

CRISPRに依存しない真菌における 非遺伝子組換え型ゲノム編集

東京理科大学 創域理工学部 生命生物科学科
教授 鎌倉 高志

2024年11月7日

真菌類

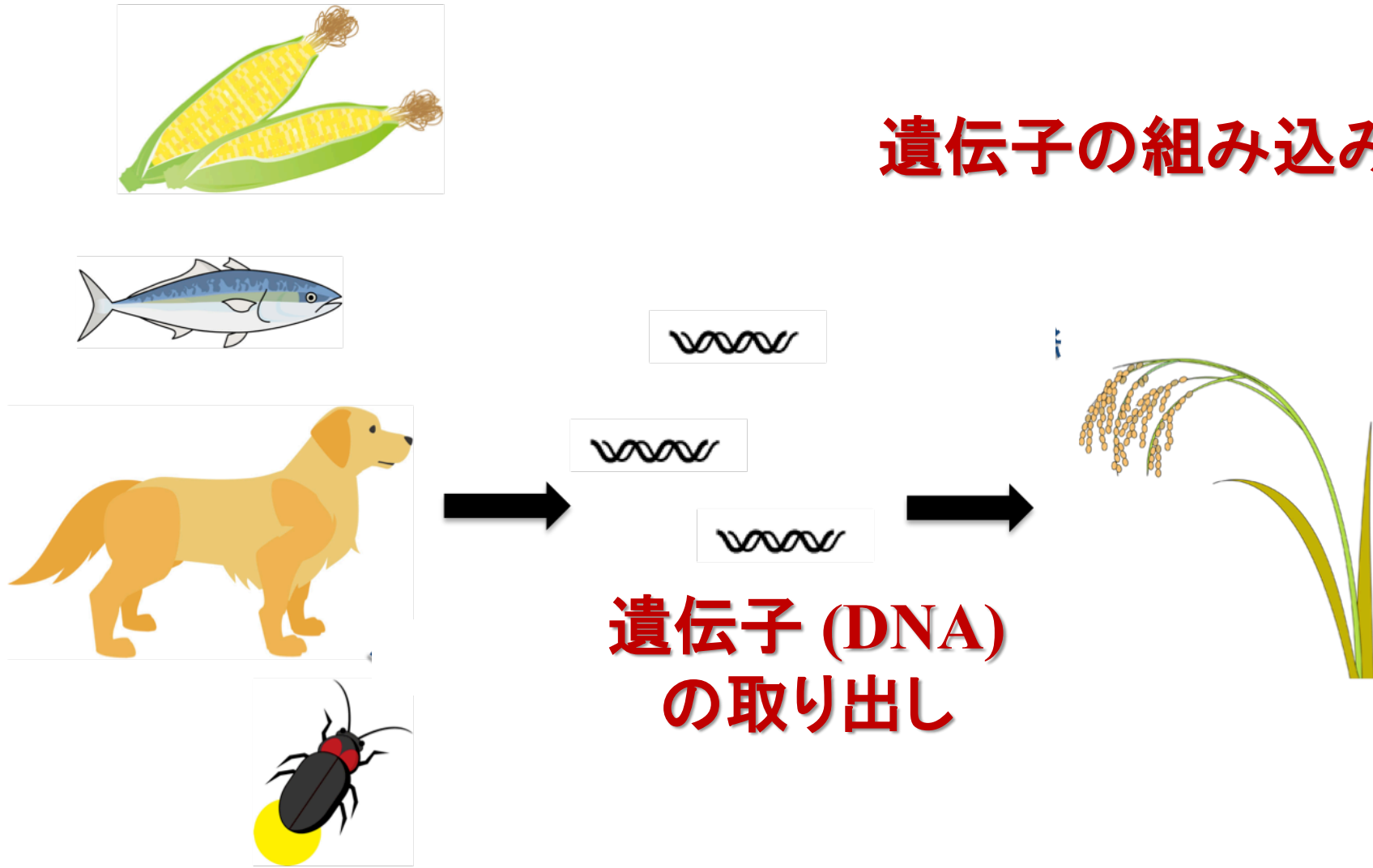
- 酵母、カビ、キノコを含む真核微生物
- 味噌、醤油、酒類等の発酵生産に利用
- 抗生物質を含む有用物質を生産
- きのことや培養肉などの食用
- 動物や植物と共生する種も存在



