

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K05402

研究課題名(和文) 酵母染色体の部分異数体ライブラリー構築と育種への応用

研究課題名(英文) Construction of segmental aneuploid library in yeast and its application for breeding

研究代表者

笹野 佑 (Sasano, Yu)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：90640194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：清酒酵母K901株に対してさまざまな染色体領域が重複した部分異数体株ライブラリーを作製し、さらに作製した菌株を用いて清酒醸造を行い、各染色体領域の重複が清酒醸造に及ぼす影響を検討した。その結果、2番染色体領域の重複がリンゴ酸生産に影響を与えることが判明した。また、出芽酵母の染色体操作技術として置換・融合・環状化・染色体外環状DNA化などの操作技術を新たに開発した。最終的に、本研究課題の目標である産業に資する部分異数体重複株の作製に成功することができた。また、欠失や重複以外にもさまざまな染色体操作を可能にする染色体工学技術を確立することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

清酒酵母を用いた研究により、出芽酵母の染色体の部分異数体化は、工業的有用性を有する清酒酵母株を育種するための新奇かつ効果的な手段となり得ることが分かった。実用酵母菌株を用いて有用性が実証できたことで本手法を用いた菌株育種を推進していく端緒を開くことができた。また、これまでに発芽酵母で可能な染色体操作技術は分断と欠失と重複の3種類のみであったが、本研究でこれに加えて置換・融合・環状化・転座・染色体外環状DNA化が可能となった。出芽酵母は物質生産の基盤生物のひとつとみなされており、合成生物学における有用ツールの開発にも大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)：A library of partially aneuploid strains with various chromosomal region duplications was constructed for Sake yeast strain K901. The results showed that the duplication of chromosome II region affected malic acid production. We also developed new chromosomal manipulation techniques for budding yeast, such as replacement, fusion, cyclization, and extrachromosomal circular DNA. We succeeded in producing a partial aneuploidy duplicate strain that is industrially useful, which is the goal of this research project. In addition to deletions and duplications, we were also able to establish chromosome engineering techniques that enable various types of chromosome manipulation.

研究分野：応用微生物学

キーワード：染色体工学 酵母 ゲノム編集技術

### 1. 研究開始当初の背景

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は基礎研究から産業応用まで幅広く用いられており、遺伝子工学技術が最も進展している真核微生物の一つである。これまでに遺伝子レベルでの改変による化成品やバイオ燃料などの高生産菌株を育種する試みは数多くなされている。しかし、発酵生産の過程で酵母は多種多様なストレスに晒されるため、高々数個の遺伝子を改変するだけでは劇的な性能改善は望めず、一度に多くの遺伝子を含む長大な領域を改変する必要がある。一方、酒類醸造やバイオエタノール生産などの実際の発酵生産に使用されている酵母菌株の多くは、全部で 16 本ある染色体のうち複数の染色体が丸ごと重複していたり（異数体）、染色体の一部の領域が重複したり欠失している（部分異数体）という特徴が見られる。この染色体の異数性が産業酵母の優れた発酵特性に関わっていることが明らかとなってきた。

このような染色体の異数性を持つ優良菌株は、長い時間をかけた選抜の繰り返しの結果得られたものであり、人工的に狙い通りの染色体領域を異数体化あるいは部分異数体化する育種技術は開発されていなかった。もし、このような技術があれば、従来の方法では決して得ることが出来ない複雑なゲノム構造を持った菌株を創り出すことも可能になり、産業上有用な菌株を飛躍的に短時間で育種することができると考えられる。

### 2. 研究の目的

1. 研究開始当初の背景で述べた背景のもと申請者は、近年急速に進展しているゲノム編集技術を応用することで、酵母の染色体を一度の操作で複数箇所を同時に分断することのできる染色体工学基盤技術（CRISPR-PCS 法）を開発した（Sasano Y et al. Sci Rep 2016）（図 1）。さらに本法を応用することにより、複数の狙った染色体領域を重複させる技術（CRISPR-PCDup 法）や複数の狙った染色体領域を欠失させる技術（CRISPR-PCD 法）などの様々な染色体操作技術を開発してきた。これまでに酵母はおろかいかなる生物においても、狙った染色体領域を重複あるいは欠失させる技術は開発されていない。ましてや複数の染色体領域を同時操作する技術はこれまで全く不可能であった。これらの技術により、従来の古典的育種法や遺伝子工学技術、あるいはゲノム工学技術をもってしても作製が不可能な複雑なゲノム組成を持った菌株の構築が可能となり、従来の菌株よりも大幅に発酵性能が向上した有用菌株が得られることが期待できる。

