

配布先: 文部科学記者会、科学記者会、名古屋教育記者会

2024年3月11日

報道機関 各位

## PCR 停止プライマーを用いた高効率な DNA 連結法を開発 ～DNA ライブラリー構築や、ゲノム合成などへの広い応用に期待～

### 【本研究のポイント】

- ・DNA のリン酸部へ  $\rho$ -ニトロベンジル<sup>注1)</sup>修飾を導入した、PCR<sup>注2)</sup>停止プライマー<sup>注3)</sup>を開発した。
- ・任意の長さや配列の接着末端<sup>注4)</sup>を有する DNA 断片の調製を可能にした。
- ・従来の制限酵素<sup>注5)</sup>法と比較して高効率での DNA 連結を可能にした。
- ・DNA ライブラリーの構築やゲノム合成に応用することで、ゲノムの機能解明や創薬への貢献が期待される。

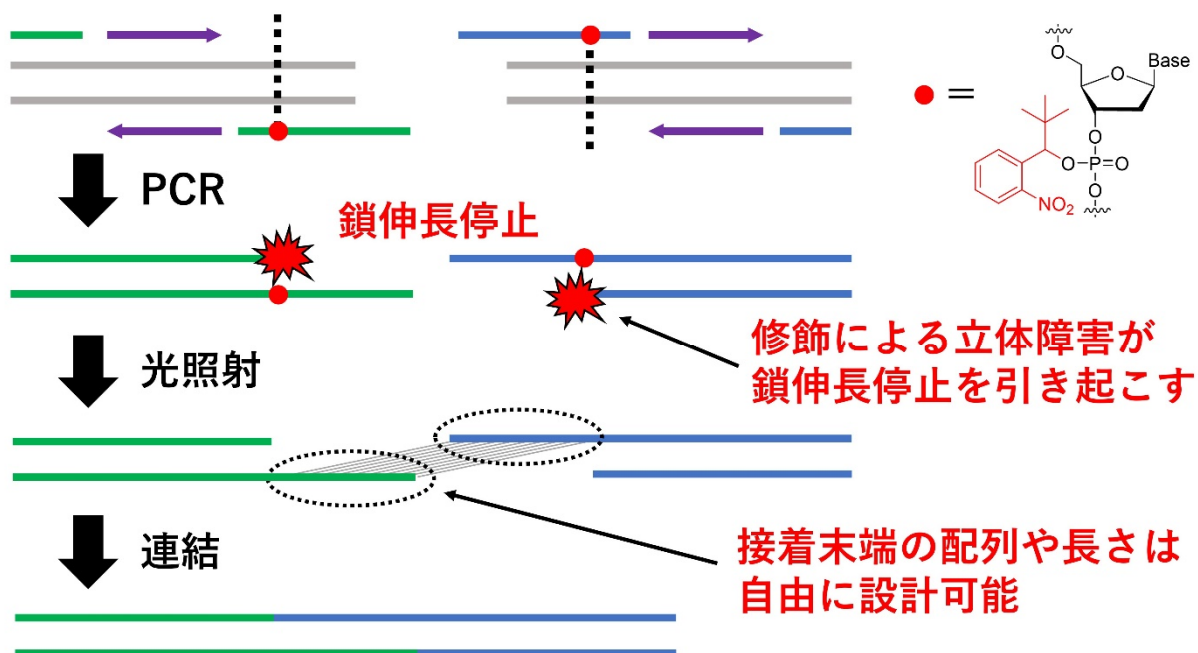
### 【研究概要】

名古屋大学大学院理学研究科の阿部 洋 教授、橋谷 文貴 助教、木村 康明 准教授、野村 浩平 博士後期課程学生らの研究グループは、東京大学の浅井 潔 教授、寺井 悟朗 特任准教授、岐阜大学の岡 夏央 准教授、理化学研究所の清水 義広 博士との共同研究で、高効率な DNA 連結を可能にする PCR 停止プライマーを開発しました。この PCR 停止プライマーを用いて調製した DNA 断片を用いることで、高い効率での連結を達成しました。この手法では、光で除去できる  $\rho$ -ニトロベンジル基を導入したプライマーを用いて PCR を行うことで、ポリメラーゼ<sup>注6)</sup>の鎖伸長反応を修飾導入位置で停止させ、接着末端を形成することができます。

