

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

参考論文

本博士論文の一部は、次の論文を基に作成されています。

Nara, S. and Su'etsugu, M.

***In vitro* amplification of whole large plasmids via transposon-mediated *oriC* insertion.**

Biotechniques, **71**, 528-533. 2021, Peek Behind the Paper selected

~~~~~

以下参考

原著論文

Mukai, T., Yoneji, T., Yamada, K., Fujita, H., Nara, S. and Su'etsugu, M.

**Overcoming the Challenges of Megabase-Sized Plasmid Construction in *Escherichia coli*.**

*ACS Synth. Biol.*, **9**, 1315-1327. 2020

1 Mb のプラスミドを増幅するための基盤技術を提供(第二章、第三章)。

Ueno, H., Sawada, H., Soga, N., Sano, M., Nara, S. and other authors.

**Amplification of over 100 kbp DNA from Single Template Molecules in Femtoliter Droplets.**

*ACS Synth. Biol.*, **10**, 2179-2186. 2021

100 kb を超える環状 DNA の増幅とエマルジョンを用いた手法を構築(第二章、第三章、第四章)。

日本語総説

奈良 聖亜、末次 正幸

**大腸菌いらずのセルフリー長鎖 DNA クローニング**

*実験医学*, **38**, 1023-1028. 2020

ラムダファージ DNA (48.5 kb) の試験管内クローニング(第三章)

特許

末次正幸、奈良聖亜、**環状 DNA の製造方法**

特願 2021-148639, 2021 年 9 月 13 日

環状 DNA を切らずに *oriC* を導入する方法(第三章)

末次正幸、奈良聖亜、**環状 DNA の複製または増幅方法**

特許第 6960684 号, 2021 年 10 月 14 日登録

トランスポゾンを用いた *oriC* 導入法(第二章)

## 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        |
| <b>第一章 序論 .....</b>                                       | <b>1</b>  |
| 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        |
| <b>第二章 トランスポゾン用いた <i>oriC</i> 挿入による長鎖環状 DNA の増幅 .....</b> | <b>15</b> |
| 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 <i>oriC</i> 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 <i>oriC</i> 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        |

|                                                                                                                                 |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>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</b> .....                                                                                | <b>37</b> |
| 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        |
| 3.3.4 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)、RP11-457I4 (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        |
| <b>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</b> .....                                                                                      | <b>74</b> |
