

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：37401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19192

研究課題名(和文)出芽酵母において“超”高次倍数体の育種はどこまで可能か？

研究課題名(英文)How high polyploid is possible to create in yeast?

研究代表者

原島 俊 (HARASHIMA, Satoshi)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：70116086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：倍数性がいかに決まっているかは現代生命科学の重要な研究課題のひとつである。また小麦や酵母などの産業生物は高次倍数体であり、その有用形質が倍数性に深く関係していることが明らかになりつつあることから倍数性は応用分野においても興味深い課題と考えられている。しかし高次倍数体の育種技術が開発されていないことから研究は進んでいなかった。本研究では、酵母を対象として自在に超高次倍数体を育種できる技術を開発し、どこまでの倍数体が育種可能かの課題に挑戦した。その結果、少なくとも32倍体までの高次倍数体を育種できることを明らかにした。しかし倍数性が高くなると、高頻度で低次倍数体化が起こることも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究対象は出芽酵母ではあるが、本研究によって、自在に高次倍数体が育種できる技術、特に同質遺伝背景を持つ倍数体シリーズを育種できる技術が開発された。従って、この技術によって、倍数性はどのように遺伝的に支配されているのかなどの基礎生命科学における課題、あるいは、なぜ産業生物に高次倍数体が多いのか、また産業生物の高次倍数性が有用形質の発現とどのように関係するのか、倍数性の維持安定性はどうかなどバイオテクノロジーにおける興味深い課題も明らかにできる準備が整ったと考えている。今まで答えることができなかった課題にアプローチが可能になったという意味で、その学術的、社会的意義は小さくないと考えている。

研究成果の概要(英文)：How ploidy in organisms is genetically controlled is one of the important issues in modern basic biology. Industrial organisms such as wheat and budding yeast are well known to be polyploid and useful traits that those polyploid strains express is likely relevant to polyploidy attracts many biotechnologists. However, research regarding physiological significance of ploidy is not advanced because breeding technology to construct polyploid strain at will is not developed.

In this study, we have developed a novel breeding technology to construct a series of isogenic or heterogenic ploid strains by using a specific mutation of mating type in budding yeast and challenged up to how higher polyploid strains could be constructed. Results revealed that the developed method was effective to breed at least super polyploid strain up to 32n chromosome set. However, we have also noted that ploidy reduction occurs at high frequency in such a super polyploid.

