

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 14 年度博士課程進学  
氏名 今井 啓太  
指導教員名 依田 幸司

論文題目 小胞体膜タンパク質による酵母細胞壁構造の制御機構の解析

### はじめに

人類は微生物との共生の上に成り立っている。腸内においては腸内細菌が有害な細菌の繁殖を妨げる役割を果たし、酒・醤油などといった日本古来の発酵醸造技術も微生物の働きなしには成立しない。しかし、そのような有益な存在である微生物の中には、有害に働いてしまう菌も存在する。特に真菌類による感染症は対処に困難である。真核生物である真菌類に効く薬剤は人にも効いてしまうのがその理由である。そこで抗真菌剤のターゲットとしては、人には存在せず、かつ真菌類にとってその存在が生育に必須な因子を選ぶ必要がある。その一番の候補として考えられるのは細胞壁である。それ故、真菌類の細胞壁を理解することは非常に重要なことである。

本研究は出芽酵母の細胞壁構造の制御機構の解明を研究の最終目的としている。細胞壁はその強固な外見から「静的」な存在に思われがちだが、外的ストレスや細胞周期に応じてその構造を刻々と変化させる「動的」な存在である。そしてそのダイナミックな変化を引き起こす細胞壁の生合成の調節機構の詳細について十分な理解には未だ至っていない。本研究では、出芽酵母に Congo red 耐性を与える小胞体膜タンパク質 Rcr1 を通して細胞内オルガネラからの細胞壁の生合成の調節機構を解析した。

### 1. *RCR1* の取得

出芽酵母 *erd1* Δ株は、糖鎖修飾に欠陥を生じ、細胞壁のグルカン構造のアセンブリーを阻害する薬剤 Congo red に対して感受性を示す。*erd1* Δ株の Congo red 感受性を多コピー発現で抑制する遺伝子をスクリーニングした結果、機能未知の ORF、*YBR005w* が取得された。しかし、*YBR005w* の多コピー発現は *erd1* Δ株の他の表現型（糖鎖修飾不全、37℃温度感受性、Geneticin 感受性）に対する抑制効果はなかった。更には、野生株や様々な細胞壁変異でも *YBR005w* を多コピー発現させると Congo red により耐性になることが分かった。そこで *YBR005w* を *RCR1* (**r**esistance to **C**ongo **r**ed **1**) と名付けた。*RCR1* の多コピー発現はまた、出芽酵母を Calcofluor 耐性にもした。これらの結果と対応するように *rcr1* Δ株は Congo red や Calcofluor に対して感受性を示した。

### 2. *RCR1* にコードされるタンパク質の特徴

*RCR1* は 213 アミノ酸よりなる一回膜貫通型タンパク質をコードしており、酵母に保存されているタンパク質である。また出芽酵母には 46%の相同性を持つ *YDR003w* が存在する。我々はこれを *RCR2* と名付けた。*RCR2* の多コピー発現は Congo red 耐性効果はなく、遺伝子破壊は野生株や *rcr1* Δ株の Congo red 感受性を強める効果もなかった。そのため Congo red 耐性効果は *RCR1* 特異的であり、*RCR1/2* は生育に必須な役割は果たしていないと考えられる。また、間接蛍光抗体染色法及び遠心分画で調べた結果、Rcr1 は小胞体に局在することが分かった。これにより Rcr1 は Congo red に直接働くのではなく小胞体から間接的に細胞壁に影響し Congo red 耐性効果を与えていることが考えられる。Rcr1 はタイプ I 型の膜タンパク質で Congo red 耐性には膜貫通領域と C 末側の細胞質側領域がその機能に十分であった。このため Rcr1 は小胞体内腔ではなく細胞質側でその機能を果たすことが Congo red 耐性効果に必要であると考えられた。興味深いことに、Rcr2 の C 末側細胞質領域を Rcr1 の N 末から膜貫通領域までと結合したキメラタンパク質も Congo red 耐性効果を持っていた。C 末側細胞質側領域は Rcr1/2 間で相同性が高く、2つのタンパク質の間で共通の機能を有する可能性が考えられる。

### 3. Congo red 耐性は細胞壁のキチンと関係している

出芽酵母の細胞壁のどの構成成分が Congo red に最も感受性が高いかは詳細に解析されていない。そこで EUROSCARF の遺伝子破壊株の中で細胞壁合成に欠陥を持つ変異株約 200 株の Congo red 感受性と *RCR1* の多コピー発現による耐性効果を網羅的に調べた。その結果、大半の変異株は野生株よりも Congo red 感受性になり、そして *RCR1* の多コピー発現で Congo red 耐性を獲得した。

