

平成 27 年 4 月 30 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25820406

研究課題名(和文)自己倍数化抑制に基づく酵母育種法の開発

研究課題名(英文)Development of yeast-breeding method without autopolyploidization

研究代表者

福田 展雄 (Fukuda, Nobuo)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・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) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：優良酵母の育種に用いられる交雑法では、2種類の親株からa型と型酵母を製造する必要がある。しかしながら同一の親株から派生したa型および型酵母が接合する自己倍数化現象が、交雑体の製造効率を著しく低下させることが課題とされる。そこで交雑育種法の発展を目指し、自己倍数化を回避するための酵母の接合抑制技術を考案した。本研究では細胞増殖の際の染色体の複製異常を利用して接合型の変換を行い、同一の親株から派生した酵母間の接合を抑制することにより、各親株からそれぞれa型酵母または型酵母を単離する手法を確立した。本技術は産業用酵母にも適用が可能であり、優良酵母株の育種が促進されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To breed superior yeast strains by the crossbreeding method, we need a-type and -type of cells derived from two kinds of parental strains. Because both a-type and -type of cells can derive from a single parental strain and mate with each other, autopolyploidization impedes isolation of the desired mating-type of cells and subsequent crossbreeding. Here, we designed a method to prevent autopolyploidization, aiming at facilitation of yeast crossbreeding. In the current study, we converted the mating-type of yeast cells by using chromosomal aberration during mitotic division. We succeeded in isolation of a-type or -type of cells from cell mixture by preventing autopolyploidization. Our approach can be applied to industrial strains, and help promote further advance in yeast crossbreeding.

研究分野：生物学

キーワード：酵母 交雑育種 自己倍数化 増殖制御 接合

### 1. 研究開始当初の背景

酵母は古来より人類の日常生活と密接に関わり合ってきた。酒精飲料、及び発酵食品の製造に加えて、近年のバイオテクノロジーの発達により医薬品の製造にも関わるに至っている。酵母の有効利用に際しては、優秀な酵母を育種することが不可欠である。

交雑育種法は、異なる二つの菌株（親株）について人為的に交雑を行い、所望の形質を有する交雑株を選抜する方法であり、両親株の優良形質を併有する株を得るために有効な方法である。産業用酵母の多くは接合能をもたない多倍体（多くは二倍体の a/α 型）であるが、酵母の交雑には接合を利用するため、交雑の両親株として用いる二株はそれぞれ a 型と α 型の接合型を持つことが必要とされる。従来は、産業用酵母から孢子形成を経て a 型又は α 型の一倍体酵母が製造されてきたが、産業用酵母の中には、孢子形成能や孢子発芽率が低く、事実上、交雑育種に利用することができない菌株も数多く存在する。

一方、孢子形成を経由せずに、a/α 型の酵母から a 型又は α 型の酵母を得る方法も存在する。たとえば、接合型変換遺伝子 HO を強制発現させる方法や、染色体の複製異常を利用する方法などが挙げられる。これらの方法の特徴は、a/α 型の酵母から細胞分裂にともなって a 型と α 型の酵母がともに出現することである。このとき、一種類の親株酵母から派生した a 型と α 型の酵母も、増殖の過程で接合することが可能であるため自己倍數化を惹起してしまう。すなわち、酵母の交雑を目的とするにも関わらず、望まざる自己倍數化が生じることにより、交雑体の作製効率が大きく低下することが課題となっていた。

### 2. 研究の目的

孢子形成・発芽が困難な酵母株にも適用可能な接合型変換手法を確立する。まず接合型変換の際に生じる自己倍數化を回避するために、酵母の接合を制御する技術を開発する。つづいて本技術を、接合型変換の際に用いることで、a/α 型の酵母から a 型と α 型の酵母を効率的に製造・単離することを目指した。

### 3. 研究の方法

図 1 に示すように、酵母の接合を誘起する遺伝子群 (hsg) は、a 型又は α 型の一倍体細胞内で特異的に発現し、a/α 型の二倍体細胞内では発現が抑制されている。接合を制御する遺伝子として、a 型細胞では a1 遺伝子が、α 型細胞では α2 遺伝子が発現しているが、これらがコードするタンパク質は、単独では hsg の発現に対し影響を与えることはほとんどない。一方、a/α 型の細胞は両遺伝子を発現し、これらがコードするタンパク質は a1-α2 複合体を形成して hsg の発現を抑制している。そこで、a 型細胞内で α2 遺伝子を、又は α 型細胞内で a1 遺伝子を強制的に発現させることにより、一倍体であるにもかかわらず

