

〈特別研究課題〉 遺伝子リスクフリーな環境構築を目指した
新規変異原性試験法の研究
助成研究者 豊橋技術科学大学 浴 俊彦



遺伝子リスクフリーな環境構築を目指した
新規変異原性試験法の研究
浴 俊彦
(豊橋技術科学大学)

Novel yeast-based assays for assessing genotoxicity in
the environment

Toshihiko Eki
(Toyohashi University of Technology)

Abstract :

DNA damages caused by various environmental factors induce genetic diseases including cancers via mutations. In particular, endogenous and exogenous oxidative damages are thought to play an important role in genetic dysfunctions as well as accelerated aging. For establishment of the genetic risk-free society, it is important to develop the assay systems for detecting DNA damages in a large number of uncharacterized chemicals. Therefore, I have developed the genotoxicity tests using novel yeast-based reporter assays. In this study, I have newly prepared and evaluated the assay using recombinant yeasts with green fluorescent protein (GFP) or luciferase as a reporter to assess the chemical-induced genotoxicity or oxidative damages. In addition, I have successfully established a genetic editing method using CRISPR/Cas9 in the budding yeast to generate multiple gene-deleted host strains efficiently.

In this study, first, I examined the levels of GFP in the yeast cells with the DNA damage-responsive *RNR3* promoter (*RNR3p*)-driven GFP reporter plasmid after the exposure to DNA damaging agents including a DNA replication inhibitor hydroxyurea and a strong oxidant hydrogen peroxide. Induced expression of GFP was observed in the reporter yeast cells at 6h after the exposure to hydroxyurea, but not in the yeasts treated with hydrogen peroxide. Second, I newly developed the oxidative stress-responsive *TRX2p*-driven yeast strains with two kinds of luciferases

(i.e., *luc2* and *luc2CP* gene coding a stable and an unstable enzyme, respectively) as well as the corresponding *RNR3p*-driven reporter strains. Induction of luciferase activity caused by the treatment with 0.1mM hydrogen peroxide was successfully detected in the yeasts with a *TRX2p-luc2CP* reporter plasmid. The oxidant-dependent induction of luciferase was clearly observed during 2h after the treatment, indicating that the assay periods can be significantly shortened compared with those in GFP-based assay. Third, I have examined the transcriptional responses of the *luc2CP* gene upon the exposure to hydrogen peroxide, in seven mutants whose an oxidative stress response-gene was disrupted and increased levels of luciferase activity were observed in some of mutant strains compared with that in the wild-type strain. Finally, I have established a CRISPR/Cas9-mediated gene editing procedure for the budding yeast. As a model experiment, *STE2* gene encoding a pheromone receptor was disrupted by the method. The constructs expressing Cas9 and a *STE2* guide RNA were prepared and transfected into yeast cells with the repair fragment DNA, and then transformants with the plasmids were isolated. In this system, only yeast cells with the *STE2* locus replaced with the repair fragment DNA via homologous recombination can be alive. Four out of seven transformants contained the disrupted *STE2* locus, clearly indicating that usefulness of CRISPR/Cas9 for efficient gene disruptions in yeast.

1. はじめに

ヒトを含む地球上の生物は細胞から構成されており、生命活動を維持するための情報(遺伝情報)は、個々の細胞に存在する遺伝物質であるデオキシリボ核酸(DNA)の塩基配列としてコードされている。DNAは化学物質であることから、環境や細胞内代謝に由来する変異原によって物理化学的に容易に破壊・変化する。細胞中では、このようなDNA損傷が日常的に高頻度に発生しており、アルキル化や酸化、付加体形成などの塩基の修飾、塩基の欠失、ピリミジン二量体形成、DNA鎖の切断や架橋などのDNA損傷の種類と程度に応じて、細胞死や突然変異を引き起こす[1]。DNA損傷は、がんなどの遺伝性疾患の原因となるため、これまでにDNA傷害性(変異原性と言い換えてもよい)を検知することは、遺伝子リスクのない安全な社会を構築するうえで、非常に重要である。そのため、DNA傷害性を検出・評価するための様々な「変異原性試験法」が開発されてきた。現在、その簡便性とコスト面から、サルモネラ菌の復帰変異誘発を利用したAmes試験[2]が広く利用されているが、原核生物を用いた試験であることから、試験結果をヒトにそのまま適用できない場合があるなどの課題が存在する。マウスなどの実験動物を用いた発がん性試験は、結果をヒトにも適用できると考えられるが、動物愛護の観点から問題であり、かつ多数の化合物を試験することは困難である。

