

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14434

研究課題名(和文) 深海酵母 *Cryptococcus liquefaciens* N6株の銅耐性機構研究課題名(英文) Molecular mechanism of *Cryptococcus liquefaciens* N6 strain

研究代表者

岩崎 博史 (Iwasaki, Hiroshi)

東京工業大学・科学技術創成研究院・教授

研究者番号：60232659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：*Cryptococcus liquefaciens* N6株は、高い銅イオンに耐性を示すユニークな酵母である。本株の銅イオン耐性の分子機構を明らかにする目的で、*C. liquefaciens*の分子生物学手法の確立を目指した。まず、5-FOAを選択マーカーとして、*ura5*変異株を分離した。これを用いて電気穿孔法による遺伝子導入の条件を確立した。次にNAT耐性遺伝子をマーカーとして2回交差によるURA5座の遺伝子破壊を試みた。その結果、NAT耐性形質転換体はすべて異所組み込みによるものであることが判明した。このことから*C. liquefaciens*の栄養増殖期は相同組換え能が極めて低いと考えられた。

研究成果の概要(英文)：*Cryptococcus liquefaciens* N6 is a unique strain of yeast that shows resistance to copper toxicity. To elucidate the mechanism underlying this phenomenon, we aimed to establish molecular biology tools in *C. liquefaciens*. For this, we first isolated *ura-* mutants by using 5-FOA as a positive selection marker. Two *ura-* mutants were found to have the same nonsense mutation in the URA5 gene by whole genome sequencing. Next, we established conditions for genetic manipulation of one *ura5* mutant by electroporation, resulting in *ura--to-ura+* transformation. We then attempted gene disruption of URA5 through a double crossover event with a targeting vector containing the NAT resistance gene. Although we obtained a considerable number of NAT resistant transformants, the NAT resistance gene was found to have integrated in an ectopic location in all cases. We speculate that gene disruption by this approach was unsuccessful due to intrinsically inefficient homologous recombination in *C. liquefaciens*.

研究分野：分子生物学、分子遺伝学

キーワード：*Cryptococcus*酵母 形質転換 分子生物学 銅耐性 分子生物学ツール モデル生物

## 1. 研究開始当初の背景

海洋研究開発機構のグループによって日本海溝の深海 5000m 付近から単離された *Cryptococcus liquefaciens* N6 (以下 N6 株と略す) は、極めて高い銅イオンに耐性を示すユニークな深海酵母である (阿部等 JAMSTEC J Deep Sea Res 1998)。N6 株は、馴化培養を行うことで 50mM という極めて高い銅イオンの存在下でも増殖可能となることが示されている (Abe et al., Biotech Lett 2001)。また、銅イオンほどではないにしろ、2 価及び 3 価鉄イオン、錫イオンなどの金属イオンに対しても N6 株はかなり高い耐性を示す。これまで、*C. liquefaciens* N6 株の高濃度銅耐性機構について分子遺伝学や分子生物学的解析は全くなされていない。また、N6 株を単離した海洋研究開発機構のグループは解散して、本研究を継続して研究するグループは存在しない。ゆえに、N6 株酵母の銅耐性の分子機構の研究はほとんどされていなかった。

ところで、近縁の *Cryptococcus neoformans* は、クリプトコッカス症の原因菌である。この感染症は日和見感染症であり、健常者における侵襲性真菌感染症として国内で最も頻度が高い。クリプトコックス属真菌は主に肺や皮膚から感染して病巣を形成する。アメリカ合衆国では、患者の 85% が、HIV 感染者から発生している。感染症学という観点からは *C. neoformans* の研究はある程度進んでいるが、しかし、*Cryptococcus* 酵母の分子遺伝学・分子生物学は大変遅れており、クリプトコッカス症の発症機構に不明な点も多い。

代表者は、これまで長年にわたり大腸菌と分裂酵母を用いて、相同組換えや DNA 修復機構に関する研究を行ってきたが、本研究開始の 2 年ほど前に、偶然、N6 株が高濃度の銅イオンに耐性であることを知りその重要性に注目した。しかし、この問題について研究する特定の資金が無かったので大学からの運営交付金で研究を行い、以下の成果を得ていた。すなわち、N6 株のパルスフィールド電気泳動による解析から、25 本の染色体を同定した。また、次世代シーケンシングにより、全ゲノムのドラフト配列を決定した。この解析では、contig 数は 200 弱まで収束し、全ゲノムは 19.3Mb と見

