【解説】

出芽酵母細胞壁 β -1,6-グルカン合成の謎を解く

野田陽一，依田幸司

細菌のペプチドグリカンや真菌の β -1,3-グルカンのような細胞壁の必須成分は、私たち哺乳動物の細胞に存在しないため、病原菌に対して特異性が高い格好の標的であり、実際に β -ラクタムのような優れた治療薬が使われてきた。抗菌剤開発という実用的見地を離れても、細菌・真菌や植物の細胞にとって必須な細胞壁が、細胞増殖と調和していかに形成されるかは、基礎生物学的に興味深い問題である。これまで多くの研究がなされ、これからは各素材の合成酵素が、細胞骨格や小胞輸送で適切な部位にいかに配置されて働くかが中心の問題であろうが、ここに合成酵素の本体もいまだよくわからない細胞壁成分がある。本稿では、この酵母の β -1,6-グルカンについて解説する。

はじめに

細胞壁は、酵母にとっても、細胞本体を外からの物理的・化学的な攻撃から鎧のように守る役目を果たしているのは間違いない。しかし、貝殻のように、ひたすら内外を遮断しているのではなく、それを通して、栄養物は

積極的に取り入れ、廃棄物は外に捨てねばならず、浸透圧や栄養条件、あるいはフェロモンなど外界の情報を迅速に細胞内に伝達して遺伝子発現を適切に制御するインターフェイスの役目も欠かせない。しかも、細胞壁は細胞の生長と増殖に合わせて、絶え間なくリモデリング・調和した分解と合成—を続けねばならない。

酵母の乾燥重量の約20%を占める細胞壁は、マンノース (Man) により高度に修飾されたタンパク質 (マンナンタンパク質) がその50%、約1,500のグルコース (Glc) が β -1,3-結合で重合した β -1,3-グルカンが40%、150 ~ 350のGlcが β -1,6-結合で重合した β -1,6-グルカンが10%、約120のN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が β -1,4-結合で重合したキチンが1 ~ 3%を占めている。これらはすべて必須成分であり、どれが欠損した変異株も生きられない。成熟した細胞壁では、これらの成分が互いに共有結合で架橋し、あたかも全体が一つの高分子であるかのようにになっている^(1~3) (図1)。

各成分の作られ方はそれぞれ異なる。マンナンタンパク質は、リボソームで作られた分泌型ポリペプチドが小胞体に入り、マンノース (Man) を主とする糖鎖の伸長を伴ってゴルジ体を通り抜け、細胞外に到達するとい

Mysterious Mechanism of Synthesis of the Cell-Wall β -1,6-Glucan in *Saccharomyces cerevisiae*
Yoichi NODA, Koji YODA, 東京大学大学院農学生命科学研究科

図1 ■ 出芽酵母細胞壁の構造

出芽酵母細胞壁はグルカンに富む内とマンナンタンパク質に富む外の二層構造をもつ。構成高分子間には共有結合の連結がある。酵素や化学処理で連結部分を含む断片を単離して調べると、マンナンタンパク質のうち、GPI-CWPはGPI-アンカーのManと β -1,6-グルカンのGlcがつながり、PIR-CWPではグルタミンの δ -アミノ基と β -1,3-グルカンのGlcがつながっている。直鎖状の β -1,6-グルカンには平均5 Glcごとに β -1,3-グルカンの分岐があり、また還元末端にも β -1,3-グルカンがついているとされる。キチンは、 β -1,6-グルカンの β -1,3-Glc分岐や直鎖状 β -1,3-グルカン末端に結合し、それがグルカン全体をアルカリ不溶性にする。

う、通常の分泌糖タンパク質の小胞輸送系による（図2）。 β -1,3-グルカンとキチンは、細胞質膜に配置された合成酵素が、細胞質内の糖ヌクレオチド（UDP-GlcとUDP-GlcNAc）をそれぞれの材料として、糖鎖重合体を細胞外に生産することがわかっている。しかし、これらの架橋に重要な β -1,6-グルカンが、どのように合成されるか、謎が多く、まだよくわかっていないのである⁽¹⁾。以下に、謎とは何か、どこまでわかっていたか、最近に私たちが何を明らかにしたか、やさしく解説したい。

