

2009年 生物工学奨励賞（斎藤賞）受賞



出芽酵母におけるゲノム工学技術の
開発と応用

杉山 峰崇



Development of genome-engineering technology and its application
to genome science and biotechnology in *Saccharomyces cerevisiae*

Minetaka Sugiyama (Department of Biotechnology, Graduate school of Engineering, Osaka University,
2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871) *Seibutsu-kogaku* **88**: 54-59, 2010.

20世紀後半に組換えDNA技術が確立されて以来、個々の遺伝子进行操作するためのさまざまな手法が開発されてきた。そのおかげで、遺伝子の機能は急速に明らかとなってきており、それらを通じて生命を工学することが可能となったのは周知のごとくである。しかし、遺伝子进行操作する時代からゲノム进行操作する時代へと移りつつある今、著者らは、生命を工学するための次世代基盤技術として、ゲノムを自在に操作・改変するゲノム工学技術が重要になろうと考えた。そこで、産業上も重要であり、真核細胞のモデルでもある出芽酵母を材料に、数年前からその開発に力を注いできた。

本稿では、はじめに新しいゲノム工学技術の開発として、著者らが独自に発展させてきた染色体の分断技術についてそのアイデアとともに解説する。そして、染色体分断技術を用いたゲノムサイエンスとバイオテクノロジーへのアプローチとして、著者らが取り組んできた4つの研究について紹介したい¹⁻⁴⁾。

ゲノム工学のキーテクノロジー：染色体の分断技術

ゲノム工学は、染色体の大領域の欠失や置換などさまざまな操作を可能とすることから、特に全塩基配列が先行して明らかとなっているポストゲノム時代において、ゲノムの機能解析に強力かつ有効なアプローチを提供する¹⁵⁻¹⁷⁾。それゆえ、シンプルかつ効果的なゲノム工学技

術の開発が、ますます必要となってきた。

著者らは、染色体を任意の位置で物理的に分断するというシンプルな操作がゲノム工学のキーテクノロジーになると考えた。染色体の分断は、任意の部位で染色体を2つに切断するが、切断後もどちらとも染色体として機能させる技術である。分断後は、特定領域の削除だけでなく、他の染色体との融合や他細胞への移植などさまざまな操作を容易にする。さらに、染色体の分断技術は、酵母人工染色体(YAC)にクローン化された動・植物染色体にも適用可能である。したがって、酵母を細胞工場とした高等生物染色体の自在な操作も可能となる。

一方、著者らは、染色体の分断技術を用いると、これまでのゲノム工学技術では難しかった大規模なゲノムの再編、すなわち一挙に多様なゲノム組成を持つ細胞を作り出すことも可能ではないかと考えた。

生命を形作るにはどのような遺伝子が必要であるかは、しばしば最少ゲノムという言葉で表現されるバイオサイエンスにおける最も根源的な問いの1つである。一方、特定の物質生産に最適な株をどのように育種するかということは、バイオテクノロジーにおける基本的な課題の1つとして挙げられる。たとえば、生産性向上のため、酵母の場合、変異処理、交雑、細胞融合や遺伝子導入などさまざまな方法が用いられてきた。しかし、ゲノムを大規模に操作する時代に移りつつある今、ゲノム工

