

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：



4-3 実験結果

4-3-1 高次倍数体の造成

当研究室の保存菌株である接合型標準株の交雑によりウラシル要求性一倍体細胞を取得した。CG379 と IF010175 との交雑より得られた a 型株を SEG1、CG378 と IF010176 の交雑より得られた α 型株を SEG2 とした。この SEG1 と SEG2 との交雑により取得した a/α 型二倍体細胞を 55°C 、10 分間の熱処理を行った。取得した細胞の接合型及び DNA 含量を測定し、同質の二倍体株 D-1 (a/a)、D-2 (α/α) を造成した。また、D-1 と D-2 の交雑から $a/a/\alpha/\alpha$ 型四倍体細胞を取得し、同様の方法により同質の四倍体株 T-16 ($\alpha/\alpha/\alpha/\alpha$) を取得した。Fig. 4-2 にそれぞれの高次倍数体の顕微鏡写真を示した。SEG2、D-2、T-16 について、細胞の長径と短径を測定した結果を Table 4-1 に示した。体積は、酵母細胞を楕円形と考え、長径と短径より算出した。

Table 4-1. Cell size of polyploid strains

Strain	Length (μm)	Width (μm)	Volume (μm^3)	Ploidy
SEG2	4.32	4.17	39.3	1
D-2	6.65	4.90	83.6	2
T-16	11.8	5.60	193.7	4

4-3-2 SEG2、D-2、T-16 の YEUp3H α -GAI 導入株

グルコアミラーゼ発現ベクター YEUp3H α -GAI を各倍数性株 SEG2、D-2、T-16 にエレクトロポレーション法により導入した。それぞれの形質転換体の培養上清についてグルコアミラーゼ活性を測定した。その結果を Table 4-2 に示した。D-2 及び T-16 は

SEG2 の約 1.5 倍の活性を示した。また、単位菌数 (1×10^8 cells) あたりの活性として計算した場合、SEG2 と比較して、D-2 で約 3 倍、T-16 で約 5 倍の活性の上昇が認められた。

Table 4-2. GA activities of transformants in culture supernatant

Plasmid	Host strain	Ploidy	Population (ml^{-1})	GA activity	
				(U/ml)	(U/ 10^8 cell)
YEU $\text{p3H}\alpha$ -GAI	SEG2	1	2.0×10^8	0.9	0.4
	D-2	2	1.3×10^8	1.4	1.1
	T-16	4	0.6×10^8	1.4	2.2

GA; glucoamylase

4-3-3 SEG2、D-2、T-16 の pSAK068-GAI 導入株

得られた各倍数性株 SEG2、D-2、T-16 に pSAK068-GAI を導入した。pSAK068-GAI はその δ 配列内に存在する *Xho*I 部位で切断して形質転換に用いた。それぞれの形質転換体について培養上清のグルコアミラーゼ活性を測定した。その結果を Table 4-3 に示した。単位菌数 (1×10^8 cells) あたりの活性には上昇がみられたが、培養液あたりの活性には違いがみられなかった。YEU $\text{p3H}\alpha$ -GAI を用いた場合は倍数性の増加とともに活性の上昇が確認されたのに対し、pSAK068-GAI を用いた場合は、大きな活性の違いは認められなかった。

Table 4-3. GA activities of transformants in culture supernatant

Plasmid	Host strain	Ploidy	Population (ml ⁻¹)	GA activity	
				(U/ml)	(U/10 ⁸ cell)
pSAK068-GAI	SEG2	1	2.0 x 10 ⁸	1.0	0.5
	D-2	2	1.3 x 10 ⁸	1.1	0.8
	T-16	4	0.6 x 10 ⁸	1.0	1.6

GA; glucoamylase

4-3-4 pSAK068-GAI 導入形質転換体の染色体の解析

SEG2、D-2、T-16 各倍数性菌株の pSAK068-GAI による形質転換体の染色体について解析した。それぞれの形質転換体の染色体をパルスフィールドゲル電気泳動により分離した後、GAI 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。その結果、いずれの菌株においても一本の染色体上にのみに GAI 遺伝子の組込みが確認された (Fig. 4-3)。

4-3-5 pSAK068-GAI 導入形質転換体からの高次倍数体の造成

pSAK068-GAI を CG379 株に導入し、形質転換体 50 株 GHM-1~GHM-50 を取得した。ハローの形成により GAI 発現分泌株を確認し、そのうち活性の高かった株 GHM-35 から 4-2-6 の方法に準じて、二倍体株 GDM-3524 (α/α)、四倍体株 GTM-3507 ($\alpha/\alpha/\alpha/\alpha$) を取得した。GHM-35 からの α/α 型二倍体細胞の取得は、まず、GHM-35 に、LEU2 を選択マーカーとしてもち、正常な *H0* 遺伝子を含んでいる YEp13 43A をエレクトロポレーションにより導入して取得した。この自己二倍体化細胞を YPD 液体培地で数回継代し、YEp13 43A を脱落させた。以上のようにして得た GHM-35 の α/α 型二倍体細胞の胞子から同質二倍体化細胞 GDM-3524 を取得した。同質四倍体化細胞 GTM-3507 は、GDM-3524 取得の際に出現する α/α 型細胞との交雑により $\alpha/\alpha/\alpha/\alpha$ 型四倍体細胞を取得し、胞子形成後、熱処理により得られた同質の四倍体細胞より選出した。それぞれの倍数性酵母のグルコアミラーゼ活性を測定した。その結果を Table 4-4

に示した。倍数性の増加とともにグルコアミラーゼ活性の上昇が認められた。また、単位菌数あたりのグルコアミラーゼ活性は倍数性にほぼ比例しており、gene dosage によるグルコアミラーゼ活性の上昇が確認された。

また、以上の構築した GHM-35、GDM-3524、GTM-3507 の 3 株を用いて 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。その結果、倍数性の増加とともに良好な発酵経過を示した。しかしながら、最終的な CO₂ 発生量はグルコースを糖源として用いた場合と比較して約 50% であった (Fig. 4-4)。

Table 4-4. GA activities of parental haploid GHM-35, diploid and tetraploid mater cells in culture supernatant

Host strain	Ploidy	Population (ml ⁻¹)	GA activity (U/ml) (U/10 ⁸ cell)	
GHM-35	1	1.6 x 10 ⁸	0.8	0.5
GDM-3524	2	1.1 x 10 ⁸	1.4	1.3
GTM-3507	4	0.9 x 10 ⁸	2.0	2.3

GA; glucoamylase

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

染色体上への GAI 遺伝子導入形質転換体を親株とした高次倍数体の造成により、gene dosage によるグルコアミラーゼ活性の上昇が認められたため、GAI 遺伝子を複数の染色体上に導入した一倍体細胞の取得を試みた。まず、CG379 株に pSAK068-GAI を導入し、GAI 活性の高かった 4 株 GHM-49、GHM-68、GHM-72、GHM-79 を取得した。これら 4 株を宿主としてさらに、pSAK068 (LEU2)-GAI を導入した。それぞれの 4 株を宿主として取得した形質転換体のうち活性の高かった一株ずつ、GHM-4925、GHM-

GHM-6859、GHM-7244、GHM-7943 を選出した。以上 4 株について染色体をパルスフィールドゲル電気泳動により分離後、GAI 遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションにより GAI 遺伝子の染色体上への導入について検討した。その結果、GHM-4925 は IV 番と V あるいは VIII 番染色体上に、GHM-6859 は IV 番と XIII あるいは XVI 番染色体上に、GHM-7244 は III 番と VII あるいは XV 番染色体上に、GHM-7943 は I 番と X 番染色体上にそれぞれ 8 配列による GAI 遺伝子の導入を確認した。これら二本の染色体上に GAI 遺伝子を導入した 4 株の α 型一倍体細胞についてグルコアミラーゼ活性を測定した。その結果、一度の形質転換により GAI 遺伝子を導入した株 (SEG2 あるいは GHM-35) と比較してグルコアミラーゼ活性が上昇したことから、GAI 遺伝子を導入した染色体数の増幅によりグルコアミラーゼ活性の上昇を確認した。

4-3-7 交雑による一倍体細胞中での遺伝子増幅

二度の形質転換により二本の染色体上に GAI 遺伝子が導入した GHM-4925、GHM-6859、GHM-7244、GHM-7943 を用いて一倍体細胞におけるさらなる GAI 遺伝子の増幅を試みた。まず、GHM-7244 と GHM-7943 に YEUTp3-*HO* を導入した。両形質転換体を YPD 液体培地で継代培養し、YEUTp3-*HO* を脱落させた。胞子形成後、マイクロマニピュレーターを用い、四分子を分離し、それぞれの α 型細胞 GHM-7244(a)、GHM-7943(a) を取得した。GHM-4925 と GHM-7244(a)、GHM-6859 と GHM-7943(a) をそれぞれ交雑し、その交雑株の胞子を四分子分離した。GHM-4925 と GHM-7244(a) の交雑株、GHM-6859 と GHM-7943(a) の交雑株それぞれから α 型一倍体細胞 GHT-127、GHT-478 を取得した。さらに、上記と同様に方法により GHT-127 と GHT-478 の α 型細胞の交雑から GHP-251 を取得した。GHT-127 の取得方法を例として模式的に Fig. 4-5 に示した。それぞれ取得した α 型一倍体細胞の染色体をパルスフィールドゲル電気泳動により分離後、GAI 遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションにより GAI 遺伝子の導入を検討した。その結果、GHT-127 は IV 番、V あるいは VIII 番、VII あるいは XV 番染色体上に、GHT-478 は I 番、X 番、XIII あるいは XVI 番染色体上に GAI 遺伝子の導入を確認した。また、GHP-251 は I 番、IV 番、V あるいは VIII

番、X 番、XIII あるいは XVI 番染色体上に GAI 遺伝子の導入を確認した。

以上の結果より、3 本の染色体上に GAI 遺伝子が導入した α 型一倍体細胞 GHT-127 及び GHT-478 を、さらに、5 本の染色体上に GAI 遺伝子が導入した α 型一倍体細胞 GHP-251 を取得した (Fig. 4-6)。それぞれのグルコアミラーゼ活性測定の結果、一倍体細胞中における GAI 遺伝子の増加により、グルコアミラーゼ活性の上昇が確認された。特に GHP-251 においては一度の形質転換により GAI 遺伝子を導入した株 (SEG2 あるいは GHM-35) と比較して約 6 倍のグルコアミラーゼ活性の上昇を確認した (Fig. 4-7)。

4-3-8 GHM-4925 からの高次倍数体の造成

二本の染色体上に GAI 遺伝子を導入した α 型一倍体細胞のうちグルコアミラーゼ活性が最も高かった GHM-4925 から α/α 型同質二倍体化細胞 GDM-94 及び、 $\alpha/\alpha/\alpha/\alpha$ 型同質四倍体化細胞 GTM-240 を造成した。それらのグルコアミラーゼ活性を測定したところ、GHM-35 の場合と同様に、倍数性の増加とともにグルコアミラーゼ活性の上昇が認められた。その結果を Table 4-5 に示した。また、GHM-35 と比較した場合、高次倍数体取得の際に用いる一倍体細胞内の GAI 遺伝子量の増加により、各倍数体での GAI 活性の上昇が確認された。

Table 4-5. GA activities of parental haploid GHM-4925, diploid and tetraploid mater cells in culture supernatant

Host strain	Ploidy	Population (ml^{-1})	GA activity (U/ml) (U/ 10^8 cell)	
GHM-4925	1	3.0×10^8	2.7	0.9
GDM-94	2	1.8×10^8	3.4	1.9
GTM-240	4	1.0×10^8	3.9	4.0

GA; glucoamylase

4-3-9 GHT-127 からの高次倍数体の造成

3 本の染色体上に GAI 遺伝子が導入した形質転換体のうち活性の高かった GHT-127 から α/α 型同質二倍体化細胞 GDT-104、 $\alpha/\alpha/\alpha/\alpha$ 型同質四倍体化細胞 GTT-270 を造成した。それらの GAI 活性を Table 4-6 に示した。その結果、GAI 遺伝子が一本あるいは二本の染色体に導入した GHM-35、GHM-4925 から造成した各高次倍数体と比較して、GAI 活性の上昇が確認された。

Table 4-6. GA activities of parental haploid GHT-127, diploid and tetraploid mater cells in culture supernatant

Host strain	Ploidy	Population (ml ⁻¹)	GA activity	
			(U/ml)	(U/10 ⁸ cell)
GHT-127	1	3.0 x 10 ⁸	3.3	1.2
GDT-104	2	1.7 x 10 ⁸	4.5	2.6
GTT-270	4	1.0 x 10 ⁸	5.3	5.6

GA; glucoamylase

4 - 4 考察

近年、酵母を宿主として用い、異種遺伝子を発現させ、酵素やワクチンといった有用タンパク質を分泌生産させる試みが盛んに行われている。醸造酵母やパン酵母等の実用酵母は一般的に三倍体や四倍体といった高次倍数体であるが、その意義は不明である。本章では、この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胞子発芽時の細胞の熱処理による高次倍数体造成法を利用し、同質の各高次倍数体細胞を取得した。また、同様に当研究室でクローニングされ、酵母での発現・分泌系が確立している黒麹菌のグルコアミラーゼ遺伝子を異種遺伝子として用

いた。

当研究室の保存菌株である一倍体の各接合型標準株の交雑で取得した SEG1 及び、SEG2 は増殖がはやく、また、形質転換効率が高かったため、高次倍数体取得の親株として用いた。高次倍数体取得の際、二倍体細胞の出現頻度は 5~10% 程度、四倍体細胞は 1% 以下であった。また、倍数性の上昇に伴い、単位培養液あたりの菌数の減少が見られた。まず、GAI 遺伝子を YEp 型プラスミドを用いて導入した。YEp3H α -GAI は GAI 発現ベクターで、酵母の MF α 1 遺伝子のプロモーターからシグナル配列、ターミネーター領域を有している。一般に、外来性のタンパク質を酵母で発現・分泌させる場合、酵母の前駆体タンパク質由来のリーダー配列が用いられる^(72, 73)。そのうち最も一般的に用いられているものが、この酵母のペプチドフェロモン α ファクターの前駆体に由来するものである。形質転換体はその倍数性ととも GAI 活性の上昇が確認され、高次倍数体の異種遺伝子発現の宿主としての有用性が示唆された。しかしながら、染色体組込み型ベクターを用いた異種遺伝子導入の場合、高次倍数体には相同組換えによる遺伝子導入の際の相同配列が複数存在するにも関わらず、一本の染色体にしか遺伝子が導入されず、期待できるほどの活性の上昇は確認されなかった。用いたプラスミド pSAK068 は酵母染色体上に 80 コピー以上存在する δ 配列を利用して、異種遺伝子を多コピーで導入することを目的に開発されたものである。しかしながら、本研究の結果は、一度の形質転換で一本の染色体上にしか遺伝子導入ができないというこれまでの報告と同じであり^(56, 74)、高次倍数体利用による導入遺伝子の増幅は認められなかった。

酵母染色体上に多コピーで GAI 遺伝子を導入するため、GAI 遺伝子導入形質転換体からの高次倍数体造成による遺伝子増幅の有効性を検討した。GHM-35 から造成した高次倍数体 (GDM-3524、GTM-3507) はその倍数性の増加に伴って、GAI 活性の上昇を示し、また、発酵試験においても良好な発酵経過を示した。GTM-3057 のエタノール濃度は、GHM-35 のそれと比較して約 1.5 倍であったが、グルコースを炭素源とした場合の約 50% までしかエタノールを生成することができなかった。これらの菌株を用いた澱粉からのエタノール生成は不十分であったが、さらに活性の強い菌株の取得により改善できるものと考えた。

以上のことから、酵母の倍数性の増加に伴う遺伝子増幅により目的遺伝子の発現の上昇が確認され、その有用性が示された。この結果をうけ、選択マーカーの利用と交雑により、高次倍数体造成の親株における遺伝子の増幅を行った。最大で 5 本の染色体上に GAI 遺伝子を導入した一倍体細胞 GHP-251 を取得した。GHP-251 の GAI 活性は一本の染色体にしか GAI 遺伝子が導入されていない細胞のそれと比較して、約 6 倍もの活性の上昇を確認した。また、二本及び三本の染色体上に GAI 遺伝子を導入した株 GHM-4925、GHT-127 の解析から、倍数性の上昇及び親株の遺伝子量に伴って、その活性は上昇することが明らかとなった。以上の結果から、高次倍数体造成法の利用は、異種遺伝子発現の宿主としての酵母の育種法として有用であることが示された。

4 - 5 小括

高次倍数性酵母における異種遺伝子発現の宿主としての有効性を示した。高次倍数体では多コピー型プラスミドでの遺伝子導入において活性の上昇が見られるだけでなく、染色体への遺伝子導入株を用いて高次倍数体を造成することによる遺伝子増幅においても活性上昇が確認された。また、用いる親株の導入遺伝子を増幅することにより、高次倍数体の造成はさらに有効であることが示された。

酵母において異種遺伝子を高効率で発現させるためには、導入遺伝子が多コピーで、かつ、安定に保持される必要がある。本章で示した高次倍数体を応用することにより、酵母染色体上に安定に保持された導入遺伝子を増幅することができ、目的遺伝子の安定高発現に有効であることが示された。

