

論文題目

酵母 *GAS1* 遺伝子の関与する細胞壁生合成機構の研究

応用生命工学専攻
平成 10 年度博士課程進学
氏名 富重斉生
指導教官 依田幸司

目次

序論	1
第1章 <i>GAS1</i> 遺伝子破壊と合成致死を示す変異株の単離と 合成致死遺伝子の同定	13
第1節 実験材料と方法	14
第2節 結果	42
第3節 考察	69
第2章 <i>KEX2</i> の細胞壁合成における役割と <i>GAS1</i> 破壊との合成致死性の解析	79
第1節 実験材料と方法	81
第2節 結果	88
第3節 考察	97
総括	101
参考文献	105
謝辞	121

略号表

CFW	Calcofluor white
CIAP	Calf intestine alkaline phosphatase
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ER	Endoplasmic reticulum
GAP	GTPase activating protein
GEF	GTP-GDP exchange factor
GPI-CWP	Glycosylphosphatidylinositol-anchored cell wall protein
GTPase	Guanosine triphosphatase
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
HOG	High osmolarity glycerol
HPLC	High performance liquid chromatography
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
O.D.	Optical density
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylene glycol
PI-PLC	Phosphatidylinositol-specific phospholipase C
PIR-CWP	Protein with internal repeat-cell wall protein
PVDF	Polyvinylidene difluoride
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate-polyacrylamidegel electrophoresis
TX-100, 114	Triton X-100, 114
UDP-glucose	Uridine 5'-triphosphate-glucose
dNTP	deoxynucleoside triphosphate
r.t.	room temperature
ura	uracil
trp	tryptophan

序論

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において細胞壁は、細胞の乾燥重量の約 30%をも占める構造物である。スフェロプラスト化した細胞が、浸透圧保護剤を添加しない限り、破裂、溶菌してしまう事実は、細胞壁が生育に必須であることを示している。

この細胞壁は三つの成分、グルカン、マンナン蛋白質、キチンによって構成されている。電子顕微鏡写真（図 A）を見ると、細胞壁は二層の層状構造をとっていることが明らかである。内側の電子密度の低い、透けて見える層はグルカンに富んでおり、外側の電子密度の高い、濃く染まる層はマンナン蛋白質に富んでいる。グルカン、マンナン蛋白質はそれぞれ、約 60、40%を占め、主要な構成成分であり、写真からは判別できないキチンは、残りの 1%前後を占めるに過ぎない。グルカンは細胞の形態を規定し、機械的なストレスから細胞を保護する構造的な剛性を細胞壁へ与えている。マンナン蛋白質は細胞壁の透過性を制限して、ペリプラズムからの可溶性蛋白質の流失や、環境中から巨大分子の流入を防止している。キチンは量的には微量であるが、出芽時に合成量が上昇し chitin ring、primary septum を形成する成分であり、細胞分裂に必須である。

しかしこれらの構成成分の占める割合は、上述したように常に一定ではなく、細胞周期を通じて出芽からはじまる細胞分裂、mating 等のイベントや、環境中の浸透圧変化や薬剤の存在などに応じて刻々変化する。この様に細胞壁は、非常にダイナミックな一種のオルガネラであり、細胞の生育だけでなく、増殖にも必須である。

本論では、以下に各構成成分と本研究の目的について概説することにする。

1. β 1,3-グルカンとキチン

β 1,3-グルカンは細胞壁の主要な構成要素であり、 β -グルカンの約 80%を占める。グルコース分子が β 1,3-結合したポリマーであり、1 分子あたり 1,500 グルコース残基からなる直鎖状の分子である[Manner et al., 1973a]。そして約 3%の β 1,6-結合により枝分れした分子が、直鎖状の分子に結合した構造をとっている。キチンは N-アセチルグルコサミン分子が β 1,4-結合したポリマーであり、 β 1,3-グルカンの非還元末端と結合する[Kollar et al., 1995]。 β 1,3-

グルカンは、化学的にアルカリ可溶性、不可溶性の画分に分類されるが、この可溶性の差はキチンとの結合の有無によって生じ、キチンが結合したものがアルカリに不溶になる。さらに *in vivo* では、アルカリ可溶性 β 1,3-グルカンはキチンとの結合によりアルカリ不可溶性 β 1,3-グルカンに変わる前駆体であることが明かにされた[Hartland *et al.*, 1994]。細胞壁の剛性を決定しているのは、このキチンを含む、アルカリ不可溶性の β 1,3-グルカンであることが、マンナン蛋白質、アルカリ可溶性グルカンを除いた後でも、細胞が形態を維持することから示された[Fleet & Manners, 1976; Kopecka *et al.*, 1974]。

形態学的、化学的な解析が進められてきた β 1,3-グルカンであるが、その合成酵素をコードする遺伝子については長いこと不明であった。明かであったのは、合成酵素が plasma membrane 画分にあること、UDP-glucose を基質とするということであった[Shematek *et al.*, 1980]。その後、一斉に複数のグループによって β 1,3-グルカン合成酵素複合体と、それをコードする遺伝子のクローン化が報告された[Inoue *et al.*, 1995; Garrett-Engele *et al.*, 1995; Ram *et al.*, 1995; Douglas *et al.*, 1994; Eng *et al.*, 1994; el-Sherbeini *et al.*, 1995; Castro *et al.*, 1995]。その結果 *FKS1*、*FKS2* は複数膜貫通型蛋白質であり、細胞周期、炭素源によってそれぞれの転写、発現が制御される触媒サブユニットをコードすることが明かとなった。また、GEF Rom2p、GAP Sac7p、Bem2p によって低分子量 GTPase Rho1p の活性が調節され、活性化型 Rho1p が調節、制御サブユニットとして *Fks1p* に結合することで、活性化を時間、空間的に制御している[Qadota *et al.*, 1996; Drgonova *et al.*, 1996]。

2. β 1,6-グルカン[Shahinian & Bussey, 2000]

β 1,6-グルカンは、グルコース分子が β 1,6-結合したポリマーであり、1分子あたり約 350 グルコース残基からなり[Kollar *et al.*, 1997]、枝分れの多い分子である[Manners *et al.*, 1973b; Boone *et al.*, 1990] が、分岐点は β 1,3-結合による。 β 1,3-グルカンに比べ、量的に少ない分子であるが、 β 1,3-グルカン、キチン、GPI-CWP の残りの anchor 部分を結び付ける細胞壁のポリマー構築においては、非常に重要な役割を果たしている[Kollar *et al.*, 1997]。 β 1,3-グルカン合成酵素、キチン合成酵素が上述のようにサブユニット構成も明らかになり、plasma membrane に局在しているのに対し、 β 1,6-グルカン合成酵素は詳細が未だに明らかになっていない。その合成に関与することが明かになっている遺伝子の多くは、K1 killer toxin に耐

性を示す *kre* 変異株 (Killer toxin resistance) のスクリーニングから取得された[Boone *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1993]。また、細胞壁のキチン鎖に結合し、アセンブリを阻害する CFW に対する感受性を指標としたスクリーニングで取得された *cwh* 変異株 (Calcofluor white hypersensitive) のなかにも、K1 killer toxin 耐性をもつものが存在し、 β 1,6-グルカン合成に関与する遺伝子が補完するように取得された。*kre* 変異株は実際に、 β 1,6-グルカンのサイズと量が減少するだけでなく、細胞壁の異常な形態、生育速度の遅延、細胞壁マンナン蛋白質 α -agglutinin を培地中に漏出するなどの表現型を示した[Brown *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 1995]。

遺伝子産物の局在の解析から、*KRE5*、*CWH41*、*ROT2* 産物は ER に、*KRE6* 産物は Golgi に、*KRE11* は細胞質に、*KRE9*、*KRE1* は細胞表層に局在していた。このようにほとんどが、分泌経路に沿って局在していたことから、 β 1,6-グルカンは細胞外へ分泌される間に各オルガネラで逐次、伸長、合成されると推定されている。最近では、細胞切片を β 1,6-グルカンに対する抗体を用いて immunogold ラベルすると、金粒子が細胞表層のみを標識することから β 1,6-グルカン合成は、細胞表層であるとする報告が出された[Montijn *et al.*, 1999]。しかし、細胞内に存在する β 1,6-グルカン前駆体は、大きさの面と輸送途中であるが故に量的な面から抗体では検出できないレベルである可能性も除外できず、決定的な証拠は得られていない。

β 1,6-グルカン合成のもう一つの謎は、合成に関与するとされる分子が実際にどのような形で機能しているかである。*KRE* 産物の中で β 1,6-グルカン合成活性をとられたものはないが、*Kre5p* は *Drosophila*[Parker *et al.*, 1995]と *S. Pombe*[Fernandez *et al.*, 1996]の UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase (UGGT)、*Cwh41p*、*Rot2p* は、glucosidase I、II に有意に相同性を示す。UGGT は、ER において Calnexin と glucosidase I、II と協調して糖蛋白質の misfolding を補正する[Helenius & Aebi, 2001]。*S. cerevisiae* では、UGGT 活性は検出されおらず、 β 1,6-グルカン合成に直接的に、或いは間接的に機能するのもも現在のところ不明である。

3. cell integrity pathway[Gustin *et al.*, 1998; Heinisch *et al.*, 1999]

細胞壁合成を大きな枠組みから制御している cell integrity pathway について述べる。

Cell integrity pathway とは、Pkc1p を頭においた MAPK cascade (Bck1p-(Mkk1p, Mkk2p)-Slt2p/Mpk1p) であり、その名の通り細胞壁の剛性を維持するために機能するシグナル伝達経路である。細胞周期が進むに従い、出芽酵母は分裂、成長を繰り返す。こうした形態変化は細胞壁の柔軟な変化、キチナーゼやグルカナーゼによる部分的な分解と合成酵素による補修がなくては起こり得ない。形態変化に伴う細胞壁剛性の変化はシグナル伝達され、下流の細胞壁合成関連遺伝子の転写を活性化する。こうした性質から、細胞壁欠損株において cell integrity pathway の機能は、生存に必須な場合が多い。このような細胞壁の欠損によって生じるストレス、薬剤、低浸透圧、熱ショックなどのストレスは、plasma membrane に局在する膜蛋白質 Wsc1p、Mid2p によって感知される。これらのストレスセンサー蛋白質には、まだホモログが存在し、ストレスの種類に応じて各々が機能すると考えられている。ストレスシグナルはセンサー Wsc1p、Mid2p への RHO1 GEF である Rom2p の結合[Philip & Levin, 2001]によって伝達され、そこで活性化された Rho1p の Pkc1p 活性化により、下流の cell integrity pathway の活性化が起こると考えられている。cell integrity pathway は Cdc28p kinase によっても活性化され、MAPK である Slt2p のリン酸化は G1/S 期にピークに達する。上記のように与えられたストレスに対応するだけでなく、プログラムされた転写の活性化も担っている。

