

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780080

研究課題名（和文） 出芽酵母におけるゲノム工学技術の開発とゲノムエボリューション

研究課題名（英文） Development of genome-engineering technology and its application to genome evolution in *Saccharomyces cerevisiae*

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：出芽酵母を対象に、一度の形質転換操作で染色体の任意領域に重複あるいは欠失を導入できる方法を用いて、ゲノワイドに 200 kb 毎の染色体部分重複および部分欠失を導入し、任意領域の部分異数性が表現型に与える影響を解析した。その結果、特定の染色体領域の部分重複や部分欠失が産業上重要となるエタノールや高温、酸ストレス耐性の向上につながることを見出した。本研究の成果は、ゲノム工学技術を用いた新たな微生物育種法の確立につながることから、発酵産業の発展に貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：Using PCR-mediated chromosomal duplication and deletion technologies that we developed, we investigated whether segmental duplication or deletion of specific chromosomal regions improved industrially important phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. Systematic analysis of segmental duplication and deletion of chromosomes revealed that alteration of copy number of specific chromosomal regions enhanced resistance against a variety of stresses including ethanol, high-temperature and acid stresses. These results indicate that the genome-engineering technologies provide a unique and useful tool not only for analyzing genome function but also for breeding of *S. cerevisiae* for efficient production of bioethanol or organic acids.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：部分異数性、ゲノム、育種、出芽酵母

1. 研究開始当初の背景

(1) 20 世紀後半に確立された組換え DNA 技術が、遺伝子の操作を通じて生命を工学することを飛躍的に加速したのは周知のごとくである。しかし、遺伝子を操作する時代からゲノムを操作する時代へと移りつつある今、申請者らは、生命を工学するための次世代基盤技術として、ゲノムを自在に操作・改変す

る技術が重要であると考え、数年前から、産業上も重要であり真核細胞のモデルでもある出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を材料にその開発に力を注いできた。そのためのキーとなる技術として、PCR を利用してワンステップで出芽酵母の染色体を何度でも繰り返し分断できる染色体の分断技術を確立した。染色体の分断は、任意の部位で染色体

を2つに切断するが、切断後もどちらとも染色体として機能させる技術である。染色体の分断技術を応用して、染色体部分欠失技術も開発した。これらのゲノム工学技術は、酵母染色体の自在な改変を可能とした。

(2) 産業用酵母が示す染色体の異数性および部分異数性は、その優れた発酵特性やストレス耐性形質との関連が示唆されている。また、病原性酵母 *Candida albicans* では、多数の遺伝子を含む特定の染色体領域のコピー数を増幅させることによって、薬剤耐性を獲得する機構が知られている。ごく最近、出芽酵母においても、様々なストレスに応じて、染色体の多様な領域のコピー数変化が誘導され、ストレス耐性を獲得する現象が報告された。染色体の異数性を変化させる機構は、真核微生物である酵母に保存された、環境変化に応じてゲノムを素早く進化させる環境適応機構の一つであると考えられる。

2. 研究の目的

上記のような背景から、代表者らが独自に開発したゲノム工学技術を駆使して、産業上重要な微生物である出芽酵母を材料に、さまざまな特性を生み出す染色体の部分重複および部分欠失をゲノムワイドに導入することが可能となれば、染色体の部分コピー数変化によるゲノムの進化を介した様々な特性を有する酵母細胞の導出が可能になると考えた。そこで、本研究では、染色体の分断技術を利用して、任意の染色体領域をワンステップで簡便に重複させるための染色体部分重複技術を確立する。そして、染色体部分欠失技術も合わせて使用し、ゲノムワイドな染色体の部分重複および部分欠失株の構築とその細胞特性を解析した。加えて、染色体の分断技術の新たな応用展開を目指して、染色体の分断技術を基にしたゲノムの大規模な再編成と育種への応用についても検討した。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株

出芽酵母野生型株として、BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 LYS2 met15Δ ura3Δ 0*)、BY4742 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ 0 MET15 ura3Δ 0*)、およびその二倍体である BY4743 (*MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ 0 met15Δ 0/MET15 ura3Δ 0/ura3Δ 0*) を使用した。染色体の分断と脱落を利用したゲノムの再編成では、野生型株として FY833 株 (*MATa his3Δ200 leu2Δ1 lys2Δ 202 trp1Δ 63 ura3-52*) を使用した。酵母の培養は、特に記載しない限り、生育至適温度である 30℃で行った。

