



Title	実用酵母における分子育種技術の開発
Author(s)	中沢, 伸重
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3081513
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

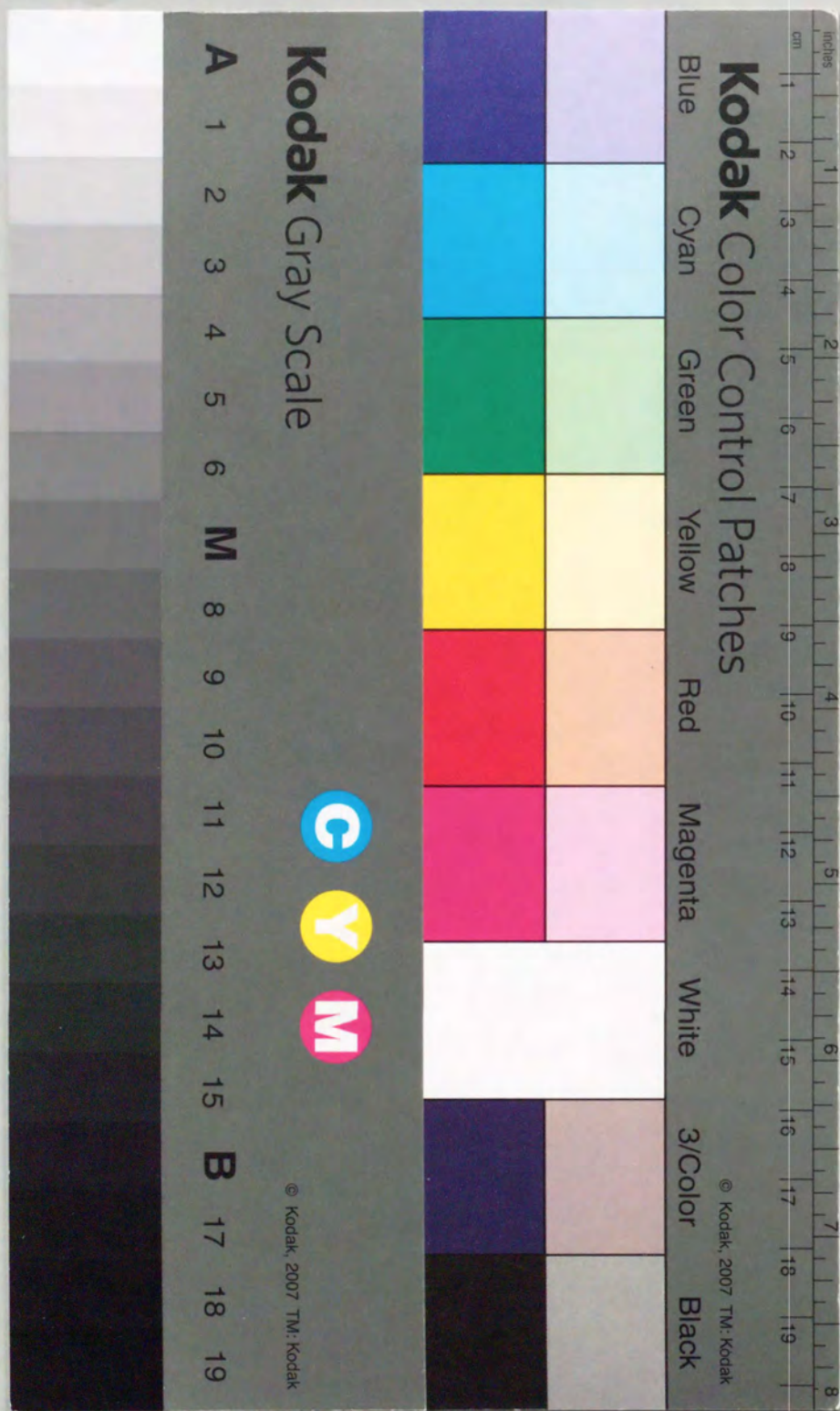
<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

実用酵母における分子育種技術の開発

中 沢 伸 重

1994年11月



①

実用酵母における分子育種技術の開発

中沢伸重

1994年11月

目次

緒論	5
第1章 <i>a1</i> 転写産物のスプライシング欠損による $\alpha 1-\alpha 2$ 抑制不能変異株	
第1節 緒言	12
第2節 実験材料および実験方法	12
第3節 結果	27
第1項 $\alpha 1-\alpha 2$ 抑制欠損変異株の分離	27
第2項 <i>AAR2</i> 遺伝子のクローニング	29
第3項 <i>AAR2</i> 遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列	30
第4項 <i>AAR2</i> 遺伝子破壊の接合型および生育への影響	32
第5項 <i>aar2</i> 変異株における接合型情報信号の変化	33
第6項 <i>aar2</i> 変異株における <i>a1</i> 転写産物のスプライシング	34
第7項 イントロンを除去した <i>MA7a1</i> 遺伝子による <i>aar2</i> 変異の抑圧試験	37
第8項 <i>aar2</i> 変異は <i>prp5</i> および <i>prp6</i> の対立遺伝子ではない	37
第4節 考察	37
第5節 要約	38
第2章 醸造用酵母の育種に有用な優性選択符号の開発	
第1節 緒言	40
第2節 実験材料および実験方法	40
第3節 結果	41
第1項 セルレニン耐性遺伝子の分離	41
第2項 セルレニン耐性遺伝子は <i>PDR4</i> 遺伝子である	43
第3項 <i>PDR4</i> 遺伝子の優性選択符号としての有用性	43
第4項 原栄養体株に対する接合型テスターの造成	44
第4節 考察	47
第5節 要約	48

第3章 協会7号酵母の接合型遺伝情報の解析とその応用	
第1節 緒言	49
第2節 実験材料および実験方法	49
第3節 結果	53
第1項 協会7号酵母の接合型遺伝情報の解析	53
第2項 協会7号酵母における接合型信号	54
第3項 協会7号酵母における接合型特異的遺伝子群の発現	55
第4項 協会7号酵母からの接合型を示す株の分離	56
第5項 吟醸酒醸造用酵母からの接合型を示す株の分離	58
第4節 考察	59
第5節 要約	60
第4章 清酒酵母の孢子非形成性のメカニズム	
第1節 緒言	61
第2節 実験材料および実験方法	61
第3節 結果	65
第1項 協会7号酵母における孢子形成制御遺伝子の転写産物	67
第2項 協会7号酵母における孢子非形成性のメカニズム	68
第3項 協会7号酵母の <i>[ME]</i> 遺伝子の機能	69
第4節 考察	70
第5節 要約	71
総合考察	72
謝辞	75
参考文献	76
関係論文	83

糸者 言命

清酒やビールの醸造 あるいはアルコール の製造などに用いられている *Saccharomyces cerevisiae* 株、いわゆる実用酵母は、経験的選抜により工業的に優れた特性を持ち、それ自身が貴重な遺伝子資源である。それらの有用形質を支配する遺伝子を知り、育種へ応用するためには、変異誘起、性的交雑、細胞融合および形質転換法などの操作が必要であろう。しかし、これらの技術を直接実用酵母に適用するには、以下の問題点がある。すなわち、これらの株では孢子形成能がほとんど失われており、接合能を示す減数分裂分離体を取得し難い。栄養要求性などの効果的選択符号がないため、細胞融合による無性的交雑体あるいは形質転換体の選択分離が困難であるなどの不利な特性がある。さらに、二倍体あるいはそれ以上の倍数体であるため変異株を取得し難く、変異処理により有用形質を損傷する可能性がある。

こうした育種に困難な特性を持つにもかかわらず、実用酵母に対する分子育種は現在までに種々試みられている。宿主および選択符号の開発においては、実用酵母に形質転換体の選択符号を付与するために、リジン生合成系の中間代謝産物である α -aminoadipate- δ -semialdehydeが蓄積すると *S. cerevisiae* は生育できなくなる性質を利用して、 α -アジピン酸耐性株を分離することにより、清酒酵母から *lys2* 変異株（小田ら、1988；北本、1989）が分離され、ウラシル生合成経路のオロチック酸のアナログである5-fluoroorotic acid (5-FOA) が存在すると生育できない性質を利用して、5-FOA耐性株を分離することにより清酒酵母から *ura3* 変異株（北本、1989；小田ら、1990）が取得されている。また清酒酵母の *URA3* および *TRP1* 遺伝子を破壊した栄養要求性株が造成された（Kitamoto et al., 1990）。これらの変異株では実験室株から得られた *LYS2*, *URA3* および *TRP1* 遺伝子を選択符号として利用することができる。一方ベクターの選択符号としては G418（Jimenez and Davies, 1980）、sulfometuron methyl（Casey et al., 1988）等の薬剤に対する耐性遺伝子、銅耐性を付与する *CUP1* 遺伝子（Fogel and Welch, 1982）が利用されている。こうして開発された宿主・ベクター系を用いて、異種遺伝子を実用酵母で発現させたり、既に性格付けされている遺伝子の発現を制御することにより育種が行われた。*Saccharomyces diastaticus* のグルコアミラーゼをコードする *STA1* 遺伝子がG418耐性遺伝子を選択符号としてビール酵母に導入され、得られたグルコアミラーゼ生産株を用いて糖化と醗酵を同時に進めることが試みられた（坂井、1987）。またビール酵母の凝集に関する *FLO1* 遺伝

子をビール酵母、清酒酵母およびワイン酵母の非凝集性株に導入し、それぞれの株に凝集性を付与することができた (Watari et al., 1991)。ビール酵母のジアセチル生産を抑制する目的で、*Enterobacter aerogenes* からクローン化した α -アセト乳酸脱炭酸酵素をコードする *ALDC* 遺伝子をビール酵母に導入し、産生されるジアセチル量を低減させた (Sone et al., 1987, 1988)。既に性格付けされている遺伝子の発現を制御した例としては、ロイシンのアナログである5,5,5-trifluoro-DL-leucineに対して耐性を付与する *LEU4* 遺伝子が分離され、この遺伝子を *S. cerevisiae* 細胞内で高発現させれば、清酒の香気成分の一つである酢酸イソアミルが多量に生成することが報告されている (Hirata and Hiroi, 1991)。またフェニルアラニンのアナログである *o*-fluoro-DL-phenylalanine の耐性株が実験室株から分離された。解析の結果、得られた変異は3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphateをコードする *ARO4* 遺伝子の優性変異で、この変異遺伝子をクローン化して清酒酵母に導入したところ、 β -フェネチルアルコール高生産株が得られた (Fukuda et al., 1992)。実験室株からクローン化した硫化水素生成抑制遺伝子 *NHS5* をビール酵母に導入し、硫化水素生成量を低減させ (手塚, 1990)、遺伝子破壊により尿素を生産しない清酒酵母が造成されている (Suizu et al., 1990)。以上のように、遺伝子の導入あるいは遺伝子の改変によって香味成分の生産調節が可能である。組換え体を使った物質生産に関して、厚生省は酵母自身の遺伝子のみで組換え体であれば、実際の生産に用いることを認めている。そのため酵母以外の遺伝子を用いた場合には、被操作株からそれらを除く必要がある。これに加え、特に食品の場合、遺伝子操作を加えた株から生産された物質の安全性が消費者にとって問題となり、生産者自身で安全性を証明することが必要である。現在、組換えDNA方式で製造された食品の商品化については、各企業が自主規制している。

それでは遺伝子の導入あるいは染色体遺伝子の改変を用いた育種ではなく、性的交雑による育種ができないであろうか。実用酵母に接合能あるいは孢子形成能を付与することができれば、接合能を有する株あるいは減数分裂分離株が取得でき、性的交雑による雑種体の造成が可能であり、上記の問題にも抵触しない。遺伝子組換えによる育種では特定の目的物質のみを高生産する菌株を造成するのに対し、性的交雑による育種では交雑の組み合わせにより多種多様な菌株が造成できるので幅広い育種が可能となろう。

S. cerevisiae の一倍体ヘテロタリズム株には、*a* および α の2種の接合型がある (Herskowitz, 1988)。*a*細胞は α 細胞と接合して、*a*/ α 二倍体細胞を形成する。二倍体細胞は接合能を示さないが、栄養飢餓条件下で孢子を形成する。孢子嚢には*a*または α の

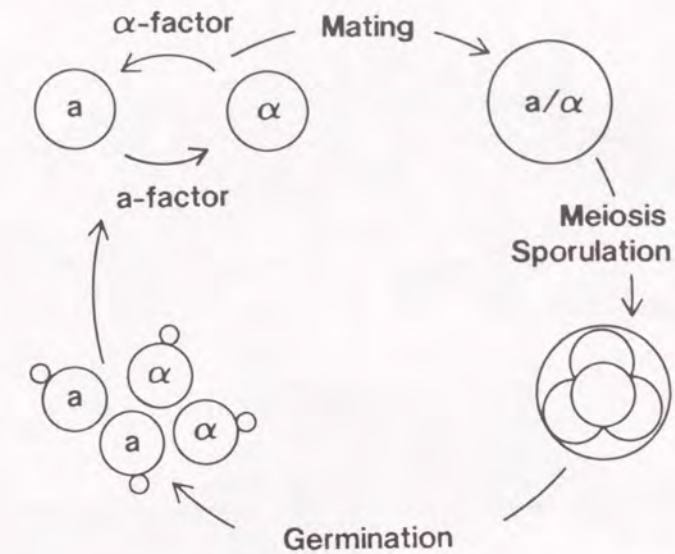


Fig. 0-1. The life cycle of *S. cerevisiae*. *a* and α cells are specialized for mating. These cells secrete peptide mating factors that are recognized by the opposite type of cell. Response to mating factor involves arrest of the cell division cycle at G1; subsequent biochemical and morphological change culminate in the fusion of one *a* cell with one α cell. The mating product is a diploid *a*/ α cell. *a*/ α cells do not express nor respond to mating factors but are able to sporulate in response to starvation and produce an ascus, which contains four haploid tetrad products (spore). The spores begin to grow on nutrient condition.

接合能を有する4個の孢子が含まれ、適当な栄養条件下で発芽し、一倍体細胞として増殖する (図 0-1)。この有性生活環を利用して、異なる菌株間の交雑による育種を行うことができる。*a* および α の接合型は第III番染色体上の *MATa* および *MAT α* 遺伝子によって決定される。接合型遺伝情報は、同じ染色体上の *HML* および *HMR* 遺伝子にもコードされているが、*SIR* 遺伝子によりそれらの発現は抑制されている (図0-2)。*MAT α* 遺伝子は、 $\alpha 1$ および $\alpha 2$ の二つのシストロンから成る。 $\alpha 1$ タンパク質は α 型特異的遺伝子群(α -specific gene; α sg)の転写を誘導し、 $\alpha 2$ タンパク質はAar1タンパク質 (Mukai et al., 1991)と協調し、*a*型特異的遺伝子群(*a*-specific gene; *asg*)の転写を抑制する($\alpha 2$ 抑制)。従って、*MAT α* 細胞は α 型を示す。*MATa*遺伝子も $a 1$ および $a 2$ の二つのシストロンから成り、 $a 1$ シストロンは二つの短いイントロンを持つ (Miller, 1984)。 $a 1$ タンパク質は単独では機能を示さず、 $a 2$ タンパク質の機能は不明である。従って、*MATa*細胞では*asg*のみが発現し、*a*型を示す。*a*細胞と α 細胞との接合により形成される*a*/ α 二倍体細胞では、 $\alpha 2$ 抑制により*asg*の転写が抑制される。また、 $a 1$ タンパク質は $\alpha 2$ タンパク質およびAar1タンパク質と協調して $\alpha 1$ シストロンや一倍体特異的遺伝子群(haploid-

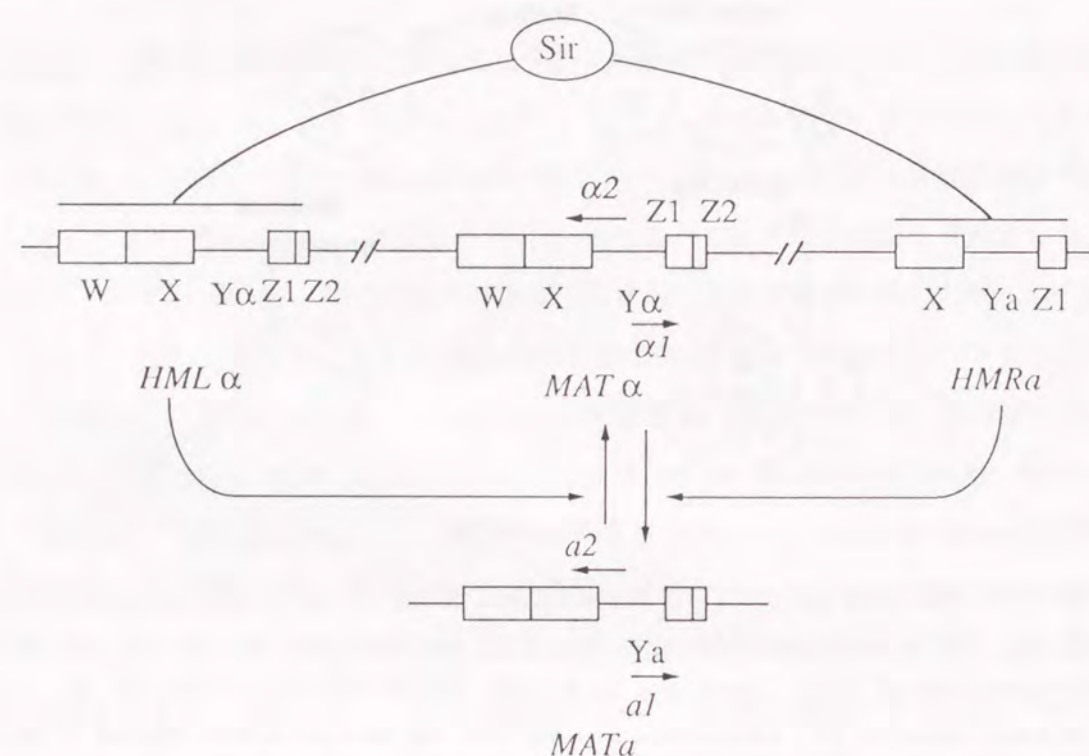


Fig. 0-2. The mating cassettes on chromosome III of *S. cerevisiae*. The W, X, Z1, and Z2 boxes represent regions of homology shared by the mating-type loci *HML*, *MAT*, and *HMR*. The *MAT* locus contains either *a* or α information; each allele encodes two divergently transcribed mRNA indicated by the arrows. The products of four *SIR* genes, Sir, repress transcription of *HML* and *HMR*.

specific gene; *hsg*) の発現を抑制 ($a1-\alpha 2$ 抑制) する。従って、*asg* も αsg も発現せず二倍体 a/α 細胞は接合能を示さない (図 0-3)。

S. cerevisiae の孢子形成には、二つの条件が必要である。一つは a/α 細胞であること (接合型遺伝情報)、もう一つは栄養源が乏しい (発酵性炭素源および窒素源の欠乏) 状態にあること (栄養源情報) である (Malone, 1990)。 a/α 細胞においては、孢子形成を負に制御する *RME1* (Mitchell and Herskowitz, 1986) 遺伝子の転写が $a1-\alpha 2$ 抑制により抑制される。その結果、孢子形成を正に制御する *IME1* 遺伝子 (Kassir et al., 1988) が発現し、*IME1* 遺伝子は *IME2* 遺伝子 (Smith and Mitchell, 1989) およびその下流で働く孢子形成に必要な遺伝子群の転写を誘導する (Mitchell et al., 1990)。*IME2* 遺伝子は、これらの孢子形成特異的遺伝子群の転写誘導に加わると共に (Mitchell et al., 1990) *IME1* 遺伝子の転写を負にフィードバック制御している (Smith and Mitchell, 1989)。子嚢の成熟に関与しプロテインキナーゼと相同性のあるタンパク質をコードする *MCK1* 遺

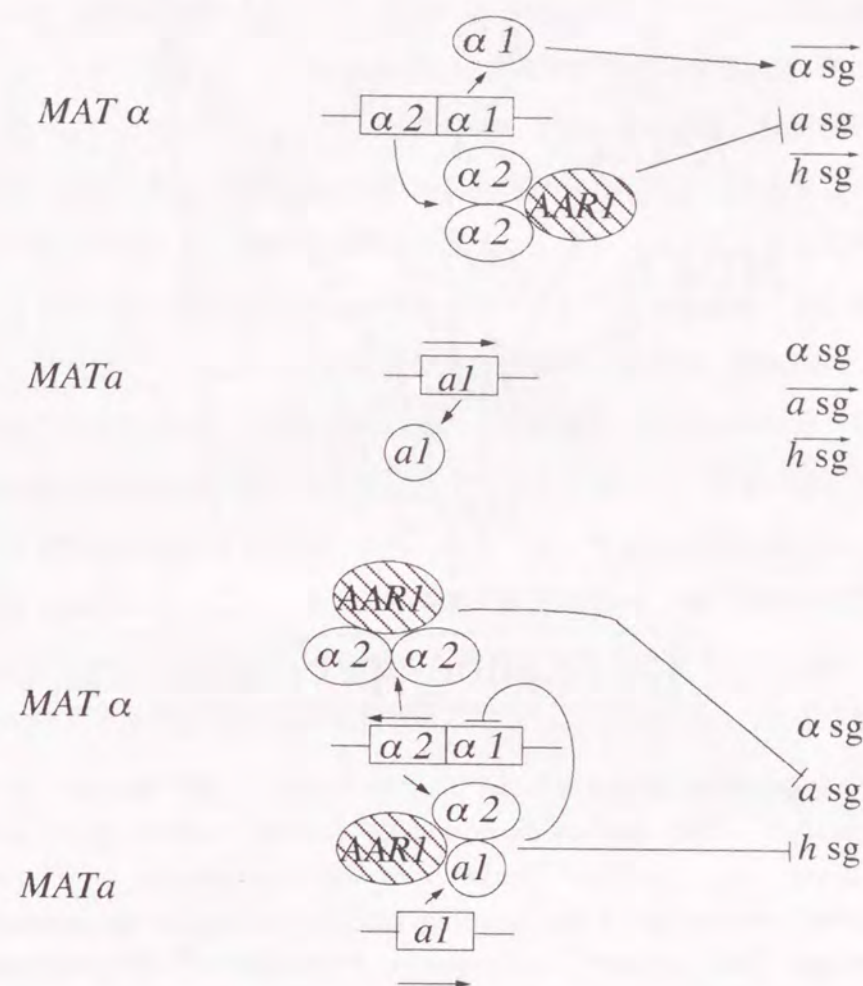


Fig. 0-3. Control of expression of cell-type-specific gene sets by regulatory proteins coded by the mating-type locus. The three panels show how the regulatory proteins encoded by the mating-type locus govern transcription of three different gene sets (αsg , α -specific genes; *asg*, *a*-specific genes; and *hsg*, haploid-specific genes). Aar1 protein is involved in both $\alpha 2$ and $a1-\alpha 2$ repressions. Arrow lines described upper side of genes indicate transcription. Arrow heads indicate stimulation of gene expression; lines with blunt end indicate repression of gene expression.

伝子 (Neugeborn and Mitchell, 1991) も *IME1* 遺伝子の転写を誘導している。 a/α 細胞でのみ転写が見られる *IME4* 遺伝子も *IME1* 遺伝子の転写に必要である (Shah and Clancy, 1992)。栄養源の情報がどのようなメカニズムで孢子形成に必要な遺伝子群に伝達されているかは詳細には明らかにされていない。しかし RAS/cAMP 系を介して *IME1* 遺伝子に伝達され、その発現を転写レベルで制御していると考えられている (Kassir et al., 1988 ;

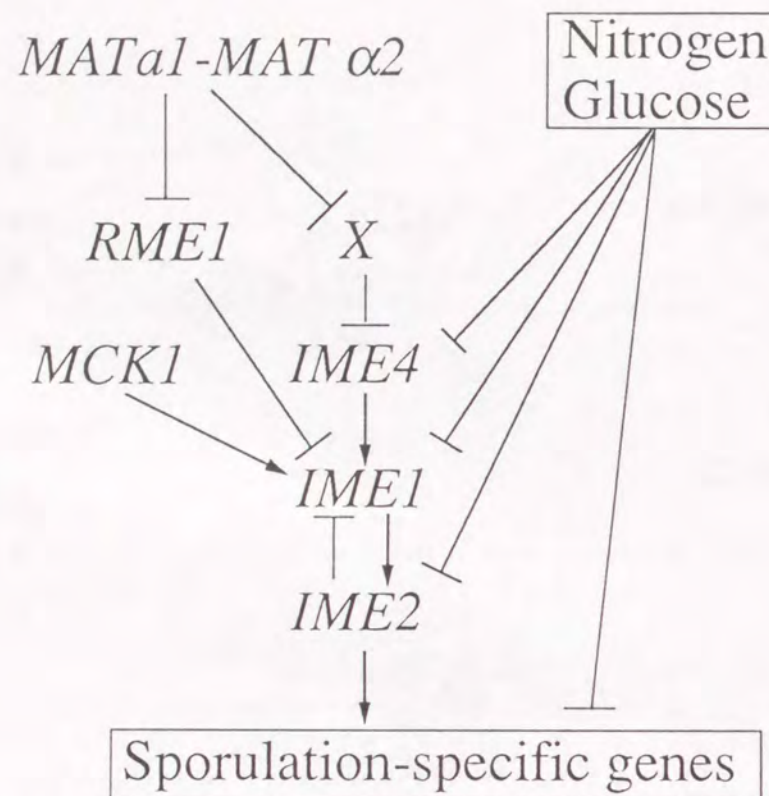


Fig. 0-4. Regulation of meiosis in *S. cerevisiae*. *IME1* product is required for *IME2* expression. *IME2* product is necessary for the expression of sporulation specific genes and a negative regulator of *IME1* expression. *IME1* product also activates the expression of sporulation specific genes in the absence of the *IME2* function. *RME1* product is a negative regulator of *IME1* expression. The *MAT* products, $a1$ and $\alpha2$, block *RME1* expression and then stimulate *IME1* expression through the *IME4* gene. *MCK1* product is required for full expression of the *IME1* gene. Nitrogen compounds and glucose block the expression of *IME1*, *IME2*, *IME4* and sporulation specific genes. "X" refers to a postulated repressor of the *IME4* gene (Shah and Clancy, 1992).

