

小胞輸送に依存する細胞壁合成過程

依田 幸司

(東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻)

研究の目的

微生物の細胞は、強固な細胞壁を最外層に持つことで、さまざまな苛酷な環境に耐えて生育できることに特徴がある。真核微生物のカビや酵母も多糖とタンパク質からなる細胞壁をもつ。-1,3-グルカンとキチンは、細胞膜にある合成酵素によって前駆体から直ちに合成されるのに対し、マンナンタンパク質や-1,6-グルカンは、小胞体からゴルジ体を経る小胞輸送経路に依存して合成・成熟・局在化が行われ、その複雑な機構には明らかでないことが多い。本研究は、小胞輸送系オルガネラや細胞壁脆弱化変異株から新規なタンパク質を発見し、その特徴を明かにすることを目的とした。この成果から、カビ・酵母の代謝・増殖・細胞機能の深い理解とバイオテクノロジーへの広い応用が期待される。

材料と方法

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた。

細胞壁グルカンに結合し、正常なアセンブリを阻害するとされるコンゴレッドへの感受性を、多コピーで抑制する新規遺伝子 *RCR1* を見出した。また、細胞壁グルカンの成熟に関する細胞膜タンパク質 Gas1 と、分泌性タンパク質を輸送中にプロセッシングするゴルジ体酵素 Kex2 は、同時欠損により合成致死になることを見つけたが、更にこの致死性を多コピーで回復させる抑制遺伝子として、新規な *SKG1*, *SKG6* を発見した。これらの遺伝子産物をタグ標識し、免疫蛍光染色によって細胞内の局在を調べ、破壊株やキメラ体、多コピー保持株を作製して、詳細な特徴を調べた。相互作用するタンパク質の探索、遺伝子破壊や多コピー化した時に影響を受ける遺伝子の探索などを行い、これらのタンパク質の働きを調べた。

細胞を穏和に破壊し、膜タンパク質 Sed5 や Tlg2 をマーカーとして、ゴルジ体由来の小胞を免疫吸着し、初期や後期のゴルジ体コンパートメントを他の小胞から単離する技術を開発した。精製ゴルジ体小胞から、これを構成する膜タンパク質を分離し、MALDI TOF-MS を用いるマイクロペプチドマッピングで同定した。Svp, Gvp, Tvp と命名した新規タンパク質について、遺伝子破壊株やタグ標識タンパク質を作製して、小胞輸送系における相互作用や働きを調べた。

結果

Rcr1 タンパク質 多コピーでコンゴレッド耐性を与える *RCR1* の遺伝子産物は、小胞体に局在する膜タンパク質であった。遺伝子破壊株はコンゴレッドに対する感受性を増すことから、通常の野生型酵母でも、*RCR1* は細胞壁の構築に関与していると考えられる。コ

ンゴレド感受性の異なるさまざまな変異株に導入して調べたところ、多コピー *RCR1* の導入によって、グルカン量は変化しないのに対して、キチン量が顕著に低下することが明らかになった。このとき、キチン合成酵素の量や局在に変化は認められず、小胞体膜上に存在する Rcr1 が未知の機構で細胞膜上のキチン合成活性を制御するというきわめて興味深い事実が明らかになった。また本研究では、コンゴレドの主要作用点、酵母ではグルカンとされてきた通説は誤りで、かびと同様にキチンであることも明らかにした (Imai et al., 2005)。

Skg1 タンパク質と Skg6 タンパク質 酵母の細胞壁脆弱化をおこす *kex2Δ gas1Δ* 二重変異の合成致死性を回避できる抑制遺伝子を取得したところ、これまで解析例がない新規タンパク質 Skg1, Skg6 を発見した。これらをタグ標識して調べたところ、ともに典型的な膜貫通型タンパク質であり、免疫蛍光染色によって細胞内の局在を調べると、いずれも細胞の出芽部に向かって高濃度に存在することが明らかになった。遺伝子破壊は重篤な形質は示さず、これらの膜タンパク質は、細胞の極性成長に補助的に関っていると予想された (Tomishige et al., 2005a, 2005b)。

Svp26 タンパク質 酵母のゴルジ体は構成と機能の異なる複数のコンパートメントであることは知られていたが、各領域の蛋白質の構成は実際にこれまで調べられたことがなかった。本研究では、初めて初期・後期のゴルジ体コンパートメントの分離精製に成功した。各領域には、確かに特徴的な輸送関連タンパク質・糖鎖修飾酵素・グルカン合成関連タンパク質が局在した。そのなかには 6 種類の機能未知の膜タンパク質が見出された。初期ゴルジ体に局在する Svp26 と命名したタンパク質は、それ自体およびマンノース転移酵素 Ktr3 と結合する性質をもつ、膜貫通型タンパク質であった。この遺伝子の破壊株では、Ktr3 をはじめとするいくつかのゴルジ体膜タンパク質の局在場所が変化し、Ktr3 の多くは小胞体に認められた。更に、この株では *N*-糖タンパク質の糖鎖の長さが野生株よりも顕著に伸張するという興味深い現象も発見した。Svp26 は、初期ゴルジ体に局在し、他の膜タンパク質の細胞内輸送を管理するとともに、外糖鎖修飾をも調節していると考えられる (Inadome et al., 2005)。

結論

出芽酵母の遺伝学的・生化学的な解析によって、小胞体及びゴルジ体に局在する新規な膜タンパク質を発見し、それらが細胞壁のキチン含量、糖タンパク質構造、極性生長にとって重要な働きをしていることを明らかにすることができた。

文献

Imai, K., N., Noda, Y., Adachi, H. and Yoda, K. (2005) A novel ER membrane protein Rcr1 regulates chitin deposition in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., **280**, 8275-8284.

- Tomishige, N., Noda, Y., Adachi, H., Shimoi, H. and Yoda, K. (2005a) *SKG1*, a suppressor gene of synthetic lethality of *kex2Δ gas1Δ* mutations, encodes a novel membrane protein that affects cell wall composition. *Yeast*, **22**, 141-155
- Tomishige, N., Noda, Y., Adachi, H. and Yoda, K. (2005b) *SKG6*, a suppressor gene of synthetic lethality of *kex2Δ gas1Δ* mutations, encodes a novel membrane protein showing polarized intracellular localization. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **51**, in press.
- Inadome, H., Noda, Y., Adachi, H. and Yoda, K. (2005) Immunoisolation of the yeast Golgi subcompartments and characterization of a novel membrane protein, Svp26, discovered in the Sed5-containing compartments. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 7696-7710.