有用形質を持つ真菌は交配ができない種が多い

遺伝子組換えとは

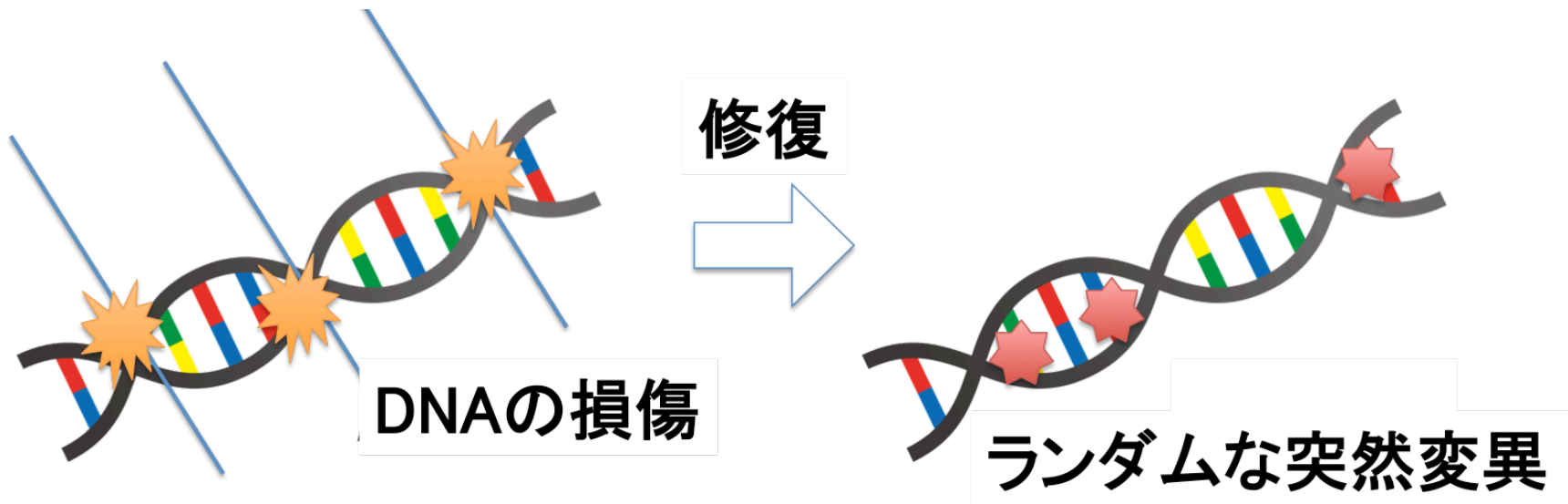
遺伝子の組み込み



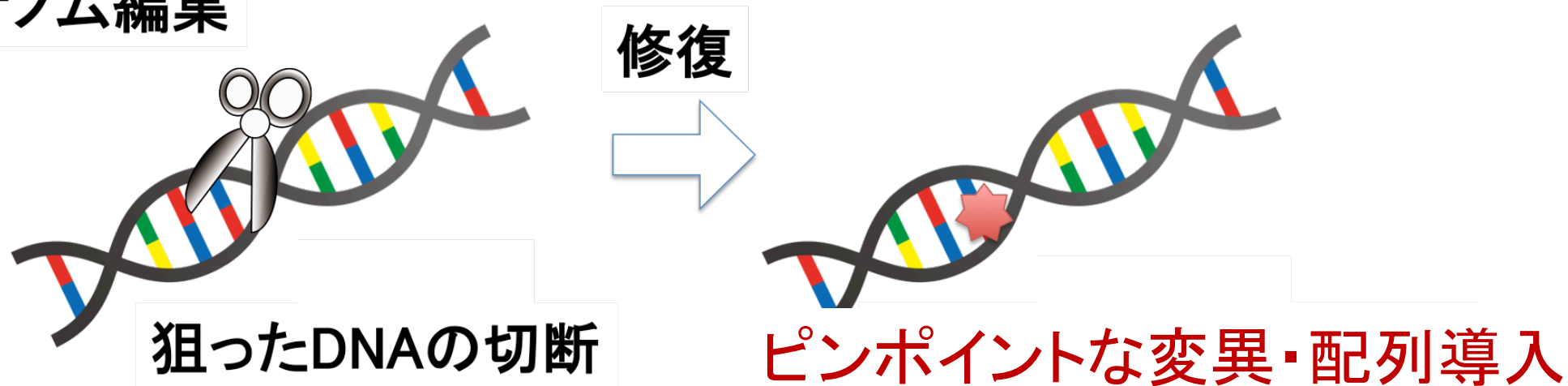
他の生物種の遺伝子を取り出して組み込む (機能を付加)