Granot et al., 1989; Matsuura et al., 1990; Kawaguchi et al., 1992)。また、栄養源情報は直接 *IME2*, *IME4* 遺伝子および孢子形成特異的遺伝子群にも伝達されている (Yoshida et al., 1990; Smith et al., 1990; Kihara et al., 1991; Kawaguchi et al., 1992; Shah and Clancy, 1992) (図 0-4)。

本研究では、実用酵母に対する新しい分子育種技術の開発を目的として、実験室株および清酒酵母協会7号を用いて、接合型制御および孢子形成制御のメカニズムについて解析を行った。第1章では実験室株を用いて接合型制御に関わる新しい遺伝子の検索を試み、 $\alpha2$ 抑制は正常であるが $a1$ - $\alpha2$ 抑制を欠損した *aar2* 変異を分離した。そして *AAR2* 遺伝子

が *MATa1* シストロンよりのイントロンを含む転写産物のスプライシングに関与することを明らかにした。第2章では、*S. cerevisiae* に多剤耐性を付与する *PDR4* 遺伝子が、真核生物の脂肪酸合成を阻害するセルレニンと組み合わせることにより、実用酵母を含む原栄養体の交雑および形質転換体取得のための優性選択符号として有用であることを述べる。また、この知見を応用して、原栄養体に対するクロスストリーク法による接合型判定系を構築した。第3章では、*PDR4* 遺伝子を優性選択符号とした形質転換系や第2章で開発した接合型判定系を利用して、協会7号の接合型制御機構が、構造的・機能的に正常な a/α 二倍体株と同様であることを明らかにした。また、この解析システムを応用して、協会7号および吟醸酒醸造酵母から実際に接合能を有する株を分離し、交雑体を造成した。第4章では、孢子形成開始を誘導する *IME1* 遺伝子を多コピーで協会7号に導入し、若干の孢子形成能の回復を観察した。また、協会7号の孢子非形成性は *IME1* 遺伝子の発現異常および *IME1* 遺伝子への栄養源情報の伝達経路の異常によることを明らかにした。総合考察では、本研究で開発した実用酵母の分子育種技術を総括し、その応用について考察した。

第1章 a1 転写産物のスプライシング欠損による a1- α 2 抑制不能変異株

第1節 緒言

醸造に用いられている実用酵母は接合能を示さず、また胞子形成能が弱いため、接合能を有する減数分裂分離株を得ることが困難である。従って、実用酵母においては菌株間の性的交雑による育種は難しい。*S. cerevisiae* の接合型制御機構において a/ α 細胞は α 2 抑制および a1- α 2 抑制により非接合型を示す (Herskowitz, 1988)。実用酵母の非接合型が α 2 抑制および a1- α 2 抑制によるならば、これらの抑制系を改変することにより、実用酵母に接合能を付与する可能性が考えられる。例えば、a/ α 細胞について、 α 2 抑制は機能しているが a1- α 2 抑制を失った状態にすれば細胞は α 型を示し、 α 1 および α 2 シストロンの発現あるいはタンパク質の機能を阻害すれば、細胞は a 型を示すと期待される。しかし、このためには α 2 抑制あるいは a1- α 2 抑制を阻害する、すなわち優性な欠損変異アレルをクローン化し、実用酵母に導入する必要がある。 α 2 抑制および a1- α 2 抑制に関与する遺伝子としては、*MATa*、*MAT α* および *AAR1* (Mukai et al., 1991) がすでに同定されており、これらの遺伝子の優性な欠損変異アレルをクローン化し、実用酵母に導入すれば接合能を付与することができるであろう。

本章では接合能を付与する技術を開発するための基礎的知見を得ようとした。 α 2 抑制は正常であるが、a1- α 2 抑制能を失った変異株の分離を試み *aar2* 変異株を分離した。この変異の解析により *AAR2* 遺伝子は a1 より転写産物に対するスプライシングに関与することを明らかにした。

第2節 実験材料および実験方法

供試菌株とプラスミド DNA

実験に用いた *S. cerevisiae* 菌株を表 1-1 に示した。プラスミドの構築とその DNA 調製のための大腸菌株は JA221 および MV1184 (Sambrook et al., 1989) を用いた。酵母低コピーベクターとして YCp50、多コピーベクターとして YRp7 と YEp24、染色体組み込みベク

Table 1-1 *S. cerevisiae* strains used

Strain	Mating type	Genotype ^a
SH682	a	<i>MATa lys1 trp3 ura1 ura2 pho3 pho5</i>
SH683	α	<i>MATα lys1 trp3 ura1 ura2 pho3 pho5</i>
SH1263	α	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112 trp1 his1-29 pho3-1 pho5-1</i>
SH1264	a	<i>MATa ura3-52::[ura3-52 HIS4 lacZ]^b leu2-3,112</i>
SH2645	Non	<i>MATa HMLα HMRA sir3::LEU2^c ura3 ade2-10^{ochre} leu2-3,112::[LEU2 MFα p-PHO5]³ trp1 his3Δ pho3-1 pho5-1</i>
SH2626	Non	<i>MATa HMLα HMRA sir3::LEU2 ura3 trp1 ilv1 pho3-1 pho5-1 leu2-3,112::[LEU2 MFα p-PHO5]</i>
SH2780	Non	<i>MATa HMLα HMRA sir3::LEU2 leu2-3,112::[LEU2 MFα p-PHO5] trp1::[TRP1 MATα]^d his3Δ pho3-3 pho5-1</i>
SH2780-m1	α	The <i>aar2-1</i> mutant of SH2780
SH2780-m2	α	The <i>aar2-2</i> mutant of SH2780
SH2925	Non	<i>MATa HMLα HMRA sir3::LEU2 ura3 ilv1 pho3-1 pho5-1 leu2-3,112::[LEU2 MFα p-PHO5] trp1::[TRP1 MATα]</i>
SH2926	Non	A SH2780 + SH2925 fusant
SH2926-t	Non	An <i>AAR2/aar2::URA3</i> heterozygous diploid clone derived from SH2926
SH2926-t-1C	α	<i>MATa HMLα HMRA sir3::LEU2 ura3 trp1::[TRP1 MATα] leu2-3,112::[LEU2 MFα p-PHO5] his3Δ ilv1 pho3-1 pho5-1 aar2::URA3</i>
SPJ 5.41	a	<i>MATa prp5-1^{ts} ura3-52 leu2-3,112 his3 his7</i>
YP149	α	<i>MATα ura3-52 trp1Δ lys2-801 ade1 ade2-10^{ochre}</i>

^a Genetic symbols are as described by Mortimer et al. (1992).

^b *ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ]* indicates a YIp plasmid bearing the *ura3-52* and *HIS4-lacZ* fusion DNA constructed and integrated at the *ura3-52* mutant locus by Lucchini et al. (1984)

^c A *sir3* locus disrupted by insertion of a *BglII-XhoI* *LEU2* fragment of *S.*

cerevisiae (Ivy et al., 1986)

^d Active *PHO5* gene connected with the promoter of an α -specific gene, *MfaI* (Kobayashi et al., 1990)

^e *trpI*:: [*TRP1 MAT α*] represents integration of plasmid p443 with homology to the *TRP1* DNA into a *trpI* mutant locus. Plasmid p443 was constructed by ligation of a 4.3-kbp *PvuI*-*Bam*HI fragment containing the *MAT α* gene, prepared from plasmid 2.5 with a 4.6-kbp *Puv*II-*Bg*II fragment containing the *TRP1* gene of YRp7.

ターとしてYIp5 (Parent et al., 1985)を用いた。*E. coli* 宿主を用いてのDNA断片の増幅のためのベクターにはpBR322を、一本鎖DNA調製のためにはpUC118とpUC119 (Sambrook et al., 1989)を用いた。*S. cerevisiae* DNAのバンクとしては、低コピーベクターであるYCp50の*Bam*HI 部位に、酵母GRF88株の染色体DNAを*Sau*3AIで部分分解して生じた断片を連結して作成されたバンク (Rose et al., 1987) を American Type Culture Collection (Rockville, Md., USA) より購入した。*MAT α* 遺伝子を含むプラスミド 2.5 (J. B. Hicks より分与) および *MAT α* 遺伝子を含むプラスミド DX (J. B. Hicks より分与) からの3.3-kbp *Eco*RI-*Hind*III DNA断片をYCp50の*Eco*RI-*Hind*III 部位に挿入し、それぞれプラスミドpYMC2およびpYMC3とした。ノーザン解析のプロープとして *ACT1* 遺伝子を含む1.0-kbp *Hind*III-*Xho*I DNAをプラスミドpYA301 (Gallwitz and Sures, 1980) から調製した。*MAT α* 遺伝子を含む1.1-kbp *Eco*RV DNA断片はプラスミド2.5から調製した。*MAT α* 2 遺伝子を含む0.8-kbp *Bam*HI-*Hind*III DNA断片を調製したp530は、以下のように構築した。合成オリゴヌクレオチド5'-CCCAAGCTTAGGAAGATAAGCAAGAAAAATG-3' と5'-CCCGGATCCATCTATCAGTTACAAACATCTTA-3' をプライマーとして、*MAT α* 遺伝子を含むプラスミドpKK24 (Harashima et al., 1989) を鋳型に用いたPCR法により753から1522までの領域 [Astellら (1981) の番号付けに従った] を増幅した。得られたPCR産物を*Bam*HIと*Hind*III二重消化後、pBluescript II KS⁺ (Stratagene, La Jolla, Calif., USA) の*Bam*HI-*Hind*III 部位に挿入した。*MAT α* 遺伝子を含む0.6-kbp *Bam*HI-*Hind*III DNA断片を調製したプラスミドp531も同様に構築した。合成オリゴヌクレオチド5'-CCCAAGCTTAGAAAAATCAAGAAGGACAACATG-3' と5'-CCCGGATCCCATTAATTATTCGTCACCACTCTA-3' をプライマーとして、M. Smithから分与されたイントロンのない*MAT α* を持つプラスミドYCpSN1-SN2 (Ner and Smith, 1989) を鋳型に用いたPCR法により1506から2132までの領域 [Astellら (1981) の番号付けに従った] を増幅した。その他のプラスミドについては図 1-1に示した。

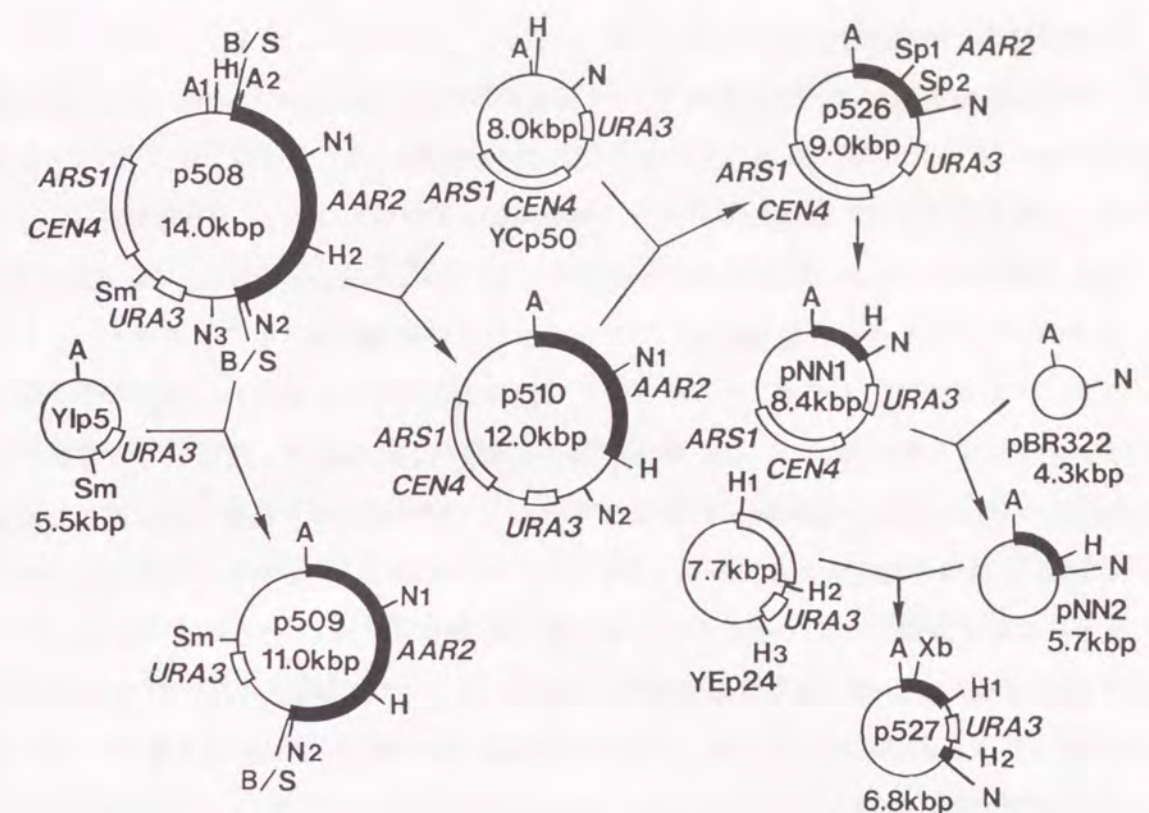


Fig. 1-1. Structures and strategy for construction of plasmids bearing the *AAR2* DNA. The procedures for construction or derivation of plasmids p508, p509, and p526 are described in the text. p510 was constructed by inserting a 4.0-kbp *Aat*II (₂)-*Hind*III (₂) fragment from p508 into the *Aat*II-*Hind*III gap of YCp50. p527 was constructed via two intermediate plasmids, pNN1 and pNN2. pNN1 was obtained by eliminating a 0.58-kbp *Sph*I (₁)-*Sph*I (₂) region from p526 and recircularized after the *Sph*I ends were changed to *Hind*III sites by digesting the overhanging 3' end to a blunt end with T4 DNA polymerase and connecting an 8-bp *Hind*III linker (Takara Shuzo). Then a 1.5-kbp *Aat*II-*Nru*I fragment of pNN1 was ligated with a 3.3-kbp *Aat*II-*Nru*I fragment of pBR322 to give plasmid pNN2. p527 was obtained by inserting a 1.1-kbp *Hind*III (₂)-*Hind*III (₃) fragment bearing the *URA3* gene from YEp24 into the *Hind*III site of pNN2. Restriction sites: A, *Aat*II; H, *Hind*III; N, *Nru*I; Sm, *Sma*I; Sp, *Sph*I; Xb, *Xba*I. B/S is the junction site of *Bam*HI and *Sau*3AI. Two or more identical restriction sites are distinguished by suffixes. Closed boxes indicate the *AAR2* DNA; open boxes represent various DNA fragments of *S. cerevisiae* chromosome other than the *AAR2* DNA. The thin lines indicate DNA fragment originating from pBR322.

使用培地と培養方法

酵母の完全培地には、YPD 培地 [1 literあたりYeast Extract (Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA) 10 g、ポリペプトン (日本製薬) 20 g、グルコース 20 g] を用いた。必要に応じてYPD 培地にアデニン (和光純薬) 0.4 g を加えたYPAD培地を用いた。酵母最少培地は1 liter あたりグルコース20 g と Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco) 6.7 g を含み、必要に応じてアミノ酸および核酸塩基 [トリプトファン、ヒスチジン、アルギニン、メチオニン、ウラシル (最終濃度 各 20 mg/l)、チロシン、ロイシン、イソロイシン、リジン、(各 30 mg/l)、バリン (150 mg/l)、フェニルアラニン (60 mg/l)、スレオニン (200 mg/l) およびアデニン (400 mg/l)] を加えた。高リン酸最少培地は1 liter あたりグルコース 20 g、アスパラギン 2 g、ビタミン混合液 [ピリドキシン、ニコチン酸、チアミン、パントテン酸 (各 200 mg/l)、イノシトール 10 g/l、ビオチン 20mg/l] 1 ml、高リン酸混合液 [KH_2PO_4 (6 g/l)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2 g/l)、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.32 g/l)、KI (0.4 mg/l)、B、Cu、Mn、Mo (各 0.04 mg 相当量/l)、Fe (0.2 mg 相当量/l)、Zn (0.28mg 相当量/l)] 250 mlを含み、必要に応じて上記濃度のアミノ酸および核酸塩基を加えた。細胞融合体選択上層培地は同下層培地1 literに BiTek-Agar (Difco) 30 gを加えて調製した。前孢子形成培地は1 literあたりグルコース50 g、Nutrient Broth (Difco) 30 g、Yeast Extract 10 gを加えて調製した。孢子形成培地は1 literあたりグルコース1 g、Yeast Extract 1.25 g、酢酸カリウム (和光純薬) 10 gを加えて調製した。子嚢解剖用フィルム培地は、上記のYPAD培地1 literに寒天 (和光純薬) 23 gを加えて調製した。

大腸菌の完全培地としては改変Luria-Bertani 培地 [LB培地; 1 literあたり Bacto tryptone (Difco) 10 g、Yeast Extract 5 g、NaCl 5 g (pH 7.0)] を、一本鎖DNA調整のためのMV1184株の培養には2×YT培地 [1 literあたりBacto tryptone 16 g、Yeast Extract 10 g、NaCl 5 g (pH 7.6)] を用いた。大腸菌の最少培地としては1 liter あたり Na_2HPO_4 6 g、 KH_2PO_4 3 g、NaCl 0.5 g、 NH_4Cl 1 g を含む溶液をオートクレーブ滅菌後、別に滅菌した10 mlの20% (W/V)グルコース、2 mlの1 M MgSO_4 および 0.1 mlの 1 M CaCl_2 を加えたM9培地を用いた。ビタミンB1は最終濃度1 mg/l、カザミノ酸は5 g/lおよびトリプトファン40 mg/lを必要に応じて加えた。アンピシリン (明治製薬) 75~150 $\mu\text{g/ml}$ 、テトラサイクリン (Sigma Chemical Company, St. Louise, Mo., USA) 15 $\mu\text{g/ml}$ 、カナマイシン (明治製薬) 70 $\mu\text{g/ml}$ 、クロラムフェニコール (和光純薬) 100 $\mu\text{g/ml}$ 、5-bromo

-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranoside (X-gal; 和光純薬) 40 $\mu\text{g/ml}$ およびiso-propyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG; ナカライテスク) 0.3 mM を必要に応じて加えた。平板培地を調製するときは、断らない限り1 liter あたり酵母用には20 g、大腸菌用には15 gの寒天を加えた。滅菌は1 kg/cm^2 、15 分間の条件でオートクレーブを用いて行った。酵母は30°Cで、大腸菌は37°Cで静置培養または振とう培養を行った。

遺伝学および分子遺伝学的方法

大腸菌の形質転換 Morrison の方法 (Sambrook et al., 1989) に従った。LB培地で37°C、一晚培養した培養液10 mlを1 literのLB培地に植菌し、600 nmにおける吸光度 ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) が 0.5~0.6 になるまで振とう培養を行った。氷中で冷却した培養液を0°Cで集菌 (8,000 rpm、5分) し、菌体を250 mlの0.1 M MgCl_2 水溶液で洗浄後、250 mlの0.1 M CaCl_2 水溶液に懸濁し氷中に20分間放置した。0°Cで集菌した後、菌体を42.5 mlの0.1 M CaCl_2 と7.5 mlのグリセロール混合液に懸濁し、コンピテント細胞とした。このコンピテント細胞は-80°Cで数カ月間保存可能である。菌体懸濁液0.2 mlにDNA溶液 (0.1~1 μg) を加え、37°Cで60分間静置培養した後、適当量を選択培地に塗布した。

酵母細胞の変異処理 変異剤にはethyl methanesulfonate (EMS, Sigma)を用いた (Rose et al., 1990)。YPD 培地で一晚振とう培養を行った3 mlの培養液から、酵母細胞を集菌 (2,000 rpm、5分) し、3 mlの0.2 Mリン酸緩衝液 (pH 8.0) に懸濁した。100 ml三角フラスコに7.5 mlの同緩衝液、0.5 mlの40% グルコース溶液、2 mlの酵母懸濁液、0.3 mlのEMSを加え、30°Cで45分間ゆっくり振とうする。菌体懸濁液1 mlを、約2 mlの無菌水で5回洗浄した。適当に希釈後、平板培地に塗布した。

接合による酵母雑種二倍体の造成 *S. cerevisiae* の雑種二倍体は、 α 型細胞とa型細胞の接合によって作成した (Rose et al., 1987)。交雑する α 型細胞とa型細胞をそれぞれ平板培地上に画線し一晚30°Cに放置し、新しいYPAD培地に画線が互いに90度で交差するように一枚のYPAD平板にレプリカした。30°Cで約12時間保温後、アミノ酸要求性などの選択培地にレプリカして、30°Cに一晚保温した。この選択培地上の交点で盛んな細胞増殖が見られれば、その細胞は雑種二倍体である。交点以外の部分が生育しないことを対照として確かめた。

子嚢解剖 前孢子形成培地で一晚生育させた二倍体細胞を孢子形成培地に移し、30°Cに2~4日間保温した。エタノールに浸したホールオブジェクトグラスをガスバーナーの炎

で滅菌した後、くぼみの中にZymolyase 100T (生化学工業) 溶液 (0.1 mg/ml) を一白金耳加え、そこに少量の子嚢形成培地から細胞をとり懸濁した。もう一枚の滅菌ホールオブジェクトグラスで覆い5~20分間室温に放置後、滅菌した大型カバーグラスに載せたフィルム培地 (12×25 mm) の端へ塗布し、これを湿室へ装着した。顕微鏡下で解剖機 (Cailloux micromanipulator Staelting Co. Ill., USA) により子嚢を分離し子嚢胞子を分けて2 mm 間隔に並べた。フィルム培地をYPAD培地上に移し、30℃で2~3日間保温した。

酵母の形質転換 Itoらによる酢酸リチウム法 (Rose et al., 1987) を用いた。酵母細胞を10 ml YPAD培地で対数増殖期まで振とう培養を行い、集菌 (2,000 rpm、5分) した。TE緩衝液 [10 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン-塩酸緩衝液 (Tris-HCl, pH 8.0)、1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA, pH 8.0)] で洗浄後、5 ml のLA溶液 [0.1 M 酢酸リチウム (和光純薬) を含む TE 緩衝液] に懸濁し、さらに 30℃ で1時間振とう培養を行った。集菌した菌体を5 ml のLAG溶液 [15% (v/v) グリセロールを含むLA溶液] に懸濁して形質転換実験の受容菌とした。0.3 ml の受容菌懸濁液に 1~10 µg のDNAと0.7 ml の 50% (w/v) ポリエチレングリコール4,000 (和光純薬) 水溶液とを加え、よく混合して30℃で1時間放置後、適量を選択培地に塗布した。

酵母の細胞融合 van Solingenとvan der Plaat (1977)の方法を一部改変して用いた。細胞融合を行う2菌株をそれぞれ5 ml のYPD培地で一晩振とう培養し、遠心分離により集菌後、4 ml の溶液A [0.01 M EDTA、1.2 M ソルビトール、0.1 M クエン酸三ナトリウム (和光純薬) (pH 5.8)] に懸濁した。集菌後、3.6 ml の溶液Aに懸濁し、Zymolyase 100T を1 mg/ml含んだ溶液Aを0.4 ml 加え、30℃で1時間保温した。集菌後、4 ml の溶液B [1.2 M ソルビトール、10 mM CaCl₂] で2回洗浄した。集菌後、0.2 ml の溶液Bに懸濁し、穏やかに1分間振とうした。2種の菌株をそれぞれ0.1 mlずつ混ぜ、これに2 ml の溶液C [20% PEG 4,000、10 mM CaCl₂、10 mM Tris-HCl (pH 7.0)] を加えた。対照として、それぞれ単独の菌株にも同様に2 ml の溶液Cを加えた。25℃で30分間保温後、集菌し、0.2 ml の溶液D (1.2 M ソルビトールを含む YPAD 培地) に懸濁し、30℃で20分間保温した。細胞融合体選択下層培地にそれぞれをまき、融解後46℃に保っておいた8 ml の上層培地を上から一面に注ぎ、30℃で2~4日間保温した。

酵母の接合型判定 *S. cerevisiae* の接合型は以下のようにして判定した。供試菌株が5株までのときは雑種二倍体の造成と同様にa型試験株 (SH682) とα型試験株 (SH683) をYPAD培地上で平行線上に一晩生育させておき、供試菌株と新しいYPAD培地上で交差する

ようにレプリカし接合させた。供試菌株が6株以上の場合は、a型試験株、α型試験株をそれぞれYPAD培地一面に生育させておき、供試菌株とレプリカにより新しいYPAD培地上でそれぞれを接触させた。30℃で約12時間保温後、アミノ酸要求性などの選択培地にレプリカし、30℃で一晩保温した。選択培地上でa型試験株との組み合わせで増殖した菌株をα型、α型試験株との組み合わせで増殖した菌株をa型、どちらの試験株との組み合わせでも増殖しなかった菌株を非接合型と判定した。

生化学的方法

フェノールまたはフェノール・クロロホルム処理によるタンパク質の除去 (フェノール抽出) 核酸を含む溶液に、TE緩衝液 (pH 8.0) で飽和させたフェノールを等容量加えて混合後、遠心分離 (12,000 rpm, 1分; Tomy MC15A Microfuge) した。界面のタンパク質を残して水相 (上層) を回収した。場合に依りて、フェノールの代わりにフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25:24:1, v/v) 混合液を用いた。

エタノールによる核酸の沈澱 (エタノール沈澱) 核酸を含む溶液に最終濃度0.3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を加え、さらに2倍容量の冷却しておいた99% エタノールを加えて混合し、-80℃ 10分間の冷却によって沈澱を形成させた。遠心分離 (12,000 rpm, 10分; Tomy MC15A Microfuge または 12,000 rpm, 15分; 久保田 Model KR-200A RA-3 ローター) により核酸の沈澱を回収した。沈澱を70% エタノールで洗浄した後、減圧下で乾固させた。

大腸菌からのプラスミドDNAの大量調製 大腸菌からのプラスミドDNAの大量調製は、Clewll と Helinskiの方法 (塩化セシウム-臭化エチジウム 平衡密度勾配遠心分離法; Sambrook et al., 1989) に従った。抗生物質を含むLB平板培地で一晩培養を行った菌体を一白金耳程度かきとり、同液体培地5 mlに植菌した。3~4時間の振とう培養後、培養液をカザミノ酸 5 g/l、トリプトファン 20 mg/l を含むM9 培地 150 mlに植菌して振とう培養を行い、培養液のOD_{600nm} が0.8に達したときに、最終濃度が100 mg/lとなるようにクロラムフェニコールを添加し、さらに16時間培養を続けた。4℃で集菌 (8,000 rpm 5分; 久保田 Model KR-200A, RA-6 ローター) し、25% (w/v) スクロースを含む50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 2.1 ml に懸濁した。同緩衝液に10 mg/mlの濃度で溶かしたリゾチーム (Sigma) 溶液 0.2 mlを加えて混合した後、氷上で10分間放置

した。0.5 M EDTA (pH 8.0) 溶液 0.2 ml を加え、さらに氷上で 5 分間放置した。この溶液に 62.5 mM EDTA、2% (v/v) Triton X-100 (和光純薬) を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 1.6 ml を加えて溶菌させた後、0°C で遠心分離 (27,000 rpm, 2 時間; 日立 Model 55P-7, RT65-T ローター) し、上澄液を得た。上澄液 2.88 ml に対し、塩化セシウム 2.88 g、0.32 ml の 5 mg/ml 臭化エチジウム水溶液を加え、分離用遠心管 (3.5 PA シールチューブ; 日立計測器サービス) に塩化セシウム溶液を移して熱シールした後、18°C で遠心分離 (99,000 rpm, 4.5 時間; 日立 Model 55P-7, RPV65T ローター) した。遠心分離後、紫外線照射によりみられるプラスミド DNA 層を注射器 (テルモシリンジ; テルモ) により抜き取り、シリコン処理した Corex 遠心管に移した。得られた DNA 試料に対して 2 倍容量の水を加えてエタノール沈澱した後、フェノール抽出、エタノール沈澱を繰り返した。RNase 処理 (最終濃度 10 µg/ml, 30 分) の後、再度フェノール抽出、エタノール沈澱を行った。DNA の沈澱を約 400 µl の TE 緩衝液に溶解し、OD_{260nm} 値を測定した後、DNA 試料として種々の操作に用いた。

大腸菌からのプラスミド DNA の迅速調製 少量のプラスミド DNA を簡便に調製するには、Birnboim と Doly によるアルカリ変性法 (Sambook et al., 1989) を行った。抗生物質を含む LB 培地で一晩培養を行った大腸菌体をエッペンドルフチューブに取り、0.1 ml の第 I 液 [50 mM グルコース、10 mM EDTA、25 mM Tris-HCl (pH 8.0)] に懸濁した。氷上 5 分間放置後、0.2 ml の第 II 液 [0.2 N NaOH、1% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS; 和光純薬)] を加え、氷上で 5 分間放置して溶菌させた。0.15 ml の第 III 液 [100 ml あたり 5 M 酢酸ナトリウム 60 ml, 酢酸 11.5 ml] を加えて攪拌し、15 分間氷中に放置した後、遠心分離 (12,000 rpm, 10 分; Micofuge MC15A) を行い、核酸を含む上澄液を新しいエッペンドルフチューブに移した。フェノール抽出とエタノール沈澱を行い、沈澱を 10 µg/ml RNase A (Sigma) を含む TE 緩衝液 50 µl に溶解し、DNA として種々の操作に使用した。

一本鎖 DNA の調製 Vieira と Messing の方法 (Sambook et al., 1989) を一部改変して行った。調製したい一本鎖 DNA に対応する二本鎖 DNA 断片を、プラスミドベクター pUC118 または pUC119 のマルチクローニング部位に挿入したプラスミドを、大腸菌 MV1184 に導入した。この導入株を 150 µg/ml のアンピシリンを含む 2×YT 培地で飽和するまで培養した。30 µl の培養液に 30 µl のヘルパーファージ M13K07 懸濁液 (約 10¹⁰ pfu/ml) を加え、37°C で 30 分間静置感染させた。この感染液を 150 µg/ml のアンピシリンと 70 µg/

のカナマイシンを含む 3 ml の 2×YT 培地に加え、37°C で 14~18 時間通気の良い条件で培養した。培養液をエッペンドルフチューブに移し、12,000 rpm、10 分間の遠心分離後、上澄液を新しいエッペンドルフチューブに移した。再度遠心分離後、上澄 1 ml だけを新しいエッペンドルフチューブに移し、200 µl の PEG 溶液 (20% PEG 6000、2.5 M NaCl) を加え、ヴォルテックスミキサーで攪拌後、氷中に 30 分間放置した。12,000 rpm、10 分間の遠心分離により上澄液を取り除き、再度遠心分離により残った上澄液をできる限り取り除いた。白色沈澱を 200 µl の TE 緩衝液に懸濁し、150 µl の TE 緩衝液飽和フェノールを加え、30 秒間攪拌後、50 µl のクロロホルムを加え、さらに 30 秒間のヴォルテックスミキサーによる攪拌を行った。12,000 rpm、5 分間の遠心分離後、上澄液を新しいエッペンドルフチューブに移し、再度フェノールとクロロホルムによるタンパク除去を行った。600 µl のジエチルエーテル (和光純薬) を加え、30 秒間攪拌後、10 秒間の遠心分離により上澄液を取り除いた。エタノール沈澱後、20 µl の TE 緩衝液に懸濁して一本鎖 DNA 試料とした。

