

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「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」
研究課題「人工ゲノムのセルフリーOn chip 合成と
その起動」

研究終了報告書

研究期間 2018年10月～2025年03月

研究代表者: 末次 正幸
(立教大学 大学院理学研究科 教授)

§ 1 研究実施の概要

(1)実施概要

本研究では、独自のセルフリーの DNA 連結・長鎖 DNA 増幅技術を利用した**ゲノム合成技術**の開発を行った(末次グループ)。また、On chip ゲノム合成実現のため、セルフリー技術のマイクロチャンバーへの実装も進めた(田端グループ)。技術実証のため、実際にマイコプラズマ 0.5Mb ミニマムゲノムおよび大腸菌 1.7Mb カーネルゲノム(独自デザインの最小ゲノム)のセルフリー合成を進めるとともに、セルフリー合成した人工ゲノムをマイコプラズマ/大腸菌に移植する技術(**ゲノム移植技術**)および大腸菌天然ゲノムを除去し(ゾンビ化)、人工ゲノムと入れ替えるための技術開発も進めた。なお 1 年の延長支援を受け人工合成した 1.7Mb カーネルゲノムで増殖可能な合成大腸菌の作成を実施した。

基本的に RCR という独自性の高い環状 DNA 増幅技術をベースに構想と試行錯誤を展開していったこともあり、世界でも類をみないユニークな新技術と今後につながる成果を達成できたと自負する。

(末次グループ)

1. 低コストのオリゴプールを想定した微量かつ多種類オリゴを同時アセンブルしダイレクトにプラスミド構築する Oligo-assembly RCR(OaR) 技術(特許出願済)
2. オリゴに内在する配列エラーを特異的に検出し除去するエラー除去技術(特許出願済)
3. DNA 断片同士を連結していき 0.4Mb までの長鎖環状 DNA をセルフリー合成する技術
4. 低温増幅能、AT リッチ配列増幅能を有し、増幅スピードもアップした進化型 oriC 配列を獲得(特許出願済)
5. 大腸菌染色体を 1Mb ごとに3分割化した株を構築(Yoneji *et al.*, 2021 NAR)
6. 大腸菌分断染色体(1Mb)を精製する技術、増幅する技術(Mukai *et al.*, 2020 ACS Synth Biol)、スーパーコイル化する技術(SCR)および別の大腸菌株に移植するゲノム移植技術(Fujita *et al.*, 2022 ACS Synth Biol)

(田端グループ)

7. C.Venter 研のマイコプラズマのゲノム移植技術の導入
8. C.Venter 研の合成したマイコプラズマ Syn3.0 ゲノムを in vitro で編集および増幅する技術
9. 末次グループの開発した DNA 連結や増幅反応をマイクロチャンバー内で行う技術
10. ウイルスゲノム再構成と 1 粒子解析

(車グループ)

9. 酢酸と炭酸水素塩からリン脂質を合成する人工細胞システムを構築した (Commun Biol 2022)
10. 簡便に短時間で人工細胞を作るためのプロトコルを編み出した (Front Bioeng Biotech 2022)
11. セルフリー合成したタンパク質を脂質膜に局在させるペプチド配列を見出した (特許出願予定)

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 染色体3分割大腸菌株(末次 G)

大腸菌ゲノム(3 Mb の 1 つの環状染色体 DNA)を細胞内において部位特異的組み換えによって分割する技術を開発。各 1 Mb からなる 3 つのサブ染色体に分割しても、大腸菌は比較的活発に増殖しうることを見出した。

2. タンパク質熱凝集による DNA アニーリング促進の発見(末次 G)

概要:特定のタンパク質において、熱凝集を通じて低濃度オリゴ DNA のアニーリングを促進するという全く新しい現象を見出した。

3. リン脂質を合成する人工細胞の構築(車 G)

概要:脂肪酸合成系とリン脂質合成酵素を合成するセルフリー系を統合することで、試験管内でリン脂質を合成することに成功した。このシステムを脂質膜小胞の内部に封入することで、膜内部でリン脂質を合成する人工細胞の構築に成功した。人工細胞膜を構成するリン脂質の約 10%を内部合成することが可能である。

4. 大腸菌 1.7 Mb カーネルゲノム人工合成とその起動による合成大腸菌の作成(末次 G)

概要:独自のセルフリー長鎖 DNA 合成技術を利用し 1.7 Mb 最小ゲノム(カーネルゲノム)の人工合成を達成した。一旦、カーネルゲノムと天然ゲノムの共存細胞を作成し、次に制限酵素 AvrII 発現により天然ゲノムのみを除去する技術(ゾンビ化技術)を開発。その結果、カーネルゲノム単独では大腸菌コロニー形成を導けないことが判明、独自のゲノムシャッフリング技術により、トラブルシューティングを実施した。そしてカーネルゲノム設計を微調整していき、ゲノムの 9 割以上をカーネルゲノムに置換した大腸菌株(コロニー形成可能)を得るまでに至った。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. オリゴ連結&エラー除去技術(末次 G)

概要:オリゴプールから正確な遺伝子合成を可能とする革新的な技術。ゲノム合成だけでなく、遺伝子のディープライブラリー作成、DNA ストレージへの展開が期待される

2. 連続的な溶液交換による 1 分子解析手法の確立(田端 G)

概要:マイクロチャンバードバイス内に固定した酵素 1 分子やウイルス 1 粒子の酵素活性を連続的な溶液交換により、反応条件を変えながら圧制する方法を確立した。これにより、酵素 1 分子の酵素学的パラメーターの決定に成功した。

3. 膜移行配列の探索と応用(車 G)

