

酵母 *Cryptococcus humicolus* の自律複製型ベクター構築の検討

環境生物化学研究室 大城 雄一
指導教官 山田 良平
解良 芳夫
高橋 祥司

背景

我々の研究室では、生体内における遊離 D-アスパラギン酸の D-アスパラギン酸酸化酵素による検出法を着想し、本酵素の調製が容易な微生物にその供給源を求め、酵母 *Cryptococcus humicolus* UJ1 を土壌から単離した。本酵母は、D-アスパラギン酸を唯一の窒素源として生育させた場合にのみ D-アスパラギン酸酸化酵素を多量に誘導合成し、L-アスパラギン酸や D-グルタミン酸を窒素源とした場合には合成しないことから、本酵母において D-アスパラギン酸の構造を認識する発現制御機構が存在すると考えられた。

現在、D-アミノ酸による遺伝子の転写誘導機構に関する知見は非常に乏しいことから、本酵母における D-アスパラギン酸酸化酵素の発現制御機構を解明することは、多くの生物に存在する未知なる生命現象に、新たな知見を与える可能性があると考えられる。当研究室ではこの機構を解明するために本酵母における宿主-ベクター系の構築を検討している。現在までに、ベクターとして選択マーカーのオロチジン 5'-リン酸脱炭酸酵素遺伝子 (*URA3* 遺伝子) を有する染色体組込み型ベクター pICUG を構築し、宿主として UJ1 の染色体 DNA の *URA3* 遺伝子に変異をかけたウラシル栄養要求性変異株である *C. humicolus* UM3 株を取得して、染色体 DNA 組込みによる形質転換系を開発している。この系では、ベクターを宿主へ導入する際に、切断して線状にする必要があること、宿主へ導入したベクターが宿主染色体 DNA に組込まれるため、宿主からのベクター回収が困難であるなどの欠点を有している。

本研究では、本酵母の染色体 DNA から複製開始起点として機能する自律複製配列 (*ARS*: Autonomously Replicating Sequence) を単離し、pICUG へ挿入することで、自律複製型ベクターの構築を検討する。この *ARS* を有する自律複製型ベクターは宿主へ環状のまま導入することが可能で、宿主内において染色体 DNA から独立して存在することができるため、宿主からの回収が容易であるなどの特徴を有する。また、形質転換効率が高いという特徴も有する。

実験と結果

本酵母の *ARS* を単離するために、UJ1 部分染色体 DNA ライブラリーの構築を検討した。UJ1 株染色体 DNA を制限酵素で切断し、1 kbp ~ 6 kbp の染色体 DNA 断片を pICUG と連結した後、大腸菌へ導入したところ、約 26 万個の大腸菌形質転換体コロ

ニーが得られた (Table 1)。ライブラリーの構築に用いた制限酵素は、*EcoR* /*Hind* の組み合わせと、*EcoR* /*Kpn* の組み合わせの 2 種類を検討した。*EcoR* /*Hind* を用いて構築したライブラリーを EH プラスミドライブラリー、*EcoR* /*Kpn* を用いて構築したライブラリーを EK プラスミドライブラリーとする。

UJ1 部分染色体 DNA ライブラリーの構築を確認するため、EH プラスミドライブラリーおよび EK プラスミドライブラリーにより得られたコロニーを無作為に選択してプラスミドを回収し、構築に用いた制限酵素で切断してアガロースゲル電気泳動解析した。その結果、pICUG のバンドと組込まれた染色体 DNA 断片のバンドが観察された。このことから pICUG への染色体 DNA 断片の組込みが明らかとなり、本酵母の部分染色体 DNA ライブラリーの構築が確認された (Fig. 1)。