酵母染色体 DNA の調製 Herford らの方法 (Rose et al., 1987) を一部改変して用いた。10 ml の YPAD 培地に酵母菌体を植菌し、定常期に達するまで一晩振とう培養を行った。2,000 rpm、5 分間の遠心分離で集菌後、0.5 ml の溶液 A [0.2 M Tris (pH 非調整)] に懸濁し、エッペンドルフチューブに移した。原液の β-mercaptoethanol (和光純薬) 25 µl を加え、25°C で 30 分間放置した。12,000 rpm、10 秒間の遠心分離で集菌後、0.5 ml の溶液 B [0.8 M ソルビトール、0.04 M K₂HPO₄ 緩衝液 (pH 6.8; 和光純薬)、1.25 mg/ml Zymolyase 100T] に懸濁し、30°C で 1 時間保温した。集菌後、0.5 ml の溶液 C [50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.2 M NaCl、0.1 M EDTA、5% SDS] を加えてすぐに 1 mg/ml のプロナーゼ E (アクチナーゼ E; 科研工業) 水溶液 5 µl を加え、白金耳で菌体をゆっくり攪拌し、60°C で細胞破片が消えるまで保温した。2 回のフェノール抽出、エタノール沈澱を行った後、約 300 µl の TE 緩衝液に溶解させて DNA 試料とした。

酵母の全 RNA の調製 Jenesen らの方法 (Rose et al., 1987) を一部改変して用いた。10 ml の適当な培地に酵母培養液を 2% 植菌して 30°C で OD_{600nm} が 0.9 になるまで振とう培養を行った。集菌後、5 ml の無菌水で洗浄し、0.3 ml の破碎用緩衝液 [0.5 M NaCl、1% (w/v) SDS、0.2 M Tris-HCl (pH 7.5)、0.01 M EDTA] に懸濁し、新しいエッペンドルフチューブに移した。0.6 g のガラスビーズ (フジストン No. 006; φ 0.25-0.3 mm, 富士理科工業)、および 0.3 ml のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25:24:1, v/v) 混合液を加え、ヴォルテックスミキサーで 2 分 30 秒間破碎した。12,000 rpm、5 分間

の遠心分離後、再度上澄液についてのフェノールで除タンパク質を行った。0.05% (v/v) diethyl pyrocarbonate (DEPC; Sigma) を含む99%エタノールを加え、-20°Cで一晩核酸を沈澱させた。0.05%DEPCを含む70%エタノールでの洗浄、減圧乾固後、得られた核酸沈澱を1% DEPC を含む無菌水150 μ lに懸濁し、酵母全RNA試料とした。

酵素反応 制限酵素は宝酒造またはニッポンジーンから購入した。その酵素反応は、添付された緩衝液中で、いずれも37°Cで1時間以上行った。DNA連結反応は、約1 μ gのDNAを含むライゲーション緩衝液[66 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM ATP, 1 mM spermidine (Sigma), 0.01 M MgCl₂, 15 mM dithiothreitol (DTT; Sigma), 0.2 mg/ml bovine serum albumin (BSA; Sigma)] 中で10単位のT4 DNAリガーゼ(宝酒造)を加え、16°Cで3時間以上行った。制限酵素切断による5' 突出末端の平滑化は、約1 μ g DNAを含む反応液[50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 0.1 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)] 中で、1単位のKlenow fragment(宝酒造)を加え、25°Cで1時間の反応により進めた。3' 突出の平滑化には、Klenow fragmentの代わりにT4 DNA polymerase(宝酒造)を用いた。DNAの5' 末端リン酸基の切断反応は、約1 μ g DNAを含む付属緩衝液中で、1単位のcalf intestine由来alkaline phosphatase (CIP; 宝酒造)を加え、37°Cで1時間行った。反応停止にはフェノール抽出を用いた。

アガロースゲル電気泳動 Tanaka らの方法(Sambrook et al., 1989)に従った。3 mm 厚の0.6~2% (w/v) アガロース(Agarose L03; 宝酒造)サブマリン型スラブゲルを使用し、10×TAE緩衝液[0.4 M Tris-酢酸緩衝液(pH 7.4), 0.2 M 酢酸ナトリウム, 10 mM EDTA] を使用前に希釈して用いた。試料は通常、DNA溶液に1/6 容量の泳動用染色液[40% (w/v) スクロース, 0.25% (w/v) ブロモフェノールブルー(BPB), 0.25% (w/v) キシレンシアノール]を加えて調製した。定電圧100 Vで泳動後、ゲルを臭化エチジウム溶液(5 μ g/ml)で染色し、トランスイルミネーター(Ultra Violet C62)でDNAバンドを観察した。写真はUVフィルター(Kenko SL-39)および赤色フィルター(Kenko R-60)を用い、ポラロイドカメラ(MP-4)でフोटラマ PB3000 フィルム(富士フィルム)によって撮影した。DNA断片の分子量の推定にはcI857S7ファージDNA(宝酒造)のHindIII切断断片(23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0 および 0.6 kbp)を標準にした。

ホルマリン変性アガロースゲル電気泳動 RNA試料の電気泳動には通常1.5% アガロース濃度のゲルを用いた(Sambrook et al., 1989)。100 mlの1.5% ホルマリン変性アガロースゲルを調製する場合、1.5 gのアガロース粉末を74 mlの0.1% DEPC 水に加えて

融解後、固まる前に10 mlの10×MOPS 緩衝液[0.2 M MOPS (3N-Morpholino) propane sulfonic acid, 和光純薬], 50 mM 酢酸ナトリウム(pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.02% (v/v) DEPC]と16 mlのホルムアルデヒド(和光純薬)を加えてゲル型に流し込んだ。電気泳動は、ホルマリン変性アガロースゲル電気泳動用緩衝液[1×MOPS, 16% (v/v) ホルムアルデヒド, DEPC 水で調製した]を用い、定電圧50 Vで行った。電気泳動用試料は、RNA溶液2 μ lに対して、1 μ l 10×MOPS、2 μ l ホルムアルデヒド、5 μ l ホルムアミド(カラムクロマトグラフ用、ナカライテスク)、1 μ l 臭化エチジウム水溶液(0.4 mg/ml)を加えて調製し、65°C、15 分間の加熱後、すぐに1 μ lの泳動用染色液を加えて電気泳動に用いた。

ポリアクリルアミド電気泳動 Maniatisらの方法(Sambrook et al., 1989)に従った。適当量の30% (w/v) アクリルアミド混合液(100 ml に対してアクリルアミド 29 g, N,N'-メチレン-ビス1 g)、20 mlの5×TBE緩衝液[1 literあたりTris 54 g, ホウ酸27.5 g, 0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 ml] および20 mg/mlの過硫酸アンモニウム水溶液5 mlに脱イオン水を加え、全量を100 mlとした。この混合液を減圧下で脱気し、100 μ lのN-N'-N'-tetramethylethylenediamine (TEMED; ナカライテスク)を加え、ゲルを重合させた。試料は、DNA溶液に1/6 容量の泳動用染色液を加えて調製した。15 分程度の予備泳動後、核酸試料を定電圧(5 V/cm 以下)で泳動した。泳動後の操作はアガロースゲル電気泳動の場合と同様に進めた。DNA断片の分子量の推定にはプラスミドベクターpBR322のHpaII切断断片を標準にした。

尿素変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 6% ポリアクリルアミド溶液は、アクリルアミド 3.42 g、N,N'-メチレン-ビス 0.18 g、尿素 25.2 g、5×TBE 緩衝液 12 mlをそれぞれ混合し、それに脱イオン水を加え全量が60 mlとなるように調製した。この溶液をろ過後、30分間脱気し、60 mg/ml過硫酸アンモニウム溶液を0.6 mlおよび25 μ lのTEMEDを加えて重合させた。なお泳動には、200×400×0.35 mmのガラス板(宝酒造)を用い、泳動は1×TBE 緩衝液で30 分程度の予備泳動後、約65°Cに保つように定電圧(1,500~2,500 V)または定電力(約46 W)で行った。泳動後、ゲルを濾紙(type 3MM; Whatman)に移し、ゲルの反面をサララップで被い、ゲルドライヤー(アトー)を用いて75~80°Cで30分間以上乾燥させた。X線フィルム(Kodak XOMatRP; Eastman Kodak Company, N.Y., USAまたはRXO-H; 富士フィルム)を用いて室温または-80°Cでオートラジオグラフィーを行い、現像と定着はX線フィルムプロセッサ(Model FPM60; 富士写真フィルム)を使用

した。定着を終えたフィルムは、流水で30分間洗浄後、乾燥して結果を観察した。

電気泳動ゲルからのDNA断片の抽出 プレップAジーンDNA精製キット (Bio-Rad) を用い、その使用説明書に従った。アガロースゲル電気泳動後、臭化エチジウム水溶液により染色し、トランスイルミネーター上で目的のDNA断片をカミソリの刃で切り出してエッペンドルフチューブに移した。切りだしたゲル0.1 ml容量に対して0.3 mlの binding bufferを加え、50°Cの水浴中でゲル片が溶解するまで保温した。1 μ gの試料DNAに対して5 μ lのmatrixを加えよく混合し、室温で5分間以上放置して試料DNAをmatrixに吸着させた。12,000 rpm、5秒間の遠心分離後、上澄液を捨て、300 μ lのbinding bufferに懸濁し遠心分離後上澄み液を取り除いた。同じ操作をwash bufferで3回繰り返し、最後の洗浄の時できるだけwash bufferを取り除いた。沈澱を10 μ lのelution bufferに懸濁して、50°Cの水浴中5分間の保温によりDNAを溶出した。12,000 rpm、30秒間の遠心分離により上澄を新しいエッペンドルフチューブに移した。DNA回収率を上げるために、沈澱に10 μ lのelution bufferを加え、再度DNAを溶出し先のDNA溶液と合わせてDNA試料とした。

DNAの³²P 標識 (マルチプライム法) ハイブリダイゼーション実験におけるプローブDNAの³²Pによる標識は、Random Primer DNA Labeling Kit (宝酒造) を用い、その使用説明書に従った。標識するDNA試料 (25 ng) 12 μ lに対してrandom primer 2 μ lを加え、95°Cで3分間加熱後、氷中で5分間急冷した。 $\times 10$ buffer 2.5 μ l、dNTP 混合液 2.5 μ l、[α -³²P] dCTP (>3000 Ci/mmol; ICN) 5 μ l、Klenow fragment 1 μ lを混合し、37°Cで3時間標識反応を行った。DNAとして取り込まれなかった[α -³²P] dCTPを取り除くためにNICK Column (Pharmacia) を用いて標識したDNAプローブを精製した。カラム中の緩衝液を捨てて、3 mlのTE緩衝液で平衡化したカラムに標識したDNA溶液を加え、400 μ lずつTE緩衝液を加えることにより分画した。放射能活性のピーク (2本目の画分) をガイガーカウンターで確認して、95°C、5分間の煮沸後、氷中で急冷した溶液をハイブリダイゼーション反応の標識プローブとして用いた。

³²P DNAの5'末端標識 プライマー伸長実験におけるプライマーDNAの³²Pによる標識は、DNA 5'末端標識キット (宝酒造) を用い、その使用説明書に従った。標識するDNA試料 (5 pmol 以下) 14 μ lに対して5 $\times$ exchange buffer 5 μ l、[γ -³²P] ATP (10 mCi/ml) 5 μ lおよびT4 PNK (10 U/ μ l) 1 μ lを加え、37°Cで30分間保温した。70°Cで5~10分間加熱して酵素を失活させた。10 μ lの7 M 酢酸アンモニウムを加え、

さらに87.5 μ l (2.5 倍量) の冷エタノールを加え、-20°Cで30~60分間保冷した。12,000 rpmで10分間遠心して沈澱を回収し、70%の冷エタノールで2回洗浄した。脱気乾燥した後、50 μ lの無菌水に溶解しプライマー伸長実験のプライマーとして用いた。

ゲルからのメンブレンフィルターへのDNAおよびRNAの転移 Southernの方法 (Sambrook et al., 1989) に従った。DNAを泳動したアガロースゲルを10分間室温で0.25 N HCl溶液に浸した後、アルカリ変性液 (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) に30分間浸してDNAを変性させ、さらに中和液 [3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.5)] に30分間ゲルを浸した。20 $\times$ SSC溶液 (1 $\times$ SSCは0.15 M NaCl, 0.015 M クエン酸ナトリウム) を入れたトレイに2枚のシャーレを台として置き、その上にガラス板を載せた。両端が20 $\times$ SSC溶液に浸るように濾紙 (type 3MM) を2枚置き、その上にゲルを載せた。ゲルと同じ大きさに切ったメンブレンフィルター (Biodyne; Pall, N.Y., USA) をゲル上に気泡がはいらないように載せ、さらにメンブレンフィルターより2~3 mmずつ小さく裁断した濾紙を3枚載せた。その上にペーパータオルをゲルと接しないように約15 cm高に積み、約1 kgの重しを載せた。一晩のプロットングの後、メンブレンフィルターをゲルから剥し、2 $\times$ SSC溶液で軽く洗浄後、80°Cで2時間焼き付けた。ホルマリン変性アガロースゲル中のRNAの転移は、アルカリ変性および中和処理を省いた。

ハイブリダイゼーション サザンハイブリダイゼーションは、DNAを固定したフィルターを、100 °Cで5分間煮沸後、氷上で急冷したハイブリダイゼーション溶液 I [5 $\times$ Denhardtの緩衝液 (100 $\times$ Denhardtの緩衝液; 2% (w/v) Ficoll, 2% (w/v) polyvinyl prolidone, 2% (w/v) BSA, 5 $\times$ SSPE (20 $\times$ SSPE; 3.6 M NaCl, 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 8.3), 20 mM EDTA, 0.2% SDS, 500 μ g/ml calf thymus DNA; フィルター 100 cm² あたり4 ml] に浸し、プラスチック袋に入れて熱シールした。水で濡らしたペーパータオルでプラスチック袋を包み、65°Cで1時間以上予備ハイブリダイゼーションを行った。その後、プラスチック袋の溶液を半分捨てて、標識したプローブを加えて熱シールを行った。濡らしたペーパータオルで包んだプラスチック袋をさらにプラスチック袋で包み、65°Cで一晩ハイブリダイゼーション反応を行った。フィルターをプラスチック袋から取り出し、洗浄緩衝液A (2 $\times$ SSC, 0.1% SDS) で軽く洗浄後、250 mlの洗浄緩衝液Aで振とうしながら室温で15分間の洗浄を4回繰り返した。さらに、250 mlの洗浄緩衝液B (0.1 $\times$ SSC, 0.1% SDS) で50°Cに保温しながら30分間の洗浄を2回繰り返した。フィルターを濡らした状態のままサランラップで包み、紙に固定した。この紙をカセットに入れ、その上にX線フィルムを、

さらに必要ならば増感紙を装着し、 -80°C で感光した。現像と定着は、X線フィルムプロセッサーを用いた。定着を終えたフィルムは、流水で30分間洗浄後、乾燥して結果を観察した。ノーザンハイブリダイゼーションではハイブリダイゼーション溶液Ⅰの代わりにハイブリダイゼーション溶液Ⅱ [$5\times$ Denhardtの緩衝液, $5\times$ SSC, 0.1% SDS, 50 mMリン酸緩衝液 (pH 6.5), 250 $\mu\text{g/ml}$ calf thymus DNA, 50% ホルムアミド] を用い、ハイブリダイゼーション温度は 42°C で行った。洗浄、感光、現像および定着はサザンハイブリダイゼーションと同様に行った。

DNA塩基配列の決定 Sanger らの方法(Sambrook et al., 1989)を改変したSequenase シーケンシングキット (United States Biochemical; Ohio., USA) を用いた。7 μl の一本鎖DNA溶液 (約1 pmolを含む)、1 μl のプライマーDNA (0.5 pmol/ μl) および2 μl の $5\times$ シーケンシング緩衝液 [200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 100mM MgCl_2] とを混合し、 65°C で15分間加温後、室温に放置して徐々に冷却し対合させた。この一本鎖 DNAプライマーDNA混合液に、1 μl の0.1 M DTT, 2 μl の適当に希釈したラベリング混合液 [各7.5 μM の dGTP, dATP, dTTP]、0.5 μl の [α - ^{32}P] dCTP (>3000 Ci/mmol) および2 μl のSequenase 溶液を加え混合し、 37°C で5分間反応させた。この反応液3.5 μl ずつを、2.5 μl の4種塩基に対応する停止液 [各80 μl の dGTP, dATP, dTTP, dCTP, 50 mM NaClおよび8 μM のddNTP (ddGTP, ddATP, ddTTPまたはddCTP)] と混合し、さらに同温度で5分間伸長反応後、4 μl の反応停止液 [95% (v/v) ホルムアミド, 20 mM EDTA, 0.05% (w/v) キシレンシアノール, 0.05% (w/v) プロモフェノールブルー] を加えて反応を停止させ、 95°C 、2分間加熱後、直ちに得られた4種の反応液 2 μl ずつを尿素変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した。

プライマー伸長法 Domdey らの方法 (Sambrook et al., 1989) に従った。サンプルRNA 10 μg と $10^4\sim 10^5$ cpmのDNAプライマーを混合し、1/10量の3 M酢酸ナトリウム (pH 5.2) と2.5倍量の冷エタノールを加え、 -20°C で30分間放置した。12,000 rpmで10分間遠心し、上澄液を除いて70% 冷エタノールを加え、12,000 rpmで2分間遠心し、上澄液を除き乾固させ、40 $\sim$ 50 μl の無菌水に溶解し再度乾固させた。30 μl のhybridization buffer [40 mM PIPES (pH 6.4), 1 mM EDTA (pH 8.0), 0.4 M NaCl, 80% formamide] に完全に溶解し、 85°C で30分間保温した後、 42°C で8 $\sim$ 12時間保温し対合させた。170 μl の無菌水と400 μl の冷エタノールを加え、 0°C で1時間放置した後、12,000 rpmで15分間遠心した。70%の冷エタノールを加え遠心分離後、上澄液を捨てて乾固した。20 μl の

revers transcriptase buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 60 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM dNTP, 1 mM dithiothreitol, 1 unit/ μl placental RNase inhibitor, 50 $\mu\text{g/ml}$ actinomycin D] に溶解し、10 単位のrevers transcriptase (宝酒造) を加え、穏やかに充分混合し遠心して気泡を除き 37°C で2時間保温した。1 μl の0.5 M EDTA (pH 8.0) と1 μl のDNase-free pancreatic RNase (5 $\mu\text{l/ml}$) を加え、 37°C で30分間保温した。150 μl の0.1 M NaClを含むTE緩衝液 (pH 7.6) と200 μl のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール混合液を加えヴォルテックスミキサーで30秒間攪拌した後、12,000 rpmで5分間遠心した。上層を新しいエッペンドルフチューブに移し、500 μl の冷エタノールを加え充分に混合し、12,000 rpmで5分間遠心した。上澄液を捨てて、70%の冷エタノールを加え、再度遠心し上澄液を捨て乾固させた。10 μl のloading buffer [80% formamide, 10 mM EDTA (pH 8.0), 1 mg/ml xylene cyanol FF, 1 mg/ml bromophenol blue] と2.5 μl の50 mM NaOH を加え、 42°C で15分間保温した。 95°C で5分間保温し直ちに氷上に移し急冷し、全量を尿素変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した。

合成オリゴヌクレオチド プライマー伸長実験のプライマーとして *MATa* 転写産物に対しては 5'-TAGATCTCATACGTTT-3' (Astell ら [1981] による塩基番号 2007から 1992までの *MATa* 遺伝子の塩基配列) を *ACT1* 転写産物に対しては 5'-AACCGTTATCAATAACCAAA-3' (GallwitzとSeidel [1980] による塩基番号+346から+327までの *ACT1* 遺伝子の塩基配列) を合成機 (Gene Assembler Plus; Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) で合成した。

寒天平板上における酸性ホスファターゼ活性の検出 Toh-eとOshima (1974) の方法に従った。 α -ナフチルリン酸 (Sigma) 5 mg, Fast Blue Salt B (Merck, Darmstadt Germany) 50 mg を含む5 mlの0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に、50 mgの寒天を5 mlの脱イオン水に加熱融解した溶液を加えて混合した後、平板培地のコロニー上に重層した。酸性ホスファターゼを産生しているコロニーは、ジアゾカップリング反応によって赤色を呈する。

第3節 結果

第1項 $\alpha 1-\alpha 2$ 抑制欠損変異株の分離

$\alpha 2$ 抑制は正常であるが $\alpha 1-\alpha 2$ 抑制が欠損した変異株の分離を試みた。目的の変異株を効率よく分離するために、SH2780株 (*MATa HML α HMR α sir3::LEU2 leu2-3, 112::[LEU2*

MFα [p-*PH05*] *trp1::[TRP1 MATα]* *his3Δ pho3-1 pho5-1 ura3*) を造成した。この菌株では *MATa* および *trp1* 遺伝子座に組み込まれた *MATα* の発現に加え、*SIR3* 遺伝子が破壊されているため *HMLα* と *HMRa* が発現する。その結果 *a* および α 遺伝子が 2 コピーずつ存在し、接合能を示さない。また染色体上の酸性ホスファターゼ遺伝子 (*PH03*, *PH05*) が欠損し、*leu2* 遺伝子座には α 型特異的遺伝子群の一つで α -ファクターをコードする *MFα1* 遺伝子のプロモーター部に抑制性酸性ホスファターゼをコードする *PH05* 遺伝子の構造部を連結した *MFα* [p-*PH05*] 融合遺伝子 (Kobayashi et al., 1990) が組み込まれている。SH2780 株は *a1-α2* 抑制により $\alpha1$ シストロンの発現が抑制され、 α 型特異的遺伝子群および *MFα* [p-*PH05*] 融合遺伝子は発現しない。そのためコロニーは酸性ホスファターゼ (以下 APase) 活性染色により染色されない (白色)。もしこれらの細胞で $\alpha2$ 抑制は正常で *a1-α2* 抑制にだけ欠損が起れば、 $\alpha1$ シストロンの転写抑制が解除され α 型特異的遺伝子群だけが発現するため接合型は α 型となり、その細胞のコロニーは APase 活性染色により赤色 (APase⁺) を示すと期待した。

SH2780 株を EMS によって変異処理後、YPAD 培地に塗布し、30°C で 2~3 日間保温した。約 20,000 コロニーのうち、APase 活性染色でピンク色または赤色を呈したコロニーを選択し、接合型試験を行って、 α 型を示す 11 株を分離した。*MATα*, *MATa*, *AAR1* あるいは他遺伝子における変異の可能性を調べるために、*MATα*, *MATa* および *AAR1* 遺伝子を持つプラスミド pYMC2, pYMC3 および pYMC5 (Mukai et al., 1991) をそれぞれ変異株に導入し、得られた形質転換体について APase 活性染色を行った。9 株は 3 つの遺伝子のうちのいずれかで表現型が抑圧されたが、11 株のうち 2 株はなお赤色を示した。これら 2 株をそれぞれ SH2780-m1 および -m2 とした。どちらの株も α 接合能は野生型株よりも弱く、YPAD 培地上での生育は遅かった。

SH2780-m1 および -m2 と SH2646 (*MATa HMLα HMRa sir3::LEU2 MFα* [p-*PH05*]) とを細胞融合させた。得られた二倍体は、接合能を示さず APase 活性染色で白色を示したので、これらの変異は劣性と判断した。SH2870-m1 と SH2646 との融合体を孢子形成させ、9 個の子囊の四分子分析を行ったところ、非接合型と α 型および APase 活性染色がそれぞれ 2 : 2 に分離し、 α 型を示す減数分裂分離株のコロニーは、全て APase 活性染色で赤色を示した。生育遅延の表現型は、 α 型および APase 活性染色によるコロニーの赤色表現型と共に分離した。これらの結果より、SH2780-m1 と -m2 株に生じた変異は核性の単一遺伝子に起こった変異であると結論した。

SH2780-m1 と -m2 間で相補性試験を行うために、SH2780-m1 と SH2646 との融合体の四分子分離株の中から、 α 型で APase 活性染色で赤色を示し、His⁺, *Ilv⁺* 要求性を示す減数分裂分離体を選択し、SH2780-m2 (*his3*, *Ilv⁺*) と細胞融合した。得られた融合体は α 型で、APase 活性染色でそのコロニーが赤色を示したので、これら 2 株の変異は相補しないと判断し、SH2780-m1 および SH2780-m2 株が持つ変異アレルは同一遺伝子に属し、それぞれ *aar2-1* および *aar2-2* (*a1-α2* repression) とした。

第 2 項 AAR2 遺伝子のクローニング

AAR2 遺伝子のクローニングを行うために、*S. cerevisiae* 遺伝子ライブラリー YCp50 "CEN BANK" A の DNA を *aar2-1* 変異株に導入し、正常な生育を示す Ura⁺ 形質転換体 4 株を得た。これらの形質転換体は非接合型で、APase 活性染色で白色を示したので、*aar2* 変異が示す 3 つの表現型が全て抑圧されたと判断した。これらの形質転換体の一つから調製した DNA 試料を用いて、大腸菌をアンピシリン耐性に形質転換し、この形質転換体からプラスミドを回収した。回収したプラスミドを *aar2-1* 変異株に再び導入したところ、形質転換体はすべて非接合型で APase 活性染色で染まらなかった。以上の結果より、この酵母形質転換体は示す Aar2⁺ 表現型は、プラスミド上の情報により与えられていると判断した。すなわち、回収されたプラスミドは *aar2* 変異を相補する DNA 断片を含むと結論し p508 (図 1-1) と名付け以下の解析に用いた。

プラスミド p508 上の *aar2* 変異を相補する DNA 断片が *aar2* 変異の抑圧変異を含む断片ではなく、真の *AAR2* 遺伝子を含むことを確認するために組み込みマッピングを行った。p508 上の *AatII* (2) - *SmaI* 8.0-kbp 断片を組み込みベクター YIp5 に連結したプラスミド p509 (図 1-1) を作成した。p509 の酵母 DNA 挿入断片内に 1 箇所だけ存在する *HindIII* で切断後、SH2780-m1 株に導入した。Ura⁺ 形質転換体を SH2646 と細胞融合し、細胞融合体を四分子分析にかけた。14 個の子囊を解剖した結果すべての四分子が正常に生育し、非接合型、APase 活性染色で白色を示したので、プラスミド p509 は *AAR2* を含むと結論した。酵母菌株 YP149 の染色体 DNA を orthogonal-field-alternation gel electrophoresis (OFAGE) により分離し、プラスミド p508 より調製した 2.0-kbp *AatII* (2) - *NruI* (1) DNA 断片をプローブとしてサザン解析を行った。その結果、*AAR2* 遺伝子は第 II 番染色体上に存在すると結論した。

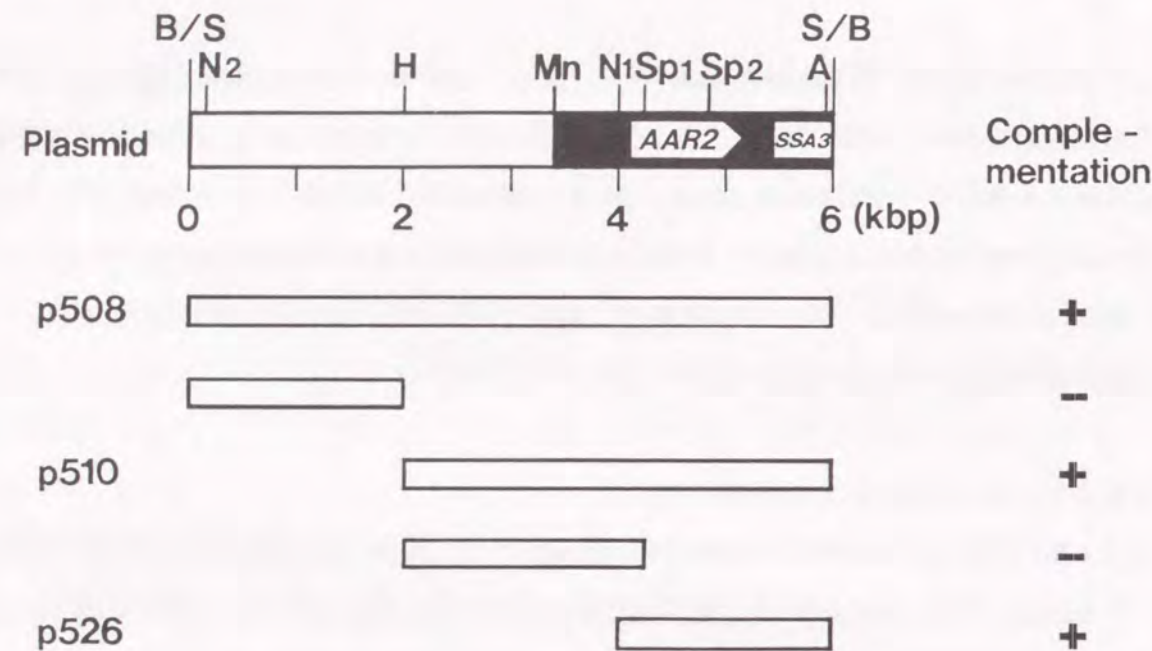


Fig. 1-2. Restriction map of the *AAR2* DNA and delimitation of the functional region. Construction and derivations of p508, p510, and p526 are described in Fig. 1-1. Complementation of the *aar2* mutation was detected by testing the ability to complement the slow growth, α mating type, and APase⁺ phenotype of transformants with the respective plasmids in cells of strain SH2780-m1 (*aar2-1 ura3* [*Mfa* /p-*PHO5*]). The open and closed boxes at the top represent the cloned yeast DNA. Nucleotide sequences were determined for the closed region as indicated by the open arrow and open box; the open arrow with *AAR2* indicates the approximate position and direction of the ORF of *AAR2*, and the open box with *SSA3* indicates the N-terminal coding region of the *SSA3* gene encoding heat shock protein HSP70 (Boorestein and Craig, 1990). + and - represent ability and inability, respectively, to complement the *aar2* mutant phenotypes. Mn represents the restriction site of *Mn*/I; other abbreviations for restriction sites are as in Fig. 1-1.

