

活性化剤内包型ポーラスガラス上での 核酸合成法の開発と光制御

東京工業大学 生命理工学院

准教授 大窪 章寛

2021年11月2日

従来技術とその問題点

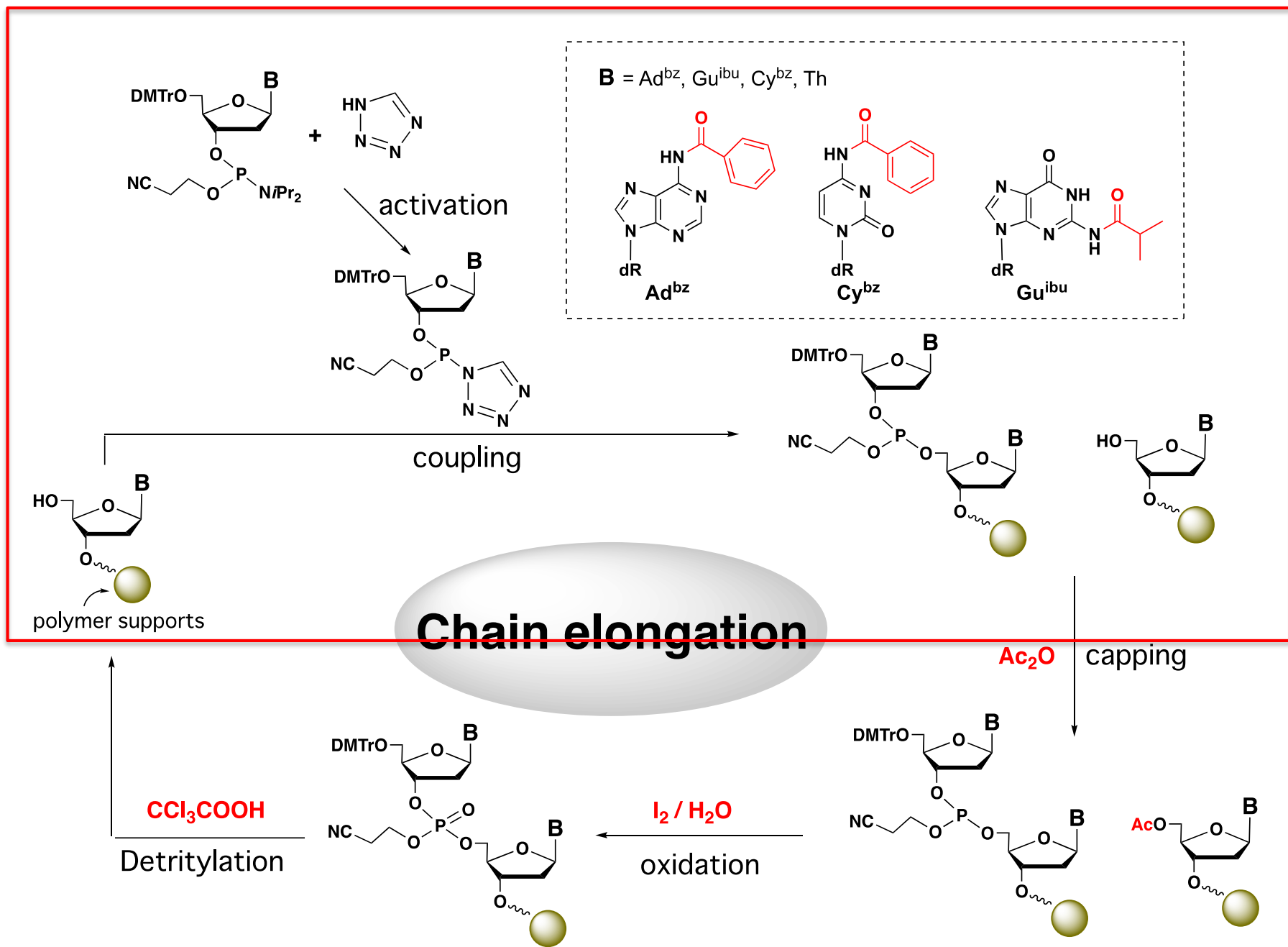
既に実用化されている核酸合成は、核酸医薬に使用される数十量体の合成は得意であるが、