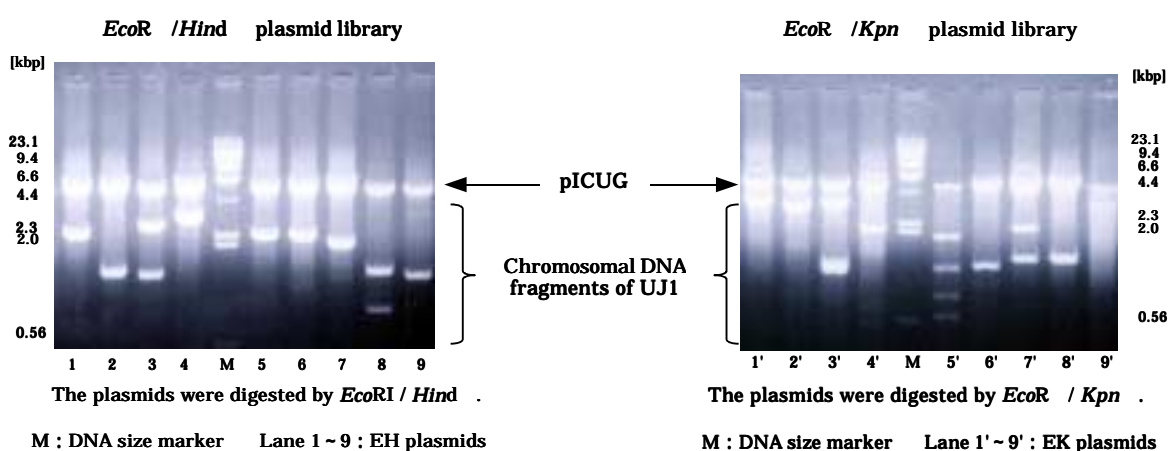


Fig. 1 構築した UJ1 部分染色体 DNA ライブラリーのアガロースゲル電気泳動解析

構築した UJ1 部分染色体 DNA ライブラリーから ARS を有する可能性の高いプラスミドを選抜するために、ライブラリーを UM3 株へ導入することによる選抜を 2 回行ったところ、ARS を有する可能性の高いプラスミドを保持する可能性のある UM3 株形質転換体を得られた (Table 2)。

Table 2 EH プラスミドライブラリーおよび EK プラスミドライブラリーの UM3 株形質転換効率

Plasmid	No. of transformants μg^{-1} DNA	
	1st transformation [†]	2nd transformation ^{††}
pICUG	0.0	0.0
EH Plasmids	2.2	1.8
EK Plasmids	1.5	1.5

[†] The mean for 23 independent experiments.

^{††} The mean for 10 independent experiments.

得られた UM3 株形質転換体が保持するプラスミドの染色体 DNA 断片を解析するため、得られた UM3 株形質転換体からプラスミドを回収し、構築に用いた制限酵素で切断してアガロースゲル電気泳動解析したところ、異なる染色体 DNA 断片を有する少なくとも 10 種のプラスミドの存在が明らかとなった (Fig. 2)。

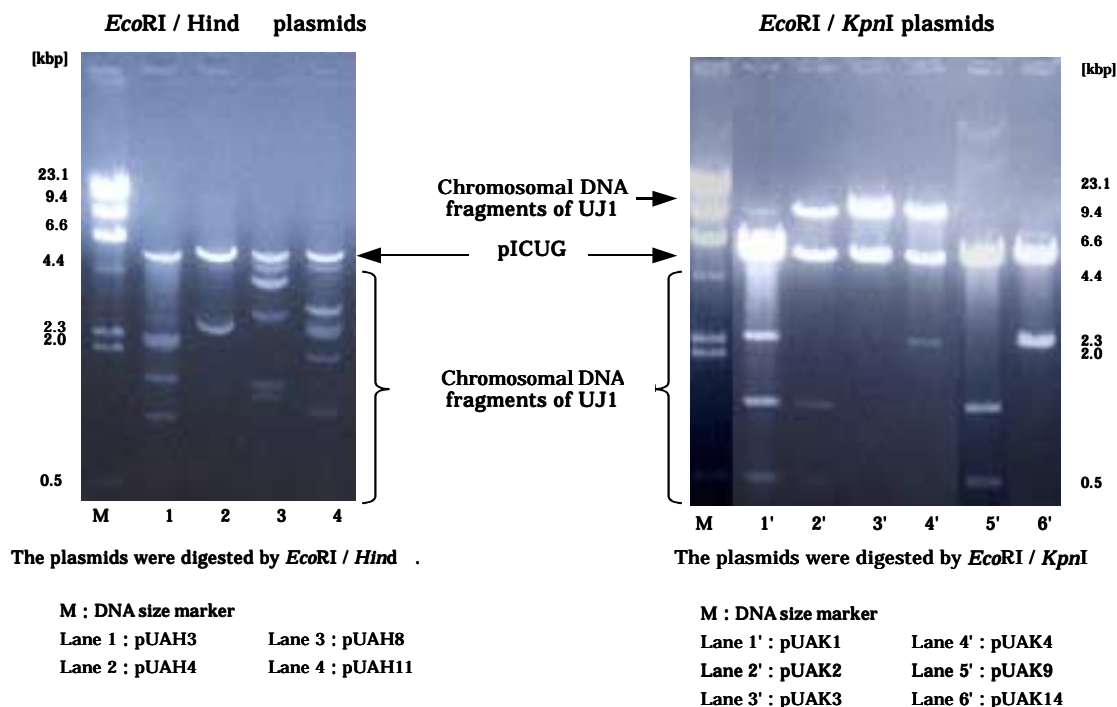


Fig. 2 選抜されたプラスミドの有する DNA 断片解析の結果、明らかになった 10 種類のプラスミド

この 10 種のプラスミドから、さらに ARS を含む可能性の高いプラスミドを選抜するために、それぞれのプラスミドの UM3 株形質転換効率を評価した。その結果、pUAH11 と名付けたプラスミドの形質転換効率が最も高く、この pUAH11 の持つ染色体 DNA 断片に ARS が存在することが示唆された (Table 3)。