4. マンナン蛋白質と本研究の目的

マンナン蛋白質は、グルカン-キチンネットワークの隙間を埋めるよう外側を覆い、細胞壁の透過性を制限する役割を担っている。マンナン蛋白質は、まず細胞壁に共有結合しているか否かに分けられる。共有結合していないマンナン蛋白質は、静電的な相互作用によりグルカン-キチンネットワーク内に留められていると推定されている。細胞壁に共有結合するマンナン蛋白質は、その結合様式により、2 つに分類されている。PIR-CWP と GPI-CWP である。

PIR-CWP は、可溶性の分泌蛋白質でアミノ酸配列上、N 末に分泌のためのシグナルシーケンスと分子内に繰り返し配列をもつ。またセリン/スレオニン-リッチで非常に多くの O-糖鎖の修飾を受ける。 β 1,3-グルカナーゼ処理あるいは、O-糖鎖を切る β -エリミネーションに類似の穏やかなアルカリ処理によって、細胞壁から遊離する[Mrsa et al., 1997;

Mrsa & Tanner, 1999]ことから、O-糖鎖を介して β 1,3-グルカンに共有結合していると推定されている。*S. cerevisiae* ゲノムには 4 種類の PIR-CWP をコードしている *PIR1-4* が存在している[Smits *et al.*, 1999]。

GPI-CWP は、アミノ酸配列上 N 末の分泌のためのシグナルシーケンスと、C 末に GPI-anchor 付加のための 20-30 アミノ酸の疎水性配列からなるシグナルシーケンスをもつ。PIR-CWP 同様にセリン/スレオニン-リッチであり、N-、O-糖鎖の修飾を受け、分子量の著しい増幅を受けるものが多い。

GPI-anchor の生合成は PI への GlcNAc 付加から始まり、最後に EtN-P のアミノ基が GPI-anchor 型蛋白質前駆体 ω site (後述) のカルボキシル基とアミド結合を形成して GPI-anchor 型蛋白質が誕生するまで、全て ER で行われる (図 B)。GPI-anchor の主鎖骨格は真核生物で広く保存されている。最近特に Kinoshita らは、動物細胞における GPI-anchor 合成不全株 *pig* 変異株と出芽酵母のゲノム全塩基配列を利用した相補的な研究により、anchor 主鎖の合成のみならず、側鎖修飾に関与する酵素遺伝子を次々と同定している[Hong *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 1999; Oishi *et al.*, 2001]。主鎖、側鎖に関わらず、合成に関与する遺伝子には必須なものが多く、GPI-anchor の存在意義を示している。GPI-CWP は、小胞体で既製の anchor を *en bloc* に付加された後、ゴルジ体を経て plasma membrane まで輸送される。plasma membrane に一時係留された後に、GPI-anchor の一部で切断され細胞壁グルカンに共有結合する。この過程は、GPI-CWP である性凝集素 α -agglutinin をレポーターに、各輸送過程の *sec* 変異株を用いた pulse-chase によって詳細な解析が行われた[Lu *et al.*, 1994]。これにより、 α -agglutinin が GPI-anchor によっていったん plasma membrane 上に局在すること、GPI-anchor を切られた後、可溶性中間体を経て細胞壁へ共有結合することが示された。

GPI-anchor 型蛋白質の ER-Golgi 間の輸送には、Key となるいくつかの因子が存在する。まず GPI-anchor 型蛋白質は、GPI-anchor を付加されることが Golgi 以降の輸送、修飾、成熟化に必要である[Doering & Schekman, 1997]。Anchor 付加のシグナルシーケンスが切断されないような変異体 Gas1p は、Golgi へ到達して糖鎖修飾されるが、ER へ戻ってしまう[Letourneur & Cosson, 1998]。次に、セラミド合成の最初のステップの変異株 *lcb1-100* にお

いて[Sutterlin *et al.*, 1997]、あるいは野生株へのセラミド合成阻害剤 myriocin [Horvath *et al.*, 1994]の処理によって、ER-Golgi 間の輸送が GPI-anchor 型蛋白質特異的に遅延する。また、ER-Golgi 間の輸送には、Emp24p、Erv25p といった、酵母 p24 ファミリー蛋白質が GPI-anchor 型蛋白質の膜レセプターとして効果的なソーティング、輸送に機能している[Schimmoller *et al.*, 1995; Belden & Barlowe, 1996; Marzioch *et al.*, 1999; Muniz *et al.*, 2000]。

ER で他の cargo とは異なる分泌小胞にソーティングされる[Muniz *et al.*, 2001]ことと、セラミドの必要性から小胞の膜成分も異なっていると容易に推察される[Horvath *et al.*, 1994; Sutterlin *et al.*, 1997]。このセラミド、GPI-anchor 型蛋白質を含む分泌小胞は、Golgi に到達して以降セラミドからスフィンゴ脂質の合成、GPI-anchor 型蛋白質の修飾、脂質部分のリモデリングを受けると推察される。この間、他の cargo とは ER から一定して分離された膜ドメインを保つのか、いったん解離してまた Golgi を出る時にソーティングされるのかは、不明である。ER でコア糖鎖の修飾を受けた GPI-anchor 型蛋白質は、Golgi 間を進むに従い、*N*-、*O*-糖鎖ともにさらに伸長反応を受け、成熟型となる。

一方、GPI-anchor 型蛋白質の Golgi-plasma membrane 間の輸送については、糖鎖修飾などのマーカーが利用できないこともあるためかほとんど報告がない。ER-Golgi 間輸送時のようにレセプターの存在は不明であるが、他の plasma membrane 蛋白質とは異なる脂質組成のソーティングプラットフォームによって輸送、ソーティングされることが、動物細胞での研究や、ER-Golgi 間輸送の流れから推定される。

これまでは、細胞壁の化学的、物理的各種操作によりマンナン蛋白質の抽出が試みられてきた。最近では、 β 1,3-グルカナーゼ処理によって Cwp1p、Cwp2p、Tip1p と 3 つの GPI-CWP が細胞壁から溶出された[Van der vaart *et al.*, 1995]。Cwp1p は細胞壁を *Rarobacter faecitabidus* ProteaseI (RPI) で処理することによっても溶出される[Shimoi *et al.*, 1995]。他にも、DTT 存在下 SDS による細胞壁の抽出で、既知を含む 7 つの可溶性細胞壁蛋白質 (Scw=soluble cell wall protein) が同定された (表 2-1)。

S. cerevisiae のゲノム全塩基配列が明かになり、まず効力を発揮したのは GPI-CWP の同定においてである。GPI-CWP の特徴的な一次配列は、ORF 検索の判断基準となり、58 ORFs[Caro *et al.*, 1997]、53ORFs[Hamada *et al.*, 1998a]と推定ではあるが、50 を超える ORF

が GPI-CWP をコードすることが明かになった。この頃、GPI-anchor 型蛋白質には、最終的に細胞壁に共有結合されるもの (GPI-CWP) と、Gas1p のように細胞質膜に留まるもの (GPI-anchor 型膜蛋白質) の 2 種が存在していると考えられていた。GPI-CWP の C 末部分と α -galactosidase 等、酵素活性をもつレポーターとの融合蛋白質の局在を、活性を指標に検討した結果[Screuder *et al.*, 1993; van Berkel *et al.*, 1994; van der Vaart *et al.*, 1996, 1997]、融合蛋白質もまた細胞壁へ局在し、GPI-CWP の C 末、特に GPI-anchor 付加されるアミノ酸 (ω site) 付近に、細胞壁への局在化シグナルが存在すると予想された。しかし、GPI-anchor 型膜蛋白質の ω site から 1-3 アミノ酸残基 N 末側 (ω -1 \sim ω -3) には、塩基性アミノ酸が 2 つ以上並ぶという共通項が見い出されたが、GPI-CWP にはシグナル様の配列は見い出されなかった。前記の Hamada *et al.* は各 ORF 翻訳産物の C 末と、レポーター蛋白質との融合蛋白質の局在性から、これらの ORFs を分類した[Hamada *et al.*, 1998a]。さらに、C 末部分に site directed mutagenesis をかけ、局在性が変化するアミノ酸の種類、位置を網羅的に追った[Hamada *et al.*, 1998b]。その結果、 ω -2 と ω -4 または -5 に相当するアミノ酸が細胞壁への取込みに重要であり、ポジティブに働くシグナルの存在が初めて明かになった。また GPI-CWP と GPI-anchor 型膜蛋白質の局在性に、明瞭な境界はなく細胞壁への取込み効率が高いものから低いものまで、様々な程度を示す[Hamada *et al.*, 1998a, 1999]。

シグナル様配列は明かになったものの、GPI-CWP の細胞壁への転移に関与する分子と機構については、未だ不明である。しかし、酵母細胞の生育に必須な過程であり基礎的に非常に興味深い。また応用的には人や家畜の真菌症において、真菌細胞壁の GPI-CWP が感染に重要な役割を果たしており、GPI-CWP の細胞壁への転移の過程を抗真菌剤開発のための有効なターゲットとして、解明が待たれている。そこで本研究では、この GPI-CWP の細胞壁への転移に関与する分子と機構を明らかにすることを目的とした。

Gas1p は、1) G1/S 期の移行の際、不安定な蛋白質を同定することを目的とした、同調培養した細胞から調製したサンプルの二次元電気泳動により、gp115 として取得された。後に不安定な分子種は、Gas1p の前駆体であることが判明した[Popolo *et al.*, 1984, 1986]。2) 酵母における GPI-anchor 型蛋白質を同定する目的で、細胞を TX-114 で可溶化、膜蛋

白質、GPI-anchor 型蛋白質を濃縮し、anchor を切断する PI-PLC 処理によって detergent 画分から可溶性画分に移行する蛋白質を追跡した結果、Gas1p (Glycophospholipid-anchored surface protein) を取得した[Conzelmann *et al.*, 1988]。以上の二つの生化学的なアプローチにより取得された。以降、Gas1p は plasma membrane に豊富に存在する GPI-anchor 型蛋白質であること、ER での 105kDa から Golgi での糖鎖修飾により、125kDa にシフトすることから、主に輸送のレポーター、GPI-anchor 付加に必要な配列の解析に用いられた[Nuoffer *et al.*, 1991, 1993]。細胞形態など Gas1p 自身の機能解析も行われてきたが、遺伝子破壊株では、野性株に比べ生育速度が遅くなる、形態は Multi-budded cell を示す、CFW 感受性を示す、 β 1,3-、 β 1,6-グルカンの付加した GPI-CWP を培地中に漏出する、野性株に比べ細胞壁糖組成の Man/Glc ratio が上昇する、といった表現型から、 β 1,3-グルカンのアセンブリに関与するということが示唆されるのみであった[Vai *et al.*,1991; Popolo *et al.*, 1993; Kapteyn *et al.*, 1997; Ram *et al.*, 1994, 1998]。最近になって β 1,3-グルカンを内部で切断して新たに生じた還元末端を、他の β 1,3-グルカンの非還元末端に結合させて β 1,3-グルカンを伸長させる、 β 1,3-glucanosyltransferase 活性をもつことが *in vitro*、recombinant Gas1p を用いて示された[Mouyna *et al.*, 2000]。

