

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05424

研究課題名（和文）高次倍数体育種の基盤を為すDNA修復制御法の探求

研究課題名（英文）Search for DNA repair control methods that form the basis of polyploid breeding

研究代表者

福田 展雄（Fukuda, Nobuo）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：00613548

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：自然界の微生物のなかには高次倍数体（三倍体以上の倍数体）が少なからず存在しており、高次倍数体では二倍体に比べるとゲノム安定性が低いとされている。本研究では、相同組換えによるDNA修復に注目し、RecombinaseをコードするRAD51遺伝子と、最重要のMediatorをコードするRAD52遺伝子の過剰発現がDNA修復エラー発生率に及ぼす影響を評価した。野生型遺伝子を有する酵母では、グルコース含有培地と比べてガラクトース含有培地で培養した場合にDNA修復エラーの発生率が上昇することが確認されたが、RAD51またはRAD52遺伝子の過剰発現により、これを抑制できることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高次倍数体の細胞は肥大化することが知られており、魚類や植物等の品種改良において人為的にも生み出されてきた。ゲノム不安定性は新たな生物を生み出すために不可欠であるが、有用生物を創製した場合にはそれらの形質が安定に維持されることもまた必要となる。しかしながら微生物での高次倍数体育種の事例は比較的少なく、その要因の1つとしてゲノム安定性低下の懸念があった。本研究で得られたDNA修復エラーの発生率の低減という成果は、ゲノム安定性を向上するための手がかりとなる。また栄養源等の条件でDNA修復エラー発生率が大きく変動するという結果はゲノム不安定性の理解を深めるうえで重要な知見となる。

研究成果の概要（英文）：Polyploids are present in the microorganisms in nature, which are seen to have lower genomic stability than diploids. In this study, we focused on DNA repair by homologous recombination and evaluated the effect of overexpression of the RAD51 gene encoding recombinase and the RAD52 gene encoding the most important mediator on the incidence of DNA repair errors. It was confirmed that yeast having a wild-type gene had an increased incidence of DNA repair errors when cultured in a galactose-containing medium compared to a glucose-containing medium, but the incidence of DNA repair errors was suppressed by overexpression of the RAD51 or RAD52 gene.

研究分野：微生物工学

キーワード：酵母 倍数体 遺伝子発現 DNA修復

1. 研究開始当初の背景

細胞内では DNA 分子の損傷が 1 日あたり最大 50 万回程度発生することが知られているが、個体の生存を維持するため、細胞はこれらの損傷を修復する機能 (DNA 修復) を備えている。特に重篤な DNA 損傷の様式は DNA 二重鎖の切断であり、これを修復する主要な DNA 修復機構が相同組換えである (*Nat Rev Cancer*, 2016, 16, 110-120.)。

有性生殖を行う生物では、多くの場合、基数の 2 倍の染色体数をもつ二倍体として存在し、両親に由来する相同染色体を有する。相同組換えによる DNA 修復では主として姉妹染色分体を修復の鋳型として用いるが、相同染色体を鋳型として使用することも報告されており (*Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93, 7131-7136.)、一方の相同染色体に格納されていた情報の一部が失われることも生じる (ヘテロ接合性の消失)。また二重鎖切断が修復されない場合は、損傷した染色体を複製の過程で喪失すること (染色体喪失) も知られており (*PLoS One*, 2013, 8, e68094.)、残された相同染色体のみを用いて生存することとなる。これらの修復エラーは完全に排除することはできないが、正常な DNA 修復機能を有する二倍体の細胞内では、極めて低い頻度でしか発生しない。

