

2022年3月30日  
三菱商事ライフサイエンス株式会社

## 外部から遺伝物質を持ち込まずにゲノムを改良する技術「TAQing2.0」を開発

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、国立大学法人東京大学（東京都文京区、総長：藤井輝夫）、太田邦史教授らが共同で行った「TAQing2.0 タンパク質の直接導入による不稔性産業酵母のゲノム再編成技術」に関する研究論文が、学術雑誌 *Communications Biology* に掲載されました。

## 【発表のポイント】

- 多くの遺伝子が関わる複雑な形質を高速で改良できるゲノム再編成誘発技術「TAQingシステム」を改良し、外来のDNAやRNAを一切導入せずに育種する技術「TAQing2.0」を開発しました。
- 本技術では、市販の細胞膜貫通ペプチドを用いて細胞にDNA切断酵素 *TaqI* を直接導入します。細胞の保持温度により *TaqI* の活性をコントロールすることで、自然界の交配の際に生じるゲノム再編成過程を模しながら、そのイベントの発生頻度を劇的に高めることができます。
- 本技術を、交配育種が困難なトルラ酵母に適用すると、大規模なゲノムの構造変異が複数箇所を確認されました。また、これまで大まかにしか明らかにならなかったトルラ酵母の全ゲノム配列を、正確に決定することにも成功しました。
- この技術を応用することで、同一種内での遺伝的多様性を高め、産業有用株の効率的な取得につながると考えられます。また、取得過程および得られた株には外来DNAやRNAを使用していないため、これまでの遺伝子組換え生物よりも社会的に受容されやすいと期待されます。

## 【発表内容】

古来より人類は、交配育種（かけあわせ）という有性生殖の仕組みを利用して、動植物を自らにとって有用な性質をもつ品種に改良してきました。この方法は、外部から遺伝子を導入することなくゲノムDNA（注1）を変化させるのですが、DNAの変化は世代交代を経て行われるため、生物の改良には非常に長い期間がかかるという根本的な課題がありました。また、有性生殖の機能をもたない生物については交配育種を用いることができず、放射線や薬剤処理を通じてDNA変化を誘発させてきましたが、これらの方法も多大な時間や労力が必要という点で、同じ課題を抱えていました。

## 三菱商事ライフサイエンス

太田教授らはこれまでに、ゲノム再編成を誘発する技術である「TAQingシステム(注2)」を開発していました(Muramotoら, *Nat. Commun.* 2018)。この技術では、パン酵母や植物(シロイヌナズナ)の細胞に制限酵素(注3、*TaqI*や*MboI*など)の遺伝子を遺伝子工学的に導入し、誘導性プロモーターの制御下で一時的に発現させ、同時多発的に細胞内のDNAを切断します。これにより、ゲノムDNAの大規模な再編成が誘発され、バイオエタノール発酵性能などの有用形質を備えた変異体を迅速に取得することが可能になりました。しかし、当初のTAQing技術では、制限酵素の遺伝子をプラスミドDNAなどにより外部から導入する必要がありました。したがって、遺伝子導入系が確立されていない生物種に適用できないことや、得られた変異株は遺伝子組換え生物として取り扱うべき側面が存在するなど、実用化の際に課題がありました。

本研究グループは、今回開発したTAQing2.0技術によって、これらの課題を克服することに成功しました。

本研究では、不稔性産業酵母の一種であるトルラ酵母(注4)を用いました。緩衝液中の生きたトルラ酵母細胞に、制限酵素 *TaqI* と膜透過性ペプチド(市販品)の混合物を添加し、一定時間加温するというシンプルな操作で、細胞内でゲノムDNA切断を引き起こし、大規模なゲノム再編成を誘発することに成功しました(図1)。また酵母の増殖時期や緩衝液条件を最適化することで、細胞壁を消化することなく、様々なタンパク質や酵素を、その立体構造や活性を保持させたまま細胞内に送致する方法も、同時に確立しました。この技術をトルラ酵母に1回適用するだけで、凝集性やストレス耐性(未発表データ)といった表現型変化を伴う変異株を取得しました。得られた変異株について、1分子DNAシーケンサーなどを用いて全ゲノム解析を行ったところ、導入した *TaqI* の切断配列部位でゲノム再編成が生じている証拠が得られました(図2)。また、この成果を得る過程で、これまで大まかにしか明らかになっていなかったトルラ酵母の全ゲノム配列を正確に決定することにも成功しました。

