遺伝子組換え酵母の実用化へむけて

—不安を取り除く組換え新技術—

遺伝子組換え生物には他の微生物の有用な遺伝子が導入されており、その遺伝子産物ならびにプラスミド上の抗生物質耐性遺伝子の人体への影響など、食品として使用する場合問題点が残る。

筆者は、実用酵母と研究室酵母の違いを述べ、問題となる自律複製プラスミドや染色体からのプラスミドの除去、遺伝子置換法によるきれいな酵母の育種など、新しい組換え技術について解説していただいた。

赤 田 倫 治

I. は じ め に

平成9年に海外で開発された遺伝子組換え農作物が輸入されるようになった。しかし、全く新しい概念で作られ出された遺伝子組換え食品の登場は、消費者の漠然とした不安をかき立てることになる。

厚生省は組換えDNA技術応用食品の安全性評価指針を作成している。平成3年の指針には「組換え体そのものを食さない場合に限られる」という条件が付いていたが、平成8年に「組換え体そのものを食する生産物にあっては、組換え体が種子植物の場合に適用すること」として許可され、遺伝子組換え農作物の輸入へと進んでいく。しかし、新聞等で遺伝子組換え食品の安全性や環境への影響が懸念され、消費者のともだいの声も聞こえてくる¹⁾。

問題点を概観すると次の2点が大きいと思われる。1つめは、遺伝子組換え植物には微生物などの他の生物由来の有用遺伝子が導入されており、この遺伝子産物の人体への毒性やアレルギー誘発性が問題とされる。2つめは、組換え遺伝子作製や導入に必要なプラスミド上の抗生物質耐性遺伝子の影響である。いずれも厚生省は安全性に問題なしとの結論を出してはいるが、消費者の不安を完全に消すことには至っていない。

遺伝子組換え食品の不安を取り除くにはどうすればよいだろうか。

II. 酵母から不要な遺伝子配列を除去する技術

食品や醸造に関わる実用酵母の遺伝子組換え育種では、味、香り、生育状態など希望の性質を付与する有用遺伝子を探し、酵母に導入して元来その酵母が持ち得なかった性質を与えることになる。このためには、有用遺伝子を運び屋であるプラスミドにつなげなければならない。プラスミドとは遺伝子を組み換えたり、大腸菌で大量に増幅するために必要な環状DNAで、大腸菌への導入に必要な抗生物質耐性遺伝子などの遺伝子配列を持つ。したがって、ほとんどの場合、有用遺伝子の隣には大腸菌由来の遺伝子配列がある。もちろん、有用遺伝子を酵母に導入する場合も、ほとんどの場合、大腸菌の遺伝子配列も導入されることになり、不安のたねとなってしまふ。それならば、不必要な大腸菌由来の配列を酵母から除去してしまえば問題とはならないはずである。そこで、特定の遺伝子配列を酵母から除去する技術が必要となる。

酵母への遺伝子導入は、形質転換と呼ばれるようにマーカー遺伝子が入ることによる酵母の性質変化を利用して、入っていない酵母から入った酵母を選抜する

Toward Practical Application of Recombinant Yeasts: A New Genetic Method to Remove Unsafe Feelings

Rinji AKADA (Department of Applied Chemistry and Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Yamaguchi University)

第1図 酵母への遺伝子導入と除去のポジティブセレクション

方法である。入った酵母のみが生育するような選択法なのでポジティブセレクションといえることができる(第1図)。いくつかのマーカー遺伝子がそろっており、研究室酵母では栄養要求性マーカー遺伝子、実用酵母では薬剤耐性マーカー遺伝子が、一般的である(第1表)。

一方、一度入ったDNAをその生物から抜くにはどんな方法があるだろうか。この場合も考え方は同じで、今度は除去用マーカー遺伝子が抜けた酵母のみを選択する方法がある。遺伝子導入とは反対なのでカウンターセレクションと呼ばれる。

代表的なシステムがウラシル (UMP) 合成経路の酵素遺伝子である *URA3* と選択薬剤である5-フルオロオロチン酸 (5-fluoroorotic acid, 以後5-FOA) を利用するシステムである。概要を第2図に示した。*URA3* 遺伝子がコードするオロチジン酸デカルボキシラーゼはピリミジンアナログである5-FOAを代謝

