

生物機能利用技術研究

化学食品部 食品技術研究室

江口良寿, 小金丸和義, 増田照雄, 坂田宗章

遺伝子組換え技術による実用酵母の育種を行う目的で、酵母に対する抗生物質であるG 4 1 8に対する耐性遺伝子を持つY E p系プラスミドの構築を行った。構築されたプラスミドは7 k bから15 k bで、制限酵素による検討の結果3種類の実用酵母用ベクターとして利用可能なプラスミドが得られた。これらはすべてY E p 1 3由来の大腸菌および酵母の複製開始点を含み、大腸菌-酵母のシャトルベクターとして機能できた。

1. 緒言

遺伝子組換え技術の発展により、これまで育種改良が出来なかった微生物についてもその応用による育種改良がなされるようになってきた。しかしながら、実用酵母の育種改良の要望は高いにもかかわらず、これまで酵母の遺伝子組換え技術は実験室株という半数体（1倍体）酵母についてのみ研究が行われてきた。これは実用酵母が2倍体であり、酵母実験室株で使用される栄養要求性の遺伝子マーカーが使用できないためである。

一方、G 4 1 8は酵母のタンパク質合成を阻害する抗生物質¹⁾として知られており、この耐性遺伝子は優性遺伝子として機能するため実用酵母の遺伝子マーカーとして用いることが出来る。また、G 4 1 8耐性遺伝子は大腸菌においてカナマイシンおよびネオマイシン耐性遺伝子として機能するため、大腸菌-酵母シャトルベクターとした場合大腸菌の遺伝子マーカーとしても利用できる。さらに、この遺伝子はp U C - 4 Kのマルチクロニングサイトにクロニングされており、容易に分離して利用することが出来る。

そこで本研究では、実用酵母の育種改良に応用可能な酵母ベクターの開発を目的とし、の持つG 4 1 8耐性遺伝子大腸菌-酵母シャトルベクターのY E p 1 3に組み込み3種のプラスミドを得たので報

告する。

2. 実験方法

2.1 菌株およびプラスミド

Escherichia coli MV1184, *E. coli* MC1061, *E. coli* JM83はY E p 1 3 (図-1), p U C - 4 K (図-2) および構築プラスミドの増幅に用いた。また、構築し実用酵母に応用可能と考えられたプラスミドは*Saccharomyces cerevisiae* AH22に形質転換し、酵母菌体内発現の検証を行った。

プラスミドは酵母-大腸菌シャトルベクターのY E p 1 3とG 4 1 8耐性遺伝子を有するp U C - 4 Kを用いた。表-1に使用菌株およびプラスミドの遺伝子型を示した。

Table 1. Bacterial, yeast strains and plasmids

Strains	Genotype
Bacteria:	
<i>Escherichia coli</i> MV1184	Δ (srl-recA)306::Tn10 Δ (lac-pro)ara, thi, rpsL, ϕ 80 dlacZ Δ M15[F, proAB, lacI, lacZ Δ M15, traD36]
MC1061	hedR, hedM, ara Δ 139, Δ (ara-leu)7697 Δ lacX74, rpsL, GalK
JM83	ara, Δ (lac-proAB), rpsL(=strA), ϕ 80, lacZ Δ M5
Yeast:	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AH22	a, leu2-3, leu2-112his4-519, can, gal2
Plasmid:	
pUC-4K	Amp, Neo
YE p13	Tet, Amp, LEU2

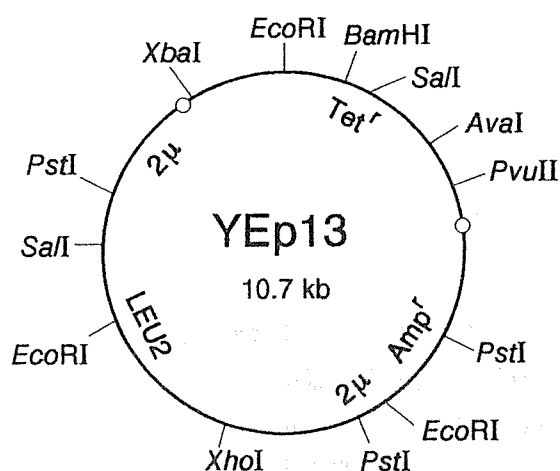


Fig.1. Restriction map of YE p13.