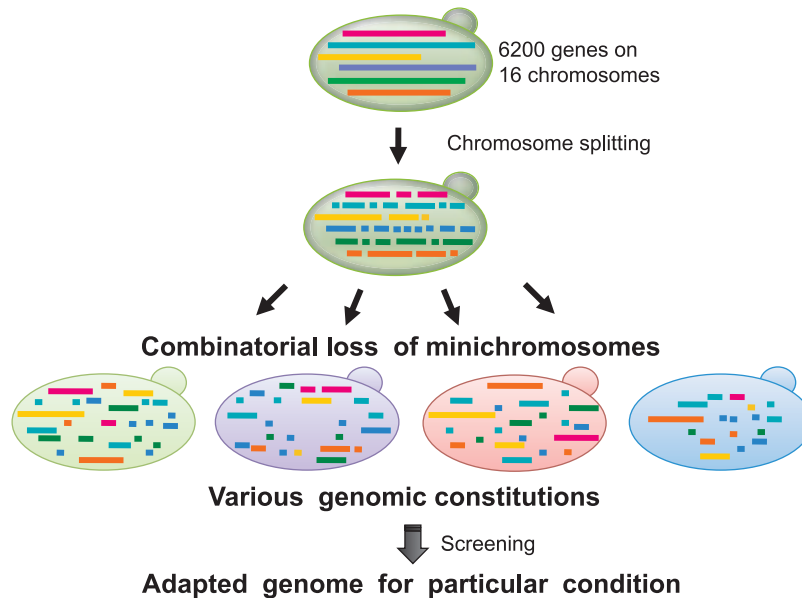


図1. 染色体の分断技術を利用したゲノムの再構成. 本文参照.

学的手法により、物質生産により適したゲノム組成や最少ゲノムに対する答えを導くことも、今までにない新たな可能性をもたらすのではないだろうか。つまり、著者らのアイデアは以下のようなことである（図1）。16本の染色体に合計約6200個の遺伝子を持っている一倍体の酵母細胞を対象にして、染色体の分断を行い、多数のミニ染色体を作製する。非常に興味深いことに、酵母では、50 kb以下のミニ染色体は不安定であり、細胞分裂時に高頻度で脱落してしまうことが報告されている¹⁸⁻²⁰。したがって、分断後培養を行えば、さまざまな組み合わせでのミニ染色体の脱落が誘導され、多様なゲノム組成を持つ細胞の導出が期待される。たとえば、たった20個の脱落可能なミニ染色体でも、その脱落の組み合わせは、約100万通りにもなり、これまでの育種技術によってはなし得なかった多様な組み合わせの多重変異株を創製できる道が拓けることになる。物質の生産性でスクリーニングすることができれば、より高い生産性を示すゲノム組成を見いだすことも可能となる。また、ミニ染色体の脱落により、培養した条件での最少ゲノム組成について重要な知見を与えることも可能となろう。

このようなゲノム工学技術は、少なくともこれまでになかった技術であるので、革新的な育種技術という観点からだけでなく、ゲノムの機能解析においても新しい事実を発見できるのではないかと考えた。そこで、ゲノムを自在に改変するためのキーとなる技術として、操作が容易で効率の良い染色体分断技術の確立に取りかかった。

PCR-mediated Chromosome Splitting (PCS) 法

染色体には、染色体として機能するために3つの配列が必要である。1つ目は、染色体を複製させるための自立複製配列（ARS）、2つ目は、複製された姉妹染色体を均等に分配するためにスピンドルが結合するためのセントロメア、そして、3つ目は、染色体の末端複製の問題を解決するためのテロメア配列である。したがって、染色体の分断によって新しく生成した染色体もこれら3つの配列を具備していなければならない。これら3つの配列を導入し、さらに簡便で効率の良い染色体分断法を確立するために、さまざまな経緯や困難があったが、紙面が限られているので、ここでは割愛させていただき、最終バージョンのみ解説させていただくことにする。

上記の3つの配列の必要性を念頭におきつつ、操作がシンプルで非常に効率が高く、しかも何度でも繰り返し分断を可能とする新しい染色体分断方法 PCR-mediated chromosome splitting (PCS) 法を確立した（図2）⁷。PCS法は、セントロメアおよび分断株を選択するための選択マーカーを2ステップのPCRで調製し、酵母に導入する簡単な方法である。操作はこれだけであるが、分断効率は80%以上を達成した。

操作を簡単に説明すると、1回目のPCRで、分断のための標的配列となる約400 bpのDNA断片を2つ調製する。次に、2回目のPCRで、テトラヒメナ由来の36 bpのテロメア配列（5'-(CCCCAA)₆-3'）と選択マーカーからなるDNA断片、あるいは、5'-(CCCCAA)₆-3'とセントロメアからなるDNA断片と1回目のPCRで調製した標的配