遺伝学的アプローチ

酵母が真核細胞のモデルとして突出する理由は、分子遺伝学的な理解と解析ツールの完成度の高さである。1倍体でも生きられるので劣性の遺伝子変異体を容易に選択でき、遺伝子操作のベクターもさまざまに開発され、染色体上の遺伝子を相同組換えで自在に加工できるなど、ほかのどの生物種より実験しやすい。 β -1,6-グルカン合成機構の解析も、カナダのHoward Busseyの研究室を中心に、変異株から精力的に進められた。

K1キラー酵母が分泌するK1キラータンパク質は、感受性酵母の細胞膜に穴を開けて殺すが、その際のリセプターとして β -1,6-グルカンが必要であるため、 β -1,6-グルカン含量が低下した変異株はK1キラー耐性になる。この形質を利用し、1990年代に多数の*kre* (K1-killer resistant) 変異株が分離され、 β -1,6-グルカン合成に必要な遺伝子が同定された。塩基配列から産物を予想すると、膜タンパク質らしきもの、分泌タンパク質らしきもの、細胞質タンパク質らしきものと、さまざまであった（表1）。抗体を調製したり、タグ標識したりして、細胞

内の局在を顕微鏡や細胞分画で調べると、実際に予想どおりさまざまな場所にあるタンパク質が β -1,6-グルカン合成にかかわっているのがあった（図2）。その後、酵母のポストゲノム解析で作られた約4,000株の遺伝子破壊株コレクションを調べると、さらに多数の遺伝子が β -1,6-グルカン量に間接的であろうが影響することもわかっている⁽⁴⁾。

β -1,3-グルカンやキチンの合成では、それぞれ Fks1, Fks2 や Chs1, Chs2, Chs3 のような膜タンパク質が主要な役割を果たしている。これらは、細胞質中の糖ヌクレオチドから多糖を合成して膜の外側に排出する触媒サブユニットと考えられる。 β -1,6-グルカン合成の第1の謎は、そのような複数回膜貫通型ポリペプチドである触媒サブユニットらしきものが見つけられないことである。

生化学的アプローチ

先に酵母細胞壁の各構成分子は共有結合でネットワーク化していると述べた。糖鎖高分子を分解するグリコシダーゼやその仲間には、低分子への分解のみでなく、2つの糖鎖を連結する反応を触媒するものがある。分泌型のBgl2やGPIアンカー型膜タンパク質のGas1などには糖鎖連結活性が認められるので⁽⁵⁾、鎖の伸長や架橋はこれらの酵素の働きによると考えられている。

マンナンタンパク質とグルカン鎖の間には、2つの連結様式が知られている。一つは、PIR-CWPと呼ばれる5種類のタンパク質に見られる、弱アルカリで切断される結合で、反復する保存されたアミノ酸配列中のグルタミン残基と β -1,3-グルカンが直接つなげられている⁽⁶⁾。もう一つは、GPI-CWPと呼ばれる約30種類のGPIアン

図2 ■ β -1,6-グルカン合成に働く遺伝子産物

これらは、細胞内小胞輸送経路のいろいろな場所に局在している。変異によって β -1,6-グルカン含量が大きく減少する遺伝子の産物は、 β -1,3-グルカン合成酵素 (GS) やキチン合成酵素 (CHS) が細胞質膜を貫通するサブユニットを主体とするのに対し、小胞体から細胞外に分泌されるものまで多様な場所に存在しており、個々の役割が不明である。