またグルカン合成 (*FKS1*、*ROM2*、*KRE6*)、N糖鎖修飾酵素 (*MNN9*、*MNN10*、*HOC1*、*ANP1*)、GPI アンカータンパク質 (*GAS1*) など細胞壁合成において重要な役割を果たす遺伝子の破壊株は Congo red に高感受性を示し、*RCR1* の多コピー発現でも Congo red 耐性にならなかった。一方、キチン合成酵素 III をコードする *CHS3* とそのレギュレーター (*CHS4~7*) の遺伝子破壊株は Congo red に耐性を示し、*RCR1* の多コピー発現をしてもそれ以上耐性にはならなかった。出芽酵母における細胞壁のキチンの 90%は Chs3 が合成する。それ故、細胞壁のキチン含量が減少することが Congo red 耐性に十分であることが考えられた。細胞壁成分を測定した結果、*RCR1* 多コピー発現株はアルカリ可溶なグルカンは野生株と比べて変化が見られないのに対してキチン含量が減少していることが分かった。また、Congo red に高感受性を示した *fks1*  $\Delta$  株などはキチン含量が野生株の 3~4 倍増加していた。一方、*rcr1*  $\Delta$  株は野生株と比較してキチン含量の増加していた。Calcofluor 染色で細胞壁のキチンを観察したところ、野生株では bud neck と scar が強く、そして lateral cell wall は弱いが一様に染色されていた。その一方で、*RCR1* 多コピー発現株では bud neck と scar の染色が観察されたが lateral cell wall の染色がなくなっていた。以上の結果から、Congo red のメインターゲットは細胞壁のキチンであると結論した。そしてこの結果は Rcr1 は小胞体膜上で細胞壁のキチン含量を調節するレギュレーターの役割を果たしているというきわめて興味深いものである (1)。

#### 4. Rcr1 との結合の解析

前述の結果から Rcr1 は Chs3 を調節する機能を持つことが考えられた。しかし Chs3 を始め Chs5、Chs7 などレギュレータータンパク質の局在・発現量は *RCR1* の多コピー発現しても際立った変化はみられない。また Rcr1 との結合は確認されず、直接結合による阻害効果も考えにくい。Chs3 のキチン合成活性は測定系の誤差範囲が大きく *RCR1* の効果に帰結するのが困難である。以上のことから、Rcr1 の分子の側面からキチン合成への影響を解析することにした。

免疫沈降により Rcr1 の結合タンパク質を探索した結果、小胞体の O 糖鎖修飾酵素 Pmt4、E3 ユビキチンリガーゼ Rsp5 を含む 3 つのタンパク質が共沈した。また、Congo red 耐性に必要な C 末側細胞質側領域をベイトにした two-hybrid スクリーニングからは *RSP5*、機能未知 ORF *YNL144c* の部分断片が取得された。*RSP5* と *YNL144c* の部分断片はまた、*RCR2* の同領域とも結合した。

更に、Pmt4 とは膜貫通領域で結合し Rsp5 の 3 つの WW ドメインを含む部分断片は Rcr1 の分子内に存在する 2 つの PXY 配列 (PPSY、PEY) を介して結合すること、*YNL144c* との結合には PPXY 配列が必須であることが分かっ

た。しかし、*pmt4* Δ株においても *RCR1* による耐性活性は失われないことや 2 つの PXY 配列を破壊した *RCR1* は耐性活性を持つことからこれらの結合は Congo red 耐性効果には関係がないと考えられる。また、Rcr1 の細胞質側領域と Rsp5 の部分断片との結合は Rcr1 の PEY 配列が必須で、PPSY 配列は結合をより強くする効果は持つが、単独では Rsp5 との結合は検出されなかった。この結果は PPXY を持つだけでは Rsp5 との結合に不十分であること示唆し、一方で Rcr1-Rsp5 の結合の特異性をより強調するものである。また、*RCR1* 多コピー発現株では膜局在する Rsp5 の割合が増加した。Rcr1/2 は、Rsp5 を小胞体膜へリクルートすることで Congo red 耐性とは別の役割をしているとも考えられる。特に Rcr1 は Pmt4 と結合することから、Pmt4 による O 糖鎖修飾の基質をユビキチン化するなどにも関わっているかもしれない。また、Ynl144c は 2 個の PPXY と 3 個の PXY 配列を持つ希有なタンパク質であった。Rcr1 の PPXY 配列が結合に必須なことから、PPXY を介した結合ネットワークが予想される。

#### まとめ

多コピー発現により出芽酵母に Congo red 耐性を与える *RCR1* の解析を通して、Congo red 耐性にはキチンが減少することが十分であることを確認する結果を得た。小胞体に局在するキチン合成のネガティブレギュレーターはこれまで発見されておらず、この結果はキチン合成の調節機構の新たな側面を切り開くものと捉えている。また Rcr1 は Pmt4、Rsp5 を始め様々なタンパク質との結合することが明らかとなり、これらの結合は Congo red 耐性とは別経路における小胞体における Rcr1/2 の役割を示唆している。

- (1) Imai, K., Noda, Y., Adachi, H., Yoda, K. (2005) A novel ER membrane protein Rcr1 regulates chitin deposition in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* (印刷中)