

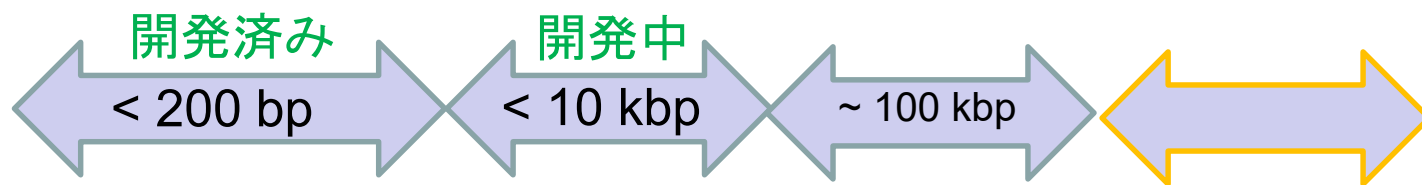
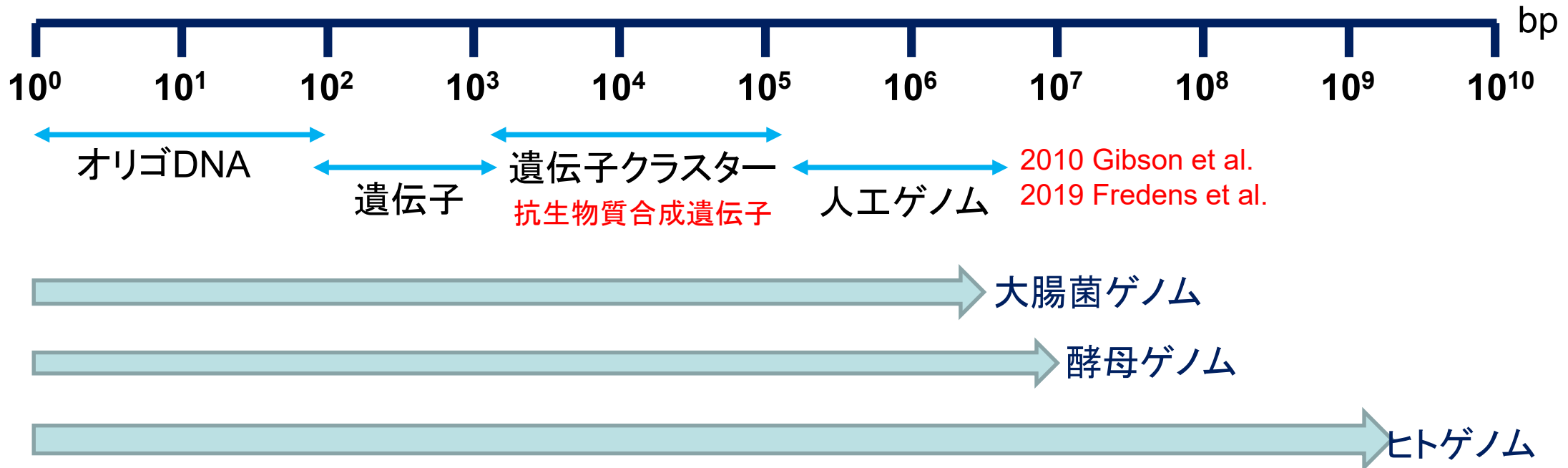
クローニングなしで、迅速・正確に 任意配列の人工遺伝子を合成します