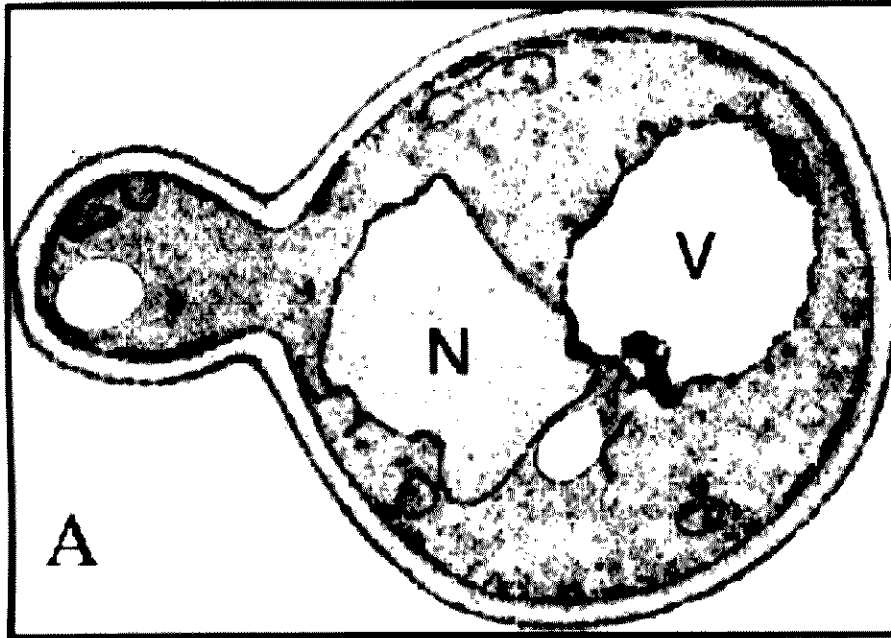
これまで、細胞壁関連遺伝子の網羅的なスクリーニングが行われてきたにもかかわらず、本研究の目的でもある GPI-CWP の転移に関与する分子、遺伝子は取得されていない。その主たる原因としては、機能重複遺伝子の存在が考えられる。

本研究では、細胞壁欠損株の中では上記のように明瞭な表現型を示す *gas1* 破壊株が、さらに *kre6* 破壊と合成致死を示す[Popolo *et al.*, 1997]ことに着目した。Kre6p は β 1,6-グルカン合成酵素と考えられ、その破壊株では細胞壁の β 1,6-グルカン量が 50%まで減少する[Roemer *et al.*, 1993, 1994]。そこで“*gas1 kre6* 二重破壊株の合成致死性は、 β 1,3-グルカンやキチンへの GPI-CWP の結合量の極度の減少による”という仮説をたてた (図 C)。GAS1 遺伝子破壊という、既に細胞壁への β 1,6-グルカンを介した GPI-CWP の転移が生存により必須になるような不全の生じた background を利用することで、目的の分子が機能重複遺伝子産物であっても互いに相補することができなくなると予想した。

ゲノム全塩基配列が明かになり、利用も自由な時に網羅的な、しかも古典的なスクリー

ニングはそぐわない。そこで、本研究では目的の分子に照準を合わせることで、*gas1* 破壊株を用いた合成致死スクリーニングを行うこととした。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は真核細胞のモデル生物として、細胞内種々の生理現象を解き明かす研究が進められている。一方で動物細胞には存在しない細胞壁は、こうした研究における解析をしばしば妨げている。しかし、細胞壁を研究対象とすることは、対象である生物を理解するためだけでなく、酵母を含めた真菌類と高等真核生物との相互作用が引き起こす、病疾を克服、予防するといった重要な使命を自然と帯びてくることが容易に想像される。本研究で得られた知見が、そのコンテキストにおいて理解、解明の一助となれば幸いである。



図A 野生型酵母 (SEY6210) の電子顕微鏡写真

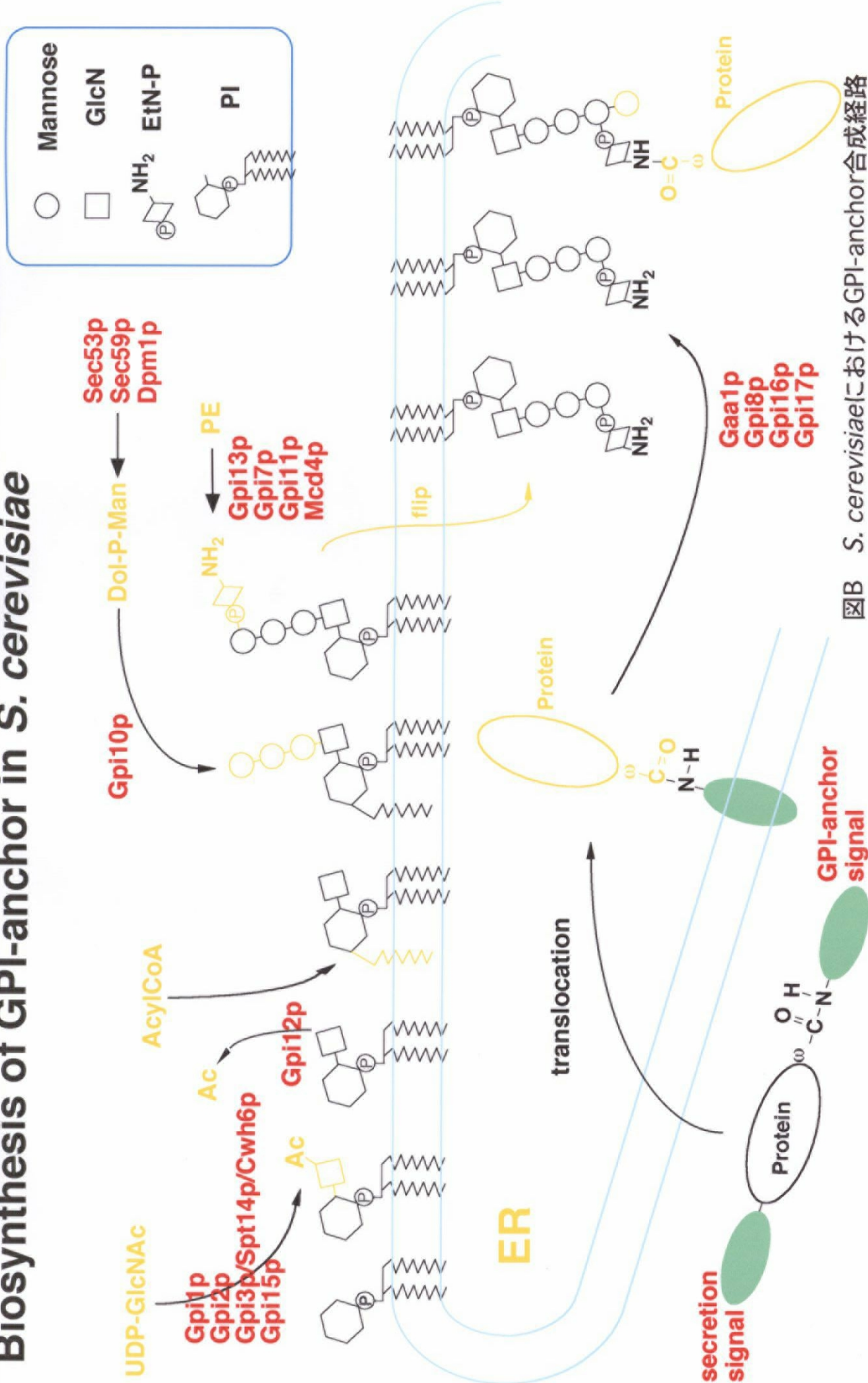
N: nucleus; V: vacuole

Holthuis JC, Nichols BJ, Pelham HR

The syntaxin Tlg1p mediates trafficking of chitin synthase III to polarized growth sites in yeast.

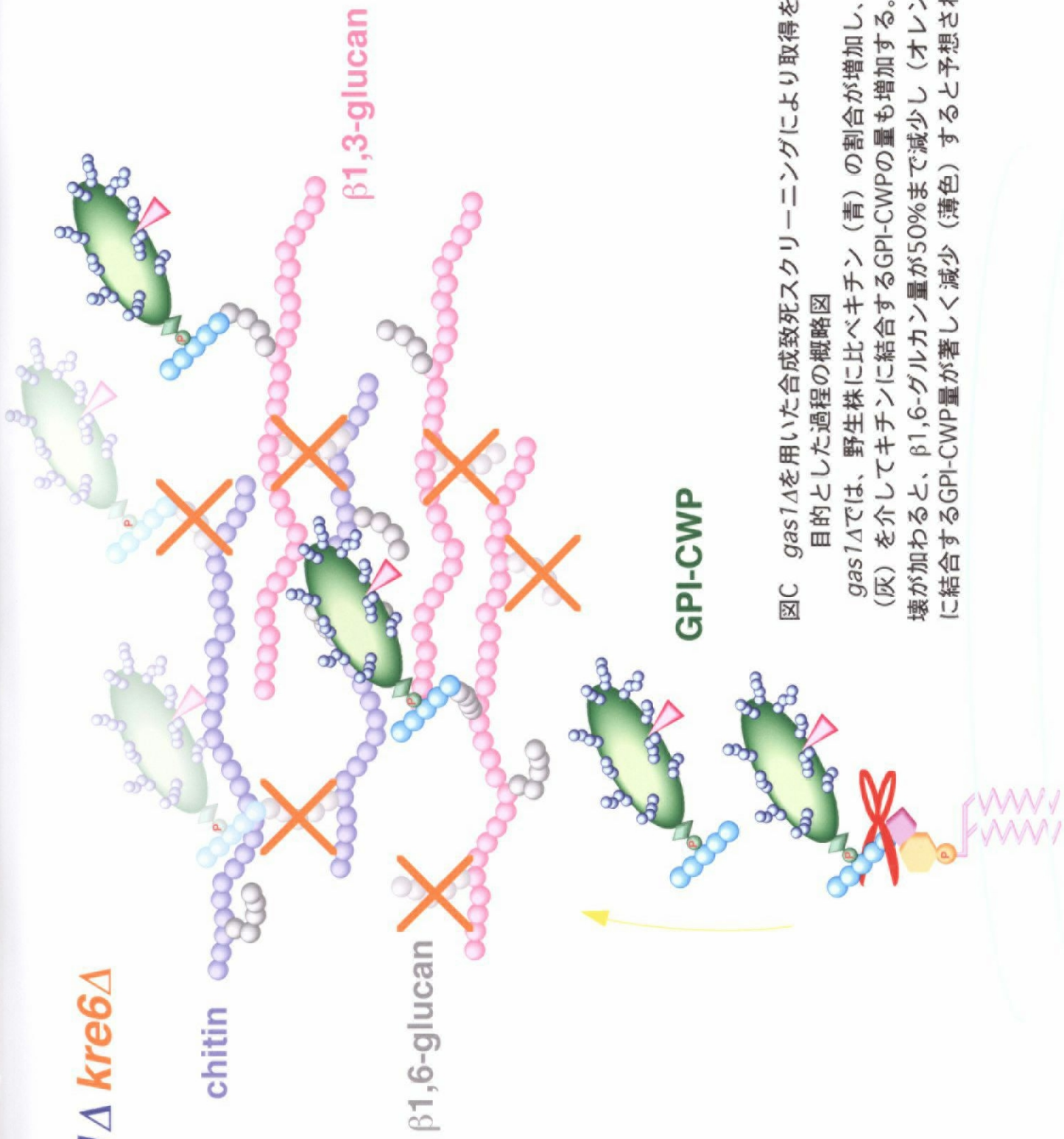
Mol Biol Cell 1998 Dec;9(12):3383-97 より転載