積もられた。この値は、パルスフィールド電気泳動から得られた値と良く一致している。また、*C. liquefaciens* N6 株がタンパク質合成阻害剤 G418 (アミノグリコシド系抗生物質)、及び、5-フルオロオロチン酸 (5-FOA) に対する感受性を調べ、これらの薬剤に対して、N6 株が出芽酵母

*Saccharomyces cerevisiae* と同程度の感受性を示したので、選択マーカーとして利用することが可能であると判断していた。また、これら以外にも選択マーカーとして利用できるアミノ酸合成遺伝子は、出芽酵母や分裂酵母で用いられているマーカー遺伝子のオーソログとして、ゲノム解析より同定していた。

## 2. 研究の目的

これまで、*Cryptococcus* 酵母の分子遺伝学・分子生物学的解析はほとんどされておらず、形質転換法やプラスミド系などの基本的な解析ツールが存在しない。本研究では、*C. liquefaciens* 酵母の分子遺伝学・分子生物学的ツールを新たに開発し、これを用いて、ユニークな特徴をもつ *C. liquefaciens* N6 株の高濃度銅イオン耐性機構の分子機構を解明することと、*C. neoformans* などにも応用できる *Cryptococcus* 酵母に普遍的に応用できる分子生物学の確立を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) *Cryptococcus* 株、培養条件、及び、培地など

*C. liquefaciens* N6 株は東京工業大学梶原将教授から分与された。*C. albidus* (Saito) は ATCC より分与された (ATCC22460)。*Cryptococcus* 培養の培地は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で用いる YPD 及び、SD 培地を用いた。培養温度は 30 °C で行った。

(2) 分子生物学的手法

*C. liquefaciens* N6 株の培養や染色体 DNA 調整などの分子生物学的手法は、*S. cerevisiae* の実験手法に準じた。すなわち、Method in Yeast Genetics; A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual に記載してある方法に従った。エレクトロポレーションは、Bio-rad 社の Gene Pulser MXcell エレ

クトロポレーションシステムを用いた。また、Biolistic Particle ガンは、Bio-rad 社の Helios gene gun システムを用いた。また、次世代シーケンサーによるゲノム解析はイルミナ社の MiSeq を用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1) アプローチ

上記の目的を達成するためには、*C. liquefaciens* の分子生物学的方法論やツールをまず確立する必要がある。それに対して最初にやるべきことは、細胞内に遺伝子導入法を確立することであると考えた。これは、一般的には形質転換法と同義であるので、遺伝子を導入した結果、表現型が変わることを指標とすることができる。もっとも単純な方法は、5-FOA をポジティブセレクションのマーカーとすることである。5-FOA を培地に添加すると、野生株では 5-FOA を代謝して毒性のある 5-フルオロデオキシウリジンを生成し、その結果、菌体は死滅するが、ウラシル要求性である *ura3* (オロチジン 5'-リン酸脱炭酸酵素遺伝子)、もしくは *ura5* (オロチン酸ホスホリボシル基転移酵素遺伝子)変異株では、5-FOA を代謝できないため、5-FOA 添加培地でも生育可能になる。そこで、まず、自然突然変異により 5-FOA 耐性株の単離を試みた。

約  $10^8$  個の *C. liquefaciens* N6 細胞を 5-FOA を添加した SD プレート上に塗布し、コロニーを形成したものが 13 個あった。これらから 2 個独立したクローンを分離し、ゲノム DNA を調整して、次世代シーケンサーによって全ゲノムを決定したところ、2 株とも *URA5* に突然変異 (5 番目のアミノ酸のナンセンス変異) があった。この *ura5* 変異株を Q5 とし、以後の実験に用いた。

