

第2節 結果

1-2-1. *GAS1* 遺伝子破壊株を用いた合成致死スクリーニング

本スクリーニング系で、取得が予想される変異株として目的の変異株以外に、細胞壁の主要な構成要素であるグルカン、キチンの合成酵素や、*PKC1* とその下流の MAPK cascade のコンポーネントの変異株が挙げられる。しかしグルカン、キチン合成酵素をコードするそれぞれ *FKS1*、*CHS3* の破壊は *gas1* 破壊株では、生育に影響が出るものの致死性ではないことが報告されており [Kapteyn *et al.*, 1997; Popolo *et al.*, 1997]、合成致死スクリーニングを遂行する動機の一つとなった。一方で、*PKC1* とその下流の MAPK cascade のコンポーネント (*BCK1*、*SLT2/MPK1*) の破壊は、*GAS1* 破壊と合成致死になることが報告されている [Popolo *et al.*, 1997; Turchini *et al.*, 2000] 上に、その変異株は細胞壁変異株のスクリーニングには必ず現れる [Shimizu *et al.*, 1994]。それらは 37℃ 以上では溶菌を起こし致死性だが、浸透圧保護剤の添加により生育は回復するという特徴的な表現型を示す [Cid *et al.*, 1995]。そこで本研究では、既知であり、シグナル伝達系の分子の取得をできる限り回避するために、1M ソルビトールを添加した培地でスクリーニングを行った。

スクリーニング系としては、古典的な *ade2 ade3* の系 [Kranz & Holm, 1990] を用いた。*ade2* 株はアデニン生合成中間体の蓄積のため赤いコロニーを生じ、加えて *ade3* 欠損をもつ *ade2 ade3* 株は白いコロニーを生じることを利用した系である。染色体上の *ade3*、*gas1Δ* をプラスミド上の *ADE3 GAS1* 遺伝子で相補した株を変異処理し、新たに入った変異が *gas1Δ* にとって essential であるかどうかを、このプラスミド (pNT68: *CEN ADE3 URA3 GAS1*、*ADE3-GAS1* プラスミドとする) の脱落が許されるか否かで判定する (図 1-1)。つまり赤いコロニーは合成致死である (*ADE3-GAS1* プラスミドを脱落し得ない) こと、白または白いセクターの入ったコロニーは変異が致死性ではない (*ADE3-GAS1* プラスミドを脱落し得る) ことを表す。

以上を指標に、*ade2 ade3 gas1Δ* を *ADE3-GAS1* プラスミドで相補した株 (NTY9/pNT68 *MATα*) を親株として、EMS により変異処理した。約 10 万コロニーから、プラスミド脱

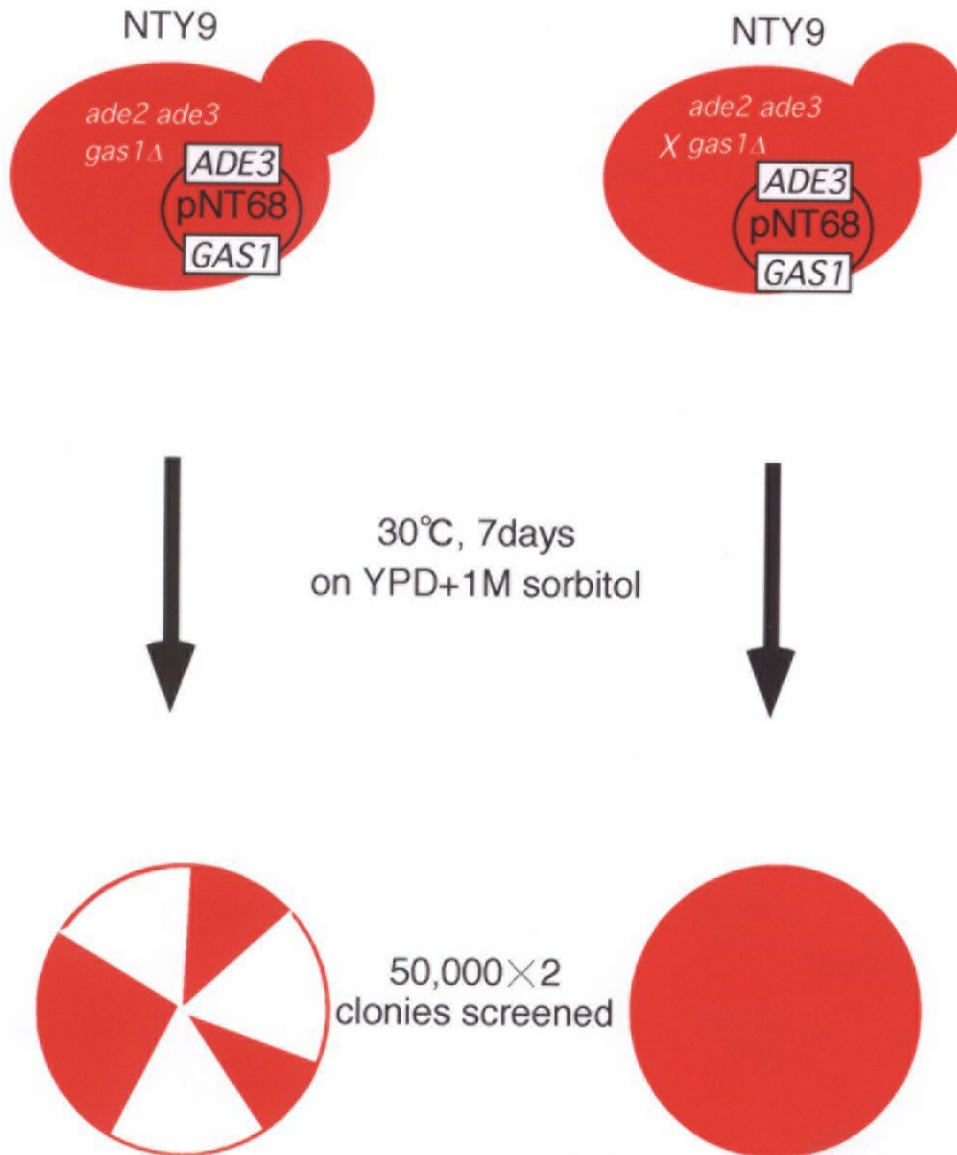


図1-1 *gas1*破壊株を用いた合成致死を示す遺伝子のスクリーニング

右: 変異Xが*gas1*Δと合成致死を示す場合、pNT68無しでは生育できなくなるため赤いコロニーを形成する。

左: 変異が合成致死を示さない場合、pNT68を脱落した細胞が生じるため赤いコロニーの中に白いセクターを形成する。

本スクリーニングでは、合計100,000コロニーをスクリーンした。

落が許されない、赤いコロニーを生じる合成致死変異株 53 株を単離した。

まず栄養マーカーの異なる *TRP1* と野生型 *GAS1* の載ったプラスミド (pNT53) で変異株を形質転換した。全ての株でセクターを回復したため、コロニーの赤色は染色体上に入った合成致死変異によるものであり、プラスミドの *ADE3* が染色体上へ転位したためではないことが明らかになった。

また *MATa* 株 (*ade2 ade3 gas1Δ*) とかけ合わせて二倍体を作製したところ、全ての変異株でセクターを回復したため、変異が劣性であることが明らかになった。

生育の温度感受性を調べたところ、37℃での温度感受性を 5 株、14.5℃での低温感受性を 15 株が示した。そのうち、3 株が両方に感受性を示した (表 1-1)。

また細胞壁β1,3-グルカンのアセンブリーを阻害する Congo red に 23 株が感受性を示し、細胞壁生合成に関係する遺伝子に変異が入っていることが示唆された (表 1-1、図 1-2)。

1-2-2. 相補遺伝子のクローニング

1-2-2-1. 相補遺伝子のクローニング

クローニングに際し、まず、多数の形質転換体中からのポジティブな選択が可能な、温度感受性、低温感受性を指標にした。*gas1* 破壊株の chromosome から作製したゲノムライブラリ NTLY1 で変異株を形質転換後、温度感受性株の場合は 37℃に、低温感受性株の場合は 26.5℃で一定時間インキュベーション後、14.5℃に移した。生育してきたコロニーから、ライブラリプラスミドの回収、大腸菌での増幅後、再び変異株を形質転換したが、温度感受性、低温感受性どちらの場合も再現性はみられなかった。そこで、クローニングに用いた変異株を二倍体にし、四分子解析を行った。その結果、合成致死性と温度感受性はリンクしておらず、クローニングの指標として適さないことが明らかになった。

そのため、次には、定法に従いセクターの回復を指標にクローニングをすすめることにした。即ち、変異を相補する遺伝子が導入されることにより、*ADE3-GAS1* プラスミドの脱落が許されるようになった形質転換体を選択する。この方法は形質転換体のすべてを、コロニー色状が判定可能な大きさに生育させる必要がある。そこで特に、四分子

Isolated mutants 53

Recessive mutation 53

Temperature sensitive(37°C) 5

Cold sensitive(14.5°C) 15

Congo red sensitive(YPD+50 μ g/ml) 23

表1-1 単離した変異株の表現型内訳

37°Cでの温度感受性株のうち3株は、14.5°Cでの低温感受性も示した。

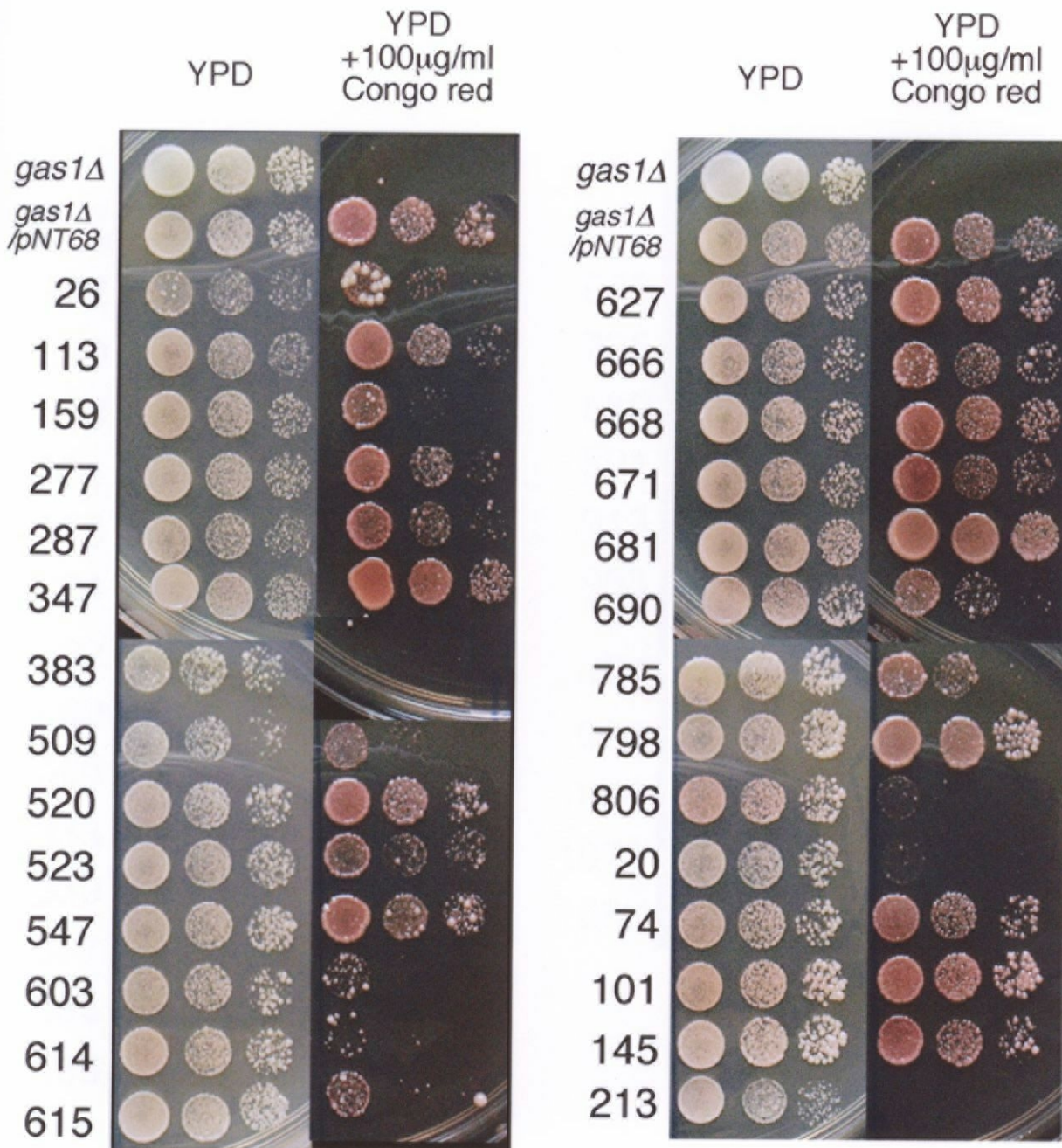


図1-2 取得した変異株のCongo red感受性

変異株、NTY9 (*gas1* Δ)/pCOM3、NTY9/pNT68(*GAS1*)の菌体数を 2.0×10^7 cells/mlに揃え、10倍ずつ2段階の希釈を行い、1株3段階の希釈段階を作製した。各希釈段階から5mlずつ、YPD、YPD+100mg/ml Congo red plateにスポットし、30 $^{\circ}$ Cで2日間培養した。

