

酵母における多様性創出ゲノム工学とその育種への応用 —微生物育種工学のパラダイムシフト—

原島 俊

バイオテクノロジーの最終的な目的は、有用物質を最大の収率で生産できるバイオプロダクションシステムを確立することである。バイオプロダクションシステムは、「生命に学ぶ」「生命を創る」「生命で造る」という3つのプロセスから構成されていると考えても良いであろう(図1)。このうち、筆者の専門である微生物育種工学は、主として、「生命(細胞)を創る」を扱うものであり、その目的は、これまで生産できなかった新規な有用物質を生産できる「細胞」や、既に生産されているものであっても、これまでとは比べものにならないような高い効率で生産できる「細胞」を創成することである。

この目的のために、これまで、主として4つの育種技術が用いられてきた。すなわち、i) 突然変異、ii) 接合、iii) 細胞融合、iv) 組換えDNA技術であり(図1)、これらの技術を駆使して、自然界から分離してきた多様な(微)生物を、目的に合致するように創り変えることが微生物育種工学を専門とする研究者の仕事であった。しかし、こうした育種技術では、変異をいくつも積み重ねる必要があるなど多大な労力と時間がかかること、また、近年有用形質は多くの遺伝子によって支配されていることが明らかになり、従来の単一あるいは少数の遺伝子を対象とした育種技術では限界があることなどが認識されるようになったことから、短時間で、しかも、一挙に多

数の遺伝子を操作して、一気に目的の菌株に到達できる新しい育種技術が切望されるようになってきた。

ベストゲノム化学合成学と多様性創出ゲノム工学

こうした機運の中、折しも、2010年に、米国のCraig Venterによる、Mycoplasma全ゲノムの化学合成が報告された。この報告以来、少なくともゲノムの小さい微生物の育種についての考え方は急速に変わってきたように思われる。筆者は、今後の微生物育種は、少なくとも以下のような2つの方向(戦略)で進んで行くのではないかと考えている(図1)。そのひとつは、i) 特定の有用物質の生産にベストのゲノムを「化学合成」する方向である(ベストゲノム化学合成学とでも呼ぼう)。しかし、これには、現時点で、少なくとも2つの大きな障壁がある。ひとつは、DNAの化学合成コストの高さである。現在、酵母の全ゲノム1.4 MBを化学合成しようとする、1塩基30円としても約4億円程度かかる。おそらく現在のコストの約1000分の1のコストにならないと現実的ではないであろう。したがって、この問題を解決するには、飛躍的に安いコストでDNAを合成できる新しい革新的な技術の開発が必要である。もうひとつの障壁は、もっと深刻な問題であるが、合理的なデザインに基づいて目的に応じたベストゲノムを化学合成しようとしても、その目的に合致するベストゲノムがどのようなゲノムなのか明らかになっていないことである。これ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ゲノム機能学を飛躍的に進展させる必要がある。

筆者が考えるふたつめの育種の方向は、既存のゲノム(微生物)から出発して、ゲノムや転写・翻訳のレベルで無限の多様性から成る細胞集団を創り出し、その中から、目的物質の生産にベストのゲノムや転写・翻訳プロファイルを示す細胞を、一挙に効率よく選び出してくる方向である。これを筆者は、「多様性創出ゲノム工学」と呼んでみたい。なぜこのように考えるかという理由は次項で述べるが、こうしたことを実現するためには、ゲノムレベルや転写・翻訳レベルで無限の多様性を創出する革新的なゲノム工学技術の開発が必要であることは言うまでもない。

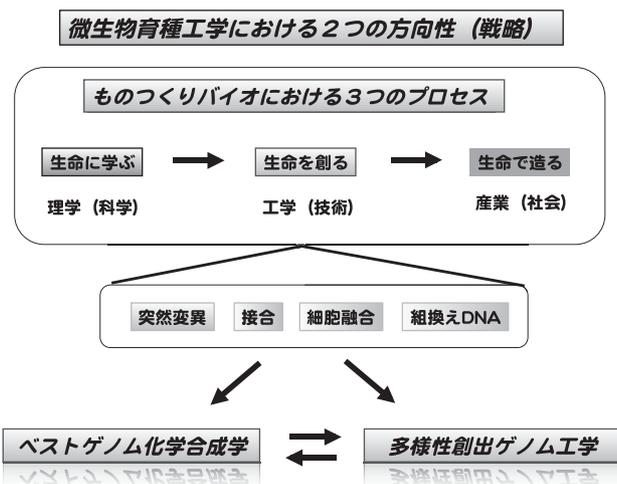


図1. 微生物育種工学における2つの方向性(戦略)

