

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02878

研究課題名(和文)ゲノムの再編成による多様な人工ゲノムを持つ酵母細胞の創成と育種への応用

研究課題名(英文) A novel genome engineering technology to create a huge number of genomic diversity by splitting chromosomes and application to breeding 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) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：物質生産に最適なゲノムを持つ酵母細胞を育種する技術として、「ゲノムの再編成技術」と命名した技術を提案した。「ゲノムの再編成技術」とは、天然の染色体を分断することで多数の脱落可能な染色体を創製し、そのランダムな組み合わせの脱落による再編成を利用して(例えば20個で約100万通り： $20C_{r=1-20}$)、目的物質の生産条件で最も増殖の良い細胞や目的物質の生産性が最も高い細胞を選抜する技術である。1回の形質転換で、同時に複数部位の分断を達成するため、相同組み換え頻度の上昇やPCRで多数のガイドRNAを発現するDNA断片を1日で調製できる技術などを確立し、効率の良いゲノムの再編成技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

どのような生物を対象としても、今後のゲノム操作、特に「合成生物学」では、1回の形質転換操作で、多数の遺伝子を同時に、しかも効率よく操作・改変できる技術が重要になってくるであろう。本研究で開発を試みた「ゲノムの再編成技術」は、酵母を対象としたものではあるが、そのプロトタイプであると考えている。また「ゲノムの再編成技術」の中心的な要素技術である染色体の分断技術の効率化は、染色体任意領域の欠失や重複、置換の効率化をも同時に可能とする。さらに、生産効率が非常に高い細胞が持つゲノムの解析によって、将来ベストゲノムを合理的に設計できる理論を確立するための有用な知見が得られることも期待できる。

研究成果の概要(英文)： We have developed a novel breeding method called "Genome Reorganization Technology" in yeast. The technology consists of creation of master strain harboring a variety of artificial chromosomes by splitting natural chromosome. For example, twenty split chromosomes have a potential to generate one million kinds of genomic diversity by combinatorics. Based upon this idea, we have developed efficient chromosome splitting method which enables simultaneous splitting of multiple chromosomal sites by a single transformation. Master strain thus constructed was cultivated in the presence of reagent accelerating chromosome non-disjunction under a variety of conditions depending upon the purposes. Then, desired mutant was screened through random loss of split chromosomes during mitotic growth. We believe that this novel technology could be a useful tool kit to obtain unprecedented mutants which have never been isolated in previous study.

研究分野：酵母の生命科学・生物学

キーワード：酵母 ゲノムの再編成技術 人工ゲノム ゲノム工学 染色体工学 ゲノム編集

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

目的の有用物質生産に最適なゲノム(本申請では"ベストゲノム"と呼ぶ。ただし、ベストゲノムは目的によっていくつも想定される)を自在に創製する育種技術の開発は微生物育種工学者の夢であると言っても過言ではない。目的の有用物質の生産に最適なベストゲノムを持つ微生物の開発には、研究開始当初、少なくとも以下の2つのアプローチが考えられた。ひとつは、"ベストゲノム"をコンピュータ上で合理的に設計し、それを化学合成するアプローチである。このアプローチは、もし特定の有用物質を生産するためのベストゲノムがどのようなゲノムかが明らかであれば有効であろう。DNAの合成技術が格段に進歩し、約100分の1の経費で可能になってきた現在では、細菌であれば、全ゲノムの化学合成は30万円ほどでできるとも試算されており、あながち無謀とは言い難い。しかし、もっと深刻な問題は、ベストゲノムを設計できる知識基盤が現代の生命科学にはまだまだ不足しており、それぞれの物質生産に最適なベストゲノムがどのようなゲノムかがわかっていないことである。

