

## 외래 알파아밀라제의 *Saccharomyces cerevisiae*에서의 생산과 분비효율의 증진

최성호 · 김 근\*  
수원대학교 유전공학과

**Improvement of Production and Secretion of Heterologous  $\alpha$ -Amylase from *Saccharomyces cerevisiae*.**  
**Choi, Sung Ho and Keun Kim\***. Department of Genetic Engineering, The University of Suwon, Suwon 445-743, Korea – In order to increase the production and secretion rate of mouse salivary  $\alpha$ -amylase from *Saccharomyces cerevisiae*, various experiments were attempted. A plasmid pCNNinv (*AMY*) was constructed by the substitution of *ADC1* promoter and native signal sequence of mouse salivary  $\alpha$ -amylase cDNA gene with *PRB1* promoter and yeast invertase leader sequence, which resulted in 25% increase in the production of  $\alpha$ -amylase in the culture medium. The respiratory deficient transformant carrying pCNNinv (*AMY*) were obtained by treating yeast cells with ethidium bromide, and the  $\alpha$ -amylase activities in the culture brothes of the respiratory-deficient transformants were 5-8 times higher than that of parental wild type strain.  $\alpha$ -Amylase activity was also increased 3 times when the 0.015% (w/v) of 2-mercaptoethanol was added to the culture medium.

**Key words:** Heterologous  $\alpha$ -amylase production, *Saccharomyces cerevisiae*, respiratory deficient transformant, medium composition.

다른 생물에서 유래한 고부가가치의 단백질을 생산하기 위하여, 효모를 생산 매개체로 사용하는 데는 여러 장점들이 있는데, 그 생산물인 단백질이 세균의 endotoxin이나 다른 세균 물질에 오염되어 있지 않고, glycosylation 등 post-translational processing이 가능하며, 단백질을 세포외로 분비할 수 있다는 점 등이다[3, 6]. 또한 *Saccharomyces cerevisiae*는 인류역사와 더불어 오랜 세월동안 식품발효에 사용되어 소위 GRAS 생물로 분류되어 있다. 또 한가지 유전자 재조합법의 성과는 외부의 새로운 유전자를 생체세포에 도입시킴으로써 생체체의 물질대사 경로를 의도적으로 변화시켜 원하는 대사산물을 생산하게 하는 기술 즉, 대사공학 기술이 가능하게 되었다. 전분분해효소인  $\alpha$ -amylase의 유전자를 *Saccharomyces*에 도입하여 전분이용능이 없는 효모가 전분을 직접 발효할 수 있도록 하는 것이 그 예라 할 수 있다 [12, 16, 18].

유전자 재조합 단백질의 산업적 생산을 위한 공정의 개발에서 가장 중요한 요인의 하나는 host organism으로부터 그 단백질의 생산량을 증대시키는 일이다. 어떤 특정한 외래 단백질의 생산 효율에 미치는 요인으로서 promoter, plasmid copy number, plasmid stability, 염색체로의 삽입, secretion signal의 존재 여부와 종류, 그 단백질의 생화학 그리고 생물리적 성질 등을 들 수 있다[6, 7, 14]. 또한 supersecreting mutant[10, 15], 호흡결여돌연변이주[4], 그리고 protease-

deficient mutants[17] 등을 이용하여 외래단백질 생산을 증진시킬 수도 있다.

이러한 배경에서 본 연구에서는 mouse의 salivary  $\alpha$ -amylase gene을 모델로 하여 외래 단백질의 *S. cerevisiae*에서의 발현과 분비를 증진시키기 위한 기초연구의 목적으로 또 한편으로는 전분을 직접 발효시킬 수 있는 효모형질전환체의 제작과 전분분해효소 생산 증진을 위한 목적으로 연구를 수행하였다.

### 재료 및 방법

#### Yeast strain and plasmids

Yeast strain은 *S. cerevisiae* K81(a *trp1*, *leu2*, *ura3*, *gal2*)를 사용하였으며, 사용된 plasmids는 Table 1에 나타내었다.