百量体を超える長鎖核酸の高効率合成ができない

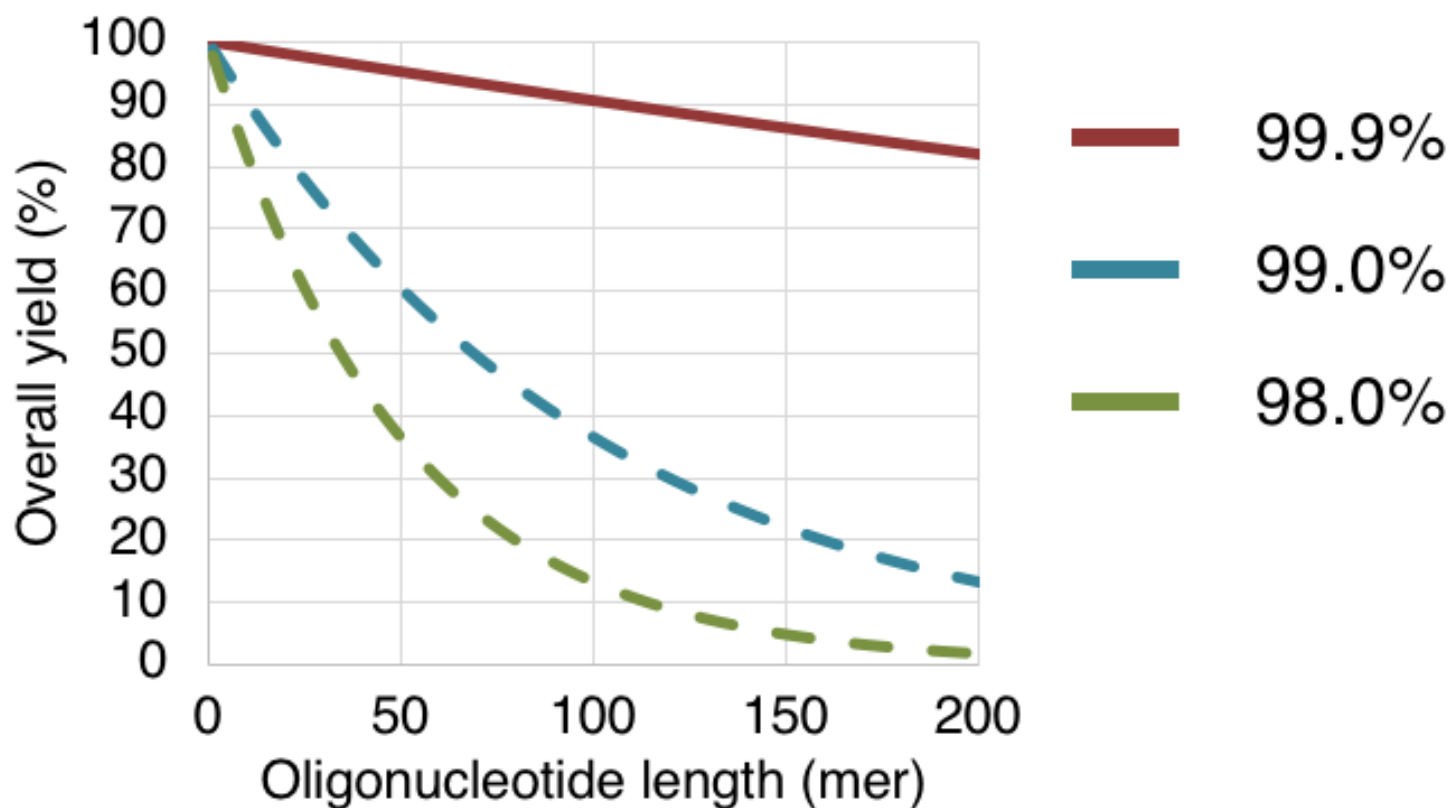
多数の核酸を高密度・大量に同時合成することができない

等の問題があり、ゲノム合成やmRNA医薬の化学合成など長鎖核酸を使用する新産業には適していない。

従来の核酸合成プロトコール



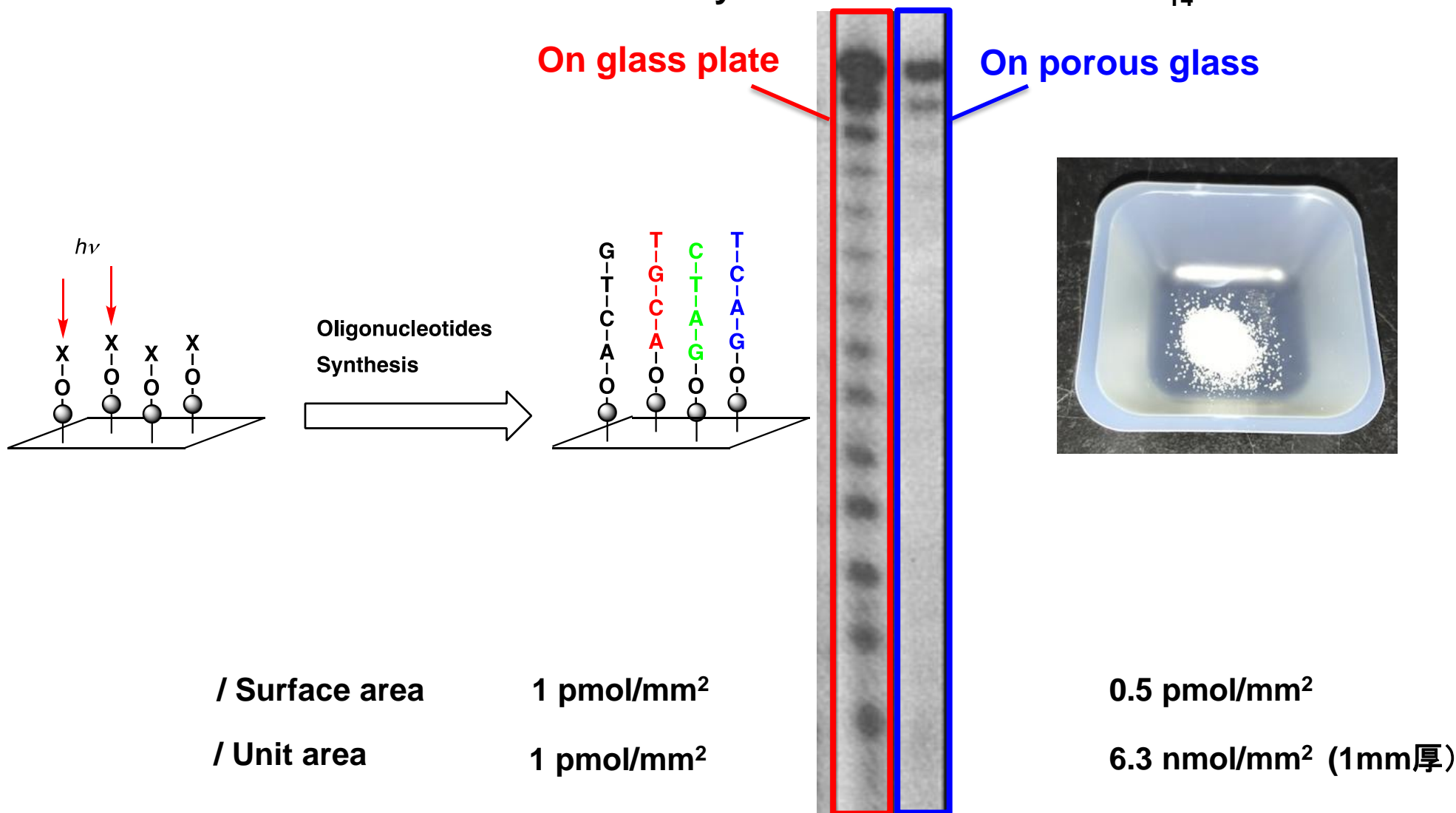
百量体を超える長鎖核酸の高効率合成ができない



多数の核酸を高密度・大量に同時合成することができない

X. Gao, Nucleic Acids Res. **2001**, 29, 2171-2180

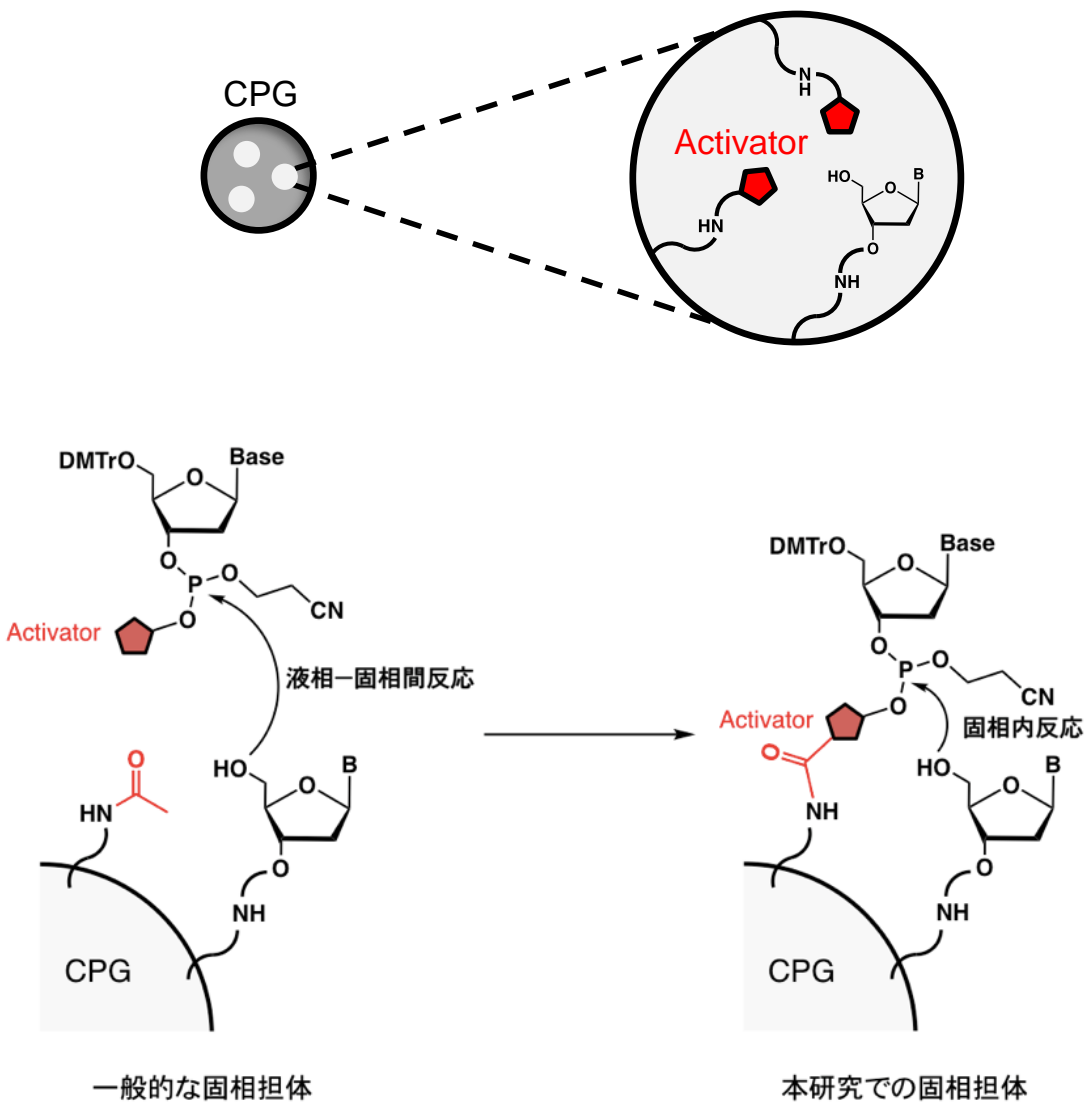
Chemical synthesis of 5'-³²P-labeled T₁₄



二つの新技術

新技術(I)

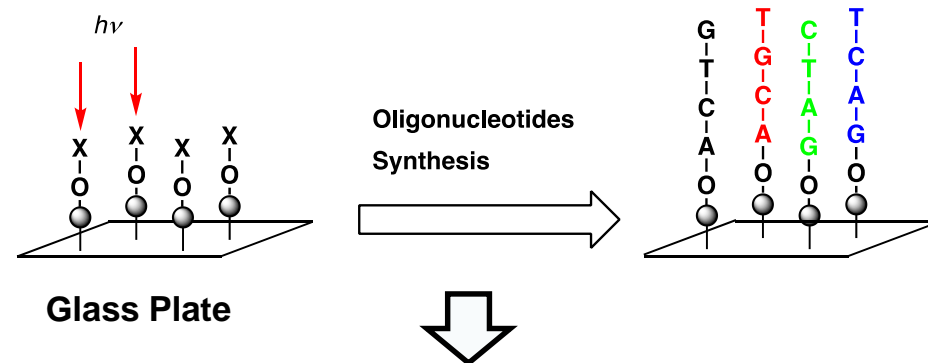
活性化剤内包型固相担体上での高効率鎖伸長
特願2019-031683



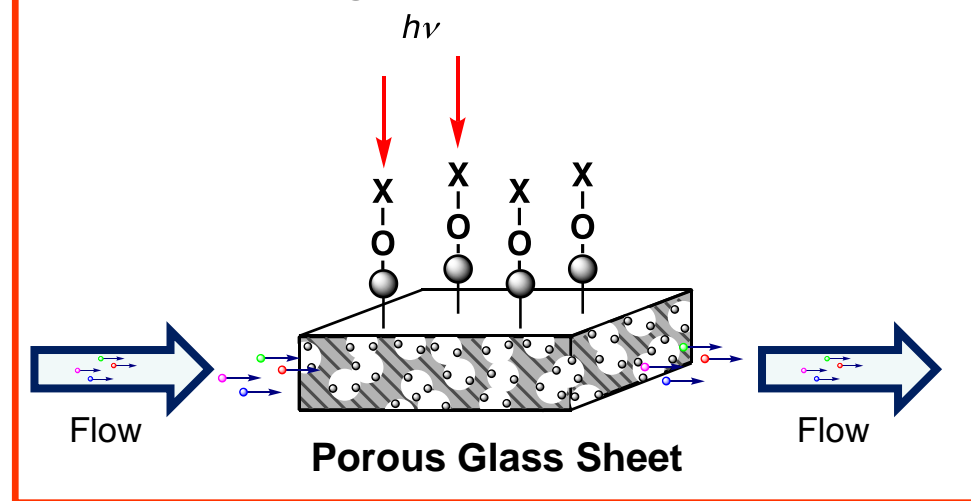
新技術(II)

