

出芽酵母における  
糖鎖付加機構の遺伝生化学的研究

橋本 仁志

①

論文題目

出芽酵母における糖鎖付加機構の遺伝生化学的研究

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻

平成7年度博士課程進学 橋本 仁志

指 導 教 官 依田 幸司

## 目次

序論	3
第1章 VIG9遺伝子の単離と機能の解析	
1-1 序	10
1-2 結果	
1-2-1 <i>vig9</i> 変異株の形質	11
1-2-2 VIG9遺伝子のクローニング	13
1-2-3 Vig9蛋白質の機能の解析	21
1-3 考察	27
第2章 VIG4遺伝子の単離と機能の解析	
2-1 序	30
2-2 結果	
2-2-1 <i>vig4</i> 変異株の形質	31
2-2-2 VIG4遺伝子のクローニング	33
2-2-3 Vig4蛋白質の局在	37
2-3 考察	42

### 第3章 Mnn9蛋白質複合体の単離と機能の解析

3-1. 序	45
3-2. 結果	
3-2-1 変異株の形質と蛋白質の構造	47
3-2-2 蛋白質の局在	49
3-2-3 蛋白質複合体の単離	56
3-2-4 蛋白質複合体の安定性	60
3-3 考察	62
総括	67
実験材料と方法	72
参考文献	81
謝辞	89

## 序論

### 糖鎖研究の意義

真核生物においては、多くの蛋白質が糖鎖の修飾を受ける。糖鎖は、蛋白質の種類によって異なるが、安定性、フォールディング、局在性、蛋白質同士の相互作用など蛋白質の構造と機能の面で大きく寄与している。また、糖鎖は非常に複雑且つ多様な構造をしており、これが細胞の特異性を認識するためにも機能していることが知られている。一方、進化的に糖鎖の構造と機能の重要性和精密さは増加しているが、糖鎖の生合成および蛋白質への付加の過程は生物種間で基本的に保存されている。

### 酵母研究の有用性

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においても、大部分の糖鎖は小胞体からゴルジ体を経る過程で付加され、蛋白質のフォールディングおよび安定化のために、また細胞壁の重要な構成成分の一つとして機能している [Kukuruzinska et al., 1987; Herscovics and Orlean, 1993]。酵母 *S. cerevisiae* は真核生物のモデル生物としてよく用いられている。これは酵母 *S. cerevisiae* においては宿主-ベクター系が確立しており、遺伝子操作を中心とする分子生物学的解析が強力であることが理由である。つまり条件致死をはじめとする変異株の取得、また特定の遺伝子を標的とする遺伝子破壊株の作製、さらには多コピーサプレッサーや合成致死変異株などのスクリーニングを通じて遺伝学上関連している遺伝子の取得、などが可能であるという点である。また酵母 *S. cerevisiae* は一倍体と二倍体の二つの生活環を持つため劣性の形質を観察することができ、既によく知られているプロモーターを用いることによって、遺伝子の発現のスイッチの on-off が容易であることもその理由の一つである。更には全ゲノム配列がついに明かとなったことから、これを利用することで膨大な情報を得ることができるようになった。そこで糖鎖の付加過程についても、このような利点を生かして、他の真核生物システムを

用いた系では得ることの難しかった情報が酵母から得られるようになってきている。

### 酵母における糖鎖

酵母 *S. cerevisiae* において分泌に伴って起こる糖鎖修飾には、1) アスパラギン残基へのN-結合同型、2) セリンまたはスレオニン残基へのO-結合同型、3) カルボキシル末端へのグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型がある (Fig. 0-1)。ただし高等真核生物において糖鎖を構成している糖は非常に多様であるが、酵母 *S. cerevisiae* においてはほとんどマンノースが主体である。糖の供与体として働くのはUDP-Nアセチルグルコサミン、GDP-マンノース、UDP-グルコースである。小胞体の内腔側で付加されるマンノースおよびグルコースは、ドリコールリン酸とそれぞれGDP-マンノースまたはUDP-グルコースから生成されるドリコールリン酸マンノースまたはドリコールリン酸グルコースから供給される [Abeijon and Hirschberg, 1992; Herscovics and Orlean, 1993]。一方、ゴルジ体ではGDP-マンノースを膜上に存在するトランスポーターを用いて内腔側に輸送し、糖転移酵素の基質とする。

### N-結合同型糖鎖の構造と生合成

N-結合同型糖鎖は  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  をコアとしてその後成熟し、 $\text{Man}_9\text{-13GlcNAc}_2$  といった構造(カルボキシペプチダーゼY (CPY))またはコアに200残基程度までのマンノースが様々な大きさで付加される構造(分泌蛋白質や細胞壁のマンナン蛋白質の多く)をしている (Fig. 0-1)。後者の構造をとるような場合はまず  $\alpha$ -1,6結合による主鎖が伸び、それに続けて  $\alpha$ -1,2および  $\alpha$ -1,3結合による側鎖が伸長していく。またリン酸ジエステル結合によるマンノースがコアや外糖鎖に付加されることもある [Kukuruzinska *et al.*, 1987; Herscovics and Orlean, 1993]。その生合成は小胞体およびゴルジ体で段階的に行われる。まず小胞体の細胞質側で  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  という構造がドリコールに付加された形で合成され、その後小胞体の内腔側に移行して  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  という構造になり、ドリコールから蛋白質にOligosaccharyltransferase複合体により移され [Silberstein and

Gilmore, 1996; te Heesen *et al.*, 1993]、グリコシダーゼにより  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  という構造に刈り込まれる [Esmon *et al.*, 1984; Camirand *et al.*, 1991]。ゴルジ体に輸送されてから、Och1により最初の  $\alpha$ -1,6-マンノースが付加され、Mnt1/Kre2およびMnn1といった糖転移酵素を用いて外糖鎖が形成される [Hausler *et al.*, 1992; Nakayama *et al.*, 1992; Graham *et al.*, 1992]。リン酸糖はMnn4およびMnn6を用いて付加される。 [Odani *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997]

#### O-結合型糖鎖の構造と生合成

O-結合型糖鎖はセリンまたはスレオニンに直接マンノースが1~5個分岐なく付加したような構造である [Kukuruzinska *et al.*, 1987; Herscovics and Orlean, 1993] (Fig. 0-1)。その生合成は小胞体の内腔及びゴルジ体で行われる。一つめのマンノースはドリコールリン酸マンノースからPmt1~Pmt7蛋白質によって付加される [Strahl-Bolsinger *et al.*, 1992; Gentzsch and Tanner, 1996; Gentzsch and Tanner, 1997]。二つめ、三つめの  $\alpha$ -1,2-マンノースはその詳しい機構などは不明であるが、小胞体およびゴルジ体で9種からなるMnt1/Kre2蛋白質ファミリーによって付加され [Hausler *et al.*, 1992; Lussier *et al.*, 1997]、四つめ、五つめのマンノースはMnn1蛋白質により  $\alpha$ -1,3結合で付加される [Graham *et al.*, 1992]。

#### GPIアンカーの構造と生合成

GPIアンカーについてはまだよく分かっていないが構造は他の真核生物のものとよく似ており、ethanolamine-P-6-Man-  $\alpha$ -1,2-Man-  $\alpha$ -1,6Man-  $\alpha$ -1,4GlcN-  $\alpha$ -1,6- inositol phospholipidという形である [Ferguson, 1991] (Fig. 0-1)。GPIアンカーの付加される蛋白質はシグナル配列であるN末端以外にC末端にも疎水性領域を持ち、小胞体内腔側でこのC末端領域が切断されその代わりにGPIアンカーが付加される [Gerber *et al.*, 1992]。脂質の部分は小胞体以前の過程ではジアシルグリセロールで、その後の過程でセラミドに移されることもあるが、これは蛋白質によって違うようである [Conzelmann

*et al.*, 1992]。細胞膜外に輸送された後、蛋白質がGPIから細胞壁のグルカンヘトラン  
スグリコシレーションされるものもあるがその詳細な機構については不明である[Klis,  
1994]。

#### 既知の糖鎖不全変異株

上記のような酵母 *S.cerevisiae* における糖鎖付加過程の解析は主に変異株を用いて行  
われてきた。その取得方法は様々で、細胞に *in vivo* で [<sup>3</sup>H]マンノースを取り込ませ糖  
鎖不全により糖タンパク質の糖鎖部分への [<sup>3</sup>H]マンノースの取り込み量が野生株より  
減少し放射線による損傷を免れた株を濃縮するという [<sup>3</sup>H]マンノース自殺法を用いて  
一連の *alg* 変異[Huffaker and Robbins, 1983]、*och1* 変異[Nagasu *et al.*, 1992] 等が取得され、  
また細胞表層のマンナン蛋白質の糖鎖不全に起因した抗原性の変化を指標に *mnn* 変異  
株は取得された[Raschke *et al.*, 1973; Ballou, 1990]。その他糖鎖不全となることが確認  
されている変異株として、バナジン酸耐性を指標として取得された *vrg* 変異株[Ballou  
*et al.*, 1991]、キラー毒素耐性を指標として取得された *kre2* 変異株[Hill *et al.*, 1992]、  
 $Ca^{2+}$ -ATPase の変異である *pmr1* 変異株[Rudolph *et al.*, 1989]、小胞体に局在する蛋白質  
の残留機構が欠損した *erd1* 変異株[Hardwick *et al.*, 1990]、カルコフラーホワイト高感受  
性となる *cwh* 変異株[Ram *et al.*, 1994] などいくつか報告されている。これらの変異株の  
中で、対応する遺伝子が同定されその機能及び糖鎖不全となる分子機構についてもよ  
く分かっているものはまだ少ない。

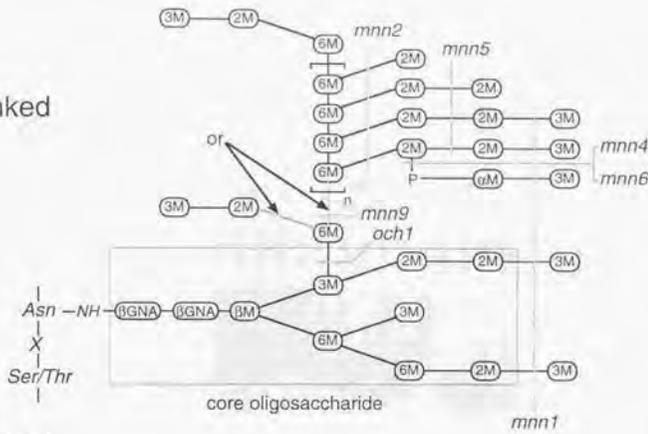
#### 本研究にいたるまでの経緯

以上のような前提にたつて、当研究室の榊原らは糖鎖不全となる変異株を取得し解  
析を行うことにより、出芽酵母の外糖鎖付加過程に関与する因子を同定し、それら因  
子の活性制御機構やゴルジ体に局在化する糖転移酵素の局在化機構、さらにはゴルジ  
体そのものの機能解析を目的として、研究を開始した。変異株は Ballou らの報告

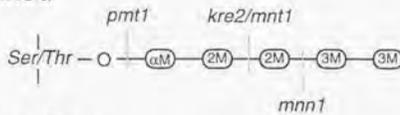
[Ballou *et al.*, 1991]を基に、5mMバナジン酸に対して耐性となる自然突然変異株を取得し、13の相補群に分類した。これらの株について分泌糖蛋白質であるインペルターゼの電気泳動を行い、活性染色によりその移動度を野生株と比較したところ、そのうちの4相補群については野生株との差は見られず、他の9相補群では野生株よりも移動度が大きかった (Fig. 0-2A)。このことより前者の変異を *vmg* (vanadate resistance and mature glycosylation) 変異、後者を *vig* (vanadate resistance and immature glycosylation) 変異と名付けた。*vig*変異株のうち *vig2*, 3, 5, 8, 9変異株の糖鎖は成熟型と小胞体型の中間程度の分子量を示し、*vig1*, 4, 6, 7変異株は小胞体型に近い分子量を示した。そこで前者をクラス1、後者をクラス2とした。また、O-糖鎖の分子量を調べる目的で、キチナーゼを精製し泳動度を比較した。その結果、*vig4*, 5, 8, 9変異株ではO-糖鎖も短くなっていることが確認された (Fig. 0-2B)。これら *vig*変異の中には当然既知の遺伝子の変異株も含まれていると考えられるが、相補性テストや遺伝子組み込みといった遺伝学的手法により、*vig1=van1=och3* [Kanik-Ennulat and Neff, 1990]、*vig3=anp1* [Melnick and Sherman, 1993; Chapman and Munro, 1994]、*vig6=mn9* [Ballou *et al.*, 1991; Yip *et al.*, 1994]、*vig7=och1* [Nakayama *et al.*, 1992]、*vig8=sec53=alg4* [Bernsterin *et al.*, 1985; Kepes and Schekman, 1988]であることが、また *pmi40*, *erd1*, *kre2*, *pmr1*変異は *vig*変異の中には含まれていないことが確認された。

本研究においてはこれら *vig*変異のうち二つの相補群に属する変異については相補する野生型遺伝子をクローン化して解析を行い、機能未知であった三群の *VIG*遺伝子についてはそのコードする蛋白質の生化学的解析を行った。

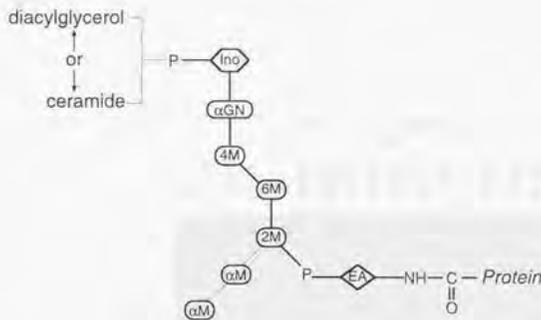
### N-linked



### O-linked



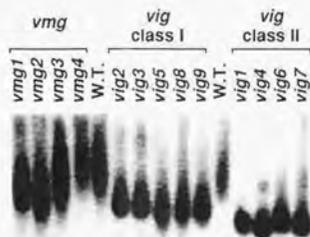
### GPI anchor



- |             |                    |             |                   |     |                   |    |                   |            |                   |
|-------------|--------------------|-------------|-------------------|-----|-------------------|----|-------------------|------------|-------------------|
| $\alpha$ GN | $\alpha$ -1,6-GlcN | $\beta$ GNA | $\beta$ -GlcNAc   | Ino | Inositol          | EA | Ethanolamine      | $\alpha$ M | $\alpha$ -Man     |
| $\beta$ M   | $\beta$ -1,4-Man   | 2M          | $\alpha$ -1,2-Man | 3M  | $\alpha$ -1,3-Man | 4M | $\alpha$ -1,4-Man | 6M         | $\alpha$ -1,6-Man |

Fig. 0-1 出芽酵母における糖蛋白質と糖脂質の糖鎖構造

A



B

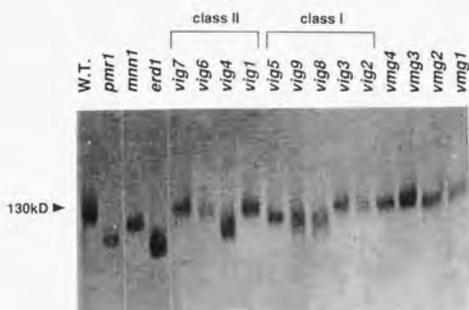


Fig. 0-2 *vig*, *vmg*変異株におけるインベルターゼ(A)とキチナーゼ(B)

## 第1章 VIG9遺伝子の単離と機能の解析

### 1-1 序

*vig9*変異株は*vig*変異のうちのクラス1に属し、N-, O-糖鎖ともにコアと成熟型の中間程度の大きさを示す。クラス1の変異株として他に*vig3*, *vig5*, *vig8*がある。*VIG3*は*ANPI*と同一であり3章で解析した。*VIG5*は*MNN1*と同一でこの遺伝子産物は $\alpha$ -1,3-Mannosyltransferaseであり、N型糖鎖の側鎖を付加する糖転移酵素であるため変異株では糖蛋白質の大きさがコアと成熟型の中間程度になる[Graham *et al.*, 1992]。*VIG8*は*SEC53/ALG4*と同一でこの遺伝子産物はホスホマンノムターゼである[Bernsterin *et al.*, 1985; Kepes and Schekman, 1988]。これはマンノース-6-Pをマンノース-1-Pへと変換する酵素で、糖の供与体であるGDP-マンノースの前駆体の合成を行う。そこで変異株ではGDP-マンノースの供給量が低下することにより糖鎖不全となる。以上を踏まえ*vig9*変異を相補する遺伝子のクローニングを試みた。

## 1-2 結果

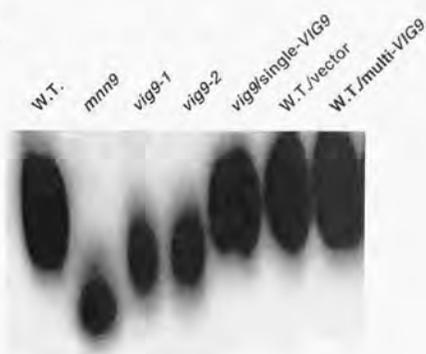
### 1-2-1 *vig9*変異株の形質

*vig9*変異株は*vig*変異のうちのクラス1に属する変異株で、A13-18を親株として二つのアリアル (*vig9-1*, *vig9-2*) が得られた。これらの生育は25℃および37℃でもまたYEYP培地およびSD培地でも、野生株と変わらなかった。細胞からペリプラズム画分を調製し、SDSのはいったポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った (SDS-PAGE) 後、活性染色を行って、分泌糖蛋白質であるインペルターゼの分子量を野生株および既知の糖鎖不全変異株である*mnn9*変異株 [Ballou *et al.*, 1991; Yip *et al.*, 1994] と比較した。その結果、*vig9*変異株におけるN-結合型糖鎖は野生株と*mnn9*変異株の中間程度の分子量であることが分かった (Fig. 1-1A)。またこのインペルターゼの分子量が糖鎖の大きさのみを反映しているかどうかを調べるために、それぞれのインペルターゼをエンドグリコシダーゼHで処理することにより糖鎖を除いたインペルターゼを免疫沈降により回収し大きさを比較した (Fig. 1-1B)。その結果、インペルターゼの蛋白質部分の大きさは等しいことから、*vig9*変異株では外糖鎖の付加に欠損があることが確かめられた。

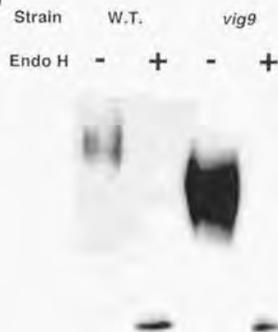
また、細胞培養液中に分泌されてきたキチナーゼをキチンと共沈させることにより精製し、これをSDS-PAGEした後クマシーブリリアントブルー (CBB) で染色を行って、キチナーゼの分子量を野生株と比較した。その結果、*vig9*変異株におけるO-結合型糖鎖は野生株より少し小さいことが分かった (Fig. 1-1C)。

次に変異株は糖鎖の構造異常により細胞表層のマナン蛋白質の性質が変化し、その結果物質の透過性も変化していると考え、*vig9*変異株の薬剤感受性について調べた (Table 1-1)。*vig9*変異株はジェネティシン (G418) に対して感受性の上昇が観察された。その他、*vig9*変異株では細胞同士の凝集性の上昇が観察された [Sakakibara, 1993]。

A



B



C

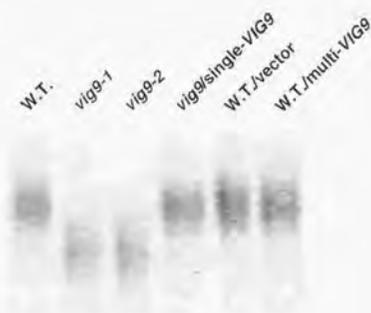


Fig.1-1 野生株と *vig9* 変異株におけるインベルターゼ(A)(B)とキチナーゼ(C)の大きさ。

	Vanadate (mM)		Cycloheximide (ng/ml)	5-Fluorouracil ( $\mu$ g/ml)	Hygromycin B (unit/ml)	Geneticin ( $\mu$ M)
	SD	YEPD	SD	SD	SD	YEPD
W.T.	3	4	>400	16	>364	>100
<i>vig9</i>	4	5	>400	16	364	<25

Table 1-1 野生株と *vig9* 変異株における薬剤感受性。数字は最大生長非阻害薬剤濃度を示す。

## 1-2-2 VIG9遺伝子のクローニング

*vig9*変異株ではジェネティシンに対する感受性が上昇していることを利用して*vig9*変異を相補する野生型遺伝子のクローニングを試みた。H17-6C (*MATa*, *vig9-1 leu2 ura3 trp1*) にG16酵母ゲノミックライブラリー (low copy, *TRP1*) を形質転換し、レブリカ法でジェネティシンに対する耐性を野生株程度まで獲得したことが確認された形質転換体を選択した。さらに、インペルターゼの活性染色によって糖鎖が野生株程度まで回復しているものから、独立した3種類のクローンを回収した (pSV901、902、903) (Fig. 1-2)。インペルターゼの分子量を指標としてサブクローニングを行い、*vig9*変異を相補するために必要な領域をpSV903のHindIII - *Sau3A1/Bam*HI 2.5kbに限定した。