ゲノム編集とは

ランダムな変異導入

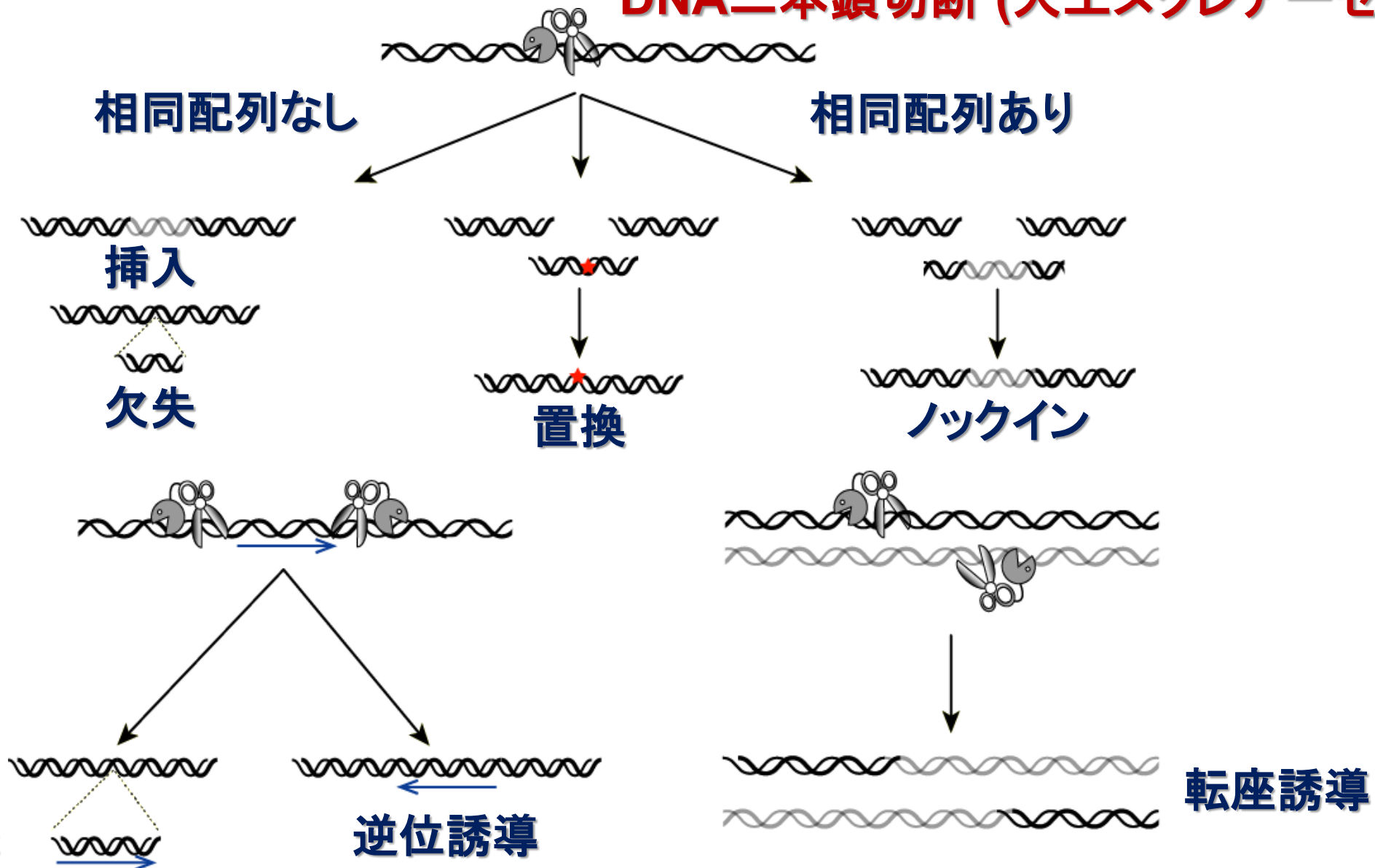


ゲノム編集



ゲノム編集の一例

DNA二本鎖切断 (人工ヌクレアーゼ)



