

産業用酵母菌の遺伝子操作技術の開発とその応用

Development of genetic manipulation techniques
for industrial yeasts and their applications

平成 27 年 3 月

村上 允唯

山口大学大学院医学系研究科

応用分子生命科学系専攻

要旨

酵母は発酵・醸造食品の製造、バイオエタノール生産に利用されている。しかし、このような有用な機能を持つ産業用酵母の遺伝子操作系の確立は容易ではない。本研究では2種の産業用酵母の遺伝子操作技術の確立を目指した。

ビール酵母 *Saccharomyces pastorianus* はビールの生産に用いられる下面発酵酵母であり、染色体が *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) と *Saccharomyces bayanus* (Sb) からなる異型4倍体であるという特徴を持つ。そのせいで遺伝子操作が難しいことが知られており、今までに栄養要求性変異株が取得されたことがない。そこで、遺伝子工学的手法でのウラシル要求性ビール酵母の取得を目指した。栄養要求性変異株を取得し、栄養要求性マーカーを用いることが可能となれば効率よく遺伝子操作を行うことができる。ビール酵母の4つの *URA3* 遺伝子を破壊するために、4つのうち Sc 型の *URA3* 遺伝子と Sb 型の *URA3* 遺伝子のそれぞれ1つをヘテロで破壊した株をまず取得し、この株に対してヘテロをホモ化できる Loss of heterozygosity を用いることで Sc 型、Sb 型ともに *ura3* が破壊されホモとなったビール酵母 *ura3* 破壊株が得られるのではないかと考えた。相同組換えによる遺伝子導入効率は相同配列の長さに依存し、相同配列が長いほど効率よく導入できることが知られているため、ビール酵母 Sb *URA3* 遺伝子を研究用酵母に導入し、研究用酵母内で Sb *URA3* 遺伝子の中に *KanMX* 遺伝子を挿入した破壊用コンストラクトを作製した。これにより、Sb *URA3* 相同配列を約 1000 bp もつ *KanMX* 遺伝子を得ることができた。この長い相同配列を持つ *KanMX* 遺伝子を用い、ビール酵母 Sb *URA3* 遺伝子の破壊を行うことが可能であった。同様の手法を用い *Hygro^R* 遺伝子でビール酵母 Sc *URA3* 遺伝子の破壊を行い、ビール酵母の Sc *URA3* 遺伝子の1つを *Hygro^R* 遺伝子で、Sb *URA3* 遺伝子の1つを *KanMX* 遺伝子で破壊した *URA3* ヘテロ破壊株を得ることができた。*URA3* が完全に破壊されれば、5-fluoroorotic acid (5-FOA) 培地で選択できる。ビール酵母 *URA3* ヘテロ破壊株を 5-FOA 培地にレプリカしたところコロニーを得ることができた。得られたコロニーに対し、PCR を用いて Sc 型、Sb 型それぞれの *URA3* 領域を調べたところ、どちらの領域も *URA3* 遺伝子が *KanMX* 遺伝子及び *Hygro^R* 遺伝子により置換されていることがわかった。この結果は Sc 型、Sb 型それぞれで LOH が起こったことを示している。得られた株は U 培地上で生育不可能であり、Sc *URA3* 遺伝子をマーカーとして形質転換を行うことが可能であった。ウラシル栄養要求性ビール酵母の取得により、今まで困難とされてきたビール酵母の遺伝子操作が容易に行えるようになった。これにより、ビール酵母の研究、育種は大きく進歩することが期待できる。

耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* は耐熱性を持ち、高温条件下でのバイオエタノール生産の可能性が検討されている新しい酵母である。この酵母は、Non-homologous end joining (NHEJ) の活性が高いという特徴がある。NHEJ とは非相同な DNA 末端同士が結合するというものである。これを利用した新しいクローニング法を考案した。マーカー遺伝

子を分断し形質転換を行うことで、NHEJにより、分断したマーカー遺伝子が正常に機能する様に結合したもののみ選択でき、クローニングサイトとして利用できるのではないかと考えた。そこで、*URA3* 遺伝子を上流と下流に分断し、これらの DNA 断片を同時に *K. marxianus* へ導入したところ、正常な *URA3* 遺伝子が機能できるようになり形質転換が成功した。この結果は、細胞内で2つの DNA 断片が正常に機能するように結合したことを示している。また、このクローニング法を使い従来のクローニング法と比べ操作が単純かつ高効率なプラスミド構築法を考案した。2つのマーカー遺伝子を向かい合わせたクローニングサイトを持ち、プラスミドの構築に必要な自律複製配列を含んだプラスミドを構築した。このプラスミドのクローニングサイトを用いたプラスミド構築の効率を、*ScLEU2* 遺伝子を挿入断片として評価した結果、効率よくプラスミドを構築することに成功した。さらに、この方法を応用し、網羅的に *K. marxianus* 由来の遺伝子と *yEGFP* 遺伝子との融合遺伝子を構築できた。これらの結果より、このクローニング法は酵母の遺伝子操作を迅速かつ簡易に行う上で有効な手段であることを示している。

ABSTRACT

Yeasts are utilized in many industries: fermentation brewing and bio-ethanol production. Genetic manipulation system is helpful for improvement of these industrial yeast. However, genetic manipulation method for most of industrial yeasts are limited. In this study, I focused on the two yeasts; the bottom-fermenting yeast *Saccharomyces pastorianus* and the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*,

The bottom-fermenting yeast *Saccharomyces pastorianus* is a natural hybrid of *S. cerevisiae* (Sc) and *S. bayanus* (Sb). Nearly all bottom-fermenting yeast strain used industrially are allotetraploid and do not normally sporulate. These characteristics have greatly complicated the selection of auxotrophic bottom-fermenting yeast strain. The most important genetic tool for related yeasts has been the development of auxotrophic strain that allow for selection in matings and transformations. However, auxotrophic strain have never been reported in bottom-fermenting yeast. I describe construction of a *ura3* deletion strain derived from the lager strain Weihenstephan34/70 by targeted transformation and subsequent loss of heterozygosity (LOH). Initially, deletion constructs of the Sc and Sb types of *URA3* were constructed in laboratory yeast strains in which a *TDH3p-hygro* allele conferring hygromycin B resistance replaced Sc*URA3* and a *KanMX* cassette conferring G418 resistance replaced Sb*URA3*. The lager strain was then transformed with these constructs to yield a heterozygous *URA3* disruptant, (*ScURA3*⁺/*Scura3Δ::TDH3p-hygro*, *SbURA3*⁺/*Sbura3Δ::KanMX*) which was plated on 5-fluoroorotic acid (5-FOA) plates to generate the desired Ura⁻ homozygous disruptant, (*Scura3Δ::TDH3p-hygro*/*Scura3Δ::TDH3p-hygro* *Sbura3Δ::KanMX*/*Sbura3Δ::KanMX*) through LOH. This *ura3* deletion strain was then used to construct a bottom-fermenting yeast transformant overexpressing *ATF1* that encodes an enzyme to produce acetate esters. The *ATF1*-overexpressing transformant produced significantly more acetate esters than the parent strain. We expect that *ura3Δ* lager strain will be useful for targeted alteration of additional genes relevant to brewing.

The thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*, which has been studied for cost-effective, high-temperature ethanol fermentation, exhibits a unique DNA transformation feature: non-homologous DNA fragments are efficiently integrated into the chromosome during a standard transformation process. This property is the result of non-homologous end joining (NHEJ) activity, which is a highly conserved DNA repair mechanism that fuses two DNA molecules together regardless of end sequences. The identification of high-efficiency NHEJ in *K. marxianus* led us to speculate that NHEJ may be exploited for recombining target DNAs without the requirement for DNA end processing or the

addition of specific sequences. As NHEJ randomly joins DNA ends, correctly joined DNA fragments need to be identified before being used for DNA cloning.

I developed a novel selection system using C-terminal truncated selection marker genes to identify correctly assembled sequences. In this system, when a non-functional, truncated selection marker fragment is joined with a DNA fragment corresponding to the truncated region, a functional marker is generated. First, to demonstrate the applicability of NHEJ to DNA cloning, a C-terminal-truncated non-functional *ura3* selection marker and the truncated region were PCR amplified separately, mixed and directly used for the transformation. *URA3*⁺ transformants appeared on the selection plates, indicating that the two DNA fragments were correctly joined by NHEJ to generate a functional *URA3* gene that had inserted into the yeast chromosome. To develop cloning system, the shortest *URA3* C-terminal encoding sequence that could restore the function of a truncated non-functional *ura3* was determined by deletion analysis and it was included in the primers to amplify target DNAs for cloning. Transformation with PCR amplified target DNAs and C-terminal truncated *ura3* produced numerous transformant colonies, in which a functional *URA3* gene was generated and was integrated into the chromosome with the target DNAs.

Several *K. marxianus* circular plasmids with different selection markers were also developed for NHEJ-based cloning and recombinant DNA construction. Further, I applied the novel recombinant DNA construction method for genome-wide localization analysis in *K. merxianus*. For GFP fusion construction, yEGFP gene was cloned in an autonomously replicating plasmid pKM092. In pKM092, yEGFP is constitutively expressed by *TDH3* promoter of *Saccharomyces cerevisiae* and Sc*URA3* as a marker gene faces yEGFP with transcription directions. To construct fusion genes, pKM092 was linearized by PCR to delete C-terminal encoding sequences of both yEGFP and Sc*URA3*. Coding sequences in *K. marxianus* genome were also amplified by PCR, and GFP C-terminal sequence and Ura3 C-terminal sequence were added to N-terminus in-frame and C-terminus, respectively. Transformation of *K. marxianus* with the two DNA fragments and following selection under uracil deficient condition produced transformants and they contained a fusion-protein expression plasmid, in which yEGFP was located on N-terminus of the inserted coding sequence. As a result, I constructed 3,314 of GFP-fusion expressing strains and observed localization of the 3,014 fusion proteins.

The novel recombinant DNA construction method developed here is a relatively simple and reliable procedure among DNA cloning systems developed to date. The potential of DNA manipulation through NHEJ represents a promising method that might also be applicable to other organisms, including human cells, which exhibit relatively

high NHEJ activity.

第一章	
序論	1
第二章	
ウラシル要求性ビール酵母の構築と遺伝子操作	
2.1 緒言	4
2.2 実験材料及び方法	6
2.3 実験結果	12
2.3.1 下面発酵ビール酵母での <i>ScURA3</i> 、 <i>SbURA3</i> ヘテロ破壊株の構築	12
2.3.1.1 下面発酵ビール酵母 <i>SbURA3</i> 遺伝子破壊	12
2.3.1.2 下面発酵ビール酵母 <i>ScURA3</i> 遺伝子破壊	17
2.3.2 Loss of heterozygosity (LOH) によるウラシル要求性ビール酵母の構築	22
2.3.3 ウラシル要求性ビール酵母を用いた <i>ATF1</i> 過剰発現株の評価	26
2.4 考察	28
2.5 結言	30
第三章	
耐熱性酵母 <i>Kluyveromyces marxianus</i> を用いた新規クローニング法の開発	
3.1 緒言	31
3.2 実験材料及び方法	33
3.3 実験結果	41
3.3.1 細胞外から導入した異なる DNA 断片間の結合	41
3.3.2 分断したマーカー遺伝子の最小化	42
3.3.3 NHEJ を利用したマーカー遺伝子の分断によるクローニング法の検討	47
3.3.4 NHEJ クローニング法を利用したプラスミドの構築	48
3.3.4.1 <i>K. marxianus</i> 内で機能する自律複製配列の単離	49
3.3.4.2 KmARS7 最小配列の決定と解析	49
3.3.5 プラスミド pKM001 を利用したクローニングの評価	60
3.3.6 <i>K. marxianus</i> と <i>S. cerevisiae</i> での NHEJ を利用したクローニング法の比較	63
3.4 考察	65
3.5 結言	68

第四章	
<i>Kluyveromyces marxianus</i> を利用した GFP 融合タンパク質の構築と解析	
4.1 緒言	69
4.2 実験材料及び方法	71
4.3 実験結果	75
4.3.1 yEGFP 遺伝子を含むプラスミド pKM092 の構築	75
4.3.2 GFP 融合タンパク質構築の評価	75
4.3.3 PCR による <i>K. marxianus</i> 全遺伝子の網羅的な増幅	78
4.3.4 GFP 融合タンパク質の網羅的な構築	78
4.4 考察	80
4.5 結言	82
第五章	
結論	83
参考文献	84
本研究に関する発表論文	90
謝辞	91

第一章

序論

酵母はパンや酒の製造に用いられる有用微生物として古くから利用されてきた。さらには、ガソリン代替エネルギーとしてのバイオエタノール生産にも用いられている。このような発酵・醸造食品の製造、バイオエタノール生産などの産業に利用されている、あるいは利用が期待されている酵母を産業用酵母と呼び、ほとんどの場合、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が用いられている。また、*S. cerevisiae* はヒトに近い真核生物である理由から、古くからモデル生物として研究利用もされてきた。そのため、研究に適した株のスクリーニングや育種が進みこれらの酵母は研究用酵母と呼ばれ、産業用の *S. cerevisiae* とは区別されている。研究用酵母では、遺伝子導入法 (Ito *et al.*, 1983)、遺伝子を導入する際に用いるベクタープラスミドコレクション (Sikorski and Hieter, 1989)、相同組換えを利用した染色体上への遺伝子導入法 (Orr-Weaver *et al.*, 1983)、対象遺伝子を標的とした遺伝子破壊法 (Rothstein, 1983) などの基礎的な遺伝子操作技術が確立し、研究の目的に合わせ様々に利用されている。

一方、産業用酵母でも発酵・醸造食品の品質、エタノールの生産量や発酵速度などは使用する酵母菌の影響を受けるため優良な酵母菌の育種が行われている。清酒酵母協会 7 号から、泡を生成しない泡なし酵母 (協会 701 号) の単離や、20%のアルコール中でも生育することのできるアルコール耐性酵母の単離が報告されている (田村, 1997)。さらに交配や細胞融合法などの手法も、少ないが報告例がある。しかし、産業用酵母での変異株の単離や交配、細胞融合法にはそれぞれ問題がある。変異誘発による育種では目的とした優良酵母を取得できる確率が低く、交配や細胞融合による育種では、産業用酵母の孢子形成能の低さから 1 倍体の分離には多くの手間と時間が必要となる。あるいは、取得できるとも限らない。これらの問題点を解決するために、遺伝子操作による育種法が考えられる。遺伝子操作を行うことで目的の性質を持った酵母菌を分子レベルで育種することが可能となる。例えば、清酒酵母は、研究用酵母の遺伝子操作技術を応用できることから比較的多くの遺伝子操作例があり、高泡形成能 (Shimoi *et al.*, 2001) や高濃度のアルコール生産能 (Watanabe *et al.*, 2009) など、清酒酵母の醸造特性に関わる遺伝子の解析や、清酒酵母の遺伝子の中に黄麹菌 *Aspergillus oryzae* のアミラーゼ遺伝子を導入し、アミラーゼを生産させて麹菌を必要としない有用酵母が作製されている (清酒酵母研究会, 1992)。このように、モデル生物としての研究で得られた遺伝子操作技術が産業での有用酵母育種につながっている。さらに、*S. cerevisiae* は 1996 年に真核生物として初めて全塩基配列が解析されたことから、これまでの遺伝子やタンパク質をひとつずつ扱う研究手法からゲノム全体を扱う研究手法が発展し、これまでに DNA マイクロアレイ (DeRisi, J. L *et al.*, 1997) や全タンパク質間の相互作用解析 (Ito *et al.*, 2001; Uetz *et al.*, 2000)、全タンパク質の細胞内局在 (Huh *et al.*, 2003)

などが報告されている。これらゲノムワイドな研究手法の確立により、細胞全体での遺伝子の機能、意味を理解することが可能となった。このような、ゲノムワイドな遺伝子操作技術を産業用酵母に適用することができれば、産業用酵母の育種の課題を解決し、酵母産業のさらなる発展に期待できる。

産業的に価値のある酵母は *S. cerevisiae* 以外にも存在し、それぞれに有用な機能を持っている。*Pichia pastoris* は、異種タンパク発現が優秀な点から生物医薬品生産での有用性が高まっている。*Pichia stipitis* は、五炭糖の資化能力によりバイオエタノール生産に期待されており、*Lipomyces starkeyi* は脂質生産酵母である。本研究では、2種類の産業用酵母、下面発酵ビール酵母 *Saccharomyces pastorianus* と耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* を研究対象とした。

世界のビール生産量は約1億9,294万kLであると報告されており（キリンビール株式会社, 2014）、500 mLを250円と仮定すると、100兆円規模の大きな市場であることがわかる。ビール酵母 *S. pastorianus* はビールの生産に用いられる下面発酵酵母で、ラガービールの製造に用いられる。*S. cerevisiae* もビールを生産することは可能であるが、上面発酵酵母として、ラガービールではなくエールビールの製造に用いられる。ラガービールは、エールビールと比べ一定の品質のビールを大量生産するのに向いている。そのため、大量消費の現在では *S. pastorianus* はビール生産の面で *S. cerevisiae* より実用的に優れているといえる。実際、ラガービールの生産は日本を含め世界の大手ビールメーカーの主流であり、ビール生産量の大部分を占める。

近年、化石燃料に代わるクリーンなエネルギーとしてバイオエタノールが注目されている。2011年の世界のバイオエタノール生産量は861億Lであり（Renewables 2012 Global Status Report）、バイオエタノールの値段を140円/Lとした場合、120兆円規模の市場となる。耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* は耐熱性を持ち、高温条件下でのバイオエタノール生産の可能性が検討されている新しい酵母である。バイオエタノールの生産工程の中で、熱処理や発酵熱により温度の上昇した培地は、酵母が増殖しエタノール発酵ができる最適温度に冷却されなければならない。そのため、高温条件下でのエタノール生産が可能であれば、冷却コストの削減を期待できる。また、高温発酵による利点は冷却コストの削減以外にも存在する。糖化と発酵を同時に行う並行複発酵を行う際に、酵素活性の低下が抑えられる温度で発酵を行うことで必要な酵素量が少ないといった利点や、高温で増殖できない雑菌等の混入リスクが下がるといった利点があり、様々なコストの削減に期待できる。年に30,000kLのエタノールを生産する発酵タンクで、35°Cから、5°C上昇させた40°Cでのエタノール生産を行ったと仮定すると、一年に約3,000万円が削減可能であることが予測され、これらの理由により、耐熱性酵母である *K. marxianus* が期待されている（Abdel-Banat *et al.*, 2010a; Nonklang *et al.*, 2008）。

しかし、これらの酵母を含む産業用酵母のほとんどは、育種を行う際の遺伝子操作技術が十分ではない。本研究では、第二章では *S. pastorianus* のウラシル要求性株の構築と遺伝

子操作を、第三章及び第四章では耐熱性酵母 *K. marxianus* を用い、新規組換え DNA 構築法の開発とそれを利用した網羅的 GFP 融合タンパク質の構築を検討することで、ゲノムワイドな遺伝子操作技術のための基礎的な遺伝子操作技術の構築を目指した。

第二章

ウラシル要求性ビール酵母の構築と遺伝子操作

2.1 緒言

下面発酵ビール酵母 *Saccharomyces pastorianus* ではこれまでに栄養要求性変異株は取得できておらず、遺伝子を導入する際に薬剤耐性マーカーしか用いられていない (Hammond, 1995; Hansen and Killend-Brandt, 2003)。しかし、薬剤耐性マーカーを使用した形質転換では、形質転換体選択時にマーカー遺伝子を持たないにもかかわらず増殖してくる薬剤耐性株が出現してしまい、その結果、選択効率が低く栄養要求性マーカーに比べ使いにくいという欠点がある (Akada *et al.*, 2002)。*S. pastorianus* は *Saccharomyces cerevisiae* の染色体と、*Saccharomyces bayanus* の染色体から成る異型 4 倍体である (Casaregola *et al.*, 2001; Dunn B, Sherlock, 2008; Nakao *et al.*, 2009; Rainieri *et al.*, 2006; Tamai *et al.*, 1998; Yamagishi and Ogata, 1999)。また、異型 4 倍体である下面発酵ビール酵母は通常、胞子を作らない。これらの特徴が栄養要求性下面発酵ビール酵母の取得を困難にしている。

しかしながら、2 倍体清酒酵母 *S. cerevisiae* では栄養要求性変異株が取得できており、5-fluoroorotic acid (5-FOA) 培地 (Boeke *et al.*, 1984) を使用することで、2 倍体清酒酵母 *ura3* 変異株を耐性株として選択することが可能である。さらには、様々な栄養要求性変異株が取得されており、それらの効率は予想より高頻度であった (Hashimoto *et al.*, 2005)。この結果は、相同組換えが loss of heterozygosity (LOH) を引き起こし、2 倍体清酒酵母での劣性変異株の取得を可能にしたと考える。LOH を用いることで、削除型の栄養要求性変異株や産業的に有用な株が 2 倍体清酒酵母から取得されている (Kotaka *et al.*, 2009; Sahara *et al.*, 2009)。また、病原性酵母 *Candida albicans* からの劣性変異株の単離が報告されている (Takagi *et al.*, 2008)。LOH を利用して取得された栄養要求性株では、さらに、交配型にも LOH が適応され、*MATa/MATa* 型や *MAT α /MAT α* 型の清酒酵母が *MATa/MAT α* 型の 2 倍体より単離されている (Hashimoto *et al.*, 2006)。

これらの事実より、下面発酵ビール酵母からの *ura3* 変異株の単離が 5-FOA での選択や Hashimoto らの手法で可能ではないかと考えたが、取得することはできなかった (data not shown)。この結果から、LOH は Sc 染色体間、Sb 染色体間のみで起こるのではないかと仮定した。これが正しければ、Sc *URA3* 遺伝子の一つと Sb *URA3* 遺伝子の一つを破壊したヘテロ *URA3* 破壊株 (*Scura3 Δ /ScURA3⁺ Sbura3 Δ /SbURA3⁺*) を取得し、5-FOA を用いることで、Sc 染色体間及び Sb 染色体間でそれぞれ LOH が生じ、両相同染色体が共にホモ *ura3* 破壊株となった株の単離、つまり、下面発酵ビール酵母のウラシル要求性株の取得が期待できる。本章では、薬剤耐性遺伝子による遺伝子破壊と、LOH を介した 5-FOA 培地による選択を用いることでウラシル栄養要求性ビール酵母が取得できることを明らかにし、得られ

たウラシル要求性ビール酵母を用いた *ATF1* 遺伝子の過剰発現により、ビール酵母においても PCR と形質転換のみの操作で遺伝子操作可能であることを示す。ウラシル要求性ビール酵母の取得により、今まで困難とされてきたビール酵母の遺伝子操作が容易に行えることが期待できる。

2.2 実験材料及び方法

使用菌株及び培地

本章で使用した酵母菌を Table 2.1 に示した。下面発酵ビール酵母 Weihenstephan 34/70 (RAK4647) はビール産業に広く利用されている酵母菌である。YPD 培地 (2% グルコース、2% ポリペプトン、1% 酵母エキス) または、SD 培地 (2% グルコース、0.17% YNB; yeast nitrogen base without amino acids without ammonium sulphate (US Biological, MA, USA)、0.5% ammonium sulphate) を用いて 28~30°C で酵母菌の培養を行った。-U 培地、-H 培地、-L 培地は SD 培地に、それぞれ、ウラシル、ヒスチジン、ロイシンを除く必要な栄養素を加えた培地である (Ausubel *et al.*, 1999)。G418 耐性株の選択には、YPD 培地に G418 を 200~500 µg/ml 加えた G418 培地を用いた。Hygromycin 耐性株の選択には、YPD 培地に Hygromycin を 500~600 µg/ml 加えた Hygromycin 培地を用いた。ウラシル要求性株の選択には、-U 培地に 50 µg/ml ウラシルと 1 mg/ml 5-FOA を加えた 5-FOA 培地を用いた (Akada *et al.*, 2006)。実験で用いた各薬剤の濃度は結果に示した。

DNA の調製、PCR 及び形質転換

染色体 DNA はこれまでに報告されている、Zymolyase 100T を用いる方法 (Nonklang *et al.*, 2008) で調製した。本章で PCR による DNA 増幅に使用したプライマーを Table 1.2 に示した。PCR には KOD-plus DNA polymerase (Toyobo, Osaka, Japan) を使用した。PCR は 94°C 1 分ホットスタートの後、94°C 20 秒、55°C 30 秒 (アニーリング)、68°C 4 分 (伸長) で 30 サイクル反応させ、アニーリング及び伸長条件は PCR 産物の長さなどにより変化させた。DNA 断片を結合させるための PCR、フュージョン PCR は報告されている方法で行った (Cha-aim *et al.*, 2009)。プラスミド pST106 は、Sc*URA3* 遺伝子と *TDH3* 遺伝子のプロモーター (*TDH3p*) を含むプラスミドであり、*URA3-TDH3p* コンストラクトを PCR で増幅するためのテンプレートとして使用した (Cha-aim *et al.*, 2009)。薬剤耐性遺伝子を PCR で増幅するためのプラスミドとして、pKT127 (Accession No, P30175, EUROSCARF) 及び pTriEx-4Hygro (Product number 70934-3, Novagen, Darmstadt, Germany) を使用した。*URA3* をマーカーとした形質転換を行うためのプラスミドとして YEpGAP-Cherry (Kepper-Ross *et al.*, 2008) を使用した。酵母菌の形質転換はこれまでに報告されている酢酸リチウム法 (Hoshida *et al.*, 2005) を用いた。酵母を YPD 培地で増殖させ、200 µl の one-step buffer (36% polyethyleneglycol 3350 (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan)、0.2 M 酢酸リチウム、0.5 mg/ml carrier DNA) に懸濁し 42°C に 1 時間置いたのち選択培地にまいた。

研究用酵母内での *URA3* 相同遺伝子破壊株の構築

○ビール酵母 *SbURA3* 破壊用コンストラクトの構築

初めに、ビール酵母 *SbURA3* 遺伝子が研究用酵母 *ura3Δ0* 領域に挿入された株の構築を以下のように行った。RAK4647 の染色体 DNA をテンプレートとし、*URA3-5'40-SbURA3-1000* と *URA3-3'40c-SbURA3+1804c* のプライマーを使用し PCR を行った。これらのプライマーは 40 塩基の *ScURA3* 配列が付加している *SbURA3* 領域を増幅するプライマーである。2.8 kbp の *SbURA3* 配列の両端に、相同組換えのための 40 bp の *ScURA3* 配列が付加した PCR 産物を得た。この PCR 産物を研究用酵母 RAK3600 へ形質転換した。RAK3600 は *ura3Δ0* 領域に *Pichia pastoris* の *HIS3* 遺伝子 (*PpHIS3*) が挿入されている。-U 培地で選択した後、ヒスチジン要求性により形質転換に成功した株を確認した。さらに、形質転換体の染色体 DNA をテンプレートとして、*URA3-290*、*URA3-280c* のプライマーで PCR を行い、3.4 kbp のバンドが増幅できたことより正確に挿入できていることを確認した。この株を RAK4745 (*ura3Δ0::SbURA3*) とした。

次に *SbURA3* 破壊用コンストラクトを、以下の方法で *KanMX* 遺伝子を RAK4745 の *SbURA3* に挿入することで作製した。pKT127 をテンプレートとして、プライマーに *SbURA3-5'40-KanMX-334* と *SbURA3-3'40c-KanMX+966* を使用した。これらのプライマーの 5'配列には、*SbURA3* 配列 40 塩基を含んでおり、3'配列は *KanMX* 配列にアニールするための配列である。PCR 産物を RAK4745 へ形質転換した。形質転換体の選択には G418 培地を用いた。得られた形質転換体より取得した染色体 DNA をテンプレートとして、*URA3-290* と *URA3-280c* のプライマーで PCR を行い、3.8 kbp の位置にバンドができており、PCR 産物が正しく挿入できていることを確認した。このうちのひとつを RAK4886 とした。この株は *SbURA3Δ0::KanMX* となっており、-U 培地で増殖しないウラシル要求性株であった。

○ビール酵母 *ScURA3* 破壊用コンストラクトの構築

まず、以下の方法で *TDH3* プロモーター (*TDH3p*) により発現する Hygromycin 耐性遺伝子 (*Hygro^R*) を研究用酵母の *ura3Δ0* 領域で構築した。初めに、*TDH3p* を *Hygro^R* の上流に挿入した。pTriEX-4Hygro をテンプレートとして、*TDH3p40-Hygro+1* と *10TG-Hygro+1035c* のプライマーにより増幅した。*TDH3p40-Hygro+1* は 5'配列に *TDH3p* の配列を含み、3'配列に *Hygro^R* の ORF 配列を含む。*10TG-Hygro+1035c* はフュージョン PCR のため 5'配列に 20 塩基の TG 連続配列を含み、3'配列に *Hygro^R* の ORF 配列を含む。*URA3* 遺伝子の増幅は、BY4704 の染色体 DNA をテンプレートとして、*10CA-URA3-243* と *URA3-280c* のプライマーを用い増幅した。*10CA-URA3-243* はフュージョン PCR のため 5'配列に CA 連続配列を含む。これらの PCR 産物をテンプレートとして、*TDH3p40-Hygro+1* と *URA3-280c* のプライマーでフュージョン PCR を行った。*Hygro^R* の ORF と *URA3* が、

10TG と 10CA により結合された PCR 産物を得た。PCR 産物を、*ura3Δ0* 領域に *TDH3p* と *yCluc* (yeast-type *Cypridina noctiluca* luciferase) 遺伝子、*LEU2* 遺伝子が含まれる株である RAK4920 に形質転換を行った。得られた形質転換体が、PCR 産物の挿入により *LEU2* の抜け落ちが起こり、ロイシン要求性となったことを確認した。形質転換体より取得した染色体 DNA をテンプレートとして、URA3-300 と URA3-300c のプライマーを用いて PCR でも、PCR 産物が挿入されていることを確認した。Hygromycin 耐性及び Ura⁺を示した株を RAK5591 とした。

次に以下の方法で、研究用酵母内で *ScURA3* 破壊用コンストラクトを *TDH3p-Hygro^R* を挿入することにより作製した。RAK5591 より取得した染色体 DNA をテンプレートとして、URA3-300 と URA3-3'40c-Hygro+1035c のプライマーにより PCR を行った。URA3-3'40c-Hygro+1035c は、*ScURA3* の下流配列 40 塩基と *Hygro^R* の配列 20 塩基を含む。この PCR 産物を RAK3600 へ導入し、RAK6035 を得た。RAK6035 はヒスチジン要求性を示し、URA3-1000 と URA3-1000c のプライマーで PCR を行うことで *ura3Δ0* 領域に *TDH3p-Hygro^R* が正しく挿入されていることを確認した。

下面発酵ビール酵母 *URA3* 破壊株の構築

○ビール酵母 *SbURA3* 破壊

まず、*SbURA3* 破壊用コンストラクトを Weihenstephan 34/70 (RAK4647) の *SbURA3* 領域へ、以下の方法で挿入した。RAK4886 (*Sbura3::KanMX*) より取得した染色体 DNA をテンプレートとし、PCR により両端にビール酵母 *SbURA3* 相同配列を約 1000 bp 持つ *KanMX* 遺伝子を増幅した。プライマーは *SbURA3-971*、*SbURA3+1756c* を使用した。この PCR 産物を使用し、RAK4647 に形質転換した。得られた形質転換体から取得した染色体 DNA をテンプレートとし、*SbURA3-1100* と *SbURA3+1840c* のプライマーを用い PCR により *SbURA3* 遺伝子の破壊を確認した。得られた株を RAK4965 とした。

○ビール酵母 *ScURA3* 破壊

次に、RAK4965 の *ScURA3* 領域に *ScURA3* 破壊用コンストラクトを、以下の方法で挿入した。RAK6035 (*ScURA3::TDH3p-Hygro^R*) より取得した染色体 DNA をテンプレートとして、プライマーに URA3-1000 と URA3-1000c PCR を用いて、約 1000 bp の *ScURA3* 相同配列を両端に持つ *TDH3p-Hygro^R* 遺伝子を増幅した。この PCR 産物を RAK4965 の *ScURA3* 領域へ挿入した。得られた形質転換体に対する、URA3-1380 と URA3+1940 のプライマーでの PCR により *TDH3p-Hygro^R* 遺伝子の *ScURA3* 領域への挿入を確認し、RAK6171 とした。これにより、*S. pastorianus* ヘテロ *URA3* 破壊株である RAK6171 (*Sbura3Δ0::KanMX/SbURA3⁺ Scura3Δ0::TDH3p-Hygro^R/ScURA3⁺*) を得た。

発酵試験及び香気成分測定

ビール酵母の発酵試験及び香気成分測定は、アサヒビール株式会社酒類技術研究所の尾形智夫氏に依頼した。麦汁での発酵試験を行い、HS-SPME ガスクロマトグラフィーによる香気成分の測定を行った。

Table 2.1 Yeast strains used in this study.

