

研究用

Takara

Aureobasidin A 耐性
形質転換システム

Aureobasidin A

説明書

Aureobasidin A 耐性形質転換システム (本システム) の使用について

本製品をご利用の際は、以下の点にご注意ください。

- 本製品は、研究目的以外には使用できません。ヒト、動物への医療、臨床診断などには使用しないようご注意ください (また、本製品により得られた生物材料を第三者へ譲渡することはできません)。
- 本製品を研究目的以外に使用される場合は、事前に弊社にお問い合わせください。

Aureobasidin A 耐性形質転換システム

Aureobasidin A 耐性形質転換システムは抗真菌抗生物質 Aureobasidin A¹⁾ (オーレオバシジン A, AbA) と酵母または糸状菌由来の AbA 耐性遺伝子を含むベクターを用いた形質転換システムです。酵母またはアスペルギルス属を形質転換するための種々のベクターがあります。AbA 耐性遺伝子は優性遺伝子であり、1~数コピーで、AbA に対する耐性を付与します。栄養要求性変異を持たない野生型の株 (一倍体~多倍体) を宿主とした時も、高い効率で形質転換体が得られます。

< 特長 >

- ・ 栄養要求性変異をもたない野生型酵母、野生型アスペルギルス属や実用株 (酒酵母、パン酵母等) も効率良く形質転換できます。
- ・ 選択培地は完全培地 (YPD 等) に Aureobasidin A を添加するだけで、複雑な栄養要求アミノ酸の添加は必要ありません。
- ・ 実用酵母を宿主として遺伝子ライブラリーをスクリーニングする際に特に有効です。
- ・ *Saccharomyces cerevisiae* (pAUR101, pAUR112, pAUR123, pAUR135)、*Schizosaccharomyces pombe* (pAUR224) または *Aspergillus nidulans* (pAUR316) への形質転換効率は栄養要求性選択マーカーを用いた場合と同程度です。

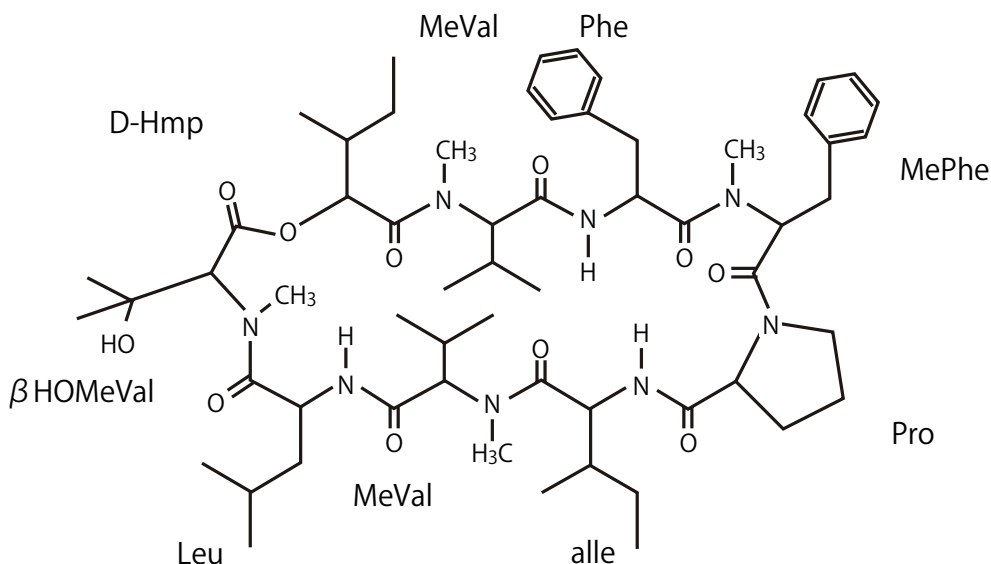
(酵母; 酢酸リチウム法で $1 \sim 5 \times 10^4$ 形質転換体 / μg DNA
糸状菌; プロトプラスト-PEG 法で $10^2 \sim 10^3$ 形質転換体 / μg DNA)

I. 製品説明

Aureobasidin A

Aureobasidin A (AbA) は *Aureobasidium pullulans* No. R106 株より単離された分子量 1,100 の環状デブシペプチドの抗生物質です。

AbA は *S. cerevisiae*、*Schizo. pombe*、*Candida glabrata*、*C. albicans*、*Kluyveromyces lactis*、一部の *Aspergillus* などの真菌類に対して低濃度で殺菌的に働きます。



Aureobasidin A の構造式

表 1. 種々の真菌に対する Aureobasidin A の最小生育阻止濃度 (MIC)

菌株		MIC
<i>S. cerevisiae</i>	ATCC9763 (二倍体)	0.2 ~ 0.4
	SH3328 (一倍体)	0.1
	清酒酵母協会 701 号 (二倍体)	0.1 ~ 0.2
	焼酎酵母協会 2 号 (二倍体)	0.1
	ビール酵母 (三 or 四倍体)	0.1
	パン酵母 (二倍体)	0.2 ~ 0.4
<i>Schizo. pombe</i>	JY-745 (一倍体)	0.1
<i>K. lactis</i>	IFO1267	0.05
<i>K. marxianus</i>	IFO1735	0.2
<i>C. glabrata</i>	TIMM1062	0.1 ~ 0.2
<i>C. albicans</i>	TIMM-0136	0.04
<i>C. tropicalis</i>	TIMM-0324	0.08
<i>A. nidulans</i>	FGSC89	2 ~ 5