光透過性を向上させたポラスガラス上での
光制御型核酸フロー合成
特願2021-033892

• On glass plate



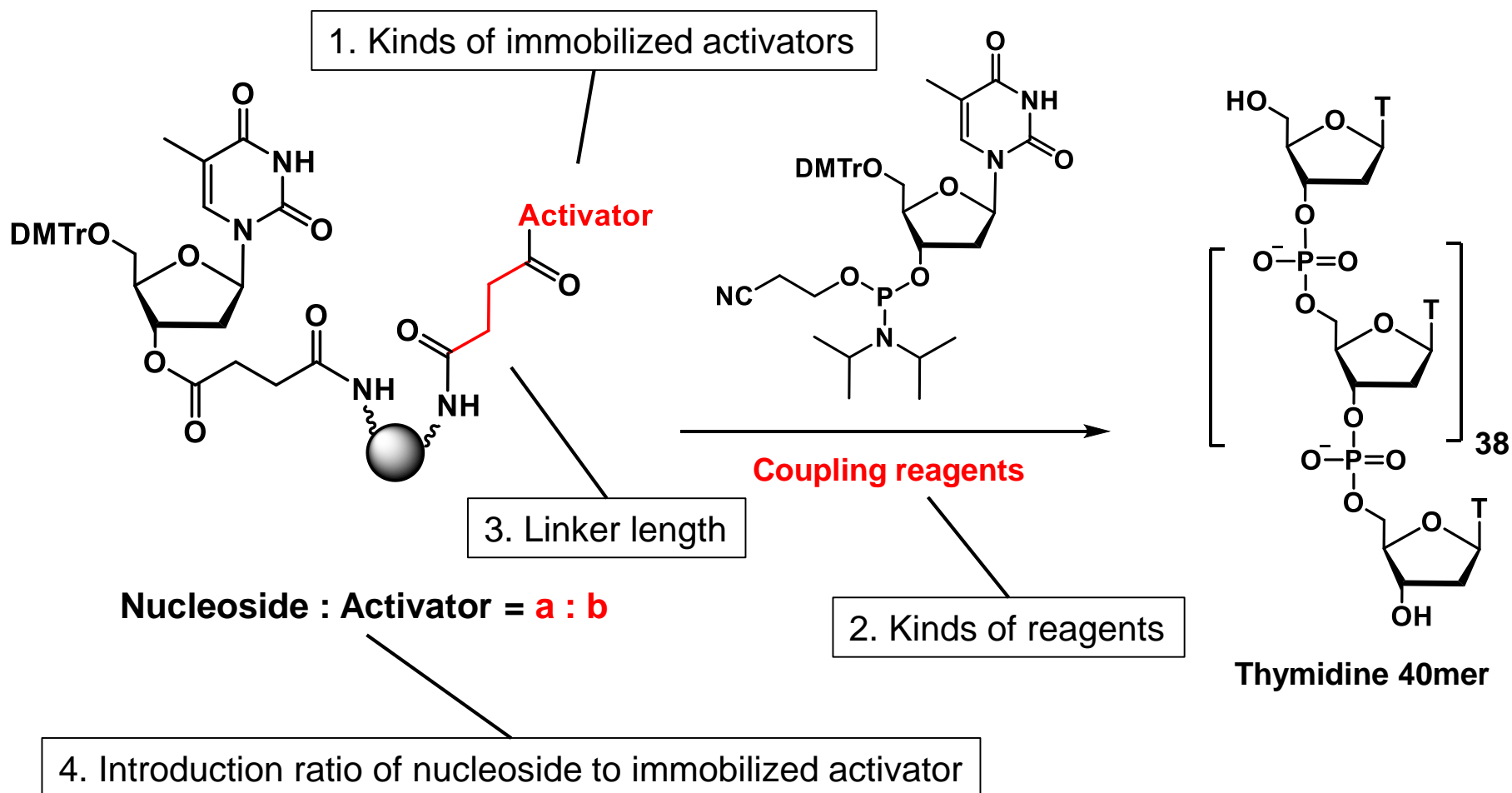
• On porous glass sheet



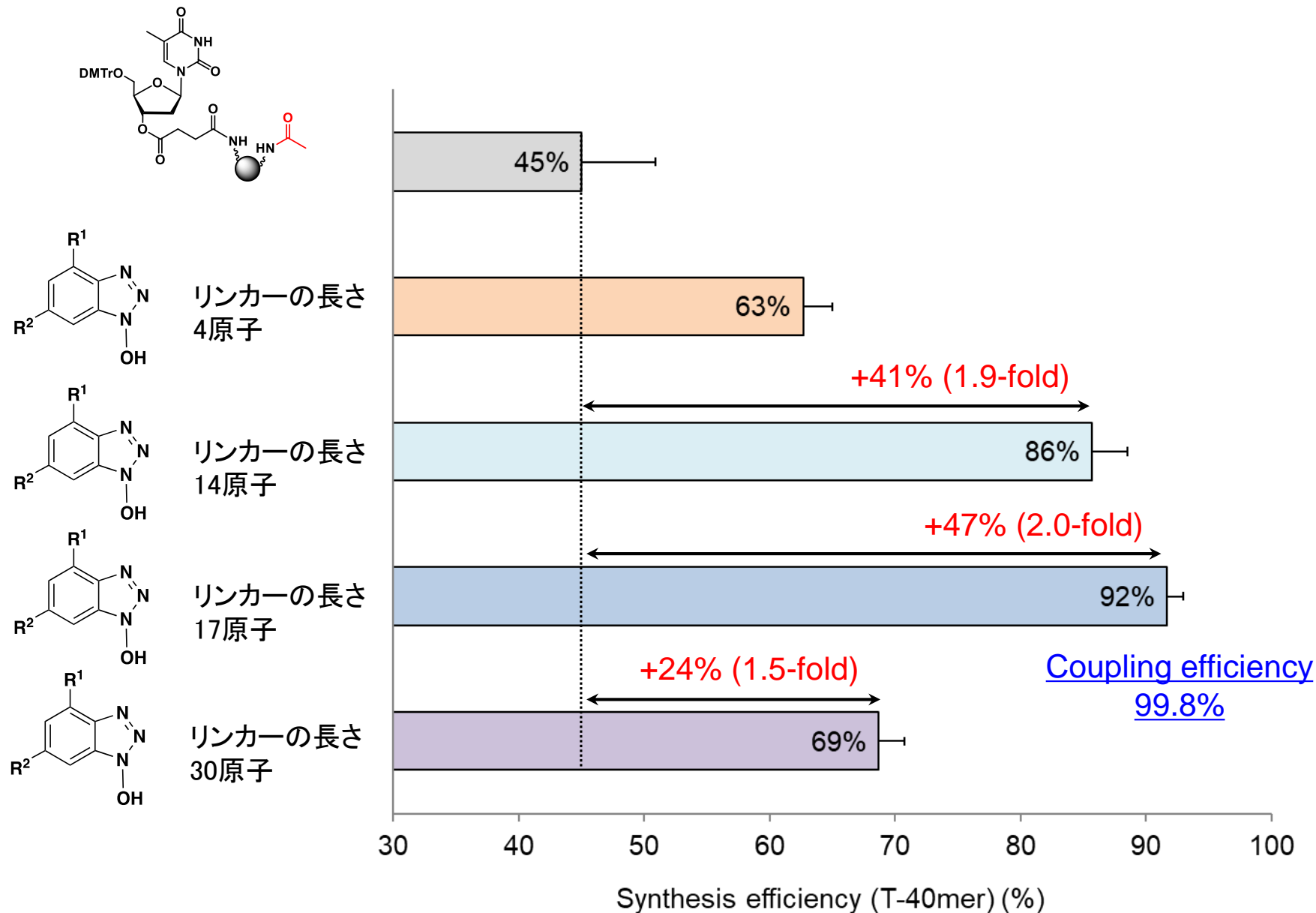
新技術(I)の特徴・従来技術との比較

- HOBt誘導体を内包した固相担体を用いることで従来技術の問題点であった、**鎖伸長効率を向上**することに成功した。
- 40量体合成時において従来の合成法と比較して**2倍の合成純度**を達成することができた。
- この**高い鎖伸長効率 (>99.8%)**は100量体以上の合成においても保たれることを明らかにした。