真菌類のゲノム編集で出来ること

- 生命の設計図であるゲノム情報を正確に改変
- 外来DNAを含まない非遺伝子組換え型でのゲノム情報の改変
- 有用菌 (物質生産・発酵・食用・共生) の効率的な遺伝子機能解析
- 有用菌 (物質生産・発酵・食用・共生) の機能改良 (品種改良)

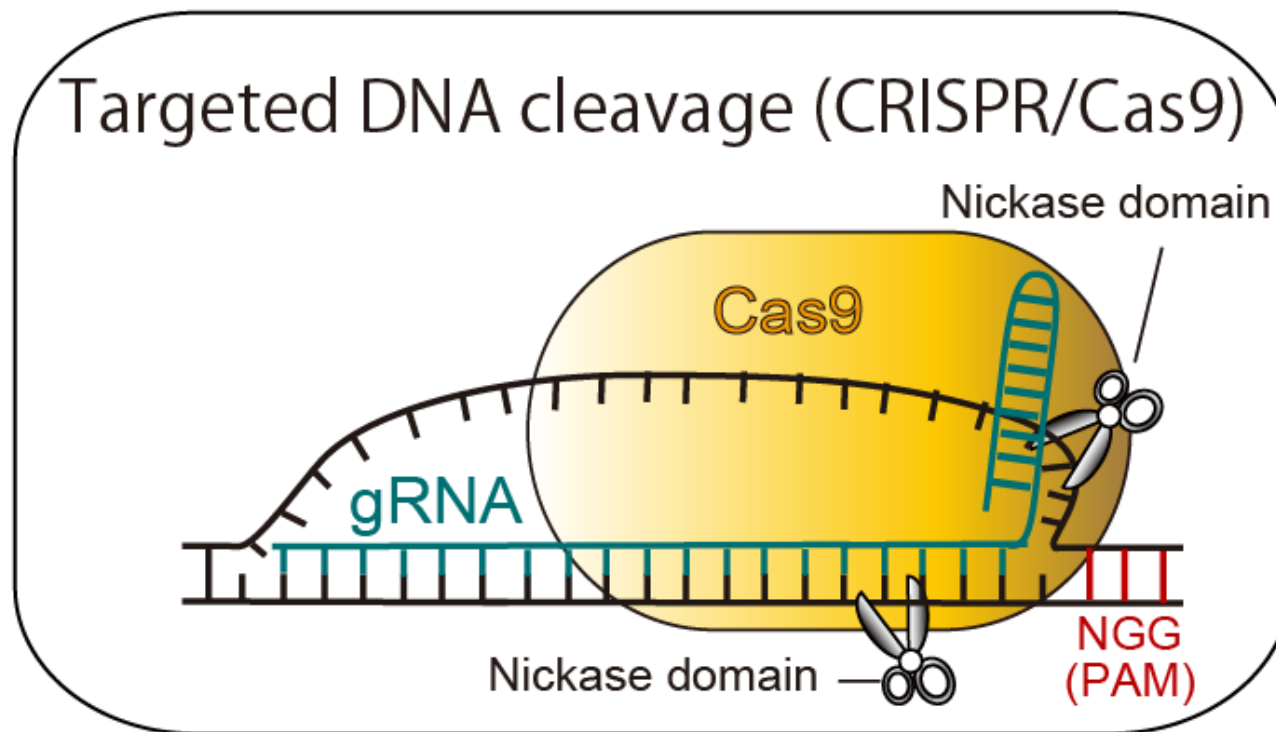
従来手法では不可能であったゲノム操作が可能

ゲノム編集ツール (CRISPR/Cas9)

