

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
2018 年度採択研究代表者

2021 年度 年次報告書

大窪 章寛

東京工業大学生命理工学院
准教授

ゲノム完全化学合成を指向した革新的フロー合成法の開発

§ 1. 研究成果の概要

本研究の目的は、三百万塩基対程度の人工ラン藻(シアノバクテリア)ゲノム DNA を正確かつ高効率で化学合成する手法の確立である。

これまでの DNA 合成は、「1. 縮合効率が低い」「2. デプリネーションをおこしやすく合成純度が低い」「3. アシル型保護基の脱保護に長時間を要する」「4. 精製作業が煩雑である」などの問題点を含んでいた。

本研究は、我々がこれまでに世界に先駆けて開発してきた「多種の DNA オリゴマーを高効率かつ大量に合成できる革新的な手法」を駆使し、従来の DNA 合成が抱えていた問題点の克服し、シアノバクテリアのゲノム DNA の完全化学合成目指している。

2021 年度までに、活性化剤内包型の固相担体を用いることで 100 量体を超えるオリゴヌクレオチドの合成においても、99.8%以上の鎖伸長効率を達成することができ、当初掲げた「鎖伸長効率の向上」に成功している。また、核酸合成を 5' から 3' の方向で合成し、キャップ化剤にホスホロアミダイト化合物を用いることで、キャップ化効率を大幅に向上できるだけでなく、キャップ化されたオリゴヌクレオチドが増幅・連結反応の基質にならないことを明らかにした。

一方で、3'-チオリン酸結合を有する修飾オリゴヌクレオチドは増幅・連結反応の基質となり、未修飾の DNA 二重鎖が効率よく増幅されることも明らかにすることができた。さらに、この増幅反応にエキソヌクレアーゼ III を加えたところ、チオリン酸結合をもつオリゴヌクレオチドは、未修飾のオリゴヌクレオチドの 50 倍もの増幅効率を示すことが明らかになった。現在では、この知見を基盤とし、エキソヌクレアーゼ III を使用した多種類のオリゴヌクレオチドの同時かつ高効率精製に応用している。

これら基盤技術と独自に開発したマスクレス露光装置搭載核酸合成装置を用いて、目的のシアノバクテリアゲノムの合成を推進している。

§ 2. 研究実施体制

(1) 大窪グループ

① 研究代表者: 大窪 章寛 (東京工業大学生命理工学院 准教授)

② 研究項目

- ・世界最高峰の長鎖 DNA 合成技術の確立
- ・ゲノム DNA 合成を指向した長鎖 DNA 合成フローシステムの構築
- ・特定の色素合成遺伝子およびその関連遺伝子の導入による光合成効率の評価

【代表的な原著論文情報】

- 1) Akihiro Ohkubo, Kousuke Muto, Rintaro Watanabe, Daisuke Ogata, “Chemical synthesis of modified oligonucleotides containing 5’-amino-5’-deoxy-5’-hydroxymethylthymidine residues.” **Current Protocols**, *1*, e70, 2021.
- 2) Yu Miyazaki, Aoma Yoshida, Teruyuki Okaniwa, Kouichiro Miyauchi, Akihiro Ohkubo, “Oligonucleotide Synthesis on Porous Glass Resins Containing Activators” **Current Protocols**, *in press*, 2022. DOI: 10.1021/acs.orglett.2c01348