

# 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」事後評価（課題評価）結果

## 1. 研究領域の概要

本研究領域はゲノムの構造と機能に関する基本原理（ゲノムの動作原理）の解明とその知見に基づく細胞利用の基盤技術の創出を目指すものである。特に、長鎖DNAの活用を通して細胞の制御を目指すことで生命科学、ゲノム科学、細胞工学などのライフサイエンスのフロンティアの開拓と技術基盤の確立を目指す。

近年、世界的に長鎖DNAを活用した研究開発が加速している。これらはいずれも合成生物学の流れを汲むものであり、米国、中国、英国では複数の拠点形成され、基礎研究や技術開発、ベンチャー企業の育成など戦略的な投資が行われている。しかしながら、各国の取り組みを見ると、細胞を任意に制御するためのゲノムの設計指針にまで踏み込んだ研究開発は少ないように見受けられる。

そこで、本研究領域では将来的なゲノム設計の基盤技術の構築に向けゲノムの動作原理の解明を目的とした研究開発に取り組む。ここでは、進展が著しい長鎖DNAの活用を視野に「ゲノムの構造と機能の解明」、「ゲノム設計のための基盤技術」、「ゲノムスケールのDNA合成技術」、「人工細胞の構築」の4つの課題を推進し、ゲノムの複雑な機能と構造に関する知見の創出とゲノム合成や人工細胞に関する新たな技術の構築を目指す。

## 2. 事後評価の概要

### 2-1. 評価の目的、方法、評価項目及び基準

「戦略的創造研究推進事業(先端的低炭素化開発を除く)の実施に関する規則」における「第4章 事業の評価」の規定内容に沿って実施した。

### 2-2. 評価対象個人研究者及び研究課題

#### 2019年度採択研究課題

- (1) 海津 一成（理化学研究所生命機能科学研究センター 上級研究員）  
ゲノム配列から自動で全細胞モデリングする技術の開発
- (2) Canela Andres（京都大学白眉センター 特定准教授）  
ゲノム構築におけるDNAトポロジーの役割
- (3) 寺川 剛（京都大学大学院理学研究科 助教）  
DNAカーテンによるエピゲノム修飾継承の一分子計測
- (4) 西山 朋子（京都大学大学院理学研究科 教授）  
ゲノム三次元構造とゲノム機能をつなぐハブ構造構築
- (5) 野崎 晋五（広島大学大学院先進理工系科学研究科 共同研究講座准教授）  
ボトルシップ法による人工細菌の創出
- (6) 林 剛介（名古屋大学大学院工学研究科 准教授）  
有機化学を基盤としたエピゲノム修飾ヌクレオソーム再構成技術の確立
- (7) 原田 哲仁（九州大学生体防御医学研究所 准教授）  
組織特異的ゲノム構造の再構築技術の開発
- (8) 真栄城 正寿（北海道大学大学院工学研究院 准教授）  
人工エクソソームによる長鎖DNAの細胞導入法の開発
- (9) 正木 慶昭（東京工業大学生命理工学院 助教）  
副反応を起こさない核酸等価体による長鎖DNA合成

- (10) 水内 良 (東京大学大学院総合文化研究科 特任助教)  
原始生命の進化に学ぶゲノム拡張基盤の構築
- (11) 村山 泰斗 (情報・システム研究機構国立遺伝学研究所 准教授)  
ゲノム複製・組換えにおけるDNA高次構造制御機構の解明