Biosynthesis of GPI-anchor in *S. cerevisiae*



図B *S. cerevisiae*におけるGPI-anchor合成経路
 図中、EtN-P付加のステップは推定
 flipの時期も推定

gas1Δ kre6Δ



図C *gas1*Δを用いた合成致死スクリーニングにより取得を
目的とした過程の概略図

*gas1*Δでは、野生株に比べキチン（青）の割合が増加し、 β 1,6-グルカン（灰）を介してキチンに結合するGPI-CWPの量も増加する。ここに*kre6*破壊が加わると、 β 1,6-グルカン量が50%まで減少し（オレンジX）、細胞壁に結合するGPI-CWP量が著しく減少（薄色）すると予想される。

第 1 章 *GAS1* 遺伝子破壊と合成致死を示す変異株の単離と合成致死遺伝子の同定

序

出芽酵母において *gas1* 破壊株では、 β 1,6-、 β 1,3-グルカンの付加した GPI-CWP が培地中に漏出する[Ram *et al.*, 1998]。そして β 1,6-グルカンを介してキチンに結合する GPI-CWP が、野生株では細胞壁全蛋白質量の 1-2%しか存在しないのに対して、*gas1* 破壊株では 40%まで増加するようになる[Kapteyn *et al.*, 1997]。*gas1* 破壊株はまた、*KRE6* の破壊により合成致死を示す[Popolo *et al.*, 1997]。*Kre6p* は β 1,6-グルカン合成酵素と考えられ、その破壊株では細胞壁の β 1,6-グルカン量が 50%まで減少する[Roemer *et al.*, 1993, 1994]。そこで“*gas1 kre6* 二重破壊株の合成致死性は、 β 1,3-グルカンやキチンへの GPI-CWP の結合量の極度の減少による”という仮説をたてた。この仮説に基づけば、 β 1,6-グルカンへの GPI-CWP の転移に働く遺伝子の変異もまた *gas1* 破壊株と合成致死性を示すはずである。そのような遺伝子を取得することを目的とし、*gas1* 破壊株を用いた合成致死スクリーニングを行った。本章では、スクリーニングの結果と取得した遺伝子の破壊株を用いた解析について述べる。

第一節 実験材料と方法

1-1-1. 実験材料

1-1-1-1. 菌株

Escherichia coli

Strain	Genotype
DH5 α	F, ϕ 80lacZ Δ M15, supE44 Δ lacU169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1
TOP10F	F {lacIq Tn10(TetR)} mcrAD(mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG
KC8	leuB600 pyrF::Tn5 hisB463 trpC9830 Δ lacX74 galU galK StraA r _k -

Saccharomyces cerevisiae

Strain	Genotype
YAT1628	MATa ade2 ade3 his7 leu2 ura3 can1 sap3
KA31	MATa/ α his3/his3 leu2/leu2 trp1/trp1 ura3/ura3
KA31-1A	MAT α his3 leu2 trp1 ura3
NTY1	KA31-1A cwp1 Δ ::HIS3
NTY2	KA31 MATa cwp1 Δ ::HIS3
NTY3	KA31-1A gas1 Δ ::LEU2
NTY7	MAT α ade2 ade3 his leu2 trp1 ura3
NTY8	MATa ade2 ade3 his leu2 trp1 ura3
NTY9	NTY7 gas1 Δ ::LEU2
NTY10	NTY8 gas1 Δ ::LEU2
NTY11	MATa/ α ade2/ade2 ade3/ade3 his3/his3 leu2/leu2 trp1/trp1 ura3/ura3
NTY19	KA31-1A ipt1 Δ ::TRP1
NTY22	NTY8 ipt1 Δ ::TRP1
NTY25	NTY11 gas1 Δ ::LEU2 ipt1 Δ ::TRP1

菌株 (続き)

Strain	Genotype
NTY30	KA31 <i>cwp1Δ::HIS3 ipt1Δ::TRP1</i>
HIY2	KA31 <i>MATa kex2Δ::URA3</i>
NTY31	KA31 <i>gas1Δ::LEU2 kex2Δ::URA3</i>
NTY37	KA31 <i>MATα kex2Δ::URA3</i>
NTY38	KA31 <i>MATa kex2Δ::URA3</i>
NTY40	KA31 <i>kre6Δ::HIS3/KRE6</i>
NTY45	KA31 <i>MATα kre6Δ::HIS3</i>
NTY46	KA31 <i>MATa kre6Δ::HIS3</i>
NTY47	KA31 <i>gas1Δ::LEU2 ipt1Δ::TRP1</i>
NTY48	KA31 <i>MATα ipt1Δ::TRP1</i>
NTY49	KA31 <i>MATa ipt1Δ::TRP1</i>
NTY51	KA31 <i>MATa gas1Δ::LEU2 ipt1Δ::TRP1</i>
NTY62	KA31 <i>MATα cwp1Δ::HIS3 ipt1Δ::TRP1</i>
NTY71	KA31 <i>MATa wsc1Δ::HIS3</i>
NTY72	KA31 <i>dfg5Δ::TRP1/DFG5</i>
NTY74	NTY11 <i>dfg5Δ::TRP1/DFG5</i>
NTY75	KA31 <i>ykl046cΔ::TRP1/YKL046c</i>
NTY77	KA31 <i>ykl046cΔ::LEU2/YKL046c</i>
NTY79	NTY11 <i>ykl046cΔ::TRP1/YKL046c</i>
NTY80	NTY11 <i>ykl046cΔ::LEU2/YKL046c</i>
NTY82	NTY11 <i>bck1Δ::URA3/BCK1</i>
NTY83	KA31 <i>bck1Δ::HIS3/BCK1</i>
NTY85	NTY11 <i>bck1Δ::URA3/BCK1</i>
NTY87	KA31 <i>big1Δ::URA3/BIG1</i>
NTY89	KA31 <i>MATa mid2Δ::HIS3</i>

菌株 (続き)

Strain	Genotype
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
Y00897	BY4741 <i>gas1Δ::kanMX4</i>
Y02771	BY4741 <i>sur1Δ::kanMX4</i>
Y03173	BY4741 <i>csg2Δ::kanMX4</i>
NTY91	<i>MATa/α his3 leu2 ura3 trp1/TRP1 gas1Δ::LEU2/GAS1 sur1Δ::kanMX4/SUR1</i>
NTY92	<i>MATa/α his3 leu2 ura3 trp1/TRP1 gas1Δ::LEU2/GAS1 csg2Δ::kanMX4/CSG2</i>
NTY93	KA31 <i>MATα wsc1Δ::HIS3</i>
NTY94	KA31 <i>MATa dfg5Δ::TRP1</i>
NTY95	KA31 <i>MATα dfg5Δ::TRP1</i>
NTY98	KA31 <i>MATα ykl046cΔ::LEU2</i>
NTY99	KA31 <i>MATa ykl046cΔ::LEU2</i>
NTY104	NTY11 <i>MATa ykl046cΔ::LEU2</i>
NTY105	NTY11 <i>MATα ykl046cΔ::LEU2</i>
NTY106	NTY11 <i>MATa ykl046cΔ::TRP1</i>
NTY107	NTY11 <i>MATα ykl046cΔ::TRP1</i>
NTY116	KA31 <i>MATα mid2Δ::HIS3</i>
NTY118	KA31 <i>MATα big1Δ::URA3</i>
NTY120	KA31 <i>MATa big1Δ::URA3</i>

1-1-1-2. プラスミド

plasmid	Description
pRS314	<i>TRP1</i> -marked centromere vector
pRS416	<i>URA3</i> - marked centromere vector

pCOM3	<i>ADE3</i> (<i>Ade3-2p</i>), <i>URA3</i> -marked centromere vector
pNT53	<i>GAS1</i> in pRS314
pNT68	<i>GAS1</i> in pCOM3
pNT99-2	<i>GAL1::GAS1</i> in pRS416

1-1-1-3. 合成 DNA

Primer name	Sequence*	Description
NT15	5' <u>AAGCGAGCTGGGCCCTATCATAGC</u> 3'	<i>GAS1</i> Fw <i>ApaI</i>
NT16	<u>TCATACAAGCCCCGGGATGAGAGAAG</u>	<i>GAS1</i> Re <i>SmaI</i>
NT38	<u>GGACTCGTCGACTTTTAATTTT</u>	<i>KRE6</i> Fw <i>SalI</i>
NT39	<u>CTTATTCCTGCAGAGTTAATAA</u>	<i>KRE6</i> Re <i>PstI</i>
NT46	<u>AAGTGAGGATCCAACATA</u>	<i>KRE6</i> disruption <i>BamHI</i>
NT51	<u>TTATTTAAGCTTAATGTATTG</u>	<i>IPT1</i> Re <i>HindIII</i>
NT52	<u>GATCCGCTCGAGTAGACTATA</u>	<i>IPT1</i> disruption <i>XhoI</i>
NT57	<u>TGTATGGGATCCTGGCATTGT</u>	<i>DFG5</i> Fw <i>BamHI</i>
NT58	<u>AAATTGCGGGTTCGACGGGCTGCAG</u>	<i>DFG5</i> Re <i>SalI</i>
NT61	<u>ATTGTCGGATCCGCCTGAGAT</u>	<i>BIG1</i> Fw <i>BamHI</i>
NT62	<u>TAACGAACCCCTCGAGAAGATACTT</u>	<i>BIG1</i> Re <i>XhoI</i>
NT65	<u>CGCACTGGATCCCAGCTTATA</u>	<i>YKL046c</i> Fw <i>BamHI</i>
NT66	<u>TGTCGACATCTCGAGGTGACA</u>	<i>YKL046c</i> Re <i>XhoI</i>
NT67	<u>ATGAGAGAGCTCGGCCATGC</u>	<i>BIG1</i> disruption <i>SacI</i>

*: 制限酵素サイトは配列中下線で示す。

1-1-1-4. 試薬（特に断わりのない限り特級を使用した。）

大腸菌生育培地

1) **LB+Amp**

Yeast extract (Becton Dickinson) 0.5% (0.5g/100ml)

Tryptone peptone (Becton Dickinson) 1% (1g/100ml)

NaCl (国産化学) 0.5% (0.5g/100ml)

