

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 17 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23651206

研究課題名(和文)代謝機能解析及び物質生産用宿主として利用可能な分裂酵母大規模遺伝子削除株の取得

研究課題名(英文)Characterization of large-scale genome-reduced fission yeast strains

研究代表者

竹川 薫 (Takegawa, Kaoru)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50197282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：分裂酵母は真核生物の中で最も遺伝子数の少ない生物の1つである。申請者らは新しく開発した遺伝子削除法を用いて、分裂酵母の染色体遺伝子をさらに削除することを試みた。その結果、第1および第2染色体末端付近の合計約660kbを同じ株で削除した大規模遺伝子削除株の創製に成功した。分裂酵母大規模遺伝子削除株は野生株とほぼ同等の生育を示し、また異種タンパク質であるGFPやヒト成長ホルモンの培地への分泌量が野生株よりも約2倍多くなった。以上の結果から今回取得した分裂酵母大規模遺伝子削除株は物質生産などにも適用可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：The gene number of *Schizosaccharomyces pombe* belong to smallest class in free-living eukaryotes. We further reduced *S. pombe* gene number by genome reduction to examine a minimal gene set required for growth in laboratory condition. The genome-reduced strain has four deletion regions. As results of the genome reductions, 224 genes of total approximately 5100 genes were reduced. The quadruple-deletion strain that has total deletion size of 657.3 kb, showed some decreasing effects of the uptake of glucose and a part of amino acids in comparison with the parental strain. In the quadruple-deletion strain, cellular ATP concentration was increased 2.7-fold and the production level of an enhanced green fluorescent protein (EGFP) was improved to 1.7-fold.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：分裂酵母 遺伝子削除 物質生産 代謝機能

## 1. 研究開始当初の背景

生物は様々な環境に対応するため特殊な条件下のみで発現される多数の遺伝子を持っている。これらの遺伝子群は栄養十分で生育環境の整った条件においては不要であり、無駄なエネルギーを消費している。Venterらは、これまでに最小のゲノム(570kb)で最小遺伝子数(517)の生物 *Mycoplasma genitalis* にランダムに変異を生じさせ、382 個の遺伝子で生育可能であることを報告した(PNAS 103, 425-430 (2006))。逆に DNA 合成装置で必要最小限と考えられる遺伝子を合成していくことで最小の人工生物を作りだす試みも行われ、Venterらは1.08メガのDNAを合成して最小ゲノム生物の合成を行っている(Science 329, 52-56 (2010))。

このような最小遺伝子生物を作る試みはバクテリアなどの原核生物で行われており、真核生物ではこれまでにほとんど報告はない。最初に全ゲノム塩基配列が明らかになった出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では約6,200個の遺伝子の中で約1,100個が生育に必須な遺伝子であることが知られている。しかし実際には合成致死(2つ以上の非必須遺伝子でも同時に破壊すると初めて致死性を示す)表現型を示すなど単純ではない。このように出芽酵母を始め真核生物の最小遺伝子セットを同定することは極めて困難である。

我々は平成13-17年度に資金援助を得て行ったNEDOプロジェクト「分裂酵母MGFの開発研究」において、異種タンパク質生産を効率的に行うためには無駄なエネルギー消費を出来るだけ抑えることにより、通常の栄養豊富な培養条件下では生育に重要ではない遺伝子を可能な限り削除して異種タンパク質生産に特化した分裂酵母株を作れないかと考えた。そこで分裂酵母染色体を大規模に削除する方法を考案した。さらに分裂酵母染色体から大規模に遺伝子を一度に削除する

方法の開発を試み、新しい分裂酵母遺伝子削除方法を報告した(Nucleic Acid Res. 34, e11 (2006))。本法は従来の方法とは全く異なり、遺伝子削除を行った「痕跡」が全く染色体上に残らないために、今後遺伝子組換え酵母を用いた医薬品等の生産等の産業用酵母として十分に使用できることが期待できる。そこでこの方法を用いて、出来るだけ不要な遺伝子が削除された産業利用可能な分裂酵母株を作ることが出来ないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、大規模に遺伝子が削除され、遺伝子発現制御機構の解析や異種タンパク質生産などの様々な研究に適用可能な分裂酵母モデル実験株を創製することである。真核生物では技術的に様々な困難な点があり、実際にはこのような研究はほとんど行われていないが、我々の開発した新しい染色体加工技術を用いた新しいアプローチにより、最終的には大規模に遺伝子が削除され、機能未知な非必須遺伝子が大幅に削除され、生育や物質生産能力の向上した分裂酵母モデル実験株を作り出すことを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1. 分裂酵母の必須遺伝子の同定と削除可能領域の検討

