Galactose-Specific Recognition System in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* におけるガラクトース特異的な認識システム

Matsuzawa, Tomohiko; Ohashi, Takao; Nakase, Mai; Yoritsune, Ken-ichi; and Takegawa, Kaoru

Department of Bioscience & Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu University,

Hakozaki 6-10-1, Fukuoka 812-8581, Japan

FAX: 81-92-642-2849, E-mail: takegawa@agr.kyushu-u.ac.jp

(Received on January 24, 2012, accepted on February 8, 2012)

Key Words: fission yeast, galactosylation, flocculin, galactosyltransferase, invasive growth

Abstract

In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, galactose residues are transferred to *N*- and *O*-linked oligosaccharides of glycoproteins by galactosyltransferases in the lumen of the Golgi apparatus. Although galactose residues are not essential for growth of *S. pombe*, the galactosylation of protein is required for maintenance of normal cell shape, sexual agglutination, and tolerance toward various drugs. Cell surface glycoproteins play a key role in flocculation and filamentous invasive growth in yeasts. We identified fission yeast *gsf2*⁺, encoding a flocculin that binds to galactose residues located on cell surface glycoconjugates. Flocculation and invasive growth of *S. pombe* is tightly controlled by *gsf2*⁺ expression. Furthermore, pyruvylation of galactose residues negatively regulates flocculation by capping galactose residues in *N*-linked galactomannan. *S. pombe* appears to have a unique galactose-specific recognition system in which Gsf2p/flocculin plays an essential role in mediating cell-cell interactions.

要 約

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* では、ゴルジ体内腔でガラクトース転移酵素により糖タンパク質の *N*- および *O*-結合型糖鎖にガラクトース残基が転移される。ガラクトース残基は分裂酵母の生育には必須ではないが、タンパク質へのガラクトシル化は細胞形態の維持、性的凝集や各種薬剤に対する抵抗性に重要である。酵母において細胞表層の糖タンパク質は凝集や菌糸状の侵入性増殖に重要な役割を果たす。我々は分裂酵母の *gsf2*⁺ 遺伝子が細胞表層複合糖質のガラクトース残基と結合する凝集素をコードしていることを見いだした。分裂酵母の非性的凝集や侵入性増殖は *gsf2*⁺ 遺伝子の発現により厳密にコントロールされている。またガラクトース残基のピルビン酸の付加は *N*-結合型のガラクトマンナンにガラクトース残基を覆うことにより負に制御している。このように分裂酵母はガラクトースを特異的に認識するシステムを有しており、Gsf2/凝集素タンパクが細胞間相互作用を成立させるために必須の役割を果たしていることがわかった。

A. Introduction

The fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* is a well-characterized yeast species and shares greater similarity to higher animals than the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* in terms of splicing mechanisms, cell division control, transcription-initiation mechanisms and post-translational modifications. *S. pombe* was the sixth eukaryotic organism to have its genome fully sequenced (1). Initially, *S. pombe* was considered to be similar to the budding baker's yeast, *Saccharomyces* species, and to differ from it only in that it proliferates by fission. Over time, however, it has been revealed that *S. pombe* shares other features of higher organisms (2). Therefore, *S. pombe* has now become an attractive host for the expression of complex molecules, including glycosylated proteins derived from higher animals.

Glycosylation is a major covalent modification

A. はじめに

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は最も研究の進んでいる酵母の1つであり、mRNAのスプライシング機構、細胞分裂制御機構、転写開始機構や翻訳後の修飾機構などが出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* よりも高等動物と多くの類似点を有している。分裂酵母は真核生物において6番目に全ゲノム塩基配列が明らかになった(1)。研究の初期において *S. pombe* は細胞が分裂して伸長するという点のみがパン酵母などの *Saccharomyces* 属と異なっており、他は類似していると考えられていた。しかし長い年月を経て *S. pombe* が高等生物と共通点を持っていることがわかってきた(2)。そのため、分裂酵母は今や高等動物由来の糖タンパク質などの複雑な分子を発現させる魅力的な宿主と考えられるようになった。

グリコシレーションは真核生物において分泌・膜タンパク

that modulates the structure and function of secretory and membrane proteins in eukaryotes. In the case of producing glycoproteins, especially for human therapeutic use, precise structural information on the oligosaccharide portion of the glycoprotein is extremely important. However, the oligosaccharide structures of yeasts, including *S. pombe*, differ significantly from those of mammalian cells and humans, which has compromised their therapeutic utility. The difference between yeast and mammalian glycan structures of glycoproteins is a major problem for using yeasts as production hosts. The glycoproteins of *S. pombe* contain a large amount of galactose in addition to mannose (3), indicating that *S. pombe* is equipped with mechanisms for the galactosylation of glycoprotein like animal cells. Therefore, determining the safety and efficacy of fission yeast-derived glycoproteins will first require determining their exact structures and any undesirable effects that the *S. pombe* glycans may cause in humans.

Galactosylation, which occurs in the Golgi apparatus, is one of the unique characteristics of glycoprotein synthesis in *S. pombe*. Generally ascomycetous yeast species like *S. cerevisiae* do not produce galactose-containing glycans. Although some basidiomycetous yeasts have been reported to contain Gal residues by monosaccharide composition analysis, their detailed overall glycan structures remain unknown. Furthermore, galactosylation is also rarely found in invertebrates and plants. Protein galactosylation seems to play a role in cell-cell recognition. In mammalian cells, Gal residues are used as a recognition saccharide, as in antigenic ABO blood group structures and blood-streaming glycoproteins recognized by the asialoglycoprotein receptor. These Gal recognition mechanisms have not been described in lower eukaryotes, and thus, the study of galactose function in *S. pombe* galactoproteins is intriguing.

In the present review, we discuss current understanding of the biosynthetic pathway and physiological role of galactose-containing oligosaccharides in fission yeast. We also discuss the possible functions of a galactose-specific recognition system in this species.

B. Glycosylation in Fission Yeast

B-1. N-Linked Glycosylation

N-Glycosylation is widely conserved from yeasts to humans, especially the early step that takes place in the endoplasmic reticulum (ER). N-Glycosylation begins with the assembly of a precursor, dolichol pyrophosphate-linked $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ glycan ($\text{Dol-PP-Man}_5\text{GlcNAc}_2$) at the cytoplasmic face of the ER (4). The precursor is then flip-flopped into the lumen of the ER by a process that is not well understood in *S. pombe*. Assembly of Dol-PP-glycan is completed by the addition of four mannose and three glucose

質の構造や機能を調節するための主要な共有結合修飾である。とりわけヒトへの治療用途を目的としてタンパク質を生産する場合には、糖タンパク質糖鎖部分の正確な構造に関する情報がとりわけ重要である。しかしながら分裂酵母を含む酵母の糖鎖構造は哺乳類やヒトのものと大きく異なっており、このことが治療用としての有効性を難しくしている。そのため酵母と哺乳類の糖タンパク質糖鎖構造の違いは生産用宿主として最も大きな問題である。分裂酵母の糖タンパク質には非常に多量のマンノースの他にガラクトースが含まれていることから(3)、分裂酵母は哺乳類と同様にタンパク質へのガラクトース付加の能力が備わっている。そのため、分裂酵母由来の糖タンパク質の安全性や効能を決定するために、正確な構造決定を行うこと、また分裂酵母の糖鎖がヒトにおいて引き起こす可能性のある好ましくない効果について調べることは最も必要である。

ゴルジ体内腔で起こるガラクトシル化は分裂酵母における糖タンパク質の合成において最もユニークな特徴の一つである。一般的に *S. cerevisiae* のような子囊菌類はガラクトース含有糖鎖を合成しない。いくつかの担子菌類は単糖組成分析によりガラクトース残基が含まれていることは報告されているが、その詳細な糖鎖構造については不明である。さらにガラクトシル化は無脊椎動物や植物においてもまれである。タンパク質のガラクトシル化は細胞間認識機構において重要な役割を果たすと考えられている。哺乳動物細胞において抗原決定基として ABO 血液型や、アシアロ糖タンパクレセプターにより認識される血液中の糖タンパク質において、ガラクトースは認識糖として利用される。このようなガラクトース認識機構は下等な真核生物において報告がなく、分裂酵母におけるガラクトース含有糖タンパク質のガラクトース残基の機能は大変興味深い。

本総説では、分裂酵母におけるガラクトース含有糖鎖の生合成経路と生理的な機能について紹介する。また分裂酵母におけるガラクトース特異的な認識システムの機能についても議論したい。

B. 分裂酵母の糖鎖付加機構

B-1. N-結合型糖鎖生合成

N-結合型糖鎖生合成の初期段階は粗面小胞体 (ER) で起こり、酵母からヒトまで広く保存されている。N-結合型糖鎖生合成は ER 膜の細胞質側においてドリコール結合型糖鎖 (ドリコールニリン酸 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$) の合成から始まる。合成されたドリコールニリン酸 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ は ER 膜の細胞質側から内腔側へ転移されるが、その過程は分裂酵母では良く分かっていない。ER 内腔へ転移されたドリコールニリン酸 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 糖鎖は ER に局在する種々の糖転移酵素によっ

residues by ER-localized glycosyltransferases to generate Dol-PP-Glc₃Man₉GlcNAc₂. After covalent attachment to asparagine residues in Asn-X-Ser/Thr sequons (where the X is any amino acid other than proline) of nascent polypeptides in an en bloc manner by an oligosaccharyltransferase complex, one α1,2-Glc, two α1,3-Glc and one α1,2-Man residues are removed by glucosidase I and II, and ER α-mannosidase I, respectively (4). *S. pombe* seems to lack the ER α-mannosidase I activity that generates Man₈GlcNAc₂ glycan, although the encoding gene has been identified (5). The resulting Man₈GlcNAc₂ for organisms other than *S. pombe* and Man₉GlcNAc₂-containing glycoproteins for *S. pombe* are then transported into the Golgi apparatus where *N*-glycan processing differs significantly between yeasts and humans.

S. pombe glycoproteins contain a large outer chain of *N*-linked oligosaccharides, known as the ‘galactomannan outer chain’, comprising an α1,6-linked D-mannose backbone decorated with α1,2-linked D-galactose residues (6,7) and pyruvylated β1,3-linked D-galactose residues (8–10). By contrast, the elongated form in the budding yeast *S. cerevisiae* is known as mannan, and consists exclusively of mannose residues (11). These outer-chain structures are characteristic of these yeast species and differ from structures in higher eukaryotes. The *S. pombe och1* mutant does not synthesize the outer chains on secreted acid phosphatase. (The *och1*⁺ gene is a functional homolog of *S. cerevisiae OCH1* encoding α1,6-mannosyltransferase.) This indicates that *S. pombe* Och1p/mannosyltransferase is a key enzyme in the elongation of the outer chain (12). Recently, *N*-linked oligosaccharide structures in a *S. pombe och1Δ* mutant were determined (13). *N*-linked oligosaccharides had galactosylated core structures and were quite different from those in *och1Δ* mutants of other yeast species, which have no galactose residues. The core oligosaccharide structures of wild-type *S. pombe* strains were also partially analyzed and were found to comprise either α1,2-mannosylated or α1,2- or α1,3- galactosylated Man₉GlcNAc₂ (nonamannosyl-*N*-acetylglucosamine), containing a terminal α1,6-linked mannose residue. Thus, the non-reducing ends of *N*-linked oligosaccharides from *S. pombe och1Δ* mutant cells are α-galactosylated (14).