当研究室では、ヒトと同じ真核生物であり、取り扱いが容易な出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)を用いたDNA傷害性検出法の研究を続けている。酵母やヒト

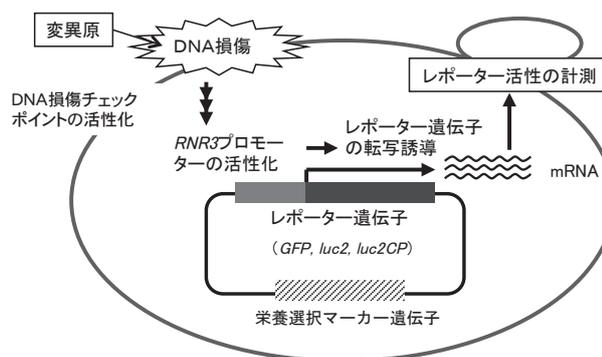


図1 DNA傷害性検出用レポーター酵母の概要

などの真核生物には、DNA損傷や異常なDNA複製停止が起こると、ゲノム安定性を維持するために、これらの異常を検知する「DNA損傷チェックポイント」と呼ばれる仕組みが備わっている。この仕組みでDNA損傷が検知されると、タンパク質キナーゼによるリン酸化カスケードを介して、最終的に細胞増殖の一時的な停止とDNA修復関連遺伝子の転写活性化が起こり、DNA損傷の修復が行われる。当研究室で開発しているDNA傷害性検出法は、DNA損傷によって特異的に転写活性化される酵母リボヌクレオチド還元酵素サブユニット3(*RNR3*)遺伝子[3]のプロモーターを用いたレポーターアッセイ法を利用している(図1)。*RNR3*プロモーターとレポーター遺伝子とを連結したプラスミドDNAを導入した組換え酵母が、DNA傷害性物質(変異原)に暴露すると、生じたDNA損傷によってDNA損傷チェックポイントが駆動し、*RNR3*プロモーターの転写活性化を介したレポーター遺伝子の発現誘導が起こる[4]。その際、レポーター遺伝子として酵素や蛍光タンパク質をコードする遺伝子を用いれば、発現した遺伝子産物の酵素活性や蛍光強度の増加率を計測することによって、暴露した際に酵母が被ったDNA傷害性の強度を評価することができる。我々は、これまでに β -ガラクトシダーゼや分泌性ルシフェラーゼをレポーターとしたDNA傷害性検出法を開発し、論文発表してきた[5, 6]。既知のDNA傷害性物質以外に、前者の方法を用いて、近年、医科学分野で注目されている低温プラズマ処理を行った際に生じるDNA傷害性についても初めて明らかにしている[7]。

