

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

立教大学大学院理学研究科生命理学専攻

奈良 聖亜

2021

目次

要旨.....	v
本論文で示した表のリスト.....	viii
本論文で示した図のリスト.....	ix
第一章 序論.....	1
1.1 試験管内再構成系を用いた研究.....	1
1.2 PURE system と DNA 自己複製システム.....	3
1.3 RCR.....	5
1.4 RCR を基盤にしたバイオテクノロジーと再構成研究.....	6
1.5 複製と転写翻訳の共役.....	7
1.6 本研究への着想.....	11
1.7 参考文献.....	12
第二章トランスポゾン用いた oriC 挿入による長鎖環状 DNA の増幅.....	15
2.1 序論.....	15
2.2 方法.....	16
2.2.1 プラスミドと OriC トランスポゾンの調製.....	16
2.2.2 Tn5 transposase の精製.....	16
2.2.3 Tn-oriC による oriC 挿入反応.....	17
2.2.4 RCR.....	17
2.2.5 ラムダファージ DNA の環状化.....	18
2.2.6 OriC トランスポゾンの抜き出し.....	18
2.3 結果.....	20
2.3.1 Tn5 トランスポジション反応を用いた oriC の挿入.....	20
2.3.2 Tn-oriC を用いた RCR 増幅.....	20
2.3.3 Tn-RCR を用いた低濃度 DNA の増幅.....	23
2.3.4 Tn-RCR を用いた GC リッチ DNA の増幅.....	25
2.3.5 Tn-RCR を用いた長鎖 DNA の増幅.....	25
2.3.6 Tn-RCR を用いたオルガネラ DNA の増幅.....	25
2.3.7 直鎖状 DNA の環状化による Tn-RCR 増幅.....	29
2.3.8 OriC トランスポゾンの抜き出し.....	31
2.4 考察.....	33
2.5 参考文献.....	35

第三章 組換え酵素による DNA 連結反応を用いた環状 DNA の増幅	37
3.1 序論.....	37
3.2 方法.....	40
3.2.1 DNA 断片とプラスミドの調製.....	40
3.2.2 RA-RCR.....	41
3.2.3 CRISPR-Cas9 システムによる DNA 切断.....	41
3.2.4 その他の DNA.....	42
3.3 プロトコル	45
3.4 結果.....	47
3.4.1 RA-RCR を用いたヒト mtDNA(16.6)の試験管内クローニング.....	47
3.4.2 繰り返し配列(2.5 kb)の試験管内クローニング.....	49
3.4.3 長鎖環状 DNA (Bacmid (147 kb)、RP11-96M14 (205 kb)、RP1-247E2 (153 kb)、RP11-45714 (192 kb)、CH17-81M08 (204 kb))の試験管内クローニング.....	51
3.4.4 ヒトセントロメア機能配列(pWTR11.32 (60 kb)、pWTR11.64 (120 kb)、pWTR11.128 (240 kb))の増幅.....	54
3.4.5. RA-RCR を用いたヒトゲノム領域(5.5 kb)の試験管内クローニング.....	56
3.4.6 大腸菌長鎖ゲノム領域(93 kb, 220 kb)の試験管内クローニング.....	58
3.4.7 ウイルス DNA (ラムダファージ DNA (48.5 kb)、T4 ファージ DNA (40 kb)、SARS-CoV-2 発現プラスミド (31.1 kb))の試験管内クローニング.....	61
3.4.8 環状 DNA を切らない RA-RCR.....	66
3.5 考察.....	70
3.6 参考文献.....	72
第四章 試験管内染色体複製システムと転写翻訳システムの共役	74
4.1 序論.....	74
4.2 方法.....	76
4.2.1 環状 DNA の構築.....	76
4.2.2 本章で使用したタンパク質.....	79
4.2.3 PURE system を用いた DnaA の生産.....	79
4.2.4 PURE system と RCR の共役系.....	79
4.2.5 PURE ^{EcR} -RCR 産物の qPCR 定量.....	80
4.3 結果.....	84
4.3.1 T7 RNA polymerase を用いた RCR と PURE system の共役.....	84
4.3.2 大腸菌 RNA polymerase を用いた RCR と PURE system の共役系の構築.....	87
4.3.3 PURE ^{EcR} -RCR における DNA 増幅効率.....	91
4.3.4 PURE ^{EcR} -RCR におけるターミネーター配列の効果.....	98