こうした状況下、考えられるもうひとつの戦略は、既存のゲノムを持つ微生物から出発してなんらかの方法論によって可能な限り多くの種類のゲノム組成を持つ人工細胞集団を創成し、その細胞集団から、目的生産物の生産に最適なゲノムを持つ細胞をスクリーニングすることであろう。このアプローチでは、いかにして多様なゲノムを持つ細胞集団を創成するかが鍵になる。もし、そうした技術を開発することができ、それを利用して特定の有用物質生産に最適なベストゲノムを持つ細胞をスクリーニングによって手中にすることができれば、実際に使える細胞を手に入れることができるだけでなく、その細胞が持つゲノムの解析から、ベストゲノムを合理的に設計できる理論を確立するための有用な知見を得ることも期待できる。本研究の開始時は、こうした背景であった。

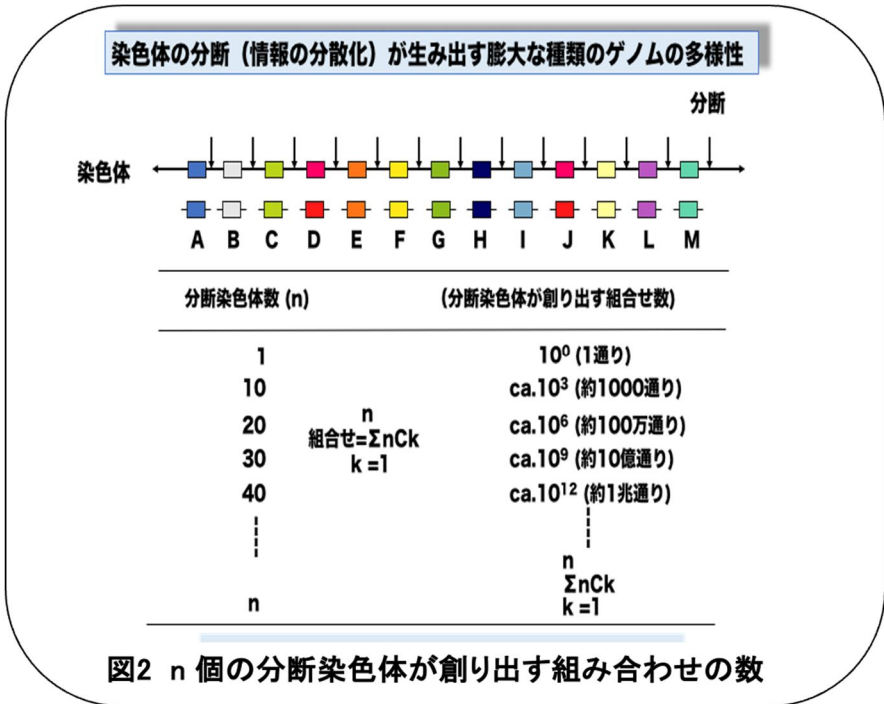
2. 研究の目的

上記のような研究開始当初の背景のもと、申請者らが考えたことは第2のアプローチ、すなわち、ベストゲノムを手中にするため、出芽酵母を材料にゲノムの多様性を創り出す技術の開発である。

出芽酵母の1倍体細胞は約6,000個の遺伝子を200kb~1500kbの長さの16本の染色体上に持つ(図1)。染色体は細胞分裂に際し複製され姉妹染色分体ができるが、姉妹染色分体が正常に分離(均等分離)すれば母細胞と娘細胞にひと



セットずつ分配される。しかし不均等分離が起これば、どちらかの細胞に姉妹染色分体の両方が分配されるので染色体を持たない細胞が生成される。通常こうした不均等分離の頻度は、天然の染色体では 10^6 回の細胞分裂あたり1回程度しか起こらない。しかし、約50kbより小さい人工染色体("ミニ染色体"と称す)を作成し、それを持つ細胞を微小管重合阻害剤の存在下で培養すると細胞分裂