第3項 *AAR2* 遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列

aar2 変異を相補できる最少領域を限定するために、p508上の6.0-kbp挿入断片から種々の欠失を作製した (図 1-2)。それぞれのプラスミドを *aar2* 変異株 SH2780-m1 に導入し、APase 活性染色表現型と接合型を調べた。その結果より、*aar2* 変異を相補できる断片を 2.0-kbp *Aat*II - *Nru*I₍₁₎ (p526) までに限定した。*Mn*/I から *Aat*II までの領域の塩基配列を決定した結果、この断片内には 1,065-bp からなる ORF が認められ (図 1-3)、Aar2 タンパク

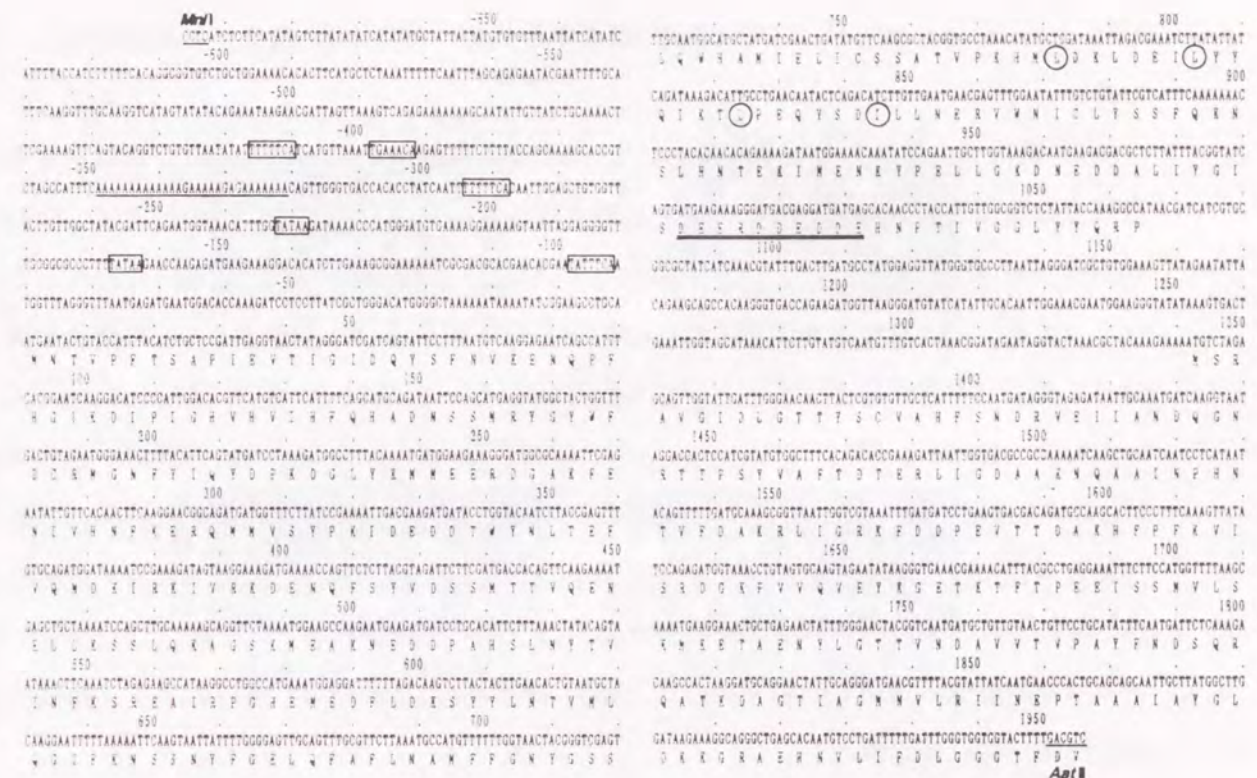


Fig. 1-3. Nucleotide sequence of the *AAR2* gene and deduced amino acid sequence. The ORF start site at +1 is that of *AAR2*, and the ORF start site at 1342 is that of *SSA3*. The underline in the 5' upstream region of the *AAR2* ORF indicates an A-rich region. Putative TATA and pheromone-responsive (5'-TGAACA-3') elements are enclosed in boxes. The four encircled amino acid residues in the *AAR2* ORF represent the leucine (or isoleucine) residues analogous to the leucine zipper structure. A peptide segment rich in acidic amino acid residues is doubly underlined.

ク質は 355 アミノ酸残基からなる分子量 41 kDa のタンパク質であると計算される。EMBL (European Molecular Biology Laboratory) および NBRF (National Biomedical Research Foundation) のデータベースを利用して GENETYX program (Software Development Co., Tokyo) により相同性検索を行ったところ、既報のタンパク質あるいは遺伝子との有意な相同性は認められなかった。しかし、2.0-kbp *Aat*II - *Nru*I₍₁₎ 断片の塩基配列に対して相同性検索を行ったところ、*AAR2* 遺伝子の 276-bp 下流に熱ショックタンパク質をコードする *SSA3* 遺伝子が見いだされた。*SSA3* 遺伝子は既にクローニングされており、その DNA 断片中に少なくとも 308 アミノ酸から成る未知の ORF が存在すると報告されている (Boors-

tein and Craig, 1990)。この未知のORF塩基配列の一部は*AAR2* 遺伝子の塩基配列と一致した。

AAR2 遺伝子の特徴的な塩基配列として、Aに富んだ領域が-349から-321位に存在する。真核生物遺伝子の転写開始位置の決定と基本転写量の決定に関わるTATAボックス (Breathnach and Chambon, 1981) に類似の配列が-167と-163および-232と-228位に存在した。性フェロモンにより転写が誘導される遺伝子 (例えば*FUS1*) の上流には、転写活性化因子 Ste12 タンパク質が結合することが知られている 5'-TGAAACA-3' 配列 (Pheromone responsive element; PRE) (Dolan et al., 1989; Errede and Ammerer, 1989) が存在するが、*AAR2* 遺伝子の-398と-392 位にもこの配列が見られ、-98と-92, -294と-288, および-416と-410には、逆向きで不完全な配列 (7つの塩基のうち6つが合っている) が見られた。推定されるAar2タンパク質の特徴としては、261~282番目のアミノ酸位にロイシンジッパー様の配列 (Landschulz et al., 1988) が存在し、332~341 番目のアミノ酸位には酸性領域が見いだされた。

第4項 *AAR2* 遺伝子破壊の接合型および生育への影響

AAR2 遺伝子の機能を明らかにするため、*AAR2* 遺伝子破壊株を造成した。*URA3* DNAの挿入により破壊した*AAR2* 遺伝子を含む *NruI*-*XbaI* DNA断片をプラスミドp527 (図 1-1) より調製し、二倍体株SH2926 (*MATa HMLα HMR a sir3::LEU2 ura3 trp1::[TRP1 MATα] leu2-3, 112::[LEU2 MFα Ip-PHO5] AAR2⁺*) に導入し、One step gene disruption 法 (Rothstein, 1983) で *Ura⁺* 形質転換体を得た。無作為に選んだ1株の形質転換体からの19個の子囊について四分子分析を行った。生育は 2+:2-に分離し、生育したクローンはすべて *Ura⁺* であった (図 1-4)。しかし30°C、10日間培養を続けるとコロニーが見られなかったスポットで、2つのコロニーが形成された。この2つのクローンは *Ura⁺* で、このうちの1株 (SH2926-t-1C) についてサザン解析を行ったところ、*AAR2* 遺伝子座が *URA3* 遺伝子で破壊されていることが解った。遺伝子破壊株は *aar2* 変異株と同様に α 型を示し、そのコロニーはAPase活性染色で赤色を呈した。生育は *aar2* 変異株より遅かった。また *aar2* 変異株とは異なり、この2株は25°Cでは生育が非常に遅く、37°Cでは全く生育しなかった。四分子分析より *AAR2* 遺伝子破壊株は (*Ura⁺* 株) 殆どが生育しなかったので、得られた2つの遺伝子破壊株は二次的な変異により生育可能となったと考えられる。

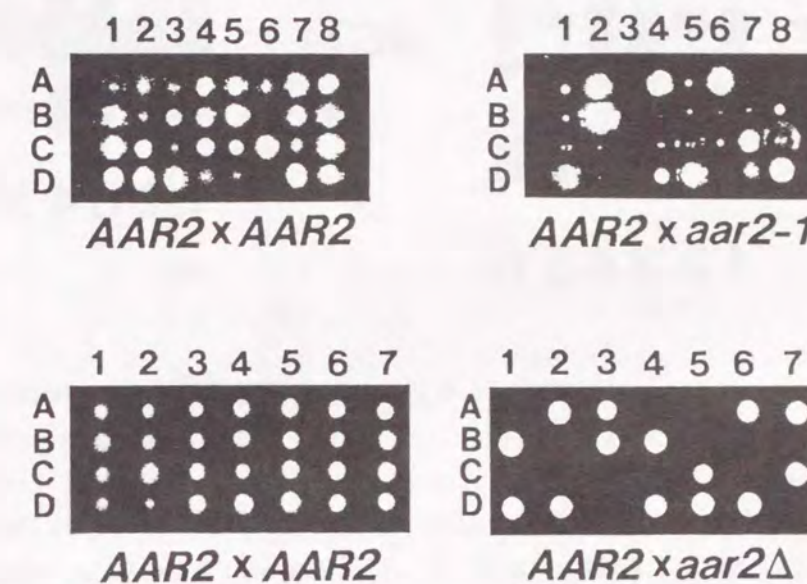


Fig. 1-4. Growth properties of tetrad spores having the *aar2-1* mutation or the *aar2::URA3* disruptant allele. Diploids constructed by protoplast fusions of SH2780 plus SH2645 (*AAR2⁺ ADE⁺/AAR2⁺ ade2*) and SH2780-m1 plus SH2645 (*aar2-1 ADE2⁺/AAR2⁺ ade2*) were sporulated, dissected on a YPAD plate, and incubated at 30°C for 3 or 5 days. Similar dissection plates of diploid strain SH2926 (*AAR2⁺/AAR2⁺*) and its *AAR2⁺/aar2::URA3* derivative (SH2926-t) were incubated at 30°C for 3 or 5 days. Four spores (rows A to D) from individual tetrads (lanes 1 to 8 or 7) were arrayed in columns.

第5項 *aar2* 変異株における接合型情報信号の変化

aar2 変異株が α 型を示すメカニズムを明らかにするため、SH2780-m1 (*aar2-1* 変異株) および SH2926-t-1C (*aar2::URA3* 破壊株) から調製したRNAを用いて *a1*, $\alpha1$ および $\alpha2$ 遺伝子の転写産物をノーザン解析により調べた。 $\alpha1$ 転写産物は両株で検出されたが、野生型株 SH2780では検出されなかった (図 1-5A)。 $\alpha2$ 転写産物は、野生型株と同様に両変異株で検出された。これらの結果は、 α 型で *MFα Ip-PHO5* 融合遺伝子の発現により APase活性染色で赤色となる *aar2* 変異株の表現型は $\alpha1$ - $\alpha2$ 抑制の欠損によることを示している。

a1 の転写産物は野生型株と同様に両変異株においても検出されたが、その電気泳動速度は野生型株の場合より遅かった (図 1-5B)。*a1* 遺伝子は54-bpと52-bpからなる2個の

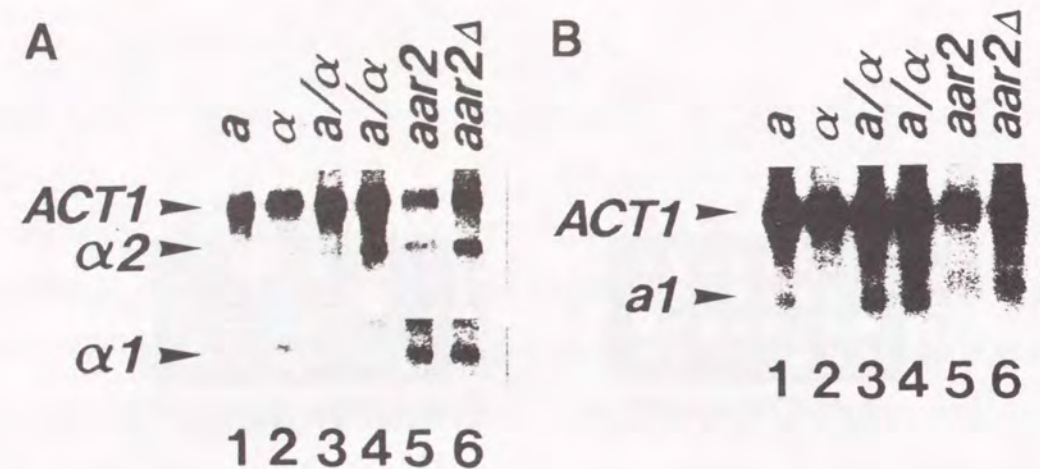


Fig. 1-5. Northern analysis of $\alpha 1$, $\alpha 2$, and $a1$ transcription levels in the *aar2* mutant and the *aar2::URA3* disruptant. Poly (A)⁺ RNAs were prepared from cells of strains SH1264 (*MATa AAR2*⁺; lanes 1), SH1263 (*MAT α AAR2*⁺; lanes 2), SH2645 (*MATa HML α HMRA sir3::LEU2 AAR2*⁺; lanes 3), SH2780 (*MATa HML α HMRA sir3::LEU2 [TRP1 MAT α] AAR2*⁺; lanes 4), SH2780-m1 (*MATa HML α HMRA sir3::LEU2 [TRP1 MAT α] aar2-1*; lanes 5), and SH2926-t-1C (*MATa HML α HMRA sir3::LEU2 [TRP1 MAT α] aar2::URA3*; lanes 6). Samples of 1 μ g of poly (A)⁺ RNA were put into slots of formaldehyde-agarose gel (1.5%). (A) A ³²P-labeled 1.1-kbp *Ec* α V fragment bearing the *MAT α 1* gene prepared from plasmid 2.5 was used to detect the $\alpha 1$ transcript. A 0.8-kbp *Bam*HI-*Hind*III fragment prepared from p530 bearing the *MAT α 2* gene was used to detect the $\alpha 2$ transcript. (B) A 0.6-kbp *Bam*HI-*Hind*III fragment encoding *MATa1* prepared from p531 was used as a probe to detect the $a1$ transcript. A 1.1-kbp *Xho*I-*Hind*III fragment encoding the *ACT1* gene of *S. cerevisiae* prepared from pYA301 (Gallwitz and Sures, 1980) was used as the probe for an internal marker. The specific activity of each probe was adjusted to 10⁸ cpm/ μ g of DNA.

イントロンを含んでいる。それらがスプライシングされることにより、活性を持つ $a1$ タンパク質が産生されると考えられている (Ner and Smith, 1989)。これらのことから *aar2* 変異株では、 $a1$ 転写産物がスプライシングされないために正常な $a1$ タンパク質が生成されず、 $a1$ - $\alpha 2$ 抑制が欠損したと考えた。

第6項 *aar2* 変異株における $a1$ 転写産物のスプライシング

aar2 変異株における $a1$ 転写産物のスプライシングを解析するために、 $a1$ 転写産物の3'末端部と相補する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして、*aar2-1* 変異株および *aar2* 遺伝子破壊株から調製したpoly (A)⁺RNAに対して、プライマー伸長法により解析

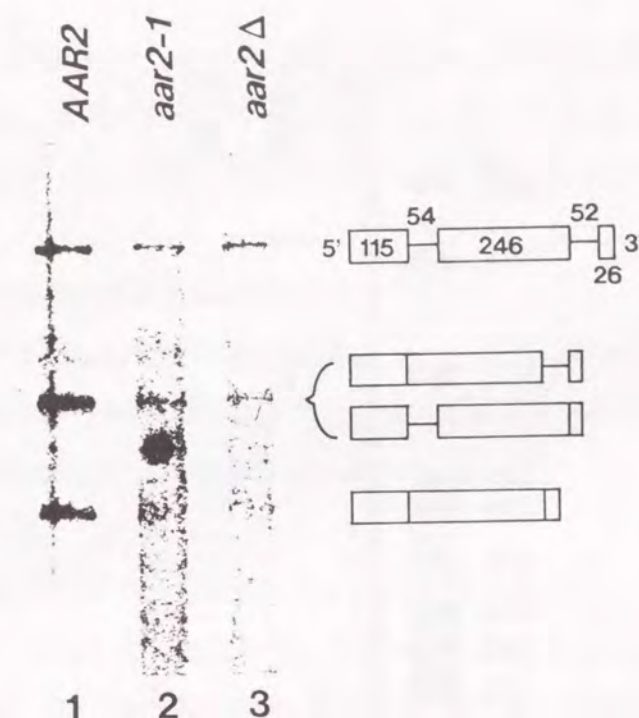


Fig. 1-6. Primer extension analysis of $a1$ pre-mRNA in the *aar2* mutant. Poly(A)⁺ RNAs were prepared from cells of strain SH2780 (*AAR2*; lane 1), SH2780-m1 (*aar2-1*; lane 2), and SH2926-t-1C (*aar2::URA3*; lane 3) and hybridized with the ³²P-labeled oligonucleotide described in Materials and Methods by the procedure described by Sombrook et al. (1989). Primer extension products were purified and electrophoresed on a polyacrylamide sequencing gel containing 7 M urea. Suggested structures of the $a1$ transcripts are shown on the right. Open boxes and lines are exons and introns, respectively. The numbers are the lengths of the exons and introns in bases (Ner and Smith, 1989).

を行った。野生型株では、検出されたバンドの強さから、二つのイントロンの両方がスプライシングされている $a1$ 転写産物と片方のイントロンだけがスプライシングされている $a1$ 転写産物がほぼ等量存在し、全くスプライシングされていない $a1$ 転写産物量は他の2つに比べ少い (図 1-6)。これに対して *aar2* 変異株および *aar2* 遺伝子破壊株では、全くスプライシングされていない転写産物と片方のイントロンだけがスプライシングされている $a1$ 転写産物が等量存在し、両方のイントロンが完全にスプライシングされた $a1$ 転写産物はほとんど検出されなかった。これらの結果より、*aar2* 変異株では $a1$ 転写産物のスプライシングが正常に行われていないと結論した。ノーザン解析での内部標準として用いた *ACT1* 遺伝子も、+11 位から約 300塩基のイントロンを含んでいることが知られている



Fig. 1-7. Splicing of *ACT1* pre-mRNA in *aar2* mutants. Total RNAs were prepared from cells of strain SH2780 (*AAR2*⁺; lane 2), SH2780-m1 (*aar2*⁻¹; lane 3) and hybridized with a ³²P-labeled oligonucleotide (from +346 to +327 of *ACT1*) described in Materials and Methods under the conditions used for detection of *a1* transcripts (Fig. 1-6). *Hap*II-digested fragments (in bases) of pBR322 DNA were run in parallel (lane 1) as size markers.

(Gallwitz and Seidel, 1980; Ng and Abelson, 1980)。そこで、この遺伝子の転写産物についてもプライマー伸長法で検討した。その結果、野生型株、*aar2* 変異株および *aar2* 遺伝子破壊株共にスプライシングが正常に行われる場合に期待される160塩基の長さのバンドが検出された(図 1-7)。この結果より *aar2* 変異株および *aar2* 遺伝子破壊株の *ACT1* 転写産物は、野生型株と同様に正常にスプライシングされていると考えられ、少なくとも *AAR2* 遺伝子は *ACT1* 転写産物のスプライシングには関与していないことが解った。

第7項 イントロンを除去した *MATa1* 遺伝子による *aar2* 遺伝子の抑圧試験

aar2 変異株では *a1* 転写産物のスプライシングが正常に行われないことを確かめるため、イントロンを除去した *MATa1* 遺伝子を持つプラスミド YCpSN1-SN2 (Ner and Smith 1989) を SH2780-m1 (*aar2*⁻¹ *ura3* [*MFa* *ip-PHO5*]; α 接合型で APase⁻) に導入した。Ura⁺ 形質転換体4株を選び、接合型試験と APase 活性を調べたところ、全てが非接合型で APase⁻ 表現型を示したので、*a1*- α 2 抑制が回復したと結論した。しかし、APase⁻ 表現型を示した形質転換体は *aar2*⁻¹ 宿主株と同様生育が遅かった。また形質転換体からプラスミドを脱落させると、*aar2* 変異株の表現型 (α 接合型で APase⁺) に戻った。

第8項 *aar2* 変異は *prp5* および *prp6* の対立遺伝子ではない

スプライシングに関与している遺伝子のうち *PRP5* (Lustig and Abelson, 1986) および *PRP6* (Vijayaghavan and Abelson, 1989) 遺伝子が *AAR2* と同じ第II番染色体上にあることが知られている。*PRP5* 遺伝子の塩基配列は既に決定されており (Legrain and Choulika, 1990) *AAR2* 遺伝子との塩基配列との比較により両者が異なることは明らかであった。*AAR2* 遺伝子と *PRP5* 遺伝子との同一性を調べるために、SH2926-t-1C (*MATa aar2* disruptant; 37°C で生育しない) と SPJ 5.41 (*MATa prp5*; 37°C で生育しない) を交雑した。得られた二倍体株は 37°C で生育を示したので、*AAR2* 遺伝子は *PRP5* 遺伝子ではないと結論した。

第4節 考察

本章では *a1*- α 2 抑制および生育に関与する *AAR2* 遺伝子を同定した。*aar2* 変異を持つ *a1*/ α 細胞は、*a1*- α 2 抑制が欠損するため接合型は α 型を示し、生育が遅くなった。*aar2* 変異株での *a1*- α 2 抑制欠損は、*a1* 転写産物のスプライシングの異常によることが解った。これらの結果より、*AAR2* 遺伝子は *a1* および生育に関与する遺伝子の転写産物に対するスプライシングに関係する遺伝子であると結論した。

S. cerevisiae においてスプライシングに関与するいくつかの *PRP* 遺伝子 (Woolford, 1989) のうち、*PRP2* 遺伝子が *MATa1* 転写産物のスプライシングに関わっていることが報告されている (Miller, 1984)。温度感受性 *prp2* 変異株では、制限温度下で *ACT1* 転写産物のスプライシングも行われない (Vieira and Messing, 1987)。しかし、*aar2* 変異株では *ACT1* 転写産物の正常なスプライシングが見られた。従って、*AAR2* 遺伝子は少なくとも

ACT1 転写産物のスプライシングには関与していない。

転写産物のスプライシングはスプライシオソームと呼ばれる大きな複合体により行われる (Green, 1986; Padgett et al., 1986)。もし *Aar2* タンパク質がスプライシオソームの一部であるならスプライシングは核内で実行されるので、*Aar2* タンパク質は核内に移行しなければならない。推定された *Aar2* タンパク質のアミノ酸配列からは核への移行シグナルは認められなかったが、タンパク質の多量体化に関与すると考えられているロイシンジッパー (Struhl, 1989) が存在した。従って *Aar2* タンパク質はこのロイシンジッパーにより、スプライシオソームの構成タンパク質と結合して核に移行する可能性がある。スプライシングに関わるタンパク質 *Prp6* および *Prp9* (Legrain and Choulika, 1990) もロイシンジッパーを持つことが知られており、これらは *Aar2* タンパク質と結合する候補となる。

FAR1 (Chang and Herskowitz, 1990), *FUS1* (McCaffrey et al., 1987; Trueheart et al., 1987; Van Arsdell et al., 1987) および *FUS3* (Elion et al., 1990) 遺伝子のよう、性フェロモンにより発現が誘導される遺伝子上流には 5'-TGAAACA-3' の配列が存在する。*AAR2* 遺伝子上流にも、同じ配列で1コピーと逆向きで一塩基異なる配列が3コピー存在し、性フェロモンにより発現が誘導される可能性がある。*AAR2* 遺伝子の転写産物は検出できなかったが、性フェロモン非存在下では *AAR2* 遺伝子の発現が低いのかもれない。

第5節 要約

非接合型を示す *S. cerevisiae* の a/α 細胞から、 $\alpha 2$ 抑制は正常で $a1-\alpha 2$ 抑制が欠損し、 α 接合能を示す *aar2* 変異株を分離した。*aar2* 変異株および遺伝子破壊株は増殖遅延を示した。クローニングした *AAR2* 遺伝子から355アミノ酸をコードするタンパク質コード域が見いだされた。ノーザン解析により、*aar2* 変異株および遺伝子破壊株では $\alpha 1$ および $\alpha 2$ 転写産物が検出されたが、*a1* 転写産物は野生型株に比べ電気泳動での移動速度が遅かった。プライマー伸長法による解析で、*aar2* 変異株および遺伝子破壊株では *a1* 転写産物に存在する2つの短いイントロンはスプライシングされていないことが解った。しかし、生育に必須でイントロンを持つことが知られている *ACT1* 転写産物は正常なスプライシングを受けていた。イントロンを削除した *MATa1* 遺伝子を *aar2* 変異株に導入したところ、生育遅延表現型は変化しなかったが、*aar2* 変異株の α 接合型は非接合型となった。これらの結果

より、*AAR2* 遺伝子は *a1* シストロンおよび細胞増殖に重要な遺伝子のスプライシングに働いていると考えられた。*AAR2* 遺伝子は、第II番染色体上の *SSA3* 遺伝子に近接して存在し、*ACT1* 転写産物のスプライシングに関与する同じ染色体上の *PRP5* あるいは *PRP6* 遺伝子とは異なる遺伝子であった。

第2章 醸造酵母の育種に有用な優性選択 符号の開発

第1節 緒言

一般に実用酵母は遺伝学的操作に有効な選択符号を持たないため、細胞融合や形質転換による育種や解析が困難である。実用酵母の形質転換体を選択するための選択符号として、いくつかの薬剤耐性および重金属耐性遺伝子が提案されている。薬剤耐性選択符号としては、G418 (Jimnez and Davies, 1980)、methotrexate (Zhu et al., 1985)、chloramphenicol (Hadfield et al., 1986)、hygromycin B (Gritz and Daives, 1983)、glyphosate (Kunze et al., 1989)、cycloheximide (Takagi et al., 1986)、methyl glyoxal (Murata et al., 1985)、およびsulfometuron methyl (Casey et al., 1988) に対するそれぞれの耐性遺伝子が見いだされている。重金属耐性選択符号としては、銅耐性 *CUP1* 遺伝子 (Fogel and Weich, 1982) が知られている。しかし、実用酵母間で耐性の度合いに差があり、最適の形質転換条件が設定し難く、あるいは薬剤が容易に入手できないなどにより、いずれの薬剤も十分とは言い難い。そこで実用酵母を含む原栄養体に対して優性選択符号となる有用な遺伝子を新たに見いだすことを目的として、*S. cerevisiae* の細胞にセルレニン耐性を付与する遺伝子の検索を行った。その結果、*S. cerevisiae* の細胞に多薬剤耐性を付与する遺伝子として既に報告されていた *PDR4* 遺伝子を見いだした。また、*PDR4* 遺伝子を利用して原栄養体に対する簡単に効率の良い接合型判定系を構築した。

第2節 実験材料および実験方法

本章で用いた実験材料および実験方法のうち、第1章において記述した以外について記述する。

供試菌株とプラスミドDNA

実験に用いた *S. cerevisiae* 菌株を表 2-1 に示した。またプラスミドの構造を図2-1に示した。

Table 2-1 *S. cerevisiae* strains used

Strain	Mating type	Genotype or characteristics ^a
SC288C	α	<i>MATα SUC2 mal gal2 CUP1</i>
OP-3C	α	<i>MATα ura3-52 leu2-3, 113</i>
KA31	a/α	<i>MATα/MATα ade2/ade2 his3/his3 leu2/leu2 trp1/trp1 ura3/ura3</i>
SH682-Cer ^r	a	Transformant of SH682 with pCR1
SH683-Cer ^r	α	Transformant of SH683 with pCR1
Kyokai no. 7	Non	A wild type diploid strain (Kitamoto et al., 1990; Oda et al., 1990)
K-9H-11	a	A wild type haploid strain from Kyokai no. 9 (Hara et al., 1983)

