

酵母*Saccharomyces cerevisiae*の遅延性ホモタリズム現象と新規な異種遺伝子発現系に関する研究

浴野, 圭輔
九州大学農学研究科農芸化学専攻

<https://doi.org/10.11501/3145633>

出版情報：九州大学, 1998, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：



酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の遅延性ホモタリズム現象と新規な異種遺伝子発現系に関する研究

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の
遅延性ホモタリズム現象と
新規な異種遺伝子発現系に関する研究

法野圭雄

1994

①

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の遅延性ホモリズム現象と
新規な異種遺伝子発現系に関する研究

浴 野 圭 輔

1998年

目次

緒章	1
第1章 遅延性ホモタリズム、ヘテロタリズム現象に起因する欠陥領域の特定	
1-1 緒言	11
1-2 実験方法	12
1-3 実験結果	17
1-3-1 <i>HO</i> 遺伝子導入株の表現型	17
1-3-2 <i>wy2HO</i> 及び <i>ho</i> 遺伝子の塩基配列の決定	18
1-3-3 ΔHO 遺伝子導入の確認	19
1-3-4 ΔHO 遺伝子導入による変異アミノ酸相補の確認	19
1-3-5 ΔHO 遺伝子導入による発現制御領域の解析	20
1-4 考察	21
1-5 小括	23
第2章 生活環を規定する <i>wy2HO</i> 及び <i>ho</i> 内のアミノ酸の特定	
2-1 緒言	32
2-2 実験方法	32
2-3 実験結果	35
2-3-1 <i>wy2HO</i> 及び <i>ho</i> 遺伝子導入形質転換体の表現型	35
2-3-2 各種 <i>HO</i> 遺伝子導入形質転換体の表現型	35
2-4 考察	36
2-5 小括	38

第3章 遅延性ホモリズム酵母 wy2 mater 株における

ナンセンスサプレッションの解析

3-1	緒言	43
3-2	実験方法	44
3-3	実験結果	46
3-3-1	変異型 GAI 分泌の確認	46
3-3-2	ナンセンスサプレッションで挿入されるアミノ酸	47
3-4	考察	47
3-5	小括	49

第4章 高次倍数性酵母の遺伝子工学への利用

4-1	緒言	55
4-2	実験方法	56
4-3	実験結果	60
4-3-1	高次倍数体の造成	60
4-3-2	SEG2、D-2、T-16 の YEUp3II α -GAI 導入株	60
4-3-3	SEG2、D-2、T-16 の pSAK068-GAI 導入株	61
4-3-4	pSAK068-GAI 導入形質転換体の染色体の解析	62
4-3-5	pSAK068-GAI 導入形質転換体からの高次倍数体の造成	62
4-3-6	二本の染色体上に GAI 遺伝子を導入した一倍体細胞の取得	63
4-3-7	交雑による一倍体細胞中での遺伝子増幅	64
4-3-8	GHM-4625 からの高次倍数体の造成	65
4-3-9	GHT-127 からの高次倍数体の造成	66
4-4	考察	66
4-5	小括	68

第5章 キラー酵母の線状プラスミドを利用した細胞質での遺伝子発現と キラー形質を利用したプラスミドの安定化	
5-1 緒言	76
5-2 実験方法	78
5-3 実験結果	84
5-3-1 <i>S. cerevisiae</i> F102-2 の形質転換	84
5-3-2 生体内組換え線状プラスミドの検出	84
5-3-3 形質転換体の pGKL1 のキュアリング	85
5-3-4 pGKL1 のキュアリング株の解析	86
5-3-5 pGKL1-ORF4 及び pGKL1-ORF3 導入形質転換体	87
5-3-6 プラスミド YEp51-R3 の安定性の検討	87
5-4 考察	88
5-5 小括	90
終章	105
謝辞	113
参考文献	114

緒 章

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の研究は、異種遺伝子発現のホストとして酵母を扱う生化学的研究と、細胞構造の形態学的研究や、生理学的研究を通して生物として酵母を調べる生物学的研究の大きく二つに分けることができる。現在、酵母は基礎及び応用の両面において広く研究材料として用いられており、1996年4月にはそのゲノムの全塩基配列が決定され、公開されている。このように酵母を材料とする研究が発展してきた理由の一つは遺伝学が駆使できたことによる。ある性質が次の世代へどのように伝わるかという遺伝学研究においては、研究対象とする生物に性のシステムが存在することが必要である。

酵母において現在のように a 及び α と定義している性は 1943 年に発見された。a 及び α という接合型の存在により、酵母の生活環は現在のところヘテロタリズムとホモタリズムという二つに大別されている。ヘテロタリックな生活環では、a 及び α の接合型をもつ株は単独で培養すればそれぞれの接合型を維持したまま一倍体細胞として安定に栄養増殖する。a、 α の異なる接合型の株を混合培養して初めて接合を起こし、接合子形成を経て二倍体融合細胞が形成される。二倍体細胞は栄養飢餓条件下において通常四つの胞子を形成する。それらの胞子は a 及び α の接合型が 2 : 2 に分離し、それぞれヘテロタリックな生活環を示す。これに対し、ホモタリックな生活環は、胞子発芽後二、三代のうち一倍体の母細胞が a 型は α 型に、 α 型は a 型に性転換を起こし、その娘細胞との接合により二倍体細胞を生じる。この自己二倍体化細胞は安定に二倍体細胞として増殖していく。a 及び α という接合型は第三染色体上の MAT 遺伝子座 (mating type) に a の情報が存在するか α の情報が存在するかにより決定される (Fig. 0-1)。MAT 遺伝子座と同様に接合型の情報をコードしている遺伝子座である HML、HMR (通常、HML 座には α 、HMR 座には a の情報が存在する) が同一染色体上に存在しているが、SIR (silent information regulator) 等の遺伝子産物の作用によりその発現は抑制されている^(1,4)。一方、第四染色体上には MAT 遺伝子座の二重

鎖 DNA を特異的に切断する endonuclease をコードする *H0* 遺伝子 (homothallic switching) が存在する。ホモタリック株においてはこの *H0* endonuclease により *MAT* 遺伝子座が切断された後、非発現遺伝子座の *HML* あるいは *HMR* 座から発現座の *MAT* 座に接合型の情報が転移し、接合型の変換が起こる⁽⁵⁾。ヘテロタリック株では *H0* が不活性型 (*ho*) となっているものと考察されている。結局のところヘテロタリック株とホモタリック株の違いは *H0* 遺伝子をもっているかどうか、そして、それによって接合型の変換が起こるかどうかの違いであると理解されるようになった。これらの事実は遺伝子が動くという当時としては全く新しい生物学の概念を生み出す端緒となり、遺伝子の相同組換えにおける二重鎖切断修復のモデルの一つとして、組換え、修復だけでなく、転写制御や細胞周期の問題など、現在の分子生物学上の主要な課題を含む興味深い現象であると認識されるに至った。その後、接合型の変換には三つの特徴があることが明らかとなった。① *a* あるいは α の接合能をもつ細胞では接合型の変換が起こるが、接合能をもたない細胞 (*a/\alpha*) では起こらない (cell-type control)⁽⁶⁾。② 接合型の変換は細胞周期の特定の時期に起こる (cell cycle control)⁽⁷⁾。③ 接合型変換は母細胞では起こるが娘細胞では起こらない (mother daughter control)⁽⁸⁾。これらの三つの条件がすべて満足されたときにのみ接合型の変換が起こる。接合型変換の開始において主要な役割を果たすのは *H0* 遺伝子であり、結局、変換の制御は *H0* 遺伝子の発現制御の問題であると考察された。上述の接合型変換の三つの制御様式に対応する *H0* 遺伝子の発現制御には *SWI* (switching) 遺伝子群 *SWI1*~*6* に代表される *Trans-acting* に働く多くの遺伝子群^(8,10) が関与している。また、*H0* 遺伝子の 5' 上流には 2 つの調節領域 *URS1*、*URS2* (upstream regulatory sequence) が存在する⁽⁶⁾ (Fig. 0-1)。これら調節遺伝子による *H0* 遺伝子の発現のメカニズムについては細かく研究されている。*URS1* を欠失させると *H0* の発現が起こらないことから *URS1* はいわゆる *UAS* (upstream activating sequence) として機能している。*a/\alpha* 細胞においては *MATa*、*MAT α* 遺伝子それぞれがコードする調節タンパク質のうち、*Mat α 1p* と *Mat α 2p* が強調して二倍体細胞では発現しない一倍体特異的遺伝子群 (haploid

specific genes : *hsg*) の発現を転写レベルで抑制している ($a1-\alpha2$ 抑制)^(12, 14)。これら一倍体特異的遺伝子群の 5' 上流には共通配列 ($a1-\alpha2$ オペレーター) が存在し、 $Mat\alpha1p$ - $Mat\alpha2p$ 複合体が結合することで転写が抑制されている。*HO* 遺伝子上流にも $URS1$ 、 $URS2$ にわたって少なくとも 9 個の $a1-\alpha2$ オペレーター が存在することが cell-type control に寄与していると考察されている。 $URS2$ が欠失すると細胞周期のいずれの時期においても *HO* の発現が見られる。この領域には $Swi4p$ / $Swi6p$ -dependent cell cycle box (SCB) とよばれる配列が存在し、この配列に $Swi6p$ と G_1 期に特異的に転写される $Swi4p$ が強調して結合することにより cell cycle control が支配されている。また、mother daughter control においては、母細胞においてのみ $Swi5p$ が $URS1$ に結合することにより *HO* 遺伝子の発現が支配されていると考察されていた。しかしながら、 $Swi5p$ は母細胞及び、娘細胞に共に存在することから、母細胞のみにおける接合型変換のメカニズムについては明らかとなっていなかった。1996 年に入り $Swi5p$ リプレッサーとして機能する $Ash1p$ が発見され、 $She1p$ ~ $She5p$ の作用によりこの $Ash1p$ が娘細胞のみに蓄積することが示され、娘細胞では *HO* の発現が抑制されることが明らかとなった^(15, 16)。

以上のようにヘテロタリズム、ホモタリズムという二つの生活環の発見から接合型変換に関与する遺伝子が次々と明らかとなっていくなか、九州大学農学部農芸化学科発酵化学教室においてフィリピンのライスワインから分離された *Saccharomyces cerevisiae wy2* は上述のヘテロタリズムともホモタリズムとも異なる生活環を示すことが明らかとなった。*wy2* 株は高エタノール耐性を示す下面酵母であり、発酵速度が速くまた、下面酵母でありながらイヌリン発酵性をもつという有用形質をもつ。この *wy2* 株を用いた有用酵母の育種の目的からその生活環の決定が行われた。*wy2* 株の子のうを分割すると、その単胞子培養株は、接合型に関して *mater* と *non-mater* が 2 : 2 に正規分離することが明らかとなった。このことから *wy2* 株は以前に発見された接合型に関する変異株である準ホモタリズムである可能性が示唆された。準ホモタリズム株は *mater* : *non-mater* が 2 : 2 に正規分離するが、 $2a$: 2α の四分子から $2a$: $2a/\alpha$

あるいは $2a/\alpha : 2a$ を生じる。つまり $2a : 2\alpha$ の四分子から α 型細胞のみが自己二倍体化を生起し、 $2a : 2a/\alpha$ を生じる Hq 型準ホモタリズムと、 a 型細胞のみが自己二倍体化することにより $2a/\alpha : 2\alpha$ を生じる Hp 型準ホモタリズムの2種類が存在する。これら準ホモタリズムにおいては、 $H0$ 遺伝子は正常に機能しているが、 HML 、 HMR どちらも同じ接合型の遺伝情報をコードしているため、どちらか一方の接合型への変換しかできない^(17,18)。しかしながら $wy2$ mater 細胞は a 、 α いずれの接合型も示すことから、既知の生活環とは異なる新規な生活環であるものと考察し、その解析が行われてきた。 $wy2$ の non-mater 細胞は、胞子発芽後、性転換を起こし、自己二倍体化する正常なホモタリズムの生活環を示した。一方、mater 細胞は、培養当初は安定に一倍体増殖し、ヘテロタリズムの形質を示すが、継代培養を繰り返していくうちに徐々に自己二倍体化細胞が出現してくるという特異な現象を示すことが明らかとなった⁽¹⁹⁾ (Fig. 0-2)。この $wy2$ mater 細胞の遅れて性転換を起こし、自己二倍体化する生活環を“遅延性ホモタリズム” (delayed homothallism) と名づけた。

酵母の生活環の違いは上述の4つの遺伝子、 $H0$ 、 MAT 、 HML 及び HMR により決定されている。そこでまず、 $wy2$ mater 細胞における $H0$ 遺伝子の発現を *Trans-acting* に制御する遺伝子群について検討を行うため、ヘテロタリズム標準株 (ho 株) との交雑による相補試験が行われた。交雑後の四分子分析の結果、四分子ともすべて mater を示し、胞子形成能を示さなかった。このことから、 $wy2$ mater 細胞が示す遅延性ホモタリズムは、その $H0$ 遺伝子の発現を *Trans-acting* に制御する遺伝子群に起因するものではないことが明らかとなった (Table 0-1)。

以上の結果を受けて、本論文は、 $wy2$ mater 細胞が示す遅延性ホモタリズム現象を、従来知られていた酵母の生活環であるヘテロタリズムとホモタリズムの中間の性質を示す新規な第三の生活環として、その起因を解明しようとしたものである。まず、 $wy2$ mater 細胞に見られる接合型変換に影響を及ぼす因子について解析を行った。正常な $H0$ 遺伝子を $wy2$ mater 細胞に導入することにより第三染色体上に存在する接合型の変換に関わる遺伝子座、 HML 、 HMR 及び MAT について検討した。また、 $H0$ 遺伝子の 5'

上流領域に存在する発現制御領域について解析を行うとともに、wy2 mater 株とヘテロタリック株それぞれの *H0* (*ho*) 遺伝子を解析した (第 1 章)。その結果より、wy2 株の *H0* 遺伝子と *ho* 遺伝子に存在するアミノ酸変異とその表現型との相関について検討した (第 2 章)。また、wy2 *H0* 遺伝子に存在する nonsense mutation において、翻訳の際に起こると考えられる nonsense suppression について解析した (第 3 章)。

一方、酵母を異種遺伝子発現の宿主として用いる研究は、遺伝子組換えが大腸菌から発展して、真核生物の酵母やカビでも可能になるにつれて、急激にその有用性を広げてきた。酵母の研究は醸造業を中心に行われてきた歴史的背景があるが、現在は応用的な一面として、医薬品や食品を遺伝子工学的に生産するための宿主として酵母を用いる研究が幅広く進んでいる^(20,21)。特に食品製造の面では、酵母の醸造能力を拡大させる目的で、カビ類のグルコアミラーゼ等の酵素の発現が検討されてきた⁽²²⁾。酵母は人類の歴史とともに食品生産に用いられてきた生物であり、宿主に用いた場合、特に経口的にそれを摂取することの安全性確かである。様々な有用性をもつ酵母を用いた異種遺伝子発現系における重要な課題のひとつは、その宿主、ベクター系の開発である。異種遺伝子発現の宿主として酵母を用いる場合、発現ベクターのもつべき重要な性質は、宿主細胞中での安定な増殖と高コピー数の維持である。理想的なベクターは、選択圧のない条件下においても全ての細胞中に高コピーで維持されるものである。酵母細胞を宿主とする系でその目標を達成するために、多くのベクターと様々な方法が研究されてきた。しかし多くの場合、1 つの要求を満たすために他の要求が犠牲になっている。例えば、酵母の染色体の *ARS* 因子を利用したベクターでは高コピー数が得られるが、選択圧のない条件下では非常に不安定で、すぐに消失してしまう⁽²³⁾。一方、ベクターを染色体に組み込むか、あるいはベクターにセントロメアを挿入することによって、ベクターを安定に維持させることができるが、そのコピー数は少ないままである^(24,25)。

現在用いられている *Saccharomyces* 酵母のプラスミドベクターの種類としては、染色体に組み込まれて安定に保持される *YIp* 型、酵母染色体の複製起点の一部をもち自立

増殖する YRp 型、酵母の核外遺伝子である 2 μ m DNA の複製起点をもち YRp 型ベクターよりも安定性のよい YEp 型⁽²⁶⁾、YRp 型ベクターに酵母のセントロメアを挿入し、コピー数は低く制限されるが、保持性が極めて高い YCp 型ベクターがある。さらに、数 Mb 単位での DNA 遺伝子導入を可能にしたセントロメアとテロメアをもつ YAC ベクターや、染色体改変用のベクターが開発されている。

一方、当研究室においては、胞子発芽時の熱処理による同質の高次倍数性酵母を造成する方法が確立している^(27,28) (Fig. 0-3)。通常、自然界から分離される酵母は倍数性の面からみると二倍体のものが多いが、ビール酵母やアルコール酵母などの醸造酵母やパン酵母などには、三倍体や四倍体といった高次倍数体と思われるものが多く見いだされている^(29,30)。この事実は高次倍数体が醸造にとって何らかの意味を持っていることを示唆しているが、現在、その意義については不明である。しかしながら、実用酵母の育種改良にあたっては、この倍数性を考慮する必要があると考えられる。そこで、上述の YEp 型、YIp 型プラスミドを用い、異種遺伝子発現の宿主としての高次倍数性酵母の有用性を検討した (第 4 章)。

また、異種遺伝子発現に用いるベクター系構築の観点から、キラ酵母 *Kluyveromyces lactis* が保持する二本の細胞質性線状プラスミドの利用を検討した。このプラスミドは異種酵母に導入できることから、新たな発現ベクターとしての応用が期待されている⁽³¹⁻³³⁾。このプラスミドを利用して細胞質での異種遺伝子の発現を行った。また、キラ酵母のもつ、キラ毒素分泌、毒素耐性というキラ形質を利用することにより YEp 型ベクターを安定に保持させるシステムを構築し、その可能性を検討した (第 5 章)。

