

2012年度 生物工学奨励賞（江田賞）受賞



## 清酒酵母の高発酵性に関する 遺伝学的研究

渡辺 大輔



### Genetic study of high fermentation ability of sake yeast

Daisuke Watanabe (National Research Institute of Brewing, 3-7-1 Kagamiyama, Higashihiroshima, Hiroshima 739-0046) Seibutsu-kogaku 91: 2-9, 2013.

#### はじめに

清酒酵母は、分類学上は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に属するにも関わらず、清酒もろみにおいて他の出芽酵母菌株にはない高いアルコール発酵性（発酵速度及びアルコール収量）を示す。発酵中の酵母細胞は、アルコール濃度の上昇を含む多様なストレスにさらされるため、酵母のストレス耐性を高めることによって発酵性の向上に成功した事例は複数知られている<sup>1,2)</sup>。しかしながら、発酵性の強弱がストレス耐性のみによって説明できるのかどうか、また、清酒酵母が実際に高いストレス耐性を示すのかどうか、という点については未解明であり、清酒酵母の高発酵性の原因については長い間不明のままであった。近年、代表的な清酒酵母菌株として知られるきょうかい7号（以下、K7）の全ゲノム配列が解読された<sup>3)</sup>ことにより、この高発酵性を生み出すメカニズムを遺伝子レベルで解析するための情報基盤が整備された。そこで、真核生物のモデル生物として1996年に全ゲノムが解読され、遺伝子・表現型に関する膨大な情報が集積している実験室酵母<sup>4)</sup>との比較を通して、清酒酵母の高発酵性の原因を探索することにした。

#### 清酒酵母のストレス応答欠損

筆者らはまず、発酵中における清酒酵母と実験室酵母の遺伝子発現に着目することで、両者の発酵性の差を生み出す遺伝子の候補を見いだすことができるのではないかと考えた。筆者らの研究グループでは以前に、発酵中の清酒もろみにおける清酒酵母細胞（ここでは、K7の

泡なし株であるK701）の遺伝子発現プロファイルを生み出す転写因子の候補を検索したところ、もっとも顕著な特徴として、清酒酵母では実験室酵母と比べて転写因子 *Msn2/4p* のターゲット遺伝子の発現が抑制されていることが明らかになった<sup>7)</sup>。*Msn2/4p* は出芽酵母のストレス応答において中心的な役割を果たすことが知られている転写因子であり、熱ショックや酸化ストレス、浸透圧ストレス、エタノールストレスなどのさまざまなストレスに応答して、抗酸化防御機構や炭水化物代謝に関わる因子、また、分子シャペロンなどをコードする多数のターゲット遺伝子の発現を誘導することにより細胞の生理状態をダイナミックに変化させ、ストレス環境に適応させるというメカニズムがよく研究されている<sup>8-11)</sup>。実験室酵母を用いた清酒小仕込試験では、発酵中に *Msn2/4p* のターゲット遺伝子の発現レベルが一過的に上昇することから、酵母細胞が清酒もろみという発酵環境中のストレスを感知し、そのストレスに対して適応するためのメカニズムが適切に働いていることが推測される。一方、清酒酵母ではこれらの遺伝子発現の多くが著しく抑制されており、ストレス応答に欠損を示すのではないかと予想された（図1）。

