

総 説

# サブトラクション法でクローン化した菌糸形成関連遺伝子と、 遺伝子破壊にもとづく機能解析

鈴木 孝 仁

奈良女子大学理学部生物科学科

## 要 旨

工業的・医学的に重要視されている酵母 *Candida tropicalis* では、グルコースを炭素源とする半合成液体培地にエタノールを添加した培養で、高率に菌糸形成が誘導される。*C. tropicalis* のエタノール添加培養と、無添加の酵母型増殖を示す培養との間での遺伝子発現の差異を利用し、両者で共通に発現する遺伝子をハイブリッド形成させて差し引くサブトラクション法によって、この菌糸形成過程で強く発現する遺伝子群を残し、それらを単離する方法を開発した。サブトラクションの後にクローン化した遺伝子群の相補的 DNA の塩基配列を決定し、相同性検索を行ったところ、分裂酵母のチアミン生合成遺伝子 *ntm1+* やパン酵母のチアミン生合成遺伝子 *THI5* と相同性の高いホモログ (*Ctnmt1+* と命名) が分離された。*Ctnmt1+* の転写発現は、エタノール無添加培養では、対数増殖期後期で強く、定常期に入る前の Post-diauxic な増殖期では微弱となった。一方エタノール添加培養での発現は、酵母の脱極性化の進む第一相で強く、菌糸の伸長が起こる第二相で微弱となった。第一相の増殖期にチアミンを培地に添加すると、その後の菌糸伸長に遅れを生じ、酵母型に近い短い菌糸が連鎖し枝分かれした菌糸体が形成された。

この遺伝子を機能喪失させるため、*URA3* 及びハイグロマイシン耐性の遺伝子を挿入させて遺伝子破壊を行ったところ、エタノール無添加培養でも菌糸形成が起こるようになり、またチアミンの類似物であるオキシチアミン添加によっても、エタノール無添加培養で菌糸が形成されるようになることから、*Ctnmt1+* の発現によるチアミン生合成は菌糸の伸長を第一相でむしろ抑制することにはたらいっていることが示唆された。さらにこの遺伝子破壊株がチアミン要求性にはならないことから、*C. tropicalis* 酵母には、*Ctnmt1+* 以外にもチアミン生合成に必須な別の遺伝子群があることが示唆された。

**Key words:** 菌糸形成 (hyphal formation), *Candida tropicalis*, サブトラクション法 (subtractive gene cloning), 遺伝子破壊 (gene disruption), チアミン生合成遺伝子 (thiamine biosynthesis gene), *THI5* 遺伝子 (*THI5* gene)

## はじめに

単細胞性で出芽によって増殖する酵母菌類には、培養条件が変わることによって細胞が縦長に伸長して連鎖状に連なり、先端成長で増殖する菌糸増殖の形態をとり得る二形性酵母が見られる<sup>1)</sup>。出芽増殖の典型であるパン酵母にも、窒素減を制限すると菌糸形態で増殖する株が存在し、菌糸形成のモデル生物として、その遺伝的解析に使われてきた<sup>2-3)</sup>。他方、ヒトや動物を宿主にして感染を引き起こすカンジダ酵母や、植物を宿主とする病原真菌の多くで、二形性に伴う菌糸形成は、宿主感染と組織侵襲の際過程で見られる増殖形態であることから、病原性因子として重要視されている<sup>4)</sup>。

菌糸形成に関わる遺伝子のはたらきに関しては、パン酵母や *Candida albicans* で研究が進んでいる。寒天培地内

別刷請求先: 鈴木 孝仁

〒630-8506 奈良市北魚屋西町  
奈良女子大学理学部生物科学科

への菌糸増殖の有無を表現型の指標にして、特定の遺伝子を機能欠損させ、あるいは機能亢進させたときに、この指標がどう変わるかを基にして、個々の遺伝子のはたらきおよび複数の遺伝子間の相互作用が明らかになった<sup>2)</sup>。その結果、菌糸形成には cAMP や MAP キナーゼの関わる信号伝達経路がはたらいっていることが明らかとなった<sup>5)</sup>。しかしながら、酵母型から菌糸型へと増殖形態が変わっていく生理学的過程でどのような遺伝子がどのような時間的変化を伴って機能しているのかといった疑問に答えるには、寒天培地内への増殖を指標にする解析方法だけでは限界があり、例えば液体培養で経時的に生理的变化を追跡できる実験系が必要となってくる。このためには、人為的に制御可能な条件下で、同調的に菌糸形成が誘導できることが望まれる。上原らは、石油分解酵母 *C. tropicalis* でグルコースを炭素源とする液体半合成培地中に 2.5% のエタノールを添加すると、高率に菌糸 (偽菌糸) を誘導できることを報告した<sup>6)</sup>。この酵母は、石油成分であるアルカンや、高級脂肪酸を酸化す

