

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：37401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660066

研究課題名(和文) 出芽酵母における多様性創出ゲノム工学技術の開発

研究課題名(英文) Development of genome engineering technology to create genome diversity in yeast

研究代表者

原島 俊 (HARASHIMA, Satoshi)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：70116086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、申請者らが酵母を材料として、それまでに開発してきた多様な酵母ゲノム工学技術の中で、キーテクノロジーである「染色体任意部位における分断技術」の迅速化・簡便化を目的とした。その結果、従来の分断技術に、近年勃興してきた「ゲノム編集技術」を取り入れる事によって、これまで不可能であった1回の形質転換で4カ所までの同時分断が可能となる革新的な技術を開発することができた。この成果は、ゲノムの多様性を創出するために必要な、多数の人工染色体の創出を、飛躍的に短い時間で達成することができることを意味しており、「多様性創出ゲノム工学」の発展に大きな貢献をする技術であると結論できる。

研究成果の概要(英文)：We have previously developed chromosome splitting technology (PCS) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. It is based on homologous recombination and enables splitting of a chromosome at any point to form two newly derived chromosomes. However, because of low homologous recombination activity, PCS is limited to a single site at a time, which makes the splitting of multiple loci laborious and time-consuming. In this study, we have developed efficient and versatile genome engineering technology named CRISPR-PCS by integrating PCS with the genome editing CRISPR/Cas system. This integration allowed activation of homologous recombination. In fact, the CRISPR-PCS enabled generation of simultaneous multiple chromosome splitting such as generation of up to five derived chromosomes from a single chromosome and eight derived chromosomes from four different chromosomes. The CRISPR-PCS technology should contribute to not only breeding novel yeast strains but also revealing genome function.

研究分野：ゲノム工学

キーワード：酵母 ゲノム工学 ゲノム編集 染色体工学 ゲノム機能 育種

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、酵母を材料として、それまでいずれの生物でも開発されていなかった染色体任意部位のワンステップ分断技術、任意領域の削除技術、重複技術等々、多様なゲノム工学技術を開発し、それらの技術が実際に「ゲノム機能の解明や育種」に応用できることを 20 報近い論文によって示してきた。物質生産に最適なゲノムを「ベストゲノム」と定義すれば、これからの微生物育種における最大の課題は、ベストゲノムがいかなるものかを明らかにすることであろう。この問題に答えるため、本研究では、申請者らが開発してきた酵母のゲノム工学を駆使して、天文学的な種類のゲノム組成を持つ出芽酵母細胞集団を創出し、それからベストゲノムを持つ細胞をスクリーニングする「多様性創出ゲノム工学技術」の開発を目指した。

### 2. 研究の目的

上記の目標を達成するため、体細胞分裂で脱落可能な染色体領域を、申請者らが開発した染色体分断技術(PCS法)によりゲノムワイドに人工染色体化し、その多様な組み合わせの脱落によって多様性を創出する(ゲノムの再編成)技術を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

従来の技術は、一度の形質転換により染色体一カ所の分断しかできず、同時性と迅速性の観点からは満足のいくものではなかった。そこで、本研究では、染色体の分断技術に、近年勃興してきたゲノム編集技術 CRISPR/Cas を取り入れ、従来不可能であった染色体の複数部位の同時分断を可能とする、スループットの高い革新的なゲノム工学技術(CRISPR-PCS 技術と命名)を確立することを目的とした。

### 4. 研究成果

(1) CRISPR-PCS 法による形質転換効率の上昇  
まず、従来の PCS 技術に比べ、CRISPR-PCS

技術では、形質転換体の出現頻度がどれくらい上昇するかを調べたところ、CRISPR-PCSの方が約10倍~100効率が良いことがわかった。このことにより、従来の PCS 法によってミニ染色体を作成するには順次 2 回の形質転換が必要であったにもかかわらず、CRISPR-PCS 法では、1 回の形質転換で新しいミニ染色体を一挙に作成できるようになった。

