

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「化学を基盤とするゲノムスケール DNA  
合成技術の開発」

## 研究終了報告書

研究期間 2018年 4月～2022年 3月

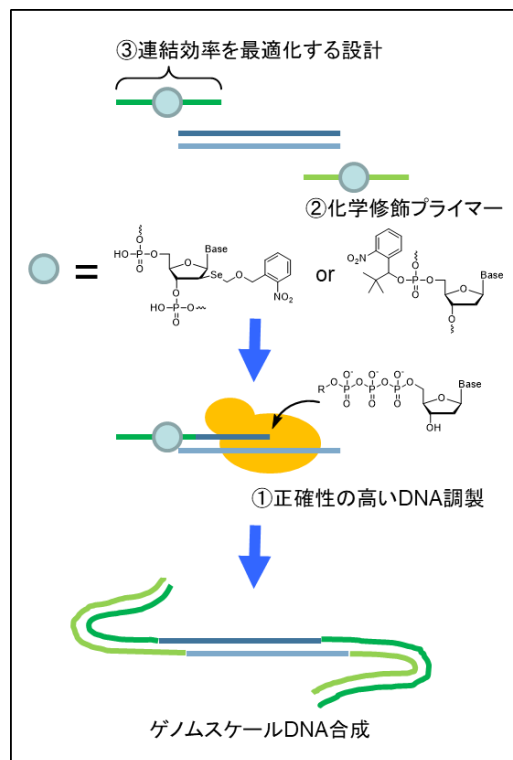
研究代表者：阿部 洋  
(名古屋大学大学院理学研究科 教授)

## § 1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

本研究課題では有機化学、生化学、バイオインフォマティクスを利用することで実用的なゲノムスケール DNA 合成法開発を目的としている。具体的には①正確性の高い DNA 断片調製法、②高効率かつ高精度な DNA 断片連結手法、③連結効率を最適化する DNA 断片の設計手法の3技術の確立に取り組んでいる。核酸分子に化学修飾を施すことでこれらの課題の解決を図っており、研究体制としては岡グループが化合物の合成を、阿部グループが化合物の合成と生化学的な評価を、そして浅井グループが配列情報の解析と設計を担っている。

①に関しては PCR の正確性を向上する dNTP 誘導体を設計、合成した。岡グループが誘導体を合成し、阿部グループが正確性向上の検討実験を行い、得られたデータを浅井グループが解析した。本研究で用意した dNTP 誘導体はリン酸に化学修飾を施すものであり、合成される PCR 産物には残らない。いくつかの誘導体について検討を行った結果、この誘導体を用いることで PCR の正確性を 2 倍程度向上することができた。一般的に PCR の正確性は dNTP 取り込み時と取り込まれ後の修正ステップの2段階によって保障されており、高精度なPCRは取り込まれ後の修正ステップの活性を向上させたDNAポリメラーゼによって達成される。一方で本研究によるPCR正確性向上は dNTP 取り込み時の正確性を向上させるものであり、修正ステップとは独立に働く。このため本研究で開発した dNTP 誘導体と高精度ポリメラーゼを組み合わせることで相乗的に PCR 正確性の向上が期待できる。②に関しては任意の接着末端を調製できる化学修飾プライマーを開発した。PCR の際に伸長反応を停止して 5' 突出接着末端を形成する stop プライマーと、PCR 完了後に切断反応を経て 3' 突出接着末端を形成するポスト切断プライマーの 2 種類を作成した。それぞれの化学修飾プライマーは阿部グループと岡グループにより合成された。本プライマーを用いることで従来の制限酵素を用いた手法よりも高精度かつ高効率の DNA 断片連結を実現した。上記の技術を活用するには適切なプライマーと十分な特異性をもつ接着末端の配列設計が不可欠である。そこで③として遺伝的アルゴリズムを用いることで高速なプライマー配列設計を行うプログラムを浅井グループが開発した。最後に①、②、③で示した成果を組み合わせ、ゲノムスケール DNA 合成のベンチマークとして 48 kbp のラムダファージゲノムの合成に取り組んだ。まずラムダファージゲノムを4つの領域に分割し、③のプライマー設計プログラムを用いることで適切な PCR プライマー配列を得た。これに従い②の stop 修飾を含んだプライマーを合成し、PCR によって 10 kbp 超の DNA 断片を得た。これらの断片は stop プライマーによる接着末端を持つため混合することで適切な順序で連結が可能である。実際に4断片を混合することで 48 kbp のラムダファージゲノムの再構築に成功した。今後の課題としては 10 kbp 超の DNA 断片の連結効率が 10%前後と低い点が挙げられる。この低効率のため断片数が増えるに従い完全な連結産物の収率が低くなってしまふ。DNA 鎖の負電荷による反発が問題であることが示唆されているため、DNA 結合タンパク質との連結により電荷を解消することで効率向上が望めると考えている。



## (2) 顕著な成果

### <優れた基礎研究としての成果>

#### 1. 核酸 2 次構造の遷移エネルギー計算法の開発

##### 概要:

DNA や RNA の 2 次構造に関する遷移エネルギーを正確に計算するアルゴリズムを開発した。一般的なプライマー設計では、DNA の最小自由エネルギーが設計の指標として用いられているが、さらに遷移エネルギーを考慮することにより正確なプライマー設計技術につながる可能性がある。本プロジェクトでも修飾塩基を含むプライマーや接着末端の設計に利用できる可能性がある。本研究は、バイオインフォマティクスの国際学会である ISMB にて口頭発表された。

