

プログラム名：豊かで安全な社会と新しいバイオものづくりを  
実現する人工細胞リアクタ

PM名：野地 博行

プロジェクト名：「ふえる」人工細胞デバイス

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 (成 果)

平成28年度

研究開発課題名：

人工ゲノムの試験管内合成法の開発

研究開発機関名：

学校法人 立教学院

研究開発責任者

末次正幸

## I 当該年度における計画と成果

### 1. 当該年度の担当研究開発課題の目標と計画

デザインされた人工細胞の作出のためには、細胞の設計図であるゲノムを人工合成する必要がある。これまでのところゲノム合成法として生物宿主を利用した手法が知られているが、膨大なコストと手間のかかるものである。本研究開発課題では、独自の「複製サイクル再構成による長鎖環状 DNA 増幅技術」を基盤にして、人工ゲノムを試験管内の酵素反応のみにより、簡便に合成する技術の開発を行うとともに、合成したゲノムを起動させるための技術開発も進める。そのため H28 年度は以下の研究項目を実施する。

- ① より長大な環状 DNA (500kb) を安定に増幅するための技術改良を進める。このため、ゲノムレベルの長鎖環状 DNA を細胞外で安定に操作するための技術開発も併せて行う。
- ② 多数の DNA 断片を一度に連結環状化できるような反応を開発する。このためすでに構築を、独自の「組換え修復再構成による DNA 連結法」の改良を進める。
- ③ 異種環状 DNA に *oriC* (増幅法での複製開始に必要な DNA 配列) を挿入し、複製サイクル再構成系で増幅する技術を開発する。*oriC* 挿入法として他に、トランスポゾン化してとばす手法や、CRISPR-Cas9 のような配列特異的切断技術を利用した手法などのアイデアについて検討する。
- ④ 人工ゲノムを起動させるための技術を検討する。
- ⑤ 社会実装化に向けた実施例の収集のため、環状 DNA 増幅キットの大量製造を行う。

### 2. 当該年度の担当研究開発課題の進捗状況と成果

#### 2-1 進捗状況

- ① 【増幅法の技術改良】長鎖 DNA の安定増幅に効果のあるタンパク質、キレート剤、反応条件等を複数見出し、計画通りに進んでいる。
- ② 【連結法の開発】独自に連結法を構築している最中に、先行特許調査により、類似因子を用いた実施例が見つかった。このため先行実施例よりも「圧倒的に多数の断片を連結できる」という特徴を付加するための検討を進めているところである。
- ③ 【*oriC* 導入法の開発】トランスポゾンにより簡便に環状 DNA に *oriC* を導入する方法を開発した。
- ④ 【人工ゲノム起動技術】野地プログラムの他課題と連携して進めるとともに、独自にも長大 DNA 導入のための L-form 大腸菌の利用などの検討を進めている。
- ⑤ 【増幅キット大量製造】研究試薬メーカーに委託したタンパク質製造に関して、いくつかの精製ステップで問題が発生し、一部のタンパク質の製造が滞っている。

#### 2-2 成果

- ① 【増幅法の技術改良】長鎖 DNA の安定増幅に効果のあるタンパク質、キレート剤、反応条件等を複数見

出し、これまでの増幅例としては 200kb DNA が最長であったところ、本年度に 325kb DNA の増幅まで達成することができた。

- ② **【連結法の開発】** 先行競合技術で連結できるとされている DNA 断片数は 6 断片程度である。我々は、連結法の効率化のための新規因子、反応条件を詳細に検討し、26 断片という、競合技術を凌駕する数の DNA 断片を同時連結する技術開発に成功した。
- ③ **【oriCを導入法の開発】** *oriC* (300bp) をトランスポゾン化して導入することで、もともと *oriC* を持たないような異種環状 DNA を簡便に増幅鑄型とする技術を開発した。またこの技術を用いて好熱菌プラスミドのような GC リッチ (GC 含有率 70%) な DNA も我々の増幅法で増幅できることを見出した。さらに導入する *oriC* の両末端に複製終結配列 *ter* を付加することで、増幅中に生じる副次的な多量体産物の産生をうまく抑えることができることを見出した。これらの成果はまとめて特許出願した。

### 2-3 新たな課題など

- i. **【500kb 長鎖 DNA の試験管内調製】** 従来技術と比較して、より長鎖の DNA 増幅を達成したが、当面の目標である 500kb の長鎖 DNA の増幅にはまだ至っていない。試行錯誤したもの、どうやら 500 kb は大腸菌細胞内で調製することができないようであり (従来の 200kb DNA であれば細胞内調製可能)、連結法を用いて複数の長鎖断片から試験管内で構築する必要があると考えている。よって、試験管内で 500 kb 長鎖 DNA 断片を連結法により調製する技術開発に力を入れる必要がある。
- ii. **【増幅キットの調製ロット間でのバラツキ】** 増幅キットは 1 4 種ある精製タンパク質を混ぜ合わせて調製している。これは、研究室で 2 ヶ月に一回程度大量調製ストックしているものであるが、キット調製の際に、精製タンパク質のロットが変わり、その度に増幅能力にバラツキが出る点が問題となってきた。精製タンパク質の品質試験の方法、より安定性の高い精製法の構築など、増幅キットの安定生産に向けた管理の仕組みの構築が早急に必要である。

### 3. アウトリーチ活動報告

なし。