pAUR ベクター

pAUR ベクターは大腸菌とのシャトルベクターで、形質転換のための選択マーカーとして出芽酵母 *S. cerevisiae* 由来の Aureobasidin A (AbA) 耐性遺伝子 *AUR1-C*^{2,3)} (pAUR101, pAUR112, pAUR123, pAUR135)、分裂酵母 *Schizo. pombe* 由来の AbA 耐性遺伝子 *aur1^R* (pAUR224)、または糸状菌 *A. nidulans* 由来の AbA 耐性遺伝子 *aurA^R* (pAUR316) を用いています。これらのベクターにより、酵母またはアスペルギルス属を形質転換した時、形質転換体は抗生物質 AbA に対する耐性形質を獲得します。その結果、形質転換体は AbA を含む培地上で AbA 耐性コロニーとして得られます。

pAUR101 は導入遺伝子を安定に保持させるための染色体組込み型ベクターです。プラスミドは酵母内では自律的に複製できず、染色体上の相同領域との組換えにより染色体上に組み込まれた状態で維持されます。

pAUR112 はプラスミド状態で維持されるベクターです。酵母内で自律的複製を可能にする CEN/ARS 配列を含み、細胞分裂時にも安定に伝達されます。CEN 配列を含むため、酵母細胞内でのプラスミドコピー数は 1 ~ 数コピーです。

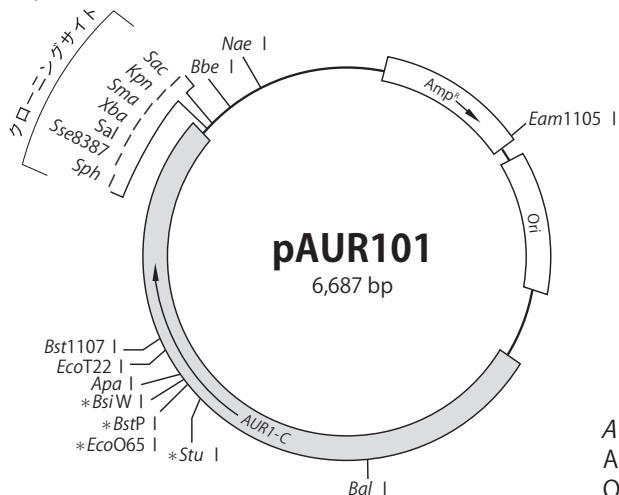
pAUR123 は、pAUR112 由来のタンパク発現用プラスミドベクターです。発現用プロモーターとして、アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH1) のプロモーターを含みます。

pAUR135 はひとつの選択マーカー *AUR1-C* で繰り返し形質転換を行うためのマーカー除去型ベクターです。pAUR135 にはガラクトース誘導性生育阻害配列 GAL10p-GIN11M86 が組み込まれており、このベクターを用いて取得した形質転換体から簡便な方法で選択マーカーを含むベクター配列が除去されたクローンを選別できます。

pAUR224 は *Schizo. pombe* を宿主としたタンパク発現用ベクターです。発現用プロモーターとして、サイトメガロウイルス (CMV) 由来のプロモーターと SV40 由来のポリ (A) シグナル配列を含んでいます。

pAUR316 は *Aspergillus* 内でプラスミド状態で維持されるベクターです。*Aspergillus* 内で自律的複製を可能にする AMA1 配列⁹⁾ を含みます。

<pAUR101 DNA の制限酵素地図>



- AUR1-C — *S. cerevisiae* の AbA 耐性遺伝子
- Amp^R — *E. coli* の選択マーカー
- Ori — *E. coli* の複製起点 (pUC119 由来)

<pAUR101 DNA のクローニングサイト図>

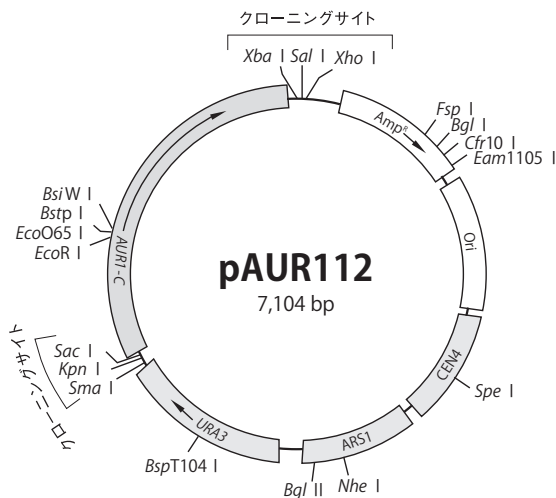


*: AUR1-C 遺伝子内の 1 カ所切断推奨部位

Stu I, BstP I, EcoO65 I, BsiW I

酵母に形質転換を行う際は、必ず AUR1-C 遺伝子内の上記の制限酵素ひとつを用いて、プラスミドを 1ヶ所切断してください。なお、大腸菌に形質転換を行う際は切断する必要はありません。

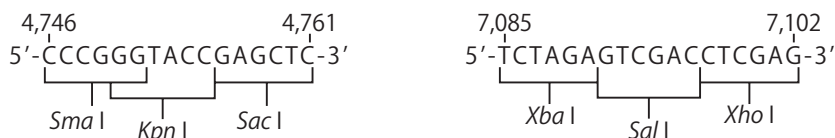
<pAUR112 DNA の制限酵素地図>



GenBank Accession No. AB012283

- AUR1-C — *S. cerevisiae* の AbA 耐性遺伝子
- URA3 — *S. cerevisiae* のウラシル選択マーカー
- ARS — *S. cerevisiae* の複製起点
- CEN — *S. cerevisiae* のセントロメア
- Amp^R — *E. coli* の選択マーカー
- Ori — *E. coli* の複製起点 (pBR322 由来)