しかしながら、「アルコール発酵性の高い清酒酵母が実はストレス応答に欠損を示す」という点は従来の知見

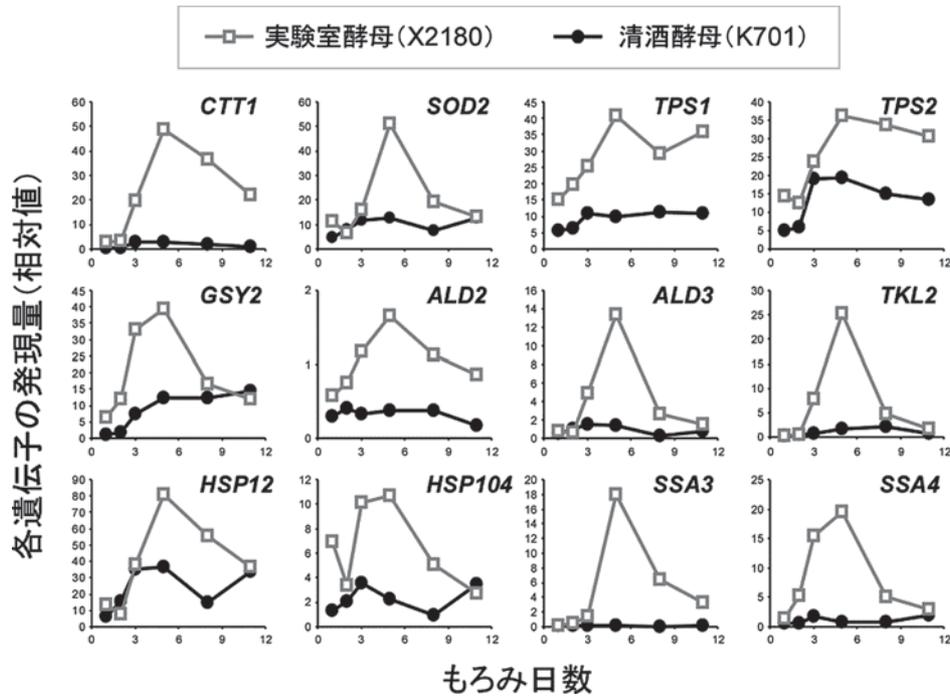


図1. 清酒もろみにおける Msn2/4p ターゲット遺伝子の発現パターン

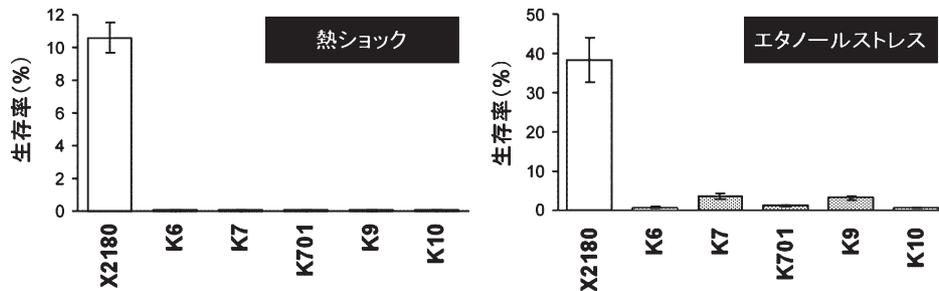


図2. 実験室酵母 (X2180) と清酒酵母 (K6, K7, K701, K9, K10) を用いたストレス耐性試験の結果. 左は定常期の細胞を 54°C で 30 分処理した後の生存率, 右は定常期の細胞を 22% エタノール溶液で 30 分処理した後の生存率を示す.

からは予想し難い結果であったため、清酒酵母と実験室酵母のストレス耐性の獲得について実際に調べてみることにした<sup>12)</sup>。K7, K701 を含む複数の清酒酵母菌株と実験室酵母 X2180 を用いて、急激な熱ショックやエタノールストレスを与えた時の生存率を測定したところ、いずれの清酒酵母菌株も実験室酵母と比べて低い値を示し、清酒酵母が十分にストレス耐性を獲得できていないことが実証された(図2)。以上の結果から、トランスクリプトーム解析の結果と矛盾することなく、清酒酵母はストレスに弱い酵母であることが明確に示された。

改めて考察してみると、清酒もろみにおいても、清酒酵母は決して高アルコール濃度の環境に適応しているわけではない。アルコール濃度の上昇に対応することがで

きないまま細胞毒性を有するアルコールを生産し続けてしまうので、清酒酵母細胞の生存率は発酵末期において徐々に低下していくことが知られている。一方、実験室酵母の場合は、酵母が死滅するようなアルコール濃度に達する前に発酵を停止するので、高い生存率を維持し続けることができる<sup>12)</sup>。以上の結果を考え合わせると、清酒酵母は「ストレスに弱く、かつ、高発酵性を示す酵母」であり、ストレス耐性に依存しない発酵性向上のメカニズムの存在が初めて示唆される結果となった。

