

高次倍数体酵母の新しい育種技術とその応用

102

(大阪大・工・醗酵) 原島 俊・高木敦子・大嶋泰治

1) 目的

酵母の実用株には高次倍数体が多い。倍数体化は細胞の持つ様々な活性に、質的あるいは量的な変化を引き起こす。例えば、果實の遺伝背景の細胞が合体した雑種倍数体であれば、両親の形質からの質的な変化が期待されるであろうし、同質の遺伝背景のものの倍数体化によ、例えば、細胞容積や表面積の増大による栄養物や酸素吸収速度、あるいは一定培養容量における細胞数の変化などが予想される。こうした倍数体化の生物活性に及ぼす影響をできるだけ正確に評価し、その生物学的意味を問うには、同質の遺伝背景を持ち、倍数性のみ異なる株を用いて実験を行う必要がある。交雑や細胞融合技術の確立により、雑種倍数体の作成は、比較的容易であるにもかかわらず、同質倍数体についての効率の良い作成技術は未開発であった。

最近、我々はプロトプラスト法による形質転換体の中に、しばしば親株より大きい細胞から成るものがあることに気がついた。この知見が、同質遺伝背景の高次倍数体やさらには後述の実用株間の雑種倍数体の作成に利用できると考え、まずこの現象の定量化を行った。

2) 形質転換付随細胞融合¹⁾

形質転換に付随して起こる細胞融合を利用して、同質あるいは雑種倍数体を得るためには、形質転換体中の細胞融合体頻度が、かなり高いことが必要である。これを求めるため、以下の2つの実験法を工夫した。まずi) 栄養的に相補する同型接合型一倍体2株のプロトプラストを混合後、酵母プラスミドで形質転換を行い、形質転換体中に出現する細胞融合体の頻度を調べた。その結果、形質転換と細胞融合が独立に起こると仮定した時の頻度、 10^5 の 10^4 倍の頻度、約10%~60%で雑種融合体が出現した。そこで、同じ表現型を持つ細胞融合間の自己融合体をも考慮し得る計算式を二項分布関数を基に誘導し、真の細胞融合体頻度を算出したところ、10%~100%の値を得た。さらに、混合2株に異なった細胞質遺伝子符号を付与し、形質転換体中の細胞質混合頻度を調べたところ、6%~81%の値を得た。核融合体の場合と同様同じ表現型細胞間の細胞質混合の頻度も考慮して、真の細胞質混合体頻度を算出したところ、6%~93%であった。又、各実験ごとの核融合体と細胞質混合体の頻度を合計すれば、96%~100%であった。

次に、ii) 二倍体以上の核相を持つば孢子形成能を示す一倍体突然変異株(sin^-)を用い、自己融合体をも検出できる系で形質転換を行った。形質転換体の中で孢子形成能を示すものの割合を調べたところ、26%~90%の値を得た。これらの結果より、酵母の形質転換体は、そのほとんどが核融合体あるいは細胞質混合体であり、この現象を利用して同質遺伝背景を持つ倍数体、果實2株間の細胞質混合体、さらには、選択符号を持たないため従来の細胞融合法では育種できない実用株間の雑種倍数体を効率良く作成し得るものと考えた。

4 シンポジウム (酵母の育種)

3) 形質転換付随細胞融合法による同質遺伝背景を持つ高次倍数体酵母の作成²⁾

実際に、同質遺伝背景の倍数体株の選択を形質転換法を試みた。すなわち、単一の一倍体株をプラスミドにより形質転換し、任意に選んだ形質転換体の細胞の大きさを観察した。その結果、容易に二倍体と思われる株を見出すことができ、DNA含量測定・遺伝解析により、これらの倍数性を確認した。この二倍体株よりプラスミドを除去し、これを宿主として、再び形質転換を行い、四倍体形質転換株を得た。

4) 形質転換付随細胞融合法の実用株間雑種作成への応用

現在用いられている酵母プラスミドでは、栄養要求符号による選択が行われており、形質転換体を得るには宿主が要求性符号を持つことが必須条件である。形質転換体のほとんどが細胞融合体であることがわかっている。たのび、大腸菌のAmp^r、Tc^r符号のように、野生株にも適用できるプラスミド選択符号が酵母にもあれば、清酒酵母、パン酵母、アルコール酵母など、要求性符号を持たない実用株についても、混合形質転換により雑種作成が可能であろう。最近、真核細胞に広い作用域を示す抗生物質G418が、*Saccharomyces rouxii*など酵母にも抗菌作用を示し、これが大腸菌由来のカナマイシン耐性遺伝子産物により不活性化されることが明らかにされた。そこでG418耐性符号と、我々の"形質転換付随細胞融合法"を組合せれば、実用株間の雑種を効率よく作成する技術を開発し得ると思われる。しかし、*S. cerevisiae* は、一般にG418に耐性度が高いなど、いくつかの問題点もあり、今後の展望とともに若干の考察を行う。

5) 倍数体化が醗酵速度、比増殖速度に及ぼす影響³⁾

我々が倍数体酵母の研究を始めた最初の動機である実用株に倍数体が多い理由を明らかにするため、同質遺伝背景を持つ倍数体株を用い、比増殖速度、醗酵速度を調べた。その結果、各倍数体間では、有意な差は見られなかった。しかし、2種の倍数体シリーズ株、S系とT系より、S/T (S, Tは1ゲノムセット)、S/S/T/T株を作成し、S/S、T/T及びS/S/S/S、T/T/T/T株と、一定培養当たりの醗酵速度を比較したところ、S/T、S/S/T/T株間では差が見られないのに対し、雑種はいずれも速い醗酵速度を示した。これより、実用株で高次倍数体が多く選択されたのは、同質遺伝背景の細胞の倍数体化による細胞の物理的因子の変化が有利に働くからではなく、質的に異なった多くの遺伝情報を持つことが出来ることによると考えられた。

6) 倍数性とプラスミドコピー数の関係

細胞の持つ様々な活性のつかには、醗酵速度や比増殖速度の他にも倍数性との関係が興味を呼び起すものが多い。上記のテーマについて、一般講演で、高木らが発表する。

文献

- 1) Harashima, S., Takagi, A., Tada, H. and Oshima, Y.: Genetics of Industrial Microbiology. p148 (1982).
- 2) Takagi, A., Harashima, S. and Oshima, Y.: Appl. Environ. Microbiol. **45**, 1034 (1983).
- 3) Takagi, A., Harashima, S., and Oshima, Y.: Jpn. J. Genet. **56**, 639 (1981).