| 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 <sup>EcR</sup> -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 <sup>EcR</sup> -RCR における DNA 増幅効率.....                                                                               | 91        |
| 4.3.4 PURE <sup>EcR</sup> -RCR におけるターミネーター配列の効果.....                                                                            | 98        |

|                                                                             |            |
|-----------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.3.5 PURE <sup>EcR</sup> -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 <i>E. coli</i> RNAP の効果 .....              | 102        |
| 4.3.7 DNA polymerase III の生産に依存した PURE <sup>EcR</sup> -RCR .....            | 107        |
| 4.3.8 バックトラック活性を持たない <i>E. coli</i> RNAP を用いた PURE <sup>EcR</sup> -RCR..... | 109        |
| 4.4 考察.....                                                                 | 111        |
| 4.5 参考文献 .....                                                              | 114        |
| <b>第五章 総合討論.....</b>                                                        | <b>117</b> |
| 5.1 総合討論 .....                                                              | 117        |
| 5.2 参考文献 .....                                                              | 120        |
| 謝辞.....                                                                     | 122        |

## 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。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 の複製が促進された。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。



## 本論文で示した表のリスト

表 2.1 第二章で用いたプライマーのリスト

表 3.1 第三章で行った RA-RCR を用いた試験管内クローニング

表 3.2 第三章で用いたプライマーのリスト

表 3.3 RCR 増幅のための *oriC* 導入法の比較

表 4.1 pOriT7AG、pOriT7G、pOris70AG、pOris70G、pOris70AGp3、pOris70Gp3、  
pOris70AGter、pOris70Gter の構築に用いた DNA 断片のリスト

表 4.2 環状 DNA 構築に用いたプライマーのリスト

## 本論文で示した図のリスト

- 図 1.1 大腸菌染色体複製システム再構成系(RCR)の概略図
- 図 1.2 大腸菌 RNA polymerase (*E. coli* RNAP)と複製フォークの衝突のモデル図
- 図 1.3 転写進行に伴う鋳型 DNA のスーパーコイル状態のモデル図
- 図 1.4 RCR を基盤にした DNA 増幅法と再構成研究
  
- 図 2.1 試験管内 Tn5 トランスポジション反応
- 図 2.2 Tn-oriC による *oriC* 挿入反応に依存した RCR 増幅
- 図 2.3 Tn-RCR における *cycler*-RCR の検討
- 図 2.4 エマルジョンを用いた Tn-RCR
- 図 2.5 Tn-RCR による pTT8 プラスミドの増幅
- 図 2.6 Tn-RCR による F プラスミドの増幅
- 図 2.7 Tn-RCR によるヒト mtDNA の増幅
