

研究終了報告書

「副反応を起こさない核酸等価体による長鎖 DNA 合成」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：正木 慶昭

1. 研究のねらい

長鎖 DNA 合成は、大規模に遺伝情報を改変もしくは新規に設計を可能にする。そのため、ゲノム動作原理の解明から有用物質生産まで、持続可能な社会の実現に向けた基盤技術になることが期待されている。しかし現在の化学合成技術を利用した長鎖 DNA 合成では、化学合成に由来する合成エラーにより、合成された DNA 配列の正確性に課題がある。わずかに塩基の合成エラーであっても、コドン読み枠のずれやストップコドンの生成など、機能を完全に变化させてしまう破壊的な変化をもたらしてしまう。この課題を解決していくには、合成エラーが生じる化学合成法そのものを改善していくアプローチが有効である。

本研究では、DNA の化学合成を長鎖 DNA 合成に適した方法へと進化させることで、正確性の高い DNA 合成法を開発することを目的としている。DNA 化学合成法を進化させる上で課題となるのが、極微量の副生成物の定量である。化学合成法の各サイクルで生成する副生成物の量は1%未満であり、合成後の DNA は多種多様な微量の副生成物の混合物として得られる。そのためどのような副生成物が、どの程度長鎖 DNA の正確性に影響するか、網羅的に定量した研究はなく、化学合成法を進化させる上で課題となっていた。そこで微量の副生成物の定量法の開発、開発した手法を利用した副反応メカニズム推定、そして推定されたメカニズムに対応する改良法開発という三つの観点から化学合成法にアプローチを行い、正確性の高いオリゴヌクレオチド合成法の開発を目指した。さらに合成したオリゴヌクレオチドの効率的な精製法、そして遺伝子合成に向けた配列設計法を開発し、正確性の高い長鎖 DNA 合成を達成すべく研究を展開した。

2. 研究成果

(1) 概要

本さがけ研究は、ゲノム合成においてボトルネックとなっているオリゴヌクレオチドの配列の正確性の課題に対し、有機化学の観点からのゲノム合成だからこそできる方法論を取り込むことで解決を目指した。ゲノム合成に特化することで、汎用の核酸合成法から大幅な正確性の向上に挑戦した。この研究を進める上で鍵となったコンセプトは下記の3つの気づきである。すなわち、① ゲノム合成では、鋳型 DNA はごくわずかで良い (収量は問題とならない)、② ゲノム合成において問題となる副生成物は、変異・挿入・欠失を含むオリゴヌクレオチドのみである、③ ゲノム合成では増幅反応を利用するため、鋳型 DNA は DNA でなくてもよい、の3点である。ゲノム合成では、DNA ポリメラーゼを使用した複製、増幅過程が必須であり、もととなる化学合成した鋳型 DNA は最終生成物に含まれない。そこで、化学合成時における副反応を原理的に回避する非天然塩基を利用した化学合成法の開発をおこなった。

この研究を進める上で鍵となったのが、微量の副反応に由来する変異・挿入・欠失の正確な

定量方法である。通常、化学合成の副反応解析には HPLC や質量分析や酵素分解等を組み合わせた方法が汎用されるが、本研究では、ゲノム合成において問題となる副反応に着目するべく、次世代シーケンサーを利用した評価系を構築した。その結果、0.01%まで高い再現性を持って評価可能な系の構築に成功した。この正確な評価系を利用して、副生成物の反応条件の依存性を明らかにし、ごく微量の副反応のメカニズム推定をおこなった。推定されたメカニズムを抑制する非天然核酸として、8-アザ-7-デアザグアノシン誘導体を利用することで、最も多く見られた GA 変異を 50 分の 1 以下まで低減することに成功した。また長鎖合成に適した新たな反応性官能基を有する保護基の開発、新たな高効率なキャップ化条件の開発にも成功しており、効率的な遺伝子合成も達成した。本研究で得られた知見は 2 件の領域内外の共同研究につながっており、産学連携に向けた特許取得もおこなった。本研究で開発した合成法は、長鎖 DNA 合成のみならず、長鎖 RNA 合成など他の合成に応用可能であり、核酸合成の基盤技術として、今後さらに発展させていく。

