

末次 正幸

立教学院 立教大学 理学部
准教授

人工ゲノムのセルフリー-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。

2019 年度は、引き続き長鎖環状 DNA の RA 連結、RCR 増幅法の改善を進めた。その結果、ゲノム上の特定の長鎖 DNA 領域(100 kb レベル)について、その両端を CRISPR-Cas9 で切断し、生じた長鎖断片を RA-RCR 連結増幅法により選択的に環状 DNA 分子として増幅する新技術を構築した。この技術はリピート病などの遺伝子診断などにも応用可能なものとして期待される。

また、大腸菌内で組換えを利用して 1Mb スケールの長鎖環状 DNA を構築する新技術を開発、得られた 1Mb 環状 DNA を試験管内に取り出し、RCR 増幅法によって環状 DNA 分子としてセルフリ一増幅することにも成功した(図1:論文受理済、次年度に成果論文として記載予定)

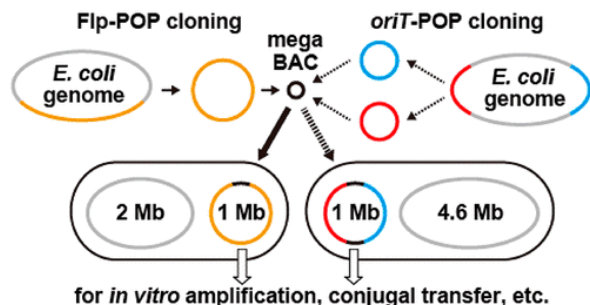


図1 新規長鎖 DNA (1Mb) クローニング技術と
得られた 1Mb DNA の試験管内増幅

(野地[田端]グループ)

本年度は、デジタル RCR 法の最適化と、デジタル RCR 後に無細胞タンパク質合成を連続的に行う実験系の構築を目指した。デジタル RCR 法はリアルタイムでの DNA 増幅の観察に成功し、反応条件が十分最適化出来ていることがわかった。また、デジタル RCR 後にバッファー交換を連続的に行うことで、無細胞タンパク質合成をそのまま実施することにも成功した。これは、on chip cloning のみならず、on chip screening にまでシステムを拡張出来ることを示している。さらに、on chip RA 法の開発も開始した。一方、RCR 法を用いた mycoplasma ゲノム (0.5Mb) の *in vitro* 増幅にも成功し、そのゲノムの起動にも成功している。この成果は、生物を介さずに調整されたゲノムでも起動出来ることを示す初めての結果である。また、このゲノムの *in vitro* 編集システムの構築にも取り組んだ。最終的には *in vitro* でゲノムの構築、編集、増幅までを行い、起動することが出来るようになると考えている。

§ 2. 研究実施体制

(1) 末次グループ

- 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[田端]グループ

- 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 cloning system
 - ・マイコプラズマゲノム移植技術の構築