

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18672

研究課題名(和文) 出芽酵母において染色体間ゲノム操作を可能にする新奇ゲノム工学技術の開発

研究課題名(英文) Development of novel genome engineering technology for inter-chromosomal manipulation in the budding yeast

研究代表者

笹野 佑 (Sasano, Yu)

大阪大学・工学研究科 助教

研究者番号：90640194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：産業酵母に必要とされる有用形質の多くは、数多くの遺伝子により制御されている。そこで、酵母の性質をゲノムスケールで大規模に改変するゲノム工学技術の発展が望まれている。本研究では出芽酵母を対象として、複数の染色体を一度の操作で自在な位置で分断することができる新技術CRISPR-PCS法を開発した。本法により非常に高い効率で染色体分断を行うことが出来るようになり、一度の操作で4か所の染色体を同時分断することに成功した。さらに、本法を応用することで、複数の染色体領域の欠失、重複、置換、転座、融合、環状化を高効率で行うことが可能となった。本技術の応用により、革新的な微生物育種に繋がるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Most useful traits required for industrial yeast strains are regulated by many genes. Thus, development of genome engineering technology for large scale genome manipulation in yeast is desired. In this study, a novel chromosome engineering technology called CRISPR-PCS that enables simultaneous splitting of yeast chromosomes at the targeted sites at a time was developed. With this technology, highly efficient chromosome splitting became possible and we succeeded in quadruple chromosome splitting. In addition, other chromosomal manipulation such as deletion, duplication, replacement, translocation, fusion, and circularization also became possible by applying CRISPR-PCS. It is expected that CRISPR-PCS technology can be applied to innovative microbial breeding.

研究分野：応用微生物学

キーワード：CRISPR-PCS 出芽酵母 ゲノム工学 染色体工学

1. 研究開始当初の背景

微生物を用いた有用物質生産において、目的とする有用物質を高生産ないしは低コストで生産する菌株をいかにして育種するか、微生物に新たな物質を生産する能力をいかにして付与するかは重要な課題である。一方、近年ストレス耐性などの有用形質は多くの場合複数の遺伝子により支配されていることが明らかになってきた。しかし、従来の菌株育種技術では、一度に操作できる遺伝子の数が限られているため、大規模なゲノム操作には限界があった。従って、個々の遺伝子に着目し組換え操作を積み重ねる従来の遺伝子工学による育種技術とは異なり、短時間に多数の遺伝子を一挙に操作することが可能なゲノム工学技術を開発し、これを微生物育種に応用することが望まれていた。

このような背景のもと、申請者らは出芽酵母を対象に染色体の任意の位置で分断し、1本の染色体を2本の機能的な染色体へと分断する技術 PCS 法 (PCR-mediated Chromosome Splitting 法) を開発してきた。本法を用いることで任意染色体領域の欠失 (PCD 法) や重複 (PCDup 法) が可能となり、また PCS 法を応用したゲノム再編成誘導による有用菌株育種技術 (GREO 法) などを開発している。これらの技術は有用なものであるが、一度の操作で一か所の染色体操作しか行うことができないという大きな欠点があった。これにより、複数染色体領域の操作には多大な時間と労力を要し、実用的な技術とはほど遠い状態であった。

2. 研究の目的

本研究では、出芽酵母を対象に染色体上の複数の任意の箇所を一度の操作で一挙に分断する技術の開発を行う。また、染色体分断以外の染色体操作 (欠失、重複、置換、融合、相互転座、環状化など) に開発した方法を適用することで、これら染色体操作を高効率で、ハイスループットに行うことを目的とする。換言すると、一度の操作で、複数箇所の染色体操作を確実に実行することを目的とした。特に、染色体間の相互転座や融合を高効率で行う技術は現在までに開発されていないため、これらの技術の開発を目指した。

