

2)

遺伝子組換え酵母による S- アデノシル
メチオニンの生産に関する基礎的研究

1992年

塩見尚史

目 次

第1章 序 論	1
1.1 はじめに	1
1.2 組換え微生物による有用物質の生産に 関する既往の研究	2
1.3 本研究の目的と内容	8

第1編 酵母のエチオニン耐性遺伝子の取得とその特性

第2章 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> のエチオニン耐性遺伝子の クローニングとS-アデノシルメチオニンの蓄積への 影響	11
2.1 緒言	11
2.2 実験方法	12
2.3 結果	16
2.4 考察	30
2.5 結言	32
第3章 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> のエチオニン耐性 遺伝子の塩基配列とその特性	33
3.1 緒言	33
3.2 実験方法	34

3.3 結果	38
3.4 考察	48
3.5 結言	49

第4章 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> のスペルミン耐性遺伝子の クローニングとS-アデノシルメチオニンの蓄積への 影響	50
--	----

4.1 緒言	50
4.2 実験方法	51
4.3 結果及び考察	52
4.4 結言	59

第2編 S-アデノシルメチオニンの生産法の開発

第5章 エチオニン耐性遺伝子を有する酵母によるS-アデノシ ルメチオニン及びその関連物質の生産	60
--	----

5.1 緒言	60
5.2 実験方法	62
5.3 結果	64
5.4 考察	74
5.5 結言	76

第6章 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> のエチオニン耐性遺伝子を マーカーとするプラスミドの発現と安定性	77
---	----

6.1 緒言	77
6.2 実験方法	78
6.3 結果及び考察	80
6.4 結言	90

第7章 トランスポゾンによるエチオニン耐性遺伝子の酵母 染色体への挿入とその発現及び安定性	91
--	----

7.1 緒言	91
7.2 実験方法	92
7.3 結果	95
7.4 考察	104
7.5 結言	106

第8章 総括	107
--------	-----

謝辞	112
引用文献	113
公刊論文及び口頭発表目録	119

第 1 章 序 論

1.1 はじめに

分子遺伝学は、遺伝子組換え技術(遺伝子工学)の開発により近年めざましい発展を遂げて来ている。この技術により、基本的には全ての遺伝子をクローニングすることができ、それらの遺伝子を増殖の速い微生物を宿主として発現させることにより、それまで微量にしか取得できなかった動物等の生理活性物質を、大量に生産することが可能になってきた。この技術は多くの分野にインパクトを及ぼし、付加価値の高い生理活性物質の生産のみならず、現在大量に利用されている微生物由来の有用物質の生産やコモディティーな化学の分野にまで応用がなされ始めている。これらの有用物質を工業的に生産するためには、遺伝子の発現、プラスミドの安定性などの工学的諸問題を解決する必要があるが、物質生産に関する研究に比べ工業的な生産方法に関する研究は少なく、十分な方法論は未だ確立されていないのが現状である。それゆえ、生産プロセスに適した組換え体を設計し得る方法論を確立していくことは、現在の重要な課題である。本研究は、S-アデノシルメチオニン(SAM)の工業的生産プロセスの開発を例にとり、野性酵母の分子育種に適したマーカー遺伝子の探索と目的遺伝子の宿主内での安定化の方法論に関して基礎的研究を行なったものである。以下に、本研究の背景と構成について述べる。

1.2 組換え微生物による有用物質の生産に関する既往の研究

1.2.1 組換え微生物により生産される有用物質

遺伝子組換えに関する研究は、1968年大腸菌のDNA連結酵素の発見¹⁾と1970年スミスらのDNA切断酵素の発見²⁾により始まる。そして同年塩化カルシウム溶液中に大腸菌を浸漬することによりDNAを菌体内に形質導入する方法³⁾がマンデルらにより開発されたことを契機に遺伝子組換え実験の条件が整い、最初のクローニング実験が行なわれるに至った⁴⁾⁻⁵⁾。以来、遺伝子組換え技術を利用して生理活性物質の生産に結びつけようとする研究は急速に発展し、現在では多分野へインパクトを及ぼし始めている。ここでは、組換え微生物による有用物質の生産についてその概略を紹介する。

遺伝子組換え技術は、薬理効果が知られているにもかかわらず大量生産方法の見い出されていなかった、ホルモンなどの微量物質の生成に関与するタンパク質の遺伝子を、増殖の速い微生物中で発現させることにより大量に生産する試みにまず適用された⁶⁾⁻⁸⁾。アメリカを中心として、インスリン、成長ホルモン、インターフェロン (α 、 β 、 γ)、インターロイキン、TNF、TPAなどの動物由来の遺伝子が次々とクローニングされた。これらの遺伝子産物の多くは商品化あるいは臨床の段階に入りつつある。また、遺伝子組換え技術のワクチン製造への利用も考えられている。これは、細胞表面の抗原決定基部分のペプチドに相当する遺伝子をクローニングし、その遺伝子産物をワクチンとして利用しようとするもので、B型肝炎、エイズ、インフルエンザなどウイルスに対するワクチンの開発がなされつつある。さらに、医療や食品分野などで重要なウロキナーゼ、リゾチームなどのヒト由来の酵素も、以下に述べる微生物由来の酵素同様遺伝子のクローニングがなされている。

一方、既に生産されている微生物由来の有用物質に関しては、遺伝子組換え菌を利用して更にその生産能力を強化することが試みられている⁶⁾⁻⁸⁾。微生物由来の工業的酵素には、食品製造やその関連工業において大量に利用される

Table 1.1 Some industrially used enzymes, their sources and uses⁹⁾.

Enzyme	Source	Principal uses
α -Amylase	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus licheniformis</i>	Starch hydrolysis for sugar syrups, brewing; Textiles and paper
Cellulase	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Trichoderma reesei</i> <i>Penicillium</i> sp.	Fruit and vegetable processing
β -Glucanase	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Aspergillus niger</i>	β -Glucan hydrolysis in brewing
Glucoamylase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus</i> sp.	Glucose syrup production from liquefied starch
Glucose isomerase	<i>Actinoplanes missouriensis</i> <i>Streptomyces</i> sp.	Isomerization of glucose into high fructose syrup
Lactase	<i>Saccharomyces</i> sp. <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Hydrolysis of lactose in milk and whey
Lipase	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Mucor</i> sp. <i>Rhizopus</i> sp.	Cheese and butter flavour modification; Fat and oil processing
Pectinase	<i>Aspergillus niger</i>	Extraction and clarification of fruit juices
Penicillin amidase	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Escherichia coli</i>	6-Aminopenicillanic acid synthesis for manufacture of semi-synthetic antibiotics
Protease (alkaline)	<i>Bacillus licheniformis</i>	Detergent and leather industries
Protease (neutral)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Baking and brewing
Protease (acid)	<i>Endothia parasitica</i>	Cheese manufacture

Table 1.2 Some important microbial products⁹⁾.

Product	Organism
<i>Foods and beverages</i>	
Bread	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Beer and wine	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Blue cheeses	<i>Penicillium roquefortii</i>
Camembert and Brie cheeses	<i>Penicillium camembertii</i>
Soy source	<i>Aspergillus oryzae</i>
Sauerkraut and pickles	<i>Leuconostoc, Pediococcus and Lactobacillus</i>
Yoghurt and fermented milks	<i>Lactobacillus and Streptococcus</i>
Vinegar	<i>Acetobacter aceti</i>
<i>Food additives</i>	
Glutamic acid, lysine and other amino acids	<i>Corynebacterium glutamicum Brevibacterium flavum</i>
Inosinic acid and ribonucleotides	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Vitamins	<i>Various yeasts and bacteria</i>
<i>Single cell proteins</i>	
From alkanes	<i>Methylophilus methylotrophus, Saccharomyces lypolytica</i>
From milk whey	<i>Kluyveromyces fragilis</i>
From starch and polysaccharides	<i>Fusarium graminearum</i>
From CO ₂ /sunlight	<i>Various algae</i>
<i>Industrial chemicals</i>	
Ethanol	<i>Saccharomyces cerevisiae Zymomonas mobilis</i>
n-Butanol	<i>Clostridium species</i>
Citric acid	<i>Aspergillus niger</i>
Lactic acid	<i>Lactobacillus species</i>
<i>Polysaccharides</i>	
Xanthan	<i>Xanthomonas campestris</i>
Dextran	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Alginates	<i>Azotobacter vinelandii</i>
<i>Medical products</i>	
<i>Steroids</i>	
Hydroxylated steroids (cortisone, hydrocortison, etc.)	<i>Mycobacteria and related bacteria Rhizopus arrhizus Curvularia lunata</i>
<i>Antibiotics</i>	
About 1000 compounds	<i>Filamentous fungi</i>
About 300 compounds	<i>Actinomycetes</i>
About 500 compounds	<i>Non-filamentous fungi</i>
<i>Insect toxins</i>	
Against lepidoptera larvae	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Against mosquitos and blackfly	<i>Bacillus thuringiensis Bacillus sphaericus</i>

アミラーゼやプロテアーゼなどの酵素と、臨床生化学の分野で少量利用される酵素がある。大量に利用される酵素とその用途をTable 1.1⁹⁾に示す。現在大量に利用されているプロテアーゼ、アミラーゼ、グルコースイソメラーゼなどの酵素もその遺伝子がクローニングされており、将来的にはこれら全ての酵素の生産が遺伝子組換え菌を用いて行なわれることになると考えられる。一方、Table 1.2⁹⁾に示した様に、酵素以外の微生物由来の有用な生産物が種々の分野で利用されている。これらの多くは多酵素系を利用して生産されるため、生産効率を律速する遺伝子あるいは、正のフィードバック制御に関与する遺伝子をクローニングすることにより、大量生産に結び付ける研究が行なわれている。アミノ酸では実用化段階に入っている。

さらに、エポキシダーゼによるエポキシドの生産やニトリルヒドラーゼによるアクリルアミドの生産などに代表される化学プロセスの生物反応プロセスへの変換に興味もたれている。従来の微生物ではコスト的に化学プロセスの方が優れている場合でも、遺伝子組換え菌による工業的な生産の技術が進めば、これらのうちいくつかは、遺伝子組換え菌を利用した生物反応プロセスに置き換えられると考えられる。また、現在化学プロセスにより生産されている他の多くのコモディティーな化学物質などの分野¹⁰⁾にも遺伝子組換え技術は大きな影響を及ぼしてくるであろう。

1.2.2 遺伝子組換え微生物の工業的利用に関する工学的諸問題

目的の遺伝子を保持した組換え微生物を利用して物質生産を行なうためには、生産効率を十分考慮する必要がある。そのためには、工学的に解決されなければならない課題も多い。真核生物である酵母*Saccharomyces cerevisiae*は、原核生物である大腸菌に比べ、動物等の真核生物由来の遺伝子を発現しやすい上に、古くより、アルコール飲料やパンの製造に利用されてきたことから安全性の面でも宿主として優れている。以下に、遺伝子組換え酵母*S. cerevisiae*の分子育種とその工業的利用に関する工学的問題として、野性株用のベクタープ

ラスミド、特にそのベクターに付与すべきマーカー遺伝子の開発と組み込んだ遺伝子の安定化法について述べる。いかにして目的のタンパク質を菌体外に分泌させるか、遺伝子を発現させるのに必要なプロモーターやターミネーターとしてどのようなものを選択していくかなど、その他の工学的諸問題も存在するが¹¹⁾⁻¹²⁾、ここでは省略する。

1) 野性酵母用のマーカー遺伝子の開発に関する既往の研究

目的遺伝子を宿主細胞に形質転換した場合、形質転換体を選別するためのマーカーが必要である。*S. cerevisiae*では、マーカーとしてアミノ酸要求性を相補する遺伝子（例えば、*Leu2*、*His3*など）が、一般に利用されている。しかしながら、工業的な生産を考慮した場合、栄養要求性等の変異のない野性型酵母を利用した方が安価な培地を利用できる点や高い菌体収率を得られる点で優れている。また、既に生産されている微生物由来の有用物質の生産能力を遺伝子組換え技術を利用して強化する場合、或いは、コモディティーな化学物質を遺伝子組換え菌で生産しようとする場合、生産性の高い株を宿主にする必要があるが、そのような株はほとんどが栄養要求性のない野性株である。さらに、パン、清酒、ビールなどの実用上よく利用されている酵母に対して遺伝子組換え技術による分子育種を行なうことが望まれているが、これらは高次倍数体であり、アミノ酸要求性などの変異を付加することは容易ではない。また、突然変異によるアミノ酸要求性などの誘発は、実用酵母の特性を劣化させる可能性も考えられ、容易に変異を付与することが出来ない場合が多い。

このような野性型の酵母に遺伝子を形質転換し、その転換体を選別するためには薬剤耐性のマーカーを利用する必要がある。これは、細胞増殖に対して阻害効果のある薬剤を培地に添加し、その薬剤に対して耐性を有する遺伝子を含むプラスミドを利用して形質転換体を選別する方法である。大腸菌においてはアンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシンなどの抗生物質に耐性を示す耐性遺伝子が利用されている。近年酵母においても、少ないながら数種類の耐

性マーカーが開発されつつあり、例えば、G418耐性に関与する3-ホスホリラーゼ遺伝子¹³⁾、メトトレキセートとスルファニルアミド耐性に関与するジヒドロ葉酸還元酵素の遺伝子¹⁴⁾などがある。しかし、その薬剤が高価であることから必ずしも実用的とはいえず、より実用性の高いマーカー遺伝子の開発が要求されている。

2) 形質転換した遺伝子の宿主中での安定化に関する既往の研究

プラスミド、特に人工的に作製したプラスミドは宿主菌体内に必ずしも安定に存在せず、分配不安定性並びに構造不安定性のために増殖に伴って脱落していく。例えば、酵母のYRp7などでは、1世代増殖するごとに約70-90%のプラスミドが脱落する。一般に、工業的な生産を行なうためには宿主菌を最低30-60世代培養する必要があることから、このプラスミドの脱落をいかに抑制できるかが最終的な生産収率に対して非常に重要となる。

プラスミドの安定性に関する数学的モデルが*E. coli*¹⁵⁾⁻¹⁷⁾及び*S. cerevisiae*¹⁸⁾⁻¹⁹⁾において提示されているが、精緻すぎる数学的モデルに基づくコンピュータシミュレーションの結果は、実際の複雑な現象を現在十分に表現できていないだけでなく、十分に安定性を高めることはできない。それゆえ、安定なベクタープラスミドの開発が、まず必要と考えられる。

安定なベクタープラスミドの開発に関する研究は、最近*E. coli*においてなされつつあり²¹⁾⁻²³⁾、Fプラスミド由来の遺伝子断片 (*miniF*)を適当なベクターと連結する方法や、*par*遺伝子を利用する方法などではかなり高いプラスミドの安定性が得られている。

一方、*S. cerevisiae*は、*E. coli*と比較してあまり研究がなされていない。ベクタープラスミドとして*S. cerevisiae*中に多コピー存在するプラスミドの2 μ mDNAを利用するプラスミド (YEp系)、染色体中のARS領域を有するプラスミド (YRp系) 及びセントロメアを利用したプラスミド (YCp系) などの開発が行なわれた。遺伝子の発現という面からは、コピー数の多いプラスミドが好ま

しいが、YRp系のプラスミドは、コピー数が多いのに対し安定性は著しく低い。YCp系のプラスミドは、安定性は高いが細胞当たり1コピーしか存在しない。これに対し、YEp系のベクターはコピー数が多く安定性も高いことから工業的な生産に適していると考えられた²⁴⁾。しかし、例えば、YEp13ですら1世代増殖する際に、10%程度欠落した。そこで、2 μ mDNAプラスミドの安定性保持機構の解析が行なわれ、2 μ mDNAに存在する遺伝子 (REP1、REP2、REP3、FLP、Z) の組合せを変えたプラスミドや2 μ mDNA全体を有するプラスミドpJDB219、pSI4あるいはpYX1が開発された²⁵⁻²⁸⁾。安定性の面ではこの2 μ mDNA全体を有するプラスミドが優れていた²⁷⁾。

また、目的の遺伝子を宿主の染色体内に組み込むことにより、目的遺伝子を多コピー数宿主内に挿入し、発現と安定性を高める試みも行なわれている。挿入部分として、染色体内に多コピー存在するTy因子を用いる方法²⁸⁾⁻²⁹⁾とリボソームDNAを用いる方法³⁰⁾がある。

1.3 本研究の目的と内容

前節までに述べてきたように、分子生物学の発展に伴って動植物など由来の遺伝子を*S. cerevisiae*を宿主としてクローニングし、目的の有用物質を生産することが可能になってきた。しかし、*S. cerevisiae*を宿主として工業的なレベルでの生産を行なう場合、適当な野性酵母用マーカーの開発と高い安定性を有するベクタープラスミドが開発されていないことが、工業化へのひとつの大きな障害になっている。それゆえ、生産プロセスに適した組換え体を設計し得る方法論を確立していくことは、現在の重要な課題である。

本研究では、工業化に有利なマーカー遺伝子と目的遺伝子の宿主中での安定化方法の開発を中心に、S-アデノシルメチオニン(SAM)の生産に関する基礎的な検討を行なった。SAMの構造をFig. 1.1に示す。SAMは、メチル基転移反応の供与体として生体中で重要な役割を果たすだけでなく、肝臓障害や脳障害

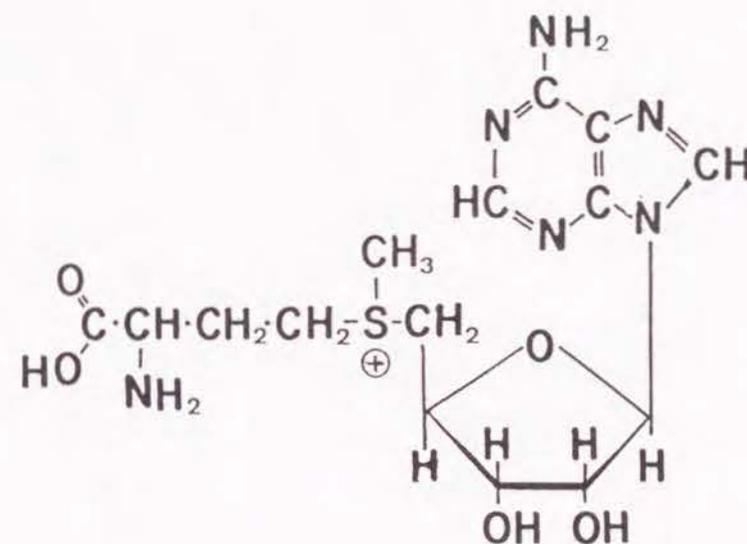


Fig. 1.1 Structure of S-adenosylmethionine (SAM).

に対する薬理的な有効性が報告されており、その工業的な生産が期待されている物質である。本論文は以下に示す章により構成される。

まず、第1部においては、エチオニン耐性遺伝子を野性酵母用のマーカーとして取得し、その生化学的並びに遺伝学的な特性について解析した。即ち、第2章では野性酵母で発現するマーカー遺伝子を取得することを目的として、メチオニンのアナログ物質であるエチオニンに耐性を示す酵母*S. cerevisiae*の遺伝子のクローニングを行なった。さらに、その生化学的な特性についても検討を行ない、SAMの蓄積に関与していることを明らかにした。また、第3章では、このエチオニン耐性遺伝子の塩基配列とそれから推算されるタンパク質の遺伝学的解析も行なった。さらに、第4章ではその他の特性として、エチオニン耐性遺伝子が酵母のスベルミン耐性にも関与していることについて述べた。

次に、第2部では、目的遺伝子の発現と安定性を高める方法の開発を中心にSAMの生産に関する研究を行なった。即ち、第5章では、このエチオニン耐性遺伝子を有する酵母を用いると工業的に十分利用し得る濃度のSAMを菌体内に蓄

積し得ること、また、同様にS-アデノシルホモシステインも蓄積できることを示した。しかし、この第5章で使用したベクターは、安定性が低く工業的な生産には適さない。そこで、第6章ではエチエオン耐性遺伝子をマーカーとし、且つ、プラスミドの安定性の高い工業化用ベクタープラスミドの開発を行なった。このプラスミドは、SAMの工業的な生産に利用できるのみならず実用酵母の育種にも利用できることを示した。最後に、第7章では染色体工学的なアプローチとして、エチオニン耐性遺伝子の酵母染色体内への挿入を行ない、多コピー挿入することができた。今後安定性を改良していくことにより、SAMの生産ベクターとして利用できる可能性があることを明らかにした。

第 1 編

酵母のエチオニン耐性遺伝子の取得とその特性

第2章 Saccharomyces cerevisiaeのエチオニン耐性遺伝子のクローニングとS-アデノシルメチオニンの蓄積への影響

第3章 Saccharomyces cerevisiaeのエチオニン耐性遺伝子の塩基配列とその特性

第4章 Saccharomyces cerevisiaeのスペルミン耐性遺伝子のクローニングとS-アデノシルメチオニンの蓄積への影響

第 2 章

*Saccharomyces cerevisiae*のエチオニン耐性遺伝子のクローニングとS-アデノシルメチオニンの蓄積への影響

2.1 緒言

酵母細胞に目的の遺伝子を形質転換し発現させるためには、形質転換体を選別するためのマーカーが必要となる。酵母の場合、栄養要求性を人為的変異により付与した半数体酵母を宿主として用い、その栄養要求性を相補する遺伝子をマーカー遺伝子として利用することにより形質転換体を選別する方法が一般に行なわれている。しかしながら、工業的な生産を考慮した時、安価な培地を利用でき増殖も優れている野性型の倍数体を利用した方が有利であり、特に、第1章で述べた様な微生物由来の有用物質、酵素、コモディティーケミカルなどの安価で多量に利用される物質の場合にはそのことが必須となる。さらに、清酒、ビール、あるいはパンなどの生産に利用される酵母の分子育種による改良が待望されているが、これらの酵母はいずれも高次倍数体である。このような高次倍数体には、人為的変異により栄養要求性を宿主に付与することが困難であることから、形質転換体を選別するためには、薬剤耐性遺伝子をマーカーとして利用する必要が生じてくる。

大腸菌では、薬剤耐性遺伝子としてアンピシリン耐性遺伝子やテトラサイクリン耐性遺伝子などが頻繁に利用されているが、酵母ではこれらの薬剤に対して宿主自身が耐性を有していることなどのために、これらの遺伝子を利用できない。それゆえ、薬剤耐性マーカーとなる遺伝子の開発が酵母において望まれ

ており、いくつか開発されつつある。例えば、G418耐性に関与する3-ホスホトランスフェラーゼの遺伝子¹³⁾、メトトレキサートとスルファニルアミド耐性に関与するジヒドロ葉酸還元酵素の遺伝子¹⁴⁾などがある。しかしながら、その薬剤が高価であることなどマーカーとして必ずしも実用的とはいえず、より実用性の高いマーカーの開発が望まれている。

アミノ酸アナログ物質は、そのアミノ酸と拮抗的に作用して、しばしば細胞の増殖を阻害する。エチオニン、メチオニンのアナログ物質であり、アミノ酸アナログの中で比較的安価に入手できること、酵母の増殖阻害効果が大きいことなど、マーカー用の薬剤として優れている。そこで、本研究ではこのエチオニンに耐性を示す遺伝子を野生株用のマーカーとして開発することを目的として、まず酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のエチオニン耐性遺伝子のクローニングを行なった。さらに、その遺伝子の生化学的特性とエチオニンの解毒機構についても検討した。

2.2 実験方法

2.2.1 菌株、プラスミドおよび培地

酵母の宿主として大嶋教授（大阪大学）より分譲して頂いた *Saccharomyces cerevisiae* DKD-5D-H (a *leu2-3 leu2-112 trp1 his3*) 株及び *S. cerevisiae* ATCC52052 (α *his4-712 met2-1 ura3-52 leu2-112 lys2*) 株を使用し、大腸菌の宿主として *Escherichia coli* DH1 (*F⁻ gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi1 hsdR17 supE44 λ*) を使用した。また、プラスミドとしては、酵母の *Leu2* 遺伝子を有する YEp13 を使用した。酵母の培地として、SD 最少培地 (2% グルコース、0.67% イースト窒素ベース W/O アミノ酸、pH 5.0 (アミノ酸及び核酸を適宜添加)) を使用した。添加物の最終濃度は、L-トリプトファン、L-ヒスチジン、L-メチオニンを 0.02 kg/m³ に、L-ロイシン、L-リジンを 0.03 kg/m³ に、ウラシルを 0.01 kg/m³ にした。また、大腸菌の培地には LB 培地 (1% ポリペプトン、

0.5% イーストエキストラクト、0.5% 塩化ナトリウム、0.1% グルコース、pH 7.2) を使用した。

2.2.2 遺伝子組換え操作

酵母 *S. cerevisiae* DKD-5D-H 株の遺伝子ライブラリーの作製は以下の方法により行なった。まず、酵母 *S. cerevisiae* DKD-5D-H 株より Cryer らの方法³¹⁾ により染色体 DNA を抽出精製した。得られた染色体 DNA を制限酵素 *Sau3AI* で部分的に分解した後、この分解物を 0.8% のアガロースゲル電気泳動に供した。ゲルより 5-10 kb の断片を切り出し、透析チューブ法³²⁾ により DNA を回収後、これを精製した。一方、ベクタープラスミド YEp13 は、制限酵素 *BamHI* で完全に切断した後、脱リン酸化処理³²⁾ を施した。この脱リン酸化処理したベクターと既に回収した染色体 DNA 断片をライゲーションキットを用いてライゲーションを行なった。この DNA 混合物を塩化カルシウム法³⁾ に従って *E. coli* DH1 に形質転換し、0.03 kg/m³ のアンピシリンを含有する LB 培地の寒天プレートに塗布し、310.2 K で 20 時間放置した。生えてきたアンピシリンに耐性を示すコロニーをすべて回収し、プラスミドを抽出した後、さらに超遠心分離による方法で精製した³²⁾。得られたプラスミドを酢酸リチウム法³³⁾ により酵母 *S. cerevisiae* DKD-5D-H 株に形質転換した後、L-ロイシンを含有しない SD 最少培地に塗布し 303.2 K で 2 日間放置した。得られたコロニーすべてを集菌し、SD 最少培地に懸濁することにより、DKD-5D-H 株の遺伝子ライブラリーを得た。

酵母中のプラスミドの抽出精製は Cryer らの方法³¹⁾ に従って行ない、これを *E. coli* DH1 に形質転換 (レスキュー) した後、プラスミドを精製した。

2.2.3 酵素活性

酵母の細胞を L-メチオニンを含有する、あるいは含有しない 1.0×10^{-3} m³ の SD 最少培地中で好氣的に 303.2 K で 18 時間培養した。この対数増殖後期の細胞を集菌した後、0.85% の生理食塩水で洗浄し、 10 mol/m^3 のトリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) に懸濁した。スクリー管 (ブラウン社、 1.5×10^{-5} m³) に 0.45-0.55

μm ガラスビーズを70%まで入れた後、細胞懸濁液で満たし、炭酸ガスで冷却しながら、2分間ホモジナイザー（MSKセルホモジナイザー、ブラウン社）を用いて粉砕することにより菌体を破壊した。パスツール管に取り、277.2K、15,000 r.p.mで60分間遠心分離し、その上澄み液を酵素抽出液とした。アスパルトキナーゼ、ホモセリンデヒドロゲナーゼ、ATPスルフィラーゼの活性測定には、この酵素抽出液をそのまま使用した。SAM合成酵素の活性測定には、 0.01mol/m^3 のふっ化フェニルメチルスルホニル(PheMeSO₂F)を含有する 10mol/m^3 のトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)中、277.2Kで一昼夜この酵素抽出液を透析したものを使用した。アスパルトキナーゼ及びホモセリンデヒドロゲナーゼの活性測定には、Truffa-BachiとCohenの方法³⁴⁾及びDattaとGestの方法³⁵⁾をそれぞれ使用した。ATPスルフィラーゼは、VitoとDreyfussの方法³⁶⁾に従って測定した。反応によりATPから生成するリン酸イオンは、FiskeとSabbarow³⁷⁾の方法により分析した。SAM合成酵素の活性測定には、Shiozakiらの方法³⁸⁾を使用した。反応により合成されたSAMはGreenの方法³⁹⁾により分析した。また、タンパク質濃度は、Lowryの方法⁴⁰⁾に従った。

2.2.4 菌体中のS-アデノシルメチオニンの分析

S-アデノシルメチオニン(SAM)の抽出及び分析は以下の方法で行なった。対数増殖後期(0.8-1.0kg/m³)の酵母細胞を277.2K、5,000 rpmで10分間遠心分離することにより集菌し、蒸留水で1回洗浄後、遠心分離により集菌した。これを $3.5 \times 10^{-6}\text{m}^3$ の10%過塩素酸に懸濁し、303.2Kで1時間放置した。この溶液を277.2K、10,000 rpmで10分間遠心分離した後、上澄み液を注意深く回収した。この沈殿物にさらに $1.0 \times 10^{-6}\text{m}^3$ の10%の過塩素酸溶液を添加し遠心分離により上澄み液を回収した。これらの溶液を、 $5.0 \times 10^{-6}\text{m}^3$ のメスフラスコに入れ、 $5.0 \times 10^{-6}\text{m}^3$ になるように10%の濃度の過塩素酸を加えた。菌体抽出液中のSAMの分析には、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を使用した。HPLCは、LC-5A型(島津製作所)に50cm(25cm x2)のAsahipak GS-320(旭化成株)カラムを取り付けたものを使用し、258nmの波長で測定した。溶出液として、 100mol/m^3

のリン酸二ナトリウム/水酸化ナトリウム緩衝液(pH 10.0)を使用し、 $2.0 \times 10^{-6}\text{m}^3/\text{min}$ の速度で送液した。SAMの濃度は、得られたデータより面積を計算し、検量線(10%過塩素酸にSAMの純品を溶解した種々の濃度溶液から面積と濃度の関係を求めたもの)から算出した。この分析条件により、アデノシン、アデノシン一リン酸、アデノシン二リン酸、アデノシン三リン酸等の核酸及びSAMの類似物質である5'-メチルチオアデノシン、S-アデノシル-L-ホモシステインの保持時間とSAMの保持時間9.8分とは完全に分離された。

2.2.5 菌体内のL-メチオニン濃度の分析

菌体内のL-メチオニン濃度は、Cherestらの方法⁴¹⁾に基づいて以下の方法により測定した。種々の濃度のL-メチオニンを含有する $5.0 \times 10^{-4}\text{m}^3$ のSD最少培地中で対数増殖後期(0.8-1.0kg/m³)まで酵母細胞を303.2Kで培養した後、277.2K、5,000 r.p.m.で10分間遠心分離することにより集菌し、蒸留水により3回洗浄後、再度遠心分離により集菌した。この菌体を蒸留水に懸濁し、10分間沸騰浴中で煮沸した後、遠心分離(10,000 rpm、30min)した。この上澄み液をメチオニンアッセイ培地(Difco社)に添加し、*Leuconstoc mesenteroides* P-60株(ATCC8042)の増殖により測定した。標準線は、種々の濃度の化学合成のL-メチオニンにより作成したものを使用した。

2.2.6 菌体濃度の測定

菌体濃度の測定には、分光光度計(Hitachi 100-10型あるいはHitachi U-1100型、日製産業株)を用いて、1cmのセルにより610nmの波長で濁度(O.D.)を測定した。さらに、この濁度より菌体濃度を算出した。菌体濃度は、蒸留水で十分洗浄後、遠心分離により沈殿した酵母菌体を383.2Kで6時間乾燥した場合の重量(kg-dry cells)を使用した。酵母DKD-5D-Hにおいて、Hitachi U-1100を使用した場合は、1 O.D. = $0.275\text{ kg-dry cells/m}^3$ として算出した。

2.2.7 紫外線顕微鏡写真

プラスミドの入った *S. cerevisiae* DKD-5D-H株の細胞を、 5.0mol/m^3 のL-メチオニンを含む、あるいは含有しないSD最少培地、 2.0mol/m^3 のD,L-エチオニンを含むSD最少培地の3種類の培地中で好氣的に対数増殖後期まで 303.2K で培養し、冷却した 0.85% の生理食塩水で1回洗浄し、同食塩水に懸濁した。紫外線顕微鏡写真は、細胞懸濁液1滴を石英のスライドガラスの上に置き、その上に石英のカバーガラスをのせ、まわりをマニキュアによりシールしたサンプルを10分間室温で紫外線を照射し、UVMP型 (Ernst Leitz, Wetzlar)の顕微鏡で、波長 260nm 、バンド幅 3mm で撮影した。フィルムは Kodak Spectrum Analysis NO.1 (Eastman Kodak Rochester社)を使用した。

