

学位論文

酵母 *Kluyveromyces marxianus* の遺伝子操作系
を利用した分泌タンパク質の合成生物学的解析

平成 27 年 4 月

山口大学医学系研究科

応用分子生命科学系専攻

鎗水 透

目次

緒言	6
第 1 章 耐熱性酵母 <i>Kluyveromyces marxianus</i> における遺伝子操作技術の確立	8
1.1 はじめに	8
1.2 実験材料	9
1.2.1 使用菌株	9
1.2.2 使用オリゴヌクレオチド	11
1.2.3 培地組成	12
1.3 実験操作	14
1.3.1 二重栄養要求性株の取得	14
1.3.2 ウラシル要求性株の取得	14
1.3.3 栄養要求性の同定	14
1.3.4 PCR による遺伝子断片の合成	14
1.3.5 形質転換	15
1.3.6 接合、孢子形成、および四分子解析	16
1.4 結果	17
1.4.1 <i>K. marxianus</i> の栄養要求性変異株の単離	17
1.4.2 NHEJ を介した遺伝子型の決定	18
1.4.3 他の <i>K. marxianus</i> からのウラシル要求性株の単離	21
1.4.4 <i>K. marxianus</i> 株の接合型の決定	22
1.4.5 <i>K. marxianus</i> 二倍体株の孢子形成	23
1.5 考察	26
1.6 参考文献	29
第 2 章 酵母を利用した遺伝子全合成手法の構築	32
2.1 はじめに	32

2.2 実験材料.....	34
2.2.1 使用菌株および培養条件.....	34
2.2.2 使用オリゴヌクレオチド.....	35
2.3 実験方法.....	39
2.3.1 遺伝子設計.....	39
2.3.2 プライマーの設計、及びプライマー溶液の作成.....	41
2.3.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)を利用した遺伝子全合成.....	42
2.3.4 <i>S. cerevisiae</i> の形質転換.....	43
2.3.5 <i>K. marxianus</i> の形質転換.....	43
2.3.6 非相同末端結合を利用した <i>K. marxianus</i> の発現ベクターの構築.....	44
2.3.7 GLuc 活性の検出.....	45
2.3.8 yRoGLU1 のクローニング及びグルコアミラーゼ活性検出.....	46
2.4 結果.....	47
2.4.1 yPhCell1 遺伝子全合成.....	47
2.4.2 yGLuc 遺伝子全合成.....	47
2.4.3 合成遺伝子配列の解析.....	51
2.4.4 <i>K. marxianus</i> を宿主としたエラー除去法の構築.....	53
2.4.5 yRoGLU1 遺伝子全合成.....	54
2.5 考察.....	57
2.6 参考文献.....	59
第3章 非相同末端結合を利用した分泌シグナル配列の合成生物学的な解析と酵母で高い分泌を示す人工配列の構築.....	63
3.1 はじめに.....	63
3.2 実験材料.....	65
3.2.1 使用菌株および培養条件.....	65
3.2.2 使用オリゴヌクレオチド.....	65

3.3 実験方法.....	71
3.3.1 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	71
3.3.2 形質転換.....	71
3.3.3 ルシフェラーゼ活性評価.....	71
3.3.4 アミノ酸削除型 GLuc の作成.....	72
3.3.5 アミノ酸置換型 GLuc の作成.....	73
3.3.6 疎水性配列改変型 GLuc の作成.....	74
3.3.7 人工分泌シグナル配列付加型 GLuc 変異遺伝子の作成.....	75
3.3.8 異種タンパク由来分泌シグナル付加型 GLuc 変異遺伝子の作成.....	77
3.3.9 転写量の比較.....	77
3.3.10 ウェスタンブロットティング.....	78
3.3.11 M ¹⁶ 付加型 hLIF の作成.....	78
3.3.12 ELISA 法によるタンパク質検出.....	79
3.4 実験結果.....	80
3.4.1 アミノ酸の削除による分泌シグナル配列の解析.....	80
3.4.2 グルタミン酸の置換による分泌シグナル配列の解析.....	81
3.4.3 リジンの置換による分泌シグナル配列の解析.....	82
3.4.4 疎水性配列の置換による分泌シグナル配列の解析.....	83
3.4.5 分泌シグナル配列の定義.....	84
3.4.6 分泌シグナル配列中の疎水性領域の検討.....	85
3.4.7 GLuc タンパク量の比較.....	86
3.4.8 異種分泌タンパク質由来分泌シグナル配列の比較.....	87
3.4.9 人工分泌シグナル配列による酵母での Lif タンパクの高発現化.....	88
3.5 考察.....	90
3.6 参考文献.....	93

結言 95

謝辭 97

緒言

酵母菌を利用したパンや酒の製造が多くの地域で伝統的に行われているように、微生物を利用した産業は古来より人類の生活を支えてきた。また、有用な能力を持つ微生物の発見は技術革新をもたらし、社会を大きく変化させてきた。近代ではアオカビが生産するペニシリンの発見が世界初の抗生物質としてその後の医薬品産業を大きく変化させ、わが国においてはアミノ酸を分泌生産する細菌の発見がアミノ酸発酵産業を興した。今後の発展のためには、より有用な性質を持つ生物が必要とされる。

1970年代に確立された遺伝子組換え技術は、生物間での遺伝子の交換という概念を確立した。この技術は全生物に共通するDNAという物質を対象とするため、動物、植物、微生物など様々な宿主を利用でき、画期的な成果をあげてきた。産業においては遺伝子組換えを利用したタンパク質生産という技術革新が興り、1980年にはヒトインスリン生産性の大腸菌が作成され、バイオ医薬品の生産に利用された。しかし、既存の遺伝子組換え技術には限界も見え始めてきた。様々な有用遺伝子を導入し、新たな有用タンパク質や有用生物を構築することが可能となったが、どの場合も基本的には生物の遺伝子を利用し、自然選択的または突然変異的に構築された遺伝子を利用している。これまでの遺伝子組換えでは、生物のもつ遺伝子配列そのものを利用し、その変異から有用形質を示すものを利用することしかできていない。しかしながら、現在、人工的に遺伝子を合成する方法の開発が進められており、そのような方向での生物学は合成生物学と呼ばれている。

人工的に設計された遺伝子配列の利用においては、最近では細菌の全ゲノムが人工に合成され、この考え方を推進した(1)。この手法は生命現象の解析にも用いられ、人工的に合成された染色体が酵母研究へ利用されている(2, 3)。現状の合成生物学的な手法は生命現象の再現に留まっているが、生物のゲノムを理想的な機能を持つように人工的な設計を行えることができるため、既存の生命を超えるものを生み出す可能性がある。特に産業へのポテンシャルは大きく、オーダーメイドされた生物による新たな技術革新が興るかもしれない。しかし、設計の基礎となるデータベースが不十分であるため、遺伝子設計は経験則的に行われるのが現状である。例えば全く新しいタンパク質配列を人工的に設計して従来よりも優れた機能を示すものを取得することを考えた場合、仮にランダムな配列から取得すると考えると20種類のアミノ酸配列が10アミノ酸並んだだけでさえ 20^{10} という莫大な配列が存在する。そのような配列から新しい機能配列を見つけることは至難の業となる。非常に難しい課題であるが、まず、現行の遺伝子組換え技術

が非効率的であり、一つの遺伝子を調べるだけでも手間がかかっていたためでもあった。そこで、本稿ではまず大量の遺伝子を効率的に調べるための効率的な遺伝子組換え技術を新規に確立し(第1章)、これを人工的な遺伝子配列の合成に適用した(第2章)。さらにタンパク質の一部の構造に注目して機能の解析を行い、これを基にした人工的な遺伝子設計を進めた(第3章)。本研究において、細胞から分泌されるタンパク質が共通して持つ分泌シグナル配列をモデル化し、全く新しい配列が機能することを示すことができた。本研究で、人工的な遺伝子配列を開発する上での可能性を示す。

参考文献

1. Gibson, D. G., Benders, G. A., Andrews-Pfannkoch, C., Denisova, E. A., Baden-Tillson, H., Zaveri, J., Stockwell, T. B., Brownley, A., Thomas, D. W., Algire, M. A., and other 7 authors., Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome., *Science*, 319, 1215-1220, 2008.
2. Dymond, J. S., Richardson, S. M., Coombes, C. E., Babatz, T., Muller, H., Annaluru, N., Blake, W. J., Schwerzmann, J. W., Dai, J., Lindstrom, D. L., and other 5 authors., Synthetic chromosome arms function in yeast and generate phenotypic diversity by design., *Nature*, 477, 471-476, 2011.
3. Annaluru, N., Muller, H., Mitchell, L. A., Ramalingam, S., Stracquadanio, G., Richardson, S. M., Dymond, J. S., Kuang, Z., Scheifele, L. Z., Cooper, E. M., and other 70 authors., Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome., *Science*, 344, 55-58, 2014.

第1章 耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* における遺伝子操作技術

の確立

1.1 はじめに

酵母は古来より人類と密接に関わってきた生物種である。特に出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は製パンやエタノール発酵、さらにタンパク質製造などの産業で広く利用されている。研究対象としても *S. cerevisiae* は身近な生物であり、代表的な酵母菌として古くから利用されてきた。特に、自然界から単離された株同士の掛け合わせによって S288C 系統株のような遺伝学的に重要な株系統が確立されたことはその後の遺伝学的手法の起点となった(1)。遺伝子組換えの宿主として利用される株の多くは S288C 由来のものであり(2)、これらは多様な手法に利用されてきた(3)。遺伝子の導入には酵母-大腸菌間のシャトルベクターを介した宿主-ベクター系が広く行われている。これは、酵母の自動複製起点配列とセントロメア配列を含んだ YCp や 2 μ m プラスミドオリジンを含むマルチコピー型の YEp などの酵母細胞内で高い保持率を示すシャトルベクターが代表的である(4)。さらに *S. cerevisiae* S288C 株の全ゲノム配列が解析され、データベース化もされている(5)。このような背景から *S. cerevisiae* では遺伝子組換え技術の構築が進んでおり、遺伝学的、分子生物学的な手法を行いやすい。従って真核生物のモデルとして有用であり、生物への理解を深める研究結果が示されてきた。

酵母の中では、*S. cerevisiae* や *Kluyveromyces lactis* などの利用が進んでおり、これらに関する知見も多い(6-8)。しかし、これらの種以外の non-conventional な酵母群の中には従来とは大きく異なる性質を示し、産業を大きく変え得るものも多い。中でも *K. lactis* の近縁種であり、*S. cerevisiae* とも系統樹的に近い *Kluyveromyces marxianus* は耐熱性を示し、他の酵母では生存できない高温でも生育や発酵が可能であった(9)。この性質は現在のバイオテクノロジー産業では有利な性質である。従来はプラント操業の過程で微生物が活発に働ける環境を維持するために温度のコントロールが必要であったが、*K. marxianus* はこのためのコストを低減できることが期待された(10-13)。そこで、*K. marxianus* の性質を有効に利用する遺伝子実験系の構築を目指し、その基礎として様々な栄養要求性株の取得と同定を行った。さらに接合、孢子形成から四分子分析などの基礎的な遺伝学的実験系を確立することを目的とした。

1.2 実験材料

1.2.1 使用菌株

使用した *K. marxianus* 株を Table 1.1 に記載した。*K. marxianus* の野生株は Biological Resource Center, NITE (NBRC)、及び National Center for Yeast Collection (NCYC) より得た。また、*S. cerevisiae* 株は BY4704 (*MATa ade2Δ::hisG his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63*)、BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*)、及び BY4743 (*MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 met15Δ0/MET15 ura3Δ0/ura3Δ0*)を使用した(2)。

Table 1.1 : 使用した *Kluyveromyces marxianus* 株

Name	Origin	Genotype	Gene
RAK3396	DMKU3-1042	Wild type	
RAK3605	DMKU3-1042	<i>ura3-1</i>	ScURA3, KmURA3
RAK3873	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ade5,7-1</i>	ScADE5,7
RAK3874	DMKU3-1042	<i>ura3-1 lys4-1</i>	ScLYS4
RAK3875	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ser-</i>	
RAK3876	DMKU3-1042	<i>ura3-1 his-</i>	
RAK3877	DMKU3-1042	<i>ura3-1 his5-1</i>	ScHIS5
RAK3878	DMKU3-1042	<i>ura3-1 arg-</i>	
RAK3879	DMKU3-1042	<i>ura3-1 arg-</i>	
RAK3880	DMKU3-1042	<i>ura3-1 met-</i>	
RAK3881	DMKU3-1042	<i>ura3-1 met6-1</i>	ScMET6
RAK3882	DMKU3-1042	<i>ura3-1 his7-1</i>	ScHIS7
RAK3883	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ND</i>	
RAK3884	DMKU3-1042	<i>ura3-1 his4-1</i>	ScHIS4
RAK3885	DMKU3-1042	<i>ura3-1 lys2-1</i>	ScLYS2
RAK3886	DMKU3-1042	<i>ura3-1 lys9-1</i>	ScLYS9
RAK3887	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ade-</i>	
RAK3888	DMKU3-1042	<i>ura3-1 lys4-2</i>	ScLYS4
RAK3889	DMKU3-1042	<i>ura3-1 his6-1</i>	ScHIS6
RAK3890	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ade6-1</i>	ScADE6
RAK3891	DMKU3-1042	<i>ura3-1 leu2-1</i>	ScLEU2
RAK3892	DMKU3-1042	<i>ura3-1 his-</i>	
RAK3893	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ND</i>	
RAK3894	DMKU3-1042	<i>ura3-1 arg-</i>	
RAK3895	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ade5,7-2</i>	ScADE5,7
RAK3896	DMKU3-1042	<i>ura3-1 lys2-2</i>	ScLYS2
RAK3897	DMKU3-1042	<i>ura3-1 met15-1</i>	ScMET15
RAK3898	DMKU3-1042	<i>ura3-1 met6-2</i>	ScMET6
RAK3899	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ade-</i>	
RAK3900	DMKU3-1042	<i>ura3-1 his2-1</i>	ScHIS2
RAK3901	DMKU3-1042	<i>ura3-1 arg-</i>	
RAK3902	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ND</i>	
RAK3903	DMKU3-1042	<i>ura3-1 his4-2</i>	ScHIS4
RAK3904	DMKU3-1042	<i>ura3-1 arg-</i>	
RAK3906	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ade6-2</i>	ScADE6
RAK3907	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ade-</i>	
RAK3908	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ade2-1</i>	ScADE2
RAK3909	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ile- val-</i>	
RAK3910	DMKU3-1042	<i>ura3-1 arg-</i>	
RAK3911	DMKU3-1042	<i>ura3-1 thr- met-</i>	
RAK3912	DMKU3-1042	<i>ura3-1 arg-</i>	
RAK3913	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ade-</i>	
RAK3914	DMKU3-1042	<i>ura3-1 trp3-1</i>	ScTRP3
RAK3915	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ade-</i>	
RAK3916	DMKU3-1042	<i>ura3-1 his3-1</i>	ScHIS3
RAK3917	DMKU3-1042	<i>ura3-1 trp4-1</i>	ScTRP4
RAK3918	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ND</i>	

RAK3919	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ade-</i>	
RAK3920	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ND</i>	
RAK3921	DMKU3-1042	<i>ura3-1 trp3-2</i>	ScTRP3
RAK3922	DMKU3-1042	<i>ura3-1 met-</i>	
RAK3923	DMKU3-1042	<i>ura3-1 met-</i>	
RAK3924	DMKU3-1042	<i>ura3-1 lys-</i>	
RAK3925	DMKU3-1042	<i>ura3-1 thr- met-</i>	
RAK3926	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ade6-3</i>	ScADE6
RAK3927	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ND</i>	
RAK3928	DMKU3-1042	<i>ura3-1 lys1-1</i>	ScLYS1
RAK3929	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ND</i>	
RAK3930	DMKU3-1042	<i>ura3-1 lys2-3</i>	ScLYS2
RAK3931	DMKU3-1042	<i>ura3-1 trp-</i>	
RAK3932	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ile- val-</i>	
RAK3933	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ade-</i>	
RAK3934	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ND</i>	
RAK3935	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ND</i>	
RAK3936	DMKU3-1042	<i>ura3-1 thr-</i>	
RAK3937	DMKU3-1042	<i>ura3-1 trp5-1</i>	ScTRP5
RAK3956	DMKU3-1042	<i>ura3-1 arg-</i>	
RAK3957	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ND</i>	
RAK3958	DMKU3-1042	<i>ura3-1 lys2-4</i>	ScLYS2
RAK3959	DMKU3-1042	<i>ura3-1 arg-</i>	
RAK3960	DMKU3-1042	<i>ura3-1 lys9-1</i>	ScLYS9
RAK3961	DMKU3-1042	<i>ura3-1 lys2-5</i>	ScLYS2
RAK3962	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ND</i>	
RAK3963	DMKU3-1042	<i>ura3-1 met2-1</i>	ScMET2
RAK3964	DMKU3-1042	<i>ura3-1 his7-1</i>	ScHIS7
RAK3965	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ile- val-</i>	
RAK3966	DMKU3-1042	<i>ura3-1 leu2-2</i>	ScLEU2
RAK3967	DMKU3-1042	<i>ura3-1 leu-</i>	
RAK3968	DMKU3-1042	<i>ura3-1 leu1-1</i>	ScLEU1
RAK3969	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ND</i>	
RAK3970	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ND</i>	
RAK3684	NCYC587	Wild type	
RAK3685	NCYC1429	Wild type	
RAK3686	NCYC2791	Wild type	
RAK4010	NBRC0219	Wild type	
RAK4011	NBRC0260	Wild type	
RAK4012	NBRC0273	Wild type	
RAK4013	NBRC0277	Wild type	
RAK4014	NBRC0288	Wild type	
RAK4015	NBRC0482	Wild type	
RAK4016	NBRC0483	Wild type	
RAK4017	NBRC0690	Wild type	
RAK4018	NBRC1963	Wild type	
RAK4019	NBRC0541	Wild type	
RAK4020	NBRC1777	Wild type	
RAK4021	NBRC0272	Wild type	
RAK4022	NBRC1735	Wild type	
RAK4071	NCYC587	<i>ura5-1</i>	KmURA5, ScURA5
RAK4072	NCYC1429	<i>ura5-2</i>	KmURA5
RAK4073	NCYC2791	<i>ura5-3</i>	KmURA5
RAK4074	NBRC0219	<i>ura3-13</i>	KmURA3
RAK4075	NBRC0260	<i>ura3-14</i>	KmURA3
RAK4076	NBRC0273	<i>ura3-15</i>	KmURA3
RAK4077	NBRC0277	<i>ura3-16</i>	KmURA3
RAK4078	NBRC0288	<i>ura5-4</i>	KmURA5
RAK4079	NBRC0482	<i>ura3-17</i>	KmURA3
RAK4080	NBRC0483	<i>ura3-18</i>	KmURA3
RAK4081	NBRC0690	<i>ura3-19</i>	KmURA3
RAK4082	NBRC1963		
RAK4083	NBRC0541	<i>ura5-5</i>	KmURA3
RAK4084	NBRC1777	<i>ura5-6</i>	KmURA3
RAK4085	NBRC0272	<i>ura3-10</i>	KmURA3
RAK4086	NBRC1735	<i>ura3-11</i>	KmURA3
RAK4088	DMKU3-1042	<i>ura3-1 leu2-2</i> [ScURA3]	

RAK4152	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ade2-2</i> [ScURA3]
RAK4153	DMKU3-1042	<i>ura3-1 lys2-2</i> [ScURA3]
RAK4154	DMKU3-1042	<i>ura3-1/ura3-1 ade2-2/ADE2 LYS2/lys2-2</i> [ScURA3]
RAK4155	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ade2-2 lys2-2</i>
RAK4156	DMKU3-1042	<i>ura3-1/ura3-1 ADE2/ade2-2 leu2-2/LEU2 lys2-2/LYS2</i> [ScURA3]
RAK4157	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ade2-2 leu2-2 lys2-2</i>
RAK4172	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ade2-2</i>
RAK4173	DMKU3-1042	<i>ura3-1 lys2-2</i>
RAK4174	DMKU3-1042	<i>ura3-1 leu2-2</i>
RAK4175	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ade2-2 lys2-2</i>
RAK4176	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ade2-2 leu2-2</i>
RAK4177	DMKU3-1042	<i>ura3-1 leu2-2 lys2-2</i>
RAK4178	DMKU3-1042	<i>ura3-1 ade2-2 leu2-2 lys2-2</i>

1.2.2 使用オリゴヌクレオチド

使用したオリゴヌクレオチドを Table 1.2 に記載した。

Table 1.2 : 使用オリゴヌクレオチド

Name	Sequence (5'→3')
ADE1-757	CCGCCATACTCTCCGAATCCT
ADE1+1151c	GGCAGTGGAGGAGCGAGCCAGG
ADE2-797	CGCTGGCGCATCTGTTCCTCTA
ADE2+1991c	CTCGTTCTGCATTGAGCCGCC
ADE4-940	GGTCGTATTGACGCAACCGACG
ADE4+1945c	GTTGGTCCATCCTATGGTGGCG
ADE5,7-757	GGTCAACCGCCTCCTGAGGACC
ADE5,7+2787c	GCCCAGCGCAGGTTCTGTGTTTC
ADE6-971	GCCGCCAGAATTAGCTCCAACG
ADE6+4549c	GTCCAGAAGCTAAGGCCTCCAG
ADE8-933	CTGCACCGTGGGAGGCCCTCC
ADE8+910c	CCCTGTAACAGGTTGTGAGCCG
ADE12-836	GAAGCGGCCACGGCCTCTGCTC
ADE12+1705c	ACGTACCGGAGCCAATCAACCG
ADE13-907	CCCCTGGCGCGGGAGGCCCGCT
ADE13+1862c	CGAAGGTGTCTCTGTCTTCGAC
ADE16-966	GAAAGAGTTGGTCGTGTCGGC
ADE16+2060c	CGGGATGTGGGTGCAGAGTGGG
ADE17-755	GAGTTGGCCGTCTGTGCTGCTAACTT
ADE17+2219c	ATACAGTATTATGGCCCTGCCGATG
HIS1-699	CCGTGCACATTTACGTCATGT
HIS1+1268c	CAGCTTATGCGTTACGATCCC
HIS2-867	CACCCAGGGTGCTTTAGCTACA
HIS2+1396c	AGGTTTCCCAGCCAAACCCGTA
HIS3-966	CCCGAGAGGAAACTTCTTAGCG
HIS3-1463c	TGTTGGCTTGGTAAAACGGGCC
HIS4-922	AGAATGGTCTCGAAGAAGTGC
HIS4+2771c	ACCCATCCCGTAACACTCTATC
HIS5-740	AAGTATGCCGTGCACCTTTTCGC
HIS5+1527c	CGTCGTTCGATGCATCCTCTTC
HIS6-910	ATTTTCGAGTGTACGCGATCTGG
HIS6+1193c	CAAGTTGTCGTCAGAGGTATCG
HIS7-814	AGGGTAACGAACACTGCTTCGT
HIS7+2033c	TTAGTAGAGGATGCTCTGGCCA
LEU1-460	ATGATTGAAGGCCCGCTCCGCG
LEU1+2720c	TTACAGACTTGGTGTGGCACC
LEU2-457	GGCCGAGCGGTCTAAGGCGCCT
LEU2+1573c	GTCGACTACGTCTTAAGGCCG
LEU4-694	GCGACGAGACACCAGCTGTGTGCCG
LEU4+2240c	TTGATTCTGCTGCCTTTGCGTGCC
LEU9-989	CTCGGCCAAGCGAGTCTCTTC
LEU9+2056c	TTATGCGGTGGGTGGCCCTGGG
LYS1-551	AAGGCAAGTGAAAGCCATTGCC

LYS1+1642	GTATTGTGGAGCAGTCAGCATC
LYS2-556	CACAGCGGACGGTGTTCGTCGAAGG
LYS2+4681c	CTTCAGGGTAGTATGTCACCGACGC
LYS4-504	ATAGCCAAAGCTGTCCTCTGGT
LYS4+2272	GGCTTTAGGTCAGACACTGGTT
LYS9-515	CCCACGTTGGTAGCTACATATG
LYS9+1519	TACTAGCGGTTCAAGCTTCAGG
LYS12-512	AAGAGGTCCTAGACGTCTGGGA
LYS12+1350	TCCAGCGAAGCCACAGAACTA
MET1-939	GCGTGGCAATGCCGTTCTAGCC
MET1+2143c	CCCTTTCAGAGAACCCTCCACC
MET2-840	GCGCCAGGCTTCCGTATCCCAG
MET2+1719c	GTGGCTGTCTACAAGTGCGGTC
MET3-980	CCTTAACTTTAGCCGCGCAGGG
MET3+1839c	GTCGCTATTGCCTCCGTCTCCA
MET4-804	GGAGAGAGGCTGACCCAAGAGG
MET4+2506c	CCTGGCGCTTTCTGGCCCTGTA
MET6-577	GAACCAGGTTCCCGCACTCCGG
MET6+2721c	GGGCCGATATCGTAGGATCAGC
MET7-817	GGCTGTGGGCGAGGTAACACTT
MET7+2350c	CCGCGCGGCACAGGCATCTCTA
MET8-816	CGCTCCATCCGACGGGCAACCA
MET8+1280c	TCATCGCGCAAGGGGCGGGTG
MET10-916	CGACCGCGCTAGAGTCCGGGTT
MET10+3544c	GTCCGGTGGGCAAAGGTCGTTG
MET13-676	CGTGGCGGCGGTGTGGCGGCGG
MET13+2275c	GGGGCCGTGTTTTAACTTGTGA
MET14-488	GCGCCTTTGTGAGCCCTCCCGG
MET14+919c	GGCGCCGGATCAGAATTCACG
MET17-787	CTCCTCGAGGATTTAGGAATCC
MET17+1727c	GTAGCATCCAACCAAATCCCGC
TRP1-400	AAACGGCAGCCCCGATCTAAAA
TRP1-1017c	CGAGGATACGGAGAGAGGTATG
TRP2-700	CCTTGCATTGCACACAGTCCAA
TRP2-1950c	CCGCCAAGTACTTCCGTGAACA
TRP3-650	CATCGTTTCTCCACCCCTACTA
TRP3+1629c	GAACGCCGGCCCCAGAGGGAAG
TRP4-309	ACATGACATAGGCCATCGGCTT
TRP4-1515c	GGGCCTTCGTTCTCATCACCAT
TRP5-544	CCAAGGGGGACAAGTATCTATG
TRP5+2292c	GAAAATGTGGCTGTTCTGACCG
URA3-200	GATGACAATACAGACGATGATAACA
URA3-200c	GAACCTTGTTGTTCTTTGGAGTTC
URA3-290	GAGAAGGGCAACGGTTCATCATCTC
ScURA5-321	GTTTGATCTCATCAATCAGAGG
ScURA5+869c	GCAGCTACAGGCAAGAGGTACCGAA
KmURA3-505	TGAAATTAGGCGCTGTACCGGCTC
KmURA3+953c	CAGCTTCTAGCACGTGACTAACTT
KmURA5-728	CGCTCCAACACTTCGGAACAATTC
KmURA5+835c	CAATAACCAAGAAGACGATGATGAG

1.2.3 培地組成

YPD 培地は 1% yeast extract (YE)、2% peptone、及び 2% glucose の組成で作製した。固体培地(プレート)として使用する場合には、培地用寒天を 2%加えた。選択培地は 0.17% yeast nitrogen base w/o A.A. w/o A.S.、0.5% ammonium sulfate、2% glucose の最小培地(MM 培地)に栄養混合物を添加して作製した。栄養混合物の組成は Ausubel らによる記述を参照した(15)。Table 1.3 に主な栄養素混合物の組成を記した。FOA 培地は、-U mix を添加した最小培地(MM-U 培地)に uracil 50 mg/ml 及び 5-fluoroorotic acid monohydrate

を 1 g/l 加えて作製した。接合培地として 2% glucose、2% glucose+1% YE、2% glucose+1% peptone、および 2% glucose+0.5% NH₄Cl を使用した。胞子形成培地(SPO 培地)は 1% CH₃COOK、0.1% YE、0.05% glucose の組成で作製した。

Table 1.3 : 選択培地用栄養混合物の組成

Nutrient	-U	-A	-K	-L	+UA	+UH	+UK	+UL	+UM	+UW	+7aa	+15aa
Adenine hemisulfate	0.5	-	0.5	0.5	0.5	-	-	-	-	-	0.5	1.25
L-Arginine HCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6
L-Aspartic acid Na	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
L-Glutamic acid Na	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
L-Histidine HCl	2	2	2	2	-	2	-	-	-	-	2	0.6
L-Leucine	4	4	4	-	-	-	-	4	-	-	4	1.8
L-Lysine HCl	2	2	-	2	-	-	2	-	-	-	2	0.9
L-Methionine	2	2	2	2	-	-	-	-	2	-	2	0.6
L-phenylalanine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.5
L-Serine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11.25
L-Threonine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
L-Tryptophan	2	2	2	2	-	-	-	-	-	2	2	1.2
L-Tyrocine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9
L-Valine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.5
Uracil	-	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0.6
添加量 [g/L]	0.6	0.5	0.5	0.5	0.1	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.6	1.3

1.3 実験操作

1.3.1 二重栄養要求性株の取得

K. marxianus DMKU3-1032 のウラシル要求性変異株である RAK3605(10)を親株とした。RAK3605 を YPD 培地で 1 晩培養して細胞を採取し、滅菌超純水に懸濁した。懸濁液を YPD プレートに 1000 cells/plate となるように調製して塗付した。クリーンベンチ内でプレート上の細胞に紫外線を 45~60 sec 照射し、3 日程度培養した。YPD プレート上のコロニーを新しい YPD プレート及び MM プレートにレプリカし、2 日培養した。MM プレート上でコロニーを形成しなかった株を候補株とした (RAK3873-RAK3968)。

1.3.2 ウラシル要求性株の取得

様々な *K. marxianus* の野生株を親株としてウラシル要求性株の取得を行った。酵母細胞を YPD プレートに塗付し、UV を照射した。細胞を一晩培養してコロニーを形成させ、FOA プレートにレプリカした。FOA plate 上で形成されたコロニーから単コロニーを同定し、MM+U プレートおよび MM プレート上での増殖を試験した。MM+U プレート上でのみコロニーを形成した株を候補株とした(RAK4071-RAK4086)。

1.3.3 栄養要求性の同定

1.3.1 で選別された候補株は、MM+7aa プレートまたは MM+15aa プレートでの増殖を試験された。その後、予想された栄養要求性に対応した選択培地上での増殖を観察した。

1.3.4 PCR による遺伝子断片の合成

増幅した遺伝子断片と使用したテンプレートとプライマーを Table 1.4 に表記した。PCR には KOD plus DNA polymerase kit を用いた。染色体 DNA 溶液 1.0 μ l、プライマー溶液を各 0.3 μ l ずつ、10 \times KOD plus buffer 1.0 μ l、2 ml dNTPs 1.0 μ l、25 mM MgSO₄ 0.4 μ l、KOD plus DNA polymerase 0.2 μ l を滅菌超純水 5.8 μ l と混ぜて合計で 10 μ l の反応溶液を作成した。94 $^{\circ}$ C 1.0 min で反応を開始させ、94 $^{\circ}$ C 20 sec の熱変性・50 $^{\circ}$ C 30 sec のアニーリング・68 $^{\circ}$ C 3-4 min の伸長反応を 30 サイクル繰り返し、15 $^{\circ}$ C まで冷却した。DNA 断片をアガロース電気泳動法で分析した。これらの PCR 産物の濃度は 31.0-82.8 ng/ μ l 程度であり、2 μ l を形質転換に直接使用した。

Table 1.4 : PCR による遺伝子断片の合成

DNA	Template	Primer1	Primer2
<i>ScADE1</i>	BY4743	ADE1-757	ADE1+1151c
<i>ScADE2</i>	BY4743	ADE2-797	ADE2+1991c
<i>ScADE4</i>	BY4743	ADE4-940	ADE4+1945c
<i>ScADE5,7</i>	BY4743	ADE5,7-757	ADE5,7+2787c
<i>ScADE6</i>	BY4743	ADE6-971	ADE6+4549c
<i>ScADE8</i>	BY4743	ADE8-933	ADE8+910c
<i>ScADE12</i>	BY4743	ADE12-836	ADE12+1705c
<i>ScADE13</i>	BY4743	ADE13-907	ADE13+1862c
<i>ScADE16</i>	BY4743	ADE16-966	ADE16+2060c
<i>ScADE17</i>	BY4743	ADE17-755	ADE17+2219c
<i>ScHIS1</i>	BY4700	HIS1-699	HIS1+1268c
<i>ScHIS2</i>	BY4700	HIS2-867	HIS2+1396c
<i>ScHIS3</i>	BY4700	HIS3-966	HIS3-1463c
<i>ScHIS4</i>	BY4700	HIS4-922	HIS4+2771c
<i>ScHIS5</i>	BY4700	HIS5-740	HIS5+1527c
<i>ScHIS6</i>	BY4700	HIS6-910	HIS6+1193c
<i>ScHIS7</i>	BY4700	HIS7-814	HIS7+2033c
<i>ScLEU1</i>	BY4743	LEU1-460	LEU1+2720c
<i>ScLEU2</i>	BY4700	LEU2-457	LEU2+1573c
<i>ScLEU4</i>	BY4743	LEU4-694	LEU4+2240c
<i>ScLEU9</i>	BY4743	LEU9-989	LEU9+2056c
<i>ScLYS1</i>	BY4743	LYS1-551	LYS1+1642
<i>ScLYS2</i>	BY4743	LYS2-556	LYS2+4681c
<i>ScLYS4</i>	BY4743	LYS4-504	LYS4+2272
<i>ScLYS9</i>	BY4743	LYS9-515	LYS9+1519
<i>ScLYS12</i>	BY4743	LYS12-512	LYS12+1350
<i>ScMET1</i>	BY4743	MET1-939	MET1+2143c
<i>ScMET2</i>	BY4743	MET2-840	MET2+1719c
<i>ScMET3</i>	BY4743	MET3-980	MET3+1839c
<i>ScMET4</i>	BY4743	MET4-804	MET4+2506c
<i>ScMET6</i>	BY4743	MET6-577	MET6+2721c
<i>ScMET7</i>	BY4743	MET7-817	MET7+2350c
<i>ScMET8</i>	BY4743	MET8-816	MET8+1280c
<i>ScMET10</i>	BY4743	MET10-916	MET10+3544c
<i>ScMET13</i>	BY4743	MET13-676	MET13+2275c
<i>ScMET14</i>	BY4743	MET14-488	MET14+919c
<i>ScMET17</i>	BY4743	MET17-787	MET17+1727c
<i>ScTRP1</i>	BY4743	TRP1-400	TRP1-1017c
<i>ScTRP2</i>	BY4743	TRP2-700	TRP2-1950c
<i>ScTRP3</i>	BY4743	TRP3-650	TRP3+1629c
<i>ScTRP4</i>	BY4743	TRP4-309	TRP4-1515c
<i>ScTRP5</i>	BY4743	TRP5-544	TRP5+2292c
<i>ScURA3</i>	BY4704	URA3-200	URA3-200c
<i>ScURA3</i>	BY4704	URA3-290	URA3-200c
<i>ScURA5</i>	BY4704	ScURA5-321	ScURA5+869c
<i>KmURA3</i>	DMKU3-1042	KmURA3-505	KmURA3+953c
<i>KmURA5</i>	DMKU3-1042	KmURA5-728	KmURA5+835c

