

論文の内容の要旨

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

論文題目

酵母 *GAS1* 遺伝子の関与する細胞壁生成機構の研究

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞壁は細胞の最外層にあって、その形態を規定し、浸透圧変化など環境変化を緩衝する重要な役割を果たしている。この細胞壁はグルカン、キチンの糖ポリマーとマンナン蛋白質によって構成されている。グルカンは、直鎖状のポリマーで骨格となって細胞壁に剛性を与える β 1,3-グルカンと、それから分枝した β 1,6-グルカンとで構成されている。キチンは、出芽時に出芽部位において合成量が上昇するほかは、細胞壁全体に微量存在している。グルカン、キチンは骨格の強度を保つようにクロスリンクし、マンナン蛋白質はそのグルカン-キチンネットワークの隙間を埋めるように外側を覆い、細胞壁の透過性を制限している。

マンナン蛋白質は、細胞壁への結合様式によって PIR-CWP と GPI-CWP の 2 種類に分類されている。PIR-CWP が O-糖鎖を介してグルカンに直接結合するのに対し、GPI-CWP は GPI-アンカーによって細胞質膜に一時係留された後、GPI-アンカー内が切断され β 1,6-グルカンを介して細胞壁 β 1,3-グルカンに共有結合する。GPI-CWP の細胞壁への転移に関与する分子と機構は未だに明らかになっていないが、酵母細胞の生育に必須な過程であり、基礎研究の対象として非常に興味深い。また、人や家畜の真菌感染の際に、GPI-CWP が関与することが知られており、GPI-CWP の細胞壁転移機構は抗真菌剤の有効なターゲットとして、臨床の場においても解明が期待される。本

研究は、この GPI-CWP の細胞壁への転移に関与する分子と機構を明らかにすることを目的とした。

1. GAS1 遺伝子破壊と合成致死を示す変異株の単離

出芽酵母において *gas1* 破壊株では、 β 1,6-、 β 1,3-グルカンの付加した GPI-CWP が培地中に漏出する。そして野生株細胞壁には 1-2%しか存在しないキチンが、*gas1* 破壊株では 40%まで増加し、GPI-CWP は β 1,6-グルカンを介してこのフラクションにも共有結合するようになる。*gas1* 破壊株はまた、*KRE6* の破壊により合成致死を示す。*Kre6p* は β 1,6-グルカン合成酵素と考えられ、その破壊株では細胞壁の β 1,6-グルカン量が 50%まで減少する。そこで“*gas1 kre6* 二重破壊株の合成致死性は、 β 1,3-グルカンやキチンへの GPI-CWP の結合量の極度の減少による”という仮説をたてた。この仮説に基づけば、 β 1,6-グルカンへの GPI-CWP の転移に働く遺伝子の変異もまた *gas1* 破壊株と合成致死性を示すはずである。そのような遺伝子を取得することを目的とし、*gas1* 破壊株を用いた合成致死スクリーニングを行った。

1-1. *GAS1* 遺伝子破壊株を用いた合成致死スクリーニング

スクリーニングには、染色体の *gas1* 破壊遺伝子をプラスミド上の *GAS1* 遺伝子で相補しておき、このプラスミドの脱落が許されるか否かを検定する、古典的な *ade2 ade3* の系を用いた。EMS 処理した 10 万コロニーから、プラスミド脱落が許されない合成致死変異株 53 株を単離した。変異はいずれも劣性であった。また細胞壁 β 1,3-グルカンのアセンブリーを阻害する Congo red に 23 株が感受性を示し、細胞壁生合成に関係する遺伝子に変異が入っていることが示唆された。

1-2. 変異遺伝子の同定

gas1 破壊株は細胞壁に比較的重度の欠損を持つため、*ade2 ade3* の系では、変異を相補する遺伝子ライブラリプラスミドを選択することが困難であった。そこで、*Gas1p* の発現を *GAL* プロモーターで制御することで、相補活性をグルコース培地上のコロニーの生育で判断できるようにした。

