

酵母のキラー因子研究と抗真菌剤としての応用

木村哲哉*・苅田修一**・粟冠和郎*・大宮邦雄*

三重大学生物資源学部*, 遺伝子実験施設**

Studies on Yeast Killer Factors and Their Use for Anti-fungal Agents

Tetsuya KIMURA*, Shuichi KARITA**, Kazuo SAKKA* and Kunio OHMIYA*

*Faculty of Bioresources, Mie University,

**Center for Molecular Biology and Genetics, Tsu, Mie 514-8507, Japan

Abstract

The killer phenomenon is widespread among various genera and species of yeasts. Killer yeasts secrete polypeptides, known as killer factors that kill sensitive strains of yeasts, in their culture medium. Among these factors, HM-1 of *Hansenula mrakii* IFO 0895 has unique features. It has high stability against heat treatment and is stable in wide a pH range. It also kills a variety of other yeast strains. The killing mechanism and The cell wall receptor of HM-1 have been extensively studied. These studies suggest that HM-1 can be used as an anti-fungal agent. While molecular mechanism of K1 killer factor of *Saccharomyces cerevisiae*, killer factor of *Kluyveromyces lactis* and SMKT of *Pichia farinosa* are also described.

Key Words : Anti-fungal agent • Killer factor • *Hansenula mrakii* • *Saccharomyces cerevisiae*

緒 言

ある微生物が、同種の他の株を殺す現象は、大腸菌の コリシン生産株やバクテリオシン生産細菌でよく知られている。酵母でも同様の現象が見られ、1963年にこの現象をはじめて見つけた Bevan と Makower によって、他の株を殺す側をキラー株 (killer), 殺される側を感受性株 (sensitive) と命名されている¹⁾。1970年代になって、多くの研究者がキラー酵母の検索を行った。特に Philliskirk と Young は National Collection of

Yeast Culture の保存株を系統的に調査し、28属、148種 964株から7属、59株にキラー株の存在を報告している²⁾。Wickner は、代表的なキラー株について、お互いのキラーにたいする免疫性 (キラーに対する抵抗性) から、K1 から K11 のグループに分類した³⁾。しかし、これらに当てはまらないキラー株も多く報告され、また、キラー株の検索において、どの株を感受性の検定に使うかによって膨大な組み合わせが生じ、どれだけのキラー株が存在するのかは見当もつかない。

酵母といえば酒類の製造が連想される。ビール醸造や

清酒醸造などの現場で、ある時期に野生酵母の混入で醸造株が完全に駆逐され、製品の品質が低下する現象が、実は野生のキラー酵母の混入によって醸造株が速やかに殺され、微生物相が変化するためであった。国税庁醸造試験所の大内らは清酒酵母の広範な検索を行い、比較的高頻度でキラー株の存在することを報告した⁴⁾。また、清酒醸造に利用される協会酵母のいくつかは、野生のキラー株に対して感受性が高く、汚染の原因であることが考えられたので、キラーに対して耐性の変異を獲得した醸造株の育種も行われた⁵⁾。この他、ワイン酵母や、漬物、味噌などからもさまざまなキラー酵母の検索が行われた。

キラー酵母の検索が進む一方で、1980年代に入り、キラー因子の精製がすすめられ、それぞれ、全く異なる分子量の蛋白質であることがわかってきた。また、分子生物学の進展により、キラー因子をコードする遺伝子の解明が進められた結果、プラスミドにコードされるものや、染色体にコードされるものなど、キラー因子は実にバラエティーに富んでいることがわかってきた。また、*Saccharomyces cerevisiae*から見つかった K1 キラー因子の分泌が、真核細胞の蛋白質分泌モデルとして利用され、先駆的に優れた研究がなされた。1980年代後半からは、*S. cerevisiae*が真核細胞のモデル細胞として脚光をあげはじめ、これにつれて、キラー因子自体の研究から、次第にキラー因子を利用した酵母細胞の研究、すなわち、細胞壁の合成や、細胞膜とイオン輸送、細胞周期とシグナル伝達系といった真核細胞に普遍的に存在する現象解明へと研究がシフトしていった。このころから、醸造現場などに清潔で汚染の少ないシステムが導入され、野生株混入の危険が減少するに伴い、キラー因子の産業への応用の期待が薄れ、多くの研究者がキラー因子の研究から撤退をしていった。ところが、1990年代に入り、医療分野で抗生物質やステロイド剤の発達で減少した細菌の感染症にかわり、酵母や糸状菌の日和見感染による患者が増大し始めた。さらに、エイズ患者の増大に伴い、カリニ肺炎などカビによる感染で死亡する患者が増加がみられ始めた。これらの真菌は、細菌と異なり、細胞の機構が動物と近いため、抗菌剤を開発しても人間の細胞にも毒性が出てしまうことから、有効な抗真菌剤の開発が急務となった。そこで、製薬企業の多くが、キラー因子に目を付け、キラー因子の構造や作用機作を

もとに新たな抗真菌剤の開発に乗り出した。もっとも注目されたのが、*Hansenula mrakii*が生産する HM-1 である。このキラー因子は、耐熱性や分子量の大きさ、細胞壁の合成を阻止する性質などから、新規抗真菌剤のモデルとして最適とされ、近年の分子生物学、構造生物学の進歩によって、その立体構造や作用機構がもっとも解明されたキラー因子となった。本論文では HM-1 を中心にして、キラー因子の研究の歴史と最近の研究成果について記述する。

1. *Hansenula mrakii* IFO 0895 株の分泌する HM-1 キラー因子

*Hansenula*属には多くのキラー酵母の存在がわかっていたが、*Hansenula*属が酒類などの製造に利用できない点や、形質転換系も確立していないことなどからあまり注目されていなかった。しかし、これらの中から極めて安定で、作用範囲も広い HM-1 キラー因子が見つかったことから、製薬企業を中心にして近年ではもっとも注目され、研究も進展したキラー因子となった。

1.1 *Hansenula*属酵母のキラー株検索の HM-1 の発見

*Hansenula*属酵母については、その生理的性質などにより、原始的な 1 菌株から派生したとされる 5 つの系統発生グループに分けられていた。*Hansenula*属にはキラー株の多いことが知られていたが、野本らは、系統グループに従って代表的な株のキラー活性を調べ、同じグループに属する *H. mrakii*, *H. saturnus*, *H. beijerinckii* など土星型の孢子を形成する株は、大部分がキラー株であり、かつ、他の多くのキラー株をも殺すことができる強力なキラー株であることを見いだした⁶⁾。また、これらは他のキラー株にほとんど殺されないことを報告している。この後、リボソーム RNA の塩基配列から、これらの属する株を *Williopsis* として、従来の *Hansenula* から分ける提案がなされている⁷⁾。一方残りの *Hansenula* を *Pichia* 属に含めるという提案も同時にされているが、多くの研究者は *Hansenula* という名称を使用しており、本論文でも *Hansenula* で統一する。その後、*H. mrakii* IFO 0895 株の分泌するキラー因子が、熱処理や広範な pH に対して極めて安定であり、他のキラー因子とは異なった特徴を有していることを報告された⁸⁾。

1.2 HM-1の構造

山本らは*H. mrakii* IFO 0895 株の生産するキラ－因子の特徴的な性質に着目し、医療分野への応用を目的として、まずキラ－因子の化学的な分析が必須と考え、キラ－因子の精製を行った⁹⁾。培養上澄みを濃縮して、粗酵素を得た。これをマウスに免疫し、モノクローナル抗体を作成した。これらの抗体の中で、キラ－活性を中和する抗体を選抜し、抗体カラムを作成して、粗酵素画分よりキラ－因子を濃縮した。精製したキラ－因子をHM-1と命名した。分子量は約1万で、精製タンパクからアミノ酸配列を決定したところ88個のアミノ酸から構成されていた。100℃で10分煮沸しても安定で、pH2からpH11まで安定であった。88アミノ酸と分子量が小さいうえに10個のシステイン残基をもち、S-S結合でコンパクトな構造をしていることが安定性と関係するのではないかと推定された。著者らは、このアミノ酸配列をもとに合成プローブを作成し、染色体ライブラリーからHM-1をコードする遺伝子を単離した¹⁰⁾。推定アミノ酸配列は、山本らの決定したものと100%一致した。N末端側に37アミノ酸からなる分泌シグナルが存在した。また、同じプローブを用いて、*H. saturnus* IFO 0117の染色体ライブラリーをスクリーニングし、86%の相同性をもつ遺伝子を得た (Fig. 1)。*H. saturnus* も*H. mrakii* と極めて類縁であり、性質の似たキラ－因子HYIを分泌することが報告されている¹¹⁾。これらのことから、同じグループに属する*Hansenula* には、よく似たキラ－因子を分泌する可能性が考えられた。そこで、HM-1遺伝子とHYI抗体を使って、サザンブロットリングとウエスタンブロットリングでこの属の代