(2) 詳細

研究テーマ 1「次世代シーケンサーによる極微量副生成物の定量」

DNA の化学合成では通常 99%という高い効率で合成できるため、各サイクルで微量に生成する副生成物は 1%未満の混合物である。そのような微量の副生成物の生成を回避するためには、高い再現性を持って正確に定量する手法の開発が必要不可欠である。本研究では、ゲノム合成という特色に着目した。化学合成によって生成する副生成物のうち問題となるのは、DNA ポリメラーゼによって認識され、一塩基変異・挿入・欠失を引き起こす副生成物のみである。そこで次世代シーケンサー(NGS)の配列解析を用いた副生成物定量法を開発した (Fig 1a)。

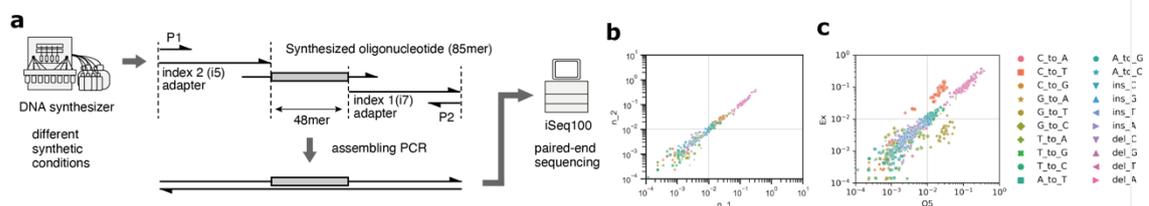


Figure 1. 微量副反応生成物の評価。a) 実験スキーム b) 合成バッチ間の再現性 c) 同一合成オリゴヌクレオチドに対し、異なるポリメラーゼでのサンプル調整による変化。

標準条件で異なるバッチで化学合成したオリゴヌクレオチドを解析し、比較したものを Fig 1b に示す。0.01%以上の領域において高い相関がみられることから、再現性をもって評価が可能であることを確認した。この方法ではポリメラーゼによる副生成物認識も重要な要素となる。種々のポリメラーゼを使用し評価した結果、例えば TakaRa Ex Taq(Ex)と Q5 High-Fidelity DNA polymerase(Q5)では、CT 変異が Q5 で相対的に減少し、GT 変異が Ex で減少することがわかった。CT 変異は C の脱アミノ化による U の生成によって起こると考えられる。Q5 は U に対するリードスルー効率が低いことが知られており、CT 変異が減少したと考えられる。このことはアセンブル反応に使用する DNA ポリメラーゼによっても、長鎖 DNA の正確性は大きく影響を受けることがわかった(成果 5-3-2, 5-3-4)。そこで、正確性を高めるため、変異ポリメラーゼを利用した共同研究も進めている。なお、研究テーマ2以降では、ミス取り込みが少ない Q5 を使用している。

研究テーマ 2「副生成物の生成を回避する非天然核酸を用いた合成法の開発」(当初計画 1)

核酸の化学合成には問題となる微量な副生成物が多数生成する。この極微量な副生成物は、通常の化学反応としてはマイナーな反応経路によって生成するため、わずかな反応性の違いで生成量が増加すると考えられる。そこで、それぞれの副生成物がどの反応条件で大きく生成量を増加させるかを探索した(Fig 2a)。系統的に活性化剤、キャップ化剤、酸化剤およびデブロッキング剤の反応性を変化させ、それぞれの副生成物の変化量を追跡した。その結果、GA 変異はキャップ化剤によって大きく生成量が増加することがわかった。また興味深いことに、同様のアミノ化により生成すると考えられる TC 変異も増加する様子が見られた。この結果から、GA 変異の生成機構として、下記の反応機構を推定した (Fig 2b)。