#### 2-3. 事後評価の実施時期

2022年12月6日(火曜日) 事後評価会開催

#### 2-4. 評価者

##### 研究総括

塩見 春彦 慶應義塾大学医学部 教授

##### 領域アドバイザー

朝倉 陽子 味の素(株) R&B企画部 シニアマネージャー

石井 浩二郎 高知工科大学環境理工学群 教授

今井 由美子 医薬基盤・健康・栄養研究所感染症制御ワクチンプロジェクト プロジェクトリーダー

岩崎 信太郎 理化学研究所開拓研究本部 主任研究員

岡崎 寛 理化学研究所創薬・医療技術基盤プログラム プログラムディレクター

小比賀 聡 大阪大学大学院薬学研究科 教授

角谷 徹仁 東京大学大学院理学系研究科/情報・システム研究機構国立遺伝学研究所 教授

北島 智也 理化学研究所生命機能科学研究センター 副センター長・チームリーダー

黒川 顕 情報・システム研究機構国立遺伝学研究所 教授

菅野 純夫 千葉大学未来医療教育研究機構 特任教授

鈴木 勉 東京大学大学院工学系研究科 教授

二階堂 愛 東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授

横川 隆司 京都大学大学院工学研究科 教授

##### 外部評価者

該当なし

### 3. 総括総評

さきがけ研究領域「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(ゲノム合成)」では、ゲノムの構造と機能に関する基本原理(ゲノムの動作原理)の解明とその知見に基づく細胞利用の基盤技術の創出を目指している。このため、ゲノムや細胞を人工的に合成し制御する新しい技術や設計理論の基盤を構築し、それを検証していく。つまり、「創って調べて制御する」ゲノム合成生物学をさまざまな見地から進めている。近年のゲノム解析研究は、タンパク質をコードする遺伝子の数は発生の複雑さに比例して増大するものではないことを明らかにした。また、多くのタンパク質のアミノ酸配列も種間でよく保存されていることから、種の違いはゲノムに存在する遺伝子の種類や数よりそれらの時空間的発現制御が重要であることが示されている。一方、染色体の数や大きさ、染色体上の遺伝子の配置は種間で大きく異なり、このことが種特異的な時空間的遺伝子発現制御を可能にしているとの仮説が提唱されている。しかし、従来の手法を用いている限り、大規模なゲノム改変や異種ゲノムの導入・起動を行い上記の仮説を検証し、ゲノムの動作原理を理解することは難しく、10kbp程度以上の長鎖DNAの人工合成・ハンドリング・細胞導入・人工細胞構築のための基盤技術とゲノムの設計ルール of 解明のための予測技術の開発が不可欠である。本領域ではそれらを可能にする野心的な提案を意識的に採択した。

特に、第2期生において大きな進展が見られたものとして、データベースやAI関連技術を駆使したゲノム配列の特徴抽出、機能発現を可能とする設計アルゴリズムやソフトウェアの開発と細胞全体の遺伝子発現と代謝のモデルを構築しシミュレーションする技術の開発(海津)が挙げられる。また、自己複製可能な人工細胞作製のための進化する人工細胞の構築(水内)など、大胆な技術開発により今後の研究発展につながる展望を得ることができた。

ゲノムの構造と機能の解明に寄与する基礎研究においては、ゲノムの動作原理の理解を目的とする幾つかのテーマが進められた。試験管内再構成と構造解析、さらにはシミュレーションにより遺伝子発現を制御するDNAループやクロマチン構造(TAD、A/B domain等)やコヒーシンの新たな機能を明らかにする研究(西山、村山、寺川、Canela、林、原田)において、遺伝子発現の活性化や抑制、転写とカップリングしたDNA複製制御等に関するさまざまな新しいかつ重要な知見が得られた。これらの中には近い将来教科書に掲載されることが十分予想される成果も含まれる。また、ゲノムスケールのDNA合成とその細胞への導入技術の開発においては、空き瓶の中で帆船模型を組み上げるボトルシップのように大きな人工ゲノムを分断化した状態で細菌細胞に導入し細胞内で完全なゲノムへと組み上げることで人工細菌を生み出す手法の開発(野崎)、長鎖DNA合成における合成配列の信頼性を大幅に向上させる技術の開発(正木)、長鎖DNAを高効率で細胞に導入することが可能な人工エクソソームおよび脂質ナノ粒子(ナノ粒子)の開発(真栄城)についても興味深い研究が進められた。これらの過程で、マイクロ流路を用いた細胞融合系が長鎖DNAや異種ゲノムを細胞に導入する非常に強力なツールであることが領域内で広く認識され、共同研究を通して実用化が進められている。今後、大規模なゲノム改変や異種ゲノムの導入・起動につながる画期的な手法の開発が期待される。