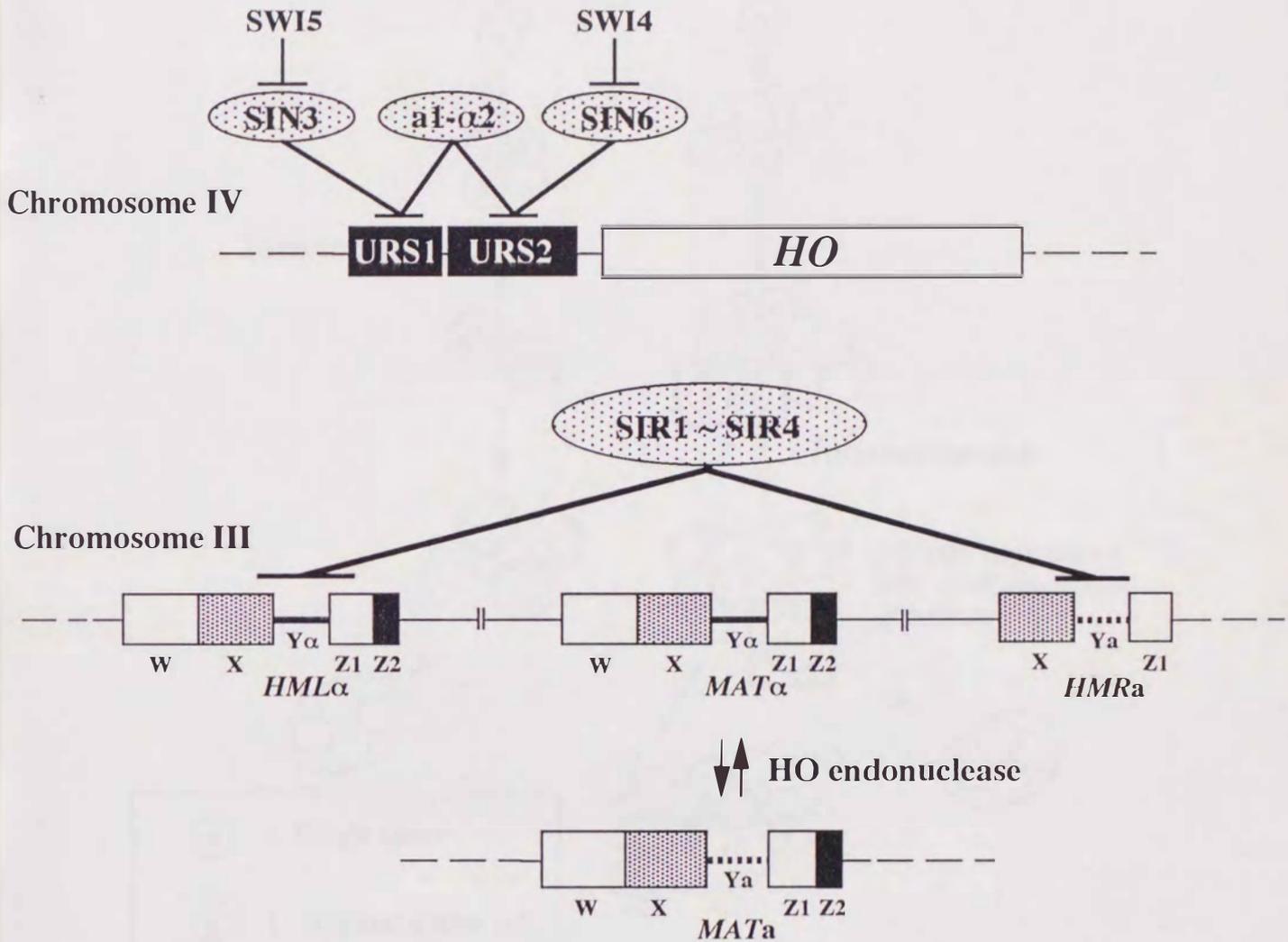


Fig.0-1 Cassette model of mating-type interconversion

Organizations of genes responsible for mating-type interconversion in chromosome III and IV in *S.cerevisiae* are shown schematically. The *HML* and *HMR* are repressed by *Sir* gene products. Mating-type interconversion is initiated by break at the *MAT* locus by the action of HO endonuclease.

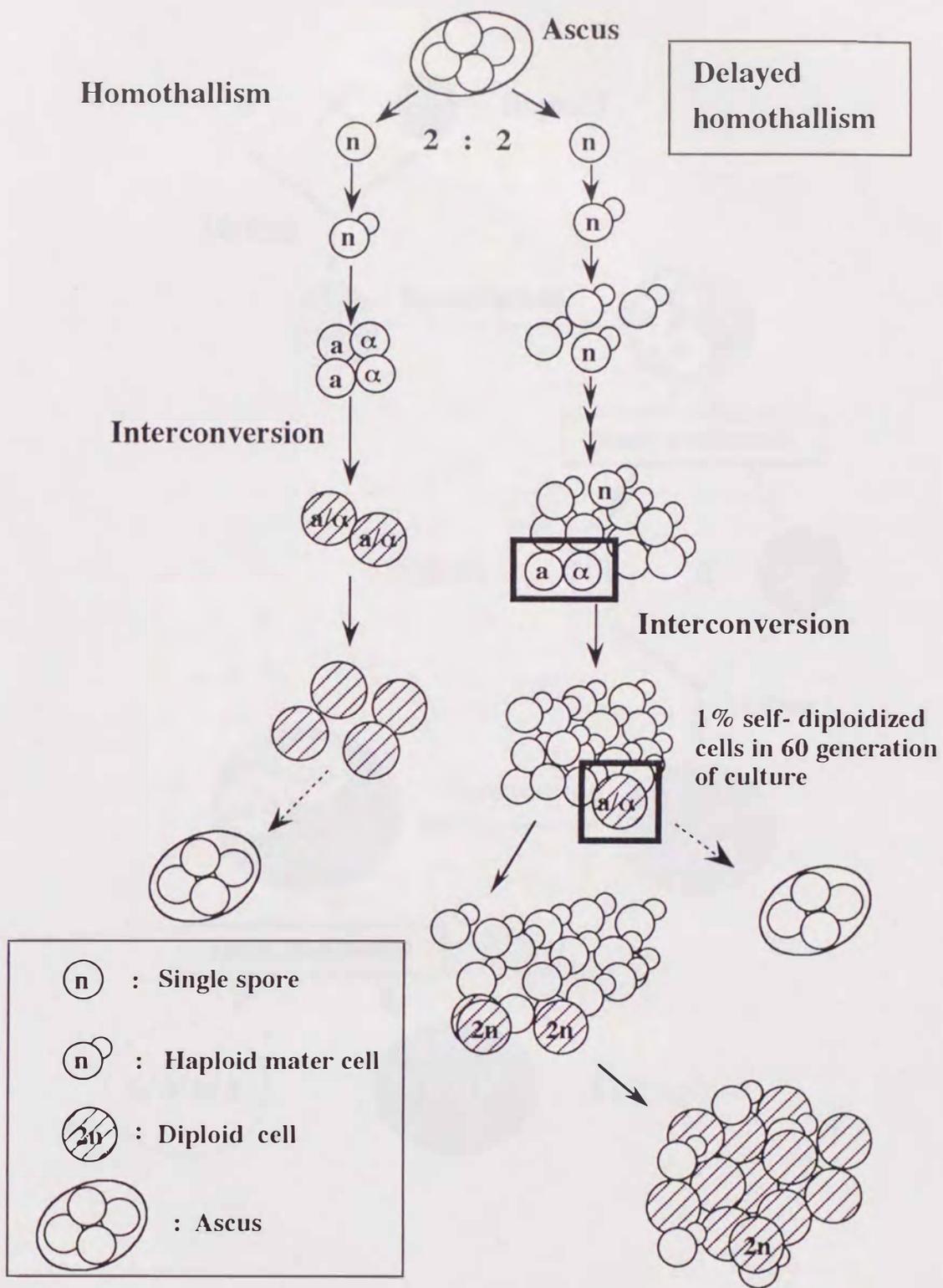


Fig.0-2 Life cycle of *S.cerevisiae wy2*

The segregation pattern of ascospores in *wy2* is 2 mater : 2 non-mater. The non-mater cells show normal homothallic life cycle. The mater cells show delayed homothallic life cycle.

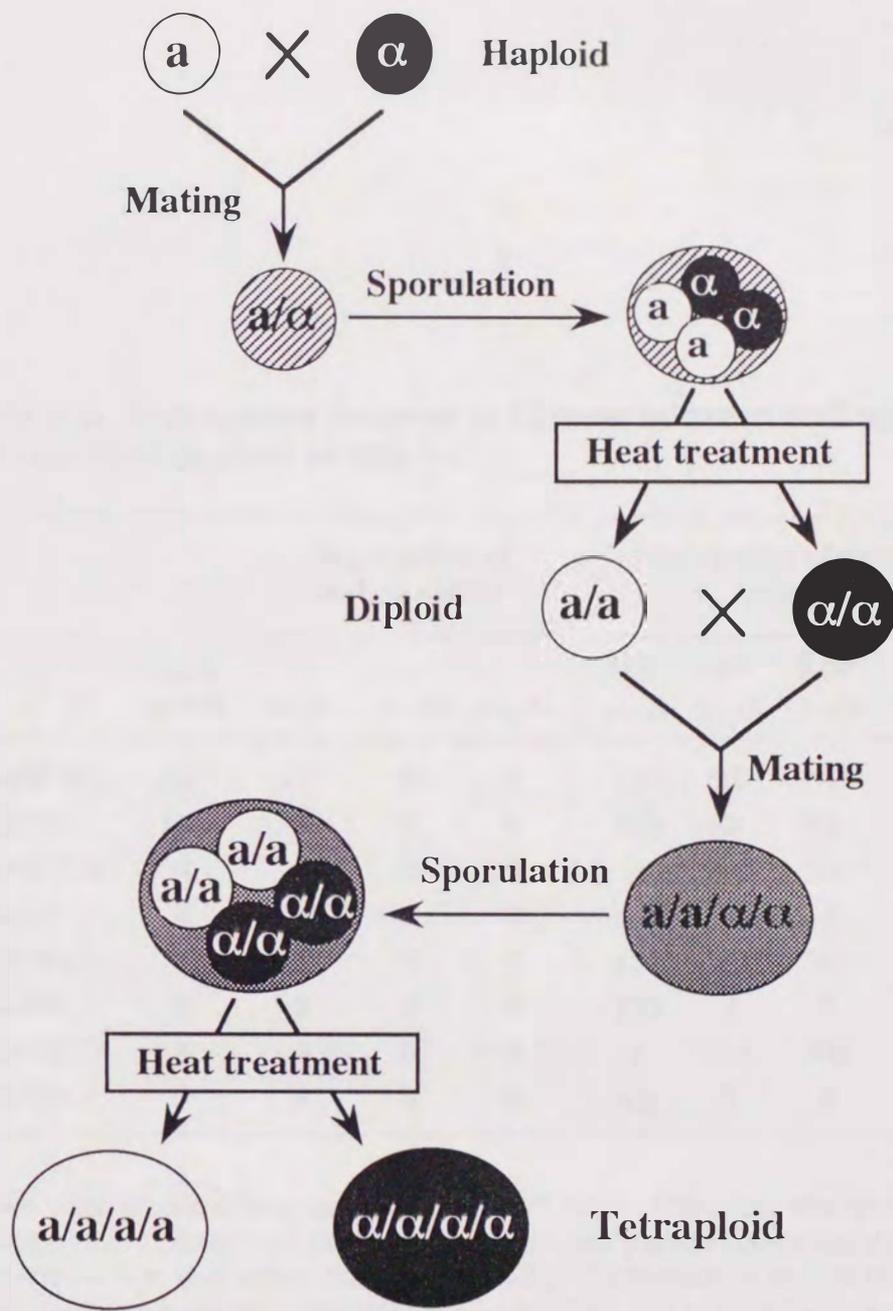


Fig.0-3 Construction of polyploid cells by heat treatment

The diploidizations occur when spores are cultured for 30 min in liquid medium to initiate germination followed by subsequent heat treatment at 55°C for 10 min.

Table 0-1. Segregation patterns in Crosses between wy2 maters and standard haploid strains

Cross	Asci tested	Segregation of mating ability			Segregation of auxotrophic requirements				
		4+:0-	2+:2-	0+:4-	Arg 2+:2-	Leu 2+:2-	Trp 2+:2-	His 2+:2-	Ura 2+:2-
1-d x IFO-10176	12	12	0	0	12	ND	ND	ND	ND
1-d x CG-379	12	12	0	0	ND	12	12	12	12
16-a x IFO-10176	4	4	0	0	4	ND	ND	ND	ND
16-a x CG-379	4	4	0	0	ND	4	4	4	4
14-d x IFO-10175	11	11	0	0	11	ND	ND	ND	ND
14-d x CG-378	9	9	0	0	ND	9	9	ND	9
10-b x IFO-10175	8	8	0	0	8	ND	ND	ND	ND
10-b x CG-378	8	8	0	0	ND	8	8	ND	8

The tetrads were prepared from cells between wy2 mater strains and standard haploid strains. Segregation patterns of auxotrophic makers and mating ability are shown. 1-d and 16-a represent **a** wy2 mater strains. 14-d and 10-b represent **α** wy2 mater strains. Standard haploid strains: IFO-10175 (*MAT^a agr6*), IFO-10176 (*MAT^α agr6*), CG378 (*MAT^a leu2 trp1 ura3*), CG379 (*MAT^α leu2 trp1 his3 ura3*).

1 - 1 緒言

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の接合型変換には *HO*、*HML*、*HMR*、*MAT* 等の遺伝子が関与し、また、それらの発現を制御する遺伝子群も数多く存在している。現在までに報告されている接合型変換に異常を示す変異株は、上述の遺伝子群のうちのいずれかに異常をきたしたものであることが明らかとなっている。緒章で述べた準ホモタリズムは、接合型の情報をコードしているサイレントコピーである *HML* あるいは、*HMR* に異常が存在する。*Hq* 型準ホモタリズムの場合、本来 α の情報をコードしている *HML* に a の情報が存在するために、 α 型細胞は a 型細胞へと接合型変換ができるが、逆に a 型細胞はサイレントコピーに α の情報が存在しないために接合型変換ができない。そのため、その子のう胞子からは $2a : 2a/\alpha$ の細胞が出現してくることになる。*Hp* 型準ホモタリズムの場合はその逆になる。また、*MAT* 遺伝子座に変異が存在する場合 (*MAT-inc*)、あるいは、*MAT* 座に隣接して存在する変異 (*stk1*、*stk2*) は、接合型変換の効率を著しく低下させることが明らかとなっている^(34, 36)。その他にも、二本鎖 DNA 切断による組換え修復に関与する遺伝子群に変異が存在する場合、例えば *RAD52* 変異は致死的であるが、*RAD50* 及び *XRS2* 変異は二本鎖修復の段階で遅延を生じる⁽³⁷⁾。

wy2 mater 株が示す遅延性ホモタリズム現象の起因は、その接合型変換の特徴から、1) *MAT* 遺伝子座あるいは *HML*、*HMR* において欠陥が生じているために接合型の情報の変換が正常に行われぬ、2) *HO* 遺伝子の発現を *Trans-acting* に制御している遺伝子群あるいは、その上流に存在する制御領域に欠陥が存在する、3) *HO* 構造遺伝子内に変異が存在する、以上三つの可能性が示唆される。先に行われた *wy2 mater* 株とヘテロタリズム株との交雑による相補試験の結果、接合能に関してすべての四分子は *mater* を示し、接合型変換が正常に起こらないことが明らかにされた⁽¹⁹⁾。このことから、*HO* 遺伝子を *Trans-acting* に制御している遺伝子群は正常に存在しているものと考察され

る。

本章では *wy2 mater* 株が示す遅延性ホモタリズム現象に起因する欠陥部位を特定するため、*HML*、*HMR* と *MAT* 遺伝子座及び、*HO* 遺伝子の発現制御に関与する遺伝子群の機能を検証し、また、*wy2 mater* 株の *HO* 遺伝子のクローニングを行い、その塩基配列を決定した。さらに、ヘテロタリズム株 (*ho* 株) である *S. cerevisiae* CG379 株についても解析し、*ho* 遺伝子の塩基配列も同様に決定した。

1 - 2 実験方法

1-2-1 使用菌株

遅延性ホモタリズム酵母 *S. cerevisiae wy2 mater 14 d* (*MAT α ura3*) 及び、ヘテロタリズム酵母 *S. cerevisiae* CG379 (*MAT α ura3 leu2 trp1 his3*)。

1-2-2 培養方法

菌株の培養には YPD 培地 (1% yeast extract、2% polypeptone、2% glucose) を用いた。平板培地には寒天を 2% 添加して用いた。形質転換体の選出には SD 培地 (0.67% yeast nitrogen base without amino acids [Difco]、2% glucose、2% agar) に必要なアミノ酸 (2.4% uracil、7.2% leucine、4.8% tryptophan、2.4% histidine) を添加した培地を用いた。胞子形成には、胞子形成培地 (1% potassium acetate、0.1% yeast extract、0.05% glucose、2% agar、栄養要求性株には栄養素を通常の 1/4 量添加) を使用し、3 日間培養した。菌株は 30℃ で培養した。

1-2-3 プラスミド YEp3-*HO* の構築

正常な *HO* 遺伝子を含むプラスミド YEp13 43A は大阪大学の原島教授より分譲いただいた。まず、この YEp13 43A を制限酵素 *Hind*III で消化し、*HO* 遺伝子を含む 2.5 kb の断片を得た。その *HO* 遺伝子断片を *bla* 及び *URA3* を選択マーカーとする酵母

と大腸菌のシャトルベクター YEUp3 の *Hind*III 部位に導入した。このプラスミドを YEUp3-*H0* とした。

1-2-4 プラスミド YIp5- Δ H0 の構築

正常な *H0* 遺伝子を含むプラスミド YEp13 43A を制限酵素 *Hind*III、*Pst*I で消化し、構造遺伝子の 342 bp からターミネーターを含む 2368 bp までの約 2.0 kb の断片をプラスミド pUC19 の *Hind*III-*Pst*I 部位に導入し、pUC19- Δ H0 を構築した。この pUC19- Δ H0 を *Hind*III と pUC19 のマルチクローニングサイトに存在する *Sal*I で消化した。この Δ H0 遺伝子を含む約 2.0 kb の断片を *bla* 及び *URA3* を選択マーカーとする染色体組込み型プラスミド YIp5 の *Hind*III-*Sal*I 部位に導入し、YIp5- Δ H0 を構築した (Fig. 1-1)。

1-2-5 pHSG- Δ H0 の構築

YEp13 43A を制限酵素 *Sal*I、*Xho*I で消化し、*LEU2* 遺伝子を含む約 2.2 kb の断片を pHSG299 の *Sal*I 部位に導入し、pHSG299-*LEU2* を構築した。1-2-4 で構築した pUC19- Δ H0 を *Hind*III、*Sal*I で消化し、 Δ H0 遺伝子を含む約 2.0 kb の断片を pHSG396 の *Hind*III-*Sal*I 部位に導入し、pHSG396- Δ H0 を構築した。次いで、pHSG299-*LEU2* を pHSG299 のマルチクローニング部位に存在する *Sph*I、*Sac*I で消化した。この *LEU2* 遺伝子を含む約 2.2 kb の断片を pHSG396- Δ H0 の *Sph*I *Sac*I 部位に導入し、酵母染色体組込み型プラスミド pHSG- Δ H0 を構築した (Fig. 1-2)。

1-2-6 *S. cerevisiae* の形質転換

菌株をまず、4 ml YPD 液体培地で一晚 30℃ で振とう培養した。次いで、その培養液 1 ml を 100 ml YPD 培地に接種し、対数増殖期 (OD_{600} が 1.3-1.5) まで振とう培養した。培養液を遠心機 (KUBOTA KR-20000T) にて 4,000 rpm、4℃ で遠心分離し、集菌した。菌体を 20 ml の冷滅菌水で 2 度洗浄した。次いで、菌体を 20 ml の 1 M ソルビトールに懸濁し、4,000 rpm、4℃ で集菌し、菌体を 100 μ l の 1 M

ソルビトールに懸濁した。その酵母懸濁液 50 μ l をマイクロチューブに分注し、100 ng の plasmid DNA (5 μ l) を加えた後、水中に 5 分間放置した。染色体組込み型プラスミドを導入する場合は、相同組換えを行う遺伝子内部に存在する唯一の制限酵素部位で切断して用いた。線状化した DNA 断片はフェノール抽出、エタノール沈殿により精製し、1 μ g を使用した。BTX600 エレクトロポレーションシステムを用いて Table 1-1 の条件でエレクトロポレーションを行った。栄養要求性を相補することを指標に SD 培地により形質転換体を選出した。

Table 1-1. Condition for electroporation.

