

耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* の発現ベクターの作成

北本則行・吉野庄子

麹菌、耐塩性酵母（主発酵酵母及び後熟酵母）及び耐塩性乳酸菌は、醤油醸造において大変重要な役割を担う微生物として知られている。麹菌はプロテアーゼ、ペプチダーゼ、グルタミナーゼなど数多くの酵素を菌体外に分泌し、醤油原料である大豆・小麦の分解や呈味成分の生成に大きく関与している。最近の急速な遺伝子操作技術の進展により糸状菌においても遺伝子組換えが可能となり、醤油麹菌実用株 *Aspergillus oryzae* KBN616株では硝酸還元酵素遺伝子 (*niaD* 遺伝子) を選択マーカーに用いた形質転換系が開発されている<sup>1)</sup>。原料利用率の向上あるいは品質向上の観点より本菌からセルラーゼ、ポリガラクトナーゼ、ペクチンエステラーゼなどをコードする遺伝子の解析が行われ、これらの遺伝子を高発現する遺伝子組換え麹菌も創り出されている<sup>2-5)</sup>。また、キシラン分解酵素活性が著しく低下した醤油麹菌も遺伝子組換え技術を用いて創り出されている<sup>6)</sup>。

醤油醸造に要する時間を考えてみると、製麹時間は約三日であるのに対して発酵熟成時間は約半年から一年と非常に長い。そこで、原料利用率の向上あるいは品質向上の目的のためには、発酵熟成プロセスにおいて重要な働きをする耐塩性主発酵酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* 中での麹菌由来遺伝子の発現も麹菌の改良と同様に重要であると考えられる。*Z. rouxii* に関する研究は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に関する研究に比べると非常に少ない。しかし、強力なプロモーターを持つ解糖系酵素、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GAPDH) をコードする遺伝子がクローニングされたり<sup>7)</sup>、*Z. rouxii* が持つ 2  $\mu$ mDNA 類似プラスミド pSR1 を利用した形質転換系の開発が行われている<sup>8)</sup>。さらに GAPDH 遺伝子プロモーターを用いて麹菌アルカリプロテアーゼ遺伝子 cDNA の *Z. rouxii* 内での発現及び麹菌アルカリプロテアーゼの遺伝子組換え *Z. rouxii* による分泌生産について報告されている<sup>9)</sup>。一方、*Z. rouxii* では *S. cerevisiae* のように発現ベクターが開発されていないため、これまでほとんど異種遺伝子の発現が行われていない。そこで、*Z. rouxii* 内で麹菌遺伝子 cDNA などの異種有用遺伝子の効率的な発現を目的として、*Z. rouxii* 由来 GAPDH 遺伝子プロモーター及び

ターミネーターを利用した *Z. rouxii* 用発現ベクターの作製を行った。

## 実験方法

## 1. 使用菌株及び培養条件

*Z. rouxii* MA11-3 (*a*, *leu2*) 株を染色体 DNA の調製及び形質転換に使用した。*Escherichia coli* DH 5  $\alpha$  株は、種々の DNA 断片のクローニングに使用した。*Z. rouxii* MA11-3 株は YPD 培地中で 30°C にて、*E. coli* DH 5  $\alpha$  株は LB 培地中で 37°C にてそれぞれ培養を行った。

表1 使用したオリゴヌクレオチドプライマー

プライマー	配列
P1	5'-CCCTAGGATCCTCCTCCCGTTTCACATGCTC-3'
P2	5'-CCTCTAGAATGCATTGTTATCTGTGATGTACTTTTT-3'
P3	5'-CCGCTCTAGATGTTTCTTCTAGCTGACTT-3'
P4	5'-CGAGCYGTCGACCGGGCGGCTATGGATGTG-3'