して毒性物質に変え、細胞を殺してしまう。*URA3* 遺伝子が壊れた *ura3⁻* 株では代謝できないので5-FOA 耐性となり生育できる。したがって、5-FOA 培地で生育する株は *URA3* 遺伝子が抜けていることになる。多くの研究室酵母は *ura3⁻* 変異を持たせてあり、*URA3* 遺伝子は遺伝子導入用マーカーとしても利用できるため、*ura3⁻* 変異株/*URA3* 遺伝子/5-FOA のシステムは遺伝子導入と除去が行える非常に有効な方法として頻繁に利用されている。他にも同じ考え方で *LYS2*, *CAN1*, *CYH2* 遺伝子を使う除去システムがある(第2表)。いずれの方法も優性の薬

第2図 *ura3⁻* 変異株/*URA3*/5-FOA による遺伝子導入と除去システム

第1表 形質転換による遺伝子導入システムの一部

利用する変異	遺伝子	選択培地, 試薬
<i>ura3⁻</i>	<i>URA3</i>	ウラシル欠損
<i>his3⁻</i>	<i>HIS3</i>	ヒスチジン欠損
<i>trp1⁻</i>	<i>TRP1</i>	トリプトファン欠損
-	<i>kan^r</i>	G418
-	<i>AUR1^r</i>	Aureobasidin A
-	<i>SMR1^r</i>	Sulfometuron methyl

第2表 遺伝子除去システム

利用する変異	遺伝子	選択試薬
<i>ura3⁻</i>	<i>URA3</i>	5-Fluoroorotic acid
<i>lys2⁻</i>	<i>LYS2</i>	DL- α -Aminoadipic acid
<i>can1⁻</i>	<i>CAN1</i>	Canavanine
<i>cyh2^r</i>	<i>CYH2</i>	Cycloheximide

剤感受性遺伝子、劣性の耐性変異および薬剤を組み合わせた方法である²⁾。

実用酵母にこれらの方法を応用すれば遺伝子を除去することが可能である。しかし、実用酵母への応用には大きな問題があった。

III. 実用酵母と研究室酵母の違い

発酵や醸造用の実用酵母は同じ酵母でも研究室酵母のように扱うことができない面がある。実用酵母では、1) 通常2倍以上なので劣性変異が取得できない、2) 胞子形成率が悪く1倍体の子孫をとることがむずかしい、3) 栄養要求性変異がないので研究室酵母のマーカー遺伝子が使えない、4) 遺伝子導入がむずかしいので遺伝子破壊や置換がしづらい、といった様々な問題が出てくる。

実用酵母の遺伝子導入系もいくつか報告されているが³⁻⁷⁾、実用酵母は薬剤に対して高い耐性能を持っていたり、薬剤が高価であったり、形質転換操作が煩雑であったりしてまだまだ利用しやすいとはいえない。さらに、今後、複数の遺伝子を扱うことを考えればもっと多くの薬剤耐性遺伝子が必要となる。少なくとも2つの導入用マーカー遺伝子があれば、2倍体の遺伝子のそれぞれを破壊することさえできない。加えて、これらの薬剤耐性遺伝子は細胞の生理状態を変えることによって薬剤耐性を示すようになるので、実用酵母自体の発酵能力などに悪影響を与える可能性も否定できない。いわば危険性を含んだマーカー遺伝子ともいえる。一度使った導入用マーカー遺伝子をその酵母から除去できれば、同じマーカー遺伝子の再利用とマーカー遺伝子を持たない実用酵母の育種ができるので価値ある方法となる。しかしながら、先に述べた研究室酵母の除去システムは、*ura3⁻*などの劣性変異のない実用酵母には使えない。そこで新たな除去用マーカー遺伝子が必要となる。