Basic vector construct (CRISPR/Cas9)



Targeted DNA cleavage (CRISPR/Cas9)



非常に簡便に作製が可能/様々な応用が可能

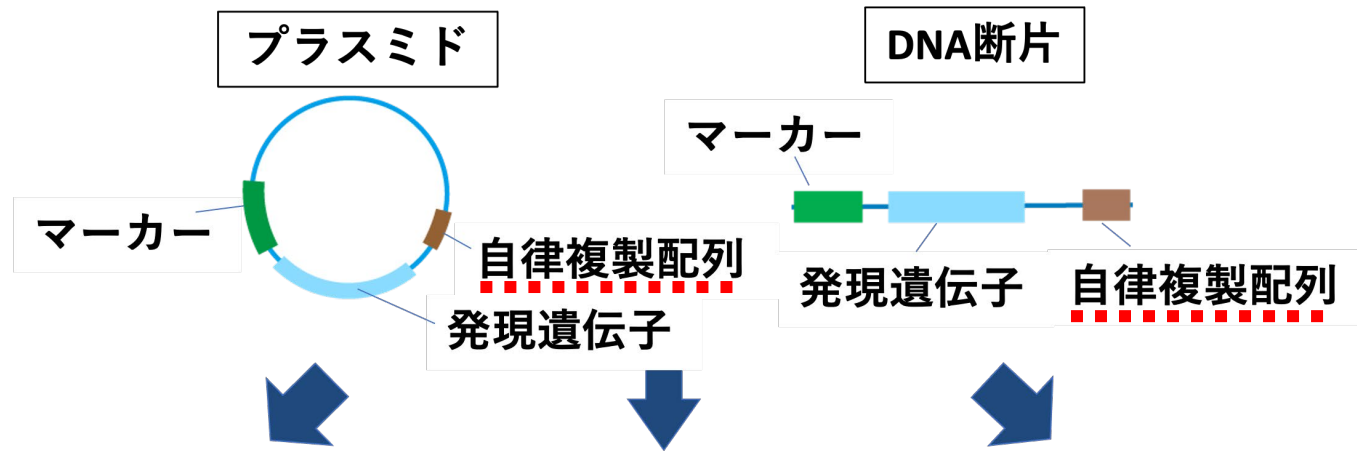
従来技術とその問題点

- CRISPRの使用には高額かつ複数のライセンス費用が要求されるリスク
- 微生物でのゲノム編集ではCRISPRが必ずしも最適なツールではない
- 外来DNAやタンパク質の導入効率が低いことからマーカー遺伝子の利用が必要となることも（遺伝子組換えに該当）
- 自律複製ベクターは一部の真菌のみで利用可能

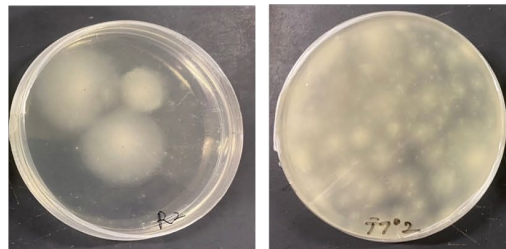
新規の自律複製配列の同定と純国産ゲノム編集技術の確立

新規自律複製配列

自律複製ベクター (DNA断片)

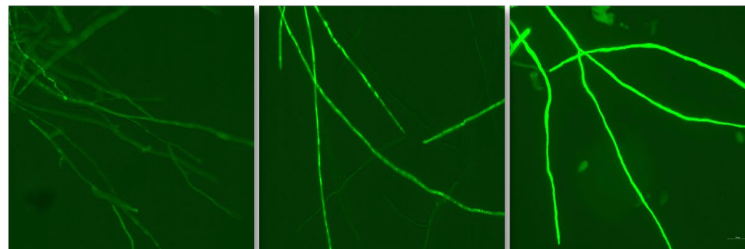


形質転換効率向上



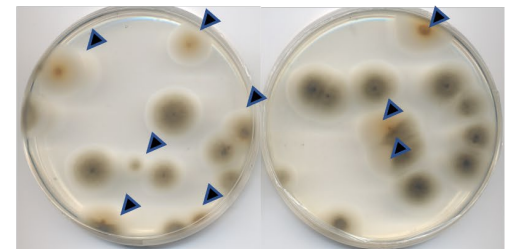
従来法 自律複製ベクター

発現調節 (コピー数調節)



