

Title	Development of a novel technology for genome engineering and genome-wide construction of a series of segmental aneuploids in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Author(s)	Natesuntorn, Waranya
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/53981
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

Abstract of Thesis

Name (Waranya Natesuntorn)

Title

Development of a novel technology for genome engineering and genome-wide construction of a series of segmental aneuploids in *Saccharomyces cerevisiae*
(出芽酵母におけるゲノム工学技術の開発とゲノムワイドな部分異数体の構築)

Abstract of Thesis

Segmental aneuploidy is one of prominent genome rearrangements and is associated with both adverse and beneficial effects in different organisms. An interesting question is whether, and if so, how segmental aneuploidy is related to phenotypic alterations. However, study of segmental aneuploids is restricted by the difficulty of creating them in a designed manner. This prompted us to design a new approach to overcome this problem. In this study, a new genome engineering technology for generation of segmental aneuploidy in a designed way was established which was named PCR-mediated chromosomal segmental duplication (PCDup) technology. The method like PCDup has never been reported in any kind of organisms. PCDup technology could duplicate any selected chromosomal regions by means of a PCR, followed by a single transformation. Sizes of duplicated regions were up to 300 kb. Moreover, those newly generated chromosomes were stable during several rounds of mitosis. To study the biological significance of segmental aneuploidy, construction of a complete library of segmental duplication of approximately 100-kb to 200-kb region that covered the whole *S. cerevisiae* genome was attempted. The result showed that 53 out of 62 designated regions were duplicated with desired karyotype in a proportion of 3% to 100% of analyzed transformants. Nine regions in the genome could not be duplicated. Next, the phenotypes of segmental aneuploid strains in stressful environments were investigated as this might provide insights into the function of the duplicated region. The result revealed that some of segmental aneuploids displayed tolerance to stresses such as high temperature, high ethanol content and strong acidic pH, while in others segmental aneuploid showed stress sensitivity. In the majority of cases, a removal of the duplicated chromosome resulted in back to the parental phenotype, suggesting that the changes in phenotype in segmental aneuploids were associated with the duplicated chromosomal regions. Since duplication of only single specific gene on the duplicated regions is not reported to confer phenotypic alterations observed in this study, phenotypic changes are presumably the result of the combination of simultaneous increases in dosages of multiple genes located on the duplicated region. It should be emphasized that this new collection of *S. cerevisiae* haploid yeast strains with designed duplication of specific chromosomal regions should be valuable resources for studying the association of segmental aneuploidy with particular traits. In conclusion, the PCDup technology is a simple, efficient, rapid and economic tool for creation of segmental aneuploidy with defined region in *S. cerevisiae* to broaden the knowledge about segmental aneuploidy and its consequences. It can be used as a technology not only for studying basic bioscience but also breeding novel yeast strains with desired properties for industrial purposes.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (Waranya Natesuntorn)			
	(職)	氏	名
論文審査担当者	主 査	教授	福井 希一
	副 査	教授	仁平 卓也
	副 査	教授	福崎 英一郎
	副 査	教授	渡邊 肇
	副 査	教授	村中 俊哉
	副 査	教授	紀ノ岡 正博
	副 査	教授	藤山 和仁
	副 査	教授	永井 健治
	副 査	准教授	杉山 峰崇

論文審査の結果の要旨

本研究は、出芽酵母におけるゲノム工学技術の開発と、それを利用したゲノムワイドな部分異数体の構築およびそれらの表現型解析を目的とし、その研究成果をまとめたものであり、緒論（第1章）、本文（第2章、第3章）、総合討論（第4章）からなっている。

第1章では、ゲノム工学技術の開発の歴史および生命科学・生物工学への利用についての説明の後、染色体の重複など染色体数の異常を示す異数性と多細胞生物における疾患や真核単細胞生物である出芽酵母における細胞特性との関連についてのこれまでの知見が述べられている。そして、染色体の任意領域の重複を持つような部分異数体細胞を簡便に作成することができれば、疾患や細胞特性との関連を解析することが可能となり、ゲノム機能の解析や産業酵母の育種にもつながることが述べられている。しかし、現状では、いかなる生物においても部分異数体細胞を簡便に作成する技術が確立されていないことも述べられており、本研究の目的と意義を明確にしている。

第2章では、出芽酵母を用いて染色体の任意領域の部分重複を可能にする技術、PCR-mediated chromosome duplication technology (PCDup) の確立について述べられている。この技術は、PCRで調製される2つの短いDNA断片を酵母細胞に導入することにより、簡便に染色体の任意領域を2コピー化（重複）する技術である。相同組換えのための標的配列と選択マーカー（場合によりセントロメア配列も付加）およびテロメアシード配列からなる2つのDNA断片を酵母細胞に導入すると、それぞれのDNA断片と相同な標的配列間で組換えが起こり、標的配列間の染色体領域が独立した染色体として生成され任意領域が重複される。その重複効率は形質転換体の10%から30%であり、重複した領域から成る染色体の安定性もほぼ100%である。重複可能な染色体長を調べるために、50 kbから400 kbまでの領域の重複を試みており、重複可能な最大の長さは、おおよそ300 kbであることを明らかにしている。また、正確に2コピー化されているかどうかを調べており、調べた限りではほぼ正確に2コピー化されていることも明らかにしている。これらの結果より、世界で初めて簡便に、染色体任意領域を重複させ部分異数体を作成する技術の開発に成功している。

第3章では、開発したPCDup技術を利用して、1倍体出芽酵母のゲノム全域を200 kb毎に重複させた重複株シリーズを作成し、細胞生理との関連や育種への応用について検討している。まず、ゲノム全域を62領域に分け、200 kb毎の重複を試みた結果、62領域中、53領域について重複可能であることを示している。作成した53種の重複株の表現型を解析したところ、多様な表現型を示すことを明らかにしている。例えば、53領域中、9領域の重複が39℃への高温耐性獲得に寄与しており、8領域が8%エタノールへの耐性獲得に寄与していることを見出している。一方、31領域の重複は80 mM酢酸への感受性を引き起こし、4領域の重複は13℃への感受性を引き起こすことも見出している。こうした表現型と染色体部分領域の重複との関連を調べるために、重複染色体を脱落させたところ、調べたうちのほとんどにおいて、脱落株の表現型が親株と同じ元の表現型に戻ることから、染色体部分領域の重複と表現型の変化との間に明確な関連性があることを見出している。観察された表現型の変化は重複領域に存在する遺伝子の単独の重複によるとの報告はないことから、表現型の変化は、特定の遺伝子の重複によるものではなく、重複領域に存在

する複数の遺伝子の重複によるとの考えを提案している。一方、重複を試みた62領域中、重複できなかった9領域についての解析から、これらの領域には重複を阻害する遺伝子群が存在することを示唆している。

第4章の総合討論では、本研究で得られた知見をまとめるとともに、PCDup技術の育種への応用およびPCDup技術のさらなる改良などを含む今後のゲノム工学技術の展望を述べている。以上のように、本論文は、簡便かつ効率の良い、染色体任意領域の部分重複技術を開発しただけでなく、部分異数性と細胞特性の関係に多くの知見をもたらしたものである。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。