Chase mode	2.5 kV/Resistance High voltage (HV)
Set resistance	R5 (129 ohm)
Set charging voltage	1.5 kV
Estimated field strength	7.5 kV/cm
Disired pulse length	5 msec

1-2-7 サザンハイブリダイゼーション

α 型遅延性ホモタリズム酵母 wy2 mater 14-d 株、ヘテロタリズム酵母 CG379 株及び、 $\Delta H0$ 遺伝子導入形質転換体からゲノム DNA を Hereford の方法で抽出し⁽³⁸⁾、*Hind*III で消化した。制限酵素処理後の DNA をアガロースゲル (0.7%) により電気泳動を行い、Southern の方法⁽³⁹⁾により Biodyne B nylon membrane (Pal 1) へトランスファーした。DNA プローブに用いた *H0* 遺伝子断片は以下の方法で調製した。YEpl3 43A より *H0* 遺伝子を含む 2.5 kb の *Hind*III 断片をアガロースゲルから Geneclean kit (B10 101 Inc. 製) を用いて回収し、プローブ DNA のラベリング

を行った。アガロースゲルは抽出用のゲル SeaKem LE (FMC Bio Products 製) を使用し、TAE buffer (40 mM Tris acetate、1 mM EDTA) で泳動した。前述のメンブランへ標識したプローブをハイブリダイゼーションし、プローブに相補的な DNA 断片を検出した。プローブのラベリング及び相補的な DNA の検出は、Nonradioactive DNA labeling and detection kit (Boehringer Mannheim) を使用した。

1-2-8 wy2H0 及び ho 遺伝子のクローニング

1-2-7 の方法に準じ、14-d 株及び CG379 株からゲノム DNA を抽出し、HindIII で消化後、アガロースゲル電気泳動を行った。上記のサザンハイブリダイゼーションよりシグナルを検出した 2.5 kb のゲノム DNA 断片を GeneClean kit を用いて回収した。この 2.5 kb HindIII 断片を pBluescriptII SK+ の HindIII 部位に導入し、大腸菌 XL1-Blue をエレクトロポレーション法により形質転換した。エレクトロポレーションの条件は Table 1-1. に準じ、Set charging voltage を 2.5 kV で行った。形質転換体が得られた plate に対し、ニトロセルロース膜 (pore size 0.45 μm) を用いて、コロニーハイブリダイゼーションを行った。相補 DNA の検出には Nonradioactive DNA labeling and detection kit を使用した。

1-2-9 PCR による H0 遺伝子の増幅

$\Delta H0$ 遺伝子を導入した 14-d 株及び CG379 株それぞれの形質転換体のゲノム DNA を抽出し、H0 遺伝子を PCR 法によって増幅した。Forward primer として 5'-ACA AAGCTT **ATG** CTTTCTGAAAACACGAC-3' を、Reverse primer として 5'-ACA AAGCTT **TAA** GCAGATGCGCGCACC-3' を用いた (下線は HindIII 部位を、反転文字はスタートコドン [ATG]、ストップコドン [TAA] をそれぞれ表す)。PCR 反応は全量 50 μl の系で、Table 1-2 の反応液組成及び、Table 1-3 の条件で行った。オリゴヌクレオチドプライマーは DNA 合成機 (ABI397、Applied Biosystems 社製) を用いて合成し、OPC カラム (Applied Biosystems 社製) により精製した。PCR 法により増幅した約 1.8 kb の H0 遺伝子断片はそれぞれフェノール抽出、エタノール沈

殿により精製した。その後、*Hind*III で消化し、pHSG396 の *Hind*III 部位に導入した。これら 14-d 株及び CG379 株の Δ *HO* 遺伝子導入株から増幅した *HO* 遺伝子を導入したプラスミドをそれぞれ pHSG396-*HO* (14-d) 及び pHSG396-*HO* (CG379) とした。

Table 1-2. Composition of PCR mixture.

100 μ M dNTPs
1 μ M Forward primer
1 μ M Reverse primer
1 x PCR buffer (Promega Co. Ltd)
2.5 mM $MgCl_2$ (Promega Co. Ltd)
0.5 U Taq DNA polymerase (Promega Co. Ltd)
1 μ g Template DNA (Δ <i>HO</i> 形質転換体ゲノム DNA)

Table 1-3. Condition of PCR.

Denaturation,	93°C for 1 min
Primer annealing,	56°C for 1.5 min
Primer extension,	72°C for 1.5 min
30 cycle	
72°C for 10 min	

1-2-10 塩基配列の決定

コロニーハイブリダイゼーションの結果得られた *wy2HO* 及び *ho* 遺伝子それぞれの 2.5 kb *Hind*III 断片を以下のフラグメントに断片化した。アガロースゲル電気泳動を行った後、Geneclean kit により回収し、サブクローニングした。418 bp *Hind*III-*Pst*I、95 bp *Pst*I、365 bp *Pst*I-*Bam*HI、391 bp *Bam*HI-*Bgl*III 断片は pUC19 の

HindIII-*Pst*I、*Pst*I、*Pst*I-*Bam*III、*Bam*III それぞれの部位に、また、617 bp *Bgl*II-*Sac*II、649 bp *Sac*II-*Hind*III、731 bp *Hind*III-*Sca*I、984 bp *Sca*I、1037 bp *Sca*I-*Hind*II 断片は pBluescriptII SK+ の *Bam*III-*Sac*II、*Sac*II-*Hind*III、*Hind*III-*Eco*RV、*Eco*RV、*Eco*RV-*Hind*II それぞれの部位にサブクローニングし、シーケンス用サンプルとした (Fig. 1-3)。

また、pHSG396-*HO* (14-d)、pHSG396-*HO* (CG379) をそれぞれ *Bam*III、*Hind*III で消化した。*HO* (14-d) 遺伝子の 1056 bp *Bam*III-*Hind*III 断片及び、*HO* (CG379) 遺伝子の 707 bp、1056 bp それぞれの *Bam*III-*Hind*III 断片を pUC19 の *Bam*III-*Hind*III 部位に導入した。

これらのプラスミドを PEG 溶液 (20% polyethylene glycol 6000、2.5 M NaCl) による沈殿法により精製し、サンプルを調製した。Sanger らの dideoxy-mediated chain termination 法⁽⁴⁰⁾により、DNA Sequencer (Applied Biosystems 社製 Model 373A) を使用して、塩基配列を決定した。

1 - 3 実験結果

1-3-1 *HO* 遺伝子導入株の表現型

酵母多コピー型プラスミド YEUp3 に正常な *HO* 遺伝子を挿入したプラスミド YEUp3-*HO* を 14-d 株及び CG379 株それぞれに導入した。両形質転換体 10 株ずつの表現型を胞子形成培地での胞子形成能により検討した。その結果、コントロールとしてベクターのみである YEUp3 を導入した形質転換体は胞子形成を示さなかったのに対し、YEUp3-*HO* を導入した両形質転換体は、ともに胞子を形成した (Table 1-4)。このことから正常な *HO* 遺伝子の存在によりヘテロタリズム株、遅延性ホモタリズム株ともに正常なホモタリズムの表現型を示すことが明らかとなった。以上の結果より、14-d 株及び CG379 株においては性転換現象に関わる遺伝子群のうち *HO* (*ho*) 遺伝子以外の *MAT*、*HML* 及び *HMR*

遺伝子は正常に機能しているものと考察した。

1-3-2 wy2H0 及び ho 遺伝子の塩基配列の決定

1-3-1 の結果より wy2 mater 株及び CG379 株においては、それぞれの H0 (ho) 遺伝子に欠陥があることが示唆された。そこでそれらの H0 (ho) 遺伝子の存在について検討した。正常な H0 遺伝子をプローブとして、14-d 株及び CG379 株のゲノム DNA に対してサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、いずれも正常な H0 遺伝子と同じサイズである 2.5 kb にシグナルを検出した。そこで、それぞれの H0 (ho) 遺伝子をコロニーハイブリダイゼーションにより取得した。次いで、14-d 株、CG379 株それぞれから H0 構造遺伝子を含む HindIII 断片 2534 bp の塩基配列を決定した。この HindIII 断片は -171 bp の 5' 上流領域、1758 bp の構造遺伝子、605 bp の 3' 下流領域を含んでいる。

1986 年に Russell⁽⁴¹⁾ らによって報告された H0 遺伝子の塩基配列との比較を行うと、wy2H0 遺伝子においては 14 の塩基に、ho 遺伝子においては 11 の塩基に相違が見られた。wy2H0 遺伝子においては、5' 上流領域に 1 個所 (-31)、構造遺伝子内に 10 個所 (371、791、877、1028、1061、1379、1427、1586、1590、1742)、3' 下流領域に 3 個所 (1916、1944、2005)。ho 遺伝子においては、5' 上流領域に 1 個所 (-14)、構造遺伝子内に 4 個所 (565、667、1214、1424)、3' 下流領域に 6 個所 (1853、1868、1917、1942、1964、2003)。それぞれの塩基配列から推定されるアミノ酸配列の比較を行うと、H0 と wy2H0 には 3 つのアミノ酸の相違 (Trp²⁹²→amber mutation、His⁴⁷⁵→Leu⁴⁷⁵、Glu⁵³⁰→Lys⁵³⁰) が、また、H0 と ho の間には 4 つのアミノ酸の相違 (Thr¹⁸⁹→Ala¹⁸⁹、Gly²²³→Ser²²³、Leu⁴⁰⁵→Ser⁴⁰⁵、His⁴⁷⁵→Leu⁴⁷⁵) が認められた (Table 1-5)。wy2H0 と ho との比較では、His⁴⁷⁵ のみが共通に変異していることが明らかとなった。

1-3-3 $\Delta H0$ 遺伝子導入の確認

14-d 株及び CG379 株においてそれぞれの $H0$ (ho) において 3 つ及び 4 つのアミノ酸変異が存在することが明らかとなった。そこで、それら変異アミノ酸を正常な $H0$ 型のアミノ酸で相補することで、 $wy2H0$ 及び ho 遺伝子上流に存在する発現制御領域について検討した。

まず、 $wy2H0$ 及び ho 遺伝子における相同組換えのための染色体組込み型プラスミド $YIp5-\Delta H0$ 及び $pHSG-\Delta H0$ を構築した。 $\Delta H0$ 遺伝子はスタートコドンから 342 bp までの 5' 側を欠失した $H0$ 遺伝子である。それぞれを $\Delta H0$ 遺伝子内に存在する制限酵素部位 Bam III あるいは Eco 47III で切断、線状化し、14-d 株及び CG379 株に導入した。14-d 株及び、CG379 株の相同組換えによる $\Delta H0$ 遺伝子導入のモデルを Fig. 1-4、Fig. 1-5 にそれぞれ示した。 $\Delta H0$ 遺伝子の相同組換えにより 2 種の $H0$ 遺伝子がタンデムに生じるが、下流遺伝子はその 5' 側が欠失しているため発現しない。それぞれの形質転換体について $\Delta H0$ 遺伝子の相同組換えによる導入の確認を行った。まず、それぞれの形質転換体からゲノム DNA を抽出した。抽出したそれぞれのゲノムを $Hind$ III で消化し、正常な $H0$ 遺伝子をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。予想される相同組換えから、Fig. 1-6 に示すように $YIp5-\Delta H0$ を導入した 14-d 株からは 2.5 kb と 7.0 kb に、 $pHSG-\Delta H0$ を導入した CG379 株からは 2.5 kb と 6.5 kb にシグナルが検出されると考えられる。その結果、14-d 株には約 2.5 kb と 7.0 kb に、また、CG379 株には約 2.5 kb と 6.5 kb にシグナルを検出した。このことから、 $wy2H0$ 及び ho 遺伝子それぞれにおいて正常に相同組換えが起きていることを確認し、Fig. 1-6 に示すようにタンデムに 2 種の $H0$ 遺伝子が存在することが明らかとなった。

1-3-4 $\Delta H0$ 遺伝子導入による変異アミノ酸相補の確認

相同組換えにより変異アミノ酸が相補されていることを確認するため、相同組換えでタンデムに生じた 2 つの $H0$ 遺伝子のうち上流遺伝子のみを 1-2-9 に示した primer を用いて PCR により特異的に増幅した。用いた primer が annealing する

部位を Fig. 1-4、Fig. 1-5、Fig. 1-6 それぞれに矢印で示した。下流側の遺伝子はその 5' 側が欠失しているために用いた Forward primer は annealing することができないため、上流側の遺伝子のみを増幅できる。このため、CG379 の形質転換体においては Fig. 1-6 の矢印で示した 1.8 kb 及び 8.2 kb の遺伝子断片、14 d 株においては 1.8 kb 及び 8.7 kb 遺伝子断片が PCR により増幅される可能性がある。

PCR を行った結果、それぞれ上流の *HO* 遺伝子のみ約 1.8 kb を特異的に増幅した (Fig. 1-6)。次いで、この PCR 産物の塩基配列を決定した結果、*wy2HO* 遺伝子、*ho* 遺伝子それぞれのアミノ酸変異は正常な *HO* 遺伝子の相同組換えにより相補されていることを確認した。

1-3-5 ΔHO 遺伝子導入による発現制御領域の解析

ΔHO 遺伝子を 14-d 株及び CG379 株の *wy2HO* 及び *ho* 遺伝子に相同組換えにより導入し、それぞれの変異アミノ酸を相補した形質転換体を取得した。それら形質転換体の表現型について胞子形成能を検討した。その結果、形質転換体の胞子形成能を確認し、*wy2HO* 及び *ho* 遺伝子それぞれに存在するアミノ酸変異を相補することにより、正常なホモタリズム表現型を示す細胞の出現が確認された。相同組換えにより生じる二つの *HO* 遺伝子のうち上流側の遺伝子のみが正常な機能を有する *HO* 遺伝子である。そのため、*wy2HO* あるいは *ho* それぞれの遺伝子上流に存在する発現制御領域が正常である場合、形質転換体は性転換を起こし、正常なホモタリズムの表現型を示すことになる。

以上の結果より、14-d 株及び CG379 においてはその *wy2HO* 及び *ho* 遺伝子上流に存在する発現制御領域は正常に存在していることが明らかとなった。

1 - 4 考察

S. cerevisiae wy2 mater 株が示す遅延性ホモリズム現象は、酵母の接合型変換に関与する遺伝子群の欠陥に起因するとの推察のもとに、その欠陥部位を特定するため、*MAT*、*HML*、*HMR*、*HO* それぞれの遺伝子について検討を行った。また、接合型変換を示さないヘテロリズム酵母 CG379 株についても同様に解析を行った。

正常な *HO* 遺伝子を導入することにより、14-d 株、CG379 株ともに正常なホモリズムの表現型を示したことから、*MAT*、*HML*、*HMR* それぞれの遺伝子座及び、*HML*、*HMR* 遺伝子座の発現抑制に関与している *SIR* 遺伝子群ともに正常に存在していることが明らかとなった。

wy2 *HO*、*ho* 遺伝子の塩基配列を決定し、アミノ酸レベルでの相違について比較した。その結果、wy2 *HO* は 292 番目の Trp が TAG amber codon に変異していることが明らかとなった。wy2 mater 株においてはこの TAG amber codon において nonsense suppression が起こり、wy2 *HO* が正常に翻訳されるものと考察した。また、正常な *HO* には C 末端側に 5 つの Cys-X₂-Cys 配列 (それぞれ 466、486、508、522、558 から始まる) が存在し、これに関連して 4 つの Cys-X_{2,4}-His 配列 (81、257、412、470)、His-X₃-His 配列 (267) が 1 つ、His-X₂-Cys 配列 (574) が 1 つ存在する⁽⁴¹⁾。これらの配列は Zn²⁺ 結合部位と考えられ、finger 構造を形成して *HO* の DNA 結合の役割を果たすものと推定されている⁽⁴⁹⁾。wy2 *HO* と *ho* で共通して Leu への変異が見られた 475 番目の His はこの DNA binding に関与する zinc-finger を形成するアミノ酸の一つと考えられる。さらに、酵母に存在するエンドヌクレアーゼには、保存された領域が 2 箇所存在し、*HO* においては ²¹⁴WMLGLWLCGTT と ³²⁵FLAGLIDSDGYV がそれに相当する⁽⁴²⁾。*ho* に見られた 223 番目のアミノ酸変異 (Gly²²³→Ser²²³) はこの領域内の変異であることが明らかとなった。以上の結果から、wy2 *HO*、*ho* それぞれの構造遺伝子内に存在するアミノ酸変異が *HO* の機能に影響を及ぼす可能性が示された。