- 図 2.8 Tn-RCR によるラムダファージ DNA の増幅
- 図 2.9 OriC トランスポゾンの抜き出し
  
- 図 3.1 RA-RCR のモデル図
- 図 3.2 *oriC* 断片(*oriC* cassette)の配列とプライマーの設計
- 図 3.3 RA-RCR を用いたヒト mtDNA の増幅
- 図 3.4 RA-RCR を用いた p601\_208x12 の増幅
- 図 3.5 RA-RCR を用いた Bacmid の増幅
- 図 3.6 RA-RCR を用いた BAC クローンの増幅
- 図 3.7 RA-RCR を用いたヒトセントロメア機能配列の増幅
- 図 3.8 RA-RCR を用いた NBPF19 遺伝子領域の増幅
- 図 3.9 RA-RCR を用いた大腸菌ゲノム領域の増幅
- 図 3.10 RA-RCR を用いたラムダファージ DNA の増幅
- 図 3.11 RA-RCR を用いた T7 ファージ DNA の増幅
- 図 3.12 RA-RCR を用いた SARS-CoV-2 発現プラスミドの構築
- 図 3.13 RecA の D-loop 活性を用いた環状 DNA への *oriC* の導入と環状 DNA の増幅
- 図 3.14 *oriC* 断片と環状 DNA による RA-RCR
- 図 3.15 Rm-RCR における RecA 依存性
- 図 3.16 Rm-RCR におけるエキソヌクレアーゼの検討
  
- 図 4.1 RCR と PURE system の共役による DNA の自己複製
- 図 4.2 PURE<sup>EcR</sup>-RCR のモデル図

- 図 4.3 T7 RNA polymerase を用いた RCR と PURE system の共役系
- 図 4.4 s70 プロモーターのコンセンサス配列と PURE system による *dnaA* の発現
- 図 4.5 PURE<sup>EcR</sup>-RCR による pOris70AG の増幅
- 図 4.6 RCR 増幅に対するデキストランの影響
- 図 4.7 PURE<sup>EcR</sup>-RCR における転写・翻訳の依存性
- 図 4.8 PURE<sup>EcR</sup>-RCR における鋳型 DNA 濃度の検討
- 図 4.9 PURE<sup>EcR</sup>-RCR における反応時間の検討
- 図 4.10 PURE<sup>EcR</sup>-RCR における *E. coli* RNAP 濃度の検討
- 図 4.11 PURE<sup>EcR</sup>-RCR における鋳型 DNA の再起的な増幅
- 図 4.12 エマルジョンを用いた PURE<sup>EcR</sup>-RCR
- 図 4.13 PURE<sup>EcR</sup>-RCR におけるターミネーター配列の検討
- 図 4.14 PURE<sup>EcR</sup>-RCR における UvrD 及び Rep の検討
- 図 4.15 生産されたタンパク質に依存しない PURE<sup>EcR</sup>-RCR のモデル図
- 図 4.16 RCR と PURE system の共役系における *E. coli* RNAP の効果
- 図 4.17 RCR と PURE system の共役系における *E. coli* RNAP の効果
- 図 4.18 RCR と PURE system の共役系における UvrD 及び Rep の効果
- 図 4.19 RCR と PURE system の共役系における RNaseH 依存性
- 図 4.20 DNA polymerase III 遺伝子をコードする鋳型環状 DNA の PURE<sup>EcR</sup>-RCR
- 図 4.21 RNAP カスケードを用いた PURE<sup>EcR</sup>-RCR
- 図 4.22 複製と転写の衝突のモデル図

## 第一章 序論

### 1.1 試験管内再構成系を用いた研究

生物学における知見の蓄積に伴って、生命現象の試験管内再構成が広く行われるようになってきている。生命現象を試験管内で再構成することは、対象の生命現象に必要な最少要素を明らかにするだけでなく、その仕組みを理解することに繋がる。バイオテクノロジーの観点からは、生命現象を自在にデザインし有用なツールとして活用することが可能である。

モデル生物である大腸菌については生化学や分子遺伝学の知見が多く、様々な代謝系や複製・転写・翻訳システムなどがそれぞれ精製された因子を用いて再構成されている。例えば、転写翻訳システムの再構成系である PURE system は、タンパク質合成に必要な最少因子から構成され、関連する因子の機能解析などに役立っている(Shimizu et al., 2001)。また、リボソームディスプレイ法や mRNA ディスプレイ法といった有用な遺伝子のスクリーニング技術などに応用されている(Villemagne et al., 2006; Reyes et al., 2021)。転写翻訳システムが生命の根幹となるセントラルドグマの構成要素であることから、PURE system は、生命現象を再構成する上で中心的な反応系といえる。