3. 研究の方法

一度の操作で複数箇所の染色体操作を行うためには、染色体分断の効率を大幅に向上させることが不可欠である。このために申請者が着目したのが、新奇ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 である。本技術は Cas9 ヌクレアーゼと配列特異性を規定するガイド RNA (gRNA) の作用により、任意の箇所 DNA 二重鎖切断 (DSB) を引き起こすことが出来る技術である。出芽酵母では DSB が発生した箇所近傍の相同組換え活性が数千倍上昇することが知られているため、染色体分断を行いたい箇所の近傍を CRISPR/Cas9 により切断

すれば染色体分断の効率が向上するのではないかと考えた (図 1 参照)。

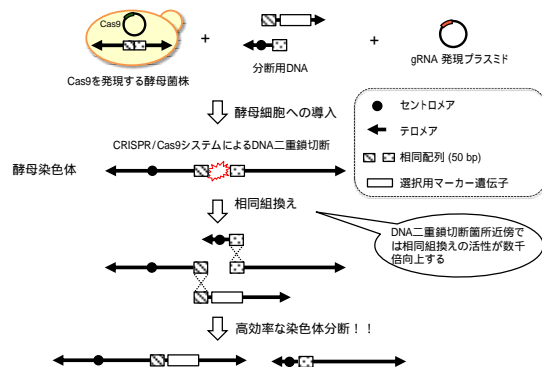


図 1 CRISPR-PCS 法の概略図

4. 研究成果

Cas9 ヌクレアーゼを発現する酵母菌株を構築し、染色体分断用 DNA と分断予定部位近傍を標的に設計した gRNA 発現プラスミドを同時に導入した (図 1)。その結果、得られる形質転換体の数が PCS 法と比較して約 200 倍増加した。得られた形質転換体では目的の箇所のみに分断が起こっており、意図しない Genome rearrangement は観察されなかった。以上より、CRISPR/Cas9 を PCS 法に取り入れることで染色体分断の効率を大幅に向上させることに成功した。そこで本法を CRISPR-PCS 法と命名した。染色体分断効率が向上したことにより、これまで不可能であった、複数染色体の同時分断が可能となった。これまでに最大 4 か所までの同時分断に成功している。

上述したように PCS 法を応用することで任意染色体領域の欠失や重複が可能である。そこで、CRISPR-PCS 法により複数領域の同時欠失や同時重複が可能か検討したところ、一度の操作で少なくとも 4 領域の同時欠失 (CRISPR-PCD 法) や 2 領域の同時重複 (CRISPR-PCDup 法) を行うことに成功した。さらに、他の染色体操作 (相互転座、染色体融合、環状化など) においても CRISPR-PCS 法を適用することにより高効率で行う事が出来ることを示した。特に当初の目的であった染色体間の染色体操作に関しては、自然界では起こりえないタイプの相互転座 (転座後にダイセントリックとアセントリック染色体が生じるタイプの転座) を起こすことができるようになった。

一方、CRISPR-PCS 法では複数箇所の染色体分断操作を行った際に、得られる形質転換体のうち目的とする複数分断が起きた株の割合が低い (50% 以下) という問題があった。目的とする分断が起きていない形質転換株のシーケンス解析の結果、このような株では 2 つの異なる分断用 DNA がマーカーリサイクルのために付加している loxP 配列を介して相同組換えにより融合した状態でゲノムに組み込まれていることが判明した。そこで、

分断用 DNA 間で相同組換えが起きないように loxP 配列を除いた分断用 DNA を作製し、これを用いて複数箇所の同時分断を行ったところ、得られた形質転換体の全てで目的的分断が起きていることを確認した。さらに、分断用 DNA に含まれるマーカー遺伝子による選抜を行わないマーカーフリー染色体分断も可能であることが示された。

