

酵母ベクターの種類と歴史

大橋 貴生

酵母は単細胞世代を有する真菌類の総称であり、古くから発酵食品に用いられてきた微生物の一つである。近年、遺伝子工学技術の進歩により、長大な歴史がある発酵食品生産だけでなく、医療タンパク質やバイオ燃料生産、および巨大DNA断片のクローニングにも用いられている。酵母は単細胞真核生物であり、真核生物の中でも操作が容易で、大腸菌用の培養設備があれば、酵母株、酵母ベクター、酵母用の培地を準備するだけで、早速実験を行うことができる。ひとくちに酵母と言っても多様な種があり、さまざまな酵母がさまざまな発酵生産に利用されている。酵母は安価な培地で生育速度が速く、高密度培養が可能であり、結果として生産コストが低く抑えられるなど、多様なメリットがある。ここでは、酵母を用いて、遺伝子クローニング、遺伝子機能解析、および異種タンパク質生産をするにあたり、避けては通れない酵母ベクターについて概説したい。

2ミクロンDNAプラスミド

ほとんどの細菌において、その細胞内に多種類のプラスミドを保持していることが知られている。一方、真核生物ではプラスミド発見の報告は限られ、*Saccharomyces* 属¹⁾、*Kluyveromyces* 属²⁾および*Zygosaccharomyces* 属酵母³⁾において報告があり、他の酵母を含む真核生物では未だプラスミドは発見されていない。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で発見された環状二本鎖DNAは2ミクロンDNAプラスミド (2 μm DNA) と呼ばれ、実験室株を含め出芽酵母に普遍的に存在する。2ミクロンDNAプラスミドは真核生物で初めて見つかったプラスミドであり、真核生物におけるDNAプラスミドの複製、分子組換え、安定維持、分配、コピー数制御のメカニズム解明の研究に用いられてきた。それらの知見の蓄積とともに、酵母における遺伝子操作の有用なツールとしての多コピーベクターの素材として開発されてきた。

2ミクロンDNAプラスミドの2ミクロンの名前は電子顕微鏡で約2 μm長の環状DNA鎖として観察されたことに由来し、筆者が文献を調べた限り1976年のHollenbergらの論文で2 μm DNAの名称が使われ始めたようである⁴⁾。それまでは酵母の環状DNAと呼ばれ、

現在のような定まった名称はなく、サンプルの調製法やそれに由来する純度に応じて、マイナーな成分を含めて0.3–12 μmの範囲のさまざまなサイズが報告されていた。2 μm DNAは6318 bpの塩基配列を有し、その塩基配列中には一対の逆向き反復配列が存在する。その反復配列間でアニーリングし、二つのループを持つダンベル型の形状をしている(図1)。実際、電子顕微鏡下でダンベル型の形状が観察されている。この反復配列内にはFRT (FLP recombination target site) と呼ばれる特定領域が存在し、FRP特異的な組換え酵素FLPによって、フリップフロップ組換えが起こる。その結果、この上下のFRT部位間で180°回転することにより、反復配列を挟む塩基配列の一方が逆向きになった2種の異性体が等量生じる。2 μm DNAは他にも、タンパク質をコードする三つの遺伝子 (*REP1*, *REP2*, *RAF1*) および*STB* (*REP3*) 配列を有しており、これらはプラスミドDNAの安定維持および均等分配に関与している^{5,6)}。複製は

