



Large-scale genome reorganization in *Saccharomyces cerevisiae* through combinatorial loss of mini-chromosomes.

染色体の分断と脱落による出芽酵母ゲノムの大規模な再編成

(JBB, Vol. 113, No. 6, 675–682, 2013)

上田 洋二¹・生嶋 茂仁^{2a}・杉山 峰崇²・的場 亮³・
金子 嘉信²・松原 謙一³・原島 俊^{2*}

酵母細胞におけるゲノムの大規模な改変技術は、産業にとって有用な物質を産生する菌株の育種のみならず、ゲノム機能の解明においても有用である。近年、筆者ら^{1,2)}は、出芽酵母の染色体を分断しミニ染色体化する技術であるPCR-mediated Chromosome Splitting (PCS) 法を開発した。PCS法は、セントロメア、テロメアおよび形質転換体を選択するためのマーカーを含む分断用断片をPCRで調製し、形質転換によって酵母に導入するという簡単な操作で天然の染色体を分断する新しいゲノム工学技術である。従来、50 kb以下のミニ染色体は有糸分裂中に容易に脱落する³⁾ことが知られている。PCS法を繰り返すことによって、50 kb以下のミニ染色体を多数保持した酵母細胞を作り、種々の異なる条件で培養すれば、さまざまなミニ染色体の組合せを持った酵母細胞を生み出すことができると考え、筆者らは、この技術をGenome Reorganization Technology (GRoO技術)と名づけた。本研究は、GRoO技術により、実際に多様なミニ染色体の組合せを持った細胞を創成することができるか検証することを目的に実験を行った。

まず、PCS法を用いて多くのミニ染色体を持つ二つの出芽酵母株 (ZN92株, SH6484株) を作製した。ZN92株は、第4染色体と第11染色体から作った16本のミニ染色体を持っている。16本中7本のミニ染色体は必須遺伝子を持っていないため、それらのミニ染色体は、多様な組合せで脱落すると考えられる。SH6484株は、9本の染色体を分断して作製した、非必須遺伝子からなる14本のミニ染色体を持っている。ZN92株と同様、種々の組合せでの脱落が生じると考えられた。

このことを実証するため、まず、ZN92株において7本のミニ染色体が、どのような組合せで脱落するか検証した。7本のミニ染色体の脱落の組合せは、特定の組合せによる合成致死がないと仮定すると、理論上128通り

$(\sum_{k=1}^7 C_k)$ である。ZN92株を培養し、得られたコロニー

のうち128を分析したところ、ミニ染色体の組合せが異なる19種があることがわかった。このことから、GRoO技術によって、さまざまな組合せのミニ染色体をもつ株を作り出せることが実証できたと考えた。興味深いことに、7本のミニ染色体のうち、1本のミニ染色体(18 kb)はいずれのクローンでも脱落していなかった。このミニ染色体は12個の非必須遺伝子を持つが、それらの中に合成致死となる遺伝子の組合せがあることが示唆された。

次に、ミニ染色体では、分断時にセントロメアが末端に付加されていることから、セントロメア機能が抑制されている可能性があるため、コピー数の増加有無を、SH6484株を用いて解析した。SH6484株を栄養培地で培養し、ゲノム構成が変化した株を得た。この株と、比較対象とした非染色体分断株であるFY834株からゲノムDNAを抽出し、DNAマイクロアレイを用いて網羅的にゲノムDNAの変化を調べた。その結果、ミニ染色体14本中8本が脱落し、6本は保持されていることがわかった。また、保持されているミニ染色体のうち4本でコピー数の増加が観察された。加えて、興味深いことにミトコンドリアゲノムや分断されていない第12番染色体上のリボソーム遺伝子領域が増幅していることがわかった。これより、この現象は、ミニ染色体の脱落あるいは染色体の分断によって生じた可能性が考えられた。

このように、筆者らは、本研究で開発したGRoO技術が、ゲノム機能やその構成の解明に役立つだけでなく、有用物質の生産に適した培養条件下でゲノム構成を最適化させることに応用できることから、産業上有用な株の育種にも有効な方法であると考えている。

- 1) Sugiyama, M. *et al.*: *Biotechniques*, **38**, 909 (2005).
- 2) Sugiyama, M. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **84**, 1045 (2009).
- 3) Surosky, R. T. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 414 (1986).

* 著者紹介 大阪大学大学院工学研究科 (教授) E-mail: harashima@bio.eng.osaka-u.ac.jp

¹東レ株式会社, ²大阪大学大学院工学研究科, ³株式会社DNAチップ研究所

^a現、キリンホールディングス株式会社