

メタノール資化酵母の接合型変換機構を利用した人工接合型変換システム構築の試み

前川 裕美
九州大学大学院 農学研究院

研究の目的

代表的なモデル酵母である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* および分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* に見られるように、酵母の中にはホモタリック（自家生殖が可能）な性サイクルを持つ種または株と、有性生殖には異なる接合型の同種細胞を必要とするヘテロタリックがある。一般に有性生殖は進化適応に有利であることから、ホモタリックの方が菌株の育種に有利であると考えられる。

酵母の接合型（性）は接合型遺伝子座 *MAT* により決定される表現型であり、*S. cerevisiae* および *S. pombe* は接合型変換を行うことによりホモタリックであることが知られている。*S. cerevisiae* の接合型変換機構は詳細な分子機構が知られている（図1）¹⁾。一方、進化的にやや遠いメタノール資化酵母 *Ogataea polymorpha* では、異なる分子機構によりホモタリックになっていることが明らかになった^{2,3)}。*O. polymorpha* は同一染色体上の2つの *MAT* 配列が存在するが、一方のみが転写活性を持つ。*MAT* に隣接する逆向き反復配列（IR）間領域に染色体逆位が誘導され、接合型が変換される。*S. cerevisiae* と比べて必要な *MAT* 配列が少ないことから、*O. polymorpha* の接合型変換機構を人工接合型変換システムのモデルとして、染色体逆位反応に必要な因子の同定と重要な *MAT* 周辺のゲノム配列の特徴を明らかにすることを試み、分子機構の解明を目指した。

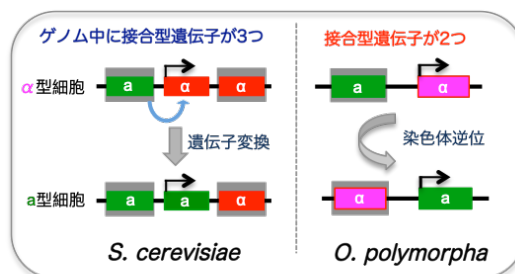


図1 酵母の接合型変換機構

方法および結果

O. polymorpha の接合型変換は栄養飢餓条件でのみ誘導されるが、転写因子 Rme1 を構成的に発現することにより栄養増殖中でも接合型変換が誘導することができる⁴⁾。詳細な分子機構の解析のためには、栄養条件に依存せず染色体逆位を誘導できる実験系が必要であるため、*RME1* 遺伝子と AID デグロン・システムを組み合わせたが、Rme1 発現の ON/OFF の制御は不完全であった。そこで、Tet プロモーターによる転写レベルでの誘導・抑制システムの構築を行った。*S. cerevisiae* の Tet ON/OFF システムは *O. polymorpha* では機能しなかったが、種由来のプロモーターおよび転写抑制因子を用いることにより *O. polymorpha* で機能するシステムを構築することがで

きた。現在、*O. polymorpha* Tet-OFF システムを用いて *RME1* 遺伝子発現制御株の構築と条件の検討を進めている。

また、接合型変換の分子機構を解明するために、IR 間の染色体逆位反応に必須の因子の同定を試みた。これまでに接合型変換に必要な因子として Rad51, Rad52, Rad17 が同定されており、染色体逆位には DNA 相同組換え・修復機構が働いていると考えられる（前川、未発表）⁵⁾。そこで、DNA 相同組換え・修復や複製に関与すると考えられる遺伝子を候補遺伝子として、遺伝子欠失変異株を作製し、接合型変換に欠損または亢進が見られるかを検証した。その結果、*rad24*, *mec3*, *ddc1*, *mph1*, *mus81* 変異株では接合型変換が不能であることを見出した。また、ChIP 解析により、Rad52 が栄養飢餓条件で IR 配列に集積することが示唆された。

続いて、MAT 遺伝子座近傍の DNA 配列や染色体構造に注目した。反復配列の向きが影響を与えるかを検討するために、一方の IR を反転させ、順向き構造を持つ株を作製した（図 2）。この MAT-DR 株では野生型で起こる染色体逆位と同等の反応が起こると、IR 間の配列が欠失すると予想される。MAT-DR 株は栄養増殖時には欠失は起こらなかったが、栄養飢餓条件で誘導された。*mph1* 変異株では逆向き IR 間の逆位、順向き IR 間欠失に欠損が見られたが、*mus81* 変異株は順向きの場合の IR 間配列欠失には欠損を示さなかった。この結果から、構造特異的なエンドヌクレアーゼは接合型変換制御の標的ではないと考えられる。

