

第2章 *KEX2* の細胞壁合成における役割と *GAS1* 破壊との合成致死性の解析

序

Kex2p は分泌経路に局在し、蛋白質前駆体のプロ体やプロホルモンを特異的な部位で切断するプロセシングプロテアーゼのプロトタイプである。これらの酵素は酵母、線虫、昆虫、両生類、哺乳類にいたる真核生物の regulated secretory pathway (e.g. PC1/3、PC2)、constitutive secretory pathway (e.g. furin、PC7、*Kex2*)の両方に存在することが明らかになっている。このうち *kexin/furin* は subtilase super family に属するセリンプロテアーゼである [Rockwell & Fuller, 2001]。ただし、同じくスーパーファミリーに含まれる subtilisin は、リソソームや液胞といった蛋白質分解活性のあるコンパートメント、細胞外で機能する消化酵素であるのに対し、*Kex2p* のようなプロセシングプロテアーゼは細胞内のソーティングや分泌に関わるコンパートメントで、より特異的な切断を行うという点で大きく異なる。

S. cerevisiae では、*Kex2p* は C 末端側に膜貫通領域をもち、ゴルジ体に局在し、基質の di-basic な部位 (aliphatic/basic P₄、basic P₂、Arg at P₁; P₁ アミノ酸の C 末側で切断されるとする。) を認識するプロセシングプロテアーゼをコードしている [Rockwell & Fuller, 1998]。*kex2* 変異株は、これまでによく知られた低温感受性や、低温下でのキチン、アクチンの delocalization の他に、pH7.0 以上の培地で生育不能、Ca²⁺感受性の生育、fluorecent weak-base quinacrine を液胞に蓄積できないなどの液胞の酸性化欠損に起因した *vma*- phenotype を示し、*vma45* 変異株として単離されている [Oluwatosin et al., 1998]。その他にも RNA polymerase II complex との遺伝的な相互作用が報告されている [Davie & Kane, 2000]。このように、いくつかの付加的な表現型を示すことから *Kex2p* の基質は、知られている以上に多種存在すると考えられる。

本研究では、*KEX2* は取得した変異 allele ばかりでなく遺伝子破壊も *GAS1* 破壊と合成致死を示した。また、*kex2* 破壊株は Congo red 感受性であること (図 2-1)、Cwp1p の発現量が増加していること (図 1-8,9) から細胞壁に欠損を生じていることが示唆された。そこで *KEX2* の細胞壁合成における役割と *GAS1* 破壊との合成致死性について詳細に解析した。

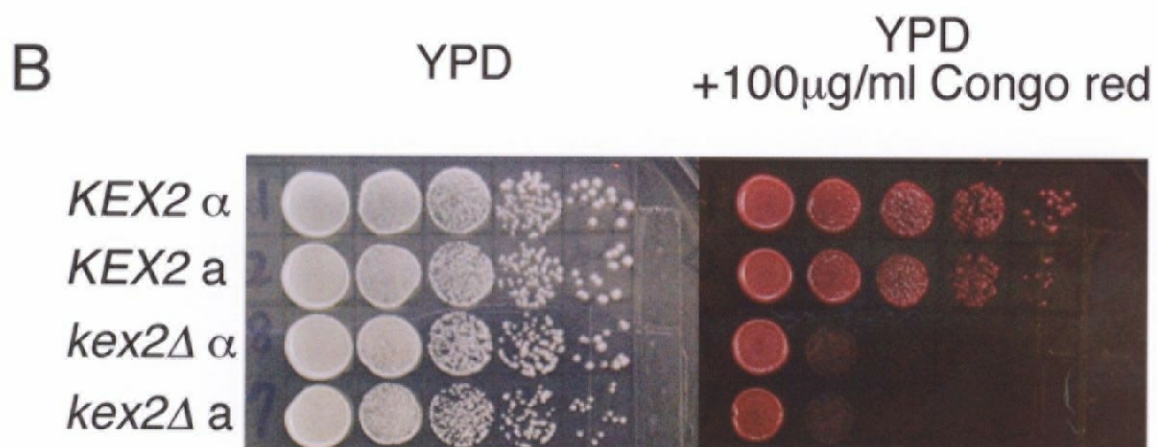
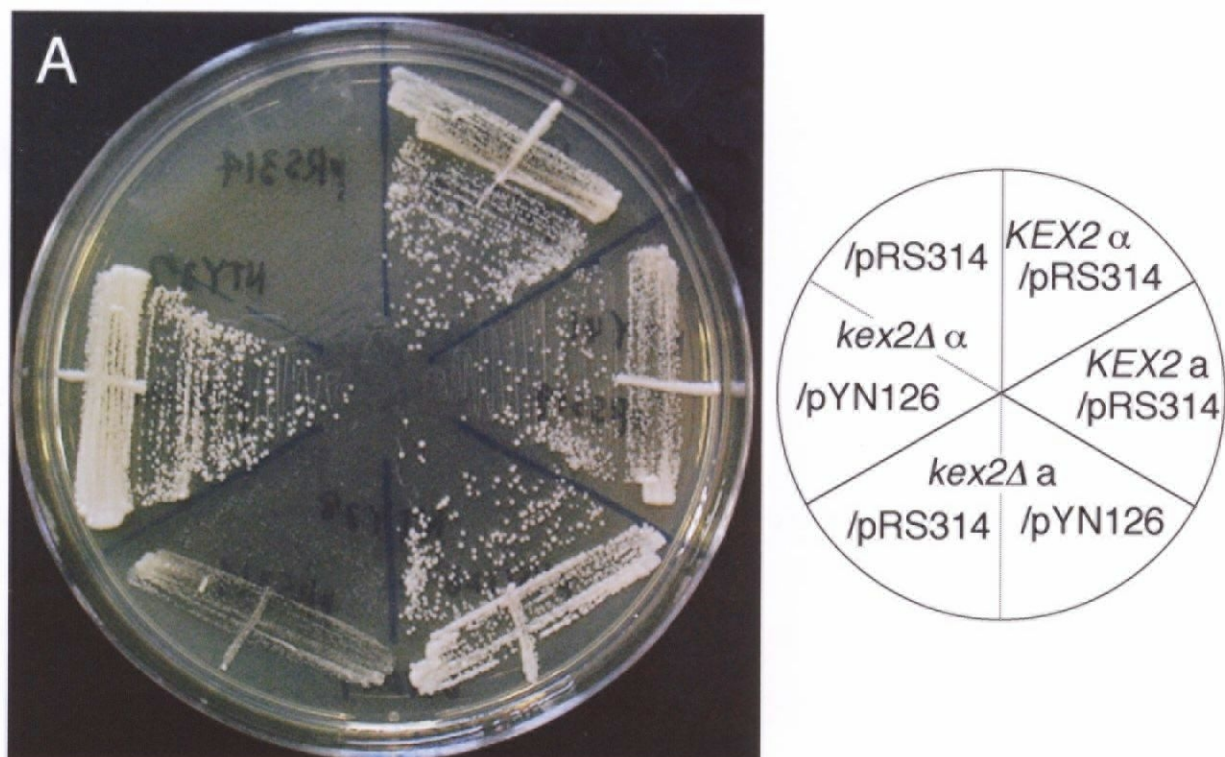


図2-1 *kex2*破壊株の低温感受性、Congo red感受性

A. 両mating typeのKA31にvector pRS314、NTY37 (*kex2Δ MATa*)、NTY38 (*kex2Δ MATa*)にpRS314、pYN126 (*KEX2*)を導入し、YPDにstreak、14.5°Cで5日間培養した。

B. 両mating typeのKA31 (w.t.)、NTY37 (*kex2Δ MATa*)、NTY38 (*kex2Δ MATa*) から第一段を 2×10^7 cells/mlに調製し、さらに10倍希釈を4段階行い、1株5段の希釈段階を作製した。各希釈段階から5mlずつ、YPD±Congo red plateにスポットし、30°Cで2日間培養した。

*kex2*破壊株はMating typeに関わらず、低温感受性、Congo red感受性を示した。

第1節 実験材料と方法

2-1-1. 実験材料

2-1-1-1. 菌株

Escherichia coli

Strain	Genotype
DH5 α	F, ϕ 80lacZ Δ M15, supE44 Δ lacU169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1

Saccharomyces cerevisiae

Strain	Genotype
KA31-1A	MAT α his3 leu2 trp1 ura3
NTY31	KA31 gas1 Δ ::LUE2/GAS1 kex2 Δ ::URA3/KEX2
NTY37	NTY31-7b MAT α kex2 Δ ::URA3
NTY38	NTY31-7c MAT α kex2 Δ ::URA3
NTY93	KA31 MAT α wsc1 Δ ::HIS3
NTY118	KA31 MAT α big1 Δ ::URA3

2-1-1-2. プラスミド

plasmid	Description
pRS314	TRP1-marked centromere vector
pRS416	URA3-marked centromere vector
pRS424	TRP1-marked 2 μ m vector
pYN126	KEX2 in pRS314
pNT150-2	MKC7 in pRS424
pNT151	YAP3 in pRS424
pNT152	EXG1-3HA in pRS424
pNT153	KRE9-3HA in pRS424

2-1-1-3. 合成 DNA

Primer name	Sequence*	Description
NT74	5'CTCCTGTCTAGAACTAGCGAA3'	MKC7 Fw XbaI
NT75	CTAATCTCTCTCGAGTGAAAT	MKC7 Re XhoI
NT76	TTAAACGTCGACGAGTTGTA	YAP3 Fw SalI
NT77	GATTTTGTGACTGCAGTTATCA	YAP3 Re PstI
NT78	TTAGCGGGATCCGTACCT	EXG1 Fw BamHI
NT79	TGAGGGCTCGAGAGTTAGAAAT	EXG1 Re XhoI for C-terminal tagging
NT80	TGTATTCTGGATCCTTGCAAAC	KRE9 Fw BamHI
NT81	AGCCGCTACTTCGAGATACTTTTC	KRE9 Re XhoI for C-terminal tagging

*表中下線は制限酵素 site を示す。

2-1-1-4. 試薬

組成を記していない試薬については、第 1 章を参照のこと。

大腸菌生育培地

1) LB+Amp

酵母生育培地

1) MY

2) SD

3) YPD

4) 5×YM broth

Yeast extract	1.5% (1.5g/100ml)
Malt extract	1.5% (1.5g/100ml)
Peptone	2.5% (2.5g/100ml)
Glucose	5% (5g/100ml)

5) 0.1M citrate-trisodiumcitrate buffer (pH4.4)

A. 0.1M クエン酸

クエン酸一水和物 (国産化学) 0.1M (1.04g/100ml)

B. 0.1M クエン酸三ナトリウム

クエン酸三ナトリウム二水和物 (和光純薬工業) 0.1M (1.3g/100ml)

A49.5ml、B50.5ml を混合し、100ml とする。

6) YM-0.1M citrate buffer (pH 4.6) broth

5×YM broth と 0.1M citrate-trisodiumcitrate buffer (pH4.4)とをオートクレーブ後、1:4 の割合で混合した。

核酸操作

1) Solution I

2) solution II

3) solution III

4) TE

5) PEG 溶液

酵母細胞の分画

lysis buffer (SDS-lysis buffer)

1M Tris-HCl pH 7.5 50mM (5ml/100ml)

0.5M EDTA pH 7.5 5mM (1ml/100ml)