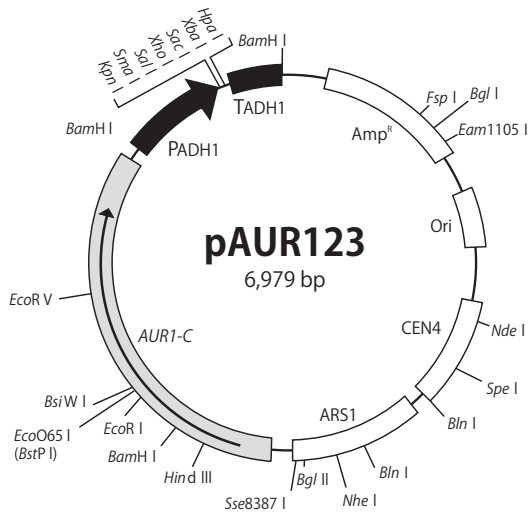
<pAUR112 のクローニングサイト図>



pAUR123 は、pAUR112 由来のタンパク発現用ベクターです。発現用プロモーターとして構成的に発現するアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (ADH1) のプロモーター⁴⁾ を含みます。発現させたい遺伝子 (開始コドン ATG を含む)^{注1} をクローニングサイトに挿入することにより、酵母内で構成的に発現させることができます。また、クローニングサイトには、読み枠をずらした3個のストップコドンが含まれています。

注1：5'-noncoding 領域はできるだけ短いものがよいと思われます。

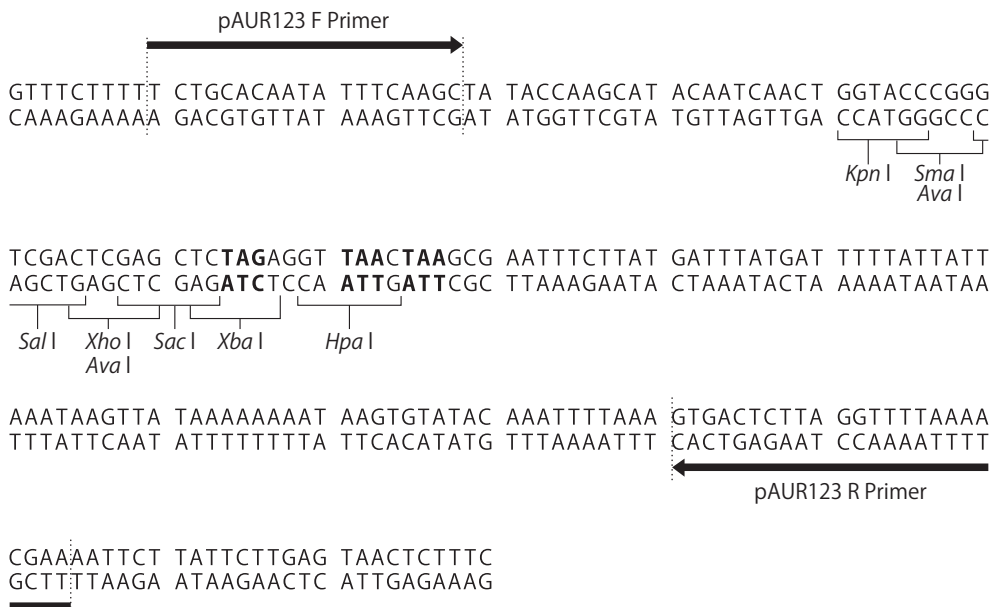
<pAUR123 DNA の制限酵素地図>



- AUR1-C — *S. cerevisiae* の AbA 耐性遺伝子
- ARS — *S. cerevisiae* の複製起点
- CEN — *S. cerevisiae* のセントロメア
- Amp^R — *E. coli* の選択マーカー
- Ori — *E. coli* の複製起点 (pBR322 由来)
- PADH1 — ADH1 遺伝子のプロモーター
- TADH1 — ADH1 遺伝子のターミネーター

pAUR123 の ADH1 プロモーターは構成発現プロモーターですので、Aureobasidin A 耐性の形質転換体を YPD など適当な培地で生育させるとタンパク質が発現します。ただし、発現量の多いプロモーターではありませんので、タンパク質の高発現は期待できません。

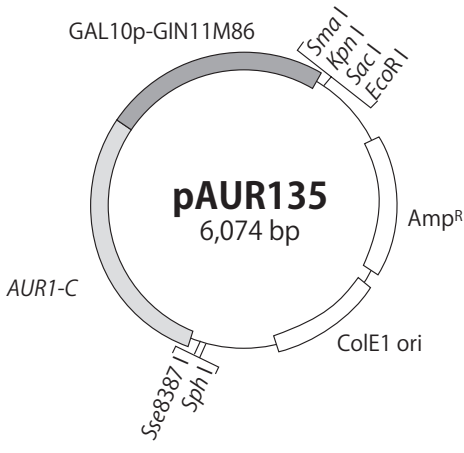
<pAUR123 のクローニングサイト図>



太字：ストップコドン

pAUR135 はひとつの選択マーカー *AUR1-C* で繰り返し形質転換を行うためのマーカー除去型ベクターです。pAUR135 にはガラクトース誘導性生育阻害配列 GAL10p-GIN11M86 が組み込まれており、このベクターを用いて取得した形質転換体から簡便な方法で選択マーカーを含むベクター配列が除去されたクローンを選別できます。

<pAUR135 DNA の制限酵素地図>

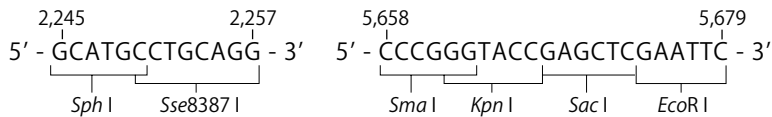


- | | |
|------------------|------------------------------------|
| <i>AUR1-C</i> | — <i>S. cerevisiae</i> の AbA 耐性遺伝子 |
| GAL10p-GIN11M86 | — ガラクトース誘導性生育阻害配列 |
| Amp ^R | — <i>E. coli</i> の選択マーカー |
| ColE1 ori | — <i>E. coli</i> の複製起点 |