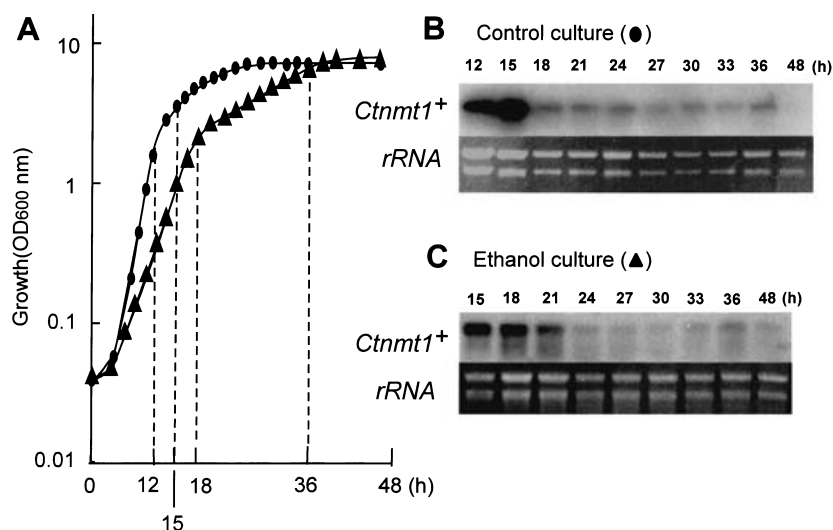


Fig. 1. Growth curves and the Northern analysis of *Ctnmt1*<sup>+</sup> in the control and ethanol culture in *C. tropicalis*. The growth curve of the ethanol culture was biphasic (A). The strong expression of *Ctnmt1*<sup>+</sup> was limited within the first growth phase of this culture (B) and during the late log-phase of the control culture (C).

Table 1. Plasmid clones carrying subtracted cDNAs preferentially expressed in the ethanol culture

Plasmid clones	Homologous genes*: Remarks
A8	<i>nmt1/THI5</i> : Thiamine biosynthesis
A12, E11	<i>ERG20</i> : Farnesyl-diphosphate synthetase
B12	<i>CRL1</i> : GTP-binding protein
E6	<i>SOK1</i> : Suppressor of cAMP-dependent protein kinase mutant
E12	<i>DDR48</i> : Stress response protein
G3	<i>CTR68: THR4</i> (threonine synthase)-like gene
H12	none
	<i>APR2</i> : Actin-related protein
	<i>FHL1</i> : Regulation of rRNA processing

\*According to the *Candida* blast search (<http://www-sequence.stanford.edu:8080/bncontigs6.html>)

る能力があり、これら炭化水素を唯一の炭素源とした無機培地で増殖させることができる。そのため、石油や廃油から有益な分解産物を得る目的で、また炭化水素をビタミンやアミノ酸などに転化する工程で利用されるなど、工業的に重要な微生物として注目されている材料である<sup>7)</sup>。またこの酵母は、土壌から分離されるだけでなく、ヒトや動物の体内からも分離される<sup>8)</sup>。

*C. tropicalis* のエタノール添加培養において、この酵母は増殖速度の異なる二相の増殖曲線を示す (Fig. 1A)<sup>9)</sup>。第一相では、添加したエタノール濃度が2.5%に維持され、酵母が大型球形化して脱極性の状態に至る (Fig. 2A-B)。第二相になってエタノール濃度は減少し始め、大型球形細胞から菌糸が出現し、極性伸長する (Fig. 2 C-D)。第二相の培養から菌を集菌して新しいエタノール添加培地に移すと、菌糸の伸長が抑制され、脱極性化した酵母型細胞が出現することから、第一相ではむしろ菌糸形成が抑制され、第二相でその抑制が解除されると考えられている<sup>9)</sup>。

この酵母は有性生殖世代をその生活史にもたず、二倍体の核相を有している点で、遺伝的交雑ができず、劣性

の遺伝子突然変異体を得ることが困難であった<sup>10)</sup>。そこで菌糸形成で発現する遺伝子群を解明するためには、エタノール添加培養とエタノールを含まない対照培養 (酵母増殖のみ) との遺伝子発現の差を利用し、サブトラクション法<sup>11)</sup> をこの現象の解析に応用することにした。すなわち、菌糸形成に先立つ第一相で発現している mRNA から相補的 DNA を合成し、酵母型増殖のみが起こる対象培養で発現する mRNA から相補的 DNA を合成し、前者から後者を差し引くことによって、残った相補的 DNA を菌糸形成の過程で特に発現する遺伝子群として得て、さらにそこから個々の遺伝子を分離同定することを我々は試みた<sup>12)</sup>。菌糸形成の過程ではたらく遺伝子としてクローン化されたものについて、ノーザン解析をした結果、エタノール添加培養で強く発現する一群の遺伝子が得られた (Table 1)。

#### チアミン合成遺伝子 *nmt1*<sup>+</sup> のホモログ *Ctnmt1*<sup>+</sup>

Table 1 で示した遺伝子群には、分裂酵母のチアミン合成遺伝子 *nmt1*<sup>+</sup> と相同性の高いものが含まれていた。そこでこのホモログの全長をサブクローニングによって

