

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380048

研究課題名(和文)ゲノムのワードプロセッシング技術の新展開 - 酵母染色体任意領域重複技術の開発

研究課題名(英文)Development of for creating segmental aneuploid word processing technology of genome in yeast

研究代表者

原島 俊 (HARASHIMA, Satoshi)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70116086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：産業酵母の有用形質には染色体の部分異数性が重要であることが明らかになってきた。こうした部分異数性と有用表現型との関係を明らかにするため、任意領域の重複を自在に作り出すゲノム工学技術(PCDup法と命名)を開発した。PCDup法により、16本の染色体の全てについて、200kb 毎の重複(62領域)を作成することを試みた。その結果、53領域について重複株を得る事ができた。さらに53株について表現型を調べた。その結果、高温や酸に対して耐性が見られる株もあった。重複領域内の遺伝子の単独過剰発現ではそうした表現型は報告されていないので、それらの表現型は重複領域内複数遺伝子の同時重複によると考えられた。

研究成果の概要(英文)：It is being known that segmental aneuploidy plays an important role for industrial yeast strain to display useful traits. We have developed a news genome engineering technology to create segmental duplication of any desired region of chromosome in yeast. This technology designated PCDup for PCR-mediated chromosome segmental duplication was applied to construct a series of 62 strains harboring every 10 kb to 200 kb chromosomal region. 53 among 62 regions were successfully duplicated while other regions were not. Phenotypic analysis of 53 strains harboring segmental duplication revealed that some of the strains displayed industrially useful trains such as resistance to high temperature and acid environment. Since it has never been reported that over-expression of individual genes present on those regions causes such phenotype, we suggest that those phenotypes were likely due to simultaneous over-expression of some of genes present on those regions.

研究分野：酵母遺伝学, ゲノム機能工学

キーワード：酵母 ゲノム工学 染色体工学 異数体 バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

持続的な社会の存続に必須の様々な汎用化成品やバイオ燃料などの生産には、育種技術は、まだまだ十分であるとは言い難い。近年、生産の場で、細胞は複数のストレスに曝されることが認識され、生産株には、多様なストレスに耐性の形質が必須であることが明らかになってきた。一方では、有用形質は多くの遺伝子に支配されていることも明らかになり、その改変には、複数の遺伝子を一挙に操作する新しい育種技術が必要であることも共通認識となりつつある。

こうした背景のもと、近年、上記の要求に応え得るいくつかの技術が報告されている。例えば、多くの遺伝子のプロモータに結合する TATA 結合タンパクに変異処理を施した後細胞に導入し、大規模な転写変換を引き起こす「グローバル転写装置工学」、多様な配列に結合できる人工的な転写因子プールを作成し、これにより多数の遺伝子の転写変換を創出する「人工転写因子工学」などである。これらの技術は、転写レベルで無限の多様性を創り出した後、その中から、目的に合致した表現型を示す最適細胞を選んでくることを目論むものである。しかし、こうした技術の多くは、もともと細胞機能を解明することを目的として開発されたものであり、そのバイオテクノロジーへの応用はこれからの課題である。

こうした背景のもと、申請者らは、ゲノムの大規模操作が、今後の微生物育種にとって重要になると考え、酵母を材料として、様々なゲノム工学技術を開発してきた。そのためのキーテクノロジーとなるものが染色体を任意の部位で分断できる「ワンステップ染色体分断技術(PCS法: PCR-mediated chromosome splitting)」であり、この技術が、ゲノムの多様性創出を含む、多様なゲノム操作に応用できることを、約 20 報の論文によって発表してきた。このように、本研究の開始当初の背景は、i) ゲノムレベル、あるいは ii) ゲノムの発現レベルのいかにかわらず、「多様性創出による微生物育種」という新しい風が吹き始めた頃と言える。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、本申請では、ゲノム工学技術をさらに発展、拡張するため、これまで、いずれの生物でも開発されていない、「染色体任意領域の重複技術の開発; PCDup 法: PCR-mediated chromosome duplication 法」に焦点をあてた研究を行った。申請者らは、文章がワードプロセッサで自在に操ることができるようになったように、種々のゲノム工学技術の発展によって、ゲノムが、まさに、文章のようにプロセッシングできるようになりつつあることを実感しており、こうした様々な技術によるゲノムの大規模操作を、「ゲノムのワードプロセッシング」と呼んでみたいと思っている。ゲノムの任意領域の重複技術も、ゲノムのワードプロセッシング技術のひとつであるが、この技術が開発できれば、ゲノムワイドな重複株について種々の表現型を解析し、「酵母ゲノム機能を理解する」だけでなく「有用菌株の