表9株のキラ－因子を調べた¹²⁾。しかし、*H. mrakii* と*H. sturnus*以外には、相同性が高いと思われるキラ－因子の存在は示唆されなかった。最近になり、蛋白質構造の解析技術の進歩によって、HM-1の立体構造が明らかにされ、βシートが平行してつながった構造をしていることがわかった¹³⁾。今後、構造と作用機構との関連が明らかにされるであろう。

1.3 HM-1作用機構

精製されたHM-1を用いて、感受性株である*S. cerevisiae*に対する影響が調べられ、アルカリ不溶性グルカン(β-1, 3-グルカン)の合成がHM-1添加後、15分で停止することが見いだされた¹⁴⁾。グルカン合成が、短時間で停止するのに対して、DNAやRNAの合成、タンパク質、脂質の合成は大きな影響は受けないことが示された。さらに、感受性株から単離した細胞膜画分を使い、HM-1によってグルカン合成酵素活性が阻害されることが示された。この結果から、山本らは、HM-1の作用機構は、感受性株のグルカン合成を阻害することであると報告した。当時、酵母細胞壁主成分のグルカン合成をする酵素に関しては、10年以上も研究が進展しておらず、HM-1の作用機構の解明が、酵母の細胞壁合成の解明と抗真菌剤開発につながるものと期待された。その後、日本ロシュのグループは、HM-1と細各種細胞壁成分を混ぜて感受性酵母に加え、HM-1の作用を抑制する成分を探するという方法を用いて、細胞壁のどの成分がHM-1と結合するのかを調べた¹⁵⁾。その結果、グルカンや、マンナンだけが、HM-1の作用を抑制したことから、HM-1の受容体はこれらの成分ではないかと推定

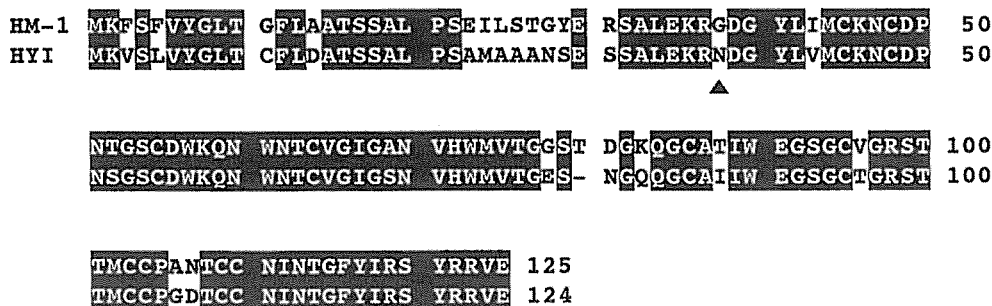
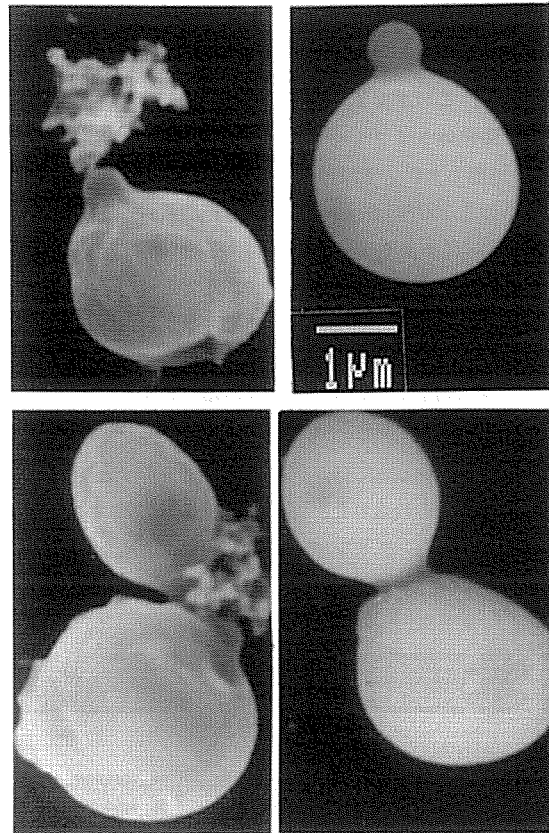


Fig. 1. Alignment of amino acid sequences of HM-1 and HYI. Arrowhead indicates the processed sites recognized by KEX2-like proteinase.

した。その後、著者らは HM-1 で処理した細胞の形態的な観察を行ったところ、出芽した細胞や、出芽後に細胞が分離する部位 (Bud neck) で細胞壁に穴があき、細胞内の物質が漏出しているところを観察した (Fig. 2)¹⁹⁾。これらの部位は、グルカン合成酵素が局在化している部位と一致する。これは HM-1 がグルカン合成酵素を阻害するため、正常な細胞壁合成が阻害され、浸透圧ショックで細胞が破裂して死んでいることを示唆している。小宮山らも同様の観察を行い、HM-1 処理後に RNA や蛋白質が漏出してくることを報告している¹⁷⁾。また、培地へソルビトールのような浸透圧保護剤

を添加することで、HM-1 の作用を抑制できることも示した。このような形態的变化の特徴は、パブラカンジンやエキノカンジンといったグルカン合成酵素阻害剤でも観察されている。最近になって、HM-1 が *S. cerevisiae* より精製されたグルカン合成酵素を阻害することも示された^{18, 19)}。しかし、この実験では、用いられた HM-1 の濃度は、細胞に対する致死濃度よりもはるかに高濃度の HM-1 を添加しないとグルカン合成酵素の阻害がおこらないことや、完全に酵素活性を阻害することができないなど不明な点も残されている。また、ソルビトール存在下で HM-1 処理した細胞を、もう一度



yeast cell treated with HM-1

yeast cells without
HM-1 treatment

Fig. 2. Morphological changes in cells treated with HM-1. *S. cerevisiae* cells were treated with HM-1 and observed with a scanning electron microscope. RNA and other components were discharged from the budneck and budding site.

HM-1 のない培地へ植えてやると、再度増殖を開始できることから、HM-1 とその受容体との結合はそれほど強くないことが示唆された。

近年 *S. cerevisiae* より精製されたグルカン合成酵素は Rho1 タンパクと呼ばれる低分子量 GTPase によって活性が制御されていることが示された (Fig. 3)²⁰⁾。Rho1 はプロテインキナーゼ C (Pkc1) と Map キナーゼ系の支配下で、外界の刺激や細胞周期に応じて細胞の

形態形成や増殖を制御していることが知られていることから (Fig. 4)^{21, 22)}、グルカン合成は細胞にとって極めて重要な役割を演じていると考えられる。さらに、細胞の形態をモニターし、異常が生じると細胞周期を停止させる機構 (形態チェックポイント) の存在も報告されていることから²³⁾、HM-1 による作用は細胞の活動を根本的に乱して細胞を殺しているのかもしれない。

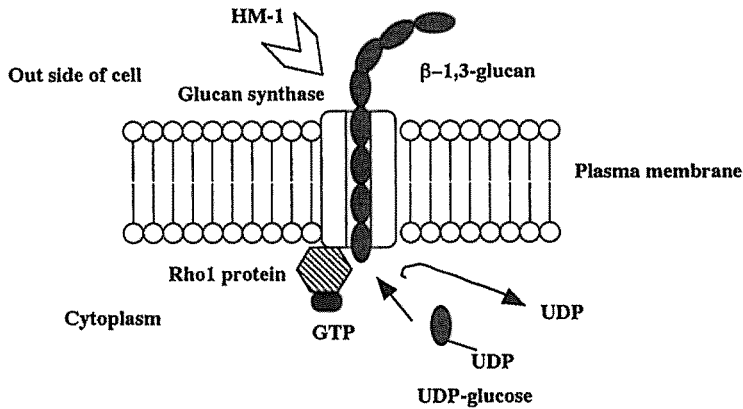


Fig. 3. Schematic model of glucan synthase and its regulation by Rho1GTPase. Rho1GTPase activate glucan synthase and regulate the synthesis of cell wall glucan. HM-1 inhibits the glucan synthase.