Strain name	Genotype	Description
BY4700	<i>MATa ura3Δ0</i>	<i>S. cerevisiae</i> (Brachmann <i>et al.</i> , 1998)
BY4704	<i>MATa ade2Δ::hisG his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63</i>	<i>S. cerevisiae</i> (Brachmann <i>et al.</i> , 1998)
RAK3600	<i>MATa ade2Δ::hisG his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0::PpHIS3</i>	<i>S. cerevisiae</i> , PpHIS3 is <i>Pichia pastoris</i> HIS3.
RAK4745	<i>MATa ade2Δ::hisG his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0::SbURA3</i>	<i>S. cerevisiae</i>
RAK4886	<i>MATa ade2Δ::hisG his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0::Sbura3Δ0::KanMX</i>	<i>S. cerevisiae</i>
RAK4920	<i>MATa his3ΔI leu2Δ0 met15Δ0 ade2Δ0 ura3Δ0::TDH3p-yCLuc-LEU2</i>	<i>S. cerevisiae</i>
RAK5591	<i>MATa his3ΔI leu2Δ0 met15Δ0 ade2Δ0 ura3Δ0::TDH3p-hygro-URA3</i>	<i>S. cerevisiae</i>
RAK6035	<i>MATa ade2Δ::hisG his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0::TDH3p-hygro</i>	<i>S. cerevisiae</i>
RAK4647	Wild type bottom-fermenting yeast	<i>S. pastorianus</i> , Weihenstephan34/70
RAK4965	<i>ScURA3/ScURA3 Sbura3Δ0::KanMX/SbURA3</i>	<i>S. pastorianus</i> , SbURA3 hetero-disruptant
RAK6171	<i>Scura3Δ0::TDH3p-hygro/ScURA3 Sbura3Δ0::KanMX/SbURA3</i>	<i>S. pastorianus</i> , ScURA3 ,SbURA3 hetero-disruptant
RAK6174	<i>Scura3Δ0::TDH3p-hygro/Scura3Δ0::TDH3p-hygro Sbura3Δ0::KanMX/Sbura3Δ0::KanMX</i>	<i>S. pastorianus</i> , uracil-auxotroph
RAK6937	<i>Scura3Δ0::TDH3p-hygro/Scura3Δ0::TDH3p-hygro Sbura3Δ0::KanMX/Sbura3Δ0::KanMX ScURA3-TDH3p-ScATF1/ScATF1</i>	<i>S. pastorianus</i> , ScATF1-overexpression strain

Table 2.2 Primers used in this study.

Oligonucleotide	Sequence
URA3-5'40-SbURA3-1000	atcaaagaaggtaatgtggctgtggttcagggtccataACTAATTTTGTT GGCTCTGA
URA3-3'40c-SbURA3+1804c	tttcgtcattatagaaatcattacgaccgagattcccggACAGTGGAACAG TGGTGATT
URA3-290	GAGAAGGGCAACGGTTCATCATCTC
URA3-280c	CAGTCTGTGAAACATCTTTCTACCA
SbURA3-5'40-KanMX-334	tgcaaaattctccagaaaaaagggatccatagaaaagaatCCCAGAATACC CTCCTTGAC
SbURA3-3'40c-KanMX+966c	tatacacgcatgcacttttacttatggtacatatcttttTCTGCGCACTTAAC TTCGCA
TDH3p40-Hygro+1	caagaacttagtttcgaataaacacacataaacaacaaaATGGATAGATCC GGAAAGCC
10TG-Hygro+1035c	tgtgtgtgtgtgtgtgtgCTATTCCTTTGCCCTCGGAC
10CA-URA3-243	cacacacacacacacacaCTGTGGTTTCAGGGTCCATA
URA3-300	GAAGAGTATTGAGAAGGGCAAC
URA3-300c	TGTTGTGAAGTCATTGACACAG
URA3-3'40c-Hygro+1035c	tttcgtcattatagaaatcattacgaccgagattcccggCTATTCCTTTGCC CTCGGAC
URA3-1000	TACTAGGAAATGAGAATTTTGGAA
URA3-1000c	TGCGATTGGCAGTGGAACAGTGGTA
SbURA3-971	GACGTAGCTTCAGCACGCGTAC
SbURA3+1756c	GGGCCTGCCACGCGGGTCATC
SbURA3-1100	CTCACCGCTAATTCCTCCTGAA
SbURA3+1840c	GCGCGGCCGGGAACGAAACTCT
URA3-1380	TGTGCGGATCAGACGGAGTACT
URA3+1940c	GGCCTCGTGGCGCACATGGTAC
ATF1-801	aaccaacaaaaattcgagacaagaaaataaaaaacggcaGGCGCGCCCG
ATF1-40cTDH3pc	gagagctgataaattgatgtatttggatactgatgaagTTTATGTGATGAT TGATT

2.3 実験結果

栄養要求性変異株を取得することで遺伝子操作を容易に行うことが可能である。しかし、下面発酵ビール酵母 *S. pastorianus* は異型 4 倍体であるため栄養要求性のような劣性変異株の取得は報告されていない。そこで本研究では、薬剤耐性遺伝子による遺伝子破壊と LOH を組み合わせる手法で、下面発酵ビール酵母において栄養要求性変異株であるウラシル要求性株の取得を試みた。また、ウラシル要求性株を使った過剰発現株の構築を行い、ウラシル要求性株の網羅的解析への有効性を評価した。

2.3.1 下面発酵ビール酵母での *ScURA3*、*SbURA3*ヘテロ破壊株の構築

下面発酵ビール酵母では UV 変異と 5-FOA 培地による手法ではウラシル要求性株は取得できていない。そのため、LOH は *Sc* 染色体間、*Sb* 染色体間のみで起こるのではないかと仮定した。この仮説を検証するため、下面発酵ビール酵母の *ScURA3* のひとつ、*SbURA3* のひとつをそれぞれ破壊したビール酵母ヘテロ *URA3*破壊株の構築を進めた。

2.3.1.1 下面発酵ビール酵母 *SbURA3* 遺伝子破壊

遺伝子破壊の方法としては、薬剤耐性遺伝子を用いた相同組換えによる手法がある。相同組換えによる遺伝子導入効率は相同配列の長さに依存し、相同配列が長いほど効率よく導入できることが知られている。そこで、長い相同配列を持つ薬剤耐性遺伝子を得るために、研究用酵母内で *S. pastorianus* の *URA3* 領域に薬剤耐性遺伝子を挿入した破壊用コンストラクトを構築することにした。

ビール酵母 *SbURA3* 破壊用コンストラクトを作製するために、まず、ビール酵母の *SbURA3* 遺伝子を研究用酵母の *ura3Δ0* 領域に導入することにした (Fig. 2.1)。研究用酵母は相同組換えを行う際 40 bp の相同配列で組換え可能である。

ビール酵母 RAK4647 より抽出した染色体から *ScURA3* 相同配列 40 bp を持つ *SbURA3* 遺伝子を増幅した。この PCR 産物を RAK3600 の *ScURA3* の領域に導入し-U 培地による選択を行った結果、コロニーが得られた。-H 培地による選択と PCR により、正しく挿入された株を選択し RAK4745 とした。ビール酵母 *SbURA3* をマーカーとした形質転換が可能であったことから、ビール酵母 *SbURA3* 遺伝子は研究用酵母内で機能することがわかった。

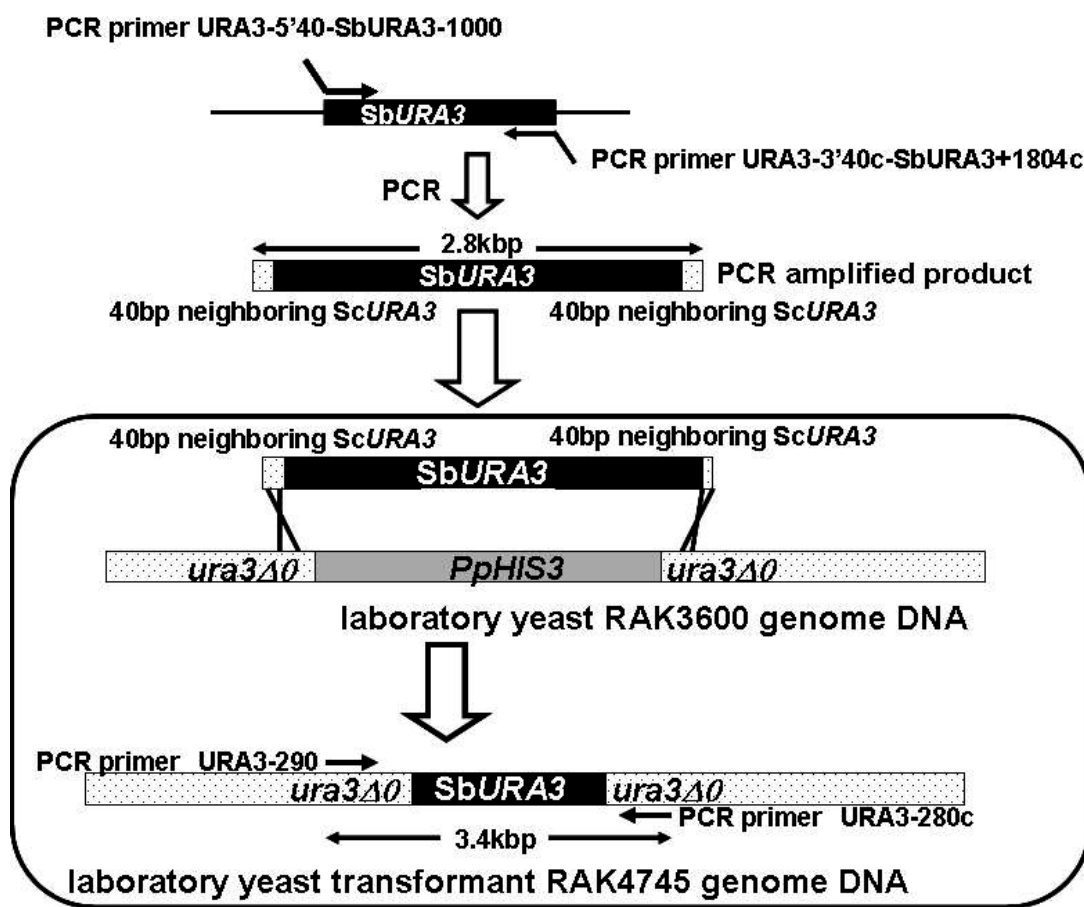


Fig. 2.1 ビール酵母 *SbURA3* 遺伝子の研究用酵母への導入
 PCR により増幅した *ScURA3* 相同配列 40 bp を両端に持つビール酵母 *SbURA3* が、RAK3600 の *ura3Δ0* 領域に正しく挿入された場合 *PpHIS3* の抜け落ちによりヒスチジン要求性を示す。また、URA3-290、URA3-280c のプライマーを用いて PCR を行った場合 3.4 kbp のバンドが得られる。

○ *KanMX* 遺伝子を用いたビール酵母 *SbURA3* 破壊用コンストラクトの作製結果

KanMX 遺伝子は G418 耐性を与える薬剤耐性遺伝子である。研究用酵母 (BY4704) 及びビール酵母 (RAK4647) の G418 耐性を調べるために、スポット試験を行った。その結果、BY4704 は 300 μg/ml で生育できず、RAK4647 では 50 μg/ml で生育できないという結果が得られた (Fig. 2.2)。この濃度を指標に G418 耐性株の選択を行った。

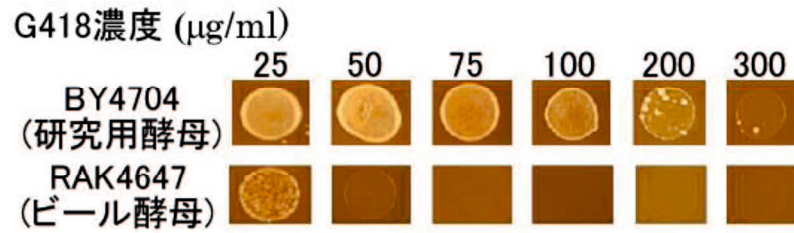


Fig. 2.2 研究用酵母及びビール酵母の G418 耐性
 数字で示した濃度 (μg/ml) の G418 培地に、YPD 培地で培養した研究用酵母 (BY4704) 及びビール酵母 (RAK4647) をスポットし 28°C で 3 日培養した。

研究用酵母内で *SbURA3* 遺伝子の破壊の概念を Fig. 2.3 に示す。研究用酵母内の *SbURA3* を *KanMX* により破壊することで、その染色体をテンプレートとして長い *SbURA3* 相同配列を持つ *KanMX* が増幅可能と考えた。

プラスミド pKT127 から *SbURA3* 相同配列 40bp を両端に持つ *KanMX* 遺伝子を増幅し RAK4745 へ導入した。選択培地は 200 μg/ml G418 培地を用いた。その結果、G418 耐性を持つ株が得られ、-U 培地による選択と PCR により、正しく挿入できた株を選択し RAK4886 とした。この株を使用することで、長い *SbURA3* 相同配列を持つ *KanMX* が増幅可能となった。

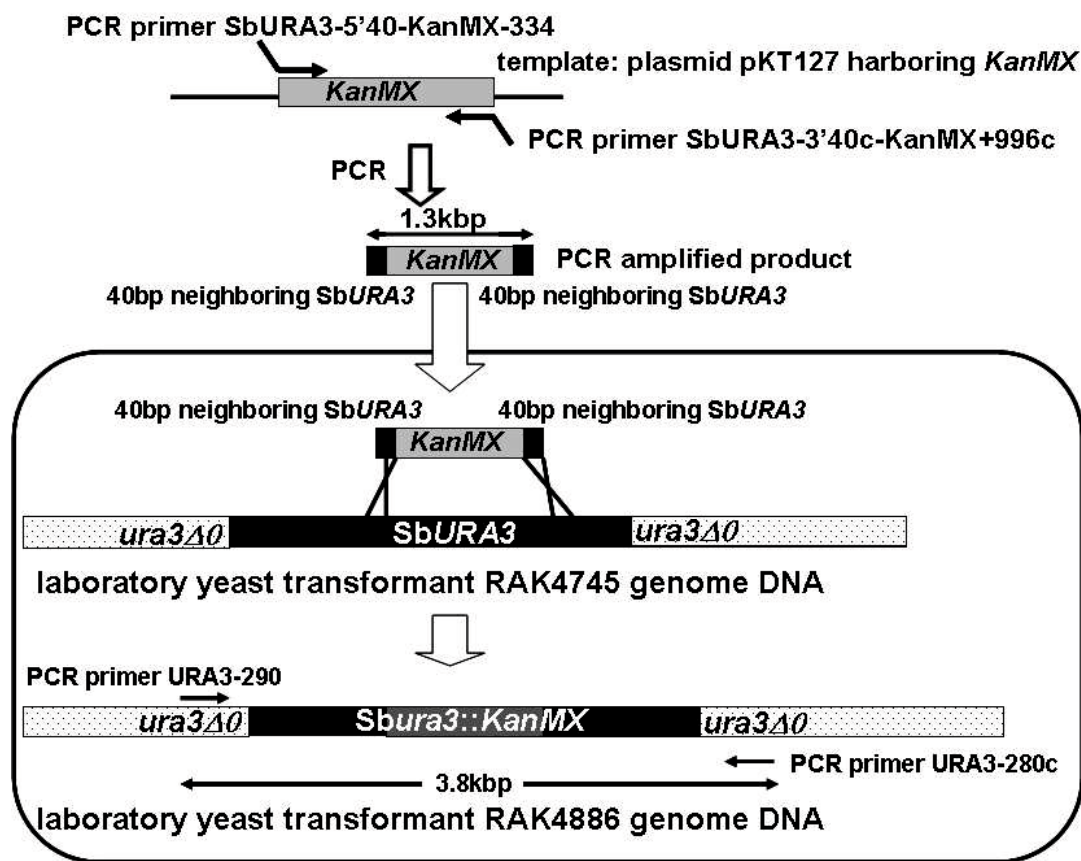


Fig. 2.3 *KanMX*遺伝子による研究用酵母内でのビール酵母 *SbURA3*遺伝子破壊
PCRにより増幅した *SbURA3*相乗配列 40 bp を両端に持つ *KanMX*により *SbURA3*が破壊された場合ウラシル要求性を示す。また、URA3-290、URA3-280cのプライマーでPCRを行った場合、3.8 kbpのバンドが得られる。

○*KanMX*遺伝子を用いたビール酵母 *SbURA3*遺伝子破壊結果

RAK4886を用いることで、長い *SbURA3*相同配列を持つ *KanMX*遺伝子を増幅することができる (Fig. 2.4)。この長い相同配列を持つ *KanMX*を用いることでビール酵母 *SbURA3*が破壊できると考えた。

RAK4886からビール酵母 *SbURA3*相同配列を約 1000 bp 持たせた *KanMX*遺伝子を増幅しビール酵母 RAK4647に形質転換した。形質転換体を選択する際、YPD培地にまき1日培養後 500 μg/ml G418培地にレプリカすることでG418耐性を示す株が得られた。PCRにより正しく挿入されていた株を選択しRAK4965とした。*SbURA3*領域をPCRにより増幅した結果である Fig. 2.5では、RAK4965を用いた場合3.4 kbと3.0 kbの2つのバンドが増幅できた。この結果は、RAK4647の *SbURA3*のひとつが *KanMX*により破壊されたことを示している。この株の *ScURA3*遺伝子のひとつを破壊することでビール酵母ヘテロ

*URA3*破壊株が得られる。

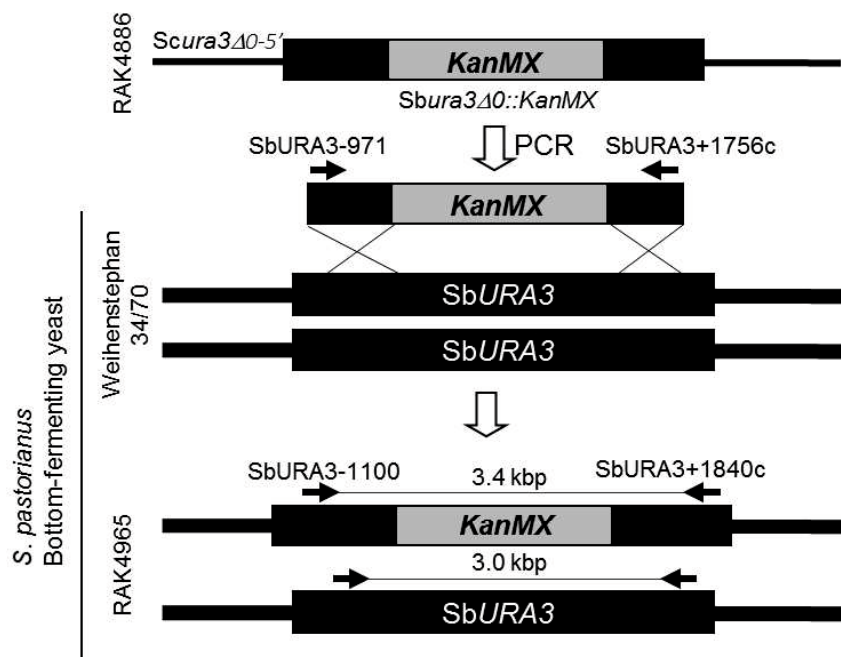


Fig. 2.4 ビール酵母 *SbURA3*破壊の概念図

RAK4886 より増幅した約 1000 bp の *SbURA3* 相同配列を両端に持つ *KanMX* によりビール酵母 *SbURA3* を破壊した場合、*SbURA3*-1100、*SbURA3*+1840c のプライマーで PCR を行うと 3.4 kbp のバンドが得られる。

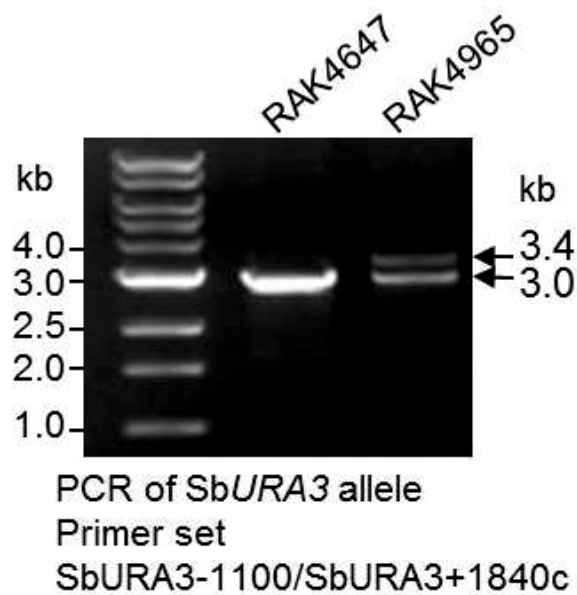


Fig. 2.5 *KanMX*によるビール酵母 *SbURA3*破壊
*SbURA3*領域をPCRにより増幅した結果、RAK4965では3.4 kbpと3.0 kbpの2つのバンドが得られた。この結果は、*SbURA3*のひとつが*KanMX*により破壊されたことを示す。

2.3.1.2 下面発酵ビール酵母 *ScURA3* 遺伝子破壊

ビール酵母 *SbURA3* 遺伝子のひとつが *KanMX*により破壊された株である RAK4965 を構築した。この株の *ScURA3* 遺伝子のひとつを破壊することで、ビール酵母ヘテロ *URA3* 破壊株の構築を進めた。

○*Hygro^R* 遺伝子を用いたビール酵母 *ScURA3* 破壊用コンストラクトの作製結果

Hygro^R 遺伝子は過剰発現させることで Hygromycin 耐性を与える薬剤耐性遺伝子である。研究用酵母 (BY4704) の Hygromycin 耐性を調べるために、スポット試験を行った(Fig. 2.6)。その結果、400 $\mu\text{g/ml}$ で生育できなかった。この濃度を指標に Hygromycin 耐性株の選択を行った。

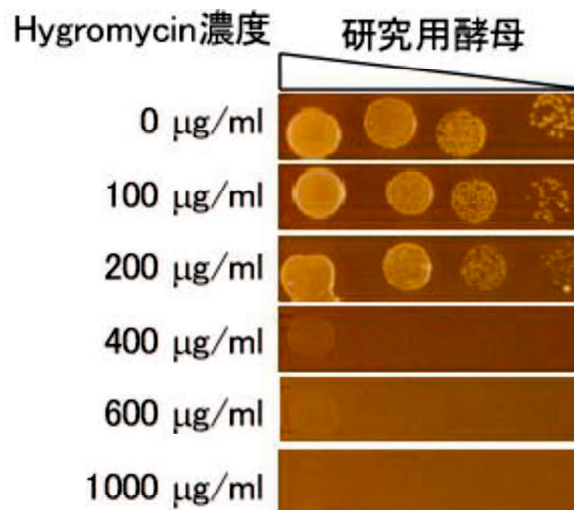


Fig. 2.6 研究用酵母の Hygromycin 耐性

0~1000 µg/ml Hygromycin 培地に YPD 培地で培養した研究用酵母 (BY4704) をスポットし 28℃、3 日培養した。

プラスミド pTriEx-4 Hygro は、Hygromycin 耐性を与える *Hygro^R* 遺伝子に哺乳類細胞用のプロモーターを用いているため酵母で *Hygro^R* 遺伝子を発現させることができない。そのため、酵母での恒常的高発現プロモーターである *TDH3p* の下流に *Hygro^R* 遺伝子を導入し (Fig. 2.7)、その株を用いて破壊用コンストラクトの作製を進めた (Fig. 2.8)。

プラスミド pTriEx-Hygro より増幅した *Hygro^R* と、BY4704 から増幅した *URA3* とをフュージョン PCR により結合した。この PCR 産物を RAK4920 へ導入し、-U 培地による選択を行った。-L 培地による選択と PCR により、正しく挿入された株を選択し RAK5591 とした (Fig. 2.7)。

