



Title	Golgi体膜のリン脂質非対称性とGolgi体機能との関連性に関する研究
Author(s)	宮坂, 衛
Description	配架番号 : 2630
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14507号
Issue Date	2021-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14507
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81517
Type	doctoral thesis
File Information	Mamoru_Miyasaka.pdf



学 位 論 文

Golgi 体膜のリン脂質非対称性と Golgi 体機能との関連性に関する研究

(A study on the relationship between membrane
phospholipid asymmetry and function of the Golgi
apparatus)

2021 年 3 月

北 海 道 大 学

宮 坂 衛

学 位 論 文

Golgi 体膜のリン脂質非対称性と Golgi 体機能との関連性に関する研究

(A study on the relationship between membrane
phospholipid asymmetry and function of the Golgi
apparatus)

2021 年 3 月

北 海 道 大 学

宮 坂 衛

目

次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
実験方法	9 頁
実験結果	23 頁
考察	46 頁
総括および結論	49 頁
謝辞	50 頁
利益相反	51 頁
引用文献	52 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Mamoru Miyasaka, Tetsuo Mioka, Takuma Kishimoto, Eriko Itoh, Kazuma Tanaka

A complex genetic interaction implicates that phospholipid asymmetry and phosphate

homeostasis regulate Golgi functions

PLoS One. 15: e0236520, 2020

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 宮坂衛、三岡哲生、田中一馬

出芽酵母 Neo1 フリッパーゼとその関連遺伝子の機能解析

第 92 回 日本生化学会大会, 2019 年 9 月 18 日・横浜

要旨

【背景と目的】

真核生物の細胞膜は、細胞質側と細胞外側とで異なるリン脂質の組成を持つ、脂質の二重層で構成されている。この脂質二重層の非対称性は広く酵母から高等生物まで保存され、その変化や制御は血液凝固や細胞のアポトーシス、小胞輸送など様々な生命活動に重要であることが知られている。脂質二重層の非対称性を維持するために、Flippase と呼ばれる膜タンパク質（4 型 P-type ATPase）が働いており、真核生物のモデル生物である出芽酵母には Drs2、Dnf1、Dnf2、Dnf3 そして Neo1 が存在する。Neo1 は単独の欠損変異で致死となり、他の Flippase と重複しない機能を有すると考えられているが、その機能に関しては未だ不明な点も多い。

Neo1 は主にエンドソーム及び Golgi 体膜での膜輸送に関与しているとされる。北海道大学遺伝子病制御研究所分子間情報分野の先行研究において、*NEO1* 欠損による致死性を抑圧する変異として *CFS1* 遺伝子が見出された。*CFS1* 欠損は他の Flippase 欠損も抑圧することから、脂質非対称性の制御に関わることが想定される。しかし、*Cfs1* に関しても Neo1 と共局在することは知られているが、その機能の詳細は明らかではない。*neolΔ cfs1Δ* 変異株は一見野生型と変わらない表現型を示す。そこで、*neolΔ cfs1Δ* 変異株における異常を明らかにするために、*NEO1/CFS1* と遺伝学的相互作用を示す遺伝子として、*ERD1* 遺伝子が北海道大学遺伝子病制御研究所分子間情報分野で見出された。*Erd1* は最近、Golgi 体内腔から細胞質へのリン酸の輸送に関わる因子であることが報告されている。*neolΔ cfs1Δ erd1Δ* 株は致死性を示すことから、私は *neolΔ cfs1Δ erd1Δ* 株の解析を通して、Golgi 体膜の脂質二重層とリン酸イオンとの機能的関係について研究を行った。

【材料と方法】

neolΔ cfs1Δ erd1Δ 株は致死となるため、表現型解析を行うために Neo1 の発現を調節できる株を作成し、主として Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株において解析を行った。細胞膜タンパク質（Snc1-pm, Pdr5, Sso1）に GFP や mRFP1 を融合し、その輸送や細胞内局在を検討した。これらのタンパク質が変異株でどの Organelle に局在しているのかを検討するために、*cis*-Golgi 体および *trans*-Golgi network (TGN) のマーカータンパク質としてそれぞれ Mnn9 と Sec7 を用いた。また、Golgi 体におけるリン脂質の分布を調べるために、Phosphatidyl serine (PS) の結合タンパク質として Lact-C2 及び evt-2 PH を用いた。Phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) については PI4P の結合タンパク質として Osh2 を用いた。PI4P を形成するキナーゼである Pik1 の局在も観察を行った。

neol1Δ cfs1Δ erd1Δ 株に生じている異常について手がかりを得るために、その増殖欠損を高発現で抑圧するマルチコピーサプレッサー (MCS) 遺伝子をスクリーニングした。同定された MCS 遺伝子の中に細胞膜におけるリン酸輸送に関わる *PHO87*, *PHO90* を認めたため、生育培地のリン酸濃度やリン酸輸送に関わる遺伝子の変異が *NEO1*, *CFS1* の遺伝子欠損株の増殖に及ぼす影響について比較検討した。また、小胞体から Golgi 体への輸送に関わる遺伝子も同スクリーニングで同定されたため、Hmg1 や Rtn1 タンパク質を可視化して小胞体構造を観察した。また、小胞体ストレス応答について Unfolded protein response (UPR) をモニターするために UPR elements (UPRE) を用いて観察した。

【結果】

Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株では、いずれの細胞膜タンパク質 (Snc1-pm, Pdr5, Sso1) も細胞内に蓄積し、細胞膜への小胞輸送経路に障害が生じている事が考えられた。Snc1-pm と Mnn9, Sec7 を同時に観察し、Snc1-pm は Sec7 との共局在を示した。このことから、小胞輸送障害は、主として TGN にて生じている事が考えられた。Lact-C2 および evt-2 PH の観察により、同株では TGN における細胞質側層に通常は存在しない膜リン脂質 PS が露出している可能性が考えられた。また、Osh2 が TGN に局在しなかったことから、同株では TGN において PI4P が欠如し、輸送障害の原因となっていることが示唆された。

MCS スクリーニングにより細胞膜のリン酸輸送体である *PHO87*, *PHO90* 遺伝子が単離された。このことは、細胞質のリン酸濃度の低下が三重変異株の致死性に関与する可能性を示唆する。しかし、培地のリン酸濃度や他の細胞膜リン酸輸送体の変異は Neo1-depleted *cfs1Δ* 変異株の増殖に影響を与えなかった。従って、*erd1Δ* 変異によって生じる Golgi 体内腔のリン酸濃度の上昇が、Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株の致死性の原因である事が考えられた。さらに、同スクリーニングで *SAR1*, *YIP1* という小胞体からの小胞形成に関わる遺伝子も単離された。小胞体のマーカータンパク質 (Hmg1, Rtn1) の観察によって、Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株では小胞体の構造異常も生じている事が示された。同株においては UPR も観察され、*cis*-Golgi 体から小胞体に向けた逆行性の小胞輸送の障害も生じている可能性が示唆された。

【考察】

Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株では、Golgi 体からの順行性および逆行性の小胞輸送障害が生じている事が示唆された。今回得られた結果は Golgi 体膜の脂質非対称性制御と Golgi 体内腔のリン酸濃度制御の間に機能的な関係が存在することを示唆する。*neol1Δ cfs1Δ* 変異による何らかの脂質非対称性の異常が、*erd1Δ* 変異によるリン酸

蓄積が引き起こすイオンホメオスタシス異常と組み合わせられることにより、PI4P の減少や Golgi 体内腔のタンパク質-脂質相互作用に影響が生じて、小胞輸送障害の原因となっている可能性が推察された。このことから Erd1 は Golgi 体膜のリン脂質非対称性に機能的に関連する、新たな因子である事が示唆された。さらに、Pik1 は Neol-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株において正常な局在を示したことから、Pik1 の不活化やその基質である PI が Golgi 体膜の細胞質側層に不足している可能性も考えられた。Inositol の枯渇により、*cfs1Δ* 変異同様に *NEO1* 欠損株における生育障害が抑圧される事が報告されており、PI の代謝やリン脂質二重層における分布が、Neol、Cfs1 などの機能と関連している可能性も考えられる。

【結論】

neolΔ cfs1Δ 変異と合成致死となる *erd1Δ* 変異により、Golgi 体において小胞輸送の障害が生じている事が明らかとなった。Erd1 は Golgi 体内腔のリン酸濃度を変化させる事で、Golgi 体膜のリン脂質非対称性に機能的に関連している可能性が示唆された。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

DIC	differential interference contrast
DTT	dithiothreitol
5-FOA	5-fluoroorotic acid
GFP	green fluorescent protein
IPC	inositol phosphoceramide
MIP ₂ C	mannosyl-di-inositol phosphoceramide
PC	phosphatidylcholine
PE	phosphatidylethanolamine
PH	pleckstrin homology
PI	phosphatidylinositol
PI4P	phosphatidylinositol-4-phosphate
PS	phosphatidylserine
SD	synthetic dextrose
SM	sphingomyelin
SNARE	soluble NSF attachment protein receptors
TGN	<i>trans</i> -Golgi network
UPR	unfolded protein response

緒言

様々な疾患の機序の解明に、細胞内輸送経路を明らかにすることは重要である。悪性腫瘍に関わる Ras や PD-L1 といった膜タンパク質などの発現にも、Golgi 体などの Organelle を介した細胞内輸送が係わる事が知られている (Burr et al., 2017; Misaki et al., 2010)。細胞を構成する基本単位として生体膜があり、細胞の小胞輸送、形態や極性、Organelle の機能を支える役割を担っている。真核生物において、生体膜は様々な種類の脂質による二重層で構成されている。このような二重層において脂質は非対称性に分布し、細胞膜の外側層には SM や PC が、細胞質側には PS および PE が多く存在する事が知られている (図 1) (Op den Kamp., 1979)。この脂質二重層の非対称性分布は酵母からヒトなどの高等生物まで保存されており、細胞の働きに重要であると考えられている。例えば細胞質側の PS が細胞外側層に露出する事は、細胞のアポトーシス、血液凝固や細胞の食食のトリガーとして必要である事が知られており、さらには癌細胞表面のマーカーになる事も示唆されている (Zwaal et al., 1997; Balasubramanian et al., 2003; Sharma et al., 2018)。そして、脂質非対称性は細胞内の小胞輸送・細胞極性にも関わる事が報告されている (Saito., 2007; Das et al., 2012; Kato et al., 2013)。

細胞における膜脂質二重層の非対称性を形成・維持するためには、二重層間を横切るリン脂質の移動が必要であり、Flippase と呼ばれる 4 型 P-type ATPase が細胞外側層から細胞質側層へリン脂質を輸送すること (flip) が重要な働きを担っていると考えられている (図 1) (Seigneuret et al., 1984)。また、細胞膜のみならず、いくつかの flippase はエンドソームや Golgi 体膜上で働き、細胞内の小胞輸送を制御している (Sebastian et al., 2012; Panatala et al., 2015)。

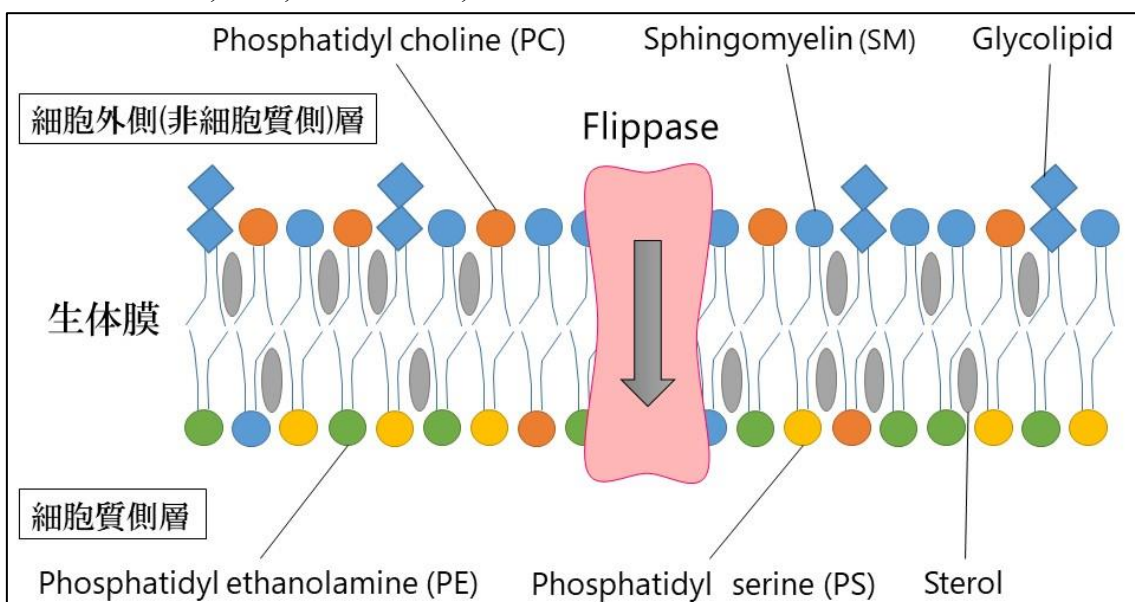


図 1. 細胞膜の脂質非対称性

真核生物の細胞膜では、細胞外側(非細胞質側)層には Sphingomyelin (SM) や Phosphatidylcholine (PC) が、細胞質側層には Phosphatidylserine (PS) および Phosphatidylethanolamine (PE) が多く存在し、脂質が非対称に分布する。この脂質非対称性の形成・維持には Flippase が必要であると考えられている。Golgi 体やエンドソーム等の内膜でも、脂質は非対称に分布すると考えられているが、詳細は不明である。

これら Flippase はヒトには 14 種類、研究実施先である北海道大学遺伝子病制御研究所分子間情報分野で使用している真核生物のモデル生物である出芽酵母

(*Saccharomyces cerevisiae*) には 5 種類 (Drs2, Dnf1, Dnf2, Dnf3, Neo1) が存在する事が知られている (Coleman et al., 2013; Tanaka et al., 2011)。Neo1 以外の Flippase は、サブユニットである Cdc50 ファミリータンパク質と複合体を形成している (Cdc50-Drs2, Lem3-Dnf1/ Dnf2, Crf1-Dnf3) (Saito et al., 2004)。さらにこれら 4 つの Flippase は単独の欠損変異では致死とはならず機能の一部が重複していると考えられているが、Neo1 は単独の欠損変異で致死となることから、独立した機能を有する可能性が考えられる (Hua et al., 2002)。Cdc50-Drs2 複合体はエンドソームや TGN に局在し、膜輸送において重要である事が知られている。Cdc50-Drs2 複合体によるリン脂質の flip はクラスリン被覆小胞を含む小胞形成を促進するとされているが、その詳細な機序は未だ不明である (Sebastian et al., 2012; Panatala et al., 2015; Muthusamy et al., 2009)。Neo1 は同様にエンドソームや Golgi 体に存在し、Golgi 体からの小胞輸送 (*cis*-Golgi 体から小胞体への逆行性輸送やエンドサイトーシス、液胞への輸送) に関わるとされている (Hua et al., 2003; Wicky et al., 2004)。Neo1 は Flippase としての活性は実証されていないが、*neo1* 変異株では細胞膜における PE の非対称性が失われている事が報告されている (Takar et al., 2016)。これらに加え、他の Flippase と高いアミノ酸配列の相同性をもつ事、*NEO1* は *cdc50Δ* 変異体のマルチコピーサプレッサーとして働く事、エンドサイトーシスーリサイクリング経路において Cdc50-Drs2 複合体と同様の機能を持つ事なども報告されており、Neo1 もまた Flippase の一種である可能性は高いと考えられる (Saito et al., 2004; Takeda et al., 2014)。Neo1 は未だその機能の詳細など不明な点が多いが、Neo1 のヒトにおけるオルソログの 1 つである ATP9A が肝臓癌細胞におけるエキソソームの調節因子であることも指摘されており、Golgi 体に存在して働く Neo1 のさらなる解析が細胞内小胞輸送および細胞機能の解明に重要であると考えられる (Naik et al., 2019)。

研究室の先行研究により、*neo1* 欠損によって生じる細胞の致死性が *CFS1* 遺伝子の欠損変異により抑圧される事が明らかにされた (Yamamoto et al., 2017)。Cfs1 はそのアミノ酸配列から PQ-loop family に属する 7 回貫通型の膜貫通タンパク質と予想され、Neo1 と共局在してエンドソームおよび Golgi 体に局在し、Flippase であることが

示唆される *neol* 欠損を抑圧する事から Golgi 体の生体膜脂質非対称性に関与すると考えられる。*cfs1Δ* 変異は *neolΔ* 変異の致死性のみならず、小胞輸送障害も抑圧する事が明らかになっているが、その詳細な機能や Flippase 変異の抑圧機構は明らかではない。一見、野生株と変わらないように見える *neolΔ cfs1Δ* の二重変異株でも、Golgi 体膜機能などに関しては野生株と同等ではない可能性が考えられる。必須遺伝子である *NEO1* を含むこれら 2 種類の遺伝子が全く不要であるとは考えづらい事から、*neolΔ cfs1Δ* 変異体のエンドソーム/Golgi 体膜機能の異常を補うように働く遺伝子の存在が想定される。この考えに基づき、当研究室の先行研究において、合成致死スクリーニングという手法を用いて、*neolΔ cfs1Δ* の二重変異と組み合わせると致死となる変異として *ERD1* 遺伝子変異が単離された。合成致死とは、単独の遺伝子欠損では細胞が致死性を示さないのに対し、複数の遺伝子の欠損が共存することで致死性が発現されることである。乳がん・卵巣がんの治療戦略において、*BRCA*・*PARP* 遺伝子間の合成致死性が利用されており、近年では *BRCA* 遺伝子変異陽性乳がん患者への *PARP* 阻害薬の投与が一定の効果を示している (Bryant et al., 2005; Farmer et al., 2005; Litton et al., 2020)。Erd1 は Golgi 体内腔のリン酸を細胞質へと輸送する機構に関わっていることが報告されている (Snyder et al., 2017)。

以上より、私は真核生物の Golgi 体膜のリン脂質非対称性と関連する因子を明らかにする目的で、酵母細胞において Golgi 体膜のリン脂質非対称性に関わると考えられる *Neol*・*Cfs1* と、Golgi 体内腔からのリン酸輸送に関わる *Erd1* との関連性に関する研究を行うこととした。

実験方法

1. 株と plasmid DNA

使用した出芽酵母株および大腸菌を表 1 に示す。YKT 株は YEF43 (Longtine et al., 1998) の同質遺伝子誘導体であり、表 1 には関連する遺伝子型のみを記載した。

ゲノム配列に相同性を有するプライマーを用いた PCR 法により増幅した DNA 断片をゲノムに導入することにより、遺伝子欠損および *GAL1* プロモーター、green fluorescent protein (GFP)、mCherry、及び monomeric red fluorescent protein 1 (mRFP1) などの蛍光タンパク質の遺伝子融合を行った (Shaner et al., 2004; Longtine et al., 1998)。Plasmid の構築や PCR、DNA シークエンスには標準的な分子生物学手法を用いた (Sambrook., 2001)。大腸菌株 XL1-Blue を、plasmid の構築及び増幅に用いた。

YEF43 株を背景にした *CFS1*, *ERD1*, *BST1*, *EMP24*, *ESP1*, *ERP1*, *ERP2*, *RER1*, *VAN1*, *MNN10*, *MNN2*, *MNN5*, *MNN4*, *MNN6*, *MNN1* の各遺伝子欠損株は以下の手法を用いて作成した (Bi et al., 1996)。BY4741 株においてこれらの遺伝子が *KanMX6* によって欠損された株のゲノム DNA をテンプレートとして、隣接する DNA 配列を含む領域を PCR にて増幅した (Brachmann et al., 1998)。増幅した DNA 断片を適切な株に導入し、G418 耐性へと形質転換された株を得た。*KanMX6::P_{PIK1}-GFP-PIK1* 株の作成では、*TRP1::P_{GAL1}-GFP-PIK1* 株において PCR 法を利用して *KanMX6::P_{PIK1}-GFP-PIK1* へと置換した (Erdeniz et al., 1997)。PCR に基づいた手法で作成した変異は、全て colony PCR 法で検証し、意図した通りの遺伝子座に置換または挿入が行われている事を確認した。

表 1. 使用した酵母および大腸菌

酵母

名称	接合型	遺伝子型	由来
YKT38	a	<i>lys2-801 ura3-52 his3Δ-200 leu2Δ-1 trp1Δ-63</i>	Misu et al., 2003
YKT2085	a	<i>TRP1::P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ::CaURA3</i>	Yamamoto et al., 2017
YKT2134	alpha	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 TRP1</i>	本研究
YKT2135	alpha	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 TRP1</i>	本研究
YKT2136	a	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 erd1Δ::HphMX4 TRP1</i>	本研究
YKT2137	alpha	<i>cfs1Δ::HIS3MX6 erd1Δ::HphMX4</i>	本研究
YKT2138	alpha	<i>erd1Δ::KanMX6</i>	本研究
YKT2139	a	<i>LEU2::GFP-SNC1-pm</i>	本研究
YKT2140	a	<i>KanMX6::P_{GALI}-NEO1 LEU2::GFP-SNC1-pm</i>	本研究
YKT2141	a	<i>KanMX6::P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 LEU2::GFP-SNC1-pm</i>	本研究
YKT2142	alpha	<i>KanMX6::P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 erd1Δ::HphMX4 LEU2::GFP-SNC1-pm</i>	本研究
YKT2143	a	<i>cfs1Δ::HIS3MX6 erd1Δ::HphMX4 URA3::GFP-SNC1-pm TRP1</i>	本研究
YKT2144	a	<i>erd1Δ::HphMX4 LEU2::GFP-SNC1-pm</i>	本研究
YKT2145	a	<i>PDR5-GFP::CaURA3</i>	本研究
YKT2146	alpha	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 PDR5-GFP::CaURA3</i>	本研究
YKT2147	alpha	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 PDR5-GFP::CaURA3</i>	本研究
YKT2148	alpha	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 erd1Δ::HphMX4 TRP1</i>	本研究
YKT2149	a	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 erd1Δ::HphMX4 PDR5-GFP::CaURA3 TRP1</i>	本研究
YKT2150	a	<i>HIS3MX6::P_{GALI}-ERD1-GFP::KanMX6 MNN9-mRFP1::TRP1</i>	本研究
YKT2151	a	<i>HIS3MX6::P_{GALI}-ERD1-GFP::KanMX6 SEC7-mRFP1::KanMX6</i>	本研究
YKT2152	a	<i>LEU2::GFP-SNC1-pm MNN9-mCherry::CaURA3 TRP1</i>	本研究
YKT2153	a	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 LEU2::GFP-SNC1-pm MNN9-mCherry::CaURA3 TRP1</i>	本研究