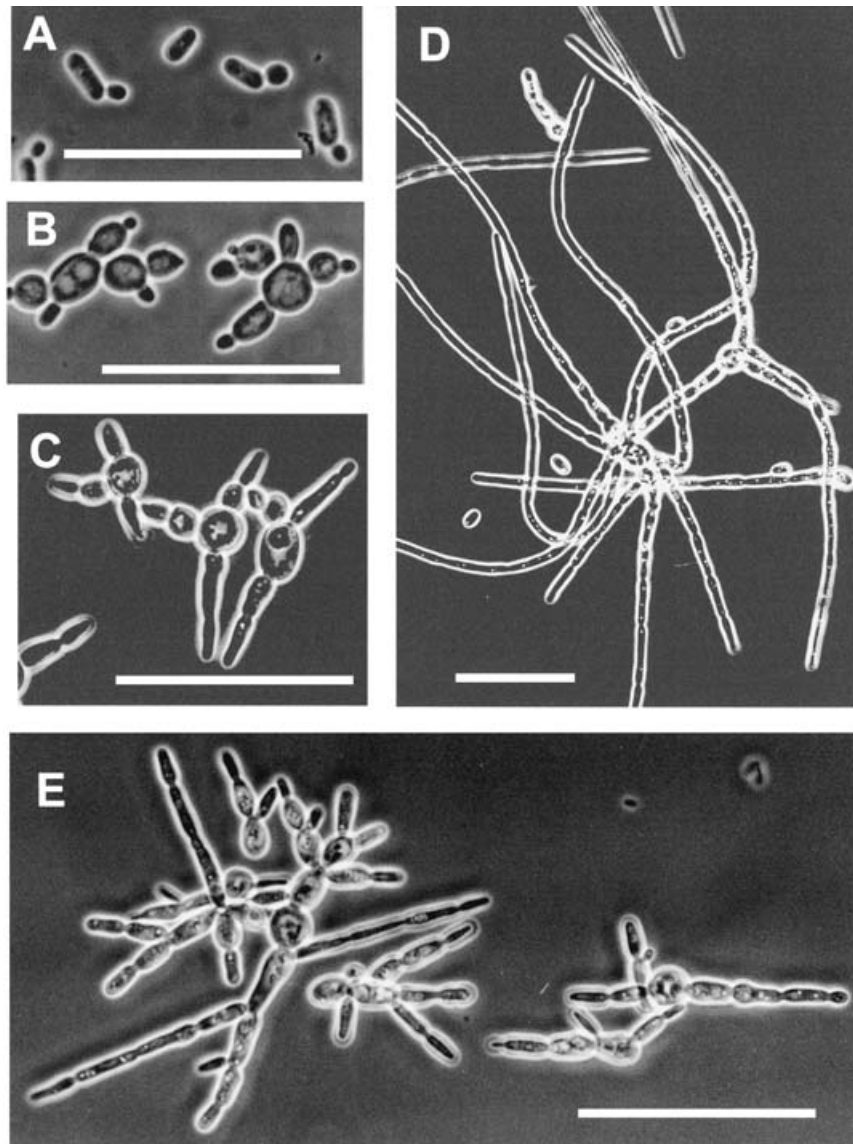
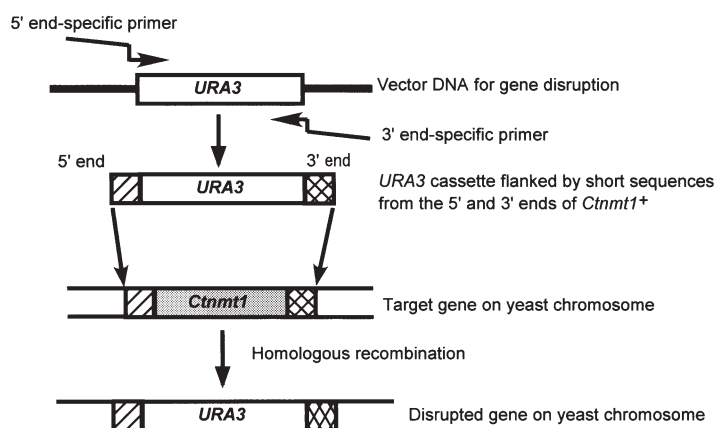


Fig. 2. Phase-contrast micrographs of *C. tropicalis* Pk233 cells grown in the ethanol culture at 0 time (A), at late stage of first growth phase showing appearance of the swollen cells (B), at the early stage of second growth phase showing the production of pseudohyphal filaments (C) and at 48h. The addition of exogenous thiamine ( $3 \mu\text{M}$ ) at the first growth phase brought about the formation of a mycelium consisting of yeast cells in chains with branching (D). Bar represents  $50 \mu\text{m}$ .

