Saccharomyces cerevisiae のエチオニン耐性遺伝子を マーカーとするプラスミドの発現と安定性[†]

塩見尚史・福田秀樹

鐘淵化学工業(株) 生産技術研究所^{††}

福田泰樹

中京短期大学^{†††}

村田幸作・木村 光

京都大学 食糧科学研究所^{††††}

遺伝子を組み替えた酵母を工業的に利用していくためには、一般の酵母で発現するマーカーを有し、且つ、安定に宿主中に保持される工業用のベクタープラスミドの開発が必要である。エチオニン耐性遺伝子がマーカーとして優れた特性を有することから、これをマーカーとする工業化用ベクタープラスミド pER9 を作製した。pER9 は 9.8 Kb と短く、クローニングに適した *Bam*HI, *Sal*I 部位を有し、宿主中に安定に存在した。さらに、エチオニンにより選択圧を加えると 40 世代培養後でもプラスミドの保持率は 98% であった。また、実用酵母である清酒酵母やビール酵母中で発現し、実用酵母の育種に利用できることがわかった。

緒 言

分子遺伝学の発展により、異種あるいは酵母自身の遺伝子を酵母に導入し、有用な物質やタンパク質を大量生産することが可能になってきている。しかしながら、これら有用物質を生産する工業的プロセスの確立には、遺伝子を組み替えた酵母といえども安価な一般的培地で高い増殖速度を持つ倍数体酵母を宿主とし、その宿主内で高コピー、且つ、安定に保持される工業化用ベクタープラスミドの開発が必要不可欠である。このような、目的からゲンタマイシン類似の抗生物質である G418 をマーカーとし、それに耐性を示す遺伝子⁷⁾を有するベクタープラスミド(例えば YRpG1¹¹⁾)が現在頻繁に利用されているが、この種のベクタープラスミドはそのコピー数と倍数体酵母宿主内での安定性において必ずしも十分ではなく、酵母の生産プロセスにおける生産性の制御の面で大きな障害となっている。したがって、発酵工業、化学

工業の分野において、より優れた工業化用ベクタープラスミドの開発が現在の重要な課題となっている。このようなベクタープラスミドの開発とそのベクターに付与すべきマーカーの開発は、清酒酵母、パン酵母、ビール酵母など実用的倍数体酵母の分子レベルでの育種に適用できるのみならず、将来的には、組み換え体酵母で置換されるであろうこれら発酵プロセスの制御と最適化に重要な手段を提供するものと考えられる。

前報において、我々は、メチオニンのアナログであるエチオニンに耐性を示し、且つ、S-アデノシルメチオニンの合成蓄積を促進する酵母の遺伝子のクローニングについて報告した^{12,13)}。今回、このエチオニン耐性遺伝子をマーカーとして改良を加え、実用酵母内で発現し、且つ、安定に保持される工業化に適したベクタープラスミド pER9 を作製した。この pER9 のエチオニン耐性遺伝子の酵母細胞内での発現と安定性について述べる。

1. 実験方法

1.1 菌株と培地

大腸菌の宿主として *Escherichia coli* DH1(F⁻, *gry* A96, *rec*A1, *end*A1, *thi*1, *hds*R17, *sup*44, λ^{-}) を使

[†] 1990年7月27日受理

^{††} 〒676 高砂市高砂町宮前町1-8

^{†††} 〒509-61 瑞浪市土岐町2216

^{††††} 〒611 宇治市五ヶ庄

用した。また、酵母の宿主として、*Saccharomyces cerevisiae* IFO 2044, IFO 2376, IFO 1953, IFO 0849, および大阪大学の大嶋教授より分譲して戴いた *S. cerevisiae* DKD-5D-H (a, *leu*2-1, *leu*2-112, *trp*1, *his*3) を使用した。大腸菌の培養には、L 培地 (0.5% ペプトン, 1% イーストイクトラクト, 0.5% 塩化ナトリウム, 0.1% グルコース, pH 7.2) を、酵母の培養には、YPD 培地 (2% グルコース, 2% バクトペプトン, 1% イーストイクトラクト) および SD 最少培地 (2% グルコース, 0.68% イーストイクトラクト W/O アミノアシド) に 20g/m³ になるように *L*-トリプトファンと *L*-ヒスチジンを添加したものを使用した。