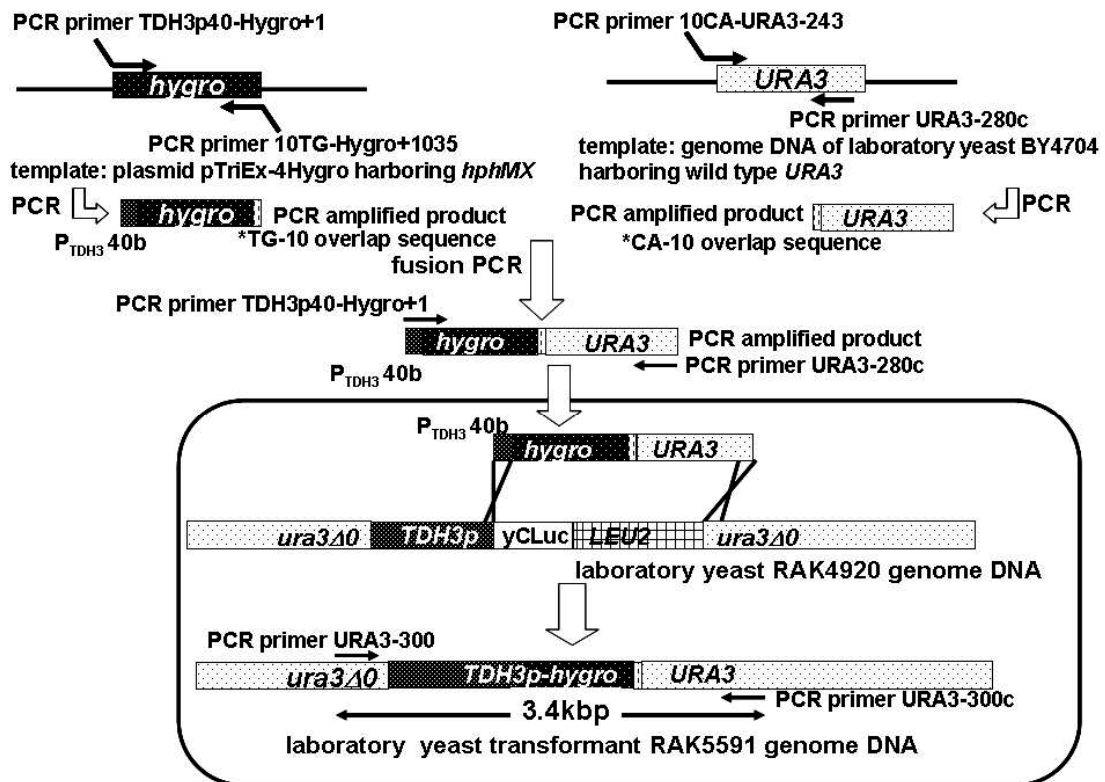


Fig. 2.7 *Hygro^R* 遺伝子の研究用酵母への導入

10TG/10CA 配列により *Hygro^R* と *URA3* を結合させた DNA を導入した場合、*LEU2* の抜け落ちによりロイシン要求性となる。また、URA3-300、URA3-300c のプライマーで PCR を行うと 3.4 kbp のバンドが得られる。

RAK5591 から *TDH3p-Hygro^R* を増幅し RAK3600 へ導入した。選択培地は 600 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin 培地を用いた。-H 培地による選択と PCR により、正しく挿入された株を選択し、RAK6035 とした (Fig. 2.8)。

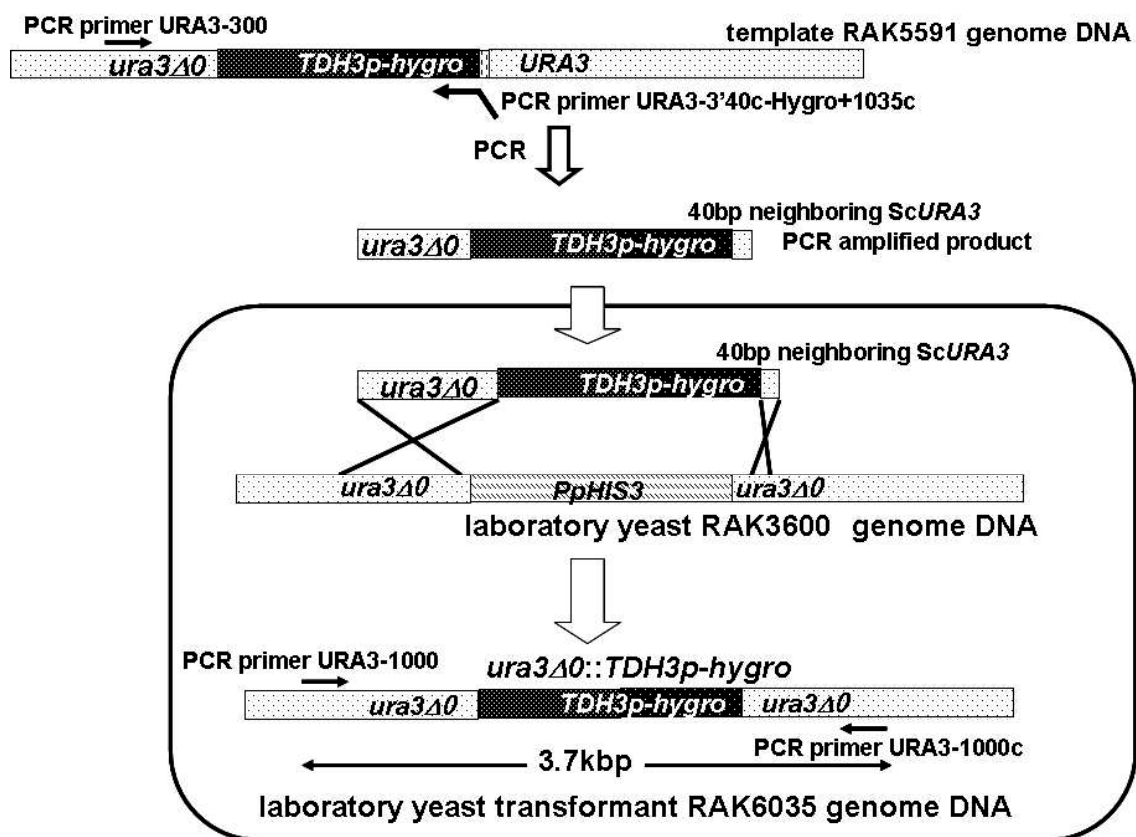


Fig. 2.8 *Hygro^R* 遺伝子によるビール酵母 *ScURA3* 破壊用コンストラクトの作製
 PCR で増幅した *ScURA3* 相同配列を両端に持つ *TDH3p-Hygro^R* が RAK3600 の *ura3Δ0* 領域に正しく挿入された場合 *PpHIS3* の抜け落ちによりヒスチジン要求性を示す。また、URA3-1000、URA3-1000c のプライマーを用いて PCR を行った場合 3.7 kbp のバンドが得られる。

○*Hygro^R* 遺伝子を用いたビール酵母 *ScURA3* 遺伝子破壊結果

ビール酵母 *SbURA3* 遺伝子のひとつが破壊された RAK4965 に対して *Hygro^R* 遺伝子での *ScURA3* 遺伝子の破壊を試みた (Fig. 2.9)。RAK6035 から長い *ScURA3* 相同配列を持つ *Hygro^R* 遺伝子を増幅し、これを用いることでビール酵母 *ScURA3* 遺伝子破壊を行えると考えた。

RAK6035 より約 1000 bp の *ScURA3* 相同配列を持つ *TDH3p-Hygro^R* 遺伝子を増幅し、RAK4965 の *ScURA3* 領域へ導入した。形質転換体を選択する際、YPD 培地にまき 1 日培養後 500 μg/ml Hygromycin 培地にレプリカすることで Hygromycin 耐性を示す株が得られた。PCR により正しく挿入されていた株を選択し RAK6171 とした。*ScURA3* 領域を PCR により増幅した結果である Fig. 2.10 では、RAK6171 を用いた場合 3.8 kb と 3.3 kb の 2 つのバンドが増幅できた。この結果は、RAK4965 の *ScURA3* のひとつが *TDH3p-Hygro^R* により破壊されたことを示している。これにより、ビール酵母の *ScURA3* の 1 つと

Sb *URA3* の 1 つが破壊できたビール酵母ヘテロ *URA3* 破壊株を取得できた。

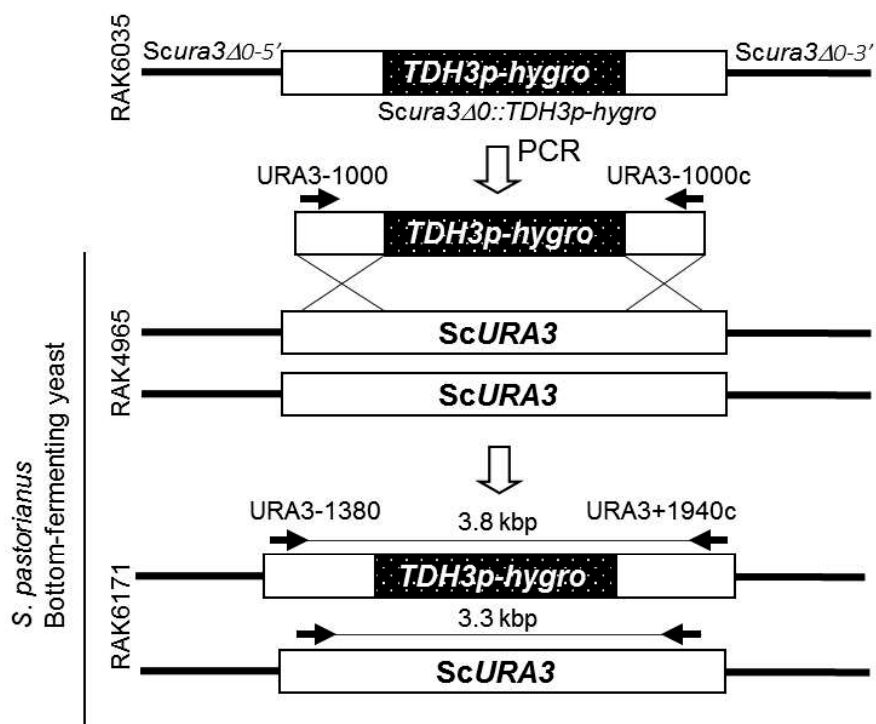


Fig. 2.9 ビール酵母 *ScURA3* 破壊の概念図

RAK6035 より増幅した約 1000 bp の *ScURA3* 相同配列を両端に持つ *TDH3p-Hygro^R* によりビール酵母 *ScURA3* を破壊した場合、URA3-1380、SbURA3+1940c のプライマーで PCR を行うと 3.8 kbp のバンドが得られる。

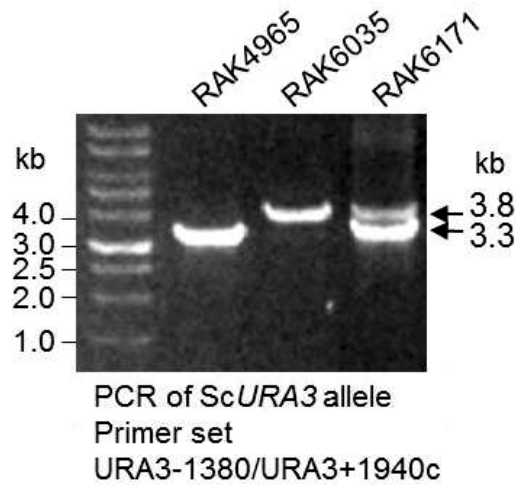


Fig. 2.10 *TDH3p-Hygro^R*によるビール酵母 *ScURA3*破壊
*ScURA3*領域をPCRにより増幅した結果、RAK6171では3.8 kbpと3.3 kbpの2つのバンドが得られた。この結果は、*ScURA3*のひとつが *TDH3p-Hygro^R*により破壊されたことを示す。

2.3.2 Loss of heterozygosity (LOH) によるウラシル要求性ビール酵母の構築

LOHとは、ヘテロの状態にある相同染色体がホモの状態になることである。そのため、*Scura3::TDH3p-Hygro^R/ScURA3Sbura3::KanMX/SbURA3*のRAK6171を用いれば、ビール酵母でもSc間、Sb間で共にLOHが起こることにより、*URA3*遺伝子が完全に破壊されたビール酵母が得られるのではと考えた (Fig. 2.11)。

5-FOA培地上では *URA3*が機能する株は生育できず、*URA3*が機能しない株のみ増殖することが可能である。そのため、RAK6171に対し、5-FOA培地による選択を行うことで、ビール酵母 *URA3*遺伝子が全て破壊された株が取得可能と考え、5-FOA培地での選択を試みた。その結果、5-FOA培地上で生育可能な株が取得できた。得られた株をRAK6174とし、*ScURA3*、*SbURA3*のそれぞれの領域に特異的なプライマーを用いてPCRを行った結果、*ScURA3*が *TDH3p-Hygro^R*に、*SbURA3*が *KanMX*に置換されている結果となった (Fig. 2.12)。この結果より、ビール酵母ホモ *ura3*破壊株が取得できた。

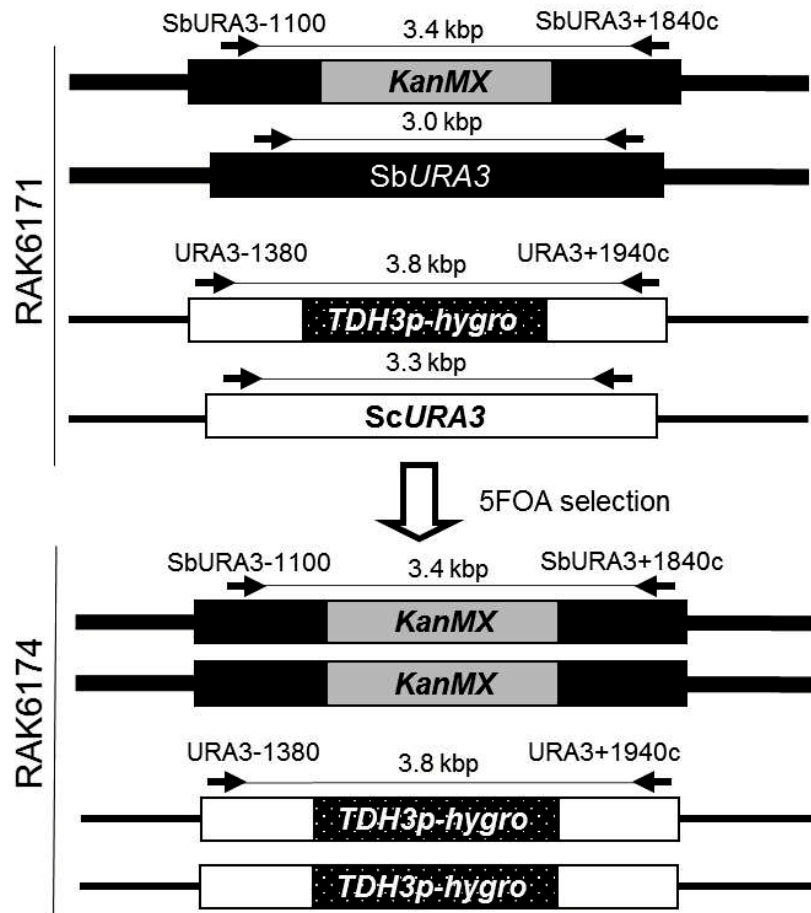


Fig. 2.11 LOH によるビール酵母 *URA3* 遺伝子破壊
 5-FOA 培地による選択により *URA3* 遺伝子がすべて破壊されるように
 LOH が起こった株が選択できる。

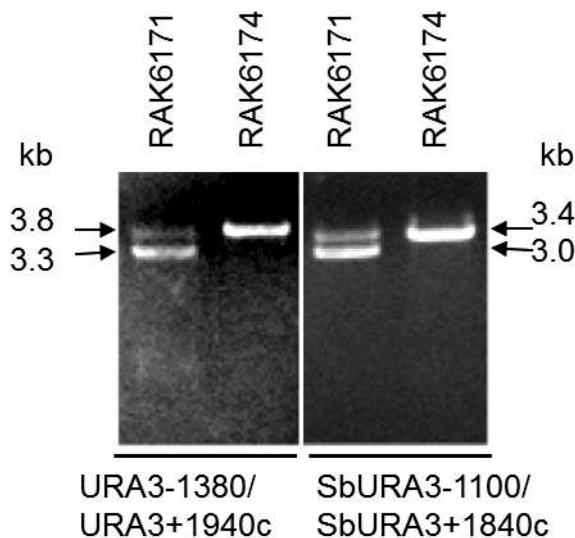


Fig. 2.12 RAK6174 株の *ScURA3* 及び *SbURA3* 領域

ScURA3 領域の増幅には URA3-1380、URA3+1940 のプライマーを、*SbURA3* 領域の増幅には SbURA3-1100、SbURA3+1840c のプライマーを使用した。RAK6174 は *ScURA3*、*SbURA3* どちらもそれぞれの薬剤耐性遺伝子により置換された。

また、得られた株を-U培地に塗ったところ、生育不可能であったことから、ウラシル要求性となっていることが示された (Fig. 2.13)。このウラシル要求性ビール酵母 RAK6174 に対し、*URA3* 遺伝子をマーカーとした形質転換が行えるか調べるために、*URA3* をマーカーに持つプラスミド YEp-GAP-cherry を導入し、-U培地での選択を行った。また、この際プラスミドを導入していない酵母も同様に-U培地にまいた。28°C、3日静置培養を行った結果が Fig. 2.14 である。プラスミドを導入した酵母をまいたプレートでコロニーを得ることができ、さらに、プラスミドを導入していない酵母をまいたプレートでは復帰株がみられなかったことより、ウラシル要求性ビール酵母は *URA3* 遺伝子をマーカーとした形質転換が可能であり、形質転換の効率は *S. cerevisiae* と同程度であった (Fig. 2.14)。

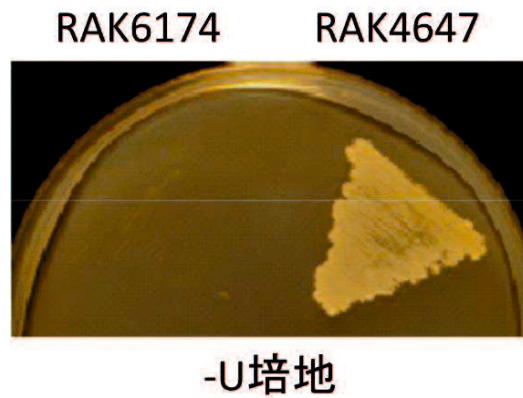


Fig. 2.13 RAK6174 の-U 培地での増殖

ウラシル要求性の株は-U 培地上で生育することができない。RAK6174 は-U 培地上で生育できていないことからウラシル要求性であることが示された。

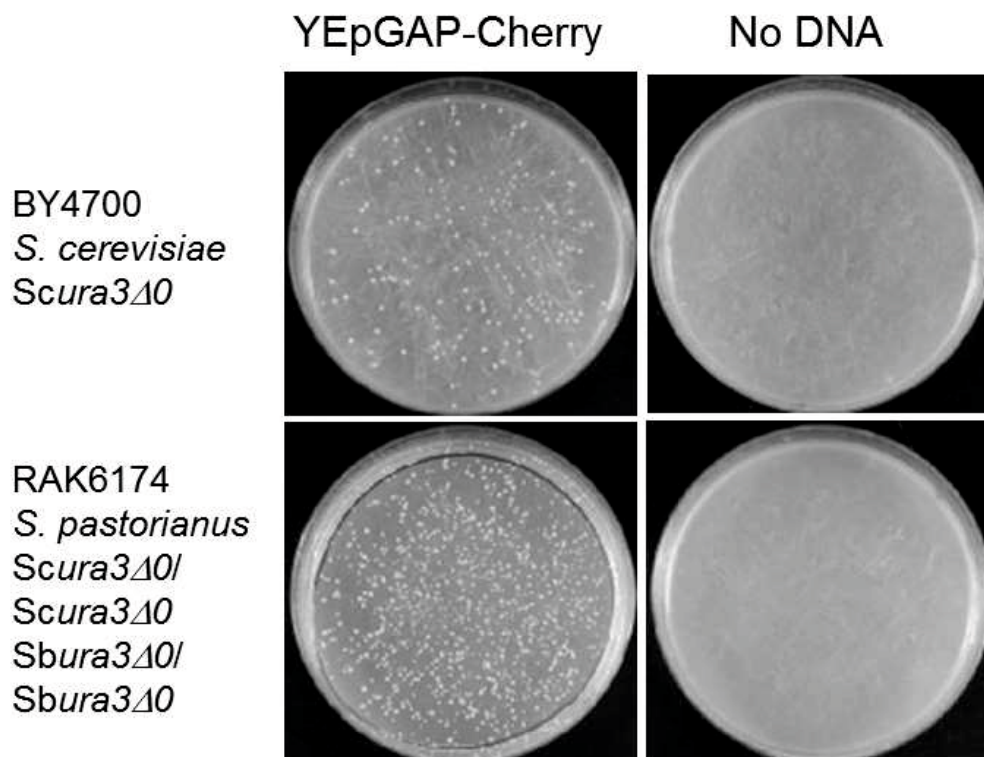


Fig. 2.14 *URA3* 遺伝子によるビール酵母への形質転換

BY4700 と RAK6174 へ形質転換を行い-U 培地へまいた。左側の培地はプラスミド YEpGAP-Cherry を導入した場合、右側の培地はプラスミドを導入していない場合。

2.3.3 ウラシル要求性ビール酵母を用いた *ATF1* 過剰発現株の評価

ウラシル要求性ビール酵母を使用してアルコールアセチル化酵素の遺伝子である *ATF1* の過剰発現を試みた。ビールの主な香り成分は揮発性のエステルであり、アルコールアセチル化酵素の遺伝子を過剰発現させた時の香り成分の量で評価した。

恒常的高発現プロモーター *TDH3p* によって *ATF1* を過剰発現させるために *URA3* マーカーが含まれる形質転換用フラグメントを増幅し RAK6174 へ導入した (Fig. 2.15)。

ATF1 過剰発現株の発酵試験結果を Table 2.3 に示す。*ATF1* 遺伝子を過剰発現させた結果、*ATF1* 過剰発現株で酢酸エステル生産量が増加していた。

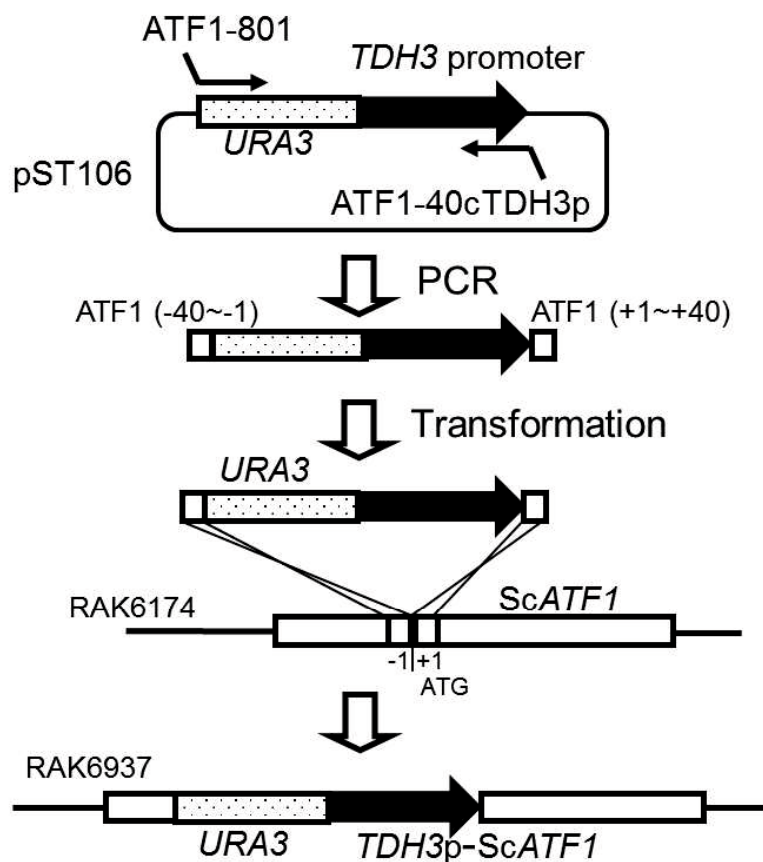


Fig. 2.15 ウラシル要求性ビール酵母での *ATF1* 過剰発現株構築の模式図
プラスミド pST106 から *ATF1* 相同配列を両端に持つ *URA3*-*TDH3p* を
増幅し、ビール酵母 *ScATF1* の上流へ挿入した。

Table 2.3 Volatile compounds produced by *ScATF1* overexpression yeast strain after wort fermentation.

Strains	Final apparent extract (°P)	Concentration (mg/l)				
		Ethyl acetate	Isoamyl alcohol	Isoamyl acetate	β -phenylethyl alcohol	β -phenylethyl acetate
Weihenstephan34/70 (RAK4647)	1.34	12.1	54.0	1.58	21.3	0.47
RAK6937/TDH3p- <i>ScATF1</i>	1.41	67.2	50.6	12.5	25.0	5.83

2.4 考察

下面発酵ビール酵母 *S. pastorianus* は *S. cerevisiae* 由来の染色体と *S. byanus* 由来の染色体からなる異型 4 倍体酵母である (Casaregola *et al.*, 2001; Nakao *et al.*, 2009; Rainieri *et al.*, 2006; Tamai *et al.*, 1998; Yamagishi and Ogata, 1999)。この複雑な染色体構造のために、下面発酵ビール酵母に関する育種技術には限りがあり、酵母の育種を行う際に有用な栄養要求性株が取得できていないという問題点があった。そこで、5-FOA 培地を用いた *ura3* または *ura5* 変異株の取得方法 (Boeke *et al.*, 1984) や、LOH を利用した劣性変異株取得方法 (Hashimoto *et al.*, 2005) を下面発酵ビール酵母に対し試みたが、取得することはできなかった (data not shown)。これらの結果より、LOH は同種の染色体間でしか起こらないことが考えられた。

研究用酵母 *S. cerevisiae* 由来の ScUra3 アミノ酸配列は、*S. pastorianus* 由来の ScUra3 と 100%一致し、SbUra3 アミノ酸配列とは 94%一致することが報告されている (Nakao *et al.*, 2009)。下面発酵ビール酵母が持つ Sb *URA3* 遺伝子が機能するか調べるために、研究用酵母の *ura3Δ0* 領域に導入したところ Ura⁺となる形質転換体を取得することが可能であった。このことは、下面発酵ビール酵母が持つ Sb *URA3* 遺伝子は *URA3* 遺伝子としての機能を持っており、異型 4 倍体である下面発酵ビール酵母は、Sc *URA3* が二つ、Sb *URA3* が二つあると考えた。本研究で、それぞれ一方を破壊した株である RAK6171 を構築し、この株の *URA3* 領域の PCR 結果から、Sc、Sb 共に、異なる二本の DNA が増幅されたことから、この構造が証明された。この結果は、Sb *URA3* 遺伝子と Sc *URA3* 遺伝子のそれぞれ一方を破壊した株である RAK6171 ではウラシル要求性を示さなかったことも説明している。また、RAK6171 に対して 5-FOA 培地による選択を行うことで、ウラシル要求性を示す株である RAK6174 を取得することが可能であった。RAK6174 に対して Sc *URA3* 領域、Sb *URA3* 領域をそれぞれ特異的に増幅するプライマーを用いて PCR を行った結果では、それぞれの領域で特異的な一本のバンドしか現れていない。この結果は、RAK6171 で正常に機能する *URA3* 遺伝子に変異が生じたのではなく、LOH により Sc *URA3*、Sb *URA3* 遺伝子すべてが破壊されたことを示している。これらの結果から、LOH は同種の染色体上でのみ引き起こされ、たとえ塩基配列の相同性が高かったとしても Sc 由来と Sb 由来の染色体上では引き起こされないことが考えられる。例えば、Sc *URA3* と Sb *URA3* の翻訳領域の塩基配列相同性は 82%である。

研究用酵母での *ura3Δ0* 型の酵母 (Brachmann *et al.*, 1998) と同様に、Sc *URA3*、Sb *URA3* を完全に破壊した削除型ウラシル要求性下面発酵ビール酵母 RAK6174 を構築した。そこで、RAK6174 をホスト株として、yEmRFP を含む YE_p 型のプラスミドである YE_pGAP-Cherry (Keppler-Ross *et al.*, 2008) を用いて形質転換を行った。プラスミドを導入していない株をまいた培地では、コロニーがひとつも現れておらず、形質転換効率は研究用酵母を使用した場合と同程度であり、得られた形質転換体は赤色の蛍光を示した (data not shown)。これらの結果より、削除型ウラシル要求性下面発酵ビール酵母は研究用酵母の遺伝子操作

技術が利用可能であると考えられた。このような削除型の酵母と、削除した遺伝子をマーカーとして形質転換に使用した場合、マーカー遺伝子は染色体と相同配列を持たず目的外の相同組換えを生じたコロニーの出現を抑えることができ、形質転換の有用な宿主株となる。そこで、RAK6174 で醸造に関連する遺伝子として、アルコールアセチル化酵素をコードしている遺伝子である *ATF1* 遺伝子の過剰発現を行った。この過剰発現株を用いた麦汁による発酵試験の結果では、*ATF1* 過剰発現株の酢酸エステル生産量が、野生型株に比べ大きく増加している結果となった。削除型ウラシル要求性ビール酵母である RAK6174 を用いることで、*S. cerevisiae* と同様に PCR と形質転換のみで遺伝子の過剰発現を行えたことより、下面発酵ビール酵母でもゲノムワイドな研究 (Winzeler *et al.*, 1999; Ghaemmaghami *et al.*, 2003; Huh *et al.*, 2003) へと発展することが期待できる。

2.5 結言

第二章では、ラガービールの生産に用いられる下面発酵ビール酵母 *S. pastorianus* のウラシル要求性株の構築と遺伝子操作を行い、得られたウラシル要求性ビール酵母を用いることで容易に遺伝子操作を行えることを示した。これまで困難とされてきた異型4倍体である下面発酵ビール酵母に対して、薬剤耐性遺伝子による遺伝子破壊と LOH を用いることで、劣性変異株の取得が可能であった。この結果より、下面発酵ビール酵母では、同種染色体間での組換えは起こることが示された。また、得られたウラシル要求性ビール酵母に対して、*S. cerevisiae* と同様の手法である、PCR と形質転換という簡単な操作で遺伝子の過剰発現が正確に行えた。この結果より、ウラシル要求性ビール酵母を用いることで、*S. cerevisiae* と同様にゲノムワイドな研究が行えることが示された。