53株のうち23株が感受性を示した。

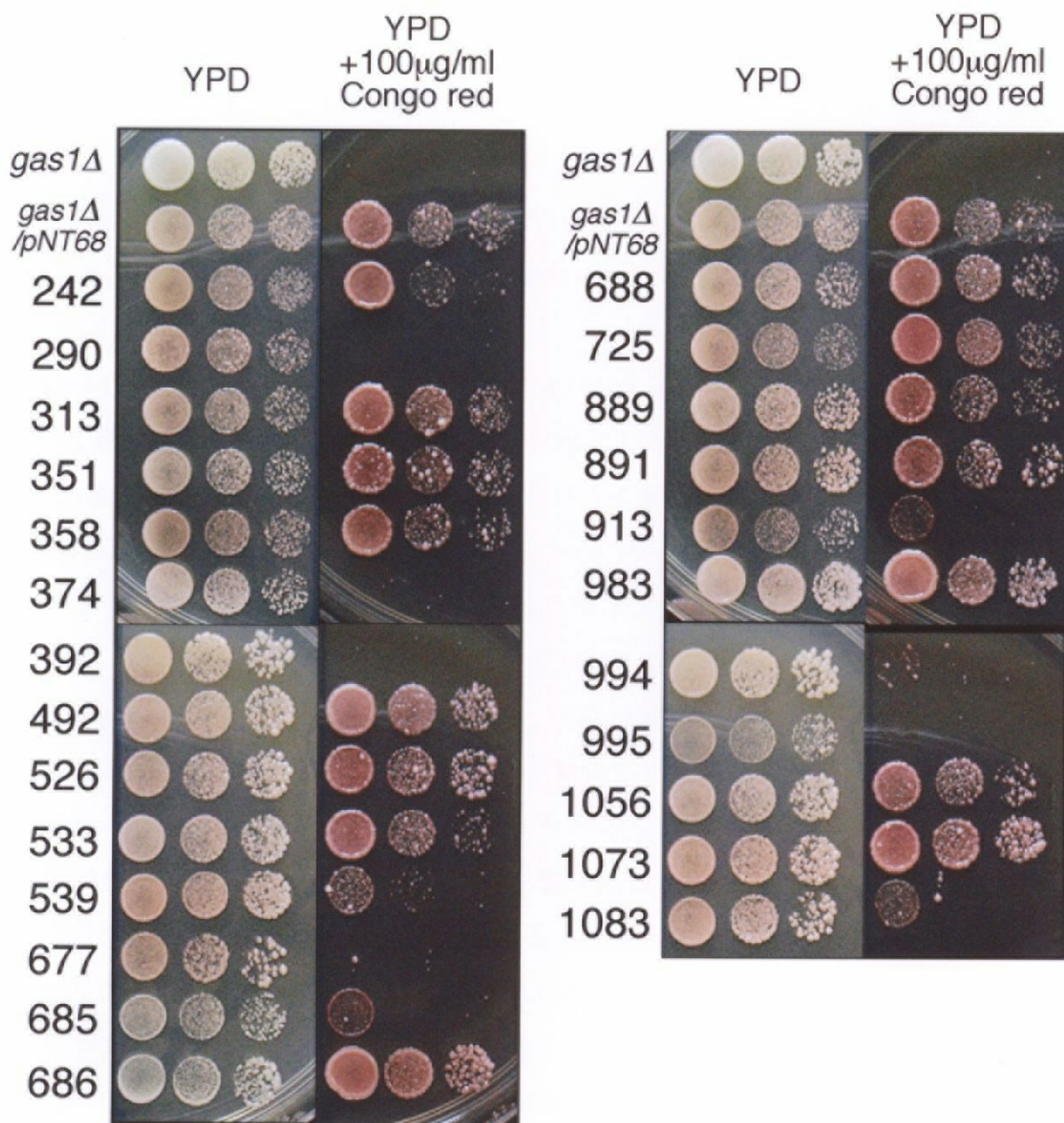


図1-2 取得した変異株のCongo red感受性（続き）

変異株、NTY9 (*gas1Δ*)/pCOM3、NTY9/pNT68(*GAS1*)の菌体数を 2.0×10^7 cells/mlに揃え、10倍ずつ2段階の希釈を行い、1株3段階の希釈段階を作製した。各希釈段階から5mlずつ、YPD、YPD+100mg/ml Congo red plateにスポットし、30℃で2日間培養した。53株のうち23株が感受性を示した。

解析を行った変異株のうち、合成致死性が一遺伝子変異に起因することが確実なものからクローニングを行った。ところが、ここでも得られたライブラリプラスミドには再現性が得られなかった。この理由として、取得した 53 変異株はコロニーの色を指標にスクリーンしたが、この中には非常に生育が困難にはなるものの、致死性ではないものが含まれている可能性が考えられた。

ADE3-GAS1 プラスミドのマーカが *URA3* であるので、5-FOA を利用し、プラスミド脱落時の致死性について、各変異株をさらに検討したところ、15 株が 5-FOA に感受性を示した(表 1-2)。このうち、細胞壁合成に参与する遺伝子に変異が入っている可能性が高い Congo red 感受性を示す 10 株を中心に、セクターの回復を指標としたクローニングを行った。ところが、この方針に従い得られたライブラリプラスミドにも、再現性のあるものはなく、まだ他に障害となる原因の存在が考えられた。

ade2 ade3 の系によるクローニングでは、変異を相補する遺伝子ライブラリプラスミドを保持する株は、*ADE3-GAS1* プラスミドを脱落して、白または白いセクター入りのコロニーを生じることを前提としている。ところが前述したように、*gas1* 破壊株は細胞壁に比較的重度の欠損を持ち、生育速度にも影響が出る。たとえ、変異を相補する遺伝子ライブラリプラスミドを保持していたとしても、*ADE3-GAS1* プラスミドの方も保持していた方が生育に有利になるため、脱落するものは少ない、つまり白または白いセクターを生じるコロニーは少ないという可能性が考えられた。その場合、セクターを指標としては、ライブラリプラスミドの変異の相補活性がはっきりせず、結果クローニングを困難にしていることが推測された。

そこで、ライブラリプラスミドの変異を相補する活性が明瞭に判断できる系を構築することにした。そのために、まず野生型 *GAS1* を *GAL1* プロモーター下においたプラスミド pNT99-2 (*CEN URA3 GAL1::GAS1*, *pGAL-GAS1* プラスミドとよぶ) を作製した。この *pGAL-GAS1* プラスミドを導入した変異株では、グルコース培地上では強制的に *GAS1* の転写が停止し、生育はライブラリプラスミドの相補活性に完全に依存する。この系では、コロニーの生育で相補活性を判断できるようになるはずである。

取得した全 53 株で *ADE3-GAS1* プラスミドと *pGAL-GAS1* プラスミドを交換した(実験方法)。交換の完了した変異株から YPD と YPG プレートにひいて、YPG 上では生育す

YPG+1M sorbitol

YPD+1M sorbitol

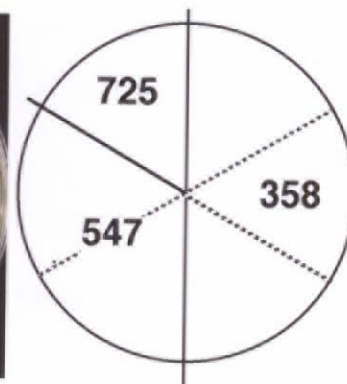
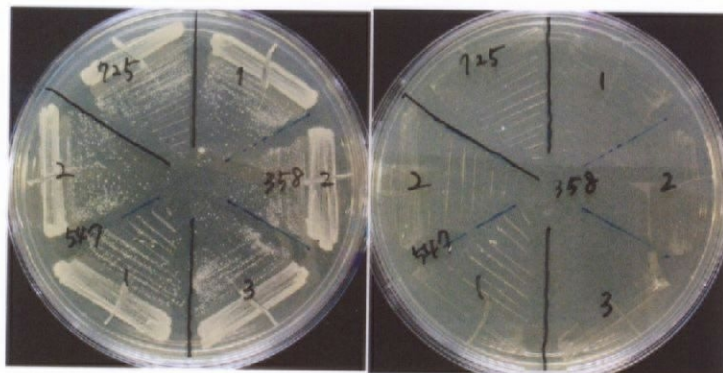
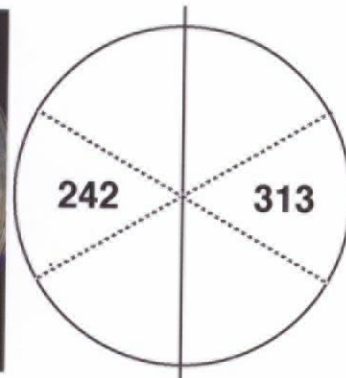
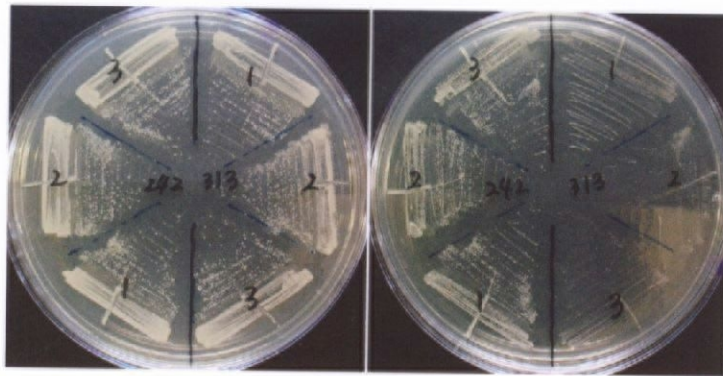


図1-3 グルコース培地で生育できないpGAL-GAS1 plasmid (pNT99-2)を導入した変異株

各変異株 (242、313:上段、358、547、725:下段) のシングルコロニーを同時にYPD+1M sorbitol、YPG+1M sorbitol plateにひき、30℃、2日間培養した。ここではグルコース培地で生育できない242株以外で、変異相補遺伝子のクローニングを行った。

るが、YPD 上では生育できない株、あるいは生育に顕著な差が出る株を選択した (図 1-3)。その結果、5-FOA 感受性株では 10 株、5-FOA 非感受性株では 4 株の計 14 株で生育の差が顕著、つまり致死性が明かであり、以降のクローニングを行うことにした。

NTLY1 で形質転換した変異株は、SD-trp+1M sorbitol plate に撒いた。30℃で 2~3 日培養後、現れたコロニーからライブラリプラスミドを回収し、大腸菌で増幅後、ポジティブコントロール pNT53 (*CEN TRP1 GAS1*)、ネガティブコントロール pRS314 (*CEN TRP1*) と共に形質転換し、相補活性の再現性を確認した。今回は再現性のあるライブラリプラスミドが得られ、これらについては DNA シークエンシングにより、インサートに含まれる DNA 領域を同定した。ORF が複数含まれていた場合、制限分析により相補活性のある領域を同定した。その結果、9 株においてこれまでに合成致死性の報告のある *KRE6*、*BCK1* を含む 8 種類の変異遺伝子を同定した(表 1-2)。

1-2-2-2. 取得した遺伝子産物の性質

取得した各遺伝子について、これまでに得られている知見を以下にまとめる。

BIG1 は、*tor2^s* の 2 つのサプレッサー変異 *rot1-1*、*rot2-1* が示す合成致死のマルチコピーサプレッサーとして取得された[Bickle et al., 1998]。Big1p は 87bp のイントロンを含む 335 アミノ酸、推定 1 回膜貫通型蛋白質であるが、ホモログは見つかっていない。遺伝子破壊は、致死的ではないものの非常に厳しい生育阻害を起こす。また非常に大きく膨らんだ形態をとり、しばしば出芽せずに多核化した様子が観察される。破壊株の生育阻害は、炭素源としてガラクトースや 1M ソルビトールの添加によって軽減される。細胞壁のキチン含量が野生株の 173%になること、*cwh41*、*gas1*、*fks1* といった細胞壁に欠損を生じる変異もまた *tor2^s* をサプレッサーすることから、*big1* 破壊株も細胞壁に欠損を生じていることが示唆されている。