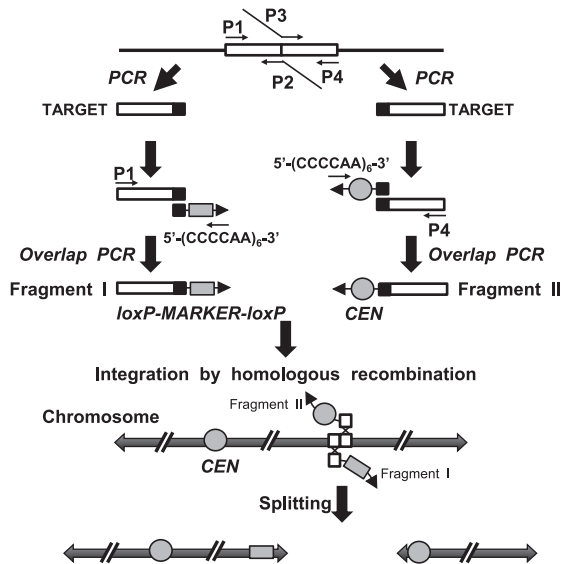


図2. PCS法. プライマー P1 (20 mer), P2 (オーバーラップ配列 30 mer + 20 mer), P3 (オーバーラップ配列 30 mer + 20 mer), P4 (20 mer) を用いて1回目のPCRで30 bpのオーバーラップ配列 (黒塗り四角) が付与された標的配列 (TARGET, 400 bp) をそれぞれ増幅する. 次に, あらかじめ調製しておいた, 5'-(CCCCAA)₆-3' (黒塗り矢印) とオーバーラップ配列 (黒塗り四角) を両端に持つ選択マーカー (*loxP*-MARKER-*loxP*, 灰色長方形) およびセントロメア (*CEN*, 灰色丸) と, 1回目に増幅した標的配列を用いてオーバーラップPCRを行い, 染色体分断に必要な2つの断片 (fragment I と II) を調製する. その後, 調製した2つの断片を同時に酵母細胞に導入すると, 標的配列で相同組換えが起こり, 染色体が分断される.

列をオーバーラップPCRで融合し, 図2中の fragment I と II を調製する. 5'-(CCCCAA)₆-3' は, 酵母細胞内でテロメア形成の核となりうるので²¹⁾, テロメア配列を *in vitro* で調製することなしに, この 36 bp の配列を利用して分断部位での新規のテロメア形成が可能となった. そして, 得られた fragment I と II を同時に酵母細胞に導入し, マーカーで形質転換体を選択すると, 標的配列で相同組換えが起こり, 期待通りに任意の部位で染色体の分断が起こった株が得られるという算段である. また, 繰り返し分断可能となるように, 選択マーカーに Cre/*loxP* システムを導入した²²⁾. *loxP* 配列に挟まれた選択マーカーは, Cre 組換え酵素を発現させることによって分断染色体から除去できる. こうして, 選択マーカーを再利用することにより何度でも分断可能となった.

実際, PCS法を用いて 230 kb と出芽酵母の中で最も短い染色体である第1番染色体を5つの染色体に連続的に分断し, 巨大な染色体を電気泳動で分離できるパルスフィールドゲル電気泳動解析で確認した結果 (図3a), 第1番染色体が合計5つの染色体に分断されており, 分断された染色体は染色体として機能していることがわかった. また, PCS法を用いて 575 kb の第5番染色体を9つの染色体に分断することを試みたが, 平均90%程度の高

