

## 9550 耐塩性酵母のナトリウム排出遺伝子の解析と応用に関する研究

助成研究者：渡部 保夫(愛媛大学 農学部)

味噌や醤油の製造に用いられる酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* は耐塩性を示すが、その耐塩性は高濃度の食塩が存在する環境で生育するために浸透圧やイオン濃度を巧妙に制御することにより達成されていると考えられる。後者は細胞から積極的な排出機構を介していると推察され、それに関係する因子として  $\text{Na}^+$ -ATPase と  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -アンチポーターを想定している。アンチポーターについては、同遺伝子のクローニング及び遺伝子破壊を行い、同アンチポーターの機能が耐塩性にとって重要であることを既に例証した。 $\text{Na}^+$ -ATPase については遺伝子クローニングと構造解析を既に行った。本研究では *Z. rouxii* で  $\text{Na}^+$ -ATPase 遺伝子 (*ZENA1*) の機能の解明を目的として、同遺伝子を破壊した破壊株を作製し、破壊株の耐塩性及び細胞膜 ATPase 活性の変化を検討した。さらに、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -アンチポーター遺伝子 (*ZSOD2*) を機能発現して塩感受性酵母の耐塩性を高めることができたので結果を報告する。

*ZENA1* の機能を評価するために、同遺伝子を破壊した変異株を以下のように作製した。*ZENA1* を含む DNA に *LEU2* DNA を挿入した *ZENA1::LEU2* を構築し、*Z. rouxii leu2* 株を形質転換した。*ZENA1* が破壊されたことをサザンブロット分析により確認した。同破壊体をいろいろな濃度の NaCl を含む寒天プレート上で培養することにより耐塩性を評価したところ、野生株と顕著な違いは認められなかった。すでに耐塩性に関係することが分かっている  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -アンチポーター遺伝子 (*ZSOD2*) は上記変異株では活性であるので、同タンパク質の機能が無視できる条件(中性及び弱アルカリ性)において同様の耐塩性評価を行ったが、差異は見いだされなかった。さらに、遺伝子破壊株の細胞膜 ATPase 活性を測定したが、破壊株における同活性の低下は全く観察されなかった。これらのことより、*ZENA1* は転写はされているが、活性な機能タンパク質にまで合成されないと考えられ、*Z. rouxii* の耐塩性における  $\text{Na}^+$ -ATPase の関与は小さいと結論した。一方、*ZENA1* と相同性を持つ二番目の遺伝子 (*ZENA2*) が存在するという結果を得た。*ZENA2* が機能タンパク質をコードしているかどうかは今後の検討課題である。

*Z. rouxii* 由来の  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -アンチポーター遺伝子 (*ZSOD2*) を利用した酵母の耐塩性化を試みた。*ZSOD2* を *GAL1* プロモーターと *CYC1* ターミネーターの間に挿入した酵母用プラスミドベクターを構築した。同ベクターを用いて塩感受性酵母を形質転換した。耐塩性を 5mM LiCl を含む培地での生育度から評価したところ、*ZSOD2* を導入された株は同培地で生育した。このことは  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -アンチポーター遺伝子を利用して生物の耐塩性化が可能であることを暗示している。



## 9550 耐塩性酵母のナトリウム排出遺伝子の解析と応用に関する研究

助成研究者：渡部 保夫（愛媛大学 農学部）

### 1. 研究目的

味噌や醤油の製造に用いられる酵母は耐塩性という特性を有している。耐塩性とは、環境中に高濃度の食塩が存在することによる浸透圧の変化やナトリウム等のイオン状態の変動に対して巧妙に調節適応することであると考えられる。前者の浸透圧に対する適応現象はこれまでに多くの研究者により検討されており、適合溶質（Compatible solutes）の一つであるグリセロール等の蓄積により細胞内外の浸透圧差を中和する機構が明らかにされている。筆者らは後者のイオン調節について研究を続けており、特に細胞に対して毒性を示すナトリウムイオン（Na<sup>+</sup>）の排出機構に注目している。現在、その排出に関係する因子として Na<sup>+</sup>-ATPase と Na<sup>+</sup>/プロトン（H<sup>+</sup>）アンチポーターを想定しており、これらの遺伝子を解析し、微生物や植物の細胞で正確に発現させれば、高塩環境下でも生育できる新規生物を分子育種できるものと考えている。本研究では、上記二つのタンパク質の遺伝子と耐塩性酵母の耐塩性との関連性を解析し、塩感受性であるアルコール・パン酵母でそれらの遺伝子を発現させ、その酵母の耐塩性がどのように変化するかを検討することにより、将来の有用飼料植物の耐塩性化という利用・応用への糸口を探ることを目的とした。耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* の Na<sup>+</sup>-ATPase 遺伝子（*ZENA1*）の構造解析、同遺伝子破壊株の作製、同遺伝子の転写発現量の変化、同遺伝子破壊酵母の細胞膜 ATPase 活性の変化を検討した結果、並びに *Z. rouxii* の Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-アンチポーター遺伝子（*ZSOD2*）を適当なプロモーターの制御下で塩感受性酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で発現させた結果を報告する。