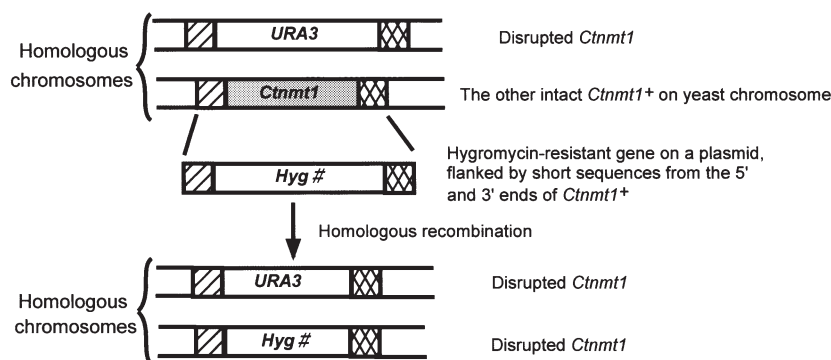
得た。次に塩基配列を決定したところ、開いた読み枠 (Open Reading Frame) は 1026 個の塩基対からなり、アミノ酸残基数は 341 であった。ホモロジー検索を行ったところ、分裂酵母の *nm11*<sup>+</sup>産物とはアミノ酸レベルで 58%であったが、パン酵母の *THI5*産物とは 73%とさらに相同性が高かった。*THI5*は *THI11*, *THI12*, *THI13*と共に遺伝子ファミリーを成しており、お互いにアミノ酸残基が 1 つしか変わらず、詳細な機能は不明とされている<sup>13</sup>。*nm11*<sup>+</sup>及び *THI5*は、チアミン生合成経路のうち、ヒドロキシメチルピリミジン残基の生合成最終段階のリン酸化酵素をコードしている<sup>13-15</sup>。一方、パン酵母では *THI2*/*THI3*がチアミン生合成と細胞外からのチアミンの取り込みの調節に関与しており、これらは *THI5*とは全く相同性が認められない<sup>16</sup>。最近になって、パン酵母がチア

ミンを含まない培地で培養される際に、対数増殖期でこれら *THI5* 遺伝子ファミリーが発現されることが判明した<sup>17-18</sup>。そこで機能がよく分かっている分裂酵母 *nm11*<sup>+</sup>を相同な相手と想定して、この *C. tropicalis*におけるホモログを暫定的に *Ctnmt1*<sup>+</sup>と命名した。分裂酵母の *nm11*<sup>+</sup>はチアミンを含まない培地では転写されるがチアミンを添加するとその発現が完全に抑制される<sup>14</sup>。またこの遺伝子を欠失した分裂酵母の変異株ではチアミン要求性を示し、この遺伝子の機能を完全に欠いたとしても致死になるわけではない<sup>14-15</sup>。

対照培養及びエタノール添加培養における *Ctnmt1*<sup>+</sup>の発現をノーザン解析によって調べた (Fig. 1B-C)。対照培養では、対数増殖後期において *Ctnmt1*<sup>+</sup>の発現が強くなり、その後定常期に至る Post-diauxic の時期を通じて

(1) 1st step of gene disruption : Insertion of *URA3*

## (2) 2nd step of gene disruption : Insertion of hygromycin-resistant gene

Fig. 3. The process of gene-disruption of *Ctnmt1*<sup>+</sup> in *C. tropicalis*.

発現が弱いまま持続した。完全に定常期に入った48時間の培養では、*Ctnmt1*<sup>+</sup>の発現はほとんど見られなくなった。一方、エタノール添加培養では、*Ctnmt1*<sup>+</sup>の発現は、第一相で強く、第二相で微弱になることが判明した。また *Ctnmt1*<sup>+</sup>の発現は3 $\mu$ Mのチアミン添加により直ちに抑制された。そこで、エタノール添加培養の様々な時点でチアミンを添加し、*Ctnmt1*<sup>+</sup>の発現を抑制して菌糸形成への影響を調べた結果、第一相後期までにチアミンを添加すると菌糸細胞の伸長が遅れ、酵母型に近い細胞が連鎖状につながった枝分かれの多い菌糸体の形態が見られるようになった (Fig. 2E)。そこで、遺伝子 *Ctnmt1*<sup>+</sup>は、チアミンの生合成とともに菌糸の成長にも関わっている可能性が示唆された。*Ctnmt1*<sup>+</sup>と菌糸形成との因果関係の有無をさらに明確にするために、遺伝子破壊によって *Ctnmt1*<sup>+</sup>の機能を失わせた場合、及びチアミンの代わりにチアミンアナログを培養に添加した場合に、それぞれ菌糸形成への影響がどうなるのかを調べることにした。

***Ctnmt1*<sup>+</sup>破壊株の作成とその表現型**

*C. tropicalis* 酵母は二倍体であるため、特定の遺伝子を破壊して機能を失わせようとする場合に、それぞれの相同染色体上にある双方の対立遺伝子を破壊しなければな