この全領域の塩基配列を決定し (Fig. 1-3)、この中に361アミノ酸をコードするオープンリーディングフレーム (ORF) を見いだした。配列から予想されるこの蛋白質の分子量は39,565でpIは5.93であった。上流域にはTATAボックスであろうと思われる配列が3カ所見られた (Fig. 1-3 アンダーライン)。また下流域には3カ所のポリA付加シグナルが見られた (Fig. 1-3 点線)。この領域が*vig9*変異株で変異の起こっている遺伝子であることを示すため、H17W (*MAT a/α*, *vig9-1/vig9-1 ADE2/ade2 HIS3/his3 leu2/leu2 ura3/ura3*) にpSV921をHpaIで切断した後形質転換し、*LEU2+*となった形質転換体を孢子形成させ、四分子解析を行った結果、*VIG9+*と*LEU2+*は連鎖していることが確認された。このことからこの領域にコードされている遺伝子が*VIG9*遺伝子であると結論した。またpSV914に乗っている領域以外の他のクローンの塩基配列を部分的に決定したところ、5'側の下流域には転写因子をコードする*MBP1*遺伝子が[Koch *et al.*, 1993]存在することが分かった。*MBP1*は染色体四番に存在していることが報告されていることから[Koch *et al.*, 1993]、*VIG9*遺伝子も染色体四番に乗っていることがわかった。

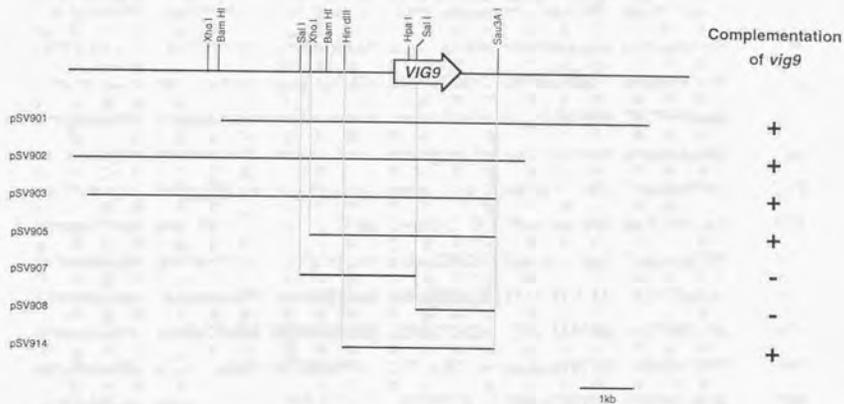


Fig. 1-2 *VIG9*遺伝子の制限酵素地図。図で示した領域が*vig9*変異を相補するかどうかをプラスミドの名前の右に相補する場合は+でしない場合は-で示す。

ATGCTGCACC	CGATCCCTCT	TACCTGCGTG	CTGGGTGAAA	AGCAAGACTA	AGAGCAAGAC	-661
CCPTGGATAA	CGGACCAAT	GCGACTCTPT	CGTCTCTTCC	TGCAACTCTG	ACTATAGCPT	-662
TTTCTATCAT	TGCCPTAAAC	AAACCCGTCA	CGCACCTCAC	CAGCAACOGC	AGCATGAAGA	-541
ACGGGAAAAA	AGAAAAAAA	AACGGCAAA	AAACGGCAC	GTCTACTTGC	TGGCCAGCTA	481
GAAATGCTCT	GGGAGCCACC	ACGGTITAT	TTTATCTCAA	TCCTCGAAAA	ACTPTTPTTT	-421
CTTTGTTTTT	GTCTGTTTTT	AGCATGAACA	GCGCAGCAAT	AAACAAACAA	ACAACAAAC	-361
AGACGGACAG	ACACAGAACC	ACAGCTGACC	GGTAGTAAAG	TAAAGCTGGT	GTPTCTCCCT	-301
TGTGTTTTCT	TTTTTCTCTG	CCCTGTGGCG	CCTCTGTAAA	CATATATATA	GTAGACTTTT	-241
CACGTCATGT	TTAGAAGTPT	CACATAGTCT	TGTPTTCTTT	TCCTCAAAC	TGTATPTTPT	-181
TTTTCTTTGT	CTATCTPTGT	CTCACCTCTT	TGACTTTGAT	AACGPTCATC	AAGTGTGCAA	-121
ACTACTTTAC	ATTCGCTAAC	TCPTTCTCTC	TGTCCAAATA	TTTTTGTGAC	TATGCAAAA	-61
AAATATTTAC	AGCACAAGAC	AACTTACAAC	TTTCAACAAT	AAACATTTTA	TAAATGAAAA	-1
ATGAAAGGTT	TAAATTTAGT	CGGTGGTTAC	GGTACCAGAT	TGAGACCTTT	AACCTTGACC	60
M K G L	I L V	G G Y	G T R L	R P L	T L T	
GTTCGAAAGC	CACTGGTTGA	ATTCCGTAAT	AGACCAATGA	TTTTACACCA	AATCGAGGCT	120
V P K P	L V E	F G N	R P M I	L H Q	I E A	
TTAGCCAAAG	CTGGTGTATC	TGACATCGTT	CITGCTGTTA	ATTACAGACC	AGAAGTCAAG	180
L A N A	G V T	D I V	L A V N	Y R P	E V M	
GTGGAAACTT	TGAAGAAGTA	CGAAAGGAA	TATGGTGTTA	ACATCACTTT	CTCTGTAGAA	240
V E T L	K K Y	E K E	Y G V N	I T F	S V E	
ACTGAACCAT	TAGGTACTGC	AGTCCATTG	AAATPGCTG	AAAGTGTMTT	GAGAGGAGC	300
T E P L	G T A	G P L	K L A E	D V L	K K D	
AACCTCCAT	TTTTCTGCTT	AAACTCCGAC	GTCATTTGCG	AAATATCCAT	CAAGGAATG	360
N S P F	F V L	N S D	V I C E	Y P F	K E L	
GCTGACTTCC	ACAAAGCTCA	CGGTGGTAAA	GGTACCATG	TTGCTACCAA	GGTCGACGAA	420
A D F H	K A H	G G K	G T I V	A T K	V D E	
CCPTCTAAAT	ACGGTGTGAT	TGTCCTGAT	ATAGCTACTC	CAAACTTGAT	TGACGATTT	480
P S K Y	G V I	V H D	I A T P	N L I	D R F	
GTGAAAAGC	CAAAGAAAT	TGTTGGTAA	AGAATTAACG	CCGGTTTGTG	CAITTTAAAC	540
V E K P	K E F	V G N	R I N A	G L Y	I L N	
CCAGAAGTCA	TTGACTTIGAT	TGAAATGAAG	CCAACCTCAA	TTGAAAAGGA	AACCTTCCCA	600
P E V I	D L I	E M K	P T S I	E K E	T F P	
ATCTTGTGCG	AAGAAAAACA	ACTATATCC	TTGCAITTTGG	AAGGTTTCTG	GATGGATGTT	660
I L V E	E K Q	L Y S	F D L E	G P W	M D V	
GGTCAACCAA	AGGACTCTCT	GTCCTGTACC	GTCTTTTACT	TGAACTCTTIT	GGCCACAGAGA	720
G Q P K	D F L	S G T	V L Y L	N S L	A K R	
CAACCAAAA	AATTTGGTAC	AGTGGCCAAC	ATTTTGGTGA	ATGCCCTGAT	CGACCCAACC	780
Q P K K	L A T	G A N	I V G N	A L I	D P T	
GCTAAGATTT	CCTCCACTGC	TAGATTTGGC	CCAGACGTGG	TTATCGGTCC	TAAATGTCACC	840
A K I S	S T A	K I G	P D V V	I G P	N V T	
ATCGGTGATG	GTGTTAGAAT	CACCAGATCT	GTTGTTTTGT	GCAACTCCAC	CATCAAGAAC	900
I G D G	V R I	T R S	V V L C	N S T	I K N	
CACCTCCITGG	TCAAATCTAC	CATCGTAGGC	TGGAACCTCTA	CCGTGGCTCA	ATGGTGTGCT	960
H S L V	K S T	I V G	W N S T	V G Q	W C R	
TGGAAGGTTG	TCACTGCTCT	GGGTGACGAC	GTTGAAGTTA	AGGACGAAAT	CTACATCAAC	1020
L E G V	T V L	G D D	V E V K	D E I	Y I N	
GGTGTAAAG	TCTTACCTCA	TAACTATATC	TCCGATAATG	TTCCAAAGGA	AGCTATATTT	1080
G G K V	L T H	K S I	S D N V	F K E	A I I	
ATGTGAGTTA	GGGAAACGAA	CTGTAATTGA	ATATAACTTA	TATCACTCAT	CTGTTTTTGT	1140
M Ter						
TAAATTTTAT	TTAGCCAATA	TCATTTATAA	AAGAGGAAAA	CATGCACAGA	AAAAGCACTG	1200
CTTACTGTTA	TGCTTAGTTT	TGTAATPGAA	AAITGAAAAAT	AAAAAATAAA	AAGAAAATAA	1260
AGRAAAAAAG	GTPTGATCCT	ATGTAACCTT	TTATTTACGT	AGAAGTTAAT	AAATATTAAT	1320
TCATITTTTT	AICTATTTTT	CAGTATATGG	ATACATGTAA	AGTTCCTCTA	TTTATGTATA	1380
TTTTATGCAIT	GACTATTCGC	GITTAGAAT	GTGATGATCT	GTCTCGCCCC	CTTATTTTTA	1440
TTATITGTTG	CTATCAATGT	CITGATGAT	ACAATCCAGC	AACATCTTAC	TTCTTCAATA	1500
TTCAITTTCCG	TACCTTCCCT	GATTAATCCG	CTATAITTTAT	GAATCTTGGC	ATTCCTCTCA	1560
AAITTTCTTCA	CCAAGGAACT	CAATTTGGTT	TTCTCTTGTG	ATTGCAACAT	CGTTAGTCTC	1620
TGAGCCAAT	CCAACCTTTC	CACGCTATTA	TTATCTTCTC	CAACTGTGTT	AITGGTGGTA	1680
GCGTAGTTT	CATCTTCTAT	TAAATTTGTC	AATAAAAAAC	TTTGGCTGTA	TCCAGCTTT	1740
TGTTTTATCA	ACCGTTTGTG	TCSTATGAGC	CTTTTCTTCA	ATTTCTTAGT	ATTTTGTCTC	1800
TGTAGACGAG	ATAAAAATTC	GAAATCATCA	TTAGTCTGAG	CTTCGCCGTT	CTTACTTTTA	1860
CTGCTCTCTT	TCAATACCTC	TAAATTTTTT	AGGCTTACCT	GATATTTTGT	TCTAGAAAAG	1920
CTTTTTAAAG	TTTTTTGCAA	ACTTTTTTAT	TGTTTTGAT	GCTGTTTCAIG	AAGATC	1976

Fig. 1-3 VIG9遺伝子の塩基配列及びコードされる蛋白質のアミノ酸配列。アンダーラインで示した箇所がTATAボックスと考えられる配列、点線で示した箇所がポリA付加シグナル。

### 1-2-3 VIG9遺伝子の解析

VIG9遺伝子が酵母の生育にとって必須であるかどうかを調べるため、二倍体の株を用いて一方のVIG9遺伝子が破壊された株を作製した。遺伝子破壊用にVIG9遺伝子のHpaI-SalI間にLEU2遺伝子をHpaI-SalIで切り出してつなぎ、このプラスミドをVIG9遺伝子の両端で切断して直線状にして、W303株に導入した。このプラスミドがゲノム上に組み込まれていることを、VIG9遺伝子の両端に対応するプライマー1と2を用いてPCRを行い確認した。胞子を形成させた後31個の四分子解析を行った結果、四つの胞子のうち生育可能なものは各々二つで (Fig. 1-4) これらの表現形はすべて*leu2*であった。このことから、VIG9遺伝子は酵母の生育にとって必須な遺伝子であることが示された。

次にVig9蛋白質の疎水性度をKyteとDoolittleの方法[Kyte and Doolittle, 1982]に従ってプロットした (Fig. 1-5)。この図よりVig9蛋白質は全長にわたり親水性であり、シグナル配列や膜貫通領域として機能するような配列は見られなかった。よってVig9蛋白質は細胞質で機能するものと考えられる。

次にVig9蛋白質の機能に関する手がかりを得るため、FASTAプログラム[Pearson and Lipman, 1988]を用いてデータベースを検索したところ、この蛋白質は新規の蛋白質であるが、いくつかの細菌の蛋白質とのホモロジーが高いことが分かった (Fig. 1-6)。その中で*Salmonella typhimurium*のRfbF蛋白質[Jiang et al., 1993]とは251アミノ酸にわたって32.7%のアミノ酸が一致しており、この蛋白質はO-抗原の生合成過程においてグルコース-1-リン酸とCTPからCDP-グルコースを形成するような酵素である。*Yersinia pseudotuberculosis*のRfbF蛋白質[Kessler et al., 1993]とは257アミノ酸にわたって31.1%のアミノ酸が一致していた。*Yersinia enterocolitica*のRfbA蛋白質[Zhang et al., 1993]とは254アミノ酸にわたって27.6%のアミノ酸が一致しており、この蛋白質はdTDP-L-ラムノースを形成する酵素である。*Streptomyces griseus*のStrD蛋白質[Dister et al., 1987]とは

339アミノ酸にわたって23.3%のアミノ酸が一致しており、この蛋白質はdTDP-L-ストレプトースを形成する酵素である。これらホモロジーの高い蛋白質には共通した特徴がある。つまりこれらの酵素はすべて糖リン酸とヌクレオチド三リン酸から糖ヌクレオチドを合成する反応を触媒するのである。そこで糖鎖不全となる様な変異株の形質、蛋白質が親水性であること、そして上記のホモロジーの結果より、Vig9蛋白質はマンノース-1-リン酸とGTPからGDP-マンノースの生合成を行うGDP-マンノースピロホスフォリラーゼであると予想された。

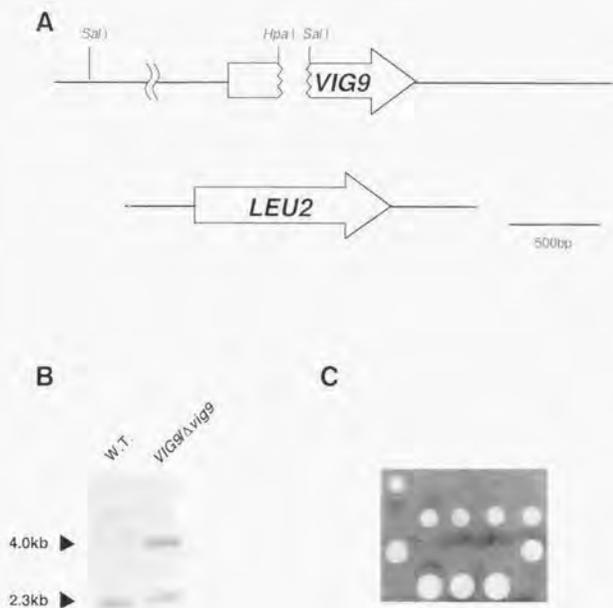


Fig. 1-4 *VIG9*遺伝子破壊株の作製。(A)*VIG9*遺伝子を*LEU2*遺伝子によって破壊するためのDNAフラグメントの構築。(B)遺伝子破壊のサザンブロットィングによる確認。野生型の染色体は1.8kb、破壊された染色体は3.5kbのバンドを生じる。(C)*VIG9*遺伝子の一方を破壊された二倍体の四分子分離。

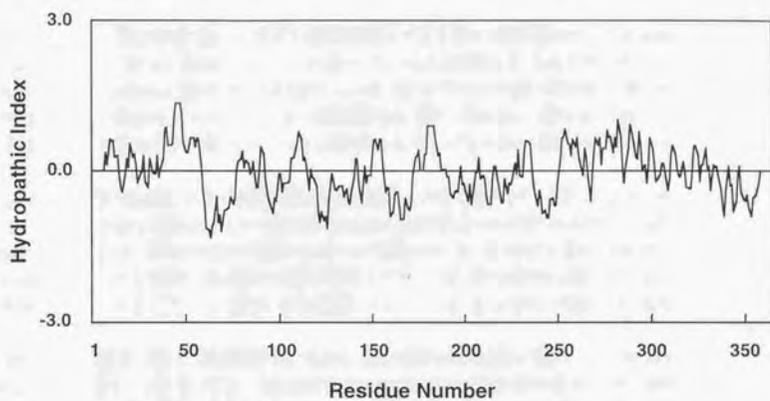


Fig. 1-5 予想される Vig9 の Hydropathy Profile。

Vig9	— <b>M</b> KGLIL <b>GG</b> STR <b>LRP</b> I <b>I</b> TV <b>PKPLV</b> G <b>GF</b> MI <b>I</b> Q <b>IEAL</b> W <b>AG</b> V <b>DI</b> V <b>AV</b> R	1-56
StrD	— <b>M</b> KAV <b>AGG</b> STR <b>LRP</b> I <b>I</b> TS <b>AK</b> LV <b>PA</b> W <b>GV</b> LFY <b>GLE</b> IR <b>AAE</b> II <b>GV</b> I <b>V</b> Q <b>T</b>	1-56
RfbA	— <b>M</b> K <b>AV</b> LAG <b>STR</b> L <b>I</b> I <b>I</b> FG <b>SK</b> L <b>LP</b> VY <b>DK</b> MI <b>Y</b> Y <b>FS</b> VM <b>AE</b> OD <b>LI</b> I <b>ST</b> PE	1-56
S.RfbF	— <b>M</b> KAV <b>LAG</b> STR <b>LR</b> SEE <b>I</b> W <b>AK</b> PK <b>VE</b> EG <b>GI</b> LW <b>I</b> MK <b>MS</b> V <b>IK</b> Q <b>FI</b> I <b>CC</b> Q <b>Y</b> K	1-56
Y.RfbF	ME <b>I</b> Q <b>V</b> AV <b>LAG</b> STR <b>LR</b> SEE <b>I</b> W <b>AK</b> PK <b>VE</b> EG <b>GI</b> LW <b>I</b> MK <b>LY</b> SS <b>Y</b> E <b>IN</b> D <b>I</b> CC <b>Q</b> Y <b>K</b>	1-60
Vig9	PE <b>VE</b> IL <b>KK</b> Y <b>E</b> KEY <b>GN</b> IT <b>FS</b> VE <b>TE</b> ————— <b>PLG</b> AG <b>PL</b> KA <b>ED</b> IK	57-98
StrD	ADE <b>I</b> AA <b>VG</b> D—G <b>S</b> RF <b>EL</b> K <b>V</b> SY <b>I</b> PO <b>SK</b> ————— <b>PLG</b> A <b>H</b> CV <b>L</b> I <b>S</b> RF <b>IG</b>	57-97
RfbA	DL <b>PS</b> FK <b>R</b> L <b>GG</b> SO <b>FE</b> I <b>RL</b> Q <b>Y</b> AK <b>Q</b> PS————— <b>PLG</b> AO <b>AF</b> I <b>IG</b> E <b>FI</b> A	57-98
S.RfbF	GY <b>IK</b> E <b>Y</b> FAN <b>Y</b> FL <b>MS</b> —DV <b>TF</b> MA <b>EN</b> RM <b>EV</b> H <b>K</b> R <b>VE</b> P <b>W</b> NV <b>I</b> VD <b>T</b> Q <b>SS</b> MT <b>GG</b> R <b>Y</b> K <b>RA</b> E	57-115
Y.RfbF	GY <b>IK</b> E <b>Y</b> FAN <b>Y</b> FM <b>MS</b> —D <b>TF</b> CM <b>RD</b> N <b>EM</b> I <b>V</b> H <b>OK</b> R <b>VE</b> P <b>W</b> NV <b>I</b> VD <b>T</b> Q <b>ED</b> SM <b>T</b> GG <b>R</b> Y <b>K</b> RV <b>KD</b>	61-119
Vig9	— <b>D</b> NS <b>PF</b> Y <b>NS</b> V <b>I</b> CE <b>Y</b> P <b>I</b> — <b>KEL</b> AD <b>FK</b> A <b>H</b> GG <b>K</b> Q <b>I</b> V <b>AT</b> W <b>EE</b> SK <b>Y</b> GV <b>I</b> V <b>DI</b> AT <b>PN</b>	99-155
StrD	— <b>E</b> DF <b>I</b> MY <b>I</b> — <b>I</b> GN <b>F</b> V <b>VG</b> VE—DS <b>V</b> RE <b>FA</b> ARP <b>D</b> —A <b>H</b> LM <b>I</b> V <b>VE</b> PS <b>FE</b> — <b>VA</b> ELSD <b>SG</b>	98-150
RfbA	— <b>G</b> ER <b>CA</b> —L <b>LD</b> GN <b>I</b> Y <b>FG</b> SO <b>SK</b> RE <b>V</b> AS <b>R</b> ND <b>E</b> —A <b>I</b> V <b>FG</b> Y <b>Q</b> VD <b>A</b> ER <b>F</b> GV <b>IE</b> F <b>EN</b> F <b>NA</b>	99-154
S.RfbF	W <b>VD</b> EA <b>LF</b> TY <b>GG</b> V <b>AD</b> LD <b>I</b> — <b>K</b> ATI <b>DF</b> KA <b>H</b> GS <b>MT</b> AT <b>F</b> — <b>PE</b> GF <b>GA</b> L— <b>D</b> I <b>R</b> AGO	116-170
Y.RfbF	W <b>VD</b> EA <b>LF</b> TY <b>GG</b> V <b>S</b> DV <b>NI</b> — <b>A</b> EL <b>IE</b> FK <b>SG</b> KA <b>IT</b> AT <b>I</b> — <b>Y</b> PE <b>GF</b> GA <b>L</b> — <b>D</b> IK <b>DK</b> O	120-174
Vig9	<b>I</b> DR <b>VE</b> PK <b>PE</b> Y <b>GS</b> RI <b>NG</b> LY <b>LN</b> P <b>AV</b> IDL <b>I</b> — <b>S</b> K <b>PT</b> — <b>S</b> I <b>E</b> — <b>K</b> ET <b>FP</b> I <b>VEE</b> — <b>K</b> LY	156-209
StrD	Q <b>V</b> L <b>GL</b> E <b>EP</b> A <b>HP</b> K <b>S</b> DL <b>AL</b> V <b>Y</b> LF <b>SA</b> I <b>HE</b> AV <b>AA</b> I <b>T</b> SW <b>R</b> GE <b>LE</b> I <b>T</b> DA <b>V</b> OW <b>I</b> DA <b>GR</b> D <b>VR</b>	151-210
RfbA	<b>I</b> — <b>S</b> I <b>E</b> PK <b>PK</b> SD <b>W</b> AV <b>T</b> EL <b>Y</b> F <b>Y</b> DK <b>W</b> EM <b>AK</b> E <b>K</b> S <b>ER</b> GE <b>L</b> E— <b>I</b> T <b>U</b> NE <b>MY</b> LA— <b>K</b> GL	155-210
S.RfbF	— <b>V</b> RS <b>FE</b> PK <b>PG</b> — <b>D</b> AM <b>IN</b> GF <b>F</b> V <b>LN</b> S <b>VID</b> LI— <b>D</b> ND <b>AI</b> — <b>T</b> WE— <b>O</b> PL <b>MT</b> AA <b>O</b> — <b>G</b> EM	171-222
Y.RfbF	— <b>V</b> RS <b>FE</b> PK <b>PG</b> — <b>D</b> AL <b>IN</b> GF <b>F</b> V <b>LN</b> S <b>VID</b> LI— <b>D</b> GD <b>K</b> S— <b>T</b> WE— <b>O</b> PL <b>MT</b> AA <b>O</b> — <b>G</b> EM	175-226
Vig9	<b>SE</b> I— <b>E</b> GF <b>I</b> — <b>I</b> D <b>VG</b> ORK <b>D</b> — <b>L</b> ET <b>V</b> I <b>NS</b> LA <b>K</b> RO <b>K</b> IT <b>G</b> AN <b>IV</b> W <b>I</b> D <b>PT</b> K <b>IS</b>	210-264
StrD	<b>ET</b> V <b>I</b> — <b>S</b> E <b>Y</b> — <b>K</b> IG <b>W</b> IT <b>D</b> EV <b>N</b> FM <b>I</b> ET <b>TE</b> PR <b>CD</b> GL <b>Y</b> D <b>ERS</b> DL <b>I</b> FM <b>VE</b> EG <b>EV</b> R	211-265
RfbA	R <b>VE</b> L <b>GF</b> EA <b>L</b> — <b>L</b> IG <b>—T</b> H <b>S</b> I <b>D</b> AS <b>IF</b> I <b>HT</b> IE <b>K</b> RO <b>F</b> W <b>AC</b> LEE <b>I</b> AY <b>ON</b> W <b>L</b> S <b>RE</b> K <b>N</b>	211-267
S.RfbF	A <b>EH</b> — <b>PE</b> — <b>O</b> P <b>D</b> IL <b>RD</b> Y <b>IL</b> EL <b>WE</b> K <b>K</b> AP <b>W</b> W <b>E</b>	223-257
Y.RfbF	A <b>EH</b> — <b>AE</b> — <b>O</b> P <b>D</b> IL <b>RD</b> Y <b>IL</b> EL <b>W</b> EE <b>G</b> R <b>AP</b> W <b>W</b> E	227-261
Vig9	ST <b>KI</b> EP <b>DM</b> V <b>IG</b> PN <b>VT</b> I <b>GD</b> GV <b>R</b> I <b>TR</b> SV <b>L</b> C <b>N</b> ST <b>I</b> KN <b>S</b> Y <b>K</b> ST <b>IV</b> GN <b>ST</b> V <b>GW</b> OC <b>LE</b> SV	265-324
StrD	NS <b>RM</b> EP <b>—T</b> W <b>IG</b> AG <b>TR</b> V <b>T</b> NS <b>Y</b> — <b>V</b> GP <b>FT</b> S <b>LA</b> ED <b>CV</b> ED <b>S</b> — <b>S</b> Y <b>EF</b> S <b>IV</b> RG <b>AS</b> I <b>SG</b> VR <b>IE</b> A	266-322
RfbA	EL <b>EA</b> L <b>N</b> K <b>TY</b> GY <b>LL</b> KL <b>AK</b> ES 268-289	
Vig9	TV <b>L</b> ED <b>Y</b> W <b>Y</b> K <b>DE</b> I <b>Y</b> ING <b>GV</b> PH <b>KS</b> I <b>S</b> NP <b>KE</b> A <b>I</b> IM	325-361
StrD	SL <b>I</b> GF <b>W</b> TS <b>AE</b> VP <b>PH</b> AV <b>LV</b> GD <b>HS</b> RA <b>Q</b> ISS	323-355