第三章

耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* を用いた新規クローニング法の開発

3.1 緒言

組換え DNA の構築は、生物学、医学、生物工学においてよく用いられる基礎的な技術である。最初の組換え DNA の構築は 1972 年に行われ (Jackson *et al.*, 1972)、以降は、遺伝子やゲノムを解析するための必須技術として世界中で利用されている。組換え DNA の構築は、目的に合わせて複数の DNA 断片を結合することである。これまでに、*in vivo*、*in vitro* で DNA 断片を結合する方法が多数構築され、製品として市販されているものもある。最も一般的な方法は、*in vitro* で目的遺伝子とプラスミド DNA の結合を行い、*Escherichia coli* を用いてクローン化する方法である。目的遺伝子とプラスミド DNA を、同一または適合する制限酵素によって処理し、DNA リガーゼにより *in vitro* で結合を行い、*E. coli* に形質転換し選択を行う。この方法を発展させた、異なる DNA を結合する手法や、組換え DNA を選択する手法が多数開発されている。例えば、Gateway™ システムは、*E. coli* 内で DNA 断片とベクターを DNA 組換え反応を利用し結合させ、組換え DNA を構築する方法である (Alberti *et al.*, 2007; Giuraniuc *et al.*, 2013)。アニーリングを利用したクローニングシステムでは、短い相同配列 (16-18 塩基) を目的遺伝子の末端に付加し、*in vitro* で組換え DNA を構築したのち *E. coli* へ導入される (Benoit *et al.*, 2006; Irwin *et al.*, 2012)。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の場合では、高頻度で相同組換えを起こす特徴を利用し、*in vivo* でプラスミド上や染色体上で相同組換えを行い組換え DNA を構築する方法がある (Andersen, 2011; Fukunaga *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 1987; Oldenburg *et al.*, 1997)。この方法では、導入 DNA とベクタープラスミドまたは染色体上の目的領域との相同配列は 40 塩基程度で行うことが可能である (Baudin *et al.*, 1993; Fukunaga *et al.*, 2013; Wach *et al.*, 1994, 1997)。

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) も *in vitro* で DNA を結合させる手法として利用されている。伸長 PCR 法やフュージョン PCR 法では、DNA 断片の 5'末端または 3'末端のどちらか一方に結合させる配列との同じ配列を加えることで二つの DNA 配列を結合させることが可能である。DNA 断片の結合において、GC リッチの短い人工配列を用いることで結合の正確性が増すことが報告されている (Chaim *et al.*, 2009, 2012)。しかしながら、汎用的な大腸菌を利用する系を含め、このような DNA 結合方法では、制限酵素サイトや相同配列、重複配列が必要となり、組換え DNA を構築する際には制限がある。

耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* は耐熱性を持ち、高温条件下でのバイオエタノール生産によるコスト削減が期待されている酵母であり (Abdel-Banat *et al.*, 2010a; Nonklang *et al.*, 2008)、形質転換を行った際、相同配列を持たない DNA 断片が高頻度で染色体上に挿入されることが報告されている (Nonklang *et al.*, 2008)。この機構は、生物

間に高度に保存されている DNA 二本鎖切断修復機構である非相同末端結合 (NHEJ) によるもので (Abdel-Banat *et al.*, 2010b)、末端配列に関係なく DNA の結合を行う機構である。*K. marxianus* に対して、これまでの組換え DNA 構築法を用いてゲノムワイド解析を行うことは多くの時間と費用が必要となる。事実、組換え DNA 構築を伴うゲノムワイド解析がシステマティックに行われているのは、*S. cerevisiae* だけであり、これは、*S. cerevisiae* 内で直接組換え DNA 構築が可能であるからと考えられる。従って、*K. marxianus* でのゲノムワイド解析を現実的なものにするには、*K. marxianus* 内で直接 DNA を構築する方法が必要である。そこで、*K. marxianus* が持つ高頻度の NHEJ を利用することで、*K. marxianus* 内で組換え DNA の構築が行えないかと考えた。

NHEJ は DNA の末端をランダムに結合する機構であるため、どのように2つの目的 DNA を結合させるか、その方法が必要である。そこで、目的の形に構築できた組換え DNA だけを選択する方法を考えた。それは、C 末配列を削除したマーカー遺伝子を使用して、正しく結合した組換え DNA を選択する方法である。この方法は、機能しない箇所まで削除したマーカー遺伝子と、削除した配列を目的遺伝子に与え、これが結合したときにだけマーカー遺伝子を機能させる方法である。この方法を用いることで、NHEJ によりランダムに結合した組換え DNA の中から正しく結合したものを容易に選択することが可能となる。さらに、2つの異なる DNA からできた一本の DNA の自己環状化により、マーカー遺伝子とは異なる DNA 配列間の結合が可能になる。これには、環状 DNA として細胞内で維持するための自律複製配列が必要である。本章では、これを可能にするために、外部から導入した異なる DNA 断片間の結合の検討、機能がなくなるように2つに分断したマーカー遺伝子を用いる選択方法の検討、*K. marxianus* 自律複製配列の単離を行い、NHEJ を利用した新規組換え DNA 構築法の開発を目指した。

3.2 実験材料及び方法

使用菌株及び培地

本章で使用した酵母菌、*K. marxianus* と *S. cerevisiae* を Table 3.1 に示した。酵母の培養は、YPD 培地 (2% グルコース、2% ポリペプトン、1% 酵母エキス) または、SD 培地 (2% グルコース、0.17% YNB (US Biological, MA, USA)、0.5% ammonium sulphate) を用いて 28~30°C で培養を行った。-U 培地、-L 培地は、SD 培地に、それぞれウラシル、ロイシンを除く必要な栄養素を加えた培地である (Ausubel *et al.*, 1999)。G418 耐性株の選択には、YPD 培地に G418 を 200 µg/ml 加えた G418 培地を用いた。ウラシル要求性株の選択には、-U 培地に 50 µg/ml ウラシルと 1 mg/ml 5-FOA を加えた 5-FOA 培地を用いた (Akada *et al.*, 2006)。20 µg/ml kanamycin (K4000, Sigma-Aldrich, MO, USA) を含む Luria-Bertani (LB) 培地は、*KanMX* 遺伝子を含むプラスミドを *E. coli* へ形質転換した際の選択に用いた。

DNA の調製、PCR 及び形質転換

K. marxianus 及び *S. cerevisiae* のプラスミドと染色体 DNA は、これまでに報告されている Zymolyase 100T を用いる方法 (Nonklang *et al.*, 2008) で調製した。*E. coli* でのクローニングに用いるプラスミド DNA は Zymoprep™ II - Yeast Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research, Orange, CA, USA) を用いて酵母から取得した。DNA 濃度の測定には Quant-iT™ dsDNA と Qubit® を用いた (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)。PCR の酵素は、KOD plus、KOD FX (Toyobo, Osaka, Japan) または PrimeSTAR® GXL (Takara Bio, Otsu, Japan) を説明書に従い使用した。PCR に用いたプライマーを Table 3.2 に示した。

S. cerevisiae の形質転換は、これまでに報告されている酢酸リチウム法を用いた (Hoshida *et al.*, 2005)。酵母を YPD 培地で増殖させ、200 µl の one-step buffer (36% polyethyleneglycol 3350 (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan)、0.2 M 酢酸リチウム、0.5 mg/ml carrier DNA) に懸濁し 42°C に 1 時間置いたのち選択培地にまいた。*K. marxianus* の形質転換は、Abdel-Banat らの方法を用いた (Abdel-Banat *et al.*, 2010b)。酵母を YPD 培地で培養後、50 µl の transformation buffer (40% polyethyleneglycol 3350 (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan)、0.1 M dithiothreitol (Wako, Osaka, Japan)、0.2 M 酢酸リチウム) に懸濁し 42°C に 30 分置いたのち選択培地にまいた。*E. coli* は DH5α 株を使用し、プラスミドの導入、精製は Ausubel らの方法 (Ausubel *et al.*, 1999) を使用した。

ScURA3 遺伝子を分断する PCR は、5'配列を URA3-223 と ScURA3+375c、3'配列を ScURA3+376 と URA3+880c のプライマーを用い、*S. cerevisiae* BY4704 の染色体 DNA をテンプレートとして増幅した。5'配列を ScURA3-5'、3'配列を ScURA3-3'とした。これらの PCR 産物を 100 ng ずつ混ぜ、*K. marxianus* RAK3605 へ形質転換した。コントロールとして、URA3-223 と URA3+880c のプライマーを用いて増幅した PCR 産物を形質転換し

た。

Sc*URA3* 遺伝子 C 末配列の削除解析には、フォワードプライマーに URA3-290 を使用し、リバープライマーに 5GCG-URA3+804c、URA3taa+792c、URA3taa+789c、URA3taa+786c、URA3taa+783c、URA3taa+780c、URA3taa+777c、URA3taa+774c、URA3+771c を使用し、BY4704 染色体 DNA をテンプレートにそれぞれ PCR を行った。これらの PCR 産物を RAK3605 へ形質転換した。

Sc*ADE2* 遺伝子の染色体への導入効率の検討には、1 回目の PCR を *S. cerevisiae* BY4700 より取得した染色体 DNA をテンプレートに用い、Sc*ADE2*-400 と 3CG9-*ADE2*+1916c をプライマーに用いて PCR を行った。この PCR 産物をテンプレートとして、Sc*ADE2*-400 と URA3+772786taa-3CG9 のプライマーを用い 2 回目の PCR を行い、Sc*URA3* の C 末配列を付加した Sc*ADE2* を増幅した。C 末配列を削除した Sc*URA3* 遺伝子の増幅は、BY4704 染色体 DNA をテンプレートとし、URA3-290 と URA3+771c のプライマーで増幅を行った。これら 2 つの PCR 産物を混ぜ、*K. marxianus* RAK3908 へ形質転換した。

yEmRFP の染色体への導入効率の検討には、プラスミド YEpGAP-Cherry (Keppler-Ross *et al.*, 2008) をテンプレートに使用し、TDH3-698 と 3CG9-yEmRFP+711c のプライマーで PCR を行い、この PCR 産物をテンプレートとして TDH3-698 と URA3+772786taa-3CG9 のプライマーで増幅した PCR 産物を使用した。この PCR 産物と C 末配列を削除した Sc*URA3*(-223~+771) を混ぜて RAK3605 へ形質転換を行い、得られたコロニーの RFP の発現を蛍光顕微鏡により観察した。

K. marxianus ゲノム DNA ライブラリーの構築と KmARS 解析

K. marxianus DMKU3-1042 株の染色体 DNA と *S. cerevisiae* の CEN/ARS、*URA3* を含むプラスミド pRS316 (Sikorski and Hieter, 1989) を *EcoRI* と *XhoI* でそれぞれ処理し、T4 DNA ligase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) によりライゲーションを行った。これを *E. coli* へ形質転換し、約 6000 の形質転換体を混ぜてプラスミドを精製し、*K. marxianus* ゲノム DNA ライブラリーとした。このライブラリーを用いて *K. marxianus* 自律複製配列 (KmARS) の単離を行った。

単離できたプラスミドのひとつである pRS316KmARS7 は、pRS316 の *EcoRI*、*XhoI* クローニングサイトに 788 bp の KmARS7 配列が挿入されていた。

KmARS7 領域解析には、pRS316KmARS7 をテンプレートとしフォワードプライマーに pRS316URA3+300 を使用し、KmARS7+100c、KmARS7+200c、KmARS7+220c、KmARS7+240c、KmARS7+260c、KmARS7+280c、KmARS7+300c、KmARS7+400c、KmARS7+500c、KmARS7+600c、KmARS7+700c、KmARS7+790c を用いて KmARS7 配列をそれぞれ削除した。同様に、逆方向からの削除には pRS316URA3+901c をフォワードプライマーとして、KmARS7+1、KmARS7+201、KmARS7+211、KmARS7+221、

KmARS7+231、KmARS7+241、KmARS7+251、KmARS7+261、KmARS7+401、KmARS7+601 を用いて KmARS7 配列の削除をそれぞれ行った。増幅した PCR 産物を RAK3605 へ形質転換した。KmARS7 最小配列の評価には、まず1回目の PCR として pRS316KmARS7 をテンプレートとし、15C-pRS316URA3-226 と pRS316URA3+901c のプライマーを使用し PCR を行った。この PCR 産物には 5'配列に 15C (5'-cccccccccccccc-3') があり、これをテンプレートとして使用し2回目の PCR を行った。2回目の PCR にはプライマー-KmARS7(201-260)10C、KmARS7(211-260)10C、KmARS7(221-260)10C、を使用した。これらは 3'配列に 10C 配列 (5'-cccccccccc-3') が付加してあり、2回目の PCR による URA3 遺伝子への KmARS7 配列の付加に使用した。プライマーは pRS316URA3+901c と上記の3種のプライマーをそれぞれ用いた。PCR 産物を RAK3605 へ形質転換した。

K. marxianus で維持可能なプラスミドの構築

○pKE1

pKT127 (Sheff and Thorn, 2004) をテンプレートとして、15C-KanMX-334 と KanMX+810c のプライマーを用いて、1.1 kb の G418 耐性遺伝子 *KanMX* を増幅した。また、pRS316KmARS7 をテンプレートに用い、KmARS7+201 と 15G-pRS316-4276c のプライマーを用いて 2.8 kb の DNA を増幅した。これら2つの DNA を用いて、KanMX+810c と KmARS7+201 のプライマーを用いて、15C/15G 配列によるフュージョン PCR (Chaim *et al.*, 2009, 2012) を行った。これにより得られた 3.9 kb の PCR 産物を RAK3605 へ形質転換し、G418 耐性を持つ株を選択した。正しく導入され、環状化されていることを KanC と KmARS7+500c のプライマーを用いて確認した。酵母から取得したプラスミドを *E. coli* へ形質転換し、プラスミドを pKE1 とした。

○pKS716

KmARS7 最小配列を含む、C 末配列を削除した *KanMX* 遺伝子を、pKT127 をテンプレートとし KmARS(201-260)-KanMX-334 と KanMX+792c のプライマーを用いて PCR により増幅した。また、プラスミド pRS316KmARS7 をテンプレートに用い、KanMX+793-pRS316-4276 と AmpR+1008 をプライマーに用い PCR を行った。この PCR 産物は *KanMX* 遺伝子の削除した C 末配列を含んでいる。これらの PCR 産物を混ぜて RAK3605 へ形質転換を行い、G418 耐性を持つ株を選択した。酵母からプラスミド抽出を行い、電気泳動によりプラスミドが目的の大きさであったことを確認したものを pKS716 とした。

○pKM716

BY4704 より取得した染色体 DNA をテンプレートに用い、URA3-223 と KanMX+793-URA3+880c のプライマーで PCR を行った。また、プラスミド pKS716 をテンプレートに用い、AscSmaBam-Eori+235c と KanMX+792c のプライマーで PCR を行った。これらの

PCR 産物を混ぜて RAK3605 へ形質転換した。G418 耐性を持つ株選択し、その株から抽出したプラスミドのサイズを電気泳動により調べ、目的の位置にバンドがあったプラスミドを pKM716 とした。

○pKM001

K. marxianus セントロメア配列 (Iborra and Ball, 1994) は RAK3596 より取得した染色体 DNA をテンプレートに使用し、プライマーに CenDCDEIII-211 と BamSmaAsc-CenDCDEIII+36c を用いて PCR により増幅した。増幅したセントロメア配列を KmCenD とした。また、プラスミド pKM716 をテンプレートに使用し、プライマーに URA3-223 と AscSmaBam-Eori+235c を用いて PCR を行った。これらの PCR 産物をテンプレートに用い、URA3-223 と CenDCDEIII-211 のプライマーによりフュージョン PCR を行った。PCR 産物を RAK3605 へ形質転換し、-U 培地で選択した。酵母から取得したプラスミドを *E. coli* へ形質転換し、プラスミドを pKM001 とした。

K. marxianus プラスミドを用いた NHEJ クローニングの評価法

S. cerevisiae RAK3614 より取得した染色体 DNA をテンプレートとして、URA3+772-786-URA3-243 と KanMX+802-URA3+900c のプライマーを用いて増幅した。RAK3614 は *ura3Δ0* 領域に *ScLEU2* 遺伝子を含む株 (Fukunaga *et al.*, 2013) であるので、PCR 産物は両端に *ScURA3* と *KanMX* の C 末配列を含んでいる *ScLEU2* である。また、pKM001 をテンプレートとして、URA3+771c と KanMX+801c のプライマーを用いて PCR を行った。この PCR 産物は、ともに C 末配列を削除した *ScURA3* と *KanMX* が含まれる。これら 2 つの PCR 産物を混ぜて RAK5193 へ形質転換した。形質転換体の選択は -U 培地で行い、得られた形質転換体を G418 培地、-L 培地、5-FOA 培地に植え、それぞれの培地で増殖可能な株を数えた。Ura⁺、Leu⁺、G418⁺の株より取得した DNA を用いて、URA3+21 と KanC のプライマーにより PCR を行い正確に構築できているか調べた。

K. marxianus と *S. cerevisiae* での NHEJ 活性の比較法

K. marxianus と *S. cerevisiae* で NHEJ 活性を比較するために、いずれの酵母でも維持可能なプラスミド pRS316KmARS7 を使用した。pRS316KmARS7 を PCR により、URA3+771c と URA3+772 のプライマーで線状化した。正しく環状化した線状 DNA は *URA3* が機能し、-U 培地で Ura⁺となる株を選択することで判断できる。NHEJ を利用したプラスミドのクローニングには、pRS316KmARS7 をテンプレートとして、URA3+771c と pRS316URA3+1536 のプライマーで PCR を行い増幅した *URA3* の C 末配列を削除した線状の pRS316KmARS7 を用いた。また、*Aspergillus oryzae* の α -アミラーゼ遺伝子を *ScTDH3* プロモーターにより発現させる DNA である *ScTDH3p*-TAA は、pRS316-TAA (Hoshida *et al.*, 2013) をテンプレートとして、プライマー URA3+772786TGA+PGKterc

と ScTDH3-572 を用いて増幅した。2つの PCR 産物を、*K. marxianus* RAK3605 及び *S. cerevisiae* BY4700 に形質転換した。-U 培地上に生育した形質転換体の数により形質転換効率を評価した。

プラスミドの検出法及び保持率測定法

酵母がプラスミドを含む株か調べるために、*URA3* マーカープラスミドを保持している酵母を-U 培地で 1 日培養し、 $1/10^6$ 希釈した培養液を YPD 培地上にまきコロニーを形成させた。その後、コロニーを 5-FOA 培地にレプリカした (Boeke *et al.*, 1987)。5-FOA 培地上で増殖可能なコロニーは *ura3* 株であることより、*URA3* マーカープラスミドが抜け落ちたことを示しており、これらは自律複製プラスミドを保持していたことになる。また、5-FOA 培地で増殖できない株は、プラスミドが染色体上に挿入されたことを示している。

また、プラスミドの保持率を測定するために、YPD 培地上のコロニーを-U 培地にレプリカした。*URA3* マーカープラスミドを含む株は-U 培地上で生育可能であることより YPD 培地上のコロニー数と-U 培地上のコロニー数を比較し、プラスミドの保持率を求めた。

$$\text{プラスミド保持率 (\%)} = \text{U/Y} \times 100$$

Y : YPD 培地上のコロニー数

U : -U 培地上のコロニー数

顕微鏡観察

酵母は蛍光顕微鏡 Axio Imager. A1 (Carl Zeiss, Jena, Germany) を用いて観察し、RFP の蛍光観察の際にはフィルター (filter set 43HE) を用いて観察した。

Table 3.1 Yeast strains used in this study.

Strain name	Genotype	Reference
RAK3596	<i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU3-1042 wild type	(Limtong <i>et al.</i> , 2007)
RAK3605	<i>Kluyveromyces marxianus ura3-1</i>	(Nonklang <i>et al.</i> , 2008)
RAK3908	<i>Kluyveromyces marxianus ura3-1 ade2-1</i>	(Yarimizu <i>et al.</i> , 2013)
RAK4736	<i>Kluyveromyces marxianus ura3-1 leu2-2 ku70::ScLEU2</i>	(Nonklang <i>et al.</i> , 2008)
RAK5193	<i>Kluyveromyces marxianus ura3-1 leu2Δ1</i>	This study
BY4700	<i>Saccharomyces cerevisiae MATa ura3Δ0</i>	(Brachmann <i>et al.</i> , 1998)
BY4704	<i>Saccharomyces cerevisiae MATa ade2Δ::hisG his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63</i>	(Brachmann <i>et al.</i> , 1998)
RAK3614	<i>Saccharomyces cerevisiae MATa ade2Δ::hisG his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0::LEU2</i>	(Fukunaga <i>et al.</i> , 2013)

Table 3.2 Oligonucleotide primers used in this study.

Oligonucleotide	Sequence (5'-3')
15C-KanMX-334	ccccccccccccccccagaataccctccttgac
15C-pRS316URA3-226	ccccccccccccccagcttttcaattcaattcatcattt
15G-pRS316-4276c	ggggggggggggggggcgggaaatgtgcgcggaacct
3CG9-ADE2+1916c	cccgggcccattattccttcttctgttac
3CG9-yEmRFP+711c	cccgggcccttattatataattcatccatacca
5GCG-URA3+804c	ggggggccccgggggtagtttctgctggccgcattcttc
AmpR+1008	cgtagaaaagatcaaaggatcttct
AscSmaBam-Eori+235c	ggcgcgcccgggatccttccgcttctcgtcactg
BamSmaAsc-CenDCDEIII+36c	ggatccccggcgcgccccataaaatattttacttccgg
CenDCDEIII-211	catggcagttcaagaaaagaaaac
KanC	tgattttgatgacgagcgtaat
KanMX+792c	catcaaatgaaactgcaatttattc
KanMX+793-pRS316-4276	ctcgatgagttttctaactcagctactgacaataaaaagatgggtccgcgcacatttccc
KanMX+793-URA3+880c	ctcgatgagttttctaactcagctactgacaataaaaagatgtaataactgatataattaa
KanMX+801c	ctcatcgagcatcaaatgaaactgc
KanMX+802-URA3+900c	ttttctaaattacgaccgagattcccgg
KanMX+810c	ttagaaaaactcatcgagcatcaaa
KmARS7(201-260)10C	caagacttctgaagtgaaaaccaactttcagcttcaactaaaaatgaaaatcagtggc cccccccc
KmARS7(201-260)-KanMX-334	caagacttctgaagtgaaaaccaactttcagcttcaactaaaaatgaaaatcagtggc ccagaataccctccttgac
KmARS7(211-260)10C	tgaagtgaaaaccaactttcagcttcaactaaaaatgaaaatcagtggcccccccc
KmARS7(221-260)10C	accaactttcagcttcaactaaaaatgaaaatcagtggcccccccc
KmARS7+1	ggaattcagggatgatcttgag
KmARS7+201	caagacttctgaagtgaaaac
KmARS7+211	tgaagtgaaaaccaactttcag
KmARS7+221	accaactttcagcttcaact
KmARS7+231	agtcttcaactaaaaatgaaa
KmARS7+241	ctaaaaatgaaaatcagtggaa
KmARS7+251	aatcagtggaaagaaggtaaac
KmARS7+261	aagaaggtaaacgacttcatgt
KmARS7+401	gagatcttatattctaaaacca
KmARS7+601	tccatatagacagttcccacc
KmARS7+100c	tagcaaaaatattctgcttccgct

(Continues)

Table 3.2 (Continued)

KmARS7+200c	ttgaactaacgagatgactat
KmARS7+220c	ttcacttcaagaagtctgtt
KmARS7+240c	ttgaagactgaaagttggttt
KmARS7+260c	ccactgatttcatttttagtt
KmARS7+280c	atgaagtcgttaccttcttc
KmARS7+300c	ctattcaattcatatataacat
KmARS7+400c	cacagataataaatattggca
KmARS7+500c	gccttcacacggcaaaggtcct
KmARS7+600c	attaagtgtttagaaaaggtca
KmARS7+700c	gccgcttagagagaggctta
KmARS7+790c	ctcgagcccctagagaggctaa
pRS316URA3-300	ggtgttggcgggtgctcggggct
pRS316URA3+1563	cgactcactatagggcgaattg
pRS316URA3+901c	cggtatttcacaccgataggg
ScADE2-400	acctttgatgcggaattgactttt
ScTDH3-572	gctgtaaccgtacatgcccaaat
ScURA3+375c	caccacaccgtgtgcattcgtaatg
ScURA3+376	ggcccaggattgttagcggttga
TDH3-698	ataaaaaacacgcttttcagttcg
URA3+21	ggaacgtgctgctactcatcctagt
URA3+771c	ttcccagcctgcttttctgtaacgt
URA3+772	gcatattgagaagatgcggccagc
URA3+772786taa-3CG9	gcatattgagaagataacccgggccc
URA3+772786TGA+PGKterc	gcatattgagaagatgaaggcattaaaaggagcgaatftt
URA3+772-786-URA3-243	gcatattgagaagataactgtggttcagggtccata
URA3+880c	gtaataactgatataattaaattga
URA3-223	aagctttcaattcatcttttttttttg
URA3-290	gagaagggcaacggttcacatctc
URA3taa+774c	ttatgcttcccagcctgcttttctgta
URA3taa+777c	ttaatatgcttcccagcctgcttttctgta
URA3taa+780c	ttacaaatgcttcccagcctgcttttctgta
URA3taa+783c	ttatctcaaatatgcttcccagcctgcttttctgta
URA3taa+786c	ttatcttcaaatatgcttcccagcctgcttttctgta
URA3taa+789c	ttagcatcttcaaatatgcttcccagcctgcttttctgta
URA3taa+792c	ttagccgcatcttcaaatatgcttcccagcctgcttttctgta

3.3 実験結果

3.3.1 細胞外から導入した異なる DNA 断片間の結合

これまでの研究により、線状 DNA 断片を *K. marxianus* へ導入した際、NHEJ により染色体上へランダムに挿入されることがわかっていた (Nonklang *et al.*, 2008)。NHEJ は遺伝子修復機構のひとつで、DNA の末端同士を結合させる (Abdel-Banat *et al.*, 2010b)。そのため、導入した線状 DNA が染色体に挿入されるだけでなく、導入した DNA 同士でも末端が結合することが考えられた。組換え DNA を構築するためには、細胞に導入した DNA 断片間が結合することが必須の条件になる。これが成功すれば、NHEJ を介するので DNA 末端に相同配列などの配列を与えずに組換え DNA の構築が可能になる。そこで、導入した線状 DNA の末端同士が結合するか調べるために、*ScURA3* 遺伝子を 2 本に分断した 2 つの DNA 断片を RAK3605 へ導入し、-U 培地で選択を行うことにした (Fig. 3.1)。-U 培地で生育可能なコロニーが得られれば分断した *ScURA3* 遺伝子が結合したといえる。

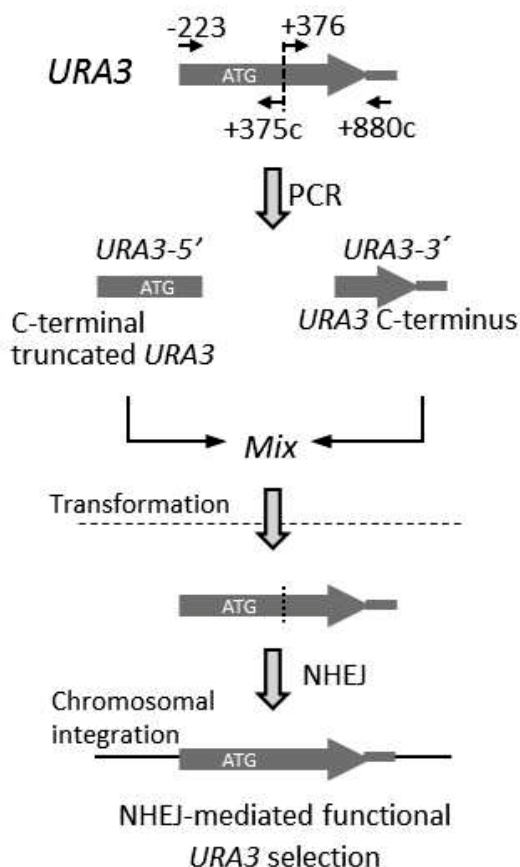


Fig. 3.1 分断した *ScURA3* 遺伝子を用いる形質転換

PCR により増幅した、分断した 2 つの *URA3* 遺伝子が細胞内で正しく結合することでマーカー遺伝子として機能し-U 培地で生育可能となる。

*K. marxianus*に分断した *ScURA3* である、*ScURA3-5'*及び *ScURA3-3'*を導入し-U 培地での選択を行った結果、分断した *ScURA3* のそれぞれ一方のみを導入した場合には形質転換体を得ることはできなかったが、両 DNA を用いた場合は、生育可能なコロニーを得ることができた (Table 3.3)。この結果は、分断した *ScURA3* が *K. marxianus* 内で結合し、マーカー遺伝子として機能したことを示している。さらに、この現象が NHEJ に依存していることを調べるために、NHEJ に必須の *Ku70* を破壊した RAK4736 を用いて実験を行った。実験の結果、プラスミドを用いた場合は RAK3605 と同様のレベルの効率で形質転換体を得られたが、分断したマーカーや線状 *URA3* 遺伝子では、コロニーを得ることができなかった。このことから、分断したマーカー遺伝子による選択は NHEJ に依存していることがわかった。また、*S. cerevisiae* は NHEJ を利用した DNA 導入に適していないことがわかった (Table 3.3)。pRS316KmARS7 は、*K. marxianus*、*S. cerevisiae* でともに機能するプラスミドである。

3.3.2 分断したマーカー遺伝子の最小化

上記の結果は単に二本の DNA が結合できるだけでなく、分断したマーカー遺伝子が正常に機能するように結合したものだけを選択できることを示している。そのため、分断したマーカー遺伝子の一方の DNA と、分断したマーカー遺伝子のもう一方を目的遺伝子と結合させた DNA とを *K. marxianus* へ導入しマーカー遺伝子による選択を行うことで、選択されたコロニーには目的遺伝子が組込まれていることになる。しかしこのためには、分断したマーカー遺伝子と目的遺伝子を結合させる必要があるが、これも一種の組換え DNA であり、従来の構築法を用いて作製したのでは意味がない。この課題は分断したマーカー遺伝子の一方を PCR のプライマーに含めることができれば、目的遺伝子の増幅と同時に、この配列を与えることで解決できると考えた (Fig. 3.2)。そこで、分断したマーカー遺伝子の最小化がどの程度可能か、*ScURA3* 遺伝子の機能する最小領域と機能しない最大領域を探索しプライマーに含むことのできる長さ (100 塩基程度) であるか検討することにした。

ScURA3 遺伝子の C 末側を順次削除し、マーカー遺伝子として機能するか調べた結果 (Table 3.4)、+786 まで削除した DNA でも *ScURA3* 全長と同程度のコロニーが得られたため、+787 から+801 までの配列は *ScURA3* が機能するためには必要がないことがわかった。さらに、+786 より短くしていくと徐々に形質転換体の数は減っていき、+771 で完全に機能していない結果となった。この結果から、*URA3* を+771 まで削除し、これに対して、+772 から+786 とストップコドンを与えれば、*URA3* 機能を回復させることができると考えられた。*ScURA3* の+772 から+786 までの配列と終止コドンは 18 塩基であるので、プライマーに持たせることが可能な長さであり、目的遺伝子を増幅するプライマーに使用すれば、*ScURA3* 遺伝子の C 末 18 塩基 (+772 から+786 と終止コドン) を含んだ遺伝子を目的遺伝子に付加することができ、N 末側の *ScURA3* 遺伝子(-223 から+771)と同時に *K. marxianus* に導入することで目的遺伝子が *ScURA3* 遺伝子とともに染色体上へ導入され、

このような細胞だけを選択できると期待できる (Fig. 3.2)。

Table 3.3 NHEJ-mediated functional *URA3* selection.