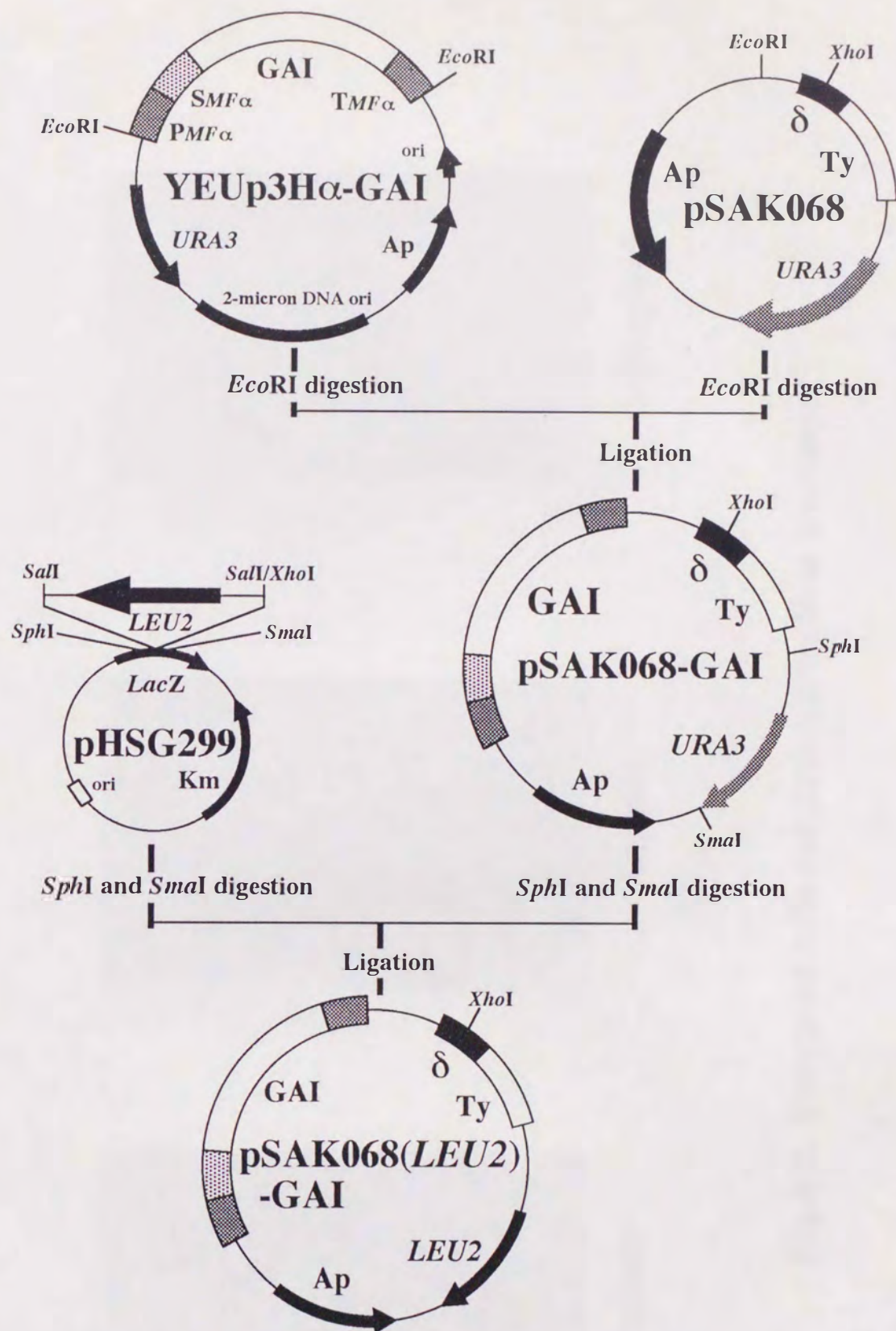
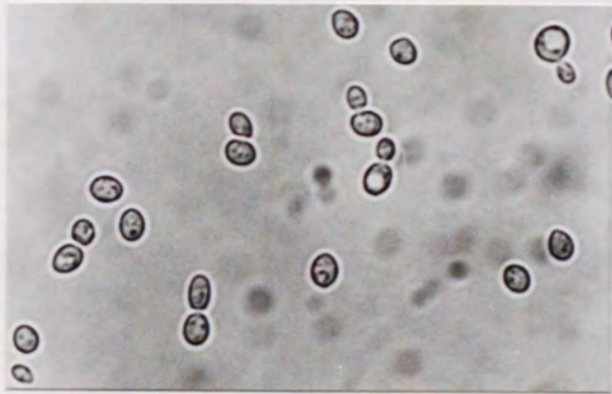


Fig.4-1. Construction of pSAK068-GAI and pSAK068(LEU2)-GAI

pSAK068-GAI and pSAK068(LEU2)-GAI are δ -integrative plasmids for GAI secretion. *PMF α* , *SMF α* , and *TMF α* indicate promoter, signal, and terminator sequence of mating factor α (MF α), respectively.



Haploid



Diploid



Tetraploid

Fig.4-2. Polyploid cells constructed by heat treatment

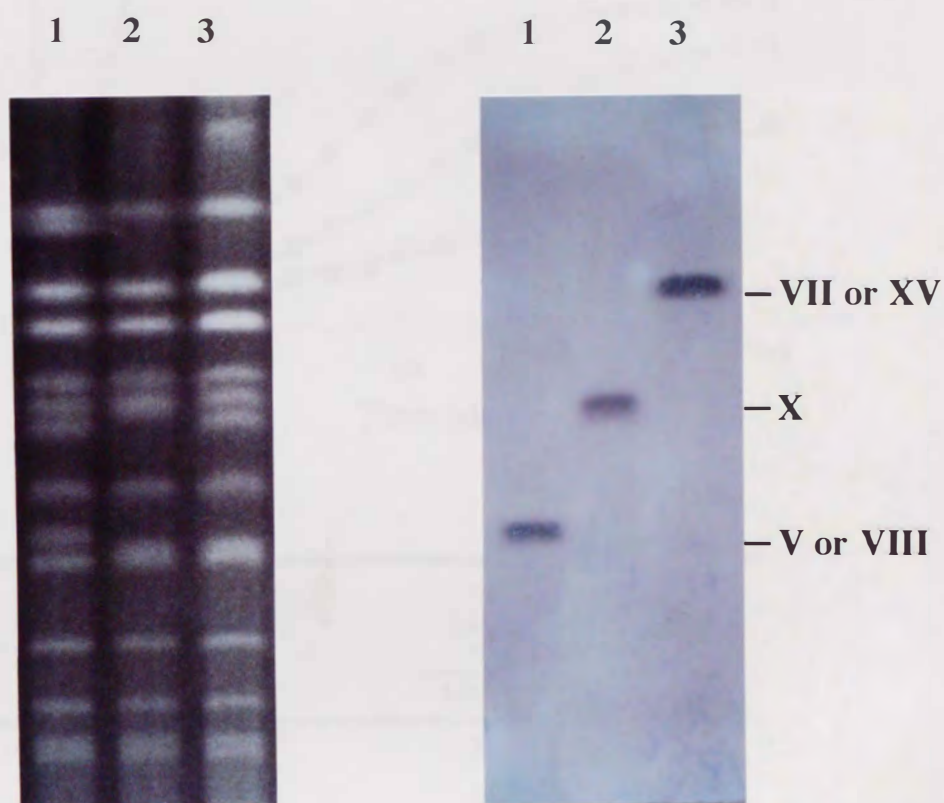
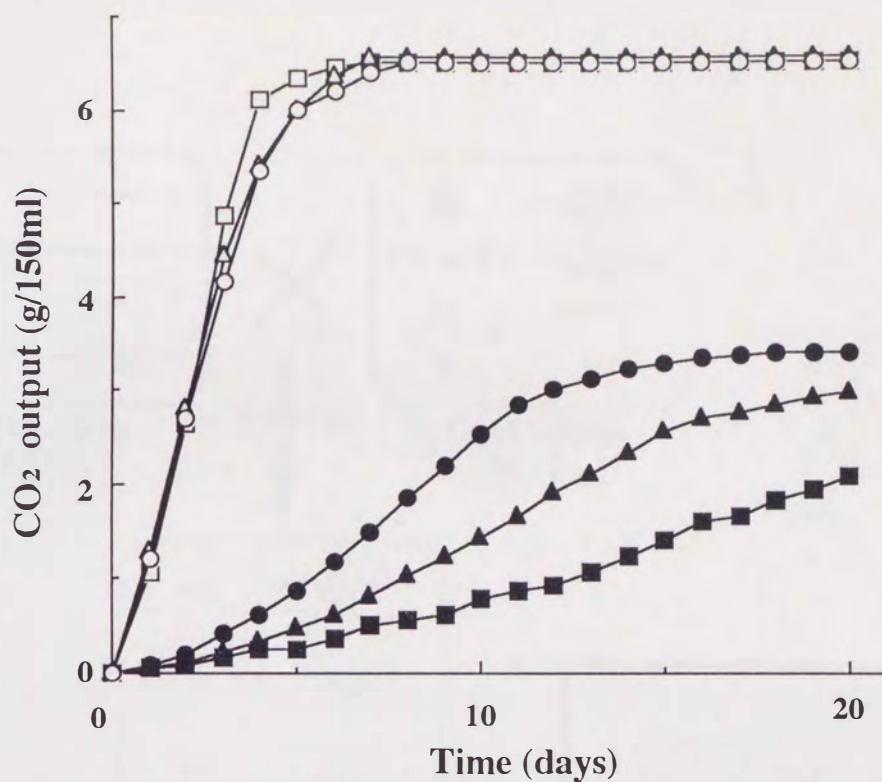


Fig.4-3. Localizations of δ -integrated *GAI* gene on transformants

Pulsed-field gel electrophoresis gel was stained with ethidium bromide. The separated chromosomal DNAs of the transformants with pSAK068-*GAI* were hybridized with *GAI* gene as a probe.

Lane1; SEG2 (α haploid cell) transformed with pSAK068-*GAI*,
 lane2; D-2 (α/α diploid cell) transformed with pSAK068-*GAI*,
 lane3; T-16 ($\alpha/\alpha/\alpha/\alpha$ tetraploid cell) transformed with pSAK068-*GAI*.



Strain	Ethanol (%)	
	Carbon source	
	Glucose	Starch
GHM-35	5.8	2.4
GDM-3524	5.8	3.1
GTM-3507	5.7	3.4

Fig.4-4. Ethanol fermentation by parental haploid GHM-35, diploid GDM-3524 and tetraploid GTM3507

GHM-35 was CG379 transformed with pSAK068-GAI. GDM-3524 and GTM-3057 are diploid and tetraploid mater cells constructed from GHM-35 by heat treatment, respectively.

Symbols: ■ and □, GHM-35; ▲ and △, GDM-3524; ● and ○, GTM-3507. Open and closed symbols represent the fermentation from glucose and starch as carbon source, respectively.

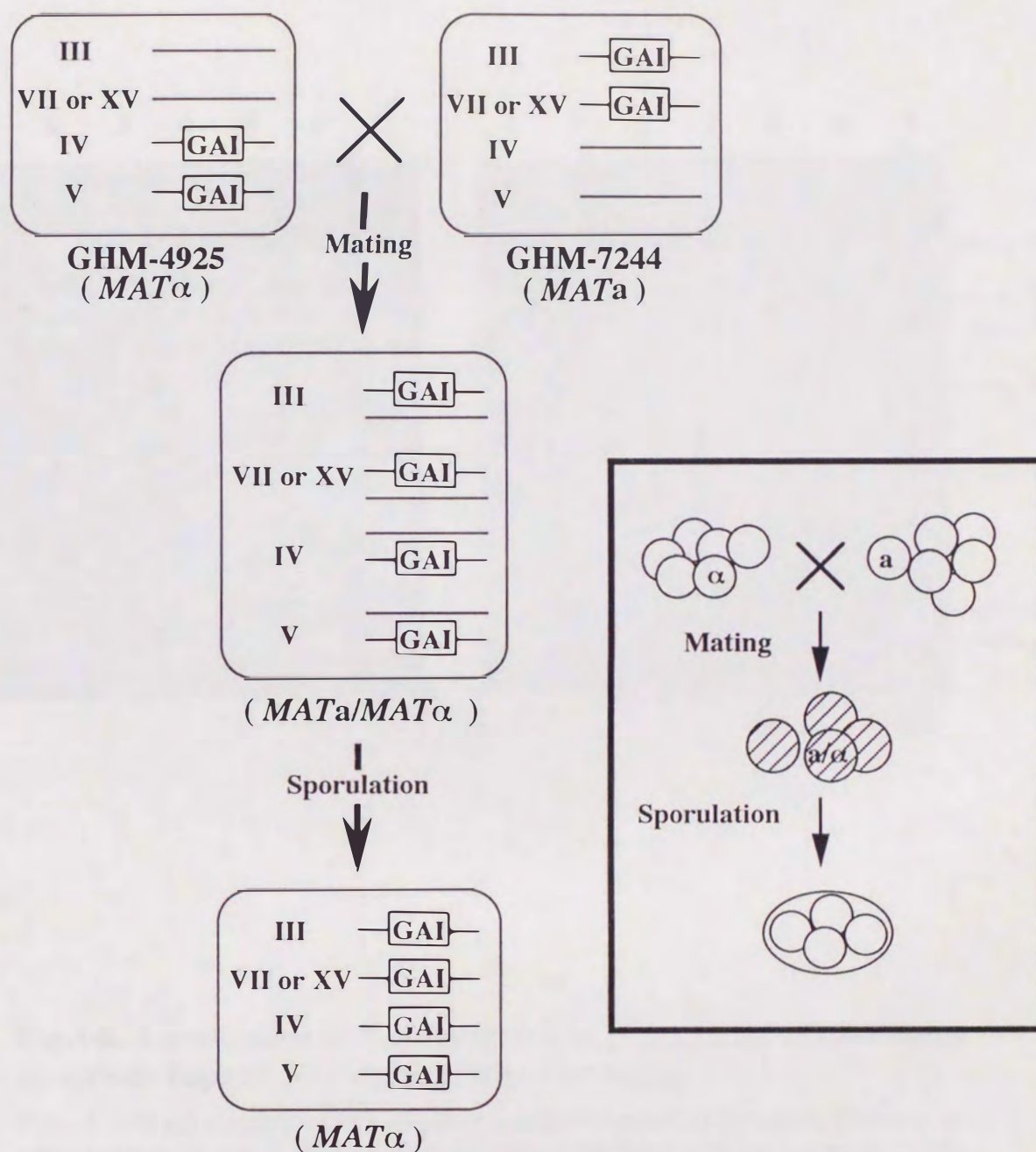


Fig.4-5. Construction of the haploid yeast cells carrying *GAI* genes on several chromosomes

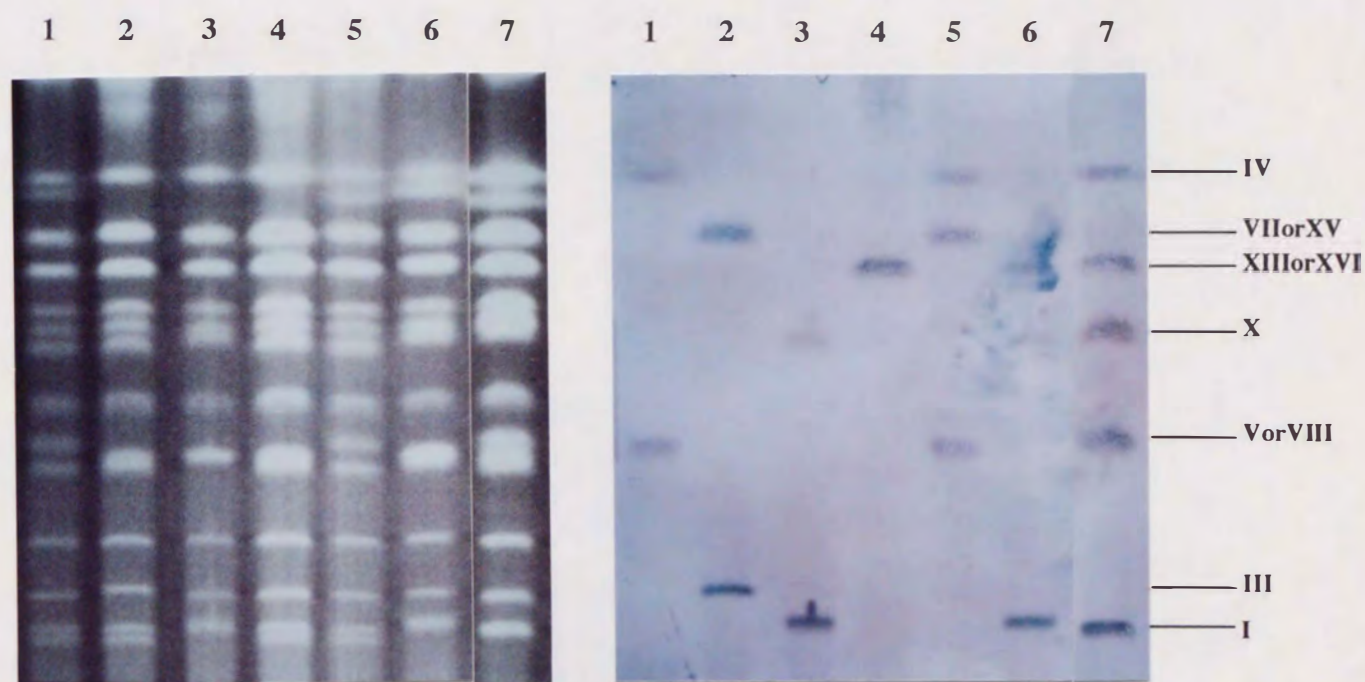


Fig.4-6. Localization of δ -integrated GAI genes on the chromosome in various haploid cells constructed by crossing

Pulsed-field gel electrophoresis gel was stained with ethidium bromide. The separated chromosomal DNAs of the transformants were hybridized with GAI gene as a probe. GHM-4925, GHM-7244, GHM-6859, GHM-7943 are CG379 transformed with pSAK068-GAI and pSAK068(*LEU2*)-GAI. GHT-127 was generated from the diploid crossed between GHM-4925 and GHM-7244. GHT-478 was generated from the diploid crossed between GHM-6859 and GHM-7943. GHP-251 was generated from the diploid crossed between GHT-127 and GHT-478. Lane1, GHM-4925; lane2, GHM-7244; lane3, GHM-7943; lane4, GHM-6859; lane5, GHT-127; lane6, GHT-478; lane7, GHP-251.

