

## *Yarrowia lipolytica*의 Multicopy Integration Vector 개발

김정윤\* · 우문희 · Dewey D.Y. Ryu<sup>1</sup>

충남대학교 자연과학대학 미생물학과

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, University of California at Davis, CA, USA

## Development of a Multicopy Integration Vector in *Yarrowia lipolytica*

Jeong-Yoon Kim\*, Moon-Hee Woo and Dewey D.Y. Ryu<sup>1</sup>

Department of Microbiology, Chungnam National University

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, University of California at Davis, CA, USA

**Abstract** — Multicopy integration vector is a very useful vector system in that they can be integrated into chromosomal DNA in several copies and stably maintained under non-selective conditions. To develop a multicopy integration vector system in the yeast *Yarrowia lipolytica*, P-type ribosomal DNA was cloned from *Y. lipolytica*. A *Hind*III-*Bgl*III fragment of the cloned rDNA and a promoterless *URA3* gene were inserted into pGEM1, generating multicopy integration vectors, pMIYL-1 and pMIYL-2. The rDNA fragment is for targeted homologous recombination between the vector and the chromosomal DNA of *Y. lipolytica*, and the promoterless *URA3* gene is a defective selection marker for inducing multicopy integration. pMIYL-1 and pMIYL-2 have a unique restriction enzyme site, *Kpn*I, and two unique restriction enzyme sites, *Kpn*I and *Eco*RI, respectively, which can be used for targeting of the vectors into the rDNA of *Y. lipolytica* chromosomal DNA. After transformation of the vectors into *Y. lipolytica*, copy number and stability were analyzed by Southern hybridization. The vectors were found to be present in less than 5 copies per cell and were stably maintained during growth in non-selective media.

유전자 재조합 기술이 개발된 이래로 heterologous protein을 생산할 수 있는 많은 숙주와 벡터의 개발이 이루어져왔다. 이 중에서 *Escherichia coli*와 그 벡터들은 heterologous gene의 발현에 있어서 주요한 역할을 해왔다. 그러나, 이 *E. coli* system에는 endotoxin에 의한 산물의 오염, inclusion body의 형성, post-translational modification이 안되는 등의 문제점들이 있다(1). 또한, *Bacillus subtilis* 등의 다른 미생물을 이용한 분비 벡터 system들이 개발되었으나(2, 3) 생산된 단백질이 extracellular protease에 분해되거나 만들어진 단백질이 원래의 단백질과는 다른 특성을 보이는 등의 문제점들 때문에 최근에는 진핵세포를 이용한 유전자 발현체계에 많은 관심이 주어졌다(4-6). 이 중에서 *Saccharomyces cerevisiae*는 간단한 배지에서 고농도로 배양이 가능하고 *E. coli* 만큼 유전자 조작이 간편하기 때문에 heterologous gene의 발현을 위한 중요한 균주로 부각이 되었다(7, 8). 또한 최근

에는 *S. cerevisiae* 외에도 *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* 등의 다른 효모균을 이용한 유용 유전자의 발현에 대한 연구가 활발하게 수행되고 있다(9-11).

이전에는 *Candida*, *Endomycopsis*, 또는 *Saccharomycopsis lipolytica* 등으로 알려져 있었던 *Yarrowia lipolytica*는 dimorphic yeast로서(12, 13) citric acid, isopropylmalic acid, erythritol, 그리고 mannitol 등을 생산하는 데에 사용되어 왔다(14-16). 이 *Y. lipolytica*에서는 lysine 대사, alkane 이용, mating과 sporulation, 그리고 genetic mapping 등과 같은 유전학적, 생리학적 연구가 잘 되어 있다(17-20). 또한, 이 *Y. lipolytica*는 alkaline protease, acid proteases, 그리고 RNase 같은 비교적 분자량이 큰 단백질을 세포 밖으로 대량으로 분비할 수 있는 능력 때문에 최근에는 heterologous proteins을 생산하기 위한 숙주로서 관심을 끌고 있다(21, 22). *Y. lipolytica*에서 autonomously replicating sequence(ARS)가 발견되었는데 이 ARS에 기초한 벡터들은 세포당 2 내지 4개씩 존재하는 것으로 알려져 있다(23-25). 비록 이 벡터들은

**Key words:** *Yarrowia lipolytica*, multicopy, integration

\*Corresponding author

*S. cerevisiae*의 ARS 벡터보다는 훨씬 안정한 것으로 알려져 있지만 안정성에 있어서 많은 문제를 안고 있기 때문에 클론된 유전자들을 높은 효율로 발현시킬 때에는 적절하지 않은 것으로 보인다. 따라서, copy 수가 많이 존재하며 안정하게 유지되는 벡터를 제조하는 것이 *Y. lipolytica*를 이용하여 heterologous proteins을 대량으로 생산하기 위해서 필요하다.

최근에 *S. cerevisiae*와 *Kluyveromyces lactis* 등에서 non-selective한 배양 조건하에서도 안정하게 유지되며 multicopy로 존재하는 새로운 벡터들이 개발되었는데, 이러한 벡터들은 회분배양을 수행하였을 때 non-selective한 배지 조건하에서도 70세대가 넘도록 안정하게 유지가 되었다(26, 27). 이 벡터들은 homologous recombination이 일어나는 지역인 ribosomal DNA(rDNA)와 표지 유전자로 이용된 promoterless *TRP1* 유전자 또는 *LEU2d* 유전자로 구성이 되어 있다. 이러한 벡터들이 multicopy integration 되는 기작에 대해서는 아직도 확실히 밝혀지지 않았으나, copy 수의 증폭은 아마도 완전하지 않은 표지 유전자가 매우 낮은 수준으로 발현이 됨으로써 생기는 강한 selection pressure에 기인하는 것으로 보인다(28). 본 연구에서는 *Y. lipolytica*에서 사용될 수 있는 multicopy integration 벡터의 제조를 시도하였다. 이 벡터는 *Y. lipolytica*의 rDNA의 일부분을 포함하고 있으며 표지 유전자로서 promoter 부분이 거의 제거된 *URA3* 유전자를 가지고 있는 것으로, *Y. lipolytica*의 chromosome으로 끼어 들어가 안정하게 유지됨을 알 수 있었다.