#### (2) 2カ所同時分断

そこで次に、同じ染色体上の 2 カ所、および異なる染色体上の 2 カ所の同時分断を試みた。その結果、同じ染色体においても、違う染色体においても、CRISPR-PCS によってのみ同時分断が可能であることがわかった。同時に、CRISPR-PCS 技術の最適化も図った結果、使用する分断に必要な PCS 断片の相同領域を 50 bp と短くしても、同時分断が可能であることもわかった。

#### (3) 3箇所、4箇所同時分断

こうした成果をもとに、2 年目には、同時 3 箇所分断、さらに同時 4 カ所分断に挑戦した。その結果、まず、異なる染色体における 3 箇所同時分断に成功した。これより 1 回の形質転換で、3 つの天然の染色体を 6 つの人工染色体にすることが可能となった(3本 → 6本)。ついで、同一染色体における 3 箇所同時分断にも成功した。この結果、1 回の形質転換で、1 本の天然染色体を 4 つの人工染色体にすることが可能となった(1本 → 4本)(図 1)。さらに、異なる染色体上の 4 箇所の部位の同時分断に

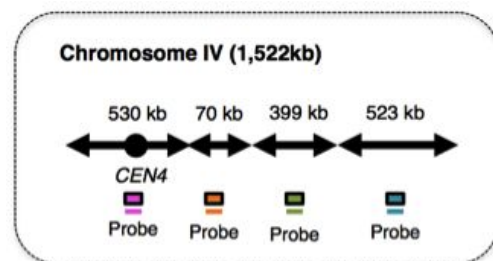


図 1. 4 番染色体における三カ所同時分断

も成功した。これより、1回の形質転換で、4つの天然染色体を8本の人工染色体にすることができるようになった(4本 8本)(図では示していない)。これらの結果は、ゲノムの再編成技術によりゲノムの多様性を創出するために必要な、多数の人工染色体の創出を、これまでより飛躍的に短い時間で達成することができることを意味しており(従来のPCS法では、4本の染色体を8本にするに

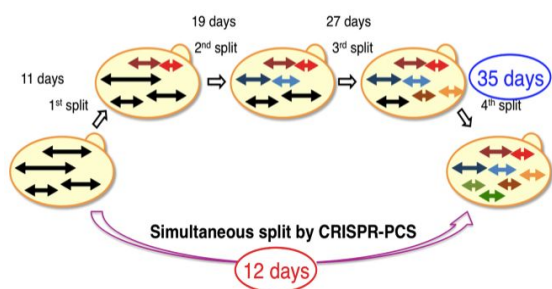


図2 CRISPR-PCS法による染色体分断の加速化

は、35日程度かかっていたのが、12日間程度)染色体分断に要する多大な時間や労力を大幅に削減することが出来ることとなった(図2)。

#### (4) 今後の展望

こうした研究成果を基盤にした今後の研究の方向としては、染色体分断技術の更なるハイスループット化を目指すとともに、染色体の2領域、あるいは3領域の同時削除、同時重複技術の確立も目指すことを考えている。この目的は、染色体分断による人工染色体の創出と、その後の多様な組合わせの脱落を介したゲノムの多様性創出という方法論だけでなく、ワンステップの形質転換で、種々の複数染色体領域の削除や重複の組み合わせによってゲノムの多様性創出を可能にするためである。しかし、その組み合わせ数を考えると、このアプローチが真に有効であるためには、少なくとも5領域程度について、同時削除、

同時重複が可能になる必要があろう。従って、同時削除、同時重複については、その限界を見極めることが必要である。また、本挑戦的萌芽研究とは別途の研究によって、単一領域の削除、あるいは単一領域の重複により、バイオテクノロジーに有用な形質が現れる染色体の特定領域をいくつも明らかにしているの、こうした領域の2つあるいは3つ、あるいはそれ以上の組合わせを持つ細胞の、ハイスループットでの創成を目指すことが今後の課題であると考えている。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計13件)

Sangwallek, J., Kaneko, Y., Tsukamoto, T., Marui, M., Sugiyama, M., Ono, H., Bamba, T., Fukusaki, E., Harashima, S., Cloning and functional analysis of *HpFAD2* and *HpFAD3* genes encoding  $\Delta 12$ - and  $\Delta 15$ -fatty acid desaturases in *Hansenula polymorpha*., Gene., 査読有, 533, 2014 110-118, Doi: 10.1016/j.gene.2013.09.115.