#### 2. 高い PCR 増幅効率を示す新規化学修飾 dNTP の開発

##### 概要:

$\gamma$  位にアミド結合を介してスルホネート基を導入した dNTP が high fidelity PCR 酵素の良い基質となり、高い PCR 増幅効率を示した。負電荷をもつスルホネート基が酵素による基質認識に用いられていることを示唆している。また、A、T 誘導体は増幅効率を下げる傾向にある一方で、G、C 誘導体が高い増幅効率を示すことも分かった。これらの知見は、dNTP の化学修飾による PCR 増幅効率やエラー率の改善に役立つと期待される。

#### 3. 2'-セレノ核酸の合成法の開発

##### 概要:

これまで合成が達成されていなかった 2'-セレノピリミジンヌクレオシドの合成に初めて成功した。ピリミジン塩基 3 位を電子求引性のニトロ基で保護することで、2'-O-トリフラート中間体のピリミジン 2 位-2' 位分子内環化反応を抑制し、2' 位のセレノ化が可能となったためである。これによって、2'-セレノ核酸を用いる新規 DNA アセンブリ法において、接着末端の配列設計の自由度が飛躍的に高まった。

### <科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

#### 1. 光切断修飾 DNA の合成と特性評価

##### 概要:

光照射によって切断される化学修飾 DNA を開発した。本修飾は糖鎖の 2' 位にセレノ基と光感受性のニトロベンジル基を導入したものであり、あらゆる塩基に対して導入可能となっている。よって特定の修飾塩基を用いる従来のポスト切断プライマーと比べて配列自由度が格段に高いことが特徴である。また in vitro, in vivo 両方での切断を確認しており、細胞内に導入した核酸の光照射による切断にも利用できるため応用の幅が広い技術と言える。

#### 2. Stop プライマーの合成と特性評価

##### 概要:

リン酸部位にニトロベンジル基を導入することで位置特異的に DNA ポリメラーゼを停止し、任意の接着末端をもつ DNA の調製手法を確立した。本手法によって作成した長鎖接着末端は非常に高い効率で連結することが可能であり、従来法を上回る連結効率を確認した。またあらゆる DNA 断片に対して導入が可能であり、従来法では難しかった 10 kbp 以上の DNA 断片の連結も確認できた。

#### 3. DNA 断片設計アルゴリズムの開発

##### 概要:

長鎖 DNA を構成する DNA 断片と、その両端にあるプライマー配列を適切に設計するアルゴリズムを開発した。このアルゴリズムは、DNA 断片のサイズ、接着末端の結合強度(結合エネルギー)および特異性を、多目的遺伝的アルゴリズムを用いて同時に最適化する。本アル

ゴリズムを用いて  $\lambda$  ファージの全長 DNA に対して断片およびプライマーの設計を行った。得られた DNA 断片が PCR により増幅すること、隣り合う DNA 断片が試験管内で連結できることを確認している。

<代表的な論文>

1. Completely Chemically Synthesized Long DNA Can be Transcribed in Human Cells

概要：ケミカルライゲーション法によってホスホロアミダイト法で合成した DNA オリゴを連結し 78 および 258 bp の二本鎖 DNA 断片を合成した。本報告で用いたケミカルライゲーションは 3' 末のホスホロチオエートと 5' 末のヨードアシル基を連結させるもので T7 RNAP による転写の鋳型として利用できる。また真核生物の RNAP による転写も可能であり、細胞実験で shRNA の転写とこれによるノックダウン効果を確認した。

2. Phosphorothioate Modification of mRNA Accelerates the Rate of Translation Initiation to Provide More Efficient Protein Synthesis

概要：ホスホロチオエート(PS)を含んだ mRNA が高い翻訳活性を示すことを確認した。種々の実験から 5' UTR 領域に PS を配置することでリボソームの RNA への結合を促進できることが示唆された。天然の mRNA と比較して最大で 20 倍の翻訳効率向上が確認できており、mRNA を利用した医薬品開発および人工細胞におけるタンパク質生産において重要な技術になることが期待される。

3. Chemically synthesized circular RNAs with phosphoramidate linkages enable rolling circle translation

概要：化学ライゲーションによる核酸の連結法についての論文であり、EDC/HOBt の存在下で 3' アミノ修飾核酸と 5' リン酸化核酸の連結に成功した。相補的な核酸を Splint として用いることで配列特異的な連結が可能であり、ワンポットで 2 カ所の連結を達成した。本反応では天然とは異なる核酸連結構造を生じる。しかし本反応を用いて調製した環状 RNA は問題なくリボソームによる翻訳を進行するため、生体分子との相互作用に与える影響は小さいと考えられる。

## §2 研究実施体制

### (1) 研究チームの体制について

#### ① 阿部グループ(研究機関別)

研究代表者:阿部 洋 (名古屋大学大学院理学研究科 教授)

研究項目

- ・PCRの正確性向上
- ・新規DNAアセンブリ法の開発
- ・ケミカルライゲーションの開発
- ・細胞膜透過性テトラリン酸型抗ウイルス薬の開発
- ・PS-mRNAの翻訳メカニズム解析(領域内共同研究)

#### ② 岡グループ(研究機関別)

主たる共同研究者:岡 夏央 (岐阜大学工学部化学生命工学科 准教授)

研究項目

- ・アミダイト化学の改善
- ・PCRの正確性を向上させるdNTP誘導体の効率的合成法の確立
- ・2'-チオ核酸、2'-セレン核酸の効率的合成法の確立

#### ③ 浅井グループ(研究機関別)

主たる共同研究者:浅井 潔 (東京大学大学院新領域創製科学研究科 教授)

研究項目

- ・ゲノム構築のための配列設計技術

### (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