2.2 培地

大腸菌はLB培地（1%バクトトリブトン，0.5%酵母エキス，1%NaCl）を用いて培養し，構築プラスミドの選択培地にはこれに1.5%の寒天および30μg/mlのカナマイシン，50μg/mlのアンピシリンもしくは15μg/mlのテトラサイクリンを添加して使用した。また，酵母はYPD培地（2%ペプトン，1%酵母エキス，2%グルコース）で培養し，選択寒天培地にはSD-his培地（0.67%酵母ニトロゲンベースアミノ酸不含，2%グルコース，25μg/mlヒスチジン，1.5%寒天）を用いた。

2.3 プラスミドの調製およびG418耐性遺伝子の分離精製

用いたプラスミドは，塩化カルシウム法²⁾によって大腸菌へ形質転換し，アルカリSDS法で抽出，PEG法によって精製した。得られたプラスミドはアガロースゲル電気泳動および制限酵素消化によって分析した。また，G418耐性遺伝子はpUC-4Kを制限酵素PstIで完全消化後電気泳動し，G418耐性遺伝子部分のみをDNACELLによってアガロースゲルより回収した。さらにこれをフェノール/クロロホルム処理し，エタノール沈澱して精製した。

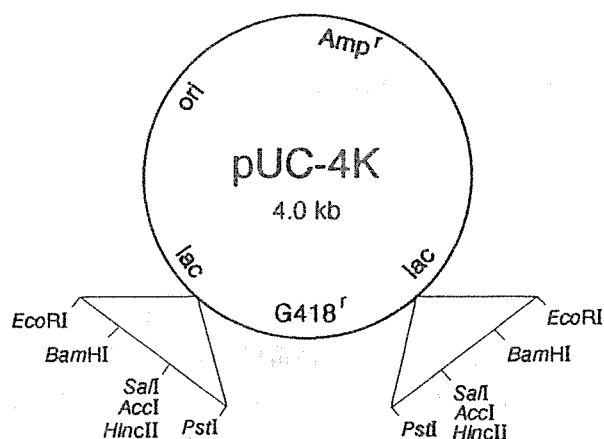


Fig.2. Restriction map of pUC-4K

2.4 G418耐性遺伝子とYE p13の連結

G418耐性遺伝子とベクターYE p13の連結は，制限酵素PstIで消化したベクターとG418耐性遺伝子をライゲーションバッファーに溶解後等量混合し，タカラライゲーションキットA液とB液とを添加し16℃，6時間反応させて行った。次に，この反応液10μlと大腸菌（*E. coli* MV1184）コンピテントセル100μlを混合して大腸菌へ形質転換し，得られたコロニーからG418耐性遺伝子を含むプラスミドを回収した。さらに，得られたプラスミドを制限酵素で消化後アガロースゲル電気泳動し，その切断パターンから制限酵素地図を作成して実用酵母のベクターとして利用可能なプラスミドを選択した。

3. 結果および考察

3.1 pUC4Kの精製およびG418耐性遺伝子の回収

アルカリSDS法によって抽出され，PEG法によって精製されたは大腸菌培養液200mlから約500μgが得られた。このプラスミドの260nmと280nmの吸光度の比は約1.7となり，以下の実験に十分使用可能と考えられた。さらに，このプラスミド10μgからG418耐性遺伝子は約1μg回収され，その回収率は約40%であった。

3.2 G418耐性遺伝子を有する実用酵母ベクターの構造

得られた16種のプラスミドのうち実用酵母のベクターとして応用可能なものは、制限酵素による分析の結果3種類のみであった。これらは、いずれも酵母と大腸菌の複製開始点および薬剤耐性遺伝子などのマーカー遺伝子をただひとつ含んでいた。得られた3種類の実用酵母用ベクターとして応用可能なプラスミドの構造（制限酵素地図）を図-3に示した。なお、他のプラスミドは酵母の複製開始点を欠損したり、複製開始点や薬剤耐性遺伝子を重複して含んでおり、酵母菌体内での複製や安定性に問題があると考えられた。このように目的のプラスミド以

外のプラスミドが多く出てきたのは、*Pst*Iでベクターを完全消化した場合3つの部分に分かれ、これらが正常に連結されなかったものが多かったためだと考えられる。また、YEp13のすべての遺伝子マーカーを有するプラスミドが得られなかったのは、先の理由とさらに、プラスミドサイズが大きくなりすぎるためだと考えられる。

3.3 酵母菌体内への構築ベクターの導入

得られたプラスミドのうち2遺伝子を有するプラスミドをKUR法³⁾（酢酸リチウム法）によって酵母実験室株へ形質転換し、酵母菌体内への形質転換効率について検討を行った。得られた形質転換コロ