表1 ■ 代表的な関連遺伝子産物

名称	ポリペプチド部分の分子量	細胞内局在	活性と特徴など
Kre5	156 K	小胞体	グルコース転移酵素ホモログで、N末端にシグナル配列、C末端に小胞体駐在シグナルHDELあり。グルカン鎖を合成する可能性あり。
Cwh41	97 K	小胞体	グルコシダーゼI。N糖鎖末端のグルコースを切断する。N末端にシグナル配列。
Rot2	110 K	小胞体	グルコシダーゼII。N糖鎖の第2、第3のグルコースを切断する。N末端にシグナル配列。
Cne1	57 K	小胞体	カルネキシンのホモログ。
Keg1	24 K	小胞体	Kre6などと結合し、小胞体から細胞膜に移行させる生育に必須な膜タンパク質。
Rot1	29 K	小胞体	汎用のシャペロンタンパク質。N末端にシグナル配列、C末端に膜貫通配列をもつI型膜タンパク質。
Kre6	80 K	小胞体～細胞膜 (出芽部位)	膜貫通配列をもつII型膜タンパク質。グリコシダーゼモチーフをもち、糖鎖を切り継ぎ伸長する可能性あり。
Skn1	86 K	小胞体～細胞膜 (出芽部位)	Kre6のホモログで、Kre6との二重破壊は致死になる。
Kre2	51 K	ゴルジ体	膜貫通配列をもつII型膜タンパク質。O糖鎖への α -1,2-マンノース転移酵素。
Kre11	63 K	細胞質	小胞輸送にかかわるTRAPP IIのサブユニットの一つ。
Kre1	32 K	細胞膜	GPI-アンカータンパク質で細胞の外に露出する。
Kre9	30 K	細胞外分泌	N末端にシグナル配列をもち、O-糖鎖修飾が多い分泌型タンパク質。
Knhl	30 K	細胞外分泌	Kre9ホモログでKre9との二重破壊は致死になる。

カー型マンナンタンパク質で、C末端側のGPIアンカー中にあるマンノースが β -1,6-グルカンを介して β -1,3-グルカンと連結している⁽³⁾。この糖と糖の結合も、糖鎖架橋酵素が触媒すると想定されているが、実際にどの遺伝子産物が鎖の連結を行うか不明で、第2の謎である。

酵母細胞から調製した無細胞系で、 β -1,6-グルカンが合成できれば、酵素本体に迫ることができる。基質となるグルコース供与体として、ヌクレオチドUDPがついたUDP-Glcとポリプレノールの一種ドリコールがついたDol-P-Glcが考えられる。前者は生育に必須だが、後者は酵母では必須でない。唯一のDol-P-Glc合成酵素で

あるAlg5の遺伝子破壊株も、野生株と同じ β -1,6-グルカンを細胞壁にもっているの、 β -1,3-グルカンと同じく、 β -1,6-グルカンもUDP-Glcから作られる。

酵母膜画分とUDP-Glcをある条件下でインキュベートして、抗 β -1,6-グルカン抗体が反応する産物の *in vitro* 合成に成功したという報告がいくつかある^(7,8)。しかし、私たちも追試を試みたが成功していない。フランスの研究グループも、膜画分では β -1,3-グルカンばかりできるといい、その代わり、浸透圧ショックで細胞膜を傷つけ低分子物質を自由に透過できるように処理したプロトプラストなら、 β -1,6-グルカンをうまく合成できたと

報告している⁽⁹⁾。産物の構造解析と β -1,6-グルカンが減少する変異株のプロトプラストを用いると生成量が激減することも示された。この透過性細胞は、小胞輸送系の研究でもよく使われたように、細胞のなかの主要プロセスがまだ動いている。このことは、タンパク質が細胞内を移動し消費された化合物も再生するような生理のプロセスが β -1,6-グルカンの合成には必要であることを意味している。

細胞生物学的アプローチ

抗 β -1,6-グルカン抗体を使う免疫電子顕微鏡観察で、 β -1,6-グルカンの存在を示す金粒子は細胞壁にしか見つからない⁽¹⁰⁾。また、蛍光標識した抗体と非標識抗体を使って、新たに合成された β -1,6-グルカンを観察すると、出芽部分が光って見える⁽¹¹⁾。すなわち、 β -1,6-グルカンは出芽部位の細胞壁で主に作られる。ところが、その合成に必要な遺伝子産物がある場所は、小胞体、細胞質、細胞膜から、細胞外までであるので、いったいどこで何が起こっているか、第3の謎である。