1.3.5 形質転換

K. marxianus の形質転換には、Babiker らの方法を使った(14)。酵母細胞を YPD 液体培地に懸濁し、28°C 150 rpm の振とう培養を 1 晩行った。培養液を 1.5 ml のマイクロチューブに移して遠心分離(12,000 rpm 1 min)し、上澄みを除去した。細胞に TF buffer (40% polyethylene glycol 3350、0.2 M lithium acetate、及び 0.1 M dithiothreitol)を加えて vortex で攪拌し、遠心分離(12,000 rpm 1 min)して上澄みを除去した。再度 TF buffer を細胞に加えて vortex で攪拌し、懸濁液を 1.5 ml マイクロチューブに分注した。これに形質転換

用の DNA 断片を 2 μ l 加え、vortex で攪拌した後にヒートショック(42°C 30 min または 47°C 15 min)を与えた。ヒートショック後のサンプルを選択培地に塗付し、28°C で 3 日間静置培養した後にコロニーを観察した。

1.3.6 接合、孢子形成、および四分子解析

K. marxianus 株の RAK4088 (*ura3-1 leu2-2* [ScURA3])を各種ウラシル要求性株と接合用の培地上で交差させて塗付し、1-2 日培養した。培地上の酵母細胞を MM プレートにレプリカし、現れたコロニーを接合によって現れた酵母細胞として採取した。

K. marxianus 二倍体酵母 RAK4154 を孢子形成させた。この酵母は RAK4152 (*ura3-1 ade2-2* [ScURA3]) と RAK4153 (*ura3-1 lys2-2* [ScURA3]) を接合させて得た株であった。RAK4154 を SPO 培地で培養し、顕微鏡で孢子の形成を観察した。マイクロマニピレーターを使って孢子を分離させ、それぞれの栄養要求性を同定した。その内、ウラシル・アデニン・リジンの三重の栄養要求性を示した株を RAK4155 (*ura3-1 ade2-2 lys2-2*)とした。同様の操作を RAK4156 でも行った。この株は RAK4088 (*ura3-1 leu2-2* [ScURA3]) と RAK4155 (*ura3-1 ade2-2 lys2-2*) を掛け合わせた株であった。この操作から二重、三重、または四重の栄養要求性を示す株(RAK4157、及び RAK4172-RAK4178)を得た。

1.4 結果

1.4.1 *K. marxianus* の栄養要求性変異株の単離

K. marxianus DMKU3-1042 のウラシル要求性変異株(*ura3-1*)である RAK3605(10)を親株とした。UV 照射後に形成された約 15,000 個のコロニーを YPD プレートまたは MM+U プレートにレプリカし、MM+U プレート上で増殖を示さなかった 79 個のコロニーを候補株とした。

栄養要求性の特定のために、候補株を MM+15aa プレート及び MM+7aa プレートにそれぞれ植えた。候補株 79 株の内、50 株は両方の培地で増殖したことからアデニン、ヒスチジン、リジン、ロイシン、メチオニン、またはトリプトファンの内いずれかを要求すると予想された。そこで、6 種の選択培地(MM+UA、MM+UH、MM+UK、MM+UL、MM+UM、MM+UW)上での増殖から、栄養要求性を決定した。これによってアデニン要求性株を 13 株、ヒスチジン要求性株を 10 株、リジン要求性株を 11 株、ロイシン要求性株を 4 株、メチオニン要求性株を 7 株、トリプトファン要求性を 5 株同定した。一方で、79 株中 29 株は MM+15aa では増殖したが、MM+7aa 培地では増殖しなかった。これらの株は MM+15aa のみ含まれるアルギニン、アスパラギン、グルタミン、フェニルアラニン、セリン、スレオニン、チロシン、またはバリンの内いずれかを要求すると予想された。この内、9 株はウラシル・アルギニン含有最小培地で増殖し、アルギニン要求性であると分かった。1 株はウラシル・セリン含有最小培地で増殖し、セリン要求性であると分かった。1 株はウラシル・スレオニン含有最小培地で増殖し、スレオニン要求性であると分かった。残りの株に関しては複数の栄養素を要求すると予想し、トリプトファンとチロシン、及びフェニルアラニン、メチオニンとスレオニン、またはイソロイシンとバリンといった生合成の経路が共通するアミノ酸に注目した。そこで MMU にトリプトファン・チロシン・フェニルアラニンを加えた培地(MMU+WYF)、MMU にメチオニン・スレオニンを加えた培地(MMU+MT)、及び MMU にイソロイシン・バリンを加えた培地(MMU+IV)を使った選別を行った。2 株は MMU+MT で増殖し、ウラシル・メチオニン・スレオニン要求性であると分かった。3 株は MMU+IV で増殖したため、ウラシル・イソロイシン・バリン要求性であると分かった。以上の結果を Table 1.5 にまとめた。

Table 1.5 : 栄養要求性変異株の同定

栄養素	要求性株の数	SGD*における関連遺伝子
アデニン	13	11 ADE _x
リジン	11	9 LYS _x
ヒスチジン	10	7 HIS _x
メチオニン	7	20 MET _x
トリプトファン	5	5 TRP _x
ロイシン	4	6 LEU _x
アルギニン	9	11 ARG _x
セリン	1	4 SER _x
スレオニン	1	2 THR _x
イソロイシン/バリン	3	5 ILV _x
メチオニン/スレオニン	2	3 HOM _x
不明	13	-
Total	79	

* SGD, *Saccharomyces* Genome Database(5)

1.4.2 NHEJ を介した遺伝子型の決定

アデニン、ヒスチジン、リジン、ロイシン、メチオニン、およびトリプトファン要求性株に対して相補遺伝子の同定を進めた。RAK3605 に *S. cerevisiae* 由来の *URA3* 遺伝子を相補させられた(10, 14)ことから、*S. cerevisiae* 由来の配列を候補とした。遺伝子配列は *Saccharomyces* Genome Database (5)より得た。Table 1.5 に各栄養要求性に対応する相補遺伝子候補の数を表記した。

例としてヒスチジン要求性株の相補遺伝子の決定の手順を記述する。この場合、ヒスチジンの生合成関連遺伝子群から 7 種の候補が予想され(ScHIS1、ScHIS2、ScHIS3、ScHIS4、ScHIS5、ScHIS6、及び ScHIS7)、配列を PCR によって増幅した。PCR 産物をそのまま形質転換に用いたが、同時に形質転換のコントロールとして ScURA3 を導入した場合と、遺伝子を入れなかった場合(No DNA)も検証した(Fig. 1.1)。RAK3877 は ScHIS5 を導入した時にコロニーが生じた。RAK3882 は ScHIS7 を導入した時にコロニーが生じた。RAK3884 は ScHIS4 を導入した時にコロニーが多く出た。RAK3889 は ScHIS6 を導入した時にコロニーが多く出た。RAK3900 は ScHIS2 を導入した時にコロニーが生じた。RAK3903 は ScHIS4 を導入した時にコロニーが多く生じた。RAK3916 は ScHIS3 を導入した時にコロニーが多く生じた。RAK3964 は ScHIS7 を導入した時に形質転換体が多く生じた。RAK3876 コロニーが全く得られず、RAK3892 はバックが大量に現れたため、相補遺伝子が特定されなかった。以上の結果を Table 1.6 にまとめた。

ヒスチジン以外の栄養要求性株の相補遺伝子の決定では、ロイシン生合成関連遺伝子

(*ScLEU1*, *ScLEU2*, *ScLEU4*, *ScLEU9*), リジン生合成関連遺伝子(*ScLYS1*, *ScLYS2*, *ScLYS4*, *ScLYS9*, *ScLYS12*, *ScLYS13*), トリプトファン生合成関連遺伝子(*ScTRP1*, *ScTRP2*, *ScTRP3*, *ScTRP4*, *ScTRP5*), アデニン生合成関連遺伝子(*ScADE1*, *ScADE2*, *ScADE4*, *ScADE5*, *ScADE6*, *ScADE8*, *ScADE12*, *ScADE13*, *ScADE16*, *ScADE17*), およびメチオニン生合成関連遺伝子(*ScMET1*, *ScMET2*, *ScMET3*, *ScMET4*, *ScMET6*, *ScMET7*, *ScMET8*, *ScMET10*, *ScMET13*, *ScMET14*, *ScMET17*)が特定された。これらを使った解析結果を Table1.7～Table1.11 にまとめた。

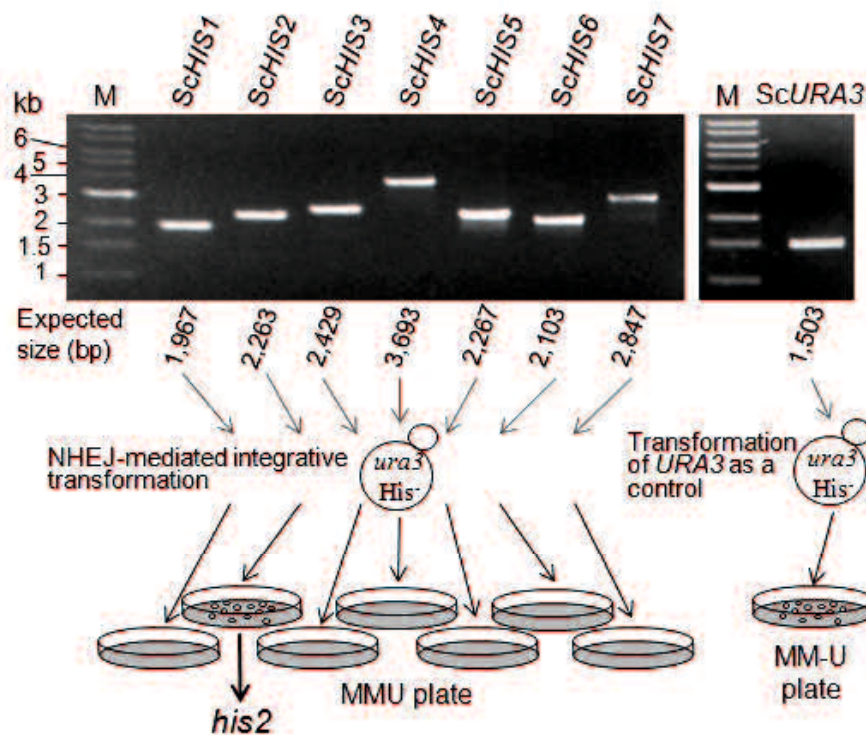


Fig. 1.1 : ウラシル・ヒスチジン要求性株の遺伝子型の決定の手順

Table 1.6 : ウラシル・ヒスチジン要求性株の遺伝子型の決定

ScHISx gene	ScORF size (bp)	No. of strains identified	His ⁻ RAK strain							
			3877	3882	3884	3889	3900	3903	3916	3964
<i>ScHIS1</i>	894	0	0	0	0	1	0	0	1	0
<i>ScHIS2</i>	1008	1	1	5	0	1	375	0	0	2
<i>ScHIS3</i>	663	1	0	8	0	1	0	1	42	2
<i>ScHIS4</i>	2400	2	0	0	656	0	0	292	0	0
<i>ScHIS5</i>	1158	1	167	0	0	1	0	0	1	2
<i>ScHIS6</i>	786	1	0	0	1	315	0	0	0	1
<i>ScHIS7</i>	1659	2	0	79	1	2	0	0	0	170
<i>ScURA3</i>	—	—	79	124	1900	118	213	699	43	422
No DNA			0	0	0	0	0	0	0	9

*RAK3876、および RAK3892 の結果は割愛した

Table 1.7 : ウラシル・ロイシン要求性株の遺伝子型の決定

ScLEUx gene	ScORF size (bp)	No. of strains identified	LEU ⁻ RAK strain		
			3891	3966	3968
ScLEU1	2340	1	0	0	127
ScLEU2	1095	2	222	249	0
ScLEU4	1860	0	0	0	0
ScLEU9	1815	0	0	0	0
ScURA3	—	—	283	581	1107
No DNA			0	0	0

*RAK3967 はバックが大量に出たため割愛した

Table 1.8 : ウラシル・リジン要求性株の遺伝子型の決定

ScLYSx gene	ScORF size (bp)	No. of strains identified	LYS ⁻ RAK strain									
			3874	3885	3886	3888	3896	3928	3930	3958	3960	3961
ScLYS1	1122	1	0	0	1	0	2	328	1	9	0	2
ScLYS2	4179	5	0	222	2	0	79	3	252	247	1	35
ScLYS4	2082	2	225	1	0	243	4	1	0	8	0	2
ScLYS9	1341	2	0	1	107	0	4	0	3	8	47	0
ScLYS12	1116	0	0	1	0	0	1	1	2	5	1	2
ScURA3	—	—	351	1326	320	1182	622	533	1014	1166	405	363
No DNA			0	4	2	0	1	0	0	5	0	1

*RAK3924 はバックが多く出たため割愛した

Table 1.9 : ウラシル・トリプトファン要求性株の遺伝子型の決定

ScTRPx gene	ScORF size (bp)	No. of strains identified	TRP ⁻ RAK strain		
			3914	3917	3921
ScTRP1	675	0	0	0	0
ScTRP2	1524	0	0	0	0
ScTRP3	1455	2	80	0	37
ScTRP4	1143	1	0	109	1
ScTRP5	2124	1	0	0	0
ScURA3	—	—	235	52	90
No DNA			0	0	0

*RAK3931、RAK3937 はバックが多く出たため割愛した

Table 1.10 : ウラシル・メチオニン要求性株の遺伝子型の決定

ScMET _x gene	ScORF size (bp)	No. of strains identified	MET ⁻ RAK strain			
			3881	3897	3898	3963
ScMET1	1782	0	1	0	1	0
ScMET2	1461	1	0	0	1	758
ScMET3	1536	0	2	0	3	0
ScMET4	2019	0	0	0	0	0
ScMET6	2304	2	35	0	239	0
ScMET7	1647	0	0	0	3	0
ScMET8	825	0	1	1	4	0
ScMET10	3108	0	0	0	5	0
ScMET13	1803	0	0	0	3	0
ScMET14	609	0	0	0	2	0
ScMET17	1335	1	0	81	0	0
ScURA3	—	—	202	950	315	1293
No DNA			0	0	4	0

*RAK3880、RAK3922、RAK3923 はバックが多く出たため割愛した

Table 1.11 : ウラシル・アデニン要求性株の遺伝子型の決定

ScADE _x gene	ScORF size (bp)	No. of strains identified	ADE- RAK strain					
			3873	3890	3895	3906	3908	3926
ScADE1	921	0	nt	0	nt	nt	2	4
ScADE2	1716	1	nt	0	nt	nt	183	14
ScADE4	1533	0	nt	0	nt	nt	1	1
ScADE5,7	2409	2	73	0	186	nt	2	0
ScADE6	4077	3	nt	73	nt	183	0	141
ScADE8	645	0	nt	0	nt	nt	0	11
ScADE12	1302	0	nt	1	nt	nt	2	6
ScADE13	1449	0	nt	0	nt	nt	0	9
ScADE16	1776	0	nt	0	nt	nt	1	8
ScADE17	1779	0	nt	0	nt	nt	2	1
ScURA3	—	—	723	274	753	2080	279	1053
No DNA			1	0	4	0	1	3

*他の株はバックが多く出た、またはコロニーが得られなかったため割愛した

1.4.3 他の *K. marxianus* からのウラシル要求性株の単離

NBRC や NCYC より譲渡された *K. marxianus* 株由来の栄養要求性株を取得した。UV 照射によって得られた FOA 耐性株に KmURA3 遺伝子を相補させてみたが、意外にも形質転換体が現れたものと現れなかったものがあった。このため、URA3 以外のウラシル合成経路に変異が生じたと予想した。そこで各ウラシル要求株に KmURA5 遺伝子を相補させてみたところ、KmURA3 が相補されなかった全ての株で KmURA5 が相補した。

ただし、RAK4082 はどちらの遺伝子を導入した場合でも十分な数の形質転換体が現れなかった。また、RAK3605 と RAK4071 に関しては *ScURA3* と *ScURA5* も導入したが、どちらの遺伝子も *K. marxianus* 由来の遺伝子を使った場合と同様の結果が示された。

Table 1.12 に以上の結果をまとめた。

Table 1.12 : ウラシル要求性株の遺伝子型の決定

Name	Origin (auxotroph)	Km <i>URA3</i> (<i>ScURA3</i>)	Km <i>URA5</i> (<i>ScURA5</i>)	No DNA	Determined genotype
RAK3605	DMKU3-1042 (<i>ura</i>)	1156 (273)	0 (0)	0	<i>ura3-1</i>
RAK4071	NCYC587 (<i>ura</i>)	0 (1)	580 (220)	2	<i>ura5-1</i>
RAK4072	NCYC1429 (<i>ura</i>)	0	300	0	<i>ura5-2</i>
RAK4073	NCYC2791 (<i>ura</i>)	0	24	0	<i>ura5-3</i>
RAK4074	IFO0219 (<i>ura</i>)	63	2	0	<i>ura3-3</i>
RAK4075	IFO0260 (<i>ura</i>)	59	0	0	<i>ura3-4</i>
RAK4076	IFO0273 (<i>ura</i>)	1154	0	0	<i>ura3-5</i>
RAK4077	IFO0277 (<i>ura</i>)	247	2	0	<i>ura3-6</i>
RAK4078	IFO0288 (<i>ura</i>)	0	47	0	<i>ura5-4</i>
RAK4079	IFO0482 (<i>ura</i>)	35	0	0	<i>ura3-7</i>
RAK4080	IFO0483 (<i>ura</i>)	62	0	0	<i>ura3-8</i>
RAK4081	IFO0690 (<i>ura</i>)	185	0	0	<i>ura3-9</i>
RAK4083	IFO0541 (<i>ura</i>)	2	50	0	<i>ura5-5</i>
RAK4084	IFO1777 (<i>ura</i>)	0	73	0	<i>ura5-6</i>
RAK4085	IFO0272 (<i>ura</i>)	72	6	0	<i>ura3-10</i>
RAK4086	IFO1735 (<i>ura</i>)	154	0	0	<i>ura3-11</i>

*RAK4082 は形質転換体が現れなかったため割愛した。

1.4.4 *K. marxianus* 株の接合型の決定

栄養要求性を指標として、*K. marxianus* 株の接合型を決定した。DMKU3-1042 由来株 RAK4088 (*ura3-1 leu2-2* [*ScURA3*])と、ウラシル要求性株 RAK3605 (DMKU3-1042)、RAK4071 (NCYC587)、RAK4074 (NBRC0219)、RAK4076 (NBRC0273)、RAK4077 (NBRC0277)を接合させた。接合が起きた場合、要求性が相補された菌体が現れると予想した。条件検討のために 2% glucose、2% glucose+1% YE、2% glucose+1% peptone、および 2% glucose+0.5% NH₄Cl のプレートを使用した。各プレート上で菌同士を交差させて塗付し、1~2 日程度培養した後に MM プレートにレプリカした。Fig. 1.2a のように MM プレート上で酵母の増殖が見られ、これらの株は接合して二倍体になったと予想された。この時、2% glucose プレートから MM プレートへレプリカした菌の増殖が最も良かった。また、意外にも同系統の株同士の組み合わせであるはずの RAK4088 と RAK3605 の組み合わせでも酵母が増殖した。

さらに、*ura3* と *ura5* 同士の掛け合わせも試みた(Fig. 1.2b)。 *ura3* 株として RAK3605

と RAK4077 を使い、*ura5* 株として RAK4071、RAK4072、RAK4073 を使った。これらの株は全て系統の異なる株である。2% glucose プレート上で掛け合わせた後、MM プレートにレプリカして増殖を見たが、すべての組み合わせで菌体の増殖が見られた。ただし、RAK4073 を用いた掛け合わせの場合には他のものよりも菌体の増殖が弱かった。

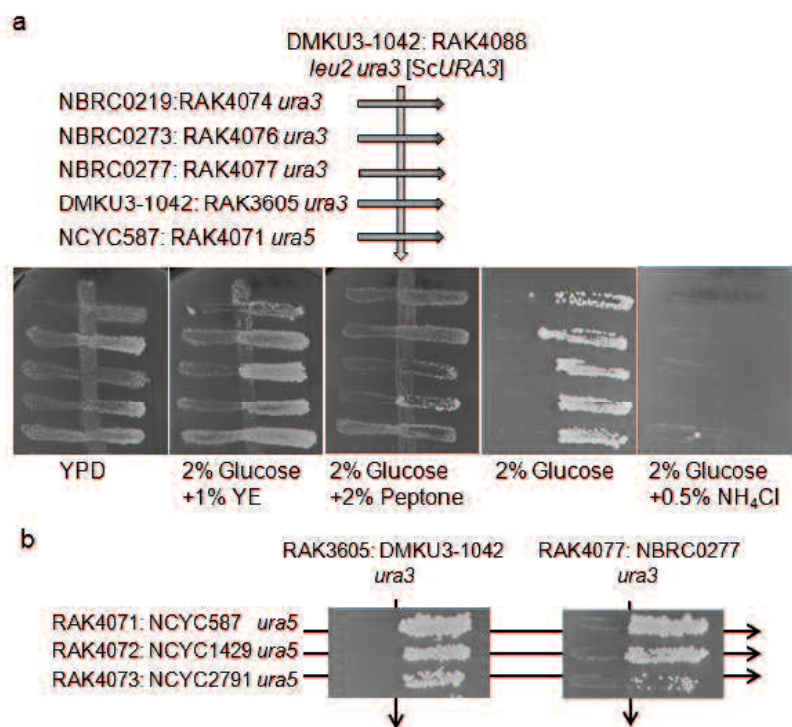


Fig. 1.2 : *K. marxianus* 株の接合

1.4.5 *K. marxianus* 二倍体株の孢子形成

K. marxianus 二倍体株から、孢子を形成させて子孫株を取得するための条件を検討した。孢子形成のモデルとして RAK4154 を使用した。この株は RAK4152 (*ura3-1 ade2-2* [ScURA3]) と RAK4153 (*ura3-1 lys2-2* [ScURA3]) を掛け合わせた株であった。Fig. 1.3a では、SPO 培地に植えられた RAK4152、RAK4153、及び RAK4154 の細胞の様子を顕微鏡で六時間毎に観察した。0、6、12 h の時点では、どの酵母細胞にも変化は見られなかった。18 h 経過した時点で、RAK4154 には円がクローバー状に四つ連なった形態の細胞のみ見られた。一倍体である RAK4152 や RAK4153 にはこのような形態の細胞が見られなかったため、これを孢子と見なした。24 h 経過した時点で、孢子は見られなくなったが、一倍体の細胞に分離したためと考えた。

Fig. 1.3b では、マイクロマニピレーターを使用して 11 個分の孢子を YPD プレート上でそれぞれ四つの細胞に分離させた。一つの孢子から ABCD の位置に細胞が移され

た。ほとんどの胞子は分離後も増殖したが、列 8 の C、D や列 9 の A のように、増殖しないものも見られた。

分離された子孫株は、RAK4152 と RAK4153 の形質を引き継いでいることが予想された。そこで、Fig. 1.3c では 12 個分の胞子から子孫をとり、栄養要求性を調べた。RAK4152 と RAK4153 の遺伝子型からアデニン、リジン、又はウラシル要求性が予想され、MM-A、MM-K、または MM-U のプレートに植え、増殖を観察した。子孫株はそれぞれ異なる要求性を示し、要求性を示さないもの、要求性を一つのみ示したものの、要求性を二つ示したものの、そして全ての栄養素に対して要求性を示したものが現れた。これらの内、アデニン、リジン、ウラシルといった三重の栄養要求性を示した株を RAK4155 とした。

RAK4155 は、さらに RAK4088 (*ura3-1 leu2-2* [ScUR43]) と掛け合わせ、二倍体の RAK4156 (*ura3-1/ura3-1 ADE2/ade2-2 leu2-2/LEU2 lys2-2/LYS2* [ScUR43]) を取得した。この株から胞子を取って二重、三重、または四重の栄養要求性株を取得した(RAK4157、RAK4172-RAK4178)。

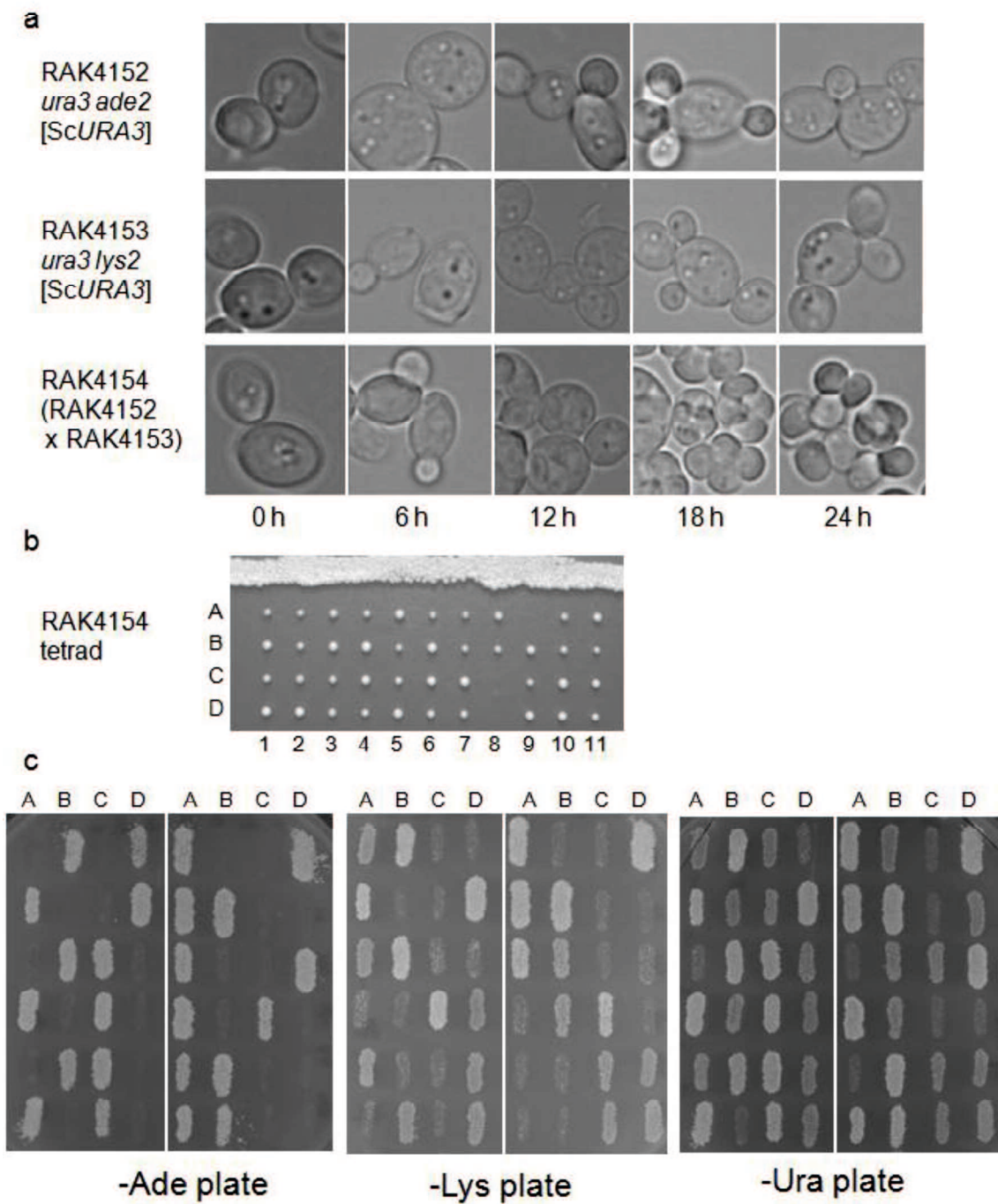


Fig. 1.3 : *K. marxianus* 株の胞子形成

1.5 考察

栄養要求性株は、酵母の遺伝子操作手法の基礎の構築に利用されてきた(16-18)。 *K. marxianus* の遺伝子操作手法の確立のために、栄養要求性株の構築は重要な仕事であった。代表的な酵母である *S. cerevisiae* から構築されてきた栄養要求性株ではウラシル、アデニン、ロイシン、トリプトファン、ヒスチジン、メチオニン、およびリジンの要求性を示すものが多いが(2)、 *K. marxianus* でもこれらの株が現れやすく、79 の候補株の内 50 株はこれらの栄養要求性のいずれかを示した(Table 1.5)。また、各栄養要求性株の出現頻度には偏りが見られ、アデニン、リジン、ヒスチジン、およびアルギニン要求性株の出現頻度は他のものよりも高かった。この事に関して *S. cerevisiae* における栄養素の生合成の経路をゲノムデータベースで調べたところ、合成に関わる遺伝子数と要求性株の出現頻度に関連が見られた(Table 1.4)。このことから、 *K. marxianus* における栄養素の生合成は *S. cerevisiae* に似た経路で進むと予想した。一方で、メチオニンに関してはこれが当てはまらなかったため、合成経路が大きく異なっていることが考えられた。

形質転換は遺伝子断片のベクターへのクローニングを介した手法が一般的であり、 *S. cerevisiae* では酵母-大腸菌間のシャトルベクターが主に利用される(19、20)。 *E. coli* は簡単に培養でき、増やした細胞から抽出することで大量の遺伝子が取得できるが、構築されたベクターは不正確な遺伝子配列がクローニングされる場合が多く、非効率的であった。近年我々は遺伝子を PCR で増幅し、これを酵母に直接挿入する手法を利用してきた。この手法ではベクターが不要となり、遺伝子を簡単に操作できた。特に *K. marxianus* は NHEJ によって染色体上に高頻度で PCR 産物を挿入したため、これを遺伝子型の決定に利用した。さらに、 *S. cerevisiae* のゲノム由来の遺伝子断片を *K. marxianus* に相補させたことも本研究の特色であった。一般的には、異種生物由来の遺伝子は宿主細胞では効果的に機能しないことが多い。このためにプロモーターを宿主のものへの付け替えや、宿主細胞での発現に適したベクターへのクローニングが行われてきた(21、22)。しかし、本研究では *S. cerevisiae* 由来の遺伝子が *K. marxianus* の細胞でそのまま発現させられることが分かった。

K. marxianus のヒスチジン要求性株の遺伝子型の決定では、 *HIS2-HIS7* に変異がある株が取得でき、ヒスチジン生合成に関わる遺伝子の変異体を一通りそろえられた。リジン要求性株の場合は 11 株中 5 株が *LYS12* 変異体であった。 *ScLYS12* は 4179 bp というマーカーとして使用した遺伝子の中で最大であったため、変異の生じやすさが遺伝子のサイズに依存すると予想した。同様のことは、今回相補される変異体が取れなかった

ScHIS1 (894 bp)、ScTRP1 (675 bp)、ScTRP2 (1524 bp)、および ScLYS12 (1116 bp)が比較的小さいサイズであったことから考えられた。このことから *K. marxianus* が *S. cerevisiae* に似たゲノムの構造を持っていることが示唆された。ただし、この仮説に当てはまらないものも見られ、ScLEU4 (1860 bp)や ScLEU9 (1815 bp)は比較的大きいサイズであるにも関わらず相補される変異体は現れなかった。

ADE や MET 変異体は、他の遺伝子と比べて多くは同定されなかった。ADE 変異体の場合、変異が明確に示されたものは 13 株中 6 株であり、他のものは形質転換のバックグラウンドが大きく相補遺伝子の特定が困難であった。MET 変異体でも同様の傾向がみられ、取得した株の約半数は高いバックグラウンドが見られた。このことに関しては、*K. marxianus* のアデニンやメチオニンの生合成経路が *S. cerevisiae* と異なり、*S. cerevisiae* 由来の遺伝子では明確な特定が困難な変異が生じたのではないかと予想している。

K. marxianus 株のウラシル要求性株は FOA 耐性を指標として取得したが、*S. cerevisiae* では同様の手順で *ura3* 変異体のみが現れるということが知られていたため、*ura3* 変異体のみが現れると予想されていた。しかし、取得された FOA 耐性株には KmURA3 が相補したものと KmURA5 が相補したものが現れ、*ura3* 変異体も *ura5* 変異体も同定された (Table 1.12)。RAK3605 (*ura3*)では ScURA3 も相補し、RAK4071 (*ura5*)では ScURA5 も相補されたため、これらの遺伝子の機能は *K. marxianus* と *S. cerevisiae* で変わらないと考えられた。ScURA5 はオロチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするが、*S. cerevisiae* は ScURA10 にも同様の機能を持つタンパクがコードされている。従って、*ura5* 変異体でも ScURA10 が機能するため、*ura5* 変異体が FOA 耐性を示さない。一方で、*K. marxianus* は *ura5* 変異体が FOA 耐性を示したことから、オロチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼが一つの遺伝子にのみにコードされていると考えられた。

S. cerevisiae は a 型と α 型という二つの接合型を持ち、これらの細胞間で接合が起こることが知られており、*K. marxianus* でも二種類の接合型が報告されていた(23)。一方でホモタリックな接合も報告されていた(24)。今回使用した *K. marxianus* 株の内、DMKU3-1042 株に関しては一倍体の酵母であることが示唆されていた(10)。また、他の株に関しても *ura3* や *ura5* 変異体が高頻度で現れたため (Table 1.12)、一倍体であると予想された。これらの株は RAK4088 や RAK3605 と接合したが、RAK3605 は一倍体であると示されていた DMKU3-1042 株由来の変異体であるため、今回使用した *K. marxianus* 株のほとんどのものは一倍体であると考えられた。例外として NBRC0617 株に関しては他の株のようにウラシル要求性株を取得できなかったが、このことからこの株は一倍

体では無いことが考えられた。

各 *K. marxianus* 株より取得されたウラシル要求性変異株は、DMKU3-1042 由来の栄養要求性株との接合を試験された。接合することによってお互いの栄養要求性が相補され、最小培地上での増殖が見られるようになると予想したが、意外にも殆どの株が接合した (Fig. 1.2)。したがって、*K. marxianus* はホモタリックな接合が可能な酵母であることが分かった。また、2% glucose 培地で最も効果的に接合したことから、他の酵母と同様に窒素源の濃度に影響を受けることが示唆された(25-27)。

接合によって取得された二倍体酵母の胞子の形成を評価した。SPO 培地で培養することで胞子形成が高頻度で起こった (Fig. 1.3)。胞子を分離させて解析したところ、掛け合わせに使った株の形質が子孫にハイブリッドに受け継がれており、これによって三重、四重の栄養要求性を示す株が取得できた。

Kluyveromyces lactis、*Yarrowia lipolytica*、*Hansenula polymorpha*、及び *Pichia pastoris* に代表される non-conventional な酵母のいくつかの種はタンパク質生産や発酵のために利用されてきた(28)。これらの酵母の形質転換手法の多くは *S. cerevisiae* から得られた知見が応用されている。*S. cerevisiae* では相同組み換えの活性が高く、特定の位置へ遺伝子が導入されるように構築されている。一方で *K. marxianus* における NHEJ と PCR を利用した形質転換法は染色体上のランダムな位置に遺伝子の挿入が起こることを特徴としている。このような考え方は *K. marxianus* に特有のものではなく、*Candida* 属の酵母で同様の報告がされている(29, 30)。従って、non-conventional な酵母群には *K. marxianus* のように NHEJ の活性が強く、*S. cerevisiae* の常識が通用しないものが多いことが予想される。NHEJ による遺伝子操作は *K. marxianus* の遺伝子操作に有効であったが、他の酵母でもこれを有効に利用できると期待できる。

1.6 参考文献

1. Mortimer RK, Johnston JR., Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center., *Genetics* 113: 35–43. 1986.
2. Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, *et al.*, 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. 1998.
3. Botstein D., Genetics in the post-sequence era., *Trends Genet* 9: 101. 1993.
4. Lundblad V., Yeast cloning vectors and genes., *Curr Protoc Mol Biol.*, Chapter 13:Unit13.4. 2001.
5. Cherry JM, Adler C, Ball C, *et al.*, SGD: Saccharomyces Genome Database., *Nucleic Acids Res* 26: 73–79. 1998.
6. Mattiazzi M, Petrovic U, Krizaj I., Yeast as a model eukaryote in toxicology: a functional genomics approach to studying the molecular basis of action of pharmacologically active molecules., *Toxicol* 60: 558–571. 2012.
7. van Leeuwen JS, Vermeulen NP, Chris VJ., Yeast as a humanized model organism for biotransformation-related toxicity., *Curr Drug Metab* 13: 1464–1475. 2012.
8. Schaffrath R, Breunig KD., Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*., *Fungal Genet Biol* 30: 173–190. 2000.
9. Llorente B, Malpertuy A, Blandin G, Artiguenave F, Wincker P, Dujon B., Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 12. *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*., *FEBSLett* 87: 71–75. 2000.
10. Abdel-Banat BM, Hoshida H, Ano A, *et al.*, 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: 861–867.2010a.
11. Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann C, Gombert AK., The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential., *Appl Microbiol Biotechnol* 79: 339–354. 2008.
12. Limtong S, Sringiew C, Yongmanitchai W., Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*., *Bioresour Technol* 98: 3367–3374. 2007.