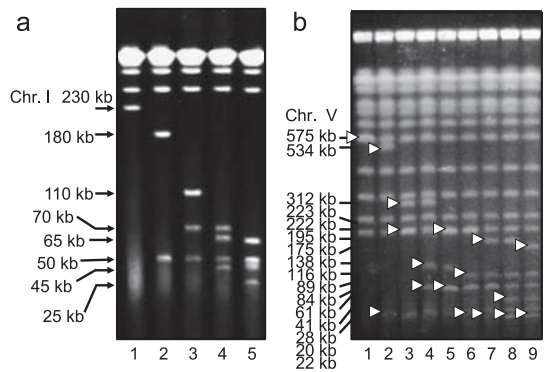


図3. パルスフィールドゲル電気泳動解析. レーン番号は生成された分断染色体の数を示す. (a) 第1番染色体 (Chr. I) の5回連続分断. 第1番染色体が左端から順番に, 2つ, 3つ, 4つ, 5つの染色体に変化されていることがわかる. レーン5では, 2つの45 kb分断染色体が重なっている. (b) 第5番染色体 (Chr. V) の9回連続分断. 矢印は新しく生成した分断染色体を示す.

い分断効率を維持したまま, 選択マーカーを再利用しつつ連続的に分断することが可能であった (図3b). これらの結果から, PCS法では分断後も新しい染色体として正常に挙動できること, 分断効率が高いこと, 分断を繰返し行えることがわかり, PCS法はシンプルかつ高効率の染色体分断方法であることがわかった.

さらに, ARS 配列が存在しない染色体領域を分断によって操作できるように, ARS 配列を PCS法に取り込んだ方法も開発した^{3,4)}. YACにクローン化された動・植物染色体は, 通常, 酵母細胞内でARS活性を示す配列を含んでいない. したがって, この方法は, YACにクローン化された動・植物染色体の詳細なマッピングや機能解析に向けた操作にも有効であり, 実際, シロイヌナズナ DNA を含む YAC のどのような領域でも, 染色体分断によって新しく YAC として機能させることを示すことができた.

染色体分断技術のゲノムサイエンスとバイオテクノロジーへの応用

次に, 開発した染色体分断法を用いたゲノムサイエンスとバイオテクノロジーへの応用の取り組みとして, 1) 有用形質の遺伝的基盤解析への染色体分断技術の応用: Chromosome shuffling, 2) 染色体の分断によるゲノムの再構成への展開, 3) 染色体構造と細胞生理の解析: リボソーム DNA クラスターのみからなる染色体の構築, 4) ワンステップ染色体欠失導入への応用について紹介したい.

1) 有用形質の遺伝的基盤解析への染色体分断技術の応用: **Chromosome shuffling** エタノール耐性や高温耐性など酵母の有用形質の多くは, 多数の遺伝子に

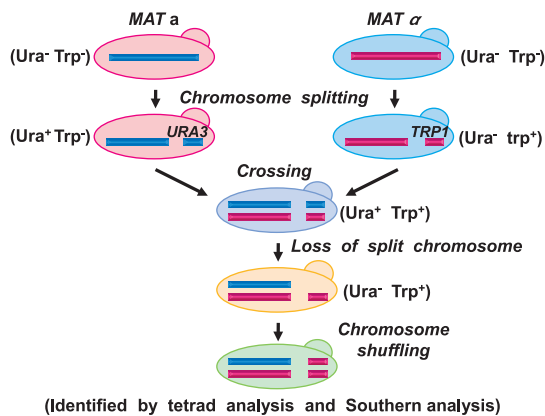


図4. Chromosome shuffling法. 本文参照.

よって支配されていることが知られているが、このような多因子形質を解析するためのゲノム工学的アプローチは限られている²³⁾。そこで、多因子によって支配されている有用形質について、相反する形質を示す2つの酵母株の特定の(同一の)染色体領域の置換を行った後、表現型を解析することにより、有用形質の遺伝的基盤を染色体のレベルで効率良く解析することができる chromosome shuffling という方法を考案した(図4)¹¹⁾。簡単に説明すると、形質の違う a 型と α 型酵母の同一の染色体部位を分断して、*URA3* や *TRP1* などマークしておく。その後、これらを交雑し、得られた二倍体を培養することによって、どちらかのミニ染色体の脱落を誘導する。興味深いことに、この段階で、ミニ染色体について、ヘミザイガスな状態からホモザイガスな状態に自発的に回復する細胞が出現してくるのを見いだし、このような株は、四分子分析やサザン解析で見分けることが可能である。このような株は、特定の染色体領域だけが片親由来のものだけから成るハイブリッドであるので、このハイブリッドの表現型を評価・解析することにより、形質に重要な遺伝子の絞り込みが可能となる。したがって、この方法により、有用形質の遺伝的基盤をサブクロモソームレベルで解析することが可能となった。