2. *Z. rouxii* MA11-3 株由来 GAPDH 遺伝子断片の PCR 法による増幅

本実験に用いたプライマーの塩基配列を表1に示す。既報<sup>2)</sup>にしたがって調製した *Z. rouxii* MA11-3 株の染色体 DNA を鋳型 DNA として P1, P2 プライマーを用いて PCR 反応を行い、*Z. rouxii* MA11-3 株由来 GAPDH 遺伝子プロモーター領域の増幅を行った。また、P3, P4 プライマーを用いた PCR 反応によって *Z. rouxii* MA11-3 株由来 GAPDH 遺伝子ターミネーター領域の増幅を同様にして行った。

## 3. 塩基配列の決定方法

*E. coli* DH 5  $\alpha$  株にクローニングされた種々の DNA 断片の塩基配列の決定は、Thermo Sequenase 蛍光シーケンサー用サイクルシーケンシングキット (Amersham Pharmacia Biotech 社製) および DNA シーケンサー Model 4000 (LI-COR 社製) を使用して行った。塩基配列の解析には "GENETYX" プログラムを用いて行った。

4. *Z. rouxii* MA11-3 株の形質転換方法

Ushio らの方法<sup>8)</sup>にしたがって一晩培養して得られた

*Z. rouxii* MA11-3 株の菌体を Zymolyase 処理によりプロトプラスト化させた。得られたプロトプラストに PEG 存在下で DNA の取り込みを行わせ、再生培地中で 1 週間培養した。増殖してきたコロニーを pick up plate に取り、さらに 4 日間培養を行った。最終的に pick up plate 上で良好な生育を示すコロニーを真の形質転換株とした。

### 実験結果及び考察

#### 1. *Z. rouxii* MA11-3 株由来 GAPDH 遺伝子のプロモーター及びターミネーター領域の PCR 法による増幅

既に報告されている *Z. rouxii* ME 3 株由来 GAPDH 遺伝子<sup>7)</sup> の塩基配列に基づいて合成した 4 種類のプライマーを用いて *Z. rouxii* MA11-3 株の染色体 DNA を鋳型 DNA として PCR 反応を行ったところ、705bp の GAPDH 遺伝子プロモーター領域と 423bp の GAPDH 遺伝子のターミネーター領域が特異的に増幅されてきた。この特異的に増幅された GAPDH 遺伝子プロモーター領域及びターミネーター領域の塩基配列を決定し、*Z. rouxii* ME 3 株由来 GAPDH 遺伝子の塩基配列と比較した。その結果、制限酵素切断部位 (*Bam*HI, *Eco*T22I, *Xba*I, *Sa*II) を導入した 4 カ所を除いて *Z. rouxii* MA11-3 株由来 GAPDH 遺伝子の塩基配列と *Z. rouxii* ME 3 株由来 GAPDH 遺伝子の塩基配列は完全に一致していた (図 1 A, B)。

#### 2. *Z. rouxii* 由来 GAPDH 遺伝子プロモーター及びターミネーターを利用した発現ベクターの作成

上で述べた *Z. rouxii* MA11-3 株由来 GAPDH 遺伝子プロモーター及びターミネーターを利用して発現ベクターの作成を試みた (図 2)。

pSR1 由来 IR 及び選択マーカー *LEU2* を含む多コピープラスミド pKU24<sup>10)</sup> を制限酵素 *Bam*HI 及び *Sa*II で切断した後、制限酵素 *Bam*HI 及び *Xba*I で切断した GAPDH 遺伝子プロモーター及び制限酵素 *Xba*I 及び *Sa*II で切断した GAPDH 遺伝子ターミネーターを挿入して発現ベクター pZG110 を作成した。発現ベクター pZG110 上には *Eco*T22I 切断部位及び *Xba*I 切断部位それぞれユニークサイトとして存在している。したがって、GAPDH 遺伝子プロモーターの 3' 側に導入した制限酵素 *Eco*T22I の認識配列は ATGCAT であるので、認識配列中の ATG を遺伝子翻訳のための開始コドンとして使用することができる。また、GAPDH 遺伝子ターミネ-