同じくセントラルドグマの構成要素である複製システムについては、30 年以上も前にアーサー・コーンバーグによって、精製タンパク質を用いたミニ染色体の複製が再構成されている(Kaguni and Kornberg, 1984)。しかしながら、複製を繰り返しながらの DNA 増幅には至っておらず、大腸菌が染色体を指数関数的に増やす仕組みを完全に再構成することはできていなかった。そこで、これまでに再構成されていた複製の開始・伸長反応に、さらに終結・分離反応を統合し、複製がサイクルする反応系(RCR: Replication Cycle Reaction)が構築された(Su'etsugu et al., 2017; Hasebe et al., 2018)。RCR は、26 種の精製タンパク質から構成され、大腸菌染色体の複製開始起点である *oriC* を持つ環状 DNA を指数関数的に増幅することができる(図 1.1)。染色体複製システムを利用していることから、1 Mb を超える長大な DNA を増幅できる点でバイオテクノロジーの分野で期待される技術である(Mukai et al., 2020)。しかしながら、鋳型環状 DNA が *oriC* を持つ必要があることから、如何にして *oriC* を環状 DNA に導入するかが課題であった。また、Polymerase Cycle Reaction (PCR) 法のような既存の DNA 増幅系と異なり、RCR が等温反応であることから、様々な生化学反応との統合が可能であり、DNA 複製を基盤とした生命現象の再構成に繋がる。例えば、PURE system と組み合わせることで、セントラルドグマの完全な再構成が可能であると考えられる。

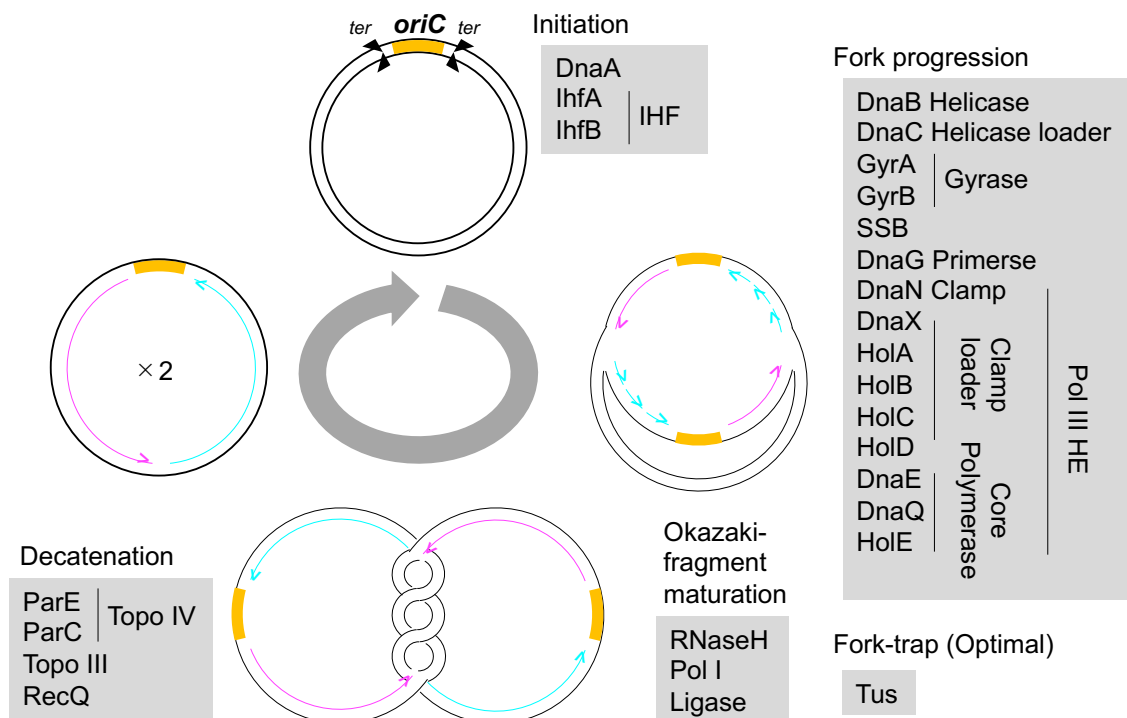


図 1.1 大腸菌染色体複製システム再構成系(RCR)の概略図。大腸菌染色体の複製開始起点 *oriC* を持つ環状 DNA を指数関数的に増幅する。*ter* は、Tus 結合配列であり、複製フォークの過剰進行を抑える(Hasebe et al., 2018)。Su'tsugu et al. (2017) を参考に作製した。

## 1.2 PURE system と DNA 自己複製システム

PURE system は、試験管内で転写翻訳システムを再構成した無細胞タンパク質合成系である(Shimizu et al., 2001)。無細胞タンパク質合成系は、初め、細胞抽出液を用いたタンパク質合成系として開発され、DNA にコードされた遺伝情報が機能分子であるタンパク質に変換される仕組みの解明に深く貢献してきた(Nirenberg and Matthaei, 1961)。しかしながら、細胞抽出液にはタンパク質合成には無関係な因子が多く含まれるため、タンパク質合成に必要とされる最少因子を明らかにするには不向きであった。そこで、2001 年に大腸菌から精製した因子を用いて転写翻訳システムを再構成した PURE system が開発された(Shimizu et al., 2001)。PURE system は、10 種の翻訳因子(IF1、IF2、IF3、EF-Tu、EF-Ts、EF-G、RF1、RF2、RF3、RRF)、20 種の tRNA アミノアシル化酵素、リボソーム、T7 RNA polymerase、tRNA、ヌクレオチドやアミノ酸などの基質及び ATP や GTP の再生を行う因子から構成される。PURE system では、T7 プロモーターから転写される遺伝子をコードする DNA を鋳型とし、T7 RNA polymerase による転写反応によって mRNA が合成される。mRNA が翻訳反応の鋳型となりタンパク質が合成される。PURE system には、シャペロンなどのタンパク質の立体構造形成に関わる因子が含まれないため、合成されたタンパク質が機能しないといったことが起こり得る。しかし一方で、そういった因子を加えることで立体構造形成に関わる機能を解析することも可能である(Niwa et al., 2009)。

近年では、PURE system はリボソームディスプレイ法や mRNA ディスプレイ法などの遺伝子ライブラリーから有用なタンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングする技術にも利用されている(Villemagne et al., 2006; Reyes et al., 2021)。これらの技術では、mRNA とそれを鋳型に発現したタンパク質を物理的に対応づけ、発現したタンパク質をその結合活性などで選択し、鋳型 mRNA を解析することで有用な遺伝子をスクリーニングする。PURE system には、RNase などの分解酵素が含まれないためスクリーニングの効率が上がる。