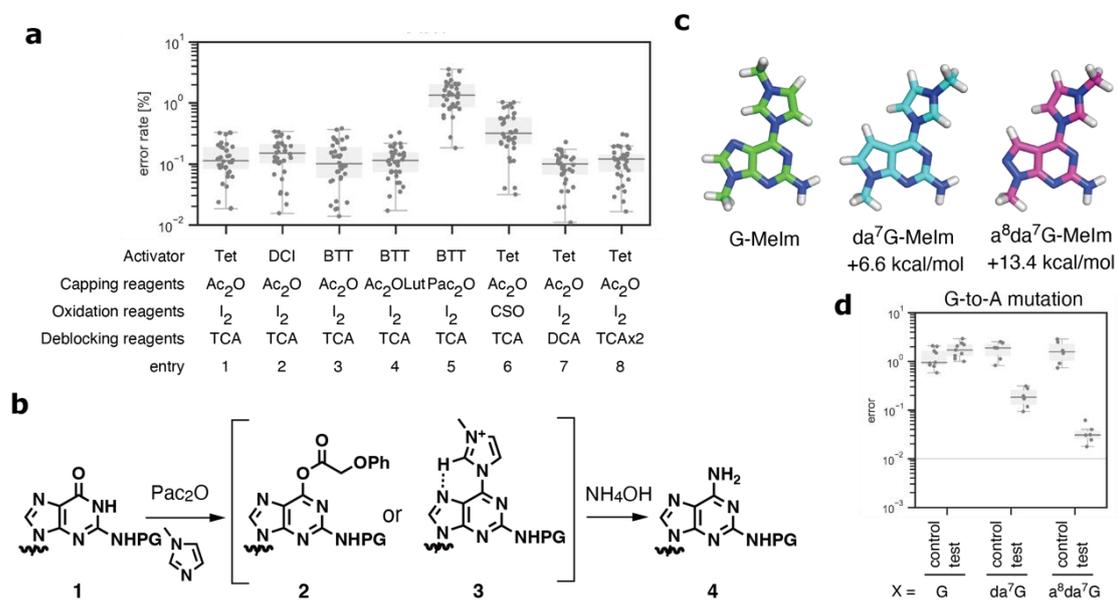


Figure 2 GA 変異の合成条件依存性と非天然核酸をもちいた抑制。a) GA 変異の合成条件依存性。b) 推定される GA 変異の生成機構。c) イミダゾリウム中間体を不安定化する非天然核酸の設計。d) GA 変異の抑制効果。

推定した反応機構から、反応中間体を不安定化する誘導体を利用し GA 変異を抑制することを試みた。反応中間体を不安定化するためにグアニン塩基の 7 位を脱窒素、電子状態を不安定化するために、8 位に窒素を導入した 7-デアザ-8-アザグアノシン誘導体を生設計し、DFT 計算上で 13.4 kcal/mol 不安定化することを確認した(Fig 2c)。対応するホスホロアミダイト誘導体を利用し、DNA 合成した結果、コントロールと比較して 50 倍以上の GA 変異を抑制することに成功した(Fig 2d, 成果 5-1-1, 5-2-1, 5-2-2)。

研究テーマ 3「欠失を最小化するためのキャップ化条件検討」(当初計画 3)

標準条件で合成した場合、最も多くみられる合成エラーは GA 変異に次いで欠失がみられる。欠失は、脱 DMTr 化不十分、もしくはカップリングおよびキャップ化反応不十分により生成すると

考えられる。前テーマで明らかになったように GA 変異はキャップ化が大きな影響を与える。例えばキャップ化効率は、Pac2O のように反応性の高いアシル化剤を使用とすると、欠失は抑制されるが GA 変異が増加する。そのため新たなキャップ化法を開発する必要がある。そこで新たなキャッピング反応を研究し、欠失の大幅に抑制することに成功した。