ーターの 5' 側に導入した制限酵素 *Xba*I の認識配列は TCTAGA であるので、認識配列中の TAG を遺伝子翻訳のための終止コドンとして使用することができる。したがって、*Z. rouxii* 内で発現させたい遺伝子の開始コドンの直前への *Eco*T22I 切断部位の導入、あるいは 2 番目のコドンの CAT への変更 (2 番目のアミノ酸残基の His 残基への変更) による *Eco*T22I 切断部位の導入及び終止コドンの直後への *Xba*I 切断部位の導入、あるいは最後のコドンの変更 (最後のアミノ酸残基の変更) による *Xba*I 切断部位の導入によって容易に発現ベクター pZG110 へ、*Z. rouxii* 内で発現させたい遺伝子をクロニングができる。

#### 3. *Z. rouxii* MA11-3 株の形質転換

発現ベクター pZG110 で *Z. rouxii* を形質転換することが可能かどうか検討するために *Z. rouxii* MA11-3 株の形質転換を試みた。約 5  $\mu$ g の pZG110 を用いて形質転換を行ったところ、19 株の形質転換株を得ることができた。したがって、形質転換効率は約 4 株/ $\mu$ gDNA となる。この形質転換効率は従来報告<sup>8)</sup> されている形質転換効率 (数百~数千株/ $\mu$ gDNA) に比較すると著しく低い値である。しかし、形質転換効率は菌株、生育時期、使用する PEG の平均分子量あるいは  $\text{CaCl}_2$  濃度などに大きく影響される<sup>8)</sup>。したがって、*Z. rouxii* MA11-3 株の最適な形質転換条件を決定すれば、形質転換効率を向上させることが可能であろう。

今後、*Z. rouxii* MA11-3 株の最適な形質転換条件を決定するとともに醤油麹菌実用株 (*A. oryzae* KBN616 株) 由来の有用たんぱく質遺伝子 cDNA の *Z. rouxii* MA11-3 株での発現を試みていく予定である。

### 要 約

- 1) *Z. rouxii* MA11-3 株由来 GAPDH 遺伝子のプロモーター及びターミネーター領域を PCR 法により増幅を行った。その塩基配列は、*Z. rouxii* MA11-3 株由来 GAPDH 遺伝子の塩基配列と完全に一致していた。
- 2) *Z. rouxii* MA11-3 株由来 GAPDH 遺伝子プロモーター及びターミネーターを利用して *Z. rouxii* 用発現ベクター pZG110 を作成した。
3. 発現ベクター pZG110 を用いて約 4 株/ $\mu$ gDNA の形質転換効率で *Z. rouxii* MA11-3 株を形質転換することができた。

**A**

*Bam*HI

GGATCCTCCTCCCGTTCACATGCTCCGAACCCTTTGGAAAATTCTGTGCGCGGGCGCTAGC 60  
 ACGTAATGACCCTTGATGACAAACTCCAATGGTATCACCCACTGTCTCTCCCCCTCCC 120  
 CTTTTTTCCTTCTTTCTTTCCATCTATTTCTGATCTCCTCCCCTCAGCAGATGTCCCGA 180  
 AAGGTACAGCTGCGATACGGGCAGCCACTTTTGTGACGTCTCGCAACAGGATCACCCCTGCA 240  
 CGACGGGGCACAATAGGATTCCCGTTGGCACGGTGCTGGTGTATAGCCGCCGAGGGTGGG 300  
 GTATAAAGGGCTACATCCTTACCCCCACGCAGGCGATAACCCGCATCATACTGTCCT 360  
 CCTCTTCGCTCTCGCCACTAGCCGCCGAACCATTGCTACCGCAATGACACCGTGTGGTG 420  
 ATCTCAAGGGAGGATGTGTGGGTGTGGGACGGAACCTCCACTTTTTCTCAGTAGGTGCG 480  
 ATGCCCCCTACACCGAGCTTCCACTAACGTGTTTTCAGCGGTTGAAGGCAATGGGATCGCA 540  
 GAATTATCGCAGCTTGTGGTATATAAAGGGAGAAGATATATGGATAAGAGACATGTTCT 600  
 ACTTCTGTTCTCTCTTTCTTTTTATCCTATATCACCAGAACAATCAAGTTCGCATTGAT 660