#### ストレス応答欠損を引き起こす原因変異の探索

清酒酵母がストレスに弱い原因を遺伝子レベルで解明することを目的として、ストレス応答関連遺伝子上の変

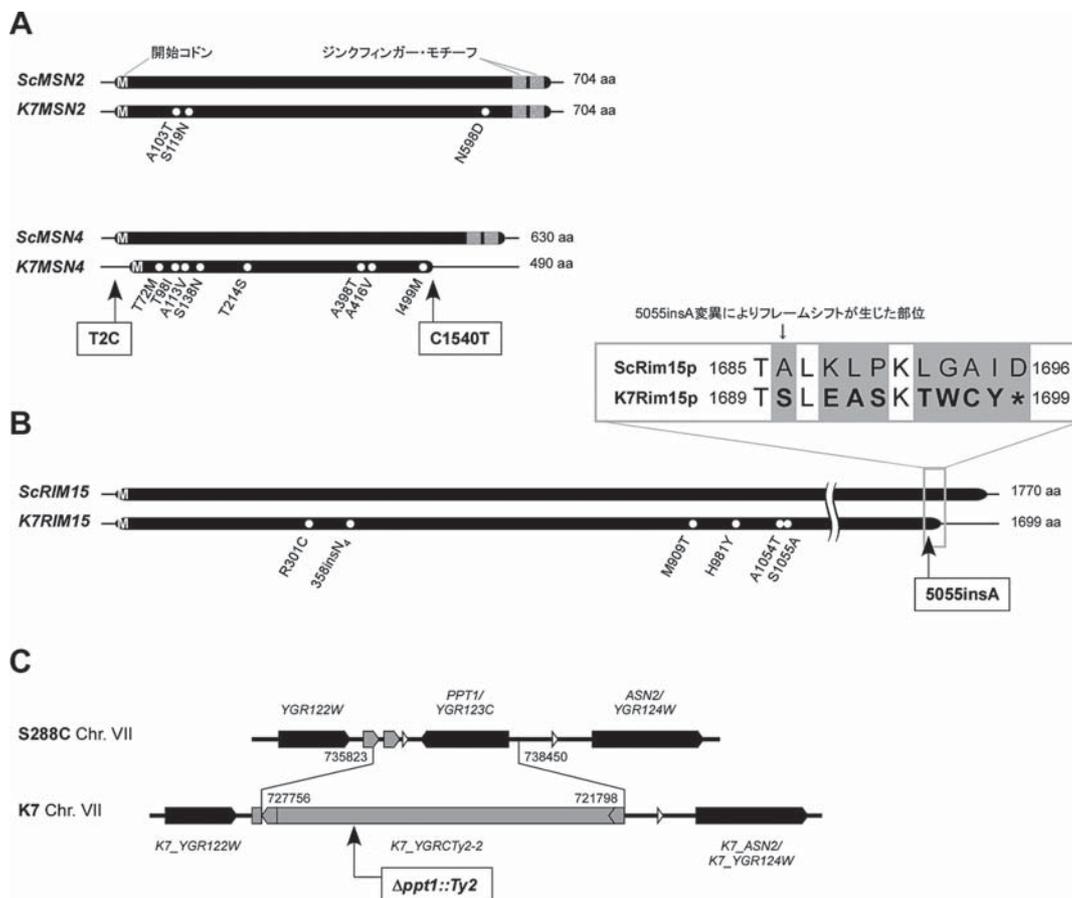


図3. K7グループの清酒酵母に特異的なストレス応答機能欠失変異

異に着目した。まずMSN2/4遺伝子に着目したところ、K7のMSN4遺伝子では開始コドンに一塩基置換（T2C変異）が生じていることに加え、推定上の読み枠の途中にも一塩基置換によるナンセンス変異（C1540T変異）が見られ、この遺伝子産物はN末端とC末端を共に欠失していることが推測された（図3A）<sup>7)</sup>。特に、Msn4pのC末端に近い部分には転写因子としての機能（DNAとの結合）に必須なジンクフィンガーモチーフが存在しており、K7のMsn4pはこの領域を完全に欠失していることから、転写因子活性を失っていることが予想された。実際に、レポーター遺伝子を用いた解析では、K7のMsn4pの転写因子活性を検出することはできなかった。以上のデータから、*msn4*<sup>C1540T</sup>変異が清酒酵母のストレス応答欠損の一因ではないかと考えられたが、Msn4pと相同な機能を有するMsn2pについては、K7において正常な機能を有することを以前に確認していたので<sup>13,14)</sup>、*msn4*<sup>C1540T</sup>変異だけで清酒酵母のストレス応答欠損を十分に説明することは困難であった。

そこで、さらにMsn2/4pの関連因子に焦点を当てて解析を進めた結果、Msn2/4pの上流活性化因子として知

られるRIM15プロテインキナーゼ遺伝子<sup>15)</sup>における変異を見出すことができた<sup>16)</sup>。K7のRIM15遺伝子では、読み枠の途中におけるアデニンの一塩基挿入（5055insA変異）によってフレームシフトが生じており、推定上の遺伝子産物ではC末端の75アミノ酸が欠失していた（図3B）。実験室酵母において該当する部位にアデニンを挿入すると、RIM15遺伝子破壊株とほぼ同一の表現型（免疫抑制剤ラパマイシンに対する感受性やストレス耐性の低下）を示したことから（図4A）、この挿入変異が機能欠失変異であることが示された。つまり、K7ではRim15pの機能欠損により、ストレス存在下におけるMsn2/4pを介した遺伝子発現が抑制されていると考えることができる。実際に、清酒酵母に実験室酵母由来のRIM15を導入するとストレス耐性が大きく回復したことから（図4B）、この仮説が正しいことが裏付けられた。

また興味深いことに、これらの*rim15*<sup>5055insA</sup>変異や*msn4*<sup>C1540T</sup>変異は、きょうかい6号、7号、9号、10号およびその派生株（以下、K7グループ）に共通して分布しており、その他の清酒酵母（大正時代以前に単離され現在は広く用いられていない菌株）やワイン酵母、ビー

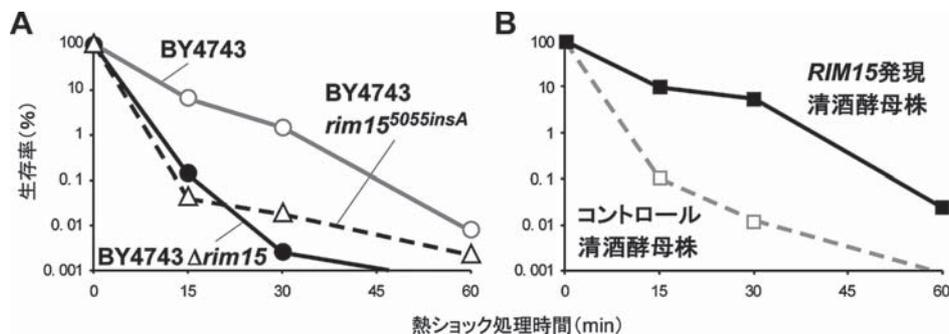


図4. *RIM15* 遺伝子と熱ショック耐性の関係. いずれも, 定常期の細胞を54°Cで処理した後の生存率を示す. (A) 実験室酵母における *Rim15p* 機能欠損の影響, (B) 清酒酵母における *RIM15* 遺伝子導入の影響.