4M NaCl 150mM (3.75ml/100ml)

(SDS) (2%)

使用直前に 100mM PMSF、protease inhibitor cocktail をそれぞれ 100、500 倍希釈で加えた。

lyticase 用バッファー

リン酸カリウム-ソルビトールバッファー

0.2M KH_2PO_4	0.1M(16ml/200ml)
0.2M K_2HPO_4	0.1M(84ml/200ml)
Sorbitol	1.2M(43.7g/200ml)
1M MgCl_2	1mM(200 μ l/200ml)

細胞壁画分を処理する時は、ソルビトール抜きで調製した。

SDS-PAGE

- 1) 4 \times sample buffer
- 2) SDS-PAGE running gel buffer (pH8.8)
- 3) SDS-PAGE stacking gel buffer (pH6.8)
- 4) SDS-PAGE 泳動用バッファー

Western blotting

- 1) 10 \times TBS (pH7.4)
- 2) Anode buffer 1 (pH10.4)
- 3) Anode buffer 2 (pH10.4)
- 4) Cathode buffer (pH9.4)
- 5) TBS (Tris-buffered saline)

酵母形質転換

- 1) 10 \times LiOAc stock sol. pH7.5
- 2) LiPEG
- 3) LiTE

2-1-2.実験方法

題のみ記した項目は、第1章を参照のこと。

2-1-2-1.大腸菌の形質転換

2-1-2-2.酵母の形質転換

2-1-2-3. DNA シークエンシング

2-1-2-4. K1 killer toxin sensitivity

中型試験管の YPD 4ml に検定株を植菌し、30℃で一晩激しく振盪培養した。対数増殖期 (O.D.₆₀₀=~2, 3) まで培養し、培養液を 10 倍に希釈して O.D.₆₀₀ を測定した。これをもとに、O.D.₆₀₀=0.01 相当 (2.0×10^5 cell/ml) に培養液を希釈し、検定に用いた。K1 killer toxin 産生株の培養上清を 1.5ml チューブに 100ul 入れ、二段目以降は YM medium(pH4.6)50μl をあらかじめいれておいた 1.5ml チューブに 50μl ずつ serial dilution し、五段目まで (K1 killer 上清の濃度 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32) 調製した。

同時に killer 上清を含まない YM medium(pH4.6)を用意した。次に検定菌を全てのチューブに 50μl (1×10^4 /tube) ずつ加えて 100μl の培養液とし、18℃、41hr 静置培養後、O.D.₆₀₀ を測定した。感受性は killer 上清のを含まない培養液の O.D.₆₀₀ に対する killer 上清入り培養液の O.D.₆₀₀ の割合として表した。

2-1-2-5. Congo red sensitivity

2-1-2-6. Total lysate の調製

2-1-2-7.培地中の蛋白質の濃縮[Nuoffer *et al.* 1993]

lysate を調製する際に、-80℃で保存していた培地上清 2ml を、まず 13,000rpm、4℃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 0.125 mg/ml になるように加え、よく混合した。ここに TCA

(trichloroacetic acid) 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℃で 5 分間遠心して得られた沈殿を、氷冷した acetone 800μl 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×sample buffer を加え、SDS-PAGE のサンプルとした。

2-1-2-8.酵母細胞の破碎と分画

YPD 10ml で一晚培養した前培養液から、500ml 容坂口フラスコの YPD 100ml に植菌し、30℃で振盪培養した。O.D.₆₀₀=1.0 に達したところで、3,000rpm、5 分間の遠心により集菌した。脱イオン水、lysis buffer で 1 回ずつ菌体を洗った後、直前に 100mM PMSF、PIC をそれぞれ 100、500 倍希釈になるように加えた氷冷 lysis buffer 500μl で懸濁し、氷冷ワッセルマン試験管に移した。ここにガラスビーズ 1.5g を計り入れ、1 分間ボルテックスによる破碎、1 分間氷上に静置を 1 サイクルとし、これを低温室で 8 サイクル行った。細胞破碎液はいったん 15ml 容遠心チューブに移し、氷冷 lysis buffer 500μl で 2 回ガラスビーズを洗い、細胞破碎液に加えたものをライセートとした。ライセートは 3,000rpm、4℃、5 分間の遠心で上清と沈殿（細胞壁画分を含む）に分けた。

2-1-2-9.ライセートの遠心分画

O.D.₆₀₀=1.0 の菌体から上記の要領で調製したライセートは体積が約 1.6ml になるため、800μl ずつ 2 本の 1.5ml チューブに分け 3,000rpm、4℃、5 分間の低速遠心後、上清を 600μl ずつとり、1 本のチューブにまとめた。沈殿は細胞壁画分として別に粗精製を行った。12,000rpm、4℃、10 分間の遠心後、上清 800μl をベックマン卓上超遠心機用遠心チューブに移し S10 とし、上清の残りを除いた沈殿は P10 とした。S10 は、45krpm、4℃、1 時間の超遠心後（卓上超遠心機 TL-100, TLA55; BECKMAN）、上清を 300μl とり、S100 とした。上清の残りを除いた沈殿を P100 とした。P10、P100 は PMSF、PIC を添加した lysis buffer 600μl を加えてピペティングにより、よく懸濁した。S100、P10、P100 画分はそれぞれ適量の 4×sample buffer を加えて 1 分間煮沸し、SDS-PAGE のサンプルとした。

2-1-2-10.細胞壁画分の lyticase 処理

ライセートの低速遠心による沈殿は、上清の残りを完全に捨て、lysis buffer 800 μ l で懸濁し、3,000rpm、4 $^{\circ}$ C、5分間の遠心での洗いを2回行った。SDS-lysis buffer 300 μ l を加えよく懸濁した後、5分間の煮沸を2回行い、細胞壁に非共有結合により残っている蛋白質、膜画分のコンタミネーションを除いた。14,000rpm、5分間の遠心で細胞壁画分を沈降させた。2回の洗いからそれぞれ上清を150 μ l ずつ分取、一つにまとめて hot-SDS 処理画分とした。細胞壁画分は Lysis buffer 400 μ l で5回洗い、完全に SDS を除いた後、ソルビトール抜き of lyticase buffer 400 μ l で3回洗ったものを粗精製細胞壁とした。粗精製細胞壁 100mg (wet weight) に対し、lyticase buffer 200 μ l を加えた懸濁液に、15 μ l の lyticase を加え、ピペッティングによってよく懸濁した。30 $^{\circ}$ C で2時間インキュベート後、さらに15 μ l の lyticase を加え、ピペッティングによってよく懸濁した。30 $^{\circ}$ C で一晩インキュベート後、4 \times sample buffer を加えて2分間煮沸し、14,000rpm、5分間の遠心上清を細胞壁の lyticase 処理画分とし SDS-PAGE のサンプルとした。

第2節 結果

2-1. *KEX2* の細胞壁合成における役割

2-1-1. 細胞壁合成における Kex2p プロテアーゼ活性の役割

MKC7 は mono-basic な部位を認識する GPI-anchor 型 aspartyl protease をコードするが、*kex2* 破壊株の低温感受性のマルチコピーサプレッサーとして取得された[Komano & Fuller, 1995]。これは、*Mkc7p* が *Kex2p* よりも基質特異性認識が緩く、plasma membrane に局在するため、マルチコピーで発現させることで、輸送途中のゴルジ体で *Kex2p* の基質をプロセッシングするためと考えると理解しやすい。*YAP3* もまた、mono-basic な部位を認識する GPI-anchor 型 aspartyl protease をコードし、*kex2* 変異株の pro- α -factor processing defect のマルチコピーサプレッサーとして取得された[Egel-Mitani et al., 1990]が、低温感受性の弱いマルチコピーサプレッサーでもある[Komano & Fuller, 1995]。そこで“*Kex2p* はプロテアーゼ活性を通じて細胞壁合成に関与している。”と仮説をたてた。これを検証するため、同様の論拠により *MKC7* および *YAP3* がマルチコピーで *kex2* 破壊株の Congo red 感受性 (図 2-1) をサプレスするかどうか検討した (図 2-2)。

その結果、*MKC7* はマルチコピーで *kex2* 破壊株の Congo red 感受性を野生株と同程度までサプレスした。*YAP3* もまた、弱いながらもサプレッサー活性を示した。このことから、*Kex2p* が細胞壁合成に関与する基質分子をプロセッシングしていることを強く示唆された。

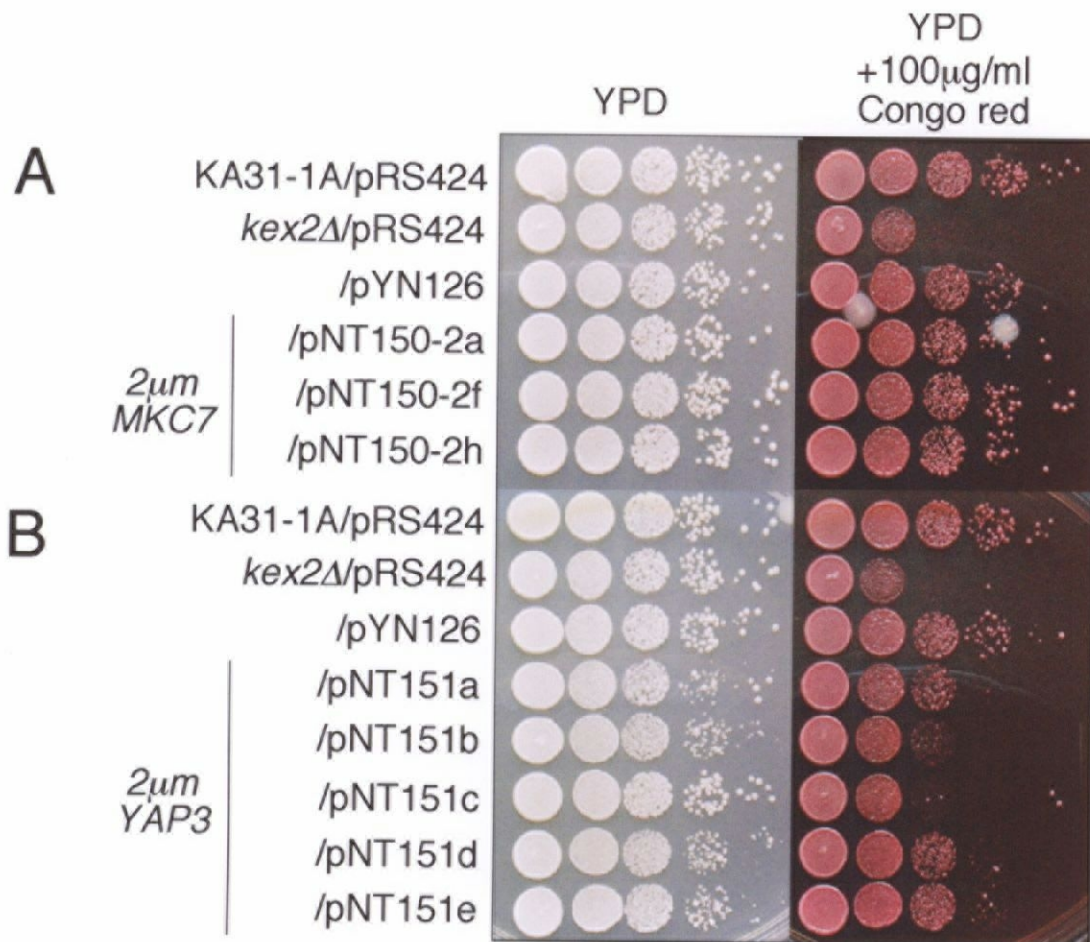


図2-2 類似のプロテアーゼ活性は*kex2*破壊株のCongo red感受性をマルチコピーでサプレスする

SD-trpで培養した上記各株を

A. MKC7 (pNT150-2 2μ m)

B. YAP3 (pNT151 2μ m)

第1段目を 2.0×10^7 に調製し、さらに10倍希釈を4段階行い、1株5段階の希釈系列を作製した。各希釈系列から5mlずつYPD \pm Congo red plateにスポットし、30 $^{\circ}$ Cで2日間培養した。