本領域では研究者間の共同研究を推奨した。その結果、本領域のさきがけ研究者同士、および本領域とのハイブリッド領域であるCRESTの研究者との間で共同研究が多数生まれ大きな成果に結びついてきていることは期待以上である。また、コロナ禍においても定期的に本領域のCREST・さきがけ合同進捗報告会をオンラインで開催し、アドバイザーや総括のみならず研究者が互いに批評・助言することによって研究のレベルが向上し領域が活性化した。その結果、第2期生11名中5名が研究期間中に、さらに1名が研究期間終了後に異動・独立または内部昇進し、独自の研究分野をさらに切り拓ける立場に就いた。競争的研究費に関しても、1名(西山)が領域代表として、また1名(原田)が計画班員代表として科研費学術変革領域研究(A)を、2名(正木、水内)が創発的研究支援事業を獲得し、継続的な資金獲得に繋がっている。このことは、本領域研究者の高い実力が認められたと同時に、本領域の質の高さを示すものであり、本領域が将来の主導的研究者の養成についても一定の役割を果たしたことを示す指標であると考えられる。全体に、新型コロナウイルス感染拡大のため研究の進捗が危ぶまれたが、個々の研究者の強いモチベーションにより研究が推進され、期待以上の成果が上がったと総括する。

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： ゲノム配列から自動で全細胞モデリングする技術の開発

2. 個人研究者名

海津 一成（理化学研究所生命機能科学研究センター 上級研究員）

3. 事後評価結果

本研究では、入力したゲノム配列に対して複数のバイオインフォマティクスツールを組み合わせで解析し、加えて多様なデータベースと連携することで全ゲノム規模モデルを構築し、1細胞1分子レベルのシミュレーションにより細胞のふるまいを再現・予測する技術を開発した。具体的には、大腸菌を対象として、ゲノム配列から自動で増殖速度やゲノムレベルでのマルチオミックス、ゲノム複製などの細胞のふるまいを再現する全細胞のモデルを構築する技術を開発した。さらに、この技術を可視化し、グローバルな研究コミュニティでの活用を提案した。また、このモデルを検証するための、ハイスループットな実験系も立ち上げている。これにより塩基配列レベルの様々なゲノム設計を計算機上で試し、検証することが可能になる。これらの成果は大腸菌など特定の種に限定せず、プラスミドや他の原核生物にも応用できるものである。したがって、総合的に見て、目標を十分達成できたと評価する。

本技術は、ゲノム配列を解析するバイオインフォマティクス、配列から分子の構造や機能を予測する構造生物学、分子のはたらきから細胞のふるまいを再現するシステム生物学を統合したプラットフォームであり、様々なゲノム配列を仮想的に改変・設計し、計算機上でその表現型を予測することで、ゲノム配列構造の設計原理の一端を明らかにできる可能性を示している。さらにゲノム配列情報を介して生化学、遺伝学、分子生物学、生物物理学、合成生物学など異なる分野の知見を結び付けることで、ドラッグスクリーニングを仮想実験として行う可能性をも示している。

研究期間中に、海外から新たに全細胞シミュレーションを目指す留学生の受入れを行い、また、領域内共同研究も開始し、国内外を含めた計算システム生物学のコミュニティ形成を進めてきている。開発したソフトウェアの幾つかは既にオープンソースで公開しており、また、システム生物学を中心とした研究支援のためのVRプラットフォーム（ECellDive）もオープンソースで公開している。これらは重要な成果であり、速やかに論文にまとめ発表することを期待したい。

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： ゲノム構築における DNA トポロジーの役割

2. 個人研究者名

Canela Andres (京都大学白眉センター 特定准教授)

3. 事後評価結果

In this study, Canela Andres has done lots of experiments to understand the molecular functions of the evolutionary conserved structural maintenance of the chromosome (SMC) protein complex which plays an essential role in the genome folding including DNA loop extrusion. His work in both mammalian cell lines and *E. coli* has revealed the consequence of the interaction between SMC complexes and Topoisomerase type II (TOP2); TOP2 is necessary for compaction of the chromatin mediated by cohesion, a member of the SMC complexes in mammals, and MukBEF, a member of the SMC complexes in bacteria, and TopoIV bind to highly transcribed regions, especially the ribosomal RNA operons that are domain boundaries in *E. coli*. The data presented are of high quality. His findings suggest a new model in which how MukBEF and TopoIV function in transcription.

His work demonstrates that the function of MukBEF at its binding sites on the genome is not promoting the formation of structural domains like cohesion in mammals, but rather preventing them, which suggests that these domains are not regulatory structures, but DNA torsions generated by high transcription and replication.