2) 染色体の分断によるゲノムの再構成への展開

次に、前述したゲノムの再構成について(図1)、染色体の分断とその後のミニ染色体の脱落により、本当に多様なゲノム組成を持つ細胞が一挙に創出できるかどうかをモデル実験で調べた。

一倍体酵母細胞において、大きさが50 kb以下の7つのミニ染色体をPCS法で作製した。この7つのミニ染色体は、遺伝子をそれぞれ20個弱含んでいるが、それらの中には単独遺伝子破壊で致死性を示す必須遺伝子は含まれていないことから脱落可能と予想される。これら7つのミニ染色体の脱落可能な組み合わせは、理論的には128

通り考えられる。そこで、この株を栄養培地で培養した後、平板培地に塗布して128コロニーをピックアップし、これら7つのミニ染色体が脱落しているかどうかを解析した(論文準備中)。

その結果、まったく新しい19種のゲノム組成を持つ株が得られた。一方、理論値よりも得られたゲノム組成の種類が少なかった理由として、脱落が観察されないミニ染色体も存在した。したがって、それらのミニ染色体の脱落は致死となることが疑われ、単独欠失では致死とはならないが、多重欠失で致死性を示す合成致死遺伝子の存在も示唆された。いずれにしても、染色体の分断と脱落により、予想したような多様なゲノム組成を創り出すことが実際に証明できた。したがって、PCS法による迅速かつ高効率な染色体の分断とミニ染色体の脱落によって、これまでの育種技術によってはなし得なかった多様なゲノム組成、つまり多様な特徴を持つ細胞を一挙に創製する道が拓けた。これらの株をスクリーニングに供することによって、さまざまな目的に合わせてゲノムの再構成や進化を促進できることが示唆された。

3) 染色体構造と細胞生理の解析：リボソームDNAクラスター染色体の構築

PCS法は、さまざまな大きさや構造の染色体を持つ酵母細胞を自在に作り出せることから、染色体の構造が細胞生理に及ぼす影響を系統的に調べることが容易となった。出芽酵母のリボソームDNA(rDNA)は、第12番染色体の左端から450 kb、右端から610 kbの位置に存在するが、約9 kbのユニットが150コピータンデムに並んだ巨大なクラスターを構成しており、第12番染色体の半分以上がrDNAクラスターであるという特異な構造を示す。このようなタンデムリピート配列は、組換えによる構造変化の危機に絶えずさらされており、ゲノムの恒常性維持という観点からも興味を持たれる。

そこで、PCS法を用いて、第12番染色体をrDNAクラスターの両端で分断して、rDNAクラスターのみからなる特異的な染色体を構築し、rDNAが関与する細胞生理における第12番染色体の構造の重要性を解析した¹⁾。その結果、rDNAクラスター染色体では、野生型株では維持されているrDNAのコピー数が半分以下に減少し、rDNAが局在する核小体の形態が異常となること、および、老化を引き起こすと考えられている extra chromosomal rDNA circles が蓄積し寿命も低下した。これらのことから、第12番染色体上におけるrDNAクラスターの左右の構造がrDNAの正常な機能発現に重要であることが明らかとなった。