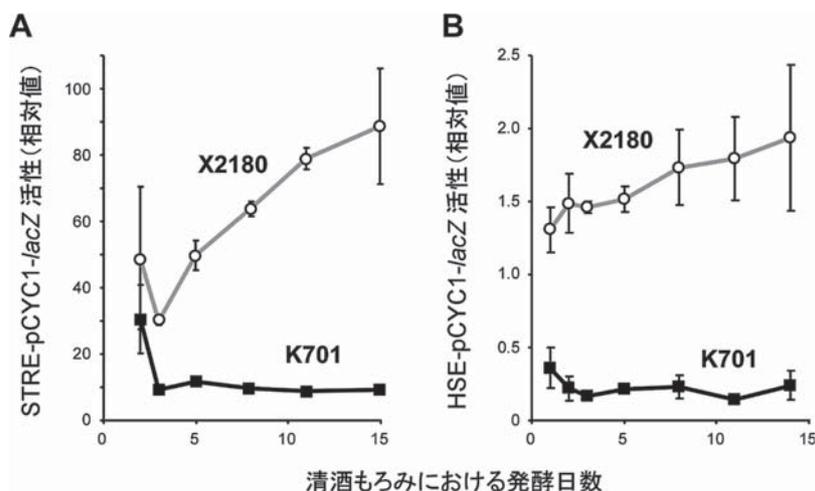


図5. レポーター遺伝子アッセイによる, 清酒もろみにおけるストレス応答転写因子活性の測定. (A) *Msn2/4p* 活性, (B) *Hsf1p* 活性.

ル酵母, しょうちゅう酵母, 実験室酵母, *S. cerevisiae* 以外の *Saccharomyces* 属の酵母には見いだされなかった<sup>7,16</sup>). この結果から, 過去のある時点においてK7グループの清酒酵母の祖先株が *Rim15p* と *Msn4p* の機能を失い, その後, これらの機能欠失変異を有する酵母の方が清酒醸造において何らかのメリットを示したことから, このようなストレスに弱い清酒酵母菌株の使用が広まったのではないかと推測される. このメリットについては後述することとした.

筆者らは, 清酒もろみ中における *Msn2/4p* 以外のストレス応答機構にも着目して研究を進めた. レポーター遺伝子を用いたアッセイの結果, *Hsf1p* という別のストレス応答転写因子の活性も K701 において抑制されていることが明らかになった(図5)<sup>17</sup>). *Hsf1p* はもともと, 真核生物に広く保存された熱ショック応答因子 (*heat shock factor*) として同定されたが<sup>18,19</sup>), 他にも酸化ストレスやグルコース枯渇, エタノールストレスなどのさま

ざまなストレスに応答し<sup>20-22</sup>), 多数のターゲット遺伝子の発現を誘導する<sup>23,24</sup>). これらのターゲット遺伝子には *Msn2/4p* のターゲットと共通のものもあることから, *Hsf1p* は *Msn2/4p* と協調的に酵母のストレス応答を担っていると考えることができる<sup>25</sup>).

ところが, K7 において *HSF1* 遺伝子の配列には目立つ異常が見られず, 実験室酵母 X2180 とのアレル交換試験においても影響が検出されなかったことから, 清酒酵母の *Hsf1p* 自体は転写因子活性を欠損していないことが明らかになった. それにも関わらず清酒酵母において *Hsf1p* の転写因子活性が抑制されているということは, *Hsf1p* の *in vivo* における制御に何らかの異常が生じている可能性が考えられた. そこで, 抗 *Hsf1p* 抗体を用いたイムノプロット解析を行った結果, K701 では *Hsf1p* のリン酸化パターンに明らかな差異を見いだすことができた. 実験室酵母の *Hsf1p* では, 外界からのストレスによってリン酸化レベルが上昇し, それに伴って転写因子活性

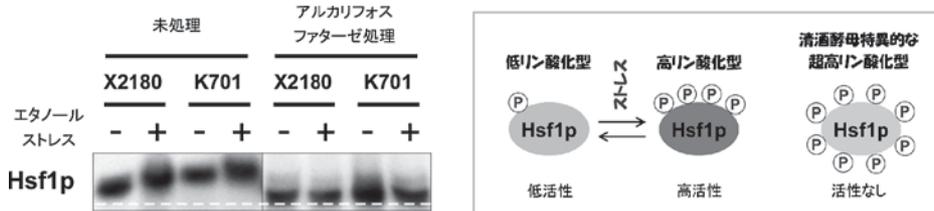


図6. 清酒酵母において見いだされた新規Hsf1pリン酸化パターン. ストレス未処理の細胞とエタノールストレス（8%エタノール溶液で15分処理）を与えた細胞を用いてイムノプロット解析を行った.

