

細胞を使わない次世代ゲノム合成法

RA-RCR: The Next Generation "Cell-Free" System for Genome Synthesis

● 要素技術RAとRCRを開発 ⇒ 2ステップの等温反応のみにより簡便な長鎖DNA合成が可能

【技術の概要】

近年の、ゲノム情報の蓄積、DNA合成のコストダウン、ゲノム編集の大規模化等の急激な進展に伴う新たな潮流として、ゲノムスケールの長鎖DNA合成が挙げられる。しかしながら、複製可能なDNAサイズ・配列、複製エラー、操作性等の制約により、ゲノムレベルのバイオエンジニアリングを効率的に実行するのは困難であった。我々は、50種を超えるDNA断片を連結可能な要素技術であるRA(Recombination Assembly)および200kbを超える長鎖環状DNAを正確かつ高速で増幅可能な要素技術であるRCR(Replication Cycle Reaction)を開発した。これらの要素技術の組み合わせにより、無細胞系で簡便にゲノムスケール長鎖DNAの合成可能な次世代型合成生物学ツールを提供する。

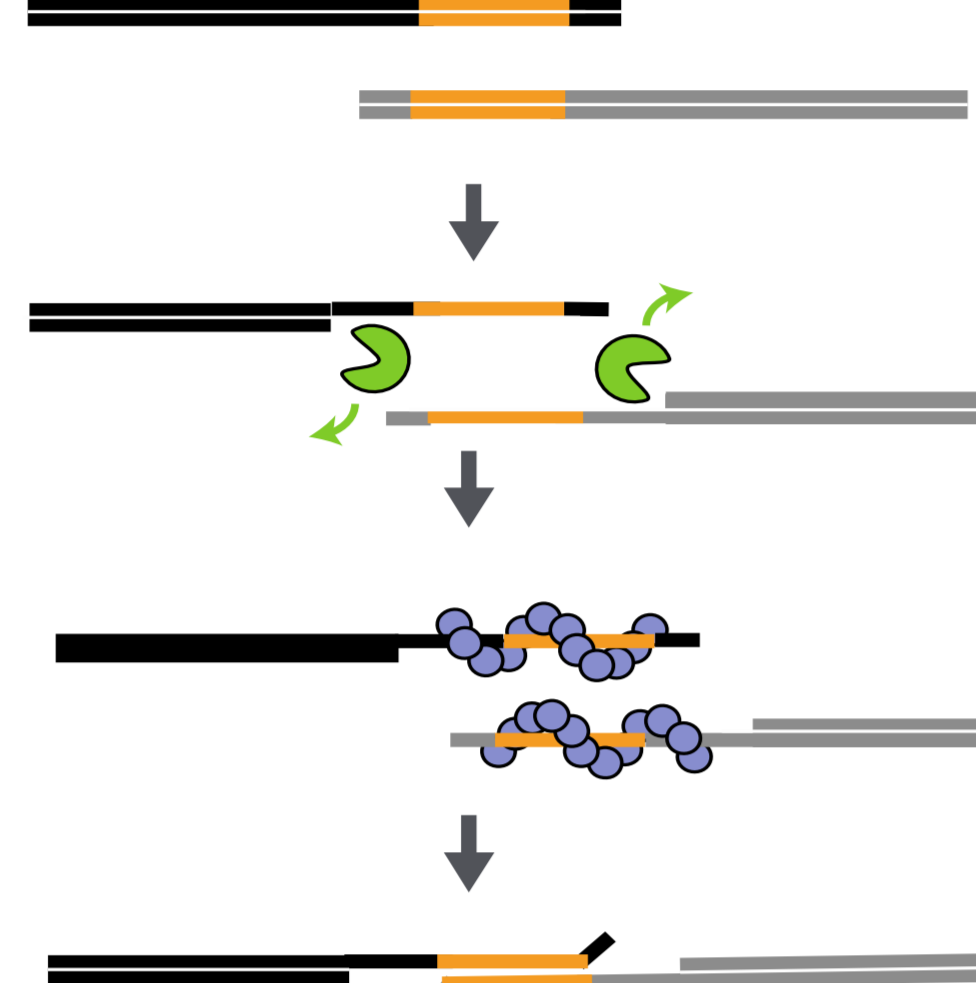
註)本技術の詳細については右記URLをご参照ください

<http://www.jst.go.jp/chizai/news/biojapan2018.html>

【RA: Recombination Assembly】

相同組換えを利用した酵素的な連結

30-42°C, 30 min



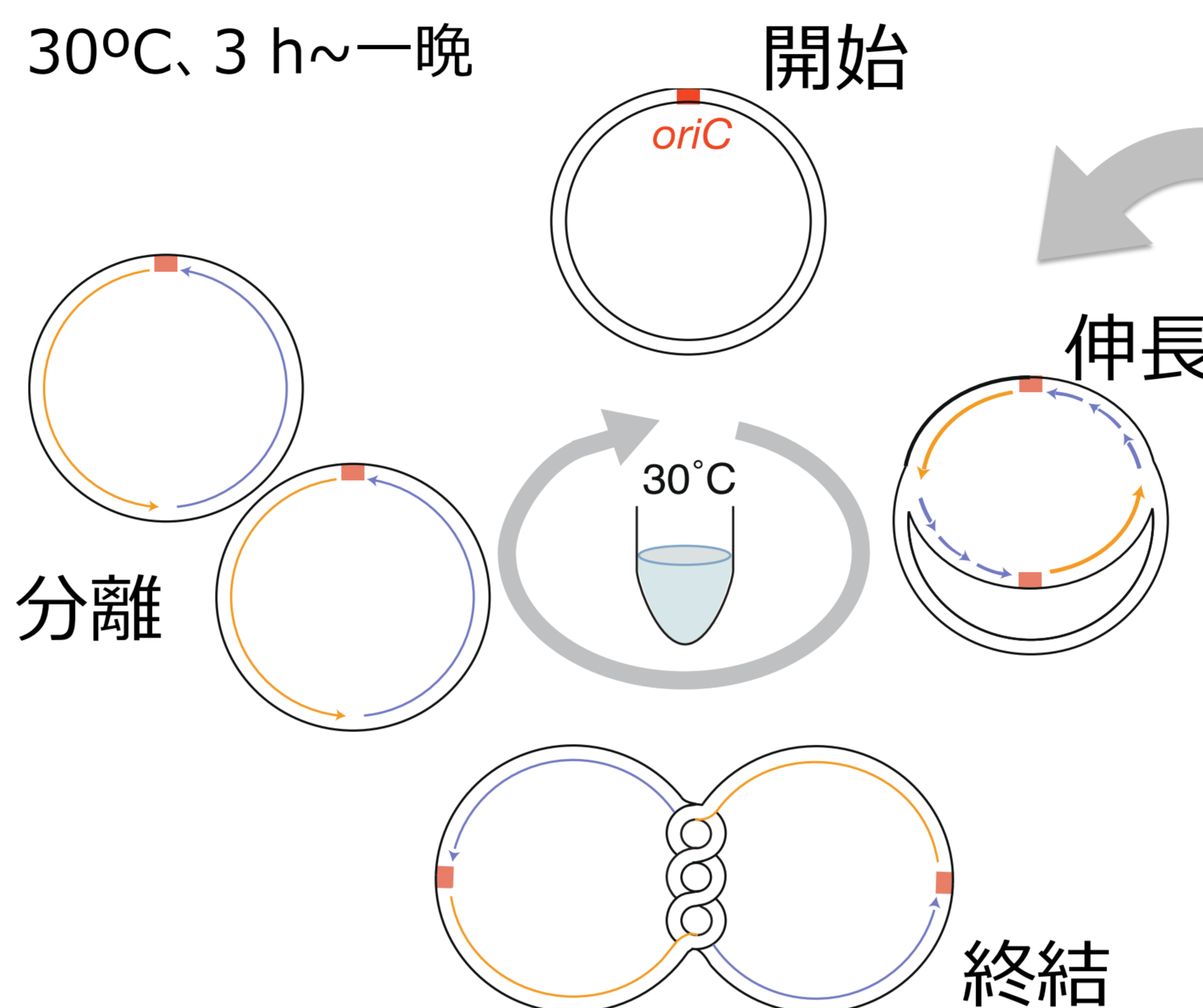
20~60bpの「のりしろ」で連結 (配列は自由)