上記を混合、オートクレーブ後、約 70℃に冷めてからアンピシリンナトリウムを 100 µg/ml になるように粉末で加えた。

2) **10×M9 salts**

Na₂HPO₄ · 12H₂O (国産化学) 11.2g/100ml

KH₂PO₄ (国産化学) 1.5g/100ml

NH₄ Cl (国産化学) 0.5g/100ml

NaCl 0.5g/100ml

3) **M9+Amp plate (-trp)**

A. 10×M9 salts 10ml/100ml

B. Casamino acid (Becton Dickinson) 0.2g/100ml

Adenine sulfate dihydrate (和光純薬工業) 1ml/100ml

Uracil (和光純薬工業) 1ml/100ml

Histidine hydrochloride monohydrate(和光純薬工業)0.2ml/100ml

以上を水で 30ml にメスアップ

C. glucose (国産化学) 0.4% (0.4g/100ml)

Agar (国産化学) 1.5g/100ml

以上を水で 60ml にメスアップ

オートクレーブ後 A、B、C と下の試薬を混ぜ、プラスチックシャーレに注いだ。

1M MgSO ₄ (国産化学)	1mM (0.1ml/100ml)
100mM CaCl ₂ (国産化学)	0.1mM (0.1ml/100ml)
Ampicillin sodium (和光純薬工業)	50μg/ml (5mg/100ml)

4) SOB

Tryptone	2%(4g/200ml)
Yeast Extract	0.5%(1g/200ml)
1M NaCl	10mM(2ml/200ml)
1M KCl (国産化学)	2.5mM(0.5ml/200ml)

上記を混合して、オートクレーブ後

1M MgCl ₂ (国産化学)	10mM(2ml/200ml)
1M MgSO ₄ (国産化学)	10mM(2ml/200ml)

になるように添加した。

5) SQC

Tryptone	2%(2g/100ml)
Yeast extract	0.5%(0.5g/100ml)
5M NaCl	10mM(200μl /100ml)
2M KCl	2.5mM(125μl/100ml)

上記を混合して、オートクレーブ後

1M MgSO ₄	10mM(1ml/100ml)
1M MgCl ₂	10mM(1ml/100ml)
2M Glucose	20mM(1ml/100ml)

になるように添加した。

酵母生育培地

1) 5-FOA plate (100ml)

solution A

5-Fluoroorotic acid (和光純薬工業)	100mg
uracil	2.4mg
H ₂ O	50ml

Solution B

2×SD-ura	50ml
Agar	1.5g

オートクレーブ後、約 65℃まで冷ました Solution B にフィルター滅菌した solution A を器壁を伝わせるように穏やかに加えて混合後、プラスチックシャーレに注いだ。

2) MY

Yeast Extract	0.3% (0.3g/100ml)
Malt extract (Becton Dickinson)	0.3% (0.3g/100ml)
Peptone	0.5% (0.5g/100ml)
Glucose	1% (1g/100ml)

3) SD

Yeast nitrogen base w/o a.a.(Becton Dickinson)	0.17% (0.17g/100ml)
Anmonium sulfate (国産化学)	0.5% (0.5g/100ml)
Glucose	2% (2g/100ml)

これに適宜、必要なアミノ酸、塩基を添加した(-uracil、-tryptophan の時に限り 0.2% casamino acid も加えた)。

4) SG

Yeast nitrogen base w/o a.a.	0.17% (0.17g/100ml)
Ammonium sulfate	0.5% (0.5g/100ml)
galactose (和光純薬工業)	2% (2g/100ml)
sucrose (国産化学)	0.05% (0.05g/100ml)

添加物は SD の場合と同様

5) Sporulation medium

Potassium acetate (国産化学)	1% (1g/100ml)
Yeast extract	0.1% (0.1g/100ml)

6) YPD

Yeast extract	1% (1g/100ml)
Peptone	2% (2g/100ml)
Glucose	2% (2g/100ml)

1M sorbitol 添加培地作製時は、以下の試薬を加えてオートクレーブした。

D-Sorbitol	1M (18g/100ml)
------------	----------------

100 μ g/ml Congo red プレート作製時は、オートクレーブ後、培地の温度が約 70 $^{\circ}$ C に下がってから以下の試薬を加えた。

2%(2mg/ml) Congo red stock solution	100 μ g/ml (0.5ml/100ml)
-------------------------------------	------------------------------

7) 2%(20mg/ml) Congo red stock solution

Congo red	2% (1g/50ml)
-----------	--------------

スターラーで良く溶解してから、フィルタ滅菌をした。

酵母 chromosomal DNA 抽出

1) ソルビトール溶液

D-Sorbitol	1.2M (21.6g/100ml)
1M Tris-Cl(pH7.5)	50mM(5ml/100ml)
0.5M EDTA (国産化学)	100mM (20ml/100ml)

2) EDTA 溶液

1M Tris-Cl(pH7.5)	10mM (1ml/100ml)
0.5M EDTA	100mM (20ml/100ml)

核酸操作

1) solution I

Glucose	50mM (1.8g/200ml)
1M Tris-HCl (pH8.0)	25mM (5ml/200ml)
0.5M EDTA (pH8.0)	10mM (4ml/200ml)

2) solution II

NaOH (国産化学)	0.2N (1.6g/200ml)
Sodium dodecylsulfate(SDS; 和光純薬工業)	1% (2.0g/200ml)

3) solution III

5M AcOK (国産化学)	120ml (58.9g/200ml)
----------------	---------------------

酢酸で pH5.5 に調製した。

4) TE

1M Tris-HCl	10mM (2ml/100ml)
0.5M EDTA	1mM (0.4ml/100ml)

5) PEG 溶液

PEG6000 (国産化学)	30%(30g/100ml)
NaCl	1.6M (9.4g/100ml)

6) リン酸カリウム-ソルビトールバッファー (lyticase 用バッファー)

0.2M KH_2PO_4 (国産化学)	0.1M(16ml/200ml)
0.2M K_2HPO_4 (国産化学)	0.1M(84ml/200ml)
D-Sorbitol (関東化学)	1.2M(43.7g/200ml)
1M MgCl_2	1mM(200 μl /200ml)

スフェロプラストを扱う時のみソルビトールを添加した。

Southern hybridization

1) 20 \times SSPE

NaCl	3M (175.3g/1l)
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (国産化学)	0.2M (31.2g/1l)
EDTA	0.02M (7.4g/1l)

10N あるいは粒状 NaOH で pH を 7.4 に調整した。

2) Hybridization buffer

20×SSPE	5×SSPE (20ml/100ml)
Formamide (国産化学)	50% (50g/100ml)
Na-Pi buffer pH7.0	50mM
SDS	7% (7g/100ml)
Blocking reagent (Roche diagnostics)	2% (2g/100ml)
N-Lauroylsarcosine sodium salt (nacalai tesque)	0.1% (0.1g/ml)

3) Denaturation sol.

NaCl	1.5M(87.7g/1l)
NaOH	0.5M(20g/1l)

4) Buffer1

Tris(hydroxymethyl)aminomethane(nacalai tesque) 0.1M (12.1g/1l)

NaCl 0.15M (8.77g/1l)

HCl で pH7.5 に調整した。

5) Blocking stock solution

Blocking reagent (Roche diagnostics) を Buffer1 に終濃度 10%になるように溶解、4℃で保存。

6) Buffer2

Buffer1 で Blocking stock solution を終濃度 1%になるように希釈した。

7) Buffer3

使用直前に 5ml 調製し、3ml を平衡化に、2ml を発色反応に用いた。

1M Tris-Cl pH9.5	0.1M (500 μ l/5ml)
4M NaCl	0.1M (125 μ l/5ml)
2M MgCl ₂	50mM (125 μ l/5ml)

大腸菌コンピテントセル作製

Transformation buffer (TB)

Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)(PIPES; 同仁化学) 10mM (0.3g/100ml)

CaCl₂ (国産化学) 15mM (0.22g/100ml)

KCl 250mM (1.864g/100ml)

1M KOH で pH を 6.7 に調整後、

MnCl₂·4H₂O (国産化学) 55mM (1.09g/100ml)

を加え、フィルタ滅菌した。

酵母形質転換

1) 10×LiOAc stock solution pH7.5

lithium acetate (国産化学) 1M(10.2g/100ml)

希釈した酢酸で pH を調整した。

2) LiPEG

PEG#4000 (国産化学) 40%(40g/100ml)

1M Tris-Cl pH7.5 10mM(1ml/100ml)

0.5M EDTA pH7.5 1mM(0.2ml/100ml)

10×LiOAc stock 10ml/100ml

3) LiTE

10×LiOAc stock solution	10ml/100ml
1M Tris-Cl pH7.5	10mM(1ml/100ml)
0.5M EDTA pH7.5	1mM(0.2ml/100ml)

SDS-PAGE

1) 4×sample buffer

Tris	6% (0.6g/10ml)
HCl	3.5% (350μl/10ml)
SDS	4% (0.4g/10ml)
Glycerol (国産化学)	40% (4ml/10ml)
2-Mercaptoethanol (和光純薬工業)	20% (2ml/10ml)

2) SDS-PAGE running gel buffer (pH8.8)

Tris	1.5M(90.9g/500ml)
SDS	0.4% (2g/500ml)

3) SDS-PAGE stacking gel buffer (pH6.8)

Tris	0.5M(30.3g/500ml)
SDS	0.4% (2g/500ml)

4) 30% acrylamide

acrylamide (和光純薬工業)	30% (150g/500ml)
<i>N,N</i> -Methylene-bis(acrylamide)(和光純薬工業)	0.8% (40g/500ml)

5) SDS-PAGE 泳動用バッファー

Tris	0.5M (60g/10l)
Glycine (日理化学)	288g/10l
SDS	10g/10l

Western blotting

1) 10×TBS (pH7.4)

Tris	0.5M(121.14g/2L)
NaCl	1.5M(175.4g/2L)

2) Anode buffer 1 (pH10.4)

Tris	0.3M (72.7g/2L)
Methanol (国産化学)	10% (200ml/2L)

3) Anode buffer 2 (pH10.4)

Tris	25mM (6.06g/2L)
Methanol	10% (200ml/2L)

4) Cathode buffer (pH9.4)

Tris	25mM (6.06g/2l)
6-amino-n-caproic acid (Sigma)	40mM (10.5g/2l)
10% SDS	0.01% (2ml/2l)
Methanol	20% (400ml/2l)

5) TBS (Tris-buffered saline)

1M Tris-HCl, pH7.5	100mM (100ml/1l)
NaCl	0.9% (9g/1l)