### 2. 研究方法

#### 2-1 耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* 由来 Na<sup>+</sup>-ATPase 遺伝子（*ZENA1*）のクローニングと構造解析

既にクローニングされていた *Saccharomyces cerevisiae* の Na<sup>+</sup>-ATPase 遺伝子（*ENA1*）の塩基配列に従ってオリゴヌクレオチドを合成し、PCR 用プライマーとして用いて *ENA1* DNA を合成した。同 DNA 断片をプローブとして、*Z. rouxii* の染色体 DNA ライブラリーをスクリーニングした。二度のスクリーニングにより

*ZEN1* をコードする DNA 断片をクローニングした。同断片の塩基配列を常法に従って決定した。

## 2-2 *Z. rouxii* の *ZEN1* 遺伝子破壊株の作製

*ZEN1* を含む DNA 断片を pUC ベクターにサブクローニングした後、*ZEN1* のコーディング領域の後半 2/3 を除去、*S. cerevisiae* *LEU2* DNA を挿入し、*ZEN1::LEU2* DNA を回収した。同構築体を用いて *Z. rouxii leu2* 株をスフェロプラスト法に従い形質転換した。*ZEN1* DNA をプローブとしたサザンブロット分析により *Z. rouxii* の *ZEN1* が破壊されていることが確認できた株（以下 *ZEN1* 破壊株と述べる）を得た。

## 2-3 *ZEN1* 破壊株の耐塩性

*ZEN1* 破壊株および野生株一白金耳の菌体をそれぞれ 100  $\mu$ l の滅菌水に懸濁した。懸濁液 10  $\mu$ l を以下の寒天プレート上に滴下し 30°C で 2 ~ 8 日間保温し、生育度を比較した。使用した寒天（2%）プレートは 0 ~ 3 M NaCl を含む富栄養培地（pH 4.8）、0 ~ 3 M NaCl および 20mM MES を含む富栄養培地（pH 7.0）、50% ソルビトールを含む富栄養培地（pH 4.8）であった。

## 2-4 ノーザンブロット分析

全 RNA は Rose 等の方法に従い以下のように調製した。菌体（湿菌重量 1 ~ 3 g）を LETS 緩衝液（0.1M LiCl、10mM EDTA、10mM Tris-HCl（pH 7.5）、0.2% SDS、0.1% DEPC）1.25 ml に懸濁し、フェノール 1.5 ml、ガラスビーズ 5 g を加え、ボルテックスミキサーを用いて激しく攪拌した。破碎液に 2.5 ml の LETS 緩衝液を加えた後、遠心分離により上清を回収した。フェノール・CIAA 抽出を行った後、LiCl 沈殿を行い全 RNA を調製した。

全 RNA は常法通りホルムアルデヒド変性アガロースゲルを用いて分離後、ナイロン膜にブロットした。RNA は UV クロスリンカーを用いて膜に固定した。

プローブとしてジゴキシゲニンでラベルした DNA を用いた。ハイブリダイゼーションおよび免疫的発光検出はペーリンガー・マンハイム社製のキットを用いて、発光基質として AMPPD を用いて行い、X線フィルムに露光した。

## 2-5 *Z. rouxii* 細胞膜 ATPase 活性の測定

酵素試料として以下のように調製したクルード膜区分を用いた。菌体を 0.1M MES-Tris（pH 6.5）に懸濁した後、Tris、EDTA、DTT、PMSF をそれぞれ終濃度 50mM、5mM、5mM、1mM になるように添加し、液体窒素を用いて急速凍結した。融解後、試料液 6 ml 当たり 6 g のガラスビーズを加え、ボルテックスミキサーを用いて激しく攪拌した。破碎液に 6% ソルビトール、5mM EDTA、2mM DTT を含む 0.1M Tris-HCl（pH 6.5）を 4 倍量加え希釈後、低速遠心分離により上清を得た。高速遠心分離により沈殿を回収後、20% グリセロール、0.1mM EDTA、0.1mM DTT を

