

藤森科学技術振興財団
研究実施概要報告書

(西暦) 2026年 5月 11日

公益財団法人藤森科学技術振興財団
理事長 藤森 行彦 殿

藤森科学技術振興財団の助成金による研究が終了しましたので、下記のとおり報告をいたします。

所属機関 名古屋大学

職 名 特任助教

氏 名 松崎 哲郎



【提出書類】

- (1) 研究実施概要報告書 (本紙)
添付書類 (A4 版 3 枚以内) : 研究状況を示す写真等の資料
- (2) 収支報告書
添付書類 : 助成金を充当した経費の領収書
領収書を添付しない場合 : 支払一覧表と支払部門担当者記名捺印

④

(1) テーマ

バイオマスからの有用化学物質産生に資する新規出芽酵母発現系の樹立とその改良

(2) 本研究の期間

(西暦) 2025年4月～2026年3月

(3) 本研究の目的

出芽酵母は遺伝子操作が容易なモデル真核生物である。近年出芽酵母の代謝経路を遺伝学的に操作することでバイオ燃料や医薬品の安価でかつ環境負荷の少ない産生システムが様々構築されている。このような代謝経路の操作では一般に多数の外来遺伝子導入が必要である。

従来、多数の遺伝子導入は目的遺伝子群を含む巨大 DNA カセットを合成し、それをゲノムへ挿入することで達成されてきた。しかし巨大 DNA カセットの合成はコストがかかり、また巨大 DNA のゲノムへの挿入は技術上困難である。より安価でかつ実装が簡便な多種類遺伝子発現系が求められる。

そこで申請者は最も古典的で簡便なプラスミドベースの遺伝子導入に着目した。そして申請者はこれまでの研究で出芽酵母への 10 種類のプラスミド導入を達成し、最大 20 種類の遺伝子同時発現が理論上可能なプラスミドベースの新規発現系を構築した (Dong et al., *FEBS Open Bio*, 2024)。本研究では本発現系を改良し最大 40 種類の遺伝子を同時発現可能な異次元の発現系の樹立を目指す。

(4) 本研究の概要

出芽酵母の栄養用要求性およびこれまでの成果

出芽酵母のプラスミド選択では栄養要求性の相補を利用する。栄養要求性選択はある栄養素の生合成経路の遺伝子を欠損させた株に対し当該遺伝子を補完することで栄養素生合成経路が回復し栄養要求性がなくなることを利用したものである。ウラシル生合成経路を例に説明すると、この経路の遺伝子の一つ *URA3* を欠損する株はウラシルの生合成ができないためウラシル欠損培地で生育できない。これをウラシル要求性という。しかし、*URA3* を栄養マーカーとしてコードするプラスミドが導入されるとウラシル生合成が可能となりウラシル欠損培地で増殖可能となる。

申請者はこれまで新規の栄養マーカーを探索し、その欠損を実験用酵母株 BY4741 へ導入し 10 種類の栄養要求性を示す株 $\Delta 10$ を樹立した。さらに $\Delta 10$ は栄養要求性選択で 10 種類のプラスミドを保持できることを確認した。今回用意したプラスミドは各々 2 種類の遺伝子発現ができるため、10 種類のプラスミドを保持できる本実験系では最大 20 種類の遺伝子同時発現が可能である。ここまでの成果は査読つき国際科学雑誌に掲載済みである (Dong G, Nakai T, Matsuzaki T. *FEBS Open Bio*, 2024)。

しかし、遺伝子欠損の影響により $\Delta 10$ には増殖遅延が認められた。そこでまず本研究ではその増殖遅延の改善を目的に以下の 3 点に取り組んだ。

【新規栄養マーカーの探索】

$\Delta 10$ や既存の実験用出芽酵母株で利用されていない栄養マーカーで、かつその欠損により増殖遅延が認められないもの 5 種類を探索する。

【増殖遅延のない新規 $\Delta 10$ 細胞の構築】

上記で得られた新規栄養マーカー 5 種類の遺伝子欠損を BY4741/BY4742 (5 種類の栄養マーカー欠損あり) に導入し、合計 10 種類の栄養マーカー欠損がある細胞を樹立する。既存の $\Delta 10$ (Dong G, Nakai T, Matsuzaki T. *FEBS Open Bio*, 2024) と区別するためにこちらを新規 $\Delta 10$ と記載する。

【新規 $\Delta 10$ 細胞が 10 種類のプラスミドを保持できることの確認】

新規 $\Delta 10$ が欠損する栄養マーカーのプラスミドを構築する (合計 10 種類)。構築したプラスミドを順次新規 $\Delta 10$ に導入し、すべてを同時に保持できることを確認する。