TBS は主に 10×TBS を希釈して調製した。

1-1-2. 実験方法

1-1-2-1. 大腸菌からのプラスミド回収

大腸菌のシングルコロニーを LB 2ml に植菌し、一晚振盪培養した。培養液を 1.5ml チューブに移し、7,000rpm、5 分間の遠心で集菌した。培養上清は捨て、菌体を 100 μ l の Solution I に懸濁し、続いて Solution II、Solution III をそれぞれ 200 μ l、150 μ l 加え、2、3 回転倒混合し、氷上 10 分間静置した。14,000rpm、5 分間遠心し、上清を新しい 1.5ml チューブに移した。0.6 倍量のイソプロパノールを加えて良く混合し、10 分間静置した。14,000rpm、5 分間遠心し、上清を捨て、沈殿を 50 μ l の TE に溶解した。2.5 倍量のエタノールを加えよく混合し、14,000rpm、5 分間遠心した。上清は捨て、沈殿を風乾した。20 μ l の 50 μ g/ml RNase 入り TE を加えて沈殿を溶解し、65 $^{\circ}$ C、10 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、制限酵素処理、PEG 沈に供した。

1-1-2-2. 制限酵素処理

プラスミド DNA、10 \times buffer、H₂O で全量を 10 μ l にし、37 $^{\circ}$ C、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。用途に応じてプラスミド DNA 量は調節した。制限酵素の種類によって、反応温度、10 \times buffer は最適のもの (Roche diagnostics) を選択した。

1-1-2-3. CIAP 処理

制限酵素処理した後の反応液に、CIAP 酵素液 (Roche diagnostics) 1 μ l を加えて 37 $^{\circ}$ C、20 分間インキュベートした。65 $^{\circ}$ C、15 分間のインキュベート後、アガロース電気泳動に供し、目的のバンドを切り出し、gene clean kit (BIO 101) により精製、ライゲーション用サンプルとした。

1-1-2-4. アガロースゲル電気泳動

1) アガロースゲルの作製

三角フラスコに入れた TAE buffer に 0.8%になるように、電気泳動用アガロース (岩井化学薬品) を加え、電子レンジで完全に溶解するまで加熱した。スターラーで攪拌し、70 $^{\circ}$ C 位に冷ましたところで、型に流し込み、コームをさして 30 分静置、ゲル化させた。

2) 電気泳動

アガロースゲルを TAE buffer (0.1 μ g/ml Ethidium bromide) で充たしたサブマリン式泳動槽 (Mupid-21 ミニゲル泳動槽; コスモバイオ) にセットし、分子量マーカーと 6 \times loading buffer を加えたサンプルをゲルのウェルにアプライし、定電圧 100V で泳動した。サンプルがゲルの 6~7 割まで達したところで泳動を止め、UV イルミネーター、撮影装置 (ATTO) により、確認、記録あるいはバンドの切り出しを行った。

1-1-2-5. 大腸菌コンピテントセルの調製

大腸菌 DH5 α をフリーズストックから LB 2ml に植菌し、一晩培養したものを前培養とした。前培養液から SOB 100ml ずつ入れた 2 本の 300ml 容羽根つき三角フラスコに 100 μ l ずつ植菌した。18 $^{\circ}$ C で二晩激しく振盪培養し、O.D.₆₀₀ が 0.6 程度になったところで 50ml 遠心チューブに移し、氷上に 10 分間静置した。7,000rpm、4 $^{\circ}$ C、5 分間の遠心で集菌し、菌体を氷冷した TB 30ml で穏やかに洗った。再び 7,000rpm、4 $^{\circ}$ C、5 分間の遠心で集菌し、菌体を氷冷した TB 20ml に穏やかに懸濁した。DMSO を終濃度 7% になるように 1.4ml 加えてよく懸濁した。1.5ml チューブに 100~200 μ l ずつ分注し、液体窒素で凍結、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

1-1-2-6. 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 1~5 μ l 加えてよく混合し、氷上に 15 分間静置した。42 $^{\circ}$ C で 30 秒間、熱ショックを与えてから、マーカー薬剤入りの LB プレートに撒いた。

1-1-2-7. エレクトロポレーション用コンピテントセルの調製

大腸菌 TOP10F または KC8 のシングルコロニーを 10ml の LB に植菌し、37 $^{\circ}$ C で一晩、前培養した。前培養液 10ml を LB 1l に植菌し、2 時間激しく振盪培養する。7,000rpm、4 $^{\circ}$ C、5 分間遠心し、上清を捨て、菌体を氷冷した 1mM HEPES pH7.0、200ml で 2 回、100ml、50ml で 1 回ずつ洗った。さらに氷冷した 20ml の 10% Glycerol で洗った後、2ml の氷冷 10%

Glycerol に懸濁した。氷冷した 1.5ml チューブに 50 μ l ずつ分注し、液体窒素で凍結、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

1-1-2-8. エレクトロポレーションによる大腸菌へのプラスミド DNA の導入

導入するプラスミド DNA の体積が大きい場合、エタノール沈殿により濃縮した。最終的にプラスミド DNA 3 μ l 以下になるように H₂O に溶解した。これを氷冷したエレクトロポレーション用のキュベット (BTX) の側壁に付け、氷上で融解しておいたエレクトロポレーション用コンピテントセル 40 μ l でキュベットの底に流し込み、軽く振り気泡を除いた。キュベットの周囲に付いた水分を良く拭き取り、Gene pulser (Bio-Rad) のチャンバーにセットし、2.5kV、25 μ F、200 Ω の条件で pulse した。即座に SOC 1.0ml をキュベットに加え、ピペッティングで懸濁した後 1.5ml チューブに移した。これを 37 $^{\circ}$ C で 1 時間激しく振盪培養した後、希釈等により目的に応じた菌体量をプレートに撒いた。

1-1-2-9. *gas1* Δ genomic library の作製

1) 酵母 chromosomal DNA の抽出 (ラージスケール)

KA31 α *gas1* Δ の YPD 10ml の前培養液を YPD 11 に植菌し、30 $^{\circ}$ C で 1~20 \times 10⁸ cells/ml の濃度まで培養する。5,000rpm、室温、5 分間遠心し、細胞を 100ml の水で洗った。集菌後、ソルビトール溶液 10ml に懸濁した。Zymolyase100T (生化学工業) を 5mg 加え、37 $^{\circ}$ C、20 分間緩やかに振盪した (懸濁液を顕微鏡観察し、80%以上の細胞がスフェロプラスト化するまで、インキュベートを続けた。)。10% SDS 溶液を 1ml 加えてよく混合した後、proteinase K (Roche diagnostics) 10mg を加え、37 $^{\circ}$ C、6 時間振盪した。フェノール/クロロホルム抽出を 2 回行った。上清の 2 倍量(20ml)の氷冷エタノールをゆっくり加え、鉤状にしたパスツールピペットで核酸を巻取り、氷冷 70%エタノールで濯いだ。EDTA 溶液 5ml に溶解し、RNase stock solution (10mg/ml) 100 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。さらにフェノール/クロロホルム抽出を 2 回行った後、上清に 2 倍量(10ml)の氷冷エタノールをゆっくり加え、鉤状にしたパスツールピペットで核酸を巻取り、氷冷 70%エタノールで濯いだ。これを EDTA 溶液 2ml に溶解し、氷冷エタノール 4ml を加え DNA を巻取り、

70%エタノールでリンスした。TE 1ml に溶解し、70℃、10 分間インキュベートして残存 DNase を完全に失活させた後、4℃で保存した。

2) genomic library の insert 調製

最初のチューブは chromosomal DNA 130μg を入れ、total 180μl、残り 9 本のチューブは chromosomal DNA 65μg/tube を入れ、total 90μl の反応系になるように 10 本の 1.5ml チューブを用意した。最初のチューブに *Sau3AI* 2μl を加えて混合し、90μl をとり、残り 9 本のチューブで serial dilution した。37℃、15 分間インキュベート後、4μl/tube の 0.5M EDTA を加え、酵素反応を止めた。各チューブから 4μl をアガロース電気泳動に供し、genomic library insert として用いる 5kb 以上の範囲で、部分消化されているチューブを 3 本選択した。これを 65℃、10 分間インキュベートし、10%から 40%の linear sucrose gradient 12ml の top にのせ、25krpm、20℃で 16 時間、超遠心した（日立超遠心機 himac CP85β、スウィングローター P40S）。超遠心後、gradient の bottom から 300μl ずつ分画し、うち 5μl をアガロース電気泳動に供し、5~20kb の DNA フラグメントが分画されているチューブを 3 本選択した。それぞれのチューブに 2 倍量 (600μl)の TE を加え、2 本に分注しエタノール沈殿した。2 本分の DNA 沈殿は 50μl の TE に溶解し、1 本のチューブにまとめてライゲーション用サンプルとした。

3) *gas1Δ* genomic library の作製

genomic library のベクターには、low copy で選択用マーカー遺伝子として *TRP1* をもつ pRS314 を用いた。*Bam*HI で 37℃で 1 時間制限処理した後、CIAP 処理した。アガロース電気泳動後、単一のバンドを切り出し、gene clean により精製して、ライゲーション用サンプルとした。

ライゲーション反応は、インサート：ベクター=10~20：1（質量で）の割合で混合し、全体を 20μl の反応系で 4℃、一晩行った。ライゲーション後、反応液の 5μl をエタノール沈殿により 2μl に濃縮し、40μl のエレクトロポレーション用コンピテントセルと混合して氷冷したエレクトロポレーション用キュベットに移した。2.5kV、25μF、200Ωの条件でパ

ルス後、即座に SOC 1ml 加え、37℃、1 時間振盪培養した。培養液を LB で 10 倍に希釈したものを 100 μ l を LB+Amp plate に撒き、37℃、一晚インキュベーションした。現れたコロニーを培養後、プラスミドを抽出し、マルチクローニングサイト両脇の *Pvu*II サイトで切断、平均インサートサイズを計算した。プレート当たりのコロニー数、平均インサートサイズ、インサートの入っている割合から *S.cerevisiae* のゲノムサイズ (1.2 \times 10⁷bp) の 10 倍以上をカバーするように、残りのライゲーション反応液を用いて、エレクトロポレーションを行った。実際には、約 17 万コロニーを 8ml の LB で回収し、グリセロール 5ml を加えたものを 200 μ l ずつ分注し-80℃で保存した。平均インサートサイズ 6~10kb、インサート率 90%以上より、ゲノムの約 90 倍をカバーしていると考えられる。

1-1-2-10. *gas1* 破壊株との合成致死スクリーニング

1) 変異処理

NTY9/pNT68 のシングルコロニーを 500ml 容坂口フラスコの SD-ura 100ml に植菌し、一晚振盪培養した。合成致死スクリーニングはコロニーの色で判断するため、密に生育するコロニーは見極めが難しい。検討の結果 500 コロニー/plate を目安に菌体を撒くこととした。10 倍に希釈して O.D.₆₀₀ を測定し、2 \times 40 \times 10⁷ cells 分を 2 つに分けて集菌した。50mM の NaPi buffer で 1 回洗った後、それぞれ菌体を 1ml の NaPi buffer に懸濁した。2 つのチューブに \pm 30 μ l EMS (Sigma) で 30℃、30 分間静置した (約 50% の survival rate)。集菌し、上清は 500 μ l 分は、10% Na₂S₂O₃ を入れたビーカーに捨て、チューブに 500 μ l の 10% Na₂S₂O₃ を加えてよく混和した。再び集菌して、H₂O で 2 回洗った後に菌体は 1ml の H₂O に懸濁した。この細胞懸濁液を 2 \times 10³ 倍まで希釈した後、希釈懸濁液を 10 本のチューブに分注し、2 \times 10⁴ 倍の懸濁液をそれぞれについて調製した。100 μ l ずつ 100 枚の YPD+1M sorbitol plate に撒いた。