分裂酵母の遺伝子を削除する際に最も重要な問題は必須遺伝子をどのように破壊せずに多くの遺伝子を削除するかである。これまで我々は出芽酵母の全必須遺伝子約1,100個と相同性の高い分裂酵母遺伝子を検索し、これらを分裂酵母の仮想必須として分裂酵母の染色体上に印をつけた仮想必須遺伝子染色体マップを作成した。この操作により第一染色体に約30ヶ所、第二染色体に約30ヶ所、第三染色体に約20ヶ所の削除可能領域(仮

想必須遺伝子の存在しない領域が 50 kb 以上あるところ)を選び出すことができた。また、分裂酵母の必須遺伝子に関する新たな報告(Nat. Biotechnol. 28, 617-623, 2010)があり、我々の仮想必須遺伝子染色体マップの再検討を行った。分裂酵母の仮想必須遺伝子は染色体上に平均して約 20-30kb ごとに存在しているが、3 本の染色体の約 20 ヶ所程度は 50kb 以上仮想必須遺伝子が存在しない領域を見出したので、この領域を削除した。とりわけ出芽酵母にはホモログが存在しない分裂酵母特異的遺伝子については、単独破壊株の取得も含めて慎重に機能解析を行い、削除すべきかを検討した。

## 2. 各種遺伝子削除株の生育速度の検討と多重遺伝子削除株の構築

50kb 以上削除できた分裂酵母削除株を遺伝学的な掛け合わせを行ない、単独破壊株の別の領域の削除を試みることで、1つの株で複数箇所が削除された多重削除株を作製した。その際、予期できない合成致死の効果が生じる可能性があるため、削除領域の組み合わせは出来るだけ多く検討した。

## 2. マイクロアレイ解析による遺伝子削除株の遺伝子発現解析

本研究により遺伝子が削除された株においては、削除された遺伝子は確実に発現していないが、さらに転写因子などの他の遺伝子の発現に關与する遺伝子が除去された場合には、遺伝子は実際には削除されていないが多くの遺伝子の発現も抑えられることが予想される。逆に遺伝子の抑制に關与していた遺伝子を削除した場合には、抑制されている遺伝子の脱抑制が起こっている可能性がある。我々は分裂酵母の全遺伝子の発現を解析するマイクロアレイ用 DNA チップを旭硝子(株)ASPEX と共同で作製した。そこで分裂酵母マイクロアレイを用いて、大規模遺伝子削除株の全遺伝子の発現がどのように変化したのか解析を行った。

## 4. 研究成果

### 1. 分裂酵母大規模遺伝子削除株の創製

分裂酵母は約 4900 個の遺伝子を持ち、その約 26.1%が必須遺伝子であることが最近報告された<sup>6)</sup>。これらの必須遺伝子は、3 本の染色体上に満遍なく散在しているが、第 1、第 2 染色体末端付近には比較的広い非必須遺伝子領域が存在している。そこで Latour 法と名付けた我々の開発した新しい遺伝子削除法による大規模遺伝子削除を試みた。本法はまず破壊したい特定の領域を選び、片方にマーカー *ura4<sup>+</sup>* 遺伝子と削除したい領域のもう片方の遺伝子の一部を PCR により増幅して貼り付ける。目的の領域に張り付いたコロニーを、5-フルオロオロチン酸(FOA)含有培地に生育させることで相同組換えが起こり、この領域内の全ての遺伝子が全て削除される。本法は 1)FOA で *ura4<sup>+</sup>* 遺伝子が除去されると、削除された領域の周りに遺伝子操作の「痕」が全く残らない、2)FOA 処理により、*ura4<sup>+</sup>* 遺伝子が完全に除去されるので再びウラシル要求性を用いたセレクションが可能であり、同一株での多重遺伝子削除が可能である、3)一度遺伝子を貼り付けてから FOA による削除を行うために、削除できない場合にはこの領域に必須遺伝子が存在することが推定可能である、などの利点を持っている。

