

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：37401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14894

研究課題名(和文) 出芽酵母“超”高次倍数体育種技術の開発と応用

研究課題名(英文) Development of a novel construction method of polyploid 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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)： 倍数性がどのような仕組みで制御されているかは現代生命科学の重要な課題のひとつである。産業酵母の多くは高次倍数体であることが知られており、倍数性はバイオテクノロジーの観点からも興味ある課題と考えられている。しかし、高次倍数体を自在に造成する技術が開発されていないことから、その研究は進んでいなかった。本研究では、酵母の特異な接合型変異(mat 2-102)を利用して、次々と“超”高次倍数体を育種する技術を開発した。これを用いて、これまでに育種されていなかった6倍体、8倍体、10倍体を育種した。今後、どこまで高次の倍数体が育種できるかに挑戦する。また、産業酵母の有用形質と倍数性の関係を明らかにする

研究成果の概要(英文)： How ploidy in organisms is controlled is one of the important issues in modern biology. Industrial strains of budding yeast is well known to be polyploid is also interesting fact in biotechnology in connection with useful characteristics. However, research regarding physiological significance of ploidy is not advanced due to unavailable technology to construct polyploid at will. In this study, we have developed a novel breeding technology to construct a series of polyploid strain by using a specific mutation of mating type in budding yeast. We have created hexaploid, octoploid and decaploid using this technique. We are now challenging whether more higher polyploid strain could be created.

研究分野：応用微生物学

キーワード：酵母 “超”高次倍数体

1. 研究開始当初の背景

倍数性がどのような仕組みで制御されているかは現代生命科学の重要な課題のひとつである。例えば、原核生物には倍数体は存在しない。真核生物では、植物に倍数体が存在するが、動物では、まれに爬虫類などで倍数体が存在するものの、ヒトを含む哺乳類には倍数体は存在しない。しかし、なぜ、ヒトを含む哺乳類に4倍体が存在しないのかについて、そのメカニズムは不明である。一方、いくつかの産業用生物、特に産業酵母の多くは高次倍数体であることが知られており、倍数性はバイオテクノロジーの観点から興味ある課題と考えられている。このように、高次倍数性は、基礎、応用両面において重要な課題であるにもかかわらず、高次倍数体を自在に造成する技術が開発されていないことから、その研究は進んでいなかった。例えば、高次倍数性の生理的な意味を正確に解析するためには同一遺伝背景の倍数体が必要である。我々は以前の研究で「形質転換付随融合法」と命名した育種技術によって、同質遺伝背景を持つ1~4倍体の酵母倍数体シリーズを構築した。しかしさらに高次の倍数体酵母を育種する技術が開発されていなかった。また、酵母ではどこまで高次の倍数性が育種できるかについても研究が行われていなかったというのが研究開始当初の状況である。

2. 研究の目的

酵母には **a**、**α** と呼ばれる 2 つの接合型があり、**a**、**α** 細胞を接合させると非接合性となる。しかし当研究室では、**a** 型細胞と接合させた時生成した 2 倍体細胞に **α** 接合型を付与する特殊な変異 (*matα 2-102*) を分離した。この *matα 2-102* 変異を利用すれば、この変異を導入した **a** 型細胞は **α** 型を示すので、これと、もとの **a** 型細胞を交雑することができる。交雑体は、再び **α** 型を示すと予想されるので、このプロセスを繰り返すことによって、理論的には無限に高次の倍数体を造

成することができる考えた。本研究は、この仮説が正しいかどうか、また、どこまで高次倍数体を造成できるかという、これまでに問われたことのない生命科学の基本的な課題のひとつを明らかにすることを目的とする。また、これに加えて、もし”超”高次倍数体(本研究では 8 倍体以上の倍数体を”超”高次倍数体と呼ぶことにする)を造成することができれば、そのバイオテクノロジーにおける有用性を検証するのも、本研究の目的のひとつとした。

3. 研究の方法

本研究では、*matα 2-102* 変異を多コピープラスミドベクターにクローン化し、**a** 型細胞に形質転換で導入することにより、“超”高次倍数体を育種する方法論を開発する。倍数性の上昇によって、*matα 2-102* 変異の **a** 型細胞への **α** 型付与能に変化があるか、交雑体の取得のための選択符号をにどのようなものを使うか、高次倍数体、特に”超”高次倍数体は、その倍数性を安定に保持できるかなども検討する。