B-2. O-Linked glycosylation

Unlike *N*-glycosylation, several types of *O*-glycosylation occur on the hydroxy amino acids Ser, Thr, hydroxyproline, hydroxylysine and tyrosine in proteins of many organisms, to generate *O*-GalNAc, *O*-Man, *O*-fucose, *O*-xylose, *O*-Glc, *O*-GlcNAc, *O*-Gal, and *O*-arabinofuranose glycans (15). Yeasts synthesize only *O*-Man type glycans, consisting of Man₁₋₅ structures in *S. cerevisiae* and Gal₀₋₂Man₁₋₃ structures in *S. pombe* (16). The terminal and penultimate Man residues are linked via α1,3-linkages in *S. cerevisiae* while the terminal Gal residues are linked via α1,2- and/or α1,3-

て4つのマンノースと3つのグルコースの付加を受け、ドリコール二リン酸 Glc₃Man₉GlcNAc₂ 糖鎖が生合成され、さらに新生ポリペプチド鎖中の Asn-X-Ser/Thr 配列 (X はプロリン以外のアミノ酸) 内のアスパラギン残基にオリゴ糖転移酵素複合体によってひとまとめに転移される (4)。転移された Glc₃Man₉GlcNAc₂ 糖鎖からはそれぞれ ER グルコシダーゼ I、ER グルコシダーゼ II および ER マンノシダーゼ I によって1残基の α1,2- グルコース、2残基の α1,3- グルコースおよび1残基の α1,2- マンノースがトリミングを受ける (4)。分裂酵母においても、ER マンノシダーゼ I の遺伝子は同定されているが、Man₈GlcNAc₂ 糖鎖を生成する活性は欠失しているようである (5)。分裂酵母以外で生成した Man₈GlcNAc₂ 糖鎖および分裂酵母で生成した Man₉GlcNAc₂ 糖鎖が付加した糖タンパク質はゴルジ体へと輸送され、ゴルジ体以降では酵母とヒトでは異なった糖鎖生合成が行われる。

分裂酵母の糖タンパク質はガラクトマンナンと呼ばれる巨大な糖外鎖を有した *N*-結合型糖鎖 (8-10) が付加され、ガラクトマンナンは α1,2- ガラクトース (6, 7) やピルビン酸化 β1,3- ガラクトースの側鎖を有した α1,6- マンノース主鎖から構成されている。一方、出芽酵母ではマンナンと呼ばれる糖外鎖を有し、主にマンノースから構成されている (11)。これらの糖外鎖を含む糖鎖は酵母とその近縁種に特異的であり、高等真核生物の糖鎖構造とは大きく異なっている。分裂酵母 *och1* 変異体では分泌タンパク質である酸性ホスファターゼの糖外鎖の付加が起こっておらずコア糖鎖からのみ構成されていた。この結果は、分裂酵母 Och1 タンパク質／α1,6- マンノース転移酵素は出芽酵母 Och1 タンパク質と機能的に類似していること、分裂酵母においても糖外鎖生合成の鍵酵素であることを意味している (12)。最近、分裂酵母 *och1* 破壊株の *N*-結合型糖鎖の構造解析が行われ、高度に α1,2- および α1,3- ガラクトース修飾を受けた Man₉GlcNAc₂ 糖鎖であること、またその構造はガラクトース修飾を受けていない他の酵母の *och1* 破壊株の糖鎖構造とは大きく異なることが明らかとなった (13)。また、野生株のコア糖鎖の構造についても一部解析されており、α1,2- および α1,6- マンノース、α1,2- および α1,3- ガラクトース修飾を受けた構造であることが明らかとなっている。以上の結果より、分裂酵母 *och1* 変異体の *N*-結合型糖鎖の非還元末端は α- ガラクトース修飾を受けていることが分かった (14)。

B-2. O-結合型糖鎖生合成

N-結合型糖鎖とは異なり、*O*-結合型糖鎖付加は様々な生物種のタンパク質中のセリン、スレオニン、ヒドロキシプロリン、ヒドロキシリジン、チロシンに起こり、*O*-*N*-アセチルガラクトサミン、*O*-マンノース、*O*-フコース、*O*-キシロース、*O*-グルコース、*O*-*N*-アセチルグルコサミン、*O*-ガラクトースおよび *O*-アラビノフラノースなど様々な単糖が付加する (15)。酵母では *O*-マンノシル化のみが起こり、出芽酵母では Man₁₋₅ 糖鎖、分裂酵母では Gal₀₋₂Man₁₋₃ 糖鎖で構成されてい

linkages in *S. pombe*. The core Man backbone is linked via α 1,2-linkages in both species.

In *S. cerevisiae*, synthesis of *O*-linked oligosaccharides is initiated in the lumen of the ER by an essential family of protein *O*-mannosyltransferases (PMTs), namely Pmt1–Pmt7p. These enzymes catalyze the transfer of mannose from Dol-P-Man (dolichol phosphate-activated mannose) to specific serine or threonine residues (17, 18). It has been reported that the PMT family consists of three subfamilies: *PMT1*, *PMT2* and *PMT4*. Members of the *PMT1* subfamily interact in pairs with members of the *PMT2* subfamily, whereas the *PMT4* subfamily forms homomeric complexes (18). Addition of the first mannose residue to a serine or threonine residue is not only important for cell function in *S. cerevisiae* and in *S. pombe* (19, 20), but also in mammals (21–23). Therefore, the initiation of protein *O*-mannosylation by the PMT family appears to be highly conserved from yeasts to multicellular eukaryotes (18, 24). Current biochemical and genetic studies indicate that *S. cerevisiae* *O*-linked oligosaccharides have a linear structure, Man_{1–5}-Ser or Man_{1–5}-Thr, in which the second and third mannose residues are elongated by the mannosyltransferases Kre2p, Ktr1p and Ktr3p (25), whereas the fourth and fifth mannose residues are elongated by the mannosyltransferases Mnn1p, Mnt2p and Mnt3p (26). In contrast, *S. pombe* *O*-linked oligosaccharides have one or two galactose residues that can be attached to the α 1,2-linked mannose backbone, giving rise to a branched Gal_{0–2}Man_{1–3}-Ser (or -Thr) structure (27). A major galactosyltransferase in *S. pombe* has been purified (28) and the corresponding gene was cloned and identified as *gma12*⁺ (29). The fission-yeast genome contains seven galactosyltransferase gene homologues, including *gma12*⁺ and *gmh1*⁺–*gmh6*⁺ (29,30). *Gma12p* has been shown to be responsible for the galactosylation of *O*-linked oligosaccharides (30). In contrast, the α 1,2-mannosyltransferase involved in the synthesis and processing of *S. pombe* *O*-linked oligosaccharides has not been well characterized.

Recently we identified six *S. pombe* α 1,2-mannosyltransferase gene homologues, namely *omh1*⁺–*omh6*⁺. The encoded enzymes contain a C-terminal catalytic domain known to be conserved in the *S. cerevisiae* KTR mannosyltransferase family (31). Furthermore, we determined that *omh1*⁺ encodes the putative α -mannosyltransferase responsible for elongation of *O*-linked oligosaccharides (31). *O*-linked oligosaccharides from wild-type cells contain a significant amount of disaccharides, but also tetrasaccharides. The HPLC profile of *O*-linked oligosaccharides in *omh1* Δ cells was found to be quite different from that in the wild-type strain in terms of accumulated galactosylmannose disaccharides (31). No satisfactory method is currently available for converting heterogeneous *O*-linked oligosaccharides into homogeneous

(16). 出芽酵母では非還元末端から1つ目および2つ目のマンノースは α 1,3-結合で、分裂酵母の非還元末端のガラクトースは α 1,2-または α 1,3-結合で結合している。両酵母において主鎖は1から3つの α 1,2-マンノース主鎖から構成されている。

出芽酵母において、*O*-結合型糖鎖の生合成はERの内腔でタンパク質：*O*-マンノース転移酵素 (Pmt) ファミリー的作用によって開始される。Pmt ファミリーはPmt1 からPmt7 タンパク質から構成され、ドリコールリン酸マンノース (Dol-P-Man) からマンノース残基を特定のセリンまたはスレオニン残基に転移する活性を有する (17, 18)。またPmt ファミリーはさらにPmt1、Pmt2 およびPmt4 タンパク質からなる3つのサブファミリーに分類され、Pmt1 サブファミリーはタンパク質Pmt2 サブファミリータンパク質とヘテロタンパク質複合体を、Pmt4 サブファミリータンパク質はホモタンパク質複合体を形成することが報告されている (18)。これらのセリンおよびスレオニンへのPmt ファミリータンパク質による*O*-マンノシル化は出芽酵母や分裂酵母 (19, 20) だけでなく、哺乳類でも細胞機能へ重要な役割を果たしており (21–23)、その*O*-マンノシル化機構は酵母から多細胞真核生物まで高度に保存されている (18, 24)。出芽酵母における2残基目以降のマンノースに関しては、2残基目と3残基目のマンノースはKre2、Ktr1、Ktr3 タンパク質/ α 1,2-マンノース転移酵素により転移され (25)、4残基目と5残基目のマンノースはMnn1、Mnt2、Mnt3 タンパク質/ α 1,3-マンノース転移酵素により転移されることが、生化学的および遺伝学的解析により示されている (26)。一方、分裂酵母では α 1,2-マンノース主鎖に1または2つの α -ガラクトースが付加され、分岐したGal_{0–2}Man_{1–3}-Ser/Thr 構造が合成される (27)。分裂酵母の主要なガラクトース転移酵素は精製され (28)、本タンパク質をコードする遺伝子が*gma12*⁺ 遺伝子としてクローン化された (29)。分裂酵母ゲノムには*gma12*⁺ 遺伝子を含め7つのガラクトース転移酵素遺伝子 (*gmh1*⁺ – *gmh6*⁺) が存在し (29, 30)、その中でも*Gma12* タンパク質は*O*-結合型糖鎖のガラクトース付加に関与していることが示されている (30)。しかし、分裂酵母*O*-結合型糖鎖のマンノース付加に関与する α 1,2-マンノース転移酵素についてはまだ良く分かっていなかった。

最近、我々は分裂酵母*O*-結合型糖鎖のマンノース付加に関与すると考えられる α 1,2-マンノース転移酵素遺伝子を同定し、*omh1*⁺ – *omh6*⁺ と名付けた。これらの遺伝子がコードするタンパク質のC末端には、出芽酵母Ktrマンノース転移酵素ファミリータンパク質と相同性を示す触媒ドメインを有していた。さらに我々は*omh1*⁺ 遺伝子が*O*-結合型糖鎖の伸長に関与する推定 α 1,2-マンノース転移酵素をコードしていることを見出した (31)。野生株と*omh1* 破壊株のHPLC解析を行ったところ、野生株の*O*-結合型糖鎖は2糖だけでなく4糖の糖鎖も含んでいたが、興味深いことに*omh1* 破壊株では、野生株とは異なりGal-Manの2糖の糖鎖が蓄積されており、均一

O-linked oligosaccharides in glycoproteins. Interestingly, loss of *omh1*⁺ did not lead to any obvious phenotypes, suggesting that at least a disaccharide unit (galactosylmannose) is sufficient for normal cell-wall structure and function in fission yeast.

B-3. Structure of Glycosphingolipids

As in higher eukaryotic cells, phospholipids, sterols and sphingolipids are the major membrane lipid components in yeasts. Sphingolipids are abundant components of eukaryotic plasma membranes, with important functions in bilayer stability, stress adaptation, signaling and possibly, formation of lipid microdomains (32–34). Sphingolipids in microorganisms contain a long-chain amino alcohol, phytosphingosine, amide-linked to a very-long-chain fatty acid, with inositol phosphate or mannosylated inositolphosphate as the polar head group. The budding yeast *S. cerevisiae* has served as a unique model to uncover sphingolipid metabolic pathways, providing a key framework from which sphingolipid metabolism and function can be elucidated. The three classes of yeast sphingolipids – inositol phosphorylceramide (IPC), mannosylinositol phosphorylceramide (MIPC) and mannosyldiinositol phosphorylceramide [M(IP)₂C] – are intermediates and products of a common biosynthetic pathway (35, 36).

Sphingolipid biosynthesis begins with the condensation of palmitoyl-CoA and serine *via* the serine palmitoyltransferase complex in the ER. Synthesis occurs in the ER until formation of ceramide (37). After transport to the Golgi apparatus, ceramide is converted to IPC. Next, IPC is converted to MIPC, with GDP-mannose as the carbohydrate donor (38). The final step of the complex sphingolipid biosynthetic pathway was found previously (39) to require IPT1 (encoding an inositolphosphotransferase) for synthesis of M(IP)₂C, the most abundant complex sphingolipid in budding yeast, which is found primarily in the plasma membrane.

Although the complete genome sequence of *S. pombe* has been reported (1), there have been few studies on the biosynthetic pathway and role of sphingolipids. On the other hand, fission yeast mutants that display defects in cell-wall formation have been isolated (40). One such mutant, *css1*, accumulates significant amounts of α - and β -glucans. Csslp shares sequence similarity with mammalian neutral sphingomyelinases (40). Interestingly, the *css1*⁺ gene is essential, unlike the *ISC1* gene in *S. cerevisiae*, and therefore the synthesis of ceramides from sphingolipids through Csslp-mediated hydrolysis might play essential roles in *S. pombe*.