#### 배지 및 배양

YPD배지(1% yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% glucose)는 효모배양에 있어서 완전배지로 사용되었다. 형질전환된 효모의 분리를 위해서 SD배지(0.67% Yeast Nitrogen Base without amino acids, 2% glucose, supplemented amino acids)가 사용되었다. 형질전환된 효모의 전분 분해 능력으로서 분해환 형성 능력을 시험하기 위한 배지로는 YPDIS3 agar 배지(1% yeast extract, 2% Bacto-peptone, 1% glucose, 3% Sigma Lintner potato soluble starch, 2% agar)가 사용되었고,  $\alpha$ -amylase 생산을 위한 배지로는 YPS3 액체배지(1% yeast extract, 2% Bacto-peptone, 3% Sigma Lintner potato soluble starch)가 사용되었다. 호흡결여주를

\*Corresponding author  
Tel. 82-31-220-2344, Fax. 82-31-220-2344  
E-mail: kkim@suwon.ac.kr

**Table 1. The list of plasmids.**

| Plasmid                         | Relevant properties   | Source               |
|---------------------------------|---|----------------------|
| pMS12                           | <i>ADC1</i> promoter, mouse salivary $\alpha$ -amylase cDNA, <i>TRP1</i> , $2\mu$ <i>ori</i> of yeast, bacterial replicative <i>ori</i> of pBR322, Amp <sup>r</sup> , 10.0 kb | K.K. Thomsen [18]    |
| pCNNinv                         | <i>PRB1</i> promoter [14], <i>LEU2</i> , invertase signal sequence of <i>S. cerevisiae</i> , <i>lacZ</i> , <i>PGK</i> terminator, Amp <sup>r</sup> , 7.9 kb                   | K.K. Thomsen Denmark |
| pCNN( <i>AMY</i> <sup>a</sup> ) | pCNNinv with the mouse salivary $\alpha$ -amylase cDNA of pMS12, 9.5 kb   | This work            |

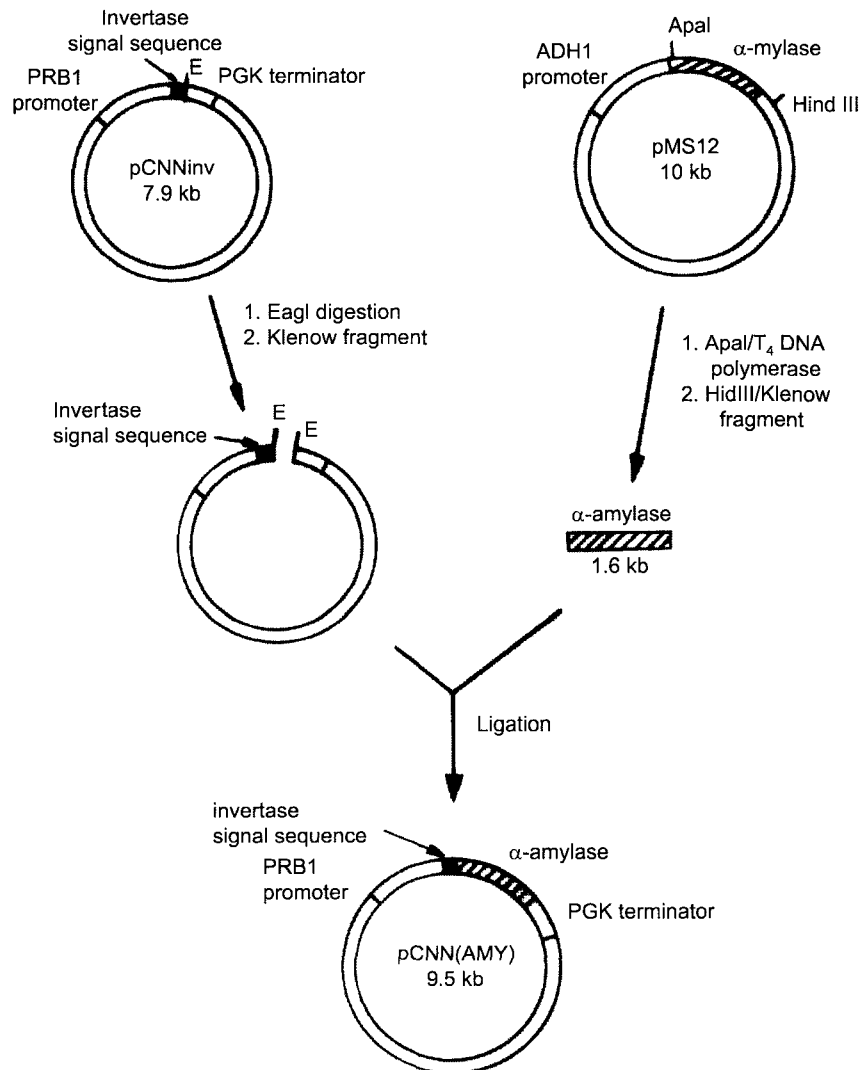
<sup>a</sup>*AMY* indicates the mouse salivary  $\alpha$ -amylase cDNA.