YKT2154	a	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 erd1Δ::HphMX4 LEU2::GFP-SNC1-pm MNN9-mCherry::CaURA3 TRP1</i>	本研究
YKT2155	a	<i>LEU2::GFP-SNC1-pm SEC7-mRFP1::CaURA3</i>	本研究
YKT2156	a	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 LEU2::GFP-SNC1-pm SEC7-mRFP1::CaURA3</i>	本研究
YKT2157	alpha	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 erd1Δ::HphMX4 LEU2::GFP-SNC1-pm SEC7-mRFP1::CaURA3</i>	本研究
YKT2158	alpha	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 LEU2::GFP-SNC1-pm</i>	本研究
YKT2159	alpha	<i>URA3::OSH2-PH-GFP</i>	本研究
YKT2160	alpha	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 URA3::OSH2-PH-GFP</i>	本研究
YKT2161	alpha	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 URA3::OSH2-PH-GFP</i>	本研究
YKT2162	alpha	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 erd1Δ::HphMX4 URA3::OSH2-PH-GFP</i>	本研究
YKT2163	a	<i>cfs1Δ::HIS3MX6 erd1Δ::HphMX4 URA3::OSH2-PH-GFP</i>	本研究
YKT2164	a	<i>erd1Δ::HphMX4 URA3::OSH2-PH-GFP</i>	本研究
YKT2165	alpha	<i>URA3::OSH2-PH-GFP SEC7-mRFP1::TRP1</i>	本研究
YKT2166	alpha	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 URA3::OSH2-PH-GFP SEC7-mRFP1::TRP1</i>	本研究
YKT2167	a	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 URA3::OSH2-PH-GFP SEC7-mRFP1::TRP1</i>	本研究
YKT2168	a	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 erd1Δ::HphMX4 URA3::OSH2-PH-GFP SEC7-mRFP1::TRP1</i>	本研究
YKT2169	a	<i>HIS3MX6::P_{PIK1}-GFP-PIK1 SEC7-mRFP1::KanMX6</i>	本研究
YKT2170	a	<i>TRP1::P_{GALI}-NEO1 HIS3MX6::P_{PIK1}-GFP-PIK1 SEC7-mRFP1::KanMX6</i>	本研究
YKT2171	a	<i>TRP1::P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ::CaURA3 HIS3MX6::P_{PIK1}-GFP-PIK1 SEC7-mRFP1::KanMX6</i>	本研究
YKT2172	alpha	<i>TRP1::P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ::CaURA3 erd1Δ::HphMX4 HIS3MX6::P_{PIK1}-GFP-PIK1 SEC7-mRFP1::KanMX6</i>	本研究
YKT2173	a/alpha	<i>neo1Δ::HIS3MX6/NEO1 cfs1Δ::HphMX4/cfs1Δ::HphMX4 ERD1/erd1Δ::KanMX6 TRP1</i>	本研究

YKT2174	a	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 erd1Δ::HphMX4 URA3::GFP-SNC1-pm TRP1</i>	本研究
YKT2176	alpha	<i>TRP1::P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ::CaURA3 pho84Δ::HIS3MX6</i>	本研究
YKT2177	a	<i>TRP1::P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ::CaURA3 pho84Δ::HIS3MX6 pho87Δ::KanMX6 pho90Δ::HphMX4</i>	本研究
YKT2178	a	<i>TRP1::P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ::CaURA3 pho84Δ::HIS3MX6 pho87Δ::KanMX6 pho89Δ::BleMX6 pho90Δ::HphMX4</i>	本研究
YKT2179	a	<i>LEU2::mRFP1-SNC1-pm</i>	本研究
YKT2180	alpha	<i>HIS3MX6::P_{GALI}-NEO1 LEU2::mRFP1-SNC1-pm</i>	本研究
YKT2181	alpha	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 LEU2::mRFP1-SNC1-pm TRP1</i>	本研究
YKT2182	alpha	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 erd1Δ::HphMX4 LEU2::mRFP-SNC1-pm TRP1</i>	本研究
YKT2183	a	<i>URA3::HMG1-GFP</i>	本研究
YKT2184	a	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 URA3::HMG1-GFP</i>	本研究
YKT2185	a	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 URA3::HMG1-GFP</i>	本研究
YKT2186	alpha	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 erd1Δ::HphMX4 URA3::HMG1-GFP</i>	本研究
YKT2187	alpha	<i>cfs1Δ::HIS3MX6 erd1Δ::HphMX4 URA3::HMG1-GFP</i>	本研究
YKT2188	a	<i>erd1Δ::HphMX4 URA3::HMG1-GFP</i>	本研究
YKT2189	a	<i>URA3::HMG1-GFP TRP1::NUP188-mRFP1</i>	本研究
YKT2190	a	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 URA3::HMG1-GFP TRP1::NUP188-mRFP1</i>	本研究
YKT2191	a	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 URA3::HMG1-GFP TRP1::NUP188-mRFP1</i>	本研究
YKT2192	alpha	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 erd1Δ::HphMX4 URA3::HMG1-GFP TRP1::NUP188-mRFP1</i>	本研究
YKT2193	a	<i>RTN1-GFP::KanMX6 SEC63-mRFP1::CaURA3</i>	本研究
YKT2194	a	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 RTN1-GFP::KanMX6 SEC63-mRFP1::CaURA3</i>	本研究
YKT2195	a	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 RTN1-GFP::KanMX6 SEC63-mRFP1::CaURA3 TRP1</i>	本研究

YKT2196	a	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 erd1Δ::HphMX4 RTN1-GFP::KanMX6 SEC63-mRFP1::CaURA3 TRP1</i>	本研究
YKT2197	alpha	<i>URA3::HMG1-GFP LEU2::mRFP1-SNC1-pm</i>	本研究
YKT2198	alpha	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 URA3::HMG1-GFP LEU2::mRFP1-SNC1-pm</i>	本研究
YKT2199	alpha	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 erd1Δ::HphMX4 URA3::HMG1-GFP LEU2::mRFP1-SNC1-pm</i>	本研究
YKT2200	a	<i>URA3::2x UPRE-GFP</i>	本研究
YKT2201	alpha	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 URA3::2x UPRE-GFP TRP1</i>	本研究
YKT2202	a	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 URA3::2x UPRE-GFP TRP1</i>	本研究
YKT2203	a	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 erd1Δ::HphMX4 URA3::2x UPRE-GFP TRP1</i>	本研究
YKT2204	alpha	<i>cfs1Δ::HIS3MX6 erd1Δ::HphMX4 URA3::2x UPRE-GFP TRP1</i>	本研究
YKT2205	alpha	<i>erd1Δ::HphMX4 URA3::2x UPRE-GFP TRP1</i>	本研究
YKT2206	a	<i>HphMX6::P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 bst1Δ::KanMX4</i>	本研究
YKT2207	a	<i>HphMX6::P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 emp24Δ::KanMX4</i>	本研究
YKT2208	a	<i>HphMX6::P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 eps1Δ::KanMX4</i>	本研究
YKT2209	alpha	<i>HphMX6::P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 erp1Δ::KanMX4</i>	本研究
YKT2210	alpha	<i>HphMX6::P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 erp2Δ::KanMX4</i>	本研究
YKT2211	a	<i>HphMX6::P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ::HIS3MX6 rer1Δ::KanMX4</i>	本研究
YKT2212	a	<i>TRP1::P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ::CaURA3 van1Δ::KanMX6</i>	本研究
YKT2213	a	<i>TRP1::P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ::CaURA3 mnn10Δ::KanMX6</i>	本研究
YKT2214	a	<i>TRP1::P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ::CaURA3 mnn2Δ::KanMX6</i>	本研究
YKT2215	a	<i>TRP1::P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ::CaURA3 mnn5Δ::KanMX6</i>	本研究
YKT2216	a	<i>TRP1::P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ::CaURA3 mnn4Δ::KanMX6</i>	本研究
YKT2217	a	<i>TRP1::P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ::CaURA3 mnn6Δ::KanMX6</i>	本研究
YKT2218	a	<i>TRP1::P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ::CaURA3 mnn1Δ::KanMX6</i>	本研究
YKT2219	a	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-PIK1</i>	本研究
YKT2220	a	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-PIK1 cfs1Δ::HphMX4 TRP1</i>	本研究
YKT2221	alpha	<i>KanMX6::P_{GALI}-3HA-PIK1 neo1Δ::HIS3 cfs1Δ::HphMX4 TRP1</i>	本研究
YKT2222	a	<i>KanMX6::P_{GALI}-ERD2 URA3::2x UPRE-GFP TRP1</i>	本研究

YKT2223	alpha	<i>KanMX6::P_{GALI}-ERD2 URA3::HMGI-GFP LEU2::mRFP1-SNC1-pm</i>	本研究
YKT2224	a	<i>KanMX6::P_{GALI}-ERD2 SEC7-mRFP1::CaURA3 LEU2::mRFP1-SNC1-pm</i>	本研究
YKT2225	a	<i>KanMX6::P_{GALI}-NEO1 erd1Δ::HphMX4 LEU2::GFP-SNC1-pm</i>	本研究
大腸菌 XL1-Blue	hsdR17, supE44, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lac/F', [proAB+, lacIq, lacZΔM15::Tn10(tetr)]		

次に、本研究で使用した plasmid DNA を表 2 に示した。pRS316-mCherry-evt-2 PH (pKT2205) は、田口友彦氏（東北大学）より供与された pmCherry-Evc2-C2 plasmid を元に、pRS316-*P_{TPH}-T_{ADHI}* の *NheI*-*BamHI* 間に mCherry-evt-2 PH フラグメントを挿入し作成した。pRS306-2×*URRE-GFP* (pKT2196) は、pRS306-*P_{TPH}-T_{ADHI}* の *HindIII*-*KpnI* 間に 2×*URRE* (Pollard et al., 1998) および *GFP* を挿入する事で作成した。これら pRS306 をベースにした plasmid は、*URA3* 遺伝子座に挿入した。pRS416-*P_{TPH}-GFP-PHO87* (pKT2203) と pRS416-*P_{TPH}-GFP-PHO90* (pKT2204) は *PHO87*、*PHO90* それぞれのコーディング領域を pRS416-*P_{TPH}-GFP-PEP12-T_{PEP12}* (pKT1487) の *BamHI*-*Sall* 間に挿入し作成した (図 2)。 *ERD1*、*PHO87*、*PHO90*、*ERS1*、*SAR1* または *YIP1* をフラグメントに持つマルチコピー plasmid は野生株 (YKT38) のゲノム DNA を元に PCR で各領域を増幅し、YEplac181 の Vector へと挿入した。

表 2. 使用した plasmid DNA

名称	特徴	由来
YEplac181	<i>LEU2</i> 2μm	Gietz et al., 1988
pmCherry-Evc2-C2	<i>mCherry-evt-2 PH</i>	田口友彦氏 (東北大学) より
pKT1444 [pRS416 GFP-SNC1-pm]	<i>P_{TPH}-GFP-SNC1-pm URA3 CEN</i>	Lewis et al., 2000
pKT1470 [YCplac33 NEO1]	<i>NEO1 URA3 CEN</i>	本研究
pKT1476 [pRS416 GFP-SSO1]	<i>P_{TPH}-GFP-SSO1 URA3 CEN</i>	Reggiori et al., 2000
pKT1487 [pRS416 GFP-PEP12]	<i>P_{TPH}-GFP-PEP12 URA3 CEN</i>	Furuta et al., 2007
pKT1491 [pRS315 GFP-SNC1-pm]	<i>P_{TPH}-GFP-SNC1-pm LEU2 CEN</i>	Mioka et al., 2014
pKT1755 [pRS416 mRFP1-Lact-C2]	<i>mRFP1-Lact-C2 URA3 CEN</i>	Mioka et al., 2014
pKT2196 [pRS306 2x UPRE-GFP]	<i>2x UPRE-GFP URA3</i>	本研究
pKT2197 [YEplac181 ERD1]	<i>ERD1 LEU2 2μm</i>	本研究

pKT2198 [YEplac181-PHO87]	<i>PHO87 LEU2 2μm</i>	本研究
pKT2199 [YEplac181 PHO90]	<i>PHO90 LEU2 2μm</i>	本研究
pKT2200 [YEplac181 ERS1]	<i>ERS1 LEU2 2μm</i>	本研究
pKT2201 [YEplac181 SAR1]	<i>SAR1 LEU2 2μm</i>	本研究
pKT2202 [YEplac181 YIP1]	<i>YIP1 LEU2 2μm</i>	本研究
pKT2203 [pRS416 P_{TPII} -GFP-PHO87]	<i>P_{TPII}-GFP-PHO87 URA3 CEN</i>	本研究
pKT2204 [pRS416 P_{TPII} -GFP-PHO90]	<i>P_{TPII}-GFP-PHO90 URA3 CEN</i>	本研究
pKT2205 [pRS316 mCherry-evt-2 PH]	<i>mCherry-evt-2 PH URA3</i>	本研究

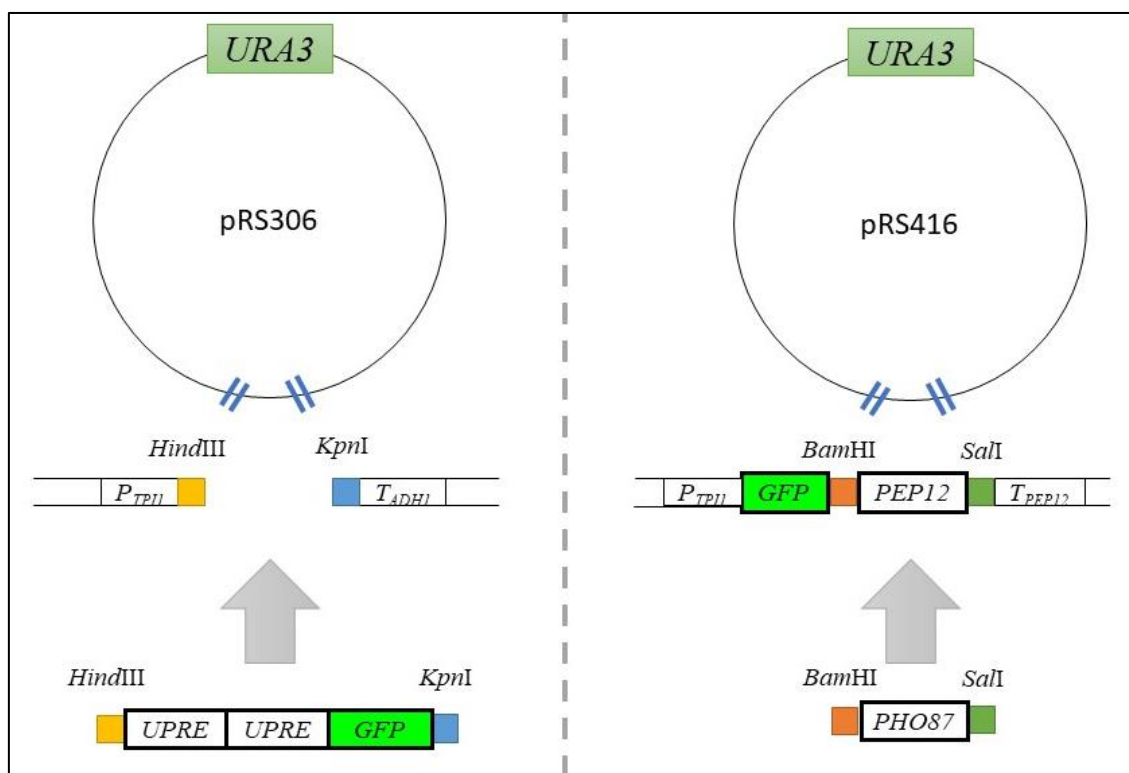


図 2. plasmid DNA 作成の例 (pRS306-2×*URRE-GFP*, pRS416-*P_{TPII}-GFP-PHO87*)

Vector および挿入したい DNA 断片をそれぞれ制限酵素で処理して Ligation した。同様に
して他の plasmid DNA も作成した。

2. 酵母細胞および大腸菌の培養条件

酵母細胞は特に表記しない場合は 30 °C で培養した。酵母は Gurithrie (Guthrie and Fink ., 1991) および Burke (Burke et al., 2000) らの方法に従い以下の培地で培養した。

栄養豊富な非選択培地としては YPDA 培地 (2% glucose、1% Yeast extract、2% Bacto-Peptone、0.01% adenine を含有) を用いた。栄養要求性による選択培地としては、最小培地 (SD 培地) を用いた。SD 培地は 0.67% yeast nitrogen base (YNB) w/o amino acids、2% glucose を含有し、さらにアミノ酸および核酸 [Tryptophan, Histidine, Arginine, Methionine, Uracil, Adenine (終濃度 20 mg/l), Tyrosine, Leucine, Isoleucine, Lysine (終濃度 30 mg/l), Phenylalanine (60 mg/l)] をそれぞれ含有する (Rose., 1990)。また、カザミノ酸入り SD 培地 (SDA 培地) は SD 培地に 0.5% Casamino acids を含有する。各アミノ酸および核酸の栄養要求性を調べるため、あるいは plasmid DNA を保持させるために SD または SDA 培地から Tryptophan、Histidine、Uracil、Leucine をそれぞれ除いた培地を作成した。これらの培地は SDA-W, SD-H, SDA-U, SD-L と表記した。

glucose 非存在下かつ galactose 存在下で発現が誘導されるプロモーター (*GAL1* プロモーター) を利用する場合には glucose の代わりの炭素源として 3% galactose、0.2% sucrose を用いた。上記の YPDA 培地や SD 培地の炭素源として 3% galactose、0.2% sucrose を用いる場合、YPDA は YPGA、SD は SG に表記を変更し、YPGA 培地と SG-L 培地において使用した。galactose を制限した培地による実験においては、2% raffinose と、0.01% または 0.1% galactose を炭素源として用いた。低リン酸 SD 培地は YNB w/o amino acids and phosphate (ForMedium Ltd., Hunstanton, UK) を用いて、pH6.6 になるように 1 M K_2HPO_4 と 1 M KH_2PO_4 を 38.1: 61.9 の比で SD または YPDA 培地に加えて作成した。

培地に抗生物質を加える場合は、終濃度はそれぞれ G418 が 200 μ g/ml、Hygromycin β が 300 μ g/ml、Zeocin が 300 μ g/ml となるように添加した。

URA3 遺伝子を有する株が生育できない毒性による選択培地として使用した SD-L+5-fluoroorotic acid (5-FOA) 培地は、SD-L 培地に 0.1% 5-fluoroorotic acid を加え、Uracil の終濃度を 50 mg/l とした。

酵母二倍体の孢子形成を誘導するため、1% 酢酸カリウムを含有する 1% KoAc spo 培地を使用した。

なお、以上の培地を寒天培地として使用する場合は、上記の液体培地に 2% の agar を加えて作成した。

Plasmid DNA を作製・増幅するための大腸菌の培地として、1% Trypton, 0.5% Yeast extract, 1% NaCl, 1.5% agar を含有する LB 寒天培地、および 1.2% Trypton peptone, 2.4% Yeast extract, 1.6% glycerol, 17 mM KH_2PO_4 / 72 mM K_2HPO_4 , 2% glucose を含有する TB 培地を用いた。

抗菌剤として Ampicillin を加える際は終濃度が 50 μ g/ml になるように加えた。

3. 酵母細胞の形質転換法

(1) 酵母簡易形質転換法

YPDA 寒天培地上で 1 晩培養した酵母細胞を楊枝で適量掻き取り、250 μ l の PLATE buffer [40% ポリエチレングリコール (PEG) (MW 3350) , 0.1 M 酢酸リチウム (LiAc) , 10 mM Tris-HCl (pH7.5) , 1 mM EDTA] に懸濁した。そこに carrier DNA (10 mg/ml) を 95 $^{\circ}$ C で 5 分温めた後、氷上で急冷して 10 μ l 加え、1 M DTT 8 μ l、約 100 ng の plasmid DNA を加えてよく混合し、これを常温で 4 時間~1 晩放置した。その後、42 $^{\circ}$ C で約 10 分間ヒートショック処理をし、遠心して上清を取り除き、200 μ l の滅菌水で懸濁して選択培地に塗布した。

(2) 酵母高効率形質転換法

YPDA 液体培地で 1 晩培養した酵母培養液を、 5×10^6 cells/ml の濃度になるように 10 ml の YPDA 液体培地に接種した。 2×10^7 cells/ml になるまで 30 $^{\circ}$ C で振盪培養して集菌し、10 ml の滅菌水で洗浄した後に再度遠心して集菌し、200 μ l の 0.1 M LiAc に懸濁後、1.5 ml のエッペンドルフチューブに分注した。これを遠心して上清を取り除き、再度 80 μ l の 0.1 M LiAc に懸濁後に遠心した。上清を取り除き、あらかじめ用意した Transformation Mix (50% PEG 240 μ l、1 M LiAc 36 μ l、95 $^{\circ}$ C で熱処理した carrier DNA (10 mg/ml) 25 μ l、H₂O 25 μ l) を加え、最後に DNA 約 5 μ g を加えて混和した。30 $^{\circ}$ C で 30 分保温した後、さらに 42 $^{\circ}$ C で 30 分ヒートショック処理をし、これを遠心して上清を取り除き、200 μ l の滅菌水に懸濁して選択培地に塗布した。

4. Colony PCR 法

寒天培地上で酵母を 1 晩以上培養し、育った酵母細胞をマイクロチップにて 1.5 mL のエッペンドルフチューブへ少量接種した。チューブごと電子レンジ 400W にて 1 分間加温し、Sapphaire Amp[®] Fast PCR Master Mix (タカラ) 5 μ l と 10 μ M の primer を各 0.2 μ l ずつ加え、滅菌水を足して計 10 μ l とした。これを Gene Amp PCR System 9700 (PE Biosystems) を用いて、PCR (94 $^{\circ}$ C 1 分、98 $^{\circ}$ C 5 秒、55 $^{\circ}$ C 5 秒、72 $^{\circ}$ C 10 秒 / kbp のサイクルを 30 回繰り返す、72 $^{\circ}$ C 3 分後、4 $^{\circ}$ C で冷却保持) を施行した。

5. 酵母からの plasmid DNA の回収

3 ml の YPDA 液体培地で 1 晩培養した酵母培養液を 1.5 ml チューブに培養液を移し、遠心して回収した。滅菌水 1 ml で洗浄した後、yeast lysis buffer [2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH8.0) , 1 mM EDTA] 0.2 ml を加え懸濁し、そこに直径 425-600 μ m のガラスビーズを加えてよく攪拌した。フェノール・ク