環境由来の低レベルのDNA傷害性を検出するにはアッセイ系の高感度化が非常に重要となる。そのため、人工転写因子を利用した高感度な間接レポーター法の開発[5]やDNA修復遺伝子の破壊株を利用したレポーター法[6]の開発によって、従来法の5~100倍の高感度化を達成してきた。しかし、酵母は強固な物理的バリアである細胞壁を持つため、化学物質の細胞内への浸透性が低く、かつ透過した化合物を細胞外に排出する薬剤排出タンパク質が存在するため、培養細胞に比較して化合物に対する感受性が低いことが知られている。そのため、さらなるDNA傷害性の高感度化には、細胞壁形成や薬剤排出に関連した遺伝子群を多重的に破壊した酵母株を用いることが重要となる。近年、原核生物の一種の獲得性防御機構であるClustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat(CRISPR)/Cas9システムを利用したゲノム編集技術が、哺乳類を含めた様々な生物種に適用できるようになってきた。CRISPR/Cas9によるゲノム編集は、標的配列の20塩基程度の配列を持つガイドRNA(gRNA)とCas9と呼ばれるヌクレアーゼによって、gRNA配列に対応するDNA配列をCas9が特異的に切断することに依っている[8]。すなわち、標的DNAの塩基配列に対応するgRNAを、Cas9とともに細胞に導入すれば、人為的にゲノムの標的DNAに切断を起こさせ、つづくDNA切断部位が修復される過程で、欠失や外来DNAの挿入などを起こさせることで、標的ゲノム部位を改変するというものである。従来、ゲノムの改変には、同じ塩基配列を持つDNA同士を組換える「相同組

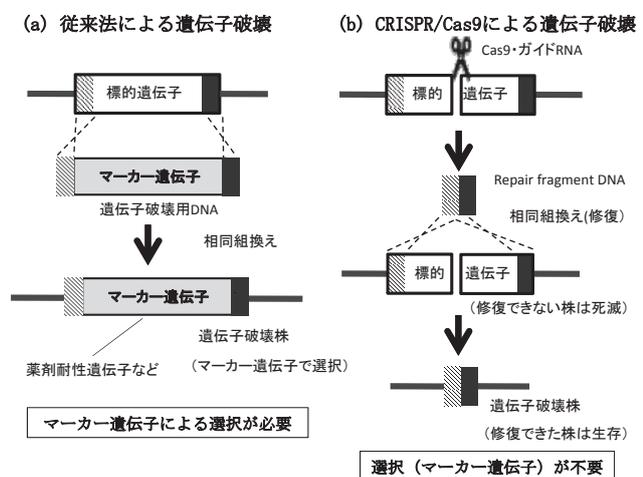


図2 2つの手法による酵母遺伝子破壊の原理

換え」が利用されてきたが、多くの生物では、相同組換えの頻度は非常に低く、標的DNAと選択用マーカー遺伝子を共導入した膨大な数の細胞集団に含まれるわずかな組換え細胞を、薬剤を利用する方法で時間と労力をかけて、選択してくる必要があった(図2 a)。CRISPR/Cas9によるゲノム編集では、標的部位に選択的に切断を起こせるため、高頻度かつ特異的に標的DNA部位を改変することができる。特に酵母は、他の生物に比べて、DNA切断の修復を相同組換えに大きく依存しているため、CRISPR/Cas9によるゲノム編集を行う際に、標的部位の部分配列を外来DNAの両端に組み込んでおくことで、外来DNAを正確かつ高頻度に標的部位に導入できる特徴を持つ[9]。この方法では、標的DNA部位が切断され、修復できなかった酵母は死んでしまい、修復された(ゲノム改変された)酵母のみが生存できると考えられ、薬剤選択や栄養選択なしに、高効率に遺伝子破壊などのゲノム改変株の作製が可能となる(図2 b)。

本研究では、GFPレポーター酵母を用いたDNA傷害性検出法により、代表的なDNA傷害に対する応答性を検証し、検出が困難であった酸化DNA傷害性を検知するための本法の改良を行った。また、宿主の改良に必要な多重遺伝子破壊を可能とするため、CRISPR/Cas9によるゲノム編集を酵母に適用するための基盤技術を確立した。