#### 基盤技術：染色体分断技術 CRISPR-PCS 法

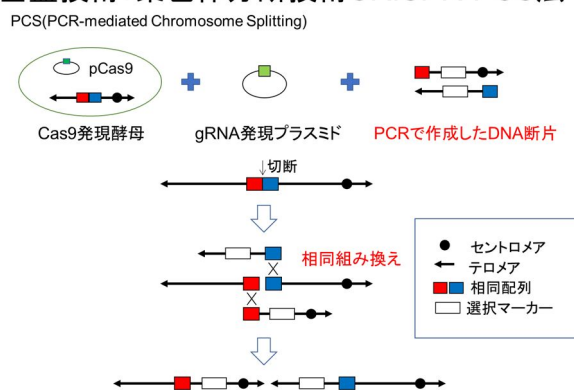


図 1 染色体操作の基盤技術 CRISPR-PCS 法

そこで本研究では、CRISPR-PCDup 法と CRISPR-PCD 法を用いて複数の染色体領域が様々な組み合わせで部分異数体化した酵母菌株の集団（ライブラリー）を創り出し、その多様なゲノム組成を持つライブラリーの中から、有用形質を示す菌株をスクリーニングすることを目的とする。そして、有用形質に關する染色体領域およびその最適な組み合わせを特定する。最終的に、得られた知見を基に、実生産に資する有用菌株を育種することを目指す。また、開発した染色体工学技術をさらに洗練、発展させるために技術的な改良も併せて行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

CRISPR-PCDup 法を用いて複数の染色体領域が重複した菌株ライブラリーを構築する。具体的な実験計画としては、出芽酵母の全ゲノムを約 200 kb ごとにカバーする全 62 の領域に分割し、これら 62 領域が多様でランダムな組み合わせで複数重複した菌株ライブラリーを構築する。この 200 kb 毎の領域分割は、筆者らが以前発表した論文（Natesuntorn W et al. Sci Rep 2015）を基に選定している。使用する菌株はこれまでに申請者が数多くの染色体工学実験に用いてきた実験室酵母株（FY834 株）及び産業酵母（清酒酵母 K901）を用いる。62 領域それぞれを重複す

るための重複用 DNA 断片を調製し、それらの DNA 断片を全て、あらかじめ Cas9 ヌクレアーゼ発現プラスミドを導入しておいた酵母株に導入する。このとき、CRISPR/Cas9 システムを働かせるために必要なガイド RNA も同時に導入する。これにより複数の染色体領域が重複した菌株ライブラリーを作製する。CRISPR-PCDup 法では一度の形質転換操作で少なくとも 4 領域を同時に重複することが可能であることが分かっている。従って、理論上は約 60 万通りのゲノム構成を持つライブラリーが構築できることが期待される。申請者らはこれまでの研究で、これら 62 領域の単一重複株は既に作製しており(Natesuntorn W et al. Sci Rep 2015)、この時に使用したリソースの一部は本研究においても使用できる。この菌株ライブラリーの中から、発酵生産環境で酵母が晒される様々な環境ストレス(高温、高濃度エタノール、高浸透圧、低 pH、その他発酵阻害物質など)において耐性を示す菌株をスクリーニングする。得られた耐性株における重複領域を解析し、重複することで上記ストレスに耐性をもたらす染色体重複の組み合わせを解明する。

染色体複数領域の重複実験と同様の考えに基づき、CRISPR-PCD 法を用いて染色体複数領域の欠失も行う。申請者らは以前に、10 kb 以上の欠失可能な遺伝子領域(全 44 領域)の単一欠失株を作製している(Kaboli S et al. Nucleic Acids Res 2014)。この時に使用したリソースの一部を基に CRISPR-PCD 法を用いて、これら 44 領域が様々な組み合わせで複数欠失した菌株ライブラリーを作製する。CRISPR-PCD 法では一度の形質転換操作で少なくとも 4 領域を同時に欠失することが可能であることが分かっているため、理論上は約 15 万通りのゲノム構成からなる菌株ライブラリーが得られることが期待される。構築したライブラリーから、重複の場合と同様に有用性質を持つ菌株をスクリーニングし、有用形質をもたらす染色体欠失の組み合わせを明らかにする。使用する菌株は、もともと二倍体である BY4743 株を宿主株にして染色体欠失を行う。これにより容易に染色体異数性を持つ株を育種することができる。

