

トルラ酵母の新しい育種技術の開発
「日本農芸化学会2020年度大会(福岡)」にて発表

三菱商事ライフサイエンス株式会社(本社:東京都千代田区、代表取締役社長:藤木 洋)と、東京大学(東京都文京区、学長:五神 真)太田邦史教授らの共同研究グループは、FDA(米国食品医薬品局)で安全性が認められているトルラ酵母を対象にした、新しいゲノム再編成技術「タンパク質導入型TAQingシステム」の開発に成功しました(注1)。この技術は、太田邦史教授らが開発した核酸導入型TAQingシステム(注2)の改変版で、核酸を使わず、高度好熱菌由来 *TaqI* 酵素を生きたトルラ酵母に直接導入すること、また不規則な再編成のイベントを自己ゲノム内だけで完結させることを特長とします。

この技術により、体細胞分裂しかしないと考えられているトルラ酵母のゲノムに、減数分裂時に起こる染色体の転座や欠失、逆位といった大規模再編成を効率的に加えることができるようになりました。これにより、トルラ酵母ゲノムの潜在能力が引き出され、医薬・化粧品バイオ素材を製造する微生物プラットフォームとしての応用可能性を拡げることが期待できます。

本研究結果を、「日本農芸化学会2020年度大会(福岡)(2020年3月25日~28日)」にて発表しました。(新型コロナウイルス感染症の感染拡大防止のため、同大会ホームページへの大会講演要旨集の掲載をもって、発表の成立とされました。)

(注1) 日本公開特許、特開2018-130116

(注2) Muramoto N., Oda A., Ohta K. *et al.*, *Nat Commun.*, 9:1-15, 2018

【主な研究成果】

- ・タンパク質導入型TAQingシステムをトルラ酵母に適用して、凝集性形質を獲得した株を取得した(注3)。本発表は、当該株のゲノム構造を次世代シーケンシングで詳細解析したものである。
- ・*TaqI* 認識配列TCGAが境界配列であるような染色体の転座や欠失を、複数箇所検出した。
- ・変異領域が1,000 kbaseを超える大規模なものも存在した。

(注3) 日本農芸化学会2019年度大会、講演番号3C5p09

三菱商事ライフサイエンス

【日本農芸化学会2020年度大会(福岡)発表概要】

日時:2020年3月27日

講演番号:3A08p07

演題名:エンドヌクレアーゼ *TaqI*の直接導入で得られた産業用酵母の再編成ゲノムの構造解析

発表者:安川 泰史¹、小田 有沙²、増尾 直久¹、太田 邦史²

(1・三菱商事ライフサイエンス株式会社 2・東京大学総合文化研究科)

【目標・課題】当社では産業用酵母のトルラ酵母 *Candida utilis*(以下Cu)を用いて、グルタチオンなどのバイオ素材を発酵生産している。本研究の目標は、微生物プラットフォームとして有用なCuを育種で創出することである。Cuは高密度培養でもアルコール発酵しないことから、物質生産性に優れる。一方でゲノムは高次倍数性であり、有性生殖様式も未解明なことから、従来の組換えDNA技術は適用しづらい。古典的な突然変異育種には多くの時間と労力が必要で、また得られる形質も既に飽和しつつある。よって産業用酵母にも適用できる新しい育種技術の開発が課題であった。

【経緯】東京大学太田研が開発したTAQingシステムは、体細胞分裂期に発現させた耐熱性制限酵素 *TaqI*でゲノムをランダムに切断/再結合(シャッフリング)させ、多数の遺伝子が関わる量的形質を高速改良する技術である[1]。また活性*TaqI*を直接生細胞内に導入するタンパク質導入型TAQingシステムも確立されており[2, 3]、我々は後者をCuに適用して、継代安定的で凝集度合の異なる二種類のCu凝集株を取得した。昨年の本大会では、染色体PFGEパターンがCu野生型のそれと互いに異なることを報告している[4]。本発表では、その後に実施したゲノムリシーケンス解析について報告する。

【方法・結果・考察】Cu NBRC0988(以下WT)とCu凝集株a4、a9からゲノムを精製しPCRフリーでライブラリー調製した。Illumina NovaSeqを用いて2×150 baseペアエンドシーケンシングを行い、ゲノムサイズ13 Mbに対して4-12 Gbのデータ量を取得した。リファレンスには *Cyberlindnera jadinii* NRRL y-1542あるいはWTのPacBio Sequelによるde novoアセンブル配列を用いた。TAQingによって生じたゲノム再編を検出するために、a4、a9株のリシーケンス情報のうち、複数の染色体領域(またはコンティグ)にまたがってマッピングされたリード(chimeric alignment)に着目し、異なるコンティグ間での転座が起こっている領域の候補を探索した。さらに、これらの境界配列(breakpoint)が*TaqI*認識配列TCGAである領域を抽出した。またカバレッジが大きく変わる領域を抽出することで、コンティグレベルでの倍数性の変化や転座が検証できるので、a4、a9株におけるカバレッジをWTのカバレッジで正規化して、抽出領域の染色体構造を定量的に推定した。結果、a4では転座が少なくとも一か所、a9では欠失と転座が少なくとも一か所ずつ検出された。現在、構造変異をより詳細に決定するため解析を継続している。

[1] Muramoto N., et al., Nat Commun., 9:1-15, 2018 [2] 日本公開特許、特開2017-104082

[3] 日本公開特許、特開2018-130116

[4] 日本農芸化学会2019年度大会 3C5p09

【このリリースに関するお問い合わせ先】

三菱商事ライフサイエンス株式会社 研究開発本部

所在地:〒100-0006 東京都千代田区有楽町一丁目1番3号 東京宝塚ビル14階

TEL: 03-6891-7101 FAX: 03-5501-7330