

酵母キラー形質を利用したプラスミドの安定化

○浴野圭輔、白上知幸、古川謙介 (九大農化)

【目的】プラスミドを用いて酵母で異種遺伝子を大量発現させる場合、そのコピー数と安定性が問題となる。そこで、選択圧をかけずにマルチコピーで安定に保持されるベクターシステムの構築を目的として、YE_p型プラスミドの保持安定化の検討を行った。本研究では酵母 *Kluyveromyces lactis* の線状プラスミドである pGKL1 に存在するキラー形質（毒素分泌、耐性）を利用して、外来プラスミドの安定化を試みた。

【方法及び結果】酵母のキラー形質を支配する遺伝子は *Saccharomyces cerevisiae* においても機能する。キラー毒素は3つのサブユニットから構成されているが、そのコア成分であるγサブユニットは pGKL1-ORF4 に、また、キラー毒素耐性タンパク質は pGKL1-ORF3 にコードされている。まず、pGKL1-ORF3 及び、pGKL1-ORF4 を PCR により増幅し、それぞれを YE_p51 の GAL10 プロモーター下流に挿入し、YE_p51-R3、YE_p51-T4 を構築した。次に、YE_p51-T4 の GAL10 プロモーターと pGKL1-ORF4 を含む断片を染色体組み込み型ベクター pSAK068 に導入して pSAK068-GT4 を構築し、キラー感受性酵母 *S. cerevisiae* DBY746 株の染色体上に導入した。その後、YE_p51-R3 でこの株を形質転換し、ガラクトースを含む培地において継代培養を行った。その結果、pSAK068-GT4 のみを導入した株はガラクトース誘導下で増殖できなかったが、YE_p51-R3 をさらに導入した株は、ガラクトース誘導下においても正常に増殖し、栄養要求性による選択をかけることなく YE_p51-R3 を安定に保持することができた。

Plasmid stabilization by use of yeast killer toxin gene and the resistant gene

○ Keisuke Ekino, Tomoyuki Shirakami, and Kensuke Furukawa
(Dept. Agric. Chem., Kyushu Univ.)

〈KeyWords〉 *Saccharomyces cerevisiae*, killer plasmid, plasmid stabilization

メチロトロフ酵母 *Candida boidinii* を用いた *Sulfolobus* 由来トレハロース生成酵素の発現

(キリンビール・基盤技術研究所、¹応用開発センター、²京大・農・農化)

○須田尚子、米田俊浩、決得麻佐子¹、小林和男¹、阪井康能²、加藤暢夫²、
近藤恵二、玉井幸夫

【目的】我々は *Sulfolobus* 属高度好熱細菌が産生する新規グリコシルトランスフェラーゼ (GTase) 及び α-アミラーゼ (Amylase) による効率的トレハロース生産について報告した(1)。今回、メチロトロフ酵母 *Candida boidinii* (*C. boidinii*) による効率的な GTase、Amylase 生産系の構築を目的として、それぞれの酵素の *C. boidinii* 内での発現について検討したので報告する。

【方法及び結果】*C. boidinii* において、メタノールを炭素源として培養することによってアルコールオキシダーゼと同様に著量生産されるギ酸脱水素酵素の遺伝子 (*FDH1*) より調節領域を取得し、異種遺伝子発現ベクターを構築した。GTase、Amylase 構造遺伝子をそれぞれ発現ベクターの *FDH1* プロモーター下流に連結したプラスミドより形質転換体を得た。形質転換株をメタノールを炭素源として培養すると、それぞれの酵素は菌体内に活性型で生産されていた。最も生産性の高かった株では発現ベクターが多コピーで染色体に挿入されていた。70℃の熱処理により *C. boidinii* 由来の菌体内タンパク質の大部分が不溶性となったことから *C. boidinii* を用いた発現系がトレハロース生成酵素生産において有用であることが明らかとなった。

(1)日本農芸化学会1995年度大会講演要旨集 p.30

Expression of novel trehalose-producing enzymes in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*

○Hisako Suda, Toshihiro Komeda, Msako Kettoku¹, Kazuo Kobayashi¹, Yasuyoshi Sakai², Nobuo Kato², Keiji Kondo, Yukio Tamai (Central Laboratories for Key Technology, Kirin Brewery Co., Ltd. ¹Applied Bioresearch Center, Kirin Brewery Co., Ltd. ²Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyoto University)

【Key words】 methylotrophic yeast, *Candida boidinii*, trehalose, transformation