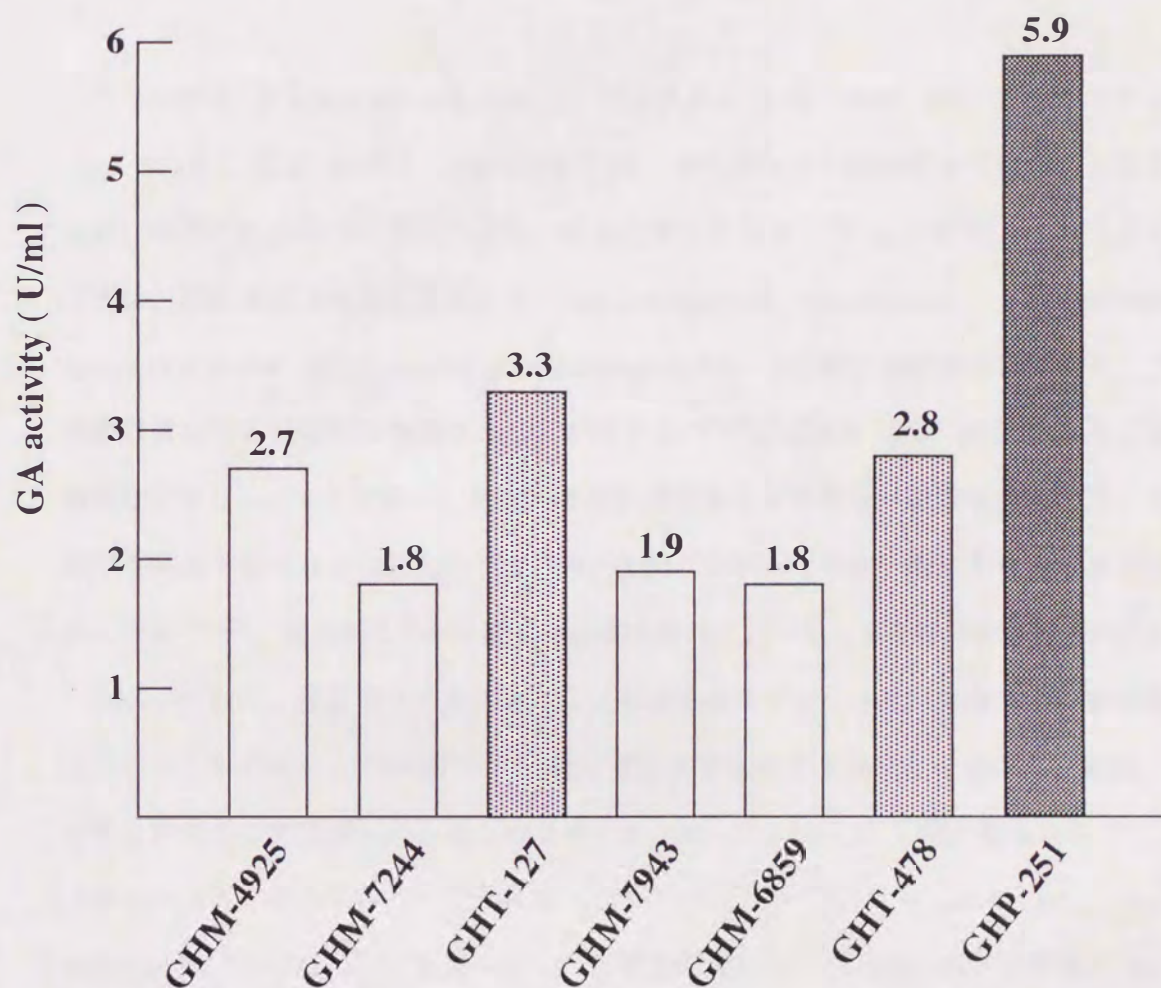


Fig.4-7. Glucoamylase activities of Haploid Cells containing *GAI* genes on several chromosomes

Glucoamylase (GA) activities (U/ml) of various haploid cells are shown. GHM-4925, GHM-7244, GHM-7943, and GHM-6859 contain *GAI* genes on two chromosomes. GHT-127 and GHT-478 contain *GAI* genes on three chromosomes. GHP-251 contains *GAI* genes on five chromosomes.

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

キラー酵母 *Kluyveromyces lactis* が保有する 2 種の線状 DNA プラスミド pGKL1 (8.9 kb) 及び pGKL2 (13.5 kb) は、核内ではなく細胞質中に存在し、細胞質で複製、転写されるという独自の遺伝子発現機構を有する (Fig. 5-1)。これらのプラスミドは、細胞融合や形質転換により *Saccharomyces cerevisiae*、*Kluyveromyces fragilis* あるいは、*Candida pseudopropicalis* などの異種酵母に導入でき、これらの細胞質中でも自律的に複製することができる⁽³¹⁻³³⁾。pGKL1 及び pGKL2 を共に有した酵母は、*K. lactis* と同様に、多種属の感受性酵母を殺すキラー毒素を分泌する。また、両プラスミドはそれぞれ細胞当たり 50~100 コピー含まれ、既に全塩基配列が決定されている⁽⁷⁵⁻⁷⁸⁾。以上のことから酵母の広宿主域ベクターとしての利用が期待されている。

Kamper らは、核遺伝子であるロイシン合成系遺伝子を pGKL1 に導入し、細胞質で発現させることに成功している^(79,80)。細胞質で異種遺伝子を発現させるには、pGKL の転写系を利用する必要がある。彼らはまず、*S. cerevisiae* の *LEU2* 構造遺伝子 (ターミネーターの一部を含む) の前後を pGKL1-ORF2 の UCS (upstream conserved sequence) を含む 5' 上流配列と 3' 下流配列ではさんだ DNA 断片を構築した。これを *S. cerevisiae* の pGKL 保有キラー株 (*leu2*⁻) に導入し、one step 遺伝子破壊の方式 (*in vivo* 組換え) に従って、pGKL1 の ORF2 領域を *LEU2* 構造遺伝子で入れ換え、細胞質で発現させた。さらに同様の手法で、G418 耐性の構造遺伝子 (*G418*^R) を pGKL1-ORF2 の UCS 下流に挿入し、G418 耐性で選択できる線状プラスミドも作成している^(81,82)。また、Meinhardt らは、pGKL2 の ORF5 の UCS を含む約 200 bp の配列をプロモーターとして連結した大腸菌の *aph* 遺伝子 (aminoglycoside phosphotransferase をコードする遺伝子) を、pGKL1 の ORF2 領

域に *LEU2* 構造遺伝子と共に導入し、外来遺伝子である *aph* 遺伝子を、酵母の細胞質で発現させることに成功している⁽⁸³⁾。

本章ではまず、この細胞質性線状キラープラスミドの新たなベクターをしての可能性を検討した。*in vivo* の遺伝子組換えにより、キラープラスミドに外来遺伝子を導入し、*S. cerevisiae* を宿主として、細胞質で異種タンパク質を発現、分泌させることを試みた。外来遺伝子として、強力な生澱粉分解活性を有する黒麹菌のグルコアミラーゼ I (GAI) の cDNA を用いた。

一方、多コピーで、かつ安定な発現ベクター系の構築を目的として、上記のキラー形質の利用を試みた。キラープラスミドである pGKL1 は毒素タンパク質を生産、分泌し、様々な酵母の生育を阻害するが、宿主自身は毒素耐性であるというキラー形質を宿主細胞に付与する。毒素タンパク質は α 、 β 、 γ の 3 つのサブユニットから構成されている。このうち pGKL1-ORF4 にコードされている γ サブユニットが毒素本体であり、pGKL1-ORF2 にコードされている α 、 β サブユニットはその菌体外分泌に関与しており、ORF2 が欠損すると γ サブユニットは分泌されず、菌体内に蓄積する^(84, 85)。また、毒素に対する耐性因子は pGKL1-ORF3 にコードされている⁽⁸⁶⁾。以上のキラー形質に関与する pGKL1-ORF3、ORF4 を利用して、高コピー安定型発現ベクター系の構築を試みた。まず、pGKL1-ORF4 をキラー感受性酵母の染色体上に安定に導入し、さらに、pGKL1-ORF3 を保持するプラスミドを導入した。このようにしてプラスミドを保持した細胞のみを増殖させる自己選択圧をかけることにより、プラスミドの安定化を試みた (Fig. 5-2)。

5 - 2 実験方法

5-2-1 使用菌株

キラー酵母 *K. lactis* 由来の 2 種の細胞質性線状プラスミド pGKL1 及び pGKL2 保有株である *S. cerevisiae* F102-2 (*MATa*、*leu2*、*his4*、*can1*)、及び、キラー感受性酵母である *S. cerevisiae* B511-4C (*MAT α /MAT α* 、*ade1/ade1*、*his4/his4*、*leu2/leu2*、*thr4/thr4*)。

5-2-2 酵母線状プラスミドの抽出

pGKL プラスミドの抽出は、郡家らの方法⁽⁸⁷⁾に準じ、スフェロプラスト法により行った。迅速かつ簡便に調製するためにフェノール処理と RNaseA 処理は省略した。キラー酵母 *S. cerevisiae* F102-2 を 5 ml の YPD 液体培地で一晩振とう培養し、さらに 100 ml の YPD 培地で 8~10 時間培養した。集菌 (3000 rpm、5 min) し、菌体を冷滅菌水で 2 回洗浄した。菌体を 10 ml の Zymolyase 前処理溶液 (1 M sorbitol、50 mM potassium phosphate [pH 7.5]、14 mM β -Mercaptoethanol) に懸濁し、30 分間ゆるやかに振とうし、集菌した。Zymolyase 溶液 (Zymolyase 前処理溶液に 100~400 μ g/ml Zymolyase を加えたもの) に懸濁し、30℃ で 30~90 分間緩やかに振とうし、反応させた。遠心分離してスフェロプラストを集め、lysis 溶液 (50 mM EDTA、10% SDS) を加え、緩やかに懸濁した。65℃ で 15 分間放置した後、5 M 酢酸カリウム溶液を加え、氷中に 30 分以上放置した。遠心分離後、上清の 2.5 倍量の冷 100% エタノールを加え、綿状になった DNA をピペットチップでからめて取り、マイクロチューブに移した。高速遠心後、上清を捨て、集めた DNA を 70% エタノールでリンスした。DNA を乾燥させ、適量の TE 溶液に溶解した。抽出した DNA を完全に溶解した後、アガロースゲル電気泳動を行い、pGKL プラスミドの存在を確認した。

5-2-3 生体内組換えベクター pKTF951 の構築

(i) プラスミド pKTF1 の構築

まず、酵母の GAI 分泌ベクター YEUp3H α -GAI を鋳型としてこのベクターに含まれる酵母 α 因子遺伝子の開始コドン (ATG) から GAI 遺伝子の終止コドン (TAG) までの配列を PCR により増幅した。酵母の α 因子の分泌シグナルは酵母の性に関わらず正常に機能することが以前の研究により明らかとなっている。Forward primer として 5'-AGAGAATTCATGCATAGATTTCTTCAATTTT-3' を、Reverse primer として 5'-ATAGAATTCCGATCCCTACCGCCAGGTGTCGGTC-3' を用いた (枠囲みは *EcoRI* 部位、下線は *NsiI* 部位、点線の下線は *BamHI* 部位を表す。また、反転文字はスタートコドン [ATG]、ストップコドン [TAG] をそれぞれ表す)。得られた PCR 産物を *EcoRI* で消化し、pHSG396 の *EcoRI* 部位に導入した。次に、それを *NsiI* と *BamHI* で消化し、Schaffrath により構築された生体内組換えベクター pAR1⁽⁸⁸⁾ の *NsiI*、*BamHI* 部位に導入し、その *LEU2* 遺伝子断片と組換えたプラスミド pKTF1 を構築した。pKTF1 ではキラープラスミド pGKL1 の ORF2 の開始コドン (ATG) の下流に α 因子遺伝子のプロセッサ配列が、アミノ酸のフレームが一致するように連結されている (Fig. 5-3)。

(ii) 生体内組換えベクター pAR2 の構築

ベクターの長さを短くし、組換え効率を上げる目的で pAR1 の pUC19 の部分を pHSG299 につなぎ換え、次にこれを *AccI* で消化した後、セルフライゲーションを行った。これにより *LEU2* 選択マーカーの下流にある約 400 bp の *AccI* 断片を除去した pAR1*Acc* を構築した。さらにこれを *PstI* と *SacI* で消化し、pHSG299 の部分を pBluescriptII SK+ につなぎ換え、ORF1 の上流に *XhoI* サイトが付加された pAR2 を構築した (Fig. 5-4)。

(iii) 生体内組換えベクター pKTF951 の構築

pKTF1 を鋳型として、pKTF1 上にあるキラープラスミド pGKL1 の ORF2 の開始コドン (ATG) の約 100 bp 上流の位置から、GAI の終止コドン (TAG) までの領域を

PCR により増幅した。pGKL1 上の ORF2 の 5' 非翻訳領域には、キラープラスミドの細胞質性プロモーターとして機能している upstream conserved sequence of ORF2 (UCS2) が含まれている。Forward primer として 5'-NN GAATTCGGATCCAGGTGCAGACAAAGAA-3' を、Reverse primer として 5'-ATA GAATTCGGATCC TCCGCCAGGTGTCGGTC-3' を用いた (下線は *EcoRI* 部位、点線の下線は *BamHI* 部位を表す。また、反転文字はストップコドン [TAG] を表す)。得られた PCR 産物を *BamHI* で消化し、pHSG396 の *BamHI* 部位に導入し、pHSG-MF α GAI を構築した (Fig. 5-5)。また、同時に *BamHI* で消化した断片を pAR2 の *LEU2* 選択マーカーの下流にある *BamHI* 部位に、*LEU2* 選択マーカーと同じ向きに挿入し、生体内組換えベクターの pKTF951 を構築した。*BamHI* 部位の下流には ORF2 のターミネーターが存在する (Fig. 5-3)。

5-2-4 生体内組換えベクター pKTF952 の構築

Meinhardt らは、pGKL2 の ORF5 の UCS を用いて *aph* 遺伝子を比較的高発現させることに成功している⁽⁸³⁾。この UCS5 を利用すれば、外来遺伝子を細胞質でより高発現させることができるものと考察し、pGKL2 の UCS5 を含む約 200 bp の DNA 断片をプロモーターとして用いた。5-2-2 の方法に準じ、キラープラスミドを調製し、アガロースゲル電気泳動後、Geneclean kit により pGKL2 を精製した。精製した pGKL2 を鋳型として PCR 法により、UCS5 (TAATGTGA) を含む約 200 bp の DNA 断片を増幅した。Forward primer として、5'-GCGAATTCATGCATCTTGTATAGATAAAAA-3' を、Reverse primer として 5'-GCGAATTCATG CAATTCAATTTGTTTG-3' を用いた (下線は *EcoRI* 部位、点線の下線は *NsiI* 部位を表す。また、反転文字はスタートコドン [ATG] を表す)。ORF5 の開始コドン (ATG) とその下流につなぐ外来遺伝子である GAI 遺伝子とのコドンのフレームが一致するようにプライマーをデザインした。得られた PCR 産物を *NsiI* で消化し、5-2-3(iii) で構築した pHSG-MF α GAI の *NsiI* 部位に導入した。これにより、pGKL1 の ORF2 のプロモーター領域と α 因子遺伝子のプレプロ配列の境の *NsiI* 部位に pGKL2 の ORF5 のプロモーター領域を新たに挿入したプ

ラスミド pHSG-P2P5 を構築した。1-2-10 の方法に準じてその塩基配列を決定し、UCS5 を含む約 200 bp の *Nsi*I 断片の導入方向を確認した。次に、この pHSG-P2P5 を *Bam*HI で消化し、pAR2 の *Bam*HI 部位に *LEU2* 選択マーカーと同じ向きに挿入し、生体内組換えベクター pKTF952 を構築した (Fig. 5-5)。

5-2-5 プラスミド YEp51-R3 の構築

5-2-4 の方法に準じて精製した pGKL1 を鋳型としてキラー毒素耐性因子をコードする ORF3 遺伝子を PCR 法により増幅した。Forward primer として 5'-NNNGTCGACAAA ATGTGTTTAGAATTAGAT-3' を、Reverse primer として 5'-NNNGGATCC TTGGGAAAGTTAAGATGT-3' を用いた (下線は *Sal*I 部位、点線の下線は *Bam*HI 部位を表す。また、反転文字はそれぞれスタートコドン [ATG] 及びストップコドン [TAA] を表す)。PCR により増幅した 1.3 kb 断片を *Sal*I 及び *Bam*HI で消化し、酵母多コピー型プラスミド YEp51 が保持するガラクトース誘導性 *GAL10* プロモーターの下流に存在する *Sal*I-*Bam*HI 部位に導入し、YEp51-R3 を構築した (Fig. 5-6)。

5-2-6 プラスミド YIpHT4 の構築

5-2-5 で調製した pGKL1 を用い、キラー毒素の γ サブユニットをコードする ORF4 遺伝子を PCR 法により増幅した。Forward primer として 5'-NNNGTCGAC VIGAAGATATATCATATATTTA-3' を、Reverse primer として 5'-NNNGGATCC TTTACACATTTTCCATTCT-3' を用いた (下線は *Sal*I 部位、点線の下線は *Bam*HI 部位を表す。また、反転文字はそれぞれスタートコドン [ATG] 及びストップコドン [TAA] を表す)。PCR により増幅した 0.7 kb 断片を *Sal*I 及び *Bam*HI で消化し、酵母多コピー型プラスミド YEp51 が保持するガラクトース誘導性 *GAL10* プロモーターの下流に存在する *Sal*I-*Bam*HI 部位に導入し、YEp51-T4 を構築した (Fig. 5-6)。YEp51-T4 を *Eco*RI で消化し、*GAL10* プロモーターと ORF4 遺伝子を含む 2.5 kb の断片を pBluescriptII SK+ の *Eco*RI 部位に導入し、pBleu-PG4 を構築した。

YCpHIS4 の *HIS4* 遺伝子を含む 2.3 kb の *Bam*HI-*Sal*I 断片と 1.7 kb の *Sal*I

断片を染色体組込み型ベクター YIp5 の *Bam*HI-*Sal*I 部位に導入した。さらに、pBleu-PG4 を ORF4 遺伝子の下流と pBluescriptII SK+ のマルチクローニング部位に存在する *Bam*HI で消化し、*GAL10* プロモーターと ORF4 遺伝子を含む 2.2 kb の断片を導入して YIpHT4 を構築した (Fig. 5-7)。

5-2-7 形質転換体のキラー検定⁽⁸⁹⁾

キラー感受性酵母 *S. cerevisiae* B511-4C を 4ml の YPD 液体培地で一晚培養後、滅菌水で希釈し、キラー検定培地 (1% yeast extract、2% peptone、2% dextrose、50 mM クエン酸緩衝液 [pH 5.0]、0.003% methylene blue、2% agar) に塗布し、乾燥させた。pKTF951 及び pKTF952 の導入により得られたそれぞれの形質転換体をキラー感受性酵母を塗布したキラー検定培地にストリークし、30℃ で 2~3 日培養し、キラー酵母の周囲に感受性酵母の生育阻止帯の形成により、キラー活性を検討した。

5-2-8 組換えプラスミド導入形質転換体の GAI 分泌の確認

野生型キラープラスミド pGKL1 を欠失し、組換え線状プラスミド pNS951 及び pNS952 だけを保持するようになった形質転換体の GAI の分泌をハローの形成、抗 GAI 抗体によるウエスタン解析及び、DNS による活性測定を行い、確認した。両形質転換体ともに 0.5% soluble starch を含む LEU-free SD plate で 30℃、1 週間培養した。

さらに、それぞれの形質転換体を 4ml LEU-free SD 培地で、30℃ において一晚培養し、さらに、50ml の同培地で、30℃、2 日間培養した。集菌し、菌体を除去した培養上清を脱イオン水に対して、4℃ で 2 日間透析した後、凍結乾燥した。コントロールとして、親株である *S. cerevisiae* F102-2 株も同様に培養し、培養上清中の粗酵素を調製した。ただしこの場合、培地として SD 培地にロイシンを適量添加したものをを用いた。凍結乾燥後、0.2 ml の脱イオン水に溶解し、これを粗酵素液とし以下の実験に用いた。それぞれの粗酵素を用い、3-2-2 の方法に準じ、SDS-PAGE、ブロッティング及び、