분리, 확인하기 위해 YPDG(1% yeast extract, 2% Bacto-peptone, 1% glucose, 3% glycerol)에 0.05%(w/v) triphenyl tetrazolium chloride(TTC)가 들어간 배지와 SG(0.67% Yeast

Nitrogen Base without amino acids, 3% glycerol)배지가 사용되었다. 효모의 액체배양은 호기적 조건에서 30°C에서 회전식 진탕배양기에서 200 rpm의 속도로 배양하였다.

**pCNN(*AMY*) 제작**

유전자 재조합을 위한 DNA를 다루는 모든 과정들은 Sambrook 등[11] 방법에 따라서 수행되었다. Mouse salivary  $\alpha$ -amylase cDNA에 있는 mouse native signal sequence를 제거하고 *S. cerevisiae* invertase signal sequence로 교체하기 위하여 pMS12 plasmid로 부터 mouse native signal sequence를 제외시킨 mouse salivary  $\alpha$ -amylase cDNA를 분리하여 vector pCNNinv(K. K. Thomsen, Carlsberg Laboratory, Denmark)에 삽입시켜서 새로운 vector pCNN(*AMY*)을 제작하였다(Fig. 1). 먼저 pCNNinv를 *EagI* endonuclease로 자른후에 dNTP를 넣어준 조건하에서 Klenow fragment에 의한 DNA polymerization 반응을 시켜 5'-protruding end를



**Fig. 1. Construction of pCNN(*AMY*).** E indicates the restriction site of *EagI*.

blunt end로 만들었다. Self ligation을 방지하기 위하여 calf intestinal alkaline phosphatase를 처리하였다. pMS12 내에 존재하는  $\alpha$ -amylase cDNA gene을 분리하기 위하여 pMS12 plasmid를 먼저 ApaI로 자른후에 linearized plasmid로 만들고 그 3'-protruding end를 T4 DNA polymerase로 제거하여 blunt end로 만들었다. 이 반응은  $\alpha$ -amylase gene의 reading frame을 맞추기 위해서 수행되었다. 이 linearized pMS12 plasmid를 HindIII로 반응 시켜서  $\alpha$ -amylase cDNA gene만을 분리해서 Klenow fragment를 이용하여 5'-protruding end를 전과 같은 방법으로 blunt end로 만들었다. 위에서 만든 linearized pCNNinv vector와  $\alpha$ -amylase cDNA gene 절편을 T4 DNA ligase를 이용하여 ligation 시켜서 새로운 vector pCNN(AMY)를 완성하였다.

### 효모 형질전환

효모 형질전환은 Ito 등[2]에 의한 lithium acetate method를 기초로 하였다. 효모 형질전환체의 선별은 SD2 agar plate에서 성장한 colony를 YPD1S3 agar plate에 tooth-pick로 접종하여 2~3일간 배양한 후 전분분해 결과로 생기는 colony주위에 투명한 환를 형성하는 것을  $\alpha$ -amylase가 분비되는 형질전환체로 판단하였다.