本法を用いて、必須遺伝子の中で最も染色体末端にある遺伝子は、第 1 染色体左腕 (ALT) では *trs33*、第 1 染色体右腕 (ART) では *sec16*、第 2 染色体左腕 (BLT) では *zas1*、第 2 染色体右腕 (BRT) では *usp109* であることを明らかにした。Kim らによって発表された分裂酵母のゲノムワイドな一遺伝子破壊解析では、上記で述べた必須遺伝子より各染色体末端側にある SPAC1F8.07c、SPBC1348.06c、*alr2* も必須遺伝子であると報告されていた。我々の実験結果から SPAC1F8.07c を欠失すると著しい生育遅延を

生じるが生育可能であり、また他の2つの遺伝子欠失はほとんど生育に影響しなかった。この違いは実験に用いた親株の問題かもしれないが原因については不明である。

我々の目的である、増殖効率を低下させることなく物質生産宿主としての細胞機能の安定性も確保するため、慎重に削除領域の検討を行い、染色体大規模削除領域を様々な組合せで統合し、合計15種類の染色体大規模削除株を創製した。最大染色体削除株は、第1, 第2染色体両末端の4領域削除を削除したIGF742株で、その染色体削除サイズは657.3kb(全ゲノムの約4.7%)、遺伝子削除数は216遺伝子であった。このようにして、得られた大規模遺伝子削除株は、最大比増殖速度が親株の約80%、細胞形態は若干小さくなる傾向を示すが、最終到達濁度は野生株とほぼ同等で、核も正常に分配されていた。削除領域である染色体末端はヘテロクロマチンを形成するタンパク質が結合する領域であるため、テロメアへの影響も懸念されたが、栄養培地で100世代細胞分裂を行ってもテロメア長に異常は観察されなかった。以上の結果から、我々の取得した分裂酵母大規模遺伝子削除株の生育特性に関しては、ほぼ野生株と同等の安定性を維持し、物質生産用宿主として使用可能であると判断した。

## 2. 分裂酵母大規模遺伝子削除株による異種タンパク質生産

一連の操作で得られた各種染色体大規模削除株を宿主として、モデルタンパク質を用いた物質生産評価を実施した。モデルタンパク質として、緑色蛍光タンパク質(EGFP)は細胞内におけるタンパク質合成効率、一方、ヒト成長ホルモン(hGH)とヒトトランスフェリン(hTF)にはN末端にシグナル配列を付加し、タンパク質合成効率に加えて分泌効率も評価した。

大規模遺伝子削除株は合成培地(EMM)に

おけるEGFPタンパク質合成効率は、野生株の約1.7倍生産量が高まることがわかった。また栄養培地(YPD)を用いたhGHとhTFの分泌発現解析では大規模遺伝子削除株で分泌発現効率が最も高い値を示した。EGFPの生産については、染色体末端領域の削除に伴って生産量が増加しており、削除した特定の1つの遺伝子が影響しているのではなく、100kb以上の染色体領域の削除により生産性が向上するという興味深い結果が得られた。

以上の結果から、分裂酵母の大規模遺伝子削除株は、異種タンパク質生産において野生株と同等、もしくは分泌生産能が増加するということがわかり、本株が産業応用へ適用可能であることを示すことができた。

## 3. 分裂酵母大規模遺伝子削除株の細胞内代謝系の解析

実際に異種タンパク質生産性が向上した染色体大規模削除株の細胞内では、どのような現象が生じているのか解析を行った。EGFPを菌体内生産する大規模削除株を培養してトランスクリプトーム解析を行った。その結果、大規模削除株の特徴として、一部の窒素飢餓で誘導される遺伝子の発現が上昇しており、アンモニアトランスポーター等の発現量も上昇していた。さらに、取り込んだアンモニアを利用して、グルタミン酸やグルタミンを生合成する遺伝子の発現量が上昇していた。グルタミン酸は、様々なアミノ酸生合成過程においてアミノ基供与体として機能している。これは大規模削除株では各種アミノ酸生合成過程が亢進しているため、グルタミン酸合成遺伝子の発現量が増加している可能性が示唆された。ただしメタボローム解析結果から、大規模削除株ではアミノ酸生合成系の最終産物となる各種アミノ酸の量が全体的に増加しているというわけではなく、増加を示したアミノ酸はシステインのみで、逆にアラニン、セリン、グルタミン酸、ヒス