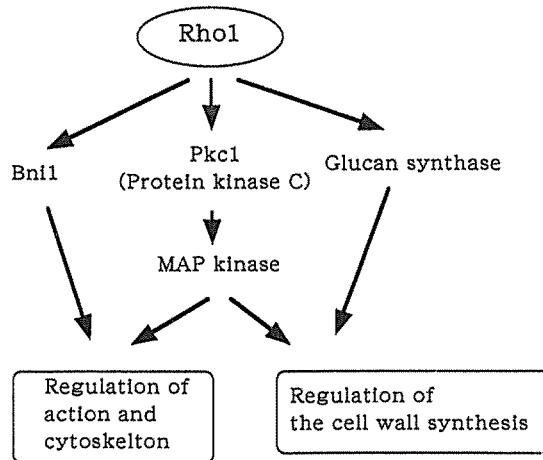


Fig. 4. Target of the Pho1GTPase in *S.cerevisiae* and its function.

1.4 出芽酵母を用いた HM-1 受容体の解析

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、遺伝学的な解析のしやすさから、真核細胞のモデルとして盛んに利用されてきた。キラー因子の作用機構の解明にも、耐性変異株の単離と、その変異を相補する遺伝子の解析をすることで、キラー作用に関わる遺伝子が解析されてきた。HM-1 についても同様の手法がとられ、いくつかの遺伝子が発見された。米国のシェリング・プラウ社のグループは、*S. cerevisiae* キラー耐性株を多数分離し、いくつかの変異相補群に分類した²⁹⁾。これらのうち、細胞壁可溶性酵素ザイモリアーゼに対する感受性が変化する変異株を選び、この変異を相補する遺伝子 *KNR4* を単離した。彼らはこの遺伝子を破壊するとザイモリアーゼ感受性が変化するのみでなく、細胞のグルカンが減少することから、*KNR4* がグルカン合成に関与するタンパクをコードしているのではないかと推察している。最近、*KNR4* が、細胞壁成分のキチンを合成する酵素の発現を制御しているという報告がされている³⁰⁾。日本ロシュと東北大のグループは、過剰発現で細胞がキラー耐性になる遺伝子 *HKR1* を単離した³⁰⁾。さらに、この遺伝子は細胞の増殖に必須で、C 末端側を欠失させると、細胞

の増殖や形態に異常を生じることを見いだした²⁹⁾。筆者らも、HM-1 耐性変異株を多数分離し、相補群に分けた。これらは、主に 3 つの相補群に分類され、これらのうち 2 つについて変異を相補する遺伝子を単離した。一つは細胞壁マンノプロテインのアスパラギン結合型糖鎖のコア部分を合成する酵素をコードする遺伝子 *ALG3* と同じであり¹⁰⁾、もう一つは、コア糖鎖をポリペプチド鎖中のアスパラギンに転移する酵素 (oligosaccharyl transferase) のサブユニット *STT3* をコードすることがわかった (Fig. 5)²⁹⁾。これらの結果から、キラー耐性化は細胞壁構造の変化によることが示唆された (Fig. 6)。また、HM-1 の最終ターゲットはグルカン合成酵素であるが、HM-1 は最初に細胞壁のマンノプロテインか、あるいは糖鎖や糖構造を認識して結合している可能性が示唆された。しかし、現在まで、細胞表層に HM-1 の受容体が存在する直接的な証拠は得られていない。

1.5 病原性酵母に対する HM-1 の作用と臨床への応用

医療分野での真菌症の増大については緒言でも述べた。そこで、精製 HM-1 を使って、臨床由来の酵母、糸状菌類に対する最小発育阻止濃度 (MIC) が調べられ

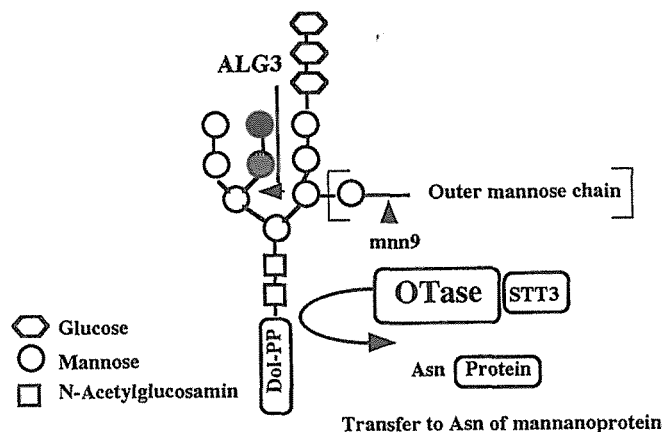


Fig. 5. Schematic drawing of an core-oligosaccharide of mannoprotein. Shaded mannose residue is added by the *ALG3* gene product. The black mannose residue and three glucose residues are not present on the oligosaccharide of mannoprotein since these residues are removed before being transferred to protein. The *MNN9* gene product adds the outer mannose chain after coreoligosaccharide is transferred to a protein.

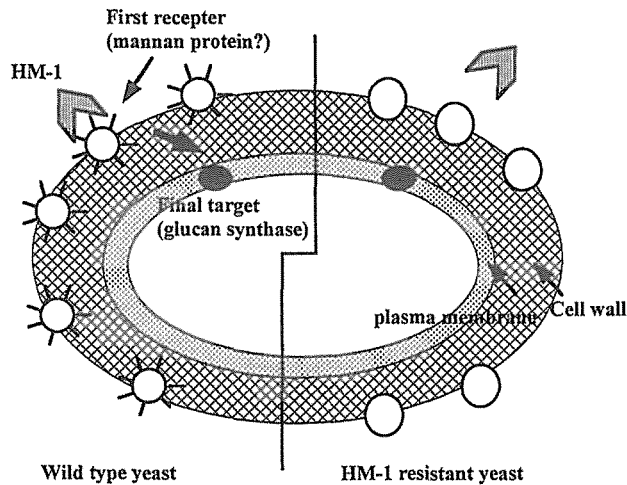


Fig. 6. Schematic drawing of killer action by HM-1. HM-1 binds the putative receptor in the cell wall of sensitive cell, then is internalized into the cell wall by unknown mechanism. Finally, HM-1 inhibit the glucan synthase of the target cell.

た²⁹⁾。その結果、HM-1は子囊菌酵母、子囊菌系無孢子酵母にはよく効いたが、担子菌系の無孢子酵母や糸状菌には効果がなかった。この結果は、細胞壁にグルカンを多く含む酵母には、HM-1は作用する一方で、キチンを主成分とする株には作用しないことを示しており、先に述べた、HM-1の作用機構とも関連している。エキノカンジンやパブラカンジンといった、グルカン合成阻害剤もよく似た抗菌活性を示すことから、HM-1の作用機構と細胞壁構成成分の関連が強く示唆される。臨床的に重要な*Candida albicans*に対して、HM-1の効果が弱いことが応用へのネックと考えられる。しかし、HM-1の構造と作用機構との関連が明らかになれば、蛋白質工学的手法を用いて、*C. albicans*にも有効なキラ因子をつくることも可能となるであろう。また、HM-1の菌株に対する選択毒性を利用して、膾炙菌症の主要病原菌である*Candida*属を簡便に分類するプレート培養法が開発され、早期の病原菌分類に利用できることが報告されている³⁰⁾。これは、同一菌株内での、キラ因子の選択的作

1.6 HM-1の醸造食品への応用

酵母を利用する発酵工業や醸造業では、その目的に

じて適した酵母が利用される。しかし、味噌や醤油といった伝統的な醸造業では、発酵を開放系で行ったり、あるいは製造コストとの関係で、十分な殺菌装置を導入できなかったりする。発酵過程で野生酵母の侵入を受けても、食中毒の様な重大な汚染はおこらないが、収率の低下や品質の劣化を招くことが多い。しかし、野生酵母も同じ種属であることが多く、汚染の排除には薬剤が利用できない。このような目的に対して、自分以外を殺すキラ因子の性質は有用であり、これまでも清酒やビール、ワイン醸造では多くの研究がなされ、いくつかは実用化されている。従来知られていたキラ因子はいずれも耐熱性が30℃くらいまでと低く、pH安定性も狭い範囲のものしかなかった。また、作用する属も狭く、実用性が低かった。HM-1は従来のキラ因子と異なり、安定性が高く、作用する酵母類も広い。そこで、HM-1を醸造食品の野生酵母汚染防止に利用しようとする研究がいくつかなされた。鍵山らは、粗精製したHM-1をつかって、味噌や醤油などに野生酵母が混入することを防止できることを報告した(特開 昭62-40272 ヒゲタ醤油)。著者らも、味噌、醤油などの醸造現場から分離した野生酵母を用いて、HM-1が作用するか調べた。その結果、大部分の野生酵母に対して、HM-1は効果のあることがわかった