People can get the impression that he always tries very hard to make good interactions with other members of this research area of PRESTO, which has led good, fruitful and stabilizing collaborations in this research area to help the progress of his own and other research. Now it is very important for him to write up at least a couple of papers based on these new and exciting findings.

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： DNA カーテンによるエピゲノム修飾継承の一分子計測

2. 個人研究者名

寺川 剛（京都大学大学院理学研究科 助教）

3. 事後評価結果

本研究では、DNA 複製に伴うヒストンリサイクルについて、必要な最低限の分子コンポーネントを明らかにし、さらに、詳細な分子機構、特にミニマルヒストンリサイクリングのリーディング鎖へのバイアスを明らかにした。研究はDNA カーテン法による1分子蛍光イメージングとナノポアシーケンシングによる可視化という *in vitro* の系とシミュレーションをうまく組み合わせしており、さらに、深層学習や高速原子間力顕微鏡計測も駆使しており、他のグループとの競合の中で非常に高い研究力を示した。したがって、総合的に見て、目標を十分達成できたと評価する。

本研究では、DNA 複製装置の再構成に必要な18種類のタンパク質それぞれとヌクレオソームの再構成に必要なヒストンオクタマーの精製を行い、ヌクレオソームを再構成したDNA基質上に、DNA複製装置を再構成する系を確立した。この系を使って、ヒストンがリサイクルされるDNA鎖の種類（リーディング鎖またはラグging鎖）とDNA上の位置を定量する手法を確立し、必要最低限の分子コンポーネントによるヒストンリサイクルでは、多くのヒストンはリーディング鎖にリサイクルされることを明らかにした。この結果は、従来の細胞内で両方の鎖にほぼ均等にリサイクルされるという知見とは一致しない。したがって、必要最低限以外の分子コンポーネントが均等なリサイクルを実現していることを示唆している。本研究で確立した手法を用いた今後の研究で、それらの分子コンポーネントが明らかになることが期待される。また、関連分野での伸びしろも大きい。

研究期間中に多くの領域内研究者と活発に交流しており、そこから生まれた共同研究において、ナノポアシーケンスを使用したヒストンリサイクルを検出する方法等の重要な成果が既に出てきている。また、論文発表も積極的に行っている。これらの成果は今後ヒストンリサイクルの分子機構研究に広く応用されていくことが期待され、科学技術への波及効果は大きい。今後さらに本研究の成果を深めていくことで、独創的・挑戦的かつ国際的に高水準の先駆的な基礎研究を推進し、革新的技術シーズを世界に先駆けて創出していくことを期待したい。

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： ゲノム三次元構造とゲノム機能をつなぐハブ構造構築

2. 個人研究者名

西山 朋子（京都大学大学院理学研究科 教授）

3. 事後評価結果

本研究では、ゲノムのループドメイン形成の動的なメカニズムを、コヒーシ複合体に着目して一分子レベルで解析し明らかにした。コヒーシはリング状のタンパク質複合体で、これまでの研究から、DNA複製に依存した姉妹染色分体間接着に必須であることが知られている。同時に、TAD (Topologically associated domain) をはじめとしたゲノム高次構造の形成に必要であり、実際にいくつかの遺伝子座ではプロモーターとエンハンサーを近接させることで転写を活性化していることが知られている。研究課題は(1)顕微鏡下におけるDNAループ形成再構成系および一分子観察系の構築、(2)細胞内におけるコヒーシ構造変化の役割、(3)DNAループ形成に必要なコヒーシ複合体の構造的特徴の解明、(4)コヒーシ類似複合体コンデンシンとのループ形成メカニズムの比較、(5)DNA高次構造形成モジュールとしての応用の5つに分けられる。本研究の結果、コヒーシのloop extrusionにおける基礎的な生化学的・物理化学的・構造生物学的メカニズムの理解を深めた。一つ一つの現象について、豊富な関連知識・情報をもとに丁寧に考察しており、緻密な実験デザインでコヒーシの分子機構を明らかにした素晴らしい研究である。開発した系を利用することでloop extrusionとtransの機構を見分ける機構が理解できるとより素晴らしい。また、コンデンシンの研究も平行して進めており、コヒーシとコンデンシンの機能的類似性と相違を明確にしていくことで、新しい分野を切り拓いていくことが期待できる。