## 재료 및 방법

### 사용균주와 plasmids

본 실험에 사용된 균주와 plasmids는 Table 1에 나타나 있다. *Y. lipolytica* 균주 및 plasmid pIMR53은 David M. Ogrydziak 교수로부터 분양받았다.

### 배지 및 배양

*E. coli*의 배지로는 LB(1% Bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) 또는 ampicillin이 100 µg/ml 첨가된 LB를 사용하였다. *Y. lipolytica*의 배지로는 YM (0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% Bacto-peptone, 1% glucose), YPDC(1% yeast extract, 1% Bacto-peptone, 1% glucose, 50 mM citrate buffer, pH 4), 또는 YLT dropout 배지(0.67% YNB without amino acids, 2.0% glucose, dropout mixture, pH 5.5)가 사용되었다. Dropout mixture는 1l 당 adenine 30 mg, uracil 20 mg, L-tryptophan 60 mg, L-threonine 37.5 mg, L-histidine 20 mg, L-lysine 40 mg, L-tyrosine 20 mg, L-phenylalanine 50 mg, 그리고 L-tyrosine 20 mg을 포함하고 있으며, 경우에 따라서 uracil을 첨가하지 않았다. *Y. lipolytica*는 50 ml의 배지가 담긴 500 ml 삼각플라스크에서 진탕배양(250 rpm) 하였으며, 배양온도는 28°C로 유지하였다.

### DNA 조작 및 형질전환

제한효소, T4 DNA ligase 등은 Boehringer Mannheim, New England Biolab에서 구입하였으며, *E.*

Table 1. Characteristics of strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristic(s)	Reference or source
<i>E. coli</i>		
JM101	<i>supE thi Δ(lac-proAB)</i> F' [ <i>traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15</i> ]	29
<i>Y. lipolytica</i>		
CX161-1B	<i>ade1A</i>	20
I	<i>ade1A, xpr2, ura3</i>	D.M. Ogrydziak
Plasmids		
pGEM1	<i>E. coli</i> cloning vector; Amp <sup>r</sup>	Promega
pIMR53	pBR322 with <i>URA3</i> of <i>Y. lipolytica</i>	D.M. Ogrydziak
pYRD	pGEM1 with 7.7 kb <i>HindIII</i> rDNA fragment of <i>Y. lipolytica</i>	this study
pGU3	pGEM1 with promoterless <i>URA3</i> of <i>Y. lipolytica</i>	this study
pGU3-1	pGEM1 with promoterless <i>URA3</i> of <i>Y. lipolytica</i>	this study
pMIYL-1	pGU3 with 3.6 kb <i>HindIII-BglII</i> fragment of rDNA	this study
pMIYL-2	pGU3-1 with 3.6 kb <i>HindIII-BglII</i> fragment of rDNA	this study

*coli*에서의 plasmid 분리, subcloning, 형질전환 등의 DNA 조작은 기본적으로 Sambrook 등(29)의 방법대로 수행하였다. *Y. lipolytica*의 형질전환은 변형된 Davidow 등(30)의 방법에 따랐는데, *Hae*III-digested *E. coli* DNA를 carrier DNA로 이용하였다.

### Chromosomal DNA의 분리

*Y. lipolytica* CX1B-161 균주를  $1-2 \times 10^8$  정도가 되도록 YPDC에서 배양한 후, 상온에서 3000 rpm으로 5분동안 원심분리하여 50  $\mu$ l의 Lyticase(0.3 mg/ml)을 포함하는 0.5 ml sorbitol(0.9M sorbitol, 0.1M EDTA, 0.1M Tris-Cl, pH 8.0) 용액에 현탁시켰다. 이 용액에 0.28M의 2-mercaptoethanol 50  $\mu$ l를 첨가한 후 37°C에서 1시간 동안 반응을 시켰다. 이렇게 얻은 spheroplasts를 다시 3000 rpm, 5분동안 원심분리하여 수확한 후 0.5 ml Tris/EDTA 용액(20 mM EDTA, 50 mM Tris-Cl, pH 8.0)에 현탁시킨 후 50  $\mu$ l의 10% SDS를 넣고 65°C에서 20분 동안 반응을 하여 lysis 시켰다. 5M의 potassium acetate 용액 200  $\mu$ l를 넣고 열음에서 30분동안 방치한 후 원심분리를 하여 상등액만을 얻은 다음 100% ethanol을 DNA를 침전시켰다. 이 DNA를 TE buffer에 녹인 후 RNase A를 처리하여 RNA를 제거한 후 isopropanol로 DNA를 침전시켰다. 이렇게 얻은 chromosomal DNA는 TE buffer에 녹여 보관하였다.

### Southern hybridization

*Y. lipolytica*의 chromosomal DNA를 *Hind*III로 절단한 뒤 5  $\mu$ g 씩 0.7% agarose gel에서 전개하였다. 이 gel을 변성용액(1.5M NaCl, 0.5M NaOH)에서 45분, 중화용액(1.5M NaCl, 0.5M Tris-Cl, pH 7.0)에서 30분 동안 처리하고 nylon membrane(Hybond-N, Amersham)에 blotting 하였다. Hybridization은 ECL-labeling and detection system kit(Amersham)을 이용하여 제조회사에서 추천하는 방법에 따라 42°C에서 수행하였다. Probe는 *Pst*I으로 절단된 pMIYL3 plasmid 절편(*URA3*)을 사용하였다. 감광은 X-ray film(Kodak)에 5~15분간 노출시켜서 수행하였다.