pRS424: 2μ m TRP1、pYN126: CEN TRP1 KEX2、

pNT150-2: 2μ m TRP1 MKC7、pNT151: 2μ m TRP1 YAP3

2-2. Kex2p の細胞壁合成に關与する基質分子の探索

2-2-1. Kex2p プロテアーゼ活性の GPI-CWP 転移機構への關与の可能性

kex2 破壊株では、野生株に比べ Cwp1p の発現量が顯著に増加するとともに、Cwp1p の培地中への漏出も認められた (図 1-10)。これらのことから、*kex2* 破壊株では細胞壁への GPI-CWP の転移のステップに欠損がある可能性が示唆された。そこで、野生株、*kex2* 破壊株の細胞壁画分に局在する Cwp1p の量を検討した。YPD で培養した野生株、*kex2* 破壊株をガラスビーズにより破碎して調製したライセートを遠心分画し、各画分に存する Cwp1p 量を比較した。また、細胞壁画分は recombinant β 1,3-glucanase、lyticase で処理し、遊離してくる Cwp1p 量をウェスタン解析により比較した (図 2-3)。

その結果、細胞内の膜画分 P10、P100 画分における Cwp1p 量は一様に増加していた。また細胞壁から非共有結合により存在する蛋白質、膜画分のコンタミネーションを溶出した hot-SDS 画分、そして β 1,3-グルカンに共有結合した蛋白質が溶出される lyticase 処理画分においても、Cwp1p 量は一様に増加していた。とくに lyticase 処理画分における Cwp1p 量増加は、単に発現量の増加を反映しているだけでなく、*kex2* 破壊株においても GPI-CWP 転移のプロセスに欠損は生じていないことを示唆する。

2-2-2. 細胞壁グルカン生合成への關与の可能性

破壊株のうち、Man/Glc ratio が野生株に比べ高くなる株では、グルカンの合成量が減少している可能性が考えられた。そこで β 1,3-、 β 1,6-グルカンのどちらに影響が出ているのか更に検討するため、 β 1,6-グルカン欠損株が耐性を示す K1 killer toxin に対する感受性を観察した (図 2-4)。

その結果、各破壊株は耐性を示すものと感受性を示すものとに二分した。耐性株のコントロールである *kre2*、*kre6* 破壊株は耐性を示すのに対し、*kex2* 破壊株は野生株同様に感受性を示した。

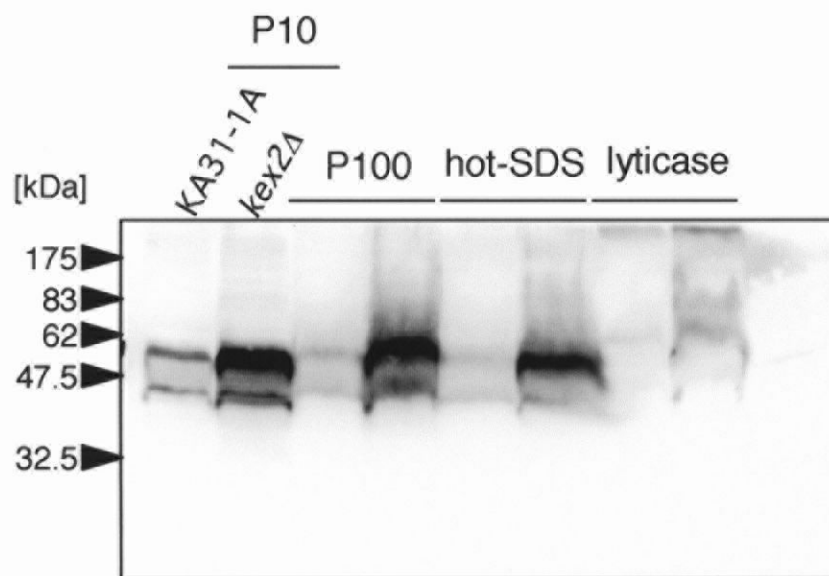


図2-3 細胞内、細胞壁各画分におけるCwp1p量の比較

野生株、*kex2* 破壊株を破碎後、3,000rpm 5分の遠心により細胞内、細胞外画分に分画した。

細胞内画分

P10: 12,000rpm 10分の遠心の沈殿

P100: 45krpm 1時間の超遠心の沈殿

細胞外画分

hot-SDS: 細胞壁画分をSDS含有バッファーにより5分 2回煮沸した画分

lyticase: 粗精製細胞壁画分をrecombinant β 1,3-glucanase処理した画分

kex2 破壊株では、野生株に比べ発現量の増加したCwp1pは細胞内、細胞壁各画分でも一様に増加していた。

K1 killer toxin sensitivity

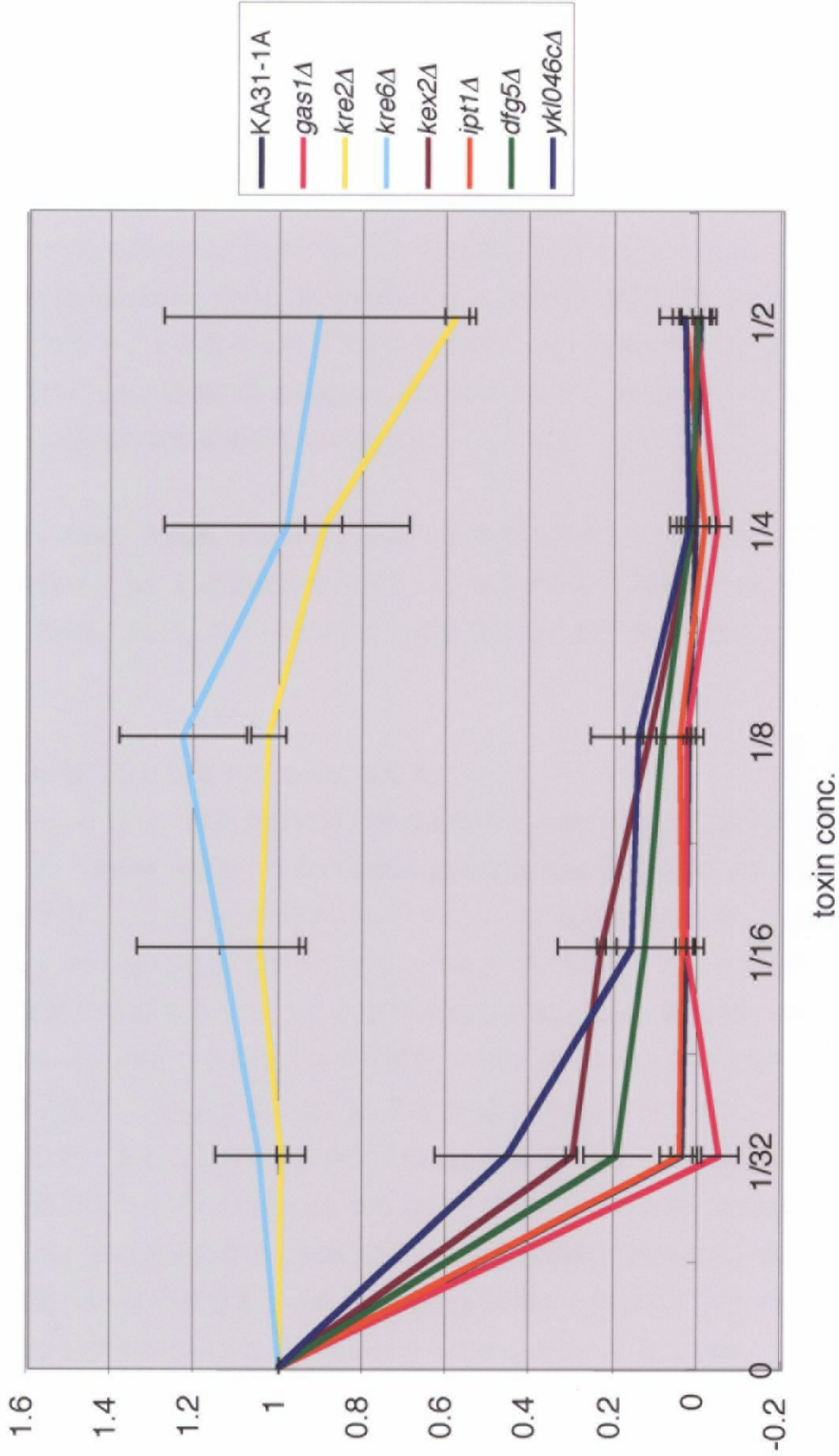


図2-4 Man/Glc ratio が高くなる破壊株のK1 killer toxinに対する感受性

K1 killer toxin産生株の培養上清を上記濃度で含む培地に各株 1×10^4 cells ずつ植菌し、18°C、41時間培養後、O.D.600を測定し、培養上清を含まない区分 (toxin conc.=0) を1とした時の割合で表した。S.D.はn=3で算出。

Fuller らは、*kex2* 破壊株の低温感受性のマルチコピーサプレッサーとして *MKC7* を取得した際、*MKC7* に比べると活性の弱い *MKC1* と *MKC4* と 2 つの分泌蛋白質をコードする遺伝子を同時に取得している [Komano & Fuller, 1995]。 *MKC1*、*MKC4* に関する知見は、その後報告されておらず、これらの産物は不明なままである。そこで、*Kex2p* の認識サイト KR をもち、グルカン合成への関与が考えられる分泌性の蛋白質を MIPS、YPD 両データベースを検索し、 β 1,6-グルカンの合成、プロセッシングに関与するとの報告がある *Kre9p* [Brown *et al.*, 1993]、*Exg1p* [Jiang *et al.*, 1995] を選択した。 *Kex2p* がこれらの蛋白質のプロセッシングと活性化を行っている可能性について検討することにした。 *MKC7* の場合と同様に *kex2* 破壊株の Congo red 感受性について、*KRE9*、*EXG1* のマルチコピーサプレッサー活性の有無を観察した (図 2-5)。

その結果、*KRE9*、*EXG1* は Congo red 感受性をサプレスしなかった。また、*kre9*、*exg1* 破壊株はともに低温感受性を示すという報告がないことから、*kex2* 破壊株の細胞壁欠損が、*Kre9p*、*Exg1p* のプロセッシング、活性化不能に起因する可能性は小さいと判断した。