次に、wy2 *HO*、*ho* 遺伝子それぞれの上流領域について検討を行った。相同組換えを利

用して、wy2*HO*、*ho* 遺伝子内のそれぞれ 3 つ及び、4 つのアミノ酸変異を正常な *HO* 遺伝子で相補する形で形質転換を行った。導入する遺伝子は正常な *HO* 遺伝子のスタートコドンから 342 bp に存在する *Pst*I 部位までを欠失させた ΔHO 遺伝子を用いた。これはシングルクロスオーバーによる相同組換えにより生じる二つの *HO* 遺伝子のうち下流の遺伝子の発現を阻害するためであり、また、相同組換えにより生じた *HO* 遺伝子が、wy2*HO*、*ho* それぞれの遺伝子の変異を相補していることを確認するためである。相同組換えの際、YIp5- ΔHO は *Bam*HI で、pHSG- ΔHO は *Eco*47III で切断、線状化し、14-d 株、CG379 株それぞれの形質転換に用いた。一般に ARS 配列が存在しない染色体組込み型プラスミドを用いて相同組換えを行う場合、組換えを行う目的遺伝子内で切断し、線状化することで、環状のプラスミドと比べて 10 倍から 1000 倍形質転換効率が低いことが報告されている^(43,44)。 ΔHO 遺伝子導入により得られた形質転換体は 2 種の *HO* 遺伝子がタンデムに存在し、上流側の遺伝子が *HO* の構造遺伝子の全長 1758 bp を保持しているのに対し、下流側の遺伝子は、その 5' 末端側が ΔHO 遺伝子由来であるためにスタートコドンを含む 342 bp が欠失している。*HO* 構造遺伝子を増幅するため、スタートコドンを含む領域を Forward primer に、ストップコドンを含む領域を Reverse primer として用いることにより、二つの遺伝子のうちの上流側を特異的に増幅することができた。この PCR の際、14-d 株の形質転換体からは、約 1.8 kb 及び 8.7 kb の断片が、CG379 株の形質転換体からは、約 1.8 kb 及び 8.2 kb の断片が生成する可能性が考えられるが、8.7 kb 及び 8.2 kb の断片は PCR 反応中に伸長阻害が起こり、1.8 kb の断片のみを特異的に増幅したものと考察した (Fig. 1-6)。 ΔHO 遺伝子導入により表現型が正常なホモタリズムに変換した 14-d 株、CG379 株それぞれの形質転換体のゲノム DNA から増幅した約 1.8 kb の PCR 産物の塩基配列は、すべて正常な *HO* 遺伝子と同一であった。このことから、14-d 株及び CG379 株いずれにおいても *HO* (*ho*) 遺伝子の上流に存在する発現制御領域は正常に存在することが明らかとなった。

遅延性ホモタリズム酵母である *S. cerevisiae* wy2 mater 株及び、ヘテロタリズム酵母 *S. cerevisiae* CG379 株において、その生活環を規定する欠陥部位の特定を行った。正常な *HO* 遺伝子の導入により 14-d 株 及び CG379 株は、それぞれ *MAT* 遺伝子座及び、*HML*、*HMR* 遺伝子座とこれらサイレントカセットの発現を抑制している遺伝子群は正常に機能していることを明らかにした。

wy2 *HO* 遺伝子、*ho* 遺伝子の塩基配列を決定し、正常な *HO* 遺伝子との比較から、アミノ酸レベルでそれぞれ 3 つ及び 4 つの変異が存在することが明らかとなった。また、それぞれの遺伝子において存在する変異を相補する形で正常な *HO* 遺伝子を相同組換えにより導入することで、それぞれの遺伝子の上流に存在する発現制御領域が正常に機能していることを明らかにした。

以上の結果から、wy2 mater 株及び CG379 株が示す生活環である遅延性ホモタリズム及びヘテロタリズムは、wy2 *HO*、*ho* 遺伝子内に存在する塩基置換に起因するものと考察した。

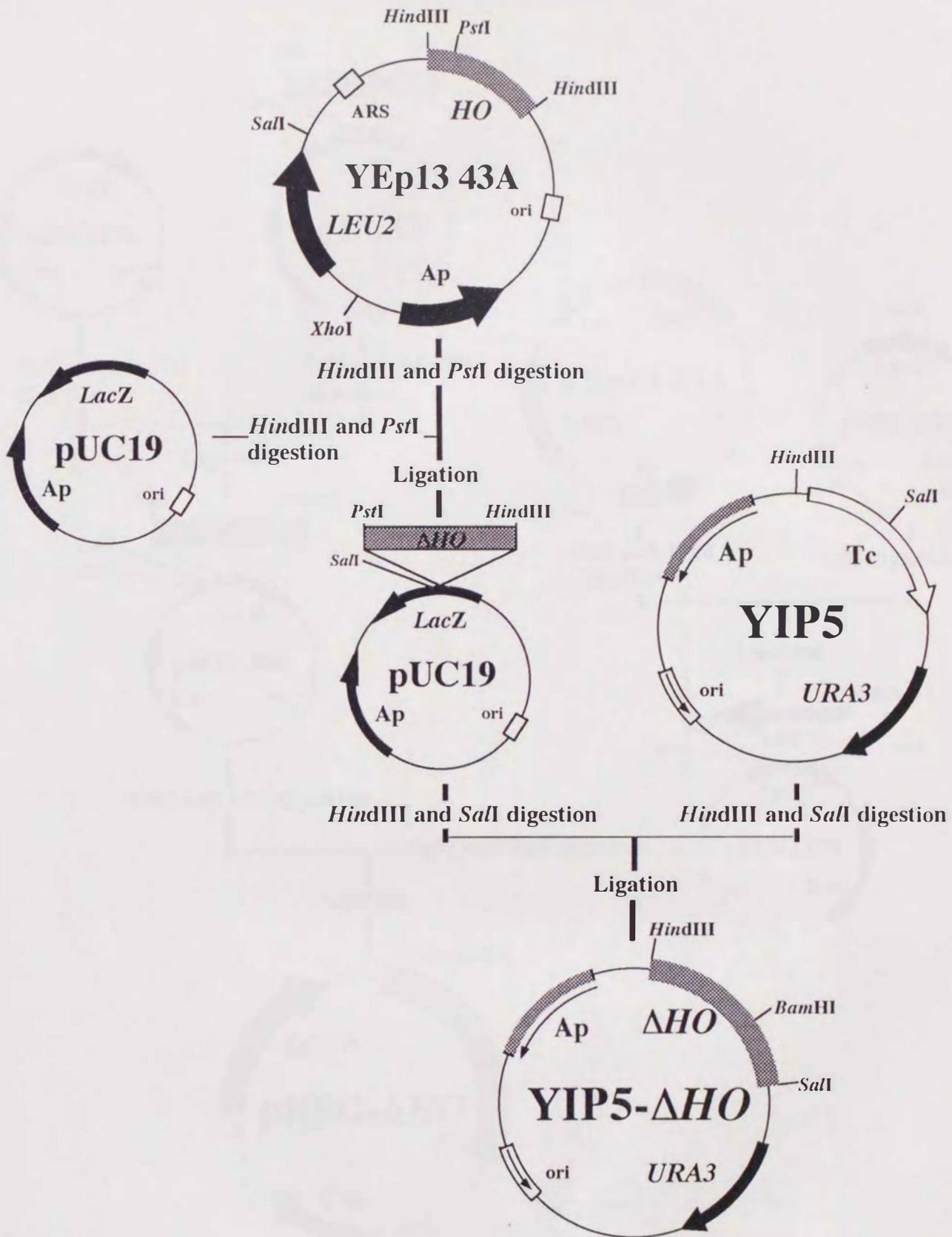


Fig.1-1. Construction of YIp5- Δ HO

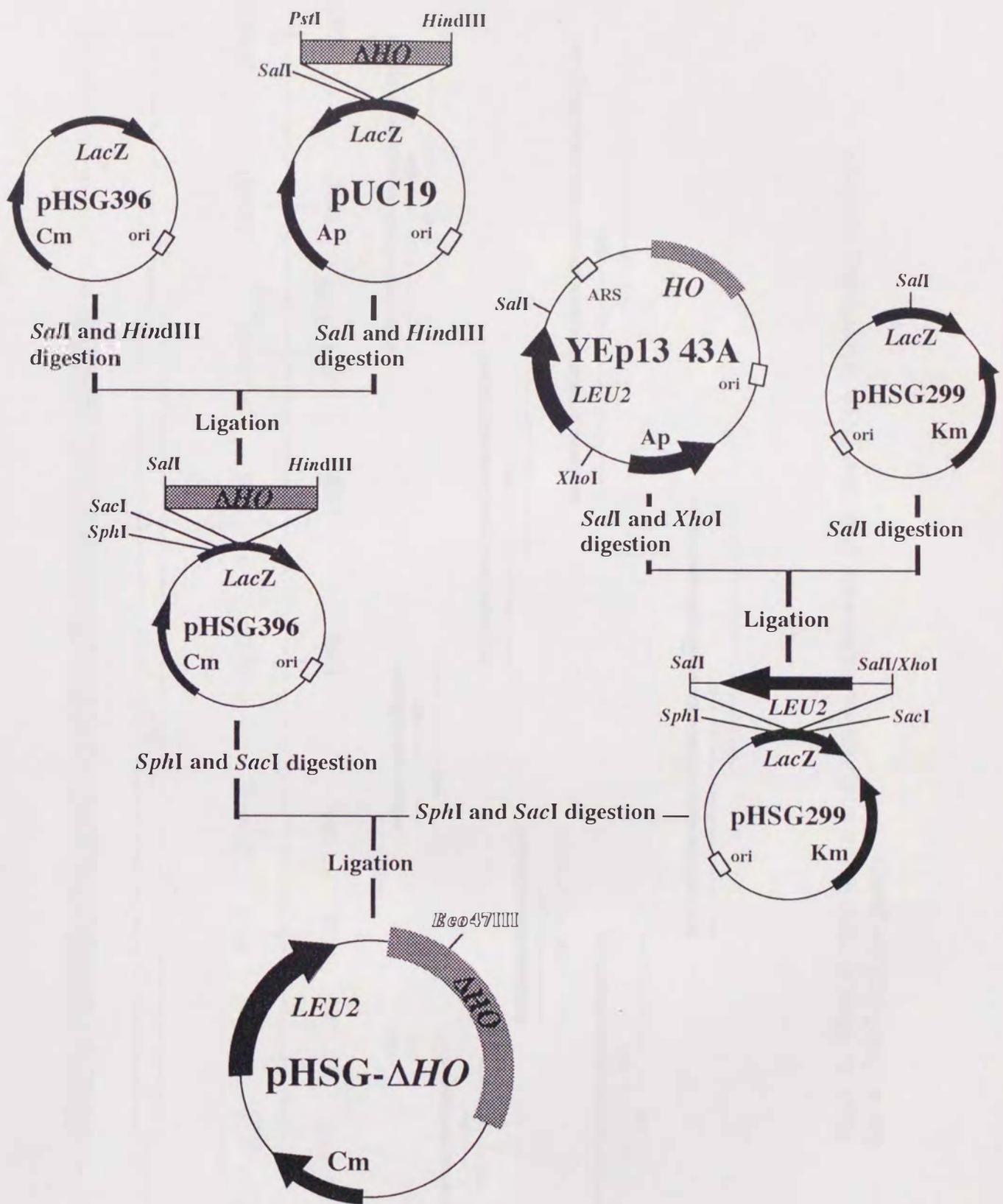
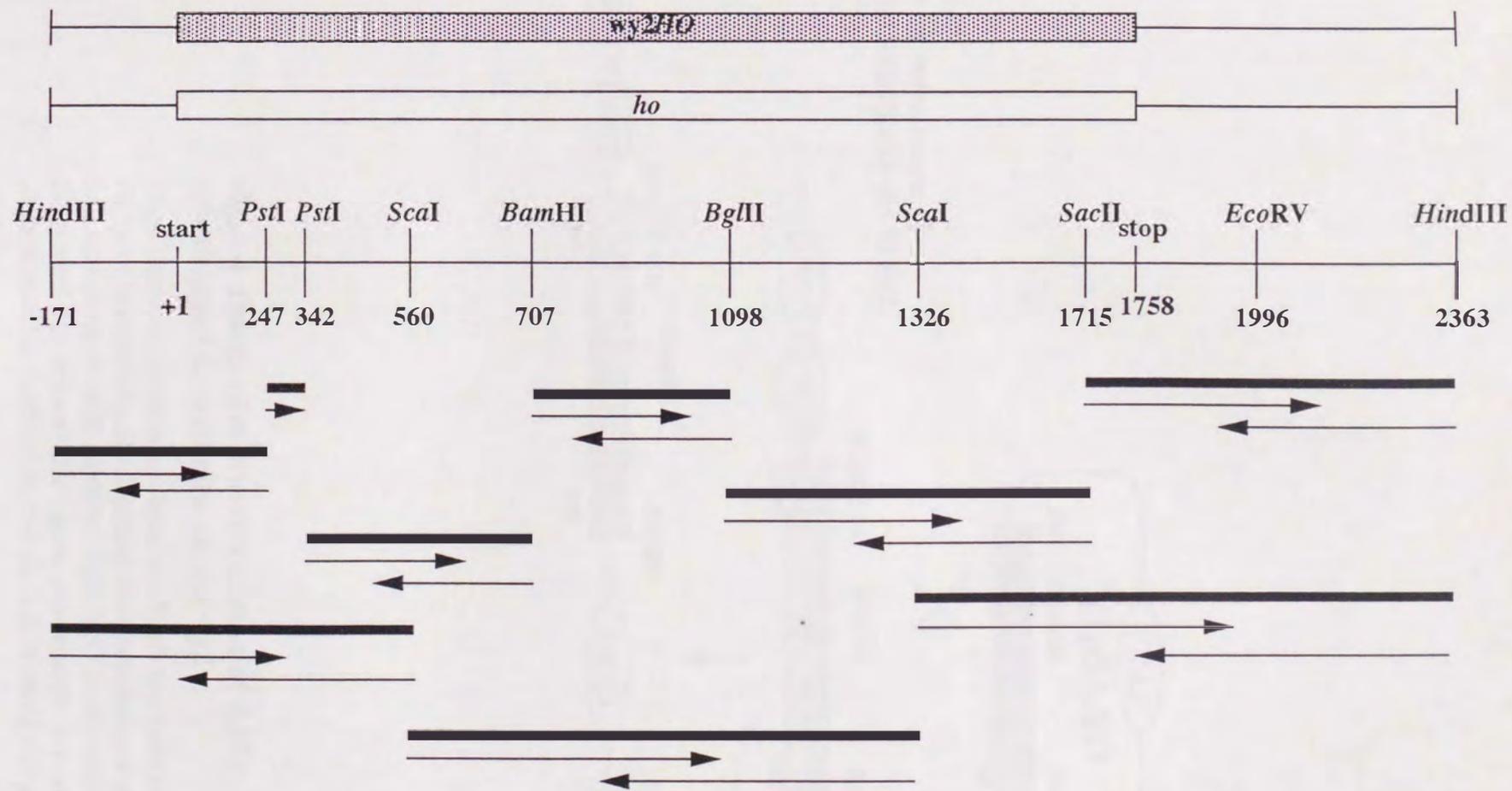


Fig.1-2. Construction of pHSG-ΔHO



26

Fig.1-3. Map of restriction endonuclease cleavage sites and DNA sequencing strategy for *wy2HO* and *ho* genes

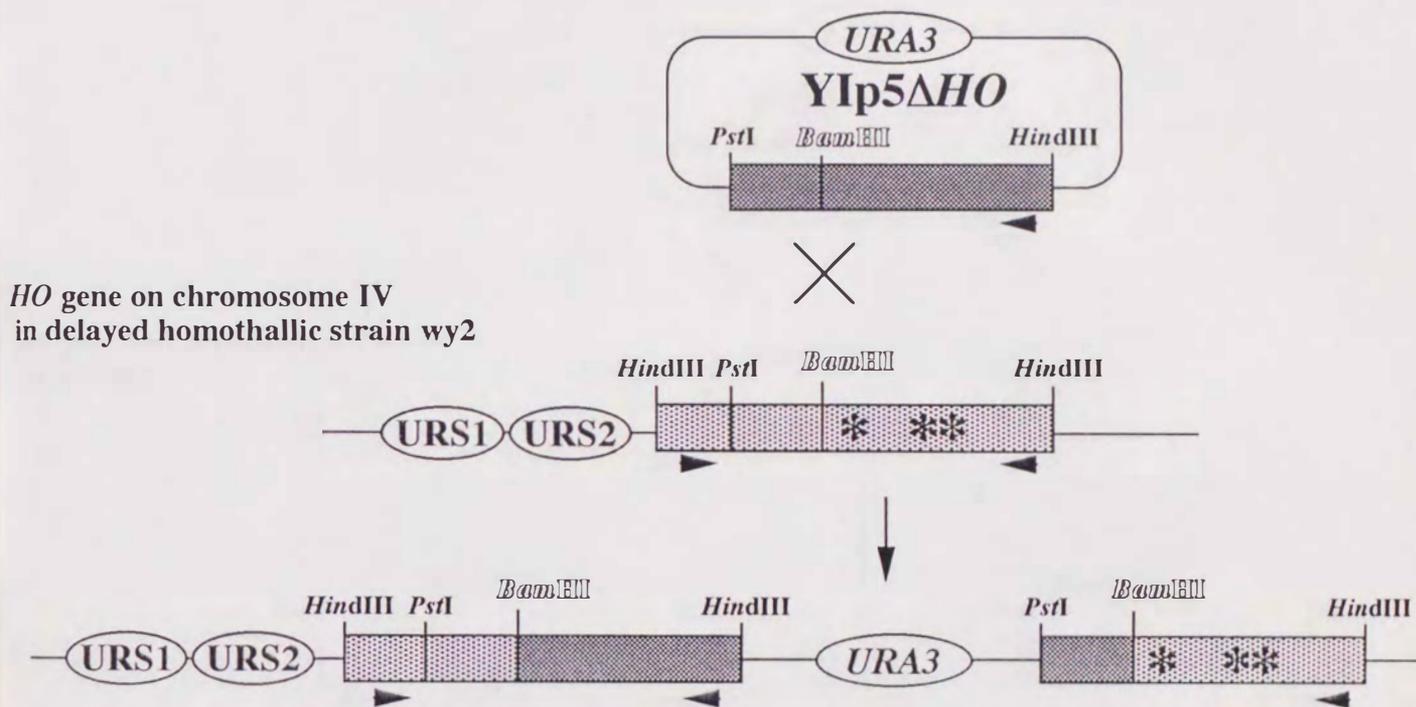


Fig.1-4 Integrative transformation of ΔHO into delayed homothallic strain wy2

Homologous recombination between YIp5- ΔHO and the wy2 *HO* gene is schematically depicted. Asterisks indicate amino acid mutations. *Bam*HI-digested YIp5- ΔHO is recombined at the *Bam*HI site in the wy2 *HO* gene. Arrowheads indicate the primers used for amplification of the recombinant *HO* gene.