含む10mM Tricine-NaOH (pH 7.5) に懸濁した。同クルード膜区分は細胞膜以外に、ミトコンドリア膜、液胞膜等を含んでいる。

ATPase 活性の測定は 50mM MES-Tris (pH 5 ~ 8)、5mM MgCl<sub>2</sub>、5mM ATP、酵素試料からなる反応液を用いて 30℃で行った。反応液 0.8 ml に 0.5% モリブデン酸アンモニウムを含む 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液 1.6 ml、10% アスコルビン酸 16 μl を加えて 30℃ 30分間保温し、生じた青色を 750 nm で比色定量した。タンパク質の定量は、酵素試料を NaOH で加熱処理し、膜タンパク質を可溶化した後、Lowry 等の方法に従って行った。細胞膜 ATPase は特異的にバナジン酸により阻害されるので、80 μM バナジン酸により阻害される ATPase 活性を細胞膜 ATPase 活性とした。

## 2-6 ZENA1 と相同な遺伝子の同定

野生型 *Z. rouxii* 株の染色体 DNA を制限酵素 *EcoRI*、*HindIII*、*XbaI* で消化後、常法に従ってナイロン膜にブロットした。UV クロスリンカーを用いて固定後、*ZENA1 XbaI* 断片をジゴキシゲニンでラベルしたプローブを用いて以下の二つの条件でサザンブロット分析を行った。ブロット膜の最終洗浄の条件は、温和な条件：2X SSC、0.2% SDS、47℃と、厳しい条件：0.1X SSC、0.1% SDS、65℃であった。

## 2-7 *Z. rouxii* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> アンチポーター遺伝子 (*ZSOD2*) の *S. cerevisiae* での発現

*S. cerevisiae* 用発現ベクターとして pYES2 (Invitrogen 社製) を用いた。このベクターはマーカー遺伝子として *URA3* を、プロモーターとして *GAL1* プロモーターを、ターミネーターとして *CYC1* ターミネーターを、複製オリジンとして 2 μm オリジンを含んでおり、大腸菌とのシャトルベクターである。

*ZSOD2* のタンパク質をコードしているコーディング領域は *SspI* により切断することにより回収できる。同断片を pYES2 のマルチクロニング部位に挿入した。同構築体を用いてアルカリカチオン法に従い *S. cerevisiae ura3 ena1::LEU2::ena4* (Na<sup>+</sup>-ATPase 遺伝子を破壊することにより塩感受性になった株) を形質転換した。同株の LiCl 耐性を 5mM LiCl を含むアルギニン合成培地 (ウラシルを含まない) で培養することにより評価した。

## 3. 研究結果および考察

### 3-1 *Z. rouxii* ZENA1 遺伝子破壊株の作製とその性質

*Z. rouxii* は 3M のような高濃度の食塩存在下で生育でき、耐塩性を示す。これは多くの機能が関与することにより達成されているものと推察できるが、本酵母の浸透圧に対する適応が細胞内のグリセロール等の適合溶質の蓄積により達成されているという機構以外、確認されたものはない。筆者らは、同酵母の耐塩性機構を解明することを目的として、上記適合溶質に関係するもの以外の機構を検討することに

