

学位論文内容の要旨	
学位論文題目	産業用酵母菌の遺伝子操作技術の開発とその応用
氏名	村上 允唯
<p>酵母は発酵・醸造食品の製造、バイオエタノール生産に利用されている。しかし、このような有用な機能を持つ産業用酵母の遺伝子操作系の確立は容易ではない。本研究では2種の産業用酵母の遺伝子操作技術の確立を目指した。</p> <p>ビール酵母 <i>Saccharomyces pastorianus</i> はビールの生産に用いられる下面発酵酵母であり、染色体が <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Sc) と <i>Saccharomyces bayanus</i> (Sb) からなる異型4倍体であるという特徴を持つ。そのせいで遺伝子操作が難しいことが知られており、今までに栄養要求性変異株が取得されたことがない。そこで、遺伝子工学的手法でのウラシル要求性ビール酵母の取得を目指した。栄養要求性変異株を取得し、栄養要求性マーカーを用いることが可能となれば効率よく遺伝子操作を行うことができる。ビール酵母の4つの <i>URA3</i> 遺伝子を破壊するために、4つのうち Sc 型の <i>URA3</i> 遺伝子と Sb 型の <i>URA3</i> 遺伝子のそれぞれ1つをヘテロで破壊した株をまず取得し、この株に対してヘテロをホモ化できる Loss of heterozygosity を用いることで Sc 型、Sb 型ともに <i>ura3</i> が破壊されホモとなったビール酵母 <i>ura3</i> 破壊株が得られるのではないかと考えた。相同組換えによる遺伝子導入効率は相同配列の長さに依存し、相同配列が長いほど効率よく導入できることが知られているため、ビール酵母 Sb <i>URA3</i> 遺伝子を研究用酵母に導入し、研究用酵母内で Sb <i>URA3</i> 遺伝子の中に <i>KanMX</i> 遺伝子を挿入した破壊用コンストラクトを作製した。これにより、Sb <i>URA3</i> 相同配列を約 1000 bp もつ <i>KanMX</i> 遺伝子を得ることができた。この長い相同配列を持つ <i>KanMX</i> 遺伝子を用い、ビール酵母 Sb <i>URA3</i> 遺伝子の破壊を行うことが可能であった。同様の手法を用い <i>Hygro^R</i> 遺伝子でビール酵母 Sc <i>URA3</i> 遺伝子の破壊を行い、ビール酵母の Sc <i>URA3</i> 遺伝子の1つを <i>Hygro^R</i> 遺伝子で、Sb <i>URA3</i> 遺伝子の1つを <i>KanMX</i> 遺伝子で破壊した <i>URA3</i> ヘテロ破壊株を得ることができた。<i>URA3</i> が完全に破壊されれば、5-fluoroorotic acid (FOA) 培地で選択できる。ビール酵母 <i>URA3</i> ヘテロ破壊株を FOA 培地にレプリカしたところコロニーを得ることができた。得られたコロニーに対し、PCR を用いて Sc 型、Sb 型それぞれの <i>URA3</i> 領域を調べたところ、どちらの領域も <i>URA3</i> 遺伝子が <i>KanMX</i> 遺伝子及び <i>Hygro^R</i> 遺伝子により置換されていることがわかった。この結果は Sc 型、Sb 型それぞれで LOH が起こったことを示している。得られた株は U 培地上で生育不可能であり、Sc <i>URA3</i> 遺伝子をマーカーとして形質転換を行うことが可能であった。ウラシル栄養要求性ビール酵母の取得により、今まで困難とされてきたビール酵母の遺伝子操作が容易に行えるようになった。これにより、ビール酵母の研究、育種は大きく進歩することが期待できる。</p> <p>耐熱性酵母 <i>Kluyveromyces marxianus</i> は耐熱性を持ち、高温条件下でのバイオエタノール生産の可能性が検討されている新しい酵母である。この酵母は、Non-homologous end joining (NHEJ) の活性が高いという特徴がある。NHEJ とは非相同な DNA 末端同士が結合するというものである。これを利用した新しいクローニング法を考案した。マーカー遺伝子を分断し形質転換を行うことで、NHEJ により、分断したマーカー遺伝子が正常に機能する様に結合したもののみ選択でき、クローニングサイトとして利用できるのではないかと考えた。そこで、<i>URA3</i> 遺伝子を上流と下流に分断し、これらの DNA 断片を同時に <i>K. marxianus</i> へ導入したところ、正常な <i>URA3</i> 遺伝子が機能できるようになり形質転換が成功した。この結果は、細胞内で2つの DNA 断片が正常に機能するように結合したことを示している。また、このクローニング法を使い従来のクローニング法と比べ操作が単純かつ高効率なプラスミド構築法を考案した。2つのマーカー遺伝子を向かい合わせたクローニ</p>	

