターで除き, TBST block で3回, TBST で1回洗浄し, 上清をアスピレーターで完全に除き, マウンティング溶液3 μ l を滴下し, cover glass を被せた. 8つ折りにしたキムワイプを cover glass の上に乗せてしっかり

と押さえた後， マニキュアでシールした．

顕微鏡は共焦点レーザー顕微鏡 (FV-500; Olympus)を使用し， 対物レンズは 100 倍 (Plan APO ×100 Oil; Olympus) を使用し， ズーム倍率は 2 倍で画像を取り込んだ． GFP 融合タンパクの蛍光は Multi-Argon レーザーを使い， EGFP filter set を使用した． Texas Red でラベルされた二次抗体を使用したときは HeNe-Green レーザーを使い， Texas Red filter set を使用した． Alexa Fluor でラベルされた二次抗体を使用したときは適当なレーザーを使い， それぞれに適した filter set を使用した． 共染色したときは sequential mode を使った． 画像の取り込みは Kalman filter を使い 3 回積算して， ノイズを減少させた． 3 次元投影するときは， 0.25 μm 間隔で Z 軸の幅が 8 μm の画像を投影した． 画像は Photoshop ver.5 (Adobe)のレベル補正でコントラストの調節， 解像度調整で画像サイズの変更， レイヤーオブションのスクリーンにより merge 画像の作製を行った．

Lyticase 処理による細胞破碎液の調製

試薬

Sorbitol buffer

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

B88

HEPES	20 mM
酢酸カリウム	150 mM

酢酸マグネシウム	5 mM
ソルビトール	200 mM

1M KOH で pH を 6.8 に調製した.

B88 w/pic

B88	1 ml
pics	2 μ l
PMSF	10 μ l
benzamidine	10 μ l

使用直前に調製した.

B88 w/ 1% Triton X-100

B88	9 ml
10% Triton X-100	1 ml

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

方法

酵母を適当な液体培地 100ml(適宜スケールダウン)で OD₆₀₀=1.0 まで培養した. 集菌し, Sorbitol buffer で洗浄し, Sorbitol buffer, 5 ml に懸濁した. 2-メルカプトエタノール 30 μ l を加え, 30°C で 10 分間インキュベートした. lyticase 100 μ l を加え, 30°C で 30 分間インキュベートした. 1,000 g, 室温で 5 分間遠心して集菌し, Sorbitol buffer で 2 回洗浄した. スフェロプラストを氷上で冷却し, 氷冷した B88 w/pics を 5 ml 加え懸濁した. 氷上に 5 分間静置し, 1,000 g, 4°C で 5 分間遠心して上清を回収し, 細胞破碎液とした.

Kre6 の安定性の検討

各検定株 25°C, o/n, 前培養, OD₆₀₀=0.5 くらいまで培養する.その後, 准许容温度 (30°C, 27.5°C)に移し 90 min 培養, 集菌して 10 ODunits / ml になるように 1× sample buffer で希釈し, 1min boli してから 20μl (0.02 ODunit/lane) SDS-PAGE に供し抗 Kre6, 抗 Scs2 抗体により免疫ブロットした.

免疫沈降

試薬

Sorbitol buffer (Lyticase 処理による細胞破碎液の調製)

B88 w/ pics (Lyticase 処理による細胞破碎液の調製)

B88 w/ 1% Triton X-100

B88 9 ml

10% Triton X-100 1 ml

B88 w/ 1% digitonin

B88 9 ml

10% digitonin 1 ml

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

方法

SD 50 ml で OD₆₀₀=1.0 まで培養した. 1,000 g, 室温で 5 分間遠心して集菌し, ソルビトールバッファで洗浄した. ソルビトールバッファ 1 ml に懸濁し, 2-メルカプトエタノール 6 μl を加え, 30°C で 10 分間インキュベートした. lyticase 50 μl を加え, 30°C で 30 分間インキュベートし, 細胞をスフェロプラストにし