#### 4. 研究成果

##### 1) 複数領域異数体ライブラリーの作製

出芽酵母において複数の染色体領域が重複ないしは欠失した菌株の作製に着手した。まずは形質転換効率が高い欠失から着手した。BY4743 株を宿主に、酵母の 1 番染色体、3 番染色体、9 番染色体の各々の左腕および右腕を欠失した部分異数体を作成することができた。

清酒酵母 K901 株に対してさまざまな染色体領域が重複した部分異数体株ライブラリーを作製し、さらに作製した菌株を用いて清酒醸造を行い、各染色体領域の重複が清酒醸造に及ぼす影響を検討した。その結果、特定の染色体領域の重複が、清酒醸造における有機酸および芳香族化合物の生産に影響を及ぼすことがわかった。有機酸が清酒の味に大きく影響することから、リンゴ酸濃度を変化させる 2 番染色体の重複領域に着目した。2 番染色体の部分重複を有する清酒酵母協会 901 号株を構築し、得られた異数性清酒酵母株を用いて清酒を醸造した。その結果、エタノール生産能に影響を与えることなく、低いリンゴ酸生産能を示す清酒酵母株を開発できる可能性が示された(図 2)。本研究の結果、酵母の異数性が清酒醸造特性を変化させること、特に 2 番染色体の異数性が清酒醸造におけるリンゴ酸生産量を変化させることが明らかとなった。結論として、異数体化は、工業的意義を有する改良形質を有する清酒酵母株を育種するための新規かつ有用な手段となり得ることが分かった。本研究成果については論文を発表している(Hotta et al. JBB 2024)。

後述する本研究成果の一つである染色体外環状 DNA 化(EccENA 化)技術を用いて染色体部分重複株を作製した。9 番染色体および 15 番染色体の様々な領域を EccDNA 化した株を作製した。

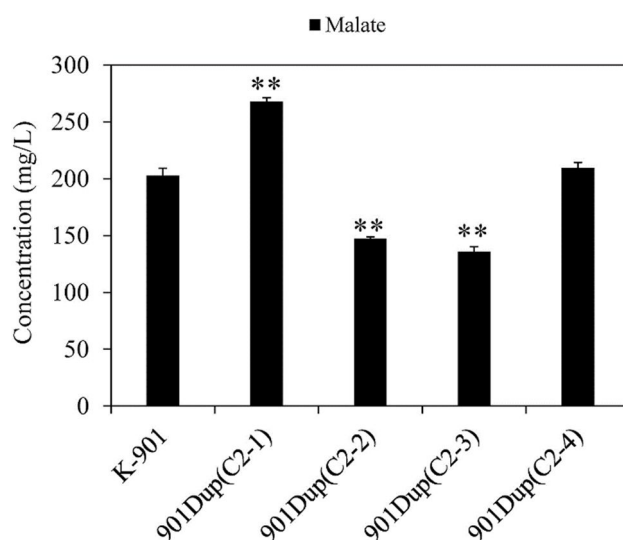


図 2 清酒酵母の 2 番染色体の部分重複によるリンゴ酸量の変化 (Hotta et al. JBB 2024 より抜粋)

