

課題番号	Q21L-05
課題名（和文）	新規耐熱性人工酵素の開発と合成生物学的バイオテクノロジーの開発
課題名（英文）	A New development of thermostable artificial enzymes and synthetic biological technology
研究代表者	所属（学部、学科・学系・系列、職位） 理工学部、理工学科、生命科学系、助教 氏名 高橋 俊介
	所属（学部、学科・学系・系列、職位） 氏名
共同研究者	所属（学部、学科・学系・系列、職位） 氏名
	所属（学部、学科・学系・系列、職位） 氏名
	所属（学部、学科・学系・系列、職位） 氏名
	所属（学部、学科・学系・系列、職位） 氏名

#### 研究成果の概要（和文）

近年、バイオテクノロジーが広範な産業の基盤を支える「バイオエコノミー社会」が世界的に到来しつつある。本学でもバイオエコノミー社会を実現するための基盤技術の開発に取り組むことは非常に重要である。そこで、本研究では合成生物学や基礎的な遺伝子工学に必要な道具である、二本鎖 DNA 結合タンパク質、DNA 連結酵素、DNA 合成酵素などの候補遺伝子の選定、設計、人工合成、そして、ベクター構築した。これらの構築 DNA はサンガー法により正しい DNA 配列であることが示された。今後、これらの構築ベクターを大腸菌へと導入し、タンパク質発現、精製、機能評価を実施し、新たな酵素創出やバイオテクノロジーの開発へと展開させる。

#### 研究成果の概要（英文）

In this study, I selected, designed, artificially synthesized, and constructed the candidate genes such as double-stranded DNA-binding proteins, DNA ligases, and DNA polymerases, which are necessary tools for synthetic biology and genetic engineering. These constructed vectors were shown to have the correct DNA sequence by a sanger sequencing. In the future, we will transform these construct vectors into E. coli, and then carry out E. coli protein expression, purification, and functional properties. Through these studies, I will develop a new artificially enzyme and biotechnology.

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ゲノム解析やゲノム編集などのバイオテクノロジーにおける革新的技術と人工知能及び情報技術との融合により、バイオテクノロジーが広範な産業の基盤を支える「バイオエコノミー社会」が世界的に到来しつつある。特に、バイオテクノロジー分野において、遺伝子やプロモーター、シグナル配列などの生物の構成要素を連結した長鎖 DNA を細胞に導入することで、自然界には存在しない新しい生命機能やシステムを人工的に作り出す「合成生物学」が急速に進展している。こうしたなか、政府は、2019年にまとめた「バイオ戦略」で、2030年に世界最先端のバイオエコノミー社会を日本で実現することを目標として掲げており、『第五次産業革命』となりうるバイオ産業のもと、日本が生き残るためには、基盤技術となる合成生物学の発展を加速させる技術が必要となっている。

## 2. 研究の目的

政府が推し進めるバイオエコノミー社会を実現するための基盤技術の開発を本学でも取り組むことは非常に重要である。そこで、本研究では合成生物学やその基礎的な遺伝子工学に必要な道具である耐熱性人工酵素を開発することを通して、新たなバイオテクノロジーやバイオ・化学・医薬品・食品など産業界全体の発展に貢献するための基盤技術を開発することを目指す。

## 3. 研究の方法

National Center for Biotechnology Information (NCBI) の The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用いて、合成生物学やその基礎的な遺伝子工学に必要な道具となる、二本鎖 DNA 結合タンパク質、DNA 連結酵素、DNA 合成酵素などの候補遺伝子を選定し、設計した。

本合成法は、二段階の戦略から構成される。まず、設計した人工遺伝子断片を複数の重複一本鎖オリゴ DNA へと分割した。そして、第一段階目にて、隣合う二本の重複一本鎖オリゴ DNA をそれぞれ貼り合わせ、短い二本鎖 DNA 断片を合成した。続く第二段階目では、これらの短い二本鎖 DNA 断片を多数

連結し、全長の人工遺伝子断片へと組立てた。

合成した人工遺伝子断片は、大腸菌発現ベクターへと組換えた後、サンガーシーケンスにより DNA 配列が正しいことを確認した。

## 4. 研究成果

NCBI の BLAST を用いて、合成生物学やその基礎的な遺伝子工学に必要な道具となる、一本鎖 DNA 結合タンパク質、二本鎖 DNA 結合タンパク質、ミスマッチ DNA 切断酵素、DNA 連結酵素、DNA 合成酵素などの候補遺伝子を選定し、設計した。遺伝子配列の設計にあたり、大腸菌のコドンへと最適化した。これにより、生物種間のコドンのバイアスを取り去り、mRNA の安定性や転写や翻訳の効率を上げるが期待できる。

本研究代表者が開発した人工遺伝子合成技術を用いて、設計した各種遺伝子を人工遺伝子合成した。その結果、全ての人工遺伝子の合成に成功した。これらの人工遺伝子を TA クローニングにより、サブクローニングした後、サンガー法により全ての人工遺伝子配列が正しいことが示された。その後、タンパク質発現ベクターへと組換えることに成功した。

今後の展開として、これらの構築遺伝子ベクターが大腸菌内でタンパク質発現、精製、さらに、機能特性を評価する。機能の確認後、これらの酵素を組み合わせることによる新たな酵素の創出やバイオテクノロジーの開発を試みる。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

- ① 高橋俊介、大重真彦、桂進司、長原礼宗、DNA 及び DNA 代謝酵素の 1 分子イメージング技術の開発、第 44 回日本分子生物学会年会、2021 年 12 月、横浜
- ② ヴァヴリッカ・クリストファー、高橋俊介、渡邊直暉、清田洋正、荒木通啓、近藤昭彦、蓮沼誠久、Machine learning-based discovery of plant aryl acetaldehyde producing enzymes for the biosynthesis of benzyloisoquinoline alkaloids、第 38 回農薬環境科学研究会、2021 年 10 月、神戸