Based on a BLAST search of protein databases, *S. pombe* contains many proteins homologous to proteins required for sphingolipid biosynthesis in *S. cerevisiae*. Interestingly, no fission yeast equivalents of the inositolphosphotransferase Ipt1p were found (41). In addition, *S. pombe* has three *SUR1* homologues but no genes homologous to

な糖鎖を生産していることが明らかとなった (31)。現在、糖タンパク質に付加する O-結合型糖鎖を構造的に不均一な糖鎖群から均一な糖鎖に変換する技術は他には開発されていない。分裂酵母 *omh1*⁺ 遺伝子の破壊は O-結合型糖鎖構造以外に明らかな表現型を示しておらず、分裂酵母では少なくとも 2 糖単位 (Gal-Man) の糖鎖が存在していれば、通常の細胞壁構造を保つことができ、正常に生育するようである。

B-3. スフィンゴ糖脂質の構造

高等真核細胞のように、酵母においてもリン脂質・ステロール・スフィンゴ脂質は主な膜脂質の構成要素である。スフィンゴ脂質は真核生物細胞膜の重要な構成因子であり、脂質二重層の安定化・ストレス応答・シグナル伝達、そして脂質マイクロドメインの形成にも重要な役割を果たしている (32–34)。微生物におけるスフィンゴ脂質は長鎖アミノアルコールを含み、そのアミノ基に長鎖脂肪酸が付加したフィトスフィンゴシンの極性ヘッドグループとしてイノシトールリン酸またはマンノースが付加されたものが存在する。出芽酵母 *S. cerevisiae* はスフィンゴ脂質代謝経路を解明するためのモデル生物として役立ち、スフィンゴ脂質代謝や機能を解明する重要な基本的枠組みを提供している。酵母のスフィンゴ脂質のクラスは 3 つ存在し、イノシトールホスホリルセラミド (IPC)・マンノシルイノシトールホスホリルセラミド (MIPC)・マンノシルジイノシトールホスホリルセラミド [M(IP)₂C] がある。これらのスフィンゴ脂質は全て共通の生合成経路の中間代謝物や生成物である (35, 36)。

スフィンゴ脂質の生成は、小胞体上でセリン・パルミトイルトランスフェラーゼ複合体によりセリンとパルミトイル-CoA の縮合から開始する。小胞体上ではセラミドまでが合成される (37)。小胞体上で合成されたセラミドはゴルジ体へ輸送された後、イノシトールリン酸が付加されて IPC に変換される。次に、IPC は GDP-マンノースを糖供与体として MIPC へ変換される (38)。複合スフィンゴ脂質生合成経路の最後のステップである M(IP)₂C を合成するためには、イノシトールホスホトランスフェラーゼをコードしている *IPT1* 遺伝子が必要である。M(IP)₂C は出芽酵母の複合スフィンゴ脂質の中で最も多く存在しており、主に細胞膜に局在していることがすでに報告されている (39)。

S. pombe のゲノム解析は完了しているが (1)、*S. pombe* におけるスフィンゴ脂質の生合成経路や機能に関してはほとんど解析が進んでいない。一方、細胞壁形成に異常が見られる分裂酵母変異株に関してはよく解析がなされている (40)。そのような変異株のひとつに *css1* 変異体があり、*css1* 変異株は α - β -グルカンの劇的な蓄積が引き起こされる。Csslp は哺乳類の中性スフィンゴミエリナーゼと高い相同性を持っている (40)。興味深いことに、*S. cerevisiae* のホモログである *ISC1* 遺伝子とは異なり、*S. pombe* の *css1*⁺ 遺伝子は必須遺伝子である。つまり、*S. pombe* において Csslp による加水分解を介したスフィンゴ脂質からのセラミドの生成は生育に必須である可能性が考えられる。

タンパク質データベースの BLAST 検索結果より、*S.*

CSG2 of *S. cerevisiae* encoding an ER membrane protein required for mannosylation of inositolphosphorylceramide. In an effort to better understand the role of MIPC in fission yeast, we constructed strains harbouring disruptions in *SURI* homologues encoding mannosyltransferase, and subjected them to phenotypic characterization (41). Analysis of the sphingolipid composition of wild-type cells confirmed that MIPC is the terminal and most abundant complex sphingolipid in *S. pombe* (41). Three proteins (*Sur1p*, *Csg2p* and *Csh1p*) have been shown to be involved in the synthesis of MIPC from IPC in *S. cerevisiae* (42–44). The *S. pombe* genome has three genes (*SPAC2F3.01*, *SPCC4F11.04c* and *SPAC17G8.11c*) that are homologues of *SURI*, termed *imt1*⁺, *imt2*⁺ and *imt3*⁺, respectively (41). To determine whether these genes function in MIPC synthesis in *S. pombe*, single and multiple gene disruptants were constructed. Single *imt* disruptants were found to be viable. MIPC was not detected and IPC levels were increased in the triple disruptant, indicating that the three *SURI* homologues are involved in the synthesis of MIPC (41). GFP-tagged *Imt1p*, *Imt2p* and *Imt3p* localized to membranes of the Golgi apparatus. The MIPC-deficient mutant exhibited pleiotropic phenotypes, including defects in cellular and vacuolar morphology, and in localization of ergosterols. MIPC seemed to be required for endocytosis of a plasma membrane-localized amino acid transporter, because sorting of the transporter from the plasma membrane to the vacuole was severely impaired in the MIPC-deficient mutant grown under nitrogen-limiting conditions. These results suggest that MIPC has multiple functions not only in the maintenance of cell and vacuole morphology but also in vesicular trafficking in fission yeast (41).

C. Golgi-Resident Glycosyltransferases in *S. pombe*

Glycosyltransferases play key roles in glycan biosynthesis and all the encoding genes in *S. pombe* were identified in 2002 (1). The general Golgi-localized glycosyltransferases have type-II architecture, which consists of a small N-terminal cytoplasmic domain, a transmembrane domain, and a C-terminal catalytic domain. In humans, *N*-glycan processing in the Golgi typically involves the following steps to generate multiantennary complex type glycans: trimming of α 1,2-Man residues, transfer of one β 1,2-GlcNAc, further trimming of α 1,3- and α 1,6-Man residues, transfer of another β 1,2-GlcNAc, and addition of other β -GlcNAcs to generate multiantenna, including α 1,6-fucose onto the GlcNAc residue at the reducing end, β 1,4-Gals, α 1,4-fucoses and terminal α -*N*-acetylneuraminic acids. In contrast to humans, yeasts extend the α 1,6-Man backbone on core glycans with diverging branching structures occurring as a function of species (16). In *S. pombe* *Gal* α 1,2-, *Gal* α 1,3-, *Man* α 1,2-, and pyruvated-4,6-acetal-linked-*Gal* β 1,3-*Gal* α 1,2-

pombe には *S. cerevisiae* においてスフィンゴ脂質生合成に必要とされるタンパク質ホモログの大半が保存されていることがわかった。しかし興味深いことに、分裂酵母にはイノシトールホスホトランスフェラーゼ *Ipt1p* のホモログが存在しないことがわかった (41)。さらに、*S. pombe* は3つの *SURI* ホモログを持っているが、*S. cerevisiae* の *CSG2* に相当するタンパク質は存在しない。分裂酵母において MIPC の機能を解析するために、我々はマンノシルトランスフェラーゼをコードしている *SURI* ホモログ遺伝子の破壊株を作製し、その株の表現型を調べた (41)。野生株のスフィンゴ脂質組成の解析により、*S. pombe* において MIPC が最終産物であり、複合スフィンゴ脂質の中で最も多く存在していることを明らかにした (41)。*S. cerevisiae* において、3つのタンパク質 (*Sur1p*, *Csg2p*, *Csh1p*) は IPC から MIPC を合成するステップに関与していることが報告されている (42–44)。*S. pombe* のゲノム上には3つの *SURI* ホモログ (*SPAC2F3.01*, *SPCC4F11.04c* and *SPAC17G8.11c*) が存在しており、我々はそれぞれ *imt1*⁺, *imt2*⁺ and *imt3*⁺ と名付けた (41)。分裂酵母において、それらの遺伝子が MIPC の合成に関与しているかどうかを調べるために、一重・二重・三重遺伝子破壊株を作製した。それぞれの単独遺伝子破壊株においては生育に変化は見られなかった。三重遺伝子破壊株においては MIPC が検出されず、IPC レベルが増加していたことから、3つの *SURI* ホモログ遺伝子は MIPC の生合成に関与していることが示された (41)。GFP タグを付加した *Imt1p*·*Imt2p*·*Imt3p* はゴルジ体膜に局在していた。また、MIPC 欠損株においては細胞形態や液胞形態の異常・エルゴステロールの局在異常といった様々な表現型が観察された。さらに MIPC 欠損株において、窒素源飢餓条件における細胞膜から液胞へのトランスポーターの輸送は阻害されていた。これらの結果から、MIPC は細胞形態や液胞形態の維持だけでなく、小胞輸送にも必要であり、分裂酵母において MIPC は多くの機能を担っていることが示唆された (41)。

C. 分裂酵母のゴルジ体に局在する糖転移酵素

糖転移酵素は糖鎖生合成に重要な役割を果たしており、2002 年に全ての糖転移酵素候補遺伝子が明らかとなった (1)。一般的にゴルジ体に局在する糖転移酵素は II 型膜タンパク質であり、短い N 末端細胞質ドメイン、膜貫通ドメインおよび C 末端触媒ドメインから構成される。ヒトにおいて *N*-結合型糖鎖はゴルジ体において以下に示すような糖鎖修飾を経て、多分岐の複合型糖鎖が生成される： α 1,2-マンノースの除去、 β 1,2-*N*-アセチルグルコサミンの付加、 α 1,3- および α 1,6-マンノースの除去、さらなる β 1,2-*N*-アセチルグルコサミンの付加、多分岐構造を生成するための β -*N*-アセチルグルコサミン、 β 1,4-ガラクトース、 α 1,4-フコース、そして *N*-アセチルノイラミン酸の付加、および還元末端 *N*-アセチルグルコサミンへの α 1,4-フコースの付加などである。分裂酵母ではヒトとは異なり α 1,6-マンノース主鎖が *Man*₅*GlcNAc*₂ コア糖鎖へと付加される。この α 1,6-マンノース主鎖は酵母種ごとに様々な異なる側鎖修飾を受けており (16)、分裂酵母では α 1,2- および α 1,3-ガラクトース、 α 1,2-マンノース、ピルビン酸 4,6-アセタール

side chains are attached to the $\alpha 1,6$ -Man backbone.

Galactosylation consists of three steps including biosynthesis of UDP-Gal in the cytosol (45,46), transport of UDP-Gal from the cytosol into the lumen of the Golgi (47–49), and transfer of a Gal residue from UDP-Gal by Golgi-localized galactosyltransferases (28–30). In *S. pombe*, seven $\alpha 1,2$ -galactosyltransferase-related genes have been identified. Gma12p was purified first as a major $\alpha 1,2$ -galactosyltransferase prior to cloning of the gene (28,29). The *gmh1*⁺ – *gmh6*⁺ genes were identified as homologs of *gma12*⁺ (30, 50). The encoded $\alpha 1,2$ -galactosyltransferase-related enzymes have been partially characterized and their substrate specificities determined. Gma12p is a general $\alpha 1,2$ -galactosyltransferase able to transfer $\alpha 1,2$ -Gal onto every terminal $\alpha 1,2$ -Man residue on *N*- and *O*-linked glycans. The Gmh proteins seem to have different substrate preferences. Gma12p, Gmh2p, Gmh3p and Gmh6p were also found to be involved in the galactosylation of *N*-linked glycans by acid phosphatase mobility analysis. Furthermore Gmh3p was reported to be involved in the galactosylation of core glycans by an *in vitro* galactosyltransferase assay using a solubilized microsomal fraction from a *gmh3* Δ mutant. Gmh2p and Gmh6p are involved in the galactosylation of *O*-linked glycan with Gmh2p appearing to have a preference for shorter glycans and Gmh6p for longer glycans. To our knowledge, *gmh1* Δ , *gmh4* Δ and *gmh5* Δ mutants have not been reported to have glycosylation defects. Recently, we found three previously unknown $\alpha 1,3$ -galactosyltransferases and named them *otg1*⁺ – *otg3*⁺ (unpublished results). We found that Otg2p could transfer Gal residues onto both *N*- and *O*-linked glycans while Otg3p could only do so onto *N*-linked glycans when Man₉GlcNAc₂-PA and Man-Man-Man-PA were used as substrates. To date, Otg1p has not shown any activity towards *N*- and *O*-linked glycans when UDP-Gal was used as a donor substrate. We speculate that the assay conditions may have been suboptimal or that Otg1p preferred sugar nucleotides other than UDP-Gal as donor substrates. Galactosylation seemed to function as the elongation termination signal for *O*-linked glycans because no further substitutions of α -Gal residues in the glycans were observed. Current understanding of the substrate specificity of *S. pombe* α -galactosyltransferase is summarized in Fig. 1.

In *S. cerevisiae*, biosynthesis of the $\alpha 1,6$ -Man backbone begins with addition of a single $\alpha 1,6$ -Man onto the $\alpha 1,3$ -Man residue linked to the $\beta 1,4$ -Man in the core *N*-linked glycan by ScOch1p (51). While *S. pombe* also has Och1p, its substrate specificity is different than that of ScOch1p (12). The removal of $\alpha 1,2$ -mannose at the lower branch (linked to the $\beta 1,4$ -Man via $\alpha 1,3$ -linkage) increased the activity of SpOch1p, while it decreased the activity of ScOch1p compared with Man₉GlcNAc₂ glycan.