CSG2、*IPT1* は、スフィンゴ脂質合成の最後の 2 ステップ IPC→MIPC→M(IP)₂C に関わる遺伝子である。図 1-4 にあるように、*CSG2*、*SUR1/CSG1* は IPC (inositolphosphoceramide)

から MIPC (mannosyl-inositolphosphoceramide)へのマンノース付加のステップで、*IPT1* は、MIPC から $M(IP)_2C$ (mannose-(inositolphosphate)₂-ceramide) を合成するステップで機能すると推定されている。*SUR1/CSG1*、*CSG2* は 50mM Ca^{2+} 感受性の生育を示す変異株のスクリーニングにより取得された遺伝子である。Sur1p のみがゴルジ体の α 1,6-mannosyltransferase である Och1p[Nakayama et al., 1992]、Hoc1p[Neiman et al., 1997]の活性中心にホモロジーのある配列をもつこと、Csg2p は小胞体に局在する[Takita et al., 1995]こと、*SUR1* は *csg2* の Ca^{2+} 感受性をマルチコピーでサプレスするが、その逆はサプレスしない[Beeler et al., 1997]ことから、*SUR1* は触媒サブユニット、*CSG2* は制御を担うサブユニットをコードしていると推定されている。*IPT1* は、IP(inositolphosphate)を付加する反応の類似性からセラミドを基質とする Aur1p のホモログとして取得された[Dickson et al., 1997]。ipt1 破壊株では、 $M(IP)_2C$ 合成酵素活性がなくなり、完全に $M(IP)_2C$ は欠失、それを補うように MIPC が増加する[Dickson et al., 1997]。またステロールに親和性を示すポリエーテル系抗生物質 Nystatin に対する耐性が増す[Leber et al., 1997]。

BCK1、*WSC1/HCS77/SLG1*、*MID2* は MAPK cascade の cell integrity pathway のコンポーネントをコードしている。*BCK1*[Lee & Levin, 1995]は *BCK1-(MKK1, MKK2)-SLT2/MPK1* から構成される MAPK cascade の MAPKKK である。Cell integrity pathway は細胞周期が進行し、出芽といった形態変化のための細胞壁再構築時に伴う剛性の変化をシグナル伝達し、細胞壁合成に関わる遺伝子の転写を活性化する。*WSC1* [Verna et al., 1997; Gray et al., 1997; Jacoby et al., 1998]、*MID2* [Rajavel et al., 1999]は短い細胞質領域とセリン/スレオニンに富んだ細胞外領域を持ち plasma membrane に局在する [Ketela et al., 1999; Lodder et al., 1999; Verna et al., 1997; Rajavel et al., 1999]、1 回膜貫通型蛋白質である。この細胞外領域は O-糖鎖修飾に富み、棒状の構造をとって細胞壁のストレスセンサーとして機能すると推定されている。現在、ともに Rho1p の GEF Rom2p と相互作用し、活性化された Rho1p の Pkc1p 活性化により、cell integrity pathway の活性化が起これと考えられている [Philip & Levin, 2001]。

KRE6 には同じくゴルジ体に局在するホモログをコードする *SKN1* が存在する。hydrophobic cluster analysis によると、Kre6 と Skn1 は family 16 glycoside hydrolases に有意に類似性をもつが、nucleotide diphospho-sugar glycosyltransferases には類似しておらず、

Strain	Gal/Glu*1	Congo red sensitivity*2	Temperature sensitivity*3	Cloned gene	Synthetic lethality*4
287	○	r		<i>BIG1</i>	
383	×	s	cs		
509	○	s	ts & cs	<i>CSG2</i>	○
523	○	r			
614	○	s		<i>BCK1</i>	○
785	×	s	cs		
806	○	s			
101	○	r			
242	×	s			
290	○	s			
392	×	s			
686	×	r	cs		
725	○	r	cs	<i>DFG5</i>	
913	○	s	ts & cs	<i>KRE6</i>	○
995	○	s	ts	<i>WSC1</i>	○
				<i>MID2</i>	×
5-FOA insensitive					
313	○	r	cs	<i>IPT1</i>	×
358	○	r			
547	○	r		<i>IPT1</i>	×
1083	○	s	cs	<i>KEX2</i>	○
<i>DFG5</i> homologue				<i>YKL046c</i>	
<i>CSG2</i> related				<i>SUR1</i>	×

*1 pGAL-GAS1 plasmidを使用したアッセイ

○:ガラクトース培地で生育するが、グルコース培地で生育できない

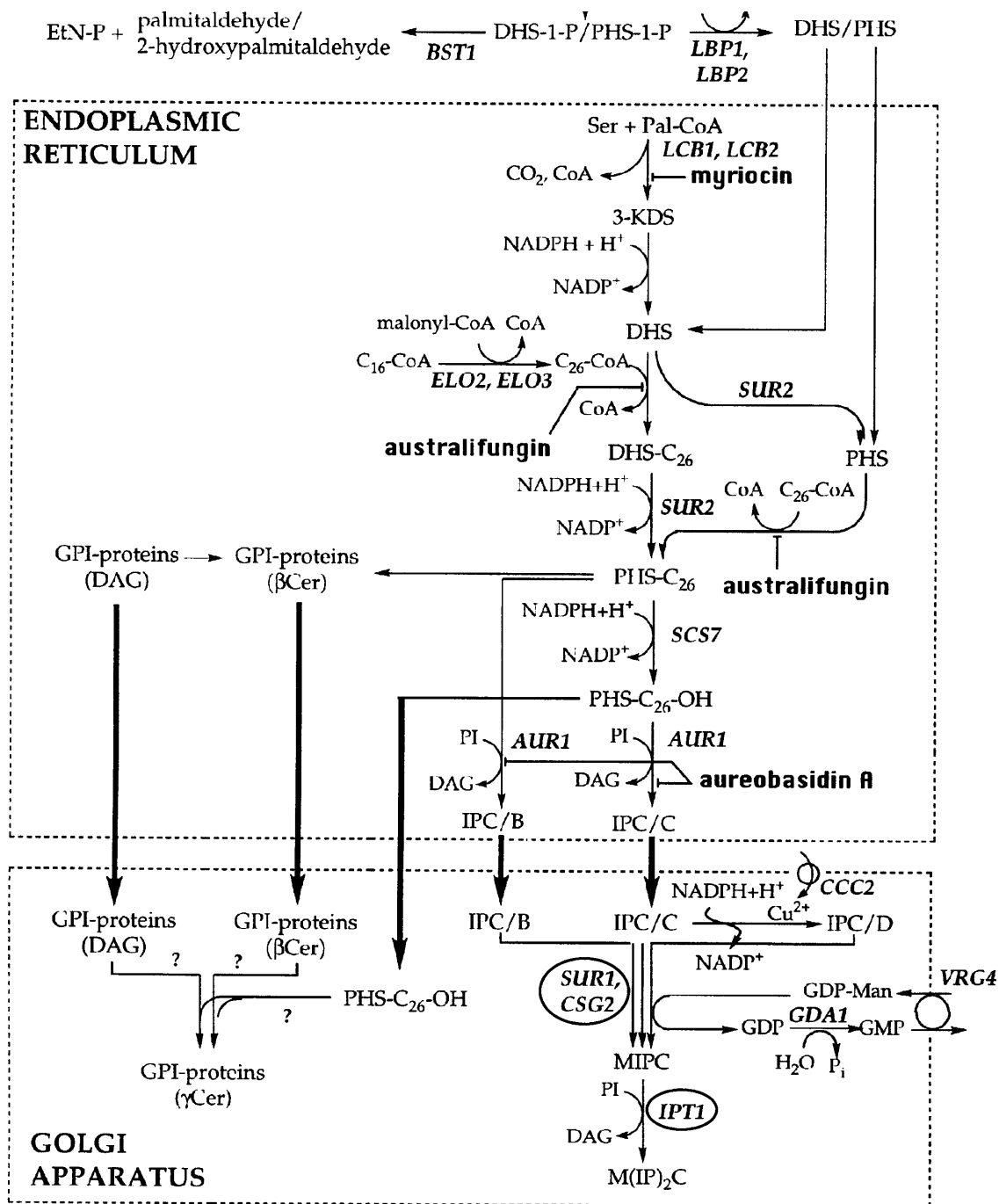
×:いずれの培地においても生育する

*2 r: resistant, s: sensitive

*3 ts: temperature sensitivity at 37°C, cs: temperature sensitivity at 14.5°C

*4 ○: synthetic lethal, ×: not lethal

表 1-2 クローニングを行った変異株と同定した変異遺伝子



Schematic representation of the biosynthesis of sphingolipids in *S. cerevisiae*.

Abbreviations used:

GPI, glycosylphosphatidylinositol; **Cer**, ceramide; **Cer-P**, ceramide phosphate; **DAG**, diacylglycerol; **DHS**, dihydrosphingosine; **IPC**, inositol phosphoceramide; **MIPC**, mannosylinositol phosphoceramide; **M(IP)2C**, inositol phospho-MIPC; **PHS**, phytosphingosine; **PI**, phosphatidylinositol;

図1-4 *S. cerevisiae*におけるスフィンゴ脂質生合成経路

本研究で解析したCSG2、SUR1、IPT1の機能する位置を赤丸で示した。

MIPSデータベースより転載

Adapted from F. Reggiori and A. Conzelmann

Biosynthesis of inositol phosphoceramides and remodeling of glycosylphosphatidyl anchors in *Saccharomyces cerevisiae* are mediated by different enzymes.

J Biol Chem 273: 30550-30559 (1998)

glucosyltransferases というよりも、glucosyl hydrolases か transglucosylases であるとする報告がある [Montijn *et al.* 1999]。これによれば、Kre6p は β 1,6-グルカン伸長反応というよりもプロセッシングをしていることになる。

DFG5 は、filamentous growth に欠損を示す変異株のスクリーニングにより取得された [Mosch & Fink, 1997]。Mutant homozygous diploid は、野生株が細胞の両極端から交互に出芽するのに対し、細胞極性を消失してランダムな出芽パターンを示す。最近では、バクテリアの mannanase に低いながらもホモロジーを示し、GPI-anchor 型蛋白質をコードする遺伝子として、*DFG5* と *YKL046c* が見い出された。それぞれ単独の遺伝子破壊は生育可能であったが、二重破壊株は合成致死であることが報告された [Kitagaki *et al.*, 2001]。

KEX2 は、ゴルジ体に局在するプロセッシングプロテアーゼをコードする遺伝子である。これまで pro- α -factor や killer toxin のプロセッシング、活性化を行っていることが良く知られているが、基質蛋白質配列中 KR が最適認識配列であることが明らかになっている。

1-2-3. 破壊株の作製と変異遺伝子の同定、*gas1* 破壊との合成致死性

上記 8 変異遺伝子のうち、*CSG2* と同じステップで機能すると考えられている *SUR1*、*DFG5* のホモログである *YKL046c* を加えた、10 種類の遺伝子の破壊株を *ipt1*、*wsc1*、*mid2* 破壊株以外は、二倍体で one step gene disruption により作製した。遺伝子破壊は Southern hybridization により確認した後、胞子分けにより両 mating type の破壊株を得た。二倍体で作製した *bck1* 破壊株は、胞子分けの結果 YPD、YPG において生育するもの、生育できないものが 2: 2 に分離し、KA31 background では破壊は致死であった。1M ソルビトールを添加した YPD、YPG においても生育は回復しなかった。*big1* 破壊株は、YPD+1M ソルビトールにおいてのみ胞子を分けることができたが、非常に生育が悪かった。いったん生育したものは、1M ソルビトールの添加に関わらず生育し、germination の段階に欠損があることが示唆された。これらを *gas1* 破壊株とかけ合わせ、四分子解析を行ったところ、*csg2*、*wsc1*、*kex2* 破壊株の 3 株で新たに合成致死性が確認された。本スクリーニングでも取得されたが、合成致死性は既に報告されている *bck1*、*kre6* 破壊株と合わせて 5

株で *gas1* 破壊株と合成致死を示すことが明かとなった (表 1-2)。

一方、*sur1*、*mid2*、*ipt1* 破壊株は合成致死を示さなかった。このうち *gas1 ipt1* 二重破壊株は YPD プレート上では、*gas1* 破壊株と同程度に生育の遅れを示したが、YPD+1M ソルビトールプレート上では、更に生育の遅れを示した (図 1-5)。また Gas1p 同様に GPI-anchor 型蛋白質をコードする *CWP1* の破壊株と *ipt1* 破壊株をかけ合わせ、*cwp1 ipt1* 二重破壊株の高浸透圧感受性について検討した。*gas1 ipt1* 二重破壊株、*cwp1 ipt1* 二重破壊株それぞれ 6 個の胞子嚢由来の胞子について 30℃、YPD±1M ソルビトールプレートでの生育を観察した。*gas1 ipt1* 二重破壊をもつ胞子はすべて 1M ソルビトール存在下で生育阻害を起こしているのに対し、*cwp1 ipt1* 二重破壊をもつ胞子の生育は 1M ソルビトールの存在によらず、良好であった (図 1-5)。

