

實用酵母の形質轉換系開発のための
基礎的研究

尾形 智夫

①

实用酵母の形質転換系開発のための
基礎的研究

尾形 智夫

目次

序論	2
実験材料及び実験方法	7
第一章 酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> のアルコール脱水素酵素 I 遺伝子 プロモーターに接続した大腸菌のアミノグリコシド ホストトランスフェラーゼ II 遺伝子 (<i>ADHI-APT2</i> 遺伝子) の構築	12
第二章 改変したアミノグリコシドホストトランスフェラーゼ II 遺伝子 (<i>ADHI-APT2</i> 遺伝子) を利用した <i>Saccharomyces</i> 属 実用酵母の形質転換系の構築	24
第三章 電気パルス法を用いた <i>Saccharomyces</i> 属実用酵母の形質転換 の試み	35
第四章 酵母 <i>Hansenula anomala</i> の形質転換のための選択マーカー 遺伝子としての <i>URA3</i> 遺伝子のクローニング	41
第五章 酵母 <i>Hansenula anomala</i> の <i>ura3</i> 変異株の分離および これを用いた形質転換	57
第六章 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> の遺伝子の <i>Hansenula anomala</i> における機能性の検討	69
総括	82
発表論文	86
引用文献	87
謝辞	95

序論

酵母は古来より人間生活に結びついている生物である。ビール、日本酒、ワイン焼酎等の酒類製造やパン製造等の食品製造に用いられる *Saccharomyces* 属酵母が最も身近な存在であろう。これ以外にも、味噌、醤油製造での *Zygosaccharomyces rouxii* が古くから利用されている。一方、食品工場等から排出される高濃度の有機物を含む排水の処理には、*Hansenula* 属、特に *Hansenula anomala* に属する酵母を用いることが有効であることが Yoshizawa(1978) によって示されており、さらに、飼料としての SCP (Single Cell Protein) の開発として、石油系原料より *Candida lipolytica*、*C. maltosa*、*C. utilis* の利用が考えられており、幅広い分野で各種酵母がその特性に応じての利用の可能性が示されている。これらの実用株の大部分は天然から利用目的に応じて、選択分離された株であり、これらの菌株に改良を加えるためには実用株に適した育種法が必要である。

Saccharomyces 属実用酵母の育種については、従来より選抜法、交配法、突然変異法、プロトプラスト融合法などが試みられてきた。この例として、突然変異法と選抜法を組み合わせ、清酒酵母で泡なし酵母を造成したこと (Ouchi and Akiyama 1971)、プロトプラスト法を用いて、ビール酵母に凝集性やキラー性を付与したこと (Russell and Stewart 1979, Young 1981) 等が報告されている。しかし、*Saccharomyces* 属実用酵母は通常二倍体あるいは高次倍数体、あるいは異数体であるため、交配に必要な 1 倍体を取得する際、形質分離によって親株の優れた形質が欠損する可能性があり、また突然変異に際しても目的の遺伝子座における変異に加え、変異操作の過程で親株の優れた形質に損傷を与える危険性がある。プロトプラスト

融合法においても、優れた形質以外に望ましくない形質も導入される可能性がある。これらの方法に比べ、遺伝子組換え手法を用いた育種は望ましい形質のみを導入する、部位特異的な遺伝的操作が可能のため、合目的な実用株の育種法としては優れていると考えられる。

遺伝子組換え手法を用いた育種は、プラスミドDNAを宿主に導入する方法を用いる。この際、導入された宿主がプラスミド上に存在する選択遺伝子により、元の株の形質が変化することで選択する、いわゆる形質転換を利用することが通常である。形質転換には、菌体の処理とプラスミドDNA上に存在する選択遺伝子が重要となる。*Saccharomyces cerevisiae*の形質転換は、酵素処理することでプロトプラスト化した菌体にポリエチレングリコール (PEG)、カルシウムイオン存在下でDNAと接触させることで形質転換株を得るプロトプラスト法がHinnen *et al.* (1978) やBeggs

(1978) によって開発され、さらにIto *et al.* (1983) によって菌体をリチウムイオン等で処理することで、プロトプラスト化せず簡便に形質転換株を得る、いわゆるリチウム法が開発されている。また、Becker and Guarente (1991) は酵母を電気パルス処理することで、高効率に形質転換株を得ることができることを報告している。しかし、これらの報告はすべて実験室酵母を用いたもので、実用酵母は実験室酵母と異なる点がいくつかあり、実験室酵母の形質転換の方法をそのまま全ての

Saccharomyces 属実用酵母に用いることはできないであろう。その理由の一つに、*S. cerevisiae* に分類されている実験室酵母は、本来はパン酵母であったものより、分離継代され、あるいは変異処理、接合を繰り返したものである。したがって、実際に酒類製造等食品製造に用いられる *Saccharomyces* 属実用酵母と異なる点も数多く存在する。また、これらの形質転換は、宿主の栄養要求性等の変異遺伝型に対し、それ

を相補する野生型遺伝子を用いることで、変異を相補する表現型を有する形質転換株を選択することによって行ってきたものである。しかし、この形質転換の方法をそのまま実用酵母に用いることは前記の理由によって適当ではない。すなわち、宿主に栄養要求性の変異を付与する必要がある、宿主の多数倍性、異数倍性ゆえに、変異を付与することが困難であり、さらに、変異操作の結果、他の形質、特に優良形質に損傷を与える危険性があるからである。このため、実用酵母の形質転換には宿主の遺伝型によらない選択マーカー遺伝子（優性マーカー遺伝子）の利用が必要であり、従来より各種薬剤に対する耐性遺伝子の利用が試みられてきた。実例としては、銅耐性 (Forgel *et al.* 1982, Hinchliff *et al.* 1986)、メソトレキセート耐性 (Zhu *et al.* 1985)、G-418耐性 (Jimenez *et al.* 1980, Sakai and Yamamoto 1986, Webster and Dickson 1983)、クロラムフェニコール耐性 (Hadfield *et al.* 1986)、ハイグロマイシンB耐性 (Gritz *et al.* 1983) を利用した *S. cerevisiae* の形質転換が報告されている。ところが、実用酵母の中には各種薬剤に対する耐性の強い株もあり、前記した薬剤耐性遺伝子を用いた形質転換の方法をそのまま全ての *Saccharomyces* 属実用酵母の形質転換に用いることは不可能であると考えられる。

Hansenula anomala を用いた排水処理は、高濃度の有機物や SS (suspended solids) を含む排水、例として清酒製造場からの洗米排水や蒸留酒製造場より蒸留排水に有効であることが報告されている (Yoshizawa 1978, Moriya *et al.* 1990)。この時、凝集性や熱安定性等菌株の性質が排水処理に重要である。排水処理に用いられている酵母である *H. anomala* は、このこと以外にも、一部にキラー酵母の存在 (Young and Yagi 1978, Kagiya *et al.* 1988)、あるいはヘム非依存性の呼吸系の存在 (Sakajo *et al.* 1991) 等、生化学的に興味深いことが見いだされている。しかし、遺伝学的研

究や宿主・ベクター系の確立のための試みはみられていない。*H. anomala*の宿主・ベクター系の確立は排水処理に用いられている実用酵母の育種改良のみならず、前記した生化学的研究に対しても寄与することが大きいものと期待される。また、これらの特性を利用して、有用物質生産の宿主とすることも有望である。*S. cerevisiae*の形質転換に続いて、*Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse 1981)、*Kluyveromyces lactis* (Das and Hollenberg 1982)、*C. maltosa* (Takagi *et al.* 1986)、*C. boidinii* (Sakai *et al.* 1993) 等の酵母における形質転換の報告がある。これらのなかには、必ずしも遺伝学的研究が蓄積されていない種も存在する。これらの種の形質転換系の確立に至る方法を*H. anomala*の宿主・ベクター系の確立に応用しようのではないかと考えられた。

以上に記載した背景を基にし、本研究では実用酵母のうち、*Saccharomyces*属実用酵母と*H. anomala*の形質転換系の開発を検討した。第一章においては、*Saccharomyces*属実用酵母の形質転換の際の選択マーカー遺伝子として、大腸菌のアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ II (*apt2*) 遺伝子の利用について検討した。*apt2* 遺伝子に、*S. cerevisiae*のアルコール脱水素酵素 I (*ADH1*) 遺伝子のプロモーターを接続することでその発現を強化することを試み、形質転換株の抗生物質 G-418 に対する耐性度が顕著に上昇することを期待した。第二章においては、*S. cerevisiae*の*ADH1* プロモーターを接続することで発現が強化された *apt2* 遺伝子 (*ADH1-APT2* 遺伝子) を選択マーカーとして、*Saccharomyces*属実用酵母のなかで薬剤に対する耐性が強い株においても形質転換株を選択することが可能であるかどうかを検討した。第三章においては、*Saccharomyces*属実用酵母の中で、形質転換能が低く、リチウム法では形質転換株が得られなかった株について、実験室酵母では

高効率で形質転換株が得ることができると報告されている電気パルス法を用いることを検討した。第四章においては、排水処理において用いられている実用酵母である *H. anomala* の形質転換系の確立のために、選択マーカー遺伝子として、オロチジン-5'-リン酸脱炭酸酵素 (ODCase) をコードする *URA3* 遺伝子のクローニングを試みた。第五章においては、形質転換の際の宿主として用いるため、*H. anomala* の *ura3* 変異株を分離したこと、及びこの変異株を用いて挿入型の形質転換を試みた。第六章においては、*H. anomala* の形質転換において、優性選択マーカー遺伝子として、*S. cerevisiae* の *ADHI* 遺伝子のプロモーターが接続された大腸菌の *apt2* 遺伝子を用いることの可能性を検討した。併せて、*S. cerevisiae* のプロモーターの *H. anomala* における機能性を検討した。

実験材料及び実験方法

1、使用菌株

実験室酵母としては、*Saccharomyces cerevisiae* YNN27 (MAT α *trp* 1-289 *ura* 3-52 *gal* 2) を用いた。*Saccharomyces* 属実用酵母としては、以下に示すものを用いた。下面発酵ビール酵母としては、*S. bayanus* IFO 2031、*S. pastorianus* IFO 10010、*S. pastorianus* IFO 10011、上面発酵ビール酵母としては、*S. cerevisiae* IFO 1951、*S. cerevisiae* IFO 1952、清酒酵母としては、*S. cerevisiae* IFO 2347 (協会酵母7号)、*S. cerevisiae* IFO 2377 (協会酵母9号)、ワイン酵母としては、OC-2株とGeisenheim 74株を用いた。

Hansenula anomala は、洗米排水に対する処理能の高い凝集性の酵母として、自然界より分離された *H. anomala* J-224 株を用いた (佐藤ら 1986)。*H. anomala* の1倍体は、J-224 株をランダム胞子分離法を用いて分離した J-224-H1 株を用いた。*H. anomala* の *ura3* 変異株は、Boeke *et al.* (1984) の方法を用いて、5-fluoroorotic acid (5-FOA) に対する耐性を利用して分離した。

プラスミドの分離および遺伝子ライブラリーの作製のため、大腸菌は、*Escherichia coli* HB101 (F^- , *ara*-14 *gal* K2 *hsd*S20 (r_B^- m_B^-) *mtl*-1 *pro* A2 *rec* A13 *rsp* L20 *sup* E44 *xyl*-5)、*E. coli* JM109 (*rec*A1 *thi* D(*lac*-*pro*AB) *end*A1 *gyr*A96 *hsd*R17 *sup*E44, F' [*tra*D36 *pro*AB+ *lacI*^q *lac*ZDM15])、*E. coli* P2392 (F^- , *gal* K2 *gal* T22 *hsd*R514 *lac* Y1 *met* B1 *sup*E44 *sup* F58 *trp*R55, P2)、ラムダファージはEMBL3を用いた。

2、使用培地

酵母 *S. cerevisiae* あるいは、*H. anomala* の培養は、栄養培地として YPD 培地 (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) あるいは、最少培地として SD 培地 (2% glucose, 0.67% yeast nitrogen base w/o amino acids) に要求性の物質を加えておこなった。大腸菌の培養では、LB 培地 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, pH7.5)、2 × YT 培地 (1.6% tryptone, 1% yeast extract, 0.5% NaCl, pH7.6) を用いた。

3、酵母の形質転換

S. cerevisiae あるいは、*H. anomala* の形質転換は、リチウム法 (Ito *et al.* 1983) あるいは、電気パルス法 (Becker and Guarente 1991) を用いた。それぞれの方法は、目的に応じて一部に変更を加えた。例えば、リチウム法を用いて、抗生物質 G-418 耐性を選択マーカーとして形質転換株を選択する場合は、Sakai and Yamamoto (1986) の方法を用いた。すなわち、形質転換に供した酵母菌体は、リチウム塩、ポリエチレングリコール (PEG) 処理した後、菌体を洗浄し、YPD 培地に懸濁し、30°C で 4 時間振盪した後、選択培地に塗布した。電気パルス法を用いて、抗生物質 G-418 耐性を選択マーカーとして、形質転換株を選択する場合は、蒸留水で洗浄した菌体を、プラスミド DNA 存在下でパルス処理後、YPD 培地に懸濁し、30°C で 4 時間振盪した後、選択培地に塗布した。電気パルスの条件は本文中に記載した。

4、酵母の G-418 耐性度の測定

酵母の抗生物質 G-418 耐性度は、次のように測定した。G-418 が各濃度で含まれる YPD 培地に、各酵母を、 2×10^6 以下の濃度で植菌し、生育を調べた。生育は 600nm

の吸光度の変化で確認した。

5、酵母 *Hansenula anomala* の染色体ライブラリーの作製

酵母 *H. anomala* からの染色体DNAは、Cryer *et al.* (1975) の方法に従って調製した。調製されたDNA 100 μ g/ml を、制限酵素 *Sau* 3A-I で部分分解した後、5% から20% のショ糖密度勾配遠心法を用いて、9-25 kbp のDNAフラグメントを分離した。分離したDNA断片 5 μ g/ml を、 λ ファージの誘導体であるEMBL3の *Bam* HI分解物とライゲーションした後、*in vitro* packagingした。ファージ混合物を、大腸菌のP2392株にtransfectionし、*H. anomala* の染色体ライブラリーとした。

6、DNAハイブリダイゼーション

アガロース電気泳動したサンプルを、Hybond-N⁺ (アマシヤム社製) にアルカリブロット法を用いて転写した。low stringency の条件でのハイブリダイゼーションは、55°Cで、6 \times SSC、5 \times Denhardt's solution、0.1% SDS、20 μ g/ml 変性サケ精子DNAの溶液でおこなった。プローブの標識は、³²Pによる放射能標識、酵素ペルオキシダーゼによる酵素標識のいずれかでおこなった。放射能標識は、 α -³²P-dCTPを用い、宝酒造社製のランダムプライム標識キットの方法に従った。酵素標識は、アマシヤム社のECLダイレクトDNA/RNA標識検出システムを用いた。

7、*H. anomala* *ura3* 変異株の分離

H. anomala の *ura3* 変異株は、Boeke *et al.* (1984) の方法を用いて、5-fluoroorotic acid (5-FOA) に対する耐性を利用して分離した。1倍体である *H. anomala* J-224-H1

を、YPD培地で培養し、対数増殖期中期にて集菌し、0.1 M リン酸カリウム緩衝液に、菌体濃度 10^8 程度になるように懸濁した。2ml の菌懸濁液に変異誘発剤であるethyl methanesulfonate (EMS) $150 \mu\text{l}$ 加え、 30°C で1時間保温した。滅菌水にて洗浄後、5% チオ硫酸ナトリウム水溶液 8ml 加え、室温にて10分間放置した。滅菌水にて洗浄後、菌懸濁液を $20 \mu\text{g/ml}$ のウラシル、0.1% 5-FOA を含むSD培地に塗布し、5-FOA 耐性変異株を分離した。得られた*H. anomala* の5-FOA 耐性変異株より、オロチジン-5'-リン酸炭酸酵素 (ODCase) 活性を測定し、*ura3* 変異株を分離した。

8、オロチジン-5'-リン酸炭酸酵素 (ODCase) の測定

ODCase の活性はYoshimoto *et al.* (1978) の方法に従い、測定した。YPD培地で培養した酵母菌体を、洗浄後、0.1M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) -5mM β -メルカプトエタノールにて懸濁し、ガラスビーズにて破碎し、無細胞抽出液を作製した。ODCase の活性は、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) -0.1 M メルカプトエタノール -1mM オロチジン-5'-リン酸ナトリウム中で、基質であるオロチジン-5'-リン酸の減少を285 nm の吸光度の減少で測定した。オロチジン-5'-リン酸の分子吸光計数は、 $1.65 \times 10^3 \text{ cm}^2 \text{ M}^{-1}$ で、1U は、 $1 \mu\text{mol}$ のオロチジン-5'-リン酸をウリジン-5'-リン酸に変換する活性を示したものである。

9、*H. anomala ura3* 変異株と*H. anomala*の形質転換株の安定性測定

H. anomala ura3 変異株の形質の安定性は、次のように測定した。*H. anomala ura3* 変異株をYPD培地で培養し、新しいYPD培地に1%のサイズで植菌した。10世代以上培養した後、培養液をSD寒天培地に塗布し、コロニーの出現率を、YPD培地に塗布

して出現した生菌数に対する割合で示した。*H. anomala*の形質転換株の安定性は次のように測定した。*H. anomala*の形質転換株をYPD培地で定常期まで培養し、新しいYPD培地に1%のサイズで植菌した。10世代以上培養した後、培養液の一部をYPD寒天培地に塗布し、コロニーを形成させた後、各コロニーをSD寒天培地とウラシルを添加したSD寒天培地に移し、ウラシル非要求性の形質の維持の割合で示した。

10、部位特異的な塩基配列の改変

*H. anomala*のURA3遺伝子のプロモーターの機能性を検討するために、部位特異的な塩基配列の変換を行った。*H. anomala*の翻訳開始点にEcoRI部位を導入するために、AAAAGATATATCACTGAATTCAAAACITTAの配列のオリゴヌクレオチドを用い、アマシャム社製のin vitro mutagenesis kitを用いた。

第一章 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のアルコール脱水素酵素 I 遺伝子 プロモーターに接続した大腸菌のアミノグリコシドホスホトラ ンスフェラーゼ II 遺伝子 (*ADHI-APT2* 遺伝子) の構築

緒言

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、単細胞生物であり、遺伝学的取扱いも容易であり、真核生物のモデル系として以前より用いられてきた。特に、Hinnen *et al.* (1978) や Beggs (1978) によって、形質転換系が確立されて以来、分子生物学的手法が多々利用されてきた。序論にも記載したように、この形質転換系は実験室酵母を用いたもので、宿主の栄養要求性等の変異遺伝型に対し、それを相補する野生型遺伝子を選択マーカーとして用いることで、変異を相補する表現型を有する形質転換株を選択することで行ってきたものである。しかし、宿主の変異を相補する形質転換株を分離するこの形質転換の方法は実用酵母に用いることは序章に記載した理由にて適当と考えられない。このため、実用酵母の形質転換には各種薬剤に対する耐性遺伝子の利用、銅耐性 (Forgel and Welch 1982, Hinchliff and Danbney 1986)、メソトレキセート耐性 (Zhu *et al.* 1985)、G-418耐性 (Jimenez *et al.* 1980, Sakai and Yamamoto 1986, Webster and Dickson 1983)、クロラムフェニコール耐性 (Hadfield *et al.* 1986)、ハイグロマイシンB耐性 (Gritz and Davies 1983) の利用が検討されてきた。