なぜゲノムの多様性創出か

目的の有用物質を最大の収率で生産する菌株の育種には、その物質特有の合成・代謝系の改良だけでなく、多くの場合、増殖能、発酵能、耐熱性、耐酸性、耐浸透圧性、エタノール耐性など、いわゆる有用形質と呼ばれる形質も考慮する必要がある。しかし、こうした有用形質は多くの遺伝子によって支配されていることがコンセンサスになりつつあり、この事実は、筆者らが目的とする有用菌株の育種には、これまでのように、ひとつないし少数の遺伝子ではなく、一度に多数の遺伝子が操作できる育種技術が必要であることを意味している。もちろん、この問題は、ベストゲノムがどのようなものかわかっていれば、そして、DNAが安価に合成できれば、化学合成によって解決できる。しかし、上述のように、ベストゲノムの化学合成が、現時点では、まだまだ現実的ではないとすれば、別のアプローチを考える必要がある。筆者は、少なくともそのひとつが、「多様性創出ゲノム工学」ではないかと思っている。その理由は、この技術が、短時間でベストゲノムに到達可能な育種技術であり、しかも、以下に述べるように、現実感のある技術であることである。また、「多様性創出ゲノム工学」は、将来、ベストゲノムをデザインする上での必要な知識と情報を我々に与えてくれる技術であることも重要な理由として付け加えたい。それでは、「多様性創出ゲノム工学」とはどのようなものか、ゲノムの多様性をどのようにして創出することができるのであろうか。

多様性創出ゲノム工学技術

幸いなことに、近年、ゲノム自身やゲノム発現の多様性を創出する技術がいくつか報告され始めている。

グローバル転写装置工学 (global transcription machinery engineering, gTME) 2006年に、酵母を材料として、米国MITのStephanopoulosとFinkは、グローバル転写装置工学と彼らが呼んだ技術をScience誌に報告した¹⁾。この技術は、TATA結合タンパク (TBP) のようなグローバルな作用を持つ転写因子に *in vitro* で変異処理を施して変異ライブラリーを作成した後、野生型細胞に導入し、目的の有用表現型を示す細胞をスクリーニングしてくる技術である。出芽酵母は約6000の遺伝子を持つが、そのほとんどの遺伝子が、TBPの作用下にあると考えられている。そして、TBPと転写メダイエーターと言われる20に余る因子との相互作用の仕方によって、転写活性化因子や転写抑制因子が転写開始部位に作用する頻度やRNA合成酵素が転写開始部位に呼び込まれる頻度が規定され、その結果、それぞれの遺伝子においてさまざまなレベルで転写が開始されることが明らかになっている。

こうした事実をもとに、彼らは、この技術で、エタノール耐性株をスクリーニングした結果、丸ごとの細胞を対象として変異処理を行う場合には分離困難なエタノール耐性株を分離した。耐性表現型を示した細胞から単離したTBPが3つの優性変異を持っていること、発現プロファイルから13個の遺伝子の発現が色々なレベルで変化していることが明らかになった。色々な変異を持つTBPが細胞に入ると、異なる発現プロファイルを持つ莫大な種類の細胞集団が創出されると予想される。その中から目的の表現型を示す細胞を取得することが可能であることを明確に示したこの技術は、「多様性創出ゲノム工学」による育種技術として非常に有用な技術であるように筆者には思われる。また、目的の表現型が、具体的にどのような遺伝子の、どのような発現変化によってもたらされたのかが明らかにされたことは、将来、ベストゲノムを化学合成するための有用な情報であろう。同じように、転写レベルで多様性を創出する技術として、「人工転写因子工学」が提唱されているが²⁾、紙面の都合上ここでは省略する。