ロホルムを 0.3 ml 加え、12,000 rpm で 5 分間遠心した後、水層を別のチューブに移した。3 M NaoAc (sodium acetate/pH4.8) 10 μ l と 100%エタノール 250 μ l を加えてよく混合し、12,000 rpm で 10 分間遠心し上清を取り除いた。さらに、70%エタノール 500 μ l で洗浄し、12,000 rpm で 5 分間遠心し上清を取り除き、ペレットを空気乾燥させた後に 30 μ l の滅菌水に溶かした。精製した DNA 溶液 1 μ l を用いて、大腸菌をエレクトロポレーション法で形質転換し、アルカリミニプレップ法で DNA を調整した。

6. 大腸菌の形質転換法

大腸菌の形質転換は電気穿孔法（エレクトロポレーション法）により行った。電気穿孔法に用いたコンピテントセルは以下の方法で作製した。LB 培地中、37°C で 1 晩振盪培養した大腸菌培養液 5 ml を 500 ml の LB 培地に移した。OD₆₀₀ が 0.7 になるまで 37°C で振盪培養し、遠心により集菌した。集菌した細胞をあらかじめ冷却しておいた 10%グリセロール溶液に懸濁した。その後、コンピテントセル懸濁液をチューブに分注し、液体窒素を用いて直ちに凍結した。以降、-80°C で保存した。

氷上で予冷したキュベット（1 mm 幅）内にあらかじめ調整しておいたコンピテントセルを 40 μ l ずつ入れ、さらに plasmid DNA 1 μ l を注入した。これに E.coli Pulser (BIO-RAD) で 1.8 kV の電圧をかけ、ただちに 1 ml の SOC 培地を加え、1.5 ml チューブに回収した。37°C で 1 時間保温後、50 μ g/ml アンピシリンを含んだ LB 寒天培地 (LB+Amp) に塗布し、37°C で 1 晩培養した。

7. 大腸菌からの plasmid DNA の回収

アルカリミニプレップ法を用いて行った。plasmid DNA で形質転換した大腸菌を、アンピシリンを含んだ TB 培地 2.0 ml に接種し、37°C で 1 晩振盪培養した。培養液を 1.5 ml チューブに移し、遠心して細胞を回収した。DNA の溶出には Fast GeneTM Plasmid Mini Kit を用いた。4°C に冷却した mP1 buffer 200 μ l に細胞を懸濁し、さらに mP2 buffer (0.125N NaOH, 1% SDS) 200 μ l を加えてよく混合し、室温で 2 分静置した。さらに 300 μ l の mP3 buffer を加えて混合し、13,000 rpm で 2 分間遠心した。上清を別のカラムに移し、13,000 rpm で再度 30 秒間遠心。カラム上から mP4 buffer 150 μ l と mP5 buffer 300 μ l をそれぞれ加え、13,000 rpm で 3 分間遠心した。カラム上から TE buffer [10 mM Tris-HCl (pH8.0) , 1 mM EDTA (pH8.0)] 40 μ l を加えて室温で 2 分間空気乾燥させた。13,000 rpm で 2 分間遠心し、沈殿物を plasmid DNA として回収した。

8. 四分子解析

酵母は一倍体 (Haploid) でも二倍体 (Diploid) でも増殖可能である。そのため、通常一倍体の酵母細胞を接合させて二倍体とし、減数分裂による四分子 (Tetrad) を分離する四分子解析を行う事で、異なった遺伝子型の株を得る事が可能となる。YPD 培地上に解析する二倍体酵母細胞を塗布し、30℃で 24 時間~48 時間培養後、これを 1% KoAc 培地上に接種した。25℃で数日保温して孢子形成を行い、顕微鏡下で孢子の確認を行った後、50 U/ml zymolyase 100T (生化学工業) 50 μ l に少量の酵母を懸濁した。30℃で 15 分保温して細胞壁を破壊した後、ここに 50 μ l の滅菌水を加え、軽く攪拌した。30 μ l をとって、YPD もしくは YPGA プレート上の一部に塗布し、マイクロマニピレーター (ナリシゲ) を用いて孢子を四分子に分離した後に 30℃で 3-5 日間培養した (図 3)。

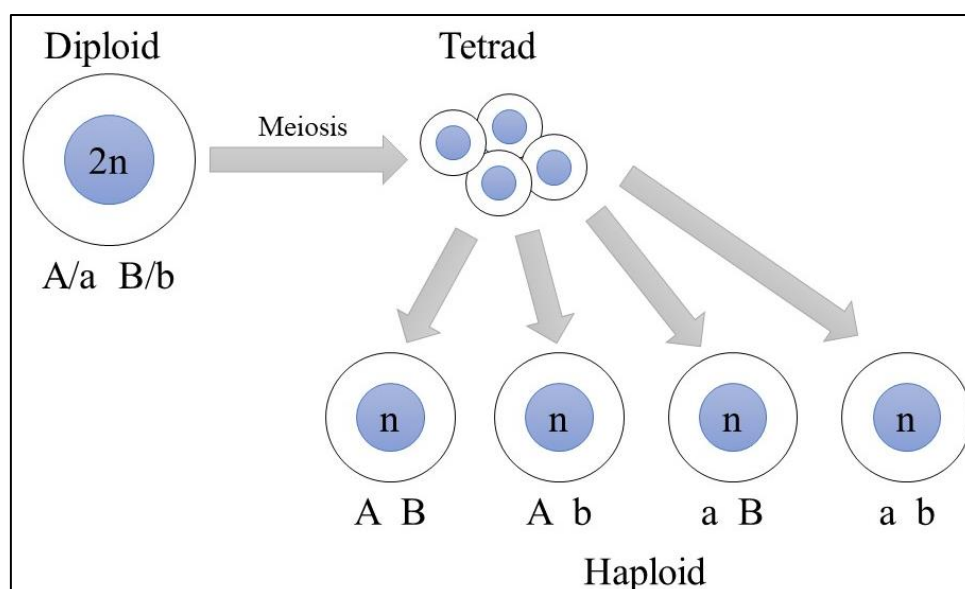


図 3. 四分子解析による形質遺伝

二倍体からの減数分裂による四分子 (Tetrad) を分離する事で、異なる遺伝形質を持った株を得る事が可能となる。

9. DNA シーケンス

DNA シーケンス反応に用いた plasmid はアルカリミニプレップ法により大腸菌から精製した。反応は ABI PRISM BigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems) を用いて行った。

10. 蛍光顕微鏡観察

3 ml の YPDA 液体培地に酵母細胞を接種し、*P_{GALI}-NEO1* 株は約 12 時間、それ以外の株（plasmid を保持している細胞を含む）は約 20 時間、対数増殖期 $OD_{600}=0.5 \sim 1.5$ まで 30°C で振盪培養した。1~1.5 ml を集菌後、1 ml の SD 液体培地で洗浄し、適当量の SD 液体培地に懸濁した。プレパラートを作成し、蛍光顕微鏡下で細胞を観察した。それぞれ 200 個以上の細胞を観察し、統計処理のために各株について観察を 5 回行った。

顕微鏡は Nikon ECLIPSE E800 microscope（Nikon Instec）を用い、GFP の観察には GFP bandpass filter set（excitation 460-500 nm; dichroic mirror 505 nm; emission 510-560 nm）を使用し、mRFP1 および mCherry の観察には G2-A band pass filter set（excitation 510-560 nm; dichroic mirror 575 nm; emission 590 nm）を使用した。画像は冷却式デジタル CCD カメラ（C4742-95-12NR; Hamamatsu photonics K. K.）と AQUACOSMOS software（Hamamatsu photonics K.K.）により取得した。

11. 蛍光タンパク質融合遺伝子発現株の作製

遺伝子への蛍光タンパク質融合遺伝子の付加は、Longtine ら（Longtine et al., 1998）の方法に準じて行った。順方向プライマーとして 5' 端側から標的となる遺伝子の停止コドン直前の配列 40 塩基、それに引き続き付加する蛍光タンパク質の 5' 端 20 塩基からなるオリゴヌクレオチドプライマーを設計した。逆方向プライマーとして 5' 端から停止コドン直後の相補的配列 40 塩基とそれに引き続き、選択マーカーカセットの 3' 端 20 塩基からなるオリゴヌクレオチドプライマーを設計した。これらのプライマーを用い、適当な選択マーカーまたは蛍光タンパク質の配列を含む plasmid をテンプレートとして PCR を行い、DNA 断片を増幅した。増幅した DNA 断片を用いて酵母高効率形質転換法によって酵母内に導入し、蛍光タンパク質融合遺伝子発現株を作製した。

12. *neo1Δ cfs1Δ* 変異と合成致死となる変異遺伝子の同定

neo1Δ cfs1Δ 株と合成致死となる変異のスクリーニングは、以前に研究室で行われた方法（Kishimoto et al., 2005）を用いた。スクリーニングされた 11,100 のコロニーから、3 つの単一劣性変異が遺伝解析により特定され、対応する野生型遺伝子をクローニングした。これらの遺伝子は、*DRS2*、*CDC50*、および *ERD1* をコードしており、*DRS2/ CDC50* の突然変異は *neo1Δ cfs1Δ* 株に対し合成致死であることが以前に示されている（Yamamoto et al., 2017）。同様に、本研究では *erd1Δ* 変異が *neo1Δ cfs1Δ* 変異に対して合成致死となる事を確認している（図 4）。

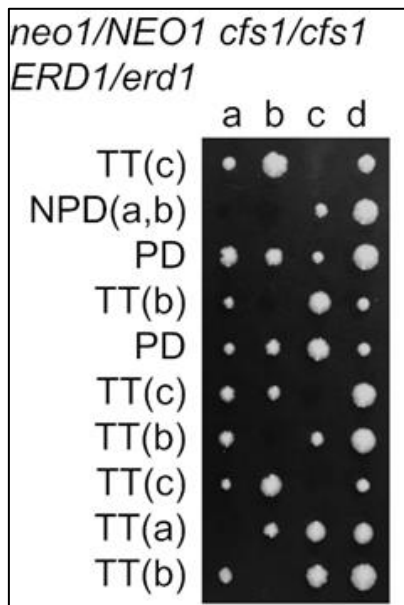


図 4. *erd1Δ* 変異による *neo1Δ cfs1Δ* 変異に対する合成致死性

四分子解析を *neo1Δ/NEO1 cfs1Δ/cfs1Δ ERD1/erd1Δ* の 2 倍体で行った。四分子の遺伝子型 (TT, tetra type; PD, parental ditype; NPD, nonparental ditype) を示し、三重変異体と考えられる部位を括弧内に示している。遺伝子型が *neo1Δ cfs1Δ erd1Δ* となる三重変異体において、合成致死性が出現している。

13. *neo1Δ cfs1Δ erd1Δ* 変異の致死性を抑圧するマルチコピーサプレッサー遺伝子の同定

YCplac33-*NEO1* plasmid (pKT1470) を導入した *neo1Δ cfs1Δ erd1Δ* 株 (YKT2173) をマルチコピー plasmid である YEp13 から作られたゲノム DNA ライブラリーを用いて形質転換した (Fischhoff et al., 1984)。SD-L 培地上で形質転換した細胞を 30°C で 3 日間培養し、SD-L+0.1% 5-FOA (5-fluoroorotic acid) 培地へレプリカした。5-FOA は *URA3* 遺伝子がコードするオロチジン酸デカルボキシラーゼにより代謝され、毒性を有する 5-fluorouracil へ変換されるため、5-FOA を含む培地上では *URA3* 遺伝子を有する株は生育できない (Boeke et al., 1987)。この事により *URA3* 遺伝子を持つ YCplac33-*NEO1* plasmid が導入された *neo1Δ cfs1Δ erd1Δ* 変異株は、5-FOA を含む培地上では致死となるが、ゲノム DNA ライブラリー内にその遺伝子の高発現により *neo1Δ cfs1Δ erd1Δ* 変異の致死性を抑圧する plasmid が含まれる場合のみ、YCplac33-*NEO1* plasmid が生育に必須ではなくなる。このような株では YCplac33-*NEO1* plasmid を落とす、つまり保持する必要がないため 5-FOA 培地上で生育可能となる (図 5)。この方法を用いて *neo1Δ cfs1Δ erd1Δ* 変異の合成致死性を抑圧する plasmid を有する株の選別を行った。約 300,000 の形質転換体から 190 個のクローンを得て、そのうち 61

個の解析を行った。18 個には *NEO1* や *ERD1* が含まれている事を colony PCR で確認したため除外した。残りの 43 個を制限酵素で処理し、13 個の独立したクローンを得た。これら 13 個の plasmid による抑圧を確かめるために YCplac33-*NEO1* を有する *neo1Δ cfs1Δ erd1Δ* 株 (YKT2173) に導入した。DNA シークエンスによって 5 つの異なる遺伝子領域が導入されている事を確認し、*PHO87*、*PHO90*、*ERS1*、*SAR1*、*YIP1* の各フラグメントが抑圧している遺伝子である事を同定した。

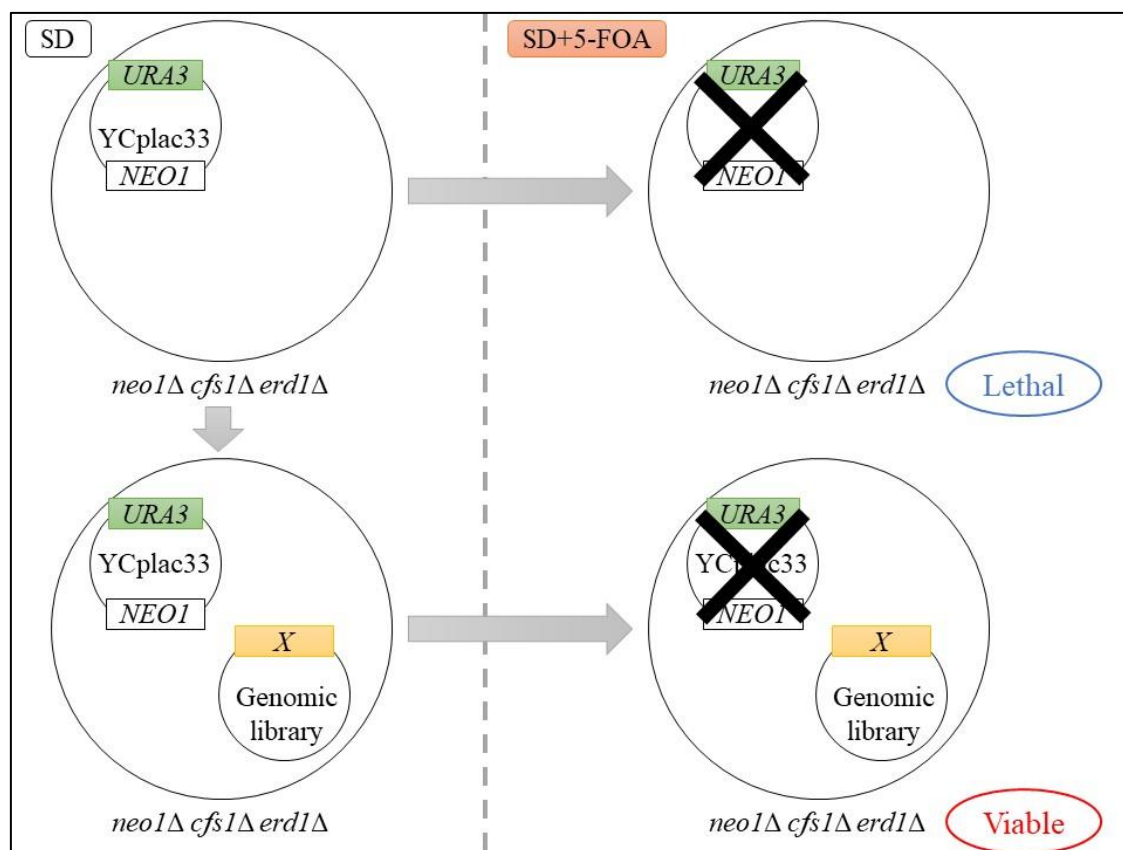


図 5. 5-FOA を用いたマルチコピーサプレッサースクリーニング

5-FOA を加えた培地で *URA3* 遺伝子を持つ YCplac33-*NEO1* plasmid を失っても生育出来る株、つまり合成致死性が抑圧されている酵母細胞には多コピーにより抑圧する遺伝子 *X* (マルチコピーサプレッサー) が導入されていると考えられ、生育可能であった酵母細胞から plasmid DNA を抽出した。

実験結果

1. *neol1Δ cfs1Δ* 変異と合成致死性を示す *erd1Δ* 変異の単離

北海道大学遺伝子病制御研究所分子間情報分野の先行研究により、*cfs1Δ* 変異は *neol1Δ* 変異による致死性を抑圧することがわかった。*neol1Δ cfs1Δ* 変異株は正常に発育し、*cfs1Δ* 変異は *neol1Δ* 変異株における小胞輸送障害をも抑圧した (Yamamoto et al., 2017)。*neol1Δ* 変異株では、細胞膜において PE や PS が細胞外側層に露出されるとい、膜脂質非対称性の異常が引き起こされる (Takar et al., 2016)。*cfs1Δ* 変異は *neol-2* 温度感受性変異株における細胞膜での PE や PS の細胞外への露出を完全に抑圧するが、*neol1Δ* 変異株における露出は抑圧しなかった (van Leeuwen et al., 2016; Takar et al., 2019)。これは Cfs1 が Neo1 の Flippase 作用に部分的に拮抗するためと考えられる。*NEO1*、*CFS1* と機能的に関連する遺伝子を同定するために、研究室の先行研究で合成致死スクリーニングが行われ、*ERD1* 遺伝子が単離された (図4)。*ERD1* は小胞体に局在するタンパク質の保持 (小胞体に必要なタンパク質が、Golgi 体へ一度送られた後に小胞体に戻る事) に必要な膜タンパク質をコードする遺伝子として同定され、Golgi 体でのタンパク質の糖鎖付加に必要である事が報告されている (Pelham et al., 1988; Hardwick et al., 1990)。さらに近年、Erd1 が Golgi 体におけるタンパク質糖鎖付加の副産物であるリン酸を、Golgi 体内腔から細胞質中へ輸送するタンパク質である事も報告されている (Snyder et al., 2017)。*neol1Δ cfs1Δ erd1Δ* 変異株の表現型解析を行うために、*NEO1* の発現を glucose 抑制性 *GAL1* プロモーターによって制御した、*P_{GAL1}-NEO1 cfs1Δ erd1Δ* 変異株 (=Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株) を作成した。培地に炭素源として galactose が含まれる YPGA 培地においては、*GAL1* プロモーターが働く事で *NEO1* が十分に発現されるが、YPDA 培地においては *NEO1* が十分に発現されない。このような株を作成する事で、致死性を示す *NEO1* などの遺伝子欠損株を調べる事が可能である。*erd1Δ* 変異は、Neo1-depleted *cfs1Δ* 変異とは合成致死性を示したが、*cfs1Δ* 変異とは示さなかった (図6)。

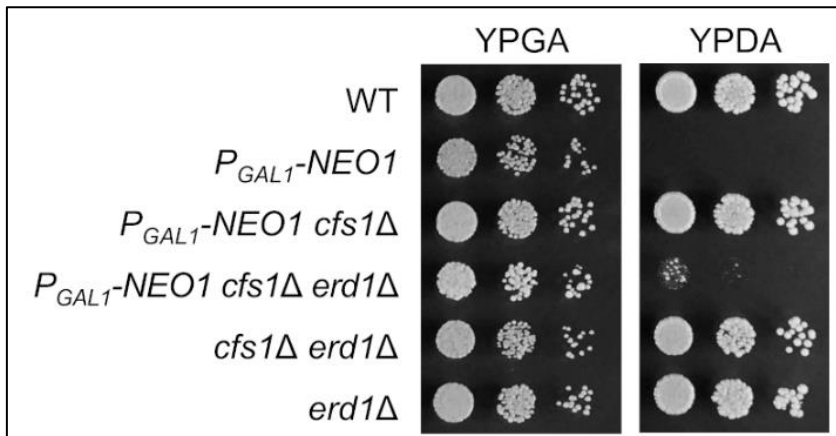


図6. Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株の生育障害

細胞を early log phase まで YPGA 液体培地で約 12 時間、30°C で培養し、 1.0×10^7 cells/mL に濃度をそろえて 4 μ l ずつ YPGA・YPDA 培地へ滴下。1/10 に希釈してそれぞれ 4 点ずつ滴下し、30°C で 1.5 日培養した。使用株は wild type (WT) (YKT38), P_{GAL1} -*NEO1* (YKT2134), P_{GAL1} -*NEO1 cfs1* Δ (YKT2135), P_{GAL1} -*NEO1 cfs1* Δ *erd1* Δ (YKT2136), *cfs1* Δ *erd1* Δ (YKT2137), *erd1* Δ (YKT2138)。 P_{GAL1} -*NEO1* と P_{GAL1} -*NEO1 cfs1* Δ *erd1* Δ 変異株において、YPGA 培地では生育しているが *GAL1* プロモーターが働かない、つまり *NEO1* 遺伝子が発現されない YPDA 培地では生育障害が生じている。

そこで研究室における先行研究にて、小胞体タンパク質の保持に関与する他の遺伝子変異が、Neo1-depleted *cfs1* Δ 変異と合成致死性を示すかが調べられたが、いずれの変異でも合成致死とはならなかった (図 7)。