(Table 1)。また、醸造現場で生息するいくつかの菌株についてキラ-の感受性を調べた結果、*K. lactis*や*S. cerevisiae* 007といったキラ-株に対して、HM-1は作用範囲が広いことがわかった (Table 2)。HM-1を精製し、添加することは、HM-1の生産コストや、数カ月にも及ぶ発酵期間を考慮すると難しい。そこで、醸造酵母自体にHM-1遺伝子を導入し、発酵期間中に

HM-1を生産させることができれば都合がよい。そこで、清酒酵母をモデルにして、HM-1を安定に生産させる方法を開発した。宿主となる酵母自体がHM-1に感受性を示したので、変異処理を行い、HM-1耐性株を得た。これに、酵母で強力に働くアルコールデヒドロゲナーゼプロモーター下でHM-1遺伝子を発現させた³⁾。当初、プラスミド型のベクターにのせて発現をさせたが、宿主

Table 1 Isolation of wild yeasts from miso, shoyu and other fermented food and their sensitivity to HM-1

source	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6	Others	Total
Miso	0	0	0	11	0	0	4	15
Shoyu	0	0	0	10	0	3	7	20
Unknown	0	0	0	9	0	0	4	13
Total	0	0	0	30	0	3	15	48
Sensitivity to HM-1	0	0	0	29	0	0	9	38

- | | |
|---|---|
| Group 1. <i>Z. rouxii</i>
<i>Z. bailii</i> | 3. <i>Candida group V</i>
<i>C. polymorpha</i>
<i>C. tropicalis</i> |
| 2. <i>Candida group III</i>
<i>C. etchellsii</i>
<i>C. halonitratophila</i>
<i>C. halophila</i>
<i>C. mannitofaciens</i>
<i>C. nodaensis</i>
<i>C. versatilis</i> | 4. <i>Picha-Debaryomyces</i>
<i>P. farinosa</i>
<i>D. hansenii</i> |
| | 5. <i>Hansenula</i>
<i>H. anomala</i>
<i>H. subpelliculosa</i> |
| | 6. <i>Candida group IV</i>
<i>C. famata</i> |

Table 2 Killer activity of several killer strains

killer strain	<i>K. lactis</i> 1267	<i>S. cerevisiae</i> 007	<i>H. mrakii</i> 0895	<i>H. saturnus</i> 0117
tested strain				
<i>C. etchellsii</i> 10037	-	-	-	-
<i>C. versatilis</i> 10056	++	+	++	-
<i>C. versatilis</i> 10038	-	-	-	-
<i>D. hansenii</i> 0855	-	-	-	-
<i>D. tamaraii</i> 0854	-	-	-	-
<i>H. anomala</i> 0144	-	-	++	++
<i>H. anomala</i> 0569	++	-	++	++
<i>Z. rouxii</i> 0494	-	-	++	-
<i>Z. rouxii</i> 0510	+	-	++	-
<i>Z. rouxii</i> 0517	-	-	-	-
<i>Z. bisporus</i> 1730	-	-	++	-

Killer activity + killing-non-killing

All strains except *S. cerevisiae* 007 were obtained from Institute of Fermentation, Osaka. *S. cerevisiae* 007 is Kyokai yesat.

内でのベクター保持が不安定であった。そこで、染色体へ多コピー組み込むタイプのベクターを開発し、酵母に導入したところ、安定に HM-1 を生産するようになった (Fig. 7)。この HM-1 生産型酵母を用いて、*Hansenula anomala* と共存培養モデル実験を行ったところ、HM-1 生産株は、もとの宿主に比べて *H. anomala* の生育を抑制することができた (Fig. 8)。この手法を他の実用株に応用することで、野生株の汚染

に強い醸造株を育種することが可能になるであろう。

2. 各種キラ－酵母について

これまでに数多くのキラ－酵母の報告がされているが、キラ－因子の精製や、作用機構まで追求された研究は少ない。以下に、キラ－因子が精製され、作用機構や受容体などが研究されているキラ－酵母について述べる。

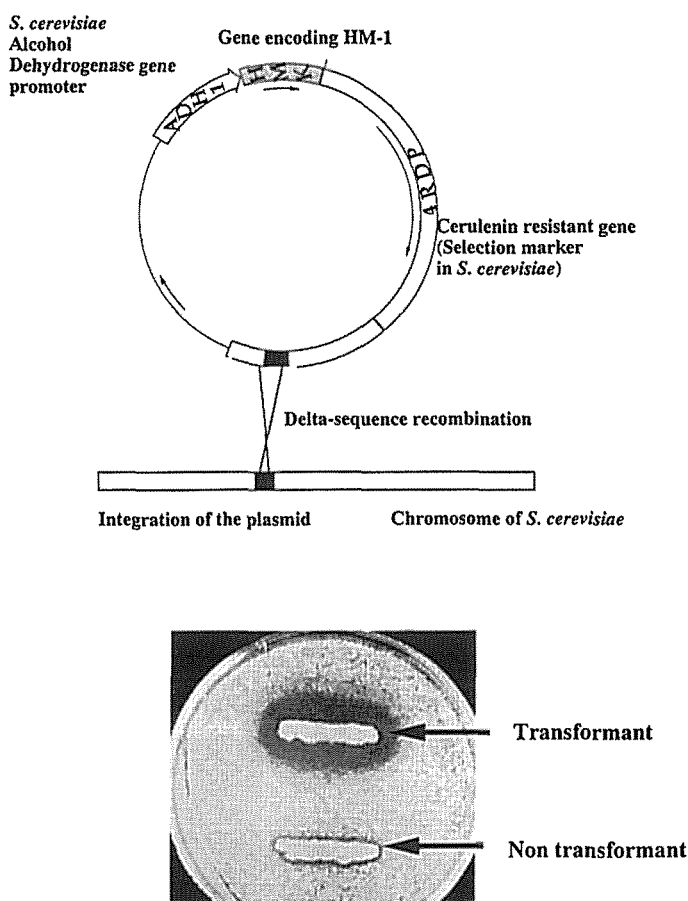


Fig. 7. Transformation of *S. cerevisiae* by the integration plasmid harboring HM-1 encoding gene. HM-1 resistant mutant *S. cerevisiae* was transformed with the plasmid. Integration was carried out at the delta-sequences on the *S. cerevisiae* chromosome. High frequent transformation efficiency was achieved since there are many delta-sequences in the host cell. Transformants were selected on the Cerulenin plate. The transformants were tested for killer activity against HM-1 sensitive strain. After streaking of the transformant and non-transformant, the culture of the sensitive strain *H. anomala* was sprayed on the plate. Clear zone (growth inhibitory zone of the sensitive strain) was observed around the transformant.

2.1 K1キラー酵母

K1キラー因子は Makower と Bevan によってキラー酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) から最初に発見されたキラー因子である。細胞質中にある二本鎖 RNA (dsRNA) にコードされており、さらに、宿主がキラーに耐性を示すのは、このプラスミド上にある免疫性タンパクをコードする遺伝子のためであることも示されている³²⁻³⁴。この免疫性蛋白質は、キラー因子の疑似受容体となつて、細胞にキラー免疫性を与えると推定されているが、直接的な証拠は得られていない。精製された K1キラー因子は、 α と β のサブユニットからなる二量体であった^{35, 36}。キラー因子をコードする遺伝子の解析から、K1キラー因子は、分子量の大きな一本の前駆体として合成され、分泌の過程で修飾、プロセッシングを受けることが示された (Fig. 9)^{37, 38}。キラー因子のプロセッシングに関与するペプチダーゼとエンドプロテアーゼとして Kex1 と Kex2 が報告されたが、これらは真核細胞の蛋白質プロセッシングに普遍的に存在するメカニズムであることが後に示され、キラー因子研究が普遍的な生命現象の解明にも役立つことの一例といえる。K1キラー因子の作用機構については、数多く報告されているが、現在受け入れられているのは、K1キラー因子が細胞膜にイオンチャンネルを形成し、細胞のイオン勾配を破壊するという説である^{39, 40}。また、キラー因子の変異マッピングによって、どの部分が活性に重要であるかも明らかにされている⁴¹⁻⁴³。K1キラー因子研究によるもっと

