

研究終了報告書

「メガベースサイズの人工 DNA を用いたヒト人工染色体の設計・構築と汎用化」

研究期間：2018 年 10 月～2022 年 3 月

研究者：大関 淳一郎

1. 研究のねらい

ヒト人工染色体は、染色体分配装置であるセントロメアを構成する反復 DNA 配列（アルフォイド DNA）を細胞に導入することで作られる。導入した数十 kb のセントロメア DNA は、細胞内で複数分子が連結（マルチマー化）し、最終的に 1～数 Mb 程度の長さとなる。このマルチマー上に新規にセントロメアや姉妹染色分体が接着（コヒージョン）する領域などを獲得したものが、宿主と同じ機構で各娘細胞に分配される。この「染色体を作って調べる」実験系は、染色体・ゲノム DNA がどのように機能するかを理解するために非常に有用な系である。また、ヒト人工染色体は、100Mb スケールの DNA 配列を搭載し、活用できる。将来的には、DNA 合成で作られた人工遺伝子群や、人工ゲノムを丸ごと搭載し、これを編集・活用する、ゲノムスケールの合成生物学への応用も期待される。

しかしながら、ヒト人工染色体形成機構には、まだ不明な点、制御できない点も多い。例えば、マルチマー化の過程でヒト人工染色体がどのような機構でどのような DNA 構造となっているかはよくわかっていない。この原因としては、セントロメア DNA が高度な反復配列であるため、構造解析が困難なことなどが挙げられる。また、ヒト人工染色体形成にはセントロメアやコヒージョン領域などの機能構造の形成が必須ではあるが、これらがどのような配置で分布し、機能しているかについてもよくわかっていない。これらの構造や配置を DNA レベルから再構築するのに必要な配列情報が得られれば、染色体分配機構の理解が深まるだけでなく、ヒト人工染色体形成に最適化した DNA 配列を再設計し、より効率良く汎用性の高いヒト人工染色体形成も可能になる。

そこで本研究では、構造解析とクロマチン操作が可能な人工のアルフォイド DNA を合成し、これを用いてヒト人工染色体の DNA 構造や、この上に形成されるセントロメアなどの機能構造の分布を解明するための材料・手法を開発する。また、得られたヒト人工染色体構造情報をもとに、ヒト人工染色体形成の核となる配列の再設計を目指すとともに、マルチマー化を回避して導入 DNA の構造変化を防ぐため、ヒト人工染色体と同じメガベーススケールの導入 DNA を作製する技術開発を行う。そして、これらの技術を組み合わせ、次世代の汎用型ヒト人工染色体ベクターの開発に繋げることを目的とする。

2. 研究成果

(1) 概要

研究のねらいに基づき、まず構造解析とクロマチン操作が可能な人工アルフォイド DNA の設計・合成・連結を行なった。具体的には、構造解析の目印となる配列（位置コード）を付加した2種類の人工アルフォイド反復単位（セントロメアユニットとヘテロクロマチンユニット）を、それぞれ数百個作成し、これらの配列を大腸菌人工染色体ベクター上で連結した。また、こ

の人工反復配列上に埋め込んだ各位置コード配列情報を、次世代シーケンサーで解読する汎用的な手法も開発した。

次に、上記の 2 種類のユニットをヒト細胞に共導入し、ヒト人工染色体形成が形成されることを確認した。また、通常の ChIP 解析に加え、位置コード配列を用いた ChIP-seq 解析からも、セントロメアユニット上へのセントロメア特異的なヒストン H3 (CENP-A) の集合が検出され、設計通りにセントロメアユニット配列上に限定的にセントロメアを新規形成させられていることが確認できた。また、同様の ChIP-seq 解析から、この CENP-A の集合した領域のごく近傍と遠位の部分は、異なるヒストン修飾状態であることもわかってきた。

加えて、導入 DNA のコピー数の解析から、得られたヒト人工染色体のうち、含まれるセントロメアユニット配列の長さが短いものは、90~190kb 程度と推測された。これらの株のうちの 1 つをロングリードシーケンサーで解析した結果、導入したセントロメアユニット DNA 配列を 5 つのクラスターまで繋ぎ合わせ、人工セントロメアの構造を推定することもできた。

上述の系をさらに発展させ、ヒト人工染色体全体を構造解析するためには、マルチマー化の回避が重要となる。その方法として、導入 DNA をあらかじめヒト人工染色体として安定に維持される DNA サイズ (0.7Mb 以上) まで大きくすれば、マルチマー化の過程は不要になり、回避できると考えた。この可能性を検証するため、試験管内でアルフォイド DNA を 1Mb 程度の長さまで連結できる系を作成し、この系を元に異なる種類のアルフォイド DNA を設計通りに連結する手法の開発も進めている。