Table 3 10 種類のプラスミドの UM3 株形質転換効率

Plasmid	No. of transformants μg^{-1} DNA [†]
pICUG	0.0
pUAH 3	1.0
pUAH 4	3.0
pUAH 8	1.5
pUAH 11	17.0
pUAK 1	2.0
pUAK 2	7.5
pUAK 3	8.0
pUAK 4	5.5
pUAK 9	5.5
pUAK 14	5.5

[†] The results are the mean for two indepent experiments.

得られた pUAH11 の宿主内における存在形態を明らかにするために、pUAH11 による UM3 株形質転換体の全 DNA を調製して、サザンプロット解析を行った。その結果、pUAH11 のものと思われるバンドが宿主染色体 DNA のバンドから離れた位置に観察され、宿主内で pUAH11 が染色体 DNA 外に存在していることが示唆された (Fig. 3)。

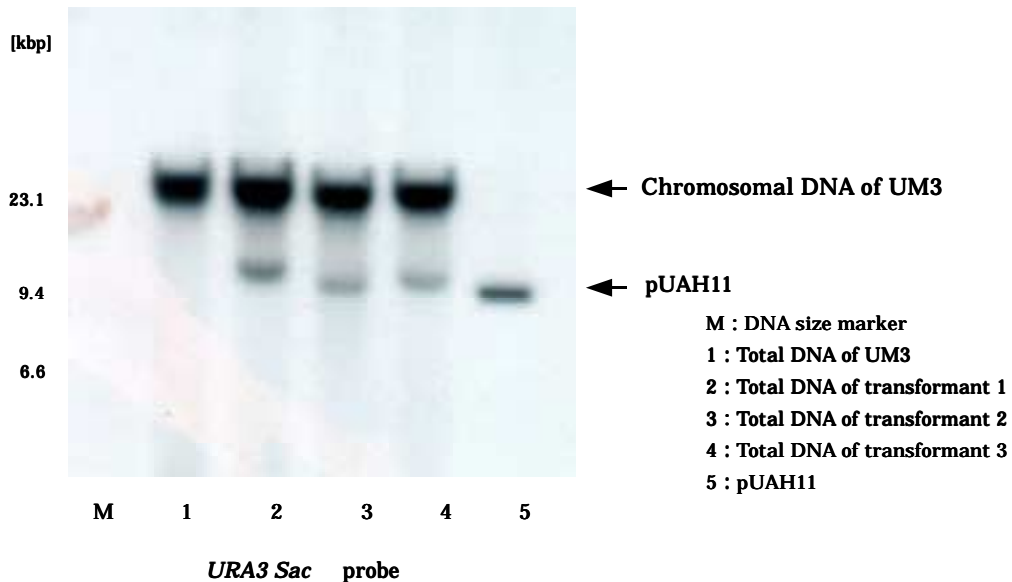


Fig. 3 pUAH11 による UM3 株形質転換体の全 DNA に対するサザンプロット解析

pUAH11 が有する染色体 DNA 断片を解析するため、pUAH11 を制限酵素 *EcoR* /*Hind* で切断したもの、*EcoR* のみで切断したもの、*Hind* のみで切断したものをアガロース電気泳動解析した。その結果、レーン 1 の *EcoR* /*Hind* で切断した pUAH11 のバンドパターンから、pUAH11 には、
 ,
 ,
 ,
 の 5 つの DNA 断片からなる全長約 7.8 kbp の UJ1 染色体 DNA 断片が存在することが明らかとなった (Fig. 4)。また、このアガロースゲル電気泳動解析結果をもとに、pUAH11 が有する染色体 DNA 断片の制限酵素地図を作成したところ、観察された 5 つの DNA 断片は Fig. 5 のように存在することが明らかとなった (Fig. 5)。