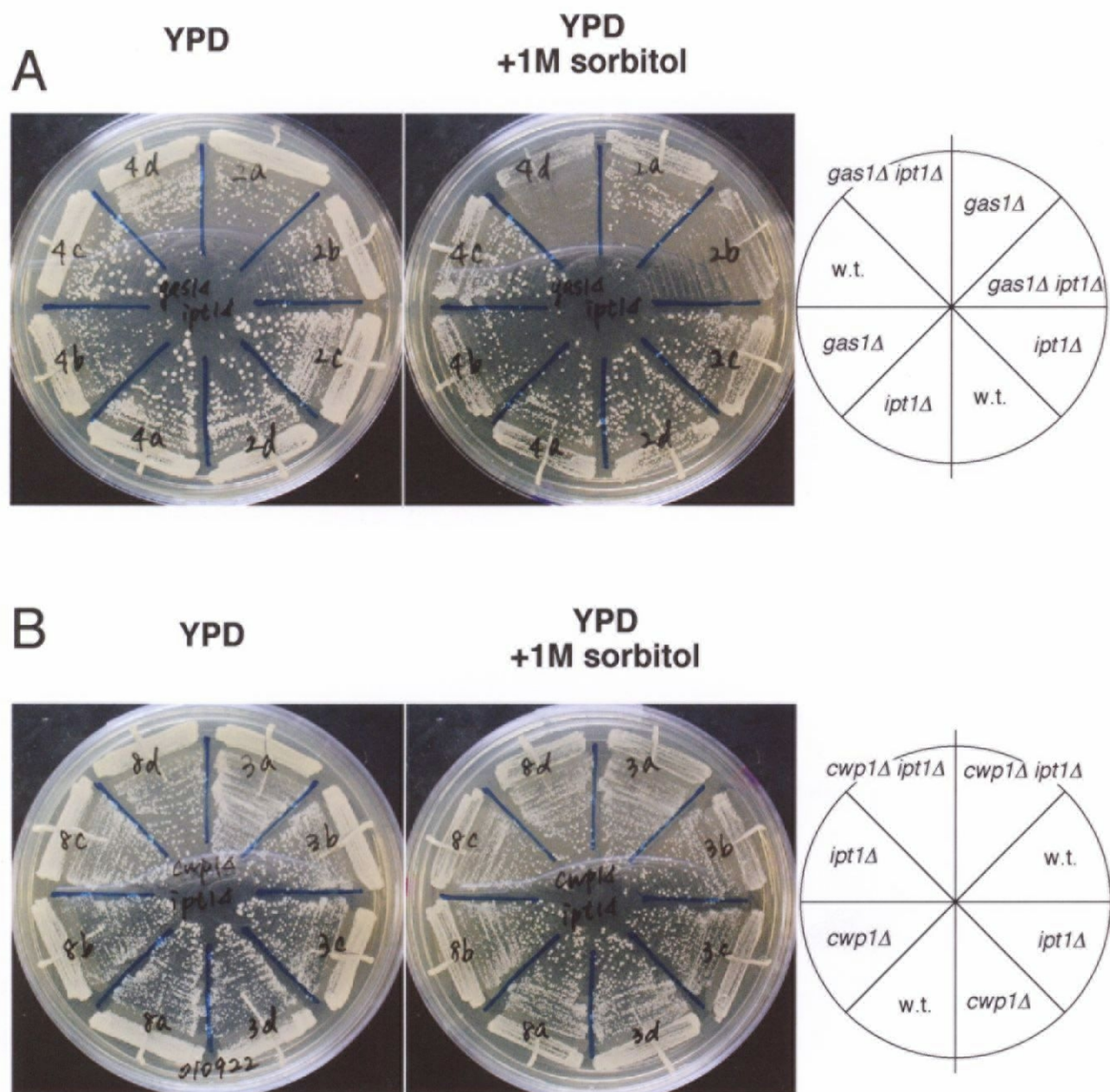


図1-5 *gas1 ipt1*二重破壊株の高浸透圧感受性は*gas1*破壊に特異的である

A. NTY47 (*MATa/a gas1Δ/GAS1 ipt1Δ/IPT1*)の四分子解析により生じた胞子を、YPDおよびYPD+1M sorbitol plateにひき30°Cで2日間培養した。

*gas1Δipt1Δ*の胞子は、致死ではないものの高浸透圧感受性の生育を示した。

B. NTY30 (*MATa/a cwp1Δ/CWP1 ipt1Δ/IPT1*) の場合

*cwp1Δ ipt1Δ*の胞子は感受性を示さない。

いずれの株も検討した独立の5個の子囊において、上と同様の結果が得られた。

1-2-4. 破壊株における細胞壁合成の解析

取得した遺伝子の細胞壁合成への関与を検討するため、作製した破壊株を用いて細胞壁欠損時に特徴的な表現型の有無を観察した。

1. Congo red に対する感受性、
2. 細胞壁のグルカン由来のグルコース、マンナン蛋白質由来のマンノース、キチン由来のグルコサミンの3種の糖組成、
3. 欠損をもつ細胞壁に対して機能する補償機構の一つである細胞壁蛋白質 Cwp1p の発現量増加、

の3点について検討した。以下その結果について述べる。

1-2-4-1. Congo red に対する感受性

Congo red は β 1,3-グルカンに親和性をもち、結合して β 1,3-グルカン鎖が最終的にリボン状の線維へとアセンブルするのを妨げ、細胞壁は異常な形態を示す[Kopecka *et al.*, 1992]。そのため、細胞壁に欠損をもつ変異株、遺伝子破壊株では、野生株に比べ高い感受性を示す。本スクリーニングで得られた変異株については既に検討したが(図 1-2)、additional な変異のない遺伝子破壊株を用いて、細胞壁に欠損を生じている可能性について検討した(図 1-6)。その結果、ネガティブコントロールの *gas1* 破壊株のほかは *kre6*、*wsc1* 破壊株が顕著に感受性を示した。*big1* 破壊株は *mnn9* 破壊株同様、既に YPD プレート上で他に比べ生育が悪かった。しかし、YPD+100 μ g/ml Congo red プレート上ではさらに生育阻害を生じ、第一段目のスポットでも菌体は生育できなかった。これより両者とも感受性を示していると考えられる。*kex2* 破壊株については第 2 章に示す。

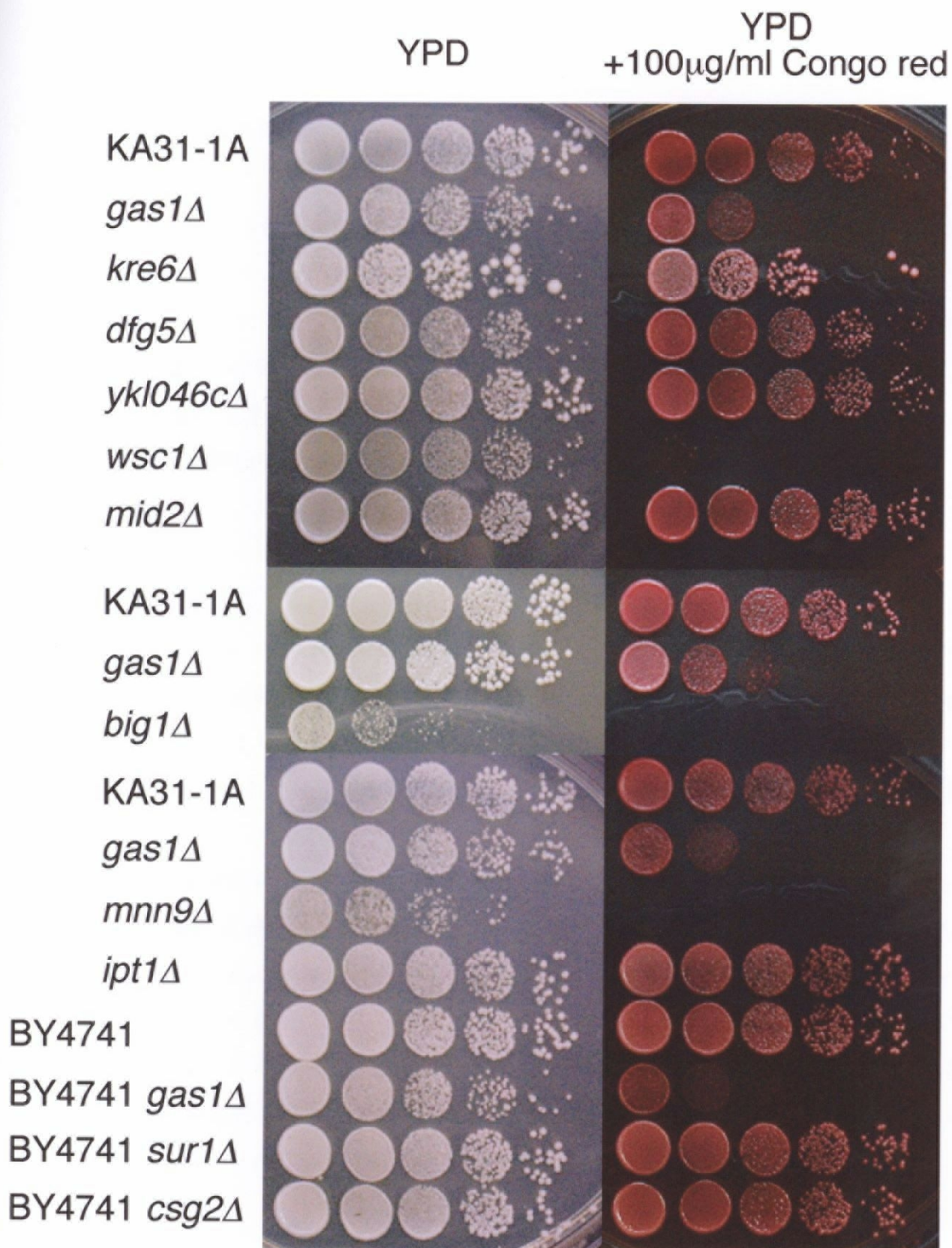


図1-6 取得した遺伝子破壊株のCongo redに対する感受性
各遺伝子破壊株の菌体数を 2×10^7 に揃え、10倍ずつ4段階の希釈を行い、各希釈段階から5 μ lずつスポットした。

1-2-4-2. 細胞壁の糖組成

細胞壁を構成する糖はグルカン由来のグルコース、マンナン蛋白質の N-、O-糖鎖由来のマンノース、キチン由来の N-アセチルグルコサミンの 3 種類である。これまでに取得された変異株や遺伝子破壊株の細胞壁糖組成の解析[Ram *et al.*, 1994; Lussier *et al.*, 1997]からは、その遺伝子産物の機能を反映した結果が得られている[Dallies *et al.*, 1998]。そこで、本研究で取得した遺伝子の細胞壁合成における役割に関して知見を得る目的で、各遺伝子破壊株の細胞壁糖組成を解析した。

1-2-4-2a. 各遺伝子破壊株の細胞壁糖組成解析と Man/Glc ratio の比較

野生株 KA31-1A、BY4741 に加え、これまでの報告[Dallies *et al.*, 1998]から、野生株に比べてグルコースに対するマンノースの割合 (Man/Glc ratio) が低下する株として *gas1* 破壊株、上昇する株として *mnn9* 破壊株をコントロールとした。スクリーニングの条件である YPD+1M ソルビトールで培養した細胞の細胞壁画分からサンプルを調製した。

その結果、破壊株によって様々な値をとることが明かとなった (図 1-7)。*gas1*、*kre6*、*kex2*、*ipt1*、*dfg5* 破壊株が、野生株の Man/Glc ratio 0.79、0.75 に比べ高い値をとるのに対して *mnn9*、*sur1*、*csg2* 破壊株は低い値をとった。*yk1046c* 破壊株はほぼ同様の値をとった。前者は、*gas1*、*kre6* 破壊株に代表されるように、グルカン合成・修飾に欠損を持つ株である可能性が示唆される。一方、後者は *mnn9* 破壊株に代表されるように、マンノース糖鎖不全株である可能性、もしくは細胞壁に局在するマンナン蛋白質量が減少している株である可能性が考えられる。

1-2-4-2b. 細胞壁糖組成 Man/Glc ratio の低い株における糖鎖不全の可能性

sur1、*csg2* 破壊株では、N-糖鎖不全株の *mnn9* 破壊株同様、細胞壁糖組成は低い Man/Glc ratio を示した。そこで、*sur1*、*csg2* 破壊株で N-糖鎖不全を生じている可能性を検討する