結合型 Gal $\beta 1,3$ -Gal $\alpha 1,2$ - 側鎖が $\alpha 1,6$ - マンノース主鎖に付加している。

ガラクトシル化は以下の3つのステップからなる：細胞質での UDP- ガラクトースの合成 (45, 46)、細胞質からゴルジ体内腔への UDP- ガラクトースの輸送 (47–49)、ゴルジ局在ガラクトース転移酵素によるガラクトース残基の転移 (28–30)。前述の通り、分裂酵母では7つの $\alpha 1,2$ - ガラクトース転移酵素様遺伝子が同定されている。その中でも Gma12 タンパク質は主要な $\alpha 1,2$ - ガラクトース転移酵素として最初に精製・クローン化され (28, 29)、*gmh1*⁺ – *gmh6*⁺ 遺伝子は *gma12*⁺ 遺伝子のホモログとして同定された (30, 50)。これらの $\alpha 1,2$ - ガラクトース転移酵素様タンパク質は生化学的な解析が試みられ、基質特異性の一部が明らかとなっている。Gma12 タンパク質は普遍的な $\alpha 1,2$ - ガラクトース転移酵素であり、*N*- および *O*- 結合型糖鎖に付加している全ての末端 $\alpha 1,2$ - マンノースに $\alpha 1,2$ - ガラクトースを転移することができる。Gmh タンパク質は互いに異なる基質特異性を有しており、酸性ホスファターゼの電気泳動解析により Gma12、Gmh2、Gmh3 および Gmh6 タンパク質は *N*- 結合型糖鎖のガラクトシル化に関与していることが見出された。さらに Gmh3 タンパク質は *gmh3* 破壊株から調製した可溶化酵素を用いた試験管内の酵素活性測定解析により、コア糖鎖のガラクトシル化に関与していることが報告されている。Gmh2 と Gmh6 タンパク質は共に *O*- 結合型糖鎖のガラクトシル化に関与し、Gmh2 タンパク質はより短い糖鎖に、Gmh6 タンパク質はより長い糖鎖を好むことが分かった。現在のところ、*gmh1*、*gmh4* および *gmh5* 破壊株では顕著な糖鎖付加欠損の表現型がみられず、その機能は不明である。最近、我々は新しく3つの $\alpha 1,3$ - ガラクトース転移酵素様遺伝子を見出し、*otg1*⁺ – *otg3*⁺ 遺伝子と名付けた (データ未発表)。これらの遺伝子産物の中でも、Man₉GlcNAc₂-PA、Man₃-PA および UDP- ガラクトースを基質として用いた酵素活性測定解析により、Otg2 タンパク質は *N*- および *O*- 結合型糖鎖に、Otg3 タンパク質は *N*- 結合型糖鎖に $\alpha 1,3$ - ガラクトースを転移することが明らかとなった。しかし、今のところ Otg1 タンパク質は UDP- ガラクトースをドナー基質として用いた場合、*N*- または *O*- 結合型糖鎖にもガラクトース転移活性は検出されていない。この理由として、活性測定条件が至適化されていない、または Otg1 タンパク質はガラクトース転移酵素以外の活性を有していて活性検出には UDP- ガラクトース以外のドナー基質を必要とすることの2点の可能性を考えている。*O*- 結合型糖鎖中のガラクトースはさらなる修飾を受けていないことから、ガラクトース付加は *O*- 結合型糖鎖においては伸長終止シグナルとして働いているようである。これまでに得られている分裂酵母 α - ガラクトース転移酵素の基質特異性に関する知見を図1にまとめた。

出芽酵母において、 $\alpha 1,6$ - マンノース主鎖の生合成は出芽酵母 Och1 タンパク質の作用により *N*- 結合型コア糖鎖の $\beta 1,4$ - マンノースに結合している $\alpha 1,3$ - マンノースへの $\alpha 1,6$ - マンノースの付加から開始される (51)。一方、分裂酵母も Och1 タンパク質は有しているが、その基質特異性は出芽酵母のものと異なっている (12)。例えば、分裂酵母 Och1 タンパク質は、*N*- 結合型コア糖鎖の $\beta 1,4$ - マンノースに $\alpha 1,3$ 結合を介して結合している分岐上の $\alpha 1,2$ - マンノースを1残基除去した Man₈GlcNAc₂

Fig. 1. Substrate specificities of *S. pombe* galactosyltransferases. Schematic structures of *S. pombe* N- (A) and O-linked glycans (B). Arrows indicate function of Gma12p, Gmh proteins and Otg proteins by showing where the enzymes act and which Gal residues are transferred.

The primary elongation is then conducted by the mannan polymerase (M-Pol) I complex which consists of ScVan1p and ScMnn9p (52, 53). The subsequent elongation is carried out by the M-Pol II complex which consists of ScAnp1p, ScHoc1p, ScMnn9p, ScMnn10p and ScMnn11p (53–55). In *S. pombe*, homologs for these proteins, except for ScVan1p and ScHoc1p have been predicted. Therefore, it appears that formation of the M-pol I complex does not occur in *S. pombe*. On the other hand, we found that Anp1p and Mnn9p formed an M-pol II-like complex by co-immunoprecipitation assay (unpublished results). Furthermore, by phylogenetic analysis, Gmh4p and Gmh5p were found to comprise sub-families with ScMnn11p and ScMnn10p (50), which are components of the M-Pol II complex, and are thought to play roles in complex stabilization, respectively (54). Therefore, these glycosyltransferases may be components of the M-Pol II-like complex and contribute to their stability. However, other components of this M-pol II-like complex remain to be analyzed. The genes and mutants known to be required for glycosylation are summarized in Table I.

D. Why *S. pombe* Is Unable to Grow on Galactose medium?

Galactose is an important sugar used not only in glycosylation, a major posttranslational modification, but

糖鎖をアクセプター基質として用いた場合、Man₉GlcNAc₂ 糖鎖と比べてより高い活性を示すが、出芽酵母 Och1 タンパク質ではより低い活性を示す。 α 1,6-マンノース主鎖の伸長の初期段階は Van1 および Mnn9 タンパク質からなるマンナン伸長酵素 (M-pol) I 複合体が関与し (52, 53)、残りの伸長には Anp1、Hoc1、Mnn9、Mnn10 および Mnn11 タンパク質からなる M-pol II 複合体が関与している (53–55)。分裂酵母ではこれらのタンパク質の存在が予測されているが、Van1 および Hoc1 タンパク質のホモログは今のところ見つかっておらず、M-pol 複合体 I は存在しない可能性がある。一方、我々は免疫沈降実験により Anp1 および Mnn9 タンパク質が M-pol II 様複合体を形成していることを見出している (データ未発表)。さらに進化系統樹解析により、Gmh4 および Gmh5 タンパク質は、それぞれ Mnn11 および Mnn10 タンパク質とサブファミリーを形成していることが見出されている (50)。出芽酵母 Mnn11 および Mnn10 タンパク質は M-pol II 複合体構成成分であり複合体の安定性に寄与していることが明らかとなっていることから (54)、分裂酵母 Gmh4 および Gmh5 タンパク質も M-pol II 複合体の構成成分となり、複合体の安定性に寄与している可能性が考えられる。しかし、分裂酵母 Anp1 および Mnn9 タンパク質以外のタンパク質が M-pol II 様複合体の構成成分として存在しているかどうかは、さらなる解析を待たねばならない。分裂酵母の糖鎖生成に関与する遺伝子とその機能は表 I にまとめた。

D. 分裂酵母はなぜガラクトースを資化できないのか

ガラクトースは糖鎖の構成成分として重要なだけであ

Table I. Genes involved in *S. pombe* glycosylation.

Gene	Function	Reference
<i>mpg1</i> ⁺ (SPCC1906.01)	Mannose-1-phosphate guanyltransferase (predicted)	18
SPBC13G1.02	Mannose-1-phosphate guanyltransferase (predicted)	1
<i>vrg4</i> ⁺ (SPAC144.18)	GDP-Man transporter (predicted)	1
<i>och1</i> ⁺ (SPAC1006.05c)	α -1,6-Mannosyltransferase	13
<i>dpm1</i> ⁺ (SPAC31G5.16c)	Dolichol-phosphate mannosyltransferase catalytic subunit	19
<i>dpm2</i> ⁺ (SPBC21B10.11)	Dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit (predicted)	20
<i>dpm3</i> ⁺ (SPBC21B10.11)	Dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit	20
<i>alg5</i> ⁺ (SPBC56F2.10c)	Dolichyl-phosphate β -glucosyltransferase (predicted)	1
<i>alg7</i> ⁺ / <i>gpi2</i> ⁺ (SPBC15D4.04)	UDP-GlcNAc:Dol-P <i>N</i> -acetylglucosaminophosphotransferase	21
<i>alg13</i> ⁺ (SPAC56E4.02c)	Dol-PP-GlcNAc GlcNAc transferase (predicted)	1
<i>alg14</i> ⁺ (SPAC5D6.06c)	UDP-GlcNAc transferase associated protein (predicted)	1
<i>alg1</i> ⁺ (SPAC23C4.14)	β 1,4-Mannosyltransferase (predicted)	1
<i>alg11</i> ⁺ / <i>gmd3</i> ⁺ (SPCC330.08)	α 1,2-Mannosyltransferase (predicted)	22
<i>alg3</i> ⁺ (SPAC7D4.06c)	α 1,3-Mannosyltransferase (functionally characterized)	23
<i>alg9</i> ⁺ (SPAC1834.05)	α 1,3- and α 1,6-Mannosyltransferase (predicted)	1
<i>alg12</i> ⁺ (SPBC1734.12c)	α 1,2-Mannosyltransferase (predicted)	1
<i>alg6</i> ⁺ (SPBC342.01c)	α 1,3-Glucosyltransferase (functionally characterized)	24, 25
<i>alg8</i> ⁺ (SPAC17C9.07)	α 1,3-Glucosyltransferase (predicted)	1
<i>ost1</i> ⁺ (SPAC27F1.07)	Oligosaccharyltransferase complex subunit (predicted)	1
<i>ost2</i> ⁺ (SPAC6F6.05)	Oligosaccharyltransferase complex subunit (predicted)	1
<i>ost3</i> ⁺ (SPAPB17E12.11)	Oligosaccharyltransferase complex subunit (predicted)	1
<i>ost4</i> ⁺ (SPAC7D4.15c)	Oligosaccharyltransferase complex subunit (predicted)	1
<i>ost5</i> ⁺ (SPCC18.19c)	Oligosaccharyltransferase complex subunit (predicted)	1
<i>swp1</i> ⁺ (SPCC553.06)	Oligosaccharyltransferase complex subunit (predicted)	1
<i>whp1</i> ⁺ (SPCC338.15)	Oligosaccharyltransferase complex subunit (predicted)	1
<i>stt3</i> ⁺ (SPAC27F1.07)	Oligosaccharyltransferase complex subunit (predicted)	26
<i>gls1</i> ⁺ (SPAC6G10.09)	α 1,2-Glucosidase I (predicted)	1
<i>gls2</i> ⁺ (SPAC1002.03c)	α 1,2-Glucosidase II (predicted)	24, 25
<i>mns1</i> ⁺ (SPAC2E1P5.01c)	ER-Mannosidase I (functionally characterized)	27
<i>mn9</i> ⁺ (SPAC4F10.10c)	M-pol II like complex subunit (predicted)	-
<i>anp1</i> ⁺ (SPBC1734.04)	M-pol II like complex subunit (predicted)	-
<i>uge1</i> ⁺ (SPBC365.14c)	UDP-Glc 4-epimerase	4
<i>gal10</i> ⁺ (SPBPB2B2.12c)	UDP-Glc 4-epimerase	4
<i>gms1</i> ⁺ (SPCC1795.03)	UDP-Gal transporter	5 – 7
<i>gma12</i> ⁺ (SPCC736.04c)	α 1,2-Galactosyltransferase	9
<i>gmh1</i> ⁺ (SPAC5H10.11)	α 1,2-Galactosyltransferase (predicted)	10
<i>gmh2</i> ⁺ (SPAC5H10.13c)	α 1,2-Galactosyltransferase (functionally characterized)	10
<i>gmh3</i> ⁺ (SPAC22E12.06c)	α 1,2-Galactosyltransferase	10
<i>gmh4</i> ⁺ (SPBC8D2.17)	α 1,2-Galactosyltransferase (predicted)	11
<i>gmh5</i> ⁺ (SPAC637.06)	α 1,2-Galactosyltransferase (predicted)	11
<i>gmh6</i> ⁺ (SPBC1289.13c)	α 1,2-Galactosyltransferase (functionally characterized)	11
<i>otg1</i> ⁺ (SPAC5H10.12c)	α 1,3-Galactosyltransferase (predicted)	Ohashi <i>et al.</i> submitted
<i>otg2</i> ⁺ (SPBC4C3.08)	α 1,3-Galactosyltransferase	Ohashi <i>et al.</i> submitted
<i>otg3</i> ⁺ (SPBC4C3.09)	α 1,3-Galactosyltransferase	Ohashi <i>et al.</i> submitted
<i>pvg3</i> ⁺ (SPBC1921.06c)	β 1,3-Galactosyltransferase (functionally characterized)	28
<i>imt1</i> ⁺ (SPAC2F3.01)	Mannosyltransferase involved in mannosylinositol phosphoryl ceramide (MIPC) biosynthesis (functionally characterized)	29
<i>imt2</i> ⁺ (SPCC4F11.04c)	Mannosyltransferase involved in MIPC biosynthesis (functionally characterized)	29
<i>imt3</i> ⁺ (SPAC17G8.11c)	Mannosyltransferase involved in MIPC biosynthesis (functionally characterized)	29
<i>ogm1</i> ⁺ / <i>oma1</i> ⁺ (SPAC22A12.07c)	Protein <i>O</i> -mannosyltransferase (functionally characterized)	30, 31
<i>ogm2</i> ⁺ / <i>oma2</i> ⁺ (SPAPB1E7.09)	Protein <i>O</i> -mannosyltransferase (functionally characterized)	30, 31
<i>ogm4</i> ⁺ / <i>oma4</i> ⁺ (SPBC19C7.12c)	Protein <i>O</i> -mannosyltransferase (functionally characterized)	30, 31
<i>omh1</i> ⁺ (SPBC19C7.12c)	α 1,2-Mannosyltransferase (functionally characterized)	32
<i>omh2</i> ⁺ (SPBC16H5.09c)	α 1,2-Mannosyltransferase (predicted)	32
<i>omh3</i> ⁺ (SPCC777.07)	α 1,2-Mannosyltransferase (predicted)	32
<i>omh4</i> ⁺ (SPBC1773.08c)	α 1,2-Mannosyltransferase (predicted)	32
<i>omh5</i> ⁺ (SPBC32H8.08c)	α 1,2-Mannosyltransferase (predicted)	32
<i>omh6</i> ⁺ (SPAC959.04c)	α 1,2-Mannosyltransferase (predicted)	32