[pAUR135 を切断しない制限酵素 (タカラバイオで販売しているもの)]

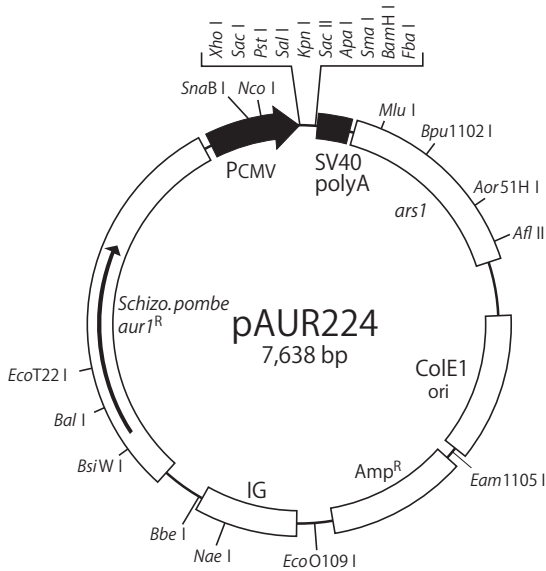
Acc III, *Afl* II, *Aor*13H I, *Aor*51H I, *Bal* I, *Bgl* II, *Bln* I, *Bpu*1102 I, *Bsp*T104 I, *Bss*H II, *Bst*X I, *Cla* I, *Cpo* I, *Eco*52 I, *Eco*81 I, *Fba* I, *Hind* III, *Mlu* I, *Nae* I, *Not* I, *Nru* I, *Pma*C I, *Sac* II, *Sal* I, *Sfi* I, *Sna*B I, *Spe* I, *Van*91 I, *Xba* I, *Xho* I

<pAUR135 DNA のクローニングサイト図>



pAUR224 は、*Schizo. pombe* 由来の変異遺伝子 *aur1^R*¹⁰ を酵母形質転換のための選択マーカーとして用いています。pAUR224 はプラスミド状態で保持できるベクターです。発現用プロモーターとして *Schizo. pombe* 内で構成的に発現するサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターを含みます。

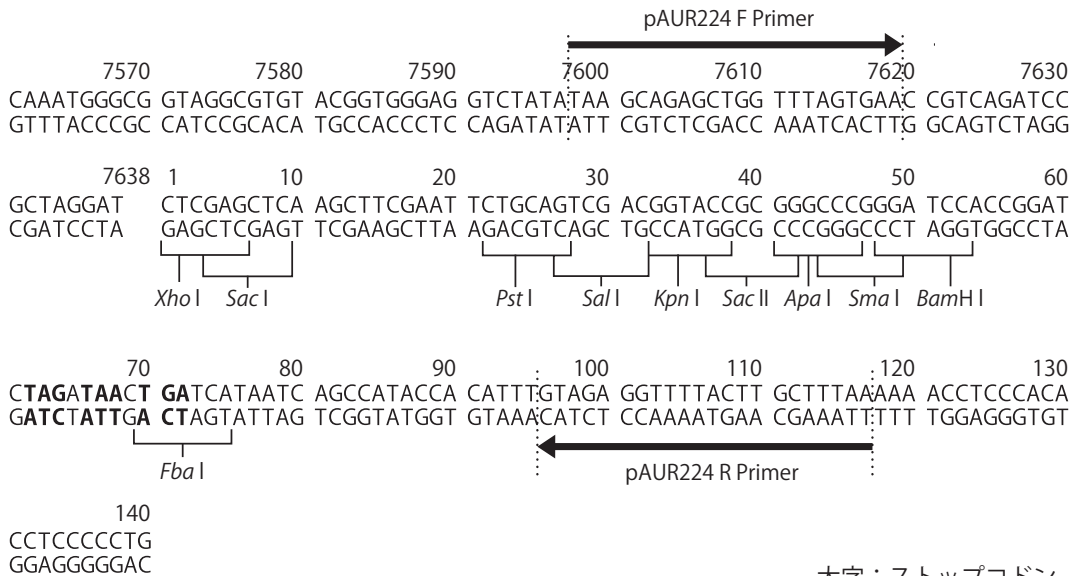
<pAUR224 DNA の制限酵素地図>



- aur1^R* — *S. pombe* の AbA 耐性遺伝子
- ars1* — *S. pombe* の複製起点
- PCMV — CMV プロモーター
- SV40polyA — SV40 由来の polyA シグナル
- Amp^R — *E. coli* の選択マーカー
- ColE1 ori — *E. coli* の複製起点
- IG — M13 ファージの intergenic region

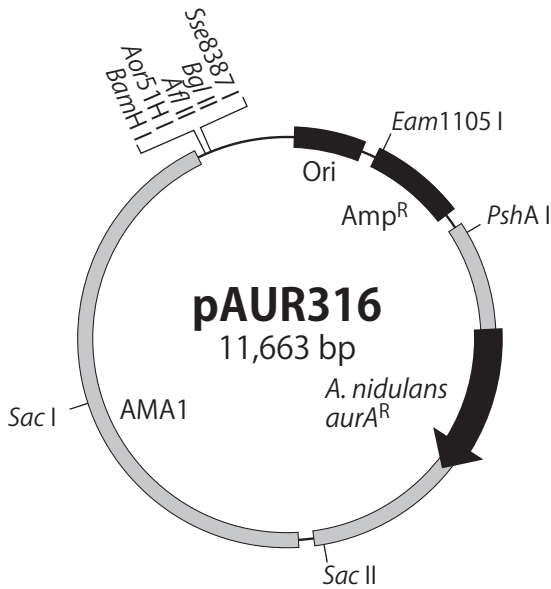
pAUR224 の CMV プロモーターは *Schizo. pombe* 内で構成発現のプロモーターとして働きます。

