

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19227

研究課題名(和文)新規DNA合成法CAIOSによる合成生物学の新展開

研究課題名(英文)Development of a novel method CAIOS for DNA synthesis toward buildup of synthetic biology

研究代表者

岡村 好子 (OKAMURA, YOSHIKO)

広島大学・統合生命科学研究科(先)・教授

研究者番号：80405513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：DNA合成にかかる時間短縮にむけて、本研究では、リガーゼを基盤とするDNA合成法(CAIOS法)を提案し、その機動性を評価することを目的とした。

1st CAIOSで得た300-merのコアオリゴ4本を、2nd CAIOSで1.2-kbpの二本鎖DNAの合成に成功した。所要時間は3日だった。PCR増幅困難配列を見だし、その部分書き換えは1日で達成し、迅速・簡便であることも証明した。以上の結果から、CAIOS法は、任意の配列を迅速に合成する機動性に優れ、数千bpの遺伝子合成は2ndCAIOSまでで十分対応できることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、CAIOS法は、任意の配列を迅速に合成する機動性に優れ、数千bpの遺伝子合成は2ndCAIOSまでで十分対応できることが示された。また、「書き換え」も1日で終了するため、遺伝子受託合成の標準的な納品までの時間が3週間から2ヶ月であるとする、3日から5日で合成できたため、少なくとも4分の1程度の短縮を可能とする。また、PCR合成困難配列は本手法で補完できることも示された。本方法は、高精度でありながら書き換えも簡便で、かつ安定した収量も得られることから、DBTLのボトルネックを解消するのみならず、今後ゲノムライティングのための基盤技術に寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we propose a ligase-based DNA synthesis method, Circular Assembling into Ordered Sequence (CAIOS), and evaluate its mobility in order to improve the mobility of the DBTL (design-build-test-learn) cycle.

First, we synthesized 1.2-kbp DNA consist with four 300-mers that were obtained by the 1st CAIOS, and then they were ligated into by the 2nd CAIOS. Next, the sequence causing DNA polymerase slippage was found and partial rewriting was achieved in one day. This result proved that CAIOS method is rapid and easy. In addition, native and codon-optimized sequences were synthesized for heterogenous expression using *E. coli* as a host. These results indicate that the CAIOS method has excellent mobility for rapid synthesis of arbitrary sequences and that a few kbp DNA can be synthesized through 2nd CAIOS.

研究分野：生物学

キーワード：合成生物学 遺伝子合成 コドン書き換え

1. 研究開始当初の背景

合成生物学の大きな目的の一つは、設計された生合成遺伝子クラスターを用いて代謝経路を最適化し、生物生産物の収量や生産性を向上させることである。この目的達成のためには代謝経路を効率良く運用するため DBTL (design-build-test-learn) サイクルと呼ばれるワークフローを用いて試行錯誤テストを行い改良することが不可欠である。しかし、現行の DBTL 運用の最大のボトルネックとして、正確な配列を持つ 2 kb 程度までの DNA 合成に要する時間がしばしば長くなる、または全く合成できないことが挙げられる。現在の DNA 合成には PCR を基盤とした PCA 法が最も用いられているが、PCR では増幅不可な配列は PCA でも合成できないため、わずか数 kb の遺伝子も合成困難なことがある。さらに PCR を基盤技術とすることで高い正確性で最長 20-kb 増幅が可能である DNA ポリメラーゼをもってしても、クローニングとシーケンス確認は必須であり、ここでも時間を費やすことになる。

Nature Biotechnology (2020 年 10 月 5 日号)の News によると、現時点で、遺伝子合成の問題は長いオリゴヌクレオチド合成により解決できると考えられており、2013 年から注目されてきた Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)による合成法が現在 300-mer 程度まで可能となったと、期待感を高めている^[1]。そして多くの企業が TdT 法をテストしているが、いくつかの顕著なバイアスがあることが指摘されはじめていることにも言及していた^[1]。

一方、申請者らは、オリゴヌクレオチドをリガーゼで伸長する方法を検討し、60-mer の合成オリゴ 5 本から 300 bp の合成を達成し、その合成時間は 1 日かからないプロトコルを策定した。この新規手法を **Circular Assembling into Ordered Sequence (CAIOS)**と名付け、「数 kb だが合成が難しい配列」に対して、問題解決の有効性と、DBTL 運用の機動性を研究期間内に検討したいと構想した。

[1] M. Eisenstein, Enzymatic DNA synthesis enters new phase. *Nat Biotechnol.* 38, 1113–1115 (2020).