Fig. 1-6 予想される Vig9 とホモロジーの高い細菌の蛋白質のアミノ酸配列の比較。S.RfbF は *Salmonella typhimurium* の RfbF 蛋白質、Y.RfbF は *Yersinia pseudotuberculosis* の RfbF 蛋白質、RfbA は *Yersinia enterocolitica* の RfbA 蛋白質、StrD は *Streptomyces griseus* の StrD 蛋白質を示す。Vig9 と同一のアミノ酸を反転文字で表わす。

#### 1-2-4 Vig9蛋白質の機能解析

前記の仮説を証明するために、それぞれの酵母の菌体抽出液を用いてGDP-マンノースピロホスホリラーゼの活性のアッセイを行った。 $[\alpha^{32}\text{P}]\text{GTP}$ とマンノース-1-リン酸を菌体抽出液と混ぜてインキュベートし、その後混合液をTLCで展開した後GDP-マンノースにあたるスポットの放射活性を測定しGDP-マンノースピロホスホリラーゼ活性とした。この活性が菌体抽出液の蛋白質量との相関を調べたとき直線状になることを確認した後 (Fig. 1-7)、野生株、*vig9*変異株、*VIG9*遺伝子を多コピーで保持している株、また変異株に*VIG9*遺伝子を低コピーで導入した株で時間経過に伴う $[\beta^{32}\text{P}]\text{GDP}$ -マンノースの生成量の変化を調べた (Fig. 1-8)。その結果、変異株ではGDP-マンノースピロホスホリラーゼ活性が非常に低く、多コピー株では3-4倍程度活性が上昇しており、また変異株に*VIG9*遺伝子を低コピーで導入した場合活性は野生株程度まで回復していた。更に変異株における活性の低下が、障害物質によるものでないことを確認するため、変異株および野生株の菌体抽出液を混合し活性を測ったところ、これは野生株と変わらなかった (Fig. 1-8)。一方、この遺伝子を多コピーで導入した株の糖鎖をインペルターゼおよびキチナーゼで確認したが、特に野生株と比較して違いは見られなかった (Fig. 1-1)。

さらにVig9がGDP-マンノースピロホスホリラーゼそのものであって、活性制御因子でないことを示すため、グルタチオンSトランスフェラーゼとVig9の融合蛋白質を大腸菌を用いて発現、精製しその活性を測定した (Fig. 1-9)。その結果、GST-Vig9を加えたときにコントロールのGSTのみでは見られなかったGDP-マンノースのスポットが見られた。これらのことから*VIG9*遺伝子はGDP-マンノースピロホスホリラーゼをコードする構造遺伝子であることがわかった。

また、野生株と変異株の細胞内のGDP-マンノース量を比較した。野生株及び*vig9-1*変異株を $[\text{C}^{14}]$ -マンノースを含む培地で生育させ細胞抽出液中のGDP-マンノース量を

定量した。すると、*vig9-1*変異株では野生株の70.6%に低下していることがわかった。

次にこの反応系に10倍量のNTPを加えることにより反応がどの程度阻害されるのかを調べた (Fig. 1-10)。その結果、GDP-マンノースの精製量はコントロールと比較してGTPでは18%、ATPでは51%、UTPでは67%、CTPでは87%であった。またマンノース-1-リン酸を系に加えなかった場合活性はコントロールと比較して7.1%で、これは菌体上清に少量含まれるマンノース-1-リン酸と反応したことによって生成されたものと考えられる。これらの結果から、特異性が低い可能性が考えられたが、先の組み換え蛋白質を用いて特異性を調べた場合には、基質としてGTPとマンノース-1-リン酸以外の組み合わせではほとんど活性がなかった (阿部、私信)。

上記の結果から、Vig9蛋白質はGDP-マンノースピロホスホリラーゼそのものであり、GDP-マンノースの生合成の最終段階で機能していると結論した。

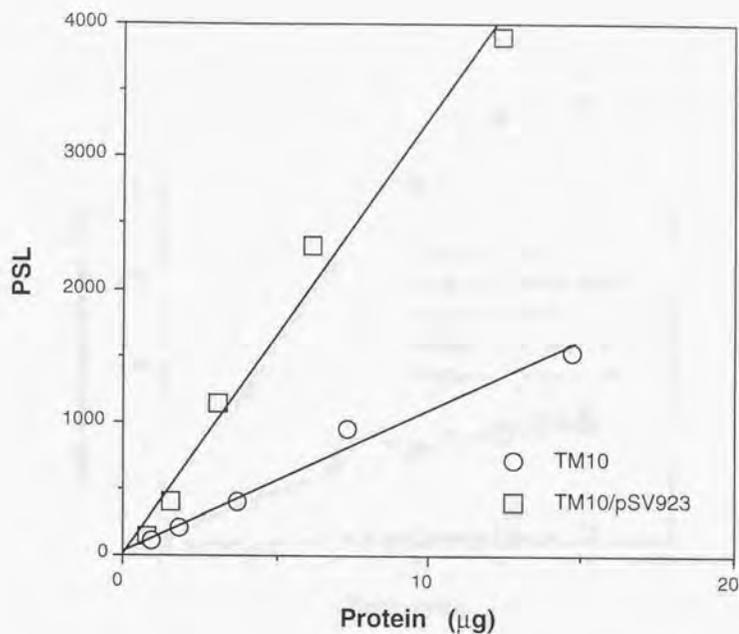


Fig. 1-7 GDP-マンノースピロホスホリラーゼ活性の測定。○が野生株、□がVIG9を多コピーで発現している野生株の細胞質画分を用いたときの活性を示す。活性は合成されたGDP-マンノースの量で示す。

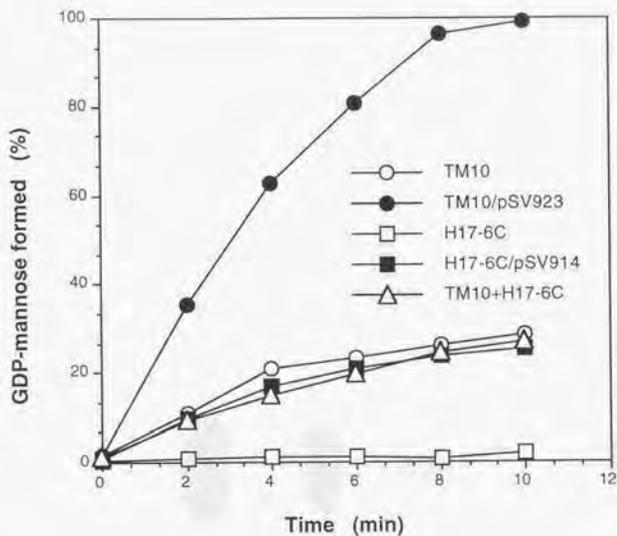


Fig. 1-8 GDP-マンノースピロホスホリラーゼ活性の株による比較。○は野生株、●はVIG9を多コピーで発現している野生株、□は*vig9*変異株、■はVIG9遺伝子を低コピープラスミドにより供給されている*vig9*変異株、△は野生株と*vig9*変異株の細胞質画分を用いたときの相対活性の経時的変化を示す。



Fig. 1-9 GST-Vig9によるGDP-マンノースピロホスホリラーゼ活性。細胞質画分の代わりに精製したGST-Vig9を加えたときのTLCのオートラジオグラフィー。

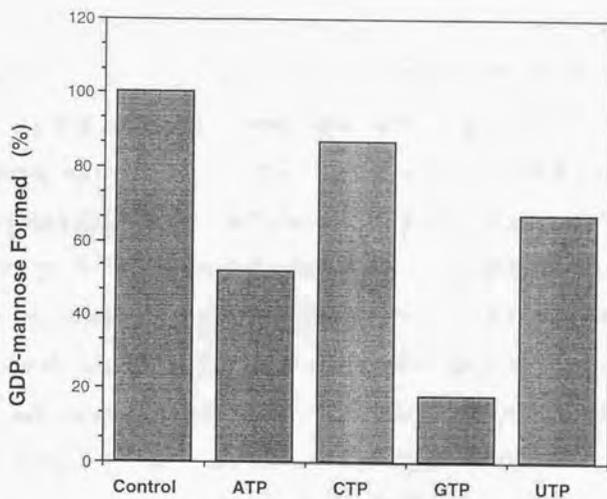


Fig. 1-10 ヌクレオチド三リン酸による競争阻害効果。10倍量のコントロールのNTPを系に加えたときの活性の変化を示す。Controlとして何も加えないときを100%として相対活性を示す。

### 1-3 考察

本章では糖鎖不全を示す *vig9* 変異を相補する遺伝子のクローン化をおこなった。塩基配列を決定し、そのコードするアミノ酸配列のホモロジーの結果より、Vig9 蛋白質は GDP-マンノースピロホスホリラーゼではないかと予想した。そこで酵母の菌体抽出液を用いて GDP-マンノースピロホスホリラーゼの活性のアッセイを行い、さらには組み換え蛋白質を大腸菌を用いて発現、精製し活性を測定した。これら一連の実験から Vig9 蛋白質は GDP-マンノースピロホスホリラーゼそのものであると結論した。この酵素は糖鎖合成の際の基質である GDP-マンノースの生合成過程における最後の段階を司る酵素であり、この酵素の変異が GDP-マンノースの供給量を減らし、その結果糖鎖不全となるものと考えられる。この GDP-マンノースの生合成過程に関与する遺伝子として *PMI40* [Payton *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1992]、*SEC53/ALG4* [Bernsterin *et al.*, 1985; Kepes and Schekman, 1988] 遺伝子が知られている。これらの遺伝子はそれぞれホスホマンノイソメラーゼ、ホスホマンノムターゼをコードしており、Fig. 1-11 に示した GDP-マンノースの生合成過程の段階の一つを担っている。これらの遺伝子の変異株は共に糖鎖不全の形質を示し、現在知られている変異株は温度感受性で高温で糖鎖不全および蛋白質輸送が阻害され、また遺伝子破壊株は致死である。VIG9 遺伝子の遺伝子破壊株は致死であるが、*vig9-1*, *vig9-2* 変異株は 37°C においても野生株と同程度の生育を示す。一方、これとは別の細胞壁の剛性が低下している変異株のスクリーニングから、VIG9 遺伝子に関する変異株が取得された [Kawada, 1997]。この *vig9-3* 変異株は浸透圧保護剤存在下でのみ生育し、高温感受性である。またこの変異株では細胞壁に繫留される蛋白質が細胞外へと漏出するという形質を示す [Kawada, 1997]。これら変異株はすべてリーキー変異株であり、致死になるまでには GDP-マンノースの合成量が低下しないような変異を持っていると考えられる。GDP-マンノースの合成が止まると蛋白質に付加するべき糖鎖がコアの部分からすべて生合成できなくなるため、

小胞体内にトランスロケーションされた蛋白質のフォールディングが阻害、もしくは安定性低下のために分解されることによって、致命的となると思われる。更にGDP-マンノースはGPI-アンカーの生合成に用いられる。細胞壁を構成しているマンナン蛋白質はいったんGPI-アンカー化されたのち細胞壁へと移行することがわかっている。そこでGPIの生合成を阻害すると細胞壁の合成の低下という形質を示すと考えられる。一方、ゴルジ体において付加される外糖鎖の付加に關与する遺伝子の破壊株は致命的とはならず、*vig9-3*変異株中でもコア糖鎖は付加されていることから、GDP-マンノースの生合成に關与する遺伝子破壊株が致命的となるのはコア糖鎖の合成が不可能となることによると考えられる。

出芽酵母におけるNDP-Hexoseピロホスホリラーゼとして、UDP-ガラクトースを生合成するGal7、UDP-グルコースを生合成するUgp1が現在まで知られていた[Tajima *et al.*, 1985; Daran *et al.*, 1995]。これら二つの蛋白質はそれぞれファミリーを形成しており、動物細胞に到るまで多くのホモログが存在していることがわかっている。本研究で新たに見出されたVig9には酵母ゲノム中だけでなく、真核生物でまだそのホモログは報告されていない。Fig. 1で示したようにVig9は原核生物のNDP-Hexoseピロホスホリラーゼと高いホモロジーを示すことから、この蛋白質は進化的に保存されてきたNDP-Hexoseの合成酵素として新たなファミリーを形成していると考えられる。酵母における糖鎖は大量のマンノースを含んでいるが、高等真核生物ではコアに一部含まれているだけに過ぎない。そこでGDP-マンノースを大量に生合成する必要のない高等真核生物においてはVig9のホモログが存在していない可能性がある。この場合、真菌に対する新たな抗生物質のターゲットとしてVig9は有望であり、そのスクリーニングに*vig9*変異株は有用であると考えられる。

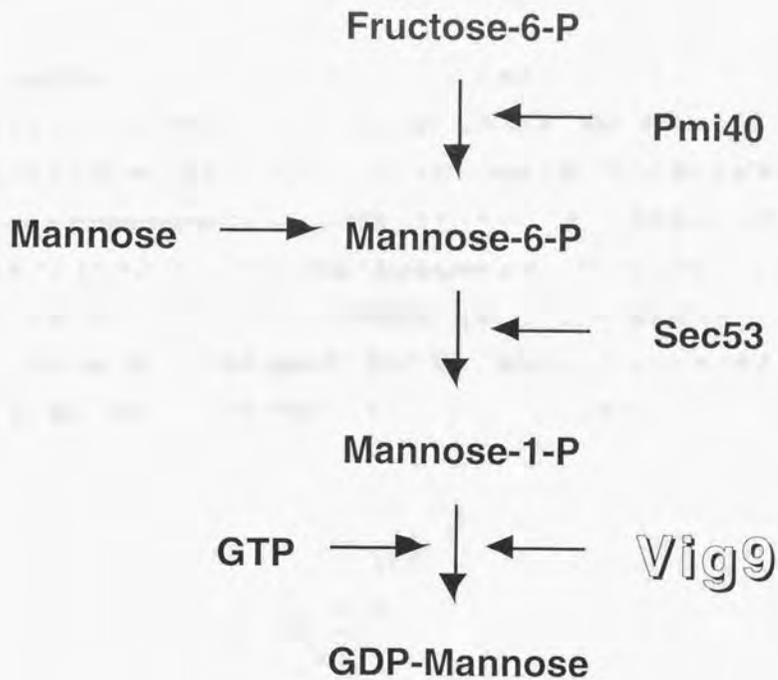


Fig. 1-11 出芽酵母におけるGDP-マンノースの生合成経路。

## 第2章 VIG4遺伝子の単離と機能の解析

### 2-1 序

*vig9*変異株は*vig*変異のうちのクラス2に属し、N-、O-糖鎖ともにコア型に近い大きさを示す。クラス2の変異株として他に*vig1*, *vig6*, *vig7*がある。*VIG1*, *VIG6*はそれぞれ *VAN1*, *MNN9*と同一であり3章で解析した。*VIG7*は*OCH1*と同一でこの遺伝子産物は $\alpha$ -1,6-Mannosyltransferaseであり、N型糖鎖のコアからバックボーンを伸長させる際の最初の $\alpha$ -1,6-マンノースの付加を触媒する[Nakayama *et al.*, 1992]。そのため、変異株では糖蛋白質の大きさがコアとほとんど同程度になる。ただしO-糖鎖に変化はないという点で*vig4*と異なっており*vig4*は全く異なる機構で糖鎖不全となっていると考えられる。以上を踏まえ*vig4*変異を相補する遺伝子のクローニングを試みた。

## 2-2 結果

### 2-2-1 *vig4*変異株の形質

*vig4*変異株は*vig*変異のうちのクラス2に属する変異株で、A5-8-1Cを親株として8株が、A13-18を親株として6株が、またYPH250を親株として1株が得られた。これらの生育は25℃でも37℃でも野生株と変わらなかった。細胞からペリプラズム画分を調製し、SDS-PAGEした後、免疫沈降を行って、分泌糖蛋白質であるインベルターゼの分子量を野生株および既知の糖鎖不全変異株である*vig9*変異株と比較した。その結果、*vig4*変異株におけるN-結合型糖鎖は*vig9*変異株よりも更に小さいER型とはほぼ同じ分子量であることが分かった (Fig. 2-1A)。

また、細胞培養液中に分泌されてきたキチナーゼをキチンと共沈させることにより精製し、これをSDS-PAGEした後CBB染色を行って、キチナーゼの分子量を野生株および*vig9*変異株と比較した。その結果、*vig4*変異株におけるO-結合型糖鎖は野生株よりも、*vig9*変異株よりも更に小さい分子量を示すことが分かった (Fig. 2-1B)。

次に変異株は糖鎖の構造異常により細胞表層のマンナン蛋白質の性質が変化し、その結果物質の透過性も変化していると考え、*vig4*変異株の薬剤感受性について調べた (Table 2-1)。*vig4*変異株はシクロヘキシミド、ハイグロマイシンBやジェネティシン (G418) に対して感受性の上昇が観察された。その他、*vig4*変異株では細胞同士の凝集性の上昇が観察された [Sakakibara, 1993]。