研究分野：応用微生物学、微生物遺伝学

キーワード：出芽酵母 高次倍数体 倍数性の維持安定性 同質遺伝背景

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

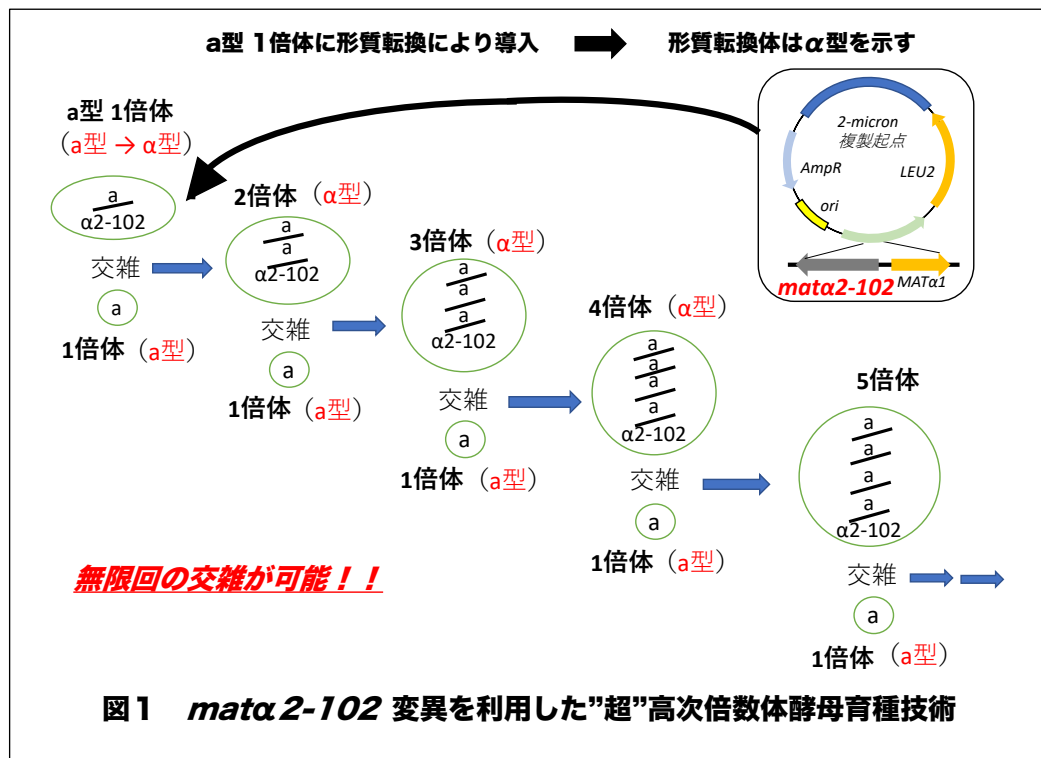
1. 研究開始当初の背景

倍数性が遺伝的にどのように決まっているかは現代生命科学の重要な研究テーマのひとつである。ヒトは2倍体であるが、どうして3倍体のヒトが存在しないのか。細菌は1倍体であるが、なぜ2倍体の細菌が存在しないのかなど、基礎生命科学的な観点からも答えられるべき課題は多い。一方、我々の日常生活に密接に関係する産業植物や産業微生物においても、小麦はなぜ6倍体なのか、また産業酵母に高次倍数体が多いのはなぜなのかなど、バイオテクノロジーの観点からも興味ある課題は目白押しである。しかしそうした疑問に答えることは、これまでいずれの生物においても可能ではなかった。その理由は、高次倍数体を自在に育種する技術が開発されていなかったためである。

2. 研究の目的

酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)の1倍体実験室株は、*MATa*、*MAT α* 遺伝子によって決められる **a** または α と呼ばれる接合型を持っている。**a** 型と α 型を交雑すると **a**/ α 型細胞となるが、この **a**/ α 型細胞は接合能を示さない。従って、**a**/ α 型細胞は、それ以上 **a** 型あるいは α 型のいずれの細胞とも掛け合わせることができず、交雑による育種は不可能である。申請者らは、こうした産業酵母の間で自由な交雑を可能にする育種技術の開発を行ってきた。その研究途上、接合型遺伝子 *MAT α 2* の特異な変異 (*mat α 2-102* と命名) 株を分離した。

この *mat α 2-102* 変異株は、野生型の α 型細胞と同様、**a** 型細胞と正常に接合し、**a**/ α 2-102 型 2 倍体細胞を生成する。しかし、野生型 **a**/ α 型細胞が接合能を示さないのと違い、不思議なことに α 接合能を示すという特異な性質を持つ。従って、この *mat α 2-102* 型変異遺伝子を利用すれば、理論的には **a** 型細胞と無限回の交雑が可能なのではとのアイデアを考えるに至った。



もし、このアイデアが有効であれば、酵母遺伝学が始まって以来半世紀もの歴史において全く育種されたことのない 5 倍体以上、あるいはそれ以上の倍数性を持つ高次倍数体 (本申請では”超”高次倍数体と称した) を造成できると考えた。本研究では、このアイデアを基に、i) 酵母で”超”高次倍数体を自在に育種できる技術を開発すること、ii) 開発した技術を用いて、いったいどこまで超高次倍数体が育種できるのかを明らかにすること、さらに、iii) それによって、産

業酵母はなぜ4倍体なのか、なぜ5倍体以上の”超”高次倍数体が存在しないのかなど、基礎、応用両面における答えを見出すことに挑戦した。

3. 研究の方法

mat α 2-102 変異遺伝子を利用して”超”高次倍数体育種技術を開発するため、*mat α 2-102* 変異遺伝子を多コピープラスミドにクローン化した。そして、このプラスミドを形質転換により **a** 型細胞に導入することで、**a** 型細胞に α 型接合能を付与した。接合能の検定は、本研究で使用した菌株が持っていない *ura1 ura2* 要求性を持つ **a** あるいは α 接合型テスターを利用して行った。細胞サイズの測定は、通常の光学顕微鏡観察を用いて行った。個々の細胞の DNA 含量は Fluorescence Assisted Cell sorting (FACS) 解析によって測定した。