また、転写翻訳システムが、生命の根幹であるセントラルドグマの構成要素である点から、PURE system と様々な生化学反応を統合し、より複雑な生命現象を再構成しようとするアプローチが行われている。例えば、DNA 複製システムと PURE system を組み合わせることによる複製と転写翻訳の共役系は、セントラルドグマの完全な再構成である (Fujiwara et al., 2013; Ichihashi et al., 2013)。これまでに、Φ29 ファージの DNA 複製システムと PURE system による複製と転写翻訳の共役系が報告されている(van Nies et al., 2018)。この共役系では、Φ29 ファージの DNA 複製システムを構成するタンパク質を遺伝子としてコードし、また Φ29 ファージ DNA の複製開始起点を持つ直鎖状ゲノムを鋳型とする。これによって、PURE system による遺伝子の転写翻訳に共役したゲノムの複製が達成される。さらに、複製と転写翻訳の共役系を、油中水滴エマルジョンやリボソームなどを用いてゲノム DNA を 1 分子毎に微小空間に閉じ込めることで、発現したタンパク質分子が自身の鋳型となっ

たゲノム DNA 分子の複製のみに機能するようなゲノムの自己複製が可能である。ゲノム自己複製系の構築によって、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再現することが可能であり、有用変異遺伝子を獲得する方法の開発にも繋がる。しかしながら、 $\Phi$ 29 ファージの DNA 複製システムでは DNA 複製の効率が悪いいため、全長配列を持たない分子量の小さな DNA が副産物として増幅する (van Nies et al., 2018)。この副産物は複製に必要な遺伝情報を持たないため、その増幅により自己複製能を持ったゲノムの淘汰が起きないと考えられる。そこで、本研究では、大腸菌染色体複製システムの再構成系である RCR を用いたゲノムの自己複製系の構築を目指した。

### 1.3 RCR

大腸菌の染色体複製の再構成系については、1984年にアーサー・コーンバーグによって、精製タンパク質を用いたミニ染色体の複製系が構築されていた(Kaguni and Kornberg, 1984)。環状 DNA である大腸菌染色体の複製反応は、複製開始起点である *oriC* からその対極に向かって両方向に進行する(Kornberg and Baker, 1992; Hiasa and Marians, 1999)。*oriC* 配列上での DnaA タンパク質の重合により DNA が折り曲げられ、*oriC* 配列の一部が開裂することで複製が開始される(Ozaki and Katayama, 2009)。この開始反応には、環状 DNA の負のスーパーコイルが必要である(Smelkova and Marians, 2001)。開始反応後は、*oriC* 開裂部の両側に、DnaB helicase や DNA polymerase III などからなる2つの複製複合体が形成され、両方向に複製フォークが進行する(Fang et al., 1999)。また、複製フォークの進行中は、DnaG primase によって合成された RNA プライマーを起点に、DNA polymerase III によってリーディング鎖とラギング鎖の伸長が行われる (Kelman and O'Donnell, 1995)。複製フォークが進行するためには、Gyrase によってトポロジカルなストレスを解消する必要がある(Smelkova and Marians, 2001)。このようにして、ミニ染色体の複製再構成系では、鋳型環状 DNA を *oriC* から複製するが、複製を終結させ、二分子の娘環状 DNA に分離する仕組みを持たないため、複製産物が次の複製の鋳型となり複製が繰り返されるような複製サイクルの再構成には至っていなかった。

複製の終結には、複製フォーク同士が *oriC* 対極部で融合し(Neylon et al., 2005)、DNA polymerase I や Ligase などによって岡崎フラグメントが連結する必要がある(Funnell et al., 1986)。複製産物である二分子の娘環状 DNA は、互いに絡み合っているため、Topoisomerase IV などによる分離反応が行われなくてはならない(Peng and Marians, 1993; Suski and Marians, 2008)。その後、Gyrase によって負のスーパーコイルが導入されることで、次の複製開始が可能である(Smelkova and Marians, 2001)。

RCR では、これまでに再構成されていた複製の開始・伸長反応に、終結・分離反応を統合することで、*oriC* を持つ環状 DNA を鋳型とした複製サイクルを可能とした (図 1.1; Su'tsugu et al., 2017)。RCR は、26 種の精製タンパク質から構成され、30°C の等温反応で行われる。また、鋳型 DNA が 1 分子さえあれば増幅可能であるだけでなく、複製の精度 ( $1.2 \times 10^{-8}$  エラー/塩基/サイクル) がかなり高い。さらに、染色体複製システムを利用しているため、1 Mb を超える長大な環状 DNA の増幅も可能である(Mukai et al., 2020)。これらの特徴から、バイオテクノロジーの分野では、長鎖 DNA の試験管内クローニングやゲノム合成に繋がる技術として期待される。また、PCR 法とは異なり、RCR が 30°C の等温反応で行われるため、様々な生化学反応と統合することができ、染色体複製サイクルを基盤とした生命現象の再構成が可能である。