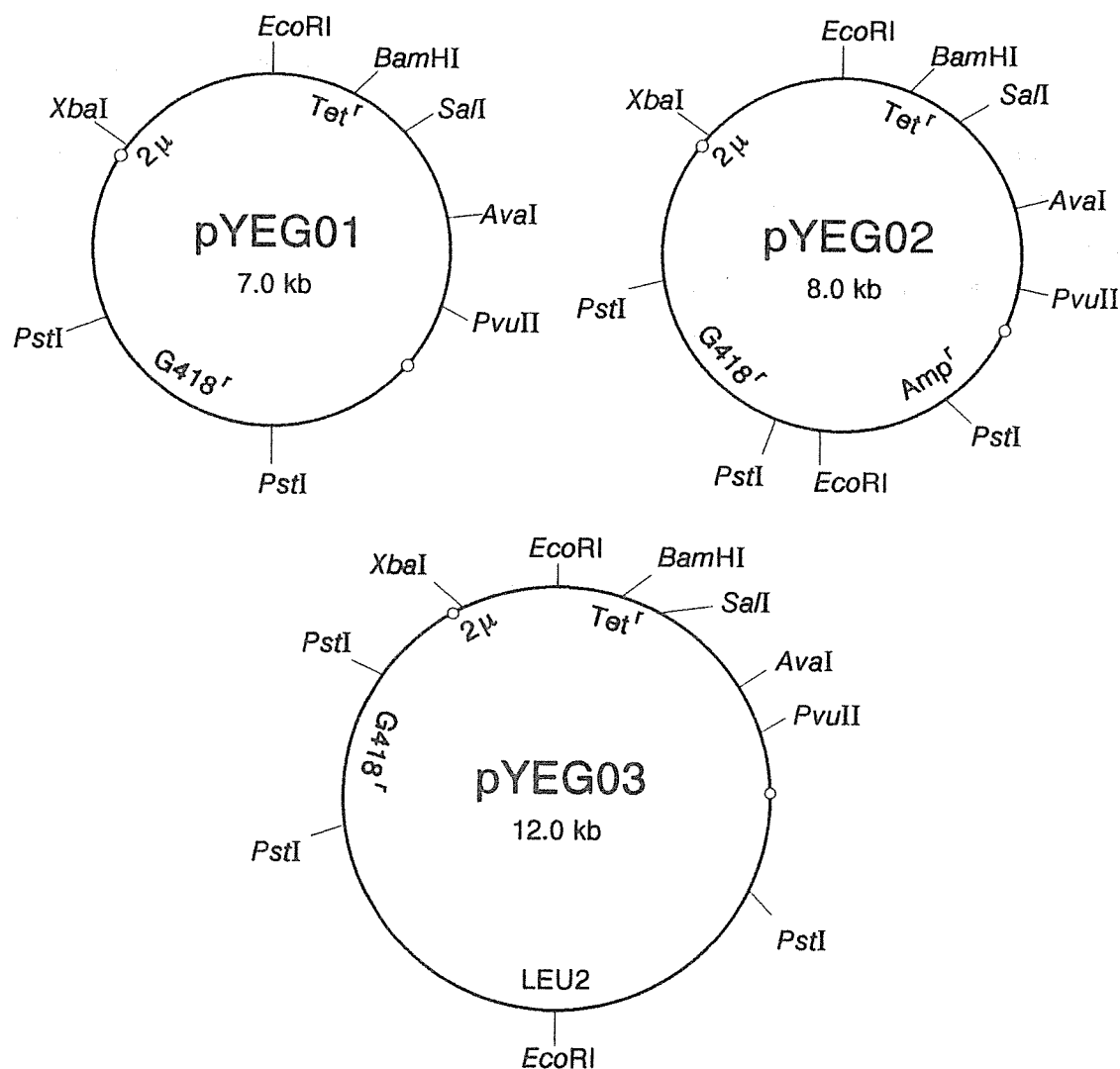


Fig.3. Restriction maps of yeast vectors.

ニーの数は対象としたYEp13より若干少なかったが、プラスミドサイズを考慮すると形質転換効率はほとんど差がなく、酵母菌体内への取り込みおよび安定性は全く問題ないと考えられた。

しかしながら、実用酵母への形質転換は現在、安全委員会および科学技術庁の許可がおりていないため未実施であり、実用酵母における形質転換効率および安定性についての検討は行っていない。今後は清酒酵母や醤油酵母など実用酵母へのこれらプラスミドの形質転換を行い、その効率およびプラスミド

の安定性について検討する予定である。

参考文献

- 1) 岡村和彦, "酵母のニューバイオロジー"
(株)医学出版センター p.182 (1990)
- 2) Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166, 557-580 (1983)
- 3) Ito, H., K. Murata, and A. Kimura., Agric.
Biol. Chem., 48, 341-347 (1984)

Constraction of host-vector system of alchol producing yeasts

Chemistoty and Food Devision

Y. Eguchi, K. Koganemaru, T. Masuda, M. Sakata

YE_p series plasmids were constracted with G418, antibiotics for yeasts, resistance gene in order to breed new type alchol producing yeasts (wild type strains). Three plasmids among 7 to 15kb plasmids were certified as vector for yeasts by restriction endonucleases examination. Those vector containing origin of replication were able to act as E.coli-yeast shuttle vector system.