

Saccharomyces sensu stricto における ゲノム工学的育種の可能性

金子 嘉信*・原島 俊

生物はゲノムを多様化させ、その能力を巧妙に創生、変化させながらさまざまな環境に適応し、この地球上に存在し続けている。我々人類もその一員として地球上に存在し続けるためには、いろいろな生物の仕組みをもっと学び、理解して、さまざまな分野に活用して共存共栄をはかることが大切である。食品産業で重要な微生物の1つである *Saccharomyces cerevisiae* は、真核生物で最も早くゲノム塩基配列が解読され、基礎生物学でも重要なモデル生物の1つである。この *S. cerevisiae* を含む *Saccharomyces sensu stricto* と呼ばれる近縁種酵母のゲノム解析結果が最近続々と報告され、その成果の1つとして酵母の進化史がひもとかれようとしている。そして、そこには新しい育種技術開発のヒントもありそうである。本稿では *Saccharomyces sensu stricto* を中心とする最近のゲノム解析の成果を概観し、育種のためのゲノムデザインの可能性を考えてみたい。

Saccharomyces sensu stricto とは

まず、*S. cerevisiae* を含む近縁種酵母の分類学的変遷¹⁾から紹介する。*S. cerevisiae* は酵母の分類書として有名な *The Yeasts, a Taxonomic Study* の初版から登場している。表1に示すように1970年には41種の *Saccharomyces* 酵母のうち、属の基準種 *S. cerevisiae* を含めた非常に近縁な酵母17種を狭義の *Saccharomyces* 酵母として認識し、現在 *Zygosaccharomyces* や *Torulaspora* などに帰属している酵母種と区別して *Saccharomyces sensu stricto* と呼んだ。1984年

にはその17種間で交配性があることや種の区別の基準にしていた糖発酵性の表現型が変化しやすいことなどから1つの種 *S. cerevisiae* に統合されたが、DNA-DNA 再会合実験および厳密な交配実験の結果から、あらためて種としての区別を行い、1998年の第4版による分類では4つの種、すなわち *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus* が *Saccharomyces sensu stricto* として記載された。この4種のうち、*S. pastorianus* は *S. bayanus* と *S. cerevisiae* が交雑した異質四倍体 (allotetraploid) を起源として誕生したと考えられている種で、後述するように実際に遺伝子レベルと染色体レベルで両種のハイブリッドタイプであることが確認されている。2000年には新たに3種の同胞種が報告され、現在では *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* を加えた7種が *Saccharomyces sensu stricto* とされている。*S. uvarum* を *S. bayanus* から独立させて、8番目の種として復活させる提案もされている。このように *Saccharomyces sensu stricto* に含まれる酵母は一時期すべて同一種とされたほど非常に近縁な種であり、同胞種 (sibling species) と呼ばれる関係にある。これらの種間では接合による雑種株が得られ、胞子形成も進行するが、その子嚢胞子の生存性がない。

18S rDNA 配列による系統樹解析²⁾によると *Saccharomyces* 酵母は系統樹の枝が他の属の酵母と混じっている不均一な属であるが、同胞種関係にある *Saccharomyces sensu stricto* は1つの系統枝クラスターとしてまとまっている。*Saccharomyces* 酵母にはこれ以外に *Saccharomyces sensu lato* と呼ばれるグループが知られている。これらは *Saccharomyces sensu stricto* ほどの系統的なまとまりはなく、rDNA 系統樹では他の属酵母と混在してかなり広い範囲に広がっている。

Saccharomyces sensu stricto のゲノム進化

ゲノム倍加仮説とゲノム多様化 *S. cerevisiae* ゲノムの中に多くの重複遺伝子領域を見いだした Wolfe と Shields は、*S. cerevisiae* の祖先種酵母でゲノムの倍加と染色体の大規模再編成が生じて現在の *S. cerevisiae* に進化してきたという単純明快な仮説を提出した。³⁾ つまり、*Saccharomyces sensu stricto* は、共通祖先酵母が *Kluyvero-*