2. 実験

2.1 レポーター酵母によるDNA傷害性、および酸化傷害性の検出

DNA傷害性検出には、*RNR3*遺伝子プロモーターと、*GFP*遺伝子、あるいは培養細胞発現用に最適化されたタンパク質寿命の異なる2種類のルシフェラーゼをコードする遺伝子(安定型*luc2*、短寿命型*luc2CP*)を連結したレポーター遺伝子を、それぞれ*GALI*プロモーターを除去したシャトルベクター-pESC-HIS Δ GALに組み込んだプラスミドを用いた。酸化傷害性の検出には、酵母のチオレドキシシン2(*TRX2*)遺伝子プロモーターを利用した3種類のレポータープラスミドを同様に作製した。以上のレポーターコンストラクトを野生型酵母BY4741株に導入した6種類のレポーター酵母を実験に用いた。

GFPレポーター酵母を用いた実験では、組換え酵母を30度で一晩、SD選択培地で前培養した後、YPD培地で波長600nmでの光学密度(OD₆₀₀)を1.0になるよう希釈し、96穴プレートに100 μLずつ分注、薬剤処理を各時間行った。GFP蛍光強度の測定は、遠心操作で上清を除去し、さらに蒸留水で2回遠心洗浄した酵母を蛍光測定用96穴黒色プレートに移し、多用途型プレートリーダー(Tecan Infinite M1000)を用いて行った。ルシフェラーゼの活性測定については、酵母をYPD培地で30度、一晩前培養を行い、遠心操作で上清を除いた後、SD選択培地でOD₆₀₀を1.0に希釈し、96穴プレートに100 μLずつ分注、D-ルシフェリンカリウムを終濃度0.5mMになるよう添加して28度で90分間おき、さらに発光測定用96穴白色プレートに菌液を移し、薬剤処理を各時間行った後、多用途型プレートリーダーにて発光強度の測定を行った。発光強度やGFP蛍光強度は、測定蛍光値を試料の細胞数で校正した値を用いた。薬剤処理によるレポーター発現レベルの変化を示すために、処理群の校正値を非処理群の校正値で除した値をFold Induction値として用いた。

レポータープラスミドの宿主として、野生型株のほか、DNA傷害や酸化傷害による感受性を上げるために、BY4741由来の10種のDNA修復関連遺伝子(*mag1Δ*, *ntg1Δ*, *apn1Δ*, *rad27Δ*, *rad10Δ*, *yku70Δ*, *rad59Δ*, *mlh1Δ*, *mms2Δ*, *pso2Δ*)[6]、および7種の酸化ストレス応答遺伝子破壊株を用いた(表1)。

表1 実験に用いた酸化ストレス応答遺伝子破壊株

酸化ストレス応答 遺伝子破壊株	遺伝子産物の概要
<i>ctl1Δ</i>	細胞質カタラーゼ
<i>trx2Δ</i>	細胞質チオレドキシシン
<i>rad27Δ</i>	ヌクレアーゼ (複製、DNA 除去修復)
<i>tsa1Δ</i>	チオレドキシシンペルオキシダーゼ
<i>sod1Δ</i>	スーパーオキシドディスムターゼ 1
<i>sod2Δ</i>	スーパーオキシドディスムターゼ 2
<i>yap1Δ</i>	酸化ストレス応答転写制御因子 (負対照)