当たり 20%もの高頻度(天然の染色体の1万倍)で不均等分離が起こることを見出した。従って、多くのミニ人工染色体を作成し、そのランダムな組み合わせを想定すると天文学的な数の人工ゲノムを持つ細胞集団を創製できる。例えば、20個のミニ染色体を作ると約100万通りのミニ染色体の組合せが可能である(図2)。従って、染色体を分断後、分断染色体を持つ細胞を種々の選択圧のある条件下で培養すると、その条件下での増殖に必要な(有利)なミニ染色体を保持した細胞を選択できるであろう。これが染色体の分断による「ゲノムの再編成技術」のアイデアである(図1)。本研究では、このアイデアを具現化するための技術開発を目的とした。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するためには、簡便で効率的な染色体分断技術を開発することが必要である。この技術のプロトタイプ(PCS法)は、既に本研究の開始前に開発をしていた。その概要を図3に示す。染色体の分断には分断断片と染色体との相同組み換えを利用する。1箇所の分断には2つのDNA断片が必要であり(図3:分断断片A,B)、分断断片には、分断により生成するDNA断片を染色体として機能させるためにはセントロメア(CEN)およびテロメア(TEL)を付加することが必要である。この方法を繰り返すことによって、順次、染色体を複数箇所でも分断することが可能になった。しかし、この方法によって多数の人工染色体を効率良く創製するには、1回の形質転換で複数の部位を分断できるようにすることが不可欠であった。

そこで申請者らはゲノム編集技術(CRISPR/Cas9)を取り入れ、相同組み換え頻度を数百倍に上昇させることによって1回の形質転換で一挙に複数の部位の分断ができる技術を開発することにした。さらに、ゲノム編集技術には、ガイドRNA(gRNA)を発現させて目的の標的部位にデリバリーすることが必要であるが、研究開始当初には、プラスミドへの標的配列のクローニングによる方法しか開発されていなかった。この方法は面倒で時間がかかるので、PCR技術だけを利用して、数時間で多種類のgRNAを発現できるDNA断片を一挙に調製する技術の開発も目指すことにした。

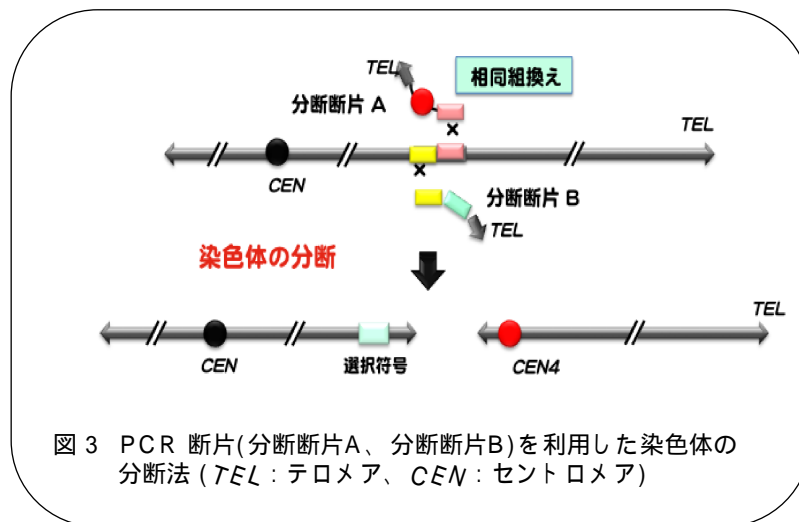
4. 研究成果

(1) ゲノム編集技術との融合による分断技術の効率化

多様なゲノムを持つ細胞集団を効率良く創成するには、1回の形質転換で複数の部位を同時に、しかも簡便に分断できる技術が不可欠である。分断は相同組み換えを利用するので、複数部位の同時分断を可能にするためには、それぞれの部位でその頻度を上げることが必要である。そのため、DNAの二重鎖切断が起こった部位の近傍では相同組み換え頻度が数百倍上昇する事実を考慮し、初年度は、申請者らが開発してきた従来の染色体分断技術(PCS法)に、任意の部位にDNA二重鎖切断を起こすことができるゲノム編集技術を取り入れ、PCS法を進化させたCRISPR/PCS法を確立した。