このなかでは、G-418耐性は最も優れた選択マーカーであると考えている。これは、他の薬剤耐性、例えば銅耐性やクロラムフェニコール耐性を選択マーカーとした際、

耐性遺伝子を有することでの上昇する形質転換体の耐性度が小さいので、それぞれの耐性遺伝子を有する形質転換体のコロニーと有しないコロニーを選択培地上で区別することは難しいからである。これに対し、G-418耐性は、耐性遺伝子の導入による耐性度の上昇が比較的大きいので、G-418に対する耐性の弱い株を形質転換に用いた場合は、耐性遺伝子を有する形質転換体のコロニーと有しないコロニーを選択培地上で区別することは比較的容易であるからである。

G-418耐性を選択マーカーとした場合、形質転換体酵母内でG-418耐性を発現する遺伝子は、大腸菌のトランスポゾンTn903内に存在するアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ II 遺伝子 (*apt 2*) 遺伝子である。Jimenez *et al.* (1980)、Sakai and Yamamoto (1986)、Webster and Dickson (1983) の報告は、全てこの遺伝子をそのまま酵母用のプラスミドに移したものである。大腸菌由来の *apt 2* 遺伝子が酵母内で機能したものと考えられる。しかし、*apt 2* 遺伝子は大腸菌由来であり、酵母の転写開始領域が存在していないので、酵母内の発現は必ずしも強力であるとは考えられない。G-418耐性は耐性遺伝子の導入によるその耐性度の上昇は、他の耐性遺伝子を導入した場合と比較したところ大きいものではあるが、いくつかの実用酵母にみられるようにそれ自身の耐性度の大きいものに対しては、形質転換の際の選択マーカーとして用いることには難しい。すなわち、形質転換に供した株と薬剤耐性遺伝子を有する形質転換株との間の薬剤耐性の度合いの差が小さく、形質転換の際、選択培地上の薬剤濃度が低いと、選択培地上に薬剤耐性遺伝子を有する形質転換株でないにもかかわらず、コロニーを形成する、いわゆるバックグラウンドコロニーの出現がみられることがしばしばであるからである。また、選択培地の薬剤濃度が高いと、形質転換体酵母の *apt 2* 遺伝子の発現が弱いので、薬剤耐性遺伝子を有する形質転換

体もコロニーを形成することができなくなるからである。

本研究では、この大腸菌由来の *apt2* 遺伝子に酵母 *S. cerevisiae* で強力に機能することが確認されているアルコール脱水素酵素 1 (*ADH1*) 遺伝子のプロモーターを接続し、*apt2* 遺伝子の酵母内発現の強化を試みた。酵母内での発現が強化された *apt2* 遺伝子を形質転換の際の選択マーカーとして用いることで、薬剤に対する耐性の強い実用酵母の形質転換の可能性を検討した。

実験結果

Jimenez *et al.* (1980)、Sakai and Yamamoto (1986)、Webster and Dickson (1983) らは、大腸菌由来のアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ II 遺伝子 (*apt2* 遺伝子) が導入された形質転換体酵母で、抗生物質G-418 に対する耐性が上昇したことを報告している。この際用いた *apt2* 遺伝子は、大腸菌のトランスポゾンTn903 由来のものをそのまま用いたもので、*S. cerevisiae* のプロモーターが存在しない。そこで、この遺伝子の形質転換体内の発現は、必ずしも強力であるとは考えにくく、低コピープラスミドによる形質転換体では、G-418 に対する耐性はそれほど上昇しないことが予想された。プラスミドYCpG11は *S. cerevisiae* のセントロメア、野生型の *URA3* 遺伝子と大腸菌のトランスポゾンTn903内に存在する *apt2* 遺伝子を有するものである。この型のプラスミドはセントロメアの機能により、1 倍体の *S. cerevisiae* 内では1 コピーで存在することが報告されている。このプラスミドを *trp1 ura3* 変異を有する実験室酵母である *S. cerevisiae* YNN27 に導入した。トリプトファン非要求性の表現型より形質転換株を選択し、そのG-418耐性を調べた。G-418耐性は、栄養培地であるYPD培地に各濃度のG-418を加え、生育性を調べることによって行った。プラスミドYCpG11を有する *S. cerevisiae* YNN27は、親株に比べてG-418の耐性は上昇していたが、G-418濃度が200 μ g/ml 以上になると生育を認めなかった (Table 1)。これに対し、多コピー型のプラスミドであるYRpG1あるいは、YEpg24の形質転換体では、G-418濃度が200 μ g/ml 以上であっても、生育が認められた。このことは大腸菌の *apt2* 遺伝子には、*S. cerevisiae* で機能する転写活性化配列、すなわち、プロモーターを有していないことにより、形質転換された酵母内での発現が弱く、低コピープラスミドであるYCpG11ではG-418に対する耐性の上昇は小さいものと考えられる。

従って、大腸菌の *apt 2* 遺伝子をそのまま用いて、全ての *Saccharomyces* 属実用酵母を G-418 耐性を選択マーカーとして形質転換することは、特に低コピーの場合、困難であることが予想された。すなわち、G-418 に対する耐性度の上昇が小さく、特に、元来の G-418 耐性の強い株では、G-418 含有培地上で形質転換体を選択することが難しくなるからである。

そこで、*apt 2* 遺伝子に *S. cerevisiae* のプロモーターを接続し、その発現を強化することを試みた。大腸菌のトランスポゾン Tn903 内に存在する *apt 2* 遺伝子を有するプラスミド YRpG1 を、制限酵素 *Xho I* と *Pvu II* で処理することで分離し、*EcoRI* リンカーを付着させた後、*ADHI* プロモーターを有する *S. cerevisiae* の発現ベクター pYcDE-1 の *EcoRI* 部位に挿入し、*apt 2* 遺伝子が *ADHI* プロモーターに対し正方向に接続した pYcDE- Δ G11 と、逆方向に接続した pYcDE- Δ G10 を作製した (Fig. 2(a))。それぞれのプラスミドを *S. cerevisiae* YNN27 に導入した。YNN27 株は *trp1* 変異を有し、それぞれのプラスミドは野生型の *TRP1* 遺伝子を有しているため、形質転換体はトリプトファン非要求性の表現型をもって選択した。栄養培地である YPD 培地に各濃度の G-418 を加え、それぞれのプラスミドから得られた形質転換体の生育性を調べた (Table 1)。その結果、プラスミド pYcDE- Δ G11 を有する形質転換体では、G-418 耐性度が上昇し、G-418 濃度が 1000 μ g/ml であっても生育可能であったのに対し、プラスミド pYcDE- Δ G10 を有する形質転換体では、その G-418 耐性度は親株とは変化がなかった。これより、*apt 2* 遺伝子は *S. cerevisiae* の *ADHI* プロモーターの転写活性化機構により、*S. cerevisiae* 内での発現が強化されたものと判断した。

S. cerevisiae の *ADHI* プロモーターと *apt 2* 遺伝子との接続部位は、Fig. 2 (b) に示し

た。プラスミドpYcDE-ΔG11を作製する際、制限酵素Xho Iの処理により、*apt 2* 遺伝子がコードする蛋白質のN末端10アミノ酸が削除され、本来の蛋白質では19番目にあたるメチオニンのコドンが、プラスミドpYcDE-ΔG11の形質転換酵母での開始コドンになっているものと判断した。従って、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼIIの蛋白質は、N末端18アミノ酸は酵素活性に必須ではないものと判断した。以後、今回作製した*S. cerevisiae*の*ADH1*プロモーターによって形質転換酵母内で発現が強化された*apt 2* 遺伝子は、*ADH1-APT2*遺伝子と記載する。

さらに、この*ADH1-APT2*遺伝子をBam HI - Sal Iフラグメントとした後、*S. cerevisiae*の挿入用ベクターであるYIp5のBam HI、Sal I部位に挿入し、プラスミドpAGI-1を作製した (Fig. 3)。このプラスミドは、挿入用のベクターであるので、形質転換体酵母内で1コピーで存在する。従って、単コピーベクターであるYcP-G11と比較することは適当であろう。作製したプラスミドpAGI-1を、*S. cerevisiae* YNN27に導入し、得た形質転換体のG-418耐性を検討した。プラスミドpAGI-1の形質転換体は、G-418濃度が1000 μ g/ml にも生育が可能であったのに対し、プラスミドYcP-G11を有する*S. cerevisiae* YNN27は、G-418濃度が200 μ g/ml 以上になると生育を認めなかった (Table 1)。以上より、*ADH1-APT2*遺伝子は*S. cerevisiae*の*ADH1*プロモーターが接続することにより、形質転換体での発現が強化され、この結果、形質転換体ではG-418に対する耐性が上昇したことが明確となった。

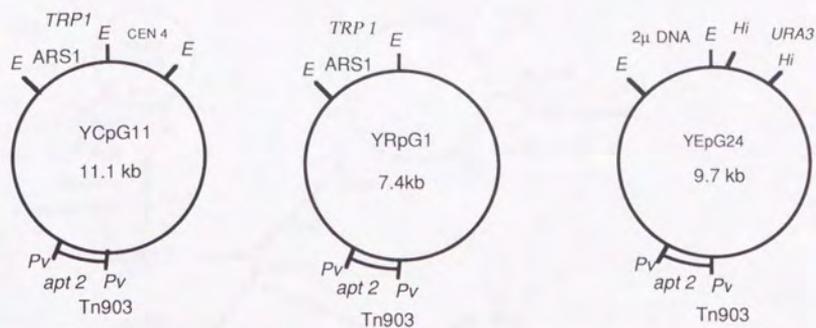
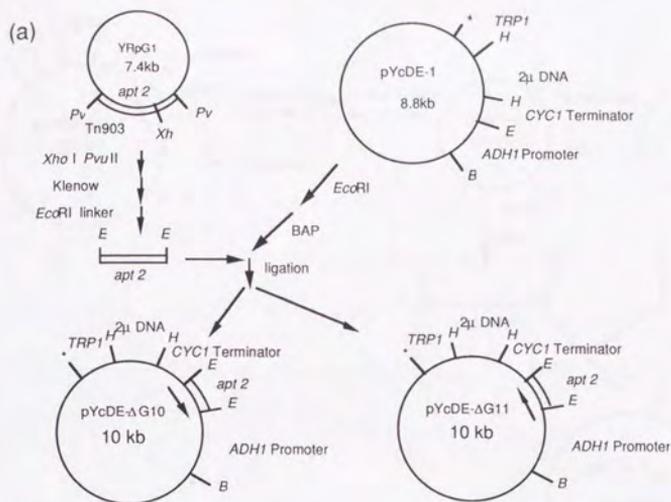


Fig. 1. The structures of the plasmids having *E. coli apt 2* gene. The open box indicates the sequence of *E. coli* transposon Tn903. Abbreviations are as follows: E, *Eco* RI; Hi, *Hin* d III; Pv, *Pvu* II.

Table 1. G-418 resistance of transformants and the parent strain.

Strain	Plasmid	G-418 concentration ($\mu\text{g/ml}$)			
		25	50	200	1000
<i>S. cerevisiae</i> YNN27	-	×	×	×	×
	YCpG11	○	○	×	×
	YRpG1	○	○	○	×
	YEpG24	○	○	○	×
	pYcDE- Δ G10	×	×	×	×
	pYcDE- Δ G11	○	○	○	○
	pAGI-1	○	○	○	○

○, Yeast could grow; ×, Yeast could not grow.



(b)

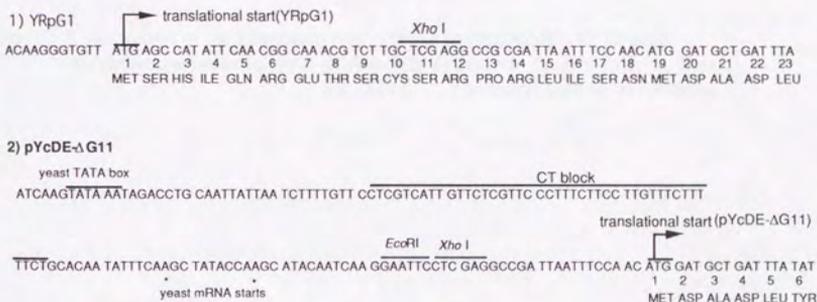


Fig. 2. (a) Construction of plasmids in which *apt2* gene was expressed under the control of *ADH1* promoter. Abbreviations are as follows: *B*, *Bam* HI; *E*, *Eco* RI; *H*, *Hin* d III; *Pv*, *Pvu* II; *Xh*, *Xho* I; *, The restriction site was blunted. BAP, bacterial alkaline phosphatase.

(b) Nucleotide sequences around the translational start codon in YRpG1 and pYcDE-ΔG11.

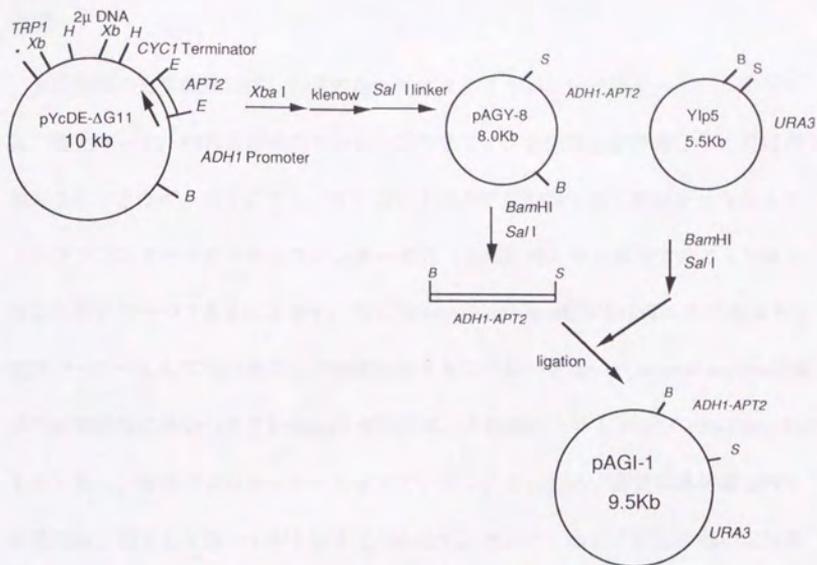


Fig. 3. Construction of the integration type plasmid having *ADH1-APT2* gene.
 Abbreviations are as follows: *B*, *Bam* HI; *E*, *Eco* RI; *H*, *Hin* d III; *S*, *Sal* I.
Xb, *Xba* I. *, The restriction site was blunted.

考察

実用酵母の形質転換には、宿主の遺伝型によることのない選択マーカー、すなわち、優性マーカーの利用が適当である。これまでに、各種薬剤耐性遺伝子の利用が検討されてきたが、宿主にアミノグリコシド系の抗生物質に対し耐性を付与するアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ II (*apt2*) 遺伝子を利用することが最も適切な方法の一つである。しかし、全ての *Saccharomyces* 属実用酵母をこの遺伝子を選択マーカーとして用いることで形質転換することはできない。*Saccharomyces* 属酵母の形質転換に用いられている *apt2* 遺伝子は、大腸菌のトランスポゾン Tn903 由来のものであり、酵母のプロモーターを有していない。このため、形質転換体酵母内での発現は、必ずしも強いものとは考えられない。そこで、薬剤に耐性の強い実用酵母の形質転換の選択マーカーとすることは難しい。本研究では、大腸菌由来の *apt2* 遺伝子に、*S. cerevisiae* の強発現遺伝子であるアルコール脱水素酵素 I (*ADH1*) 遺伝子のプロモーターを接続し、*apt2* 遺伝子の *Saccharomyces* 属酵母内での強発現を目指した。本研究で構築した *S. cerevisiae* *ADH1* プロモーターに接続した *apt2* 遺伝子 (*ADH1-APT2*) は、形質転換体酵母内で強発現し、1 コピー存在するだけで抗生物質 G-418 に対する耐性度は顕著に増加したことを認めた。

従来の報告にあつては、*apt2* 遺伝子は大腸菌由来のものをそのまま用いてきた。Sidhu *et al.* (1990) は、大腸菌のプラスミドにおいて *S. cerevisiae* の転写を誘導する配列があることを見だしている。従って、大腸菌由来の *apt2* 遺伝子によって、*S. cerevisiae* が抗生物質 G-418 に耐性を有したことを見だしたとの従来の報告はこの転写誘導によるものと考えられる。

本研究にて構築した *ADH1-APT2* 遺伝子は、*ADH1* プロモーターの作用によって、

形質転換体酵母内での発現も強く、抗生物質G-418 に対する耐性も明瞭に認められるので、*Saccharomyces*属実用酵母の形質転換において、選択マーカーとして有効に用いることができるものと期待される。

要約

大腸菌のアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ II の遺伝子 (*apt2* 遺伝子) を、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のアルコール脱水素酵素 I (*ADH1*) の遺伝子のプロモーターに接続した。この *ADH1-APT2* 遺伝子を、実験室酵母 *S. cerevisiae* YNN27 に導入したところ、形質転換体酵母では抗生物質 G-418 に対する耐性が著しく上昇した。

第二章 改変したアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ II 遺伝子 (ADHI-APT2 遺伝子) を利用した *Saccharomyces* 属実用酵母の 形質転換系の構築

緒言

前章で記載したように、実用酵母の形質転換には優性マーカーを選択マーカーとして用いることが適当であろう。*Saccharomyces* 属実用酵母の形質転換はクロラムフェニコール耐性を選択マーカーとして利用したものが、Hadfield *et al.* (1986) によって示されている。クロラムフェニコールは原核生物の70S リボソームでのタンパク合成は阻害するが、真核生物の80S リボソームでのタンパク合成は阻害しない。従って、酵母で認められるクロラムフェニコールによる生育阻害は、ミトコンドリアでのタンパク合成阻害によるものと考えられ、高濃度でないと作用しない。このため、耐性遺伝子導入による、クロラムフェニコール耐性度の上昇の程度が明瞭ではなく、形質転換の際の選択マーカーとしては適切ではないと考えられる。Sakai and Yamamoto (1986) は、G-418耐性を選択マーカーとし、実験室酵母と下面発酵ビール酵母を用いて、リチウム塩で処理し、プラスミドDNAとポリエチレングリコール (PEG) に接触させた酵母菌体を洗浄した後、栄養培地であるYPD培地でポストインキュベーションすることで、G-418を含む選択培地上で形質転換株を分離できたことを報告した。この際のポストインキュベーションは、リチウム塩処理等で損傷した処理菌体を回復させ、抗生物質を含む選択培地で形質転換体を選択するための必要な手段であると報告している。ここで用いたG-418耐性遺伝子は大腸菌由来のも