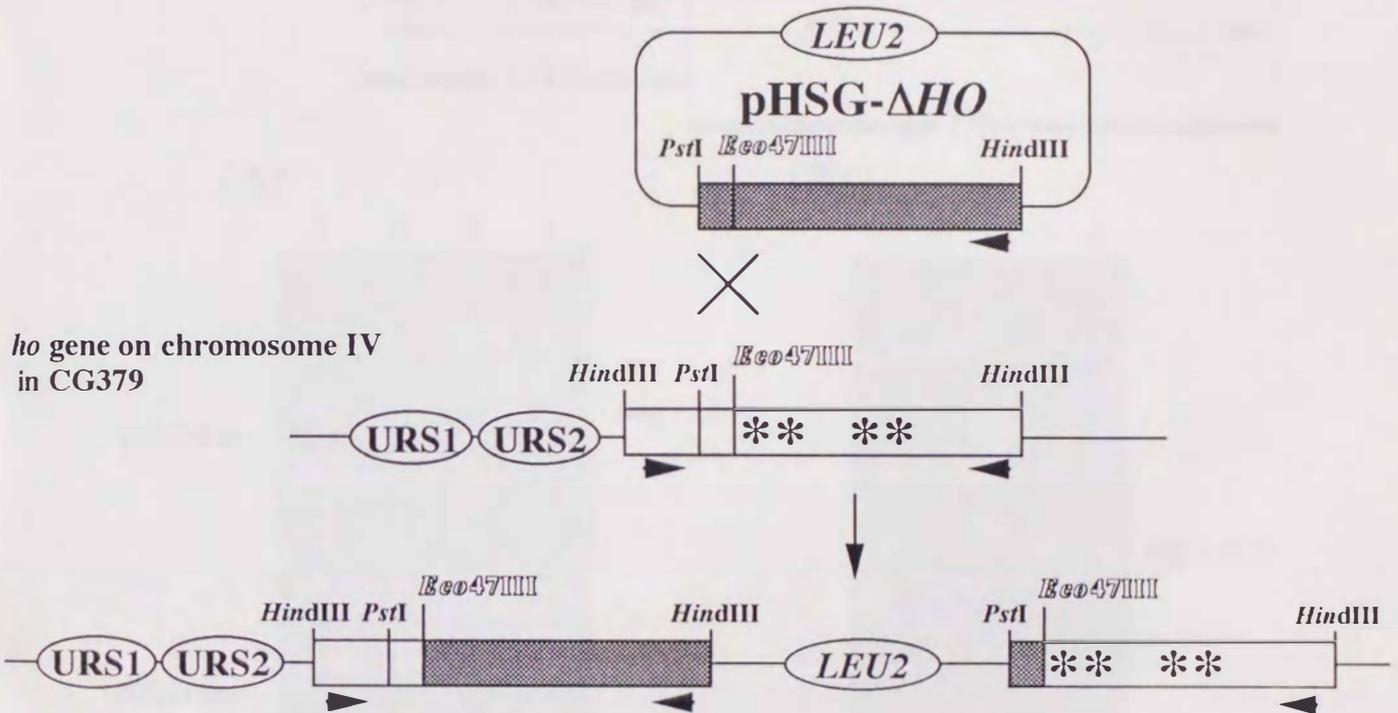
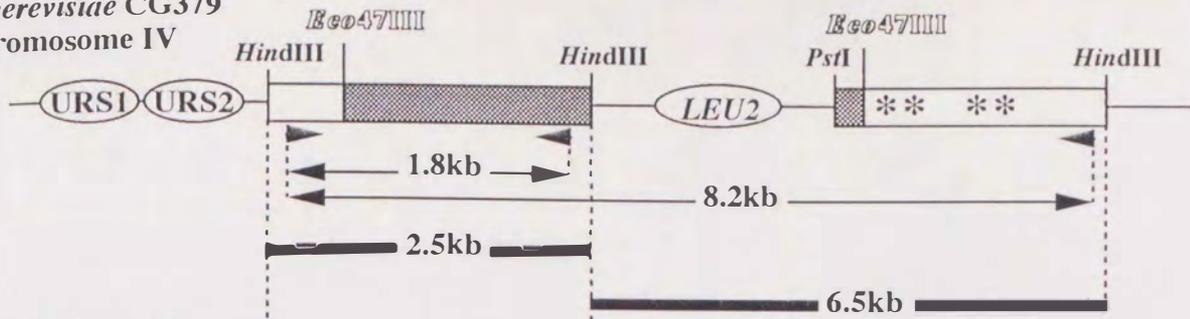


Fig.1-5 Integrative transformation of ΔHO into heterothallic strain CG379

Homologous recombination between *pHSG- ΔHO* and the *ho* gene is schematically depicted. Asterisks indicate amino acid mutations. *Eco47III*-digested *pHSG- ΔHO* is recombined at the *Eco47III* site in the *ho* gene. Arrowheads indicate the primers used for amplification of the recombinant *HO* gene.

S.cerevisiae CG379
chromosome IV



S.cerevisiae wy2
chromosome IV

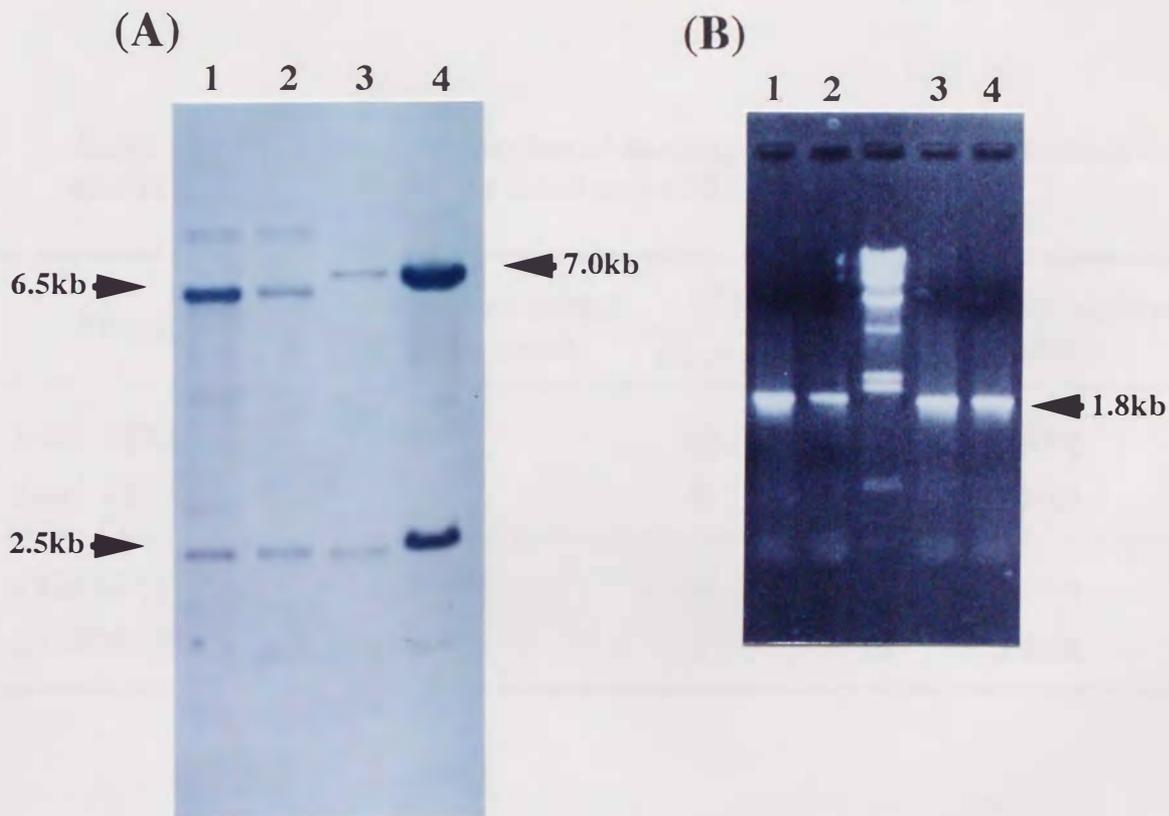
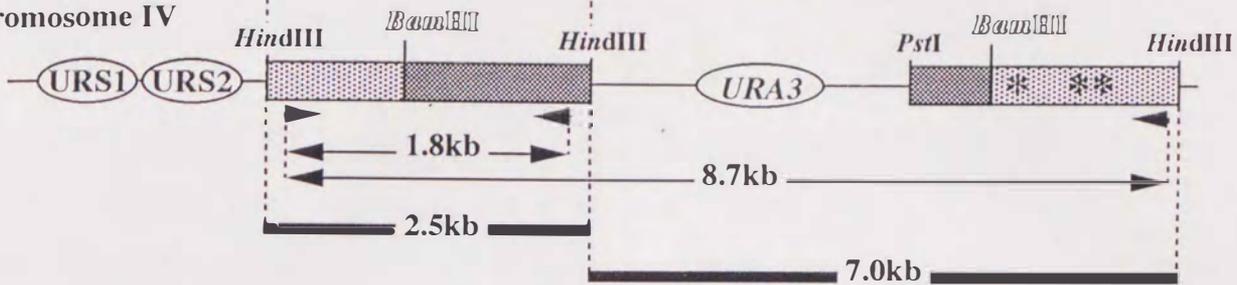


Fig.1-6 Analysis of the transformants by homologous recombination with pHS Δ *HO* and YIp5 Δ *HO*

Genetic maps of *ho* and *wy2HO* genes transformed with pHS Δ *HO* and YIp5- Δ *HO* are indicated. Arrowheads indicate the PCR primers used in this experiment.

(A) The Genomic DNAs were digested with *HindIII*. Hybridization was performed with 2.5-kb *HindIII* fragment containing the *HO* gene as a probe. Lanes; 1 and 2, CG379 transformed with the *Eco47III*-digested pHS Δ *HO*; 3 and 4, wy2 mater 14-d strain transformed with the *Bam*HI-digested YIp5- Δ *HO*. (B) Agarose gel electrophoresis of the recombinant *HO* genes amplified from the genomic DNAs of Δ *HO* transformants by PCR. The lane numbers are the same with (A).

Table 1-4. Self-interconversion of mating-type by transformation of *HO* gene into wy2 mater 14-d and CG379

Strains	Number of tested transformants	Mating ability		Sporulation ability
		Mater	Non-mater	
14-d (YEUp3)	10	10	0	0/10
14-d (YEUp3- <i>HO</i>)	10	0	10	10/10

CG379 (YEUp3)	10	10	0	0/10
CG379 (YEUp3 - <i>HO</i>)	10	0	10	10/10

Table 1-5. Amino acid alteration in wy2 HO and ho endonucleases

Position		Codon/Amino acid		
		<i>HO</i>	wy2 <i>HO</i>	<i>ho</i>
NT/AA				
565	189	ACA Thr	ACA Thr	GCA Ala
667	223	GGT Gly	GGT Gly	AGT Ser
875	292	TGG Trp	TAG —	TGG Trp
1214	405	TTA Leu	TTA Leu	TCA Ser
1424	475	CAT His	CTT Leu	CTT Leu
1588	530	GAA Glu	AAA Lys	GAA Glu

第2章 生活環を規定する wy2H0 及び ho 内のアミノ酸の特定

2 - 1 緒言

第1章において、遅延性ホモタリズム酵母 wy2 mater 14-d 株と、ヘテロタリズム酵母 CG379 株それぞれの H0 (ho) 遺伝子の塩基配列を決定し、正常な H0 遺伝子との比較から、アミノ酸レベルでそれぞれ 3 つ及び 4 つの相違が存在することが明らかとなった。wy2H0 の 2 番目のアミノ酸変異 (His⁴⁷⁵ → Leu⁴⁷⁵) は ho の 4 番目の変異と同一であり、この His は DNA 結合に関与すると考えられている。

我々が ho 遺伝子の塩基配列を決定したのと同時期に Meiron らによって ho 株である S288C 株の ho 遺伝子の解析が行われた。その結果、S288C 株の ho 遺伝子の配列は我々が決定した CG379 株の ho 遺伝子の配列と同一であった⁽⁴⁵⁾。彼らの報告によると、DNA 結合に関与すると考えられる 475 番目のアミノ酸 (His⁴⁷⁵) 唯一の変異のために H0 活性が失われ、ヘテロタリズム株においては性転換を生起しないものとされている。しかしながら、wy2 mater 株は遅延はするが、性転換現象を示すため、H0 活性は保持されているものと推察される。

そこで本章では、wy2H0 と ho において存在するアミノ酸変異が H0 活性に及ぼす影響について検討した。

2 - 2 実験方法

2-2-1 YEUp3-wy2H0 及び YEUp3-ho の構築

1-2-8 の pBluescriptII SK+ に挿入された wy2H0 遺伝子及び、ho 遺伝子それぞれの 2.5 kb HindIII 断片を酵母多コピー型プラスミド YEUp3 の HindIII 部位に導入し、YEUp3-wy2H0、YEUp3-ho を構築した。

2-2-2 *HO* 遺伝子の組換え体の構築

HO、*wy2 HO*、*ho* 遺伝子それぞれに共通に存在する制限酵素部位を用いて、*HO* 遺伝子の組換え体を構築した。各 *HO* 遺伝子の 0.85 kb *Hind*III-*Bam*HI 断片を fragment I、0.4 kb *Bam*HI-*Bgl*II 断片を fragment II、1.25 kb *Bgl*II-*Hind*III 断片を fragment III とした (*HO* 遺伝子は wt-I, II, III、*wy2 HO* 遺伝子は *wy2*-I, II, III、*ho* 遺伝子は *ho*-I, II, III と表記した)。まず、YEUp3 の *Hind*III 部位に挿入されたそれぞれの遺伝子を *Hind*III、*Bam*HI で消化し、0.85 kb *Hind*III-*Bam*HI 断片 (fragment I) と 1.65 kb *Bam*HI-*Hind*III 断片 (fragment II、III) それぞれを pHSG396 の *Hind*III-*Bam*HI 部位に挿入した。次に、pHSG396-*wy2*-II, III を *Bam*HI、*Bgl*II で消化し、*wy2*-II 0.4 kb 断片と pHSG396-wt-II, III を *Bgl*II、*Hind*III で消化して得た wt-III 1.25 kb 断片を同時に pBluescriptII SK+ の *Hind*III-*Bam*HI 部位に挿入した。また、逆に wt-II と *wy2*-III の断片を pBluescriptII SK+ の *Hind*III-*Bam*HI 部位に挿入したプラスミドも同様に構築した。以上の *wy2*-II/wt-III、wt-II/*wy2*-III の各 1.65 kb *Bam*HI-*Hind*III 断片を pHSG396 の *Bam*HI-*Hind*III 部位にサブクローニングした。

このようにして得られた fragment I を含む pHSG396 と fragment II, III を含む pHSG396 それぞれを *Hind*III、*Bam*HI で消化し、適当に組み合わせて YEUp3 の *Hind*III 部位に挿入し、2.5 kb の fragment I~III を含む様々な *HO* 遺伝子の組換え体を構築した (Fig. 2-1)。

2-2-3 *ho* の Ser²²³ 及び Leu⁴⁷⁵ におけるの部位特異的変異の導入⁽⁴⁶⁾

ho の Ser²²³ と Leu⁴⁷⁵ を正常な *HO* 型のアミノ酸 Gly²²³ 及び、His⁴⁷⁵ に置換するために、それぞれ Table 2-1 に示した変異導入プライマー及び、*Aat*II 部位を *Acc*I 部位に変換するセレクションプライマーを用いた。この操作において pUC19 をベクターとして用いるため、YEUp3-*ho* を *Hind*III で消化し、*ho* 遺伝子を含む断片を pUC19 の *Hind*III 部位に挿入し、pUC19-*ho* を構築し、鋳型 DNA として用いた。反応は U.S.E. mutagenesis kit (pharmacia) を用いて行った。1-2-10 の方法に準じ、

塩基配列を決定することで変異導入の確認を行った。

部位特異的変異の導入により *ho* の Ser²²³ と Leu⁴⁷⁵ をそれぞれ Gly²²³ 及び His⁴⁷⁵ に置換して得られたプラスミドを pUC19-*hoS223G* 及び pUC19-*hoL475H* とした (Fig. 2-2)。それぞれを *Hind*III で消化して得た 2.5 kb 断片を YEUp3 の *Hind*III 部位に挿入し、YEUp3-*hoS223G* 及び YEUp3-*hoL475H* を構築した。

Table 2-1. Primers used for site-directed mutagenesis.

Selection primer (convert the *Aat*II site to *Acc*I site)

5'-GAAAAGTGCCACCTGTCGACTAAGAAACCATTA-3'

Mutagenic primers

For *hoS223G* 5'-CTGTGGTTAGGTGACGGTACAACAAAAGAGCC-3'

For *hoL475H* 5'-GTGTGGGAGAACAGTATAAAATATCACAAAAA-3'

Nucleotides corresponding to Gly²²³ and His⁴⁷⁵ are indicated by white in black letters and *Acc*I site is underlined, respectively.