も大きな成果は、カナダマックギル大学の Bussey らのグループによるキラー耐性変異株の解析であろう。彼らは、K1キラー因子が、感受性株の細胞壁 β -1, 6-グルカンを認識結合することで、細胞への致死作用が始まることを発見し、この現象を利用して細胞壁グルカンの合成機構を解明できるのではないかと考えた⁴⁴。長年にわたり、耐性変異株 kre とこれを相補する遺伝子群 (KRE) の解析を行い、酵母細胞壁の β -1, 6-グルカンの合成に関与する遺伝子群の単離に成功している⁴⁵。この研究は、*S. cerevisiae* の遺伝学と分子生物学を強力な武器にして推し進められた。酵母細胞壁は複雑で、その合成機構を解明することは容易ではない。その糸口として、K1キラー因子を選び、これを指標にして細胞壁合成の機構に迫った戦略は正解だったといえる。

2.2 *Kluyveromyces lactis* の生産するキラー因子

K. lactis のキラー因子は線状 DNA プラスミド上にコードされ、 α β γ からなるサブユニット構造をしている。 α (99kDa) と β (30kDa) はひとつの前駆体として生産され、分泌過程でプロセッシングを受ける^{46, 47}。 γ は 28kDa で、これが感受性株に致死作用をもたらす。感受性の *S. cerevisiae* に γ サブユニットを発現させることで、致死性を再現することができた⁴⁸。また、*S. cerevisiae* の耐性変異株の解析から、細胞外からのキラー因子添加では耐性を示すが、 γ を内部で発現させると感受性となる変異 (細胞内へ γ が侵入できない) と、内部

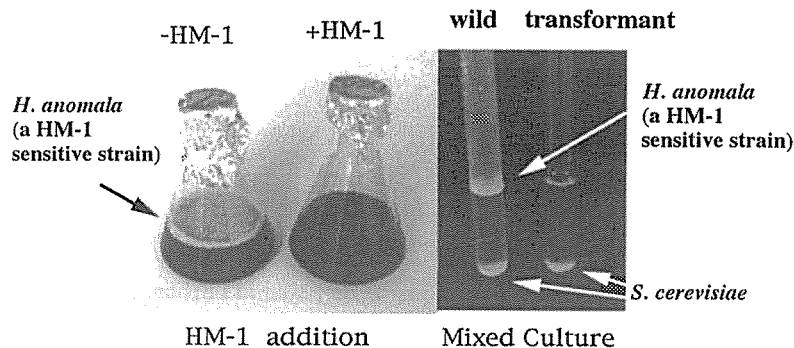


Fig. 8. Growth inhibition of *Hansenula anomala* by HM-1. Left : Growth inhibition of *H. anomala* by addition of purified HM-1. About 10^3 cells of *H. anomala* was inoculated with (1 μ g/ml) or without HM-1 toxin. Right : *H. anomala* was cultivated with wild *S. cerevisiae* or the transformant expressing HM-1.

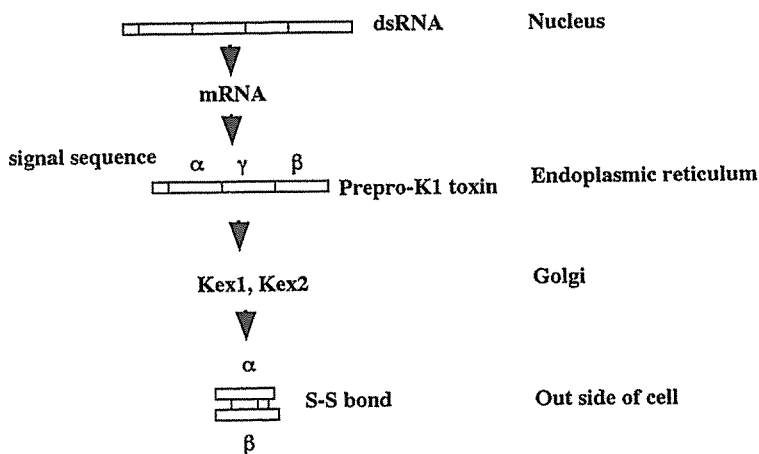


Fig. 9. Synthesis and secretion of K1 killer toxin.

で発現しても耐性を示す株（最終的な作用点に耐性をもつ）が得られることが報告された⁴⁹⁾。このことは、このキラー因子は、細胞外受容体と、最終ターゲットの両方がキラーの作用に必要であることを示している。キラー因子の作用機構については、当初、アデニレートシクラーゼを阻害することで細胞周期を停止させるためとされたが⁵⁰⁾、その後、このデータを否定する報告も出されている⁵¹⁾。最近になって、 α サブユニットの一部が、細菌のキチナーゼと相同性を示すことが報告され、キチナーゼの阻害剤であるアミロサジンによりそのキラー活性が阻害されることから、キラー因子が作用する最初のステップでキチンが関与していることが示唆された⁵²⁾。また、細胞壁キチンの合成変異株がキラー因子に耐性になることも示された⁵³⁾。キチン合成酵素の活性化因子の変異がキラー耐性の表現型を示すことも報告され^{54, 55)}、*K. lactis*キラー因子の受容体がキチンであることが証明されつつある。現在までにいくつかの耐性変異株が複数のグループから報告されており⁵⁶⁻⁵⁸⁾、これらの解析からさらに詳細な作用機構が解明されるものと思われる。また、このキラー因子は、サイレージの変敗防止に効果のあることが報告されている⁵⁹⁾。

2.3 耐塩性酵母 *Pichia farinosa* の生産するキラー因子

鈴木らにより味噌麹から分離されたキラー酵母 (*Pichia farinosa*) は耐塩性酵母で、食塩存在下でキ

ラー活性を有するというユニークな性質をもつ⁶⁰⁾。キラー因子 (SMKT) は精製され、ジスルフィド結合を介さない α と β の二本のサブユニットから構成されることが報告されている^{61, 62)}。遺伝子のクローニング結果より、222アミノ酸からなる前駆体として合成され、分泌の過程で *S. cerevisiae* の Kex1, Kex2 に似たプロテアーゼによってプロセッシングを受けることが示された。さらに、培地中の食塩存在下においてのみ前駆体が正常にプロセッシングを受け、活性のある SMKT が生産されることがわかった⁶³⁾。精製キラー因子からその立体構造も解明された⁶⁴⁾。さらに、中性 pH 付近で SMKT が失活するのは、 α サブユニットが不溶化し凝集するためであることが示された⁶⁵⁾。SMKT の致死作用について詳細は未解明であるが、鈴木らは、*S. cerevisiae* の耐性変異株の解析から、機能不明の P タイプ ATPase (SPF1) を破壊すると、SMKT に耐性になり、この株は細胞壁のマナンたんぱく質糖鎖が低分子化していることを見つけた⁶⁶⁾。さらに、破壊株と野生株を SMKT で処理した後に、ホルムアルデヒドで固定化し、SMKT の β サブユニットに対する抗体で検出すると、破壊株の方は SMKT が細胞表面層により多く付着していることを報告している。この結果は一見矛盾するが、細胞壁のマナンたんぱく質の変化によって表面の構造が変化し、本来の SMKT の受容体への吸着が阻害されて、SMKT に耐性化したのではないかと推察される。この結果は、細胞壁上に何らかの SMKT 認識機構がある可

能性を示唆している。

2.4 それ以外のキラー酵母

*S. cerevisiae*からはK1キラー因子以外に多くのキラー因子が見つかった。K2キラー因子はK1とよく似ており、 $\alpha\beta$ サブユニットから構成され、遺伝子はdsRNAプラスミド上にある⁶⁷⁾。細胞壁 β 1, 6グルカンが受容体であることが知られているが⁶⁸⁾、作用機構については不明である。KT28キラー因子も同様に低分子の $\alpha\beta$ サブユニットから構成され、dsRNAにコードされている⁶⁹⁻⁷²⁾。細胞壁マンナンが受容体とされている^{73, 74)}。作用機構はDNA合成の阻害とG1期での細胞分裂停止を引き起こすためと考えられている⁷⁵⁾。これ以外に、染色体上にコードされるKHS, KHRキラー因子が報告されているが、作用機構など詳細は不明である。耐塩性酵母*Zygosaccharomyces bailii*⁷⁶⁾や*Hansenula anomala*⁷⁷⁾からもキラー因子が見つかったが、詳細はわかっていない。