1.2 エチオニン耐性実験

エチオニンを含有しない 5ml の SD 培地で振とう培養した酵母を、50ml の種々の濃度のエチオニンを含有する SD 最少培地 (500ml 坂口フラスコ, シリコン栓) に植菌し、30°C で振とう培養した。2ml の培養液を経時的にサンプリングし、分光光度計 (日立 U-1100 型) を用いて 610nm の濁度を測定することにより菌濃度を算出した。

1.3 プラスミドの作製方法

プラスミドとして、YEp13, YRpG1¹¹⁾, および pJDB 207²⁾, pJDB 219¹⁾ を使用した。プラスミドは、適当な制限酵素で切断した後、アルカリフォスファターゼにより脱リン酸化処理し、ライゲーションキット (宝酒造 株) により、挿入すべき DNA 断片と連結した。大腸菌および酵母への形質転換は、塩化カルシウム法¹⁰⁾ と酢酸リチウム法⁶⁾ をそれぞれ用いた。

1.4 プラスミドの安定性

プラスミドの安定性は、Futcher⁵⁾ らの方法に基づいて行った。すなわち、10ml のロイシンを含有しない SD 培地で対数増殖後期まで培養した酵母細胞を、25ml のロイシンを含有する SD 培地 (300ml の三角フラスコ, シリコン栓) に 10⁻⁴kg/m³ になるように植菌した。これを対数増殖後期近くまで振とう培養し、この増殖した菌を新たな 25ml のロイシンを含有する SD 培地に 10⁻⁴kg/m³ になるように植菌して振とう培養した。このロイシンを含有する SD 培地に植えつぐ操作を 7~10 日繰り返した。一方、増殖した菌は、1 プレート当たり約 100 個になるように YPD プレートに塗布し、2 日間放置した。その後、96 個のコロニーについてレプリカ法によりロイシン要求性の有無を調べた。培養は、いずれも 30°C で行った。世代数は濁度より菌濃度を算出して計算した。

1.5 菌体内の S-アデノシルメチオニンの測定

5ml の SD 培地で培養した酵母を、5mol/m³ の *L*-メチオニンを含有する SD 培地 50ml に 10⁻²kg/m² になるように植菌し、30°C で 24 時間振とう培養した。この培

養液より菌を集めた後、既に報告した方法にしたがって S-アデノシルメチオニンを抽出し、分析した。蓄積量は、乾燥菌体グラム当たりのグラム数 (g/g-乾燥菌体) として表示した。

1.6 実用酵母中でのプラスミドの発現と確認

プラスミド pER9 を形質転換した実用酵母の形質転換体は、一度 SD 寒天プレートに塗布し、1 日間 30°C で増殖させた後、菌を集菌して 0.85% の食塩水で適当な菌濃度に希釈し、*D,L*-エチオニンを含有する SD 寒天プレートに塗布した。また、プラスミドの確認は以下の方法で行った。10ml の YPD 培地で停止期まで振とう培養したプラスミドの入った酵母を集菌し、滅菌水で一回洗浄した後、Cryer⁴⁾ らの方法に従ってプラスミドを抽出精製した。このプラスミドを、大腸菌 DH1 に形質転換し、アンピシリン耐性のコロニーを選別した。この菌よりプラスミドを Kado⁸⁾ らのラビッド法で抽出し、0.8% アガロースゲル電気泳動により確認した。

2. 結果および考察

2.1 エチオニン耐性遺伝子のマーカーとしての機能

マーカー (例えば栄養要求性) を有していない一般の酵母に対してプラスミドを形質転換し、その転換体を選別するためには、薬剤などに耐性な遺伝子をマーカーとして用いる必要がある。この際、確実に選別を行うためには、プラスミドを保持した菌と欠落した菌の比増殖速度の差が十分大きいこと、菌濃度や薬剤の濃度により選択のしやすさが影響を受けないことなどの特性がマーカーに要求される。そこで、エチオニンを薬剤として用いた場合の、エチオニン耐性遺伝子のマーカーとしての特性について調べた。