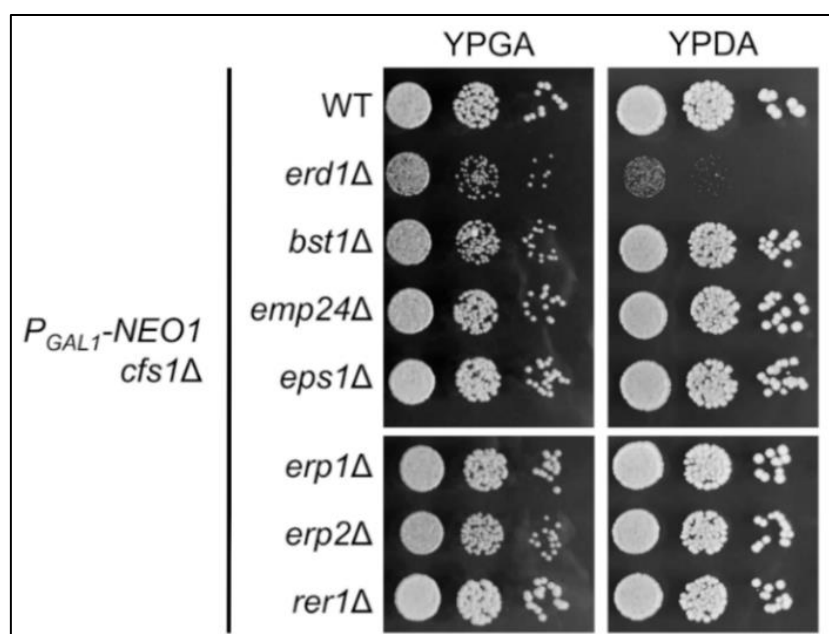


図 7. Neo1-depleted *cfs1* Δ 変異と小胞体タンパク質保持に関わる遺伝子欠損との合成致死性

各株を図 6 のようにスポットし培養した。使用株は P_{GAL1} -*NEO1 cfs1* Δ (WT) (YKT2085) と P_{GAL1} -*NEO1 cfs1* Δ に以下の変異が加わった各株、*erd1* Δ (YKT2136), *bst1* Δ (YKT2206), *emp24* Δ (YKT2207), *eps1* Δ (YKT2208), *erp1* Δ (YKT2209), *erp2* Δ (YKT2210), *rer1* Δ (YKT2211)。 P_{GAL1} -*NEO1 cfs1* Δ *erd1* Δ 変異株以外では、YPDA 培地においても正常に生育しており、合成致死性は生じていない事が示された。

さらに Golgi 体におけるタンパク質糖鎖付加に関与する他の遺伝子変異と、Neo1-depleted *cfs1* Δ 変異との関係を調べたが、こちらも同様に合成致死とはならなかった (図 8)。

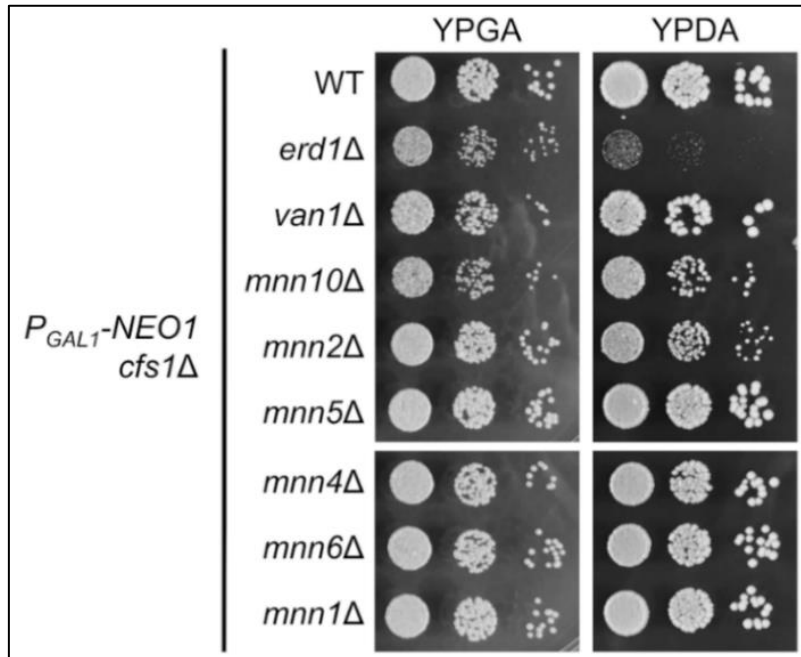


図 8. Neo1-depleted *cfs1*Δ 変異と Golgi 体におけるタンパク質糖鎖付加に関わる遺伝子欠損との合成致死性

各株を図 6 のようにスポットし培養した。使用株は $P_{GAL1-NEO1}$ *cfs1*Δ (WT) (YKT2085) と $P_{GAL1-NEO1}$ *cfs1*Δ に以下の変異が加わった各株、*erd1*Δ (YKT2136), *van1*Δ (YKT2212), *mnn10*Δ (YKT2213), *mnn2*Δ (YKT2214), *mnn5*Δ (YKT2215), *mnn4*Δ (YKT2216), *mnn6*Δ (YKT2217), *mnn1*Δ (YKT2218)。図 7 同様に $P_{GAL1-NEO1}$ *cfs1*Δ *erd1*Δ 変異株以外では、YPDA 培地においても正常に生育しており、合成致死性は生じていない事が示された。

これらの結果により、Neo1-depleted *cfs1*Δ 変異との合成致死性は *erd1*Δ 変異に特異的である事が示唆された。

次に、Neo1-depleted *cfs1*Δ *erd1*Δ 変異株において小胞輸送を検討するために、GFP を融合させた Snc1p-pm タンパク質をマーカータンパク質として実験を行った。Snc1p-pm はエキソサイトーシスに働く v-SNARE であるが、エンドサイトーシスを阻害する点突然変異を有しており、従って常時、細胞膜に局在する (Lewis et al., 2000)。既報 (Yamamoto et al., 2017) の通り、Neo1-depleted 株では GFP-Snc1p-pm が細胞内に蓄積し、*cfs1*Δ 変異ではそれが抑圧された。Neo1-depleted *cfs1*Δ *erd1*Δ 変異株では、Neo1-depleted 株のように Snc1p-pm の細胞内蓄積が認められた (図 9)。

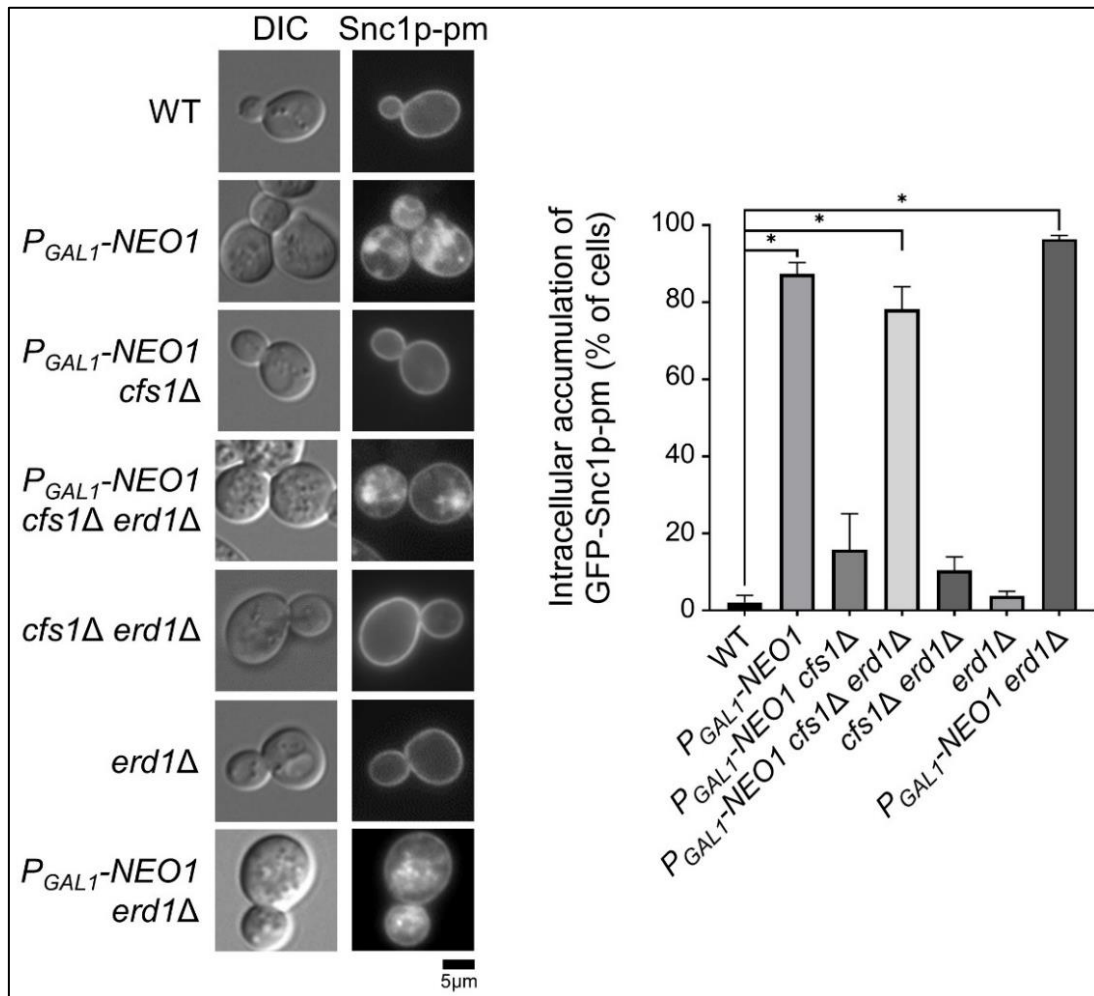


図9. Neo1-depleted *cfs1*Δ *erd1*Δ 変異株における GFP-Snc1p-pm の細胞内蓄積

各株を YPDA 液体培地で 30°C、約 20 時間 (Neo1-depleted 株・Neo1-depleted *cerd1*Δ 変異株では約 12 時間)、exponential phase まで培養し、蛍光顕微鏡にて観察した。使用株は WT (YKT2139), P_{GAL1} -NEO1 (YKT2140), P_{GAL1} -NEO1 *cfs1*Δ (YKT2141), P_{GAL1} -NEO1 *cfs1*Δ *erd1*Δ (YKT2142), *cfs1*Δ *erd1*Δ (YKT2143), *erd1*Δ (YKT2144), P_{GAL1} -NEO1 *erd1*Δ (YKT2225)。右図はそれぞれ 200 個細胞を観察したうちの GFP-Snc1p-pm の細胞内蓄積率を示している (* $p < 0.01$)。 P_{GAL1} -NEO1, P_{GAL1} -NEO1 *cfs1*Δ *erd1*Δ, P_{GAL1} -NEO1 *erd1*Δ 変異株において、GFP-Snc1p-pm の細胞内蓄積が生じている。

同様に細胞膜タンパク質である Pdr5 と Sso1 にも GFP を融合して観察を行った。Pdr5 は ATP 結合カセット輸送体であり (Egner et al., 1995)、一方、Sso1 は細胞膜における分泌小胞の融合に関わる *t*-SNARE である (Aalto et al., 1993)。GFP-Snc1p-pm と同様に、Neo1-depleted 株において Pdr5p-GFP と GFP-Sso1p は細胞内に蓄積した (200 個の細胞の観察で蓄積する率は Pdr5-GFP が 77%, GFP-Sso1p が 94%)。Neo1-depleted *cfs1*Δ 変異株では Pdr5p-GFP と GFP-Sso1p の細胞内蓄積率は低く (200 個の細

胞の観察で蓄積する率は Pdr5-GFP が 16%, GFP-Sso1p が 28%)、Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株では Pdr5p-GFP がやや少ないものの、Pdr5p-GFP、GFP-Sso1p いずれも二重変異株より細胞内蓄積が認められた (200 個の細胞の観察で蓄積する率は Pdr5-GFP が 45%, GFP-Sso1p が 84%) (図 10)。これらの結果から、Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株では、細胞膜タンパク質の細胞内輸送、つまり小胞分泌の経路において輸送障害が起きている事が考えられた。Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株の細胞内輸送の観察において、培養時間を延ばすと細胞は致死に至る事を確認しており、経過としては小胞輸送障害が生じる事が致死性の原因であると考えられた。

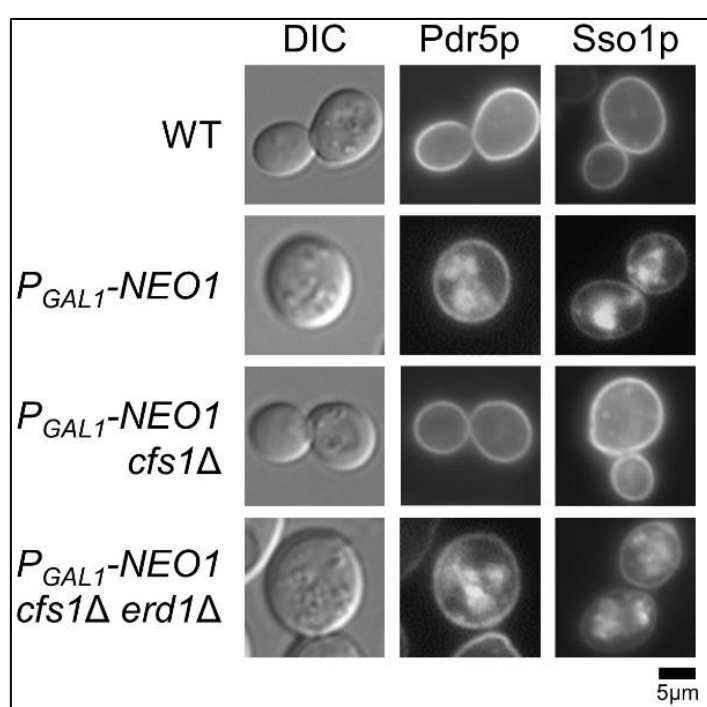


図 10. Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株における Pdr5p-GFP と GFP-Sso1p の細胞内蓄積

Pdr5p-GFP は図 9 と同条件で培養し、GFP-SSO1 株は SDA-Ura で培養し観察した。使用株は WT (YKT38 と YKT2145), *P_{GAL1}-NEO1* (YKT2134 と YKT2146), *P_{GAL1}-NEO1 cfs1Δ* (YKT2135 と YKT2147), *P_{GAL1}-NEO1 cfs1Δ erd1Δ* (YKT2148 と YKT2149) で、*PDR5-GFP* 株と、pRS416-*GFP-SSO1* (pKT1476) 導入株を使用した。*P_{GAL1}-NEO1*, *P_{GAL1}-NEO1 cfs1Δ erd1Δ* 変異株において、GFP-Snc1p-pm と同様に Pdr5p-GFP と GFP-Sso1p の細胞内蓄積を認めた。

2. Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株における細胞膜タンパク質の TGN への蓄積

Neo1 は TGN と、*cis*-, *medial*-Golgi そしてエンドソームに局在する (Hua et al., 2003; Wicky et al., 2004; Huh et al., 2003)。Cfs1 は部分的に TGN に局在するが (Yamamoto et al., 2017)、Erd1 に関しては未だにその局在の詳細は不明である。

Erd1p-GFP は own プロモーター下で発現した場合、その検出は非常に困難であった。そのため今回、*GAL1* プロモーター下で Erd1p-GFP を発現させてその局在を調べた。Erd1p-GFP の局在を比較検討するために、*cis*-Golgi のマーカーとして Mnn9p-mRFP1 を (Jungmann et al., 1998)、TGN のマーカーとして Sec7p-mRFP1 を用いた (Franzusoff et al., 1991)。Erd1p-GFP は Sec7p-mRFP1 より、Mnn9p-mRFP1 と共局在を示した (図 11) : Erd1p-GFP は Mnn9p-mRFP1 の蛍光と 44% ($n = 221$)、Mnn9p-mRFP1 は Erd1p-GFP の蛍光と 43% ($n = 225$)、共局在を示した。一方で、Erd1p-GFP は Sec7p-mRFP1 の蛍光と 9% ($n = 316$)、Sec7p-mRFP1 は Erd1p-GFP の蛍光と 12% ($n = 221$) のみ共局在を示した。このことから、Erd1 は主に *cis*-Golgi に局在していると考えられる。

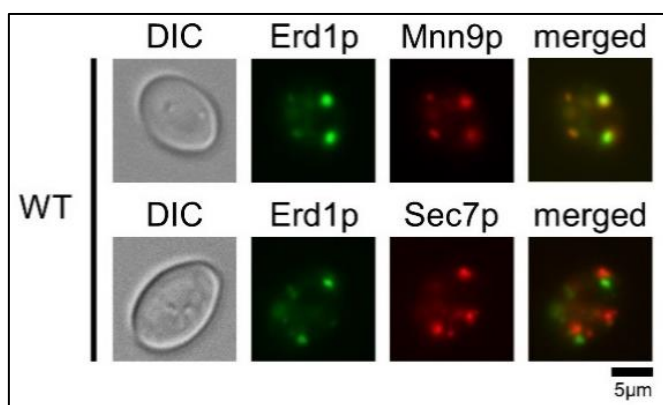


図 11. Erd1p-GFP と Mnn9p-mRFP1 の共局在

細胞を exponential phase まで YPGA 液体培地で約 7 時間、30°C で培養し観察した。使用株は P_{GAL1} -ERD1-GFP MNN9-mRFP1 (YKT2150), P_{GAL1} -ERD1-GFP SEC7-mRFP1 (YKT2151)。Erd1p-GFP は Sec7p-mRFP1 より、Mnn9p-mRFP1 と蛍光が重なる割合が高く共局在を示した。

Neo1、Cfs1、Erd1 の局在のパターンから、Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株における小胞輸送障害は Golgi 体にて起こっている可能性が考えられた。そのため、Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株において GFP-Snc1p-pm がどこに蓄積するのか、*cis*-Golgi なのか TGN なのかを調べる事とした。Neo1-depleted 株においても Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株においても、Mnn9p-mCherry と GFP-Snc1p-pm の蛍光の共局在率は高くはなかった (25%, $n = 224$; 26%, $n = 237$) (図 12)。

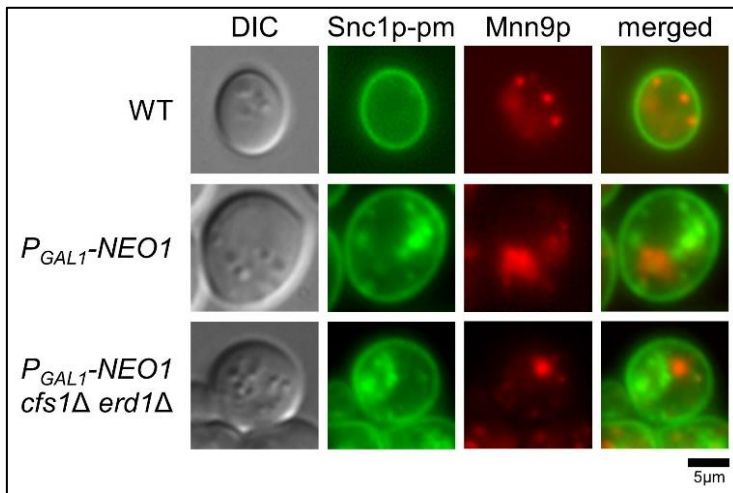


図 12. Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株における GFP-Snc1p-pm と Mnn9p-mCherry の細胞内局在

各株を図9のように培養し観察した。使用株は WT (YKT2152), *P_{GAL1}-NEO1* (YKT2153), *P_{GAL1}-NEO1 cfs1Δ erd1Δ* (YKT2154)。それぞれ *GFP-SNC1-pm* と *MNN9-mCherry* の遺伝子を有している。いずれの株でも Mnn9p-mCherry と GFP-Snc1p-pm は共局在を示さなかった。

一方で、Sec7p-mRFP1 と GFP-Snc1p-pm の蛍光は、両株において高い共局在率を示した (87%, $n = 200$; 70%, $n = 215$) (図 13)。これらの結果から、Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株において Snc1p-pm は主に TGN で蓄積していると考えられた。

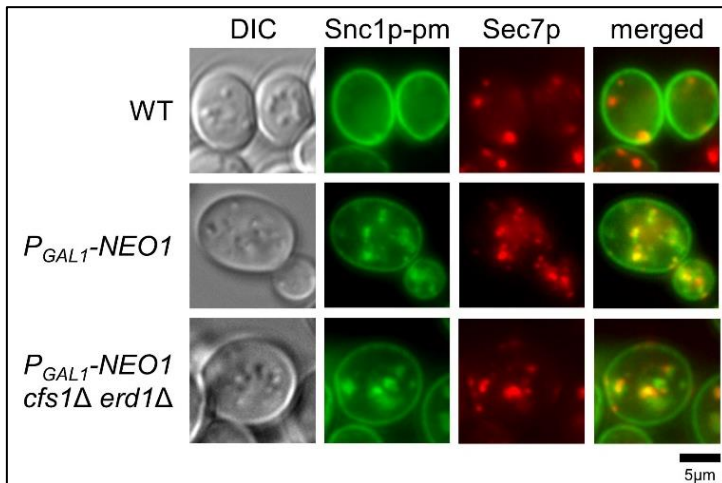


図 13. Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株における GFP-Snc1p-pm と Sec7p-mRFP1 の細胞内局在

各株を図9のように培養し観察した。使用株は WT (YKT2155), *P_{GAL1}-NEO1* (YKT2156), *P_{GAL1}-NEO1 cfs1Δ erd1Δ* (YKT2157)。それぞれ *GFP-SNC1-pm* と *SEC7-mRFP1* の遺伝子を有している。Sec7p-mRFP1 と GFP-Snc1p-pm は *P_{GAL1}-NEO1*, *P_{GAL1}-NEO1 cfs1Δ erd1Δ* 変異株において、共局在を示した。

3. Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株におけるリン脂質の分布異常

次に Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株において、膜リン脂質の分布を調べた。リン脂質の一つである PS は、抗体や PS を蛍光標識する手法を用いた観察法が報告されているが、正確に Golgi 体のような Organelle の膜リン脂質の分布を調べるのは困難であるとされている (Leventis et al., 2010)。生きたまま細胞内の PS を観察し、さらに細胞膜や Organelle の細胞質側層における PS を検出することで PS の非対称性も調べられるプローブとして有用とされる、Lactadherin-C2 ドメイン (Lact-C2) と、evectin-2 の pleckstrin homology (PH) ドメイン (evt-2 PH) を用いた (Yeung et al., 2008; Uchida et al., 2011)。GFP-Lact-C2 は通常の野生株においては細胞膜でのみ蛍光し、TGN 等など Organelle 膜における蛍光は認められない。すなわち、細胞膜の細胞質側層にのみ PS が局在すると考えられる。しかし、Flippase 変異株では TGN 膜上で蛍光し、そのメカニズムについては不明であるが、TGN において PS が細胞質側層に露出している事が考えられている (Mioka et al., 2014)。Neo1-depleted 株では、GFP-Snc1p-pm は mRFP1-Lact-C2 および mCherry-evt-2 PH と細胞内で共局在を示した (67%, $n = 207$; 71%, $n = 208$) (図 14A, B)。Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株でも同様に、GFP-Snc1p-pm は mRFP1-Lact-C2 および mCherry-evt-2 PH とある程度の共局在を示した (51%, $n = 255$; 61%, $n = 206$)。図 13 やこれらの結果から、Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株では GFP-Snc1p-pm が蓄積している TGN において、膜リン脂質の PS は細胞質側層に露出していると考えられる。