植物病原菌(糸状菌)*Ustilago maydis*からはキラー因子とよく似たタンパク質抗菌物質KP1, KP4, KP6が見つかった⁷⁸⁻⁸¹⁾。このうちKP4については結晶解析から高次構造が解明されており⁸²⁾、また、カルシウムチャンネルを阻害することも示されている。これらは、酵母には作用しないが、糸状菌類に作用する。

これ以外にも数多くのキラー酵母の存在が報告されているが、キラー因子の精製や作用機構が調べられていないものが大半で、十分研究が進展しているとはいえない。キラー酵母については、総説がいくつか出ている^{83, 85)}。また、農水省食研の鈴木がキラー酵母に関するホームページを開設している (<http://ss.nfri.affrc.go.jp/~csuzuki/KTHP.html>)。

おわりに

キラー酵母の研究が始まってすでに35年以上が経過しているが、残念ながらその作用機構を完全に解明できたものはまだない。当初、多くのキラー酵母の存在が報告され、それらのいくつかは醸造現場で応用されたが、製造技術の進歩により、野生酵母の混入の危険そのものがほとんどなくなり、研究の意義が薄れたため研究が打ち切られた場合が多い。しかし、近年になり、医療現場

では、抗生物質の利用によって細菌による感染症は減少する一方で、真菌類による日和見感染は増大する傾向にある。特にエイズ患者では、真菌による感染は致命的である。これに対し、製薬会社を中心に抗真菌剤の開発が急がれているが、真菌が真核細胞で、動物細胞と近い細胞内構造をしているため副作用がネックとなる。抗真菌剤の最も有効なターゲットは、動物細胞にはない細胞壁合成である。この点において、キラー因子の多くが細胞壁を受容体、あるいは最終ターゲットにしており、キラー因子の構造と作用機構を調べることは、新たな抗真菌剤の開発につながるものと期待される。すでにいくつかのキラー因子の立体構造が解明されており、その構造をもとにあらたな抗真菌剤を合成しようとする試みが始まっている。これは、蛋白質構造をもとにしたドラッグデザインとして注目されている。

出芽酵母*S. cerevisiae*のゲノム塩基配列が完全に解読されたが、約6000個ある遺伝子のうち、何らかのデータから機能が推定できるものは全体の3分の2であり、残りは機能不明である。これらの機能を解析するのに、さまざまな薬剤に対する感受性を調べて、その作用から遺伝子の機能に迫ろうという遺伝学(Chemical Genetics)が欧米を中心に注目を集めている。多様なキラー因子の作用機構研究も機能未知な遺伝子の解明に貢献できるに違いない。

要 約

キラー現象は多くの酵母が示す現象である。キラー酵母はキラー因子とよばれるタンパク質性の抗菌因子を培地中に分泌する。これらキラー因子のなかで、*Hansenula mrakii*のHM-1は、熱安定性、pH安定性においてきわめて優れている。また、作用する菌株も広範囲に及ぶ。HM-1の作用機構は、感受性株の細胞壁グルカン合成酵素の阻害にあり、受容体も細胞表面にあることが示されている。これらの特徴を考えると、HM-1が新たな抗真菌剤開発のモデルとして期待される。ここでは、その他の主なキラー因子である、*S. cerevisiae*のK1キラー因子、*K. lactis*のキラー因子、耐塩性のキラー酵母*P. farinosa*のSMKTについても解説をした。

文 献

- 1) BEVAN, E. A. and M. MAKOWER. The physiologi-

- cal basis of the killer character in yeast, Pro. 11th Int. Congr. Genet., 1 : 202 (1963).
- 2) PHILLISKIRK, G. and T. W. YOUNG. The occurrence of killer character in yeast of various genera, Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol., 41 : 147-151 (1975).
 - 3) WICKNER, R. B. The killer double-strand RNA plasmids of yeast, Plasmid, 2 : 303-322 (1979).
 - 4) 大内弘造・川島 宏. 清酒酵母保存菌株における Killer および Neutral strain の分布. 69 : 629-630 (1974).
 - 5) 今村武司・川本雅之・高岡祥夫. 清酒酵母からの killer 耐性変異株の分離およびその性質. 52 : 300-305 (1974).
 - 6) NOMOTO, H., K. KITANO, T. SHIMAZAKI, K. KODAMA and S. HARA. Distribution of killer yeasts in genus *Hansenula*, Agric. Biol. Chem., 48 : 807-809 (1984).
 - 7) YAMADA, Y., M. MATSUDA, K. MAEDA, C. SAKAKIBARA and K. MIKATA. The phylogenetic relationships of the saturn-shaped ascospore-forming species of the genus *Williopsis* Zender and related genera based on the partila sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs (*Saccharomycetaceae*) : the proposal of Komagataea Gen. Nov., Biosci. Biotech. Biochem., 58 : 1236-1244 (1994).
 - 8) ASHIDA, S., T. SHIMAZAKI, K. KITANO and S. HARA. New killer toxin of *Hansenula mrakii*, Agric. Biol. Chem., 47 : 2953-2955 (1983).
 - 9) YAMAMOTO, T., M. IMAI, K. TACHIBANA and M. MAYUMI. Application of monoclonal antibodies to the isolation and characterization of a killer toxin secreted by *Hansenula mrakii*, FEBS Lett., 195 (1-2) : 253-257 (1986).
 - 10) KIMURA, T., N. KITAMOTO, K. MATSUOKA, K. NAKAMURA, Y. IIMURA and Y. KITO. Isolation and nucleotide sequences of the genes encoding killer toxins from *Hansenula mrakii* and *H. saturnus*, Gene, 137 (2) : 265-270 (1993).
 - 11) OHTA, Y., TSUKADA, Y., and SUGIMORI, T. Production, purification and characterization of HYI, an anti-yeast substance, produced by *Hansenula saturnus*, Agric. Biol. Chem., 48 (4) : 903-908 (1984).
 - 12) KIMURA, T., N. KITAMOTO, Y. OHTA, Y. KITO and Y. IIMURA. Structural relationships among killer toxins secreted from the killer strains of the genus *Williopsis*, J. Ferment. Bioeng., 80 (1) : 85-87 (1995).
 - 13) ANTUCH, W., P. GUNTERT and K. WUTHRICH. Ancestral gamma/beta-crystallin precursor structure in a yeast killer toxin., Nat. Struct. Biol., 3 (8) : 662-665 (1996).
 - 14) YAMAMOTO, T., T. HIRATANI, H. HIRATA, M. IMAI and H. YAMAGUCHI. Killer toxin from *Hansenula mrakii* selectively inhibits cell wall synthesis in a sensitive yeast, FEBS Lett., 197 (1-2) : 50-54 (1986).
 - 15) KASAHARA, S., B. S. INOUE, T. MIO, T. YAMADA, T. NAKAJIMA, E. ICHISHIMA, Y. FURUICHI and H. YAMADA. Involvement of cell wall β -glucan in the action of HM-1 toxin, FEBS Lett., 348 : 27-32 (1994).
 - 16) KIMURA, T., N. KITAMOTO, Y. KITO, Y. IIMURA, T. SHIRAI, T. KOMIYAMA, Y. FURUICHI, K. SAKKA and K. OHMIYA. A novel yeast gene, RHK1, is involved in the synthesis of the cell wall receptor for the HM-1 killer toxin that inhibits β -1, 3-glucan synthesis, Mol. Gen. Genet., 254 : 139-147 (1997).
 - 17) KOMIYAMA, T., T. OHTA, H. UTAKAMI, Y. SHITATORI, T. TAKASUKA, M. SATOH, T. WATANABE and Y. FURUICHI. Pore formation on proliferating yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell buds by HM-1 killer toxin., J. Biochem., 119 (4) : 731-736 (1996).
 - 18) INOUE, S. B., N. TAKEWAKI, T. TAKASUKA, T. MIO, M. ADACHI, Y. FUJII, C. MIYAMOTO, M. ARISAWA, Y. FURUICHI and T. WATANABE. Characterization and gene cloning of 1, 4- β -D-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*, Eur. J. Biochem., 231 : 845-854 (1995).
 - 19) TAKASUKA, T., T. KOMIYAMA, Y. FURUICHI and T. WATANABE. Cell wall synthesis specific cytotoxic effect of *Hansenula mrakii* toxin-HM-1 on *Saccharomyces cerevisiae*, Cell. Mol. Biol. Res., 41 (6) : 575-581 (1995).
 - 20) QADOTA, H., C. P. PYTHON, S. B. INOUE, M. ARISAWA, Y. ANRAKU, T. ZHENG, D. E. LEVIN and Y. OHYA. Identification of yeast Rholp GTP-ase as a regulatory subunit of 1, 3- β -D-glucan synthase, Science, 272 : 279-281 (1996).
 - 21) BUSSEY, H. Rho returns : its targets in focal adhesions, Science, 273 (5272) : 203 (1996).
 - 22) BUSSEY, H. Cell shape determination : a pivotal role for Rho, Science, 272 (5259) : 224-225 (1996).
 - 23) LEW, D. J. and S. I. REED. A cell cycle checkpoint monitors cell morphogenesis in budding yeast, J.