13. Nonklang S, Abdel-Banat BM, Cha-aim K, *et al.*, Hightemperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3–1042., *Appl Environ Microbiol* 74: 7514–7521. 2008.
14. Abdel-Banat BM, Nonklang S, Hoshida H, Akada R., Random and targeted gene integrations through the control of non-homologous end joining in the yeast *Kluyveromyces marxianus.*, *Yeast* 27: 29–39. 2010b.
15. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology.*, Wiley: Chichester. 1999.
16. Mount RC, Jordan BE, Hadfield C., Transformation of lithium-treated yeast cells and the selection of auxotrophic and dominant markers., *Methods Mol Biol* 53: 139–145.1996.
17. Pronk JT., Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research., *Appl Environ Microbiol* 68: 2095–2100. 2002.
18. Snow R., An enrichment method for auxotrophic yeast mutants using the antibiotic ‘nystatin’, *Nature* 211: 206–207. 1966.
19. Struhl K, Davis RW., Production of a functional eukaryotic enzyme in *Escherichia coli*: cloning and expression of the yeast structural gene for imidazole–glycerolphosphate dehydratase (his3)., *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5255–5259. 1977.
20. Ratzkin B, Carbon J., Functional expression of cloned yeast DNA in *Escherichia coli.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 487–491. 1977.
21. Choo KB, Wu SM, Hung L, Lee HH., Effect of vector type, host strains and transcription terminator on heterologous gene expression in yeast., *Biochem Biophys Res Commun* 140: 602–608. 1986.
22. Kudla B, Persuy MA, Gaillardin C, Heslot H., Construction of an expression vector for the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe.*, *Nucleic Acids Res* 16: 8603–8617. 1988.
23. Johannsen E., Hybridization studies within the genus *Kluyveromyces* van der Walt emend. van der Walt., *Antonie Van Leeuwenhoek* 46: 177–189. 1980.
24. Lane MM, Burke N, Karreman R, *et al.*, Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus.*, *Antonie Van Leeuwenhoek* 100: 507–519. 2011.
25. Moore TD, Edman JC., The α -mating type locus of *Cryptococcus neoformans* contains a peptide pheromone gene., *Mol Cell Biol* 13: 1962–1970. 1993.

26. Morishita M, Morimoto F, Kitamura K, *et al.*, Phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase is required for the cellular response to nutritional starvation and mating pheromone signals in *Schizosaccharomyces pombe.*, *Genes Cells* 7: 199–215. 2002.
27. Nadin-Davis SA, Nasim A., *Schizosaccharomyces pombe* ras1 and byr1 are functionally related genes of the ste family that affect starvation-induced transcription of mating-type genes., *Mol Cell Biol* 10: 549–560. 1990.
28. Johnson EA., *Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts—the ascomycetes.*, *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 503–517. 2013.
29. Dmytruk KV, Voronovsky AY, Sibirny AA., Insertion mutagenesis of the yeast *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*) by random integration of linear DNA fragments., *Curr Genet* 50: 183–191. 2006.
30. Sasano Y, Yurimoto H, Sakai Y., Gene-tagging mutagenesis in the methylotrophic yeast *Candida boidinii.*, *J Biosci Bioeng* 104: 86–89. 2007.

第2章 酵母を利用した遺伝子全合成手法の構築

2.1 はじめに

遺伝子工学的手法では、対象とする遺伝子の取得が困難な場合は遺伝子を準備できないという問題が起こる。例えば高等真核生物では発現する期間が限定的であったり転写量が低かったりする場合は十分なメッセンジャーRNA(mRNA)が得られず、逆転写DNA(cDNA)の取得が困難な場合が多い(1, 2)。また、選択的スプライシングによって一つの遺伝子配列から複数の mRNA が転写され、対象物の確実な取得すら困難な場合もある(3)。微生物でも同様の問題が挙げられ、培養法が確立されていない生物種では polymerase chain reaction (PCR)による増幅に十分な量のゲノムが得られない場合が多い(4-6)。また、エボラウイルスに代表される病原性のウイルスを扱う場合は安全性を保障する設備が必要とされる。一方で、これまで蓄積されてきた莫大な量のゲノム情報は存在するので、この配列情報の利用が課題となる。このような現状に対して、遺伝子全合成の手法が必要となっている。遺伝子合成は配列さえ判ればどのようなものでも取得できるため、生きた生物は不要である。

遺伝子全合成手法のもう一つの利点として、変異遺伝子の構築をより大幅に行える点が挙げられる。例えば異種生物由来の遺伝子の高発現のために、遺伝子工学的な手法による改変が必要とされることがある。コドン最適化は代表的なアプローチであり、緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子(7)、赤色蛍光タンパク質(RFP)遺伝子(8)、ヒト成長ホルモン遺伝子(9)、リパーゼ遺伝子(10)、グルコアミラーゼ遺伝子(11)、またはウイルスタンパク遺伝子(12, 13)などの多数の遺伝子が酵母での発現に最適化されたコドンに改変されてきた。遺伝子合成の対象は一遺伝子に留まらずゲノム全体に及び、*Mycoplasma genitalium* の全ゲノムが合成されたという報告はこの手法の新たな可能性を示唆し(14-16)、*S. cerevisiae* では人工的に合成されたゲノムの利用が試みられている(17, 18)。遺伝子全合成の手法は生命への理解に新たなアプローチを示しており、将来的にはゲノム全体をデザインして目的に最適な生物を人工的に構築することが期待できる。

遺伝子全合成法の技術的なコンセプトは、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドの組立である。組立にはPCRを利用した手法が広く行われている(19-21)が、DNAリガーゼを利用した手法なども報告されている(22)。しかし、現在の手法では確実な合成が難しく、設計とは異なる配列が副産物として大量に表れてしまう。エラーの要因として、合成オリゴヌクレオチド中に不正確な配列が混入することが挙げられる(23)。従って、液

体クロマトグラフィーやポリアクリルアミドゲル電気泳動などで高純度なオリゴヌクレオチドを得ることがエラーの低減化に必要とされた。一方で、合成された遺伝子群から、エラーを除去する手法も試みられてきた。この考え方は、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子全合成において適用され、合成微生物のDNA二本鎖のミスマッチ修正の機能が利用された(24)。また、蛍光タンパク質遺伝子合成においてミスマッチを検出して結合する、*Thermus aquaticus*由来のMutSタンパクを利用したエラー除去の例も報告されている(25)。これらの手法では認識されるエラーの条件が限られていたが、エラーを含む配列を除去し、正確な配列の頻度をある程度上昇させた。もう一方のアプローチとして、合成遺伝子と緑色蛍光タンパク質遺伝子をin-frameに融合させてマーカー遺伝子の機能からエラーの無いものを選択する手法が報告された(26)。

従来法では、遺伝子合成後に大腸菌ベクターへのクローニングを経る場合が多く、これによって煩雑な手順が必要とされていた。そこで、本研究では大腸菌へのクローニングを行わず、直接酵母へと導入することで簡易化された遺伝子導入法を利用した。特に酵母 *Kluyveromyces marxianus* ではPCR と非相同末端結合(non-homologous end joining; NHEJ)を利用した高効率化された遺伝子導入手法が確立されており(27)、これを利用したエラー除去法を構築した。

2.2 実験材料

2.2.1 使用菌株および培養条件

Table 2.1 に使用した酵母株を記した。

YPD 培地は 1% yeast extract (YE)、2% peptone、及び 2% glucose の組成で作製した。選択培地は 0.17% yeast nitrogen base w/o A.A. w/o A.S.、0.5% ammonium sulfate、2% glucose の最小培地(MM 培地)に栄養混合物を添加して作製した。第一章の Table 1.3 に栄養混合物の組成を記載した。固体培地(プレート)として使用する際は培地用寒天を 2% 加えた。

Table 2.1 : 使用した酵母株

Name	Species ^a	Genotype
BY4743	Sc	<i>MATa</i> α <i>his3</i> Δ 1/ <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0/ <i>leu2</i> Δ 0 <i>LYS2</i> / <i>lys2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0/ <i>MET15</i> <i>ura3</i> Δ 0/ <i>ura3</i> Δ 0
RAK3614	Sc	<i>MATa</i> <i>ade2</i> Δ 0:: <i>hisG</i> <i>his3</i> Δ 200 <i>leu2</i> Δ 0 <i>lys2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>trp1</i> Δ 63 <i>ura3</i> Δ 0:: <i>LEU2</i>
RAK3625	Sc	<i>MATa</i> <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0:: <i>ScTDH3</i> _{p_{Asc1}} <i>AoTAA</i> _{NotI} <i>PGK1</i> ter- <i>LEU2</i>
RAK3908	Km	<i>ura3-1 ade2-1</i>
RAK4296	Sc	<i>MATa</i> <i>his3</i> Δ 200 <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>trp</i> Δ 63 <i>ura3</i> Δ 0:: <i>ScGAL10</i> p-yCLuc _{15c} <i>URA3</i>
RAK4314	Sc	<i>MATa</i> <i>ade2</i> Δ 0A <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0:: <i>ScTDH3</i> _{p_{15c}} <i>URA3</i>
RAK4920	Sc	<i>MATa</i> <i>ade2</i> Δ 0A <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0:: <i>ScTDH3</i> _p -yCLuc _{15c} <i>LEU2</i>
RAK4960	Sc	<i>MATa</i> <i>ade2</i> Δ 0A <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0:: <i>ScTDH3</i> _p -yCLuc _{15c} <i>URA3</i>
RAK5125	Sc	<i>MATa</i> <i>ade2</i> Δ 0A <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0:: <i>ScTDH3</i> _p -yGLuc _{15c} <i>LEU2</i>
RAK5986	Km	<i>ura3-1 ade2-1</i> pKM019 [<i>ScADE2</i> - <i>KmARS7</i> - <i>ScURA3</i>]
RAK6140	Km	<i>ura3-1 ade2-1</i> pKM030 [<i>KmCenD</i> - <i>ScADE2</i> - <i>KmARS7</i> - <i>ScURA3</i>]
RAK6202	Km	<i>ura3-1 ade2-1</i> pKM149 [<i>KmCenD</i> - <i>ScADE2</i> - <i>KmARS7</i> - <i>ScTDH3</i> _p -yCLuc _{15c} <i>ScURA3</i>]
RAK9817	Km	<i>ura3-1 ade2-1</i> pKM288 [<i>ScADE2</i> - <i>ScTDH3</i> _p -PhEG- <i>ScURA3</i> - <i>KmCenD</i> - <i>KmARS7</i>]
RAK7889	Km	<i>ura3-1 ade2-1</i> [<i>KmCenD</i> - <i>ScADE2</i> - <i>KmARS7</i> - <i>ScTDH3</i> _p -yRo <i>GLU1</i> ^{<i>ΔN-1</i>} = <i>ScURA3</i>]
RAK7890	Km	<i>ura3-1 ade2-1</i> [<i>KmCenD</i> - <i>ScADE2</i> - <i>KmARS7</i> - <i>ScTDH3</i> _p -yRo <i>GLU1</i> ^{<i>ΔN-2</i>} = <i>ScURA3</i>]
RAK10276	Km	<i>ura3-1 ade2-1</i> pKM407 [<i>KmCenD</i> - <i>ScADE2</i> - <i>KmARS7</i> - <i>ScTDH3</i> _p - Δ 42yRo <i>GLU1</i> ^{T138P A139L T140P} = <i>ScURA3</i>] ^d
RAK10277	Km	<i>ura3-1 ade2-1</i> pKM408 [<i>KmCenD</i> - <i>ScADE2</i> - <i>KmARS7</i> - <i>ScTDH3</i> _p - Δ 42yRo <i>GLU1</i> ^{[S84L-D120T] L418F} = <i>ScURA3</i>] ^{b,d}
RAK10278	Km	<i>ura3-1 ade2-1</i> pKM409 [<i>KmCenD</i> - <i>ScADE2</i> - <i>KmARS7</i> - <i>ScTDH3</i> _p - Δ 42yRo <i>GLU1</i> ^{T136S} = <i>ScURA3</i>] ^d
RAK10279	Km	<i>ura3-1 ade2-1</i> pKM410 [<i>KmCenD</i> - <i>ScADE2</i> - <i>KmARS7</i> - <i>ScTDH3</i> _p - Δ 42yRo <i>GLU1</i> ^{L422W I504V N506T} = <i>ScURA3</i>] ^d
RAK10280	Km	<i>ura3-1 ade2-1</i> pKM411 [<i>KmCenD</i> - <i>ScADE2</i> - <i>KmARS7</i> - <i>ScTDH3</i> _p - Δ 42yRo <i>GLU1</i> ^{I101N [K105R-T152P]} = <i>ScURA3</i>] ^{c,d}
RAK10281	Km	<i>ura3-1 ade2-1</i> pKM412 [<i>KmCenD</i> - <i>ScADE2</i> - <i>KmARS7</i> - <i>ScTDH3</i> _p - Δ 42yRo <i>GLU1</i> wild type= <i>ScURA3</i>] ^d
RAK10282	Km	<i>ura3-1 ade2-1</i> pKM413 [<i>KmCenD</i> - <i>ScADE2</i> - <i>KmARS7</i> - <i>ScTDH3</i> _p - Δ 42yRo <i>GLU1</i> ^{W338A} = <i>ScURA3</i>] ^d
RAK10470	Km	<i>ura3-1 ade2-1</i> pKM429 [<i>ScADE2</i> - <i>ScTDH3</i> _p -yRo <i>GLU1</i> wild type- <i>ScURA3</i> - <i>KmCenD</i> - <i>KmARS7</i>]
RAK13613	Km	<i>ura3-1 ade2-1</i> pKM935 [<i>ScADE2</i> - <i>ScTDH3</i> _p - yRo <i>GLU1</i> ^{T138P A139L T140P} - <i>ScURA3</i> - <i>KmCenD</i> - <i>KmARS7</i>]
RAK13615	Km	<i>ura3-1 ade2-1</i> pKM936 [<i>ScADE2</i> - <i>ScTDH3</i> _p -yRo <i>GLU1</i> ^{[S84L-D120T] L418F} - <i>ScURA3</i> - <i>KmCenD</i> - <i>KmARS7</i>] ^b
RAK13617	Km	<i>ura3-1 ade2-1</i> pKM937 [<i>ScADE2</i> - <i>ScTDH3</i> _p -yRo <i>GLU1</i> ^{T136S} - <i>ScURA3</i> - <i>KmCenD</i> - <i>KmARS7</i>]
RAK13619	Km	<i>ura3-1 ade2-1</i> pKM938 [<i>ScADE2</i> - <i>ScTDH3</i> _p -yRo <i>GLU1</i> ^{L422W I504V N506T} - <i>ScURA3</i> - <i>KmCenD</i> - <i>KmARS7</i>]
RAK13621	Km	<i>ura3-1 ade2-1</i> pKM939 [<i>ScADE2</i> - <i>ScTDH3</i> _p - yRo <i>GLU1</i> ^{I101N [K105R-T152P]} - <i>ScURA3</i> - <i>KmCenD</i> - <i>KmARS7</i>] ^c
RAK13623	Km	<i>ura3-1 ade2-1</i> pKM940 [<i>ScADE2</i> - <i>ScTDH3</i> _p - yRo <i>GLU1</i> ^{W338A} - <i>ScURA3</i> - <i>KmCenD</i> - <i>KmARS7</i>]

^aSc: *Saccharomyces cerevisiae*, Km: *Kluyveromyces marxianus*.

^bAmino acid sequence from 84 to 120: LLQSLVLTNTGPSLLLSTVSRNSTSSTKSLVRPTTT.

^cAmino acid sequence from 105 to 152:

RNSTSSTKSLVRPTTTTLLTKSLPLSQPPPPLPLPPPPLHLPLPP.

^d= indicates in-frame fusion of coding sequences.

2.2.2 使用オリゴヌクレオチド

Table 2.2 に使用したオリゴヌクレオチドの名前と配列を記した。

Table 2.2 : 使用したオリゴヌクレオチド

Name	Sequence (5'→3')
TDH3p40-ycellulase	CAAGAACTTAGTTTCGAATAAACACACATAAACAAACAAAATGGAAGGTAACACCATCTT
ycellulase-1	ATGGAAGGTAACACCATCTTGAAGATCGTCTTGATCTGTACCATCTTGGCTGGTTTGTTCGGTC AAGTCGTCCAGTCTA
ycellulase-2	CGCTGAAAACACCGCTTACCAAAACCCCAACCGGTATCTACTACGAAGTCAGAGGTGACACCA TCTACATGATCAACGTCCG
ycellulase-3	CTTCTGGTGAAGAAACCCCAATCCACTTGTTCGGTGTCAACTGGTTCGGTTTCGAAACCCCA AACCACGTCTCCACGGT
ycellulase-4	TTGTGGAAGAGAACTGGGAAGACATGTTGTTGCAAATCAAGTCTTTGGGTTTCAACGCTAT CAGATTGCCATTCTGTAC
ycellulase-5	CGAATCTGTCAAGCCAGGTACCAACCAATCGGTATCGACTACTCTAAGAACCAGACTTGA GAGGTTTGGACTCTTTGC
ycellulase-6	AAATCATGGAAGATCATCAAGAAGGCTGGTGACTTGGGTATCTTCGTCTTGTGGACTACC ACAGAATCGGTTGTACC
ycellulase-7	CACATCGAACCATTTGTGGTACACCGAAGACTTCTCTGAAGAAGACTTCATCAACACCTGGATC GAAGTCGCTAAGAGATT
ycellulase-8	CGGTAAGTACTGGAACGTATCGGTGCTGACTTGAAGAACGAACCACACTCTGTACCTCTC CACCAGCTGCTTACACCG
ycellulase-9	ACGGTACCGGTGCTACCTGGGGTATGGGTAACCCAGCTACCGACTGGAACCTGGCTGCTGAA AGAATCGGTAAGGCTATC
ycellulase-10	TTGAAGGTCGCTCCACACTGGTTGATCTTCGTCAAGGTACCCAATTCACCAACCCAAAGAC CGACTCTTCTTACAAGTG
ycellulase-11	GGGTTACAACGCTTGGTGGGTGGTAACCTTGATGGCTGTCAAGGACTACCCAGTCAACTTGC CAAGAAACAAGTTGGTCT
ycellulase-12	ACTCTCCACACGTCTACGGTCCAGACGTCTACAACCAACCATACTTCGGTCCAGCTAAGGGTT TCCCAGACAACTTGCCA
ycellulase-13	GACATCTGGTACCACCCTTCGGTTACGTCAAGTTGGAATTGGGTTACTCTGTCTCATCGGT GAATTCGGTGGTAAGTA
ycellulase-14	CGGTCACGGTGGTGACCCAAGAGACGTATCTGGCAAAAACAAGTTGGTCGACTGGATGATCG AAAACAAGTTCTGTGACT
ycellulase-15	TCTTCTACTGGTCTTGAACCCAGACTCTGGTGACACCGGTGGTATCTTGAAGACGACTGG ACCACCATCTGGGAAGAC
ycellulase-16	AAGTACAACAACCTTGAAGAGATTGATGGACTCTTGTCTAAGTCTTCTTCTTACCCAATCTG TCATCAGATCTACCAC
ycellulase-17	CCCAACCAAGTCTAACACCGCTAAGAAGATCTGTGGTCCAGCTATCTTGATCATCTTGGCTGT CTTCTCTTTGTTGTTGA
15G-ycellulase	GGGGGGGGGGGGGGTATCTTGGAGCTCTTCTCAACAACAAAGAGAAGACA
ycellulase-1c40	GGTAAGCGGTGTTTTCAGCGTAGACTGGGACGACTTGACC
ycellulase-2c40	TGGGGTTTCTTACCAGAAGCGACGTTGATCATGTAGATG
ycellulase-3c40	TCCCAGTTTCTTCCACAAACCGTGGACGACGTGGTTTG
ycellulase-4c40	TACCTGGCTTGACAGATTCGGTACAGAATGGCAATCTGAT
ycellulase-5c40	GATGATCTTTTCCATGATTTGCAAAGAGTCCAAACCTCTC
ycellulase-6c40	TACCACAATGGTTCGATGTGGGTACACCGATTCTGTGGT
ycellulase-7c40	TGACGTTCCAGTACTTACCGAATCTTTAGCGACTTCGAT
ycellulase-8c40	CCAGGTAGCACCGGTACCGTCCGGTGTAAAGCAGCTGGTGG
ycellulase-9c40	CAGTGTGGAGCGACCTTCAAGATAGCCTTACCGATTCTTT
ycellulase-10c40	CCCACCAAGCGTTGTAACCCACTTGTAAAGAAGAGTCGGT
ycellulase-11c40	ACCGTAGACGTGTGGAGAGTAGACCAACTTGTCTTGGC
ycellulase-12c40	AAGTGGTGGTACCAGATGCTGGCAAGTTGTCTGGGAAAC
ycellulase-13c40	TTGGGTCACCACCGTGACCGTACTTACCACCGAATTCACC

y cellulase-14c40 GTTCCAAGACCAGTAGAAGAAGTCACAGA AACTTGT TTTTCG
y cellulase-15c40 CTCTTCAAGTTGTTG TACTTGTCTTCCCAGATGGTGGTCC
y cellulase-16c40 CGGTGTTAGACTTGGTTGGGGTGGTAGATCTGATGACAGA
y cellulase-17c TTATCTTGGAGCTCTTCTCAACAACAAAGAGAAGACA
y cellulase-1 ATGGAAGGTAACACCATCTTGAAGATCGTCTTGATCTGTACCATCTTGGCTGGTTTGTTCGGTC
AAGTCGTCCCAGTCTA
y cellulase-2 CGCTGAAAACACCGCTTACCAAACCCCAACCGGTATCTACTACGAAGTCAGAGGTGACACCAT
CTACATGATCAACGTCCG
y cellulase-3 CTTCTGGTGAAGAAACCCCAATCCACTTGTTCGGTGTCAACTGGTTCGGTTTCGAAACCCCAA
ACCACGTCTCCACGGT
y cellulase-4 TTGTGGAAGAGAACTGGGAAGACATGTTGTTGCAAATCAAGTCTTTGGGTTTCAACGCTATC
AGATTGCCATTCTGTAC
y cellulase-5 CGAATCTGTCAAGCCAGGTACCCAACCAATCGGTATCGACTACTCTAAGAACCCAGACTTGAG
AGGTTTGGACTCTTTGC
y cellulase-6 AAATCATGGAAGATCATCAAGAAGGCTGGTGACTTGGGTATCTTCGCTCTTGTGGACTACC
ACAGAATCGGTTGTACC
y cellulase-7 CACATCGAACCAATTGTGGTACACCGAAGACTTCTCTGAAGAAGACTTCATCAACACCTGGATC
GAAGTCGTAAAGAGATT
y cellulase-8 CGGTAAGTACTGGAACGTATCGGTGCTGACTTGAAGAACGAACCACACTCTGTACCTCTCC
ACCAGCTGCTTACACCG
y cellulase-9 ACGGTACC GG TGTACTCTGGGGTATGGGTAACCCAGCTACCGACTGGA ACTTGGCTGCTGAAA
GAATCGGTAAGGCTATC
y cellulase-10 TTGAAGGTCGCTCCACACTGGTTGATCTTCGTCGAAGGTACCCAATTCACCAACCCAAAGACC
GACTCTTCTTACAAGTG
y cellulase-11 GGGTTACACGCTTGGTGGGGTGGTAACTTGATGGCTGTCAAGGACTACCCAGTCAACTTGCC
AAGAAACAAGTTGGTCT
y cellulase-12 ACTCTCCACACGTCTACGGTCCAGACGTCTACAACCAACCATACTTCGGTCCAGCTAAGGGTT
TCCCAGACAAC TTGCCA
y cellulase-13 GACATCTGGTACCACCACCTTCGGTTACGTCAAGTTGGAATTGGGTTACTCTGTCTCATCGGTG
AATTCGGTGGTAAGTA
y cellulase-14 CGGTCACGGTGGTGACCCAAGAGACGTCATCTGGCAAAAACAAGTTGGTTCGACTGGATGATCG
AAAACAAGTTCTGTGACT
y cellulase-15 tCTTCTACTGGTCTTGGAAACCAGACTCTGGTGCACCCGGTGGTATCTTGAAGACGACTGGA
CCACCATCTGGGAAGAC
y cellulase-16 AAGTACAACA ACTTGAAGAGATTGATGGACTCTTGTCTAAGTCTTCTTCTTACCCAATCTG
TCATCAGATCTACCAC
y cellulase-17 CCCAACCAAGTCTAACACCGCTAAGAAGATCTGTGGTCCAGTATCTTGATCATCTTGGCTGTC
TTCTCTTTGTTGTTGA
TDH3p40-yGLuc CAAGA ACTTAGTTTCGAATAAACACACATAAACAAACAAAATGGGTGTCAAGGTCTTGTTCG
CTTTGATCTGTATCGCTG
yGLuc-2 TCGCTGAAGCTAAGCCAACCGAAAACAACGAAGACTTCAACATCGTCGCTGTCGCTTCTAAC
TTCGCTACCACCGACTTG
yGLuc-3 GACGCTGACAGAGGTAAGTTGCCAGGTAAGAAGTTGCCATTGGAAGTCTTGAAGGAAATGG
AAGCTAACGCTAGAAAGGC
yGLuc-4 TGGTTGTACCAGAGGTTGTTGATCTGTTGTCTCATCAAGTGTACCCCAAAGATGAAGAA
GTTTATCCCAGGTAGAT
yGLuc-5 GTCACACCTACGAAGGTGACAAGAACTGCTCAAGTGGTATCGGTGAAGCTATCGTCGAC
ATCCCAGAAATCCCAGGT
yGLuc-6 TTCAAGGACTTGAACCAATGGAACAATTCATCGCTCAAGTGC ACTTGTGTGCTGACTGTACC
ACCGGTTGTTGAAGGG
yGLuc-7 TTTGGCTAACGTCCAATGTTCTGACTTGTGGAAGAAGTGGTTGCCACAAAGATGTGCTACCTT
CGCTTCTAAGATCCAAG
yGLuc-8 GTC AAGTCGACAAGATCAAGGGTGTGGTGGTACTAA
yGLuc-1c GGTTGGCTTAGCTTCAGCGACAGCGATAACAGATCAAAGCG
yGLuc-2c AACTTACCTCTGT CAGCGTCCAAGTCGGTGGTAGCGAAGT
yGLuc-3c AAC AACCTCTGGTACAACCAGCCTTTCTAGCGTTAGCTTC
yGLuc-4c GTCACCTTCGTAGGTGTGACATCTACCTGGGATGAACTTC
yGLuc-5c ATTGGTTCCAAGTCTTGA AACCTGGGATTTCTGGGATGT
yGLuc-6c AACATTGGACGTTAGCCAAACCCTTCAAACAACCGGTGGT
yGLuc-7c CTTGATCTTGTGCTGACTTGACCTTGGATCTTAGAAGCGAAG
15G-yGLuc GGGGGGGGGGGGGGGTTAGTCAACCACCAGCACC
yGLuc-1c80 TTGAAGTCTTCGTTGTTTTCGGTTGGCTTAGCTTCAGCGACAGCGATACAGATCAAAGCGAAC
AAGACCTTGACACCCAT
yGLuc-2c80 ATGGCAACTTCTTACCTGGCAACTTACCTCTGT CAGCGTCCAAGTCGGTGGTAGCGAAGTTAG
AAGCGACAGCGACGATG
yGLuc-3c80 GATGTGAGACAAACAGATCAAACAACCTCTGGTACAACCAGCCTTTCTAGCGTTAGCTTCCA
TTTCTTCAAGACTTCCA
yGLuc-4c80 CCACCTTGAGCAGATTCCCTGT CACCTTCGTAGGTGTGACATCTACCTGGGATGAACTTCTTC
ATCTTTGGGGTACACTT
yGLuc-5c80 CTTGAGCGATGAATTGTTCCATTGGTTCCAAGTCTTGA AACCTGGGATTTCTGGGATGTGCA