ゲノムノシャフリング技術 (genome shuffling technology) *Saccharomyces cerevisiae*に属する酵母で、増殖の上限温度が41°C以上のものは、つい最近まで自然界からは分離されていなかった。41°Cは、いわば、チャンピオンデータであった。しかし、2009年に、中国天津科学技術大学のグループが、ゲノムシャフリングと呼ばれる技術によって、驚くことに55°Cでも増殖する出芽酵母を報告した³⁾。この技術は、変異処理を施した複数の菌株の細胞融合を繰り返し行い、それによって創出された多様な細胞からベストのゲノムを持つ細胞をスクリーニングしてくる技術であるが、この報告も、筆者にとっては非常に興味深い報告であった。その理由は、*S. cerevisiae*という種が、もともと持っている遺伝情報では41°C以上の温度では増殖できないと長い間思われていたことが、遺伝情報 (変異) の組合せ如何によっては、一挙に55°Cという高い温度で生育できるような細胞を創成できることを示したからである。この表現型が、ゲノムのどのような変化によって引き起こされたか、発現プロファイルがどのように変化しているかについては非常に興味をもたれるが、2年を経過した現在でも後続論文の発表はない。しかし、こうした菌株を取得することは、通常の突然変異処理によっては、おそらく不可能であり、「多様性創出ゲノム工学」技術のひとつとして有用なものと考えられる。

ゲノム工学基盤技術としての染色体分断技術の開発

筆者らは、この数年、育種のために多彩な応用が可能な「新しいゲノム工学技術」の開発が必要と考えてきた。ゲノム工学発展のための基盤技術とはどのような技

術であろうか。筆者らは、それを染色体の分断技術であると考えた。その理由は、染色体の分断による情報（遺伝子）の分散化によって、莫大な多様性が生まれると考えたからである。染色体の分断技術とはどのような技術であろうか。

染色体分断技術 (PCR-mediated chromosome splitting technology, PCS) 染色体が正常に挙動するためには3つの因子が必要である。娘細胞への染色体の正確な分配に必要なセントロメア (CEN)、染色体末端の保護と複製に必要なテロメア (TEL)、染色体自身の複製に必要な自己複製配列 (autonomously replicating sequence, ARS) である。したがって、一本の染色体を、いずれかの位置で2つに分断した場合には、ひとつのCENと2つのTELが不足することになり、これをなんらかの方法で付加する必要がある。染色体分断技術の開発には、それなりに色々な苦労があったが、紙面の都合上省略させて頂き、現在確立された技術の概要を図2に示した(図2)⁴⁾。でき上がってしまえば、非常に簡単で、効率の良い、しかも安価な技術であり、ユーザーフレンドリーな技術になったと自負している。4年生でも、研究室に配属されたその日からできる。必要な知識と技術は、プライマーの設計の考え方とPCR、そして酵母の形質転換技術である。なにかの遺伝子をクローン化する必要もない。具体的には、図2で分断断片Aと分断断片Bと記載してある2種の断片をPCRで調製し、その2つの断片を同時に酵母細胞に導入するだけである。そうすると形質転換体の70%から100%の頻度で期待通りの分断が起こる。染色体の分断技術は、次項に述べるように多彩な応用が可能であるが(図3)⁵⁾、紙面の都合上、本稿では、以下、3つの応用について紹介する。