表1. *Saccharomyces sensu stricto* を構成する酵母種の変遷

1970 年	1984 年	1998 年	2000 年
<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>S. bayanus</i>		<i>S. bayanus</i>	<i>S. bayanus</i>
<i>S. chevalieri</i>		<i>S. paradoxus</i>	<i>S. paradoxus</i>
<i>S. diastaticus</i>		<i>S. pastorianus</i>	<i>S. pastorianus</i>
<i>S. italicus</i>			<i>S. cariocanus</i>
<i>S. norbensis</i>			<i>S. kudriavzevii</i>
<i>S. uvarum</i>			<i>S. mikatae</i>
他 10 種			

* 著者紹介 (代表) 大阪大学大学院工学研究科応用生物工学専攻 (助教授) 〒565-0871 吹田市山田丘2-1
TEL. 06-6879-7422 FAX. 06-6879-7421 E-mail: kaneko@bio.eng.osaka-u.ac.jp

myces 酵母の祖先と種分化した後、約1億年前にゲノムを倍加して四倍体となり、その後の転座、逆位、欠失などの染色体の再構築によりゲノムの多様化を進め、現在の7つの酵母種 (*S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus*) に進化してきたと考えている。2003年には、Kellis ら⁴⁾と Cliften ら⁵⁾の2グループによって *Saccharomyces sensu stricto* 4種 (*S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. bayanus*) および *Saccharomyces sensu lato* に含まれる *S. castellii* と *S. kluyveri* の全ゲノム塩基配列がほぼ解読された。これにより *Saccharomyces sensu stricto* 内のゲノム多様化について全配列レベルでの検討なされた。今までに検出されている染色体の大きな構造変化は転座、逆位、重複そして欠失で、ゲノム中に散在しているトランスポゾンTy、重複 tRNA あるいはリボソームタンパク質の重複遺伝子の相同配列を利用した組換えによって生じたと推定されている。⁴⁾ 200アミノ酸以上をコードする遺伝子を調べてみると1つの種にしか存在しない、つまり種特徴的な遺伝子が53個見つかった。⁴⁾そして、これらの遺伝子はテロメアあるいはTy付近に多く見られる。また、共通に存在する遺伝子でも塩基配列の変化が早い遺伝子と遅い遺伝子がこれら近縁な同胞種内でも見られる。⁴⁾

重複遺伝子領域はゲノム全体が倍加して生じたという考え以外に、染色体セグメントとして限定された領域が数多く増幅されて生じたという説も提案されている。しかし、全ゲノム倍加説を強く支持する証拠が最近報告された。Kellis ら⁶⁾と Dietrich ら⁷⁾はゲノムが倍加する前に *Saccharomyces sensu stricto* 祖先種と種分化した系統と考えられる *Kluyveromyces waltii* と *Ashbya gossypii* のゲノムをそれぞれ解読し、染色体上の遺伝子配置が *S. cerevisiae* との間でどのくらい保存されているかを詳細に調べた。その結果、*K. waltii* の8本の染色体あるいは *A. gossypii* の7本の染色体は異なる2本の *S. cerevisiae* 染色体に見つかるシンテニー領域を組み合わせていくことによりほぼ完全に再構築することができた。この事実を染色体セグメント増幅機構で説明することはむずかしく、全ゲノムの倍加が起こったことを強く支持している。

フランスの半子囊菌酵母ゲノムプロジェクト⁸⁾では、*S. cerevisiae* 以外の13種の酵母についての部分的なゲノムランダムショットガン解析や *Candida glabrata*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica* の完全ゲノム解読⁹⁾の成果が出ており、これら酵母のゲノム進化が推定できるようになった(図1)。3~6億年前に

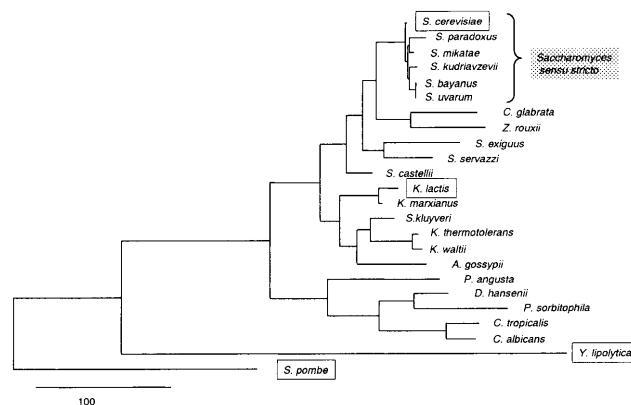


図1. 子囊菌酵母の25S rDNA配列による系統樹(文献9のFigure S7より改変)