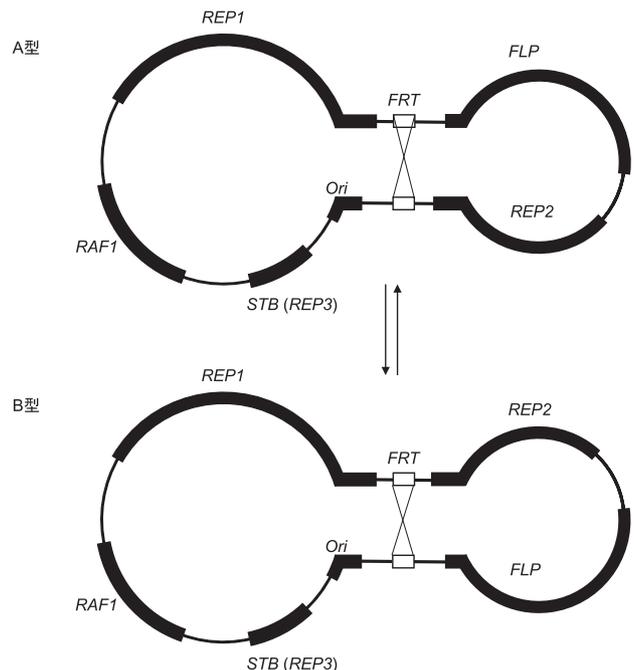


図1. 2 μm DNAの構造。文献6)に記載されている図を一部改変した。FRT間で組換えが起こり、FRTを挟んで塩基配列が逆向きになった2種類の異性体 (A型, B型) が等量存在する。

染色体DNAの複製マシナリーを利用して行われ、複製開始点*Ori*から二方向に向けて始まる。染色体DNAの複製は細胞周期ごとに1回の複製に厳密に制御されているが、1分子の2 μ m DNAを酵母細胞に導入すると、たちまち1細胞当たり30~50コピーまで増殖する。これについては、*Ori*からの複製開始後にDNAポリメラーゼが*FRT*に到達すると組換えが起こり、複製方向が逆転し、同一分子内の2個の複製フォークが同方向に向き、互いに他を追いかけながら複製が進み、その結果、複製が連続的に繰り返されてコピー数が自立的に増加するといったモデルが提唱されている⁷⁾。

YE_p型 (yeast episomal plasmid) プラスミド

さまざまな生物の全ゲノム配列が次世代シーケンスにより次々と読まれていく現代では想像もつかないが、1983年のPCR発明以前の遺伝子の単離およびその単離した遺伝子のDNA配列決定や機能解析のような実験では、DNAを生体から抽出し、制限酵素で切断後、大腸菌用クローニングベクターに入れて、大腸菌で増幅後、塩基配列を読む、そして大腸菌変異体の相補性を調べて機能を調べる、といった手法を採っていた。1970年代後半に入り、pBR322のような大腸菌用プラスミドを用いた大腸菌を含む原核生物の遺伝子クローニング手法が整備されてきたが、一方で、ヒトなどの真核生物由来の遺伝子では原核生物に配列および機能的に類似した遺伝子が存在しない場合も多く、真核単細胞生物である酵母を用いたクローニングベクターの開発が求められていた。

そこで、前述のような2 μ m DNAの性質を利用したYE_p型プラスミドが開発された⁸⁾。たとえば、初期に開発されたYE_p型プラスミドであるYE_p13は大腸菌と出芽酵母の両方で利用できるシャトルベクターであり、代表的な大腸菌クローニングベクターであるpBR322をベースに、2 μ m DNA、*LEU2*遺伝子を有している。そのため、大腸菌ではアンピシリン耐性を指標に、出芽酵母ではロイシン要求性を指標にプラスミド保持する細胞を容易に選抜できる。他にもYE_p型プラスミドとしてはpYES2ベクターがThermo Fischer Scientific社より販売されている⁹⁾。pYES2ベクターはガラクトース存在化で下流の遺伝子発現を誘導する*GALI*プロモーター、*CYC1*ターミネーター配列、および出芽酵母栄養要求性マーカーとして*URA3*遺伝子を有している。*GALI*プロモーターの下流に10種類以上の制限酵素サイトを配置したマルチクローニングサイトがあり、発現させたい遺伝子をクローニングすることができる。

自律複製配列 (ARS)