が増大することが報告されているが、K701のHsf1pはストレスがない条件でも高度にリン酸化されており、既知のHsf1p活性調節メカニズムでは説明できない新規のパターンを示した(図6). この現象に着目し、Hsf1pの新たなリン酸化調節メカニズムを明らかにするために、実験室酵母のプロテインフォスファターゼ遺伝子破壊株のセットを用いてHsf1pのリン酸化パターンを解析した. その結果、*PPT1*という、機能がほぼ未解明のプロテインフォスファターゼをコードする遺伝子の破壊株において、ストレス非存在下における高リン酸化型Hsf1pを検出することができた. この結果から、清酒酵母においても、このPpt1pの機能が欠損したことによってHsf1pが恒常的に高リン酸化され、活性が低下したのではないかという仮説を立てた. これと矛盾することなく、実験室酵母の*PPT1* 遺伝子破壊株はエタノールストレスに応答したHsf1pの活性化に欠損を示すことをレポーター遺伝子アッセイにより確認した. また驚くべきことに、K7グループの清酒酵母ではこの*PPT1* 遺伝子全長を含む染色体領域がレトロトランスポゾンTy2により置換されており( $\Delta ppt1::Ty2$ 変異), *PPT1* 遺伝子を欠失していることも明らかにした(図3C)<sup>17)</sup>. この変異も、*rim15*<sup>5055insA</sup> 変異や*msn4*<sup>C1540T</sup> 変異と同様にK7グループ以外の酵母菌株には一切見つからないことから、K7グループの清酒酵母に特異的なストレス応答欠損を引き起こした原因の一つであることが証明された. また、K7グループの清酒酵母においてはこれらの変異がいずれも共通して保存されていることから、このようなストレス応答欠損が清酒醸造において何らかのメリットにつながる可能性が考えられた.

#### ストレス応答欠損変異とアルコール発酵性の関係

次に、これまでに見いだされた清酒酵母におけるストレス応答欠損の原因変異が、清酒醸造においてどのような役割を果たすのかを明らかにするために、実験室酵母を用いた清酒小仕込試験を実施し遺伝子破壊の影響を調べた. 発酵のモニタリングには、筆者らが清酒小仕込試

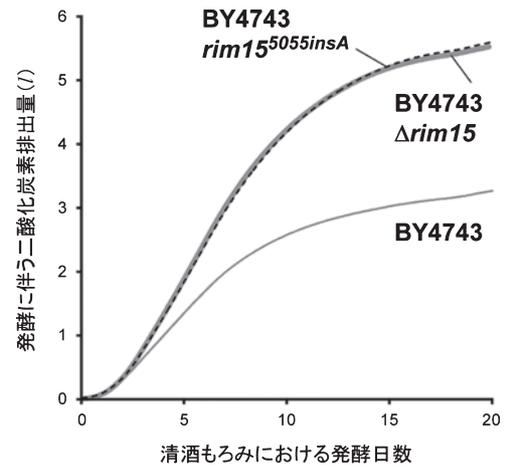


図7. Rim15p機能欠損による発酵性の向上

験用に独自に改良した自動発酵測定装置（ファームグラフII)<sup>26)</sup>を用いた. その結果、*RIM15* 遺伝子破壊は発酵速度を顕著に向上させることが明らかになった(図7)<sup>16)</sup>. アルコール収量に関しても、20日間の発酵試験終了時のアルコール濃度は、親株(BY4743)を用いた場合には $11.2 \pm 0.2\%$ であったのに対し、*RIM15* 遺伝子破壊株を用いた場合には $17.0 \pm 0.4\%$ にまで上昇した. また、*rim15*<sup>5055insA</sup> 変異株も*RIM15*破壊株とほぼ同一の発酵経過を示し、発酵終了時のアルコール濃度は $16.8 \pm 0.2\%$ に到達した. この結果から、*RIM15* 遺伝子におけるアデニンの一塩基挿入が、ストレス応答の欠損だけでなく、高い発酵性を生み出す主要な原因であることが結論づけられた. また、*MSN4*や*PPT1* 遺伝子の破壊も、Rim15p機能欠損と比べると効果は小さいが、有意に実験室酵母の発酵性を改善できることを示した<sup>7,17)</sup>. 以上の結果から、K7グループの清酒酵母において特異的に見いだされた3つの変異はいずれも、ストレス応答欠損と高発酵性の両方に寄与していることが明らかになった. このように、清酒酵母という天然の実用酵母菌株から高発酵性原因変異を世界で初めて同定したことに加え、出芽酵母のMsn2/4pやHsf1pを介したストレス応答経路がアル