Schizosaccharomyces pombe 系統と種分化した半子囊菌酵母祖先種はイントロンやDNAトランスポソンの削減によりゲノムサイズを節約した系統とそのまま維持した *Y. lipolytica* 系統に分かれ、ゲノムサイズを減少させた系統は *S. cerevisiae* タイプのセントロメアと *MAT* 遺伝子カセットシステムを持つ系統へと種分化した。さらにその後、ゲノムを倍加させた *Saccharomyces sensu stricto* 系統とあまり遺伝子を重複させなかった *K. lactis* 系統へと種分化した。*Saccharomyces sensu stricto* ではゲノム倍加の後にゲノム縮重あるいはゲノム再編成に違いが生じ、*S. bayanus* が最も早く *S. cerevisiae* と分岐したと推定されており、一方 *S. pastorianus* はすでに分岐した *S. cerevisiae* と *S. bayanus* の異質四倍体の系統から進化してきたことがラガービール酵母のゲノム解析からも強く支持されている。二倍体でホモタリック株が多いワイン酵母では、ホモタリズムによる劣性変異のホモ接合化によって「ゲノム更新 (genome renewal)」が起こり、ゲノム多様化が進行するという考えが提案されている。¹⁰⁾

種間雑種形成によるゲノム多様化 本特集で中尾と 芦刈が報告しているように、ラガービール酵母 (*S. pastorianus*) ゲノムは単純な *S. cerevisiae* と *S. bayanus* 2系統ゲノムの共存ではなく、両者のキメラ染色体や一部を大きく欠失した染色体なども存在するゲノム構成になっていることが明らかになった。したがって、酵母においても種間雑種形成によりゲノムの多様化が促進されていると考えられる。一方、我々も *S. bayanus* と *S. pastorianus* について、複数遺伝子の RFLP 解析や PCR 解析などによりゲノム構成を推定したところ、*S. bayanus* (Sb) タイプ、*S. cerevisiae* (Sc) タイプ、*S. uvarum* (Su) タイプ、Sb-Sc 混合タイプ以外にも Sb-Su 混合タイプの存在が示唆された。*S. bayanus* 内で少し系統が分かれかけてい

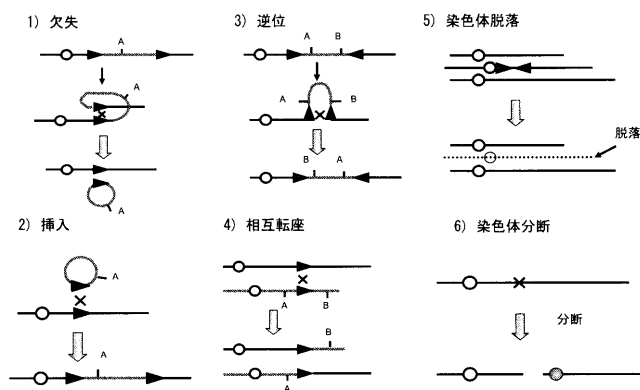


図2. 染色体改変単位操作技術の概念図. 1) から5) の黒三角印は部位特異的組換えシステムの標的配列を示す.

るようである. そして, *S. bayanus* 基準株は *S. uvarum* ゲノムが共存する雑種タイプの系統であることがわかってきた.

ゲノムの先祖返り・進化促進技術

欠失, 挿入, 逆位, 相互転座, 染色体脱落, 染色体分断などの大規模な染色体構造変化が自然に生じることが知られているが, *S. cerevisiae* ではこれらの染色体構造変化をデザインして構築する基本技術が完成している.¹¹⁾ 図2に示すように部位特異的な組換えシステムを利用して欠失, 挿入, 逆位, 相互転座, 染色体脱落が可能である. また, 染色体分断技術に関しては本特集で杉山らが詳しく紹介している.