2.2.8 試薬

ライゲーションキット及び制限酵素は宝酒造(株)より入手した。D,L-エチオニンは、Nacalai tesque社から、S-アデノシル-L-メチオニン、S-アデノシル-L-エチオニン、S-アデノシル-L-ホモシステイン、L-カナバニン、p-フルオロ-D,L-フェニルアラニン、L-イソロイシンヒドロキサメート、D,L-スレオニンヒドロキサメート、D,L-ヒドロキシノルバリン、L-カナバニン、アセチル-L-システインはSigma Chemical社より入手した。

2.3 結果

2.3.1 エチオニン耐性遺伝子のクローニング

アミノ酸アナログ物質は、アミノ酸と拮抗的に反応し増殖阻害効果を引き起こす。そこで、エチオニンとその他のアミノ酸アナログ物質が、酵母の増殖に及ぼす影響を比較した。酵母 *S. cerevisiae* DKD-5D-H株を $0, 1.0, 3.0, 27.0\text{mol/m}^3$ の濃度で、種々のアミノ酸アナログ物質 (L-イソロイシンヒドロキサメート、D,L-スレオニンヒドロキサメート、D,L-ヒドロキシノルバリン、D,L-エ

チオニン、L-カナバニン、p-フルオロ-D,L-フェニルアラニン、アセチル-L-システイン)を含むSD最少培地中で培養し、20時間後におけるその増殖を調べた。その結果、L-イソロイシンヒドロキサメート、D,L-スレオニンヒドロキサメート、D,L-ヒドロキシノルバリンは、高濃度で増殖阻害が現れ 27.0mol/m^3 でコントロールに対して約 50% 増殖阻害を示した。これに対し、D,L-エチオニン、L-カナバニン、p-フルオロ-D,L-フェニルアラニン、アセチル-L-システインは、比較的低濃度 (1.0mol/m^3)でも増殖阻害効果が高くほとんど増殖はみられなかった(データを図示せず)。それゆえ、アミノ酸アナログ物質の中で、D,L-エチオニン、L-カナバニン、p-フルオロ-L-フェニルアラニン、アセチル-L-システインが野性株を選別する耐性マーカー用の薬剤として適していると考えられる。本研究では、これらの増殖阻害効果の大きい薬剤のうち最も安価に入手できること、ならびに、工業的に有望なメチオニンの代謝産物であるSAMの蓄積に関連が深いことから、D,L-エチオニンをマーカー用の薬剤として利用した。

次に、このエチオニンに耐性を有する遺伝子の取得を試みた。エチオニンに耐性を示す遺伝子をクローニングするために、まず酵母 *S. cerevisiae* DKD-5D-H株自身のエチオニンに対する耐性を更に詳しく調べた。DKD-5D-H株の細胞を $0.3\text{mol/m}^3, 1.0\text{mol/m}^3, 2.0\text{mol/m}^3$ のD,L-エチオニンを含むSD最少培地 (L-ロイシンを含む)の寒天プレートに、1プレート当たり 10^6 個ずつ塗布し、 303.2K で放置した。この結果、いずれの濃度でも少なくとも4日間はDKD-5D-H株の細胞は生育することができなかった。そこで酵母DKD-5D-H株の遺伝子ライブラリー (実験方法2.2.2)の酵母細胞を 0.3mol/m^3 のD,L-エチオニンを含むSD最少培地の寒天プレートに塗布し 303.2K で4日間放置した。その結果、Fig. 2.1に示すようなD,L-エチオニンに耐性を示すコロニー数10個得た。25個のコロニーについてその栄養要求性を調べたところ、L-トリプトファンとL-ヒスチジンに要求性があり、L-ロイシンに要求性がなく、DKD-5D-H株にプラスミドが入った場合の栄養要求性と一致した。

エチオニンに耐性を示す変異株は、SAMの蓄積に影響及ぼすことが知られている。そこで、これら25個の形質転換体を、 5.0mol/m^3 のL-メチオニンを含む

するSD最少培地で振盪培養し、その対数増殖期におけるSAMの蓄積への影響を調べた。その結果、コントロールであるベクタープラスミドYEpl3がDKD-5D-H株に入ったもの(DKD-5D-H/YEp13)が、SAMを約0.020kg/kg-dry cells蓄積するのに対し、25個の内の17個の形質転換体(Class I)は、蓄積量が約0.001-0.004kg/kg-dry cellsでありSAMの蓄積が抑制されていた。しかしながら、残り8個の形質転換体(Class II)では、SAMの蓄積量が0.100-0.160kg/kg-dry cellsであり、逆にSAMの蓄積が高まっていた。この後者(Class II)の遺伝子は、そのエチオニン耐性機構が生化学的にも興味深い上に、工業的に価値のあるSAMの生産に利用できる可能性があることから、本研究ではこの後者の遺伝子に焦点を当てさらに検討を行なった。



Fig. 2.1 Photograph of colonies of transformants carrying ethionine-resistant gene.

Transformants (10^7 cells/plate) were spread on SD plate containing 0.3 mol/m^3 D,L-ethionine.

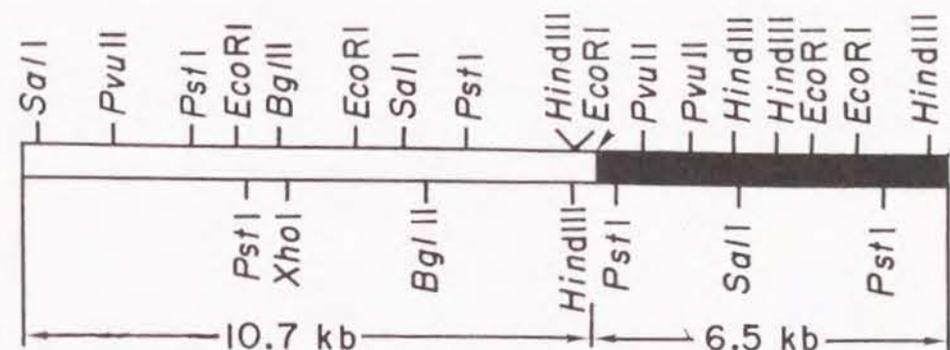


Fig. 2.2 Restriction map of plasmid pYSMH1.

■: chromosomal DNA fragment; □: vector plasmid YEpl3.
▲, BamHI/Sau3AI site.

Class IIの形質転換体の内の1個よりプラスミドを精製した。得られたプラスミドをpYSMH1と呼ぶ。プラスミドpYSMH1を制限酵素で切断した後、アガロースゲル電気泳動によりその制限酵素地図を決定した結果をFig. 2.2に示す。プラスミドpYSMH1は、YEpl3のBamHI部位に6.5キロベース(kb)の染色体DNAのSau3AI断片が挿入されたものであり、全体として17.2kbであった。

2.3.2 エチオニン耐性遺伝子を保持している酵母によるSAMの蓄積

プラスミドpYSMH1を*S. cerevisiae* DKD-5D-H株に形質転換した細胞(DKD-5D-H/pYSMH1)中に蓄積している物質がSAMであることの確認を行なった。DKD-5D-H/pYSMH1の細胞及びコントロールであるYEpl3を形質転換した細胞(DKD-5D-H/YEp13)を、L-メチオニンを含むしないSD最少培地あるいはL-メチオニンを含むSD最少培地で振盪培養し、その抽出液をHPLCにより分析した結果をFig. 2.3に示す。コントロールであるDKD-5D-H/YEp13の細胞抽出液では、L-メチオニンを添加した培地で培養した時、溶出時間9.8分の紫外線(258nm)吸収物質の増

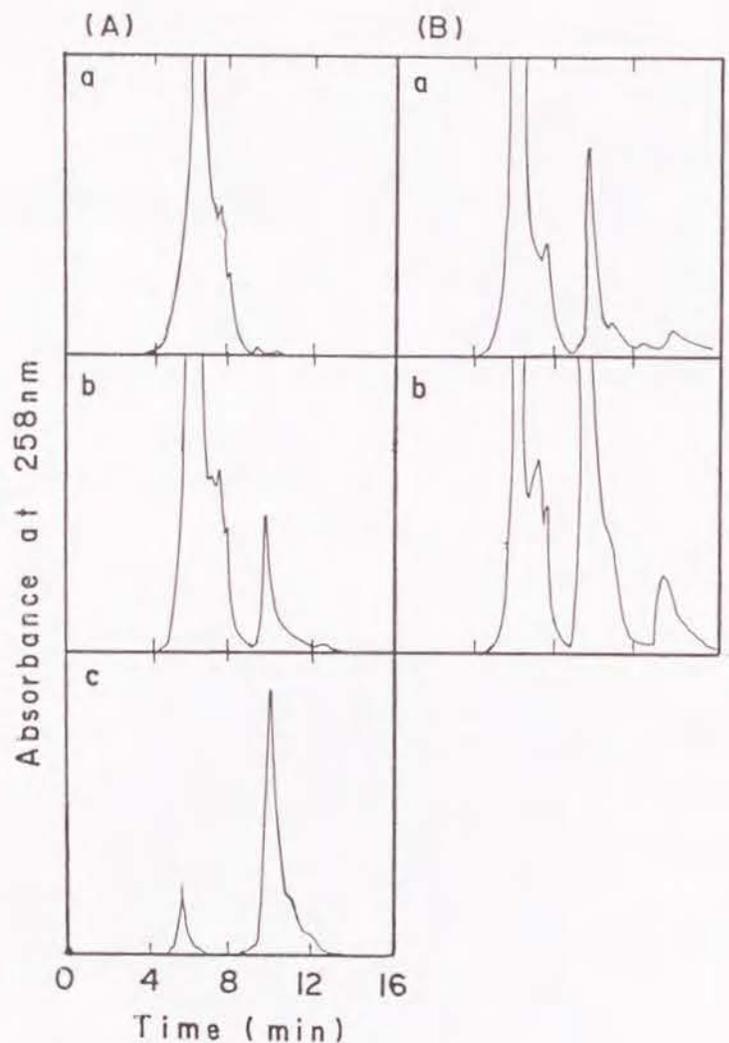


Fig. 2.3 HPLC chromatograms of cell extracts.

Yeast cells of DKD-5D-H/YEp13 (A) or DKD-5D-H/pYSMH1 (B) were cultured in the absence (a) or presence (b) of 5 mol/m^3 L-methionine. Cell extracts were analyzed by high-performance liquid chromatography. Panel (A.c) shows the retention time of authentic SAM.

加が見られた (Fig. 2.3A.a, Fig. 2.3A.b)。一方、DKD-5D-H/pYSMH1では、L-メチオニンを添加した培地でこの9.8分の紫外線吸収物質が著しく増加した。さらに、この場合14.0分の紫外線吸収物質も増加したが、その他の紫外線吸収物質はコントロールと大きな差は見られなかった (Fig.2.3B.a, Fig.2.3B.b)。この9.8分の紫外線吸収物質の溶出時間はSAMのそれと完全に一致した (Fig. 2.3A.c)。

さらに、Fig. 2.3B.bの蓄積物質がSAMであることを確認するためにpHを低くして分析を行なった。その結果、SAMの保持時間はpHに大きく影響を受けた。最終的にFig. 2.4に示す条件に変えてHPLCにより分析した結果を示す (Fig. 2.4)。DKD-5D-H/pYSMH1では、L-メチオニンを添加した培地でこの14.1分の紫外線吸収物質が著しく増加し、22.2分の紫外線吸収物質も増加した。この14.1分の紫外線吸収物質は、SAMの保持時間と完全に一致した。一方、S-アデノシル-L-ホモシステイン (SAH)の保持時間は、Fig. 2.3及びFig. 2.4の条件においてそれぞれ14.0分、22.2分であることから、もうひとつの増加した紫外線吸収物質は、SAHであることが確認された。

また、Fig. 2.4のHPLCの条件において、コントロール部分を差し引いた面積よりSAMの濃度を算出し、Fig. 2.3のHPLCの条件より算出したSAMの濃度と比較したところ、その誤差は5%でありほぼ一致した。また、これらの抽出液を2種類の条件 (A、B) 下で、ペーパークロマトグラフィーにより分析した (Fig. 2.5)。A、Bいずれの条件で分析した場合も、SAM及びSAHと同じRf値のところにはスポットがある以外は特に異なった位置にスポットを見い出せなかった。このことは、HPLCの結果とよく一致する。以上のことから、pYSMH1上のエチオニン耐性遺伝子を有する酵母によりSAMの蓄積が高くなっていることが確認された。

また、コントロールであるDKD-5D-H/YEp13あるいはDKD-5D-H/pYSMH1の細胞を種々の濃度のL-メチオニンを含むSD最少培地で培養し、対数増殖後期において菌体を集菌した。その菌体中のSAMの蓄積量と培地に添加したL-メチオニン濃度との関係をTable 2.1に示した。コントロールであるDKD-5D-H/YEp13およびDKD-5D-H/pYSMH1ともL-メチオニンの添加に伴ってSAMの蓄積量が増加し

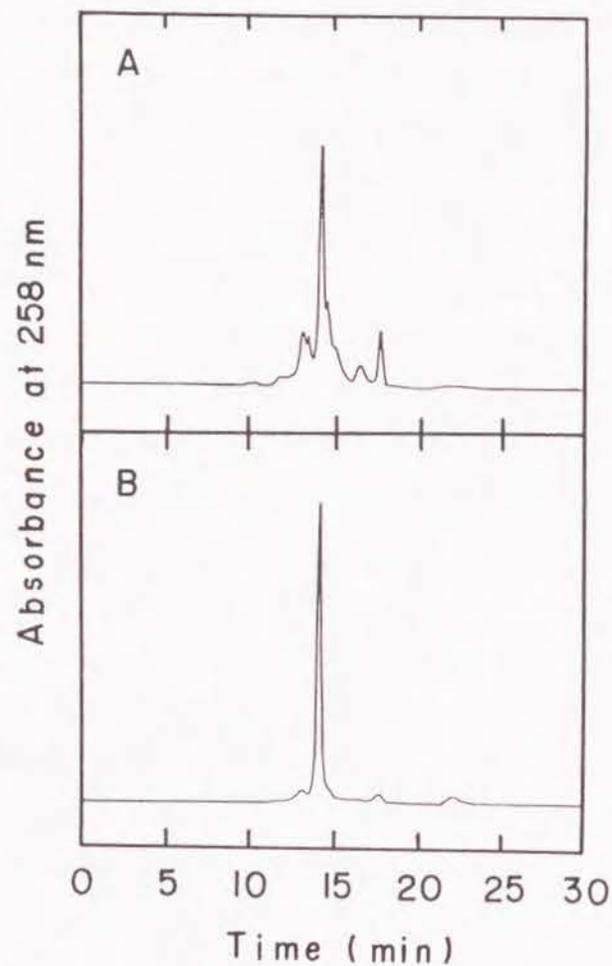


Fig. 2.4 HPLC analysis of cell extract.

Cell extract (Fig.2.4A) and authentic SAM (Fig.2.4B) were analyzed by HPLC equipped with an Asahipac GS-320 column. The flow rate of mobile phase (0.1 mol/m^3 sodium phosphate buffer, pH 7.0) was $1.0 \times 10^{-6} \text{ m}^3/\text{min}$.

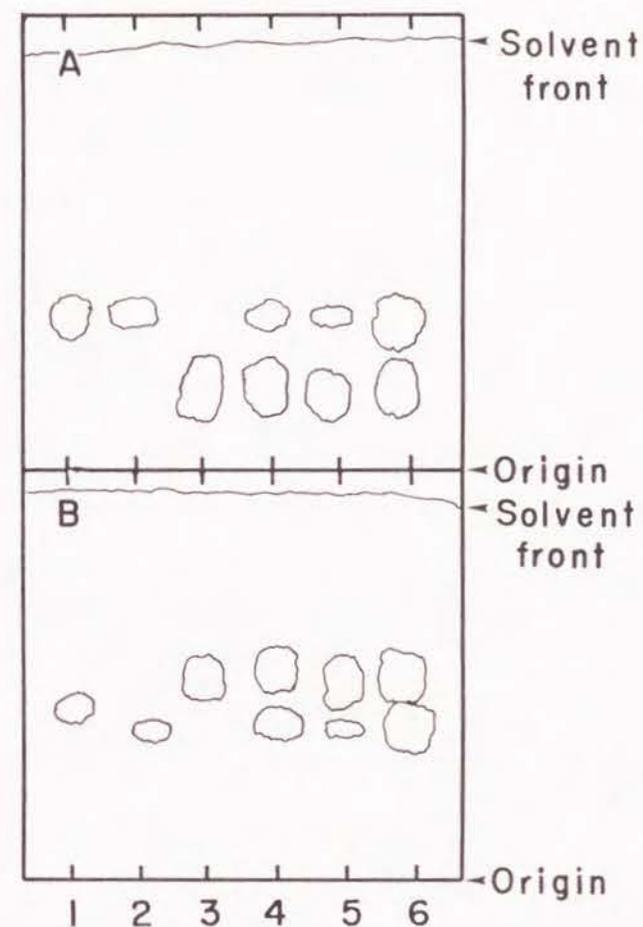


Fig. 2.5 Analysis of cell extracts by paper chromatography.

Cell extracts were analyzed by paper chromatography.

Lane 1, authentic SAH; lane 2, authentic SAM; lanes 3,4,5 and 6, cell extracts corresponding to those in Figs. 2.3 Aa,Ab, Ba and Bb, respectively.

Cell extracts ($5.0 \times 10^{-6} \text{ m}^3$) were spotted on Wattman No.1 paper, developed with solvent systems of A: ethanol: $500 \text{ mol/m}^3 \text{ CH}_3\text{COONa}$ (7:3 by volume) and B: ethanol n-butanol: water: acetic acid: 1% $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (30:35:40:1:2 by volume). Spots were detected under UV light at 254 nm.

Table 2.1 Accumulation of SAM and L-methionine by *S. cerevisiae* DKD-5D-H /pYSMH1 cells.

Strains	L-methionine	SAM	L-Methionine
	added to medium (mol/m ³)	in cells x10 ⁻³ (kg/kg-dry cells)	in cells x10 ⁻³ (kg/kg-dry cells)
DKD-5D-H/YEp13	0	N.D.	0.05
	1.0	23	4.00
	5.0	22	6.75
DKD-5D-H/pYSMH1	0	20	0.29
	1.0	112	3.59
	5.0	166	7.08

Yeast cells of DKD-5D-H/YEp13 or DKD-5D-H/pYSMH1 were grown on SD minimal medium containing L-methionine at the various concentrations.

N.D.: not detected.

た。また、その最大蓄積量は、DKD-5D-H/pYSMH1の細胞の方がDKD-5D-H/YEp13に比べて約8倍高くなっていた。

2.3.3 エチオニン耐性遺伝子の特性

このエチオニン耐性遺伝子の生化学的な特性についてさらに検討した。まず、

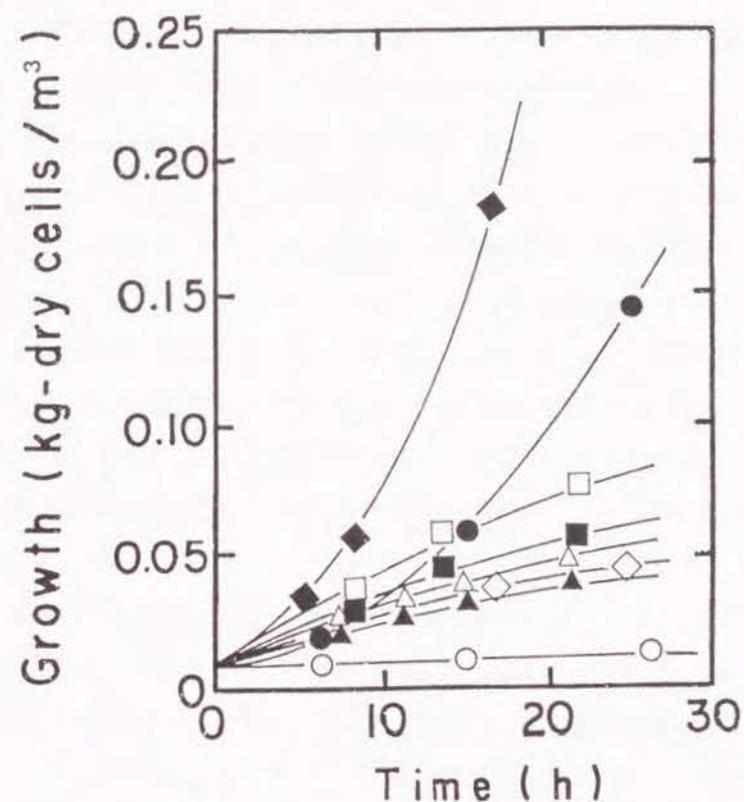


Fig. 2.6 Resistance to amino acids analogues in DKD-5D-H/pYSMH1 cells. Yeast cells of DKD-5D-H/YEp13 (open symbols) and DKD-5D-H/pYSMH1 (closed symbols) were grown on SD minimal medium containing various amino acid analogues.

◇,◆, 0.3mol/m³ D,L-ethionine; ○,●, 0.05 mol/m³ seleno-L-methionine; △,▲, 2.0mol/m³ L-canavanine; □,■, 1.0mol/m³ p-fluoro-D,L-phenylalanine.

DKD-5D-H/pYSMH1の細胞及びコントロールのDKD-5D-H/YEp13の細胞を、種々の濃度のアミノ酸アナログを含有するSD最少培地で培養し、その増殖への影響を調べた(Fig. 2.6)。コントロールであるDKD-5D-H/YEp13の細胞が、メチオニンアナログ物質であるD,L-エチオニン及びS-セレノ-L-メチオニンにより増殖阻害を受けているのに対し、DKD-5D-H/pYSMH1の細胞は、これらのメチオニンアナログ物質に対する増殖阻害効果が少なく、これらの物質に対して耐性を示した。他方、フェニルアラニンアナログ(p-フルオロ-D,L-フェニルアラニン)及びアルギニンアナログ(L-カナバニン)は、DKD-5D-H/YEp13の細胞とDKD-5D-H/pYSMH1細胞の両方とも増殖を阻害し、両者に大きな差は見られなかった。この遺伝子がメチオニンアナログ物質にのみ耐性を示したことから、この遺伝子は、メチオニンの合成あるいは代謝経路に関与する遺伝子である可能性が高いと考えられた。

そこで、このエチオニン耐性遺伝子のメチオニン合成経路への影響について調べた。DKD-5D-H/pYSMH1の細胞とDKD-5D-H/YEp13の細胞を、L-メチオニンを含有しないSD最少培地あるいは1.0mol/m³のL-メチオニンを含有するSD最少培地で対数増殖期まで培養した細胞より調製した酵素抽出液を用いて、メチオニンの合成に関与する3種類の酵素(アスパルトキナーゼ、ホモセリンデヒドロゲナーゼ、ATPスルフィラーゼ)及びSAM合成酵素の活性を測定した結果をTable 2.2に示す。DKD-5D-H/pYSMH1のアスパルトキナーゼ、ホモセリンデヒドロゲナーゼ、ATPスルフィラーゼの3種の酵素活性は、DKD-5D-H/YEp13のそれに対してほとんど差はなかった。SAMの合成酵素活性は、DKD-5D-H/pYSMH1の方がDKD-5D-H/YEp13に比べて1.3-1.5倍程度高めであったが明確な差は見られなかった。また、L-メチオニンを含有する培地で培養した場合、アスパルトキナーゼとATPスルフィラーゼの活性が抑制されており、DKD-5D-H/pYSMH1で特に抑制されていた。このようにメチオニン合成の活性が抑制されていることから、L-メチオニンを含有する培地で培養したDKD-5D-H/pYSMH1の細胞中に蓄積したSAMは、主に菌体外のL-メチオニンにより合成されていると考えられる。

さらに、菌体外のL-メチオニンによりSAMの蓄積が高まることを、メチオニ

Table.2.2 Activity of enzymes in methionine biosynthetic pathway of DKD-5D-H/YEp13 or DKD-5D-H/pYSMH1 cells.

Strains	L-Methionine				
	added to medium (mol/m ³)	Asparto-kinase ^a	Homoserine dehydrogenase ^b	ATP sulfurylase ^b	SAM synthase ^b
DKD-5D-H /YEp13	0	2.2	35.9	46.0	1.8
	1.0	1.8	28.2	6.1	2.3
DKD-5D-H /pYSMH1	0	2.7	54.5	50.4	2.1
	1.0	0.5	34.5	1.2	3.1

Note: The yeast cells were grown in SD minimal medium with or without L-methionine at various concentrations.

^a Milliunits per milligram of protein. One unit of enzyme activity was defined as $\Delta A_{540}^{1\text{cm}}$ of 1.0 per min.

^b nmol/min mg-protein.

ン要求性の酵母を用いて調べた。ホモセリン-O-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子の欠損した酵母 *S. cerevisiae* ATCC52052株に、プラスミドpYSMH1及びYEp13をそれぞれ形質転換したもの(ATCC52052/pYSMH1及びATCC52052/YEp13)を、種々の濃度のL-メチオニンを含有するSD最少培地で培養した後、対数増殖期における菌体内のSAMの含有量を調べた(Table 2.3)。ATCC52052/pYSMH1の細胞ではSAMの蓄積量が高く、1.0mol/m³のL-メチオニンを含有する培地ではその

Table 2.3 Accumulation of SAM by *S. cerevisiae* ATCC 52052 /pYSMH1 cells.

Strain	L-Methionine added to medium (mol/m ³)	SAM in cells (x10 ⁻³ kg/kg-dry cells)
ATCC52052/YEp13	0.13	0.5
	1.0	3.0
	3.0	3.4
	5.0	6.0
ATCC52052/pYSMH1	0.13	34.8
	1.0	116
	3.0	122
	5.0	124

Yeast cells of ATCC52052/YEp13 or ATCC52052/pYSMH1 were grown on SD minimal medium containing L-methionine at the various concentrations.

30%がSAMに変換された。他方、ATCC52052/YEp13の細胞ではSAMの蓄積量は低く、1.0mol/m³のL-メチオニンを含む培地で7%しかSAMに変換されなかった。メチオニン要求性株の細胞を用いて菌体内にSAMを合成させた場合、その合成に必要なL-メチオニンはすべて培地に添加したL-メチオニンが利用されていると考えられる。

また、培地にL-メチオニンを添加して培養した時の、菌体内のL-メチオニン

含有量についても調べた。DKD-5D-H/pYSMH1の細胞とDKD-5D-H/YEp13の細胞を、種々の濃度のL-メチオニンを含むSD最少培地で対数増殖期まで培養した後、細胞より菌体内のL-メチオニンを抽出した。結果を、Table 2.1に示す。L-メチオニンの添加に伴って菌体内のL-メチオニン含有量が増加したが、その増加量はDKD-5D-H/pYSMH1の細胞とDKD-5D-H/YEp13の細胞とではほぼ同じであった。

以上のことから、エチオニン耐性遺伝子は、メチオニンの合成活性、SAMの合成活性、あるいは、メチオニンの菌体内の蓄積を高めることに関与するのではなく、SAMの蓄積を高めることに関与していると考えられる。

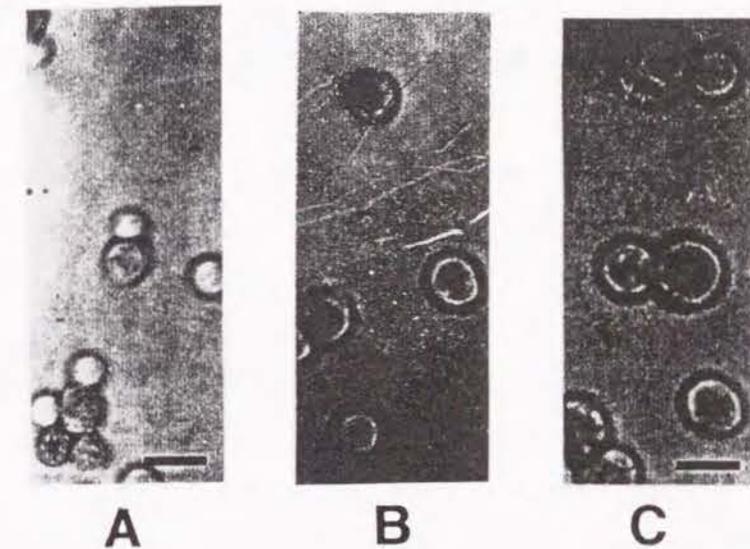


Fig. 2.7 Localization of ultraviolet-absorbing material. Ultraviolet micrographs were taken using cells of *S. cerevisiae* DKD-5D-H/pYSMH1 grown on SD medium containing: A, none; B, 5.0mol/m³ L-methionine and C, 2.0mol/m³ D,L-ethionine. Bars in photographs represent 2.0 μm in length.