弱 強

非組換え型ゲノム編集

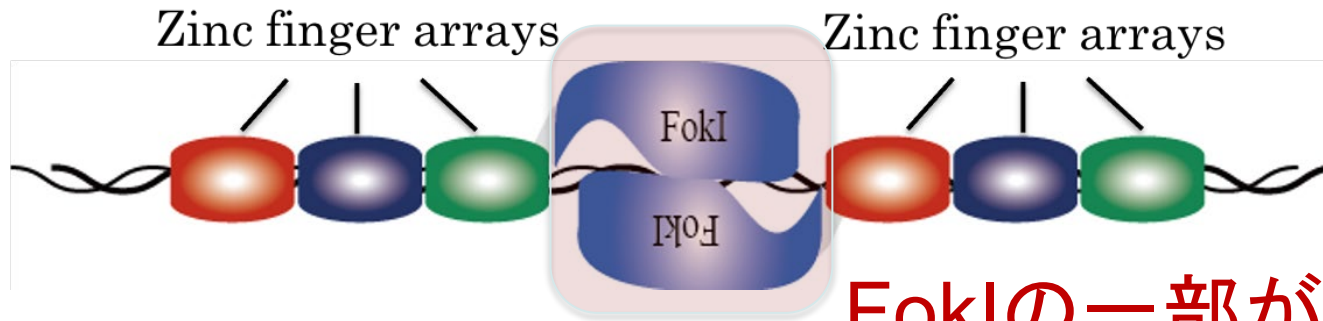


▲:ゲノム編集成功株

細胞内での安定性やコピー数 (遺伝子発現量)を調整可能

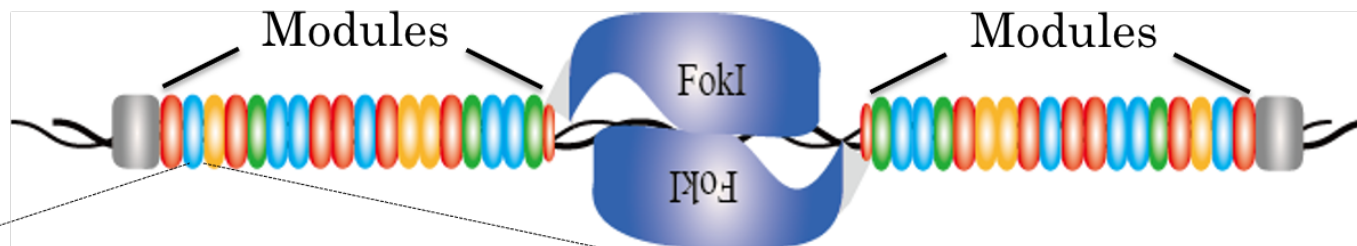
新規ヌクレアーゼドメイン

ZFN (Zinc Finger Nuclease) ライセンスフリー



FokIの一部が知財化

TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease)



Repeat variable-diresidue (RVD)