プラスミド pYSMH1¹²⁾ は、エチオニン耐性遺伝子を含有する染色体 DNA の *Sau*3AI 断片をプラスミド YEp13 の *Bam*HI 部位に挿入したプラスミドである (Fig. 1)。この pYSMH1 を有する酵母 DKD-5D-H/pYSMH1 およびコントロールとして YEp13 を有する酵母 (DKD-5D-H/YEp13) を 0.3mol/m³ の濃度の *D,L*-エチオニンを含有する SD 培地に植菌し、振とう培養した時の経時変化を Fig. 2 に示す。G418 耐性では、植菌後約 5 時間後から増殖阻害が起こり、このことが、形質転換体の選別を不明瞭にしていた¹¹⁾。しかし、エチオニンではこのような時間遅れは認められなかった。また、増殖は停止期近くまではほぼ一定の比増殖速度で増加し (Fig. 2)、重金属耐性の場合など多くの場合に見られ⁹⁾、選別を不明瞭にする要因である増殖に伴う比増殖速度の増加も見られなかった。さらに、DKD-5D-H/pYSMH1 の比増殖速度は、0.3mol/m³ のエチオニンを含有する場合、コントロール

Fig. 1 Restriction map of plasmids pYSMH1, pER4 and pER9

Restriction enzymes used are: B; *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; P, *Pst*I; Pv, *Pvu*II; S, *Sal*I; ↑, *Bam*HI/*Sau*3AI. □, YEp13 fragment; ■, Chromosomal DNA fragment; ▨, pJDB207 fragment

に比べ約8倍大きかった。以上のことから、エチオニン耐性遺伝子が、マーカーとして優れた特性を有しており、これをマーカーとして利用すれば形質転換体を確実に選別できると考えられる。

そこで、 10^7 個および 10^9 個の DKD-5D-H 株の細胞懸濁液 100ml に約 50 個になるように DKD-5D-H/pYSMH1 の細胞を加え、 0.3 mol/m^3 の *D, L*-エチオニンと *L*-ロイシンを含有する SD 培地のプレートにそれぞれ塗布し、 30°C で 4 日間放置した結果、約 50 個のコロニーの出現が得られた。それぞれのプレート上の 25 個のコロニーについて、栄養要求性を調べたところ、すべてが、*L*-トリプトファンと *L*-ヒスチジン要求性であり *L*-ロイシンに要求性が無く、DKD-5D-H/pYSMH1 と同じ要求性であった。すなわち、形質転換体を 100% 選別できた。

それゆえ、エチオニンを薬剤とし、このエチオニン耐性遺伝子をマーカーとして利用すれば形質転換体を確実に選別できることが判明した。

2.2 プラスミド pYSMH1 の改良

形質転換体を選別するためのマーカーとしてエチオニン耐性遺伝子を利用できることがわかった。しかしながら、プラスミド pYSMH1 は、ベクタープラスミドとして使用するには 17.2 キロベース (Kb) と長すぎる上に、適当なクローニング部位が存在しない (Fig. 1)。さらに、プラスミドの安定性も十分とはいえない。そこで、pYSMH1 の改良を行った。

まず、エチオニン耐性遺伝子のサブクローニングを行った。プラスミド pYSMH1 を制限酵素 *Hind* III で分解し、それぞれの分解物をプラスミド YEp13 の *Hind* III 部位に挿入した。これらを酵母 DKD-5D-H 株に形質転換しエチオニン耐性を調べたところ、3Kb の *Hind* III の DNA 断

Fig. 2 Effects of *D, L*-ethionine on growth rate Yeast cells of DKD-5D-H/YEp13 and DKD-5D-H/pYSMH1 were cultured in SD medium in the presence (▲, ●) and absence (△, ○) of 0.3 mol/m^3 *D, L*-ethionine ▲, △, DKD-5D-H/YEp13; ●, ○, DKD-5D-H/pYSMH1