2.3.4 紫外線顕微鏡による観察

SAMの蓄積部位を知るために、紫外線顕微鏡による観察をおこなった。DKD-5D-H/pYSMH1の細胞を、SD最少培地、 5.0mol/m^3 のL-メチオニン及び 2.0mol/m^3 のD,L-エチオニンを含有するSD最少培地で対数増殖期まで培養した細胞の紫外線顕微鏡写真をFig. 2.7に示す。 5.0mol/m^3 のL-メチオニンで培養した場合、L-メチオニンを含有せずに培養したもの(Fig. 2.7A)に比べ、酵母細胞の中心部分に紫外線吸収物質が著しく蓄積していた(Fig. 2.7B)。この物質は、Fig. 2.4の結果から、SAMであると考えられる。菌体中で合成されたSAMは液胞に蓄積することが知られている。SAMの液胞への蓄積を示す場合のNakamuraら⁴²⁾の紫外線顕微鏡撮影の結果が、Fig. 2.7によく類似していることから、DKD-5D-H/pYSMH1に蓄積したSAMは液胞に蓄積していると考えられる。一方、 2.0mol/m^3 のD,L-エチオニンで培養した時にも中心部分に紫外線吸収物質が著しく蓄積した(Fig. 2.7C)。

2.4 考察

エチオニンに耐性を示す変異株が、バクテリア、酵母、動物細胞などで数多く取得されており、その多くはSAMの合成酵素(メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ)の欠損株である⁴³⁾⁻⁴⁵⁾ことから、エチオニンの毒性はエチオニン自身よりもむしろこの酵素によって合成されるS-アデノシル-L-エチオニン(SAE)に毒性があると考えられている。ところが、エチオニンあるいはその他のメチオニンアナログ物質に耐性を示すにもかかわらず、菌体内のSAMの蓄積が高められた変異株も真核生物由来の細胞において取得されており⁴⁶⁾⁻⁴⁸⁾、例えば、酵母*S. cerevisiae*において取得されたエチオニンに耐性を示す変異株のなかには、SAMの蓄積を抑制するもの(eth2とeth10)以外にSAMの蓄積を高めるもの(eth3あるいはeth2-7)も存在している⁴⁹⁾⁻⁵⁰⁾。このことは、SAEの毒性に対して非感受性になるためのなんらかの解毒機構が存在することを示唆

している。

本研究では、高コピー数であるYEp13を有するベクターと連結した時に、エチオニンに耐性を示す遺伝子のひとつをクローニングした。この遺伝子は、メチオニン合成酵素活性やSAM合成酵素活性の測定、SAM及びメチオニンの菌体内蓄積量の測定の結果などから、SAM蓄積を高めることに関与する遺伝子であると考えられ、その場合SAMは液胞に蓄積されていた。即ち、このエチオニン耐性遺伝子の産物は、液胞内のSAMの蓄積量を直接的あるいは間接的に高める機能を有しSAMを液胞に排除することにより蓄積を高めていると思われる。

エチオニンを含有する培地で酵母を培養した場合、SAEがメチオニン合成酵素により合成され、液胞に蓄積することが知られている⁴²⁾。Fig. 2.7Cで蓄積した紫外線吸収物質をHPLCで分析したところ、保持時間が9.8分であり、SAEの保持時間と一致した。それゆえ、エチオニンを含有する培地でDKD-5D-H/pYSMH1の細胞を培養した場合、エチオニンがSAEに変換され液胞に著量蓄積している可能性が高い。従って、この遺伝子によるエチオニンの解毒機構としては、エチオニンがSAM合成酵素によりSAEに変換され、これを液胞に蓄積、即ち排除することにより解毒しているものと考えられる。リジンはSAM同様酵母*S. cerevisiae*において液胞に特異的に蓄積する⁵¹⁾。*S. cerevisiae*において、Anrakuら⁵²⁾はリジンのアナログ物質であるACEに感受性の変異株を取得した結果、この変異株では液胞が形成されないことを見出した。このことにより、液胞にリジンアナログ物質の解毒機能があることが示唆されている。本研究の結果及びAnrakuらの結果は、液胞が解毒機能という新たな機能を有する可能性を提示するものであり、今後の研究が期待される。

2.5 結言

本章では、野生酵母用のマーカーとしてのエチオニン耐性遺伝子の取得とその生化学的特性を調べた。まず、メチオニンのアナログ物質であるエチオニンが、比較的低濃度において酵母 *S. cerevisiae* の増殖を阻害することから、野生酵母用のマーカー薬剤として利用できることがわかった。そこで酵母の遺伝子ライブラリーより、エチオニンに耐性を示す遺伝子の中のひとつをクローニングし、そのプラスミドを精製した。得られたエチオニン耐性遺伝子を有する酵母の生化学的特性を調べた結果、この遺伝子産物が直接的あるいは間接的に液胞へのSAMの蓄積に関与している可能性があることが示唆された。それゆえ、エチオニンの解毒は、エチオニンがSAM合成酵素によりSAEに変換された後、液胞に排除されることにより解毒されていると考えられる。

第3章

Saccharomyces cerevisiae のエチオニン耐性遺伝子の塩基配列とその特性

3.1 緒言

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、メチオニン合成に関する酵素やS-アデノシルメチオニン (SAM) の合成酵素 (メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ) の生化学的ならびに遺伝学的性質は古くより研究されており、最近ではこれらの中のいくつかの遺伝子は既にクローニングされている。酵母 *S. cerevisiae* には、SAM合成酵素が2種類存在する事が知られており、その特性は Cherest⁴⁹⁾ らにより、遺伝子の構造は Thomas⁵⁴⁾⁻⁵⁵⁾ により調べられている。

一方、SAMの透過酵素は細胞膜⁵⁶⁾ 及び液胞膜⁵⁷⁾ に存在し、SAMの能動的な輸送を行なっていることが知られている。細胞膜のSAMの透過酵素の欠損株が *S. cerevisiae* において取得され、その酵素の活性や基質特異性などについて詳細に調べられているが、タンパク質の精製は行なわれていない⁵⁸⁾。他方、液胞膜のSAMの透過酵素は、細胞内で合成されたSAMを液胞に蓄積する透過酵素である。これについては、その存在が知られているが、ほとんど研究がなされていないのが現状である。

第2章において取得した *S. cerevisiae* のエチオニンに耐性を示す遺伝子は、その生化学的特性からこの遺伝子産物がSAMの液胞への蓄積を直接あるいは間接的に高めることに関与していると考えられる。本章では、このエチオニン耐性遺伝子の産物をさらに詳しく調べることを目的として、この遺伝子を有するDNA断片をサブクローニングした後、その全塩基配列を決定した。さらに、推

定されるエチオニン耐性遺伝子の塩基配列とそれから算出されるアミノ酸配列を決定し、SAMの合成酵素や透過酵素との関連について検討した。

3.2 実験方法

3.2.1 菌株と培地

大腸菌の宿主として *Escherichia coli* DH1 (F^- *gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi1 hsdR17 sup44* λ^-) 及び JM109 (*recA1* Δ (*lac-proAB*) *endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 relA1 supE44* / F' *traD36 proAB⁺ lacI^qZ Δ M15*) を、酵母の宿主として *Saccharomyces cerevisiae* DKD-5D-H (*a leu2-1 leu2-112 trp1 his3*) を使用した。

酵母の培養には、YPD培地(2% グルコース、2% バクトペプトン、1% イーストイクトラクト) 及びSD最少培地(2% グルコース、0.67% イーストニトロゲンベースW/Oアミノ酸、pH5.0 (0.02kg/m³のL-トリプトファンとL-ヒスチジンを添加))を使用した。また、大腸菌の培養には、LB培地(1% ポリペプトン、0.5% イーストイクトラクト、0.5% 塩化ナトリウム、0.1% グルコース、pH 7.2) を使用した。

3.2.2 プラスミドの作製

プラスミドpYSMH1のエチオニン耐性遺伝子をサブクローニングするために、ベクタープラスミドとしてYEp13、pUC19及びJ. D. Beggs教授より分譲して頂いたpJDB207^{5,6)}を使用した。ベクタープラスミドは、制限酵素で切断した後、アルカリフォスファターゼにより脱リン酸化処理^{3,2)}し、種々のDNA断片とライゲーションキットを用いてライゲーションした。大腸菌及び酵母への形質転換は、塩化カルシウム法³⁾及び酢酸リチウム法^{3,3)}を用いてそれぞれ行なった。

プラスミドpER1、pER2、pER3、pER4は、プラスミドpYSMH1を制限酵素HindIIIで部分的に分解したものをYEp13に挿入することにより得た(Fig. 3.1)。プラスミドpER5は、以下の方法により作製した。即ち、pER4より得られるHindIII断片(3.0キロベース(kb))をベクタープラスミドpUC19のHindIII部位

に挿入した。得られたプラスミドより、2.2kbのPstI断片を切り出して、pJDB207のPstI部位に挿入することによりpER5を得た。また、プラスミドpER6(Fig. 3.1)は、pER4を制限酵素NcoIで切断した後、ランティングキットを用いて平滑末端処理し、ライゲーションキットによりライゲーションしたもので、pER4のNcoI部位でフレームシフトミューテーションされている。一方、プラスミドpER7、pER8(Fig. 3.1)は、 λ DNAの断片をpER4のHindIII断片中に挿入することにより遺伝子破壊を行なったもので、以下の手順で作製した。プラスミドpER4より3.0kbのHindIIIのDNA断片を切り出し、ベクタープラスミドpBR322のHindIII部位に挿入した。このプラスミドのKpnI部位及びBssHII部位に、 λ DNAよりKpnI断片(1503bp)及びBssHII断片(1501bp)を切り出したものをそれぞれ挿入した。これらKpnI断片及びBssHII断片が挿入されたそれぞれのプラスミドを、HindIIIで切断し、それぞれの断片をYEp13のHindIII部位に挿入することにより、pER7、pER8を得た。

3.2.3 エチオニン耐性及びSAMの蓄積の実験

エチオニンに対する耐性を調べるために、プラスミドの入った酵母の細胞を2.0mol/m³のD,L-エチオニンを含有するSD最少培地(内径1.6cm、長さ16.5 cmの試験管)中、303.2Kで好氣的に培養した。菌体濃度は、分光光度計(Hitachi U-1100)の610nmでの濁度(O.D.)を測定することにより算出した。また、SAMの蓄積については、プラスミドの入った酵母を好氣的に5.0mol/m³のL-メチオニンを含有する5.0x10⁻⁵m³のSD最少培地中、303.2Kで培養した後、対数増殖後期(O.D.=5-6)で集菌し、菌体中のSAMを測定した。SAMの抽出及び分析は、実験方法2.2.4で述べた方法で分析した。

3.2.4 DNAのシーケンシングと解析

一本鎖DNA(ssDNA)の調製には、Messingの方法^{5,9)}を用い、Sangerら^{6,0)}のDi-deoxy法によりシーケンシングを行なった。プラスミドpER4のHindIII断片(3.0kb)、あるいはそれをPvuIIで切断したものをプラスミドM13mp18及び、

M13mp19にサブクローニングした。得られた塩基配列の解析には、DNA解析用ソフトウェアの "DNASIS" (日立ソフトウェア (株)) を利用してパーソナルコンピュータにより解析した。即ち、DNASISにより、オープンリーディングフレーム (ORF)位置の検索、制限酵素部位の検索、タンパク質の分子量とハイドロパシー (Window = 6 (amino acids)) の計算を行なった。また、塩基配列及びアミノ酸配列のホモロジーは、DNASIS中のEMBLのデータベースを利用して行なった。

3.2.5 染色体の分離とサザンブロッティング

酵母DKD-5D-H株の細胞をYPD培地で培養した後、50mol/m³のEDTA溶液 (pH 8.0) に懸濁した。この細胞懸濁液 (O.D.=700) にザイモリアーゼ (2kg/m³) 溶液を添加し、310.2Kで1時間放置した。さらに、この溶液に3倍量の1% アガロース溶液 (125mol/m³ EDTA (pH 7.5)) を添加して混合した後、ゲル型に注ぎ固化することによりゲルブロックを得た。このゲルブロックをLET緩衝液 (500mol/m³ EDTA (pH 8.0)、10mol/m³ Tris-HCl (pH 7.5)、7.5% 2-メルカプトエタノール) 中310.2Kで24時間、NBS緩衝液 (500mol/m³ EDTA (pH 8.0)、10mol/m³ Tris-HCl (pH 7.5)、1% N-ラウロイルサルコシナトリウム塩、1kg/m³ プロテイナーゼK) 中323.2Kで24時間、50mol/m³ のEDTA溶液 (pH 8.0) 中303.2Kで24時間づつ2回放置した。その後、277.2Kで冷蔵保存した。ゲルブロック用のアガロースとして、InCert™を用いた。

染色体DNAの分離には、PULSEWAVE™760及びMODEL 200/2.0 POWER SUPPLY (BIO-RAD Laboratories社) を用い、FIGE法 (Field Inversion Gel Electrophoresis) により行なった。約10⁸個の酵母が入ったゲルブロックを1%のパルスフィールド電気泳動用のアガロースゲル (FastLane™) に挿入し、100mol/m³ のL-グリシンを含有する0.25xTBE緩衝液 (25mol/m³ Tris、25mol/m³ ほう酸、0.5mol/m³ EDTA) を緩衝液として電気泳動した。まず、150mVで0.7時間泳動した後、条件をInitial time 0.3秒、Final time 66秒、Ratio 3.0秒、Volt 150mV、Timer 16hに再設定して泳動を続けた。

また、サザンブロッティングには、PhotoGene™ 核酸検出システムを使用し、BRL社のマニュアルに従って行なった。プローブは、BioNick™ラベリングシステムによりピオチン化することによりラベルした。ピオチン化したラベルの検出は、Fiji X Rayフィルムを室温中で30分間感光することにより行なった。また、分子サイズのマーカーとして、Yeast DNA-PFGE Markersを使用し、染色体番号はCarleら⁶¹⁾の染色体パターンを参考にして決めた。

3.2.6 ノーザンブロッティング

プラスミドの入った酵母細胞を、2.0mol/m³のD,L-エチオニンを含有しない、あるいは含有するSD最少培地中で303.2Kで好氣的に振盪培養し、対数増殖期 (O.D.=4) の細胞 (5x10⁸個) を集菌した。0.85%の生理食塩水で一回洗浄後、全RNAをElderらの方法⁶²⁾に従って調製した。また、ノーザンブロッティングは、Maniatisらの方法³²⁾に従って行なった。即ち、RNAをMOPS緩衝液 (20mol/m³ MOPS、5.0mol/m³ 酢酸ナトリウム、1.0mol/m³ EDTA、0.002% ジエチルピロカーボネート) を用いた1%のアガロースゲル電気泳動で分離した後、Hybond-Nフィルターにトランスファーした。その後、50%ホルムアミドを含む緩衝液中でプローブと315.2Kでハイブリダイゼーションした。このフィルターを0.1%SDSを含む2x SSPE緩衝液 (370mol/m³ 塩化ナトリウム、250mol/m³ リン酸一ナトリウム、25mol/m³ EDTA) で2回、0.1%SDSを含む1x SSPE緩衝液で1回、0.1%SDSを含む0.5x SSPE緩衝液で1回洗浄した。その後、室温で20時間Fuji X Rayフィルムに感光させた。DNAのプローブは、(α -³²P)dCTPを用い、ランダムプライマーDNAラベリングキットにより調製した。E. coliのリボソーマルRNA (16S, 23S) を分子サイズのマーカーとして使用した。

3.2.7 試薬

ライゲーション、ブランチング、ランダムプライマーDNAラベリングの各種キット、プラスミド (M13mp18とM13mp19)、制限酵素 (BssHIIを除く)、FastLane™、InCert™等のアガロースは宝酒造(株)のものを使用した。また、

BioNick™、PhotoGene™は、BRL社のものを、Yeast DNA-PFGE Markersは、Pharmacia社のものを使用した。さらに、BssHIIはニッポンジーン(株)より、Hybond-Nフィルターと [α - 32 P]dCTPはAmarsham-Japan社より入手した。

3.3 結果

3.3.1 エチオニン耐性遺伝子のサブクローニング

プラスミドpYSMH1は、エチオニン耐性遺伝子を含有する6.5kbの染色体DNAのSau3AI断片をベクタープラスミドYEpl3のBamHI部位に挿入したプラスミドである(第2章)。エチオニン耐性遺伝子がこの染色体DNA断片中のどこに位置し、どのような塩基配列であるかを決定するために、pYSMH1の染色体DNA断片部分のサブクローニングを行なった。プラスミドpER1、pER2、pER3及びpER4は、pYSMH1を制限酵素HindIIIで部分的に分解した断片をベクタープラスミドYEpl3のHindIII部位に挿入したものである(Fig. 3.1)。これらのプラスミドを*S. cerevisiae* DKD-5D-H株に形質転換した株のエチオニン耐性を調べた結果、pER1あるいはpER4の入った株がエチオニンに耐性であり、pER2あるいはpER3の入った株はエチオニンに対して感受性であった(Fig. 3.1)。それゆえ、エチオニン耐性遺伝子は、pYSMH1の左端のHindIII断片(3.0kb)に存在することが判明した。さらに、pER4のPstIからHindIIIまでの断片(2.2kb)をベクタープラスミドpJDB207に挿入したプラスミドpER5を作製した。このpER5をDKD-5D-H株に形質転換した株は、エチオニンに対して感受性であった。それゆえ、pYSMH1のPstI部位よりも左側のDNA領域がエチオニン耐性の発現に必要であることがわかった。

3.3.2 エチオニン耐性遺伝子の塩基配列

エチオニン耐性遺伝子のオープンリーディングフレーム(ORF:構造遺伝子領域)を調べるために、pER4の3.0kbのHindIII断片(Fig. 3.2A)をFig. 3.2B



Fig. 3.1 Trimming of DNA insert in plasmid pYSMH1.

Procedures for plasmid construction are described in Materials and Methods.

- , Chromosomal DNA fragment with a gene for ethionine resistance;
- , vector YEpl3 fragment; X, position of frame-shift mutation;
- ⊗, λ DNA fragment inserted for mutation. Restriction enzymes used are: H, HindIII; P, PstI; E, EcoRI; S, Sall; Bs, BssHII; K, KpnI and N, NcoI. Et^r, susceptibility to ethionine (+, resistant; -, sensitive); SAM, SAM contents in cells ($\times 10^{-3}$ kg/kg-dry cells). ND, not determined.

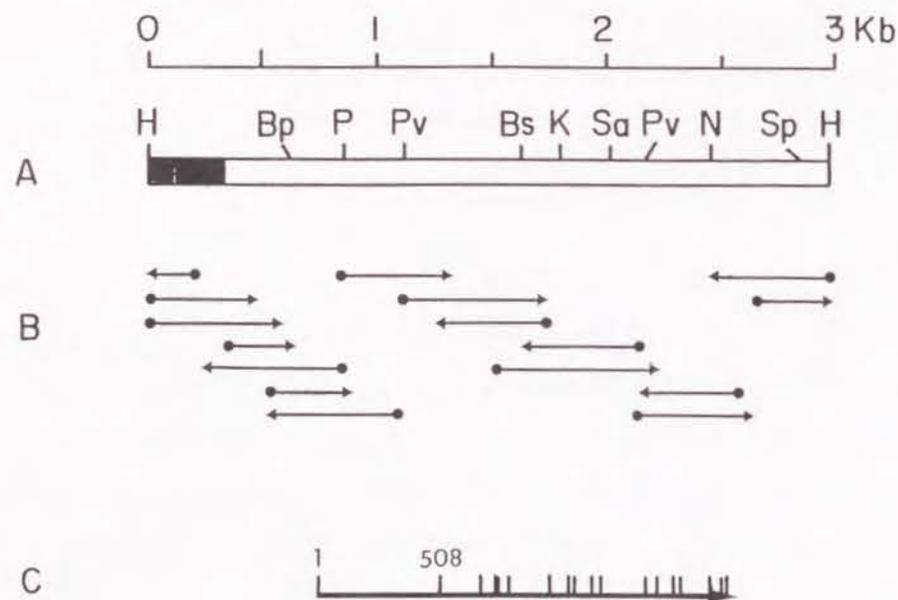


Fig. 3.2 A, Restriction map of the *Hind*III fragment from pER4. Restriction enzymes used are: Bp, *Bsp*HI; Sa, *Sau*I; Sp, *Sp*I and Pv, *Pvu*II. Other abbreviations for restriction enzymes are shown in Fig. 3.1. B, Sequencing strategy of the *Hind*III fragment. Extent and direction of DNA sequencing are indicated by horizontal arrows. C, ORF. Vertical bars represent positions of ATG codon.

に示す領域に対してシーケンシングを行ない、全塩基配列を決定した(Fig. 3.3)。このデータに基づいて、ORFの存在領域を調べたところ、可能性の高いORFはFig. 3.2Cに示すORF(1851bp)の1つしか存在しなかった。このORFがエチオニン耐性遺伝子に対応することを確認するために、このORF内に存在する *Nco*I、*Kpn*I及び *Bss*HIIの制限酵素切断部位を破壊したプラスミドであるpER6、

pER7及びpER8をそれぞれ作製した。これら3種類のプラスミドを *S. cerevisiae* のDKD-5D-H株にそれぞれ形質転換し、そのエチオニン耐性を調べたところ、いずれの形質転換体もエチオニンに対して感受性であった(Fig. 3.1)。既に、pER4の左側の *Hind*IIIから *Pst*Iまでの0.6Kbの断片が必要であることがわかっていることから、pER4の *Hind*III断片(3kb)のうち、エチオニン耐性の発現には、*Pst*Iから *Nco*Iまでの領域が少なくとも必要であることが明らかとなった。このことから、Fig. 3.2Cに示すORFがエチオニン耐性遺伝子のORFであると考えられる。

エチオニン耐性遺伝子に対応するORFには、多くのATGコドンが存在する。第2番目に長いORFを与えるATGコドンは、+508の位置に存在し、そのORFは1344bpである。しかしながら、エチオニン耐性遺伝子の発現には、pER4の左端の *Hind*III/*Pst*IのDNA断片が必要であることを考慮すれば、最も長いORFを与えるATGコドン(+1の位置)が、エチオニン耐性遺伝子の開始コドンである可能性が最も高いと考えられる。そこで本研究では、この仮の遺伝子をERC1(Ethionine Resistance Conferring Gene)遺伝子と命名し、このERC1遺伝子についてさらに検討した。

ERC1遺伝子の塩基配列をFig. 3.3に示す。ERC1遺伝子のORF及びその上流と下流には、酵母によく見られる特徴的な塩基配列が存在した。まず、Goldberg Hogness box⁶³⁾ 類似の2個のプロモーター配列がmRNAの開始付近、即ち、-358の位置(TATAA)と-232の位置(TATA)に存在した。また、酵母の開始コドンで最も多い塩基配列であるAXXATGXXTという塩基配列と同様の配列が-2から6の位置(ACTATGTCT)に認められた。さらに、ZaretとSherman⁶⁴⁾により示された一

Fig. 3.3 Nucleotide and deduced amino acid sequences.

Nucleotide sequence was determined using chromosomal DNA fragment (*Sau*-3AI/*Hind*III) of pER4 and numbered from presumed initiation codon as +1. TATA-like sequence was underlined and potential transcription sequence was double-underlined.

-443 GATCTTTTAGACCATTGCTTCTGTTTACCGGAGGCATGCGACCTGAACATCGGGATGCTTTATAAGAACAATCTCTCGACTTTTG
-332 AGCTTGTTCCTCTGCTTATTTGTCGAGATGATGTTTATTTACATATCTTTGACGTAATAATATCGGAATAATGCATGCGCAATTCGGGTAGCCCGTTATAGGGAAAA
-221 TGAATAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAGACTAAAAAATAGAAAGACCGGCACTTAAAAAGAAAAAATTCATGATACTGCAAAATAGTAAAGAACCTTGGCAA
-110 AGAAATAATCCGGTAAGGGAAGATAGACCGGCTTAAAGAGTACTTTTTCAGATTTGTCAGAGTCTGTTGTTAGCGGTGAAGAAGATAGAAAGAAGACGAAAGAAGACT
1 ATGTCTAAACAATTTAGTCATACCACCAACGACAGAAGATCAATCGATTATCTACTCCACAGTGTGGAAAGGACGGGCTTTTCACGCTGACAGACTACATCCACAGGAG
M S K Q F S H T T N D R R S S I I Y S T S V G K A G L F T P A D Y I P Q E
112 TCAGAAGAAAATTAATGAGGGCAGAGAGCAAGAGGGTAGTGAAGAAGAACTTCTATACCGGCAATGACGATGAGACGGAGGGGAAAGTGAATACCATTCGTTGTTA
S E E N L I E G E E Q E G S E E E P S Y T G N D D E T E R E G E Y H S L L
223 GATGCCAACAAATTCGGGACATTGCAACAAGAAGCGTGGCAACAAGTTATGACTCTACGACCGTAAGCGGTTGCTTGACGAAGAACGGGACCTGCTAATAGACAACAAA
D A N N S R T L Q Q E A W Q Q G Y D S H D R K R L L D E E R D L L I D N K
334 CTGCTCTCTCAACACGGCAACGGTGGGGAGATATAGAAAGTACGGACATGGCCAAGCAATTTGACCGGACGAGGAAGAAAAGACAGCTGAGATTGCAAAATACGTTGGAG
L L S Q H G N G G G D I E S H G H G Q A I G P D E E E R P A E I A N T W E
445 AGCGGATCGAGAGTGGCCAGAAAATCAGCACAACCTTTAAGAGAGAAACGCAAGTGAACAGATGAATGCGTTGCCGCTAATCTTCACCTTTATCTTCAAAAATTCGTTG
S A I E S G Q K I S T T F K R E T Q V I T M N A L P L I F T F I L Q N S L
556 TCACTAGCATCTATTTCTCCGCTCACAATTTAGGACGAAAAGAGCTAGGTGGTGTACTACTCGGTTCTATGACTGCTAACATCAGGGTCTTCTGCTATTCAGGCTG
S L A S I F S V S H L G T K E L G G V T L G S M T A N I T G L A A I Q G L
667 TGATCTGCTGGACACTGTGTGCGCAGGCAATCGGTGCAAAAATACCACTTGGTGGGTGTGCTAGTGCAGAGATGTGCGGTGATCACCATCTTGGCGTTCTTGGCA
C T C L D A Q A Y G A K N Y H L V G V L V Q R C A V I T I L A F L P
778 ATGATGTATGTTGGTTTGGTTCGGAAAAGATCCCTAGCACTAATGATTCCGGAGAGAGAATGCGCGCTAGCGGCTAACTATCTACGTGAACCGCATTCGGTGTG
M M Y V W F V W S E K I L A L M I P E R E L C A L A A N Y L R V T A F G V
889 CCAGGATTCATCTTTTGAATGTTGTAAGAGGTTCTTACAATGTCAGGATATTTCCATGCATCCACAATGTCGCTCTTTGTGTGGCACCTTGAACGCATTGATGAAC
P G F I L F E C G K R F L Q C Q G I F H A S T I V L F V C A P L N A L M N
1000 TACTTACTTGTGGAATGACAAGATTGGGATTTGGTACCTTGGTGGCCATTATCGGTTGTGATCAACTACTGGTTGATGACGCTCGGATTACTAATATACGCAATGACC
Y L L V W N D K I G I G Y L G A P L S V V I N Y W L M T L G L L I Y A M T
1111 ACCAAGCACAAGGAGAGACCACTCAAAATGCTGGAATGGTATCATCCCTAAGGAACAAGCAATTAAGAATGCGGTAAGATGATTAACCTAGCTATTCCCGGCGTGGTATG
T K H K E R P L K C W N G I I P K E Q A F K N W R K M I N L A I P G V V M
1222 GTGGAGGAGAGTTCCTCGGCTTTGAAGTGTGACAAATTTTCGCTTCCCACTGCGGACCGATGCGCTTGGGCGCTCAGTGGTGGTACGATTGCGTCTCTTGCATAC
V E A E F L G F E V L T I F A S H L G T D A L G A Q S I V A T I A S L A Y
1333 CAAGTGCCTTTCTCTATCTCCGTTTCTACAGTACAGTGTGGCAATTTTATCGGCGGCTGCTATACGACAGCTGCATGATCAGTGCCTGCTTATTGTTGTC
Q V P F S I S V S T S T R V A N F I G A S L Y D S C M I T C R V S L L L S
1444 TTGTGTGCTCCTCAATGAACATGTTGCTTATCTGCGTTATAAGGAACAAATGCAAGTCTATTTCTACTGAGAGCGCTGATGGAAGATGGTGGACACACTACCT
F V C S S M N M F V I C R Y K E Q I A S L F S T E S A V V K M V D T L P
1555 CTCTTGGGTTCAATTAATCGATGCTTTAATGCGTCCACCGGATGCTTACGTTGCAAGGAGACAAAAATAGTGGGTACATCAACCTAGTCCGATCTTAC
L L A P M Q L F D A F N A S T A G C L R G Q G R Q K I G G Y I N L V A F Y
1666 TGTCTAGGTGTGCCATGGCATAATGTTAGCATTCCTGTATCATCTGGGTGTAGCGGCTTATGGTGGGTATAACTAGCGGTTGGTAATGATGAGTGTGTGCAAGGA
C L G V P M A Y V L A P L Y H L G V G G L W L G I T S A L V M M S V C Q G
1777 TACGCGGTTTTTCATGTTGACAGACCGGATTTCTCGGAGCGGACGCAATGCTGAGACCCATACATCATAAAAATCTCTTCAGGGTCAATGACGTATAGGGGAG
Y A V F H G D R R I L G A A R K R N A E C T H T S ***
1888 ATGCACACCCCAACCCCAACACACCCAGCTTCTAGCCAATTTATGTTGGTAAAGTAAATTTAAGGGTTTCGCCATGTGGCATGCCACCGGCAAAAATAATACACGTGCC
1999 GTACGGCACCAACCGGCATGCAATTTCTGCAATTTGAAAAGTTTGTGCGCTTTCATGCTTTTTATGATGATACATACATACATTCGTGCATACATTTATATATA
2110 TATAGAGTGTGCATCGTGCATATGATTATTTATACCCTTTTTTTGTTTTTTGATTTTGTCTGTCAAAAGGAAGAGAAAAGGCATATCGAAGGGTGAATGAGAAAAGCTT

般的なターミネーションに関する塩基配列としてTATGT ... TTTが、+1822位置
の downstream に存在した。

一方、ERC1遺伝子の塩基配列よりアミノ酸配列を決定した (Fig. 3.3)。その
タンパク質 (ERC1タンパク質) の分子量を計算した結果、67,977であった。こ
のERC1タンパク質のコードン使用頻度をTable 3.1に示す。酵母にとって好まし
くないコードンが比較的多数使用されていた。さらに、BenneteenとHall⁽⁶⁹⁾らの
提示したコードン使用頻度の指数であるcodon bias indexを計算した結果、0.3
であった。これらのことから、ERC1は転写効率の悪い遺伝子であると考えられ
る。さらに、KyteとDoolittleの方法⁽⁶⁶⁾に従って、ハイドロパシーを計算した
結果がFig. 3.4である。ERC1タンパク質のN末端側に疎水性の高い領域が存在
した。

一方、SAM合成酵素の構造遺伝子であるSAM1とERC1との相関を調べたところ、
高い相関関係は得られなかった。そこで、EMBLのデータベースを用いてERC1
遺伝子とのホモロジーの高いものを検索したが、ホモロジーの高い遺伝子は見
い出せなかった。

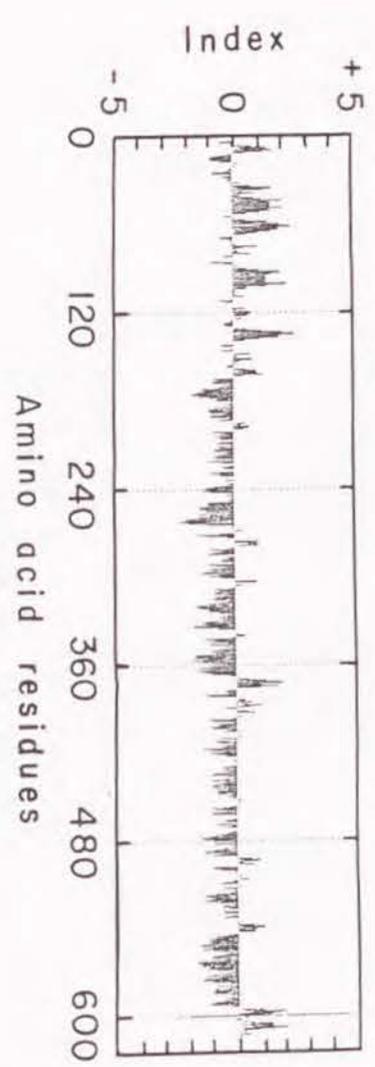


Fig. 3.4 Hydropathy analysis of corresponding protein of ERC1.
Index: hydropathic index.

Table 3.1 Codon usage of *ERC1* gene.

Phe	UUU	13	Ser	UCU	9	Tyr	UAU	7	Cys	UGU	8
	UUC	16		UCC	10		UAC	14		UGC	8
Leu	UUA	10		UCA	6	End	UAA	1	End	UGA	0
	UUG	18		UCG	8	End	UAG	0	Trp	UGG	9
	CUU	9	Pro	CCU	5	His	CAU	9	Arg	CGU	7
	CUC	7		CCC	3		CAC	5		CGC	4
	CUA	19		CCA	6	Gln	CAA	20		CGA	0
	CUG	8		CCG	3		CAG	5		CGG	3
Ile	AUU	15	Thr	ACU	4	Asn	AAU	10	Ser	AGU	8
	AUC	22		ACC	13		AAC	15		AGC	5
	AUA	6		ACA	10	Lys	AAA	7	Arg	AGA	9
Met	AUG	19		ACG	10		AAG	14		AGG	2
Val	GUU	8	Ala	GUC	11	Asp	GAU	5	Gly	GGU	22
	GUC	4		GCC	8		GAC	14		GGC	12
	GUA	4		GCA	20	Glu	GAA	21		GGA	9
	GUG	23		GCG	14		GAG	17		GGG	7

3.3.3 エチオニン耐性遺伝子のサザンブロッキングとノーザンブロッキング

酵母 *S. cerevisiae* DKD-5D-H 株の染色体DNAをFIGE法により分離した後、ビオチンでラベルしたプラスミド pER4 の 0.9kb の PvuII 断片と染色体DNAとを、サザンブロッキング法によりハイブリダイズさせた (Fig. 3.5)。その結果、XI 染色体と考えられる位置に、1本のハイブリダイズしたバンドが見いだされた。

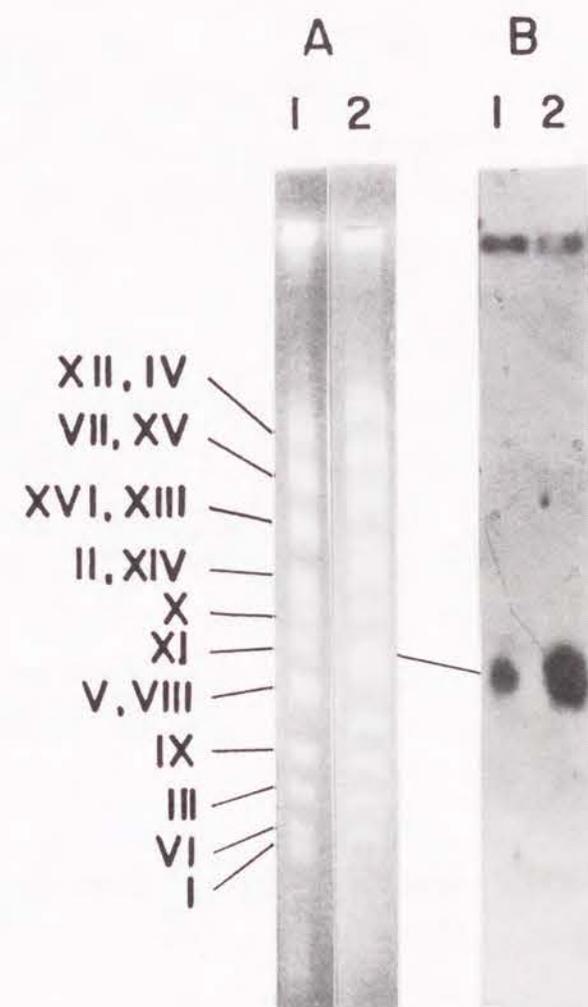


Fig. 3.5 Southern blot analysis of ethionine-resistant gene. A, Separation of chromosomal DNA by FIGE method. B, Southern blotting with DNA fragment (0.9kb of PvuII fragment from pER4) of ethionine-resistant gene. Lane 1: *S. cerevisiae* DKD-5D-H cells; lane 2: *S. cerevisiae* YNN221 cells (Yeast DNA-PFGE Markers).