これら本研究・共同研究で得られた材料・手法・情報は、これまでに開発してきたクロマチン操作技術と組み合わせることで、次世代の汎用型ヒト人工染色体ベクターの作製に繋がると期待する。

(2) 詳細

研究テーマ A 「構造解析可能な人工アルフォイド DNA の作製」

研究のねらいに基づき、まず構造解析とクロマチン操作が可能な人工アルフォイド DNA の合成を行なった。具体的には、構造解析のための目印となる配列(位置コード)を付加したアルフォイド DNA 基本反復単位(2kb: 図 1 左)を数百種類作成し、これらを大腸菌人工染色体ベクター上で 128~192kb 程度の長さの複数のブロックまで連結することができた(図 1 右)。また、これらの反復単位はセントロメア構造を新規形成できる配列(セントロメア形成ユニット)とできない配

列(ヘテロクロマチン形成ユニット)に分かれており、DNA レベルでセントロメア構造形成の分布を制御できる。

この人工反復配列上に埋め込んだ位置コード配列を次世代シーケンサーで読み取ることで、そ

の DNA 構造の推測や、ChIP などの高次構造解析手法を用いることも可能になる。しかしながら、これらの解析でサンプルごとに全ゲノムシーケンスを行うことは費用面・汎用性に課題が残る。そこで、必要な位置コード情報のみをエンリッチし、ショートリードの次世代シーケンサー解析にかけることで、これら位置コードのコピー数の量比の解析手法も開発した。

研究テーマ B 「位置コードを持つアルフォイド DNA を用いたヒト人工染色体の作製と解析」

作製した人工アルフォイド DNA が、設計通りに機能するかどうかを検証するため、人工アルフォイド DNA をヒト培養細胞に導入し、ヒト人工染色体(HAC)形成実験を行なった。その結果、作製した配列からヒト人工染色体が得られた(図 2)。また、qPCR による DNA のコピー数解析の結果から、得られたヒト人工染色体は、導入 DNA のヘテロマルチマーであることが確認された。