た. 1,000 g, 室温で 5 分間遠心して集菌し, ソルビトールバッファーで 2 回洗
浄し, -80 °C で凍結した. 氷上で融解し, B88 w/pics を 1 ml 加えて懸濁してスフ
ェロプラストを burst させた. 氷上に 5 分間静置した後, 1,000 g, 4 °C で 5 分間
遠心した. 上清を別のチューブに回収し, 沈殿に 500 µl の B88 w/ pics を加え,
懸濁した. 1,000 g, 4 °C, 5 分間遠心し, 上清を先程の上清と併せた. この上清
から 1350 µl を別のチューブに移し, 10% Triton X-100 を 150 µl 加え, 氷上で 10
分間静置した後, 16,000 g, 4 °C で 10 分間遠心した. 上清 1200 µl を超遠心用の
1.5 ml チューブに回収し, 100,000 g, 4 °C で 1 時間遠心した. 上清を 1 ml 回収
し, 抗 myc 抗体(H)を 50 µl 加え, 4 °C で 1 時間転倒混和した. Protein A Sepharose
(Protein A Sepharose™ 4 Fast Flow; Amersham Biosciences) 20 µl(1:1 slurry)を B88
w/ Triton X-100 で 3 回洗浄した. 1 時間転倒混和したサンプルを, 洗浄した Protein
A Sepharose の入ったチューブに全量移し, 4 °C で一晩転倒混和した. 16,000 g,
4 °C で 10 秒間の遠心で Protein A Sepharose を B88 w/ Triton X-100 で 5 回洗浄し
た. Protein A Sepharose に 1x SDS-PAGE sample buffer を 50 µl 加え, 氷上で 5 分
間インキュベートした. 16,000 g, 4 °C, 10 秒間遠心し, 上清を 40 µl 回収した.
これをもう一度繰り返し, 上清を併せ, 泳動用サンプルとした.

GST 融合タンパク質の精製

試薬

STE buffer

1 M Tris-Cl (pH8.0)	2 ml (final 10 mM)
NaCl	1.75 g (final 150 mM)
500 mM EDTA	0.4 ml (final 1 mM)
イオン交換水	up to 200 ml

100 mM DTT

DTT 17.42 mg

イオン交換水 1 ml

10% TritonX-100

TritonX-100 10 g

イオン交換水 90 ml

調製後，オートクレーブ

PBS (10mM Phosphate Buffered Saline)

PBS 用粉末 (SIGMA) 1 袋

イオン交換水 up to 1L

調製後，オートクレーブ

Elution solution

50mM glutathione 100 μ l final 5mM

1M Tris-HCl(pH8.0) 50 μ l final 50mM

イオン交換水 850 μ l

50mM glutathione

Glutathione 15.4mg

イオン交換水 1ml

方法

目的のプラスミドを形質転換した大腸菌を 2 ml LB-amp 液体培地で，37°C で前

培養した. 本培養用の LB-amp 液体培地に 1% 植菌し, 37°C で 2 時間振盪培養後, IPTG を 1 mM になるように添加し, 引き続き 37 °C で 2 時間, 振盪培養した. 集菌(4,000 g, 5 min, 4°C)した菌体を, 100 ml の培養液あたり 1ml STE buffer で 1 回洗浄後, 再び 1 ml STE buffer で懸濁した. そこに, 使用直前に調製した 20 mg/ml lysozyme を 5 µl 加え, 氷上で 20 分間静置した. 1 mM DTT を 10 µl, 100 mM PMSF を 10 µl, 1 µg/ml protease inhibitor cocktail を 2 µl 加え, 懸濁した. この溶液を氷上で 1 分間, 超音波処理して細胞を破砕した. 15,000 g, 4°C で 5 分間遠心して 900 µl の上清を得た. この上清に 10% TrironX-100 を 100 µl 加え, 氷冷 PBS 500 µl で 5 回洗浄した Glutathione sepharose beads を 20 µl 加え, 4°C で o/n 転倒混和した. 500 g, 4°C で 30 秒遠心し, 上清を取り除いた. Beads を氷冷 PBS で 500 µl で 5 回洗浄した. Beads を Elution solution 100µl に 10min 氷上で抽出した. 同様の抽出を 4 回繰り返して, 400µl の抽出液を得た.

K1 killer toxin 感受性解析

検定株は, OD₆₀₀=1.0 くらいまで培養してから滅菌水により OD₆₀₀=0.1 相当に希釈して Low-pH YPD plate (pH4.5)(酵母用 plate 参照)の に塗布し, 乾燥した. K1 killer 株は 16°C で YPD で培養. OD₆₀₀=1.0 まで培養, 遠心により集菌し, 滅菌水に懸濁して OD₆₀₀=2.0 相当の菌液を調製し, 検定株を塗布し乾燥しておいた plate に 5µl spot し, 16-25°C で培養した.