*Eco*T22I *Xba*I

TCATATCAAATAAAAAGTACATCACAGATAACAATGCATTCTAGA 705

**B**

*Xba*I

TCTAGATGTTTCTTCTAGCTGACTTATGAAAAAGAAAGGTCGATGAGTTATGATATAGA 60  
 TCTAGGTACGTTTTTATACTGATTTAAGTTGAAAGTACTTTTTTTACTTCACTCACTTTA 120  
 TCAAGTTTTTTCAAGTTTTCAATTTAAGTTGAAAGTACTTTTTTTACTTCACTCACTTTA 180  
 TTA CTACATAGTTGCGAAGCCCGATCCGTAGCTGACGCTGCTGTCGTGCAGGTCGCGCAC 240  
 ATGGGAGCTTTGGGAGTAGGCTGGGAAATGGAACGCTGCGTCTCTTGTCTGTGCCAGAAT 300  
 CGCCAGCATCAGTGCATTGGTCTCGCACCACAGATGGTATTACCTGTGACCTCTAAATA 360  
 TTTCTTCCAGTCGTCATACTTATCACCTGGCGATTCCAACCACATCCATAGCCGCCCGGTC *Sal*I 420  
GAC 423

図1 *Z.rouxii* MA11-3株由来 GAPDH 遺伝子のプロモーター領域 (A) 及びターミネーター領域 (B) の塩基配列

使用したプライマーの配列を下線で示す。

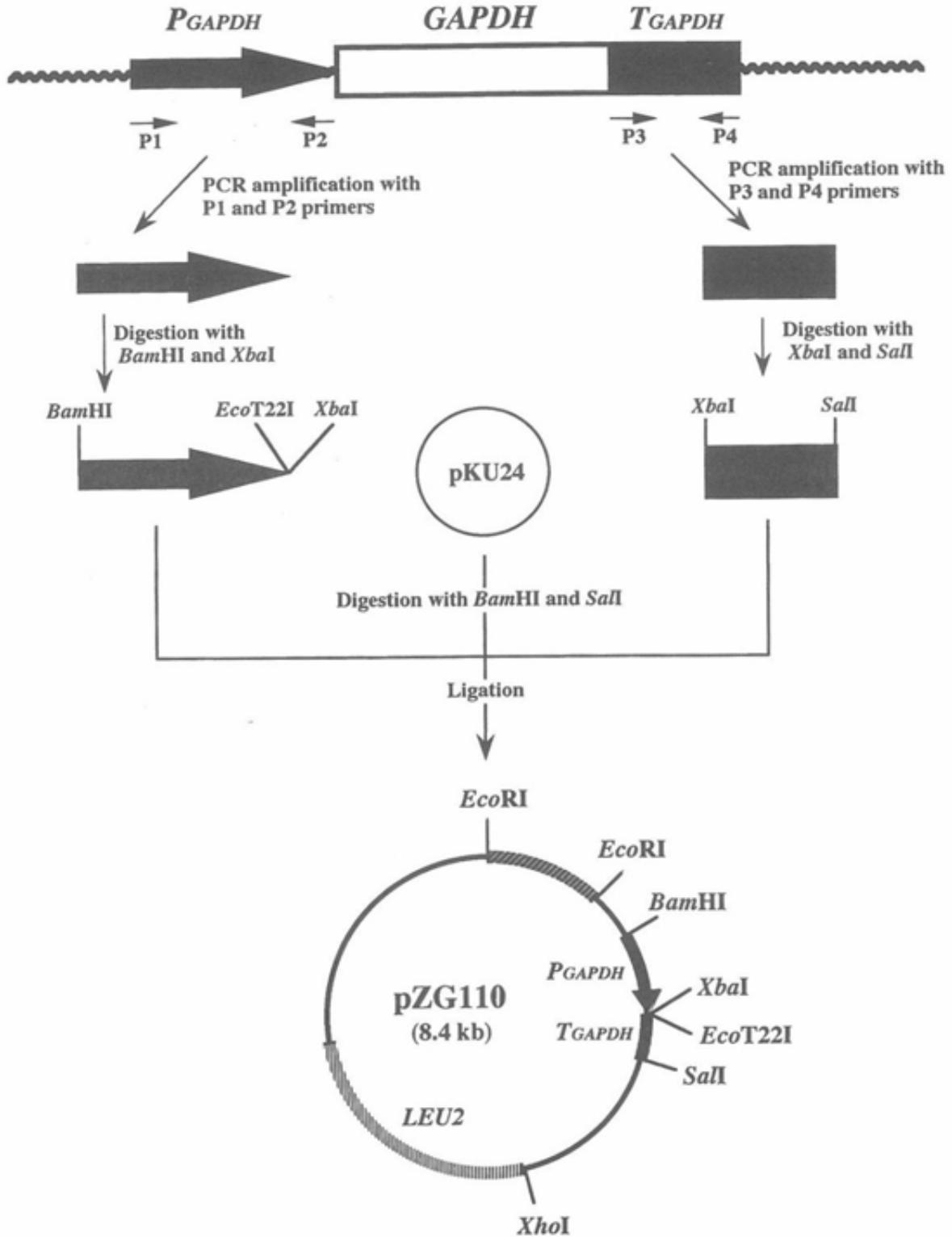


図2 *Z.rouxii* 用発現ベクター pZG110の作成方法

本研究にあたり *Z. rouxii* MA11-3 株及びプラスミド pKU24 を分譲して下さいましたヒガシマル醤油(株)研究所, 牛尾公平所長に深謝いたします。

文 献

- 1) N. Kitamoto, T. Kimura, Y. Kito, K. Ohmiya and N. Tsukagoshi : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1795 (1995)
- 2) N. Kitamoto, T. Kimura, Y. Kito, K. Ohmiya and N. Tsukagoshi : *FEMS Microbiol. Lett.*, **111**, 37 (1993)