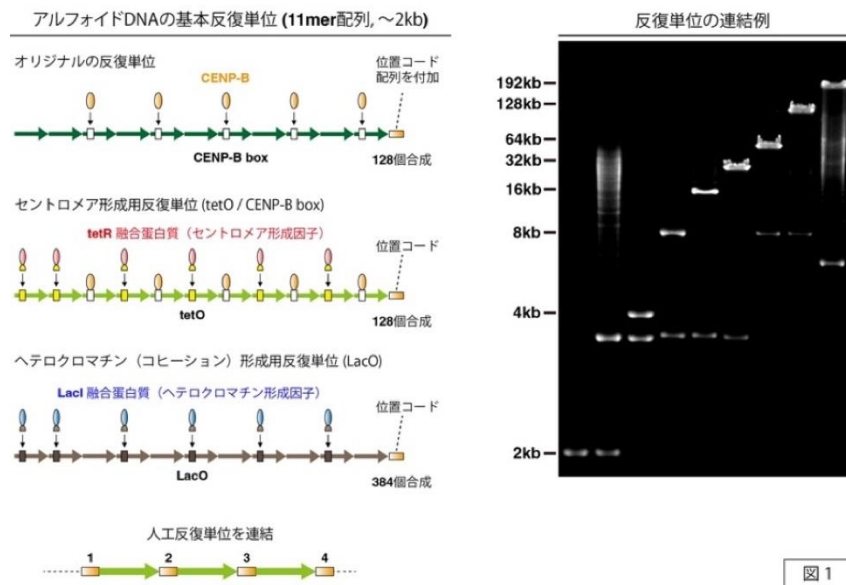


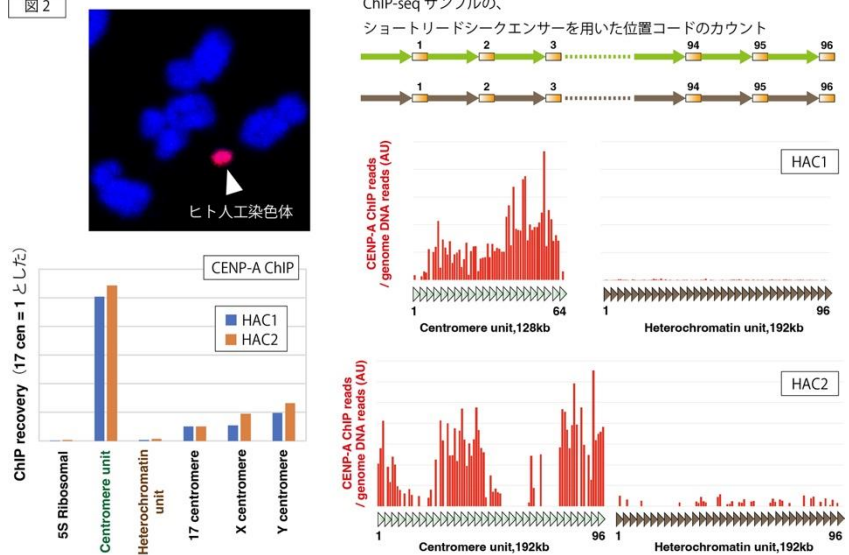
図 1

マルチマー化が起こると、ヒト人工染色体上に同じ配列が重複して存在するため、配列と高次構造を 1:1 で対応させることが難しくなる。そこで、導入時のセントロメアユニットとヘテロクロマチンユニットの量比を調整し、セントロメアユニット配列のコピー数が 1 に近いヒト人工染色体株を探索し、これを複数得た。これらの株を用いて ChIP 解析を行ったところ、セントロメア特異的なヒストン H3 (CENP-A) は、セントロメアユニット配列上に集中していることが複数の株で確認できた。同様の結果は、位置コードを用いた ChIP-seq の結果でも確認できた (図 2 右)。また、ヒストン修飾に対する抗体を用いた同様の ChIP-seq 解析から、同じセントロメアユニット配列上においても、CENP-A の集合した領域のごく近傍に入っている修飾と、CENP-A の集合していない領域に入っている修飾は、異なっていることもわかってきた。さらに、これらの位置コードが実際のヒト人工染色体上でどのように整列しているか (マルチマー化の過程でどの程度変化しているか) をロングリードシーケンサーで解析し、一つの人工染色体株では、導入したセントロメアユニット DNA 配列を 5 つのクラスターまで繋ぎ合わせ、人工セントロメア

の構造を推定することもできた。

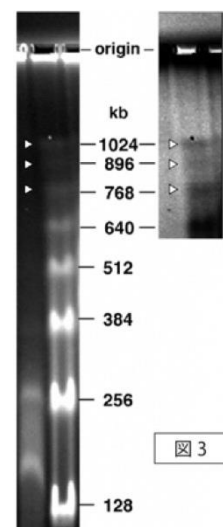
以上の技術開発とヒト人工染色体の構造情報は、本来のセントロメア構造や形成機構の理解に役立つだけでなく、人工セントロメアの新規形成を含めた、次世代のヒト人工染色体構築のためにも重要な情報と言える。

図 2



研究テーマ C 「マルチマー化による構造変化回避のためのメガベーススケール DNA 作製」

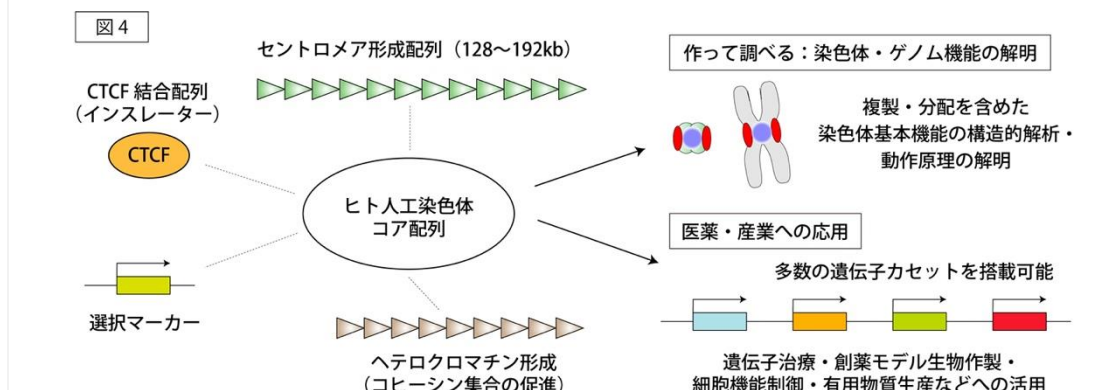
人工染色体を安定に維持するためには、全体としての 0.7Mb 程度のサイズは必要であると考えられる。現状、不足している染色体サイズは、導入 DNA のマルチマー化の過程で補われていると考えられるが、その代償として全体の DNA 構造が不明になってしまっている。このマルチマー化を回避しつつヒト人工染色体を形成させ、人工染色体全体の構造を明らかにするため、試験管内でのアルフォイド DNA 連結手法の開発を進めた。現在、試験管内で 128kb のアルフォイド DNA 断片を 1Mb 程度の長さまで連結することはできている (図 3)。そこで、異なる種類のアルフォイド DNA 断片を設計通りに連結する手法の開発も進めている。このような手法の開発により、人工アルフォイド DNA だけでなく、多数の遺伝子カセットや、複雑な遺伝子座などを 100kb~