研究テーマ 4「反応性官能基を有する新たな保護基の開発」(当初計画 2)

長鎖 DNA 合成では単一のオリゴヌクレオチドの合成のみならず、複数のオリゴヌクレオチドを合成し、アセンブリ反応を利用して再構成していく。そのため複数のオリゴヌクレオチドを同時にかつ効率的に精製する方法の開発も、長鎖 DNA 合成の正確性向上に重要である。そこで核酸合成で使用される保護基を改変し、反応性官能基を導入することで、複数のオリゴヌクレオチドを同時精製可能なアプローチの開発を試みた。

DMTr 基のメチル基の一つを、末端アルキンを含む官能基に変換し、開発したユニットを合成するオリゴヌクレオチドの末端に導入した。導入したオリゴヌクレオチドの反応性はアジドクマリンとの反応により確認し、温和な条件で切断が可能であることを確認した。保護基を導入したオリゴヌクレオチドをアジド化ビーズでプルダウンによる精製に成功した(成果 5-3-3、5-3-5)。

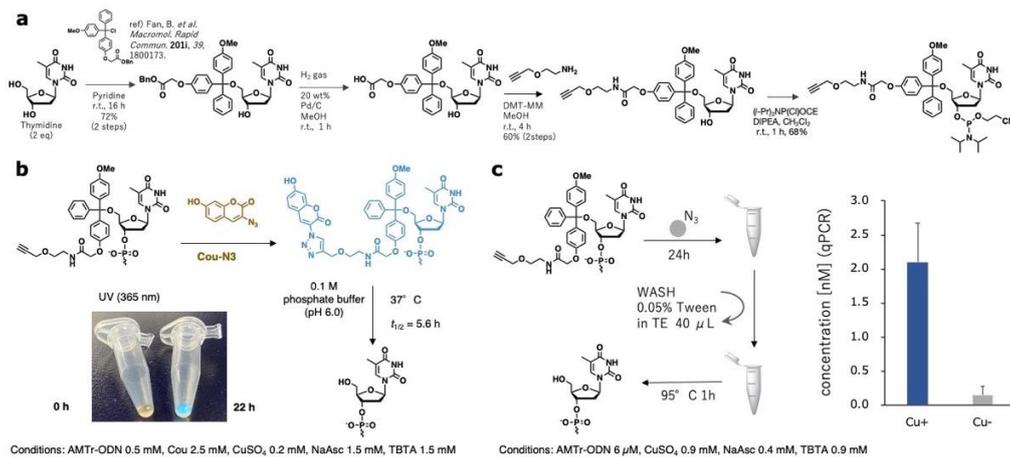


Figure 4 反応性官能基を有する新たな保護基。a) 合成スキーム。b) アジドクマリンとの反応。c) アジド化ビーズとの反応によるプルダウン精製。

当さがけ研究領域内外の研究者との連携

本研究期間中に、ゲノム合成領域の CREST 大窪チームとの共同研究や、国立医薬基盤・健康・栄養研究所のグループらとの共同研究を進めている。

3. 今後の展開

本研究では、化学合成による極微量な合成エラーによる影響の網羅的な定量を可能にし、合成エラーの低減のための新たな合成技術を世界に先駆けて実現してきた。この成果を社会実装する上での課題は、パートナーリングとコストである。

まずパートナーリングの観点から、背景と考えられるシナリオについて述べる。本研究では、長鎖 DNA 合成における要素技術の一つである化学合成"条件"であり、業界をリードしてい

る米国ベンチャーよりも高い正確性を達成している。しかし長鎖 DNA 合成に向けた化学合成は、合成条件とともに合成装置が重要になってくる。特に微細加工技術、インクジェット技術や半導体技術を応用した微小液滴をコントロールする技術など、複数の要素技術を組み合わせることが必須である。このような背景から、パートナーリングの観点から社会実装には、大きく下記の二つのシナリオが考えられる。