一方、自然界の植物や微生物のなかには高次倍数体 (三倍体以上の倍数体) も少なからず存在しており、高次倍数体では二倍体に比べるとゲノム安定性が低く、それゆえ容易に新たな形質を獲得することから高い環境適応性を有している (*Nature*, 2015, 519, 349-352.)。また高次倍数体の細胞は肥大化することが知られており、魚類や植物等の品種改良において人為的にも生み出されてきた。人類にとって、他の生物種のゲノム不安定性は新たな生物を生み出すために不可欠であるが、有用生物を創製した場合にはそれらの形質が安定に維持されることもまた必要となる。高次倍数体の育種においては、上述の魚類や植物で多くの成功例が積み重ねられているなか、微生物での応用事例は比較的少なく、その要因の 1 つとしてゲノム安定性低下の懸念があった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、出芽酵母を宿主として選定し、高次倍数体におけるゲノム安定性向上の実現可能性を検証することである。相同組換えには複数の分子経路が存在し、全容解明には未だ至っていないが、Recombinase (Rad51) をコードする *RAD51* 遺伝子を欠損するとヘテロ接合性の消失の発生頻度が増大することや、最重要の Mediator (Rad52) をコードする *RAD52* 遺伝子を欠損すると DNA 二重鎖の切断を受けた細胞のほぼ全てで染色体喪失が発生することが知られている (*Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93, 7131-7136.)。また試験管内でのタンパク質・DNA 複合体の観察では、他の関連タンパク質や修復対象 dsDNA および鋳型 ssDNA に対し、Rad51 および Rad52 の分子数が不足すると適切な複合体が形成されないことが示されている (*J Mol Biol*, 2009, 390, 45-55.)。そこでこれら主要遺伝子の発現量を人為的に変化させることで、DNA 修復エラー発生率への影響を調査する。

3. 研究の方法

1) 酵母菌株の作製

野生型の *RAD51* および *RAD52* 遺伝子を有する a 型と α 型の一倍体細胞を順次かけ合わせていくことで、二倍体 (BY4743L)、三倍体 (BY4743-3L)、四倍体 (BY4743-4L) の菌株を作製した (図 1)。

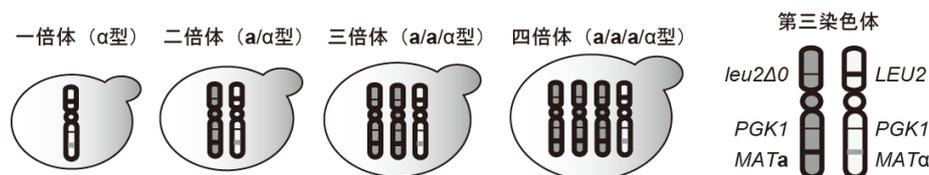


図 1 酵母倍数体における第三染色体の構成

また *RAD51* および *RAD52* 遺伝子上流にガラクトースの添加により遺伝子の高発現を可能とする *GAL1* プロモーターを挿入した一倍体細胞を作製し、野生型の一倍体細胞を含めた組み合わせでかけ合わせを行うことで、ガラクトースの存在下で *RAD51* 遺伝子を過剰発現する二倍体 (GR51/L)、*RAD52* 遺伝子を過剰発現する二倍体 (GR52/L)、上記の両遺伝子を過剰発現する二倍体 (GR51/52-L) の菌株を作製した。

2) 遺伝子数の測定

各倍数体の酵母は一倍体と同様にゲノム内に1コピーの *LEU2* 遺伝子を第三染色体内に有しており、他の第三染色体は *LEU2* 遺伝子を欠損している *leu2Δ0* 型となっている (図2)。野生型の *RAD51* および *RAD52* 遺伝子を有する一倍体、二倍体、三倍体、四倍体酵母から DNA を抽出し、*LEU2* 遺伝子を参照遺伝子としたリアルタイム PCR を実施することにより *PGK1* 遺伝子の相対定量を実施した。各酵母の倍数性に相当する第三染色体の数は *LEU2* に対する *PGK1* の遺伝子数比により評価した。