広島大学大学院統合生命科学研究科
教授 岡村 好子

令和6年2月15日



DNA鎖長のニーズ



sgRNA
 オリゴ合成でも対応可能
 合成エラーは除けない
guide RNA 鋳型合成
 特願2021-183664
 PCT出願済み

酵素遺伝子
 mRNAワクチン
 バイオ医薬
 核酸医薬
市場拡大中

二次代謝合成経路
 化成品合成経路
 今後のバイオエコノミー
 の主戦場
2030年までに標準化必須

CAIOSの利点

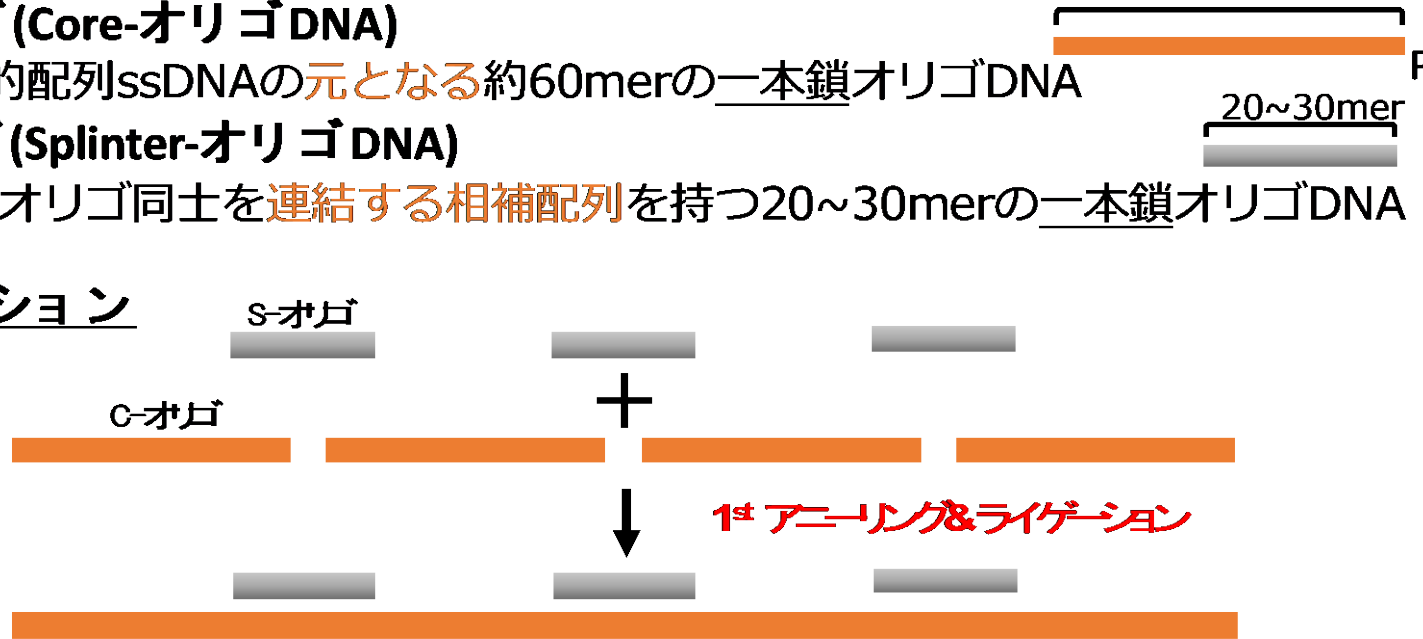
- ・PCRを使用しない
- ・PCRで増幅できない配列(繰り返し、ポリヌクレオチドなど)も合成可能
- ・PCRエラーは無視できる
- ・合成オリゴのエラー率は希釈で除去できる
- ・高い正確性
- ・シーケンスによる確認時間を省略可能

新規DNA合成法: CAIOS法

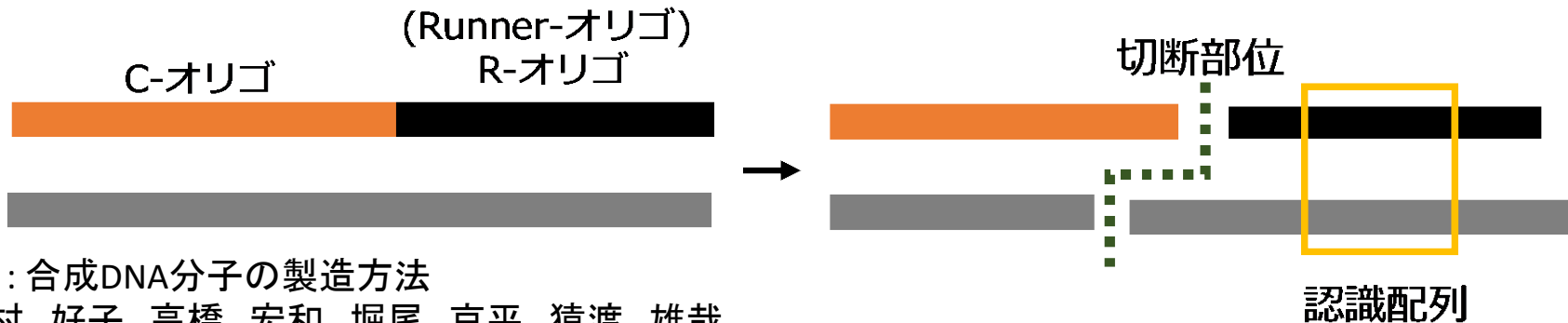
(Circular Assembling Into Ordered Sequence)

