

多様性創出ゲノム工学技術の開発と微生物育種への応用

笹野 佑・Yeon-Hee Kim・杉山 峰崇・原島 俊*

近年、微生物育種技術の進展が著しい。目的とする有用物質の生産に素質のある微生物を自然界からスクリーニングし、突然変異を重ねていくこれまでの方法論が、いくつかのエポックメーキングな技術によって取って代わろうとされている。こうした技術の代表的なものは、「グローバル転写装置工学」「ゲノムシャフリング技術」「人工転写因子工学」「リボソーム結合部位改変工学」、そして我々が提唱している「ゲノム再編成工学」などである。さらに、それらに加え、最近では、「CRISPR/Cas」と呼ばれる画期的な技術も登場した。これらの技術の中には、数年前から知られていたものもあるが、「多様性の創出」という明確な概念のもと、微生物育種に積極的に応用しようとする動きは近年のことであると言っても過言ではない。筆者らは、この技術を「多様性創出ゲノム工学」という言葉で呼ぶことを提唱したい。

多様性創出ゲノム工学とは

技術の応用の背景にある共通のアイデアは、素材微生物（ゲノム）から出発し、ゲノムレベル、転写レベル、翻訳レベルの違いはあるにせよ、多数の遺伝子によって支配される有用形質を改変することを目的として、ゲノムを大規模に改変したり、転写や翻訳装置を操作して、一挙に多数の遺伝子の発現を変化させることである。そして、その結果、創り出された何億通りという多様なゲノム、多様な転写や翻訳プロファイルを持つ細胞集団の中から、目的の物質について、最高の生産収率を示す細胞をスクリーニングするとのアイデアである。それらの物質生産に応じて最高の収率を示す細胞が持つゲノムを筆者らは「ベストゲノム」と呼んでいる。

ベストゲノムの化学合成

一方、こうした流れとは独立に、もう一つ、微生物育種にパラダイムシフトが起こることを想起させる出来事が2010年にあった。それは、米国のCraig Venter博士が、Mycoplasmaの全ゲノムを化学合成し、もともとのゲノムと入れ替えることに成功した報告である。この報告は、今後の育種が、究極には特定の有用物質の生産のための「ベストゲノム」をデザインし、「化学合成」することに行き着くことを想起させる。本稿では、この方法論を「ベ

ストゲノムの化学合成」と呼ぶ事にする。ゲノムの化学合成と言っても、ゲノムの一部を合成するレベルから、full functionalで工業生産に最適化されたベストなゲノム全体を化学合成するレベルまでさまざまなレベルがあり、それによって事情は違ってくるが、いずれにしても現時点では少なくとも二つの大きな障壁がある。

その一つは、DNAの化学合成コストの高さである。現在のDNA合成価格から計算すると、大腸菌ゲノム全体の合成は3億円、酵母菌では4億円かかる。この価格では、たとえ特定の物質生産にベストのゲノムが明らかになったとしても、いずれの企業もゲノムの化学合成による育種に向かうとは思えない。したがって、この問題を解決するためには、飛躍的に安いコストでDNAを合成できる技術の開発が必要である。

しかし、もっと深刻な問題は、それぞれの有用物質の生産に最適化されたゲノムを化学合成しようとしても、一体、こうしたベストゲノム（目的によってそれぞれ違う）がどのようなゲノムなのかが明らかになっていないことである。この問題を解決しない限り、「ベストゲノムの化学合成」はあり得ない。この問題を解決するためには、当然ながら、個々の遺伝子の機能だけでなく、遺伝子のネットワーク構造やゲノム全体の機能をさらに深く知る必要があろう。したがって、育種技術としての「ベストゲノムの化学合成」は、現時点ではすぐさまこれに向かって動くことは困難であろう。それ故、以下では、現時点で現実的な方法論として考えられる「多様性創出ゲノム工学技術」について紹介する。ただ、それらの技術については、以前に、生物工学会誌2012年第6号『90周年記念特別企画 特集「大規模ゲノム改変と微生物育種』にも拙稿を表したので¹⁾、以下には、筆者らが開発してきた多様なゲノム工学技術の中で²⁾、特に多様性創出ゲノム工学に關係する「ゲノムの再編成工学」とその周辺について紹介したい。

育種戦略としてのゲノムの再編成工学

従来の育種技術の問題点は、i) 多大な時間と労力がかかる、ii) 単一または少数の遺伝子の操作しかできないということにまとめられよう。この問題を解決するため、短時間で、一挙に多数の遺伝子、あるいは遺伝子発現を