2-2-3. 細胞壁に局在する *Kex2p* の基質について

Mrsa *et al.* は、細胞質膜に対し非透過性のビオチン化試薬を用いて細胞壁蛋白質を標識した後、30mM NaOH、あるいは β 1,3-glucanase laminarinase による細胞壁蛋白質の抽出、同定を行った。N 末シークエンシングによって蛋白質同定を行った結果、一群の蛋白質 *Ccwp* (*Pir1-4p*) は N 末がプロセッシングされていること、アミノ酸配列との照会で KR の C 末側で切断されていることが明らかになった。 *kex2* 変異株で同様の蛋白質抽出、streptavidin-HRP によるウェスタン解析と N 末シークエンシングを行った結果、それらは高分子量側にシフトすること、N 末は N 末シグナルシークエンスの後でプロセッシングされた状態であることが明らかになり、*Kex2p* の基質であることが判明した。しかし、ウェスタン解析時のバンドの intensity からは、プロセッシングの有無は細胞壁への局在に影響しなかった。また還元条件下、SDS による細胞壁蛋白質の抽出では、N 末シークエンシングの結果、*Scwp* の同定となった。 *Ccwp/Pirp* の場合と同様に、アミノ酸 KR の C 末側でプロセッシングされていることが明らかになった [Capellaro *et al.*, 1998]。これらの *kex2p* の基質である、基質となり得る細胞壁蛋白質を表 2-1 にまとめる。

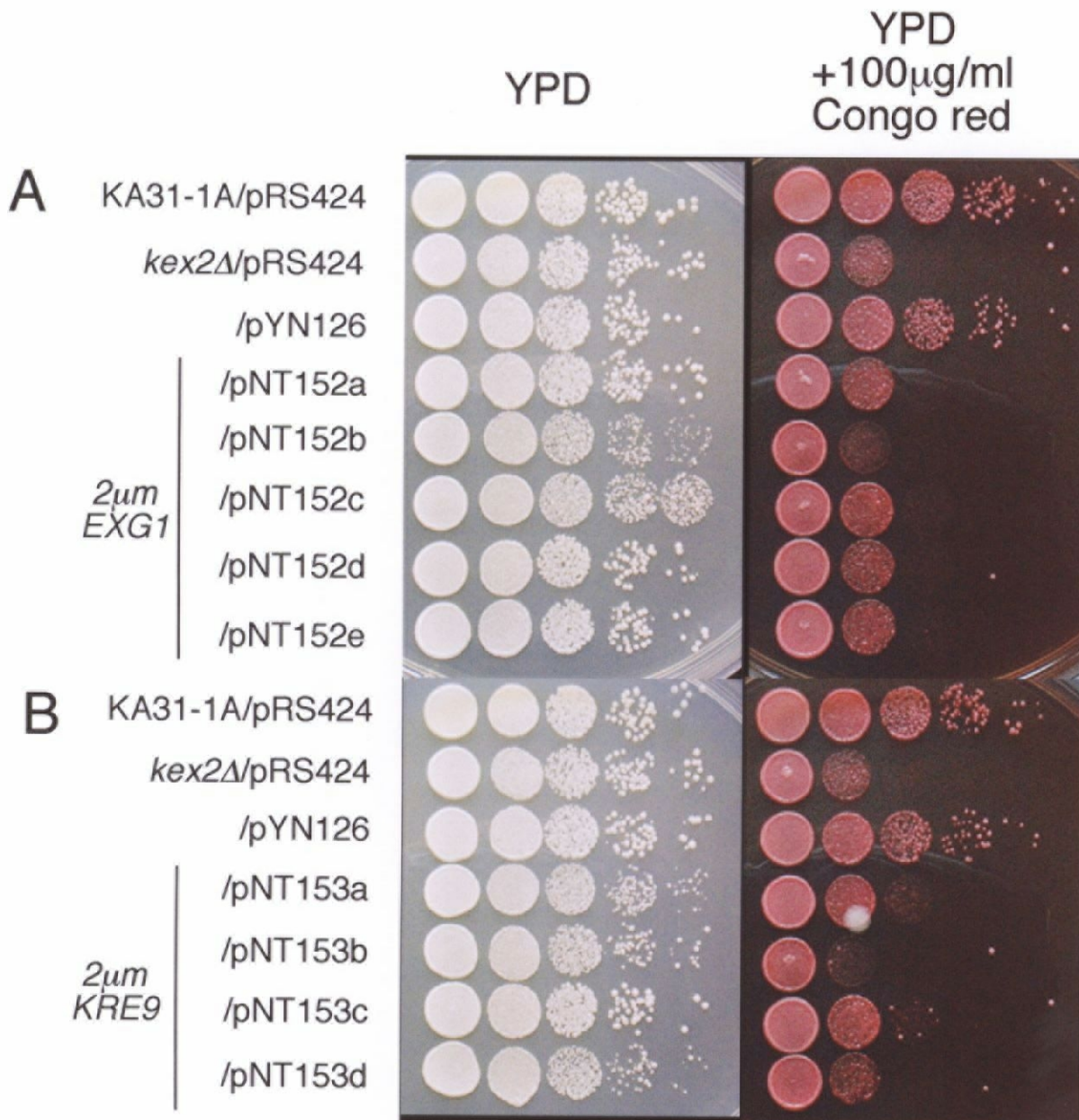


図2-5 *kex2*破壊株のCongo red感受性の
マルチコピーサプレッサー活性の検定

A. *EXG1*(pNT152、*2 μ m TRP1*)、B. *KRE9*(pNT153、*2 μ m TRP1*)が
*kex2*破壊株のCongo red感受性をマルチコピーでサプレスするか検討した。
Congo red感受性の検定方法は、図2-2に同じ。

pRS424: *2 μ m TRP1*、pYN126: *CEN TRP1 KEX2*

EXG1、*KRE9*を*kex2*破壊株にマルチコピーで導入したが、
Congo red感受性をサプレスしなかった。

表 2-1 Kex2pによるプロセシングサイトをもち細胞壁蛋白質とプロセシングサイト付近のアミノ酸配列

Protein	Sequence around Kex2p-recognition site	Referenc
known		
Exg1p/Scw6p	¹ MLSLKTLTLLCT LLTVSSVLAT PVPARDPSSI QFVHEEN KKR YYDYDHGSLG EPIRGVNIGG ⁶⁰	1
Pir1p/Ccw6p	³¹ PSATYKGGIT DYSSTFGIADV EPIATTASSK AKRAAA ISQI GDGQIQATTK TTA ^{AAVSQIG} ⁹⁰	2
Pir2p/Ccw7p	⁴¹ DYASTFGIADV QPISTTSSAS SAATTASSKA KRAASQIGDG QVQAATTAS VSTKSTAAAV ¹⁰⁰	
Pir3p/Ccw8p	³¹ PSATYKGGIT DYSSSFGIAI EAVATSASSV ASSKA KRAAS QIGDGQVQAA TTTAAVSKKS ⁹⁰	
Pir4p/Cis3p/Ccw5p	³¹ STLTPGTGSIS CGAAEYTTTF GIAVQAITSS KAKRDVISQI GDGQVQATSA ATAQAIDSQA ⁹⁰	
putative		
Scw4p	¹ MRLSNLIAASA SLLSAATLAA PANHEHK DKR AVVTTTVQKQ TTIIVNGAAS TPVAAL ^{EENA} ⁶⁰	3
Scw10p	¹ MRFSNFLT ^{VS} ALLTGALGAP AVRHKHE KRD VVTATVHAQV TVVSGNSGE TIVPVNENAV ⁶⁰	
Scw11p	¹ MISPISFLSS LLCLTYL TSA LPILP KREVV TRVHTASTTN VVTD ^{FYSTTT} EVVIAPTVEF ⁶⁰	

1: Larriba *et al.* (1993)

2: Mrsa *et al.* (1997)

3: Capellaro *et al.* (1998)

細胞壁に限定してもこれだけの基質となり得る蛋白質が存在していることから、*kex2* 破壊株の細胞壁欠損は、これら複数の基質蛋白質のプロセッシング不能が原因となっている可能性が推定される。*pir1-4* 破壊株は、それらの組み合わせで二重、三重、四重破壊株と破壊を進めるに従い、Congo red、CFW への感受性が高くなった[Mrsa & Tanner, 1999]。

一方、Scw4、10、11p はグルカナーゼに弱いホモロジーを示し、単独破壊株は表現型を示さない。しかし、*scw4 scw10* 二重破壊株は CFW 感受性を示し、二重破壊株同士では mating 効率も低くなる [Capellaro *et al.*, 1998]。

本節における解析は以上であり、Kex2p の基質とその細胞壁合成における役割について考察にまとめる。

第3章 考察

本章では、*gas1* 破壊株を用いた合成致死スクリーニングによって取得された *KEX2* 遺伝子産物の細胞壁合成における役割を明かにすることを目的として解析を行った。

KEX2 の細胞壁合成における役割

kex2 破壊株は、野生株に比べ *Cwp1p* の発現量が顕著に増加し (図 1-8,9)、また Congo red 感受性も示す (図 2-1) ことから、細胞壁に欠損をもつことが示唆された。*gas1* 破壊との合成致死性は、細胞壁の欠損が重なり、*Cwp1p* をはじめ細胞壁合成遺伝子の転写、発現増加では補填できない位の欠損を生じたためという可能性が考察される。

それでは、*kex2* 破壊株の細胞壁にはどのような変化が生じているのだろうか。細胞壁糖組成 Man/Glc ratio (図 1-7) を参考にすると、上記の明瞭な表現型からは予想外であるが、大きな変化を示さなかった。それでも野生株の 0.75-0.8 に比べると 0.94 と増加しており、グルカン合成が影響を受けていることが推定された。 β 1,6-グルカン量の減少する株が耐性を示す、K1 killer toxin に対しては感受性を示し、細胞壁 β 1,6-グルカンの量が減少している可能性は排除される。*kex2* 破壊株では、培地中に *Cwp1p* を漏出する。しかしこの漏出は、溶菌のためではなく (図 1-10)、また細胞壁への転移に欠損を生じているためでもないことが推定される (図 2-3)。このことから、培地中に存在する *Cwp1p* にグルカンが付加していることが予想される。そうであれば、*kex2* 破壊株で生じている細胞壁欠損はグルカンの架け替えのステップである可能性が推察される。そこで、 β 1,3-グルカンの抗体により培地中の *Cwp1p* にグルカンが付加しているか検討することが、今後非常に重要であると考えられる。もちろん、他の原因で細胞壁に欠損を生じ、単に発現量の増加した *Cwp1p* を留めておけなくなっている可能性も除外できない。

KEX2 は、ゴルジ体に局在するプロセシングプロテアーゼをコードしており、素直に推察するならば、分泌経路を細胞外まで輸送される、細胞壁合成に関与する分子のプロセシング、活性化を行うことで細胞壁合成に与っていることが予想された。この予想に違わず、*Kex2p* の KR という認識より緩い、mono-basic なアミノ酸を認識するプロセシングプロテアーゼをコードする *MKC7*、*YAP3* は程度の差こそあれ、*kex2* 破壊株の Congo red 感受性をマルチコピーでサプレスした (図 2-2)。このことから *Mkc7p*、*Yap3p* によって代わりにプロセシングされた基質分子が、細胞壁合成に機能することが示唆された。*Mkc7p*、*Yap3p*

は、GPI-anchor により細胞表層に局在する。そのためゴルジ体-plasma membrane-エンドソームをサイクルする Kex2p が、細胞表層で機能する可能性も除外できないかも知れない。

