

## 論文の内容の要旨

論文の題目 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞壁形成に関わるタンパク質に関する研究  
氏名 北垣 浩志

酵母はその細胞の外側に強固な細胞壁を持っている。酵母細胞壁は酵母を外界の環境から守ると同時に、外界の情報を酵母細胞に伝えるインターフェースでもある。また醸造においても、酵母細胞壁は清酒酵母の高泡形成能やビール酵母の凝集性などに関与し、重要な役割を有している。本研究では、酵母の静置培養特異的細胞壁タンパク質として Tir1p/Srp1p を、定常培養期において主要な細胞壁タンパク質として Sed1p を同定し、Sed1p が定常培養期において溶解酵素に対する耐性に関与していることを明らかにした。また、*DCW1* 及び *DFG5* の遺伝子産物は GPI アンカー型膜タンパク質であり、芽の細胞壁の生合成に重要な役割を持つことを明らかにした。

### 1 静置培養特異的細胞壁タンパク質 Tir1p/Srp1p の同定と解析

静置培養した酵母の細胞壁グルカンから酵母溶解酵素である *Rarobacter faecitabidus* protease I 処理で遊離する 100-kDa のタンパク質を精製した。このタンパク質は、振盪培養した酵母からは見いだされなかった。このタンパク質のアミノ酸配列を決定したところ、*TIR1/SRP1* 遺伝子がコードするタンパク質であった。*TIR1/SRP1* はこれまでにグルコース、低温ショックあるいは嫌気培養で誘導される遺伝子として見つかっており、その産物は細胞壁タンパク質ではなく細胞膜タンパク質であると考えられてきた。しかしながら、Tir1p/Srp1p は  $\beta$ -1,3-グルカナーゼ処理によって細胞壁から溶出され、精製した Tir1p/Srp1p は  $\beta$ -1,6-グルカンに対する抗体と反応し、グルコースを含んでいた。これらのことから、Tir1p/Srp1p は静置培養された酵母における主要な細胞壁タンパク質のひとつであり、細胞壁に  $\beta$ -1,6-グルカンを通じて結合していることが示唆された。*TIR1/SRP1* mRNA は静置培養でのみ転写され、その転写は *ROX1* repressor により制御されていた。以上のことから、Tir1p/Srp1p は静置培養特異的細胞壁タンパク質であることが示された。

### 2 定常培養期の主要細胞壁タンパク質 Sed1p の同定と解析

上記と同様の方法により、振盪培養した酵母の細胞壁から 260-kDa の構造細胞壁タンパク質を精製した。アミノ酸配列の解析から、このタンパク質は *SEDI* 遺伝子の産物であることが明らかとなった。*SEDI* はこれまでに、分泌経路からの小胞体内腔のタンパク質の回収に欠陥を持つ *erd2* 変異のマルチコピーサプレッサーとして見出されている。Sed1p はセリンとスレオニンに富み、他の細胞壁タンパク質と同じようにグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカーを付加するための想定上のシグナル配列を含んでいる。しかしながら、他の細胞壁タンパク質とは異なり、Sed1p は6個のシステインと7個の想定上のN糖

鎖結合部位を含むことから、細胞壁タンパク質の新しいファミリーに属することが示唆された。エピトープタグを付加した Sed1p はイムノブロット解析で細胞壁の  $\beta$ -1, 3-グルカナーゼ抽出画分に見出されたことから、Sed1p はグルカナーゼで抽出可能な細胞壁タンパク質であると考えられた。SEDI mRNA の発現は定常培養期で増加し、それに付随して細胞壁の Sed1p 含量も増加していた。SEDI を破壊しても、対数増殖期の細胞には効果がなかったが、定常培養期の細胞は溶解酵素感受性になった。これらの結果は、Sed1p が定常培養期における主要な構造細胞壁タンパク質のひとつであり、定常培養期における溶解酵素に対する耐性に必要であることを示している。