*著者紹介 大阪大学大学院工学研究科生命先端専攻（教授） E-mail: harashima@bio.eng.osaka-u.ac.jp

染色体の分断と脱落を利用したゲノムの再編成技術

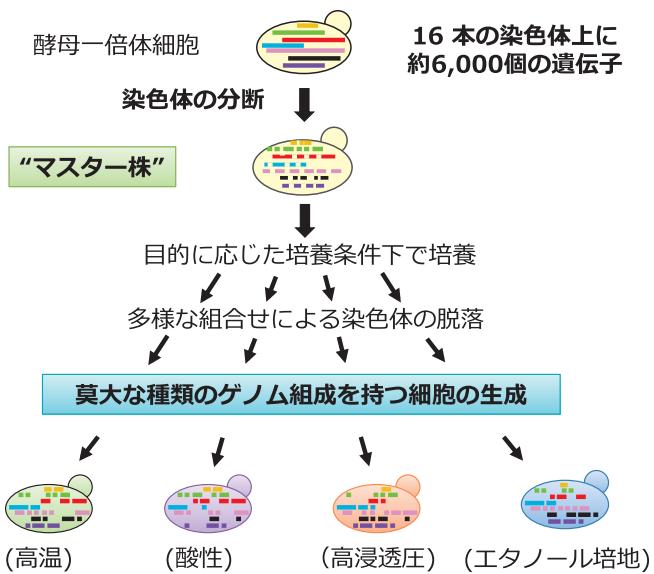


図1. 多様性創出ゲノム工学技術としてのゲノムの再編成工学

操作して、目的の細胞（ベストゲノム）に到達できる新しい育種技術が求められてきた。こうした技術の一つが、筆者らが進めている「ゲノムの再編成工学」である³⁾。

ゲノムの再編成工学のコンセプトは以下のようなものである。出芽酵母の一倍体は約6000の遺伝子を16本の染色体上に持つ（図1）。筆者らは、染色体を任意の部位で分断する「染色体分断技術（PCS法）」を開発したが、この技術によって、染色体を約50 kb以下の染色体に分断すると、こうした短い染色体では、体細胞分裂時に、 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ の頻度で不分離が起こり、娘細胞に正常に伝達されない（脱落する）ことが知られている。このことを利用すれば、天文的な数のゲノムの多様性を創りだすことができる。たとえば、20個のミニ染色体を想定しただけでも約100万通り、30個のミニ染色体を作れば約10億通りの多様性（組合せ）が作出可能である（表1）。

ゲノムの再編成工学によるエタノール耐性酵母の創出

実際にこうした方法論が有効であるかどうかを、エタノール耐性酵母が分離できるかどうかで検証した⁴⁾。PCS法を用いて一倍体酵母のゲノムを分断し、必須遺伝子を含まず脱落可能と予想される12個のミニ染色体を持つ親株を作成後、8%のエタノールを含む培地で培養し、ゲノムの再編成を誘導した。その結果、親株よりも著しく増殖能が良いエタノール耐性株を8株分離することができた（図2、図3）。それらの8株におけるミニ染色体の組成を調べたところ、いずれの株も、8番染色体の

表1. n個の染色体が創り出す組合せ数

分断染色体数 (n)	(分断染色体の脱落が創り出す組合せ数)
1	10^0 (1通り)
10	ca. 10^3 (約1000通り)
20	組合せ = $\sum_{k=1}^n nCk$ ca. 10^6 (約100万通り)
30	ca. 10^9 (約10億通り)
40	ca. 10^{12} (約1兆通り)
⋮	⋮
n	$\sum_{k=1}^n nCk$

左端25 kbの領域、および14番染色体の右端35 kbの領域からなるミニ染色体が脱落していることがわかった。二つの領域には、それぞれ15個、10個の遺伝子があり、それらの遺伝子のなんらかの組合せの脱落が、顕著なエタノール耐性をもたらしていると想像された。これらの結果は、ゲノムの再編成工学が、新しい育種技術として有用であることを示した結果であると考えている。

SCRaMBLE技術によるゲノムの多様性創出

緒論で、ベストゲノムの化学合成は、現時点では困難であると述べた。しかし、ゲノムの化学合成を通して多様性を創出しようとする試みは行われている。ジョンズ・ホプキンス大学のBoeckらは、Sc2.0と命名した出芽酵

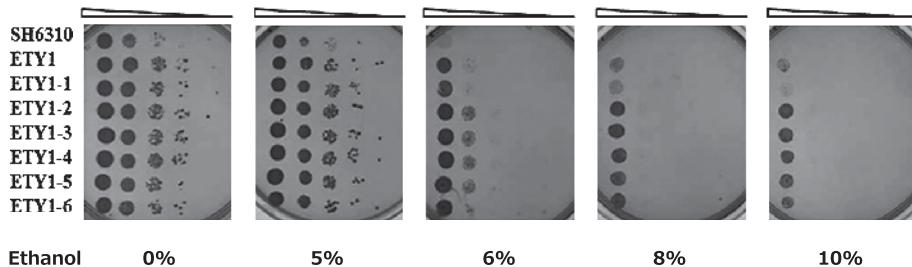


図2. ゲノムの再編成工学によって分離されたエタノール耐性変異株. SH6310株は12個の分断染色体を持つ親株であり, ETY1は, SH6310株から分離された8株のエタノール耐性株の一つである. ETY1-1～ETY1-6は, ETY1から分離されたクローンである. (文献4から改変).

