

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580118

研究課題名(和文)ヘテロ接合性消失を利用した2倍体焼酎酵母の1ステップ遺伝子破壊法の開発

研究課題名(英文)Development of one-step gene disruption system of diploid shochu yeast strain using loss of heterozygosity

研究代表者

玉置 尚徳(Tamaki, Hisanori)

鹿児島大学・農学部・教授

研究者番号：20212045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：焼酎酵母は2倍体であり2つある対立遺伝子の片方に変異が生じても形質として表れにくいため変異株の取得は困難であるとされてきた。本研究では、LOH(Loss of Heterozygosity:ヘテロ接合性消失)という現象を利用した2倍体焼酎酵母の遺伝子破壊システム構築を目的とした。リジン(LYS5)とウラシル(URA3)合成に関わる遺伝子を組み合わせた遺伝子破壊カセットをデザインし、焼酎酵母のロイシン合成遺伝子LEU2の1つを破壊した後、LOHを誘発することで両方のLEU2遺伝子破壊に成功した。さらに、用いた破壊カセットを除去することで繰り返し利用可能な遺伝子破壊システムの構築に成功した。

研究成果の概要(英文)：It has been thought to be difficult to obtain mutant strain, because shochu yeast is diploid. Thus mutation in one of the two allelic genes is hard to appear as a mutant phenotype. In this study, we constructed a gene disruption system of diploid shochu yeast by using LOH (Loss of Heterozygosity). We designed and constructed a gene disruption cassette by combination of LYS5 a gene involved in Lysine biosynthesis and URA3 a gene involved Uracil biosynthesis. By using this gene disruption cassette, we succeeded in single gene disruption of LEU2 a gene involved in Leucine biosynthesis, and thereafter obtained a double gene disruptant by inducing LOH. Further, we succeeded second round gene disruption after removing the gene disruption cassette from LEU2 double gene disruptant.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ヘテロ接合性消失 焼酎酵母 2倍体 遺伝子破壊

1. 研究開始当初の背景

(1)これまでの酵母の育種法は、紫外線照射や変異剤処理により遺伝子に損傷を引き起こすことで行われてきた。しかしこの方法では、目的の遺伝子のみをターゲットとすることはできず、また目的以外の遺伝子にも損傷を与えてしまう恐れを含んでいる。

(2)さらに、醸造用酵母は2倍体であるために同じ遺伝子を2つ持つことから、それら2つの遺伝子を1度に働かなくすることは、確率的に非常に低いものであり、ゆえに変異株の取得には多大な時間と労力を要するものであった。

2. 研究の目的

本申請研究では、ヘテロ接合性消失(LOH; Loss of Heterozygosity)という現象を利用した簡便な酵母の遺伝子破壊方法の構築を目的とした。(LOHとは、ヘテロな遺伝子座位がDNAの組み換えや修復の過程でホモとなる現象である。)LOHの育種への応用は、2倍体清酒酵母についてLOHと2段階の形質転換を用いた遺伝子破壊法が報告されている(Appl. Microbiol. Biotechnol. 82, 387-395(2009))。