^a Genetic symbols are as described by Mortimer et al. (1992)

第3節 結果

第1項 セルレニン耐性遺伝子の分離

セルレニンは真菌類の生育を強く阻害する抗生物質として報告され (秦ら, 1960)、その後の解析により脂肪酸合成を阻害することが明らかになっている。酵母もセルレニンによりその増殖が阻害される (Kawaguchi et al., 1982)。そこでセルレニン耐性を付与する遺伝子とセルレニンを組み合わせることにより *S. cerevisiae* における効果的な優性選択系が構築できるのではないかと考えた。*S. cerevisiae* にセルレニン耐性を付与する遺伝子を分離するため、S288C株から調製した染色体DNAを *Sau3AI* で部分消化後、多コピー型ベクター YEp24 (*URA3*^r) の *Bam*HI 部位に挿入して作製した遺伝子ライブラリーを、酵母 OP-3C 株 (*ura3*⁻) に導入した。得られた約1,000株の Ura⁺ 形質転換体から、10 μ g/ml 濃度でセルレニンを含む YPAD 培地で増殖する125株を選択した。125株のそれぞれから調製した DNA 試料を用い大腸菌をアンピシリン耐性に形質転換し、これらから回収した125のプラスミドを用いて酵母 OP3-C 株を Ura⁺ に再び形質転換を行った。いずれのプラスミドに

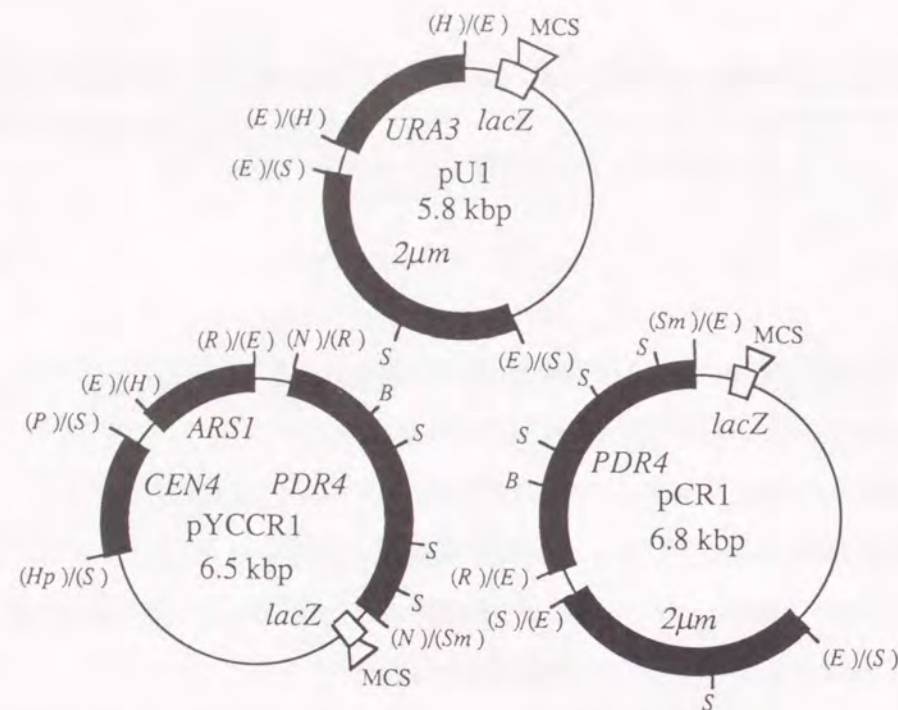


Fig. 2-1. Structure of plasmid pU1, and the plasmids bearing the *PDR4* gene, pCR1 and pYCCR1. pU1 was constructed by inserting the 1.1-kbp *Hind*III *URA3* fragment of YEp24 at the *Eco* 0109I site of pUC19 (Yanish-Perron et al., 1985) after blunt-ending the *Hind*III and *Eco* 0109I ends and a 2.0-kbp *Eco* 0109I fragment bearing the replication origin of 2 μ m DNA prepared from YEp24 at the *Ssp*I site of the pUC19 moiety after blunt-ending the *Eco* 0109I ends. The single copy plasmid pYCCR1 bearing *PDR4* was constructed by assembling a 0.84-kbp *Eco* RI-*Hind*III fragment bearing *ARS1* from YRp7 (Parent et al., 1985), 0.85-kbp *Pvu*I-*Hpa*I fragment bearing the *CEN4* sequence from YCp19 (Parent et al., 1985), and a 2.1-kbp *Eco* RI-*Sma*I fragment carrying *PDR4* from a plasmid which was constructed by inserting a 2.1-kbp *Kpn*I₂-*Kpn*I₃ fragment bearing the *PDR4* DNA into the *Kpn*I site of pUC19. The multicopy plasmid pCR1 was constructed by assembling the same 2.0-kbp *Eco* 0109I fragment bearing the replication origin of 2 μ m DNA used in construction of pU1, and the same 2.1-kbp *Eco* RI-*Sma*I fragment of *PDR4* used in construction of pYCCR1. The closed boxes indicate DNA fragments of *S. cerevisiae*. The open boxes represent DNA fragment of *E. coli*. The thin lines indicate the DNA fragments originating from pBR322. MCS represents multi-cloning sites and *lacZ* indicates a portion of the *lacZ* gene encoding the α fragment of β -galactosidase. Abbreviations of restriction sites are: *B*, *Bam*HI; *E*, *Eco*0109I; *H*, *Hind*III; *Hp*, *Hpa*I; *N*, *Nru*I; *P*, *Pvu*I; *R*, *Eco* RI; *S*, *Ssp*I; *Sm*, *Sma*I. (E)/(H), (E)/(R), (E)/(S), (E)/(Sm), (Hp)/(S), (N)/(R), (N)/(Sm), (P)/(S): junction site of these restriction ends after blunt-ending with T4 DNA polymerase.

についても得られた形質転換体はすべてセルレニン耐性を示した。セルレニン耐性を付与する125個のプラスミドについてその制限酵素地図を作製したところ、全てのプラスミドは同一の断片を含んでいた。

第2項 セルレニン耐性遺伝子は*PDR4* 遺伝子である

セルレニン耐性を付与する最少領域を限定するために、3.8-kbpの挿入断片の種々の領域を欠失させた(図2-2)。作製したプラスミドをOP-3C株に導入し、Ura⁺形質転換体を分離した。次いでそれぞれのUra⁺形質転換体のセルレニン耐性を調べ(図2-2)、セルレニン耐性を付与できる最少の領域を2.1-kbp *Kpn*I₂-*Kpn*I₃断片にまで限定した。*Kpn*I₂から*Ssp*I₄までのDNA断片の塩基配列を決定したところ、HussainとLenard(1991)によって報告されている*PDR4*遺伝子の塩基配列(GenBank, accession no. X53830)と同一であった。彼らは3.8-kbp *Sal*I-*Eco*RI領域の塩基配列を決定し、1,950 bpからなるORFを見いだした。従ってPdr4タンパク質は650アミノ酸からなる分子量72.5 kDaのタンパク質であると推察された。しかし、*PDR4*遺伝子のC末端領域を含まない2.1-kbp *Kpn*I₂-*Kpn*I₃断片を多コピーベクターpU1(図2-1)の*Kpn*I認識部位に挿入して、*S. cerevisiae*細胞に導入するとセルレニン耐性を付与することができた。2.1-kbp *Kpn*I₂-*Kpn*I₃断片全領域の塩基配列を決定していないが、本研究で決定した1192から3289までの塩基配列はHussainとLenard(1991)の結果と一致している。この結果はクローン化し塩基配列を決定したDNAの多型性か、Pdr4タンパク質のC末端がセルレニン耐性に不要であるか、あるいは本ベクターより作られるPdr4タンパク質のC末端が、ベクターDNA部から作られたタンパク質で構成されてもセルレニン耐性を付与することができたと考えられる。

第3項 *PDR4* 遺伝子の優性選択符号としての有用性

第1項では、セルレニン耐性を付与する断片を多コピーベクターを用いて選択した。本来宿主に1コピー存在する*PDR4*遺伝子によってセルレニン耐性が付与されたのは、この遺伝子が多コピーで導入されたためと考えられる。このことを確認するため、*PDR4*遺伝子の2.1-kbp *Kpn*I₂-*Kpn*I₃DNA断片を持つ多コピー型プラスミドpCR1(図2-1)と単コピー型プラスミドのpYCCR1(図2-1)をOP-3C株に導入し、耐性度を比較した。pYCCR1を持つ細胞は1 μ g/mlの濃度のセルレニンを含むYPAD培地では増殖したが、2 μ g/mlの濃度ではpCR1を持つ細胞に比べ増殖は遅かった(表2-2)。この結果より、*PDR4*遺伝子が2

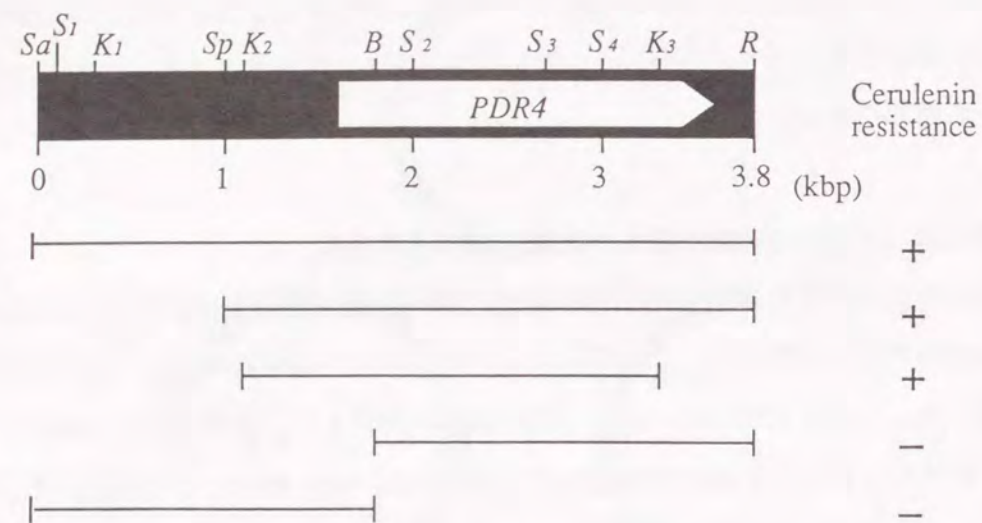


Fig. 2-2. Restriction map of *PDR4* and delimitation of the functional region for cerulenin resistance. The top line shows the 3.8-kbp common region of the cloned DNA fragments conferring cerulenin resistance. Yeast strain OP-3C (*ura3*) was transformed to the *Ura*⁺ phenotype with sub-fragments (indicated by thin lines) ligated into the multi-cloning site of pU1 (Fig. 2-1) and the *Ura*⁺ transformants were tested for cerulenin resistance on YPAD plates containing 10 μ g of cerulenin per ml. The open arrow tagged with *PDR4* indicated the approximate position and direction of the *PDR4* ORF deduced from the nucleotide sequence determined by Hussain and Lenard (1991). + and - represent ability and inability, respectively, to confer the cerulenin-resistance phenotype. Abbreviations of the restriction sites are: *K*, *Kpn*I; *Sa*, *Sa*I; *Sp*, *Sph*I, and others are as in Fig. 2-1. Three or more *Kpn*I or *Ssp*I restriction sites are distinguished by suffixes.

コピーになれば酵母細胞は 1 μ g/mlの濃度のセルレニンに対して耐性を獲得するが、多コピーで導入すれば、より高い耐性を付与することができることが解った。

第4項 原栄養体に対する接合型テスターの造成

栄養要求性を持つ a あるいは α 型一倍体株に *PDR4* 遺伝子を導入すれば、原栄養体に対する接合型テスターとして利用できると考えた。セルレニンを含む最少培地を選択培地とした場合、*PDR4* 遺伝子を導入された形質転換体は栄養要求性であるため生育しない。一方原栄養体もセルレニン感受性であるためにこの培地では生育できず、両株の交雑体のみが

Table 2-2 Dosage effect of the *PDR4* gene

Plasmid	Cerurenin concentration (μ g/ml)					
	0	0.5	1.0	2.0	5.0	10.0
pU1	++	-	-	-	-	-
pYCCR1	++	++	++	+	+	±
pCR1	++	++	++	++	++	+

+ and - represent growth and no growth of strain OP-3C transformed with pYCCR1 (single copy plasmid), pCR1 (multicopy plasmid), or pU1 (without the *PDR4* gene) on YPAD plates with the indicated amounts of cerulenin per ml.

生育すると期待される。すなわち、この接合型テスターを用いれば、原栄養体に対するクロストリーク法による接合型判定系を構築できると考えた。

このような接合型テスター株を造成するために、*PDR4* 遺伝子を持つ多コピー型プラスミド pCR1 を、SH682 (*MATa lys1 trp3 ura1 ura2 pho3 pho5*) および SH683 (*MAT α lys1 trp3 ura1 ura2 pho3 pho5*) 株に導入した。ここでは選択培地の炭素源としてグルコースの代わりにガラクトースを用いた。理由はわからないが、その方がグルコースを用いた場合よりセルレニンに対する感受性がより高くなるからである。得られたセルレニン耐性形質転換体をそれぞれ SH682-Cer^r (a) および SH683-Cer^r (α) と名付けた。

SH682-Cer^r および SH683-Cer^r 株を接合型テスターとして栄養要求性選択符号を持たない *S. cerevisiae* 株の接合型を判定できるかをモデル実験によって調べた。まず、二倍体株 KA31 (*MATa/MAT α ade2/ade2 his3/his3 leu2/leu2 trp1/trp1 ura3/ura3*) を孢子形成させて子囊の解剖を行った。8個の子囊から得られた四分子をYPAD培地上に並べ、30°Cで1日培養した。これをガラクトースを炭素源とした 2 μ g/mlの濃度でセルレニンを含む lys⁻培地 (SGal+Cer) とセルレニンを含まない lys⁻培地 (SGal) にレプリカした。SGal培地では全ての四分子が増殖したが、SGal+Cer 培地では増殖せず、これらはセルレニン感受性であった。次にYPAD培地上の四分子を、あらかじめSH682-Cer^r (a) あるいはSH683-Cer^r (α) 株を一面に生育させておいたYPAD培地にレプリカし接合させた。これらのプレート

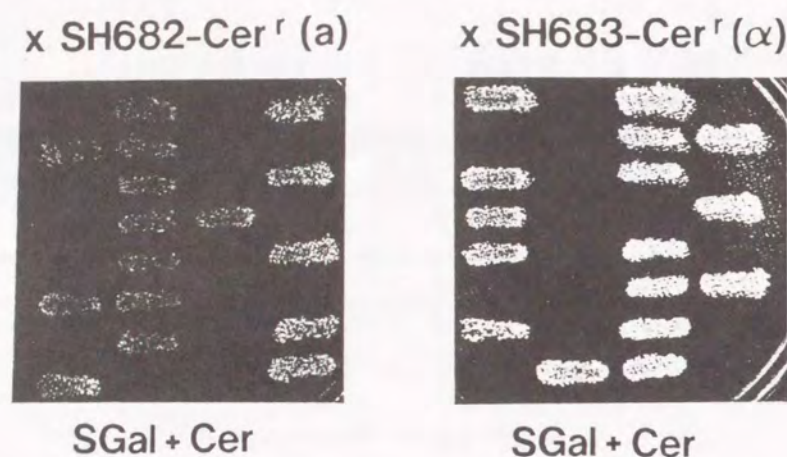


Fig. 2-3. Mating type test with the cerulenin resistant mating-type testers SH682-Cer^r (a) and SH683-Cer^r (α). The plates where the tester strains and meiotic segregants of KA31 were mated were replicated onto SGal+Cer plates and incubated at 30°C for 2 days. Details of the procedures are described in the text.

を30°Cで1日保温後、SGal+Cer 培地にレプリカし、30°Cでさらに2日間培養した。その結果、四分子の接合型を明確に判定することができた(図2-3)。

さらにこれらのセルレニン耐性接合型テスターが、清酒醸造に用いられている原栄養体である協会7号酵母(Kitamoto et al., 1990; 小田ら, 1990)や協会9号酵母から分離されている一倍体株K-9H-11(原ら, 1983)の接合型判定に実際に利用できるかを試験した。混合液体培養試験法により協会7号およびK-9H-11株は既にそれぞれ非接合型およびa型と判定されている。協会7号とK-9H-11株をYPAD 培地で垂直線上に増殖させ、SH682-Cer^r (a) およびSH683-Cer^r (α) 株をYPAD培地で水平線上に増殖させ、新しい YPAD培地上で交差するようにレプリカした。30°C で1日培養後、SGal+Cer培地にレプリカし30°Cで2日培養した。その結果、協会7号は非接合型、K9-H-11 株はa型と判定され、混合液体培養試験法による結果と一致した(図 2-4)。これらのことより、セルレニン耐性接合型テスターはクロスストリーク法による原栄養体の接合型判定に有用であると結論した。

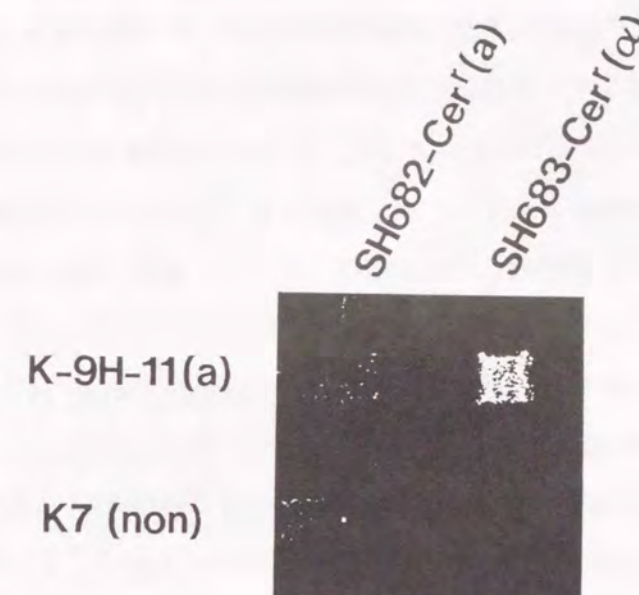


Fig. 2-4. Tests of mating ability of brewing yeasts with the cerulenin resistant mating-type testers SH682-Cer^r (a) and SH683-Cer^r (α). The plate on which the cells of tester strains and Kyokai no. 7 (K7) and K-9H-11 had been mated was replicated onto SGal+Cer plates and incubated at 30°C for 2 days.

第4節 考察

本章では、実用酵母を含む原栄養体に対する新しい優性選択符号を見いだすことを目的として、*S. cerevisiae* の脂肪酸合成を阻害するセルレニンに対して耐性を付与する遺伝子を検索分離した。その遺伝子の優性選択符号としての有用性とそれを利用した原栄養体に対する接合型判定系の構築について述べた。セルレニン耐性を付与する遺伝子のクローニングを行ったところ、既に*S. cerevisiae* に cycloheximideと sulfometuron methyl に対して耐性を付与することが報告されている *PDR1* 遺伝子 (Leppert et al., 1990) と同一DNA断片が得られた。また、この遺伝子は *PAR1* (Schnell et al., 1992), *SNQ3* (Hertle et al., 1991), および *YAP1* (Moye-Rowley et al., 1989) 遺伝子としても同定されている。*PAR1* および *SNQ3* 遺伝子は、4-nitroquinoline-1-oxide, Trenimon と N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (Schnell et al., 1992) および 鉄キレート剤 (Hertle et al., 1991) に対して耐性を付与する遺伝子としてそれぞれ分離されている。ほ乳動物の癌遺伝子タンパク質でjun familyに属する転写因子AP-1と相同性のあるタンパ

ク質をコードする遺伝子として、*YAP1* 遺伝子は同定された (Moye-Rowley et al., 1989)。

セルレニン耐性を付与する遺伝子の最少領域は2.1-kbp *KpnI*₂-*KpnI*₃断片に限定された。しかし、HussainとLenard (1991) によって決定された塩基配列から推定される Pdr4タンパク質のC末端コード部を含んでいない。決定されたどちらかの塩基配列に間違いがあるか、あるいはPdr4タンパク質のC末端領域はセルレニン耐性付与に対して不要であると考えられることができるが、これは今後の問題である。

PDR4 遺伝子を染色体に挿入した形質転換体は、cycloheximide および sulfometuron methylに対してわずかに耐性を与えると報告されている (Leppert et al., 1990)。しかし、セルレニン耐性については、*PDR4* 遺伝子を単コピー型プラスミドで導入した場合でも顕著にセルレニン耐性を与えることが本研究で示された。従って、*PDR4* 遺伝子を形質転換体の優性選択符号として利用する場合には、cycloheximideやsulfometuron methylよりもセルレニンの方が選択性に優れている。

従来、原栄養体に対する接合型判定には、標準株との混合液体培養法が用いられていた。この方法では、顕微鏡下で接合子形成の有無を観察することにより接合型を判定するため、経験が必要である。しかし、本研究で開発した原栄養体に対するプレート上でのクロスストリーク法による接合型判定系は、経験も不必要で簡便である。実用酵母の接合型判定にも有用で、次章で示すように実用酵母から接合能を有する株を分離する場合にも極めて有効であった。

第5節 要約

S. cerevisiae に多薬剤耐性を付与する *PDR4* (*YAP1/PAR1/SNQ3*) 遺伝子の2.1-kbp *KpnI*断片がセルレニンに対して優性な耐性形質を付与することを見いだした。この 2.1-kbp *KpnI*断片は既に発表されている塩基配列 (Hussain and Lenard, 1991) から推定されるタンパク質のC末端を含んでいない。2.1-kbp *KpnI*断片を多コピー型プラスミドに乗せて α および α 型一倍体株に導入することにより、原栄養体に対する接合型テスターを造成した。

第3章 協会7号酵母の接合型遺伝情報の解析とその応用

第1節 緒言

実用酵母は一般に二倍体以上の倍数体であり (Emeis, 1961; 郡家, 1964; Emeis, 1965; 高野ら, 1966; Gunge, 1966; Kitamoto et al., 1990; 小田ら, 1990)、接合能を持たないため、交雑による育種が困難である。実用酵母から接合能を有する株を分離するには、ランダム胞子分離および熱処理法が用いられてきた (大内と秋山, 1976; 原ら, 1983; 浅野ら, 1987) が、これらの方法は経験を必要とする。そこで実用酵母から接合能を有する株を簡便に取得する技術の開発を目的として、実用酵母の接合型制御機構を明らかにすることを試みた。融合遺伝子の応用とサザンおよびノーザン解析により、清酒酵母協会7号の接合型制御機構について研究を行い、その接合型遺伝情報は構造的および機能的に正常な a/α 株と同様と考えられた。そこでこの結果を基に、協会7号酵母から a 型あるいは α 型を示す株が分離できないかと考えた。解析に用いた融合遺伝子と、第2章で開発したセルレニン耐性接合型テスターを組み合わせ、接合能を示さない株から接合能を示す株を効率よく分離する方法を考案し、協会7号酵母から a 型あるいは α 型を示す株を分離した。さらにこの方法を実際の醸造現場で用いられている酵母株にも応用し、分離した株間での交雑により雑種を造成した。

第2節 実験材料および実験方法

本章で用いた実験材料および実験方法のうち、第1章と第2章において記述した以外の方法について記述する。

供試菌株とプラスミドDNA

実験に用いた *S. cerevisiae* 菌株を表3-1に示した。ノーザン解析のプロープとしての、*Hfa* 1 0.5-kbp *Bam*HI-*Xho*I DNA はプラスミド pNN65 から調製した。*STE6* DNA プロープはプラスミド pNN71 から1.0-kbpの *Bam*HI-*Hind*III DNA断片として調製した。*MAT α* *ip*-*PHQ5* 融合遺伝子を含むプラスミド pNN62 (図 3-1) は以下のように構築した。*PHQ5* 遺伝子の構

Table 3-1 *S. cerevisiae* strains used

Strain	Mating type	Genotype or characteristics ^a
SH1089	a	<i>MATa leu2-3,-112 trp1 ura3-52:: [HIS4-lacZ, ura3-52]</i> ^b <i>pho3-1 pho5-1</i>
SH1091	α	<i>MATα his1-29 leu2-3,-112 trp1 ura3-52:: [HIS4-lacZ, ura3-52] pho3-1 pho5-1</i>
SH2424	non	SH1089 with <i>S/R3</i> allele disrupted by insertion of a 1.5- kbp <i>BglII-XhoI LEU2</i> fragment of <i>S. cerevisiae</i> prepared from plasmid pJH107 (Ivy et al., 1986)
K ^c	non	Sake yeast for ginjo-shu making (our stock culture)
S ^c	non	Sake yeast for ginjo-shu making (our stock culture)

^a Genetic symbols are as described by Motimer et al. (1992).

^b *ura3-52:: [HIS4::lacZ, ura3-52]* indicates a DNA construct bearing a fusion gene consisting of the *lacZ* gene connected with the *HIS4* promoter and inserted at the *ura3-52* locus (Lucchini et al., 1984).

^c Each of these strains has the *MATa/MAT α* , *HML α /HML α* , and *HMRa/HMR α* genotype.

造部については、合成オリゴヌクレオチド 5'-CTCGGATCCGCAAAATTCGAGATTACCAATG-3' と 5'-CTCAGATCTAAATCTATTTTCAGCAATATAG-3' をプライマーとして、*PHO5* 遺伝子を含むプラスミド pPHO5 (Arima et al., 1983) を鋳型に用いたPCR法により-18から+1574までの領域 (翻訳開始コドンATGのAを+1として) を増幅した。得られたPCR産物を *Bam*HI と *Bgl*II 二重消化後、*YIp5* の *Bam*HI 部位に *Tet* 遺伝子と同じ向きになるように挿入したプラスミドを pSH39 (Mukai et al., 1993) と名付けた。*MAT α 2* ORF を含む *MAT α 1* シストロンのプロモーター部については、合成オリゴヌクレオチド 5'-CTCAAGCTTATATGTATTTTGTTAACTCT-3' と 5'-CTCGGATCCTATTAAGTTATTATATATGG-3' をプライマーとして、プラスミド pYMC2 (第1章) を鋳型に用いたPCR法により654から1750までの領域 (*MAT α 2* と *MAT α 1* のプロモーター領域を含む) [Astell ら (1981) の番号付けに従った] を増幅した。得られたPCR産物を *Bam*HI と *Hind*III で二重消化後、プラスミド pSH39 の *Bam*HI-*Hind*III 部位に挿入した。ライゲーション産物を *E. coli* にアンピシリン耐性で形質転換し、二種のプラスミドを得た。そのうちの一つのプラスミドを SH1089 (a) 株に導入して得られた形質転換体は、非接合型で酸性ホスファ

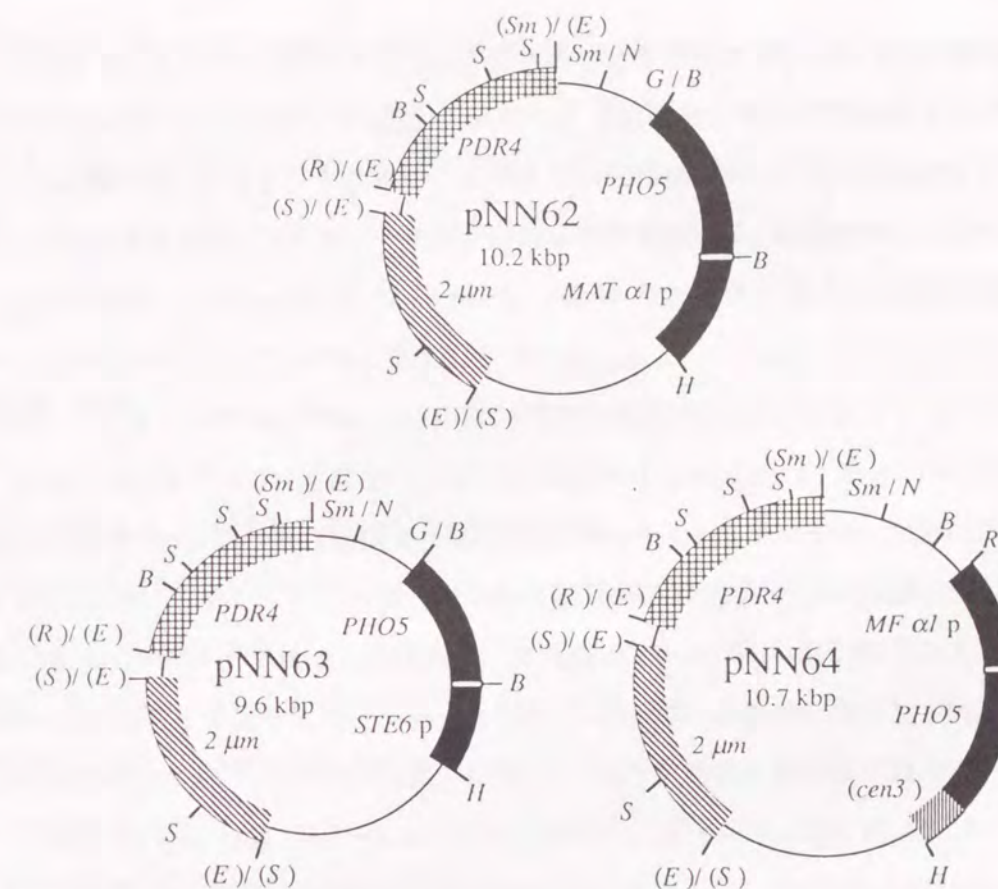


Fig.3-1. Structure of plasmids pNN62, pNN63, and pNN64 bearing various gene fusions with the *PHO5* gene as the reporter. The boxes indicate DNA fragments of *S. cerevisiae*. The thin lines are the DNA fragments originating from pBR322. *MAT α 1p*, *STE6p*, and *MF α 1p* represent the promoter of the *MAT α* , *STE6*, and *MF α 1* genes, respectively. The *MAT α 1* DNA contains a defective *MAT α 2* cistron (see text). Abbreviations of the restriction sites are: B, *Bam*HI; E, *Eco*0109I; G, *Bgl*II; H, *Hind*III; N, *Nru*I; R, *Eco*RI; S, *Ssp*I; and Sm, *Sma*I. The (E)/(S), (R)/(E), (S)/(E), and (Sm)/(E) are the junction sites of these restriction ends after blunt-ending with T4 DNA polymerase. (*cen3*) in pNN64 represents a partial fragment of the *CEN3* DNA derived from pHK104 (Kobayashi et al., 1990).