yGLuc-6c80 CGATAGCTTCACCGATA
 CCACTTCTTCAACAAGTCAGAACATTGGACGTTAGCCAAACCCTTCAAACAACCGGTGGTAC
 AGTCGACACACAAGTCGA
 yGLuc-7c80 GGTTAGTCACCACCAGCACCTTGATCTTGTGCGACTTGACCTTGGATCTTAGAAGCGAAGGTA
 GCACATCTTTGTGGCAA
 yGLuc-1 40 ATGGGTGTCAAGGTCTTGTTCGCTTTGATCTGTATCGCTG
 yGLuc-2 40 TCGCTGAAGCTAAGCCAACCGAAAACAACGAAGACTTCAA
 yGLuc-3 40 CATCGTCGCTGTGCGTCTTAACCTCGCTACCACCGACTTG
 yGLuc-4 40 GACGCTGACAGAGGTAAGTTGCCAGGTAAGAAGTTGCCAT
 yGLuc-5 40 TGGAAGTCTTGAAGGAAATGGAAGCTAACGCTAGAAAAGGC
 yGLuc-6 40 TGTTGTACCAGAGGTTGTTGATCTGTTTGTCTCACATC
 yGLuc-7 40 AAGTGTACCCCAAAGATGAAGAAGTTCATCCCAGGTAGAT
 yGLuc-8 40 GTCACACCTACGAAGGTGACAAGGAATCTGCTCAAGGTGG
 yGLuc-9 40 TATCGGTGAAGCTATCGTCGACATCCCAGAAATCCCAGGT
 yGLuc-10 40 TTCAAGGACTTGGAACCAATGGAACAATTCATCGCTCAAG
 yGLuc-11 40 TCGACTTGTGTGTCGACTGTACCACCGGTTGTTGAAGGG
 yGLuc-12 40 TTTGGCTAACGTCCAATGTTCTGACTTGTGAAGAAGTGG
 yGLuc-13 40 TTGCCACAAAGATGTGCTACCTTCGCTCTAAGATCCAAG
 yGLuc-14 GTCAAGTCGACAAGATCAAGGGTGTGGTGGTACTAACCCCCCCCCCCCCC
 yGLuc-1c40 GGTTGGCTTAGCTTCAGCGACAGCGATAACAGATCAAAGCG
 yGLuc-2c40 TAGAAGCGACAGCGACGATGTTGAAGTCTTCGTTGTTTT
 yGLuc-3c40 AACTTACCTCTGTCAGCGTCCAAGTCGGTGGTAGCGAAGT
 yGLuc-4c40 CATTTCTTCAAGACTTCCAATGGCAACTTCTACCTGGC
 yGLuc-5c40 AACAACCTTGGTACAACCAGCCTTTCTAGCGTTAGCTTC
 yGLuc-6c40 TTCATCTTTGGGGTACACTTGATGTGAGACAAACAGATCA
 yGLuc-7c40 GTCACCTTCGTAGGTGTGACATCTACCTGGGATGAACTTC
 yGLuc-8c40 CGACGATAGCTTACCAGATACCACCTTGAGCAGATTCTT
 yGLuc-9c40 ATTGGTTCCAAGTCTTGAACCTGGGATTTCTGGGATGT
 yGLuc-10c40 ACAGTCGACACACAAGTCGACTTGAGCGATGAATTGTTCC
 yGLuc-11c40 AACATTGGACGTTAGCCAAACCCTTCAAACAACCGGTGGT
 yGLuc-12c40 GTAGCACATCTTTGTGGCAACCCTTCTTCAAACAAGTCAG
 yGLuc-13c40 CTTGATCTTGTGCGACTTGACCTTGGATCTTAGAAGCGAAG
 yRoGLU1-1 ATGCAATTGTTCAACTTGCCATTGAAGGTCTCTTCTTCTTGGTCTTGTG
 yRoGLU1-2 TTACTTCTCTTTGTTGGTCTCTGCTGCTTCTATCCCATCTTCTGCTTCTG
 yRoGLU1-3 TCCAATTGGACTCTTACAACACTACGACGGTCTTACCTTCTGTTAAGATC
 yRoGLU1-4 TACGTCGAAGAACATCGCTTACTCTAAGAAGGTACCGTCATCTACGCTGA
 yRoGLU1-5 CGGTTCTGACAACCTGGAACAACAACGGTAACACCATCGCTGCTTCTACT
 yRoGLU1-6 CTGCTCCAATCTCTGGTCTAATACTACGAATACTGGACCTTCTCTGCTTCT
 yRoGLU1-7 ATCAACGGTATCAAGGAATTCTACATCAAGTACGAAGTCTCTGGTAAGAC
 yRoGLU1-8 CTACTACGACAACAACAACCTTGCTAATACTACCAAGTCTTACCTTAAGC
 yRoGLU1-9 CAACCACCACCACCGCTACCGCTACCACCACCACCGCTCCATCTACCTT
 yRoGLU1-10 ACCACCACCCACCATCTAGATCTGAACCAGCTACCTTCCCAACCGGTAA
 yRoGLU1-11 CTCTACCATCTCTTCTTGGATCAAGAAGCAAGAAGGTATCTTAGATTCTG
 yRoGLU1-12 CTATGTTGAGAAAACATCAACCCACCAGGTTCTGCTACCGGTTTACGCT
 yRoGLU1-13 GCTTCTTTGTCTACCGCTGGTCCAGACTACTACTACGCTTGGACCAGAGA
 yRoGLU1-14 CGCTGCTTTGACTCTAACGTCATCGTCTACGAATACAACACCACCTTGT
 yRoGLU1-15 CTGGTAACAAGACCATCTTGAACGCTTGAAGGACTACGTCACCTTCTCT
 yRoGLU1-16 GTCGAAGACCAATCTACCTTACCCTGCTGTAACCTGTTGGGTGAACCAAA
 yRoGLU1-17 GTTCAACCCAGACGCTTCTGGTTACACCGGTGCTTGGGGTAGACCACAAA
 yRoGLU1-18 ACGACGGTCCAGCTGAAAGAGCTACCACCTTCTTCTGCTGACTCT
 yRoGLU1-19 TACTTGACCCAAACCAAGGACGCTTCTTACGTCACCGGTACCTGAAAGCC
 yRoGLU1-20 AGCTATCTTCAAGGACTTGGACTACGTCGTCACGCTGTTGTTAAGGTT
 yRoGLU1-21 GTTTCGACTTGTGGGAAGAAGTCAACGGTGTCCACTTCTACACCTTGATG
 yRoGLU1-22 GTCATGAGAAAAGGTTTGTGTTGGGTGCTGACTTCGCTAAGAGAAAACGG
 yRoGLU1-23 TGACTCTACCAGAGCTTCTACCTACTTCTACCCTTCTACCATCGCTA
 yRoGLU1-24 ACAAGATCTCTTCTTCTGGGTCTTCTAACAACCTGGATCCAAGTCTCT
 yRoGLU1-25 CAATCTGTCACCGGTGGTGTCTCTAAGAAGGGTTTGGACGCTCTACCTT
 yRoGLU1-26 GTTGGCTGCTAACTTGGGTCTGTCGACGACGGTTTCTTACCCACGGTT
 yRoGLU1-27 CTGAAAAGATCTTGGCTACCCTGTCGCTGTCGAAGACTCTTTCGCTTCT
 yRoGLU1-28 TTGTACCAATCAACAAGAACTTGCATCTTACTTGGGTAACCTATACGG
 yRoGLU1-29 TAGATACCCAGAAGACACTACAACGGTAACGGTAACCTTCAAGGTAACCT
 yRoGLU1-30 CTTGGTTCTTGGCTGTCACCGGTTACGCTGAATTGTAACAGAGCTATC
 yRoGLU1-31 AAGGAATGGATCGGTAACGGTGGTGTACCGTCTTCTATCTTTGCC
 yRoGLU1-32 ATTCTTCAAGAAGTTCGACTCTTCTGCTACCTCTGGTAAGAAGTACACCG
 yRoGLU1-33 TCGGTACCTCTGACTTCAACAACCTTGGCTCAAAAACATCGCTTTGGCTGCT
 yRoGLU1-34 GACAGATTCTGTCTACCGTCCAATTGACGCTCACAACAACCGGTTCTT
 yRoGLU1-35 GGCTGAAGAATTGACAGAACACCACCGGTTTGTCTACCGGT
 yRoGLU1-36 GCTAGAGACTTGACCTGGTCTACGCTTCTTGGATCACCG

yRoGLU1-37	CTTCTTACGCTAAGGCTGGTGTCCAGCTGCTTAA
yRoGLU1-1c	AGCAGAGACCAACAAAGAGAAGTAAGACAAGACCAAGAAGAAAGAGACCT
yRoGLU1-2c	TCGTAGTTGTAAGAGTCCAATTGGACAGAAAGCAGAAGATGGGATAGAAGC
yRoGLU1-3c	TAGAGTAAGCGATGTTCTTGACGTAGATCTTACCAGAGAAGGTAGAACCG
yRoGLU1-4c	GTTGTTGTTCCAGTTGTCAGAACCCTCAGCGTAGATGACGGTGACCTTCT
yRoGLU1-5c	TAGTTAGAACCAGAGATTGGAGCAGAGTAAGAAGCAGCGATGGTGTACC
yRoGLU1-6c	TGTAGAATTCCTTGATACCGTTGATAGAAGCAGAGAAGGTCCAGTATTCCG
yRoGLU1-7c	AGCAGAGTTGTTGTTGTCGTAGTAGGTCTTACCAGAGACTTCGTACTTGA
yRoGLU1-8c	GTAGCGGTAGCGGTGGTGGTGGTGGCTTAGAGGTAGAGACTTGGTAGTT
yRoGLU1-9c	CAGATCTAGATGGTGGGGTGGTGGTAGAGGTAGATGGAGCGGTGGTGGTG
yRoGLU1-10c	CCTGATCCAAGAAGAGATGGTAGAGTTACCGTTGGGAAGGTAGCTGGTT
yRoGLU1-11c	GGTGGGTTGATGTTTCTCAACATAGCGAATCTAGAGATACCTTCTTGCTT
yRoGLU1-12c	CTGGACCAGCGGTAGACAAAGAAGCAGCGATGAAACCGGTAGCAGAACTT
yRoGLU1-13c	GATGACGTTAGAGGTCAAAGCAGCGTCTCTGGTCCAAGCGTAGTAGTAGT
yRoGLU1-14c	ACGTTCAAGATGGTCTTGTACCAGACAAGGTGGTGGTGTATTTCGTAGAC
yRoGLU1-15c	CGGTAGAGGTAGATTGGGTCTTGACAGAGAAGGTGACGTAGTCCTTCAAG
yRoGLU1-16c	GTAACCAGAAGCGTCTGGGTTGAACTTTGGTTCACCCAAACAGTTACAGA
yRoGLU1-17c	GTAGCTCTTTCAGCTGGACCGTCGTTTTGTGGTCTACCCCAAGCACCGGT
yRoGLU1-18c	AAGCGTCCTTGGTTGGGTCAAGTAAGAGTCAGCGAAACAAGATGAAGGTG
yRoGLU1-19c	GTAGTCCAAGTCCCTTGAAGATAGCTGGCTTCAAGGTACCGGTGACGTAAG
yRoGLU1-20c	TTGACTTCTTCCCACAAGTCAAAACAACCGTTAGACCAGACGTTGACGAC
yRoGLU1-21c	CCAACAACAACCCCTTCTCATGACCATCAAGGTGTAGAAGTGGACACCG
yRoGLU1-22c	GTAGGTAGAAGCTCTGGTAGAGTACCGTTTTCTTAGCGAAGTCAGCAC
yRoGLU1-23c	GAGACCCAGAAAGAAGAGATCTTGTAGCGATGGTAGAAGCGGTAGAAGA
yRoGLU1-24c	TAGAGACACCACCGGTGACAGATTGAGAGACTTGGATCCAGTTGTTAGAA
yRoGLU1-25c	GACAGAACCCAAGTTAGCAGCCAACAAGGTAGAGACGTCCAAACCCCTTCT
yRoGLU1-26c	ACAGCGGTAGCCAAGATCTTTTCAAGAACCTGGGGTGAAGAAACCGTCGTC
yRoGLU1-27c	GCAAGTTCTTGTGATTGGGTACAAAGAAGCGAAAGAGTCTTCGACAGCG
yRoGLU1-28c	GTTGTAGGTGTCTTCTGGGTATCTACCGATAGAGTTACCCAAGTAAGATG
yRoGLU1-29c	TAACCGGTGACAGCCAAGAACCAAGAGTTACCTTGAGAGTTACCGTTACC
yRoGLU1-30c	CACCACCGTTACCGATCCATTCCTTGATAGCTCTGTAGTACAATTCAGCG
yRoGLU1-31c	AGAAGAGTCAAACTTCTTGAAGAATGGCAAAGAGATAGAAGAGACGGTGA
yRoGLU1-32c	AAGTTGTTGAAGTCAGAGGTACCGACGGTGTACTTCTTACCAGAGGTAGC
yRoGLU1-33c	ATTGGACGGTAGACAAGAATCTGTCAGCAGCCAAGCGATGTTTTGAGCC
yRoGLU1-34c	TTCTGTCGAATCTTACGCCAAAGAACCCTTGTGTGAGCGTGCA
yRoGLU1-35c	GACCAGGTCAAGTCTCTAGCACCGGTAGACAAACCGGTGG
yRoGLU1-36c	ACCAGCCTTAGCGTAAGAAGCGGTGATCAAAGAAGCGTGA
yRoGLU1-37c-URA3 terc	TTAATTATATCAGTTATTACTTAAGCAGCTGGAGC
TDH3p40-glucoR	CaagaacttagttcgaataAACACACATAAACAAACAAAATGCAATTGTTCAACTTGCCATTGAAGGTC TCTTCTTCT
15G-glucoR	GGGGGGGGGGGGGGTAAAGCAGCTGGAGCACAGCCTTAGCGTAAGAAGCGGTG
15C-LEU2-1	CCCCCCCCCCCCCGGGAATACTCAGGTATCGTA
URA3-300c	TGTTGTGAAGTCATTGACACAG
TDH3p40	CAAGAACTTAGTTTTCGAATAAACACACACATAAACAAACAAA
URA3-200c	GAACTCTGTTGTTCTTTGGAGTTC
pRS316URA3-226	AGCTTTTCAATTCAATTCATCATT
URA3+880c	GTAATAACTGATATAATTAATTTGA
KmARS7(201-260)31	CAAGACTTCTTGAAGTGAIAAACCAACTTTCAGTCTTCAAACCTAAAAATGAAAATCAGTGGAG
6URA3-226	CTTTTCAATTCATTCAT
15C-URA3+880c	CCCCCCCCCCCCCGTAATAACTGATATAATTAATTTGA
URA3+772-9c(118)	GCATATTTGAGAAGATGCGGCCAGCAAAACTAAAAACTGTATTATAAGTAAATGCATGTAT ACTAAACTCACAAATTAGAGCTCAATTTAATTATATCAGTTATTACCCCCCCCCC TTCCAGCCTGCTTTTCTGTAACGT
URA3+771c	GCATATTTGAGAAGATAAAAAACTGTATTATAAGTAAATGCATGTATACTAAACTCACAAAT
URA3+772term3CG9	TAGAGCTTCAATTTAATTATATCAGTTACCCGGGCC
URA3+21	GGAACGTGCTGCTACTCATCCTAGT
ScURA3+31	GCTACTCATCTAGTCTGTTGCTG
yGLuc+3c-TDH3-1c	CATTTTGTGTTTATGTGTGTTTATTTCGA
yGLuc+4	GGTGTCAAGGCTTGTTCGCTTTGA
URA3(+4-20)c-yGLu c+555c	TTATATGTAGCTTTCGAGTCACCACCAGCACCCCTTGA
URA3+30c-yRoGLU 1(1793-1812)c	AGCACGTTCCCTTATATGTAGCTTTCGAAGCAGCTGGAGCACCCAGCCT
yRoGLU1+4	CAATTGTTCAACTTGCCATTGAAGG
yRoGLU1+43	GTCTTGCTTACTTCTCTTTGTTGG
yRoGLU1+1(75)	ATGCAATTGTTCAACTTGCCATTGAAGGTCTCTTCTTCTTGGTCTTGTCTTACTTCTCTTTGTT GGTCTCTGCT

2.3 実験方法

2.3.1 遺伝子設計

セルラーゼ遺伝子 yPhCel1 は、*Pyrococcus horikoshii* 由来のエンド-1, 4-b-グルカナーゼ(GenBank No. BAA30271)のアミノ酸配列から設計した。この際、アミノ酸配列中の配列の NXS、または NXT を NXA と改変したが、これはタンパク質への不要な糖鎖修飾を防ぐ目的で行った(28)。ルシフェラーゼ遺伝子 yGLuc は、*Gaussia princeps* 由来ルシフェラーゼタンパク(GenBank No. AY015993)のアミノ酸配列から設計した。また、グルコアミラーゼ遺伝子 yRoGLU1 は、*Rhizopus orizae* 由来グルコアミラーゼタンパク(RoGLU1 : GenBank No. D00049)のアミノ酸配列から配列を設計した。遺伝子設計の際にはコドン使用頻度を *S. cerevisiae* の *TDH3* 遺伝子配列中に頻出のコドンに改変した(Table 2.3)。Fig. 2.1 に yPhCel1 の配列を、Fig. 2.2 に yGLuc の配列を、Fig. 2.3 に yRoGLU1 の配列を記載した。

Table 2.3 : 使用したコドン

アミノ酸	コドン	アミノ酸	コドン	アミノ酸	コドン
アラニン(A)	GCT	システイン(C)	TGT	アスパラギン酸(D)	GAC
グルタミン酸(E)	GAA	フェニルアラニン(F)	TTC	グリシン(G)	GGT
ヒスチジン(H)	CAC	イソロイシン(I)	ATC	リジン(K)	AAG
ロイシン(L)	TTG	メチオニン(M)	ATG	アスパラギン(N)	AAC
プロリン(P)	CCA	グルタミン(Q)	CAA	アルギニン(R)	AGA
セリン(S)	TCT	スレオニン(T)	ACC	バリン(V)	GTC
トリプトファン(W)	TGG	チロシン(Y)	TAC	終止	TAA


```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120
ATGCAATTGTTCAACTTGCATTGAAGGTCCTTCTTCTTGGCTTGTCTACTTCTCTTGTGGTCTCTGCTGCTTCTATCCATCTCTGCTTCTGTCCAATTGGACTCTACAAC
M Q L F N L P L K V S F F L V L S Y F S L L V S A A S I P S S A S V Q L D S Y N
130     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240
TAGGACGGTCTACCTTCTGCTAGATCTAGCTCAAGAACATCGCTTACTCTAGAAGGTCACCGTCATCTACGCTGACGGTCTGACAACTGGAAACAACGGTAAACCCATCGCT
Y D G S T F S G K I Y V K N I A Y S K K V T V I Y A D G S D N W N N N G N T I A
250     260     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360
GCTTCTTACTCTGCTCCAATCTCTGGTCTAATACGAATACTGGACCTTCTGCTGCTATCAACGGTATCAAGGAATCTACATCAAGTACGAAGTCTGCTGGTAAACCTACTACGAC
A S Y S A P I S G S N Y E Y W T F S A S I N G I K E F Y I K Y E V S G K T Y Y D
370     380     390     400     410     420     430     440     450     460     470     480
AACAAACCTCTGCTAATCACTCAAGTCTCTACCTCTAAGCCAACCCACCACCCTACCCTACCACCACCACCCTCCATCTACCTCTACCACCACCACCCTCTAGA TCTGAACCA
N N N S A N Y Q V S T S K P T T T A T A T T T T A P S T S T T T P P S R S E P
490     500     510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
GCTACCTTCCCAACCGGTAACTCTACCTCTCTTGGATCAAGAAGCAAGAGGTATCTAGATTGCGCTATGTTGAGAACAACCAACCCAGGTCTGCTACCAGTTCATCGGT
A T F P T G N S T I S S W I K K Q E G I S R F A M L R N I N P P G S A T G F I A
610     620     630     640     650     660     670     680     690     700     710     720
GCTTCTTGTCTACCGCTGGTCCAGACTACTACTACGCTTGGACCAGAGACGCTGCTTTGACCTCTAACGTCATCGTCTACGAATACAACACCACCCTGCTGGTAAACAGACCATCTTG
A S L S T A G P D Y Y A W T R D A A L T S N V I V Y E Y N T T L S G N K T I L
730     740     750     760     770     780     790     800     810     820     830     840
AACGCTTGAAGGACTACGCTACCCTTCTGCAAGACCCTAATCTACCTCTACCCTGCTAAGTGTGTTGGTGAACCAAGTTCACCCAGACGCTTCTGGTACACCGGTGCTTGGGT
N V L K D Y V T F S V K T Q S T S T V C N C L G E P K F N P D A S G Y T G A W G
850     860     870     880     890     900     910     920     930     940     950     960
AGACCAAAACGACGGTCCAGCTGAAAGAGCTACCACCTTCATCTTGTTCGCTGACTTACTTGGACCAACCAACGACGCTTCTTACGTCACCGGTACCCTGGAAGCCAGCTATCTTC
R P Q N D G P A E R A T T F I L F A D S Y L T Q T K D A S Y V T G T L K P A I F
970     980     990     1000    1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080
AAGGACTTGGACTACGCTGTCACGCTGGTCTAACGGTGTGTTGACCTTGGGAAAGGTCACCGTGTCCACTTCTACACCTGATGTCATGAGAAGGGTGTGTTGGGTGCT
K D L D Y V V N V W S N G C F D L W E E V N G V H F Y T L M V M R K G L L L G A
1090    1100    1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
GACTTCGCTAAGAGAACGGTACCTCTACCAGAGCTTCTACCTACTCTCTACCCTTCTACCATCGCTAACAAGATCTCTTCTTCTGGGTCCTCTTCTAACCACTGGATCCAAGTCTCT
D F A K R N G D S T R A S T Y S S T A S T I A N K I S S F W V S S N N W I Q V S
1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280    1290    1300    1310    1320
CAATCTGTCACCGGTGGTGTCTCTAAGAAGGGTGTGGACGCTCTACCTTGTGGCTGCTAACTTGGGTCTGTGACGACGCGGTTCCTTACCACCGGTCTGAAAGATCTTGGCTACC
Q S V T G G V S K K G L D V S T L L A A N L G S V D D G F F T P G S E K I L A T
1330    1340    1350    1360    1370    1380    1390    1400    1410    1420    1430    1440
GCTGTCGCTGTCGAAGACTCTTTCGCTCTTGTACCCAATCAACAAGAAC TGGCCATCTACTTGGGTAACTCTATCGGTAGATACCAAGAACACTTACAACGGTAAACGGTAACTCT
A V A V E D S F A S L Y P I N K N L P S Y L G N S I G R Y P E D T Y N G N S
1450    1460    1470    1480    1490    1500    1510    1520    1530    1540    1550    1560
CAAGGTAACTCTTGGTCTTGGCTGTCACCGGTACGCTGAAATGACTACAGAGCTATCAAGGAA TGGATCGGTAAACGGTGGTGTACCGGTCCTCTTCTATCTCTTGGCAATCTCAAG
Q G N S W F L A V T G Y A E L Y Y R A I K E W I G N G G V T V S S I S L P F F K
1570    1580    1590    1600    1610    1620    1630    1640    1650    1660    1670    1680
AAGTTCGACTCTCTGCTACCTCTGGTAAAGTACACCGTGGTACCCTGACTTCAACAACTTGGCTCAAACATCGCTTGGCTGCTGACAGA TCTGCTACCCTCAATTCGAC
K F D S S A T S G K K Y T V G T S D F N N L A Q N I A L A A D R F L S T V Q L H
1690    1700    1710    1720    1730    1740    1750    1760    1770    1780    1790    1800
GCTCACAAACGGTCTTGGCTGAAAGAA TCGACAGAACCACCGGT TGTCTACCCTGCTAGAGACTTGGCTGCTCAGCTCTTGTATCACCCTCTTACGCTAAGCTGGT
A H N N G S L A E E F D R T T G L S T G A R D L T W S H A S L I T A S Y A K A G
1810
GCTCCAGCTGCTTAA
A P A A *

```

Fig. 2.3 : yRoGLU1 遺伝子配列

2.3.2 プライマーの設計、及びプライマー溶液の作成

yPhcell1 遺伝子配列より、遺伝子合成のプライマーとして合成オリゴヌクレオチド ycellulase-1~17、ycellulase-1c40~16c40、及び ycellulase-17c を設計した。各プライマー濃度が 0.5 μM に調製された混合溶液を作成した。この混合溶液を滅菌超純水(SDW)で希釈し、濃度 0.25、0.125、0.0625、0.03125 μM の溶液を作成した。

yGLuc 遺伝子配列より、合成オリゴヌクレオチド TDH3p40-yGLuc、15G-yGLuc、yGLuc-2~8、yGLuc-1c~7c、yGLuc-1c80~7c80、yGLuc-1 40~14 40、及び yGLuc-1c40~14c40 を設計した。TDH3p40-yGLuc、15G-yGLuc、yGLuc-2~8、及び yGLuc-1c~7c を使ってプ

プライマー溶液 F80/S40 が作成された。TDH3p40-yGLuc、15G-yGLuc、yGLuc-2~8、及び yGLuc-1c80~7c80 を使ってプライマー溶液 F80/S80 が作成された。yGLuc-1 40~14 40、及び yGLuc-1c40~14c40 を使ってプライマー溶液 F40/S40 が作成された。これらの混合溶液では各プライマーの濃度が 0.5 μM となるように調製した。

yRoGLU1 遺伝子配列より、合成オリゴヌクレオチド TDH3p40-glucoR、15G-glucoR、yRoGLU1-1~37、yRoGLU1-1c~36c、及び yRoGLU1-37c-URA3terc を設計した。各プライマー濃度が 0.27 μM に混合溶液を作成した。

2.3.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)を利用した遺伝子全合成

PCR によって各プライマーを接続して遺伝子を合成した。この反応には KOD-plus- (東洋紡)、または Phusion DNA polymerase (FINNZYMES)を使用した。KOD-plus-を用いた反応の場合、プライマー混合溶液 2.0 μl 、10 \times KOD plus buffer 1.0 μl 、2 ml dNTPs 1.0 μl 、25 mM MgSO_4 0.4 μl 、KOD plus DNA polymerase 0.2 μl を SDW5.4 μl と混ぜ、10 μl の反応溶液を作成した。基本的な反応サイクルでは 94 $^\circ\text{C}$ 1.0 min で反応を開始させ、94 $^\circ\text{C}$ 20 sec の熱変性・55 $^\circ\text{C}$ 30 sec のアニーリング・68 $^\circ\text{C}$ 1~4.5 min の伸長反応を 20 サイクル繰り返し、15 $^\circ\text{C}$ まで冷却した。Phusion DNA polymerase の場合、プライマーの混合溶液 1.0 μl 、5 \times Phusion HF Buffer 2.0 μl 、2 ml dNTPs (TOYOBO)1.0 μl 、50 mM MgCl_2 0.2 μl 、ジメチルスルホキシド 0.3 μl 、Phusion DNA polymerase 0.1 μl を SDW 5.4 μl と混ぜ、合計で 10 μl の反応溶液を作成した。基本的な反応サイクルでは 98 $^\circ\text{C}$ 30 sec で反応を開始させ、98 $^\circ\text{C}$ 7 sec の熱変性、55 $^\circ\text{C}$ 20 sec のアニーリング、72 $^\circ\text{C}$ 30 sec の伸長反応を 30 サイクル繰り返し、72 $^\circ\text{C}$ に 7.0 min 置き、15 $^\circ\text{C}$ に冷却した。

上記の産物は再度の PCR で増幅された。増幅のためのプライマーとして yPhc11 では TDH3p40-ycellulase と 15G-ycellulase、yGLuc では TDH3p40-yGLuc と 15G-yGLuc、yRoGLU1 では TDH3p40-glucoR と 15G-glucoR を使った。この反応では、PCR 産物 1.0 μl 、10 μM のプライマー溶液を各 0.3 μl 、10 μM 0.3 μl 、10 \times KOD plus buffer 1.0 μl 、2 ml dNTPs 1.0 μl 、25 mM MgSO_4 0.4 μl 、KOD plus DNA polymerase 0.2 μl を SDW5.8 μl と混ぜ、合計で 10 μl の反応溶液を作成した。反応条件は 94 $^\circ\text{C}$ 1.0 min で反応を開始させ、94 $^\circ\text{C}$ 20 sec の熱変性、60 $^\circ\text{C}$ 30 sec のアニーリング、68 $^\circ\text{C}$ 1-2 min の伸長反応を 30 サイクル繰り返し、15 $^\circ\text{C}$ まで冷却した。以上の反応で得た PCR 産物はアガロースゲル電気泳動法で分析された。得られた遺伝子を合成遺伝子として使用した。

2.3.4 *S. cerevisiae* の形質転換

合成遺伝子を *S. cerevisiae* に導入する場合、Fusion PCR (29)によって合成遺伝子を *ScLEU2* 遺伝子と繋げた遺伝子断片を作製して導入した(Fig. 2.4A)。

まず、合成遺伝子を電気泳動ゲルから抽出した。ゲル中の DNA バンドをスパチュラで切り出し、1.5 ml tube に充填されたフィルター入りチップにいれ、12,000 rpm 10 min で遠心分離した。形質転換のマーカー遺伝子として、*ScLEU2* を RAK3614 の染色体 DNA から KOD plus による PCR で得た。この反応ではプライマーとして 15C-LEU2-1 と URA3-300c を使った。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動法で分析され、DNA バンドをゲルより抽出した。

Fusion PCR では合成遺伝子の溶液 0.5 μ l、*ScLEU2* 遺伝子の溶液 0.5 μ l、10 μ M TDH3p40 0.3 μ l、10 μ M URA3-200c 0.3 μ l、10 \times KOD plus buffer 1.0 μ l、2 ml dNTPs 1.0 μ l、25 mM MgSO₄ 0.4 μ l、KOD plus DNA polymerase 0.2 μ l を SDW 5.8 μ l と混ぜ、合計で 10 μ l の反応溶液を作った。反応条件は94 $^{\circ}$ C 1.0 min で反応を開始させ、94 $^{\circ}$ C 20 sec の熱変性、65 $^{\circ}$ C 30 sec のアニーリング、68 $^{\circ}$ C 4.0 min の伸長反応を 30 サイクル繰り返した。これを形質転換用 DNA 断片とした。

S. cerevisiae の形質転換はリチウム法(30)によって行った。宿主として RAK4314 を使用した。RAK4314 を 2 ml の YPD に懸濁して 28 $^{\circ}$ C 150 rpm の振とう培養を一晩行い、前培養液とした。前培養液 1 ml を深底シャーレ中の 9 ml YPD に移し、28 $^{\circ}$ C 150 rpm の振とう培養を 5 h 行った。この培養液を 15 ml tube に移し、8000 rpm 3 min の遠心分離後に上清を捨てた。5 ml の SDW で菌体を洗浄し、8000 rpm 3 min の遠心分離後に上清を捨て、これを cell として使用した。60% polyethylene glycol 3350 120 μ l、cell 61 μ l、10 mg/ml cDNA 10 μ l、4M LiOAc 5 μ l、及び形質転換用 DNA 断片 4 μ l を混ぜて合計で 200 μ l にした。10 mg/ml cDNA は-20 $^{\circ}$ C で保存されていたものを 3 min 煮沸し、2 min 氷冷した後に使用した。サンプルに heat shock を 42 $^{\circ}$ C で 40 min 与え、SDW を 100 μ l 加えて攪拌した。200 μ l を MM-L プレートに塗り、28 $^{\circ}$ C で 3 日間静置培養した。生えてきた菌体を別の MM-L プレートに塗り、28 $^{\circ}$ C で一晩静置培養した。生えた菌体を MM-U プレートにレプリカし、28 $^{\circ}$ C で一晩静置培養した。MM-L プレートで増殖し、MM-U プレートでは増殖しなかった株を形質転換体とした。

2.3.5 *K. marxianus* の形質転換

Babiker らの方法を参照した(31)。DMKU3-1042 のウラシル・アデニン要求性株

RAK3908(32)を宿主とした。30 ml の YPD に RAK3908 のシングルコロニーを懸濁し、28°C 150 rpm で一晩振とう培養した。培養液を 50 ml チューブに移して遠心分離(3000 rpm 3 min)し、上澄み液を除去して細胞を得た。0.9 ml の TF buffer (40% polyethylene glycol 3350、0.2 M lithium acetate、及び 0.1 M dithiothreitol)に細胞を懸濁し、再度遠心分離(3000 rpm 3 min)して上澄みを除いた。0.6 ml の TF buffer に細胞を懸濁し、懸濁液 50 µl を 1.5 ml マイクロチューブに分注した。これに DNA 断片を約 50~70 ng 加えて攪拌した。このサンプルにヒートショック(42°C 30 min)を与え、150 µl の SDW と混合した。これを MM-A プレートに塗付し、28°C で 3 日間培養した。

2.3.6 非相同末端結合を利用した *K. marxianus* の発現ベクターの構築

K. marxianus の NHEJ によって二つの遺伝子断片を生体内で接続させて発現ベクターを構築した(27)。まず、ScURA3 遺伝子をプラスミド pRS316KmARS7(27)から、pRS316URA3-226 と URA3+880c をプライマーに用いた PCR で増幅した。この反応で得た PCR 産物に、*K. marxianus* の自動複製配列(autonomously replicating sequence : ARS)である KmARS7(27)を付加した。これは、KmARS7(201-260)316URA3-226 と 15C-URA3+880c をプライマーとして用いた PCR によって付加した。一方で、ScADE2 遺伝子を BY4743 の染色体より PCR で増幅した。これは、ADE2-797 と 15G-ADE2+1916c をプライマーとして使用した。これら二つの DNA 断片を、KmARS7(201-260)316URA3-226 と ADE2-797 を用いた fusion PCR で接続した。この DNA 断片を RAK3908 に導入し、MM-U 培地で選択した。Ade⁺ Ura⁺ FOA⁺ を示した形質転換体を RAK5986 とした。

RAK5986 で構築されたプラスミドに、*K. marxianus* のセントロメア配列である KmCenD(27)を加えた。KmCenD は DMKU3-1042 野生株の染色体より、9C-CenDCDEIII-211 と CenDCDEIII+36c を用いた PCR で増幅された。この反応で得た PCR 産物に、URA3+772-9c(118)と CenDCDEIII+36c を用いた PCR によってクローニング用の配列を付加した。一方でベクターの配列は RAK5986 の染色体より ADE2+1716c と URA3+771c を用いた PCR で増幅された。これら二つの DNA 断片を RAK3908 に導入し、MM-U 培地で選択した。Ade⁺ Ura⁺ FOA⁺ を示す形質転換体を RAK6140 とした。

RAK6140 で構築されたプラスミドに、ルシフェラーゼ遺伝子である yCLuc を導入した。yCLuc の配列は TDH3-698 と URA3+771c を用いた PCR で RAK4260 の染色体より増幅した。ベクターの配列は RAK6140 の染色体より URA3+771c と URA3+772 を用い

た PCR によって増幅した。さらにこの反応より得た産物をテンプレートとして、URA3+772 と KmARS7(201-260)-ADE2-797 をプライマーとして用いた PCR によってクローニングに必要な配列のみを増幅した。これら二つの DNA 断片を RAK3908 に導入し、MM-U 培地で選択した。Ade⁺ Ura⁺ FOA⁺ を示す形質転換体を取得し、CLuc 活性を ATTO 社製の検出キットを使って評価した。Cluc 活性を示した株を RAK6202、RAK6203、RAK6204 とした。

K. marxianus の NHEJ を利用して yGLuc と ScURA3 を in-frame に導入した。ベクターの配列は、RAK6202 の染色体より yGLuc+3c-TDH3-1c と URA3+21 を用いた PCR で増幅した。yGLuc の配列は RAK5125 の染色体より、URA3(+4-20)c-yGLuc+555c と yGLuc+4、yGLuc+28、yGLuc+52、または yGLuc-4 をプライマーとして使用した PCR で増幅した。これらの配列を、ベクターの配列と同時に RAK3908 に導入し、MM-U 培地で選択した。