(2) 染色体の部分重複および部分欠失

酵母染色体の部分重複には、一倍体細胞を対象として、PCR-mediated chromosomal duplication 法 (図 1) を適用した。

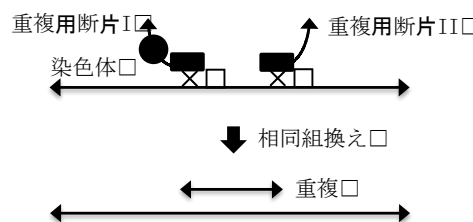


図 1. PCR-mediated chromosomal duplication 法

PCR により、相同組換えに必要な標的領域、選択マーカー、セントロメア、およびテロメア配列を保持した重複用断片 I と II を調製し、一倍体酵母細胞に導入することで部分重複株を構築した。

酵母染色体の末端領域の欠失には、二倍体細胞を対象として、PCR-mediated chromosomal deletion 法 (図 2) を適用し、ハプロ部分欠失株を構築した。

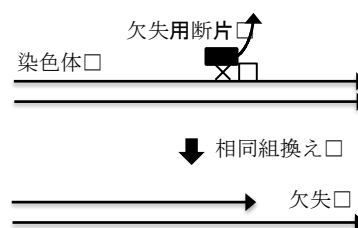


図 2. PCR-mediated chromosomal deletion 法

PCR により、相同組換えに必要な標的領域、選択マーカー、およびテロメア配列を保持した欠失用断片を調製し、二倍体酵母細胞に導入することでハプロ部分欠失株を構築した。

酵母染色体の内部領域の欠失には、まず、一倍体細胞を対象にして、染色体の分断技術による欠失予定領域のミニ染色体化を行った。その後、野生型株と交雑させ、二倍体を形成した後、当該ミニ染色体の脱落によりハプロ部分欠失株を構築した。ミニ染色体の脱落には、薬剤である 5-FOA を用いた *URA3* マーカーのカウンターセクション法を使用した。

4. 研究成果

(1) 染色体部分重複技術の確立と染色体部分重複株の細胞特性解析

染色体の分断技術を応用することにより、染色体の部分重複技術を確立した (図 1)。重複効率は、得られた形質転換体の 10% から 90% と差はあるものの、重複により致死となる領

域以外は、簡便に重複させることが可能となった。

解析のために安定性が高く、遺伝子も十分な数がのっている 150 kb 程度 (100 個程度の遺伝子) を重複の単位として、第 1 番から第 16 番までの染色体の端から 200 kb 毎にそれぞれの領域が部分重複した酵母株の構築を試みた。これまでに、第 1 番から第 7 番、および第 10 番から第 16 番染色体の部分重複を行った。得られた部分重複株の細胞特性を解析したところ、第 1 番染色体 [1 bp - 100 kb] の重複は硫酸ストレス耐性を付与し、第 3 番染色体 [1 bp - 160 kb] と [160 kb - 315 kb] の重複はエタノールおよび硫酸ストレス耐性を付与することを見出した (図 3)。部分重複染色体株の安定性を調べたところ、非常に安定に保持されることが分かった。

一方、第 4 番染色体 [800 kb - 1,000 kb] は重複させることができなかった。そこで、当該領域を 50 kb 毎の 4 つに分けて重複させたところ、それぞれは重複させることが可能であった。したがって、第 4 番染色体 [800 kb - 1000 kb] には、同時に 2 コピーに増幅すると致死となる複数個の遺伝子の存在が示唆され、染色体の部分重複技術はゲノムの機能解析にも役立つツールを提供できることが分かった。

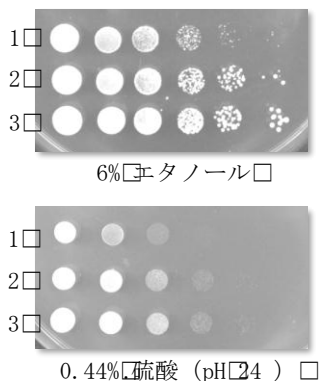


図 3. 染色体部分重複株のストレス耐性

野生型株 (1)、第 3 番染色体 [1 bp - 160 kb] 重複株 (2)、および第 3 番染色体 [160 kb - 315 kb] 重複株 (3) を 6% エタノールおよび 0.44% 硫酸含有培地に、 10^6 個の細胞数から順次 10 倍希釈してスポットし生育させた。