2) 合成致死スクリーニング

変異処理した菌体を撒いた YPD+1M sorbitol plate は、30℃で 7 日前後インキュベートすることにより、コロニーの色が明瞭になった。実体顕微鏡 (OLYMPUS) で観察し、赤い

コロニーを YPD+1M sorbitol plate にパッチにした。これをマスタープレートとし、ここからさらに 2 回 YPD+1M sorbitol plate にひいて、白いコロニー、白いセクターの入ったコロニーを生じない株をさらに選択した。結局パッチにした 1921 コロニーから 53 コロニーを選択した。これらの株は、まず *ADE3-GAS1* プラスミド (pNT68) 依存に赤くなることを確認し、以降の解析を行った。

1-1-2-11. 変異株のプラスミド交換～*ADE3-GAS1* プラスミド (pNT68) から *pGAL-GAS1* プラスミド (pNT99-2) へ～

どちらのプラスミドもマーカーが *URA3* であるため、*TRP1* マーカーのプラスミド pNT53 (*CEN TRP1 GAS1=TRP1* プラスミドと呼ぶ) を介して交換することにした。

変異株/*ADE3-GAS1* プラスミドを *TRP1* プラスミドで形質転換し、SD-trp+1M sorbitol プレートに撒き、30℃、2～3 日間インキュベートした。得られた形質転換体のうち、*ADE3-GAS1* プラスミドが脱落して白いコロニーを形成するものを 8 コロニー選択し、SD-ura+1M sorbitol、SD-trp+1M sorbitol プレートに同時にひいて 30℃、2～3 日間インキュベートした。SD-trp+1M sorbitol プレートで生育するが、SD-ura+1M sorbitol プレートでは生育しないものを選択し、変異株/*TRP1* プラスミドとした。次に得られた変異株/*TRP1* プラスミドを *pGAL-GAS1* プラスミドで形質転換し、SG-ura+1M sorbitol プレートに撒き 30℃、2～3 日間インキュベートした。得られた形質転換体を 8 コロニーひろい、SG-ura+1M sorbitol、SD-trp+1M sorbitol プレートに同時にひき、30℃、2～3 日間インキュベートした。このうち SG-ura+1M sorbitol プレートでは生育するが、SD-trp+1M sorbitol プレートでは生育できないものを選択し、変異株/*pGAL-GAS1* プラスミドとして、以下のクローニングに用いた。

1-1-2-12. Yeast からの plasmid 回収

SD-trp+1M sorbitol plate 上、30℃、2 日間の培養で現れたコロニーを拾い、SD-trp+1M sorbitol plate に master plate を作製した。Master plate から 4ml SD-trp+1M sorbitol に植菌し、30℃、2 日間振盪培養した。これを集菌し、1 回滅菌水で洗った後、ソルビトール-リン酸バッファー 100μl、2-mercaptoethanol 0.5μl、lyticase 1μl を加えて 30℃に静置し、スフェロ

プラスト化した。1 時間後 2,000rpm、5 分間遠心し、上清を除いた後は、大腸菌からの plasmid 回収法（アルカリ-SDS 法）に従い、プラスミド DNA を回収した。

1-1-2-13. ライブラリプラスミドの回収と増幅

酵母から回収したプラスミドは TE 20 μ l に溶解し、そのうち半量（10 μ l）を 1 回の形質転換に用いた。まず、エレクトロポレーションにより大腸菌 KC8 のコンピテントセルを 2.5kV、25 μ F、200 Ω の条件で pulse し、即座に LB 0.8ml を加えてキュベットから 1.5ml チューブに洗い込み、そのまま 26 $^{\circ}$ C、2 時間振盪培養した。培養液の一部をそのまま M9+Amp-trp plate に撒き、37 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。ここで得られたコロニーからプラスミドを回収し、これを酵母の形質転換、DNA シークエンシング用のサンプルとした。

1-1-2-14. 酵母の形質転換

酢酸リチウム法を用いた。すなわち、シングルコロニーを YPD10ml（ラージスケールでは 100ml）に植菌し、振盪培養後 O.D.₆₀₀ = 約 0.5 に達したところで、3,000rpm、室温、5 分間の遠心で集菌した。滅菌水と、LiTE 溶液で 1 回ずつ洗った後、300 μ l（ラージスケール: 100 μ l）の酢酸リチウム TE 溶液に懸濁し、酵母コンピテントセルとした。このうち 50 μ l（ラージスケール: 100 μ l）に、形質転換するプラスミド DNA、キャリアー DNA（10mg/ml）1 μ l（ラージスケール: 10 μ l）と LiPEG 溶液 350 μ l（ラージスケール: 700 μ l）とを加え、よく懸濁した後、30 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。さらに 42 $^{\circ}$ C、15 分間熱ショックを与えた後、14,000rpm、5 秒間遠心して上清を捨てた。菌体は 800 μ l の滅菌水で 2 回洗った後、滅菌水に懸濁し、形質転換効率、目的に応じた菌体量を、形質転換に用いたプラスミドのマーカ―を欠乏する合成培地に撒いた。

1-1-2-15. DNA シークエンシング

大腸菌から回収したプラスミドは、PEG 溶液を 0.4 倍量加え、氷上 30 分静置した。14,000rpm、4 $^{\circ}$ C、10 分間遠心し、沈殿は 70%エタノールで洗った後、減圧乾燥した。これを TE に溶解したものをシークエンス反応の鋳型として用いた。

シーケンス反応は Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (PE Applied Biosystems) を用い、付属の説明書に従いおこなった。1 反応当たり、PEG 沈殿にて精製した鋳型プラスミド約 400ng、プライマー 3.2pmol、Big Dye premix 8 μ l に蒸留水を加えて 20 μ l になるように調製した。PCR 反応は、熱変性を 96 $^{\circ}$ C、10 秒、アニーリングを 50 $^{\circ}$ C、5 秒、伸長反応を 60 $^{\circ}$ C、4 分の 3 ステップを 1 サイクルとして、25 サイクル進行させた後に 4 $^{\circ}$ C に移行するプログラムによって行った (PE Applied Biosystems; Gene amp 2400)。反応産物は、1.5ml チューブに移してエタノール沈殿し、室温で 14,000rpm、5 分間遠心沈降した。沈殿は 70%エタノールで 1 回洗った後、減圧乾燥し TSR 20 μ l に溶解した。2 分間煮沸した後、即座に氷冷したものを DNA シークエンシングのサンプルとして専用のチューブに移した。

DNA シークエンサーは Model 310 DNA Sequencer (PE Applied Biosystems) を使用した。操作及び、設定は標準のプロトコルに従って行った。

1-1-2-16. Congo red sensitivity

中型試験管中 YPD 4ml に検定株を植菌し、30 $^{\circ}$ C で一晩激しく振盪培養した。対数増殖期 ($O.D._{600} \sim 2, 3$) まで培養し、培養液を 10 倍希釈して $O.D._{600}$ を測定した。この値を基に $O.D._{600}=1.0$ 相当 (2.0×10^7 cell/ml) に培養液を希釈し、これを一段目のサンプルとした。ここから cell suspension 10 μ l をとり、あらかじめ滅菌水を 90 μ l 入れておいた 1.5ml チューブに入れ、10 倍に希釈した。同様に各検定株について五段目まで 10 倍希釈を繰り返し、各サンプルから 5 μ l ずつ YPD および YPD+100 μ g/ml Congo red plate にスポットした。スポット後、30 $^{\circ}$ C で 2 日間培養し、写真に記録した。

1-1-2-17. Total lysate の調製

中型試験管 (YPD 4ml) で 30 $^{\circ}$ C、一晩振盪培養した前培養液から、YPD 10ml の入った L tube に 2%植菌し、 $O.D._{600}$ =約 1.0 で 3,000rpm r.t. で 5 分間の遠心で集菌した。培養上清は TCA 沈殿により濃縮するため 2ml 分とり、使用するまで -80 $^{\circ}$ C で保存した。菌体は滅菌水で 1 回洗った後、3,000rpm r.t. で 5 分間遠心した。次に lysis buffer で 1 回洗い、再び 3,000rpm

r.t.で5分間遠心した。菌体を lysis buffer 500 μ l に懸濁してワッセルマン試験管に移し、glass beads (TOSHIN RIKO no.04, 0.4-0.5mm) 1.2g を加え、1分 vortexing、1分 on ice を4回繰り返し、菌体を破碎した。さらに lysis buffer 400 μ l を加えてよく懸濁した後、そのうち450 μ l をとり、4 \times sample buffer を150 μ l 加え、SDS-PAGE のサンプルとした。

1-1-2-18. 培地中の蛋白質の濃縮 [Nuoffer *et al.* 1993]

lysate を調製する際に、-80 $^{\circ}$ Cで保存していた培地上清2mlを、まず13,000rpm、4 $^{\circ}$ Cで5分間遠心し、培地に含まれる菌体を完全に沈降させた。これより1.4ml分の上清を新しい1.5mlチューブに移し、キャリアー蛋白質として ovalbumin (Sigma) を stock solution (12.5mg/ml) から終濃度0.125mg/mlになるように加え、よく混合した。ここに TCA (trichloroacetic acid; 国産化学) を10% (v/v)になるように加え、よく混合し、氷上に静置した。30分後、13,000rpm、4 $^{\circ}$ Cで5分間遠心して得られた沈殿を、氷冷 acetone 800 μ l で3回洗い、風乾した。乾燥した沈殿を1M Tris-Cl pH8.0 に溶解し、4 \times sample buffer を加え、SDS-PAGE のサンプルとした。

1-1-2-19. 細胞壁糖組成の測定 [Dallies *et al.*, 1998]

1) 細胞壁画分の調製

対数増殖期 (O.D.600=1.0) まで培養した細胞を3,000rpm、室温で5分間遠心し、集菌した。脱イオン水で3回洗い、10mM Tris-Cl pH8.0 500 μ l で懸濁し、ワッセルマン試験管に移した。0.5gのガラスビーズを加え、低温室にて vortexing 1分、氷上静置1分を1サイクルとして8サイクル行い、細胞を破碎した。顕微鏡で細胞の95%程度が破碎したことを確認して、次へ進んだ。細胞破碎液は1.5mlチューブに移し、ガラスビーズを10mM Tris-Cl pH8.0 500 μ l で2回洗ったものと合わせた。7,000rpm、4 $^{\circ}$ Cで5分間遠心し、細胞壁を含む画分を沈降させ、これを上清が透明になるまで3回を目安に氷冷した脱イオン水で洗った。SDS-lysis バッファー400 μ l に洗浄後の沈殿を懸濁し、5分間煮沸を2回行い、細胞壁に非共有結合的に局在する蛋白質、膜画分のコンタミネーションを除いた。14,000rpm、5分間の遠心による沈殿を、上清が透明になるまで3回を目安に脱イオン水で洗った。さら