## 2) 新しい染色体工学技術の開発

本研究課題開始時において、申請者が開発していた染色体工学技術は、分割、欠失、重複の3つであった。出芽酵母における染色体工学技術をさらに洗練・発展させるため、新しく染色体領域の置換、融合、環状化、転座、染色体外環状 DNA 化などの染色体操作技術を開発した。このうち染色体の置換については CRISPR-PCRep と名付け論文として発表した(Easmin et al. JBB, 2020)。本申請課題で新たに開発した染色体工学技術を図3に示す。このうち、染色体外環状 DNA 化(EccDNA 化)技術については特筆すべき技術であり詳細に説明する。これまで酵母の染色体外に環状化したりボソーム DNA が存在しており、細胞老化と関連付けられて研究されてきたが、近年リボソーム DNA 以外にもゲノム全体に由来する環状化 DNA が染色体とは独立して細胞内で複製されており、これが細胞の環境適応や進化に関わることが報告された(Møller et al, PNAS, 2015, Demeke et al, PLoS Genet, 2015)。したがって、任意領域を自在に染色体外環状 DNA(以下 EccDNA)化できる技術を確立することができれば、合成生物学の新たな有用ツールとなりうることを期待される。このような考えのもと、CRISPR-PCS 法と同様な手法を適用することで、任意の染色体領域を自在に EccDNA 化できる技術を開発した。特筆すべき点は、CRISPR-PCDup 法では重複できる領域の長さが最大で 400 kb 程度であったのに対して、本法を用いることで 1000 kb 以上もの長大な染色体領域の重複が可能となる点である。本手法では選択マーカーとして抗生物質 G418 耐性遺伝子を保持しているが、G418 非含有培地で継代を行っても EccDNA はほとんど脱落せず、細胞内に安定的に存在していることが分かった。一方、EccDNA は染色体とは独立して存在しているため、細胞内コピー数は自然界で見られるように 10 コピー以上であることが期待されたが、定量 PCR および孢子分離による遺伝解析の結果からはコピー数は 1 ないし 2 程度であることが判明した。これはおそらく、各遺伝子にはコピー数の上限が決まっており、長大な領域を重複すればするほど、細胞内で存在可能なコピー数の上限が下がっていくためであると考えられる。

本研究課題全体の成果を総括すると、当初目標としたゲノム全体にわたるライブラリーの構築には至らなかったが、最終的なアウトプット目標である、産業に資する部分異数体重複株の作製には成功することができた。また、欠失や重複以外にもさまざまな染色体操作を可能にする染色体工学技術を確立することができた。本研究成果は合成生物学の発展に寄与することができたと自負している。