本技術の特徴は、接着末端の長さや配列を自由に設計できる点です。これにより、長鎖の接着末端を形成することが可能となり、DNAの連結効率が向上しました。また、様々な配列を設計できるため、複数の断片を同時に連結することも可能です。

従来の制限酵素を用いた DNA 連結法では、連結できる DNA の長さに制限がある点や、連結効率が低い点が課題でした。本技術ではこれらの課題を克服した新たな DNA 連結技術として、分子生物学や、遺伝子工学、合成生物学といった幅広い分野の研究で貢献する可能性があります。例えば、DNAライブラリーの構築を通じたタンパク質設計や核酸の機能の向上、長鎖 DNA の合成によるゲノムの機能解明や医薬品開発につながるゲノムの創製などが期待できます。

本研究成果は、2024年2月26日付イギリス王立化学会(RSC)が発行する雑誌「RSC Chemical Biology」に掲載されました。



## 【研究背景と内容】

DNA の効率的かつ正確な連結技術は、分子生物学、生化学、遺伝子工学など、幅広い分野で極めて重要です。例えば、新機能を持つタンパク質を設計したり、mRNA<sup>注7)</sup>の配列を最適化して翻訳効率を向上させたりするためには、多様なDNA配列を含むライブラリーを構築する必要があります。DNAライブラリーの構築には、高効率なDNA断片の連結技術が不可欠です。また、合成生物学では、長鎖のゲノムDNAの合成を目指しており、複数のDNA断片を効率的に連結する技術が必要とされています。

これまで、DNAの連結には主に酵素が用いられてきました。例えば、Golden Gate Assemblyという手法では、特定の配列を制限酵素が認識してDNAを切断し、接着末端を形成させます。その後、生じた接着末端同士が二本鎖を形成し、DNAリガーゼ<sup>注8)</sup>によってつなぎ合わせることができます(図1a)。しかし、この手法には次の2つの課題があります。①制限酵素の認識配列が6塩基対と短いため、理論的には $4^6 = 4096$ 塩基の間隔で認識配列が出現してしまう点、②形成される接着末端が4塩基と短いため、DNA断片間で安定した二本鎖を形成できない点です。

本研究では上記の課題を解決するため、酵素を使わない化学的な接着末端形成手法を開発しました。DNAのリン酸部に、光によって切断できる *o*-ニトロベンジル保護基を導入したPCR停止プライマーを新たに設計しました(図1b)。この修飾により、ポリメラーゼの鎖伸長反応が立体的に阻害され、PCR産物に5'突出領域を形成させることができます。PCR停止プライマーはその合成時に、接着末端となる部分を任意の長さ・配列で設計することができ、配列設計の制約がなくなります。これにより、従来の制限酵素法では不可能であった長さの接着末端を形成することが可能になります。