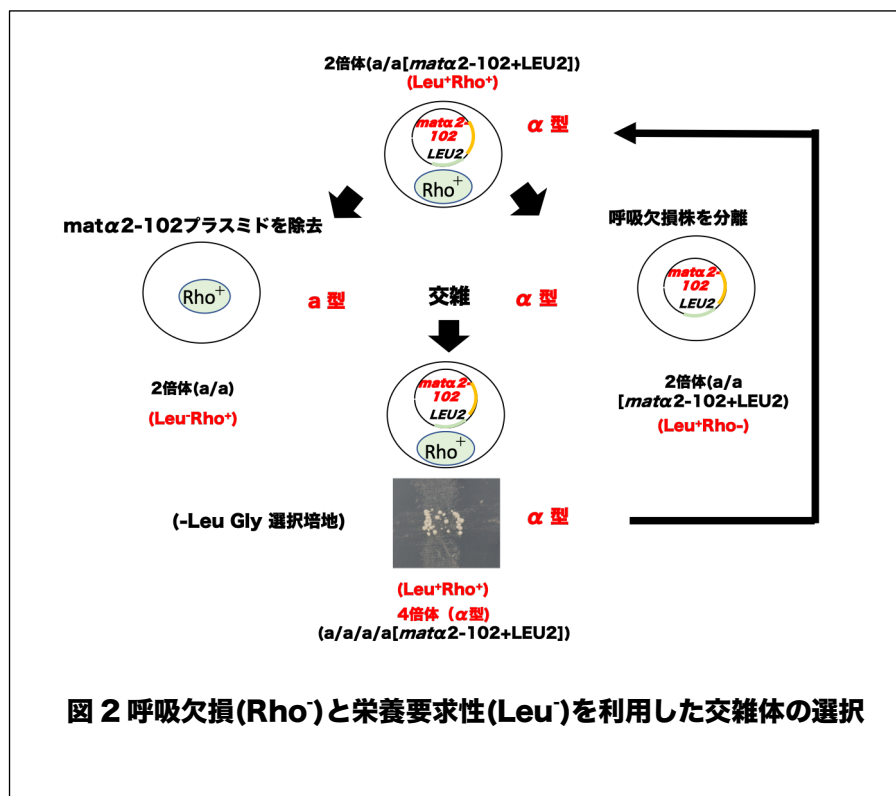
4. 研究成果

本研究を開始した年度までに、2年間の科学研究費(挑戦的萌芽研究)の支援を得、*mat α 2-102* 変異遺伝子が、4倍体までの倍数体に α 接合能を付与できることを明らかにしていた。また得られた倍数体を組み合わせて交雑し、6倍体 (= 2倍体 x 4倍体)、8倍体 (= 4倍体 x 4倍体)、10倍体 (= 4倍体 x 6倍体)を造成できるとの結果を得ていた。

しかし、一方では、*mat α 2-102* 変異遺伝子が **a** 型株に α 型を付与する能力は、倍数性が高くなれば徐々に弱くなること、また高次倍数体間の交雑体を取得するために用いていた薬剤であるセルレニン耐性の選択が効かなくなることも明らかになっていた。そこで、本研究では、まず高次倍数体の選択法として、セルレニン耐性表現型の代わりに呼吸欠損表現型 (Rho⁻) を使うシステムが効率よく機能するかどうかを検討した。

(1) 高次倍数体選択のための呼吸欠損表現型の利用

”超”高次倍数体を効率よく分離するための選択システムとして、*mat α 2-102* 変異遺伝子と *LEU2* マーカーを持たせたプラスミド(pSJ67 と命名)を持つ α 型株 (Leu⁺ Rho⁺) を、ミトコンドリア DNA を除去するエチジウムブロミドで処理し、呼吸欠損にした