<pAUR224 のクローニングサイト図>



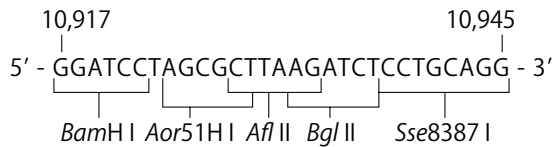
pAUR316 は、*A. nidulans* 由来の変異遺伝子 *aurA*^R 8) を *Aspergillus* 形質転換のための選択マーカーとして用いています。pAUR316 はプラスミド状態で保持できるベクターです。

<pAUR316 DNA の制限酵素地図>



- aurA*^R — *A. nidulans* の AbA 耐性遺伝子
- AMA1 — *A. nidulans* の複製起点
- Amp*^R — *E. coli* での選択マーカー
- Ori — *E. coli* の複製起点

<pAUR316 DNA のクローニングサイト図>



II. 操作

【II-1. 酵母の形質転換法】

酵母の一般的な取扱い法や遺伝子操作法に関する参考文献として、Guide to yeast genetics and molecular biology (1991) Methods in Enzymology 194 (Academic Press) をお勧めします。

(1) *S. cerevisiae* の形質転換

< 試薬類 >

- YPD 培地：1% Yeast extract、2% Poly peptone、2% D-glucose
- YPD 寒天培地：YPD 培地に 2% の agar を加える
- YPD 選択培地
 - ≥ 0.5 μg/ml Aureobasidin A を含む YPD 寒天培地
 - ※ 使用する宿主株によって Aureobasidin A に対する感受性が若干異なります。
- Aureobasidin A ストック
 - 500 μg/ml となるようにメタノールまたはエタノールに溶解。
 - 4°C 保存 (長期保存可)。
- Carrier DNA
 - サケ精子 DNA (10 mg/ml) を超音波で切断 (3 kb ~ 15 kb) 後、10 分間 100°C で処理し、急冷後、使用する。
- Solution A：100 mM Lithium acetate、10 mM Tris-HCl pH7.5、1 mM EDTA*1
- Solution B：40 g Polyethylene Glycol 4000 を 100 ml Solution A に溶解する*1 (用時調製*2)。
 - *1：Solution A, B はフィルター滅菌してください。
 - *2：Solution B は、形質転換効率を高めるためにも用時調製をお勧めします。

< 形質転換方法 >

1. 一晚培養した酵母の培養液 0.5 ml を 50 ml の YPD 培地に加える (100 倍希釈)。
2. 30°C で OD₆₆₀ = 1 ~ 2 (2 倍体では 2 ~ 4) となるまで培養する (約 6 時間)。
3. 1,000 × g で 5 分間遠心分離し、集菌する。
4. 菌体を 10 ml の Solution A に懸濁し、再び 1,000 × g で 5 分間遠心分離し集菌する。
5. 菌体を最終濃度が OD₆₆₀ = 150 になるように Solution A に懸濁する。
6. マイクロ遠心チューブに細胞懸濁液 100 μl を分注し、30°C 1 時間インキュベートする。
7. 5 μg の DNA (プラスミドもしくは直鎖状 DNA) と、添加直前に 100°C で 10 分間処理し急冷した 150 μg の Carrier DNA (Total 20 μl) を加える。
 - ※ pAUR101, 135 の場合、必ず直鎖状にして形質転換してください。環状のまま使用すると、形質転換効率が著しく低下し、形質転換体が得られないことがあります。pAUR112 および pAUR123 の場合は、プラスミドのまま形質転換してください。
8. 850 μl の Solution B を加え、静かに混合する。
9. 30°C で 30 分間インキュベートした後、42°C で 15 分間インキュベートする。
10. 10 分間室温で静置する。
11. 5,000 rpm で 1 分間遠心分離して集菌し、YPD 培地 5 ml に再懸濁させる。
12. 30°C で 6 時間から一晚培養する。
13. 遠心により集菌した菌体を 1 ml ~ 数 ml の 0.9% NaCl に懸濁し、100 μl ずつを YPD 選択培地プレートにまく。30°C で培養した場合、3 ~ 4 日で形質転換体が現われる。

(2) *Schizo. pombe* の形質転換

< 試薬類 >

- YEL 培地：5 g Yeast extract, 30 g D-glucose / 1 L water
- YEA 寒天培地：YEL 培地に 2% の寒天を加える
- YEA 選択培地
 $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$ Aureobasidin A を含む YEA 寒天培地
- MB 培地：5 g glucose, 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g KH_2PO_4 , 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.36 g CH_3COOK , 0.1 g NaCl, 0.1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 ml trace elements, 1 ml ビタミン溶液 / 1 L water
- trace elements：

H ₃ BO ₃	500 mg
(100 ml あたり) CuSO ₄ ·5H ₂ O	40 mg
KI	100 mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	200 mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O	530 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1,000 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	400 mg
- ビタミン溶液：

nicotinic acid	1 g
(100 ml あたり) myo-inositol	1 g
biotin	1 mg
pantothenic acid	100 mg
- 0.1 M 酢酸リチウム pH4.9：酢酸により pH を調整後、濾過滅菌
- 50% (w/v) PEG4000：濾過滅菌