育種」にも応用できると考え研究を行った。

3. 研究方法

(計画 1) 染色体任意領域重複技術の開発

ダウン症候群やガン細胞の例を持ち出すまでもなく、遺伝子自身は正常であっても、染色体の異数性や部分異数性によってそのコピー数のバランスが異常になると、細胞生理に重要な影響が出てくることは良く知られている。単一遺伝子の重複ではなく、数十の遺伝子が存在する染色体領域の重複が、有用形質にどのような影響を及ぼすかについては、これまで、そうした異常なゲノム組成を持つ細胞を自在に創り出す技術がなかったこともあって全く未知の領域であった。本申請では、望みのサイズの染色体任意領域の重複を可能とするゲノム工学技術を以下のような考え方で開発した。すなわち、申請者らは、既に、ゲノムの任意領域をワンステップで削除する「染色体任意領域のワンステップ削除技術(PCD法: PCR-mediated chromosome deletion)」を開発している。この技術は、クローニングを必要とすることなく、PCR とワンステップの形質転換で、染色体の任意領域を削除できる技術である。染色体任意領域の重複には、この技術で用いるプライマーと全く逆の方向性を持つプライマーを使えばよいと考えた。すなわち、重複を目的とする領域の左端あるいは右端と 50 塩基程度の相同な配列に、テロメア付加のためのシード配列を付けた 2 種のオリゴヌクレオチドをプライマーとし、セントロメア、あるいは形質転換体の選択マーカーを持つプラスミドを鋳型として用いて PCR により 2 種の DNA モジュールを増幅し、それらを用いて形質転換を行う。導入した 2 種の DNA モジュールのそれぞれと重複を目指す領域の左端、および右端とで相同組換えが起こり、その結果、ワンステップで当該の領域からなる新しい染色体が生成することを期待した。

(計画 2) 全ゲノムに渡る染色体部分重複株の構築と表現型の解析

産業酵母の有用形質には、染色体部分領域の重複が重要であることが明らかになってきた。こうした部分異数性と(有用)表現型との関係を明らかにするため、計画 1 で開発した重複技術により、出芽酵母 1 倍体が持つ 16 本の染色体に渡る、ゲノムワイドな染色体部分領域重複株を、100kb~200kb の大きさで作成し、そうした部分異数性(segmental duplication)の表現型、あるいは細胞生理(有用形質)に及ぼす効果を解析した。

4. 研究成果

(計画 1) 染色体任意領域重複技術の開発

研究方法の項で述べた戦略により、染色体の任意領域を自在に重複させるゲノム工学技術を開発することができた。この技術を PCDup (PCR-mediated chromosome segmental duplication) 法と命名した。PCDup 法により重複できる長さには下限は無いと考えられたが、上限は 300kb までであった。重複可能領域に上限がある理由としては、重複現象が、生成し

た染色体の娘細胞への不分離によって起こると想定されることから、300kb以上の長さになると染色体の不分離(chromosome non-disjunction)の頻度が著しく低くなるためと考えられた。

16本の染色体の全てについて、100kb～200kb毎の重複(合計62領域)を試みたところ、62領域のうち53領域については重複株を得る事ができたが、9領域については重複が得られなかった。重複株が得られなかった9領域について、200kb領域を任意に50kb領域に分け重複を試みた結果、7領域については、50kb領域のひとつが重複できず、残りの2領域については、4つの50kbの全てが重複可能であった。これらの結果より、7領域のそれぞれにおいて重複できない50kbの領域については、その領域内に、コピー数が同時に2コピーに増加すると合成致死を引き起こす遺伝子ペアがある可能性が示唆された。また残りの2領域については、4つの50kbの領域のいずれかの組み合わせにおいて、コピー数が同時に2コピーに増加すると合成致死を引き起こす遺伝子ペアがある可能性が示唆された。

(計画2)全ゲノムに渡る染色体部分重複株の構築と表現型の解析

重複が得られた全53株について表現型の解析を行った。その結果、多くの重複株はストレス感受性を示すものの、高温や酸に対して耐性が見られる株もあった。重複領域内のそれぞれの遺伝子の単独過剰発現では、そうした表現型は報告されていないので、こうした表現型は重複領域内にある複数遺伝子の同時重複に起因すると考えられた。

これらの研究成果より、PCDup法は、簡便に、効率良く染色体任意領域の自在な重複を可能とする新しいゲノム工学技術として有用な方法であると結論した。また、PCDup法により構築した、出芽酵母の全ゲノムをカバーする部分異数体は、産業に有用な酵母の育種分野への貢献可能なリソースとしてだけでなく、薬剤耐性/感受性等、医学薬学分野に関連した種々の細胞生理の異常などを系統的に解析するためのリソースとしても大きな有用性を持っていると期待できる。

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9件)

笹野 佑、Yeon-Hee Kim、杉山 峰崇、原島 俊 多様性創出ゲノム工学技術の開発と微生物育種への応用、*生物工学会誌*、第92巻、第11号、589-592 (2014)