出芽酵母の場合には16本の染色体DNA全体に、30~40 kbpの間隔で合計約300個の自律複製開始配列(ARS)が染色体DNAの複製起点として存在している。ARS自身は100~200 bp程度のDNA断片で、4つのサブドメイン配列(*ACS*, *B1*, *B2*, *B3*)を有している。このサブドメイン配列の中でも、11 bpからなる*ACS*配列は複製に必須の配列で、一つでも変異が入ると複製されないことが分かっている。*ACS*配列の近傍には*B1*配列が存在し、*ACS*配列と*B1*配列で複製起点認識配列を構成し、6種類のタンパク質(*Orc1*–*Orc6*)から構成される複製起点認識配列複合体(*Orc*)がATP依存的に全細胞周期を通じて結合している。*Orc*にはさらに複数のタンパク質が結合しており、その結合するタンパク質は細胞周期によって変化し、二重らせん構造をほどいていると考えられている。二重らせん構造がほどかれると、ヘリカーゼやDNAポリメラーゼなどの複製酵素群が集まり、複製が開始される。

YRp型 (yeast replicating plasmid)

代表的なYRp型プラスミドであるYRp7はpBR322のEcoRIサイトに、酵母染色体上で隣接している*TRP1*遺伝子および*ARS1*配列を含んだDNA断片が挿入されている(図2)¹⁰⁾。YE_p型プラスミドと同様に、YRp型プラスミドは複数回継代後にプラスミドを落とすことがあり、宿主内での保持安定性は低い、高いコピー数を保ち、挿入された遺伝子の高発現が期待できる。

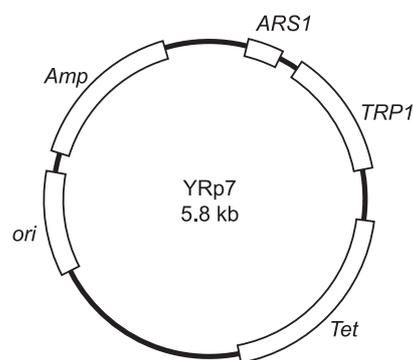


図2. YRp7の構造。大腸菌-酵母のシャトルベクターであり、大腸菌および酵母複製起点を、大腸菌用選択マーカーとしてアンピシリン耐性遺伝子およびテトラサイクリン耐性遺伝子を、酵母用選択マーカーとしてトリプトファン合成遺伝子を有する。アンピシリン耐性遺伝子およびテトラサイクリン耐性遺伝子内のユニークな制限酵素を用いて、目的の遺伝子断片を挿入し、酵母内で複製させることができる。

YCp型 (yeast centromeric plasmid)

YRp型のプラスミドの中でもセントロメア配列を挿入し、宿主内の保持安定性を増したプラスミドをYCp型プラスミドと呼ぶ。プラスミド上のセントロメア配列が染色体上の動原体と同様に機能するので、細胞分裂時に娘細胞に安定に分配され、通常1細胞当たり1コピーのプラスミドが保持される。

YIp型 (yeast integrative plasmid) プラスミド

酵母細胞内での複製起点を持たないプラスミドで、酵母細胞内でプラスミドとしては複製されないが、一度染色体に組み込まれると、酵母の染色体と同様に複製される。YIp型プラスミドは、大腸菌用プラスミドに酵母由来の栄養要求性マーカーを連結したもので、これらの対応するマーカー遺伝子座に相同組換えにより染色体上に挿入する。たとえば、YIp5はpBR322に出芽酵母由来のURA3遺伝子を連結したもので、pBR322配列上の任意の制限酵素サイトに挿入したいDNA配列がクローニングできる(図3)⁹⁾。このプラスミドを出芽酵母に導入した場合、クローニングした任意のDNA配列ごと染色体上の出芽酵母URA3遺伝子座に組み込まれる。一度、これらのDNA配列が酵母染色体に組み込まれば、安定的に保持される。