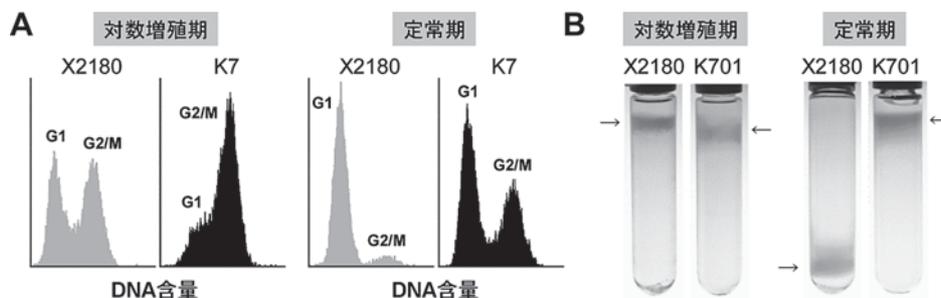


図8. 発酵過程における細胞生理状態のモニタリング。(A) フローサイトメーターを用いた細胞周期の解析結果。(B) 細胞浮遊密度の測定による休止期の解析結果。Percoll密度勾配遠心により、非休止期(密度小)と休止期(密度大)の細胞に分画することができる<sup>33)</sup>。

コール発酵を阻害する、つまり、「アルコール発酵にとって不要なストレス応答が存在する」という知見を得たことが、醸造学・発酵工学分野における本研究のもっとも主要な成果であると考えている。

高発酵性とは、発酵速度の観点から言えば「発酵期間をどれだけ短縮できるか」、アルコール収量の観点から言えば「白米からどのくらい清酒を製造できるか」、という製造効率に直結する性質であるため、清酒酵母菌株を選抜する際にもっとも重要視される指標の一つである。一方で、ストレス耐性については、清酒醸造においては発酵終了時に酵母を回収して繰り返し使用するということが通常行わないので、高いストレス耐性を有する必要性は小さいと考えられる。このような条件で長年にわたって選抜されてきた清酒酵母が、「ストレスに弱く、かつ、高発酵性を示す酵母」であるということは理にかなっているように思われる。

### 細胞周期シグナルとアルコール発酵性の関係

最後にもう一つ、別のアプローチによる清酒酵母の高発酵性メカニズムの研究事例についてもご紹介したい。清酒酵母の特徴を細胞レベルで明らかにするために、酵母細胞形態のハイスループット解析に用いられるCalMorphソフトウェア<sup>27,28)</sup>を用いて、清酒酵母きょうかい6号、7号、9号、10号と実験室酵母X2180の対数増殖期における細胞形態を解析し、清酒酵母菌株にのみ共通する形質を探索した<sup>29)</sup>。その結果、清酒酵母は実験室酵母と比較して「未出芽細胞の割合が少ない」「出芽細胞における母細胞のサイズが小さい」という形態学的特徴を有することがわかった。これらの特徴は、細胞周期においてG1期進行シグナルが強化された*whi*変異株(*WHI1-1*,  $\Delta$ *whi5*など)<sup>30-32)</sup>と共通のものであったため、清酒酵母においてもG1期進行が異常に亢進している可能性が示唆された。

そこで、フローサイトメーターを用いた解析および細胞浮遊密度の測定<sup>33)</sup>により発酵過程における細胞周期の状態をモニターしたところ、実験室酵母は細胞数の飽和に伴って速やかに細胞周期をG1期で停止し、その後G0期(休止期)に移行するのに対し、清酒酵母はG1期停止および休止期移行の両方に欠損を示した(図8)<sup>12,29)</sup>。また、定量PCR法により、清酒酵母は実験室酵母と比べてG1期進行に必須なサイクリン*CLN3*の発現レベルが発酵期間を通して有意に高いことも明らかになった。この清酒酵母における*CLN3*高発現の意義を探るために、K7の*CLN3*遺伝子破壊株を用いて発酵試験を行うと、親株であるK7と比べて発酵速度が低下することを見いだした。一方で、実験室酵母では*whi*変異の導入により発酵速度が向上した(図9)<sup>29)</sup>。以上の結果から、*CLN3*遺伝子の高発現を介したG1期進行の亢進が清酒酵母の高発酵性の一因であることを解明した。この発見は、これまでまったく無関係と思われていた細胞周期シグナルとアルコール発酵の間の新規な関連性を示すものとなった。清酒酵母における*CLN3* mRNAの発現レベルを高める原因変異の同定については今後取り組むべき課題の一つであると考えている。

### おわりに

本研究では、ゲノム解析、トランスクリプトーム解析、ハイスループット細胞形態解析を通して、K7グループの清酒酵母はストレス応答や細胞周期制御において他の出芽酵母菌株とは異なる固有の特徴を有しており、そのいずれもが高発酵性と関連があることを明らかにした。おそらく清酒酵母は、発酵性を向上させる複数の遺伝的変化を併せ持っており、それらの相互作用によって優れた発酵効率を達成したのだろうと推測される。本研究成果は、清酒酵母の起源を理解する上で重要であることに加え、バイオエタノール酵母をはじめとする実用酵母菌