本申請研究では、これまでの研究の流れからさらに進めて、1度の形質転換のみを行いその後は選択培地で培養するだけで2つの対立遺伝子を破壊できる方法を提案する。

3. 研究の方法

(1)申請者は、これまでに焼酎酵母において形質転換が可能で、両端に破壊する遺伝子の配列を持たせてPCR増幅したカナマイシン耐性遺伝子(*Kan^r*)を用いることで対立遺伝子のうちの一方を破壊できること、またLOHが可能であることを見出してきた。そこで、初年度には、LOHを誘発する要因について検索を行った。具体的には、我々がこれまでに開発したLOHの頻度を測定できるシステムを用いて酵母の各種処理によるLOHへの影響を調べた。本システムは、焼酎酵母の2つの*URA3*遺伝子(ウラシル合成系に参与)のうち片方をカナマイシン耐性遺伝子(*Kan^r*)で置換した株(*URA3/Kan^r*) (図1)を用いて、各種薬剤や物理的処理の後、FOA(5-フルオロオロト酸)を含むプレートに塗り広げて培養を行い、出現したコロニーの数よりLOHの頻度を算出する方法である。*URA3*遺伝子産物は、FOAを毒性物質に変換するため*URA3*遺伝子を持つ株はFOAを含む培地に生育できないが、*URA3*遺伝子が欠失した株は、FOAを含む培地に生育することができる。すなわち、*URA3/Kan^r*を持つヘテロな株でLOHが生じると*URA3/URA3*あるいは*Kan^r/Kan^r*株となるが、このうち*Kan^r/Kan^r*株はFOAプレートに生育できるためそのコロニー数と全菌体数よりLOHの頻度を算出し、LOHを高頻度に誘発する条件を見出した。

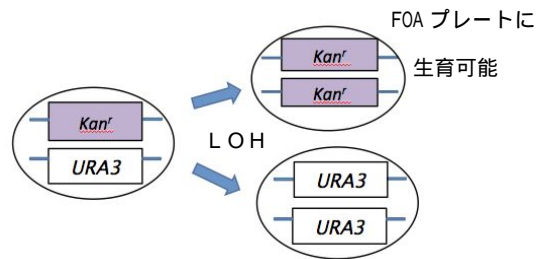


図1 LOH 頻度測定法

(2)本申請研究では、標的とする2個の対立遺伝子を破壊することのできる破壊カセットの構築とそれを用いた焼酎酵母遺伝子破壊株の簡便な取得方法の開発を行う。本方法は、図2に示す8つのステップからなる。これまでに得られた焼酎酵母 K2 株の配列情報より、*URA3*(ウラシル合成系遺伝子)と *LYS5*(リジン合成系遺伝子)をPCR法により取得し、これら2つの遺伝子からなる破壊カセットを考案し構築する(図2ステップ[1])。*URA3*遺伝子と *LYS5*遺伝子を用いる理由は、それぞれ逆セレクションが可能だからである。前述のように、*URA3*遺伝子が欠失した株は、FOAを含むプレートで生育でき、また、*LYS5*を欠失した株は、同様に AA(アミノアジピン酸)を含むプレートで生育できる。本法では、破壊カセットの除去に際してこの仕組みを利用している。

(3)本破壊カセットは、*LYS5*遺伝子の両側に *URA3*遺伝子の上流部分と下流部分を配置しそれぞれオーバーラップする領域を持たせてある。*URA3*は上流と下流に分断されているのでこのままでは機能しないが、オーバーラップした部分で組み換えが起こると挟まれた *LYS5*が抜け落ちて(ループアウト)完全な *URA3*遺伝子が復活するように設計されている。

(4)まず本破壊カセットの両端に破壊しようとする標的遺伝子の配列をPCR法により付加したものを *URA3LYS5*欠損株に導入することで2つある標的遺伝子の一方と破壊カセットが置き換わった株をリジンを含まない培地で選択する(ステップ[2,3])。つぎに前年度の検討結果よりLOHを誘発する処理(紫外線照射など)を行う。LOHが生じた株(ステップ[4])は、栄養要求性がステップ[3]の株と同じであるため区別できないが、さらに *URA3*のオーバーラップした部分で組み換えが起こった株は、ウラシルとリジンを合成できるようになる。そこでウラシルとリジンを含まない培地を用いることで簡便に2つの標的遺伝子が欠失した株を選択できることとなる(ステップ[5,6])。このようにして得られた2重破壊株は、その後、栄養培地で培養を続けることで破壊カセットの両端にある相同領域間で組み換えを起こして低頻度