(Leu⁺Rho⁻)。この株と、プラスミドを導入していない親株の **a** 型株 (Leu⁻Rho⁺) を交雑後、呼吸欠損株は増殖できないグリセロールを炭素源とし、ロイシンを含まない選択培地 (-Leu Gly 培地) にレプリカしたところ、交雑体が選択できることがわかった (図 1)。この結果より、以後の実験では、呼吸欠損表現型とロイシン要求性を利用した交雑体選択システムを使うことにした。

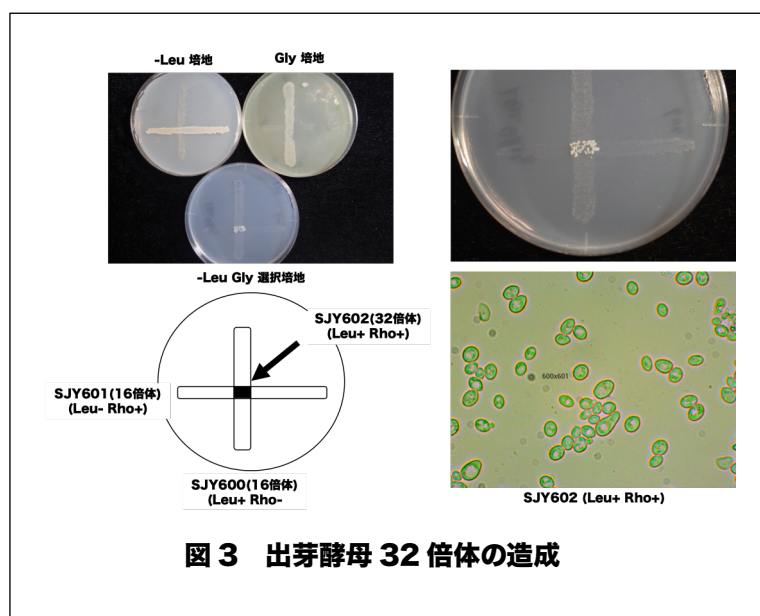
(2) 種々の倍数性を持つ高次倍数体の造成

そこで交雑体から、プラスミドを脱落させたクローン (Leu⁻Rho⁺) と、呼吸欠損にしたクローン (Leu⁺Rho⁻) を、それぞれ分離した後、両者を掛け合わせ、-Leu Gly 培地で交雑体を選択する操作を繰り返し、同質の遺伝背景を持つ倍数体シリーズを造成することを試みた。その結果、期待通り、2 倍体、4 倍体、8 倍体、16 倍体、32 倍体までの倍数体シリーズを作成することができた (図 2)。図 2 には 32 倍体の育種例を示した。32 倍体以上の超高次倍数体が作成できるかどうかは今後の課題である。