ングサイトを持ち、プラスミドの構築に必要な *Autonomously Replicating Sequence* (自律複製起点) を含んだプラスミドを構築した。このプラスミドのクローニングサイトを用いたプラスミド構築の効率を、*ScLEU2* 遺伝子を挿入断片として評価した結果、効率よくプラスミドを構築することに成功した。さらに、この方法を応用し、網羅的に *K. marxianus* 由来の遺伝子と *yEGFP* 遺伝子との融合遺伝子を構築することが可能であった。これらの結果より、このクローニング法は酵母の遺伝子操作を迅速かつ簡易に行う上で有効な手段であることを示している。

【論文審査結果の要旨】

本研究では産業的に有用な酵母菌 2 種に対して、それぞれの酵母菌の特徴を踏まえ、それを克服あるいは活用することで、網羅的レベルで応用可能な遺伝子操作技術の開発を行った。

酵母 *Saccharomyces pastorianus* は下面発酵ビール酵母とも呼ばれ、ラガータイプのビール生産に普遍的に使用される酵母である。しかし、劣性変異の取得ができないことから優良株の育種が全く進んでいない。劣性変異株が取得できないのは、*S. pastorianus* の染色体構造が *S. cerevisiae* と *S. bayanus* の異型 4 倍体であることに起因していると考え、遺伝子工学的な標的遺伝子の破壊と染色体間の組換えを組み合わせることで劣性変異株を得る方法を考案した。*URA3* 遺伝子をターゲットとして *S. cerevisiae* と *S. bayanus* のそれぞれ一方の遺伝子を遺伝子工学的に破壊し、この酵母からウラシル要求性株を得ることに成功した。*S. pastorianus* で栄養要求性という劣性変異株を初めて獲得したことはもちろんであるが、*S. cerevisiae* と *S. bayanus* の遺伝子間にある程度の相同性があるにもかかわらずこれらの染色体間では組換えが起こらないことも証明したことになる。このことは異型 4 倍体の *S. pastorianus* において、*S. cerevisiae* と *S. bayanus* の染色体が安定して維持されている理由でもあると考えられる。

さらに獲得したウラシル要求性 *S. pastorianus* に対して、*ATF1* 遺伝子のプロモーターを置換して香りの特性が改善されたビール酵母を構築した。この時の遺伝子置換方法は、PCR と形質転換だけの非常に簡便な方法であることから、*S. pastorianus* の全遺伝子を対象とした遺伝子操作が可能であることを示している。

酵母 *Kluyveromyces marxianus* は高温でエタノール生産ができることから、省エネ低コストのエタノール生産への利用が期待されている。この酵母が非相同末端結合という DNA 末端を結合する能力が高いことに着目し、*K. marxianus* 細胞内で直接組換え DNA を構築できる全く新しい遺伝子組換え法を開発した。非相同末端結合は配列に依存しない DNA 結合機構であるので、これまで組換え DNA 構築法に利用できるとは全く考えられていなかった。しかし、非相同末端結合活性の高い *K. marxianus* で、これを介した組換え DNA 構築が可能になれば、*K. marxianus* での網羅的遺伝子解析が可能になる。そこで、いくつかの工夫を組み合わせ、目的の組換え DNA を確実に選択できる方法の構築に成功した。これまで非相同末端結合は DNA 損傷に対する不正確な修復機構として知られていたが、今回得られた結果からは約 90% の正確さで組換え DNA の構築が可能であることも明らかにした。

さらに、実際に、この新規組換え DNA 構築方法を用いて *K. marxianus* ゲノムにコードされる遺伝子の内約 3 千遺伝子の GFP 遺伝子との融合遺伝子を構築し、それらの局在を観察することで、開発した方法が網羅的遺伝子操作に利用できることを証明した。非相同末端結合は生物に広く保存されている修復機構であるので、他の生物での汎用性も期待できる。

全遺伝子を対象とする網羅的な遺伝子操作は生物の理解のための大きな武器となる。本研究では、産業的に有用な 2 種の酵母の特徴を理解して両酵母でこれを可能にしたことから、これら産業用酵母の利用を発展させる

うえで価値が高い。

公聴会における主要な質問内容は、新規に開発した *K. marxianus* の組換え DNA 構築法の応用に関するもの、*S. pastorianus* および *K. marxianus* での遺伝子操作方法の効率に関するもの、既存の組換え DNA 構築法やゲノムレベルの遺伝子操作法と比べての利点や問題点に関するものなどであった。いずれの質問に対しても学位申請者からの的確な回答がなされた。

以上より、本論文は新規性、独創性、実用性いずれも非常に優れており、博士の学位論文に十分に値するものと判断した。