Biosynthetic Pathway and Physiological Role of Galactose-Containing Oligosaccharides in Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* におけるガラクトース鎖付加機構と生理的役割

Tanaka, Naotaka*; and Takegawa, Kaoru

Department of Life Sciences, Kagawa University, Miki-cho, Kagawa 761-0795, Japan,

FAX: 81-87-891-3021, E-mail: takegawa@ag.kagawa-u.ac.jp

*Present Address: Department of Molecular Membrane Biology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa, Ishikawa 920-0934, Japan

Key Words : fission yeast, galactosylation, UDP-galactose transporter, Golgi apparatus

Abstract

In recent years, the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* has attracted interest as a promising unicellular eukaryote model for studies on the biosynthetic pathway and oligosaccharide structures of glycoproteins. The glycoproteins of *S. pombe* contain a large amount of galactose in addition to mannose, indicating that *S. pombe* is equipped with mechanisms for galactosylation of glycoprotein, like mammalian cells. To elucidate the physiological role of galactosylation, we isolated an *S. pombe* mutant (*gms1*) defective in protein galactosylation. We found that disruption of the *gms1*⁺ gene (Δ *gms1*) in *S. pombe* led to a complete loss of cell surface galactosylation, due to a defect in the transport of UDP-galactose as substrate for galactosyltransferase from cytosol into the lumen of the Golgi apparatus. Therefore, the Δ *gms1* strain is very useful for the analysis of the phenotypes of *S. pombe* cells lacking galactose residues and for the elucidation of the galactosylation mechanism. Although galactose residues are not essential for growth of *S. pombe* cells, the galactosylation of protein is required for the maintenance of normal cell shape, sexual agglutination, tolerance toward various drugs, and non-sexual flocculation in *S. pombe*.

要 約

近年、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は糖タンパク質糖鎖の生合成や糖鎖構造の解析の研究に真核生物のモデル系としての興味もたれている。分裂酵母の糖タンパク質にはマンノースの他に多量のガラクトースが含まれていることから、動物細胞のように糖タンパク質糖鎖にガラクトースを付加する能力があることがわかってきた。分裂酵母におけるガラクトース鎖の機能を解析する目的で、我々はガラクトース鎖付加に欠損を示す変異株(*gms1*変異株)を取得した。そして分裂酵母の*gms1*⁺遺伝子がUDP-ガラクトーストランスポーターをコードしており、*gms1*⁺遺伝子を破壊した株ではガラクトシルトランスフェラーゼの基質であるUDP-ガラクトースがゴルジ内腔へと輸送されないために細胞表層のガラクトース鎖が完全に欠損していることを明らかにした。 Δ *gms1*株はガラクトース鎖の付加が完全に行われないために分裂酵母におけるガラクトース鎖の機能を解析する上で非常に有用であることがわかった。 Δ *gms1*株の諸性質の解析結果から、分裂酵母のガラクトース鎖は細胞形態の維持、性的凝集、種々の薬剤への抵抗性や非性的凝集などの様々な現象に重要な役割を果たしていることを明らかにすることができた。

A. Introduction

Schizosaccharomyces pombe is a unicellular eukaryote belonging to the Ascomycetes. It is called a fission yeast because it only reproduces by means of fission, besides spores. *S. pombe* is the most intensely studied and well-characterized yeast species in terms of molecular genetics and cell biology, along with baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *S. pombe* has not been used actively to make products such as wine, beer and bread industrially, unlike other yeast species. Although *S. pombe* belongs to the yeast group and is subject to manipulation similar to other yeasts, it has many features different from the budding yeast *S. cerevisiae*. Fission and budding yeasts are evolutionarily distant, and *S. pombe* can be considered unique with char-

A. はじめに

分裂酵母は単細胞真核微生物でAscomycetesに属する。分裂酵母という名前は胞子を形成する以外は分裂により細胞が増殖することに起因している。分裂酵母はパン酵母と並び、細胞生物学や分子遺伝学の手法を用いることができるために現在最も解析が進んでいる酵母である。分裂酵母は他の酵母とは異なり、ワイン、ビールやパン製造など工業的にはこれまで積極的に用いられていなかった。他の酵母と同様な取り扱い技術が適用可能であるが、多くの点で出芽酵母とは異なっている。分裂酵母と出芽酵母は進化的にも離れており、分裂酵母は動物細胞と類似した性質を持ったユニークな酵母である。そのため分裂

acteristics similar to mammalian cells, making the fission yeast an informative and accurate eukaryotic model system for molecular-biological studies. For example, it is one of the best experimental models for the study of cell-cycle control, chromosomal structure, and signal transduction for sexual differentiation. There are also prospective biotechnological applications for this microorganism, such as in heterologous eucaryotic gene expression, and *S. pombe* is considered to be an attractive host for secretory proteins. Glycosylation is a major covalent modification that modulates the structure and function of secretory and membrane proteins in eucaryotes. The differences between yeast and mammalian glycan structures of glycoproteins are a major stumbling block to the use of yeasts as a production vector. Therefore, determining the safety and efficacy of *S. pombe*-derived glycoproteins requires learning the exact structures produced by this organism. Here we will focus on recent work on the biosynthetic pathway and physiological role of galactose-containing oligosaccharides in fission yeast.

B. Glycosylation in *S. pombe*

In the budding yeast *S. cerevisiae*, elongation of the *N*-linked oligosaccharide occurs by the extension of an α 1,6-linked mannose backbone onto which mannose residues are attached (1). Many glycosylation-defective mutants have been isolated from *S. cerevisiae*, and genetic selections have resulted in the identification of several genes required for the glycosylation event (2). Molecular characterization of the products of these genes has revealed a number of biochemical activities involved in this process. In contrast, the synthesis of the *N*-linked oligosaccharides of *S. pombe* is not well understood. Glycosylation occurs in the lumen of the *S. pombe* endoplasmic reticulum (ER), as in mammalian cells. Glycoproteins are then transported into the Golgi apparatus where modifications take place, although these modifications differ from those which occur in higher eucaryotic cells (Fig. 1). The initial step in the assembly of *N*-linked oligosaccharides seems to be similar to that of *S. cerevisiae*, and the precursor $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ is assembled on the dolichol carrier (3). Then the oligosaccharide is transferred to proteins in the ER, and the precursor is modified to the core oligosaccharide, $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, by removal of the three glucose residues. The smallest *N*-linked oligosaccharide is $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, because *S. pombe* cells lack the activity of $\text{Man}_9\alpha$ 1,2-mannosidase in the ER (4). The *N*-linked oligosaccharides in *S. pombe* were elongated in the secretory pathway by the addition of 50–100 sugar residues. Recently, an *S. pombe och1* mutant was isolated that was hypersensitive to an anticancer drug E7070 (5). The *S. pombe och1* mutant did not synthesize the outer chains on secreted acid phosphatase, and the *och1*⁺ gene was a functional homolog of *S. cerevisiae* *OCH1*. This indicates that *S. pombe* Och1p/mannosyltransferase is a key enzyme in the elongation of the outer chain (5). The glycoproteins of *S.*

酵母は分子生物学的研究における真核生物のより良いモデル系となっている。例えば細胞周期コントロール、染色体構造、性的分化のシグナル伝達などの実験系として最も適している。また分裂酵母は例えば異種タンパク質発現などのバイオテクノロジー方面への応用も期待されており、分泌タンパク質の魅力的な宿主と考えられている。グリコシレーションは真核生物において分泌及び膜タンパク質の構造と機能を調節する最も主要な修飾機構である。酵母を異種タンパク質発現の宿主として用いる場合に酵母と動物細胞の生産する糖タンパク質の構造の違いは最も大きな障壁となっている。そこで分裂酵母の糖タンパク質の安全性や糖鎖付加の効果を解析するためにはその正確な構造や生合成機構を研究する必要がある。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及び生理的機能についての最近の研究成果についてまとめた。