< 形質転換方法 >

1. 100 ml MB 培地中で酵母を 30°C で培養し、OD₆₀₀ = 0.2 ~ 0.5 まで培養する (約 15 時間)。
2. 2,000 rpm 5 分間の遠心により菌体を回収する。
3. 菌体を滅菌水で洗う。
4. OD₆₀₀ = 50 に相当する菌体につき 0.8 ml 0.1 M 酢酸リチウムを加え懸濁する。
5. マイクロ遠心チューブに細胞懸濁液 100 μl を分注し、30°C 1 時間インキュベートする。
6. プラスミド DNA 10 μl (約 1 μg 使用) を加える。
7. 290 μl 50% PEG 4000 (30°C 保温) を加え、ゆるやかに懸濁する。
8. 30°C 1 時間インキュベートした後、43°C で 15 分間インキュベートする。
9. 5 分間室温で静置。
10. 5,000 rpm 2 分間遠心後、上清を完全に除く。
11. 菌体を 5 ml YEL 培地に懸濁後、30°C で 6 時間以上培養する。
12. 一部を YEA 選択培地プレートへまく。

【II-2. pAUR135 を用いたマーカー除去 (遺伝子破壊の場合)】

(1) 機能破壊用断片の pAUR135 への挿入

1. 破壊したい遺伝子の一部領域 (pAUR135 を切断しない制限酵素で一箇所切断できるもの) を PCR 等で準備する。
(組換え効率を上げるため、なるべく長い断片を使用してください。)
2. ストップコドンの導入 [PrimeSTAR[®] Mutagenesis Basal Kit (製品コード R046A) など] や一部を欠失させることなどにより、マーカーを含む pAUR135 ベクター領域除去後に目的遺伝子が機能破壊される形に設計する。
3. pAUR135 のクローニングサイトに挿入し、プラスミドを精製する。
4. プラスミドを破壊用断片の一箇所切断サイトで切断し、直鎖状にする。

(2) 出芽酵母の形質転換法

1. 酢酸リチウム法 (II-1 の (1) を参照) により形質転換を行う。
2. YPD 培地 2 ~ 5 ml で 6 時間から一晩培養した後、適宜、AbA を含む YPD 選択プレートに塗布する。
3. 取得した形質転換体の遺伝子機能の破壊を、形質の変化やゲノムのチェック等により確認する。

(3) マーカー除去株の選別

1. 遺伝子破壊された形質転換体、数 ~ 10 数クローンをそれぞれ YPGal のプレート上にストリークし、シングルコロニーを分離する。
(YPGal ; 2% Galactose, 2% Polypeptone, 1% Yeast extract)
2. YPGal プレート上に生育してきたコロニーを 10 ~ 数 10 個について、Aureobasidin A 感受性の確認および遺伝子機能の破壊の確認を行い、マーカー除去された遺伝子機能破壊株を選別する。

[注意]

生育阻害配列 GIN11M86 の発現はガラクトース誘導性の GAL10 プロモーターにコントロールされています。したがって、ガラクトース資化性の高い宿主であるほど効率良くマーカー除去が起こります。宿主株のガラクトース資化性を確認してご使用ください。

【II-3. *A. nidulans* の形質転換法】

(1) 試薬類

- ・ 孢子懸濁液
スラント上の *A. nidulans* の孢子を 5 ml 0.1% Tween 80, 0.8% NaCl に懸濁し、ガラスろ過器 (3G1) または綿ろ過により、ろ液 (孢子懸濁液) を集める。
- ・ PD 培地 (1 L あたり)
Potato dextrose broth (Difco 社製) 24 g
- ・ SD 選択培地 (1 L あたり)
Polypepton S (和光純薬社製) 10 g
glucose 20 g
NaCl 0.8 M (終濃度)
agar 20 g
Aureobasidin A $\geq 2 \mu\text{g/ml}$
- ・ SD 軟寒天選択培地
SD 選択培地の agar を 1% にしたもの。約 45°C で保温しておく。
- ・ プロトプラスト化溶液
3 mg/ml Yatalase (製品コード T017)
0.3 mg/ml Lysing enzymes from *Trichoderma harziaum* (Sigma 社製)
0.8 M NaCl
10 mM リン酸ナトリウム buffer (pH6.0)
各コンポーネント添加後、溶液をろ過滅菌する。
- ・ Solution 1
0.8 M NaCl
10 mM CaCl_2
10 mM Tris-HCl (pH8.0)
ろ過滅菌、用時調製
- ・ Solution 2
40% (w/v) PEG4000
50 mM CaCl_2
50 mM Tris-HCl (pH8.0)

(2) *A. nidulans* の形質転換

- 100 ml の PD 培地に *A. nidulans* の孢子懸濁液 (0.5 ml) を植菌し、30°C で 12 ~ 20 時間振盪培養する (バツフル付き三角フラスコ等で激しく振盪する)。
- ガラスろ過器 (3G1) を用いたろ過により菌糸を集め、滅菌水で洗浄後、スパテル等で押さえて十分に水分を除く。
- 適量 (数百 μ l 相当) の菌糸を 10 ml のプロトプラスチック化溶液 (50 ml 容ポリプロピレン製遠心管) に加え懸濁する (菌糸の量は溶液中で菌糸がサラサラ動く程度)。
- 30°C で 1 ~ 2 時間ゆるやかに振盪しプロトプラスチック化する (顕微鏡で確認する)。
- ガラスろ過器 (3G2) によるろ液を、2,000 rpm 5 分間遠心し、プロトプラスチックを集める。
- プロトプラスチックを 0.8 M NaCl で 2 回洗浄する。
- プロトプラスチックを 2×10^8 /ml となるように Solution 1 に懸濁し、0.2 容量の Solution 2 を加えて緩やかに懸濁する (Solution 2 は粘性が高いため十分懸濁する)。
- 0.2 ml のプロトプラスチック懸濁液 (≥ 10 ml 容ポリプロピレン製遠心管) にプラスミド (20 μ l 以下) を加える (プラスミドは最大 20 μ g までにする)。
- 氷中で 10 分間静置する。
- 1 ml の Solution 2 を加え、緩やかに懸濁する。
- 室温で 10 ~ 15 分間静置する。
- 10 ml の Solution 1 を加えて緩やかに懸濁する。
- 遠心でプロトプラスチックを集め、上清をできるだけ除き、プロトプラスチックを 0.2 ml の Solution 1 に懸濁する。
- SD 選択プレートにプロトプラスチック懸濁液をのせ、5 ml (90 mm ϕ シャーレあたり) の SD 軟寒天選択培地を加え、プロトプラスチックが均一になるようにすばやく重層する。
- 30°C で 5 ~ 7 日間培養する。