- ・50断片までの同時連結を確認
- ・長鎖(>200 kb)の連結を確認

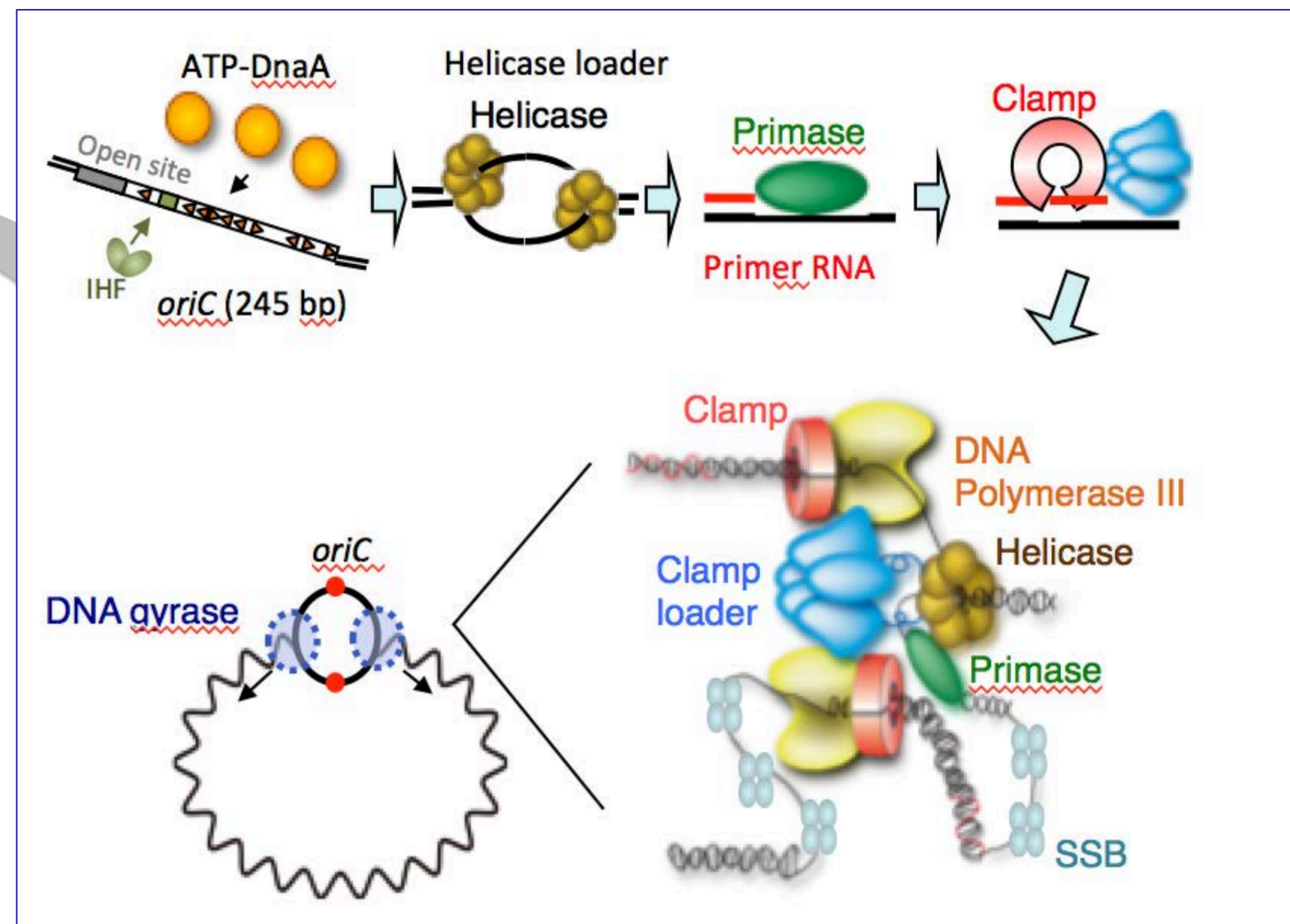
【RCR: Replication Cycle Reaction】

大腸菌染色体複製サイクルの繰り返し