B. 分裂酵母の糖鎖付加機構

出芽酵母において糖タンパク質の*N*-結合型糖鎖は α 1,6-結合マンノース主鎖へのマンノース残基の付加が起こる(1)。多くの糖鎖合成欠損変異株の取得が出芽酵母で行われ、変異株の遺伝学的解析から糖鎖修飾に必要な多くの遺伝子が同定されている(2)。これらの遺伝子産物の解析から糖鎖合成に関与する多くの特徴を持ったタンパク質が明らかにされた。一方、分裂酵母の*N*-結合型糖鎖の生合成機構についてはこれまでにあまり解析が行われていない。分裂酵母においても動物細胞と同様に*N*-結合型糖鎖の付加は粗面小胞体(ER)内腔で開始される。糖タンパク質はその後ゴルジ体内腔へと輸送され、さらに糖鎖修飾が行われるが、その修飾機構が高等動物のものとは大きく異なっている(図1)。*N*-結合型糖鎖付加の初期ステップは出芽酵母と類似しており、前駆体である $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ がドリコール担体に付加される(3)。その後、この糖鎖がER内でタンパク質へと付加され、3分子のグルコースが除去されることによりコア糖鎖である $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ へと変換される。分裂酵母の最小の*N*-結合型糖鎖の構造は $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ である。これは出芽酵母で見られるER局在 $\text{Man}_9\alpha$ 1,2-マンノシダーゼ活性が分裂酵母では検出されないことによる(4)。分裂酵母の*N*-結合型糖鎖は分泌経路において最終的には50–100個の過剰な糖鎖の伸長が起こる。最近になって抗ガン剤のE7070に強い感受性を示す変異株として取得されていた変異株として分裂酵母 *och1* 変異株が取得された(5)。分裂酵母の *och1* 変異株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、分裂酵母 *och1*⁺ 遺伝子は出芽酵母のマンノシルトランスフェラーゼをコードする *OCH1* 遺伝子と機能的にも類似している。この結果から分裂酵母 Och1p/マンノシルトランスフェラーゼも糖外鎖の伸長の鍵となる酵素である。分裂酵母の糖タンパク質はマンノースの他に多量のガラクトースを含んでいる(6,7)。これは動物細胞のように糖タン

Fig. 1. Schematic diagram of the biosynthetic pathway of glycoproteins in fission yeast.

pombe contain a large amount of galactose in addition to mannose (6, 7), indicating that *S. pombe* is equipped with mechanisms for the galactosylation of glycoprotein like animal cells. Research has demonstrated that the outer chain of galactomannan has an α -1,2-linked galactose or pyruvylated galactose attached to a poly- α -1,6-linked mannose backbone (8), and the pyruvylated galactose epitope bears remarkable structural resemblance to the *N*-acetylneuraminic acid-linked galactose epitope found in mammalian cells (9). This is in contrast to the mannosylphosphate groups found on the glycoproteins produced by other fungi including *S. cerevisiae* (10). Although there have been no reports on the isolation of *S. pombe* mutants lacking only pyruvylated galactose residues, the lack of pyruvate in oligosaccharides (the loss of surface charge) may change the properties and environment of the *S. pombe* cell surface. A major galactosyltransferase was purified (11), and the corresponding gene was cloned and identified as *gma12*⁺ (12). Galactosyltransferase is located in the Golgi apparatus in *S. pombe*. The Golgi apparatus is well organized and morphologically distinct in *S. pombe*, unlike in *S. cerevisiae* (11, 13). The pathway of protein galactosylation has revealed that galactosyltransferase exhibits genetic redundancy (12, 14). The Gma12p galactosyltransferase is responsible for the synthesis of an *N*-linked GalMan₉GlcNAc core glycan in an early step in the elongation of the Golgi outer chain, and for the galactosylation of *O*-linked oligosaccharides (14, 15). Gmh3p among the three members of the *gmh* family as α -1,2-galactosyltransferase homologs is also involved in the

パク質へのガラクトース付加機構を有することを示している。ガラクトマンナン糖鎖構造の解析結果から α 1,6-結合マンノース主鎖へ α 1,2-結合のガラクトースもしくはピルビン酸化ガラクトースが付加されていることがわかった(8)。ピルビン酸化ガラクトースは動物細胞に見られる *N*-アセチルノイラミン酸との構造の類似点が認められ興味深い(9)。ピルビン酸ガラクトースが分裂酵母における唯一の酸性糖鎖であることは出芽酵母など他の真核微生物の糖タンパク質糖鎖がマンノースリン酸であることと対照的である(10)。これまでにガラクトースのピルビン酸化に関与する分裂酵母の遺伝子は全く知られていないが糖鎖中のピルビン酸ガラクトースの欠損(細胞表面電荷の欠損)は細胞表面環境や性質を変えるのかもしれない。分裂酵母の主要なガラクトシルトランスフェラーゼは精製され(11)、本タンパク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(12)。ガラクトシルトランスフェラーゼ活性はゴルジ体に局在しているが、あまり発達していない出芽酵母のゴルジ体とは違い分裂酵母のゴルジ体は良く発達しており形態的にも出芽酵母とは異なっている(11, 13)。糖タンパク質のガラクトース鎖合成に関与する遺伝子の解析からガラクトシルトランスフェラーゼが複数存在することがわかってきた(12, 14)。Gma12/ガラクトシルトランスフェラーゼは *N*-結合型コア糖鎖 GalMan₉GlcNAc のゴルジでの外鎖伸長に関与しており、また *O*-結合型糖鎖のガラクトース付加にも関与している(14, 15)。3つのガラクトシルトランスフェラーゼホモログとして同定された *gmh* ファミリータンパクの中で

Fig. 2. A model for the function of the Gms1p/UDP-galactose transporter on the Golgi membrane. The galactosylation of glycoproteins in fission yeast requires the transport of UDP-galactose as substrate for the galactosyltransferase into the lumen of the Golgi apparatus, which is achieved by the Gms1p/UDP-galactose transporter. UDP-galactose is synthesized from UDP-glucose by UDP-glucose 4-epimerase(s). In addition to the galactosyltransferase encoded by *gma12*⁺, there are seven ORFs with homology to Gma12p in the *S. pombe* genome as shown in the figure.

galactosylation of the *N*-linked core oligosaccharides, and the $\Delta gmh3\Delta gma12$ double disruptant still has some galactosyltransferase activity (14). In addition to the galactosyltransferases encoded by *gma12* and *gmh1-3*, we found four ORFs with homology to galactosyltransferase (Fig. 2 and our unpublished results). Therefore, the genetic redundancy of galactosyltransferase may be a way to compensate for the single mutation of galactosyltransferase.

C. Isolation of Glycosylation-deficient Mutants from *S. pombe*

The study of mutants of the yeast *S. cerevisiae* defective in protein glycosylation has contributed greatly to the elucidation of the glycoprotein glycan structures and the pathways for their biosynthesis (1, 2). Several glycosylation-defective mutants have independently been isolated in *S. pombe*. Ballou and Ballou (16) screened for glycosylation mutants among cells that fail to adhere to QAE-Sephadex, and isolated three recessive mutants (*gmn1-3*). One strain, Sp137 (*gmn1gmn3*), is almost devoid of galactose residues, and these mutations led to the synthesis of a secreted invertase with a high electrophoretic mobility, indicative of underglycosylation (15). Huang and Snider have

Gmh3 タンパクは*N*-結合型コア糖鎖のガラクトース鎖付加に関係しており、*gmh3gma12* 二重破壊株はまだガラクトシルトランスフェラーゼ活性を有している(14)。Gma12と*gmh1-3*遺伝子がコードするガラクトシルトランスフェラーゼに加えて、我々は分裂酵母にはあと4つのガラクトシルトランスフェラーゼホモログ遺伝子が存在することを見いだした(図2及び未発表結果)。このようにガラクトシルトランスフェラーゼの遺伝的重複は一つの遺伝子が欠損してもその変異を補うためにあると考えられる。

C. 分裂酵母糖鎖合成欠損変異株の取得

出芽酵母において糖鎖合成欠損変異株に関する研究は糖タンパク質糖鎖の構造や生合成経路の解析に非常に有用な知見を与えた(1,2)。一方、分裂酵母においてこれまでにいくつかのグループにより糖鎖合成欠損変異株が取得された。BallouとBallouはQAE-Sephadexゲルに吸着しない変異株の中から分裂酵母糖鎖合成欠損変異株を単離し、3つの劣勢変異株(*gmn1-3*)を取得した(16)。これらの中の1つの菌株Sp137(*gmn1gmn3*)はほとんどガラクトース鎖の付加が行われておらず、この変異は分泌糖タンパク質であるインベルターゼの分子量が低下していることから糖鎖合成に欠損があることがわかった(16)。HuangとSniderはソ

screened mutants among cells that grew well in the presence of sorbitol but grew poorly without sorbitol (17). Among these osmotically sensitive mutants, they have isolated four recessive mutants (*gps1-4*). *N*-linked oligosaccharides from *gps2* mutants have much less galactose than wild-type because of reduced levels of the galactose donor, UDP-galactose, due to decreased activity of UDP-glucose 4-epimerase which synthesizes UDP-galactose. Jigami and co-workers have isolated mutants that have reduced numbers of galactose residues using galactose-specific *Griffonia simplicifolia* I (GS-I) lectin (18), including eight recessive mutants (*gmd1-8*). One of these mutants, *gmd3*, showed a defect in glycosylation of secreted acid phosphatase and decreased amounts of both mannose and galactose. The *gmd3*⁺ gene encodes a protein that has significant similarity with *S. cerevisiae* Alg11p involved in the synthesis of *N*-linked core oligosaccharides (18).