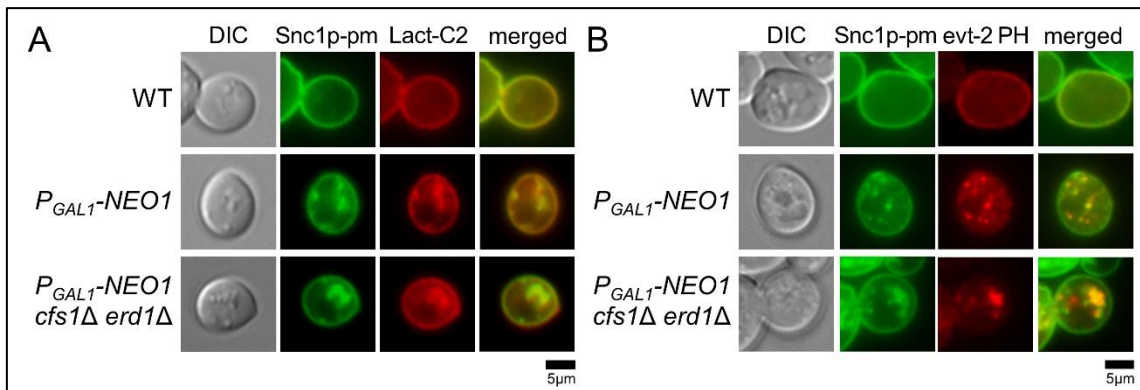


図 14. Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株の TGN における PS 露出

A: mRFP1-Lact-C2 の局在を示す。各株を図 9 のように培養し観察した。使用株は WT (YKT2139), $P_{GALI-NEO1}$ (YKT2158), $P_{GALI-NEO1} cfs1\Delta erd1\Delta$ (YKT2142)。それぞれ GFP-SNC1-pm を有し、pRS416-mRFP1-Lact-C2 (pKT1755) を挿入した。

B: mCherry-evt-2 PH の局在を示す。A 同様に各株を培養し観察した。使用株は WT (YKT2139), $P_{GALI-NEO1}$ (YKT2158), $P_{GALI-NEO1} cfs1\Delta erd1\Delta$ (YKT2142)。それぞれ GFP-SNC1-pm を有し、pRS316-mCherry-evt-2 PH (pKT2205) を挿入した。

P_{GALI}-NEO1, *P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ erd1Δ* 変異株において、GFP-Snc1p-pm は mRFP1-Lact-C2 および mCherry-evt-2 PH と共局在を示した。

さらに TGN における PI4P についても検討した。PI4P は Pik1 キナーゼにより生成され、TGN から細胞膜およびエンドソームへの小胞輸送において極めて重要な役割を担う (De Matteis et al., 2013)。Osh2 タンパク質の PH ドメインのタンデムダイマーが、細胞膜に加えて Golgi 体における PI4P も検出することが報告されているのでこれを利用した (Roy et al., 2004)。Osh2p-PH-GFP は、野生株で Golgi 体構造に局在を示した。しかし、Neo1-depleted 株および Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株では、細胞膜に主に局在している事が観察された (図 15A)。両株において Osh2p-PH-GFP の蛍光が細胞膜でのみ認められる細胞は、57%以上になることが観察により明らかとなった。さらに、Neo1-depleted *cfs1Δ* 変異株でも蛍光が細胞膜でのみ認められる細胞が、一定程度存在している事がわかった (32%)。また、Neo1-depleted 株および Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株において Osh2p-PH-GFP が TGN に局在しないことを、Sec7p-mRFP1 を同時に発現させることで確かめている (図 15B)。これらにより、PI4P は本来局在する TGN に局在せず、この事が Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株における小胞輸送障害を引き起こしている可能性がある。これは Pik1 欠損により、GFP-Snc1-pm の細胞内蓄積が引き起こされるという既報にも一致している (Mioka et al., 2014)。

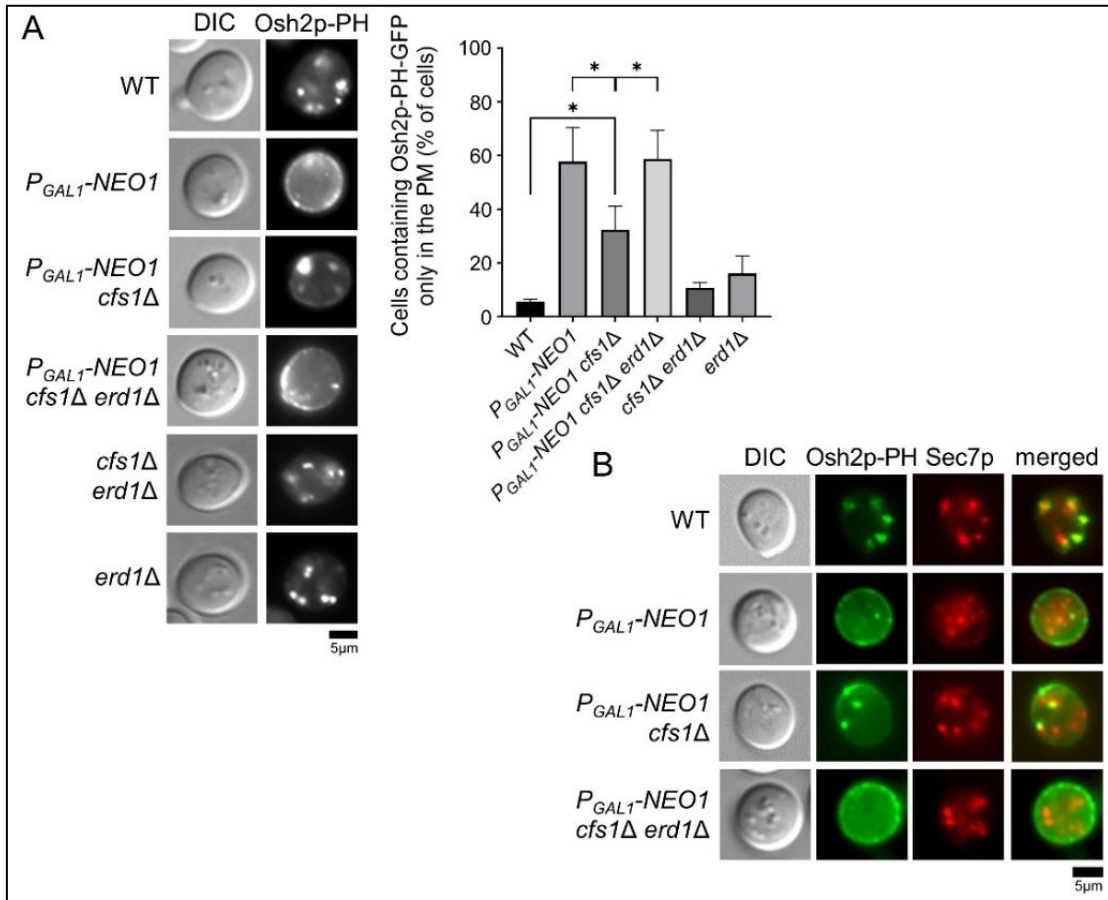


図 15. Neo1-depleted $cfs1\Delta erd1\Delta$ 変異株の TGN における PI4P 欠如

A: Osh2p-PH-GFP の局在を示す。各株を図 9 のように培養し観察した。使用株は WT (YKT2159), $P_{GALI-NEO1}$ (YKT2160), $P_{GALI-NEO1} cfs1\Delta$ (YKT2161), $P_{GALI-NEO1} cfs1\Delta erd1\Delta$ (YKT2162), $cfs1\Delta erd1\Delta$ (YKT2163), $erd1\Delta$ (YKT2164)。右図には Osh2p-PH-GFP の蛍光を細胞膜のみで示す細胞の割合を図 9 同様に観察した (* $p < 0.01$)。

B: Osh2p-PH-GFP と Sec7p-mRFP1 の局在を示す。各株を図 9 のように培養し観察した。使用株は WT (YKT2165), $P_{GALI-NEO1}$ (YKT2166), $P_{GALI-NEO1} cfs1\Delta$ (YKT2167), $P_{GALI-NEO1} cfs1\Delta erd1\Delta$ (YKT2168)。全株において OSH2-PH-GFP と SEC7-mRFP1 を有する。

$P_{GALI-NEO1}$, $P_{GALI-NEO1} cfs1\Delta erd1\Delta$ 変異株において、Osh2p-PH-GFP は主に細胞膜に局在し、Sec7p-mRFP1 と共局在を示さなかった。

そこでさらに私は、GFP-Pik1p の局在を調べる事とした。すると、GFP-Pik1p は Neo1-depleted 株および Neo1-depleted $cfs1\Delta erd1\Delta$ 変異株において通常通り Sec7p-mRFP1 と共局在を示すという、大変興味深い結果が明らかとなった。それぞれの株で、89% ($n = 224$) および 95% ($n = 213$) もの GFP-Pik1p が Sec7p-mRFP1 と共局在を示していた (図 16)。

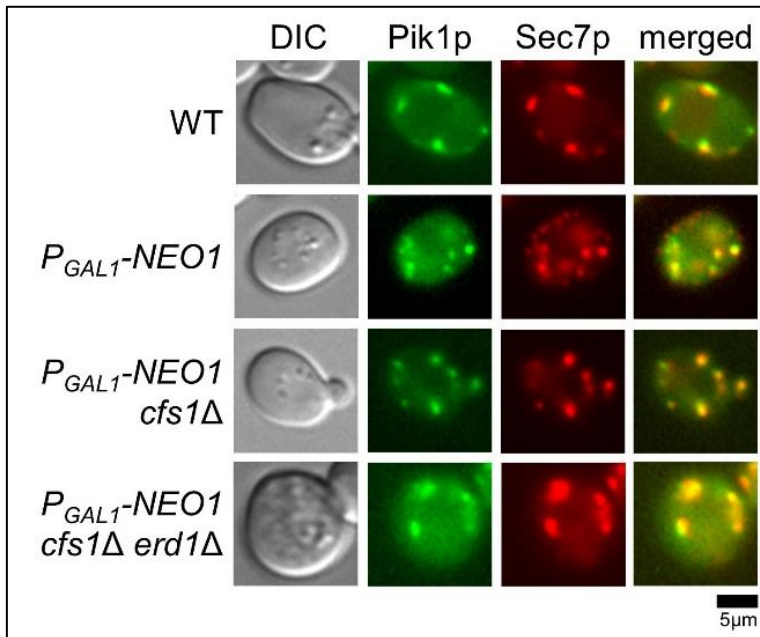


図 16. *Neo1*-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株における GFP-Pik1p と Sec7p-mRFP1 の共局在

各株を図9のように培養し観察した。使用株は WT (YKT2169), *P_{GAL1}-NEO1* (YKT2170), *P_{GAL1}-NEO1 cfs1Δ* (YKT2171), *P_{GAL1}-NEO1 cfs1Δ erd1Δ* (YKT2172)。全株において *P_{PIK1}-GFP-PIK1* と *SEC7-mRFP1* を有する。全株において GFP-Pik1p が Sec7p-mRFP1 と共局在を示している。

つまり、これらの変異株では TGN において Pik1 が不活性化されているか、あるいは PI4P の基質となる PI が細胞質側層に少ない可能性などが考えられる。この事に関連し、Pik1 の部分的な欠乏により *neo1Δ cfs1Δ* 変異株の生育障害が生じていたため、*neo1Δ cfs1Δ* 変異では PI4P の産生自体に問題があるのかもしれない (図 17)。

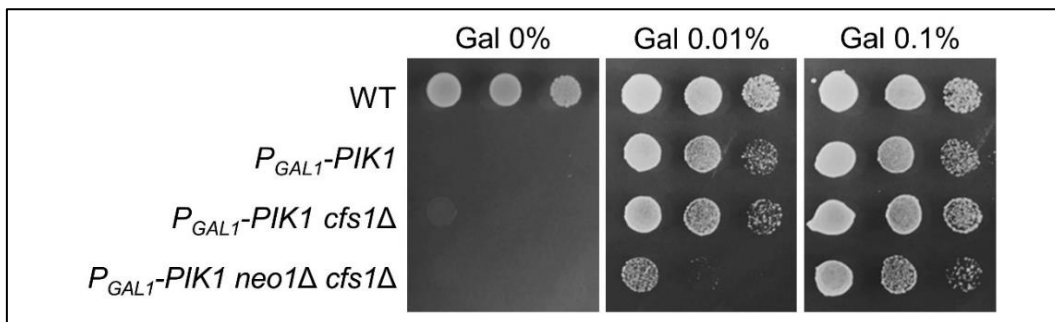


図 17. Pik1 の部分的な欠損による *neo1Δ cfs1Δ* 変異株の生育不良

各株を最小発育培地に 2% glucose を含むもの (galactose 0%; Gal 0%)、2% raffinose に 0.01 または 0.1% の galactose を含むもの (Gal 0.01%, Gal 0.1%)、各培地に図 6 のようにスポットし、30°C で 4 日間培養した。使用株は WT (YKT38), *P_{GAL1}-PIK1* (YKT2219), *P_{GAL1}-PIK1 cfs1Δ*

(YKT2220), $P_{GALI-PIK1} neol\Delta cfs1\Delta$ (YKT2221)。 $P_{GALI-PIK1} neol\Delta cfs1\Delta$ 変異株において、Galactose を制限した培地、つまり Pik1 の発現量を制御する事で生育不良が示された。

4. Neo1-depleted $cfs1\Delta$ 変異株の生育における Golgi 体内腔のリン酸ホメオスタシスの重要性

$neol\Delta cfs1\Delta erd1\Delta$ 変異株の合成致死性の原因を調べるために、マルチコピーサプレッサースクリーニングを行った。マルチコピーサプレッサーとは高発現で変異を抑圧できる遺伝子のことである。 $neol\Delta cfs1\Delta erd1\Delta$ 変異のマルチコピーサプレッサーは、この変異株において欠損している機能との関連が示唆される。 $NEO1/URA3$ plasmid を持つ $neol\Delta cfs1\Delta erd1\Delta$ 変異株にゲノムライブラリーを形質転換させ、形質転換体を 5-FOA を加えた培地から得た。これにより、 $PHO87$ 、 $PHO90$ 、 $ERS1$ 、 $SAR1$ 、 $YIP1$ 遺伝子が単離された (図 18A)。さらにこれらのマルチコピーサプレッサーは、Neo1-depleted $cfs1\Delta erd1\Delta$ 変異株の生育障害を抑圧するが、Neo1-depleted 株の生育障害は抑圧しない事を確認した (図 18B, C)。

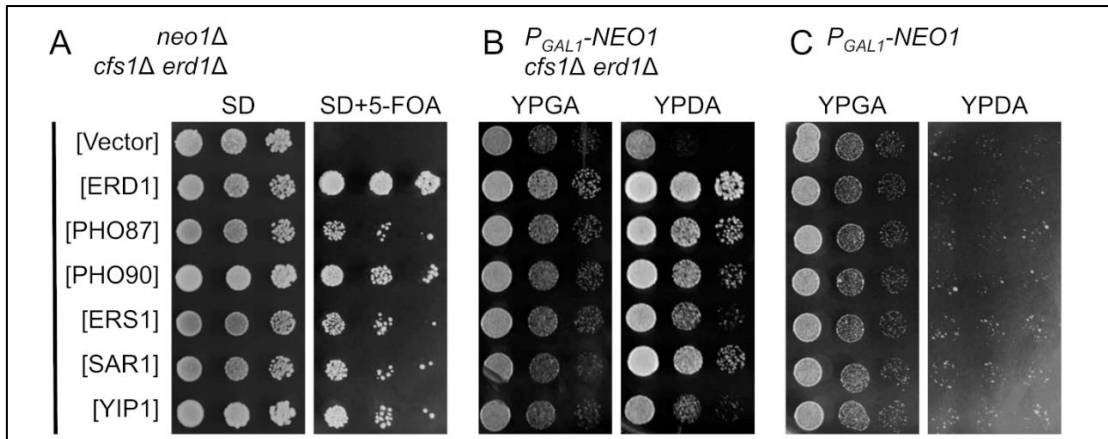


図 18. $neol\Delta cfs1\Delta erd1\Delta$ 変異株に対するマルチコピーサプレッサーの単離

A: 図 6 のように、8 μ l ずつ SD-L と SD-L+5-FOA 培地に各株をスポットし、30°C で 4 日間培養した。 $neol\Delta cfs1\Delta erd1\Delta$ 変異株に YCplac33-NEO1 (pKT1470) を導入した株を使用した (YKT2173)。同株には、YEplac181(Vector)、pKT2197(ERD1)、pKT2198(PHO87)、pKT2199(PHO90)、pKT2200(ERS1)、pKT2201(SAR1)、pKT2202(YIP1)の各 plasmid を導入した。5-FOA が付加された培地、つまり YCplac33-NEO1 (pKT1470) が機能しない状態でも $neol\Delta cfs1\Delta erd1\Delta$ 変異株が生育しており、各 plasmid により生育障害が抑圧されている。

B: A 同様にスポットし、30°C で 1.5 日間培養した。 $P_{GALI-NEO1} cfs1\Delta erd1\Delta$ (YKT2174) を使用した。 $P_{GALI-NEO1} cfs1\Delta erd1\Delta$ 変異株も $NEO1$ 遺伝子の発現が抑圧される YPDA 培地で通常通り生育する事から、各 plasmid による生育障害の抑圧が認められた。

C: B 同様にスポットし培養した。 $P_{GALI-NEO1}$ (YKT2134) を使用した。 $P_{GALI-NEO1}$ 変異株に対しては、各 plasmid による生育障害の抑圧は認められなかった。

この事は、マルチコピーサプレッサーは *NEO1* 遺伝子の変異を抑圧するのではなく、*erd1Δ* 変異自体または Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株に関連する合成致死性を抑圧している事を示唆している。Pho87 と Pho90 は細胞膜における低親和性リン酸輸送体である (Auesukaree et al., 2003; Hürlimann et al., 2009; Wykoff et al., 2007)。ERS1 は *erd1Δ* 変異に対するマルチコピーサプレッサーとして単離され (Hardwick et al., 1990)、Ers1 は液胞におけるシスチン輸送体として働く (Gao et al., 2005)。Sar1 は小胞体からの COPII 小胞の形成を制御し (Haucke., 2003; Suda et al., 2017)、Yip1 は同じく COPII 小胞生成に関わっている (Heidtmann et al., 2003)。これら全てのマルチコピーサプレッサーが Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株における GFP-Snc1p-pm の細胞内蓄積や、Osh2p-PH-GFP の細胞膜への誤局在をも抑圧する事も確認した (図 19)。

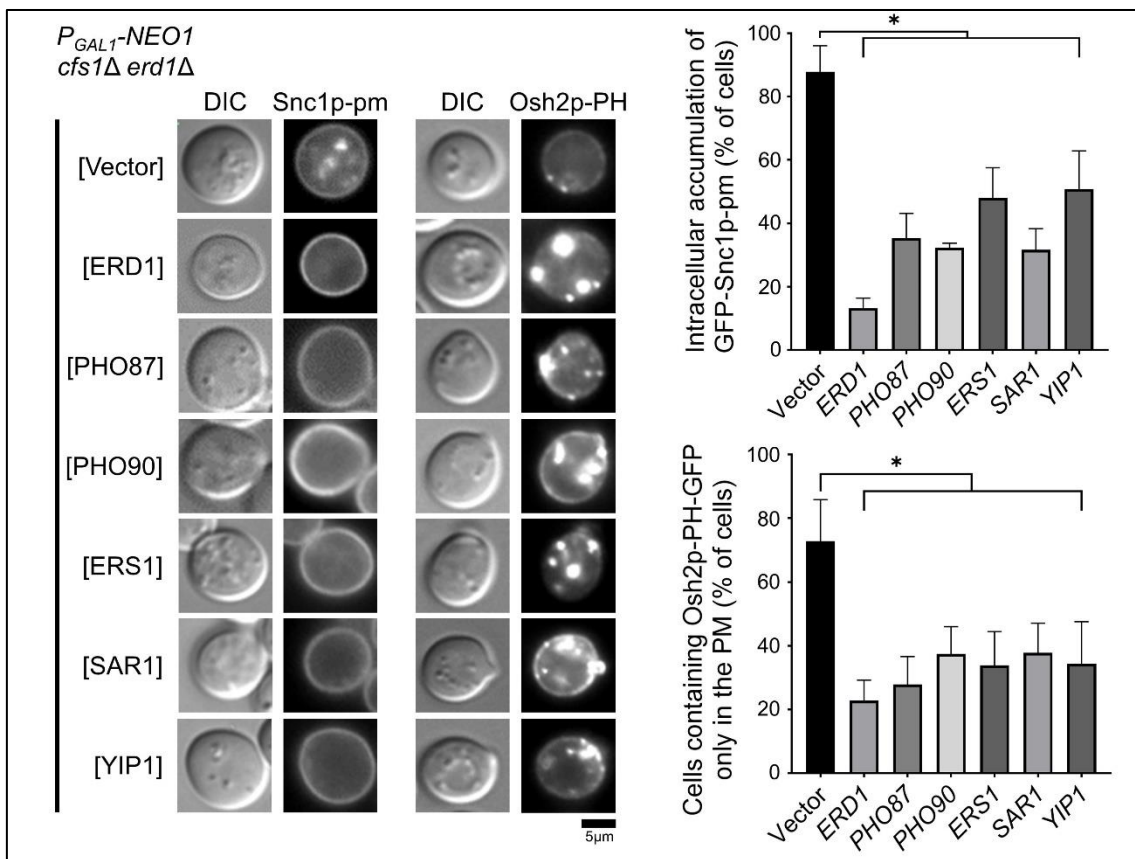


図 19. Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株における GFP-Snc1p-pm の細胞内蓄積および Osh2p-PH-GFP の誤局在の抑圧

各株を図9のように培養し観察した。使用株は、*P_{GAL1}-NEO1 cfs1Δ erd1Δ* 変異に GFP-Snc1p-pm (YKT2174)、または Osh2p-PH-GFP (YKT2162) を有しているもの。それぞれ図 18 と同じ plasmid を形質転換し、右図には GFP-Snc1p-pm の蓄積率及び Osh2p-PH-GFP の細胞膜でのみの蛍光率を図9 同様に示した (* p < 0.01)。*P_{GAL1}-NEO1 cfs1Δ erd1Δ* 変異株において生育障