2-2-4 形質転換体の継代培養

HO 遺伝子の組換え体及び、部位特異的変異導入により作成した変異型 *ho* 遺伝子それぞれの形質転換体を 4 ml の uracil-free SD 液体培地に接種し、一晚 30℃ で振とう培養した。その培養液から、40 µl を新たな SD 液体培地に接種し、振とう培養を繰り返した。以上の操作を 20 回繰り返す、それぞれの継代培養毎の菌体を滅菌水で洗浄し、胞子形成培地に接種することで胞子形成能について検討した。

2 - 3 実験結果

2-3-1 wy2 HO 及び ho 遺伝子導入形質転換体の表現型

YEU $p3$ -wy2 HO 及び YEU $p3$ - ho それぞれをエレクトロポレーションによりヘテロタリズム株である CG379 に導入し、その表現型について検討した。その結果、wy2 HO 及び ho 遺伝子を導入したそれぞれの形質転換体はともに胞子を形成せず、表現型の変化は見られなかった。次いで、それぞれの形質転換体を、栄養要求性による選択圧をかけた状態で継代培養を行った。継代培養毎にその培養液の一部について胞子形成能を検討した。

その結果、 ho 遺伝子を導入した形質転換体は胞子を形成せず、表現型の変化が見られなかったのに対し、wy2 HO 遺伝子導入株は継代培養の後、wy2 mater 株と同様に、15回の継代培養から胞子を形成する自己二倍体化細胞の出現が確認された。

以上の結果から、この CG379 を宿主として、以後構築した様々な HO 遺伝子の表現型を検討した。

2-3-2 各種 HO 遺伝子導入形質転換体の表現型

wy2-I/wt-II, III 遺伝子 (HO 遺伝子と比較してアミノ酸変異は存在しない) 導入株は、形質転換直後に胞子を形成し、ホモタリズムの表現型を示した。wt-I/wy2-II, III 遺伝子 (wy2-II fragment 由来の Trp²⁹² の TAG amber 変異、wy2-III 由来の His⁴⁷⁵→Leu⁴⁷⁵ 及び Glu⁵³⁰→Lys⁵³⁰ 変異が存在する) 導入株は、wy2 mater 株と同様に継代培養を繰り返していくうちに自己二倍体化細胞の出現が確認された。ho-I/wt-II, III 遺伝子 (ho -I 由来の Thr¹⁸⁹→Ala¹⁹⁸ 及び Gly²²³→Ser²²³ 変異が存在する) 導入株は表現型に変化は見られず、ヘテロタリズムの表現型のままであった。以上の表現型がホモタリズム、ヘテロタリズム、遅延性ホモタリズムとこれまでに定義された表現型を示したのに対し、以下の遺伝子を導入した形質転換体はこれらとは異なる表現型を示した。

wt-I/wy2-II/wt-III 遺伝子 (wy2-II 由来の Trp²⁹² の TAG amber 変異のみが存在する) 導入株は wy2 mater 細胞と同様な表現型を示したが、wy2 mater 細胞が⁵ 15

回の継代培養から自己二倍体化細胞が出現し始めるのに対し、この形質転換体は 5 回の継代培養で孢子形成細胞が確認された (Fig. 2-3)。また、wy2-I/wt-II/wy2-III 遺伝子 (wy2-III 由来の His⁴⁷⁵→Leu⁴⁷⁵ 及び Glu⁵³⁰→Lys⁵³⁰ 変異が存在する) 及び、wt-I/ho-II,III 遺伝子 (ho-III 由来の Ser⁴⁰⁵→Leu⁴⁰⁵ 及び His⁴⁷⁵→Leu⁴⁷⁵ 変異が存在する) 導入株は、形質転換直後に孢子を形成し、ホモタリズムと同様な表現型を示した。しかしながら、その孢子形成率は *HO* 遺伝子の形質転換体と比較して約 35% と低かった (Table 2-2)。

一方、部位特異的変異導入により構築した変異型遺伝子のうち、*hoI475II* 導入株の表現型に変化は見られなかったのに対し、*hoS223G* 導入株は、孢子形成率は低いが孢子を形成し、ホモタリズムの表現型を示した (Fig. 2-2)。

以上の結果より、TAG amber codon が存在した場合、ナンセンスサプレッションが起り、自己二倍体化細胞が遅れて出現してくるものと考察した。また、DNA 結合に関与する His⁴⁷⁵ の変異が存在する場合、*HO* 活性が低下し、孢子形成能が低下するものと考察した。

2 - 4 考察

HO、*wy2HO*、*ho* 遺伝子それぞれを共通に存在する制限酵素部位を利用して組み合わせた *HO* 遺伝子のキメラを構築し、これらの遺伝子をヘテロタリズム酵母である CG379 株に導入し、その表現型について検討した。*wy2HO* 遺伝子を導入した形質転換体は *wy2mater* 株と同様な表現型を示し、15 回の継代培養で自己二倍体化細胞が出現した。この結果から CG379 株を、構築した遺伝子の表現型について検討する宿主として、以後の実験に用いた。

wt-I/wy2-II,III、wt-I/wy2-II/wt-III それぞれの形質転換体は遅延性ホモタリズムの表現型を示した。このことから、*HO* 遺伝子内にナンセンス変異が存在する場合、このナンセンスコドンにおいてサプレッションが起り、*HO* が正常に翻訳されるものと考

察した。wt-I/wy2-II/wt-III 遺伝子は正常な HO 遺伝子に TAG amber codon のみをもつ遺伝子であり、この形質転換体は wy2 mater 細胞が示す性転換の時期よりも継代培養のかなり早い時期に自己二倍体化細胞の出現が確認された。ナンセンスサブプレッションにより翻訳された wt-I/wy2-II/wt-III 遺伝子は、TAG 以外のアミノ酸変異が存在しないために正常なエンドヌクレアーゼ活性を保持しているため、継代培養の早い時期に自己二倍体化細胞が出現するものと考察した。このことから、DNA 結合に関与すると考えられる 475 番目の His が変異した HO では、DNA 結合活性が低下し、HO の活性低下を引き起こすものと考察した。wy2-I/wt-II/wy2-III 及び wt-I/ho-II, III 遺伝子は共通に 475 番目の His が変異した遺伝子であり、この形質転換体は遺伝子導入後すぐに胞子を形成する正常なホモタリズムと同様な表現型を示した。しかしながら、正常な HO 遺伝子導入株と比較してその胞子形成率は低かった。正常な HO と比較したこれらのキメラ HO が示す活性の低下は、475 番目のアミノ酸変異による DNA 結合活性の低下が起因しているものと考察した。この結論は上述の wt-I/wy2-II/wt-III の表現型に対する考察と一致するものである。

以上の結果は、His475 が HO 活性に critical であるとする Meiron らの報告とは矛盾する⁽⁴⁵⁾。そこで、部位特異的変異の導入により、変異型 ho 遺伝子を構築することで HO 活性に必須なアミノ酸を特定した。酵母に存在するエンドヌクレアーゼにおいて保存された領域内のアミノ酸変異である Ser²²³、及び DNA 結合に関与すると考えられるアミノ酸変異 Leu⁴⁷⁵ を、それぞれ正常な HO 型のアミノ酸に変換した hoS223G 及び hoL475H を構築した。これらの表現型について解析を行った結果、hoS223G を導入した形質転換体のみが HO 活性を保持していたことから Gly²²³ が HO 活性に必須であることが明らかとなった。

wy2 mater 株の *HO* 遺伝子、ヘテロタリズム株の *ho* 遺伝子の塩基配列を決定した結果、明らかとなったアミノ酸変異がその表現型に及ぼす影響について検討した。

wy2 mater 株に見られる遅延性ホモタリズム現象は、その *HO* 遺伝子に存在するナンセンス変異においてサプレッションが起こり、*HO* が正常に翻訳された結果、継代培養を繰り返していくうちに自己二倍体化細胞の出現が確認されるようになるものと考察した。また、その際翻訳される *HO* は DNA 結合に関与すると考えられる His⁴⁷⁵ が変異しているため、その活性が低下しているものと考察した。つまり、ナンセンスサプレッションと DNA 結合活性の低下が相互にかかわり合って、性転換が遅延する現象が生起するものと考察した。

また、*ho* 遺伝子に部位特異的変異を導入することにより、酵母に存在するエンドヌクレアーゼに保存された領域内のアミノ酸である Gly²²³ が *HO* の活性に必須であることを明らかにした。つまり、ヘテロタリズム株においてはこのアミノ酸変異により *HO* 活性が失われ、性転換が起こらないことが明らかとなった。

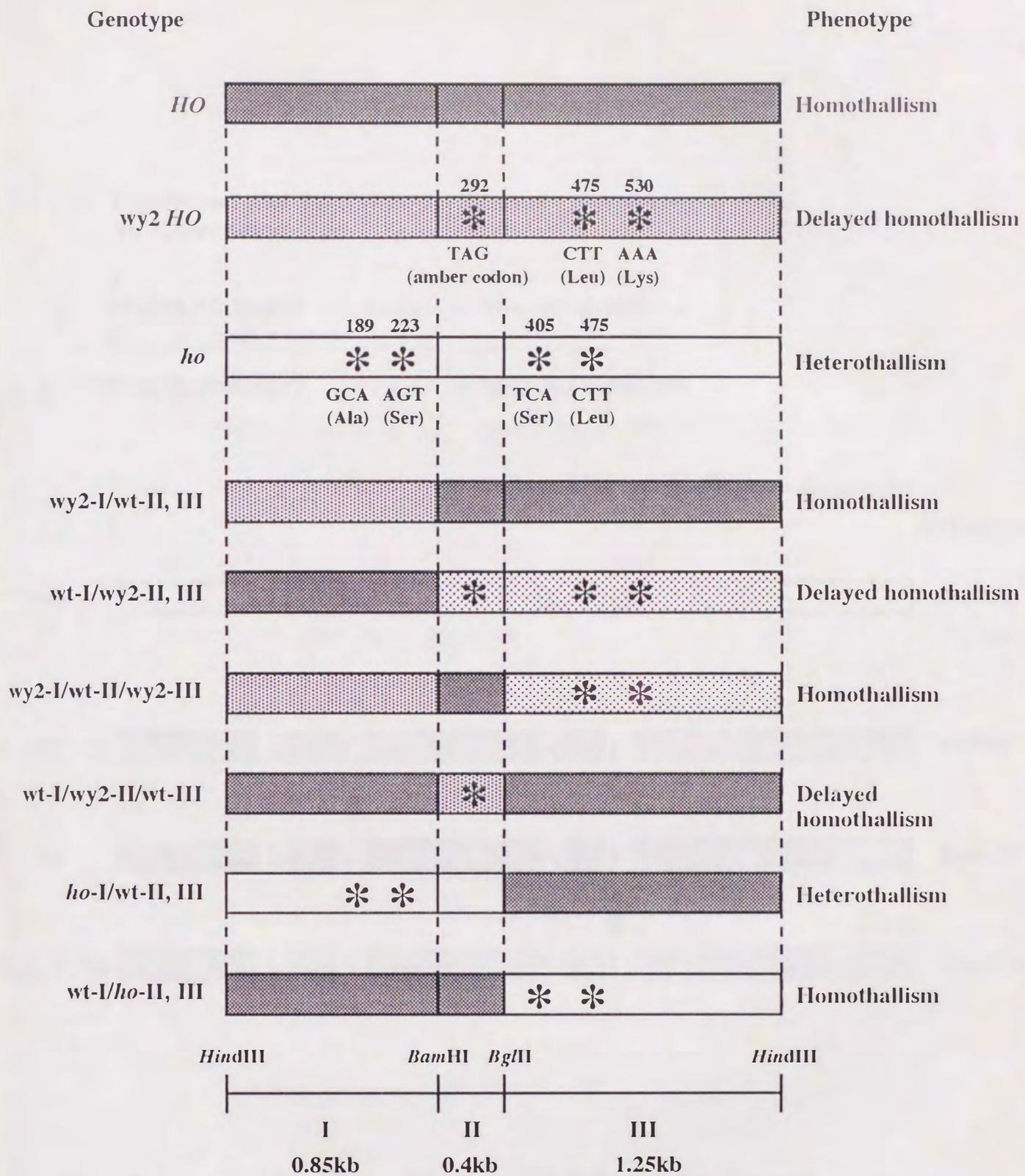


Fig.2-1. Construction of various types of chimeric *HO* gene

Common and unique restriction sites *Bam*HI and *Bgl*II are indicated within *HO*, *wy2HO*, and *ho* genes at the bottom, generating three fragments I, II, and III. Asterisks indicate amino acid mutations.

Conserved motifs of site-specific endonuclease
in *S.cerevisiae*

Y
--FLAGLIDGDGYF ---- ~100 a.a. ---- W--GF-DADGT-
W E S

HO ³²⁵FLAGLIDSDGYV (99 a.a.) ²¹⁴WMLGLWLGDTT
223

Cys-His zinc-finger domain

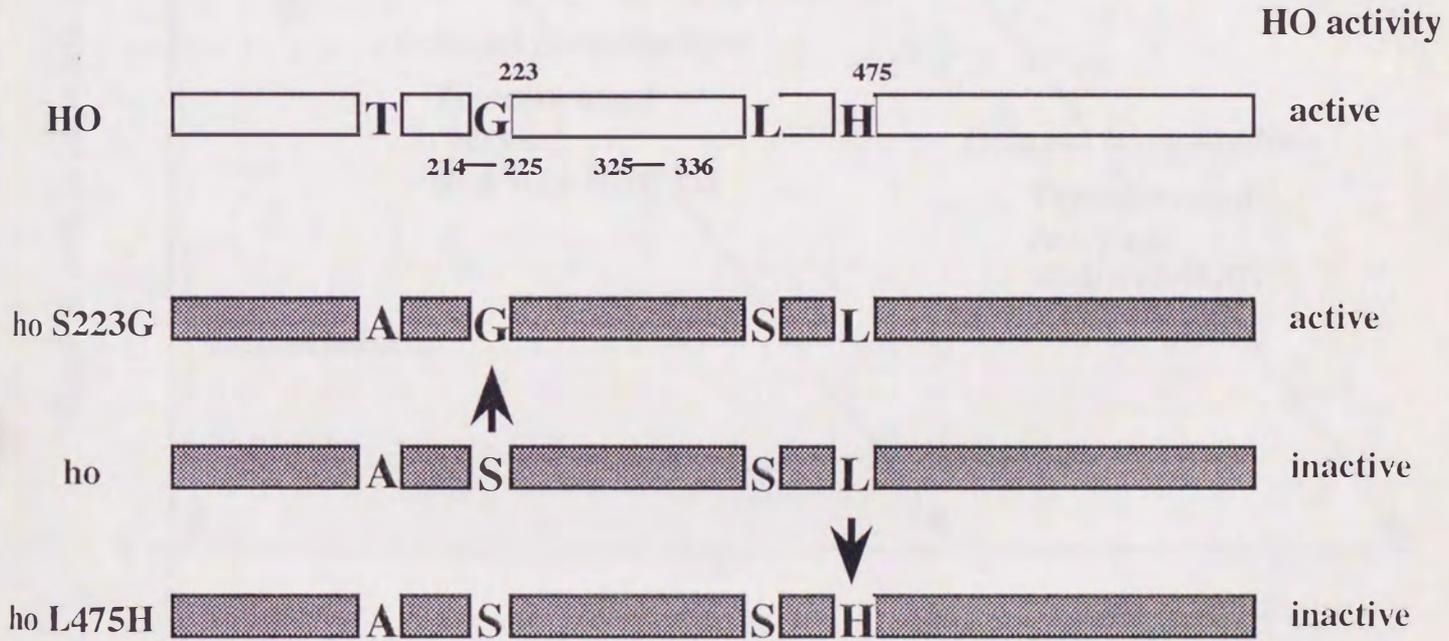


Fig.2-2. Functional analysis of amino acids in ho by site-directed mutagenesis

The conserved motifs of site-specific endonuclease in *S.cerevisiae* are shown. The numbers next to the amino acids (a.a.) represent the position in HO. HO endonuclease possesses these motifs at 214 to 225 and 325 to 336. Gly223 is present in these motifs. His475 is present in zinc-finger motifs concerned in DNA binding.

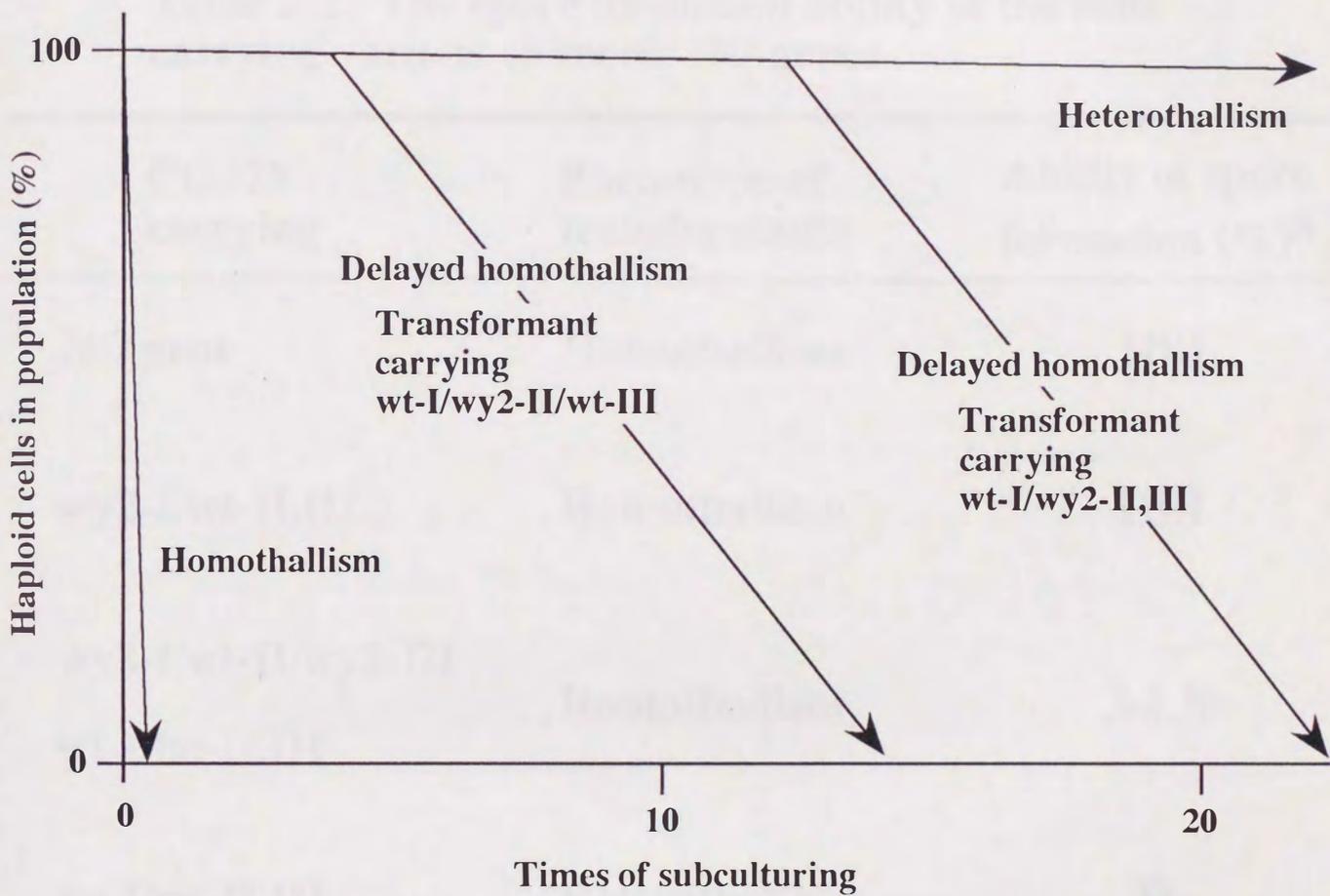


Fig.2-3. The conceptual life cycles of transformants with various *HO* genes

Life cycles of transformants carrying wt-I/wy2-II,III and wt-I/wy2-II/wt-III are shown in comparison with those of homothallism, heterothallism, and delayed homothallism.