### 안정성 측정

Chromosome 상에 끼어 들어가 있는 벡터의 안정성은 다음과 같이 측정하였다. *Y. lipolytica* 형질전환체를 non-selective 배지(YPDC)에서 25~30세대를 배양하면서 배양 중간에 sample을 시간별로 취하여 YM 배지에 도말하여 콜로니들을 얻어낸 뒤 uracil이 빠진 YLT dropout 배지에 replica-plating하여 표

지 유전자(*URA3*)의 존재를 확인하였고, 최종적으로 Southern blotting을 통하여 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### ribosomal RNA 유전자의 클로닝

벡터를 chromosome 속으로 끼워넣기 위해서는 homologous recombination이 일어날 수 있는 target site가 필요하다. 효모에서는, 동물세포에서와는 달리, 선형 DNA 절편에 의한 형질전환율은 target site가 여러 군데 떨어져 있거나 혹은 한군데 집중적으로 모여 있는 것에 상관없이 그 수에 비례한다고 보고된 바 있다(31). rRNA 유전자는 한개의 세포내에 수십에서 수백 개의 copy가 같은 위치에 모여 있으므로 multicopy로 벡터를 chromosome에 삽입하기에 매우 좋은 target site를 제공해 준다. *Y. lipolytica*에는 두 종류의 rDNA(P-type과 G-type)가 있는 것으로 알려져 있는데 이 둘은 non-transcribed spacer region의 길이와 구성에 있어서 차이가 있는 것으로 보고되었다(32). *Y. lipolytica*의 전체 게놈 DNA를 *Hind*III로 완전히 절단한 후 0.7% agarose gel에서 전개를 시킨 다음 rDNA로 예상되는 7.7 kb 크기를 갖는 진한 밴드에 해당하는 부분(32)을 잘라내서 DNA를 회수하였다. 이 DNA 절편들을 *Hind*III로 잘라진 pGEM1 벡터에 끼워넣은 다음 *E. coli* JM101에 도입하여 *Y.*

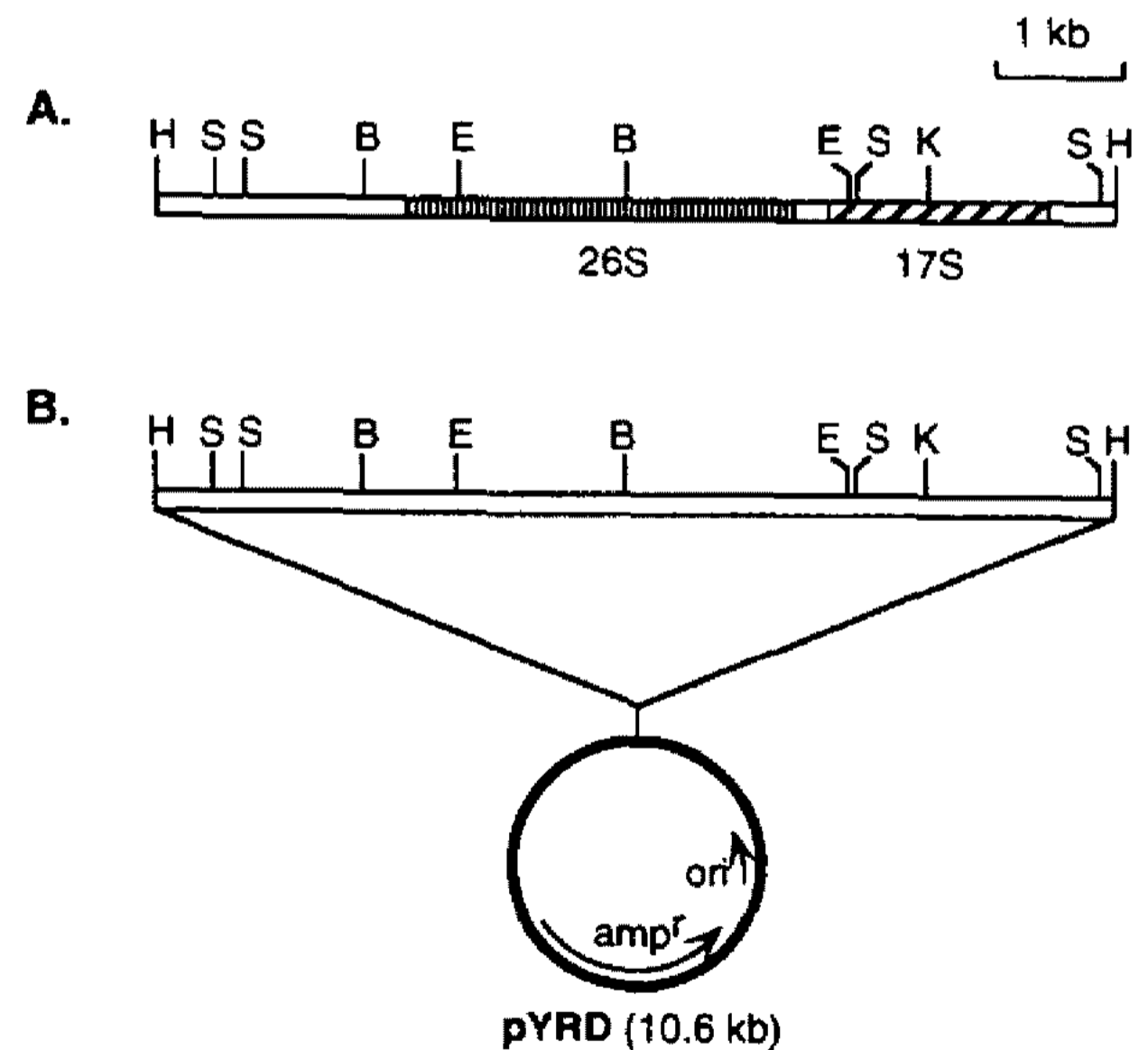


Fig. 1. Partial restriction map of the P-type ribosomal DNA of *Y. lipolytica*.