3) DNA 修復エラーの測定

第三染色体のセントロメアの左右には、ロイシン (Leu) 生合成経路の酵素をコードする *LEU2* 遺伝子座と、酵母の性決定を司る *MAT* 遺伝子座が存在する。各倍数体の第三染色体のうち1つのみが、*LEU2* 遺伝子と α 型の *MAT* 遺伝子 (*MAT α*) を有し、他の第三染色体は全て *leu2Δ0* アリル (欠損型) と a 型の *MAT* 遺伝子 (*MAT a*) を有する。なお1つの細胞内に *MAT a* と *MAT α* 遺伝子を有する酵母は a/α 型の性的形質を、*MAT a* または *MAT α* 遺伝子のみを有する酵母はそれぞれ a 型、 α 型の性的形質を有する。したがって図1の酵母株は全て a/α 型となるが、これらの酵母株にプラスミド pLhyS-2K-Pa1 (*AMB Expr.* 2016, 6, 45.) を導入して抗生物質 G418 を含む固体培地上で選抜すると、*MAT a* 遺伝子を失い a 型となった酵母のみが生育する。図2のように N_{total} 個の酵母細胞を上記培地に播種して N_{colony} 個のコロニーが形成したとき、倍数体におけるヘテロ接合性の消失の発生率 (R_{LOH}) または染色体喪失の発生率 (R_{loss}) は、遺伝子変異の発生率 ($R_{mutation}$) よりも圧倒的に高いため、 $R_{mutation}$ を近似的にゼロとして取り扱う。すなわち DNA 修復エラーの発生率を R_{error} として、 $R_{error} = N_{colony} / N_{total} \approx R_{LOH} + R_{loss}$ として評価した。

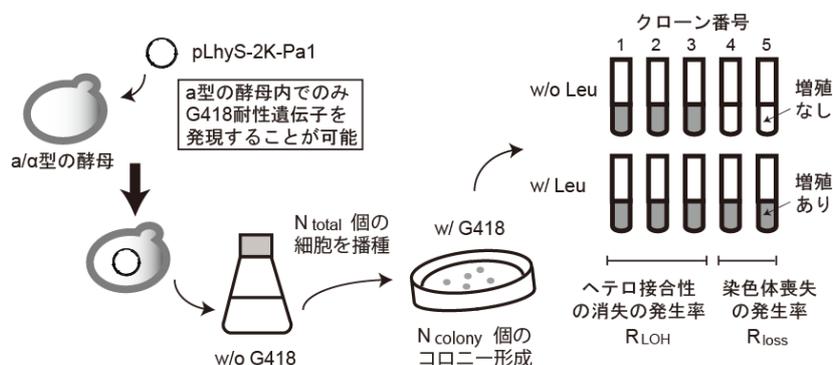


図2 DNA 修復に関するエラー発生率の測定方法

4) 遺伝子発現量の定量

二倍体の各酵母をグルコース培地 (SD 培地) またはガラクトース培地 (SGR 培地) を用いて培養した。回収した酵母細胞から RNA を抽出・精製したのち、逆転写酵素を用いて cDNA を作製した。代表的なハウスキーピング遺伝子である *ACT1* を参照遺伝子として、リアルタイム PCR により *RAD51* および *RAD52* 遺伝子発現量の相対定量を行った。

4. 研究成果

一般的に高次倍数体では二倍体に比べるとゲノム安定性が低いとされている。そこで作製した三倍体および四倍体の酵母の倍数性を確認するため、リアルタイム PCR を用いて各酵母の第三染色体の数を測定した。一倍体酵母の測定値を基準として相対定量することにより、各倍数体が想定した倍数性を有することが示された (図3)。