小胞体中存在し β -1,6-グルカン合成にかかわるタンパク質には、ある特徴がある。それは、タンパク質のフォールディングや品質管理への関与が予想されることである⁽¹²⁾。Rot1はシャペロン活性が証明された小胞体膜タンパク質である⁽¹³⁾。Cwh41, Rot2, Kre5, Cne1は、哺乳類で糖タンパク質の品質管理機構として見いだされた、カルネキシン・サイクルを構成するタンパク質セットのホモログである⁽¹⁴⁾。糖タンパク質のN糖鎖は、小胞体内でDol-PP-GlcNAc₂Man₉Glc₃から糖鎖がアスパラギンに転移されることから始まる。転移後に3つのGlcは、一つ目がCwh41、あとの2つがRot2のグルコシダーゼ活性により除去されてから、ゴルジ体以降に輸送される。しかし、タンパク質の構造が正しくないと、Glc転移酵素(UDP-Glc: glycoprotein glucosyltransferase, Kre5がホモログ)が再びGlcをつけ、このGlcの存在を目印にシャペロンであるカルネキシン(Cne1がホモログ)が結合し、そのタンパク質が正しくフォールディングするまで小胞体内にとどめるのである。ただし、出芽酵母では、哺乳類や分裂酵母で同じサイクルが機能していることが証明できていない⁽¹⁵⁾。*kre5*変異株は極めて重篤な β -1,6-グルカン量低下を示すが、Kre5タンパク質が糖タンパク質にGlcを転移する活性をもつという報告もまだないのである。

Keg1の発見とKre6の局在の見直し

私たちは、小胞輸送系に存在する機能不明な必須膜タンパク質を調べるなかで、Keg1に注目した。Keg1は200アミノ酸の推定4回膜貫通タンパク質で小胞体に局在し(図2, 表1)、遺伝子破壊は致死で、網羅的な酵母2ハイブリッド探索から β -1,6-グルカン合成に必要なKre6と結合することだけがわかっていた。

Kre6は膜貫通配列を一つもち、N末端を細胞質に向けたII型膜タンパク質で、C末端側にはファミリー16グリコシダーゼに分類される配列があり、糖鎖の連結・伸長にかかわる可能性がある⁽¹⁰⁾。Kre6の変異は重篤な β -1,6-グルカン低下を示し、ホモログのSkn1との二重破壊は致死である。すなわちこれらは β -1,6-グルカン合成に必要な同じ働きをし、Kre6が主に機能している⁽¹⁶⁾。

温度感受性変異*keg1-1*株を取得して調べると、生育可能な低温でも β -1,6-グルカン量の低下が認められた⁽¹⁷⁾。膜を界面活性剤で溶かして免疫沈降すると、Keg1はKre6ともSkn1とも結合することが確認された。多コピーで温度感受性を回復する抑制遺伝子を探索すると、小胞体シャペロンのRot1が取得され、Cwh41, Rot2, Cne1の遺伝子破壊は*keg1-1*の温度感受性を重篤にするという遺伝子相関が見られた⁽¹⁸⁾。

このように役割不明ながらタンパク質の間のつながりがわかってくる間に、Kre6の局在にも変遷があった。Kre6はGFP標識タンパク質の観察から、ゴルジ体にあるとされていた⁽¹¹⁾。しかし、この報告は、1コピーでは

Kre6

図3 ■ 野生型出芽酵母におけるKre6の間接免疫染色

抗Kre6抗体によって染色すると出芽部位への局在を示す蛍光顕微鏡写真が得られる。

図4 ■ 私たちの作業仮説モデル

GPI-CWPには β -1,6-グルカン合成のプライマーになりうる糖鎖がタンパク質 *N* 糖鎖とGPIとにあるが、Kre5は小胞体内でGPIのManに β -1,6-Glcを付加する。 β -1,6-グルカン鎖がついたGPI-CWPは、Keg1, Cne1, Rot1などの関与でゴルジ体を経由し、Kre6とともに生長が盛んな出芽部分の細胞質膜に到達する。Kre6はKre1, Kre9などとともに短い β -1,6-グルカンを伸長させ、それに β -1,3-グルカンやキチンが結合されて細胞壁が作られる。