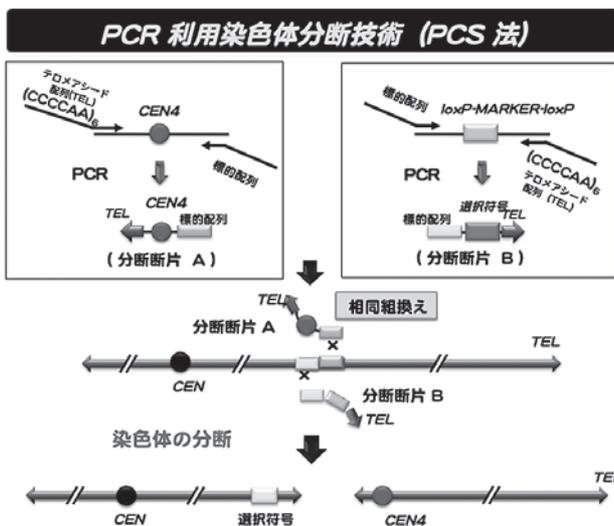


図2. 出芽酵母ゲノム工学のキーテクノロジー、染色体分断技術

ゲノム工学のキーテクノロジー、染色体の分断技術

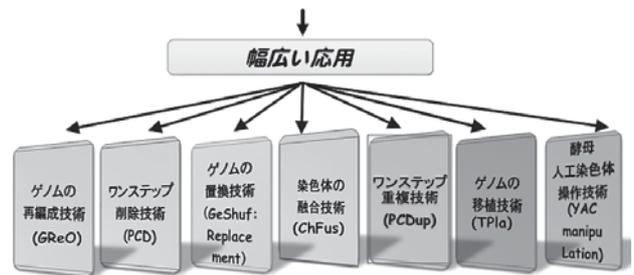


図3. 染色体分断技術の多彩な応用

ワンステップ染色体削除技術 (PCR-mediated chromosome deletion technology, PCD)

プライマー設計時に付加するゲノムとの相同配列を、離れた2つの部位から取ると、その2つの部位に挟まれた染色体領域をワンステップで削除できる⁶⁾。この技術も非常に効率の良い技術であり、形質転換体の約70%以上の頻度で目的の領域が削除される。染色体の末端領域を削除することももちろん可能で、これまでに、約500kbの領域を削除した菌株をいくつか作製している。それらの菌株の中には、エタノールやグリセロールが蓄積している菌株もある⁷⁾。また、単独の破壊では致死にはならない遺伝子だけが存在する領域が、どうしても削除できないので詳しく調べてみると、その領域に、同時に削除されると致死となる遺伝子の組合せがあることなどもわかってくる。

ワンステップ染色体任意領域重複技術 (PCR-mediated chromosome segmental duplication technology, PCDup)

ダウン症候群やがん細胞に見られるように、特定の染色体全体や染色体特定領域の部分異数性は、細胞生理に大きな影響を及ぼすことが知られている。ビール酵母など、産業酵母においてもしばしば異数性が見られることはよく知られているが、近年、次世代シーケンサーの発達により、産業酵母のゲノム配列が次々と決定されてきた結果、色々な染色体領域において部分重複 (segmental duplication) があることがわかってきた。さらに、こうした染色体の部分重複が産業酵母の有用形質に深く関係しているのではないかと可能性が指摘されるようになった。同じ *S. cerevisiae* なのに、いわゆる実験室酵母を用いては、おいしいビール、おいしい清酒は決して醸造できないことはよく知られているが、それがどのようなメカニズムによるかは、いまだに解決されていない古くて新しい研究課題である。なぜ、最終的な答えが得られないかと言えば、やはり、ゲノムの構造・機能と有用形質の関係を精密に解析する方法論がないためと言ってもよいであろう。

筆者らは、以前から、ゲノムの任意の領域の重複がどのように細胞生理、特に有用形質に影響を及ぼすかにつ

いて興味を持っていたが、この問題を明らかにするための方法論がなかった。しかし、染色体の分断技術の応用として、重複を目的とする領域の両端に相同性を持ち、削除技術と方向性が逆のプライマーを設計すれば、ゲノムの任意領域を重複することができるのではないかと考えた。そして、実際に、この方法で、ゲノムのどのような領域でも重複させることができるようになった(未発表)。育種の観点から、色々な領域の重複株について、いくつかの有用物質を調べてみると、重複によって酸耐性やエタノール耐性を与える領域があることも明らかになってきた。データベースを調べてみても、その領域に存在するひとつひとつの遺伝子を過剰発現したときにそうした表現型を示すことは記載されていないので、その領域に存在する複数の遺伝子の相加的、相乗的な遺伝子量効果ではないかと推察している。今後、詳細なメカニズムを明らかにしたいと思っている。この染色体任意領域重複技術は、著者の知る限り、どのような生物においても開発されていない初めてのゲノム工学技術である。

