

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「ゲノムスケールの DNA 設計・合成による細胞制御技術の創出」
研究課題「新規ゲノム再編成技術と長鎖 DNA 合成を活用したゲノム改修技術の開発」

研究終了報告書

研究期間 2018年10月～2024年03月

研究代表者: 太田 邦史
(東京大学 大学院総合文化研究科
教授)

§ 1 研究実施の概要

(1)実施概要

本研究は、太田グループが開発した TAQing システム (DNA 切断酵素を細胞内で条件的に活性化してゲノムを切断し、再編成を誘発) を活用し、新形質を発現する「最小改修ゲノム」を合成することを目指した。基本的な概念検証実験は完了し、当初目的としていた方法論を確立することができたと認識している。

以下、具体的な実施状況を箇条書きで列挙する。

①TAQing システムを改良した **Ex-TAQing 法** (DNA 切断酵素を変更してゲノム再編成パターンを多様化) の開発 (豊田中央研究所と共同、日本、米国特許取得、論文発表 2020)

②**TAQing2.0 法** (制限酵素等を生細胞内に直接送致してゲノム再編成を行う方法) の開発 (三菱商事ライフサイエンスと共同、日本特許出願、論文発表 2022)

③光で制御可能な **MagTAQing 法** を開発し、減数分裂期細胞におけるゲノム再編成の特徴を明らかにした (論文投稿準備中)。

④上記技術を用いて、酵母、植物、線虫 (杉本グループと共同)、ヒト細胞 (田代グループと共同)、トルラ酵母 (三菱商事ライフサイエンスと共同) 等に対して TAQing によるゲノム再編成を誘発し、多様な表現型を有する人工細胞の作製に成功 (一部論文発表 2022、その他複数の論文を準備中)

⑤TAQing 変異株の全ゲノム配列を解読により、**表現型変化に関わる染色体領域のマッピング法を確立** (論文発表 2022)

⑥上記マッピング技術を用いることで、有用形質に関わる遺伝子領域の特定に成功 (特許出願予定、論文準備中)

⑦上記情報を元に**最小改修ゲノムを設計し、所定の機能を有する再設計人工酵母細胞の合成に成功** (論文発表 2022、論文準備中)

⑧舩本グループと共同で、複数の Cre-loxP セットを用いたボトルシップ DNA 延長法を用いて、酵母やトリ細胞の染色体上での長鎖 DNA 合成、ヒトやタバコの人工染色体での**長鎖 DNA 合成法を確立**

⑨ボトルシップ型長鎖 DNA 延長法で合成ヒト抗体遺伝子座を組み込んだニワトリ B 細胞株 DT40 を用いて、**ヒト抗体を迅速に作製・改良できるシステムを開発** (カイオム・バイオサイエンスと共同)

⑩田代グループにより、オリゴ DNA プローブを用いた 3D-FISH や多色 FISH を利用して、合成ゲノムの核内配置や TAQing によるヒト細胞ゲノム再編成の解析を実施

(2)顕著な成果

< 優れた基礎研究としての成果 >

1. 改良型 TAQing システムによる適用範囲の拡大とゲノム再編成制御の多様性

概要:

オリジナルの TAQing システムを改良し、制限酵素種を変更した ExTAQing やタンパク質の細胞内直接送致による外来の遺伝物質の導入を経ない TAQing2.0、また光で活性化可能な MagTAQing という新規技術を開発することで、酵母、非伝統的酵母、線虫、ヒト細胞等に適用範囲を拡大することができた。とくに杉本グループと共同で実施した線虫での TAQing 実験では、動物個体でのゲノム再編成や染色体分断化に成功し、Dumpy 表現型や Him 表現型、行動異常などの多様な表現型変化を示す変異体が得られた。

2. TAQing システムによるゲノム再編成を用いた量的形質の遺伝学的解析法の確立

概要:

凝集性、糖資化能、高温増殖能などの量的形質について、表現型が異なる 2 系統の酵母を細胞融合した後に TAQing を行い、量的な表現型変化が見られる変異株を構築した。これらのゲノム配列を解析し、コピー数多型やヘテロ接合性喪失などの変化から、表現型変化をも

たらず染色体領域や遺伝子群を特定する新たな方法論を開発した(Yone et al., *Sci Rep.*, 2022)。

3. 光で制御可能な MagTAQing システムの開発

概要:

制限酵素 MboI を2分割し、東京大学の佐藤守俊教授が開発した青色光下で二量体を形成する magnet タグ(Kawano et al., *Nature Commun.* 2015)を双方の断片に連結し、酵母細胞内で発現させた。青色光照射後に細胞死を誘発する分割ペアを選別した。このペアを導入した酵母に青色光を照射すると、MboI 認識配列を切断点に有する転座や、コピー数変動などが発生することを確認した。この方法を利用することで、減数分裂など特定の細胞周期にある細胞でゲノム再編成を誘発することに成功した。将来的には、動物個体内の特定臓器やがん組織内でゲノム再編成を誘発したりすることが可能である。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. 外来 DNA 導入を必要としない TAQing2. 0法の開発

概要:

ビール酵母や清酒酵母、トルラ酵母などの工業用醸造酵母の多くは孢子形成能を失っており、交配による品種改良が困難である。また、組換え DNA に対する社会受容性の問題から、外来 DNA 導入を経ないゲノム改良法の開発が必要であった。そこで、本研究において、膜貫通型ペプチドを活用して、DNA 切断酵素を直接細胞内に送致して TAQing を行う TAQing2.0 法を開発し、これを用いてトルラ酵母で変異株を取得した(Yasukawa et al., *Commun. Biol.*, 2022)。

2. 人工ヒト型抗体遺伝子座を有するトリ DT40 細胞を用いたヒト抗体迅速作製システム

概要:

Cre-loxP 系を用いたボトルシップ型長鎖 DNA 合成法により、抗体遺伝子座の上流に存在するトリ偽抗体遺伝子クラスターを人工設計・合成したヒト型偽抗体遺伝子クラスターに置換し、トリ抗体遺伝子もヒト抗体遺伝と交換した人工細胞を構築した。この人工 DT40 細胞にヒストン脱アセチル化酵素阻害剤等を作用させて抗体遺伝子再編成を加速して得た抗体多様化ライブラリから、血管内皮増殖因子 VEGF などに対する機能性モノクローナル抗体を迅速に作製し、さらに高親和性化にも成功した(Seo et al., *Cell. Mol. Imm.*, 2020; Masuda et al., *mAbs*, 2022)。

3. 菌類の TAQing による二次代謝物合成の誘発

概要:

糸状菌類は抗菌物質などのリード化合物となる二次代謝物を産生するが、その生合成遺伝子群の多くは休眠した状態になっている。糸状菌に TAQing を実施することで、ゲノム再編成を通じて休眠中の二次代謝物生合成遺伝子を覚醒し、新たな創薬リード化合物を取得する可能性が開かれた。生物多様性条約に基づく ABS 基本ルールにより、近年簡単に海外で微生物を収集することが困難になっているが、実験室で TAQing により糸状菌などの生物多様性を獲得し、新規創薬リード化合物を含むライブラリ構築への道筋が得られた。

< 代表的な論文 >

1. Tanaka H., Muramoto N., Sugimoto H., Oda A., Ohta K.

Extended-TAQing system for large-scale plant genome reorganization.
The Plant Journal **103**: 2139-2150, (2020)

概要:

シロイヌナズナの細胞内において常温で活性を示す種々の制限酵素を発現し、最も効率よく

ゲノム DNA を切断する酵素として MseI を見出した。MseI に人工的なイントロンを挿入し、熱ショックプロモーター下に置いた発現ベクターを作製し、植物に導入した。形質転換個体を一過的に穏和に加温して MseI 発現を誘導し、多部位でゲノム再編成を誘発することに成功し、アブシジン酸感受性系統や高塩濃度耐性系統の取得にも成功した(拡張型 TAQing 法、Ex-TAQing 法)。