2. 研究の目的

本研究の目的は、リガーゼを基盤とする DNA 合成法 Circular Assembling into Ordered Sequence (CAIOS)法の機動性を評価することである。具体的には、PCR が抱える問題である、「合成困難な配列」の克服および正確な配列入手に至る時間の大幅な短縮の実証である。本方法は、高精度でありながら書き換えも簡便で、かつ安定した収量も得られることから、DBTL のボトルネックを解消するのみならず、今後ゲノムライティングのための基盤技術に寄与できると考えた。

3. 研究の方法

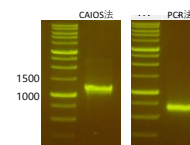
1 本当たり 60-mer のオリゴ DNA を基本単位として連結し、(1) PCR で増幅しがたい配列の合成、(2) 1st CAIOS で得た長いコアオリゴ数本でさらに長い DNA (1.2~1.5 kb)合成、(3) コアオリゴの入れ換えによる書き換え、(4) 遺伝子回路を作成し、*in vitro* または細胞内での遺伝子起動と DBTL サイクルの運用、について検討した。

4. 研究成果

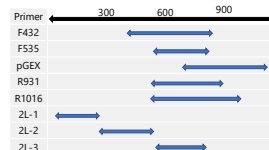
(1) PCR で増幅しがたい配列の合成

ターゲット酵素配列を、敢えてポリヌクレオチド配列になるようにコドンを変更し、約 1.2-kbp の人工配列遺伝子を CAIOS 法で作製した (後述)。この合成遺伝子を鋳型に PCR を行った結果、PCR 産物は 800-bp の断片が確認され、400-bp の欠失が考えられた (図 1A)。よって、鋳型 1.2-kbp と PCR 産物 800-bp をダイレクトシーケンスした結果、CAIOS 法で合成した鋳型は設計した配列と完全一致した結果 (図 1B) を得たが、PCR 産物の配列決定できた部分は 700-bp であり、さらに短くなった (図 1C)。図 1C の結果から 270-870-nt 間に欠損領域があることが判明し、この領域にはポリヌクレオチド配列が存在する。実際にポリヌクレオチドは数 bp であるが、DNA ポリメラーゼが滑りを起こししやすい配列も含まれていたと考えられる。この結果から、「PCR では増幅しがたい配列」を CAIOS 法で容易に合成できることが実証された。

(A) 人工配列遺伝子の増幅産物



(B) CAIOS法で合成した全長配列確認



(C) PCR法で増幅した断片の全長配列確認



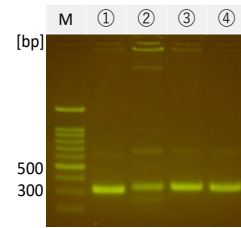
図1 ポリヌクレオチド配列を含む人工遺伝子の合成確認

(2) 1st CAIOS で得た長いコアオリゴ数本でさらに長い DNA (1.2-kbp) 合成

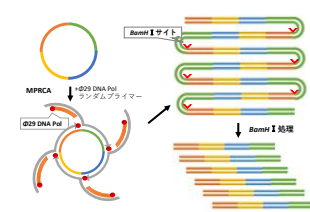
60-mer のオリゴ DNA を 1 回の反応で何本繋がられるか検討した結果、10 本程度であった。1 反応あたりに持ち込める全 DNA 濃度によって規定されるため、本数が多いと 1 本当たりの濃度が不足すると考察された。