DNA introduced ^a	DNA form	Transformation efficiency ^b (colonies/μg DNA)		
		<i>K. marxianus</i>		<i>S. cerevisiae</i>
		<i>ura3-1</i> (RAK3605)	<i>ura3-1 ku70Δ</i> (RAK4736)	<i>ura3Δ0</i> (BY4700)
pRS316KmARS7	Circular plasmid	6.3×10^4	7.4×10^4	8.1×10^4
Sc <i>URA3</i>	Linear DNA fragment	8.4×10^3	0	0
Sc <i>URA3</i> -5' and Sc <i>URA3</i> -3'	Two linear DNA fragments	1.4×10^3	0	0

^a100 ng of each DNA fragment was used for transformation.

^bAverage of three experiments were shown.

Table 3.4 Sequential *URA3* C-terminal deletion for determination of functional boundary sites.

Deletion fragment ^a	Nucleotide position from A (+1) of the start codon and encoding amino acids												Number of colonies of three experiments				
	W	E	A	Y	L	R	R	C	G	Q	Q	N					
	768	771	774	777	780	783	786	789	792	795	798	801					
+801(Full)	tgg	gaa	gca	tat	ttg	aga	aga	tgc	ggc	cag	caa	aac	<i>TAA</i>	285,	180,	137	
+792	tgg	gaa	gca	tat	ttg	aga	aga	tgc	ggc	<i>TAA</i>				346,	266,	244	
+789	tgg	gaa	gca	tat	ttg	aga	aga	tgc	<i>TAA</i>					329,	210,	232	
+786	tgg	gaa	gca	tat	ttg	aga	aga	<i>TAA</i>						283,	232,	272	
+783	tgg	gaa	gca	tat	ttg	aga	<i>TAA</i>							39,	23,	33	
+780	tgg	gaa	gca	tat	ttg	<i>TAA</i>								3,	10,	10	
+777	tgg	gaa	gca	tat	<i>TAA</i>									0,	3,	1	
+774	tgg	gaa	gca	<i>TAA</i>										1,	0,	1	
+771	tgg	gaa												0,	0,	0	

^aEach C-terminal truncated fragment had a stop codon with the exception of +771.

Table 3.5 Maximum length of non-functional selection marker and minimum C-terminal sequence of marker genes for functional marker selection.

Marker gene	Last position of native CDS	Last position of maximum non-functional CDS	Last position of minimum functional CDS	Minimum nucleotide sequence and length for functional recovery	
				Nucleotide sequence (Encoding amino acid sequence)	length
<i>ScURA3</i>	+801	+771	+786	GCA TAT TTG AGA AGA-stop (A Y L R R)	18
<i>KanMX</i>	+807	+801	+807	TTT TTC-stop (F F)	9
<i>ScLEU2</i>	+1092	+1065	+1086	GCC GAA GAA GTT AAG AAA ATC-stop (A E E V K K I)	24
<i>ScHIS3</i>	+660	+646	+660	AA GGT GTT CTT ATG-stop G V L M	17

CDS, coding sequence

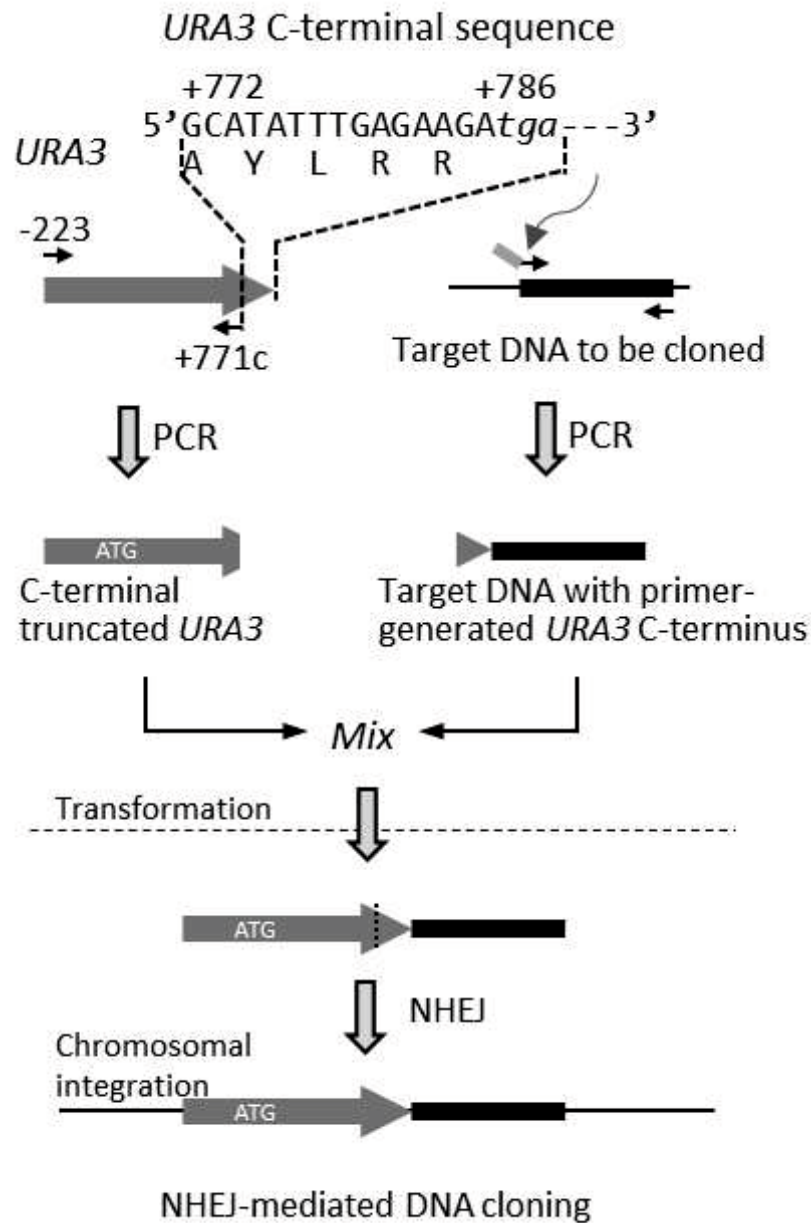


Fig. 3.2 *ScURA3* 遺伝子の C 末配列を含む遺伝子のクローニング
URA3 の C 末配列は 5 アミノ酸 (AYLRR) のみの短い配列で機能が回復するためプライマーに含めることが可能である。C 末配列を削除した *URA3* 遺伝子と削除した C 末配列を含むプライマーで増幅した目的遺伝子を混ぜて *K. marxianus* へ形質転換することで正しく結合した DNA を含む株は Ura⁺となる。

また、*KanMX*、*ScLEU2*、*ScHIS3* 遺伝子に対しても *ScURA3* の場合と同様に C 末側の削除を行った。その結果を Table 3.5 に示す。いずれの遺伝子でも、プライマーに含めるの

に十分短い配列であった。

3.3.3 NHEJ を利用したマーカー遺伝子の分断によるクローニング法の検討

3.3.2 の結果から *ScURA3*+771 の機能を回復するための最小 C 末配列は 18 塩基と考えられ、この 18 塩基はプライマーに持たせることが可能な長さであった。この位置の分断で、目的遺伝子が *K. marxianus* の染色体上に組込まれたものを選択可能かどうか検討するために、*ScADE2* 遺伝子と *yEmRFP* 遺伝子を用いて以下のように実験を行った。

*ade2*株である RAK3908 は赤色を示すが、*ade2* 遺伝子が相補された場合白色に戻ることが知られている (Ugolini and Bruschi, 1996; Zimmermann, 1975)。*ScADE2* 遺伝子を PCR で増幅した後、*ScURA3* の +772 から +786TAA を与え、この DNA と *ScURA3*+771 とを同時に *K. marxianus* に導入しウラシル欠損培地で選択した。その結果、552 コロニーが得られ、そのうち 542 コロニーが白色を示した。この結果より *URA3* で選択した 99% のコロニーで *ScADE2* が導入されている結果となった (Fig. 3.3)。また、*yEmRFP* を導入した場合は、233 コロニーが得られ、そのうち 12 コロニーを蛍光観察した結果すべてのコロニーで赤色蛍光を示した (Fig. 3.3)。以上の結果より、*URA3* の C 末配列を 30 塩基削除し、これに +772 から +786 と終止コドンの 18 塩基を与えることで、目的遺伝子が導入された株を正確に選択できることがわかった。

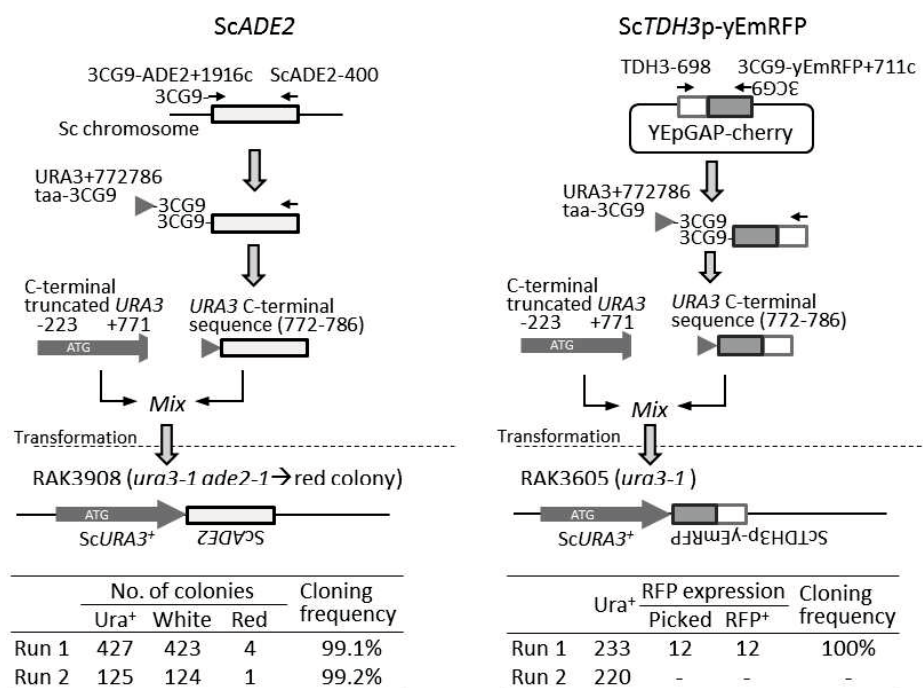


Fig. 3.3 *ScADE2* 及び *yEmRFP* を用いた導入効率の検討
ScADE2 及び *yEmRFP* を目的遺伝子として *URA3*+772 から+786TAAの配列を付加し、*URA3*+771 までの DNA と混ぜて *K. marxianus* へ形質転換した。*ScADE2* の場合はコロニーの色で、*yEmRFP* の場合は RFP の蛍光観察からそれぞれの目的遺伝子が導入されたか判断した。

3.3.4 NHEJ クローニング法を利用したプラスミドの構築

分断したマーカー遺伝子と NHEJ を利用して、目的遺伝子を *K. marxianus* に導入することが可能なことがわかった。しかし、組換え DNA の本質である異なる 2 つの DNA 断片を結合させる方法が必要である。そこで、線状 DNA の両端の結合による環状化を利用できないかと考えた。マーカー遺伝子配列間の結合に続いて（実際には順序は関係ない）、できた一本の DNA の両末端が結合すれば、そこに位置する DNA 間を結合、つまり組換え DNA を構築できると考えられる (Fig. 3.4)。そこで、まずはプラスミドに必要な要素である自律複製配列 (ARS) の単離を行うことにした。

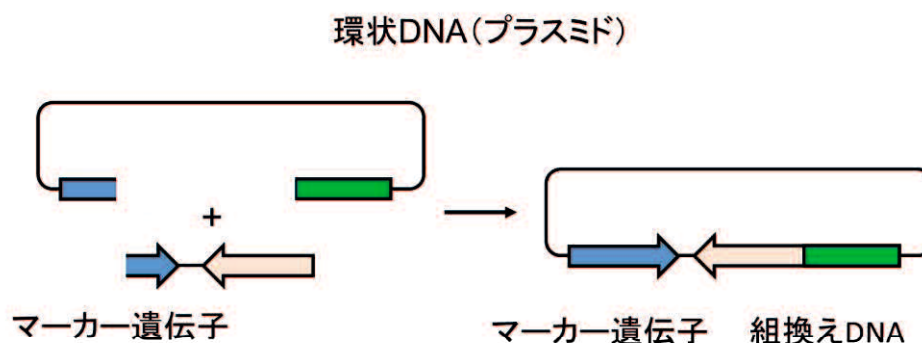


Fig. 3.4 環状 DNA を用いた組換え DNA 構築

マーカー遺伝子とは異なる 2 つの DNA を結合させるには環状 DNA (プラスミド) を用いることで可能となる。

3.3.4.1 *K. marxianus* 内で機能する自律複製配列の単離

プラスミドが細胞内で複製され、次世代の細胞に伝達・維持されるためには ARS 配列が必要である。*S. cerevisiae* の ARS 配列 (ARS4) を含むプラスミド pRS316 は、*K. marxianus* 内で機能しないことがわかっていた (Nonklang *et al.*, 2008)。そこで、pRS316 をもとに作られた *K. marxianus* の染色体ライブラリーから KmARS 領域を含むプラスミドを選出した。これらの中には、ライブラリープラスミドが切れ、*K. marxianus* の染色体上に挿入されたものも含まれる可能性がある。プラスミドとして維持されている場合は、細胞の増殖過程でプラスミドの抜け落ちが生じる。そのため、*URA3* 遺伝子をマーカーとして 5-FOA 培地を用いて選択することが可能である。染色体上に組み込まれた場合では、5-FOA 培地上で生育することは不可能であるが、プラスミドとして保持している場合、保持しているプラスミドが抜け落ちたものが 5-FOA 培地上で生育してくる (Boeke *et al.*, 1987; Foureau *et al.*, 2013)。実際に 5-FOA 培地で選択した結果、5-FOA 培地上で生育可能なコロニーが得られた。その中の一つのプラスミドを pRS316KmARS7 と名付け、このプラスミドに含まれる *K. marxianus* の染色体領域 788 bp を KmARS7 と名付けた。

3.3.4.2 KmARS7 最小配列の決定と解析

線状 DNA は NHEJ により末端同士が結合し、細胞内で環状化することが知られている (Foureau *et al.*, 2013)。このとき、ARS 配列を含む線状 DNA は、ARS 配列を持たないものより形質転換効率が上昇することが知られている (Foureau *et al.*, 2013)。これらを利用し KmARS 配列の解析を行うことにした。

KmARS7 配列の中で ARS 配列として機能する最小の領域を決定するために、pRS316KmARS7 から *URA3* 配列を含む形で KmARS7 配列を上流及び下流から削除した DNA 断片を PCR で増幅し *K. marxianus* に導入し、形質転換効率を指標とし KmARS として機能する領域の探索を行った。その結果、下流からの削除で 1~260 の領域、上流から

では 211~788 の領域で KmARS として機能している結果となった (Fig. 3.5)。

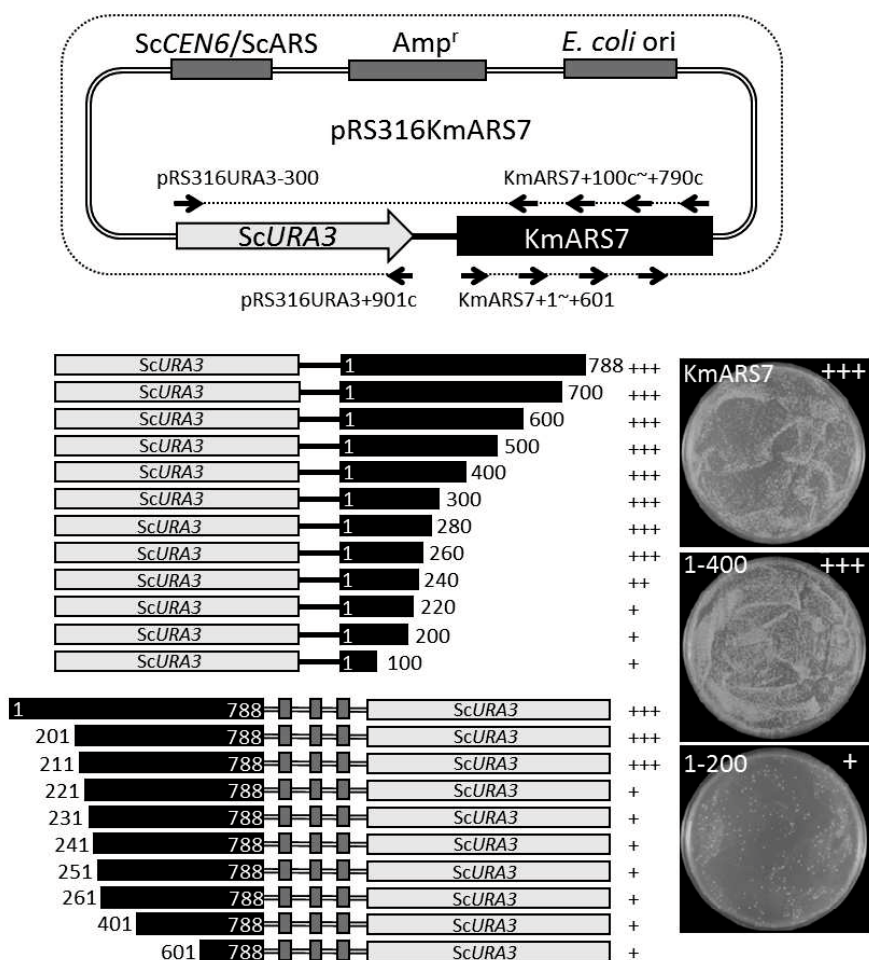


Fig. 3.5 KmARS7 配列の段階的削除による機能領域の検討
 pRS316KmARS7 より KmARS7 の配列を含む *URA3* を増幅した。図の上部の矢印は使用したプライマーの位置を表す。図の下部の+は形質転換効率を表している (+:低い、+++ :高い)。形質転換効率を指標として KmARS7 の機能領域を決定した。

両方向からの削除解析の結果、201-260 の領域内に ARS 配列が含まれると予測された。そこで、201-260, 211-260, 221-260 の領域を、*URA3* 遺伝子を増幅するプライマーに含めて設計しこれを用いて *URA3* 遺伝子を増幅した。増幅した DNA を *K. marxianus* に導入した結果、201-260 を持たせたときが最も多くの形質転換体を得られ、配列を短くするごとに得られる形質転換体は少なくなった (Fig. 3.6)。

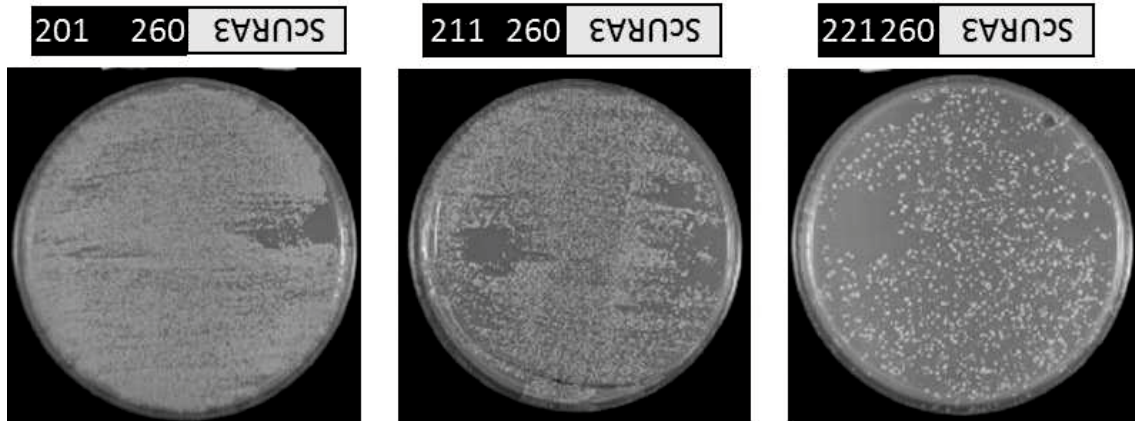


Fig. 3.6 KmARS7 最小配列の検討

PCRにより KmARS7 領域を含む *URA3*を増幅し、*K. marxianus*へ形質転換した。配列を短くするごとに得られる形質転換体は少なくなった。

この結果より、最小の KmARS7 配列は 201-260 の 60 bp とした (Fig. 3.7)。この配列は 60 bp と十分短いので、目的遺伝子を増幅するプライマーに含めることも可能である。得られた 60 bp の配列の中で、210-221, 239-226 の相補鎖, 241-253 ではよく似た配列であった (Fig. 3.7)。

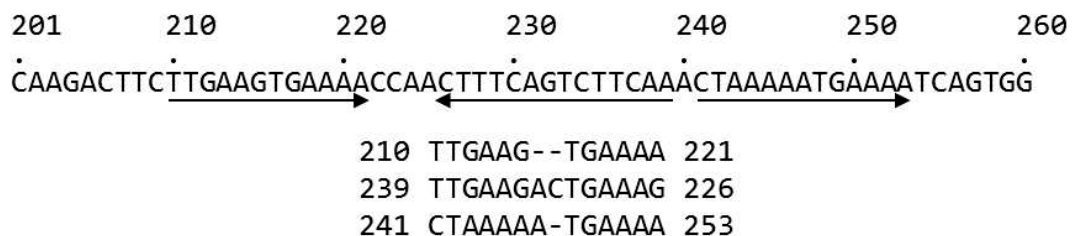


Fig. 3.7 KmARS7 最小配列とそれにみられる類似配列

201-260, 211-260, 221-260 の中で最も高い形質転換効率を示した 201-260 を KmARS7 最小配列として決定した。210-221, 239-226 の相補鎖, 241-253 ではよく似た配列であった。矢印は類似配列の位置を表している。

KmARS 配列が単離できたので、次に NHEJ を利用してプラスミド構築が可能であるか検討しながら、*K. marxianus*での組換え DNA 構築に適したプラスミドを構築することにした。

○プラスミド pKE1

K. marxianus 内で、NHEJ を利用した組換え DNA 構築法を用いたプラスミド構築が可能であるか検討した。

KanMX は酵母に G418 耐性を与える薬剤耐性遺伝子である。*K. marxianus* で *KanMX* と G418 を用いた選択を行うためには、*K. marxianus* の G418 耐性を知る必要がある。そこで、これを調べるために、RAK3605 を用いスポット試験を行った。その結果、RAK3605 は 200 $\mu\text{g/ml}$ G418 培地で生育不可能であることがわかった (Fig. 3.8)。

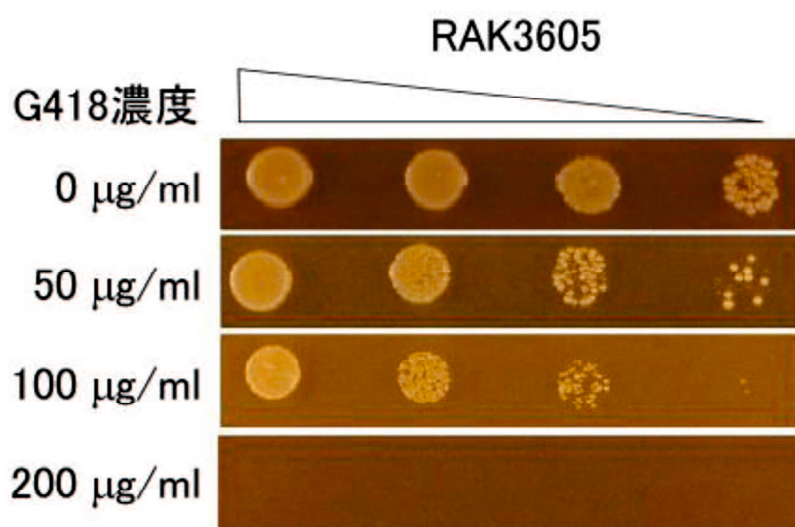


Fig. 3.8 *K. marxianus* (RAK3605) を用いた G418 耐性試験
YPD 培地で培養した *K. marxianus* (RAK3605) を 0~200 $\mu\text{g/ml}$ G418 培地へスポットし、28 $^{\circ}\text{C}$ で3日培養した。右側へ行くごとに 1/10 希釈している。

プラスミド pKT127 より 15C-*KanMX* を増幅した。また、プラスミド pRS316KmARS7 より 15G 配列が付加した DNA を増幅した。2つの PCR 産物をフュージョン PCR により結合させた。この DNA は *KanMX*、大腸菌の複製起点である *E. coli ori*、大腸菌でのマーカー遺伝子である Ampicillin 耐性遺伝子 *Amp^R*、*K. marxianus* での複製起点である KmARS7(201-788)が含まれている。フュージョン PCR により作製した PCR 産物を RAK3605 へ導入し、200 $\mu\text{g/ml}$ G418 培地で選択した。得られた形質転換体 12 株から DNA を抽出し、KanC と KmARS7+500c をプライマーに用い PCR を行った。KanC と KmARS7+500c を用いて PCR を行うと、環状化している場合はバンドが現れるが、環状化していない場合はバンドが現れない (Fig. 3.9)。このため PCR によりプラスミドを保持しているか調べることができる。

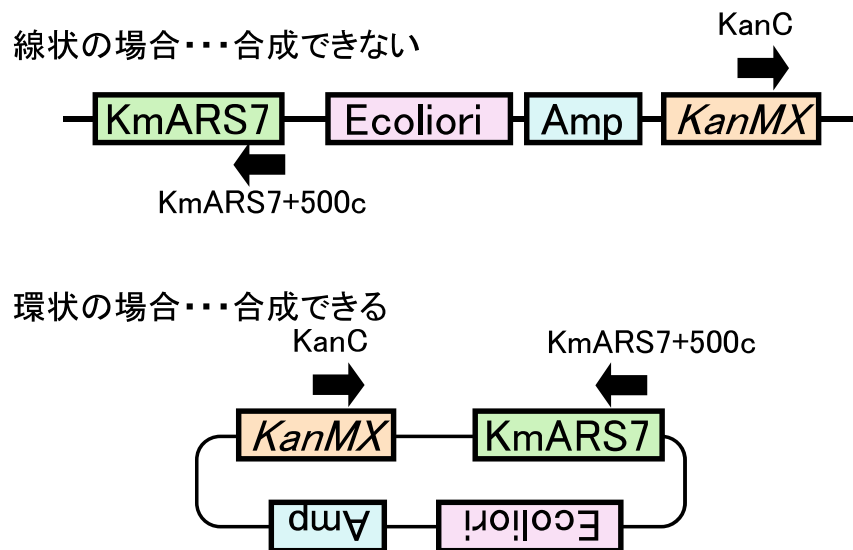


Fig. 3.9 PCR を用いたプラスミドのチェック法

環状化した場合は、KanC と KmARS7+500c のプライマーを用い PCR を行うことでバンドができる。このことより導入した DNA が環状化しているか判断できる。