2.2 CRISPR/Cas9による酵母ゲノム編集法の確立

2015年にMansらによって報告された方法[10]を参考に、酵母フェロモン受容体をコードする *STE2* をモデル標的遺伝子として、CRISPR/Cas9によるゲノム編集法の確立を行った。Cas9発現コンストラクトは、*cas9*発現酵母株のゲノムDNAよりPCR増幅した、5'側に *TEF1* プロモーター、3'側に *CYCI* ターミネーターを付加した *Streptococcus pyogenes cas9* 遺伝子カセットDNA (約4.8kb) を、In Fusionクローニング法にて、トリプトファン選択マーカーを持つpRS414ベクターに組み込んで作製した。*STE2* ガイドRNA発現コンストラクトは、*STE2* 標的配列 (5'-ATGACATTATGAGTAAAATA-3') を付加したプライマーで、ヒスチジン選択が可能なgRNA発現用pMEL10プラスミドを鋳型に逆PCRを行い、自己環化させることで作製した。BigDyeターミネーター法によるシークエンシング反応産物を自動DNAシークエンサー (ABI3130) により解析して、作製したコンストラクトの塩基配列を確認した。*STE2* 遺伝子破壊のために、Cas9によるDNA切断を相同組換えで修復するための *STE2* 読み枠の両側60bp配列を連結した *STE2* repair fragment DNA (5'-CTATAATTATAATTGGTTACTTAAAAATGCACCGTTAAGAACCATATC CAAGAATCAAAATCAAAATTTACGGCTTTGAAAAAGTAATTTTCGTGACCTTCGGTATAAG GTTACTACTAGA-3') を調製した。Cas9発現コンストラクトを導入した酵母YPH499株に、*STE2* ガイドRNA発現プラスミドと *STE2* repair fragment DNA を共導入し、SD選択寒天培地で形質転換コロニーを形成させた。負対照として、pRS414ベクターを導入した株に上記のDNAを共導入した実験を行った。*STE2* 遺伝子破壊は、*STE2* 遺伝子を挟み込むPCRプライマーを用いたコロニーPCR (東洋紡KOD FX Neo) によって検証した。PCR産物は1%アガロースゲル電気泳動によって分析した。野生型 *STE2* 遺伝子からは、約2 kb、*STE2* 遺伝子が破壊 (*STE2* repair fragment DNA で置換) された場合、約700bpのPCR産物が検出される。

3. 結果と考察

3.1 レポーター酵母によるDNA傷害性と酸化傷害性の検出

当研究室で確立した *RNR3* プロモーターを利用したGFPレポーター酵母により、代表的なDNA傷害剤への応答性を検証した際に、アルキル化剤、クロスリンカー、DNA切断試薬、複製阻害剤などについては検出可能であったが、酸化傷害剤 (過酸化水素) については明確な検出が困難であっ

た。そこで、主なDNA修復経路の10種類の遺伝子破壊株を宿主としたレポーター酵母を調製し、0.3mM過酸化水素、および50mMヒドロキシウレア(複製阻害剤)処理後6、24時間目のGFP発現レベルを調べたが、ヒドロキシウレア処理群で2~10倍のFold Induction値の上昇が見られたのに対し、過酸化水素処理群では殆ど値の上昇は観察できなかった(data not shown)。

そこで、酸化的DNA傷害を含めた酸化傷害自体を広く検知するために、酸化ストレス応答性を示す酵母チオレドキシン2(*TRX2*)遺伝子プロモーターを利用したGFPレポーター酵母を新たに作製したが、過酸化水素による明確なGFP発現は観察できなかった(data not shown)。DNA傷害ストレスと比較して、酸化傷害ストレスは一過性であり、ストレスによって誘導された転写活性化も酸化傷害の場合は一過的であることが考えられたため、タンパク質に6時間以上の長時間を要するGFPはレポーターとして適していない可能性がある。そこで、タンパク質成熟が早いルシフェラーゼを用いたレポーター酵母を新たに作製し、さらに一過性の転写変動を検知しやすい短寿命型ルシフェラーゼレポーター酵母も作製した。その結果、ルシフェラーゼレポーター酵母では、0.1 mM過酸化水素処理群と対照群との間に有意なFold Induction値の差は見られなかったが、短寿命型ルシフェラーゼレポーター酵母では、処理後90分間にかけて、処理群で2倍程度の一過性の活性上昇が明確に検出された(図3)。