らず a1-α2 複合体を形成させた。これにより当該酵母の接合能を抑制して自己倍數化を回避した。

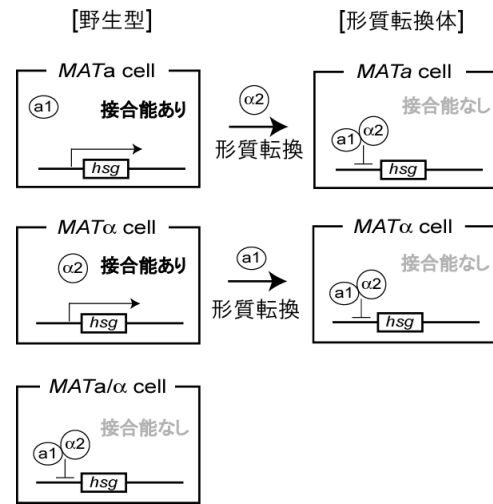


図 1 a1-α2 複合体による接合抑制

つづいて、染色体の複製異常により出現した a 型または α 型の酵母を単離するために、以下のような発現ベクターを構築した。

STE2 プロモーター (P<sub>STE2</sub>) の下流にマーカー遺伝子を連結することで、マーカー遺伝子を a 型細胞特異的に発現するベクターを構築した。また、HO プロモーター (P<sub>HO</sub>) の下流にマーカー遺伝子を連結し、P<sub>STE2</sub>-α2 とともに共発現させることにより、マーカー遺伝子を α 型細胞特異的に発現するベクターを構築した。なおマーカー遺伝子にはウラシル合成遺伝子 URA3 または G418 耐性遺伝子 kanMX4 を利用した。

構築した発現ベクターを a/α 型の酵母に導入して培養したのち、以下に示す選択圧を与えて、a 型または α 型の酵母を寒天培地上で単離した。URA3 を用いた場合はウラシル欠損培地上で生育可能なもの、kanMX4 を用いた場合は G418 含有培地で生育可能なものが目的の接合型 (a 型または α 型) を有する酵母細胞となる。

取得した酵母細胞を、既知の接合パートナーと混合培養することにより、接合体の形成がみられるかを調べた。このとき取得した酵母細胞と既知の接合パートナーには、それぞれ異なる栄養要求性を付与しており、接合体のみが生育可能な栄養条件を設定して、コロニー形成の有無を指標とした接合能の判定試験を実施した。

### 4. 研究成果

まず a1 または α2 を導入することで、酵母の接合を抑制できるか確認した。図 2 に示す増殖試験では、a 型および α 型の酵母がともに接合能を有しているとコロニー形成が見られるが、a 型酵母に α2 遺伝子を、α 型酵母に a1 遺伝子を強制的に発現させることによ

り、接合抑制を生じさせることに成功した（右から2列目および3列目）。

$MA7a \rightarrow$	WT	a1	$\frac{WT}{x}$	$\alpha 2$	$\frac{WT}{x}$
	x	x	x	x	x
$MA7\alpha \rightarrow$	WT	$\frac{WT}{x}$	a1	$\frac{WT}{x}$	$\alpha 2$

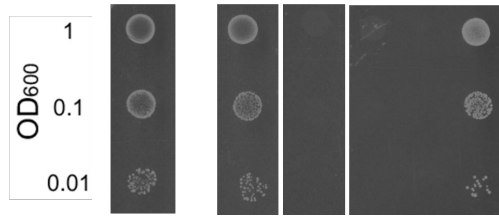


図2 一倍体酵母における接合抑制

つづいて a 型細胞特異的、あるいは  $\alpha$  型細胞特異的な URA3 マーカー遺伝子の発現システムを構築し、その評価を行った。ウラシルを欠いた培地中において a 型、 $\alpha$  型、a/ $\alpha$  型酵母を個別に培養したところ、図3に示すように、それぞれ標的としている a 型あるいは  $\alpha$  型酵母のみが URA3 を発現して増殖可能であることが確認された。

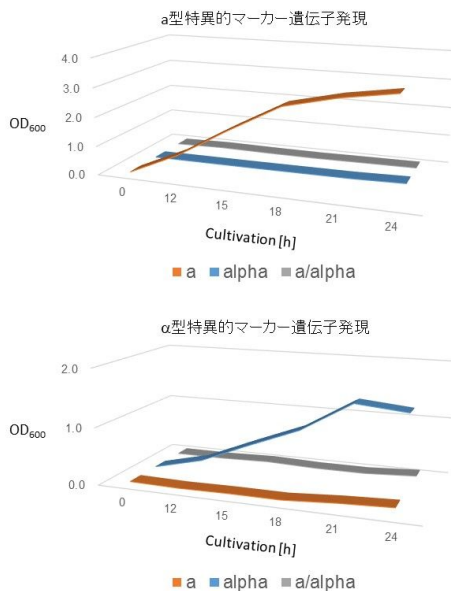


図3 URA3 マーカー遺伝子の発現確認

さらに、a1 または  $\alpha 2$  遺伝子を予め導入したうえで、a/ $\alpha$  型実験室酵母 (BY4743 株) を一晚程度培養し、ウラシル欠損寒天培地を用いて、a 型 (BY4743A) もしくは  $\alpha$  型酵母 (BY4743AL) の単離を行った。取得した酵母の接合能を、親株の BY4743 と比較して、評価を行った。図4に示すようにそれぞれ異なる栄養要求性マーカー遺伝子を有する BY4743 を共培養しても、両形質を継承した接合体のコロニーは出現しない。一方、同様に異なる栄養要求性を有する BY4743A と BY4743AL を共培養すると、接合体のコロニーが形成されることから、これらの酵母細胞は、a 型および  $\alpha$  型の接合能を獲得している