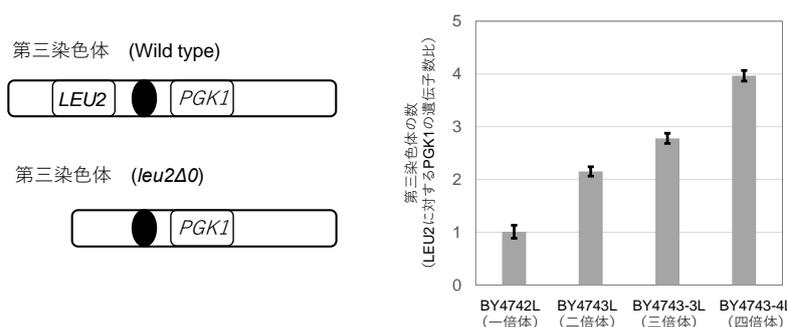


図3 倍数性の確認

つづいて倍数性の異なる酵母菌株の DNA 修復エラー発生率を比較した (図4)。四倍体酵母の DNA 修復エラー発生率は二倍体酵母と同程度であった。一方、三倍体酵母では二倍体酵母よりも低い DNA 修復エラー発生率が確認され、ヘテロ接合性の消失の発生率 (R_{LOH}) と染色体喪失の発生率 (R_{loss}) の比率を比べると、とくに染色体喪失の発生頻度が減少していることが示された。上記の結果より、高次倍数体のゲノム安定性が必ずしも二倍体と比べて低いと断定することはできないといえる。

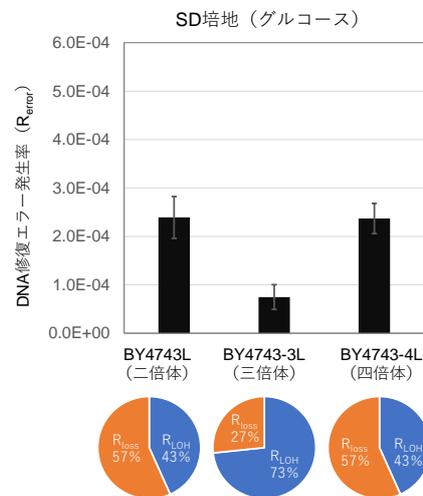


図4 倍数体のゲノム安定性比較

また二倍体酵母ではヘテロ接合性の消失と染色体喪失が同程度の頻度で発生することが示された。そこで相同組換えに大きく関与することが知られる *RAD51* および *RAD52* 遺伝子の過剰発現が DNA 修復エラー発生率へ及ぼす影響を調査した。まず各遺伝子が過剰発現していることを確認するため、各酵母を SD 培地 (グルコース含有) と SGR 培地 (ガラクトース含有) でそれぞれ培養したのち、*ACT1* 遺伝子をリファレンスとした各遺伝子の発現量を定量した (図5)。SD 培地で培養した二倍体酵母 BY4743L から得られた値を基準値として相対値を比較したところ、ガラクトースを添加した場合に、*GAL1* プロモーターが機能することで、各遺伝子の過剰発現が生じていることが確認された。

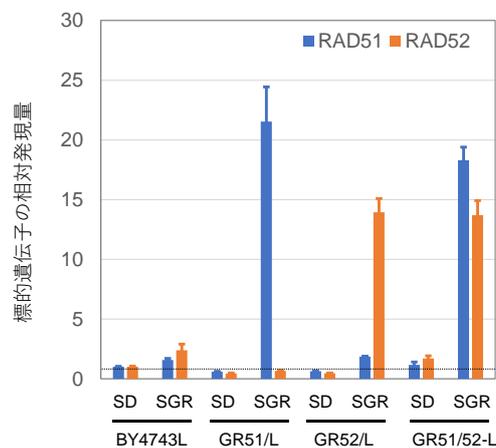


図5 *RAD* 遺伝子発現量の相対定量

次に各二倍体酵母の DNA 修復エラー発生率を比較した (図6)。SD 培地 (グルコース) で培養した場合の DNA 修復エラー発生率は、いずれの菌株でも同程度であった。これに対して、SGR 培地 (ガラクトース) を用いた場合、*RAD51* および *RAD52* 遺伝子を過剰発現しない二倍体酵母 BY4743L では DNA 修復エラー発生率が上昇することが確認された。エラーの種別を確認すると特にヘテロ接合性の消失 (相同組換え修復の異常) が増大していた。また *RAD51* および *RAD52* 遺伝子を共に過剰発現する二倍体酵母 GR51/52-L においては、さらに顕著な DNA 修復エラー発生率の上昇がみられた。一方、*RAD51* または *RAD52* 遺伝子を過剰発現する二倍体酵母 GR51/L、GR52/L では、SGR 培地 (ガラクトース) を用いた場合の DNA 修復エラー発生率が他の酵母と比べて明らかに低い値を示した。またエラーの種別を確認するとヘテロ接合性の消失と染色体喪失が同程度の頻度で発生していた。とりわけ Mediator 分子である Rad52