PCR の結果、12 株中 11 株でバンドが現れた (Fig. 3.10)。この結果は、KmARS7 を含む線状 DNA は 90%程度で環状化しており、*K. marxianus* 内でプラスミドが構築できることを示している。形質転換体酵母 #3 由来のプラスミドを pKE1 (Fig. 3.11) とした。

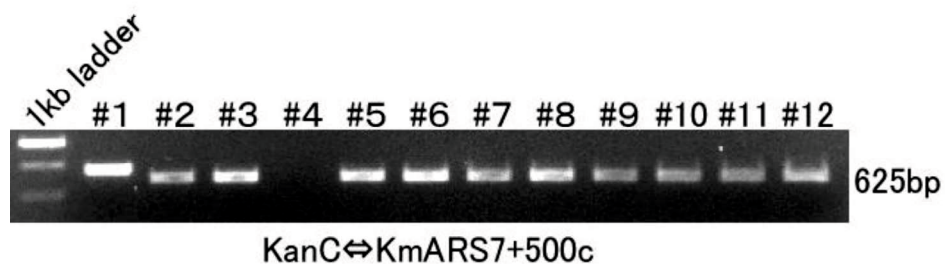


Fig. 3.10 NHEJ クローニング法を用いたプラスミド構築結果
#4 を除く 11 株でバンドができたことより、これらの株は環状 DNA を保持している。

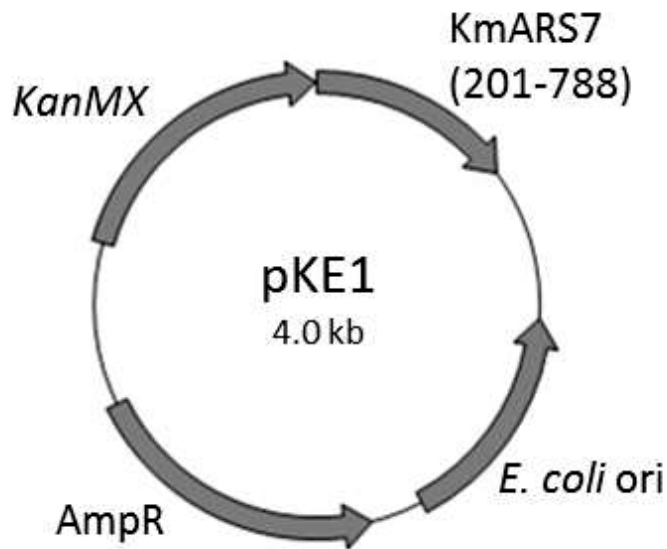


Fig. 3.11 プラスミド pKE1

プラスミド pKE1 は KmARS7 と *E. coli* ori を含むため、*K. marxianus* と *E. coli* で操作可能である。

G418 はアミノグリコシド系抗生物質で、同じアミノグリコシド系抗生物質の 1 つに Kanamycin がある。Kanamycin は大腸菌を選択する薬剤培地に用いられる。*KanMX* 遺伝子は酵母で用いられる耐性遺伝子であるが、大腸菌でも機能できるかを、*KanMX* 遺伝子が大腸菌へ導入しマーカー遺伝子として使用できるか調べることにした。

プラスミド pKE1 を *E. coli* へ形質転換し、Ampicillin 培地及び Kanamycin 培地にまいた。また、この際プラスミドを導入していない *E. coli* も同様に Ampicillin 培地及び Kanamycin 培地へまいた。37°C で 18 時間培養した結果、Ampicillin 培地、Kanamycin 培地どちらも、プラスミドを導入していない *E. coli* をまいたプレートではコロニーが得られず、プラスミドを導入した *E. coli* をまいたプレートではコロニーを得ることができた (Fig. 3.12)。この結果は *KanMX* 遺伝子が *E. coli* でもマーカー遺伝子として扱えることを示している。

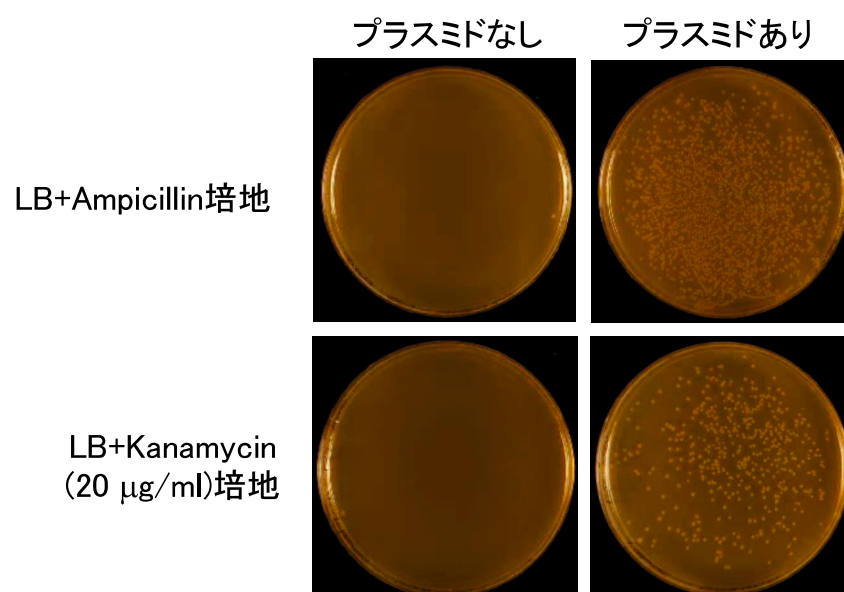


Fig. 3.12 プラスミド pKE1 の大腸菌への形質転換結果
 左側はプラスミドを導入していない *E. coli*、右側はプラスミド pKE1 を導入した *E. coli* をまいた培地である。Kanamycin 培地でも Ampicillin 培地と同様に形質転換体の選択ができています。

KanMX 遺伝子が大腸菌でマーカー遺伝子として使用できたことから、酵母と大腸菌のマーカー遺伝子を分けて用意しておく必要がなくなった。

○プラスミド pKS716

pKE1 が構築できたことにより、*K. marxianus* 内でプラスミド構築が可能であることがわかった。次に、NHEJ を利用したマーカー遺伝子の分断による組換え DNA 構築法を、プラスミドを用いて可能かどうか検討した。マーカー遺伝子の分断による組換え DNA 構築法を Fig. 3.13 に示す。この方法を適応できれば、組換えプラスミドを構築することが可能となり、プロモーターを変えたい場合や融合タンパク質を構築することが可能となる。

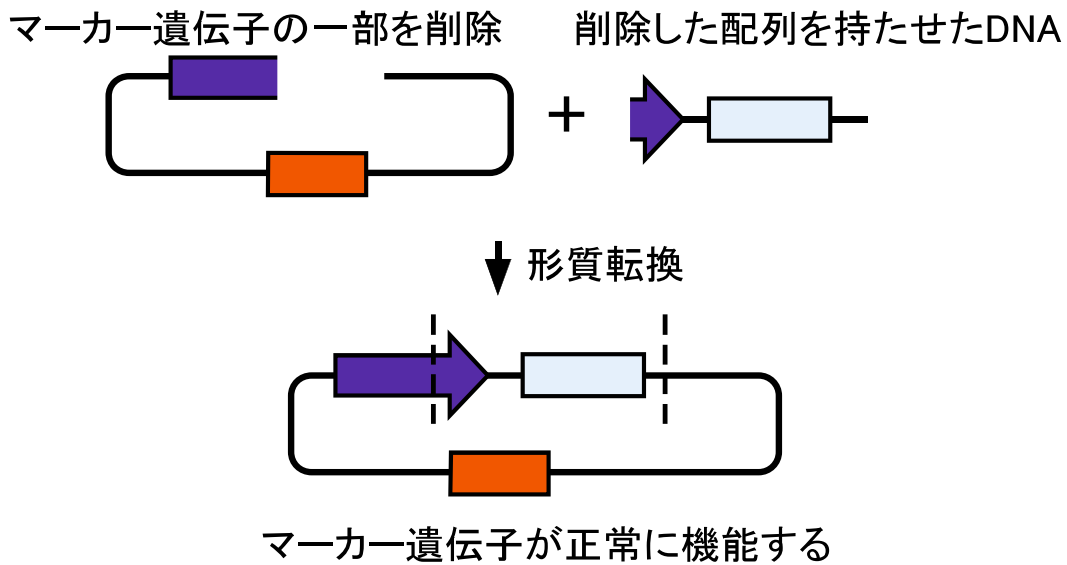


Fig. 3.13 マーカー遺伝子の分断による選択を用いたプラスミド構築
マーカー遺伝子の分断による選択をプラスミドに応用することで容易に
組換えプラスミドが構築できる。

プラスミド pKT127 をテンプレートに用い、KmARS7(201-260)-KanMX-334 と KanMX+792c のプライマーを用いて PCR を行い、得られた PCR 産物を fragment 1 とした。この fragment 1 は *KanMX* 遺伝子を、開始コドンから数えて 792 番目までの塩基を含んでいる。また、プラスミド pRS316KmARS7 をテンプレートに用い、KanMX+793-pRS316-4276 と AmpR+1008 をプライマーに用い PCR を行い、得られた PCR 産物を fragment 2 とした。この fragment 2 は *KanMX* 遺伝子の、開始コドンから数えて 793 番目以降の塩基を含んでいる。Fragment 1 のみの場合、fragment 2 のみの場合、fragment 1 と fragment 2 を混ぜた場合の 3 パターンを RAK3605 へ形質転換を行った。それぞれを 200 $\mu\text{g/ml}$ G418 培地で選択した。その結果、fragment 1 と fragment 2 を混ぜて形質転換を行った場合のプレートのみ G418 選択条件でコロニーを得ることができた (Fig. 3.14)。この結果は分断した *KanMX* 遺伝子が *K. marxianus* 内で機能するように結合したことを示している。プラスミド抽出を行い、電気泳動によりプラスミドが目的の大きさであったことを確認したものを pKS716 (Fig. 3.15) とした。

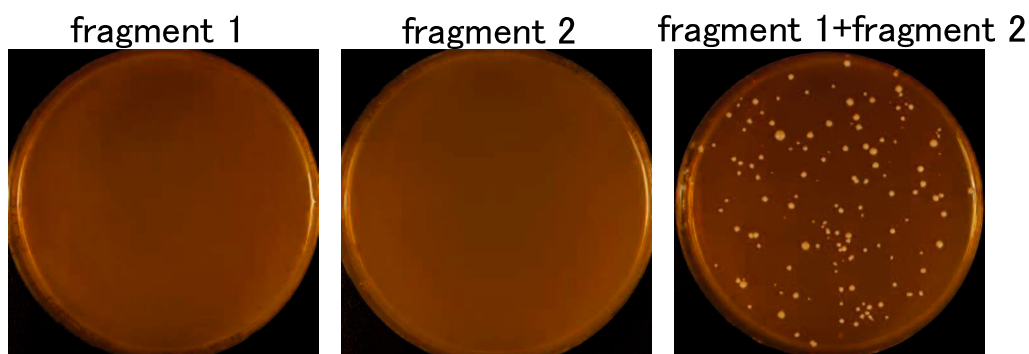


Fig. 3.14 マーカー遺伝子の分断による選択法を用いたプラスミド構築の形質転換
 左は fragment 1 のみ、中は fragment 2 のみ、右は fragment 1 と fragment 2 を混ぜて形質転換した場合の形質転換結果。

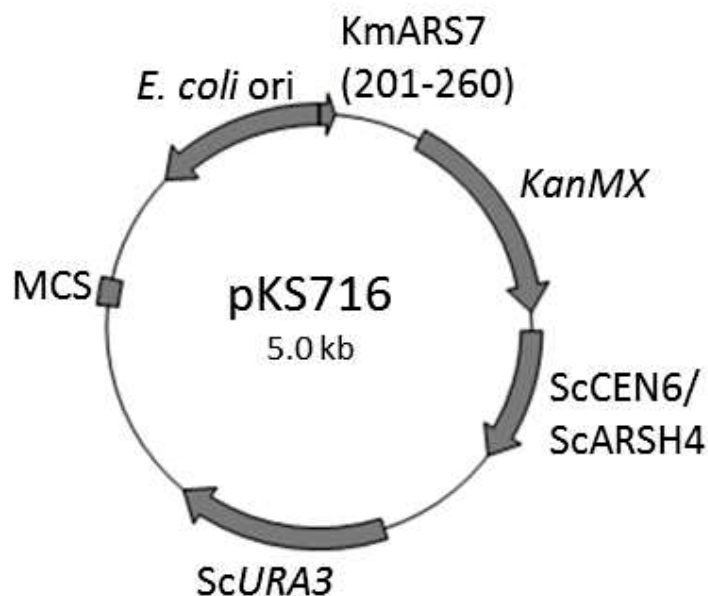


Fig. 3.15 プラスミド pKS716

プラスミド pKS716 は KmARS7 と *E. coli* ori、ScCEN6/ScARSH4 を含むため、*K. marxianus* と *E. coli*、*S. cerevisiae* で操作可能である。

上記の結果より、NHEJ を利用したマーカー遺伝子の分断による選択法をプラスミド構築に利用することが可能であった。

○プラスミド pKM716

NHEJ を利用したマーカー遺伝子の分断による選択法がプラスミド構築にも有効であることがわかった。しかし、選択を与えていない末端同士の結合は塩基の挿入や欠失がなく正

確に結合しているかはわからない。もし、塩基の挿入や欠失が起こってしまうと、融合タンパク質を構築する場合などにフレームがずれてしまい目的のタンパク質が構築できない恐れがある。これを検討するために、マーカー遺伝子の向かい合ったプラスミドの構築を行うことにした。マーカー遺伝子を向かい合わせることで、選択を与えていない末端の結合率を調べることが可能となる。

BY4704 より増幅した *KanMX* の C 末配列を含む *URA3* とプラスミド pKS716 より増幅した C 末配列を削除した *KanMX* を含む DNA を混ぜて *K. marxianus* へ形質転換し 200 $\mu\text{g/ml}$ G418 培地で選択を行った。得られた形質転換体から 12 株を選びプラスミドを抽出した。その結果 14 種のプラスミドを取得し、抽出したプラスミドのサイズを電気泳動により調べたところ目的の位置にバンドがあったプラスミドは 14 種中 11 種であった (Fig. 3.16)。

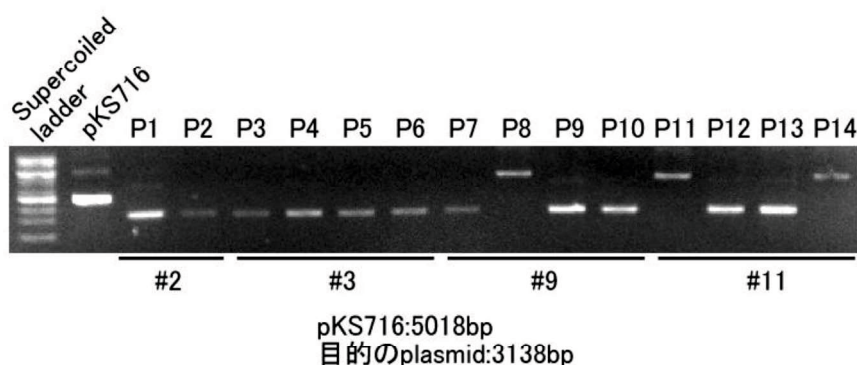


Fig. 3.16 抽出したプラスミドの大きさの確認

#2、3、9、11 はプラスミドを抽出した酵母を表している。P1~P14 は酵母から抽出したプラスミドを表している。形質転換体酵母 12 種からプラスミド抽出を行った結果、4 つの酵母からプラスミドが 14 種取得でき、そのうち 11 種が目的の大きさであった。

目的の位置にバンドがあったプラスミド 11 種の中から、P1、P9 の 2 種を選び、RAK3605 へ形質転換し、-U 培地、200 $\mu\text{g/ml}$ G418 培地で選択可能であるか調べた。それぞれの培地にまいた後、28°C で 3 日静置培養を行ったところ、P1、P9 ともに -U 培地及び 200 $\mu\text{g/ml}$ G418 培地で選択することが可能であった (data not shown)。P1 を pKM716 (Fig. 3.17) として保存した。これにより、マーカー遺伝子の向かい合ったプラスミド pKM716 を構築することができた。

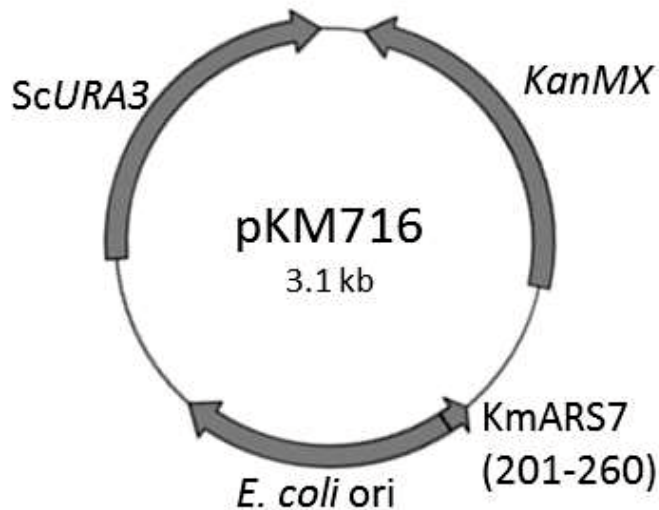


Fig. 3.17 プラスミド pKM716

プラスミド pKM716 は KmARS7 と *E. coli ori* を含むため、*K. marxianus* と *E. coli* で操作可能である。また、ScURA3 と KanMX が向かい合った構造を持つ。

○プラスミド pKM001

S. cerevisiae のセントロメア配列は、*S. cerevisiae* 内でプラスミドの安定性を向上させることがこれまでにわかっていた (Hsiao and Carbon, 1981)。さらに、*K. marxianus* のセントロメア配列はこれまでに同定されていた (Iborra and Ball, 1994)。そこで、*K. marxianus* でもプラスミドの安定性を向上できるかを、*K. marxianus* のセントロメア配列 (KmCenD) を含むプラスミドを構築し検討した。

RAK3596 より制限酵素サイト配列 (5'-ggatccggggcgccc-3') を含む KmCenD 配列を増幅した。また、pKM716 より制限酵素サイト配列の相補鎖を含む DNA を増幅した。2 つの PCR 産物をフュージョン PCR により結合させ、得られた PCR 産物を RAK3605 へ形質転換した。形質転換体より抽出したプラスミドの大きさ及び制限酵素による切断を調べ正確に構築できたプラスミドを pKM001 とした (Fig. 3.18)。

pKM716 と pKM001 の保持率を調べるために、これらのプラスミドが導入されている酵母を YPD 及び-U 培地で培養し、YPD 培地上のコロニー数と、-U 培地上のコロニー数からどの程度の株でプラスミドを維持しているか比較した。pKM716、pKM001 とともに RAK3605 へ形質転換を行い-U 培地で選択した。得られた形質転換体から 3 株ずつ選び、

保持率の測定に用いた。測定の結果、pKM001の保持率の平均は54.3%、pKM716の保持率の平均は28.7%であり、KmCenD配列を用いることでプラスミドの保持率が上昇している結果となった。

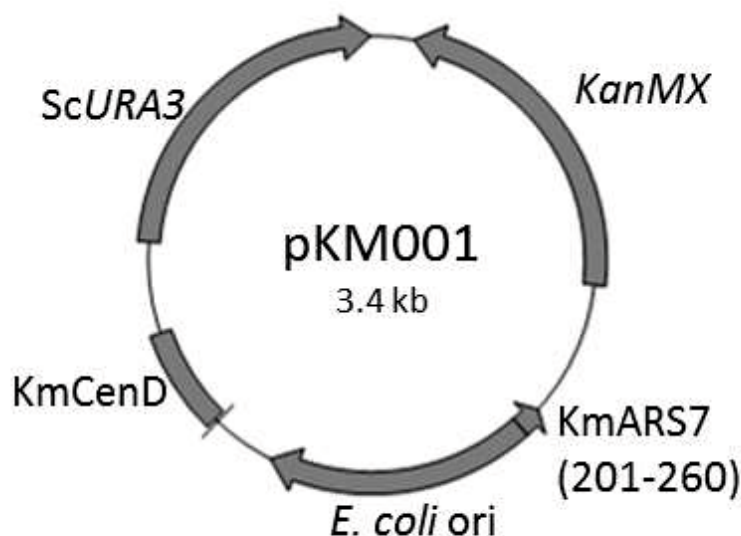


Fig. 3.18 プラスミド pKM001

プラスミド pKM001はプラスミド pKM716に KmCenD 配列を加えた構造をとる。

3.3.5 プラスミド pKM001 を利用したクローニングの評価

pKM001 を用いたクローニングの概念図を Fig. 3.19 に示す。まずは pKM001 より ScURA3+771c と KanMX+801c のプライマーで両マーカー遺伝子とも機能しない領域まで削除する様に増幅した DNA と、導入遺伝子をそれぞれのマーカー遺伝子の機能を相補する配列である、ScURA3+772-786 と KanMX+802-810 の配列をそれぞれ含むプライマーで増幅した DNA を混ぜて *K. marxianus* に導入することで、組換えプラスミドの構築が可能であると考えた。*K. marxianus* に導入した際、DNA は NHEJ によりランダムに結合するが、選択培地によるマーカー遺伝子の選択を行うことで目的のプラスミドのみ選択できると期待できた。

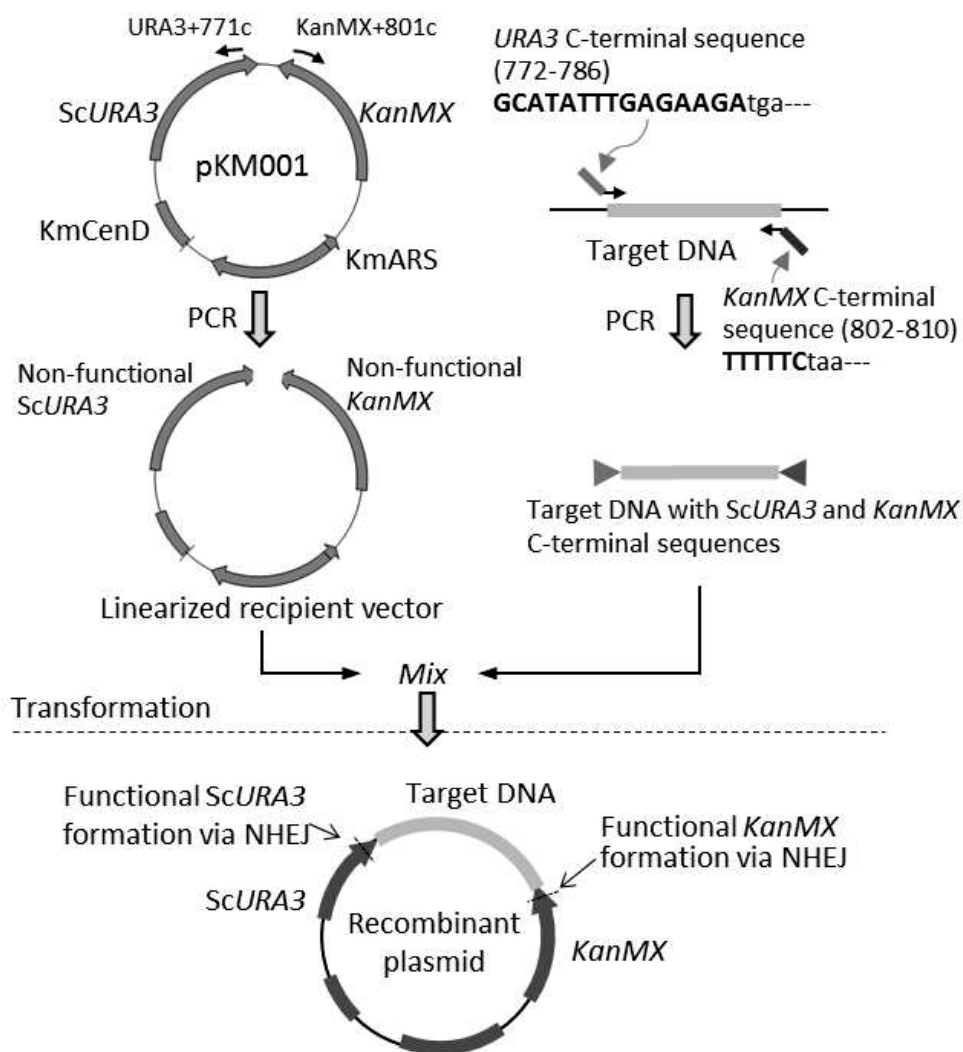


Fig. 3.19 プラスミド pKM001 を用いた組換えプラスミド構築の概念図
pKM001 より *ScURA3*, *KanMX* とともに機能しない領域まで削除する様に増幅した DNA と、導入遺伝子をそれぞれのマーカー遺伝子の機能を相補する配列をそれぞれ含むプライマーで増幅した DNA を混ぜて *K. marxianus* に導入することで組換えプラスミドの構築が可能となる。

この方法の正確さを調べるために *ScLEU2* 遺伝子を導入遺伝子に用いて実験を行った。構築の概念図を Fig. 3.20 に示す。*ScLEU2* の両端にマーカー遺伝子 (*KanMX* と *ScURA3*) の一部を持たせている DNA 断片と、プラスミド pKM001 のマーカー遺伝子 (*KanMX* と *ScURA3*) の一部を削除した DNA 断片を混ぜて RAK5193 へ形質転換し、-U 培地で選択を行った。得られた形質転換体に対し、*ScLEU2* 遺伝子が挿入されているか調べるために -L 培地へのレプリカを行った。その結果、76 株中 74 株が -L 培地で増殖可能であった (Fig. 3.20)。この結果は *ScLEU2* 遺伝子が *K. marxianus* 内に導入されたことを示している。さ

らに、G418 培地へのレプリカを行い、選択を与えていない末端がどの程度正確に結合しているのか調べた結果、76 株中 67 株で G418 培地での増殖が可能であった (Fig. 3.20)。この結果は、選択を与えていない場合でも 90% 程度のプラスミドで塩基の欠失や挿入なしに結合していることを示している。また、5-FOA 培地へのレプリカを行った結果では、76 株中 74 株が増殖可能であり、プラスミドとして細胞内に存在している事を示した。

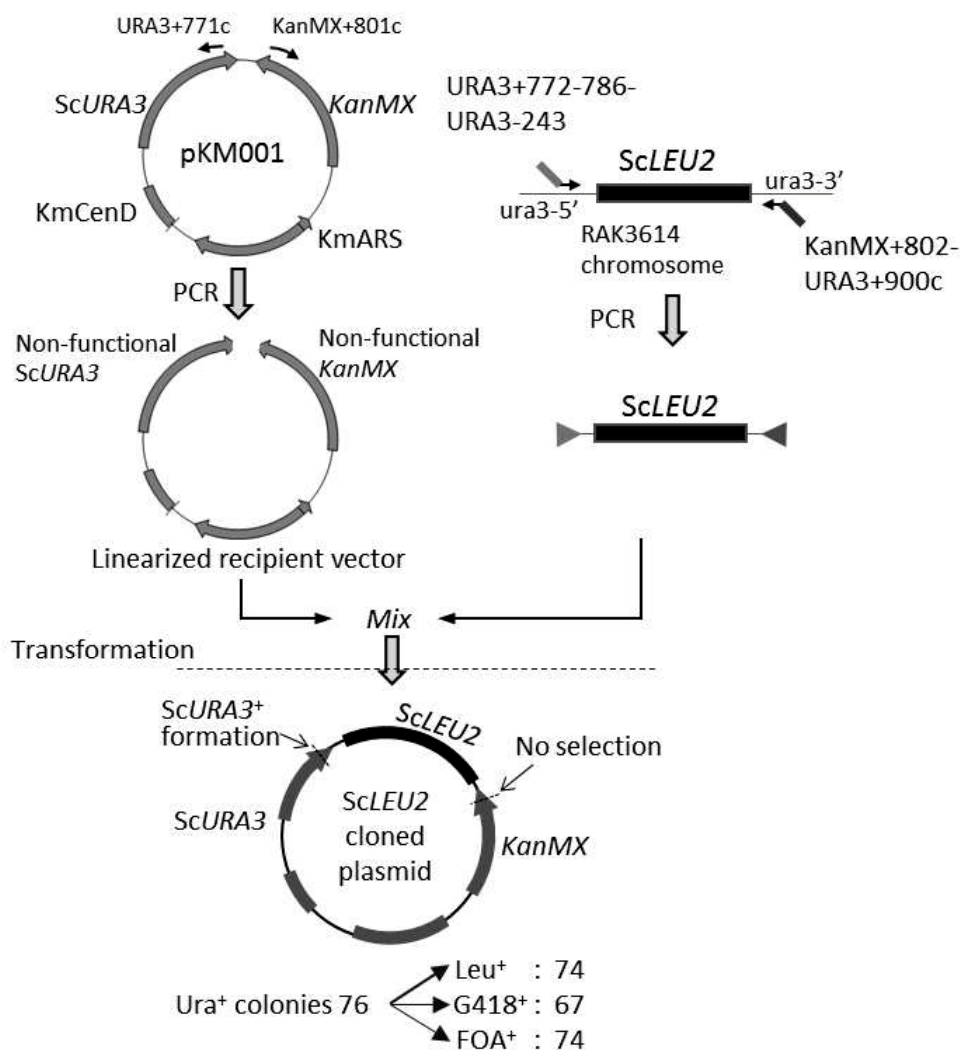


Fig. 3.20 *ScLEU2* 遺伝子を用いた組換えプラスミド構築の評価
ScLEU2 遺伝子を導入遺伝子に用いてプラスミドを構築した結果、形質
 転換体 76 株中 Leu⁺が 74 株、G418⁺が 67 株、FOA⁺が 74 株であった。