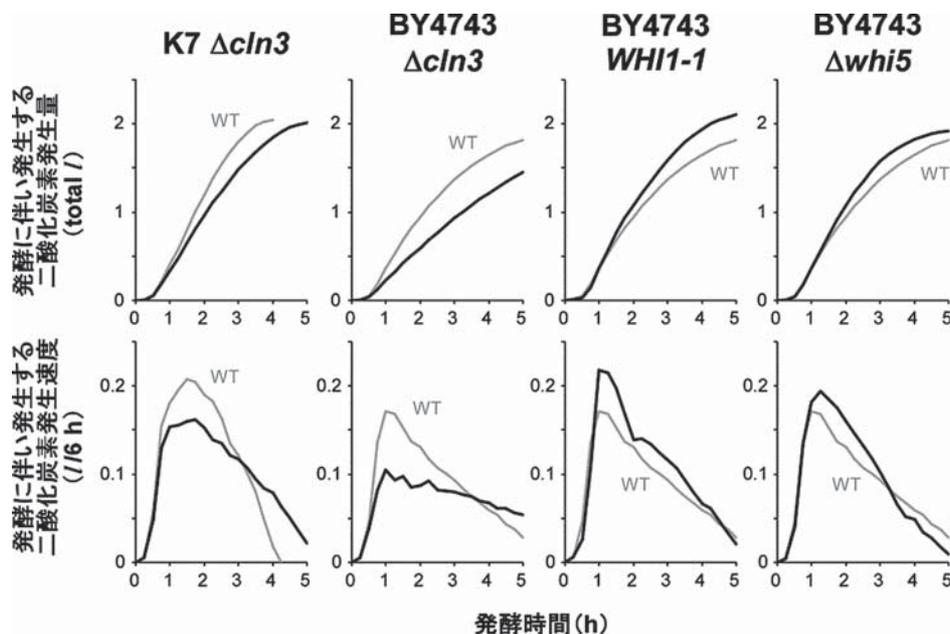


図9. Cln3pを介した細胞周期シグナルと発酵性の関係. いずれも、灰線が親株 (K7またはBY4743), 黒線がCLN3破壊株またはwhi変異株の発酵試験 (20%グルコース含有YPD培地, 30°Cにおける試験) の結果を示す.

株の発酵性改変<sup>34)</sup>に向けての育種法の確立にとっても、きわめて有用な技術基盤を提供するものとなるだろう。

また、本研究は、清酒酵母K7の全ゲノム解析結果<sup>3)</sup>を活用することにより遂行された部分が多く、清酒酵母のポストゲノム研究のさきがけとしても重要な位置を占めることになる予想される。清酒酵母は高発酵性だけでなく、香味成分の生成バランスや機能性成分の生産などにおいても、他の出芽酵母菌株にはない優れた特徴を多数有している。今後は、このような個性を生み出すメカニズムについても、ゲノム情報に基づいて遺伝子レベルで解明できるようになると期待される。さらに将来的には、K7以外の清酒酵母菌株のゲノム情報や、オミックス解析のデータが集積していけば、醸造特性に関する菌株間のわずかな差異に至るまで、その原因について明確な答えを得ることができるようになるだろう。このような知見を積み上げていくことによって、清酒酵母をより深く理解し、醸造上のさまざまな課題の解決に貢献し、醸造技術をさらに発展させていくことが可能となるだろうと信じて研究を続けていきたい。

本研究の機会を与您いただき多大なるご指導・ご鞭撻を賜りました独立行政法人酒類総合研究所研究企画知財部門下飯仁部門長、赤尾健主任研究員に心から感謝の意を申し上げます。また本研究のうち、ストレス応答に関連する研究は、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 高木博史教授、笹野佑博士 (現・大阪大学) との共同研究、細胞形態学的解析は、東京大学大学院新領域創成科学研究科 大矢

禎一教授、野上識特任准教授、平田愛子特任研究員との共同研究、自動発酵装置の改良はアトー株式会社 木村宏樹氏、太田和憲氏、新田房二郎氏との共同研究により実施されました。また、抗Hsf1p抗体は金沢大学大学院医学系研究科 櫻井博教授に分与いただきました。この場を借りまして厚く御礼申し上げます。その他、本研究にご指導・ご助言を賜りました関係の先生方、当所醸造技術基盤研究部門において共に研究を行った研究職員、非常勤職員の皆様方、広島大学大学院先端物質科学研究科の学生の皆様方に感謝申し上げます。

本研究の一部は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構生物系特定産業技術研究支援センターの「イノベーション創出基礎的研究推進事業」として、また、公益財団法人野田産業科学研究所の奨励研究助成により実施されたものです。

## 文 献

- 1) Alper, H., Moxley, J., Nevoigt, J., Fink, G. R., and Stephanopoulos, G.: *Science*, **314**, 1565–1568 (2006).
- 2) Zhao, X. Q. and Bai, F. W.: *J. Biotechnol.*, **144**, 23–30 (2009).
- 3) Akao, T., Yashiro, I., Hosoyama, A., Kitagaki, H., Horikawa, H., Watanabe, D., Akada, R., Ando, Y., Harashima, S., Inoue, T., Inoue, Y., Kajiwara, S., Kitamoto, K., Kitamoto, N., Kobayashi, O., Kuhara, S., Masubuchi, T., Mizoguchi, H., Nakao, Y., Nakazato, A., Namise, M., Oba, T., Ogata, T., Ohta, A., Sato, M., Shibasaki, S., Takatsume, Y., Tanimoto, S., Tsuboi, H., Nishimura, A., Yoda, K., Ishikawa, T., Iwashita, K., Fujita, N., and Shimoi, H.: *DNA Res.*, **18**, 423–434 (2011).
- 4) Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W.,

- Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., and Oliver, S. G.: *Science*, **274**, 546–567 (1996).
- 5) Wu, H., Zheng, X., Araki, Y., Sahara, H., Takagi, H., and Shimoi, H.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 7353–7358 (2006).
  - 6) Boorsma, A., Foat, B. C., Vis, D., Klis, F., and Bussemaker, H. J.: *Nucleic Acids Res.*, **33**, W592–W595 (2005).
  - 7) Watanabe, D., Wu, H., Noguchi, C., Zhou, Y., Akao, T., and Shimoi, H.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 934–941 (2011).
  - 8) Martínez-Pastor, M. T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., and Estruch, F.: *EMBO J.*, **15**, 2227–2235 (1996).
  - 9) Schmitt, A. P. and McEntee, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5777–5782 (1996).
  - 10) Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P. O.: *Mol. Biol. Cell*, **11**, 4241–4257 (2000).
  - 11) Causton, H. C., Ren, B., Koh, S. S., Harbison, C. T., Kanin, E., Jennings, E. G., Lee, T. I., True, H. L., Lander, E. S., and Young, R. A.: *Mol. Biol. Cell*, **12**, 323–327 (2001).
  - 12) Urbanczyk, H., Noguchi, C., Wu, H., Watanabe, D., Akao, T., Takagi, H., and Shimoi, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 44–48 (2011).
  - 13) Watanabe, M., Tamura, K., Magbanua, J. P., Takano, K., Kitamoto, K., Kitagaki, H., Akao, T., and Shimoi, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 163–170 (2007).
  - 14) Watanabe, M., Watanabe, D., Akao, T., and Shimoi, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **107**, 516–518 (2009).
  - 15) Cameroni, E., Hulo, N., Roosen, J., Winderickx, J., and De Virgilio, C.: *Cell Cycle*, **3**, 462–468 (2004).
  - 16) Watanabe, D., Araki, Y., Zhou, Y., Maeya, N., Akao, T., and Shimoi, H.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 4008–4016 (2012).
  - 17) Noguchi, C., Watanabe, D., Zhou, Y., Akao, T., and Shimoi, H.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 385–392 (2012).
  - 18) Sorger, P. K. and Pelham, H. R.: *EMBO J.*, **6**, 3035–3041 (1987).
  - 19) Wiederrecht, G., Seto, D., and Parker, C. S.: *Cell*, **54**, 841–853 (1988).
  - 20) Tamai, K. T., Liu, X., Silar, P., Sosinowski, T., and Thiele, D. J.: *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 8155–8165 (1994).
  - 21) Liu, X. D. and Thiele, D. J.: *Genes Dev.*, **10**, 592–603 (1996).
  - 22) Takemori, Y., Sakaguchi, A., Matsuda, S., Mizukami, Y., and Sakurai, H.: *Mol. Genet. Genomics*, **275**, 89–96 (2005).
  - 23) Hahn, J. S., Hu, Z., Thiele, D. J., and Iyer, V. R.: *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 5249–5256 (2004).
  - 24) Eastmond, D. L. and Nelson, H. C.: *J. Biol. Chem.*, **281**, 32909–32921 (2006).
  - 25) Amorós, M. and Estruch, F.: *Mol. Microbiol.*, **39**, 1523–1532 (2001).
  - 26) Watanabe, D., Ota, T., Nitta, F., Akao, T., and Shimoi, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 54–57 (2011).
  - 27) Ohtani, M., Saka, A., Sano, F., Ohya, Y., and Morishita, S.: *J. Bioinform. Comput. Biol.*, **1**, 695–709 (2004).
  - 28) Saito, T. L., Sese, J., Nakatani, Y., Sano, F., Yukawa, M., Ohya, Y., and Morishita, S.: *Nucleic Acids Res.*, **33**, W753–W757 (2005).
  - 29) Watanabe, D., Nogami, S., Ohya, Y., Kanno, Y., Zhou, Y., Akao, T., and Shimoi, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 577–582 (2011).
  - 30) Nash, R., Tokiwa, G., Anand, S., Erickson, K., and Futcher, A. B.: *EMBO J.*, **7**, 4335–4346 (1988).
  - 31) de Bruin, R. A., McDonald, W. H., Kalashnikova, T. I., Yates, J. 3rd, and Wittenberg, C.: *Cell*, **117**, 887–898 (2004).
  - 32) Costanzo, M., Nishikawa, J. L., Tang, X., Millman, J. S., Schub, O., Breitkreuz, K., Dewar, D., Rupes, I., Andrews, B., and Tyers, M.: *Cell*, **117**, 899–913 (2004).
  - 33) Allen, C., Büttner, S., Aragon, A. D., Thomas, J. A., Meirelles, O., Jaetao, J. E., Benn, D., Ruby, S. W., Veenhuis, M., Madeo, F., and Werner-Washburne, M.: *J. Cell Biol.*, **174**, 89–100 (2006).
  - 34) Sasano, Y., Watanabe, D., Ukibe, K., Inai, T., Ohtsu, H., Shimoi, H., and Takagi, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 451–455 (2012).