研究期間中に多くの研究者と活発に交流することで、関連分野のリーダーとしてのネットワークの中核を築いたものと思われる。実際、すでに学術変革領域研究(A)の領域代表として活躍している。

本研究では主に、ゲノム高次構造の一つの構成単位である「DNAループ構造」が形成される仕組みを、SMCタンパク質複合体であるコヒーシやコンデンシンの機能と結びつけて明らかにした。今後、SMCタンパク質複合体に依存しない高次ゲノム構造の形成メカニズムやコヒーシの必須機能である姉妹染色分体間接着メカニズムとの相違点についての解明等、ゲノム高次構造形成メカニズムの包括的な理解が深まることが期待される。また、本研究の成果は、ヒトを含む高等真核生物の複雑な染色体構造を人為的に合成するために必要な「ゲノム高次構造化エレメント」の開発につながるものであり、医療応用に直結する次世代の人工ゲノム合成プロジェクトに貢献するものと期待される。

(2023年6月追記)

本研究者は研究期間中にライフイベントにより研究中断したため、2023年5月まで6週間の研究期間延長を行った。生活と研究のバランスを上手く取り、異動による新たな研究環境の立ち上げも適切に進めているように見受けられる。色々な意味で新しい環境で新しい分野に挑戦する時が来たように思われる。研究は順調に進んでおり、今後も細部にこだわりすぎず大きな問い(ロードマップ)を設定することを期待する。

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： ボトルシップ法による人工細菌の創出

2. 個人研究者名

野崎 晋五（広島大学大学院先進理工系科学研究科 共同研究講座准教授）

3. 事後評価結果

本研究では、空き瓶の中で帆船模型を組み上げるボトルシップのように、大きな人工ゲノムを分断化した状態で細菌細胞に導入し、細胞内で完全なゲノムへと組み上げることで人工細菌を生み出す手法を開発した。具体的にはバクテリオファージの試験管内パッケージングを用いて約 50 kb までの DNA を複数断片の PCR 産物から簡便、迅速、正確に構築する手法（iPac 法）を確立しており、既存の方法と比べて 1/10 以下の低コストで行えるため、これまで困難であった大きな DNA を扱う研究への参入障壁が大幅に下がることが期待される。また、細菌細胞内へと順次 DNA を導入していき、徐々に細胞内で大きなゲノムを構築するという手法をとる場合、多数の菌株で同時にコンピテントセルを作製するという場面においては既存の方法は現実的ではない。そこで、本研究ではより簡便にコンピテントセル作製及び形質転換を行う方法の開発も行った。さらに、人工細菌を作り出す上ではゲノムを構築するだけでなく、ゲノムを受け入れる器である細胞シャーシも重要となる。この細胞シャーシとして、制限酵素を細胞内で発現させることでホストゲノムを分解させた無核細胞を用いた研究を進めた。iPac 法は、一反応当たり 700 円程度のコストで行える、非常に低コストかつ簡便な DNA 構築法である。このため、誰でも簡便に数十 kb の DNA の構築が可能となり、そのような大きな DNA を扱う研究が広く行われるようになることが期待される。

今後、iPac 法を他の手法と組み合わせていくこと、細胞シャーシへ順次 DNA を導入していきそれを細胞シャーシ内部で大きく組み上げていくことにより、巨大なゲノムを構築していく技術の確立への発展が期待される。また、自在にゲノムがデザインされた人工細菌の創出技術の創生に繋がり、物質生産等への応用だけでなく、生命の必須因子を決定していく新規技術の開発が期待される。さらに、本研究で開発してきた技術を活用していくことで、無核細胞内へ様々な遺伝子を導入していき、死を待つだけの無核細胞を生命として機能する細胞へと変換できる可能性も示している。

大腸菌を用いた各種ゲノム合成技術とその支援技術を開発してきており、今後、これらの技術を他のバクテリアに応用・拡大していける可能性は大きい。研究期間中に多くの研究者と活発に交流してきており、このネットワークは今後の大きな財産となる。このネットワークを生かしてさらなる飛躍を期待したい。