害を抑圧する各 plasmid は、GFP-Snc1p-pm の細胞内蓄積率及び Osh2p-PH-GFP の細胞膜への誤局在をも抑圧している事が示された。

PHO87 と PHO90 遺伝子が単離されたことは、Erd1 が Golgi 体内腔から細胞質中へリン酸を輸送する働きを有することから大変興味深い (Snyder et al., 2017)。なぜなら、細胞膜における低親和性リン酸輸送体である Pho87 と Pho90 によって *neol1Δ cfs1Δ erd1Δ* 変異株の致死性が抑圧されたということは、細胞質中のリン酸濃度が下がったことが致死性の要因である可能性が考えられるからである (図 20A)。そのため、まず私は細胞外のリン酸濃度を上げる事で、Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株の生育障害を抑圧できるかを調べた。YPD 培地には約 5 mM のリン酸が含まれており (Bisson et al., 1982)、20 mM、50 mM とリン酸濃度を上げた培地で生育を調べた。しかし、いずれも生育障害は抑圧されなかった (図 20B)。また、*erd1Δ* 変異によって細胞質中のリン酸濃度が低下する事が、Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株の合成致死性の原因となっているとすると、Neo1-depleted *cfs1Δ* 変異株は細胞質中のリン酸濃度低下に対して何らかの変化を示す可能性もあると考えた。しかしながら、Neo1-depleted *cfs1Δ* 変異株を低リン酸培地 (1 mM や 3 mM) で培養してもほぼ正常に生育した (図 20C)。次に Neo1-depleted *cfs1Δ* 変異株にリン酸輸送体の変異を導入する事を試みた。Pho87 と Pho90 に加えて、細胞膜にはさらに Pho84、Pho89 という高親和性のリン酸輸送体がある (Bun-Ya et al., 1991; Martinez et al., 1998)。これら全てのリン酸輸送体の変異を加えてみても、Neo1-depleted *cfs1Δ* 変異株は正常に生育することがわかった (図 20D)。これらの結果は、細胞質中のリン酸濃度の低下ではなく、*erd1Δ* 変異によって排出されないリン酸が Golgi 体内腔に溜まる、つまり Golgi 体内腔のリン酸濃度の上昇が Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株の致死性の原因である可能性を示唆している。

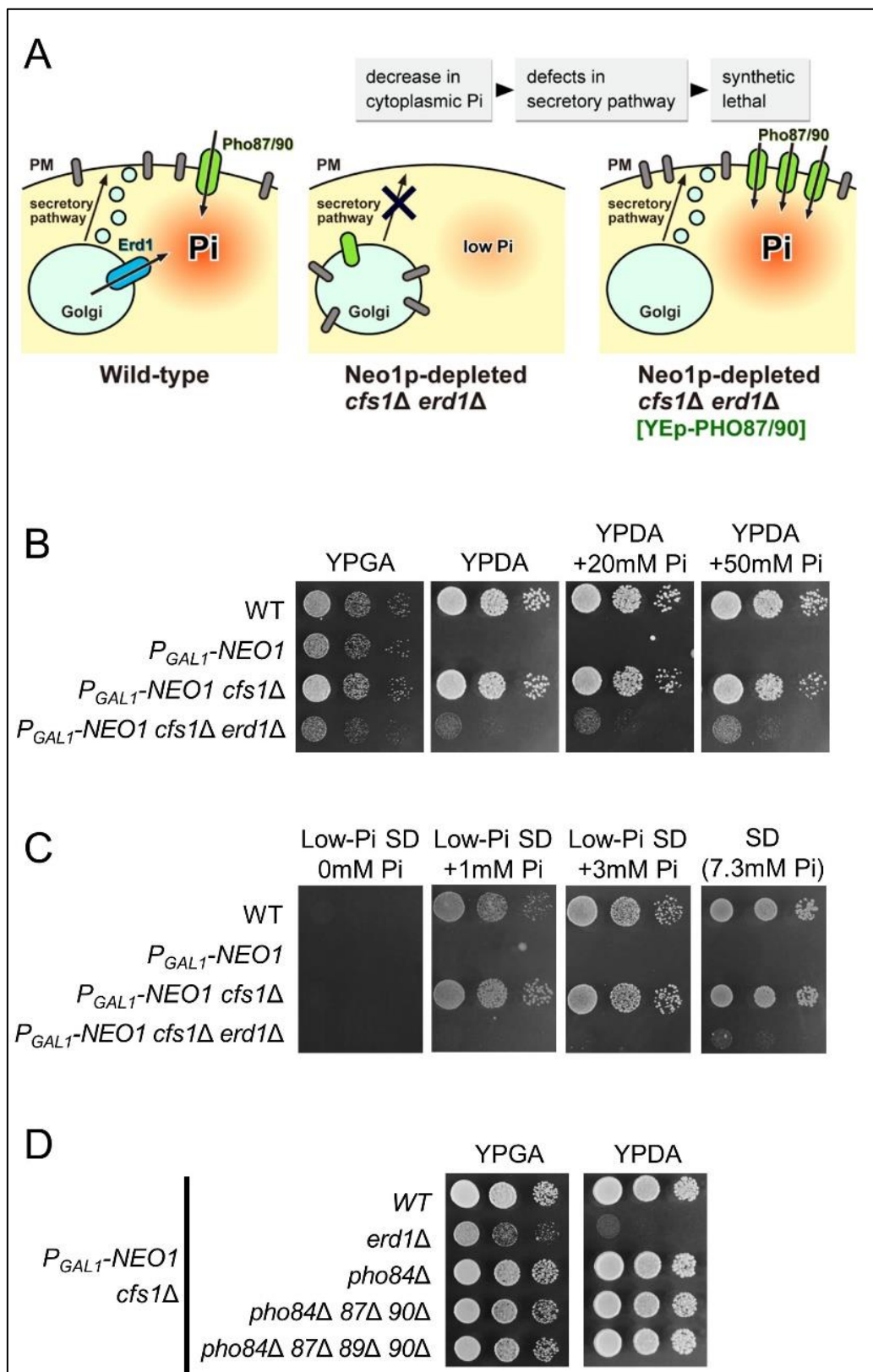


図 20. NEO1-depleted *cfs1Δ* 変異株に *erd1Δ* 変異を加えて生じる合成致死性と細胞質リン酸濃度の関係

A: Neo1-depleted *cfs1Δ* 変異株に *erd1Δ* 変異を加えて生じる合成致死性は細胞質中リン酸濃度の低下による可能性があり、このモデル図は *PHO87/PHO90* 遺伝子の過剰発現により、細胞質のリン酸濃度を上昇させる事でその合成致死性を抑圧する可能性を示したものである。細胞膜タンパク質は灰色の棒状モデルで図中に示した。

B: 20 mM、50 mM のリン酸濃度に調整した各培地に、各株を図6のようにスポットし 30°C で 1.5 日間培養した。使用株は WT (YKT38), *P_{GALI}-NEO1* (YKT2134), *P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ* (YKT2135), *P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ erd1Δ* (YKT2136)。いずれの培地も Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株の生育障害を抑圧しなかった。

C: リン酸濃度を 0 mM、1 mM、3 mM に調整した SD 培地（標準リン酸濃度 7.3mM）に各株を B 同様にスポットし、30°C で 2 日間培養した。使用株は B と同様。Neo1-depleted *cfs1Δ* 変異株は低リン酸培地でも正常通り発育した。

D: 各株を B 同様にスポットし、30°C で 1.5 日間培養した。使用株は、*P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ* (YKT2135), *P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ erd1Δ* (YKT2136), *P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ pho84Δ* (YKT2176), *P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ pho84Δ pho87Δ pho90Δ* (YKT2177), *P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ pho84Δ pho87Δ pho89Δ pho90Δ* (YKT2178)。Neo1-depleted *cfs1Δ* 変異株に細胞膜リン酸輸送体の変異を加えた場合も、生育障害は示さなかった。

Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株において細胞膜のタンパク質が TGN に蓄積する事から（図9～図13）、Pho87 や Pho90 も TGN に蓄積する可能性も考えられる。そこで、*TPH1* プロモーター下で発現するようにコントロールした GFP-Pho87p と GFP-Pho90p の蓄積を調べた。野生株では GFP-Pho87p と GFP-Pho90p は主に細胞膜に局在したが、点状の構造物が一部細胞内に観察された。mRFP1-Snc1p-pm は、通常通り細胞膜にのみ局在を示した。Neo1-depleted 株では、GFP-Pho87p の 85% ($n = 200$)、GFP-Pho90p の 82% ($n = 200$) が mRFP1-Snc1p-pm の細胞内蓄積と共局在を示した。同様に Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株でも、GFP-Pho87p の 79% ($n = 200$)、GFP-Pho90p の 84% ($n = 200$) が mRFP1-Snc1p-pm の細胞内蓄積と共局在を示した（図21A）。これらにより、Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株では Pho87 と Pho90 も TGN に蓄積してしまっていると考えられる。

以上の事をまとめると、Pho87 と Pho90 の過剰発現により、Golgi 体内腔に蓄積されたリン酸の細胞質中への輸送が行われ、*neo1Δ cfs1Δ erd1Δ* 変異株の致死性が抑圧される機序が考えられる（図21B）。つまり Golgi 体内腔のリン酸濃度の上昇が、*neo1Δ cfs1Δ erd1Δ* 変異株の致死性の原因であると推察される。

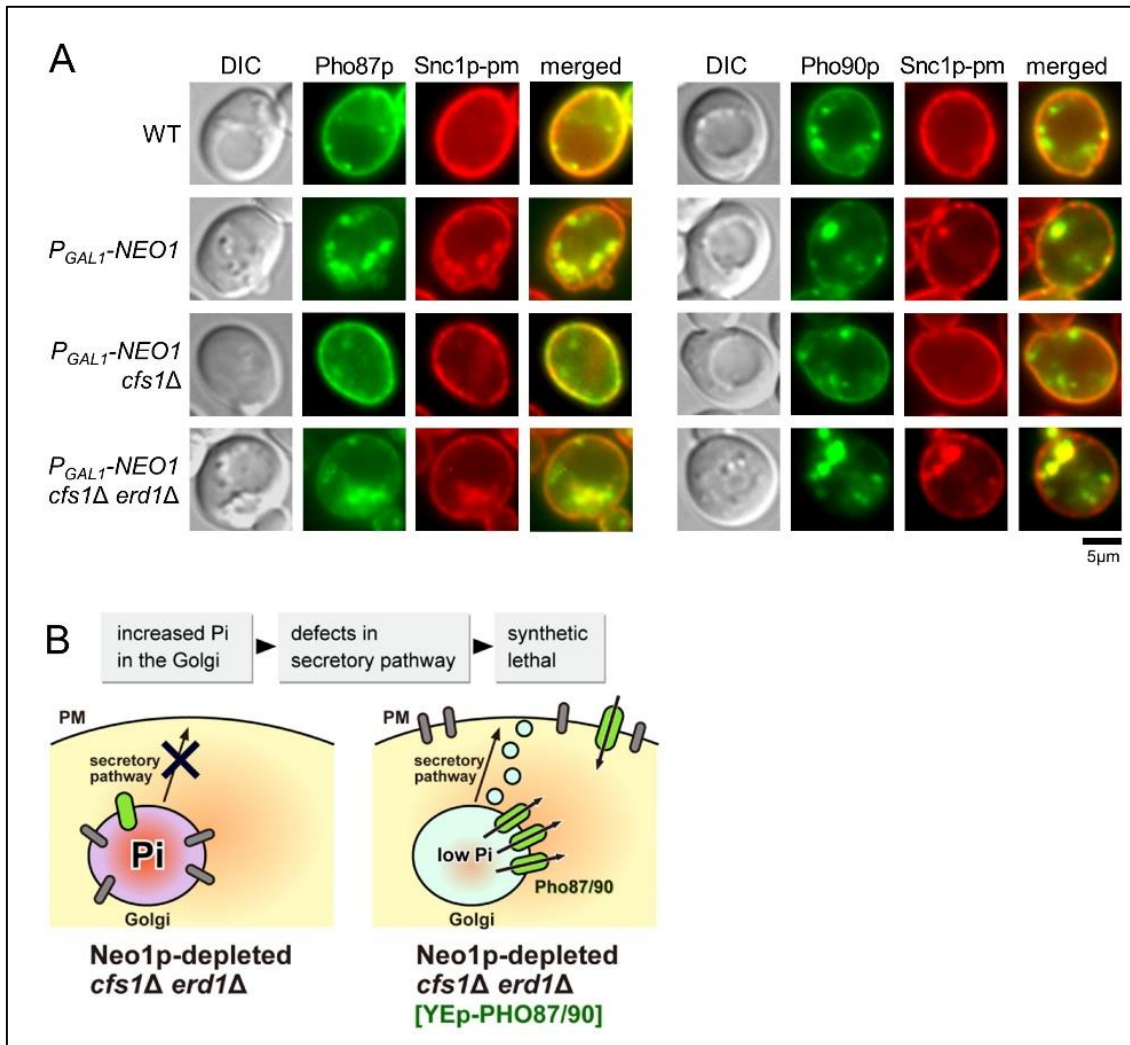


図 21. NEO1-depleted *cfs1*Δ *erd1*Δ 変異株における GFP-Pho87p および GFP-Pho90p の局在

A: 各株を図 9 のように培養し観察した。使用株は WT (YKT2179), P_{GAL1} -*NEO1* (YKT2180), P_{GAL1} -*NEO1* *cfs1*Δ (YKT2181), P_{GAL1} -*NEO1* *cfs1*Δ *erd1*Δ (YKT2182)。全株において *mRFP1-SNC1-pm* を有し、pRS416 P_{TPII} -GFP-PHO87 (pKT2203) (左図) または pRS416 P_{TPII} -GFP-PHO90 (pKT2204) (右図) を導入している。GFP-Pho87p および GFP-Pho90p はいずれも *mRFP1-Snc1p-pm* と細胞内で共局在を示し、小胞輸送障害により TGN に蓄積している事が考えられた。

B: NEO1-depleted *cfs1*Δ 変異株に *erd1*Δ 変異を加えて生じる合成致死性は Golgi 体内腔のリン酸濃度の上昇により引き起こされる可能性がある。このモデル図は *PHO87/PHO90* 遺伝子の過剰発現により、Golgi 体内腔のリン酸濃度を低下させる事でその合成致死性を抑圧する可能性を示したものである。

5. NEO1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株が示す小胞体構造の異常

SAR1、*YIP1* という小胞体からの COP II 小胞形成に関わる遺伝子がマルチコピーサプレッサーとして単離された事で、Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株では小胞体にも変化が起きている可能性が考えられた。そこで、Hmg1p-GFP を用いて小胞体の形態を調べた。Hmg1 はヒドロキシメチルグルタリル-CoA 還元酵素で、HMG-CoA からメバロン酸への変換を触媒する (Basson et al., 1986)。Hmg1 は核周囲の小胞体に局在するが (Koning et al., 1996)、Neo1-depleted 株や Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株ではその構造に異常が観察された (図 22)。

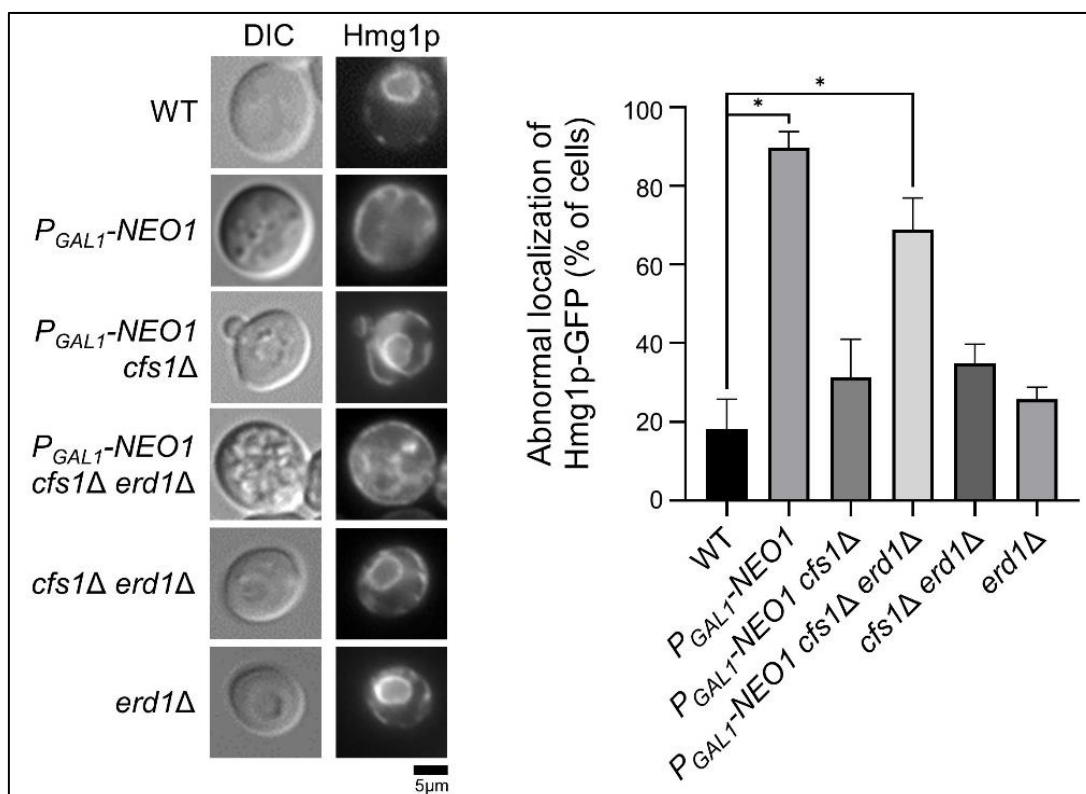


図 22. NEO1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株における Hmg1p-GFP の局在

左図では、各株を図 9 のように培養し観察した。使用株は WT (YKT2183), *P_{GAL1}-NEO1* (YKT2184), *P_{GAL1}-NEO1 cfs1Δ* (YKT2185), *P_{GAL1}-NEO1 cfs1Δ erd1Δ* (YKT2186), *cfs1Δ erd1Δ* (YKT2187), *erd1Δ* (YKT2188)。全株において *HMG1*-GFP を有している。右図は、核周囲への Hmg1p-GFP 局在が欠如している割合を図 9 同様に示した (* $p < 0.01$) 野生株で認められるような Hmg1p-GFP の環状構造が、*P_{GAL1}-NEO1* および *P_{GAL1}-NEO1 cfs1Δ erd1Δ* 変異株で乱れている事が示された。

Hmg1-GFP は核周囲の小胞体に環状に局在せず、細胞質中で糸状の構造を示していた。また、核膜孔複合体のヌクレオポリンである Nup188 を用いて核膜についても調べた (Nehrbass et al., 1996)。Hmg1p-GFP 同様に、Nup188p-mRFP1 の核への局在は

Neo1-depleted 株や Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株で失われている事が観察された (図 23)。

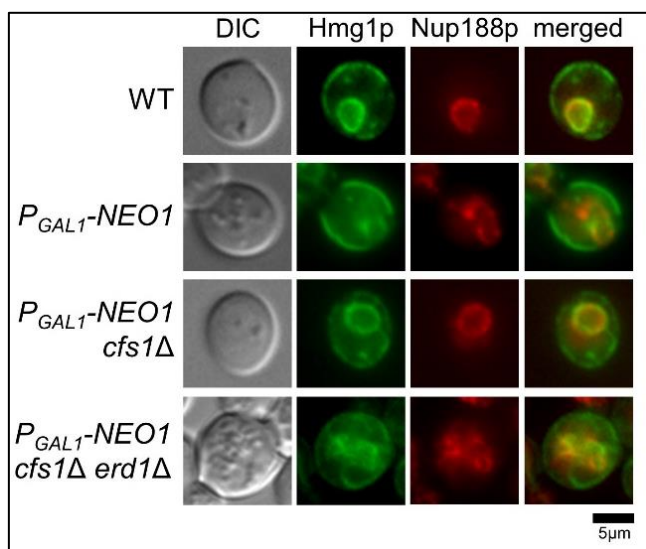


図 23. NEO1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株における Nup188p-mRFP1 の局在

各株を図9のように培養し観察した。使用株は WT (YKT2189), *P_{GAL1}-NEO1* (YKT2190), *P_{GAL1}-NEO1 cfs1Δ* (YKT2191), *P_{GAL1}-NEO1 cfs1Δ erd1Δ* (YKT2192)。全株において *HMG1-GFP* と *NUP188-mRFP1* を有している。Hmg1p-GFP 同様に Nup188p-mRFP1 の環状構造が、*P_{GAL1}-NEO1* および *P_{GAL1}-NEO1 cfs1Δ erd1Δ* 変異株で乱れている事が示された。

次に、細胞膜周囲の表層小胞体のマーカータンパク質である、Rtn1 を調べた。Rtn1 はレチクロンファミリーの一種で、小胞体細管形成に関与する (De Craene et al., 2006)。野生株では Rtn1p-GFP は細胞膜周囲に環状に認められたが、程度の差はあるが、Neo1-depleted 株では 78% ($n = 200$)、Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株では 29% ($n = 200$)に Rtn1-GFP の異常な点状の細胞内集積が認められた (図 24)。

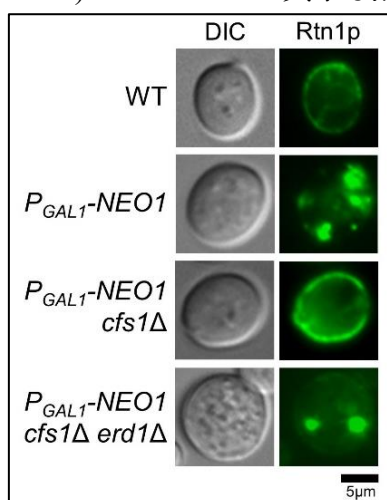


図 24. NEO1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株における Rtn1p-GFP の局在

各株を図9のように培養し観察した。使用株は WT (YKT2193), P_{GAL1} -*NEO1* (YKT2194), P_{GAL1} -*NEO1 cfs1Δ* (YKT2195), P_{GAL1} -*NEO1 cfs1Δ erd1Δ* (YKT2196)。全株において *RTN1*-GFP を有している。Rm1p-GFP の異常な細胞内集積が、 P_{GAL1} -*NEO1* および P_{GAL1} -*NEO1 cfs1Δ erd1Δ* 変異株で認められた。