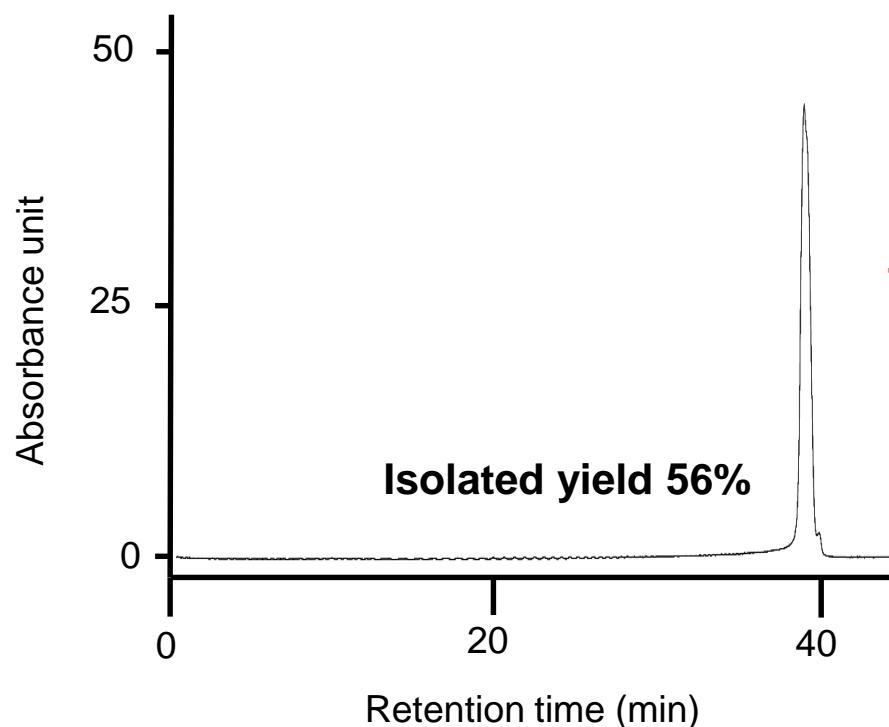
新技術(I)の特徴・従来技術との比較



新技術(I)の特徴・従来技術との比較



新技術(I)の特徴・従来技術との比較



高い鎖伸長効率 (>99.8%) は100量体以上の合成においても保たれる

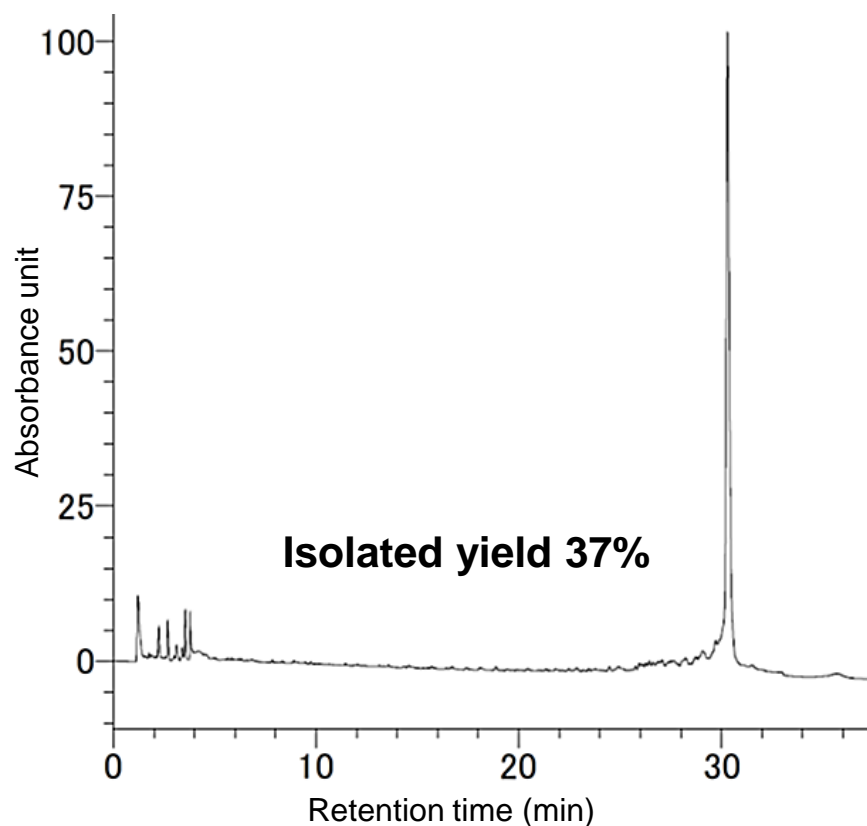
A buffer : 25mM Tris-HCl (pH8.0) buffer

B buffer : 500mM NaClO₄ in 25mM Tris-HCl (pH8.0) buffer

Flow : 1ml/min

Gradient : 0-50min, Bconc. 20-40%

新技術(I)の特徴・従来技術との比較



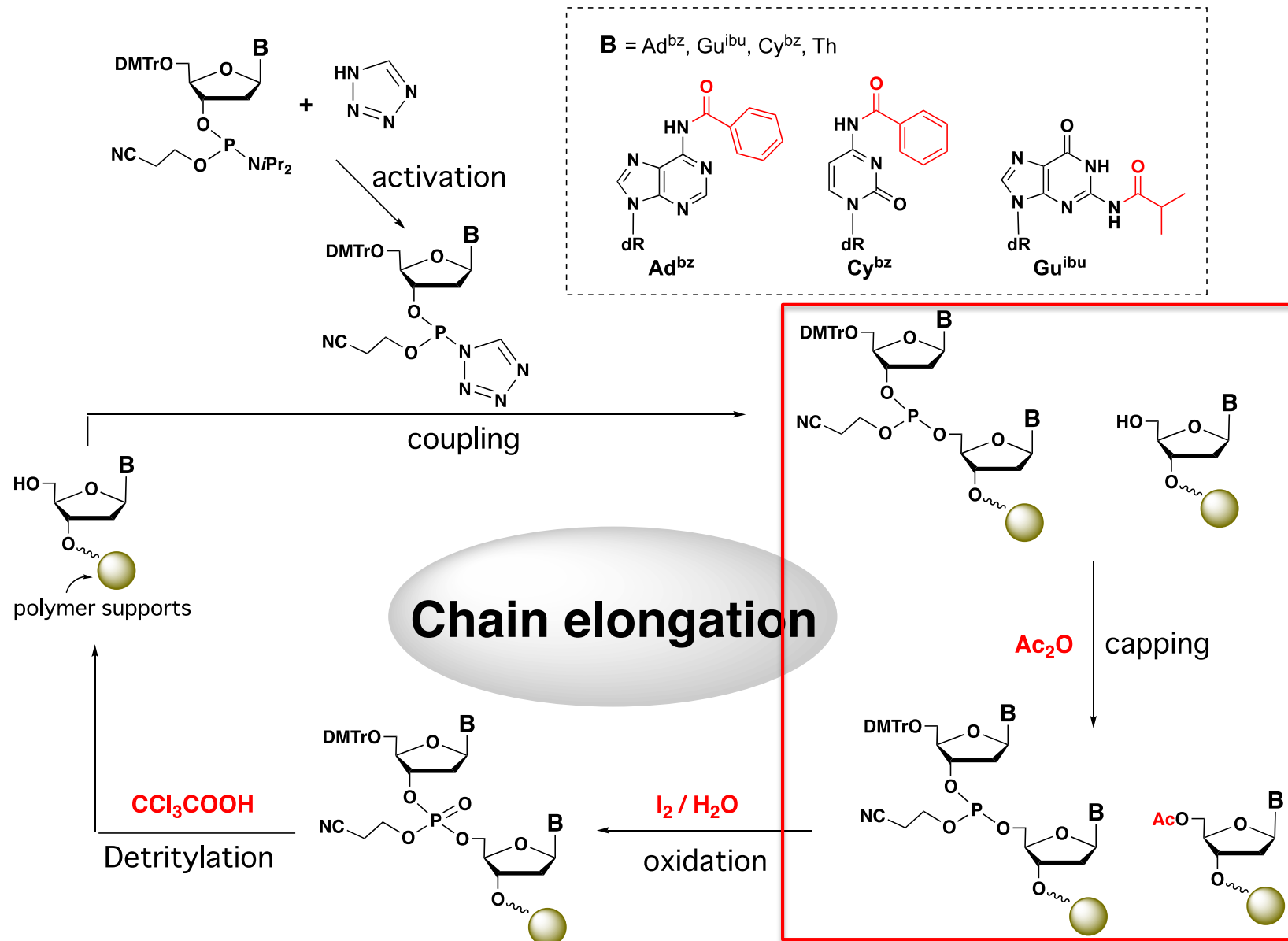
d(TGA TCC GTA TGC GGG TGT TCT GGA TCG TGT TAA
TTA TGA TCA GAT GAG CGT TTA TGT TGG TCG TGG
TGT TGG TGG TGG TAG CCT)