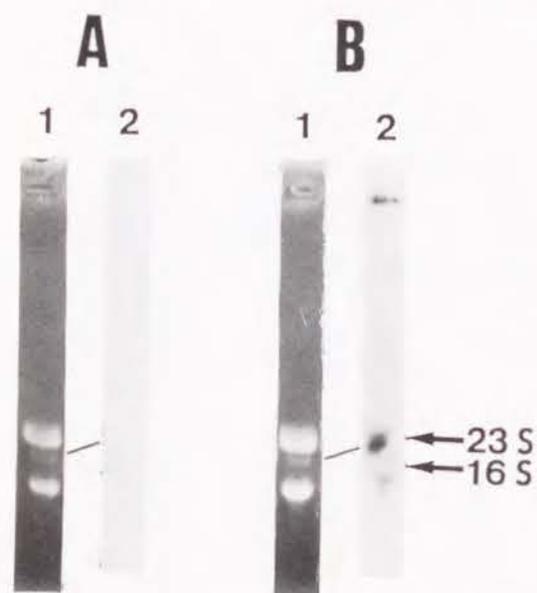


Fig. 3.6 Northern blot analysis of ethionine-resistant gene transcript.

Probe used for Northern blotting is *KpnI/NcoI* fragment of pER4 and positions of ribosomal RNAs of *E. coli* used as size markers are shown on the right of photographs. RNAs used for blotting were prepared from *S. cerevisiae* DKD-5D-H cells with pER4, which were grown on SD medium in the absence (A) or presence (B) of 2.0 mol/m³ D,L-ethionine. Lane 1, agarose gel electrophoresis of total RNA, lane 2, autoradiogram after Northern blotting with a probe.

また、マーカーとして用いた *S. cerevisiae* YNN295株でも同一の位置にハイブリダイズした。これらのことから、ERC1遺伝子は、*S. cerevisiae*の染色体XI上の遺伝子であることが確認された。

次にノーザンプロテイングについて調べた。プラスミドpER4の入った *S. cerevisiae* DKD-5D-H株の細胞 (DKD-5D-H/pER4)を、2.0mol/m³のD,L-エチオニンを含むあるいは含まないSD最少培地で培養した。それぞれの細胞より全RNAを調製し、この全RNAとラベルした0.6kbの*KpnI/NcoI*断片とのハイブリダイゼーションをノーザンプロテイング法により行なった。その結果、エチオニンの存在下で培養した菌より調製したサンプルにおいて、RNAとハイブリダイズしたバンドが2.3kbの位置に見いだされた (Fig. 3.6B)。一方、エチオニンを含む培地で培養した菌より調製したサンプルでは、ほとんどバンドが見られなかった (Fig. 3.6A)。実験結果3.3.2で得られたORFの結果から判断すれば、この2.3kbのバンドがエチオニン耐性遺伝子のmRNAであると考えられる。

このエチオニン耐性遺伝子のmRNA (2.3kb)の量は、D,L-エチオニンを含む培地で培養した時、著しく増加した (Fig. 3.6B)。

3.3.4 エチオニン耐性とSAMの蓄積の関係

ERC1タンパク質がSAMの蓄積を高める機能があるかどうかを確認するために、種々のサブクローニングされたプラスミドを *S. cerevisiae* DKD-5D-H株に形質転換した形質転換体6個についてSAMの蓄積を調べた (Fig. 3.1)。エチオニン耐性遺伝子を有するプラスミドであるpER1あるいはpER4の入った転換体は、SAMの蓄積量が高く、その量はpYSMH1が入ったものと同様であった (0.130-0.160kg/kg-dry cells)。他方、エチオニン耐性遺伝子が破壊され、エチオニンに対して感受性になったプラスミドであるpER3、pER7及びpER8を入れたものはSAMの蓄積が少なく、その量はYEp13が入ったものと同様であった

(0.010-0.015kg/kg-dry cells)。この結果から、このERC1タンパク質はエチオニンに耐性を示すだけでなく、菌体内のSAMの蓄積を高めることにも関与していると考えられる。

3.4 考察

エチオニン耐性遺伝子をサブクローニングし、その塩基配列からエチオニン耐性遺伝子の可能性の高い仮のORF (ERC1遺伝子) を決定した。このERC1遺伝子は、SAMの蓄積を高めることに関与する遺伝子であることから、SAMの合成酵素との相関が期待された。しかし、エチオニン耐性遺伝子ERC1の塩基配列は、SAMの合成酵素の遺伝子であるSAM1及びSAM2とは異なるものであり、両者の間に何等の相関も見い出せなかった。さらに、メチオニン合成経路の遺伝子及びSAM合成遺伝子 (MET3、MET25、SAM1、SAM2) には、共通の塩基配列GAAAAGTGGが開始コドンの上流 -200から -300付近に存在し、SAMによるメチオニンの合成やSAMの合成のフィードバックリプレッションに、この塩基配列が関与するのではないかということが示唆されている。しかし、ERC1遺伝子にはそのような塩基配列は存在しなかった。

一方、ERC1遺伝子より得られるタンパク質が、エチオニンに耐性を示すだけでなく、SAMの液胞への蓄積を高める機能を有していることが明らかになった。このことは、ERC1タンパク質がSAMの液胞の透過酵素である可能性を示唆するものである。さらに、ERC1タンパク質には、N-末端側に疎水性の高い領域が存在することから、このタンパク質が膜に結合して存在する可能性があることも示唆された。しかし、*S. cerevisiae*において細胞膜のアミノ酸の透過酵素のクローニングが行なわれている⁶⁷⁾が、ERC1タンパク質との相関は見い出せなかった。この遺伝子産物が、液胞のSAMの透過酵素であるのかそれとも別のタンパク質であるのかについては、遺伝子産物のタンパク質の精製と解析がさらに必要である。

3.5 結言

*S. cerevisiae*のエチオニン耐性遺伝子を含有するプラスミドpYSMH1をサブクローニングした結果、この耐性遺伝子がHindIII断片 (3.0kb)内に存在することが判明したので、このDNA断片の全塩基配列を決定した。このDNA断片は1個の長いオープンリーディングフレームを含んでおり、フレームシフトミューテーション、及び、ノーサンプロッチングの結果からこのORFがエチオニン耐性遺伝子のORFであり、最も長いORFを与えるATGコドンを開始コドンとする可能性が高いことを確認した。最も長いORFを与える遺伝子 (ERC1遺伝子) から推定されるタンパク質は617のアミノ酸残基からなる分子量67,977のタンパク質であり、メチオニンアデノシルトランスフェラーゼあるいはその他の既知の遺伝子との相同性は見い出せなかった。また、このタンパク質はN末端側に疎水性の領域を有する特徴があった。さらに、このERC1遺伝子はエチオニンに耐性を示すだけでなく、菌体内のSAMを液胞へ輸送蓄積する機能があることも考えられた。

第 4 章

Saccharomyces cerevisiae のスベルミン耐性遺伝子の
クローニングと S-アデノシルメチオニンの蓄積への影響

4.1 緒言

S-アデノシルメチオニン (SAM) の代謝経路のひとつにポリアミンの合成に関与する経路がある。プトレスシンやスベルミジンは、最も一般的なポリアミンであり、生体内では DNA や RNA など多くの物質の代謝制御に利用されている⁶⁸⁾。

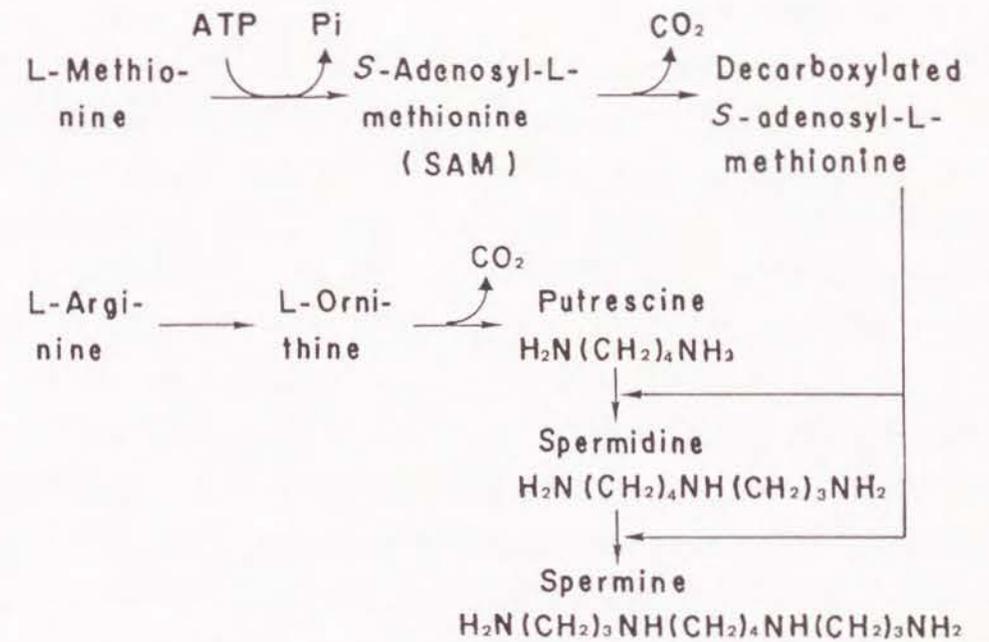


Fig. 4.1 Pathway of polyamine biosynthesis in *S. cerevisiae*.

スベルミンもまたすべてではないが、多くの生物種で見出される。これら、ポリアミンの*Saccharomyces cerevisiae*における合成経路をFig. 4.1に示す。

微生物、動植物などの生物種において、プトレスシンとスベルミジンの代謝と機能に関する研究がなされているが、スベルミンの代謝と機能、とりわけ高濃度スベルミンの強い毒性に関する研究はほとんど見当たらない^{69) - 72)}。そこで、スベルミンの毒性発現と解毒機構を明らかにするため、酵母*Saccharomyces cerevisiae*のスベルミンに耐性を示す遺伝子のクローニングを行なった。得られたスベルミンに耐性を示す遺伝子の中には、エチオニンに耐性を示し、同時にSAMの蓄積を高める遺伝子が存在した。それゆえ、エチオニン耐性遺伝子がスベルミン耐性にも関与していることが示唆された。

4.2 実験方法

4.2.1 菌株及び培地

酵母として*Saccharomyces cerevisiae* DKD-5D-H株 (a *leu2-3 leu2-112 trp1 his3*) を、大腸菌として*Escherichia coli* DH1 (*F⁻ gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi1 hsdR17 SupE44 λ⁻*) を宿主として使用した。酵母の培地として、SD最少培地 (2% グルコース、0.67% イースト窒素ベースW/Oアミノ酸、pH5.0 (0.02mol/m³のL-トリプトファンとL-ヒスチジン及び0.03mol/m³のL-ロイシンを適宜添加)) を使用した。

4.2.2 遺伝子のクローニング

酵母DKD-5D-Hの遺伝子ライブラリーは、2.2.2で述べた方法を用いて作製した。ただし、染色体DNAを制限酵素*Sau3AI*の部分分解物として、3-10キロベース(kb)の断片を使用した。大腸菌及び酵母の形質転換には、塩化カルシウム法³⁾及び酢酸リチウム法³³⁾をそれぞれ使用した。

4.2.3 増殖実験と分析

ポリアミン及びD,L-エチオニンの耐性実験は、4.0x10⁻⁶ m³のSD最少培地にポリアミンあるいはD,L-エチオニンを適宜含有した培地を試験管(内径 1.6 cm、長さ16.5 cm)に入れたものに酵母細胞を植菌し、303.2Kで好氣的に振盪培養した。菌体濃度は、分光光度計 (Hitachi 100-40型) により培養液の610 nmの濁度を測定することにより算出した。

また、SAMの蓄積の実験では、2.0x10⁻³ m³の坂口フラスコに 1.0x10⁻³ m³の 1.0 mol/m³のL-メチオニンを含有するSD最少培地を入れ、これにL-メチオニンを含有しないSD最少培地で対数後期まで培養した酵母細胞を植菌し、303.2Kで好氣的に振盪培養した。菌体内のSAMの抽出および分析は実験方法2.2.4で述べた方法で行なった。また、グルコースの分析はグルコースアナライザー (Glucose Analyzer II、ベックマンジャパン社)を用いて行なった。菌体濃度は610 nmの濁度を測定し、そこから乾燥菌体重量を算出した。

4.2.4 試薬

プトレスシン、スベルミジン及びスベルミンはSigma Chemical社より、制限酵素は宝酒造(株)より入手した。

4.3 結果及び考察

4.3.1 スベルミン耐性遺伝子のクローニング

まず、DKD-5D-H株に対するプトレスシン、スベルミジン、スベルミンの増殖に及ぼす影響について調べたのがFig. 4.2である。プトレスシン (Fig. 4.2A) やスベルミジン (Fig. 4.2B) では、270mol/m³の高濃度でも増殖できるのに対し、スベルミン (Fig. 4.2C) では30mol/m³以上で増殖が阻害された。この結果から、スベルミンあるいはその代謝産物が酵母*S. cerevisiae*に対して強い毒性を有することが明らかとなった。実際、他の研究者によりスベルミンのバク

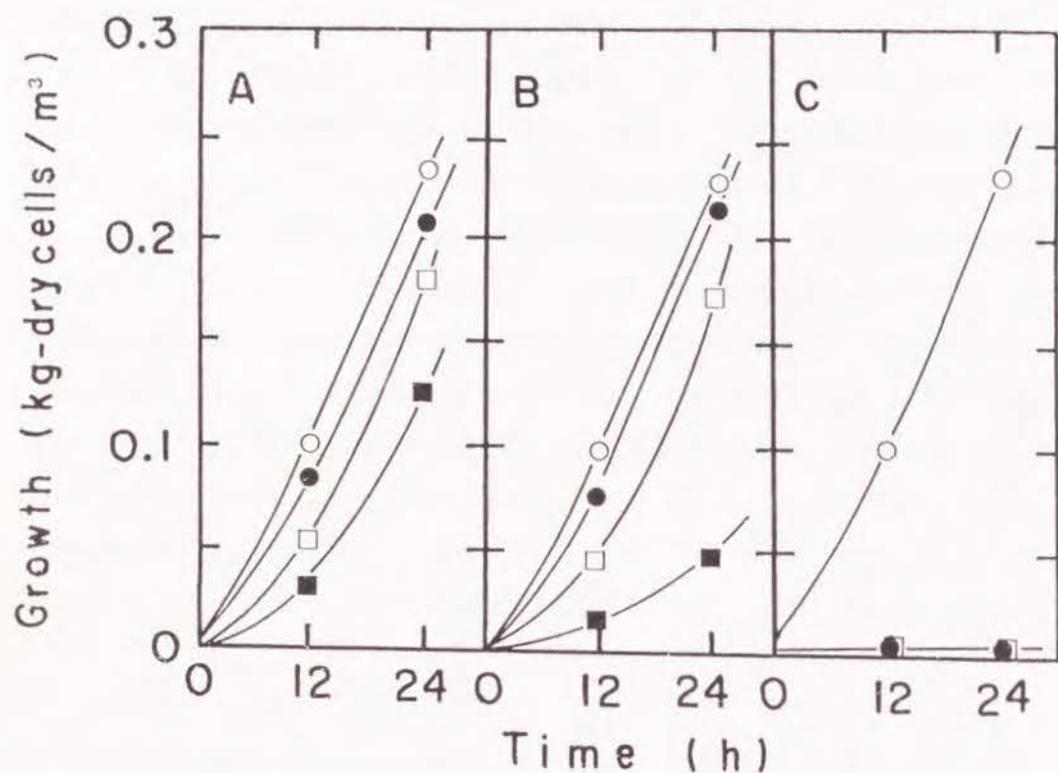


Fig. 4.2 Effects of polyamines on growth of DKD-5D-H cells. The cells were grown on SD minimal medium containing polyamines (A, putrescine; B, spermidine; C, spermine) at various concentrations (○, 0 mol/m³; ●, 30 mol/m³; □, 90 mol/m³; ■, 270 mol/m³).

テリアへの毒性についての報告がなされており^{69) - 72)}、その毒性がスベルミンの酸化物に起因することも示唆されている。

次に、酵母 *S. cerevisiae* におけるスベルミンの増殖阻害効果の機構を明らかにするため、スベルミンに耐性を示す酵母の遺伝子のクローニングを試みた。その様な遺伝子はスベルミンの無毒化に反応するある種の遺伝子であるか、あるいは、スベルミンの代謝に関する遺伝子として得られることが期待される。

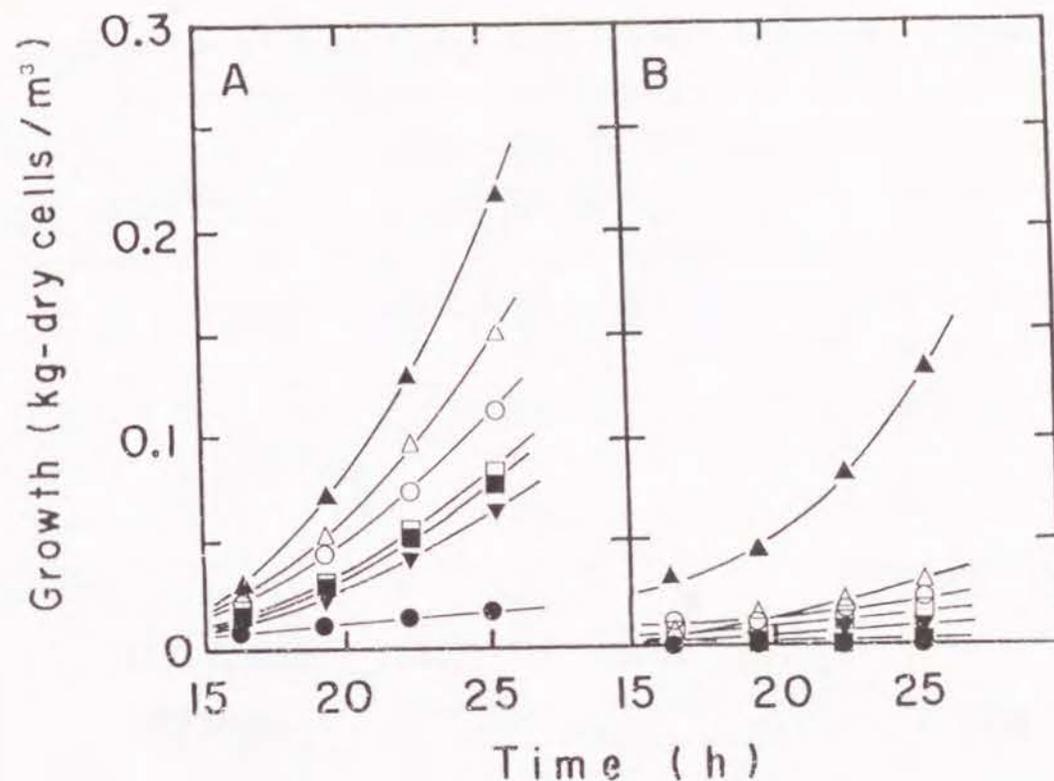


Fig. 4.3 Resistance of transformants to spermine. Control DKD-5D-H/YEp13 (●) and six transformants (○, SPR1; △, SPR2; ▲, SPR3; □, SPR4; ■, SPR5; ▼, SPR6) cells were grown on SD minimal medium containing spermine at 20 mol/m³ (A) and 40 mol/m³ (B).

そこで、酵母 *S. cerevisiae* DKD-5D-H株の遺伝子ライブラリーを、30mol/m³のスベルミンを含有するSD最少培地の寒天プレートに塗布し、303.2Kで3日間放置した。その結果、目的の遺伝子と思われる6個のスベルミンに耐性を示すコロニーを得た。これら6個の形質転換体 (SPR1-SPR6) のスベルミンに対する増殖阻害効果をコントロールであるYEpl3を有する酵母 (DKD-5D-H/YEp13) と比較したのが Fig. 4.3である。コントロールの細胞は20mol/m³ (Fig. 4.3A) 及び

40mol/m³ (Fig. 4.3B) のいずれの場合も完全に増殖が阻害された。一方、形質転換体はいずれもスベルミンに耐性を示したが、そのなかで、SPR3は、他のもの (SPR1, 2, 4, 5, 6) と異なる特性を示した。SPR3の世代時間は、20 mol/m³の場合も40mol/m³の場合も大きな差はみられなかった。しかし、その他の形質転換体の世代時間は、スベルミン濃度の増加により長くなった。このスベルミン耐性の結果から、スベルミンに耐性を示す遺伝子には少なくとも2種類存在することが予測された。即ち、スベルミンに強い耐性を示すもの (SPR3) と弱い耐性を示すもの (SPR1, 2, 4, 5, 6) が存在した。

この強い耐性と弱い耐性を示すものが存在することに着目し、SPR1とSPR3についてさらに調べた。SPR1及びSPR3よりプラスミドを抽出、精製した (得られたプラスミドをそれぞれpSPR1及びpSPR3と称した)。これら、プラスミドの制

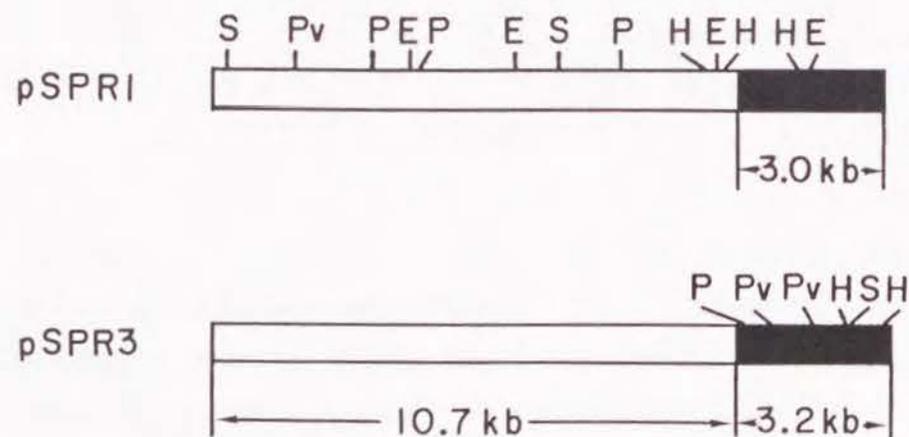


Fig. 4.4 Restriction maps of hybrid plasmids pSPR1 and pSPR3.

■: Chromosomal DNA fragment; □: vector plasmid YEpl3. Abbreviations are: S, SalI; Pv, PvuII; P, PstI; E, EcoRI; H, HindIII. The chromosomal DNA fragment (3.0 Kb) in pSPR1 contains no S and P sites, but contains many Pv sites.

限酵素地図をFig. 4.4に示した。プラスミドpSPR1は13.7 kbであり、3.0 kbの染色体DNA断片がベクタープラスミドYEpl3のBamHI部位に挿入されたものであった。他方、プラスミドpSPR3は13.9kbで3.2kbの染色体DNA断片が挿入されたものであり、その制限酵素地図のパターンはpSPR1と異なるものであった。しかしながら、興味深いことに、pSPR3の制限酵素地図は、既に第2章で取得している同じDKD-5D-H株のエチオニン耐性遺伝子の制限酵素地図とよく一致した。それゆえ、このpSPR3に着目し、さらにその特性を調べた。

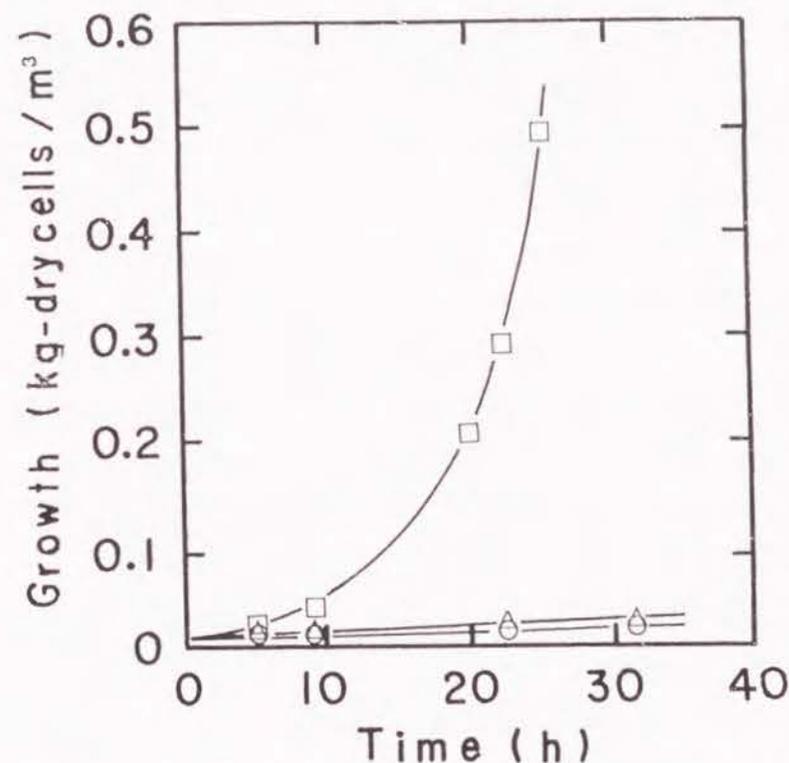


Fig. 4.5 Effect of ethionine on growth of transformants.

Control DKD-5D-H/YEpl3 (O) and transformants (Δ, SPR1; □, SPR3) cells were grown on SD minimal medium containing 1.0 mol/m³ of D,L-ethionine.

4.3.2 pSPR3の特性

スペルミン耐性遺伝子(pSPR3)が、エチオニン耐性遺伝子と表現型が同じであることを確認するために、プラスミドpSPR1、pSPR3及びYEpl3をDKD-5D-H株の細胞にそれぞれ形質転換し、これら形質転換体のエチオニンに対する感受性と、SAMの蓄積について調べた。まず、エチオニンに対する感受性では、pSPR3の入った酵母の細胞 (DKD-5D-H/pSPR3)が、 1.0 mol/m^3 のD,L-エチオニンを含むSD最少培地でも増殖できるのに対し、YEpl3あるいはpSPR1の入った細胞 (DKD-5D-H/YEp13、DKD-5D-H/pSPR1)は増殖阻害を受けた (Fig. 4.5)。

また、 1.0 mol/m^3 のL-メチオニンを含むSD最少培地で培養した時のSAMの蓄積量の経時変化をFig. 4.6に示した。コントロールであるDKD-5D-H/YEp13の細胞でのSAMの蓄積は増殖に伴って高まり、約 $0.02 \text{ kg/kg-dry cells}$ まで蓄積した後、ほぼ一定になった (Fig. 4.6A)。また、データを示していないがDKD-5D-H/pSPR1も約 $0.02 \text{ kg/kg-dry cells}$ までしか蓄積できなかった。他方、DKD-5D-H/pSPR3は、約2時間SAMの蓄積が高まりその後一定になった。このDKD-5D-H/pSPR3の蓄積量は高く約 $0.10 \text{ kg/kg-dry cells}$ にまで達した (Fig. 4.6B)。この蓄積量は、DKD-5D-H株の細胞にpYSMH1を入れたもの (DKD-5D-H/pYSMH1)の蓄積量 (Table 2.1)とほぼ同じであった。一方、DKD-5D-H/pYSMH1の細胞は、エチオニンに耐性を示すだけでなくスペルミンにも耐性を示した (データ図示せず)。このようにpSPR3の制限地図とその表現型がpYSMH1とよく一致することから、同一の遺伝子断片を有していると考えられる。

スペルミン耐性遺伝子とエチオニン耐性遺伝子の表現型での最も明白な一致点は、菌体内にSAMが蓄積することであり、それゆえ、SAMの蓄積がスペルミンの毒性緩和に関与している可能性が考えられる。しかしながら、酵母のスペルミン耐性に関する研究はほとんど行なわれておらず、この遺伝子産物によりスペルミンの解毒機構を説明することは現在のところ非常に困難である。これについては、さらに検討が必要である。

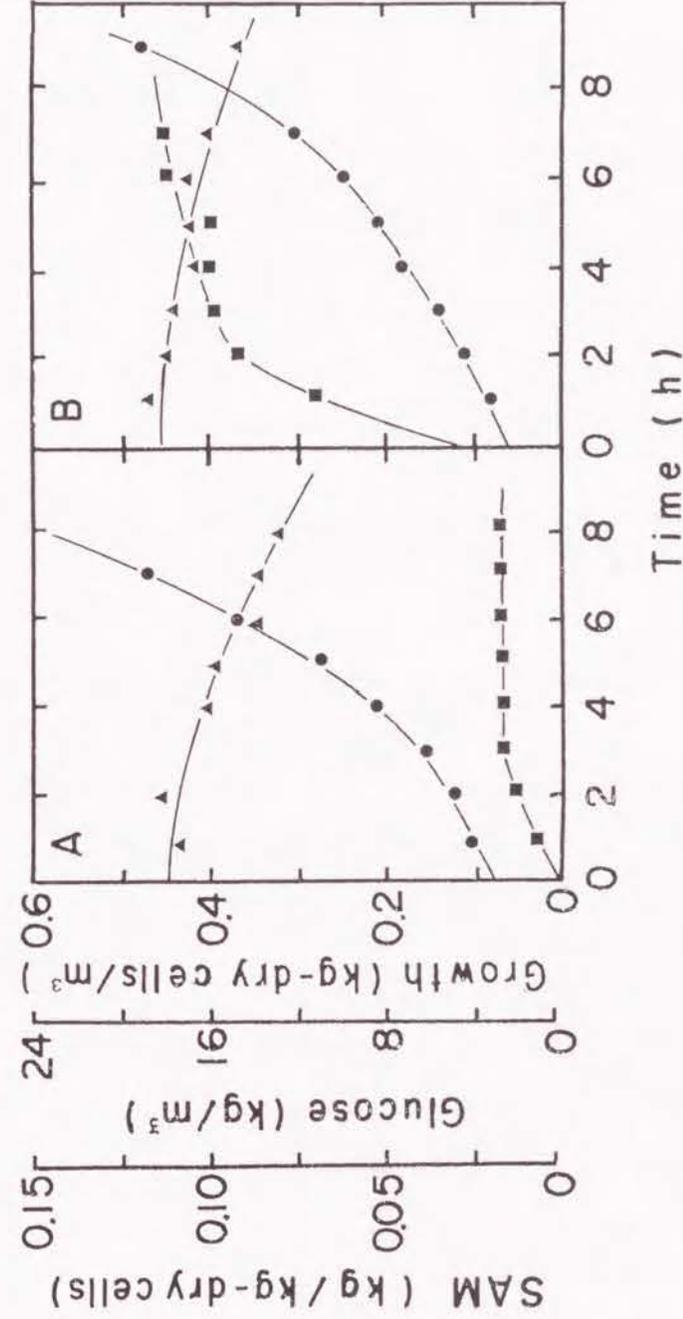


Fig. 4.6 Accumulation of SAM in DKD-5D-H/YEp13 and SPR3 cells. Control DKD-5D-H/YEp13 (A) and transformant SPR3 (B) cells were aerobically cultured in $2.0 \times 10^{-3} \text{ m}^3$ Sakaguchi flask with $1.0 \times 10^{-3} \text{ m}^3$ of SD minimal medium containing 1.0 mol/m^3 of L-methionine.

■, SAM in cells; ▲, glucose in medium; ●, cell growth.