片を有するプラスミド pER4 (Fig. 1) が、エチオニンに耐性を示した。すなわち、6.5Kb の断片を 3.0Kb にまで減少できた。

次に、プラスミドの安定性を高めるためにより安定なベクターへの置き換えを行った。高コピー数を有することが知られている³⁾ 4 種類のプラスミド YRpG1, YEp13, pJDB207, pJDB219 の宿主 DKD-5D-H 株中での世代数とプラスミドの欠落率の関係を調べた結果を Fig. 3 に示す。プラスミドの欠落した細胞の割合は、ロイシン要求性の細胞の割合 (Leu⁻ cell) に等しい。YRp 系のベクターである YRpG1 は、非常に不安定で、プラスミドの欠落が著しく 5 世代で 99% がプラスミドの欠落細胞であった。YEp 系のベクターである YEp13 は YRpG1 に比べ安定であったが、40 世代で 80% 欠落した。一方、Beggs の作製した $2 \mu\text{m}$ のプラスミド全体を含有するプラスミドである pJDB219 およびそれをサブクローニングしたものである pJDB207 は、40 世代でも欠落率は 5~7% 程度で、非常に安定であった。

そこで、pER4 の 3Kb の *Hind* III 断片を切り出し、この安定性の高いプラスミド pJDB207 の *Hind* III 部位に挿入した。得られたプラスミド pER9 を Fig. 1 に示した。プラスミド pER9 は、6.8Kb の pJDB207 と 3.0Kb の染色体 DNA を含む断片からなり、全体として 9.8Kb である。したがって、結果的にはプラスミド pYSMH1 の 17.2Kb に比

Table 1 Ethionine resistance and growth of DKD-5D-H cells carrying various plasmids

Plasmids	Specific growth rate [1/h] ethionine added to SD ^a			Growth after 24 h ^b	S-adenosyl- methionine in cells ^c
	0	0.3	2.0		
YEp13	0.32	0.02	0.01	1.28	0.013
pYSMH1	0.25	0.16	0.11	0.60	0.16
pER4	0.26	0.15	0.11	0.83	0.14
pJDB207	0.30	0.02	0.01	0.74	0.015
pER9	0.16	0.13	0.08	0.13	0.28

a, mol/m³; b, kg/m³; c, g/g-dry cells

Fig. 3 Stability of various vector plasmids in *S. cerevisiae* DKD-5D-H cells

■, YRpG1; ●, YEp13; ▲, pJDB207;
▼, pJDB219

べ、7.4Kbも縮少できたことになる。また、pYSMH1をBamHIで、pER9をBamHIおよびSalIでそれぞれ切断した。その結果、pYSMH1のBamHI/Sau3AI部位 (Fig. 1の↑)は、両方ともBamHIで切断されなかった。一方、pER9はBamHIおよびSalIの切断点をそれぞれ1箇所有していた。すなわち、pER9はクローニング部位としてBamHIおよびSalI部位を利用できる。

以上のことから、プラスミドpER9は、9.8Kbとコンパクトである上に適当なクローニング部位を有し、クローニング用のベクターとして使いやすいことが明らかとなった。

2.3 プラスミドpER9の発現と安定性

S-アデノシルメチオニンは、生体中でメチル基供与体として働く重要な物質であり、工業的な生産も期待されている。プラスミドpYSMH1を有する酵母は、エチオニンに耐性を示すだけでなく、S-アデノシルメチオニンの蓄積量も高い。そこで、プラスミドpER4、pER9の入った酵母DKD-5D-H株を種々の濃度のエチオニンを含

Fig. 4 Stability of plasmid pER4 and pER9 in *S. cerevisiae* DKD-5D-H cells

Stability was checked in the absence (●,▲) and presence (○,△) of 0.3mol/m³ D,L-ethionine. ●,○, pER4; ▲,△, pER9

有するSD培地で培養した場合のD,L-エチオニンに対する耐性の強さ、および5mol/m³の濃度のL-メチオニンを含有するSD培地で24時間培養した時のS-アデノシルメチオニンの蓄積について調べた。結果をTable 1に示す。pER4のエチオニン耐性の強さに対応する比増殖速度およびS-アデノシルメチオニンの蓄積量は、pYSMH1のそれとはほぼ一致した。一方、pER9では、pYSMH1に比べ比増殖速度がエチオニンを含有する場合も含有しない場合もやや低下した。しかし、S-アデノシルメチオニンの蓄積量は、pYSMH1に比べ約2倍になっていた。この蓄積量が高い理由は、pJDB207のほうが、YEp13よりも高コピー数を有する³⁾ためと考えられる。しかし、S-アデノシルメチオニンの生産性についてはより速度論的な検討が必要である。