ので、*S. cerevisiae*のプロモーターを有さないものである。その結果、形質転換体酵母内での*apt 2* 遺伝子の発現が弱く、その株自身G-418耐性が強いものには、形質転換の際の選択マーカーとして用いることはできないと考えられる。これは、選択培地のG-418濃度が低い条件で、用いる菌株の元来のG-418耐性が強いと形質転換されていないにもかかわらず、選択培地上にコロニーを形成する、いわゆるバックグラウンドコロニーの出現がみられるからである。また、形質転換体酵母内での*apt 2* 遺伝子の発現が弱いので、選択培地のG-418濃度を高くし、バックグラウンドコロニーの出現を抑制を試みると、形質転換体のコロニー形成も阻害してしまうことが予想される。Kitamoto *et al.* (1991) は、尿素非産生酵母の造成のため、清酒酵母協会9号の*CARI* 遺伝子の破壊をおこなった。この際、*CARI* 遺伝子内に*apt 2* 遺伝子を挿入し、G-418耐性を示す形質転換株を分離した。この時、G-418濃度を600 μ g/mlとし、バックグラウンドコロニーの出現を抑制するとともに、*apt 2* 遺伝子の必ずしも強力ではない発現においても、形質転換株の分離が可能となる様に、選択培地のG-418濃度に工夫を加えていた。本研究においては、前章で記載した*S. cerevisiae*の*ADH1* プロモーターに接続し、発現が強化された*apt 2* 遺伝子 (*ADH1-APT2* 遺伝子) を用いて、G-418耐性を選択マーカーとして、選択培地のG-418濃度を一律に1000 μ g/ml とすることで、薬剤耐性の強い*Saccharomyces* 属実用酵母の形質転換においてもバックグラウンドコロニーの出現を抑制するとともに、*ADH1-APT2* 遺伝子の形質転換体酵母内での強力な発現によって、G-418濃度が高い選択培地においても形質転換体がコロニーを形成することが可能ではないかと考え、検討した。

実験結果

前章では、実験室酵母である *Saccharomyces cerevisiae* YNN27 を宿主として、*S. cerevisiae* の *ADHI* プロモーターを接続することで、その発現が強化された *apt2* 遺伝子 (*ADHI-APT2* 遺伝子) を用いて、抗生物質 G-418 耐性を選択マーカーとして、形質転換体を選択できたことを記載した。しかし、ここで用いた *S. cerevisiae* YNN27 は、G-418 に対する耐性は弱い。各種 *Saccharomyces* 属実用酵母には、G-418 に対する耐性の強い株の存在も予想された。このような株の形質転換にも、*ADHI-APT2* 遺伝子は選択マーカーとして十分機能することが期待できる。そこで、各種 *Saccharomyces* 属実用酵母の G-418 耐性を検討した。検討した各種 *Saccharomyces* 属実用酵母は、下面発酵ビール酵母 2 種、清酒酵母 2 種、ワイン酵母 1 種の G-418 耐性について検討した。G-418 耐性は、各種酵母を栄養培地である YPD 培地に定常期まで培養後、その培養液を G-418 が各濃度で含まれる YPD 培地に、各酵母を、 2×10^6 以下の濃度で植菌し、生育を調べた。生育は 600nm の吸光度の変化で確認した。結果は Table 2 に示した。*Saccharomyces* 属実用酵母間においても、G-418 に対する耐性は異なっていた。下面発酵ビール酵母は、調べた 2 株とも G-418 濃度 50 μ g/ml で生育を阻害されたのに対し、清酒酵母は 2 種とも G-418 濃度 100 μ g/ml で生育を阻害されなかった。特に、協会 7 号酵母は G-418 濃度 200 μ g/ml で生育を認めた。清酒酵母協会 7 号のように、G-418 耐性の強い *Saccharomyces* 属実用酵母においても、*ADHI-APT2* 遺伝子が形質転換の際の選択マーカーとして機能することを期待し、各種 *Saccharomyces* 属実用酵母の形質転換を試みた。試みた *Saccharomyces* 属実用酵母は Table 3 に示した。ビール酵母が 5 株、このうち下面発酵酵母が 3 株、上面発酵酵母が 2 株、清酒酵母が 2 株、ワイン酵母 2 株である。このうち、清酒酵母は内在性の 2

μm DNAを有していないことが知られている。前章で記載したプラスミドpYcDE- ΔG11 は、酵母*S. cerevisiae*での複製機構は $2\mu\text{m}$ DNAの複製開始起点 (ori) とSTB部位を含むものである。この型のプラスミドは、内在性の $2\mu\text{m}$ DNAと共存することで安定的に保持されることが見いだされている (Kikuchi 1983)。上面発酵ビール酵母、下面発酵ビール酵母では内在性の $2\mu\text{m}$ DNAが存在することが既に報告されている (Tubb 1980, Brown *et al.* 1981, Aigle *et al.* 1984)。従って、プラスミドpYcDE- ΔG11 の複製が可能であると考えられる。これに対し、清酒酵母は内在性の $2\mu\text{m}$ DNAが存在しないので、ADHI-APT2遺伝子を有する他のベクターの構築を行った。ADHI-APT2遺伝子を有するDNAフラグメントを、複製開始点がARS1であるプラスミドYRp7に導入し、プラスミドpAGR-1を作製した (Fig. 4)。このプラスミドを用いて、表に記載されている*Saccharomyces*属実用酵母の形質転換を試みた。形質転換はSakai and Yamamoto (1986)の方法に従った。すなわち、リチウム処理等を行った後、ポストインキュベーションし、抗生物質G-418が添加された選択培地に塗布し、形質転換株を選択した。選択培地として、G-418を $1000\mu\text{g/ml}$ 含有するYPD寒天培地を用いた。G-418が $1000\mu\text{g/ml}$ まで上昇させると、清酒酵母協会7号のように薬剤耐性の強い株であっても生育せず、調べた全ての*Saccharomyces*属実用酵母で生育してこないことを確認している (Table 2)。従って、選択培地のG-418濃度を上昇させることによって、形質転換されていないにもかかわらず生育してくる、いわゆるバックグラウンドコロニーは形成されないものと考えられる。また、ADHI-APT2遺伝子ではADHI遺伝子のプロモーターの作用により、apt2遺伝子の発現が強化されるので、形質転換体はG-418濃度が $1000\mu\text{g/ml}$ 以上でも生育してくることを確認してい

る (Table 1)。試みた9株の *Saccharomyces* 属実用酵母のうち、1株の下面発酵酵母、2株の清酒酵母、1株のワイン酵母の計4株の *Saccharomyces* 属実用酵母では形質転換株が得られた (Table 4)。この条件での形質転換では、各酵母で選択培地上でバックグラウンドコロニーの出現はみられなかった。

Table 1. Results of genetic engineering of yeast strains. The strains were cultured on the selective medium for 24 hours. The results are shown as the number of colonies per plate. The number of colonies was counted after 24 hours of incubation. The results are shown as the number of colonies per plate. The number of colonies was counted after 24 hours of incubation.

Strain	Number of colonies per plate
1. <i>S. cerevisiae</i> (K1)	0
2. <i>S. cerevisiae</i> (K2)	0
3. <i>S. cerevisiae</i> (K3)	0
4. <i>S. cerevisiae</i> (K4)	0
5. <i>S. cerevisiae</i> (K5)	0
6. <i>S. cerevisiae</i> (K6)	0
7. <i>S. cerevisiae</i> (K7)	0
8. <i>S. cerevisiae</i> (K8)	0
9. <i>S. cerevisiae</i> (K9)	0

Table 2. G-418 resistance of each industrial yeast.

strain	G-418 concentration ($\mu\text{g/ml}$)			
	50	200	500	1000
Laboratory yeast <i>S. cerevisiae</i> YNN27	×	×	×	×
Lager yeast Pilsen No.1 <i>S. bayanus</i> IFO 2031	×	×	×	×
Lager yeast <i>S. pastorianus</i> IFO 10010	×	×	×	×
Lager yeast <i>S. pastorianus</i> IFO 10011	×	×	×	×
Sake yeast Kyoukai No.7 (K-7) <i>S. cerevisiae</i> IFO 2347	○	○	×	×
Sake yeast Kyoukai No.9 (K-9) <i>S. cerevisiae</i> IFO 2377	○	×	×	×
Wine yeast OC - 2	○	×	×	×

○, Yeast could grow; ×, Yeast could not grow.

Table 3. Industrial yeast strains used for transformation with *ADH1-APT2*.

strain	Application
<i>S. bayanus</i> IFO 2031	Lager yeast Pilsen No.1
<i>S. pastorianus</i> IFO 10010	Lager yeast
<i>S. pastorianus</i> IFO 10011	Lager yeast
<i>S. cerevisiae</i> IFO 1951	Ale yeast
<i>S. cerevisiae</i> IFO 1952	Ale yeast
<i>S. cerevisiae</i> IFO 2347	Sake yeast Kyoukai No.7 (K-7)
<i>S. cerevisiae</i> IFO 2377	Sake yeast Kyoukai No.9 (K-9)
Wine yeast OC - 2	Wine yeast
Geisemheim 74	Wine yeast

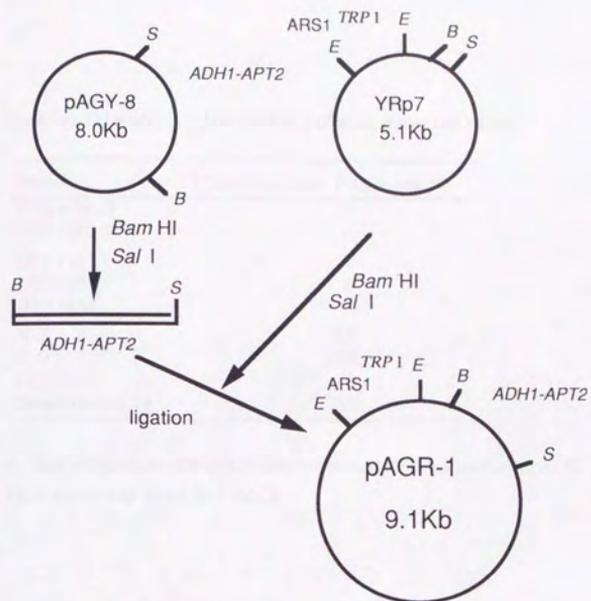


Fig. 4. Construction of the plasmid which has *ADH1-APT2* gene and *ARS1*. Abbreviations are as follows: B, *Bam HI*; E, *Eco RI*; S, *Sal I*.

Table 4. Transformation efficiency of each industrial yeast.

strain	Transformation efficiency a)
Pilsen No.1	22
IFO 10010	0
IFO 10011	0
IFO 1951	0
IFO 1952	0
K-7	84
K-9	106
OC-2	0
Geisemheim 74	55

a) Transformation efficiency was expressed as transformants per 10 μ g DNA.

Each strain was listed in Table 3.

考察

Sakai and Yamamoto (1986) は、下面発酵ビール酵母である *Saccharomyces carlsbergensis* の2種の酵母をリチウム処理、プラスミドDNAとポリエチレングリコール (PEG) に接触させ、洗浄した後、栄養培地である YPD 培地でポストインキュベーションした後、抗生物質 G-418 を含む選択培地に塗布することで、形質転換体を得ることが可能となったことを報告した。この際、用いた酵母は G-418 耐性の弱いものであった。G-418 耐性の強い菌株には、この方法を用いることは困難であることが予想された。これは、形質転換体酵母内の *apt 2* 遺伝子の発現が弱く、高い G-418 濃度の選択培地では形質転換体のコロニーが出現することができず、また、低い G-418 濃度の選択培地では、菌株自体の高い G-418 耐性によって、形質転換されていないにもかかわらずコロニーを形成する、いわゆるバックランドコロニーが出現してしまうことが予想されるからである。そこで、各種 *Saccharomyces* 属実用酵母の G-418 耐性について検討してみた。Table 2 に示してあるように、各酵母によってその G-418 耐性は様々であった。調べた下面発酵ビール酵母の全てはその G-418 耐性は、実験室酵母のものと変わらないものであった。清酒酵母は調べた 2 株とも G-418 耐性が強いものであった。特に、清酒酵母協会 7 号は、G-418 濃度 200 μ g/ml であっても生育が認められ、強い耐性がみられた。Yamazaki and Nonomura (1994) は、清酒酵母 8 株の G-418 耐性を 100 μ g/ml の YPD 培地での生育性で調べたところ、全て G-418 耐性であったこと、これに対し、ワイン酵母 15 株を調べたところ、1 株を除いて全て G-418 に感受性であったことを報告している。以上のように、各種 *Saccharomyces* 属実用酵母において、G-418 に対する耐性度が異なることは、他の研究者によっても確認されている。形質転換体酵母内で *apt 2* 遺伝子が強力に発現することが確認さ

れているADHI-APT2遺伝子が、清酒酵母協会7号のようにG-418に耐性の強い株に対しても、選択マーカーとして有効に機能することを期待した。各種*Saccharomyces* 属実用酵母の形質転換において、選択培地は、G-418を1000 μ g/mlまで高濃度としたため、清酒酵母協会7号のような薬剤耐性の強い株であってもバックグランドコロニーの出現は抑制され、ADHI-APT2 遺伝子の強力な発現により、G-418耐性は強力になり、形質転換株の選択が可能となり、ADHI-APT2 遺伝子が*Saccharomyces* 属実用酵母の形質転換の際の選択マーカーとして有効であることが示された。この際用いたプラスミドは、選択マーカーとしてADHI-APT2遺伝子を有し、*Saccharomyces* 属実用酵母での複製起点としては、2 μ m DNAの複製開始起点 (ori.) とSTB部位を持つものと、ARS1を持つものを作製した。これは、内在性の2 μ m DNAを持たない*Saccharomyces* 属実用酵母においても複製可能にするためである。

形質転換の結果、試みた9株の*Saccharomyces* 属実用酵母のうち4株は形質転換株を得ることができた。このうち、形質転換株の得られなかった5株は、形質転換能が低いことによるものと考えられる。

要約

1、*Saccharomyces*属実用酵母の抗生物質G-418 に対する耐性を検討したところ、清酒酵母協会7号は200 μ g/ml の濃度でも生育可能な耐性の強い株であった。

2、G-418 耐性の強い清酒酵母協会7号に対して、*ADHI-APT2*遺伝子を有するプラスミドを用いて、G-418 耐性を選択マーカーとして形質転換を試みた。選択培地のG-418 濃度を上昇させ、バックグランドコロニーの出現を抑制することで、清酒酵母協会7号の形質転換株を得ることができた。

第三章 電気パルス法を用いた *Saccharomyces* 属実用酵母の形質転換の 試み

緒言

前章で記載したように、*S. cerevisiae*のADHIプロモーターに接続し、発現が強化された $apt2$ 遺伝子（ADHI-APT2遺伝子）を転換マーカーとして、*Saccharomyces*属実用酵母の形質転換を試みたところ、試みた9株のうち、4株は形質転換株が得られたのに対し、残りの5株は形質転換株が得られなかった。これは、形質転換能が低いことによるものと考えられる。Becker and Guarente (1991)は酵母を電気パルス処理することで、高効率に形質転換株を得ることができることを報告している。そこで、この方法を*Saccharomyces*属実用酵母の形質転換に応用することで、形質転換能が低く、リチウム法では形質転換株の得られなかった5株について、電気パルス法による形質転換を試みることにした。電気パルス法を用いた酵母の形質転換はいくつか報告されている（Hood and Stachow 1990, Meilhoc *et al.* 1990）。これらの報告の中では、形質転換に供する菌株の処理が異なるので、結果として印加する電圧が異なってくる。本研究では、供する菌株の処理は、Becker and Guarente (1991)の方法に従った。すなわち、対数増殖期の酵母を滅菌水で洗浄し、1Mソルビトール溶液に懸濁し、パルスを印加する方法である。彼らの報告では、1.5kVのパルス電圧が最適であるとしているが、電圧を変化させた場合の結果は記載していない。他の報告（Hood and Stachow 1990, Meilhoc *et al.* 1990）とあわせて考慮すると、このケースの電圧はやや高すぎると考えられるので、印加電圧の条件から検討することとした。

実験結果

電気パルス法による形質転換の条件について検討した。実験室酵母 *S. cerevisiae* YNN27 を用いて、印加電圧について検討した。電気パルス法の方法は、概ね Becker と Guarente (1991) の方法に従ったが、パルス印加後、1M ソルビトール添加に変え、1M ソルビトール - YPD 液体培地に懸濁し、30°C で4時間保温の操作を加えた。パルス発生装置は、バイオラッド社製のジーンバルサーを用いた。生存率は、1M ソルビトール - YPD 液体培地に懸濁した後、一部を YPD 寒天培地に塗布し現れた菌数を、パルス印加前の菌数に除し、表した。形質転換効率はプラスミド DNA μ g 当たりの形質転換株数で示した。印加電圧 0.75 kV の時、最も高い形質転換効率を得、電圧を上昇させると生存率が急速に低下し、これに伴い形質転換効率も低下した (Table 5)。

以上の条件検討の結果、0.75 kV, 25 μ F, 200 Ω が最適であると判断し、

Saccharomyces 属実用酵母の形質転換に際し、この条件にて行うこととした。結果は Table 6 に示した。リチウム法では形質転換株の得られなかった5株の *Saccharomyces* 属実用酵母全てで形質転換株を得ることが可能であった (Table 6)。

Table 5. Electroporation conditions for transformation of *S. cerevisiae* a)

kV	Transformation efficiency ^{b)}	Viability(%)
0.5	9.5×10^2	83.0
0.75	9.0×10^3	20.6
1	4.9×10^3	3.5
1.5	1.0×10^2	1.5

a) The laboratory yeast *S. cerevisiae* YNN27 was used in this experiment.

b) Transformation efficiency was expressed as transformants per μ g DNA.

Table 6. Transformation efficiency of each industrial yeast.

Strain	Transformation efficiency	
	Lithium acetate method	Electroporation ^{a)}
IFO 10010	0	42
IFO 10011	0	63
IFO 1951	0	2
IFO 1952	0	10
OC-2	0	94

a) Transformation efficiency was expressed as transformants per μ g DNA. Each strain was listed in Table 3.