30°C, 3 h~一晩

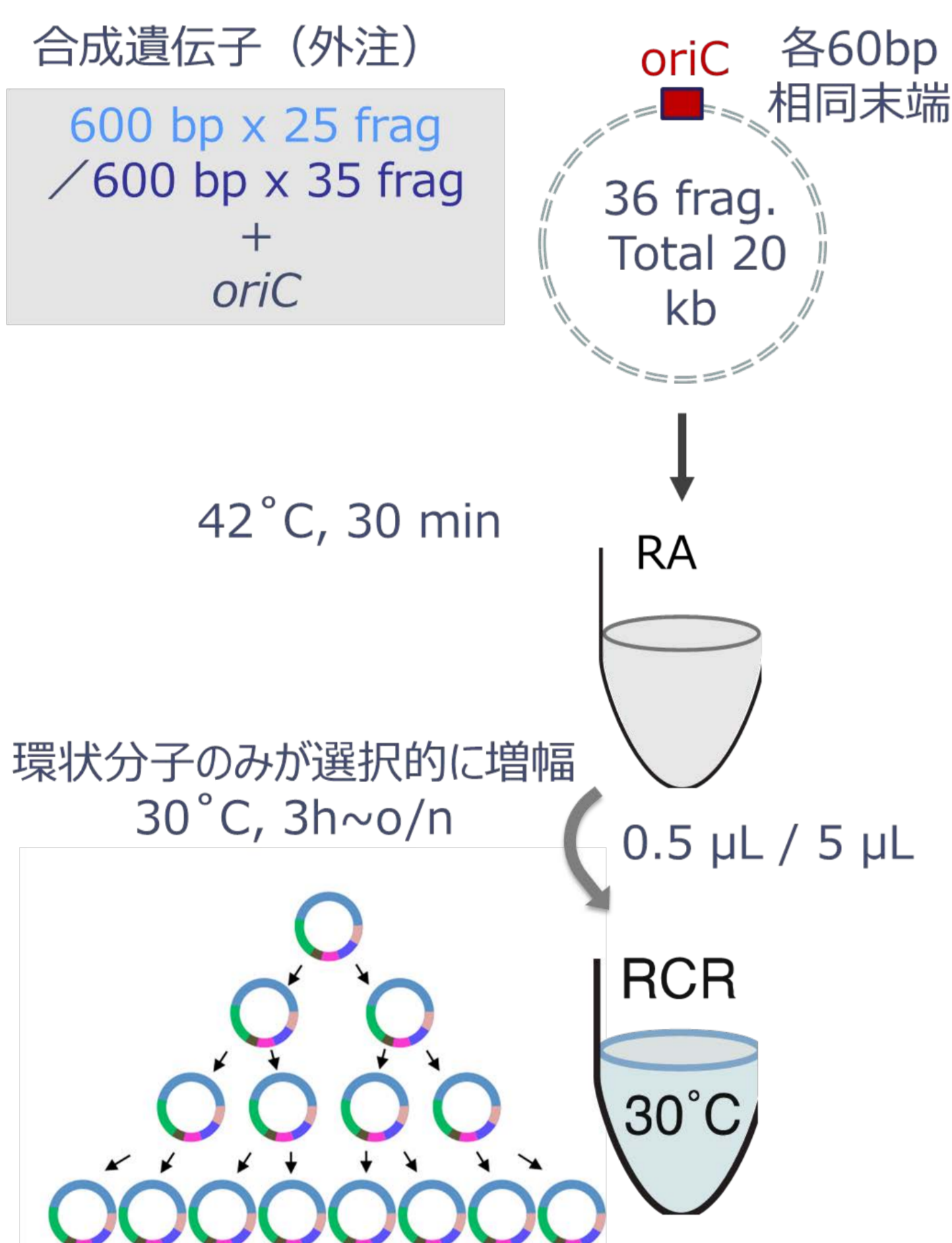


25種類のタンパク質から構成

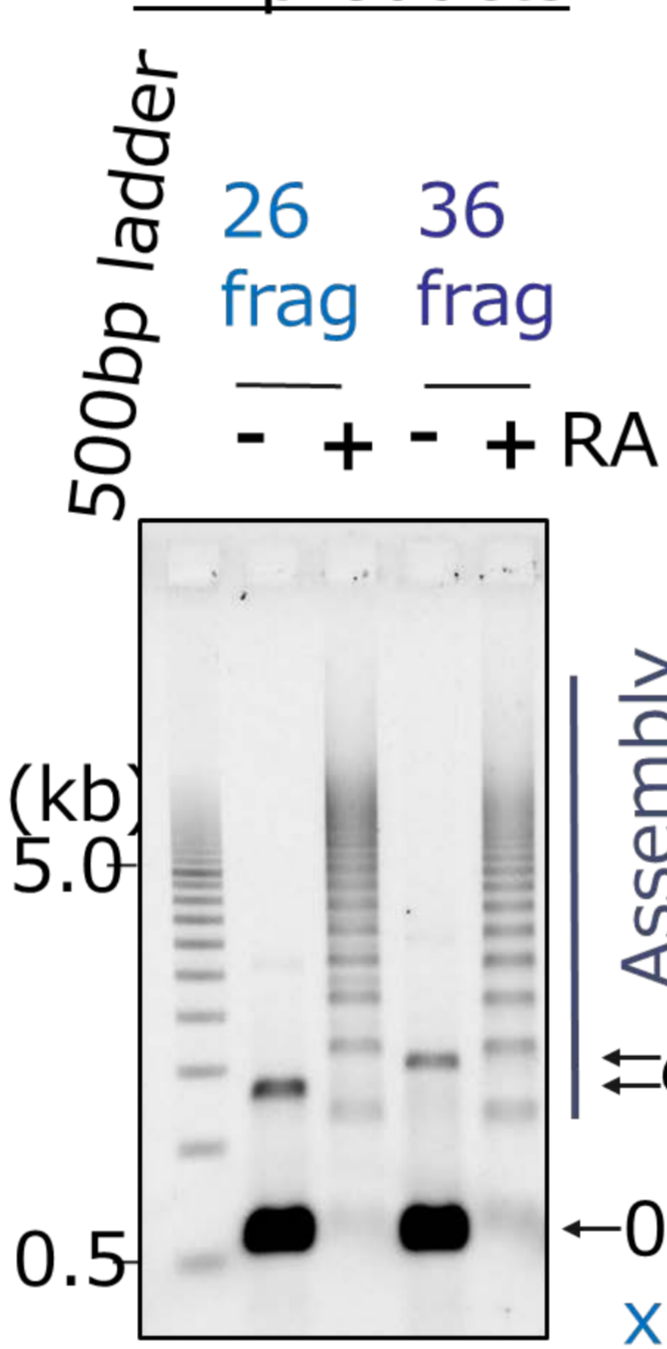


- ・環状DNA分子が指数的に増幅 (5分で2倍に)