- 原理
- **C-オリゴ (Core-オリゴ DNA)**
 目的配列ssDNAの元となる約60merの一本鎖オリゴDNA
 - **S-オリゴ (Splinter-オリゴ DNA)**
 C-オリゴ同士を連結する相補配列を持つ20~30merの一本鎖オリゴDNA

ライゲーション



Type II S制限酵素切断(1st & 2nd 消化に使用) ☆認識配列の外側を切断
 ⇒認識サイトをコア配列に残さない



発明の名称: 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
 出願人: 国立大学法人広島大学 [100%]
 出願番号: 特願2021-081230 (2021-05-12 出願)
 PCT/JP2022/018793 (2022-04-26 出願)

現行法との比較(鎖伸長原理)

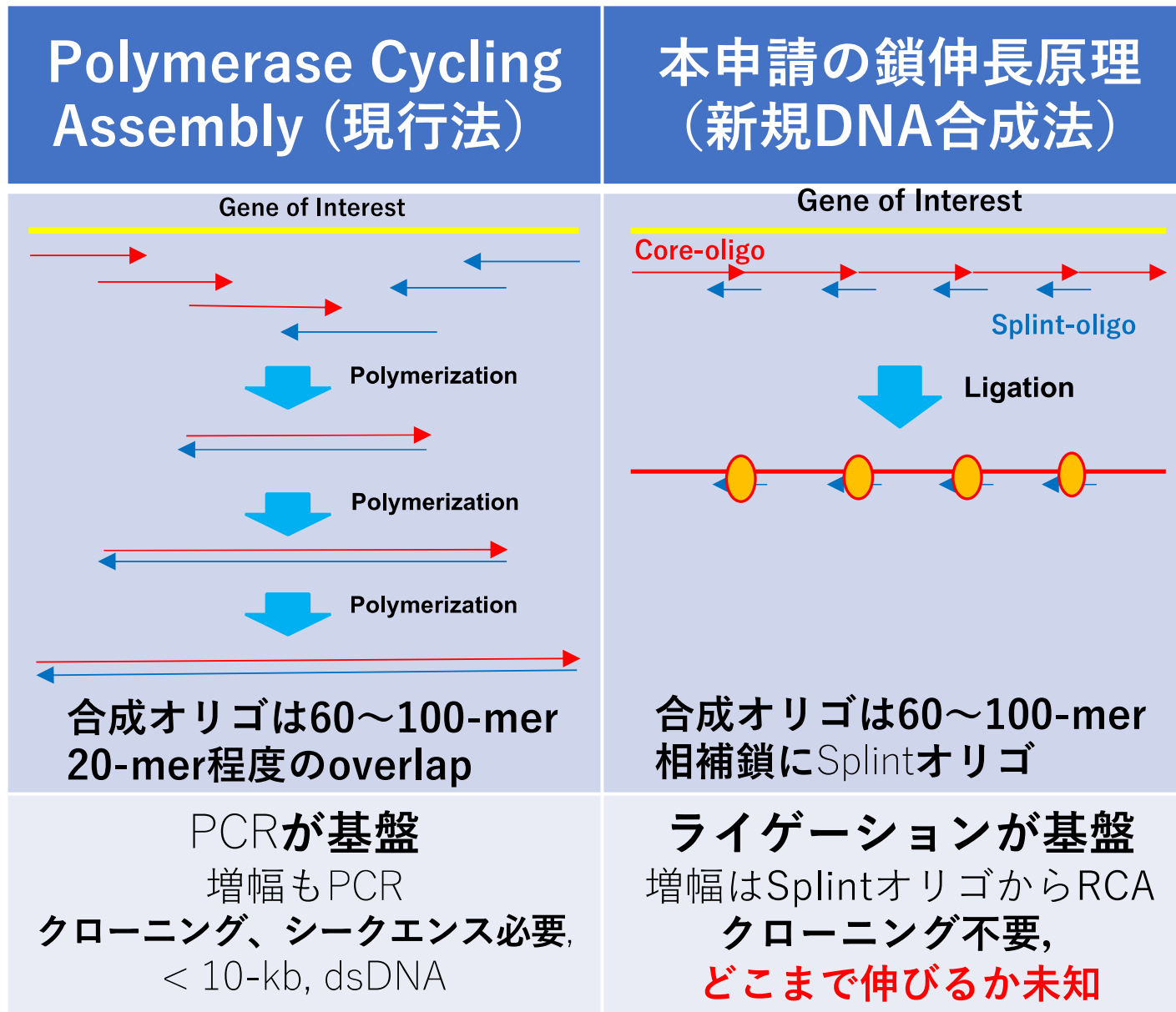


図1 鎖伸長原理の比較

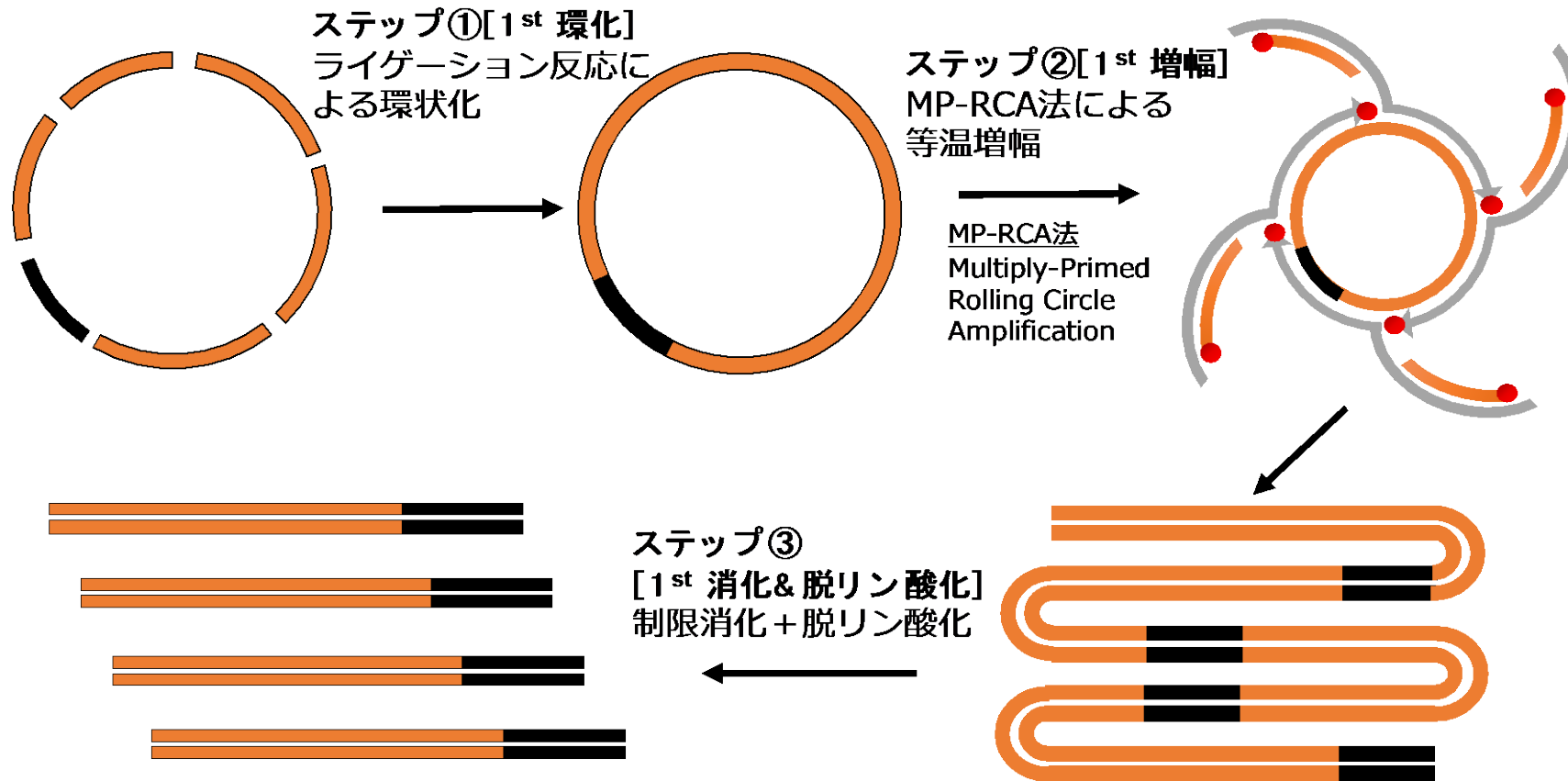
現行法との比較(本技術の特長)