Laviña WA, Shahsavarani H, Saidi A, Sugiyama M, Kaneko Y, Harashima S., Suppression mechanism of the calcium sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae* *ptp2Amsg5A* double disruptant involves a novel HOG-independent function of Ssk2, transcription factor Msn2 and the protein kinase A component Bcy1., J Biosci Bioeng. 査読有, 117, 2014, 135-141, Doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.06.022.

Sugiyama M, Akase SP, Nakanishi R, Horie H, Kaneko Y, Harashima S., Nuclear localization of Haa1, which is linked to its phosphorylation status, mediates lactic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, Appl Environ Microbiol, 査読有, 80, 2014,

3488-3495. Doi:10.1128/AEM.04241-13.

Kaboli S, Yamakawa T, Sunada K, Takagaki T, Sasano Y, Sugiyama M, Kaneko Y, Harashima S, 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.*, 査読有、42、2014、9838-9853. Doi: 10.1093/nar/gku576.

Sharmin D, Sasano Y, Sugiyama M, Harashima S, .Effects of deletion of different PP2C protein phosphatase genes on stress responses in *Saccharomyces cerevisiae*.、*Yeast*. 査読有、31、2014 393-409. Doi: 10.1002/yea.3032.

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*、査読有、92 巻、2014、589-592. [https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9211/9211\\_tokushu\\_1.pdf](https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9211/9211_tokushu_1.pdf)

Natesuntorn W, Iwami K, Matsubara Y, Sasano Y, Sugiyama M, Kaneko Y, Harashima S, Genome-wide construction of a series of designed segmental aneuploids in *Saccharomyces cerevisiae*, *Scientific Reports*, 査読有、5、2015、12510-12527、DOI : 10.1038/srep12510.

Kaboli S, Miyamoto T, Sunada K, Sasano Y, Sugiyama M, Harashima S, Improved stress resistance and ethanol production by segmental haploidization of the diploid genome in *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 査読有、

121, 2016, 638-644、DOI : 10.1016/j.jbiosc.2015.10.012.

Zhou Y, Yuikawa N, Nakatsuka H, Maekawa H, Harashima S, Nakanishi Y, Kaneko Y, Core regulatory components of the PHO pathway are conserved in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*, *Current Genetics* 査読有、2016, 印刷中

Numamoto M, Tagami S, Ueda Y, Imabepu Y, Sasano Y, Sugiyama M, Maekawa H, Harashima S, Nuclear localization domains of GATA activator Gln3 are required for transcription of target genes through dephosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*、*Journal of Bioscience and Bioengineering*, 査読有、120, 2015、121-127, DOI : 10.1016/j.jbiosc.2014.12.017.

Sharmin D, Sasano Y, Sugiyama M, Harashima S, Type 2C protein phosphatase Ptc6 participates in activation of the Slt2-mediated cell wall integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*、*Journal of Bioscience and Bioengineering*, 査読有、119、2015, 392-398, DOI : 10.1016/j.jbiosc.2014.09.013.

Sasano Y, Yamagishi K, Tanikawa M, Nakazawa T, Sugiyama M, Kaneko Y, Harashima S, Stabilization of mini-chromosome segregation during mitotic growth by overexpression of YCR041W and its application to chromosome engineering in *Saccharomyces cerevisiae*、*Journal of Bioscience and Bioengineering* 査読有、119、2015, 526-531 DOI : 10.1016/j.jbiosc.2014.10.006.