高い鎖伸長効率 (>99.8%) はミックス配列
の合成においても保たれる

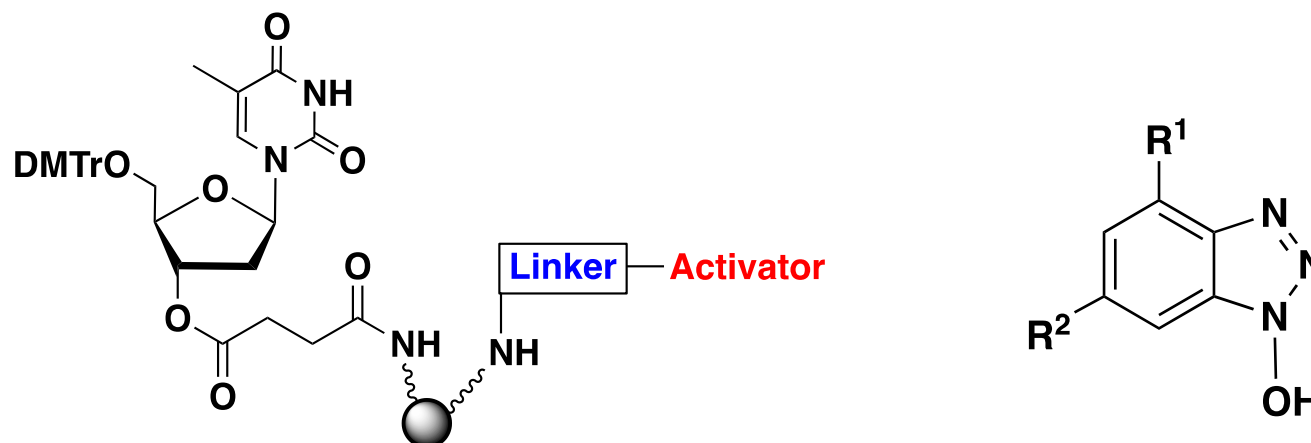
A buffer : 25mM Tris-HCl (pH8.0) buffer
B buffer : 700mM NaClO₄ in 25mM Tris-HCl (pH8.0) buffer

Flow : 1ml/min
Gradient : 0-50min, Bconc. 0-50%

新技術(I)の特徴・従来技術との比較



新技術(I)の特徴・従来技術との比較

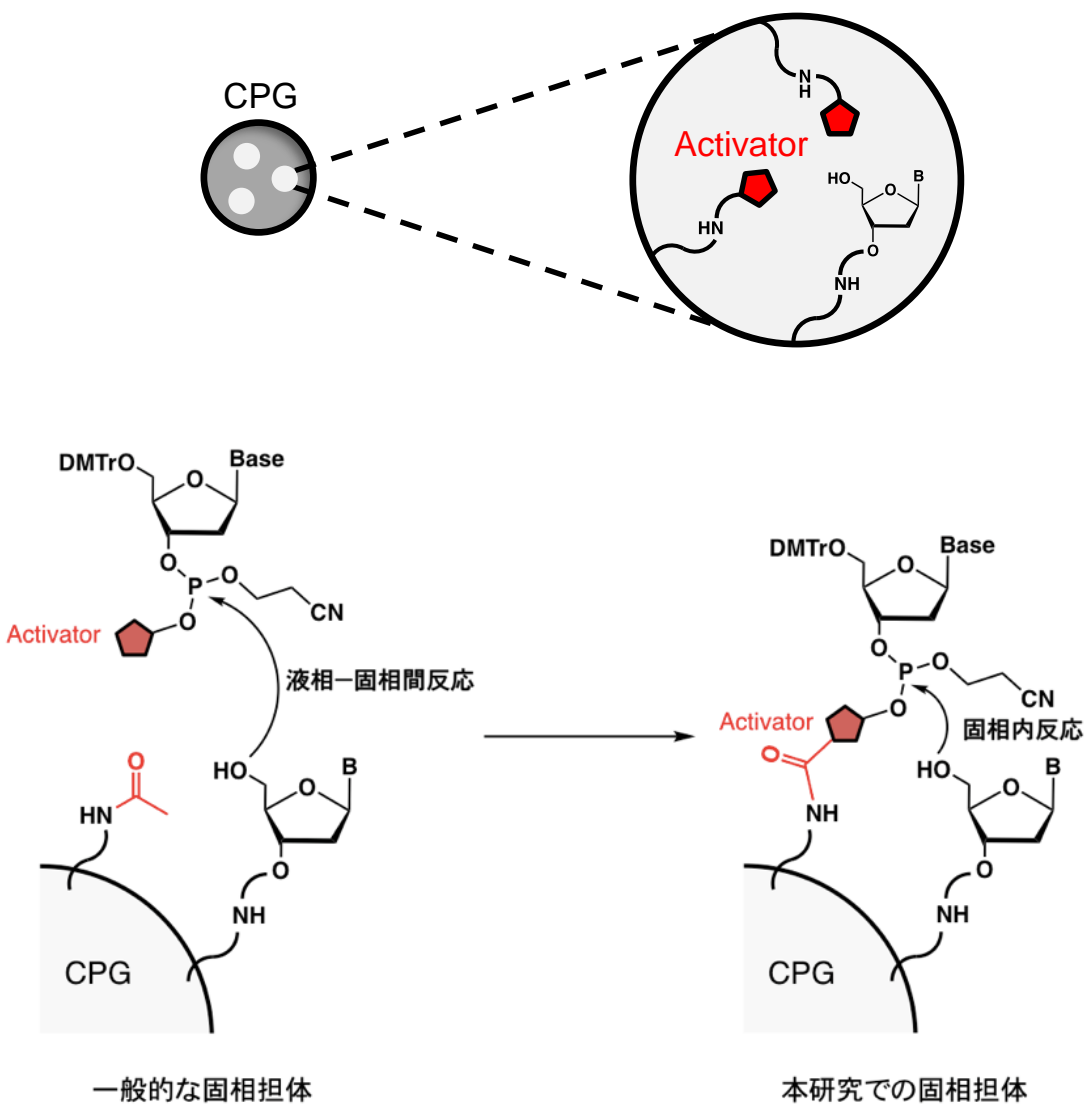


| Entry | Capping reagents | Efficiency |
|-------|--|------------|
| 1 | 5% Ac ₂ O | 87% |
| 2 | 5% Pac ₂ O | 90% |
| 3 | 5% PH(OPh) ₂ | 72% |
| 4 | 5% P(OPh) ₃ | 81% |
| 5 | 0.25 M <i>i</i> Pr ₂ NP(OBn) ₂ | >99% |

二つの新技術

新技術(I)

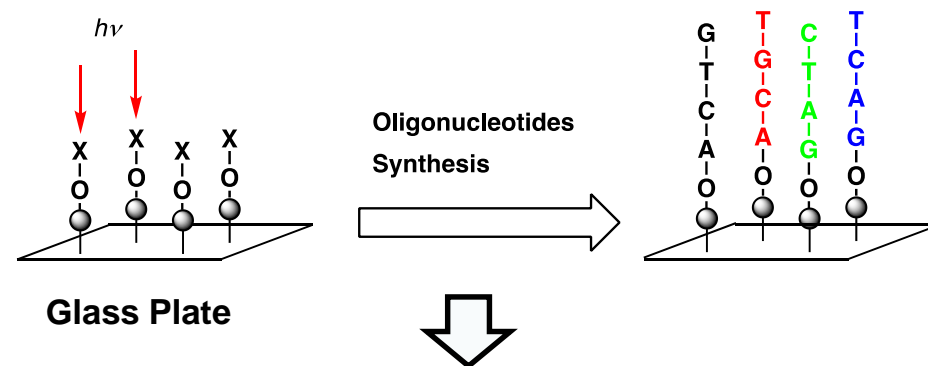
活性化剤内包型固相担体上での高効率鎖伸長
特願2019-031683



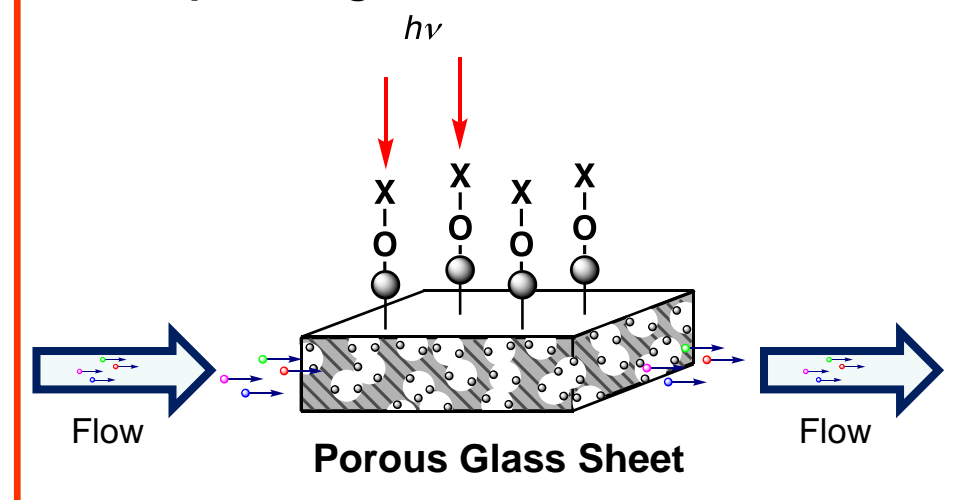
新技術(II)