- (1) 既存技術が集積化した合成プラットフォームを持つ米国企業と組み、要素技術の一つとして社会実装を目指すシナリオ
- (2) 適切な技術をもつ企業と組んで、新たな合成プラットフォームの開発を通して社会実装するシナリオ

現時点では、日本発の技術価値の最大化という観点から、(2)の可能性を模索している。

二つ目の課題はコストである。本研究で開発した非天然核酸を用いたアプローチは、原理的に副反応を抑制できる化学合成法として最終的にたどり着くアプローチである。しかし、まだ長鎖 DNA 合成の市場規模が小さいため、スケールメリットによるコスト削減が困難であり、短期的な競争力にはつながりにくい。そこで現在、非天然核酸を用いずとも正確性が向上する化学合成法の開発もすすめており、その技術の成果もでてきている。

おおよそのタイムスパンとしては、3 年でより競争力のある化学合成法へとブラッシュアップし、適切なパートナーリングを行うことで、5 年後の社会実装へとつなげていきたい。

4. 自己評価

1) 研究目的の達成状況

本研究は DNA の化学合成を長鎖 DNA 合成に適した方法へと進化させることで、正確性の高い DNA 合成法開発を目的として実施してきた。この目的を達成するために 4 つの当初計画を立てて実施してきた。

当初計画 1 の非天然塩基を利用した変異抑制について、極微量の副生成物解析法を開発し、副反応メカニズムを推定、回避するための分子設計をした結果、大幅な変異抑制を達成し、化学合成 DNA の正確性向上に成功した。その内容は 2 件の特許出願(5-2)と論文発表(5-1-1)につながっている。

当初計画 2 のハイスループット精製を可能にする新たな反応性官能基を有する保護基も合成を完了し、当初計画の分子設計上の課題を明らかにして第二世代の保護基へと進化させていっている(5-3-3, 5-3-5)。

当初計画 3 の新たなキャッピング法について、当初計画の方法の問題点を明らかにし、改善した新たな高効率キャッピング法の開発に成功した(未発表)。

当初計画 4 の遺伝子合成と組み合わせた機能進化について、従来法よりも高効率で遺伝子をアセンブルする方法の開発に成功した(未発表)。さらなる発展にむけ、CREST 榊原チームの深層学習と融合するための新たなアプローチについて検討している。

上記の当初計画に加え、本研究の実施には極微量の副生成物を正確に定量する技術開発が必要不可欠であり、化学合成と次世代シーケンサーを組み合わせた新たなアプローチの開発に成功した。また計画を超えた発展的な内容として、合成した DNA の機能評価のために必要な技術の開発をすすめることもできた(5-1-2, 5-1,3, 5-3-1)。このように本研究成果により、独自性の高い新たな技術シードとしての DNA 化学合成法を開発し、研究目的を達成

することに成功した。

2) 研究の進め方

研究実施体制および研究計画は、社会情勢の変化に対応すべく柔軟に変更し、研究目標の達成を最大化した。特に2020年度はウェットの実験に大きな制限がかかったため、分析にもちいるアルゴリズムや評価系のための設計技術などの *in silico* の研究を当初計画から変更して前倒で実施し、当初計画にあった人件費を削減した。その一方で受託合成を利用し、研究進捗に対する影響を最小化することに成功した。また研究費の執行状況は、各年度計画的かつ適切な執行をおこなった。

3) 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

持続可能な社会の実現には、持続可能な物質生産が必要である。持続可能な物質生産には、生産系として自己増殖可能な系が有効であり、合成生物学が果たす役割は大きい。本研究は合成生物学による物質生産を可能にする長鎖 DNA 合成に関わる基盤技術を開発してきた。開発した成果は、現在の化学合成による正確性の大幅な向上を可能にしており、合成生物学による技術イノベーションを支える技術である。