Sugiyama M, Akase SP, Nakanishi R, Kaneko Y, Harashima S, Overexpression of ESBP6 improves lactic acid resistance and production in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bioscience and Bioengineering、査読有、印刷中、2016 DOI 10.1016/j.jbiosc.2016.03.010.

[学会発表](計 26 件)

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 1～3 日、東京大学弥生講堂、(東京都文京区)

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 1～3 日、東京大学弥生講堂、(東京都文京区)

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 9 日～11 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市白石区)

砂田啓輔、Saeed Kaboli、宮本哲也、笹野 佑、杉山峰 崇、原島 俊、ゲノムエンジニアリングによる出芽酵母二倍体ゲノムの部分一倍体化と育種への応用、日本生物工学会第 66 回大会、2014 年 9 月 9 日～11 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市白石区)

Harashima S Genome engineering : perspective and challenges for synthetic biotechnology in yeast. The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (招待講演)(国際会議)、2015 年 11 月 17 日～2015 年 11 月 19 日、マングリンホテル(バンコク、タイ)

Minetaka Sugiyama, Junyuan Wu, Yu Sasano, Yoshinobu Kaneko, Chuenchit Boonchird, Satoshi Harashima、Improvement of thermotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production by genome shuffling、The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (招待講演)(国際会議)、2015 年 11 月 17 日～2015 年 11 月 19 日、マングリンホテル(バンコク、タイ)

Yu Sasano, Koki Nagasawa, Saeed Kaboli, Minetaka Sugiyama, Satoshi Harashima、CRISPR-PCS: An efficient and versatile chromosome splitting technology in yeast, The 27th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology、2015 年 9 月 6 日～2015 年 9 月 12 日 Conference Hall (Levico Terme、イタリア)

Minetaka Sugiyama、Junyuan Wum、Yu Sasano、Satoshi Harashima、Improved thermotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production by genome shuffling、The 32nd International Specialized Symposium on Yeast、2015 年 9 月 13 日～2015 年 9 月 17 日、Perugia Congress Center (Perugia、イタリア)

Yu Sasano、Koki Nagasawa、Saeed Kaboli、

Minetaka Sugiyama, Satoshi Harashima,  
CRISPR-PCS : 多様な染色体操作が可能な  
染色体工学技術、酵母遺伝学フォーラム第  
48 回研究報告会、2015 年 8 月 31 日 ~  
2015 年 9 月 2 日、広島大学総合科学研究  
科 (広島県東広島市)

原島 俊、出芽酵母プロテインホスファ  
ターゼのゲノムサイエンス、日本プロテ  
インホスファターゼ研究会 2015 学術集  
会、2016 年 1 月 29 日 ~ 2015 年 1 月 30  
日、基礎生物学研究所 (愛知県岡崎市)  
(招待講演)

その他 16 件

〔図書〕(計 2 件)

Sasano Y, Sugiyama M, Harashima S.  
Springer, Chapter 5: Development and  
application of novel genome engineering  
technology in *Saccharomyces cerevisiae*. In  
Microbial Production, (ed by Anazawa H  
and Simizu S), 2014, 306 (53-62).

M. Sugiyama, Y. Sasano, S. Harashima,  
Springer, Mechanism of Yeast Adaptation to  
Weak Organic Acid Stress : In Stress  
Biology of Yeasts and Fungi (ed by H.  
Takagi and H. Kitagaki), 2015, 218 (107  
-121).

〔その他〕

ホームページ等

崇城大学 生物生命学部 応用微生物工学科  
原島研究室ホームページ

<http://rsrch.ofc.sojo-u.ac.jp/sjuhp/KgApp?kyoinId=ymemgkoyggy>

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

原島 俊 (HARASHIMA Satoshi)  
崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号 : 70116086

(2) 研究分担者

杉山峰崇 (SUGIYAMA Minetaka)  
大阪大学・工学研究科・准教授

研究者番号 : 80379130

笹野 佑 (SASANO Yu)

大阪大学・工学研究科・助教

研究者番号 : 90640194