光透過性を向上させたポーラスガラス上での
光制御型核酸フロー合成
特願2021-033892

• On glass plate



• On porous glass sheet



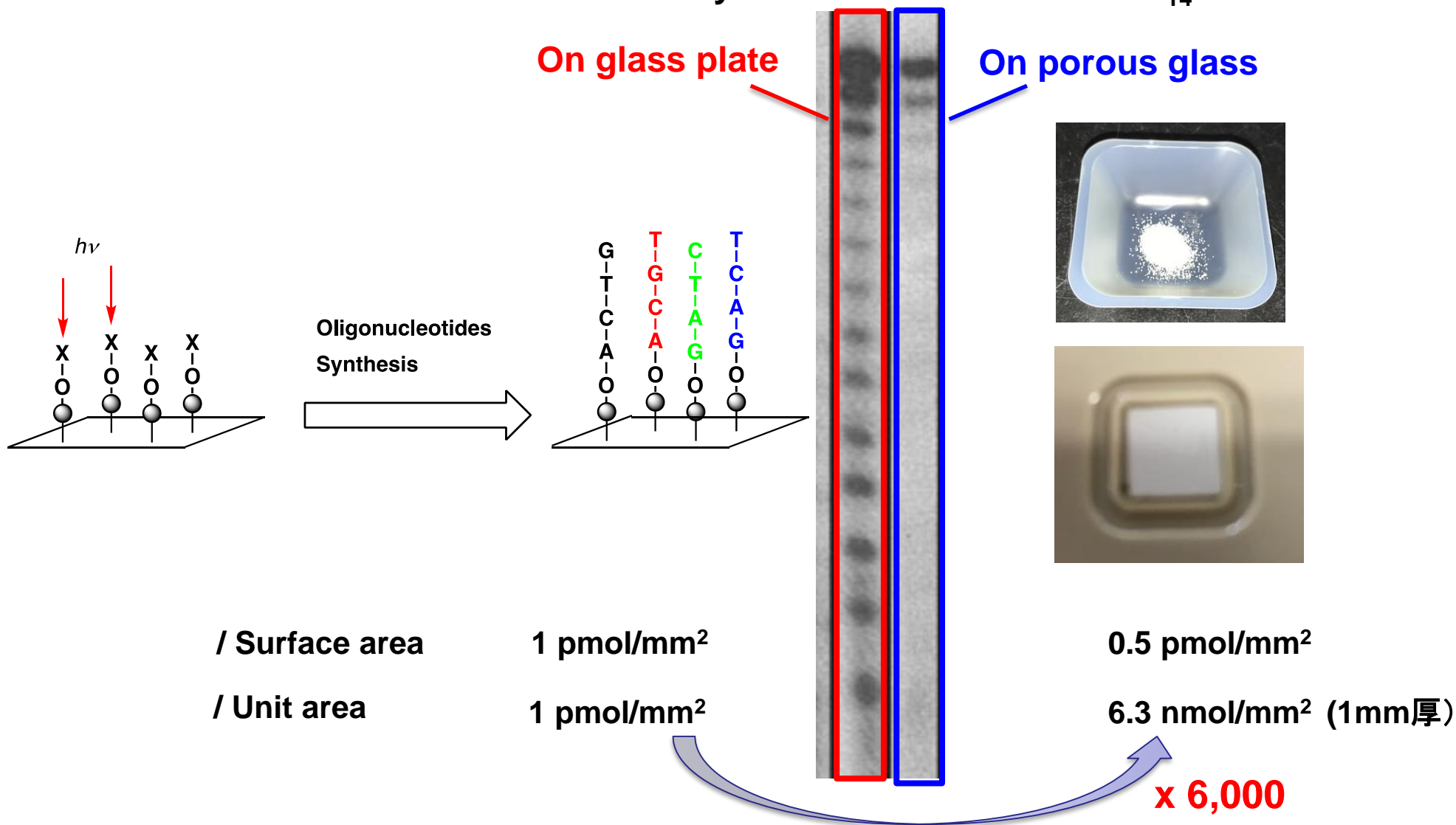
新技術(II)の特徴・従来技術との比較

- 板状ポーラスガラスの光透過性を向上した光制御型核酸フロー合成を構築し従来技術ではできなかった、**大量(6,000倍)・高密度(5,000倍)な同時合成**を可能にした。
- 200nmの細孔径をもつポーラスガラスを特定の混合有機溶媒に浸潤させることで、**光透過性を900倍以上向上**できることを明らかにした。
- また、ポーラスガラスの厚さを8mmにしても、1mmの場合と比べて**50%もの光を透過**できる。

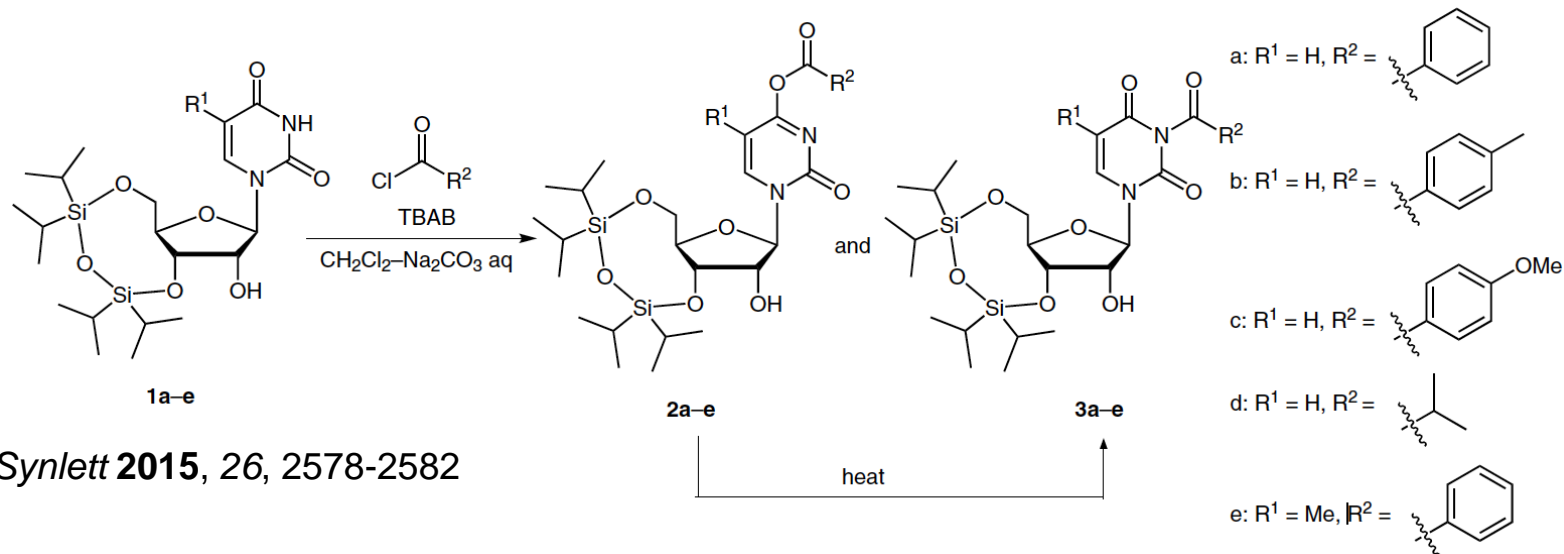
新技術(II)の特徴・従来技術との比較

X. Gao, Nucleic Acids Res. 2001, 29, 2171-2180

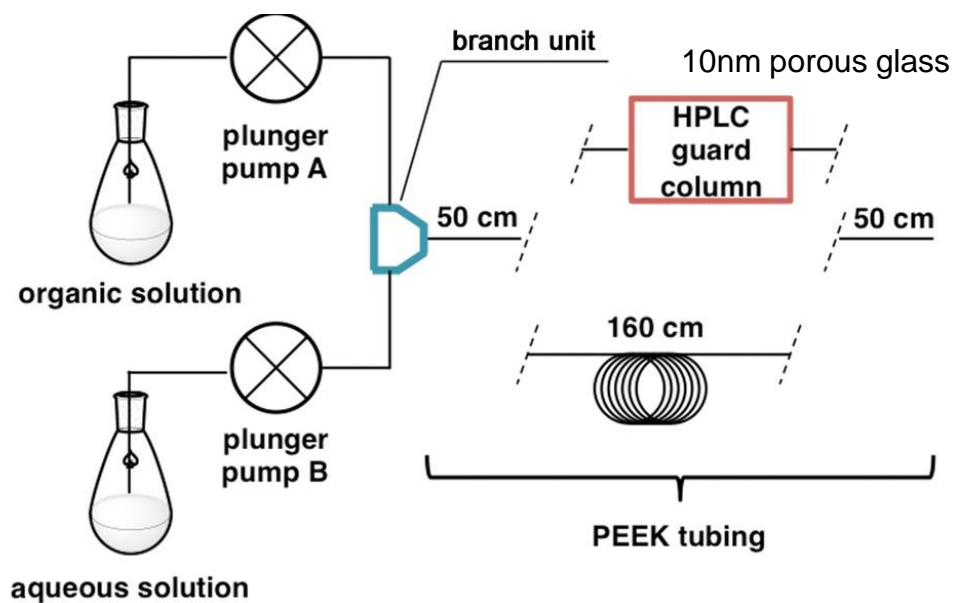
Chemical synthesis of 5'-³²P-labeled T₁₄