(2) ガイドRNAの発現・デリバリー技術の確立

ゲノム編集技術を取り入れることによって相同組み換え頻度、すなわち染色体の分断頻度を上昇させることができたが、ゲノム編集技術自身の効率化を妨げている要因のひとつは、gRNAの発現・デリバリーの問題である。すなわち、それまでのgRNA技術の発現には、標的配列をひとつひとつプラスミドにクローン化する技術が用いられていたため、面倒で時間がかかることが課題となっていた。そこで、クローニング技術を使わず、PCRのみでgRNAの発現を可能とする技術(gRNA-TES法と命名)を開発しつつあったが、この技術を確立した。すなわち、分断部位ごとに異なる20塩基の標的配列をプライマーに取り入れて設計することにより(標的配列を含め合計75塩基とする)、gRNAを発現するDNAを、共通のプラスミドを鋳型にしたPCR産物として調製するプロトコルを完成した。その結果、多



なる20塩基の標的配列をプライマーに取り入れて設計することにより(標的配列を含め合計75塩基とする)、gRNAを発現するDNAを、共通のプラスミドを鋳型にしたPCR産物として調製するプロトコルを完成した。その結果、多

それぞれに対応するgRNAを発現するDNA断片をPCR技術のみを使って1日で調製できる技術を開発することができた。この技術の開発により、1回の形質転換によって、現時点までに、同時に染色体の3箇所の部位での分断が可能となり、それまで、順次分断を繰り返すことが必要なため、1ヶ月以上かかっていた3箇所の分断が1日でできるようになった。

また、申請者らは、本研究の一環として、染色体の分断技術だけでなく、染色体任意領域の部分欠失技術(PCD)、部分重複技術(PCDup)、そして置換技術(PCRep)も並行して開発してきたが、新しく開発したgRNA-TES法を利用して、それぞれの技術(CRISP/PCD、CRISPR/PCDup、CRISPR/PCRepと命名)についても効率の良い技術に進化させることができた。

(3) ゲノムの再編成技術のさらなるスピードアップ

- 複数のgRNAを同時にひとつのmRNAとして発現する技術の開発 -

ゲノムの再編成技術をさらにスピードアップするためには、1回の形質転換によって10箇所程度の分断が可能になる必要がある。そうすれば、例えば、2回の形質転換により20箇所の分断を起こすことができ、少なくとも20個の人工染色体を創ることができる。その再編成による組み合わせは100万通りとなる。しかし、本研究を開始した時点までに開発した技術では、複数のgRNA発現断片を混合して酵母細胞に導入していたこともあり、全てのgRNA発現断片が細胞内に取り込まれていることが担保されていない難点があった。そこで、複数のgRNAのそれぞれをひと続きのRNAとして発現させ、一挙に細胞内に取り込ませたあと、それぞれの標的にデリバリーできるようなシステムを開発することにした(PCRgRNA/tRNA法と命名)。

このことを可能にするため、異なるgRNAを発現するそれぞれのDNA断片をPCRで調製するとき、各gRNAの間に、酵母細胞が持つRNaseによって切断されるtRNA遺伝子の配列が含まれるようなPCR反応を設計した。モデル実験として、4箇所の染色体部位を選定しPCR反応を行った後、Golden Gate Assembly反応(GGA反応)を行った。期待通りひと続きのDNAに連結されているかどうかを解析したところ、連結されていることが確認できた。そこで、別途、PCRによって、4箇所の染色体部位の相同組み換え頻度を上げるために使用する8種の分断DNAモジュールを調製した後、1種のGGA DNA断片と8種のDNA分断モジュールを用いて酵母の形質転換を行った。その結果、当初目的とした4箇所の標的が同時に分断された形質転換体を得ることはできなかったが、3カ所の染色体部位を同時に分断できることまでは明らかとなった。