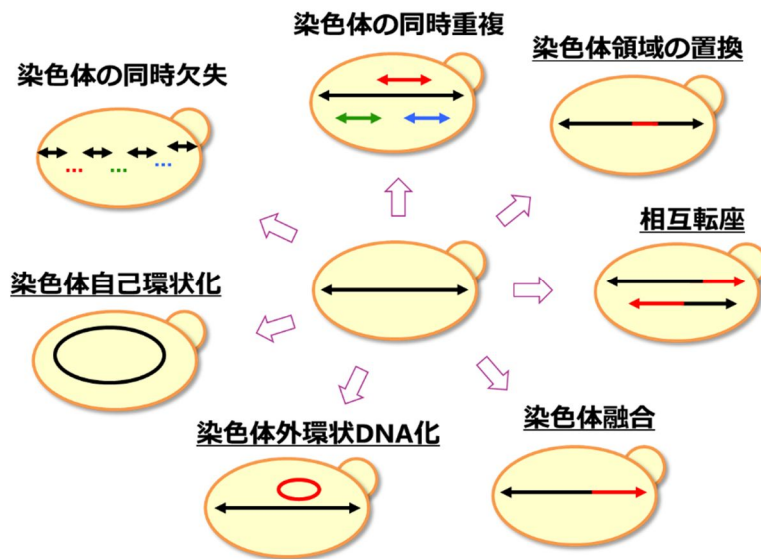


図3 出芽酵母における多様な染色体操作技術  
(下線を引いた技術が本研究課題で開発した技術)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hotta Natsuki, Kotaka Atsushi, Matsumura Kengo, Sasano Yu, Hata Yoji, Harada Tomoka, Sugiyama Minetaka, Harashima Satoshi, Ishida Hiroki	4. 巻 137
2. 論文標題 Effect of yeast chromosome II aneuploidy on malate production in sake brewing	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 24~30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2023.10.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sasano Yu, Hamaguchi Ayuki, Taguchi Hisataka	4. 巻 13
2. 論文標題 Draft genome sequence of thermotolerant <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AH465, isolated from Mt. Tatsuda, Kumamoto, Japan	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mra.01124-23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Naim Hassan, Farhana Easmin, Yu Sasano, Keisuke Ekino, Hisataka Taguchi, Satoshi Harashima	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Systematic approach for assessing whether undeletable chromosomal regions in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> are required for cell viability	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 AMB Express	6. 最初と最後の頁 73-89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13568-020-01001-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Saleh Jamehdor, Kasra Arbabi Zabolli, Sina Naserian, Jose Thekkiniath, Honey Alef Omidy, Ali Teimoori, Behrooz Johari, Amir Hossein Taromchi, Yu Sasano, Saeed Kabolli	4. 巻 58(3)
2. 論文標題 An overview of applications of CRISPR-Cas technologies in biomedical engineering	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Folia Histochem Cytobiol	6. 最初と最後の頁 163-173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5603/FHC.a2020.0023.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 笹野 佑, 原島 俊	4. 巻 52 ( 8 )
2. 論文標題 出芽酵母における染色体工学の最先端と応用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 53-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 笹野 佑, 原島 俊	4. 巻 4(11)
2. 論文標題 出芽酵母における染色体工学の最先端と応用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 99-105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Easmin Farhana, Hassan Naim, Sasano Yu, Ekino Keisuke, Taguchi Hisataka, Harashima Satoshi	4. 巻 128
2. 論文標題 gRNA-transient expression system for simplified gRNA delivery in CRISPR/Cas9 genome editing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 373 ~ 378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2019.02.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Easmin Farhana, Sasano Yu, Kimura Shunta, Hassan Naim, Ekino Keisuke, Taguchi Hisataka, Harashima Satoshi	4. 巻 129
2. 論文標題 CRISPR-PCD and CRISPR-PCRep: Two novel technologies for simultaneous multiple segmental chromosomal deletion/replacement in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 129 ~ 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2019.08.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hassan Naim, Sasano Yu, Kimura Shunta, Easmin Farhana, Ekino Keisuke, Taguchi Hisataka, Harashima Satoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 CRISPR-PCDup: a novel approach for simultaneous segmental chromosomal duplication in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 AMB Express	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13568-020-0957-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浜口愛勇生, 大寺史織, 田口久貴, 笹野佑
2. 発表標題 熊本から分離した高温耐性出芽酵母のゲノム解析
3. 学会等名 日本生物工学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 浜口愛勇生, 田口久貴, 笹野 佑
2. 発表標題 九州地方から分離した新奇酵母について
3. 学会等名 第28回日本生物工学会九州支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笹野 佑, 平野 貴大, 平瀬 陸, 田口 久貴
2. 発表標題 キシロース資化性酵母 <i>Spathaspora passalidarum</i> のキシリトール脱水素酵素の耐熱化
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 豊留 あいり, 山城 裕孝, 笹野 佑, 田口久貴
2. 発表標題 キシロース発酵性酵母 <i>Spathaspora passalidarum</i> における遺伝子破壊法の確立
3. 学会等名 日本生物工学会第73回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀田 夏紀, 小高 敦史, 松村 憲吾, 杉山 峰崇, 笹野 佑, 原島 俊, 秦 洋二, 石田 博樹
2. 発表標題 酵母の染色体異数性が清酒醸造に与える影響と酵母育種への応用
3. 学会等名 第71回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 生田 宗一郎, 久富 歩, 笹野 佑, 田口 久貴
2. 発表標題 出芽酵母における任意領域の染色体外環状DNA化技術の開発
3. 学会等名 第71回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊留あいり, 高田和真, 高木佑希子, 笹野 佑, 田口久貴
2. 発表標題 複数染色体領域の欠失による発酵阻害物質耐性出芽酵母菌株の育種
3. 学会等名 第26回 日本生物工学会九州支部 長崎大会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 高田 和真
2. 発表標題 複数染色体の欠失によるフラン化合物耐性出芽酵母菌株の育種
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度西日本支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笹野 佑
2. 発表標題 新奇染色体工学技術を用いた多様なゲノム組成を持つ出芽酵母菌株ライブラリーの構築と菌株育種
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 笹野 佑, 原島 俊	4. 発行年 2023年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 102
3. 書名 アグリバイオ 出芽酵母における染色体工学の最先端と応用	

1. 著者名 植田充美、笹野佑ほか	4. 発行年 2021年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 289
3. 書名 バイオエネルギー再燃	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田口 久貴  (Taguchi Hisataka)  (90212018)	崇城大学・生物生命学部・教授    (37401)	
研究分担者	原島 俊  (Harashima Satoshi)  (70116086)	崇城大学・生物生命学部・特任教授    (37401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関