

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658081

研究課題名(和文)染色体の分断技術によるRNA高生産酵母の育種

研究課題名(英文)Construction of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with a high level of RNA

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) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：核酸系うま味調味料の供給源であるRNAを高生産する酵母の育種を行った。このため、i)リボソームRNA(rRNA)転写の上昇と、ii)rDNAのコピー数増加の戦略を取った。i)では、rRNAの転写に重要な遺伝子(RRN5及びRRN10)の破壊株から抑圧変異株を分離し、feedback制御を解除後、野生型RRN5あるいはRRN10遺伝子を導入した。ii)では、ゲノム工学を利用して、約150コピーあるrDNA遺伝子を約300コピーとした。その結果、rrn5あるいはrrn10破壊株のいずれを出発株とした場合にも、野生型株の約2倍のRNAを生産する酵母を育種できた。

研究成果の概要(英文)：Breeding of yeast strains with higher RNA content is important because yeast RNA is a source of 5'-ribonucleotides used in food industries. To construct an *S. cerevisiae* strain with higher RNA content, we have employed a four-step breeding procedure. In the first step, an *S. cerevisiae* disruptant of the RRN5 or RRN10 gene, important components of rRNA transcription, was constructed. In the second step, suppressors were isolated that restored the slow growth of the rrn10 disruptant. Since RRN5 is an essential gene, plasmid rescue method was applied in case of rrn5 disruptant. In the third step, wild-type RRN5 or RRN10 gene was introduced into each of the suppressors. In the final step, copy number of rDNA gene was increased from ca. 150 to 300 by genome engineering. By these strategies, we have successfully constructed *S. cerevisiae* strains producing 2-fold higher content of RNA compared with strains currently used in industry.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：応用微生物学 酵母 染色体工学 ゲノム工学 リボソームRNA

1. 研究開始当初の背景

うま味調味料は様々な食品に使用されており、今日の食生活において欠かすことはできない。また、2013年には和食がユネスコの無形文化遺産に登録され、和食の繊細な味わいを醸し出す“うま味”について世界中が注目している。核酸系うま味調味料であるグアニル酸やイノシン酸は微生物由来、特に酵母由来のRNAを原料として酵素分解法により生産されるため、RNA高含有酵母の育種は産業上有用である。RNAの約80%はリボソームRNA(rRNA)であるので、rRNA含量を増やすことが有効である。このため、以前より自然界から分離したrRNA高含量酵母が使われているが、積極的な育種は行われていない。その理由は、約150コピーあるrRNA遺伝子のコピー数を増加させる方法論や、rRNA遺伝子転写の恒常性維持機構(feedback inhibition)の複雑さにより転写を上昇させる方法論が無いことによる。こうした問題を解決することによって、RNA含量を2倍にでも増加させることができれば産業的な意義には大きなものがある。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、本研究の目的は、抑圧変異株の分離とゲノム工学技術を駆使して、RNA高含有酵母を育種することである。

3. 研究の方法

本研究では、具体的には、以下の方法論(育種戦略)を取った。すなわち、(1)rRNA転写のfeedback inhibitionが解除された変異株を単離する。(2)この変異株において、我々が開発した革新的ゲノム工学技術を利用して、rRNA遺伝子のコピー数を一挙に300コピーにまで増幅し、本研究の目的を達成する。

4. 研究成果

(1)rRNA転写のfeedback inhibitionが解除

された抑圧変異株の分離

*rrn10*破壊株を親株とした場合

rRNAの効率の良い生合成には、RRNと命名されたいくつかの遺伝子が知られている。このうち初年度は、RRN10遺伝子に着目した。RRN10遺伝子は、必須遺伝子ではないが、その破壊によってrRNA合成能が極度に低下し、極小のコロニーしか形成しない。そこで、まず、*rrn10*破壊株を構築し、次に、この破壊株から、通常の大きさのコロニーを形成する7つの抑圧変異株(SupA~SupG)を分離した。これらの抑圧変異株にRRN10野生型遺伝子を導入し、RNA含量を測定したところ、RNA含量は野生型株の1.4~2.3倍上昇した。

RNA含量上昇のメカニズムを明らかにするため、最もRNA含量の増加率が大きかったSupE抑圧変異株(遺伝解析から2つ以上の抑圧変異を持つことが示唆されている)のゲノムDNAから構築したライブラリーを用いて*rrn10*破壊株が示す極小コロニー表現型を野生型の大きさに戻す遺伝子のクローン化を試みたところ、リボソームタンパクをコードするRPL40A遺伝子がクローン化された。しかし、SupE抑圧変異株からクローン化されたRPL40A遺伝子の塩基配列は、*rrn10*破壊株のRRPL40A遺伝子と全く同じであった。しかし、SupE抑圧変異株では、RPS31やRPL5の、その他のリボソームタンパクをコードする遺伝子の転写も上昇していること、SupE抑圧変異株にRPL40A遺伝子を多コピーで導入すると、RNA含量が約2倍に増加すること、RPL40AのホモログであるRPL40B遺伝子も同様な効果を持つ事がわかった。従って、RPL40AあるいはRPL40B遺伝子は抑圧変異遺伝子ではないが、多コピーでSupE抑圧変異と組み合わせると、RNA含量を顕著に増加させるのに有効な遺伝子であることがわかった。