より、耐塩性の全体像を明らかにし、それらの機構を利用する方策をも入手したいと考え研究を続けている。

筆者らが研究している対象はナトリウム等のイオンの調節制御である。*Z. rouxii* 酵母では、高濃度の食塩存在下で培養されたときでも細胞内部のナトリウムイオン ( $\text{Na}^+$ ) 濃度は非常に低く抑えられており、特別な排出機構が存在するものと考えられた。まず、細胞膜において物質透過に関係すると一般に考えられているタンパク質に ATP をエネルギーとして積極的に物質を排出する ATPase という酵素がある。そこで、*Z. rouxii* の細胞膜を単離し、それに含まれる ATPase の性質を検討した(1)。一般に、酵母細胞の細胞膜 ATPase はプロトン ( $\text{H}^+$ ) を排出する  $\text{H}^+$ -ATPase であると考えられている。筆者らが単離した *Z. rouxii* 細胞膜の ATPase も同様に  $\text{H}^+$ -ATPase であり、 $\text{Na}^+$ により活性が刺激されるような、いわゆる  $\text{Na}^+$ -ATPase 特有の性質は示さなかった。次に、*Z. rouxii*  $\text{H}^+$ -ATPase の遺伝子 (*ZPMA1*) をクローニングした。その構造は既にクローニングされていた *S. cerevisiae* の  $\text{H}^+$ -ATPase 遺伝子 (*PMA1*) と非常に類似していた(2)。ここで、*ZPMA1* の転写及び翻訳発現が培地の食塩濃度に依存して高まることを認めた(3)。このことは *Z. rouxii* の  $\text{H}^+$ -ATPase の機能が同酵母の耐塩性にとって重要であることを暗示しており、さらにその酵素の機能により形成される細胞膜の  $\text{H}^+$ 勾配の重要性を示唆している。この  $\text{H}^+$ 勾配と  $\text{Na}^+$  排出を結び付ける因子として  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -アンチポーターという細胞膜輸送タンパク質を想定した。分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* から  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -アンチポーターのものと考えられる遺伝子 *SOD2* がクローニングされたことから、*Z. rouxii* からそれと相同性を示す遺伝子 (*ZSOD2*) をクローニングした(4)。同遺伝子はこれまでクローニングされていた  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -アンチポーターと構造が類似していたことから *Z. rouxii* のアンチポーターの遺伝子であると結論し、さらに同遺伝子を破壊したいわゆるノックアウト変異株を作製した(4)。同変異株は通常生育できる 3M NaCl を含む寒天プレート上で生育できず、耐塩性が低下した(4)。このことから、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -アンチポーターを介した  $\text{Na}^+$ 排出機構が *Z. rouxii* 細胞に存在し、同機構が同酵母の耐塩性にとって重要であることを例証した(4)。しかしながら、同変異株の耐塩性の低下は期待していたレベルよりも低く、これ以外の機構も関係していると思われた。

最近、酵母 *S. cerevisiae* から新規の細胞膜 ATPase 遺伝子 (*ENA1*) がクローニングされ、それが  $\text{Na}^+$ を輸送する  $\text{Na}^+$ -ATPase であることが分子生物学的に例証されたことから、上記と同様にその相同遺伝子 (*ZENA1*) をクローニングした(5)。このことは *Z. rouxii* の細胞膜にも  $\text{Na}^+$ -ATPase が存在することを示していた、上述した通り *Z. rouxii* の細胞膜の ATPase は  $\text{Na}^+$ -ATPase 的性質を全く示さないにもかかわらずである。ここで、*ZENA1* の塩基配列は DNA データバンクに登録済みであり、アクセス番号は D78567 である。

本研究では、最初に *ZEN1* の転写に及ぼす培地食塩の効果をノーザンブロット分析により検討した。*Z. rouxii* 野生株細胞を無食塩環境で対数期中期まで培養後、同細胞を 2M NaCl を含む培地で培養することにより食塩ショックを与えた。*ZEN1* mRNA は確認できたが、食塩ショックによる量的変化は観察されなかった（データ示さない）(5)。

次に、*ZEN1* をノックアウトした遺伝子破壊株を作製し、同遺伝子の機能を以下のように検討した(5)。*Z. rouxii* では遺伝子マーカーとしてロイシン要求性が利用でき、同変異が *S. cerevisiae* の *LEU2* 遺伝子により相補できる。そこで、*ZEN1* のコード領域の後半 2/3 を削除し、そこに *LUE2* の DNA を挿入した *ZEN1::LUE2* 構築体を作製した。同構築体を用いて *Z. rouxii leu2* 株を形質転換した。得られたロイシン非要求性株から、染色体 DNA を単離して *ZEN1* DNA をプローブとしたサザンブロット分析により目的とする遺伝子破壊を確認した（データ示さない、以下 *ZEN1* 破壊株と述べる）。*ZEN1* 破壊株の耐塩性を野生株と比較した。結果を図 1 に示した。*ZEN1* 破壊株と野生株の間で耐塩性（0～3 M NaCl）、耐浸透圧性（50% ソルビロール）において変化は認められなかった。*S. cerevisiae ENA1* 遺伝子についての研究から *ENA1* 遺伝子は中性から弱アルカリ性において機能することが示唆されていたこと、同破壊株においてなお Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-アンチポーター機能は活性であるが、培地の pH が中性からアルカリ性では H<sup>+</sup>勾配が緩衝され、アンチポーターの機能は無視できると考えられることから、*ZEN1* 破壊株の耐塩性試験を培地の pH を緩衝液により中性に保った条件において行った。両者の株の間に違いは認められなかった（図 1）。これらのことから、*ZEN1* 遺伝子すなわち Na<sup>+</sup>-ATPase は *Z. rouxii* の耐塩性にほとんど関与していないと推察した。