検出できないという理由で多コピー発現したKre6-GFPのデータであり、このタンパク質は私たちが調べてみると *kre6* 変異形質を元に戻す活性もなかった⁽¹⁷⁾。6myc エピトープで標識したKre6-6mycは不十分ながら活性があり、低コピーで免疫蛍光染色により小胞体にある像が得られた。小胞体膜タンパク質のKeg1と結合することから、一時はそう信じて報告した⁽¹⁷⁾。しかし、活性が不十分なのが気になって、染色体の *KRE6* 遺伝子の末端により小さな3HAタグをつけることで野生株同等の活性をもつKre6-3HAを観察したところ、なんと、小胞体ではなく出芽部位の細胞質膜が染色された。最終的には、Kre6のN末端84アミノ酸を抗原にして作製した抗体で野生型酵母を観察しても同じ結果を得た⁽¹⁹⁾ (図3)。Kre6は芽の膜に存在する。そこは β -1,6-グルカンが主に生成する場所である。

Kre6とSkn1は、細胞を壊して蔗糖密度勾配遠心で分画する実験では、小胞体画分と細胞質膜画分とに存在することが再現性をもって示される。しかし、免疫抗体染色法で細胞を見ると、いずれも出芽部分の細胞膜が強く染色され、小胞体の像は見られない^(18,19)。小胞体内のKre6やSkn1は抗体が接近できないようにほかの細胞成分でマスクされている可能性が考えられる。Kre6のN末端側の細胞質に面した部分は、小胞体からCOPII小胞に乗って運び出されるのに必要だが、この部分を削って小胞体から出にくくしていくと、 β -1,6-グルカン量が減少し、Kre6が芽に移行することが機能にも必要であることがわかった⁽¹⁹⁾。さらに *keg1-1* 変異株ではKre6が不安定で、ユビキチン系で分解されやすくなっていた⁽¹⁸⁾。免疫沈降で、Keg1はKre6ばかりでなく、Kre5やCne1と結合することが認められたが、*keg1-1* 変異体ではKre6との結合が検出されなくなった。さらに、*keg1-1* 変異体や *cne1* 破壊株では、Kre6やSkn1の出芽部位への存在も検出されなくなっていた⁽¹⁸⁾。

以上から、Kre6とSkn1は小胞体でKeg1その他のタンパク質とコンプレックスで存在し、その助けで一部が出芽部位の細胞膜に移行し、それが β -1,6-グルカン合成に必須であることまで明らかにできたのである。

おわりに

紙面が足りないので細かな議論は省き、Busseyらが考えたいくつかの可能性⁽²⁰⁾を発展させた、私たちの現在の作業仮説のみを記そう (図4)。抗 β -1,6-グルカン抗体で検出できないような短い鎖が、芽の細胞膜に到達したKre6により連結されて伸長する。その短い鎖は、おそらく小胞体で作られ始め、Kre6とともに芽に運ばれてくるだろう。第一三共でとられた β -1,6-グルカン合成阻害剤の標的がKre6であり、阻害剤処理すると細胞外タンパク質に結合した β -1,6-グルカンが減少すること⁽²¹⁾と関連する。小胞輸送を助けるTRAPPIIのサブユニットKre11がかかわるのは、これら細胞質中の中間体を細胞表層に輸送する必要があるからであろう。短い β -1,6-グルカン鎖を合成する酵素の最有力候補はGlc転移酵素ホモログのKre5である。短い鎖は、小胞体から細胞壁に輸送されてくるGPI-CWPのGPIを構成するMan残基につながっている可能性が高い。GPI-CWPにできた β -1,6-グルカンをつなぐのではなく、GPI-CWPのManをプライマーとして合成すると考えるのである。 β -1,3-グルカンやキチンとの連結も架橋酵素によるのではなく、 β -1,6-グルカンがそれらの合成のプライマーである可能性も否定できない。これらを明らかにするため私たちは変異株や無細胞系を駆使して解析を進めている。分泌されるKre9とKnh1や細胞膜タンパク質Kre1の機能が何かまだ予想すらできないが、近いうちその正体を明らかにできると思う。