(3) 高次倍数体の育種はどこまで可能か

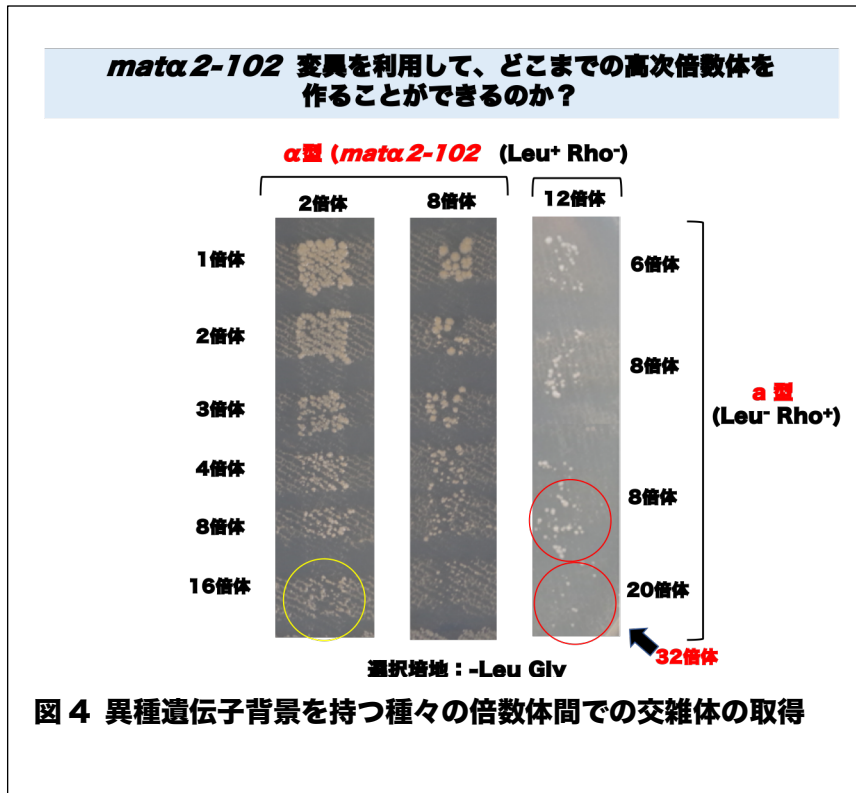
上記では、単一の **a** 型 1 倍体から出発し、図 1 の交雑法を繰り返すことにより全く遺伝背景が同じ倍数体シリーズを作成できることを示した。しかし、本法は、どのような遺伝背景を持つ株であっても、**a** 型株であれば自在に倍数体を育種できる。従って、色々な遺伝背景を持つ株で、呼吸欠損表現型とロイシン要求性表現型を利用した交雑体選択法で各種倍数体を造成した。その結果、倍数性が上昇すると、*mat α 2-102* 変異が **a** 型株に α 接合能を付与する能力が徐々に低下することがわかったが、 α 型については 2、4、8、12 倍体を、また、**a** 型については、6、8、20 倍体を作成することができた。

そこで、さらに、これらの高次倍数体を同士を交雑し、どこまでの高次倍数体が育種できるかを検討した。また、これらの高次倍数体のなかで、もっとも倍数性が高い 12 倍体と 20 倍体を掛け合わせる方法でも 32 倍体 (= 12 倍体 x 20 倍体) が育種できるかどうかを検



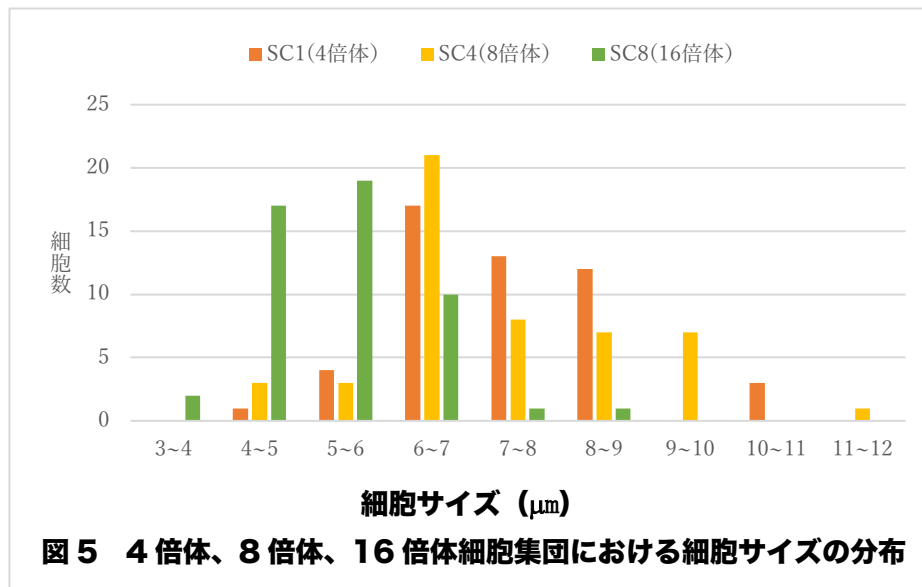
討した。その結果、倍数性が上昇すると、やはり接合の強さは徐々に低下してくることは観察されたものの、どのような株を用いても、少なくとも 32 倍体までは交雑体を取得するこ