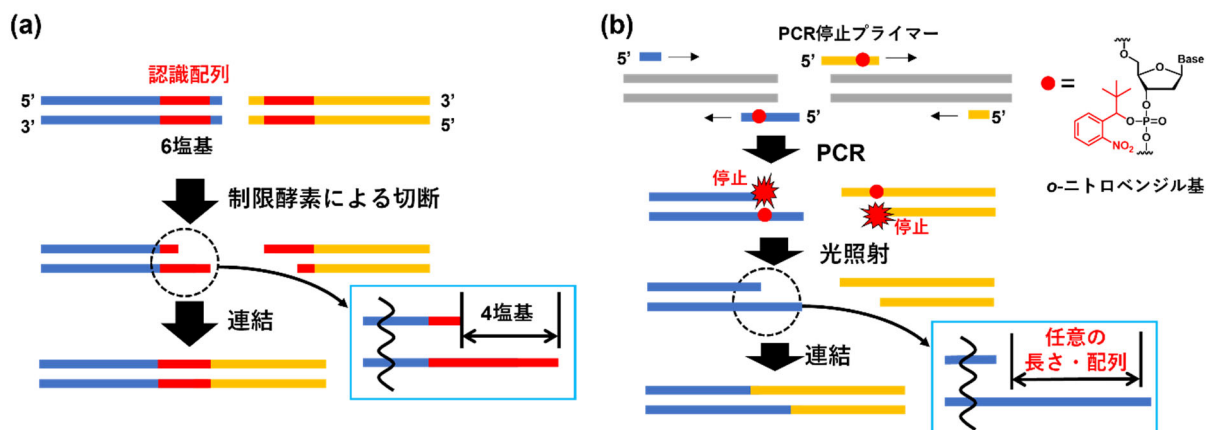


図1. DNA 連結技術の概要。(a)制限酵素を用いた DNA の連結法。(b)本研究で開発したPCR停止プライマーによるDNAの連結法。

はじめに、PCR 停止プライマーによる接着末端の形成を、突出領域に制限酵素の認識配列を含めることで確認しました。鎖伸長停止が起こらず平滑末端<sup>注9)</sup>となった場合、制限酵素の認識配列が二本鎖となり、制限酵素による切断が起こります。一方、鎖伸長反応が停止し接着末端が形成された場合、制限酵素は一本鎖を認識しないため鎖切断は起こりません(図2a 左側)。通常のプライマーと PCR 停止プライマーを用いた PCR 産物を制限酵素処理した結果、通常のプライマーでは平滑末端となるので切断産物が確認されたのに対し、PCR 停止プライマーの場合には確認されませんでした(図2a 右側)。この結果から、PCR 停止プライマーを用いることで接着末端が形成されたことが確認されました。

次に、PCR 停止プライマーを用いて実際に DNA 連結を行いました。接着末端が 50 塩基となるように PCR 停止プライマーを設計し、2 kbp<sup>注10)</sup>と 3 kbp の DNA 断片を合成しました。DNA 断片同士の連結を行ったところ、77% の連結効率を示しました(図 2b 左側)。比較として、同じ配列を用いて Golden Gate Assembly を行ったところ、その連結効率は 44% でした(図 2b 右側)。PCR 停止プライマーを用いた手法により、従来の制限酵素法と比べて連結効率が著しく向上しました。これは、制限酵素によって形成される 4 塩基の接着末端の  $T_m$  値<sup>注11)</sup>が約 10 °C であるのに対し、PCR 停止プライマーによって形成される 50 塩基の接着末端の  $T_m$  値が 76 °C であるため、熱力学的安定性の向上が寄与していると考えられます。