also as a carbon and energy source. However, *S. pombe* is unable to assimilate galactose (57). In *S. cerevisiae*, the galactose pathway (also called Leloir pathway), which effects the complete transformation of galactose to glucose, has been extensively characterized. The galactokinase Gal1p (ATP- α -D-galactose-1-phosphotransferase), the transferase Gal7p (uridine diphosphoglucose [UDPG]- α -D-galactose-1-phosphouridylyltransferase), and epimerase Gal10p (UDPG-4-epimerase) function in this pathway (58–61) while *GAL2* encodes the galactose permease (62). *S. pombe* does not grow in media containing galactose as the sole carbon source even though *S. pombe* has the galactose-assimilating genes (*gal1*⁺, *gal7*⁺ and *gal10*⁺) needed for galactose metabolism and unidentified galactose transporters (46).

To clarify why *S. pombe* does not grow on galactose, we isolated gain-of-function *S. pombe* mutants (FG2–8) able to grow on galactose medium by using a proofreading-deficient DNA polymerase (57). The disparity theory argues that genetic diversity can be introduced by an error-prone DNA polymerase followed by replication of advantageous mutations by an error-free DNA polymerase (63, 64). Microarray and Northern analyses were performed initially to examine differences between the wild-type strain and the FG2–8 mutant. SPBPB2B2.10c (*gal7*⁺), SPBPB2B2.12c (*gal10*⁺) and SPBPB2B2.13 (*gal1*⁺), orthologs of *S. cerevisiae* *GAL10*, *GAL7*, *GAL1* respectively, were constitutively up-regulated in the FG2–8 mutant. In addition, SPBPB2B2.07c, SPBPB2B2.08 and SPBPB2B2.09c located near the *gal* genes (between *S. pombe* specific domain of unknown function genes, DUF999 and DUF999) were also up-regulated (Fig. 2).

く、炭素源・エネルギー源としても重要な糖である。しかし、分裂酵母 *S. pombe* はガラクトースを資化できない (57)。出芽酵母ではガラクトースの資化経路の解析はこれまでに活発に行われており、この経路はガラクトースを炭素源とする培地において活性化されることが知られている。ガラクトースの資化経路は Gal1p (ATP- α -D-galactose-1-phosphotransferase)、Gal7p (uridine diphosphoglucose- α -D-galactose-1-phosphouridylyltransferase)、Gal10p (UDPG-4-epimerase) によって構成されており (58–61)、また細胞外から細胞内へガラクトースを取り込むガラクトーストランスポーター Gal2p が同定されている (62)。分裂酵母はガラクトースを資化できないにも関わらず、これらガラクトース資化に関与する遺伝子 (*gal1*⁺, *gal7*⁺, *gal10*⁺) が存在しており、また、培地中のガラクトースを細胞内に取り込めることが明らかになっている (46)。

分裂酵母がガラクトースを資化できない原因を解明する為に、我々は不均衡変異導入法を用いて「ガラクトースを資化できる」分裂酵母変異株 (FG2-8) を取得した (57)。不均衡変異導入法は校正能を欠損した DNA ポリメラーゼを用いた新しい変異導入方法で、DNA 複製の際に生じる誤りを DNA ポリメラーゼに校正させないことによって変異を蓄積させる (63, 64)。まず初めに野生株と FG2-8 株の発現レベルでの違いをマイクロアレイ解析とノーザン解析によって調べた。FG2-8 株では出芽酵母の *GAL7*、*GAL10*、*GAL1* のオルソログである SPBPB2B2.10c (*gal7*⁺)、SPBPB2B2.12c (*gal10*⁺)、SPBPB2B2.13 (*gal1*⁺) の発現が増加していた。また、FG2-8 株では染色体上でこれら *gal* 遺伝子の近傍に位置している SPBPB2B2.07c、SPBPB2B2.08 そして SPBPB2B2.09c (これらの遺伝子は 2 つの DUF999 に挟まれている) の発現も増加していた (図 2)。

Fig. 2. Region-specific up-regulation of FG2-8 strain grown on glucose. Wild-type and FG2-8 cells were grown on glucose. Total RNA was extracted and used for northern analysis. Localization of *gal* genes on chromosome 2 in *S. pombe* are shown.

The telomere consists of specialized heterochromatin localized at ends of chromosomes which contributes to genome integrity. The fission yeast *gal* genes are located at the end of the right arm of chromosome 2. Telomeric heterochromatin which is subject to gene silencing (65), extends approximately 50 kb from the chromosome end on the right arm of chromosome 2. Our results are consistent with the possibility that gene silencing represses expression of the *gal* genes in the wild-type strain, and that the silencing was diminished in FG2-8 (57). Swi6p, a heterochromatin protein 1 (HP1) that recruits various effectors to heterochromatin for multiple functions, is required for telomeric gene silencing. Swi6p has been localized to the long region of the subtelomere (65). To test possible involvement of Swi6p, a *swi6Δ* strain was constructed and streaked on glucose- and galactose-containing plates. The *swi6Δ* strain was unable to assimilate galactose as sole carbon source. Moreover, *gal7⁺*, *gal10⁺* and *gal1⁺* were not up-regulated in the *swi6Δ* strain, indicating that the *gal* genes were silenced in a Swi6p-independent manner. These results suggest that the *gal* genes were repressed independently of telomeric gene silencing (Fig. 2). Identification of the mutation responsible for constitutive expression of the *gal* genes in FG2-8 is the subject of on-going work based on cloning of the wild-type allele. Its discovery will provide new information about galactose metabolism and gene silencing in *S. pombe* and may lead to development of a galactose-based gene expression system.

E. Role of Galactosylation in Fission Yeast

The study of *S. cerevisiae* mutants defective in protein glycosylation has contributed greatly to the elucidation of the glycan structures found in budding yeast glycoproteins and the pathways for their biosynthesis (66, 67). Several glycosylation-defective mutants have independently been isolated in *S. pombe* (68). To elucidate the physiological role of galactosylation, we screened for galactosylation-defective mutants based on galactose-specific peanut lectin agglutination. We also isolated a *gms1* (for galactomannan synthesis defective) mutant deficient in glycosylation of cell surface glycoproteins, in which the galactose content of polysaccharides was significantly reduced (69). A comparison of the deduced Gms1p amino acid sequence with the sequences of other known proteins in the database revealed a significant degree of similarity with the human UDP-galactose transporter. Interestingly, galactose residues in the polysaccharides isolated from *gms1Δ* cells were absent as determined from sugar-composition and NMR analyses, indicating that the supply of UDP-galactose from the cytoplasm to the Golgi lumen was disrupted by the single mutation in *gms1⁺* encoding the UDP-galactose transporter (47, 48, 70).

テロメアは特異的なヘテロクロマチンを含み、染色体の末端に存在し、ゲノムの保全性に貢献している。前述の様に、分裂酵母の *gal* 遺伝子は第二染色体右腕の末端付近に位置している。テロメアのヘテロクロマチン領域は第二染色体右腕の末端から約 50 kb 程度まで及んでおり、この領域では遺伝子はサイレンシングによって発現が抑制されている (65)。我々は分裂酵母野生株では *gal* 遺伝子がサイレンシングによって抑制されており、FG2-8 株ではそのサイレンシングが欠損していることを見出した (57)。

ヘテロクロマチンタンパク質 (HP1) である Swi6p はテロメアにおけるサイレンシングに必須であり、サブテロメア領域に幅広く局在していることが知られている (65)。この Swi6p が *gal* 遺伝子のサイレンシングに関わっているかを調べるために、*swi6Δ* 株を取得し、グルコース培地及びガラクトース培地に塗布した。*swi6Δ* 株は野生株と同様にガラクトース培地で生育できず、また、*gal7⁺*、*gal10⁺*、*gal1⁺* の発現上昇も見られなかった。このことから *gal* 遺伝子は Swi6p 非依存的なサイレンシングを受けており、*gal* 遺伝子のサイレンシングはテロメアにおけるサイレンシングとは異なった未知の機構によって行われていることが示唆された (図 2)。

現在、FG2-8 株において *gal* 遺伝子の発現上昇の原因となっている変異の同定を試みている。変異の同定によって分裂酵母におけるガラクトース代謝とサイレンシングに関する新たな知見を得ることができ、また、ガラクトースを誘導物質として用いた発現系の構築が可能になると考えている。

E. 分裂酵母におけるガラクトシル化の役割

出芽酵母において糖鎖合成欠損変異株の研究は出芽酵母における糖タンパク質の糖鎖構造の解析や、生合成経路の解析に非常に有効である (66, 67)。分裂酵母においていくつかの糖鎖合成欠損変異株が独立して単離された (68)。我々もガラクトシル化の生理的役割を解明するために、ガラクトース特異的なピーナツレクチンで凝集されない株を検索することにより、細胞表層糖タンパク質のガラクトース含量が顕著に低下した変異株 (*gms1*) を 1 つ単離することができた (69)。遺伝子から予想される Gms1 タンパクの amino 酸配列と既知の配列を比較したところ、ヒトの UDP-ガラクトース輸送体と高い相同性を示すことがわかった。興味深いことに *gms1* 遺伝子破壊株から調製した多糖には NMR 解析等により全くガラクトースが付加されていないことがわかり、細胞質からゴルジ体内腔への UDP-ガラクトースの供給が *gms1* 遺伝子を破壊することにより停止することがわかった (47, 48, 70)。

The *gms1Δ* strain is very useful for the analysis of phenotypes of *S. pombe* cells lacking galactose residues and for the elucidation of the mechanism of galactosylation. The *gms1Δ* strain is viable at 26°C and 36°C but grew more slowly than the wild-type strain. Wild-type cells displayed a normal cylindrical morphology. In contrast, more than 80% of *gms1Δ* cells were round or pear-shaped, with a larger diameter (3–6 mm in width). Electron microscopic analyses suggest that galactomannan is exposed at the surface of the fission yeast cell wall, and that a deficiency of galactose residues affects cell wall structure (49). Furthermore, the mating process was severely affected in the *gms1Δ* strains during nutritional starvation because cells were incapable of sexual conjugation (49). Therefore, galactosylation of cell surface glycoproteins is required for sexual conjugation in *S. pombe*. Although galactose residues are not essential for growth of *S. pombe*, protein galactosylation is required for the maintenance of normal cell shape, sexual agglutination, and tolerance toward various drugs.

F. Cell Surface Galactosylation Is Essential for Cell-Cell Recognition in *S. pombe*

Flocculation of *S. cerevisiae* is a nonsexual form of cell aggregation which is calcium-dependent and reversible. Flocculation and sedimentation of yeast cells to the bottom of fermentation vessels is a desirable industrial property. Therefore, the mechanism by which *S. cerevisiae* cells flocculate has been studied extensively both biochemically and genetically. This phenomenon is thought to involve cell surface components and to result from a lectin-like interaction between a cell wall sugar-binding protein and cell-surface mannan (71). Several dominant flocculation genes including *FLO1*, *FLO5* and *FLO10* have been identified in *S. cerevisiae* (72–75). The N-terminal regions of Flo1p, Flo5p and Flo10p are important for sugar recognition (76). Recently, the domain structure of Flo5p was resolved, and the N-terminal Flo5A domain (S23 to H271) was found to be required for calcium-dependent flocculation (77).