### $\alpha$ -Amylase 활성 측정

$\alpha$ -Amylase 활성 분석은 Kim 등[5]의 방법에 의하여 측정하였고, 효소활성 1 unit는 crude enzyme solution ml당 환원당 1 mole을 생성하는 양으로 정의하였다.

### $\alpha$ -Amylase 분비효율의 결정

세포밖으로 분비되는  $\alpha$ -amylase의 분비율을 결정하기 위하여 세포밖과 세포내 그리고 periplasmic space에 존재하는  $\alpha$ -amylase 활성을 각각 측정하였다[1].

### 호흡결여주의 획득

Ethidium bromide으로 처리한 효모세포들을 YPD와 SG 배지에 각각 접종하여 2일 배양후 YPD에서는 자라지만 SG 배지에서는 자라지 않는 colony를 분리하는 방식으로 호흡결여주를 획득하였다[13].

## 결과 및 고찰

### pCNN(AMY)에 의한 $\alpha$ -amylase 생산증진

PRB1(vacuolar protease B gene) promoter와 yeast의 invertase secretion signal sequence를 갖는 새롭게 제작한 pCNN(AMY) plasmid를 K81균주에 도입한 후에 YPD1S3 고체배지 상에서 clear zone의 halo 크기가 큰 여러 colony들을 획득하였고, 다시  $\alpha$ -amylase 활성 분석을 통하여 효소

활성이 우수함을 확인한 후 이것을 K81/pCNN(AMY)라고 명명하였다. 먼저 형질전환체의  $\alpha$ -amylase activity를 보면 K81/pCNN(AMY)의 경우 3일째 배양에서  $\alpha$ -amylase activity가 K81/pMS12보다 약 25% 이상 증가하게 되었음을 보여 주고 있다(Fig. 2). 여기에서  $\alpha$ -amylase 생산은 pMS12 보다 pCNN(AMY)의 경우가 배양전체 기간동안 월등히 높게 나타난 반면, 효모세포의 성장은 거의 비슷한 수준을 보이고 있다. 이러한 K81/pCNN(AMY)의  $\alpha$ -amylase 활성증가는 secretion signal sequence에 의한 분비효율의 차이 그리고, promoter strength 차이에 의한 것으로 사료된다. 즉 pMS12는 ADC1(alcohol dehydrogenase gene 1) promoter 그리고 mouse salivary  $\alpha$ -amylase native secretion signal을 가지고 있고, pCNN(AMY)는 PRB1 promoter 그리고 *S. cerevisiae*의 invertase signal sequence를 가지고 있다. 이렇게 효모의 promoter를 바꿈으로서 효모에서의 외래 단백질 생산을 증가시키는 연구는 최근에도 계속 되어오고 있으며[7], 외래 단백질의 native secretion signal sequence를 사용할 때보다 yeast 고유의 secretion signal sequence를 사용할 때 secretion efficiency가 높게 나타나는 결과들이 보고되어 왔다[1, 16].

Table 2는 K81/pCNN(AMY)와 K81/pMS12의 세포외로 분비된  $\alpha$ -amylase 활성, periplasm내 활성, 그리고 세포내 활성을 각각 분획별로 측정된 결과이다. 여기에서 K81/pMS12의 경우는 전체  $\alpha$ -amylase 중에서 89.4%가 growth medium으로 분비되었는데 이와 같은 결과는 Thomsen[18]이 보고한 결과와 일치하고 있다. 한편, K81/pCNN(AMY)의 경우는 96.3%가 분비되어 invertase signal sequence의 사용 경우보다 약 7% 정도의 secretion efficiency가 증진되었음을 알 수 있었다.