*Z. rouxii ZEN1* 破壊株と野生株の細胞膜 ATPase 活性を測定した。酵素試料はクルード膜区分であるが、バナジン酸が細胞膜 ATPase に特異的な阻害剤であることから、バナジン酸の存在により阻害される ATPase 活性を細胞膜 ATPase 活性とした。*ZEN1* は転写発現されていることから同遺伝子に由来するタンパク質は生合成されていると考えられる。そこで、*ZEN1* に由来する活性を検出するために、広い pH 範囲で ATPase 活性を測定した。結果は ATPase 活性の最適 pH プロファイルとして図 2 に示した。*ZEN1* 破壊によってもそのプロファイルに変化は認められず、最大活性も低下しなかったことから、*ZEN1* 遺伝子は最終的な機能性タンパク質にまでは発現されないと考えられ、*Z. rouxii* の細胞膜 ATPase 活性はほぼすべてが H<sup>+</sup>-ATPase (*ZPMA1*) に由来すると考えた。

*Z. rouxii* の Na<sup>+</sup>-ATPase をコードする遺伝子は本実験で検討した *ZEN1* 以外に少なくとももう一つ存在することが示唆された。それを示すサザンブロット分析の結果を図 3 に示した。左のプロットは右のプロットに比した温和な条件で分析して

おり、塩基配列の若干異なる遺伝子（相同性遺伝子）が検出できる。左のプロットでは、約 8 Kb の *Hind*III 断片と 1.4Kb の *Xba*I 断片に由来するバンドが検出されたが、右のより厳しい条件での分析ではそれらのバンドは消失した。この相同性遺伝子を仮に *ZENA2* とすると、*ZENA2* が機能しているかどうかを、遺伝子クローニング、遺伝子破壊等の実験により検討する必要がある。従って、*Z. rouxii* の耐塩性における  $\text{Na}^+$ -ATPase の関与については *ZENA2* の解析結果を加味してから結論を出したいと考えている。

### 3-2 *Z. rouxii* $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -アンチポーター遺伝子 *ZSOD2* の *S. cerevisiae* における機能発現

*Z. rouxii* 由来の  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -アンチポーター遺伝子 *ZSOD2* のコーディング領域を、同遺伝子を含む DNA 断片を *Ssp*I により切断することにより得た。同断片を *S. cerevisiae* 用発現ベクター pYES2 のマルチクローニング部位に挿入した。挿入した遺伝子の発現制御因子として *GAL1* プロモーターと *CYC1* ターミネーターを用いた。得られた組換えベクター（pYES2-*ZSOD2*）を用いて *S. cerevisiae* の塩感受性株を形質転換した。得られた形質転換体の耐塩性度を検討した。本実験では、LiCl に対する耐性として検討したが、Li<sup>+</sup>は Na<sup>+</sup>よりも細胞に対してより毒性であるので、得られる結果はより明瞭になると期待できる。5mM LiCl を含む培地での生育度を図4に示した。コントロールとして pYES2 ベクターで形質転換した細胞を用いた。コントロール株は 5mM LiCl を含む培地では生育できなかったが、pYES2-*ZSOD2* を持っている株は十分に生育した。この結果は  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -アンチポーター遺伝子の機能発現により酵母においては耐塩性の付与が可能であることを示している。

## 4. 今後の課題

*Z. rouxii* には  $\text{Na}^+$ -ATPase の2番目の遺伝子の存在が本研究により示されたことから、その遺伝子（*ZENA2*）の解析が必要である。また、*ZENA1* がコードする  $\text{Na}^+$ -ATPase 遺伝子の利用については、同遺伝子の構造から適当な位置に適当な制限酵素の部位が存在しないことから検討していないが、DNA デレーション法や PCR 法により目的とする DNA 断片を取得した後、いろいろな発現ベクターに組み込み、*S. cerevisiae* 等を形質転換し、本遺伝子による耐塩性化の可能性を検討する。