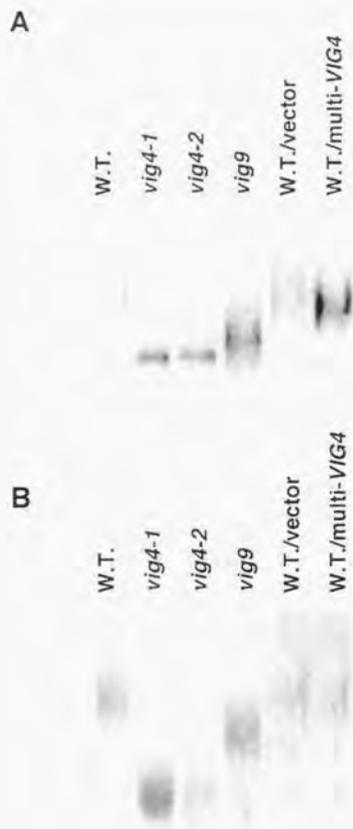


Fig.2-1 野生株と *vig4* 変異株におけるインベルターゼ(A)とキチナーゼ(B)の大きさ

	Vanadate (mM)		Cycloheximide (ng/ml)	5-Fluorouracil (μg/ml)	Hygromycin B (unit/ml)	Geneticin (μM)
	SD	YEPD	SD	SD	SD	YEPD
W.T.	3	4	>400	16	>364	>100
<i>vig4</i>	4	5-6	200-300	16	182	25

Table 2-1 野生株と *vig4* 変異株における薬剤感受性。数字は最大生長非阻害薬剤濃度を示す。

## 2-2-2 VIG4遺伝子のクローニング

*vig4*変異株ではジェネティシンに対する感受性が上昇していることを利用して*vig4*変異を相補する野生型遺伝子のクローニングを試みた。K2-1C (*MAT α*, *vig4-2 leu2 ura3 lys1 lys2 his3*) にC10酵母ゲノミックライブラリー (low copy, *LEU2*) を形質転換し、レプリカ法でジェネティシンに対する耐性を野生株程度まで獲得したことが確認された形質転換体を選択した。さらに、インバルターゼの活性染色によって糖鎖が野生株程度まで回復しているものから、1種類のクローンを回収した (pSV401) (Fig. 2-2)。インバルターゼの分子量を指標としてサブクローニングを行い、*vig4*変異を相補するために必要な領域をpSV401の*HindIII* - *HindIII* 3.1kbに限定した。この全塩基配列を決定したところ (Fig. 2-3)、この中に337アミノ酸をコードするオープンリーディングフレーム (ORF) が含まれることがわかった。配列から予想されるこの蛋白質の分子量は37,018でpIは9.61であった。

Vig4蛋白質の疎水性度をKyteとDoolittleの方法[Kyte and Doolittle, 1982]に従ってプロットした (Fig. 2-4)。この図よりVig4蛋白質は全長にわたり疎水性であり、何回も膜を貫通していると予想された。

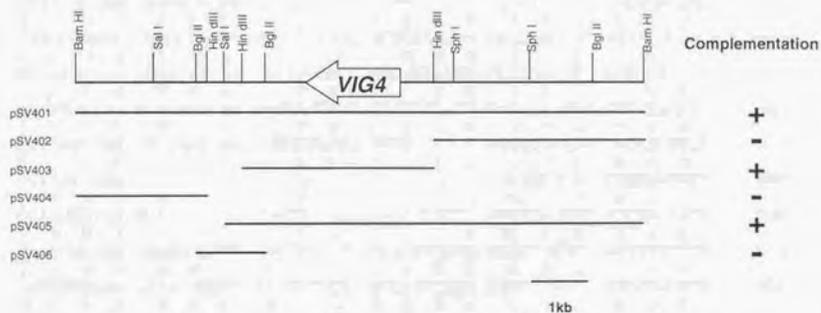


Fig. 2-2 *VIG4*遺伝子の制限酵素地図。図で示した領域が $vig4$ 変異を相補するかどうかをプラスミドの名前の右に相補する場合は+でしない場合は-で示す。

TAATGGACCA	TGGCAATGIG	CGCCATATAT	ATATGGGGCT	CCCTTATGAG	AAGCTIG	-481
TATATGACTG	GTGGTACAAA	GTGGCAATGGT	GGTATATAGA	TGTATGGAACA	TAGAAGAAA	-421
TGGCCATAAT	GATTAATATP	CCCTTTTTTAT	AAAGAAITAG	CCGCCRTAA	CCATTTGAGT	-361
ATCACAGITG	ACGAAAAGAG	ACACGTGGCC	TAAACCCGTA	ATGAATCCCA	CACGAAAANT	-301
AGCTAAACGG	GTMTTTCAGA	ATCCCTCTTAC	CCAGCCCTTG	ATAATAGTIT	TGGCCGAAAA	-241
AAATAAAAG	AAAGAAAAAA	ATTTGAAATTT	CCGGATCCGA	ACAAAACAAT	AACAGAAAAA	-181
CAGAAATATAT	ATAACCCCTC	CAAGCCCTATT	TCTTGTTCGC	GATTAATATGT	TGACATCCCTC	-121
TTAATTTACCA	AAAGACCCCTA	AGAAAAACAAA	CACACTAACC	ACACAGTATC	TTTTGCCCGA	-61
ATGCTGAAT	TGAAAACAGG	TCATGCAGGC	CATAACCCCT	GGGCTTCAGT	TGCCAATTC	-1
M S E L	K T G	H A G	H N P W	A S V	A N S	60
GGTCCGATCT	CTATTTTATC	CTACTGTGGT	TCCCTTATTT	TAATGACGGT	GACTAACGAG	120
G P I S	I L S	Y C G	S S I L	M T V	T N K	
TTCCGTGCTCA	ATTTGAAGGA	TTTCAACATG	AACTTTGTCA	TGCTTTTTCGT	GCAATCTTTG	180
F V V N	L K D	F N M	N F V M	L F V	Q S L	
GTTTGACTA	TAACCTTGAT	TATCCTACGT	ATACTGGGCT	ATGCGAAGTT	CCGTTCATTA	240
V C T I	T L I	I L R	I L G Y	A K F	R S L	
AACAAAAAG	ACGCCAAGAA	CTGGTTCCTT	ATTTCTTTT	TACTGGTCTT	GATGATCTAC	300
N K T D	A K N	W F P	I S F L	L V L	M I Y	
ACCTCTTCCA	AGGCTTTACA	ATACTTGGCT	GMTCCAAATP	ACACCATTTT	CAAGAATTTG	360
T S S K	A L Q	Y L A	V P I Y	T I F	K N L	
ACTATTAICT	TGATTTCTTA	TGGTAGGTT	CTCTTTTMTG	GTGGCTCTGT	CACCTCCATG	420
T I I L	I A Y	G E V	L F F G	G S V	T S M	
GAATTTGTCAT	CATTTTGTGTT	GATGGTCTTT	TCTTCTGTG	TTGCAACTIG	GGGAGCCAG	480
E L S S	F L L	M V L	S S V V	A T W	G D Q	
CAAGCTGTGG	CTGCCAAGCC	TGCTTCATTTG	GCTGAAGGAG	CAGCCGGTGC	TGTTGCCCTCC	540
Q A V A	A K A	A S L	A E G A	A G A	V A S	
TTTAACCCAG	GTATTTCTGT	GATGTTCAACC	AACTGTATCA	CTTCTGCAAT	ATTCGTCTTT	600
F N P G	Y F W	M F T	N C I T	S A L	F V L	
ATAATGAGAA	AGAGAATTA	GTTAACCTAAC	TTCAGGATTT	TGCACACTAT	GTTTTACAA	660
I M R K	R I K	L T N	F K D F	D T M	P Y N	
AATGTTTTGG	CTCTACCTAT	TCTATTTGCTG	TTTTCTTTCT	GTGTGGAAGA	TTGGTCTTCA	720
N V L A	L P I	L L L	F S F C	V E D	W S S	
GTTAATTTGA	CCAATAACTTT	TTCTTAAAGAT	TGCTTAACTG	CTATGATCAT	CAGTGGTGT	780
V N L T	N N F	S N D	S L T A	M I I	S G V	
GCATCCGTCG	GTATTTCTTA	CTGTTCCGGT	TGGTGTGTTT	GTGTACTTCA	GTCTACTTACA	840
A S V G	I S V	C S G	W C V R	V T S	S T T	
TATTCGATGG	TAGGGGCTTT	GAACAAGCTG	CCAAITGCTT	TGTTCTGGTTT	GATTTTCTTT	900
Y S M V	G A L	N K L	F I A L	S G L	I F F	
GATGCTCCAA	GAAACTTCTT	ATCTATTTCT	TCCATTTTAA	TGGTPTTCTT	ATCAGGTATT	960
D A P R	N F L	S I L	S I F I	G F L	S G I	
ATTTATGCTG	TTGCCAAAAC	AAAGAAGCAA	CAAGCCCAAC	CTTTACGTAA	ATGAGAAGTT	1020
I Y A V	A K Q	K K Q	Q A Q P	L R K	Ter	
ACGGGGGGTG	CAATTTATTTT	TTTTTTTTTTG	GTTTTATTTTA	TTTTTATAGAG	GCATCTAATG	1080
CAAGTAGATTT	TATATACAAT	TATACTTAAA	ATTTGATATAC	CTTAGAACAG	GTCGGACACA	1140
ACGTTGTGTA	ACTCCAATAT	ATCTACTAATG	ACAATAGCCG	CTTCTGGTGT	TTGCCCAAAA	1200
ATTTCTATTTA	CTTCAATTTCT	AACTTAAATGA	ATACATGTTT	TCAITGCCAA	TTTTGATACCT	1260
GTCTCGATGT	TTTTCCCACT	GTCATCTATA	AAATAGCAT	TCTCTATCT	TGCCAACCCG	1320
CTTTCTTTCA	TGGCTTTTTC	AAATGCTTTA	ACATGTGTTT	TGCAGACCAG	CGTATCTGTC	1380
CTAGAGTAGT	CACAATATGT	CAATCCATCA	AAATAATCCG	CTATACCCAA	CAATCTCAGG	1440
CAACGATATG	CGTGTTTTTT	ATAAGCGTTG	GTGAAAAGCC	ACAATTTATC	AATCTTTCC	1500
GATTTCTCTCA	ATCTCAACAG	CATATTTCTT	AATGGTATAT	CAGGTTTCAA	GATATCTTTG	1560
AGTGTGAAGG	AATCATCCAC	AAGCCGGTTA	TATTTCCAGT	CGTTCTACTTT	GTGGAACATT	1620
ACAAGTCCCC	TTATGGCAAG	TCCATACTCT	TTGTAGTBA	AGTTAATCAA	AACGTGAGCA	1680
TCTTCAGGTG	ATAGTTTCAA	GTGTGTTTGA	AGAACCCTCA	GTATAGATTTG	TTGCATAAGA	1740
TCGTGAATTC						1750

Fig. 2-3 *VIG4*遺伝子の塩基配列及びコードされる蛋白質のアミノ酸配列。アンダーラインで示した箇所がTATAボックスと考えられる配列、点線で示した箇所がポリA付加シグナル。

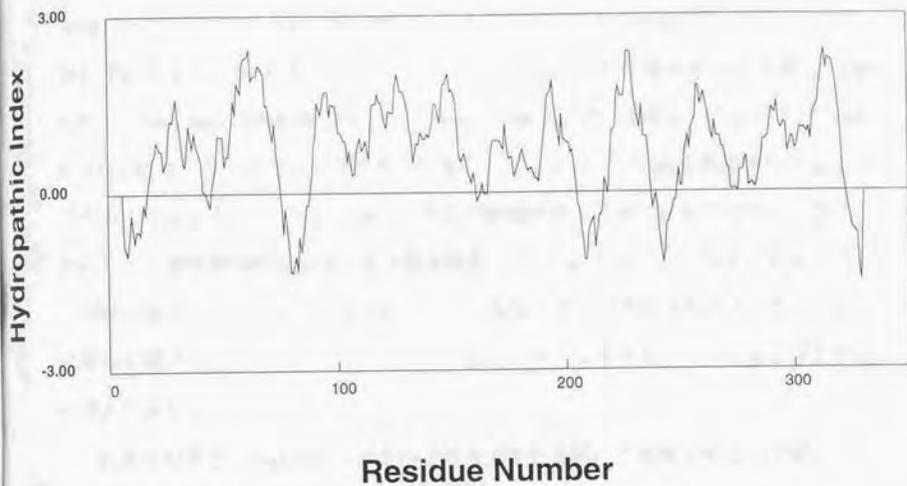


Fig. 2-4 予想される Vig4 の Hydropathy Profile。

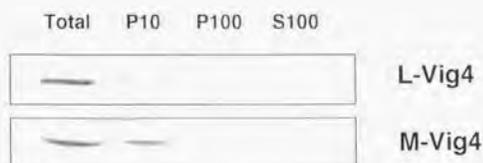
### 2-2-3 Vig4蛋白質の局在

Vig4が細胞内でどこに存在し、どのような機能を担っているのかを調べるために、Vig4にmycのタグをつけて細胞内で発現させ、タグに対する抗体を用いて免疫学的解析を行った。この細胞からオルガネラの膜を保った状態でライセートを作製し、遠心分画を行ったところ、Vig4は10,000g及び100,000gの沈殿画分に存在したことから何らかの膜に存在していると予想された (Fig. 2-5A)。これを確かめるため膜を0.8M NaCl, 1.6M Urea, 0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1% Triton X-100で処理して遠心したところ、Triton X-100で処理したときのみ可溶性画分に移行したことから、Vig4は膜貫通型の蛋白質であることが示された (Fig. 2-5B)。そこで細胞内のどの膜に存在するのかを調べるためにシヨ糖密度勾配遠心法により膜を分画した (Fig. 2-5C)。これからVig4はゴルジ体膜に存在していると考えられた。更に、細胞を間接蛍光抗体染色法を用いてVig4の局在を調べたところ (Fig. 2-6)、ドット状のパターンを示し、ゴルジ体に存在すると思われた。

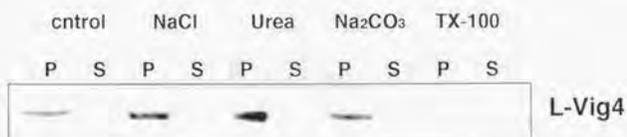
これまでの系ではVig4-mycは自身のプロモーターを用いて発現させていたが、一方でGAPDHプロモーターをもちいてコピー数を上げた場合について調べた。この時、Vig4は遠心分画を行うと10,000gの沈殿画分にほとんどが存在し (Fig. 2-5A)、シヨ糖密度勾配遠心分画を行うと低コピーの場合より比重がわずかに高くなっていた (Fig. 2-5C)。そこで間接蛍光抗体染色を行ったところ、Vig4はドット状の染色像を示すが低コピー状態の場合と比較して、ドットは大きく厚みのある構造であった (Fig. 2-6)。この像は膜蛋白質を大量に発現したことによって初めて見られた特殊な膜構造体であると思われた。そこで、この細胞を電子顕微鏡を用いて詳しく観察することとした。急速凍結置換法により固定した野生株及び多コピー発現株を電子顕微鏡下で観察すると、野生株では通常見られない幾つもの膜が重なった構造が見られたほか、小胞体と思われる膜が増大していた (Fig. 2-7)。糖染色を行うと、この層状の膜はよく染まる

ことからゴルジ体由来であると考えられる。このときVig4は実際にどの膜に存在するかを免疫電子顕微鏡により観察した。この時、蛋白質の局在位置を示す金コロイド粒子はスタックした膜上及び小胞体膜上に存在した (Fig. 2-7)。

**A**



**B**



**C**

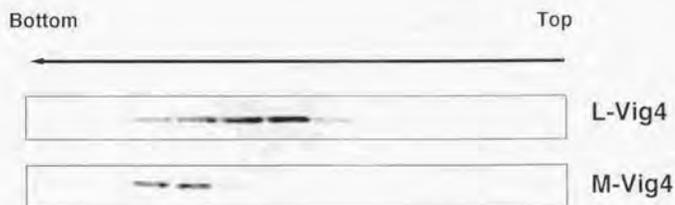


Fig. 2-5 Vig4の遠心による分画。(A), (B), (C)L-Vig4は低コピーで、M-Vig4は多コピーでVig4とmycの融合蛋白質を発現させた場合。(A)はライセートの遠心による分画、(B)は薬剤処理後の遠心による分画、(C)はショ糖密度勾配遠心による分画。

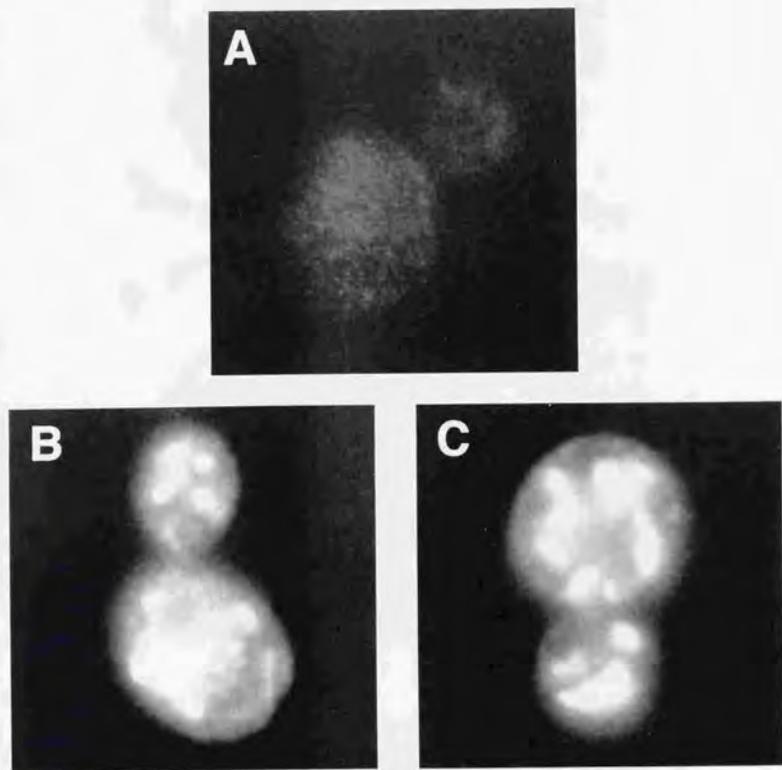


Fig. 2-6 間接蛍光抗体染色法によるVig4の局在。(A)はコントロールプラスミド、(B)は低コピープラスミド、(C)は多コピープラスミドでVig4とmycの融合蛋白質を発現させた。

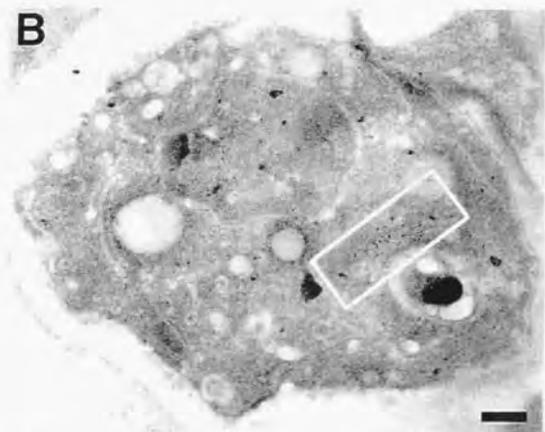
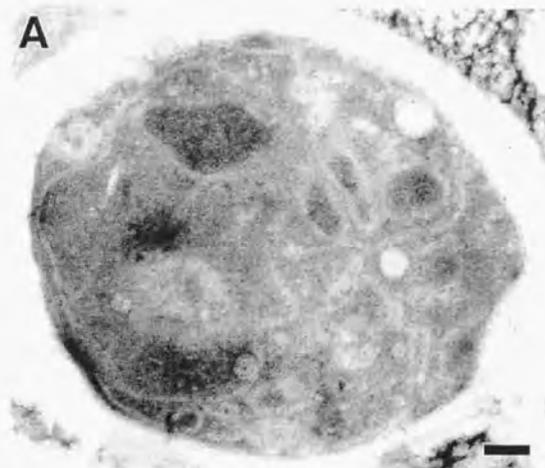


Fig. 2-7 Vig4を多コピーで発現させた細胞の電子顕微鏡像。(C)は(B)の囲った領域の拡大。写真内にあるスケールバーは200nm。

## 2-3 考察

本章では糖鎖不全を示す *vig4* 変異を相補する遺伝子のクローン化をおこなった。塩基配列を決定したところ、337アミノ酸からなる膜蛋白質と予想される配列をコードしていた。タグをつけた蛋白質の分画および細胞の染色から、実際に Vig4 は膜蛋白質でありゴルジ体に存在していることを示した。

ホモロジー検索から *Leishmania donovani* の Lpg2 と相同性が高いことがわかった [Ma *et al.*, 1997]。Lpg2 はゴルジ体において GDP-マンノースを細胞質側から内腔へと輸送するトランスポーターであることが示されていた [Ma *et al.*, 1997]。酵母の相同分子である Vig4 はその変異株の形質を考え合わせ、ゴルジ体における GDP-Man トランスポーターであると考えられた。一方で、本研究の進行中 1996 年になって、Vig4 が我々とはほぼ同時期に発見されていた酵母の Vrg4/Van2 と同一の分子であることがわかった [Poster and Dean; 1996]。実際に Vig4/Vrg4 が GDP-マンノースのトランスポーターであることは、Dean らのグループにより最近示された [Dean *et al.*, 1997]。、小胞体内腔で糖蛋白質にマンノース残基が付加される場合には、Vig9 蛋白質によって合成された GDP-マンノースが、細胞質側で GDP-マンノースからドリコールリン酸に渡され、それがフリップフロップによって内腔側をむき、ドリコールリン酸マンノースから合成中の糖鎖へと受け渡される [Abeijon and Hirschberg, 1992]。しかし、ゴルジ体の内腔では、糖の供与体は GDP-マンノースであり、細胞質にある GDP-マンノースを内腔側へトランスポーターを用いて輸送しなければならない [Hirschberg, 1987]。この輸送は GMP とのアンチポートで、マンノースを付加した後の GDP を GMP へと変換しなければならない。この GDPase をコードする *GDA1* 遺伝子の変異はやはり糖鎖不全となることがわかっている。 [Abeijon *et al.*, 1993]。Vig4 はこのトランスポーター本体であり、*vig4* 変異株では GDP-Man をゴルジ体内腔へ輸送できないために、糖鎖不全の形質を示すと考えられる。Vig4 を非常に強力な GAPDH プロモーターの下流で発現させた場合、細胞内に特異な