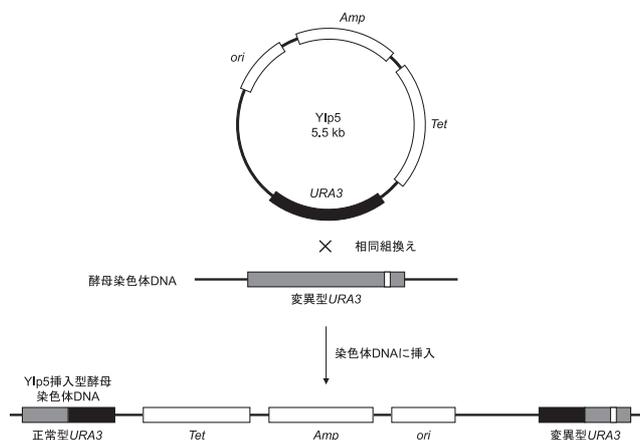


図3. YIp5を用いたクローニング。YRp7と同様に、大腸菌用選択マーカーであるアンピシリン耐性遺伝子およびテトラサイクリン耐性遺伝子内のユニークな制限酵素を用いて、目的の遺伝子断片を挿入することができる。酵母複製起点を持たないが、大腸菌複製起点を有するために、酵母導入前に大腸菌細胞内で、組換え体YIp5を構築することができる。宿主酵母染色体DNA上のURA3遺伝子座で相同組換えが起こり、YIp5断片を染色体に挿入することができる。ウラシル要求性宿主(ura3⁻)を用いた場合、ウラシルを含まない最少培地で生育できるコロニー(URA⁺)として、形質転換体を選択できる。一度、組み込まれたYIp5断片は染色体DNAの一部として、安定的に酵母宿主細胞内で複製される。

酵母人工染色体 (yeast artificial chromosome; YAC)

数百kbpを超える巨大なDNA断片をクローニングするベクターとして酵母人工染色体 (yeast artificial chromosome; YAC) が1987年にBurkeらにより報告された¹¹⁾。YACはセントロメア、テロメア (TEL)、ARS配列を構成成分に持ち、酵母細胞内で人工染色体として振る舞う。初期に構築されたpYAC2の場合、その他にも栄養要求性マーカーであるTRP1およびURA3遺伝子、オーカーサプレッサーであるtRNA変異遺伝子であるSUP4、そしてpBR322に由来する大腸菌における薬剤耐性マーカーであるAmp遺伝子および大腸菌複製起点oriを有している(図4)。環状プラスミドであるpYAC2は大腸菌で調製し、BamHI処理により二つのテロメア間に存在するHIS3遺伝子を切り出し、続くSmaI処理によりSUP4遺伝子が分断されることで、片側にテロメア、もう片側に平滑末端となった左腕および右腕断片が生じる。この両平滑末端に目的の遺伝子断片を挿入し、人工染色体DNA巨大直鎖状断片が完成する。この断片をtrp1およびura3変異を有する酵母に導入し、これらの栄養要求性を利用して形質転換体を選抜する。ま