概要:抗体などの可溶性タンパク質の N または C 末端に付加することで、セルフリー合成と同時にリポソーム膜に局在化させるアミノ酸配列を見出した。現在これを応用して、アクティブドラッグデリバリーシステムやウイルス様脂質粒子の開発に取り組んでいる。

<代表的な論文>

1. Yoneji, T., Fujita, H., Mukai, T., and **Su'etsugu, M.** Grand scale genome manipulation via chromosome swapping in Escherichia coli programmed by three one megabase chromosomes. Nucleic Acids Res., DOI:10.1093/nar/gkab298 (2021) **Breakthrough Paper**

概要:大腸菌染色体を 3 分割し各 1Mb とした。ゲノム移植技術を開発し 1Mb 染色体を別の株に移植することにも成功。査読時にはゲノム合成分野のマイルストーンとなる成果と評された。

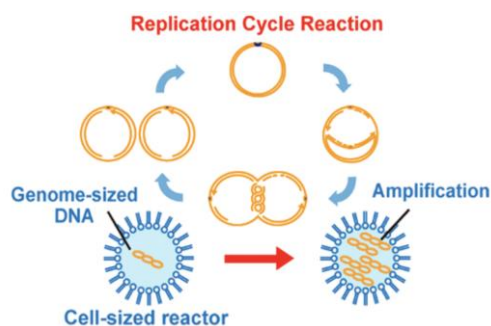
JST 科学技術振興機構 @JST_info · 4月28日

〈プレスリリース〉 **3分割したゲノム**からなる大腸菌を作製、自由なゲノム出し入れを実現〜モデル生物でのゲノムインストール技術〜
jst.go.jp/pr/announce/20220428

人工合成した分割ゲノムを移植し、有用な機能がデザインされた人工大腸菌を構築するといった、合成生物学での展開が期待されます。
 #JST #CREST

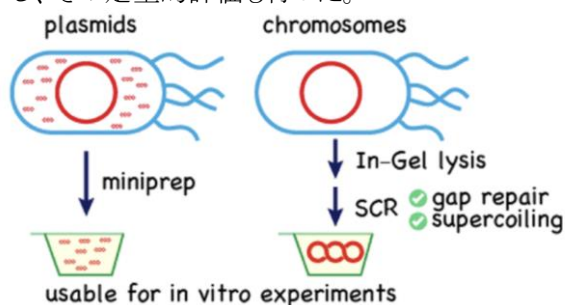
2. Ueno, H., Sawada, H., Soga, N., Sano, M., Nara, S., **Tabata, K.**, **Su'etsugu, M.** and Noji, H. Amplification of Over 100 kbp DNA from Single Template Molecules in Femtoliter Droplets. *ACS Synth. Biol.*

概要: 100 kb DNA をフェムトリッターの液滴に封入し、一分子からの増幅を検出した。



3. Fujita, H., Osaku, A., Sakane, Y., Yoshida, K., Yamada, K., Nara, S. Mukai, T.* and **Su'etsugu, M.*** Enzymatic Supercoiling of Bacterial Chromosomes Facilitates Genome Manipulation. *ACS Synth. Biol.* **11**, 3088–3099 (2022) DOI:10.1021/acssynbio.2c00353

概要: メガサイズ DNA の移植効率を高めるスーパーコイル化技術 (SCR) を開発した。SCR はまた、メガサイズ DNA のサイズ解析を容易にすることを示した。さらに 2 Mb の RCR 増幅を示し、その定量的評価も行った。



§2 研究実施体制

1. 研究チームの体制について

末次グループ

研究代表者: 末次正幸 (立教大学理学部 教授)

研究題目: 人工ゲノムのセルフリー合成とその起動

研究項目

計画① オリゴ DNA から数 kb サイズの環状 DNA(mini-circle)を調製する技術
計画② 合成オリゴのエラーを酵素的に排除する技術
計画③ 環状 DNA を集積して数 Mb の合成ゲノム(mega-circle)を調製する技術
計画④ セルフリーで合成ゲノムの配列を改変する技術
計画⑤ 合成ゲノム(数 Mb)の細胞移植技術
計画⑥ 大腸菌ミニマムプラットフォームゲノムの合成(→カーネルゲノムプロジェクト)
計画⑩ (コロナ対策追加)SARS-CoV-2 ゲノム合成
若手チャレンジ(鈴木祥太)ゲノムからの無細胞タンパク質合成系の起動に向けた研究

田端グループ

主たる共同研究者：田端和仁（東京大学工学系研究科応用化学専攻 准教授）

研究題目： On chip DNA 合成技術および合成マイコプラズマの開発

研究項目

On chip DNA 合成技術の確立

計画⑦ On chip assembly system

計画⑧ On chip cloning system

合成マイコプラズマの開発

計画⑨ 合成ゲノムの起動

車グループ さきがけ編入支援

主たる共同研究者：車愈澈（国立研究開発法人海洋研究開発機構（JAMSTEC）

超先鋭研究プログラム 主任研究員）

研究項目：リン脂質を合成する人工細胞のサブゲノム構築

研究項目

計画⑪ 無細胞リン脂質合成系の設計と構築

計画⑫ 膜移行配列を利用した機能性脂質ナノ粒子の構築

2.国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

DNA 連結、増幅技術は OriCiro 社に技術導出しており、OriCiro 社から試薬キットとして国内外のアカデミア研究者に広く使ってもらっていた。また、会社を通じて国内外のバイオ企業との連携を進めていた。モデルナへの会社売却後(2023 年 2 月)は、モデルナと連携して mRNA 創薬プロセスへの技術実装を進めている。また試薬キット供給停止につき、アカデミアでの試薬キット利用に関しては末次グループにおいて余力の許す範囲でアカデミア共同研究として複数展開中。