ために、*sur1*、*csg2* に *ipt1* 破壊株を加えてライセートを、分子内に推定の *N*-糖鎖付加部位が 10 ケ所存在し、過剰な修飾を受ける Yap3p に対する抗体でのウェスタン解析に供した (図 1-12)。*N*-糖鎖不全株のコントロールとして、*mnn9* 破壊株のほかに、*vig9-1* 変異株を用いた。

その結果、コントロールではその変異、遺伝子破壊の影響の大きさに従い、Yap3p のスメアなバンドは、*vig9-1* で低分子量域にシフトし、*mnn9* 破壊株では、約 80kDa までシフト、単一なバンドとして検出された。

background の異なる野生株によって、検出されるスメアなバンドの分子量域に差が生じたが、*csg2*、*sur1* 破壊株、*ipt1* 破壊株で検出されるバンドの分子量域はそれぞれの野生株と同様であった。このことから、いずれの株においても *N*-糖鎖付加には欠損を生じていないことが示唆された。

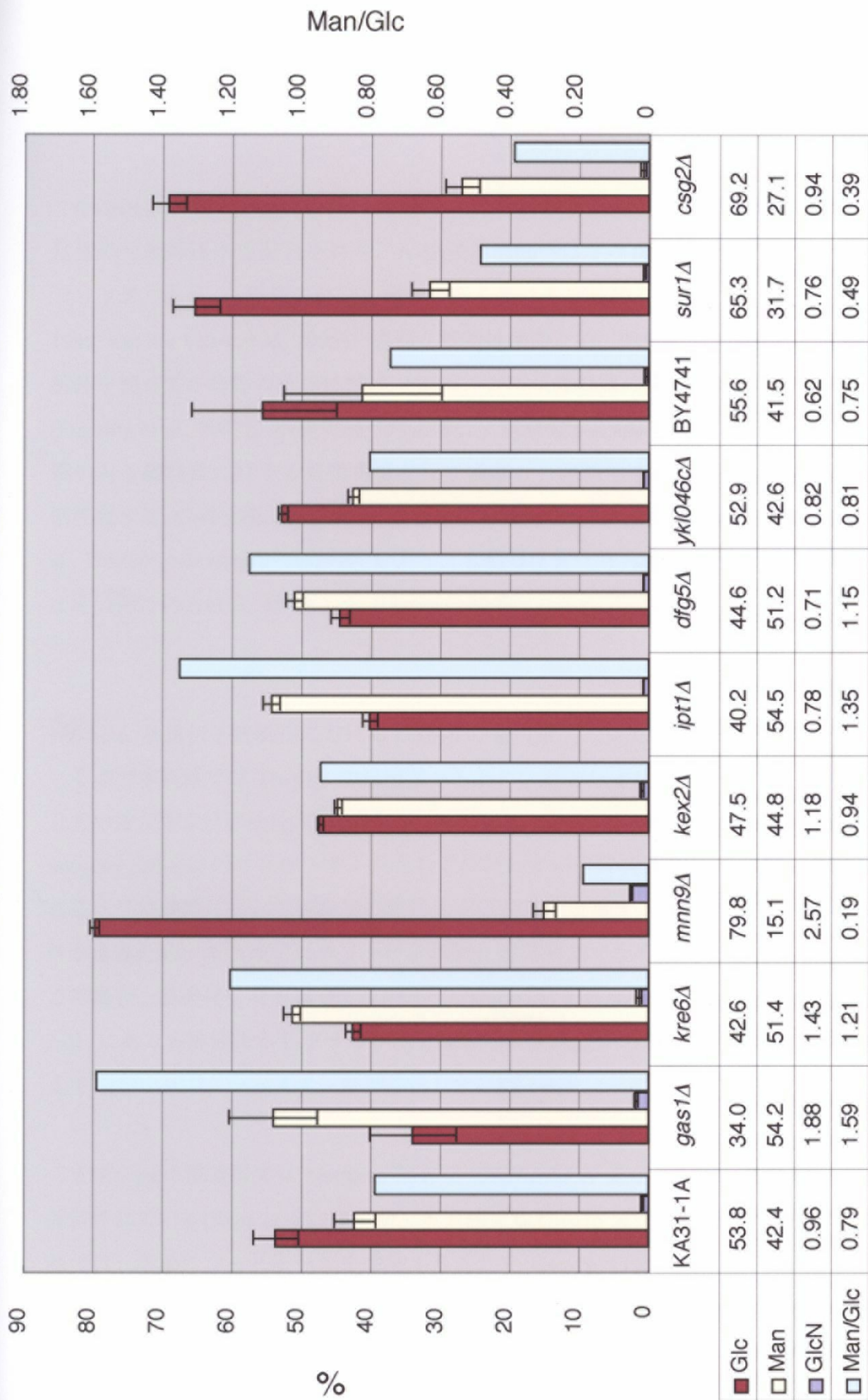


図1-7 各遺伝子破壊株細胞壁の糖組成 各株1回の培養からサンプルを3つに分けて測定、平均した。
S.D.はn=3で算出した。

1-2-4-3. 各遺伝子破壊株における Cwp1p の発現量

Cwp1p はアミノ酸配列中、N 末に分泌のためのシグナルシーケンス、C 末に GPI-anchor 付加のための疎水性配列を持ち、N-糖鎖付加部位は 1 ケ所であるが、セリン、スレオニンリッチであり、O-糖鎖の修飾を非常に多く受ける典型的な GPI-CWP である [Shimoi *et al.*, 1995; van der Vaart *et al.*, 1995]。過剰な糖鎖付加のため、219 アミノ酸よりなる蛋白質は、抗体を使って小胞体の前駆体型は 45kDa、ゴルジ体以降の成熟型は 55kDa に検出される [Fraering *et al.*, 2001]。序論で述べたように、MAPK cascade の cell integrity pathway は、欠損のある細胞壁に対する補償機構として機能し、細胞壁合成に係る遺伝子の転写を活性化する。CWP1 は、細胞周期によって転写制御を受けている [Caro *et al.* 1998; Spellman *et al.*, 1998] が、cell integrity pathway によっても転写活性化される遺伝子の一つである [Kapteyn *et al.*, 1997; Ram *et al.*, 1998; Jung & Levin, 1999]。

1-2-4-3a. 各遺伝子破壊株における Cwp1p の発現量

そこで本実験では Cwp1p の発現量をもとに、各遺伝子破壊株において補償機構が機能しているか否か、Cwp1p の成熟化のプロセスに欠損がないか、そして各遺伝子産物が cell integrity pathway のコンポーネントとして機能している可能性について検討した。ただし、各遺伝子破壊株によって細胞壁の溶解度が異なり、遊離する Cwp1p の量に差が出る可能性があるため、本実験ではライセート調製に溶菌酵素でなく、グラスビーズを使用した。この場合、細胞壁に共有結合している Cwp1p は含まれない。対数増殖期 (O.D.₆₀₀=1.0~2.0) にある各破壊株からライセートを調製し、O.D.₆₀₀ から 1 レーンあたりの菌体数を揃えて SDS-PAGE、ウェスタン解析に供した (図 1-8,9)。

まず、*gas1* 破壊株では Northern 解析で CWP1 mRNA 量が 3 倍程度まで増加することが報告されている [Ram *et al.* 1998] が、本実験でも Cwp1p 発現量の増加が確認された。野生株では、培地にソルビトールを添加することで Cwp1p の発現量増加が認められた。また全ての株において±ソルビトールで Cwp1p 発現量に違いは認められなかった (図 1-8,9)。

csg2、*sur1* 破壊株では若干増加しているようにも見えるが、野生株とほぼ同程度の発現量を示した。その他の破壊株では軒並み発現量が増加していた。なかでも、*kex2* 破壊株、*big1* 破壊株において発現量の増加が顕著であった。*ipt1* 破壊株では *gas1* 破壊株と同程度の発現量増加が認められるが、45kDa の前駆体が蓄積していた (図 1-8,9A)。

1-2-4-3b. 各遺伝子破壊株培養上清における Cwp1p 量

GPI-CWP の細胞壁への転移のステップに欠損を生じている場合、Cwp1p を培地中に漏出することが予想されるので、ライセート調製時の培養上清を TCA 沈殿により濃縮し、1 レーンあたりの菌体数を揃えて SDS-PAGE、ウェスタン解析に供した (図 1-10)。

その結果、培地中の Cwp1p は *kex2*、*wsc1*、*big1* 破壊株で顕著に検出された。培地に 1M sorbitol を添加により、*big1* 破壊株では検出量が減少した。

1-2-4-3c. 培地中に漏出した Cwp1p の由来・原因の検討

PKC1-MAPK cascade のコンポーネントをコードする遺伝子の変異株は、37℃で溶菌することが報告されている。そこで、前項の培地中で検出された Cwp1p が、破壊株の溶菌が原因である可能性を検討した。そのために、細胞質のマーカー蛋白質 Pgk1p に対する抗体でウェスタン解析を行った (図 1-11)。ポジティブコントロールとして、野生株のライセートを用いた。

その結果、*wsc1* 破壊株では Pgk1p に対する抗体でシグナルが検出され、溶菌していることが示唆された。それに対し *kex2*、*big1* 破壊株では、シグナルは検出されず、培地中の Cwp1p は溶菌のためではなく、細胞壁から漏れ出していることが示唆された。

YPD

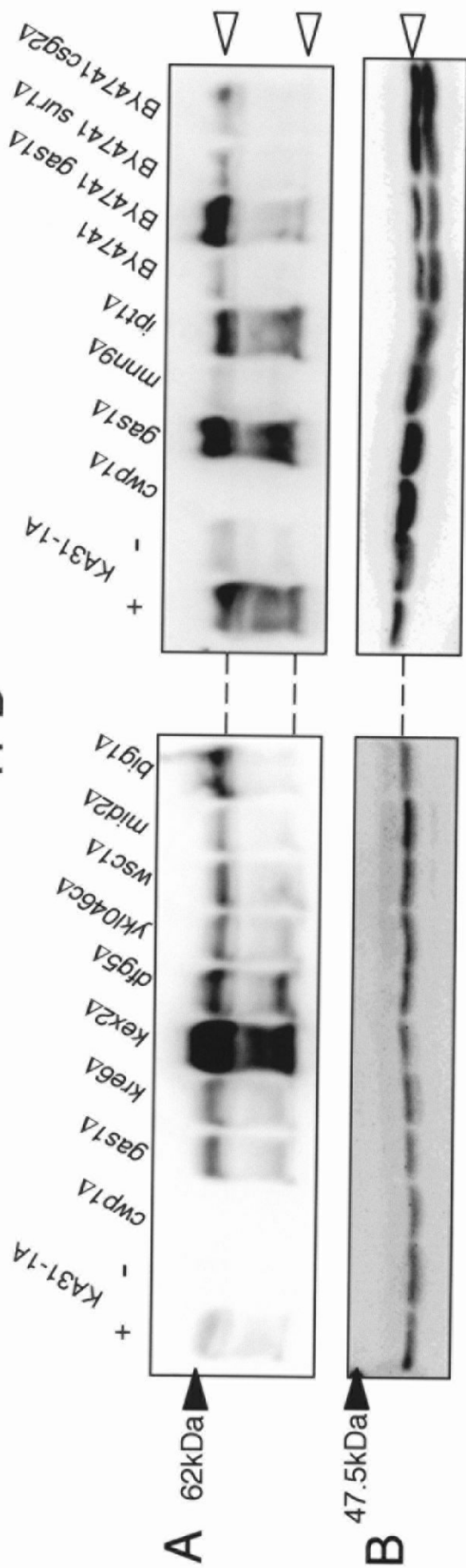


図1-8 YPDで培養した破壊株におけるCwp1pの発現量の比較
 A. 2.0×10^5 cells/lane相当のライセートを泳動した。anti-Cwp1pによるWestern解析
 B. Aのloading control, anti-Sed5pによるWestern解析、doubletの上のバンドがSed5p。