以上の研究成果より、CRISPR-PCS 法により今まで不可能であった、複数染色体の同時分断に成功した。これを応用することにより、複数の染色体領域の欠失や重複が可能となり、また、他の染色体操作（置換、転座、融合、環状化など）も高効率で行うことが可能となった。これにより、出芽酵母における染色体工学技術は実用的な水準に達したものと考えられる。開発した CRISPR-PCS 法を用いることで酵母ゲノムを一挙に大規模に改変することが可能となり、今までの技術では得られなかったような革新的な能力を持った菌株及び菌株集団の創製が可能になると考えられ、微生物育種の有用なツールとなることが大いに期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Sasano Y, Nagasawa K, Kaboli S, Sugiyama M, Harashima S. CRISPR-PCS: a powerful new approach to inducing multiple chromosome splitting in *Saccharomyces cerevisiae*. Sci Rep. 6:30278,

DOI: 10.1038/srep30278.

Kaboli S, Miyamoto T, Sunada K, Sasano Y, Sugiyama M, Harashima S. Improved stress resistance and ethanol production by segmental haploidization of the diploid genome in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biosci Bioeng. 121 (6):638-44, 2016.

DOI: 10.1016/j.jbiosc.

Natesuntorn W, Iwami K, Matsubara Y, Sasano Y, Sugiyama M, Kaneko Y, Harashima S. Genome-wide construction of a series of designed segmental aneuploids in *Saccharomyces cerevisiae*. Sci Rep. 5:12510, 2015. DOI: 10.1038/srep12510.

Sasano Y, Yamagishi K, Tanikawa M, Nakazawa T, Sugiyama M, Kaneko Y, Harashima S. Stabilization of mini-chromosome segregation during mitotic growth by overexpression of *YCR041W* and its application to

chromosome engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biosci Bioeng. 119 (5):526-31, 2015. DOI: 10.1016/j.jbiosc.

[学会発表](計8件)

笹野佑、多様な染色体操作を可能にする CRISPR-PCS 法の開発と応用展開、第 82 回酵母研究会講演会、2017 年 3 月、神戸

笹野佑、長澤宏器、木村駿太、Kaboli Saeed、中井大志、村山亮太、杉山峰崇、原島俊、CRISPR-PCS 法を基盤とした酵母染色体の多様な操作技術の開発、日本生化学会 2016 年度大会、2016 年 9 月、富山

Yu Sasano, Koki Nagasawa, Shunta Kimura, Saeed Kaboli, Taishi Nakai, Ryota Murayama, Minetaka Sugiyama, Satoshi Harashima, CRISPR-PCS: a versatile chromosome manipulation technology in *Saccharomyces cerevisiae*, 14th International Congress on Yeast, 2016 年 9 月、淡路島

Satoshi Harashima, Minetaka Sugiyama, Yu Sasano, Yeast genome engineering - A new challenge to deciphering genome function and breeding-, 14th International Congress on Yeast, 2016 年 9 月、淡路島

笹野佑、長澤宏器、木村駿太、Kaboli Saeed、中井大志、村山亮太、杉山峰崇、原島俊、出芽酵母において多様な染色体操作を可能にする CRISPR-PCS 法の開発、第 49 回酵母遺伝学フォーラム、2016 年 9 月、神戸

笹野佑、CRISPR 干渉を利用した新規合成致死遺伝子スクリーニング法の開発、第 189 回酵母細胞研究会例会、2015 年 11 月、東京

Yu Sasano, Koki Nagasawa, Saeed Kaboli, Minetaka Sugiyama, Satoshi Harashima, CRISPR-PCS: an Efficient and Versatile Chromosome Splitting Technology in yeast, 27th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, 2015 年 8 月、イタリア

笹野佑、長澤宏器、Kaboli Saeed、杉山峰崇、原島俊、CRISPR-PCS: 多様な染色体操作が可能な染色体工学技術、第 48

回酵母遺伝学フォーラム、2015年8月、
広島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹野 佑 (SASANO, Yu)
大阪大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：90640194

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

原島 俊 (HARASHIMA, Satoshi)
崇城大学・生物生命学部・教授
研究者番号：70116086

杉山 峰崇 (SUGIYAMA, Minetaka)
大阪大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：80379130

(4) 研究協力者

該当なし