ながら破壊カセットを脱落する(ループアウト)(ステップ[7])。そのような株は、*URA3*と*LYS5*が欠失していることから、FOAとAAを含むプレートで選択することができる。(ステップ[8])これにより、次の標的遺伝子破壊が可能となり、繰り返し遺伝子破壊を行うことができるようになる。また、ここで用いられている破壊カセットは、焼酎酵母ゲノムDNAを鋳型としたPCRのみにて合成されていることから、得られた遺伝子破壊株は、いわゆるセルフクローニング株となり外来遺伝子を含む遺伝子組換え生物とはならない。

4. 研究成果

(1)申請者は、先行研究により焼酎酵母において形質転換が可能であり、PCRにて増幅したカナマイシン耐性遺伝子(*Kan^r*)により、焼酎酵母の対立遺伝子のうち一方を破壊できること、さらにはヘテロ接合性消失(LOH)が可能であることを示してきた。

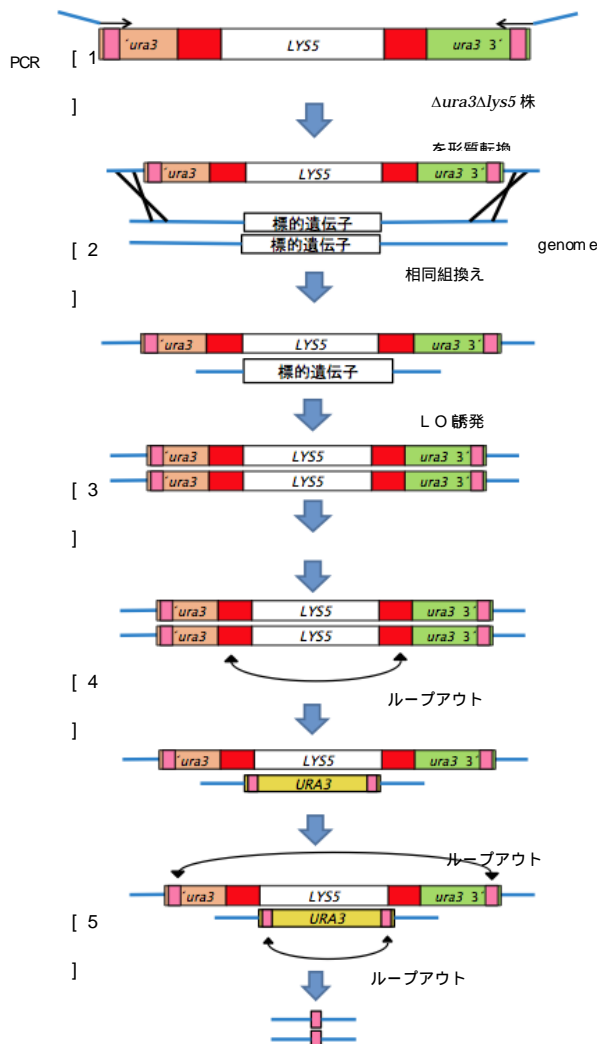


図2 遺伝子破壊及び破壊カセット除去の流れ

(2)H24年度の研究では、LOHを誘発する要因について検索を行い、紫外線照射ならびにヒートショック処理により有意にLOHの頻度の上昇を認めた。さらに最適条件の検討を行い、紫外線を30秒照射後、菌体をYPD液体培地にて回収し、さらに24時間振とう培養することでLOHが数十倍の効率で生じることを見出した。また、LOHによる遺伝子破壊を行うための*URA3, LYS5*遺伝子欠損株(*ura3⁻ lura3⁻ lys5⁻ / lys5⁻*株)の取得を行った。

(3)H25年度には、我々が先行して行った焼酎酵母(鹿児島2号)のドラフトゲノム解析による配列情報をもとに破壊カセットをPCR、フュージョンPCRによって作成した。リジン生成に関与する遺伝子*LYS5*の両側にウラシル生成遺伝子*URA3*をオーバーラップする領域を持たせて二分割した断片を付加し、さらに分割した*URA3*の両方の外側に相同な配列をもたせた。本破壊カセットをターゲット遺伝子(*LEU2*)の配列を付加したプライマーでPCR増幅し、焼酎酵母(*ura3⁻ lura3⁻ lys5⁻ / lys5⁻*株)を形質転換し、リジン非要求性を指標として*LEU2*遺伝子ヘテロ破壊株を取得した。その後LOHを誘発することで*LEU2*の2重破壊株を取得した。*LEU2*の2重破壊株の取得は、ゲノムサザンプロットおよびロイシン要求性の表現型によって確認した。