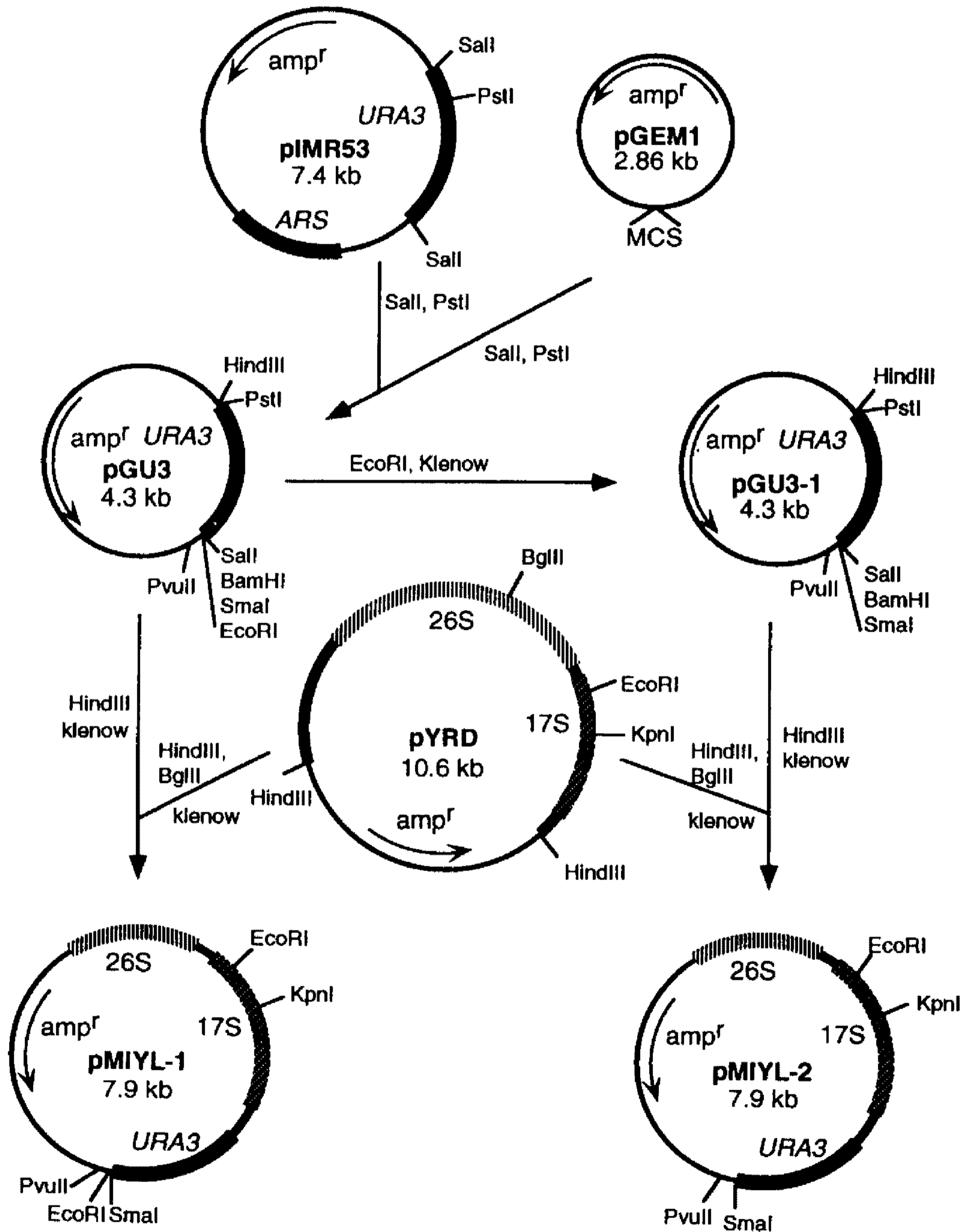
(A) restriction map of the P-type rDNA taken from reference 32, (B) restriction map of the P-type rDNA which was cloned from *Y. lipolytica* CX161-1B and inserted into pGEM1. Restriction sites: B, *Bgl*II; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; S, *Sal*I.

*lipolytica*에서 유래된 7~8 kb *Hind*III 절편들을 포함한 plasmids를 가진 형질전환체들을 얻었다. 이 형질전환체들로부터 plasmids를 추출하여 여러가지 제한효소로 잘라보아 이미 보고가 된 rDNA의 제한효소지도와 비교를 함으로써 rDNA를 포함하고 있을 가능성이 많은 plasmids를 선별하였다(data not shown). 이 plasmid들을 *Sall*, *Kpn*I, *Eco*RI, *Bgl*II 등으로 잘라 본 결과 7.7 kb의 크기를 갖는 P-type rDNA의 제한효소지도와 정확하게 일치하는 plas-

mid를 골라낼 수 있었고 이 plasmid를 pYRD라고 명명하였다(Fig. 1).

**벡터의 제조**

Multicopy integration vector를 제조하기 위해서는 target site 외에도 불완전한 표지유전자가 필요한데 본 실험에서는 promoter 부분이 없는 *URA3* 유전자를 사용하였다. 이 promoterless *URA3*를 만들기 위하여 5' 말단에 해당되는 쪽은 *Pst*I으로 절단하였고, 3' 말단



**Fig. 2. Construction of multicopy integration vectors, pMIYL-1 and pMIYL-2.** pMIYL-1 has one unique restriction site, *Kpn*I, and pMIYL-2 has two unique restriction sites, *Eco*RI and *Kpn*I, in the 17S gene.