膜構造を蓄積することを見出した。この膜はその構造上の特徴および糖染色の結果からゴルジ体由来のものであると考えられる。分泌変異株を用いて膜構造を蓄積させた場合以外で、出芽酵母においてゴルジ体がスタックしている状態がはっきり電子顕微鏡下で観察されたのは初めての例である。これはゴルジ体に局在するべき膜蛋白質が大量に膜に作られた結果、その局在する場であるゴルジ体の量が増えたと考えられる。これまでに、ゴルジ体膜蛋白質を大量に発現させた場合その局在は液胞であった [Roberts *et al.*, 1992]。またゴルジ体膜局在決定領域に変異が入った場合も液胞へとミスポートされてしまう。すなわち小胞体を出た後の膜蛋白質のデフォルトの経路は液胞で、これまでに知られていた膜蛋白質の膜局在機構が飽和性のものであることを示している。一方で、Vig4の場合は恐らく蛋白質そのものにゴルジ体局在機構を備えており、量が増えた場合にもデフォルトの経路には乗らずゴルジ体膜を増やす方向に細胞は対応するのであろう。出芽酵母においてゴルジ体は発達した膜構造としては観察されていなかったため、*cis*, *medial*, *trans*といったサブコンパートメントが実際に存在しているのかも定かではなかった。Vig4を大量に発現した株を用いた結果から、出芽酵母においてもゴルジ体の構造は高等真核生物と同等の構造及び極性を保っていることがわかった。この株を利用することにより出芽酵母におけるゴルジ体の生化学的解析が容易となると思われる。

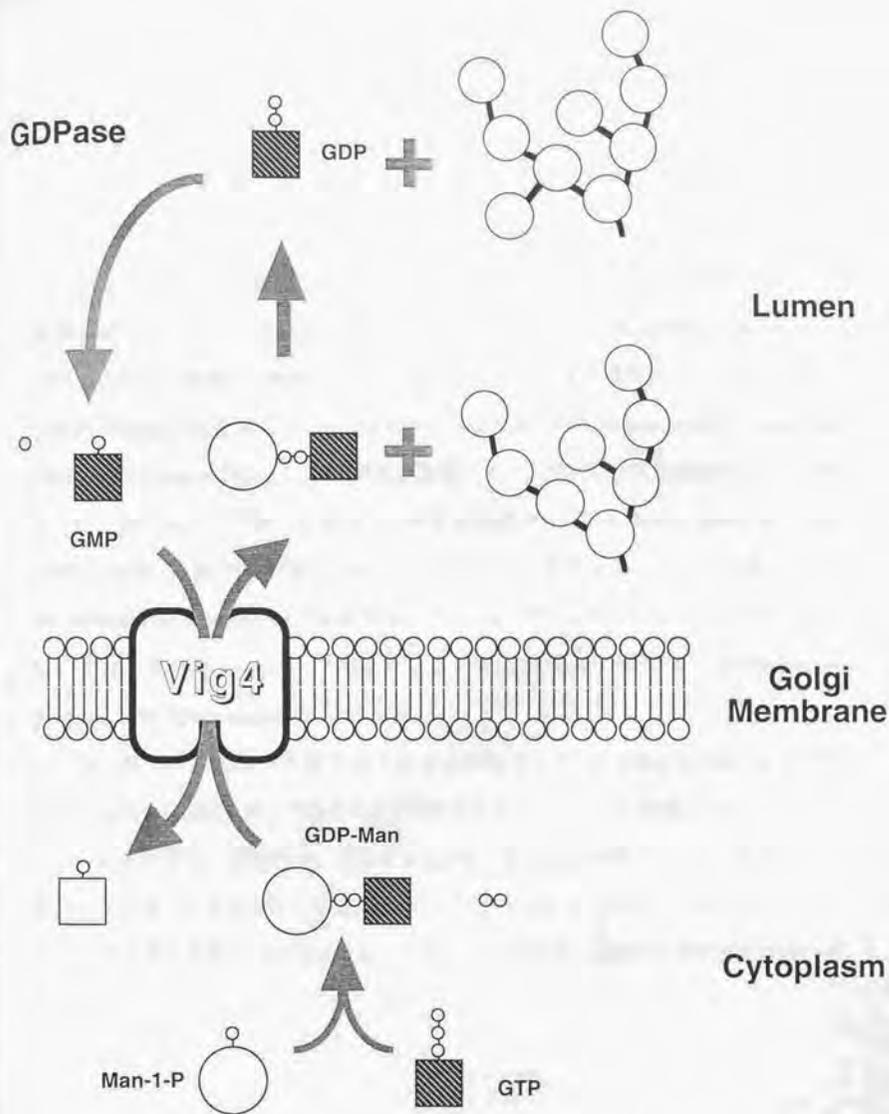


Fig. 2-8 Vig4の作用モデル。

### 第3章 Mnn9蛋白質複合体の単離と機能の解析

#### 3-1 序

*mnn9*変異株は細胞表層の抗原性の変化を指標として得られた代表的な外糖鎖不全変異株のひとつであり、N糖鎖の構造がコア型に非常に近い構造である[Ballou *et al.*, 1991; Yip *et al.*, 1994]。出芽酵母の蛋白質の中でMnn9と高い相同性を示すものとしてVan1及びAnp1が知られている[Kanik-Ennulat and Neff, 1990; Melnick and Sherman, 1993; Chapman and Munro, 1994]。*van1*変異株は最初バナジン酸に対する耐性変異株として取得され、蛋白質のリン酸化に関与していると指摘されている[Kanik-Ennulat and Neff, 1990]。*ANP1*は染色体V番にコードされている遺伝子のうちで欠失によりaminonitrophenol propandiol及び高浸透圧に対して感受性になるものとして知られていた。また、変異株ではゴルジ体膜蛋白質の局在機構に欠損を生じる[Melnick and Sherman, 1993; Chapman and Munro, 1994]。

一方、我々の変異株の相補テストによる解析から*VIG1*, *VIG3*, *VIG6*はそれぞれ*VAN1*, *ANP1*, *MNN9*と同一であることが明らかとなった。これらの遺伝子によってコードされる蛋白質の一次構造は、どれもN末端側に膜貫通領域を一つもち、お互いにホモロジーの高い領域をそれよりC末端側にもつというものである(Fig.3-1)。ところがこれらの蛋白質の機能についてはほとんどわかっておらず、興味をもたれたため解析を行った。

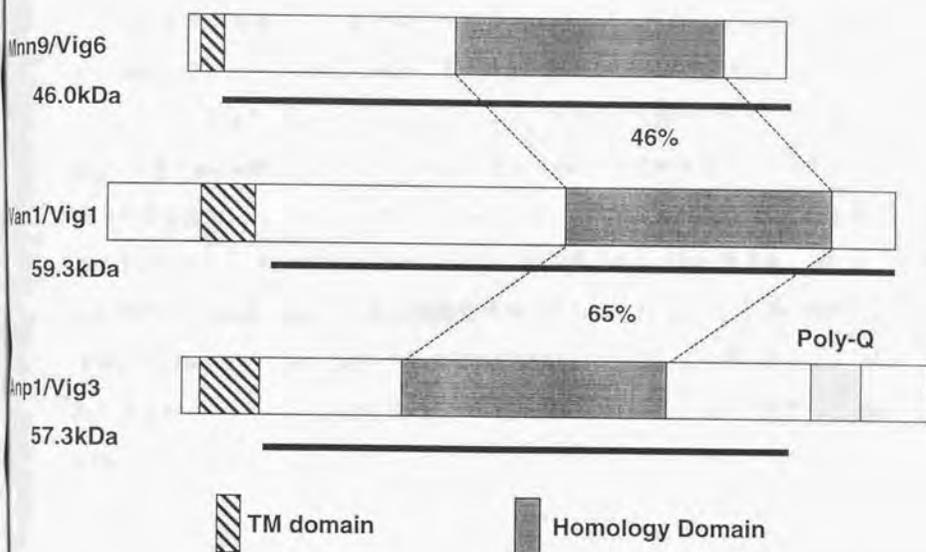


Fig. 3-1 Mnn9ファミリー蛋白質の一次構造。アンダーラインは抗体作製の際に抗原として用いた領域。

## 3-2 結果

### 3-2-1 変異株の形質と蛋白質の構造

まずそれぞれの遺伝子の破壊株を作製した。破壊株は致死ではないが、 $\Delta anpI$ 、 $\Delta mnn9$ 株では特に生長が遅い。また、その糖鎖を調べるためにインペルターゼ及びキチナーゼの分子量を比較した(Fig.3-2A)。すると、N糖鎖を付加されるインペルターゼは $\Delta vanI$ 及び $\Delta mnn9$ 株ではコアに近い大きさを、 $\Delta anpI$ 株では野生型とコア型の中間程度の分子量を示した。インペルターゼをエンドグリコシダーゼHで処理して分子量を比較するとすべて同じ大きさを示すことから、分子量の変化は蛋白質でなく糖によることがわかった(Fig.3-2A)。一方でO糖鎖を付加されるキチナーゼの分子量は野生株とほぼ変化がなかった(Fig.3-2B)。 $\Delta mnn9$ 株では理由はわからないが分解されてしまい検出できなかった。ただし、 $mnn9$ 変異株では検出でき、野生株と差異はなかった(Fig.0-2)。

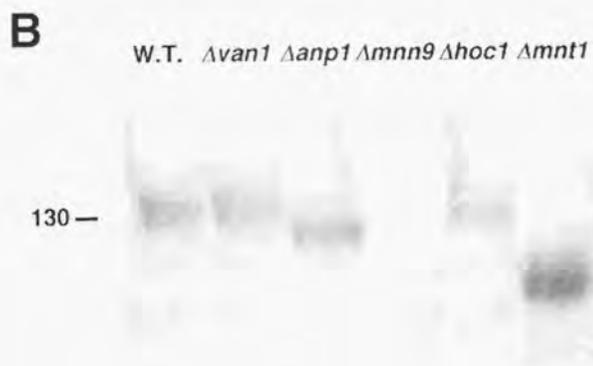
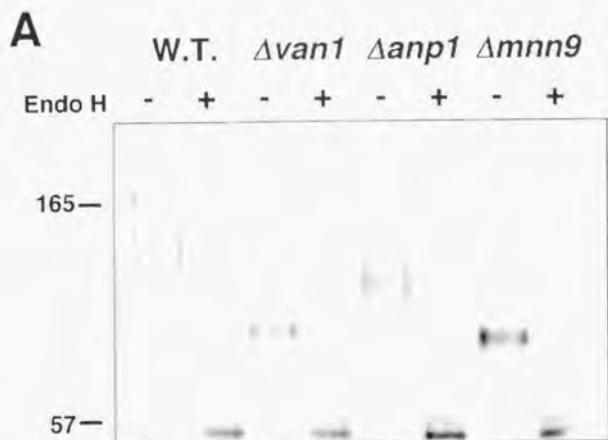


Fig. 3-2 Mnn9ファミリー遺伝子破壊株におけるインベルターゼ(A)とキチナーゼ(B)。Endo H+はEndoHを加えてインキュベートした後、免疫沈降を行った。

### 3-2-2 蛋白質の局在

次に、蛋白質の局在及び生化学的解析を行う目的で抗体の作製を行った。抗原としては、His×6との融合蛋白質を大腸菌中で発現させ大量精製したものをを用いたが、大腸菌内で融合蛋白質が膜貫通領域と思われる疎水性領域を含む場合は発現しなかったため、膜貫通領域よりC末端側の内腔側のポリペプチドを用いた(Fig.3-1)。His×6-Mnn9, His×6-Van1ではウサギを免疫しHis×6-Anp1ではマウスを免疫したが、Anp1に対する抗体は酵母内のネイティブなAnp1を認識することができなかった。そこで、蛋白質のC末端側にc-myc×6抗原ペプチドを融合して発現させ、mycに対する抗体を用いることとした。

以上の抗体を用いて蛋白質の局在を調べた。まず、遠心による分画をおこなった。オルガネラの膜を保った状態でライセートを作製し、10,000g及び100,000gで沈殿(P)と上清(S)に分けた。するとこれらの蛋白質はP10、P100に存在したことから膜に存在していると予想された(Fig. 3-3)。これを確かめるため膜を0.8M NaCl、1.6M Urea、0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、1% Triton X-100で処理して遠心したところ、Triton X-100で処理したときのみ可溶性画分に移行したことから、膜貫通型の蛋白質であることが示された。更に膜に対する配向性を決定するために、膜の外側からプロテアーゼを加え分子量の変化を見た。すると、界面活性剤を加えないときはVan1で~6kDの減少、Mnn9, Anp1ではほとんど大きさの変化が見られなかったことから、これらの蛋白質はC末端側の大部分を膜の内腔側に配向するII型の膜蛋白質であることがわかった(Fig. 3-5)。そこで細胞内のどの膜に存在するのかを調べるためにショ糖密度勾配遠心法により膜を分画した(Fig. 3-6)。この結果から、これらの蛋白質はOch1と一部重なる画分に移動し、ゴルジ体に存在すると考えられた。更に、細胞を間接蛍光抗体染色法で染色したところ(Fig. 3-7)、低コピーのプラスミドにのせ自身のプロモーターを用いて発現させた場合、どれもドット状のパターンを示しゴルジ体に存在すると考えられた。ただし、

ベクターを多コピーのもので発現させた場合、Mnn9は小胞体に蓄積していた (Fig. 3-7)。さらにGAPDHのプロモーターを用いてコピー数を増やした場合、Van1の一部やAnp1も小胞体に蓄積するようになった (Fig. 3-7)。また、この時液胞へと輸送されてしまっているものがあるかどうかを調べるため、液胞のプロテアーゼをコードするPEP4の破壊株を用いて染めたところ、Van1では強く液胞が染まることがわかった (Fig. 3-7)。

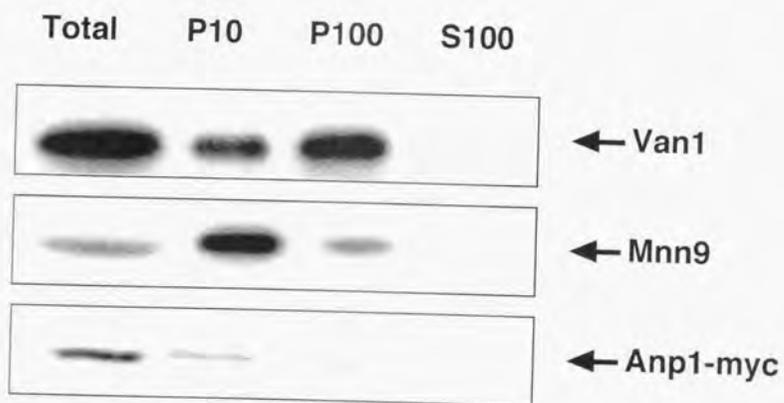


Fig. 3-3 遠心による分画。

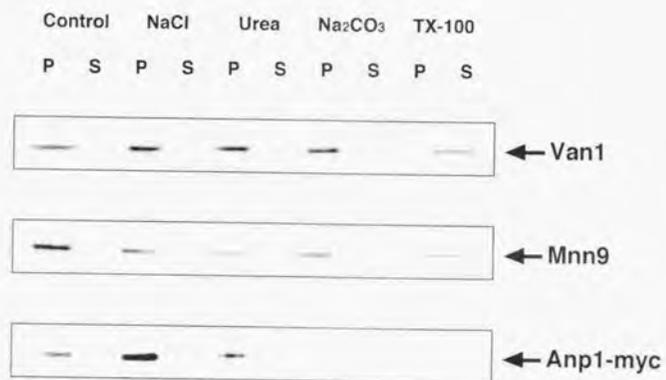


Fig. 3-4 薬剂処理による蛋白質の挙動。

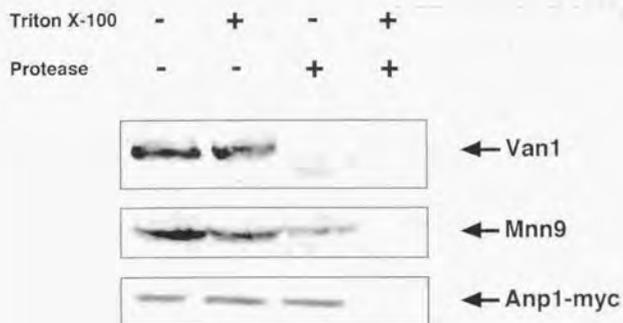


Fig. 3-5 プロテアーゼ処理による膜上の配向性の決定。

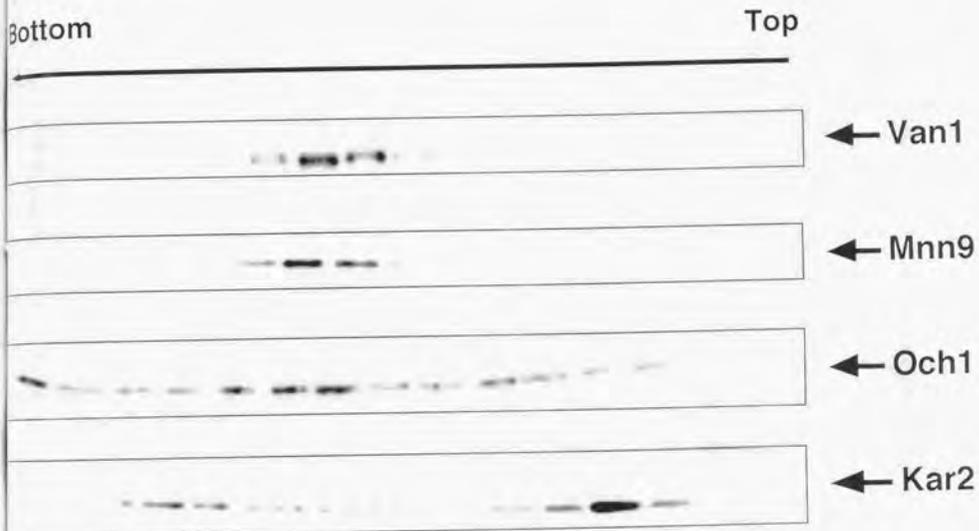


Fig. 3-6 ショ糖密度勾配遠心による分画。

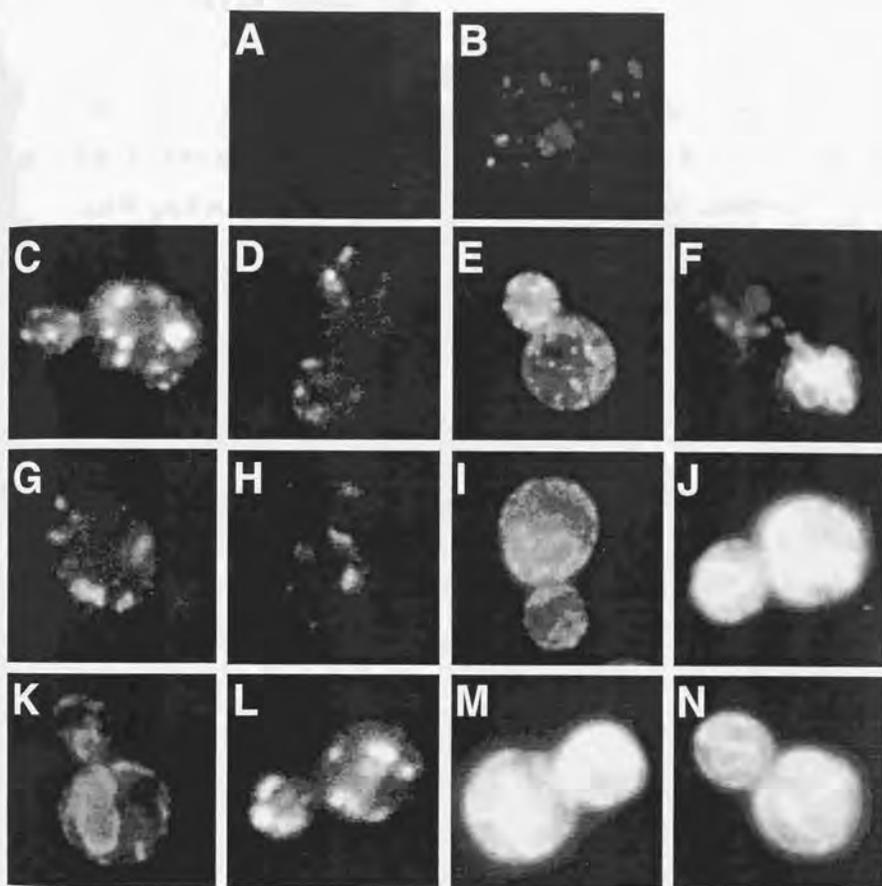


Fig. 3-7 間接蛍光抗体染色法による局在。Van1-myc (C, D, E, F), Anp1-myc (G, H, I, J), Mnn9-myc (K, L, M, N)を2 $\mu$  プラスミド(C, G, K), *CEN* プラスミドで自身のプロモーター(D, H, L), 2 $\mu$  プラスミド上でGAPDHプロモーター(E, F, I, J, M, N)下で野生株(C, D, E, G, H, I, K, L, M)または*pep4*変異株(F, J, N)中で発現させたときにmycに対するモノクローナル抗体9E10を用いて細胞を染色した。(A)はプラスミドのないコントロール、(B)はゴルジ体のマーカーであるMnt1-mycで染めたもの。