(4)H26年度には、*LEU2*の2重破壊株の破壊カセット内に2カ所ずつ配置した相同な配列間での組み換えにより破壊カセットが抜け落ちるループアウトを利用することで、*LEU2*ダブルループアウト株の取得を行った。*LEU2*ダブルループアウト株は、YPD液体培地にて適宜培養後、FOA培地あるいは、AA培地にて選択することで容易に取得することができた。さらに、この株を用いて2つめの遺伝子として*ADE2*の破壊を行い、*ADE2*2重破壊株、*ADE2*ダブルループアウト株を取得することにも成功した。ここで得られた株に関しては、ゲノムサザンプロット解析及び栄養要求性の表現型により確認を行った。

(5)本方法を用いることで同じ破壊カセットを用いた繰り返し利用可能な遺伝子破壊システムの構築に成功した。なお、本方法で用いた破壊カセットは、すべてPCRによって焼酎酵母より増幅された配列のみから構成されるため、得られた遺伝子破壊株はセルフクローニング株であり、遺伝子組み換え株とはならない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3件)

吉崎由美子, 松山晃佑, 大庭暁紘, 園田舟, 奥津果優, 玉置尚徳, 高峯和則, サツマイモの加熱方法が芋焼酎香気に与え

る影響、査読有(2015)日本醸造学会誌 印刷中

吉崎由美子,金顯民,奥津果優,池永誠,
玉置尚徳,高峯和則、韓国伝統的麴「ヌルク」を用いた焼酎製造の可能性、査読有(2015)日本醸造学会誌,110(3),170-178
高峯和則,吉崎由美子,山本優,吉竹一哉,
橋本文雄,玉置尚徳,鮫島吉廣、サツマイモに含まれるモノテルペン配糖体の分布、査読有(2012)日本醸造協会誌、107:782-787

〔学会発表〕(計 6件)

武藤亜依、吉崎由美子、奥津果優、高峯和則、二神泰基、玉置尚徳、LOH を利用した2倍体焼酎酵母遺伝子破壊システムの構築、第32回 YEAST WORKSHOP、11/14/2014、「ビューポートくれ(広島、呉)」

迎麻菜美、吉崎由美子、奥津果優、高峯和則、二神泰基、玉置尚徳、LOH を利用した2倍体焼酎酵母遺伝子破壊システムの構築、第66回日本生物工学会大会9/9/2014「札幌コンベンションセンター(北海道、札幌)」

迎麻菜美、吉崎由美子、奥津果優、高峯和則、二神泰基、玉置尚徳、2倍体焼酎酵母における繰り返し利用可能な遺伝子破壊システムの構築、第47回酵母遺伝学フォーラム、9/1/2014、「東大弥生講堂(東京)」

玉置尚徳、焼酎酵母育種のための基盤技術の開発、第78回酵母研究会、8/7/2014「アサヒビール吹田工場(大阪、吹田)」

玉置尚徳、焼酎酵母育種法の開発、日本応用糖質科学会九州支部 第16回特別講演会、3/4/2014、「鹿児島大学(鹿児島)」

迎麻菜美、玉置尚徳、LOH を利用した繰り返し利用可能な遺伝子破壊システムの構築、第31回 YEAST WORKSHOP、11/2/2013「鹿児島大学農学部(鹿児島)」

〔その他〕

ホームページ等

http://chem.agri.kagoshima-u.ac.jp/Shochu_new/brewing/research.html#cont01

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉置 尚徳 (TAMAKI Hisanori)

鹿児島大学・農学部・教授

研究者番号：20212045