IV. 増殖阻害遺伝子

我々は、別の研究から取得していた増殖阻害遺伝子と呼ぶ遺伝子群が、この除去用マーカー遺伝子として使えるのではないかと考えた。

増殖阻害遺伝子とはある遺伝子産物を過剰生産してやると増殖が停止してしまうような遺伝子群のことをいう⁸⁾。様々な遺伝子が取得されている(第3表)。発現は栄養源の種類で調節できるようにしてあり、通常のグルコース培地では発現がOFFとなり全く正常の細胞と変わらないが、ガラクトースを与えると発現スイッチがONとなり、増殖阻害遺伝子の過剰発現が開始され増殖停止を引き起こす。もしもこの増殖阻害遺伝子が酵母から脱落したなら、ガラクトース培地でも生育ができるようになるはずである。つまり、増殖阻害遺伝子は除去用マーカーとなることができる。この場合には酵母側に変異は必要ない。ガラクトースのプロモーターを働かせることのできるガラクトース資化性株であれば使えるはずである。

(1) 自律複製プラスミドの除去

我々はまず研究室酵母で増殖阻害遺伝子が除去のセレクションに使えるかどうかを調べた。染色体とは独立に複製するプラスミドは通常細胞から抜けやすい性質を持つ。そこで、まず、このプラスミドを除去できるかどうかを試してみた。マーカー遺伝子と増殖阻害遺伝子を自律複製プラスミドにのせ、通常のグルコース培地で形質転換し、プラスミドを導入した。グルコース培地では阻害遺伝子は働かないので通常と同じ操作でよい。この酵母をガラクトースを栄養源としプラスミドが抜けても増殖できる非選択培地(YPGal)で培養した。コントロールの増殖阻害遺伝子を持たないプラスミド(p316 GALとp315 GAL)はガラクトース培地で35~38%が抜けるのに比べ、増殖阻害遺伝子を持つプラスミド(pGU 108-11とpGL 108)は90%以上が抜けていた(第4表)。これにより、増殖阻害遺伝子はプラスミドの除去に使えることがわかった⁹⁾。

(2) 染色体からのプラスミドの除去

実際の実用酵母育種には安定な染色体上への遺伝子導入が必要であり、遺伝子破壊や置換も全て染色体上で行われる。そこで染色体に組み込んだ場合の除去効果を調べてみた。

第3表 増殖阻害遺伝子群

プラスミド	遺伝子	ORF	染色体	機能
pGA11	<i>GIN1</i>	YER110c	V	分泌?
pGA18	<i>URA2</i>	YJL130c	X	ウラシル合成経路
pGA47, 74	<i>BNI1</i>	YNL271c	XIV	形態形成
pGA51	<i>GIN3</i>	YML128c	XIII	?
pGA54	<i>GIN4</i>	YDR507c	IV	タンパクキナーゼ
pGA56	<i>PSP1</i>	YDR505c	IV	DNA複製?
pGA58	<i>GIN6</i>	YKR100c	XI	?
PGA68	<i>BOI1</i>	YBL085w	II	形態形成
pGA77	<i>RBP1</i>	YBR212w	II	RNA結合タンパク
pGA79	<i>GIN8</i>		VIII	?
pGA85	<i>SAC7</i>	YDR389w	IV	形態形成
pGA101	<i>GIN10</i>	YKL173w	XI	翻訳, EF-2 相同
pGA108	<i>GIN11</i>			テロメア X-エレメント
pGA109	<i>TPK3</i>	YKL166c	XI	cAMP 依存タンパクキナーゼ
pGA128	<i>GIN12</i>	YKL042w	XI	?
pGA129	<i>PRK1</i>	YIL095w	IX	タンパクキナーゼ

第4表 増殖阻害遺伝子による ARS/CEN プラスミドの除去

プラスミド	導入用 マーカー	増殖阻害 遺伝子	YPD (グルコース)		YPGal (ガラクトース)	
			除去コロニー /コロニー総数	除去された 割合 (%)	除去コロニー /コロニー総数	除去された 割合 (%)
p316GAL	<i>URA3</i>	—	153/707	21.6	171/451	37.9
p315GAL	<i>LEU2</i>	—	276/1018	27.1	353/1000	35.3
pGU108-11	<i>URA3</i>	<i>GIN11</i>	188/1040	18.1	659/731	90.2
pGL108	<i>LEU2</i>	<i>GIN11</i>	454/1533	29.6	1118/1157	96.6