#### 1.4 RCR を基盤にしたバイオテクノロジーと再構成研究

近年の次世代シーケンス技術や合成生物学的手法の進展により、長鎖 DNA を簡便に増幅する技術への期待が高まっている。一般的に広く使われる PCR 法では、10 kb を超える長大な DNA や GC リッチな DNA の増幅が困難である。また、微生物を用いた DNA クローニング法では、ホストに対する毒性を示す DNA の増幅は難しい。一方で、RCR では、長鎖 DNA を試験管内で増幅できることから、長大なプラスミドや難培養微生物のゲノムなどをクローニングし、その配列を解析することや、DNA 連結法と組み合わせて長大な環状 DNA を構築することが可能であると考えられる。RCR は、PCR 法のようにプライマーを必要としないため、鋳型環状 DNA の配列が未同定であっても、*oriC* を導入することさえ出来れば、その増幅が可能である。

RCR は、また、大腸菌の染色体複製サイクルを再構成した系としては世界で唯一である。染色体複製は、生命の根幹となるシステムであるため、それを基盤とした生命現象の再構成は、増殖する人工細胞の構築に繋がる。特に、RCR と PURE system を組み合わせることによる複製と転写翻訳の共役系の構築は、大腸菌そのもののセントラルドグマを完全に再構成することである。これは、これまでの大腸菌研究において蓄積されてきた多くの知見を参考に進められるだけでなく、その過程では新たな生理学的原理の発見が期待される。また、これまでの  $\Phi 29$  ファージの DNA 複製系や PCR 法と比較すると、RCR が 30°C の等温で行われ、且つ DNA 増幅効率の良い複製系である点は大きなアドバンテージである。さらに、長鎖 DNA を増幅できる点では、鋳型 DNA にコードする遺伝子数を増やし、さらに高次の生命現象を再構成することが可能である。

## 1.5 複製と転写翻訳の共役

複製と転写翻訳の共役において、重要となるのは複製と転写の協調的な進行である。実際に生体内では、同一の染色体 DNA 上で複製と転写が起こるため互いに干渉し合っている。例えば大腸菌染色体に機能する複製と転写では、複製フォークの進行速度が RNA polymerase による転写の進行速度に比べて 10~20 倍ほど速いことから(Kornberg and Baker, 1992)、複製が転写に衝突し、複製が阻害される(Merrikh et al., 2012)。転写の停滞は複製との衝突を誘発し、特に、RNA 合成のエラーなどによって RNA polymerase がバックトラックした場合は、RNA polymerase と鋳型 DNA が安定な複合体を形成するため、複製阻害の原因となる(図 1.2; Nudler, 2012)。一方で、複製と転写の衝突を回避するための機構も存在し、大腸菌では、GreAB、DksA、Mfd、UvrD、Rep などのタンパク質因子や、転写とカップリングした翻訳などが知られている(Dutta et al., 2011; Tehrani et al., 2010; Pomerantz and O'Donnell, 2010; Guy et al., 2009; Brüning and Mariani, 2021; Boubakri et al., 2006)。例えば、GreAB は、RNA polymerase と直接結合し、RNA polymerase のバックトラック状態の解消に働く。これにより、転写がスムーズに進行するため、複製と転写の衝突による複製阻害が抑制される(図 1.2; Nudler, 2012)。

また、DNA トポロジーの観点では、大腸菌の染色体複製において、*oriC* 近辺の転写が *oriC* からの複製開始を制御していることや(Kaguni and Kornberg, 1984; Bates et al., 1997)、転写産物である RNA が鋳型 DNA とハイブリダイズすることで R-loop を形成し、DNA 合成の起点となるプライマーとして機能することが報告されている(Itoh et al., 1980)。どちらも進行中の複製や転写において、その上流や下流にそれぞれ局所的にできる負のスーパーコイル、または正のスーパーコイルが関わっている(Liu and Wang, 1987; Magnan and Bate, 2015; Masse and Drolet, 1999)。*oriC* から離れる転写は、*oriC* 内に負のスーパーコイルを導くため複製開始反応を促進し、*oriC* に向かう転写は、正のスーパーコイルを導くため開始反応を抑制する(Baker and Kornberg, 1988; Magnan and Bate, 2015)。また、転写上流にできる負のスーパーコイルは、mRNA と鋳型 DNA のハイブリダイゼーションを促進する(図 1.3; Masse and Drolet, 1999)。ハイブリダイズした mRNA は、プライマーとしての機能を持つだけでなく、複製進行を阻害する(Boubakri et al., 2006; Gan, et al., 2011; Brüning and Mariani, 2021)。また、複製や転写の下流にできる正のスーパーコイルは、複製や転写の進行を遅らせる(Smelkova and Mariani, 2001; Chong et al., 2014)。このような局所的なスーパーコイルに対しては、正のスーパーコイルを除去する Gyrase、負のスーパーコイルを除去する Topoisomerase I、または正負のいずれのスーパーコイルも除去する Topoisomerase IV などのトポイソメラーゼが働く(Smelkova and Mariani, 2001; Leela et al., 2021)。しかしながら、それらの活性は互いに拮抗し合う側面もあるため、バランスよく働きながら染色体 DNA のトポロジーを制御している(Donczew et al., 2014)。