※ 器具、溶液は全て滅菌し、操作は無菌的に行ってください。

【II-4. *E. coli* 株への形質転換法】

シャトルベクター pAUR101, pAUR112, pAUR123, pAUR224, pAUR135 または pAUR316 に DNA フラグメントを挿入し、*E. coli** HB101, JM109 などに通常の方法にて形質転換を行う。

*: GeNotype として *recA*⁻ を保持している *E. coli* であれば形質転換を行うことができます。

III. 実験例

pAUR112 DNA を用いて *S. cerevisiae* の実用酵母 (清酒酵母、焼酎酵母、パン酵母、ビール酵母) での形質転換効率を比較した。形質転換はプロトコールにしたがって行った。形質転換効率は、1 μ g プラスミドあたりの形質転換体のコロニー数で表わす。プラスミドを加えない場合は、選択培地には全くコロニーを形成しない。

表 2. pAUR112 による実用酵母の形質転換効率

菌株	Aureobasidin A 濃度 (μ g/ml)		
	0.5	1.0	2.0
清酒酵母	4.19×10^4	2.96×10^4	4.87×10^3
焼酎酵母	2.10×10^4	8.36×10^3	1.59×10^3
パン酵母	2.49×10^3	868	236
ビール酵母	1.95×10^3	1.25×10^3	350

IV. Q & A

- Q-1. *S. cerevisiae* の全ての菌株で、Aureobasidin A (AbA) 濃度 0.5 $\mu\text{g/ml}$ で形質転換体を選択できるか？
- A-1. 用いる宿主株の AbA に対する感受性によって、選択濃度は変わります。最小生育阻止濃度 (MIC) が 0.1 ~ 0.4 $\mu\text{g/ml}$ の宿主株の場合は、0.5 $\mu\text{g/ml}$ で選択できます。MIC が 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 以下、あるいは 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の宿主株の場合には、選択プレートの AbA の濃度を MIC の 2 ~ 5 倍に設定してください。
- Q-2. 染色体組込型ベクター pAUR101 を 1ヶ所切断して *S. cerevisiae* を形質転換するときに、どの制限酵素を用いるといいのか？
- A-2. *AUR1-C* 遺伝子内を 1ヶ所のみ切断する制限酵素のうち、*Stu*I, *Bst*PI, *Eco*O65I, *Bs*WI の 4種類のいずれかを使用してください。
- Q-3. pAUR123 ベクターや pAUR224 ベクターを用いたタンパク質の発現に、誘導操作は必要か？
- A-3. 必要ありません。pAUR123 の ADH1 プロモーターや pAUR224 の CMV プロモーターは構成発現のプロモーターですので、AbA 耐性の形質転換体を YPD や YE など適当な培地で生育させると、構成的にタンパク質が発現します。
- Q-4. pAUR ベクターが使用できる酵母の種は？
- A-4. pAUR101 は *S. cerevisiae* のほか、*Candida glabrata*, *Kluyveromyces marxianus*, *K. lactis* で使用できることを確認しています。これらの株に pAUR101 を *AUR1-C* 遺伝子や挿入遺伝子以外の箇所 (例えばクローニングサイト) で切断し、linear にして導入すると、non-homologous recombination により染色体への組込が起こり、 $10 \sim 10^3/\mu\text{g}$ DNA の効率で AbA 耐性となった形質転換体が得られました。pAUR112 は、*S. cerevisiae* 以外の酵母ではプラスミド状態で保持できませんが、linear にして用いれば、上記の株で染色体組込に使えます。また、pAUR123 も linear にして *C. glabrata* の形質転換に用いたところ、染色体に組込まれた状態でタンパク発現がみられました。pAUR224 は、*Schizo. pombe* 用のベクターです。一方、*Pichia pastoris*, *C. albicans* などでは、AbA 耐性遺伝子マーカーが十分に機能しないため、pAUR ベクターは使用できません。
- Q-5. AbA の作用機序は？
- A-5. AbA は、酵母のイノシトールリン酸セラミド合成系の酵素 Inositolphosphorylceramide (IPC) synthase の活性を阻害します⁵⁾。また、選択マーカーとして用いている *AUR1-C* 遺伝子は、IPC synthase をコードしていると考えられる *S. cerevisiae* の *aur1* 遺伝子に優性変異を導入し、AbA 耐性とした遺伝子です⁴⁾。
- Q-6. プラスミドを保有していない宿主酵母が AbA 耐性となる可能性は？
- A-6. AbA に対する自然耐性変異株は確認されていないので、まず発生しないと思われます。
- Q-7. *AUR1-C* 遺伝子を使って、*S. cerevisiae* の one-step gene disruption 法による遺伝子破壊は可能か？
- A-7. *LEU2* 遺伝子内に *AUR1-C* を挿入し、*LEU2* 遺伝子が機能しない状態 (*LEU2* 領域は *AUR1-C* の前後に 500 bp ずつ) にした DNA 断片を用いて、*S. cerevisiae* を形質転換し、*LEU2* 遺伝子の one-step gene disruption を行ったデータがあります。一倍体を形質転換した場合、Aureobasidin A 耐性形質を示すクローンの約 1/25 で *LEU2* 遺伝子の破壊が起こっていました。残りの耐性クローンでは、宿主が本来有している *aur1* 遺伝子が選択マーカー *AUR1-C* と置き換わっていました。しかし、二倍体株で one-step gene disruption を行う場合には、目的とするクローンの割合はさらに低くなると考えられますので、色の変化など形質転換体の他の選択方法がない場合にはあまりお勧めできません。