CFW 感受性の解析

検定株は, OD₆₀₀=1.0 くらいまで培養してから滅菌水により OD₆₀₀=0.5 相当に希釈. さらに滅菌水で 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 の各段階希釈サンプルを調製した. SC+CFW plate(酵母用 plate 参照)に各 10µl spot し, 30°C で培養した. CFW の濃度は, 実験により 100µg / ml と 40µg / ml を使い分けた(各 Figure 参照).

アセトンパウダー処理による抗 Kre6 抗体の精製

1)アセトンパウダー作成

Δkre6 株(Y05574)を 100ml, OD600=1.0 まで培養して集菌, 1ml 水で洗った. B88+pics, PMSF, Benzamidine, 500μl に懸濁し, 1g, glass beads を加え MULTI-BEADS SHOKER (安井機械) により破碎 (1min×3times) ,800 g, 5min, 4°C,遠心により未破壊菌体を除去した. 上清回収, 200μl ずつ 1.5ml チューブに分注し, 各チューブに 800μl ice-cold acetone 加え, ピペティングでまぜた(詰まるので blue tip の先を切って使う). 氷上 30min 静置した. 2500 g, 5min, 4°C,遠心, acetone 除去した. 再度 ice-cold acetone 1ml を加え 10min 静置. ウェスタンブロッティング用の PVDF 膜上にペレットをのせて o/n 以上良く乾かした. 薬さじでかき取って tube に集める.(100 ODunit より 50mg くらい), -20°C 保存. この粉末をアセトンパウダーとした.(SD 培地で培養した菌体を見るときは, YPD で培養した時とは非特異の蛍光シグナルのパターンが異なっていたため, 同じ SD 培地で生育させた *Δkre6* 株より調製したアセトンパウダーを用いて精製した抗体を使用した.)

2)アセトンパウダー処理

抗体に対して Tween 20 0.05%, アセトンパウダー1%を加える. 抗体 1ml に Tween20 0.5μl + アセトンパウダー 10mg を加え, 4°C, o/n 転倒混和した. 10,000 g, 10min, 4°C 遠心して上清回収した. 上清を再度 10,000 g, 10min, 4°C 遠心しアセトンパウダーを完全に除去して 4°C 保存に保存した. この血清を精製抗 Kre6 抗体として間接蛍光観察に使用した.

細胞同調

試薬

1mg / ml alpha-factor

alpha-factor 1mg + 1ml DMSO (store at -20°C)

5% succinic acid

0.5g succinic acid / 10 ml water

方法

[Amberg, 2005]を参考にした.

YPD 10ml 3 本, 25°C o/n, OD₆₀₀ = 0.8 まで培養し 100Dunits 回収を 3000 rpm, 5 min 遠心して菌体を回収した. 5ml 水で洗い, 1.5ml チューブに移してから, 1ml 水で 4 回洗った. その時の遠心は 9000rpm, 1min. 1/10 5% succinic acid と 200μl alpha-factor (2μg/ml final)を加えた 100ml, YPD を 2 本用意して菌株を植え継いだ (OD₆₀₀=0.1 相当にする). 180 min 30°C 培養し細胞同調を行った. 顕微鏡で見ながら bud が無くなっているのを確認した. 3000 rpm, 5 min 遠心して菌体を回収した. 5ml 水で洗い, 1.5ml チューブに移してから 1ml 水で 4 回洗った. YPD 100ml に対して, 同調を行った培養液 200ml 分より回収した菌体を植え継いだ(この時 OD₆₀₀=0.4-0.5 くらい). 芽の大きさを見ながら培養し, 大体 100min(1cycle と 10min くらい), 顕微鏡観察した時に多くの細胞に小さい芽が目えたら 3ml 2% NaN₃/100ml YPD を加え生育を止めた. 2000 rpm, 5 min 遠心して菌体を回収し 10 ml の 10 mM NaN₃ により洗った. 1 ml sucrose solution (±EDTA)(下記)により洗って-80°C に保存した.

EDTA±の蔗糖密度勾配遠心分画

試薬

100mM Hepes (600ml)

Hepes (FW 238.3) 14.298g

Adjust pH to 7.4 with 1N KOH.