ことが確認された。

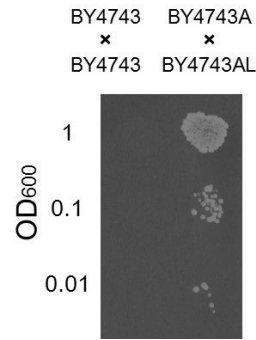


図4 単離した酵母株に対する接合能評価

実験室酵母に対しては URA3 のような栄養要求性マーカー遺伝子が用いられるが、これらは産業用酵母に対してそのまま利用することができないため、G418 やハイグロマイシンなどの薬剤に対応した耐性遺伝子を選択マーカー遺伝子として利用することが一般的である。そこで選択マーカー遺伝子を URA3 から kanMX4 に変更した発現ベクターを構築した。この発現ベクターを清酒酵母協会7号 (a/ $\alpha$  型) に導入して2日間培養し、G418 を含む寒天培地を用いて、a 型 (K7A) もしくは  $\alpha$  型酵母 (K7AL) の単離を行った。これらの酵母株の接合能を評価したところ、既知の  $\alpha$  型または a 型酵母と接合を生じることが確認され、実験室酵母のみならず、産業利用酵母においても、a 型および  $\alpha$  型の接合能を獲得させることに成功した。

以上のように、a/ $\alpha$  型の酵母から孢子形成過程を経ることなく、a 型および  $\alpha$  型の酵母を製造する技術を開発した。本技術を用いることで、同一の親株から派生した酵母間で生じる自己倍数化を回避することができるため、効率的に出現した a 型あるいは  $\alpha$  型の酵母を単離することができた。これまでの交雑育種においては、未だ十分には利用されていない酵母資源が数多く存在している。本研究の成果は、これらの酵母資源を有効利用する上で非常に有用であり、今後の交雑育種が大きく促進されるものと期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

(1) Fukuda N, Honda S, "Functional analyses and affinity-alteration of receptors and enzymes based on membrane recruitment of yeast guanine nucleotide-binding protein gamma subunit." 査読有, Receptors & Clinical Investigation, vol.2, 2015, e373, DOI: <http://dx.doi.org/10.14800/rci.373>

(2) Fukuda N, Honda S. “Rapid Evaluation of Tyrosine Kinase Activity of Membrane-Integrated Human Epidermal Growth Factor Receptor Using the Yeast Ggamma Recruitment System” 査読有, ACS Synthetic Biology, vol.4, 2015, 421-429, DOI: 10.1021/sb500083t

(3) Kaishima M, Fukuda N, Ishii J, Kondo A. “Desired alteration of protein affinities: competitive selection of protein variants using yeast signal transduction machinery.” 査読有, PLOS ONE, vol.9, 2014, e108229 DOI: 10.1371/journal.pone.0108229.

(4) Fukuda N, Honda S. “Development of Growth Selection Systems to Isolate a-type or alpha-type of Yeast Cells Spontaneously Emerging from MATa/alpha diploids” 査読有, Journal of Biological Engineering, vol.7, 2013, 27 DOI: 10.1186/1754-1611-7-27.

〔学会発表〕(計3件)

(1) 福田 展雄、本田 真也 “酵母表現型を指標としたヒト受容体チロシンキナーゼ活性評価法の開発”, 第66回日本生物工学会大会, 2014年9月9日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

(2) Fukuda N, Honda S, “Rapid evaluation of tyrosine kinase activity of membrane-integrated human epidermal growth factor receptor using the yeast Ggamma recruitment system”、The Synthetic Biology: Engineering, Evolution & Design (SEED) conference 2014、2014年7月17日、Manhattan Beach Marriott (CA, United States)

(3) 福田 展雄、松倉 智子、本田 真也 “自己倍数化抑制に基づく酵母の接合型変換技術の開発”, 第65回日本生物工学会大会、2013年9月18日、広島国際会議場(広島県・広島市)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 接合能を有する酵母のスクリーニング方法

発明者: 福田 展雄, 本田 真也

権利者: 独立行政法人産業技術総合研究所

種類: 特許出願

番号: 特願 2013-126804

出願年月日: 2013/6/17

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 展雄 (FUKUDA NOBUO)

独立行政法人産業技術総合研究所・

バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号: 00613548

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし