

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04475

研究課題名(和文) 染色体分断技術とゲノム編集技術の融合による酵母ゲノム工学の新展開

研究課題名(英文) A new twist of genome engineering technology by integrating CRISPR-Cas9 technology in yeast

研究代表者

原島 俊 (HARASHIMA, Satoshi)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：70116086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム工学は、基礎(ゲノム機能の解明)、応用(有用微生物の育種)の両面で今後の生命科学、バイオテクノロジーの発展に欠かせない研究の推進エンジンである。ゲノムを自在に操作するため、ゲノム編集技術を取り入れ、ゲノムの複数部位の同時分断技術、ゲノムの複数領域の同時削除技術、ゲノムの複数領域の同時重複技術、染色体大規模領域の置換技術の開発を行なった。また、そうした技術を、さらに、ユーザーフレンドリーにするため、ゲノム編集技術における多様なガイド(guide) RNAのデリバリーのための簡便な調製技術の開発も行なった。

研究成果の概要(英文)：Genome engineering could be a prospective research-promoting engine for both basic and applied biosciences. With this basic idea, we have developed a variety of genome engineering technologies. These include one-step chromosome splitting, deletion, segmental duplication and chromosome replacement. In this study, we have further developed these genome engineering technologies by integrating CRISPR-Cas9 genome editing technology. Outcome of these efforts resulted in multiple simultaneous splitting, deletion and duplication of any desired site and regions on chromosome. These achievement accelerates manipulation of genome to reveal not only genome function but also strain breeding for biotechnology.

研究分野：応用微生物学

キーワード：酵母 ゲノム工学

1. 研究開始当初の背景

多くの生物においてゲノムの塩基配列が決定されていた研究開始当初はもちろん、それから3年経過した今日においても、遺伝子間相互作用やネットワーク、合成致死など、高次のゲノム機能についてはまだまだ研究が十分とは言い難い。また、近年、持続的な社会の構築にはバイオによる生産手段が必須と考えられるようになってきたが、そのために必要なゲノム育種技術の開発も、まだまだ不十分である。生産の場で、細胞が曝される多様なストレスへの耐性は多くの遺伝子に支配されていることも明らかとなり、細胞育種には、多くの遺伝子を一挙に操作するゲノム工学技術が必須であることも共通認識となりつつある。こうした研究開始当初の背景のもと、「ゲノム機能の解明(基礎)」と「ゲノム育種(応用)」の両分野をとともに推進できる「研究推進エンジン」として、「ゲノム工学技術」の進展が、今後益々重要性を増してくるものと考えた。

このような基本的な考えのもと、申請者らは、本研究の開始当初の数年前に、ゲノム工学技術のキーテクノロジーとして、PCR技術だけで、染色体を任意の部位で自在に分断できるワンステップ染色体分断技術(PCS: PCR-mediated Chromosome Splitting)を確立し、その後、PCSをキーテクノロジーとして、多彩なゲノム工学技術を開発してきた。また、そうした技術を駆使して、例えば、非必須遺伝子しか存在しないにもかかわらず、ゲノムの多くの領域が酵母細胞の生存に必須であること(*Nucl Acids Res* 2014)、あるいは、「ゲノムの再編成技術」と命名した新しい育種技術によって、従来の変異株分離技術によっては分離できなかったエタノール耐性株を分離できることなどを報告してきた(*J. Appl. Microbiol. Biotech.* 2012)。これまでに、染色体やゲノムを操作する技術は、他生物を含め断片的には報告されてきたが、申請者らのように、キーテクノロジーとしてのPCSと、それをもとにした応用範囲の広い多彩なゲノム工学技術を開発してきたグループは、研究開始当初はもちろん、現在でも存在しない。

しかし、それらのいずれの技術も、ゲノム上の単一部位、あるいは単一領域を対象とした場合には威力を発揮するものの、複数の部

位や複数の領域を同時に操作することには成功していなかった。もし、開発してきた様々なゲノム操作技術(例えば、ゲノムの任意領域の削除技術(PCD: PCR-mediated Chromosome Deletion)や重複技術(PCDup: PCR-mediated Chromosome Duplication)、再編成技術(GReO: Genome Re-Organization)等を、同時に複数の部位や領域を対象として可能なように発展させることができれば、染色体を一挙に多数に分断したり、多数の特定領域を同時に削除したり、あるいは重複したりすることが可能となり、ゲノムの再編成や多様化を短い時間に達成(加速化)することができる。こうした技術の進化は、単に技術の改良に留まらない革新的な効果を、ゲノム操作にもたらすものと考えた。こうした状況が、研究開始当初の状況である。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、本申請では、ゲノム工学技術をさらに発展、拡張するため、我々が開発してきた染色体の分断技術(PCS)、削除技術(PCD)、重複技術(PCDup)に、新しく勃興してきたゲノム編集技術を融合し、これまで達成することができなかった複数領域同時分断技術(CRISPR-PCS)複数領域同時削除技術(CRISPR-PCD)、複数領域同時重複技術(CRISPR-PCDup)の開発を行うことを研究の目的とした。また、これらの技術のハイスループット化(迅速、簡便化)に関わる重要な要素技術である様々なガイドRNA(gRNA)の発現を、共通の鋳型プラスミドを用いてPCRだけで調製する非常に簡便な技術の開発(gRNA-TES: gRNA Transient Expression System)も目的とした。

3. 研究の方法

本研究を始めるまでに開発をしていた染色体任意部位の分断技術(PCS)、染色体任意領域の欠失技術PCD、染色体任意領域の重複技術(PCDup)技術を、PCSでは標的部位に、またPCDとPCDupでは標的領域の両端に、ゲノム編集技術による二重鎖切断を導入入れることにより、従来ではできなかった複数部位や複数領域の染色体操作ができるかどうかを検討する。また、様々な標的に対するgRNAを、ひとつの共通鋳型プラスミドで、PCRによって調製できるプライマーのデザイン戦略を考える。

4. 研究成果

1) ゲノムの複数部位の同時分断技術 (CRISPR-PCS) の開発

「ワンステップ染色体分断技術 (PCS)」に、「ゲノム編集技術」を取り入れることによって、これまで不可能であった染色体複数部位の同時分断を可能とする技術を開発することができるかどうかの検討を行なった。その結果、4カ所の部位の分断が、1回の形質転換で同時にできるようになった。この成果は、Nature の姉妹紙である Scientific Reports 誌 (2016) に発表したが、この成果によって、1本の天然染色体を、一回の形質転換によって5本に分断することができるようになった。その結果、従来、ひとつひとつ分断を続けていくことでしかできなかったため、1本の天然染色体を5本に分断するのに約35日かかっていたが、それが1日できるようになった (確認に要する時間を含めると、1週間程度かかるが、操作そのものは1日で終了する)。

2) ゲノムの複数部位の同時削除技術 (CRISPR-PCD) 法の開発

従来の PCD 技術では成功していなかった染色体2領域の同時削除が、CRISPR/Cas 複合体の発現下において可能となるかどうか試みた。まず、染色体末端領域の2カ所について同時欠失を行ったところ、従来法では全く得られなかった同時欠失形質転換体が、形質転換体総数の約20%の頻度で得られることがわかった。次に、相同組換え部位が倍となるため、より難易度が高くなる染色体内部領域の2カ所同時欠失を試したところ、同じく従来法では全く得られなかった2領域同時欠失形質転換体が約50%の頻度で得られることがわかった。この技術を CRISPR-PCD と命名した。これらの結果より、染色体の末端、内部にかかわらず、少なくとも2領域については、CRISPR-PCD 法によって同時欠失が可能であることがわかった。

3) ゲノムの複数部位の同時重複技術 (CRISPR-PCDup) の開発

従来の PCDup 法では成功していなかった染色体2領域の同時重複が、CRISPR/Cas 複合体の発現下で PCDup 技術を行う事により可能となるかどうか試みた。その結果、形質転換体総数の約40%が、目的の2領域が同時に重複している形質転換体であることが

わかった。この技術を CRISPR-PCDup と命名した。これらの結果から、従来法では実現できなかった染色体2領域同時重複が、CRISPR-PCDup 法によって可能であることがわかった。

4) 染色体大規模領域の削除 (置換) 技術の開発

これまでの研究で、大規模に任意の染色体領域を削除する技術 (PCD 法) を開発してきた。しかしこの技術では削除により染色体数の増加が起こるので正確な表現型の解析には適さない。一方、染色体数の増減を伴わない、従来の削除技術 (PCRep; PCR-mediated Chromosome Replacement) では大規模領域 (>100kb) を削除する事は不可能である。その理由として、削除に用いる DNA モジュールの左端および右端に付加した染色体との相同配列は、ゲノム上で数百 kb と遠く離れており、相同組換えが起こるためには、それら遠く離れた部位が核内で大きなループ構造を形成して近接する必要があるであろうと考えた。こうしたループ構造は、2つの部位が染色体上で遠く離れていればいる程困難と想像される。そこで、この問題を解決する為、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を取り入れ、遠く離れた部位に二重鎖切断を入れることにより、それらの部位が、細胞内で近接可能になる状況を作り出すようにした。こうした条件下で、一体どれくらいの長さまで大規模領域の削除 (置換) が可能かを、二倍体を用いて検討した。その結果、少なくとも500kbの長さの領域を容易に削除できることが明らかになった。

5) guide RNA の簡便なデリバリー技術の開発

我々が開発してきた種々のゲノム工学技術 (分断、削除、重複など) と CRISPR/Cas9 技術を融合して、より強力でユーザーフレンドリーなゲノム工学技術とするためにはいくつかの点を簡便化する必要がある。そのひとつが、多様な標的部位に応じて個々に作成する必要がある gRNA 発現プラスミドの構

築である。これを簡便化するため、共通のプラスミドを鋳型として、どのような標的配列にも応じた gRNA を調製できる技術

(gRNA-TES: gRNA Transient Expression System) を開発した。gRNA-TES は、プラスミドを使用せず、gRNA を一過的に発現する DNA 断片を PCR だけで調製するものである。オーバーラップ PCR の条件、形質転換時に導入する gRNA 発現 DNA 断片量の最適化、使用する DNA ポリメラーゼの種類などを検討し、この技術を最大限に発揮するための最適化条件を確立した。

6) 新規合成致死遺伝子ペアの同定

ゲノム機能を理解する重要な課題のひとつは、合成致死を引き起こす遺伝子ペアの同定である。以前の研究によって、単独で削除しても致死にはならない遺伝子(非必須遺伝子)しか存在しないにもかかわらず、染色体から削除できない 49 領域を見出していた。そこで、本研究では、これら 49 領域のうち長さが小さい 5 領域について合成致死遺伝子ペアを同定することを試みた。5 領域のそれぞれについて、左半分と右半分の領域の削除を試みた結果、Chr9-2 (9 番染色体の左端から 2 番目の 14.4kb の領域) の右側領域のみ (7 遺伝子が存在) 削除できなかった。従って、合成致死遺伝子ペアはこの領域に存在し、7 つの遺伝子のうちのいずれかの組み合わせであることが示唆された。一方、他の 4 つの領域については、左側領域の欠失も右側領域の欠失もいずれも致死ではなかったため、合成致死ペアは両領域に分かれて存在することが示唆された。今後は、同様な限定削除解析を繰り返すことによって、最終的には、それら 5 つの領域に存在する未知合成致死遺伝子ペアの同定を目指す。

こうして開発してきた一連のゲノム工学技術は、本研究申請のもととなった *Nucleic Acids Research* 誌(2014 年)の論文、そして、本研究の 1 年目の成果として *Nature* の姉妹

誌である *Scientific Reports* 誌 (2015 年) に発表した論文、さらに 2 年目の成果として同じく *Scientific Reports* 誌 (2016 年) に受理された論文と、毎年 Impact Factor の高い国際誌に発表してきており、当初考えていた以上に研究は進展したと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

- 1) Sasano Y, Kariya T, Usugi S, Sugiyama M, Harashima S. Molecular breeding of *Saccharomyces cerevisiae* with high RNA content by harnessing essential ribosomal RNA transcription regulator. *AMB Express*. (査読有) 2017 7(1):32, 2017. DOI: 10.1186/s13568-017-0330-4.
- 2) Yu Sasano, Satoshi Harashima, CRISPR-PCS Protocol for Chromosome Splitting and Splitting Event Detection in *Saccharomyces cerevisiae*, *Bio-protocol*, (査読有), 7(10), 2017 DOI: 10.21769/Bioprotoc. 2306
- 3) Kitichantaropas Y, Boonchird C, Sugiyama M, Kaneko Y, Harashima S, Auesukaree C Cellular mechanisms contributing to multiple stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential use in high-temperature ethanol fermentation. *AMB Express*. (査読有) 2016 6(1):107. DOI: 10.1186/s13568-016-0285-x.
- 4) Yu Sasano, Koki Nagasawa, Saeed Kaboli, Minetaka Sugiyama, Satoshi Harashima, "CRISPR-PCS: a powerful new approach to inducing multiple chromosome splitting in *Saccharomyces cerevisiae*" *Scientific Reports*. (査読有) 2016, 6:30278. DOI: 10.1038/srep30278
- 5) Sugiyama M Akase SP, Nakanishi R, Kaneko Y, Harashima S. Overexpression of ESBP6 improves lactic