- Cell Biol., 120 : 739-749 (1995).
- 24) HONG, Z., P. M. NATHANIEL, H. BROWN, L. E. TRAN, K. J. SHAW, R. S. HARE and B. DIDOMENICO. Cloning and characterization of KNR4, a yeast gene involved in (1, 3) - β -glucan synthesis, Mol. Cell. Biol., 14 : 1017-1025 (1994).
- 25) MATIN, H., A. DAGKESAMANSKAIA, G. SATCHANSKA, N. DALLIES and J. FRANCOIS. KNR4, a suppressor of *Saccharomyces cerevisiae* cwh mutants, is involved in the transcriptional control of chitin synthase genes, Microbiol., 145 : 249-258 (1999).
- 26) KASAHARA, S., H. YAMADA, T. MIO, Y. SHIROTORI, C. MIYAMOTO, T. YABE, T. NAKAJIMA, E. ICHISHIMA and Y. FURUICHI. Cloning of the *Saccharomyces cerevisiae* gene whose overexpression overcomes the effects of HM-1 killer toxin, which inhibits β -glucan synthesis, J. Bacteriol., 176 : 1488-1499 (1994).
- 27) YABE, T., T. YAMADA-OKABE, S. KASAHARA, Y. FURUICHI, T. NAKAJIMA, E. ICHISHIMA, M. ARISAWA and H. YAMADA-OKABE. HKR1 encodes a cell surface protein that regulates both cell wall β -glucan synthesis and budding pattern in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, J. Bacteriol., 178 : 477-483 (1996).
- 28) KIMURA, T., T. KOMIYAMA, Y. FURUICHI, Y. IIMURA, S. KARITA, K. SAKKA and K. OHMIYA. N-glycosylation is involved in the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to HM-1 killer toxin secreted from *Hansenula mrakii* IFO 0895, Appl. Microbiol. Biotech., 51 (2) : 176-184 (1999).
- 29) YAMAMOTO, T., K. UCHIDA, T. HIRATANI, T. MIYAZAKI, J. YAGIU and H. YAMAGUCHI. In vitro activity of the killer toxin from yeast *Hansenula mrakii* against yeasts and molds, J. Antibiotics, 41 (3) : 398-403 (1988).
- 30) 山本哲郎・宮崎敬之・柳生淳二・岩瀬 一・片桐信之・穂垣正暢・内田勝久・竹重厚子・野原久美子・山口英世. 酵母 *Hansenula mrakii* の生産するキラー毒素を用いた *Candida albicans* と *Candida glabrata* の判定培地の作製および、その産婦人科領域への応用. Jpn. J. Med. Mycol., 29 : 257-264 (1988).
- 31) KIMURA, T., N. KITAMOTO, Y. IIMURA and Y. KITO. Production of HM-1 killer toxin in *Saccharomyces cerevisiae* transformed with the PDR4 gene and δ -sequence-mediated multi-integration system, J. Ferment. Bioeng, 80 (5) : 423-428 (1995).
- 32) VODKIN, M., F. KATTERMAN and G. R. FINK. Yeast killer mutants with altered double-strand ribonucleic acid, J. Bacteriol., 117 (2) : 681-686 (1974).
- 33) HOPPER, J. E., K. A. BOSTIAN, L. B. ROWE and D. J. TIPPER. Translation of the L-species dsRNA genome of the killer-associated virus-like particles of *Saccharomyces cerevisiae*, J. Biol. Chem., 252 (24) : 9010-9017 (1977).
- 34) SKIPPER, N., D. Y. THOMAS and P. C. K. LAU. Cloning and sequencing of the preprotoxin-coding region of the yeast M1 double-strand RNA, EMBO J., 3 (1) : 107-111 (1984).
- 35) BOSTIAN, K. A., Q. ELLIOTT, H. BUSSEY, V. BURN and A. SMITH. Sequence of the preprotoxin dsRNA gene of type I killer yeast : multiple processing events produce a two-component toxin, Cell, 36 (3) : 741-751 (1984).
- 36) ZHU, H., H. BUSSEY, D. Y. THOMAS, J. GAGNON and A. W. BELL. Determination of the carboxyl termini of the α and β subunits of yeast K1 killer toxin. Requirement of a carboxypeptidase B-like activity for maturation, J. Biol. Chem., 262 (22) : 10728-10732 (1987).
- 37) ZHU, Y. S., X. Y. ZHANG, C. P. CARTWRIGHT and D. J. TIPPER. Kex2-dependent processing of yeast K1 killer preprotoxin includes cleavage at ProArg-44, Mol. Microbiol., 6 (4) : 511-520 (1992).
- 38) ZHU, Y. S., J. KANE, X. Y. ZHANG, M. ZHANG and D. J. TIPPER. Role of the gamma component of preprotoxin in expression of the yeast K1 killer phenotype, Yeast, 9 (3) : 251-266 (1993).
- 39) MARTINAC, B., H. ZHU, A. KUBALSKI, X. L. ZHOU and M. CULBERTSON. Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 (10) : 6228-6232 (1990).
- 40) BUSSEY, H. K1 killer toxin, a pore-forming protein from yeast, Mol. Microbiol., 5 (10) : 2339-2343 (1991).
- 41) BOONE, C., H. BUSSEY, D. Y. THOMAS and T. VERNET. Yeast killer toxin : site-directed mutations implicate the precursor protein as the immunity component, Cell, 46 (1) : 105-113 (1986).
- 42) STURLEY, S. L., Q. ELLIOTT, J. LEVITRE, D. J. TIPPER