本研究で開発した合成法は、社会実装に向けて特許取得(国内、PCT)を行い、産学連携に向けた活動も実施している。例えばFlintBoxの利用、BioJapanでの研究紹介である。本研究をさらに発展させることで、日本発の高精度長鎖 DNA 合成技術を社会実装し、持続可能な社会の実現に貢献していく。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:3件

1. Masaki, Y. ; Onishi, Y.; Seio, K. "Quantification of synthetic errors during chemical synthesis of DNA and its suppression by non-canonical nucleosides." <i>Sci. Rep.</i> , 2022 , <i>12</i> , 12095
本論文では、DNA の化学合成における副反応を次世代シーケンサーにより定量する方法、定量により推定された副反応機構、ならびに非天然核酸による抑制についての研究を報告している。特に 8-アザ-7-デアザグアノシン誘導体は GA 変異を大幅に抑制可能であることを見出した。
2. Masaki, Y. ; Tabira, A.; Hattori, S.; Wakatsuki, S. "Insertion of a methylene group into the backbone of an antisense oligonucleotide reveals the importance of deoxyribose recognition by RNase H" <i>Org. Biomol. Chem.</i> , 2022 , ASAP (DOI: 10.1039/d2ob01667b)
本論文では核酸-タンパク質相互作用を調べるために、メチレンを挿入した核酸誘導体を用いて系統的に評価した研究を報告している。本論文の方法により、リン酸基よりも糖部との相互作用の方が核酸結合タンパク質の一つである RNase H の結合において重要であることを見出した。本手法は DNA とタンパク質の相互作用解析に有効な方法論になる。
3. Masaki, Y. ; Maruyama, A.; Yoshida, K.; Tomori, T.; Kishimura, T.; Seio, K.

"Oligodeoxynucleotides Modified with 2'-O-(Cysteinylaminobutyl)carbamoylethyl ribothymidine Residues for Native Chemical Ligation with Peptide at Internal Positions" *Bioconj. Chem.* **2022**, 33, 272-278.

本論文では、合成した核酸に機能を付加させることのできる反応点を導入した研究を報告している。Native Chemical Ligation 反応を利用することで効率的に合成した核酸に機能性のペプチド等を導入可能であることを確認している。DNA と相互作用する分子について研究するツールとしての応用が期待される。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 2 件 (特許公開前のもも含む)

1	発 明 者	正木 慶昭
	発 明 の 名 称	非天然塩基を利用した長鎖 DNA 合成
	出 願 人	東京工業大学
	出 願 日	2021/04/16
	出 願 番 号	特願 2021-069896、
	概 要	非天然塩基を鋳型 DNA 合成におけるユニットとして用いることで、合成される長鎖核酸に含まれる変異の発生率を 50 倍以上低下させることができる技術
2	発 明 者	正木 慶昭
	発 明 の 名 称	非天然塩基を利用した長鎖 DNA 合成
	出 願 人	東京工業大学
	出 願 日	2022/03/18
	出 願 番 号	PCT/JP2022/012843
	概 要	1 件目の特許の PCT 出願

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1) [受賞] 2022/08/02

正木慶昭 日本核酸医薬学会 奨励賞(化学)

2) [国際学会発表] 2022/11/03

"Systematic comparison of DNA chemical synthesis conditions by next-generation sequencing"

Yoshiaki Masaki, Yukiko Onishi, Kohji Seio, ISNAC 2022

3) [国際学会発表] 2022/11/03

"Synthesis and property of alkoxytrityl type protecting group having reactive moiety"

Taichi Yagata, Yoshiaki Masaki, Yukiko Onishi, Kohji Seio, ISNAC 2022

4) [国内学会発表] 2022/03/24

「次世代シーケンサーをもちいた化学合成 DNA の副生成物解析」

正木慶昭, 矢形太一, 清尾康志 日本化学会 第 102 春季年会

5) [国内学会発表] 2022/03/23

「末端アルキンを有するアルコキシトリチル型保護基の開発」

矢形太一, 正木慶昭, 清尾康志 日本化学会 第 102 春季年会