オートクレーブした。

EDTA+

Sucrose solution+EDTA (100 ml) Final

Hepes (FW 238.3) 0.24g 10mM

Sucrose 12.5 g

500 mM EDTA (pH 8.0) 2 ml 10 mM

Adjust pH to 7.5 with 1N KOH.

オートクレーブした。

Buffer A +EDTA (50 ml) final

100 mM Hepes (pH7.4) 5 ml 10 mM

500 mM EDTA (pH 8.0) 1 ml 10 mM

Water 44 ml

オートクレーブしていない。

Buffer B +EDTA (50 ml) final

200 mM Hepes (pH7.4) 5 ml 10 mM

500 mM EDTA (pH 8.0) 1 ml 10 mM

sucrose 30 g 60 %

イオン交換水を加えて 50 ml へ。オートクレーブしていない。

EDTA-

Sucrose solution (100 ml)		Final
Hepes (FW 238.3)	0.24 g	10mM
Sucrose	12.5 g	
1 M MgCl ₂	直前に 1/1000 量加える	(1mM final)

Adjust pH to 7.5 with 1N KOH.

オートクレーブした.

Buffer A (50 ml)		final
100 mM Hepes (pH7.4)	5 ml	10 mM
Water	45 ml	
1 M MgCl ₂	直前に 1/1000 量加える	

オートクレーブしていない.

Buffer B (50 ml)		final
100 mM Hepes (pH7.4)	5 ml	10 mM
sucrose	30 g	60 %
1 M MgCl ₂	直前に 1/1000 量加える	(1mM final)

イオン交換水を加えて 50 ml へ. オートクレーブしていない.

方法

[Powers, 1998]を参考にした.

100ml YPD, OD600=1.0 まで培養した細胞を 1000 g, 5 min 遠心して菌体を回収し 10 ml の 10 mM NaN₃ により洗った. 1 ml sucrose solution (±EDTA)(下記)により洗って-80°C に保存した.

Sucrose gradient solutions (Mix Buffer A and B)

	18 %	22 %	26 %	30 %	34 %	38 %	42 %	46 %	50 %	54 %	60 %
A	1.05ml	0.95	0.85	0.75	0.65	0.55	0.45	0.35	0.25	0.15	0
B	0.45ml	0.55	0.65	0.75	0.85	0.95	1.05	1.15	1.25	1.35	1.5

蔗糖密度勾配を作る為、BufferA,B を上記の表の通りに混ぜて、ショ糖溶液 1.5 ml をエッペンチューブに作りよく混ぜた、そのうち 1 ml を取って氷上で冷やしておいた。Ultra-Clear Centrifuge Tube (BECKMAN, 14 x 95 mm) にパスツールピペットで 60%→18%の順に 1ml ずつ積み上げて蔗糖密度勾配を作製した。以上の操作が完了した後、-80°C に保存していた pellet より細胞破碎液の調製を始めた。

上記の細胞、もしくは同調した細胞(細胞同調参照)に 1.5 ml sucrose solution (\pm EDTA) w/ pics, PMSF(1 mM), benzamidine (1 mM)を加えた。4g glass beads を入れたワッセルマン(ガラス試験管)へ移し、低温室で Vortex を 1min, 4 回(インターバル, 氷上 1min)で細胞破碎した。上清を 1.5ml エッペンチューブに移し*1, ビーズを 500 μ l sucrose solution (\pm EDTA)w/ pics, PMSF(1 mM), benzamidine (1 mM)で洗って上清を 1.5ml エッペンチューブに移した*2。800 g, 5min 遠心して未破壊細胞を除去し、*1 と*2 より回収した上清を合わせて再度 800 g, 5min 遠心、上清を 1.2 ml を取り作成しておいた蔗糖密度勾配に重層した。

EDTA+の場合

30000 rpm (113700 x g)(Beckman SW40 Ti rotor) , 4 °C, 19 hr, 遠心した(Beckman XL-A).

EDTA-の場合

35000 rpm(154700 x g) (Beckman SW40 Ti rotor) , 4 °C, 2.5 hr 遠心した(Beckman

XL-A).