1.2-kbp の人工配列遺伝子を合成するためには、CAIOS 法を 2 回繰り返す必要があるため、5 本のオリゴ DNA で 300-bp のユニットを合成し、これを 4 本繋げて 1.2-kbp となるように、ターゲット酵素配列を 20 パーツに分けてオリゴ DNA を合成した。図 2 にその結果を示す。図 2A は設計通りのユニットサイズが得られたことを示している。300-bp より高分子側のバンドは制限酵素の不完全消化のため、2 倍、3 倍のサイズが検出されていると考察されたが、レーン 2 の 300-bp より小さいバンドは、オリゴ DNA が 1 本分不足したサイズであるため、不完全な反応を除くために、ゲルから 300-bp のバンドを切り出し、抽出精製して 2nd CAIOS に移行した。図 2B は 2nd CAIOS の原理を示す。図 2A のユニット (2 本鎖 DNA) を 1 本鎖 DNA にした後にライゲーションで環状化し、multiple priming rolling circle amplification (MPRCA) で増幅し、ハイパータンデムリピートを配列内のユニークサイト (*Bam*HI) で消化して目的の断片を得た。図 2C の電気泳動像から 1.2-kb p の合成が確認された。ここまでの合成時間は、1st CAIOS 断片の調製に 1 日、ゲル切り出し精製を含め、2nd CAIOS が 2 日であり、3 日で 1.2-kb が合成できた。なお、最終産物を念のためシーケンスした結果、配列に間違いは無かった (図 1B)。φ29 DNA ポリメラーゼはゲノムスケールの長鎖を正確に合成できる酵素であり、最終産物はシーケンス確認の必要が無い (後述)。

(A) 1st CAIOSによるユニット合成の確認



(B) 2nd CAIOSの原理



(C) 2nd CAIOS後の合成確認

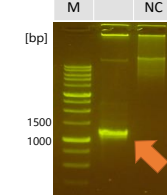


図 2 1.2-kbの人工配列遺伝子合成

(3) コアオリゴの入れ換えによる書き換え

組換えタンパク質の発現において、宿主生物のコドン頻度にあわせてコドンを最適化して遺伝子を合成することは一般に行われている。本研究で使用しているターゲット酵素配列も高熱細菌由来のため、大腸菌のコドン頻度に合わせてコドン最適化を行っている (コドン最適化ツール GenSmart™ を使用)。そして (1) においてポリヌクレオチドを取って設計したが、「DNA ポリメラーゼの滑り」かどうかの確認のため、当該箇所の配列をネイティブ配列に戻したオリゴ DNA を使用して、当該箇所を含むユニットのみ再合成し、2nd CAIOS で全長合成を行った。

他のユニットは既に合成済みのため、当該ユニットのみ 1st CAIOS および 1 本鎖化するだけなので、この書き換えは 1 日で終了した。PCR で鋳型 1.2-kbp を増幅した結果、鋳型と同じサイズの断片を得ることができた (data not shown)。以上の結果から、合成困難な配列をコドン置換によって回避する従来の PCA 法と比較しても、リカバーにかかる時間が 1 日でよいことが示された。これは、(4) の DBTL サイクルの運用にも重要なポイントである。

(4) *in vitro* または細胞内での遺伝子起動と DBTL サイクルの運用

(2) において、最終産物のシーケンス波形データをみると、一部分で二重ピークがみられ、10%以下の小さな波形の塩基は、主要ピークと 1 塩基ずれていた。オリゴ DNA はホスホロアミダイト法を使用して合成されているが、1 塩基伸長当たりの収率は 99.5%以上と保証されている。すなわち 1 塩基当たり $10^{-2} \sim 10^{-3}$ のエラー混入が想定されるがこれは希釈によって除去できる。実際に希釈してから MPCRA を行い、エラーの除去に成功した。従って、シーケンス確認のステップを排除しても信頼できる配列合成が可能であり、PCA 法のクローニング、シーケンスに要する時間分の短縮が可能になった。