文献

- 1) G. Lesage & H. Bussey: *Microb. Mol. Biol. Rev.*, **70**, 317 (2006).
- 2) R. Kollár, E. Petráková, G. Ashwell, P.W. Robbins & E. Cabib: *J. Biol. Chem.*, **270**, 1170 (1995).
- 3) R. Kollár, B. B. Reinhold, E. Petráková, H. J. Yeh, G. Ashwell, J. Drgonová, J. C. Kapteyn, F. M. Klis & E. Cabib: *J. Biol. Chem.*, **272**, 17762 (1997).
- 4) N. Pagé, M. Gérard-Vincent, P. Ménard, M. Beaulieu, M. Azuma, G. J. Dijkgraaf, H. Li, J. Marcoux, T. Nguyen, T. Dowse *et al.*: *Genetics*, **163**, 875 (2003).
- 5) I. Mouyna, T. Fontaine, M. Vai, M. Monod, W. A. Fonzi, M. Diaquin, L. Popolo, R. P. Hartland & J.-P. Latgé: *J. Biol. Chem.*, **275**, 14882 (2000).
- 6) M. Ecker, R. Deutzmann, L. Lehle, V. Mersa & W. Tanner: *J. Biol. Chem.*, **281**, 11523 (2006).
- 7) E. López-Romero & J. Ruiz-Herrera: *Biochim. Biophys. Acta*, **500**, 372 (1977).
- 8) E. Vink, R. J. Rodriguez-Suarez, M. Gérard-Vincent, J. C. Ribas, H. de Nobel, H. van den Ende, A. Durán, F. M. Klis & H. Bussey: *Yeast*, **21**, 1121 (2004).
- 9) V. Aïmanianda, C. C. Clavard, C. Simenel, T. Fontaine, M. Delepierre & J.-P. Latgé: *J. Biol. Chem.*, **284**, 13401 (2009).
- 10) R. C. Montijn, E. Vink, W. H. Müller, A. J. Verkleij, H. Van den Ende, B. Henrissat & F. M. Klis: *J. Bacteriol.*, **181**, 7414 (1999).
- 11) H. Li, N. Pagé & H. Bussey: *Yeast*, **19**, 1097 (2002).
- 12) G. Z. Lederkremer: *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **19**, 515 (2009).
- 13) M. Takeuchi, Y. Kimata & K. Kohno: *Mol. Biol. Cell*, **19**, 3514 (2008).
- 14) M. Aebi, R. Bernasconi, S. Clerc & M. Molinari: *Trends. Biochem. Sci.*, **35**, 74 (2010).
- 15) F. S. Fernández, S. E. Trombetta, U. Hellman & A. J. Parodi: *J. Biol. Chem.*, **269**, 30701 (1994).
- 16) T. Roemer, S. Delaney & H. Bussey: *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 4039 (1993).
- 17) K. Nakamata, T. Kurita, M. S. A. Bhuiyan, K. Sato, Y. Noda & K. Yoda: *J. Biol. Chem.*, **282**, 34315 (2007).
- 18) T. Kurita, Y. Noda & K. Yoda: *J. Biol. Chem.*, **287**, 17415 (2012).
- 19) T. Kurita, Y. Noda, T. Takagi, M. Osumi & K. Yoda: *J. Biol. Chem.*, **286**, 7429 (2011).
- 20) S. Shahinian & H. Bussey: *Mol. Microbiol.*, **35**, 477 (2000).
- 21) A. Kitamura, K. Someya, M. Hata, R. Nakajima & M. Takemura: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53**, 670 (2009).

プロフィール

野田 陽一 (Yoichi NODA)

＜略歴＞1989年東京大学農学部農芸化学科卒業／1994年同大学農学系大学院農芸化学専攻博士課程修了／1994年日本学術振興会特別研究員／1996年東京大学大学院農学生命科学研究科助手／2007年同助教、現在に至る＜研究テーマと抱負＞出芽酵母における細胞内小胞輸送の研究。細胞を構成する成分がオルガネラに局在化する機構に関することには何でも興味があります＜趣味＞料理

依田 幸司 (Koji YODA)

＜略歴＞1974年東京大学農学部農芸化学科卒業／1976年同大学大学院農学系研究科修士課程修了／1979年同博士課程修了（農博）／1981年東京大学農学部助手／1991年同助教／1994年同大学大学院農学生命科学研究科教授、現在に至る＜研究テーマと抱負＞有用微生物の細胞機能に関する分子遺伝生化学的研究。現在は、出芽酵母の小胞体から細胞壁まで、それぞれの成り立ちの謎を解きたい＜趣味＞中古CD漁盤と日常画像の記録