4) ワンステップ染色体欠失導入への応用 出芽酵母は単細胞の真核生物であり、ゲノムの全塩基配列も決

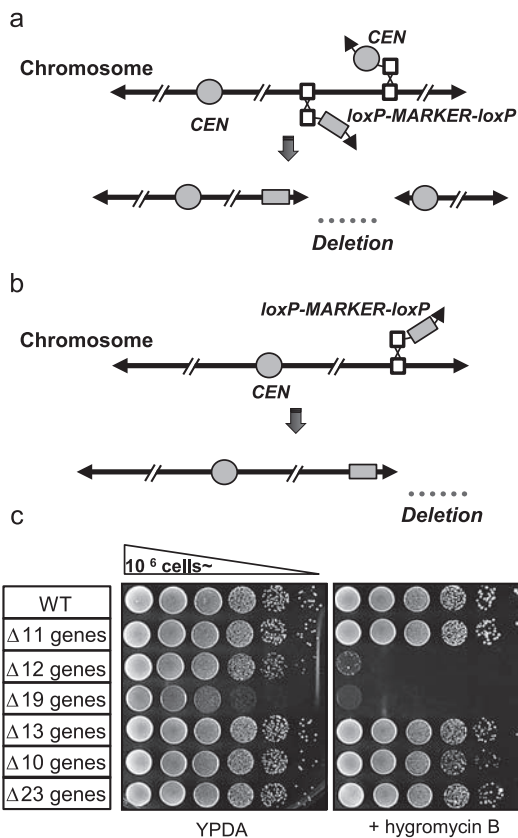


図5. PCD法。(a) 染色体の内部領域への欠失導入。(b) 染色体の末端領域への欠失導入。本文参照。(c) 欠失株の生育。栄養培地 (YPDA) とハイグロマイシン添加培地 (100 μg/ml) に左端から10⁶個の細胞を順次10倍希釈してスポットし、30°Cで生育させた。WT, 野生型株; 以下, それぞれの株名は欠失した遺伝子数を示す。Δ23 genesは、Δ13 genesとΔ10 genesの欠失領域を併せ持つ株として作製された。

定されていることから、細胞が生命を維持していくための必要な最少遺伝子セットを調べるモデル生物として非常に魅力的である。一倍体出芽酵母は約6200個の遺伝子を持つが、その80%以上は非必須遺伝子であることから、少なくとも研究室の環境下において、生命維持機能とは切り離すことが可能な遺伝子が多数存在することが示唆される²⁴⁾。そこで、簡便に染色体に大きな欠失を導入することができれば、最少ゲノムの研究やゲノムの機能解析をさらに促進できるのではと考え、PCS法を応用することによって、染色体の任意の領域にワンステップで大規模欠失を導入できるPCR-mediated chromosomal deletion (PCD) 法を開発した⁸⁾。

染色体の内部領域の場合、PCS法と同様の2つのDNA断片をPCRで調製し、図5aのように欠失させたい領域の外側に導入すれば、その内部領域はテロメアもセントロメアも持たないことから欠失できると考えた。また、染色体の末端領域の場合、図5bのように選択マーカーを持つ1つのDNA断片のみの導入で欠失可能である

うと考えた。

このアイデアを確かめるために、40 kb 程度までの大きさで、それぞれ遺伝子を10個から19個含むが、必須遺伝子を含まない4つの内部領域と2つの末端領域を一倍体細胞で欠失させた。形質転換体を取得後、それぞれ7株以上についてパルスフィールドゲル電気泳動と欠失領域をプローブとしたサザン解析を行った結果、6つの領域中、5つの領域において70%以上の効率で期待通りの欠失を導入できることがわかった。欠失を導入できなかった1つの領域 (14個の非必須遺伝子を含む第13番染色体の中央領域31 kb) についても、その後の解析から、一倍体酵母の生存に必須な領域であることが明らかとなった⁸⁾。一倍体細胞において、このようにワンステップで効率良く染色体の内部に大きな欠失を導入できる方法はこれまでに報告されていない。