遺伝子の起動にむけて、別の酵素遺伝子のネイティブ配列と最頻度コドン書き換え配列を合成した。長鎖 DNA 配列になると、Splint オリゴをどこに設計するかが重要であることがわかった。実施例で示すと、60-mer の Core オリゴを 5 本と Splint オリゴを 5 本投入して 300-mer の合成 DNA を作成した場合、Splint オリゴは Tm 値と鎖長をパラメータに配列を決定していたが、失敗すると all or nothing の成果である (1 カ所でも繋がらないと環状化しない)。これを 100%成功させるアルゴリズムの策定のため、Splint オリゴの設計自動化プログラムの作成に着手し、現在までにプロトタイプとなるプログラムを得た。プログラ

ムで計算された Splint オリゴを用いて DBTL サイクルを行い、CAIOS 成功率および反応効率の評価を行った。これにより、計算プログラムは成功率が 7~8 割程度に向上した。

最後に、設計したネイティブ配列と最頻度コドン書き換え配列を T7 プロモーター下に連結して、*in vitro* あるいは *in vivo* 発現を行った。発現量に明確な差はでなかった。GenSmart™ で設計した配列を検証した結果、決して最頻度コドンを多用しているわけではなく、レアコドンに置換されている場合もあり、発現バランスが考慮された設計になっていたのかもしれない。今後、極端な偏り配列で実施し、遺伝子合成ルールを考察する予定である。

本研究の結果、CAIOS 法は、任意の配列を迅速に合成する機動性に優れ、数キロ bp の遺伝子合成は 2ndCAIOS までで十分対応できることが示された。また、「書き換え」も 1 日で終了するため、遺伝子受託合成の標準的な納品までの時間が 3 週間から 2 ヶ月であるとする、3 日から 5 日で合成できたため、少なくとも 4 分の 1 程度の短縮を可能とする。また、PCR 合成困難配列は本手法で補完できることも示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroto Maeda, Yuto Hirata, Hirokazu Takahashi, Kenshi Watanabe, Tsunehiro Aki, Yoshiko Okamura	4. 巻 in press
2. 論文標題 Development of a transformation system for Nitratireductor sp.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Marine Biotechnology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10126-023-10198-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 平田悠人、前田大翔、高橋宏和、渡邊研志、秋庸裕、岡村好子
2. 発表標題 Nitratireductor sp. OM-1のクロトン酸生成遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第22回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田大翔、高橋宏和、渡邊研志、秋庸裕、岡村好子
2. 発表標題 Nitratireductor sp. OM-1における遺伝子組換え系の開発
3. 学会等名 第22回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroto Maeda, Yuto Hirata, Hirokazu Takahashi, Kenshi Watanabe, Tsunehiro Aki, Yoshiko Okamura
2. 発表標題 Biofuel production by genetic engineering in Nitratireductor sp. OM-1 and Escherichia coli
3. 学会等名 Internationa Symposium on Fuel & Energy 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 猿渡雄哉, 高橋宏和, 岡村好子
2. 発表標題 オリゴDNAを用いた新規遺伝子合成法の開発
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 猿渡雄哉, 高橋宏和, 岡村好子
2. 発表標題 ライゲーションを基盤とする新たな遺伝子合成法
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 宏和 , 猿渡 雄哉 , 堀尾 京平 , 岡村 好子
2. 発表標題 無細胞クローニングによるsgRNAのin vitro転写用鋳型DNAの簡便な構築
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 鋳型DNAの製造方法	発明者 岡村好子、高橋宏和	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願 2021-183664	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 合成DNA分子の製造法	発明者 岡村好子、高橋宏和、堀尾京平、猿渡雄哉	権利者 広島大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/018793	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 合成DNA分子の製造方法	発明者 岡村好子、高橋宏和、堀尾京平、猿渡雄哉	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021- 81230	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高橋 宏和 (TAKAHASHI HIROKAZU) (10612517)	広島大学・統合生命科学研究科(先)・研究員 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------