*Z. rouxii* の  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -アンチポーター遺伝子については *ZSOD2* と相同性をもつ2番目の遺伝子（*ZSOD22*）が存在していることも分かっており、同遺伝子のクローニングを終え、現在塩基配列を決定中である。*ZSOD22* の遺伝子破壊、*ZSOD2*/*ZSOD22* の二重遺伝子破壊等を行い *Z. rouxii* のナトリウム排出機構の全体像を明らかにしたいと考えている。*ZSOD2* の機能発現により *S. cerevisiae* の耐塩性の上昇が達成でき、同遺伝子による耐塩性の付与の可能性を示唆されたが、プロモーター等



を種々変えて遺伝子発現のための最適条件を確立し、遺伝子の安定化の為に組換え遺伝子の染色体への挿入を行う必要がある。

## 5. 文献

- (1) Y. Watanabe, M. Yamaguchi, and Y. Tamai, *Yeast*, **7**, 599 (1991).
- (2) Y. Watanabe, M. Shiramizu, and Y. Tamai, *J. Biochem.*, **110**, 237 (1991).
- (3) Y. Watanabe, Y. Sanemitsu, and Y. Tamai, *FEMS Microbiol. Lett.*, **114**, 105 (1993).
- (4) Y. Watanabe, S. Miwa, and Y. Tamai, *Yeast*, **11**, 829 (1995).
- (5) Y. Watanabe, A. Ichimiya, Y. Nagaoka, and Y. Tamai (submitted).

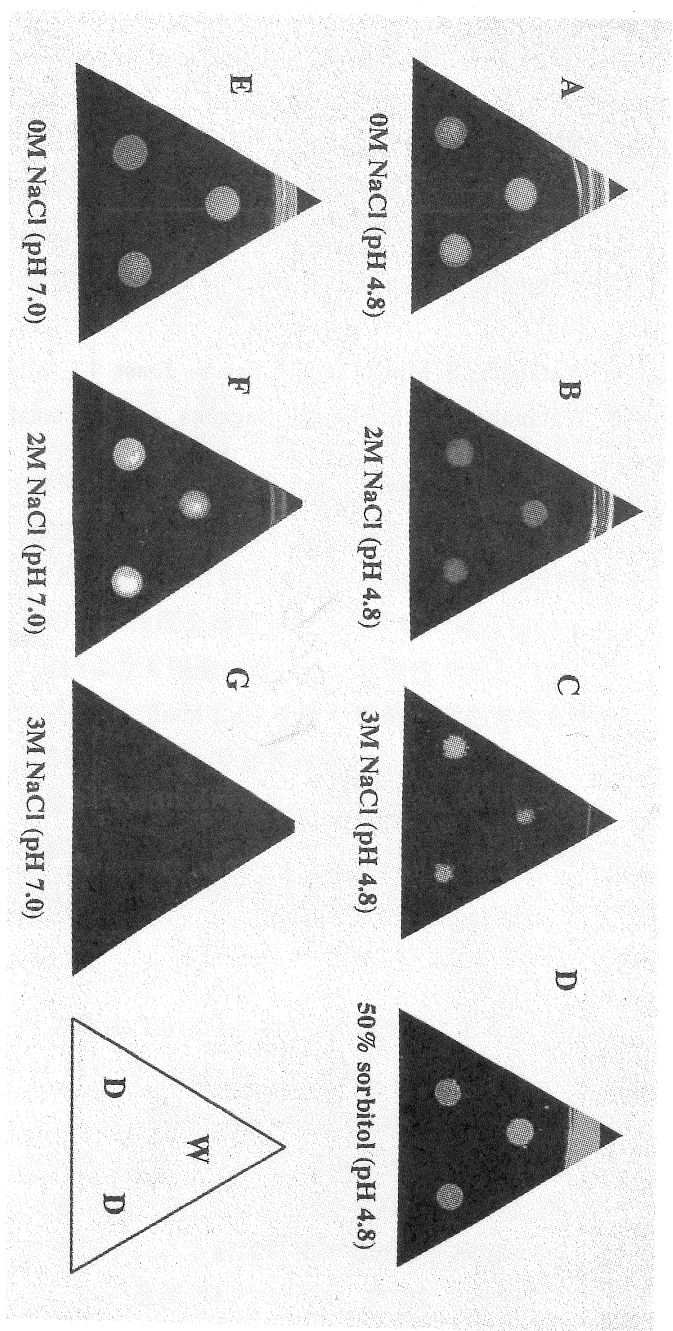


Figure 1. Growth of Wild-type Strain (W) and *Z-enul*Δ Disruptants (D1 and D3) on Various Media