### 3-2-3 蛋白質複合体の単離

Fig. 3-4においてこれら膜蛋白質はTriton X-100によっても一部しか可溶化されない。これは大きな蛋白質複合体を形成していることが原因であると考え、界面活性剤を加える際に塩を共存させて可溶性を比較した。すると塩が250mM以上存在するときこれら膜蛋白質は完全に可溶化されたことから、静電的相互作用による蛋白質複合体を形成していることが示唆された (Fig. 3-8)。そこで、この複合体を単離すべく、界面活性剤で可溶化したライセートを用いて免疫沈降を行った (Fig. 3-9A)。そのバンドのパターンが一部似ていたので、さらにウェスタンブロッティングを行った (Fig. 3-9A)。Van1-mycおよびAnp1-mycの免疫沈降物中にはMnn9が含まれていたが、Anp1-mycの免疫沈降物中にはVan1は含まれていなかった。一方、Mnn9-mycにもVan1は含まれていた。更にAnp1-mycを発現させた細胞からポリクローナル抗体を用いてVan1およびMnn9を免疫沈降したところMnn9の免疫沈降物にのみAnp1-mycが検出された。以上の結果から、細胞内にはVan1-Mnn9複合体とAnp1-Mnn9複合体が存在していることが予想された。更にこれらの複合体に含まれる蛋白質を同定するためにプロテインシーケンスを図に示すバンドについて行った。その結果、Anp1-myc免疫沈降物からAnp1-myc、Mnn9そしてHoc1と呼ばれる既知の蛋白質が、Mnn9免疫沈降物からはMnn9-myc、Anp1が同定された。Hoc1は最初Protein kinase Cの変異*pkc1-371*のアリール特異的多コピーサブプレッサーとして取得された [Neiman *et al.*, 1997]。 $\alpha$ -1,6-糖転移酵素であるOch1とホモロジーが高いことから、Hoc1は何らかの糖転移酵素をコードしていると考えられるが、その破壊株ではN-, O-結合型糖鎖を付加される蛋白質の大きさに変化がなかった。Hoc1にmycタグをつけて免疫沈降を行うとそのパターンはAnp1の場合とよく似ており (Fig. 3-10)、ウェスタンブロッティングからHoc1-myc免疫沈降物にVan1は含まれない。このことから、Hoc1はAnp1-Mnn9複合体にのみ含まれていると考えられる。

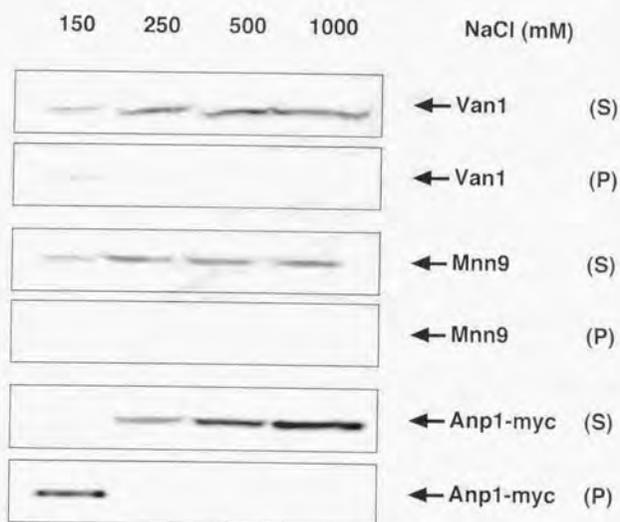


Fig. 3-8 界面活性剤とNaClによるMnn9ファミリー蛋白質の可溶化。ライセートに Triton X-100とNaClを示した濃度で加えてインキュベートした後、上清(P)と沈殿(S)に分けた。

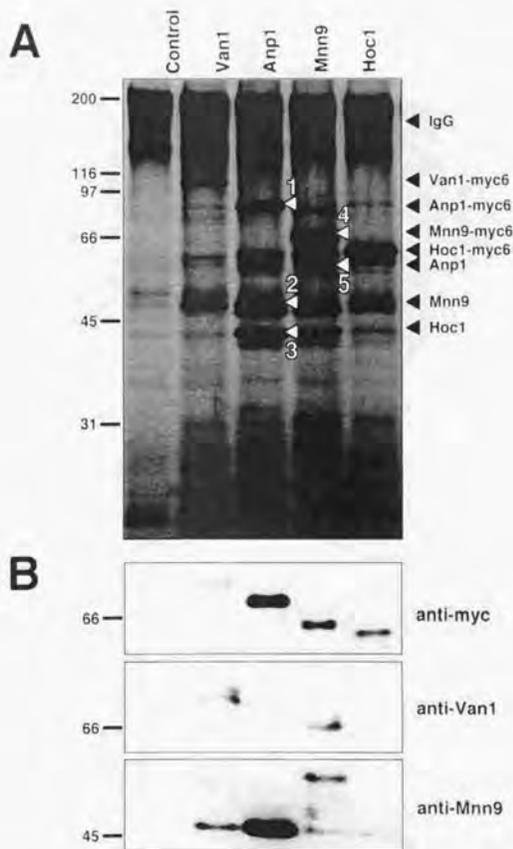


Fig. 3-9 Mnn9ファミリーの免疫沈降物。(A)は上に示したプローブを用いて免疫沈降したものを非還元状態でSDS-PAGEし、銀染色したもの。(B)はSDS-PAGEした後、横に示した抗体でウェスタンブロッティングを行った結果。ゲル内に示した数字が切り出してN末端のアミノ酸配列を決定したもの。1; MKYNNRKL SF (Anp1), 2; SLSLVSYRLR (Mnn9), 3; AKTTKRASSF (Hoc1), 4; SLSLXSYRLR (Mnn9), and 5; MKYNXXX (Anp1)。

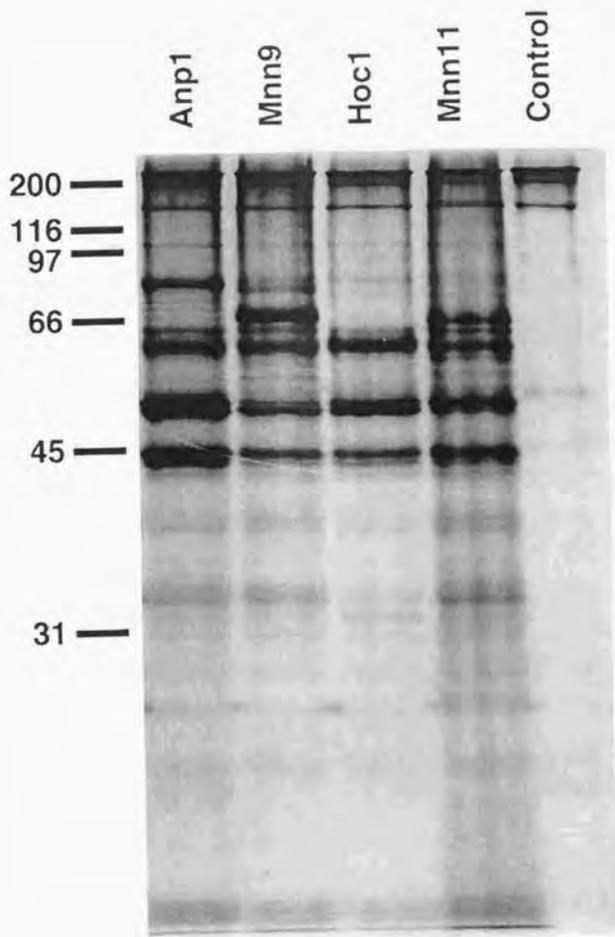


Fig. 3-10 Anp1複合体の構成因子にそれぞれタグをつけて免疫沈降したもの。

### 3-2-4 蛋白質複合体の安定性

前項においてVan1-Mnn9複合体とAnp1-Hoc1-Mnn9複合体が細胞内に存在していることを示したが、これが各種遺伝子破壊株中ではどのような挙動をするかを調べた。野生株,  $\Delta anp1$ ,  $\Delta mnn9$ ,  $\Delta hoc1$ 破壊株中にVan1-myc, Anp1-myc, Mnn9-myc, Hoc1-mycを低コピープラスミドにクローン化して導入し、細胞当たりの蛋白質の量をウェスタンブロットリングによって比較した(Fig. 3-11)。すると、 $\Delta van1$ 株中では特に変化はなかったが、 $\Delta anp1$ ,  $\Delta hoc1$ 株中ではAnp1-Hoc1-Mnn9複合体の他のコンポーネントの量も減っていた。また $\Delta mnn9$ 株中では他のどの蛋白質も顕著な量が減少していた。このことからこれらの複合体は複合体を形成するパートナーが欠けると安定性を失ってしまうと考えられる。

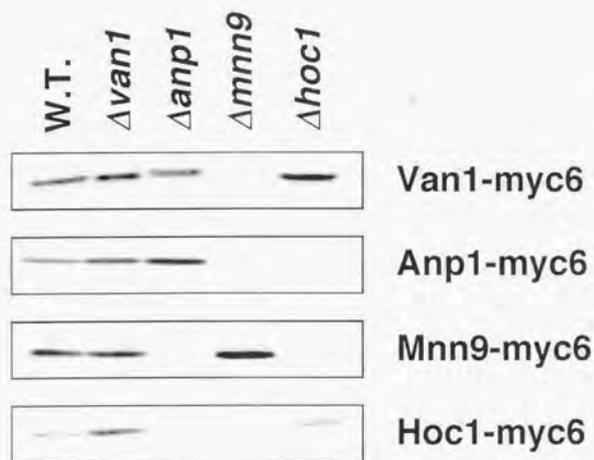


Fig. 3-11 破壊株中における他の蛋白質の安定性。上に示した株内で右に示した蛋白質を発現させウェスタンブロッティングを行った結果。

### 3-3 考察

本章ではそれぞれ独立にクローン化された3つの遺伝子 *VIG1/VAN1*, *VIG3/ANP1*, *VIG6/MNN9* がファミリーに属し複合体を形成していることを示した。これらの遺伝子の変異株は糖鎖不全の形質を示し、一次構造上もホモロジーの高い領域を含んでいることから、その機能に興味をもたれた。3つの蛋白質に *myc* のタグをつけて発現させ、タグを用いて免疫沈降したところこれらの蛋白質は複合体を形成していることが示唆された。その後細胞内には *Van1-Mnn9* 複合体と *Anp1-Hoc1-Mnn9* 複合体が存在することを示した。ホモロジーを見ると *Anp1* と *Van1* の間のホモロジーは65%で *Van1* と *Mnn9* の間の46%、*Anp1* と *Mnn9* の間の50%よりかなり高い。このことから *Mnn9* が複合体の双方に含まれており微妙に *Anp1*, *Van1* と機能が異なると考えられる。ホモロジーの高い領域がどのような機能を担っているのかはまだわからない。この領域を介して複合体を形成しているのかもしれない。これらの複合体がC末端側の内腔側の領域を介して複合体を形成しているらしいことは、この領域を用いた酵母のTwo-Hybridシステムで示されている(小島、私信)。*Anp1* にはホモロジーの高い領域よりも更にC末端側にグルタミンが22残基連続して並ぶPoly-Q領域があり、これが他の蛋白質との結合に機能している可能性がある。これらも合わせて、今後どの領域がどの蛋白質との相互作用に必要なのかを解析していく予定である。この複合体内の結合は強く、免疫沈降の際に架橋剤等を加えていないばかりでなく、2MのNaCl中でもほとんど解離しない(小島、私信)。ただしこの複合体の構成因子の一つが欠けると複合体全体の安定性が低下し、残りの構成因子の量が減少する(Fig. 3-11)。このことからこれらは複合体を形成することで非常に強固な相互作用が生じ安定な構造体となると考えられる。しかし、*HOC1* の遺伝子破壊株が糖鎖構造に顕著な変化を示さないことは、この結果と矛盾しているかのように見える。 $\Delta hoc1$  株では実際に *Anp1*, *Mnn9* は減少している(Fig. 3-11)。このことの説明として、*Anp1-Mnn9* は *Hoc1* 以外ともまた別の複合体を形

成しておりそれが糖鎖構造に関与している、とも考えられるがAnp1の免疫沈降物とHoc1のそれを比較すると非常によく似ていることからこれは考えにくい。恐らくは活性の本体がAnp1-Mnn9の側にあり、これが一部でも残っていれば糖鎖構造の顕著な変化は引き起こさないのではないかと考えられる。Calcofluor WhiteやCongo Redといった細胞壁の構造に以上のある変異株が感受性となる薬剤に対して $\Delta hoc1$ 株は感受性であることから、何らかの細胞壁の構造変化を起こしていることは間違いないが、その構造についてはまだわからない。この蛋白質が $\alpha$ -1,6-MannosyltransferaseであるOch1とホモロジーが高いことから何らかの糖転移酵素の可能性はあるがまだわからない。

一方でMunroらのグループにより我々と同様な結果が報告された[Jungmann and Munro, 1998]。彼等によりAnp1-Hoc1-Mnn9複合体にはさらにMnn11 (YJL183w)が含まれていることが示された。Mnn11はやはりII型の膜蛋白質でホモロジー検索の結果、*Saccharomyces cerevisiae*の機能未知なMnn10と部分的に40%程度のホモロジーがあることがわかった。Mnn10は*Schizosaccharomyces pombe*の $\alpha$ -1,2-galactosyltransferaseなどを含むファミリーの一員である[Dean and Poster, 1996]。Mnn11が実際にAnp1-Hoc1-Mnn11-Mnn9複合体のなかでどのような機能を担っているのかはまだ明かではない。

これら複合体の局在はゴルジ体であった。これはその機能がゴルジ体で付加される糖鎖に関与している点からも妥当である。ところがそれぞれの蛋白質のコピー数を増加させると小胞体にも存在するようになる。複合体を形成するような蛋白質の場合、その構成因子の一つが欠けるなどして正常なコンホメーションをとれなくなると小胞体に蓄積するというのはよくある現象で、イムノグロブリンの例がよく知られている[Knittler and Haas, 1992]。これは小胞体における品質管理機構のために異常な蛋白質は小胞体からゴルジ体へと向かう小胞体から排除または乗ることができないことを示していると考えられる。Mnn9複合体の場合は、それぞれの構成因子のみでは小胞輸送の系に乗ることができず、複合体を形成して初めてゴルジ体へと輸送される仕組みになって

いると考えられる。

ただし、Van1の場合はGAPDHプロモーターによって大量に発現させた場合でも小胞体への蓄積はほとんど見られなかった。では大量に発現したVan1はどこに局在するのか？これを確かめるために液胞のプロテアーゼであるPEP4の破壊株を用いて染色した結果、液胞へ輸送されていることがわかった(Fig. 3-7)。つまり、Van1は複合体を形成してなくても小胞体における品質管理機構は通り抜けるが結局ゴルジ体に留まることができず膜蛋白質デフォルトの経路である液胞へと輸送されてしまうものと考えられる。これはAnp1の場合は少なくとも4つの因子からなる複雑な複合体を形成しているが、Van1の場合は相互作用する相手がMnn9しか見つかっていないことと関係があるかもしれない。

一方でコピー数を増やした場合ばかりでなく、 $\Delta van1$ 株中でもMnn9は小胞体に残っているのが観察される。恐らくほかの構成因子が欠けた場合も小胞体に蓄積すると考えられるが、他の場合はほとんど分解されてしまってよくわからなかった。

では、この複合体は実際にどのような機能を担っているのか？以前よりMnn9は糖転移酵素そのものではないと考えられてきた。それは、mnn9変異株における糖鎖はヘテロであり、もっとも有力な候補である $\alpha$ -1,6-Mannosyltransferase活性が一部残っていることがわかったからである。しかしMnn9は複雑な複合体を形成しており、またその構成因子のなかに糖転移酵素とホモロジーの高いものが含まれていることから、この複合体はやはり糖転移酵素であると考えられる。preliminaryな実験からこれらの複合体を免疫沈降したピーズにGDP-マンノースから糖蛋白質にマンノースを移す活性があることがわかっており、今後詳細な検討を行う予定である。

Mnn9複合体には現在までに二種類あることがわかっているが、二つの複合体の機能の違いはまだわからない。説明の一つは、基質の構造が異なるということであろう。構造としても蛋白質部分と糖鎖部分がある。蛋白質による糖鎖構造の違いがあることは、以前より知られていて、 $\alpha$ -1,6-マンノースのバックボーンがほとんど伸長せずマ

マンノース13個程度しか付加されないカルボキシペプチダーゼYの様なタイプと、バックボーンが伸長し最終的にマンノースが100~200個付加されるインベルターゼの様なタイプである。それぞれをVan1-Mnn9またはAnp1-Hoc1-Mnn11-Mnn9複合体が認識して糖鎖付加を行っているかもしれない。糖鎖部分を認識している場合は二つの複合体は連続的な反応を行っていると考えられる。その場合糖鎖の大きさから考え、Van1複合体がある反応を行った後にAnp1複合体が次の反応を触媒すると思われる(Fig. 3-12)。細胞内のVan1の量がAnp1と比較して非常に少ないことから、Van1の行う反応よりAnp1の行う反応のほうが量的に多いものである可能性もある。今後、上記の実験を基質の条件を変え行うことにより、これらの問題を明かにしていきたい。

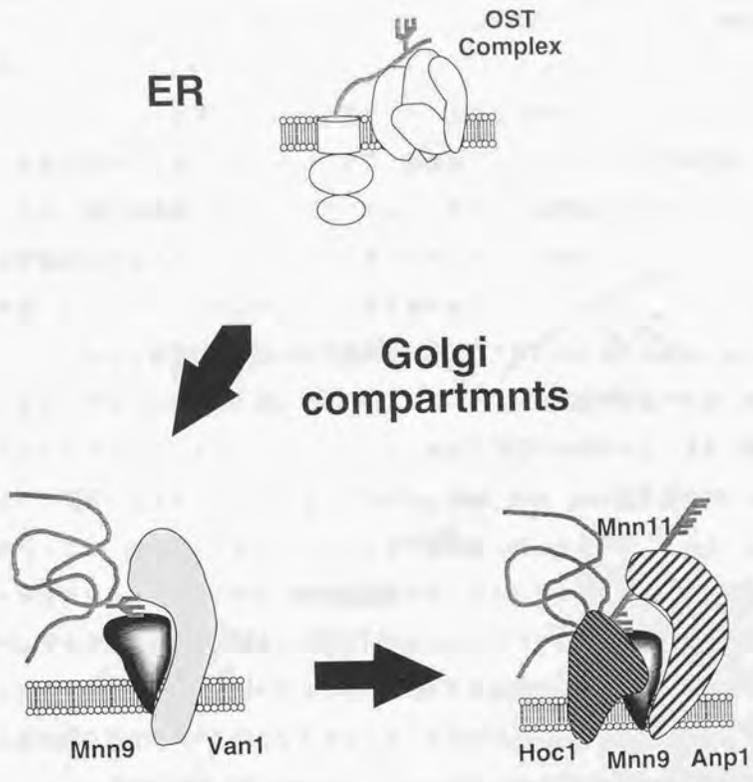


Fig. 3-12 Mnn9ファミリーの作用モデル

## 総括

### バナジン酸耐性と糖鎖不全

我々はバナジン酸耐性を指標として変異株を取得し解析を行った。バナジン酸耐性変異株の中に糖鎖不全変異株が多く含まれる理由についてはまだよく分かっていない。しかしこれは恐らく糖鎖不全という形質による二次的な効果としてバナジン酸耐性という形質が現れてくると思われる。つまり、細胞壁やペリプラズムおよび細胞膜に存在する蛋白質には糖鎖が大量に付加されており、糖鎖不全変異株においてはこれらの構造が顕著に変化するものと思われる。その結果、物質の透過性も変化し、あるものは透過しやすくあるものは透過しにくくなるのであろう。シクロヘキシミドやジェネティシンに対する感受性の上昇という変異株の形質もこれによるものと思われる。また、細胞の凝集性が変異株において高まっていることも、細胞壁の構造が大きく変化しているであろう事を予想させる。ただし逆に糖鎖不全変異株がすべてバナジン酸耐性という形質を示すかについては定かではなく、*erd1*、*kre2*、*pmr1*変異株について検定を行ったが、株のバックグラウンドによって耐性度も異なるようで、はっきりしたことは分からなかった。バナジン酸の標的蛋白質と言われているものには、細胞膜のATPaseやホスファターゼがある。バナジン酸耐性変異株の中にはこのような標的蛋白質の変異も含まれていると思われる。特に*vmg*変異株は糖鎖に変化はないことからこれら標的蛋白質またはその周辺にある蛋白質に変異が入っている可能性が高い。ただし、バナジン酸感受性細胞膜ATPaseをコードする*PMA1*遺伝子[Serrano *et al.*, 1986]は*LEU1*遺伝子の近傍にあり、一方*vig*、*vmg*変異の中には*leu1*変異と連鎖するものがないことから、*PMA1*遺伝子に変異のある株が含まれている可能性は低い。