Heterothallic strains of fission yeast, h^+ and h^- , are usually non-flocculent when cultured separately. In contrast, cells of homothallic strains of *S. pombe* become intensely flocculent (sexual flocculation) after prolonged cultivation. In contrast to sexual flocculation, little attention has been given to flocculent mutants of heterothallic strains and to mechanisms of nonsexual flocculation in *S. pombe*. It was reported that disruption of the fission yeast LAMMER kinase, Lkh1p, or *tup12⁺* encoding a global transcriptional repressor caused flocculation (78, 79). Furthermore, we have isolated fission yeast mutants that flocculate constitutively upon growth in liquid media (80). One of the flocculent mutants, *gsfl* (galactose-specific flocculation), exhibited a dominant,

gms1 遺伝子破壊株はガラクトースが欠損した分裂酵母の表現型を調べることによりガラクトシル化の機能を証明するために大変有効であった。*gms1* 破壊株は 26 °C や 36 °C において野生株よりもやや生育速度は遅いが生育可能であった。通常、分裂酵母野生株は円筒形の細胞形態を示すが、*gms1* 破壊株は円形やナシ型の形態を示し、野生株よりも少し直径が大きい (3–6 mm の広さ)。電子顕微鏡観察により、ガラクトース鎖は分裂酵母細胞壁の表面に露出しているが、ガラクトースの欠損により細胞壁の構造に欠損を示した (49)。その上、窒素飢餓条件下における交配過程に重要な影響があり、性的凝集ができないことがわかった (49)。以上の結果から、ガラクトース残基は分裂酵母において生育には必須では無いが、タンパク質のガラクトシル化は細胞形態の維持、性的凝集や各種薬剤に対する抵抗性などに重要な役割を果たしていることが明らかになった。

F. 細胞表層のガラクトシル化は細胞間認識に必須である

出芽酵母の非性的凝集はカルシウムイオン依存的に可逆的に起こることが知られている。非性的凝集は発酵工業において発酵タンクの底に菌体を沈める役割を持っているために好ましい性質とされ、出芽酵母の非性的凝集機構は生化学及び遺伝学的手法を用いて盛んに研究が行われている。この現象は細胞表層のマナンと細胞壁に局在する糖結合タンパク質との相互作用によるものであることが明らかにされており (71)、出芽酵母では *FLO1*、*FLO5*、*FLO10* 等の凝集素をコードする遺伝子が同定されている (72–75)。これら凝集素の N-末端ドメインが隣接する細胞との相互作用に重要であると考えられており (76)、近年、Flo5p の結晶構造解析から、N 末端の Flo5A ドメイン (S23 から H271 まで) がカルシウムイオン依存的な凝集に重要であることが明らかにされた (77)。

分裂酵母ヘテロタリック株 (h^+ 、 h^-) は別々に培養すると通常は凝集性を示さないが、ホモタリック株は長時間培養を行うと性的凝集を引き起こす。性的凝集と比べて、分裂酵母におけるヘテロタリック株の非性的凝集はこれまであまり解析が行われていなかった。これまでに、LAMMER キナーゼ Lkh1p や転写抑制因子をコードする *tup12⁺* の欠損によって凝集が引き起こされることが報告されている (78, 79)。また我々は液体培養を行うと構成的に細胞が凝集する分裂酵母変異株を単離した (80)。凝集株の 1 つである *gsfl* (galactose specific flocculation) 変異株はカルシウム依存的な非性的凝集を示し、

nonsexual and calcium-dependent aggregation phenotype which suggested that galactose residues rather than mannose residues in cell wall glycoproteins may be receptors that mediate cell-cell adhesion in *gsf1*-mediated flocculation (80). Although the *S. pombe* genome has been sequenced, a candidate protein involved in nonsexual flocculation had not been found.

We found that nonsexual flocculation in *S. pombe* was induced by expression of *S. cerevisiae* *FLO8* (81). The *FLO8* gene, encoding a transcriptional activator of the dominant flocculation genes *FLO1* and *FLO11*, induces nonsexual flocculation in *S. cerevisiae* (82). The *FLO8*-dependent flocculation of *S. pombe* was inhibited by addition of galactose, and required the presence of Ca^{2+} . To determine why *FLO8* expression induced flocculation in *S. pombe*, microarray analysis was performed in wild-type and *FLO8*-overexpressing cells. In the *FLO8*-overexpressing strain, a gene designated *gsf2*⁺ was specifically induced. The *gsf2*⁺ gene was also highly expressed in *lkh1* Δ , *tup12* Δ and *gsf1* mutants, all of which exhibited nonsexual flocculation which was abolished by deletion of *gsf2*⁺. The Gsf2 protein consists of 43.9% serine and threonine residues and contains an N-terminal signal sequence, a C-terminal GPI anchor signal sequence, eight repeated sequences consisting of 78 and 44 amino acids, respectively, and 16 putative *N*-glycosylation NX(S/T) sites. Although, Gsf2p does not share sequence similarity with Flo1p, Flo11p or Flo5p, the protein structures (GPI anchor, high Ser/Thr content, and repeated sequences) resemble budding yeast flocculins. We conclude that Gsf2p aggregates cells into 'flocs' by binding to galactose-containing cell surface oligosaccharides (81).

Yeasts propagate in a unicellular fashion by budding or by binary fission. However, many types of yeast can switch growth modes, changing from unicellular growth to filamentous branching multicellular hyphae. This transition can be induced by a wide variety of environmental changes ranging from pH to carbon source. Many species of dimorphic yeasts are pathogenic towards humans and plants in the hyphal form (83, 84). Recently, invasive filamentous growth was reported in *S. pombe* (85, 86). Under conditions of low nitrogen and high glucose (LNB medium), *S. pombe* grows as long and branched invasive structures (85). In addition, high iron concentrations in the growth medium also stimulate adhesion and invasive growth by fission yeast (86). The adhesion phenotype of the wild-type strain grown on LNB media was almost completely abolished by deletion of *gsf2*⁺. Colonies produced by *gsf2* Δ cells on LNB medium had a smooth colony morphology with no filamentous growth observed. These results indicate that *gsf2*⁺ is essential not only for flocculation but also for efficient filamentous growth in *S. pombe* (81) (Fig. 3). Cell surface glycoproteins play

また、細胞壁中のマンノースではなくガラクトースが *gsf1* 変異株における細胞同士の接着に重要であることが明らかになった (80)。しかし、分裂酵母のゲノムプロジェクトは終了しているにもかかわらず、分裂酵母における凝集素は未同定であった。

我々は出芽酵母 *FLO8* 遺伝子を分裂酵母において発現させることによって分裂酵母の非性的凝集が誘導されることを見出した (81)。*FLO8* は出芽酵母において *FLO1* や *FLO11* の発現を誘導し、マンノースによって阻害される非性的凝集を引き起こす転写活性化因子をコードしている (82)。この *FLO8* 依存的な分裂酵母の凝集はカルシウムイオンを必要とし、ガラクトースによって阻害される。なぜ *FLO8* を発現させることによって凝集が誘導されるのかを調べる為に、分裂酵母 *FLO8* 発現株のマイクロアレイ解析を行った。*FLO8* 発現株では1つの機能未知遺伝子の発現が増加しており、この遺伝子を *gsf2*⁺ と命名した。*gsf2*⁺ は凝集株である *lkh1* Δ 株や *tup12* Δ 株、*gsf1* 変異株においても高発現しており、また、これらの凝集株の *gsf2*⁺ 遺伝子を破壊することによって凝集が消失することが明らかになった。Gsf2p タンパク質はその N 末端に分泌シグナル、C 末端に推定 GPI アンカーサイト、78 アミノ酸残基又は 44 アミノ酸残基から成る 8 回のリピート配列、そして 16 カ所の推定 *N* 結合型糖鎖付加サイトを有しており、全体の 43.9% がセリン又はスレオニンによって構成されている。Gsf2p は出芽酵母凝集素 Flo1p、Flo11p または Flo5p とはアミノ酸配列は似ていないが、GPI アンカーサイトを有する点やセリン / スレオニンに富んだリピート配列を有するなどの特徴はこれらの凝集素と類似していた。以上の結果より、我々は Gsf2p が細胞表面のガラクトース含有糖鎖に結合することによって凝集を引き起こしていると結論づけた (81)。

酵母は1つの独立した細胞が出芽又は分裂することによって増殖する。しかし、多くの種類の酵母は pH や炭素源等の環境変化によって多数の細胞から成る枝分かれした菌糸状の増殖へと増殖形態を変化させる。このような2形性酵母の多くはヒトや植物に対して感染性を示す (83, 84)。近年、分裂酵母もまた菌糸状の増殖を行うことが報告された (85, 86)。分裂酵母は低窒素源・高グルコース培地 (LNB 培地) において菌糸状の増殖を行うことが報告され (85)、また、鉄が過剰な培地においてもまた寒天培地の内部に侵入する菌糸状の増殖を行う (86)。LNB 培地におけるこのような菌糸状の増殖は *gsf2* Δ 株では完全に消失しており、*gsf2*⁺ は凝集だけでなく、菌糸状の増殖にも必要であることが示唆された (81) (図 3)。細胞表面

Fig. 3. *S. pombe* can switch growth modes from a single-celled form to flocculation and invasive (filamentous) growth mediated by Gsf2p. The flocculin Gsf2p and its activator Pvg4p/Mbx2p are not only required for non-sexual flocculation but are also required for invasive (filamentous) growth through recognition of galactose residues on cell surface glycoconjugates in the presence of Ca²⁺.

a key role in flocculation and filamentous invasive growth in yeasts. The budding yeast *S. cerevisiae* extends the core oligosaccharide with an α 1,6-linked mannose backbone, which is further modified by addition of α 1,2- and α 1,3-linked mannose side chains (87). Flo1p, a lectin-like cell-surface protein which aggregates cells into 'flocs', binds to mannose sugar chains on the surface of other cells (88–90). In contrast, the glycoproteins of fission yeast *S. pombe* contain large amounts of α -linked galactose residues in addition to α -linked mannose residues (91). Galactosylation of glycoproteins is a unique feature of fission yeast, and Gsf2p binds to galactose-containing sugar chains on the surface of other cells.

G. The Role of Pyruvylated Galactose Found on the *S. pombe* Cell Surface

Nearly all of the proteins found on the cell surface of most organisms are glycosylated. In most cases, the glycan moieties associated with these glycoproteins provide the surface with a net negative charge, which plays a significant role in the regulation of the cell influx/efflux processes and in cell-cell interactions such as cell aggregation and pathogenic adhesion. A wide range of acidic saccharides and saccharide modifications, for example, muramic acid, hexuronic acids, sialic acids, succinate, lactate, and pyruvate, are found in

の糖タンパク質は酵母の凝集や菌糸状増殖の鍵となっており、出芽酵母 *S. cerevisiae* は α 1,6 結合したマンノース主鎖に α 1,2 結合、 α 1,3 結合したマンノース側鎖が存在しており (87)、出芽酵母凝集素 Flo1p はこのマンノースを認識して結合する (88–90)。これに対し、分裂酵母 *S. pombe* の糖タンパク質には多くの α 結合マンノースに加え、 α 結合ガラクトースが存在しており (91)、分裂酵母凝集素 Gsf2p はこのガラクトースを認識して結合している。

G. 分裂酵母の細胞表面に見出されたピルビン酸化ガラクトシルの機能

ほとんどの生物の細胞表面に見られるタンパク質には糖鎖が付加しており、多くの場合、この糖タンパク質中の糖鎖は細胞表面を負電荷にすることに貢献している。この負電化は細胞への物質の流入や排出、細胞同士の接着や病原体の宿主への接着等に重要な役割を担っている。多くの酸性糖、例えばムラミン酸、ヘキスロン酸、シアル酸、コハク酸、乳酸、そしてピルビン酸等は細菌の多糖において発見されている (92–97)。一般的に、シアル酸や硫酸が付加したグリカンには脊椎動物の糖タンパク質において見られる。出芽酵母 (*S. cerevisiae*、

bacterial polysaccharides (92–97). In general, sialylated and sulfated glycans are associated with vertebrate glycoproteins. In several budding yeast species (*i.e.* *S. cerevisiae*, *Candida albicans*, and *Pichia pastoris*), phosphate groups present on extracellular glycans provide the negative cell surface charge (98, 99). A notable exception is sialic acid α 2,6- and α 2,3-linked to the penultimate β -galactopyranosyl residues in glycans from two isolates of *C. albicans* (100, 101).

Andreishcheva *et al.* isolated mutants that lack PvGal in cell-surface glycoconjugates (*pvg* mutants) (102). Restoration of a negative charge to the cell surface by complementation with an *S. pombe* genomic library led to the identification of five genes involved in PvGal biosynthesis, designated *pvgI*⁺-*pvg5*⁺. *Pvg1p* was predicted to be a pyruvyltransferase because it shares a ~300-350-aa stretch of about 30% identity and about 45% similarity with nearly 20 identified or predicted pyruvyltransferases (103). *Pvg3p* was predicted to be galactosyltransferase (102). This corresponds with the finding that galactomannans purified from the *pvg3* mutant lack both pyruvated and β 1,3-linked galactose. *Pvg2p* and *Pvg5p* have no apparent orthologs, and *Pvg4p* (also called *Mbx2p*) has a MEF2-type MADS-box in its N-terminal region.