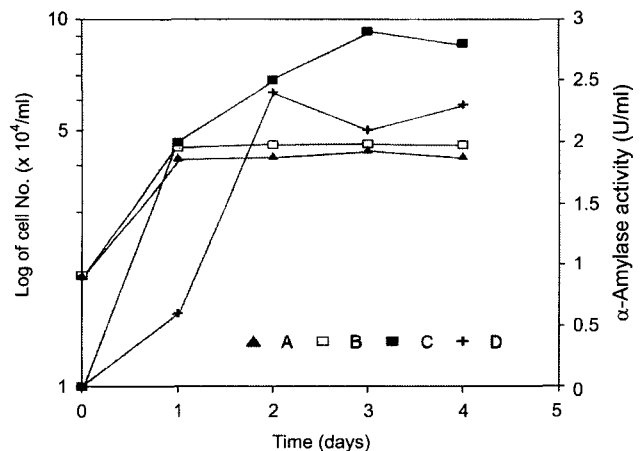


Fig. 2. The time course of  $\alpha$ -amylase activities of the K81/pMS12 and K81/pCNN(AMY). Cells were grown at 30°C in YPS3 in a rotary shaking incubator operated at 200 rpm. A(▲), cell number of K81/pMS12; B(□), cell number of K81/pCNN(AMY); C(■),  $\alpha$ -amylase activity of K81/pCNN(AMY); D(+),  $\alpha$ -amylase activity of K81/pMS12.

**Table 2. Localization of  $\alpha$ -amylase.**

| Subcellular fraction | Relative $\alpha$ -amylase activity <sup>a</sup> (%) |                        |
|----------------------|--|------------------------|
|                      | K81/pMS12  | K81/pCNN( <i>AMY</i> ) |
| Extracellular        | 89.4 <sup>b</sup>                                    | 96.3                   |
| Intracellular        | 5.3  | 0.0                    |
| Periplasmic          | 5.3  | 3.7                    |

<sup>a</sup>The  $\alpha$ -amylase activities were measured after 2 days of cultivation at 30°C in a rotary shaking incubator operated at 200 rpm.

<sup>b</sup>This data are the relative  $\alpha$ -amylase activity against total  $\alpha$ -amylase activity.

**Table 3.  $\alpha$ -Amylase production by respiratory deficient mutants<sup>a</sup>.**

| Strain and clone No.                   | Aerobic culture <sup>b</sup> |                                       | Anaerobic culture <sup>c</sup> |                                       |
|--|------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
|  | Activity (unit)              | Activity/10 <sup>8</sup> cells (unit) | Activity (unit)                | Activity/10 <sup>8</sup> cells (unit) |
| [K81/pCNN( <i>AMY</i> )]               | 1.81                         | 0.39                                  | 1.64                           | 0.42                                  |
| [K81/pCNN( <i>AMY</i> )]p <sup>-</sup> |                              |                                       |                                |                                       |
| clone No. 3                            | 1.89                         | 2.28                                  | 2.06                           | 1.87                                  |
| 7                                      | 1.95                         | 1.82                                  | 2.31                           | 2.97                                  |
| 24                                     | 2.12                         | 3.02                                  | 1.67                           | 2.88                                  |
| 49                                     | 1.95                         | 2.70                                  | 1.87                           | 3.11                                  |

<sup>a</sup>The  $\alpha$ -amylase activities were measured after 3 days of cultivation at 30°C.

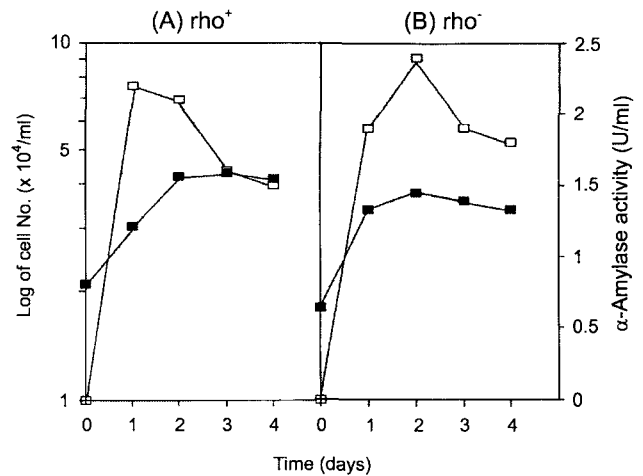
<sup>b</sup>The cells were grown in a rotary shaking incubator operated at 200 rpm.