これは PC の生成が障害される *cho2Δ* 変異株でも認められた所見である (Hermesh et al., 2014)。これらの構造物は野生株や *Neo1*-depleted *cfs1Δ* 変異株では認められなかった。このことから、*Neo1*-depleted 株および *Neo1*-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株では、小胞体の構造異常が起きている事が考えられる。しかしながら、これらの変異株において mRFP-Snc1p-pm は Hmg1p-GFP と重なって蓄積しなかった (<1%, 200 cells)。つまり、Hmg1p-GFP の観察で認められる小胞体構造の異常は起きているものの、Snc1p-pm は小胞体に蓄積せずに図9~13 に示したように TGN に蓄積していると考えられる。小胞体から Golgi 体への小胞輸送に関しては目立った異常がないことが考えられた (図25)。

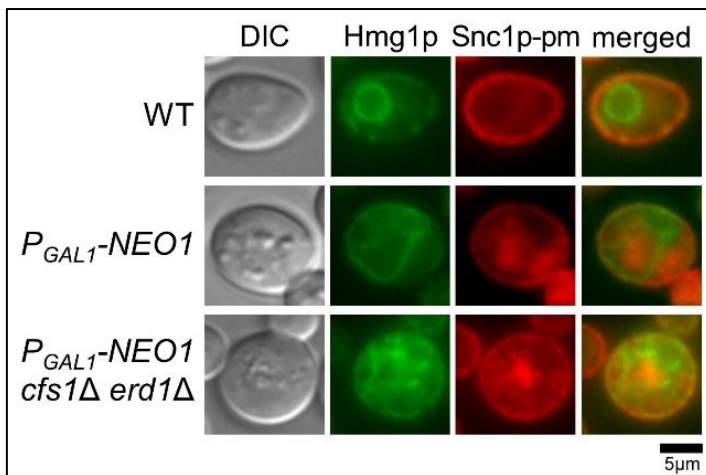


図 25. *NEO1*-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株における mRFP1-Snc1p-pm と Hmg1p-GFP の局在

各株を図9のように培養し観察した。使用株は WT (YKT2197), P_{GAL1} -*NEO1* (YKT2198), P_{GAL1} -*NEO1 cfs1Δ erd1Δ* (YKT2199)。全株において *mRFP1-SNC1*-pm と *HMG1*-GFP を有している。いずれの株でも mRFP-Snc1p-pm は Hmg1p-GFP と共局在を示さなかった。

Erd1 は元来、小胞体シャペロンの Kar2p/ Bip のような小胞体内腔のタンパク質を分泌してしまう変異株から単離されたものである (Pelham et al., 1988; Hardwick et al., 1990)。したがって、*erd1Δ* 変異株では Kar2p の *cis*-Golgi 体から小胞体へ戻る経路が阻害されていると考えられる。*neo1* 温度感受性株では Kar2p が同じように分泌され、Rer1 という小胞体へ戻る経路のレセプターである小胞体膜タンパク質が誤局在

する事が報告されている (Hua et al., 2003; Sato et al., 2001)。小胞体で Kar2 を保持できないと、変性したタンパク質が小胞体に蓄積され、異常タンパク応答(UPR)が誘発される (Walter et al., 2011; Mori., 2009)。そこで Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株で UPR の発生を、UPR elements (UPRE)に GFP を結合させることで調べた (Merksamer et al., 2008)。野生株をジチオトレイトール (DTT) などの還元剤で処理すると、異常タンパク質が小胞体内に蓄積し、UPRE-GFP の発現が誘導される。Neo1-depleted および Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株では、DTT で誘導されるのと比較しても、強い UPR が誘導された (図 26)。

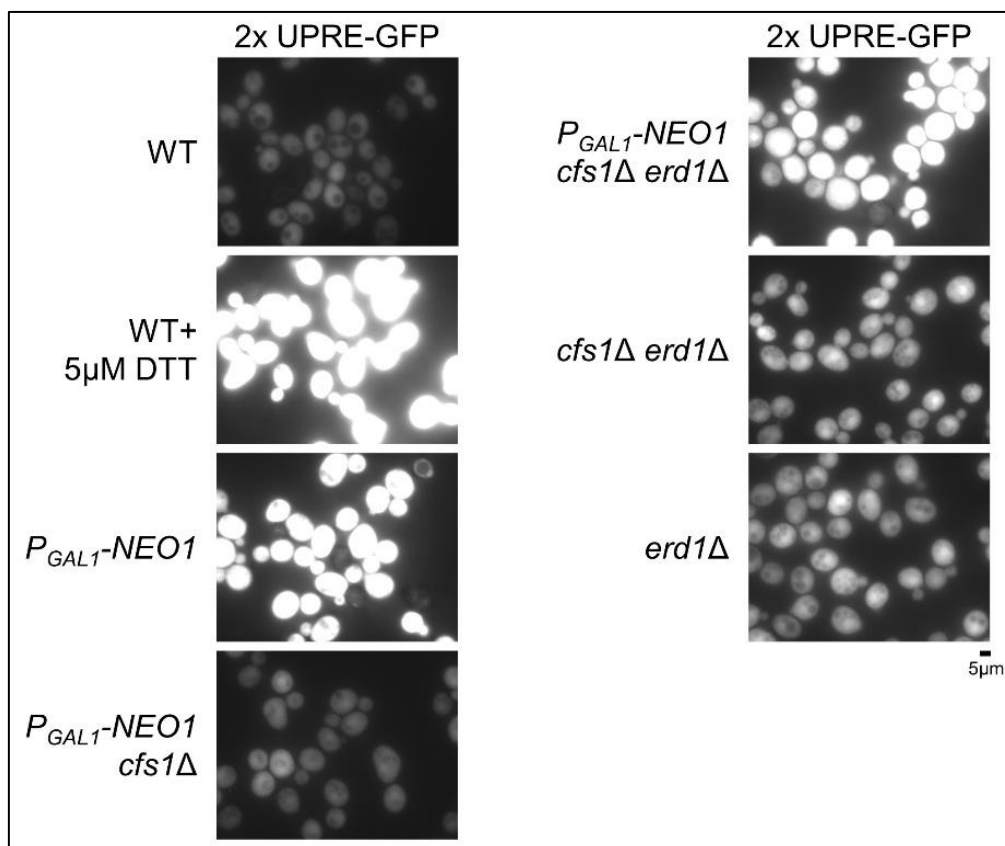


図 26. Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株における UPR の誘導

各株を図9のように培養し観察した。野生株は OD_{600nm} = 1.0 相当の early log phase の細胞を 1.5ml 収集し、5 μM DTT を含む YPDA で 4 時間培養した。使用株は WT (YKT2200), *P_{GAL1}-NEO1* (YKT2201), *P_{GAL1}-NEO1 cfs1Δ* (YKT2202), *P_{GAL1}-NEO1 cfs1Δ erd1Δ* (YKT2203), *cfs1Δ erd1Δ* (YKT2204), *erd1Δ* (YKT2205)。全株において 2×UPRE-GFP を有している。Neo1-depleted および Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株で 2×UPRE-GFP の蛍光が認められた。

erd1Δ 変異株は既報通り弱い誘導を示した (Jonikas et al., 2009)。その他に、*ERD2* は小胞体内腔タンパク質を *cis*-Golgi 体から戻すための受容体をコードする遺伝子である (Semenza et al., 1990)。*ERD2* 欠損株では、Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株同様

に、強い UPR の誘導と小胞体構造の異常を示したが、Snc1p-pm の細胞膜への輸送は正常であった (図 27)。

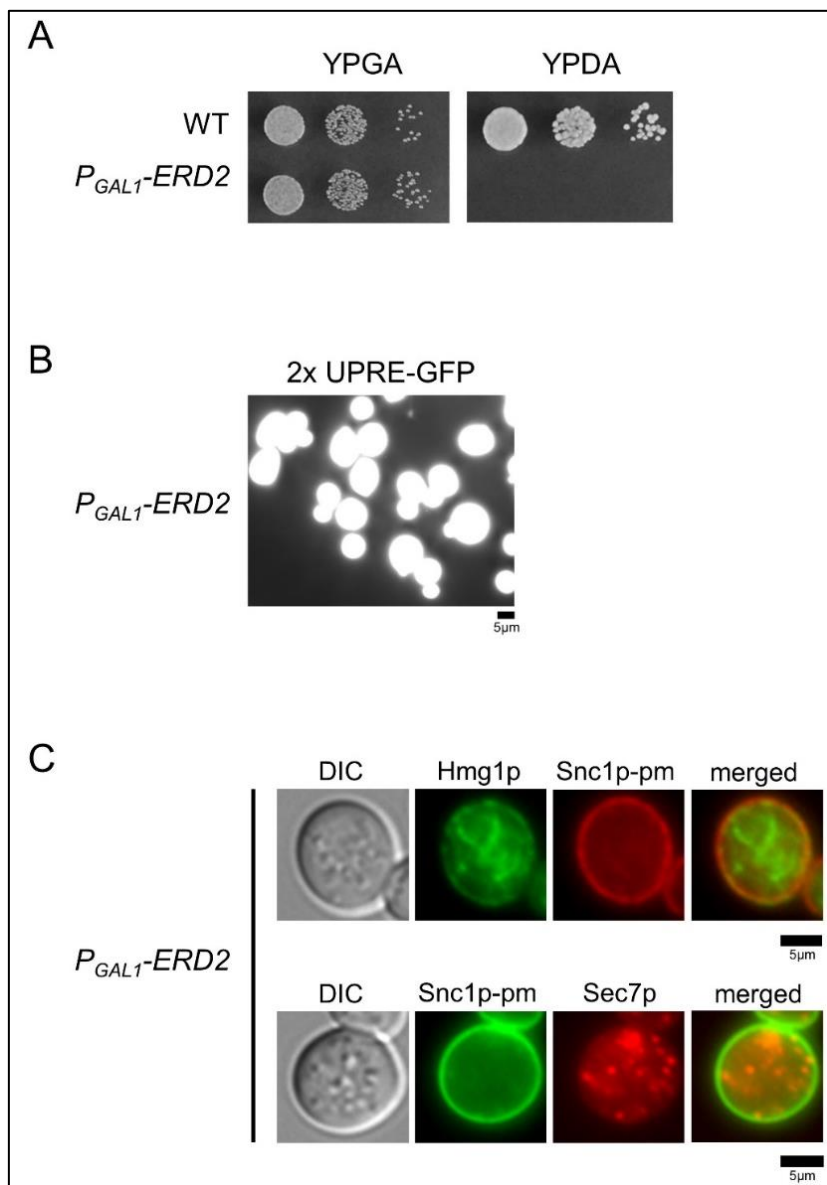


図 27. $ERD2$ 欠損株における UPR の誘導と小胞体の構造異常

A: 各株は図 6 のようにスポットし、30°C で 1.5 日間培養した。使用株は WT (YKT38), $P_{GAL1}\text{-ERD2}$ (YKT2222)。 $P_{GAL1}\text{-ERD2}$ 変異株では、YPDA 培地で生育障害が示された。

B: 図 9 のように培養し観察した。使用株は $P_{GAL1}\text{-ERD2}$ (YKT2222) で 2xUPRE-GFP を有している。 $P_{GAL1}\text{-ERD2}$ 変異株で 2xUPRE-GFP の蛍光が認められた。

C: 各株は図 9 のように培養した。使用株は $P_{GAL1}\text{-ERD2}$ に $HMG1\text{-GFP}$ と $mRFPI\text{-SNC1-pm}$ を導入した株 (YKT2223)、 $GFP\text{-SNC1-pm}$ と $SEC7\text{-mRFPI}$ を導入した株 (YKT2224)。 $P_{GAL1}\text{-ERD2}$ 変異株では Hmg1p-GFP の構造異常は認めるものの、Snc1-pm の細胞内蓄積は認めなかった。

Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株のこれら小胞体の構造的かつ機能的な異常は、Neo1-depleted 株同様に、*cis*-Golgi 体から小胞体に向けた逆行性の小胞輸送の異常が原因なのかもしれない (Hua et al., 2003)。

Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株において、マルチコピーサプレッサーが小胞体の構造異常まで抑圧するのかについても検討した。全ての単離されたサプレッサー遺伝子で、小胞体の構造異常は抑圧された (図 28)。

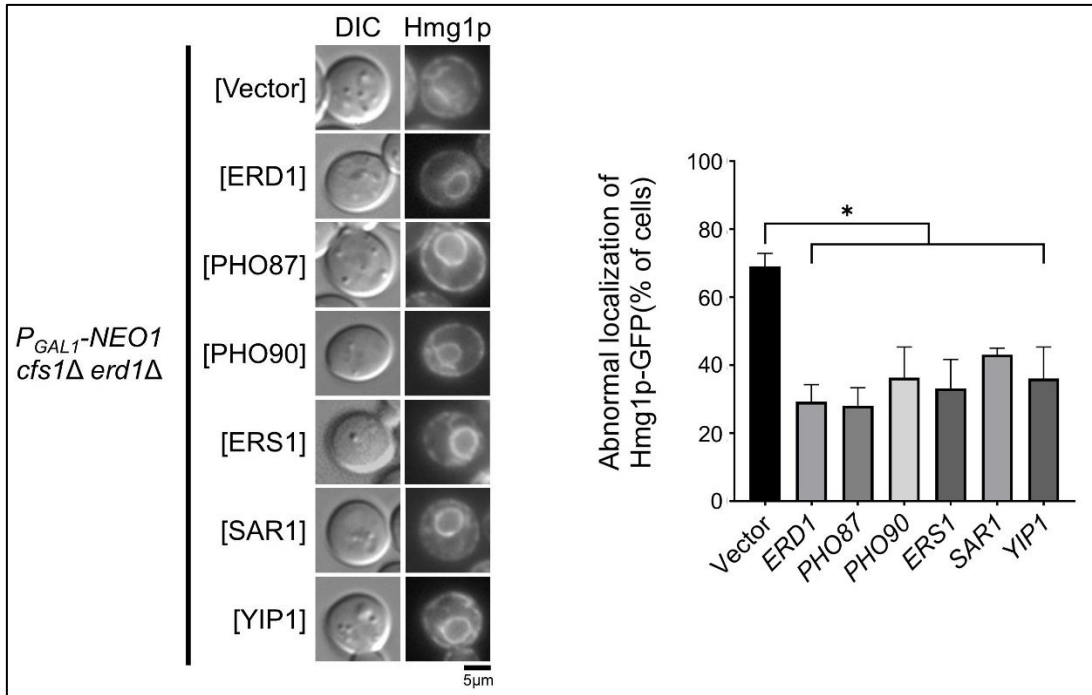


図 28. Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株のマルチコピーサプレッサーによる Hmg1p-GFP 異常の抑圧

各株を 30°C の YPDA 液体培地で 20 時間培養し観察した。使用株は *P_{GALI}-NEO1 cfs1Δ erd1Δ* (YKT2186) で、全株において *HMG1-GFP* と図 19 同様のマルチコピーサプレッサーを有している。右図は、核周囲への Hmg1p-GFP 局在が欠如している割合を図 9 同様に示した (* p < 0.01) Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株における Hmg1p-GFP の構造異常が、マルチコピーサプレッサーにより抑圧される事が示された。

SAR1, *YIP1* による抑圧機構は不明だが、Ers1 や Pho87、Pho90 というような膜タンパク質が小胞体から Golgi 体へ持続的に輸送される事で、抑圧をもたらしている可能性はある。あるいは、小胞体からの小胞輸送が増加し、Golgi 体からの小胞輸送が障害される事で Neo1-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株の Golgi 体の体積が増加している事も考えられる。この事が、Golgi 体内腔のリン酸濃度を下げ、結果的に Golgi 体からの小胞輸送障害が抑圧されるのかもしれない。

考察

neol Δ *cfs1* Δ 変異と合成致死となる *erd1* Δ 変異を元に本研究を行った。Neo1p-depleted *cfs1* Δ *erd1* Δ 変異株では、TGN からの順行性小胞輸送および *cis*-Golgi 体からの逆行性小胞輸送が障害され、Golgi 体機能に強い障害が生じている事が明らかとなった。本研究により Erd1 は Golgi 体膜のリン脂質非対称性に機能的に関連する新たな因子である事が示唆された。

Neo1 の Flippase 活性は未だ実証されていないが、*neol* 温度感受性株で細胞膜での PE の非対称性が失われることや (Takar et al., 2016)、Neo1 が Flippase として最もよく知られている Drs2 と機能的に関連することは遺伝学的に多く示されている (Saito et al., 2004; Takeda et al., 2014; Takar et al., 2019; Huang et al., 2020; Montigny et al., 2016)。したがって、Cfs1 も機能未知のタンパク質ではあるが、Scramblase または Floppase の正の制御因子として、Flippase に拮抗する機能を有する可能性が考えられる。あるいは、Cfs1 は Neo1 と Drs2 の機能を分離している可能性も考えられている。すなわち、Drs2 が *neol* Δ *cfs1* Δ 変異株において Neo1 と置き換わる可能性が指摘されている (Takar et al., 2019)。いずれにしても、*neol* Δ *cfs1* Δ 変異株の Golgi 体膜における脂質二重層の非対称性分布は正常に制御されていないと考えられる。

Flippase の小胞輸送における役割について、小胞形成に関わるとの観点から広く研究が行われている (Sebastian et al., 2012; Panatala et al., 2015)。DRS2/CDC50 複合体は Arf1 低分子 GTPase 及びそのレギュレーターと遺伝的かつ物理的に相互作用をする (Chen et al., 1999; Chantalat et al., 2004; Sakane et al., 2006)。また、*drs2* Δ 変異株は、TGN のクラスリン被覆小胞の形成異常を生じる (Chen et al., 1999; Gall et al., 2002; Liu et al., 2008)。細胞質側層へのリン脂質輸送活性に基づいて、小胞形成の過程における Flippase の機能として次の 2 つのモデルが提唱されている。1 つは局所のリン脂質の flip により膜の湾曲が形成され、この事が小胞形成を促進する。2 つ目は PS のようなリン脂質の輸送によりアダプターやコートタンパク質などを引き寄せる事で、小胞形成を促進するというものである (Panatala et al., 2015; Takeda et al., 2014; Graham et al., 2010)。しかしながら、どちらのモデルも分子レベルでの証明は行われていない。

Erd1 は Golgi 体から細胞質中へのリン酸輸送に必要とされている (Snyder et al., 2017)。Golgi 体内腔でリン酸はタンパク質糖鎖付加反応によって生じる。Golgi 体内腔でのリン酸の蓄積は、*erd1* Δ 変異株のタンパク質糖鎖付加障害や Kar2p/Bip タンパク質の *cis*-Golgi 体から小胞体へ戻る経路の障害などが原因であると考えられる。本研究により Golgi 体内腔のリン酸蓄積が、*neol* Δ *cfs1* Δ 変異株に *erd1* Δ が加わった事による合成致死性の原因である事が示唆された。リン脂質非対称性の異常と、リン酸ホメオスタシスの障害は、Golgi 体膜からの小胞形成過程に重篤な障害を来すと考えられる。Golgi 体膜におけるリン脂質二重層の分布は不明だが、非対称性分布は糖転

移酵素やイオン輸送体、カーゴ受容体などを含む膜タンパク質の機能と活性を調節している可能性がある。つまり、Flippase によって調整されるリン脂質の再分布と Golgi 体内腔のリン酸濃度は、協調して Golgi 体膜の機能を制御していると考えられる。このメカニズムは、Flippase が小胞形成過程に直接的に関与する（と考える）モデルとは異なっている。Golgi 体内腔のリン酸とリン脂質非対称性の機能的関連性は不明だが、リン酸の増加はイオン環境を変化させ、Golgi 体膜の内腔側でのタンパク質—脂質相互作用に影響を与える可能性がある。したがって、イオン環境と脂質の同時性の変化は Golgi 体からの小胞輸送に著しく大きな影響を与えると推察される。細胞膜タンパク質は、Neo1-depleted 株および Neo1p-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株では TGN から輸送されないが、これは TGN における PI4P の欠如に起因する可能性がある。興味深いことに、PI4 キナーゼである Pik1 は通常どおり Pik1 の結合パートナーである Sec7 と共存していた (Gloor et al., 2010)。つまり、Pik1 は活性化されていないか、またはその基質である PI が Golgi 体膜の細胞質側層に十分に存在しないのかもしれない。PI はスフィンゴ脂質複合体、イノシトールホスホセラミド(IPC)、およびマンノシル—イノシトールホスホセラミド(MIP₂C)、など Golgi 体の内腔側で合成される経路の、イノシトールリン酸のドナーとしても使用される (Levine et al., 2000)。したがって、PI の脂質二重層間における分布の制御は、Golgi 体機能にとって重要な要素である。しかし、蛍光ラベルされた PI はまだ利用できないため、Flippase アッセイでは検討されていないのが現状である。PI は Neo1-depleted 株および Neo1p-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株では、主に Golgi 体内腔側層に分布している可能性がある。今後、Neo1 が PI を flip するか否かは非常に興味深い研究対象と考えられる。当研究室の先行研究で、イノシトールの枯渇が Cdc50p-depleted *lem3Δ crf1Δ* 変異株や *NEO1* 欠損株の生育障害を抑圧するが、Cdc50 と Neo1 の同時欠損株は抑圧しないとの知見が得られている (Yamagami et al., 2015)。この抑圧のパターンが *cfs1Δ* 変異と同じであることも興味深い点である (Yamamoto et al., 2017)。イノシトールの枯渇による抑圧メカニズムも不明であるが、PI の代謝または二重層の分布に関与している可能性があり、Cfs1 もまたこのプロセスに関与している可能性がある。

Neo1 のオルソログである ATP9A が肝臓癌細胞のエキソソームと関わり、エキソソームは癌細胞の微小環境の決定や増殖と生存に影響するため、Cfs1 などを通じて Neo1 の解析が進む事がひいては肝臓癌などの癌細胞の解明にも関わる可能性が考えられる (Naito et al., 2017)。一方、乳がん、卵巣がんや転移性膀胱癌に対しても、BRCA 遺伝子変異陽性患者に対する遺伝的相互作用、合成致死性を利用した PARP 遺伝子阻害薬が一定の効果を示している (Litton et al., 2020; Ledermann et al., 2016; Golan et al., 2019)。本研究のような出芽酵母を用いた研究を背景に、哺乳類細胞のゲノム解

析が急速に進んでいる現代において、オルソログなどからその遺伝子の解明を進めることで臨床医学における有用性を示す研究へと発展する可能性も考えられる。

総括および結論

① 本研究により、以下のような新知見が得られた。

1. *neo1Δ cfs1Δ* 変異と合成致死となる *erd1Δ* 変異が加わると、Golgi 体からの小胞輸送に障害が生じている事が明らかとなった。
2. Erd1 は Golgi 体膜のリン脂質非対称性に機能的に関連する因子である事が示唆され、その機序として Golgi 体内腔のリン酸濃度の変化が Golgi 体膜のリン脂質非対称性に関連している可能性が示唆された。
3. Neo1p-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株では Golgi 体における PI4P が欠如しており、その事が小胞輸送障害を引き起こしている可能性が示唆された。

② 新知見の意義

従来、細胞の Organelle の機能（小胞輸送など）には、細胞質中のタンパク質、イオン環境や、Organelle 膜における脂質二重層の細胞質側層のリン脂質などが関連していると考えられていた。本研究を通して得られた知見は、Golgi 体内腔、つまり Organelle 内腔側のイオン環境や Organelle 内腔側のリン脂質の分布が Organelle の機能に関連している可能性を示した事である。この事は、真核生物における細胞内の小胞輸送などを解析する上で、新たな視点となり得ると考えられる。

③ 本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開され得るか

Neo1p-depleted *cfs1Δ erd1Δ* 変異株の Golgi 体における小胞輸送障害の原因として、PI4P の基質である phosphatidylinositol (PI) が Golgi 体内腔側に留められている可能性があり、今後、イオン環境変化との関連性や、同株などで PI の flip との関連性を解析する研究への展開が考えられる。また、そのような研究を通じて未解明な部分が多い Cfs1 および Flippase の一種と考えられる Neo1 の両タンパク質の機能について解明が進められると考えられる。

④ 今後の課題

今後の課題としては、本研究で行った遺伝的相互作用を通じた Neo1 や Cfs1、Erd1 の機能解析を踏まえ、最終的にはこれらのタンパク質を精製して生化学的に機能解析を進めていく必要がある。また、様々な疾患の機序や細胞内の薬物動態の解析に繋げていくためには、オルソログ等を通じて mammal の細胞においても同様の知見が得られるかを明らかにしていく事も重要である。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究を行わせていただき非常に丁寧にご指導いただいた北海道大学遺伝子病制御研究所分子間情報分野 田中 一馬 教授、および本研究の機会を与えていただきました北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室II 平野 聡 教授に深く感謝致します。本研究を遂行するにあたり様々な方々のご指導、ご協力を賜りました。研究全般、実験の遂行および論文の作成にあたって、多大な労を賜った三岡哲生助教、岸本拓磨助教に深く感謝致します。また、様々なご協力をいただいた分子間情報分野の皆様、そして北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室IIの皆様に心から感謝致します。また、実験の技術的な補佐や事務手続きなど、日頃の研究生生活の全面的なサポートをしていただいた伊藤絵里子研究推進委員、森田沙織事務補助員に心から御礼を申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はありません。

引用文献

Aalto, M. K., Ronne, H., and Keränen, S. (1993). Yeast syntaxins Sso1p and Sso2p belong to a family of related membrane proteins that function in vesicular transport. *EMBO J.* *12*, 4095-4104.

