

氏名	奈良 聖亜
学位の種類	博士(理学)
報告番号	甲第591号
学位授与年月日	2022年3月31日
学位授与の要件	学位規則(昭和28年4月1日文部省令第9号) 第4条第1項該当
学位論文題目	転写翻訳と共役した環状ゲノム複製サイクル Mini-chromosome replication cycle coupled with transcription and translation
審査委員	(主査) 関根 靖彦 (立教大学大学院理学研究科教授) 花井 亮 (立教大学大学院理学研究科教授) 末次 正幸 (立教大学大学院理学研究科教授)

## I. 論文の内容の要旨

### (1) 論文の構成

論文は、以下の 5 章で構成されている。第 1 章（序論）では本論文の背景が述べられている。第 2 章では、複製サイクル反応によって任意の環状 DNA を増幅するために、トランスポゾンを用いて複製開始配列 *oriC* を環状 DNA に導入する手法とその効果について述べられている。第 3 章では、DNA 連結反応を用いて長鎖環状ゲノムを試験管内で合成する手法の構築と、様々な環状 DNA の合成例について述べられている。第 4 章では、合成した環状 DNA を鋳型とし、染色体複製と転写・翻訳を 1 つの試験管内で共役させる系を構築する試み、並びに、複製と転写の衝突を回避するための機構に関する解析及び回避の共役系における重要性について述べられている。第 5 章では、以上の結果をふまえた総合討論が展開されている。

### (2) 論文の内容要旨

精製された因子を用いて生命現象を試験管内で再構成することは、対象とする生命現象の成立の境界条件を明らかにする上で重要であり、同時に、バイオテクノロジーのツール開発の基礎となる。これまでに、精製された大腸菌の因子を用いて転写と翻訳を試験管内で行うシステムが開発されており、PURE system と呼ばれている。また、大腸菌ゲノムの複製起点である *oriC* 配列に依存した、DNA 複製の試験管内再構成系も実現されており、Replication Cycle Reaction (RCR) と呼ばれている。

本研究ではまず、様々な環状 DNA を RCR によって複製するための手法を開発した。RCR の鋳型となる DNA には *oriC* が必要である。そのため、如何にして環状 DNA に *oriC* を導入するかが課題であった。そこで、トランスポゾンを用いて *oriC* を挿入する技術を開発し、ミトコンドリア DNA などの様々な DNA を RCR によって増幅できることを示した。この方法によって、環境中の微量な環状 DNA なども増幅して解析できる可能性がある。

続いて、任意のゲノム構造を持った長鎖環状 DNA を、RCR を用いて試験管内で構築する技術を開発した。末端がオーバーラップした DNA 同士を DNA 組換え酵素を用いて連結する手法を RCR と組み合わせ、新型コロナウイルスを人工的に産生するためのプラスミドなど、様々な環状 DNA を試験管内で構築した。また、PCR では増幅が難しいとされる長大なリピート配列(約 60 kb)なども増幅できることを示した。

さらに、RCR と PURE system を共役させ（以下、PURE-RCR と呼ぶ）、大腸菌染色体の複製と転写・翻訳の衝突について解析した。構築した PURE-RCR 系においては、RCR における複製開始に必須な DnaA を遺伝子として供給し、その転写・翻訳に依存して RCR の複製反応が進むものである。また、RNA polymerase として大腸菌 RNA polymerase ホロ酵素を用

いている。鋳型となる環状 DNA の分子数を減らすと PURE-RCR における DNA 増幅反応の効率が低下することを見出し、その主要な原因として複製と転写の衝突が考えられた。そこで、この衝突を回避するための機構について探索を進め、1) RNA polymerase の停滞を解消する因子 GreAB、2) 転写産物 RNA と鋳型 DNA との二重鎖である R-loop を分解する RNase H、3) DNA helicase である UvrD あるいは Rep が、PURE-RCR 系における複製と転写の衝突回避に機能することが見いだされた。以上の結果は、複製と転写が同じ鋳型 DNA 上で効率よく進行するために、緻密な衝突回避の分子機構が機能していることを試験管内再構成系で初めて明らかにしたものである。

## II. 論文審査の結果の要旨

### (1) 論文の特徴

現代の生物学は要素還元論に依拠している。細胞の機能をタンパク質や DNA などの分子の機能に還元するわけであるが、それらのパーツから細胞が再構成できて、初めて、要素還元が実証され、完遂されるのだと言える。この再構成は「合成生物学」と呼ばれており、その工学的側面が強調されることが多い。しかし、要素分子を闇雲に混ぜ合わせたとしても意味ある機能は演出されない。合成生物学は、機能演出の境界条件を明らかにし、また未知の要件を発見する点で、理学としても大変に重要である。本論文は、「セントラルドグマ」と呼ばれ、生命の中心的な機能である、複製・転写・翻訳について、それらの統合的な再構成について述べている。セントラルドグマを再現するためには、特定の生物の全ゲノム DNA を用いることが理想であるが、それほど長大な分子の試験管での扱いは現在では難しいため、論文の前半では、トランスポゾンと複製サイクル再構成系 (RCR) を用いて、任意の構造のミニゲノムを合成する技術について述べている。論文の後半では、こうして合成したミニゲノムのいくつかを鋳型に用いて、複製と転写・翻訳の共役再構成系の構築を試みた結果を述べミニゲノム上での複製と転写の衝突がミニゲノムの複製に阻害的であること、そしてその阻害を回避する複数の機構が働いていることを示している。細胞内で起こっている複製と転写・翻訳反応を試験管内で統合的に再現しようという系の開発の試みは、本論文が世界的にも初めてである。

### (2) 論文の評価

論文の前半で述べられているゲノムを試験管内で合成/増幅するための技術は、革新的であり、ゲノム合成時代の長鎖 DNA 合成ツールとして有用なものであると評価される。論文後半では、複製・転写・翻訳の統合的な試験管内再構成系の構築を試みており、これは世界でも類を見ない野心的な取り組みであって、それ自体が高く評価できる。その結果、複製と転写の衝突を回避する機構の重要性を見出しており、従来、細胞内での研究で示唆されていた複数の因子の機能を、精製因子のみからなる再構成系で明らかにした。この成果は当該分野にとって非常に重要な知見であり、また、合成生物学の理学的側面を如実に表している。

2022 年 1 月 13 日 (木) 14 時より 15 時まで本論文についての公聴会を開き、論文の内容の説明と質疑応答を行った。申請者は論文について明快に説明し、質疑に対する応答も満足すべきものであった。