To elucidate the physiological role of galactosylation, we have screened for galactosylation-defective mutants based on galactose-specific peanut lectin agglutination and isolated one mutant that is deficient in the galactosylation of cell surface glycoproteins. We isolated a *gms1* (for galactomannan synthesis defective) mutant that is deficient in glycosylation of cell surface glycoproteins, in which the galactose content of polysaccharides was significantly reduced (19). The chemical structure of *gms1* and *N*-linked polysaccharides was studied. Mannose and galactose compose the sugars in the wild-type polysaccharides at a ratio of 1 : 1.2. In contrast, the composition of sugars in the *gms1* mutant polysaccharides was Man : Gal = 1 : 0.18. The NMR data showed that the number of side chains consisting of α -1,2-linked galactose residues is much smaller and unsubstituted α -1,6-polymannose chains are attached to the core oligosaccharides in the *gms1* mutant. Because of the unbranched α -1,6-polymannose outer chain of *gms1* cell surface glycoproteins, the agglutination activity against Concanavalin A lectin was increased.

We cloned the *gms1*⁺ gene which restored the galactosylation of cell wall glycoproteins. DNA sequence analysis of the minimum complement fragment revealed the presence of a hydrophobic protein of 353 amino acid residues with one intron (20, 21). 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 human UDP-galactose transporter. Interestingly, we found that cells containing a disruption of the *gms1*⁺ gene were viable and the Δ *gms1* cells did not bind with the galactose-specific peanut lectin. Moreover, galactose residues in the polysaccharide of Δ *gms1* cells were completely lost as determined from sugar-composition and NMR analyses. These results showed that the addition of galactose residues to cell surface glycoproteins is not essential for the growth of *S. pombe* cells. As mentioned above, α -galactosyltransferase activity is retained by the Δ *gmh3* Δ *gma12*

ルビトール存在下では良く生育するがソルビトールを培地から除くとほとんど生育しない変異株を単離した(17)。これらの浸透圧感受性変異株の中から4つの劣勢変異を示す糖鎖合成欠損変異株(*gps1-4*)を取得した。これらの変異株の中で *gps2* 変異株の *N*-結合型糖鎖はガラクトース含量が低下していた。これはガラクトースの供与体であるUDP-ガラクトースの含量がUDP-グルコース4-エピメラーゼ活性の低下から減少していることに起因する。Jigamiらのグループはガラクトース特異的レクチンである *Griffonia simplicifolia* I (GS-I)レクチンを利用してガラクトース含量の低下した8つの劣勢変異株(*gmd1-8*)を取得した(18)。これらの変異株の中で *gmd3*変異株は分泌糖タンパク質である酸性ホスファターゼの糖鎖付加に欠損を示し、マンノース及びガラクトース両方の含量が低下していた。*gmd3*⁺遺伝子は出芽酵母の *N*-結合型コア糖鎖の合成に関与するAlg11pと高い相同性を示すタンパクをコードしていることがわかった(18)。

分裂酵母におけるガラクトース鎖の機能を解析する目的で我々はガラクトース特異的レクチンであるピーナッツレクチンの凝集性を利用してガラクトース鎖付加に欠損を示す変異株の取得を試みた。その結果、細胞表層糖タンパク質のガラクトース鎖欠損を示す1つの変異株を取得した。我々はこの変異株を *gms1*(galactomannan synthesis defective)変異株と名付けた(19)。解析の結果 *gms1*変異株の細胞表層多糖のガラクトース含量が極度に低下していることがわかった。そこで *gms1*変異株の *N*-結合型多糖の構造解析を行った。分裂酵母野生株の多糖のマンノースとガラクトースの糖組成の比は1 : 1.2であるのに対し、*gms1*変異株の糖組成の比はMan : Gal = 1 : 0.18であった。NMR分析の結果、側鎖である α 1,2-結合ガラクトースの数が著しく減少しており、ほとんどが置換されていない α 1,6-結合マンノース主鎖から成ることが明らかになった。*Gms1*変異株は分岐していない α 1,6-結合マンノース外鎖から成るためにコンカナバリンAレクチンに対する凝集活性が増大していた(19)。

我々は *gms1*変異株のガラクトース鎖付加欠損を相補する *gms1*遺伝子の取得を行った。取得された遺伝子は1個のイントロンを含む353個のアミノ酸から成る疎水性のタンパク質をコードしていることがわかった(20, 21)。既知のタンパク質とのアミノ酸配列の比較の結果、*Gms1*タンパクはヒトのUDP-ガラクトーストランスポートと高い相同性を示すことが明らかになった。大変興味深いことに *gms1*⁺遺伝子破壊株(Δ *gms1*株)は致死性を示さず、またガラクトース特異的ピーナッツレクチンが細胞表層に全く結合しないことがわかった。さらに解析の結果、 Δ *gms1*株から調製した多糖にはガラクトースが全く含まれていないことが糖組成分析やNMR分析の結果から明らかになった。これらの結果から我々は初めて分裂酵母のガラクトース鎖が完全に欠損した株を取得し、分裂酵母では細胞表層糖タンパク質へのガラクトース鎖への付加は生育には必須ではないことを明らかにすることができた。既に述べたように分裂酵母 *gmh3**gma12*

Table I. Genes and mutants necessary for glycosylation of *S. pombe* glycoproteins.

Gene	Mutant	Gene product	Reference
<i>gms1+</i>		SPCC1795.03(352aa), UDP-galactose transporter A102T mutation (original <i>gms1-1</i> mutant)	19-21, 34, 47
	<i>gmn1</i>	unknown, defective in adding α 1,2-linked mannose residues	16, 68
<i>gmn2+</i>		defective in retention of luminal endoplasmic reticulum proteins, Erd1 homolog	16, Tanaka <i>et al.</i> unpublished
	<i>gmn3</i>	allelic to <i>gms1</i> (A258E mutation)	16, 34
	<i>gps1</i>	unknown, defective in adding mannose residues to the core oligosaccharide	17
	<i>gps2</i>	unknown, reduced UDP-glucose 4-epimerase activity	17
	<i>gps3</i>	unknown, osmotically sensitive	17
	<i>gps4</i>	unknown, osmotically sensitive	17
	<i>gmd1</i>	unknown, decrease in the number of N-linked oligosaccharides	18
	<i>gmd2</i>	unknown, defective in elongation of N-linked oligosaccharides	18
<i>gmd3+</i>		SPCC330.08 (471aa), <i>S. cerevisiae</i> <i>ALG11</i> homolog, essential	18
	<i>gmd4</i>	unknown, defective in elongation of N-linked oligosaccharides	18
<i>och1+</i>		SPAC1006.05c (366aa), α -1,6-mannosyltransferase	5
<i>stt3+</i>		SPBC1271.02 (752aa) oligosaccharyltransferase subunit, essential	69

double mutant strain (14). Therefore, the genetic redundancy of galactosyltransferase may be a way to compensate for the single mutation of galactosyltransferase. Surprisingly, the supply route of UDP-galactose from the cytoplasm to the Golgi lumen was disrupted by the single mutation of the *gms1+* gene encoding the UDP-galactose transporter (20) (Fig. 2). The genes and mutants known to be necessary for glycosylation are summarized in Table 1.