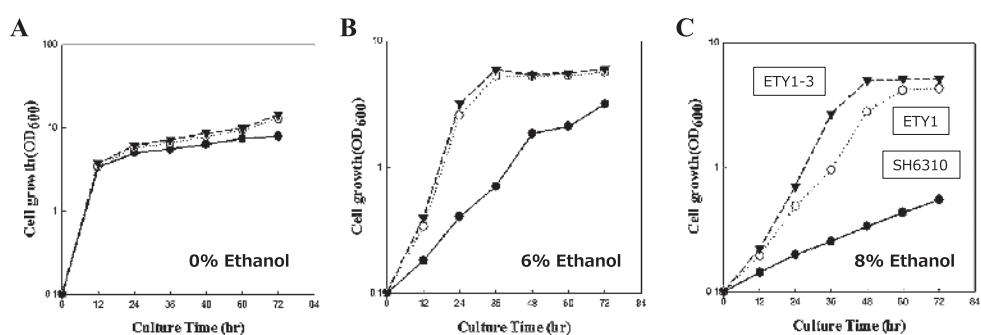


図3. SH6310株, エタノール耐性株ETY1, およびそのクローン (ETY1-3) の増殖挙動 (文献4から改変).

母ゲノムの人工合成の仕事を進めており, これまでに9番染色体の右腕, および6番染色体の左腕, 3番染色体全体をそれぞれ人工合成したゲノムと入れ替えた⁵⁾. 彼らは色々な設計思想を基に合成ゲノムをデザインしているが, その中でもっとも注目されるのは, 合成したゲノム上の非必須遺伝子の3'UTR領域に, ファージP1の部位特異的組換え酵素 (Cre) の標的配列であるloxP配列を挿入したことである. このSCRaMBLE (Synthetic chromosome rearrangement and modification by loxP-mediated evolution) と呼ばれるシステムでは, 任意の時期にCre酵素を発現させることによりloxP配列間でランダムな組換えを誘導し, それによってゲノムの大規模な再構成を引き起こして, 一挙に, 莫大な数のゲノム組成を持つ細胞を創り出すことを目論んでいる. ゲノムの化学合成を通して, 多様性を創出する技術として今後の発展が期待できる.

ゲノムの大規模改変によるゲノム機能の解明と育種への応用

ゲノムの再編成工学は, ゲノムの部分領域をミニ染色体化し, その脱落の組合せによりゲノムの多様性創出を目指すものである. したがって, この技術を応用するためには, あらかじめ, 非必須領域をミニ染色体化するこ

とが必要である. 筆者らは, 最近, ゲノムワイドに合成致死 (二つの遺伝子のそれぞれの単独破壊は致死ではないが, 同時に破壊した場合に致死となる現象) 遺伝子のペアを同定する仕事を進める中で, 非必須遺伝子だけを含むにもかかわらず, ミニ染色体化しても脱落できない領域がかなりの頻度で存在することを見いだした. このことは, その領域に, 高頻度で合成致死を引き起こす遺伝子のペアが存在することを示唆している. 合成致死, もっと広く言えば, 遺伝的相互作用の問題は, 基礎生命科学においてだけでなく, 有用形質の操作を目指すバイオテクノロジー, 薬剤の標的の問題など, 医学生物学を含む真核生物機能ゲノム科学における大きな課題でもある. 多様性創出ゲノム工学は, ゲノムの大規模な欠失, 重複などの組合せによる多様な表現型の創出がコンセプトであるので, 「ゲノムの再編成工学技術」の周辺の問題として, 少し詳しく述べてみたい.

まず, 酵母ゲノムに, 12 kb以上の長さで, 非必須遺伝子のみからなる領域をマップすると110個あった(図4)⁶⁾. これらの領域が脱落可能かどうかを, 筆者らが開発したゲノム工学技術を利用して解析したところ, 興味深いことに, 少なくとも56領域が脱落できないことがわかった. これらのうち49領域は, これまでの研究で合成致死の遺伝子ペアが知られていない領域であった.