以下同じ

チューブを取り出し、氷上で、1ml ずつ Top から fraction を取得した。取得できた fraction の内 300 μ l だけ取り分け、100 μ l の 4 x Sample buffer を加え、37°C 5min 保温(GFP-Keg1 の検出時)、もしくは、1min boil(GFP-Keg1 発現株でも GFP-Keg1 以外のタンパク質を検出する時は boil した)した。サンプルは-80 °C で保存した。

免疫電子顕微鏡

25°C で培養した対数増殖期の細胞を使用した。高圧凍結固定法により細胞を固定した。詳細については参考文献参照 [Konomi, 2000], [Humbel, 2000]. 免疫電子顕微鏡観察については, [Takagi, 2003], [Konomi, 2003]と同様の方法で, 抗 HA 抗体(1:25 dilution)と 1 nm 超微粒子金コロイド結合抗マウス二次抗体(1:100 dilution; GAM IgG GP-US; Aurion, Wageningen, the Netherlands)を用いた。金コロイド粒子のジグナルは silver enhancement kit (Aurion RGent SE-EM, Aurion)を用いて, 銀粒子により増幅した[Takagi, 2003], [Konomi, 2003]. 染色した細胞の観察は, 透過型電子顕微鏡 JEM 1200 EXS (JEOL Ltd., Tokyo, Japan)で 80 kV で行った。

Protease protection assay

試薬

Sorbitol solution (Lyticase 処理による細胞破碎液の調製)

SPP (Lyticase 処理による細胞破碎液の調製)

方法

[Imai, 2005]の方法に従った。

Kre6-3HA 発現株(KTY284)を YPD 100ml, $OD_{600}=1.0$ まで培養した. 900 μ l sorbitol sol. に懸濁して 6 μ l 2ME を加え 30°C 10min 保温した. 100 μ l lyticase を加えて 30°C, 30min 細胞壁を処理し, 細胞をスフェロプラストに変換した. 1,000 x g, 5min 遠心して細胞を回収し, 1ml sorbitol buffer で 2 回洗った. 細胞を 1ml B88/pics に懸濁して, 氷上 20min 静置して, スフェロプラストをバーストさせ, 1,000 g, 5min して上清を回収した*1. さらに再度 B88/pics, 500 μ l を加えて上清回収, *1 を合わせた*2. *2 を 10,000 g, 10min 遠心して上清を除去し, 取得した pellet を膜画分とした.

100 μ l SPP (1.2M sorbitol 0.1M KPO₄, pH7.5)により膜画分を洗い, 200 μ l SPP に懸濁した. 膜画分のタンパク質濃度を以下の方法で定量した. [Guthrie, 2002]を参考に, 取得した膜画分を 2%SDS により段階的に希釈して A₂₈₀ を測定した. 1/100 希釈し, て A₂₈₀=0.4 の時に, 元のタンパク質濃度を 8mg/ml protein として換算した.膜画分 35mg protein (\pm 0.3mg/ml proteinase K \pm 1% final TritonX-100, SPP up to 50 μ l)に調製した. 氷上 5min で反応させ, 1mM PMSF 反応停止, 2x sample buf. 50 μ l を加えて Boil 1min した. 調製したサンプルを SDS-PAGE, 免疫ブロットに供し. 各抗体で検出した.

参考文献

- 池田文昭 (2005) キャンディン系抗真菌薬ミカファンギン *Jpn. J. Med. Mycol.* **46**, 217-222
- Aimanianda, V., Clavaud, C. C., Simenel, C., Fontaine, T., Delepierre, M., and Latgé, J. P. (2009) cell wall β -(1, 6)-glucan of *Saccharomyces cerevisiae* structural characterization and in situ synthesis. *J Biol Chem* **284**, 13401–13412
- Amberg, D. C., Burke, D., Strathern, J. N. (2005) “Cell Synchrony” [*Methods in Yeast Genetics* (Cold Spring Harbor)] 165-167
- Arai, S., Noda, Y., Kainuma, S., Wada, I., and Yoda, K. (2008) Ypt11 functions in bud-directed transport of the Golgi by linking Myo2 to the coatomer subunit Ret2. *Curr Biol* **18**, 987-991
- Ayscough, K. R., Eby, J. J., Lila, T., Dewar, H., Kozminski, K. G. and Drubin, D. G. (1999) Sla1p is a functionally modular component of the yeast cortical actin cytoskeleton required for correct localization of both Rho1p-GTPase and Sla2p, a protein with Talin homology. *Mol Biol Cell* **10**, 1061–1075
- Brown, J. L., Kossaczka, Z., Jiang, B. and Bussey, H. (1993) A mutational analysis of killer toxin resistance in *Saccharomyces cerevisiae* identifies new genes involved in cell wall (1 \rightarrow 6)- β -glucan synthesis. *Genetics* **133**, 837-849
- Castro, O., Chen, L. Y., Parodi, A. J. and Abeijón, C. (1999) Uridine diphosphate-glucose transport into the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*: *in vivo* and *in vitro* evidence. *Mol Biol Cell* **10**, 1019-1030
- Chuang, S. J. and Schekman, R. W. (1996) Differential trafficking and timed localization of two chitin synthase proteins, Chs2p and Chs3p. *J Cell Biol* **135**, 597-610
- Du, Y., Walker, L., Novick, P. and Novick, S. F. (2006) Ptc1p regulates cortical ER

