

末次 正幸

立教大学理学部  
准教授

## 人工ゲノムのセルフフリー On chip 合成とその起動

### §1. 研究成果の概要

マイコプラズマや酵母などにおいて、ゲノムの人工合成研究が進められているが、これまでのところゲノム合成は、莫大な手間と時間とコストのかかる技術であり、一般的に実施できる実験ではない。ゲノムスケールの長鎖 DNA を合成するためには、短い DNA 断片を連結していく必要があり、例えば 1 Mb のマイコプラズマゲノムを合成するためには 1 kb の合成 DNA 断片を 1,000 断片連結して環状にする必要がある。この連結は、大腸菌や酵母といった生物学的宿主を用いた DNA クローニングに依存しており、手間と時間がかかるというだけでなく、毒性のある配列はクローニングできないなど、合成可能な配列が制限される点も問題である。

本研究では、独自のセルフフリーの DNA 連結・長鎖 DNA 増幅技術を利用し、生物学的クローニングによらないゲノム合成技術の開発を進めている(末次グループ)。さらに、超微量、超並列な On chip 上でのゲノム合成を可能とするため、セルフフリーゲノム合成技術をマイクロリアクターに実装するための研究を行っている(野地グループ)。また、技術の実証のため、マイコプラズマをモデルとしたセルフフリーゲノム合成(末次グループ)と合成ゲノムの細胞内への移植(野地グループ)のための技術開発を進めている。

(末次グループ)

独自に構築した DNA 連結法においては、50 種類の合成 DNA 断片を一回の反応で同時に連結し約 30 kb の環状ミニゲノムを構築することに成功している。より巨大な DNA を構築する場合には、DNA が切れやすいなどの問題を解決する必要がある。2018 年度は長鎖 DNA 同士を 7 断片連結し、より巨大な 100 kb を超える長鎖環状ミニゲノムをセルフフリーで構築するための条件を決定した。

セルフフリー合成した 30 kb の人工環状ミニゲノムは大腸菌ゲノムの必須遺伝子クラスター(DCW)をコードしている。そこで人工環状ミニゲノムが細胞内で起動し、機能するかを検討したところ、期待通りに機能し、ゲノム上の天然 DCW 領域を欠失させた場合には、薬剤耐性マーカーを入れずとも安定に DCW 保有環状ミニゲノムとして保持されることがわかった。

(野地グループ)

本年度はゲノム移植法の確立と微小液滴内でのゲノムレベル DNA の増幅に取り組んだ。ゲノム移植に関しては米国クレイグベンター研究所(JCVI)で開発された *Mycoplasma* の全ゲノム交換法で、世界で唯一の微生物ゲノムをまるごと交換できる方法である。本法を活用して作成したゲノムを起動するべく、ゲノム移植法の立ち上げを行った。当初、ゲノム交換は全くうまくいかなかったが、JCVI と全く同じメーカーの試薬をそろえたところうまくいくようになった。この方法が非常にデリケートな実験であることがわかった。また、ゲノム合成を効率化するには微小液滴中で使用する試薬や DNA の量を極限まで減らした実験系内で行う方がよい。そのため、私たちは微小液滴内でゲノムレベル DNA を増幅する方法の開発に取り組んだ。増幅法は末次グループで開発された RCR 法を採用した。実験の結果、1 分子のゲノムレベル DNA からの増幅を確認できた。これは、将来的に微小液滴内で DNA 断片を連結し 1 分子のゲノムが作成できればよいことを示している。

## §2. 研究実施体制

### (1) 末次グループ(研究機関別)

- ① 研究代表者:末次 正幸 (立教大学理学部 准教授)
- ② 研究項目
  - ・人工ゲノムのセルフリー合成とその起動

### (2) 野地グループ(研究機関別)

- ① 主たる共同研究者:野地 博行 (東京大学 工学系研究科応用化学専攻 教授)
- ② 研究項目
  - ・On chip DNA 合成技術の確立
  - ・合成マイクロプラズマの開発