

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 18 年度博士課程 入学
氏 名 栗田 朋和
指導教員名 依田 幸司

論文題目 出芽酵母の細胞壁構成多糖 β -1,6-glucan 合成関連遺伝子の解析

出芽酵母の β -1,6-glucan は, glucose が約 350 残基, β -1,6 結合により繋がった細胞壁多糖である. 細胞壁の主要な多糖である β -1,3-glucan にキチンやマンナンタンパク質を共有結合で繋ぐ働きをもち, 細胞壁の形成に必須である. 抗体を用いた解析で β -1,6-glucan は細胞質膜の外側にしか検出されず, また芽の極性生長端で盛んに合成されると報告されている. β -1,6-glucan の合成酵素は未だに明らかにされておらず, 分子機構はおろか合成を行われている場所すらも良くわかっていない. β -1,6-glucan 合成に関する遺伝子は, β -1,6-glucan と結合する毒性タンパク質, K1 killer toxin に対する 耐性変異株から同定された. 現在までに多くの遺伝子産物が調べられたが, そのほとんどは小胞体(ER)から細胞質膜(PM)までの小胞輸送経路中に局在すると示唆されている. β -1,6-glucan 合成系における最大の問題は, PM の外側にしか β -1,6-glucan が検出されないにも拘らず, 変異により β -1,6-glucan が減少し且つ合成反応に関わりうるタンパク質が PM に発見されていない点にある. それ故, β -1,6-glucan 合成関連遺伝子産物の局在に関する正確な知見は, 非常に重要である.

本研究では、1章で β -1,6-glucan 合成酵素の最も有力な候補タンパク質である Kre6 が極性生長端に集積する新たに発見した局在について検討した。2章では β -1,6-glucan 合成に関わる ER の必須膜タンパク質 Keg1 について、Kre6 や Cne1 等との相互作用を中心に検討を行った。

1 章 Kre6 の極性生長端への集積に関する解析

KRE6 遺伝子破壊株は、K1 killer toxin に対する耐性、キチンに結合して生育を阻害する Calcofluor White (CFW) に対する高感受性、アルカリ不溶性 β -1,6-glucan の減少の形質を示す。このような表現型に加え C 末端側内腔領域には Family 16 glycosylhydrolase との相同性と UDP-glucose binding domain もある為、 β -1,6-glucan 合成酵素本体である可能性が高いと考えられている。しかし Kre6 の局在に関して、これまでに tag の種類や位置、発現量等によって、3種類もの異なる局在が議論された。そこでまず、抗 Kre6 抗体を取得して真の Kre6 の局在と機能を調べた。

取得できた抗 Kre6 を用いて間接蛍光観察すると、従来見られたことのない、芽や出芽予定部位に極性化した局在が見出された。蔗糖密度勾配遠心分画と免疫電子顕微鏡観察では、このような株でも、大部分の Kre6 は ER に存在し、より少量の Kre6 のみが PM や分泌小胞のような膜画分に局在すると考えられた。ER マーカー Lip1 との共染色により Kre6 が出芽予定部位や芽に移行するのは ER の移行より先行する事が分かった。芽の先端に極性化する PM のマーカー Snc1 と Kre6 を共染色すると、PM 上では局在が一致した。しかし、細胞質においては、Kre6 はより内側の膜画分にも局在していた。

次にこの新規な Kre6 の局在の生物学的な意味を検討した。Kre6 の N 末端の細胞質側は Kre6 の正しい局在に必要な領域と考えられる。そこで、Kre6 の N 末端をそれぞれ 137, 230, 280 アミノ酸残基削った変異 Kre6 タンパク質を作出し、変異タンパク質の局在とその株の細胞壁の検討を行った。 $\Delta 137kre6$ 株は間接蛍光観察により少数の細胞でとても弱い Kre6 の芽への局在が検出され、蔗糖密度勾配遠心分画では PM 領域に peak が検出されたが、K1 killer toxin に対して弱い耐性化が見られた。この結果より Kre6 が芽に強く極性化する局在は Kre6 の完全な活性化に必要と考えられた。 $\Delta 230$, $\Delta 248 kre6$ 株は、細胞内に弱い dot 状構造を検出するのみで、極性化した局在は全く失われ、蔗糖密度勾配遠心分画においても PM 領域の peak は検出されなかった。 $\Delta 230$, $\Delta 248$ 株は、K1 killer toxin に対し $\Delta kre6$ 株と同等の耐性と CFW 高感受性を示した。この結果より、N 末端 $\Delta 230$, $\Delta 248 kre6$ 変異タンパク質は、極性化する