次に、このようにして作製した欠失株の生育を調べたところ (図5c)、大変興味深いことに、19個の遺伝子が削除された株を除いて、栄養培地 (YPDA) で野生型株と遜色のない生育を示した。このことから、欠失した遺伝子群は少なくとも研究室条件下では生存にまったく必要ないことが明らかとなった。一方、12個の遺伝子が削除された株はタンパク質合成の阻害剤であるハイグロマイシンに強い感受性を示した。しかし、この感受性は、これら12個の遺伝子の単独破壊株では見られなかったことから、欠失した12個の遺伝子の中に機能重複した遺伝子の存在が明らかとなった。これらのことから、PCD法は、最少ゲノムへ向けたゲノムの特定領域の要不要、および、その領域に含まれる遺伝子群の機能重複や合成致死などの遺伝学的相互作用を迅速にサーベイできる有用なツールとなることが示された。

おわりに

本研究では、出芽酵母における染色体の分断技術PCS法を開発し、それを基盤として、これまでは困難であったサブクロモソームレベルでの有用形質の遺伝的基盤解析、ゲノムの大規模な再構成、染色体構造と細胞生理の解析、および染色体への簡便な欠失導入などを可能とする新しいゲノム工学技術への道を拓いた。さらに、PCS法はYACにクローン化された動・植物染色体にも適用できることから、酵母を細胞工場として、高等生物染色体の機能解析にも貢献することも可能となった。特に、染色体の分断とミニ染色体の脱落を利用すると、これまでの育種技術によってはなし得なかった多様なゲノム組成、すなわち多様な特徴を持つ多重欠失株を一挙に作り出すことが可能となった。実際、著者らはPCS法を用いたゲノムの大規模改変によってエタノールやグリセロール

ルの生産量が向上した株を見いだしていることから⁶⁾、染色体の分断技術を用いたゲノム工学的手法から得られる情報は、今後、育種における最適なゲノムの構築に重要な貢献をするであろう。

一方、ミニ染色体の脱落を人為的に制御することが可能となれば、さらに染色体分断技術の利用範囲は広がる。ミニ染色体を安定化させる方法として、ヘテロクロマチン形成に参与する Sir タンパク質と相互作用のある Zds1p や Zds2p を過剰発現する方法が報告されているが²⁵⁾、著者らも独自に、ミニ染色体の安定性を強化する遺伝子を見いだしており(論文準備中)、その機構解明とミニ染色体の安定化制御への応用に興味が持たれる。加えて、なぜミニ染色体が不安定なのかは未だ明らかとなっておらず、ミニ染色体の脱落制御技術の開発を目指して、その機構の解明にも挑戦している。

科学の飛躍的な進展には、必ず基盤的な技術の発展があったと言っても過言ではない。著者らはゲノムの自在な操作技術が、今後のバイオサイエンス、バイオテクノロジーにおける基盤技術のひとつになるものと考えており、その発展に努力していきたい。

本研究は、大阪大学大学院工学研究科 生命先端工学専攻(旧 応用生物工学専攻)ゲノム機能工学領域で行われた研究であり、多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました原島 俊教授に心よりお礼申し上げます。同時に、本研究を行うにあたりご助言、ご助力くださいました同研究室の金子嘉信准教授、慶應義塾大学医学部の西沢正文先生に深謝致します。また、一緒に研究を行った KimYeon Hee 先生(現・韓国 Dong-Eui 大学)、山岸一雄さん(現・味の素)、生嶋茂仁さん(現・キリンホールディングス)、中澤利雅さん(現・白鶴酒造)、技術員であった池田真知子さん、および、谷河真理映さん(現・森永乳業)に感謝申し上げます。彼らと出会うことがなければ、このような賞は到底頂くことができなかつたと思います。この他にも、向由起夫先生(現・長浜バイオ大学)、中村 純先生(広島大学)、隅谷孝洋先生(広島大学)、村上紀里子さん(現・ネオモルガン研究所)、および、原島研究室の学生諸氏に感謝の意を表します。