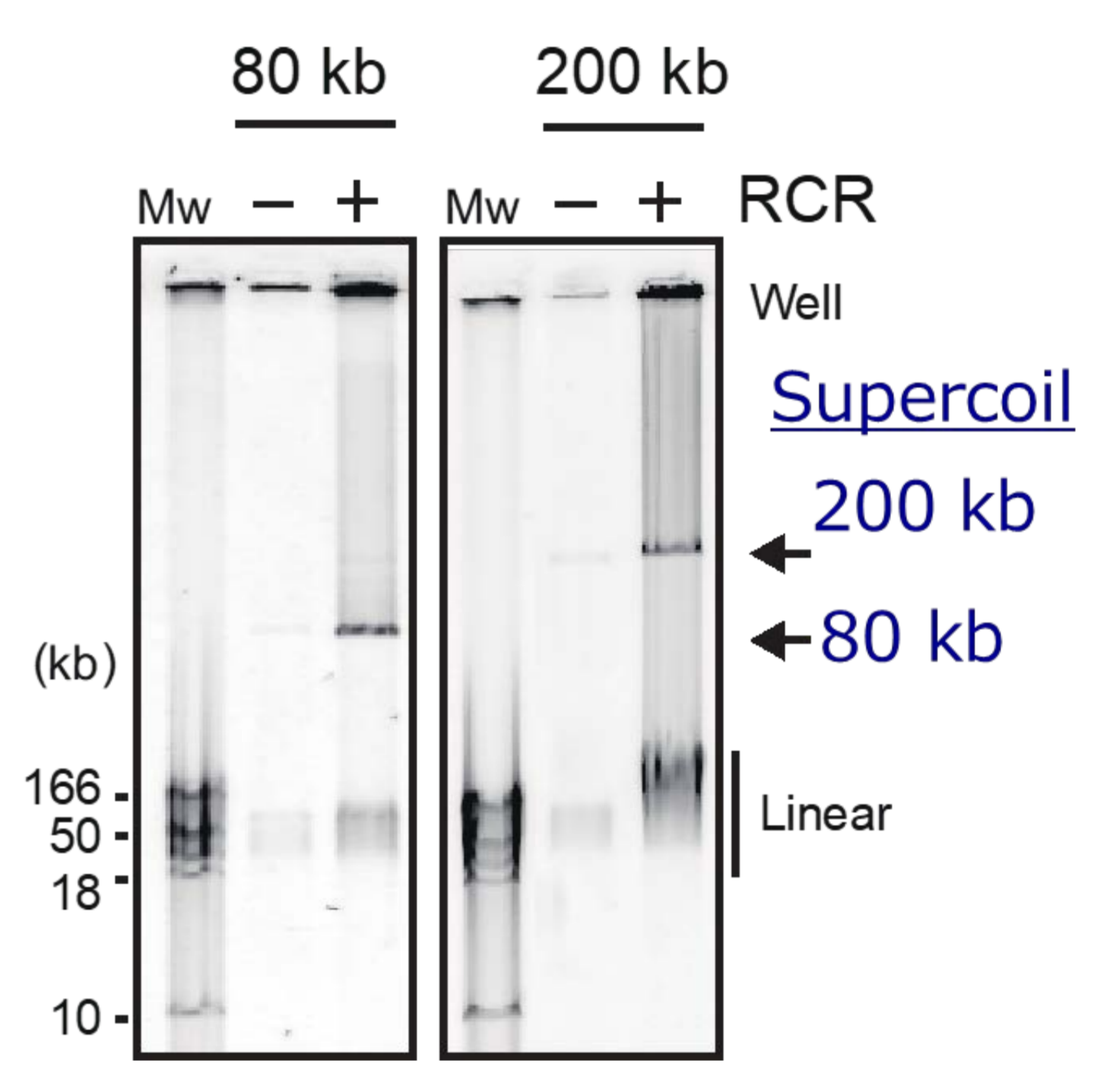