K. marxianus の NHEJ を利用して合成遺伝子と ScURA3 を in-frame に導入した際には、ベクターの配列は RAK6202 の染色体から yGLuc+3c-TDH3-1c と URA3+21、または URA3+31 を使用した PCR によって増幅された。一方で合成 yGLuc から yGLuc+1 と URA3(+4-20)c-yGLuc+555c を使用した PCR によって合成遺伝子のインサートを増幅した。yRoGLU1 の場合は URA3+30c-yRoGLU1(1793-1812)c と yRoGLU1+1、または yRoGLU1+42 を使った。増幅された合成遺伝子をベクターと同時に RAK3908 に導入し、MM-U 培地で選択した(Fig. 2.4B)。

2.3.7 GLuc 活性の検出

酵母細胞を 24 well マイクロプレート中の 1 ml YPD に懸濁し、28°C 150 rpm の振とう培養を一晩行った。遺伝子活性の有無を調べる場合には、この培養液を使用した。活性値の比較を行う場合には本培養を行った。10 µl の前培養液を 24 well マイクロプレート中の YPD に移し、28°C 150 rpm の振とう培養を一晩行った。

試薬として *Gaussia* Luciferase Assay Kit (New England BioLabs) を使用した。1×*Gaussia* Luciferase Assay Buffer 1000 µl と 100×*Gaussia* Luciferase Substrate を 10 µl を混ぜた。これを基質溶液として使用した。発光強度は GloMax[®]-20/20 Luminometer (Promega) で測定した。培養液を 10 µl 採取した 1.5 ml micro tube に GLuc working solution を 20 µl 添加した。混ぜたサンプルは 5 sec 静置した後にルミノメーターに装填し、発光値(RLU)を測定した。また、細胞量の目安として培養液の濁度(OD600)をマイクロプレートリーダー (BioTek) で測定した。培養液の GLuc 活性を RLU/(OD600×µl)として算出した。

2.3.8 yRoGLU1 のクローニング及びグルコアミラーゼ活性検出

RAK10276~RAK10282 の染色体から、TDH3-100 と 3CG9-yRoGLU1+1815c を使って yRoGLU1 遺伝子を増幅した。この遺伝子断片に、yRoGLU1+1(75)と URA3+772term3CG9 を使って PCR を行い、クローニング用の配列を付加した。ベクター遺伝子断片を RAK9717 の染色体から、TDH3-1c40 と URA3+771 を使った PCR で増幅した。

以上の二つの DNA 断片を RAK3908 に形質転換し、MM-U 培地上で選択した。形質転換体を YPD+1% デンプンプレートに植えて 28°C で二日間培養し、ヨウ素デンプン反応によるハロアッセイを行った。

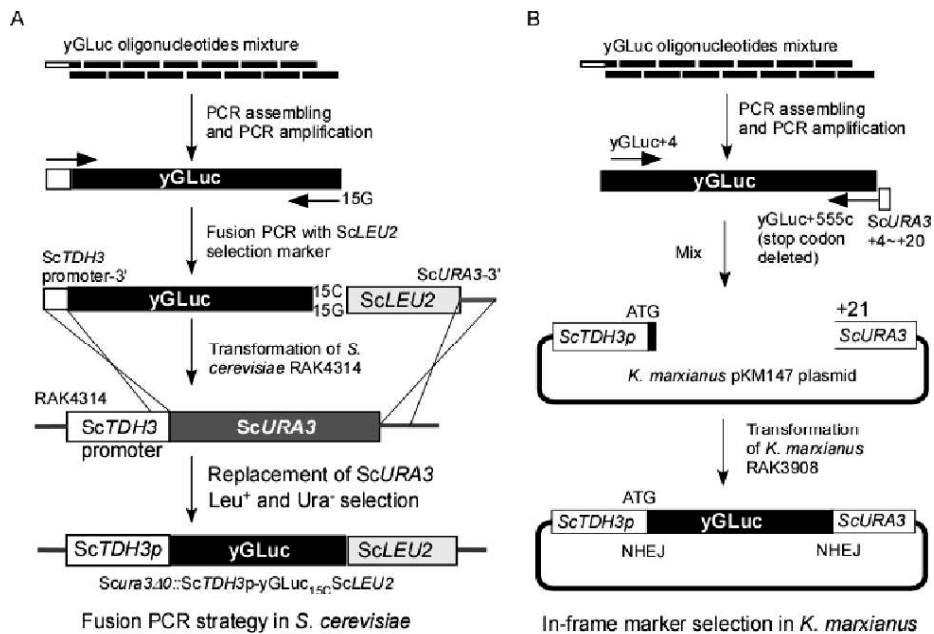


Fig. 2.4 : 合成遺伝子の酵母への導入

2.4 結果

2.4.1 yPhCell1 遺伝子全合成

まず yPhCell1 の合成を試みた。各プライマー濃度を 0.5 μM として調製された混合溶液を 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125 μM と段階希釈し、各濃度の溶液から遺伝子を合成した。Fig. 2.5 に合成遺伝子の分析結果を記載した。0.5, 0.25, 0.125 μM の溶液から得た PCR 産物は yPhCell1 のサイズである 1377 bp に近いサイズの DNA バンドが見られた。一方で 0.0625, 0.03125 μM のものからは DNA のバンドは現れなかった。0.5 μM の混合溶液から得られた合成遺伝子を酵母 *S. cerevisiae* に導入した形質転換体は、セルロースの分解が検出されなかった。セルラーゼ活性の確実な検出法が確立されていなかったこともあり、現状では yPhCell1 遺伝子の合成は困難であると判断した。

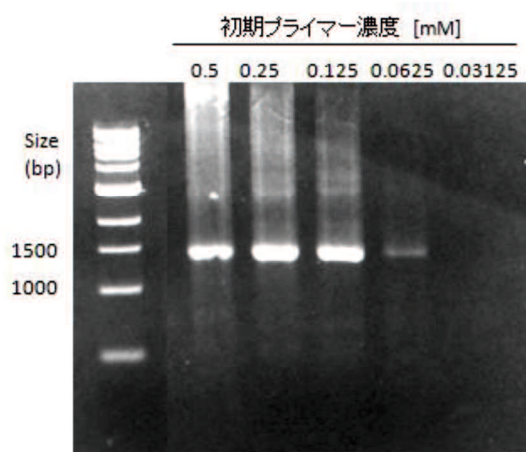


Fig. 2.5 : yPhcell1 遺伝子全合成

2.4.2 yGLuc 遺伝子全合成

セルラーゼと比べてルシフェラーゼ活性の検出は簡単であり、アッセイ系も確立されていた。そこで yGLuc の合成を通して、確実な遺伝子合成のための条件検討を進めようとした。合成の正確さを、調べた形質転換体中の数に対するルシフェラーゼ活性株の数の割合として評価した。

まずはプライマーの設計について検討した。このために三種類のパターンを用意した (Fig. 2.6)。S80/C40 は yPhCell1 遺伝子の合成でも行った 80 base のプライマーを 40 base のプライマーで繋げるパターンであり、S80/C80 はアニーリング領域がより長く設計された 80 base のプライマー同士を繋げるパターンであり、S40/C40 は各プライマーの配列がより短く設計された 40 base のプライマー同士繋げるパターンであった。Fig. 2.7 に各パターンから合成した遺伝子のアガロースゲル電気泳動法による分析結果を図示し

た。どのパターンからでも、yGLuc 遺伝子のサイズである 558 bp に近いサイズの DNA が示され、どのパターンも使った場合でも yGLuc とみられる DNA のバンドの濃さは変わらなかった。

合成遺伝子を *S. cerevisiae* の RAK4314 に導入し、形質転換体のルシフェラーゼ活性を調べた。活性株の頻度は S80/C40 で 1/36、S80/C80 で 0/31、S40/C40 では 0/38 であり、どのパターンでも非常に低かった(Table 2.4 の 1-3)。以後は S40/C40 を使って、反応条件の検討を進めた。

プライマーの接続が起こる第一段階目の PCR に注目し、反応条件の最適化を進めた。特に、相補する配列間で水素結合による二本鎖が形成される、アニーリングに注目した。アニーリングの温度を 55.0、64.5、75.3、80.0°C と設定して第一段階目の PCR を行い、それぞれの産物を同じ条件下での PCR で増幅した。Fig. 2.8 に各温度条件下から合成した遺伝子のアガロースゲル電気泳動法による分析結果を図示した。どの条件下でも yGLuc とみられる DNA のバンドの濃さは変わらなかった。この内、アニーリング温度 64.5°C での合成遺伝子を酵母に導入し、形質転換体のルシフェラーゼ活性を調べた。この時、活性株の頻度は 1/13 となった(Table 2.4 の 4)。アニーリング温度を高めたことで活性株の頻度がわずかに上がったように見えたので、さらに高い 68.0、72.3、75.1、79.0°C の温度条件下でも同様の検証を行った。この時、伸長反応もアニーリングと同じ温度に設定し、高温条件を維持した。Fig. 2.9 に各温度条件下での合成遺伝子のアガロースゲル電気泳動法による分析結果を図示した。68.0°C、72.3°C の場合にはこれまでと同様の DNA バンドが見られた。75.1°C で合成されたサンプルは、68.0°C や 72.3°C の場合よりも DNA のバンドがやや薄く、79.0°C ではさらに薄まった。この内、アニーリング温度 68.0、75.1、79.0°C での合成遺伝子を RAK4314 に導入し、形質転換体のルシフェラーゼ活性を調べた。この時、活性株の頻度は 68.0°C では 1/20、75.1°C では 4/20、79.0°C では 0/20 と示された(Table 2.4 の 5-7)。

さらにプライマーの質が合成に与える影響を検証した。このために北海道サイエンス社製の同じ配列のプライマーを用意し、従来使っていた Fasmac 社製のものと同一条件下で合成した。Fig. 2.10 に反応温度 68.0、72.3、75.1、79.0°C の温度条件下での両者のプライマーから合成した遺伝子のアガロースゲル電気泳動法による分析結果を図示した。両者の差は 75.1°C や 79.0°C といった高温条件下で見られ、北海道サイエンス社製のプライマーを使った場合はより濃い DNA バンドが見られた。合成遺伝子を酵母に導入し、ルシフェラーゼ活性を調べたが、活性株の頻度は基本的な条件下で合成したもの

では 4/20、反応温度 75.1°C で合成したものでも 4/20 であった(Table 2.4 の 8、9)。

また、DNA ポリメラーゼの性質の栄養を検証するために、Phusion DNA polymerase を使った。アニーリング温度を 55.0°C、58.4°C、65.8°C、72.0°C と設定し、プライマーを繋げた。Fig. 2.11 では、合成した遺伝子のアガロースゲル電気泳動法による分析結果を図示した。55.0°C、及び 72.0°C での合成遺伝子を RAK4314 に導入し、形質転換体のルシフェラーゼ活性を調べた。活性株の頻度はアニーリング温度 55.0°C では 11/20、72.0°C では 8/20 と、いままでで最も高い正確さが示された(Table 2.4 の 10、11)。

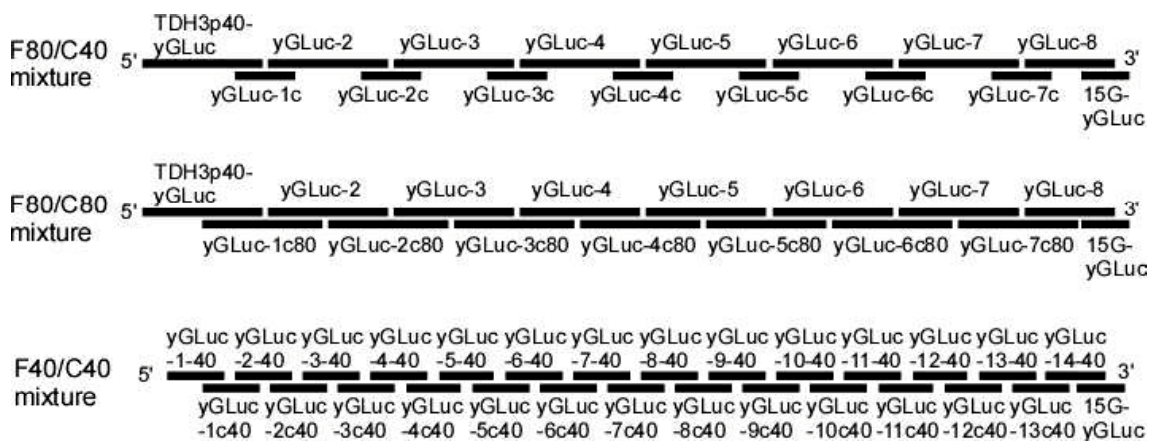


Fig. 2.6 : yGLuc 遺伝子全合成のオリゴヌクレオチド設計パターン

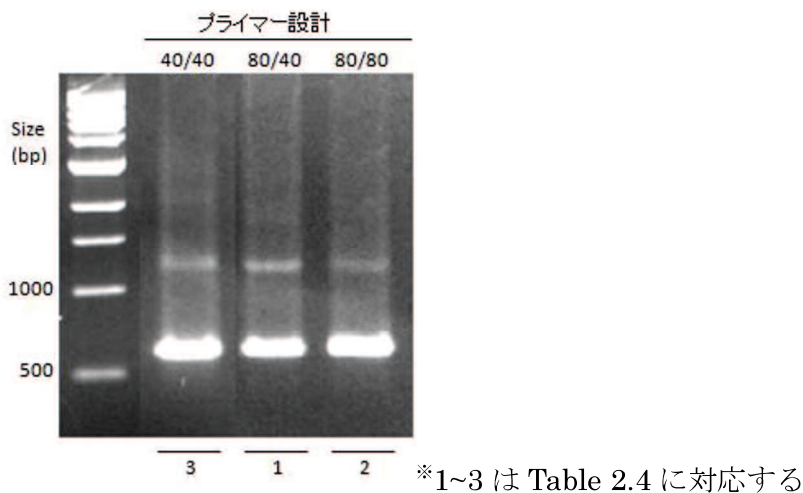
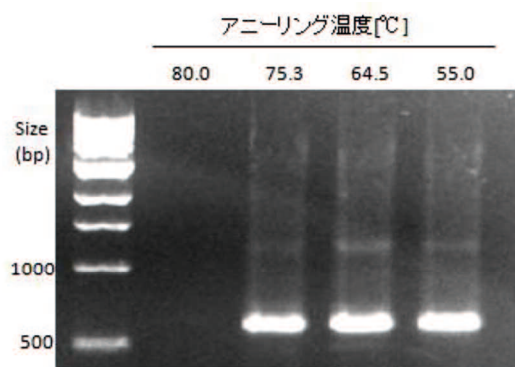
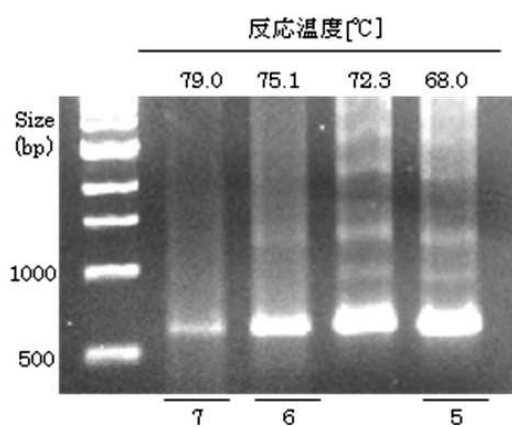


Fig. 2.7 : 各パターンでの yGLuc 遺伝子全合成



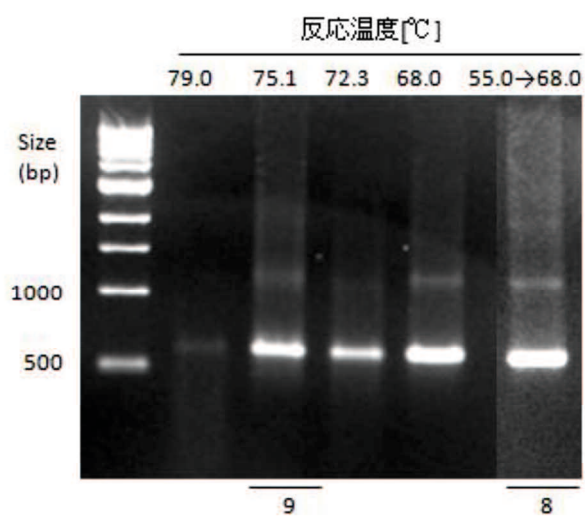
*4はTable 2.4に対応する

Fig. 2.8 : 各アニーリング温度条件下での yGLuc 遺伝子全合成



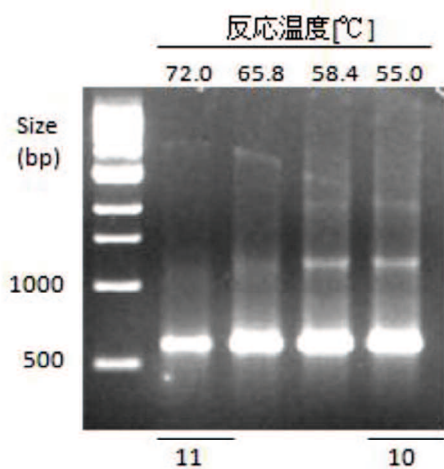
*5~7はTable 2.4に対応する

Fig. 2.9 : 各反応温度条件下での yGLuc 遺伝子全合成



*8, 9はTable 2.4に対応する

Fig. 2.10 : 北海道サイエンス社製のプライマーを使用した yGLuc 遺伝子全合成



※10, 11 は Table 2.4 に対応する

Fig. 2.11 : Phusion DNA polymerase を使用した yGLuc 遺伝子全合成

Table 2.4 : yGLuc 遺伝子全合成における反応条件と合成の正確性の評価]

No.	Oligonucleotides		Polymerase ^{*3}	Temperature [°C]		GLuc ⁺ /Clones	
	Set ^{*1}	Supplier ^{*2}		Annealing	Elongation	Sc ^{*4}	Km ^{*5}
1	S80/C40	F	K	55.0	68.0	1/36	8/24
2	S80/C80	F	K	55.0	68.0	0/31	6/24
3	S40/C40	F	K	55.0	68.0	0/32	9/20
4	S40/C40	F	K	64.5	68.0	1/13	-
5	S40/C40	F	K	68.0	68.0	1/20	-
6	S40/C40	F	K	75.1	75.1	4/20	13/24
7	S40/C40	F	K	79.0	79.0	0/20	-
8	S40/C40	H	K	55.0	68.0	4/20	14/24
9	S40/C40	H	K	75.1	75.1	4/20	19/24
10	S40/C40	H	P	55.0	72.0	11/20	15/24
11	S40/C40	H	P	72.0	72.0	8/20	-

*1 S80 and C80 were consisted of 80 bases. S40 and C40 were consisted of 40 bases (Fig. 2.5)

*2 F was indicated as FASMAC. And H was indicated as Hokkaido system science.

*3 K was indicated KOD plus polymerase. And P was indicated as Phusion DNA polymerase.

*4 *S. cerevisiae* was used as a host. Synthetic DNA was fused with ScLEU2 by fusion PCR.

*5 *K. marxianus* was used as a host. Synthetic DNA was fused in-frame with ScURA3 by NHEJ.

2.4.3 合成遺伝子配列の解析

PCR の条件を最適化して活性株の頻度を約 5 割まで高められたが、未だに非活性株も高い頻度で現れた。そこで、非活性株に導入された yGLuc 遺伝子配列を解析し、変異の傾向を特定しようと試みた。基本的な PCR 条件下で合成したものと、反応条件 75.1°C

でのものを対象とした。この時、プライマーの違いについてさらに詳しく検証するために、fasmac 社製のプライマーを使ったものと北海道サイエンス社製のプライマーを使ったものをそれぞれ調べた(Table 2.4 の No.3、6、8、9)。

解析された非活性株の yGLuc 遺伝子の全てから変異が見つかり、正確に合成されていないために活性が検出されてなかった事が分かった。ヌクレオチドの欠失(deletion)、置換(substitution)、または挿入(insertion)の三種類が見られ、中でも deletion が高頻度で起きていた。また、変異の生じた位置に偏りは見られず、遺伝子配列のランダムな位置に見られた。これによってタンパク質の構造が変質し、非活性化したと考えられた。特に RNA からタンパク質への翻訳のためのトリプレットコドンにずれが生じたものが多い、15 株の非活性株の内 13 株でこのようなフレームシフトが見られた。

基本的な反応条件では、北海道サイエンス社製のプライマーを使った合成遺伝子は変異がより少なかった。一方で 75.1°C では、このような差は見られなかった。

Table 2.5 に以上の結果をまとめた。

Table 2.5 : yGLuc 遺伝子全合成におけるエラーの解析

Clone ^{*1}	PCR	Mutation (A of the start codon was counted as 1) ^{*2}			
		Deletion	Substitution	Insertion	Extra stop codon
No. 1	3	a68Δ, t103Δ, c240Δ, t280Δ	-	-	+
No. 2	3	a68Δ, c88Δ, g150Δ, a151Δ, t160Δ, t161Δ, a223Δ, c285Δ, t396Δ	-	-	+
No. 3	6	g427Δ, t434Δ	-	-	+
No. 4	6	-	c308t	-	-
No. 5	6	c402Δ	-	-	+
No. 6	8	g222Δ	-	-	+
No. 7	8	-	g410t	-	-
No. 8	9	-	-	g373gg	+
No. 9	9	a299Δ	-	g529ggg	+
No. 10	9	a11Δ	-	a533aag	+
No. 11	9	a368Δ	-	-	+
No. 12	9	a490Δ, g542Δ	-	-	+
No. 13	9	t170Δ	-	-	+
No. 14	9	-	-	g134gg	+
No. 15	9	c15Δ, t26Δ, g296Δ	-	-	+

*1 Analyzed DNA samples were obtained with the PCR condition shown in Table2

*2 It was indicated that adenine as a, guanine as g, cytosine as c, thymine as t, and deletion as Δ

2.4.4 *K. marxianus* を宿主としたエラー除去法の構築

遺伝子全合成では高頻度でフレームシフトを起こすエラーが生じることが分かった。このことから、より確実な遺伝子全合成のためには、フレームシフトを含む変異を除去することが必要であると考えた。フレームシフトが生じた遺伝子ではタンパク質の機能がなくなる。そこで、合成遺伝子にマーカー遺伝子を翻訳のフレームを合わせた in-frame な融合遺伝子として宿主に導入し、マーカー遺伝子の正の機能によりフレームシフトの無い遺伝子が導入された形質転換体を選択することを試みた。フレームシフトが生じた合成遺伝子では、下流のマーカー遺伝子の翻訳も変質するため、形質転換体として現れてこないと予想した。

この手法の構築のために、*K. marxianus* を宿主とした。高い NHEJ 活性を利用して、遺伝子導入の簡略化を図った。マーカー遺伝子として、*S. cerevisiae* 由来の *URA3* 遺伝子(*ScURA3*)を利用した。この遺伝子は *K. marxianus* のマーカー遺伝子として解析が進められており(27)、NHEJ によって遺伝子末端同士が期待通りに結合された形質転換体を選択するために最適であった。

yGLuc は分泌タンパク質をコードする遺伝子であるが、*ScURA3* は細胞内で機能するタンパク質をコードする遺伝子であった。そのため、両者を in-frame で融合することはタンパクの機能に問題を起こすことが予想された。そこで、正確な配列がクローニングされた株である RAK6205 をベースに、yGLuc と *ScURA3* の in-frame な融合遺伝子を作成し、その機能を評価した。この時、同時に yGLuc の 5'末端の配列の一部が削除され配列も作成した。この部分は、GLuc タンパクの分泌シグナル配列にあたる部分であり、この配列を削除することで GLuc の分泌を弱められると予想した。本稿では、yGLuc の配列全て(WT)、+4~+27 までの配列を削除したもの($\Delta 27$)、+4~+51 までの配列を削除したもの($\Delta 51$)、及び+4~+78 までの配列を削除したもの($\Delta 78$)をそれぞれ *ScURA3* と in-frame となるように導入した。Table 2.6 に、形質転換の結果をまとめた。意外なことに、削除されない配列を導入しても形質転換体が他のものと変わらない頻度で現れた。従って、ScUra3 タンパクは GLuc タンパクと融合させても十分に機能することが示された。一方でルシフェラーゼの活性は低下し、in-frame で無い場合と比べて約 0.27%まで低下した。

合成 yGLuc 遺伝子を使って in-frame 法を試験した。PCR の条件を検討する過程で複数の yGLuc 合成遺伝子を得ていたが、その内の数種類を in-frame 法による選別に使った(Table 2.4 の Km)。In-frame 法を適用した場合、最大で約 8 割の活性株が特定できた。また反応条件とは関係なく、ほとんどの合成遺伝子から高い頻度で活性株が現れた。

Table 2.6 : yGLuc と ScURA3 との in-frame 遺伝子の導入

Gene name	Deleted region	Primer for deletion	Transformation result [units/ng]
Δ27	4g-27g	yGLuc+28	382/ 95
Δ51	4g-51t	yGLuc+52	592/106
Δ78	4g-78c	yGLuc-4	272/118
Blank	-	-	0/140

2.4.5 yRoGLU1 遺伝子全合成

これまで yGLuc 遺伝子全合成の効率化を進めてきたが、この過程で得られた知見を yRoGLU1 遺伝子全合成に適用した。yRoGLU1 は 1815 bp の遺伝子であり、yGLuc と比べて長い配列であるために合成の困難さが予想された。

yGLuc の場合と同様に合成遺伝子を *S. cerevisiae* に導入し、形質転換体を 4 株取得した。同時に、*K. marxianus* の NHEJ を利用した ScURA3 と in-frame に導入された形質転換体も 2 株取得した(RAK7889 と RAK7890)。これらの株を使ってハロアッセイを行ったが、ハロを示した株は見られなかった。そこで、これら 6 株に導入された yRoGLU1 の配列を解析した(Table 2.7)。*S. cerevisiae* の 4 株については合成のエラーが多く見られ、全ての配列からフレームシフトが示された。一方で RAK7889 と RAK7890 ではエラーは見られたが、頻度はより低く、大規模なフレームシフトは見られなかった。

RAK7889 と RAK7890 の yRoGLU1 は、共通して 5'末端にエラーがあり、分泌能の低下が予想された。一方で、分泌シグナルにエラーの無いものは現れておらず、yRoGLU1 を ScURA3 との in-frame な導入で選択するには分泌を弱める必要があると予想した。そこで合成遺伝子の+4~+42 の部分を予め削除して ScURA3 と in-frame に導入し、7 株のクローンを得た(RAK10276~10282)。Table 2.7 に、これらの株に導入された yRoGLU1 配列の解析結果をまとめた。RAK10281 は設計通りの配列を持っており、他の 6 株ではエラーが生じていたが、ScURA3 に影響するフレームシフトは見られなかった。

RAK10276~10282 に導入された yRoGLU1 の活性を評価するために、PCR によってシグナル配列を付加した上で *K. marxianus* にクローニングした(Fig. 2.12A)。Fig. 2.12B には、形質転換体をデンプン培地に植えてハロアッセイで評価した結果を記載した。正確な配列を持っていた RAK10281 由来の yRoGLU1 が導入された形質転換体はハロを示した。また、変異が生じていたが、RAK10276、RAK10278、RAK10279、RAK10280 由来の遺伝子が導入された形質転換体もハロを提示した。一方で RAK10277、RAK10282 由来の遺伝子が導入された形質転換体ではハロが検出されなかった。

Table 2.7 : yRoGLU1 遺伝子全合成

Method	Clone	Insert	Mutation (a of the start codon was counted as 1)* ¹			Extra stop codon
			Deletion	Substitution	Insertion	
Fusion	No. 1	WT	a912Δ, t1660-g1602Δ, t1761Δ	t264a, c269t, G811c, a824c, t864g, g871c, a911c	a971ac, c1602cc, t1813tt	+
Fusion	No. 2	WT	g1018-c1823Δ, g1087Δ	a209c, c210a, a1132c, c1535t	g385gg, c714cc, c809cc	+
Fusion	No. 3	WT	a133Δ, t322Δ	t752c		+
Fusion	No. 4	WT	c1211-a1226Δ	g1298c	g385gg, g550gg, a962aa, a1057aa	+
In-frame	RAK7889	WT	a1-g109Δ, t1178Δ	c452a	g1510gg	-
In-frame	RAK7890	WT	a1-g3Δ	t1299g, t1300g	-	-
In-frame	RAK10276	C4toG42	c411Δ	-	c420cc	-
In-frame	RAK10277	C4toG42	t250Δ	g1257c	c360cc	-
In-frame	RAK10278	C4toG42	-	a406t, t1770c	-	-
In-frame	RAK10279	C4toG42	-	t1265g, a1510g, a1517c	-	-
In-frame	RAK10280	C4toG42	a314Δ	t302a, c1023a	c456cc	-
In-frame	RAK10281	C4toG42	-	-	-	-
In-frame	RAK10282	C4toG42	t1012-g1014Δ	-	-	-

*1 It was indicated that adenine as a, guanine as g, cytosine as c, thymine as t, and deletion of nucleotides as Δ.

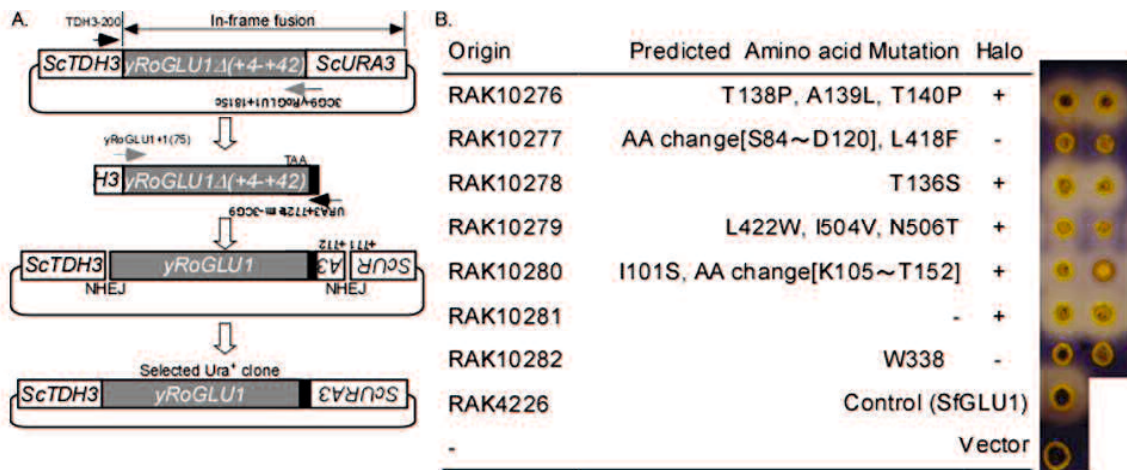


Fig. 2.12 : yRoGLU1 遺伝子のクローニング及びグルコアミラーゼ活性評価

2.5 考察

遺伝子全合成法は高いポテンシャルを持つが、高頻度で合成にエラーが起こるために確実性の低さが指摘されていた(23)。当初の目的であったセルラーゼ遺伝子の全合成ではこのことが明確に示され、約 1400 bp の遺伝子ですら合成が困難であった。そこで、確実性をあげるために反応条件を最適化した。アニーリングや伸長反応の温度やオリゴヌクレオチドの長さ、DNA ポリメラーゼの能力等の条件を検討したが確実性を十分に高めることはできなかった(Table 2.4)。正確性をさらに高めるためにはより質の高いオリゴヌクレオチドを使用することが考えられたが、十分な正確性を保証するための純度は不明であり、コストの問題などもあるため現状では難しいと判断した。そこで、合成遺伝子からのエラー除去の手法の確立を進めた。yGLuc 遺伝子全合成では、導入株 15 株の内 13 株にフレームシフトが生じており、このために活性が検出できなかったと分かった(Table 2.5)。従って、フレームシフトを起こした遺伝子を除去できれば正確な配列のみが選択できると考えた。このための手法として、形質転換マーカーの C 末端に合成遺伝子を in-frame に繋ぎ、マーカーの機能でフレームシフトを含む遺伝子を除くように遺伝子を導入する手法を構築した(Fig. 2.1B)。従来の遺伝子操作技術の常識では、マーカー遺伝子との in-frame な遺伝子断片をつくるために煩雑な操作が予想されるが、我々は *K. marxianus* の NHEJ を利用してこれを簡易化した。これによって同じ合成遺伝子から得られる活性株の出現率が格段に上げられ、確実性の向上に有効に機能した。この手法では遺伝子を宿主細胞に導入するだけなので、先行して確立されていたエラー除去法(23-25)と比べて、よりシンプルである。

酵母の遺伝子操作では一般的には選択マーカーとして栄養要求性や薬剤耐性の遺伝子が使われ、これらのものの多くは細胞質で機能するタンパクがコードされている。今回の合成のターゲットとした yGLuc および yRoGLU1 は分泌タンパク質をコードする遺伝子であり、選択マーカーと in-frame に導入した場合は活性が現れないことが十分に予想できた。しかし、yGLuc と ScUR43 の融合遺伝子(yGLuc=ScUR43)はウラシル要求性を相補し、ルシフェラーゼ活性も微弱ながら検出された(data not shown)。従って、GLuc=Ura3 タンパクは細胞質内と細胞外の両方に局在することが示されたが、これは Gluc タンパクの分泌能が弱いためほとんどのタンパクは分泌小胞に移行されずに細胞内に残ったと予想している。対比的に yRoGLU1 と ScUR43 の融合遺伝子(yRoGLU1=ScUR43)は、RoGlu1 の分泌シグナル配列が正常な場合は Ura3 が機能しないことが示唆された。従って、RoGlu1 の分泌シグナル配列はより強い分泌能を持ち、そ

のために yGLuc=ScURA3 とは異なる傾向を示したと考えた。

yRoGLU1 遺伝子合成では、取得された形質転換体は全て正確に ScURA3 遺伝子との in-frame となっており、エラーの頻度も大幅に減少した(Table 2.7)。このことから、遺伝子全体に影響するようなフレームシフトが除去できたことが示され、1815 bp の遺伝子を対象とした場合でも有効に機能した。しかしながら、狭い範囲で変異が生じた配列がいくつか現れた。これらの内 4 種類の変異体はグルコアミラーゼ活性を示したため、変異の生じた箇所がタンパクの機能に影響しない部分であったと示唆された。一方でグルコアミラーゼ活性が示されなかったものも現れたが、中でも RAK10282 では、アミノ酸一か所の変異しか起きていないにも関わらずグルコアミラーゼは失活した(Fig. 2.12B)。この時欠失していた 338 番目のトリプトファンは、RoGlu1 タンパクの機能に重要な役割をしていると考えられる。

2.6 参考文献

1. Khan, M. A., Kar, M., Mittal, S., Kumar, S., Bharagava, V. L., Sengupta, J., and Ghoshi, D., Small scale transcript expression profile of human first trimester placental villi analyzed by a custom-tailored cDNA array., *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 54, 235-254, 2010.
2. Ko, M. S., Kitchen, J. R., Wang, X., Threat, T. A., Wang, X., Hasegawa, A., Sun, T., Grahovac, M. J., Kargul, G. J., Lim, M. K., and other 13 authors, Largescale cDNA analysis reveals phased gene expression patterns during preimplantation mouse development, *Development.*, 127, 1737-1749, 2000.
3. Dhir, A. and Buratti, E., Alternative splicing: role of pseudoexons in human disease and potential therapeutic strategies., *FEBS J.*, 277, 841-855, 2010.
4. Kotik, M., Novel genes retrieved from environmental DNA by polymerase chain reaction: current genome-walking techniques for future metagenome applications., *J. Biotechnol.*, 144, 75-82, 2009.
5. Lorenz, P., Liebeton, K., Niehaus, F., and Eck, J., Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13, 572-527, 2002
6. Rajendhran, J. and Gunasekaran, P., Strategies for accessing soil metagenome for desired applications., *Biotechnol. Adv.*, 26, 576-590, 2008.
7. Cormack, B. P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N. A., Falkow, S., and Brown, A. J., Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans.*, *Microbiology*, 143(Pt 2), 303-311, 1997.
8. Keppler-Ross, S., Noffz, C., and Dean, N., A new purple fluorescent color marker for genetic studies in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans.*, *Genetics*, 179, 705-710, 2008.
9. Apte-Deshpande, A., Rewanwar, S., Kotwal, P., Raiker, V. A., and Padmanabhan, S., Efficient expression and secretion of recombinant human growth hormone in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: potential applications for other proteins., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 54, 197-205, 2009.
10. Chen, M. L., Guo, Q., Wang, R. Z., Xu, J., Zhou, C. W., Ruan, H., and He, G. Q., Construction of the yeast whole-cell *Rhizopus oryzae* lipase biocatalyst with high activity., *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, 12, 545-551, 2011.