<sup>c</sup>The cells were grown without shaking.

**호흡결여주에 의한 분비물 증진**

여러 호흡결여변이주(p<sup>-</sup> cells) 100여 주 중에서 halo size 를 측정하여  $\alpha$ -amylase 활성이 높다고 사료되는 4균주를 선별하였다. 이들의  $\alpha$ -amylase 활성을 측정해 본 결과(Table 3), 그의  $\alpha$ -amylase 활성이 parent인 K81/pCNN(*AMY*)보다 증진된 것을 보여주고 있으며, 호기적 배양과 혐기적 배양 모두에서 호흡결여변이주의  $\alpha$ -amylase 활성이 높았고 1×10<sup>8</sup> cell당  $\alpha$ -amylase 활성을 비교해 보면 약 5~8배 정도 증가하였다.

Fig. 3은 배양시간에 따른 K81/pCNN(*AMY*)(wild type, p<sup>+</sup>)와 K81/pCNN(*AMY*)p<sup>-</sup> No. 49 두 균주의  $\alpha$ -amylase 활성을 혐기적 배양조건에서 비교한 결과이다. 호흡결여변이주가 야생주에 비하여  $\alpha$ -amylase 활성이 높게 나타났고, 호흡결여변이주의 경우 배양 2일째에 최고의  $\alpha$ -amylase 활성을 나타냈다. Kaisho 등[4]은 호흡결여변이주를 이용하여 human lysozyme 생산을 약 10배 정도 증진되었음을 보고하였고, Parikh 등[8]은 호흡결여변이주의 외래단백질 생산량의 증가 이유로서, transcription level을 낮추고, m-RNA의 stability에 영향을 주는 것으로 알려진 어떤 negative element의 발현이 호흡결여주에서는 억제되어서 transcription level에서 유전자 발현이 증가되어 protein의 생산이 증가되



**Fig. 3. The time course of the  $\alpha$ -amylase activities of the rho<sup>+</sup> cells(A) and rho<sup>-</sup> cells(B) of K81/pCNN(*AMY*). Cells were grown at 30°C in YPS3 without shaking. ■, cell number per ml; □,  $\alpha$ -amylase activity (U/ml).**

**Table 4. Effect of different ratios of yeast extract and peptone in culture medium on the  $\alpha$ -amylase production by K81/pCNN(*AMY*)<sup>a</sup>.**

| Growth medium (%) <sup>b</sup> |         | Relative $\alpha$ -amylase activity (%) |
|--------------------------------|---------|---|
| Yeast extract                  | Peptone |   |
| 2.5                            | 5.0     | 14.3                                    |
| 1.5                            | 3.0     | 71.4                                    |
| 1.0                            | 2.0     | 100.0                                   |
| 0.5                            | 1.0     | 62.5                                    |

<sup>a</sup>Cells were grown at 30°C in a rotary shaking incubator operated at 200 rpm for 3 days.

<sup>b</sup>The growth medium contained 3% starch and different percentage of yeast extract (Y) and peptone (P).

**Table 5. Effect of different concentrations of NaCl on the  $\alpha$ -amylase production by K81/pCNN(*AMY*)<sup>a</sup>**

| Concentration of NaCl (mM) | Relative $\alpha$ -amylase activity (%) |
|----------------------------|---|
| 0                          | 88.6                                    |
| 100                        | 100.0                                   |
| 200                        | 93.2                                    |
| 300                        | 65.9                                    |
| 400                        | 61.4                                    |

<sup>a</sup>The  $\alpha$ -amylase activities were measured after 3 days of cultivation of the cells at 30°C in YPS3 with different concentrations of NaCl in a rotary shaking incubator operated at 200 rpm.

거나, 또는 m-RNA의 stability가 높아져서 단백질의 생산이 증진된다고 분석하였다.