4.4 結言

ポリアミンの中で、スベルミンが酵母*S. cerevisiae*の増殖を阻害する効果が強かった。酵母*S. cerevisiae* DKD-5D-II株の遺伝子ライブラリーより得たスベルミンに耐性を示す遺伝子には、耐性の強いものと弱いものが存在した。この強い耐性を示す遺伝子の制限地図は、既を取得しているエチオニン耐性遺伝子のそれとよく一致した。そして、このスベルミン耐性遺伝子を有する酵母はエチオニンにも耐性を示し、SAMを菌体内に蓄積した。このことから、エチオニン耐性がスベルミンの毒性緩和に関与していると考えられる。

第 2 編

S-アデノシルメチオニンの生産法の開発

第5章 エチオニン耐性遺伝子を有する酵母によるS-アデノシルメチオニン及びその関連物質の生産

第6章 *Saccharomyces cerevisiae*のエチオニン耐性遺伝子をマーカーとするプラスミドの発現と安定性

第7章 トランスポゾンによるエチオニン耐性遺伝子の酵母染色体への挿入とその発現及び安定性

第 5 章

エチオニン耐性遺伝子を有する酵母によるS-アデノシル
メチオニン及びその関連物質の生産

5.1 緒言

S-アデノシルメチオニン(SAM)は、メチオニンとアデノシン三リン酸(ATP)からSAM合成酵素(メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ)により合成され(Fig. 5.1)、生体内に存在する多様なメチル基転位反応の供与体として重要な役割を果たすアデノシン誘導体である。例えば、よく知られている生理活性アミン類のメチル化以外にもDNA、RNA、細胞膜のリン脂質、生理活性タンパク質の

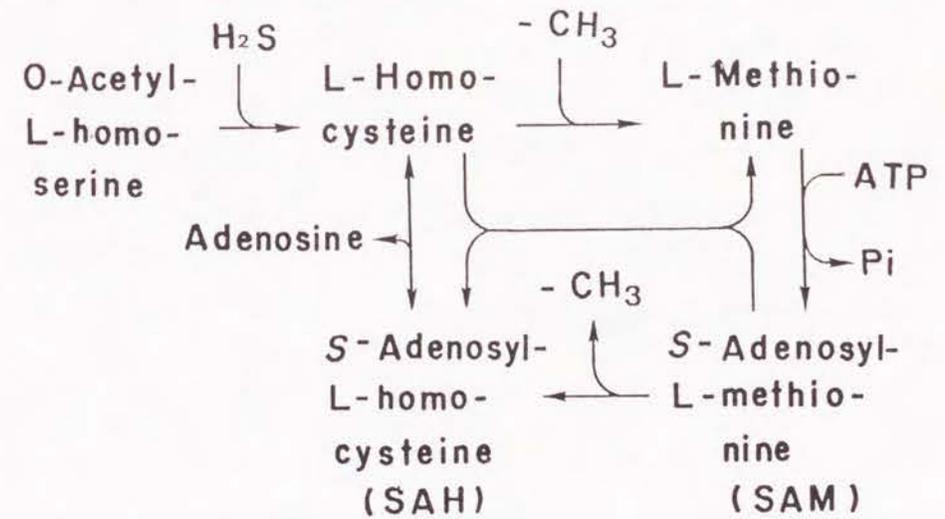


Fig. 5.1 Pathway for SAM and SAH productions by *S. cerevisiae* cells

メチル化などにもこの物質が関与していることが最近知られつつあり、生化学的観点からも注目されている⁷³⁾。また、薬理学的な観点からも興味深く、肝機能の低下に対して効果が認められ、肝臓薬としてイタリアでは既に利用されている他、高脂血症に対する有効性⁷⁴⁾、急性脳障害に対する改善⁷⁵⁾、不眠症、鬱病等の神経性疾患に対する有効性⁷⁶⁾も報告されており、その工業的な生産法の開発が期待されている。

他方、S-アデノシルホモシステイン (SAH)は、SAMのメチル基がとれた物質であり、その構造をFig. 5.2に示す。このSAHも神経系の疾患などに対する薬理効果が報告されており⁷⁷⁾、SAMと同様にその工業的な生産法の開発が期待される。酵母においては、SAMがメチル基転位反応によりメチル基を供与した際の副産物として、SAHが主に生成されている (Fig. 5.1)。

本章では、エチオニン耐性遺伝子を有する酵母を用いたSAMの生産法について、乾燥菌体法と菌体からの抽出法の両方から比較検討した。その結果、菌体からの抽出法ではSAMを高濃度に菌体内に蓄積することができた。さらに、SAHの生産についても検討した。

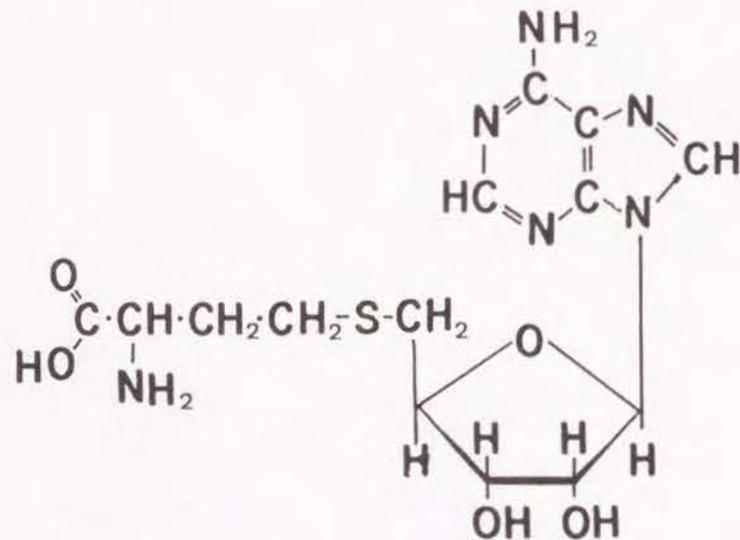


Fig. 5.2 Structure of S-adenosylhomocysteine (SAH).

5.2 実験方法

5.2.1 菌株及び培地

酵母として、*Saccharomyces cerevisiae* DKD-5D-H株(a *leu2-3 leu2-112 his3 trp1*)にプラスミドpYSMH1を形質転換した菌株 (DKD-5D-H/pYSMH1)及びYEpl3を形質転換した菌株 (DKD-5D-H/YEpl3)を使用した。酵母の培地として、SD最少培地 (2% グルコース、0.67% イーストニトロゲンベースW/Oアミノ酸、pH5.0 (0.02kg/m³のL-トリプトファンとL-ヒスチジンを添加)) を基本培地として使用した。

5.2.2 乾燥菌体の調製

酵母菌体 $2 \times 10^{-3} \text{m}^3$ をSD最少培地で対数期後期まで培養した後、集菌し、蒸留水で1回洗浄した。この菌体を16時間室温で風乾した後、253.2Kで冷凍保存した。さらに使用前に、この菌体を減圧下約20時間P₂O₅の入ったデシケータ中で乾燥した。

酵素反応は、酵母の乾燥菌体1gを $4.0 \times 10^{-6} \text{m}^3$ の反応液 (500mol/m³ グルコース、100mol/m³ リン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)、10mol/m³ 硫酸マグネシウム、100mol/m³ 塩化カリウム、50mol/m³ ATP、20mol/m³ L-メチオニン)に添加し、303.2Kで反応させた。 $5.0 \times 10^{-7} \text{m}^3$ の反応溶液を経時的にサンプリングした後、 $1.0 \times 10^{-7} \text{m}^3$ の60%の過塩素酸を添加することにより反応を停止した。生成した沈澱物を遠心分離によって除去した後、この上澄液を実験方法2.2.4で述べた高速液体クロマトグラフィー (HPLC)法により分析した。

5.2.3 菌体内のSAMとSAHの蓄積実験

1. 坂口フラスコによる実験

菌体内のSAMの蓄積実験は、 $2.0 \times 10^{-5} \text{m}^3$ のSD最少培地に酵母細胞を入れて定常期まで前培養したものを、 $5.0 \times 10^{-4} \text{m}^3$ の坂口フラスコに $1.0 \times 10^{-4} \text{m}^3$ のSD最少培地にL-メチオニン及びその他の物質を適宜添加したものに植菌し (O.D.=

0.05)、この酵母細胞を303.2Kで好氣的に振盪培養した。そして、対数増殖期後期において菌体を集菌しSAMの蓄積量を分析した。

菌体内のSAHの蓄積は $2.0 \times 10^{-5} \text{m}^3$ のSD最少培地に酵母細胞を入れて定常期まで前培養したものを、 $5.0 \times 10^{-4} \text{m}^3$ の坂口フラスコに $1.0 \times 10^{-4} \text{m}^3$ のSD最少培地にD,L-ホモシステイン及びその他の物質を適宜添加したものに植菌し(O.D.=0.05)、この酵母細胞を303.2Kで好氣的に振盪培養した。そして、対数増殖期後期において菌体を集菌しSAHの蓄積量を分析した。

2. ジャーファーマンターによる実験

$2.0 \times 10^{-3} \text{m}^3$ のジャーファーマンターを使用し、空気を十分供給することにより好氣的に培養した。培養温度は、恒温槽(EYAMA T-80)により303.2Kにコントロールした。pHはpHコントローラーを利用し、2%のアンモニア水を微量ポンプで添加することにより、pH5.4にコントロールした。培養は、酵母を $1.0 \times 10^{-4} \text{m}^3$ のSD最少培地で定常期まで培養した菌体を、 5.0mol/m^3 のL-メチオニン及び 50mol/m^3 のリン酸カリウム緩衝液(pH 5.4)を含有する $1.5 \times 10^{-3} \text{m}^3$ のSD最少培地(あるいは、グルコース濃度を変えたもの)に植菌して培養した。分析は、経時的に $5.0 \times 10^{-5} \text{m}^3$ の培養液をサンプリングし、これを分析した。

5.2.4 分析

菌体からのSAMの抽出ならびに分析は、実験方法2.2.4で述べた方法により行なった。また、SAHの抽出及び分析は、SAMと同じ方法により抽出し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法により分析した。分析条件は、SAMの分析と同じ条件(実験方法2.2.4)とした。

グルコースの分析には、グルコースアナライザー(Glucose Analyzer II、ベックマンジャパン(株))を、エタノールの分析には、ガスクロマトグラフィーを使用し、福田らの方法⁷⁸⁾に従って分析した。また、菌体濃度は610nmの濁度を測定することにより算出した。

5.3 結果

5.3.1 乾燥菌体法によるSAMの生産

酵母細胞を用いるSAMの生産法として、乾燥菌体を用いて酵素的に合成する方法と、生菌体中にSAMを蓄積した後にこれを抽出する方法の2種類がある。まず、前者の乾燥菌体を用いたSAMの生産について検討した。SAMは、ATPとL-メチオニンからSAM合成酵素(メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ)により合成される。酵母の乾燥菌体中には強いATP分解系が存在しており、乾燥菌体法を用いる場合には、反応基質として添加したATPの分解速度の方がSAMの合成速度よりも早い可能性がある。そこで、アデノシン二リン酸(ADP)やアデノシン一リン酸(AMP)などに分解された反応基質のATPを解糖系により再生しながらSAMの合成を行なった。乾燥菌体を用いるSAM合成の概略をFig. 5.3に示した。

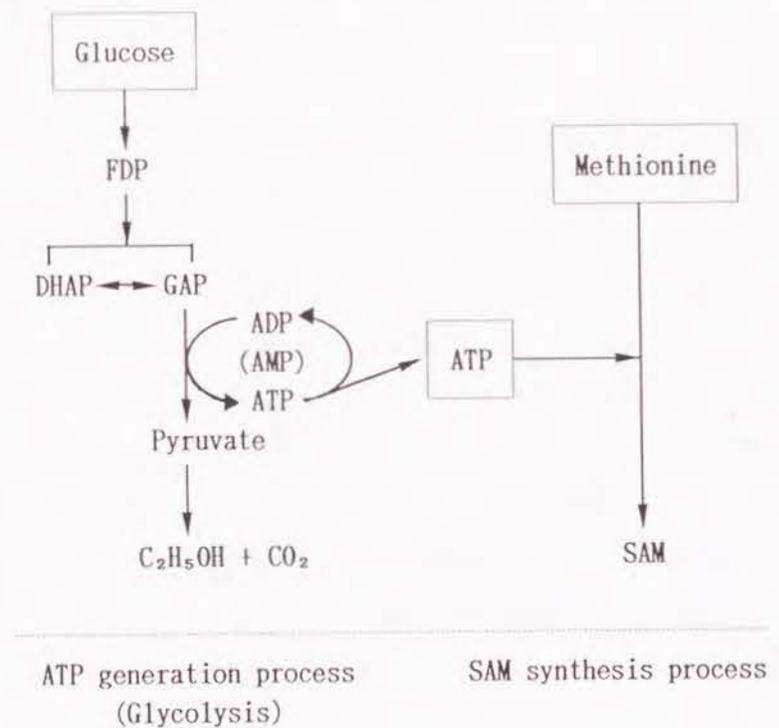


Fig. 5.3 Pathway of SAM production by using dried yeast cells.

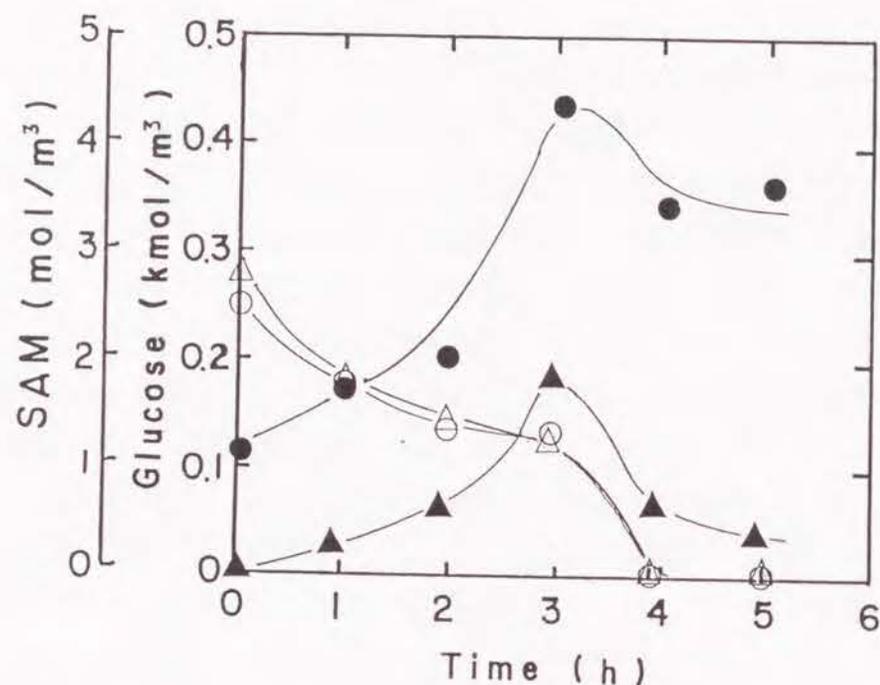


Fig. 5.4 Production of SAM by dried yeast cells.

Dried yeast cells of DKD-5D-H/YEp13 (Δ , \blacktriangle) and DKD-5D-H/pYSMH1 (\circ , \bullet) were used for SAM production. Reaction conditions are given in Materials and Methods.

\blacktriangle , \bullet , SAM; Δ , \circ , glucose

エチオニン耐性遺伝子を有するプラスミドpYSMH1を形質転換した細胞 (DKD-5D-H/pYSMH1) 及びコントロールのベクタープラスミドYEp13を酵母DKD-5D-H株に形質転換した細胞 (DKD-5D-H/YEp13) の乾燥菌体をそれぞれ調製し、実験方法5.2.2に示した反応条件で酵素的にSAMを合成した (Fig. 5.4)。DKD-5D-H/YEp13及びDKD-5D-H/pYSMH1のいずれの乾燥菌体を利用した場合もSAMが酵素的に合成され、その量はグルコースがなくなるまで増加し、その後減少した。最終的なSAMの総生産量は、DKD-5D-H/YEp13で約 2.0 mol/m^3 であるのに対し、

DKD-5D-H/pYSMH1では約 4.4 mol/m^3 であり、DKD-5D-H/pYSMH1の方がSAMの総生産量が、多くなっていた。しかし、合成速度は、DKD-5D-H/pYSMH1の方が、DKD-5D-H/YEp13に対してわずかに速いのみであり、総生産量の差は主に乾燥菌体に存在したSAM含有量の差によるものであった。それゆえ、乾燥菌体法では、エチオニン耐性遺伝子を利用することの利点はあまり見い出せなかった。

また、反応基質のATP及びメチオニン当たりのSAMの収率は、それぞれ約5%及び約12%であった。反応基質のATP及びメチオニンが十分残存するにもかかわらず、グルコースが無くなるとSAMの合成も停止することから、ATPは酵母の強いATP分解活性により速やかに分解されていると考えられる。従って、乾燥菌体を用いてSAMを合成するためには、分解されたATPを解糖系により強力に再生する必要があることが明らかとなった。

5.3.2 菌体抽出法によるSAMの生産

次に菌体からの抽出法によるSAMの生産方法、即ち、SAMを生菌体中に蓄積させた後、菌体外に抽出精製する方法について検討した。この方法は抽出液からSAMをさらに精製する必要があり、精製コストを安価にするためには、菌体内に可能な限り高濃度にSAMを蓄積することが重要である。菌体内にSAMを高濃度に蓄積する方法として、SAMの反応基質であるL-メチオニンとATPを添加する方法が考えられるが、ATP(あるいはADP、AMP)は、培地に添加しても菌体内に取り込まれない。そこで、L-メチオニンのみを培地に添加して菌体内に取り込ませ、菌体内で合成されたATPと反応させることにより、SAMの蓄積を高める方法が用いられている⁷⁹⁾。本研究では、L-メチオニンを含有する培地で培養した時のSAMの蓄積について、DKD-5D-H/pYSMH1の細胞を用いて検討した。

まず、種々の濃度のL-メチオニンを含有するSD最少培地でDKD-5D-H/YEp13あるいはDKD-5D-H/pYSMH1の細胞を振盪培養し、対数増殖期後期におけるSAMの蓄積量を分析した。培地に添加したL-メチオニンの濃度のSAMの蓄積量への影響をFig. 5.5に示す。コントロールであるDKD-5D-H/YEp13の細胞では、L-メチオニンの濃度を上げていくとSAMの蓄積量も上昇し、 2.0 mol/m^3 以上の濃度ではほぼ

一定の蓄積量(0.02kg/kg-dry cells)に到達した。一方、DKD-5D-H/pYSMH1の細胞でも、L-メチオニンの濃度を上げていくとSAMの蓄積量も上昇し、5.0mol/m³以上の濃度でコントロールの約8倍の蓄積量(0.16kg/kg-dry cells)に到達し、SAMの蓄積量はそれ以上増加しなかった。このことから、DKD-5D-H/pYSMH1の細胞はSAMの生産においてコントロール(DKD-5D-H/YEp13)よりも優れているが、L-メチオニン濃度を5.0mol/m³より高濃度にしても最大蓄積量(0.16 kg/kg-dry cells)を高められないことが明らかとなった。

そこで、L-メチオニンの濃度を5.0mol/m³に固定して、SAMの蓄積量に対するその他の添加物の影響についてさらに調べた。5.0mol/m³のL-メチオニンを含

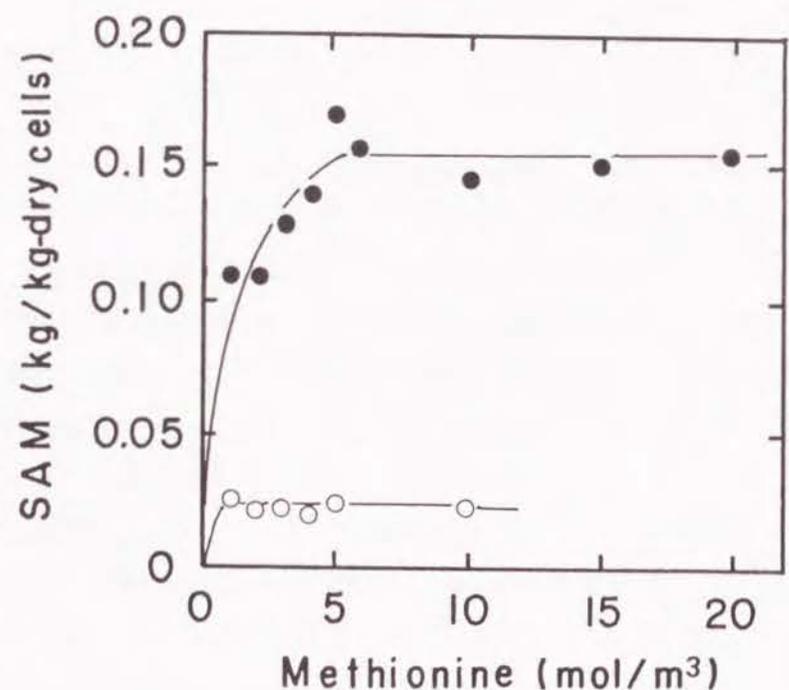


Fig. 5.5 Effect of L-methionine concentration on SAM accumulation. *S. cerevisiae* DKD-5D-H cells with YEp13 or pYSMH1 were grown in SD medium containing various concentrations of L-methionine. ○, DKD-5D-H/YEp13; ●, DKD-5D-H/pYSMH1.

有するSD最少培地を基本培地とし、これにリン酸塩、硫酸塩、アンモニウム塩などを添加した培地中でDKD-5D-H/pYSMH1の細胞を振盪培養し、対数増殖期後期でのSAMの蓄積量を調べた。その結果、硫酸塩ではあまり蓄積量が増加しなかったのに対し、リン酸塩とアンモニウム塩を添加した場合、蓄積量は増加した。そして、50mol/m³のリン酸カリウム緩衝液を含有する場合に、最も高いSAMの蓄積量(0.28kg/kg-dry cells)を得た。また、50mol/m³のリン酸カリウム緩衝液にさらにアンモニウム塩を添加した場合には、アンモニウム塩を含有しない場合とほぼ同じであり、相乗効果は見られなかった(データ図示せず)。

そこで、リン酸塩を含有した場合の菌体の増殖とSAMの蓄積の経時変化を、ジャーフェンターを用いて確認した。50mol/m³のリン酸カリウム緩衝液(pH 5.4)及び5.0mol/m³のL-メチオニンを含有するSD最少培地中、303.2KでDKD-5D-H/pYSMH1の細胞を好氣的に培養した。pHのコントロールには、pHコントロ

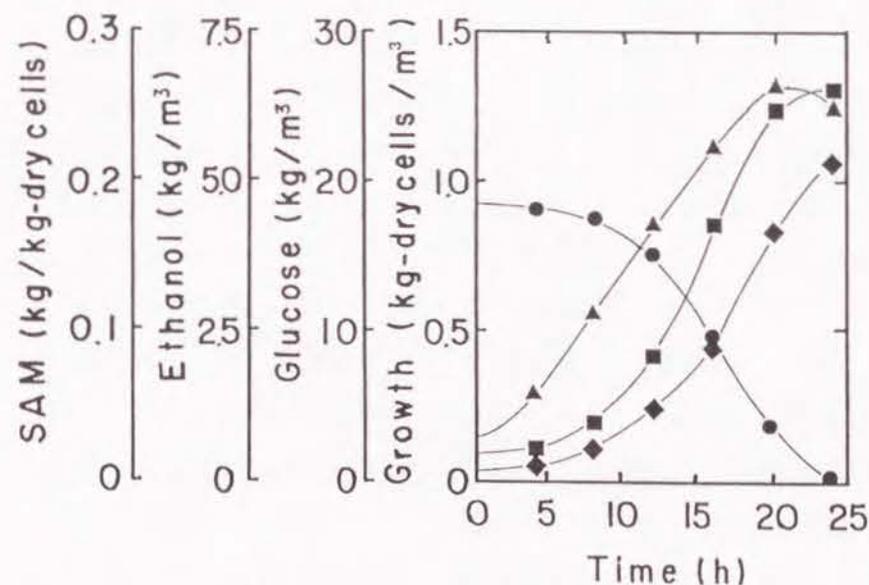


Fig. 5.6 Time course of SAM production by DKD-5D-H/pYSMH1 cells. Yeast cells of DKD-5D-H/pYSMH1 were cultured in a jar fermenter with 1.5x10⁻³ m³ SD minimal medium containing 5.0 mol/m³ L-methionine. ●, Glucose; ■, growth; ▲, SAM; ◆, ethanol

ーラーを用いて2.0%のアンモニア水を添加することにより行なった。結果をFig. 5.6に示す。この培地条件では、SAMの蓄積量は増殖とともに増加し、0.26kg/kg-dry cellsにまで到達した。その後、グルコースの消失により蓄積量は少し減少した。この最大蓄積量(0.26 kg/kg-dry cells)は、過去に報告されたSAMの最高の蓄積量(0.20kg/kg-dry cells)³⁸⁾よりもさらに高い値であった。

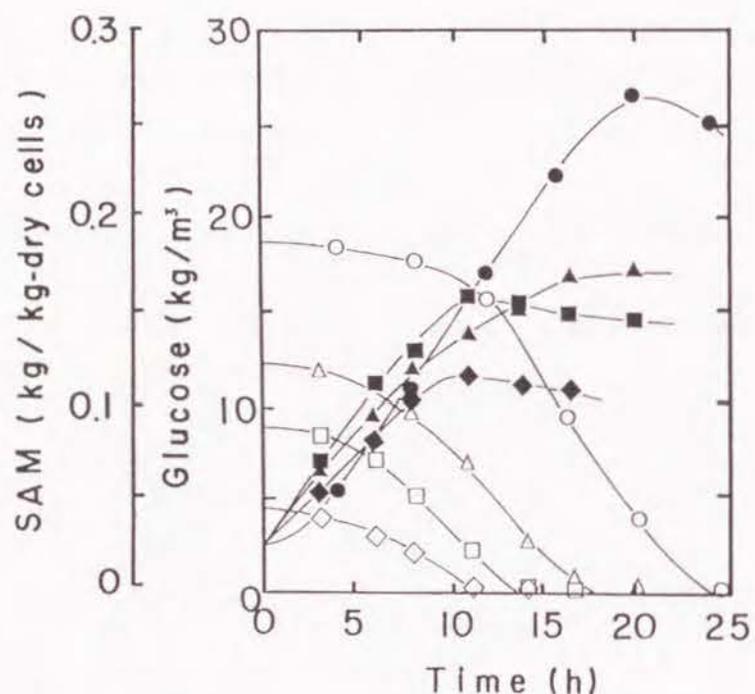


Fig. 5.7 Effect of glucose concentration on SAM production by DKD-5D-H/pYSMH1 cells.

Yeast cells of DKD-5D-H/pYSMH1 were grown on SD minimal medium containing 5.0 mol/m³ of L-methionine and at various concentrations of glucose. SAM contents were shown by closed keys (●, ▲, ■, ◆) in each case of glucose concentrations (○, 20kg/m³; △, 12kg/m³; □, 8.0kg/m³; ◇, 4.0kg/m³), respectively.

次に、グルコース濃度の菌体収率とSAMの蓄積速度への影響について、Fig. 5.6と同じ条件下で調べたのが、Fig. 5.7である。いずれのグルコース濃度の場合も、グルコースが存在する間はSAMの蓄積量は増加した。また、その蓄積量の増加速度はグルコース濃度に関係なく一定であった。一方、グルコース当たりの菌体収率(kg-dry cells/kg-glucose)は増加した。従って、SAMの蓄積速度を低下させることなくグルコース当たりの菌体収率(kg-dry cells/kg-glucose)を高めるためには、最少量ずつグルコースを添加しながら培養する半回分培養法が最適と考えられるが、この際のSAMの最大蓄積量への影響についてはさらに検討が必要である。

5.3.3 SAHの生産

SAHは、SAMからメチル基を取り除いた構造の物質(Fig. 5.2)であり、SAMの類似物質である。*Candida utilis*あるいは*S. cerevisiae*の細胞を、L-ホモシステインを培地に添加して培養した場合に菌体内にSAHが蓄積されることが知られている⁸⁰⁾。そして、このSAHもSAMと同様、液胞中にSAMの透過酵素により取込まれ蓄積される⁴⁴⁾。エチオニン耐性遺伝子が入った酵母はSAMの液胞への蓄積を高めることから、この細胞を利用すればSAHの蓄積量も高まる可能性がある。そこで、本研究では、L-ホモシステインのかわりに入手しやすいD,L-ホモシステインを使用し、SAHの生産について調べた。

DKD-5D-H/YEp13及びDKD-5D-H/pYSMH1の細胞をそれぞれ1.0mol/m³のD,L-ホモシステインを含有するSD最少培地で培養した後、その抽出液を高速液体クロマトグラフィーで分析した(Fig. 5.8)。DKD-5D-H/pYSMH1の細胞からの抽出物には、9.8分と14.0分の保持時間のところに2つのピーク(P1とP2)が見い出された(Fig. 5.8C)。これらの2つのピークは、コントロールであるDKD-5D-H/YEp13からの抽出物ではほとんど見出すことができなかった(Fig. 5.8B)。P1は、第2章で述べたようにSAMと同一の保持時間でありSAMと考えられる。一方、P2は、標準試薬のSAH(Fig. 5.8A)と保持時間が同一であり、SAHであると考えられる。さらに、第2章のFig. 2.5と同じ条件でペーパークロマトグラフィーを

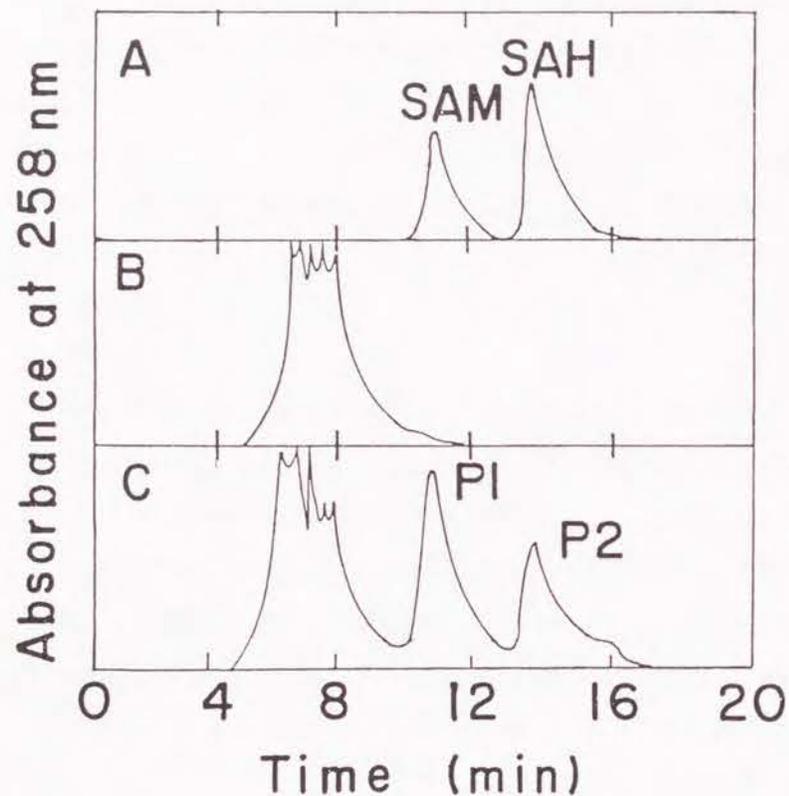


Fig. 5.8 HPLC chromatograms of cell extracts of DKD-5D-H/pYSMH1 and DKD-5D-H/YEp13 cells in the presence of D,L-homocysteine.

The cells of DKD-5D-H/YEp13 and DKD-5D-H/pYSMH1 were grown on SD minimal medium supplemented with 1.0 mol/m^3 of D,L-homocysteine. Cell extracts were analyzed for SAM and SAH on HPLC.

- (A) Authentic samples of SAM and SAH; (B) extract of DKD-5D-H/YEp13; (C) extract of DKD-5D-H/pYSMH1.