らない。*C. albicans* の *URA3*<sup>-</sup>株においては、Fonzi と Irwin によって、Sequential gene disruption strategy が開発された<sup>19)</sup>。この方法では、サルモネラ由来の *hisG* 直列配列が両脇にある選択マーカー *URA3* のカセットを、相同組換えによって当該遺伝子に挿入させ、*Ura3*<sup>+</sup>となった組換え体を先ず選択する。次にこの組換え体から、*hisG* 直列配列を介してルーピングアウトを起こし、挿入された *URA3* 部分が抜け出した *Ura*<sup>-</sup>を5-フルオルオルチン酸添加培地で選択する。こうして再び *Ura*<sup>-</sup>となったヘテロ破壊株のもう一方の野生型対立遺伝子を壊すために、選択マーカーとして再び *URA3* を使う。実際この方法を *C. tropicalis* 酵母に応用したところ、最初の方の遺伝子破壊をしてヘテロ接合体を作製するまでは順調に行くものの、もう一方の野生型対立遺伝子を壊そうとすると、すでに破壊した遺伝子座に残っている *hisG* とカセットの *hisG* とが組換えてしまって、第二の野生型対立遺伝子を破壊することが極めて困難であることが判明した。そこで Fig. 3 に示すように、*Ctnmt1*<sup>+</sup>遺伝子座の5'末端側と3'末端側の塩基配列をプライマーとしてPCR法で *URA3* 遺伝子の5'末端側と3'末端側に付加し、*hisG* 直列配列を含まない遺伝子破壊用のカセットを作製した。このカセットを染色体上の一方の *Ctnmt1*<sup>+</sup>遺伝子座で相同

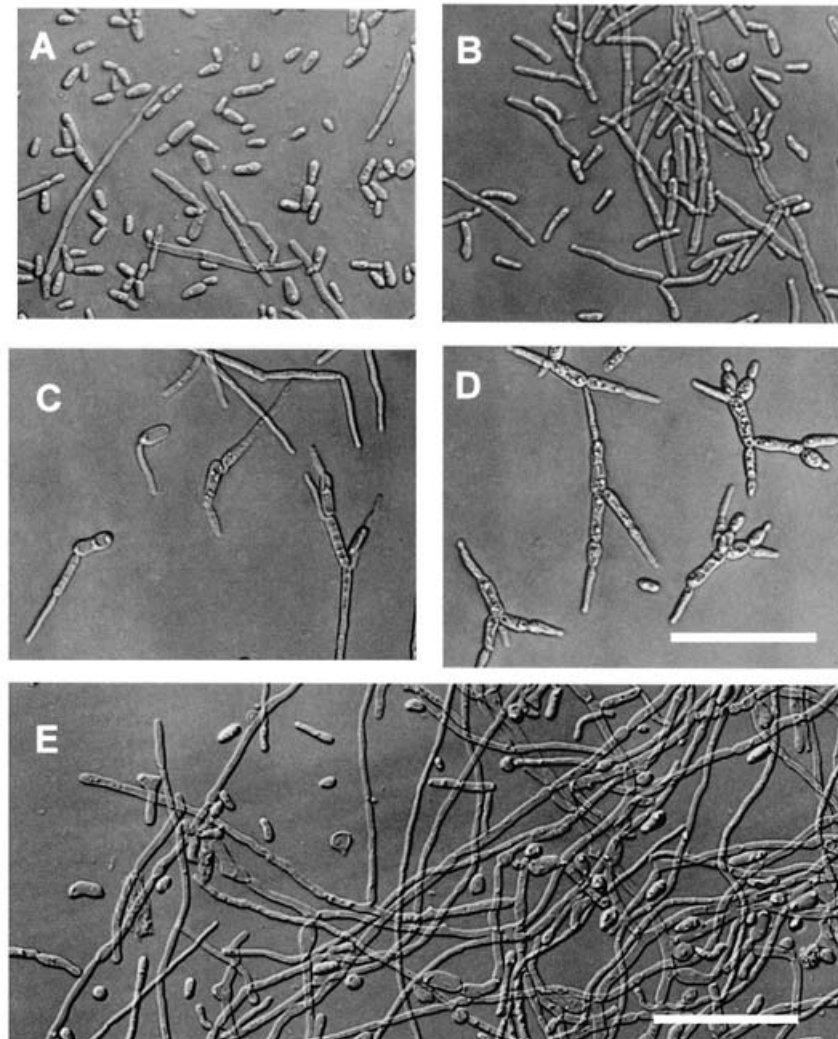


Fig. 4. Photographs of differential interference contrast microscopy of cells of *Ctnmt1*-disruptant, *nmn2*: in the control culture (A), in the control culture supplemented with thiamine (B), in the ethanol culture (C) and in the ethanol culture supplemented with thiamine (D). (E) pK233 cells cultured in the control culture supplemented with 10  $\mu$ M oxythiamine. Bar represents 50  $\mu$ m.