D. The *gms1+* Gene Encodes a UDP-galactose Transporter of *S. pombe*

Nucleotide-sugar transporters, which are also essential to the process of glycosylation, have received considerable attention in recent years. Protein glycosylation required the delivery of nucleotide sugars as a substrate for the glycosyltransferase from cytosol into the lumen of the Golgi apparatus. This process is mediated by specific nucleotide-sugar transporters that are hydrophobic, multispanning membrane proteins mainly localized at the Golgi membrane. Nucleotide-sugar transport activities including the nucleotide diphosphate/monophosphate antiporter mechanism have been studied by using the proteoliposome reconstitution system (22, 23). Recently, cDNAs encoding nucleotide-sugar transporters have been identified and

二重破壊株もガラクトシルトランスフェラーゼ活性が残っていることなどから、ガラクトシルトランスフェラーゼは複数存在し、その機能は相補的である(14)。一方、驚いたことに細胞質からゴルジ内腔へのUDP-ガラクトースの供給は*gms1+*遺伝子のみを破壊すると極度に低下することが強く示唆された(20)(図2)。なおこれまでに報告された分裂酵母の糖鎖合成に関与する遺伝子と変異株についてTable 1にまとめた。

D. *gms1+*遺伝子は分裂酵母のUDP-ガラクトーストランスポーターをコードしている

糖ヌクレオチドトランスポーターは糖転移酵素とともに糖鎖合成のプロセスには必須であり、近年注目されるようになってきた。タンパク質へ糖鎖が付加されるためには糖転移酵素の基質となる糖ヌクレオチドを細胞質からゴルジ体内腔へ輸送されなくてはならない。糖ヌクレオチドのゴルジ体内腔への輸送は複数膜貫通タンパク質である糖ヌクレオチドトランスポーターにより行われる。ヌクレオチドの二リン酸/一リン酸のアンチポート機構を含む糖ヌクレオチドの輸送活性はプロテオリビッドの再構成システムを用いて研究されていた(22, 23)。最近になって糖ヌクレオチドトランスポーターをコードするcDNAがほ乳類(24-29)、原生動物(30)、酵母(31, 32)などから同定され解

characterized from mammalian species (24–29), protozoa (30), and yeasts (31, 32) on the basis of their ability to complement the phenotypes of mutants defective in transport activity. The products of these cDNA clones consist of 320–400 amino acid residues, with 40–60% similarity of sequence (33). No conserved Golgi localization signal has been identified for these proteins, and the mechanism by which the sorting signals mediate retention is not clear. In addition, the mechanism by which the cell might regulate the distribution of Golgi nucleotide-sugar transporters within this organelle, perhaps to modulate the composition of carbohydrates on glycoproteins, glycolipids, or other carbohydrate polymers, has not been described.

To identify the amino acids important for function and localization of the Gms1p/UDP-galactose transporter, we characterized the *gms1* mutant alleles further. Sequencing analysis of the coding region of Gms1p derived from *gms1* mutants identified a single amino acid mutation (A102T or A258E) located within the putative transmembrane region (34). Interestingly, Ala-102 and Ala-258 residues are not conserved with other nucleotide-sugar transporters. The two mutational positions Ala-102 and Ala-258, which cause the decrease in UDP-Gal transport activity, were on helix 2 or 7 of the putative transmembrane, and both residues (alanine is categorized as a hydrophobic amino acid) were mutated into hydrophilic amino acids, Thr-102 and Glu-258, respectively. Why did alteration of these amino acids in Gms1p affect UDP-Gal transport activity? Although the characteristics of Thr-102 in the Ala102Thr single mutation in the *gms1* mutant are similar to those of Ser conserved in other nucleotide-sugar transporters, the *gms1* mutation led to a reduction in UDP-Gal transport activity. Therefore, the decrease in UDP-galactose transport activity observed for the Ala102Thr mutant Gms1p may not apply to all nucleotide-sugar transporters. The significance of these alanine residues to substrate recognition is a subject for future study.

The Golgi complex contains an array of glycosyltransferases and nucleotide-sugar transporters that elongate the core *N*- and *O*-linked carbohydrate structures added to glycoproteins in the ER. All known Golgi glycosyltransferases are type II integral membrane proteins in yeast and mammals (35). These glycosyltransferases have a single transmembrane domain with a short N-terminal cytoplasmic portion. The Golgi localization signals of these enzymes have been studied extensively. While no conserved localization signal has been identified, the transmembrane domains of several mammalian Golgi glycosyltransferases have been shown to localize reporter proteins to the Golgi complex (36). Thus, the mechanism by which these sorting signals mediate localization and retention is still not clear. Moreover, no conserved Golgi localization signal has been identified for multispansing membrane proteins. To search for domains functionally important to the targeting of Golgi membrane, we then constructed C-terminal deletion mutants of the Gms1p/

析が行われている。これらの遺伝子は主に糖ヌクレオチドの輸送活性が欠損する変異株の表現型を相補する遺伝子の解析から取得された。そのcDNAクローンがコードするタンパク質は320–400個のアミノ酸から成り、互いに40–60%の類似性を示す(33)。これまでに糖ヌクレオチドトランスポーターのゴルジ膜への局在に重要な保存された領域は見いだされておらず、輸送や局在シグナルについては不明である。またおそらく糖タンパク質、糖脂質や他の糖ポリマーなどにより調節されているであろう糖ヌクレオチドトランスポーターの局在・発現調節などについても明らかにされていない。

そこでGms1/UDP-ガラクトーストランスポーターの機能や局在に重要なアミノ酸を同定する目的で我々は*gms1*変異株の解析を行った。*gms1*変異株のGms1タンパクをコードする領域の塩基配列を決定したところ、1カ所の塩基の変異を生じた2つのアレル(Ala102ThrとAla258Glu)を同定することができた(34)。またこの変異はいずれもGms1タンパクの推定膜貫通領域内に起こっていた。興味深いことに102番目のアラニンと258番目のアラニンはこれまで報告されている糖ヌクレオチドトランスポーターには保存されていなかった。このAla-102とAla-258はGms1タンパクのそれぞれ2番目と7番目の膜貫通領域にあり、疎水性アミノ酸であるアラニンから親水性アミノ酸であるスレオニン(102)とグルタミン酸(258)へと置換されるとUDP-ガラクトース輸送活性を著しく低下させることがわかった(34)。ではなぜこれらのアミノ酸の変異がGms1タンパク質のUDP-ガラクトースの輸送活性を低下させるのか? スレオニンへと変異したGms1タンパクの102番目のアラニンは、他の糖ヌクレオチドトランスポーターの場合はすべてスレオニンと類似したセリン残基であるにも関わらずAla102Thr変異によりUDP-ガラクトース輸送活性が極度に低下する。それ故、Gms1タンパクのAla102Thr変異でUDP-ガラクトース活性が低下することはすべての糖ヌクレオチドトランスポーターにあてはまらない可能性がある。これらのアラニン残基の基質認識への重要性に関してはさらなる解析が必要であると考えられる。

一連のゴルジ体に局在する糖転移酵素や糖ヌクレオチドトランスポーターはERで付加された*N*-及び*O*-結合型糖鎖の伸長に機能している。これまでに酵母や高等動物で知られているゴルジ局在糖転移酵素はタイプIIの一回膜貫通タンパク質である(35)。これらの糖転移酵素は短い*N*-末端部分を細胞質側に向けてゴルジに局在している。これらの酵素のゴルジ局在化シグナルについては詳しく解析が行われている。しかし保存された局在化シグナルは同定されていないが、いくつかの動物のゴルジ糖転移酵素の膜貫通ドメインにはゴルジへの局在化シグナルが存在することがわかっている(36)。このようにゴルジ局在膜タンパク質は未だ輸送や局在化シグナルについては不明な点が多

UDP-Gal transporter. This revealed that the hydrophilic domain of the C-terminus was dispensable for the Golgi targeting of the UDP-Gal transporter in *S. pombe*. Aoki *et al.* (37) demonstrated that either the N- or C- terminal cytoplasmic segment of the human UDP-Gal transporter could be replaced by the corresponding part of the human CMP-sialic acid transporter without affecting the UDP-Gal transport activity. This finding strongly supports our results, indicating that the C-terminal hydrophilic domain of the *S. pombe* UDP-Gal transporter includes no region involved in the targeting from the ER to the Golgi membrane. After deletion of putative helix 8 of the UDP-Gal transporter in *S. pombe*, most Gms1 mutant proteins are stably localized at the ER membrane (34). Therefore, the C-terminal portion of Gms1p may not be important for stability in the *S. pombe* cells. The Gms1 protein was successfully expressed in UDP-galactose transporter-deficient Lec8 cells and was able to complement the genetic defect of the mutant cells (21), indicating that the *S. pombe* Gms1 protein was correctly targeted and stably localized even to the mammalian Golgi membrane. Essential features specifying the localization of Golgi transporter proteins are probably common to higher eukaryotes and yeasts.