(2) 染色体部分欠失株の構築と細胞特性解析

染色体部分重複実験で重複させたのと同じ領域を部分欠失させるが、それらの領域には必ず必須遺伝子が存在する。そこで、ハプロ (2n-1) 欠失でもその欠失効果が表現型に現れると予想して、二倍体細胞において同一領域をハプロ欠失させることを試みた。まず、染色体末端領域については、二倍体細胞を対象として、PCR-mediated chromosomal deletion 法 (図 2) を適用し、ハプロ部分欠

失株を構築した。染色体内部領域については、欠失予定領域がミニ染色体化された一倍体細胞を構築し、野生型株との二倍体形成後、ミニ染色体の脱落によってハプロ部分欠失株を構築した。これまでに、第 8 番、13 番、14 番、15 番、16 番染色体の部分欠失を行った。第 14 番染色体 [600 kb - 800 kb] のハプロ部分欠失により、高温耐性とエタノール耐性を獲得することが明らかとなった。

一方、一倍体細胞を用いた、非必須遺伝子のみからなる領域の抽出とその領域の欠失実験についても検討した。その結果、第 4 番染色体 [1 bp - 30 kb]、[1,470 kb - 1,490 kb] および [1,500 kb - 1,530 kb] の欠失により、乳酸や高温耐性を獲得することが明らかとなった (図 4)。

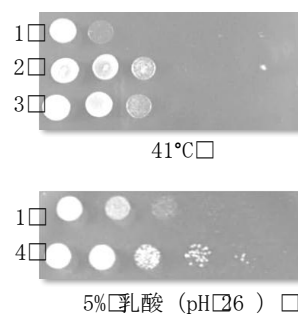


図 4. 染色体部分欠失株のストレス耐性

野生型株 (1)、第 4 番染色体 [1,470 kb - 1,490 kb] 欠失株 (2)、第 4 番染色体 [1,500 kb - 1,530 kb] 欠失株 (3)、および第 4 番染色体 [1 bp - 30 kb] 欠失株 (4) を 41°C および 5% 乳酸培地に、 10^6 個の細胞数から順次 10 倍希釈してスポットし生育させた。

酵母のエタノールや高温、酸ストレス耐性化は、循環型社会を目指したバイオマスからのエタノールや有機酸など基幹化合物の効率的な発酵生産に重要となる。「ゲノムの特定領域の部分重複・部分欠失による細胞機能の改良」という本研究の成果は、ゲノム工学技術を用いた新たな微生物育種法の確立につながることから、真核細胞のゲノムの機能解明に資するだけでなく、バイオによる循環型社会の構築を目指した発酵産業の発展にも貢献すると期待される。

(3) 染色体の分断と脱落を利用したゲノムの再編成

一倍体細胞を用いて、染色体の分断による非必須遺伝子のみからなる多数のミニ染色体の作成とそれらのミニ染色体の脱落を通じた、天然には存在しない多様なゲノム組成を持つ酵母細胞の創製について検討した。染色体の分断技術を駆使して、脱落可能と思われる多数のミニ染色体を保持する酵母細胞を作成し、栄養培地で培養することによってミニ染色体の脱落を誘導した。その結果、さ

さまざまな組み合わせでミニ染色体の脱落が起こり、天然には存在しない多様なゲノム組成を持つ酵母細胞を容易に創製できた。染色体の分断技術を利用することにより、これまでの方法では成しえなかったゲノムの大規模な再編成が可能であることが分かった。

(4) ゲノムの再編成と育種

ゲノムの再編成技術を利用して、高エタノール耐性を示す株の育種を試みた。エタノールストレス培地で、脱落可能なミニ染色体を多数保持した染色体分断株を経代培養し、ミニ染色体の脱落を誘導した。その結果、第14番染色体右端と第8番染色体左端が脱落し、高エタノール耐性を示す株が得られた(図3)。染色体の分断技術を利用したゲノムの再編成技術は、菌株育種に利用できることが明らかとなった(図5)。

