

論文の内容の要旨

論文題目

食用酵母 *Candida utilis* におけるセルフクローニング形質転換系に関する研究

岩切 亮

はじめに

Candida utilis は産業的に重要な酵母である。本酵母は、生育に補欠成分などを必要とせず、グルコースによる Crabtree 効果を示さないことから、安価な培地による高密度連続培養が可能である。また、蛋白質や核酸の生産性も高く、食飼料用のタンパク質源等として、またグルタチオン、CoA、NAD 等の医薬品原料の生産株としても広く工業的に利用されてきた。さらに *C. utilis* は米国食品医薬品局 (FDA) から認可された安全性の高い食用酵母でもあり、有用物質の工業的な生産に適した宿主として期待される。

しかし、本酵母が二倍体で条件変異を付与しにくく、胞子形成能を持たないことなどの理由から、宿主・ベクター系の開発が遅れていた。現在、*C. utilis* で利用可能な宿主 DNA 由来の選択マーカー遺伝子としては、薬剤耐性を付与する変異型リボソーム蛋白質遺伝子と、栄養要求性を相補する *URA3* ホモログ遺伝子とが知られるのみである。実用的には宿主に制約されない薬剤耐性マーカーがよく、安定性の点からそれらを染色体上に組込むことが要求される。

本研究では、有用酵母の分子育種を最終目標とし、*C. utilis* の DNA を基にした新たな薬剤耐性マーカーの作製と、それを用いた *C. utilis* のセルフクローニング形質転換系の開発を目的とした。

1. 自律複製起点 (ARS) の取得と構造の解析

C. utilis の ARS は既にいくつか取得されており、最も短いものでも 1.8 kbp を切ると著しく効率が低下すると報告されている。まず、スクリーニングに利用可能な効率的形質転換ベクターを構築する為に、コンパクトで活性の高い ARS の取得を試みた。*C. utilis* では酢酸リチウム法の DNA 導入効率が低いため、形質転換にはエレクトロポレーションが用いられてきた。*C. utilis* AHU3053 株が酢酸リチウム法で効率良く形質転換できることを見出し、操作性を考慮しこの株を宿主として用いた。

C. utilis IAM4264 株のゲノムライブラリーを用いて、*C. utilis* 内でのプラスミド複製能の付与を指標に ARS のスクリーニングを行った。IAM4264 株のゲノムを *Sau*3AI で部分消化し、*C. utilis* で機能する G418 耐性カセット (*kanMX*) を有する大腸菌用クローニングプラスミドへ挿入してゲノムライブラリーを作製した。98 個の G418 耐性コロニーから形質転換効率の高い 5 つのプラスミドを選抜した。インサートの短縮化を行い、 10^3 形質転換体/ μg DNA 以上の効率を示す、1490bp と 552bp の DNA 断片を ARS3 と ARS4 からそれぞれ取得した。

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における ARS の機能単位は 100-150bp であり、この中によく保存された 11bp の ACS (ARS consensus sequence)が見い出されている。取得した DNA 断片中には *S. cerevisiae* の ACS と同じ配列がいくつか存在したが、欠失変異体の解析から ARS 活性に必須ではないことが示された。また、ARS の最少機能単位は *S. cerevisiae* の ARS の数倍大きいことから、*C. utilis* の ARS はユニークな特徴をもつことが示唆された。これらの ARS は他の *C. utilis* 株でも機能し、実用的なベクターに利用可能であった。

2. *C. utilis* の Yap1 ホモログ遺伝子の単離とその選択マーカーとしての利用

Yap1 は、酵母 *S. cerevisiae* における各種ストレスに応答する転写因子で、その過剰発現により宿主にシクロヘキシミド (CYH) などの薬剤耐性を付与する事が可能である。*C. utilis* の Yap1 ホモログ遺伝子をクローニングし、形質転換の選択マーカーとしての有効性を検証した。

Degenerate PCR により作成したプローブを基に *C. utilis* IAM4264 のゲノム DNA より *YAPI* ホモログ遺伝子 (*CuYAPI*) をクローニングした。この遺伝子は 438 アミノ酸をコードしており、現在明かとなっている Yap1 ホモログの中では最小であった。Yap1 とは全長で 28.7%の相同性を示し、Yap1 ホモログの特徴である bZip 領域、および 2 つの

CRD (cysteine rich domain)で極めて高い相同性を有していた。

先に取得した ARS を有するプラスミドの glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 遺伝子プロモーター (CuPgap)下流に *CuYAPI* を連結し、*C. utilis* AHU3053 株に形質転換した結果、CYH 選択圧下で 3.8×10^3 形質転換体/ μg DNA の耐性コロニー が出現し、形質転換のマーカーとして機能することを確認した。一方、*S. cerevisiae* の *YAPI* を CuPgap 制御下で高発現させるプラスミドでは *C. utilis* の形質転換体は得られなかった。