上記を実施後に新規 $\Delta 10$ へさらに遺伝子欠損を導入し、最終目的の 40 種類の遺伝子発現系を目指す。

(5) 本研究の内容及び成果

【新規栄養マーカーの表現型確認】

まずは新規の栄養マーカーでかつその欠損で増殖遅延を引き起こさない遺伝子を出芽酵母データベース (Saccharomyces genome database: SGD) および既報の論文をもとに調査した。調査の結果、*URA1* (ウラシル合成), *LEU1* (ロイシン合成), *HIS5* (ヒスチジン合成), *MET2* (メチオニン合成), *LYS12* (リジン合成) が得られた。実際に原栄養株 S288C にそれぞれの欠損を導入した細胞 (*ura1Δ*, *leu1Δ*, *his5Δ*, *met2Δ*, *lys12Δ*) は想定された栄養要求性を示し (図 1)、また増殖遅延も認められなかった (図 2)。以上よりこれら 5 つの遺伝子は cell fitness への影響が少ない有用な新規栄養マーカーであることが確かめられた。

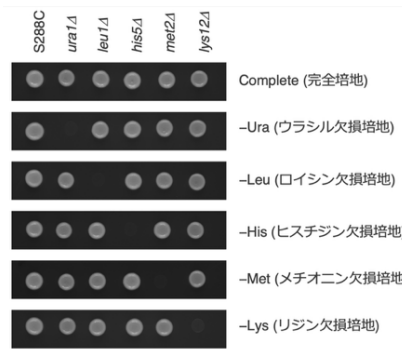


図 1. 新規栄養マーカー欠損細胞の栄養素欠損培地での増殖

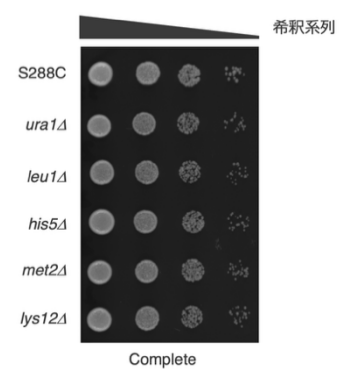


図 2. 新規栄養マーカー欠損細胞の増殖速度

【増殖遅延のないΔ10細胞の構築】

次に、これら 5 つの遺伝子 (*URA1*, *LEU1*, *HIS5*, *MET2*, *LYS12*) の欠損を BY4741/BY4742 に CRISPR/Cas9 システムを活用し導入していった。その結果、すべての遺伝子欠損導入に成功し接合型がそれぞれ異なる新規Δ10 細胞 2 種類、YMT252 (*MATa*) と YMT253 (*MATα*) を樹立した (図 3)。構築した細胞は元株である BY4741/BY4742 に比べ増殖遅延はなく、また先行研究のΔ10 (YMT183/YMT184) に比べ増殖が大きく改善された (図 4)。

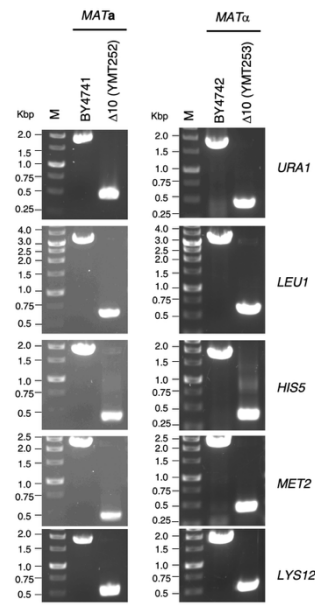


図 3. 新規Δ10の遺伝子欠損のPCRによる確認マーカー遺伝子の上流配列と下流配列にそれぞれアニールするプライマーの組み合わせでPCRを行った。

【新規Δ10細胞が10種類のプラスミドを保持できることの確認】

新規Δ10 が欠損する栄養マーカーのプラスミドを構築した。新規Δ10 も先行研究のΔ10 同様に 10 種類のプラスミドを保持可能か検証するために、新規構築したプラスミドを含め 10 種類のプラスミドを順次導入した。その結果、10 種類のプラスミドを保持する細胞が得られたことを PCR により確認した (図 5)。

今後は Renilla luciferase, firefly luciferase をモデルタンパク質として用いて新規Δ10 細胞で多種類遺伝子発現が実際に可能かどうかを検証していくとともに、遺伝子欠損を継続していく。

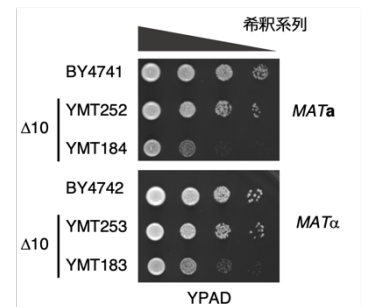


図 4. 新規Δ10 (YMT252 および YMT253) の増殖の比較 YMT183 (*MATa*) および YMT184 (*MATα*) は申請者の先行研究 (Dong G et al., FEBS Open Bio, 2024) で構築したΔ10 細胞株。