Kex2p の基質

Kex2p の基質としては、mating pheromone pro- α -factor、killer toxin などが広く知られているが、kex2 破壊株の多種多様な表現型に対応して、まだ未知の基質も多種存在していることが予想される。実際、vma45-1 として取得された kex2 変異株は vacuole の酸性化不全に起因する、pH7.0 以上の培地で生育不能、Ca²⁺感受性の生育、fluorecent weak base quinacrine を液胞に蓄積できないといった表現型を示す。ここでも MKC7、YAP3 が kex2 変異株の pH7.0 での生育をマルチコピーでサプレスし、液胞の酸性化に関与する vacuolar-type ATPase (V-ATPase) の活性化を担う基質分子の存在が示唆されている [Oluwatosin & Kane, 1998]。

細胞壁合成に関与する基質分子に目を向けると表 2-1 に挙げたような分子が報告されている。SCWs、CCWs/PIRs は、ともに分泌蛋白質をコードする。kex2 破壊株の低温感受性は、細胞壁欠損とは連鎖していない可能性が高いものの、Fuller らが、MKC7 と同時に取得した MKC1、MKC4 は分泌蛋白質をコードしていたことは、Scwps、Ccwps/Pirps が細胞壁合成を担う基質である可能性を支持する知見になるかも知れない。SCWs も CCWs/PIRs も多重破壊株は、Congo red や CFW に感受性を示し、mating 効率も低くなる。しかし、Scwps がグルカナーゼへ低いながらもホモロジーを示すのに対し、Ccwps/Pirps は活性をもたない細胞壁の構造蛋白質であるようである [Mrsa & Tanner, 1999]。そして、kex2 変異株においても Ccwps/Pirps の細胞壁への局在は、変化しない。以上を考慮すると、Kex2p によってプロセシング、活性化される基質分子としては、酵素活性をもち得る Scwps の方が仮説に合うと考察できる。

本章で検討した Exg1p と Kre9p であるが、まだまだ検討が不十分で、1) プロセシング後の成熟型の発現が、kex2 破壊株の Congo red 感受性をサプレスする。2) exg1 破壊株、kre9 破壊株それぞれと gas1 破壊の合成致死性の確認。3) Exg1p は Kex2p プロセシングサイトが N 末、Kre9p はプロセシングサイトが C 末にあるため、C 末にタグgingした Exg1p、N 末にタグgingした Kre9p が、野生株においてプロセシングされ、分子量の減少が観察されるか。以上の 3 点について検討しなければ、Kex2p の基質であり、活性化されることの証明にはならない。しかし、Exg1p は Kex2p の基質であることは既知であるものの、各輸送

ステップの *sec* 変異株を用いて Kex2p にプロセシングされるまでの経路を、*p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside を基質に活性で追跡しており [Basco *et al.*, 1990]、プロセシングによる活性化との関係は明かでない。また *kre9* 破壊の影響は重篤で、生育速度、破壊株の示す形態の報告も *kex2* 破壊のものと一致しない。これらのことから、Exg1p も Kre9p も Kex2p によって細胞壁合成に関与する基質分子ではない可能性が高いと考察する。

以上の考察から、今後は Scwps について 4) プロセシングを受ける前の前駆体型をマルチコピーで発現させた時に、*kex2* 破壊株の Congo red 感受性をサプレッスする。を上記の 3 点に含めた、4 点を検討する価値があると考えられる。

他のアプローチとしては、以下の 2 つの方法が考えられる。

1) 基質分子のスクリーニング

具体的には、*kex2* 破壊株の Congo red 感受性あるいは低温感受性のマルチコピーサプレッサーのスクリーニングが考えられる。*vma3* 破壊株も *kex2* 破壊株同様、低温感受性、pH7.0 での生育不能、quinacrine を液胞に蓄積できない等の表現型を示し、*kex2* の低温感受性が液胞酸性化不全に起因していることが示唆される。本研究でも、YPD に 1M ソルビトールを添加しても *kex2* の低温感受性は回復しなかったことから *kex2* 破壊株の低温感受性は、細胞壁欠損とは連鎖していない可能性が示唆される。この点を考慮すると、細胞壁欠損と直結していると考えられる Congo red 感受性を指標とするのが良いと思われる。また、*KEX2* をクローニングするのに用いた、*pGAL-GAS1* プラスミドを導入した *kex2* 変異株 (*gas1 Δ*) を用いることも考えられる。この株を *kex2 mkc7* 二重破壊株から作製したマルチコピーライブラリで形質転換後、グルコース培地上での生育回復を指標とするものである。この場合、*GAS1* が取得されること、*gas1kex2* 二重破壊株のマルチコピーサプレッサーであることに注意しなければならない。*gas1kex2* 二重破壊株における細胞壁の欠損は、*kex2* 単独破壊株より重篤であることは容易に予想され、マルチコピーサプレッサーとして基質遺伝子を取得できるかどうかは、実際的ではないかも知れない。

2) 細胞周期における合成致死の時期の決定

細胞壁マンナン蛋白質をはじめ、細胞壁合成に関与する多くの遺伝子の発現は、細胞周期によって厳密に制御され、その情報も現在利用可能である [Spellman *et al.*, 1998]。*gas1kex2* 二重破壊株に *pGAL-GAS1* プラスミドを導入し、グルコース培地で Gas1p の発現を停止した時に、二重破壊株の合成致死が細胞周期のどの時期であるのか、形態観察、FACS での DNA 含量の解析により検討する。その時期に発現がピークに達する、ゴルジ体以降

に局在する、プロセシングサイト KR をもつ、という criteria により、Kex2p の基質分子を同定することができるかもしれない。

以上、細胞壁合成への KEX2 の役割について考察してきたが、Kex2p がプロテアーゼ活性を通じて関与するという知見は、これが最初である。Kex2p のプロセシングによる活性化が実際に起きているのであれば、これは細胞壁合成の新たな制御の形を示しており、なおのこと基質分子の同定が望まれると同時に急がれる。

本研究でも観察されたが、*kex2* 変異株のライセートを SDS-PAGE 後、クマシー染色に供すると野生株と比較して、バンドが全体的に高分子量側にシフトしていることが、報告されている[Rogers *et al.*, 1979]。この観察からも Kex2p の基質は、予想以上に多種であることが推察される。Kex2p はセリンプロテアーゼの一種である。セリンプロテアーゼは、基質分子との間で acyl-enzyme 中間体を形成した後にプロセシングすることが知られている。Kex2p の活性中心と活性に必要な残基も同定されているため、acyl-enzyme 中間体形成が律速段階となるような Kex2p 変異体の取得も可能と考えられる。そのような変異体を *in vivo* で発現させ、変異体と共沈するような蛋白質のコレクションから Kex2p の多様な基質を同定することができるかも知れないと考える。細胞壁合成に関与するという観点からは、離れるが Kex2p の多岐にわたる細胞内での役割を考えると非常に興味深い。

総括

本研究の目的と方針

酵母細胞壁の生合成に関与する遺伝子の探索は、これまでに何度も行われ、そして様々な薬剤に対する感受性を指標とした網羅的なスクリーニングによって、その多くが取得された。 β 1,6-グルカン合成酵素については、まだ不明な点が多く残されているが、キチン、 β 1,3-グルカン合成酵素については、遺伝子は決定し、その遺伝的、生化学的な解析も一通り済んだといった印象である。そして、3つの細胞壁構成糖ポリマーもそれぞれ複数存在する合成遺伝子の多重破壊がいずれも致死的事であることから、どれを欠いても生育に支障をきたす重要なコンポーネントであることは明かである。*In vivo* ではこれらの糖ポリマーは互いにクロスリンクし、ここにマンナン蛋白質を加えて細胞壁が形成される。細胞壁、特にグルカンのメジャーな環境に存在するマンナン蛋白質は、グルカナーゼとホモロジーを示すものが多い。糖ポリマー間のクロスリンクは細胞壁の剛性を決定するが、結合自身はマンナン酵素によるものであり、今後はこれらのクロスリンクを触媒する酵素を同定していくことが基礎的にも、応用的にも必要であると考えられる。

本研究は、クロスリンクの中でも GPI-CWP とグルカンあるいはキチンとの間に形成されるものに焦点をあてた。GPI-CWP は、その配列上の特徴から 50 余りの ORF によってコードされることが推定されているが、それぞれの破壊はほとんど生育に影響しない。細胞壁合成に関与する遺伝子の変異、破壊株は cell integrity pathway によって補償されるため、変異、破壊の一義的な影響が見え難く、細胞壁の解析を困難にしている一つの要素である。

第 1 章では、以上の背景を踏まえた *gas1* 破壊株を用いた合成致死スクリーニングにより、クロスリンクを担う分子、遺伝子の取得を試みた。これまでのスクリーニングで目的の遺伝子が取得されなかった原因として、網羅的であったことと重複遺伝子によってコードされている可能性が挙げられる。本研究の目的からは網羅的である必要はなく、GPI-CWP の糖ポリマーへのクロスリンクが生育に必須となる背景を作り上げることが重要であり、それによって重複遺伝子の可能性を克服できると判断した。そこで、*gas1* 破壊株の示す表現型に着目し、合成致死スクリーニングを選択した。

取得した遺伝子について

本スクリーニングにより取得された遺伝子は、これまでの知見から細胞壁合成に関与する、関連していると考えられるものと、全く未知のものに分類できる。

KRE6、*BCK1*、*WSC1*、*BIG1* は細胞壁合成への関与が明かな遺伝子群である。破壊株の示す Congo red 感受性と、Cwp1p の発現量の上昇からも、これまでの知見と一致して細胞壁欠損は明かである。前 3 者については、報告が蓄積し異論ないところだが、*BIG1* は細胞壁の欠損は明かであるものの、機能未知であり [Bickle et al., 1998]、本研究でもその手がかりは掴めなかった。より基礎的な解析の蓄積から始めて、機能解明への手がかりとなる知見を得ることが望まれる。

CSG2、*IPT1*、*DFG5* は、細胞壁合成に関連していると考えられる遺伝子群である。

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]。このことから、形態変化に伴う細胞壁のリモデリングに関与していると示唆される。また Kitagaki et al. の報告にあるように、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こと、GPI-anchor 型蛋白質をコードする遺伝子として、ホモログ *YKL046c* が存在し、それぞれ単独の遺伝子破壊は生育可能であるが、二重破壊株は合成致死であることなどは、GPI-CWP のクロスリンクを担う分子の予想と合致する。本研究でも、Cwp1p の発現量は増加するものの、Congo red 感受性は示さなかった。表現型の現れにくい分子の解析として、今後は *in vitro* で予想される活性を検討することで役割が明かにできると考えられる。

CSG2、*IPT1* は、スフィンゴ脂質合成最後の 2 ステップに関与する遺伝子であり、予想される GPI-anchor 型蛋白質との相互作用から、細胞壁合成への直接的ではない関与が推定される。スフィンゴ脂質前駆体のセラミド合成が、GPI-anchor 型蛋白質の効果的な輸送に必要であるという知見、セラミド合成欠損により低 pH での生育不良を GPI-CWP である *CWP2* がマルチコピーでサプレスするという知見は得られている。しかし、これらの知見と異なり、GPI-CWP との関連を考察する上でセラミドでなく、スフィンゴ脂質に限定するこれらの遺伝子が取得されたのは、本研究が最初である。今後は、これらの遺伝子破壊株の Triton X-100 不溶性画分の解析はさることながら、GPI-CWP と GFP との融合蛋白質 [Ram et al., 1998; Nichols et al., 2001] や、スフィンゴ脂質特異的なプローブの開発によ