	従来法	CAIOS法
適用範囲	狭い	広い
宿主	必要	不要
PCR	使用	不要 PCRで増幅できない配列も合成可能 PCRエラーは無視できる
オリゴDNA由来エラー	残る	希釈で除去される
正確性	シーケンスで確認	高い
シーケンスによる確認時間	必要	省略可能
遺伝子組換え実験室	必要	不要

CAIOSは宿主フリーのDNA合成法

1st CAIOS : 300 bp ~ 350 bpのDNAを合成

- phi29 DNAポリメラーゼ
 - ・ 30℃の等温反応可能
 - ・ 高い鎖置換活性
 - ・ 低い複製エラー率



1st 消化後のサンプル
 ・ 目的配列を大量に切り出すことが可能

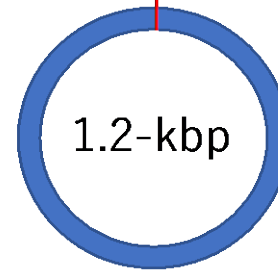
MP-RCAによる増幅産物
 = 1st RCA Product
 ・ 二本鎖で目的配列がリピート
 ・ 予め制限酵素サイトを挿入

PCRでは増幅できない配列の例

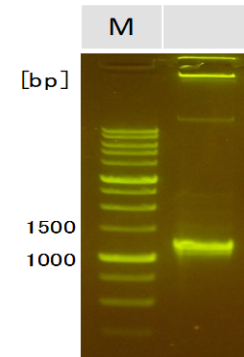
古細菌の酵素遺伝子配列を大腸菌の最頻度コドンに変換した配列

CAIOS法 (~1週間)

(A) オリゴDNAを20本連結した
 合成DNAの鎖長確認 **1.2 kbp**

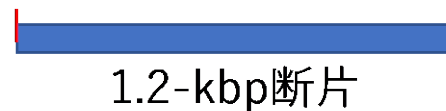


Φ29DNAポリメラーゼ
 RCA
 制限酵素消化
 (1箇所)

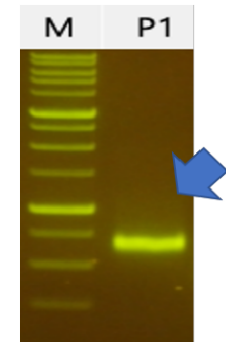


(B) (A)のリニア断片
 をPCR増幅した産物
 の鎖長 **約800 bp**

(B)