The saturated-culture was diluted 10-times with sterile-water. The dilute (100μl) was spotted on the following agar plates. The plates prepared with YM medium (A, E), YM medium containing 2M NaCl (B, F), 3M NaCl (C, G), and 5% sorbitol (D) were incubated at 30°C. A, B, C, and D plates were adjusted pH to be 4.8. E, F, and G plates were to be 7.0. A and B plates were incubated for 1.5 days, B plate for 2.5 days, C plate for 7 days, D plate for 4 days, F plate for 3.5 days, and G plate for 8 days. The growth of wild-type strain or disruptant on the plate prepared with YM medium containing 1M NaCl was same to one on 0M or 2M NaCl plate.

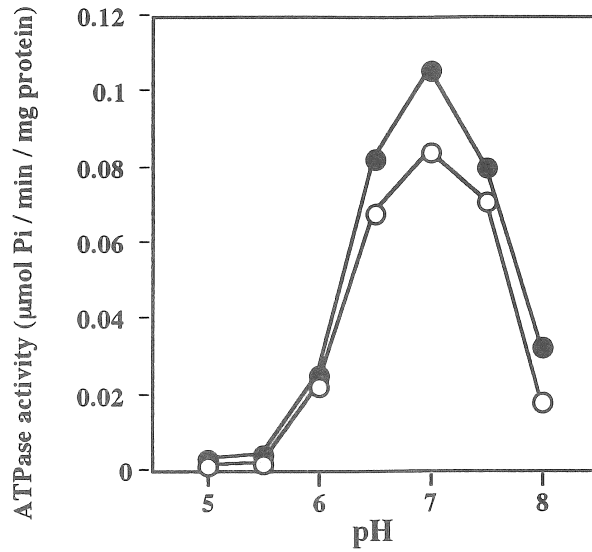


Figure 2. Effect of *ZENAI*-Disruption on Plasma Membrane ATPase Activity

—○— Wild type strain      —●— *ZENAI* -disruptant

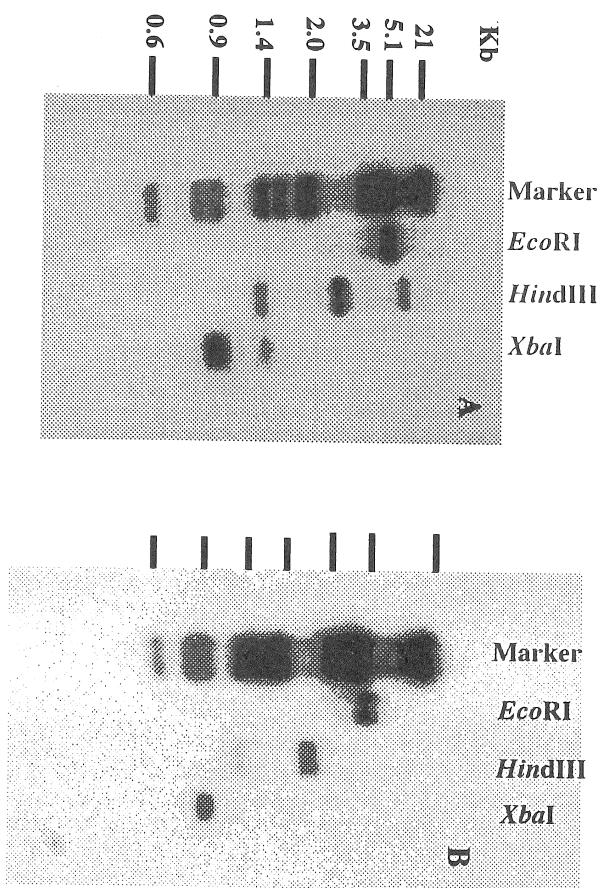
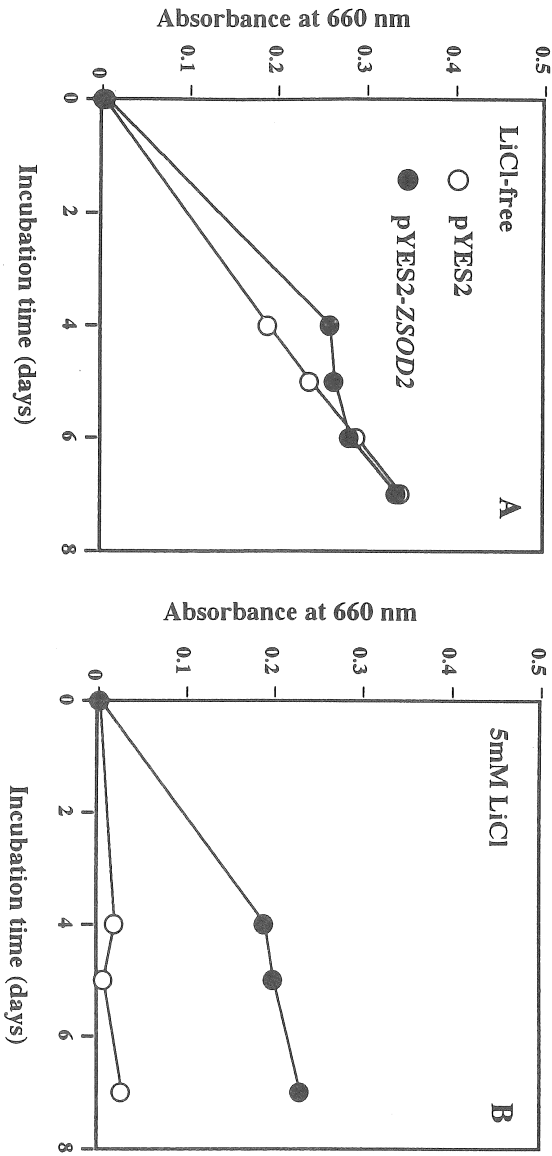