抗 GAI 抗体を用いた検出を行った。また、それぞれの粗酵素の GAI 活性を測定した。GAI 活性の測定は、3-2-2 の方法に準じ、DNS 法により測定した。培養上清を凍結乾燥したものを 0.5 ml の脱イオン水に溶解し、これを粗酵素液として用いた。

5-2-9 継代培養による pGKL1 のキュアリング⁽⁸³⁾

生体内組換えベクター (pKTF951 及び pKTF952) 導入により取得した形質転換体に存在する野生型のキラープラスミド pGKL1 のキュアリングを行った。4 ml LEU-free SD 液体培地で、30℃ において継代培養を繰り返すことにより pGKL1 をキュアリングした。培養液を適当に滅菌水で希釈し、同様の SD plate にスプレッドし、コロニーアイソレーションを行った。50 コロニーについてキラー検定を行い、その中からキラー活性を失っているコロニーを選択した。

5-2-10 プラスミド安定性の検討

pKTF952 導入により生じた生体内組換えプラスミド pNS952 の非選択圧条件下における安定性については、4 ml YPD 液体培地を用いて継代培養した。継代培養毎にその培養細胞の一部を YPD plate 上にスプレッドし、コロニーアイソレーションした。プラスミド YEp51-R3 の安定性については、YPD 培地の炭素源としてグルコースの代わりにガラクトースを含む 4 ml の YPGal 液体培地を用いて継代培養した。継代培養毎にその培養細胞の一部を YPGal plate でコロニーアイソレーションした。プラスミドの安定性は、それぞれの 50 コロニーについて LEU-free SD 培地での増殖能により、プラスミドの保持率を算出することで検討した。

5-3 実験結果

5-3-1 *S. cerevisiae* F102-2 の形質転換

組換えプラスミド pKTF951 及び pKTF952 を *S. cerevisiae* F102-2 に導入した。それぞれのプラスミドは、形質転換での組換え効率を上げるため、*Sac*I 及び、*Xho*I で消化し、線状化した後、エレクトロポレーションにより導入した。これらのプラスミドは、pGKL1 の ORF1 及び ORF3 領域と野生型 pGKL1 との相同領域で生体内組換えを起こし、細胞質中に組換え線状プラスミドを生成すると予想される。予想される相同組換えのモデルを Fig. 5-8 に示した。

5-3-2 生体内組換え線状プラスミドの検出

組換えプラスミド pKTF951 及び pKTF952 が、それぞれ相同組換えによりキラープラスミド pGKL1 のキラー毒素コード領域である ORF2 に組み込まれ、新たな線状プラスミドが形成されたかを確認した。得られたそれぞれの形質転換体から線状プラスミドを抽出し、アガロースゲル電気泳動及びサザン解析を行った。

pKTF951 の場合、予想される組換え線状プラスミドのサイズは、8874 bp の pGKL1 とほとんど変わらず、バンドが重なりあうため、組換え線状プラスミドが形成されたかどうか電気泳動では確認できなかった。GAI プローブと LEU2 プローブを用いたサザン解析の結果より、pGKL1 とほぼ同じ位置にバンドが検出され、新たな線状プラスミドの形成を確認した。この組換え線状プラスミドを pNS951 とした (Fig. 5-9)。pKTF952 を用いた場合、電気泳動により pGKL1 のバンドの他に、pGKL1 より 200 bp 大きな目的のバンドが検出され、新たな線状 DNA プラスミドの形成を確認した。この組換え線状プラスミドを pNS952 とした (Fig. 5-10)。さらに GAI プローブと LEU2 プローブを用いたサザン解析によってもその形成を確認した。

以上の結果より、pKTF951 及び pKTF952 の導入により得られた形質転換体は、野生型の pGKL1 と組換えプラスミド (pNS951 あるいは pNS952) の両方を保持しているものと考察した。

また、pKTF951 及び pKTF952 両形質転換体において *LEU2* プローブを用いた場合、親株及び形質転換体とも染色体の位置にもバンドが検出された。これは宿主の染色体上に存在する *leu2* 遺伝子に起因するものと考察した。また、形質転換体のうち、GAI プローブ、*LEU2* プローブともに組換え線状プラスミドのバンドは検出されず、染色体の位置にバンドが検出される株の出現が確認された。ただし、*LEU2* プローブでは親株の F102-2 より濃いバンドが検出された (Fig. 5-9, lane4 and Fig. 5-10, lane4)。このことから、pKTF951 及び pKTF952 による形質転換により、染色体上に GAI の cDNA と *LEU2* 遺伝子が組込まれた形質転換体が出現するものと考察した。これは制限酵素で切断されなかった環状のままの pKTF951 と pKTF952 が、その中に存在する *LEU2* 遺伝子マーカーで染色体上の *leu2* 遺伝子座と組換えを起こしたものと考察した。

5-3-3 形質転換体の pGKL1 のキュアリング

pKTF951 及び pKTF952 導入により取得した形質転換体はともに、GAI の分泌が少なく、培養3日間ではハローの検出は出来なかった。そのため、一週間培養を行い、ハロー検定を行ったが、ごく小さなハローしか形成されなかった。また、GAI の分泌が確認された両形質転換体においてキラー検定を行った結果、元株である F102-2 と同様にキラー毒素を分泌し、キラー感受性酵母の生育阻止帯を形成した。このことと 5-3-2 の結果から、両形質転換体はキラー毒素と GAI の 2 種類のタンパク質を分泌し、生体内組換えプラスミドである pNS951 あるいは pNS952 の他に野生型のキラープラスミドである pGKL1 が存在していることを確認した。そこで、形質転換体に存在する野生型のキラープラスミド pGKL1 を除くことにより、組換え線状プラスミドのコピー数を増加できるものと考察した。GAI の分泌量を増加させることを目的に、キラープラスミド pGKL1 のキュアリングを行った。

栄養要求性選択マーカーであるロイシンの欠乏状態で継代培養することによりキラー毒素を分泌せず GAI のみを分泌する株 (pGKL1 を欠失し、組換え線状プラスミド pNS951 及び pNS952 のみを保持する株) の取得を行った。継代培養後、キラー検定

及びハローアッセイを行った結果、pKTF951 及び pKTF952 両形質転換体ともその周りに感受性菌の生育阻止帯は形成されず、ハローの形成のみが検出された。このことから、キラー活性は失なわれ、GAI のみが分泌されていることを確認した。また、それぞれの株より線状プラスミドを抽出し、GAI プローブ及び LEU2 プローブを用いてサザン解析を行い、組換えプラスミドが保持されていることを確認した。これらの株は約 10 回の継代培養で容易に取得できた。

5-3-4 pGKL1 キュアリング株の解析

継代培養により取得したキラー毒素を分泌せず、GAI のみを分泌するようになった pKTF951 及び pKTF952 の形質転換体について、ハローアッセイによりグルコアミラーゼ活性を検討した。両形質転換体とも一週間培養を行い、ハローの検定を行った。その結果を Fig. 5-11 に示した。対照として用いた親株の F102-2 には、ハローは形成されなかったが、pKTF951 の形質転換体では、菌体周辺に微弱なハローが形成された。これに対し、pKTF952 の形質転換体では、より明確なハローの形成が確認された。これは pKTF952 の方が pKTF951 よりそのプロモーター活性が強いためであると考察した。

両形質転換体から調製した粗酵素について GAI のポリクローナル抗体によるウェスタン解析を行った。バンド濃度の比較から、pKTF952 の形質転換株の方が pKTF951 の形質転換株より GAI 分泌量が多く、pGKL2 の ORF5 のプロモーターが、pGKL1 の ORF2 のプロモーターと比較してプロモーター活性が強く、異種遺伝子の発現には有効であると考察した (Fig. 5-12)。

また、それぞれの形質転換体の培養上清中の GAI 活性を測定した。pNS952 のみを保持する株の方が、pNS951 のみを保持する株より、約 2.6 倍高い GAI 活性を示し、ウェスタン解析の結果と一致するものであった。しかしながら、pGKL1 のキュアリングによるグルコアミラーゼ活性の上昇はみられず、その活性はハローアッセイで示された結果と対応していた。

さらに、pNS952 のみを保持した株の非選択圧条件下における組換えプラスミドの安定性について検討した。その結果、対照として用いた YEp 型プラスミドは非選択圧条件

下の継代培養において急速に脱落するのに対し、pNS952 は栄養要求性による選択をかけることなく安定に宿主細胞中に保持されることが示された (Fig. 5-13)。

5-3-5 pGKL1-ORF4 及び pGKL1-ORF3 導入形質転換体

まず、キラー感受性酵母 B511-4C に YIpHT4 を導入した。導入の際、YIpHT4 の *URA3* 遺伝子内に存在する *ApaI* 部位で切断して用いた。この線状化したプラスミドをエレクトロポレーション法により導入し、histidine-free SD 培地で形質転換体を選出した。得られた形質転換体を炭素源がガラクトースである培地にレプリカし、増殖できない株を選出した。この株を宿主として、さらに YEp51-R3 を同様に導入し、ORF4 及び ORF3 遺伝子を導入した形質転換体を取得した。これらの形質転換体のうち炭素源がガラクトースである培地において増殖能を回復した株を取得した。しかし、その形質転換体取得の確率は非常に低かった。

5-3-6 プラスミド YEp51-R3 の安定性

pGKL1-ORF4 及び pGKL1-ORF3 遺伝子をともに導入した形質転換体を、ガラクトースを炭素源とする非選択圧条件下で継代培養した。プラスミド保持の確認は形質転換体の栄養要求性相補の表現型により行った。その結果、5 回の継代培養においてもロイシン要求性を相補したことから、プラスミド YEp51-R3 を安定に保持しているものと考察した (Fig. 5-14)。

本研究では、*in vivo* の遺伝子組換えにより、キラープラスミド pGKL1 のキラー毒素コード領域である ORF2 に外来遺伝子を導入し、*S. cerevisiae* を宿主として細胞質で異種タンパク質を発現、分泌させることに成功し、線状キラープラスミドの異種遺伝子発現ベクターとしての可能性を示した。また、毒素発現・耐性という酵母のキラー形質を利用して、非選択圧条件下においても多コピーで安定に保持されるベクター系の構築を行った。

酵母細胞質中で黒麹菌のグルコアミラーゼ遺伝子を発現するための組換えプラスミド pKTF951 及び pKTF952 の *in vivo* 遺伝子組換えにより、それぞれ目的とする生体内組換え線状プラスミド pNS951 及び pNS952 を有する形質転換体を得ることができた。それらの予想されるベクターと pGKL1 との相同組換えの様式を Fig. 5-8 に模式的に示した。組み換えプラスミドを切断、線状化した断片上の *LEU2* 遺伝子上流領域と *GAI* の cDNA の下流領域は、それぞれ pGKL1 の ORF2 の上流領域と下流領域及び、ORF3 遺伝子の一部を含んでいる。この相同領域において相同組換えが起こり、pGKL1 の ORF2 キラー毒素コード領域に、*LEU2* 遺伝子と *GAI* の cDNA が共に導入される。しかし、これらの形質転換体に対する、*GAI* プローブ、*LEU2* プローブを用いたサザン解析の結果、染色体の位置にバンドが検出される形質転換体を得られた。これは制限酵素で切断されなかった環状のままの pKTF951 あるいは pKTF952 がその中に存在する *LEU2* 遺伝子マーカーで、宿主染色体上の *leu2* 遺伝子座と相同組換えを起こし、正常に機能しなかった染色体上の *leu2* 遺伝子が修復され、*LEU+* 形質転換体が出現したのではないかと考察した。染色体に導入された *LEU+* 形質転換体の出現頻度は、組換え線状プラスミドを有した *LEU+* 形質転換体のおよそ 1/10~1/20 であった。導入するベクターの制限酵素による切断の効率により、その頻度は左右されるのではないかと考えられる。また、このような組込みの可能性を完全になくするためには、染色体上の *LEU2* 遺伝子の配列が完全に欠失した株 ($\Delta LEU2$) を宿主として用いる必要がある。

得られた形質転換体は野生型のキラープラスミド pGKL1 と組換え線状プラスミドを

保持していることが、形質転換体の線状プラスミドのアガロースゲル電気泳動及び、キラー検定により明らかとなった。これらの形質転換体はロイシン欠乏状態で継代培養を繰り返すことにより、pGKL1 をキュアリングし、容易に組換え線状プラスミドのみを保持させることができた。しかしながら、pGKL1 キュアリングによる GAI 活性の違いは認められなかった。

また、pKTF952 を用いた方が pKTF951 より活性が高かったことから、プロモーターの検討により改良の余地があると思われる。pGKL プラスミド上のプロモーターについては Schickel らによって解析されている⁽⁹⁰⁾。

現在まで pGKL プラスミドを利用して異種遺伝子を発現させる試みがいくつかなされているが、発現量とその AT の割合が関係している可能性も示唆されている。pGKL1-ORF2、pGKL2-ORF5 の AT の含量がそれぞれ 70.1%、72.8% であり、効率よく発現した *Bacillus megatherium* の glucose dehydrogenase (*gdhA*)⁽⁹⁰⁾、*E. coli* の aminoglycoside phosphotransferase (*aph*)⁽⁸³⁾ はそれぞれ AT 61.2%、56.3% であるのに対して、*Streptomyces rubiginosus* の xylose isomerase (*xylA*)⁽⁹¹⁾ はその発現量が低く AT の含量が 28.8% であった。本研究で用いた GAI 遺伝子もその AT の含量が 42.3% と低く、その発現量に影響する可能性が示唆された。

一方、酵母のキラー形質を利用して、プラスミドを安定保持するシステムの構築を行った。本研究では、まず、毒素本体である γ サブユニットをコードする pGKL1-ORF4 を相同組換えにより宿主染色体上に安定に組込み、次にその毒素耐性因子をコードする pGKL1-ORF3 を多コピー型プラスミドで導入した。これは宿主自身のキラー形質を利用して、自己選択圧をかけ、プラスミドを安定に保持させるものである (Fig. 5-2)。しかしながら、形質転換体の取得率が低く、キラー感受性酵母のみにしか利用できないといった不利な点も残されている。また、異種遺伝子導入による発現の確認、プラスミドのコピー数等の検討も必要である。このシステムでは pGKL1-ORF3 も ORF4 も同じ *GAL10* プロモーターを用いているが、これらの二つのプロモーターの強さを変えることで、YEp 型プラスミドのコピー数を増加させることは可能であると考えられる。

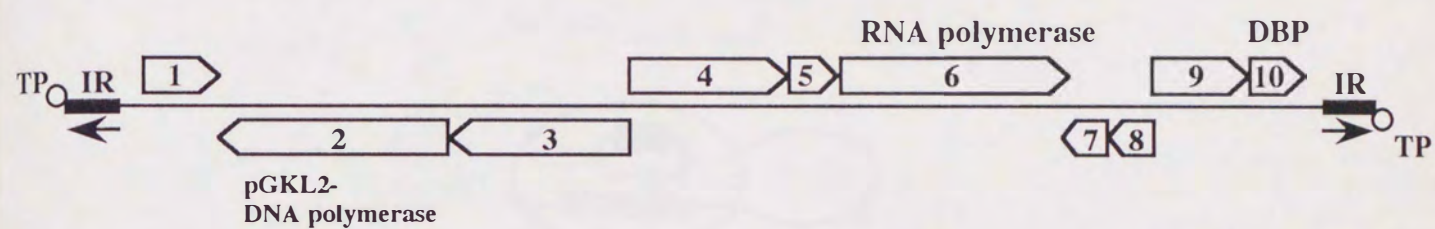
本研究では、キラー酵母が保持する細胞質性線状キラープラスミド及びそのキラー形質を利用することにより、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を宿主とした異種遺伝子発現のベクター系の構築を試みた。

まず、キラー酵母 *Kluyveromyces lactis* の細胞質性線状キラープラスミドを利用することにより、*S. cerevisiae* を宿主として、細胞質で外来異種タンパク質を発現、分泌させることに成功した。本研究では外来タンパク質として黒麹菌 *Aspergillus awamori* var. *kawachi* のグルコアミラーゼを用いた。*in vivo* の遺伝子組換えにより構築した pNS951 及び pNS952 は細胞質中に安定に存在したが、その外来遺伝子発現効率は低いものであった。

一方、キラー形質を利用することにより、YEp 型ベクターを安定に保持できる可能性を示したが、コピー数の検討及び、形質転換体取得の効率化等の問題が残っている。

本章では、線状キラープラスミド及び、その性質を利用して新たなベクター系の構築を行った。

pGKL2 (13457bp)



pGKL1 (8874bp)

