

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～2025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)

1年の研究期間延長で非組換え体型耐酸性トルラ酵母取得に関する論文発表を行った(2025)。

③青色光で制御可能な **MagTAQing 法**の確立と減数分裂期 TAQing の実施

1年の研究期間延長で論文発表を行った(2025)。

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、現在研究は終了)、糸状菌(東北大浅井教授と共同)、円石藻(セイコーエプソンと共同)、乳酸菌(住友化学)、高温耐性酵母(豊田中央研究所)、バイオマス植物(トヨタ自動車)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、キシロース資化と高温発酵能を安定的に両立させ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杉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できるヒト ADLib 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 の新規技術を開発することで、酵母、非伝統的酵母、糸状菌、線虫、藻類、ヒト細胞等に適用範囲を拡大することができた(表 1)。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に成功し、Dumpy 表現型や Him 表現型、行動異常、染色体数変化などの多様な表現型変化を示す変異体が得られた。

また、非同調培養時の酵母に対し TAQing を実施し、得られた多数の変異株の全ゲノムの解析を網羅的に行なったところ、相同組換え型もしくは非相同組換え型のゲノム再編成のどちらかに偏りを示す現象が観察された。この組換えパターンの 2 極分化は、TAQing 処理時の細

胞周期の違いを反映しているものと思われる。

1年間の期間延長で、TAQing2.0を適用して取得した線虫Him変異株において、制限酵素認識配列部での転座の発生を確認することができた。これにより、確かにTAQing2.0により線虫の表現型変化が生じたことが確認された。現在これらのデータとともに、染色体数変化株のデータの集積を行い、論文発表のためのとりまとめを行っている。

光で制御可能なMagTAQingを、減数分裂期が欠損した出芽酵母株に適用したところ、多数の組換えが発生しているにもかかわらず、配偶子のほとんどが致死であることを見出した。興味深いことに、有糸分裂期の細胞にMagTAQingを適用した際には、多くの非相同組換え型の転座が認められたが、減数分裂期細胞では相同的な配列間での異所的な組換えが頻発し、結果として染色体異常が多数発生することを明らかにした。すなわち、生物が本来行っている減数分裂期組換え(組換え酵素Spo11によるDNA切断で開始される)は、配偶子形成時に染色体異常を抑制しながら遺伝的な多様性を生み出す巧妙な機構を有していることが明らかになった(Yone et al., NAR, 2025)。

	TAQing	Ex-TAQing	TAQing2.0	共同研究先
<i>S. cerevisiae</i>	✓		✓	豊田中研
<i>C. utilis</i>	✓		✓	三菱商事LS
Sake yeasts		✓	✓	埼玉県北部研
Filamentous fungi	✓			浅井教授(東北大)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	✓	✓		トヨタ自動車
Rice	✓			大里准教授(明治大)
<i>C. elegans</i>	✓	✓	✓	杉本教授(東北大)
Human cell line	✓	✓		田代教授(広大)
円石藻		✓	✓	セイコーエプソン

表1 種々のTAQingシステムを用いた適用事例

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す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)。この方法により、高温発酵能とキシロース資化能の双方を安定的に維持するのに必要な複数の染色体領域の特定や、種々のストレス耐性遺伝子の効率的な同定が可能になった。そこで、塩耐性や銅イオン等の種々のストレスに耐性を示すTAQing変異株を多数取得して全ゲノムを決定し、表現型とゲノムDNA変化の関係について統計的解析を実施した。その結果、特定のストレス耐性に対し一定の遺伝子領域の変化パターンとの相関が確認された。これらの解析をさらに拡大し、機械学習による解析とAIモデルを構築することで、将来的には、ゲノム配列のみから表現型の推定が可能になる可能性がある。

3. 光で制御可能なTAQingシステム(MagTAQing)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、特定の細胞周期や減数分裂期にある細胞に限定的にゲノム再編成を誘発したり、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になった。

1年間の期間延長により、MagTAQing の開発と減数分裂期における時期特異的 TAQing に関する論文(Yone et al., *NAR*, 2025)論文発表とプレスリリースを行った。

<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胞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)。なお、TAQing 変異株は外来 DNA と推定される配列は元株と同じレベルであり、自然発生変異と実質的に同等であることが確認できた。

1年間の期間延長により、TAQing2.0 による非組換え体型酸耐性トルラ酵母の取得に関する論文発表(Oda et al., *Genes Cells* 2025)を行い、プレスリリースを行った。

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)。

1年間の期間延長により、オーキシンデグロンタグを用いた自在な試験管内抗体作製法に関する論文(Murayama et al., *Commun. Biol.*, 2025)を発表し、プレスリリースを行った。

3.糸状菌類の二次代謝物産生に関する休眠遺伝子の TAQing による活性化

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。

1年間の期間延長により、TAQing を適用して得た *Aspergillus niger* 変異株のゲノム解析を行い、トランスポンの Inverted Repeat に存在する制限酵素認識配列間で逆位が生じることを示した。また、この変化に伴い、周辺の遺伝子や休眠中の天然物生合成遺伝子の発現が変化することを明らかにした。

<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:

シロイス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tron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、高温発酵能とキシロース資化能の双方を安定的に維持させるのに必要な複数の染色体領域の特定や、種々のストレス耐性遺伝子の同定が可能になった。

4. Yone H., Kawashima Y., Hirai H., Oda A.H., Sato M., Kono H., and Ohta K.

Light-controlled Spo11-less meiotic DNA breaks by MagTAQing lead to chromosomal aberrations.
Nucleic Acid Res., in press (2025)

概要:

青色光下で活性化する制限酵素(MagMboI)を初めて合成し、これを用いて制御的にゲノム合成を行う技術 MagTAQing を確立した。これにより、狙った特定の細胞や組織にゲノム再編成を誘発することが可能になり、より多様なパターンのゲノム合成が可能になった。加えて、本 MagTAQing 技術を組換えが欠損した減数分裂期細胞に導入する実験を行うことで、生物が有する減数分裂期の遺伝的組換えが生殖細胞における染色体異常を抑制する機能があることを明らかにした。
※1年追加支援時の成果

§ 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 (※1年追加支援時の体制 : 太田グループの単独実施)

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 聰（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 「舛本」グループ

主たる共同研究者:舛本 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

④ 「杉本」グループ

主たる共同研究者:杉本 亜砂子（東北大学大学院生命科学研究科・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

(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, 2020-2023)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, 2022-2026)の研究計画に組み込まれた。この研究では、糸状菌だけでなく放線菌などにTAQingを実施し、薬理活性を有する新規の2次代謝物の生産を誘導する実験を計画している。TAQingで改良された高温下でキシロース資化能を有するバイオエタノール合成酵母の成果は、豊田中央研究所の共同研究(守秘義務あり)の再開に結びついた。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(継続中、守秘義務あり)、住友化学に対する研究指導(終了、守秘義務あり)で乳酸菌での実施例を取得、セイコー・エプソンとは円石藻の変異株取得の共同研究(継続中、守秘義務あり)を実施した。また、大腸菌の人工進化を行っている東京大学大学院総合文化研究科の市橋伯一教授(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(継続中、守秘義務あり)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。