4. 研究成果

4-1) *matα 2-102* 変異は、倍数性が高くなっても **α** 型を与え得るか

上記のアイデアが正しいかどうかを検討するため、*matα 2-102* 変異遺伝子を酵母ベクターにクローン化し、以前に形質転換付随細胞融合法と呼ぶ方法で作成した 1 倍体(**a**)、2 倍体(**a/a**)、3 倍体 (**a/a/a**)、4 倍体 (**a/a/a/a**) 型細胞に導入したところ、倍数性にかかわらず、全ての形質転換体は、期待通り **α** 型を示した。しかし、その **α** 接合能付与の強さは 1 倍体、2 倍体では十分強いように見えたが、3 倍体、4 倍体と倍数性が高くなるにつれ弱まった。しかしながら、*matα 2-102* 変異をベクターに乗せて **a** 型細胞に導入する方法論に

よって、高次倍数体を作成することが可能であると思われた。

4-2) 薬剤耐性選択符号を用いた 6 倍体の造成

上記の考えに従い、プラスミド上に *mat α 2-102* 変異をもつ二倍体株 SJY254 (*MATa/MATa [mat α 2-102 + LEU2]*)を利用して、6 倍体を造成することを試みた。SJY254(*MATa/MATa [mat α 2-102 + LEU2]*)とセルレニン耐性遺伝子 *PDR4* を導入した a 型 4 倍体株 SJY258 (*MATa/MATa/MATa/MATa [PDR4]*)を YPD(酵母の栄養培地)平板培地上で接合させたあと、ロイシン (Leu) を含まずセルレニン(Cer)を含む培地 (-Leu/Cer 培地) にレプリカしたところ、期待通り 6 倍体を取得することができた。この 6 倍体(SJY299 と命名)は世界で初めての同質遺伝背景(isogenic)の 6 倍体である。

4-3) 呼吸欠損表現型を利用した 8 倍体の選択

次に、取得した SJY299(6 倍体)と 2 倍体 SJY254 (*MATa/MATa [mat α 2-102 + LEU2]*)の交雑を行い、8 倍体の取得を試みた。しかし、交雑体を得ることができなかった。この現象を説明する 1 つの可能性として、酵母の倍数性が高くなるにつれ *PDR4* がセルレニン耐性を付与できなくなることを想定した。そこで、セルレニン耐性選択の代わりに呼吸欠損表現型 (Rho⁻) による選択を行うことを考えた。交雑体は Leu⁺Rho⁺で選択するため、呼吸欠損株を効率よく分離できる YPD/EtBr (エチジウムブロマイド)培地を用いて 2 倍体 SJY254 株から呼吸欠損変異株を誘導した。この株 (*MATa/MATa[mat α 2-102 + LEU2][Rho⁻]*) (SJY361 と命名) と、6 倍体(SJY299)を交雑し、8 倍体を Leu⁺Rho⁺表現型で選択したところ、Leu⁺Cer^rの表現型選択では得ることができなかった 8 倍体交雑

体を得ることができた。この交雑体を SJY369 (*MATa/MATa/MATa/MATa/MATa/MATa/MATa/MATa [Rho⁺] [mat α 2-102 + LEU2]*)と命名した。この結果より、高次倍数体交雑体の選択には、セルレニン耐性表現型より、呼吸欠損表現型を用いることが有効であると分かった。そのため、SJY361 (*MATa/MATa[mat α 2-102 + LEU2][Rho⁻]*)株を新たな基準株として、以後の交雑に利用することにした。ここで造成した 8 倍体は、もちろん、世界で初めての 8 倍体である。

4-4) 呼吸欠損選択を用いた 10 倍体の造成

次に、呼吸欠損 2 倍体基準株(SJY361)を利用して 10 倍体の造成を試みた。SJY370 (8 倍体) (*MATa/MATa/MATa/MATa/MATa/MATa/MATa/MATa [Rho⁺]*) と SJY361 (*MATa/MATa [mat α 2-102 + LEU2][Rho⁻]*) 株を YPD 平板培地上で一晩接合させ、呼吸欠損株は増殖できない炭素源としてグリセロール (Gly) を用いた-Leu/Gly 培地にレプリカした。その結果、10 倍体交雑体を取得することができた。この 10 倍体も世界で初めての 10 倍体である。

4-5) 今後の展望

本研究において、*mat α 2-102* 変異を利用して世界で初めて 6 倍体、8 倍体、10 倍体細胞を育種することができた。これらの倍数体は、単に高次倍数体というだけでなく、同質遺伝背景の高次倍数体であることにも言及しておきたい。次に行うべきことは、これらの超高次倍数体を利用して、これまで誰も育種したことのない 12 倍体、14 倍体、16 倍体、18 倍体、20 倍体など、どこまで”超”高次倍数体が育種できるかどうか挑戦することである。