-
- Q-8. GIN11M86 とは、どんな DNA か？
A-8. GIN11 は、出芽酵母のテロメア ARS 領域を含む DNA 配列です。GIN11 が高発現されると生育阻害を引き起こしますが、ARS 活性は生育阻害活性とは、直接関係はありません。GIN11M86 は GIN11 に人為的に変異を導入し、ARS 活性を消失させたものです。

- Q-9. pAUR135 は、出芽酵母ならどんな株にでも使えるか？
A-9. GAL10 プロモーターを用いた誘導発現を行いますので、ガラクトース資化性がない株では使えません。まず、宿主株のガラクトース資化性を確認してください。

[一倍体酵母の場合]

ガラクトース資化性の高い株では、使用方法に示した方法により、マーカー除去されたクローンが非常にスムーズに得られます。いくぶん効率は落ちますが、ガラクトース資化性がやや弱い株でもマーカー除去株の選別は可能です。

[二倍体酵母の場合]

やはり、ガラクトース資化性が重要です。特に実用酵母の場合、ガラクトースプレート上のコロニー生育にバラツキの出る株が多く、それも影響することがあります。例えば、ガラクトース資化能の強い焼酎酵母協会 2 号の場合では、一倍体株とほぼ同様にガラクトースプレート上で生育阻害が起こり、マーカー除去が期待できますが、細かいバックグラウンドコロニーが出やすいので十分なシングルコロニーの分離が必要です。また、バラツキが非常に大きい協会台研 396 号では、ガラクトース資化性のよいコロニーでだけ、生育阻害およびマーカー除去が起こる傾向が見られますので、多めの形質転換体で検討することが必要です。一方、資化能の弱い清酒酵母協会 7 号などでは、生育阻害にいたらない弱い生育抑制が全体に現れる傾向がみられます。そのため、形質転換体を YPGalactose の液体培地で 1～3 日振盪培養し、いったん宿主株との生育の差が確認された後、相同組換えによってマーカー除去株が生育を始めた時点で YPGalactose プレートでコロニー分離すると、マーカー除去体を得やすくなります。

- Q-10. pAUR316 は、*A. nidulans* 以外の *Aspergillus* 属でも使用できるか？
A-10. pAUR316 に含まれる *aurA^R* および AMA1 は、*nidulans* 以外の *Aspergillus* 属 (*A. oryzae*, *A. niger* など) でも十分に働くと考えられます。ただ、*nidulans* 以外の *Aspergillus* 属では、AbA に対する感受性のバラツキが大きい傾向があります。従って、AbA に対する感受性が低い株では、pAUR316 を用いた形質転換体の選択は困難ですが、感受性が比較的高い株では、形質転換体の選択が可能です。例えば、*A. niger* ATCC 6275 (IFO 6341) 株の場合、AbA に対する MIC は 1～2 $\mu\text{g/ml}$ であり、2.5～5 $\mu\text{g/ml}$ 濃度の選択プレートで pAUR316 による形質転換体の選択ができます。

各ベクターの塩基配列は、弊社ウェブサイトより、ダウンロードしていただけます (<https://www.takara-bio.co.jp/>)。

V. 参考文献

- 1) Takesako, K., Kuroda, H., Inoue, T., Haruna, F., Yoshikawa, Y., Kato, I., Uchida, K., Hiratani, T., and Yamaguchi, H. *J. Antibiot.* (1993) **46**: 1414-1420.
- 2) Hashida-Okado, T., Ogawa, A., Endo, M., Yasumoto, R., Takesako, K., and Kato, I. *Mol Gen Genet.* (1996) **251**: 236-224.
- 3) Hashida-Okado, T., Ogawa, A., Kato, I., and Takesako, K. *FEBS Letters.* (1998) **425**: 117-122.
- 4) Mumberg, D., Muller, R., and Funk, M. *Gene.* (1995) **156**: 119-122.
- 5) Nagiec, M. M., *et al.* *J Biol Chem.* (1997) **272**: 9809-9817.
- 6) 山本正幸 実験医学別冊「バイオマニュアルシリーズ 10 酵母による遺伝子実験法」(1994)
- 7) Barr, P. J., Brake, A. J., and Valenzuela, P. 編 水永武光・大隅良典共訳 酵母の遺伝子工学 (1994)
- 8) Kuroda, M., Hashida-Okado, T., Yasumoto, R., Gomi, K., Kato, I., and Takesako, K. *Mol Gen Genet.* (1999) **261**: 290-296.
- 9) Gems, D., Johnstone, I. L., and Clutterbuck, A. J. *Gene.* (1991) **98**: 61-68.
- 10) Hashida-Okado, T., *et al.* *Curr Genet.* (1998) **33**: 38-45.

VI. 関連製品

pAUR101 DNA (製品コード 3600)
pAUR112 DNA (製品コード 3601)
pAUR123 DNA (製品コード 3602)
pAUR224 DNA (製品コード 3603)
pAUR135 DNA (製品コード 3604)
pAUR316 DNA (製品コード 3605)
Aureobasidin A (製品コード 630466/630499)

VII. 注意

- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- PrimeSTAR はタカラバイオ株式会社の登録商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
テクニカルサポートライン
Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995
ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社