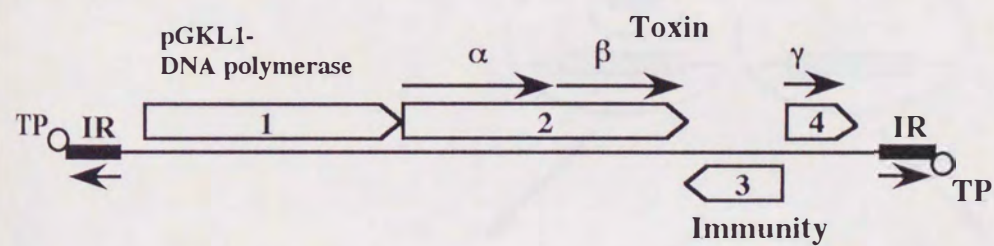


Fig.5-1. Structures of pGKL1 and pGKL2

TP, terminal protein; IR, inverted repeat

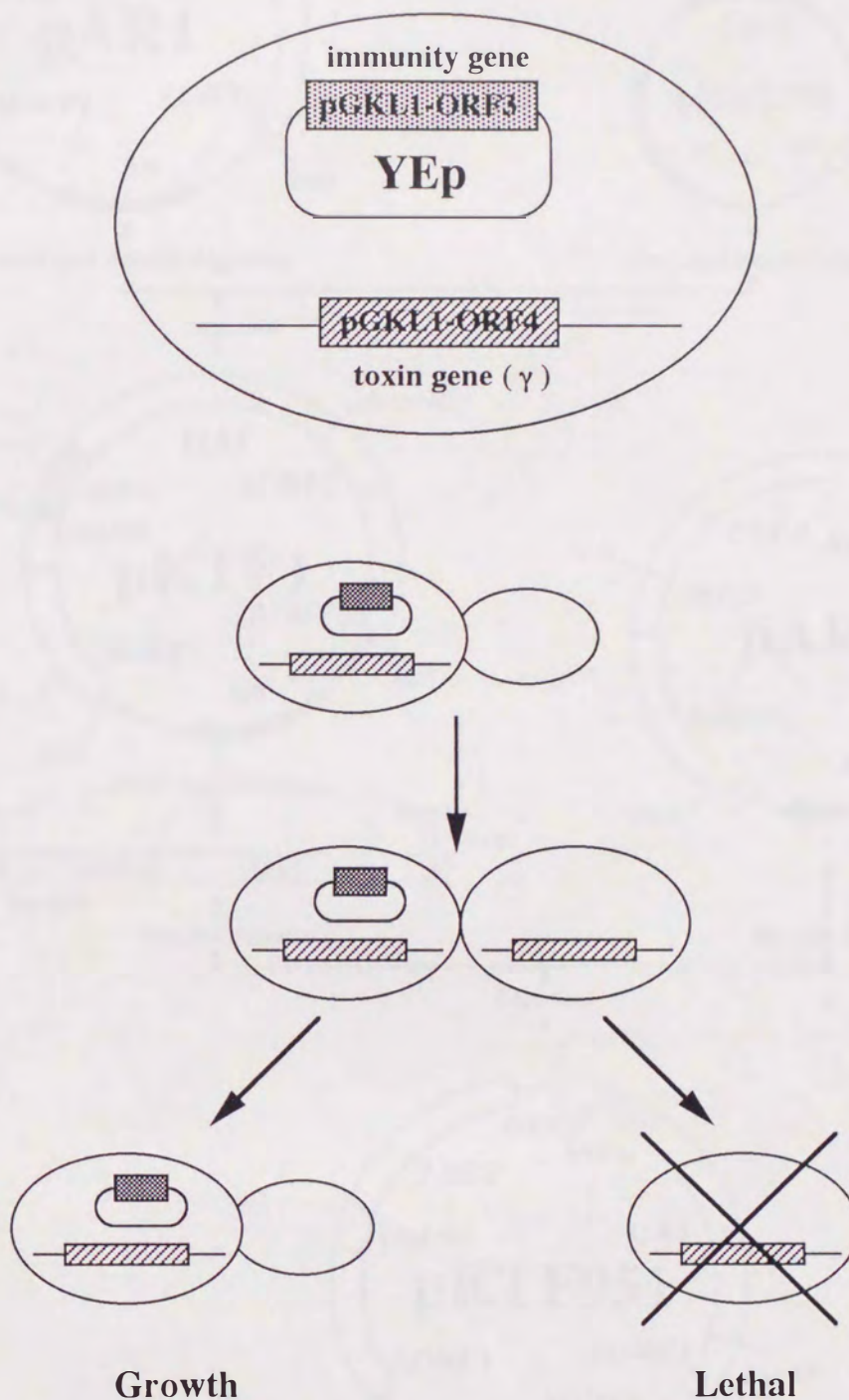


Fig.5-2. Stabilization model of plasmid containing immunity gene in yeast cells which carries toxin gene on the chromosome

pGKL1-ORF4 encodes γ subunit of killer toxin. pGKL1-ORF3 encodes immunity for killer toxin. A killer sensitive yeast containing pGKL1-ORF4 on the chromosome can propagate only when it retains pGKL1-ORF3.

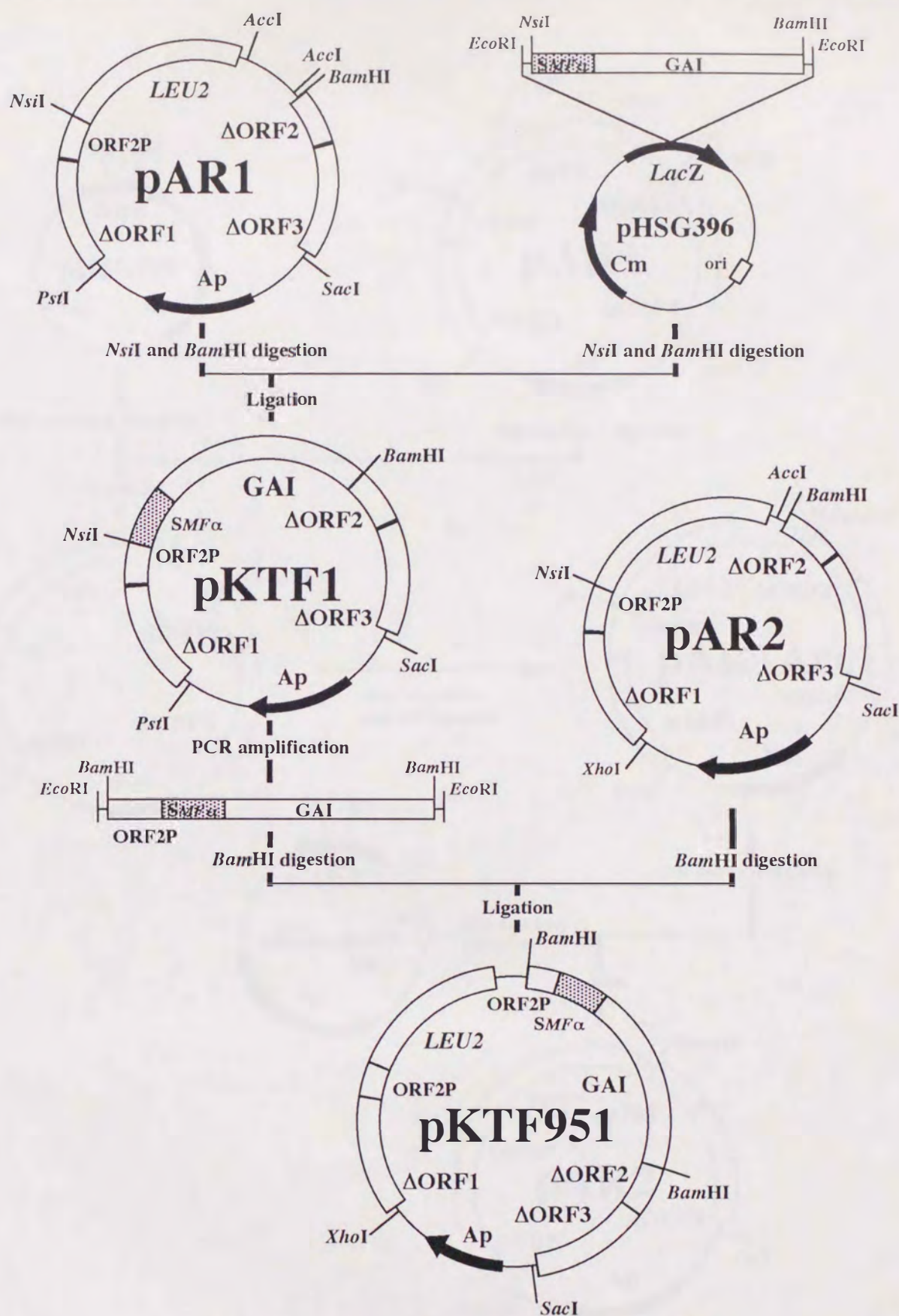


Fig.5-3. Construction of pKTF951

pKTF951 contains partial sequences of pGKL1-ORF1 (Δ ORF1), -ORF2(Δ ORF2), and -ORF3(Δ ORF3). Homologous recombination occurs at these regions of pGKL1 in a host strain. ORF2P indicates the promoter region of pGKL1-ORF2.

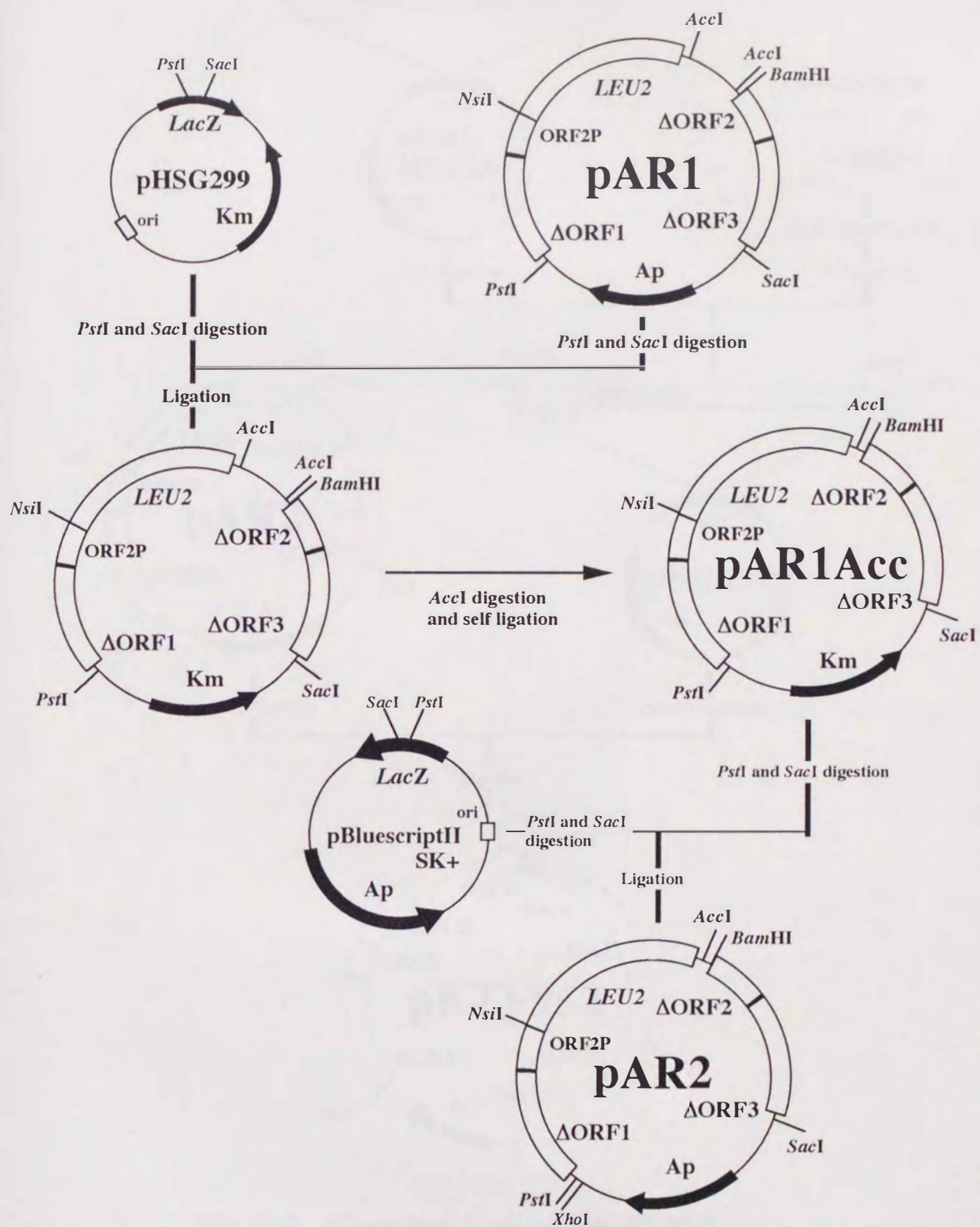


Fig.5-4. Construction of pAR2

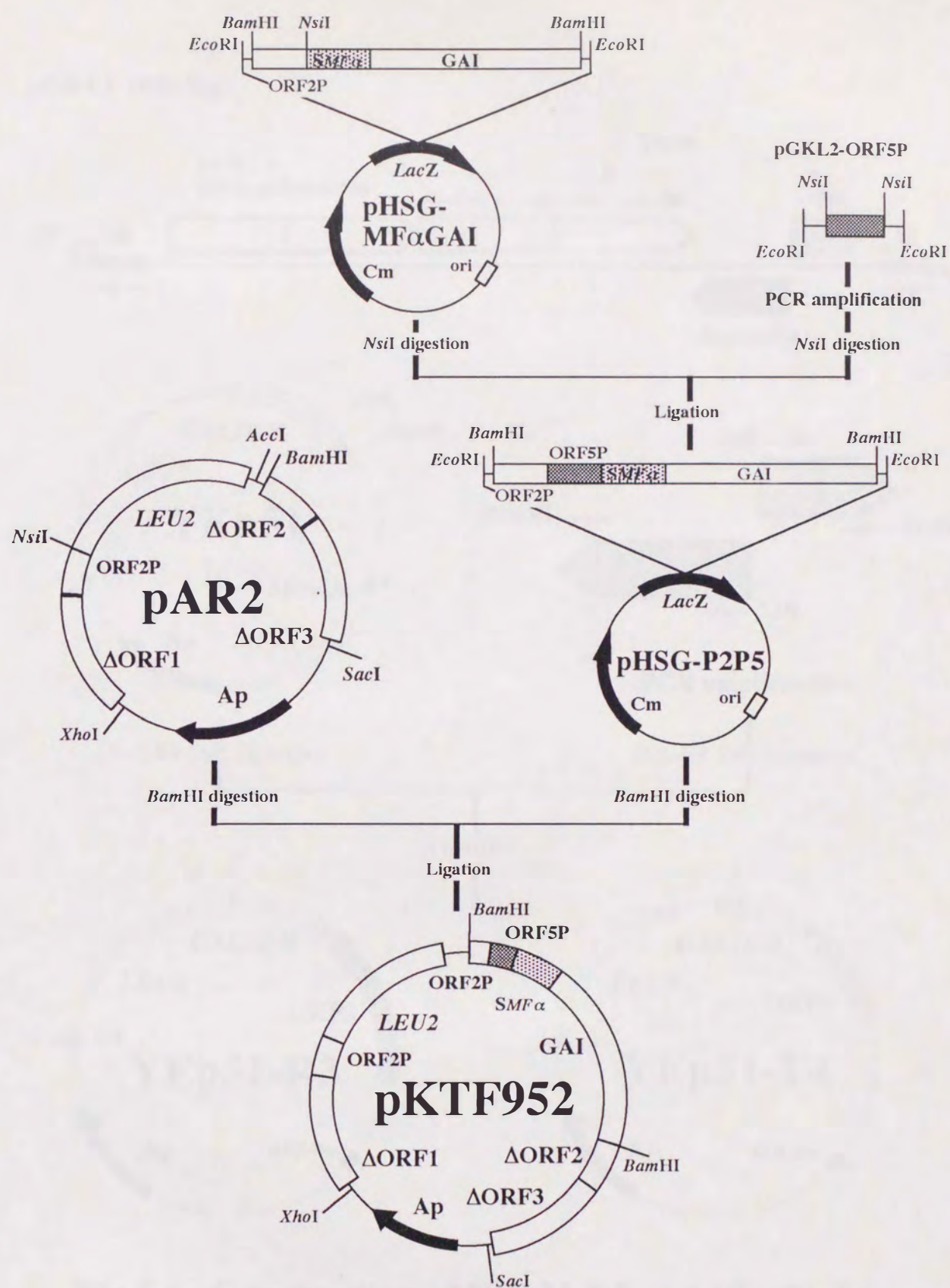


Fig.5-5. Construction of pKTF952

pKTF952 is pKTF951 containing the promoter region of pGKL2-ORF5 (ORF5P).

pGKL1 (8874bp)

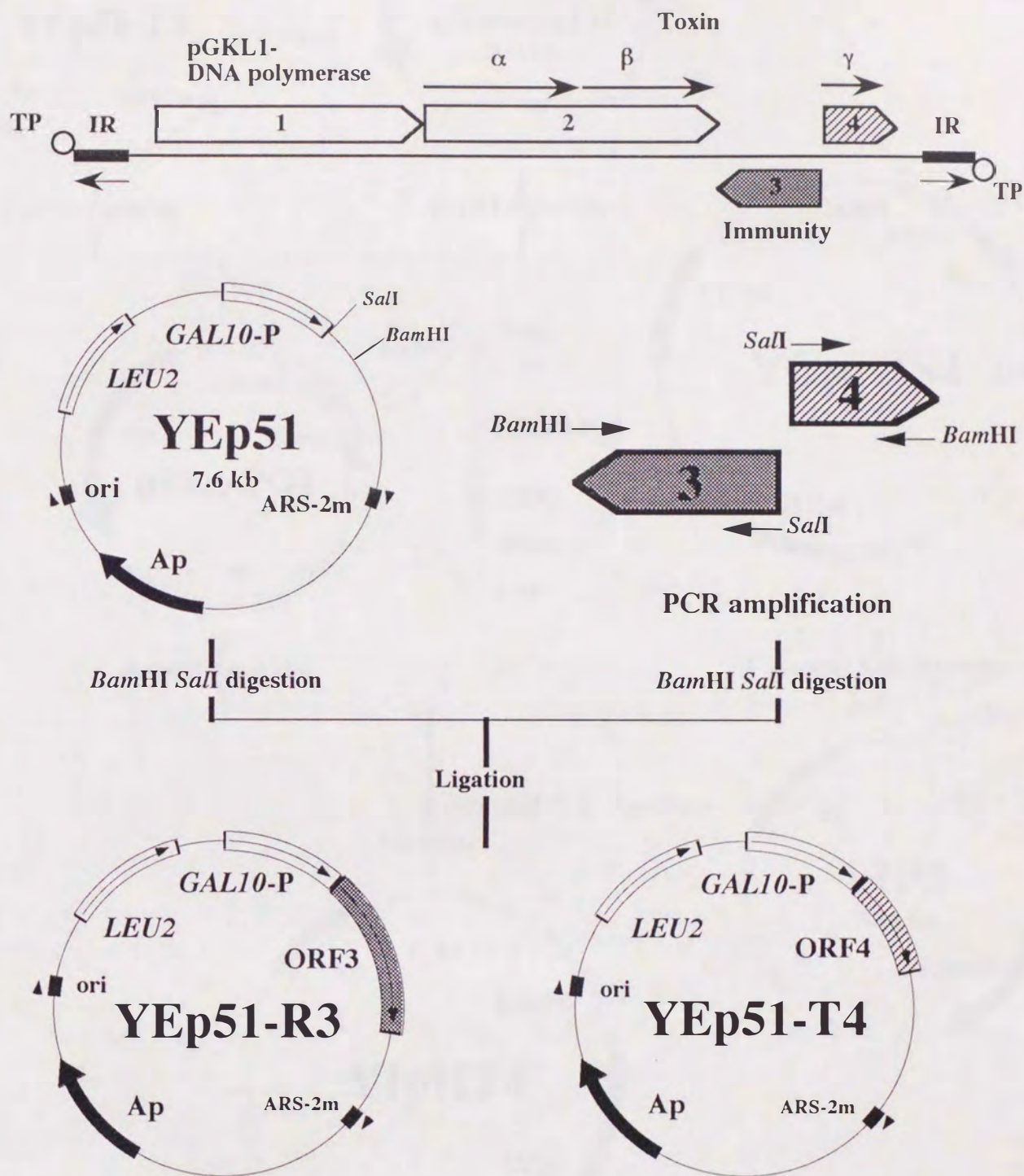


Fig.5-6. Construction of YEp51-R3 and YEp51-T4

Yeast episomal plasmid YEp51 contains galactose inducible promoter *GAL10-P*. YEp51-R3 contains pGKL1-ORF3 encoding immunity for killer toxin down stream of *GAL10-P*. YEp51-T4 contains pGKL1-ORF4 encoding γ subunit of killer toxin.