1Mb のスケールのサイズで人工合成することも可能になると期待される。

研究テーマD「改良型ヒト人工染色体の構築と形成効率の向上(汎用化)」

今回わかってきたセントロメアの構造情報に加えて、これまでに開発してきた tetR、LacI 蛋白質テザリング系を組み合わせ、次世代の汎用型ヒト人工染色体ベクターの開発を進めるため、人工染色体の元となる DNA の再設計・構築と共同研究を進めている(図 4)。



3. 今後の展開

今後の研究の展開について

本研究にて、構造解析可能な人工反復配列を作製し、これを用いてセントロメアの新規形成・維持に必要な DNA 配列長などの情報を得た。今後は、このセントロメア形成の核となる配列を利用し、これをメガベーススケールの DNA と組み合わせることでマルチマー化を回避しながら、全体の構造が明確で高次構造解析の可能なヒト人工染色体を作製する。これを用いてヒト染色体の動作原理を明らかにして行くとともに、植物なども含めた、ヒト以外の種における人工染色体ベクターの開発、並びに、これを用いた細胞機能制御・有用物質生産などへも活用して行く(図 4)。

社会実装につながるために必要な展開とタイムスパン

現在、細胞内でゲノムを少しずつ人工配列に置換した、人工の出芽酵母細胞(Sc2.0)が作られている。このゲノム中には、染色体上に散在していた 275 個の tRNA 遺伝子を一つにまとめた人工染色体も含まれ、様々な応用が期待されている。例えば、これらの tRNA を染色体ごと人工遺伝子と入れ替えれば、蛋白質合成も制御できる。実際、この人工出芽酵母は、産業応用も強く期待され、海外ではすでに民間企業での開発も進められている。

将来的に、酵母人工染色体よりも 100 倍以上大きな容量を持つヒト人工染色体ベクターが一般化すれば、よりゲノムスケールの大きな動物や植物細胞でも、人工 tRNA 遺伝子群や、代謝経路に関わる遺伝子群などをこの上に搭載し、蛋白質合成や細胞機能の制御が可能になる。これは、医薬品や有用物質の生産性向上などにつながると考えられる。技術的に課題となることは、例えば、数百個程度の人工 tRNA 遺伝子を連結して人工染色体上に搭載できるかどうかなどであるが、本研究で 2kb の人工反復単位を数百作成し、約 96 単位ずつ 4 つのブロック(384 個)まで実際に連結できているため、このような人工 tRNA 遺伝子群(遺伝子の反復した配列)の作製は、今回の技術でも十分可能と考えられる。また、搭載に関しても、

本研究で作製したヒト人工染色体上には部位特異的な組換え配列のサイトを個別に 3 種類設置してあり、既存の手法により複数の遺伝子ブロック搭載が可能である。もし、不足しているものがあるとすると、人工染色体にどのような遺伝子を搭載してどのようなものを作りたいかという社会的ニーズや、そのために必要な遺伝子の組み合わせを模索する研究の機会ではないかと思われる。

このような技術が社会実装に繋がるためには、合成生物学やその手法が社会やアカデミアに広く受け入れられ、研究開発の需要が高まってゆくことが重要と思われる。例えば、上述の人工出芽酵母(Sc2.0)や、人工染色体技術の実用例が蓄積されてゆけば、日本でもそのような研究が幅広く展開されると考えられるが、それまでには 5~10 年程度の時間は必要ではないかと考えている。

4. 自己評価

研究目的の達成状況

研究目的のうち、様々な染色体機能に特化した複数の DNA ユニットを作製する目標は達成できた。また、単一種類のユニット(128kb)を 1Mb 程度の DNA として連結することまではできたが、まだ複数種類の DNA 配列を設計通りの順序で連結することはできていない。また、誰でも簡便にヒト人工染色体を実用できる基盤に関しては、構造解析可能な人工アルフォイド DNA を作製し、この上の目印の配列(位置コード)を簡便に検出し解析に利用する手法は開発できた。この技術を用いてセントロメア構造を解析する手法の開発も進めた。これらの成果を速やかに論文として公表する必要がある。加えて、今回の研究では、ヒト人工染色体全体の最終的な DNA 構造を解析・制御する技術の確立には至っていない。これに関しては、現在、試験管内、細胞内におけるメガベーススケール DNA の作製を進めており、これを用いて(マルチマー化を介さずに)構造が明確かつ制御可能なヒト人工染色体を作製することを目指している。