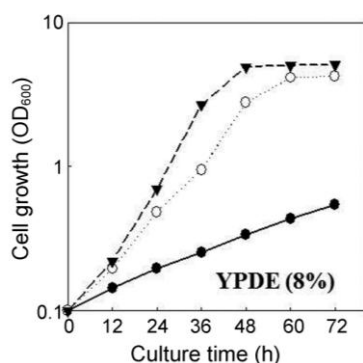


図5. ゲノムの再編成と育種

8%エタノール含有培地で、親株(ミニ染色体保持株:黒丸)、エタノール耐性株(第14番染色体右端と第8番染色体左端が脱落:白丸)、およびエタノール耐性株をさらに高濃度エタノール含有培地で継代培養することによって得られたエタノール耐性株(黒三角)の生育を調べた。

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 Youji Ueda, Shigehito Ikushima, Minetaka Sugiyama, Ryo Matoba, Yoshinobu Kaneko, Kenichi Matsubara, Satoshi Harashima: Large-scale genome reorganization in *Saccharomyces cerevisiae* through combinatorial loss of mini-chromosomes. *J. Biosci. Bioeng.* 113(6):675-682 (2012). doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.01.013. 査読有
- ② A-Hwang Park, Minetaka Sugiyama, Satoshi Harashima, Yeon-Hee Kim:

Creation of an ethanol-tolerant yeast strain by genome reconstruction based on chromosome splitting technology. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22(2):184-189 (2012). 査読有

[学会発表] (計7件)

- ① 杉山峰崇, Waranya Netesuntorn, 松原裕樹, 林達也, 原島俊: 出芽酵母におけるゲノム網羅的な染色体部分重複と表現型解析. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11日, マリンメッセ福岡(福岡).
- ② Saeed Kaboli, Takuya Yamakawa, Minetaka Sugiyama, Yoshinobu Kaneko, Satoshi Harashima: Random walks on chromosomal regions reveal hidden lethal relationships among non-essential genes in the genome of *Saccharomyces cerevisiae*. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11日, マリンメッセ福岡(福岡).
- ③ Saeed Kaboli, Takuya Yamakawa, Minetaka Sugiyama, Yoshinobu Kaneko, Satoshi Harashima: Revealing hidden lethal relationships among non-essential genes using systematic lethal screen on chromosomal regions in the genome of *Saccharomyces cerevisiae*. Aachen-Osaka Symposium, Dec. 4, 2012, Aachen (Germany).
- ④ Waranya Netesuntorn, Yuki Matsubara, Tatsuya Hayashi, Minetaka Sugiyama, Yoshinobu Kaneko, Satoshi Harashima: Exploitation of PCDup technology for breeding and genome analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. 第64回日本生物工学会大会, 2012年10月25日, 神戸国際会議場(兵庫).
- ⑤ Waranya Netesuntorn, Yuki Matsubara, Tatsuya Hayashi, Minetaka Sugiyama, Yoshinobu Kaneko, Satoshi Harashima: Exploitation of PCDup technology for breeding and genome analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. 第45回酵母遺伝学フォーラム, 2012年09月06日, 京都大学宇治キャンパスきはだホール(京都).
- ⑥ 松原裕樹, 岩見康太郎, 杉山峰崇, 金子嘉信, 原島俊: 出芽酵母における染色体任意領域重複技術の開発と応用. 第63

回 日本生物工学会大会, 2011年9月26日,
東京農工大学(東京).

- ⑦ 松原裕樹, 岩見康太郎, 杉山峰崇, 金子嘉信, 原島 俊: 出芽酵母における染色体任意領域重複技術の開発と応用. 第44回 酵母遺伝学フォーラム, 2011年9月5日, 九州大学医学部百年講堂(福岡).

[図書] (計 2 件)

- ① Yu Sasano, Minetaka Sugiyama, Satoshi Harashima: Part 2, chapter 5, Development and application of novel genome engineering technologies in *Saccharomyces cerevisiae*. Sakayu Shimizu and Hideharu Anazawa (eds). Microbial production: from genome design to cell engineering. Springer (2013) in press.
- ② 杉山峰崇, 笹野 佑, 原島 俊: 酵母ゲノム工学の最前線, 細胞工学 Vol. 32, 秀潤社, 592-599 (2013).

[その他]

ホームページ等

<http://www.bio.eng.osaka-u.ac.jp/mg/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(4) 研究協力者

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