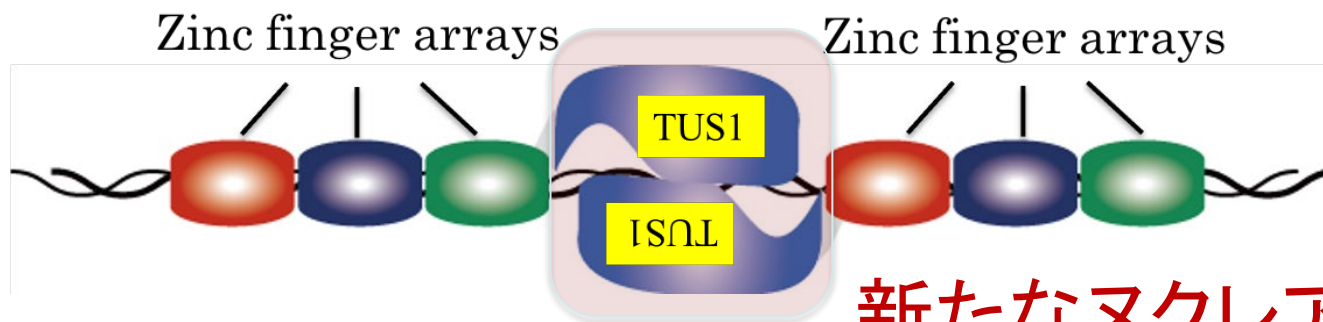
LTPEQVVAIAS **NG** GGKQALETVQRLLPVLCQAHG

NG = T HD = C NI = A NN = G or A

FokIの代替となるヌクレアーゼドメイン (TUS1-4) を取得

ゲノム編集効率

ZFN (Zinc Finger Nuclease) ライセンスフリー



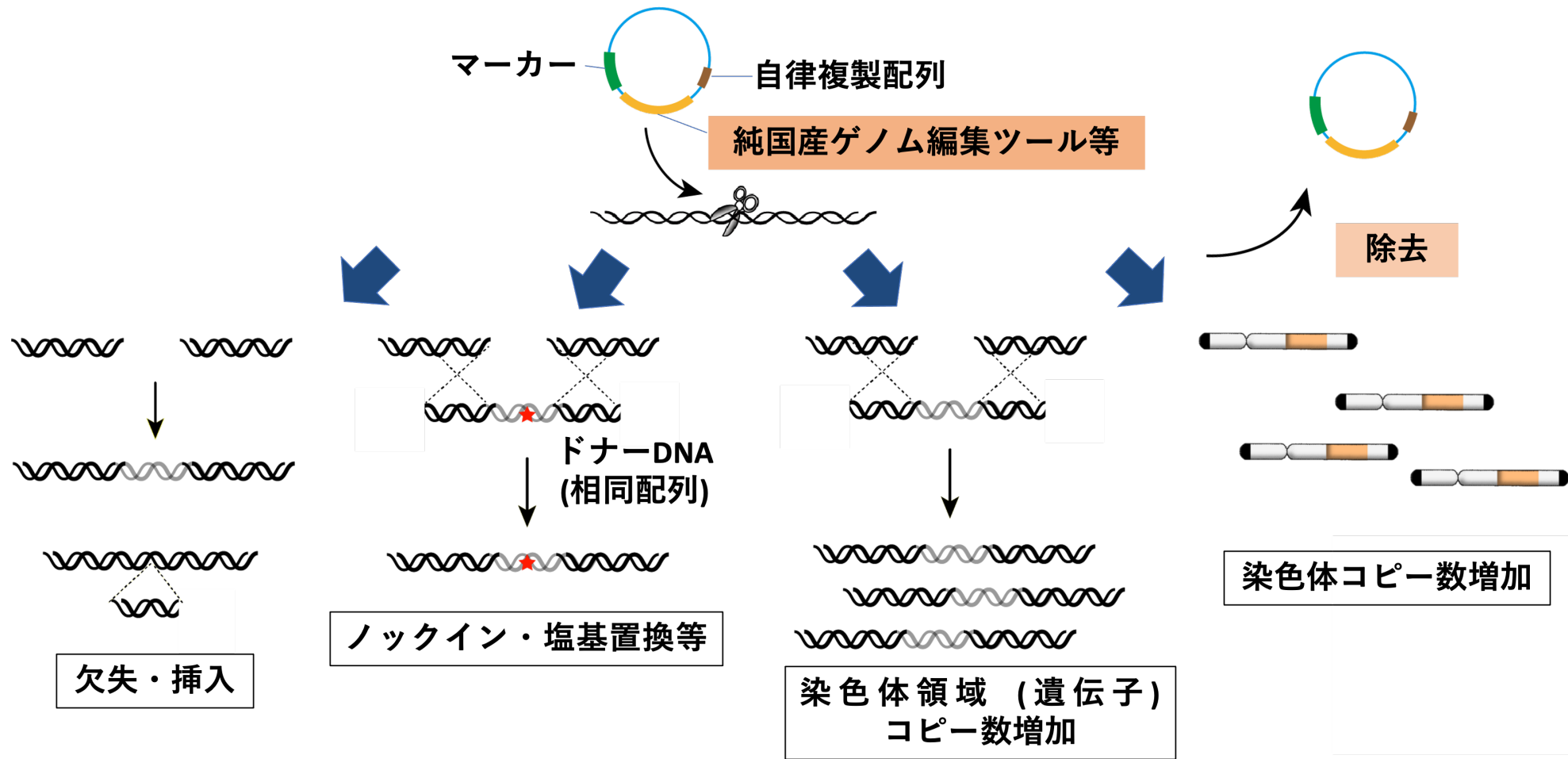
新たなヌクレアーゼTUS1

導入ツール	取得コロニー	ゲノム編集成功株	編集効率
ZFN	21	5	23.8
TUS1	43	8	18.6
TUS2	41	2	4.9
TUS3	18	1	5.6
TUS4	18	1	5.6
TUS1-imp	25	8	32.0

従来のZFNと比較して高効率でのゲノム編集が可能

新規ゲノム編集技術 (TUSEdit)

自律複製ベクター+ゲノム編集ツール



非遺伝子組換え型での効率的なゲノム編集が可能

新技術の特徴・従来技術との比較 (新規自律複製配列)

- 従来の自律複製配列 (約5000 bp) よりも短く (18-120 bp) 広範な真菌で利用可能
- 従来の自律複製配列では困難であった細胞内でのコピー数や安定性を制御することが可能
- 非選択培地での培養により細胞から簡便に除去することが可能
- 形質転換が困難な真菌での利用や非遺伝子組換え型ゲノム編集に利用可能

新技術の特徴・従来技術との比較 (ゲノム編集 **TUSEdit**)

- 従来のZFNよりも高効率でのゲノム編集が可能
- CRISPRによるライセンス費用のリスクを回避
(純国産ゲノム編集技術)
- ゲノム内の遺伝子コピー数や染色体数を増加可能
- 自律複製配列との組み合わせにより非遺伝子組換え型でのゲノム編集が可能

想定される用途

- 形質転換効率が低い非モデル微生物や有用微生物 (真菌) の遺伝子機能解析