- 3) N. Kitamoto, M. Go, T. Shibayama, T. Kimura, Y. Kito, K. Ohmiya and N. Tsukagoshi : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **46**, 538 (1996)
- 4) N. Kitamoto, J. Matsui, Y. Kawai, A. Kato, S. Yoshino, K. Ohmiya and N. Tsukagoshi : *ibid.*, **50**, 52 (1998)
- 5) N. Kitamoto, H. Okada, S. Yoshino, K. Ohmiya and N. Tsukagoshi : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**, 120 (1999)
- 6) N. Kitamoto, S. Yoshino, M. Ito, T. Kimura, K. Ohmiya and N. Tsukagoshi : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 558 (1998)
- 7) T. Imura, I. Utatsu and A. Toh-e : *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1641 (1987)
- 8) K. Ushio, H. Tatsumi, H. Araki, A. Toh-e and Y. Oshima : *J. Ferment. Technol.*, **66**, 481 (1988)
- 9) Y. Ogawa, H. Tatsumi, S. Murakami, Y. Ishida, K. Murakami, A. Masaki, H. Kawabe, H. Arimura, E. Nakano, H. Motai and A. Toh-e : *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2521 (1990)
- 10) K. Ushio, H. Otsuka, S. Yoshikawa, G. Taguchi, M. Shimosaka, N. Mitsui and M. Okazaki : *J. Ferment. Bioeng.*, **82**, 16 (1996)