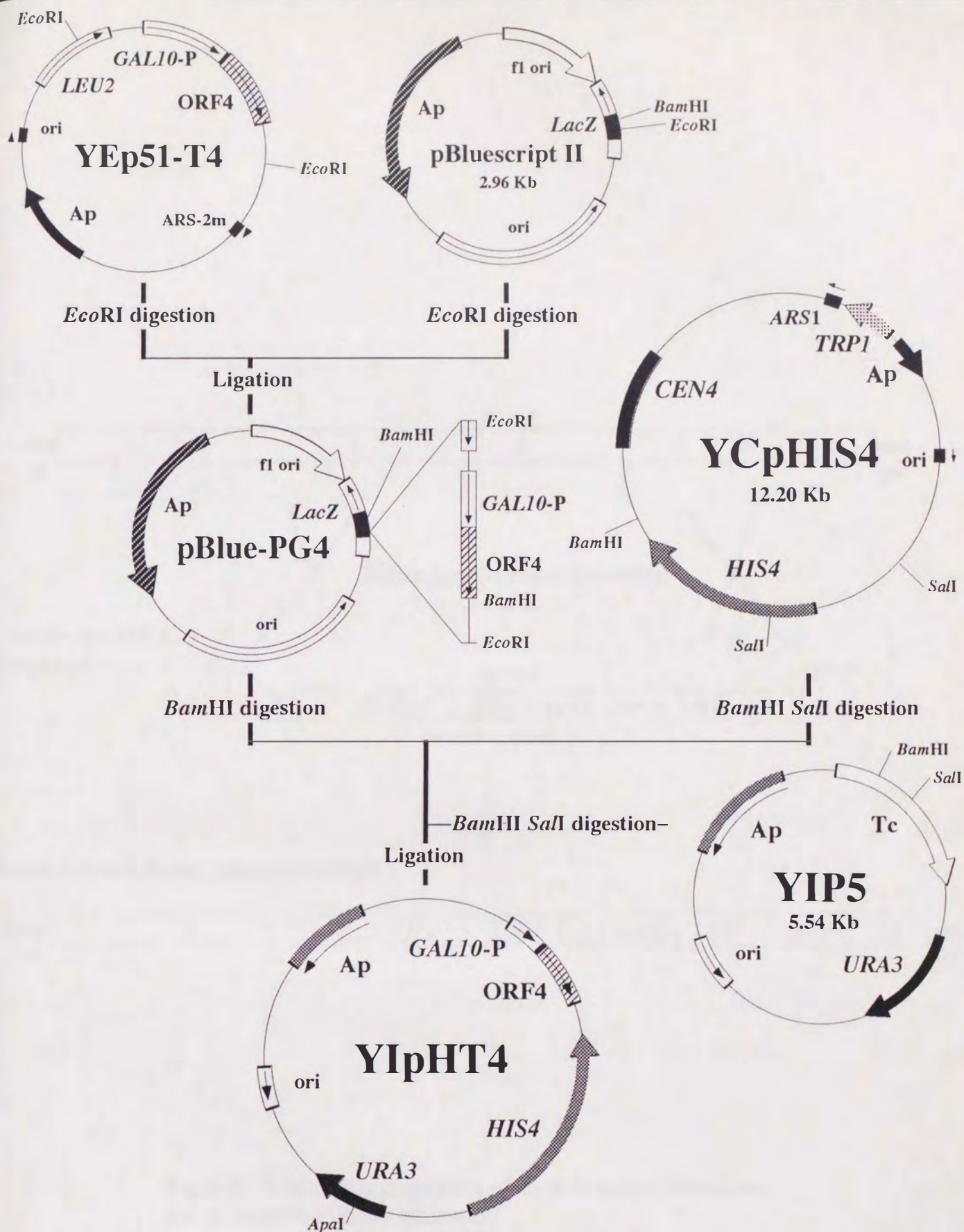


Fig.5-7. Construction of YIpHT4

The *Apal*-digested YIpHT4 was integrated at the *URA3* site on a yeast chromosome to express γ subunit of killer toxin encoded by pGKL1-ORF4.

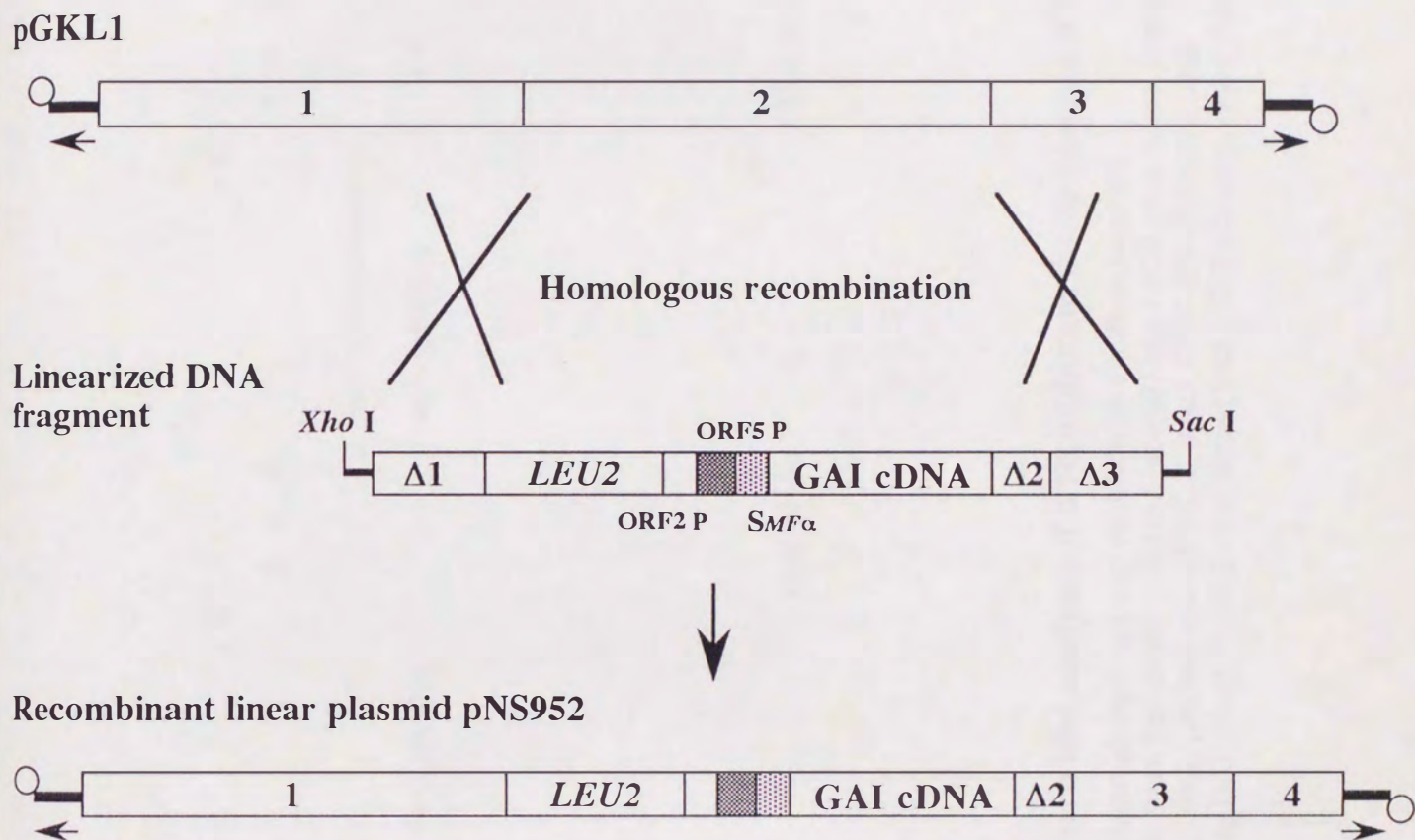


Fig.5-8. Schematic depiction of *in vivo* recombination for generating linear plasmid

Homologous recombination can be taken place between pGKL1 and DNA fragment containing *LEU2* and *GAI* gene. The DNA fragment was generated from pKTF952 digested with *Xho*I and *Sac*I.

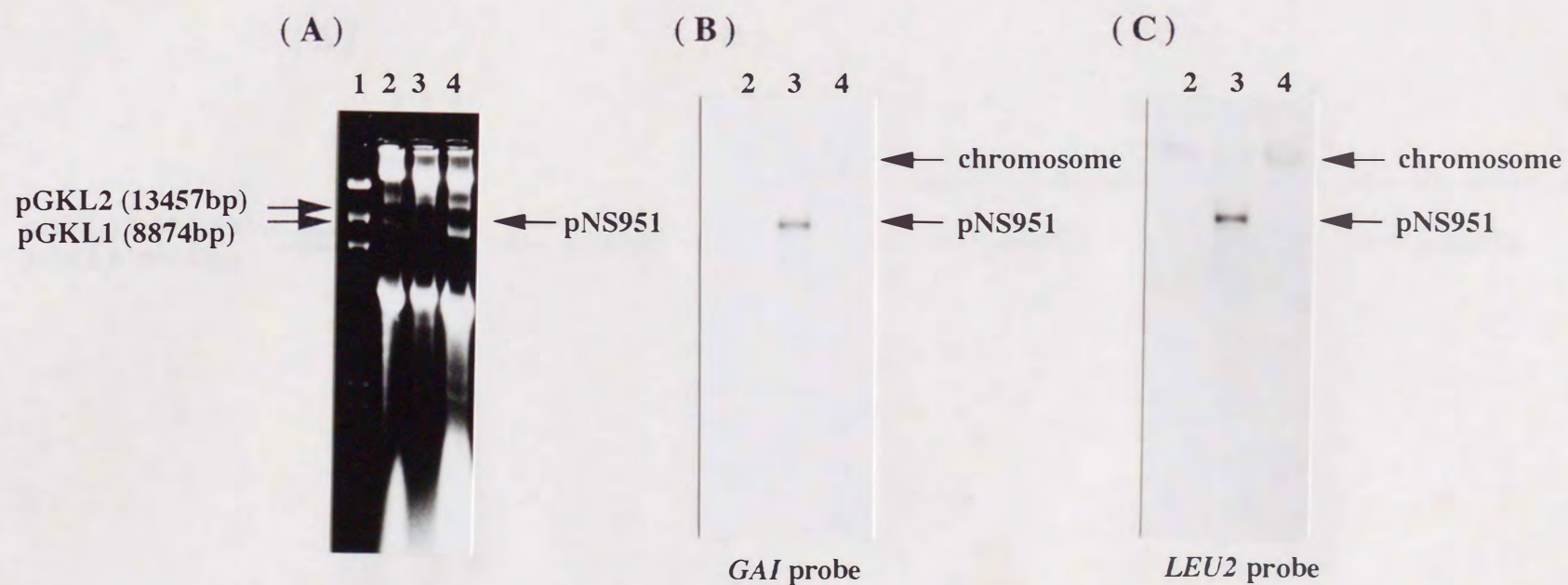


Fig.5-9. Southern blot analyses of a recombinant linear plasmid pNS951

(A) Agarose gel electrophoresis gel was stained with ethidium bromide. The hybridizations were performed with *GAI* gene (B) and *LEU2* gene (C) as probes. Lane1, λ /HindIII; lane2, parental strain F102-2; lane3, F102-2 transformed with pKTF951 secreting GAI; lane4, F102-2 transformed with pKTF951 unsecreting GAI.

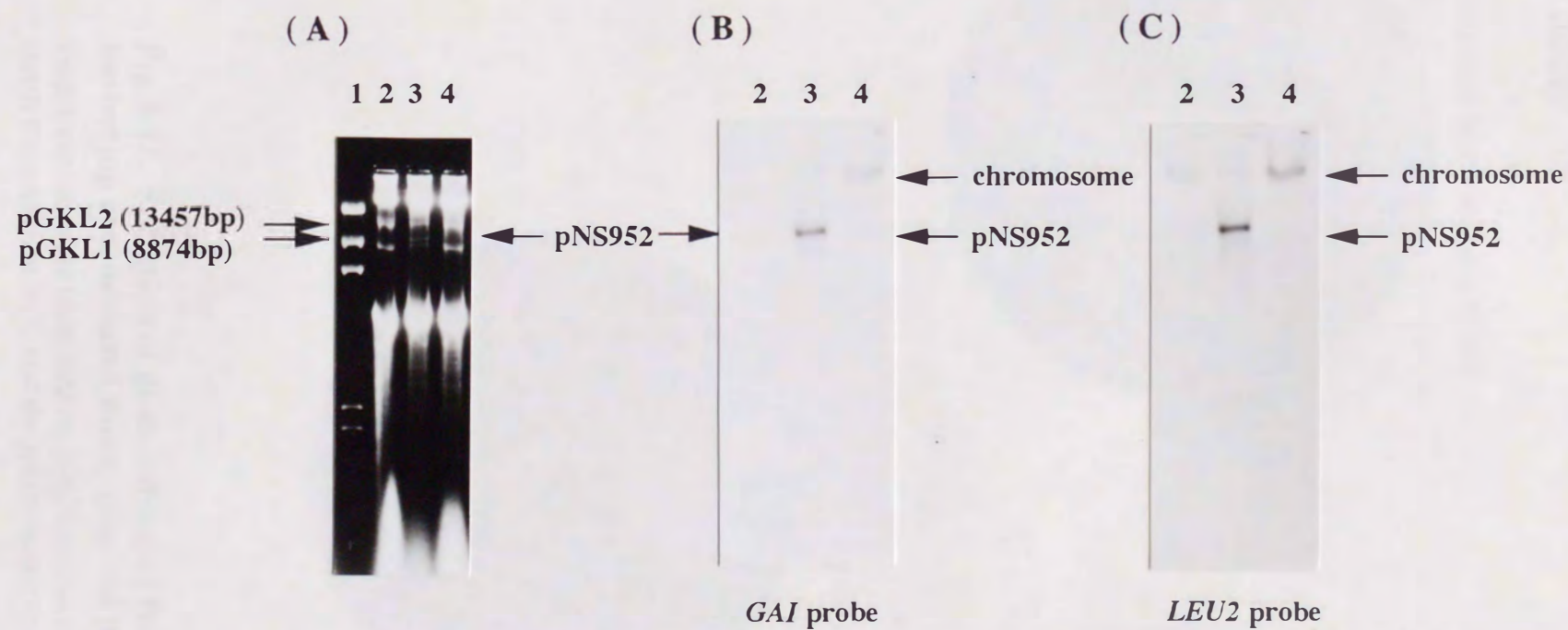


Fig.5-10. Southern blot analyses of a recombinant linear plasmid pNS952

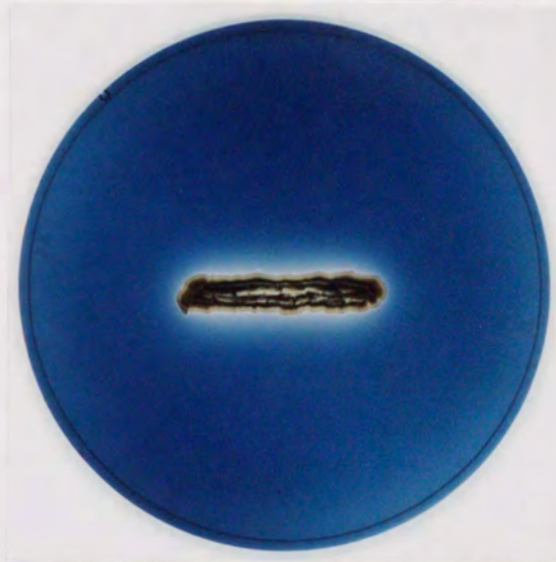
(A) Agarose gel electrophoresis gel was stained with ethidium bromide. The hybridizations were performed with *GAI* gene (B) and *LEU2* gene (C) as probes. Lane1, λ HindIII; lane2, parental strain F102-2; lane3, F102-2 transformed with pKTF952 secreting *GAI*; lane3, F102-2 transformed with pKTF952 unsecreting *GAI*.

halo assay

Transformant harboring pNS951



Transformant harboring pNS952



F102-2 (parent strain)



Fig.5-11. Secretion of glucoamylase I from a transformant harboring recombinant linear plasmid pNS951 or pNS952

Transformants were incubated on YPD medium containing 0.5% soluble starch for a week at 30°C and the plates were exposed with iodine vapor.

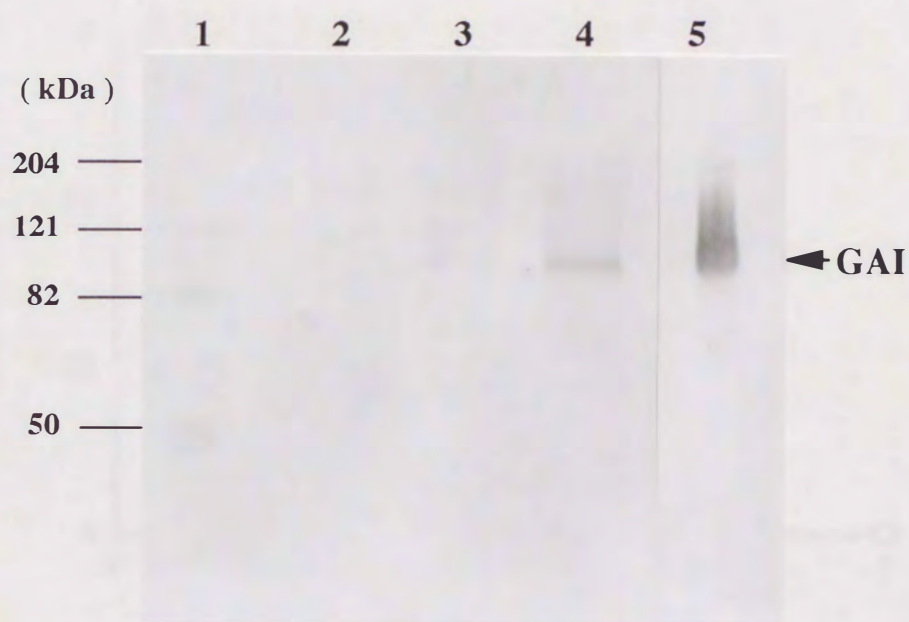


Fig.5-12. Western blot analyses of GAI secreted from the transformant with pKTF951 or pKTF952.

Lane1, molecular weight marker; lane2, parental strain F102-2; lane3, F102-2 transformed with pKTF951; lane4, F102-2 transformed with pKTF952; lane5, GAI positive control.

