

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「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」

研究終了報告書

研究期間 2018年10月～2024年03月

研究代表者:大窪 章寛
(東京工業大学 生命理工学院 准教授)

§1 研究実施の概要

(1)実施概要

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。

これまでに、板状ポーラスガラスの細孔径の検討や HOBt 誘導体の導入により、鎖伸長効率の向上を行っただけでなく、ジシアノホスホロアミダイトをキャップ化反応に用いることでキャップ化反応効率も大幅に改善した。これらの反応を含む核酸合成により構築したオリゴヌクレオチドプールから、5 Kbp DNA を合成し塩基配列の正確性を確認したところ、従来のアレイ型核酸合成に比べ 4 倍以上、カラム合成法と同等な正確性を示すことが分かった。この知見は、長鎖オリゴヌクレオチドの品質保証に直結するものであり、今後、ゲノム合成に関連する学術分野に大きく貢献すると期待される。

また、これまでに我々が開発したマスクレス露光装置を搭載した核酸合成装置の光源強度の増強や照射面積の拡大、適切なハウジングを用いることで、100nm の細孔径をもつ板状ポーラス上で光制御により、120 Kbp DNA に対応するオリゴヌクレオチドプールの同時合成が可能になった。この板状ポーラスガラスにはスクライプ加工が施されており、オリゴヌクレオチドを 8 種類の各プールに分割することができる。また、この合成結果から、既存の核酸合成に比べて、合成収量は 200 倍増加、合成コストは 1/1,000 となることが明らかになった。これらの技術は、ゲノム合成の合成コストを大幅に削減することができ、関連する産業に大いに影響を与えることができると考えられる。

現在では、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)顕著な成果

< 優れた基礎研究としての成果 >

1. 活性化剤内包型固相担体を用いた核酸合成法

概要:

ホスホロアミダイトユニットを活性化できる HOBt 誘導体を長鎖のアルキルスペーサー介して導入したポーラスガラス上で鎖伸長を行うと、その反応効率が大幅に向上し(100 量体の合成時において平均鎖伸長効率 99.8%)、合成収量を従来法と比較すると 4 倍以上高いことが分かった。この結果は 200 量体を超える核酸の高効率合成の基盤となるものであり、今後の長鎖核酸合成の基礎研究の発展に寄与できる非常に大きな成果といえる。

2. 板状ポーラスガラスの透明化技術を利用した核酸合

概要:

100nm 以上の細孔径を有する板状ポーラスガラスは、光の散乱のため 365nm の UV 光をほとんど透過させないが、このポーラスガラスをジオキサソートルエン混合溶媒に浸潤させることで、1mm の厚さで 90%、8mm の厚さでも 50%程度の UV 光の透過が可能であることを見出し、露光装置搭載型フローシステム構築に応用している。この成果を主テーマとした基本特許はすでに出願しており、論文についても現在執筆中である。また、この知見は核酸合成の合成収量を大幅に向上およびゲノム合成の低コスト化に寄与できるだけでなく、二次元でしか制御できなかった核酸合成を三次元制御するための基盤技術になり得る。

3. 活性剤内包型板状ポーラスガラスを反応基盤にした光制御フローシステムによる長鎖 DNA 合成

概要:

板状ポーラスガラスの細孔径の検討や HOBt 誘導体の導入により、鎖伸長効率の向上を行っただけでなく、ジシアノホスホロアミダイトをキャップ化反応に用いることでキャップ化反応効率も大幅に改善した。これらの反応を含む核酸合成により構築したオリゴヌクレオチドプールから、5 Kbp DNA を合成し塩基配列の正確性を確認したところ、アレイ型核酸合成に比べ 4 倍以上、カラム合成法と同等な正確性を示すことが分かった。この知見は、長鎖オリゴヌクレオチドの品質保証に直結するものであり、今後、ゲノム合成に関連する学術分野に大きく貢献すると期待される。また、stop プライマーを用いた連結により任意の DNA 配列の調製にも成功している。ミトコンドリアゲノム DNA 等の細胞を用いたクローニングが困難な DNA 配列の増幅も可能であり、これらを扱う研究分野での活躍が期待できる。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. マスクレス露光装置を搭載した核酸合成フローシステムの構築

概要:

長鎖 DNA 合成に適している大きな細孔径を有する板状ポーラスガラスの製造法の開発や板状ポーラスガラスを合成担体として利用できるマスクレス露光装置を搭載した核酸合成フローシステムの構築に成功した。このフローシステムでは、数マイクロメートル単位での精度で DNA 合成の位置を制御でき、0.6mm² の範囲で 16,000 種の核酸を 0.5pmol スケールで同時合成が可能である。また、既存の合成手法に比べて単位面積あたり 6,000 倍以上の収量の核酸を合成することができる。以上のことから、長鎖核酸合成のコンパクト化が可能であるだけでなく、ゲノム合成の合成コストを大幅に削減することができ、関連する長鎖 RNA 医薬や核酸を情報ツールとして利用する産業にも大いに貢献できる。

2. 高効率なキャップ化反応の開発および 3'-エキソヌクレアーゼを用いた精製作業の簡略化

概要:

多種類の長鎖 DNA を同時、かつ効率よく精製する技術はこれまでにはなく、高純度な DNA プール合成の大きな壁となっていた。そこで、未伸長の反応点をふさぐキャップ化反応において、従来のアシル化剤を用いた反応(反応効率 90%)から、ジベンジルホスホロアミダイトを用いた反応に変えることで反応効率の大幅な向上(反応効率 >99%)に成功した。また、3'-エキソヌクレアーゼを用いた不純物の選択的な分解反応を開発することで、精製作業の簡略化にも成功している。この二つの基盤技術を組み合わせることによって、これまでできなかった多種類の長鎖 DNA の同時、かつ高効率精製が可能となり、高純度な DNA プール合成への応用できる。現在では、すでに特許出願を行っており、今後はこの技術の企業導出に向けて各種試薬メーカー等と連携を行っていく予定である。

3. スクライブ加工板状ポーラスガラスを用いた 120Kbp DNA に対応するオリゴヌクレオチドプールの同時合成

概要:

これまでに我々が開発したマスクレス露光装置を搭載した核酸合成装置の光源強度の増強や照射面積の拡大、適切なハウジングを用いることで、100nm の細孔径をもつ活性化内包型板状ポーラス上で光制御により、120Kbp DNA に対応するオリゴヌクレオチドプールの同時合成が可能になった。この板状ポーラスガラスには、CO₂ レーザーによるスクライブ加工が施されており、オリゴヌクレオチドを 8 種類の各プールに分割すること

ができる。また、この合成結果から、既存の核酸合成に比べて、合成収量は 200 倍増加、合成コストは 1/1,000 にできることが明らかになっただけでなく、その配列正確性も、従来のアレイ合成の 4 倍以上、カラム合成法と同等のものであった。これらの技術は、ゲノム合成の合成コストを大幅に削減することができ、関連する産業に大いに影響を与えることができると考えられる。

また、短時間で開発可能な mRNA ワクチンは新興感染症に対して有効であることがコロナウイルスパンデミックで証明されている。mRNA ワクチン開発では標的となるタンパク質をコードする DNA を複数種類合成し、効率的に免疫を惹起する配列を吟味する必要がある。本研究プロジェクトで開発している DNA 合成フローシステムは長鎖 DNA 合成に十分な濃度の DNA オリゴプールを短時間で調製できるため、mRNA ワクチン開発を加速し新興感染症への対策にも貢献できる。

<代表的な論文>

1. Chemical synthesis and properties of modified oligonucleotides containing 5'-amino-5'-deoxy-5'-hydroxymethylthymidine residues. A. Ohkubo*, K. Muto, R. Watanabe, S. Nishizawa, S. Hisamatsu, T. Kanamori, *Bioorg. Med. Chem.*, 28, 115407 (2020).

概要:

この論文では、5'-アミノ-5'-デオキシ-5'-ヒドロキシメチルチミジンを、長鎖 DNA の分解耐性を向上させる化学修飾として設計したことを報告している。合成においては、5'-デオキシ-5'-C-メテニルチミジン誘導体に組み込まれた 5'-ビニル基のジヒドロキシル化により、5'-アミノ-5'-デオキシ-5'-ヒドロキシメチルチミジンの 2 つの異性体の合成に成功した。さらに、この化学修飾を含むオリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ耐性や相補的な DNA に対する結合特性が、未修飾のオリゴヌクレオチドよりも高いことを見出した。本研究においては「長鎖 DNA の分解耐性を向上させる化学修飾の導入」の項目に関連する成果である。

2. Chemical synthesis and biochemical characterization of cyclic oligonucleotides containing acyl groups at both 5'- and 3'-terminal positions. S. Nishizawa, A. Ohkubo*, *Bioorg. Med. Chem.*, 28, 115799 (2020).

概要:

この論文では、細胞へのデリバリー前後で化学構造を大きく変化できる修飾核酸として 5'末端と 3'末端の両方の位置にアシル基を含む環状オリゴヌクレオチドを設計し、塩基部無保護法高効率合成を用いることで、目的物の高効率合成に成功したことを報告している。さらに、高いヌクレアーゼ耐性を有する環状アシル化オリゴヌクレオチドが、細胞質内の還元条件下で細胞内エステラーゼによって対応する直鎖オリゴヌクレオチドへ変化することを明らかにした。本研究においては「長鎖 DNA の分解耐性を向上させる化学修飾の導入」の項目に関連する成果である。

3. Oligonucleotide Synthesis on Porous Glass Resins Containing Activators. Y. Miyazaki, A. Yoshida, T. Okaniwa, K. Miyauchi, A. Ohkubo, *Org. Lett.*, 24, 3807-3811 (2022).

概要:

この論文では、核酸合成の反応基材に用いるポラスガラスに活性化剤を導入すると、反応中間体の一部をガラス表面上に捕捉することができ、隣接基効果により反応効率が大幅に向上することを明らかにした。とくに、酸性度の高い HOBt 誘導体を炭素鎖 16-20 原子長のリンカーを介して、反応点となるヌクレオシドとおおよそ同じ量導入すると DNA の鎖伸長効率を 99.8%まで向上することに成功した。さらに、同様な反応効率の向

上は RNA 合成でも観測できることを報告している。本研究においては「鎖伸長効率の向上を目指した改良」の項目に関連する成果である。

§2 研究実施体制

(1)研究チームの体制について

大窪グループ

研究代表者:大窪 章寛 (東京工業大学生命理工学院 准教授)

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

橋谷グループ

研究分担者:橋谷 文貴 (名古屋大学大学院理学研究科 助教)

研究項目

- ・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

(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

板状ポーラスガラスや露光装置搭載型フローシステムは、東工大を中心した複数の関連企業とのネットワークを組織し開発を行っている。