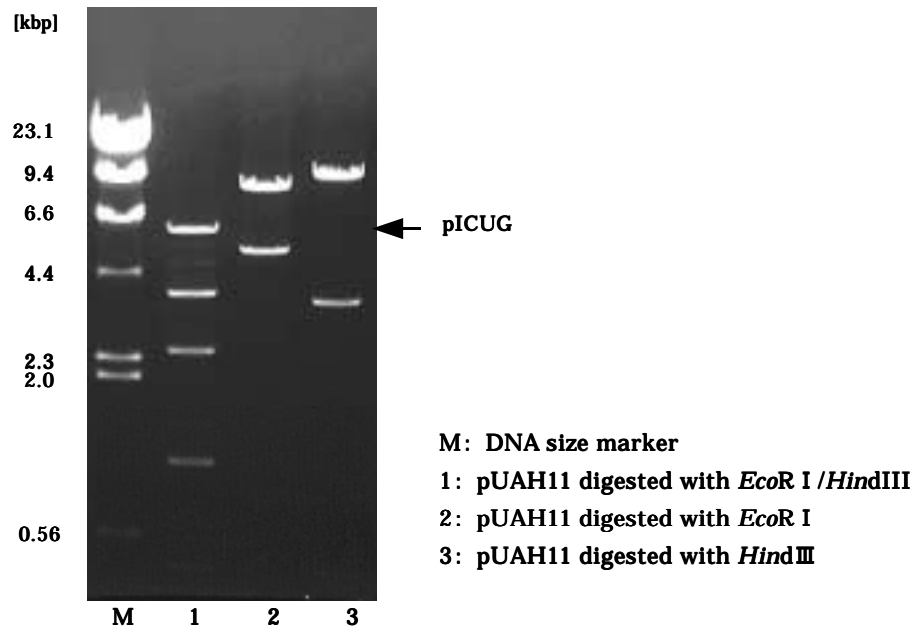


Fig. 4 pUAH11 が有する UJ1 株染色体 DNA 断片の電気泳動解析

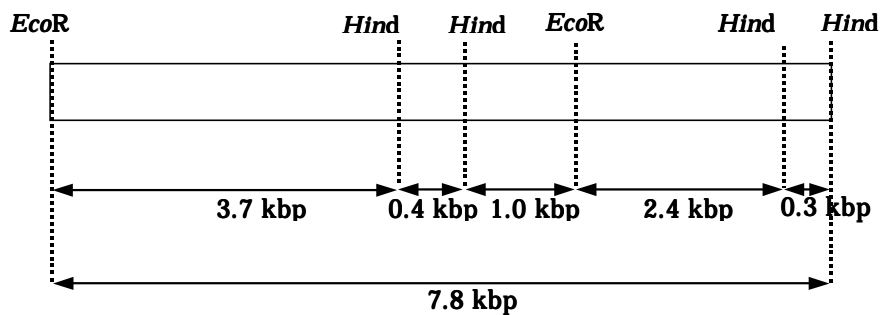


Fig. 5 pUAH11 が含む 5 つの DNA 断片

pUAH11 が有する染色体 DNA 断片のどの領域に ARS が存在するのか明らかにするため、*EcoR*、*Hind*III、*Hind*III、*EcoR*、*Hind*III の 5 つの DNA 断片をそれぞれ pICUG に組み込み、UM3 株形質転換効率を評価した。その結果、pUA3 と名付けたプラスミドの形質転換効率が最も高く、この pUA3 が有する 1 kbp の染色体 DNA 断片に ARS が存在することが示唆された。pUA3 の形質転換効率は、他の酵母における自律複製型ベクターの効率と比較して非常に低いことから、形質転換条件等の最適化の検討が必要であることを示唆した (Table 4)。

Table 5 ~ の各 UJ1 株染色体 DNA 断片を有する
プラスミドの UM3 株形質転換効率

Plasmid	No. of transformants μg^{-1} DNA [†]
pICUG	0.0
pUAH 11	2.2
pUA1	0.8
pUA2	1.1
pUA3	12.6
pUA4	0.0
pUA5	0.3

[†] The results are the mean for two independent experiments.

総括

- (1) 酵母 *C. humnclus* UJ1 の部分染色体 DNA ライブラリーを構築し、UM3 株へ導入したところ多くの形質転換体を得られた。
- (2) UM3 株形質転換体から ARS を有すると推測される 10 種類のプラスミドを単離し、それぞれのプラスミドの形質転換効率を解析したところ、pUAH11 と名付けたプラスミドが最も高い形質転換効率 (17 transformants / μg DNA) を示した。
- (3) サザンプロット解析から pUAH11 が宿主の染色体から独立して存在している事が示唆され、このプラスミドは 5 つの DNA 断片からなる、全長約 7.8 kbp の UJ1 株染色体 DNA 断片を有していた。
- (4) 7.8 kbp の染色体 DNA 断片内の 1 kbp の配列に、ARS の機能が存在することが示唆された。
- (5) 1 kbp の染色体 DNA 断片を有する pUA3 の UM3 株形質転換効率は、他の酵母における自律複製ベクターと比較して低かった。