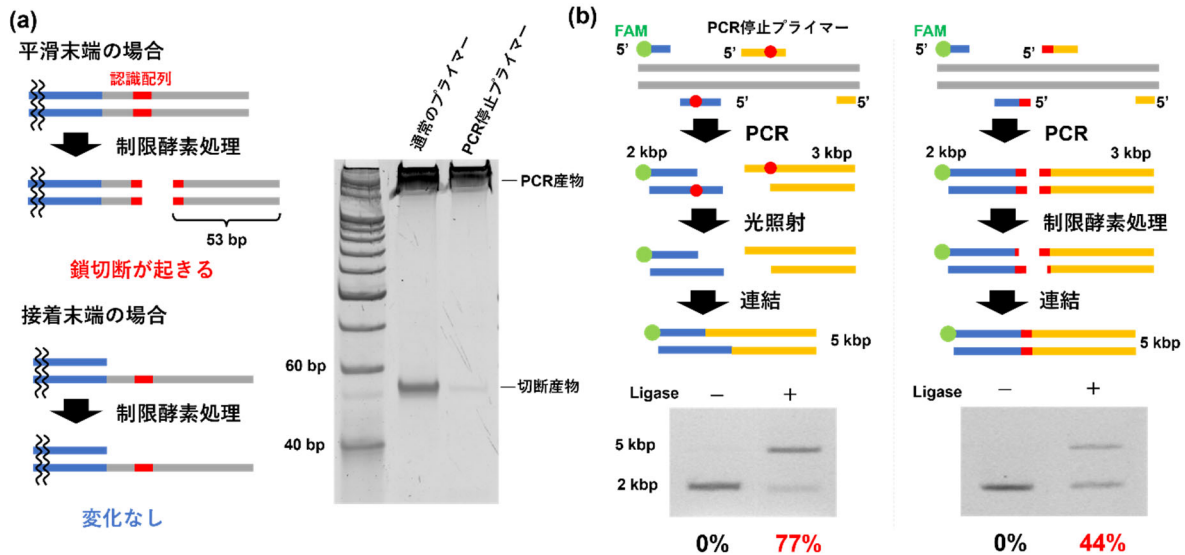


図 2. PCR 停止プライマーによる接着末端の形成とそれを用いた DNA 連結の結果。(a)PCR 停止プライマーを用いることで接着末端の形成を確認した。(b)PCR 停止プライマーを用いた場合と制限酵素処理を用いた場合の DNA 連結効率の比較を行った。ゲルのバンドは FAM<sup>注12)</sup>で検出した。

最後に、48.5 kbp からなる λファージ<sup>注13)</sup>のゲノムDNAを標的として、制限酵素では実現困難な 4 断片の同時連結によるゲノムDNAの構築を試みました。PCR停止プライマーを用いて、断片1~4を合成しました。合成した断片1~4を混合し、室温または 50 °C で 7 日間静置し、反応の時間経過をゲル電気泳動で解析しました。その結果、どちらの場合も完全長の連結産物のバンドが確認され、加熱によって断片間の連結が促進されることが明らかになりました(図3)。以上の結果から、PCR停止プライマーを用いることで、複数のDNA断片の同時連結によるゲノム DNA の合成が可能であることが示されました。

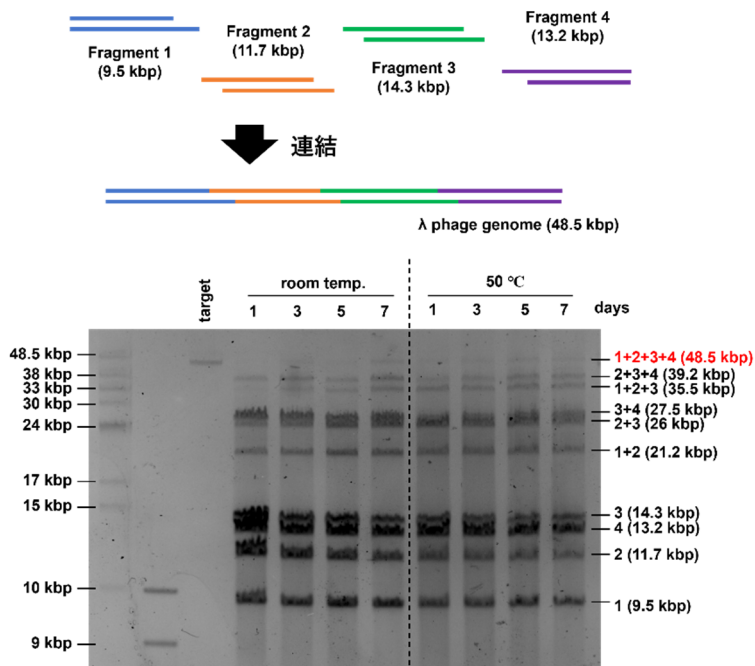


図3. λファージゲノムの4断片同時連結による合成結果。

## 【成果の意義】

本研究では、PCR によって任意の配列の接着末端形成を可能にする PCR 停止プライマーを開発しました。この PCR 停止プライマーを用いることで従来の酵素法では困難であった 50 塩基の接着末端を形成させることが可能となり、制限酵素法と比較して DNA の連結効率が大幅に向上し、さらに、48.5 kbp からなる入ファージゲノムの4断片からの合成を達成しました。