目的のプラスミドが構築できているかさらに調べるために、URA3+21 と KanC のプライマーを用いて PCR を行った。挿入 DNA である *ScLEU2* が導入できていた場合、バンドは 2.6 kb の位置にできる。PCR の結果、2.6 kb の位置にバンドができており、コントロー

ルとして用いた pKM001 よりも ScLEU2 が挿入された分だけバンドが長くなっている結果となった (Fig. 3.21)。これらの結果より、NHEJ を利用したプラスミドのクローニングが有用な手段であることが示された。

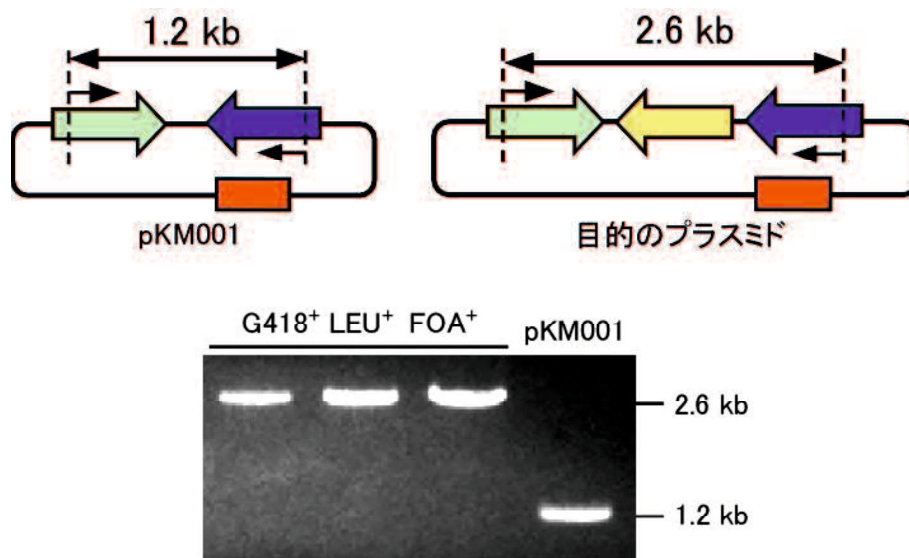


Fig. 3.21 PCR による組換えプラスミド構築の評価

URA3+21 と KanC のプライマーを用いて PCR を行った場合、pKM001 では 1.2 kbp の位置に、ScLEU2 が挿入された場合では 2.6 kbp の位置にバンドができる。

3.3.6 *K. marxianus* と *S. cerevisiae* での NHEJ を利用したクローニング法の比較

これまでの結果より、分断したマーカー遺伝子による選択と NHEJ を利用した方法が *K. marxianus* で組換え DNA 構築に有効な手段であることが示された。一方、*S. cerevisiae* でも NHEJ 機構が働くことが知られている (Moscariello *et al.*, 2010)。そこで、*K. marxianus* と *S. cerevisiae* での NHEJ を利用したクローニング法の効率を比較することにした。*K. marxianus* は RAK3605、*S. cerevisiae* は BY4700 を宿主株に使用した。プラスミド pRS316KmARS7 は、*K. marxianus* と *S. cerevisiae* でともに維持できるプラスミドである。pRS316KmARS7 をテンプレートに用い、URA3+771c と URA3+772 のプライマーで PCR を行い線状化した。プラスミドと線状化したプラスミドを *K. marxianus* と *S. cerevisiae* に導入し U 培地で選択を行った。それぞれでプラスミドを導入した効率を 100% とした際、*K. marxianus* では 13.8%、*S. cerevisiae* では 0.4% という結果となった (Table 3.6)。この結果は、*K. marxianus* の NHEJ の効率が *S. cerevisiae* と比べ約 35 倍高いことを示している。

さらに、プラスミドに DNA を導入する場合を検討するために、pRS316KmARS7 をテン

プレートに用い、URA3+771c と pRS316URA3+1563 で PCR を行い得られた DNA と、pRS316-TAA (Hoshida *et al.*, 2013) をテンプレートに用い、ScTDH3-572 と URA3+772786TGA+PGKter のプライマーで PCR を行い得られた DNA を混ぜて、*K. marxianus* と *S. cerevisiae* に導入し-U 培地で選択した。その結果、*K. marxianus* では 7.8×10^2 コロニー/ μg の効率でコロニーが得られたが、*S. cerevisiae* ではコロニーは得られなかった (Table 3.6)。この結果は NHEJ を利用した組換えプラスミド構築法は、*S. cerevisiae* では不可能なことを示している。

Table 3.6 NHEJ activity of *K. marxianus* and *S. cerevisiae*.

DNA introduced ^a	Transformation efficiency ^b (colonies/ μg DNA)	
	<i>K. marxianus</i> RAK3605	<i>S. cerevisiae</i> BY4700
pRS316KmARS7	8.0×10^4 (100%)	8.3×10^4 (100%)
linear pRS316KmARS7 cut in ScURA3	1.1×10^4 (13.8%)	3.5×10^2 (0.4%)
ScURA3-truncated vector + ScTDH3p-TAA with ScURA3 C-terminal sequence ^c	7.8×10^2	0

^a50 ng of each DNA fragment was used for transformation.

^bThe averages of three replicates are shown.

^cTransformation efficiency was calculated from total 100 ng of DNA.

3.4 考察

本研究では、*K. marxianus* の高い NHEJ 活性 (Abdel-Banat *et al.*, 2010b) を利用した新しい DNA クローニング法を開発した。NHEJ を利用したクローニング法では、正しく結合した組換え DNA の選択方法が必要になる。そのため、機能を無くすように 2 つに分断したマーカー遺伝子を用いる選択方法を確立した。さらに、自律複製する配列を組み合わせることで組換えプラスミドを構築することも可能にした。NHEJ は DNA の配列に依存せずランダムに DNA 末端を結合する機構であるため、これを利用した組換え DNA 構築法の開発はいくつかの工夫が必要であったが、開発した方法では組換え領域に特別な配列を付加する必要がない利点のある有用な方法となった。

これまでのクローニング法は、制限酵素と T4 DNA リガーゼ等によって行う方法が一般的である。T4 DNA リガーゼは、制限酵素により作られる 3'末端、5'末端の突出構造や 5'末端のリン酸化を必要とするが、NHEJ による DNA の結合は DNA リガーゼ Dnl4 によって細胞内で行われ (Chen *et al.*, 2001)、これらを必要としない。*K. marxianus* 細胞内で、NHEJ を介して直接組換え DNA を構築した場合、非特異的な DNA 結合産物も生じる。従って、目的遺伝子が導入された細胞だけを選択する方法が必要である。そのため、マーカー遺伝子の分断による選択方法を開発した。まず、マーカー遺伝子の分断による選択が可能であるか調べるために、*ScURA3* 遺伝子を N 側配列と C 側配列に分断し、*K. marxianus* に形質転換を行いウラシル欠損培地で選択を行うことで検証を行った結果、ウラシル欠損培地上で増殖可能な酵母を得ることが可能であった。この結果は、*K. marxianus* の NHEJ 活性は、細胞外から導入した異なる 2 種の DNA 断片を結合させるだけの十分な活性の高さを持つといえる。同じ操作を *S. cerevisiae* で行っても形質転換体を得られなかった。*S. cerevisiae* は相同組換え能を大きく発達させたものと考えられる。次に、マーカー遺伝子とともに目的遺伝子を細胞内に導入する方法を開発した。そこで、最小の C 末側分断配列を決定した。分断したマーカー遺伝子の機能を回復させるための、この最小の C 側配列を、目的遺伝子を増幅する際のプライマーに含めて増幅を行うことで、目的遺伝子とマーカー遺伝子の C 側配列が結合した DNA を得ることができる。機能しない箇所を切断したマーカー遺伝子の N 側配列と、目的遺伝子とマーカー遺伝子の機能が回復する C 側配列を結合した DNA 断片を混ぜて *K. marxianus* に形質転換を行うだけで、選択培地上に現れた形質転換体は目的遺伝子が正しく導入できた酵母である。この方法は、目的遺伝子が導入された酵母だけを選択可能であり、この方法を用いることで、実際に 99% の効率で *ScADE2* 遺伝子、*yEmRFP* 遺伝子の導入が可能であった。1% に満たない *Ade* 株は PCR での増幅時に非特異的に増幅された DNA によるものと考えられる。

この方法は、これまでの組換え DNA 構築法と比べ、正確な組換え DNA を高頻度で構築することが可能である。制限酵素と DNA リガーゼを用い組換えプラスミドを構築する方法では不正確に構築されたプラスミドがしばしばできてしまう。それは、ベクター上の選択マーカー遺伝子での選択を行うため、正確、不正確の見分けを選択時に行っていないからで

ある。そのため、コロニーPCR (Akada *et al.*, 2000; Ward, 1992) や、*lacZ* による選択 (Heuermann and Cosgrove, 2001) が必要となる。さらには、本研究では NHEJ を利用した方法で選択を行ったが、C 側配列に相同配列を加えることで相同組換えによる選択も可能である (data not shown)。

目的遺伝子導入細胞の選択方法に続いて、この方法を利用した組換え DNA 構築法を開発した。そのため、*K. marxianus* の自律複製配列 (ARS) を *K. marxianus* ゲノム DNA ライブラリーより単離し、その中のひとつである KmARS7 で ARS として機能する領域である 60 塩基の配列を同定した。*S. cerevisiae* と *Kluyveromyces lactis* では、11 塩基の ARS 共通配列 (ACS) が知られている (5'-(A/T)AAA(C/T)ATAAA(A/T)-3') (Dhar *et al.*, 2012; Irene *et al.*, 2004)。今回同定できた ARS 配列には、この共通配列は含まれていなかった。ライブラリーから単離されたいくつかの KmARS 配列を調べたが、共通配列は見当たらなかった (data not shown)。*Candida guilliermondii* では、*URA5* 領域内に ARS 配列が発見され、60 塩基の配列が ARS として機能する配列であることが報告されている (Foureau *et al.*, 2013)。*C. guilliermondii* の ARS 配列 60 塩基中に、*K. marxianus* の ARS 配列 60 塩基中とよく似た配列 (5'-TTGAAGTGCAAAA-3') を発見した。この配列を解析することで、ARS として必須な配列の特定に期待できる。

プラスミド DNA 上のセントロメア配列は、プラスミドの保持率を上昇させ、染色体上への組込みを抑制する効果があることが知られている (Haber *et al.*, 1984; Jager and Philippsen, 1989)。そこで、*K. marxianus* セントロメア配列 (KmCenD) を含むプラスミド (pKM001) を構築した。FOA⁺となる形質転換体が多く取得できたことから、染色体上への組込みが抑制されていた。また、実際に保持率は上昇していた。

出芽酵母 *S. cerevisiae* は、豊富な遺伝子操作技術やゲノム情報によりモデル生物として広く利用されてきた。特に *S. cerevisiae* は、高頻度の相同組換え機構により標的遺伝子組換えが優秀であり、遺伝子機能を探索する上で重要なモデル生物とされてきた (Ghaemmaghmi *et al.*, 2003; Huh *et al.*, 2003)。全遺伝子をひとつずつ破壊したセットは、*S. cerevisiae* でのゲノムワイド解析を可能とした (Kitagawa *et al.*, 2007a, 2007b; Tong *et al.*, 2001)。しかしながら、*S. cerevisiae* の特徴である高頻度の相同組換え活性は、NHEJ 活性が低いことを意味している。*S. cerevisiae* と *K. marxianus* での NHEJ 活性を評価、比較するために両方の酵母で維持可能なプラスミド pRS316KmARS7 を用いて実験を行った。プラスミド pRS316KmARS7 と線状化した pRS316KmARS7 を用いて形質転換効率の検討を行った結果、*K. marxianus* では 13.8%、*S. cerevisiae* では 0.4%の効率で、線状 DNA が NHEJ により環状化している結果となり、予想したように、*S. cerevisiae* では NHEJ 活性が低い結果となった。この著しい NHEJ 活性の違いにより、NHEJ を利用したプラスミドのクローニングは、*S. cerevisiae* では不可能である。

一般的に、NHEJ による DNA 修復は正確な結合を行う頻度が低いと報告されている (Bahmed *et al.*, 2011; Derbyshire *et al.*, 1994; Goedecke *et al.*, 1994; Gorbunova and

Levy, 1997; Lehman *et al.*, 1994)。しかしながら、*K. marxianus* では選択を与えていない末端の結合が 90%程度の正確性で行われていることが、*KanMX* 遺伝子の機能が回復したことにより推測できる。そのため、NHEJ を利用した組換え DNA 構築では、選択を与えずとも正確に目的 DNA との結合を細胞内で行うことが可能である。

3.5 結言

第三章では、従来の方法とは異なる原理での組換え DNA の構築法を開発した。耐熱性酵母 *K. marxianus* は高い非相同末端結合 (NHEJ) 活性を持つ特徴がある。この NHEJ は遺伝子修復機構のひとつで、末端配列に関係なく DNA を結合する機構である。これを利用して、*K. marxianus* 細胞内に 2 つの DNA 断片を導入し、結合させることが可能であった。しかし、NHEJ はランダムに DNA 末端を結合させる機構であるため、目的 DNA が正しく導入された細胞を選択する必要がある。そこで、分断したマーカー遺伝子を用いる選択法を開発した。この方法により、機能が失われる領域まで C 末配列を削除したマーカー遺伝子 N 末側配列の DNA 断片と、その機能が回復するために必要な C 末配列を目的遺伝子に結合させた DNA 断片とを、*K. marxianus* に導入することでマーカー遺伝子の選択を可能にした。さらに、マーカー遺伝子とは異なる 2 つの DNA の結合、つまり、組換え DNA を構築するために、*K. marxianus* の自律複製配列の単離を行い、この配列を利用し、*K. marxianus* で安定に維持されるプラスミド pKM001 を構築した。pKM001 を用いて、非選択末端での結合を評価した結果、90% の効率で正しく結合が行われていることがわかった。NHEJ を利用した組換え DNA 構築法は、PCR と形質転換のみの簡単な操作で組換え DNA を構築できることから、ゲノムワイドな遺伝子操作に有用であると考えられる。また、多くの生物が持つ非相同末端結合を利用することから、*K. marxianus* 以外の多くの生物でも利用が期待できる。

第四章

Kluyveromyces marxianus を利用した GFP 融合タンパク質の構築と解析

4.1 緒言

近年、塩基配列解析技術の発展により (Maxam and Gilbert, 1977; Sanger *et al.*, 1977)、様々な生物の全塩基配列の解読が報告されている (The yeast genome directory, 1997; International Human Genome Sequencing Consortium, 2004; The Tomato Genome Consortium, 2012)。これにより、これまでの遺伝子やタンパク質をひとつずつ扱う研究に加え、ゲノム全体を扱う研究が広く行われるようになった。ゲノム全体を扱うことで、ひとつの遺伝子に着目した場合では得ることのできない、生物全体での機能が理解できるようになる。しかし、膨大な遺伝情報が得られたとしても、それを扱うためのゲノムワイドな手法は、必ずしもすべての生物で用意されているわけではない。これまでに、マイクロアレイや遺伝子破壊株セットといったツールが発展してきた。マイクロアレイは、RNA 発現を調べるものでゲノム情報があればどの生物でも利用できる。また、遺伝子破壊は *Saccharomyces cerevisiae* が他の生物と比べ進んでいる。大腸菌や分裂酵母でも遺伝子破壊を行うことは可能であるが (Iwaki and Takegawa, 2004)、ゲノムワイドなレベルでは *S. cerevisiae* に遅れている。第三章で構築した NHEJ を利用した組換え DNA 構築法は、PCR と形質転換という簡単な操作で、細胞内で組換え DNA を構築することが可能である。このため、制限酵素とリガーゼを利用する従来の方法と比べ短時間に多数の組換え DNA を構築することができる点からゲノムワイドな研究手法に適した方法であると言える。この方法を用いて、耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* の全遺伝子を対象として網羅的な組換え DNA 構築法の有用性を検討する。

耐熱性酵母 *K. marxianus* DMKU3-1042 株の塩基配列解析の結果、8本の染色体からなる1倍体であり、4,564 遺伝子がコードされていることが判明した (星田, 2011)。これらの遺伝子に対して出芽酵母 *S. cerevisiae* との相同性からアノテーションを行い、*K. marxianus* 特異的な遺伝子に対しては、アミノ酸配列の最初の4文字と塩基配列の長さにより独自のアノテーションを行った。*K. marxianus* に対してゲノムワイドな研究手法を利用することができれば、耐熱性機構や、資化性能といった *K. marxianus* が持つ有用な機能解析がゲノムレベルで行うことが可能であり、これらのすべてが理解できると期待できる。

本研究では *K. marxianus* 全遺伝子と緑色蛍光タンパク質との網羅的な融合タンパク質の構築を検討した。GFP を用いることでタンパク質が生体内でどこに局在しているか可視化できるようになり、タンパク質の機能を知る上での手がかりとなる。また、網羅的にタンパク質局在を観察、分類することで得られるデータの解析だけにとどまらず、新たな局在配列の探索及び解析へと展開し、タンパク質局在を決定するメカニズムの詳細な解析、局在マーカーとしての利用、機能未知であるタンパク質の局在からの機能予測などに利用でき

るデータベース、研究材料として期待できる。

4.2 実験材料及び方法

使用菌株及び培地

本章で使用した酵母菌、*K. marxianus* と *S. cerevisiae* を Table 4.1 に示した。酵母の培養は、YPD 培地 (2% グルコース、2% ポリペプトン、1% 酵母エキス) または、SD 培地 (2% グルコース、0.17% YNB (US Biological, MA, USA)、0.5% ammonium sulphate) を用いて 28~30°C で行った。-U 培地は SD 培地に、ウラシルを除く必要な栄養素を加えた培地である (Ausubel *et al.*, 1999)。G418 耐性株の選択には、YPD 培地に G418 を加えた 200 µg/ml G418 培地を用いた。ウラシル要求性株の選択には、-U 培地に 50 µg/ml ウラシルと 1 mg/ml 5-FOA を加えた 5-FOA 培地を用いた (Akada *et al.*, 2006)。

DNA の調製、PCR 及び形質転換

K. marxianus 及び *S. cerevisiae* のプラスミドと染色体 DNA は、これまでに報告されている Zymolyase 100T を用いる方法 (Nonklang *et al.*, 2008) で調製した。DNA 濃度の測定には Quant-iT™ dsDNA と Qubit® を用いた (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)。PCR の酵素は、KOD FX (Toyobo, Osaka, Japan) または PrimeSTAR® GXL (Takara Bio, Otsu, Japan) を説明書に従い使用した。PCR に用いたプライマーを Table 4.2 に示した。

K. marxianus の形質転換は、Abdel-Banat らの方法を用いた (Abdel-Banat *et al.*, 2010b)。酵母を YPD 培地で培養後、50 µl の transformation buffer (40% polyethyleneglycol 3350 (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan)、0.1 M dithiothreitol (Wako, Osaka, Japan)、0.2 M 酢酸リチウム) に懸濁し 42°C に 30 分置いたのち選択培地にまいた。また、96-well を使用する場合は、Abdel-Banat らの方法で作製した *K. marxianus* コンピテントセルを 10 µl/well 入れ形質転換を行った。この方法は yEGFP (yeast-type *Aequorea victoria* green fluorescent protein) と *K. marxianus* 遺伝子との融合遺伝子を構築する際に主に使用した。

プラスミド pKM092 の構築

GFP 融合タンパク質を構築するために yEGFP と ScURA3 が向かい合った形のプラスミドを以下のように構築した。*S. cerevisiae* RAK5166 より取得した染色体 DNA をテンプレートに用い、KanMX+802-URA3-243 と URA3+772786-URA3+900c のプライマーで PCR を行った。RAK5166 は *ura3Δ0* 領域に恒常的高発現プロモーターである *TDH3* プロモーターと yEGFP、*LEU2* 遺伝子が含まれている株である。PCR 産物は *TDH3p-yEGFP-ScLEU2* の両端にマーカー遺伝子 (*KanMX* と *ScURA3*) の C 末配列が付加している。また、プラスミド pKM001 をテンプレートに用い、URA3+771c と KanMX+801c のプライマーで PCR を行った。PCR 産物はプラスミド pKM001 のマーカー遺伝子 (*KanMX* と *ScURA3*) の一部を削除してある。2つの PCR 産物を混ぜて *K. marxianus* RAK3605 へ形質転換した。G418⁺、FOA⁺の株を顕微鏡で観察し GFP の蛍光を観察できた酵母を RAK8403

とし、この株が保持しているプラスミドを pKM092 とした。

Vector DNA の増幅

pKM092 の yEGFP 遺伝子と ScURA3 遺伝子がそれぞれ機能しない領域まで削除した DNA 断片である Vector DNA の増幅は以下のように行った。RAK8403 株から取得した DNA を濃度 500 pg/μl に調製し、PCR のテンプレートに用いた。プライマーは URA3+771c、yEGFP+669c を用いた。PrimeSTAR® GXL (Takara Bio) を使用し、増幅した PCR 産物を pKM092 vector として -20°C で保存した。

K. marxianus 全遺伝子増幅用プライマーの設計

K. marxianus DMKU3-1042 株の染色体には 4564 遺伝子がコードされている。これら全ての遺伝子をそれぞれに増幅するプライマーの設計を以下のように行った。*K. marxianus* 遺伝子の CDS (coding sequence) 5'配列 25 塩基の 5'末端に GFPcM1 配列 (5'-gtcaccgctgctggatcacc-3') または、GFPcM2 配列 (5'-gtAacAgcAgcAggAatAacA-3') を遺伝子の方向により、いずれかを付加したプライマーをフォワードプライマーとして設計した。GFPcM2 配列中の大文字は GFPcM1 配列との相違箇所を示している。また、CDS 3'配列 25 塩基の 3'末端に 3CG9 配列 (5'-CCCGGGCCC-3') を付加したプライマーをリバースプライマーとして設計した。3CG9 配列は ScURA3 の C 末配列を付加するために使用した。フォワードプライマーとリバースプライマーを混ぜ、96 -well に保存したものを ORFprs001~ORFprs048 とした。

K. marxianus 遺伝子 (Insert DNA) の増幅

ORFprs001 から ORFprs048 までのプライマーセットを用いて Insert DNA を以下のように増幅した。ORFprs0NN(NN は 01~48 までの数字 : ORFprs001~ORFprs048) 1 μl を反応液に入れて最終 10 μl とした。テンプレートには RAK3596 より取得した染色体 DNA を用いた。96-well PCR プレートを用い PCR 用シールを貼り PCR を行った。1/10 に希釈し -20°C で保存した。これを KmPCR1-1NN とした (KmPCR1-101~KmPCR1-148)。KmPCR1-1NN 1 μl をテンプレートとして GFPcM1, GFPcM2 と URA3+772term3CG9 の 3 つのプライマーを混ぜて使用した。PCR 産物を GFPcMU-2NN として保存した (GFPcMU-201~GFPcMU-248)。この GFPcMU-201~GFPcMU-248 を、GFP 融合タンパク質を構築するための Insert DNA として用いた。

顕微鏡観察

酵母は蛍光顕微鏡 Axio Imager. A1 (Carl Zeiss, Jena, Germany) を用いて観察し、GFP の蛍光観察の際にはフィルター (filter set 38HE) を用いて観察した。

Table 4.1 Yeast strains used in this study.

Name	Genotype
RAK3596	<i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU3-1042
RAK3605	<i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU3-1042 <i>ura3-1</i>
RAK5166	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>MATa ade2 Δ::his Δ G his3 Δ 200 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 trp1 Δ 63 ura3::TDH3p-yEGFP-LEU2</i>
RAK8403	<i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU3-1042 pKM092
RAK9082	<i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC1777 <i>ura3⁻ ade2Δ</i>

Table 4.2 Oligonucleotide primers used in this study.