考察

前章で記載した *S. cerevisiae* の *ADHI* プロモーターに接続し、発現が強化された *apt* 2 遺伝子 (*ADHI-APT2* 遺伝子) を転換マーカーとして、9株の *Saccharomyces* 属実用酵母の形質転換を試みたところ、5株は形質転換株が得られなかった。これは形質転換能が低いことによるものと考えられるので、実験室酵母では高効率に形質転換株を得ることができること方法として報告されている電気パルス法を試みた。この結果、リチウム法では形質転換株の得られなかった5株の *Saccharomyces* 属実用酵母全てで形質転換株を得ることが可能となり、電気パルス法では極めて高効率に形質転換株を得ることができることを確認した (Table 6)。Becker and Guarente (1991) は、1.5 kV, 25 μ F, 200W の条件が適当であると報告しているが、Gysler *et al.* (1990) は 1.25 kV 以上になると、生存率が劇的に低下することを報告している。我々の結果もむしろ後者に近いものであろうと考察している。

パルス印加後、浸透圧負荷のためソルビトールを添加した YPD 液体培地で保温振盪後、選択培地である G-418 含有 YPD 寒天培地に塗布することで形質転換株を得た。これは、G-418 耐性を選択マーカーとして、リチウム法で形質転換をおこなった Sakai and Yamamoto (1986) の方法を参考にしたもので、電気パルス処理で損傷した処理菌体を回復させ、形質転換体内での *apt* 2 遺伝子の発現を得、G-418 を含む選択培地で形質転換株にコロニーを形成させ得るものである。

S. cerevisiae の *ADHI* プロモーターに接続し、発現が強化された *apt* 2 遺伝子 (*ADHI-APT2* 遺伝子) と電気パルス法を用いることで、薬剤に耐性の強い株や形質転換能の低い株を含む試みた全ての *Saccharomyces* 属実用酵母を形質転換することが可能となった。電気パルス法は *Saccharomyces* 属実用酵母を形質転換する有効な手段

となりうることが示された。

Kitamoto *et al.* (1990) は、SM (Sulfometuron methyl) 耐性と、5-FOA 耐性を組み合わせることにより、清酒酵母協会701号、901号において、*trp1/trp1*、*ura3/ura3*の二重遺伝子破壊株を造成し、清酒酵母の分子育種の宿主として有用であることを報告している。さらに、これを宿主として、*Aspergillus oryzae*の α -アミラーゼ遺伝子を導入した形質転換体を作製したことを報告している (木村他 1993)。また、Nakazawa *et al.* (1994) は、遺伝子増幅により抗生物質セルレニンに耐性を示すPDR4遺伝子を形質転換の際の選択マーカー遺伝子として、清酒酵母協会7号を形質転換し、これを利用し接合性を示す株を分離したことを報告している。

本研究で作製したADHI-APT2遺伝子を選択マーカー遺伝子として、電気パルス法を用いて、下面発酵ビール酵母にCYS4遺伝子を導入し、遺伝子増幅させることで硫化水素低生産性ビール酵母を育種したこと (Tezuka, H. *et al.* 1992)、ADH-APT2遺伝子をマーカー遺伝子として用いることで酢酸イソアミル高生産性二倍体清酒酵母を造成したこと (渡辺 他 1995) が報告されている。以上のように、ADHI-APT2遺伝子を用いることによっても、広く*Saccharomyces*属実用酵母の育種に用いる可能性が示されている。

要約

1、酵母の形質転換として、電気パルス法を検討した。印加電圧の条件を検討したところ、0.75kVの際、最も高い形質転換効率を得た。

2、リチウム塩処理では形質転換株が得られなかった*Saccharomyces*属実用酵母について、電気パルス法を用いることで全て形質転換株を得ることができた。

第四章 酵母 *Hansenula anomala* の形質転換のための選択マーカー遺伝子 としての *URA3* 遺伝子のクローニング

緒言

序論にて記載したように、Yoshizawa (1978) によって、食品工場等から排出される高濃度の有機物を含む排水の処理には、*Hansenula* 属、特に *Hansenula anomala* に属する酵母を用いることが有効であることが見いだされている。この場合、凝集性や熱安定性等酵母菌株の性質が排水処理に重要となっている。これは、酵母による排水処理において、酵母槽から流出する酵母数を抑えるために凝集性酵母を利用すること (佐藤他 1986)、上昇する酵母槽の温度に対応するため、耐熱性の酵母を利用すること (鈴木他 1991) が試みられている。このように、酵母を用いた排水処理において、凝集性や熱安定性を強化するといった菌株改良は有力な改善方法であると思われる。有用な形質のみを菌株に導入できることでは、遺伝子組換え手法を用いた菌株改良が最も適した手段であろう。しかし、このためには宿主・ベクター系の確立を必要とする。これまで、*H. anomala* の宿主・ベクター系の確立についての報告は全くない。この理由の一つとして、形質転換の際の適当な選択マーカーがないことが挙げられる。通常、酵母の形質転換は栄養要求性の変異株に対して、これを相補する野生型の遺伝子を選択マーカー遺伝子としておこなわれる。しかし、*H. anomala* を含めた *non-Saccharomyces* 属酵母においては、その多くの種は遺伝学的研究が蓄積されていないので、変異位置を特定しうる変異株を取得することは困難であった。

Boeke *et al.* (1984) は、ピリミジン塩基生成の中間体であるオロチン酸のアナログである5-fluoroorotic acid (5-FOA) 耐性を利用して、実験室酵母 *S. cerevisiae* の *ura3* 変異株(オロチジン-5'-リン酸脱炭酸酵素欠損変異株) を優性的に分離したことを報告した。5-FOAは核酸合成阻害剤として作用するが (Fig. 5)、*Saccharomyces cerevisiae* で *URA5* 遺伝子がコードするオロチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼあるいは、*URA3* 遺伝子がコードするオロチジン-5'-リン酸脱炭酸酵素のいずれかが欠損していると、5-FOAの核酸合成阻害活性が消失する。変異処理により、5-FOA含有培地で生育する変異株を選択することで *ura5* あるいは *ura3* 変異株を取得することができる。この方法は、変異位置の特定できる栄養要求性の変異株を優性的に分離できるので、遺伝学的研究が整っていない対象にも応用が可能であると考えられる。

ピリミジン塩基生成系の酵素であるオロチン酸-5'-リン酸脱炭酸酵素 (ODCase) は、オロチジン-5'-モノリン酸よりウリジン-5'-モノリン酸を合成する酵素で (Fig. 5)、*S. cerevisiae* では *URA3* 遺伝子にコードされている (Rose *et al.* 1984)。ODCase をコードする遺伝子は、各種酵母においてもいくつかの種よりクローニングされている (Turnbough *et al.* 1987, Rose *et al.* 1984, Mizukami and Hishinuma 1988, Losberger and Ernst 1989, Grimm *et al.* 1988)。これらのODCaseをコードする遺伝子を比較することより、酵素蛋白質をコードする領域 (ORF領域) には高い相同性が見いだされている。例えば、*S. cerevisiae* と *Kluyveromyces lactis* の *URA3* 遺伝子は、mRNAの転写開始あるいは終了に関与することが予想される5'あるいは3'非翻訳領域には、相同性が見出されなかったが、ORF領域では、DNA配列で72%、推定アミノ酸配列で81%の同一性を有していた (Mizukami and Hishinuma 1988)。これらの報告より、*H.*

*anomala*の *URA3* 遺伝子を相同性を利用してクローニングすることは可能であると推察された。そこで、*H. anomala*の形質転換の際の選択マーカー遺伝子としての利用を目的として、*H. anomala*のODCaseをコードする*URA3* 遺伝子のクローニングをおこなった。

また、産業上に用いられている酵母の形質転換は、前記した理由にて、優性選択マーカー遺伝子を用いることが望ましい。第一章、第二章に作製したことを記載した*ADHI-APT2* 遺伝子が、*H. anomala*の形質転換にて、選択マーカー遺伝子として機能するかについての検討は、第六章に記載した。

実験結果

*H. anomala*のURA3遺伝子をクローニングするにあたり、*S.cerevisiae*のURA3遺伝子をプローブとして用いることの可能性を検討した。*H. anomala*の染色体DNAを、制限酵素Bam HI、Eco RI、Sal Iで処理した後、*S.cerevisiae*のURA3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おこなった。low stringencyの条件にておこなったところ、いずれの制限酵素処理においても、ハイブリダイズするバンドは単一であることより、*H. anomala*のURA3遺伝子は一つのみ存在するものと判断した (Fig. 6)。 *S. cerevisiae*のURA3遺伝子をプローブとして *H. anomala* のURA3遺伝子をクローニングすることは可能であると判断した。

H. anomala のゲノミックライブラリーは、ハプロイド株である*H. anomala*J-224-H1より調製したDNAを制限酵素Sau 3A-Iで部分分解し、ラムダファージの誘導體であるEMBL3のBam HI アームとライゲーションし、in vitro packagingすることにより作製した。*S. cerevisiae*のURA3遺伝子をプローブとしたブランクハイブリダイゼーションで得たcandidate cloneより、DNAを抽出し、サブクローニングを進めた結果、Xba I、Nru I 1.7 kbpのフラグメントを得 (Fig. 7)、このXba I、Nru I 1.7 kbpのフラグメントのDNA塩基配列を決定した (Fig. 8)。804 nucleotide からなる予想ORF(オープンリーディングフレーム)と、既にクローニングされている他の酵母のODCaseとDNA及び蛋白質のレベルで比較をおこなった (Table 7)。*H. anomala*のURA3遺伝子のODCaseの酵素蛋白質をコードする領域では他の酵母のODCaseをコードする遺伝子と、高い相同性がみられた。しかし、*H. anomala*のURA3遺伝子は *Schizosaccharomyces pombe* のODCaseをコードする遺伝子 (Grimm *et al.* 1988) とは、他の酵母の遺伝子と比べて比較的低い相同性であった。蛋白質をコードする領域の

高い相同性に比べて、5'、3' 非翻訳領域では他の遺伝子との相同性は全く見いだされなかった。転写開始点は、プライマー伸長法によって決定した。その結果、Fig. 9 に示すように、*H. anomala*の *URA3* 遺伝子の転写開始点は、-128、-119、-110、-67、-62、-51、-39 であった。*S. cerevisiae*の *URA3* 遺伝子 (Roy *et al.* 1990)、*Candida albicans*の *URA3* 遺伝子 (Losberger and Ernst 1989) とともに転写が多数の位置で開始されていることが報告されている。さらに、*H. anomala*の *URA3* 遺伝子の *S. cerevisiae* 内における機能性を検討した。*H. anomala*の *URA3* 遺伝子を *S. cerevisiae* - *Escherichiacoli* のシャトルベクター YRp7に挿入した。プラスミドYRp7は、*S. cerevisiae*の *TRP1* 遺伝子と *S. cerevisiae*の複製開始点としてARS1を有している。作製されたプラスミドpURA-SR21を、*S. cerevisiae* YNN27 (MAT α *trp1 ura3*) に導入した。プラスミドpURA-SR21内に存在する *S. cerevisiae* の *TRP1* 遺伝子を選択マーカーとして、トリプトファン非要求性より形質転換株を分離した。その形質転換株のウラシル非添加培地での生育性を検討し、その結果をFig. 11 に示した。元のプラスミドであるYRp7を導入された形質転換株はウラシル要求性であったのに対し、プラスミドpURA-SR21が導入された形質転換株が、ウラシル非要求性となったことより、*H. anomala*の *URA3* 遺伝子は、*S. cerevisiae* の *ura3* 変異を相補することが示された。したがって、今回クローニングをおこなった *H. anomala*の *URA3* 遺伝子は機能のあるODCase をコードしていることが判明した。

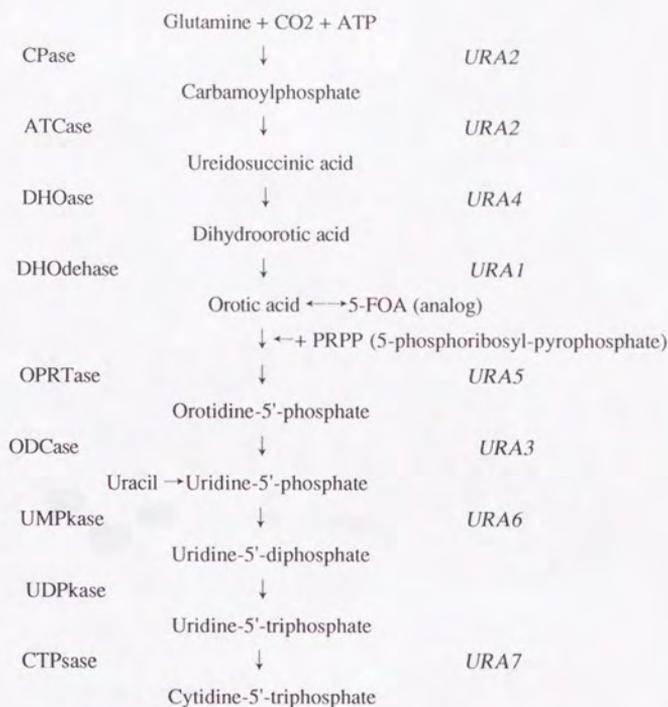


Fig. 5 The pathway of pyrimidine biosynthesis.

The enzymes are abbreviated as follows: CPase, carbamylphosphate synthetase; ATCase, aspartate transcarbamylase; DHOase, dihydroorotase; DHOdehase, dihydroorotate dehydrogenase; OPRTase, orotate phosphoribosyl transferase; ODCase, orotidine-5'-phosphate decarboxylase; UMPkase, uridine-5'-phosphate kinase; UDPkase, uridine-5'-diphosphate kinase; CTPsase, cytidine-5'-triphosphate synthetase.

Genetic numbers of *S. cerevisiae* were described.

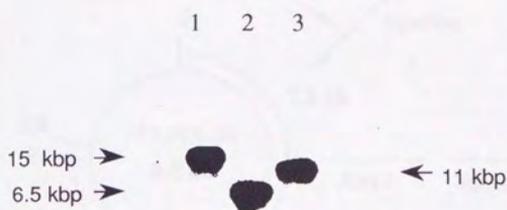


Fig. 6. Southern analysis of *H. anomala* genomic DNA. *H. anomal*agenomic DNA was digested with *Bam* HI (lane 1), *Eco* RI (lane 2) and *Sal* I (lane 3), and the resulting fragments were electrophoresed and transferred to a nylon membrane. A 1.1 kbp *Hin* d III fragment of the *S. cerevisiae* *URA3* gene isolated from YEp24 was used as a probe.

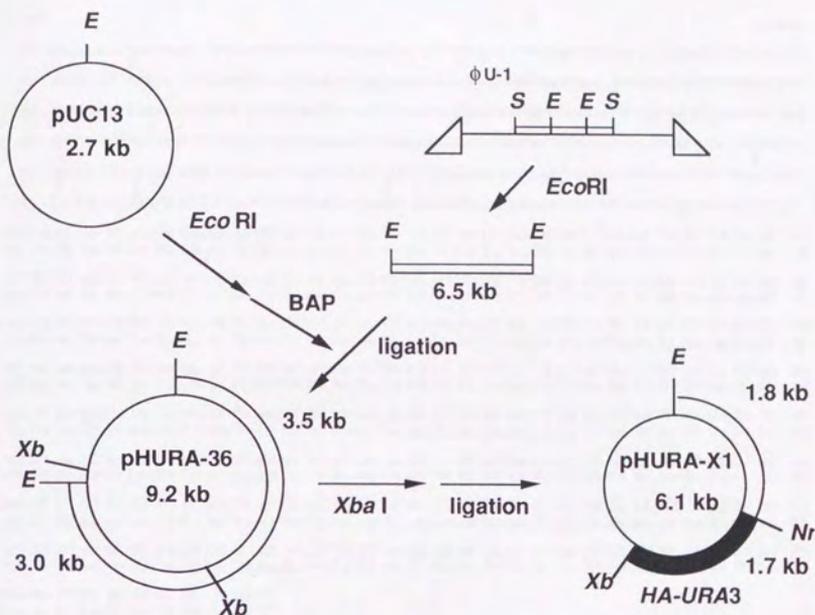


Fig. 7 Construction of the plasmids containing *H. anomala* *URA3* gene. Abbreviations are as follows: *E*, *Eco* RI; *Nr*, *Nru* I; *S*, *Sal* I; *Xb*, *Xba* I; BAP, Bacterial Alkaline Phosphatase.

```

-720  AACTATCAATCGCAACTCCACTCTCTTAAGCTCATTGTTCAGTAAATAAAGCAATTTGTCTTGGAACTTTGACCACTCTTCACTATGTTCAAGAATTTTCACTACATTTT
-600  ATAACACAGCTTCTCTTTGCAAGTAATTTGCTGAGTGAATCATTAAACAAATCGGTGAACAACTTCAACCAAAATTTGAATAAAGCGCATAAAGTCTTTGATTTGTTTTG
-480  TTCACGGATCTTGGAAATCTGTGTCTCTCTGGTFAATGATCCATTTGCTTGATAAATTAATTTGAATAGTATTAATCAAAATCGGTGGTAAGTTTCATATGGCAACA
-360  AGTTTCAGTATTTTTCAACATTTTTTTTTCTGCTGAATTTGGAAAAGATCGAAAACATCCCAATCAGGAAATTAATCGATATAGTGAGTCCATAGAAAATGGTTGACGCTC
-240  GAAAATCTTTGATATTACCAAGACATGGGATAAATAAGGATAAGTCTCTGAAATGCTTTCAAGCCATTTAATGCCATTTTACATATACAATTAACCGTATTATTTAAACATTACGT
-120  TCGACATCTGTTGTTGGTCGGGCCACTACTTTTTTTTTTAACTGGCCAAAGATTTAATTAATCAACCAACTTTTAAACTATTTTTCGACTAAAATCCACTTTGAAAAGATATATCACT

1  ATG GTC CAA ACC TTA ACC TAC CCT CAA AGA GCG GAA GCT CAC CCA TCA CCT TTG GCT AAA CGT CTT TTT GGC GTT ATG GAG TCA AAA CAA TCA AAC 96
1  Met Val Gln Thr Leu Thr Tyr Pro Gln Arg Ala Glu Ala His Pro Ser Pro Leu Ala Lys Arg Leu Phe Gly Val Met Glu Ser Lys Gln Ser Asn 32
97  TTG TGT GCT TCA AGT GAT GTT ACA ACT ACC AAA GAA TTT TTG GAA TTA GTT GAT ACA TTA GGG CCA TAC ATC TGT CTA GTA AAA ACA CAT ATT GAT 192
33  Leu Cys Ala Ser Ser Asp Val Arg Thr Thr Lys Glu Phe Leu Glu Leu Val Asp Thr Leu Gly Pro Tyr Ile Cys Leu Val Lys Thr His Ile Asp 64
193  ATT ATT GAT GAC TTT TCA ATT GAA GGC ACC ATT GAA CCA GTC AAA AAA TTG GCT TCA AAA CAT AAT TTT TTG ATC TTT GAA GAT GGT AAA TTT GCT 288
65  Ile Ile Asp Asp Phe Ser Ile Glu Gly Thr Ile Glu Pro Val Lys Lys Leu Ala Ser Lys His Asn Phe Leu Ile Phe Glu Asp Arg Lys Phe Ala 96
289  GAT ATT GGA AAC ACA GTT ACA GCT CAA TAT TCA AGT GGT GCT TTC ACA ATC GCT ACA TCG TCT GAT ATA ACT AAC CCA CAT GGT GTT ACT GGT GAA 384
97  Asp Ile Gly Asn Thr Val Thr Ala Gln Tyr Ser Ser Gly Ala Phe Thr Ile Ala Thr Trp Ser Asp Ile Thr Asn Ala His Gly Val Thr Gly Glu 128
385  GGT ATC GTT AGA GGT TTG AAA GAA GCT GCT TCA GAA GTT TCA CAA GAA CCA AGA GGT TTG TTG ATT CTT GCA GAG TTA AGT TCA CAA GGT TCT TTA 480
129  Gly Ile Val Arg Gly Leu Lys Glu Ala Ala Ser Glu Val Ser Gln Glu Pro Arg Gly Leu Leu Met Leu Ala Glu Leu Ser Ser Gln Gly Ser Leu 160
481  GCT AAA GGT GAA TAC ACT AAA ACA ACC GTT GAT ATT GCT AAA ACT GAT AAA GAT TTT GTC ATT GGA TTC ATT GCG CAA AAC GAT ATG GGT GGT AGA 576
161  Ala Lys Gly Glu Tyr Thr Lys Gln Thr Val Asp Ile Ala Lys Thr Asp Lys Asp Phe Val Ile Gly Phe Ile Ala Gln Asn Asp Met Gly Gly Arg 192
577  GAT GAA GGT TTT GAT TGT TTA ATC ATC ACT CCA GGT GTT GGT CTT GAT GAT AAA GGT GAT GGT TTA GGT CAA CAA TAC AGA TCT GTC AGT GAA GTT 672
193  Asp Glu Gly Phe Asp Cys Leu Ile Met Thr Pro Gly Val Gly Leu Asp Asp Lys Gly Asp Gly Leu Gly Gln Gln Tyr Arg Ser Val Ser Glu Val 224
673  GTT CCT GGT GGT AGT GAT ATC ATA ATT GTC GGT AGA GGT CTT TTT TGG AAA GGT AGA GAT CCA AAA GTT GAA GGC GAG GGT TAT ACA TCT GCT GGT 768
225  Val Ala Gly Gly Ser Asp Ile Ile Val Gly Arg Gly Leu Phe Gly Lys Gly Arg Asp Pro Lys Val Glu Gly Glu Arg Tyr Arg Ser Ala Gly 256
769  TGG AAC GCA TAT TTA AAG AGA ACT AGC CAA ATA TGA
57  Trp Asn Ala Tyr Leu Lys Arg Thr Ser Gln Ile ***

805  GCGTTAATTTTCAGTAAACATGCAATAACAAATGGACCTTTACGCTAGCAATCCACCACCTTCTCACTATGTCATGCAATTTGTTTCAATGAAATGCTTAAAGTATTTGAAAAGTCT
925  ATTGTGATTACCTGAATATTACCTAATGCTCCGCA 966

```

Fig. 8 Complete nucleotide and derived amino acid sequences of the *Xba* I - *Nru* I fragment of the *H. anomala* *URA3* gene. Arrows show the transcription initiation points. The five conservative regions of ODCase are underlined. Nucleotides are numbered from ATG start codon. The predicted amino acids are also numbered.