Sasano, Y., Yamagishi, K., Tanikawa, M., Nakazawa, T., Sugiyama, M., Kaneko, Y., Harashima, S. (2014) Stabilization of mini-chromosome segregation during mitotic growth by overexpression of *YCR041W* and its application to chromosome engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* Nov:15(14)1389-1723

Kaboli, S., Yamakawa, T., Sunada, K., Takagaki, T., Sasano, Y., Sugiyama, M., Kaneko, Y., Harashima, S. (2014) Genome-wide mapping of unexplored essential

regions in the *Saccharomyces cerevisiae* genome: evidence for hidden synthetic lethal combinations in a genetic interaction network. *Nucleic Acids Res.* Aug:42(15):9838-53.

Sasano, Y., Sugiyama, M., Harashima, S. (2014) Chapter 5: Development and application of novel genome engineering technology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial production -From genome design to cell engineering-*, *Microbial Production Anazawa H and Simizu S eds.*, Springer, 53-62.

Ueda, Y., Ikushima, S., Sugiyama, M., Matoba, R., Kaneko, Y., Matsubara, K., Harashima, S. (2012) Large-scale genome reorganization in *Saccharomyces cerevisiae* through combinatorial loss of mini-chromosomes. *J. Biosci. Bioeng.* Jun : 113(6):675-82

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、No5、592-599 (2013).

原島 俊 酵母における多様性創出ゲノム工学とその育種への応用 *微生物育種工学のパラダイムシフト*、*生物工学*、Vol.90、No6、302-305 (2012)

原島 俊、Yeon-Hee Kim、西沢正文 出芽酵母におけるゲノムの大規模改変技術の開発と応用 *微生物を活用した新世代の有用物質生産技術*、穴澤秀治 監修、(株)シーエムシー出版、32-41 (2012)

Park, AH., Sugiyama, M., Harashima, S., Kim, YH. (2012) Creation of an ethanol-tolerant yeast strain by genome reconstruction based on chromosome splitting technology. *J. Microbiol. Biotechnol.* Feb:22(2): 184-9

[学会発表](計25件)

笹野 佑、長澤宏器、Saeed Kaboli、杉山峰崇、原島 俊、CRISPR-PCS法による酵母染色体複数部位の同時分断」、*日本生物工学会第66回大会*、2014年9月、札幌

長澤宏器、笹野 佑、Saeed Kaboli、杉山峰崇、原島 俊、出芽酵母におけるミニ染色体のワンステップ作成技術の開発、*酵母遺伝学フォーラム第47回研究報告会*、2014年9月、東京

Saeed Kaboli、Tetsuya Miyamoto、Keisuke Sunada、Yu Sasano、Minetaka Sugiyama、Satoshi Harashima : Segmental haploidization of diploid genome in *Saccharomyces cerevisiae* and its application to breeding、*酵母遺伝学フォーラム第47回研究報告会*、2014年9月、東京

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36回日本分子生物学会年会*、2013年12月、神戸

杉山峰崇、Waranya Natesuntorn、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36回日本分子生物学会年会*、2013年12月、神戸

Saeed Kaboli、Takuya Yamakawa、Deasty Imara、Yu Sasano、Minetaka Sugiyama、Yoshinobu Kaneko、Satoshi

Harashima, Systematic mapping of unexplored regions harboring synthetic lethal interactions in *Saccharomyces cerevisiae* genome、日本生物工学会第65回大会、2013年9月、広島

Waranya Natesuntorn, Yuki Matsubara, Yu Sasano, Minetaka Sugiyama, Satoshi Harashima, Systematic segmental duplication of chromosomes for genome analysis and breeding in *Saccharomyces cerevisiae*、日本生物工学会第65回大会、2013年9月、広島

笹野 佑、長澤宏器、杉山峰崇、原島 俊：
「CRISPR/Cas-PCSシステムを利用した染色体複数部位同時分断技術の開発」、酵母遺伝学フォーラム第46回研究報告会、2013年9月、仙台

Waranya Natesuntorn, Kotaro Iwami, Yuki Matsubara, Yu Sasano, Minetaka Sugiyama, Yoshinobu Kaneko, Satoshi Harashima PCR-mediated chromosome duplication method generates a defined duplicated chromosome as a novel tool for breeding and genome analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. 26th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology 2013.8-9 Frankfurt, Germany

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、福岡

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) (研究分担者)

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

笹野 佑 (SASANO Yu)
大阪大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：90640194

金子嘉信 (KANEKO Yoshinobu)
大阪大学・大学院工学研究科・寄附講座教授
研究者番号：90161182

前川 裕美 (MAEKAWA Hiromi)
大阪大学・大学院工学研究科・寄附講座准教授
研究者番号：80399683