新技術(II)の特徴・従来技術との比較

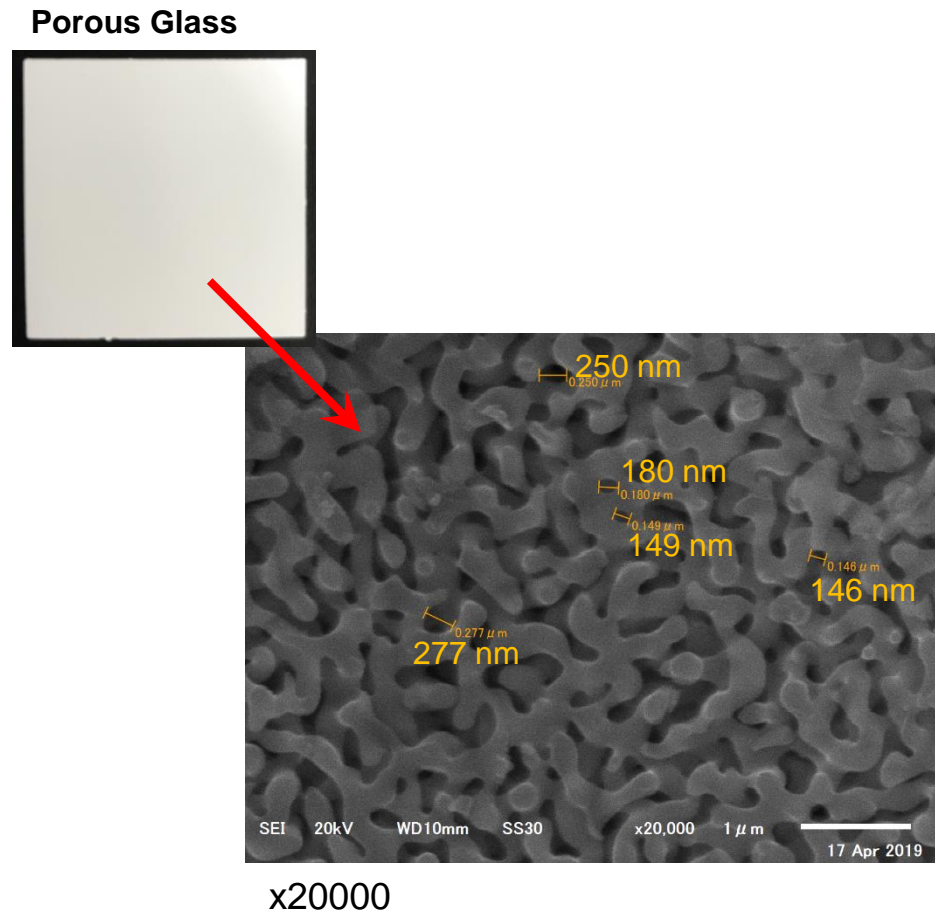


Synlett 2015, 26, 2578-2582



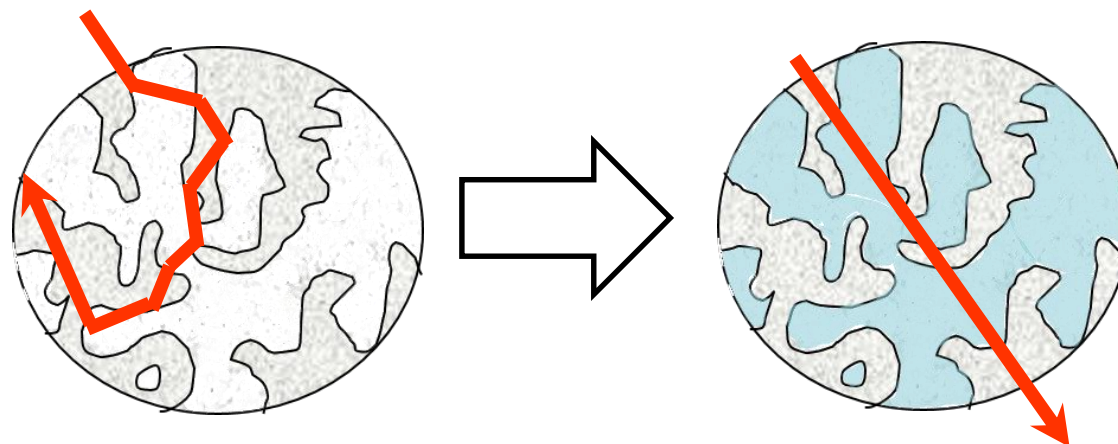
Reaction efficiency
x 1.3

新技術(II)の特徴・従来技術との比較



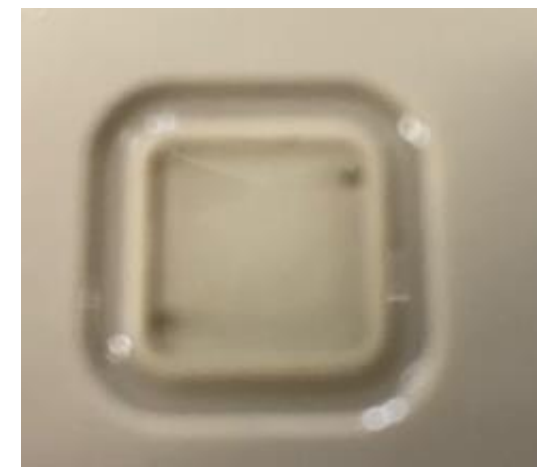
Pore Size: 110 – 461 nm
MEAN: ca. 200 nm
with metal coating [ca. 10 nm]

新技術(II)の特徴・従来技術との比較

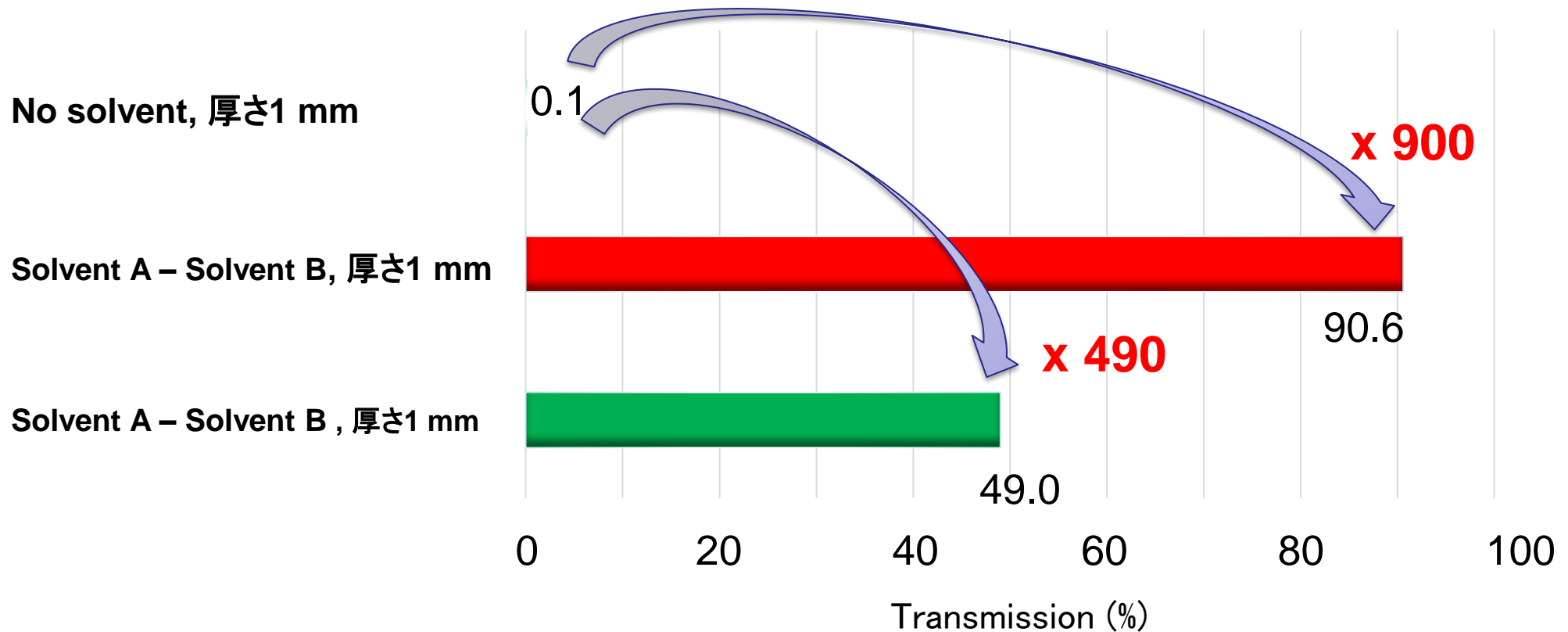
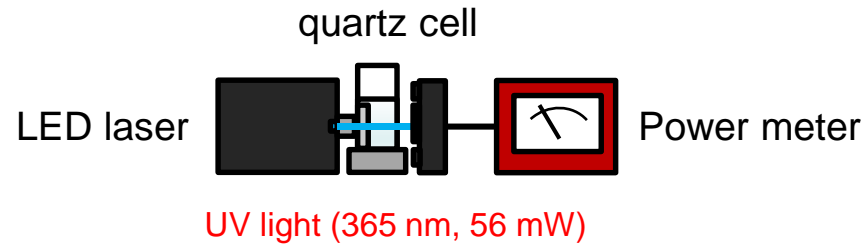