We compared flocculation of wild-type and *pvg1Δ* cells overexpressing *gsf2*⁺. Flocculation was initiated by addition of CaCl₂. While wild-type cells started to aggregate 60 sec after addition, the *pvg1Δ* strain began to aggregate within 20 sec. From this result, we reason that pyruvylation negatively regulates nonsexual flocculation by capping galactose residues in N-linked galactomannan (81). We further investigated whether pyruvylation also regulates invasive growth. Although the *pvg4⁺/mbx2⁺* gene was originally isolated as a multicopy suppressor of a *pvg4* mutant, defective in pyruvylation of N-linked oligosaccharides, deletion of *pvg4⁺/mbx2⁺* did not cause a defect in cell-surface pyruvylation. Instead, the deletion prevented invasive growth under conditions of low nitrogen and high glucose, and reduced flocculation of otherwise flocculent mutants by reducing *gsf2*⁺ expression. *pvg4⁺/mbx2⁺*-overexpressing strains exhibited nonsexual and calcium-dependent aggregation that was inhibited in the presence of galactose, but was mediated by induction of *gsf2*⁺. These findings indicate that *Pvg4p/Mbx2p* mediates invasive growth and flocculation via transcriptional activation of *gsf2*⁺ in fission yeast (104).

H. Conclusion

Recent progress in the *S. pombe* genome project has determined that *S. pombe* contains many genes that encode homologs of proteins required for glycosylation (Table I). Although we are beginning to gain some insight into the molecular mechanisms of the galactose recognition system in *S. pombe*, many questions have yet to be answered. The fission

Candida albicans, *Pichia pastoris* 等) では細胞外のグリカンに存在するリン酸基によって細胞表面が負電荷を帯びているが (98, 99), *C. albicans* 分離株の中にはグリカン中のガラクトピラノシルにシアル酸が α 2,6、 α 2,3 結合したものの存在する (100, 101)。

Andreishcheva らは細胞表面の PvGal が欠損した分裂酵母変異株 (*pvg* 変異株) を取得し (102)、この細胞表面の PvGal の欠損を相補する 5 つの遺伝子をゲノムライブラリーを用いたスクリーニングから同定し、*pvgI*⁺-*pvg5*⁺ と命名した。*Pvg1p* は約 20 もの推定ピルビン酸転移酵素と約 30 % の同一性、約 45% の相同性を示すことから、ピルビン酸転移酵素であると予想されている (103)。*Pvg3p* は *pvg3* 変異株から精製されたガラクトマンナンが PvGal だけでなく β 1,3 結合したガラクトースも欠損していることから、ガラクトース転移酵素であると予想されている (102)。*Pvg2p* と *Pvg5p* のオルソログは見つかっておらず、*Pvg4p* は *Mbx2p* と呼ばれ、その N 末端に MEF2 タイプの MADS-box を有する。

我々は *gsf2*⁺ を野性株及び *pvg1Δ* 株において過剰発現させ、両株の凝集の強さを比較した。凝集は CaCl₂ を添加することによって開始させた。野性株では 60 秒後に凝集が観察されたのに対し、*pvg1Δ* 株では 20 秒以内に凝集が観察された。この結果から、糖鎖のピルビン酸化はガラクトマンナンのガラクトース鎖をキャップすることによって非性的凝集を負に制御していることが示唆された (81)。我々はさらにピルビン酸化が菌糸状の増殖にも関与しているかを調べた。その中で、*pvg4⁺/mbx2⁺* は N-結合型糖鎖のピルビン酸化ガラクトースを欠損した *pvg4* 変異株のマルチコピーサプレッサーとして同定された遺伝子であるにも関わらず *pvg4⁺/mbx2⁺* の欠損は細胞表面のピルビン酸化には影響を与えず、その代わりに低窒素・高グルコース培地における菌糸状の増殖が阻害し、凝集変異株の *gsf2*⁺ の発現を低下させることによって凝集を消失させることが明らかになった。*pvg4⁺/mbx2⁺* 過剰発現株では *gsf2*⁺ の発現が誘導され、カルシウムイオン依存的なガラクトースによって阻害される非性的凝集が引き起こされた。これらのことから、*Pvg4p/Mbx2p* は分裂酵母において *gsf2*⁺ の発現を活性化することによって凝集や菌糸状の増殖に関与することが示唆された (104)。

H. 最後に

近年の分裂酵母ゲノムプロジェクトの進展から、分裂酵母が多くの糖鎖修飾に必要なタンパク質をコードする遺伝子を持っていることが明らかになった (表 I)。我々は分裂酵母のガラクトース認識機構の分子メカニズムに関する新たな知見を得始めたが、多くの疑問も残っている。分裂酵母凝集素 *Gsf2p* は出芽酵母凝集素 *Flo1p* や *Flo11p*、*Flo5p* と相同性は低く、

yeast flocculin Gsf2p does not share sequence similarity with budding yeast flocculins including Flo1p, Flo11p and Flo5p, and its N-terminal region recognizes and interacts with galactose-containing oligosaccharides located on the fission yeast cell surface (81). Therefore, identification of the functional domains and critical amino acid residues that mediate cell–cell adhesion and galactose binding in Gsf2p await future detailed analysis. In *S. cerevisiae*, it was reported that flocculation protects *FLO1*-expressing cells from multiple stresses, including antimicrobial drugs and ethanol (105). We suggest that *S. pombe* also makes flocs to provide protection from multiple stresses and uses filamentous growth to take evasive action in response to unfavourable environmental conditions including nutrient limitation and high iron concentrations. Screening for transcriptional regulators of *gsf2*⁺ is likely to shed light on the physiological significance of conditions that trigger filamentous growth.

S. pombe N-linked polysaccharides contain pyruvic acid 4,6-ketal-linked to Gal β 1,3-(PvGal) (8). Pyruvate has only rarely been found in eukaryotic polysaccharides and glycoprotein oligosaccharides. Available examples include several species of green and red algae (106), the nervous system of the sea slug *Aplysia kurodai* (107), and the marine sponge, in which PvGal is required for cellular recognition and adhesion (108). It is interesting to note the close structural similarity between the 4,6-ketal-linked pyruvate of the PvGal epitope and α 2,6-linked sialic acid common in glycoproteins of higher eukaryotes (8, 81). Therefore, the fission yeast cells may possess novel recognition system for PvGal. The continued identification of novel PvGal-interacting proteins in *S. pombe* will not only shed light on the galactose-recognition process in this organism, but will also be informative with respect to higher eukaryotes.

Acknowledgements

We thank members of the Takegawa lab who contributed to the work summarized in this review. We also thank Drs. Naotaka Tanaka (Kagawa Univ.), Hideki Tohda and Hiromichi Kumagai (Asahi Glass Co.) for valuable discussions. This work was partly supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, and Culture of Japan, and by the Project for Development of a Technological Infrastructure for Industrial Bioprocesses on R&D of New Industrial Science and Technology Frontiers by the Ministry of Economy, Trade & Industry (METI) and was sponsored by the New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO). T.M. was supported in part by the Japanese Society for the Promotion of Science (JSPS).

その N 末端領域で分裂酵母の細胞表面のガラクトース含有糖鎖を認識して結合する (81)。Gsf2p のガラクトースとの結合や細胞同士の接着に重要なドメインやアミノ酸残基の同定は今後の課題である。出芽酵母では、凝集は *FLO1* 発現株を抗菌剤やエタノールから保護することが報告されている (105)。分裂酵母もまた種々のストレスからの防御の為に凝集し、窒素源の枯渇や高濃度の鉄イオンなど、好ましくない環境条件から逃れる為に菌糸状の増殖を行っていると考えている。*gsf2*⁺ の発現を制御する因子の探索から菌糸状の増殖を引き起こす条件の生理的な重要性が明らかになるであろう。

分裂酵母 *S. pombe* の N- 結合型糖鎖には β 1,3 結合したガラクトースに 4,6 ケタール結合したピルビン酸 (ピルビン酸化ガラクトース: PvGal) が含まれている (8)。ピルビン酸は真核生物の多糖や糖タンパク質ではごくまれにしか見られない。分裂酵母以外にピルビン酸をその糖鎖中に持つ真核生物としては緑藻や紅藻 (106)、ウミウシ *Aplysia kurodai* の神経系 (107)、海綿等が報告されており、PvGal は細胞間認識・接着に必要とされている (108)。PvGal の 4,6 ケタール結合したピルビン酸と高等真核生物の糖タンパク質に共通して見られる α 2,6 結合したシアル酸の構造的な相同性は非常に興味深く (8, 81)、分裂酵母には PvGal を認識する新奇な機構があると考えられる。PvGal と相互作用するタンパク質の同定は分裂酵母におけるガラクトース認識機構を明らかにするためだけでなく、高等真核生物のガラクトース認識機構にも新たな知見が提供できるであろう。

References

1. Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., *et al.* (2002) *Nature* **415**, 871–880.
2. Zhao, Y., and Lieberman, H.B. (1995) *DNA Cell Biol.* **14**, 359–371.
3. Moreno, S., Ruiz, T. Sanchez, Y., Villanueva, J.R., and Rodriguez, L. (1985) *Arch. Microbiol.* **142**, 370–374.
4. Caramelo, J.J., and Parodi, A.J. (2007) *Semin. Cell Dev. Biol.* **18**, 732–742.
5. Movsichoff, F., Castro, O.A., and Parodi, A.J. (2005) *Mol. Biol. Cell* **16**, 4714–4724.
6. Bush, D.A., Horeisberger, M., Horman, I., and Wursch, P. (1974) *J. Gen. Microbiol.* **81**, 199–206.
7. Ballou, C. E., Ballou, L., and Ball, G. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9327–9331.
8. Gemmill, T.R., and Trimble, R.B. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 25945–25949.
9. Gemmill, T.R., and Trimble, R.B. (1998) *Glycobiology* **8**, 1087–1095.
10. Andreishcheva, E.N., Kunkel, J.P., Gemmill, T.R., and Trimble, R.B. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 35644–35655.
11. Ballou, C.E. (1990) *Methods Enzymol.* **185**, 440–470.
12. Yoko-o, T., Tsukahara, K., Watanabe, T., Hata-Sugi, N., Yoshimatsu, K., Nagasu, T., and Jigami, Y. (2001) *FEBS Lett.* **489**, 75–80.
13. Ohashi, T., Ikeda, Y., Tanaka, N., Nakakita, S., Natsuka, S., Giga-Hama, Y., and Takegawa, K. (2009). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 407–414.
14. Ohashi, T., and Takegawa, K. (2010) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 263–272.
15. Freeze, H.H., and Haltiwanger, R.S. (2009) *Essentials of Glycobiology*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
16. Gemmill, T.R., and Trimble, R.B. (1999) *Biochim. Biophys. Acta.* **1426**, 227–237.
17. Strahl-Bolsinger, S., Gentzsch, M., and Tanner, W. (1999) *Biochim. Biophys. Acta.* **1426**, 297–307.
18. Girrbaach, V., and Strahl, S. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 12554–12562.
19. Willer, T., Brandl, M., Sipiczki, M. and Strahl, S. (2005) *Mol. Microbiol.* **57**, 156–170.
20. Tanaka, N., Fujita, Y., Suzuki, S., Morishita, M., Giga-Hama, Y., Shimoda, C., and Takegawa, K. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 813–820.
21. Yoshida, A., Kobayashi, K., Many, H., Taniguchi, K., Kano, H., Mizuno, M., Inazu, T., Mitsunashi, H., Takahashi, S., Takeuchi, M., *et al.* (2001) *Dev. Cell* **1**, 717–724.
22. Beltran-Varelo de Bernabe, D., Currier, S., Steinbrecher, A., Celli, J., Van Beusekim, E., Van Der Zwang, B., Kayserili, H., Merlini, L., Chitayat, D., Dobyns, W. B., *et al.* (2002) *Am. J. Hum. Genet.* **71**, 1033–1043.
23. Willer T, Amselgruder W, Deutzmann R and Strahl S. (2002) *Glycobiology* **12**, 771–783.
24. Willer, T., Valero, M.C., Tanner, W., Cruces, J., and Strahl, S. (2003) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 621–630.
25. Lussier, M., Sdicu, A.M., Bussereau, F., Jacquet, M., and Bussey, H. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 15527–15531.
26. Romero, P.A., Lussier, M., Veronneau, S., Sdicu, A.M., Herscovics, A., and Bussey, H. (1999) *Glycobiology* **9**, 1045–1051.
27. Gemmill, T.R., and Trimble, R.B. (1999) *Glycobiology* **9**, 507–515.
28. Chappell, T.G., and Warren, G. (1989) *J. Cell Biol.* **109**, 2693–2702.
29. Chappell, T.G., Hajibagheri, M.A.N., Ayscough, K., Pierce, M., and Warren, G. (1994) *Mol. Biol. Cell* **5**, 519–528.
30. Yoko-o, T., Roy, S.K., and Jigami, Y. (1998) *Eur. J. Biochem.* **257**, 630–637.
31. Ikeda, Y., Ohashi, T., Tanaka, N., and Takegawa, K. (2009) *FEMS Yeast Res.* **9**, 115–125.
32. Dickson, R.C. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 27–48.
33. Holthuis, J.C., Pomorski, T., Riggers, R.J., Sprong, H., and Van Meer G. (2001) *Physiol. Rev.* **81**, 1689–1723.
34. Emdin, M. (2003) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**, 257–283.
35. Cowart, L.A. and Obeid, L.M. (2007) *Biochim. Biophys. Acta* **1771**, 421–431.
36. Dickson, R.C., Sumanasekera, C., and Lester, R.L. (2006) *Prog. Lipid Res.* **45**, 447–465.
37. Ko, J., Cheah, S., and Fischl, A.S. (1994) *J. Bacteriol.* **176**, 5181–5183.
38. Abeijon, C., Orlean, P., Robbins, P.W., and Hirschberg, C.B. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6935–6939.
39. Puoti, A., Desponds, C., and Conzelmann, A. (1991) *J. Cell Biol.* **113**, 515–525.
40. Feoktistova, A., Magnelli, P., Abeijon, C., Perez, P., Lester, R.L., Dickson, R.C., and Gould, K.L. (2001) *Genetics* **158**, 1397–1411.
41. Nakase, M., Tani, M., Morita, T., Kitamoto, H.K., Kashiwazaki, J., Nakamura, T., Hosomi, A., Tanaka, N., and Takegawa, K. (2010) *J. Cell Sci.* **123**, 1578–1587.
42. Beeler, T.J., Fu, D., Rivera, J., Monaghan, E., Gable, K., and Dunn, T.M. (1997) *Mol. Gen. Genet.* **255**, 570–579.
43. Zhao, C., Beeler, T., and Dunn, T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 21480–21488.
44. Uemura, S., Kihara, A., Inokuchi, J., and Igarashi, Y. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 45049–45055.
45. Huang, K.M., and Snider, M.D. (1995) *Mol. Biol. Cell* **6**, 485–496.
46. Suzuki, S., Matsuzawa, T., Nukigi, Y., Takegawa, K., and Tanaka, N. (2010) *Microbiology* **156**, 708–718.
47. Tabuchi, M., Tanaka, N., Iwahara, S., and Takegawa, K. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**, 121–125.
48. Tanaka, N., and Takegawa, K. (2001) *Yeast* **18**, 745–757.
49. Tanaka, N., Konomi, M., Osumi, M., and Takegawa, K. (2001) *Yeast* **18**, 902–914.
50. Ohashi, T., Nakakita, S., Sumiyoshi, W., Yamada, N., Ikeda, Y., Tanaka, N., and Takegawa, K. (2011) *Glycobiology* **21**, 340–351.
51. Nakayama, K., Nagasu, T., Shimma, Y., Kuromitsu, J., and Jigami, Y. (1992) *EMBO J.* **11**, 2511–2519.
52. Hashimoto, H. and Yoda, K. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**, 682–686.
53. Jungmann, J., and Munro, S. (1998) *EMBO J.* **17**, 423–434.
54. Jungmann, J., Rayner, J.C., and Munro, S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 6579–6585.
55. Kojima, H., Hashimoto, H., and Yoda, K. (1999) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**, 1970–1976.
56. Donoso, I., Muñoz-Centeno, M.C., Sánchez-Durán, M.A., Flores, A., Daga, R.R., Guevara, C.M., and Bejarano, E.R. (2005) *Mol. Gen. Genomics* **274**, 155–167.
57. Matsuzawa, T., Fujita, Y., Tanaka, N., Tohda, H., Itadani, A., and Takegawa, K. (2011) *J. Biosci. Bioeng.* **111**, 158–166.