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 有機化学を基盤としたエピゲノム修飾ヌクレオソーム再構成技術の確立

2. 個人研究者名

林 剛介（名古屋大学大学院工学研究科 准教授）

3. 事後評価結果

本研究では、有機化学の手法でタンパク質を作製する「タンパク質化学合成法」を用いて翻訳後修飾が部位特異的に導入されたヒストン等のエピジェネティクス関連タンパク質を作製し、その機能を解析することを目的とした。このため、新規のタンパク質の化学合成技術として、精製操作を経ず複数のペプチド断片を連結するワンポットペプチド連結法を開発した。本研究で化学合成したヒストンやその他クロマチン関連タンパク質は、延べ20種類以上にのぼり、さらに導入した修飾の種類は、メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化などの翻訳後修飾に加えて、蛍光色素であるフルオレセイン、ローダミン、チアゾールオレンジ等も含まれる。これらの修飾タンパク質は、生化学解析や構造解析へ応用され、翻訳後修飾の機能やヒストンタンパク質の構造ダイナミクスの一端を明らかにした。領域内の共同研究にも積極的に取り組み、特にクロマチン研究者と見事にコミュニケーションをとることで、ニーズに合わせた様々な翻訳後修飾を持つヒストンタンパク質やエピジェネティクス関連タンパク質を着実に化学合成し、これらの機能解明に大きく貢献している。タンパク質の化学合成という非常にチャレンジングなテーマではあったが、独自の有機合成化学手法を駆使し見事に成し遂げた点は高く評価できる。ハイインパクトジャーナルへの論文発表も多く、期待を上回る成果をあげている。

本研究において合成した各種ヒストンやさまざまな修飾を導入した合成タンパク質を活用することで、今後、クロマチンの構造解析や生化学解析が大きく進み、特定ヒストン修飾の機能が明らかとなることが期待される。また、タンパク質化学合成技術は、遺伝子工学的には作製することのできない人工タンパク質の合成が可能であるという点において革新的技術のシーズであると言えるが、本研究では、その基盤技術であるペプチド連結反応において現状世界最高効率の方法論を創出した。本技術はライフサイエンス研究や創薬研究への影響が大きく、製薬業界を中心に経済への波及効果が期待される。

本研究者は論文や特許出願といった成果発表も積極的に行っており、領域内の共同研究も活発である。また、着実に独立した研究室を作り上げてきており、今後、有機化学合成とクロマチン・ゲノム生物学を繋ぐ重要なかけ橋となることに間違いない。それにより、異分野を融合させ、新しい生命科学が創出されることが期待される。

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 組織特異的ゲノム構造の再構築技術の開発

2. 個人研究者名

原田 哲仁（九州大学生体防御医学研究所 准教授）

3. 事後評価結果

本研究では、新規の単一細胞エピゲノム解析技術を開発し、組織特異的遺伝子発現を操作する技術基盤を構築することを目的とした。具体的には、組織特異的遺伝子発現を操作する技術基盤の構築のために、組織特異的な遺伝子発現を可視化するための単一細胞解析技術の開発とそれを用いたデータの取得を目的とし、（1）組織特異性を規定するゲノム構造の獲得、（2）組織特異的なゲノム構造を規定する制御因子の同定、（3）組織特異的なゲノム構造の再構築の3つの課題を並行して進めた。その結果、クロマチンのエピジェネティック構造や転写因子の結合を少数細胞から高精度で検出することができるChIL-seq法の開発とその応用を究めた点は高く評価できる。共同研究も盛んに行われているが、本人の研究興味に基づく解析も着実に進められた。特に、分化において組織特異的遺伝子発現に必要な因子とゲノム高次構造を包括的に理解することを試み、単一細胞でエピゲノムダイナミクスを可視化する技術を開発した。これを用いて、骨格筋分化におけるヒストン修飾のダイナミクスとRNAポリメラーゼIIとの関連を解析した。単一細胞レベルでのエピゲノム解析手法の確立は高く評価できる。論文発表や特許出願といった成果発表や、領域内外との共同研究も積極的に行っており、期待を上回る成果をあげている。