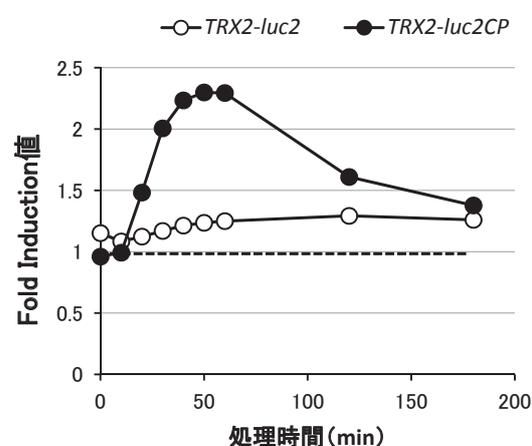


図3 過酸化水素によるルシフェラーゼ遺伝子の発現誘導

このレポーター酵母を用いて、5種類の酸化剤(過酸化水素、ジアミド[DA]、*tert*-ブチルヒドロペルオキシド[tBHP]、マレイン酸ジエチル[DEM]、メナジオン[MD])について、処理後、40分目の濃度応答曲線を調べた結果、高濃度では細胞毒性による影響が現れ、さらに誘導レベルに差は見られたものの、処理濃度に応答した活性上昇が検出できた(図4)。*TRX2*プロモーターを用いた3種類のレポーター酵母について、0.1mM過酸化水素による発現レベルの経時的変化を調べた結果、ルシフェラーゼとGFPレポーター酵母では有意な変動は見られなかったが、短寿命型ルシフェラーゼレポーター酵母では、処理後2時間にかけて一過性であるが、10倍を超える明確な発現上昇が検出できた(図5)。

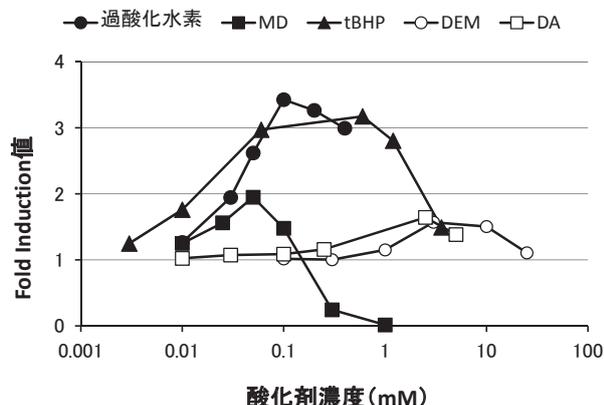


図4 酸化剤に対する短寿命型ルシフェラーゼ遺伝子の発現応答(酸化剤処理後40分目におけるルシフェラーゼ活性での評価)

遺伝子破壊株による酸化傷害性の高感度検出が可能か検討するために、7種類の酸化ストレス応答遺伝子の破壊株と短寿命型ルシフェラーゼレポーターを用いた実験を行った結果、酸化ストレス制御転写因子を欠損した*yap1Δ*株(負対照)では予想したとおり、活性上昇は見られず、*sod1Δ*株など幾つかの破壊株では、野生型株(WT)を用いた場合より高い発現レベルが認められた(図6)。結

果の検証は必要であるが、適切な遺伝子破壊株を使用することで、本手法の酸化傷害性検出能を高感度化できる可能性がある。

以上の結果より、新たに構築した短寿命型ルシフェラーゼレポーター酵母により、従来のGFPや β -ガラクトシダーゼなどのレポーター酵母でのアッセイに必要とされる時間(6時間以上)より格段に短い時間(1~2時間)で酸化傷害性の検出が可能となった。

3.2 CRISPR/Cas9による酵母ゲノム編集法の確立

2.2節に示した方法に従い、多重遺伝子破壊により宿主酵母を改良するために必要なCRISPR/Cas9によるゲノム編集法の確立を行った。手法に必要なCas9とガイドRNAの発現コンストラクトを作製し、酵母のフェロモン(α 因子)受容体遺伝子*STE2*を遺伝子破壊の標的にモデル実験を行った。Cas9はDNA切断活性を持つので発現による酵母への影響