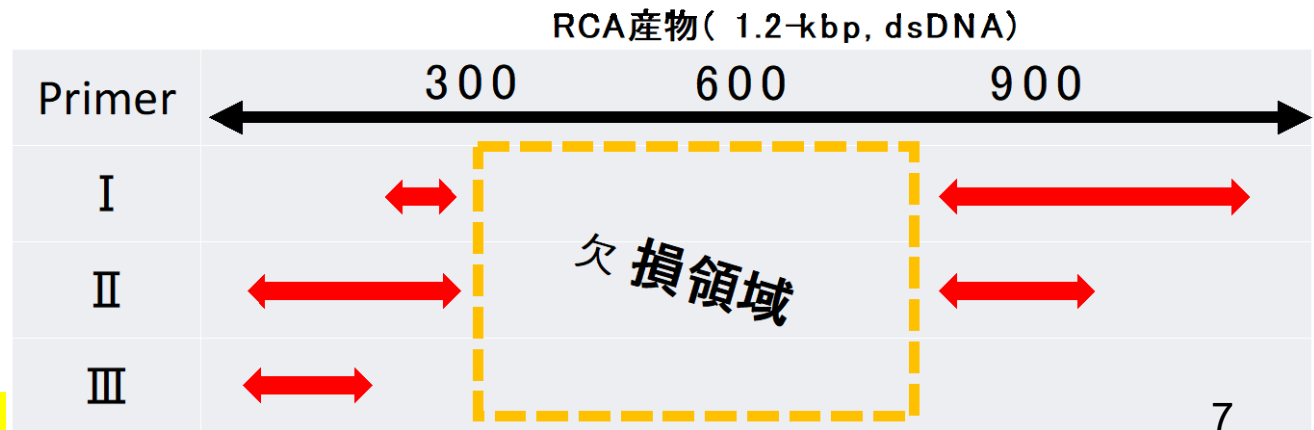
DNAポリメラーゼ
 PCR



DNAポリメラーゼが「すべり」を起こした配列が含まれていた

(C) (A)のリニア断片を
 3つのプライマーでダイレクト
 シーケンスした時のカバー
 領域と欠失領域
 得られた配列は約700 bp

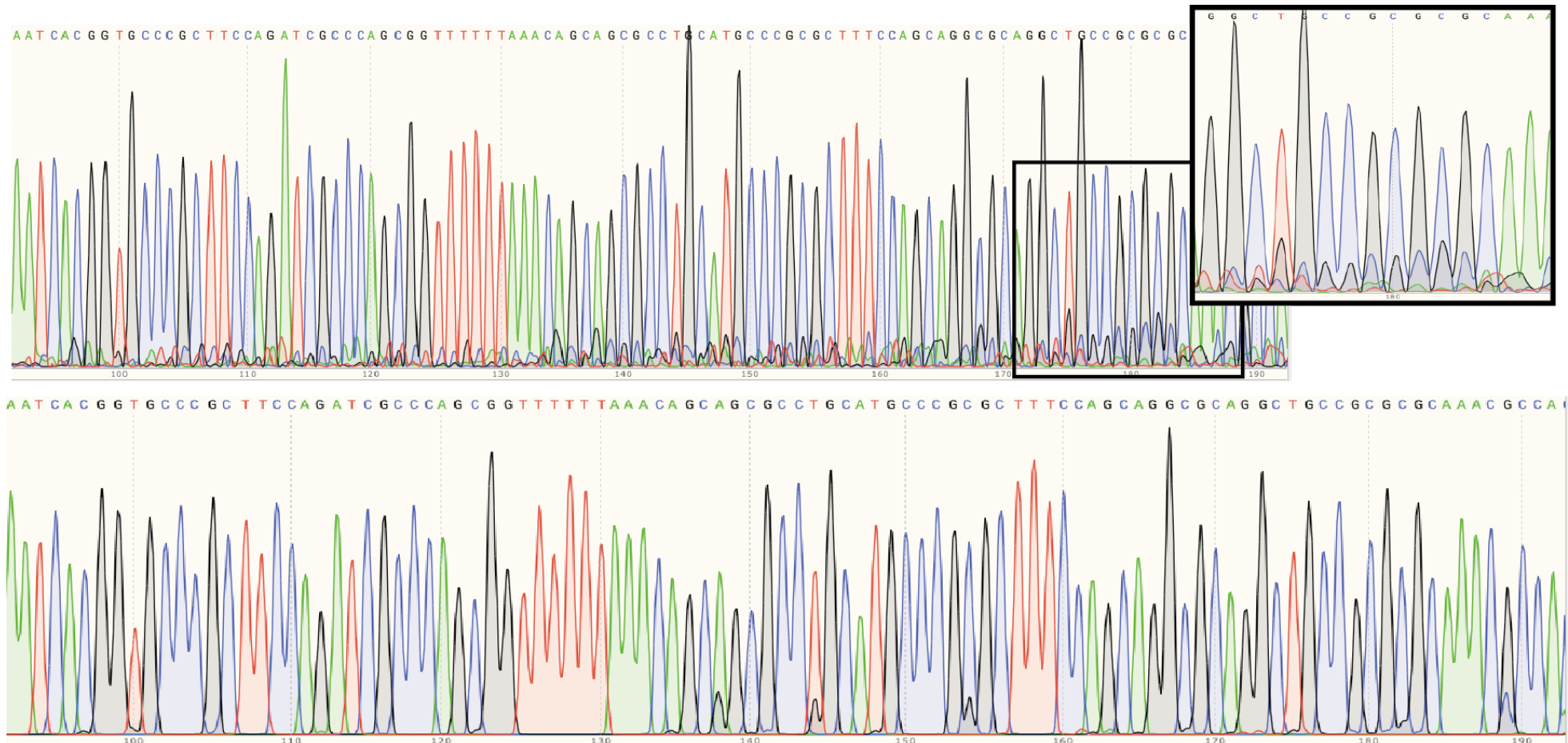
(C)