ターゼ活性を示さなかった。すなわち、このプラスミドの *MAT α 1p*-*PHO5* 上流に存在する *MAT α 2* 遺伝子から生産される $\alpha 2$ タンパク質は、 $\alpha 1$ タンパク質と協調して *MAT α 1p*-*PHO5* の転写を抑制することができる。一方、もう一つのプラスミドを SH1089 株に導入して得られた形質転換体は a 型で酸性ホスファターゼ活性を示した。従って、このプラスミドの *MAT α 1p*-*PHO5* 上流の *MAT α 2* から生産される $\alpha 2$ タンパク質は、 $\alpha 1$ タンパク質が存在して

も *MATα 1p-PH05* の転写を抑制できないと考えられる。PCR法によりDNAを増幅する過程で *MATα 2* に変異が生じたと推察される。*MATα 2* 遺伝子に変異を持つ *MATα 1p-PH05* 融合遺伝子を含む3.4-kbp *HindIII*-*NruI*断片とセルレニン耐性を付与する *PDR4* 遺伝子を、多コピープラスミドpCR1の *HindIII*-*SmaI*部位に連結したプラスミドをpNN62と名付けた。*STE6p-PH05* 融合遺伝子を含むプラスミド pNN63 (図 3-1) は以下のようにして構築した。*STE6* 遺伝子のプロモーター部については、合成オリゴヌクレオチド 5'-CTCAAGCTTGGATCGTGGGT TCAATCCC-3' と 5'-CTCGGATCCGACGTAGCTTGTCTTTGTT-3' をプライマーとして、プラスミド pBR322-ste6::lacZ (Wilson and Herskowitz, 1986) を鋳型に用いたPCR法により、-1から-469までの領域 (McGrath and Vershavsky, 1989) を増幅した。得られたPCR産物を *BamHI* と *HindIII* で二重消化後、プラスミドpSH39の同部位に連結してプラスミドをpNN27を構築した。プラスミドpNN27から *STE6p-PH05* 融合遺伝子を含む2.8-kbp *HindIII*-*NruI* 断片を調製し、プラスミドpCR1の *HindIII*-*SmaI*部位に連結して構築したプラスミドをpNN63と名付けた。*MFα 1p-PH05* 融合遺伝子を含むプラスミドpNN64 (図3-1) は以下のように構築した。プラスミド pHK104 (Kobayashi et al., 1990) から *MFα 1p-PH05* 融合遺伝子を含む 3.4-kbp *HindIII*-*NruI*断片を調製し、プラスミドpCR1の *HindIII*-*SmaI*部位に連結してプラスミドpNN64を構築した。

生化学的方法

酸性ホスファターゼ活性の測定 Toh-e ら (1973) の方法に従った。適量の酵母培養液を集菌 (2,000 rpm, 5分) し、無菌水で一度洗浄後、菌体を適量の無菌水に懸濁して酵素液とした。1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 0.05 ml、無菌水0.55 ml、*p*-ニトロフェニルリン酸液 (3.2 mg/ml) 0.2 ml、酵素液0.2 ml を混合し、35°Cで10分間反応させた。10% トリクロロ酢酸 (TCA; 和光純薬) を 1 ml加えて反応を停止させた後、飽和炭酸ナトリウム (20 g/70 ml) 2 ml加えてよく混合した後、2,000 rpm, 10分間遠心し、上澄液の A_{420nm} 値を測定した。1分間に1 μ molの *p*-ニトロフェノールを遊離させる酵素量を1単位とし、*p*-ニトロフェノールのモル吸光係数を 1.6×10^{-2} として計算した。

発酵試験 試験菌株を 5 mlのYPAD培地で30°Cで一晩培養し、2,000 rpm, 10分間遠心して集菌した。菌体と α 米16 g、麴4 g、水40 ml および 0.25 mlの加工水 (1.3% KH_2PO_4 , 0.25% NaCl, 6% lactic acid) を100 mlの三角フラスコに加え、15°Cで静置培養した。全

重量から 5.5~6.5 g 減少した時点で培養液を遠心分離し、得られた上澄液の香気成分を Megabore column (J & W Scientific, Folsom, Calif., USA) を用いて85°C、ヘリウム流量5.6 ml/minの条件でガスクロマトグラフィ (HP58900; Hewlett Packard Co., Avondale, Pa., USA) により分析した。小仕込試験は蒸米840 g、麴160 gおよび水1,480 mlで行った。

第3節 結果

第1項 協会7号酵母の接合型遺伝情報の解析

協会7号の *MAT*, *HML* および *HMR* 遺伝子座の接合型遺伝情報の構造を解析するために、協会7号、**a**型株 (SH1089)、 α 型株 (SH1091) および **a**/ α 型二倍体株 (KA31) からDNAを調製した。調製したそれぞれのDNAを *HindIII* 単独あるいは *HindIII* と *BglII* で二重消化した後電気泳動し、サザン解析を行った。*MAT*, *HML* および *HMR* 遺伝子座内には *HindIII* 制限酵素部位が存在せず (Strathern et al., 1980)、一般に *HML*, *HMR* および *MAT* 遺伝子座を含む *HindIII* 断片の大きさは、それぞれ6.1, 5.0および4.2-kbpとされている (図 3-2) (Hicks et al., 1979; Nasmyth and Tatchell, 1980) ので、泳動速度の違いにより互いに分離することが可能である。またYa領域内には *BglII* 部位があるが、 $Y\alpha$ を含む *HindIII* 断片のその他の領域には存在しないので、*MAT*, *HML* および *HMR* 遺伝子座に $Y\alpha$ あるいはYaのいずれの塩基配列が存在するかは、*BglII* により切断されるか否かで決定することができる。電気泳動終了後、ナイロンフィルターにDNA断片を写し取り、プラスミドpYMC2 (第1章) から調製し、 ^{32}P でラベルした *MATα* を含む3.3-kbp *HindIII*-*EcoRI* をプローブとして、ハイブリダイゼーションを行った。プローブは *MAT*, *HML* および *HMR* 遺伝子座のいずれにも相同性のある塩基配列部を用いているので (図 3-2)、*MAT*, *HML* および *HMR* 遺伝子座の全てにハイブリダイズする。予想された通り *HindIII*-*BglII* 二重消化の場合、**a**型株では *HMR* および *MAT* 遺伝子座に相当するバンドが下ヘシフトしており、これより *HMR* および *MAT* 遺伝子座には **a** カセットが、*HML* 遺伝子座には α カセットが存在することが解る。 α 型株では、*HMR* 遺伝子座に相当するバンドが下ヘシフトしており、*HMR* 遺伝子座に **a** カセットが、*HML* と *MAT* 遺伝子座には α カセットが存在することを示している。**a**/ α 型二倍体株では、予想されるように *HMR* および片方の *MAT* 遺伝子座に相当するバンドが下ヘシフトしており、これより *MAT*, *HML* および *HMR* 遺伝子座の接合型遺伝情報はそれぞれ **a**/ α , α / α お

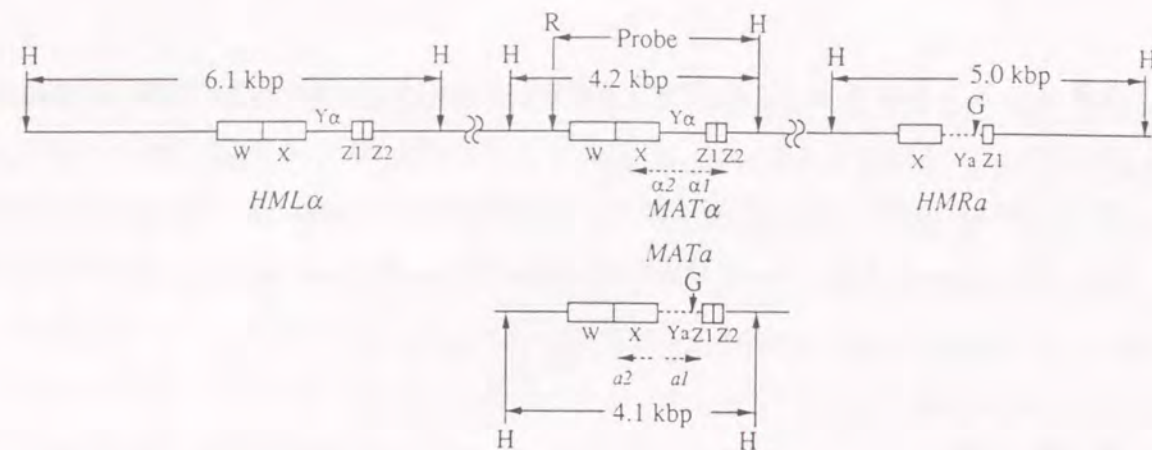


Fig. 3-2. Arrangement of the *HML*, *MAT*, and *HMR* loci on chromosome III. The regions, X, W, Z1, Z2, Yα, and Yα have, respectively, 704, 723, 239, 88, 642, and 747 bp (Astell et al., 1981). Restriction sites for *Hind*III (H) and *Bgl*II (G), and transcripts corresponding to *a1*, *a2*, *α1*, *α2* (dotted arrows) were compiled from Strathern et al. (1980) and Astell et al. (1981). Molecular size of the *Hind*III fragment or the *Hind*III-*Bgl*II fragments carrying the *MAT*, *HML*, and *HMR* loci were according to Hicks et al. (1979), and Nasmyth and Tatchell (1980). A 3.3-kbp *Hind*III-*Eco*RI (R) fragment bearing the *MATα* gene was used as the probe for Southern hybridization.

よび *a/a* であることが解る (図 3-3)。協会 7 号の電気泳動パターンは *a/α* 二倍体株と同様であり、*MAT* 遺伝子座の構造は *a/α* と考えられる。また協会 7 号の *HMR* 遺伝子座を含む *Hind*III 断片は標準実験室株のそれより約 500~800 bp 大きいと考えられた。

第 2 項 協会 7 号酵母における接合型信号

もし協会 7 号の *a* および *α* カセットが正常に機能しているなら、*MATα1*, *a* および *α* 型特異的遺伝子群の転写は、それぞれ *α2* および *a1-α2* 抑制により抑制されていると考えられる。協会 7 号の *MATa1*, *MATα1*, *MATα2*, *a* および *α* 型特異的遺伝子群の転写をノーザン解析により調べた。その結果、*a/α* 二倍体株と同様に *MATα1*, *STE6* (*a* 型特異的遺伝子群に含まれる) および *MFα1* (*α* 型特異的遺伝子群に含まれる) 遺伝子の転写産物は検出されなかった (図 3-4)。おそらく実験技術的な問題と考えられるが、協会 7 号および *a/α* 二倍体株の *MATa1* 遺伝子の転写産物は検出できなかった。しかし、*MATα1* 遺伝子の転写が見られないことより *a1-α2* 抑制は機能していると考えられる。これらの結果より、協会 7 号では標準 *a/α* 二倍体株と同様、*α2* および *a1-α2* 抑制が正常に機能していると考えられた。

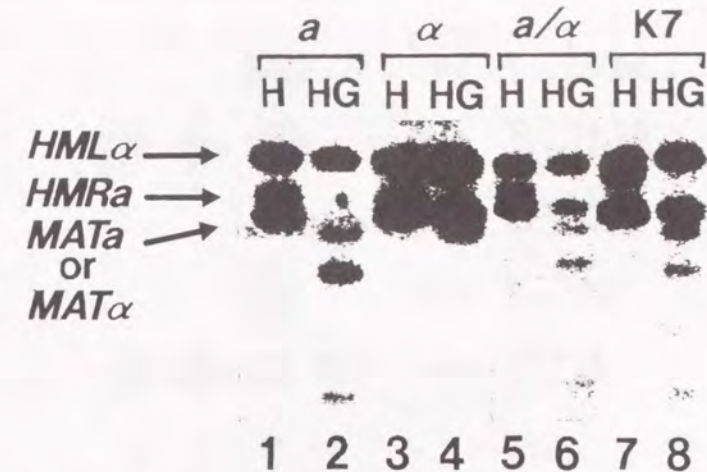


Fig. 3-3. Southern hybridization of the *MAT*, *HML*, and *HMR* loci in Kyokai no. 7 (K7). Chromosomal DNAs were prepared from cells of strains, SH1089 (*MATa*; lanes 1 and 2), SH1091 (*MATα*; lanes 3 and 4), KA31 (*MATa/MATα* diploid; lanes 5 and 6), and K7 (lanes 7 and 8). Odd and even lanes were loaded with DNAs digested with *Hind*III, and with *Hind*III and *Bgl*II, respectively. A ³²P-labeled 3.3-kbp *Hind*III-*Eco*RI fragment bearing the common X and Z1 sequence of *MATα* (Fig. 3-2) prepared from plasmid pYMC2 (Chapter I) was used as a probe. Bands correspond to *HMLα*, *HMRa*, and *MATa* fragments are indicated on the left margin. H and HG indicate chromosomal DNA digested with *Hind*III, and with *Hind*III and *Bgl*II, respectively.

第 3 項 協会 7 号酵母における接合型特異的遺伝子群の発現

前項で得られた結果を確かめるために、協会 7 号の *MATα1*, *a* および *α* 型特異的遺伝子群の発現を、それぞれプラスミド pNN62 (*MATα1p-PHO5*)、pNN63 (*STE6p-PHO5*) および pNN64 (*MFα1p-PHO5*) を用いて調べた。これらの融合遺伝子は *MATα1*, *STE6* および *MFα1* 遺伝子のプロモーター部に *PHO5* 遺伝子の構造部を連結して構築した (図 3-1)。これらのプラスミドを協会 7 号、SH1089 株 (*a*)、SH1091 株 (*α*) および SH2424 株 (*a/α*) に *PDR4* 遺伝子を選択符号として導入し、得られた形質転換体について酸性ホスファターゼ (APase) 活性を測定した。協会 7 号は *PHO3* 遺伝子が欠損していると考えられる (溝口と藤田、1982) ので、もし形質転換体が APase 活性を示せば融合遺伝子が発現していると判断できる。協会 7 号では、正常 *a/α* 二倍体株と同様に、*MATα1p-PHO5*, *STE6p-PHO5* および *MFα1p-PHO5* 融合遺伝子の発現は観察されなかった (表 3-2)。転写解析の結果から考えられたように、この事実は、協会 7 号において *α2* および *a1-α2* 抑制が機能していることを示している。*MFα1p-PHO5* 融合遺伝子の発現が *a* 型株においても観察されたが、これは *a* 細胞でも融合

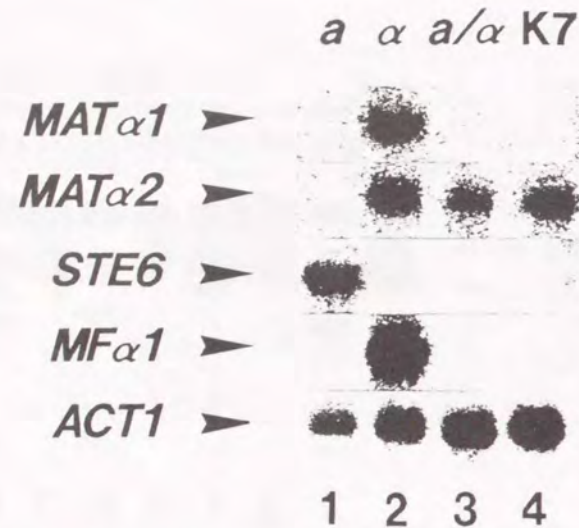


Fig. 3-4. Transcription of *MATα1*, *MATα2*, *a*-specific, and *α*-specific genes in K7. Poly(A)⁺ RNAs were prepared from cells of strains SH1089 (*MATα*; lane 1), SH1091 (*MATα*; lane 2), KA31 (*MATα/MATα*; lane 3), and K7 (lane 4). Samples of 1 μ l of poly(A)⁺ RNA were put into slots of a formaldehyde agarose gel (1.5%). A ³²P-labeled 0.7-kbp *Nde*I fragment bearing *MATα1* gene prepared from plasmid pYMC2 (Chapter I), a 0.8-kbp *Bam*HI-*Hind*III fragment prepared from p530 (Chapter I), a 1.0-kbp *Hind*III-*Bam*HI fragment prepared from pNN71 bearing a part of the *STE6* coding region, and a 0.5-kbp *Pst*I-*Sa*I fragment prepared from pNN65 bearing a part of the *MFα1* coding region were used to detect the *MATα1*, *MATα2*, *STE6*, and *MFα1* transcripts, respectively. A 1.1-kbp *Xho*I-*Hind*III fragment encoding the *ACT1* gene of *S. cerevisiae* prepared from pYA301 (Gallwitz and Sures, 1980) was used as the probe for the internal marker.

遺伝子の基礎発現があり、それが多コピー型プラスミドにより増幅されたためと考えられる。また、*MATα1p-PH05* 融合遺伝子の発現も *a* 型株で観察されたが、これは融合遺伝子の *MATα1* プロモーターが *a1-α2* 抑制を受けないためである。以上の結果から、協会7号では正常 *a/α* 二倍体株と同様、*α2* および *a1-α2* 抑制が正常に機能していると結論した。

第4項 協会7号酵母から接合能を示す株の分離

前項までの結果から、協会7号には正常な機能を持つ *a* および *α* カセットが存在することが解ったので、接合能を示す株の分離が可能と考えた。分離を迅速かつ簡便に進めるために、それぞれ *STE6p-PH05* および *MFα1p-PH05* 融合遺伝子を持つプラスミド pNN63 および pNN64 を導入した協会7号を用いた。協会7号では *α2* および *a1-α2* 抑制が機能しているので、これらの融合遺伝子は発現せず、APase の活性染色を行った場合コロニーは染色されない（白色）。しかし、*a* または *α* の接合能を持つようになれば、コロニーは赤色を示す

Table 3-2. Expression of the gene fusions in K7.

strain (Mating type)	APase activity (milli-units/OD ₆₆₀) from		
	<i>MATα1p-PH05</i>	<i>STE6p-PH05</i>	<i>MFα1p-PH05</i>
SH1089 (<i>a</i>)	20.4	21.1	6.7
SH1091 (<i>α</i>)	33.5	0.1	8.8
SH2424 (<i>a/α</i>) ^a	0.5	0.2	0.3
K7 (non)	0.8	0.6	1.4

^a A haploid strain showing non-mating type due to the disrupted *sir3* allele.

と考えられる。

プラスミド pNN63 および pNN64 を導入した協会7号を EMS で変異処理後、適当に希釈して YPAD 培地に塗布し、30°C に保温してコロニーを生育させた。約 50,000 コロニーの中から APase の活性染色で赤あるいは桃色を呈する株を *STE6p-PH05* 株からは 22 株、*MFα1p-PH05* 株からは 73 株分離した。これらの株について YPAD 培地に画線して融合遺伝子を持つプラスミドを脱落させた後、セルレニン耐性接合型テスター SH682-Cer^r(*a*) および SH683-Cer^r(*α*) を用いて接合型試験を行った。その結果、*a* 型または *α* 型を示す株がそれぞれ 5 株ずつ得られた。*α* 型を示す 5 株のうち 1 株は同時に弱い *a* 型も示した (図 3-5)。これらの *a* 型株と *α* 型株との間で交雑体を造成し、胞子形成能を調べた。しかし、全ての交雑体で胞子形成は観察されなかった。そこで無作為に選んだ 5 株の交雑体に、胞子形成を正に制御する *IME1* 遺伝子を、G418 耐性遺伝子を選択符号として導入し (詳しくは第 4 章で述べる)、得られた形質転換体について胞子形成能を調べたところ、若干の胞子が観察された。そこでマイクロマニピュレーターで子嚢解剖を行い胞子を分離したが、いずれの胞子も発芽せず減数分裂分離体は取得できなかった。

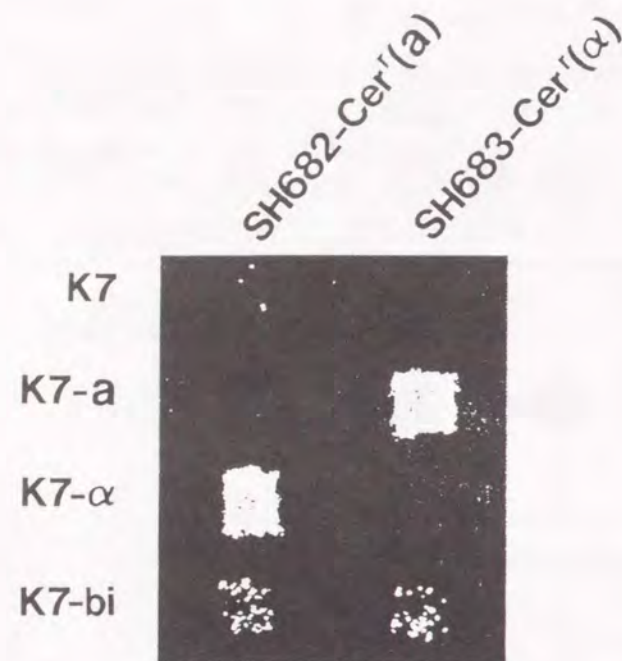


Fig. 3-5. Mating-type test on some of the derivatives from K7. Cells of K7 derivatives were cross-streaked with cerulenin resistant mating-type testers, SH682-Cer^r(a), and SH683-Cer^r(α) on a YPAD plate. The plate was at 30°C overnight then the cells were replicated onto a SD plate (2% galactose was replaced for glucose in standard SD medium for this experiment) added with 2 μg of cerulenin per ml. The replicated plate was incubated at 30°C for 2 days.

第5項 吟醸酒醸造用酵母からの接合能を示す株の分離

協会7号から接合能を示す株が分離できたことから、他の清酒酵母でも同様な方法で接合能を示す株が分離できると考えた。用いた菌株は小西酒造株式会社で吟醸酒醸造用酵母として用いられているK株およびS株である。両株とも吟醸酒づくりに適した酵母であるが、K株は低温に強いが醗過程で高泡があり、S株は吟醸香が高く高泡を生じないが低温では発酵が遅延する欠点を持っている。両株を交雑することによって、低温に強く、高泡を形成せず吟醸香の高い酵母を造成しようとした。セルレニン耐性接合型テスターにより接合型試験を行ったところ、両株とも当然のことながら接合能を持っていなかった。サザン解析により、*MAT*, *HML* および *HMR* 座の接合型遺伝情報の構造を調べた結果、データは示していないが協会7号と同じ電気泳動パターンを示し、それぞれ a/α, α/α および a/a の遺伝子型であることが解った。また両株とも、そのコロニーは APase の活性染色で染色されないの、前項で示した方法を用いて接合能を示す株の分離を試みた。K株およびS

株にそれぞれ *STE6p-PHO5* および *MFα /p-PHO5* 融合遺伝子を *PDR4* 遺伝子を選択符号として導入した。得られた形質転換体についてサザン解析により融合遺伝子が導入されたことを確認した。それぞれの形質転換体を 2 μg/ml の濃度でセルレニンを含む YPAD 液体培地を用いて 30°C で 1 日培養後、適当に希釈して 2 μg/ml の濃度でセルレニンを含む YPAD 培地に塗布し、30°C に保温してコロニーを形成させた。醸造特性を損なわないために、EMS による変異処理は行わなかった。もし接合能を持つクローンが存在するなら、そのコロニーは APase の活性染色により赤く染まると考えられる。

K株においては、約50,000コロニーの中から APase の活性染色で赤色を呈する17クローンを見いだした。プラスミドを脱落させた後、セルレニン耐性接合型テスターにより接合型を試験した結果、5クローンが a 型を示した。S株においては、約30,000コロニーの中から APase の活性染色で赤色を呈する28クローンを分離し、同様に接合型試験を行った結果、1クローンが α 型を示した。K株から分離した a 型を示す5クローンと S株から分離した α 型を示す1クローンとを交雑し、5株の交雑体を造成した。これらのうち発酵試験で、吟醸香主成分の一つであるカブロン酸エチルが親株の1.5倍の生産能を示した1株について、総米1kgの小仕込試験を行った。その結果、淡麗で吟醸香の高い酒が得られた。また、仕込中の醗経過からこの酵母は高泡を形成しないことが解った。このように融合遺伝子を用いて接合能を持つ株を見いだすシステムは、実用酵母の育種に有用であった。

第4節 考察

実用酵母に接合能を付与する技術を開発することを目的として、協会7号の接合型遺伝情報を解析した。一般に *S. cerevisiae* の天然株は接合能を示さず、協会7号もその例外ではない (Kitamoto et al., 1990; 小田ら, 1990)。一倍体細胞では接合能が見られるのに対し、二倍体細胞が接合能を示さないのは α2抑制と a1-α2抑制によるとされている。実際にこの機能が協会7号にも働いているかについては解析が行われていなかった。解析の結果、協会7号には構造的および機能的に a/α 標準二倍体株と同様な a および α カセットが存在することが明らかとなった。従って協会7号の非接合性のメカニズムは、正常株と同様に α2 および a1-α2 抑制によると結論できる。

協会7号に正常な a および α カセットが存在するので、接合能を有する株が分離できると考えた。従来、清酒酵母からの接合能を有する株の分離には、ランダム孢子分離および

熱処理法が用いられてきた。実際これらの方法で接合能を有する株が取得されている（大内と秋山、1976；原ら、1983；浅野ら、1987）。しかし、これらの研究では分離した株の接合型検定は標準株との接合子形成を顕微鏡下で観察して決定しており、経験が必要であるうえに、接合型判定を行うことに多大な労力を要する。一方本研究では、セルレニン耐性符号を持つ接合型テスターを用いており、クロスストリーク法により短時間で多くの分離株について接合型を判定することができる。今後、この方法により実用酵母の育種がさらに進展するものと期待される。

第5節 要約

サザン、ノーザンおよび融合遺伝子による発現解析の結果、協会7号の非接合性は、正常 a/α 二倍体株と同様に、 $\alpha 2$ および $a1-\alpha 2$ 抑制が働いているためと考えられた。そこで *MF α 1p-PH05* および *STE6p-PH05* 融合遺伝子を結合したプラスミドを導入して、酸性ホスファターゼの活性染色により、赤色に染色されるコロニーを見いだす方法により、接合能を示さない細胞集団中から突然変異により生ずる接合型細胞を効率良く分離する方法を考えた。この方法の有効性を協会7号について確かめた後、醸造現場で用いられている2株の吟醸酒醸造用酵母に応用し、約30,000～50,000コロニーから5株の a 型と1株の α 型を示す株を分離した。分離した株間で性的交雑により5株の交雑体を造成した。この交雑体の一株を用いて試験醸造を行ったところ、淡麗で吟醸香の高い酒を得た。

第4章 清酒酵母の胞子非形成性のメカニズム

第1節 緒言

一般に実用酵母は胞子形成能をほとんど示さず、接合能を持つ成熟分裂分離体を得られないため、性的交雑による育種が困難である。極めて低頻度で形成される子嚢に着目し、ランダム胞子および栄養細胞と胞子との温度感受性の差を利用した熱処理法により接合能を持つ成熟分裂分離体の分離が試みられてきた。さらに得られた株を用いて交雑による雑種体が造成されている（大内と秋山、1976；原ら、1983；浅野ら、1987）。一方、胞子形成率そのものを上昇させる培地条件も工夫されている。例えば、胞子形成培地にグルタチオンを添加することにより、協会7号酵母の胞子形成率が上昇することが報告されている（Kawado et al., 1992）。しかし、実用酵母の胞子形成率が低い原因は明らかにされていない。Kassirら（1988）によってクローニングされた *IME1* 遺伝子は、多コピー型プラスミドに乗せて二倍体株に導入すると、接合型遺伝情報や栄養源情報に関係なく胞子形成能を示すことが報告されている。そこで、実用酵母に *IME1* 遺伝子を導入することにより胞子形成能が回復する可能性を考えた。協会7号酵母の細胞に *IME1* 遺伝子の導入を行った結果、低頻度の胞子形成が見られた。また胞子形成関連の遺伝子群の転写解析から、協会7号の胞子非形成性のメカニズムは胞子形成条件下で *IME1* 遺伝子の転写が正常に誘導されないためであることが明らかとなった。

第2節 実験材料および実験方法

本章で用いた実験材料および実験方法のうち、第1章、第2章および第3章において記述した以外の方法について記述する。

供試菌株とプラスミドDNA

実験に用いた *S. cerevisiae* 菌株を表4-1に示した。ノーザン解析のプローブとして、*ACT1* 1.0-kbp *HindIII*-*XhoI* DNAはpYA301プラスミド（Gallwitz and Sures, 1980）から調製した。*RME1* 0.8-kbp *EcoRI* DNAはPAm246プラスミド（Neigeborn and Mitchell, 1991）から調製した。*IME1* 0.6-kbp *HindIII*-*EcoRI* DNAはYEp26-7プラスミド（Kassir

Table 4-1 *S. cerevisiae* strains used

Strain	Mating type	Genotype or characteristics ^a
Kyokai no. 9	Non	A wild type diploid strain
K7-U	Non	An <i>ura3</i> mutant of Kyokai no. 7
SH575	a	<i>ura3-52 lys2-80</i> ^{amber} <i>ade2-10</i> ^{ocher} <i>trp1</i> Δ <i>his3</i> Δ
SH576	α	<i>ura3-52 lys2-80</i> ^{amber} <i>ade2-10</i> ^{ocher} <i>trp1</i> Δ <i>his3</i> Δ
SH962	Non	<i>MATa/MATα ura3-52/ura3-52 ade2-10</i> ^{ocher} / <i>ade2-10</i> ^{ocher} <i>lys2-80</i> ^{amber} / <i>lys2-80</i> ^{amber} <i>trp1</i> Δ/ <i>trp1</i> Δ
SH2461	Non	<i>MATa/MATα HMLα/HMLα HMRa/HMRa sir3::LUE2^b/sir3::LUE2</i> <i>trp1/trp1 ura3-52::[ura3-52, HIS4-lacZ]^c/ura3-52::[ura3-52, HIS4-lacZ]</i> <i>leu2-3, 122/leu2-3, 122 pho3-1/pho3-1 pho5-1/pho5-1</i>
SH2675	α	<i>ura3-52 leu2-3, 112 trp1 pho3-1 pho5-1</i>
SH2676	a	<i>ura3-52 leu2-3, 112 trp1 pho3-1 pho5-1</i>
SH2719	a/a	A fusant between SH575 and SH2676
SH2720	α/α	A fusant between SH576 and SH2675

^a Genetic symbols are as described by Mortimer et al. (1992).