一方、pER4およびpER9のプラスミドの安定性を調べたのが、Fig. 4である。pER9はpER4に比べ、プラスミドの欠落率は遥かに少なく安定であった。しかし、

Fig. 5 Photographs of colonies of wild-type yeast strains transformed with pER9

(A) Colonies of *S. sake* IF02376 transformed with pER9 on SD plate with 1.5mol/m³ D, L-ethionine

(B) Colonies of *S. cerevisiae* IF01953 transformed with pER9 on SD plate with 5 mol/m³ D, L-ethionine

(C) Colonies of *S. cerevisiae* IF00849 transformed with pER9 on SD plate with 1.5mol/m³ D, L-ethionine

Fig. 6 Agarose gel electrophoresis of DNAs extracted from wild-type yeast strains with pER9
Lane1: DNAs extracted from *E. coli* DH1 carrying pER9 (control); Lanes2,3 and 4: DNAs obtained from the transformants of wild-type yeasts; IF02376 (lane2), IF01953 (Lane3) and IF00849 (Lane4). Chr, Chromosomal DNA

pJDB 207, YEp13 (Fig.3)と比較すれば, pER 9, pER 4の方が,それぞれ安定性が低下していた。これは, エチオニン耐性遺伝子を有するプラスミドの比増殖速度の方が有しないプラスミドのそれよりも低いことに原因があると考えられる。

2.4 エチオニン選択圧としたプラスミドの安定化

プラスミド pER9 は, 非常に安定性が高くなっているが, それでも徐々にプラスミドが欠落していく。pER9 の欠落率を更に減少させるためには, エチオニンにより選択圧を加えることが必要である。そこで0.3mol/m³の D, L- エチオニンを添加した場合のプラスミドの安定性を調べた。結果を Fig. 4 に示す。プラスミド pER4 と pER9 の比増殖速度は, それぞれ約0.15, 0.13(1/h)ではば一定であり, エチオニン耐性の低下は見られなかった。また, pER4, pER9 のプラスミドの欠落は40世代後でもそれぞれ3%, 2%であり非常に安定であった。このことから, エチオニンを選択圧として培地に添加すれば, エチオニン耐性遺伝子を有するプラスミドの欠落する割合を低下できることが明らかとなった。

2.5 実用酵母でのエチオニン耐性遺伝子の発現

エチオニン耐性が, 高次倍数体の実用酵母中でも発現すれば実用酵母の育種に利用できる。そこで, *S. cerevisiae* に属する野性型の酵母 4 種, IFO 2044 (パン酵母), IFO 2376 (清酒酵母協会 8 号), IFO 1953 (ビール下面酵母), および IFO 0849 (その他の酵母) についてエチオニン耐性遺伝子の発現を調べた。

まず, それぞれの酵母自身が有するエチオニンに対する耐性の強さを調べるために, 種々の濃度 (0.5, 1, 1.5, 2, 5mol/m³) の D, L- エチオニンを含有する SD 培地のプレートに菌を 1 プレート当たり 200 個になるように塗

布し, 30°C で 3 日間放置した。その結果, IFO 2044 は 5 mol/m³ のエチオニン濃度でもコロニーが出てきたが, IFO 2376 と IFO 0849 は 1.5mol/m³ 以上の濃度で, IFO 1953 は 5 mol/m³ 以上の濃度のエチオニンを含有した場合にコロニーは見られなかった。そこで, IFO 2376, IFO 1953, IFO 0849 にプラスミド pER9 を形質転換し, それぞれの生えてこれなかった濃度の D, L- エチオニンを含有する SD 培地のプレートに 10⁸ 個ずつ塗布し, 30°C で 3 日間放置した。その結果, Fig. 5 に示すように, エチオニン耐性を示すコロニーが 10~100 個得られた。

これらのコロニーが, プラスミド pER9 のエチオニン耐性遺伝子の発現によりエチオニン耐性を獲得した形質転換体であることを確かめるために, 各プレートより 1 個のコロニーを培養した後, 実験方法 1.6 に示した方法に従ってプラスミドを確認した (Fig. 6)。それぞれのコロニーより取り出したプラスミドは, pER9 と一致した。このことから, エチオニン耐性遺伝子は, 実用酵母中でもエチオニンを耐性マーカーとして形質転換体を選別できることがわかった。