各パネル左側の黒三角と数字は近傍の分子量マーカーの位置、
 右側の白三角は抗体で検出された蛋白質自身の位置を表す。

YPD+1M sorbitol

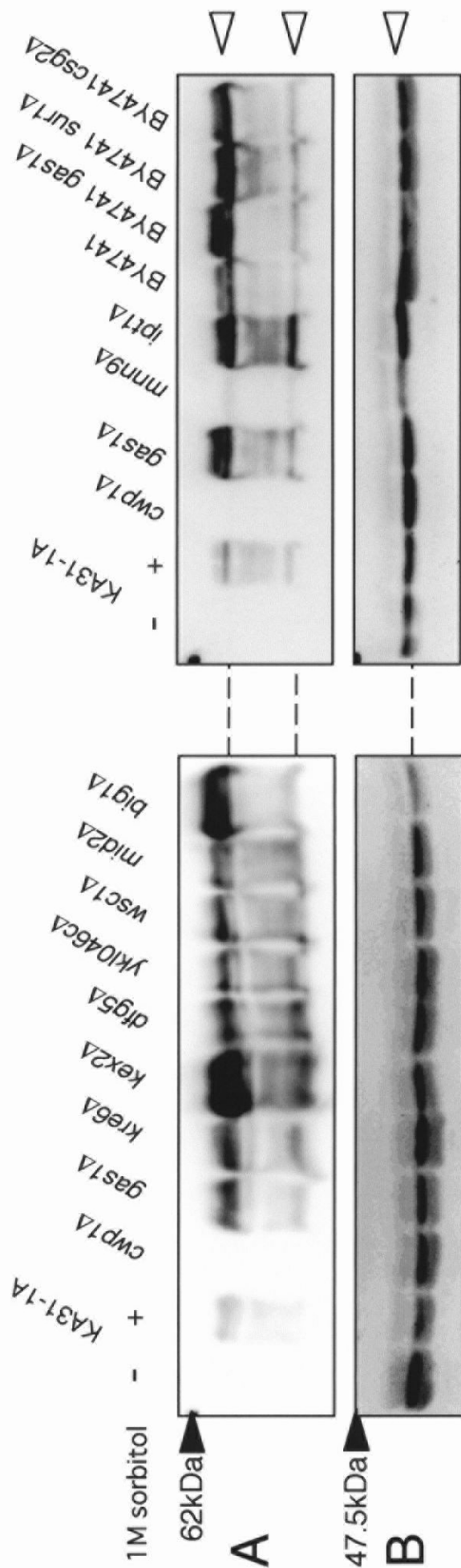


図1-9 YPD + 1M sorbitolで培養した破壊株におけるCwp1pの発現量の比較
 A. 2.0×10^5 cells/lane相当のライセートを泳動した。anti-Cwp1pによるWestern解析。
 B. Aのloading control (anti-Sed5pによるWestern解析; doubletの上のbandがSed5p)。

各パネル左側の黒三角と数字は近傍の分子量マーカーの位置、
 右側の白三角は抗体で検出された自身の蛋白質の位置を表す。

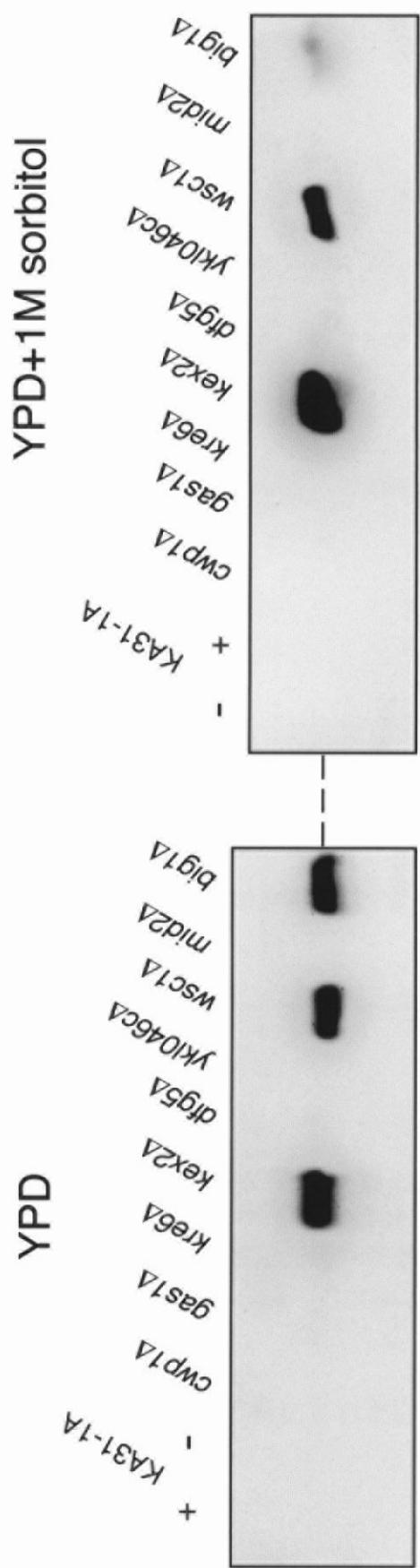


図1-10 各遺伝子破壊株培養上清中のCwp1p量の検討

左: YPD培養上清をTCA沈殿により濃縮し、Cwp1pに対する抗体によるWestern解析に供した。
 右: YPD+1M sorbitol培養上清をTCA沈殿により濃縮し、Cwp1pに対する抗体によるWestern解析に供した。
 各laneに 5.0×10^6 cells/lane当量の濃縮した培地を泳動した。

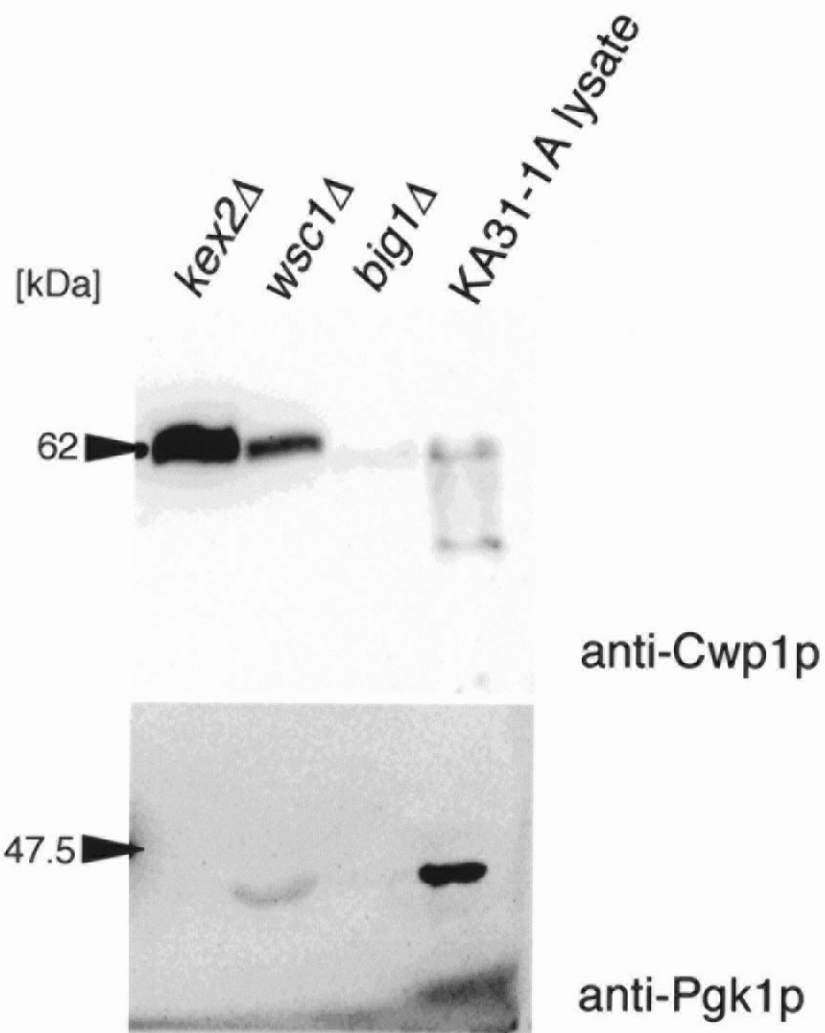


図1-11 培地上清のTCA沈殿による濃縮

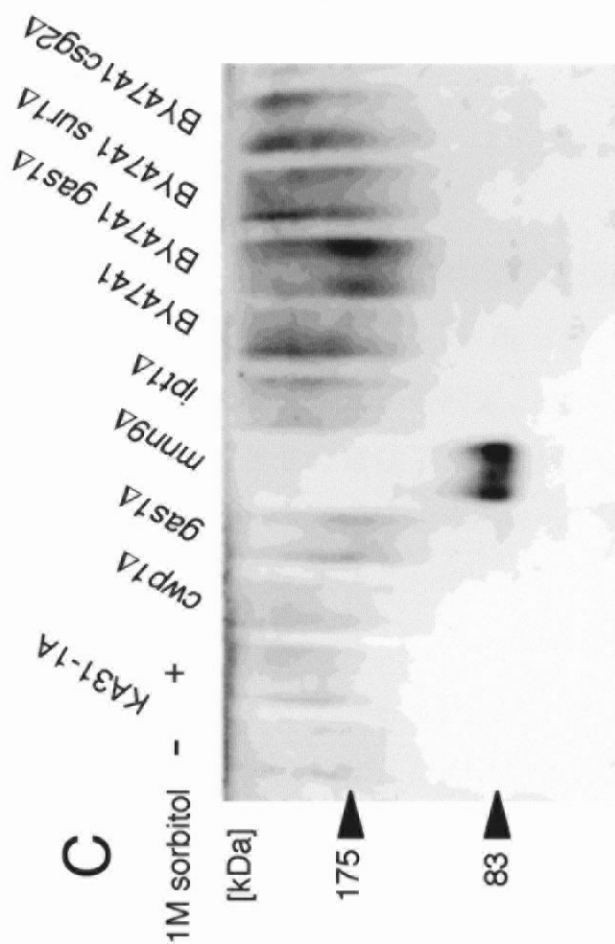
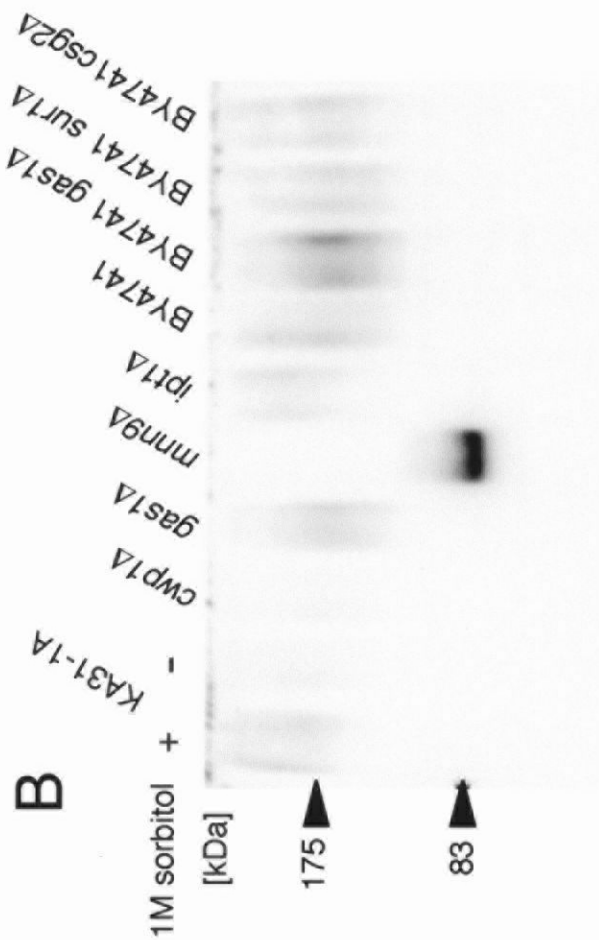
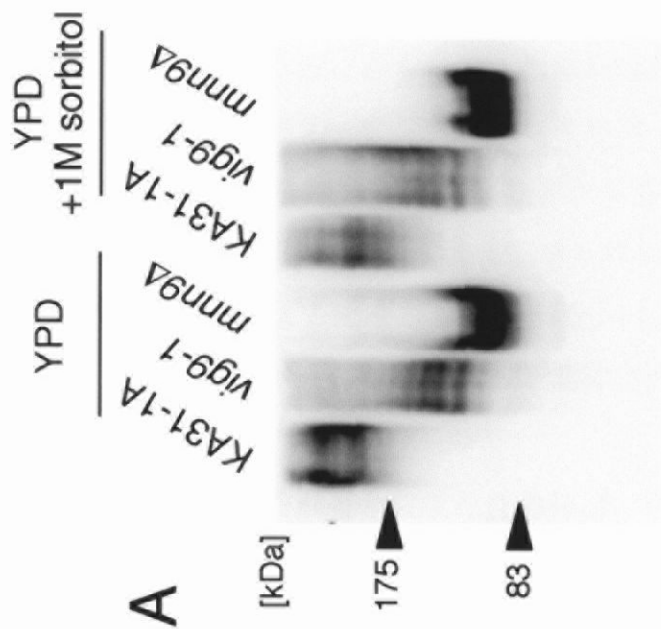
上: 図1-9で培地中 (YPD+1M sorbitol) にCwp1pを漏出する株のサンプルを再び並べWesternに供した