4.3.5 PURE ^{EcR} -RCR におけるプロモーター数の影響.....	98
4.3.6 RCR と PURE system の共役系における E.coli RNAP の効果.....	102
4.3.7 DNA polymerase III の生産に依存した PURE ^{EcR} -RCR.....	107
4.3.8 バックトラック活性を持たない E. coli RNAP を用いた PURE ^{EcR} -RCR.....	109
4.4 考察.....	111
4.5 参考文献.....	114
第五章 総合討論.....	117
5.1 総合討論.....	117
5.2 参考文献.....	120
謝辞.....	122

要約

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。試験管内再構成を行う上では、因子数は多くない方が容易であるため、比較的単純な生物の系を用いることが望ましい。そして、その生物に関して、生化学や分子遺伝学の知見が蓄積していることが必要である。大腸菌はこれらの点を満足するモデル生物である。実際、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。RCR は、バクテリアゲノムに見られるような環状 DNA を増幅することができ、100 kb を超える長大な DNA を増幅できるなど、Polymerase Chain Reaction (PCR) にはない利点がある。

RCR と PURE system を組み合わせると、セントラルドグマを1つの試験管内に完全に再構成することができる可能性がある。つまり、DNA 分子にコードされた遺伝子から発現したタンパク質が、自分自身の遺伝子 DNA を増幅するという、ゲノムの自己複製系の構築も可能になると考えられる。ゲノム自己複製系が構築できれば、多種多様な変異種から優位な分子種を選択するダーウィンの進化を試験管内で起こさせて有用変異遺伝子を獲得する方法の開発にも繋がる。本論文では、ゲノムの自己複製系の構築を目指した研究の結果を報告する。まず、自己複製系ゲノム DNA の構築のための技術として、任意の環状 DNA を増幅して解析する技術や合成ゲノムの構築と増幅の方法を開発したので、これらについて述べる。次に、それらの技術を利用して環状 DNA を構築し、RCR と PURE system を共役させたときの、環状 DNA の複製を調べた結果について述べる。後者においては、複製と転写の衝突を回避するための複数の機構が、ゲノム複製の再構成系においても重要であることが結論された。

第一章では、RCR と PURE system に関して概説し、また、複製と転写・翻訳の間の干渉に関する従来の知見を述べる。

第二章では、様々な環状 DNA を RCR によって複製するために開発した OriC トランスポゾン法について述べる。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た。そして、この方法を用いることで、ミトコンドリア DNA などの様々な DNA が 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。

第三章では、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の開発について述べる。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（倉田ら、未発表）を RCR と組み合わせ、第四章で述べる実験で用

いた DNA をはじめ、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の様々な環状 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リピート配列が RCR では増幅できること、例えば、ヒトゲノムのセントロメアとしての機能を持つ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。

第四章では、RCR と PURE system を共役させ (以下、PURE-RCR と呼ぶ。)、ゲノムの自己複製系の構築を検討した結果を述べる。RCR を構成する 26 種のタンパク質のうち複製の開始段階に必須な DnaA を、遺伝子(*dnaA*)としてコードし、また複製の開始起点になる *oriC* を持つ環状 DNA を鋳型とした。PURE system、DnaA を含まない RCR 酵素 mixture 及び鋳型環状 DNA からなる反応液をインキュベーションした。PURE system によって産生された DnaA によって RCR に必要な酵素がそろい、鋳型 DNA が複製することを期待したが、鋳型 DNA の増幅は見られなかった。