- and K. A. BOSTIAN. Mapping of functional domains within the *Saccharomyces cerevisiae* type 1, *EMBO Journal*, 5 (12) : 3381-3389 (1986).
- 43) ZHU, H. and H. BUSSEY. Mutational analysis of the functional domains of yeast K1 killer toxin, *Mol. Cell. Biol.*, 11 (1) : 175-181 (1991).
- 44) AL-AIDROOS, K. and H. BUSSEY. Chromosomal mutants of *Saccharomyces cerevisiae* affecting the cell wall binding site for killer factor, *Can. J. Microbiol.*, 24 (3) : 228-237 (1978).
- 45) LUSSIER, M., A. M. WHITE, J. SHERATON, T. De PAOLO, J. TREADWELL, S. B. SOUTHARD, C. I. HORENSTEIN, J. CHEN-WEINER, A. F. RAM, J. C. KAPTEYN, T. W. ROEMER, D. H. VO, D. C. BONDOC, J. HALL, W. W. ZHONG, A. M. SDICU, J. DAVIES, F. M. KLIS, P. W. ROBBINS and H. BUSSEY. Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*, 147 (2) : 435-450 (1997).
- 46) STARK, M. J. and A. BOYD. The killer toxin of *Kluyveromyces lactis* : characterization of the toxin subunits and identification of the genes which encode them, *EMBO Journal*, 5 (8) : 1995-2002 (1986).
- 47) STARK, M. J., A. BOYD, A. J. MILEHAM and M. A. ROMANOS. The plasmid-encoded killer system of *Kluyveromyces lactis* : a review, *Yeast*, 6 (1) : 1-29 (1990).
- 48) TOKUNAGA, M., A. KAWAMURA and F. HISHINUMA. Expression of pGKL killer 28K subunit in *Saccharomyces cerevisiae* : identification of 28K subunit as a killer protein, *Nuc. Acids Res.*, 17 (9) : 3435-3446 (1989).
- 49) BULTER, A. R., M. PORTER and M. J. STARK. Intracellular expression of *Kluyveromyces lactis* toxin gamma subunit mimics treatment with exogenous toxin and distinguishes two classes of toxin-resistant mutant., *Yeast*, 7 (6) : 617-625 (1991).
- 50) SUGISAKI, Y., N. GUNGE, K. SAKAGUCHI, M. YAMASAKI and G. TAMURA. *Kluyveromyces lactis* killer toxin inhibits adenylate cyclase of sensitive yeast cells, *Nature*, 304 (5925) : 464-466 (1983).
- 51) WHITE, J. H., B. A. R. and S. M. J. R. *Kluyveromyces lactis* toxin does not inhibit yeast adenylate cyclase, *Nature*, 345 (69) : 666-668 (1989).
- 52) BUTLER, A. R., R. W. O'DONNELL, V. J. MARTIN, G. W. GOODAY and M. J. STARK. *Kluyveromyces lactis* toxin has an essential chitinase activity, *Eur. J. Biochem.*, 199 (2) : 483-488 (1991).
- 53) TAKITA, M. A. and B. CASTILHO-VALAVICIUS. Absence of cell wall chitin in *Saccharomyces cerevisiae* leads to resistance to *Kluyveromyces lactis*, *Yeast*, 9 (6) : 589-598 (1993).
- 54) KAWAMOTO, S., M. NOMURA and T. OHNO. Cloning and characterization of SKT5, a *Saccharomyces cerevisiae* gene that affects protoplasts regeneration and resistance to killer toxin of *Kluyveromyces lactis*, *J. Ferment. Bioeng.*, 74 (4) : 199-208 (1992).
- 55) TRILLA, J. A., T. COS, A. DURAN and C. RONCERO. Characterization of CHS4 (CAL2), a gene of *Saccharomyces cerevisiae* involved in chitin biosynthesis and allelic to SKT5 and CSD4, *Yeast*, 13 (9) : 795-807 (1997).
- 56) BUTLER, A. R., J. H. WHITE, Y. FOLAWIYO, A. EDLIN, D. GARDINER and M. J. R. STARK. Two *Saccharomyces cerevisiae* genes which control sensitivity to G1 arrest induced by *Kluyveromyces lactis* toxin, *Mol. Cell. Biol.*, 14 (9) : 6306-6316 (1994).
- 57) KISHIDA, M., M. TOKUNAGA, Y. KATAYOSE, H. YAJIMA and A. KAWAMURA-WATABE. Isolation and genetic characterization of pGKL killer-insensitive mutants (iki) from *Saccharomyces cerevisiae*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60 (5) : 798-801 (1996).
- 58) YAJIMA, H., M. TOKUNAGA, A. NAKAYAMA-MURAYAMA and F. HISHINUMA. Characterization of IKI1 and IKI3 genes conferring pGKL killer sensitivity on *Saccharomyces cerevisiae*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61 (4) : 704-709 (1997).
- 59) KITAMOTO, H. K., S. OHMOMO and T. NAKAHARA. Selection of killer yeasts (*Kluyveromyces lactis*) to prevent aerobic deterioration in silage making, *J. Dairy Sci.*, 76 (3) : 803-811 (1993).
- 60) SUZUKI, C., K. YAMADA, N. OKADA and S. NIKKUNI. Isolation and characterization of halotolerant killer yeasts from fermented foods, *Agri. Biol. Chem.*, 53 : 2593-2597 (1989).
- 61) SUZUKI, C. and S. NIKKUNI. Purification and properties of the killer toxin produced by a halotolerant yeast, *Pichia farinosa*, *Agric. Biol. Chem.*, 53 : 2599-2604 (1989).
- 62) SUZUKI, C. and S. NIKKUNI. The primary and

- subunit structure of a novel type killer toxin produced by a halotolerant yeast, *Pichia farinosa*, J. Biol. Chem., 269 (4) : 3041-3046 (1994).
- 63) SUZUKI, C. Secretion of a protoxin posttranslationally controlled by NaCl in a halotolerant yeast, *Pichia farinosa*, Yeast, 15 (2) : 123-131 (1999).
- 64) KASHIWAGI, T., N. KUNISHIMA, C. SUZUKI, F. TSUCHIYA, S. NIKKUNI, Y. ARATA and K. MORIKAWA. The novel acidophilic structure of the killer toxin from halotolerant yeast demonstrates remarkable folding similarity with a fungal killer toxin., Structure, 5 (1) : 81-94 (1997).
- 65) SUZUKI, C., T. KASHIWAGI, F. TSUCHIYA, N. KUNISHIMA, K. MORIKAWA, S. NIKKUNI and Y. ARATA. Circular dichroism analysis of the interaction between the a and b subunits in a killer toxin produced by a halotolerant yeasts, *Pichia farinosa*, Protein. Eng., 10 (2) : 99-101 (1997).
- 66) SUZUKI, C. and Y. SHIMMA. P-type ATPase spf1 mutants show a novel resistant mechanism for the killer toxin SMKT, Mol. Microbiol., 32 (4) : 813-824 (1999).
- 67) DIGNARD, D., M. WHITEWAY, D. GERMAIN, D. TESSIER and D. Y. THOMAS. Expression in yeast of a cDNA copy of the K2 killer toxin gene, Mol. Gen. Genet., 227 : 127-136 (1991).
- 68) HUTCHINS, K. and H. BUSSEY. Cell wall receptor of yeast killer toxin : involvement of 1, 6- β -D-glucan, J. Bacteriol., 154 : 161-169 (1983).
- 69) SCHMITT, M. J. and D. J. TIPPER. K28, a unique double-stranded RNA killer virus of *Saccharomyces cerevisiae*, Mol. Cell. Biol., 10 (9) : 4807-4815 (1990).
- 70) SCHMITT, M. J. and D. J. TIPPER. Genetic analysis of maintenance and expression of L and M double-stranded RNAs from yeast killer virus K28, Yeast, 8 (5) : 373-384 (1992).
- 71) SCHMITT, M. J. cloning and expression of a cDNA copy of the viral K28 killer toxin gene in yeast, Mol. Gen. Genet., 246 : 236-246 (1995).
- 72) SCHMITT, M. J. and D. J. TIPPER. Sequence of the M28 dsRNA : preprotoxin is processed to an alpha /beta heterodimeric protein toxin, Virology, 213 (2) : 341-351 (1995).
- 73) SCHMITT, M. and F. RADLER. Mannoprotein of the yeast cell wall asprimary receptor for the killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28., J. Gen. Microbiol., 133 : 3347-3354 (1987).
- 74) SCHMITT, M. and F. RADLER. Molecular structure of the cell wall receptor for killer toxin KT28 in *Saccharomyces cerevisiae*, J. Bacteriol., 170 : 2192-2196 (1988).
- 75) SCHMITT, M., M. BRENDEL, R. SCHWARZ and F. RADLER. Inhibition of DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by yeast killer toxin KT28., J. Gen. Microbiol., 135 : 1529-1535 (1989).
- 76) RADLER, F., S. HERZBERGER, S. INGE and P. SCHWARZ. Investigation of a killer strain of *Zygosaccharomyces bailii*, J. Gen. Microbiol., 139 : 495-500 (1993).
- 77) 鍵山省吾・相羽富夫・門脇清・茂木孝也. 耐塩性キラール酵母に関する研究, 醤研, 15 (2) : 50-54 (1989)
- 78) TAO, J., GINSBERG, I., BANERJEE, N., HELD, W., KOLTIN, Y., and BRUENN, and J. A. *Ustilago maydis* KP6 killer toxin : structure, expression in *Saccharomyces cerevisiae*, and relationship to other cellular toxins., Mol. Cell. Biol., 10 (4) : 1373-1381 (1990).
- 79) PARK, C. M., J. A. BRUENN, C. GANESA, W. F. FLURKEY and R. F. BOZARTH. Structure and heterologous expression of the *Ustilago maydis* viral toxin, Mol. Microbiol., 11 (1) : 155-164 (1994).
- 80) PARK, C. M., N. BANERJEE, Y. KOLTIN and J. A. BRUENN. The *Ustilago maydis* virally encoded KP1 killer toxin. Mol. Microbiol., 20 (5) : 957-963 (1996).
- 81) PARK, C. M., N. BANERJEE, Y. KOLTIN and J. A. BRUENN. The *Ustilago maydis* virally encoded KP1 killer toxin, Mol. Microbiol., 20 (5) : 957-963 (1996).
- 82) GU, F., A. KHIMANI, S. G. RANE, W. H. FLURKEY, R. F. BOZARTH and T. J. SMITH. Structure and function of a virally encoded fungal toxin from *Ustilago maydis* : a fungal and mannamilan Ca²⁺ channel inhibitor, Structure, 3 : 805-814 (1995).
- 83) 大内弘造. 酵母のキラール因子と育種, 発酵と工業, 39 : 190 (1981)
- 84) 原昌 道. キラール酵母とキラートキシン, 化学と生物, 23 : 151 (1985)
- 85) 大内弘造・山本哲郎, 酵母のキラール現象, 微生物, 2 (1) : 27-41 (1986)