に HPLC グレードの蒸留水（関東化学）で 2 回洗った後に、150 μ l の HPLC グレードの蒸留水に懸濁したものを糖の定量、糖組成解析用のサンプルとして、使用するまで-80 $^{\circ}$ C で保存した。

2) フェノール硫酸法による糖の定量

対照として 0、0.01、0.1mg/ml (0、0.056、0.56 μ mol/ml)マンノース（国産化学）を同時に測定した。調製した細胞壁画分を HPLC グレードの蒸留水で 250 倍に希釈したもの 500 μ l を中型試験管に入れた。これに 5%フェノール 500 μ l を加え、よく攪拌した。濃硫酸（国産化学）を 2.5ml 安全ピペッターでとり、直接液面に当たるように入れ、即座によく攪拌した。10 分間空冷してから 40 $^{\circ}$ C の温浴に 20 分間静置し、490nm の吸光度を測定した。対照に用いたマンノースから検量線を作製し、これから各検体の糖含量を算出した。

3) 糖の加水分解

算出した糖含量をもとに、300-400 μ g の細胞壁画分（約 50 μ l 分に相当した。）を 13,000rpm、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心し、上清を捨てた。72% (w/w) H₂SO₄ 75 μ l を加えてよく懸濁し、室温で 3 時間インキュベーションした。450 μ l の HPLC グレードの蒸留水で 2N H₂SO₄ になるように希釈し、スクリーキャップ付き試験管に移した。蓋をきつく締め、ヒートブロックで 100 $^{\circ}$ C、4 時間インキュベーションした。しばらく空冷した後、氷上で静置した。HPLC グレードの蒸留水 1ml を 3 回に分けて加え、15ml 容遠心チューブ（IWAKI）に洗い込んだ。飽和水酸化バリウムを途中 pH 試験紙で確認しながら、中性(pH6.5~8.0)になるまで加えた。最終的に pH メーターで液性が pH6.5~8.0 であることを確認した。7,000rpm、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心し、中和に伴う硫酸バリウムを沈殿させた。上清約 6ml をデカンテーションして新しい 15ml 容遠心チューブに移して、4 $^{\circ}$ C で一晩静置した。残留硫酸バリウムを再び 7,000rpm、4 $^{\circ}$ C、5 分間の遠心により沈殿させ、上清をデカンテーションして新しい 15ml 容遠心チューブに移し、これを HPAEC（High performance anion exchange chromatography）による糖組成解析用試料とした。

4) 糖組成の解析

解析用試料は、HPAEC にかける前にスピンカラム (Millipore) でフィルタ濾過した。Dionex Carbpac PA-1 (Dionex) にまず、グルコース、マンノース、グルコサミンを 5mM ずつ含む標準溶液から調製した希釈系列を 50 μ l ずつアプライした。溶出は A: ミリ Q、B: 100mM NaOH を設置し、B を 14%一定の設定で行った。次に、試料を 50 μ l アプライして同様の条件で溶出した。希釈系列の各糖のモル数に対応するピーク面積から、検量線を作製して試料中に含まれる各糖のモル数を算出し、総和を 100 として表した。

1-1-2-20. サザンブロッティング

1) プローブの調製

制限酵素処理後、アガロースゲル電気泳動により分離した DNA フラグメントを切り出し、Gene clean kit で精製した。精製 DNA フラグメントは 15 μ l (約 1 μ g 分) に調製し、5 分間煮沸した後、即座に氷水に浸し変性させた。DIG labelling kit (Roche diagnostics) のヘキサヌクレオチド混合液 (バイアル 5) 2 μ l、dNTP 標識混合液 (バイアル 6) 2 μ l、Klenow enzyme (バイアル 7) 1 μ l を加えて全量を 20 μ l にしてよく混合した。37 $^{\circ}$ C で一晩インキュベーションした後、1 μ l 0.5M EDTA pH8.0 を加えて反応を停止させた。エタノール沈殿後、100 μ l TE pH8.0 に溶解し、2 回分のプローブとした。

2) 酵母 chromosomal DNA の抽出 (スモールスケール)

対数増殖期にある YPD 10ml の培養から集菌し、500 μ l ソルビトールバッファで洗った。菌体は 500 μ l ソルビトールバッファに懸濁し、2-メルカプトエタノール 1 μ l、Zymolyase 100T (10mg/ml) 5 μ l 加えて 37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベーションした。4,000rpm、5 分間の遠心で集菌し、500 μ l の 50mM Tris-Cl pH7.4, 20mM EDTA、50 μ l 10% SDS を加えてよくピペッティング、懸濁した。65 $^{\circ}$ C で 30 分間静置後、5M 酢酸カリウム 200 μ l を加えチューブを 2、3 回反転してから氷上で 60 分間静置した。14,000rpm、5 分間の遠心上清に同体積のイソプロパノールを加えて 10 分後に 14,000rpm、5 分間の遠心を行った。上清は捨て、沈殿を風乾してから TE 50 μ l に溶解した。さらにエタノール沈殿を行った後、沈殿を風乾してから TE 50 μ l に溶解し、RNase A stock solution(10mg/ml)を最終濃度 50 μ g/ml にな

るように加えた。さらに 65℃で 10 分間処理したものをサザンブロッティングに用いた。

3) トランスファー、ハイブリダイゼーション

酵母 chromosomal DNA は一晩制限酵素消化を行ったものを一部、アガロースゲル電気泳動で消化の状況をチェックしてから、トランスファー用にアガロースゲル電気泳動を行った。DNA サイズマーカーの隣に定規をおいて写真を撮り、検出の際にバンドの同定、確認に用いた。変性溶液に 30 分、中和溶液に 15 分を 2 回、浸して緩やかに振盪した。軽く水洗いしてから面取りをした。ゲルの大きさにそろえた濾紙、上下逆さまにしたゲル、Hybond-N (Amersham pharmacia biotech)、濾紙 (3MM Chr; Whatman)、ペーパータオルを重ね、ブロッティングを 4 時間から一晩かけて行った。ゲルの下にひいた濾紙は、ゲルの幅に合わせて帯状に切り、両端が 20×SSPE に浸るようにした。トランスファー後、Hybond-N を DNA 吸着面を下にして UV イルミネーターに 30 秒間あてた。Hybond-N はハイブリパックに入れ、キャリア DNA 10 μ l を含むハイブリダイゼーション溶液 3ml を加えてシールし、42℃、1 時間プレハイブリダイゼーションを行った。ハイブリパックの隅を切り、プレハイブリダイゼーション溶液を捨てて、プローブ 50 μ l を含むハイブリダイゼーション溶液 2.5ml に入れ替えてシールし、42℃、6 時間から一晩かけてハイブリダイゼーションを行った。メンブレンは室温で 25ml の 2×SSPE、0.1% SDS で 2 回、5 分ずつ振盪して洗った後、68℃の湯浴につけながら、25ml の 0.1×SSPE、0.1% SDS で 2 回、5 分ずつ振盪して洗った。このメンブレンを免疫学的検出反応に供した。

4) 免疫学的検出

メンブレンを Buffer1 で 1 分程度馴染ませる。Buffer2 15ml で 30 分間、Buffer2 5ml に抗 DIG 抗体 1 μ l を加えた溶液で 30 分間振盪した後、Buffer1 で 2 回、15 分ずつ激しく振盪して洗った。Buffer3 2ml で 2~3 分平衡化した後、メンブレンをハイブリパックに入れ、発色液 2ml を加えてシールした。バンドが検出されるまで、暗所においた。最後に TE で反応を停止し、メンブレンを乾燥させた。

1-1-2-21. Western blotting

1) SDS-PAGE

Laemmli 法に基づき行った [Laemmli, 1970]。サンプルは、4×sample buffer を加え 2 分間煮沸後、室温に冷ましてから泳動した。SDS-ポリアクリルアミドゲルは、分離ゲル溶液 6ml/ゲル 1 枚を 10cm×10cm×1mm のゲル板に流し込み、ゲル化させた後に、濃縮ゲル溶液 2ml/ゲル 1 枚を調製、同様にゲル板に充填、コームをセットし、ゲル化させて作製した。サンプルおよび分子量マーカー (Prestained Protein Marker, Broad Range; New England Biolabs) を SDS-ポリアクリルアミドゲルにアプライし、ゲル 1 枚あたり 15mA でサンプルが分離ゲルの下端に達するまで電気泳動を行った。

2) Western blotting

SDS-ポリアクリルアミドゲルから PVDF 膜 (Immobilon; Millipore) へのトランスファーはセミドライ方式のプロッター (TRANS-BLOT SD セル; Bio-Rad) を用いて行った。SDS-PAGE 終了後、ゲル板よりゲルを取り外し、Cathode buffer に浸し 5 分間振盪した。PVDF 膜と濾紙 (3MM Chr; Whatmann) は、あらかじめ分離ゲルの大きさ (8.5cm×6cm) に切っておいた。PVDF 膜は、メタノールでウェット操作の後、Anode buffer 2 に浸し、5 分間振盪した。陰電極板から Anode buffer 1 に浸した濾紙を 2 枚、Anode buffer 1 に浸した濾紙を 1 枚、PVDF 膜、ゲル、Cathode buffer に浸した濾紙 3 枚を順に重ね、上から陽電極板をのせ、1mA/cm²の定電流で 50 分間トランスファーした。

トランスファー後のメンブレンは 5% skim milk 入りの TTBS 15ml に浸し、1 時間振盪、ブロッキングした。一次抗体反応は、1% skim milk 入りの TTBS 6ml で、抗 Cwp1p 抗体 (下飯仁博士、酒類総合研究所主任研究員)、抗 Yap3p 抗体 (Yves Bourbonnais, Ph.D、Université LAVEL) は 3,000 倍に、抗 Sed5p 抗体は 1,000 倍に、抗 Pkg1p 抗体 (Molecular probe) は 6,000 倍に希釈し、メンブレンを浸して 1 時間振盪した。TTBS 15ml で 10 分間激しく振盪を 3 回行い、メンブレンを洗った。二次抗体反応は、1% skim milk 入りの TTBS 6ml で二次抗体 Peroxidase-Labeled Antibody to Rabbit IgG(H+L)、あるいは Peroxidase-Labeled Antibody to Mouse IgG conjugate(H+L) (抗 Pkg1p 抗体の時) (いずれも KPL) を 6,000 倍に希釈し、メンブレンを浸して 30 分間振盪した。TTBS 15ml で 10 分間激しく振盪を 3 回

行い、メンブレンを洗った後、TTBS を除いて発光基質溶液（SuperSignal WestPico Chemiluminescent Substrate Kit; PIERCE）に良く浸した。シグナルはルミノ・イメージアナライザー LAS-1000plus（富士写真フィルム）を用いて検出、記録した。