Table 7. Homology between each yeast ODCase and their encoding gene

Protein homology	DNA homology				
	HA	SC	KL	CA	SP
<i>H. anomala</i>		69	71	69	62
<i>S. cerevisiae</i>	73		72	68	58
<i>K. lactis</i>	81	81		67	59
<i>C. albicans</i>	72	70	71		60
<i>S. pombe</i>	54	52	54	55	

The coding regions of ODCase genes have been compared for the calculation of DNA homologies. Abbreviations are as follows: HA, *H. anomala* : SC, *S. cerevisiae* : KL, *Klyveromyces lactis* : CA, *Candida albicans* : SP, *Schizosaccharomyces pombe*.

ACGT



Fig. 9 Primer extension mapping of the transcription initiation sites of the *H. anomala* *URA3* gene. Arrows indicate the extension products detected. Size markers (lane ACGT) are DNA sequencing reactions carried out using as template *URA3* DNA strand corresponding to the RNA transcript. The same end-labeled primer was used in the extension reaction.

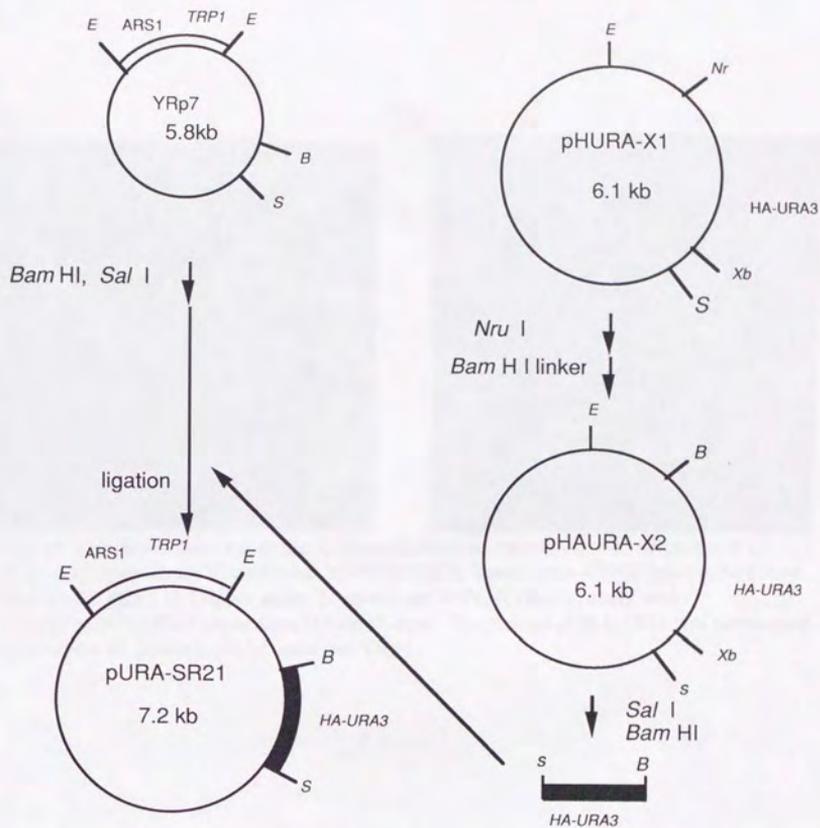
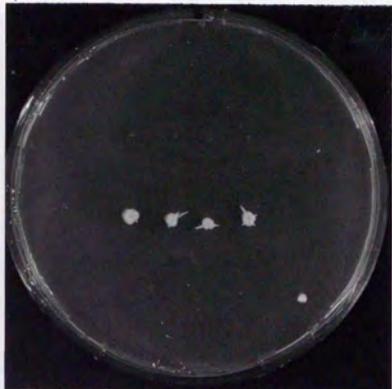


Fig. 10 Construction of the plasmid which has *H. anomala* URA3 gene and ARS1(*S. cerevisiae* autonomous replication sequence)

Abbreviations are as follows: B, Bam HI; E, EcoRI; Nr, Nru I; S, Sal I.

(A)



(B)

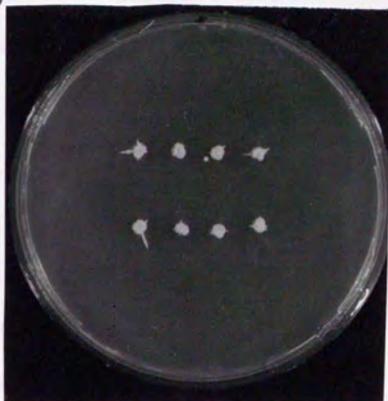


Fig. 11 Complementation test of the *S. cerevisiae* *ura3* mutation by the *H. anomala* *URA3* gene. (A) Upper strain *S. cerevisiae* YNN27(YRp7), lower strain YNN27(pURA-SR21) on medium SD agar; (B) Upper strain *S. cerevisiae* YNN27(YRp7), lower strain YNN27(pURA-SR21) on medium SD+uracil agar. The plasmid pURA-SR21 was constructed to insert the *H. anomala* *URA3* gene into YRp7.

考察

*H. anomala*の形質転換の際の選択マーカー遺伝子としての利用を考え、*H. anomala*のURA3遺伝子のクローニングをおこなった。non-Saccharomyces属の酵母のうち、*K. lactis*や*C. albicans*のURA3遺伝子は、*S. cerevisiae*のura3変異のheterogeneous complementationによりクローニングされてきている (Mizukami and Hishinuma 1988、Losberger and Ernst 1989)。一方、糸状菌である*Phycomyces blakesleeanae*のpyr G遺伝子 (ODCaseをコードする遺伝子) をクローニングする際、*Aspergillus niger*のpyr G遺伝子全体を用いたプローブではハイブリダイズされず、Pst I - Cla I 170 bpのフラグメントをプローブとして用いたことが報告されている (Diaz-Minguez, J. M., et al. 1990)。*H. anomala*のURA3遺伝子のクローニングでは、ORFのDNA塩基配列においても比較的低い同一性 (69%) にもかかわらず、*S. cerevisiae*のURA3遺伝子全体をプローブとすることが可能であった。

塩基配列の決定より、*H. anomala*のURA3遺伝子は他の真菌類のODCaseをコードする遺伝子と蛋白質をコードする領域では高いレベルの相同性を有することが示された。真菌類のODCaseは、触媒部位あるいは基質結合部位と想定される5つの領域が提唱されている (Losberger and Ernst 1989、Diaz-Minguez et al. 1990)。*H. anomala*のURA3遺伝子においてもこの領域は保存されていた。また、*H. anomala*のURA3遺伝子を*S. cerevisiae* ura3変異株に導入したところ、*S. cerevisiae*のura3変異を相補した。このことより、*H. anomala*のURA3遺伝子は機能のあるODCaseをコードしていることが示された。プロモーターが存在すると考えられる5'非翻訳領域において、相同領域が存在しないにもかかわらず、*S. cerevisiae*において*H. anomala*のURA3遺伝子が機能することは大変興味深いことである。類似した現象は、*S. pombe*

のURA4 遺伝子 (Bach 1987)、*Candida boidinii*のURA3 遺伝子 (Sakai *et al.* 1992) なども見いだされており、これらODCaseをコードする遺伝子は*S. cerevisiae*のura3 変異を相補したと報告されている。non - *Saccharomyces*属の酵母よりクローニングされた遺伝子はいくつか報告されているが、各種酵母間での転写機構の差異についての報告は少ない。URA3 遺伝子は各種酵母よりクローニングされているので転写機構の解明の手段として興味ある対象であると考えられる。

要約

1、排水処理に用いられている酵母である*H. anomala*の形質転換の際の選択マーカー遺伝子として利用するために、オロチジン-5' リン酸脱炭酸酵素 (ODCase) をコードする*URA3* 遺伝子をクローニングした。この際、*S. cerevisiae*の*URA3* 遺伝子をプローブとして、low stringency の条件にて、ハイブリダイゼーションすることによって、*H. anomala*の*URA3* 遺伝子をクローニングすることができた。

2、クローニングした*H. anomala*の*URA3* 遺伝子のDNA 塩基配列を決定した。804 ヌクレオチドからなるORFは、既にクローニングされている他の酵母のODCase と相同性が見いだされたが、転写開始あるいは終了に関与することが予想される5'、3' 非翻訳領域には相同性が見いだされなかった。

3、*H. anomala*の*URA3* 遺伝子は*S. cerevisiae**ura3* 変異を相補したことより、クローニングした*H. anomala*の*URA3* 遺伝子は機能のあるODCase をコードしていることが判明した。

第五章 酵母 *Hansenula anomala* の *ura3* 変異株の分離およびこれを用いた 形質転換

緒言

前章にて、形質転換の際の選択マーカーとして *H. anomala* の *URA3* 遺伝子をクローニングしたことを報告した。次に、本章では宿主として *H. anomala* を用いるために *ura3* 変異株の分離を試みた。Boeke *et al.* (1984) は、ピリミジン塩基生成の中間体であるオロチン酸のアナログである 5-fluoroorotic acid (5-FOA) 耐性を利用して、*S. cerevisiae* の *ura3* 変異株を容易に分離できたことを報告した。この現象を利用して遺伝学的研究が整っていない対象でも、5-FOA 耐性変異株を分離することで容易にオロチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼあるいは ODCase 欠損変異株を分離することが可能であると考えられた。メチロトロフ (methylothrop) である *Candida tropicalis* あるいは、*C. boidinii* は、SCP 産生を目的として、産業上の興味が持たれている酵母である。これらの種の宿主・ベクター系の開発のための宿主として、*ura3* 変異株 (ODCase 欠損変異株) が分離されたことが報告されている (Sakai *et al.* 1991, Haas *et al.* 1990)。これらの酵母は無孢子酵母 (asporogenous yeast) であるので、遺伝学的研究はほとんどおこなわれていなかったにもかかわらず、*ura3* 変異株を分離することができたのは、5-FOA 耐性変異を利用したからである。そこで、5-FOA 耐性変異を利用することで、同様に遺伝学的研究がほとんどおこなわれていない *H. anomala* においても *ura3* 変異株の分離が可能ではないかと考えられた。さらに、分離された *H. anomala* の *ura3* 変異株に既にクローニングした *H. anomala* の *URA3* 遺伝子を用いるこ

とによる形質転換を試みた。

*S. cerevisiae*では、挿入型の形質転換の場合、形質転換に用いたプラスミドが相同領域で組み換わり1コピーが染色体に挿入されることが主要であると報告されている (Orr-Weaver *et al.* 1981)。これに対し、分裂酵母 *Shizosaccharomyces pombe* では、形質転換に用いたプラスミドが非相同領域に挿入されることも稀ではないことが報告されている (Wright *et al.* 1986)。糸状菌 *Aspergillus oryzae* (Gomi *et al.* 1986, Tsuchiya *et al.* 1992) や *Aspergillus niger* (Buxton *et al.* 1985) などでは、相同領域に挿入される方がむしろ稀であることが報告されている。*H. anomala* の *URA3* 遺伝子を用いた形質転換では、どのようにに染色体への挿入がおこなわれているかは極めて興味深い。

実験結果

ハプロイド株である *H. anomala* J-224-H1 を、変異剤であるメタンсульホン酸エチルで処理し、0.1% 5-FOA、20 μ g/ml ウラシルを含む最少培地SD寒天培地に塗布した。約200個の5-FOA耐性のコロニーのウラシル要求性を調べたところ、ほぼ90%がウラシル要求性であった。19株のウラシル要求性の変異株のODCase活性を調べたところ、14株がODCase活性が欠損している *ura3* 変異株であった (Table 8)。7株の *ura3* 変異株の復帰変異率について調べた。全ての *ura3* 変異株は10°程度の低い復帰変異率であり (Table 8)、形質転換株の際の宿主として適しているものと判断した。

H. anomala ura3 変異株の形質転換に用いたプラスミドは、pHURA-X1である。これは大腸菌のプラスミドpUC13に、*H. anomala*の *URA3* 遺伝子を含むDNAフラグメント *EcoRI* - *XbaI* 3.5kbpを含むものである (Fig. 6)。*H. anomala*の *URA3* 遺伝子は、唯一の *EcoRV* 部位を有しているため、*EcoRV*処理により、プラスミドpHURA-X1は線状化される。*H. anomala*の形質転換は、酢酸リチウム法 (Ito *et al.* 1983) あるいは、電気パルス法 (Becker and Guarente 1991) にて行った。試みた *H. anomala ura3* 変異株全てにおいて、線状化されたプラスミドでのみ形質転換株が得られた。その形質転換効率を、Table 9に示す。*H. anomala ura3* 変異株の間で、形質転換効率には大きな差がなかった。大腸菌のプラスミドpBR322に *S. cerevisiae*の *URA3* 遺伝子が挿入されているプラスミドYIp5、あるいは、大腸菌のプラスミドpBR322に *S. cerevisiae*の 2 μ m DNAと *URA3* 遺伝子が挿入されているプラスミドYEp24を用いて、*H. anomala ura3* 変異株を形質転換することはできなかった。しかし、同様の条件下で、実験室酵母 *S. cerevisiae* YNN27を高効率で形質転換することができた (Table 9)。

11個の形質転換株より、染色体DNAを抽出し、サザンハイブリダイゼーションを

おこなった。それぞれの形質転換株より得られたサザンハイブリダイゼーションの結果は、全て同じであった。Fig.13 (A) は、プローブとして *H. anomala* の *URA3* 遺伝子を用いたものである。形質転換に用いたプラスミド pHURA-X1 を切断しない制限酵素 *Bam* HI で処理すると、形質転換株ではハイブリダイズするバンドは親株のものに比べて、その移動度は小さくなっていた (Fig.13 (A) レーン 3、4 15 kbp vs. 21 kbp)。プラスミド pHURA-X1 を一カ所、切断する制限酵素 *Eco* RI で形質転換株の DNA を処理すると、親株にはみられなかったハイブリダイズするバンドが新たに現れた (Fig. 13 (A) レーン 6 6.1 kbp)。大腸菌のプラスミド pUC13 をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションの結果は Fig. 13 (B) に示した。このプローブは、親株の DNA とはハイブリダイズせず (Fig.13(B) レーン 1、3、5)、形質転換株の染色体 DNA を制限酵素 *Bam* HI で処理すると、*H. anomala* の *URA3* 遺伝子をプローブとした場合と同じところにハイブリダイズするバンドが現れた (Fig. 13(B) レーン 4)。制限酵素 *Eco* RI で処理すると、6.1 kbp にハイブリダイズするバンドが現れ、これは *H. anomala* の *URA3* 遺伝子をプローブとした場合に新たに現れたハイブリダイズするバンドと同一のものであった (Fig. 13 (A) レーン 6 6.1 kbp)。両方のプローブとも (*H. anomala* の *URA3* 遺伝子、大腸菌のプラスミド pUC13) 未処理の高分子領域の染色体 DNA とハイブリダイズした (Fig. 13 (A) レーン 2、Fig. 13 (B) レーン 2)。さらに、プラスミド pHURA-X1 を一カ所切断する制限酵素 *Sca* I で処理すると、*H. anomala* の *URA3* 遺伝子をプローブとしてハイブリダイズすると、形質転換株では 9.5 kbp と 8.5 kbp の二つのハイブリダイズするバンドがあらわれ、親株では 12 kbp のバンドがあらわれた (data not shown)。もし、multiple integration が生じているならば、形質転換株では現れた 9.5 kbp と 8.5 kbp の二つのバンドに加えて、プラスミド

pHURA-X1 の長さに相当する6.1kbp のハイブリバンドがあらわれるはずであるが、これはみられなかった。また、*EcoRI* 処理した形質転換株の染色体DNA は、*H. anomala* の *URA3* 遺伝子とハイブリダイズする二つバンドの強度はほぼ同じであった (Fig. 13 A), lane 6)。以上より、*H. anomala* の形質転換は Fig 13 (c) に示されているように、染色体DNAの相同領域と組み換わり、プラスミドDNAが挿入されたものと判断した。

得られた形質転換体を非選択培養条件である栄養培地YPD培地で、20世代以上培養し、形質転換株のウラシル非要求性の形質の安定性を検討した。調べた全ての形質転換株において、その形質は安定に維持されていた。

Table 8. ODCase activities and reversion frequency of uracil auxotrophic mutant strains of *H. anomala*.

Strain	ODCase (U/mg protein)	Reversion frequency ^{a)}
HU-1	ND ^{b)}	3.7×10^{-9}
HU-2	ND	5.1×10^{-9}
HU-3	ND	2.7×10^{-9}
HU-4	ND	3.8×10^{-9}
HU-5	ND	1.4×10^{-9}
HU-6	ND	2.6×10^{-9}
HU-11	ND	1.5×10^{-9}
H-1	0.3	

a) Reversion frequencies of *H. anomala* *ura3* mutants were determined as follows: *H. anomala* *ura3* mutants were growing on the YPD medium for 10 generations and screening uracil auxotrophy.

b) ND, Not detected. The decrease of orotidine-5'-phosphate was undetectable. The detection limit of orotidine- 5'-phosphate was $0.1 \mu\text{M}$.

Table 9. Transformation of *H. anomalaura3* mutants and *S. cerevisiaeura3* mutant.

Host strain	Plasmid	Plasmid form	Transformation efficiency(CFU/ μ g DNA)	
			Electroporation	Lithium Acetate
HU-1	YIp5	Linearized by <i>Nco</i> I	0	NT
	YEp24	Circular	0	NT
	pHURA-X1	Circular	0	NT
	pHURA-X1	Linearized by <i>Eco</i> RV	80	23
HU-2	pHURA-X1	Linearized by <i>Eco</i> RV	150	119
HU-3	pHURA-X1	Linearized by <i>Eco</i> RV	180	30
HU-4	pHURA-X1	Linearized by <i>Eco</i> RV	350	500
HU-5	pHURA-X1	Linearized by <i>Eco</i> RV	400	NT
HU-6	pHURA-X1	Linearized by <i>Eco</i> RV	180	NT
HU-11	pHURA-X1	Linearized by <i>Eco</i> RV	380	NT
YNN27	YIp5	Linearized by <i>Nco</i> I	860	NT
	YEp24	Circular	8800	NT

NT, Not tested.