Figure 3. Southern Blot of Genomic DNA from *Zygosaccharomyces rouxii*

Genomic DNA was digested with the restriction enzymes indicated. Digoxigenin-labelled *XbaI*-fragment DNA was used as a probe. Blot filters were washed finally under the following conditions. A, 2X SS, 0.2% SDS, 47°C; B, 0.1X SS, 0.1% SDS, 65°C.



**Figure 4. Enhanced-Salt-Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* by ZSOD2 Gene from *Zygosaccharomyces rouxii***

Precultures of the salt-sensitive *S. cerevisiae* (*ENAI* :: *LEU2* :: *ENA4*) transformed with pYES2 and pYES2-ZSOD2 in Arginine-phosphate medium (pH 5.5) were inoculated into Arginine-phosphate medium containing 0mM or 5mM LiCl and 1% galactose at the inoculation size of 1:100. Expression of ZSOD2 is regulated under *GALI* promoter.

## Characterization and Utilization of Na<sup>+</sup>-Efflux Genes from a Salt-Tolerant Yeast

Yasuo Watanabe

Faculty of Agriculture, Ehime University

### Summary

The salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* is utilized industrially in making of miso-paste and soy-sauce. Its salt-tolerance seems to be achieved by the regulations of osmotic-pressure and intracellular ionic concentrations. Na<sup>+</sup>-ATPase and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter are supposed as factors that function in Na<sup>+</sup>-efflux mechanisms. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter gene (*ZSOD2*) cloned from *Z. rouxii* has been demonstrated to participate in the salt-tolerance by its gene-disruption analysis. To elucidate the role of Na<sup>+</sup>-ATPase gene (*ZENAI*), we constructed the *ZENAI*-disrupted mutant strain and examined the changes of resistant level to NaCl and plasma membrane ATPase activity of its disruptant. Moreover, we describe that the salt-tolerance could be elevated by functional expression of *ZSOD2* in a salt-sensitive yeast.

A *ZENAI::LEU2* mutant gene was constructed by the insertion of *LEU2* into *ZENAI* DNA and used to transform the *Z. rouxii leu2* strain. The level of salt-tolerance of an obtained *ZENAI* disruptant was almost same to that of the wild type strains by the estimation of growth on the agar plates containing various concentrations of NaCl. The level of plasma membrane ATPase activity of a *ZENAI* disruptant was not decreased by the gene disruption. From these results, it is thought that the functions of *ZENAI* product participate scarcely in the salt-tolerance of *Z. rouxii*. We found the presence of a second gene (*ZENA2*) homologous to *ZENAI*. The function of *ZENA2* remains to be clear.

We constructed a plasmid vector to express functionally the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter gene (*ZSOD2*). It was under the regulations of a *GALI* promoter and a *CYCI* terminator. When a salt-sensitive yeast was transformed by its plasmid, the obtained transformant could grow in the medium containing 5mM LiCl. This proposes that the elevation of resistant to salt could be achieved by functional expression of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter gene.