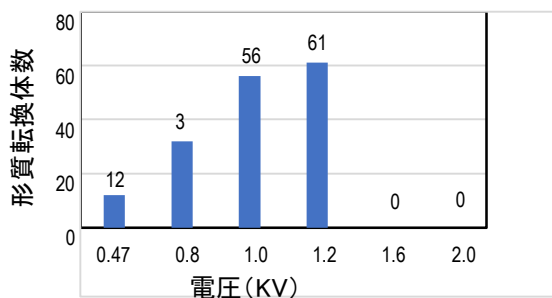


図 1. エレクトロポレーションの条件検討

##### (2) 形質転換法の確立

*URA5+* を *C. liquefaciens* N6 染色体から pBluescript プラスミドにクローニングし、これを線状化し、形質転換の基質とした。3  $\mu$ g の線状 DNA を用いて、エレクトロポレーションによって Q5 に導入し、*Ura*<sup>+</sup> コロニーが得られる条件を求めた。その結果、1.2 KV, 125  $\mu$ F 条件で、最も多くの *Ura*<sup>+</sup> コロニーが生じた (図 1)。また、この形質転換は、線状 DNA を用いると高頻度でおこり、環状のプラスミド DNA の場合、何も加えないコントロールとほぼ同等の少ない *Ura*<sup>+</sup> コロニーしか生じなかった (図 2)。よって、効率の良い形質転換には線状 DNA を用いる必要があることが判明した。さらに、形質転換の効率を上げる目的で、Helios gene gun を試行したが、形質転換体を得ることができなかった。よって、エレクトロポレーションによる遺伝子導入を今後の実験の標準とすることにした。

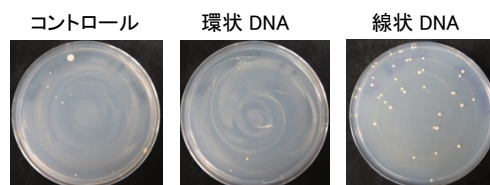


図 2. DNA の形状によるエレクトロポレーションの効率。ウラシルを含まない SD プレート条にエレクトロポレーションを行った細胞集団を塗抹した。

##### (3) 形質転換体の解析

上記の実験で得られた形質転換対が、実際に、*ura5* 座位にインテグレートしているかを PCR で検出したところ、*ura5* 座位にインテグレートしていたものは、*Ura*<sup>+</sup> の形質転換体のうち 3%程度であった。すなわち、ほとんどの *Ura*<sup>+</sup> 形質転換体は ectopic な場所に *URA5+* がインテグレートしていることがわかった。このことから、*C. liquefaciens* では相同組換えの頻度が低いことが予想された。

##### (4) ダブルクロスオーバーによる遺伝子破壊

次にダブルクロスオーバーによる *URA5* 遺伝子の破壊を試みた。そのために、ポジティブセレクションが可能な薬剤マーカー、G418、hygromycin B 及び、nourseothricin (NAT) について、選択性を検討した。その

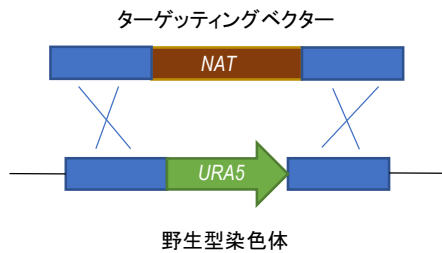


図 3. ダブルクロスオーバーによる URA5 遺伝子のターゲティングに用いたターゲティングベクターの形状。

結果、NAT の選択性が優れていることが判明した。そこで、図 3 にあるようなターゲティングベクターを作成して、NAT 耐性となった形質転換体について、ウラシル要求性を調べたところ、得られたすべての NAT 耐性株 50 株は、すべて、ウラシル非要求性であった。このことから、ターゲティングベクターは、ectopic なインテグレーションであり、相同組換えによる遺伝子破壊は困難であると結論づけた。現在、CRISPR-CAS9 による遺伝子ターゲティングを試みている。

#### (5) 比較ゲノム解析

近縁の *C. albidus* (Saito) 株は、顕著な銅耐性を示さない。そこで、この株を ATCC より入手し、MiSeq を用いて全ゲノム配列を決定し、比較ゲノム解析によって N6 株に銅耐性を付与する遺伝子の同定を試みた。*C. albidus* (Saito) 株のゲノム配列は、N6 株のゲノムに対して約 99 %以上同一であることが判明したが、銅耐性を付与する原因遺伝子や特定の配列は決定できなかった。