CFU, Colony-forming units.

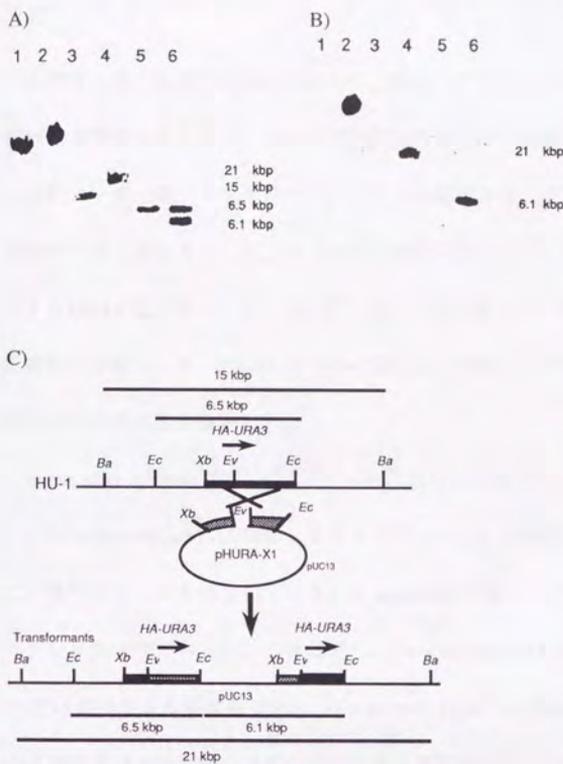


Fig. 13. (A) Southern blot hybridization of *H. anomala* cellular DNAs with *H. anomala URA3* gene (*Eco* RI - *Xba* I fragment of plasmid pHURA-X1) as a probe. The probe was labeled by ECL reagent (Amersham, UK). Five micrograms of undigested DNA (lane 1 and 2), *Bam* HI-digested DNA (lane 3 and 4), *Eco* RI-digested DNA (lane 5 and 6) were loaded. Lane 1, 3 and 5 are DNA from the parent strain *H. anomala* HU-1. Lane 2, 4, and 6 are DNA from *H. anomala* transformants. (B) Southern blot hybridization of *H. anomala* cellular DNAs with *E. coli* plasmid pUC13 as a probe. The probe was labeled by ECL reagent (Amersham, UK). Lanes are as those in Fig. 13 (A). (C) Deduced integration pattern of the plasmid pHURA-X1 by homologous recombination with *H. anomala* chromosome. The solid box indicates *H. anomala URA3* gene derived from *H. anomala* chromosome. The patched box indicates *H. anomala URA3* gene derived from *H. anomala URA3* gene from the plasmid pHURA-X1. Abbreviations are as follows: *Ba*, *Bam* HI; *Ec*, *Eco* RI; *Ev*, *Eco* RV; *Xb*, *Xba* I; *HA-URA3*, *H. anomala URA3* gene.

考察

栄養要求性の変異の相補を利用して、宿主・ベクター系を構築するためには、形質転換の際の宿主とするための栄養要求性の変異株の分離と、宿主の変異を相補する選択マーカー遺伝子をクローニングする必要がある。前章にて、形質転換の際の選択マーカー遺伝子として、*H. anomala*のオロチジン-5'-リン酸脱炭酸酵素をコードする*URA3*遺伝子をクローニングしたことを記載した。本章では*H. anomala**ura3*変異株を分離し、*H. anomala*の*URA3*遺伝子を持つプラスミドベクターを用いての形質転換の可能性を検討した。

Boeke *et al.* (1984) は、ピリミジン生合成の中間体であるオロチン酸のアナログである5-fluoroorotic acid (5-FOA) 耐性を利用して、*S. cerevisiae*の*ura3*変異株を容易に分離できることを報告している。*H. anomala*の場合、5-FOA耐性変異株の90%がウラシル要求性であった。これに対し、*Candida boidinii*の場合、5-FOA耐性変異株の1%だけがウラシル要求性であり (Sakai *et al.* 1991)、*Candida tropicalis*の場合、5-FOA耐性変異株の11%だけがウラシル要求性であった (Haas *et al.* 1990)。

McCusker and Davis (1991) は、*S. cerevisiae*で5-FOAの透過性が5-FOA感受性に影響を与えることを報告している。これら酵母菌種間での5-FOA耐性変異株の違いは、5-FOAの透過性等が影響を与えているとも考えられる。

分離された*H. anomala**ura3*変異株と*H. anomala*の*URA3*遺伝子を有するプラスミドpHURA-X1を用いて形質転換を試みた。*H. anomala**ura3*変異株は、線状化されたプラスミドpHURA-X1では形質転換することが可能であったが、環状のプラスミドでは形質転換株を得ることができなかった。Orr-Weaver *et al.* (1981) は、*S. cerevisiae*でプラスミドを線状化することで、染色体への挿入が格段に増加することを報告して

いる。*S. cerevisiae*と*H. anomala*は類似した機構で、プラスミドDNAが染色体に挿入されていると考えられる。環状のプラスミドでは*H. anomala*の形質転換株を得ることができなかった。その理由の一つとして、*H. anomala*の低い形質転換能によることが考えられる。

また、調べた*H. anomala*の形質転換株は全て、用いたプラスミドが単一な形で相同領域に挿入されていた。このような染色体挿入の形態は、*S. cerevisiae*のものと同様類似している。緒言にも記載したように、分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*では、プラスミドが非同領域へ挿入されることも比較的稀ではない現象である (Wright *et al.* 1986)。糸状菌である*Aspergillus oryzae* (Gomi *et al.* 1987.) や *Aspergillus niger* (Buxton *et al.* 1985) の形質転換は、非同領域への挿入の方がむしろ主流である。無孢子酵母である*Candida tropicalis* や (Haas *et al.* 1990)、*Candida boidinii* の場合 (Sakai *et al.* 1991) は形質転換に用いたプラスミドは相同的に挿入されるが、*S. cerevisiae* や *H. anomala* でみられる single integration 以外にも、多数のプラスミドが挿入される multiple integration や、相同領域のみが挿入される gene conversion がみられることなどが報告されている。酵母菌種間での染色体挿入の形態の違いは興味深い問題である。

S. cerevisiae では、染色体DNA に挿入されたプラスミドは非選択的条件下で培養しても安定に保持されることが報告されている (Hinnen *et al.* 1978)。*S. cerevisiae* と同じ形態で染色体への挿入型の形質転換が生じる *H. anomala* においても、挿入された形質は安定に保持されることを確認した。このことは、産業上での応用を考える際、非常に有利に働くと考えられる。また、排水処理に用いることをめざして、各種酵素を分泌する酵母を分離したことが報告されている (Iefuji, *et al.* 1994)。これらの

酵素遺伝子が、*H. anomala*にて発現することが期待される。

*S. cerevisiae*の*URA3*遺伝子を有するプラスミドであるYEp24あるいは、YIp5を用いて*H. anomala ura3*変異株の形質転換を試みたところ、形質転換株を得ることはできなかった。このことは、*S. cerevisiae*の*URA3*遺伝子が*H. anomala*では機能しないと考えられるが、 $2 \mu\text{m}$ DNAを複製開始起点とするプラスミドYEp24では、 $2 \mu\text{m}$ DNAが*H. anomala*で複製しないか、あるいは、挿入型のプラスミドであるYIp5を用いた場合は、*H. anomala*の形質転換では染色体への挿入には厳密な相同性が要求されるためとも考えられる。

各種酵母の*URA3*遺伝子は転写開始配列が存在することが予想される5'非翻訳領域は、全く相同性を有していないにもかかわらず、他種の*URA3*遺伝子が異なる酵母種で機能する例が報告されている。例えば、*Kluyveromyces lactis* (Mizukami and Hishinuma 1988)、*C. boidinii* (Sakai *et al.* 1992)のそれぞれ*URA3*遺伝子は、*S. cerevisiae*の*ura3*変異を相補することが報告されている。また、*S. cerevisiae*の*URA3*遺伝子は*C. boidinii*の*ura3*変異を相補することが報告されている (Sakai *et al.* 1993)。本研究では、*H. anomala*の*URA3*遺伝子が*S. cerevisiae*の*ura3*変異を相補することを見いだした(第4章)。以上のように、各酵母菌種間では、プロモーター領域の塩基配列が異なるにもかかわらず、各種酵母の*URA3*遺伝子が転写されうることが見いだされており、各酵母菌種間での転写機構については興味あることである。*S. cerevisiae*の*URA3*遺伝子が*H. anomala*で機能するかは次章で検討を加えた。

要約

- 1、ピリミジン塩基生合成阻害剤である5-fluoroorotic acid (5-FOA) 耐性を利用して、*H. anomala*の*ura3*変異株を分離した。
- 2、*H. anomala*の*ura3*変異株に、*H. anomala*の*URA3*遺伝子を有するプラスミドを導入したところ、形質転換株が得られた。サザンハイブリダイゼーションの結果、形質転換株では用いたプラスミドが染色体の相同領域で組換わり、挿入されたものであることが判明した。
- 3、*H. anomala*の形質転換体は、非選択条件である栄養培地YPD培地で増殖させても、その形質は安定に保持されていた。

第六章 *Saccharomyces cerevisiae* の遺伝子の *Hansenula anomala* における 機能性の検討

緒言

本研究（第四章、第五章）において、酵母 *Hansenula anomala* の形質転換をおこなうことが可能となったことを記載した。本章においては、*H. anomala* の栄養要求性の変異株を分離し、形質転換における宿主とした。実用酵母における形質転換では、宿主の遺伝型によらない形質転換、すなわち、優性形質を選択マーカーとすることが望ましいことは、本研究において第一章に記載した。これは、変異株の分離等の操作により、実用株の優良な形質を損傷させる恐れがあるからである。そこで、本研究の第一章、第二章において記載した、*Saccharomyces cerevisiae* の *ADH1* プロモーターを接続し、作製した *apt2* 遺伝子（*ADH1-APT2* 遺伝子）が、*H. anomala* においても形質転換の際の選択マーカーとなりうるかどうかを検討した。この際、作製したプラスミドは、*S. cerevisiae* の 2 μ m DNA や *ARS1* が *S. cerevisiae* では複製開始起点として作用しているが、これらは、*H. anomala* では機能し得ないことも考えられる。

一方、*H. anomala* は *S. cerevisiae* の遺伝子のプロモーターを認識することができず、*ADH1-APT2* 遺伝子が *H. anomala* では機能しないことも考えられた。しかし、先に記載したように、転写開始配列が存在することが予想される5'非翻訳領域は、全く相同性を有していないにもかかわらず、外来の *URA3* 遺伝子が異なる酵母種で機能する例が報告されている。例えば、*Kluyveromyces lactis* (Mizukami and Hishinuma 1988)、*Candida boidinii* (Sakai *et al.* 1992) のそれぞれ *URA3* 遺伝子は、*S.*

*cerevisiae*の*ura3*変異を相補することが報告されている。本研究においても *H. anomala* の*URA3* 遺伝子が*S. cerevisiae* の*ura3* 変異を相補することを見いだしている (第四章)。 *S. cerevisiae* の*URA3* 遺伝子は*C. boidinii* の*ura3* 変異を相補することが報告されており (Sakai *et al.* 1993)、 *S. cerevisiae* の*PGK* (3-ホスホグリセレートキナーゼ) 遺伝子のプロモーターは、*K. lactis*で機能しうること (Russell *et al.* 1993)、 *S. cerevisiae*の*ADHI* (アルコール脱水素酵素1) 遺伝子のプロモーターは、*Schizosaccharomyces pombe*で機能しうること等が報告されている (Russel 1983)。このように、各酵母菌種間では、DNA 塩基配列が異なるにもかかわらず、ある程度広く他種のプロモーター領域を認識している例をみることができる。酵母菌種間での転写機構、特に転写活性化配列の認識については興味あることである。本研究の第五章において、*S. cerevisiae*の*URA3* 遺伝子を有する挿入型のプラスミドである Y1p5 を用いて、*H. anomala*の*ura3*変異株を形質転換できなかったことを記載した。このことは、*H. anomala*の挿入型の形質転換では、宿主の染色体DNAと組換え領域において厳密な相同性が要求されることが考えられるが、これとは別に*S. cerevisiae*の*URA3* 遺伝子のプロモーターが、*H. anomala*では転写活性化配列として機能しないことも考えられた。

以上の点より、*S. cerevisiae*の遺伝子の*H. anomala*での機能性を検討することとし、*S. cerevisiae*の*ADHI* 遺伝子のプロモーターと*URA3* 遺伝子の*H. anomala*における機能性について検討した。

実験結果

本研究の第一章及び第二章で記載したしたプラスミドpYcDE- Δ G11、pAGR-1を用いて、抗生物質G-418耐性を選択マーカーとして、*H. anomala*の形質転換株を得ることはできなかった。これは、*S. cerevisiae*の2 μ m DNAやARS1が、*H. anomala*では複製開始起点として機能し得ないことが理由の一つとして考えられる。一方、*S. cerevisiae*のADHIプロモーターを接続させたapt2遺伝子（ADHI-APT2遺伝子）が*H. anomala*では発現機能しないことも考えられる。後者の可能性を検討するため、ADHI-APT2遺伝子を有するDNAフラグメントを、*H. anomala*のURA3遺伝子を有するプラスミドpHURA-X1に移し、プラスミドpHAPAG-1を作製した（Fig. 14）。このプラスミドを用いて、*H. anomala*ura3変異株の形質転換をおこなった。*H. anomala*の形質転換株はウラシル非要求性の形質を利用して分離し、サザンハイブリダイゼーションにて確認した。得られた*H. anomala*の形質転換体のG-418耐性を確認した。プラスミドpHAPAG-1によって形質転換された*H. anomala*のG-418耐性は、親株と変わらなかった。これに対し、*S. cerevisiae*YNN27では、ADHI-APT2遺伝子を有する挿入型のプラスミドpAGI-1の形質転換体は、G-418耐性度が著しく上昇していた（Table 10）。このことより、*H. anomala*では、*S. cerevisiae*のADHI遺伝子のプロモーターが機能しえないと考えられる。*S. cerevisiae*の解糖系遺伝子のプロモーターは、*Schizosaccharomyces pombe*と*Kluyveromyces lactis*では機能することが報告されているが（Russel 1983, Russell et al. 1993）、*H. anomala*は、これらとは異なるものと判断される。

また、前章で記載したように、*S. cerevisiae*のURA3遺伝子を有するプラスミドで

あり、挿入型のプラスミドであるY1p5を用いて*H. anomala*ura3変異株の形質転換を試みたところ、形質転換株を得ることはできなかった。この原因としては、*H. anomala*の形質転換では染色体への挿入には厳密な相同性が必要である可能性と、*S. cerevisiae*のURA3遺伝子が*H. anomala*で機能していない可能性が考えられる。そこで、*H. anomala*のURA3遺伝子を有するプラスミド(pHAURA-X1)を改変し、*H. anomala*のURA3遺伝子全体を*S. cerevisiae*のプロモーター領域を含めたURA3遺伝子に置換したプラスミド(pSUHA-2)、*H. anomala*のURA3遺伝子の酵素蛋白質をコードする領域(ORF領域)のみを*S. cerevisiae*のURA3遺伝子のORF領域と置換したプラスミド(pHAPU-SCU3)、それぞれを作製した(Fig. 15,16)。*H. anomala*のURA3遺伝子のもとの置換したプラスミドpHAPU-SCU3の作製は、次の様におこなった。*H. anomala*URA3遺伝子の翻訳開始点周辺に、*in vitro* mutagenesisによって、EcoRI部位を造成したプラスミドpHURA-ME1を作製した。一方、*S. cerevisiae*URA3遺伝子の翻訳開始点上流に存在するPst I部位をEcoRI部位に変換し、ORF領域のみをEcoRIフラグメントとして得ることが可能となるプラスミドYDp-UPE1を作製した。このプラスミドYDp-UPE1より*S. cerevisiae*URA3遺伝子のORF領域を有するEcoRIフラグメントを、プラスミドpHURA-ME1のEcoRI処理したものとligationし、プラスミドpHAPU-SCU3を得た。このプラスミドは、*H. anomala*URA3遺伝子のプロモーター下流に、*S. cerevisiae*のURA3遺伝子のORF領域を接続したものである。*S. cerevisiae*URA3遺伝子のPst I部位の利用については、Sugiyama (1995)の報告をもとにおこなったものである。

それぞれのプラスミドを、*H. anomala*由来のDNA配列の部分で制限酵素により切断線状化し、*H. anomala*ura3変異株に形質転換を試みた。また、*S. cerevisiae*由来の

DNA 配列部分を切断線状化し、*S. cerevisiae* *ura3* 変異株に形質転換を試みた。その結果を Fig. 17 に示した。*H. anomala* の *URA3* 遺伝子を有するプラスミド (pHAURA-X1) と、*H. anomala* の *URA3* 遺伝子の酵素蛋白質をコードする領域 (ORF 領域) のみを *S. cerevisiae* の *URA3* 遺伝子の ORF 領域に置換したプラスミド (pHAPU-SCU3) は、*H. anomala* を形質転換することが可能であったが、*H. anomala* の *URA3* 遺伝子全体を *S. cerevisiae* のプロモーター領域を含めた *URA3* 遺伝子に置換したプラスミド (pSUHA-2) は、*H. anomala* *ura3* 変異株を形質転換することができなかった。また、*H. anomala* の *URA3* 遺伝子は、*S. cerevisiae* *ura3* 変異を相補し (第四章、Fig. 11)、*H. anomala* の *URA3* 遺伝子プロモーターに、*S. cerevisiae* の *URA3* 遺伝子の ORF 領域を接続したプラスミド pHAPU-SCU3 も、*S. cerevisiae* の *ura3* 変異を相補していた (Fig. 17)。以上のことより、*S. cerevisiae* では *H. anomala* の *URA3* 遺伝子のプロモーターを転写活性化配列として認識しているものと考えられた。一方、*H. anomala* は、*S. cerevisiae* の *ADH1* 遺伝子のプロモーターあるいは、*S. cerevisiae* の *URA3* 遺伝子のプロモーターともに認識し得ないものと考えられた。

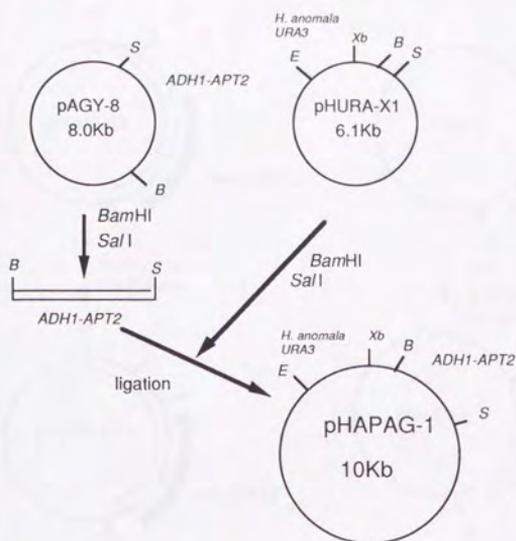


Fig. 14 Construction of the plasmid having *ADHI-APT2* gene and *H. anomala URA3* gene. Abbreviations are as follows: B, Bam HI; E, EcoRI; S, Sal I; Xb, Xba I.