CuYAPI を高発現させた *C. utilis* 株は、この他カドミウムやフルコナゾールにも高い耐性を示した。さらに *CuYAPI* を *S. cerevisiae* で過剰発現させたところ、各種薬剤耐性を付与でき、CuYap1 は Yap1 と機能的にも類似していることを確認した。

3. *CuYAPI* の発現に適したプロモーターの単離とその構造と機能の解析

さらに高効率な形質転換系の開発を目指し、CuPgap よりもマーカー遺伝子 *CuYAPI* の発現に適したプロモーターの単離を試みた。*CuYAPI* をレポーターとした *C. utilis* IAM4264 のゲノムライブラリーから、CYH 耐性を指標にしてプロモーターのスクリーニングを行った。制限酵素によりインサートの短縮化を行い、CuPgap より宿主に高濃度の CYH 耐性を付与する、P2-1-2 (0.5 kbp) と P2-33-2 (1.4 kbp) を取得した。これらを有するプラスミドは CuPgap のものより 5-10 倍高い形質転換効率を示した。プロモーター下流の DNA 断片を inverse PCR により取得し塩基配列を解析した。予想されるアミノ酸配列を基に相同性検索を行った結果、P2-1-2、P2-33-2 は、ともにリボソーム蛋白質をコードする遺伝子 *RPL31*、*RPL29* のプロモーターと推定された。

各プロモーター下流に *lacZ* を連結し、これらを *C. utilis* の染色体上に組込んだ株を作製して、*lacZ* をレポーターとしてプロモーター活性を解析した。CYH のない条件では P2-1-2 と P2-33-2 の転写活性は CuPgap の 1/10 以下であった。一方、最少阻止濃度未満 (0.5-2 $\mu\text{g/ml}$) の CYH 存在下では、CuPgap の転写活性は生育の再開まで抑えられるのに対し、取得したプロモーターでは増殖に先立ち転写が活性化され、CYH のない時に比べて約 5 倍転写量が上昇した。P2-1-2 では CYH の他にも Blasticidin S や Hygromycin B などでも転写が誘導された。

取得したプロモーターで CuPgap よりも形質転換効率が高いのは、CYH 存在下での誘導特性によるものと考えている。選択圧のない条件では誘導されないので宿主細胞への負担が少なく、薬剤耐性遺伝子の発現に適したプロモーターと言える。

4. 非相同組換えによる染色体への遺伝子導入

REMI (restriction enzyme mediated integration) 法は、*in vivo* での制限酵素の作用により DNA を染色体へ導入する方法で、酵母 *S. cerevisiae* で初めて報告された。組込みのターゲット配列を用いない染色体への導入法として、*C. utilis* でも実施可能か検討した。供試 DNA には、相同組換えの頻度を抑える為、ターミネーター成分を CuGAP 由来とした、キメラカセット P2-1-2-CuYAP1-CuTgap を用いた。*HindIII* で両端を消化したキメラカセットを酢酸リチウム法で *C. utilis* AHU3053 株へ形質転換したところ、環状 DNA を用いた時の約 13 倍の CYH 耐性株が得られた。18 株の染色体 DNA についてサザンハイブリダイゼーションによる解析を行い、17 株で *HindIII* により回収されるキメラカセットを検出した。しかし、全ての株でその他に *HindIII* では切り出せない複数のバンドを検出した。よって、形質転換は典型的な REMI とは異なる機構で染色体へ組込まれていることが推察された。

HindIII とは異なる切断面を生じる制限酵素でも頻度に差はあるが形質転換が可能であった。ただしベクターを切断しないと効率は著しく低下するので、組込みには直鎖状にする必要があった。また、制限酵素を失活させて、切断した DNA のみを用いても形質転換が可能であり、NHEJ (non-homologous end joining) で導入されているものと予想している。以上、相同配列を用いずに染色体上に遺伝子を導入する、*C. utilis* のセルフクローニング形質転換系を開発した。

まとめ

本研究では、*C. utilis* で機能する自律複製起点(ARS)を取得した。また、転写因子 *CuYAP1* とその発現に適したプロモーターとを取得し、*C. utilis* の形質転換に有効なマーカー遺伝子カセットを作製した。さらに、目的の遺伝子のみを直鎖状にして細胞に導入することでターゲット配列を用いずに染色体上に組込み可能であることを確認した。これらを基に形質転換効率の優れる自律複製型プラスミドを構築し、さらにはセルフクローニングの形質転換系を開発することができた。本研究の成果が有用酵母の分子育種や実生産株における有効変異点の解析に貢献することができれば幸いである。