쪽은 *SalI*을 처리하여 절단하였다. 따라서 이 *URA3* 유전자는 translation이 시작되는 염기(+1)로부터 5' 방향으로 41 bp 만을 가지고 있을 뿐 promoter는 가지고 있지 않다. 이 promoterless *URA3* 유전자를 pGEM1의 multicloning site의 *PstI*과 *SalI* 자리에 끼워넣어 만들어진 plasmid를 pGU3라고 명명하였다. *Y. lipolytica*의 rDNA의 일부분에 해당하는 유전자(17S와 26S의 일부분, 3.6 kb)를 pYRD로부터 *HindIII*와 *BglII*를 이용하여 분리하여 pGU3에 넣어 주었다(Fig. 2). 이렇게 해서 만들어진 벡터는 pMIYL-1인데 이 벡터에는 rDNA의 17S에 해당하는 곳에 *KpnI*이 유일한 제한효소 자리로 존재하기 때문에 이 벡터를 *Y. lipolytica*로 형질전환시킬 때 homologous recombination을 촉진시킬 수 있도록 *KpnI*으로 잘라줄 수 있다. 또한, *SmaI*과 *PvuII*가 유일한 제한효소 자리이기 때문에 발현시키고자 하는 유전자를 이런 제한효소 자리에 끼워넣을 수 있다. 이런 integration 벡터의 활용도를 높이기 위하여는 rDNA에 해당하는 지역에 유일한 제한효소 자리가 여러개 존재하는 것이 바람직하다. pGU3에는 *EcoRI* 자리가 하나 있고, rDNA의 *HindIII*와 *BglII* 유전자 조각 안쪽에 *EcoRI* 자리가 하나 있다. pGU3을 *EcoRI*으로 절단한 후 blunt end를 만들어 다시 붙여줌으로써 *EcoRI* 자리를 제거하였다.

이 것이 pGU3-1인데 이 plasmid에 rDNA의 *HindIII/BglII* 조각을 넣어서 pMIYL-2를 만들었다(Fig. 2). 이 pMIYL-2에는 rDNA 지역에 *EcoRI*과 *KpnI* 자리가 유일하게 존재한다.

pMIYL-1과 pMIYL-2에 있는 rDNA의 *HindIII/BglII* 유전자 절편은 17S 유전자 전체와 26S 유전자의 일부분을 포함하는 부분으로서 전체 rDNA 유전자의 한 쪽 끝이다. 그리고 유일한 제한효소 자리들인 *EcoRI*과 *KpnI*은 17S에 위치하고 있다. 따라서 pMIYL-1은 *KpnI*으로, pMIYL-2는 *EcoRI*이나 *KpnI*으로 절단한 후 homologous recombination을 통하여 chromosome 상으로 삽입시켰을 때, chromosome에 존재하는 17S와 26S rDNA는 원래의 구조를 유지하게 되며 오직 벡터 DNA만이 rDNA unit들 사이에 끼어 들어간 효과를 보이게 된다(Fig. 3). 이것은 많은 수의 벡터가 rDNA에 삽입되어 온전한 17S 또는 26S rRNA가 만들어지지 못함으로써 생길 수 있는 여러 가지 문제들을 방지할 수 있을 것으로 보인다.

#### 형질전환체의 분석

pMIYL-1과 pMIYL-2가 *Y. lipolytica*의 chromosome 상으로 삽입되는 것을 확인하기 위하여 pMIYL-1과 pMIYL-2를 *KpnI* 또는 *EcoRI*으로 절단한 후 *Y. lipoly-*