### 膜蛋白質の局在機構

蛋白質には機能する場所がありそこに正確に局在することが必要である。膜蛋白質

の場合その局在化シグナルは膜貫通領域 (TMD) および細胞質領域にあると考えられている。酵母における小胞体局在機構は幾つか知られているが、小胞体を出てしまったものをもう一度小胞体に逆行輸送で返すために細胞質側のKKXXシグナルが用いられる [Townsend and Pelham, 1994; Gaynor *et al.*, 1994]。これには細胞質のコートマーとの結合が関与している。TMDを介した逆行輸送への経路も知られており、これはRer1という膜蛋白質が仲介している [Sato *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1997]。一方で小胞体から出さない機構も存在しているがそれには細胞質領域が関係しているもの [Sato *et al.*, 1996] と TMDが関与しているものがある [Rayner and Pelham, 1997]。TMDはその長さに意味があるのではなくTMDの中でも比較的極性のある残基の位置が関係している [Rayner and Pelham, 1997]。また、複合体を形成する蛋白質は小胞体内でそのアッセンブリーが行われることが多いが、これが適確に行われないと小胞体を出ることができない [Bonifacino *et al.*, 1991; Knittler and Haas, 1992]。Mnn9ファミリー複合体の構成因子を多コピーで発現させた際に小胞体に蓄積する現象は、この機構によると考えられる。小胞体に局在するシグナルをもつ蛋白質を大量に発現させると小胞体膜が異常に増加することがあるが [Zimmer *et al.*, 1997]、これらの蛋白質がどのような機構を用いているのかはまだわからない。

ゴルジ体に局在化する機構にはやはりTMDと細胞質領域が関与している。細胞質領域が関与する局在機構はゴルジ体を出てpre-vacuolar compartment (PVC) またはエンドソームに輸送された蛋白質をゴルジ体へ返す経路である。この機構には細胞質に存在する蛋白質が関与していて飽和性であるため、この機構を用いてゴルジ体に局在しているKex2やDPAP Aを多コピーで発現させると液胞へミスソートされる。一方で、TMDを用いてゴルジ体に局在化する機構についてはまだ明かでない。動物細胞においては細胞質膜、リソソーム膜は脂質の組成がゴルジ体とは異なりステロールが多いため、TMDの長さが重要で21残基以上ないとゴルジ体から出ることができない [Bretsher and Munro, 1993]。酵母においてはエンドソーム、液胞膜はさほどゴルジ体と異なるないためデフォルトの経路として液胞へと分泌される。TMDを用いる機構として、長さの

ほかにゴルジ体に局在する蛋白質同士が局在するべきコンパートメントにおいて、大きな複合体を形成して次の輸送小胞へ乗ることができないようにするものが考えられている[Nilsson *et al.*, 1993; Weisz *et al.*, 1993]が、まだ確かではない。本研究において用いたゴルジ体膜蛋白質のうち、Anp1-Hoc1-Mnn11-Mnn9複合体は小胞体を出るときにすでに大きな複合体を形成しているためゴルジ体のcis領域に保持されることのできるのかもしれない。Van1は大量に発現させると小胞体を出ることにはできるが、ゴルジ体に保持されるためのMnn9との複合体を形成できずに液胞へとミスソートされてしまう。Fig. 3-9Bで見られるように、Van1-mycで免疫沈降してもゲノムにコードされるVan1は共沈しないが、Mnn9-mycで免疫沈降した場合はゲノムにコードされるMnn9が共沈しており、Mnn9同士の結合が示唆される。そこで、Mnn9の複合体は複合体同士の結合もあってより大きな複合体を形成しゴルジ体のcis領域に局在できるのかもしれない。一方、Vig4は大量に発現させてもミスソートされないばかりか、局在する場であるゴルジ体を肥大化させる。このような現象は初めてであり、積極的にゴルジ体に局在化させる機構の存在を示唆している。この場合もVig4同士のホモオリゴマーを形成することで大きな複合体としてゴルジ体内で存在している可能性もある。Vig4の様に膜を何回も貫通している蛋白質の局在についてはほとんどわかっておらず、この現象を詳しく解析することにより新たな蛋白質局在機構を明かにすることができることが期待される。

#### ゴルジ体の機能解析

ゴルジ体の機能解析を行う上で、既知のゴルジ体局在蛋白質を用いることは有効な方法の一つであると考えられるが、現在のところ分かっているものは酵母に限らず動物細胞においても非常に少ない。酵母においては、Mnn1、Och1、Mnt1蛋白質といった糖転移酵素[Hausler and Robbins, 1992; Nakayama *et al.*, 1992; Yip *et al.*, 1994]や、DPAP A、Kex2、Kex1蛋白質といったペプチダーゼ[Cooper and Bussey, 1992; Wilcox *et al.*, 1992; Nothwehr *et al.*, 1993]の外は、前述したものと分泌装置くらいしかまだ分かって

いない。残留機構や仕分け機構を司るもののほかゴルジ体そのものを構成する蛋白質はもっと存在するはずであり、実際ゴルジ体の発達した動物細胞では生化学的にゴルジ体を単離し、その構成蛋白質を順に同定していくような試みも行われている [Slusarewicz *et al.*, 1994]。更にゴルジ体は細胞分裂の際に細分化して消失し、分裂終了後また構成されるというような制御が行われている [Misteli and Warren, 1994] が、この時は通常の分泌に用いられるものとは別の出芽、融合機構を用いている。ゴルジ体膜表面蛋白質である GM130 のリン酸化及びこれに結合する p115 が重要な役割を担っている [Nakamura *et al.*, 1997]。またゴルジ体の再構築の際の膜がスタッキングするために必要な因子として、脂質修飾された細胞質蛋白質である GRASP65 がクローン化されている [Barr *et al.*, 1997]。酵母にもこの蛋白質のホモログが存在することから、Fig2-7 のようなゴルジ体膜のスタッキングの機構を遺伝学的に調べることができると考えられる。

他方培養細胞を用いた系から、非常に親水性であるがゴルジ体表面に局在し、低密度リポソーム (LDL) 受容体の糖鎖付加に深く関与している蛋白質 Id1C 蛋白質がクローン化された [Podos *et al.*, 1994]。この蛋白質は線虫でも保存されており、非常に重要な機能を担っているものと考えられるがまだよく分かっていない。Id1C 蛋白質には協同して機能すると思われる Id1B 蛋白質もあり、細胞質に存在してゴルジ体の機能を制御している因子は多く存在していると考えられる。彼らの LDL 受容体の糖鎖の状態を指標とした CHO 細胞の系からのアプローチと、我々の用いているバナジン酸耐性を指標とした酵母の系からのアプローチは、共にゴルジ体の機能解析を最終的に目標としている点でも非常に似通っており、二つの結果をあわせることにより更に深い理解が得られると考えられる。

#### 将来の展望

本研究では外糖鎖の付加機構を明かにすることと共に、糖鎖付加の場であるゴルジ体の機能についても明かにすることを目的としていたが、実際に *vig* 変異を相補する遺

伝子は糖鎖合成に関与するものばかりであった。しかし、外糖鎖付加に関しては、その糖供与体の合成及びゴルジ体内腔への輸送、そして実際に糖鎖付加を行う糖転移酵素と網羅的にクローン化することができた。これにより酵母ゴルジ体における糖鎖付加に関わる因子の大部分が同定でき、その機構もかなりの部分が明かになったと考えられる。

本研究は今後次のように進めることでより発展するものと考えている。Mnn9ファミリーについてはその活性と基質特異性を明かにする必要がある。また複合体の構成因子をすべて同定し、再構成し、活性とそれぞれの因子の関わりを調べることで、酵母細胞壁を構成するマンナン蛋白質の合成の制御機構がより明かになるであろう。一方、Vig4を大量に発現することで現われた肥大化したゴルジ体は大変興味深い。その出現の機構を遺伝学的に解析するとともに生化学的にゴルジ体を扱う材料として用いることで、当初の目的であったゴルジ体の機能と維持の機構を明らかにできると考えられる。

細胞とは、個体を構成する最小の単位であり、その中では複雑な機構が組み合わさり実に巧妙なドラマが絶え間なく演じられている。その局所的な現象を解明することが全体の解明につながるとは限らないが、仕掛けの素晴らしさ、美しさに少しでも触れるべく今後も研究を続けていきたい。

## 実験材料と方法

### 1) 使用菌株および培地

*Saccharomyces cerevisiae*菌株

A5-8-1C MAT $\alpha$  *leu1*

A13-18 MAT $\alpha$  *lys1*

YPH250 MAT $\alpha$  *ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1- $\Delta$ 1 his3- $\Delta$ 200 leu2- $\Delta$ 1*

TM10 MAT $\alpha$  *ura3 trp1 his3 leu2*

W303 MAT $\alpha/\alpha$  *ura3/ura3 leu2/leu2 trp1/trp1 ade2/ade2 can1/can1*

KA31-1A MAT $\alpha$  *ura3 trp1 his3 leu2*

LB1-10B<sup>1</sup> MAT $\alpha$  *mnn1*

M9-2D MAT $\alpha$  *mnn9 ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1- $\Delta$ 1 his3- $\Delta$ 200 leu2- $\Delta$ 1*

AA298<sup>2</sup> MAT $\alpha$   *$\Delta$ pmr1::HIS3 ura3-52 lys2- $\Delta$ 201 ade2-101 his3- $\Delta$ 200 leu2-3,-112*

$\Delta$ erd1<sup>3</sup> MAT $\alpha$   *$\Delta$ erd1::URA3 suc2- $\Delta$ 9 ura3-52 ade2-1 leu2-3,-112*

$\Delta$ kre2<sup>4</sup> MAT $\alpha$   *$\Delta$ kre2::TRP1 suc2- $\Delta$ 9 ura3-52 leu2-3,-112 trp1-901 lys2-801*

*his3- $\Delta$ 200*

S40<sup>5</sup> MAT $\alpha$  *pmi40<sup>s</sup> ura3 leu2-3,-112 trp1-289 his3-1*

YS81-1B<sup>6</sup> MAT $\alpha$  *och3/van1 leu2 ura3 trp1 his3*

H17-6C MAT $\alpha$  *vig9-1 ura3-52 trp1- $\Delta$ 1 leu2- $\Delta$ 1*

J12 MAT $\alpha$  *vig9-2 lys1*

H17W MAT $\alpha/\alpha$  *vig9-1/vig9-1 ADE2/ade2 HIS3/his3 leu2/leu2 ura3/ura3*

K2-1C MAT $\alpha$  *vig4-1 ura3-52 lys1 lys2-801 his3- $\Delta$ 200 leu2- $\Delta$ 1*

C4-8A MAT $\alpha$  *vig4-2 ura3-52 lys1 lys2-801 ade2-101 leu2- $\Delta$ 1*

$\Delta$ van1 MAT $\alpha$   *$\Delta$ van1::TRP1 ura3 trp1 his3 leu2*

$\Delta$ anp1 MAT $\alpha$   *$\Delta$ anp1::HIS3 ura3 trp1 his3 leu2*

$\Delta$ mnn9     MAT $\alpha$       $\Delta$ mnn9::LEU2 ura3 trp1 his3 leu2  
 $\Delta$ hoc1     MAT $\alpha$       $\Delta$ hoc1::HIS3 ura3 trp1 his3 leu2  
 $\Delta$ mnn11    MAT $\alpha$       $\Delta$ mnn11::HIS3 ura3 trp1 his3 leu2

- 1; Yeast Genetic Stock Center [Antalis *et al.*, 1973]  
 2; Dr. Fink より [Rudolph *et al.*, 1989]  
 3; Dr. Pelham より [Hardwick *et al.*, 1990]  
 4; Dr. Bussey より [Hill *et al.*, 1992]  
 5; Dr. Payton より [Payton *et al.*, 1991]  
 6; Dr. Jigami より

#### Escherichia coli菌株

DH5 $\alpha$      supE44  $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1  
 XL1-Blue    hsdR17 supE44 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac/F[proAB<sup>+</sup> lac<sup>A</sup>  
                   lacZ $\Delta$ M15::Tn10(*tet*<sup>r</sup>)]  
 MC1061    hsdR mcrB araD139  $\Delta$ (araABC-leu)7679  $\Delta$ lacX74 galU galK rpsL thi

#### 培地<sup>1</sup>

YEPD(1% Bacto yeast extract 2% Bacto peptone 2% glucose)

YEPS(1% Bacto yeast extract 2% Bacto peptone 2% sucrose)

SD(0.67% Bacto yeast nitrogen base w/o amino acids 2% glucose)<sup>2</sup>

LB(1% Bacto tryptone 0.5% Bacto yeast extract 0.5% NaCl)

1; プレートの場合は2%寒天を添加。

2; 栄養要求性株を培養する際は、必要に応じて適当量のアミノ酸、塩基を添加。

2) プラスミドおよび酵母ゲノミックライブラリー

プラスミド

pRS303	(pBluescript <i>HIS3</i> )	[Sikorski and Hieter, 1989]
pRS304	(pBluescript <i>TRP1</i> )	[Sikorski and Hieter, 1989]
pRS305	(pBluescript <i>LEU2</i> )	[Sikorski and Hieter, 1989]
pRS314	(pBluescript <i>TRP1 CEN6 ARSH4</i> )	[Sikorski and Hieter, 1989]
pRS416	(pBluescript <i>URA3 CEN6 ARSH4</i> )	[Sikorski and Hieter, 1989]
pYES2.0	( <i>URA3</i> 2 $\mu$ <i>GAL1</i> promoter)	[Invitrogen]
YEpl3	(pBR322 <i>LEU2</i> 2 $\mu$ )	
pKT10	( <i>URA3</i> 2 $\mu$ <i>GAPDH</i> promoter)	
pKT10-mycN	(pKT10 myc-tag <i>GAPDH</i> promoter)	
pCHI	(pKT10 myc6-tag)	
pSV901	(original clone in pRS314)	
pSV902	(original clone in pRS314)	
pSV903	(original clone in pRS314)	
pSV907	(pRS314, pSV901由来の2.1kb <i>Sall-Sall</i> 断片)	
pSV908	(pRS314, pSV903由来の1.6kb <i>Sall-Sau3AI</i> 断片)	
pSV914	(pRS314, pSV903由来の2.7kb <i>HindIII-Sau3AI</i> 断片)	
pSV919	(pBluescript, 下記のプライマー1および2を用いたPCR産物)	
pSV923	(pYES2.0, pSV903由来の2.7kb <i>HindIII-Sau3AI</i> 断片)	
pSV924	(pSV919, YEpl3由来の2.1kb <i>HpaI-Sall</i> 断片)	
pSV931	(pGEX-4T-3, pSV919由来の <i>BamHI-XhoI</i> 断片)	
pSV401	(original clone in C10 Library)	
pSV402	(pRS416, pSV401由来の3.8kb <i>HindIII-BamHI</i> 断片)	
pSV403	(pRS416, pSV401由来の3.4kb <i>HindIII-HindIII</i> 断片)	
pSV404	(pRS416, pSV401由来の2.3kb <i>HindIII-BamHI</i> 断片)	
pSV405	(pRS416, pSV401由来の7.5kb <i>Sall-BamHI</i> 断片)	

- pSV406 (pRS416, pSV401由来の1.2kb *Bgl*II-*Bgl*III断片)
- pSV461 (pBluescript, 下記のプライマー3および4を用いたPCR産物)
- pSV463 (pKT10-mycN, pSV461由来の*Bam*HI-*Xho*I断片)
- pMA12 (pCH1, )
- pSV124 (pCH1, *VAN1*)
- pSV128 (pRS416, pSV124由来の*Bam*HI-*Xho*I断片)
- pSV130 (pKT10-mycN, *VAN1* GAPDH promoter)
- pSV305 (pKT10-mycN, *ANP1* GAPDH promoter)
- pSV313 (pCH1, *ANP1*)
- pSV314 (pRS416, pSV313由来の*Bam*HI-*Xho*I断片)
- pSV629 (pCH1, *MNN9*)
- pSV631 (pRS416, pSV629由来の*Bam*HI-*Xho*I断片)
- pSV639 (pKT10-mycN, *MNN9* GAPDH promoter)
- pSV702 (pCH1, *HOCl*)
- pSV709 (pRS416, pSV702由来の*Bam*HI-*Xho*I断片)
- pSV201 (pCH1, *MNT1*)

#### 酵母ゲノミックライブラリー

G16 Library (pRS314, *TRP1*) ゲノムの断片は約8-10kb (Dr. D. Koshlandより)

C10 Library (p366, *LEU2*) ゲノムの断片は約9-12kb (Dr. D. Koshlandより)

#### 3) 合成オリゴヌクレオチドおよびPCR

##### 合成オリゴヌクレオチド

プライマー-1 5'- CGGGATCCATGAAAGGTTTAATTTTAGTCGG - 3'

プライマー-2 5'- CGCTCGAGGGCGCAGAACAGATCATCA - 3'

プライマー-3 5'- CGGGATCCATGTCTGAATTGAAAACAGGTCATG - 3'

プライマー-4 5'- CGTCTAGAAATTTACGTAAAGGTTGGGCTTGTGTG - 3'

#### PCR条件

テンプレートとしてA5-8-1Cのゲノムを調製して用いた。PCR反応は94℃を1分、50℃を1分、72℃を1.5分というサイクルで30回行った。酵素はペーリンガーマンハイム社のAmpli Taq polymeraseを用いた。

#### 4) 分子生物学的技法

分子生物学的手法は成書[Sambrook *et al.*, 1989; Guthrie and Fink, 1991]によった。

#### 5) インベルターゼ活性染色

Ballouの方法[Ballou, 1990]に従った。10mlのYEP10D培地にてOD<sub>550</sub>=0.5-1.0になるまで25℃で培養後、37℃にし、30分培養した。菌体を遠心により集め、37℃に温めた10mlのYEPS培地へ培地交換し、3時間培養してインベルターゼの誘導を行った。

誘導後、集菌した菌体を300μlのZ buffer (100mM Tris-HCl(pH=7.4), 1.4M Sorbitol, 0.1% 2-Mercaptoethanol, 250μg/ml Zymolyase-100T) に懸濁し、30℃で20分処理し、スフェロプラスト化した。これを400g, 5分遠心し、上清をペリプラズム画分とした。この画分を1/5量の80% Glycerol, 0.05% Bromophenol Blue と混ぜ、電気泳動のサンプルとした。電気泳動は7.5% SDS-PAGEでLaemmliの方法[Laemmli, 1970]に従って行い、活性染色は原法に従った。

#### 6) キチナーゼの単離

KurandaとRobbins (1991)の方法に従って、酵母を定常期まで培養しその培養液からキチンとの親和性を利用して分泌されたキチナーゼを単離した。定常期に達した培養液10mlを~10mgのキチン (Sigma) と4℃で4時間以上緩やかに浸透しキチナーゼをキチンに結合させる。その後PBSで3回洗浄し、沈殿をSDSサンプルバッファー100μlと混合し100℃で10分熱した後6% SDS-PAGEを行う。最後にゲルをCBBで染色した。

#### 7) 薬剤感受性の判定

各種薬剤添加プレートは100倍濃度の薬剤溶液をメンブレンフィルター（孔径0.45 $\mu$ m）により除菌した後に最終的に記載されている濃度になるようにYEED培地もしくはSD培地をオートクレーブ後に添加して作製した。SD培地にバナジン酸を添加する場合は、pHの上昇を防ぐため50mM Mes/NaOH (pH5.0)を同時に添加してpHを調節した。薬剤感受性の判定は25℃にて薬剤無添加プレートで生育させた菌体を薬剤添加プレートに画線、もしくは薬剤無添加培地で定常期まで培養した菌体を滅菌水で100倍希釈した後、10 $\mu$ lを薬剤添加プレートにスポットして25℃にて培養した後、増殖の程度により判定した。

使用薬剤：Sodium orthovanadate（添川理化学）

Cycloheximide, 5-Fluorouracil, Hygromycin B, Geneticin (Sigma)

#### 8) 遺伝子のクローニング

H17-6CにG16、C10ライブラリーを形質転換したプレートを100 $\mu$ Mのジェネティシンを含んだ培地にレプリカし、生育してきた形質転換体を選択し、インベルターゼの活性染色法により、糖鎖が野生株程度にまで回復している株を選びプラスミドを回収した。このプラスミドをもう一度変異株に導入し、変異を回復させる様なプラスミドをそれぞれの野生型遺伝子を含むクローンとした。

#### 9) 塩基配列の決定

pRS314ベクターに含まれるM13由来の配列を利用してアプライドバイオシステムズ社のTaq Dye Primer Cycle Sequencing Kitの-21M13 Dye PrimerとM13 Reverse Dye Primerにより二本鎖DNAを鋳型として付属の説明書の通りに行なった。DNAシーケンサーはアプライドバイオシステムズ社のModel 373A DNA Sequencerを使用した。

#### 10) ライセートの調製

各種細胞をOD<sub>550</sub>=1.0程度にまで培養した後、集菌し0.9M Sorbitolで洗浄しZ solution (10 mM HEPES (7.6), 0.9 M Sorbitol, 25 mM β-Mercaptoethanol, 250 μg/ml Zymolyase)に懸濁し37℃で30 minインキュベートする。4000 rpm, 5 min遠心し集めたスフェロプラストをLysis buffer (10 mM HEPES (7.6), 0.2 M Sorbitol, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM PMSF, 1 μg/ml protease inhibitor cocktail (Leupeptin, Chymostatin, Pepstatin, Aprotinin, Antipain (SIGMA)) (p.i.c.))に懸濁し4℃で30 minインキュベートし溶菌させ、4000 rpm, 5 min遠心して未破壊菌体を除いてライセートとする。

遠心による分画はこのライセートを10,000g, 10 min遠心し沈殿画分をP10とし、この上清画分を更に100,000g, 1 hr遠心し沈殿画分をP100、上清をS100とする。沈殿画分は一度Lysis bufferで洗浄する。また、各種薬剤による処理は20 μlの4 M NaCl, 8 M Urea, 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 5 % TritonX-100にライセート80 μlを加えて4℃で30 minインキュベートした後、100,000 g, 1 hr遠心して沈殿と上清に分ける。