本研究の一部は、新エネルギー・産業技術総合開発機構、文部科学省、および千里ライフサイエンス振興財団から助成を受けて行われました。

文 献

- 1) Kim, Y. H., Ishikawa, D., Ha, H. P., Sugiyama, M., Kaneko, Y., and Harashima, S.: *Nucleic Acids Res.*, **34**, 2914–2924 (2006).
- 2) Kim, Y. H., Kaneko, Y., Fukui, K., Kobayashi, A., and Harashima, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 55–60 (2005).
- 3) Kim, Y. H., Sugiyama, M., Kaneko, Y., Fukui, K., Kobayashi, A., and Harashima, S.: *Methods Mol. Biol.*, **349**, 103–115 (2006).
- 4) Kim, Y. H., Sugiyama, M., Yamagishi, K., Kaneko, Y., Fukui, K., Kobayashi, A., and Harashima, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **69**, 65–70 (2005).
- 5) Mizukami, A., Nagamori, E., Takakura, Y., Matsunaga, S., Kaneko, Y., Kajiyama, S., Harashima, S., Kobayashi, A., and Fukui, K.: *Biotechniques*, **35**, 734–740 (2003).
- 6) Murakami, K., Tao, E., Ito, Y., Sugiyama, M., Kaneko, Y., Harashima, S., Sumiya, T., Nakamura, A., and Nishizawa, M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 589–597 (2007).
- 7) Sugiyama, M., Ikushima, S., Nakazawa, T., Kaneko, Y., and Harashima, S.: *Biotechniques*, **38**, 909–914 (2005).
- 8) Sugiyama, M., Nakazawa, T., Murakami, K., Sumiya, T., Nakamura, A., Kaneko, Y., Nishizawa, M., and Harashima, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **80**, 545–553 (2008).
- 9) Sugiyama, M., Nishizawa, M., Hayashi, K., Kaneko, Y., Fukui, K., Kobayashi, A., and Harashima, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **96**, 397–400 (2003).
- 10) Sugiyama, M., Yamagishi, K., Kim, Y. H., Kaneko, Y., Nishizawa, M., and Harashima, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **84**, 1045–1052 (2009).
- 11) Sugiyama, M., Yamamoto, E., Mukai, Y., Kaneko, Y., Nishizawa, M., and Harashima, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **72**, 947–952 (2006).
- 12) Widiyanto, D., Yamamoto, E., Sugiyama, M., Mukai, Y., Kaneko, Y., Oshima, Y., Nishizawa, M., and Harashima, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **95**, 89–94 (2003).
- 13) Yamagishi, K., Sugiyama, M., Kaneko, Y., and Harashima, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **79**, 699–706 (2008).
- 14) Yamagishi, K., Sugiyama, M., Kaneko, Y., Nishizawa, M., and Harashima, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 563–567 (2008).
- 15) Giga-Hama, Y., Tohda, H., Takegawa, K., and Kumagai, H.: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **46**, 147–155 (2007).
- 16) Kouprina, N. and Larionov, V.: *Nat. Rev. Genet.*, **7**, 805–812 (2006).
- 17) Storici, F., Lewis, L. K., and Resnick, M. A.: *Nat. Biotechnol.*, **19**, 773–776 (2001).
- 18) Hieter, P., Mann, C., Snyder, M., and Davis, R. W.: *Cell*, **40**, 381–392 (1985).
- 19) Murray, A. W., Schultes, N. P., and Szostak, J. W.: *Cell*, **45**, 529–536 (1986).
- 20) Surosky, R. T., Newlon, C. S., and Tye, B.-K.: 1986. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **83**, 414–418 (1986).
- 21) Murray, A. W., Claus, T. B., and Szostak, J. W.: 1988. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 4642–4650 (1988).
- 22) Gueldener, U., Heck, S., Fiedler, T., Beinhauer, J., and Hegemann, J. H.: *Nucleic Acids Res.*, **24**, 2519–2524 (1996).
- 23) Kawasaki, H. and Ouchi, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 125–130 (1994).
- 24) Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Véronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., André, B., and other 63 authors: *Nature*, **418**, 387–391 (2002).
- 25) Roy, N. and Runge, K. W.: *Chromosoma*, **108**, 146–161 (1999).