染色体上からの除去は抜けやすいプラスミドのように単純ではない。そこには、相同組換えが必要になる。この相同組換えは染色体上への遺伝子挿入のときにも用いられる概念であるが、除去のためにも必要となる。

まず、モデルケースで説明しよう (第3図)。バクテリア由来の *hisG* 遺伝子配列をタンデムに2つ持たせた内側に、導入用マーカー遺伝子として *URA3* と除去用マーカー遺伝子として増殖阻害遺伝子 *GIN11*

を組込み、さらに、この *hisG* 配列間のカセットを *LYS2* 遺伝子内に挿入して破壊用プラスミド p 6-1 を作製した (第3図)。次に、このプラスミドを酵母に形質転換し、*LYS2* 遺伝子破壊を行った。*LYS2* 遺伝子が破壊された染色体上では *hisG* 配列が同方向に2つ繰り返しており、*hisG* 配列間で 10^{-4} 程度の低い頻度で組換えが起こる。つまり、約1万細胞に1つの割合で *hisG* 間の遺伝子配列が除去された細胞が現れ

第3図 相同組換えを利用したプラスミド配列の除去

ているはずである。この細胞を選択すればよい。この細胞では増殖阻害遺伝子が脱落しているのでガラクトース培地でも元気に生育できる。そこで、酵母を希釈し、ガラクトース培地 (YPGal) に 10^7 細胞程度をまき、生育してくるコロニーを調べた。数千のコロニーが現れ、その内、200コロニーを調べると196コロニー (98%) でマーカー遺伝子が除去されていることがわかった。さらに、サザン法により予想通り hisG 配列間での除去が起こっていることを確認した¹⁰⁾。この結果より、染色体上の配列も相同組換えを利用して除去できることがわかった。この場合、除去された酵母では、除去用マーカー遺伝子と同時に導入用のマーカー遺伝子も抜けており、この酵母には同じ導入用マーカー遺伝子が再び使えるようになる。つまり、遺伝子除去システムとは、マーカー遺伝子のリサイクルシステムともなっている。

(3) 遺伝子置換法によるきれいな酵母の育種

上記の遺伝子破壊の例ではバクテリア由来の hisG 配列が残ってしまう。また、実的な育種では遺伝子破壊だけではなく有用な変異を導入することが必要となる。どうすればよいのだろうか。

有用変異をもつ酵母遺伝子があったとする。その変異のみを酵母に導入するために2段階遺伝子置換という方法がある (第4図)。まず、変異を持つ遺伝子を正常遺伝子と相同組換えにより染色体上に導入する (第4図、ステップ1)。導入された酵母の染色体上では相同な配列をもつ正常遺伝子と変異遺伝子が繰り返して並ぶようになる。次に、この2つの相同遺伝子間の組換えを利用し、マーカー遺伝子と増殖阻害遺伝子を除去する (第4図、ステップ2)。hisG の場合と原理的に同じしくみである。組換え位置の違いから、ある酵母は正常遺伝子を別の酵母は変異遺伝子を一定の

第4図 2段階遺伝子置換を利用した安全な遺伝子組換え酵母の育種

確率で持つようになる。変異を持つ酵母を選べば、この酵母は変異以外は元の酵母のゲノム配列となんら変わるところはなく、この酵母は実用化可能であろう。

V. 有用遺伝子を見つける方法

有用遺伝子を酵母菌以外の生物から持ってくると他種生物の配列が入ることになり、その有毒性やアレルギー誘発性が問題にされるであろう。有用遺伝子を酵母の遺伝子から得ることができればそれを酵母に導入しても何ら問題はない。例えば、凝集性をもつ酵母から凝集性遺伝子を取得し、凝集性を持たない酵母に導入すれば、新たな酵母が育種できよう。