Table 2-2. The spore formation ability of the cells carrying various chimeric *HO* genes

CG379 carrying	Phenotype of transformants	Ability of spore formation (%)^a
<i>HO</i> gene	Homothallism	100
wy2-I/wt-II,III	Homothallism	100
wy2-I/wt-II/wy2-III wt-I/ho-II,III	Homothallism	34.8
<i>ho</i> -I/wt-II,III	Heterothallism	0

a: The ability of relative spore formation.

3 - 1 緒言

wy2 mater 株においては、その *HO* 遺伝子内に TAG amber 変異が存在し、この TAG amber codon においてナンセンスサプレッションが起こり、DNA 結合能の低下による活性の低い *HO* が翻訳されるものと考察した。このために継代培養を繰り返していくうちに遅れて自己二倍体化細胞の出現が確認されるようになるものと考察した。ナンセンスサプレッサー遺伝子は mRNA からタンパク質への情報伝達のレベルで作用する情報的サプレッサー遺伝子（翻訳的サプレッサー遺伝子）である。酵母では各ナンセンスコドンに特異的なサプレッサー遺伝子と、UAA、UAG、UGA のいずれをも認識するオムニポテントサプレッサー遺伝子の存在が明らかとなっている。つまり、tRNA 遺伝子の変異のため、アンチコドンによるコドン認識の特異性の変化により生じるサプレッションと、リボソームの変異による翻訳の際の fidelity の低下により生じるサプレッションである。酵母においては数多くのサプレッサー遺伝子が見ついている⁽⁴⁷⁾。一倍体酵母ゲノムには約 360 の tRNA 遺伝子が存在し⁽⁴⁸⁾、ほとんどのものは gene cluster を形成していない⁽⁴⁹⁾。計算上では一種類のアミノ酸に対して平均 18 個の tRNA 遺伝子が存在する。しかしながら、例えば Gln をコードする CAG の tRNA 遺伝子はゲノム上に 1 コピーしか存在せず、その tRNA 遺伝子の変異は致死的である。これら tRNA 遺伝子の変異によるナンセンスサプレッサー tRNA が、終止コドンを認識するポリペプチド遊離因子と拮抗することでナンセンスサプレッションが起こる。また、この拮抗の程度によってサプレッサー効率が変わってくる。一方、オムニポテントサプレッサー遺伝子として *sup35*、*sup45* 等の存在が明らかとなっている。*SUP35* は Translational termination factor eRF3^(50, 51) を、また、*SUP45* は release factor eRF1 をコードしており、互いに相互作用を示す^(52, 53)。このほかに、サプレッサー遺伝子の効率を増

加させる *allosuppressor*、 ρ 等の細胞質性の因子もナンセンスサプレッションに関与していることが示唆されている。

本章では、*wy2 mater* 株においてナンセンスサプレッションが起こることを実験的に証明し、そのメカニズムの解明を試みた。

3 - 2 実験方法

3-2-1 プラスミド pSAK068H α -GAI μ t の構築

酵母 *S. cerevisiae* の mating factor α (MF α)^(54,55) のプロモーター、リーダーそしてターミネーター配列を含むプラスミド YEUp3H α を *EcoRI* で消化し、得られた 1.6 kb の DNA 断片を pSAK068 の *EcoRI* 部位に導入し、pSAK068H α を構築した (Fig. 3-1)。pSAK068 は integration vector である YIp5 に Ty- δ 配列を導入して構築されたものであり^(56,57)、染色体上に約 80 コピー以上存在すると考えられる δ 配列⁽⁵⁸⁾上に相同組換えにより目的遺伝子を導入するためのプラスミドである。次いで、先に当研究室においてクローニングされた *Aspergillus awamori* var. *kawachi* のグルコアミラーゼ I (GAI) の cDNA⁽⁵⁹⁾ を鋳型として、変異プライマーを用いた PCR を行った。PCR により 3 つ目のアミノ酸である Leu (TTG) に TAG amber 変異を導入した変異型 GAI cDNA を増幅した。鋳型は、GAI を酵母において発現・分泌するためのプラスミドで、上述の YEUp3H α に GAI cDNA を挿入した YEUp3H α -GAI を用いた。その際、本来のストップコドンである TAG を TAA に変換した。Forward primer として 5'-CTGAAGCTTCTGCGACC **TAG**GATTCG-3' を Reverse primer として 5'-GCCAAGCTT **TAA**CCGCCAGGTGTCG-3' を用いた(下線は *HindIII* 部位を、反転文字は amber codon を、枠囲み文字は TAA ochre codon をそれぞれ表す)。PCR 反応は 1-2-9 の方法に準じて行った。増幅された変異型 GAI 遺伝子はフェノール抽出、エタノール沈殿により精製し、*HindIII* 消化した後、pSAK068H α の *HindIII* 部位に導入し、pSAK068H α -GAI μ t とした (Fig. 3-1)。

3-2-2 形質転換体の GAI 分泌の確認

14-d 株及び CG379 株それぞれの形質転換体を 0.5% soluble starch を含む YPD plate で 30°C、3-4 日間培養した。ヨウ素の蒸気をあてコロニーのまわりのハローの有無によりグルコアミラーゼ分泌能を検討した。

グルコアミラーゼ活性は、以下の方法により粗酵素を調整し、測定した。まず、14-d 株及び CG379 株それぞれの形質転換体を 4 ml YPD liquid で 30°C で一晚培養した。次いで、培養液 1 ml を 100 ml の YPD 培地に接種し、30°C で 3 日間振とう培養した。培養上清を脱イオン水に対して、4°C で 2 日間透析した後、凍結乾燥を行った。0.5 ml の水に溶解し、培養上清の粗酵素とした。可溶性でんぷんを基質として用い、グルコアミラーゼ活性を測定した。0.5 ml の粗酵素溶液、2.5 ml の 1% 基質溶液及び 1 ml の 10 mM Mcllvaine buffer (pH 3.8) を混合し、40°C で 2 時間反応させた。生成グルコース量を DNS 法⁽⁶⁰⁾にて定量した。1 U のグルコアミラーゼ活性は、1 分間に 1 μ mol のグルコースを遊離する酵素力価とした。

また、14-d 株及び CG379 株それぞれの形質転換体を 100 ml SD 培地で上記と同様に培養し、得た粗酵素を用いて SDS-PAGE 用サンプルとし、抗 GAI 抗体によるウエスタン解析を行った。positive control として wild-type の GAI cDNA を pSAK068 により導入した形質転換体を用い、同様に粗酵素を調整し、サンプルとした。SDS-PAGE は Laemmli の方法⁽⁶¹⁾に準じた。GAI に対する抗体は当研究室において以前に作成されたものを用いた⁽⁶²⁾。タンパク質のプロッティング及び、抗 GAI 抗体を用いた検出は既報の方法に準じた⁽⁶³⁾。

3-2-3 wy2H0 の TAG amber mutation における部位特異的変異の導入⁽⁴⁶⁾

wy2H0 遺伝子内に存在する TAG amber mutation において起こると考えられるセンスサプレッションで、TAG codon 内の 1 塩基を変えることで生じるアミノ酸への変換を行った。1 塩基置換により生じるコドンについては Fig. 3-2 のコドン表において影で示した。2-2-1 で構築した YEUp3-wy2H0 を HindIII で消化して得た 2.5 kb 断片を pUC19 の HindIII 部位に挿入し、鋳型 DNA として用いた。セレクションブラ

イマーは 2-2-3 で用いたものと同じものを用いた。変異導入プライマーについては 3 種のミックスプライマーを用い、Table 3-1 に示した。部位特異的変異の導入は 2-2-3 の方法に準じて行い、1-2-10 の方法に準じて変異導入の確認を行った。これにより構築した 7 種の変異型 *wy2HO* 遺伝子 2.5 kb *HindIII* 断片を YEU_{p3} の *HindIII* 部位に導入した。それぞれ構築したプラスミドをエレクトロポレーションによりヘテロタリズム株 CG379 に導入した。

Table 3-1. Primers used for site-directed mutagenesis.

Mutagenic primers

For TAG to AAG, CAG, GAG

5'-AAATAATCCATTC **TAG** AAAGCTGTCACAAAT-3'

For TAG to TTG, TCG

5'-AAATAATCCATTC **TAG** AAAGCTGTCACAAAT-3'

For TAG to TAT, TAC

5'-AAATAATCCATTC **TAG** AAAGCTGTCACAAAT-3'

Nucleotides corresponding to TAG amber codon are indicated by white in black letters.

Mixed nucleotides are indicated as follows, V: A+C+G, Y: C+T.

3 - 3 実験結果

3-3-1 変異型 *GAI* 分泌の確認

pSAK068H α -*GAI*mut を δ 配列内に存在する *XhoI* 部位で切断、線状化し、14-d 株及び CG379 株に導入した。それぞれの形質転換体における TAG amber codon を導入した変異型 *GAI* の発現について検討した。まず、それぞれの形質転換体を可溶性でんぷんを含む YPD 培地で培養し、ヨウ素の蒸気をあてヨウ素澱粉反応によるハローの形成に

より GAI の発現を確認した。その結果、この plate assay においてはハローの形成は確認できなかった。次いで、DNS 法によるグルコアミラーゼ活性の測定を行った。その結果においても有為な活性は検出されなかった。

また、変異型 GAI 導入形質転換体の GAI 発現の確認を GAI のポリクローナル抗体によるウエスタンブロッティングにより行った。pSAK068H α -GAI μ t を導入した 14 d 株及び CG379 株それぞれの形質転換体から粗酵素を調整し、ウエスタン解析を行った。その結果、両サンプルにおいてシグナルが検出された。しかしながら、ポジティブコントロールと比較して、それらのシグナルは非常に弱いものであった (Fig. 3-3、Fig. 3-4)。

3-3-2 ナンセンスサブプレッションで挿入されるアミノ酸

wy2 HO 遺伝子の TAG codon の 1 塩基を置換した変異型 wy2 HO 遺伝子を構築し、その表現型について検討した。それぞれの形質転換体を栄養要求性による選択圧をかけた状態で継代培養を行い、その孢子形成能について検討した。0、5、10、15 回目の継代培養による孢子形成能につて Table 3-2 に示した。TAG を TAT (Tyr)、TAC (Tyr) に変換した変異体の形質転換体は形質転換直後に孢子を形成するホモタリズムと同様な表現型を示した。これに対し、AAG (Lys)、GAG (Glu) に変換した変異体導入株は孢子形成能が確認されず、表現型の変化は見られなかった。また、CAG (Glu)、TTG (Leu)、TCG (Ser) 変異体導入株は、形質転換後すぐには孢子形成が確認されなかったが、5 回目の継代培養後から孢子を形成する細胞が確認された (Table 3-2)。

3 - 4 考察

wy2 mater 株において起こると推察した TAG amber codon におけるナンセンスサブプレッションについて検討した。当研究室において、過去にその cDNA がクローニングされ、酵母での発現系が確立している黒麹菌のグルコアミラーゼ I (GAI) をサブプレッ

ション有無の検出に用いた⁶⁴⁾。GAI の 3 つ目の Leu (TTG) を TAG amber codon に変換した変異型 GAI の発現の検討を、wy2 mater 株と全ての H0 遺伝子の表現型の評価に用いた CG379 株において行った。

それぞれの形質転換体の発現量は非常に低く、ハローアッセイ及び、DNS 法による活性測定においてもその活性は検出できなかった。しかし、GAI 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、弱いながらシグナルを検出し、その発現を確認した。以上の結果から、wy2 mater 株及び CG379 株ではその効率は低いながらも TAG amber codon においてナンセンスサプレッションが起こっていることが明らかとなった。しかしながら、ある一つのコドンが読みとられる効率は、その位置によって影響を受けると考えられており、特定の tRNA によるナンセンスサプレッサーの効率も codon が置かれている位置の前後 (context) の影響を受けると考察され、変異型 GAI のサプレッサー効率が wy2 H0 のサプレッサー効率と全く同一ではないものと考察される。

変異型 GAI のアミノ酸配列から、ナンセンスサプレッションにより挿入されるアミノ酸の特定を試みたが、サプレッサー効率が低く必要なタンパク質量が取得できなかった。そこで、wy2 H0 遺伝子の TAG を 1 つの塩基を変えることで生じる 7 種のコドンに site-directed mutagenesis により変換した変異型の wy2 H0 遺伝子を構築した。それらのうち、H0 活性を相補する変異型 wy2 H0 から TAG codon に挿入されるアミノ酸を特定することでサプレッサー遺伝子の特定を試みた。その結果、wy2 H0 の 292 番目に正常な H0 のアミノ酸である Trp 以外に、Tyr が挿入した場合においても H0 活性を相補することが明らかとなった。また、Gln、Leu、Ser が挿入した wy2 H0 変異体は、それらの形質転換体が継代培養後においてのみ胞子を形成するようになることから、H0 活性は相補するが、その活性は正常な H0 と比較して低いものと考察した。

以上の結果から、H0 の amber codon においてナンセンスサプレッションにより Trp、Tyr、Gln、Leu、Ser のアミノ酸が挿入される可能性が示された。これらの tRNA の遺伝子は染色体上に、Trp (TGG) が 6 コピー、Tyr (TAT、TAC) が 8 コピー、Gln (CAG) が 1 コピー、Leu (TTG) が 10 コピー、Ser (TCG) が 1 コピー存在し、これらを解析しようとした場合、合計 26 個の tRNA 遺伝子について解

析しなくてはならない計算になる。1 コピーしか存在しない tRNA 遺伝子に変異が生じた細胞は致死的であるため、Gln、Ser の tRNA が変異している可能性は考えられないが、CAG を decode する tRNA^{Gln} は 1 つ目の塩基で wobbling を起こし、弱いながらも TAG を読みとる活性を有することが報告されている^(65,66)。また、CAA を decode する tRNA^{Gln} も TAA ochre codon に対して同様の活性を示す⁽⁶⁷⁾。これらのコドン特異的サプレッションに加えて、SUP35 や SUP45 等のコドン非特異的なオムニポテントサプレッションによる抑制の可能性も考えられる。wy2 株において起こるナンセンスサプレッションにおいてそのメカニズムは明らかではないが、wy2H0 の TAG に挿入されるアミノ酸の種類により H0 としての機能発現は影響を受けることが明らかとなった。

3 - 5 小括

wy2H0 遺伝子内に存在する TAG amber mutation において低い効率ではあるが、サプレッションが起こることが明らかとなった。遅延性ホモタリズムでは、H0 遺伝子においてナンセンスサプレッションが生じ、活性のある H0 を発現した細胞が自己二倍体化を起こし、継代培養を繰り返していくうちに徐々に二倍体細胞の割合が増加していくものと考察した。サプレッションにより挿入されるアミノ酸によって H0 活性に差が生じること及び、その抑制効率によっても自己二倍体化細胞の出現頻度が変わるものと考察されるが、wy2H0 に挿入されるアミノ酸及び、その抑制のメカニズムについては特定できなかった。

wy2H0 遺伝子内に存在する TAG amber mutation において低効率のナンセンスサプレッションが生じ、H0 が正常に翻訳されるようになることと、その際挿入されるアミノ酸も DNA 結合に関与する 475 番目の His の変異と同様に、H0 の機能に影響を及ぼすことに起因して、遅延性ホモタリズム現象は生起しているものと考察した。

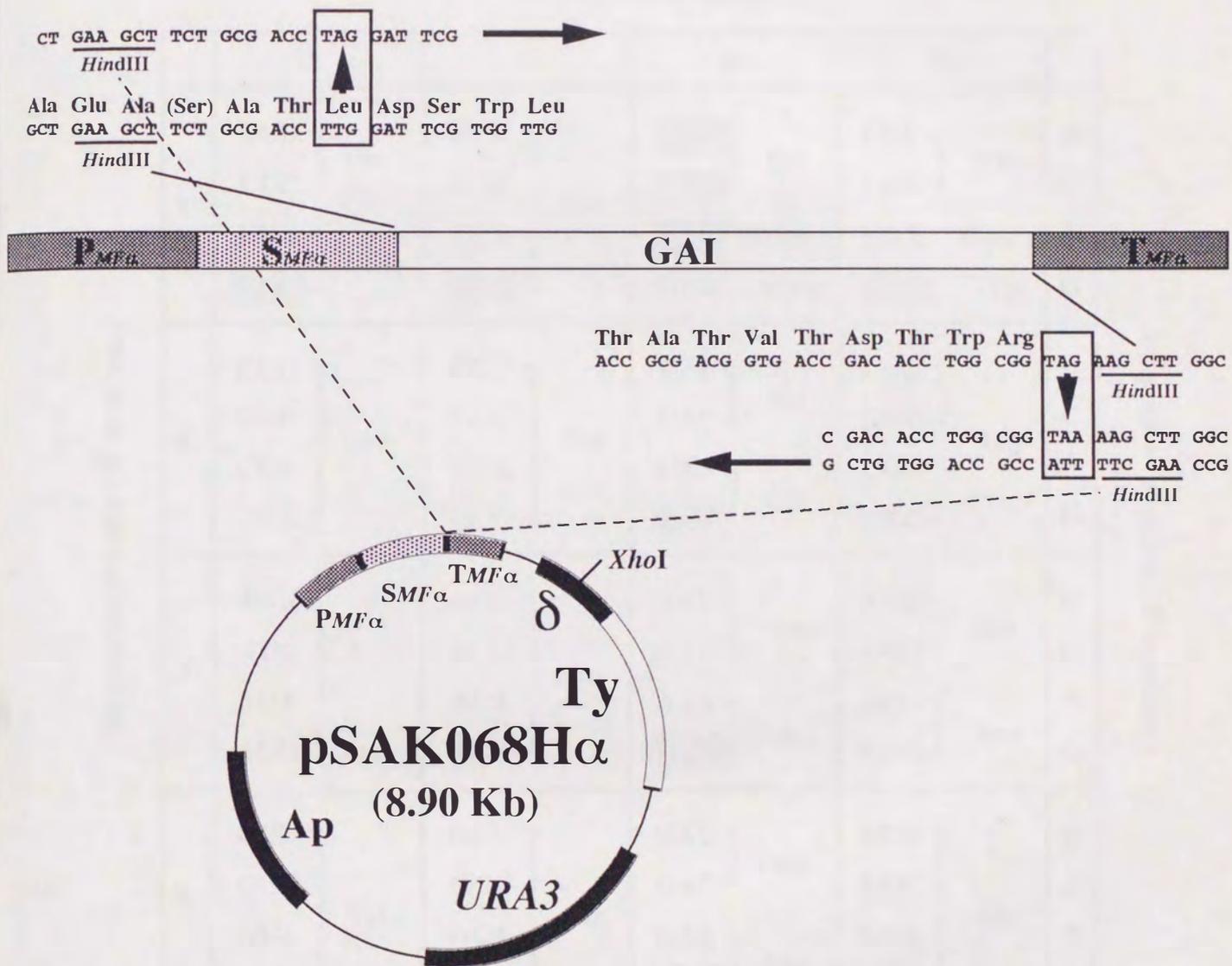


Fig.3-1. Construction of integrative plasmid pSAK068H α -GAI mut

pSAK068H α -GAI harboring *A.awamori* var.*kawachi* GAI gene containing TAG amber mutation. PMF α , SMF α , and TMF α indicate promoter, signal, and terminator sequence of mating factor α (MF α), respectively.