Table 10. G-418 resistance of transformants and the parent strains.

	G-418 concentration (μ g/ml)			
	50	200	500	1000
<i>S. cerevisiae</i> YNN27	×	×	×	×
<i>S. cerevisiae</i> YNN27/pAGI-1	○	○	○	○
<i>H. anomala</i> HU-1	×	×	×	×
<i>H. anomala</i> HU-1/pHAPAG-1	×	×	×	×

○, Yeasts could grow.

×, Yeasts could not grow.

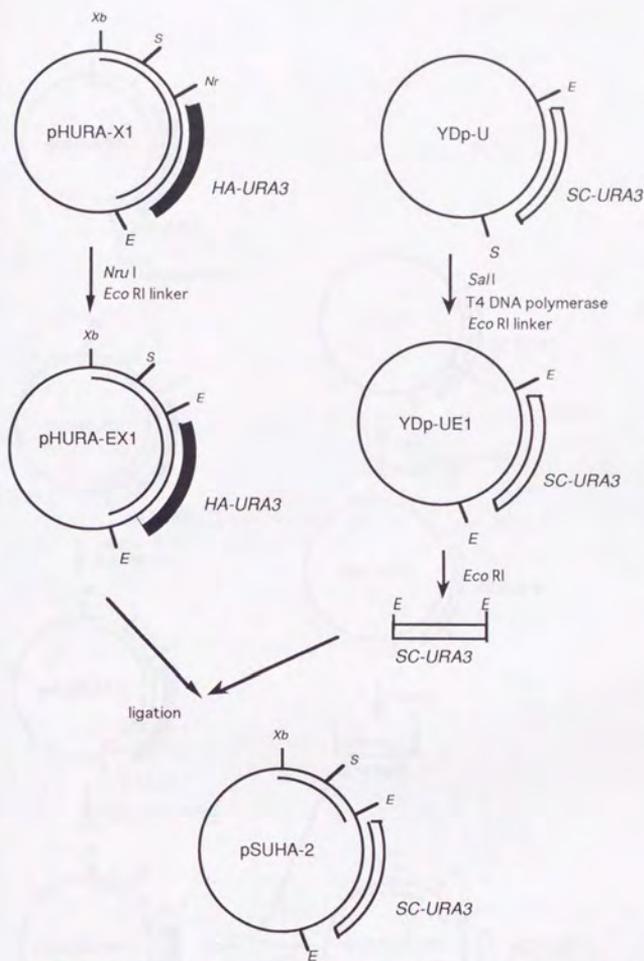


Fig.15 Construction of the plasmid in which the *H. anomala* *URA3* gene was replaced with the *S. cerevisiae* *URA3* gene. The regions of the doubled line of the plasmid represent *H. anomala* DNA sequence. The plasmid YDp-U was previously described (Berben *et al.* 1991). Abbreviations are as follows, *Ec*, *EcoRI*, *Nru*, *Nru I*, *S*, *SalI*, *Xb*, *Xba I*. *HA-URA3*, *H. anomala* *URA3* gene, *SC-URA3*, *S. cerevisiae* *URA3* gene.

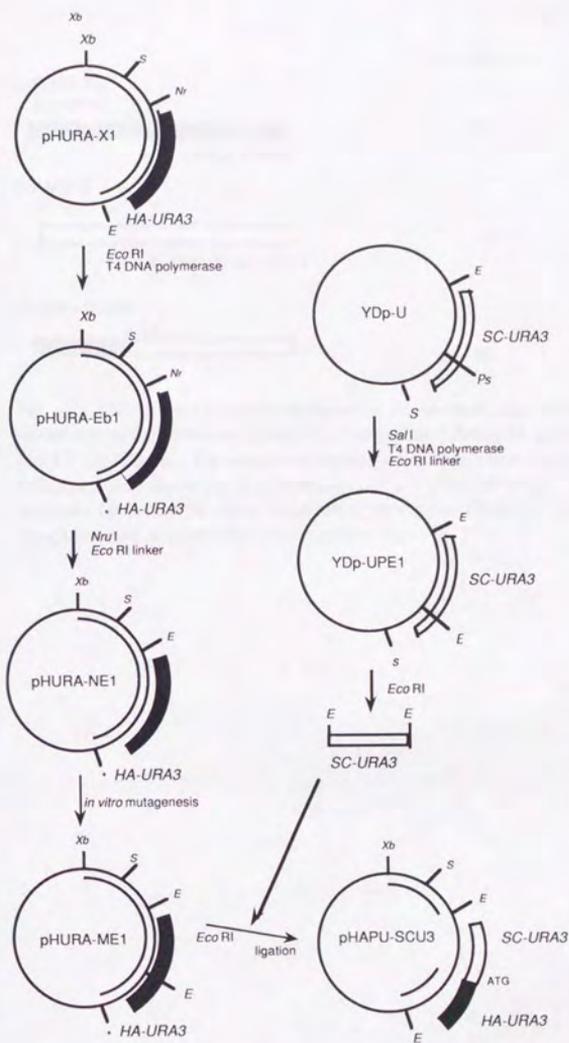


Fig 16. Construction of the plasmid having the promoter-changed *S. cerevisiae* URA3 gene. The regions of the doubled line of the plasmid represent *H. anomala* DNA sequence. Abbreviations are as follows, *Ec*, EcoRI, *Nru*, *Nru* I, *S*, *Sal* I, *Ps*, *Pst* I, *Xb*, *Xba* I. *, The restriction site was bunted. HA-URA3, *H. anomala* URA3 gene, SC-URA3, *S. cerevisiae* URA3 gene.

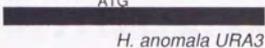
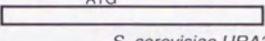
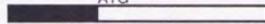
	Transformation efficiency	
	<i>H. anomala ura3</i>	<i>S. cerevisiae ura3</i>
<p>pHURA-X1 promoter</p>  <p><i>H. anomala URA3</i></p>	60	Not tested *
<p>pSUHA-2</p>  <p><i>S. cerevisiae URA3</i></p>	0	Not tested
<p>pHAPU-SCU3</p> 	30	367

Fig. 17 The results of complementation of *H. anomala ura3* mutations and *S. cerevisiae ura3* mutations by the promoter-changed *S. cerevisiae URA3*, *H. anomala URA3* and *S. cerevisiae URA3* are shown. The complementations of *ura3* mutation are represented as transformation efficiency (number of the transformants per μ g plasmid DNA). The filled boxes are *H. anomala* DNA and the open boxes are *S. cerevisiae* DNA. * *H. anomala URA3* gene complemented *S. cerevisiae ura3* mutation (see Fig. 11).

考察

実用酵母の形質転換を考える際、宿主の遺伝型によらない選択マーカー遺伝子の利用が望ましいことは、本研究の第一章において記載している。そこで、第一章から第三章に記載した *S. cerevisiae* の *ADH1* 遺伝子のプロモーターに接続することで、*S. cerevisiae* で発現が強化された *apt2* 遺伝子 (*ADH1*-*APT2* 遺伝子) を有するプラスミドを用いて、*H. anomala* の形質転換の可能性について検討した。*S. cerevisiae* の複製開始起点として、*S. cerevisiae* の 2 μ m DNA や *ARS1* を有するプラスミドである pYcDE- Δ G11、pAGR-1 を用いた場合は、*H. anomala* の形質転換は出来なかった。これは、*S. cerevisiae* の 2 μ m DNA や *ARS1* が、*H. anomala* では複製開始起点として機能し得ないことによると考えられる。一方、*H. anomala* では選択マーカーとして用いている *S. cerevisiae* の *ADH1* 遺伝子の転写活性化領域であるプロモーター領域を認識し得ないことも考えられる。そこで、*ADH1*-*APT2* 遺伝子と、*H. anomala* の *URA3* 遺伝子を有するプラスミド pHAPAG-1 を作製し、*H. anomala* の *URA3* 遺伝子を作製し、*H. anomala* の *ura3* 変異株を形質転換し、その形質転換株の G-418 耐性を調べたが、親株とは変わらなかった (Table 10)。このことより、*S. cerevisiae* の *ADH1* プロモーターは、*H. anomala* では機能し得ないと考えられた。一方では、*S. cerevisiae* の解糖系の酵素である *PGK* (3-ホスホグリセレートキナーゼ) 遺伝子のプロモーターや *ADH1* (アルコール脱水素酵素1) 遺伝子のプロモーターが、*Kluyveromyces lactis* や *Schizosaccharomyces pombe* においても機能しうることが報告されている (Russel *et al.* 1993, Russel 1983)。この *ADH1*-*APT2* 遺伝子は、*K. lactis* においても発現し、形質転換体では G-418 に対する耐性が上昇したことが認められている (北本宏子 私

信)。以上のように、それぞれの種の遺伝子の5'非翻訳領域は、*S. cerevisiae*のものと相同性が見いだされていないにもかかわらず、他種酵母では*S. cerevisiae*遺伝子の転写がおこなわれ発現する機構は不明である。

オロチジン-5'-リン酸脱炭酸酵素 (ODCase) をコードする遺伝子、いわゆる *URA3* 遺伝子は各種酵母でクローニングされていることが報告されている。これらの *URA3* 遺伝子は、プロモーター領域が存在することが予想されている5'非翻訳領域でDNA塩基配列に相同性がみられないにもかかわらず、他種の酵母においても機能している例がいくつか報告されている。ところが、*S. cerevisiae*の *URA3* 遺伝子を有する挿入型のプラスミドである YIp5 を用いて、*H. anomala*の *ura3* 変異株を形質転換を得ることはできなかった (第5章 Table 9)。 *S. cerevisiae*の *URA3* 遺伝子プロモーターの *H. anomala*での機能を調べるため、*H. anomala*の *URA3* 遺伝子を *S. cerevisiae*の *URA3* 遺伝子に置換したプラスミド pSUHA-2 を用いて、*H. anomala*の *ura3* 変異株の形質転換を試みたが、形質転換株は得られなかった。これに対し、プロモーター領域を *H. anomala*の *URA3* 遺伝子のそれに置換し、ORF領域は *S. cerevisiae*の *URA3* 遺伝子であるプラスミド pHAPU-SCU3は、*H. anomala*の *ura3* 変異株を形質転換させることは可能であった。以上の結果より、*H. anomala*では、*S. cerevisiae*の *URA3* 遺伝子のプロモーター領域を認識することができず、*H. anomala*の *URA3* 遺伝子のプロモーターに置換することで、*S. cerevisiae*の *URA3* 遺伝子のORFよりODCaseを産生することができ、形質転換株を得ることが可能になったものと考察した。これに対し、*S. cerevisiae*では、*H. anomala*の *URA3* 遺伝子が発現し、*S. cerevisiae* *ura3* 変異を相補することを見いだしている (第四章 Fig. 11)。この発現は、*H. anomala*の *URA3* 遺伝子のプロモーターを、*S. cerevisiae*では転写活性化配列として認識しうることによ

るものであることが明らかになった (Fig. 17)。以上のように、各酵母菌種間においてもプロモーター内の転写活性化配列の認識が異なることが判明した。

要約

1、*S. cerevisiae*のADHIプロモーターに接続させた*apt2*遺伝子（ADHI-APT2遺伝子）は、*H. anomala*では発現が認められなかった。これより、*H. anomala*では、*S. cerevisiae*のADHIプロモーターは、転写活性化配列として機能しないことが考えられた。

2、*S. cerevisiae*のURA3遺伝子は、*H. anomala*の*ura3*変異を相補することができなかったが、プロモーター領域を*H. anomala*のURA3遺伝子のもとと組み換えることによって、*H. anomala*の*ura3*変異を相補することが可能となった。これより、*H. anomala*では、*S. cerevisiae*のURA3遺伝子のプロモーターは転写活性化配列として作用しないことが考えられた。これに対し、プロモーター領域を*H. anomala*のURA3遺伝子のもとと置換した*S. cerevisiae*のURA3遺伝子が*S. cerevisiae*の*ura3*変異を相補したことより、*S. cerevisiae*では、*H. anomala*のURA3遺伝子のプロモーター領域を転写活性化配列として認識しうることがわかった。

総括

本研究は産業上に用いられている酵母である *Saccharomyces* 属酵母と *Hansenula anomala* の形質転換系の確立を試みたものである。

酵母の形質転換は、栄養要求等の変異のある宿主に、その変異を相補する野生型の遺伝子を選択マーカーとして導入し、その変異を相補する形質を示す形質転換株を選択する方法が通常である。この方法は、*Saccharomyces cerevisiae* に含まれる実験室酵母で試みられてきたものであるが、この方法を実用酵母、なかでも酒類製造等に用いられている *Saccharomyces* 属酵母においてもそのままの処理、方法を用いることはできない。これは、一つに *S. cerevisiae* に含まれる実験室酵母は、元来パン酵母であったものであるが、接合、分離、変異、継代を繰り返したので、実際に産業上に用いられている *Saccharomyces* 属実用酵母と異なる点が数多くあることである。このため、プロトプラスト化、リチウム塩処理等、実験室酵母の形質転換に用いた方法をそのまま応用することができるか疑問がある。さらに、実用株は通常、二倍体あるいは高次倍数体、異数体であるので、栄養要求性等の変異遺伝マーカーの付与が困難である。あるいは、変異操作の結果、実用株の優良な形質に損傷を与える危険性がある。後者の問題に対応するため、実用株の形質転換には宿主の遺伝型によらない選択マーカー遺伝子（優性マーカー遺伝子）の利用が望ましい。

本研究の第一章では、この優性マーカー遺伝子として、大腸菌のアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ II (*apt 2* 遺伝子) を選び、*S. cerevisiae* の *ADHI* 遺伝子のプロモーターを接続することで、形質転換酵母内の *apt 2* 遺伝子の発現の強化を試みたものである。この *ADHI-APT2* 遺伝子を有する実験室酵母は、抗生物質 G-418 に

対する耐性度が著しく上昇した。

本研究の第二章では、構築したADHI-APT2遺伝子が、G-418に対する元来の耐性の強い*Saccharomyces*属実用酵母に対して、形質転換において選択マーカー遺伝子としての可能性を検討したものである。*Saccharomyces*属実用酵母の元来のG-418耐性について検討すると、下面及び上面発酵ビール酵母は、実験室酵母と同程度の耐性度であったのに対し、清酒酵母はかなり強い耐性を示した。特に、協会7号酵母は、G-418 200 μ g/mlの濃度であっても生育を示した。この清酒酵母協会7号に対して、選択培地のG-418濃度を上昇させることで、バックグランドコロニーの出現を抑制し、ADHI-APT2遺伝子の形質転換酵母内の強力な発現で高いG-418濃度の選択培地上での形質転換株の分離をおこなうことが可能であった。

本研究の第三章では、リチウム塩処理では形質転換株が得られなかった*Saccharomyces*属実用酵母について、高効率に形質転換株が得られることが報告されている電気パルス法を検討したものである。電気パルス法の条件について検討したところ、従来の報告よりも低い印加電圧において最大の形質転換効率が得られたことが判明した。この条件で、ADHI-APT2遺伝子を選択マーカー遺伝子としてリチウム塩処理では形質転換株が得られなかった*Saccharomyces*属実用酵母の形質転換を試みたところ、全て形質転換株が得られた。

本研究の第四章では、排水処理に用いられている酵母*Hansenula anomala*の形質転換系の確立のため、選択マーカー遺伝子として、オロチン酸脱炭酸酵素 (ODCase) をコードするURA3遺伝子のクローニングを試みたものである。*H. anomala*のURA3遺伝子は、*S. cerevisiae*のURA3遺伝子をプローブとしてハイブリダイズすることによってクローニングすることが可能であった。DNA塩基配列を決定したところ、

ORFをコードする領域では、各種酵母のODCaseをコードする遺伝子と相同性がみられたが、5', 3' 非翻訳領域では相同性が見いだされなかった。*H. anomala*のURA3遺伝子は、*S. cerevisiae*のura3変異を相補した。

本研究の第五章では、*H. anomala*のura3変異株をピリミジン塩基生成阻害剤である5-fluoroorotic acid (5-FOA) 耐性変異株を分離することで得た。得られた*H. anomala*の5-FOA 耐性変異株のODCase活性を測定し、欠損している株を分離し、ura3変異株とした。得られた*H. anomala*のura3変異株と、*H. anomala*のURA3遺伝子を有するプラスミドを用いて形質転換を試みたところ、形質転換株が得られた。得られた形質転換株では染色体の相同領域で組換えを生じ、プラスミドが染色体に挿入されていることがサザンハイブリダイゼーションより確認された。染色体に挿入されたプラスミドは、非選択的条件においても安定的に保持された。

本研究の第六章では、*H. anomala*での*S. cerevisiae*の遺伝子のプロモーターの機能性について検討した。*H. anomala*での優性選択マーカー遺伝子として、ADHI-APT2遺伝子が機能するか検討したが、形質転換株のG-418耐性度は変化がなかった。また、*H. anomala*のura3変異は、*S. cerevisiae*のURA3遺伝子では相補されなかった。しかし、*S. cerevisiae*のURA3遺伝子のプロモーター領域を、*H. anomala*のURA3遺伝子のプロモーター領域に置換することで、*H. anomala*のura3変異は相補された。これより、*H. anomala*では*S. cerevisiae*のADHI遺伝子、URA3遺伝子のプロモーターは転写開始領域としては機能しないと判断された。

実用酵母の育種において、組換えDNA手法を用いることは有望な手法であるが、この際には形質転換系の確立が一つの重要なステップである。本研究ではこの点を検討し、酒類製造等食品製造に用いられる*Saccharomyces*属実用酵母と排水処理に用

いられる酵母である *H. anomala* の形質転換系を確立したものである。 *Saccharomyces* 属実用酵母の形質転換では、 *S. cerevisiae* の *ADHI* 遺伝子のプロモーターに接続し、発現を強化した *apt2* 遺伝子を選択マーカー遺伝子とすることで、抗生物質 G-418 に対する耐性の強い株においても形質転換株を選択することが可能となった。また、電気パルス法を用いることで、形質転換能の低い株においても形質転換株を選択することを可能とした。 *H. anomala* の形質転換では、選択マーカー遺伝子としては、オロチジン-5'-リン酸脱炭酸酵素をコードする *URA3* 遺伝子、宿主としては、これを欠損する *ura3* 変異株を造成し用いることとした。 *H. anomala* の *ura3* 変異株は、5-fluoroorotic acid 耐性変異株より分離した。分離した *H. anomala* の *ura3* 変異株と、クローニングした *H. anomala* の *URA3* 遺伝子を用いることで *H. anomala* の形質転換をおこなうことが可能となった。今後の研究によって、有用な形質の導入により、実用酵母の育種が図られることを期待したい。

発表論文

- 1、Improving Transformation Method for Industrial Yeast: Construction of *ADH1-APT2* Gene and Using Electroporation.

Tomoo Ogata, Yasushi Okumura, Makoto Tadenuma and Gakuzou Tamura.