を調べるために、Cas9発現株とpRS414ベクターを導入した対照株との増殖度を比較したが、大きな差異は見られなかった。つづいて、Cas9発現株と対照株に、*STE2*ガイドRNA発現コンストラクト、および*STE2* repair fragment DNAを導入し、寒天培地で2つのコンストラクトを持った形質転換株を選択した。*STE2*ガイドRNA発現コンストラクトを導入したCas9発現酵母では全くコロニーの形成が認められず、Cas9による*STE2*遺伝子切断によって両コンストラクトを持つ酵母は生存できなかったと考えられた。一方、2つのコンストラクトと*STE2* repair fragment DNAを導入した実験群では複数のコロニーが出現した。ガイドRNA発現コンストラクトとpRS414を持つ株、およびガイドRNA発現コンストラクトとCas9発現コンストラクト両方を持つ株のコロニーから、それぞれ10個、7個を選択し、*STE2*遺伝子全体を増幅するコロニーPCRを行った結果、PCR産物が明確に確認された株について、前者ではすべて(9/9)が野生型*STE2*遺伝子座位に由来するサイズのPCR産物が増幅されたのに対して、後者では殆ど(4/5)が*STE2* repair fragment DNAによる置換座位(遺伝子破壊)に由来するサイズのDNAが増幅された(図7)。

以上の結果は、酵母におけるCRISPR/Cas9を利用したゲノム編集では、相同組換えを介して、正確かつ高効率に遺伝子を破壊できることを示しており、このプロセスを繰り返すことで複数の遺

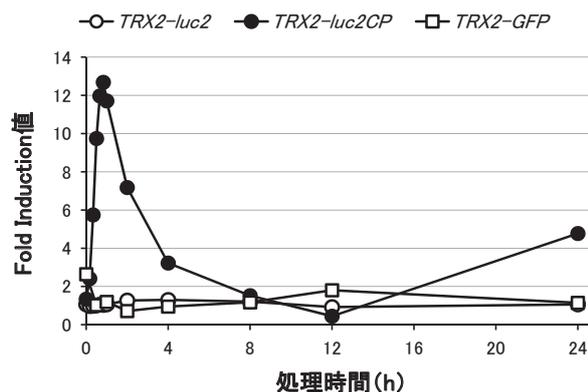


図5 過酸化水素に対する3種類のレポーター遺伝子の発現応答

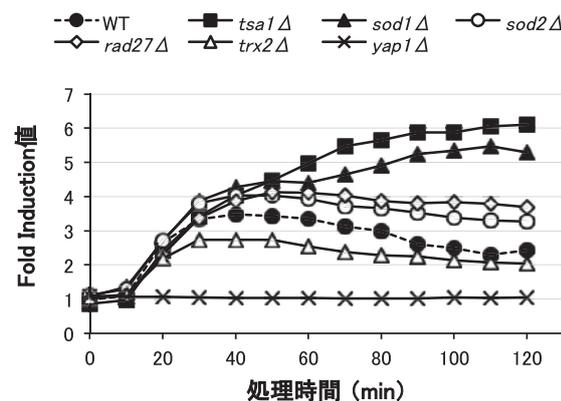


図6 遺伝子破壊株におけるレポーター活性 (0.1mM過酸化水素処理後、40分目での活性で評価。破線:野生株)

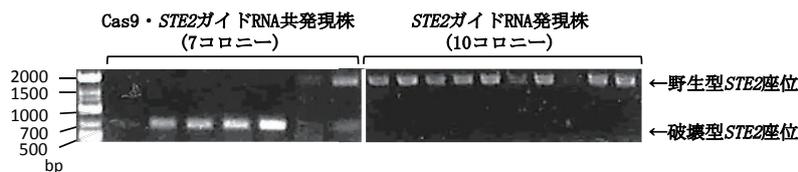


図7 コロニーPCRによる形質転換株の*STE2*座位の解析

伝子を効率よく破壊できると考えられる。さらに本手法は、レポーターコンストラクトを任意のゲノム座位に挿入することにも利用でき、今後のレポーター酵母の改良に大きく貢献すると考えられる。