#### (6) RNA 解析

N6 株、及び、*C. albidus* (Saito) 株について、SD 培地と YPAD 培地、もしくは、YPAD に 10mM 硫酸銅を添加した培地で培養して、全 RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。銅の存在の有無で 10 倍以上の発現変化があったものが見られたが、そこから、N6 株の銅耐性に関連する遺伝子を予想することは困難であった。

#### (7) まとめと今後の展望

*C. liquefaciens* N6 株酵母において、Ura<sup>-</sup>を分離して、これを宿主として Ura<sup>+</sup>を選択マーカーとして、エレクトロポレーションによる形質転換の条件を検討したところ、一定の成果を得ることができた。しかし、*S.*

*cerevisiae* で高頻度におこるダブルクロスオーバーによる遺伝子ターゲティングは、N6 株ではほとんど起こらないことが判明した。これまで *C. neoformans* でダブルクロスオーバーによる遺伝子ターゲティングが行われているが、極めて低効率である。このことから、*Cryptococcus* 酵母は、一般的に栄養増殖時における相同組換えの効率が低く、一方、非相同的末端結合による DNA 二重鎖切断修復能が相対的に優性であり、このためダブルクロスオーバーによる遺伝子ターゲティングが困難になっていると予想された。よって、ターゲティングの方法を根本的に見直す必要がある。たとえば、Crispr-cas9 法で Ku-株を作成し、その遺伝的背景でダブルクロスオーバーを試行する必要があるのかもしれない。もしくは、必要な変異株の作成は、すべて Crispr-cas9 法で行ったほうが効率的かもしれない。これらは、今後の取り組みとして、最優先すべきことである。

次世代シーケンサーを用いた比較ゲノム的アプローチで N6 株の銅耐性機構に迫ろうとしたが、有意な情報を得ることができなかった。この点を踏まえると、現時点では、まず、早急にターゲティングの手法を確立することが急務であろう。その後、ミュータントライブラリーを作成して、N6 株から銅に感受性の変異株を分離することが、一見回り道にみえても最終的には正しい答えを導くことができるのではないかとと思われる。

*Cryptococcus* 酵母の分子生物学が進まないのは、遺伝子ターゲティングが困難なためであり、その理由が相同組換え能が低いことであることを発見したことは、大変意義深い。このことを踏まえて、今後、さらに *Cryptococcus* 酵母の分子生物学の確立にむけて注力していきたい。

#### 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) (すべて査読あり)

- (1) *In vitro* site-specific recombination mediated by the tyrosine recombinase XerA of *Thermoplasma acidophilum*.

Jo M, Murayama Y, Tsutsui, and \*Iwasaki H.  
***Genes Cells*** (2017) in press.

他 3 報 (但し、これらのすべて、本研究に深く関連するが、本プロジェクトによる直接の成果と位置づけではない)

[学会発表] (計 13 件)

(1) Post-synaptic roles of Swi5-Sfr1 in DNA strand exchange. \*Iwasaki H. Protein-DNA complexes in homologous recombination at Szent-Györgyi Day. December 14, 2016. Budapest, Hungary

他 12 件 (但し、これらのすべて、本研究に深く関連するが、本プロジェクトによる直接の成果と位置づけではない)

[図書] (計 1 件)

池上彰、岩崎博史、田口英樹

池上彰が聞いてわかった生命の仕組み

朝日新聞出版 2016 年 248 ページ。対談式のため、担当部分抽出不可能

(但し、本図書は、啓蒙本であり、本計画研究に関連したアウトリーチとしての位置づけである。)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.iwasakilab.bio.titech.ac.jp/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩崎 博史 (IWASAKI Hiroshi)

東京工業大学・科学技術創成研究院・教授  
研究者番号：60232659

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

無し

### (4) 研究協力者

① 伊藤武彦 (ITO Takehiko)

東京工業大学・生命理工学院・教授  
研究者番号：90501106

② パリハッティマルダン (Palihati Maierdan)

東京工業大学・生命理工学院・大学院生