組換えをおこさせ、*URA3* 遺伝子を挿入して破壊した。この段階で、宿主の *C. tropicalis* 酵母は *Ura*<sup>+</sup> になってしまっているので、もう一方の *Ctnmt1*<sup>+</sup> 対立遺伝子を破壊する目的で *URA3* 遺伝子の挿入を行うことはもはやできない。そこで、第二の野生型対立遺伝子にはハイグロマイシン耐性遺伝子を挿入して、ハイグロマイシン耐性となる組換え体を選択することとした (Fig. 3)。 *Ctnmt1*<sup>+</sup> 遺伝子座の 5'末端側と 3'末端側の塩基配列を付加したハイグロマイシン耐性遺伝子のカセットを作製し、ハイグロマイシン添加培地でこの耐性遺伝子が挿入された破壊株を選択した。こうした二段階の工程を踏むことで両方の *Ctnmt1*<sup>+</sup> 対立遺伝子を破壊した。破壊株はチアミンを加えないエタノール無添加培地で増殖速度が遅くなるものの、最終的に達する菌濃度は未破壊株とほとんど差が見られなかった。またこの破壊株では、エタノール無添加の対照培養でも、伸長した菌糸の細胞が出現した (Fig. 4A)。この対照培養にチアミン (3~10  $\mu$ M) を加えるこ

とによって増殖速度の回復が見られ、菌糸型細胞と酵母型細胞が混在した培養となった (Fig. 4B)。チアミンを添加しないエタノール添加培地では第一相の増殖速度が遅いものの、約 1 本の菌糸を第二相で生じた (Fig. 4C)。チアミンを加えたエタノール添加培地では第一相での増殖速度が回復し、短い菌糸が枝分かれした形態となった (Fig. 4D)。これらの結果から、*Ctnmt1*<sup>+</sup> 遺伝子破壊株は、チアミン要求性にはならないこと、培地にチアミンを加えないと対照培養でもエタノール添加培養でも破壊株の増殖速度が遅くなり、チアミンを培地に加えることによって増殖速度が未破壊株と同程度まで回復することから、*Ctnmt1*<sup>+</sup> 遺伝子はパン酵母の *THI5* 遺伝子ファミリーと同様に、特定の増殖相においてはたらくチアミン合成酵素をコードしている可能性が示唆された。また *C. tropicalis* においても、パン酵母でチアミン生合成調節の主役を占める *THI2/THI3* のような別のチアミン生合成調節遺伝子や *Ctnmt1*<sup>+</sup> の同義遺伝子があり<sup>13, 16)</sup>、当該の *Ctnmt1*<sup>+</sup>

のみの遺伝子破壊ではチアミン要求性にならないのではないかとの推論も成立し得る。

#### チアミンアナログ添加による菌糸形成への影響

*Ctnmt1*<sup>+</sup> 遺伝子破壊株でむしろ細胞の伸長が起こるといふ事は、*Ctnmt1*<sup>+</sup> 遺伝子の発現が菌糸形成過程で抑制的にはたらいっていることを示している。外から与えたチアミンは酵母細胞に急速に取り込まれ、細胞内プールとして蓄えられることが知られている<sup>13-15</sup>。チアミンはチアミンピロリン酸に変えられてトランスケトララーゼの補酵素として機能する。チアミンのピリミジン残基に存在するアミノ基が水酸基に代わったオキシチアミンは、チアミンのリン酸化を阻害し、さらにトランスケトララーゼに結合して不可逆的な阻害効果をもたらすことが分かっている<sup>20</sup>。そこで、オキシチアミンを *C. tropicalis* の培養に添加した場合に菌糸形成の抑制にどのような影響を受けるのかを調べてみた。オキシチアミンを培地に 10 μM から 20 μM の濃度で添加したところ、増殖がわずかに抑えられる条件でエタノール無添加の対照培養においても菌糸形成が起こるようになった (Fig. 4E)。この場合、酵母が大型球形化する過程を経ずに菌糸が出現した。このことは、*Ctnmt1*<sup>+</sup> 遺伝子破壊株でのエタノール無添加の培養で菌糸が形成されることと共通している。またエタノール添加培養に同様な濃度でオキシチアミンを加えると、短く枝分かれした菌糸体のそれぞれの菌糸から長い菌糸がさらに伸長する現象が見られた。

#### *Ctnmt1*<sup>+</sup> の発現は酵母増殖の生理状態を反映している

本研究によって、*Ctnmt1*<sup>+</sup> の発現によるチアミン生合成は単に炭水化物代謝における補酵素の補給という役割だけでなく、細胞のある種の生理的状态を反映している側面が見られる。酵母細胞内のチアミンピロリン酸のプールは、外から加えられるチアミンが取り込まれることによって数千倍の濃度にまで達することが知られている<sup>14-15</sup>。エタノール添加培養にチアミンを加えると菌糸伸長に遅れを生ずる現象は、チアミンを加える時期が第一相に限られているという特徴が認められた。これは *Ctnmt1*<sup>+</sup> 転写発現が起こる時期にのみ、細胞外からのチアミン供給が形態形成に影響を与えることを意味している。その点では、*Ctnmt1*<sup>+</sup> の発現は菌糸の伸長がまだ起きていない酵母型での増殖期に限られている。