4. まとめ

遺伝子リスクフリーな環境の構築に資するため、レポーター酵母を用いたDNA傷害性検出法の改良に関する研究を行った。とくに従来型のGFPレポーター酵母による実験において検出が困難であった酸化傷害性の検出を目指して、タンパク質成熟に6時間以上と時間がかかるGFPレポーターに替えて、迅速な成熟が期待される二種類(安定型と短寿命型)のルシフェラーゼをレポーターとする組換え酵母を新たに作製した。そこで、酸化ストレス応答性のチオレドキシニン2(*TRX2*)遺伝子プロモーターを利用したレポーター酵母を作製し、過酸化水素に対する応答特性を調べた結果、短寿命型ルシフェラーゼレポーター酵母により、1~2時間以内に酸化傷害性応答を明確に検出することに成功した。野生型酵母に替えて、7種類の酸化ストレス応答に関わる遺伝子破壊株を宿主に同様の実験を行ったところ、幾つかの遺伝子破壊株で2倍程度の応答性の向上が観察された。

DNA修復遺伝子や薬剤排出関連遺伝子を多重的に破壊した宿主酵母を用いることで、本レポーター系の高感度化が期待できるが、相同組換えを利用する従来法では、使用できる選択用マーカー遺伝子の数に制限があるため、3つ以上の遺伝子を効率的に破壊することは事実上、不可能であった。この課題を解決するため、本研究では、CRISPR/Cas9によるゲノム編集技術を酵母に適用するための実験系を構築した。Cas9発現コンストラクトと標的遺伝子*STE2*に対するガイドRNA発現コンストラクトを作製し、修復用DNAを含めた3つのDNAを酵母に導入したところ、形質転換酵母の50%以上で、標的とした*STE2*遺伝子が完全に置換(破壊)されていた。本法では高効率に遺伝子破壊が起こせるため、選択用マーカー遺伝子を用いる必要はなくなり、原理的に破壊できる遺伝子数の上限はなくなったといえる。本研究を通じて、酵母の高効率なゲノム編集法が確立できたことで、多重遺伝子破壊株やプラスミドを用いないレポーター酵母の作製など、レポーター酵母の改良に向けた技術的な可能性と展望を大きく拡張することができた。

参考文献

1. E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Siede, R. D. Wood, R. A. Schultz, and T. Ellenberger, DNA Repair and Mutagenesis 2nd Ed., ASM Press (2005)
2. B. N. Ames, E. G. Gurney, J. A. Miller, and H. Bartsch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 3128-3132 (1972)
3. S. J. Elledge and R. W. Davis, *Genes Dev.*, 4, 740-751 (1990)
4. 浴 俊彦, バイオセンサの迅速・簡易・高機能化技術と課題解決, 技術情報協会, pp.121-127 (2014)
5. K. Ichikawa and T. Eki, *J. Biochem (Tokyo)*, 139, 105-112 (2006)
6. Y. Ochi, H. Sugawara, M. Iwami, M. Tanaka, and T. Eki, *Yeast*, 28, 265-278 (2011)
7. H. Yamaguchi, H. Yasuda, T. Eki, H. Kurita, K. Takashima, and A. Mizuno, *Inst. Electrostat. Jpn.*, 35, 8-13 (2011)

8. S. H. Sternberg and J. A. Doudna, *Mol. Cell*, 58, 568-574 (2015)
9. J. E. DiCarlo, J. E. Norville, P. Mali, X. Rios, J. Aach and G. M. Church, *Nucleic Acids Res.*, 41, 4336-4343 (2013)
10. R. Mans, H. M. van Rossum, M. Wijsman, A. Backx, N. G. A. Kuijpers, M. van den Broek, P. Daran-Lapujade, J. T. Pronk, A. J. A. van Maris, and J-M. G. Daran, *FEMS Yeast Res.*, 15, fov004 (2015)