一方、このことに関連して、a 型細胞の倍数性が上昇するにつれ、*mat α 2-102* 変異が、a 型細胞に a 型を付与する機能が低下していることが、a 接合能の低下から示唆された。

この現象が正しいのであれば、“超”高次倍数体を育種する障害となり得る可能性もあろう。もしそうであれば、これをどのようにして解決するかが課題である。また、造成した“超”高次倍数体の倍数性が安定に維持されるかどうか調べる必要がある。さらに、野生型 MAT α 2 タンパクは、MAT α 1 タンパクと複合体を作ることがわかっているが、mat α 2-102 タンパクが MAT α 1 タンパクと複合体を形成するかどうかはわかっていない。mat α 2-102 変異による“超”高次倍数体の育種技術の開発には、こうした知見も得る必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

- 1) Sasano Y, Kariya T, Usugi S, Sugiyama M, Harashima S. Molecular breeding of *Saccharomyces cerevisiae* with high RNA content by harnessing essential ribosomal RNA transcription regulator. *AMB Express*. (査読有) 2017 7(1):32, 2017. DOI: 10.1186/s13568-017-0330-4.
- 2) Hanifrahmawan Sudibyo, Jasman, Himawan Tri Bayu Murti Petrus, Agus Prasetya, Donny Widiyanto, Chusnul Hidayat, Satoshi Harashima, Irfan Dwidya Prijambada Simultaneous Hydrolysis and Fermentation of Sweet Sorghum Varieties (FS501 and KCS105) into Bioethanol using *Saccharomyces steineri* – A Kinetics Study. *Engineering Journal* (査読有), 2017, 21, 105-121 DOI 10.4186/ej.2017.21.7.105
- 3) Yu Sasano and Satoshi Harashima, CRISPR-PCS Protocol for Chromosome Splitting and Splitting Event Detection in *Saccharomyces cerevisiae*, *Bio-protocol*, (査読有), 7(10), 2017 DOI 10.21769/Bioprotoc.2306
- 4) Kitichantaropas Y, Boonchird C, Sugiyama M, Kaneko Y, Harashima S, Auesukaree C Cellular mechanisms contributing to multiple stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential use in high-temperature ethanol fermentation. *AMB Express*. (査読有) 2016 6 (1):107. DOI: 10.1186/s13568-016-0285-x.
- 5) Yu Sasano, Koki Nagasawa, Saeed Kaboli, Minetaka Sugiyama, Satoshi Harashima "CRISPR-PCS: a powerful new approach to inducing multiple chromosome splitting in *Saccharomyces cerevisiae*" *Scientific Reports*. (査読有) 2016, 6:30278. DOI: 10.1038/srep302
- 6) Sugiyama M Akase SP, Nakanishi R, Kaneko Y, Harashima S. Overexpression of ESBP6 improves lactic acid resistance and production in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng*. (査読有) 2016 122(4): 415-20. DOI:10.1016/j.jbiosc.2016.03.010.
- 7) Zhou Y, Yuikawa N, Nakatsuka H, Maekawa H, Harashima S, Nakanishi Y, Kaneko Y. Core regulatory components of the PHO pathway are conserved in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Curr Genet*. (査読有) 62(3):595-605, 2016. DOI: 10.1007/s00294-016-0565-7.
- 8) Kaboli S, Miyamoto T, Sunada K, Sasano Y, Sugiyama M, Harashima S. Improved stress resistance and ethanol production by segmental haploidization of the diploid genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng*. (査読有)121(6):638-44, 2016. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.10.012.
- 9) Natesuntorn W, Iwami K, Matsubara Y, Sasano Y, Sugiyama M, Kaneko