E. Characterization of the *S. pombe* Mutant Deficient in UDP-galactose Transport Activity

We found that disruption of the *gms1*⁺ gene (Δ *gms1*) in *S. pombe* led to a complete loss of cell surface galactosylation, due to a defect in the transport of UDP-galactose as substrate for galactosyltransferase from cytosol into the lumen of the Golgi apparatus. Therefore, the Δ *gms1* strain is very useful for the analysis of the phenotypes of *S. pombe* cells lacking galactose residues and for the elucidation of the mechanism of galactosylation.

The walls of *S. pombe* are composed of β -1,3-glucan, β -1,6-glucan, α -1,3-glucan, and galactomannoproteins (6). The mechanism of cell wall formation has been studied by genetic and molecular biological approaches in *S. pombe*, and several regulatory factors identified. Cps1 protein has been identified as the catalytic subunit of β -glucan synthase (38), and Rho1/small GTP-binding protein (39) and protein kinase C homolog (40) were identified as key regulators in the signaling pathways that control actin organization and the morphogenetic process. Although β -glucan has been studied in great detail, little is known about the synthesis of α -glucan in *S. pombe* cells. Recently, a fission yeast gene, *ags1*⁺, which encodes a putative α -glucan synthase, has been identified (41). The *ags1* mutant has a rounded cell-shape phenotype, and *ags1* was allelic to *mok1* which was originally isolated by screening to identify downstream effectors for Pck1/2 protein kinases (42). The *ags1/mok1* mutant has an abnormal cell shape, randomization of F-actin and a weak cell wall (41, 42). These results show that α - or β -glucan is essential for cell wall construction and morphogenesis in *S. pombe*

い。また複数膜貫通タンパク質のゴルジ体への局在についてはほとんど明らかにされていない。そこでGms1タンパク質のゴルジへの局在に重要なドメインを解析する目的でC-末端部分を削除したGms1変異体を作成した。この結果、Gms1タンパクのC-末端部分の親水性領域はゴルジ体への局在に重要ではないことがわかった。AokiらはヒトのUDP-ガラクトーストランスポーターのN-及びC-末端の細胞質ドメインはUDP-ガラクトースの輸送活性を変化させることなくCMP-シアル酸トランスポーターの相同性の低い同領域のアミノ酸と置換できることを報告している(37)。この結果からもUDP-ガラクトーストランスポーターのC-末端の細胞質領域はそれほどゴルジへの局在に寄与していない可能性が示された。しかしGms1タンパクの最後の8番目の膜貫通ドメインを除いた場合、ゴルジ体ではなくERに局在することがわかった(34)。分裂酵母Gms1タンパクは動物のUDP-ガラクトーストランスポーターが欠損したLec8細胞の輸送活性を相補できることがわかり(21)、Gms1タンパクは高等動物のゴルジ膜にも正しく局在できることが明らかになった。そこでGms1タンパクのゴルジ膜への局在機構を明らかにすることは高等動物や酵母に共通した機構を解明できるものと考えている。

E. ガラクトース鎖欠損株の諸性質の解析

既に述べたように分裂酵母の*gms1*⁺遺伝子破壊株(Δ *gms1*株)は細胞質からゴルジ内腔へのUDP-ガラクトースの輸送が欠損しているために、細胞表層のガラクトース鎖が完全に付加されない。そこで Δ *gms1*株は分裂酵母におけるガラクトース鎖の欠損による表現型の解析や、ガラクトース鎖付加機構の解析に優れたモデルである。

分裂酵母の細胞壁は β -1,3-グルカン、 β -1,6-グルカン、 α -1,3-グルカン及びガラクトマンナンから成る(6)。細胞壁形成のメカニズムは遺伝学的及び分子生物学的なアプローチから行われ、いくつかの調節因子がわかっている。Cps1タンパクは β -グルカン合成酵素の触媒サブユニットとして(38)、またRho1/低分子量GTP結合タンパク(39)やプロテインキナーゼCホモログ(40)はアクチン構成や細胞形態形成をコントロールするシグナル経路の鍵となる因子として同定された。 β -グルカンに関しては詳細な検討が行われていたが、一方 α -グルカンの合成に関してはほとんど明らかになっていなかった。最近になって*ags1*⁺という分裂酵母遺伝子が α -グルカン合成酵素をコードしていることが報告された(41)。*ags1*変異株は野生株の様な円筒形ではなく丸い細胞形態を示しており、*ags1*遺伝子はPck1/2タンパクキナーゼの下流に位置するエフェクター分子として取得された*mok1*遺伝子と同一であった(42)。*ags1/mok1*変異株は異常な細胞形態を示し、F-アクチンのランダム化、また弱い細胞壁構造を有することがわかっている(41, 42)。これらの結果から分裂酵母の α -及び β -グルカンは細胞壁の構造や細胞形態に必須であることが明らかにされた(41, 43)。細胞壁形成におけるガラクトマンノプロテイン

(41, 43). A role for galactomannoproteins in the process of cell wall formation in *S. pombe* was suggested by Osumi *et al.* (44, 45). Electron microscopic observation of the regenerating protoplasts of *S. pombe* revealed that the fibrillar network covers the protoplast surface, and amorphous particles of galactomannoproteins appear in the intrafibrillar space and gradually fill the network (44).

The $\Delta gms1$ 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 the $\Delta gms1$ cells were round or pear-shaped, the diameter being larger (3–6 mm in width). The ultrastructural profile was analyzed using transmission electron microscopy. Galactomannan represents the peripheral cell surface layer in *S. pombe* cells, and this layer consists of secreted galactose-rich glycoproteins (46). A reduction of galactomannan in the cell wall of strain $\Delta gms1$ was observed. The cell wall (130–150 nm) being thinner than in the wild-type (200 nm) (47). Electron microscopic analyses suggest that galactomannan is exposed at the surface of the fission yeast cell wall, and a deficiency of galactose residues affects the cell wall structure in *S. pombe*. To confirm whether the cell wall is affected by the defect in galactosylation of cell surface glycoprotein in *S. pombe*, wild-type and $\Delta gms1$ cells were incubated with β -glucanase. Wild-type cells remained stable on exposure to β -glucanase. However, $\Delta gms1$ cells were rendered hypersensitive to lysis by treatment with β -glucanase, strongly indicating that cell surface galactosylation is crucial not only in the organization of the cell wall but also in the protection of β -glucan from exogenous β -glucanase.

In *S. cerevisiae*, a number of glycosylation mutants, defective in the synthesis of outer *N*-linked oligosaccharide, show vanadate resistance (48, 49). The *gms1* mutant was severely sensitive to vanadate unlike *S. cerevisiae* mutants defective in glycosylation, and could not grow on YPD plates containing 1 mM orthovanadate. The target of vanadate *in vitro* may differ and the cell surface galactosylation may inhibit the uptake of vanadate into cytosol in *S. pombe*.