- inheritance via Slt2p. *EMBO J* **25**, 4413–4422
- Epping, E. A. and Moye-Rowley, W. S. (2002) Identification of interdependent signals required for anterograde traffic of the ATP-binding cassette transporter protein Yor1p. *J Biol Chem* **277**, 34860-34869
- Estrada, P., Kim, J., Coleman, J., Walker, L., Dunn, B., Takizawa, P., Novick, P., and Novick S.F. (2003) Myo4p and She3p are required for cortical ER inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **163**, 1255–1266
- Fehrenbacher, K. L., Davis, D., Wu, M., Boldogh, I. and Pon, L. A. (2002) Endoplasmic reticulum dynamics, inheritance, and cytoskeletal interactions in budding yeast. *Mol Biol Cell* **13**, 854–865
- Fernandez, F. S., Trombetta, S. E., Hellmann, U. and Parodi, A. J. (1994) Purification to homogeneity of UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase from *Schizosaccharomyces pombe* and apparent absence of the enzyme for *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**, 30701-30706,
- Fujie, A., Iwamoto, T., Muramatsu, H., Okudaira, T., Nitta, K., Nakanishi, T., Sakamoto, K., Hori, Y., Hino, M. Hashimoto, S. and Okuhara, M. (2000) FR901469, a novel antifungal antibiotic from an unidentified fungus No.11243 I. taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological properties *Journal of Antibiotics* **53**, 912 – 919
- Fujimoto, K. (1997) SDS-digested freeze-fracture replica labeling electron microscopy to study the two-dimensional distribution of integral membrane proteins and phospholipids in biomembranes : practical procedure, interpretation and application. *Histochem Cell Biol* **107**, 87–96
- Gurunathan, S., Chapman-Shimshoni, D., Trajkovic, S. and Gerst, J. E. (2000) Yeast exocytic v-SNAREs confer endocytosis. *Mol Biol Cell* **11**, 3629–3643

- Guthrie, C. and Fink, G. R. (2002) "Preparation of Microsomes" [Guide to yeast genetics and molecular and cell biology (Method in Enzymology)] **351** part C 263-264
- Hashimoto, H. and Yoda, K. (1997) Novel membrane protein complexes for protein glycosylation in the yeast Golgi apparatus. *Biochem Biophys Res Commun* **241**, 682-686
- Hodgson, V., J., Button, D. and Walker, G. M. (1995) Anti-Candida activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiology* **141**, 2003-2012
- Hosomi, A., Tanabe, K., Hirayama, H., Kim, I., Rao, H., Suzuki, T. (2010) Identification of an Htm1 (EDEM)-dependent, Mns1-independent ERAD pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **285**, 24324–24334
- Humbel, B. M., Konomi, M., Takagi, T., Kamasawa, N., Ishijima, S. A., and Osumi, M. (2001) *In situ* localization of β -glucans in the cell wall of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **18**, 433–444
- Imai, K., Noda, Y., Adachi, H., and Yoda, K. (2005) A novel endoplasmic reticulum membrane protein Rcr1 regulates chitin deposition in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**, 8275-8284
- Inoue, S. B., Takewaki, N., Takasuka, T., Mio, T., Adachi, M., Fujii, Y., Miyamoto, C., Arisawa, M., Furuichi, Y., Watanabe, T. (1995) Characterization and gene cloning of 1,3- β -D-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **231**, 845-54
- Konomi, M., Kamasawa, N., Takagi, T., and Osumi, M. (2000) Immunoelectron microscopy of fission yeast using high pressure freezing. *Plant Morphol* **12**, 20–31
- Konomi, M., Fujimoto, K., Toda, T., and Osumi, M. (2003) Characterization and behaviour of α -glucan synthase in *Schizosaccharomyces pombe* as revealed by electron microscopy *Yeast* **20**, 427-438

- Kota, J. and Ljungdahl, P. O. (2005) Specialized membrane-localized chaperones prevent aggregation of polytopic proteins in the ER. *J Cell Biol* **168**, 79–88
- Kimura, T., Hosoda, Y., Sa, Y., Horibe, T. and Kikuchi, M. (2005) Interactions among yeast protein-disulfide isomerase proteins and endoplasmic reticulum chaperone proteins influence their activities. *J Biol Chem* **280**, 31438-31441
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lesage, G. and Bussey, H. (2006) Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Mol Biol Rev* **70**, 317-343
- Lewis, M. J., Nichols, B. J., Prescianotto-Baschong, C., Riezman, H. and Pelham, H. R. B. (2000) Specific retrieval of the exocytic SNARE Snc1p from early yeast endosomes. *Mol Biol Cell* **11**, 23–38
- Li, H., Pagé, N., and Bussey, H. (2002) Actin patch assembly proteins Las17p and Sla1p restrict cell wall growth to daughter cells and interact with cis-Golgi protein Kre6p. *Yeast* **19**, 1097-1112
- Liang, Y., Morozova, N., Tokarev, A. A., Mulholland, J. W. and Segev, N. (2007) The role of Trs65 in the Ypt/Rab guanine nucleotide exchange factor function of the TRAPP II complex. *Mol Biol Cell* **18**, 2533–2541
- Lynch-Daya, M.A., Bhandari, D., Menon, S., Huang, J., Cai, H., Bartholomew, C.R., Brumell, J.H., Novick, S. and Klionsky, D. J. (2010) Trs85 directs a Ypt1 GEF, TRAPP III, to the phagophore to promote autophagy, *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 7811-7816
- Magnelli, P., Cipollo, J. F. and Abeijon, C. (2002) A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and [beta]-1,6-Glucan fine structure. *Anal Biochem* **301**, 136–150

- Meikle, P. J., Bonig, I., Hoogenraad, N.J., Clarke, A. E. and Stone B. A. (1991) The location of (1→3)- β -glucans in the walls of pollen tubes of *Nicotiana glauca* using a (1→3)- β -glucan-specific monoclonal antibody. *Planta* **185**, 1-8
- Montijn, R. C., Vink, E., Müller, W. H., Verkleij, A. J., Ende, H. V. D., Henrissat, B., Klis, F.M. (1999) Localization of synthesis of β -1, 6-Glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **181**, 7414–7420
- Montijn, R. C., Rinsum, J., V., Schagen, F. A. V. and Klis, F. M. (1994) Glucomannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* contain a novel type of carbohydrate side chain. *J Biol Chem* **269**, 19338-19342
- Nakamata, K., Kurita, T., Bhuiyan, M. S., Sato, K., Noda, Y., and Yoda, K. (2007) *KEG1/YFR042w* encodes a novel Kre6-binding ER membrane protein responsible for β -1, 6-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **282**, 34315–34324.
- Nishihama, R., Schreiter, J. H., Onishi, M., Vallen, E. A., Hanna, J., Moravcevic, K., Lippincott, M. F., Han, H., Lemmon, M. A., Pringle, J. R. and Bi, E. (2009) Role of Inn1 and its interactions with Hof1 and Cyk3 in promoting cleavage furrow and septum formation in *S. cerevisiae*. *J Cell Biol* **185**, 995–1012
- Pagé, N., Gérard-Vincent, M., Ménard, P., Beaulieu, M., Azuma, M., Dijkgraaf, G. J. P., Li, H., Marcoux, J., Nguyen, T., Dowse, T., Sdicu, A. M. and Bussey, H. (2003) A *Saccharomyces cerevisiae* genome-wide mutant screen for altered sensitivity to K1 killer toxin. *Genetics* **163**, 875–894
- Parent, S. A., Nielsen, J. B., Morin, N., Chrebet, G., Ramadan, N., Dahl, A. M., Hsu, M. J., Bostian, K. A., Foor, F. (1993) Calcineurin-dependent growth of an FK506- and CsA-hypersensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* **139**, 2973-2984

- Parlati, F., Dominguez, M., Bergeron J. J. M. and Thomas, D. Y. (1995) *Saccharomyces cerevisiae* *CNE1* encodes an endoplasmic reticulum (ER) membrane protein with sequence similarity to calnexin and calreticulin and functions as a constituent of the ER quality control apparatus. *J Biol Chem* **270**, 244-253
- Powers, J. and Barlowe, C. (1998) Transport of Axl2p depends on Erv14p, an ER-vesicle protein related to the *Drosophila* cornichon gene product. *J Cell Biol*, **142**, 1209–1222
- Roemer, T., and Bussey, H. (1991) Yeast beta-glucan synthesis : *KRE6* encodes a predicted type II membrane protein required for glucan synthesis *in vivo* and for glucan synthase activity *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 11295-11299
- Roemer, T., Delaney, S., and Bussey, H. (1993) *SKN1* and *KRE6* define a pair of functional homologs encoding putative membrane proteins involved in beta-glucan synthesis. *Mol Cell Biol* **13**, 4039-4048
- Roemer, T., Delaney, S., Paravicini, G, Payton, M. A. and Bussey, H. (1994) Characterization of the yeast (1→6)-beta-glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions between the *PKC1* pathway and extracellular matrix assembly. *J Cell Biol* **13**, 4039-4048
- Shahinian, S. and Bussey, H. (2000) β -1,6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **35**, 477-489
- Shahinian, S., Dijkgraaf, G. J. P., Sdicu, A. M., Thomas, D. Y., Jakob, C. A., Aebi, M. and Bussey, H. (1998) Involvement of protein *N*-glycosyl chain glucosylation and processing in the biosynthesis of cell wall β -1,6-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **149** 843–856
- Takagi, T., Ishijima, S. A., Ochi, H. and Osumi, M. (2003) Ultrastructure and behavior of actin cytoskeleton during cell wall formation in the fission yeast

- Schizosaccharomyces pombe*. *J Electron Microsc (Tokyo)* **52**, 161–174
- Takeuchi, M., Kimata, Y. and Kohno, K. (2008) *Saccharomyces cerevisiae* Rot1 is an essential molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **19**, 3514–3525
- Tang, H.Y., Xu, J. and Cai, M. (2000) Pan1p, End3p, and Sla1p, three yeast proteins required for normal cortical actin cytoskeleton organization, associate with each other and play essential roles in cell wall morphogenesis. *Mol Cell Biol* **20**, 12–25
- Trilla, J. A., Durán, A. and Roncero, C. (1999) Chs7p, a new protein involved in the control of protein export from the endoplasmic reticulum that is specifically engaged in the regulation of chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **145**, 1153-1163
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T. A., Judson, R. S., Knight, J. R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S. and Rothberg, J. M. (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **403**, 623-627
- Valdez-Taubas, J. and Pelham, H. R. B. (2003) Slow diffusion of proteins in the yeast plasma membrane allows polarity to be maintained by endocytic cycling. *Current Biol* **13**, 1636–1640
- Valdivia, R.H. and Schekman, R. (2003) The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 10287–10292
- Vink, E., Rodriguez-Surez, R.J., Gérard-Vincent, M., Ribas, J. C., de Nobel, H., Ende, H. V. D., Durán, A., Klis, F. M., and Bussey, H. (2004) An *in vitro* assay for (1→6)-β-D-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **21**, 1121-1131

謝辞

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

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

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

K1 killer toxin の生産株をいただき、K1 killer toxin 感受性の評価方法について御助言をいただきました、酒類総合研究所 醸造技術基盤研究部門 部門長、下飯仁博士に心から感謝いたします。

免疫電子顕微鏡解析、並びにその結果の解釈について御助言をいただきました、日本女子大学名誉教授、総合画像研究支援理事、大隅正子博士に心から感謝します。

免疫電子顕微鏡解析、並びにその結果の解釈について御助言をいただきました、日本女子大学バイオイメージングセンター研究員、高木智子博士に心から感謝します。

毎日の研究生活についてや研究、実験の方法まで数々の御助言をいただきました、荒井斉介博士に心から感謝いたします。

毎日の研究生活についてや研究、実験の方法まで数々の御助言をいただきました、佐藤啓介博士に心から感謝いたします。

一日のうち大半の時間を共に過ごし、公私共に大変お世話になりました、分

子生命工学研究室のみなさんおよび卒業生の方々に心から感謝いたします。

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