- Y, Harashima S. Genome-wide construction of a series of designed segmental aneuploids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports* (査読有) 5:12510, 2015. doi: 10.1038/srep12510.
- 10) Numamoto M, Tagami S, Ueda Y, Imabeppu Y, Sasano Y, Sugiyama M, Maekawa H, Harashima S. Nuclear localization domains of GATA activator Gln3 are required for transcription of target genes through dephosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng.* (査読有) 120(2):121-7, 2015. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.12.017.
- 11) Sasano Y, Yamagishi K, Tanikawa M, Nakazawa T, Sugiyama M, Kaneko Y, Harashima S. Stabilization of mini-chromosome segregation during mitotic growth by overexpression of YCR041W and its application to chromosome engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng.* (査読有) 119(5):526-31, 2015. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.10.006.
- 12) Sharmin D, Sasano Y, Sugiyama M, Harashima S. Type 2C protein phosphatase Ptc6 participates in activation of the Slt2-mediated cell wall integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng.* (査読有) 119(4):392-8, 2015. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.09.013.
- 13) Numamoto M, Sasano Y, Hirasaki M, Sugiyama M, Maekawa H, Harashima S. The protein phosphatase Siw14 controls caffeine-induced nuclear localization and phosphorylation of Gln3 via the type 2A protein phosphatases Pph21 and Pph22 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem.* (査読有) 157(1):53-64, 2015. DOI: 10.1093/jb/mvu055.
- 14) Hermansyah, Novia, Minetaka Sugiyama, Satoshi Harashima. *Candida tropicalis* Isolated from *Tuak*, a North Sumatera Indonesian Traditional Beverage, for Bioethanol Production. *Microbiology and Biotechnology Letters* (査読有) (2015), 43(3), 241-248, DOI: 10.4014/mbl.1506.06002
- [学会発表] (計 11 件)
- 1) 谷 龍典、門畑 凌太、村上 亮輔、藤本 昌希、平川 万里、浴野 圭輔、原島 俊 バガス由来阻害物耐性出芽酵母変異株の分離と遺伝解析, 日本生物工学会九州支部沖縄大会 2017
- 2) 糸数帆高、松本拓己、浴野圭輔、西澤正文、原島 俊, 酵母における”超”高次倍数体育種技術の開発, 日本生物工学会九州支部沖縄大会 2017
- 3) Satoshi Harashima, Minetaka Sugiyama, Yu Sasano, ICY2016: Yeast genome engineering, - A new challenge to deciphering genome function and breeding, The 14th International Congress on Yeasts (ICY2016) , 2016.
- 4) Yu Sasano, Koki Nagasawa, Shunta Kimura, Saeed Kaboli, Taishi Nakai, Ryota Murayama, Minetaka Sugiyama, Satoshi Harashima, ICY2016: CRISPR-PCS: a versatile chromosome manipulation technology in *Saccharomyces cerevisiae* - The 14th International Congress on Yeasts (ICY2016) , 2016.
- 5) 笹野 佑, 長澤宏器, 木村駿太, Kaboli Saeed, 中井大志, 村山亮太, 杉山峰崇, 原島 俊 出芽酵母において多様な染色体操作を可能にする CRISPR-PCS 法の

- 開発, 酵母遺伝学フォーラム第 49 回研究報告会, 2016
- 6) 笹野 佑, 長澤 宏器, 木村 駿太, Kaboli Saeed, 中井 大志, 村山 亮太, 杉山 峰崇, 原島 俊, CRISPR-PCS 法を基盤とした酵母染色体の多様な操作技術の開発, 第 68 回日本生物工学会大会, 2016
 - 7) 杉山 峰崇, 呉 俊元, 笹野 佑, 金子 嘉信, 原島 俊, バイオエタノール生産のためのゲノムシャufflingによる高温耐性酵母の開発 酵母遺伝学フォーラム第 48 回研究報告会, 2015
 - 8) 笹野 佑, 長澤 宏器, Saeed Kaboli, 杉山 峰崇, 原島 俊 CRISPR-PCS: 多様な染色体操作が可能な染色体工学技術、酵母遺伝学フォーラム 第 48 回研究報告会, 2015
 - 9) Minetaka Sugiyama, Junyuan Wu, Yu Sasano, Satoshi Harashima, Improvement of thermotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production by genome shuffling, The 32nd International Specialized Symposium on Yeasts, Perugia, Italy, 2015
 - 10) Satoshi Harashima, Genome engineering - perspectives and challenges for synthetic biotechnology in yeast. The 27th Annual Meeting of Thai Society for Biotechnology and International Conference, 2015
 - 11) Minetaka Sugiyama, Junyuan Wu, Yu Sasano, Yoshinobu Kaneko, Chuenchit Boonchird, Satoshi Harashima, Improvement of thermotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production by genome shuffling, The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, 2015

〔図書〕 (計 1 件)

- 1) 原島 俊 リン酸シグナル伝達 朝倉書店, リンの事典 (大竹久夫著書) pp98-99、pp105、2017

〔その他〕

ホームページ

<http://rsrch.ofc.sojo-u.ac.jp/sjuhp/KgApp?kyoinId=ymemgkoygy>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

浴野圭輔 (EKINO Keisuke)

崇城大学・生物生命学部・准教授

研究者番号：30310030