チジン、イソロイシン、アルギニン、メチオニンなどは減少していた。また、エネルギー通貨となる ATP 量が増加していることから、アミノ酸生合成を含む細胞内の代謝活性が上がっていることが示唆された。さらに、GTP 量も増加していることから、GTP を必要とするリボソームによるタンパク質の生合成も亢進しており、それに伴い大規模削除株では異種タンパク質 EGFP 合成量が増加していることが予想された。

真核微生物である分裂酵母は、原核生物の大腸菌や枯草菌とは異なり、必須遺伝子が染色体上にほぼ均等間隔で存在しており、大規模に染色体を削除する試みは極めて困難であった。本研究により、分裂酵母の染色体を縮小化することで、異種タンパク質の生産性を向上することも可能であることがわかった。しかし、削除された遺伝子の中から、なぜ野生株よりも EGFP の菌体内生産量が増加するかを説明できる遺伝子を特定することは現時点では難しかった。しかしながら、特定の遺伝子を削除した効果より、むしろ染色体を大規模に削除したことによる影響であることが示唆された。今後はプロテアーゼや分裂酵母細胞内の小胞輸送系に関わる遺伝子などの解析を行い、異種タンパク質分解が抑制され、タンパク質の分泌生産効率をさらに高めた分裂酵母大規模遺伝子削除株の創製を続けていきたい。

#### 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 2 件)

1. Sasaki M, Kumagai H, Takegawa K, and Tohda H: Characterization of genome-reduced fission yeast strains. *Nucleic Acids Res* 41(10), 5382-5399

(2013).

2. 竹川 薫、佐々木真弓、東田英毅：染色体工学技術を利用した分裂酵母の有用物質生産システムの構築、*生物工学会誌* 89, 521-523 (2011)

[学会発表](計 6 件)

1. 竹川 薫：分裂酵母の染色体改変技術を利用した異種タンパク質生産法の開発、日本農芸化学会 2012 年度大会 (2012) 3.22-25 京都

2. 藤木真優・佐々木真弓・竹川 薫：分裂酵母の大規模遺伝子削除株の諸性質の解析、平成 24 年度日本農芸化学会西日本支部及び日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会 (2012) 9.28-29 鹿児島

3. 藤木真優・佐々木真弓・竹川 薫：分裂酵母の非必須遺伝子を大規模に削除した株の諸性質の解析、第 30 回 YEAST WORKSHOP (2012) 11.16-17 (翠山荘) 山口市

4. 藤木真優、佐々木真弓、竹川 薫：分裂酵母の非必須遺伝子を大規模に削除した株の創製と諸性質の解析、日本生化学会九州支部例会 (2013) 5.18-19 佐賀大学

5. 藤木真優、佐々木真弓、竹川 薫：非必須遺伝子を大規模に削除した分裂酵母株の創製と物質生産への利用、第 50 回化学関連支部合同九州大会 (2013) 7.6 北九州市

6. 藤木真優、アリムジャン・イディリス、竹川 薫：分裂酵母ゲノムに存在するトランスポゾン様遺伝子配列を利用した異種タンパク質生産系の構築、日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部および日本ビタミン学会近畿・中国四国・九州沖縄地区合同大会 (2013) 9.5-6 県立広島大学

7. 藤木真優、アリムジャン・イディリス、竹川 薫：分裂酵母のゲノム中に複数存在するトランスポゾン様遺伝子配列を利用した異種タンパク質生産系の構築、第 31 回 Yeast Workshop (2013) 11.1-2 鹿児島大学

〔図書〕(計 1件)

1. 竹川 薫、松沢智彦、東田英毅：第3章4  
項 オミックス情報を用いた分裂酵母の改  
変、微生物を活用した新世代の有用物質生産  
技術、p70-77, シーエムシー出版 (2012)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

竹川 薫 (九州大学農学研究院)

研究者番号：50197282