^b A *sir3* disrupted allele by insertion of a 1.5-kbp *Bgl*II-*Xho*I *LUE2* fragment of *S. cerevisiae* (Ivy et al., 1986).

^c [*ura3-52, HIS4-lacZ*] indicates a DNA construct bearing a fusion gene consisting of the *LacZ* gene connected with the *HIS4* promoter and inserted at the *ura3* locus (Lucchini et al., 1984).

and Simchen, 1988) から切りだした。*IME2* 1.1-kbp *Hind*III-*Bam*HI DNAは pSP1プラスミド (Yoshida et al., 1990) から調製した。他のプラスミドについては、図4-1 に示した。

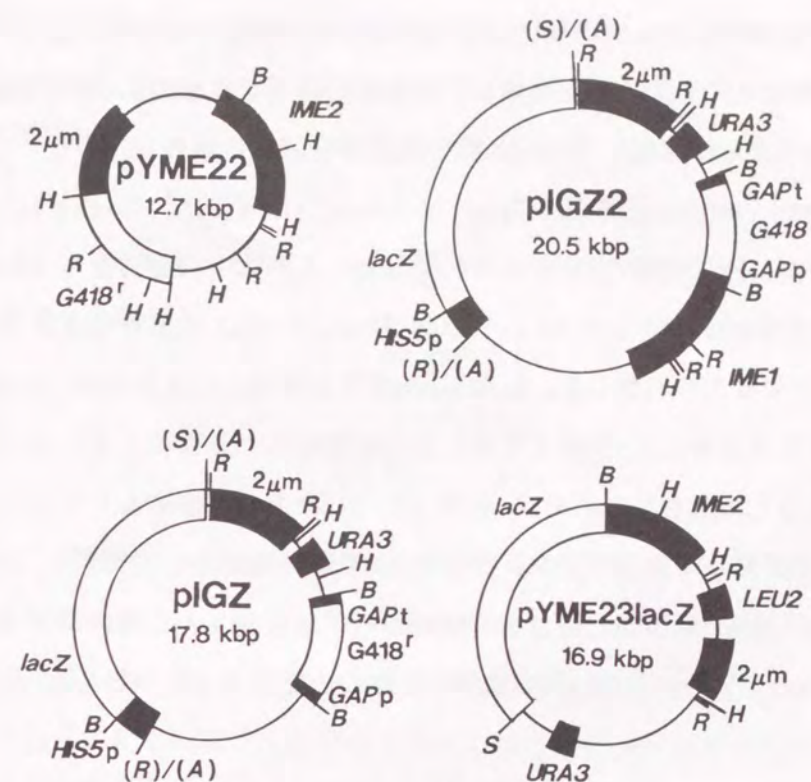


Fig. 4-1. Structures of plasmids. The closed boxes indicate DNA fragments of *S. cerevisiae*. The open boxes represent DNA fragments of *E. coli*. The thin lines indicate the DNA fragment originating from pBR322. *GAPp* and *GAPt* represent, respectively, the promoter and terminator of the *GAP* gene of *S. cerevisiae*. *G418^r* represents the kanamycin-resistance gene. Abbreviations of the restriction sites are: A, *Aat*II; B, *Bam*HI; H, *Hind*III; R, *Eco*RI; and S, *Sal*I. (S)/(A) and (R)/(A) are the junction sites of *Sal*I and *Aat*II, and *Eco*RI and *Aat*II, respectively, after blunt-ending by treating with T4 DNA polymerase.

使用培地および培養方法

前孢子形成培地には、YPGly培地[1 liter あたり Yeast Extract 10 g、Bacto-peptone (Difco) 20 g、グリセロール 20 g] および GNA 培地 [1 liter あたり Yeast Extract 10 g、グルコース 50 g、Nutrient broth (Difco) 30 g] を用いた。孢子形成培地には、NaAc培地(1 literあたり酢酸ナトリウム 10 g) およびDNaAc (NaAc 培地にYeast Extract 1.25 g、グルコース 1.0 gを加えた)を用いた。孢子形成能の解析には、2つの方法を用いた。協会7号の場合(方法I)、G418 (Life Technology, Inc.; 1 mlあたり500 μg) を添加あるいは無添加のYPGly培地で30℃、2日間培養し、8,000 rpmで5分間遠心して集

菌し無菌水で洗浄後、NaAc培地に懸濁し30°Cで3日間振とうした。協会9号の場合（方法Ⅱ）、GNA培地で30°C、2日間培養し、菌体を白金耳で集めDNaAc培地に懸濁し25°Cで1日静置し、30°Cで2日間振とうした。孢子形成率を求める場合は、少なくとも300の細胞を調べた。*RME1*、*IME1* および *IME2* 遺伝子の転写産物の解析は、SmithとMitchell (1989)の方法に従った。YPAD培地で30°C、2日間培養した菌体1白金耳を3 mlのYEPAc培地（1 literあたりBacto-peptone 20 g, Yeast Extract 10g, 酢酸カリウム 20 g）に植菌し、30°Cで2日間振とう培養した。2,000 rpmで5分間遠心により集菌した後、この菌体から調製した全RNAをYEPAc培地で生育させた細胞からの全RNAとした。1.2 mlのYEPAc培地から集菌した細胞を1.2 mlのKAc培地（1 literあたり酢酸カリウム 20 g）に懸濁し、30°Cで4時間激しく振とうした。2,000 rpmで5分間遠心して集菌し、この菌体から調製した全RNAをKAc培地で生育させた細胞からの全RNAとした。G418耐性を選択符号とするプラスミドを持つ形質転換体に対しては、上記の培地にG418を1 mlあたり500 μ g加えた。

生化学的方法

β -ガラクトシダーゼ活性測定 酵母細胞抽出液の調製は、Roseら (1990)の方法に従った。酵母培養液 ($OD_{660} \approx 1.0$) 1 mlを採取して集菌し、菌体をSM緩衝液 [85 mM NaCl, 1 mM $MgSO_4$, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)] 1 mlで洗浄し、エッペンドルフチューブに移した。この菌体を酵母破碎用緩衝液 [0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 20% (v/v) グリセロール, 1 mM DTT, 1 mM PMSF] 0.5 mlに懸濁し、0.4 gのガラスビーズ（フジストン no. 006）を加えて、低温室中（4°C）でエッペンドルフミキサー（model: 5432, Eppendorf）によって30分間攪拌した。酵母破碎用緩衝液0.5 mlを加えて遠心分離（3,000 rpm, 5分）し、上澄液を別の遠心管に移してさらに遠心分離（12,000 rpm, 5分）し、この上澄液を酵母細胞抽出液とした。

細胞抽出液中の β -ガラクトシダーゼ活性は、Jensenの方法 (1983)に従い以下のように測定した。Z緩衝液 [0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0), 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$, 0.05 M β -mercaptoethanol] 0.9 mlに、4 mg/mlの *o*-nitrophenyl- β -D-galactoside (Sigma) を含む0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0)を0.2 ml 加えて28°Cで予備加熱後、細胞抽出液 0.1 mlを加えて28°Cで反応を開始させた。反応液が薄く黄色になったところで、1 M Na_2CO_3 溶液 0.5 mlを加えて反応を停止させた。反応時間と反応液の420 nmにおける吸光度 (A_{420})を

測定して活性値を算出した。なお、1単位は28°Cで1分間に1 μ molの *o*-nitrophenylを産成する酵素量とし、1 μ molの *o*-nitrophenylの A_{420} は4.5とした。

タンパク質濃度の測定 Bradfordの方法 (1976)に従った。タンパク質定量用の染色液 (Protein Assay Kit; Bio-Rad) を脱イオン水で5倍に希釈した後、濾過した濾液1 mlに細胞抽出液 20 μ lを加えて混合し、室温で30分間反応させた。反応液の A_{595} を測定し、BSAにより作製した検量線（0.1~0.5 mg/ml）からタンパク質濃度を決定した。

第3節 結果

第1項 協会7号酵母における孢子形成制御遺伝子の転写産物

協会7号および協会9号は二倍体と考えられている (Kitamoto et al., 1990)が、両株ともほとんど孢子を形成しない。特に協会7号は前章での解析の結果、標準二倍体 a/α 株と構造的にも機能的にも同様の接合型遺伝情報を持つにもかかわらず孢子をほとんど形成しない。この原因をさらに追究するため、協会7号、二倍体実験室株 SH2461 (a/α) およびSH2719 (a/a) からそれぞれRNAを調製し、*IME1*、*IME2* および *RME1* 遺伝子の転写産物をノーザン解析により調べた。接合型遺伝子構成から考えられるように a/α 二倍体株においては*IME1* および *IME2* 転写産物が検出され、それらの転写量はYEPAc培地よりKAc培地で高く、*RME1* 転写産物量は両培地で低かった (図 4-2)。一方 a/a 二倍体株において、KAc培地での*IME1* および *IME2* 転写産物の量は a/α 株より低く、YEPAc培地ではほとんど検出されなかった。*RME1* 転写産物の量は両培地で高かった。これに対し協会7号の*IME1* および *IME2* 転写産物の量は、KAc培地における a/α 株のそれより低かったが、YEPAc培地では a/α 株と同じであった。*RME1* 遺伝子の転写は a/α 株と同様に抑制されており、協会7号において $a1-\alpha 2$ 抑制は正常であるとの前章での結果と一致する。これらの結果から、協会7号が孢子形成能を示さない原因は、孢子形成条件下においても *IME1* 遺伝子の発現が誘導されないためと推察される。*IME1* 遺伝子の発現が誘導されないメカニズムとしては、*IME1* 遺伝子の転写制御領域に異常があるか、あるいは栄養源情報の *IME1* 遺伝子への伝達経路に異常があることが考えられる。

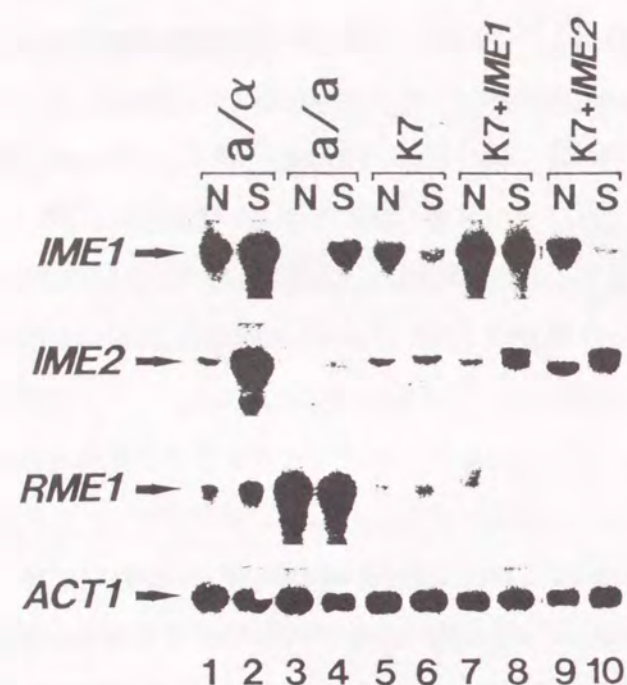


Fig. 4-2. Northern analysis of *IME1*, *IME2*, and *RME1* transcripts in Kyokai no. 7. Total RNAs were prepared from cells of strain SH2461 (*MATa/MATα*) (lanes 1 and 2), SH2719 (*MATa/MATa*) (lanes 3 and 4), Kyokai no. 7 (lanes 5 and 6), Kyokai no. 7 harboring pIGZ2 (Fig. 4-1) bearing *IME1* (lanes 7 and 8), and Kyokai no. 7 harboring pYME22 (Fig. 4-1) bearing *IME2* (lanes 9 and 10). N (nutrient YEPac medium) and S (KAc sporulation medium) represent RNA samples prepared from cells cultivated in the respective media as described in the text. Samples of 5 μ g of RNA were charged in slots of 1.5% formaldehyde-agarose gel. A 32 P-labeled 0.6-kbp *Hind*III-*Eco*RI fragment bearing the *IME1* gene prepared from plasmid YEp26-7 (Kassir et al., 1988) was used as a probe to detect the *IME1* transcript and a 1.1-kbp *Hind*III-*Bam*HI fragment prepared from pSP1 carrying the *IME2* gene was used as an *IME2* probe. A 0.8-kbp *Eco*RI fragment encoding *RME1* prepared from PAm246 was used to detect the *RME1* transcript. The *ACT1* transcript was read as an internal maker with a 1.1-kbp *Xho*I-*Hind*III fragment encoding the *ACT1* gene prepared from pYA301 as a probe.

Table 4-2. Effects of increased dosage of *IME1* on the sporulation frequency of Kyokai yeasts

Strain	Sporulation frequency on ^a			
	Protocol I		Protocol II	
	GNA + G418	GNA	GYPGly + G418	GYPGly
Kyokai no. 7+ <i>IME1</i>	0.1	0.1	1	0.1
- <i>IME1</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Kyokai no. 9+ <i>IME1</i>	5	1	0.1	0.1
- <i>IME1</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

^a Cells were sporulated by the indicated protocol (details, see text) after cultivation on the indicated pre-sporulation medium.

第2項 協会7号酵母における孢子非形成性のメカニズム

協会7号の細胞内で *IME1* 遺伝子を多量に発現させれば、孢子形成が回復すると考えた。G418耐性を選択符号として *IME1* 遺伝子を乗せた多コピー型プラスミドpIGZ2 (図 4-1) を協会7号、協会9号、実験室a/a株および α/α 株に導入した。形質転換体の選択培地としては、それぞれ 1 ml あたり 1 mg (協会7号に対して)、0.5 mg (協会9号) あるいは 0.25 mg (実験室株) のG418を含むYPAD 培地を用いた。それぞれの場合について4つの形質転換体を選び、孢子を形成させたところ、協会7号および協会9号はそれぞれ約 1% および 5% の孢子形成頻度を示した (表 4-2 および図 4-3)。一方a/a株および α/α 株の孢子形成頻度はそれぞれ10% 程度であった。いくつかの子囊からマイクロマニピュレーターによって子囊孢子を単離したが、孢子は全く発芽しなかった。このように *IME1* 遺伝子を導入したことにより、わずかではあるが孢子形成能の回復が見られたことから、協会7号および協会9号の *IME1* 遺伝子に異常があることが解った。さらに、*IME1* 遺伝子を導入しても協会7号および協会9号の孢子形成能が実験室株ほどには回復しなかったことから、*IME1* 遺伝子以外にも異常があると推察される。

IME1 遺伝子を導入した協会7号の孢子形成率が、a/a および α/α 株のそれより低い原因を明らかにするため、*IME1* 遺伝子を導入した協会7号の *IME1*, *IME2* および *RME1* 遺伝子の転写産物を解析した。その結果YEPacおよびKAc培地で *IME1* 転写産物の増加が見られ、

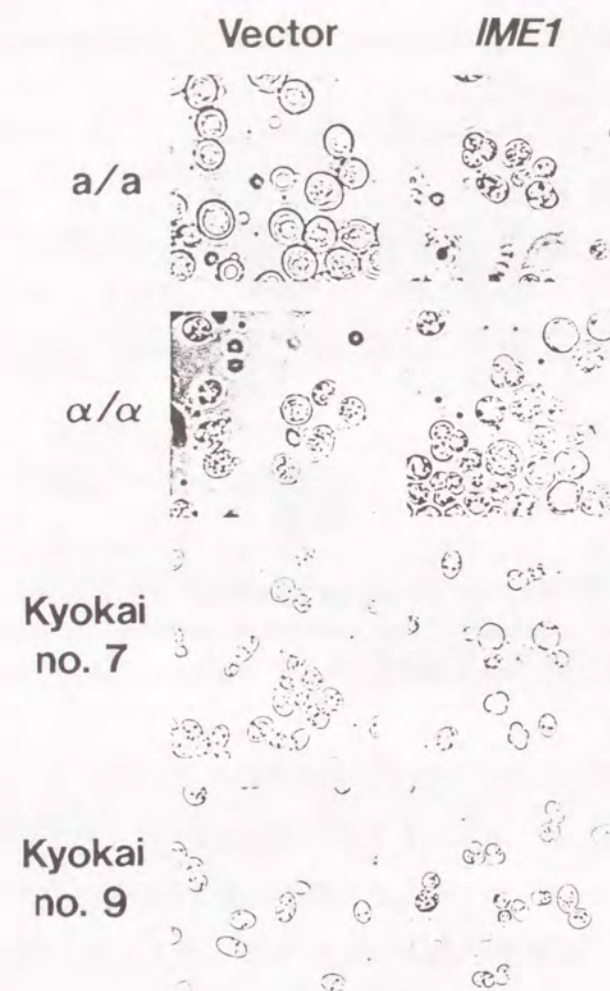


Fig. 4-3. Sporulation abilities of strains of *MATa/MATa* (SH2719), *MATα/MATα* (SH2720), Kyokai no. 7 and Kyokai no. 9 induced by increased dosage of the *IME1* gene. Cells of these strains harboring plasmid pIGZ2 (*IME1*) and pIGZ (vector) were sporulated according to protocol I (for Kyokai no. 9) and II (for others). Laboratory strains (SH2719 and SH2720) were grown at 30°C for 1 day on GNA plates, and then smeared onto DNaAc plates and incubated at 30°C for 3 days after standing at 25°C for 1 day.

その転写量は *IME1* 遺伝子を導入していない協会7号より多かった(図 4-2)。*IME2* 遺伝子の転写産物はKAc培地で増加が見られ、栄養源情報により *IME2* 遺伝子の発現が誘導されていることが観察された。しかし、KAc培地での *IME1* および *IME2* 遺伝子の転写量は、*a/α* 株のそれよりなお低かった。この結果より協会7号に *IME1* 遺伝子を導入しても実験室株ほどに孢子形成能を回復しない原因は、*IME1* 遺伝子の転写量が低いために *IME2* 遺伝子の

発現が標準二倍体 *a/α* 株に見られるほどの量まで誘導されないことによると考えられる。

a/α ime1/ime1 株に多コピーの *IME2* 遺伝子を導入すると、低頻度ではあるが孢子形成能が回復する (Smith and Mitchell, 1989) と報告されている。協会7号においても *IME2* 遺伝子量の増加によって孢子形成率が高くなるかを試験した。*IME2* 遺伝子を導入した協会7号の *IME2* 遺伝子の転写量は原株より増加した(図 4-2)が、孢子の形成は見られなかった。また、*IME1* および *IME2* 遺伝子を多コピーで同時に導入しても *IME1* 遺伝子を単独で導入した場合と同程度の孢子形成率であった。以上の結果から、協会7号の孢子非形成性は、*IME1* 遺伝子の異常に加え栄養源から *IME1* 遺伝子への情報伝達経路に異常があると考えられる。しかし、*IME2* 遺伝子の転写産物の翻訳過程、Ime2 タンパク質の修飾活性、あるいは孢子形成特異的遺伝子群の異常などの可能性も残されている。

第3項 協会7号酵母の *IME1* 遺伝子の機能

協会7号において *IME1* 遺伝子の導入により若干の孢子形成能の回復が見られたことは、正常な Ime1 タンパク質が存在すれば孢子形成は誘導されることを示している。すなわち導入した *IME1* 遺伝子によって産生される Ime1 タンパク質が正常に機能していると考えられる。このことを確かめるために、G418耐性を選択符号として、*IME2-lacZ* 融合遺伝子を持つ pYME23lacZ プラスミドを協会7号 (K7-U)、*a/a* (SH2719) および *a/α* 株 (SH962) に導入し、孢子形成条件下 (KAc 培地) での β -ガラクトシダーゼの活性を測定した。*a/α* 株は培養が進むにつれ活性の誘導が見られたが、*a/a* 株および協会7号では誘導が見られなかった(図 4-4)。これらの形質転換体には、さらに *IME1* 遺伝子を持つ pIGZ2 プラスミドを導入し、得られた形質転換体について β -ガラクトシダーゼの活性を測定した。*a/α* 株は培養開始から高い活性を示したが、*a/a* 株および協会7号では、緩やかに活性が上昇した。これらの結果は、導入した *IME1* 遺伝子によって産生される Ime1 タンパク質が正常に機能していることと協会7号の *IME1* 遺伝子が正常に機能せず、仮に Ime1 タンパク質が微量ながら存在するにしても *IME2* 遺伝子の発現を誘導していないことを示している。

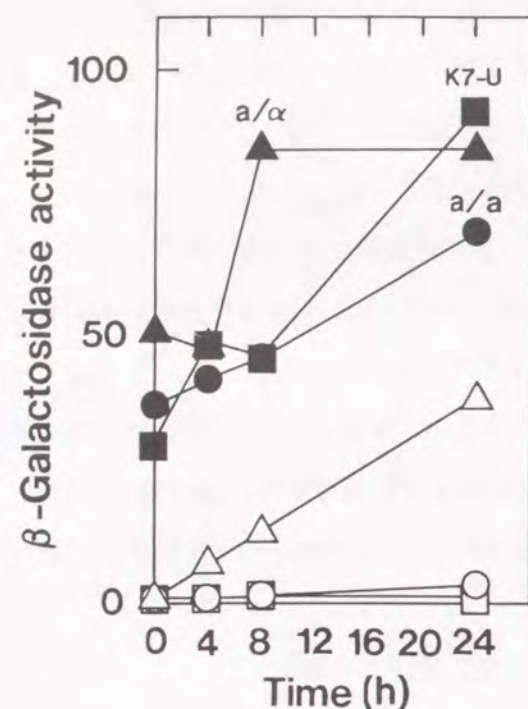


Fig. 4-4. Time courses of *IME2* expression during sporulation. Cells of SH962 (*MATa/MATα*) (▲ and △), SH2719 (*MATa/MATa*) (● and ○), and K7-U (■ and □) harboring pYME23lacZ, bearing the *IME2-lacZ* fusion gene, with (closed symbols) or without (open symbols) pIGZ2 plasmid bearing the *IME1* gene were grown in 10 ml of minimal liquid medium without uracil for selection of transformants with pYME23lacZ plasmids, and addition of G418 (1 mg per ml for Kyokai no. 7 and 0.25 mg per ml for the a/α and a/a strains) for selection of transformants with pIGZ2 plasmids at 30°C for 16 hr. The cells were harvested, resuspended in 100 ml of YEPAc liquid medium, incubated at 30°C for 24 h, resuspended in 100 ml of KAc medium after washing with the same KAc medium and shaken at 30°C. Samples of 10 ml were taken from the KAc culture at appropriate intervals for β-galactosidase assay.