増幅が見られなかった原因として、まず、T7 RNA polymerase による転写が複製と衝突することによって、転写または複製が阻害されている可能性を考えた。そこで、T7 RNA polymerase に代えて、 $\alpha 2\beta\beta'\omega\sigma 70$ のサブユニット構成を持つ大腸菌 RNA polymerase を用いた PURE-RCR の構築を検討した。その結果、鋳型 DNA が高濃度(112 pM 以上)に存在する場合には、DnaA の産生に依存した環状 DNA の増幅が見られた。一方で、油中水滴エマルジョンを用いて反応液を区画化し、鋳型環状 DNA 分子を数分子毎にそれぞれの反応区画に封入した場合や、鋳型 DNA を低濃度(56 pM 以下)にした場合は、鋳型 DNA の複製が見られなかった。反応区画内の数分子の鋳型 DNA ではその増幅が起こらない原因として、僅かな量の分子を鋳型として複製と転写が起こることで、同一の鋳型分子上で複製と転写が衝突し、互いが干渉しあっている可能性を考えた。

そこで、この衝突を回避するために、GreAB を導入した。GreAB は、大腸菌 RNA polymerase が RNA 合成のエラーなどを原因として停滞した場合に、その停滞を解消し、複製と転写の衝突の回避に働くことが知られている。PURE-RCR に GreAB を導入したところ、56 pM の鋳型 DNA を用いた場合でもその増幅が可能になった。一方、大腸菌 RNA polymerase の *rpoB* 変異(H1244Q)は *greAB* 欠損を相補することが知られている。GreAB を導入する代わりに、H1244Q 変異体 RpoB を用いた場合にも、鋳型 DNA の増幅が見られた。以上のことから、再構成系においても停滞した大腸菌 RNA polymerase が複製を阻害することが示唆された。

複製阻害の原因として、転写産物 RNA と鋳型 DNA との二重鎖である R-loop の形成も知られている。R-loop を分解する RNaseH は、RCR 酵素 mixture に含まれていたが、RCR には必須でないことが知られていた。しかし、PURE-RCR においては RNaseH が鋳型 DNA の複製に必須であることが見出された。このことは、再構成系においても R-loop が形成され、複製を阻害することを示唆している。

DNA helicase である UvrD や Rep は、DNA に結合したタンパク質を解離させる機能も持つことが知られており、停滞した大腸菌 RNA polymerase を DNA から剥がすことで、複製の衝突を回避することが示唆されている。これらのいずれかを PURE-RCR に導入したところ、

いずれの場合も、プロモーターを1つしか持たない環状 DNA では、顕著な効果が見られなかったものの、3つのプロモーターを持った環状 DNA では、鋳型 DNA の複製が促進した。これは、プロモーター数を増やして鋳型 DNA 分子あたりの転写量を増加させた場合には、RNA polymerase の停滞の頻度が上昇し、UvrD や Rep によって鋳型 DNA の複製のレスキューが、更に必要になることを示している。

以上の結果から、複製と転写の衝突回避機構が、セントラルドグマを再構成したゲノムの自己複製系には重要であることが示された。

本論文では、RCR と PURE system を共役させたゲノムの自己複製系の構築を目指し、そのために必要な知見を得ることができた。ただし、現在では、*dnaA* 遺伝子の発現と DNA の複製が同一分子上で起きているかが確認できていない。異なる分子上で起きている場合は自己複製とは言いがたく、また、試験管内ゲノム進化においては、発現産物が他のゲノム分子を複製してしまうと、自己複製に優位な変異を持ったゲノム分子が複製されず、進化が起きない可能性も考えられる。今後の検証としては、エマルジョンなどの区画を用いて、1分子ゲノム DNA からの転写・翻訳・複製が起きているかを調べるのが考えられる。