研究の進め方

研究期間前半の実施に関しては、計画に沿ってスムーズに進めることができた。一方で、後半は研究上、業務上でいくつかの課題が生じたため、実施に遅れが生じたり、研究室の異動に伴う新たなセットアップなども必要となった。研究実施体制は、補助員が 1 名であり計画上不足はなかったと考えている。研究費に関しても、状況に応じて多少の用途変更はあったが、適切に執行できたと考えている。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

今後、DNA 人工合成コストの低下や、その有用性が広まることにより、ゲノムや染色体を合成して活用してゆくことは、バイオテクノロジー分野では基本技術となってゆくことが予想される。しかし、連続して人工合成できる DNA の長さはまだ限られており、合成した複数の断片を連結・ハンドリングする技術のレベルが、活用可能な人工配列の長さには直結している。今回は、最も連結・伸長が困難とされる反復配列を、連続した 192kb のブロック 4 つまで連結する技術を確立した。この技術を、ヒト人工染色体などの 100 メガベーススケールの DNA を搭載できるベクターと組み合わせて用いれば、数百に近い遺伝子(群)であっても 1 つのヒト人工

染色体ベクターに搭載して細胞に一括導入し、活用が可能になる。これにより、基礎研究における技術力向上に加え、社会・経済においても、DNA 合成技術の応用スケールが広がり、合成 DNA を用いた細胞機能制御や、医薬品や有用物質生産力の向上につながると期待している。

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: 2件

1. Junichirou Ohzeki, Kazuto Kugou, Koichiro Otake, Koei Okazaki, Seiji Takahashi, Daisuke Shibata, Hiroshi Masumoto.
Introduction of a long synthetic repetitive DNA sequence into cultured tobacco cells.
Plant Biotechnology. 2022. 39:1-10.

本さきがけ研究の発展可能性として、合成ヒトセントロメア DNA を利用した植物人工染色体の開発を挙げている。そのための技術として、数十 kb の長さを持つ合成ヒトセントロメア DNA をタバコ培養細胞に導入する手法を開発した。また、導入した DNA 上のクロマチン構造を ChIP で解析し、宿主の反復配列(ヘテロクロマチン)とは異なる中立的な構造を取ることも明らかにした。今後、我々の持つテザリング技術などを利用して、このような導入 DNA 上に植物セントロメアを作らせることで、人工染色体の開発にもつながると期待できる。

2. Koei Okazaki, Megumi Nakano, Junichirou Ohzeki, Koichiro Otake, Kazuto Kugou, Vladimir Larionov, William C. Earnshaw, Hiroshi Masumoto.
Combination of CENP-B Box Positive and Negative Synthetic Alpha Satellite Repeats Improves De Novo Human Artificial Chromosome Formation. 2022.
Cells. 11(9):1378.

今回のさきがけ研究で用いた、合成ヒトセントロメア DNA の鋳型となる配列(目印の位置コードを付加する前の基本配列)を人工合成した論文。人工ヒトセントロメア DNA の合成、並びに、これを用いた人工染色体の作製方法の開発に貢献した。また、これらの合成配列がどのような性質を持つかを調べ、人工染色体を形成できることも確認した。

(2) 特許出願

該当なし

(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)

学会発表

Junichirou Ohzeki, Vladimir Larionov, William Earnshaw, Hiroshi Masumoto.

Human artificial chromosome, as a platform for future gene circuit installation.

EMBL Symposium Synthetic Morphogenesis: From Gene Circuits to Tissue Architecture,

EMBL Heidelberg, Germany 2019.

大関淳一郎、岡崎考映、中野めぐみ、大竹興一郎、白澤健太、磯部祥子、舛本寛
「作って調べる」セントロメアクロマチン
第 44 回 日本分子生物学会年会 2021 年 12 月

著作物

Junichirou Ohzeki, Vladimir Larionov, William C Earnshaw, Hiroshi Masumoto
De novo formation and epigenetic maintenance of centromere chromatin.
Current opinion in cell biology 2019. 58 15–25.

Jun-Ichirou Ohzeki, Koichiro Otake, Hiroshi Masumoto.
Human artificial chromosome: Chromatin assembly mechanisms and CENP-B.
Experimental cell research 2020. 389(2) 111900–111900.

大関淳一郎、Vladimir Larionov、舛本寛
染色体の安定性制御と創薬スクリーニング
細胞 2020 年 7 月号 52 巻 8 号