- CRISPRのライセンス問題を回避したゲノム編集微生物 (真菌) の分子育種/機能向上
- 微生物 (真菌) 生産物の収量増加

実用化に向けた課題

- ゲノム編集効率のさらなる向上
- 設計可能配列の拡大
- ゲノム編集アプリケーションの増加
- 様々な微生物（真菌）での利用実績の蓄積

企業への期待

- 有用微生物（真菌）の遺伝子機能解析や分子育種（ゲノム編集）に関する共同研究
- 有用微生物（真菌）の分子育種による産業用微生物の作出と販売
- ゲノム編集微生物を用いた新たな市場開拓が可能な事業パートナーを募集
- 公的資金への企業との共同申請

企業への貢献、PRポイント

- **新規**自律複製ベクターは様々な真菌で利用可能であると考えられ、これまで遺伝的な解析や操作が困難であった真菌で利用可能
- 純国産技術**TUSEdit**による遺伝子機能解析やゲノム編集微生物（真菌）の作出が可能
- 産業用微生物（真菌）の機能向上や生産物の増加に貢献
- 複数社との産学連携実施経験あり

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : ベクター又はDNA断片、キット、及び遺伝子操作された真核細胞の作製
 - 出願番号 : 特願2024-057399
 - 出願人 : 学校法人東京理科大学
 - 発明者 : 鎌倉高志、荒添貴之、新門想太
-
- 発明の名称 : 核酸切断酵素、核酸、ベクター、核酸改変用キット、及び核酸の改変方法
 - 出願番号 : 特願2024-057389
 - 出願人 : 学校法人東京理科大学
 - 発明者 : 鎌倉高志、荒添貴之、原田裕太
-
- 発明の名称 : 変異体の作製方法、遺伝子発現方法、及び真核細胞
 - 出願番号 : 特願2024-057393
 - 出願人 : 学校法人東京理科大学
 - 発明者 : 鎌倉高志、荒添貴之、原田裕太

お問い合わせ先

東京理科大学
産学連携機構

TEL 03-5228-7440

e-mail shinsei_kenkyu@admin.tus.ac.jp