り、*in vivo* での GPI-CWP の挙動、スフィンゴ脂質の組成と局在を解析することで、GPI-CWP とスフィンゴ脂質との関連に新たな知見が得られると予想される。現在、膜ドメインに関する研究は非常にホットであり、本研究で得られた遺伝子の解析による貢献が期待される。

KEX2 は細胞壁合成における関連が未知の遺伝子である。ただし、Congo red 感受性を示し、Cwp1p の発現量も顕著に増加していることから、細胞壁に欠損を生じているのは明かであり、これは *S. cerevisiae* では予想もされなかったまったく新しい知見である。ごく最近、*Candida glabrata* において *KEX2* のホモログ遺伝子が取得され、その遺伝子破壊株はこれまでに *S. cerevisiae* の *kex2* 破壊株で観察される高 Ca^{2+} 濃度、pH7.0 付近での生育不能といった表現型のほかに、CFW や SDS に感受性を示すことが報告された[Bader et al., 2001]。ただし *S. cerevisiae* における報告は本研究が最初であり、さらなる解析が急がれる。

Kex2p の基質分子

第 2 章の解析より、Kex2p はプロセシングプロテアーゼとして本来の機能を果たすことにより、細胞壁合成に関与することが明かになった。そうであれば、当然その基質分子が何であるかに関心が向く。残念ながら本研究では同定することができなかったが、考察の項で触れたように、さらに基質分子のスクリーニング系を組むことも考えている。ただ、細胞壁合成における Kex2p の基質分子は複数存在していることも明かであり（表 2-1）、全体として影響を及ぼしている可能性も十分予想される。*kex2* 破壊株では、Cwp1p 発現量増加に応じて細胞壁 β 1,3-グルカンに共有結合する量も増加しており、GPI-CWP のクロスリンクには欠損を生じていないことが示唆された。このことから、*kex2* 破壊株が培地中に漏出する Cwp1p は、いったん細胞壁へ結合したものがグルカンのリモデリングの際に、培地に流れ出た可能性が考えられる。これは、漏出した Cwp1p へのグルカンの付加を検討しなくてはならないが、付加しているのであれば Kex2p により活性化される基質は、グルカナナーゼ様蛋白質であると可能性が高いと考えられる。また、液胞酸性化不全で取得された *kex2* の別の allele が示す pH7.0 での生育不能が、本研究同様に MKC7 によってマルチコピーでサプレスされた[Oluwatosin & Kane, 1998]。このように、多様な基質をもつと推定される Kex2p は、まだ未知の細胞内生理現象に関与していると予想される。

本筋をはずれるが、Kex2p の基質コレクションを取得、同定することも非常に興味深い。

本研究の展望

近年の DNA chip の普及は、出芽酵母のゲノム全塩基配列が明かになったことと相まって、様々な情報が得られるようになった。そのなかで、全蛋白質の発現時期について解析が行われ、細胞壁合成に関与する分子の多くが細胞周期によって発現制御されていることが明かになった[Spellman *et al.*, 1998]。今後は、こうした視点から細胞壁合成をとらえることで、機能解析の手掛かりを得ることも可能であろう。

細胞壁高分子ネットワークは生化学的には、 β 1,3-グルカンと β 1,6-グルカン、キチンとクロスリンクする[Kapteyn *et al.*, 1996]こと、マンナン蛋白質、 β 1,3-グルカン、キチンとが β 1,6-グルカンを介してクロスリンクする[Kollar *et al.*, 1997]こと、GPI-anchor 主鎖のマンノースと β 1,6-グルカンとのクロスリンク[Fujii *et al.*, 1999]などが、詳細な構造解析によって明かになっている。*S. cerevisiae* では、細胞壁の糖ポリマーは大きく分けてグルカン、キチン、マンナンと種類が少なく、モデルとして非常に有効である。こうした手法は、変異株や破壊株の細胞壁についても行われるべきで、影響を受けている結合の種類が分子レベルで明かになることが期待される。ただし、ここでも機能重複の問題に突き当たる可能性も高く、それを避けるためには興味のある分子のみを抽出した *in vitro* 系の構築が有効かも知れない。

本研究のテーマである GPI-CWP の細胞壁への転移についても、*in vitro* 系、その一步手前の転移活性検出系の構築は有効であると考えられる。レポーターの選定と活性の検出方法、反応条件など十分な検討が必要と思われるが、活性で追跡することにより、機能重複分子も一挙に取得できると予想される。検出系構築後は、転位反応阻害剤の探索と解析など発展性もまた持ち合わせている。

以上、細胞壁の研究における方向性を考察したが、まずは本研究で取得された遺伝子産物の解析に取り入れ、新たな知見を得ることが期待される。

参考文献

- Bader, O., M. Schaller, S. Klein, J. Kukula, K. Haack, F. Muhlschlegel, H. C. Korting, W. Schafer, and B. Hube. 2001. The *KEX2* gene of *Candida glabrata* is required for cell surface integrity. *Mol. Microbiol.* 41: 1431-44.
- Bagnat, M., S. Keranen, A. Shevchenko, and K. Simons. 2000. Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 3254-9.
- Basco, R. D., G. Gimenez-Gallego, and G. Larriba. 1990. Processing of yeast exoglucanase (beta-glucosidase) in a *KEX2*-dependent manner. *FEBS Lett.* 268: 99-102.
- Beeler, T. J., D. Fu, J. Rivera, E. Monaghan, K. Gable, and T. M. Dunn. 1997. *SUR1* (*CSG1/BCL21*), a gene necessary for growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of high Ca^{2+} concentrations at 37 degrees C, is required for mannosylation of inositolphosphorylceramide. *Mol. Gen. Genet.* 255: 570-9.
- Belden, W. J. & C. Barlowe. 1996. Erv25p, a component of COPII-coated vesicles, forms a complex with Emp24p that is required for efficient endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J. Biol. Chem.* 271: 26939-46.
- Bickle, M., P. A. Delley, A. Schmidt, and M. N. Hall. 1998. Cell wall integrity modulates *RHO1* activity via the exchange factor *ROM2*. *EMBO J.* 17: 2235-45.
- Boone, C., S. S. Sommer, A. Hensel, and H. Bussey. 1990. Yeast *KRE* genes provide evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly. *J. Cell Biol.* 110: 1833-43.
- Brown, J. L., Z. Kossaczka, B. Jiang, and H. Bussey. 1993a. A mutational analysis of killer toxin resistance in *Saccharomyces cerevisiae* identifies new genes involved in cell wall (1→6)-beta-glucan synthesis. *Genetics.* 133: 837-49.

- Brown, J. L., & H. Bussey. 1993b. The yeast *KRE9* gene encodes an *O* glycoprotein involved in cell surface beta-glucan assembly. *Mol. Cell Biol.* 13: 6346-56.
- Cappellaro, C., V. Mrsa, and W. Tanner. 1998. New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. *J. Bacteriol.* 180: 5030-7.
- Caro, L. H., G. J. Smits, P. van Egmond, J. W. Chapman, and F. M. Klis. 1998. Transcription of multiple cell wall protein-encoding genes in *Saccharomyces cerevisiae* is differentially regulated during the cell cycle. *FEMS Microbiol Lett.* 161: 345-9.
- Caro, L. H., H. Tettelin, J. H. Vossen, A. F. Ram, H. van den Ende, and F. M. Klis. 1997. *In silicio* identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13: 1477-89.
- Castro, C., J. C. Ribas, M. H. Valdivieso, R. Varona, F. del Rey, and A. Duran. 1995. Papulacandin B resistance in budding and fission yeasts: isolation and characterization of a gene involved in (1,3)beta-D-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 177: 5732-9.
- Cid, V. J., A. Duran, F. del Rey, M. P. Snyder, C. Nombela, and M. Sanchez. 1995. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 59: 345-86.
- Conzelmann, A., H. Riezman, C. Desponds, and C. Bron. 1988 A major 125-kd membrane glycoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is attached to the lipid bilayer through an inositol-containing phospholipid. *EMBO J.* 7: 2233-40.
- Dallies, N., J. Francois, and V. Paquet. 1998. A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 14: 1297-306.

Davie, J. K., & C. M.Kane. 2000. Genetic interactions between TFIIS and the Swi-Snf chromatin-remodeling complex. *Mol. Cell. Biol.* 20: 5960-73.

Dickson, R. C., E. E. Nagiec, G. B. Wells, M. M. Nagiec, and R. L. Lester. 1997. Synthesis of mannose-(inositol-P)₂-ceramide, the major sphingolipid in *Saccharomyces cerevisiae*, requires the *IPT1 (YDR072c)* gene. *J. Biol. Chem.* 272: 29620-5.

Dijkgraaf, G. J., J. L.Brown, and H. Bussey 1996 The *KNH1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is a functional homolog of *KRE9*. *Yeast* 12: 683-92.

Doering, T. L., & R. Schekman. 1997. Glycosyl-phosphatidylinositol anchor attachment in a yeast in vitro system. *Biochem. J.* 328: 669-75.

Douglas, C. M., F. Foor, J. A. Marrinan, N. Morin, J. B. Nielsen, A. M. Dahl, P. Mazur, W. Baginsky, W. Li, M. el-Sherbeini et al., 1994. The *Saccharomyces cerevisiae FKS1 (ETG1)* gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3-beta-D-glucan synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 12907-11.

Drgonova, J., T. Drgon, K. Tanaka, R. Kollar, G. C. Chen, R. A. Ford, C. S. Chan, Y. Takai, and E. Cabib. 1996. Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science.* 272: 277-9.

Egel-Mitani, M., H. P. Flygenring, and M. T. Hansen. 1990. A novel aspartyl protease allowing *KEX2*-independent MF alpha propheromone processing in yeast. *Yeast.* 6: 127-37.

el-Sherbeini, M., & J. A.Clemas. 1995. Cloning and characterization of *GNS1*: a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in synthesis of 1,3-beta-glucan in vitro. *J. Bacteriol.* 177: 3227-34.

Eng, W. K., L. Faucette, M. M. McLaughlin, R. Cafferkey, Y. Koltin, R. A. Morris, P. R. Young, R. K. Johnson, and G. P. Livi. 1994. The yeast *FKS1* gene encodes a novel membrane protein, mutations in which confer FK506 and cyclosporin A hypersensitivity and calcineurin-dependent growth. *Gene*. 151: 61-71.

Fernandez, F., M. Jannatipour, U. Hellman, L. A. Rokeach, and A. J. Parodi. 1996. A new stress protein: synthesis of *Schizosaccharomyces pombe* UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase mRNA is induced by stress conditions but the enzyme is not essential for cell viability. *EMBO J*. 15: 705-13.

Fleet, G. H., & D. J. Manners. 1976. Isolation and composition of an alkali-soluble glucan from the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 94: 180-92.

Fraering, P., I. Imhof, U. Meyer, J. M. Strub, A. van Dorsselaer, C. Vionnet, and A. Conzelmann. 2001. The GPI Transamidase Complex of *Saccharomyces cerevisiae* Contains Gaa1p, Gpi8p, and Gpi16p. *Mol. Biol. Cell.* 12: 3295-306.

Fujii, T., H. Shimoi, and Y. Iimura. 1999. Structure of the glucan-binding sugar chain of Tip1p, a cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1427: 133-44.