本研究の成果により、組織特異的な遺伝子発現に寄与するゲノム構造を取得し分類する解析基盤の構築に成功した。解析対象として本研究では骨格筋分化系を用いているが、開発されたChIL-seq法とその改良技術は様々な分化系で利用できることが実証されてきており、今後、本技術が広く普及していくことが期待される。特に、時間軸を伴う単一細胞エピゲノム解析技術の標準的な手法となることが期待される。

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 人工エクソソームによる長鎖 DNA の細胞導入法の開発

2. 個人研究者名

真栄城 正寿（北海道大学大学院工学研究院 准教授）

3. 事後評価結果

短鎖の核酸と比較して長鎖の核酸は多くの遺伝情報をコードすることができるが、10 kbp 以上の長鎖核酸を細胞に効率良く導入することは未だに困難である。このため、本研究では、長鎖 DNA を高効率で細胞に導入することが可能な人工エクソソームおよび脂質ナノ粒子（ナノ粒子）の開発に取り組んだ。マイクロ流体デバイスを用いることで、粒径などの物性が精密に制御されたナノ粒子の作製を可能にした。また、ナノ粒子による長鎖 DNA の細胞導入における重要因子の解明に取り組み、長鎖 DNA をポリカチオンと複合体化させ、作製した複合体を脂質ナノ粒子に搭載することでトランスフェクション効率を向上できることを見出した。さらに、最適な正電荷を帯びた複合体を搭載したナノ粒子は、市販で最も高性能な遺伝子導入試薬である Lipofectamine 3k の約 4 倍のトランスフェクション効率を達成した。本研究で確立した手法を用い、またさらに改良を進めていくことで、ワクチン開発等創薬・医薬・バイオ産業分野に大きく貢献することが期待される。

現在、さらにサイズの大きなゲノムの細胞への導入技術について取り組むことを検討しており、本領域のネットワークを生かして長鎖 DNA の入手を進め、数百 kbp の DNA の導入を試みている。現在の活動状況から、近い将来それが達成されることが期待される。

本研究者は論文や特許出願といった成果発表、および領域内の共同研究を活発に行っており、さらに着実に独立した研究室を作り上げてきていることは評価できる。今後、本研究者が化学—生物—産業界を繋ぐ重要なかけ橋となることで異分野を融合させ、新しい生命科学や創薬・バイオ産業分野を創出していくことが期待される。

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 副反応を起こさない核酸等価体による長鎖 DNA 合成

2. 個人研究者名

正木 慶昭（東京工業大学生命理工学院 助教）

3. 事後評価結果

本研究では、長鎖 DNA 合成における合成配列の信頼性を大幅に向上させる技術の開発を進め、合成エラーの生成メカニズムを解析するとともに、エラーを回避することが可能な非天然塩基を利用することで塩基置換エラーの中で最も頻度高くみられる GA 置換を最大で 64 分の 1 まで低減することに成功した。長鎖 DNA 合成では、合成配列の信頼性のために、複数回のエラー低減処理と適宜シーケンスによる確認が必要不可欠であり、このことが時間、人的リソース、コストを増大させる。本研究において開発された技術により、これらを大きく軽減でき、かつ正確性の極めて高い DNA 合成法の開発につながることを期待される。また、このような成果により、独自性の高い新たな技術シーズとしての DNA 化学合成法を開発したことで、研究目的を期待以上達成したと判断する。

本研究を進める上で鍵となったコンセプトは、(1)ゲノム合成では鋳型 DNA はごくわずかで良い（収量は問題とならない）、(2)ゲノム合成において問題となる副生成物は変異・挿入・欠失を含むオリゴヌクレオチドのみである、(3)ゲノム合成では増幅反応を利用するため鋳型 DNA は DNA でなくてもよい、の 3 点である。ゲノム合成では、DNA ポリメラーゼを使用した複製、増幅過程が必須であり、元となる化学合成した鋳型 DNA は最終生成物に含まれない。このため、化学合成時における副反応を原理的に回避する非天然塩基を利用した化学合成法の開発を行った。研究の遂行においては、領域内外の研究者との共同研究により、活性化剤内包型固相による DNA 合成での変異・挿入・欠失の評価、また、DNA ポリメラーゼによる正確性向上の可能性を追求するために、変異ポリメラーゼライブラリーの評価も進めた。