### 3 細胞壁生合成に関与する DCW1 (*YKL046c*)と DFG5 の同定と解析

主要な酵母細胞壁タンパク質は GPI アンカータンパク質として合成され、細胞壁の  $\beta$ -1, 6-グルカンに転移することが知られている。この転移を糖転移反応であると仮定し、*Bacillus circulans* の  $\alpha$ -1, 6-mannanase をコードする遺伝子とホモロジーのある酵母の遺伝子をゲノムデータベースから検索したところ、DFG5 と *YKL046c* が見出された。これらの遺伝子は互いに相同であり、GPI アンカータンパク質に特徴的な構造を持っていた。DFG5 と *YKL046c* の単独破壊株は生育可能であったが、 $\Delta yk1046c$  は細胞壁溶解酵素に感受性を示し、細胞壁が弱くなっていたことから、この遺伝子が細胞壁の生合成に関与していることが示唆された。従って、*YKL046c* を DCW1 (Defective Cell Wall) と命名した。 $\Delta dcw1 \Delta dfg5$  は致死であったことから、両遺伝子産物の機能は重複しており、細胞の増殖のためには少なくともひとつは必要であると考えられた。両方の遺伝子産物が欠損した細胞では、細胞は大きく丸くなり、細胞壁のキチン含量が多くなり、主要な細胞壁タンパク質である Cwp1p を培地に分泌した。Dcw1p にエピトープタグを付加して解析したところ、Dcw1p は N 糖鎖を持った GPI アンカー型膜タンパク質であり、細胞表層を含む膜画分に局在していた。これらの結果から、Dcw1p と Dfg5p は GPI アンカー型膜タンパク質であり、細胞壁の通常の生合成に必要であることが示唆された。

### 4 温度感受性 *dcw1* 変異株の取得と解析

Dcw1p 及び Dfg5p の細胞壁生合成に関する機能をより詳細に解析するため、PCR でランダムに DCW1 に変異を導入し、プラスミドに組み込んだ後、 $\Delta dcw1 \Delta dfg5$  に形質転換して温度感受性変異株 DC61 を単離した。DC61 を 37°C で培養すると、ほとんどの細胞は母細胞の 20% 以下の断面積しか持たない小さな芽の状態を増殖を止めていた。この結果は、37°C で培養した DC61 は細胞周期のアレストを起こしていることを示唆していたため、DNA 含量を調べたところ、37°C で培養した DC61 では、1n DNA を持った細胞の割合が減少していたが、Spindle pole body (SPB) は分離していなかった。また、細胞を DAPI 染色したところ、単核であった。このことから、37°C で培養した DC61 は DNA 合成の後、SPB 分離の前で細胞周期を停止していると考えられた。これらの小さな芽の表層にはキチンが集積し、芽は溶解

を示したことから、芽の細胞壁が異常になっていると考えられた。また、*DCW1* mRNA は G1 期に、*DFG5* mRNA は S 期に、また両者とも対数増殖期に多く蓄積しており、芽の形成に重要な時期に発現すると考えられた。これらの結果から、Dcw1p と Dfg5p は、芽の細胞壁の生合成に重要な役割を持つことが示された。

## 5 結論

酵母溶解酵素である *Rarobacter faecitabidus* protease I 処理で細胞壁グルカンから遊離する 260-kDa と 100-kDa のタンパク質を精製した。アミノ酸配列を解析した結果、260-kDa のタンパク質の配列は Sed1p の配列と一致し、100-kDa のタンパク質の配列は Tir1p/Srp1p の配列と一致した。*TIR1/SRP1* 遺伝子は静置培養特異的に発現し、Tir1p/Srp1p は  $\beta$ -1,6-グルカンに結合していると考えられたことから、Tir1p/Srp1p は静置培養特異的な細胞壁タンパク質であると考えられた。一方、*SEDI* 遺伝子は定常培養期に多く発現し、Sed1p は細胞壁から  $\beta$ -1,3-グルカナーゼにより抽出できたことから、Sed1p は定常培養期の主要な細胞壁タンパク質であると考えられた。また、Sed1p は溶解酵素に対する耐性に関与していた。

*Bacillus circulans* の  $\alpha$ -1,6-mannanase をコードする遺伝子とホモロジーを持つ遺伝子として酵母ゲノムデータベースから見出した *DCW1* と *DFG5* について詳しく調べた。その結果、これらの遺伝子は互いに相同であり、両方破壊すると致死であった。 $\Delta dcw1$  は溶解酵素に対して感受性であり、 $\Delta dcw1 \Delta dfg5$  も細胞壁が弱くなった表現型を示したことから、これらの遺伝子は細胞壁の生合成に関与していると考えられた。*DCW1* にエピトープタグを付加して解析したところ、Dcw1p は N 糖鎖を持った GPI アンカー型膜タンパク質であり、膜を含む細胞表層に局在していた。Dcw1p 及び Dfg5p の細胞壁生合成における詳細な役割について解析するため、温度感受性の *dcw1* 変異株を作成したところ、37°C で培養した *dcw1<sup>ts</sup>* 株は異常な細胞壁を持った小さな芽の状態でも DNA 合成の後、SPB 分離の前で細胞周期を停止しており、細胞壁チェックポイントにより細胞周期を停止したと考えられた。事実、*DCW1* mRNA は G1 期に、*DFG5* mRNA は S 期に、また両者とも対数増殖期に多く蓄積しており、芽の形成に重要な時期に発現していた。このことから、Dcw1p 及び Dfg5p は芽の細胞壁の生合成に重要な役割を持つことが明らかとなった。