当該領域の入れ替えで修正 (~1週間)

エラーオリゴの簡便な排除

環状化ライゲーション生成物を、希釈前（上段）と限界希釈（下段）して2本鎖DNAとして増幅した後に、シーケンス反応を行って得られた結果



増幅前の鋳型DNAを希釈するだけで、正しい配列を持つオリゴ由来の物だけを増幅可能=Cloning不要

- ・ 新規人工遺伝子合成

これまでより自由な配列設計+変更も容易

- ・ sgRNA(crRNA)の鋳型作成

PCRでは作成できない配列も可能

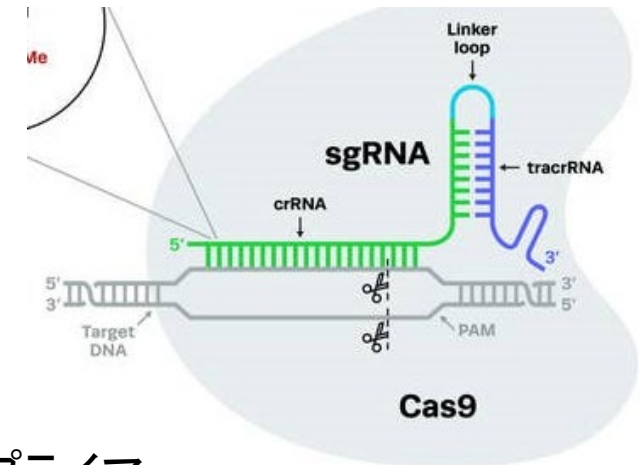
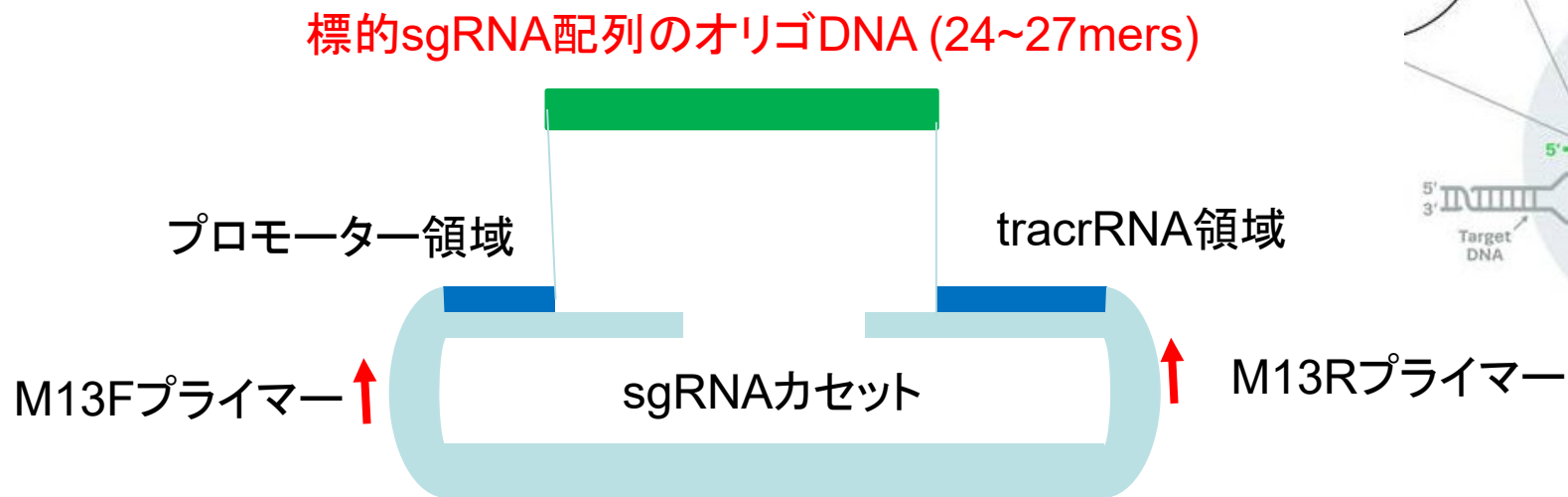
- ・ mRNA医薬などの核酸医薬作成