本研究では、化学合成による極微量な合成エラーによる影響の網羅的な定量を可能にし、合成エラーの低減のための新たな合成技術を世界に先駆けて実現してきた。多くの研究者が長鎖 DNA 合成を利用するためには、この成果を社会実装することが不可欠であるが、これに関しても現在進められている。論文発表も着実に進められており、本研究者は、今後 DNA 化学合成分野の中核となっていくことが期待される。

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 原始生命の進化に学ぶゲノム拡張基盤の構築

2. 個人研究者名

水内 良（東京大学大学院総合文化研究科 特任助教）

3. 事後評価結果

本研究では、原始生命の進化に倣うことで、RNA ゲノムを進化によって拡張していく基盤技術の開発を進め、人工細胞内で異なる遺伝子をコードした RNA 断片を集積し、効率良く複製・機能する長鎖 RNA ゲノム（2本の RNA 鎖が一本化した長鎖 RNA ゲノム）を自発的に進化させることに成功した。これは RNA ゲノム拡張の基盤技術となり、また「原始染色体の起源」という生命の起源における重要な問題の実証になった。さらに、真に自発的に複雑化する人工細胞の構築に向けて、1種類の RNA 断片から複数の RNA 断片を進化させることにも成功した。これらの成果は、様々な遺伝子をコードした RNA と組み合わせればより大規模にゲノムを拡張できる可能性を示し、さらにこれらの新しい知見を組み合わせることで、新機能（新規遺伝子）の出現原理に迫ることができる可能性がある。また、細胞間の相互作用を介してゲノム複製する複雑な人工細胞（人工多細胞）が構築できる可能性もある。すでに期待以上の成果が出ており、研究目的を達成したと判断できる。

本研究領域内の研究者との連携も強力に進め、その成果として、(1) 再構成型無細胞翻訳系用いたタンパク質の進化工学手法の効率化、(2) 液-液相分離によって形成される液滴を用いた RNA ゲノム複製のための新規人工細胞の構築、そして、(3) RNA 複製酵素から DNA 複製酵素への進化可能性の実証等に成功している。その上、それぞれ既に論文として発表していることは評価できる。

本研究における成果の大半は本研究者が筆頭・責任著者として出版しており、既に十分、独立した研究者としての重要な資質を示している。今後、独立研究室を立ち上げ、関連の研究分野で世界的にも活躍していくことが期待される。

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： ゲノム複製・組換えにおける DNA 高次構造制御機構の解明

2. 個人研究者名

村山 泰斗（情報・システム研究機構国立遺伝学研究所 准教授）

3. 事後評価結果

本研究では、独自の *in vitro* 系を用いて Smc5/6 のメカニズムに迫った。また、コヒーシンの topological loading について理解を進めた。SMC 複合体は、巨大なリング構造をとる ATPase 複合体であり、染色体の 3 次元構造の形成に関与する主要因子である。SMC 複合体である Smc5/6 複合体は、DNA の絡まりを解消する酵素群と類似して、DNA 複製や修復に機能することが報告されており、複製過程で生じる DNA の高次構造の制御を介してゲノム DNA の安定性に機能すると考えられているが、Smc5/6 複合体が、SMC タンパク質としてどのような DNA 結合や構造制御活性を持ち、それがどのように発揮されて、正確かつ効率的なゲノム複製に機能するのかは不明であった。本研究では、酵母の計 25 種の複製タンパク質・複合体を精製し、酵母の DNA 複製の試験管内再構成系を再構成した。その結果、Smc5/6 複合体は、DNA 複製において DNA コイル構造が蓄積する終結段階において阻害的に働くことを明らかにした。これは従来の仮説に反するものであり、おそらく、近い将来教科書に掲載される大きな成果である。関連する組換えタンパク質を精製する等、丁寧かつ堅実な生化学実験が行われており、本成果の論文発表が待たれる。

生化学者としての自らの研究スタイルをぶれずに中心に据え、骨太な研究を展開した点は高く評価できる。また、DNA 複製におけるヒストンリサイクルの分子機構の解明や、転写を促進するクロマチン 3 次元構造の機能構造解析に関する領域内共同研究も進められており、それぞれ重要な成果が出ている。このように、自身のテーマに留まらず、領域内の共同研究により視野が広がっており、さきがけ参画の意義が感じられる。