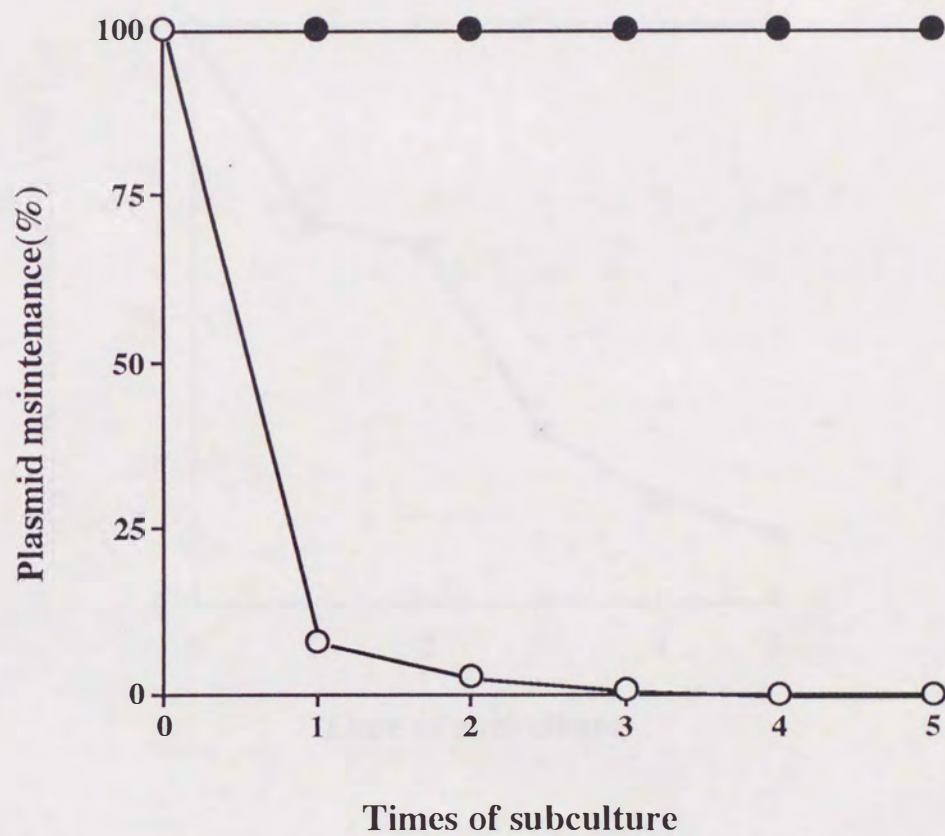


Fig.5-13. Stability of nucleic and cytoplasmic plasmid under nonselective condition

Symbols: ●, F102-2 transformed with pKTF952;
○, CG379 transformed with YEUp3H α -GAI.

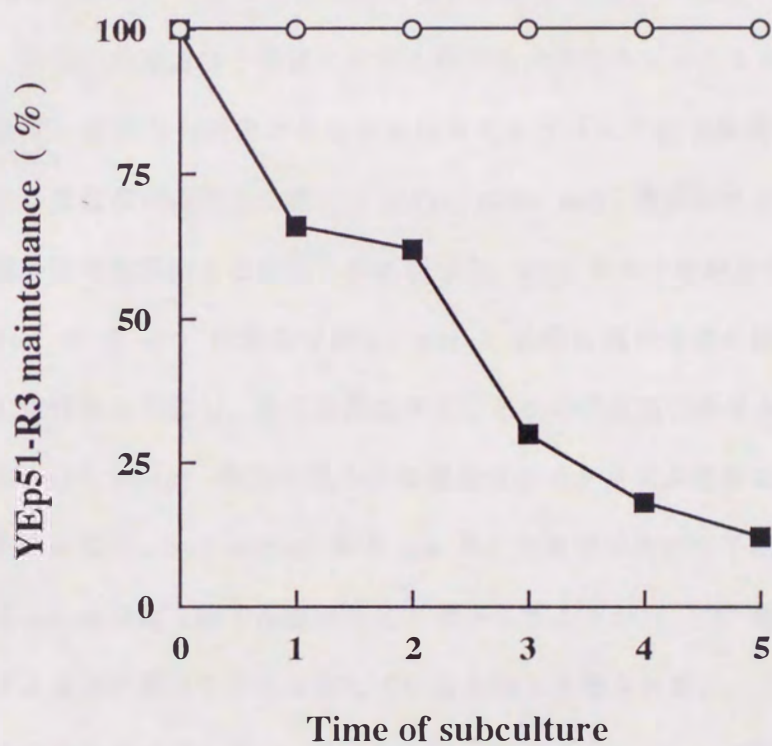


Fig.5-14. Mitotic stability of YEp51-R3 in B511-4C and B511-4C with YIpHT4 under nonselective condition

Symbols: ■, B511-4C transformed with YEp51-R3; ○, B511-4C carrying YIpHT4 on the chromosome transformed with YEp51-R3.

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は発酵醸造における主要な微生物であり、遺伝的育種による新規機能酵母の開発や異種遺伝子発現のための宿主としての開発は、基礎微生物学の進展に寄与するだけでなく、産業上においても重要な課題である。また、遺伝的解析により得られる分化や代謝制御機構の知見は広く高等生物にも普遍化できるものである。本研究は有用菌株交配育成に必須な性的分化機構の新規なメカニズムの解明及び、安定な異種遺伝子発現に有効な新手法の創出を行ったものである。

まず、新規な生活環である遅延性ホモタリズムの起因解明を行った。当研究室の保存菌株の生活環を検討した際、*S. cerevisiae* wy2 株がホモタリズムとヘテロタリズムの中間の性質を示すことが明らかとなった。wy2 株はその四分子において *mater* : non-*mater* が 2 : 2 に正規分離し、*mater* 細胞は継代培養の繰り返しによってはじめて自己二倍体化を起こし、胞子を形成することから“遅延性ホモタリズム”と名づけられた。この wy2 *mater* 細胞に見られる遅延性ホモタリズム現象は、その後の四分子にも見られること及び、wy2 *mater* 株と *ho* 株との交雑株の四分子解析においても正常なホモタリズムの表現型を示す細胞が出現しなかったことから、*HO* 遺伝子の発現を *Trans* に制御する遺伝子群は正常に存在しているものと考察された。

この結果を受け、第 1 章において、まず、wy2 *mater* 細胞に正常な *HO* 遺伝子を導入した。その結果、正常なホモタリズムの表現型を示し、酵母の接合型及び、その変換に関与している *MAT*、*HML*、*HMR* 遺伝子座は正常に存在していることを明らかにした。次に、酵母接合型変換の開始点となる *HO* 遺伝子をクローニングし、その塩基配列を決定した。また、接合型の変換を起こさないヘテロタリズム株 CG379 の *ho* 遺伝子についても同様に、その塩基配列を決定した。1986 年に Russell らが報告した *HO* 遺伝子の塩基配列⁽⁴¹⁾との比較の結果、アミノ酸レベルで wy2*HO* において三つ、*ho* において四つの変異が存在し、どちらにおいても共通に 475 番目の His が Leu へと変異していることを明らかにした。また、wy2*HO* においては Trp²⁹² が TAG amber codon へ

と変異していること、ho においては、酵母に存在するエンドヌクレアーゼに存在する保存領域内のアミノ酸 (Gly²²³) が変異していることを明らかにした。さらに、wy2 H0 及び、ho 遺伝子において確認された変異アミノ酸を正常な H0 遺伝子で相同組換えにより相補した。その結果、どちらも正常なホモタリズムの表現型を示し、H0 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を明らかにした。以上の結果から、wy2 mater 株が示す遅延性ホモタリズム現象及び CG379 株が示すヘテロタリズム現象は、それぞれの H0 のアミノ変異に起因していることを明らかにした。

第 2 章において、第 1 章で明らかにした wy2H0 及び ho のアミノ酸変異のうち、それぞれの生活環を規定しているアミノ酸を特定した。H0、wy2 H0、ho それぞれの遺伝子内に共通に存在する制限酵素部位を利用して、様々な H0 遺伝子の組換え体を構築し、ヘテロタリズム株に導入することでその表現型を検討した。その結果、wy2 mater 株においては wy2 H0 内の TAG amber mutation でサプレッションが起こり、正常に翻訳されるようになるものと考察した。また、その際発現するエンドヌクレアーゼは DNA 結合に関与するアミノ酸 His⁴⁷⁵ の変異のため、その活性が低下しているものと考察した。

大腸菌 *E. coli* での H0 エンドヌクレアーゼの発現及び、その切断活性が Kostriken らによって報告されている^(92, 93)。wy2 H0 及び様々な H0 遺伝子の発現によりそれらの切断活性の比較を行うことで、それぞれの変異アミノ酸の H0 の機能への影響が明らかになると考えられる。しかしながら、MAT 座の切断には H0 以外の cofactor の関与も報告されており⁽⁹⁴⁾、*in vitro* での活性は低いものと考えられる。

また、ho 遺伝子については、我々と同じ時期に Meiron らによってその塩基配列が決定された。彼らの報告によると His⁴⁷⁵ の唯一の変異により、ho は不活性化しているとされている⁽⁴⁵⁾。しかしながら、遅延はするが性転換現象を示す (つまり、H0 活性は保持している) wy2 mater 株の H0 にも共通の変異が存在することから、彼らの報告と矛盾することとなる。以上のことから site-directed mutagenesis 法を用い、部位特異的変異導入により、H0 活性に critical なアミノ酸を決定した。その結果、第 1 章で明らかとなったエンドヌクレアーゼの保存領域内のアミノ酸 Gly²²³ が H0 の活

性に必須であることを明らかにした。

酵母に存在するエンドヌクレアーゼは、いずれもグループ 1 イントロンがコードする DNA エンドヌクレアーゼと高い相同性をもつ保存配列 (12 アミノ酸残基のクラスターからなり、LAGLIDADG モチーフとよばれる) を二個所に組み込んでいる。この構造/機能モチーフは DNA 二重鎖切断の触媒部位として働き、intron homing に直接関与する。また、1990 年に発見され、現在まで 36 の例が報告されているタンパク質のスプライシングにおいて^(95, 96, 97)、切り出される intein のうちエンドヌクレアーゼ活性をもつタンパク質においても、これらの配列が存在し、その活性に必須であることが明らかとなっている。これらの配列を保持している DNA エンドヌクレアーゼは gene homing endonuclease (遺伝子導入エンドヌクレアーゼ) ファミリーと総称されている。プロテインスプライシングが最初に報告されたのは、酵母の液胞膜プロトン輸送性 ATPase (vacuolar membrane ATPase; V-ATPase) の分子量 70 kDa の触媒サブユニットの遺伝子 *VMA1* で、その intein は VDE (*VMA1*-derived endonuclease) とよばれる。酵母の *H0* 遺伝子はこの VDE 因子を起源にしていると Keeling らは報告しており⁽⁹⁸⁾、また、同様な推定は、VDE と *H0* エンドヌクレアーゼの基質切断認識塩基の特異性の比較からも支持されている⁽⁹⁹⁾。このことから、*H0* 内に存在する保存領域はその活性に必須であると考えられる。

第 3 章において *wy2 mater* 細胞で起こると考えられるナンセンスサプレッションについて解析した。当研究室において酵母での発現・分泌系が確立している黒麹菌グルコアミラーゼ I (*GAI*) の遺伝子内に変異プライマーを用いて TAG amber mutation を導入し、その発現について検討した。この変異型 *GAI* の *wy2 mater* 細胞における発現から、弱いながらもナンセンスサプレッションが起こっていることを実験的に証明した。また、*wy2 H0* 遺伝子の TAG amber codon を、ナンセンスサプレッションで TAG の代わりに挿入される可能性のあるアミノ酸へ部位特異的変異導入により変換し、その特定を試みたが、特定までは至らなかった。しかし、その結果、正常型の Trp 以外に、Tyr、Gln、Leu、Ser が挿入する可能性を示した。また、TAG amber codon に挿入さ

れるアミノ酸によってその活性が影響を受けることから、このサプレッションの形式も遅延性ホモタリズム現象の表現型に関与していることを示唆した。酵母のナンセンスサプレッションには tRNA の変異が関与する codon-specific なサプレッションと、codon-nonspecific なオムニポテントサプレッションが考えられ、また、Psi⁺ 因子、allosuppressor 等の関与も考えられる⁽¹⁰⁰⁻¹⁰³⁾。wy2 mater 細胞においては、効率の低いナンセンスサプレッションとその際 TAG に挿入されるアミノ酸の種類によって H0 のエンドヌクレアーゼとしての機能発現の効率とその活性に影響を及ぼし、性転換が遅れる可能性が示唆された。サプレッサーの特定により wy2 mater 株において起こるサプレッションのメカニズムを明らかにする必要がある。

以上の結果から、(1) 遅延性ホモタリズム現象は wy2 mater 細胞の H0 遺伝子内の変異に起因していること、(2) そのアミノ酸変異のうち、292 番目の Trp が TAG amber codon へナンセンス変異が生じていること、そして、その TAG amber codon において効率の低いサプレッションが生じること、(3) ナンセンスサプレッションが生じた結果、翻訳された H0 は DNA 結合に関与する His⁴⁷⁵ の変異によりその活性の低下が生じていることが明らかになった。つまり、wy2 H0 遺伝子においてナンセンスサプレッションが生じること、その際翻訳される H0 の活性を低下させるアミノ酸変異 (DNA 結合に関与する His⁴⁷⁵ の変異、さらにサプレッションによって挿入されるアミノ酸の種類によっても H0 としての機能低下を生じる可能性が考えられる) によって wy2H0 は H0 として十分に機能していないことが明らかになった。以上の要因により、遅延性ホモタリズム現象においては継代培養を繰り返すことで遅れて自己二倍体化細胞が出現するものと考察した。

一方、性転換を生起しないヘテロタリズム酵母においては、ho に存在する保存領域内のアミノ酸 Gly²²³ が変異することにより、エンドヌクレアーゼ活性が失われていることを明らかにした。

第 4 章において高次倍数性酵母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胞子発芽時の熱処理法により、同質の二倍体、四倍体といっ

た高次倍数性酵母を容易に取得できる。本法は栄養要求性などの選択のための遺伝マーカーを必要とせず、接合能を有する倍数性酵母を造成できる。このことから、この高次倍数体造成による有用酵母の育種法は、応用価値が高く、産業上の有効な手段の一つである。本研究において造成した高次倍数体は GAI 遺伝子導入による発現量の検討から異種遺伝子発現の宿主としての有効性を示した。造成した高次倍数体を宿主として YEp 型プラスミドにより GAI 遺伝子を導入した場合、倍数性の増加とともに GAI 活性が上昇した。しかしながら、 δ 配列を利用した染色体組込み型プラスミド pSAK068 による導入においては有為な活性の上昇は確認されなかった。pSAK068 は酵母染色体上に 80 コピー以上存在するという δ 配列において、相同組換えにより多コピーで目的遺伝子を導入することを目的に構築されたものである。しかし、実際は一度の形質転換においては一個所にしか導入されず、その有効性は認められていない。また、その理由については、現在のところ明らかにされていない。染色体に目的遺伝子を相同組換えで導入する場合 1 コピーで導入されることはむしろまれで、一度に数コピータンデムに導入されることが報告されているが、pSAK068 が構築された目的は果たせていない。高次倍数体においては、遺伝子導入のための相同配列が増加することから、染色体導入プラスミドの宿主としての有効性が期待された。しかし、以前の結果同様、一本の染色体上にしか遺伝子導入が確認されず、その効果は改善されなかった。そこで、高次倍数体造成の親株に GAI 遺伝子を導入し、宿主の倍数体化に伴い、目的遺伝子を増幅させることを試みた。その結果、倍数性の増加に伴い GAI 活性を上昇させることに成功した。このことから、高次倍数体造成に用いる親株の GAI 遺伝子量を増加させることにより、その親株から造成した高次倍数体の活性を増加できるものと考察した。pSAK068 を異種遺伝子発現のベクターとして用いた場合、交雑と四分子分離により複数の染色体に目的遺伝子を導入した一倍体細胞を取得できる。この方法を組み合わせて最大で 5 本の染色体上に GAI 遺伝子を導入した一倍体細胞を造成した。その結果、一本の染色体にのみに GAI 遺伝子が導入した株と比較し、約 6 倍の活性上昇を確認した。また、一本よりも二本、二本よりも三本の染色体に GAI 遺伝子が導入した親株から造成した高次倍数体は、倍数性の上昇

に伴う遺伝子量の増加に伴って GAI 活性の上昇を示した。

pSAK068 に存在する δ 配列は酵母のレトロトランスポゾン Ty の一部である。Ty の転写は細胞型によって制御され⁽¹⁰⁴⁾、接合能をもつ a あるいは α の一倍体細胞では接合能をもたない二倍体細胞に比べて Ty の RNA レベルは約 20 倍高い。また、Ty は、ゲノム中を動き回ることによって宿主の遺伝子発現に多大な影響を及ぼし得る。ある遺伝子の 5' 隣接領域に Ty が転移した場合などでは、転写の活性化が起こり得ることがある⁽¹⁰⁵⁾。しかし、その場合も接合能をもつ一倍体でしか維持されない。この Ty の性質に由来して外来遺伝子を δ 配列を利用して染色体に導入した場合、その発現レベルは二倍体細胞において極めて低い⁽⁵⁷⁾。これは δ 配列の haploid-specific な転写に起因すると考えられている^(106, 107)。

以上の結果から、pSAK068 を発現ベクターとして用いることにより、目的遺伝子を異なる染色体上に保持した様々な形質転換体を取得できる。さらに、これら形質転換体の交雑を繰り返すことで目的遺伝子を複数の染色体上に保持した一倍体細胞を取得することができた。また、以上のようにして構築した一倍体株を親株として接合能を有する高次倍数体化を行うことで、Ty の性質に由来する heterozygous な倍数体に及ぼす発現レベルの影響とは関係なく、倍数性増加に伴う導入遺伝子の増幅により目的タンパク質の高発現を可能にした。

第 5 章において、キラー酵母に存在する線状プラスミド及び、そのキラー形質を利用した異種遺伝子発現のための新たなベクター系の構築を行った。*Kluyveromyces lactis* IF01267 より発見された 2 つの線状 DNA プラスミド、pGKL1 及び pGKL2 は、染色体や環状 DNA プラスミドと異なり核内ではなく細胞質中に存在し、細胞質で複製、転写されるという独自の遺伝子発現機構を有している。これらは、細胞融合や形質転換により *Saccharomyces* 属などの異種酵母に導入でき、それらの細胞質中でも自律的に複製することができる。線状 DNA は、環状 DNA と比較して調整が困難であり、大腸菌で増殖することもできないので、ベクターとしての利用を考えた場合不利である。しかし、pGKL プラスミドは、細胞あたり 100 コピー程度存在しており、しかも選択圧