とが可能であることがわかった(図 3)。



(4)高次倍数性の安定性

次に、作成した高次倍数体の倍数性が安定に維持されるかどうかを見るため、顕微鏡観察により交雑体の細胞の大きさを解析した(図 4)。その結果、予想通り、倍数性が高くなると細胞は大きくなるが、細胞集団の中には小さい細胞も散見することがわかった。そこで、FACS 解析により個々の細胞の DNA 含量を測定したところ、低次倍数体が存在していることが明らかになった(図 5)。これらの結果より、酵母において“超”高次倍数体の育種は少なくとも 32 倍体まで、あるいはそれ以上も可能と考えられるが、“超”高次倍数体、特に 4 倍体以上になると高頻度で低次倍数体化が起こることが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sasano Yu, Sakata Tetsuro, Okusaki Sakurako, Sugiyama Minetaka, Kaneko Yoshinobu, Harashima Satoshi	4. 巻 93
2. 論文標題 Genetic analysis of suppressor mutants of a <i>pho84</i> disruptant in the search for genes involved in intracellular inorganic phosphate sensing in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 199 ~ 207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1266/ggs.18-00014	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 Easmin Farhana, Hassan Naim, Sasano Yu, Ekino Keisuke, Taguchi Hisataka, Harashima Satoshi	4. 巻 128
2. 論文標題 gRNA-transient expression system for simplified gRNA delivery in CRISPR/Cas9 genome editing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 373-378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2019.02.009	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 原島 俊	4. 巻 88
2. 論文標題 出芽酵母における多様性ゲノム創出技術の開発と応用	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 イースト技法	6. 最初と最後の頁 28 ~ 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -
1. 著者名 原島 俊	4. 巻 96
2. 論文標題 産業酵母のベストゲノムを求めて	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 284 ~ 294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Easmin Farhana, Sasano Yu, Kimura Shunta, Hassan Naim, Ekino Keisuke, Taguchi Hisataka, Harashima Satoshi	4. 巻 129
2. 論文標題 CRISPR-PCD and CRISPR-PCRep: Two novel technologies for simultaneous multiple segmental chromosomal deletion/replacement in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 129 ~ 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2019.08.004	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 Hassan, N, Sasano Y, Kimura S, Easmin F, Ekino K, Taguchi H, Harashima S.	4. 巻 10
2. 論文標題 CRISPR-PCDup: a novel approach for simultaneous segmental chromosomal duplication in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 AMB Express	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) 10.1186/s13568-020-0957-4	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 Hassan Naim, Easmin Farhana, Sasano Yu, Keisuke Ekino, Hisataka Taguchi, Harashima Satoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Systematic approach for assessing whether undeletable chromosomal regions in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> are required for cell viability.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 AMB Express	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) 10.1186/s13568-020-01001-x	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 笹野 佑、原島 俊	4. 巻 -
2. 論文標題 出芽酵母における染色体工学の最先端と応用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 細胞	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) なし	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉山峰崇, 澤田 俊, 工藤大喜, 内田 進, 笹野 佑, 原島 俊
2. 発表標題 Saccharomyces cerevisiae SPY3の高温ストレス適応機構
3. 学会等名 第51回酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原島 俊
2. 発表標題 酵母におけるゲノム工学技術の開発、-ゲノム機能の解明と育種への応用
3. 学会等名 平成30年度イースト技術懇談会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Farhana Easmin, Naim Hassan, Yu Sasano, Keisuke Ekino, Hisataka Taguchi, Satoshi Harashima
2. 発表標題 PCR-based simplified gRNA delivering system for CRISPR/Cas9, gRNA-TES, in yeast
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第51回研究報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Farhana Easmin, (崇城大院・工 応用微生物工学専攻) Naim Hassan, Yu Sasano, Keisuke Ekino, Hisataka Taguchi, Satoshi Harashima
2. 発表標題 PCR-based quick method to deliver gRNA for CRISPR/Cas9 in yeast
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度西日本支部大会
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
研究 分担者	浴野 圭輔 (EKINO Keisuke) (30310030)	崇城大学・生物生命学部・教授 (37401)	
研究 協力者	中山 祐二 (NAKAYAMA YUji)		