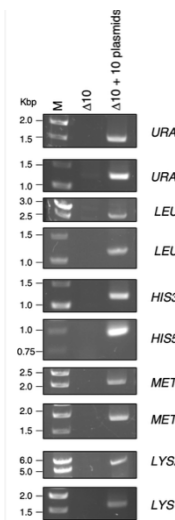


図 5. 新規Δ10 (YMT252) への 10 種類のプラスミド導入確認 (PCR)

それぞれの細胞の DNA をテンプレートとし、プラスミド特異的なプライマーおよびマーカー特異的なプライマーを用いて PCR を行った。

(6) 本研究の考察

本研究により新規栄養マーカー *URA1*, *LEU1*, *HIS5*, *MET2*, *LYS12* がその欠損で増殖遅延を引き起こさない実験上有用な新規栄養マーカーとして見出された。さらにこれらの欠損を BY4741/BY4742 に加え、10 種類の栄養マーカー欠損がある細胞 $\Delta 10$ を構築した。この新規 $\Delta 10$ は既報の $\Delta 10$ と異なり元株 BY4741/BY4742 と比べ増殖遅延は認められなかった。また新規 $\Delta 10$ もプラスミド 10 種類を保持できることを確かめた。現時点で実際の多種類遺伝子発現は検証中であるが、想定通りに遺伝子発現が認められれば本実験系は有用な多種類遺伝子発現プラットフォームであると言える。

既報の $\Delta 10$ は元株である BY4741/ BY4742 が示す栄養要求性に加えアデニン、トリプトファン、スレオニン、アルギニン、チロシンに対しても栄養要求性を示す。一方、本研究で構築した新規 $\Delta 10$ は BY4741/BY4742 がすでに栄養要求性を示すウラシル、ロイシン、ヒスチジン、メチオニン、リジンの生合成経路の遺伝子を破壊している。そのため新規 $\Delta 10$ は BY4741/BY4742 と栄養要求性が変わらない。このことは実験で使用する選択培地について一般的な市販品を利用できる点で有用である。他方、プラスミド導入では 2 種類のプラスミドを同時に導入しなければならない、すなわち 1 種類だけのプラスミド導入はできない点は注意点であり欠点と言える。

本研究では最終的に 40 種類の遺伝子発現を目指す、そのためにはさらに 10 種類のマーカー欠損を加えた $\Delta 20$ の構築が必要である。既報の $\Delta 10$ の増殖遅延はスレオニン合成酵素 *Thr1* の欠損が主な原因であることが既に明らかになっているため (Dong G, Nakai T, Matsuzaki T. *FEBS Open Bio*, 2024)、今回の新規 $\Delta 10$ にまずは既報の $\Delta 10$ が有する *Thr1* 以外のマーカー欠損 4 種類 (*ade2 Δ* , *trp1 Δ* , *arg1 Δ* , *tyr1 Δ*) を導入する。残り 6 種類は本研究と同様に同じアデニン、トリプトファン、スレオニン、アルギニン、チロシン生合成経路より新規マーカーを探索することで栄養要求性の種類を極力増やさない方向で、マーカー欠損の導入を行っていく。

(7) 共同研究者 (所属機関名、役職、氏名)

名古屋大学医学部附属病院薬剤部、教授・薬剤部長、池末裕明
 名古屋大学医学部附属病院薬剤部、准教授・副薬剤部長、溝口博之

(8) 本研究の成果の公表先

本研究につき以下の学会発表を行った。

松崎 哲郎, 溝口 博之, 池末 裕明. 出芽酵母新規栄養マーカーを用いたプラスミド同時導入法の構築. 日本薬学会第 146 年会 大阪府吹田市・2026 年 3 月 口頭発表

また以下の学会発表を予定している (報告書記載時点で審査中)。

松崎 哲郎, 溝口 博之, 池末 裕明. 出芽酵母新規栄養マーカーを利用した多種類遺伝子発現システムの樹立. 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2026 愛知県名古屋市・2026 年 7 月 口頭発表

また、本研究成果 (新規 $\Delta 10$ の構築) は査読付き国際科学雑誌に投稿予定であり、構築した実験マテリアルである新規 $\Delta 10$ と新規栄養マーカーのプラスミドは生物資源プラットフォーム NBRP 酵母 (<https://yeast.nig.ac.jp/yeast/>) および addgene (<https://www.addgene.org/>) に提供する予定である。

[注] この報告書を当財団のホームページ等に掲載します。予めご了承ください。