を過剰に合成する二倍体酵母 **GR52/L** では、炭素源をガラクトースとした場合においても、DNA 修復エラー発生率がグルコースを用いた場合と同程度の値を示した。

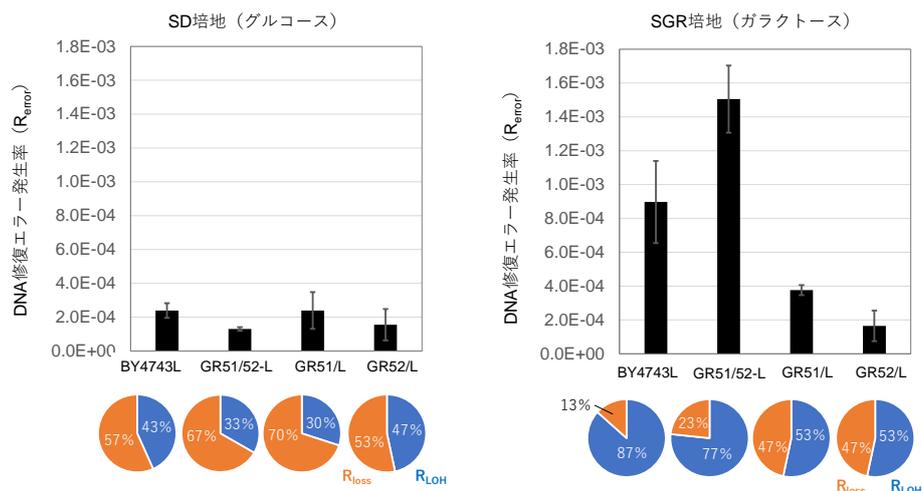


図6 *RAD* 遺伝子の過剰発現が DNA 修復エラー発生率に及ぼす影響

以上の結果より、同一の酵母であっても栄養源の種類によってゲノム安定性は変動することが示された。また一般的に使用される SD 培地 (グルコース) を用いた場合には、二倍体と比較して三倍体および四倍体の高次倍数体のゲノム安定性の低下はみられなかった。本研究において、ガラクトースを炭素源としたときに DNA 修復エラー発生率が上昇することが明らかとなったが、相同組換え修復の重要因子をコードする *RAD51* または *RAD52* 遺伝子のどちらか一方のみを過剰発現することで、DNA 修復エラー発生率を低下させることが可能であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nobuo Fukuda	4. 巻 144
2. 論文標題 A new scheme to artificially alter yeast mating-types without autodiploidization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fungal Genetics and Biology	6. 最初と最後の頁 103442
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fgb.2020.103442	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nobuo Fukuda	4. 巻 21
2. 論文標題 Crossbreeding of Yeasts Domesticated for Fermentation: Infertility Challenges	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7985
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21217985	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nobuo Fukuda, Shinya Honda, Maki Fujiwara, Yuko Yoshimura, Tsutomu Nakamura	4. 巻 Online ahead of print
2. 論文標題 Polyploid engineering by increasing mutant gene dosage in yeasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbial Biotechnology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1751-7915.13731	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nobuo Fukuda, Shinya Honda	4. 巻 in press
2. 論文標題 Synthetic gene expression circuits regulating sexual reproduction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Enzymology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.mie.2019.02.036	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福田 展雄、本田 真也
2. 発表標題 Multi-step細胞融合による多倍体酵母の創製
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------