J. Gen. Appl. Microbiol., **39**, 285-294 (1993).

- 2、Isolation and Nucleotide Sequence of *Hansenula anomala* *URA3* Gene Encoding Orotidine-5'-Phosphate Decarboxylase.

Tomoo Ogata, Yuzuru Iimura, Takaji Obata, Gakuzou Tamura.

J. Ferment. Bioeng., **74**, 352-357 (1992).

- 3、Development of an Integrative DNA Transformation System for the Yeast *Hansenula anomala*.

Tomoo Ogata, Yasushi Okumura, Yuzuru Iimura, Takaji Obata.

J. Ferment. Bioeng., **79**, 1-5 (1995).

引用文献

- Aigle, M., Erbs, D., and Moll, M.** : Some molecular structures in the genome of lager brewing yeasts. *Am. Soc. Brew. Chem. J.*, **42**, 1-7 (1984).
- Bach, M-L.** : Cloning and expression of the OMP decarboxylase gene *URA4* from *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.*, **12**, 527-534 (1987).
- Beach, D. and Nurse, P.** : High frequency transformation of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **290**, 140-142 (1981).
- Becker, D. and Guarente, L.** : High efficiency transformation of yeast by electroporation. *Method in Enzymology*, Vol. 194, ed. by Guthrie, C. and Fink, G.R., Academic Press, New York (1991) p182-187.
- Beggs, J. D.** : Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature* **275**, 104-109 (1978).
- Berben, G., Dumont, J., Gilliquet, V., Bolle, P-A. and Hilger, F.** : The YDp plasmids: a uniform set of vectors bearing versatile gene disruption cassettes for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**, 475-477 (1991).
- Boeke, J., LaCroute, F., and Fink, G. R.** : A positive selection system for mutant lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.*, **197**, 345-346 (1984).
- Brown, A. J. P. and Goodey, A. R., and Tubb, R. S.** : Interstrain transfer of the 2 μ m DNA plasmid of *Saccharomyces* by cytoduction. *J. Ints. Brew.*, **87**, 234-238 (1981).
- Buxton, F. P., Gwynne, D. I., and Davies, R. W.** : Transformation of *Aspergillus niger* using the *argB* gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene* **37**, 207-214 (1985).

Cryer, D. F., Eccleshall, R., and Marmur, J. : Isolation of yeast DNA, p. 39-44. In Prescott, D. M. (ed.), Method cell biology, vol. 12. Academic Press, New York (1975).

Das, S. and Hollenberg, C. P. : A High-frequency transformation system for the yeast *Klyveromyces lactis*. Curret. Genet., **6**, 123-128 (1982).

Diaz-Mingnez, J. M., Iturriaga, E. A., Benito, E. P., Corrochano, L. M., and Eslava, A. P. : Isolation and molecular analysis of orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene (*pyrG*) of *Phycomyces blakesleeanus*. Mol. Gen. Genet., **224**, 269-278 (1990).

Forgel, H. and Welch, J. W. : Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 5342-5346 (1982).

Gomi, K., Iimura, Y., and Hara, S. : Integrative transformation of *Aspergillus oryzae* with a plasmid containing the *Aspergillus nidulans argB* gene. Agric. Biol. Chem., **51**, 2549-2555 (1987).

Grimm, C., Kohli, J., Murray, J., and Maundrell, K. : Genetic engineering of *Schizosaccharomyces pombe*: A system for gene disruption and replacement using the *ura4* gene as a selectable marker. Mol. Gen. Genet., **215**, 81-86 (1988).

Gritz, L. and Davies, J. : Plasmid-encoded hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. Gene, **25**, 179-188 (1983).

Hass, L. O. C., Cregg, J. M., and Gleeson, M. A. G. : Development of an integrative transformation system for the yeast *Candida tropicalis*. J. Bacteriol., **172**, 4571-4577 (1990).

- Hadfield, C., Cadmore, A.,M., and Meacock, P. A.** : An efficient chloramphenicol - resistance marker for *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* . *Gene*, **45**, 149-158 (1986).
- Hinchliff, E. and Danbney, C. J.** : The genetic modification of brewing yeast with recombinant DNA. *Am. Soc. Brew. Chem. J.*, **44**, 98-101 (1986).
- Hinnen, A., Hicks, J. B. and Fink, G. R.** : Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **75**, 1929-1933 (1978).
- Hood, M. T. and Stachow, C.** : Transformation of *Schizosaccharomyces pombe* by electroporation. *Nucl. Acid Res.* **18**, 688 (1990).
- Iefuji, H., Iimura, Y., Obata, T.** : Isolation and characterization of a yeast *Cryptococcus sp.* S-2 that produces raw starch-digesting α -amylase, xylanase, and polygalacturonase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 2261-2262 (1994).
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A.** : Transformation of intact yeast cells treated with alkali cation. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168 (1983).
- Jimenez, A. and Davies, J.** : Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **287**, 869-871 (1980).
- Kagiyama, S., Aiba, T., Kadowaki, K. and Mogi, K.** : New killer toxins of Halophilic *Hansenula anomala*. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1-7 (1988).
- Kikuchi, Y.** : Yeast plasmid a cis-acting locus and two plamid proteins for its stable maintenace. *Cell*, **35**, 487-493 (1983).
- 木村和弘、北本勝ひこ、五味勝也、熊谷知栄子：麹菌(*A. oryzae*)の α -アミラーゼを生産する清酒酵母の造成 *日本醸造協会誌* **88**, 233-237 (1993).
- Kitamoto, K., Oda, K., Gomi, K. and Takahashi, K.** : Construction of uracil and tryptophan auxotrophic mutants from *Sake* Yeasts by disruption of *URA3* and *TRP1* genes. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2979-2987 (1990).

Kitamoto, K., Oda, K., Gomi, K. and Takahashi, K. : Genetic engineering of a sake yeast producing no urea by successive disruption of arginase gene.

Applied Environment. Microbiol., **57**, 301-306 (1991).

Losberger, C. and Ernst, J. F. : Sequence and transcript analysis of the *C. albicans URA3* gene encoding orotidine-5'-phosphate decarboxylase. Curr.

Genet., **16**, 153-157 (1989).

Meilhoc, E., Masson, J-M., and Teissie, J. : High efficiency

transformation of intact yeast cells by electric field pulses. Bio/technol. **8**, 223-227 (1990).

MuCusker, J. H. and Davis, R. W. : The use of proline as a nitrogen source

causes hypersensitivity to, and allows more economical use of 5FOA in

Saccharomyces cerevisiae. Yeast, **7**, 607-608 (1991).

Mizukami, M. and Hishinuma, F. : Isolation and nuclotide sequence analysis of the *URA3* (orotidine-5'-phosphate decarboxylase) gene of

Klyveromyces lactis. Agric. Biol. Chem., **52**, 3067-3071 (1988).

Moriya, K., Iefuji, H., Shimoi, H., Sato, S. and Tadenuma, M. :

Treatment of distrillery wastewater discharged from beet molassed-sprits production using yeast. J. Ferment. Bioeng., **69**, 138-140 (1990).

Nakazawa, N., Tsuchihara, K., Hattori, T., Akita, K., Harashima, S.,

Oshima, Y. : A method for direct selection of mating-competent clones from mating-incompetent industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Ferment.

Bioeng., **78**, 6-11 (1994).

Orr-Weaver, T., Szostak, J. W., and Rothstein, R. J. : Yeast

transformation: A model system for the study of recombination. Proc. Natl. Acad.

Sci. USA., **10**, 6354-6358 (1981).

- Ouchi, K. and Akiyama, H.** : Non-foaming mutants of sake yeasts selection by cell agglutination method and froth flotation method. *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1024-1032 (1971).
- Rose, M., Grisafi, P., and Botstein, D.** : Structure and function of the yeast *URA3* gene : expression in *Escherichia coli* . *Gene*, **29**, 113-124 (1984).
- Russell, C., Jarvis, A., Yu, P.-L., and Mawson, J.** : Expression and secretion of wheat α -amylase in *Kluyveromyces lactis* . *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 306-308 (1993).
- Russell, I. and Stewart, G. G.** : Spheroplast fusion of brewer's yeast strains. *J. Inst. Brew.*, **85**, 95-98 (1979).
- Russell, P. R.** : Evolutionary divergence of the mRNA transcription initiation mechanism in yeast. *Nature*, **301**, 167-169 (1983).
- Sakai, K. and Yamamoto, M.** : Transformation of the yeast, *Saccharomyces carlsbergensis* , using an antibiotic resistance marker. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1177-1182 (1986).
- Sakai, Y., Kazarimoto, T., and Tani, Y.** : Transformation system for an asporogenous methylotrophic yeast, *Candida boidinii* : cloning of the orotidine - 5'-phosphate decarboxylase gene (*URA3*), isolation of uracil auxotrophic mutants, and use of the mutants for integrative transformation. *J. Bacteriol.*, **173**, 7458-7463 (1991).
- Sakai, Y., Kazarimoto, T., and Tani, Y.** : The orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene (*URA3*) of a methylotrophic yeast, *Candida boidinii* : nucleotide sequence and its expression in *Escherichia coli* . *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, 255-260 (1992).

Sakai, Y., Goh, T. K., and Tani, Y. : High-frequency transformation of a methylotrophic yeast, *Candida boidinii*, with autonomously replicating plasmids which are also functional in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol., **175**, 3556-3662 (1993).

Sakajo, S., Minagawa, N., Komiyama, T. and Yoshimoto, A. : Molecular cloning of cDNA for antimycin A-inducible mRNA and its role in cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. Biochimica Biophysica Acta., **1090**, 102-108 (1991).

佐藤俊一、前谷龍夫、山本奈美、蓮尾徹夫、齊藤和夫、蓼沼誠、吉沢淑：凝集性酵母の選択とその排水処理への応用 日本醸造協会誌 **81**, 621-625 (1986).

Sidhu, R. S. and Bollon, A. P. : Bacterial plasmid pBR322 sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, **6**, 221-229 (1990).

Sugiyama, H., Ohkuma, M., Masuda, Y., Park, S-M., Ohta, A. and Takagi, M. : *In vivo* evidence for non-universal usage of the codon CUG in *Candida maltosa*. Yeast, **11**, 43-52 (1995).

鈴木修、佐藤俊一、家藤治幸、下飯仁、蓼沼誠、吉沢淑：耐熱性、凝集性酵母の排水処理への利用 醱酵工学会誌 **69**, 83-87 (1991).

Takagi, M., Kawai, S., Chang, M. C., Shibuya, I. and Yano, K. : Construction of a host-vector system in *Candida maltosa* by using an ARS site isolated from its genome. J. Bacteriol., **167**, 551-555 (1986).

Tezuka, H., Mori, T., Okumura, Y., Kitabatake, K. and Tsumura, Y. : Cloning of a gene suppressing hydrogen sulfide production by *Saccharomyces cerevisiae* and its expression in a brewing yeast. Am. Soc. Brew. Chem. J., **50**, 130-133 (1992).

Tubb, R. S. : 2 μ m DNA plamid in brewery yeasts. J. Inst. Brew., **86**, 78-80 (1980).

Tsuchiya, K., Tada, S., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C., and Tamura, G. : Deletion analysis of the Taka-amylase A gene promoter using a homologous transformation system in *Aspergillus oryzae*. Biosci. Biotech. Biochem., **56**, 1849-1853 (1992).

Turnbough, J. C., Kerr, K. H., Funderburg, W. R., Donahue, J. P. and Powell, F. E. : Nucleotide sequence and characterization of the *pyrF* operon of *Escherichia coli* K12. J. Biol. Chem., **262**, 10239-10245 (1987).

渡辺睦、永井英雄、近藤恭一：清酒酵母の一倍体へのHO遺伝子導入による二倍体株の分離 生物工学会誌 **73**, 277-282 (1995).

Webster, T. D. and Dickson, R. C. : Direct selection of *Saccharomyces cerevisiae* resistance to the antibiotic G-418 following transformation with a DNA vector carrying the kanamycin-resistance gene Tn903. Gene, **26**, 243-252 (1983).

Wright, A. P. H., Maundrell, K., and Shall, S. : Transformation of *Schizosaccharomyces pombe* by non-homologous, unstable integration of plasmids in the genome. Curr. Genet., **10**, 503-508 (1986).

Yamazaki, T. and Nomura, H. : Inherent G-418- resistance in hybridization of industrial yeasts. J. Ferment. Bioeng. **77**, 202-204 (1994).

Yoshimoto, A., Amaya, T., Kobayashi, K., and Tomiya, K. : Orotate decarboxylase (yeast), Method in Enzymol., vol. 51. p74-79. Colowick, S. P. and Kaplan, N. P. (ed.), Academic Press, New York (1978).

Young, T. W. and Yagi, M. : A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. Antonie van Leeuwenhoek. **44**, 59-77 (1978).

Young, Y. W. : The genetic manipulation of killer character into brewing yeast.

J. Inst. Brew., **87**, 292-295 (1981).

Yoshizawa, K. : Treatment of waste-water discharged from a sake brewery using

yeast. J. Ferment. Technol., **56**, 389-395 (1978).

Zhu, J., Contreras, R., Gheysen, D., Ernst, J., and Fiers, W. : A system for dominant transformation and plasmid amplification in *Saccharomyces cerevisiae*.

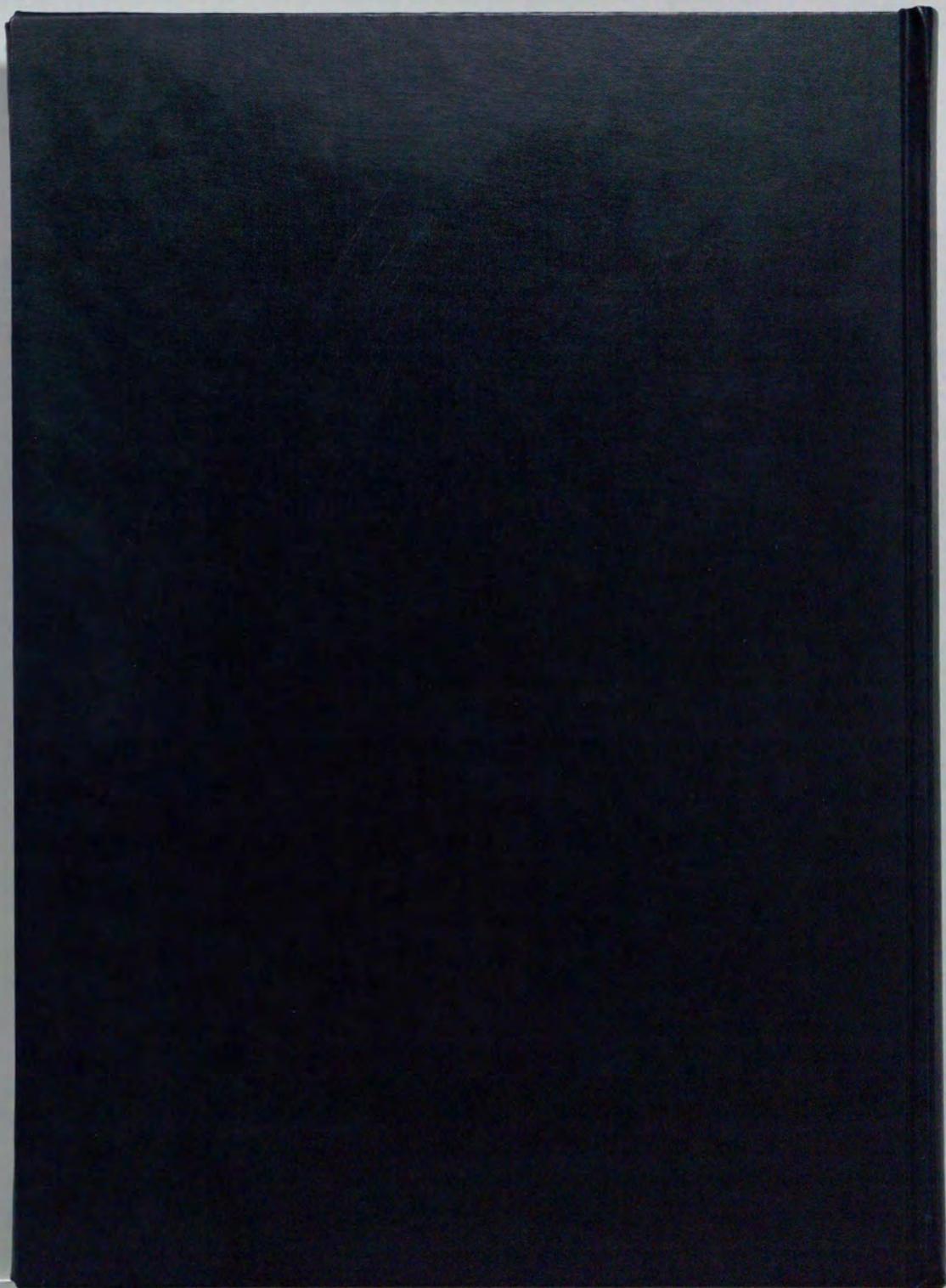
Bio/Technol., **3**, 451-456 (1985).

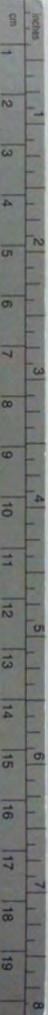
謝辞

本論文を作成するにあたり、終始ご指導とご高配を賜りました東京大学教授
大森俊雄博士に心より感謝致します。

本研究の遂行においてご懇篤なるご指導を賜りました東京大学名誉教授、元醸造
資源研究所所長 田村學造博士に心より感謝致します。また、多大なるご指導、ご
助言を賜りました前国税庁醸造試験所所長 蓼沼 誠博士、元国税庁醸造試験所第
二研究室長（現広島国税局酒類監理官）小幡孝之博士、前国税庁醸造試験所第二研
究室長（現国税庁醸造研究所微生物研究室長）飯村 穰博士に感謝致します。数々
のご援助、ご協力をいただきました元醸造資源研究所 渋谷一郎氏、加藤 泉氏、
杉山隆一氏に感謝致します。

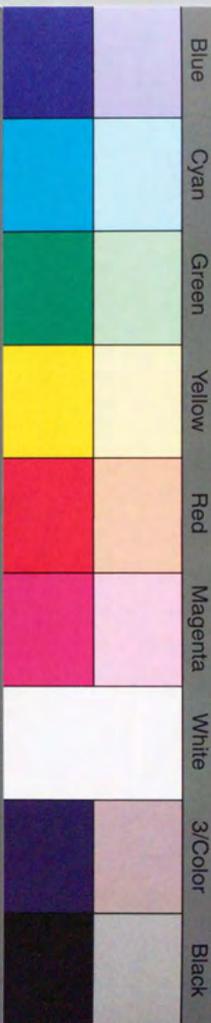
研究の遂行に格別のご理解、ご高配を賜りましたアサヒビール株式会社 瀬戸雄
三代表取締役社長、同研究開発本部長 薄葉 久専務取締役、同研究開発副本部長
松井康雄専務取締役をはじめ役員各位に御礼申し上げます。また、終始、ご指導と
激励を賜りましたアサヒビール（株）基盤研究所所長 常務取締役 北畠克顕博士、
前酒類開発研究所所長（現アサヒビール（株）福島工場長 取締役）藪内精三博士、
アサヒビール（株）基盤研究所 基礎技術部部长 奥村 康博士に深く感謝いたし
ます。





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