多様性創出ゲノム工学技術としてのゲノムの再編成技術 (genome reorganization technology, GRiT) 出芽酵母の1倍体細胞は200 kbから2000 kbの大きさの16本の染色体を持ち、それらの染色体上には約6,000の遺伝子が存在する(図4)。細胞をひとつの袋と考え、もし、この袋から、目的に応じて自在に必要な遺伝子を取り出し(あるいは取り除き)、それを新しい袋(細胞)に納める技術が開発できれば、天文学的な数のゲノムの多様性を創り出すことが可能になる。出芽酵母では、約200 kbより小さい染色体を作成すると、細胞分裂時の不分離あるいは複製欠損によって、長さに応じて $10^{-3} \sim 10^{-5}$ の頻度で失われることが知られている。従って、この現象を利用すれば、染色体を小さな染色体に分断し、その後、このミニ染色体を持つ細胞を適当な培養条件下で培養すれば、その培養条件下に必要なミニ染色体は保持され、逆にその培養条件下で不要なミニ染色体は脱落し、その結果、さまざまなゲノム組成を持つ細胞集団が生み出されることが期待できる⁸⁾。

そうであれば、特定の培養条件下(浸透圧、増殖温度、pH、多様な炭素源、エタノールや薬剤の存在下など)でもっとも増殖が良い、あるいは特定物質の生産性が最も高くなったゲノム組成を持つ「ベストゲノム」細胞をスクリーニングすることができる可能性がある。一体、どれくらい多様性が生み出されるかと言えば、たとえば、脱落可能なミニ染色体がたったの30個であっても、脱落の組合せは約12億通りにもなり、これまでの育種技術によってはなし得なかった多様な組合せの多重変異株を創製できることが期待される。この考えを、欠失させると乳酸耐性を示す30個の遺伝子に適用し、それらの遺伝子を持つ適度な長さのミニ染色体を作成した後、乳

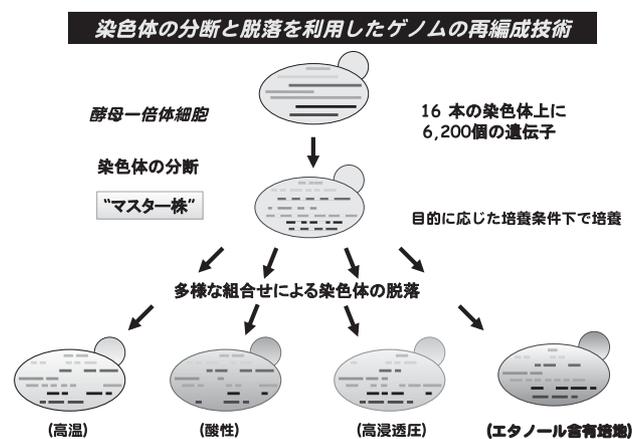


図4. 多様性創出ゲノム工学、染色体の分断と脱落によるゲノムの再編成技術

酸存在下で培養して、もっとも乳酸耐性が高く、しかも増殖もよいベストゲノムを持つ細胞が育種できることを実証するための研究を進めている。

おわりに

本稿の最初に書いたように、これからの微生物育種は、究極的には、合理的なデザインに基づいた「ベストゲノムの化学合成」に進むのではないかと考えている。しかし、そのためには、それぞれの生産物に応じて、それを生産させる細胞が持つべきベストゲノムがどのようなものかを明らかにすることが不可欠である。この観点から、本稿で述べたグローバル転写装置工学、ゲノムシャフリング工学、ゲノムの再編成工学など、「多様性創出ゲノム工学」の発展はこれからの育種にとって非常に重要である。しかし、「多様性創出ゲノム工学」の発展は、物質生産に最適なベストゲノムを持つ細胞の育種のためだけでなく、これまで困難であった大規模で系統的なゲノム機能の解析を通じて、将来、生産物に応じてゲノムを自在にデザインし化学合成する、「ベストゲノム合成生物工学」を確立するためにも必要不可欠なものであることを付け加えておきたい。

文 献

- 1) Alper, H. *et al.*: *Science*, **314**, 1565 (2006).
- 2) Lee, J. Y. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **108**, 742 (2011).
- 3) Shi, D. J. *et al.*: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 139 (2009).
- 4) Sugiyama, M. *et al.*: *Biotechniques*, **38**, 909 (2005).
- 5) Sugiyama, M. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **84**, 1045 (2009).
- 6) Sugiyama *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **80**, 545 (2008).
- 7) Murakami, K. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 589 (2007).
- 8) Ueda, Y. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 675 (2012).