局在能を失い、且つ Kre6 の本来の機能も完全に失っていると考えられた。以上の結果から、Kre6 の N 末端側の領域は ER からの搬出に必要であり、PM への極性局在が機能に必要なと考えられる。

2 章 Keg1 の機能についての解析

Yfr042w は ER の必須膜タンパク質で、error-prone PCR で作製した温度感受性変異株において CFW 高感受性、アルカリ不溶性 β -1,6-glucan の減少を示した。さらに Kre6 との結合が検出された為、*KEG1* (Kre6-binding ER protein responsible for β -1,6-Glucan synthesis 1)と命名した⁽¹⁾。

本研究においては、これまでERに局在すると考えていたKre6が芽に極性化した局在を持つことがわかった為、Keg1の局在、Kre6との結合について再検討を行った。その結果、GFP-Keg1は発現量を変えても常にERへの局在した。各種条件の蔗糖密度勾配遠心からもGFP-Keg1はER局在のパターンを示した。芽に極性化する局在を示すKre6-3HAとGFP-Keg1を発現する株を用いて再検討したところ、やはりKre6-3HAとGFP-Keg1の結合は認められた。

ここまでの結果からKre6はERに局在している時にKeg1と結合し、おそらくはKre6が機能を発揮するPMや分泌小胞に局在している時は、ERにのみに局在するKeg1とは結合していないと考えられた。

β -1,6-glucan は、細胞質膜の外側にしか検出されないにも関わらず、ER に局在する Keg1 の変異株において β -1,6-glucan が減少するのは、Kre6 を介した間接的な影響なのかも知れない。温度感受性変異 *keg1-1* 株において調べると、Kre6 の極性化局在が見られなくなった。このことから、Keg1 は Kre6 の局在に必要な因子であると考えられる。

Cne1はcalnexinと24%の相同性を示すI型膜タンパク質で、ERへの局在が報告されている。Cne1にもシャペロンとしての機能がある可能性があるが、出芽酵母における本来の役割やtargetはよくわかっていない。*keg1-1*と Δ *cne1*は二重変異株において合成生育遅延を示し、Cne1-3HAと6myc-Keg1は物理的な結合も示した。また、Cne1の破壊株において、Kre6の局在に影響が見られ、Cne1がKre6の折り畳みに関わる可能性が初めて示された。

総括

本研究では β -1,6-glucan 合成に関わるとされる遺伝子の中で初めて芽への極性化した局在を持つ遺伝子産物として Kre6 を同定し、この局在が Kre6 の機能に必要である事を示した。これまで、合成機構も合成の場所すらわからなかった、 β -1,6-glucan 合成に関して、少なくとも Kre6 が PM やその近傍の膜画分に輸送され、 β -1,6-glucan 合成に関わる反応を行う、という知見が得られた。

これまで ER のタンパク質の変異が、なぜ PM の外にある β -1,6-glucan に影響を与えるのか、全く不明であった。本研究において、少なくとも Keg1 と Cne1 の変異は、Kre6 の正しい局在に必要であるという事が示され、これら遺伝子の細胞壁への影響は Kre6 を介する可能性を示した。

(1) *Journal of Biological Chemistry* 2007, **282**(47) 34315–34324

「*KEG1/YFR042w* Encodes a Novel Kre6-binding Endoplasmic Reticulum Membrane Protein Responsible for β -1,6-Glucan Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*」

Nakamata,K., Kurita,T., Bhuiyan,S.M.A., Sato,K., Noda,Y., and Yoda,K.

(2) *Journal of Biological Chemistry* 2010, 投稿中

「Kre6 Protein Essential for Yeast Cell-Wall β -1,6-Glucan Synthesis Accumulates at Sites of Polarized Growth」

Kurita,T., Noda,Y., Takagi,T., Osumi,M., and Yoda,Y.