ところでソラマメに赤色斑点病を引き起こすさび菌 *Uromyces fabae* では、チアミン生合成が発生分化に関連している。さび菌の菌糸体がソラマメの細胞間隙を走り、宿主細胞内に吸器とよばれる特殊な形態をした期間を形成して栄養分を摂取する。こうした寄生生活のための吸器を発生分化する過程では、チアミン生合成が活発となり、その際に分裂酵母の *nmt1*<sup>+</sup> 及び *nmt2*<sup>+</sup> と相同な遺伝子が強く発現されていることが判明した<sup>21</sup>。こうした現象と比較して見ると、*C. tropicalis* 酵母のエタノール添加培養では、菌糸形成に先立つ酵母の大型球形化（脱極性化）の過程で、*Ctnmt1*<sup>+</sup> の転写発現によるチアミン生

成が活発となり、先端成長に移行した第二相ではむしろこのチアミン生合成は微弱になっている。第一相の時期にチアミンを培地に添加することは、細胞内のチアミンプールを多くすることになり、第二相への移行が遅れるため、酵母増殖に似た枝分かれの多い菌糸体ができる。他方、チアミン生合成が微弱になっている第二相の時期にチアミンを培地に添加しても、菌糸の伸長には全く影響しない。このことは、第一相から第二相への転換過程において、*Ctnmt1*<sup>+</sup> の発現によるチアミン生合成がスイッチオフされ、菌糸の伸長の過程に入ってしまうとチアミンの生合成をあまり必要としない生理状態に不可逆的に入っているとみなすこともできよう。

菌糸の伸長過程に入ったエタノール添加培養の第二相と同様に、チアミンの生合成をあまり必要としなくなる生理的状态に入る例は、分裂酵母の接合とそれに伴う細胞凝集が起こる過程に見ることができる<sup>22</sup>。分裂酵母の接合過程でチアミンを添加すると、接合の過程が進行しなくなる。こうしたチアミンがかかわっている現象においては、チアミンがチアミンピロリン酸の前駆物質として炭水化物代謝における補酵素の供給に関わっているという役割だけでなく、細胞のある種の生理的状态を反映した形態形成や分化のための信号物質として機能している側面をもっていることが強く示唆される。例えば、分裂酵母でチアミンピロリン酸キナーゼをコードしている *tnr3*<sup>+</sup> 遺伝子の変異体の中には、細胞が異常に伸長した表現型を示すことが報告されている<sup>23</sup>。これは逆に分裂酵母細胞が正常な細胞長を維持することができるのは、チアミンピロリン酸の適度な供給の上に成り立っていることを示している。今後は *C. tropicalis* における菌糸形成の過程でも、エタノール存在下における酵母でなぜ *Ctnmt1*<sup>+</sup> の発現が強力に行われる必要があるのか、チアミン代謝に関する遺伝子群やさらには Table 1 で示された他の発現遺伝子群がどう関わっているのかを広範囲かつ総括的に調べてみる必要があるだろう。また、こうした研究から、ビタミンとしてのチアミンの役割に関しても、全く新規な発見がもたらされる可能性も期待できよう。

#### 文 献

- 1) Lengeler KB, Davidson RC, D'souza C, Harashima T, Shen WC, Wang P, Pan X, Waugh M, Heitman J: Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 746-785, 2000.
- 2) Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA, Fink GR: Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: Regulation by starvation and RAS. *Cell* 68: 1077-1090, 1992.
- 3) Gimeno CJ, Fink GR: Induction of pseudohyphal growth by overexpression of *PHD1*, a *Saccharomyces* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Mol Cell Biol* 14: 2100-2112, 1994.
- 4) Calderone AR: Molecular pathogenesis of fungal infections. *Trends Microbiol* 2: 461-463, 1994.
- 5) Ernst JF: Transcription factors in *Candida albicans*: En-