のない条件で安定に保持されること及び、宿主域が広いことなどから、異種遺伝子発現のベクターとしての利用が検討されてきた。

1989 年に、Kamper らが核遺伝子マーカー *LEU2* を *pGKL1* に導入し、転写系の異なる細胞質での発現に成功した。この結果を受けて、*pGKL* プラスミドを発現ベクターとして利用する道が示された。本研究では、*in vivo* の遺伝子組換えにより、*pGKL1* のキラー毒素コード領域である *ORF2* に *GAI* 遺伝子を導入し、*S. cerevisiae* を宿主として、細胞質でグルコアミラーゼを発現、分泌させることに成功した。本研究において構築した組換えプラスミド *pKTF951* 及び *pKTF952* による形質転換体は、生体内組換えプラスミドの他に野生型の *pGKL* プラスミドを保持していることが明らかになった。そこで、形質転換体をロイシンを含まない選択培地で継代培養すると、*GAI* 活性を有し、キラー活性だけを失った株、つまり、野生型の *pGKL1* を脱落させ、組換えプラスミドのみを保持する株を取得した。しかしながら、活性の増加は認められなかった。また、*pGKL* プラスミドのうちプロモーター活性が高いうちのひとつである *pGKL2* の *UCS5* をプロモーターとして用いた場合においても、大きな効果は認められなかった。異種遺伝子の発現効率に、用いる遺伝子の *AT* の含量が関与することも示唆されており、線状プラスミドをベクターとして用いるには解決しなければならない問題が残されている。

一方、キラー毒素発現分泌・毒素耐性といったキラー形質は、*pGKL* プラスミドによって宿主細胞に付与され、その全塩基配列は既に決定されている。毒素タンパク質本体をコードしている *pGKL1-ORF4* のみを発現させることにより、 γ タンパク質は菌体内に蓄積し、宿主細胞の増殖を阻害する。*pGKL1-ORF3* がコードする毒素耐性因子を同時に発現させることで増殖を回復できるものと推察し、これらのキラー形質を利用して *YEp* 型ベクターの安定保持のシステムを構築した。栄養要求性相補の表現型から、*YEp* 型ベクターを安定に保持しているものと考察したが、形質転換体の取得効率の低さや、プラスミドのコピー数、異種遺伝子の発現効率等、検討しなければならない問題が残された。

今日の酵母研究は、基礎生物としての興味に加えて、実用酵母育種等のバイオテクノロジーへの応用であり、生物としての基礎的知見の蓄積と、その蓄積をもとに応用研究

が發展している。

本研究では、従来その存在が知られていなかった新規な生活環である遅延性ホモタリズム現象を分子レベルで解明し、また、実用酵母育種の観点から、異種遺伝子発現のための有用酵母の育種を行った。

謝 辞

本研究を行うにあたり、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました九州大学農学部教授古川謙介博士に深甚な感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、懇切丁寧な御指導、御激励を賜りました九州大学農学部助教吉野貞藏博士に深甚なる謝意を表します。

本研究を進めるにあたり、終始多大なる御助言、御激励を賜りました九州大学農学部助手後藤正利博士に深甚なる謝意を表します。

本研究中、終始有益なる御助言、御激励を賜りました九州大学文部技官南里信也博士に深甚なる謝意を表します。

本研究において実験手法の御指導ならびに御激励を賜りました熊本工業大学教授郡家徳郎博士に深甚なる謝意を表します。

また、本研究において終始御指導ならびに御激励賜りました福德長酒類株式会社研究部の田仁祥信博士、森山政弘氏ならびに林裕之氏に深く感謝いたします。

さらに、本研究において終始御激励、御助言賜りました黒杭隆政氏、早川真奈美さん、友池和章氏、Kwon Il 氏、岩切亮氏、岩下雅生氏、西哲人氏、牧田純氏、白上知幸氏ならびに深田祥予さんをはじめとする九州大学農学部発酵化学講座の諸氏に心から感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Astell, C. R., Ahlstrom-Jonasson, L., Smith, M., Tatchell, K., Nasmyth, K., and Hall, B. D., *Cell*, 27, 25-23 (1981)
- 2) Nasmyth, K. and Tatchell, K., *Cell*, 19, 753-764 (1980)
- 3) Laurenson, P. and Rine, J., *Microbiol. rev.*, 56, 543-560 (1992)
- 4) Rine, J. and Herskowitz, I., *Genetics*, 116, 9-22 (1987)
- 5) Kostriken, R., Strathern, J. K., Klar, A. J. S., and Heffron, F., *Cell*, 35, 167-176 (1983)
- 6) Nasmyth, K., *Cell*, 42, 213-223 (1985)
- 7) Breeden, L. and Nasmyth, K., *Cell*, 48, 389-397 (1987)
- 8) Nasmyth, K., Stillman, D., and Kipling, D., *Cell*, 48, 579-587 (1987)
- 9) Herskowitz, I., *Nature*, 342, 749-759 (1989)
- 10) Stern, M., Jensen, R., Herskowitz, I., *J. Mol. Biol.*, 178, 835-868 (1985)
- 11) Sternberg, P. W., Stern, M., Clark, I., and Herskowitz, I., *Cell*, 48, 567-577 (1987)
- 12) Goutte, C. and Johnson, A. D., *Cell*, 52, 875-882 (1988)
- 13) Miller, A. V., Mackay, V. L., and Nasmyth, K., *Nature*, 314, 598-603 (1985)
- 14) Siliciano, P. G. and Tatchell, K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 2320-2324 (1986)

- 15) Bobola, N., Jansen, R., Shin, T. H., and Nasmyth, K., *Cell*, 84, 699-709 (1996)
- 16) Herskowitz, I. and Sil, A., *Cell*, 84, 711-722 (1996)
- 17) Harashima, S., Nogi, Y., and Oshima, Y., *Genetics* 77, 639-650 (1974)
- 18) Harashima, S. and Oshima, Y., *Genetics* 95, 819-831 (1980)
- 19) Tani, Y., Kurokui, Y., Masaki, C., Hayakawa, M., Ekino, K., Tomohiro, Y., Miyata, A., Furukawa, K., and Hayashida, S., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 2228-2231 (1994)
- 20) Chang, C. N., Matteucci, M., Perry, L. J., Wulf, J. J., Chen, C. Y., and Hitzeman, R. A., *Mol. Cell Biol.*, 6, 1812-1819 (1986)
- 21) Brake, A. J., Merryweather, J. P., Coit, D. G., Heberlin, U. S., Masiarz, F. R., Mullenback, G. T., Urdea, M. S., Velenzulla, P., and Barr, P. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 4642-4646 (1984)
- 22) Inns, M. A., Holland, M. J., McCabe, P. C., Cole, G. E., Wittman, V. P., Tal, R., Watt, K. W. K., Gelfand, D. H., Holland, J. P., and Meade, J. H., *Science*, 228, 21-26 (1985)
- 23) Futcher, A. B. and Cox, B. S., *J. Bacteriol.*, 157, 283-290 (1984)
- 24) Clarke, L. and Carbon, J., *Nature* 287, 504-509 (1980)
- 25) Stinchcomb, D. T., Mann, C., and Davis, R. W., *J. Mol. Biol.*, 158, 157-179 (1982)
- 26) Parent, S. A., Fenimore, C. M., and Bostian, K. A., *Yeast*, 1, 83-138 (1985)
- 27) Tani, Y., Tomohiro, Y., Miyata, A., and Hayashida, S., *J. Ferment. Bioeng.* 69, 184-185 (1990)
- 28) Tani, Y., Tomohiro, Y., Miyata, A., Furukawa, K., and Hayashida, S., *Yeast*, 9, 519-521 (1993)

- 29) 高野勇, 吉栖馨, 寺島豊, 醗工, 44, 150-157 (1966)
- 30) 郡家徳郎, 農化, 38, 158-166 (1964)
- 31) Gunge, N. and Sakaguchi, K., *J. Bacteriol.*, 147, 155-160 (1981)
- 32) Gunge, N., Murata, K., and Sakaguchi, K., *J. Bacteriol.*, 151, 462-464 (1982)
- 33) Sugisaki, Y., Gunge, N., Sakaguchi, K., Yamasaki, M., and Tamura, G.,
J. Bacteriol., 164, 1373-1375 (1985)
- 34) Mascioli, D. W. and Haber, J. E., *Genetics*, 94, 341-360 (1980)
- 35) Haber, J. E., Savage, W. T., Raposa, S. M., Weiffenbach, B., and Rowe, L. B.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 2824-2828 (1980)
- 36) Haber, J. E., Mascioli, D. W., and Rogers, D. T., *Cell*, 20, 519-528 (1980)
- 37) Ivanov, E. L., Sugawara, N., White, C. I., Fabre, F., and Haber, J. E.,
Mol. Cell. Biol., 14, 3414-3425 (1994)
- 38) Hereford, L., Fahriner, K., Wooldford, J. Jr., Rosbash, M., and Kaback, D.,
Cell, 18, 1261-1271 (1979)
- 39) Southern, E. M., *J. Mol. Biol.*, 98, 503-517 (1975)
- 40) Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467 (1977)
- 41) Russell, D. W., Jensen, R., Zoller, M. J., Burke, J., Errede, B., Smith, M.,
and Herskowitz, I., *Mol. Cell. Biol.*, 6, 4281-4294 (1986)
- 42) Nakagawa, K., Morishima, N., and Shibata, T., *J. Biol. Chem.*, 266, 1977-1984 (1991)
- 43) Grunstein, M. and Hogners, D. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72,
3961-3965 (1975)

- 44) Orr-Werver, T. L., Szostak, J. W., and Rothstein, R. J.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 6354-6358 (1981)
- 45) Meiron, H., Nahon, E., and Raveh, D., *Curr. Genet.*, 28, 367-373 (1995)
- 46) Deng, W. P. and Nickoloff, J. A., *Anal. Biochem.*, 200, 81-88 (1992)
- 47) Hawthorne, D. C., and Mortimer, R. K., *Genetics*, 60, 735-742 (1968)
- 48) Schweizer, E., Mackechnie, C., and Halvorson, H. O.,
J. Mol. Biol., 40, 261-277 (1969)
- 49) Beckman, J. S., Johnson, P. F., and Abelson, J., *Science*, 196, 205-208 (1977)
- 50) Ter-Avanesyan, M. D., Dagkesamanskaya, A. R., Kushnirov, V. V., and Smirnov, V. N.,
Genetics, 137, 671-676 (1994)
- 51) Kushnirov, V. V., Ter-Avanesyan, M. D., Telckov, M. V., Surguchov, A. P., Smirnov, V. N.,
and Inge-Vechtomov, S. G., *Gene*, 66, 45-54 (1988)
- 52) Stansfield, I., Jones, K. M., Kushnirov, V. V., Dagkesamanskaya, A. R.,
Poznyakovski, A. I., Paushkin, S. V., Nierras, C. R., Cox, B. S.,
Ter-Avanesyan, M. D., and Tuite, M. F., *EMBO J.* 14, 4365-4373 (1995)
- 53) Derkatch, I. L., Bradley, M. E., and Liebman, S. W.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 2400-2405 (1998)
- 54) Krujan, J. and Herskowitz, I., *Cell*, 30, 933-943 (1982)
- 55) Kitada, K. and Hishinuma, F., *Curr. Genet.*, 13, 1-5 (1988)
- 56) Sakai, A., Shimizu, Y., and Hishinuma, F.,
Appl. Microbiol. Biotechnol., 33, 302-306 (1990)
- 57) Sakai, A., Ozawa, F., Higashizaki, T., Shimizu, Y., and Hishinuma, F.,
Bio/Technol., 9, 1382-1385 (1991)

- 58) Cameron, J. R., Loh, E. Y., and Davis, R. W., *Cell*, 16, 739-751 (1979)
- 59) Hayashida, S., Kuroda, K., Ohta, K., Kuhara, S., Fukuda, K., and Sakaki, Y.,
Agric. Biol. Chem., 53, 135-141 (1989)
- 60) Bernfeld, P., "Methods in Enzymology", Vol. 1, ed. by Colowick, S. P. and Kaplan, O.,
Academic Press Inc., New York, pp. 149-158 (1955)
- 61) Laemmli, U. K., *Nature*, 227, 680-685 (1970)
- 62) Fukuda, K., Teramoto, Y., and Hayashida, S.,
Biosci. Biotech. Biochem., 56, 8-12 (1992)
- 63) "タンパク質の化学 (上)" 日本生化学会編、pp. 41-57 (1987)
- 64) Goto, M., Semimaru, T., Furukawa, K., and Hayashida, S.,
Appl. Environ. Microbiol. 60, 3926-3930 (1994)
- 65) Lin, J. P., Aker, M., Sitney, K. C., and Mortimer, R. K.,
Gene, 49, 383-388 (1986)
- 66) Weiss, W. A. and Friedberg, E. C., *J. Mol. Biol.*, 192, 725-735 (1986)
- 67) Pure, G. A., Robinson, G. W., Naumovski, L., and Friedberg, E. C.,
J. Mol. Biol., 183, 31-42 (1985)
- 68) Hosford, E. A., Sone, H., and Takano, J., *Curr. Genet.*, 22, 357-361 (1992)
- 69) Watari, J., Takata, Y., Ogawa, M., Nishikawa, N., and Kamimura, M.,
Agric. Biol. Chem., 53, 901-903 (1989)
- 70) Burton, K., *Biochem. J.*, 62, 315- (1956)
- 71) Aigle, H., Erbs, D., and Moll, M., *J. Inst. Brew.*, 89, 72- (1983)

- 72) Smith, R. A., Duncan, M. J., and Moir, D. T.,
Science, 229, 1219-1224 (1985)
- 73) Chang, C. N., Matteucci, M., Perry, L. J., Wulf, J. J., Chen, C. Y., and Hitzeman, R. A.,
Mol. Cell. Biol., 6, 1812-1819 (1986)
- 74) Mochizuki, D., Miyahara, K., Hirata, D., Matsuzaki, H., Iatano, T.,
Fukui, S., and Miyakawa, T., *J. Ferment. Bioeng.* 77, 468-473 (1994)
- 75) Hishinuma, F., Nakamura, K., Hirai, K., Nishikawa, R., Gunge, N., and Maeda, T.,
Nucl. Acids Res., 12, 7581-7597 (1984)
- 76) Stark, M. J. R., Milcham, A. J., Romanos, M. A., and Boyd, A.,
Nucl. Acids Res., 12, 6011-6030 (1984)
- 77) Sor, F. and Fukuhara, H., *Curr. Genet.*, 9, 147-155 (1985)
- 78) Tomasino, M., Ricci, S., and Galeotti, C. L.,
Nucl. Acids Res., 16, 5863-5878 (1988)
- 79) Kamper, J., Meinhardt, F., Gunge, N., and Esser, K.,
Nucl. Acids Res., 17, 1781 (1989)
- 80) Kamper, J., Esser, K., Gunge, N., and Meinhardt, F.,
Curr. Genet., 19, 109-118 (1991)
- 81) Tanguy-Rougeau, C., Chen, X. J., Wesolowski-Louvel, M., and Fukuhara, H.,
Gene, 91, 43-50 (1990)
- 82) Cong, Y. S., Louvel, M. W., and Fukuhara, H., *Gene*, 147, 125-129 (1994)
- 83) Meinhardt, F., Wodara, C., Larsen, M., and Schickel, J.,
PLASMID, 32, 318-327 (1994)
- 84) Stark, M. J. R. and Boyd, A., *EMBO J.*, 5, 1995-2002 (1986)

- 85) Tokunaga, M., Kawamura, A., Kitada, K., and Hishinuma, F.,
J. Biol. Chem., 265, 17274-17280 (1990)
- 86) Tokunaga, M., Wada, N., and Hishinuma, F.,
Nucl. Acids Res., 15, 1031-1046 (1987)
- 87) Gunge, N., Tamaru, A., Ozawa, F., and Sakaguchi, K.,
J. Bacteriol., 145, 382-390 (1981)
- 88) Schaffrath, R., Stark, M. J., Gunge, N., and Meinhardt, F.
Curr. Genet., 21, 357-363 (1992)
- 89) Gunge, N. and Sakaguchi, K., *J. Bacteriol.*, 147, 155-160 (1981)
- 90) Schickel, J., Helming, C., and Meinhardt, F., *Nucl. Acids Res.*, 24, 1879-1886 (1996)
- 91) Schrunder, J., Gunge, N., and Meinhardt, F., *Curr. Microbiol.*, 33, 323-330 (1996)
- 92) Kostriken, R. and Herffron, F.,
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 49, 89-96 (1984)
- 93) Jin, Y., Binkowski, G., Simon, L. D., and Norris, D.,
J. Biol. Chem., 272, 7352-7359 (1997)
- 94) Wang, R., Jin, Y., and Norris, D., *Mol. Cell. Biol.*, 17, 770-777 (1997)
- 95) Hirata, R., Ohsumi, Y., Nakano, A., Kawasaki, H., Suzuki, K., and Anraku, Y.,
J. Biol. Chem., 265, 6726-6733 (1990)
- 96) Anraku, Y. and Hirata, R., *J. Biochem.*, 115, 175-178 (1994)
- 97) Anraku, Y., *Gene To Cells*, 2, 359-367 (1997)
- 98) Keeling, P. J., Roger, A. J., *Nature*, 375, 283- (1995)

- 99) Gimble, F. S., Wang, J., *J. Mol. Biol.*, 263, 163-180 (1996)
- 100) Weng, Y., Czaplinski, K., and Peletz, S. W., *Mol. Cell. Biol.*, 16, 5491-5506 (1996)
- 101) Cox, B. S., Tuite, M. F., and McLaughlin, C. S., *Yeast*, 4, 159-178 (1988)
- 102) Glover, J. R., Kowal, A. S., Schirmer, E. C., Patino, M. M., Liu, J. J., and Lindquist, S., *Cell*, 89, 811-819 (1997)
- 103) Tuite, M. F., *Nature*, 370, 327-328 (1994)
- 104) Elder, R. T., St. Jhon, T. P., Stinchcomb, D. T., and Davis, R. W., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 45, 581-591 (1980)
- 105) Williamson, V. M., Cox, D., Young, E. T., Russell, D. W., and Smith, M., *Mol. Cell. Biol.*, 3, 20-31 (1983)
- 106) Errede, B., Company, M., and Hutchinson III, C. A., *Mol. Cell. Biol.*, 7, 258-265 (1987)
- 107) Company, M. and Errede, B., *Mol. Cell. Biol.*, 7, 3205-3211 (1987)