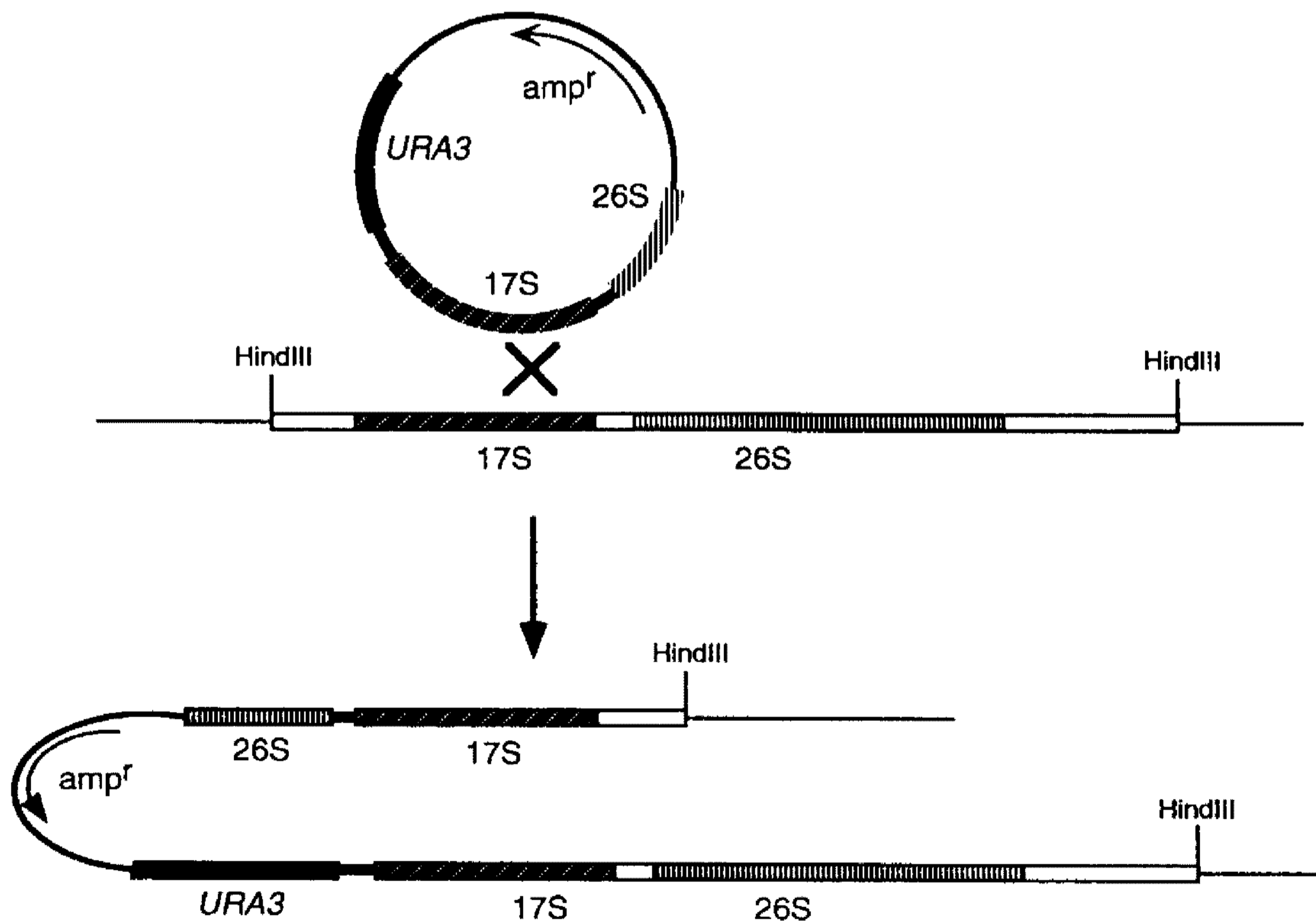


Fig. 3. Schematic representation of pMIYL site-specific integration into the rDNA of the *Y. lipolytica* chromosome. Integration of pMIYL vectors into the chromosome does not disrupt the rDNA of the *Y. lipolytica* chromosome but results in longer *HindIII* fragments.



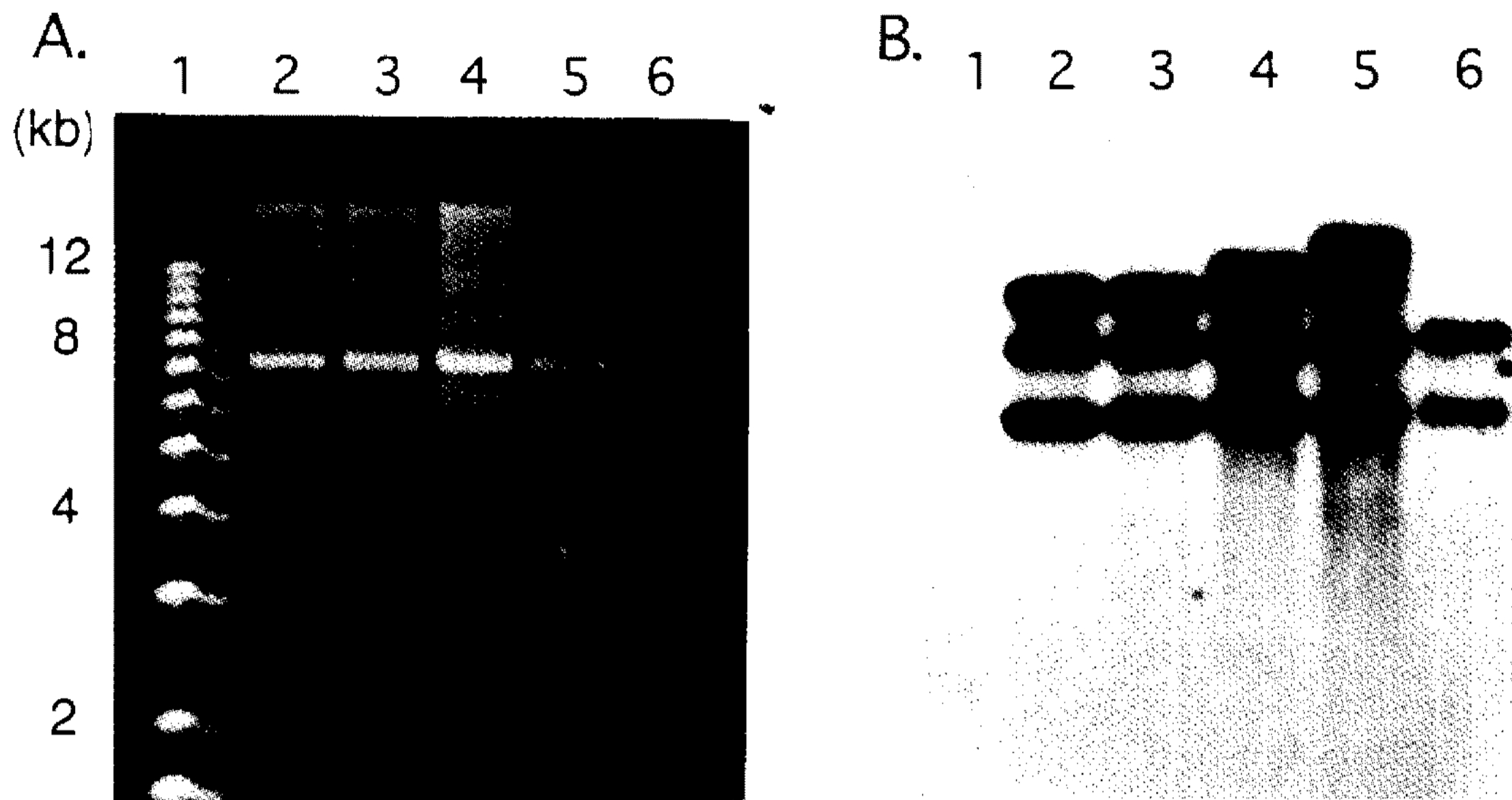


Fig. 4. Southern hybridization analysis of *Y. lipolytica* transformants.

Chromosomal DNAs from four independently isolated pMIYL-2 transformants (lane 2 to 5) and parental strain, I, (lane 6) were completely digested with *Hind*III (A) and hybridized with the *URA3* gene (B). Lane 1, 2 kb ladder (BRL).