取得した 53 株のうち、致死性が明らかな 14 株についてこの系をもちいてクローニングを行ない、9 株においてこれまでに合成致死性の報告のある *KRE6*、*BCK1* を含む 8 種類の変異遺伝子を同定した(Table1)。

1-3. 破壊株の作製と *gas1* 破壊との合成致死性

上記 8 変異遺伝子のうち、*CSG2* と同じステップで機能すると考えられている *SUR1*、

DFG5 のホモログである YKL046c を加えた、10 種類の遺伝子の破壊株を作製した（うち 2 株は購入した）。これらを *gas1* 破壊株とかけ合わせ、四分子解析を行ったところ、5 株で合成致死性が確認された。

1-4. 破壊株における細胞壁生合成の解析

取得した遺伝子の細胞壁合成への関与を検討するため、作製した破壊株を用いて細胞壁欠損時に特徴的な表現型の有無を観察した。1. Congo red に対する感受性、2. 細胞壁のグルカン由来のグルコース、マンナン蛋白質由来のマンノース、キチン由来のグルコサミンの 3 種の糖組成、3. 欠損をもつ細胞壁に対して機能する補償機構の一つである細胞壁蛋白質 Cwp1p の発現量増加、の 3 点について検討した。その結果、Congo red に対し 3 株が感受性を示した。また、グルコースに対するマンノースの割合(Man/Glc ratio)が野生株と比較して、高いものと低いものに分類することが出来た。ウェスタン解析により、6 株で Cwp1p の発現量増加が認められ、細胞壁に何らかの欠損を生じていることが示唆された。

2. *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

取得した遺伝子のうち、*KEX2* はゴルジ体に局在する di-basic な部位を認識するプロセシングプロテアーゼをコードしており、取得した変異 allele ばかりでなく遺伝子破壊も合成致死を示した。また、*kex2* 破壊株は Congo red 感受性であること、Cwp1p の発現量が増加していること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を詳細に解析した。

2-1. *KEX2* の細胞壁合成における役割

“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、以下の実験を行った。*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 Mkc7p は mono-basic な部位を認識する GPI-anchor 型 aspartyl protease である。そこで Mkc7p が *kex2* 破壊株の Congo red 感受性をサプレスするかどうか検討した。その結果、MKC7 はマルチコピーで *kex2* 破壊株の Congo red 感受性をサプレスした。これは、Kex2p が細胞壁合成に関与する基質分子をプロセシングしていることを強く示唆した。

2-2. Kex2p の細胞壁合成に関与する基質分子の探索

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-グルカンのどちらか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。その結果、*kex2* 破壊株は耐性を示し β 1,6-グルカン合成に欠損を生じている可能性が示唆された。*Kex2p* はゴルジ体に局在し、ここを通過する基質蛋白質のアミノ酸配列中、**KR** の C 末側を切断する。これらを考慮し、ゴルジ体以降に局在し、細胞壁 β 1,6-グルカン合成に関与すると考えられる分子について、*Kex2p* の基質であり、プロセッシングにより活性化される可能性を検討している。

Table 1. クローニングを行なった変異株と同定した変異遺伝子

Strain	Congo red sensitivity *1	Temperature sensitivity *2	Cloned gene	Synthetic lethality *3
287	r		<i>BIG1</i>	
509	s	ts & cs	<i>CSG2</i>	○
614	s		<i>BCK1</i>	○
725	r	cs	<i>DFG5</i>	
913	s	ts & cs	<i>KRE6</i>	○
995	s	ts	<i>WSC1</i>	○
			<i>MID2</i>	×
313	r	cs	<i>IPT1</i>	×
547	r		<i>IPT1</i>	×
1083	s	cs	<i>KEX2</i>	○
			<i>YKL046c</i>	
			<i>SUR1</i>	×

*1 r: resistant, s: sensitive

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

*3 ○: synthetic lethal, ×: not lethal