結 言

エチオニンに耐性を示す酵母の遺伝子が増殖速度に及ぼす影響について検討し, この遺伝子の表現型が形質転換体を選別するマーカーとして利用できることを確認した。さらに, エチオニン耐性遺伝子を含む DNA 断片をサブクローニングしたものをプラスミド pJDB207 に連結することによりプラスミド pER9 を作製した。この pER9 は, 9.8Kb と短く, *Bam*HI, *Sal*I などの適当なクローニング部位を有しており, 且つ, プラスミドの安定性も高いことから, 一般の酵母用のクローニングベクターとして工業的に利用できることが判明した。また, pER9 は

実用酵母中でも発現することが確認され、実用酵母の育種への応用も期待できる。

〔謝 辞〕 プラスミド pJDB219 および pJDB207 をご提供下さいました Beggs 教授に心より感謝申し上げます。また、本論文作成にあたり、御援助下さいました鐘淵化学工業生産技術研究所野島康弘研究所長に深く感謝申し上げます。

Literature cited

- 1) Beggs, J.D.: *Nature*, **275**, 104 (1978)
- 2) idem: "Genetic Engineering", **2**, 175 (1981)
- 3) Broach, J.R.: *Methods Enzymol.*, **101**, 307 (1983)
- 4) Cryer, D.R., R. Eccleshall and J. Marmur: *Methods Cell Biol.*, **12**, 39 (1975)
- 5) Futcher, A.B. and B.S. Cox: *J. Bacteriol.*, **157**, 283 (1984)
- 6) Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata and A. Kimura: *ibid.*, **153**, 163 (1983)
- 7) Jimenez, A. and J. Davis: *Nature*, **287**, 869 (1980)
- 8) Kado, C.I. and S.T. Lui: *J. Bacteriol.*, **145**, 1365 (1981)
- 9) Macara, I.G.: *J. Gen. Microbiol.*, **104**, 321 (1978)
- 10) Mandel, M. and A. Higa: *J. Mol. Biol.*, **53**, 159 (1970)
- 11) Sakai, K. and M. Yamamoto: *Agric. Biol., Chem.*, **50**, 1177 (1986)
- 12) Shiomi, N., H. Fukuda, H. Morikawa, Y. Fukuda and A. Kimura: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, 302 (1988)
- 13) Shiomi, N., H. Fukuda, Y. Fukuda, K. Murata and A. Kimura: *Biotech. Bioeng.*, **35**, 1120 (1990)

Expression and Stability of Plasmid with Ethionine Resistance Gene as a Marker in *Saccharomyces cerevisiae*

Naofumi Shiomi and Hideki Fukuda

Engineering Research Laboratories, Kanegafuchi Chemical Industry Co., Ltd., Takasago 676

Yasuki Fukuda

Chukyo Community College, Mizunami 509-61

Kousaku Murata and Akira Kimura

Research Institute for Food Science, Kyoto Univ., Uji 611

Key Words : Biochemical Engineering, Plasmid Marker, Plasmid Stabilization, *Saccharomyces cerevisiae*, Ethionine Resistance Gene

To apply genetically engineered yeast cells to practical processes for the production of useful compounds, the construction of vector plasmids having high stability and expressive selection markers in polyploid wild yeast cells is required. For this purpose, we selected an ethionine-resistance phenotype of a yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a marker and constructed a vector plasmid pER9 containing ethionine-resistance gene. The vector plasmid pER9 was 9.8 kb in length, a suitable size for manipulation, and had available cloning sites (*Bam*HI and *Sal*I) for foreign DNAs. The plasmid was stably maintained in haploid yeast cells and almost all the cells (98%) contained the plasmid, even after 40 generations, when ethionine was in the growth medium as a selection pressure. Since the ethionine-resistance gene on plasmid pER9 could be expressed and maintained in cells of yeast strains such as sake and beer yeasts, pER9 would make it possible to breed industrially useful polyploid strains of yeasts at the molecular level.