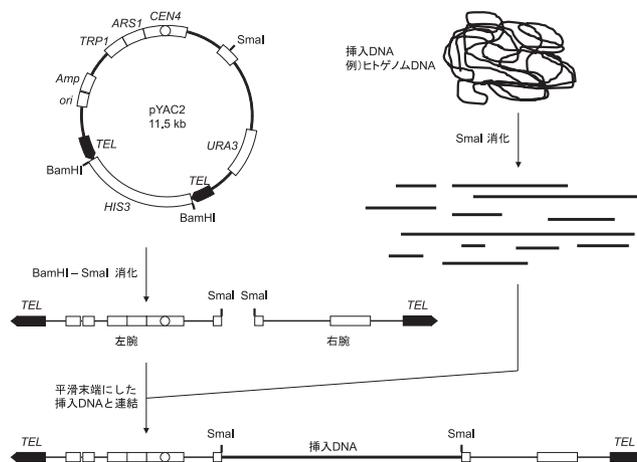


図4. pYAC2を用いた巨大DNA断片のクローニング。文献11)に記載されている図を一部改変した。たとえばヒトゲノムDNA断片をクローニングする場合、SmaIなどを用いて平滑末端にしたDNAを調製する。次に、環状ベクターであるpYACをBamHIとSmaIで処理して、左腕部および右腕部を調製する。これらを平滑末端にしたヒトゲノムDNA断片と連結し、人工染色体断片を構築する。この人工染色体断片は選択マーカーとしてTRP1およびURA3遺伝子を有するので、宿主酵母細胞に導入後、トリプトファンとウラシルを含まない最少培地に撒いて形質転換体を選択できる。人工染色体断片上のヒトゲノムDNA断片挿入の有無は、宿主細胞のオーカー変異であるade2-1またはade2-101に由来するアデニン生成中間体の蓄積によるコロニーの赤色呈色を抑圧するかどうかで選択できる。ヒトゲノムDNA断片がSUP4遺伝子内のSmaI部位に挿入されている場合、SUP4遺伝子が機能せず、コロニーは赤色を呈する。

たさらに $ade2$ オーカー変異を有する宿主を用いることで、目的巨大断片が挿入された人工染色体と挿入されていない人工染色体を含有したコロニーの赤白判別が可能となる。目的DNAが挿入されず完全な $SUP4$ 遺伝子が存在すると、オーカー変異により生じたアデニン中間代謝物によるコロニーの赤色化を抑圧し白色コロニーとなる。一方、 $SUP4$ 遺伝子内に目的遺伝子断片が挿入された場合、 $SUP4$ 遺伝子が不活性化され、赤色コロニーとなる。出芽酵母の場合、元々の染色体には230 kbから1.7 Mbpを超えるものまでであるため、YACを用いてMbpサイズの巨大DNA断片のクローニングができるようになった。現時点では各種クローニングベクターの中でもっとも大きなサイズのDNA断片をクローニングできるので、ヒトゲノムプロジェクトを始めとした、各種ゲノムプロジェクトでも広く活用されていた。

最後に

本稿では主に出芽酵母で用いられているベクターについて、歴史的な経緯を含めて、簡単に早足で紹介した。他にも分裂酵母や産業的に有用なノンコンベンショナル酵母でも利用できる新しいベクターが次々と開発されてきている。また、本稿では触れていないが、酵母ツーハイブリッド法¹²⁾やマイコプラズマの全ゲノム再構築で

有名となった相同組換えクローニング法¹³⁾など、酵母を用いた有用技術は枚挙に暇がない。酵母に関する優れた日本語の成書・総説が出版されているので、さらに詳細な情報を欲しい読者諸氏は参考にされたい^{14,15)}。

文 献

- 1) Sinclair, J. H. *et al.*: *Science*, **156**, 1234 (1967).
- 2) Gunge, N. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **145**, 382 (1981).
- 3) Toh-e, A. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **151**, 1380 (1982).
- 4) Hollenberg, C. P. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2072 (1976).
- 5) Jayaram, M. *et al.*: *Cell*, **34**, 95 (1983).
- 6) Murray, J. A. H. *et al.*: *EMBO J.*, **6**, 4205 (1987).
- 7) Fitcher, A. B. *et al.*: *J. Theor. Biol.*, **119**, 197 (1986).
- 8) Broach, J. R. *et al.*: *Gene*, **8**, 121 (1979).
- 9) サーモフィッシャーサイエンティフィック社: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V82520/> (2016/09/02).
- 10) Struhl, K. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1035 (1979).
- 11) Burke, D. T. *et al.*: *Science*, **236**, 806 (1987).
- 12) 水野貴之: バイオ実験イラストレイテッド⁷使おう酵母できる Two Hybrid, p. 75, 秀潤社 (2003).
- 13) 永野幸生, 飯笹英一: *生物工程*, **10**, 623 (2015).
- 14) 大隅良典, 下田 親: *酵母のすべて*, p. 103, シュプリンガー・ジャパン (2007).
- 15) 大嶋泰治ら: *IFO微生物学概論*, p. 122, 培風館 (2010).