**배지 조성에 따른  $\alpha$ -amylase 생산 증진**

성장배지의 조성, NaCl, 그리고 환원제로서 2-mercaptoethanol 을 배지에 첨가하여 배양한 후  $\alpha$ -amylase activity를 분석한

**Table 6. Effect of different concentrations of 2-mercaptoethanol on the  $\alpha$ -amylase production by K81/pCNN(AMY)<sup>a</sup>.**

| 2-Mercaptoethanol concentration (mM) | Relative $\alpha$ -amylase activity (%) |
|--------------------------------------|---|
| 0.000                                | 32.7                                    |
| 0.001                                | 59.1                                    |
| 0.005                                | 77.6                                    |
| 0.015                                | 100.0                                   |

<sup>a</sup>The  $\alpha$ -amylase activities were measured after 3 days of cultivation of the cells at 30°C in YPS3 with different concentrations of 2-mercaptoethanol in a rotary shaking incubator operated at 200 rpm.

결과를 Table 4, 5, 6에 나타내었다. Table 4에서 보면 성장 배지의 성분인 yeast extract와 peptone의 비율이 각각 1%, 2%일 때 배지내의  $\alpha$ -amylase activity가 가장 높은 것으로 나타났다. 그리고, Table 5과 Table 6은 각각 NaCl과 2-mercaptoethanol을 배지내에 첨가하여  $\alpha$ -amylase activity의 변화를 살펴본 결과인데 NaCl의 경우는 100 mM의 첨가시 약간의  $\alpha$ -amylase activity생산 증가를 보였고, 2-mercaptoethanol은 0.015%(v/v) 첨가했을 때  $\alpha$ -amylase activity가 대조구에 비해서 약 3배 정도 증가한 것을 보여주고 있다. Rossini 등 [9]도 배지 내에 2-mercaptoethanol을 20 mM 처리하여  $\beta$ -galactosidase의 분비효율을 4% 증진시켰다고 보고하였다. 한편 본 실험의 경우 2-mercaptoethanol은 매우 높은 효소 활성의 증가를 초래하였기 때문에, 2-mercaptoethanol이  $\alpha$ -amylase 자체의 활성에 미치는 영향을 조사해본 결과, 본 실험에서 사용한 2-mercaptoethanol의 농도(0%-0.015%)는  $\alpha$ -amylase 활성에 어떠한 영향도 미치지 못하였다(data not shown). 따라서 2-mercaptoethanol이 효소활성 자체를 증가시켰을 가능성은 배제되었다. 이러한 2-mercaptoethanol에 의한  $\alpha$ -amylase 생산의 증가는 2-mercaptoethanol에 의한 세포벽 변형 때문에 분비효율이 증가하였음[9]에 일부 기인하는 것으로 보여지나, 그 이외의 다른 이유 대해서는 더 연구할 필요성이 있다.

## 요 약

*Saccharomyces cerevisiae*로부터 외래  $\alpha$ -amylase의 발현 및 분비를 증진시키기 위하여 여러 실험이 수행되었다. ADC1 promoter와 mouse salivary  $\alpha$ -amylase cDNA gene의 native signal sequence를 효모의 PRBI promoter와 invertase leader sequence로 대체한 plasmid vector pCNN(AMY)를 제작하였다. 효모세포에서 생성된  $\alpha$ -amylase의 세포외로의 분비율은 mouse  $\alpha$ -amylase의 native signal sequence인 경우는 약 89.4%이었으며 invertase leader sequence로 치환된 경우는 96.3%로 분비효율이 증진되었다. 야생주인 K81/pCNN(AMY)와 호흡결여변이주인 K81/pCNN(AMY) $\rho$ 의 혐기적 조건하에서의 배양 결과  $\alpha$ -amylase 생산량이 K81/

pCNN(AMY)보다 K81/pCNN(AMY) $\rho$ 가 약 5~8배 정도 증가하였다.  $\alpha$ -Amylase의 생산에 있어서 배지조성에 따른 K81/pCNN(AMY)의 생산증진의 비교는 배지성분인 yeast extract와 peptone의 구성비율을 비교하였을 때 yeast extract 1%와 peptone 2%, NaCl의 경우 100 mM, 2-mercaptoethanol인 경우에는 0.015%(w/v)을 첨가하였을 때 최대 효소 활성을 나타내었고, 특히 2-mercaptoethanol인 경우에는 대조구에 비해 효소 생산량이 약 3배 정도 증진되었다.