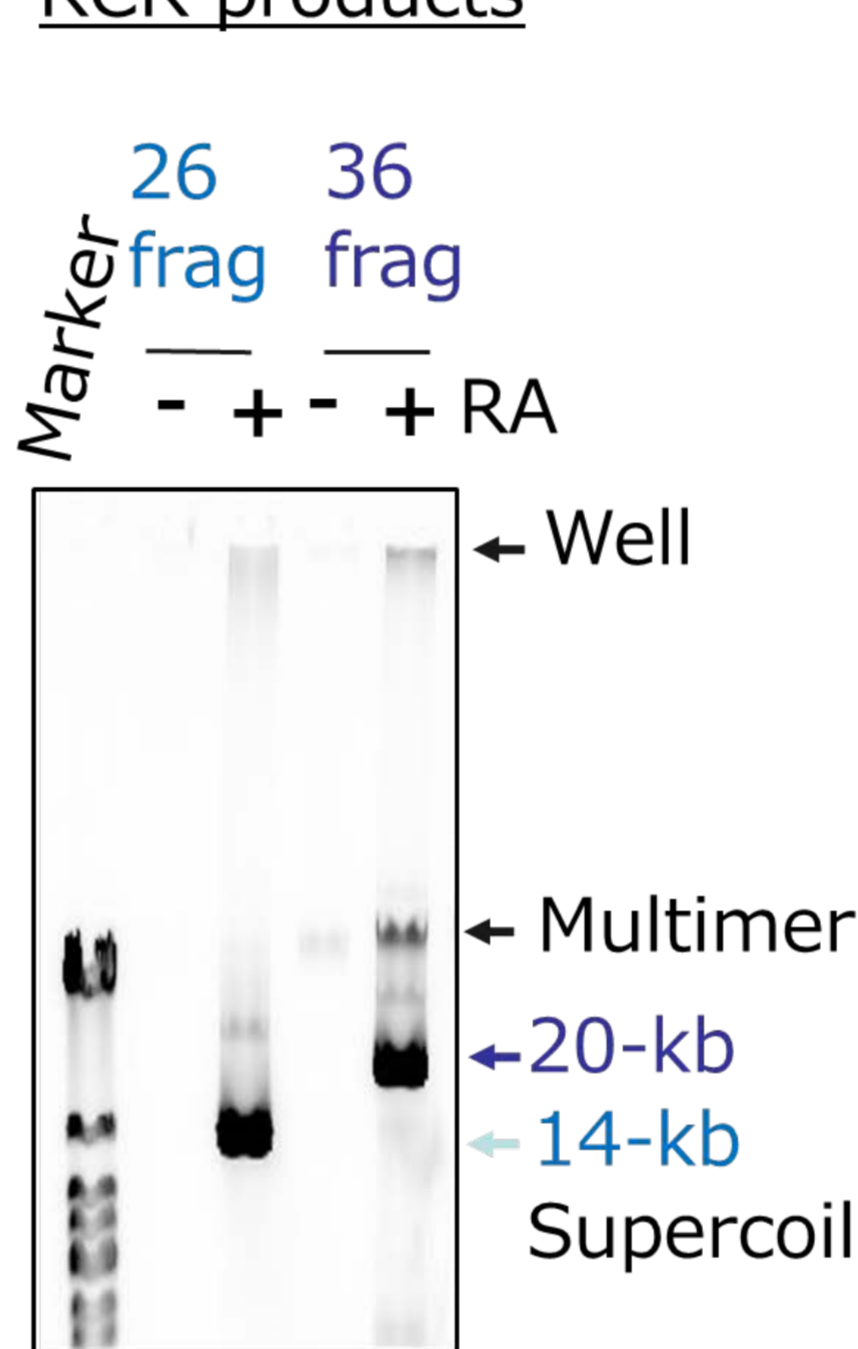
【RA-RCR】