11. Favaro, L., Jooste, T., Basaglia, M., Rose, S. H., Saayman, M., Gorgens, J. F., Casella, S., and van Zyl, W. H., Codon-optimized glucoamylase sGAI of *Aspergillus awamori* improves starch utilization in an industrial yeast., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 95, 957-968, 2012.
12. Cheng, C. Y., Wu, C. W., Lin, G. J., Lee, W. C., Chien, M. S., and Huang, C., Enhancing expression of the classical swine fever virus glycoprotein E2 in yeast and its application to a blocking ELISA., *J. Biotechnol.*, 174, 1-6, 2014.
13. Seo, J. Y., Chung, H. J., and Kim, T. J., Codon-optimized expression of fish iridovirus capsid protein in yeast and its application as an oral vaccine candidate., *J. Fish. Dis.*, 36, 763-768, 2013.
14. Gibson, D. G., Benders, G. A., Andrews-Pfannkoch, C., Denisova, E. A., Baden-Tillson, H., Zaveri, J., Stockwell, T. B., Brownley, A., Thomas, D. W., Algire, M. A., and other 7 authors., Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome., *Science*, 319, 1215-1220, 2008.
15. Gibson, D. G., Glass, J. I., Lartigue, C., Noskov, V. N., Chuang, R. Y., Algire, M. A., Benders, G. A., Montague, M. G., Ma, L., Moodie, M. M., and other 14 authors., Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome., *Science*, 329, 52-56, 2010.
16. Lartigue, C., Vashee, S., Algire, M. A., Chuang, R. Y., Benders, G. A., Ma, L., Noskov, V. N., Denisova, E. A., Gibson, D. G., Assad-Garcia, N., and other 7 authors., Creating bacterial strains from genomes that have been cloned and engineered in yeast., *Science*, 325, 1693-1696, 2009.
17. Dymond, J. S., Richardson, S. M., Coombes, C. E., Babatz, T., Muller, H., Annaluru, N., Blake, W. J., Schwerzmann, J. W., Dai, J., Lindstrom, D. L., and other 5 authors., Synthetic chromosome arms function in yeast and generate phenotypic diversity by design., *Nature*, 477, 471-476, 2011.
18. Annaluru, N., Muller, H., Mitchell, L. A., Ramalingam, S., Stracquadanio, G., Richardson, S. M., Dymond, J. S., Kuang, Z., Scheifele, L. Z., Cooper, E. M., and other 70 authors., Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome., *Science*, 344, 55-58, 2014.
19. Jayaraman, K., Fingar, S. A., Shah, J., and Fyles, J., *Proc. Natl. Acad.*, Polymerase chain reaction-mediated gene synthesis: synthesis of a gene coding for isozyme c of horseradish peroxidase., *Sci. USA*, 88, 4084-4088, 1991.

20. Jayaraman, K. and Puccini, C. J., A PCR-mediated gene synthesis strategy involving the assembly of oligonucleotides representing only one of the strands., *Biotechniques*, 12, 392-398, 1992.
21. Cherry, J., Nieuwenhuijsen, B. W., Kaftan, E. J., Kennedy, J. D., and Chanda, P. K., A modified method for PCR-directed gene synthesis from large number of overlapping oligodeoxyribonucleotides., *J. Biochem. Biophys. Methods*, 70, 820-822, 2008.
22. Au, L. C., Yang, F. Y., Yang, W. J., Lo, S. H., and Kao, C. F., Gene synthesis by a LCR-based approach: high-level production of leptin-L54 using synthetic gene in *Escherichia coli*., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 248, 200-203, 1998.
23. Ma, S., Saaem, I., and Tian, J., Error correction in gene synthesis technology., *Trends Biotechnol.*, 30, 147-154, 2012.
24. Duarte, V., Gasparutto, D., Jaquinod, M., and Cadet, J., In vitro DNA synthesis opposite oxazolone and repair of this DNA damage using modified oligonucleotides., *Nucleic Acids Res.*, 28, 1555-1563, 2000.
25. Carr, P. A., Park, J. S., Lee, Y. J., Yu, T., Zhang, S., and Jacobson, J. M., Proteinmediated error correction for de novo DNA synthesis., *Nucleic Acids Res.*, 32, 162, 2004.
26. Kim, H., Han, H., Shin, D., and Bang, D., A fluorescence selection method for accurate large-gene synthesis., *ChemBioChem*, 11, 2448-2452, 2010.
27. Hoshida, H., Murakami, N., Suzuki, A., Tamura, R., Asakawa, J., Abdel- Banat, B. M., Nonklang, S., Nakamura, M., and Akada, R., Non-homologous end joining-mediated functional marker selection for DNA cloning in the yeast *Kluyveromyces marxianus*., *Yeast*, 31, 29-46, 2014.
28. Hoshida H, Fujita T, Cha-aim K, Akada R., N-Glycosylation deficiency enhanced heterologous production of a *Bacillus licheniformis* thermostable α -amylase in *Saccharomyces cerevisiae*., *Appl Microbiol Biotechnol.* 97:5473-82, 2013.
29. Cha-aim, K., Fukunaga, T., Hoshida, H., and Akada, R., Reliable fusion PCR mediated by GC-rich overlap sequences., *Gene*, 434, 43-49, 2009.
30. Fukunaga, T., Cha-Aim, K., Hirakawa, Y., Sakai, R., Kitagawa, T., Nakamura, M., Nonklang, S., Hoshida, H., and Akada, R., Designed construction of recombinant DNA at the *ura3 Δ 0* locus in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*., *Yeast*, 30, 243-253, 2013.
31. Abdel-Banat, B. M., Nonklang, S., Hoshida, H., and Akada, R., Random and targeted gene integrations through the control of non-homologous end joining in the yeast *Kluyveromyces marxianus*., *Yeast*, 27, 29-39, 2010.

32. Yarimizu, T., Nonklang, S., Nakamura, J., Tokuda, S., Nakagawa, T., Lorreungsil, S., Sutthikhumpha, S., Pukahuta, C., Kitagawa, T., Nakamura, M., and other 4 authors., 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, 2013.

第3章 非相同末端結合を利用した分泌シグナル配列の合成生物学的な解析と酵母で高い分泌を示す人工配列の構築

3.1 はじめに

真核生物の細胞内部には特定の機能を持った小器官(オルガネラ)が高度に発達している。これらは脂質二重膜によって区切られて各々の構造を取っている。オルガネラの機能の大部分はタンパク質によって担われているが、翻訳後のタンパク質は特定の輸送経路を介してそれぞれの持ち場へ移行する。このために、タンパク質は輸送経路に入るためのシグナルとなる配列を持ち、これらは特定のパターンを持っている場合が多い(1)。中でも分泌シグナル配列は、分泌タンパク質の N 末端に共通して見られるシグナル配列として知られている(2、3)。この配列は、分泌シグナル認識粒子(signal recognition particle ; SRP)のターゲットとして機能すると考えられており、翻訳直後の分泌タンパク質は SRP によって小胞体(endoplasmic reticulum ; ER)へ挿入される(1、4、5)。その後、ゴルジ体や分泌小胞を経て最終的に分泌小胞と原形質膜との膜融合によって細胞外へ分泌される。

現在は莫大な数の分泌シグナル配列の情報が蓄積されている。これらを比較すると塩基性のアミノ酸とその直後に続く疎水性アミノ酸が豊富な配列(疎水性コア)という構造が良くみられ、疎水性コアは 10~15 個の疎水性アミノ酸で構成されていることが多い。疎水性アミノ酸としてロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン、及びグリシンなどが挙げられる。これらの残基を指標とした、分泌シグナルの配列および分泌能の予想が試みられている(6、7)。しかし、分泌シグナルの配列には厳密なコンセンサスは特定されておらず、配列の違いによって分泌発現の程度が大きく異なる(8-10)。さらに、生物によって分泌の機構が大きく異なっている可能性も示唆されており、異種生物由来の分泌タンパク質を発現させるために宿主での分泌に有利なシグナル配列に付け替える場合もある(8-13)。例えば、酵母においては接合因子 α ファクターの N 末端の配列を利用した高発現化が報告されている(11、12、14、15)。分泌は複雑な生命現象であり工学的なコントロールは難しいように思われたが、有用タンパク質の生産には分泌の機構への理解を深めることは重要なアプローチであると考えた。そのために分泌シグナル配列の解析を進め、配列のモデル化を試みた。

解析のために分泌シグナル配列を大量に合成して比較した。これを効率的に進めるた

めに、非相同末端結合(Non-homologous end joining: NHEJ)を利用した新規な遺伝子操作手法を利用した(16)。これまでに人工遺伝子合成を行ってきたが、人工的に設計されたオリゴヌクレオチドを利用することで大量の変異を簡単に構築できると予想できた。そこで、分泌タンパク質のモデルとして *Gaussia princeps* 由来のルシフェラーゼ遺伝子 (yGLuc) を使用し(17)、N 末端のアミノ酸配列変異の大規模な解析を行った。最終的に、自然には見られない人工的な分泌シグナル配列で高い分泌能を示すものを合成することができた。このことにより、新たな簡便で大量のクローンが処理できる遺伝子組換え技術を利用した合成生物学的な手法による、短いペプチド配列での人工デザインができることが示された。

3.2 実験材料

3.2.1 使用菌株および培養条件

Table 3.1 に使用した *Kluyveromyces marxianus* 株を記した。

YPD 培地は 1% yeast extract (YE)、2% peptone、及び 2% glucose の組成で作製した。選択培地は 0.17% yeast nitrogen base w/o A.A. w/o A.S.、0.5% ammonium sulfate、2% glucose の最小培地(MM 培地)に栄養混合物を添加して作製した。第一章の Table 1.3 に栄養混合物の組成を記載した(18)。固体培地(プレート)として使用する場合には、培地用寒天を 2%加えた。

Table 3.1 : 使用した酵母株

Strain name	Genotype
RAK3908	<i>ura3 ade2</i>
RAK6202	<i>ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-yCLuc-ScURA3-KmCEND]</i>
RAK6203	<i>ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-yCLuc-ScURA3-KmCEND]</i>
RAK6204	<i>ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-yCLuc-ScURA3-KmCEND]</i>
RAK6205	<i>ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-yGLuc-ScURA3-KmCEND]</i>
RAK8249	<i>ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-yGLuc(d16E)-ScURA3-KmCEND]</i>
RAK8250	<i>ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-yGLuc(d16E)-ScURA3-KmCEND]</i>
RAK8251	<i>ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-yGLuc(d16E)-ScURA3-KmCEND]</i>
RAK8252	<i>ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-yGLuc(d2Gd3V4KR)-ScURA3-KmCEND]</i>
RAK8253	<i>ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-yGLuc(d2Gd3V4KR)-ScURA3-KmCEND]</i>
RAK8254	<i>ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-yGLuc(d2Gd3V4KR)-ScURA3-KmCEND]</i>
RAK8255	<i>ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-yGLuc(16EL)-ScURA3-KmCEND]</i>
RAK8256	<i>ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-yGLuc(16EL)-ScURA3-KmCEND]</i>
RAK8257	<i>ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-yGLuc(16EL)-ScURA3-KmCEND]</i>
RAK8772	<i>ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-MKM16E-yGLuc-ScURA3-KmCEND]</i>
RAK8773	<i>ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-MKM16E-yGLuc-ScURA3-KmCEND]</i>
RAK8774	<i>ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-MKM16E-yGLuc-ScURA3-KmCEND]</i>
RAK9383	<i>ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-MKF13E-yGLuc-ScURA3-KmCEND]</i>
RAK9384	<i>ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-MKF13E-yGLuc-ScURA3-KmCEND]</i>
RAK9385	<i>ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-MKF13E-yGLuc-ScURA3-KmCEND]</i>
RAK10336	<i>ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-MKL13E-yGLuc-ScURA3-KmCEND]</i>
RAK10337	<i>ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-MKL13E-yGLuc-ScURA3-KmCEND]</i>
RAK10338	<i>ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-MKL13E-yGLuc-ScURA3-KmCEND]</i>
RAK10339	<i>ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-MK113E-yGLuc-ScURA3-KmCEND]</i>
RAK10340	<i>ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-MK113E-yGLuc-ScURA3-KmCEND]</i>
RAK10341	<i>ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-MK113E-yGLuc-ScURA3-KmCEND]</i>
RAK10252	<i>ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-hLIF-FLAG-ScURA3-KmCEND]</i>
RAK11616	<i>ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-hLIF+4-FLAG-ScURA3-KmCEND]</i>

3.2.2 使用オリゴヌクレオチド

Table 3.2 に使用したオリゴヌクレオチドの名前と配列を記した。

Table 3.2 : 使用オリゴヌクレオチド

Primer name	Sequence (5'-3')
TDH3-698	ATAAAAAACACGCTTTTTTCAGTTCG
15G-yGLuc	GGGGGGGGGGGGGGGGTTAGTCACCACCAGCACC
15C-URA3-223	CCCCCCCCCCCCCAAGCTTTTCAATTCATCTTTTTTTTTTTTG
URA3-300c	TGTTGTGAAGTCATTGACACAG
KmARS7(201-260)-	CAAGACTTCTTGAAGTGAAAACCAACTTTCAGTCTTCAAACATAAAAATGAAAA
ADE2-797	TCAGTGGCGCTGGCGCATCTGTTCCCT
URA3+771c	TTCCCAGCCTGCTTTTCTGTAAACGT
URA3+772	GCATATTTGAGAAGATGCGGCCAGC
TDH3-1c40	TTTGTTTGTTTATGTGTGTTTATTCGAAACTAAGTTCTTG
yGLuc+24c	AGCGAACAAGACCTTGACACCCAT
yGLuc+27c	CAAAGCGAACAAGACCTTGACACCC
yGLuc+30c	GATCAAAGCGAACAAGACCTTGACA
yGLuc+33c	ACAGATCAAAGCGAACAAGACCTTG
yGLuc+36c	GATACAGATCAAAGCGAACAAGACC
yGLuc+39c	AGCGATACAGATCAAAGCGAACAAG
yGLuc+42c	GACAGCGATACAGATCAAAGCGAAC
yGLuc+45c	AGCGACAGCGATACAGATCAAAGCG
yGLuc+48c	TTCAGCGACAGCGATACAGATCAAA
yGLuc+51c	AGCTTCAGCGACAGCGATACAGATC
yGLuc+54c	CTTAGCTTCAGCGACAGCGATACAG
yGLuc+57c	TGGCTTAGCTTCAGCGACAGCGATA
yGLuc+60c	GGTTGGCTTAGCTTCAGCGACAGCG
yGLuc+63c	TTCGGTTGGCTTAGCTTCAGCGACA
yGLuc+66c	GTTTTCGGTTGGCTTAGCTTCAGCG
yGLuc+69c	GTTGTTTTCGGTTGGCTTAGCTTCA
yGLuc+72c	TTCGTTGTTTTCGGTTGGCTTAGCT
yGLuc+75c	GTCTTCGTTGTTTTCGGTTGGCTTA
yGLuc+78c	GAAGTCTTCGTTGTTTTCGGTTGGC
yGLuc+81c	GTTGAAGTCTTCGTTGTTTTCGGTT
yGLuc+90c	AGCGACGATGTTGAAGTCTTCGTTG
yGLuc+108c	AGCGAAGTTAGAAGCGACAGCGACG
yGLuc+12c-TDH3-1c	CTTGACACCCATTTTGTGTTTAT
yGLuc+3-TDH3-1c	CATTTGTGTTGTTTATGTGTGTTTATTCGA
yGLuc+4	GGTGTCAAGGTCTTGTTCGCTTTGA
yGLuc+7	GTCAAGGTCTTGTTCGCTTTGATCT
yGLuc+10	AAGGTCTTGTTCGCTTTGATCTGTA
yGLuc+13	GTCTTGTTCGCTTTGATCTGTATCG
yGLuc+16	TTGTTTCGCTTTGATCTGTATCGCTG
yGLuc+19	TTCGCTTTGATCTGTATCGCTGTGCG
yGLuc+22	GCTTTGATCTGTATCGCTGTGCGCTG
yGLuc+25	TTGATCTGTATCGCTGTGCGTGAAG
yGLuc+28	ATCTGTATCGCTGTGCGCTGAAGCTA
yGLuc+31	TGTATCGCTGTGCGCTGAAGCTAAGC
yGLuc+34	ATCGCTGTGCGCTGAAGCTAAGCCAA
yGLuc+37	GCTGTGCGCTGAAGCTAAGCCAACCG
yGLuc+40	GTCGCTGAAGCTAAGCCAACCGAAA
yGLuc+43	GCTGAAGCTAAGCCAACCGAAAACA
yGLuc+46	GAAGCTAAGCCAACCGAAAACAACG
yGLuc+49	GCTAAGCCAACCGAAAACAACGAAG
yGLuc+52	AAGCCAACCGAAAACAACGAAGACT
yGLuc+55	CCAACCGAAAACAACGAAGACTTCA
yGLuc+58	ACCGAAAACAACGAAGACTTCAACA
yGLuc+61	GAAAACAACGAAGACTTCAACATCG
yGLuc+64	AACAACGAAGACTTCAACATCGTCG
yGLuc+70	GAAGACTTCAACATCGTCGCTGTGCG
yGLuc+73	GACTTCAACATCGTCGCTGTGCGCTT
yGLuc+76	TTCAACATCGTCGCTGTGCGCTTCTA
yGLuc+79	AACATCGTCGCTGTGCGCTTCTAACT
yGLuc+82	ATCGTCGCTGTGCGCTTCTAACTCG
yGLuc+91	GTCGCTTCTAACTTCGCTACCACCG

MRT8-hGLuc+37	ATGAGGACCACCACCACCACCACCACCACCACCGCTGTGGCCGAGGCCAAGCCCA CCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGT
MRQ8-hGLuc+37	ATGAGGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGGCTGTGGCCGAGGCCAAGCCCA CCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGT
MGVKLLFALICic-TD H3p-1c	GATACAGATCAAAGCGAACAACAACCTTGACACCCATTTGTTTGTATTATG
MGVKVLLALICic-T DH3p-1c	GATACAGATCAAAGCCAACAAGACCTTGACACCCATTTGTTTGTATTATG
MGVKVLFLLICic-TD H3p-1c	GATACAGATCAACAAGAACAAGACCTTGACACCCATTTGTTTGTATTATG
MGVKVLFALLCic-T DH3p-1c	GATACACAACAAGCGAACAAGACCTTGACACCCATTTGTTTGTATTATG
MGVKVLFALILic-TD H3p-1c	GATCAAGATCAAAGCGAACAAGACCTTGACACCCATTTGTTTGTATTATG
MGVKVLFALICic-T DH3p-1c	CAAACAGATCAAAGCGAACAAGACCTTGACACCCATTTGTTTGTATTATG
MGVKLLLALICic-T DH3p-1c	GATACAGATCAAAGCCAACAACAACCTTGACACCCATTTGTTTGTATTATG
MGVKVLFALILLe-T DH3p-1c	CAACAAGATCAAAGCGAACAAGACCTTGACACCCATTTGTTTGTATTATG
MGVKVLFALLLc-T DH3p-1c	CAACAACAACAAGCGAACAAGACCTTGACACCCATTTGTTTGTATTATG
MGVKVLFLLLcic-T DH3p-1c	GATACACAACAACAAGAACAAGACCTTGACACCCATTTGTTTGTATTATG
MGVKVLLLLLcic-T DH3p-1c	GATACACAACAACAACAACAAGACCTTGACACCCATTTGTTTGTATTATG
MKL(7)-hGLuc+46	ATGAAACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGAGGCCAAGCCCACCGAGAACAACGA AGACTTCAACATCGT
MKL(8)-hGLuc+46	ATGAAACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGAGGCCAAGCCCACCGAGAACA CGAAGACTTCAACATCGT
MKL(9)-hGLuc+46	ATGAAACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGAGGCCAAGCCCACCGAGAA CAACGAAGACTTCAACATCGT
MKL(10)-hGLuc+46	ATGAAACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGAGGCCAAGCCCACCGA GAACAACGAAGACTTCAACATCGT
MKL(11)-hGLuc+46	ATGAAACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGAGGCCAAGCCCAC CGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGT
MKL(12)-hGLuc+46	ATGAAACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGAGGCCAAGCC CACCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGT
MKL(13)-hGLuc+46	ATGAAACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGAGGCCAA GCCCACCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGT
MKL(14)-hGLuc+46	ATGAAACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGAGGCC AAGCCCACCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGT
MKL(15)-hGLuc+46	ATGAAACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGAG GCCAAGCCCACCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGT
MKL(16)-hGLuc+46	ATGAAACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGAGGCCAAGCCCACCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGT
MKL(17)-hGLuc+46	ATGAAACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGAGGCCAAGCCCACCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGT
MKL(13)F-hGLuc+46	ATGAAACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGAGGCCAAGCCCACCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGT
MKL(13)L-hGLuc+46	ATGAAACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGAGGCCAAGCCCACCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGT
MKL(13)I-hGLuc+46	ATGAAACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGAGGCCAAGCCCACCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGT
MKL(13)M-hGLuc+46	ATGAAACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGAGGCCAAGCCCACCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGT
MKL(13)V-hGLuc+46	ATGAAACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGAGGCCAAGCCCACCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGT
MKL(13)S-hGLuc+46	ATGAAACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGAGGCCAAGCCCACCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGT
MKL(13)P-hGLuc+46	ATGAAACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGAGGCCAAGCCCACCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGT

MKM(7)-hGLuc+46	ATGAAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGGAGGCCAAGCCCACCGAGAACAACGA AGACTTCAACATCGT
MKM(8)-hGLuc+46	ATGAAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGGAGGCCAAGCCCACCGAGAACA CGAAGACTTCAACATCGt
MKM(9)-hGLuc+46	ATGAAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGGAGGCCAAGCCCACCGAGAAC AACGAAGACTTCAACATCGT
MKM(10)-hGLuc+46	ATGAAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGGAGGCCAAGCCCACCGAG AACAAACGAAGACTTCAACATCGT
MKM(11)-hGLuc+46	ATGAAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGGAGGCCAAGCCCACC GAGAACAACGAAGACTTCAACATCGT
MKM(12)-hGLuc+46	ATGAAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGGAGGCCAAGCCC ACCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGT
MKM(13)-hGLuc+46	ATGAAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGGAGGCCAAG CCCACCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGT
MKM(14)-hGLuc+46	ATGAAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGGAGGCCA AGCCCACCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGT
MKM(15)-hGLuc+46	ATGAAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGGAGG CCAAGCCCACCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGT
MKM(16)-hGLuc+46	ATGAAAATGATGATGATGATGATGATGATGGAGG AGGCCAAGCCCACCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGT
MKM(17)-hGLuc+46	ATGAAAATGATGATGATGATGATGATGATGGAGG TGGAGGCCAAGCCCACCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGT
TAA+(1-54)-hGLuc+4 9	ATGATGGTTCGCGTGGTGGTCTCTATTCTGTACGGCCTTCAGGTCGCGGCACCT GCCAAGCCCACCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGT
SfGLU1+(1-54)-hGLuc +49	ATGAAATTCGGTGTGTTTTATTTCCGTCTTTGCTGCTATTGTTAGTGCTTTACCTGC CAAGCCCACCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGT
AmyLN5C+(1-27)c-T DH3-1c	GGCGTAAAGCCGTTTTTGTGTTTCATTTGTTTGTATGTGTGTTTATTCGA
AmyLN5C+(28-69)-hG Luc+49	CGATTGCTGACGCTGTTATTGCGCTCATCTTCTTGCTGCCTGCCAAGCCCACCG AGAACAACGAAGACTTCAACATCGT
KmPGU1+(1-54)-hGL uc+49	ATGTTATTTCAGCAACACCTTATTAATCGCAGCAGCTAGTGCAATTATTAGCTGAAG CCAAGCCCACCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGT
hIL6+(1-33)c-TDH3-1c	TGGACCGAAGGCCTTGTGGAGAAGGAGTTCATTTGTTTGTGTTTATGTGTGTTT A
hIL6+(34-69)-hGLuc+ 49	GTTGCCTTCTCCCTGGGGCTGCTCCTGGTGTGCTGCTAAGCCAACCGAAAAC AACGAAG
hEPO+(1-21)c-TDH3-1 c	AGGACAACCGTGCACCCCCATTTTGTGTTTATGTGTGTTA
hEPO+(22-60)-yGLuc+ 49	GCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTGCTGTCGCTCCCTGCTAAGCCAACCGAA AACAAACGAAG
hLIF+(1-30)c-TDH3-1c	GGGCACAACCTCTGCCGCAAGACCTTCATTTGTTTGTGTTTATGTGTGTTTATT CGA
hLIF+(31-78)-yGLuc+49	CTGCTGTTGGTTCTGCACTGGAAACATGGGGCGGGGAGCCCCCTCCCCGCTA AGCCAACCGAAAACAACGAAG
hZA2G+(1-18)c-TDH3-1 c	AGGCACCATCTTACCATTTTGTGTTGTTTATGTGTGTTA
hZA2G+(19-51)-yGLuc+ 49	GTCCTGCTGTCTCTGCTGCTCTTCTGGGTCCTGCTAAGCCAACCGAAAACA ACGAAG
KmACT1+16	GCAGAGGTCGCTGCTTTAGTTATTG
KmACT+1111c	ATGGACCAGATTCGTCGTATTCTTG
MKM(16)Ec-TDH3p-1c	CTCCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATTTTCA TTTTGTTGTTTATGTGTGTTTATTCGA
hLIF+4	AAGGTCTTGGCGGCAGGAGT

3.3 実験方法

3.3.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

KOD FX Neo kit (TOYOBO)を使用した。反応液はテンプレートDNA溶液 1.0 μ l、10 μ Mの各プライマー0.3 μ l ずつ、2 \times KOD FX Neo buffer 5.0 μ l、2 ml dNTPs 2.0 μ l、KOD FX Neo DNA polymerase 0.2 μ l を滅菌超純水(SDW)1.2 μ l と混ぜて合計で 10 μ l にした。反応は 94 $^{\circ}$ C 2.0 min で開始し、98 $^{\circ}$ C 10 sec の熱変性、65 $^{\circ}$ C 30 sec のアニーリング、68 $^{\circ}$ C 1.0~4.0 min の伸長反応を 30~40 サイクル繰り返した。15 $^{\circ}$ C に冷却して反応を終了した。

3.3.2 形質転換

RAK3908 を形質転換の宿主とした。30 ml の YPD に RAK3908 のシングルコロニーを懸濁し、28 $^{\circ}$ C 150 rpm で一晩振とう培養した。培養液を 50 ml チューブに移して遠心分離(3000 rpm 3 min)し、上澄み液を除去して細胞を得た。0.9 ml の TF buffer (40% polyethylene glycol 3350、0.2 M lithium acetate、及び 0.1 M dithiothreitol)に細胞を懸濁し、再度遠心分離(3000 rpm 3 min)して上澄みを除いた。0.6 ml の TF buffer に細胞を懸濁し、懸濁液 50 μ l を 1.5 ml マイクロチューブに分注した。これに DNA 断片を約 50~70 ng 加えて攪拌した。このサンプルにヒートショック(42 $^{\circ}$ C 30 min)を与え、150 μ l の SDW と混合した。これを MM-A プレートに塗付し、28 $^{\circ}$ C で 3 日間培養した。

3.3.3 ルシフェラーゼ活性評価

培養容器として 96 well マイクロプレートを使用した。MM-U 液体培地 160 μ l に細胞を懸濁し、28 $^{\circ}$ C で 2 日間培養して前培養液を得た。10 μ l の前培養液を 290 μ l の YPD 培地に移し、28 $^{\circ}$ C で一晩培養した。

試薬として *Gaussia* Luciferase Assay Kit (New England BioLabs)を使用した。1 \times *Gaussia* Luciferase Assay Buffer 1000 μ l と 100 \times *Gaussia* Luciferase Substrate を 10 μ l を混ぜた。これを基質溶液として使用した。発光光度は Centoro XS3 LB960 (BERTHOLD)で測定した。10 μ l の培養液を測定用 96 well 黒色マイクロプレート(Greiner Bio-One)に移して基質溶液を 20 μ l 添加し、ルミノメーターで RLU を 1 sec 測定した。また、細胞量の目安として培養液の濁度(OD600)をマイクロプレートリーダー(BioTek)で測定した。培養液の GLuc 活性を RLU/(OD600 \times μ l)として算出した。

3.3.4 アミノ酸削除型 GLuc の作成

本研究で作製した変異 GLuc は、yGLuc がクローニングされた *K. marxianus* 用プラスミドである pKM152 から作製された。このプラスミドは RAK6205 株に維持されていた。PCR によってこのプラスミドから線状 DNA 断片を作製した。この時、プライマーの配列に人工的な配列を与えることで人工的な配列を付加した。これを RAK3908 に導入し、NHEJ によって末端同士を接続させて環状のプラスミドとして導入した(Fig. 3.1)。

Table 3.3 にアミノ酸が削除された変異 GLuc の名前、アミノ酸配列、および使用したプライマーを記載した。この内 21E、d22N23N、d23N 及び d24E は d24E25D26F をテンプレートとした。

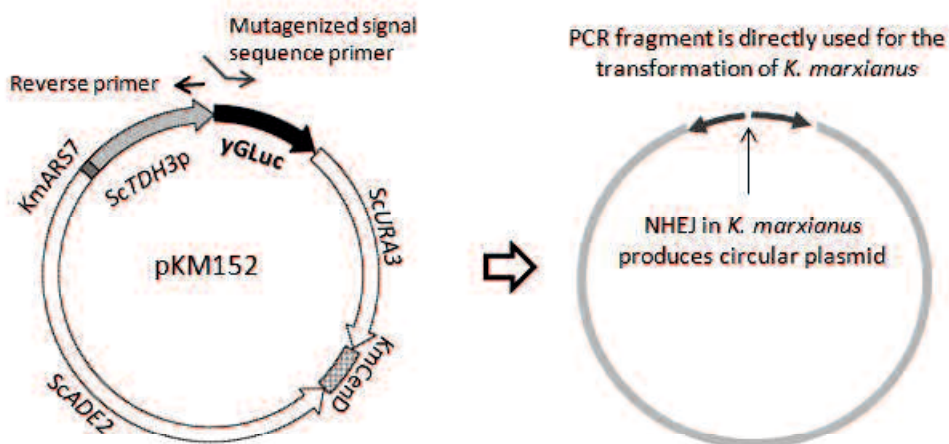


Fig. 3.1 : *K. marxianus* の遺伝子操作系を利用した変異 yGLuc の構築

Table 3.3 : アミノ酸削除型 GLuc 変異遺伝子の作成

Name	Amino acid sequence	Primer 1	Primer 2
Ctrl	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	URA3+771c	URA3+772
G2Δ	M VKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+3-TDH3-1c	yGLuc+7
G2V3Δ	M KVLVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+3-TDH3-1c	yGLuc+10
G2-K4Δ	M VLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+3-TDH3-1c	yGLuc+13
V5Δ	MGVK LFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+12c-TDH3-1c	yGLuc+16
V5L6Δ	MGVK FALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+12c-TDH3-1c	yGLuc+19
V5-F7Δ	MGVK ALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+12c-TDH3-1c	yGLuc+22
V5-A8Δ	MGVK LICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+12c-TDH3-1c	yGLuc+25
L9Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+24c	yGLuc+28
I10Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+27c	yGLuc+31
C11Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+30c	yGLuc+34
I12Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+33c	yGLuc+37
A13Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+36c	yGLuc+40
V14Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+39c	yGLuc+43
A15Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+42c	yGLuc+46
E16Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+45c	yGLuc+49
A17Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+48c	yGLuc+52
K18Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+51c	yGLuc+55
P19Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+54c	yGLuc+58
T20Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+57c	yGLuc+61
T20-N23Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+57c	yGLuc+70
E21-N23Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+60c	yGLuc+70
E24F26Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+69c	yGLuc+79
E21Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+60c	yGLuc+64
N22N23Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+63c	yGLuc+70
N23Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+66c	yGLuc+70
E24Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+69c	yGLuc+73
D25Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+72c	yGLuc+76
F26Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+75c	yGLuc+79
N27Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+78c	yGLuc+82
I28-A30Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+81c	yGLuc+91
V31-S33Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+90c	yGLuc+100
V31-A36Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+90c	yGLuc+109
T37-D39Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDL...	yGLuc+108c	yGLuc+118