より短時間でかつ変異体にも迅速対応

- ・ 人工遺伝子を用いた遺伝子回路の作成

想定される用途- 1

crRNA (sgRNA)の鋳型ライブラリー



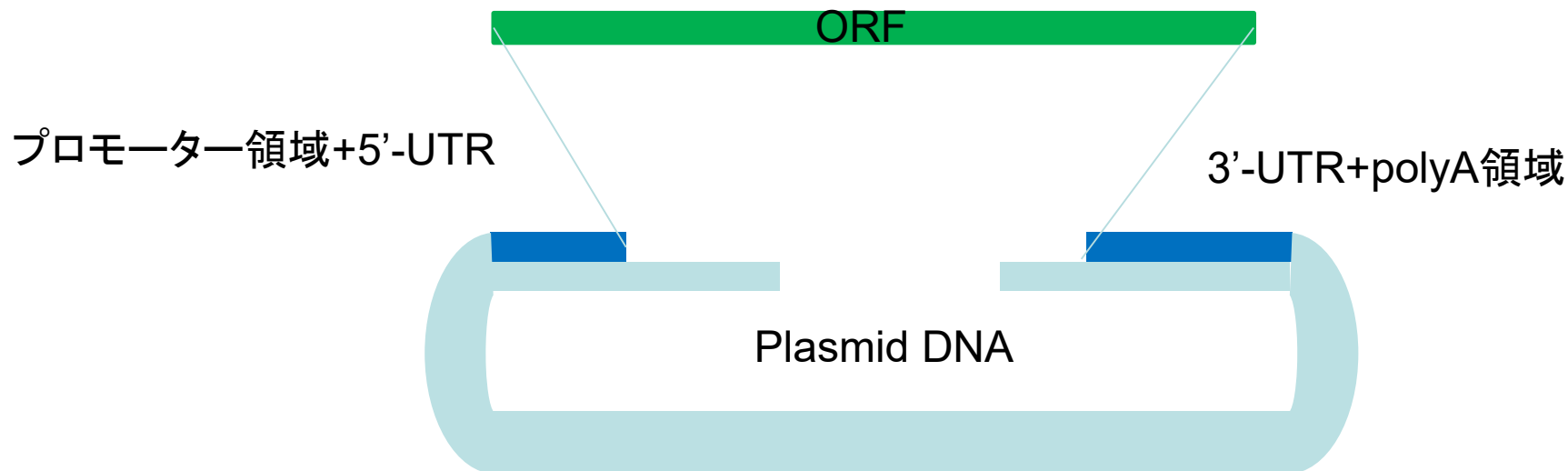
標的配列のオリゴDNA (24~27mers)を合成するだけで、標的sgRNAを転写可能な鋳型DNAを作成可能。PCRでは作成できない配列(polyN配列)も作成可能で標的配列には一切依存しない。

siRNAやmiRNAにも対応可能。

キット化を希望しています。

想定される用途- 2

mRNA医薬の製造



ORF部分をCAIOSで作成すれば、plasmidに導入後そのままDNA増幅がin vitroで可能 (Cell-free cloning)。現在polyAの長さ(100 base)をより長く(150~350 base)変更可能な技術を開発中で、出願予定である。

- ・ mRNAワクチン合成を加速、変異株にも迅速に対応できる
- ・ オリゴ由来のエラーは希釈で除去するので、正確な配列が得られる。
- ・ 全行程を宿主フリーで製造するので、LPS-free製造が可能



企業への期待

- **キット開発の共同研究**
 - sg RNA (siRNA, miRNA)ライブラリーキット
 - mRNA合成キット
 - CAIOSキット 他
- **各種事業 (ex. mRNA医薬品製造) への本技術の適用に関する共同研究**

本技術に関する知的財産権

1. 発明の名称 : 合成DNA分子の製造方法
出願番号 : 2021-081230
公開番号 : 2022-175086
出願人 : 国立大学法人広島大学
発明者 : 岡村好子、高橋宏和、堀尾京平、猿渡雄哉

2. 発明の名称 : 鋳型DNAの製造方法
出願番号 : 2021-183664, PCT/JP2022/040284
(日本は指定国から除外)
公開番号 : 2023-071073
出願人 : 国立大学法人広島大学
発明者 : 岡村好子、高橋宏和

お問い合わせ先

広島大学
産学連携部 産学連携部門

T E L 082-424-4302

F A X 082-424-6189

e-mail techrd@hiroshima-u.ac.jp