No solvent

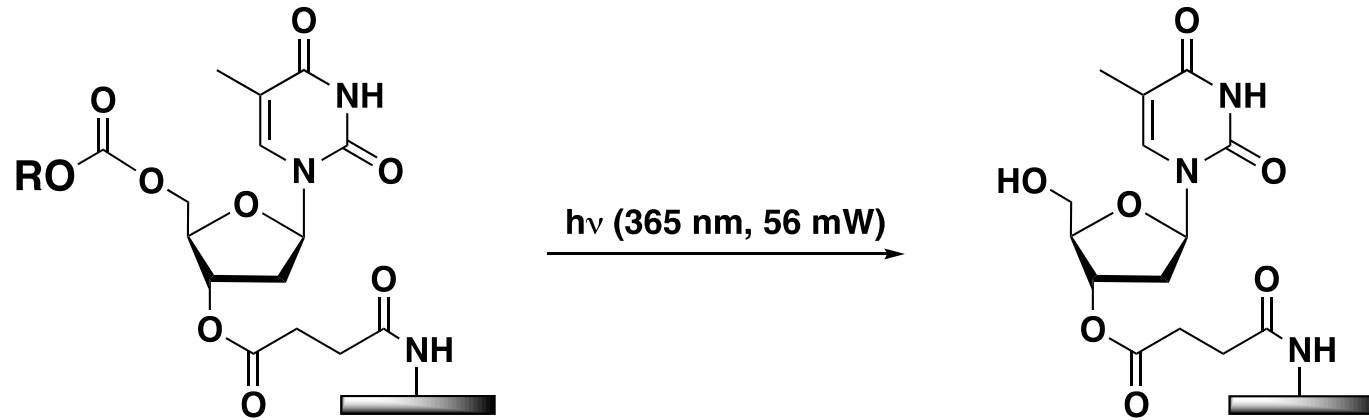
Solvent A – Solvent B



新技術(II)の特徴・従来技術との比較

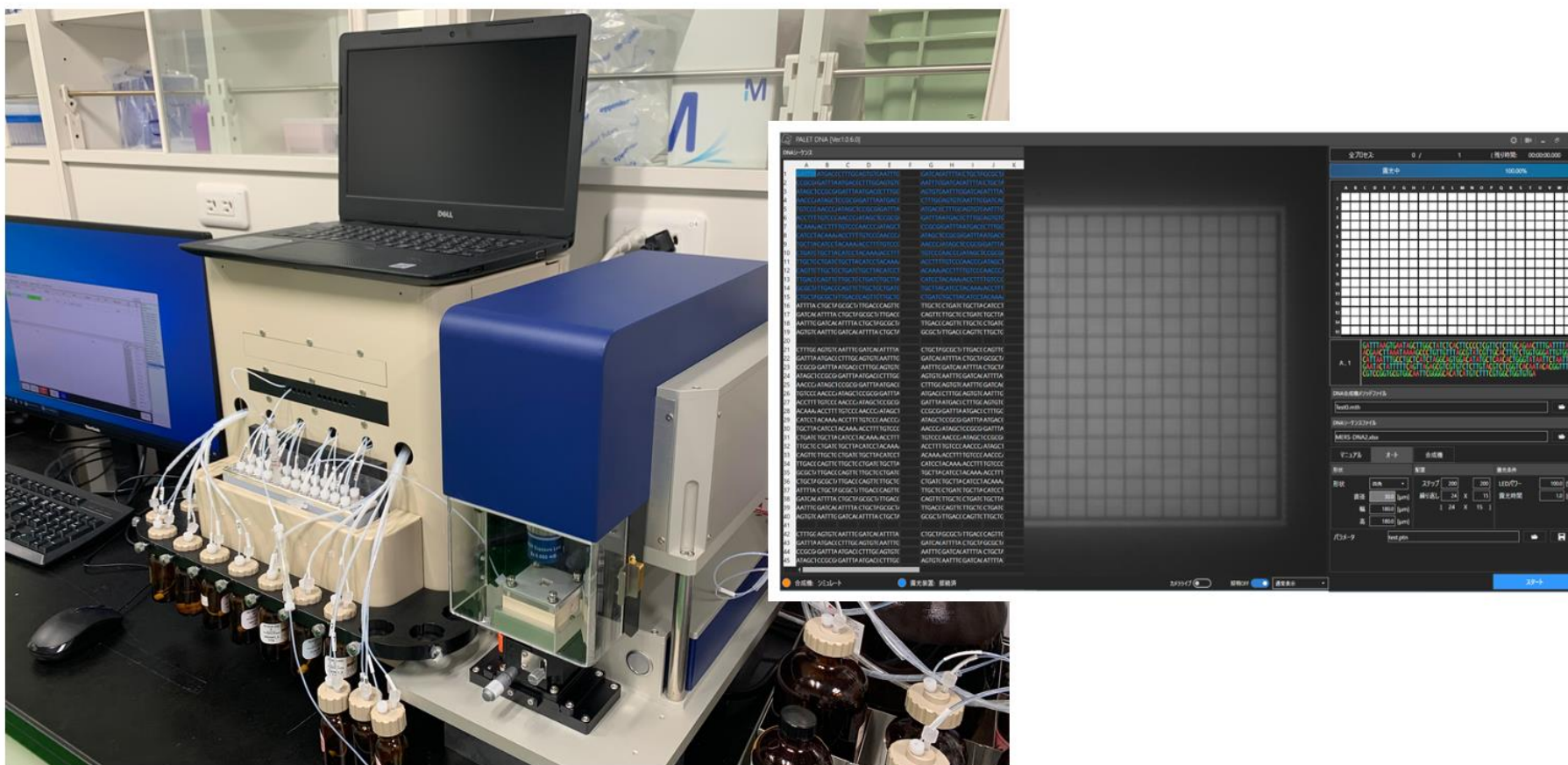


新技術(II)の特徴・従来技術との比較



| RO-ξ- | T_{comp} |
|-------|------------|
| | 100 sec |
| | 30 sec |

新技術(II)の特徴・従来技術との比較



8x8 mm の板状ポラスガラスに1pmolスケールで100万種類の核酸合成が可能
従来法に比べ5,000 倍以上の高密度合成

想定される用途

- 高純度長鎖DNAプールを用いたゲノム合成
- 純度長鎖RNAプールを用いたRNA医薬の開発
- 長鎖RNA医薬の開発
- 三次元核酸合成を利用した新規バイオチップや新規認証システムの開発

実用化に向けた課題

- 核酸合成試薬の量産化に向けた検討が必要
- フロー合成システムの最適化
- フロー合成システムの供給体制の強化

企業への期待

- 核酸合成メーカーや核酸医薬開発企業との共同研究を希望
- フロー合成システム開発の実績を持つ、企業との共同研究を希望
- 新規バイオチップや新規認証システムに興味のある企業との共同研究を希望

新技術(I)に関する知的財産権

- 発明の名称 :

核酸合成用固相担体及びそれを用いた核酸の製造方法

- 出願番号 : 特願2019-031683
- 出願人 : 東京工業大学
- 発明者 : 大窪章寛、池田黄介、三宅優

新技術(II)に関する知的財産権

- 発明の名称 :

光透過性を向上させたポーラスガラス上での
光制御型核酸フロー合成

- 出願番号 : 特願2021-033892
- 出願人 : 東京工業大学
- 発明者 : 大窪章寛、伊藤優

お問い合わせ先

**東京工業大学
研究・産学連携本部**

TEL 03-5734-3817

FAX 03-5734-2482

e-mail sangaku@sangaku.titech.ac.jp