In *S. cerevisiae*, mating type-specific agglutination of α - and α -cells depends on the heterophilic interaction of two cell surface glycoproteins, the gene products of Aga2(Aga1) and Sag1 (50). The oligosaccharide moieties of α - and α -agglutinin are not essential for the mating type-specific cell-cell interaction, however, glycosylated peptides are four to five times more active than non-glycosylated ones (51). We further demonstrated that the mating process was severely affected in the *S. pombe* $\Delta gms1$ strains during nutritional starvation because the cells were incapable of sexual conjugation (47). Therefore, the galactosylation of cell surface glycoproteins is engaged in sexual conjugation in *S. pombe*. Although mating type-specific agglutinins of h^+ and h^- cells have not been well identified in *S. pombe*, galactosylation of agglutinins may significantly affect the mat-

の機能についてはOsumiらにより解析が行われている(44, 45)。分裂酵母のプロトプラストからの再生過程を電子顕微鏡を用いて解析した結果、繊維ネットワークがプロトプラスト表面を覆い、ガラクトマンノプロテインの無定形の粒子が内側の繊維スペースに現れて徐々にネットワークを覆い始めることが報告された(44)。

$\Delta gms1$ 株は26°Cや36°Cでも生育するがその生育速度は野生株と比較して遅い。分裂酵母野生株は円筒形の細胞形態を有するのに対して、80%以上の $\Delta gms1$ 細胞は丸いか洋なし型をしており、直径もやや野生株より大きい(3–6 mm)。 $\Delta gms1$ 細胞の微細構造について電子顕微鏡を用いて観察を行った。ガラクトマンナンは細胞の表層に局在しており、この層はガラクトース鎖を含む分泌糖タンパク質から成っていることが知られている(46)。このガラクトマンナン層の減少が $\Delta gms1$ 株の細胞壁に認められ、 $\Delta gms1$ 株の細胞壁(130–150 nm)が野生株のものより(200 nm)薄くなっていることが明らかになった(47)。この電子顕微鏡観察の結果から、ガラクトマンナンは細胞の最も表層部分に露出しており、ガラクトース鎖の欠損は細胞壁の構造にも影響を与えることを明らかにした。さらに $\Delta gms1$ 株のガラクトース鎖欠損に伴う細胞壁構造に及ぼす影響を調べる目的で、野生株及び $\Delta gms1$ 株に β -グルカナーゼを作用させた。野生株は β -グルカナーゼに対して抵抗性を示すのに対して、 $\Delta gms1$ 株は β -グルカナーゼに強い感受性を示して細胞が溶解されることがわかった。この結果からガラクトース鎖付加は細胞壁の構造に重要であるだけでなく外部からの β -グルカナーゼに対する抵抗性に機能していることを明らかにできた(47)。

出芽酵母において*N*-結合型糖鎖の合成に異常を示す多くの糖鎖合成欠損変異株がバナジン酸に抵抗性を示すことが報告されている(48, 49)。*gms1*変異株は出芽酵母の糖鎖合成欠損変異株とは異なり、バナジン酸に対しても強い感受性を示すことがわかった。バナジン酸の生体内におけるターゲット分子が出芽酵母と分裂酵母では異なっている可能性があり、細胞表層のガラクトース鎖付加が阻害されることにより分裂酵母ではバナジン酸の細胞質への取り込みが阻害されないのかもしれない。

出芽酵母において α -及び α -細胞の性的凝集はAga2(Aga1)及びSag1という細胞表層糖タンパク質の相互作用によるものである(50)。 α -及び α -アグルチニンの糖鎖部分は交配型特異的な細胞と細胞の相互作用には重要ではないが、糖鎖付加が不完全なアグルチニンより4–5倍活性が高いことが報告されている(51)。我々は分裂酵母の $\Delta gms1$ 株において窒素飢餓条件下において性的凝集が起こらないことから交配プロセスに影響を及ぼすことを明らかにした(47)。この結果は分裂酵母の性的凝集に細胞表層糖タンパク質のガラクトース鎖付加が重要であることを示唆するものである。分裂酵母の h^+ 及び h^- 株のアグルチニンに関しては明らかになっていないが、アグルチニンのガラクトース鎖付加が

ing type-specific cell-cell interaction in *S. pombe*. Interestingly, Miyata *et al.* (43) reported that the addition of galactose to the medium promoted the sexual agglutination process. In contrast, the addition of galactose dispersed non-sexual flocs of wild-type h^+ or h^- haploid *S. pombe* cells. The role of cell surface galactosylation in sexual conjugation is to prompt interaction between cells of opposite mating types, and mediate the response to sex pheromones by providing a synapse at the point of cell-cell contact, at which both pheromone secretion and cell fusion occur.

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

Flocculation of *S. cerevisiae* is a nonsexual aggregation of the cells which is calcium-dependent and reversible. Flocculation and sedimentation of the cells to the bottom of the fermentor are desirable properties in industrial fermentation. 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 results from a lectin-like interaction between a cell wall sugar-binding protein and cell-surface mannan (52). Several dominant flocculation genes such as *FLO1*, *FLO5*, *FLO9*, and *FLO10* have been defined in *S. cerevisiae* by classical genetics, and these genes have been cloned and sequenced by several groups (53-55). Although the N-terminal domain is believed to react with neighbouring cell wall mannoprotein (56), the precise functions of *FLO* gene products in cell-cell interactions are still unclear.

We have isolated fission yeast mutants that constitutively flocculate upon growth in liquid media (57). Heterothallic strains of fission yeast, h^+ and h^- , are usually nonflocculent when cultured separately. In contrast, cells of the homothallic strains of *S. pombe* become intensely flocculent (sexual aggregation) after prolonged cultivation. In contrast to sexual aggregation, little attention has been given to flocculent mutants from heterothallic strains and to the mechanism of nonsexual flocculation in *S. pombe*. Therefore, one of the flocculent mutants, *gsf1*, was further characterized. Colonies of *gsf1* cells grew well at both 26°C and 36°C, and the mutant had no obvious mutant phenotype with regard to ion or drug sensitivity or cell morphology. We investigated whether the flocculent phenotype of the *gsf1* strain was caused by the unusual secretion of proteins by comparing the secretion of invertase, which is a typical secreted protein in *S. pombe* (57). The invertase activity of *gsf1* cells was indistinguishable from that of wild-type cells, indicating that the protein secretion of this mutant was normal.

When the flocculent *gsf1* cells were washed with 10 mM EDTA, flocculation was completely repressed. Deflocculated cells were washed with excess water, and CaCl_2 was added to the cell suspension. The *gsf1* cells showed recovery of flocculation activity. These results showed that flocculation is calcium-

細胞間の相互作用に影響を及ぼす可能性が示唆された。興味深いことに Miyata らは培地へのガラクトースの添加が性的凝集過程を促進することを報告している(43)。一方、ガラクトースの培地への添加は一倍体の非性的凝集を阻害することも述べている。性的凝集における細胞表層のガラクトースの機能は異なる性タイプを持つ菌との相互作用を促進し、性フェロモンの分泌と細胞融合が起こる細胞と細胞の接する接点を与えることで性フェロモンの応答を媒介しているのかもしれない。

F. 分裂酵母細胞表層のガラクトース鎖は細胞間認識機構に必須である

出芽酵母の非性的凝集はカルシウム依存的及び可逆的に起こることが知られている。出芽酵母の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、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わかりつつある(52)。出芽酵母には複数の優性凝集素遺伝子が遺伝学的手法により同定され、いくつかのグループによりクローン化されアミノ酸配列が決定された(53-55)。凝集素のN-末端ドメインが隣の細胞と相互作用すると考えられているが(56)、細胞間の相互作用に果たす*FLO*遺伝子産物の詳細な機能についてはいまだに不明な点が多い。

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の変異株を単離した(57)。 h^+ 及び h^- 細胞と呼ばれる分裂酵母のヘテロタリックな菌株は別々に培養すると通常は凝集性を示さないが、ホモタリックな菌株は長く培養を行うと性的凝集を引き起こす。性的凝集と比較して、分裂酵母におけるヘテロタリック株の凝集変異株や非性的凝集機構についてはこれまでほとんど注目されていなかった。そこで我々は取得した凝集変異株の1つである*gsf1*株についてさらに解析を行った。*gsf1*変異株は26°Cでも36°Cでも良好な生育を示し、薬剤感受性や細胞形態などに顕著な表現型を示さない。*gsf1*変異株が野生株と比較してタンパク質の異常を示すかを分泌糖タンパク質であるインペルターゼについて調べた。*gsf1*変異株のインペルターゼの分泌は正常であり、凝集がタンパク質の分泌異常により引き起こされたのではないことが示された(57)。

*gsf1*変異株の菌体を 10 mM EDTA で洗浄してやると細胞の凝集は完全に抑えられた。この凝集しなくなった菌体を水で洗い、 CaCl_2 を添加してやると再び細胞が凝集した。この結果は分裂酵母の非性的凝集も出芽酵母と同様にカルシウムイオン依存的に起こることを示している。出芽酵母の*FLO1*変異株の凝集はマンノースの添加により阻害されることから、Flo1タンパクが

dependent in *S. pombe*, similar to *S. cerevisiae*. Flocculation of *S. cerevisiae* *FLO1* mutant cells was inhibited by the addition of mannose, and therefore Flo1p is believed to possess mannose-specific lectin-like activity (56). Surprisingly, the flocculation of *S. pombe* *gsf1* mutant cells was completely inhibited not by the addition of mannose and glucose but by the addition of galactose. The results indicate that the flocculation of *S. pombe* is mediated by a galactose-specific recognition mechanism. The sugar specificity of the sugar-binding activity was examined. The flocculation of *gsf1* cells was inhibited by the addition of methyl- α , β -galactose, but not by the addition of galactosamine, *N*-acetylgalactosamine, or galacturonic acid. The flocculation activity was also inhibited by the addition of galactose-containing oligosaccharides such as lactose (Gal β →4Glc), melibiose (Gal α 1→6Glc), and raffinose (Gal α 1→6Glc α 1→2 β Fru), indicating that the *S. pombe* *gsf1* cells recognize the nonreducing sugars of galactose residues.

To determine if galactose-containing cell surface glycoproteins are required for flocculation in *S. pombe*, we tested the coflocculation between *gsf1* and Δ *gms1* cells. When wild-type cells were mixed with *gsf1* cells and allowed to co-flocculate, the supernatant was clear indicating that the wild-type and *gsf1* cells were combined into flocs. In contrast, very little coflocculation with Δ *gms1* cells was observed and the supernatant remained turbid. Therefore, binding sites for *gsf1* cells are present on the surface of nonflocculent wild-type cells, but the surface of the galactose-deficient strain Δ *gms1* did not include recognition and binding sites involved in flocculation interactions (Fig. 3). Thus, the galactosylation of cell surface glycoproteins is engaged not only in sexual conjugation but also in non-sexual flocculation in *S. pombe*.

Johnson *et al.* reported that the addition of 50% galactose dispersed non-sexual flocs of wild-type *h*⁺ or *h*⁻ haploid *S. pombe* cells (59). This suggested that wild-type *S. pombe* cells produce small amounts of galactose-specific flocculin induced by nutrient limitation in the medium. Interestingly, the addition of galactose to the medium suppressed non-sexual flocculation and promoted sexual flocculation (43). Therefore, the mechanisms of sexual and non-sexual flocculation may be regulated by different systems. Recently, the G protein-coupled receptor kinase homologue gene (*prk1*⁺) was isolated in *S. pombe* (60). Disruption of the *prk1*⁺ gene increased flocculation (60), and the Prk1 protein shares significant sequence similarity with *S. cerevisiae* Ume5p kinase (61). The *UME5* gene is also known as *SSN3* (62), and suppresses the *snf1* mutant defect in *SUC2* derepression (63). The *SSN3* null mutation partially relieved glucose repression of *SUC2*, and also increased flocculation (62). Moreover, several genes involved in glucose repression, such as *TUP1* (64), *SSN6* (65) and *MIG1* (66), were found to play important roles in non-sexual flocculation in *S. cerevisiae*. These findings strongly suggest that flocculation in *S. pombe* is con-

マンノース特異的レクチン様活性を有していると考えられている(56)。驚くことに分裂酵母 *gsf1* 変異株の凝集はマンノースやグルコースでは阻害されないが、ガラクトースの添加により完全に阻害されることがわかった(57)。この結果は分裂酵母にはガラクトースを特異的に認識する機構が備わっていることを示している。*gsf1*株の糖の特異性について調べると、メチル α , β -マンノシドの添加により阻害されるが、ガラクトサミン、*N*-アセチルガラクトサミンやガラクトン酸では阻害されなかった。また*gsf1*の凝集は例えばラクトース、メリビオースやラフィノースなどのオリゴ糖でも阻害されることから、分裂酵母 *gsf1* 細胞は非還元末端にガラクトース残基を持つ糖を認識していることが明らかになった(57)。

分裂酵母の凝集にガラクトースを含む細胞表層糖タンパク質が関与しているかを検討するため、*gsf1*変異株と *gms1* 変異株の共凝集を調べた。野生株と *gsf1*株を混合して培養を行うと培養上清は透明となることから *gsf1*は野生株と共に凝集することがわかった。一方、*gsf1*株と Δ *gms1*株を混合後、培養を行うと上澄みは濁ったままであった。これより*gsf1*株が結合する物質は野生株には存在するが、ガラクトース欠損 Δ *gms1*株には存在しないことが明らかになった(図3)。このように細胞表層のガラクトース残基は性的凝集のみならず非性的凝集にも関係していることがわかった(57)。

Johnsonらは野生株の一倍体分裂酵母の非性的凝集は50%のガラクトースの添加により分散できることを報告している(59)。このことは分裂酵母の凝集素は培地中の栄養成分の枯渇により少量のガラクトース特異的凝集素が生産されることを示している。興味深いことに培地へのガラクトースの添加は非性的凝集を抑えるが性的凝集は促進されることから、分裂酵母の性的及び非性的凝集は異なった機構で調節されていることが考えられる(43)。最近、分裂酵母のGタンパク質連結レセプターキナーゼホモログ遺伝子(*prk1*⁺)が単離された(60)。*prk1*⁺遺伝子の破壊は非性的凝集を増大させ、Prk1タンパクは出芽酵母のUme5キナーゼと高い相同性を示す(61)。*UME5*遺伝子はまた出芽酵母のインベルターゼ*SUC2*遺伝子の抑制に異常を示す*snf1*変異株のサプレッサーとして単離された*SSN3*遺伝子(62)と同一である(63)。*SSN3*遺伝子破壊株は*SUC2*遺伝子のグルコース抑制が部分的に解除されており、凝集性を示す(62)。また出芽酵母のグルコース抑制に関与する*TUP1*(64)、*SSN6*(65)、*MIG1*(66)などのいくつかの遺伝子は非性的凝集素の発現に関与していることが報告されている。これらの結果は出芽酵母の*FLO1*遺伝子様の分裂酵母凝集素の発現が出芽酵母と同様にカタボライトレプレッションを通

Fig. 3. Coflocculation between *gsf1* cells and wild-type or $\Delta gms1$ cells. Flocculation of *gsf1* cells was inhibited by the addition of galactomannan from wild-type cells but not by that from $\Delta gms1$ cells.

trolled by the *prk1*⁺ gene through the repression of catabolite similar to the *FLO1* gene from *S. cerevisiae* (67). We recently found that the flocculation of $\Delta prk1$ mutant cells was also inhibited by the addition of galactose (unpublished results). Isolation and characterization of the genes involved in the expression of *gsf1*⁺ should lead to a better understanding of the molecular mechanisms of flocculation in *S. pombe*.

じて分裂酵母 *prk1*⁺ 遺伝子により調節されていることを強く示唆している(67)。我々は *prk1*⁺ 遺伝子破壊株の凝集がガラクトースの添加により阻害されることを確認している(未発表結果)。*gsf1* (凝集素)遺伝子及びその発現に関与する遺伝子の単離は分裂酵母における非性的凝集機構の理解に役立つことが期待される。

Acknowledgements

We thank members of the Takegawa lab who contributed to the work summarized in this review. We also thank Masako

Osumi, Mami Konomi, Masao Kawakita, Nobuhiro Ishida, Clinton Ballou, and Yuko Hama for helpful discussions, and Rio, Hana, and Maho Takegawa for drawing the original cartoon. This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, and Culture of Japan, and a grant from the Asahi Glass Foundation.