本研究グループはこの改変型技術をTAQing2.0と名付け、現在、同技術の産業実用性の評価を進めています。当社ではこれまで培ってきた育種技術にTAQing2.0を加え、時々刻々と変化する顧客・市場ニーズに対して柔軟に応えるべく、より高品質な微生物発酵プラットフォームの提供を目指して参ります。

### 【用語解説】

(注1)ゲノムDNA

ある特定の生物種を記述する最小単位のDNA情報。細胞一つ一つにゲノムの情報をもつ DNAが格納されています。

(注2)TAQingシステム

## 三菱商事ライフサイエンス

2018年に報告された、生細胞内に多部位でDNAを切断する制限酵素などのタンパク質を導入し、ゲノム再編成を同時多発的に誘発する技術 (Muramotoら, *Nat. Commun.* 2018)。TAQingシステムでは、酵母細胞のバイオエタノール発酵性能や、シロイヌナズナなどの植物のストレス耐性やバイオマス量などの形質を迅速に改良することができます。

### (注3)制限酵素

4塩基あるいは6塩基、またはそれ以上の長さのDNA塩基配列を特異的に認識してDNAを切断する酵素。一部のバクテリアに存在し、バクテリアに感染するファージ（バクテリアに感染するウイルス）の増殖を制限する働きがあるため、制限酵素と呼ばれるようになりました。制限酵素は決まった配列でDNAを切断する性質があるため、組換えDNA技術の発展に不可欠な貢献を果たしました。

### (注4)トルラ酵母

トルラ酵母 (*Cyberlindnera jadinii*, *Candida utilis*) は、1910年代にタンパク質栄養源の確保のためにドイツで利用されるようになり、現在では食飼料用酵母や栄養補助食品として利用されています。また、その安全性は米国FDA (Food and Drug Administration: 食品医薬品局) がGRAS (Generally Recognized As Safe) 認定しており、世界各国で数多くの食品に利用されています。

### 【添付資料】

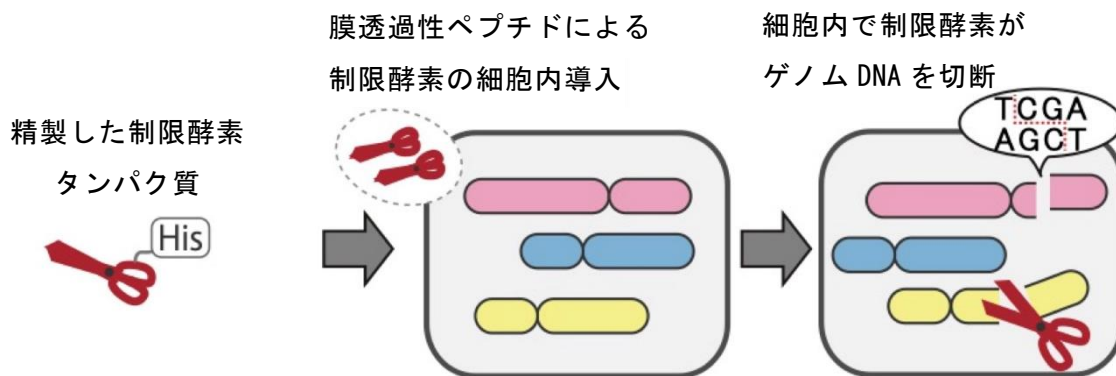


図1 TAQing2.0の概要

従来のTAQingシステムでは制限酵素遺伝子をもつプラスミドDNAを細胞に導入して細胞内で発現し、DNAの切断を細胞内で部分的に誘導します。TAQing2.0では精製した制限酵素タンパク質を膜透過性ペプチドと混合し、細胞内に直接送致します。そのため、外来DNAの取り込みを行わずにゲノム再編成を誘発することができます。また、遺伝子導入系が確立していない生物にも容易に適用できるため、適用範囲が広がります。