Oligonucleotide	Sequence
URA3+772786-URA3+900c	gcatattgagaagaTAAattacgaccgagattcccgg
KanMX+802-URA3-243	ttttcTAActgtggttcagggtccata
URA3+771	TTCCCAGCCTGCTTTTCTGTAACGT
KanMX+801c	ctcatcgagcatcaaatgaaactgc
GFPcM1	gtcaccgctgctggatcacc
GFPcM2	gtAacAgcAgcAggAatAacA
URA3+772term3CG9	gcatattgagaagataaaaaactgtattataagtaaagcatgtataactcacaattagagcttcaatttaatt atatcagTTACCCGGGCCC
yEGFP+669c	aaattctaacaagaccatgtggtct

4.3 実験結果

4.3.1 yEGFP 遺伝子を含むプラスミド pKM092 の構築

非相同末端結合 (NHEJ) を利用した組換え DNA 構築法を用いることで、PCR と形質転換のみの操作で *K. marxianus* 内で直接組換え DNA を構築することができる (第三章参照)。この方法を用いて GFP 融合タンパク質を構築するためには、GFP をコードする遺伝子が含まれたプラスミドをあらかじめ用意しておく必要がある。そのため、GFP 融合タンパク質の構築に用いるプラスミドの作製を行うことにした。

プラスミド pKM001 に含まれる *ScURA3* 遺伝子と *KanMX* 遺伝子が、それぞれ機能しない領域まで PCR により削除した DNA 断片と、*TDH3p*-yEGFP-*ScLEU2* 配列の両端に、削除した *ScURA3* 遺伝子と *KanMX* 遺伝子の機能が回復する配列を、PCR により結合させた DNA 断片を混ぜて *K. marxianus* に導入し、yEGFP 遺伝子を含むプラスミド pKM092 を構築した (Fig. 4.1)。

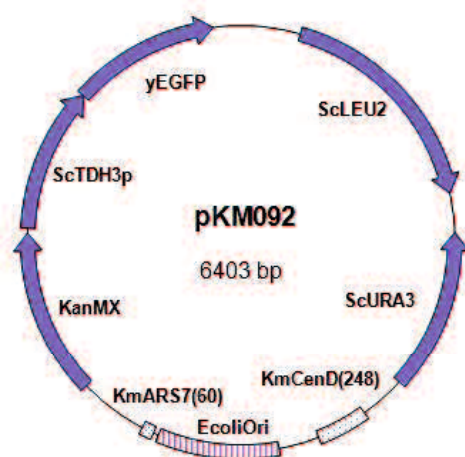


Fig. 4.1 yEGFP を含むプラスミド pKM092

プラスミド pKM092 は yEGFP を含んでおり、この yEGFP は恒常的高発現プロモーターである *TDH3* プロモーターにより発現する。

4.3.2 GFP 融合タンパク質構築の評価

GFP 融合タンパク質はプラスミド pKM092 上の yEGFP 遺伝子と *ScURA3* 遺伝子が向かい合ったサイトに、yEGFP と In-frame になる様に挿入する形で構築できると考えた。構築できる GFP 融合タンパク質は GFP の C 末に導入した遺伝子がコードするタンパク質が結合し、これにより-U培地上で生育可能かつ GFP の蛍光を観察可能な株は、正しく GFP 融合タンパク質が構築できていると期待できる。この場合、GFP 融合遺伝子は恒常的高発現プロモーターである *TDH3p* により発現することから、高発現となり蛍光の観察が容易であると考えた。

GFP 融合タンパク質は、pKM092 の yEGFP 遺伝子と ScURA3 遺伝子が、それぞれが機能しない領域まで削除した DNA 断片（これを Vector DNA と呼ぶ）と、挿入遺伝子の開始コドン側に、削除した yEGFP 遺伝子の機能が回復する配列を、終止コドンを含めずに付加し、終止コドン側には削除した ScURA3 遺伝子の機能が回復する配列を付加した DNA 断片（これを Insert DNA と呼ぶ）を PCR により増幅し、Vector DNA と Insert DNA を混ぜて *K. marxianus* に導入することで構築を試みた。Insert DNA を増幅する際、挿入遺伝子の終止コドン側に付加配列 3CG9（5'-CCCGGGCCC-3'）を付加する PCR を行った後、得られた PCR 産物をテンプレートとして ScURA3 遺伝子の機能が回復する配列を PCR により付加した。これは、ScURA3 遺伝子以外のマーカー遺伝子での選択も行えるようにしたため、共通配列である 3CG9 を付加することで、増幅に使用するプライマーを変えるだけで選択マーカーを変更できる。また、Insert DNA 中の yEGFP 遺伝子の C 末配列は、終止コドンを含まないことから、yEGFP 遺伝子と挿入遺伝子が In-frame となり、融合タンパク質が構築可能であると考えた (Fig. 4.2)。

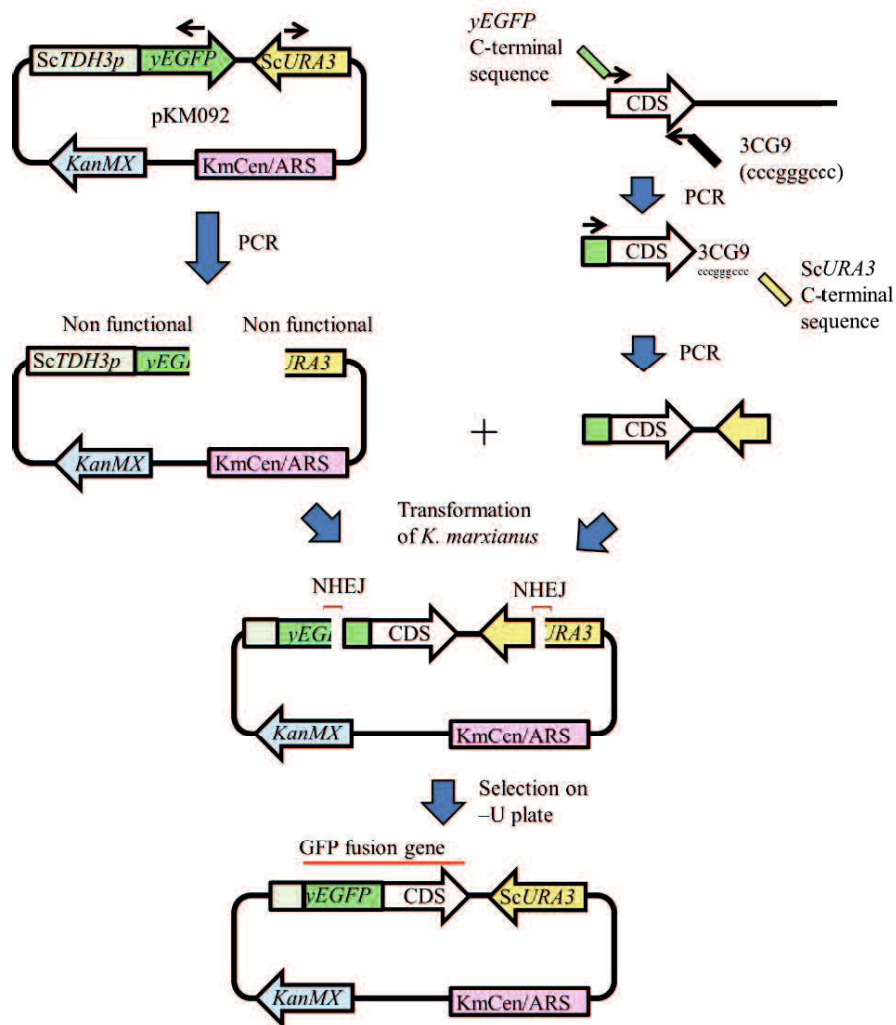


Fig. 4.2 pKM092 を用いた GFP 融合タンパク質構築の模式図
 pKM092 の *yEGFP* 遺伝子と *ScURA3* 遺伝子がそれぞれ機能しない領域まで削除した DNA 断片と、挿入遺伝子に *yEGFP* 遺伝子の C 末配列と *ScURA3* 遺伝子の C 末配列を付加した DNA 断片をそれぞれ PCR により増幅し、混ぜて *K. marxianus* に導入することで構築できる。

この方法を用いて GFP 融合タンパク質の構築及び蛍光の観察ができるか調べるために、*K. marxianus* が持つ遺伝子のひとつである *DAM1* 遺伝子を用いて検証した。Vector DNA と、*DAM1* 遺伝子より作製した Insert DNA を混ぜて、RAK9082 株へ導入し、得られた形質転換体の蛍光観察を行った結果、Fig. 4.3 のようなドット状の局在が観察できた。*S. cerevisiae* での *DAM1* 遺伝子の局在も同様な結果であったことから (Hofmann *et al.*, 1998)、正しく局在が観察できていると判断した。

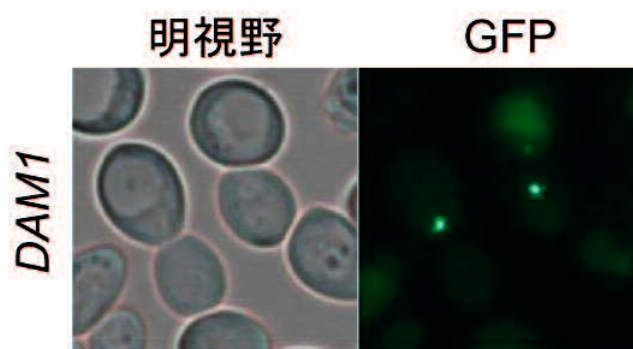


Fig. 4.3 *DAM1* 遺伝子の局在

Dam1 と GFP との融合タンパク質を構築し蛍光顕微鏡により観察した。左側が明視野、右側が GFP の蛍光を観察した写真である。Dam1 と GFP の融合タンパク質は細胞内にドット状の局在を示している。

4.3.3 PCR による *K. marxianus* 全遺伝子の網羅的な増幅

K. marxianus DMKU3-1042 株のゲノム DNA をテンプレートとして、*K. marxianus* の全遺伝子である 4,564 遺伝子で Insert DNA の増幅を試みた。その結果、4,141 遺伝子で Insert DNA の増幅を行うことが可能であった。

4.3.4 GFP 融合タンパク質の網羅的な構築

4.3.3 で得られた 4,141 遺伝子の Insert DNA を用いて、網羅的な GFP 融合タンパク質の構築を試みた。Insert DNA を Vector DNA と混ぜて RAK9082 に形質転換を行った結果、3,314 遺伝子で形質転換体を得ることができた。

得られた形質転換体に対して蛍光観察を行った結果、3,014 遺伝子で GFP の蛍光を観察することが可能であった。観察した一例を Fig. 4.4 に示した。*S. cerevisiae* のデータベースである SGD; *Saccharomyces* Genome Database と比較したところ、*IST2*、*POL12*、*SPF1*、*PRI1*、*YCK3*、*SHE1* は *S. cerevisiae* で観察された局在と同様な局在であったことから、本章で構築した GFP 融合タンパク質は正確に構築できていると考えた。GFP 融合タンパク質は様々な局在を示したことより、本章で行った方法は網羅的な GFP 融合タンパク質構築に適した手法であった。

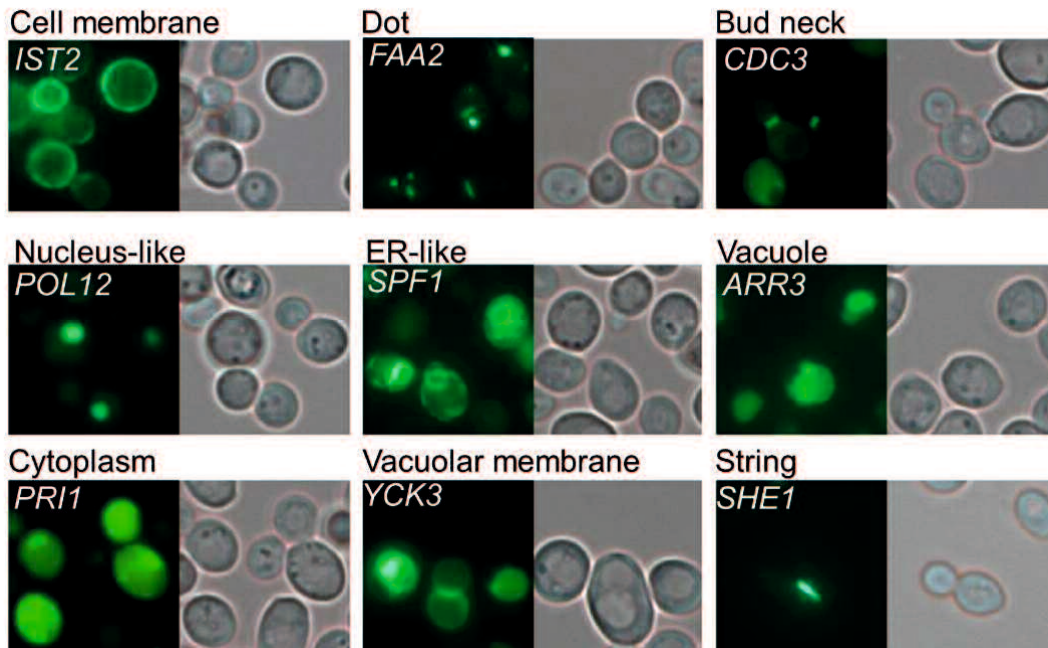


Fig. 4.4 GFP 融合タンパク質の局在例

左上部に局在箇所または見え方と遺伝子名をそれぞれ示した。それぞれの写真について左側は GFP 蛍光、右側は明視野を観察した写真である。構築した GFP 融合タンパク質は様々な局在を示した。

4.4 考察

網羅的な *K. marxianus* 遺伝子の GFP 融合タンパク質発現株を構築し、非相同末端結合 (NHEJ) を利用した組換え DNA 構築法がゲノムワイドな研究手法としてどの程度有用であるか検討した。GFP による局在が観察できた遺伝子は 3,014 遺伝子であり、全遺伝子の 66% で GFP 融合タンパク質が構築できている結果となった。*S. cerevisiae* の全遺伝子との GFP 融合タンパク質を構築した場合には、6,234 遺伝子のうち 67% にあたる 4,156 遺伝子で、GFP による局在が観察できたことが報告されている (Huh *et al.*, 2003)。このことから、NHEJ を利用した組換え DNA 構築法は、網羅的な組換え DNA を構築する上で有効な手段であるといえる。

S. cerevisiae を用いた場合 (Huh *et al.*, 2003) では、GFP 融合遺伝子の発現は遺伝子ごとのプロモーターを用いており、プロモーターによる発現量の差がでてしまうことが考えられる。本章で構築した GFP 融合遺伝子は、*S. cerevisiae* の恒常的高発現プロモーターである *TDH3p* を用いて発現させている。*TDH3p* を用いることで、GFP 融合遺伝子を恒常的に高発現させることが可能であるため、プロモーターによる差が現れることはない。そのため、GFP 融合遺伝子のほとんどで局在が観察できると予測した。実際に、形質転換体を得られた 3,314 遺伝子のうち 91% である 3,014 遺伝子で局在を観察することが可能であった。*S. cerevisiae* の場合には、形質転換体を得られた 6,151 遺伝子のうち 68% である 4,156 遺伝子で局在が観察できていることより、*TDH3p* を用いることで網羅的な局在観察の安定したデータを得ることができるといえる。しかしながら、形質転換体を得ることができた遺伝子は、*S. cerevisiae* を用いた場合は 99% であったのに対し、本章の場合では 80% であった。この原因は、高発現することで増殖に影響を与えてしまう遺伝子によるものが含まれるのだと考えられる (Makanae *et al.*, 2012)。そのため、増殖に影響を与えてしまう遺伝子に対して GFP 融合遺伝子などの組換え DNA を構築する場合には、*TDH3p* のような恒常的高発現プロモーターではなく、*GALI0p* や *GALI1p* といった誘導性プロモーター (Compagno *et al.*, 1987) を用いることで、構築、発現の両方でより多くのデータが得られると期待できる。

本章で構築した GFP 融合タンパク質は、GFP の C 末に *K. marxianus* の遺伝子を融合することで構築した。そのため、観察できた GFP 融合タンパク質の局在はタンパク質の N 末配列に依存しない局在である。GFP 融合タンパク質の局在を観察した結果、観察した遺伝子の約 7 割で、細胞内でドットのような凝集を示すものがあるという傾向があった (data not shown)。この傾向が、*K. marxianus* の特徴を示しているのか、GFP の C 末に遺伝子を融合させたことによるものかは本章の研究では明らかにできていないが、今回の網羅的な局在解析で得られた傾向として捉えられる。GFP の C 末に *S. cerevisiae* 遺伝子を融合させる研究も進められていることから (Ido Yofe *et al.*, 2014)、これとの比較によっても明らかになるかもしれない。

網羅的な研究により得られるデータは、その生物でのデータベースとしての価値のみな

らず、他の生物や異なる手法でのアプローチにより得られるデータとの比較を行うことのできる生物全体のデータベースとしての価値を持つ。研究対象が遺伝子からゲノムへ推移したように、ゲノムから生物全体へと推移することが予想される。本章で NHEJ を利用した組換え DNA 構築法がゲノムワイドな手法として有用なことが示された。この方法は、PCR と形質転換という簡単な操作で組換え DNA が構築できる点のみならず、多くの生物に共通する遺伝子修復機構である非相同末端結合を利用していることより、他の生物への応用にも優れた手法であるといえ、様々な生物でのゲノムワイド研究手法として期待できる。

4.5 結言

第四章では、第三章で構築した非相同末端結合（NHEJ）を利用した組換え DNA 構築法がゲノムワイドな研究手法として有用であることを、耐熱性酵母 *K. marxianus* の全遺伝子と緑色蛍光タンパク質（GFP）との融合タンパク質を網羅的に構築することで示した。この方法を用いることで、PCR で増幅可能であった 4,141 遺伝子のうち 73%にあたる 3,014 遺伝子で GFP 融合タンパク質の局在を観察できた。このことから、NHEJ を利用した組換え DNA 構築法は、網羅的な組換え DNA を構築する上で有効な手段であるといえる。

第五章

結論

本研究では、2種類の産業用酵母でのゲノムワイドな遺伝子操作を可能にする酵母あるいは操作法の開発を行った。第二章では、ラガービールの生産に用いられる下面発酵ビール酵母 *Saccharomyces pastorianus* で、初めての劣性変異株であるウラシル要求性株の構築に成功し、さらに、得られたウラシル要求性ビール酵母を用いることで容易に遺伝子操作を行えることを示した。遺伝子を削除したウラシル要求性ビール酵母を用いることで、*Saccharomyces cerevisiae* と同様にゲノムワイドな研究が展開可能なことが示された。第三章では、耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* を用い非相同末端結合 (NHEJ) を利用した新規組換え DNA 構築法を開発した。分断したマーカー遺伝子を用いることで、DNA 末端がランダムに結合する機構である NHEJ を利用しても、目的 DNA が細胞内へ導入された株を選択することを可能とした。第四章では、第三章で開発した組換え DNA 構築法を用いて網羅的な GFP 融合タンパク質の構築を行い、ゲノムワイドな手法としてどの程度有用であるかを評価した。PCR により増幅した遺伝子のうち 73% で局在が観察できたことから、ゲノムワイドレベルの研究に適用できる手法であるといえる。

本研究で構築したこれらの技術は、その生物のみで使用可能な技術ではなく他の生物にも応用可能な技術である。ウラシル要求性株を取得した方法は、高次倍数性や異型性をもつ生物でも劣性変異株が取得可能であることを示し、生物の基本的 DNA 修復機構の NHEJ を利用した組換え DNA 構築法は、多くの生物での汎用的な利用に期待できる。本研究で構築できた技術を多くの研究に利用してもらいたい。

参考文献

- Abdel-Banat *et al.*, 2010a. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? *Appl Microbiol Biotechnol* **85**: 861-867.
- Abdel-Banat *et al.*, 2010b. Random and targeted gene integrations through the control of non-homologous end joining in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast* **27**: 29-39.
- Akada *et al.*, 2000. DNA extraction method for screening yeast clones by PCR. *Biotechniques* **28**: 668-670, 672, 674.
- Akada *et al.*, 2002. Use of a *YAPI* overexpression cassette conferring specific resistance to cerulenin and cycloheximide as an efficient selectable marker in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **19**: 17-28.
- Akada *et al.*, 2006. PCR-mediated seamless gene deletion and marker recycling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**: 399-405.
- Alberti *et al.*, 2007. A suite of Gateway cloning vectors for high-throughput genetic analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **24**: 913-919.
- Andersen, 2011. PCR-directed in vivo plasmid construction using homologous recombination in baker's yeast. *Methods Mol Biol* **772**: 409-421.
- Ausubel *et al.*, 1999. *Short protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Bahmed *et al.*, 2011. End-processing during non-homologous end-joining: a role for exonuclease 1. *Nucleic Acids Res* **39**: 970-978.
- Baudin *et al.*, 1993. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **21**: 3329-3330.
- Benoit *et al.*, 2006. An improved method for fast, robust, and seamless integration of DNA fragments into multiple plasmids. *Protein Expr Purif* **45**: 66-71.
- Boeke *et al.*, 1984. A positive selection system for mutant lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoroorotic acid resistance. *Mol Gen Genet* **197**: 345-346.
- Boeke *et al.*, 1987. 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol* **154**: 164-175.
- Brachmann *et al.*, 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**: 115-132.
- Casaregola *et al.*, 2001. Analysis of the constitution of the beer yeast genome by PCR, sequencing and subtelomeric sequence hybridization. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1607-1618.
- Cha-aim *et al.*, 2009. Reliable fusion PCR mediated by GC-rich overlap sequences. *Gene* **434**: 43-49.

- Cha-aim *et al.*, 2012. Fusion PCR via novel overlap sequences. *Methods Mol Biol* **852**: 97-110.
- Chen *et al.*, 2001. Promotion of Dnl4-catalyzed DNA end-joining by the Rad50/Mre11/Xrs2 and Hdf1/Hdf2 complexes. *Mol Cell* **8**: 1105-1115.
- Compagno *et al.*, 1987. Translational regulation of the expression of zein cloned in yeast under an inducible GAL promoter. *Biochemi Biophys Res Commun.* **146**: 809-814.
- Derbyshire *et al.*, 1994. Nonhomologous recombination in human cells. *Mol Cell Biol* **14**: 156-169.
- DeRisi, J. L *et al.*, 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**: 680-686.
- Dhar *et al.*, 2012. Structure, replication efficiency and fragility of yeast ARS elements. *Res Microbiol* **163**: 243-253.
- Dunn B, Sherlock, 2008. Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Genome Res* **18**: 1610-1623.
- Foureau *et al.*, 2013. Characterization of an autonomously replicating sequence in *Candida guilliermondii*. *Microbiol Res* **168**: 580-588.
- Fukunaga *et al.*, 2013. Designed construction of recombinant DNA at the *ura3 Δ 0* locus in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **30**: 243-253.
- Ghaemmaghami *et al.*, 2003. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**: 737-741.
- Giuraniuc *et al.*, 2013. Gateway vectors for efficient artificial gene assembly in vitro and expression in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* **8**: e64419.
- Goedecke *et al.*, 1994. Nonhomologous DNA end joining in *Schizosaccharomyces pombe* efficiently eliminates DNA double-strand-breaks from haploid sequences. *Nucleic Acids Res* **22**: 2094-2101.
- Gorbunova and Levy, 1997. Non-homologous DNA end joining in plant cells is associated with deletions and filler DNA insertions. *Nucleic Acids Res* **25**: 4650-4657.
- Haber *et al.*, 1984. Meiotic and mitotic behavior of dicentric chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **106**: 185-205.
- Hammond, 1995. Genetically-modified Brewing Yeasts for the 21st Century. *Yeast* **11**: 1613-1627.
- Hansen and Killend-Brandt, 2003. Brewer's yeast: genetic structure and targets for improvement. *Topics Curr Genet* **2**: 143-170.
- Hashimoto *et al.*, 2005. Isolation of auxotrophic mutants of diploid industrial yeast strains after UV mutagenesis. *Appl Environ Microbiol* **71**: 312-319.
- Hashimoto *et al.*, 2006. Direct mating between diploid sake strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 689-696.
- Heuermann and Cosgrove, 2001. S-Gal: an autoclavable dye for color selection of cloned DNA inserts. *Biotechniques* **30**: 1142-1147.

- Hofmann *et al.*, 1998. *Saccharomyces cerevisiae* Duo1p and Dam1p, novel proteins involved in mitotic spindle function. *J Cell Biol.* **16**: 1029-1040.
- Hoshida *et al.*, 2005. Copper-dependent production of a *Pycnoporus coccineus* extracellular laccase in *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**: 1090-1097.
- Hoshida *et al.*, 2013. N-Glycosylation deficiency enhanced heterologous production of a *Bacillus licheniformis* thermostable alpha-amylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 5473-5482.
- 星田尚司, 中村潤平, 赤田倫治, 2011. 耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* のドラフトゲノム解析. 酵母遺伝学フォーラム要旨集 **44**: 53
- Hsiao and Carbon, 1981. Characterization of a yeast replication origin (ars2) and construction of stable minichromosomes containing cloned yeast centromere DNA (CEN3). *Gene* **15**: 157-166.
- Huh *et al.*, 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**: 686-691.
- Iborra and Ball, 1994. *Kluyveromyces marxianus* small DNA fragments contain both autonomous replicative and centromeric elements that also function in *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **10**: 1621-1629.
- Ido Yofe *et al.*, 2014. An All-in-one yeast library-creating a new toolbox for studying the proteome. Yeast Genetics Meeting 2014 Abstracts Book.
- Irene *et al.*, 2004. Identification of the sequences required for chromosomal replicator function in *Kluyveromyces lactis*. *Mol Microbiol* **51**: 1413-1423.
- Irwin *et al.*, 2012. In-fusion[®] cloning with vaccinia virus DNA polymerase. *Methods Mol Biol* **890**: 23-35.
- Ito *et al.*, 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol* **153**: 163-168.
- Ito *et al.*, 2001. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 4569-4574.
- Iwaki and Takegawa, 2004. A set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene disruption in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **68**(3):545-50.
- Jackson *et al.*, 1972. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**: 2904-2909.
- Jager and Philippsen, 1989. Stabilization of dicentric chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae* by telomere addition to broken ends or by centromere deletion. *EMBO J* **8**: 247-254.
- Kepper-Ross *et al.*, 2008. A new purple fluorescent color marker for genetic studies in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Genetics* **179**: 705-710.

- Kitagawa *et al.*, 2007a. Screening of drugs that suppress Ste11 MAPKKK activation in yeast identified a c-Abl tyrosine kinase inhibitor. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**: 772-782.
- Kitagawa *et al.*, 2007b. Genome-wide analysis of cellular response to bacterial genotoxin CdtB in yeast. *Infect Immun* **75**: 1393-1402.
- Kotaka *et al.*, 2009. Efficient generation of recessive traits in diploid sake yeast by targeted gene disruption and loss of heterozygosity. *Appl Microbiol Biotechnol* **82**: 387-395.
- Lehman *et al.*, 1994. Illegitimate recombination in *Xenopus*: characterization of end-joined junctions. *Nucleic Acids Res* **22**: 434-42.
- Limtong *et al.*, 2007. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresour Technol* **98**: 3367-3374.
- Ma *et al.*, 1987. Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene* **58**: 201-216.
- Makanae *et al.*, 2012. Identification of dosage-sensitive genes in *Saccharomyces cerevisiae* using the genetic tug-of-war method. *Genome Res* **23**: 300-311.
- Maxam and Gilbert, 1977. A New Method for Sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 560-564.
- Moscariello *et al.*, 2010. Accurate repair of non-cohesive, double strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*: enhancement by homology-assisted end-joining. *Yeast* **27**: 837-847.
- Nakao *et al.*, 2009. Genome Sequence of the Lager Brewing Yeast, an Interspecies Hybrid. *DNA Res* **16**: 115-129.
- Nonklang *et al.*, 2008. High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. *Appl Environ Microbiol* **74**: 7514-7521.
- Oldenburg *et al.*, 1997. Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic Acids Res* **25**: 451-452.
- Orr-Weaver *et al.*, 1983. Yeast recombination: The association between double-strand gap repair and crossing-over. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 4417-4421.
- Rainieri *et al.*, 2006. Pure and mixed genetic lines of *saccharomyces bayanus* and *saccharomyces pastorianus* and their contribution to the lager brewing strain genome. *Appl Environ Microbiol* **72**: 3968-3974.
- Rothstein, 1983. One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol* **101**: 202-11.
- Sahara *et al.*, 2009. Using promoter replacement and selection for loss of heterozygosity to generate an industrially applicable sake yeast strain that homozygously overproduces isoamyl acetate. *J Biosci Bioeng* **108**: 359-364.
- Sanger *et al.*, 1977. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.

- Sheff and Thorn, 2004. Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **21**: 661-670.
- Shimoi *et al.*, 2001. Identification of genes required for growth under ethanol stress using transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics* **265**: 1112-1119.
- Sikorski and Hieter, 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: 19-27.
- Takagi *et al.*, 2008. Loss of heterozygosity is induced in *Candida albicans* by ultraviolet irradiation. *Appl Microbiol Biotechnol* **77**: 1073-1082.
- Tamai *et al.*, 1998. Co-existence of two types of chromosome in the bottom fermenting yeast, *Saccharomyces pastorianus*. *Yeast* **14**: 923-933.
- 田村學造・野村喜久雄・秋山裕一・小泉武夫, 1997 酵母からのチャレンジ-応用酵母学-, 技報堂出版
- Tong *et al.*, 2001. Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science* **294**: 2364-2368.
- Uetz *et al.*, 2000. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **403**: 623-627.
- Ugolini and Bruschi, 1996. The red/white colony color assay in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: epistatic growth advantage of white *ade8-18, ade2* cells over red *ade2* cells. *Curr Genet* **30**: 485-492.
- Wach *et al.*, 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1793-1808.
- Wach *et al.*, 1997. Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 1065-1075.
- Ward, 1992. Rapid analysis of yeast transformants using colony-PCR. *Biotechniques* **13**: 350.
- Watanabe *et al.*, 2009. Overexpression of MSN2 in a sake yeast strain promotes ethanol tolerance and increases ethanol production in sake brewing. *J.Biosci* **107**: 516-518.
- Winzeler *et al.*, 1999. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**: 901-906.
- Yamagishi and Ogata, 1999. Chromosomal structures of bottom fermenting yeasts. *Syst Appl Microbiol* **22**: 341-353.
- Yarimizu *et al.*, 2013. Identification of auxotrophic mutants of the yeast *Kluyveromyces marxianus* by non-homologous end joining-mediated integrative transformation with genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **30**:485-500.
- Zimmermann, 1975. Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* **31**: 71-86.

International Human Genome Sequencing Consortium.2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome International Human Genome Sequencing Consortium. *Nature* **431**: 931-945

キリンビール株式会社, 2014. http://www.kirin.co.jp/company/news/2014/0808_01.html

Renewables 2012 Global Status Report.

<http://www.ren21.net/Resources/Publications/REN21Publications/Renewables2012GlobalStatusReport.aspx>

清酒酵母研究会（編）1992. 清酒酵母の研究-80年代の研究 清酒酵母協会

The Tomato Genome Consortium, 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* **485**: 635-641.

The yeast genome directory, *Nature* **387**

本研究に関する発表論文

(a) 査読のある雑誌等

- (1) Nobutada Murakami, Sae Miyoshi, Ryo Yokoyama, Hisashi Hoshida, Rinji Akada and Tomoo Ogata, Construction of a *URA3* deletion strain from the allotetraploid bottom-fermenting yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Yeast*, Vol. 29, No. 5, p155-165, 2012 (本文との関連：第二章)
- (2) Hisashi Hoshida, Nobutada Murakami, Ayako Suzuki, Ryoko Tamura, Jun Asakawa, Babiker M. A. Abdel-Banat, Sanom Nonklang, Mikiko Nakamura and Rinji Akada, Non-homologous end joining-mediated functional marker selection for DNA cloning in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast*, Vol. 31, No. 1, p29-46, 2014 (本文との関連：第三章)

(b) 査読のある国際会議の会議録等

- (1) Nobutada Murakami, Hisashi Hoshida, Rinji Akada, Systematic GFP fusion gene construction and localization analysis in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Abstracts of The 3rd Genetics and Genomics Conference*, 2014, Dec. 26-28, Suzhou, China, p25-26 (本文との関連：第四章)

謝辞

本研究に対し、御指導、御討論を戴きました山本修一教授、佐伯隆教授、吉本誠准教授、赤田倫治教授、星田尚司准教授に深く感謝致します。

またビール酵母の提供及び発酵試験をして戴きました、尾形智夫氏をはじめアサヒビール酒類技術研究所のみなさんに厚く御礼申し上げます。

ゲノム生命機能工学研究室に7年間在籍し、研究室のみなさんには大変お世話になりました。研究、生活の両面で多くの喜怒哀楽を共にできたことを感謝しています。

最後に、研究者としての姿勢を学ばせていただきました中村美紀子先生、研究の詳細まで御指導頂きました赤田倫治先生、最後まで叱咤激励くださいました星田尚司先生に深く感謝いたします。