さらに、転写制御の観点では、複製開始に必要な DnaA が、自身の遺伝子発現を負にフィ

ードバックすることや(Speck et al., 1999)、Topoisomerase I 遺伝子(*topA*)では、その発現自体がトポジカルな制御を受けることが報告されている(Ahmed et al., 2016)。

このようにして複製と転写は、染色体 DNA 上で複雑に相互作用している。本研究では、大腸菌における複製と転写の衝突回避機構に着目した。複製と転写翻訳の共役系の構築では、この機構を活用することで複製と転写の協調的な進行を検討した。

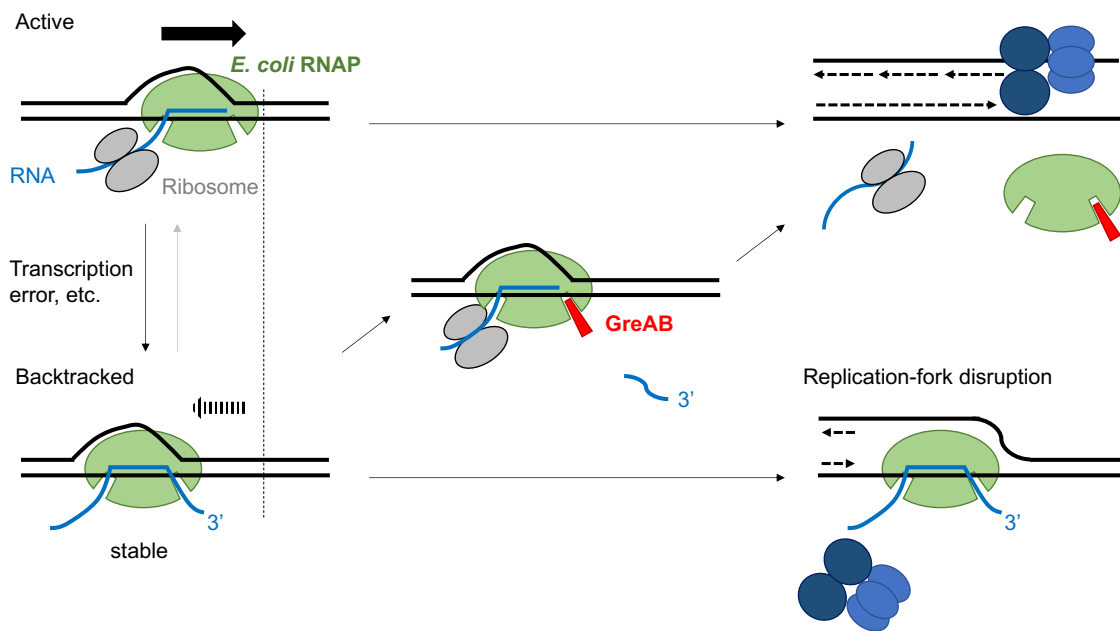


図 1.2 大腸菌 RNA polymerase (*E. coli* RNAP)と複製フォークの衝突のモデル図。バックトラッキング状態の大腸菌 RNA polymerase は、複製と衝突した場合に、その進行を阻害する。GreAB は、*E. coli* RNAP と結合し、バックトラッキング状態を解消することで、複製と転写の衝突による複製の進行阻害を回避させる。

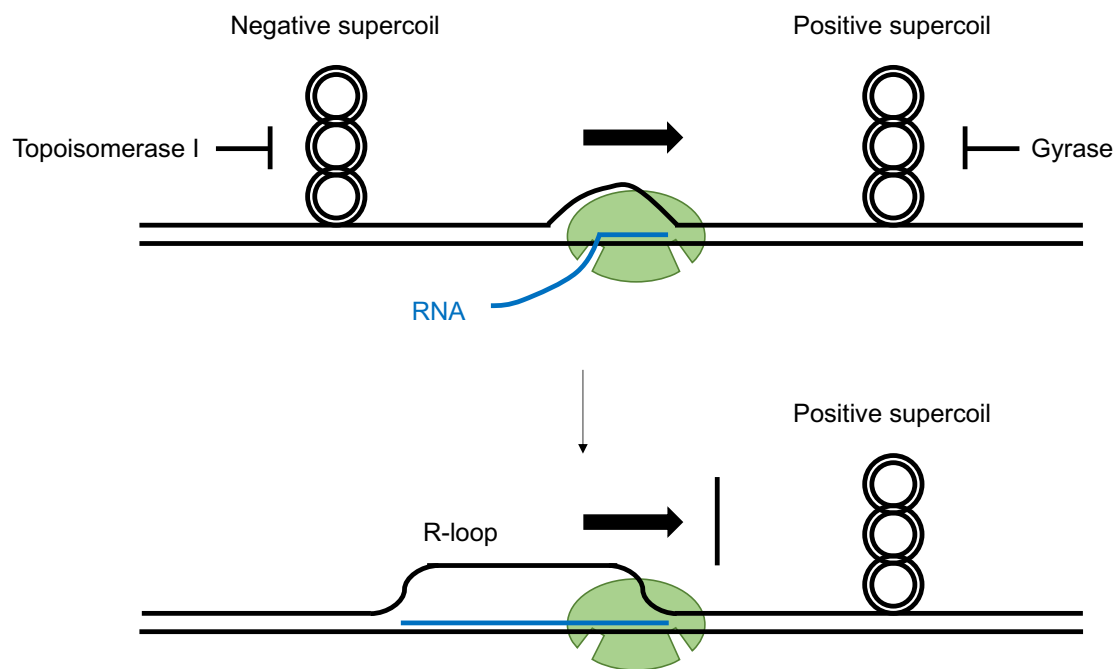


図 1.3 転写進行に伴う鋳型 DNA のスーパーコイル状態のモデル図。進行中の転写の上流には、負のスーパーコイルができ、RNA と鋳型 DNA がハイブリダイズした R-loop が形成される。下流には、正のスーパーコイルができ、転写進行を遅らせる。スーパーコイルは、トポイソメラーゼによって除去される。

## 1.6 本研究への着想

本研究は、RCRの多彩な特徴を基に着想に至った。そこで、本研究の内容をRCRの特徴に関連付けてまとめた(図1.4)。RCRは、染色体複製システムの再構成系であることから、高い正確性や長鎖DNA増幅能を持っている。また、Su'etsugu et al. (2017)の論文では、1分子の鋳型DNAの増幅に成功しており、効率の良いDNA複製反応であることも示されている。これらの特徴から試験管内DNA増幅法としての期待が高まっており、RCRの発展は、今後の分子生物学、工学、医学の進展に大きく貢献すると考えた。また、PCR法などの既存のDNA増幅法とは異なり、鋳型DNAが複製の開始起点(*oriC*)を持つ必要があることも特徴である。これは、*oriC*を持つ鋳型環状DNAに対する増幅特異性を示す一方で、*oriC*を持たない環状DNAは増幅できないという制約になる。以上のことから、RCRを汎用的に利用するための環状DNAに対する*oriC*導入法の構築へと至った。本論文の第二章と第三章では、実際に*oriC*導入法を開発した結果と、様々な環状DNAについての試験管内クローニングの実施例について述べる。

またRCRは、30°C等温で進むDNA複製反応であるため、様々な生化学反応と組み合わせることが可能である。これによって、複製と転写翻訳が共役したDNAの自己複製系が構築できるのではないかと考えた。また、DNA自己複製の本質は、複製に必要な全てのタンパク質を遺伝子としてコードするゲノムDNAから転写翻訳されたタンパク質を用いて自身のゲノムDNAを複製することであり、さらに言えば、転写翻訳に必要なタンパク質なども遺伝子としてコードする必要がある。これには、長大なゲノムDNAとその複製系が求められるため、長鎖環状DNAが増幅できるRCRが相応であると考えた。第四章では、RCRとPURE systemが共役したDNAの自己複製システムの構築について述べる。

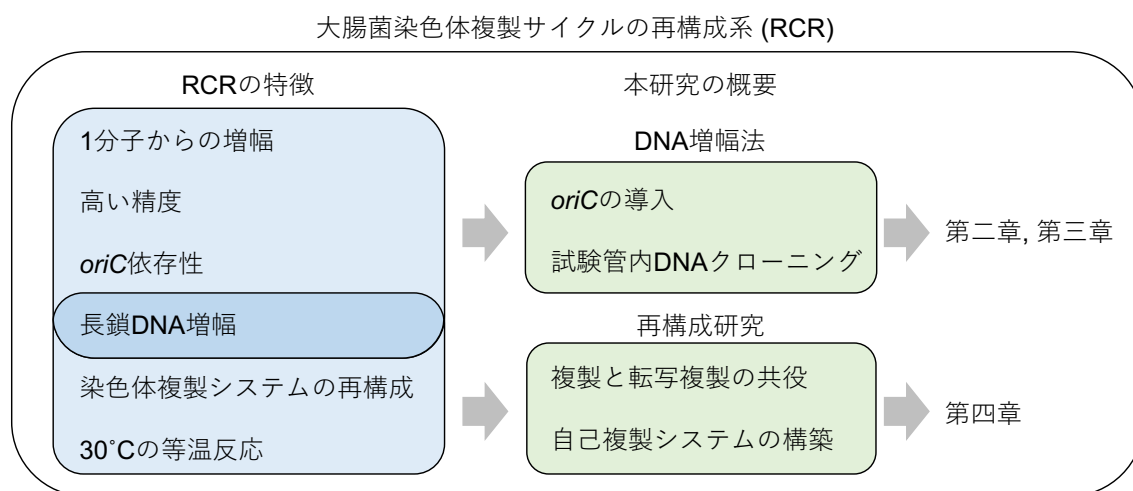


図 1.4 RCR を基盤にした DNA 増幅法と再構成研究。

## 1.7 参考文献

- Ahmed, W., Menon, S., Karthik, P. V. D. N. B. and Nagaraja, V. (2015) Autoregulation of topoisomerase I expression by supercoiling sensitive transcription. *Nucleic. Acids. Res.*, **44**, 1541-52
- Baker, T. A. and Kornberg, A. (1988) Transcriptional activation of initiation of replication from the *E. coli* chromosomal origin: an RNA-DNA hybrid near *oriC*. *Cell*, **55**, 113-23.