行なった結果、P2がSAHであることが確認された。このように、エチオニン耐性遺伝子を有する酵母DKD-5D-H/pYSMH1の細胞は、SAMだけでなくSAHの蓄積を高めることができた。

また、SAHの蓄積の経時変化を調べたのが、Table 5.1である。コントロールであるDKD-5D-H/YEp13の細胞は、 1.0 mol/m^3 のD,L-ホモシステインが培地中に存在しているにもかかわらず、SAHはほとんど蓄積されなかった。他方、DKD-5D-H/pYSMH1の細胞では、著量のSAHが蓄積された。このSAHの蓄積量は、増殖に伴って増加し、対数後期近くで最高値 (0.03 kg/m^3)に到達した。

Table 5.1 SAH productivity and growth of DKD-5D-H/pYSMH1 cells.

	Strain	Culture time (h)				
		15	22	27	33	45
Growth ^a	DKD-5D-H/YEp13	0.12	0.45	0.95	1.2	1.2
	DKD-5D-H/pYSMH1	0.12	0.35	0.90	1.0	1.0
SAH content ^b	DKD-5D-H/YEp13	ND ^c	ND	ND	ND	ND
	DKD-5D-H/pYSMH1	5.5	9.2	29	26	21

^a kg/m^3

^b $\times 10^{-3} \text{ kg/m}^3$

^c ND: not detected

The cells of DKD-5D-H/YEp13 and DKD-5D-H/pYSMH1 were grown on SD minimal medium supplemented with 1.0 mol/m^3 of D,L-homocysteine. SAH content in DKD-5D-H/YEp13 was too low to detect.

次にその他の添加物のSAHの蓄積への影響について調べた。種々の物質を添加したSD最少培地でDKD-5D-H/pYSMH1の細胞を培養した後、その対数増殖期後期の菌体内のSAH及びSAM含有量を比較した (Table. 5.2)。1.0mol/m³のD,L-ホモシステインを培地中に添加した場合、SAHは添加しない場合の13倍に増加したのに対し、SAMは約4倍であった。他方、1.0mol/m³のL-メチオニンを培地に添加した場合、SAHの増加量は2倍であり、SAMの増加量は約5倍に達した。ま

Table 5.2 Effects of various additives on SAH and SAM productions by DKD-5D-H/pYSMH1 cells.

Chemicals (1.0mol/m ³)	Content* of	
	SAH	SAM
None	2.0	20
D,L-Homocysteine	26	78
Adenosine	2.0	22
Adenosine + D,L-Homocysteine	10	30
L-Methionine	5.3	100
L-Methionine + D,L-Homocysteine	20	75
L-Cysteine	1.0	18
L-Homoserine	1.8	22
L-Homocysteinethiolactone	3.9	23

* x10⁻³ kg/kg-dry cells

The DKD-5D-H/pYSMH1 cells were grown on SD minimal medium containing various additives.

た、1.0mol/m³のアデノシン、L-システイン、L-ホモセリン、L-ホモシステインチオラクトンの添加は、SAH及びSAMの蓄積にほとんど影響を与えなかった。

5.4 考察

SAMの生産方法としては、微生物菌体からの抽出法⁷⁹⁾、有機合成法⁸¹⁾、酵素合成法⁸²⁾などが知られている。本研究では、乾燥菌体法と菌体からの抽出法についてSAMの生産を検討した。乾燥菌体法では、エチオニン耐性遺伝子を有する酵母を利用する利点はあまり存在しなかったが、菌体からの抽出法ではエチオニン耐性遺伝子を利用することにより、菌体内にSAMを高濃度に蓄積することが可能になった。そして、最終的にSAMの最大蓄積量(0.26kg/kg-dry cells)を得た。

一般に、有機合成法や酵素合成法では高い収率が得られないことから、菌体からの抽出法が有望と考えられている。実際、イタリアで既に工業生産に利用されているSAMの生産法も、菌体からの抽出法である。SAMは分解され易い物質であり、菌体外(培地中)に漏出したSAMは非酵素的に5'-メチルチオアデノシンなどに速やかに分解される。従って、この菌体抽出法では、SAMを可能な限り高濃度に菌体内に蓄積させることがSAMの生産には重要である。SAMを菌体内に蓄積させる方法として、L-メチオニンを含有する培地で培養することによりSAMを高濃度に蓄積できることが知られていた⁷⁸⁾。更に、塩崎ら⁸³⁾は、SAMの蓄積能力の高い微生物のスクリーニングを行ない、*Saccharomyces*属の酵母、特に、清酒酵母 *Saccharomyces sake*が非常に高濃度にSAMを蓄積できることを見出した。本研究で得られた最大蓄積量は、塩崎らの清酒酵母での蓄積量よりもさらに高い値であることから、本研究で使用した菌株(DKD-5D-H/pYSMH1)を使用し、菌体からの抽出法によりSAMを生産することにより、さらに安価なSAMの生産が可能になると考えられる。

また、DKD-5D-H/pYSMH1の細胞をD,L-ホモシステインを含有する培地で培養

することにより、SAHを蓄積できた。このSAHの蓄積では、D,L-ホモシステインを添加した場合にSAHとSAMの蓄積が高まったのに対し、L-メチオニンを添加した場合には、SAMの蓄積は高まったが、SAHの蓄積はあまり高まらなかった。このことから、SAHの合成はSAMの蓄積が必要であり、SAMからSAHへのメチル基転移反応には、ホモシステインがメチル基の授与体として利用されている可能性が高い。即ち、①菌体内に取り込まれたホモシステインがメチル化されてメチオニンが合成され、更に、SAMに変換される、②SAMとホモシステインから、SAM:ホモシステインメチルトランスフェラーゼによりSAHとメチオニンが合成される、③SAHはSAM同様にエチオニン耐性遺伝子の働きにより液胞に蓄積される、という3段階 (Fig. 5.1)からなると思われる。尚、この際に①、②の反応ではD-ホモシステインから、S-アデノシ-D-ホモシステインが一部合成されると考えられ⁸³⁾、得られたSAHには一部D体が含まれる可能性がある。

SAHの生産法として、L-ホモシステインを含有する培地で酵母*S. cerevisiae*を培養する方法⁸⁰⁾や、SAHデヒドロゲナーゼによるアデノシンとL-ホモシステインからの酵素的合成法⁸⁴⁾などが知られている。本研究では、前者のD,L-ホモシステインを含有する培地で培養した場合のSAHの蓄積について検討し、最大蓄積量を0.03kg/kg-dry cellsにまでにすることができた。それゆえ、DKD-5D-H/pYSMH1の細胞を利用することにより、菌体抽出法によるSAHの生産も期待できる。また、遺伝子組換えした酵母によるSAM及びSAHの生産の報告は、本研究が初めてである。

5.4 結言

D,L-エチオニンに耐性を示す遺伝子を有するプラスミドpYSMH1を酵母*S. cerevisiae*に形質転換した細胞を用いて、SAM及びSAHの生産について検討した。乾燥菌体法によるSAMの生産では、SAMの生産速度はコントロールに対して少し高いだけであった。一方、L-メチオニンを培地に添加してSAMを菌体内に蓄積させる方法では、50mol/m³のリン酸カリウムを含有した場合に、0.26kg/kg-dry cellsという過去最高の高い蓄積量を得た。さらに、L-メチオニンのかわりにD,L-ホモシステインを用いた場合、DKD-5D-H/pYSMH1の細胞は、コントロールに対してはるかに高い濃度 (0.03kg/kg-dry cells)までSAHを蓄積することができ、SAHの生産の可能性も示唆された。

第 6 章

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

6.1 緒言

分子遺伝学の発展により、異種あるいは酵母自身の遺伝子を酵母に導入し、有用な物質やタンパク質を大量生産することが可能になってきている。しかしながら、これら有用物質を生産する工業的プロセスの確立には、遺伝子組換え酵母といえども安価な一般的培地で高い増殖速度を持つ倍数体酵母を宿主とし、その宿主内で高コピー、且つ、安定に保持される工業化用ベクタープラスミドの開発が必要不可欠である。このような、目的からゲンタマイシン類似の抗生物質であるG418をマーカーとし、それに耐性を示す遺伝子¹⁾³⁾を有するベクタープラスミド(例えばYRpG1⁴⁾⁵⁾)が現在頻繁に利用されているが、この種のベクタープラスミドはそのコピー数と倍数体酵母宿主内での安定性において必ずしも十分ではなく、酵母の生産プロセスにおける生産性の制御の面で大きな障害となっている。従って、発酵工業、化学工業の分野において、より優れた工業化用ベクタープラスミドの開発が現在の重要な課題となっている。

第1部においては、メチオニンのアナログであるエチオニンに耐性を示し、且つ、S-アデノシルメチオニン(SAM)の合成蓄積を促進する酵母の遺伝子をクローニングした。そして、この遺伝子の特性を利用すれば、SAMを生産できることについて前章で述べた。しかしながら、SAMの工業的な生産を考えた場合、プラスミドpYSMH1は、YEpl3をベクターとするために安定性に問題があり、工業的にこのままではSAMの生産に利用できない。そこで、本章では野性酵母用

のマーカ-を有し、且つ、安定性の高いベクタープラスミドを作製した。このプラスミドは発現と安定性が高いだけでなく、実用酵母中에서도発現した。このようなベクタープラスミドの開発は、SAMの工業的な生産を可能にすると考えられる。また、将来的には、組換え酵母で置換されるであろう様々な発酵プロセスの制御と最適化に重要な手段を提供するだけでなく、清酒酵母、パン酵母、ビール酵母など実用的倍数体酵母の分子レベルでの育種に適用できると考えられる。

6.2 実験方法

6.2.1 菌株と培地

大腸菌の宿主として *Escherichia coli* DH1 (F^- *gyrA96 recA1 endA1 thi1 hdsR17 sup44* λ^-) を使用した。また、酵母の宿主として、 *Saccharomyces cerevisiae* IF02044、IF02376、IF01953、IF00849、及び大阪大学の大嶋教授より分譲して頂いた *S. cerevisiae* DKD-5D-H (a *leu2-1 leu2-112 trp1 his3*) を使用した。大腸菌の培養には、LB培地 (1% バクトペプトン、0.5% イーストイストラクト、0.5% 塩化ナトリウム、0.1% グルコース、pH7.2) を、酵母の培養には、YPD培地 (2% グルコース、2% バクトペプトン、1% イーストイストラクト) およびSD最少培地 (2% グルコース、0.67% イーストイストラクト W/O アミノ酸、pH 5.0 (0.02kg/m³ になるように L-トリプトファンと L-ヒスチジンを添加)) を使用した。

6.2.2 エチオニン耐性実験

D,L-エチオニンを含有しない $5 \times 10^{-6} \text{m}^3$ のSD最少培地で振とう培養した酵母を、 $5.0 \times 10^{-5} \text{m}^3$ の種々の濃度のD,L-エチオニンを含有するSD最少培地 ($5.0 \times 10^{-4} \text{m}^3$ の坂口フラスコ、シリコン栓) に植菌し、303.2Kで振盪培養した。 $2.0 \times 10^{-6} \text{m}^3$ の培養液を経時的にサンプリングし、分光光度計 (日立U-1100型) を用いて610

nmの濁度を測定することにより菌体濃度を算出した。

6.2.3 プラスミドの作製方法

プラスミドとして、YEp13、YRpG1⁸⁵⁾、及びpJDB207⁵⁸⁾、pJDB219⁸⁶⁾ を使用した。プラスミドは、適当な制限酵素で切断した後、アルカリフォスファターゼにより脱リン酸化処理⁸²⁾、ライゲーションキット (宝酒造株) により、挿入すべきDNA断片と連結した。大腸菌および酵母への形質転換は、塩化カルシウム法⁸³⁾ と酢酸リチウム法⁸⁴⁾ をそれぞれ用いた。

6.2.4 プラスミドの安定性

プラスミドの安定性は、Futcher⁸⁷⁾ らの方法に基づいて調べた。即ち、L-ロイシン (YRpG1の場合はL-トリプトファン) を含有しない $1.0 \times 10^{-6} \text{m}^3$ のSD最少培地で対数増殖後期まで培養した酵母細胞を、L-ロイシン、L-トリプトファン及びL-ヒスチジンを含有する $2.5 \times 10^{-5} \text{m}^3$ のSD最少培地 ($3.0 \times 10^{-4} \text{m}^3$ の三角フラスコ、シリコン栓) に $1.0 \times 10^{-4} \text{kg/m}^3$ になるように植菌した。これを対数増殖期後期近くまで振とう培養し、この増殖した菌体を新たなL-ロイシン、L-トリプトファン及びL-ヒスチジンを含有する $2.5 \times 10^{-5} \text{m}^3$ のSD最少培地に $1.0 \times 10^{-4} \text{kg/m}^3$ になるように植菌して振とう培養した。そして、この植えつぐ操作を7-10日繰り返した。一方、増殖した菌体は、1プレート当たり約100個になるようにYPD培地の寒天プレートに塗布し、2日間放置した。その後、96個のコロニーについてレプリカ法によりロイシン (YRpG1の場合はL-トリプトファン) 要求性の有無を調べた。培養は、いずれも303.2Kで行なった。世代数は濁度より菌体濃度を算出して計算した。

6.2.5 菌体内のS-アデノシルメチオニンの測定

$5.0 \times 10^{-6} \text{m}^3$ のSD最少培地で培養した酵母を、 5.0mol/m^3 のL-メチオニンを含有するSD最少培地 $5.0 \times 10^{-5} \text{m}^3$ に $1.0 \times 10^{-2} \text{kg/m}^3$ になるように植菌し、303.2Kで24時間振とう培養した。この培養液より菌体を集めた後、実験方法2.2.4に示

した方法に従ってSAMを抽出し分析した。蓄積量は、乾燥菌体グラム当たりのグラム数 (kg/kg-dry cells) として表示した。

6.2.6 実用酵母中でのプラスミドの発現と確認

プラスミドpER9を形質転換した実用酵母株は、一度SD最少培地の寒天プレートに塗布し、1日間303.2Kで増殖させた後、菌を集菌して0.85%の食塩水で適当な菌体濃度に希釈し、D,L-エチオニンを含むSD最少培地の寒天プレートに塗布した。また、プラスミドの確認は以下の方法で行なった。1.0x10⁻⁵m³のYPD培地で定常期まで振盪培養したプラスミドの入った酵母を集菌し、滅菌水で一回洗浄した後、Cryer⁸¹⁾らの方法に従ってプラスミドを抽出精製した。このプラスミドを、大腸菌DH1に形質転換し、アンピシリン耐性のコロニーを選別した。この菌体よりプラスミドをKado⁸⁸⁾らのラビッド法で抽出し、0.8%アガロースゲル電気泳動により確認した。

6.3 結果および考察

6.3.1 エチオニン耐性遺伝子のマーカーとしての機能

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

プラスミドpYSMH1は、エチオニン耐性遺伝子を含む染色体DNAのSau3AI断片をプラスミドYEp13のBamHI部位に挿入したプラスミドである (Fig. 6.1)。このpYSMH1を有する酵母DKD-5D-H株 (DKD-5D-H/pYSMH1) およびコントロールと

してYEp13を有する酵母 (DKD-5D-H/YEp13) を0.3mol/m³の濃度のD,L-エチオニンを含むSD最少培地に植菌し、振盪培養した時の経時変化をFig. 6.2に示す。G418耐性では、植菌後約5時間後から増殖阻害が起こり、このことが、形質転換体の選別を不明瞭にしていた⁸⁵⁾。しかし、エチオニンではこのような時間遅れは認められなかった。また、増殖は定常期近くまではほぼ一定の比増殖速度で増加し (Fig. 6.2)、重金属耐性の場合など多くの場合に見られ⁸⁹⁾、選別を不明瞭にする要因である増殖に伴う比増殖速度の増加も見られなかった。さらに、DKD-5D-H/pYSMH1の比増殖速度は、0.3mol/m³のD,L-エチオニンを含む場合、コントロールに比べ約8倍大きかった。以上のことから、エチオニン

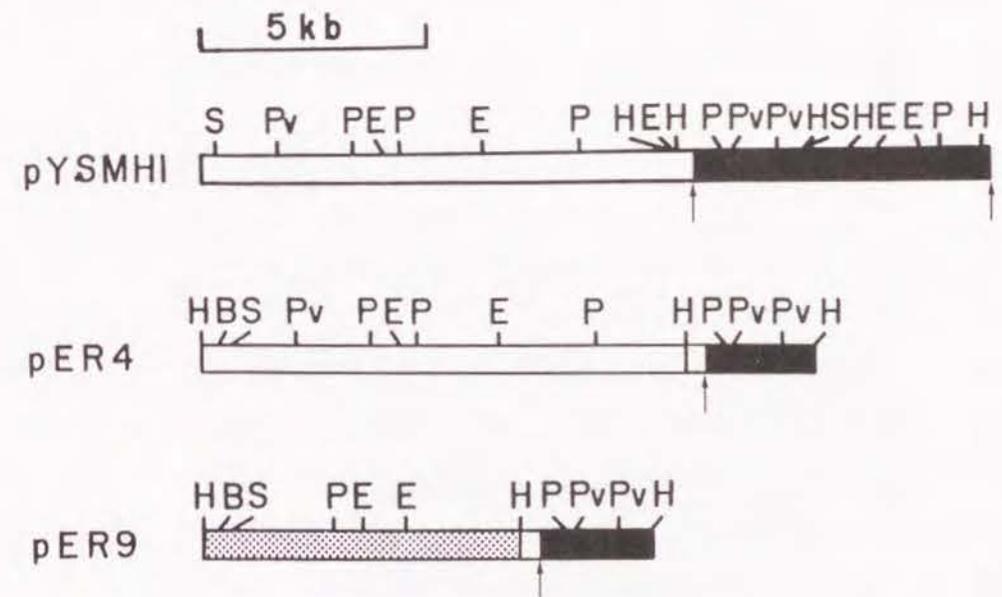


Fig.6.1 Restriction maps of plasmids pYSMH1, pER4 and pER9.

Restriction enzymes used are: B, BamHI; E, EcoRI; H, HinIII; P, PstI
Pv, PvuII; S, SalI; ↑, BamHI/Sau3AI.

□, YEp13 fragment; ■, Chromosomal DNA fragment; ▨, pJDB207 fragment.

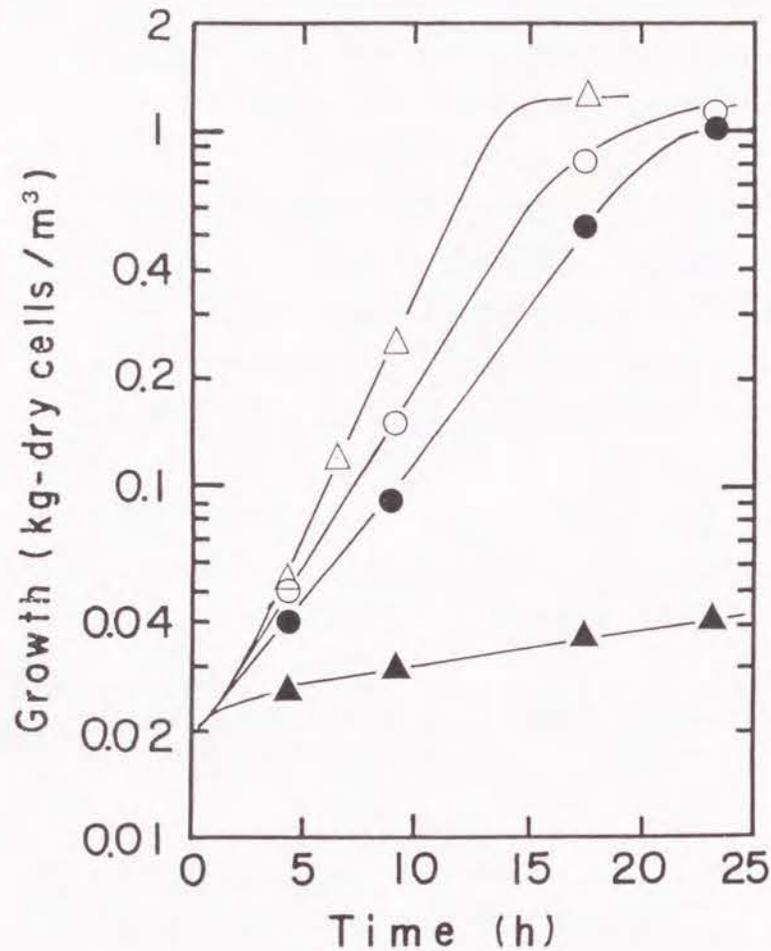


Fig. 6.2 Effects of D,L-ethionine on growth rate.

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

▲, △, DKD-5D-H/YEp13; ●, ○, DKD-5D-H/pYSMH1

耐性遺伝子が、マーカーとして優れた特性を有しており、これをマーカーとして利用すれば形質転換体を確実に選別できると考えられる。

そこで、 10^7 個及び 10^9 個のDKD-5D-H株の細胞懸濁液に約50個になるようにDKD-5D-H/pYSMH1の細胞を加え、 0.3 mol/m^3 のD,L-エチオニンとL-ロイシンを含むSD最少培地の寒天プレートにそれぞれ塗布し、 303.2 K で4日間放置した結果、約50個のコロニーが出現した。それぞれのプレート上の25個のコロニーについて栄養要求性を調べたところ、すべてがL-トリプトファンとL-ヒスチジン要求性でありL-ロイシンに要求性が無く、DKD-5D-H/pYSMH1と同じ要求性であった。即ち、形質転換体を100%選別できた。

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

6.3.2 プラスミドpYSMH1の改良

形質転換体を選別するためのマーカーとして、エチオニン耐性遺伝子を利用できることがわかった。しかしながら、プラスミドpYSMH1は、ベクタープラスミドとして使用するには17.2キロベース (kb) と長すぎる上に、適当なクロニング部位が存在しない (Fig. 6.1)。さらに、プラスミドの安定性も十分とはいえない。そこで、pYSMH1の改良を行なった。

まず、エチオニン耐性遺伝子のサブクロニングを行なった。既に第3章で述べたように、プラスミドpYSMH1を制限酵素HindIIIで分解し、それぞれの分解物をプラスミドYEp13のHindIII部位に挿入した。これらを酵母DKD-5D-H株に形質転換しエチオニン耐性を調べたところ、3kbのHindIIIのDNA断片を有するプラスミドpER4 (Fig. 6.1) が、エチオニンに耐性を示した。即ち、6.5kbの断片を3.0kbにまで縮少できた。

次に、プラスミドの安定性を高めるためにより安定なベクターへの繋ぎ換えをおこなった。高コピー数を有することが知られている²⁶⁾4種類のプラスミドYRpG1、YEp13、pJDB207、pJDB219を有するDKD-5D-Hの細胞を選択圧を加えない培地中で培養し、宿主DKD-5D-H株からのプラスミドの脱落した細胞の割合 (Plasmid⁻ cell) と世代数の関係を調べた (Fig. 6.3)。YRp系のベクターであるYRpG1は、非常に不安定でプラスミドの脱落が著しく、5世代で99%がプラス

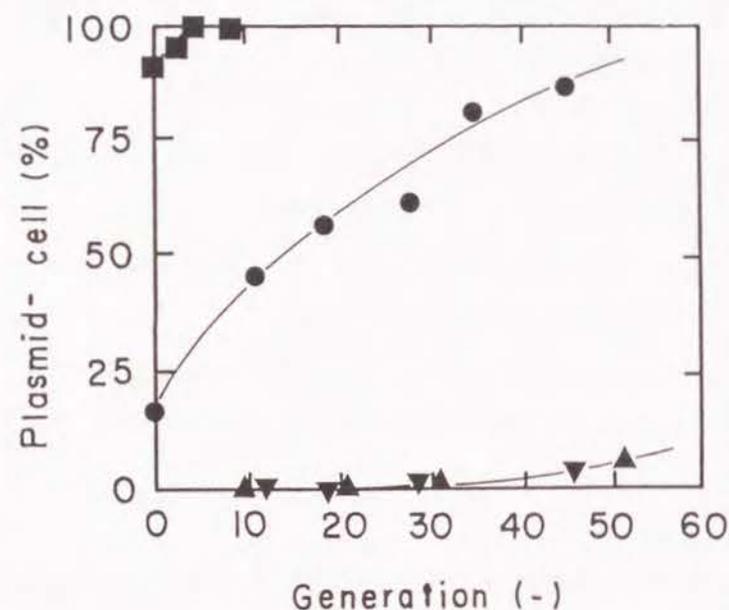


Fig. 6.3 Stability of various vector plasmids in *S. cerevisiae* DKD-5D-H cells.

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

ミドの脱落細胞であった。YEp系のベクターであるYEp13はYRpG1に比べ安定であったが、40世代で80%脱落した。一方、Beggsの作製した2 μ mのプラスミド全体を含有するプラスミドであるpJDB219及びそれをサブクローニングしたものであるpJDB207は、40世代でも脱落率は5-7%程度で、非常に安定であった。そこで、pER4の3kbのHindIII断片を切り出し、高い安定性のプラスミドpJDB207のHindIII部位に挿入した。得られたプラスミドpER9をFig. 6.1に示した。プラスミドpER9は、6.8kbのpJDB207と3.0kbの染色体DNAを含む断片からなり、全体として9.8kbである。従って、結果的にはプラスミドpYSMH1の17.2kbに比べ、7.4kbも縮少できたことになる。また、pYSMH1をBamHIで、pER9をBamHI及びSalIでそれぞれ切断した。その結果、pYSMH1のBamHI/Sau3AI部位 (Fig. 6.1の↑) は、両方ともBamHIで切断されなかった。一方、pER9はBamHI及びSalIの

切断点をそれぞれ1箇所所有していた。即ち、pER9はクローニング部位としてBamHI及びSalI部位を利用できる。

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

6.3.3 プラスミドpER9の発現と安定性

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

Table 6.1 Ethionine resistance and growth of DKD-5D-H cells carrying various plasmids.

Plasmid	Specific growth rate (1/h)			Growth after 24h ^b	SAM in Cells ^c
	ethionine added to SD ^a				
	0	0.3	2.0		
YEp13	0.32	0.02	0.01	1.28	0.013
pYSMH1	0.25	0.16	0.11	0.60	0.16
pER4	0.26	0.15	0.11	0.14	0.14
pJDB207	0.30	0.02	0.01	0.74	0.015
pER9	0.26	0.13	0.08	0.13	0.28

^a, mol/m³; ^b, kg/m³; ^c, kg/kg-dry cells.

合のD,L-エチオニンに対する耐性の強さ、および5.0mol/m³の濃度のL-メチオニンを含有するSD最少培地で24時間培養した時のSAMの蓄積について調べた。結果をTable 6.1に示す。pER4のエチオニン耐性の強さに対応する比増殖速度及びSAMの蓄積量は、pYSMH1のそれとほぼ一致した。一方、pER9では、pYSMH1に比べ比増殖速度がエチオニンを含有する場合も含有しない場合もやや低下した。しかし、SAMの蓄積量は、pYSMH1に比べ約2倍になっていた。この蓄積量が高い理由は、pJDB207のほうがYEpl3よりも高コピー数を有する²⁶⁾ためと考えられる。しかし、SAMの生産性については速度論的な検討がさらに必要である。

一方、pER4及びpER9のプラスミドの安定性を調べたのが、Fig. 6.4である。pER9はpER4に比べ、プラスミドの脱落率は遙かに少なく安定であった。しかし、

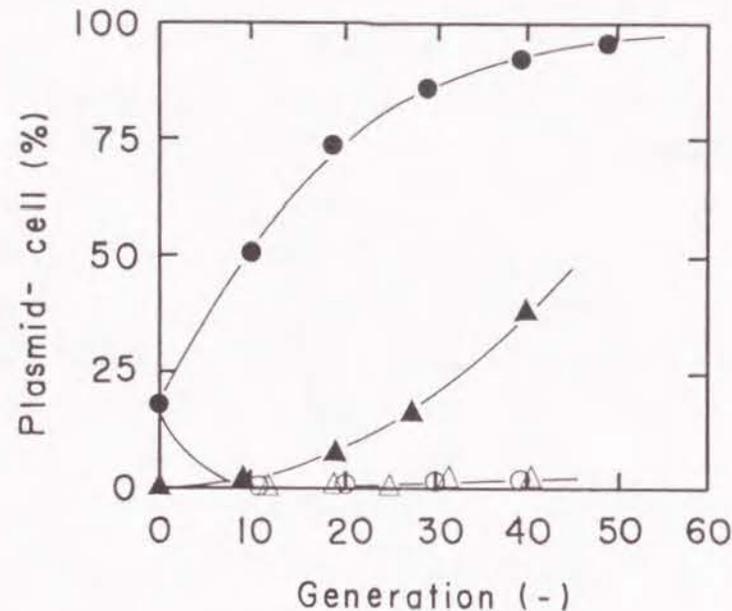


Fig. 6.4 Stability of plasmids pER4 and pER9 in *S. cerevisiae* DKD-5D-H cells.

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

●, ○, pER4; ▲, △, pER9.

pJDB207、YEpl3 (Fig. 6.3) と比較すれば、pER9、pER4の方が、それぞれ安定性が低下していた。これは、エチオニン耐性遺伝子を有するプラスミドの比増殖速度の方が有しないプラスミドのそれよりも低いことに原因があると考えられる。

6.3.4 エチオニンを選択圧としたプラスミドの安定化

プラスミドpER9は、安定性が非常に高くなっているが、それでも徐々にプラスミドが脱落していく。pER9の脱落率を更に減少させるためには、エチオニンにより選択圧を加えることが必要である。そこで0.3mol/m³のD,L-エチオニンを添加した場合のプラスミドの安定性を調べた。結果をFig. 6.4に示す。プラスミドpER4とpER9の比増殖速度は、それぞれ約0.15、0.13 (1/h)でほぼ一定であり、エチオニン耐性の低下は見られなかった。また、pER4、pER9のプラスミドの脱落率は40世代後でもそれぞれ3%、2%であり非常に安定であった。このことから、エチオニンを選択圧として培地に添加すれば、エチオニン耐性遺伝子を有するプラスミドの脱落する割合を低下できることが明らかとなった。

6.3.5 実用酵母でのエチオニン耐性遺伝子の発現

エチオニン耐性が、高次倍数体の実用酵母中でも発現すれば実用酵母の育種に利用できる。そこで、*S. cerevisiae*に属する野性型の酵母4種、IF02044 (パン酵母)、IF02376 (清酒酵母協会8号)、IF01953 (ビール下面酵母)、及びIF00849 (その他の酵母) についてエチオニン耐性遺伝子の発現を調べた。

まず、それぞれの酵母自身が有するエチオニンに対する耐性の強さを調べるために、種々の濃度 (0.5、1.0、1.5、2.0、5.0mol/m³) のD,L-エチオニンを含有するSD最少培地の寒天プレートに菌体を1プレート当たり200個になるように塗布し、303.2Kで3日間放置した。その結果、IF02044は5.0mol/m³のD,L-エチオニン濃度でもコロニーが出てきたが、IF02376とIF00849は1.5mol/m³以上の濃度で、IF01953は5.0mol/m³以上の濃度のD,L-エチオニンを含有した場合にコロニーは見られなかった。そこで、IF02376、IF01953、IF00849にプラスミ

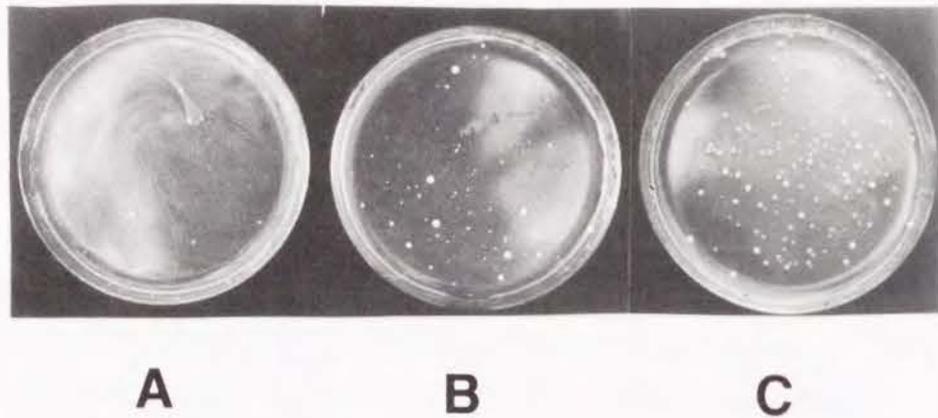


Fig. 6.5 Photographs of colonies of wild-type yeast strains transformed with pER9.

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

(B) Colonies of *S. cerevisiae* IF01953 transformed with pER9 on SD plate with 5.0 mol/m³ D,L-ethionine.