## 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 기초연구지원에 의한 결과로 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Curry, C., N. Gilkes, G. O'Neill, R. C. Miller, Jr., and N. Skipper. 1988. Expression and secretion of a *Cellulomonas fimi* exoglucanase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 476-484.
- Ito, M., K. Murata, and A. Kimura. 1984. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations or thiol compounds. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 341-347.
- Kaiser, C. A., D. Preuss, P. Grisafi, and D. Botstein. 1987. Many random sequences functionally replace the secretion signal sequence of yeast invertase. *Science* **235**: 312-317.
- Kaisho, Y., K. Yoshimura, and K. Nakahama. 1989. Increase in gene expression by respiratory-deficient mutation. *Yeast* **5**: 91-98.
- Kim, K., C. S. Park, and J. R. Mattoon. 1988. High-efficiency, one-step starch utilization by transformed *Saccharomyces* cells which secreted both yeast glucoamylase and mouse  $\alpha$ -amylase. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 966-971.
- King, D. J., E. F. Walton, and G. T. Yarranton. 1989. The production of proteins and peptides from *Saccharomyces cerevisiae*. Ch. 4. In E. F. Walton and G. T. Yarranton (eds.), *Molecular and Cell biology of yeasts*. Blackie, Van Nostrand Reinhold, USA and Canada.
- Lim, Y. Y., E. H. Park, J. H. Kim, S. M. Park, H. S. Jang, Y. J. Park, S. Yoon, M. S. Yang, and D. H. Kim. 2001. Enhanced and targeted expression of fungal phytase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 915-921.
- Parikh, V. S., M. M. Morgan, R. Scott, L. S. Clements, and R. A. Butow. 1987. The mitochondrial genotype can influence nuclear gene expression in yeast. *Science* **235**: 576-580.
- Rossini, D., D. Porro, L. Brambilla, M. Venturini, B. M. Ranzi, M. Vanoni, and L. Alberghina. 1993. In *Saccharomyces cerevisiae*, protein secretion into the growth medium depends on environmental factors. *Yeast* **9**: 77-84.
- Sakai, A., Y. Shimizu, and F. Hishinuma. 1988. Isolation and characterization of mutants which show on oversecretion phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **119**: 499-

- 506.
11. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
  12. Sato, T., H. Vemura, Y. Izumoto, J. Nakao, Y. Nakamura, and K. Matsubara. 1989. The conformation of mature human  $\alpha$ -amylase conditions its secretion from yeast. *Gene*. **83**: 355-365.
  13. Sherman, F., G. Fink, and J. B. Hicks. 1986. *Methods in yeast genetics, laboratory course manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
  14. Sleep, D., G. P. Belfield, D. J. Ballance, J. Steven, S. Jones, L. R., Evans, P. D. Moir, and A. R. Goodey, 1991. *Saccharomyces cerevisiae* strains that overexpress heterologous proteins. *Bio/Technology*. **9**: 183-187.
  15. Smith, R. A., M. J. Duncan, and D. T. Moir. 1985. Heterologous protein secretion in yeast. *Science*. **235**: 1219-1224.
  16. Southgate, V. J., A. J. C. Steyn, I. S. Pretorius, and J. J. Hendrik van Vuuren. 1993. Expression and secretion of *Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylase by using the yeast pheromone  $\alpha$ -factor promoter and leader sequence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1253-1258.
  17. Suzuki, K. K. Ichikawa, and Y. Jigami. 1989. Yeast mutants with enhanced ability to secrete human lysozyme: Isolation and identification of a protease-deficient mutant. *Mol. Gen. Genet.* **219**:58-64.
  18. Thomsen, K. K. 1983. Mouse  $\alpha$ -amylase synthesized by *Saccharomyces cerevisiae* is released into the culture medium. *Carlsberg Res. Commun.* **48**: 545-555.

(Received Oct. 30, 2002/Accepted Jan. 15, 2003)