*tica*로 도입을 하여 형질전환체들을 선별하였다. Uracil이 결여된 YLT dropout 배지에서 약 3일이 경과한 후에 나온 형질 전환체들을 같은 배지에 다시 한번 도말하여 확인을 하였다. 형질전환된 *Y. lipolytica*의 안정성을 실험하기 위하여 이 균주들을 non-selective 배지인 YPDC에서 30세대 정도를 배양한 후 uracil이 결여된 YLT dropout 배지에서 콜로니 형성 여부를 알아본 결과 chromosome에 끼어 들어간 벡터들은 매우 안정되게 유지가 됨을 알 수 있었다. 이 형질 전환체들로부터 전체 chromosomal DNA를 분리하여 Southern hybridization을 시도하였다. pMIYL-2에 의해 형질전환된 *Y. lipolytica*의 Southern hybridization 결과는 Fig. 4에 나타나있다. Densitometer를 이용하여 signal을 보이는 밴드의 진하기를 비교하여 볼 때 삽입된 벡터의 수는 5개 이하로서 그 수가 예상보다 훨씬 적었다. 이렇게 낮은 숫자의 벡터가 chromosome 상으로 끼워 들어간 이유로는 비록 *URA3* 유전자의 promoter 지역을 제거하였으나 매우 낮은 수준의 전사를 통하여 만들어진  $U_{RA3}$  단백질이 매우 안정하여 수십개 이상의 *URA3* 유전자를 필요로 하지 않았기 때문인 것으로 추정된다. 따라서, 더 많은 copy 수로 삽입되는 벡터를 개발하기 위해서는 *URA3* 유전자 내에 돌연변이를 유발하여 부분적으로 활성이 저하된  $U_{RA3}$  단백질이 만들어 지도록 하거나, 단백질의 안정성을 감소시키는 조작을 통하여 안정성이 저하된  $U_{RA3}$  단백질을 만들어 것이 필요하다고 생각된다. 그러나, 이 pMIYL 벡터는 ARS 벡터와는 달리

매우 안정하게 유지가 되므로 이 pMIYL 벡터를 사용하여 heterologous 유전자를 발현시킬 경우 효율이 크게 증가할 것으로 기대된다.

4개의 형질전환체들은 모두 같은 벡터가 삽입된 것들임에도 불구하고 다른 양상을 보여주고 있음을 알 수 있는데, 이것은 아마도 벡터가 recombination에 의해 chromosome 상으로 끼어들어갈 때 여러 장소로 각각 들어가느냐 혹은 같은 장소에 여러개가 한꺼번에 들어가느냐에 따른 결과로 추측이 된다. 즉, Fig. 3에서 보듯이, chromosome과 벡터 사이에서 recombination이 일어나면, chromosome을 *Hind*III로 절단하였을 경우 벡터를 포함하는 *Hind*III DNA 절편은 그 크기가 늘어나게 된다. 따라서, Fig. 4로부터 벡터가 chromosome으로 삽입되는 것이 항상 일정한 규칙에 따라 되는 것이 아니라 무작위적으로 일어난다는 것을 추측할 수 있다.

## 요 약

Multicopy integration vector는 복제수가 많고 non-selective한 환경조건 하에서도 매우 안정되게 유지가 되기 때문에 heterologous 유전자를 발현시키는 데 매우 유용한 벡터 시스템이다. *Yarrowia lipolytica*의 multicopy integration vector를 개발하기 위하여 *Y. lipolytica*로부터 P-type rDNA를 클로닝하였다. 이 클로닝된 rDNA의 *Hind*III-*Bgl*II 절편과 promoter 지역을 포함하고 있지 않은 *URA3* 유전자를

pGEM1 plasmid에 삽입하여 제조한 벡터를 pMIYL-1과 pMIYL-2로 명명하였다. rDNA 절편은 벡터와 chromosomal DNA 사이에 homologous recombination을 유도하기 위한 것이며, promoterless *URA3*는 불완전한 표지 유전자로서 multicopy integration을 유발시키기 위한 것이다. pMIYL-1은 rDNA의 *HindIII-BglII* 절편내에 유일한 제한효소 자리로서 *KpnI*을 가지고 있고, pMIYL-2는 *KpnI*과 *EcoRI*을 가지고 있다. 이 벡터들을 *Y. lipolytica*에 도입한 후에 형질 전환체를 선별하여 copy 수와 안정성을 검사한 결과, 벡터의 copy 수는 5개 이하로 존재하고 non-selective 배지에서도 매우 안정하게 유지가 됨을 알 수 있었다.

### 감사의 말

본 연구에 사용된 균주와 *URA3* 유전자를 제공하여 준 David M. Ogrydziak 교수께 감사드립니다. 본 연구는 한국과학재단연구비(과제번호 951-0503-006-2) 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