Auesukaree, C., Homma, T., Kaneko, Y., and Harashima, S. (2003). Transcriptional regulation of phosphate-responsive genes in low-affinity phosphate-transporter-defective mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *306*, 843-850.

Balasubramanian, K., and Schroit, A. J. (2003). Aminophospholipid asymmetry: A matter of life and death. *Annu. Rev. Physiol.* *65*, 701-734.

Basson, M. E., Thorsness, M., and Rine, J. (1986). *Saccharomyces cerevisiae* contains two functional genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *83*, 5563-5567.

Bi, E., and Pringle, J. R. (1996). ZDS1 and ZDS2, genes whose products may regulate Cdc42p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 5264-5275.

Bisson, L. F., and Thorner, J. (1982). Mutations in the *pho80* gene confer permeability to 5'-mononucleotides in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* *102*, 341-359.

Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G., and Fink, G. R. (1987). 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods. Enzymol.* *154*, 164-175.

Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J. D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast.* *14*, 115-132.

Bryant, H. E., Schultz, N., Thomas, H. D., Parker, K. M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N. J., and Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature.* *434*, 913-917.

Bun-Ya, M., Nishimura, M., Harashima, S., and Oshima, Y. (1991). The PHO84 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 3229-3238.

Burr, M. L., Sparbier, C. E., Chan, Y. C., Williamson, J. C., Woods, K., Beavis, P. A., Lam, E. Y. N., Henderson, M. A., Bell, C. C., Stolzenburg, S., et al. (2017). CMTM6 maintains the expression of PD-L1 and regulates anti-tumour immunity. *Nature*. *549*, 101-105.

Burke, D., Dawson, D. and Stearns, T., (2000). *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual* (2000 Edition). (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Chantalat, S., Park, S. K., Hua, Z., Liu, K., Gobin, R., Peyroche, A., Rambourg, A., Graham, T. R., and Jackson, C. L. (2004). The Arf activator Gea2p and the P-type ATPase Drs2p interact at the Golgi in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Sci.* *117*, 711-722.

Chen, C. Y., Ingram, M. F., Rosal, P. H., and Graham, T. R. (1999). Role for Drs2p, a P-type ATPase and potential aminophospholipid translocase, in yeast late Golgi function. *J. Cell. Biol.* *147*, 1223-1236.

Coleman, J. A., Quazi, F., and Molday, R. S. (2013). Mammalian P4-ATPases and ABC transporters and their role in phospholipid transport. *Biochim. Biophys. Acta*. *1831*, 555-574.

Das, A., Slaughter, B. D., Unruh, J. R., Bradford, W. D., Alexander, R., Rubinstein, B., and Li, R. (2012). Flippase-mediated phospholipid asymmetry promotes fast Cdc42 recycling in dynamic maintenance of cell polarity. *Nat. Cell. Biol.* *14*, 304-310.

De Craene, J. O., Coleman, J., Estrada de Martin, P., Pypaert, M., Anderson, S., Yates, J. R., Ferro-Novick, S., Novick, P. (2006). Rtn1p is involved in structuring the cortical endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell*. *17*, 3009-3020.

De Matteis, M. A., Wilson, C., and D'Angelo, G. (2013). Phosphatidylinositol-4-phosphate: the Golgi and beyond. *Bioessays*. *35*, 612-622.

Egner, R., Mahé, Y., Pandjaitan, R., and Kuchler, K. (1995). Endocytosis and vacuolar degradation of the plasma membrane-localized Pdr5 ATP-binding cassette multidrug transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 5879-5887.

Erdeniz, N., Mortensen, U. H., and Rothstein, R. (1997). Cloning-free PCR-based allele replacement methods. *Genome. Res.* *7*, 1174-1183.

Farmer, H., McCabe, N., Lord, C. J., Tutt, A. N., Johnson, D. A., Richardson, T. B., Santarosa, M., Dillon, K. J., Hickson, I., Knights, C., et al. (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature.* *434*, 917-921.

Fischhoff, D. A., Waterston, R. H., and Olson, M. V. (1984). The yeast cloning vector YEp13 contains a tRNA^{Leu3} gene that can mutate to an amber suppressor. *Gene.* *27*, 239-251.

Franzusoff, A., Redding, K., Crosby, J., Fuller, R. S., and Schekman, R. (1991). Localization of components involved in protein transport and processing through the yeast Golgi apparatus. *J. Cell. Biol.* *112*, 27-37.

Furuta, N., Fujimura-Kamada, K., Saito, K., Yamamoto, T., and Tanaka, K. (2007). Endocytic recycling in yeast is regulated by putative phospholipid translocases and the Ypt31p/32p-Rcy1p pathway. *Mol. Biol. Cell.* *18*, 295-312.

Gall, W. E., Geething, N. C., Hua, Z., Ingram, M. F., Liu, K., Chen, S. I., and Graham, T. R. (2002). Drs2p-dependent formation of exocytic clathrin-coated vesicles in vivo. *Curr. Biol.* *12*, 1623-1627.

Gao, X. D., Wang, J., Keppler-Ross, S., and Dean, N. (2005). ERS1 encodes a functional homologue of the human lysosomal cystine transporter. *FEBS J.* *272*, 2497-2511.

Gietz, R. D., and Sugino, A. (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene.* *74*, 527-534.

Gloor, Y., Schöne, M., Habermann, B., Ercan, E., Beck, M., Weselek, G., Müller-Reichert, T., and Walch-Solimena, C. (2010). Interaction between Sec7p and Pik1p: the first clue for the regulation of a coincidence detection signal. *Eur. J. Cell. Biol.* *89*, 575-583.

Golan, T., Hammel, P., Reni, M., Van, C. E., Macarulla, T., Hall, M. J., Park, J. O., Hochhauser, D., Arnold, D., and Oh, D. Y., et al. (2019). Maintenance olaparib for germline BRCA-mutated metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med.* *381*, 317–327.

Graham, T. R., and Kozlov, M. M. (2010). Interplay of proteins and lipids in generating membrane curvature. *Curr. Opin. Cell. Biol.* *22*, 430–436.

Guthrie, C., and Fink, G.R.eds. (1991). *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. Methods. Enzymol.* *194*, pp.1-863.

Hardwick, K. G., Lewis, M. J., Semenza, J., Dean, N., and Pelham, H. R. (1990). ERD1, a yeast gene required for the retention of luminal endoplasmic reticulum proteins, affects glycoprotein processing in the Golgi apparatus. *EMBO J.* *9*, 623–630.

Hardwick, K. G., and Pelham, H. R. (1990). ERS1 a seven transmembrane domain protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic. Acids. Res.* *18*, 2177.

Haucke, V. (2003). Vesicle budding: a coat for the COPs. *Trends. Cell. Biol.* *13*, 59–60.

Heidtmann, M., Chen, C. Z., Collins, R. N., and Barlowe, C. (2003). A role for Yip1p in COPII vesicle biogenesis. *J. Cell. Biol.* *163*, 57–69.

Hermesh, O., Genz, C., Yofe, I., Sinzel, M., Rapaport, D., Schuldiner, M., and Jansen, R. P. (2014). Yeast phospholipid biosynthesis is linked to mRNA localization. *J. Cell. Sci.* *127*, 3373–3381.

Hua, Z., Fatheddin, P., and Graham, T. R. (2002). An essential subfamily of Drs2p-related P-type ATPases is required for protein trafficking between Golgi complex and endosomal/vacuolar system. *Mol. Biol. Cell.* *13*, 3162–3177.

Hua, Z., and Graham, T. R. (2003). Requirement for neo1p in retrograde transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell.* *14*, 4971–4983.

- Huang, Y., Takar, M., Best, J. T., and Graham, T. R. (2020). Conserved mechanism of phospholipid substrate recognition by the P4-ATPase Neo1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell. Biol. Lipids.* *1865*, 158581.
- Huh, W. K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S., and O'Shea, E. K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature.* *425*, 686-691.
- Hürlimann, H. C., Pinson, B., Stadler-Waibel, M., Zeeman, S. C., and Freimoser, F. M. (2009). The SPX domain of the yeast low-affinity phosphate transporter Pho90 regulates transport activity. *EMBO Rep.* *10*, 1003-1008.
- Jonikas, M. C., Collins, S. R., Denic, V., Oh, E., Quan, E. M., Schmid, V., Weibezahn, J., Schwappach, B., Walter, P., Weissman, J. S., et al. (2009). Comprehensive characterization of genes required for protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science*, *323*, 1693-1697.
- Jungmann, J., and Munro, S. (1998). Multi-protein complexes in the cis Golgi of *Saccharomyces cerevisiae* with alpha-1,6-mannosyltransferase activity. *EMBO J.* *17*, 423-434.
- Kato, U., Inadome, H., Yamamoto, M., Emoto, K., Kobayashi, T., and Umeda, M. (2013). Role for phospholipid flippase complex of ATP8A1 and CDC50A proteins in cell migration. *J. Biol. Chem.* *288*, 4922-4934.
- Kishimoto, T., Yamamoto, T., and Tanaka, K. (2005). Defects in structural integrity of ergosterol and the Cdc50p-Drs2p putative phospholipid translocase cause accumulation of endocytic membranes, onto which actin patches are assembled in yeast. *Mol. Biol. Cell.* *16*, 5592-5609.
- Koning, A. J., Roberts, C. J., and Wright, R. L. (1996). Different subcellular localization of *Saccharomyces cerevisiae* HMG-CoA reductase isozymes at elevated levels corresponds to distinct endoplasmic reticulum membrane proliferations. *Mol. Biol. Cell.* *7*, 769-789.

Ledermann, J. A., Harter, P., Gourley, C., Friedlander, M., Vergote, I., Rustin, G., Scott, C., Meier, W., Shapira-Frommer, R., and Safra, T., et al. (2016). Overall survival in patients with platinum-sensitive recurrent serous ovarian cancer receiving olaparib maintenance monotherapy: an updated analysis from a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* *11*, 1579-1589.

Levine, T. P., Wiggins, C. A., and Munro, S. (2000). Inositol phosphorylceramide synthase is located in the Golgi apparatus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* *11*, 2267-2281.

Levintis, P. A., Grinstein, S. (2010). The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu Rev Biophys.* *39*, 407-427.

Lewis, M. J., Nichols, B. J., Prescianotto-Baschong, C., Riezman, H., and Pelham, H. R. (2000). Specific retrieval of the exocytic SNARE Snc1p from early yeast endosomes. *Mol. Biol. Cell.* *11*, 23-38.

Litton, J. K., Scoggins, M. E., Hess, K. R., Adrada, B. E., Murthy, R. K., Damodaran, S., DeSnyder, S. M., Brewster, A. M., Barcenas, C. H., Valero, V., et al. (2020). Neoadjuvant Talazoparib for patients with operable breast cancer with a germline BRCA pathogenic variant. *J. Clin. Oncol.* *38*, 388-394.

Liu, K., Surendhran, K., Nothwehr, S. F., and Graham, T. R. (2008). P4-ATPase requirement for AP-1/clathrin function in protein transport from the trans-Golgi network and early endosomes. *Mol. Biol. Cell.* *19*, 3526-3535.

Longtine, M. S., McKenzie, A., Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* *14*, 953-961.

Martinez, P., and Persson, B. L. (1998). Identification, cloning and characterization of a derepressible Na⁺-coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* *258*, 628-638.

Merksamer, P. I., Trusina, A., and Papa, F. R. (2008). Real-time redox measurements during endoplasmic reticulum stress reveal interlinked protein folding functions. *Cell.* *135*, 933-947.

- Mioka, T., Fujimura-Kamada, K., and Tanaka, K. (2014). Asymmetric distribution of phosphatidylserine is generated in the absence of phospholipid flippases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiologyopen*. 3, 803-821.
- Misaki, R., Morimatsu, M., Uemura, T., Waguri, S., Miyoshi, E., Taniguchi, N., Matsuda, M., and Taguchi, T. (2010). Palmitoylated Ras proteins traffic through recycling endosomes to the plasma membrane during exocytosis. *J. Cell. Biol.* 191, 23-29.
- Misu, K., Fujimura-Kamada, K., Ueda, T., Nakano, A., Katoh, H., and Tanaka, K. (2003). Cdc50p, a conserved endosomal membrane protein, controls polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 14, 730-47.
- Montigny, C., Lyons, J., Champeil, P., Nissen, P., and Lenoir, G. (2016). On the molecular mechanism of flippase- and scramblase-mediated phospholipid transport. *Biochim. Biophys. Acta.* 1861, 767-783.
- Mori, K. (2009). Signalling pathways in the unfolded protein response: development from yeast to mammals. *J. Biochem.* 146, 743-750.
- Muthusamy, B. P., Natarajan, P., Zhou, X., and Graham, T. R. (2009). Linking phospholipid flippases to vesicle-mediated protein transport. *Biochim. Biophys. Acta.* 1791, 612-619.
- Naik, J., Hau, C. M., Ten Bloemendaal, L., Mok, K. S., Hajji, N., Wehman, A. M., Meisner, S., MuncanV, Paauw, N. J., de Vries, H. E., et al. (2019). The P4-ATPase ATP9A is a novel determinant of exosome release. *PLoS One.* 14, e0213069.
- Naito, Y., Yoshioka, Y., Yamamoto, Y., and Ochiya T. (2017). How cancer cells dictate their microenvironment: present roles of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci.* 74, 697–713.
- Nehrbass, U., Rout, M. P., Maguire, S., Blobel, G., and Wozniak, R. W. (1996). The yeast nucleoporin Nup188p interacts genetically and physically with the core structures of the nuclear pore complex. *J. Cell. Biol.* 133, 1153-1162.
- Op den Kamp, J. A. (1979). Lipid asymmetry in membranes. *Annu. Rev. Biochem.* 48, 47-71.

Panatala, R., Hennrich, H., and Holthuis, J. C. (2015). Inner workings and biological impact of phospholipid flippases. *J. Cell. Sci.* *128*, 2021-2032.

Pelham, H. R., Hardwick, K. G., and Lewis, M. J. (1988). Sorting of soluble ER proteins in yeast. *EMBO J.* *7*, 1757-1762.

Pollard, M. G., Travers, K. J., and Weissman, J. S. (1998). Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell.* *1*, 171-182.

Reggiori, F., Black, M. W., and Pelham, H. R. (2000). Polar transmembrane domains target proteins to the interior of the yeast vacuole. *Mol. Biol. Cell.* *11*, 3737-3749.

Rose, M. (1990). Methods in yeast genetics: a laboratory course manual. In F. Winston & P. Hieter (Eds.). (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Roy, A., and Levine, T. P. (2004). Multiple pools of phosphatidylinositol 4-phosphate detected using the pleckstrin homology domain of Osh2p. *J. Biol. Chem.* *279*, 44683-44689.

Saito, K., Fujimura-Kamada, K., Furuta, N., Kato, U., Umeda, M., and Tanaka, K. (2004). Cdc50p, a protein required for polarized growth, associates with the Drs2p P-type ATPase implicated in phospholipid translocation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* *15*, 3418-3432.

Saito, K., Fujimura-Kamada, K., Hanamatsu, H., Kato, U., Umeda, M., Kozminski, K. G., and Tanaka, K. (2007). Transbilayer phospholipid flipping regulates Cdc42p signaling during polarized cell growth via Rga GTPase-activating proteins. *Dev. Cell.* *13*, 743-751.

Sakane, H., Yamamoto, T., and Tanaka, K. (2006). The functional relationship between the Cdc50p-Drs2p putative aminophospholipid translocase and the Arf GAP Gcs1p in vesicle formation in the retrieval pathway from yeast early endosomes to the TGN. *Cell. Struct. Funct.* *31*, 87-108.

Sambrook, J. (2001). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Ed.3. In W. D, Russell (Ed.). (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sato, K., Sato, M., and Nakano, A. (2001). Rer1p, a retrieval receptor for endoplasmic reticulum membrane proteins, is dynamically localized to the Golgi apparatus by coatamer. *J. Cell. Biol.* 152, 935-944.

Sebastian, T. T., Baldridge, R. D., Xu, P., and Graham, T. R. (2012). Phospholipid flippases: building asymmetric membranes and transport vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* 1821, 1068-1077.

Seigneuret, M., and Devaux, P. F. (1984). ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 81, 3751-3755.

Semenza, J. C., Hardwick, K. G., Dean, N., and Pelham, H. R. (1990). ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell.* 61, 1349-1357.

Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E., and Tsien, R. Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 22, 1567-1572.

Sharma, B., and Kanwar, S. S. (2018). Phosphatidylserine: A cancer cell targeting biomarker. *Semin. Cancer. Biol.* 52, 17-25.

Snyder, N. A., Stefan, C. P., Soroudi, C. T., Kim, A., Evangelista, C., and Cunningham, K. W. (2017). H⁺ and Pi Byproducts of Glycosylation Affect Ca²⁺ Homeostasis and Are Retrieved from the Golgi Complex by Homologs of TMEM165 and XPR1. *G3 (Bethesda).* 7, 3913-3924.

Suda, Y., Kurokawa, K., and Nakano, A. (2017). Regulation of ER-Golgi Transport Dynamics by GTPases in Budding Yeast. *Front. Cell. Dev. Biol.* 5, 122.

Takar, M., Huang, Y., and Graham, T. R. (2019). The PQ-loop protein Any1 segregates Drs2 and Neo1 functions required for viability and plasma membrane phospholipid asymmetry. *J. Lipid. Res.* 60, 1032-1042.

Takar, M., Wu, Y., and Graham, T. R. (2016). The Essential Neo1 Protein from Budding Yeast Plays a Role in Establishing Aminophospholipid Asymmetry of the Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* *291*, 15727-15739.

Takeda, M., Yamagami, K., and Tanaka, K. (2014). Role of phosphatidylserine in phospholipid flippase-mediated vesicle transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell.* *13*, 363-375.

Tanaka, K., Fujimura-Kamada, K., and Yamamoto, T. (2011). Functions of phospholipid flippases. *J. Biochem.* *149*, 131-143.

Uchida, Y., Hasegawa, J., Chinnapen, D., Inoue, T., Okazaki, S., Kato, R., Wakatsuki, S., Misaki, R., Koike, M., Uchiyama, Y., et al. (2011). Intracellular phosphatidylserine is essential for retrograde membrane traffic through endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *108*, 15846-15851.

van Leeuwen, J., Pons, C., Mellor, J. C., Yamaguchi, T. N., Friesen, H., Koschwanez, J., Ušaj, M. M., Pechlaner, M., Takar, M., Ušaj, M., et al. (2016). Exploring genetic suppression interactions on a global scale. *Science.* *354*.

Walter, P., and Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science.* *334*, 1081-1086.

Wicky, S., Schwarz, H., and Singer-Krüger, B. (2004). Molecular interactions of yeast Neo1p, an essential member of the Drs2 family of aminophospholipid translocases, and its role in membrane trafficking within the endomembrane system. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 7402-7418.

Wykoff, D. D., Rizvi, A. H., Raser, J. M., Margolin, B., and O'Shea, E. K. (2007). Positive feedback regulates switching of phosphate transporters in *S. cerevisiae*. *Mol. Cell.* *27*, 1005-1013.

Yamagami, K., Yamamoto, T., Sakai, S., Mioka, T., Sano, T., Igarashi, Y., and Tanaka, K. (2015). Inositol depletion restores vesicle transport in yeast phospholipid flippase mutants. *PLoS One.* *10*, e0120108.

Yamamoto, T., Fujimura-Kamada, K., Shioji, E., Suzuki, R., and Tanaka, K. (2017). Cfs1p, a Novel Membrane Protein in the PQ-Loop Family, Is Involved in Phospholipid Flippase Functions in Yeast. *G3 (Bethesda)*. 7, 179-192.

Yeung, T., Gilbert, G. E., Shi, J., Silviu, J., Kapus, A., and Grinstein, S. (2008). Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science*. 319, 210-213.

Zwaal, R. F., and Schroit, A. J. (1997). Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood*. 89, 1121-1132.