下: 上のmembraneをcytosolのmarker protein Pgk1pに対する抗体でreprobeした

*kex2Δ*培養上清で検出されたCwp1pは、*wsc1Δ*と異なり、溶菌によるものではない

図1-12 スフィンゴ脂質合成系の遺伝子破壊株
における糖鎖不全の可能性の検討

A. Control, YPD ± 1M sorbitol で培養した野生株、糖鎖不全株
(*vig9-1*, *mnn9Δ*) から調製したライセート
B. YPD で培養した各株から調製したライセート
C. YPD + 1M sorbitol で培養した各株から調製したライセートを
Yap3p に対する抗体で Western 解析した。



第3節 考察

本章では、既知の遺伝的相互作用から考察した仮説“*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”に基づき、*gas1* 破壊との合成致死スクリーニングを行い、変異株の取得と変異遺伝子の同定、クローニング、遺伝子破壊株の作製と合成致死性の確認、そして取得した遺伝子の細胞壁合成における役割を検討した。

合成致死スクリーニングから相補遺伝子のクローニングまで

本スクリーニングでは、新規の遺伝子を取得することはできなかったが、*gas1* 破壊株と合成致死を示すという点では新規の遺伝子の取得に成功した。また、*IPT1* 以外の遺伝子については飽和しておらず、本スクリーニングによってまだ未知の合成致死遺伝子の取得の可能性が残されている。本研究でクローニングに到らなかった残りの変異株についても、Congo red 感受性、温度感受性が合成致死性と連鎖していることを確認の上、あるいは他の表現型を見出した上でクローニングを進めることによっても未知の合成致死遺伝子の取得がなるかも知れない。本スクリーニング系は古典的な変異処理、変異株の取得、ゲノムライブラリによる相補遺伝子の探索からなる。本研究では、クローニング系の確立に手間取ったものの、相補活性のあるライブラリプラスミドが得られた後は、インサート両端の DNA シークエンスをデータベースで検索するだけで相補活性を含む領域を同定することができる。このような遺伝的相互作用とゲノム全塩基配列情報の利用は、出芽酵母の利点、特性である。さらに変異処理も Transposon mutagenesis を用いれば、アミノ酸置換による変異株は得られないものの、変異株を取得してから合成致死遺伝子の同定までを速やかに遂行できると期待される。

遺伝子破壊株の作製と合成致死性の確認

本スクリーニングは“*gas1* と二重破壊株が合成致死性となる変異は、 β 1,3-グルカンやキチンへの GPI-CWP の結合量を極度に減少させる”という仮説のもとに行い、合成致死を示す変異株を単離した。この仮説の検証は、得られた遺伝子の細胞壁生合成における

役割が明らかになった時点で自ずとなされるものであり、本研究では得られた遺伝子とその産物の解析を優先して行うこととした。

取得した遺伝子のうち、*KRE6*、*BCK1* の 2 遺伝子は、合成致死性が既知であったが、これは本スクリーニング系が妥当に行われたことを支持する結果である。また破壊株は作製したものの、新規の合成致死遺伝子の解析を優先させた結果、本研究では合成致死性は追試していない。

KEX2、*CSG2*、*WSC1* の 3 遺伝子は、新規の合成致死を示した。このうち、*WSC1* に関しては *PKC1*-MAPK cascade の上流で細胞壁のストレスセンサーとしての知見が蓄積しており、後にも述べるが、cell integrity pathway が機能しなくなったためである可能性が高い。*KEX2*、*CSG2* は細胞壁合成への関与については全くといっていい位に報告はなく、そういった意味で新規性が高く興味深い。*KEX2* 産物は分泌経路、ゴルジ体に局在して細胞壁合成に関与する分子のプロセッシング、活性化を通じて細胞壁合成に関与している可能性が考えられる。また、Kex2p は C 末の短い細胞質領域にゴルジ体局在化シグナルをもっており、ゴルジ体、plasma membrane、エンドソームをサイクルしている。Plasma membrane にサイクルしてきた時に、未知の機能を果たすことで細胞壁合成に関与している可能性も考えられる。*KEX2* の細胞壁合成における役割の詳細な解析については、第 2 章で述べることにする。

MID2、*IPT1* はスクリーニングで取得されたものの、その破壊株は合成致死性を示さなかった。*MID2* は *WSC1* 同様に、細胞壁のストレスセンサーとして認知されているが、合成致死性の違いは、*MID2*、*WSC1* の感知するストレスの違い、役割の違いを示している可能性があるとし唆される。

IPT1 とスクリーニングでは取得されなかったが、*SUR1* は合成致死性を示さなかった。*SUR1*、*CSG2*、*IPT1* はスフィンゴ脂質合成系の最終 2 段階の反応を担う酵素である。動物細胞ではスフィンゴ脂質はステロール、GPI-anchor 型蛋白質と緊密に相互作用した膜ドメインを形成することが示唆され、報告も蓄積してきているが、最近、出芽酵母にもそうした膜ドメインが存在することが報告された[Bagnat et al., 2000]。細胞壁合成への関与についての報告は全くないといったが、本研究の対象とした GPI-CWP はまさに GPI-anchor 型蛋白質であり、これらの遺伝子はこのような膜ドメインの形成という側面から、細胞

壁合成に関与している可能性もあると考えられる。

BIG1、*DFG5* と *DFG5* のホモログ *YKL046c* については、破壊株は作製したものの、合成致死性は確認していない。これらの遺伝子については報告も蓄積していないが、本研究の結果、細胞壁に欠損を生じていることが示唆されており、合成致死性の確認を急ぐとともに、機能の解析、細胞壁合成における役割の解析を進めたい。

各遺伝子の、細胞壁合成における役割

BIG1

結果の節で触れた細胞壁の欠損が *tor2^{ts}* をサプレスする、という事実は *tor2^{ts}* では、制限温度下では *Rho1p* を活性化できずに生育に影響が出るが、細胞壁に欠損をもつ変異株では、GEFである *Rom2p* の活性化を通じて *Rho1p* が活性化されるため、*ts* がサプレスされるというメカニズムをとることが推測されている。これは以下の観察によって支持される。1) *big1* 破壊株も *Rho1p* を活性化すること、*tor2^{ts}* は *Rho1p* の活性化によってサプレスされること、2) *rot1-1 rot2-1* の合成致死性、*big1* 破壊株の生育は *RHO1* GAPs である *SAC7* の過剰発現によってサプレスされる。3) *rot1* 破壊株、*big1* 破壊株の生育は *RHO1* GEFs である *ROM2* の破壊によって完全ではないが、改善される。そして細胞壁のキチン含量が野生株の 173%になること、*cwh41*、*gas1*、*fks1* といった細胞壁に欠損を生じる変異もまた *tor2^{ts}* をサプレスすることから、*big1* 破壊株も細胞壁に欠損を生じていることが示唆されている [Bickle *et al.*, 1998]。本研究でも Congo red 感受性、*Cwp1p* の発現量増加と同時に培地中への漏出から *big1* 破壊株が細胞壁に欠損を生じているのは明かである。*Big1p* はその一次配列から 1 回膜貫通型蛋白質であることが予想されているが、局在についての報告はない。どこの膜に局在しているかという情報は非常に重要であると考えられる。現在、*BIG1* にタグgingした構築を作製しており、局在について情報が得られると期待している。また、*BIG1* についての報文は上記の Bickle *et al.* の 1 報しかなく、しかも彼等は *rot1-1 rot2-1* 合成致死のマルチコピーサプレッサーとして取得しており、*big1* 変異として取得したのは、本研究が最初である。ホモログは見つかっていないが、*BIG1* 塩基配列中の変異点の決定から活性中心とその周りのドメイン構造について知見が得られる可能性がある。また細胞壁糖組成の測定から、機能解析への手がかりが得られるかも知れない。

CSG2、SUR1、IPT1

S. cerevisiae におけるスフィンゴ脂質は、図 1-4 に示したように、IPC、MIPC、M(IP)₂C の 3 種類である。そしてこの 3 種のスフィンゴ脂質は、主に plasma membrane に存在しているが、全ての膜を構成する脂質の 7-8%、plasma membrane のリン脂質の 30%を占める。そしてスフィンゴ脂質の最終産物 M(IP)₂C は全スフィンゴ脂質の約 75%を占める。動物細胞では低温 (4℃) で TX-100 に不溶である膜画分が単離され、ここにスフィンゴ脂質、ステロール、GPI-anchor 型蛋白質、ras 等のシグナル伝達に関わる分子が含まれていた。スフィンゴ脂質は長鎖の飽和炭化水素をもち、ファンデルワールス力と水素結合により会合しやすい性質をもっている。また GPI-anchor の脂質部分もまた飽和炭化水素をもち、*in vivo* でもこれらがステロールと共に高度にパックされた膜ドメインを形成すると考えられ、これをリン脂質による膜の海に浮かぶ“ラフト”と呼び、GPI-anchor 型蛋白質のソーティングや輸送の、また脂質修飾される ras 等のシグナル伝達分子のプラットフォームとして機能するとの概念が提出されている [Ikonen & Simons, 1997]。近年、それを裏付ける報告が対数的に蓄積してきているのに対し、酵母での報告は少なく [Bagnat *et al.*, 2000]、これからの展開が期待される。それでも酵母では、これまでにスフィンゴ脂質の前駆体であるセラミドが GPI-anchor 型蛋白質の ER から Golgi への効率良い輸送に必要であるという報告 [Horvath *et al.*, 1994; Sutterlin *et al.*, 1997]、スフィンゴ脂質の欠失による低 pH 下での生育不良を GPI-CWP をコードする *CWP2* がマルチコピーでサプレスするという報告 [Skrzypek *et al.*, 1997]があり、GPI-CWP の輸送におけるスフィンゴ脂質の必要性を示唆する。本スクリーニングで取得された *CSG2*、*IPT1* 加えて *SUR1* の遺伝子破壊株は Congo red 感受性を示さなかった。しかし、興味深いことに、一連の表現型は *ipt1* 破壊株と *csg2*、*sur1* 破壊株間で異なる傾向にあった。*ipt1* 破壊株では、細胞壁糖組成の Man/Glc ratio が低く、Cwp1p の発現量増加だけでなく、前駆体型が蓄積していることが認められた。一方 *csg2*、*sur1* 破壊株では、細胞壁糖組成の Man/Glc ratio が高く、Cwp1p 発現量は微増もしくは野生株と変わらず、前駆体型の蓄積は認められなかった。これら三つの遺伝子破壊がスフィンゴ脂質組成に及ぼす影響をみてみると、*ipt1* 破壊株では最終産物でメジャーな M(IP)₂C は完全に欠失し [Dickson *et al.*, 1997; Thevissen *et al.*, 2000]、Ipt1p の基質である MIPC が野生株の 4 倍に増加する [stock *et al.*, 2000]。*csg1/sur1*、*csg2* 破壊株では、M(IP)₂C、MIPC 共