前述のように *Saccharomyces sensu stricto* のゲノムでは染色体転座などの染色体構造変化が起こっており, 不稔性の原因の1つでもある. Delneri ら¹²⁾ は染色体転座を人為的に起こして *S. mikatae* ゲノムタイプに改変した *S. cerevisiae* を作製し, *S. mikatae* との雑種株が *S. mikatae* 染色体と *S. cerevisiae* 染色体の多様な組み合わせの染色体混成異数体胞子を生み出すことを報告した. ゲノムを祖先型に改変することより種分化した酵母種間の稔性が回復したことになる. 一方, 染色体の分断化によりゲノム構成の多様化を促進させようという試みも杉山らにより進行中である. また, 染色体を分断した一倍体と正常株とのヘテロ接合株を作製して胞子形成させると, 分断された染色体でも正常な相同染色体との組換えを起こしてもう一方の分断染色体と正常染色体をもつ異数体胞子ができることがわかった (図3). 分断は任意の染色体部位

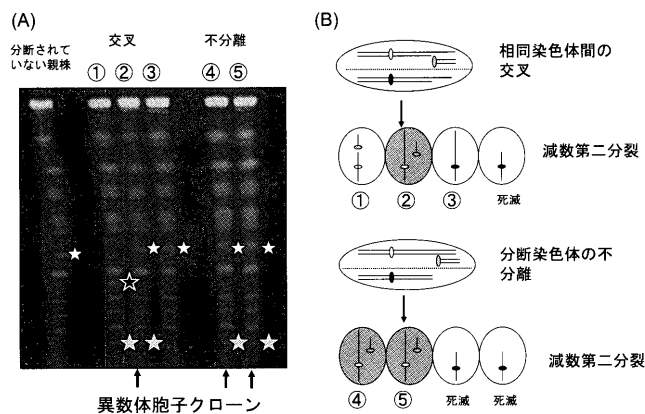


図3. 分断ヘテロ接合二倍体からの異数体胞子クローンの出現. 分断ヘテロ接合二倍体の胞子クローンの電気泳動核型 (A) と減数分裂における分断染色体の予想分配パターン (B). 星印は第XI染色体とその分断染色体を示す.

で起こすことができるので, 任意の分断染色体を余分にもつ部分異数体をデザインして作製することができるわけである.

ゲノムの倍加あるいは遺伝子の重複はヒトやマウスなどの動物, シロイヌナズナなどの植物でもその痕跡が見られ, ゲノム進化の1つの機構である. 酵母でも倍加したゲノムはさまざまな構造変化を起こし, 細胞機能の多様化を引き起こしてきたと考えられる. 酵母の能力向上にゲノムの構造的な面がどのように寄与するかはまだ未知であるが, ゲノム解析情報とゲノム工学技術を活用すれば, 自然で起こっているゲノム多様化・種分化を模倣し, 新しい育種技術へと展開できるのではないだろうか.

文 献

- 1) Rainieri, S. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **96**, 1 (2003).
- 2) James, S. A. *et al.*: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**, 453 (1997).
- 3) Wolfe, K. H. and Shields, D. C.: *Nature*, **387**, 708 (1997).
- 4) Kellis, M. *et al.*: *Nature*, **423**, 241 (2003).
- 5) Cliften, P. *et al.*: *Science*, **301**, 71 (2003).
- 6) Kellis, M. *et al.*: *Nature*, **428**, 617 (2004).
- 7) Dietrich, F. S. *et al.*: *Science*, **304**, 304 (2004).
- 8) <http://cbi.labri.fr/Genolevures/index.php>
- 9) Dujon, B. *et al.*: *Nature*, **430**, 35 (2004).
- 10) Mortimer, R. K.: *Genome Res.*, **10**, 403 (2000).
- 11) 松崎浩明ら: 酵母研究技法の新展開, p. 49, 学会出版センター (1991).
- 12) Delneri, D. *et al.*: *Nature*, **422**, 68 (2003).