Garrett-Engele, P., B. Moilanen, and M. S. Cyert. 1995. Calcineurin, the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase, is essential in yeast mutants with cell integrity defects and in mutants that lack a functional vacuolar H(+)-ATPase. *Mol. Cell. Biol.* 15: 4103-14.

Gray, J. V., J. P. Ogas, Y. Kamada, M. Stone, D. E. Levin, and I. Herskowitz. 1997. A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator. *EMBO J*. 16: 4924-37.

Gustin, M. C., J. Albertyn, M. Alexander, and K. Davenport. 1998. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1264-300.

Hamada, K., S. Fukuchi, M. Arisawa, M. Baba, and K. Kitada. 1998a. Screening for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 258: 53-9.

Hamada, K., H. Terashima, M. Arisawa, and K. Kitada. 1998b. Amino acid sequence requirement for efficient incorporation of glycosylphosphatidylinositol-associated proteins into the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273: 26946-53.

Hamada, K., H. Terashima, M. Arisawa, N. Yabuki, and K. Kitada. 1999. Amino acid residues in the omega-minus region participate in cellular localization of yeast glycosylphosphatidylinositol-attached proteins. *J. Bacteriol.* 181: 3886-9.

Hartland, R. P., C. A. Vermeulen, F. M. Klis, J. H. Sietsma, and J. G. Wessels. 1994. The linkage of (1-3)-beta-glucan to chitin during cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 10: 1591-9.

Heinisch, J. J., A. Lorberg, H. P. Schmitz, and J. J. Jacoby. 1999. The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 32: 671-80.

Helenius, A., & M. Aebi. 2001. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science.* 291: 2364-9.

Hong, Y., Y. Maeda, R. Watanabe, K. Ohishi, M. Mishkind, H. Riezman, and T. Kinoshita. 1999. Fig-n, a mammalian homologue of yeast Mcd4p, is involved in transferring phosphoethanolamine to the first mannose of the glycosylphosphatidylinositol. *J. Biol. Chem.* 274: 35099-106.

Horvath, A., C. Sutterlin, U. Manning-Krieg, N. R. Movva, and H. Riezman. 1994. Ceramide synthesis enhances transport of GPI-anchored proteins to the Golgi apparatus in yeast. *EMBO J.* 13: 3687-95.

Inoue, S. B., N. Takewaki, T. Takasuka, T. Mio, M. Adachi, Y. Fujii, C. Miyamoto, M. Arisawa, Y. Furuichi, and T. Watanabe. 1995. Characterization and gene cloning of 1,3-beta-D-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 231: 845-54.

Jacoby, J. J., S. M. Nilius, and J. J. Heinisch. 1998. A screen for upstream components of the yeast protein kinase C signal transduction pathway identifies the product of the *SLG1* gene. *Mol. Gen. Genet.* 258: 148-55.

Jiang, B., A. F. Ram, J. Sheraton, F. M. Klis, and H. Bussey. 1995 Regulation of cell wall beta-glucan assembly: *PTC1* negatively affects *PBS2* action in a pathway that includes modulation of *EXG1* transcription. *Mol. Gen. Genet.* 248: 260-9.

Jung, U. S. & D. E. Levin. 1999. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol. Microbiol.* 34: 1049-57.

Kapteyn, J. C., R. C. Montijn, E. Vink, J. de la Cruz, A. Llobell, J. E. Douwes, H. Shimoi, P. N. Lipke, and F. M. Klis. 1996. Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked beta-1,3-/beta-1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiology.* 6: 337-45.

Kapteyn, J. C., A. F. Ram, E. M. Groos, R. Kollar, R. C. Montijn, H. Van Den Ende, A. Llobell, E. Cabib, and F. M. Klis, 1997. Altered extent of cross-linking of beta1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall beta1,3-glucan content. *J. Bacteriol.* 179: 6279-84.

Kapteyn, J. C., B. ter Riet, E. Vink, S. Blad, H. De Nobel, H. Van Den Ende, and F. M. Klis. 2001. Low external pH induces *HOG1*-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol. Microbiol.* 39: 469-79.

Ketela, T., R. Green, and H. Bussey. 1999. *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the *PKC1-MPK1* cell integrity pathway. *J. Bacteriol.* 181: 3330-40.

Kitagaki, H., H. Shimoi, and K. Ito. 2001. 酵母遺伝学フォーラム口頭発表

Kollar, R., E. Petrakova, G. Ashwell, P. W. Robbins, and E. Cabib. 1995. Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and beta(1→3)-glucan. *J. Biol. Chem.* 270: 1170-8.

Kollar, R., B. B. Reinhold, E. Petrakova, H. J. Yeh, G. Ashwell, J. Drgonova, J. C. Kapteyn, F. M. Klis, and E. Cabib. 1997. Architecture of the yeast cell wall. Beta(1→6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1→3)-glucan, and chitin. *J. Biol. Chem.* 272: 17762-75.

Komano, H., & R. S. Fuller. 1995. Shared functions in vivo of a glycosyl-phosphatidylinositol-linked aspartyl protease, *Mkc7*, and the proprotein processing protease *Kex2* in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 10752-6.

Kopecka, M., H. J. Phaff, and G. H. Fleet. 1974. Demonstration of a fibrillar component in the cell wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its chemical nature. *J. Cell Biol.* 62: 66-76.

Kopecka, M., & M. Gabriel. 1992. The influence of congo red on the cell wall and (1→3)-beta-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 158: 115-26.

Kranz, J. E., & C. Holm. 1990. Cloning by function: an alternative approach for identifying yeast homologs of genes from other organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87: 6629-33.

Larriba, G., R. D. Basco, E. Andaluz, and J. P. Luna-Arias. 1993. Yeast exoglucanases. Where redundancy implies necessity. *Arch. Med. Res.* 24: 293-9.

- Leber, A., P. Fischer, R. Schneider, S. D. Kohlwein, and G. Daum. 1997. The yeast *mic2* mutant is defective in the formation of mannosyl-diinositolphosphorylceramide. *FEBS Lett.* 411: 211-4.
- Lee, K. S., & D. E. Levin. 1992. Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (*BCK1*) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol. Cell. Biol.* 12: 172-82.
- Letourneur, F., & P. Cosson. 1998. Targeting to the endoplasmic reticulum in yeast cells by determinants present in transmembrane domains. *J. Biol. Chem.* 273: 33273-8.
- Levine, T. P., C. A. Wiggins, and S. Munro. 2000. Inositol phosphorylceramide synthase is located in the Golgi apparatus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 11: 2267-81.
- Lodder, A. L., T. K. Lee, and R. Ballester. 1999. Characterization of the Wsc1 protein, a putative receptor in the stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 152: 1487-99.
- Lu, C. F., J. Kurjan, and P. N. Lipke. 1994. A pathway for cell wall anchorage of *Saccharomyces cerevisiae* alpha-agglutinin. *Mol. Cell. Biol.* 14: 4825-33.
- Lu, C. F., R. C. Montijn, J. L. Brown, F. Klis, J. Kurjan, H. Bussey, and P. N. Lipke. 1995. Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha-agglutinin and beta 1,6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Cell. Biol.* 128: 333-40.
- Lussier, M., A. M. White, J. Sheraton, T. di Paolo, J. Treadwell, S. B. Southard, C. I. Horenstein, J. Chen-Weiner, A. F. Ram, J. C. Kapteyn, T. W. Roemer, D. H. Vo, D. C. Bondoc, J. Hall, W. W. Zhong, A. M. Sdicu, J. Davies, F. M. Klis, P. W. Robbins, and H. Bussey. 1997. Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 147: 435-50.
- Luyten, K., J. Albertyn, W. F. Skibbe, B. A. Prior, J. Ramos, J. M. Thevelein, and S. Hohmann.

1995. Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J.* 14: 1360-71.

Manners, D. J., A. J. Masson, and J. C. Patterson. 1973a. The structure of a beta-(1 leads to 3)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem. J.* 135: 19-30.

Manners, D. J., A. J. Masson, J. C. Patterson, H. Bjorndal, and B. Lindberg. 1973b. The structure of a beta-(1--6)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem. J.* 135: 31-6.

Marzioch, M., D. C. Henthorn, J. M. Herrmann, R. Wilson, D. Y. Thomas, J. J. Bergeron, R. C. Solari, and A. Rowley. 1999. Erp1p and Erp2p, partners for Emp24p and Erv25p in a yeast p24 complex. *Mol. Biol. Cell.* 10: 1923-38.

Mazur, P., N. Morin, W. Baginsky, M. el-Sherbeini, J. A. Clemas, J. B. Nielsen, and F. Foor. 1995. Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol. Cell. Biol.* 15: 5671-81.

Montijn, R. C., E. Vink, W. H. Muller, A. J. Verkleij, H. Van Den Ende, B. Henrissat, and F. M. Klis. 1999. Localization of synthesis of beta1,6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 181: 7414-20.

Mosch, H. U., & G. R. Fink. 1997. Dissection of filamentous growth by transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. 145: 671-84.

Mouyna, I., T. Fontaine, M. Vai, M. Monod, W. A. Fonzi, M. Diaquin, L. Popolo, R. P. Hartland, and J. P. Latge. 2000. Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanosyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J. Biol. Chem.* 275: 14882-9.

Mrsa, V., T. Seidl, M. Gentzsch, and W. Tanner. 1997. Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 13: 1145-54.

Mrsa, V., & W. Tanner. 1999. Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast*. 15: 813-20.

Muniz M, C. Nuoffer, H. P. Hauri, and H. Riezman. 2000. The Emp24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles. *J. Cell Biol.* 148:925-30

Muniz, M., P. Morsomme, and H. Riezman. 2001. Protein sorting upon exit from the endoplasmic reticulum. *Cell*. 104: 313-20.

Nakayama, K., T. Nagasu, Y. Shimma, J. Kuromitsu, and Y. Jigami. 1992. *OCH1* encodes a novel membrane bound mannosyltransferase: outer chain elongation of asparagine-linked oligosaccharides. *EMBO J.* 11: 2511-9.

Neiman, A. M., V. Mhaskar, V. Manus, F. Galibert, and N. Dean. 1997. *Saccharomyces cerevisiae* *HOC1*, a suppressor of *pkc1*, encodes a putative glycosyltransferase. *Genetics*. 145: 637-45.

Nevoigt, E., & U. Stahl. 1997. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 21: 231-41.

Nichols, B. J., A. K. Kenworthy, R. S. Polishchuk, R. Lodge, T. H. Roberts, K. Hirschberg, R. D. Phair, and J. Lippincott-Schwartz. 2001. Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *J. Cell Biol.* 153: 529-41.

De Nobel, H., C. Ruiz, H. Martin, W. Morris, S. Brul, M. Molina, and F. M. Klis. 2000. Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in *FKS2-lacZ* expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology*. 146: 2121-32.

Nuoffer C, A. Horvath, and H. Riezman. 1993. Analysis of the sequence requirements for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 protein. *J. Biol. Chem.* 268:10558-63

Nuoffer, C., P. Jenö, A. Conzelmann, and H. Riezman. 1991. Determinants for glycosylphospholipid anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* GAS1 protein to the plasma membrane. *Mol. Cell. Biol.* 11: 27-37.