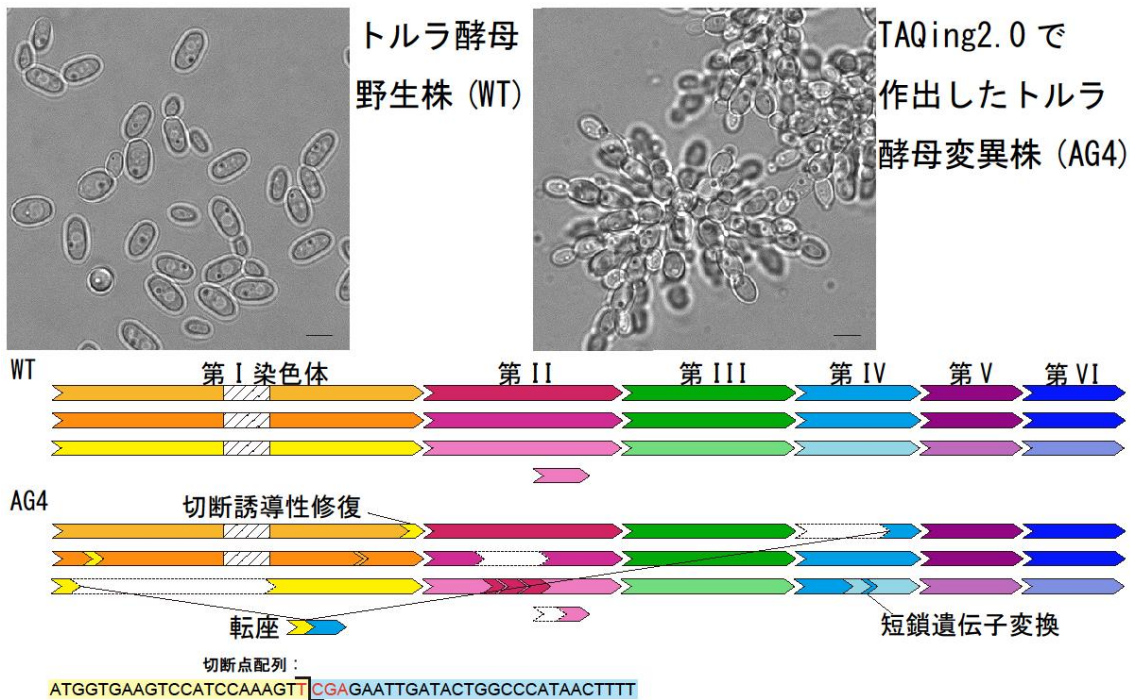


図2 TAQing2.0で作出したトルラ酵母変異株(左上、野生株;右上、変異株AG4)の顕微鏡像(写真、スケールバー: 5  $\mu$ m)と染色体構成(下段模式図)。今回開発した方法では、写真のように細胞壁を維持したままタンパク質を細胞内に導入できます。TAQing2.0をトルラ酵母に適用すると、凝集性やストレス耐性などの表現型が変化した細胞株が容易に取得できます。なお、写真で示したAG4では第 I 染色体と第IV染色体の間で転座(染色体の切断・再結合)が生じています。転座の切断点には、DNA切断酵素の認識配列が存在していることが示されています。

【発表論文】

掲載誌: *Communications Biology* (オンライン版: 2月17日)

タイトル: TAQing2.0 for genome reorganization of asexual industrial yeasts by direct protein transfection

著者: Taishi Yasukawa, Arisa H. Oda, Takahiro Nakamura, Naohisa Masuo, Miki Tamura, Yuriko Yamasaki, Makoto Imura, Takatomi Yamada, and Kunihiro Ohta\*

DOI 番号: 10.1038/s42003-022-03093-6

URL: <https://www.nature.com/articles/s42003-022-03093-6>

【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

問い合わせ窓口 総務人事部 総務広報グループ Mail: [prgroup\\_mcls@mcls-ltd.com](mailto:prgroup_mcls@mcls-ltd.com)