同様な手法により、SupD抑圧変異株のゲ

ノム DNA から構築したライブラリーを用いて、*rrn10* 破壊変異の抑圧活性を持つ遺伝子のクローン化を試みたところ、リボソームの生合成に関わる *NOP15* 遺伝子がクローン化された。クローン化された *NOP15* 遺伝子では、開始コドン上流(プロモーター領域)の-279番目の T が C に置換されており(T-279C と命名)、このアレルを *rrn10* 破壊株および野生型株に導入すると、*NOP15* 遺伝子の転写と RNA の含量が、そのコピー数に応じて上昇することがわかった。従って、*NOP15* 遺伝子の転写を増加させることも RNA 含量の増加に有効であることが明らかとなった。

rrn5 破壊株を親株とした場合

次年度は、さらに高い RNA 含量を示す株の育種を目指して、*RRN5* 遺伝子に着目した。*RRN5* は、*RRN10* 遺伝子と違って必須遺伝子であるため、*URA3* マーカーを持つプラスミドに野生型 *RRN5* 遺伝子をクローン化して、予め野生型株に導入した後、ゲノム上の *RRN5* を破壊した株(以下 $\Delta rrn5$ [*RRN5-URA3*] 株)を作成した。その後、この株をウラシル要求株のみが生育可能な 5-FOA 培地で培養することで *RRN5-URA3* プラスミドが脱落しても生育できる抑圧変異株の分離を試み、9 株の抑圧変異株(Sup13~Sup19、Sup23、Sup24 と命名)を得た。そのうち 4 株の変異は優性で、その他の変異は劣性であること、また、Sup15 抑圧変異株が持つ劣性変異(*sup15*)と、Sup16 抑圧変異株が持つ優性変異(*SUP16*)は核性の単一変異であることがわかった。これらの抑圧変異株に野生型 *RRN5* 遺伝子を導入したところ、Sup16~Sup19、および Sup23 抑圧変異株においては、野生型株よりも 1.5 倍~1.85 倍高い RNA 含量を示すことがわかった。

RNA 含量増加の機構を明らかにするため、*SUP16* 優性変異を持つ株から抽出したゲノム DNA でゲノムライブラリーを作成した。今後は、このライブラリーを利用して、*SUP16* 抑

圧変異遺伝子のクローン化を試みる予定である

(2)ゲノム工学による rRNA 遺伝子のコピー数の増加

SupE 株を出発株として、我々が開発した染色体分断技術を利用し、*TRP1* 遺伝子でマークされた rDNA クラスター(約 150 コピー)のみから成る染色体(rDNA 染色体と命名)を構築した。次に、染色体分断技術を利用して抑圧変異株の rDNA クラスターの左端と右端を分断し、rDNA 遺伝子だけからなる染色体(rDNA 染色体と命名)を構築した。その後、この rDNA 染色体(*TRP1* でマークされている)を持つ株と、接合型を変換した同じ SupE 抑圧変異を持つ株とを交雑し、雑種二倍体を得た。この雑種二倍体の減数分裂分離株から、rRNA 遺伝子クラスターを 2 セット(rRNA 遺伝子は 300 コピー)持つ株を取得した。これらの株の RNA 含量を測定したところ、rDNA クラスターを 1 コピー持つ supE 株に比べて約 61%、また、野生型株に比べても 40%増加していた。一方、rDNA クラスターを 1 コピー持つ supE 株に RPL40A 遺伝子を多コピーで導入すると、RNA 含量は RNA 含量は野生型株の約 2 倍となった。最後に、rDNA クラスターを 2 コピー持つ supE 株に *RPL40A* 遺伝子を多コピーで導入すると、RNA 含量には、さらに 50%の上昇が見られた。これらの結果より、本研究の育種戦略は、RNA 高含量酵母の育種に有用であること結論した。

(3) 今後の研究の推進方策

rrn5 破壊株から分離した抑圧変異株で単一変異を持つ事が明らかとなった Sup15 と Sup16 抑圧変異株の責任遺伝子のクローン化を行う。この遺伝子の機能強化や機能喪失によって、更に RNA 含量を高くすることが可能かどうかを検証する。また、本研究で分離した

抑圧変異株に、本研究で、その有用性を明らかにした *RPL40A*、*RPL40B*、*NOP15(T-279C)* 遺伝子を同時に多コピーで導入することによって、さらに RNA 含量の高い酵母菌株が育種できるかどうかを検証する。

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 6 件)

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、査読無、Vol.32、No5、2013、pp.592-599.