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

ドpER9を形質転換し、それぞれの酵母の生育を完全に抑える濃度のD,L-エチオニンを含むSD培地のプレートに10⁸個ずつ塗布し、303.2Kで3日間放置した。その結果、Fig. 6.5に示すように、エチオニン耐性を示すコロニーが10-100個得られた。

これらのコロニーが、プラスミドpER9のエチオニン耐性遺伝子の発現によりエチオニン耐性を獲得した形質転換体であることを確かめるために、各プレートの1個のコロニーを培養した後、実験方法6.2.6に示した方法に従ってプラス

ミドを確認をした (Fig. 6.6)。それぞれのコロニーより取り出したプラスミドは、pER9と一致した。このことから、エチオニン耐性遺伝子は、実用酵母中でもエチオン耐性マーカーとして形質転換体を選別できることがわかった。



Fig 6.6 Agarose gel electrophoresis of DNAs extracted from wild-type yeast strains carrying pER9.

Lane 1: DNAs extracted from *E. coli* DH1 carrying pER9 (control);

Lanes 2, 3 and 4: DNAs obtained from the transformants of wild-type yeasts; IF02376 (lane 2), IF01953 (lane 3) and IF00849 (lane 4).

Chr, Chromosomal DNA.

6.4 結言

エチオニンに耐性を示す酵母の遺伝子が増殖速度に及ぼす影響について検討し、この遺伝子の表現型が形質転換体を選別するマーカーとして利用できることを確認した。さらに、エチオニン耐性遺伝子を含むDNA断片をサブクローニングしたものをプラスミドpJDB207に連結することによりプラスミドpER9を作製した。このpER9は、9.8kbと短く、BamHI、SalIIなどの適当なクローニング部位を有しており、且つ、プラスミドの安定性も高いことから、SAMの工業的な生産に利用できると思われる。また、pER9は実用酵母中でも発現することが確認され、実用酵母の分子育種への応用も期待される。

第7章

トランスポゾンによるエチオニン耐性遺伝子の酵母染色体への挿入とその発現及び安定性

7.1 緒言

遺伝子組換え菌を利用して有用物質を生産する場合、形質転換した遺伝子を十分に発現させ、且つ、宿主細胞中で安定に維持することが極めて重要である。一般的には、目的の遺伝子をベクタープラスミドに連結して、プラスミドの状態に宿主細胞内に存在せしめる方法が用いられるが、これ以外にも染色体内に多コピー挿入する方法がある。染色体内に挿入する方法の利点として、1) プラスミドの場合よりも発現を高めることができる、2) 宿主細胞からの目的遺伝子の脱落を防ぐことができるなどが考えられる。特に、適当なプラスミドを有していない菌株を宿主とする場合には、染色体に挿入する方法が有用となる。

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* には、染色体上を移動するTy因子と呼ばれるトランスポゾンが存在する。Ty因子の長さは、5.9キロベース (kb) であり、両末端にはデルタ (δ) 配列と呼ばれる340ベースペア (bp) の同方向の反復配列を有している⁶²⁾。そして、Ty因子は、染色体上に約30コピー存在し、その転写に関してはTy因子のRNAが逆転写酵素によりDNAに逆転写され、それが酵母染色体に組込まれる⁹⁰⁾ ことから、Ty因子の転写機能を利用して、目的遺伝子の染色体への挿入が試みられている。

本章では、S-アデノシルメチオニン (SAM) の生産法の染色体工学的アプローチとして、Ty因子を利用したエチオニン耐性遺伝子の染色体内への挿入について検討した。

7.2 実験方法

7.2.1 菌株と培地

Saccharomyces cerevisiae DKD-5D-H株 (a *leu2-3 leu2-112 trp1 his3*)及び、*Escherichia coli* DH1(F⁻ *gyrA96 recA1 relA1 thi1 hsdR17 supE44* λ⁻)とJM109 (*recA1* △(*lac-proAB*) *endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 relA1 supE44*, /F'*traD36 proAB⁺ lacI^oZΔM15*)を宿主として使用した。酵母は303.2Kで好氣的に培養した。培地としてYPD培地(2% グルコース、2% バクトペプトン、1% イーストイクストラクト)及びSD最少培地(2.0% グルコース、0.67% イーストニトロゲンベースW/Oアミノ酸、pH5.0 (0.02kg/m³のL-トリプトファン、L-ヒスチジン、及び0.05kg/m³のL-ロイシンを適宜添加))を使用した。また、*E. coli*はLB培地(1% ポリペプトン、0.5% イーストイクストラクト、0.5% 塩化ナトリウム、0.1% グルコース)中で310.2Kで好氣的に培養した。

7.2.2 プラスミドと遺伝子操作

プラスミドpYCY-T1とpJDB207は、H. Iida博士⁹¹⁾とJ.D. Beggs博士⁵⁶⁾より分譲して頂いた。プラスミドpER4とpER9は第6章で述べたものを使用した。ベクタープラスミド(pUC19とpJDB207)は、制限酵素により切断後脱リン酸化処理を行ない³²⁾、目的のDNA断片とライゲーションキットによりライゲーションを行なった。大腸菌及び酵母への形質転換は、塩化カルシウム法³⁾及び酢酸リチウム法³³⁾を用いて行なった。

7.2.3 プラスミドの作製

pYCY-T1⁹¹⁾は、Ty因子(Ty-C1)を有する染色体DNA断片をYCp50のBamHI部位に挿入したプラスミドである。プラスミドpYCY-T1をBglIII及びHindIIIの2種類の制限酵素で切断し、2%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、 δ -配列を含有するBglIII/HindIII断片(2.4kb)を切り出し精製した。プラスミドpNS1、

pNS2、pNS3及びpNS4は、以下の手順により作製した(Fig. 7.1)。ベクタープラスミドpJDB207をBamHIとHindIIIの2種類の酵素で切断した後、pYCY-T1から切り出した2.4kbの断片を挿入することにより、プラスミドpNS3を得た。また、プラスミドpNS3をPvuII及びHindIIIの2種類の制限酵素で切断した後、 δ -配列を含有するPvuII/HindIII断片をベクタープラスミドpUC19のSmaIとHindIIIの部位に挿入することにより、プラスミドpNS1を得た。さらに、pER4をHindIIIで切断した後、エチオニン耐性遺伝子を有する3.0kbのHindIII断片をpNS1及びpNS3のHindIII部位にそれぞれ挿入することにより、プラスミドpNS2及びpER4を得た。プラスミドの染色体への挿入には、 δ -配列内に存在するXhoI部位でプラスミドを完全分解して線上のプラスミドにした後、酢酸リチウム法³³⁾により酵母に形質転換した。

7.2.4 染色体の分離

培養した酵母細胞を、50mol/m³のEDTA溶液(pH 8.0)に懸濁した。この細胞懸濁液(O.D.=700)にザイモリアーゼ(2kg/m³)溶液を添加し、310.2Kで1時間放置した。さらに、この溶液に3倍量の1% アガロース溶液(125mol/m³ EDTA (pH 7.5))を添加して混合した後、ゲル型に注ぎ固化することによりゲルブロックを得た。このゲルブロックをLET緩衝液(500mol/m³ EDTA (pH8.0)、10mol/m³ Tris-HCl(pH 7.5)、7.5% 2-メルカプトエタノール)中で310.2Kで24時間、NBS緩衝液(500mol/m³ EDTA (pH8.0)、10mol/m³ Tris-HCl(pH 7.5)、1% N-ラウロイルサルコシナトリウム塩、1kg/m³ プロテイナーゼK)中323.2Kで24時間、50mol/m³のEDTA溶液(pH 8.0)中303.2Kで、24時間づつ2回放置した。その後、277.2Kで保存した。ゲルブロック用のアガロースとしてInCert™を使用した。

染色体の分離にはPULSE WAVE™760及びMODEL 200/2.0 POWER SUPPLY (BRL社)を用いてFIGE (Field Inversion Gel Electrophoresis)法により行なった。泳動用緩衝液として、500mol/m³のL-グリシンを含有する0.25xTBE緩衝液(25 mol/m³ Tris、25mol/m³ ほう酸、0.5mol/m³ EDTA)を、ゲルとして1%のアガロースゲル(FastLane™)を使用した。泳動条件は、0.7時間、150mVで泳動

した後、Initial time 0.3秒、Final time 66秒、Ratio 3.0秒、Volt 150mVに再設定し、さらに16時間泳動を行なった。その後、このゲルをサザンブロッティングに使用した。分子サイズ及びDNA量のマーカーとして、Yeast DNA PFGE マーカーを使用し、染色体番号は、Calre⁶¹⁾らの分離パターンを参考にして決定した。

7.2.5 サザンブロッティング

サザンブロッティングには、PhotoGeneTM核酸検出システムを使用し、BRL社のマニュアルに従って行なった。ビオチン化されたラベルは、Fuji X Rayフィルムを用いて室温中で約10-30分間感光することにより検出した。 δ 配列及びエチオニン耐性遺伝子の検出のために、プラスミドpNS1の0.8KbのEcoRI断片及びプラスミドpER4中の0.9kbのPvuII断片をプローブとしてそれぞれ使用した。プローブのラベル化にはBioNickTMラベリングシステムを使用し、Nick Translation法によりビオチン化を行なった。

7.2.6 SAMの蓄積実験

前培養した酵母(15mg)を、5.0mol/m³のL-メチオニンを含む、あるいは、含有しない1.0x10⁻³m³(2.0x10⁻³m³の坂口フラスコ)の最少培地中、303.2Kで振盪培養した。菌体濃度は、610nmの濁度より乾燥菌体濃度を算出した。また、グルコース濃度は、グルコースアナライザー(Glucose Analyzer II、ベックマンジャパン社)により測定した。また、菌体内のSAMの蓄積量は、実験方法2.2.4で述べた方法により分析した。

7.2.7 試薬

制限酵素、ライゲーションキット、アガロース(InCertTM、FastLaneTM)は宝酒造(株)のものを、PhotoGeneTM核酸検出システム及びBioNickTMラベリングシステムは、BRL社のものを使用した。また、Yeast DNA-PFGE マーカーは、Pharmacia社のものを使用した。

7.3 結果

7.3.1 エチオニン耐性遺伝子の染色体内への挿入

δ 配列はTy因子の両末端に存在する同方向の反復配列であり、染色体上に多数存在する。 δ 配列を利用することにより、エチオニン耐性遺伝子を多数挿入するため、 δ 配列を含有する染色体DNA断片とエチオニン耐性遺伝子とを有する新規なプラスミドpNS2とpNS4を作製した。pNS2は、3.0kbのエチオニン耐性遺伝子と1.2kbの δ 配列を有するDNA断片とを、YIp系のベクタープラスミドpUC19のSmaI/HindIII部位に挿入したプラスミドであり、全体として、6.9kbである。他方、pNS4は、3.0kbのエチオニン耐性遺伝子と2.42kbの δ 配列を有するDNA断片とを、YEp系のベクタープラスミドpJDB207のBamHI/HindIII部位に挿入したプラスミドであり、全体として12.2kbである。

δ 配列を利用してエチオニン耐性遺伝子を染色体内に挿入する前に、この δ 配列を有する断片と相同的な配列が、酵母*S. cerevisiae* DKD-5D-H株の染色体上に多数存在するか否か検討した。即ち、酵母DKD-5D-H株の細胞の染色体をFIGE法により分離した後、pNS1の0.8kbのEcoRI断片をプローブとしてサザンブロッティングを行なった。結果を、Fig. 7.2Bに示す。プローブが、ほとんどすべての染色体とハイブリダイズしたことから、Ty-C1の δ 配列と相同的な配列が、酵母*S. cerevisiae* DKD-5D-H株の染色体上に多数存在することが、明らかとなった。

次に、プラスミドpNS2及びpNS4によるエチオニン耐性遺伝子の染色体への挿入を試みた。プラスミドpNS2及びpNS4をXhoIで切断したものを酵母*S. cerevisiae* DKD-5D-H株に形質転換した後、0.05kg/m³のL-ロイシンを含む最少培地の寒天プレートに塗布し、303.2Kで3日間放置した。その後菌を回収し、5.0mol/m³のD,L-エチオニンと0.05kg/m³のL-ロイシンを含む最少培地の寒天プレートに塗布し、303.2Kで放置した。また、ベクタープラスミドpJDB207にエチオニン耐性遺伝子を連結したプラスミドであるpER9を形質転換した株

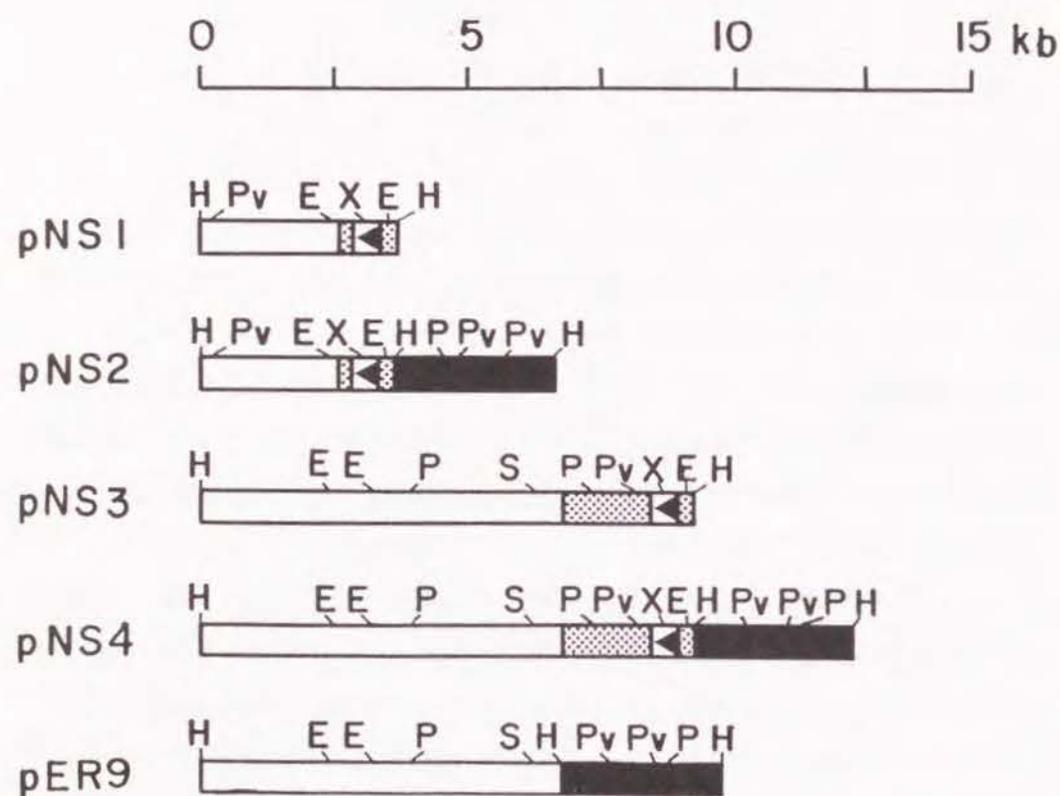


Fig. 7.1 Restriction maps of plasmids pNS1, pNS2, pNS3, pNS4 and pER9.

■: Fragment (HindIII) from plasmid pER4; ▨: fragment from pCY-T1;
 □: vector plasmid pUC19 or pJDB207; ◄: portion of δ sequence.

Abbreviations used are: E, EcoRI; H, HindIII; P, PstI; Pv, PvuII;
 S, SalI; X, XhoI.

(DKD-5D-H/pER9)をコントロールとして同様に塗布した。その結果、7日後にエチオニンに耐性を示す形質転換体を得た(データを図示せず)。

プラスミドpNS2で形質転換した株では、pER9を形質転換した株よりも小さな(直径約1/3)コロニーが得られた。そこで、3個の形質転換体(NS2-1、NS2-2、NS2-3と称する)を選別し、さらに検討した。エチオニン耐性遺伝子の染色体への挿入を調べるために、形質転換体NS2-1、NS2-2、NS2-3及びDKD-5D-H株をそれぞれ 5×10^{-5} m³のYPD培地で定常期まで培養した細胞からFIGE法で染色体を分離し、エチオニン耐性遺伝子断片(0.9kb PvuII断片)をプローブとしてサザンブロッティングを行なった(Fig. 7.2C)。ハイブリダイズしたバンドの強さから判断すれば、NS2-1では3種類の染色体(IX、VI、I)と、NS2-2では2種類の染色体(XI、I)と、NS2-3では1種類の染色体(XI)とハイブリダイズしていると思われる(Fig. 7.2C)。

他方、pNS4を形質転換したプレートには、コントロールのDKD-5D-H/pER9と同等の大きさのコロニーと小さいコロニーの2種類が明らかに存在した。そこで、DKD-5D-H/pER9と同等の大きさのコロニーより3個(NS4-1、NS4-2、NS4-3と称する)、小さいコロニーより2個(NS4-4、NS4-5と称する)の計5個を選別した。これらの形質転換体をそれぞれ 5×10^{-5} m³のYPD培地で停止期まで培養した後、エチオニン耐性遺伝子断片(プラスミドpER4の0.9kb PvuII断片)をプローブとして、Fig. 7.2と同様にサザンブロッティングを行なった(Fig. 7.3)。形質転換体NS4-4及びNS4-5由来の染色体上には、プローブとハイブリダイズするバンドが認められなかったが、NS4-1、NS4-2及びNS4-3の場合には、多くの染色体上に多コピー挿入されたバンドが見い出された(Fig. 7.3)。これらの結果から、プラスミドpNS4を利用することにより、多数のエチオニン耐性遺伝子を染色体内に挿入できることが確認された。

7.3.2 染色体内に挿入されたエチオニン耐性遺伝子の発現と安定性

形質転換体NS4-1、NS4-2及びNS4-3についてさらに、エチオニン耐性遺伝子の発現(エチオニン耐性及びSAMの蓄積)について調べた。まず、これら形質

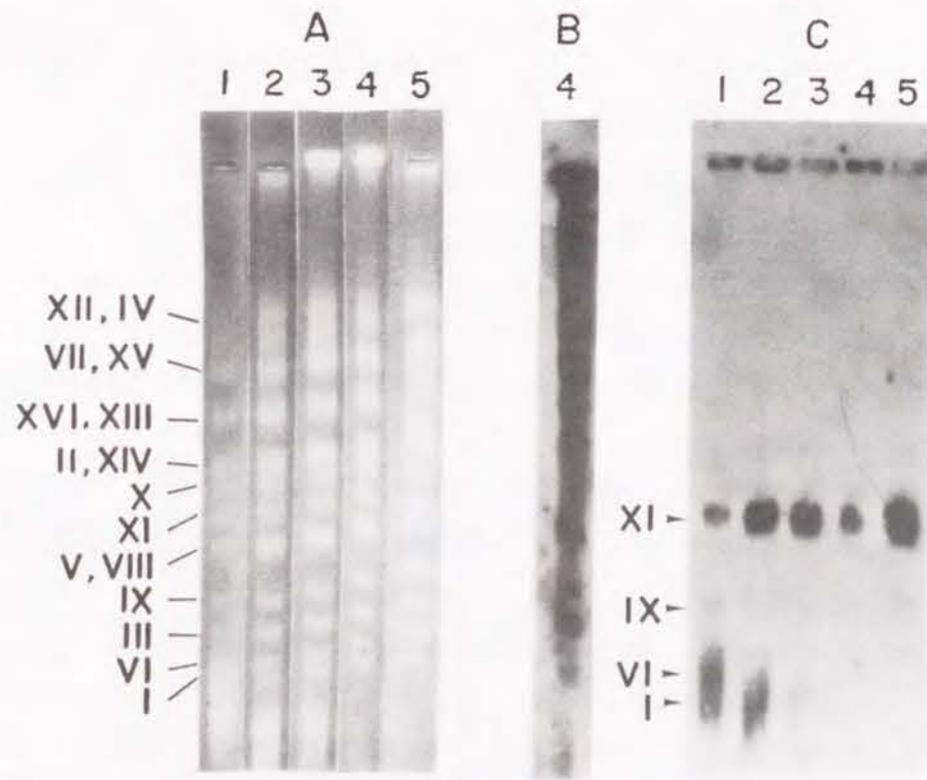


Fig. 7.2 Integration of ethionine-resistant gene into chromosomes by using pNS2.

Yeast cells NS2-1 (lane 1), NS2-2 (lane 2), NS2-2 (lane 3) and *S. cerevisiae* DKD-5D-H (lane 4) were grown on YPD medium and the chromosomes in these cells were separated by FIFE method. A: Separation patterns of chromosomes. B: Southern blotting of chromosomes with δ sequence in Ty element. *Eco*RI fragment (0.8kb) from pNS1 was used as probe (exposed for 15 min). C: Southern blotting of chromosomes with ethionine-resistant gene. *Pvu*II fragment (0.9kb) from pER4 was used as a probe (exposed for 30 min). Yeast PFGE-Marker was used for estimation of size and intensity (lane 5). Positions of chromosomes I, VI, IX and XI are indicated by arrows.

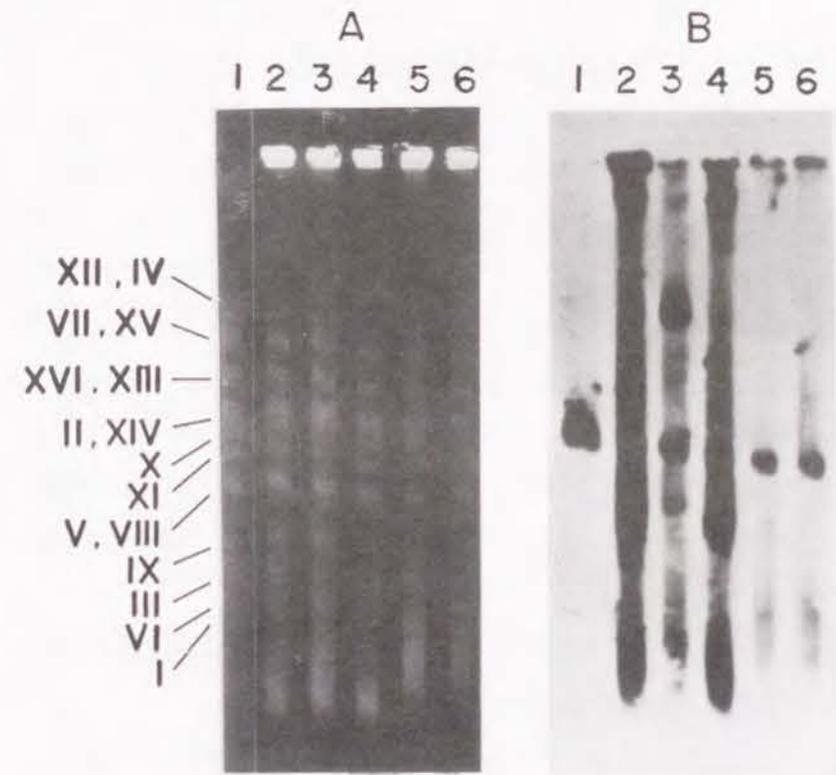


Fig. 7.3 Integration of ethionine-resistant gene into chromosomes by using pNS4.

Yeast cells NS4-1 (lane 2), NS4-2 (lane 3), NS4-3 (lane 4), NS4-4 (lane 5) and NS4-5 (lane 6) were grown on YPD medium and chromosomes in these cells were separated by FIFE method. A: Separation patterns of chromosomes. B: Southern blotting of chromosomes with ethionine-resistant gene. *Pvu*II fragment (0.9kb) from pER4 was used as a probe (exposed for 30 min). Yeast PFGE-Marker was used (lane 1) for estimation of size and intensity.

転換体のD,L-エチオニンに対する耐性の強さを調べるために、 5.0mol/m^3 のD,L- $1.0 \times 10^{-4}\text{m}^3$ のSD最少培地(L-ロイシンを含有しない)中303.2Kで好氣的に振盪培養した。その増殖をFig. 7.4に示す。コントロールであるプラスミドpJDB207を酵母DKD-5D-H株に入れた細胞(DKD-5D-H/pJDB207)がエチオニンに感受性であり増殖が著しく阻害されたのに対し、NS4-1、NS4-2及びNS4-3細胞は、エチオニンに対して耐性であり、その比増殖速度はいずれもDKD-5D-H/pER9のそれとほぼ同じであった。また、NS4-1株についてもSAMの蓄積を調べた。L-メチオニンを培地に含有するしないに拘わらず、DKD-5D-H/pRR9株およびNS4-1株の細胞はSAMを著量菌体内に蓄積した(Fig. 7.5)。そして、増殖速度は、NS4-1株の方がDKD-5D-H/pRR9株に対して遅くなっていたが、SAMの蓄積量は約2倍NS4-1株の方が高かった。

このようにNS4-1、NS4-2及びNS4-3株ではエチオニン耐性とSAMの蓄積量が有為に増大しており、*S. cerevisiae* DKD-5D-H株の染色体に挿入されたエチオニン耐性遺伝子が発現していると考えられた。

次に染色体に挿入された遺伝子の安定性を調べるために、NS4-1、NS4-2及びNS4-3株の細胞を約10世代の間、 5.0mol/m^3 のD,L-エチオニンを含有するSD最少培地(L-ロイシンを含有しない)で培養した後、遺伝子の挿入分布をFig. 7.3と同じサザンブロッティング法で調べた(Fig. 7.6)。ハイブリダイズしたバンドの強度とその分布を考慮すれば、染色体に挿入されたエチオニン耐性遺伝子は、NS4-1、NS4-2及びNS4-3株の細胞の染色体内に安定に存在すると考えられる(Fig. 7.6B, lane 3, 4 and 5)。他方、選択圧を加えない培地(L-ロイシンを含有し、且つ、D,L-エチオニンを含有しない)で培養した場合には、染色体内に挿入されたエチオニン耐性遺伝子の染色体からの顕著な脱落が見られた。それゆえ、染色体内に挿入されたエチオニン耐性遺伝子の安定な保持には、選択圧を加えて培養する必要があることが明らかとなった。

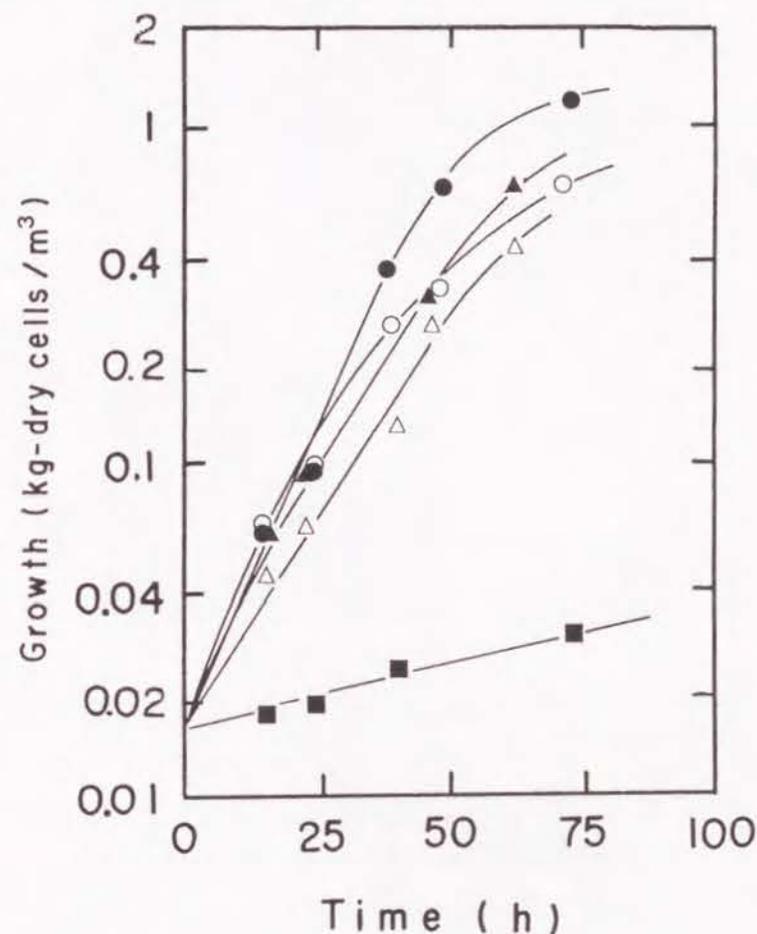


Fig. 7.4 Ethionine resistance of transformants.

Yeast cells were grown in SD minimal medium containing 5.0mol/m^3 D,L-ethionine. ■, DKD-5D-H/pJDB207; ▲, DKD-5D-H/pER9; ○, NS4-1; ●, NS4-2; △, NS4-3.

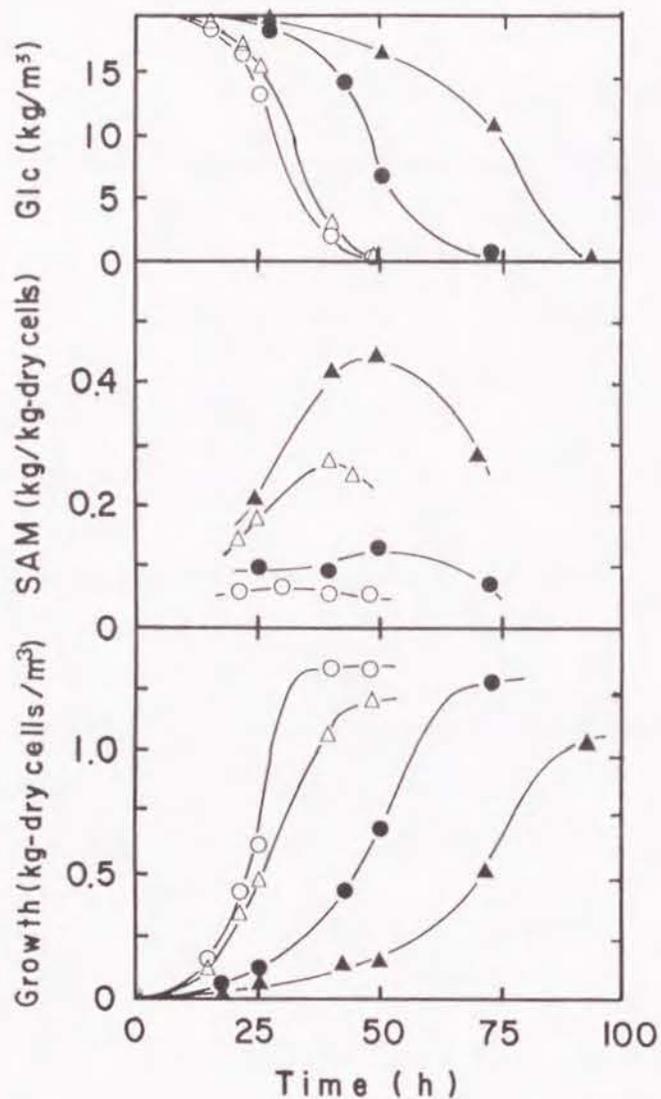


Fig. 7.5 SAM accumulation in *S. cerevisiae* DKD-5D-H/pER9 and NS4-1 cells.

S. cerevisiae DKD-5D-H/pER9 (○, ●) and NS4-1 (△, ▲) cells were grown in SD minimal medium supplemented with (●, ▲) or without (○, △) 5.0 mol/m³ D,L-methionine. Glc, glucose.