3.3.5 アミノ酸置換型 GLuc の作成

Table 3.4 に 16E、または 4K が他のアミノ酸に置換された変異 GLuc の名称、アミノ酸配列、および作成に使用したプライマーを記載した。

Table 3.4 : アミノ酸置換型 GLuc 変異遺伝子の作成

Name	Amino Acid sequence	Primer1	Primer2
E16F	MGVKVLFALICIAVAF... ...	Fc-yGLuc+45c	yGLuc+49
E16L	MGVKVLFALICIAVALA... ...	Lc-yGLuc+45c	yGLuc+49
E16I	MGVKVLFALICIAVAIA... ...	Ic-yGLuc+45c	yGLuc+49
E16M	MGVKVLFALICIAVAMA... ...	Mc-yGLuc+45c	yGLuc+49
E16V	MGVKVLFALICIAVAVA... ...	Vc-yGLuc+45c	yGLuc+49
E16S	MGVKVLFALICIAVASA... ...	Sc-yGLuc+45c	yGLuc+49
E16P	MGVKVLFALICIAVAPA... ...	Pc-yGLuc+45c	yGLuc+49
E16T	MGVKVLFALICIAVATA... ...	Tc-yGLuc+45c	yGLuc+49
E16A	MGVKVLFALICIAVAAA... ...	Ac-yGLuc+45c	yGLuc+49
E16Y	MGVKVLFALICIAVAYA... ...	Yc-yGLuc+45c	yGLuc+49
E16H	MGVKVLFALICIAVAHA... ...	Hc-yGLuc+45c	yGLuc+49
E16Q	MGVKVLFALICIAVAQA... ...	Qc-yGLuc+45c	yGLuc+49
E16N	MGVKVLFALICIAVANA... ...	Nc-yGLuc+45c	yGLuc+49
E16K	MGVKVLFALICIAVAKA... ...	Kc-yGLuc+45c	yGLuc+49
E16D	MGVKVLFALICIAVADA... ...	Dc-yGLuc+45c	yGLuc+49
E16C	MGVKVLFALICIAVACA... ...	Cc-yGLuc+45c	yGLuc+49
E16W	MGVKVLFALICIAVAWA... ...	Wc-yGLuc+45c	yGLuc+49
E16R	MGVKVLFALICIAVARA... ...	Rc-yGLuc+45c	yGLuc+49
E16G	MGVKVLFALICIAVAGA... ...	Gc-yGLuc+45c	yGLuc+49
GVΔK4F	MFVLFALICIAVAEA... ...	MFc-TDH3-1c	yGLuc+13
GVΔK4L	MLVLFALICIAVAEA... ...	MLc-TDH3-1c	yGLuc+13
GVΔK4I	MIVLFALICIAVAEA... ...	MIc-TDH3-1c	yGLuc+13
GVΔK4M	MMVLFALICIAVAEA... ...	MMc-TDH3-1c	yGLuc+13
GVΔK4V	MVVLFALICIAVAEA... ...	MVc-TDH3-1c	yGLuc+13
GVΔK4S	MSVLFALICIAVAEA... ...	MSc-TDH3-1c	yGLuc+13
GVΔK4P	MPVLFALICIAVAEA... ...	MPc-TDH3-1c	yGLuc+13
GVΔK4T	MTVLFALICIAVAEA... ...	MTc-TDH3-1c	yGLuc+13
GVΔK4A	MAVLFALICIAVAEA... ...	MAc-TDH3-1c	yGLuc+13
GVΔK4Y	MYVLFALICIAVAEA... ...	MYc-TDH3-1c	yGLuc+13
GVΔK4H	MHVLFALICIAVAEA... ...	MHc-TDH3-1c	yGLuc+13
GVΔK4Q	MQVLFALICIAVAEA... ...	MQc-TDH3-1c	yGLuc+13
GVΔK4N	MNVLFALICIAVAEA... ...	MNc-TDH3-1c	yGLuc+13
GVΔK4D	MDVLFALICIAVAEA... ...	MDc-TDH3-1c	yGLuc+13
GVΔK4E	MEVLFALICIAVAEA... ...	MEc-TDH3-1c	yGLuc+13
GVΔK4C	MCVLFALICIAVAEA... ...	MCc-TDH3-1c	yGLuc+13
GVΔK4W	MWVLFALICIAVAEA... ...	MWc-TDH3-1c	yGLuc+13
GVΔK4R	MRVLFALICIAVAEA... ...	MRc-TDH3-1c	yGLuc+13
GVΔK4G	MGVLFALICIAVAEA... ...	MGc-TDH3-1c	yGLuc+13

3.3.6 疎水性配列改変型 GLuc の作成

5V~15A の疎水性配列の改変では、まず RAK6205 の染色体 DNA をテンプレートとして、TDH3-1c40 と yGLuc+37 をプライマーとして用いた PCR を行った。この PCR 産物

をテンプレートとしてさらに PCR を行い、変異体を作製した。Table 3.5 に変異 GLuc の名称、アミノ酸配列、および作成に使用したプライマーを記載した。

Table 3.5 : 疎水性配列置換型 GLuc 変異遺伝子の作成

Name	Amino Acid sequence	Primer1	Primer2
KL ⁸	MKLLLLLLLLAVAEA...	TDH3-1c40	MKL (8) -hGLuc+37
RL ⁸	MRLLLLLLLLLAVAEA...	TDH3-1c40	MRL (8) -hGLuc+37
RM ⁸	MRMMMMMMMAVAEA...	TDH3-1c40	MRM (8) -hGLuc+37
RC ⁸	MRCCGCCCCCAVAEA...	TDH3-1c40	MRC (8) -hGLuc+37
RF ⁸	MRFFFFFFFFAVAEA...	TDH3-1c40	MRF (8) -hGLuc+37
RA ⁸	MRAAAAAAAAAVAEA...	TDH3-1c40	MRA (8) -hGLuc+37
RW ⁸	MRWWWWWWWAVAEA...	TDH3-1c40	MRW (8) -hGLuc+37
RV ⁸	MRVVVVVVVAVAEA...	TDH3-1c40	MRV (8) -hGLuc+37
RY ⁸	MRYYYYYYYYAVAEA...	TDH3-1c40	MRY (8) -hGLuc+37
RI ⁸	MRIIIIIIIIAVAEA...	TDH3-1c40	MRI (8) -hGLuc+37
RS ⁸	MRSSSSSSSAVAEA...	TDH3-1c40	MRS (8) -hGLuc+37
RT ⁸	MRTTTTTTTTAVAEA...	TDH3-1c40	MRT (8) -hGLuc+37
RQ ⁸	MRQQQQQQQAVAEA...	TDH3-1c40	MRQ (8) -hGLuc+37
V5L	MGVKLLFALICIAVAEA...	MGVKLLFALICic-TDH3p-1c	yGLuc+37
F7L	MGVKVLLALICIAVAEA...	MGVKVLLALICic-TDH3p-1c	yGLuc+37
A8L	MGVKVLFLLICIAVAEA...	MGVKVLFLLICic-TDH3p-1c	yGLuc+37
I10L	MGVKVLFALLCIAVAEA...	MGVKVLFALLCic-TDH3p-1c	yGLuc+37
C11L	MGVKVLFALILIAVAEA...	MGVKVLFALILic-TDH3p-1c	yGLuc+37
I12L	MGVKVLFALICLAVAEA...	MGVKVLFALICic-TDH3p-1c	yGLuc+37
V5F7L	MGVKLLLALICIAVAEA...	MGVKLLLALICic-TDH3p-1c	yGLuc+37
V5F7A8L	MGVKLLLLLICIAVAEA...	MGVKLLLLLICic-TDH3p-1c	yGLuc+37
C11I12L	MGVKVLFALILLAVAEA...	MGVKVLFALILLc-TDH3p-1c	yGLuc+37
I10C11I12L	MGVKVLFALLLAVAEA...	MGVKVLFALLLc-TDH3p-1c	yGLuc+37
A8I10L	MGVKVLFLLLCIAVAEA...	MGVKVLFLLLCic-TDH3p-1c	yGLuc+37
F7A8I10L	MGVKVLLLLLCIAVAEA...	MGVKVLLLLLCic-TDH3p-1c	yGLuc+37

3.3.7 人工分泌シグナル配列付加型 GLuc 変異遺伝子の作成

まず RAK6205 の染色体 DNA をテンプレートとして、TDH3-1c40 と yGLuc+64 をプライマーとして用いた PCR を行った。この PCR 産物をテンプレートとしてさらに PCR を行い、変異体を作製した。Table 3.6 に変異 GLuc の名称、アミノ酸配列、および作成に使用したプライマーを記載した。

Table 3.6 : 人工配列付加型 GLuc 変異遺伝子の作成

Name	Amino Acid sequence	Primer1	Primer2
L ⁷	MKLLLLLLLLLEA...	TDH3-1c40	MKL (7)-hGLuc+46
L ⁸	MKLLLLLLLLLEA...	TDH3-1c40	MKL (8)-hGLuc+46
L ⁹	MKLLLLLLLLLEA...	TDH3-1c40	MKL (9)-hGLuc+46
L ¹⁰	MKLLLLLLLLLEA...	TDH3-1c40	MKL (10)-hGLuc+46
L ¹¹	MKLLLLLLLLLEA...	TDH3-1c40	MKL (11)-hGLuc+46
L ¹²	MKLLLLLLLLLEA...	TDH3-1c40	MKL (12)-hGLuc+46
L ¹³	MKLLLLLLLLLEA...	TDH3-1c40	MKL (13)-hGLuc+46
L ¹⁴	MKLLLLLLLLLEA...	TDH3-1c40	MKL (14)-hGLuc+46
L ¹⁵	MKLLLLLLLLLEA...	TDH3-1c40	MKL (15)-hGLuc+46
L ¹⁶	MKLLLLLLLLLEA...	TDH3-1c40	MKL (16)-hGLuc+46
L ¹⁷	MKLLLLLLLLLEA...	TDH3-1c40	MKL (17)-hGLuc+46
L ^{13F}	MKLLLLLLLLLFA...	TDH3-1c40	MKL (13)F-hGLuc+46
L ^{13L}	MKLLLLLLLLLLA...	TDH3-1c40	MKL (13)L-hGLuc+46
L ^{13I}	MKLLLLLLLLLLIA...	TDH3-1c40	MKL (13)I-hGLuc+46
L ^{13M}	MKLLLLLLLLLLMA...	TDH3-1c40	MKL (13)M-hGLuc+46
L ^{13V}	MKLLLLLLLLLLVA...	TDH3-1c40	MKL (13)V-hGLuc+46
L ^{13S}	MKLLLLLLLLLLSA...	TDH3-1c40	MKL (13)S-hGLuc+46
L ^{13P}	MKLLLLLLLLLLPA...	TDH3-1c40	MKL (13)P-hGLuc+46
L ^{13T}	MKLLLLLLLLLLTA...	TDH3-1c40	MKL (13)T-hGLuc+46
L ^{13A}	MKLLLLLLLLLLAA...	TDH3-1c40	MKL (13)A-hGLuc+46
L ^{13Y}	MKLLLLLLLLLLYA...	TDH3-1c40	MKL (13)Y-hGLuc+46
L ^{13H}	MKLLLLLLLLLLHA...	TDH3-1c40	MKL (13)H-hGLuc+46
L ^{13Q}	MKLLLLLLLLLLQA...	TDH3-1c40	MKL (13)Q-hGLuc+46
L ^{13N}	MKLLLLLLLLLLNA...	TDH3-1c40	MKL (13)N-hGLuc+46
L ^{13K}	MKLLLLLLLLLLKA...	TDH3-1c40	MKL (13)K-hGLuc+46
L ^{13D}	MKLLLLLLLLLLDA...	TDH3-1c40	MKL (13)D-hGLuc+46
L ^{13C}	MKLLLLLLLLLLCA...	TDH3-1c40	MKL (13)C-hGLuc+46
L ^{13W}	MKLLLLLLLLLLWA...	TDH3-1c40	MKL (13)W-hGLuc+46
L ^{13R}	MKLLLLLLLLLLRA...	TDH3-1c40	MKL (13)R-hGLuc+46
L ^{13G}	MKLLLLLLLLLLGA...	TDH3-1c40	MKL (13)G-hGLuc+46
I ¹⁰	MKIIIIIIIIIEA...	TDH3-1c40	MKI (10)-hGLuc+46
I ¹¹	MKIIIIIIIIIEA...	TDH3-1c40	MKI (11)-hGLuc+46
I ¹²	MKIIIIIIIIIEA...	TDH3-1c40	MKI (12)-hGLuc+46
I ¹³	MKIIIIIIIIIEA...	TDH3-1c40	MKI (13)-hGLuc+46
I ¹⁴	MKIIIIIIIIIEA...	TDH3-1c40	MKI (14)-hGLuc+46
I ¹⁵	MKIIIIIIIIIEA...	TDH3-1c40	MKI (15)-hGLuc+46
I ¹⁶	MKIIIIIIIIIEA...	TDH3-1c40	MKI (16)-hGLuc+46
I ¹⁷	MKIIIIIIIIIEA...	TDH3-1c40	MKI (17)-hGLuc+46
F ⁸	MKFFFFFFFEA...	TDH3-1c40	MKF (8)-hGLuc+46
F ⁹	MKFFFFFFFEA...	TDH3-1c40	MKF (9)-hGLuc+46
F ¹⁰	MKFFFFFFFEA...	TDH3-1c40	MKF (10)-hGLuc+46

F ¹¹	MKFFFFFFFFFFFFEA...	TDH3-1c40	MKF (11)-hGLuc+46
F ¹³	MKFFFFFFFFFFFFEA...	TDH3-1c40	MKF (13)-hGLuc+46
F ¹⁵	MKFFFFFFFFFFFFEA...	TDH3-1c40	MKF (15)-hGLuc+46
F ¹⁷	MKFFFFFFFFFFFFEA...	TDH3-1c40	MKF (17)-hGLuc+46
M ¹⁰	MKMMMMMMMMMMEA...	TDH3-1c40	MKM (10)-hGLuc+46
M ¹¹	MKMMMMMMMMMMEA...	TDH3-1c40	MKM (11)-hGLuc+46
M ¹²	MKMMMMMMMMMMEA...	TDH3-1c40	MKM (12)-hGLuc+46
M ¹³	MKMMMMMMMMMMEA...	TDH3-1c40	MKM (13)-hGLuc+46
M ¹⁴	MKMMMMMMMMMMEA...	TDH3-1c40	MKM (14)-hGLuc+46
M ¹⁵	MKMMMMMMMMMMEA...	TDH3-1c40	MKM (15)-hGLuc+46
M ¹⁶	MKMMMMMMMMMMEA...	TDH3-1c40	MKM (16)-hGLuc+46
M ¹⁷	MKMMMMMMMMMMEA...	TDH3-1c40	MKM (17)-hGLuc+46

3.3.8 異種タンパク由来分泌シグナル付加型 GLuc 変異遺伝子の作成

まず RAK6205 の染色体 DNA をテンプレートとして、TDH3-1c40 と yGLuc+7 をプライマーとして用いた PCR を行った。テンプレートとしてさらに PCR を行い、変異体を作製した。Table 3.7 に変異 GLuc の名称、アミノ酸配列、および作成に使用したプライマーを記載した。

Table 3.7 : 人工配列付加型 GLuc 変異遺伝子の作成

Name	Amino Acid sequence	Primer1	Primer2
KmPGU1sig	MLFSNTLLIAAASALLAEA...	TDH3-1c40	KmPGU1+(1-54)-hGLuc+49
AoTAAsig	MMVAWWSLFLYGLQVAAPA...	TDH3-1c40	TAA+(1-54)-hGLuc+49
SfGLU1sig	MKFGVLFVFAAIVSALPA...	TDH3-1c40	SfGLU1+(1-54)-hGLuc+49
AmyLN5Csig	MKQQRLYARLLTLLFALIFLLPA...	AmyLN5C+(1-27)c-TDH3-1c	AmyLN5C+(28-69)-hGLuc+49
hLIFsig	MKVLAAAGVPLLLVLHWKHGAGSPLPA...	hLIF+(1-30)c-TDH3-1c	hLIF+(31-78)-yGLuc+49
hEPOsig	MGVHGCPAWLWLLSLLSLPA...	hEPO+(1-21)c-TDH3-1c	hEPO+(22-60)-yGLuc+49
hIL6sig	MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLVLPA...	hIL6+(1-33)c-TDH3-1c	hIL6+(34-69)-yGLuc+49
hCFS3sig	MAGPATQSPMKLMGLQLLWHSALWTVQEA...	hCFS3+(1-45)c-TDH3-1c	hCFS3+(46-81)-yGLuc+49
hZA2Gsig	MVRMVPVLLSLLLLGPAVPEA...	hZA2G+(1-18)c-TDH3-1c	hZA2G+(19-51)-yGLuc+49

3.3.9 転写量の比較

RAK6205、RAK8772、RAK9383、および RAK10336 から転写産物を抽出した。菌体を-U 培地 1 ml に植えて 24-well マイクロプレートで 28°C 150 rpm で二日間培養して前培養液を得た。前培養液 10 µl を 24-well マイクロプレートの YPD 培地 1 ml に移して 150 rpm 28°C で 24 h 培養した。遠心分離(1,000 g 5 min)で細胞を集め、2 ml の buffer Y (0.1 M EDTA、1 M sorbitol、0.7% 2-mercaptoethanol、および 2 mg/ml Zymolyase pH 7.4)に懸濁し、30°C に 30 min 静置した。転写産物は Maxwell 16 Research System (Promega)を使っ

て抽出した。この操作は機械を使用して自動的に進められた。

転写産物を Turbo DNA-free kit (Life Technologies) を使って精製し、SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit (Life Technologies) を使って逆転写産物を得た。逆転写産物をテンプレートとして PCR を行った。プライマーとして、yGLuc+82 と 3CG9-yGLuc+558c、または KmACT1+16 と KmACT+1111c を使った。

3.3.10 ウェスタンブロッティング

GLucタンパクの検出には、RAK6205とRAK8772を使用した。酵母菌を2 mlのYPD液体培地で一日培養し、培養上澄にアセトン1 mlを加えて2-3 min攪拌して12,000 rpm, 10 minの遠心分離後、上澄みを捨てた。沈殿を20 μ lのLaemmli Sample Buffer (Bio-rad)に溶かした。これを95°Cで5 min 加熱し、5 μ lをPAGE gel (Super Sep Ace 5-20% 17well)にロードし、Cassette Electrophoresis Unit DPE-1020 (Cosmo-bio)によって12 mA 80 minのSDS-PAGEを行った。SDS-PAGE後のタンパクは、iBlot western blotting system (Life technologies)を使ってPVDFメンブレンに転写した。一次抗体として1/5000倍に希釈されたanti-GLuc antibody (E8023S、New England Biolabs)を使用し、二次抗体として1/1000倍に希釈されたanti-rabbit IgG-HRP (Jackson ImmunoResearch Inc)を使用し、Immunostar Zeta (Wako)によって検出した。

Lifタンパクの検出には、RAK10252とRAK11616を使用した。酵母菌を2 mlのYPD液体培地で一日培養し、培養上澄にアセトン1 mlを加えて2-3 min vortexし、12,000 rpm、10 minの遠心分離後、上澄みを捨てた。沈殿を10 μ lのSample buffer (Laemmli Sample Buffer 475 μ l + 2-メルカプトエタノール25 μ l)に溶かした。これを95°C 3 min 加熱し、5 μ lをPAGE gel (Super Sep Ace 5-20% 17well)にロードし、Cassette Electrophoresis Unit DPE-1020 (Cosmo-bio)によって12 mA 80 minのSDS-PAGEを行った。PAGE gel 中のタンパクをTwobin転写bufferで満たした装置内でPVDFメンブレンにCassette Electrophoresis Unit DPE-1020を用いて100V 1 hで転写した。一次抗体にAnti-DYKDDDDK tag mouse 1E6 (Wako)を使用し、二次抗体として1/1000倍に希釈されたanti-rabbit IgG-HRP (Jackson ImmunoResearch Inc)を使用し、Immunostar Zeta (Wako) によって検出した。

3.3.11 M¹⁶ 付加型 hLIF の作成

RAK10252 の染色体 DNA をテンプレートとして、TDH3-1c40 と hLIF+7 をプライマーとした PCR を行った。この PCR 産物をテンプレートとして、MKM(16)Ec-TDH3p-1c

と hLIF+7 をプライマーとして用いた PCR を行った。これを RAK3908 に導入し、形質転換体を取得した。

3.3.12 ELISA 法によるタンパク質検出

RAK10252とRAK11616を検出に利用した。酵母菌を2 mlのMM-U培地で28°C 150 rpmで一日培養し、培養液を2 mlのYPD液体培地に20 µl添加してさらに28°C 150 rpmで一日培養した。8 µg/mlのmouse monoclonal antibody that detects human antigens (R&D Systems) をMAXISORP plate (Thermo Fisher Scientific)に50 µl滴下し、4°Cで一晩静置した。プレートをTween20が添加されたTBS (TTBS)で洗浄し、培養上澄を50 µl滴下し、室温で2 h静置した。プレートをTTBSで洗浄し、50 µlの0.4 µg/ml biotinylated human LIF goat polyclonal antibodies (R&D Systems、室温で2 h静置した。プレートをTTBSで洗浄し、Vectastain ABC standard stain solution (Vector laboratories)で検出した。サンプルのOD 450及びOD 540をSynergy MX microplate reader (BioTek)で測定し、Lifタンパクの量をOD450 - OD540の値として定量した。

3.4 実験結果

3.4.1 アミノ酸の削除による分泌シグナル配列の解析

構造中の一部のアミノ酸が削除された GLuc 変異体を構築し、GLuc 活性を比較した。N 末端から数えて 2 番目のグリシン(G2)から 39 番目のアスパラギン酸(D39)までの配列中に変異を与えた(Table 3.3)。ルシフェラーゼ活性を評価する際に、同時にネガティブコントロールとして GLuc タンパクを生産しない株(RAK6202, 6203, 6204)も使用した。これらの株から示された GLuc 活性の平均値(0.44 ± 0.2)を非活性株の指標とし、以後 0.64 以下の活性値を示した株は非活性株と見なして除外した。

Fig. 3.2 では、各アミノ酸削除型 GLuc の活性値を比較した。また、活性値の算出に使ったサンプル数を n に記載した。アミノ酸の削除によって活性値の上下が見られ、これによって GLuc タンパクの分泌に重要な部位を特定した。まず、2 番目のグリシン(G2)や 3 番目のバリン(V3)に関してはこれらを削除した変異(G2 Δ 、G2V3 Δ)の活性値が野生型とほぼ同程度であったため、重要では無いと見なした。一方で、4 番目のリジン(K4)も削除された配列(G2-K4 Δ)では GLuc が大きく低下した。従って、K4 には重要な意味があると示された。5 番目のバリン(V5)から 15 番目のアラニンまで(A15)の配列は、どのアミノ酸を削除しても GLuc 活性の低下が見られた。この配列は連続した疎水性アミノ酸という特徴的な配列であり、分泌発現に重要な構造を取っているのではないかと予想した。また、意外なことに 16 番目のグルタミン酸(E16)が削除された変異(E16 Δ)からは GLuc 活性の大幅な向上が見られた。他のアミノ酸削除型変異体からも分泌発現の変化は見られたが、劇的な変化を見出せなかった。以上の結果から、分泌発現に大きく影響した領域として KVLFIALICIAVAE を特定した。

GLuc signal sequence region					RLU ± SE	Fold	n/N
1	10	20	30	40			
WT	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				107.6 ± 10.5	1.0	69/72
G2Δ	MVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				143.2 ± 61.2	1.3	8/12
G2V3Δ	MKVLVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				199.9 ± 36.3	1.9	22/24
G2-R4Δ	MVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				3.4 ± 0.5	0.0	7/12
V5Δ	MGVKLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				13.4 ± 2.4	0.1	10/12
V5L6Δ	MGVKFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				1.6 ± 0.3	0.0	9/12
V5-F7Δ	MGVKALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				0.9 ± 0.3	0.0	2/12
V5-A8Δ	MGVKLICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				1.3 ± 0.4	0.0	2/12
L9Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				6.0 ± 1.9	0.1	5/12
I10Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				13.0 ± 3.0	0.1	11/12
C11Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				9.6 ± 2.4	0.1	11/12
I12Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				12.9 ± 3.5	0.1	10/12
A13Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				8.9 ± 2.7	0.1	10/12
V14Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				19.8 ± 5.2	0.2	10/12
A15Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				11.7 ± 2.5	0.1	9/12
E16Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				480.7 ± 152.9	4.5	9/12
A17Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				108.3 ± 20.1	1.0	10/12
K18Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				159.5 ± 34.4	1.5	12/12
P19Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				145.9 ± 44.2	1.4	11/12
T20Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				441.1 ± 60.0	4.1	9/12
T20-N23Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				229.3 ± 95.6	2.1	8/12
E21-N23Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				129.2 ± 65.8	1.2	10/12
E24-F26Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				57.3 ± 14.5	0.5	11/12
E21Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				46.8 ± 15.1	0.4	10/12
N22N23Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				62.5 ± 27.9	0.6	8/12
N23Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				112.2 ± 33.5	1.0	9/12
E24Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				71.4 ± 37.2	0.7	8/12
D25Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				77.4 ± 21.8	0.7	11/12
F26Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				47.1 ± 15.0	0.4	10/12
N27Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				37.2 ± 13.0	0.4	10/12
I28-A30Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				41.3 ± 15.6	0.4	10/12
V31-S33Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				24.0 ± 8.1	0.2	10/12
V31-A36Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				51.8 ± 11.0	0.5	8/12
T37-D39Δ	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATDDL				10.9 ± 2.8	0.1	10/12

Fig. 3.2 : アミノ酸削除型 GLuc の活性値の比較

3.4.2 グルタミン酸の置換による分泌シグナル配列の解析

E16Δは GLuc 活性を 4~5 倍に高めたため、16 番目のグルタミン酸(E16)はルシフェラーゼの分泌発現に影響するアミノ酸であることが示唆された。そこで、16E を他のアミノ酸に置換した配列を設計した(Table 3.4 の E16F~E16G)。

Fig. 3.3A ではグルタミン酸置換型 GLuc の活性値を比較した。ロイシンに置換された変異(E16L)は最も高い GLuc 活性を示し、野生型と比べて約 10 倍もの発現量であった。また、メチオニンやフェニルアラニン、またはシステインに置換されたもの(E16M、E16F、E16C)でも比較的高い数値が見られ、野生型と比べて約 5 倍の発現量が測定された。一方でアスパラギン、リジン、アルギニン、アスパラギン酸、またはプロリンに置換され

た配列(E16N、E16K、E16R、E16D、E16P)では測定値は低下した。

分泌発現が特に強まった E16L、E16M、E16F、E16C 及び E16Δでは配列を改変した結果、疎水性配列の伸長が共通して見られた。このことから分泌発現を高めたのはこれらのアミノ酸では無く、疎水性配列の伸長であったと予想した。

3.4.3 リジンの置換による分泌シグナル配列の解析

アミノ酸の削除から特定した配列(KVLFALICIAVAE)の中でも陽電荷を持つ K(リジン)は特徴的であった。そこで、リジンを他のアミノ酸に置換された変異体を構築した (Table 3.4 の GVΔK4F~GVΔK4G)。2Gや3Vは削除しても活性値に影響しなかったため、配列を設計する際には重要なアミノ酸では無いと判断した。

Fig. 3.3B では、各リジン置換型 GLuc の活性値を野生型と比較した。これらの中でアルギニンに置換された変異(GVΔK4R)から特に高い活性が検出された。次に、アスパラギンやトリプトファン、またはフェニルアラニンに置換されたもの(GVΔK4N、GVΔK4W、GVΔK4F)や置換されなかったもの(GVΔK4)からも比較的高い活性が見られた。これらのアミノ酸が 4K と同様の働きをするものとして特定された。またチロシン、メチオニン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシンに置換された変異(GVΔK4Y、GVΔK4M、GVΔK4H、GVΔK4I、GVΔK4L)からは比較的弱い活性が見られた。他の変異(GVΔK4C、GVΔK4T、GVΔK4E、GVΔK4G、GVΔK4D、GVΔK4S、GVΔK4V、GVΔK4P、GVΔK4A、GVΔK4Q)は発現を示さなかった。

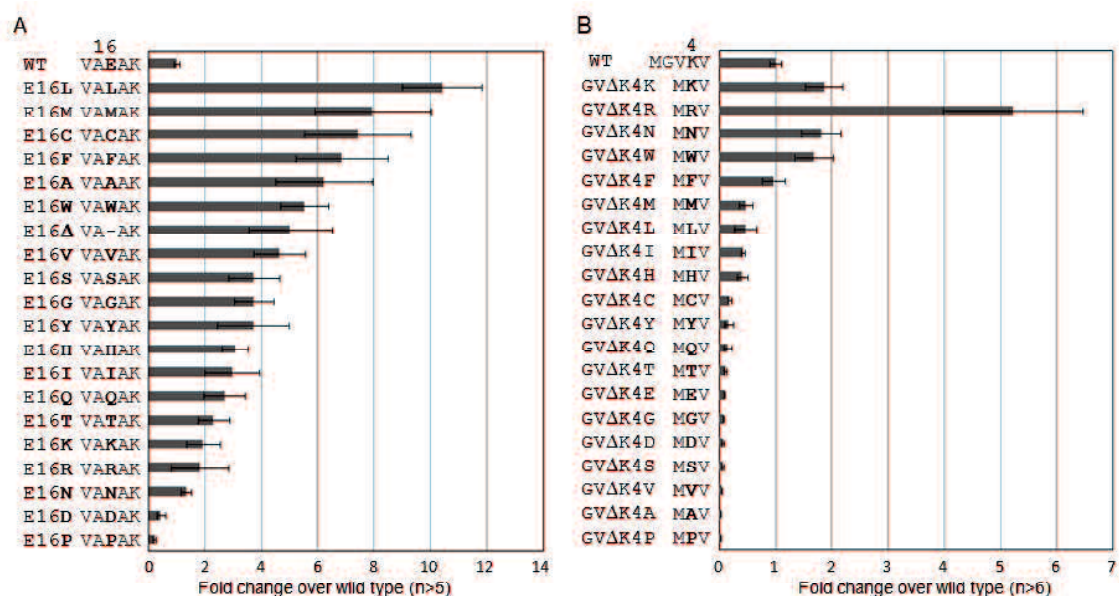


Fig. 3.3 : アミノ酸置換型 GLuc の活性値の比較

3.4.4 疎水性配列の置換による分泌シグナル配列の解析

5V から 15A までの配列(VLFALICIAVA)の解析では、配列をよりシンプルに評価するために一部を単純な配列と置き換えた。4K から 12I までの部分(VLFALICI)を単純な種類のアミノ鎖に置換された変異を設計した(Table 3.5 の KL⁸~RQ⁸)。これらの配列ではリジンよりも効果的なアミノ酸であると示されたアルギニンを配置したが、RL⁸との比較のために KL⁸も用意した。

Fig. 3.4A に各疎水性領域置換型 GLuc の活性値を野生型と比較した。まず、疎水性アミノ酸の配列を大幅に変異させても GLuc 活性は失われなかった。特にロイシン、トリプトファン、メチオニン、フェニルアラニン鎖は高い GLuc 活性を示した。一方で、スレオニン、イソロイシン、セリン、グルタミン、チロシン、アラニン、バリン、システイン鎖の変異体は GLuc 活性が示されなかった。また、期待に反して RL⁸は KL⁸ほど高い分泌発現を示さなかった。

最も高い GLuc 活性を示したものは KL⁸であったが、野生型とは 5V、7F、8A、10I、11C、および 12I の 6 か所の違いしか見られなかった。そこでこれらの数個がロイシンと置き換えられた配列を設計し、GLuc の活性値を比べた(Table 3.5 の V5L~F7A8I10L)。しかし、ロイシンの位置との関連は見られなかった(Fig. 3.4B)。

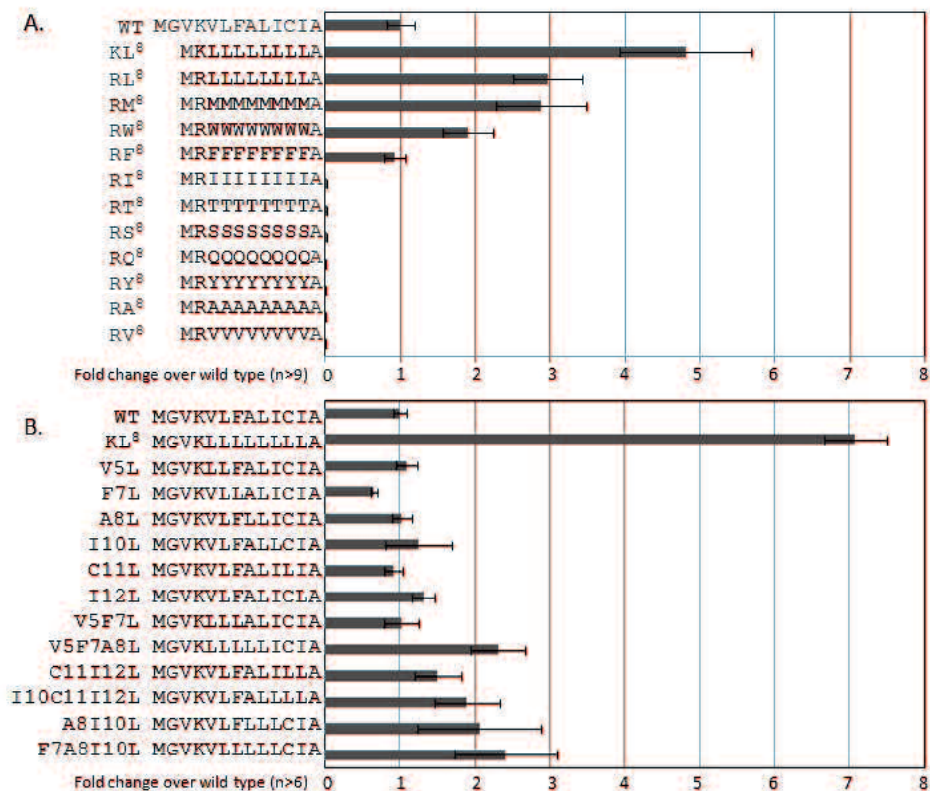


Fig. 3.4 : 疎水性配列改変型 GLuc の活性値の比較

3.4.5 分泌シグナル配列の定義

これまでの解析では特定の配列が特に強い分泌発現を示すようなことが見られず、分泌シグナルの配列は厳密な定義がされていないことが示唆された。一方で、16Eの置換の結果では疎水性配列の伸長が大幅に分泌発現を強めた。このことから、疎水性配列の長さが分泌シグナルの強さに影響すると仮定した。そこで、長さが異なるロイシン鎖を数パターン設計し、4Kと16Eの間に配置させた配列を設計した(Table 3.6のL⁷~L¹⁷)。