(4)今後の展望

今後のゲノム操作には、目的如何にかかわらず、同時に複数部位の操作技術が必要不可欠である。しかし、ひとつの遺伝子内に複数の点変異を導入することはできるようになったが、染色体上で離れて存在する複数の遺伝子を同時に操作・改変(分断、欠失、重複、置換、変異の導入等)できる技術は確立されていない。本研究では、物質生産を目的とし、そのためのベストゲノムを創成する方法論として、「ゲノムの再編成技術」と命名したゲノム工学技術を提案し、その開発を行ってきた。ゲノムの再編成技術の開発には、同時に複数部位の効率の良い分断が不可欠である。従って、1回の形質転換によってできるだけ多くの部位を同時に分断できる簡便で、ハイスループットな技術の開発を目指した。その結果、1回の形質転換によって3箇所の同時分断までは可能となったが、現時点では、それ以上の複数部位の同時分断には成功していない。しかし、本研究で開発したいいくつかの要素技術は、今後、どのような生物を対象にしても必要になってくるであろう同時・多数部位の遺伝子を効率よく操作・改変できる技術のプロトタイプになり得るものと考えている。最後に、強調しておきたいことは、本研究で開発を行ったゲノムの多様性創出技術は、いわゆるCRISPR/Casゲノム編集技術だけではできないことであり、我々の技術とゲノム編集技術の融合によって初めて可能になったものであることに言及しておきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 10件）

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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hassan Naim, Easmin Farhana, Sasano Yu, Ekino Keisuke, Taguchi Hisataka, Harashima Satoshi	4. 巻 10
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 -
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 -
1. 著者名 笹野 佑, 原島 俊	4. 巻 10
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 41-44
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 笹野 佑、原島 俊	4. 巻 7
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Farhana Easmin, 笹野 佑、木村 駿太、Naim Hassan、浴野 圭輔、田口 久貴、原島 俊	4. 巻 100
2. 論文標題 酵母における染色体任意領域の欠失・置換ゲノム工学技術：CRISPR-PCDおよびCRISPR-PCRepの開発	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 76~76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34565/seibutsukogaku.100.2_76	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 廣田 冴香、浴野 圭輔、原島 俊	4. 巻 Vol.5 (4)
2. 論文標題 出芽酵母において“超”高次倍数体の育種はどこまで可能か	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 月刊 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 41-44
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Naim Hassan , Farhana Easmin , Keisuke Ekino , Satoshi Harashima	4. 巻 5;11(13):e4082.
2. 論文標題 PCR-mediated One-day Synthesis of Guide RNA for the CRISPR/Cas9 System	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bio Protoc. 2021 Jul 5;11(13):e4082.	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) 10.21769/BioProtoc.4082.	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 -

1. 著者名 原島 俊	4. 巻 116(11)
2. 論文標題 醸造酵母の非接合性から " 超 " 高次倍数体酵母の育種技術へ	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本醸造協会誌	6. 最初と最後の頁 272-272
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 堀田夏紀、小高敦史、野口英樹、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 日本生物工学会
4. 発表年 2019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
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立山陽子、藤井菜穂、笹野 佑、田口久貴
2. 発表標題 Spathaspora passalidarum 由来キシロース還元酵素を発現するSaccharomyces cerevisiae 変異株によるキシリトール生産
3. 学会等名 第26回日本生物工学会九州支部大会
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 笹野 佑
2. 発表標題 嫌気環境での高効率キシロース発酵に向けたSpathaspora属酵母のキシロース代謝遺伝子群の機能解析
3. 学会等名 公益財団法人発酵研究所 第13回助成研究報告会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 原島 俊 他120名	4. 発行年 2022年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 690
3. 書名 遺伝学の百科事典、継承と多様性の源	

〔産業財産権〕

〔その他〕

本研究によって、崇城大学では初めて国費留学生として採用された2名のバングラデシュからの博士後期課程が博士号を取得した。彼らは5つの論文を発表したが、そのうちのひとつ、「CRISPR-PCD and CRISPR-PCRep: Two novel technologies for simultaneous multiple segmental chromosomal deletion/replacement in *Saccharomyces cerevisiae*」が、日本生物工学会の2021年度論文賞を受賞した。

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	笹野 佑 (SASANO Yu) (90640194)	崇城大学・生物生命学部・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
---------	---------