		2nd position of codon					
		U	C	A	G		
1st position of codon (5' terminus)	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } Ser UCC } UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } Ochre UAG } Amber	UGU } Cys UGC } UGA } Opal UGG } Trp	U C A G	3rd position of codon (3' terminus)
	C	CUU } Leu CUC } CUA } CUG }	CCU } Pro CCC } CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } Arg CGC } CGA } CGG }	U C A G	
	A	AUU } Ile AUC } AUA } AUG } Met	ACU } Thr ACC } ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G	
	G	GUU } Val GUC } GUA } GUG }	GCU } Ala GCC } GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } Gly GGC } GGA } GGG }	U C A G	

Fig.3-2. The genetic code

The shaded codons are generated from TAG amber codon by alteration of one nucleotide in the triplet.

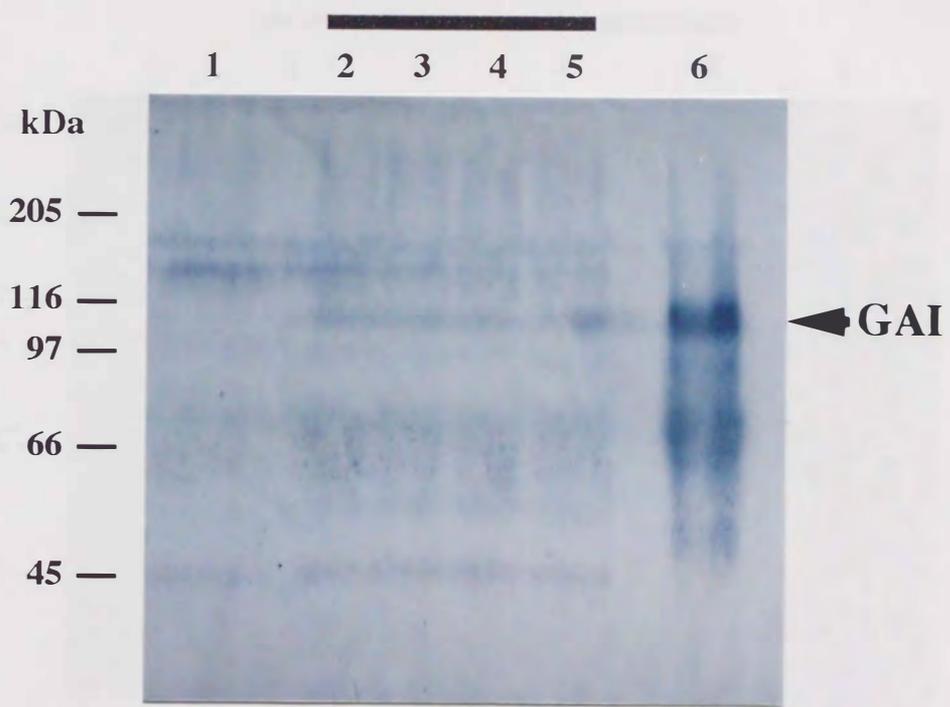


Fig.3-3. Western blot analysis of GAI containing amber mutation expressed in strain wy2 using anti-GAI antibody

Lane1; culture filtrate of wy2 mater strain 14-d (negative control), lane2-5, culture filtrate of wy2 mater strain 14-d transformed with pSAK068Hα-GAI mut containing TAG amber mutation, lane6; culture filtrate of wy2 mater strain 14-d transformed with pSAK068-GAI containing the wild-type GAI gene (positive control).

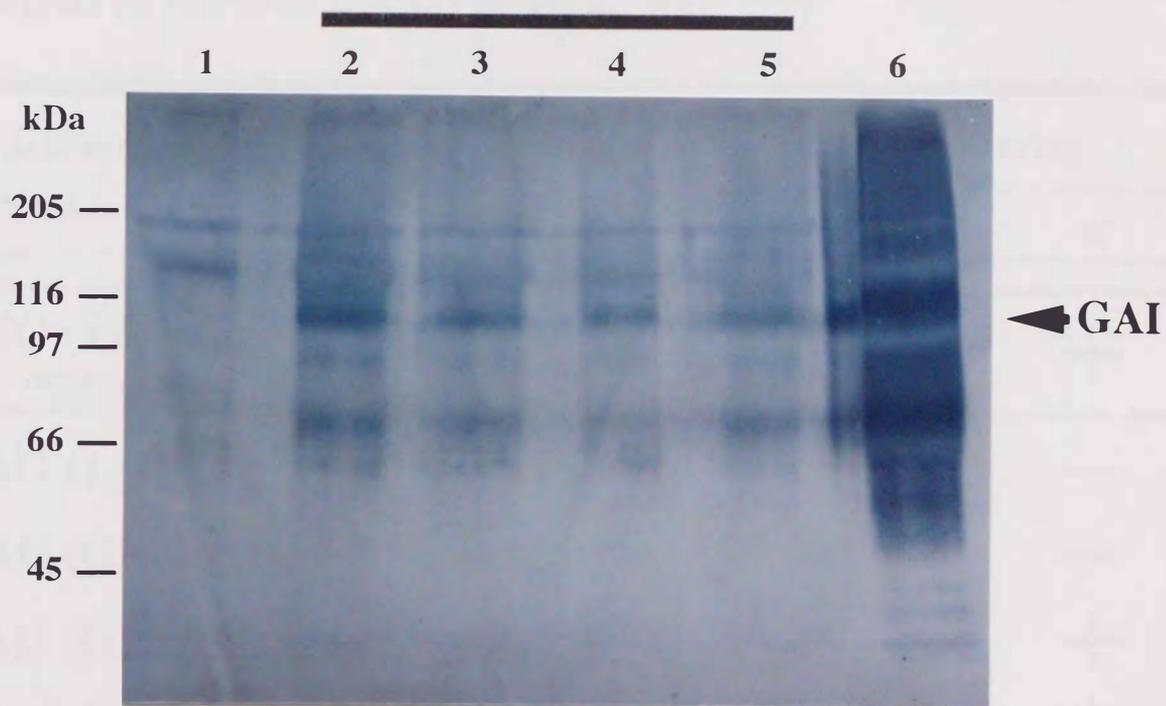


Fig.3-4. Western blot analysis of GAI containing amber mutation expressed in CG379 using anti-GAI antibody

Lane 1; culture filtrate of CG379 (negative control), lane 2-5, culture filtrate of CG379 transformed with pSAK068H α -GAI μ t containing TAG amber mutation, lane 6; culture filtrate of CG379 transformed with pSAK068-GAI containing the wild-type GAI gene (positive control).

Table 3-2. Analysis of HO activity by changing the nonsense mutation to various amino acids in wy2 HO

Amino acid mutation at 292 NT/AA	Sporulation ability during subculturing			
	0	5	10	15
TGG (Trp) (wild type)	+	+	+	+
AAG (Lys)	—	—	—	—
GAG (Glu)	—	—	—	—
CAG (Gln)	—	+	+	+
TTG (Leu)	—	+	+	+
TCG (Ser)	—	+	+	+
TAT (Tyr)	+	+	+	+
TAC (Tyr)	+	+	+	+

The HO activities were determined by the spore formations of transformants with various mutant *wy2HO* genes, which contain a point mutation at amino acid position 292. Appearance of spores are shown by +(spore formed) or -(spore unformed) during subcultures.

4 - 1 緒言

近年、遺伝子組換えによる実用酵母の育種法が開発され、酵母に異種タンパク質を生産させる試みが盛んに行われている。しかし、実用化するためには導入した遺伝子が選択圧のない条件下において安定に保持され、遺伝子産物が大量に発現される必要がある。実用酵母はその多くが二倍体以上の高次倍数体であり、通常の実験室酵母に比べて多コピー型 (YEp 型) プラスミドを安定に保持することが示唆されている。特にビール酵母では実験室株に比べ、YEp 型プラスミドを安定に保持するという事実が報告されており⁽⁶⁸⁾、安定性の因子として、一つにはその倍数性の高さが関与していると推察されている。また、高次倍数体では染色体組込み型 (YIp 型) プラスミドの標的となる対立遺伝子が複数存在することになる。従って、高次倍数体は異種タンパク質生産のための宿主として有用であると考えられる。

先に、田仁らは、清酒酵母において減数分離体を高効率に取得するために熱処理を行った際、接合能を示す二倍体細胞が高頻度に出現することを見出した⁽²⁷⁾。このような二倍体化は、胞子発芽時の熱処理が引き金となって細胞周期において DNA の複製後、出芽を伴わずに G1 期に移行し、さらに DNA 複製を生じることで同質二倍体化が起こるものと考察されている。本法は、遺伝子マーカーのない野生株における倍数体造成にも利用できる点で、育種法としての応用価値は高い。

また、当研究室では、黒麹菌のグルコアミラーゼの cDNA がクローニングされており、YEp 型プラスミドを用いた酵母での発現・分泌システムが確立している⁽⁶⁴⁾。醸造用酵母として一般に使用される *S. cerevisiae* は、グルコアミラーゼ、 α -アミラーゼ等の澱粉分解酵素を菌体外に生産しないため、澱粉を直接資化することができない。澱粉資化性酵母として *S. diastaticus*、*Saccharomycopsis fibuligera* 等が知られているが、澱粉分解力、エタノール発酵力が不十分なことから、実用性には問題がある。清酒、ビー

ル等の醸造原料である米、麦芽等は成分的に澱粉が大部分を占めるため、酵母による発酵を行う前に麴、麦芽等の糖化酵素、あるいは、酵素剤を用いてこれら澱粉をあらかじめ液化・糖化しておく必要がある。従って、グルコアミラーゼ、 α -アミラーゼ等の澱粉分解酵素を生産する酵母は液化・糖化工程の短縮、原料利用効率の向上、酵素剤使用量の低減化などが図れることから、産業上その利用価値は非常に高い。

本章では、高次倍数体の異種遺伝子発現の宿主としての有効性を検討した。当研究室において確立された孢子発芽時の熱処理により造成した高次倍数体への GAI 遺伝子の導入を試みた。さらに、高次倍数体造成法を応用し、異種遺伝子導入後の一倍体細胞に対して熱処理を行い、倍数性の増加に伴う導入遺伝子の増幅を試みた。

4 - 2 実験方法

4-2-1 使用菌株

以下の *S. cerevisiae* 一倍体標準株を使用した。CG378 (*MAT α* , *ura3*, *leu2*, *trp1*), CG379, IF010175 (*MAT α* , *arg6*), IF010176 (*MAT α* , *arg6*)。

4-2-2 プラスミド pSAK068-GAI の構築

染色体組込み型プラスミドである pSAK068 は三菱化成生命科学研究所より分譲いただいた^(56,57)。YEUp3H α -GAI は、当研究室で構築されたグルコアミラーゼを菌体外に効率よく分泌させることができるプラスミドである。このプラスミドは酵母の 2 μ m DNA *ori* と *URA3* を選択マーカーをしてもつ酵母発現ベクター YEUp3 に酵母の MF α 1 遺伝子のプロモーターからシグナル配列、ターミネーターまでを含む領域を挿入して構築した YEUp3H α の *HindIII* 部位に GAI cDNA を挿入したものである。

この YEUp3H α -GAI を *EcoRI* で消化し、MF α プロモーター、シグナル配列、ターミネーター及び、GAI cDNA を含む約 3.4 kb 断片を pSAK068 の *EcoRI* 部位に導入し、pSAK068-GAI を構築した (Fig. 4-1)。

4-2-3 プラスミド pSAK068 (LEU2)-GAI の構築

1-2-5 で構築した pHSG299-LEU2 を pHSG299 のマルチクローニング部位に存在する *Sma*I、*Sph*I で消化した。pSAK068-GAI を *Sma*I、*Sph*I で消化し、pSAK068 の *URA3* 遺伝子を含む 2.0 kb の断片を *LEU2* 遺伝子を含む 2.2 kb の *Sma*I-*Sph*I 断片と入れ換え、pSAK068 (LEU2)-GAI を構築した (Fig. 4-1)。

4-2-4 プラスミド YEUTp3-HO の構築

大阪大学の原島教授より分譲していただいた YCpHIS4⁽⁶⁹⁾ を *Eco*RI で消化して得た *TRP1* 遺伝子を含む 1.5 kb 断片を、1-2-3 で構築した YEUp3-HO の *Eco*RI 部位に導入し、YEUTp3-HO を構築した。

4-2-5 ウラシル要求性 α 型一倍体株の取得

4 種の一倍体標準株 CG378、CG379、IF010175、IF010176 をそれぞれ 4 ml YPD 培地で一晚培養した。YPD plate 上で CG378 と IF010176、CG379 と IF010175 をそれぞれ混合し、接合を行った。30°C で 6 時間静置培養し、接合子をマイクロマニピュレーターで単離し、30°C で 3 日間培養した。胞子形成培地で 30°C、3 日間培養し、Zymolyase agar (1/15 M phosphate buffer、0.01 M 2-Mercaptoethanol、1 mg/ml Zymolyase 20-T、1.5% agar) 上で子のう壁を分解し、胞子を分割した。uracil-free SD 培地でのみ増殖できず、他のアミノ酸欠損 SD 培地では増殖できる一倍体細胞を取得した。

4-2-6 高次倍体化細胞の取得⁽²⁸⁾

a 型の一倍体細胞と α 型の一倍体細胞との交雑、あるいは、 α 型の一倍体細胞に正常な *HO* 遺伝子を導入することにより a/ α 型の二倍体化細胞を取得した。また、a/a 型の二倍体細胞と α/α 型の二倍体細胞との交雑により a/a/ α/α 型の四倍体細胞を取得した。以上の heterozygous な二倍体、四倍体細胞から胞子を形成させた。その胞子を 4 ml YPD 培地で 30°C、30 分間振とう培養した。集菌後、菌体を洗浄し、55°C で

10 分間熱処理を行った。集菌後、Zymolyase 溶液 (0.6 M KCl、1/15 M phosphate buffer、0.01 M 2-Mercaptoethanol、1 mg/ml Zymolyase 20-T) に懸濁し、37°C で 60 分間培養した。集菌後、洗浄し、0.05% Tween 80 に懸濁した。超音波破碎機 (Tosho electronic corp. UCD-130) にて level 2 で、10 分間処理した。顕微鏡で胞子を観察し、胞子がバラバラになるまでこの操作を繰り返した。適当に希釈して YPD plate にスプレッドし、30°C で 3 日間培養した。

4-2-7 倍数性の判定

4-2-6 で取得したコロニーのうち、まず、標準株である CG378 と CG379 との接合によって接合能の有無を検討した。次いで、接合能を有する細胞でサイズが大きなものについて DNA 含量を測定した。これらの値を一倍体標準株の値と比較し、倍数性を判定した。DNA 含量の測定は以下の方法で行った。血球計測版により菌数を測定し、 1×10^9 の細胞を集菌し、Burton の方法⁽⁷⁰⁾に基づいた Aigle らの変法⁽⁷¹⁾に従い、DNA を抽出後、diphenylamine による比色定量を行った。

4-2-8 形質転換高次倍数体の GAI 活性

それぞれの形質転換体を 4 ml YPD 培地で 30°C 3 日間培養した。0.5 ml の培養上清を粗酵素として、グルコアミラーゼ活性を測定した。活性測定は 3-2-2 方法に準じ、DNS 法により行った。

4-2-9 pSAK068-GAI 導入形質転換体の染色体の解析

それぞれの形質転換体の染色体 DNA をパルスフィールドゲル電気泳動により分離し、GAI 遺伝子の導入について解析を行った。以下の方法によりパルスフィールドゲル電気泳動のサンプルを調整した。

菌体を 30 ml YPD で 30°C で一晩培養し、集菌後、50 mM EDTA (pH 8.0) で 2 回洗浄した。50 mM EDTA (pH 8.0) 1 ml に懸濁し、3 mg/ml Zymolyase と 42°C に保温した 1% low melting point agarose 1 ml を加え、100 μ l ずつ mold に入

れ、4℃ で 30 分間放置した。0.5 M EDTA (pH 8.0) 5 ml と 1% 2-Mercaptoethanol を入れた試験管にプラグを抜き出して入れ、37℃ で 24 時間反応させた。ES solution (0.45 M EDTA [pH 9.5]、1% N-Lauroylsarcosine Na) で 2 回洗浄後、ES solution 5 ml と 1 mg/ml Proteinase K を加え、溶液を変えながら 50℃ で 48 時間反応させた。TE buffer で 3 回洗浄し、泳動用サンプルとした。調整したサンプルは 0.5 M EDTA (pH 8.0) 中、4℃ で保存した。

サンプルプラグをパルスフィールドゲル電気泳動にかけ染色体を分離した。電気泳動の手順は、Pharmacia LKB pulse field gel electrophoresis protocol に準じた。

パルスフィールドゲル電気泳動により分離した染色体 DNA に対し、pUC119-GAI より調整したプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。

Electrophoresis run parameter

Pulse time : 70 / 120 s
Run time : 15 / 10 = 25 hr
Voltage : 200 V
Gel : 1% agarose
Cooler temp : 10℃
Buffer : 0.5 X TBE

4-2-10 発酵試験

10% soluble starch を糖源とした完全合成培地により、30℃、20 日間の発酵試験を行った。初発の菌数は 5×10^7 cells/ml とし、24 時間おきの炭酸ガス減量の測定を行った。また、発酵試験後の培養液のエタノール濃度はガスクロマトグラフィーにより定量した。