に欠失するとする報告[Beeler *et al.*, 1997]と両破壊株では MIPC が欠失するほかに、*csg2* 破壊株では $M(IP)_2C$ が激減するが、両破壊株ともに $M(IP)_2C$ は存在するという報告[Stock *et al.*, 2000]があり、*SUR1*、*CSG2* の役割については IPC へのマンノース付加で決着がついているものの、議論が分かれている。前者の $M(IP)_2C$ 、MIPC 共に欠失するという報告からは、本研究での *ipt1* と *sur1*、*csg2* 破壊株間の表現型の違いは、 $M(IP)_2C$ の存在による可能性が生じるが、後者を考慮するとまだほかの可能性がありそうである。また、*S. cerevisiae* のゲノムには、*SUR1* と 65%の identity、71%の similarity を示す ORF、*YBR161w* が存在している。この locus の破壊は Ca^{2+} 感受性を与えず、*sur1* 破壊の Ca^{2+} 感受性になんら影響しない[Beeler *et al.*, 1997]。Beeler *et al.* は、*ybr161w* 破壊株におけるスフィンゴ脂質組成には言及しておらず、この ORF が機能するのであれば、後者の *sur1*、*csg2* 破壊株においても MIPC 合成活性が残っており、 $M(IP)_2C$ も完全には欠失しないという観察も説明がつく。また、 $M(IP)_2C$ の減少がシグナル伝達され、mannosyltransferase とホモロジーのない Csg2p がそれに応じてスフィンゴ脂質の合成を制御、調節するという可能性も考えられる。実際、 $M(IP)_2C$ が *sur1* 破壊株では微減、*csg2* 破壊株において激減するという観察はこの可能性によく一致する。また *sur1*、*csg2* 破壊株は類似の細胞壁糖組成、Cwp1p の発現量を示すが、*csg2* 破壊株のみが *GAS1* 破壊と合成致死を示すのは、Sur1p にはホモログが存在しているかも知れない可能性と Csg2p の制御、調節的な広い役割に起因している可能性を想起させる。ER-Golgi 間の輸送に関わる *sec* 変異株を制限温度でインキュベートした時に、IPC の 1 種は検出されるが、マンノース付加された IPC は検出されなくなることから、IPC は ER で合成されると考えられていた[Puoti *et al.*, 1991]。最近の報告ではセラミドから IPC を合成する Aur1p はゴルジ体に局在することを示している[Levine *et al.*, 2000]。そこで IPC のうち hydroxylation の度合いが高い IPC-D はゴルジ体にも存在している。そして次反応のマンノース修飾のマンノース供与体が GDP-マンノースであることから、それ以降の分子種の合成反応はゴルジ体で行われると考えられている。こうした反応と生成スフィンゴ脂質の位置関係を考慮すると、本研究で得られた *ipt1* 破壊株では Cwp1p の ER 前駆体が蓄積するという観察は、説明が難しい。パルス-チェイス分析により ER 型、Golgi 型が良く確立している GPI-anchor 型蛋白質 Gas1p をマーカーに改めて検討する必要があると思われる。また、間接蛍光抗体染色により HA-Csg2p が ER に局在するというデータ[Takita

et al., 1995]があるが、Sur1p、Ipt1p については、反応の位置から局在が推定されているだけである。Sur1p、Ipt1p の局在を明かにしておくことも今後の重要な課題である。また、*sur1*、*csg2* 破壊株では細胞壁糖組成の Man/Glc ratio が野生株に比べ低くなっていた。これらの株の細胞壁画分を β 1,3-グルカナーゼ、 β 1,6-グルカナーゼ、キチナーゼなどで溶出される蛋白質量と種類を解析することで、GPI-CWP とスフィンゴ脂質との関わりについて知見が得られると考える。

gas1 ipt1 二重破壊株は高浸透圧下、合成生育阻害を示した。同じく合成致死性を示さなかった *gas1 sur1* 二重破壊株は、一つの子囊由来の胞子でしか検討していないが、合成生育阻害は示さなかった[data not shown]。また、GPI-CWP Cwp1p をコードする遺伝子との *cwp1 ipt1* 二重破壊株もまた、合成致死性は示さなかったが、高浸透圧感受性も示さなかった。*cwp1* 単独破壊株は、野生株同様良好な生育を示し、Congo red や CFW にもほとんど感受性を示さない。ある GPI-CWP の欠失は、他の GPI-CWP の増加によって補われると推定されている。このように *cwp1* 破壊株では細胞壁の欠損は、全く生じていない、あるいはごく軽微な欠損でしかないと推察される。高浸透圧下ということで、*ipt1* 破壊株は細胞壁に欠損を生じた条件下、膨圧を保てないことが示唆される。このことから2つの可能性が考えられる。1) 高浸透圧下、*HOG1* MAPK cascade が働くのとは、独立に plasma membrane の Fps1p グリセロールチャネルが不活化、グリセロール透過性を制限する[Luyten et al., 1995; Sutherland et al., 1997]。Plasma membrane H^+ -ATPase で複数回膜貫通型蛋白質である Pma1p は、ラフト上に局在することが示唆されており[Bagnat et al., 2000]、plasma membrane レベルでのスフィンゴ脂質組成が変化することで、複数回膜貫通型蛋白質である Fps1p の局在、機能に影響が出ている。2) スフィンゴ脂質組成の変化によるセンサー分子 Sln1p[Posas et al., 1996]、Sho1p[Gustin et al., 1998]の局在、機能に影響が出て、*HOG1* MAPK cascade へのシグナルが効果的に伝達されなくなっている。これらの可能性に関しては、まず破壊株において Hog1p のリン酸化による活性化が行われているか、あるいはアウトプットの一つ glycerol-3-phosphate dehydrogenase をコードする *GPD1* の転写量、Gpd1p 発現量の変化を検討しなければならない。それとともに、plasma membrane の蛋白質組成を野生株、*sur1*、*csg2* 破壊株のものと比較することで、生じている変化が明かになるかもしれない。

ここまで、膜ドメインの存在を考慮して考察を進めてきたが、スフィンゴ脂質とともに膜ドメインを構成するコレステロールについて Bagnat *et al.*が興味深い知見を得ている。コレステロール合成系の変異株 *erg12-1* では、Gas1p および Pma1p は、TX-100 不溶性画分で検出されなくなる。これは、コレステロールの減少、消失が膜ドメインの形成に影響すると考察している。コレステロール生合成に関与する遺伝子は、必須なものが多いため変異株と *gas1* 破壊との合成致死性を検討することで、本研究への膜ドメインの関与を決定することができる可能性を最後に挙げておく。

BCK1*, *WSC1*, *MID2

BCK1, *WSC1/HCS77/SLG1*, *MID2*はMAPK cascadeのcell integrity pathwayのコンポーネントをコードしている。*BCK1*[Lee & Levin, 1995]は*BCK1*-(*MKK1*, *MKK2*)-*SLT2/MPK1*から構成されるMAPK cascadeのMAPKKKである。Cell integrity pathwayは細胞周期が進行し、出芽といった形態変化のための細胞壁再構築時に伴う剛性の変化をシグナル伝達し、細胞壁合成に関わる遺伝子の転写を活性化する。またこうした健やかに生育する細胞においても重要であるが、細胞壁合成の関連遺伝子における変異、薬剤や低浸透圧、熱ショックといったストレス条件下におけるcell integrity pathwayの機能は必須である[Gustin *et al.*, 1998]。*gas1*破壊株では、pathwayのMAPKであるSlt2pがリン酸化、活性化される[Nobel *et al.*, 2001]。*bck1*破壊が*gas1*破壊と合成致死を示すということは、cell integrity pathwayの機能しない状況下では*gas1*破壊は、致命的な細胞壁の欠損を引き起こすと言い換えられる。

WSC1 [Verna *et al.*, 1997; Gray *et al.*, 1997; Jacoby *et al.*, 1998]、*MID2* [Rajavel *et al.*, 1999]は N 末のセリン/スレオニンに富んだ細胞外領域と C 末の短い細胞質領域を持ち plasma membrane に局在する [Ketela *et al.*, 1999; Lodder *et al.*, 1999; Verna *et al.*, 1997; Rajavel *et al.*, 1999]、1 回膜貫通型蛋白質である。この細胞外領域は O-糖鎖修飾に富み、棒状の構造をとって細胞壁のストレスセンサーとして機能すると推定されている。C 末の細胞質領域がともに Rho1p の GEF Rom2p と結合することが、two-hybrid analysis によって示された[Philip & Levin, 2001]。そこで活性化された Rho1p の Pkc1p 活性化により、cell integrity pathway の活性化が起こると考えられている。

本章の実験では、*mid2* 破壊株ではなく *wsc1* 破壊株で Congo red 高感受性になった。これは、Congo red のような細胞壁ストレスのシグナル伝達が Wsc1p によって行われること

を示唆している。このことは、*mid2* 破壊株は、CFW に対し耐性を示す[Ketela *et al.*, 1999] こと、*wsc1* 破壊株は *gas1* 破壊が引き起こす細胞壁ストレスと合成致死を示すことと一致する。言い換えれば、*gas1* 破壊による細胞壁ストレスは *WSC1* の破壊によって MAPK cascade にシグナル伝達されなくなる。

一方、Cwp1p 発現量は *wsc1*、*mid2* 破壊株ともに野生株に比べ増加が認められた。しかも増加の程度は、*wsc1* 破壊株の方が *mid2* 破壊株よりも若干多いようである。これは、対数増殖期の形態変化に伴って生じる細胞壁ストレスのシグナル伝達には、Mid2p がより機能的という可能性を示唆している。ただ両者ともに発現量が増加していることは、*wsc1 mid2* 二重破壊株が致死である[Stirling & Stark, 2000]ように、機能の重複している部分がある[Rajavel *et al.*, 1999]ことを示唆している。*S. cerevisiae* ゲノム上には *WSC1-4*[Verna *et al.*, 1997; Zu *et al.*, 2001]、*MID2*、*MTL1* [Rajavel *et al.*, 1999; Ketela *et al.*, 1999]と類似の構造をもつ遺伝子が複数存在する。にも関わらず、*wsc1 mid2* 二重破壊株の合成致死性からは、この二つの遺伝子が細胞壁ストレスのセンシングに主要な役割を果たしており、その他の遺伝子は熱ショックなどそれ以外のストレスのセンシングに関与しているという可能性が推定される。

KRE6

kre6 破壊株は Congo red 感受性を示した。これは、CFW によるスクリーニング[Ram *et al.*, 1994]でも取得されたことと一致し、細胞壁ポリマーのアセンブリを阻害する薬剤に対して高感受性を示した。また、ソルビトール添加に関わらず、Cwp1p 発現量増加を示した。

本スクリーニングは“*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”という仮説のもと行った。GPI-CWP の転移を担う分子の取得には、*kre6* 破壊株のような GPI-CWP のアクセプターである β 1,6-グルカン合成に欠損をもつ株を用いて合成致死スクリーニングを行うことも考えられた。しかし、*kre6* 破壊株の生育速度は非常に遅く、*gas1* 破壊株と比べてもスクリーニングには実際的ではないと判断した。また *gas1* 破壊株を用いることで、GPI-CWP の plasma membrane からの遊離と β 1,6-グルカンとの結合までの、未知のステップを広くカバーできると判断した。

DFG5、YKL046c

DFG5、YKL046c は、前述したようにバクテリアのマンナーゼに低いながらもホモロジーを示す、互いに相同性の高い GPI-anchor 型蛋白質をコードしていた。それぞれ単独の遺伝子破壊株は生育可能であったが、二重破壊株は合成致死であった[Kitagaki *et al.*, 2001]。まず、一次配列上の特徴から GPI-anchor 型蛋白質である可能性が高く、細胞壁の生合成に関与している可能性が考えられる。また GPI-CWP が plasma membrane から細胞壁グルカンへ転移される際に、GPI-anchor 内のマンノース残基で切断され、その還元末端がグルカンに共有結合する[Fujii *et al.*, 1999]。このことから、マンナーゼに低いながらもホモロジーを示す DFG5、YKL046c はこのステップを担う酵素である可能性が高い。

Congo red に対する感受性はどちらの単独遺伝子破壊株も示さなかった。この遺伝子重複は、FKS1 と FKS2[Mazur *et al.*, 1995]、KRE6 と SKN1[Roemer *et al.*, 1993]、KRE9 と KNH1[Dijkgraaf *et al.*, 1996]、そして CHS1、CHS2 と CHS3[Cid *et al.*, 1995]に表されるように、DFG5、YKL046c の担うステップの重要性を示しているのかも知れない。それと一致して、それぞれ単独の遺伝子破壊株の生育は、野生株と比べても遜色ないが、Cwp1p の発現量はともに野生株に比べ増加しており、細胞壁に欠損を生じているものの、互いに機能を相補し合い、影響が小さくなっている可能性が示唆された。

今後は DFG5、YKL046c の破壊が *gas1* 破壊と合成致死になることをまず確認しなければならないが、遺伝学的にはさらに、*kre6*、*kre9* 破壊株といった β 1,6-グルカン合成に欠損のある株と合成致死を示すかどうか、非常に興味深い。

1Mソルビトール存在下におけるCwp1p発現量変化について

本章の実験では、培地にソルビトールを添加した場合に、野生株をはじめ破壊株のほとんど全てにおいて、Cwp1p の発現量が増加した。野生株ではもちろんのこと *fks1*、*gas1*、*kre9* 破壊株のような細胞壁に欠損をもつ株では、培地へのソルビトール添加により、cell integrity pathway の Slt2p リン酸化が軽減もしくは、起こらなくなる[Novel *et al.*, 2001]。一方、高浸透圧条件下では MAPK cascade pathway のひとつ、HOG pathway が働き、グリセロール合成経路の遺伝子の転写を活性化して細胞内の膨圧を高めることで対応する[Nevoigt & Stahl, 1997; Gustin *et al.*, 1998]。その他、培地の低 pH 時に HOG pathway が活性

化され、Cwp1p の発現量が増加、細胞壁への取込みが増加する [Kapteyn *et al.*, 2001]。これらの事実から、本実験でソルビトール添加の場合に観察された Cwp1p 発現量の増加は、HOG pathway の活性化による可能性が考えられる。そうであるなら、これは新しい知見であり、実際に Hog1p と Slt2p のリン酸化の状態を検討しなければならない。または、本スクリーニングで得られた *bck1* 変異株で、ソルビトール添加時の Cwp1p 発現量の変化を検討することで知見が得られるかも知れない。