- vironmental control of morphogenesis. *Microbiol* **146**: 1763-1774, 2000.
- 6) Tani Y, Yamada Y, Kamihara T: Morphological changes in *Candida tropicalis* pK233 caused by ethanol and prevention by myo-inositol. *Biochem Biophys Res Commun* **91**: 351-355, 1979.
  - 7) Kawamoto S, Nozaki C, Tanaka A, Fukui S: Fatty acid beta-oxidation system in microbodies of n-alkane-grown *Candida tropicalis*. *Eur J Biochem* **83**: 609-613, 1978.
  - 8) 鈴木孝仁, 今西由巳, 岩口伸一, 上原梯次郎: *Candida tropicalis* の菌糸形成に特異的な遺伝子の検索. *真菌誌* **39**: 61-65, 1998.
  - 9) Suzuki T, Imanishi Y, Iwaguchi S-I, Kamihara T: Depolarized growth precedes filamentation during the process of ethanol-induced pseudohyphal formation in the yeast *Candida tropicalis*. *Microbiol* **144**: 403-410, 1998.
  - 10) Kamiryo T, Mito N, Niki T, Suzuki T: Assignment of most genes encoding major peroxisomal polypeptides to chromosomal band V of the asporogenic yeast *Candida tropicalis*. *Yeast* **7**: 503-511, 1991.
  - 11) Sagerstrom CG, Sun BI, Sive HL: Subtractive cloning: Past, present, and future. *Ann Rev Biochem* **66**: 751-783, 1997.
  - 12) 今西由巳, 河合俊子, 岩口伸一, 鈴木孝仁, 上原梯次郎, 横山耕治, 西村和子: Dynabeads oligo (dT)<sub>25</sub> を用いたサブトラクション法により菌糸形成細胞から得られた遺伝子群. *真菌誌* **42**: 231-239, 2001.
  - 13) Hohmann S, Meacock PA: Thiamin metabolism and thiamin diphosphate-dependent enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic regulation. *Biochim Biophys Acta* **29**: 1385(2): 201-219, 1998.
  - 14) Maundrell K: *nmt1* of fission yeast. *J Biol Chem* **265**: 10857-10864, 1990.
  - 15) Schweingruber AM, Dlugonske J, Edengarter E, Schweingruber ME: Thiamine in *Schizosaccharomyces pombe*: dephosphorylation, intracellular pool, biosynthesis and transport. *Curr Genet* **19**, 249-254, 1991.
  - 16) Nishimura H, Kawasaki Y, Kaneko Y, Nosaka K, Iwashima A: A positive regulatory gene, *THI3*, is required for thiamine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **174**: 4701-4706, 1992.
  - 17) Van Dyck L, Pascual-Ahuir A, Purnelle B, Goffeau A: An 8.2 kb DNA segment from chromosome XIV carries the RPD3 and PAS8 genes as well as the *Saccharomyces cerevisiae* homologue of the thiamine-repressed *nmt1* gene and a chromosome III-duplicated gene for a putative aryl-alcohol dehydrogenase. *Yeast* **11**: 987-991, 1995.
  - 18) Rodríguez-Navarro S, Llorente B, Rodríguez-Manzanique MT, Ramne A, Uber G, Marchesan D, Dujon B, Herrero E, Sunnerhagen P, Pérez-Ortín JE: Functional analysis of yeast gene families involved in metabolism of vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>6</sub>. *Yeast* **19**: 1261-1276, 2002.
  - 19) Fonzi, WA, Irwin MY: Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**: 717-728, 1993.
  - 20) Gubler, CJ: Thiamin. *In Handbook of Vitamins* (second ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 234-281, 1991.
  - 21) Sohn J, Voegelé RT, Mendgen K, Hahn M: High level activation of vitamin B1 biosynthesis genes in haustoria of the rust fungus *Uromyces fabae*. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 629-36, 2000.
  - 22) Schweingruber, ME, Edengarter, E: Thiamine regulates agglutination and zygote formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* **17**: 191-194, 1990.
  - 23) Fankhauser H, Zurlinden A, Schweingruber AM, Edengarter E, Schweingruber ME: *Schizosaccharomyces pombe* thiamine pyrophosphokinase is encoded by gene *tnr3* and is a regulator of thiamine metabolism, phosphate metabolism, mating, and growth. *J Biol Chem* **270**: 28457-28462, 1995.

## Subtractive Gene Cloning and Gene-disruption for Elucidation of Pseudohyphal Formation in *Candida tropicalis*

Takahito Suzuki

Department of Biological Science, Faculty of Science, Nara Women's University,  
Nara 630-8506

The dimorphic transition from yeast to pseudohyphae in the petroleum-assimilating yeast *Candida tropicalis* occurs following the addition of ethanol to glucose semi-defined medium. Subtractive gene cloning was performed on the cDNA from the yeast-growing control culture and on that from the ethanol-supplemented one (the ethanol culture). A homologue of *Schizosaccharomyces pombe nmt1<sup>+</sup>* or *Saccharomyces cerevisiae THI5* was isolated from the cDNA fraction as a preferentially expressed gene for the ethanol culture. This homologue was tentatively called *Ctnmt1<sup>+</sup>*, since exogenous thiamine repressed its expression in *C. tropicalis* growth media. The ethanol culture showed a biphasic pattern of growth phases and the expression of *Ctnmt1<sup>+</sup>* occurred at the first growth phase. The supplementation of thiamine to the ethanol culture at the first phase was followed by repression of *Ctnmt1<sup>+</sup>* expression and also delay of pseudohyphal growth: filamentous growth was inhibited and chains of yeast cells were formed. A *Ctnmt1<sup>+</sup>* disruptant of this organism did not show thiamine auxotrophy and produced pseudohyphal filaments even in the control culture. The supplementation of oxythiamine, an analog of thiamine, to the control culture was followed by the appearance of pseudohyphal filaments, indicating the participation of thiamine during the process of pseudohyphal growth in this organism.

---

この論文は、第46回日本医真菌学会総会の“シンポジウムⅢ：カンジダ属の Molecular Mycology: 臨床医にも必要な最近のトピックス”において発表されたものです。