Khatun, F., Kurata, K., Chuwattanakul, V., Sugiyama, M., Kaneko, Y., Harashima, S., Increased transcription of *RPL40A* and *RPL40B* is important for the improvement of RNA production in *Saccharomyces cerevisiae*., J. Biosci. Bioeng. 査読有、116(4), 2013, pp.423-432. DOI. 10.1016/j.jbiosc. 2013.04.006.

Khatun, F., Sasano, Y., Sugiyama, M., Kaneko, Y., Harashima, S., Increase in rRNA content in a *Saccharomyces cerevisiae* suppressor strain from *rrn10* disruptant by rDNA cluster duplication. Appl. Microbiol. Biotechnol. 査読有、97(20), 2013, pp.9011-9019. DOI. 10.1007/s00253-013-5065-9.

笹野 佑 最新のゲノム編集技術が拓く新たな微生物育種への道、生物工学会誌、査読無、Vol.91、2013、pp.719.

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

pp.675-682.

DOI. 10.1016/j.jbiosc.2012.01.013.

Park, AH., Sugiyama, M., Harashima, S., Kim, YH. Creation of an ethanol-tolerant yeast strain by genome reconstruction based on chromosome splitting technology. J. Microbiol. Biotechnol. 査読有、22(2)、2012、pp.184-189.

[学会発表](計 17 件)

原島 俊、酵母におけるゲノム工学技術の開発とゲノム機能の解明・育種への応用、大阪大学大学院工学研究科 核酸制御(陽進堂)共同研究講座設立記念シンポジウム、2013年5月、大阪

Satoshi Harashima Recent advances in breeding technologies for microorganisms –More than just a trend– JSPS-NRCT Young Scientist Seminar 2013 Osaka 2013.8, Osaka

Waranya Natesuntorn, Kotaro Iwami, Yuki Matsubara, Tetsuya Hayashi, Yu Sasano, Minetaka Sugiyama, Yoshinobu Kaneko, Satoshi Harashima, Genome-wide construction of a series of segmental aneuploids for genome analysis and breeding in *Saccharomyces cerevisiae*. JSPS-NRCT Young Scientist Seminar 2013 Osaka 2013.8, Osaka

Saeed Kaboli, Takuya Yamakawa, Deasty Imara, Yu Sasano, Minetaka Sugiyama, Yoshinobu Kaneko, Satoshi Harashima Genome-wide mapping for unexplored essential regions harboring synthetic lethal interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. JSPS-NRCT Young Scientist Seminar 2013 Osaka 2013.8 Osaka

Yu Sasano, Fahmida Khatun, Shogo Usugi, Minetaka Sugiyama, Satoshi Harashima Molecular breeding of *Saccharomyces*

cerevisiae strain producing high level of RNA. 26th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology 2013.8-9 Frankfurt, Germany

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

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

Saeed Kaboli, Takuya Yamakawa, Deasty Imara, Yu Sasano, Minetaka Sugiyama, Yoshinobu Kaneko, Satoshi Harashima Novel landscape for genetic interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. YEAST GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY NEWS JAPAN No.46 2013.9 , 仙台

Waranya Natesuntorn, Yuki Matsubara, Yu Sasano, Minetaka Sugiyama, Yoshinobu Kaneko, Satoshi Harashima, Genome-wide construction of a series of segmental aneuploids in *Saccharomyces cerevisiae*. YEAST GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY NEWS JAPAN No.46 2013.9, 仙台

Waranya Natesuntorn, Yuki Matsubara, Yu Sasano, Minetaka Sugiyama, Satoshi Harashim: 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

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

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」、2013 年度 JBA 新資源生物変換研究会シンポジウム、2013 年 12 月、東京

Satoshi Harashima Plenary Lecture Recent Advances on New Breeding Technologies in Microorganisms -More than Just a Trend-. 2012 International Symposium & Annual Meeting A New Era of Biotechnology and Bioeconomy 2012.6 Busan,Korea

Waranya Natesuntorn, Yuki Matsubara, Tatsuya Hayashi, Minetaka Sugiyama, Yoshinobu Kaneko, Satoshi Harashima Exploitation of PCDup technology for breeding and genome analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. YEAST GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY NEWS JAPAN No.45 2012.9 , 京都

Waranya Natesuntorn, Yuki Matsubara, Tatsuya Hayashi, Minetaka Sugiyama, Yoshinobu Kaneko, Satoshi Harashima : Exploitation of PCDup technology for breeding and genome analysis in *Saccharomyces cerevisiae*、日本生物工学会第 64 回大会、2012 年 10 月、神戸
原島 俊、特別シンポジウム ウィルス学における dual use「ゲノムの多様性創出工学と生命科学・生命工学におけるデ

ユアルユース問題」、第 60 回日本ウィルス学会学術集会、2012 年 11 月、大阪
原島 俊：特別講演「酵母の育種理論と育種技術の発展とともに 35 年」、第 19 回日本生物工学会九州支部福岡大会、2012 年 12 月、福岡

〔その他〕

ホームページ等

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

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
研究分担者
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