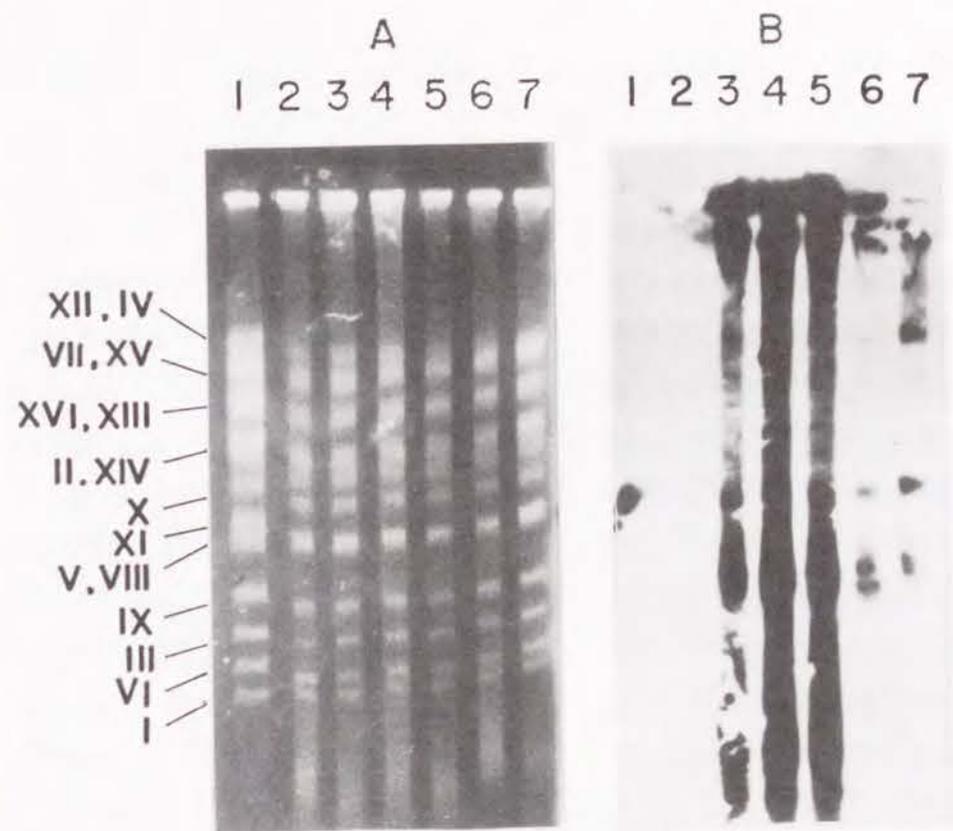


Fig. 7.6 Stability of ethionine-resistant gene integrated into chromosomes.

Yeast cells of *S. cerevisiae* DKD-5D-H (lane 2), NS4-1 (lane 3), NS4-2 (lane 4) and NS4-3 (lane 5) were grown in SD minimal medium containing 5.0 mol/m³ D,L-ethionine for approximately 10 generations. Yeast cells NS4-1 (lane 6) and NS4-2 (lane 7) were also grown in SD minimal medium containing 0.05kg/m³ L-leucine for about 40 generations. Chromosomes in these yeast cells were separated by FIGE method. A: Separation patterns of chromosomes. B: Southern blotting of chromosomes with ethionine-resistant gene. *Pvu*II fragment (0.9kb) from pER4 was used as a probe (exposed for 30 min). Yeast PFGE-Marker was used for estimation of size and intensity (lane 1).

7.4 考察

アスペルギルスなどの多核を有するカビを宿主として形質転換を行なった場合、カビの複製開始に関する遺伝子を有していないベクターを使用しているにもかかわらず、外来遺伝子が高コピー数染色体内に挿入される⁹²⁾。一方、Lopesら⁹⁰⁾は、YIp系のベクタープラスミドに酵母*S. oligorhiza*のリボソーマルDNAの遺伝子断片と*leu2-d*遺伝子とを連結したベクタープラスミドを作製し、これを*S. cerevisiae*に形質転換体することにより、これらの遺伝子が、高コピー数染色体内に挿入されることを報告している。これらの結果は、相同的な配列が染色体内に高コピー数存在すれば、染色体内に目的遺伝子を多コピー数挿入し得る可能性を示唆している。ところで、Ty因子が*S. cerevisiae*の染色体内に多コピー数存在することはよく知られている。最近 Sakaiら²⁹⁾は、Ty因子のBgIII部位に挿入した場合その転移が盛んに行なわれ不安定であるのに対し、Ty因子の δ 配列に挿入した場合は、安定に存在することを報告した。

本研究では、酵母*S. cerevisiae* DKD-5D-H株の染色体内にエチオニン耐性遺伝子を挿入することにより、SAMの蓄積量を高め、且つ、安定化することを目的として、Ty因子の δ 配列部分とエチオニン耐性遺伝子とを有する2種類のプラスミド(pNS2及びpNS4)を作製した。プラスミドpNS2は、酵母の複製開始に関する遺伝子を含有しておらず、pNS2を用いて形質転換した場合には、2-3コピー数挿入された形質転換体しか見い出せなかった(Fig. 7.2)。他方、2 μ m由来の複製点ORIを有するプラスミドpNS4を用いて形質転換した場合には、高コピー数染色体に挿入された(Fig. 7.3)。このことから、染色体へ目的遺伝子を多コピー数挿入するためには、宿主細胞に存在する複製開始に関する領域を有するプラスミドを利用する必要があると思われる。

また、本章ではこのプラスミドpNS4を形質転換した細胞(NS4-1)のSAMの生産性とプラスミド安定性について、第6章で作製したプラスミドpER9を有する酵母(DKD-5D-H/pER9)と比較検討した。その結果、SAMの蓄積量ではNS4-1の細

胞の方がDKD-5D-H/pER9の細胞よりも高めることができた。しかし、安定性の面では、挿入した遺伝子の染色体からの脱落が起こり(Fig. 7.6)、必ずしも染色体内に安定に維持できなかった。D,L-エチオニンを含有する培地でNS4-1の細胞を培養すれば、染色体からの脱落を防ぐことは可能だが、この場合はSAMだけでなくSAEも菌体内に蓄積する。SAEとSAMの分離精製は非常に困難であることを考慮すると、SAMの生産ではD,L-エチオニンを選択圧として加えながら培養することは、好ましくない。従って、プラスミドpNS4をSAMの生産に利用するためには、安定性をさらに改良していく必要があると考えられる。

一方、pNS4は、クローニング部位としてSalI部位を有している。従って、pNS4もpER4と同様に発現と安定性の高い工業化用のベクタープラスミドとして利用できると考えられる。また、実用酵母中でも発現可能なエチオニン耐性遺伝子を有していることから、染色体レベルでの実用酵母の育種への適用も期待される。

7.5 結 言

SAMの生産法の染色体工学的アプローチとして、トランスポゾン(Ty因子)を用いてエチオニン耐性遺伝子を染色体内に多コピー数挿入することを試みた。まず、Tyの両末端に存在する δ 配列の遺伝子とエチオニン耐性遺伝子とをベクタープラスミドpUC19及びpJDB207に挿入したプラスミドpNS2及びpNS4を作製した。pNS2を用いて酵母*S. cerevisiae*に形質転換した場合には、エチオニン耐性遺伝子は数コピーしか挿入されなかった。一方、pNS4を用いた場合には、染色体内に多コピー数挿入することができ、SAMの蓄積も増大した。このpNS4が挿入された形質転換体を、選択圧を加えて培養した場合、エチオニン耐性遺伝子は安定に染色体内に維持されたが、選択圧を加えずに培養した場合安定性は悪く、著しく染色体から脱落した。

第 8 章 総 括

分子遺伝学の発展により、様々な異種生物由来の遺伝子を宿主となる別の細胞中で発現することが可能になってきた。最も頻繁に利用される宿主として、大腸菌*E. coli*と酵母*S. cerevisiae*がある。特に、*S. cerevisiae*は、宿主として多くの点で*E. coli*よりも優れているのみならず、パン、清酒、ビールなどの製造に古くから利用されており、安全性も十分に保障できることから、今後タンパク質やその他有用物質生産場として大きな位置を占めると考えられる。一方、工業的な生産という面から見た場合、*S. cerevisiae*はまだ十分な研究がなされておらず、生産プロセスに適した組換え体を設計し得る方法論の確立が、現在の重要な課題となってきている。その中の最も重要な問題点は、野性酵母株で発現可能なマーカー遺伝子の開発と安定なプラスミドの開発である。特に、*E. coli*においては、野性株用の発現マーカー遺伝子と安定なプラスミドの開発に関する研究がなされつつあるのに対し、*S. cerevisiae*ではその研究は非常に少なく、現在工業的に利用し得るベクターが見当たらないことが工業化の妨げとなっている。本論文では、S-アデノシルメチオニン(SAM)の生産を例にとり、野性株でも発現し得るマーカー遺伝子の開発と、宿主内に目的遺伝子を安定に存在させる方法に関して基礎的な研究を行なった。本章では、本研究において得られた知見と今後の展望について述べる。

1. 酵母のエチオニン耐性遺伝子の取得とその特性

まず、第1部において、メチオニンアナログ物質であるエチオニンが酵母の増殖を阻害することから、*S. cerevisiae*のエチオニンに耐性を示す遺伝子を

取得し、その遺伝子の生化学的並びに遺伝学的な特性の解析を行なった。

目的遺伝子を保持したプラスミドを酵母の細胞に形質転換した後、この酵母を利用して物質生産する場合、この宿主となる酵母は増殖の早い野性型の酵母を用いる方が有利である。しかし、そのような酵母に形質転換するためには野性株で発現できるマーカーが必要である。そこで、第2章ではエチオニン耐性遺伝子をマーカーとして利用すべく、エチオニン耐性遺伝子のクローニングとその生化学的特性について調べた。酵母 *S. cerevisiae* DKD-5D-H株の遺伝子ライブラリーより取得したエチオニン耐性を有する遺伝子には、SAMの蓄積を高めるものと抑制するものが存在した。エチオニンに耐性を示し、SAMの蓄積を高める遺伝子の生化学的特性をさらに調べた結果、本遺伝子はメチオニンの合成経路、メチオニンの蓄積、SAMの合成を高めるものではなく、むしろ直接的あるいは間接的にSAMの液胞への蓄積を高めることに関与していることが明らかとなった。従って、エチオニンの解毒は、エチオニンをS-アデノシルエチオニン(SAE)に変換し、これを液胞中に蓄積、即ち、排除することにより行なわれていると考えられる。

第3章では、エチオニン耐性遺伝子の特性についてさらに詳しく知るべく、遺伝学的側面からの解析を行なった。エチオニン耐性遺伝子を保持する染色体DNA断片を3.0kbまでサブクローニングした後、その全塩基配列を決定した。このDNA断片内には、長いオープンリーディングフレーム(ORF)は1個しか存在せず遺伝子破壊の結果からこのORFがエチオニン耐性遺伝子のORFであることを確認した。ERC1遺伝子(最も長いORFを与えるATGコドンを開始コドンとしたORF)より算出されるタンパク質は、617個のアミノ酸からなり、その分子量は67,977であった。また、このタンパク質と相同性の高いタンパク質は見いだせなかったが、N末端側に非常に疎水性高い領域が存在することから膜に結合している可能性が示唆された。

一方、このエチオニン耐性遺伝子はSAMを蓄積することにより、種々のメチル化反応や、SAMの下流にあるポリアミンの合成に影響を及ぼすと考えられる。そこで、第4章では、ポリアミンの代謝に関与すると考えられるスベルミンに

耐性を示す遺伝子のクローニングを行なった。得られたスベルミン耐性遺伝子には少なくとも2種類存在し、そのひとつは、エチオニン耐性遺伝子とその制限酵素地図ならびに表現型が一致した。このことから、エチオニン耐性遺伝子は、スベルミン耐性にも関与していることが明らかとなった。

以上述べてきたように、野性酵母のマーカーとしてのエチオニン耐性遺伝子を取得できた。さらに、この遺伝子の特性を調べた結果、SAMの液胞への蓄積を高めることに関与する遺伝子であることがわかった。

2. S-アデノシルメチオニンの生産法の開発

次に、第2部では目的遺伝子を宿主内に安定に存在せしめる方法を中心に、SAMの生産法について検討を行なった。

SAMは肝機能や脳障害に対する薬理的な効果が知られており、その工業的な生産が期待されている。このSAMの生産には、L-メチオニンを含有する培地で酵母菌体を培養し、できるだけ高濃度に菌体内にSAMを蓄積する方法が最も効率がよい。本研究で取得したエチオニン耐性遺伝子は、SAMの菌体内の蓄積量を高めることからSAMの生産に有用と考えられる。そこで、第5章では、エチオニン耐性遺伝子を有する酵母を用いたSAMの生産について検討した。その結果、50mol/m³のリン酸カリウム緩衝液と5.0mol/m³のL-メチオニンを含有するSD最少培地で培養した時、SAMの蓄積量が0.26kg/kg-dry cellsという過去最高の値を得た。また、S-アデノシルホモシステイン(SAH)も、神経系の医薬としての期待が集まっているが、L-メチオニンのかわりにD,L-ホモシステインを培地に添加したとき、SAHを最高0.030kg/kg-dry cellsまで蓄積させることができた。

一方、目的遺伝子を有するプラスミドを酵母に形質転換し、その菌体を用いて工業的に物質を生産する場合、その工業的なベクターとして、野性株で発現するマーカーを有し、且つ、安定性の高いことが必要である。そこで、第6章では、工業的に利用可能なベクタープラスミドの作製を試みた。エチオニン耐性遺伝子を保持するDNA断片をプラスミドpJDB207のHindIII部位に挿入することにより作製した工業化用のベクタープラスミドpER9は、9.8kbとコンパクト

であること、*SalI*、*BamHI*などの利用しやすいクローニング部位を有していること、プラスミドの安定性が高いことなどが明らかとなった。また、このエチオニン耐性遺伝子の発現も十分高く、SAMの生産にこのプラスミドを利用できることが判明した。さらに、実用酵母中でも発現することから実用酵母の分子育種にも利用できると思われる。

さらに第7章では、このエチオニン耐性遺伝子を染色体内に挿入し、その発現と安定性について検討した。ベクタープラスミドpUC19及びpJDB207に、Ty因子の δ 配列部分とエチオニン耐性遺伝子とを挿入したプラスミドpNS2及び、pNS4を作製した。これを、酵母の染色体内に挿入したところ、pNS2では低コピー数(1-3)しか挿入できなかったが、pNS4では多コピー挿入することができ、SAMの蓄積量も更に高めることができた。また、挿入された遺伝子は選択圧を加えて培養した場合にのみ安定に存在することを明らかにした。

以上述べてきたように、本研究で取得したエチオニン耐性遺伝子を有する酵母を用いることにより、高濃度にSAMを蓄積することができた。さらに、安定性の高い工業化用のベクタープラスミドを作製することにより、SAMを工業的な規模での生産が可能となった。また、染色体に挿入すれば更にSAMの蓄積量高められることも確認した。

3. 今後の展望

近年、生体機能を模倣し工学的に利用しようという研究が、さかんに行なわれている。液体膜による分離あるいは能動的輸送も生体膜を積極的に模倣する試みといえる。著者らも、トリ-n-オクチルアミンを担体とする液体膜による重金属の輸送に関して研究を行ない、膜輸送の動力的解析と分離機能の解析を行なった⁹³⁾⁻⁹⁶⁾。最近、液体膜の研究はアミノ酸などの比較的大きな分子の輸送に重点が置かれつつある。このような大きな分子の輸送には、選択性の高い担体(キャリアー)の開発が重要な課題であるが、このような担体として生体中に存在するタンパク質(例えば、透過酵素)を利用することが考えられる。本研究で取得したエチオニン耐性遺伝子は、液胞へのSAMの蓄積を高める遺伝

子と考えられることから、今後この遺伝子産物であるタンパク質の構造と動力的な蓄積のメカニズムを解析していくことにより、生化学的な知見が得られるだけでなく、液体膜による分離の分野への応用が期待される。

また、野性酵母中で発現し、目的遺伝子の宿主内の安定性が非常に高い工業化に適したベクタープラスミドpER9を作製したが、このベクタープラスミドはSAMの生産に利用できるだけでなく、安価に生産する必要のある微生物由来の酵素や有用物質、さらには、コモディティーなケミカル物質を生産する場合に特に有用となると考えられる。また、清酒、ビール、ワイン、パンなどの実用的に利用されている酵母の分子育種が望まれているが、高次倍数体であるために、変異処理や細胞融合法による育種は非常にむずかしいのが現状である。ベクタープラスミドpER9は野性酵母中でも発現することから、ビール、清酒製造用の酵母の分子育種にも利用し得ると考えられる。現在、グルコキナーゼ遺伝子とプラスミドpER9とを連結し、これを凝集性酵母に形質転換することにより、高い糖発酵能と強い凝集性を同時に有する酵母の育種を進めている。今後、清酒やビールの風味の改良やパンの発酵力の強化などにも本ベクタープラスミドを利用できると思われる。さらに、近年染色体レベルでの遺伝子の改変(染色体工学)に興味もたれている。本研究で作製したプラスミドpNS4は、実用酵母で発現可能なエチオニン耐性遺伝子を有していることから、実用酵母の染色体レベルでの育種への展開が期待される。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、終始温かい御指導と御鞭撻を賜りました京都大学食糧科学研究所 木村光教授、村田幸作助教授に心から御礼申し上げます。また、本論文の審査をして頂きました京都大学工学部 佐田栄三教授、橋本健治教授、田中渥夫教授、内見審査をして頂きました京都大学工学部 加藤滋雄助教授に心より御礼申し上げます。

本研究の実験遂行にあたり、有益な御助言ならびに御援助を賜りました京都大学工学部 故江口彌教授ならびに化学工学科の諸先生方、京都大学原子エネルギー研究所 原田誠教授、ならびに原田研究室の方々、京都大学木材研究所 伊東孝男教授、京都大学農学部 坂口守彦教授、中京短期大学 福田泰樹助教授、宝酒造株式会社中央研究所の方々に深く感謝申し上げます。さらに、京都大学食糧科学研究所にて研究の機会をお与えくださるとともに有益な御助言を賜りました京都大学食糧科学研究所長 鬼頭誠教授ならびに食糧科学研究所の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

また、貴重な菌株やプラスミドを分譲して戴きました大阪大学 大嶋泰治教授、基礎生物学研究所 飯田秀利博士、Edinburgh大学 Jean D Beggs博士に御礼申し上げます。

研究遂行にあたり詳細な面まで御指導ならびに御援助下さいました京都大学食糧科学研究所 井上善晴助手、村田道代技官、岡本敬子技官、さらには応用微生物部門の学生ならびに研修員、受託研修員の方々に御礼申し上げます。

また、研究の機会をお与え下さいました鐘淵化学工業株式会社 新納真人会長、館科社長をはじめ関係役員、関連部門の方々、生産技術研究所 野島康弘所長、福田秀樹主任研究員ならびに生産技術研究所の方々に感謝申し上げます。

最後に本研究を終始温かく支えて下さいました鐘淵化学工業株式会社 故森川久常務に対し、ここに謹んで哀悼と感謝の念を捧げさせていただきます。

引用文献

- 1) B. M. Olivera, Z. W. Hall and I. R. Lehman: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 61, 237 (1968)
- 2) H. O. Smith and K. W. Wilcox: J. Mol. Biol., 81, 419 (1970)
- 3) M. Mandel and A. Higa: J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)
- 4) D. A. Jackson, R. H. Symons and P. Berg: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2904 (1972)
- 5) P. E. Lobban and A. D. Kaiser: J. Mol. Biol., 78, 453 (1973)
- 6) 木住雅彦, 堀内忠郎 編: "応用分子遺伝学", 講談社サイエンティフィックック, 1986
- 7) 日経産業新聞編: "バイオビジネス", 日本経済新聞社, 1988
- 8) 宮田満: バイオサイエンスとインダストリー, 48, 640 (1990)
- 9) C. M. Brown, I. Compbell, F. G. Priest (eds): "Introduction to Biotechnology", London, Blackwell Scientific Publications, 1987
- 10) 谷吉樹: バイオサイエンスとバイオテクノロジー, 48, 640 (1990)
- 11) 大嶋泰治: 発酵と工業, 39, 14 (1981)
- 12) 菱沼文男, 郡家徳郎, 中村研三: 発酵と工業, 41, 26 (1983)
- 13) D. W. Thomas and R. C. Dickson: Gene, 26, 243 (1983)
- 14) L. Gritz and J. Davis: Gene, 25, 179 (1983)
- 15) T. Imanaka and S. Aiba: Annuals New York Academy of Science, 369,1 (1981)
- 16) J. Seo and J. E. Bailey: Biotech. Bioeng., 27, 1699 (1985)
- 17) S. B. Lee, A. Seressiotis and J. E. Bailey: Biotech. Bioeng., 27, 313 (1986)
- 18) M. A. Hjortso and J. E. Bailey: Biotech. Bioeng., 26, 528 (1984)
- 19) M. A. Hjortso and J. E. Bailey: Biotech. Bioeng., 26, 814 (1984)

- 20) 平賀壯太 : 蛋白質・核酸・酵素 , 29, 430 (1984)
- 21) L. Bee, K. Gerdes and S. Molin: *J. Bacteriol.*, 169, 4646 (1987)
- 22) H. Yukawa, Y. Kurusu, M. Shimazu, M. Terasawa, A. Ohta and I. Shibuya: *Agric. Biol. Chem.*, 49, 3619 (1985)
- 23) K. Gerdes: *Biotechnol.*, 6, 1402 (1988)
- 24) A. Takagi, E. N. Chua, C. Boonchird, S. Harashima and Y. Oshima: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 123 (1985)
- 25) 菊池淑子 : 細胞工学 , 4, 322 (1985)
- 26) J. R. Broach: *Methods in Enzymology*, 101, 307 (1983)
- 27) A.B. Futcher and B. S. Cox: *J. Bacteriol.*, 157, 283 (1984)
- 28) J. D. Boeke, H. Xu and G. R. Fink: *Science*, 239, 280 (1988)
- 29) A. Sakai, Y. Shimizu and F. Hishinuma: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 302 (1990)
- 30) T.S.Lopes, J. Klootwijk, A. E. Veenstra, P. C. van der Aar, H. van Heerikhuizen, H. A. Raue and R. J. Planta: *Gene*, 79, 199 (1989)
- 31) D. R. Cryer, R. Eccleshall and J. Marmur: *Methods Cell Biol.*, 12, 39 (1975)
- 32) T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook: "Molecular Cloning, a laboratory manual", New York, 1982
- 33) H. Ito, Y. Fukuda, K. Murata and A. Kimura: *J. Bacteriol.*, 153, 163 (1983)
- 34) P. Truffa-Bachi and G. N. Cohen: *Methods in Enzymology*, 17, 694 (1971)
- 35) P. Datta and H. Gest: *Methods in Enzymology*, 17, 703 (1971)
- 36) P. C. DeVito and J. Dreyfuss: *J. Bacteriol.*, 88, 1341 (1964)
- 37) C. H. Fiske and Y. Subbarow: *J. Biol. Chem.*, 66, 375 (1925)
- 38) S. Shiozaki, S. Shimizu and H. Yamada: *Agric. Biol. Chem.*, 38, 1669 (1974)

- 39) R. C. Green: *Biochemistry*, 8, 2255 (1969)
- 40) O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)
- 41) H. Cherest, Y. Surdin-Kerjan, J. Antoniewski and H. de Robichon-Szulmajester: *J. Bacteriol.*, 115, 1084 (1973)
- 42) K. D. Nakamura and F. Schlenk: *J. Bacteriol.*, 120, 482 (1974)
- 43) R. G. Greene, C.-H. Su and C. T. Holloway: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 38, 1120 (1970)
- 44) H. Kase and K. Nakayama: *Agric. Biol. Chem.*, 38, 2021 (1974)
- 45) H. Yamada, Y. Morinaga and Y. Tani: *Agric. Biol. Chem.*, 46, 47 (1982)
- 46) E. O. Kajander, M. Kubota, C. J. Carrera, J. A. Montgomery and D.A. Carson: *Cancer Res.*, 46, 2866 (1986)
- 47) D. Kamely and J. W. Littlefield: *Expt. Cell. Res.*, 89, 154 (1974)
- 48) M. Caboche and P. Mulsant: *Somatic Cell Genetics*, 4, 407 (1978)
- 49) H. Cherest, Y. Surdin-Kerjan, J. Antoniewski and H. de Robichon-Szulmajester: *J. Bacteriol.*, 115, 1084 (1973)
- 50) M. Masselot and H. de Robichon-Szulmajester: *Mol. Gen. Genet.*, 129, 349 (1974)
- 51) K. Kitamoto, K. Yoshizawa, Y. Ohsumi and Y. Anraku: *J. Bacteriol.*, 170, 2683 (1988)
- 52) K. Kitamoto, K. Yoshizawa, Y. Ohsumi and Y. Anraku: *J. Bacteriol.*, 170, 2687 (1988)
- 53) H. Cherest and Y. Surdin-Kerjan: *Mol. Gen. Genet.*, 163, 153 (1978)
- 54) D. Thomas and Y. Surdin-Kerjan: *J. Biol. Chem.*, 262, 16704 (1987)
- 55) D. Thomas, R. Rothstein, N. Rosenberg and Y. Surdin-Kerjan: *Mol. Cell. Biol.*, 8, 5132 (1988)
- 56) T.F.Perotta-Simpson, J. E. Talmadge and K. D. Spence: *J. Bacteriol.*,

- 123, 516 (1975)
- 57) K. D. Nakamura and F. Schrenk: *J. Bacteriol.*, 118, 314 (1974)
- 58) J. D. Beggs: Gene cloning in yeast, *Genetic Engineering*, 2, 175 (1981)
- 59) J. Messing: *Methods in Enzymology*, 101, 20 (1983)
- 60) F. Sanger, S. Micklen and A. R. Coulson: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463 (1977)
- 61) G. F. Carle and M. V. Olson: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 3756 (1985)
- 62) R. T. Elder, E. Y. Loh and R. W. Davis: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 2432 (1983)
- 63) R. Breatnach and P. Chambon: *Annu. Rev. Biochem.*, 50, 349 (1981)
- 64) K. S. Zaret and F. Sherman: *Cell*, 28, 563 (1982)
- 65) J. T. Bennetzen and B. D. Hall: *J. Biol. Chem.*, 257, 3026 (1982)
- 66) J. Kyte and R. F. Doolittle: *J. Mol. Biol.*, 157, 105 (1982)
- 67) M. Vandelbol, J.-C. Jauniaux and M. Grenson: *Gene*, 83, 153 (1989)
- 68) C. W. Tabor and H. Tabor: *Microbiol. Rev.*, 49, 81 (1985)
- 69) J. Mills and D. T. Dubin: *Mol. Pharmacol.*, 2, 311 (1966)
- 70) R. Rozansky, U. Bachrach and N. Grosswicz: *J. Gen. Microbiol.*, 10, 11 (1954)
- 71) C. W. Tabor and S. M. Rosental: *J. Pharmacol.*, 116, 139 (1956)
- 72) C. W. Tabor, H. Tabor and U. Bachrach: *J. Biol. Chem.*, 252, 3671 (1964)
- 73) F. Savatore, E. Borek, V. Zappia, H. G. Williams-Ashman, F. Schlenk (eds): "The Biochemistry of Adenosylmethionine", Columbia University Press, New York, 1977
- 74) 大橋俊夫, 東健彦, 森口幸栄: *診断と新薬*, 24, 221 (1987)
- 75) 高橋二郎, 西野仁雄, 小野武年: *日薬理誌*, 87, 507 (1986)

- 76) V. Zapia, E. Usdin and F. Salvatore (eds): "Biochemical and Pharmacological Roles of Adenosylmethionine and the Central Nervous System", Pergamon Press, Oxford, 1979
- 77) P. M. Ueland: *Pharmacol. Rev.*, 34, 223 (1982)
- 78) H. Fukuda, T. Shiotani, T. Okada and H. Morikawa: *J. Ferment. Technol.*, 56, 354 (1978)
- 79) F. Schlenk and R. E. De Palma: *J. Biol. Chem.*, 229, 1037 (1957)
- 80) J. A. Duerre and F. Schrenk: *Ach. Biochem. Biophys.*, 69, 575 (1962)
- 81) J. Baddiley, G. A. Jamieson: *J. Chem. Soc.*, 61, 1085 (1955)
- 82) A. Gross, S. Geresh and G.M. Whitesides: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 8, 415 (1983)
- 83) S. K. Shapiro, A. Almenas and J. F. Thomson: *J. Biol. Chem.*, 240, 2512 (1965)
- 84) S. Shimizu, S. Shiozaki, T. Ohshiro and H. Yamada: *Eur. J. Biochem.*, 141, 385 (1984)
- 85) K. Sakai and M. Yamamoto: *Agric. Biol. Chem.*, 50, 1175 (1986)
- 86) J. D. Beggs: *Nature*, 275, 104 (1978)
- 87) A. B. Futcher and B. S. Cox: *J. Bacteriol.*, 157, 283 (1984)
- 88) C. I. Kado and S. T. Lui: *J. Bacteriol.*, 145, 1365 (1981)
- 89) I. G. Macara: *J. Gen. Microbiol.*, 104, 321 (1978)
- 90) J. D. Boeke, D. J. Garfinkel, C. A. Styles and G. R. Fink: *Cell*, 40, 491 (1985)
- 91) H. Iida: *Mol. Cell. Biol.*, 8, 5555 (1988)
- 92) J. Tilburn, C. Scazzocchio, G. G. Taylor, J. H. Zabicky-Zissman, R. A. Lackington and R. W. Davis: *Gene*, 26, 205 (1983)
- 93) M. Harada, F. Yamazaki, N. Shiomi, M. Adachi and W. Eguchi: *J. Chem. Eng. Japan*, 17, 521 (1984)

- 94) M. Harada, N. Shiomi and F. Yamazaki: J. Chem. Eng. Japan, 17, 567 (1984)
- 95) M. Harada and N. Shiomi: J. Chem. Eng. Japan, 17, 572 (1984)
- 96) 原田誠, 塩見尚史: "化学工学シンポジウムシリーズ5 液体膜による分離操作", P.133 (1984)

公刊論文目録及び口頭発表目録

I. 公刊論文目録

1. N. Shiomi, H. Fukuda, H. Morikawa, Y. Fukuda and A. Kimura:
Cloning of a gene for S-adenosylmethionine synthesis in Saccharomyces cerevisiae.
Appl. Microbiol. Biotechnol., 29, 302 (1988)
2. N. Shiomi, H. Fukuda, Y. Fukuda, K. Murata and A. Kimura:
Nucleotide sequence and characterization of a gene conferring resistance to ethionine in yeast Saccharomyces cerevisiae.
J. Ferment. Bioeng., 71, 211 (1991)
3. N. Shiomi, H. Fukuda, Y. Fukuda, K. Murata and A. Kimura:
Cloning of genes for spermine resistance in Saccharomyces cerevisiae and their effects on S-adenosyl-L-methionine accumulation.
J. Ferment. Bioeng., 69, 63 (1990)
4. N. Shiomi, H. Fukuda, Y. Fukuda, K. Murata and A. Kimura:
Production of S-adenosyl-L-methionine by Saccharomyces cerevisiae cells carrying a gene for ethionine resistance.
Biotech. Bioeng., 35, 1120 (1990)
5. N. Shiomi, H. Fukuda, Y. Fukuda, K. Murata and A. Kimura:
Production of S-adenosyl-D,L-homocysteine by Saccharomyces cerevisiae cells carrying a gene for ethionine resistance.

Agric. Biol. Chem., 54, 1595 (1990)

6. 塩見尚史、福田秀樹、福田泰樹、村田幸作、木村光：
Saccharomyces cerevisiaeのエチオニン耐性遺伝子をマーカーとするプラスミドの発現と安定性
化学工学論文集，17, 674 (1991)
7. N. Shiomi, H. Fukuda, K. Murata and A. Kimura:
Improvement of S-adenosyl-L-methionine production by transposon-mediated insertion of ethionine-resistance gene into chromosomes of a yeast Saccharomyces cerevisiae.
J. Ferment. Bioeng., (submitted for publication)

II. 口頭発表目録

1. 塩見尚史、福田秀樹、森川久、福田泰樹、木村光：
アデノシルメチオニンの蓄積に關与する酵母の遺伝子のクローニング
日本農芸化学会誌，62, 224 (1988)
2. 塩見尚史、福田秀樹、福田泰樹、村田幸作、木村光：
酵母Saccharomyces cerevisiaeのスベルミン耐性遺伝子のクローニングとS-アデノシルメチオンの蓄積
日本発酵工学会大会 講演要旨集 P.175 (平成元年度)
3. 塩見尚史、福田秀樹、福田泰樹、村田幸作、木村光：
Saccharomyces cerevisiaeのエチオニン耐性遺伝子の生化学的、遺伝学的解析

日本発酵工学会大会 講演要旨集 P.6 (平成2年度)

4. 塩見尚史、福田秀樹、福田泰樹、村田幸作、木村光：
Saccharomyces cerevisiaeのエチオニン耐性遺伝子をマーカーとするプラスミドの発現と安定性
化学工学会第56年会 研究発表講演要旨集 P.547 (平成2年度)
5. 塩見尚史、福田秀樹、福田泰樹、村田幸作、木村光：
エチオニン耐性遺伝子を有する酵母によるS-アデノシルメチオニンの生産性の改良
日本発酵工学会大会 講演要旨集 P.226 (平成3年度)