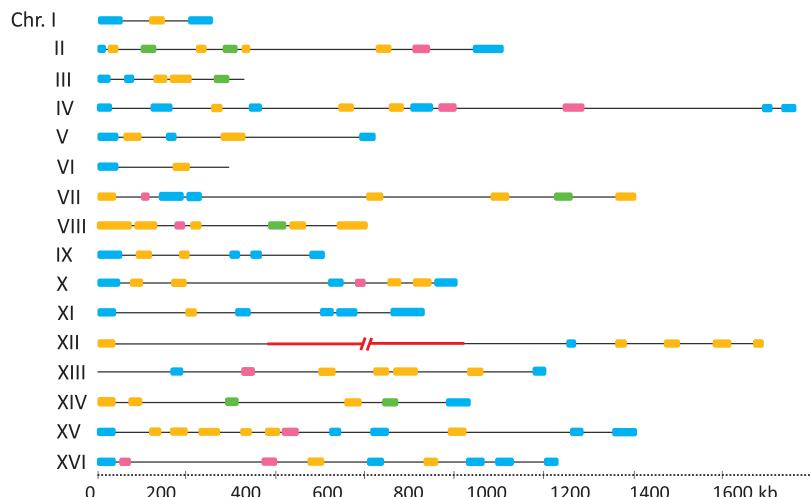


図4. 出芽酵母における非必須遺伝子だけを含む領域のゲノムワイドなマッピング。青色:脱落可能であった領域、黄色:必須領域、緑色:これまでの研究により合成致死を引き起こす遺伝子ペアがあることがわかっている領域、赤色:理由は不明であるが、ミニ染色体化ができなかったため、未解析。XII番染色体上の赤線部(-/-)は、rDNAクラスター領域。

また、一方で、脱落可能であった44領域のそれぞれの欠失株について表現型解析を行うと、エタノールや硫酸などのストレスに対して耐性を示す株も見いだされ、ゲノムの大きな領域の欠失が、細胞にとって不利な表現型をもたらすだけでなく、バイオテクノロジーにとって有用な表現型を引き起こす事も見いだした。こうした知見は、「ゲノムの再編成工学」を応用するにあたって必須の知見であるだけでなく、ゲノム機能の解明と育種への応用の観点からも有用である。

ゲノムの再編成工学の展望

「多様性創出ゲノム工学」というコンセプトのもと、微生物育種に応用できる種々の技術が発展してきた。筆者らが進めている「ゲノムの再編成工学」もそうした技術の一つであり、出芽酵母を材料として、12個の脱落可能なミニ染色体を持つ親株から出発して、これまでに分離できなかったような性質を示す細胞を短期間で分離・育種できた(図2、図3)。一方、ゲノムワイドな解析によって、14 kb~51 kbの大きさの44領域が、少なくとも栄養豊富な培地では欠失可能であることがわかった。これらの領域の欠失の組合せは1兆通り以上ある(表1)。これまで、一つの領域をミニ染色体化するには2回の分断(形質転換)が必要であり、たとえば、10個の領域をミニ染色体化するのに5か月程度かかっていた。しかし、最近、筆者らは、ゲノム編集技術であるCRISPR/Cas法を、染色体分断技術に取り入れることによって、1回の形質転換で一挙に分断ミニ染色体を作成

することに成功した(未発表)。したがって、10の領域をミニ染色体化することが約半分の2.5か月程度ができる見通しがついた。44領域のうち、10から20の領域を分断ミニ染色体化した何系統かの親株を並行して作成すれば、それから出発して、天文学的な数字のゲノムの多様性を比較的短い時間に創出できる。そして、それらを出発株として、色々な条件下で培養することによって、これまでにないベストゲノムを持つ細胞を取得できる可能性があると考えている。一旦、ベストゲノム(目的によって多数ある)を持つ細胞が取得できれば、そのゲノム組成や発現プロファイル、プロテオーム、メタボロームなどを解析することによって、なぜベストゲノムなのかを明らかにするための基盤的な知見を得ることができる。また、DNA合成のコストが下がれば、将来、デザインされたゲノムの化学合成が育種戦略として一般的になるかもしれない。こうした時に、ゲノム機能についての高次の知見は、それぞれの物質の生産においてさらに高い生産収率を示す「ベストゲノム」を合理的にデザインするための必須の知見になると期待できる。

文 献

- 1) 原島 俊:生物工学, **90**, 302 (2012).
- 2) Sugiyama, M. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **84**, 1045 (2009).
- 3) Ueda, Y. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 675 (2012).
- 4) Park, A. H. et al.: *J. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 184 (2012).
- 5) Annaluru, N. et al.: *Science*, **344**, 55 (2014).
- 6) Kaboli, S. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **42**, 9838 (2014).