Ohishi, K., N. Inoue, and T. Kinoshita. 2001. PIG-S and PIG-T, essential for GPI anchor attachment to proteins, form a complex with GAA1 and GPI8. *EMBO J.* 20: 4088-98.

Oluwatosin, Y. E., & P. M.Kane. 1998. Mutations in the yeast *KEX2* gene cause a Vma(-)-like phenotype: a possible role for the Kex2 endoprotease in vacuolar acidification. *Mol. Cell. Biol.* 18: 1534-43.

Parker, C. G., L. I. Fessler, R. E. Nelson, and J. H. Fessler. 1995. Drosophila UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase: sequence and characterization of an enzyme that distinguishes between denatured and native proteins. *EMBO J.* 14: 1294-303.

Philip, B., & D. E. Levin. 2001. Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Mol. Cell. Biol.* 21: 271-80.

Popolo, L., & L. Alberghina. 1984. Identification of a labile protein involved in the G1-to-S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81: 120-4.

Popolo, L., M. Vai, and L. Alberghina. 1986. Identification of a glycoprotein involved in cell cycle progression in yeast. *J. Biol. Chem.* 261: 3479-82.

- Popolo, L., M. Vai, E. Gatti, S. Porello, P. Bonfante, R. Balestrini and L. Alberghina. 1993. Physiological analysis of mutants indicates involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI-anchored protein gp115 in morphogenesis and cell separation. *J. Bacteriol.* 175: 1879-85.
- Popolo, L., D. Gilardelli, P. Bonfante, and M. Vai. 1997. Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the *ggp1delta* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 179: 463-9.
- Posas, F., S. M. Wurgler-Murphy, T. Maeda, E. A. Witten, T. C. Thai, and H. Saito. 1996. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the *SLN1-YPD1-SSK1* "two-component" osmosensor. *Cell.* 86: 865-75.
- Puoti, A., C. Desponds, and A. Conzelmann. 1991. Biosynthesis of mannosylinositolphosphoceramide in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on genes controlling the flow of secretory vesicles from the endoplasmic reticulum to the Golgi. *J. Cell Biol.* 113: 515-25.
- Qadota, H., C. P. Python, S. B. Inoue, M. Arisawa, Y. Anraku, Y. Zheng, T. Watanabe, D. E. Levin, and Y. Ohya. 1996. Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science.* 272: 279-81.
- Rajavel, M., B. Philip, B. M. Buehrer, B. Errede, and D. E. Levin. 1999. Mid2 is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 19: 3969-76.
- Ram, A. F., A. Wolters, R. Ten Hoopen, and F. M. Klis. 1994. A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast.* 10: 1019-30.
- Ram, A. F., S. S. Brekelmans, L. J. Oehlen, and F. M. Klis. 1995. Identification of two cell cycle regulated genes affecting the beta 1,3-glucan content of cell walls in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 358: 165-70.

Ram, A. F., J. C. Kapteyn, R. C. Montijn, L. H. Caro, J. E. Douwes, W. Baginsky, P. Mazur, H. van den Ende, and F. M. Klis. 1998. Loss of the plasma membrane-bound protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of beta1,3-glucan into the medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity. *J. Bacteriol.* 180: 1418-24.

Ram, A. F., H. Van den Ende, and F. M. Klis. 1998b. Green fluorescent protein-cell wall fusion proteins are covalently incorporated into the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 162: 249-55.

Rockwell, N. C., & R. S. Fuller. 1998. Interplay between S1 and S4 subsites in Kex2 protease: Kex2 exhibits dual specificity for the P4 side chain. *Biochemistry.* 37: 3386-91.

Rockwell, N. C., & R. S. Fuller. 2001. Differential utilization of enzyme-substrate interactions for acylation but not deacylation during the catalytic cycle of Kex2 protease. *J. Biol. Chem.* 276: 38394-9.

Roemer, T., S. Delaney, and H. Bussey. 1993. *SKN1* and *KRE6* define a pair of functional homologs encoding putative membrane proteins involved in beta-glucan synthesis. *Mol. Cell. Biol.* 13: 4039-48.

Roemer, T., G. Paravicini, M. A. Payton, and H. Bussey. 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.* 127: 567-79.

Rogers, D. T., D. Saville, and H. Bussey. 1979. *Saccharomyces cerevisiae* killer expression mutant *kex2* has altered secretory proteins and glycoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90: 187-93.

Schimmoller, F., B. Singer-Kruger, S. Schroder, U. Kruger, C. Barlowe, and H. Riezman. 1995. The absence of Emp24p, a component of ER-derived COPII-coated vesicles, causes a defect in transport of selected proteins to the Golgi. *EMBO J.* 14: 1329-39.

- Schreuder, M. P., S. Brekelmans, H. van den Ende, and F. M. Klis. 1993. Targeting of a heterologous protein to the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 9: 399-409.
- Shahinian, S., & H. Bussey. 2000. beta-1,6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 35: 477-89.
- Shematek, E. M., J. A. Braatz, and E. Cabib. 1980. Biosynthesis of the yeast cell wall. I. Preparation and properties of beta-(1 leads to 3)glucan synthetase. *J. Biol. Chem.* 255: 888-94.
- Shimoi, H., Y. Iimura, and T. Obata. 1995. Molecular cloning of *CWPI1*: a gene encoding a *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein solubilized with *Rarobacter faecitabidus* protease I. *J Biochem (Tokyo)*. 118: 302-11.
- Shimizu, J., K. Yoda, and M. Yamasaki. 1994. The hypo-osmolarity-sensitive phenotype of the *Saccharomyces cerevisiae hpo2* mutant is due to a mutation in *PKC1*, which regulates expression of beta-glucanase. *Mol. Gen. Genet.* 242: 641-8.
- Simons, K., & E.Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 387: 569-72.
- Skrzypek, M., R. L. Lester, and R. C. Dickson. 1997. Suppressor gene analysis reveals an essential role for sphingolipids in transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 179: 1513-20.
- Smits, G. J., J. C. Kapteyn, H. van den Ende, and F. M.Klis. 1999. Cell wall dynamics in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 348-52.
- Spellman, P. T., G. Sherlock, M. Q. Zhang, V. R. Iyer, K. Anders, M. B. Eisen, P. O. Brown, D. Botstein, and B. Futcher. 1998. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol. Biol. Cell.* 9: 3273-97.

- Stirling, D. A., & M. J. Stark. 2000. Mutations in *SPC110*, encoding the yeast spindle pole body calmodulin-binding protein, cause defects in cell integrity as well as spindle formation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1499: 85-100.
- Stock, S. D., H. Hama, J. A. Radding, D. A. Young, and J. Y. Takemoto. 2000. Syringomycin E inhibition of *Saccharomyces cerevisiae*: requirement for biosynthesis of sphingolipids with very-long-chain fatty acids and mannose- and phosphoinositol-containing head groups. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44: 1174-80.
- Sutherland, F. C., F. Lages, C. Lucas, K. Luyten, J. Albertyn, S. Hohmann, B. A. Prior, and S. G. Kilian. 1997. Characteristics of Fps1-dependent and -independent glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 179: 7790-5.
- Sutterlin, C., T. L. Doering, F. Schimmoller, S. Schroder, and H. Riezman. 1997. Specific requirements for the ER to Golgi transport of GPI-anchored proteins in yeast. *J. Cell Sci.* 110: 2703-14.
- Takita, Y., Y. Ohya, and Y. Anraku. 1995. The *CLS2* gene encodes a protein with multiple membrane-spanning domains that is important Ca^{2+} tolerance in yeast. *Mol. Gen. Genet.* 246: 269-81.
- Thevissen, K., B. P. Cammue, K. Lemaire, J. Winderickx, R. C. Dickson, R. L. Lester, K. K. Ferket, F. Van Even, A. H. Parret, and W. F. Broekaert. 2000. A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 9531-6.
- Turchini, A., L. Ferrario, and L. Popolo 2000. Increase of external osmolarity reduces morphogenetic defects and accumulation of chitin in a *gas1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 182: 1167-71.

Vai, M., E. Gatti, E. Lacana, L. Popolo, and L. Alberghina. 1991. Isolation and deduced amino acid sequence of the gene encoding gp115, a yeast glycopospholipid-anchored protein containing a serine-rich region. *J. Biol. Chem.* 266: 12242-8.

van Berkel, M. A., L. H. Caro, R. C. Montijn, and F. M. Klis. 1994. Glucosylation of chimeric proteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 349: 135-8.

van der Vaart, J. M., L. H. Caro, J. W. Chapman, F. M. Klis, and C. T. Verrips. 1995. Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 177: 3104-10.

van der Vaart, J. M., F. S. van Schagen, A. T. Mooren, J. W. Chapman, F. M. Klis, and C. T. Verrips. 1996. The retention mechanism of cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Wall-bound Cwp2p is beta-1,6-glucosylated. *Biochim. Biophys. Acta.* 1291: 206-14.

Van der Vaart, J. M., R. te Biesebeke, J. W. Chapman, H. Y. Toschka, F. M. Klis, and C. T. Verrips. 1997. Comparison of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* as anchors for cell surface expression of heterologous proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 615-20.

Verna, J., A. Lodder, K. Lee, A. Vagts, R. Ballester. 1997. A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 13804-9.

Watanabe, R., K. Ohishi, Y. Maeda, N. Nakamura, and T. Kinoshita. 1999. Mammalian PIG-L and its yeast homologue Gpi12p are N-acetylglucosaminylphosphatidylinositol de-N-acetylases essential in glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. *Biochem. J.* 339: 185-92.

Zu, T., J. Verna, and R. Ballester. 2001. Mutations in WSC genes for putative stress receptors result in sensitivity to multiple stress conditions and impairment of Rlm1-dependent gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics.* 266: 142-55.

謝辞

分子生命工学研究室に入室してから、6年間の長きにわたり御指導、御鞭撻を頂きました東京大学教授依田幸司博士に心から御礼申し上げます。

研究、論文作製について、御指導、御助言を頂きました東京大学助教授足立博之博士に篤く御礼申し上げます。

隣のベンチで時を構わず議論、相談にのって頂くとともに、日々の実験生活を盛り上げて下さいました東京大学助手野田陽一博士に心から御礼申し上げます。

研究を進めるにあたり、御支援頂きました理化学研究所主任研究員高月昭博士に深く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、合成致死スクリーニングの株、ベクターを御恵与下さいました東京大学教授東江昭夫博士に深く御礼申し上げます。

細胞壁研究の大先輩として、研究、実験への御助言、御指導頂いただけでなく、抗 Cwp1p 抗体を快くご恵与下さいました独立行政法人酒類総合研究所主任研究員下飯仁博士に心から感謝申し上げます。

実験機材をお借りする際に、親身に御指導、お世話して頂きました独立行政法人酒類総合研究所研究員北垣浩志氏に心から感謝致します。

抗 Yap3p 抗体をご恵与下さいました PhD. Yves Bourbonnais に深く感謝申し上げます。

素早く、快く、K1 killer toxin 産生株培養上清をご恵与下さいました藤沢薬品工業佐藤郁子氏に心から感謝致します。

毎日の研究生活を楽しめるものとしてくれた分子生命工学研究室の皆様に深く心より感謝致します。寝食をともにするほどの長時間、付き合ってくれた 34 号室の皆さんと、OB の皆様に心から感謝します。

最後に、少し長引いた学生生活を支えてくれた家族に感謝します。