- Gold, L. 1990. Expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Meth. Enzymol.* **185**: 11-14.
- Henner, D.J. 1990. Inducible expression of regulatory genes in *Bacillus subtilis*. *Meth. Enzymol.* **185**: 223-228.
- Harwood, C.R. 1992. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial work horses. *Trends Biotechnol.* **10**: 247-256.
- Bitter, G.A. 1987. Heterologous gene expression in yeast. *Meth. Enzymol.* **152**: 673-684.
- Brake, A.J. 1989. Secretion of heterologous proteins directed by the yeast  $\alpha$ -factor leader, Pp. 269-280. In P.J. Barr, A.J. Brake, and P. Valenzuela (ed.), *Yeast Genetic Engineering*, Butterworths.
- Kingsman, S.M., A.J. Kingsman, and J. Mellor. 1987. The production of mammalian proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Biotechnol.* **5**: 53-57.
- Marino, M.H. 1991. Expression of heterologous proteins in yeast. Pp. 29-65. In A. Prokop, R.K. Bajpai, and C. Ho (ed.), *Recombinant DNA Technology and Applications*, McGraw-Hill, New York.
- Romanos, M.A., C.A. Scorer, and J.J. Clare. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8**: 423-488.
- Cregg, J.M. and K.R. Madden. 1988. Development of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, as a host system for the production of foreign proteins. *Dev. Ind. Microbiol.* **29**: 33-41.
- Franke, A.E., F.S. Kaczmarek, M.E. Eisenhard, K.F. Geoghegan, D.E. Danley, J.R. DeZeeuw, M. M. O'Donnell, M.G. Gollaher, and L.S. Davidow. 1988. Expression and secretion of bovine prochymosin in *Yarrowia lipolytica*. *Dev. Ind. Microbiol.* **29**: 43-57.
- Van den Berg, J.A., K.J. van der Laken, A.J.J. van Ooyen, T.C.H.M. Renniens, K. Rietveld, A. Schaap, A.J. Brake, R.J. Bishop, K. Schultz, D. Moyer, M. Richman, and J.R. Shuster. 1990. *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: Expression and secretion of prochymosin. *Bio/Technol.* **8**: 135-139.
- Tobe, S., T. Takami, S. Ikeda, and K. Mitsugi. 1976. Production and some enzymatic properties of alkaline protease of *Candida lipolytica*. *Agric. Biol. Chem.* **40**: 1087-1092.
- Lopez, M.C., J.-M. Nicaud, H.B. Skinner, C. Vergnolle, J.C. Kader, V.A. Bankaitis, and C. Gaillardin. 1994. A phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer protein is required for differentiation of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica* from the yeast to the mycelial form. *J. Cell. Biol.* **124**: 113-127.
- DeZeeuw, J.R. and I. Stasko. 1973. Fermentation process for production of alpha-isopropylmalic acid. U.S.A. Patent No. 4407953.
- DeZeeuw, J.R. and E.J. Tynan. 1973. Fermentation process for the production of d-mannitol. U.S.A. Patent No. 3736229.
- DeZeeuw, J.R. and E.J. Tynan. 1973. Fermentation process for the production of erythritol. U.S.A. Patent No. 3756917.
- Shah, D.N., A.P. Purohit, and K.S. Sriprakash. 1982. Preliminary genetic studies on a citric acid producing strain of *Saccharomycopsis lipolytica*. *Enz. Microbial Technol.* **4**: 69-83.
- Barth, G. and H. Weber. 1984. Improved conditions for mating of the yeast *Saccharomycopsis lipolytica*. *Z. Allg. Mikrobiol.* **24**: 403-405.
- Bassel, J.B. and R.K. Mortimer. 1982. Genetic and biochemical studies of N-alkane non-utilizing mutants of *Saccharomycopsis lipolytica*. *Curr. Genet.* **5**: 77-88.
- Ogrydziak, D., J. Bassel, and R. Mortimer. 1982. Development of the genetic map of the yeast *Saccharomycopsis lipolytica*. *Mol. Gen. Genet.* **188**: 179-183.
- Cheng, S.-K., and D.M. Ogrydziak. 1987. Processing and secretion of the *Yarrowia lipolytica* RNase. *J. Bacteriol.* **169**: 1433-1440.

22. Nicaud, J.M., P. Fournier, C. LaBonnardiere, M. Chasles, and C. Gaillardin. 1991. Use of *ars18* based vectors to increase protein production in *Yarrowia lipolytica*. *J. Biotechnol.* **19**: 259-270.
23. Fournier, P., A. Abbas, B. Kudla, D.M. Ogrydziak, D. Yaver, J.-W. Xuan, A. peito, A.-M. Ribet, C. Feynerol, F. He, and C. Gaillardin. 1993. Colocalization of centromeric and replicative functions on autonomously replicating sequences isolated from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 4912-4916.
24. Fournier, P., L. Guyaneux, M. Chasles, and C. Gaillardin. 1991. Scarcity of *ars* sequences isolated in a morphogenesis mutant of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **7**: 25-36.
25. Matsuoka, M., M. Matsubara, H. Daidoh, T. Imanaka, K. Uchida, and S. Aiba. 1993. Analysis of regions essential for the function of chromosomal replicator sequences from *Yarrowia lipolytica*. *Mol. Gen. Genet.* **237**: 327-333.
26. Bergkamp, R.J.M., I.M. Kool, R.H. Geerse, and R.J. Planta. 1992. Multiple-copy integration of the  $\alpha$ -galactosidase gene from *Cyamopsis tetragonoloba* into the ribosomal DNA of *Kluyveromyces lactis*. *Curr. Genet.* **21**: 365-370.
27. Lopez, T.S., J. Klootwijk, A.E. Veenstra, P.C. van der Aar, H. van Heerikhuizen, H.A. Raue, and R.J. Planta. 1989. High-copy-number integration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: a new vector for high-level expression. *Gene* **79**: 199-206.
28. Lopez, T.S., F.A.J. Hakkaart, B.L. Koerts, H.A. Raue, and R.J. Planta. 1991. Mechanism of high-copy-number integration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **105**: 83-90.
29. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
30. Davidow, L.S., D. Apostolakos, M.M. O'Donnell, A.R. Proctor, D.M. Ogrydziak, R.A. Wing, I. Stasko, and J.R. Dezeuw. 1985. Integrative transformation of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Curr. Genet.* **10**: 39-48.
31. Wilson, J.H., W.-Y. Leung, G. Bosco, D. Dieu, and J.E. Haber. 1994. The frequency of gene targeting in yeast depends on the number of target copies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 177-181.
32. Van Herikhuizen, H., A. Ykema, J. Klootwijk, C. Gaillardin, C. Ballas, and P. Fournier. 1985. Heterogeneity in the ribosomal RNA genes of the yeast *Yarrowia lipolytica*; cloning and analysis of two size classes of repeats. *Gene* **39**: 213-222.

(Received 23 March 1995)