- acid resistance and production in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biosci Bioeng. (査読有) 2016 122(4): 415-20. DOI:10.1016/j.jbiosc.2016.03.010.
- 6) Zhou Y, Yuikawa N, Nakatsuka H, Maekawa H, Harashima S, Nakanishi Y, Kaneko Y. Core regulatory components of the PHO pathway are conserved in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. Curr Genet. (査読有) 62(3):595-605, 2016. DOI: 10.1007/s00294-016-0565-7.
- 7) 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. (査読有)121(6):638-44, 2016. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.10.012.
- 8) 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*. Scientific Reports (査読有) 5:12510, 2015. DOI:10.1038/srep12510.
- 9) Numamoto M, Tagami S, Ueda Y, Imabeppu Y, Sasano Y, Sugiyama M, Maekawa H, Harashima S. Nuclear localization domains of GATA activator Gln3 are required for transcription of target genes through dephosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biosci Bioeng. (査読有) 120(2):121-7, 2015. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.12.017.
- 10) 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. (査読有) 119(5):526-31, 2015. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.10.006.
- 11) Sharmin D, Sasano Y, Sugiyama M, Harashima S. Type 2C protein phosphatase Ptc6 participates in activation of the Slr2-mediated cell wall integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biosci Bioeng. (査読有) 119(4):392-8, 2015. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.09.013.
- 12) Numamoto M, Sasano Y, Hirasaki M, Sugiyama M, Maekawa H, Harashima S. The protein phosphatase Siw14 controls caffeine-induced nuclear localization and phosphorylation of Gln3 via the type 2A protein phosphatases Pph21 and Pph22 in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biochem. (査読有) 157(1):53-64, 2015. DOI: 10.1093/jb/mvu055.
- 13) Hermansyah, Novia, Minetaka Sugiyama, Satoshi Harashima. *Candida tropicalis* Isolated from *Tuak*, a North Sumatera Indonesian Traditional Beverage, for Bioethanol Production. Microbiology and Biotechnology Letters (査読有) 2015., 43(3), 241-248. DOI:10.4014/mb.1506.06002
- 〔学会発表〕(計 17 件)
- 1) 谷 龍典、門畑 凌太、村上 亮輔、藤本 昌希、平川 万里、浴野 圭輔、原島 俊 バガス由来阻害物耐性出芽酵母変異株の分離と遺伝解析, 日本生物工学会九州支部沖縄大会 2017
- 2) 糸数帆高、松本拓己、浴野圭輔、西澤正文、原島 俊, 出芽酵母における”超”高次倍数体育種技術の開発, 日本生物工学会九州支部沖縄大会 2017

- 3) Satoshi Harashima, Minetaka Sugiyama, Yu Sasano, Yeast genome engineering, - A new challenge to deciphering genome function and breeding, The 14th International Congress on Yeasts (ICY2016), 2016.
- 4) Yu Sasano, Koki Nagasawa, Shunta Kimura, Saeed Kaboli, Taishi Nakai, Ryota Murayama, Minetaka Sugiyama, Satoshi Harashima, ICY2016: CRISPR-PCS: a versatile chromosome manipulation technology in *Saccharomyces cerevisiae* - The 14th International Congress on Yeasts (ICY2016), 2016.
- 5) 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, 酵母遺伝学フォーラム第 49 回研究報告会, 2016
- 6) 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, 第 68 回日本生物工学会大会, 2016
- 7) 杉山 峰崇, 呉 俊元, 笹野 佑, 金子 嘉信, 原島 俊, バイオエタノール生産のためのゲノムシャフリングによる高温耐性酵母の開発酵母遺伝学フォーラム 第 48 回研究報告会, 2015
- 8) 笹野 佑, 長澤 宏器, Saeed Kaboli, 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、酵母遺伝学フォーラム 第 48 回研究報告会, 2015
- 9) Minetaka Sugiyama, Junyuan Wu, Yu Sasano, Satoshi Harashima, Improvement of thermotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production by genome shuffling, The 32nd International Specialized Symposium on Yeasts, 2015
- 10) Satoshi Harashima, Genome engineering - perspectives and challenges for synthetic biotechnology in yeast. The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference.
- 11) Minetaka Sugiyama, Junyuan Wu, Yu Sasano, Yoshinobu Kaneko, Chuenchit Boonchird, Satoshi Harashima, Improvement of thermotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production by genome shuffling, The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, 2015
- 〔図書〕(計 1 件)
- 1) 原島 俊 リン酸シグナル伝達 朝倉書店リンの事典(大竹久夫著書), pp98-99, pp105, 2017
- 〔その他〕
ホームページ
<http://rsrch.ofc.sojo-u.ac.jp/sjuhp/KgApp?kyoinId=yememgkoyggy>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
原島 俊 (HARASHIMA Satoshi)
大阪大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 70116086
- (2) (研究分担者)
- 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
- 笹野 佑 (SASANO Yu)
崇城大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 90640194
- 浴野圭輔 (EKINO Keisuke)
崇城大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 30310030