58. Schell, M.A., and Wilson, D.B. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 1162–1166.
59. Segawa, T., and Fukasawa, T. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 10707–10709.
60. Fukasawa, T., Obonai, K., Segawa, T., and Nogi, Y. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 2705–2707.
61. Majumdar, S., Ghatak, J., Mukherji, S., Bhattacharjee, H., and Bhaduri, A. (2004) *Eur. J. Biochem.* **271**, 753–759.
62. Tschopp, J.F., Emr, S.D., Field, C., and Schekman, R. (1986) *J. Bacteriol.* **166**, 313–318.
63. Furusawa, M., and Doi, H. (1998) *Genetica* **102–103**, 333–347.
64. Shevelev, I.V., and Hubscher, U. (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 364–376.
65. Kanoh, J., Sadaie, M., Urano, T., and Ishikawa, F. (2005) *Curr. Biol.* **15**, 1808–1819.
66. Balou, C.E. (1990) *Methods Enzymol.* **185**, 440–470.
67. Herscovics, A., and Orlean, P. (1993) *FASEB J.* **7**, 540–550.
68. Tanaka, N., and Takegawa, K. (2001) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **13**, 519–532.
69. Takegawa, K., Tanaka, N., Tabuchi, M., and Iwahara, S. (1996) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 1156–1159.
70. Segawa, H., Ishida, N., Takegawa, K., and Kawakita, M. (1999) *FEBS Lett.* **451**, 295–298.
71. Cappellaro, C., Baldermann, C., Rachel, R., and Tanner, W. (1994) *EMBO J.* **13**, 4737–4744.
72. Miki, B.L.A., Poon, N.H., and Seligy, V.L. (1982) *J. Bacteriol.* **150**, 878–889.
73. Bidard, F., Blondin, B., Dequin, S., Vezinhet, F., and Barre, P. (1994) *Curr. Genet.* **25**, 196–201.
74. Teunissen, A.W.R.H., Holub, E., Van Der Hucht, J., Van Den Berg, J.A., and Steensma, H.Y. (1993) *Yeast* **9**, 423–427.
75. Watari, J., Takata, Y., Ogawa, M., Sahara, H., Koshino, S., Onnela, M.-L., Airaksinen, U., Jaatinen, R., Penttilä, M., and Keranene, S. (1994) *Yeast* **10**, 211–225.
76. Kobayashi, O., Hayashi, N., Kuroki, R., and Sone, H. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 6503–6510.
77. Veelders, M., Bruckner, S., Ott, D., Unverzagt, C., Mosch, H.U., and Essen, L.Q. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 22511–22516.
78. Kim, K.H., Cho, Y.M., Kang, W.H., Kim, J.H., Byun, K.H., Park, Y.D., Bae, K.S., and Park, H.M. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**, 1237–1242.
79. Kang, W.H., Park, Y.H., and Park, H.M. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 13797–13806.
80. Tanaka, N., Awai, A., Bhuiyan, M.S.A., Fujita, K., Fukui, H., and Takegawa, K. (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 1356–1359.
81. Matsuzawa, T., Morita, T., Tanaka, N., Tohda, H., and Takegawa, K. (2012) *Mol. Microbiol.* **82**, 1531–1544.
82. Kobayashi, O., Suda, H., Ohtani, T., and Sone, H. (1996) *Mol. Gen. Genet.* **251**, 707–715.
83. Madhani, H.D., and Fink, G.R. (1998) *Trends Cell Biol.* **8**, 348–353.
84. Sanchez-Martinez, C., and Perez-Martin, J. (2001) *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 214–221.
85. Amoah-Buahin, E., Bone, N., and Armstrong, J. (2005) *Eukaryot. Cell* **4**, 1287–1297.
86. Prevorovsky, M., Stanurova, J., Puta, F., and Folk, P. (2009) *FEMS Microbiol. Lett.* **293**, 130–134.
87. Zou, J., Scocca, S., and Krag, S.S. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* **317**, 487–496.
88. Huang, K.M., and Snider, M.D. (1995) *Mol. Biol. Cell* **6**, 485–496.
89. Katayama, S., Hirata, D., Arellano, M., Perez, P., and Toda, T. (1999) *J. Cell Biol.* **144**, 1173–1186.
90. Miyata, M., Doi, H., Miyata, H., and Johnson, B.F. (1997) *Antonie Van Leeuwenhoek* **71**, 207–215.
91. Ziegler, F.D., Gemmill, T.R., and Trimble, R.B. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 12527–12535.
92. Becker, A., Katzen, F., Puhler, A., and Ielpi, L. (1998) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 145–152.
93. Chandrasekaran, R., Lee, E.J., Thailambal, V.G., and Zevenhuizen, L.P.T.M. (1994) *Carbohydr. Res.* **261**, 279–295.
94. Silver, R.P., Aaronson, W., and Vann, W.F. (1998) *Rev. Infect. Dis.* **10**, Suppl. 2, S282–S286.
95. Leslie, M.R., Parolis, H., Parolis, L.A.S., and Petersen, B.O. (1998) *Carbohydr. Res.* **309**, 95–101.
96. Bebauld, G.M., Choy, Y.M., Dutton, G.G.S., Funnell, N., Stephen, A.M., and Yang, M.T. (1973) *J. Bacteriol.* **113**, 1345–1347.
97. Cerantola, S., Bounery, J.-D., Segonds, C., Marty, C., and Montrozier, H. (2000) *FEMS. Microbiol. Lett.* **185**, 243–246.
98. Cutler, J.E. (2001) *Med. Mycol.* **39**, Suppl. 1, 75–86.
99. Parolis, L.A.S., Duus, J.O., Parolis, H., Meldal, M., and Bock, K. (1996) *Carbohydr. Res.* **293**, 101–117.
100. Alviano, C.S., Travassos, L.R., and Schauer, R. (1999) *Glycoconj. J.* **16**, 545–554.
101. Soares, R.M., Soares, R.M. de A., Alvoano, D.S., Angluster, J., Alviano, C.S., and Travassos, L.R. (2000) *Biochem. Biophys. Acta.* **1474**, 262–268.
102. Andreishcheva, E.N., Kunkel, J.P., Gemmill, T.R., and Trimble, R.B. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 35644–35655.
103. Sadykov, M.R., Ivashina, T.V., Kanapin, A.A., Shliapnikov, M.G., and Ksenzenko, V.N. (1998) *Mol. Biol.* **32**, 797–804.
104. Matsuzawa, T., Yoritsune, K.I., and Takegawa, K. (2012) *Eukaryot. Cell* **11**, 151–158.
105. Smukalla, S., Caldara, M., Pochet, N., Beauvais, A., Guadagnini, S., Yan, C., Vences, M.D., Jansen, A., Prevost, M.C., Latge, J.P., Fink, G.R., Foster, K.R., and Verstrepen, K.J. (2008) *Cell* **135**, 726–737.
106. Liao, M.L., Chiovitti, A., Munro, S.L., Craik, D.J., Kraft, G.T., and Bacic, A. (1996) *Carbohydr. Res.* **296**, 237–247.
107. Araki, S., Abe, S., Satake, M., Hayashi, A., Kon, K., and Ando, S. (1991) *Eur. J. Biochem.* **198**, 689–695.
108. Spillmann, D., Hard, K., Thomas-Oates, J., Vliegenthart, J.F., Misevic, G., Burger, M.M., and Finne, J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 13378–13387.
109. Thompson, D., Pepys, M.B., Tickle, I., and Wood, S. (2002) *J. Mol. Biol.* **320**, 1081–1086.

Profile of the Authors

Ken-ichi Yoritsune (C-4) is in a MSC student of Kyushu University. His major research focuses on the biosynthesis and physiological role of pyruvylated galactose in fission yeast.

Mai Nakase (C-3) obtained a BSC and MSC degree in Agriculture from Kagawa University, and a Ph.D. degree from Kyushu University in 2012. Her research focuses on the intracellular trafficking and ubiquitination of plasma membrane transporters in fission yeast.

Takao Ohashi (C-2) graduated from the Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka University in 2002. Obtained a Ph.D. degree from Osaka University in 2007 under the supervision of Prof. Sumihiro Hase. 2007: Post-doctoral fellow at the Department of Applied Biological Sciences, Kagawa University. 2008-August 2010: Post-doctoral fellow at the Department of Bioscience and Biotechnology, Kyushu University. September 2010 to present: Assistant Professor, International Center for Biotechnology, Osaka University (Prof. Kazuhito Fujiyama's Lab). His current interests are structure and biosynthesis of cell wall polysaccharides from yeast and plant.

Kaoru Takegawa (C-6) graduated from Kyoto University in 1986 (MSC), and obtained his Ph.D. degree in biochemistry (Faculty of Agriculture) from Kyoto University in 1990. He began his studies on the biological roles of the microbial endoglycosidase in Kyoto University and Kagawa University. He joined Dr. Scott Emr's laboratory of University of California,

San Diego (1991-1993), where he studied the phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast *VPS34* gene essential for vacuolar protein sorting. 2008 to present: Professor at the Department of Bioscience and Biotechnology, Kyushu University.

Tomohiko Matsuzawa (C-1 position of Gal) obtained a BSC and MSC degree in Agriculture from Kagawa University, and is in a Ph.D. student of Kyushu University. His research focuses on understanding the nonsexual flocculation, glycerol and galactose metabolism, and glucose-derepression machineries in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.