第4節 考察

一般に実用酵母は孢子形成頻度が低く、接合能を持つ減数分裂分離株を得ることは困難であり、育種上の障害となっている。実用酵母に孢子形成能を付与する分子育種技術を開発することを最終目的として、協会7号の孢子非形成性のメカニズムを解析した。孢子形成には接合型遺伝情報がa/αであること（二倍体株でa1-α2抑制が機能している）とグルコースおよび窒素源が共に欠乏することが必要である。これら二つの情報が正常に *IME1*

遺伝子に伝達されることによって孢子形成が開始される。

協会7号の *IME1* 遺伝子は孢子形成条件下で発現の誘導が見られなかった。しかし、協会7号に正常な *IME1* 遺伝子を導入すると若干の孢子形成能の回復が見られた。この形質転換体の孢子形成条件下における *IME1* 遺伝子の転写量を調べたところ、原株よりは高いが標準a/α株の転写量よりは低かった。以上の結果より、協会7号の孢子非形成性は *IME1* 遺伝子の転写制御機構の異常によると結論した。前章で述べたように、協会7号には機能的に正常なaおよびα接合型遺伝情報が存在するので、*IME1* 遺伝子の転写の異常は、i) *IME1* 遺伝子自身の転写制御部位の異常、ii) 栄養源から *IME1* 遺伝子への情報伝達経路の異常が考えられる。

ビール酵母の多くも孢子形成能を示さないことが知られているが、種々の *spo* 変異（孢子形成不能変異）との相補性試験の結果から、それらの株での孢子形成特異的遺伝子群の機能は正常であることが示唆されている（Tsuboi and Takahashi, 1988）。協会7号に正常な *IME1* 遺伝子を導入すると、若干の孢子形成能の回復が見られたことから、孢子形成そのものに必要な遺伝子群の機能はほぼ正常であると考えられるが、今後解析が必要であろう。協会7号の孢子形成率をさらに上昇させるためには、*IME1* 遺伝子の導入に加え栄養源情報の *IME1* 遺伝子への伝達を回復させる必要がある。しかし、栄養源情報と孢子形成開始に関与する遺伝子の報告は少なく、実験室株を材料として栄養源情報の *IME1* 遺伝子への伝達に関与する遺伝子の検索が重要である。

第5節 要約

協会7号の孢子非形成性のメカニズムを明らかにするために、*IME1*、*IME2* および *RME1* 遺伝子の転写を解析した。協会7号では孢子形成条件下で *IME1* および *IME2* 遺伝子の転写は誘導されていなかった。多コピー型プラスミドに乗せた正常な *IME1* 遺伝子を協会7号に導入したところ、若干の孢子形成が観察された。子嚢解剖を試みたが、孢子は発芽しなかった。*IME1* および *IME2* 遺伝子の両者を導入しても、*IME1* 遺伝子単独の場合と同じ程度の孢子形成率であった。正常な *IME1* 遺伝子を導入しても協会7号の *IME1* 遺伝子の転写量は、標準a/α株のそれより低く、*IME2* 遺伝子の転写量は a/α株より著しく低かった。これらの事実より協会7号の孢子非形成性は、少なくとも孢子形成条件下でも *IME1* 遺伝子の転写が正常に誘導されないためと考えられた。

総合考察

実用酵母 *S. cerevisiae* の育種技術の開発を目的として、実験室株と協会7号の接合型制御機構および協会7号の孢子非形成性に関して解析を行った。*S. cerevisiae* の接合型制御機構に関与する新しい遺伝子 *AAR2* を分離・同定し、分子生物学的な解析を行った。さらに *S. cerevisiae* に多薬剤耐性を付与する *PDR4* 遺伝子が原栄養体に対して形質転換や交雑における有用な優性選択符号であることを見いだした。協会7号の接合型制御機構を解析した結果、標準二倍体株 a/α と同様に、 $\alpha 2$ 抑制および $a1-\alpha 2$ 抑制により接合能を示さないことが明らかになった。ここで用いた解析方法を応用して、協会7号および吟醸用酵母から接合能を有する株を分離し交雑体を造成した。孢子形成を誘導する *[ME]* 遺伝子を協会7号に導入し、若干の孢子形成能の回復を観察した。協会7号の孢子非形成性は、*[ME]* 遺伝子の発現異常および栄養源から *[ME]* 遺伝子への情報伝達経路の異常によることを明らかにした。

実験室株の育種技術を実用酵母に直接用いるには、以下のような問題点がある。実用酵母は、i) 孢子形成能が弱く、減数分裂分離体が取得しにくい；ii) 従って接合能が得られず、自由に交雑できない；iii) 有用な選択符号がないので、細胞融合や形質転換ができない；iv) 突然変異処理を行えば有用形質に対応する遺伝子を損傷する可能性がある；などが挙げられる。以上の問題点の一つの解決策となる育種技術は、第3章で示した融合遺伝子による接合能を有する株の効率的な分離法と、第4章で述べた *[ME]* 遺伝子導入による孢子形成能の付与を組み合わせることにより以下のように考えられる。すなわち i) a あるいは α 接合能を有する株を迅速に判定するため、*PDR4* 遺伝子を優性選択符号として融合遺伝子 *STE6p-PHO5* および *MF α /p-PHO5* を結合したプラスミドを親株に導入する。次に ii) 酸性ホスファターゼの活性染色により赤色を呈するコロニーを選択する。この時醸造特性を損なわないように考慮して変異処理を行わない。iii) 非選択培地上での培養により選択した株から融合遺伝子プラスミドを脱落させる。iv) それらの中からセルレニン耐性接合型テスターを利用して、接合型を示すクローンをクロスストリーク法によりプレート上で判定する。v) 分離した接合能を有する株間で交雑を行い、マイクロマニピュレーターで親株より大きい雑種細胞と思われる細胞を分離する。vi) その細胞に対してセルレニン耐性接合型テスターにより、非接合型、すなわち交雑体であることを確認する。vii) 交雑体が孢子形成能を有する場合は良いが、持たない場合はG418耐性を選択符号として、胞

子形成を誘導する *[ME]* 遺伝子を交雑体に導入し孢子を形成させる。viii) マイクロマニピュレーターで孢子を分離する。上記に示した一連の操作により、協会7号および吟醸酒醸造用酵母から実際に交雑体を造成した。得られた交雑体に *[ME]* 遺伝子を導入し、孢子を形成させマイクロマニピュレーターで孢子の分離を試みたが、成熟分裂分離体は取得できなかった。*[ME]* 遺伝子を導入した吟醸用酵母の交雑体に対して、より多くの孢子を処理するためにランダム孢子分離を試みた。孢子を形成させ、Zymolyaseで孢子嚢を処理後、60°Cで20分保温した。適当に希釈してYPAD培地に塗布して培養し、生育したコロニーについてセルレニン耐性接合型テスターを用いて接合能を調べたところ、接合能を示す株を取得することができた。しかし、孢子の発芽率が低い原因は不明であり、実用酵母育種における今後の大きな問題である。

ここで示した新しい分子育種法が、組換えDNA技術を用いた他の分子育種法と異なる点は、外来の遺伝子を対象とした菌株の染色体上に組み込んでいないことである。現在、組換え体による食品や飲料の製造に対して規制がかなり緩和されており、厚生省では酵母 *S. cerevisiae* 自身のDNAだけが組み込まれた組換え体については、実際の製造に用いることを許可している。本研究で示した方法では、異種遺伝子による染色体上の遺伝子の改変を行っていないので、遺伝子組換えに対する規制に全く抵触しない。従って、導入したプラスミドが完全に除去されていることを実証できるなら育種した菌株による実際の製造には問題がないと考えられる。

本研究で得られた知見から考えられる育種技術としては、先に述べた方法以外に *PDR4* 遺伝子を選択符号とした *MAT* 遺伝子の破壊が挙げられる。*PDR4* 遺伝子が1コピー増えればセルレニン耐性を獲得するとの結果から、*PDR4* 遺伝子による *MAT* 遺伝子破壊株はセルレニン耐性により選択できると思われる。*MATa/MAT α* 遺伝子型の二倍体実用酵母に対して、もし *MATa* 遺伝子が破壊されれば細胞は α 型を示し、*MAT α* 遺伝子が破壊されれば細胞は a 型を示すであろう。別の育種法として、薬剤耐性を選択符号とする細胞融合が考えられる。G418耐性を付与する大腸菌DNAである *Tn601(903)* 遺伝子と、セルレニン耐性を付与する *PDR4* 遺伝子を細胞融合させたい菌株にそれぞれ導入し、得られた形質転換体間で細胞融合操作を行い両薬剤に対する耐性で細胞融合体を選択する。細胞融合させたい株間でそれぞれの薬剤に対する耐性に差があれば、耐性を付与する遺伝子を導入する必要はないであろう。この方法では細胞融合の後の再生過程で選択培地に二種類の薬剤が含まれることになり、プロトプラスト化した細胞は正常細胞より薬剤に対する感受性が高いため、死

滅する可能性が高くなるであろうから、薬剤の濃度を十分に検討する必要がある。さらに、接合型制御に関する *MATa*, *MAT α* , *AAR1* および *AAR2* 遺伝子の優性欠損変異を利用する育種方法も考えられる。例えば、 $\alpha 1$ - $\alpha 2$ 抑制は正常であるが $\alpha 2$ 抑制が欠損した *MAT $\alpha 2$* 優性変異遺伝子を a/α 株に導入すれば、接合型を非接合型から α 型に変換させることが可能であろう。しかし、この方法の適用には、これらの遺伝子の優性欠損変異の取得が先決である。

清酒やビール醸造、アルコール製造に用いられている実用酵母は優れた特性を持つ貴重な遺伝子資源である。一方、実用酵母は実験室株とは異なる興味深い変異株と見なすこともできる。従ってそれらの有用形質あるいは欠損した性質がどのような遺伝的支配をうけているかを明らかにすることを通じて、基礎生物学的にも重要な知見が得られることが期待される。例えば、本研究により協会7号の胞子非形成性は *IME1* 遺伝子および栄養源から *IME1* 遺伝子への情報伝達の異常により引き起こされていることが明らかとなった。協会7号と実験室株との *IME1* 遺伝子の塩基配列を比較することにより、胞子非形成性の問題を解決する方策が得られる可能性があるだけでなく、*IME1* 遺伝子上流の転写制御領域についての知見も得られる可能性がある。また、協会7号を栄養源から *IME1* 遺伝子への情報伝達に関与する遺伝子を検索するための研究材料とすることもできる。あるいは協会7号など、実用酵母の多くは実験室株と比較して増殖速度が著しく早いことから、細胞増殖や細胞周期の制御についての研究材料として有用であるかもしれない。これらの点は、今後の興味深い研究課題と思われる。このように、実用酵母の特性を解析することは、応用生物学的観点からだけでなく基礎生物学的にも有意義であると考えられる。本研究での知見が実用酵母の育種および基礎生物学に少しでも役立つことを期待する。

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始御指導を賜りました、大阪大学工学部、大嶋泰治教授に心から感謝致します。本論文の作製にあたり、有益な御助言と御教示を賜りました、大阪大学工学部、山田靖宙教授、菅 健一教授、新名惇彦教授、今中忠行教授、ト部 格教授、塩谷捨明教授、大阪大学生物工学国際交流センター、吉田敏臣教授ならびに大阪大学産業科学研究所、二井將光教授に感謝致します。

本研究に際し、直接懇切なる御指導を賜りました、大阪大学工学部、原島 俊助教授に深く感謝致します。終始研究を援助していただきました小西酒造(株)小西新太郎社長に厚く感謝致します。

本研究の共同研究者である橋本英明氏[雲海酒造(株)](第2章)、上田 努氏[現アサヒビール(株)]、土原和子、服部孝夫および秋田耕治[小西酒造(株)](第3章)、中島亮一氏[オリエンタル酵母(株)]、芦刈俊彦氏、後藤直子女史 および 天知輝男氏[サントリー(株)](第4章)、*AAR2* 遺伝子の塩基配列の決定(第1章)に協力してくださった 山本丈浩氏[現 三共(株)]に心より感謝致します。御助言および御激励を賜りました大阪大学工学部、向 由起夫博士、文谷政憲博士(現 広島大学総合科学部)、をはじめとする大嶋研究室の皆様方に感謝致します。皆様方の研究のより一層の発展を心からお祈り申し上げます。

本論文を書き終えることができたのは、妻直子の精神的援助によることを付記します。

参考文献

- 浅野慎一、久安智香、山抱基純、森村 茂、岸本眞希男、木田建次. 1987 凝集性酵母の育種と育種株の発酵特性. 醸工. 65:169-177.
- Arima, K., T. Oshima, I. Kubota, N. Nakamura, T. Mizunaga, and A. Toh-e. 1983. The nucleotide sequence of the yeast *PHO5* gene: a putative precursor of repressible acid phosphatase contains a signal peptide. Nucleic Acids Res. 11:1657-1672.
- Astell, C. R., L. Ahlstrom-Jonasson, M. Smith, K. Tatchell, K. Nasmyth, and B. D. Hall. 1981. The sequence of the DNAs coding for the mating-type loci of *Saccharomyces cerevisiae*. Cell 27:15-23.
- Brethnach, R., and P. Chambon. 1981. Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. Annu. Rev. Biochem. 50:349-383.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-252.
- Boorstein, W. R., and E. A. Craig. 1990. Transcriptional regulation of *SSA3*, an HSP70 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 10:3262-3267.
- Casey, G. P., Xiao, W., and Rank, G. H. 1988. A convenient dominant selection marker for gene transfer in industrial strains of *Saccharomyces* yeast: *SMR1* encoded resistance to the herbicide sulfometuron methyl. J. Inst. Brew. 94:93-97.
- Chang, F., and I. Herskowitz. 1990. Identification of a gene necessary for cell cycle arrest by a negative growth factor of yeast: FAR1 is an inhibitor of a G1 cyclin, CLN2. Cell 63:999-1011.
- Dolan, J. W., C. Kirkman, and S. Fields. 1989. The yeast STE12 protein binds to the DNA sequence mediating pheromone induction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:5703-5707.
- Elion, E. A., P. L. Grisafi, and G. R. Fink. 1990. *FUS3* encodes a *cdc2+*/CDC28-related kinase required for the transition from mitosis into conjugation. Cell 60:649-664.
- Emeis, C. C. 1961. Polyploide Kulturhefen. Proc. Europ. Brew. Conv., Proc. 8th Congr., Vienna, 205-215.
- Emeis, C. C. 1965. Stabilität diploider und polyploider kulturhefestämme. Proc. Europ. Brew. Conv., Proc. 10th Congr., Stockholm. 156-163.
- Errede, B., and G. Ammerer. 1989. STE12, a protein involved in cell-type-specific transcription and signal transduction in yeast, is part of protein-DNA complexes. Genes Dev. 3:1349-1361.
- Fogel, S., and Welch, J. W. 1982. Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79:5342-5346.
- Fukuda, K., M. Watanabe, K. Asano, K. Ouchi, and S. Takasawa. 1992. Molecular breeding of a sake yeast with a mutated *ARO4* gene which causes both resistance to o-fluoro-DL-phenylalanine and increased production of β -phenethyl alcohol. J. Ferment. Bioeng. 73:366-369.
- Fukuda, K., K. Asano, K. Ouchi, and S. Takasawa. 1992. Feedback-insensitive mutation of 3-deoxy-D-arabino-hepturosonate-7-phosphate synthase caused by a single nucleotide substitution of *ARO4* structural gene in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Ferment. Bioeng. 74:117-119.
- Gallwitz, D., and R. Seidel. 1980. Molecular cloning of the actin gene from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res. 8:1043-1059.
- Gallwitz, D., and I. Sures. 1980. Structure of a split yeast gene: complete nucleotide sequence of the actin gene in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77:2546-2550.
- Granot, D., J. P. Margolskee, and G. Simchen. 1989. A long region upstream of the *IME1* gene regulates meiosis in yeast. Mol. Gen. Genet. 218:308-314.
- Green, M. R. 1986. Pre-mRNA splicing. Annu. Rev. Genet. 20:671-708.
- Gritz, L., and J. Davies. 1983. Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 25:179-188.
- 郡家徳朗 1964. パン酵母の育成 (第2報) パン酵母の倍数性について. 農化. 38:158-166.
- Gunge, N. 1966. Breeding of baker's yeast—determination of the ploidy and an attempt to improve practical properties. Jpn. J. Genet. 41:203-214.
- Hadfield, C., A. M. Cashmore, and P. M. Meacock. 1986. An efficient chloramphenicol-resistance marker for *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. Gene 45:149-158.
- 原 昌道、嶋崎孝行、北野一好、飯村 穰. 1983. ハプロイド酵母による低アルコール清酒の製造. 醸協. 78:390-393.
- Harashima, S., A. Miller, K. Tanaka, K. Kusumoto, K. Tanaka, Y. Mukai, K. Nasmyth, and Y. Oshima. 1989. Mating-type control in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation and characterization of mutants defective in repression by $al-\alpha 2$. Mol. Cell. Biol. 9:4523-4530.
- 秦 藤樹、佐野敬元、松前昭広、神尾修彦、野村節三、須賀原亮三. 1960. 新抗カンディダ物質の研究. 日本細菌学雑誌 15:1075-1077.
- Herskowitz, I. 1988. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Rev. 52:536-553.
- Hertle, K., E. Haase, and M. Brendel. 1991. The *SNQ3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* confers hyper-resistance to several functionally unrelated chemicals. Curr. Genet. 19:429-433.

- Hicks, J., J. N. Strathern, and A. J. Klar. 1979. Transposable mating type genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 282:478-483.
- Hirata, D., and T. Hiroi. 1991. Genes that cause overproduction of isoamyl alcohol by increased gene-dosage effect in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric. Biol. Chem.* 55:919-942.
- Hussain, M., and J. Lenard. 1991. Characterization of *PDR4*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene that confers pleiotropic drug resistance in high-copy number. *Gene* 101:149-152.
- Ivy, J. M., A. J. S. Klar, and J. B. Hicks. 1986. Cloning and characterization of four *S/R* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 6:688-702.
- Jimenez, A., and Davies, J. 1980. Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. *Nature* 287:869-871.
- Jensen R., G. F. Jr. Sprague, and I. Herskowitz. 1983. Regulation of yeast mating-type interconversion: feedback control of *H0* gene expression by the mating-type locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:3035-3039.
- Kassir, Y., D. Granot, and G. Simchen. 1988. *IME1*, a positive regulator gene of meiosis in *S. cerevisiae*. *Cell* 52:853-862.
- Kawado, A., T. Suizu, S. Imayasu, T. Shigematsu, A. Kimura, and K. Murata. 1992. Highly efficient sporulation induced by glutathione or glutathione thiol eaters in sake (Kyokai no.7) and a wild-type yeast. *J. Ferment. Bioeng.* 74:363-367.
- Kawaguchi, A. H. Tomoda, S. Nozoe, S. Omura, and S. Okuda. 1982. Mechanism of action of cerulenin on fatty acid synthetase: effect of cerulenin on iodoacetamide-induced malonyl-CoA decarboxylase activity. *J. Biochem.* 92:7-12.
- Kawaguchi, H., M. Yoshida, and I. Yamashita. 1992. Nutritional regulation of meiosis-specific gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56:289-297.
- Kihara, K., M. Nakamura, R. Akada, and I. Yamashita. 1991. Positive and negative elements upstream of the meiosis-specific glucoamylase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 226:383-392.
- 北本勝ひこ 1989. 醸造酵母からのリジン要求性変異株の取得法. 醸協. 84:34-37.
- 北本勝ひこ 1989. 清酒酵母からのウラシル要求性変異株の取得法. 醸協. 84:849-853.
- Kitamoto, K., K. Oda, K. Gomi, and K. Takahashi. 1990. Construction of uracil and tryptophan auxotrophic mutants from *sake* yeast by disruption of *URA3* and *TRP1* genes. *Agric. Biol. Chem.* 54:2927-2987.
- Kunze, G., R. Bode, H. Rintala, and J. Hofemeister. 1989. Heterologous gene expression of the glyphosate resistance marker and its application in yeast transformation. *Curr. Genet.* 15:91-98.
- Landschulz, W. H., P. F. Johnson, and S. L. McKnight. 1988. The leucine zipper:

- a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science.* 240:1759-1764.
- Legrain, P., and A. Choulika. 1990. The molecular characterization of PRP6 and PRP9 yeast genes reveals a new cysteine/histidine motif common to several splicing factors. *EMBO J.* 9:2775-2781.
- Leppert, G., R. McDevitt, S. C. Falco, T. K. Van Dyk, M. B. Ficke, and J. Golin. 1990. Cloning by gene amplification of two loci conferring multiple drug resistance in *Saccharomyces*. *Genetics* 125:13-20.
- Lucchini, G., A. G. Hinnebusch, C. Chen, and G. R. Fink. 1984. Positive regulatory interactions of the *HIS4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 4:1326-1333.
- Lustig, A. J., R.-J. Lin, and J. Abelson. 1986. The yeast RNA gene products are essential for mRNA splicing in vitro. *Cell* 47:953-963.
- Malone, R. E. 1990. Dual regulation of meiosis in yeast. *Cell* 61:375-378.
- Matsuura, A., M. Treinin, H. Mitsuzawa, Y. Kassir, I. Uno, and G. Simchen. 1990. The adenylate cyclase/protein kinase cascade regulates entry into meiosis in *Saccharomyces cerevisiae* through the gene *IME1*. *EMBO J.* 9:3225-3232.
- McCaffrey, G. F., J. Clay, K. Y. Kelsay, and G. F. Sprague, Jr. 1987. Identification and regulation of a gene required for cell fusion during mating of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7:2680-2690.
- McGrath, J. P., and A. Varshavsky. 1989. The yeast *STE6* gene encodes a homologue of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein. *Nature* 340:400-404.
- Miller, A. M. 1984. The yeast *MATa1* gene contains two introns. *EMBO J.* 3:1061-1065.
- Mitchell, A. P., and I. Herskowitz. 1986. Activation of meiosis and sporulation by repression of the *RME1* product in yeast. *Nature* 319:738-742.
- Mitchell, A. P., S. Driscoll, and H. E. Smith. 1990. Positive control of sporulation-specific genes by the *IME1* and *IME2* products in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10:2104-2110.
- 溝口晴彦, 藤田栄信. 1981. 酸性ホスファターゼ活性を利用した清酒醪中の野生酵母の検出. 醸工. 59:185-188.
- Mortimer, R. K., C. R. Contopoulou, and J. King. 1992. Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae* edition 11. *Yeast* 8:817-902.
- Moye-Rowley, W. S., K. D. Harshman, and C. S. Parker. 1989. Yeast *YAP1* encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins. *Genes Dev.* 3:283-292.
- Mukai, Y., S. Harashima, and Y. Oshima. 1991. AAR1/TUP1 protein, with a structure similar to that of the β subunit of G protein, is required for

- $\alpha 1$ - $\alpha 2$ and $\alpha 2$ repressions in cell type control of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 11:3773-3779.
- Mukai, Y., S. Harashima, and Y. Oshima. 1993. Function of the Ste signal transduction pathway for mating pheromone sustains *MAT α 1* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 13:2050-2060.
- Murata, K., Y. Fukuda, M. Shimosaka, K. Watanabe, T. Saikusa, and A. Kimura. 1985. Phenotypic character of the methylglyoxal resistance gene in *Saccharomyces cerevisiae*; expression in *Escherichia coli* and application to breeding wild-type yeast strains. Appl. Environ. Microbiol. 50:1200-1207.
- Nasmyth, K. A., and K. Tatchell. 1980. The structure of transposable yeast mating type loci. Cell 19:753-764.
- Neigeborn, L., and A. P. Mitchell. 1991. The yeast *MCK1* gene encodes a protein kinase homolog that activates early meiosis gene expression. Genes Dev. 5:533-548.
- Ner, S. S., and M. Smith. 1989. Role of intron splicing in the function of the *MAT α 1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 9:4613-4620.
- Ng, R., and J. Abelson. 1980. Isolation and sequence of the gene for actin in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77:3912-3916.
- 小田佳緒子、北本勝ひこ、高橋康次朗、吉沢 淑. 1988. 醸造用酵母からのリジン要求性変異株の単離. 醸協. 83:614-617.
- 小田佳緒子、北本勝ひこ、五味勝也、高橋康次朗. 1990. 清酒酵母からウラシル要求性変異株の単離と変異株による清酒醸造. 醸工. 68:399-403.
- 大内弘造、秋山裕一. 1976. 反復戻し交配による優良 Killer 清酒酵母の造成. 醸工. 54:615-623.
- Padgett, R. A., P. J. Grabowski, M. M. Konarska, S. Seiler, and P. A. Sharp. 1986. Splicing of messenger RNA precursors. Annu. Rev. Biochem. 55:1119-1150.
- Parent, S. A., C. M. Fenimore, and K. A. Bostian. 1985. Vector system for the expression, analysis and cloning of DNA sequence in *S. cerevisiae*. Yeast 1:83-138.
- Rose, M. D., P. Novick, J. H. Thomas, D. Botstein, and G. R. Fink. 1987. A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on centromere-containing shuttle vector. Gene 60:237-243.
- Rose, M., F. Winston, and P. Hieter. 1990. Methods in yeast genetics: a laboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring harbor, New York.
- Rothstein, R. J. 1983. One-step gene disruption in yeast. Methods Enzymol. 101:202-211.
- 坂井和久. 1987. グルコアミラーゼ遺伝子を組み込んだ高発酵能ビール酵母の育種. 発

- 酵と工業. 45:569-578.
- Sambrook, J. E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74:5463-5467.
- Schnell, N., B. Krems, and K. Entian. 1992. The *PAR1* (*YAP1/SNQ3*) gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a *c-jun* homologue, is involved in oxgen metabolism. Curr. Genet. 21: 269-273.
- Shah, J. C., and M. Clancy. 1992. *IME4*, a gene that mediates *MAT* and nutritional control of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 12:1078-1086.
- Smith, H. E. and A. P. Mitchell. 1989. A transcriptional cascade governs entry into meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 9:2142-2152.
- Smith, H. E., S. S. Y. Su, L. Neigeborn, S. E. Driscall, and A. P. Mitchell. 1990. Role of *IME1* expression in regulation of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 10:6103-6113.
- Sone, H., T. Fujii, K. Kondo, F. Shimazu, J. Tanaka, and T. Inoue. 1988. Nucleotide sequence and expression of the *Enterobacter aerogenes* α -acetolactate decarboxylase gene in brewer's yeast. Appl. Environ. Microbiol. 54:38-42.
- Strathern, J., J. Hicks, and I. Herskowitz. 1981. Control of cell type in yeast by the mating type locus: the $\alpha 1$ - $\alpha 2$ hypothesis. J. Mol. Biol. 147:357-372.
- Struhl, K. 1989. Helix-turn-helix, zinc-finger, and leucine-zipper motifs for eukaryotic transcriptional regulatory proteins. Trends Biochem. Sci. 14:137-140.
- Suizu, T., Y. Iimura, K. Gomi, K. Takahashi, S. Hara, K. Yoshizawa, and G. Tamura. 1990. Construction of urea non-producing yeast *Saccharomyces cerevisiae* by disruption of the *CAR1* gene. Agric. Biol. Chem. 54:537-539.
- Takagi, M., S. Kawai, I. Shibuya, M. Miyazaki, and K. Yano. 1986. Cloning in *Saccharomyces cerevisiae* of a cycloheximide resistance gene from the *Candida maltosa* genome which modifies ribosomes. J. Bacteriol. 168:417-419.
- 高野 勇、吉栖 肇、寺島 豊. 1966. 醸造酵母の倍数性について (第1報) 胞子形成能と倍数性. 醸工. 44:150-157.
- 手塚秀敏. 1990. 醸造におけるバイオテクノロジー. 産調出版:82
- Toh-e, A., and Y. Ueda, S. Kakimoto, and Y. Oshima. 1973. Isolation and characterization of acid phosphatase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 113:727-738.

- Toh-e, A., and Y. Oshima. 1974. Characterization of a dominant, constitutive mutation, *PHOQ*, for the repressible acid phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 120:608-617.
- Trueheart, J., J. D. Boeke, and G. R. Fink. 1987. Two genes required for cell fusion during yeast conjugation: evidence for a pheromone-induced surface protein. Mol. Cell. Biol. 7:2316-2328.
- Tsuboi, M., and T. Takahashi. 1988. Genetic analysis of the non-sporulating phenotype of brewer's yeasts. J. Ferment. Technol. 66:605-613.
- Van Arsdel, S. W., G. L. Stetler, and J. Thorner. 1987. The yeast repeated element sigma contains a hormone-inducible promoter. Mol. Cell. Biol. 7:749-745.
- Van Soligen, P., and J. B. van der Plaats. 1977. Fusion of yeast spheroplasts. J. Bacteriol. 130:946-947.
- Vieira, J., and J. Messing. 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. Methods Enzymol. 153:3-11.
- Vijayraghavan, U., M. Company, and J. Abelson. 1989. Isolation and characterization of pre-mRNA splicing mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Genes Dev. 3:1206-1216.
- Watari, J., Y. Takata, M. Ogawa, J. Murakami, and S. Koshino. 1991. Breeding of flocculent industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains by introducing the flocculation gene *FLO1*. Agric. Biol. Chem. 55:1547-1552.
- Wilson, K. L., and I. Herskowitz. 1986. Sequences upstream of the *STE6* gene required for its expression and regulation by the mating type locus in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:2536-2540.
- Woolford, J. L., Jr. 1989. Nuclear pre-mRNA splicing in yeast. Yeast 5: 439-457.
- Yanish-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19. Gene 33:103-119.
- Yoshida, M., H. Kawaguchi, Y. Sakata, K. Kominami, M. Hirano, H. Shima, R. Akada, and I. Yamashita. 1990. Initiation of meiosis and sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* requires a novel protein kinase homologue. Mol. Gen. Genet. 221:176-186.
- Zhu, J., R. Contreras, D. Gheysen, J. Ernst, and W. Fiers. 1985. A system for dominant transformation and plasmid amplification in *Saccharomyces cerevisiae*. Bio/technology 3:451-456.

関係論文

- Kobayashi, H., N. Nakazawa, S. Harashima, and Y. Oshima. 1990. A system for temperature-controlled expression of a foreign gene with dual mode in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Ferment. Bioeng. 69:322-327.
- Nakazawa, N., S. Harashima, and Y. Oshima. 1991. *AAR2*, a gene for splicing pre-mRNA of the *MA7a1* cistron in cell type control of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 11:5693-5700.
- Nakazawa, N., T. Ashikari, N. Goto, T. Amachi, R. Nakajima, S. Harashima, and Y. Oshima. 1992. Partial restoration of sporulation defect in sake yeasts, Kyokai no.7 and Kyokai no.9, by increased dosage of the *IME1* gene. J. Ferment. Bioeng. 73:265-270.
- Nakazawa, N., H. Hashimoto, S. Harashima, and Y. Oshima. 1993. Use of the *PDR4* gene as a dominant selective marker in combination with cerulenin for prototrophic strains in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Ferment. Bioeng. 76:60-63.
- Nakazawa, N., K. Tsuchihara, T. Hattori, K. Akita, S. Harashima, and Y. Oshima. 1994. A method for direct selection of mating-competent clones from mating-incompetent industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Ferment. Bioeng. 78:6-11.
- 原島 俊、向 由起夫、中沢伸重、大嶋泰治. 1993. 酵母研究最先端、第XIII章、酵母の接合型制御と実用菌株育種. 福井作蔵 監修・（財）バイオインダストリー協会編 p255-281, (株) 医学出版センター（東京）
- 中沢伸重、原島 俊、大嶋泰治. 1993. 協会7号酵母の胞子非形成性の分子メカニズム. 醸協. 88:354-357.