References

- Balou, C.E. (1990) *Methods Enzymol.* **185**, 440–470
- Herscovics, A., and Orlean, P. (1993) *FASEB J.* **7**, 540–550
- Zou, J., Scocca, S., and Krag, S.S. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* **317**, 487–496
- Ziegler, F.D., Gemmill, T.R., and Trimble, R.B. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 12527–12535
- Yoko-o, T., Tsukahara, K., Watanabe, T., Hata-Sugi, N., Yoshimatsu, K., Nagasu, T., and Jigami, Y. (2001) *FEBS Lett.* **489**, 75–80
- Manners, D.J., and Mayer, M.T. (1977) *Carbohydr. Res.* **57**, 189–203
- Moreno, S., Ruiz, T. Sanchez, Y., Villanueva, J.R., and Rodriguez, L. (1985) *Arch. Microbiol.* **142**, 370–374
- Gemmill, T.R., and Trimble, R.B. (1998) *Glycobiology* **8**, 1987–1095
- Gemmill, T.R., and Trimble, R.B. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 25945–25949
- Jigami, Y., and Odani, T. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 335–345
- Chappell, T.G., and Warren, G. (1989) *J. Cell Biol.* **109**, 2693–2702
- Chappell, T.G., Hajibagheri, M.A., Ayscough, K., Pierce, M., and Warren, G. (1994) *Mol. Biol. Cell* **5**, 519–528
- Ayscough, K., Hajibagheri, N.M.A., Watson, R., and Warren, G. (1993) *J. Cell Sci.* **106**, 1227–1237
- Yoko-o, T., Roy, S.K., and Jigami, Y. (1998) *Eur. J. Biochem.* **257**, 630–637
- Ziegler, F.D., Cavanagh, J., Lubowski, C., and Trimble, R.B. (1999) *Glycobiology* **9**, 497–505
- Ballou, L., and Ballou, C.E. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2790–2794
- Huang, K.M., and Snider, M.D. (1995) *Mol. Biol. Cell* **6**, 485–496
- Umeda, K., Yoko-o, T., Nakayama, K., Suzuki, T., and Jigami, Y. (2000) *Yeast* **16**, 1261–1271
- Takegawa, K., Tanaka, N., Tabuchi, M., and Iwahara, S. (1996) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 1156–1159
- Tabuchi, M., Tanaka, N., Iwahara, S., and Takegawa, K. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**, 121–125
- Segawa, H., Ishida, N., Takegawa, K., and Kawakita, M. (1999) *FEBS Lett.* **451**, 295–298
- Milla, M.E., Clairmont, C.A., and Hirschberg, C.B. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 103–107
- Milla, M.E., and Hirschberg, C.B. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1786–1790
- Eckhardt, M., Muhlenhoff, V., Bethe, A., and Gerardy-Schahn, R. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 20189–20195
- Guillen, E., Abeijon, C., and Hirschberg, C. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7888–7892.
- Ishida, N., Miura, N., Yoshioka, S., and Kawakita, M. (1996) *J. Biochem.* **120**, 174–1078
- Ishida, N., Yoshioka, S., Chiba, Y., Takeuchi, M., and Kawakita, M. (1999) *J. Biochem.* **126**, 68–77
- Miura, N., Ishida, N., Hoshino, M., Yamauchi, M., Hara, T., Ayusawa, D., and Kawakita M (1996) *J. Biochem.* **120**, 236–241.
- Muraoka, M., Kawakita, M., and Ishida, N. (2001) *FEBS Lett.* **495**, 87–93
- Ma, D., Russell, D.G., Beberley, S.M., and Turco, S.J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 3799–3805
- Abeijon, C., Mandon, E.C., and Hirschberg, C.B. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5963–5968
- Dean, N., Zhang, Y.B., and Poster, J.B. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 31908–31914
- Kawakita, M., Ishida, N., Miura, N. Sun-Wada, G.H., and Yoshioka, S. (1998) *J. Biochem.* **123**, 775–785
- Tanaka, N., and Takegawa, K. (2001) *Yeast* **18**, 745–757
- Kleen, R., and Berger, E.G. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1154**, 283–325
- Munro, S. (1998) *Trends Cell Biol.* **8**, 11–15
- Aoki, K., Sun-Wada, G.H., Segawa, H., Yoshioka, S., Ishida, N., and Kawakita, M. (1999) *J. Biochem.* **126**, 940–950
- Ishiguro, J., Saitou, A., Duran, A., and Ribas, J.C. (1997) *J. Bacteriol.* **179**, 7653–7662
- Arellano, M., Coll, P.M., and Perez, P. (1999) *Microsc. Res. Tech.* **47**, 51–60
- Toda, T., Shimanuki, M., and Yanagida, M. (1993) *EMBO J.* **12**, 1987–1995
- Hochstenbach, F., Klis, F.M., van der Ende, H., van Donselaar, E., Peters, P.J., and Klausner, R.D. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9161–9166
- Katayama, S., Hirata, D., Arellano, M., Perez, P., and Toda, T. (1999) *J. Cell Biol.* **144**, 1173–1186
- Miyata, M., Doi, H., Miyata, H., and Johnson, B.F. (1997) *Antonie Van Leeuwenhoek* **71**, 207–215
- Osumi, M., Yamada, N., Kobori, H., and Yamaguchi, H. (1992) *J. Electron. Microsc.* **41**, 270–272
- Ohsumi, M., Sato, M., Ishijima, S.A., Konomi, M., Takagi, T., and Yaguchi, H. (1998) *Fung. Genet. Biol.* **24**, 178–206
- Horisberger, M., and Rosset, M. (1977) *Arch. Microbiol.* **112**, 123–126
- Tanaka, N., Konomi, M., Osumi, M., and Takegawa, K. (2001) *Yeast* **18**, 903–914
- Kanik-Ennulat, C., Montalvo, E., and Neff, N. (1995) *Genetics* **140**, 933–943
- Ballou, L., Hitzman, R.A., Lewis, M.S., and Ballou, C.E. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3209–3212
- Cappellaro, C., Hauser, K., Mersa, Y., Watzel, M., Watzel, G., Gruber, C., and Tanner, W. (1991) *EMBO J.* **10**, 4081–4088
- Cappellaro, C., Baldermann, C., Rachel, R., and Tanner, W. (1994) *EMBO J.* **13**, 4737–4744
- Miki, B.L.A., Poon, N.H., and Seligy, V.L. (1982) *J. Bacteriol.* **150**, 878–889
- Bidard, F., Blondin, B., Dequin, S., Vezinhet, F., and Barre, P. (1994) *Curr. Genet.* **25**, 196–201

54. 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
55. 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
56. Kobayashi, O., Hayashi, N., Kuroki, R., and Sone H. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 6503–6510
57. Tanaka, N., Awai, A., Bhuiyan, M.S.A., Fujita, K., Fukui, H., and Takegawa, K. (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 1356–1359
58. Tanaka, N., Ohuchi, N., Osaka, Y., Mukai, Y., Ohtani, Y., Tabuchi, M., Bhuiyan M. S. A., Fukui, H., Harashima, S., and Takegawa, K. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**, 246–253
59. Johnson, B.F., Walker, T., Calleja, G.B., and Seligy, V.L. (1988) *Can. J. Microbiol.* **34**, 1105–1107
60. Watson, P., and Davey, J. (1998) *Yeast* **14**, 485–492
61. Surosky, R.T., Strich, R., and Esposito, R.E. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 3446–3458
62. Kuchim, S., Yeghiayan, P., and Carlson, M. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4006–4010
63. Vallier, L.G., and Carlson, M. (1994) *Genetics* **137**, 49–54
64. Lipke, P.N., and Hull-Phillipsbury, C. (1984) *J. Bacteriol.* **159**, 797–799
65. Carlson, M., Osmond, B.C., Neigeborn, L., and Botstein, D. (1984) *Genetics* **107**, 19–32
66. Shanker, C.S., Ramakrishnan, M.S., and Umesh-Kumar, S. (1996) *Microbiology* **142**, 2663–2667
67. Teunissen, A.W.R.H., van der Berg, J.A., and Steensma, H.Y. (1995) *Yeast* **11**, 435–446
68. Ballou, C.E., Ballou, L., and Ball, G. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9327–9331
69. Yoshida, S., Matsuura, A., Merregaert, J., and Anraku, Y. (1999) *Yeast* **15**, 497–505

Received on May 29, 2001, accepted on June 30, 2001

Profile of the Authors

Naotaka Tanaka obtained a BSC and MSC degree in Agriculture from Kagawa University and a Doctor in Agriculture from the United Graduate School of Ehime University in 2000. In his five-year graduate work, he found that disruption of UDP-galactose transporter leads *S. pombe* strain to the complete defect of cell surface glycoproteins galactosylation. Since 2000, he has moved to the Cancer Research Institute of Kanazawa University, and has been mainly interested in lysosomal targeting of plasma membrane proteins after endocytosis.

★★★★★★★★

Kaoru Takegawa 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 the Department of Food Science and Technology of Kyoto University (Prof. Tasurokuro Tochikura's Lab) and the Department of Bioresource Science of Kagawa University (Prof. Shojiro Iwahara's Lab). 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. Takegawa is presently an associate professor at the Department of Life Sciences, Kagawa University. His recent research focuses on understanding the proteins sorting events in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* involving protein galactosylation.