Fig. 3.5Aでは、各ロイシン鎖の配列と野生型のGLuc活性を比較した。設計された配列の中で最も短いL⁷やL⁸の分泌発現は、野生型のものと比べて非常に低かった。L⁹では野生型とほとんど同じ程度の分泌発現が見られ、L¹⁰、L¹¹、L¹²、及びL¹³では分泌発現の活性化が見られた。しかし、より長いL¹⁴の分泌発現ではより低い値が示され、L¹⁰~L¹³とは異なる傾向を示し、さらに長いL¹⁵、L¹⁶、及びL¹⁷では分泌発現が見られなくなった。以上の結果から、疎水性配列の長さが分泌発現に影響することが示され、ロイシン鎖の場合には、10~13残基の長さが最適であることが分かった。

疎水性配列の長さが分泌発現に強く影響することが示されたことで、これまで分泌を阻害すると見られていた16Eの役割を見直す必要が出てきた。この配列には疎水性配列を規定するという役割があると予想できたためであった。4Kと16Eの間にはロイシンを13個まで配置させられたことを利用して、L¹³をベースに、その直後に続くグルタミン酸を他のアミノ酸と置き換えた配列を19パターン設計した(Table 3.6のL¹³F~L¹³G)。この場合は疎水性配列が伸びたものでは分泌発現が抑えられるため、16Eと同様の働きをするアミノ酸の特定を期待できた。

Fig 3.5Bでは、グルタミン酸置換型L¹³と野生型のGLuc活性を比較した。期待通りに、L¹³LやL¹³Mといったグルタミン酸が疎水性残基と置き換えられたような変異体では分泌発現の低下が見られた。最も高いGLuc活性を示したものはグルタミン酸が置換されなかったL¹³Eであり、これが最も効果の高いアミノ酸であった。次いでL¹³P、L¹³D、L¹³Q、L¹³N、L¹³Hも比較的高い発現量が見られた。以上のことから、グルタミン酸は分泌発現を阻害するアミノ酸ではなく、疎水性アミノ酸を規定する働きをしていたと考えられた。また、プロリン、アスパラギン酸、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジンにも若干ながら同様の働きが認められた。以上の結果から分泌シグナル配列をリジンとグルタミン酸に規定された一定の長さの疎水性アミノ酸として定義した。

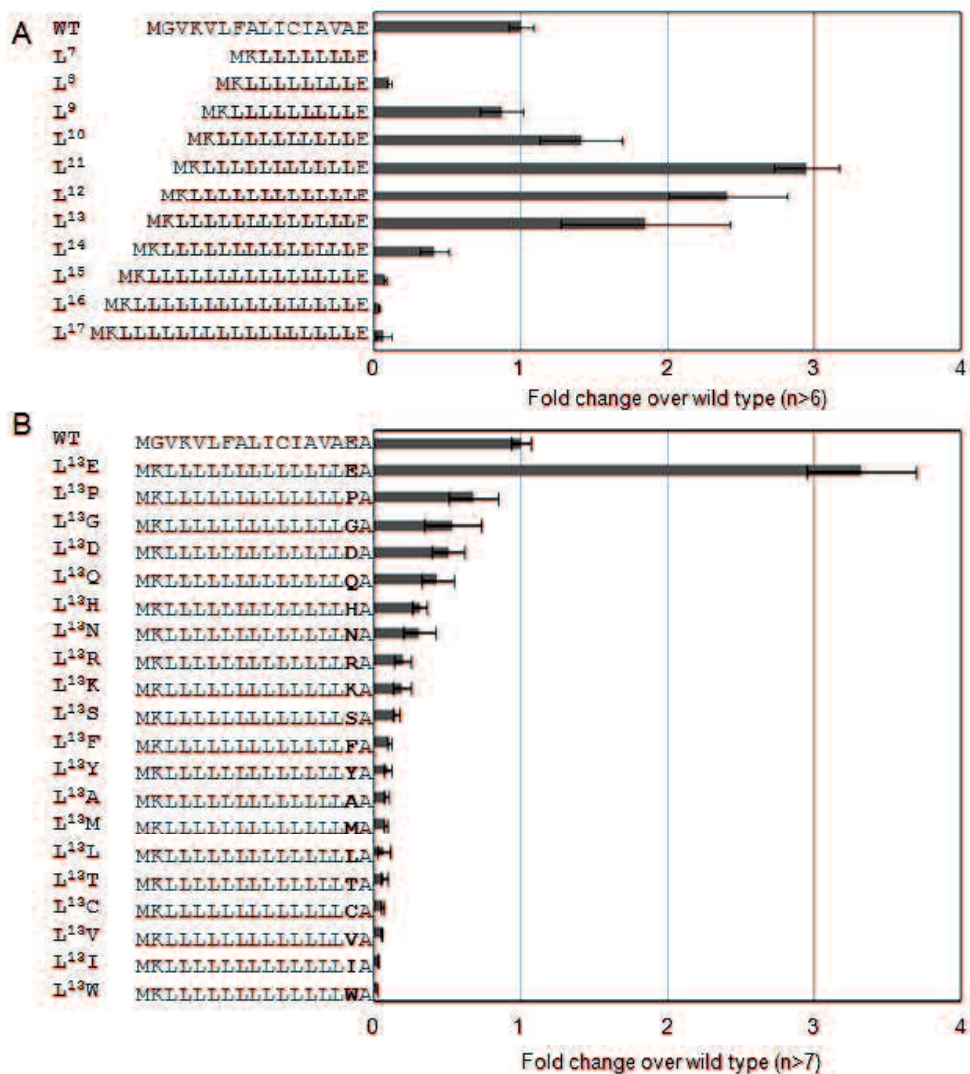


Fig. 3.5 : ロイシン鎖挿入型 GLuc の活性値の比較

3.4.6 分泌シグナル配列中の疎水性領域の検討

リジンとグルタミン酸に規定された疎水性配列とする定義を基に、さらに分泌能の高い配列の構築を試みた。疎水性アミノ酸としてはロイシンの長さしか検討されていなかったため、他のアミノ酸では違う傾向が見られると予想した。我々はイソロイシン、フェニルアラニン及びメチオニンを対象とし、配列を設計した(Table 3.6 の I⁷~M¹⁷)。イソロイシンはロイシンと似た構造をしているため、フェニルアラニンとメチオニンは Fig 3.4A で比較的高い効果を示したからであった。

Fig. 3.6A では、これらの人工分泌シグナル配列の GLuc 活性を比較した。イソロイシン鎖の場合では I¹⁰ や I¹¹ は野生型と比べて非常に弱い活性を示し、I¹² や I¹³ は L¹³ と同様

の活性値を示した。さらに長い I¹⁴、I¹⁵、I¹⁶、及び I¹⁷ では活性の値が弱まった。イソロイシン鎖はロイシン鎖と同じ程度分泌発現を高めた。フェニルアラニン鎖では、F⁸、F⁹ は分泌発現を示さなかったが、F¹⁰ や F¹¹ では L¹³ と同程度の分泌発現の上昇が見られた。さらに長い F¹³ や F¹⁵ からも分泌発現の上昇が見られたが、これらは野生型と比べて約 10~15 倍も高い値を示した。以降長くなるにつれて発現量は低下していった。最も劇的な変化を見せたのは、メチオニン鎖であった。まず、M¹⁰ の分泌発現は野生型のもの比べて格段に低く、M¹¹ では野生型の約 5 倍という L¹³ とほぼ同程度の発現が見られた。よりメチオニンの数を増やした M¹² や M¹³ の発現量は野生型の約 15 倍の数値が示された。M¹⁴、M¹⁵、M¹⁶ とさらにメチオニンの数が増えるにつれて分泌発現量も増加していった。最も効果的だったのは M¹⁶ で、野生型の約 40 倍もの分泌発現量を示した。M¹⁷ では M¹⁶ よりも分泌発現量は低下したが、野生型の約 25 倍の発現量が見られた。

3.4.7 メッセンジャーRNA 量の比較

これまでの系では分泌発現の目安としてルシフェラーゼ活性を使っていたが、分泌以外の機能に関する検証が不十分であった。転写への影響を調べるために、メッセンジャーRNA (mRNA) 量の比較を行った。対象としたのは野生型、L¹³、F¹³、及び M¹⁶ が導入された株であり、これらの株は yGLuc 遺伝子の配列を解析して設計通りの配列がクローニングされたことが明確に示された株であった。

各形質転換体から得られた逆転写 DNA をテンプレートに yGLuc の配列を 30、35、40 サイクルの PCR で増幅し、DNA バンドを比較した(Fig 3.6B)。この反応では yGLuc の配列は約 480 bp の DNA バンドとして現れることが予想され、40 サイクル反応させた場合に予想に近い約 500 bp の DNA バンドが明確に観察された。しかし、これらの DNA バンドの濃さ等に明確な差異は見られなかった。また、比較対象として分泌発現とは無関係な KmACT1 遺伝子の配列を KmACT1+16 と KmACT+1111c を使って 30 サイクルの PCR で増幅した。この反応では予想された KmACT1 遺伝子のサイズに近い約 1000 bp の DNA バンドが現れたが、サンプル間での違いは見られなかった。以上の結果から、yGLuc のメッセンジャーRNA 量はほぼ同程度であると考えられた。

3.4.7 GLuc タンパク量の比較

これまで分泌発現の程度を GLuc 活性の程度で判断してきたが、タンパクそのものの観察がされていなかった。そこで、野生型と M¹⁶ の GLuc タンパクの分泌量をウェスタ

ンブロッティングで比較した。

Fig. 3.6C では培養上澄中の GLuc タンパク量を評価した。野生型では GLuc タンパクがほとんど検出されなかったのに対し、M¹⁶ 付加型ではタンパクのバンドが明確に観察された。したがって、M¹⁶ による GLuc 活性の向上は、分泌発現が高まったためであることが明確に示された。

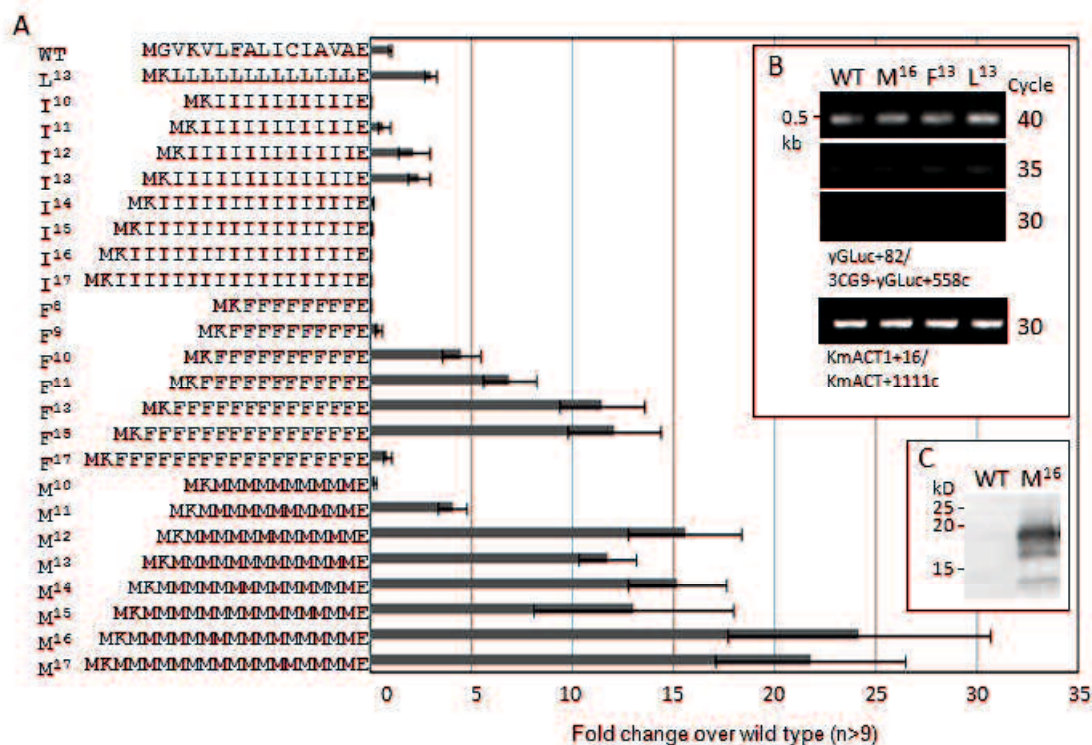


Fig. 3.6 : 人工分泌シグナル配列の分泌発現量の比較

3.4.8 異種分泌タンパク質由来分泌シグナル配列の比較

他の分泌タンパク質の配列にも注目した。対象としたのは、*Aspergillus oryzae* 由来α-アミラーゼ(AoTAA)、*Saccharomycopsis fibuligera* 由来グルコアミラーゼ(SfGLU1)、*Bacillus licheniformis* 由来α-アミラーゼ(BIAmyL)、*Kluyveromyces marxianus* 由来ペクチナーゼ(KmPGU1)であった。また、ヒト由来の分泌タンパクとして hIL6、hCFS3、hEPO、hZ2GA、及び hLIF の配列に注目した。

各タンパク質の N 末端の配列に注目し、すべての配列から疎水性アミノ酸の豊富な領域が特定された。さらに、これらの疎水性の配列はグルタミン酸、またはプロリンによって規定されていた。一方で、陽電荷は必ずしも見られるわけではなく、hEPO や AoTAA にはリジンやアルギニンなどは見られなかった。また、hZA2G や SfGLU1、BIAmyL の疎水性配列は分泌に有利と考えられるアミノ(L、I、F、または M)の割合が他

のものよりも高く、長さも適切であった。これらの配列は他のものよりも高い分泌発現を示すと期待できた。一方で、効果的な分泌発現の条件を満たさないシグナル配列も見られた。hIL6、hEPO、hLIF 由来のシグナル配列は長すぎる疎水性配列を持ち、これらの配列は酵母での発現には不利であると予想された。各タンパク質の N 末端から疎水性配列直後のグルタミン酸、又はプロリンまでの配列を分泌シグナル配列と見なし、これらが GLuc タンパクの 17 番目のアラニンに付加されるように設計した(Table 3.7)。

Fig. 3.7 では各異種分泌シグナル配列の分泌発現量を比較した。酵母での発現に有利であると予想された、SfGLU1、hZA2G 由来の分泌シグナルは他のシグナルよりも高い分泌発現を示した。また、酵母での発現に不利であると予想された hIL6、hEPO、hLIF 由来のシグナル配列は、より低い分泌発現を示した。一方で、BlAmyL 由来の分泌シグナル配列の分泌発現は、予想に反して低く示された。

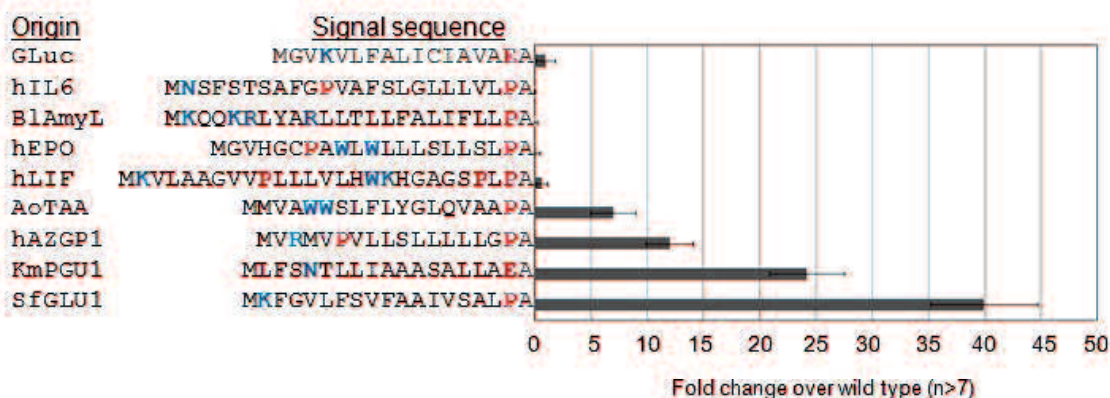


Fig. 3.7 : 異種分泌シグナル配列型 GLuc の活性値の比較

3.4.9 人工分泌シグナル配列による酵母での Lif タンパクの高発現化

Lif タンパクの分泌シグナル配列の機能は GLuc のものと同程度であったことから(Fig. 3.7)、人工分泌シグナルが分泌発現を高めることが期待できた。そこで、最も機能の高かった M¹⁶ を Lif タンパクの N 末端から 2 番目のリジンの直前に付加した。また、タンパク検出のために C 末端に FLAG タグを付加した。

Fig 3.8A では ELISA によって培養上澄中の Lif タンパクを評価した。希釈系列を作ってそれぞれの Lif タンパク量を評価した。野生型では Lif タンパクが検出されなかったのに対し、M¹⁶ 付加型では Lif タンパクが希釈率と比例して検出された。さらに FLAG タグによるウェスタンブロッティングでタンパク量を比較した。この場合は野生型のバンドは検出されなかったが、M¹⁶ 付加型で Lif タンパクと見られるバンドが観察された(Fig. 3.8B)。

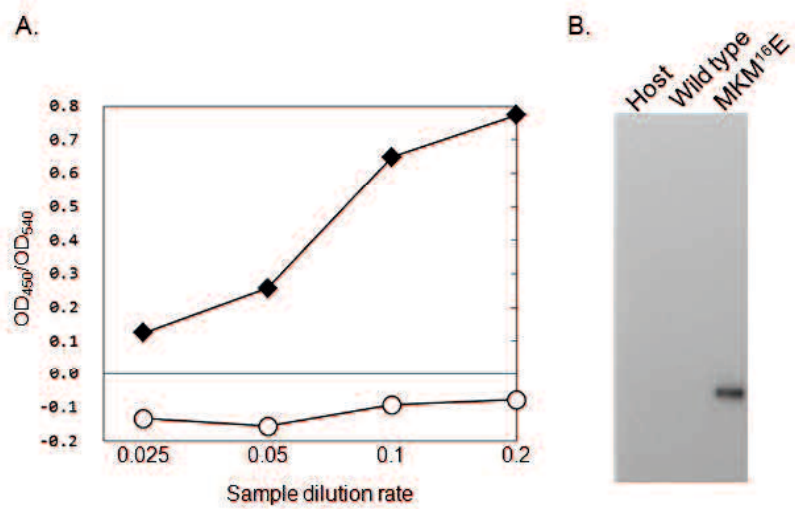


Fig. 3.8 : 酵母における Lif タンパク質生産量の比較

3.5 考察

部分特異的な変異作成は一般的には大腸菌(*Escherichia coli*)のベクタープラスミドを介して進められるが、副産物的な配列が生じることも多いため配列の確認が必須である。このために *E. coli* を介した手法は時間がかかり、変異遺伝子を次々と作成するには不向きであった。一方で、本研究では *K. marxianus* の高頻度な NHEJ による遺伝子導入法(16)を適用することで、ハイスループットな変異遺伝子の構築法が可能となった。これによって大量の変異遺伝子を導入されたクローンの取得を進めたが、正確な配列の頻度は重要な点であった。これに関連して、M¹⁶、F¹³、L¹³、及び I¹³ の形質転換体を対象として、導入された yGLuc の遺伝子配列を調べた。全部で 13 株調べたが不正確な配列が検出されたのは I¹³ が導入された株の内 1 株のみであり、その結果 I¹² になっていた。また、GLuc 活性を調べた形質転換体の内 17% は同じ系列の株とは異なり、ポジティブな値を示さなかった(Fig. 3.2)。これらは活性値の検出の際には非活性の株として除外されたが、不正確な配列がクローニングされたと予想できる。従って、今回利用した *K. marxianus* の NHEJ と PCR による変異遺伝子構築では、正確な配列が 83~90% の割合で得られることが期待できた。

GLuc 分泌シグナル配列のアミノ酸を網羅的に削除した解析(Fig. 3.2)では、4 番目のリジン(K4)、またはその直後の疎水性配列の内 1 つでも削除されると分泌発現の著しい低下が見られた。この結果は N 末端の塩基性アミノ酸と疎水性の構造が分泌発現に重要であるという既知の報告と合致した(19)。また、1 残基の削除ですら発現を大きく低下させたことから、*K. marxianus* において GLuc 分泌シグナル配列は分泌のための最低限の条件のみを満たす配列であると示唆された。さらに、16 番目のグルタミン酸(E16)の削除によって活性が 4~5 倍に高められたことは、17 番目の A によって疎水性配列が伸長していたこともあり、疎水性の長さが分泌発現に影響すると提示された。これらの結果から、分泌シグナル配列を親水性のアミノ酸に規定された疎水性アミノ鎖として定義できると予想された。GLuc 分泌シグナルの場合、K4 と E16 が規定すると見なされた。この予想の基に E16 と同様の機能を示すもの特定を進めた。Fig 3.3A では E16 が L、M、C、F、A、W、V、S、G、Y、H、I、Q、または T に置換された変異体では GLuc 活性の約 2 倍程度の上昇が見られた。しかし、これらのほとんどは疎水性であり、活性の上昇は疎水性配列の伸長によると見なされた。より詳細な解析は、疎水性アミノ酸が最大限に配置された配列である L¹³ を利用して可能となった(Fig. 3.5B)。この場合では、疎水性を規定するアミノ酸として E が最適であることが示された。P も比較的高い

GLuc 活性を示したため、疎水性配列を規定できると見なされた。K4 に関しても同様の解析を行った(Fig. 3.3B)。この場合、R、N、W、および F が K の代わりに機能した。

分泌シグナル配列の疎水性コアは、多様なアミノ酸によって構成された複雑な配列をしている。これを単純化するために、5 番目の V から 12 番目の I までの配列;VLFALICI に 1 種類のアミノ酸のみを 8 個配置された配列を設計した。これらの配列の内 L⁸、M⁸、W⁸、及び F⁸ は高い分泌発現を示した。このことから、疎水性コアの配列は大幅に変質させても機能が失われないことが分かった。一方で他のアミノ酸配列(I、T、S、Q、Y、A、V、および C)は十分な機能を示さなかったが(Fig. 3.4A)、I¹² や I¹³ は L¹³ と同程度の分泌発現が示された(Fig. 3.6A)ことから、最適数のアミノ酸が配置されていなかったことも考えられた。また、L の位置に注目した解析(Fig. 3.4B)では、アミノ酸の位置は重要で無いと分かった。以上の結果より、分泌シグナル配列の強弱は疎水性コアのアミノ酸配列が強く影響すると予想した。そこで、アミノ酸ごとの数と分泌発現量を調べた(Fig. 3.5A、Fig. 3.6A)。ロイシンでは 11~12 個を配置させた時に最も分泌発現が高まり、これより増やしていくと発現量の減少が見られた。同様の解析が *S. cerevisiae* を宿主とした異種生物由来リゾチームの発現に関して報告されており、*K. marxianus* での結果と異なり、リジンとプロリン間にロイシン鎖を 10 個配置させた配列が最適であるとされた(19)。このことから、分泌に最適なアミノ鎖の長さは生物種ごとに異なることが示唆された。さらに、他のアミノ酸でも同様の解析を行ったが、I、F、M はそれぞれ最適な数や分泌発現への影響に関してロイシンとは異なる傾向を示した。このことから、アミノ酸ごとに最適な数があることが予想され、Fig. 3.4A で GLuc 活性を示さなかった配列は数が不適切であった可能性も示唆された。F 鎖や M 鎖は特に高い GLuc 活性を示したが、中でも M¹⁶ は野生型の約 24 倍というこれまで構築してきた変異体の内では最も高い活性値を示した。RT-PCR によって転写量を比較したところ、L¹³、F¹³、及び M¹⁶ の yGLuc の mRNA 量は野生型と同等であると予想され(Fig. 3.6B)、さらに M¹⁶ は培養上澄中から GLuc タンパクが野生型よりも多く検出された(Fig. 3.6C)。従って、これらの人工分泌シグナル配列は転写には影響せず、分泌を高める配列であると明確に示された。M16 シグナルは Lif タンパクの分泌発現に適用され、発現量を大幅に高めたため(Fig. 3.8)、異種タンパク質の分泌発現に有効に機能すると期待できる。

K. marxianus における分泌シグナル配列の条件は、K (または R、W、N)-一定の数の疎水性アミノ鎖-E (または P)として定義された。この配列の条件を異種の分泌タンパク質のシグナル配列に対しても適応させた(Fig. 3.7)。多様な生物由来の分泌タンパクの N

末から E、または P までの配列を GLuc の E16 までの配列と置き換えた。これらの配列の内、SfGLU1、hZA2G、hAZGP1、AoTAA 由来の配列は他のものよりも高い分泌発現を示した。これらの配列は、N 末端側に K、R、W、または N が共通してみられ、その後の疎水性コア様配列も理想的な長さで構成されていた。中でも SfGLU1 由来のシグナルは疎水性コア中に F が多く含まれており、このために最も効果的な分泌発現を示したと予想された。一方で、hIL6、hEPO、hLIF、BlAmyL 由来の分泌シグナル配列は分泌発現をほとんど示さなかった。特に BlAmyL は、R と P の間に十分な数の疎水性アミノ酸が配置されており、分泌シグナル配列の条件は満たした配列であったので予想外の結果となった。この配列は N 末端側に K や R が多く配置されており、このために *K. marxianus* の分泌には不利であった可能性を予想している。hIL6、hEPO、hLIF の配列は N 末側に N、W、または K が配置されているが、疎水性コア中に P が共通してみられた。このアミノ酸は疎水性配列を規定すると考えられるため、これによって疎水性コアが短く規定されたために分泌発現に不利に働いたと考えられた。異種分泌シグナル配列の分泌発現は我々の仮定した定義に合致した傾向を見せ、*K. marxianus* における分泌シグナル配列の条件を裏付けた。しかし、hIL6、hEPO、hLIF 由来シグナルのような *K. marxianus* では十分に機能しなかった配列は、由来となったヒトの細胞では十分な分泌発現を示す配列として機能しているはずであり、異なる生物種間では異なる分泌の条件がみられると予想した。

3.6 参考文献

1. Blobel G, Walter P, Chang CN, Goldman BM, Erickson AH, Lingappa VR., Translocation of proteins across membranes: the signal hypothesis and beyond., *Symp Soc Exp Biol* 33: 9–36. 1979.
2. Lingappa VR, Lingappa JR, Blobel G, Chicken ovalbumin contains an internal signal sequence., *Nature* 281: 117–121. 1979.
3. Devillers-Thiery A, Kindt T, Scheele G, Blobel G, Homology in amino-terminal sequence of precursors to pancreatic secretory proteins., *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 5016–5020. 1975.
4. Ogg SC, Poritz MA, Walter P., Signal recognition particle receptor is important for cell growth and protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*., *Mol Biol Cell* 3: 895–911. 1992.
5. Stroud RM, Walter P., Signal sequence recognition and protein targeting., *Curr Opin Struct Biol* 9: 754–759. 1999.
6. Popowicz AM, Dash PF., SIGSEQ: a computer program for predicting signal sequence cleavage sites., *Comput Appl Biosci* 4: 405–406. 1988.
7. Razmara J, Deris SB, Illias RB, Parvizpour S., Artificial signal peptide prediction by a hidden markov model to improve protein secretion via *Lactococcus lactis* bacteria., *Bioinformatics* 9: 345–348. 2013.
8. Govindappa N, Hanumanthappa M, Venkatarangaiah K, Periyasamy S, Sreenivas S, Soni R, *et al.*, A new signal sequence for recombinant protein secretion in *Pichia pastoris*., *J Microbiol Biotechnol* 24: 337–345. 2014.
9. Kang HA, Nam SW, Kwon KS, Chung BH, Yu MH., High-level secretion of human alpha 1-antitrypsin from *Saccharomyces cerevisiae* using inulinase signal sequence., *J Biotechnol* 48: 15–24. 1996.
10. Kang DO, Hwang IK, Kim BY, Ahn SC, Mheen TI, Ahn JS, *et al.*, Secretion of Bacillus alpha-amylase from yeast directed by glucoamylase I signal sequence of *Saccharomyces diastaticus*., *Biochem Mol Biol Int* 39: 181–190. 1996.
11. Brake AJ., Alpha-factor leader-directed secretion of heterologous proteins from yeast., *Methods Enzymol* 185: 408–421. 1990.

12. Brake AJ., Secretion of heterologous proteins directed by the yeast alpha-factor leader., *Biotechnology* 13: 269–280. 1989.
13. Harmsen MM, Langedijk AC, van Tuinen E, Geerse RH, Raue HA, Maat J. Gene., Effect of a pmr 1 disruption and different signal sequences on the intracellular processing and secretion of *Cyamopsis tetragonoloba* alpha-galactosidase by *Saccharomyces cerevisiae* *Gene* 125: 115–123. 1993.
14. Ernst JF., Improved secretion of heterologous proteins by *Saccharomyces cerevisiae*: effects of promoter substitution in alpha-factor fusions., *DNA* 5: 483–491. 1986.
15. Shen L, Liu Z, Xie F, Zhang X, Tan S., A novel approach for secretion of heterologous proteins with correct n-terminal processing by using alpha-factor pre sequence in *Pichia pastoris*., *Protein Pept Lett* 19: 1005–1009. 2012.
16. Hoshida H, Murakami N, Suzuki A, Tamura R, Asakawa J, Abdel-Banat BM, *et al.* Non-homologous end joining-mediated functional marker selection for DNA cloning in the yeast *Kluyveromyces marxianus*., *Yeast* 31: 29–46. 2014.
17. Yarimizu T, Nakamura M, Hoshida H, Akada R., Screening of accurate clones for gene synthesis in yeast., *J Biosci Bioeng* 119: 251-259. 2014.
18. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology.*, Wiley: Chichester. 1999.
19. Yamamoto Y, Taniyama Y, Kikuchi M, Ikehara M., Engineering of the hydrophobic segment of the signal sequence for efficient secretion of human lysozyme by *Saccharomyces cerevisiae*., *Biochem Biophys Res Commun* 149: 431–436. 1987.

結言

コドン最適化のように、従来の人工的な遺伝子設計は既知の配列の改変が主流であった。しかし、遺伝子の改変に関するデータは不十分であり、人工的な遺伝子の設計は経験則的に行われる場合が多い。これは、現在の遺伝子組換え技術が煩雑な手間を必要とするため、遺伝子配列のシステムティックな解析に不向きであったためである。例えば、プラスミドベクターと制限酵素を利用する場合は遺伝子配列に設計が制限されてしまい、構築されたプラスミドの配列を逐一確認する必要もある。このため、一種類の遺伝子を導入することにすら時間がかかってしまう。一方で、我々は大量の人工配列を設計して評価していく事が人工的な遺伝子を設計するために重要なアプローチであると考えた。このために、高効率的な遺伝子組換え技術を必要とした。

酵母*K. marxianus*は高いNHEJ活性によって遺伝子断片を高頻度で取り込んだ(1, 2)。このことはベクターの構築の手間を省ける可能性を示唆し、遺伝子組換えの効率化が期待できた。そこで遺伝子組換えの基礎として、宿主として使える栄養要求性株の構築を行った。NHEJによって相補遺伝子の特定が簡単に進められ、またホモタリクな接合によって三重、四重の要求性を持つ株を取得することもできた。多様な栄養要求性株を利用して、酵母*K. marxianus*の遺伝子操作手法はより簡便となったが、さらに遺伝子全合成の手法にも効果的だった。マーカー遺伝子とのin-frameでの導入によって合成エラーの少ない遺伝子合成が期待できた。さらに、*K. marxianus*を宿主とすることで形質転換体を得るだけで良い手法が確立できた。加えて、*K. marxianus*の遺伝子操作系は大量の形質転換体を取得することにも適しており、分泌シグナルの解析を進めるために必要となった約400種類もの配列を短期間で作製することができた。以上の点から*K. marxianus*はシステムティックな遺伝子組換えに有利な形質を多く持った生物となった。

人工的な遺伝子配列は生命現象の解析に対して非常に有用な方法として注目されている(3)。しかし、本研究では分泌シグナル配列の解析に留まらず、自然の配列を大超える人工的な分泌シグナル配列の確立にも成功した。このことは、人工的な生命現象の構築がペプチドレベルでは不可能ではないという事を明確にし、今後は自然を超えるものを人工的に設計することが徐々に可能であることを意味することになった。この点で本研究は今後の合成生物学的な分野の技術の発展において重要な意味を持っている。

参考文献

1. Nonklang S, Abdel-Banat BM, Cha-aim K, *et al.*, Hightemperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042., *Appl Environ Microbiol* 74: 7514–7521. 2008.
2. Abdel-Banat BM, Nonklang S, Hoshida H, Akada R., Random and targeted gene integrations through the control of non-homologous end joining in the yeast *Kluyveromyces marxianus*., *Yeast* 27: 29–39. 2010b.
3. Dymond, J. S., Richardson, S. M., Coombes, C. E., Babatz, T., Muller, H., Annaluru, N., Blake, W. J., Schwerzmann, J. W., Dai, J., Lindstrom, D. L., and other 5 authors., Synthetic chromosome arms function in yeast and generate phenotypic diversity by design., *Nature* 477: 471-476. 2011.

謝辞

本研究を行うにあたり知識面から実験の細部に至るまで厳しくも温かいご指導を頂きました赤田倫治教授、星田尚司准教授に心より感謝申し上げます。また、実験操作でのアドバイスや精神面で支えて頂きました研究室のメンバーの皆さまにも感謝致します。

最後になりますが生活面、経済面で支えてくれた家族一同に心から感謝致します。