周知のように、実用酵母の育種は変異誘発と有用変異株の選抜によって取得されてきた。多くの方法は薬剤耐性などの優性変異を取得し、実用形質への効果をみるというのが一般的である^{11,12)}。しかし、この方法では取得できる変異に限りがある。特異的な優性変異でなければならないことや、特定の薬剤の数が選択できる変異の種類を限定してしまうことなどである。薬剤の作用機構にスクリーニングが左右されるため、狙ったタンパクの活性を変化させる変異を取得するのは困難である。もし酵母の優良形質をつかさどるタンパクの活性変化を引き起こす変異遺伝子を取りたいならば、研究室酵母を利用した遺伝子解析技術を利用すれ

ば実用可能であると考えられる。

いままでの多くの基礎研究から研究室酵母では、他の生物にはなかなかまねのできない複雑な変異スクリーニング戦略が構築できることがわかる。さらに、REVERSE GENETICS と呼ばれる手法もある。この方法は試験管内で遺伝子変異を誘発し、変異遺伝子を取得し、酵母の正常遺伝子と置き換える手法である。試験管内の変異誘導には、目的アミノ酸を変換できる部位特異的変異や化学的な変異剤や PCR による高頻度なランダム変異誘導が可能である。特定の変異を研究室酵母でスクリーニングし、特定の酵素や生理活性に影響するタンパクの有用変異遺伝子を取得する。その変異は優性であっても劣性であっても構わない。後は、その変異遺伝子を実用酵母に導入すればよいのである。優性ならば1つ入れればよいであろうし、劣性でも2つの染色体上の野生型遺伝子と置換すればよい。このような変異はいままでの実用酵母の手法では決して得られなかった変異となり、新しい実用酵母の育種に有効な方法論になると考えている。

VI. お わ り に

増殖阻害遺伝子を酵母の育種に利用し、きれいな遺伝子導入や、マーカー遺伝子のリサイクルに使えることを述べた。現在、マーカー遺伝子を変え、実用酵母の育種に応用できるシステムを構築している。このような増殖阻害遺伝子による不要配列除去の方法論は他の生物の育種においても有効であると考えられる。必要なものは、その生物での増殖阻害遺伝子と条件誘導プロモーターである。どのような生物にも過剰発現により増殖を阻害する遺伝子は存在するはずである。また、プロモーターも栄養源、ストレス、器官特異的、ホルモンなど、様々な条件で特異的に発現するプロモーターが取得できると考えられる。酵母以外の有用生

物の遺伝子組換え食品の開発にもここで紹介したシステムが応用できるものと期待している。

最後に、この研究に協力していただきました河畑美穂さんと甘利真司君に深く感謝致します。また、ご指導、ご助言をいただきました西澤義矩先生にお礼申し上げます。
〈山口大学〉

文 献

- 1) 木村幸敬：生物工学会誌，**75**，454 (1997)。
- 2) R. S. SIKORSKI and J. D. BOEKE： *Meth. Enzymol.*， **194**， 302-318 (1991)。
- 3) T. HASHIDA-OKADO, A. OGAWA, M. ENDO, R. YASUMOTO, K. TAKESAKO, and I. KATO： *Mol. Gen. Genet.*， **251**， 236-244 (1996)。
- 4) Q. XIE and A. JIMENEZ： *FEMS Microbiol. Lett.*， **137**， 165-168 (1996)。
- 5) C. HADFIELD, B. E. JORDAN, R. C. MOUNT, G. H. J. PRETORIUS, and E. BURAK： *Curr. Genet.*， **18**， 303-313 (1990)。
- 6) N. NAKAZAWA, H. HASHIMOTO, S. HARASHIMA, and Y. OSHIMA： *J. Ferment. Bioeng.*， **76**， 60-63 (1993)。
- 7) K. SHIMURA, K. FUKUDA, and K. OUCHI： *Enzyme Microb. Technol.*， **15**， 874-876 (1993)。
- 8) R. AKADA, J. YAMAMOTO, and I. YAMASHITA： *Mol. Gen. Genet.*， **254**， 267-274 (1997)。
- 9) 赤田倫治，甘利真司，西澤義矩：生物工学会大会講演要旨集 p.219 (1995)。
- 10) 河畑美穂，赤田倫治，西澤義矩：生物工学会大会講演要旨集 p.313 (1996)。
- 11) 相川元庸：生物工学会誌，**73**，50-51 (1995)。
- 12) 市川英治：醸協，**84**，166-170 (1989)。