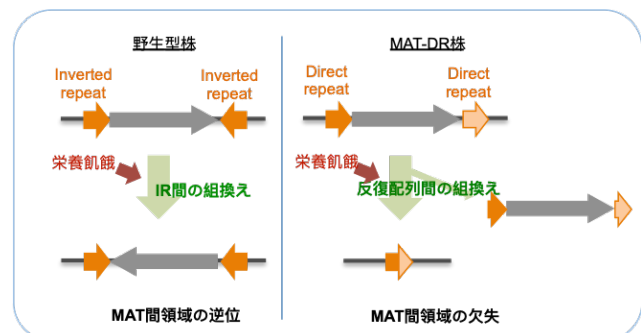


図 2 接合型遺伝子に隣接する反復配列が逆向きの株（野生型）と順向きの株（MAT-DR株）のMAT周辺領域の構造

結論

O. polymorpha の接合型変換に必須の因子として、既知の Rad51, Rad52, Rad17 に加えて、Rad17 複合体構成因子である Ddc1 および Mec3、Rad24、Mph1、Mus81 を同定した。Rad52 蛋白質が栄養飢餓条件で染色体の IR 付近に集積することから、栄養飢餓下では IR または近傍に二重鎖切断などの DNA 損傷が生じることが示唆された。これらの結果から、IR 配列での二重鎖切断修復時に Crossover が誘導されるという分子機構が働く可能性が考えられるが、*S. cerevisiae* では組換え抑制因子である Mph1 ヘリカーゼが *O. polymorpha* の接合型変換には必須であることから⁶⁾、異なる分子機構が働いている可能性が示唆された。

染色体構造の影響の解析はまだ途上であるが、MAT-TR 株の解析から反復配列の向きは組換え反応の制御に影響を与えないことが分かった。MAT 間領域には必須遺伝子が存在するため、MAT-TR 株は MAT 間配列を欠失すると生育不能となることを

利用して、接合型変換不能変異株のスクリーニングが可能である。網羅的なスクリーニングにより、接合型変換に必須の遺伝子群を網羅的に同定することが、今後の詳細な分子機構の解明につながると考えられる。

また、本研究過程で *S. cerevisiae* で用いられている Tet-ON/OFF システムを改変することにより、*O. polymorpha* で利用可能な遺伝子発現誘導系を構築しており、このシステムを活用した詳細な解析が可能になった。

文献

- 1) Haber, J. E. (2012) Mating-Type Genes and MAT Switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **191**: 33–64.
- 2) Maekawa, H., Kaneko, Y. (2014) Inversion of the chromosomal region between two mating type loci switches the mating type in *Hansenula polymorpha*. *PLoS Genet.* **10**: e1004796.
- 3) Hanson, S. J., Byrne, K. P., Wolfe, K. H. (2014) Mating-type switching by chromosomal inversion in methylotrophic yeasts suggests an origin for the three-locus *Saccharomyces cerevisiae* system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**: E4851–8.
- 4) Yamamoto, K., Tran, T. N. M., Takegawa, K., Kaneko, Y., Maekawa, H. (2017) Regulation of mating type switching by the mating type genes and RME1 in *Ogataea polymorpha*. *Sci. Rep.* **7**: 16318.
- 5) Hanson, S. J., Byrne, K. P., Wolfe, K. H. Flip/flop mating-type switching in the methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha* is regulated by an Efg1-Rme1-Ste12 pathway. *PLoS Genet.* **13**: e1007092.
- 6) Prakash R1, Satory D, Dray E, Papusha A, Scheller J, Kramer W, Krejci L, Klein H, Haber JE, Sung P, Ira G. (2009) Yeast Mph1 helicase dissociates Rad51-made D-loops: implications for crossover control in mitotic recombination. *Genes Dev.* **23**: 67-79