RA products



RCR products



- ・GCリッチな[70%]長鎖DNAの増幅も確認
- ・非常に高い正確性: 10^{-8} エラー / 塩基 / サイクル
- ・2ステップの酵素反応のみ。必要なのは、環状であること、複製起点oriC(0.3 kb)を持つこと
- ・わずか1分子の環状DNAから増幅が可能
- ・長鎖DNA(>200 kb)が環状分子のままふえる

【競合有意性】

	PCR法	細胞を使ったDNAクローニング (大腸菌、酵母、枯草菌)	本技術(RCR法)
DNAサイズ	数 kb (遺伝子レベル)	数百 kb (ゲノムレベルも可能)	数百 kb (ゲノムレベルも可能)
複製エラー	$10^{-4} - 10^{-6}$ エラー / 塩基	10^{-10} エラー / 塩基	10^{-8} エラー / 塩基
操作	熱サイクル装置が必要	時間(数日)と手間と培養技術・設備が必要 (自動化が困難)	反応液に加えて等温で温めるだけ (自動化可能)
バイオセーフティー	細胞は使わない	遺伝子組み換え実験(カルタヘナ法)	細胞は使わない
増幅困難性	GCリッチな配列、リピート配列などは困難	細胞毒性のため増やせない配列 組換えによるリピートの脱落	DNA配列は選ばない セルフリーなので、毒性や組換えも関係ない
	増やせなかったり、エラーや欠失発生時のトラブルシューティングに、手間がかかる		

【想定される用途】

● キット試薬、長鎖DNA製造(自社・受託)、デザインされた配列情報に基づく人工プラスミド、人工染色体、人工ゲノム、のセルフリー合成

【関連特許】

- 環状DNAの増幅方法(WO2016080424)
- DNAの産生方法及びDNA断片連結用キット(未公開特許出願)

代表発明者:
末次 正幸
立教大学 理学部
生命理学科 准教授

連絡先 : JST知的財産マネジメント推進部
ライセンス担当
phone: +81-3-5214-8486
e-mail: license@jst.go.jp

Department of Intellectual Property Management