従来の制限酵素を用いた手法では実現困難であった、接着末端の長さや配列を自由に設計できる点や、長鎖 DNA の連結を可能にした点は、本手法の特徴であり強みです。本研究の DNA 連結手法により、将来的にはゲノムの機能やその原理の解明、医薬品開発につながるゲノムの創製など、幅広い応用の可能性を秘めています。また、本手法を用いた DNA ライブラリーの作成技術が確立できれば、これまで困難であった複数箇所にランダム配列を持つ DNA ライブラリーの作成が可能となり、これまでにない独創的な技術になると期待されます。

本研究は、平成30年度から始まった科学技術振興機構(JST)CREST の『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』の支援のもとで行われたものです。

## 【用語説明】

注 1)  $\rho$ -ニトロベンジル:

ベンジル基のオルト位にニトロ基(-NO<sub>2</sub>)を有する。光を照射することで脱離させることが可能な置換基。

注 2) PCR:

ポリメラーゼ連鎖反応(Polymerase Chain Reaction)の略称。DNAポリメラーゼと呼ばれる酵素を利用し、一連の温度変化のサイクルを経て任意のDNA配列を指数関数的に増幅する手法。

注 3) プライマー:

一本鎖からなる短いDNA。PCRではプライマーの3'末端から鎖伸長反応が行われる。

注 4) 接着末端:

二本鎖 DNA の末端において、片方の鎖が突出して一本鎖状態となっている構造。

注 5) 制限酵素:

DNA の特定の認識配列の内部、あるいはその近くで DNA を特異的に切断する酵素。

注 6) ポリメラーゼ:

鋳型と相補的な塩基配列を持つ DNA(RNA)鎖を合成する酵素。

注 7) mRNA:

メッセンジャーRNA。DNA に記された遺伝情報が転写されたもので、mRNA の配列情報に基づいて、タンパク質が作られる(翻訳)。

注 8)DNA リガーゼ:

DNA の3' 末端と5' 末端をつなぎ合わせる酵素。

注 9)平滑末端:

二本鎖 DNA の末端において、両方の差が同じ長さとなっている構造。

注 10)kbp:

kilo-base pair の略。千塩基対。

注 11)  $T_m$  値:

二本鎖融解温度。二本鎖状態の DNA(RNA)のうち半分が一本鎖状態に解離する温度。二本鎖の安定性の指標として用いられ、値が高いほど二本鎖安定性が高い。

注 12)FAM:

蛍光色素であるフルオレセインのこと。

注 13)入ファージ:

48.5 kbp の長さの DNA をゲノムとして持ち、大腸菌を宿主とするバクテリオファージ。

## 【論文情報】

雑誌名: RSC Chemical Biology

論文タイトル: Development of PCR Primer Enabling the Design of Flexible Sticky Ends for Efficient Concatenation of Long DNA Fragments

著者: 野村浩平, 恩田馨, 村瀬裕貴, 橋谷文貴, 小野幸輝, 寺井悟朗, 岡夏央, 浅井潔, 鈴木大輔, 高橋南帆, 平岡陽花, 稲垣雅仁, 木村康明, 清水義広, 阿部奈保子, 阿部洋\*  
(\*は責任著者、下線は本学関係者)

DOI: 10.1039/d3cb00212h

URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2024/cb/d3cb00212h>