2. Yasukawa T., Oda H.A., Namkamura T., Masuo N., Tamura M., Yamazaki T., Imura M., Yamada T., Ohta K.
TAQing2.0 for genome reorganization of asexual industrial yeasts by direct protein transfection. *Commun. Biol.* **5**: 144 (2022)

概要:

膜透過性ペプチドを用いて制限酵素タンパク質をトルラ酵母の細胞内に送致し、外部から遺伝物質を持ち込まずにゲノム再編成を実現した論文。交配による品種改良が不可能な醸造用微生物や、遺伝子発現系が確立していない非モデル生物に TAQing を拡大することが可能になった。この方法により、現在多種の生物で TAQing が可能になった。

3. Yone H., Kono H., Hirai H., *Ohta K.
Gene mapping methodology powered by induced genome rearrangements. *Sci. Rep.* **12**: 16658. (2022)

概要:

凝集性形質について、表現型が異なる 2 系統の酵母を細胞融合した後に TAQing を行い、凝集性変化が見られる変異株を多数構築した。これらの全ゲノム配列を解析し、凝集性変化をもたらす遺伝子群を効率的に同定する新たな方法論を開発した論文。この方法により、有用形質に関わる複数の染色体領域の同定が可能になった。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「太田」グループ

研究代表者: 太田 邦史 (東京大学・総合文化研究科・教授)

研究項目

研究項目 1. 多様な表現型を示すプロト人工細胞の作製

研究項目 2. プロト人工細胞のゲノム情報を用いた最小改修ゲノム設計

研究項目 3. 長鎖 DNA 合成による最小改修ゲノム構築

研究項目 4. 再設計人工細胞の評価とフィードバック

研究項目 5. 新型コロナウイルスに対するモノクローナル抗体作製

② 「田代」グループ

主たる共同研究者: 田代 聡 (広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授)

研究項目

研究項目 2. プロト人工細胞のゲノム情報を用いた最小改修ゲノム設計

研究項目 4. 再設計人工細胞の評価とフィードバック

③ 「舩本」グループ

主たる共同研究者: 舩本 寛 ((公財)かずさ DNA 研究所・先端研究開発部・染色体工学研究室・室長)

研究項目

研究項目 1. 多様な表現型を示すプロト人工細胞の作製

研究項目3. 長鎖 DNA 合成による最小改修ゲノム構築

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

研究期間中に大学・研究所、産業界との連携が進捗した。東北大学大学院薬学研究科の浅井禎吾教授、国立感染症研究所の鈴木仁人主任研究員、星野仁彦ハンセン病研究センター感染制御部室長との糸状菌 TAQing に関する共同研究は、AMED の新興・再興感染症研究基盤創生事業「革新的天然物創製法に基づく薬剤耐性菌に対する抗菌薬リード化合物の開発」(代表浅井教授)が 2023 年3月に終了後も、AMED-CREST「感染症創薬に向けた研究基盤の構築と新規モダリティ等の技術基盤の創出」研究開発領域(代表 浅井教授)の研究計画に組み込まれ、太田が分担者として参画している。TAQing2.0 については、三菱商事ライフサイエンスとトルラ酵母の共同研究などに発展した(現在は研究終了)。また、大腸菌の人工進化を行っている東京大学の市橋伯一教授(同 CREST メンバー)や慶應義塾大学の河野暢明特任講師、大阪大学の渡邊肇教授に対して、技術提供を行った。人工合成人抗体遺伝子座を有するニワトリ B 細胞株を用いたヒト ADLib システムに関しては、太田研メンバーの瀬尾秀宗がカイオムバイオサイエンスと共同で開発を行い、同社が国内外の製薬企業等に技術導出を行っている。