ウェスタンブロッティングの一次抗体としてanti-myc mAb (9E10)は5000倍、anti-Van1 pAb、anti-Mnn9 pAbは3000倍、anti-Och1 pAbは2000倍に希釈して用い、二次抗体としてPeroxidase-labeled anti-Mouse IgGまたはPeroxidase-labeled anti-Rabbit IgG (Kpl) を5000倍希釈して用いた。発光基質としてSuperSignal Substrates, Western Blotting (PIERCE)を用い、X線フィルムまたはARGUS photoncounterで検出した。

#### 11) GDP-マンノースピロホスホリラーゼ活性のアッセイ

バッファー (HEPES(pH7.6) 40mM, MgCl<sub>2</sub> 8mM, Man-1-P 0.2mM, Cold GTP 0.2mM, GMP 50mM, GDP 50mM, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]GTP 0.1mCi/ml (specificity 3000Ci/mmol) に適量細胞質画分を加え、この時間を0分として25℃でインキュベートし、反応終了後等量の反応停止液 (Cold GTP 100mM, EDTA100mM) と混合し、ドライアイス/エタノール中で凍らせ反応を止める。その後サンプルを展開液 (1M LiCl, 1M HCOOH) を用い薄層PEI-セルロース (Merck) で展開し、イメージアナライザー (富士 BAS2000) を用い

てGDP-マンノースのスポットの放射活性を測定した。

#### 12) ショ糖密度勾配遠心

上記のように調製したライセートをショ糖密度勾配遠心で分けるときは、10 mM HEPES (7.6), 54, 50, 46, 42, 38, 34, 30, 26, 22, 18 % Sucroseを1 ml ずつのせた10 ml のステップグラジエントの上に1 mlのライセートをのせ、100,000 g, 16 hr遠心し、底から1 mlずつ分画する。

#### 13) 間接蛍光抗体染色

細胞を10 ml、OD<sub>550</sub>=1.0程度にまで培養した後、1 ml, 37 % Formaldehyde, 330 $\mu$ l 2 % Sodium azideを加え、30 $^{\circ}$ C, 15 min培養する。その後集菌し、3.7 % Paraformaldehydeの溶けたBuffer A (0.1 M Potassium phosphate (7.3), 10 mM Sodium azide)に懸濁させ、90 min室温でインキュベートし、固定する。Buffer Aで2回、Buffer B (1.2 M Sorbitol in Buffer A)で1回洗浄した細胞に25 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 250  $\mu$ g/ml Zymolyaseの溶けたBuffer Bを加え、37 $^{\circ}$ Cで30 minインキュベートする。Buffer Bで1回洗浄した後、0.1 % TritonX-100の溶けたBuffer Bに懸濁し10 min氷上でインキュベートする。Buffer Bで洗浄した細胞をPolylysineでコートしたスライドグラスに塗り、Buffer C (1 mg/ml BSA, 0.1 % Tween 20 in PBS)で30 minブロッキングし、Buffer Cで100倍に薄めた一次抗体をのせて1 hrインキュベートする。Buffer Cで洗浄した後、Buffer Cで200倍に薄めた二次抗体をのせて30 minインキュベートしBuffer Cで2回洗浄しマウントする。

#### 14) 免疫沈降

各種細胞をOD<sub>550</sub>=1.0程度にまで培養した後、集菌し0.9M Sorbitolで洗浄し25 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0.9 M Sorbitolに懸濁し10 min室温でインキュベートし、もう一度0.9M Sorbitolで洗浄した後、 $\beta$ -Mercaptoethanolを除いたZ Bufferを加え37 $^{\circ}$ Cで30 minインキュベートする。集菌したスフェロプラストにLysis X Buffer (10 mM HEPES (7.6), 1 %

Triton X-100, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM PMSF, 1 μg/ml p.i.c.)を加え4℃, 15 min 静置した後10,000 g, 10 min遠心した上清をとり、Protein A sepharose beads 5μlを加え4℃, 1 hr回転させながらインキュベートしてProtein Aとの非特異的結合物を除く。その後0.5μlの抗体を加えて4℃, 1 hr静置し、Protein A sepharose beads 5μlを加え4℃, o/n 回転させながらインキュベートする。TTBSで5回洗浄した後、非還元状態でSDS-PAGE し、銀染色によりゲルを染色した。

#### 15) インベルターゼ免疫沈降

各種細胞をOD<sub>550</sub>=1.0程度にまで培養した後、集菌し0.9M Sorbitolで洗浄し25 mM β-Mercaptoethanol, 0.9 M Sorbitolに懸濁し10 min室温でインキュベートし、もう一度0.9M Sorbitolで洗浄した後、β-Mercaptoethanolを除いたZ Bufferを加え37℃で30 minインキュベートする。遠心によりスフェロプラストを除いてペリプラズム画分をとり、0.1 mg/mlになるようにD-biotinoyl-ε-aminocaproic acid-N-hydroxysuccinimide esterを加え、氷上で15 minインキュベートした後、1 M NH<sub>4</sub>Clを加えて過剰量のbiotin-7-NHSを除く。Protein A sepharose beads 5μlを加え4℃, 1 hr回転させながらインキュベートしてProtein Aとの非特異的結合物を除いた後、0.5μlの抗体を加えて4℃, 1 hr静置し、Protein A sepharose beads 5μlを加え4℃, o/n 回転させながらインキュベートする。TTBSで5回洗浄した後SDS-PAGE, HRP-Streptoavidinを用いたウェスタンブロッティングにより検出した。

## 参考文献

Abeijon, C., and Hirschberg, C. B. (1992). Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem. Sci.* 17, 32-6.

Abeijon, C., Yanagisawa, K., Mandon, E. C., Hausler, A., Moremen, K., Hirschberg, C. B., and Robbins, P. W. (1993). Guanosine diphosphatase is required for protein and sphingolipid glycosylation in the Golgi lumen of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 122, 307-2.

Antalis, C., Fogel, S., and Ballou, C. E. (1973). Genetic control of yeast mannan structure. *J. Biol. Chem.* 248, 4655-4659.

Antebi, A., and Fink, G. R. (1992). The yeast  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase homologue, *PMR1*, is required for normal Golgi function and localizes in a novel Golgi-like distribution. *Mol. Biol. Cell* 3, 633-5.

Ballou, C. E. (1990). Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae mnn* mutants with nonconditional protein glycosylation defects. *Methods Enzymol.* 185, 440-70.

Ballou, L., Hitzeman, R. A., Lewis, M. S., and Ballou, C. E. (1991). Vanadate-resistant yeast mutants are defective in protein glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3209-12.

Barr, F. A., Puype, M., Vandekerckhove, J., and Warren, G. (1997). GRASP65, a protein involved in the stacking of Golgi cisternae. *Cell* 91, 253-62.

Bernstein, M., Hoffmann, W., Ammerer, G., and Schekman, R. (1985). Characterization of a gene product (Sec53p) required for protein assembly in the yeast endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 101, 2374-82.

Bonifacino, J. S., Cosson, P., Shah, N., and Klausner, R. D. (1991). Role of potentially charged transmembrane residues in targeting proteins for retention and degradation within the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 10, 2783-93.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of  $\mu\text{g}$  quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analy. Biochem.* 72, 248-54.

Bretscher, M. S., and Munro, S. (1993). Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science* 261, 1280-1.

Camirand, A., Heysen, A., Grondin, B., and Herscovics, A. (1991). Glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and characterization of the gene encoding a specific processing  $\alpha$ -mannosidase. *J. Biol. Chem.* 266, 15120-15127.

Chapman, R. E., and Munro, S. (1994). The functioning of the yeast Golgi apparatus requires an ER protein encoded by *ANP1*, a member of a new family of genes affecting secretory pathway. *EMBO J.* 13, 4696-4907.

Conzelmann, A., Puoti, A., Lester, R. L., and Desponds, C. (1992). Two different types of lipid moieties are present in glycoposphoinositol-anchored membrane proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 11, 457-66.

Cooper, A., and Bussey, H. (1992). Yeast Kex1p is a Golgi-associated membrane protein: deletions in a cytoplasmic targeting domain result in mislocalization to the vacuolar membrane. *J. Cell Biol.* 119, 1459-68.

Daran, J. M., Dallies, N., Thines-Sempoux, D., Paquet, V., and Francois, J. (1995). Genetic and biochemical characterization of the *UGP1* gene encoding the UDP-glucose pyrophosphorylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 233, 520-30.

Dean, N., and Poster, J. B. (1996). Molecular and phenotypic analysis of the *S. cerevisiae* *MNN10* gene identifies a family of related glycosyltransferases. *Glycobiology* 6, 73-81.

Dean, N., Zhang, Y. B., and Poster, J. B. (1997). The *VRG4* gene is required for GDP-mannose transport into the lumen of the golgi in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 272, 31908-14.

Distler, J., Ebert, A., Mansouri, K., Pissowotzki, K., Stockmann, M., and Piepersberg, W. (1987). Gene cluster for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: nucleotide sequence of three genes and analysis of transcriptional activity. *Nucleic Acids Res.* 15, 8041-56.

Esmon, B., Esmon, P. C., and Schekman, R. (1984). Early steps in processing of yeast glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 259, 10322-7.

Ferguson, M. A. J. (1991). Glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchors: the tale of a tail. *Biochem. Soc. Transactions.* 20, 243-256.

Gaynor, E. C., te Heesen, S., Graham, T. R., Aebi, M., and Emr, S. D. (1994). Signal-mediated retrieval of a membrane protein from the Golgi to the ER in yeast. *J. Cell Biol.* 127, 653-65.

Gentzsch, M., and Tanner, W. (1996). The *PMT* gene family: protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. *EMBO J.* 15, 5752-9.

Gentzsch, M., and Tanner, W. (1997). Protein-O-glycosylation in yeast: protein-specific mannosyltransferases. *Glycobiology* 7, 481-6.

Gerber, L. D., Kodukula, K., and Udenfriend, S. (1992). Phosphatidylinositol glycan (PI-G) anchored membrane proteins. Amino acid requirements adjacent to the site of cleavage and PI-G attachment in the COOH-terminal signal peptide. *J. Biol. Chem.* 267, 12168-73.

Graham, T. R., Verostek, M. F., MacKay, V., Trimble, R., and Emr, S. D. (1992). Characterization of the *S. cerevisiae*  $\alpha$ -1,3 mannosyltransferase. *Yeast* 8, S458.

Hausler, A., Ballou, L., Ballou, C. E., and Robbins, P. W. (1992). Yeast glycoprotein biosynthesis: *MNT1* encodes an  $\alpha$ -1,2-mannosyltransferase involved in O-glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6846-5.

Herscovics, A., and Orlean, P. (1993). Glycoprotein biosynthesis in yeast. [Review]. *FASEB J.* 7, 540-5.

Hill, K., Boone, C., Goebel, M., Puccia, R., Sdicu, A. M., and Bussey, H. (1992). Yeast *KRE2* defines a new gene family encoding probable secretory proteins, and is required for the correct N-glycosylation of proteins. *Genetics* 130, 273-83.

Hirschberg, C. B., and Snider, M. D. (1987). Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 63-87.

Huffaker, T. C., and Robbins, P. W. (1983). Yeast mutants deficient in protein glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7466-7470.

Jiang, X. M., Neal, B., Santiago, F., Lee, S. J., Romana, L. K., and Reeves, P. R. (1991). Structure and sequence of the *rfb* (O antigen) gene cluster of *Salmonella serovar typhimurium* (strain LT2). *Mol. Microbiol.* 5, 695-713.

Kanik-Ennulat, C., and Neff, N. (1990). Vanadate-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* show alterations in protein phosphorylation and growth control. *Mol. Cell. Biol.* 10, 898-909.

Kepes, F., and Schekman, R. (1988). The yeast *SEC53* gene encodes phosphomannomutase. *J. Biol. Chem.* 263, 9155-61.

Kessler, A. C., Haase, A., and Reeves, P. R. (1993). Molecular analysis of the 3,6-dideoxyhexose pathway genes of *Yersinia pseudotuberculosis* serogroup IIA. *J. Bacteriol.* 175, 1412-22.

Klis, F. M. (1994). Cell wall assembly in yeast. *Yeast* 10, 851-869.

Knittler, M. R., and Haas, I. G. (1992). Interaction of BiP with newly synthesized immunoglobulin light chain molecules: cycles of sequential binding and release. *EMBO J.* 11, 1573-81.

Koch, C., Moll, T., Neuberg, M., Ahorn, H., and Nasmyth, K. (1993). A role for the transcription factors Mbp1 and Swi4 in progression from G1 to S phase. *Science* 261, 1551-7.

Kukuruzinska, M. A., Bergh, M. L., and Jackson, B. J. (1987). Protein glycosylation in yeast. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 915-44.

Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-32.

Lussier, M., Sdicu, A. M., Bussereau, F., Jacquet, M., and Bussey, H. (1997). The Ktr1p, Ktr3p, and Kre2p/Mnt1p mannosyltransferases participate in the elaboration of yeast O- and N-linked carbohydrate chains. *J. Biol. Chem.* 272, 15527-31.

Ma, D., Russell, D. G., Beverley, S. M., and Turco, S. J. (1997). Golgi GDP-mannose uptake requires *Leishmania* LPG2. A member of a eukaryotic family of putative nucleotide-sugar transporters. *J. Biol. Chem.* 272, 3799-805.

Melnick, L., and Sherman, F. (1993). The gene clusters ARC and COR on chromosomes 5 and 10, respectively, of *Saccharomyces cerevisiae* share a common ancestry. *J. Mol. Biol.* 233, 372-388.

Misteli, T., and Warren, G. (1994). COP-coated vesicles are involved in the mitotic fragmentation of Golgi stacks in a cell-free system. *J. Cell Biol.* 125, 269-82.

Munro, S. (1995). An investigation of the role of transmembrane domains in Golgi protein retention. *EMBO J.* 14, 4695-704.

Nagasu, T., Shimma, Y., Nakanishi, Y., Kuromitsu, J., Iwama, K., Nakayama, K., Suzuki, K., and Jigami, Y. (1992). Isolation of new temperature-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in mannose outer chain elongation. *Yeast* 8, 535-47.

Nakamura, N., Lowe, M., Levine, T. P., Rabouille, C., and Warren, G. (1997). The vesicle docking protein p115 binds GM130, a *cis*-Golgi matrix protein, in a mitotically regulated manner. *Cell* 89, 445-55.

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

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

Nilsson, T., Slusarewicz, P., Hoe, M. H., and Warren, G. (1993). Kin recognition. A model for the retention of Golgi enzymes. *FEBS Lett.* 330, 1-4.

Nilsson, T., Hoe, M. H., Slusarewicz, P., Rabouille, C., Watson, R., Hunte, F., Watzel, G., Berger, E. G., and Warren, G. (1994). Kin recognition between medial Golgi enzymes in HeLa cells. *EMBO J.* 13, 562-74.

Nothwehr, S. F., Roberts, C. J., and Stevens, T. H. (1993). Membrane protein retention in the yeast Golgi apparatus: dipeptidyl aminopeptidase A is retained by a cytoplasmic signal containing aromatic residues. *J. Cell Biol.* 121, 1197-209.

Odani, T., Shimma, Y., Tanaka, A., and Jigami, Y. (1996). Cloning and analysis of the *MNN4* gene required for phosphorylation of N-linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycobiology* 6, 805-10.

Payton, M. A., Rheinacker, M., Klig, L. S., DeTiani, M., and Bowden, E. (1991). A novel *Saccharomyces cerevisiae* secretory mutant possesses a thermolabile phosphomannose isomerase. *J. Bacteriol.* 173, 2006-10.

Pearson, W. R., and Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444-8.

Poster, J. B., and Dean, N. (1996). The yeast *VRG4* gene is required for normal Golgi functions and defines a new family of related genes. *J. Biol. Chem.* 271, 3837-45.

Ram, A. F. J., Wolters, A., Brekelmans, S. S. C., and Klis, F. M. (1994). A new approach for isolating cell wall mutants of *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to Calcofluor White. *Yeast* 10, 1019-1030.

Roberts, C. J., Nothwehr, S. F., and Stevens, T. H. (1992). Membrane protein sorting in the yeast secretory pathway: evidence that the vacuole may be the default compartment. *J. Cell Biol.* 119, 69-83.

Rudolph, H. K., Antebi, A., Fink, G. R., Buckley, C. M., Dorman, T. E., LeVitre, J., Davidow, L. S., Mao, J. I., and Moir, D. T. (1989). The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in *PMR1*, a member of a Ca<sup>2+</sup> ATPase family. *Cell* 58, 133-45.

Sato, M., Sato, K., and Nakano, A. (1996). Endoplasmic reticulum localization of Sec12p is achieved by two mechanisms: Rer1p-dependent retrieval that requires the transmembrane domain and Rer1p-independent retention that involves the cytoplasmic domain. *J. Cell Biol.* 134, 279-93.

Sato, K., Sato, M., and Nakano, A. (1997). Rer1p as common machinery for the endoplasmic reticulum localization of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9693-8.

Serrano, R., Kielland, B. M., and Fink, G. R. (1986). Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>), K<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *Nature* 319, 689-93.

Sikorski, R. S., and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.

Silberstein, S., and Gilmore, R. (1996). Biochemistry, molecular biology and genetics of the oligosaccharyltransferase. *FASEB J.* 10, 849-858.

Slusarewicz, P., Nilsson, T., Hui, N., Watson, R., and Warren, G. (1994). Isolation of a matrix that binds medial Golgi enzymes. *J. Cell Biol.* 124, 405-13.

Smith, D. J., Proudfoot, A., Friedli, L., Klig, L. S., Paravicini, G., and Payton, M. A. (1992). *PMI40*, an intron-containing gene required for early steps in yeast mannosylation. *Mol. Cell. Biol.* 12, 2924-3.

Strahl-Bolsinger, S., Immervoll, T., and Tanner, W. (1992). Protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and cloning of the dolichol-phosphate-D-mannose-protein. *Yeast* 8, S489.

Tajima, M., Nogi, Y., and Fukasawa, T. (1985). Primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* *GAL7* gene. *Yeast* 1, 67-77.

te Heesen, S., Knauer, R., Lehle, L., and Aebi, M. (1993). Yeast Wbp1p and Swp1p form a protein complex essential for oligosaccharyl transferase activity. *EMBO J.* 12, 279-84.

Townsley, F. M., and Pelham, H. R. (1994). The KKXX signal mediates retrieval of membrane proteins from the Golgi to the ER in yeast. *Eur. J. Cell Biol.* 64, 211-6.

Wang, X. H., Nakayama, K., Shimma, Y., Tanaka, A., and Jigami, Y. (1997). *MNN6*, a member of the *KRE2/MNT1* family, is the gene for mannosylphosphate transfer in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 272, 18117-24.

Weisz, O. A., Swift, A. M., and Machamer, C. E. (1993). Oligomerization of a membrane protein correlates with its retention in the Golgi complex. *J. Cell Biol.* 122, 1185-96.

Wilcox, C. A., Redding, K., Wright, R., and Fuller, R. S. (1992). Mutation of a tyrosine localization signal in the cytosolic tail of yeast Kex2 protease disrupts Golgi retention and results in default transport to the vacuole. *Mol. Biol. Cell* 3, 1353-71.

Yip, C. L., Welch, S. K., Klebl, F., Gilbert, T., Seidel, P., Grant, F. J., O'Hara, P. J., and MacKay, V. L. (1994). Cloning and analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* *MNN9* and *MNN1* genes required for complex glycosylation of secreted proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2723-7.

Zhang, L., al, H. A., Toivanen, P., and Skurnik, M. (1993). Genetic organization and sequence of the *rfb* gene cluster of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3: similarities to the dTDP-L-rhamnose biosynthesis pathway of *Salmonella* and to the bacterial polysaccharide transport systems. *Mol. Microbiol.* 9, 309-21.

Zimmer, T., Vogel, F., Ohta, A., Takagi, M., and Schunck, W. H. (1997). Protein quality--a determinant of the intracellular fate of membrane- bound cytochromes P450 in yeast. *DNA Cell Biol.* 16, 501-14.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり暖かいご指導、ご鞭撻を賜りました山崎眞狩教授、依田幸司教授に心より感謝いたします。

実際に実験の方法から姿勢まで丁寧にして辛抱強くご指導いただきました榊原明博士に心より感謝いたします。

抗体作製を行っていただいたエスエス製薬(株)橋公一博士、電子顕微鏡写真を撮っていただいた分子細胞生物学研究所平田愛子博士、プロテインシーケンスを行っていただいた理化学研究所千々松昌男博士に心より感謝いたします。

実際の実験に関しまして有益なご助言を頂きました北本勝ひこ教授、片岡宏誌助教授、野田陽一助手、有岡学助手、門倉博助手に心より感謝いたします。

*och1*、*mnn9*、*och3*変異株および遺伝子を御供与いただき且つ様々なご助言を頂きました通産省生命工学工業技術研究所 地神芳文博士に心より感謝いたします。

*anp1*破壊株及び遺伝子を御供与いただき且つ様々なご助言を頂きました醸造研究所下飯仁博士に心より感謝いたします。

pRSベクターおよび酵母ライブラリーを御分与いただき且つ様々なご助言を頂きました山本歩博士に心より感謝いたします。

本研究で用いた変異株およびプラスミドを御分与いただきました海外の研究者の皆様、心より感謝いたします。

共同研究者であり様々なご協力を頂きました川田剛士氏、小島英敏氏、阿部将人氏に心より感謝いたします。

最後になりましたが、公私にわたり様々なご指導、ご協力を頂きました本條秀子、石大賢両博士をはじめとする微生物学研究室の皆様、浦川到氏、高宮正也氏をはじめとする分子生命工学研究室の皆様、生物有機化学研究室永田晋治氏に心より感謝いたします。



inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak 2007 TM Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black

# Kodak Gray Scale



© Kodak 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