- Bates, D. B., Boye, E., Asai, T. and Kogoma, T. (1997) The absence of effect of *gid* or *mioC* transcription on the initiation of chromosomal replication in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 12497-12502.
- Boubakri, H., de Septenville A. L., Viguera, E. and Michel, B. (2010) The helicases DinG, Rep and UvrD cooperate to promote replication across transcription units *in vivo*. *EMBO J.*, **29**, 145-57.
- Brüning, J. G. and Marians, K. J. (2021) Bypass of complex co-directional replication-transcription collisions by replisome skipping. *Nucleic. Acids. Res.*, **49**, 9870-9885.
- Chong, S., Chen, C., Ge, H. and Xie, X. S. (2014) Mechanism of transcriptional bursting in bacteria., *Cell*, **158**, 314-326.
- Donczew, R., Zakrzewska-Czerwińska, J. and Zawilak-Pawlik, A. (2014) Beyond DnaA: the role of DNA topology and DNA methylation in bacterial replication initiation. *J. Mol. Biol.*, **426**, 2269-82.
- Dutta, D., Shatalin, K., Epshtein, V., Gottesman, M. E. and Nudler, E. (2011) Linking RNA polymerase backtracking to genome instability in *E. coli*. *Cell*, **146**, 533-43.
- Fang, L., Davey, M., J. and O'Donnell, M. (1999) Replisome assembly at *oriC*, the replication origin of *E. coli*, reveals an explanation for initiation sites outside an origin. *Mol. Cell*, **4**, 541-53.
- Funnell, B. E., Baker, T. A. and Kornberg, A. (1986) Complete enzymatic replication of plasmids containing the origin of the *Escherichia coli* chromosome., *J. Biol. Chem.*, **261**, 5616-24.
- Fujiwara, K., Katayama, T. and Nomura, S., M. (2013) Cooperative working of bacterial chromosome replication proteins generated by a reconstituted protein expression system. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 7176-83.
- Gan, W., Guan, Z., Liu, J., Gui, T., Shen, K. and other authors. (2011) R-loop-mediated genomic instability is caused by impairment of replication fork progression. *Genes Dev.*, **25**, 2041-56.
- Guy, C. P., Atkinson, J., Gupta, M. K., Mahdi, A. A., Gwynn, E. J. and other authors. (2009) Rep provides a second motor at the replisome to promote duplication of protein-bound DNA. *Mol. Cell*, **36**, 654-66.

- Hasebe, T., Narita, K., Hidaka, S. and Su'etsugu, M.,(2018) Efficient arrangement of the replication fork Trap for in vitro propagation of monomeric circular DNA in the chromosome-replication cycle reaction. *Life (Basel)*, **8**, 43.
- Hiasa, H. and Marians, K. J. (1999) Initiation of bidirectional replication at the chromosomal origin is directed by the interaction between helicase and primase. *J. Biol. Chem.*, **274**, 27244-8.
- Ichihashi, N., Usui, K., Kazuta, Y., Sunami, Y., Matsuura, T. and Yomo, T. (2013) Darwinian evolution in a translation-coupled RNA replication system within a cell-like compartment. *Nat. Commun.*, **4**, 2494.
- Itoh, T., and Tomizawa, J. (1980) Formation of an RNA primer for initiation of replication of ColE1 DNA by ribonuclease H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 2450-4.
- Kaguni, J. M. and Kornberg, A. (1984) Replication initiated at the origin (*oriC*) of the *E. coli* chromosome reconstituted with purified enzymes. *Cell*, **38**, 183-90.
- Kelman, Z. and O'Donnell, M. (1995) DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. *Annu. Rev. Biochem.*, **64**, 171-200.
- Kornberg, A. and Baker, T. A. (1992) *DNA Replication*. 2nd edn. W.H.Freeman, NY.
- Leela, J. K., Raghunathan, N. and Gowrishankar, J. (2021) Topoisomerase I essentiality, DnaA-independent chromosomal replication, and transcription-replication conflict in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **203**, e0019521.
- Liu, L. F. and Wang, J. C. (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 7024-7027.
- Magnan, D. and Bates, D. (2015) Regulation of DNA replication initiation by chromosome structure. *J Bacteriol.*, **97**, 3370-7.
- Masse, E. and Drolet M. (1999) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *J. Biol. Chem.*, **274**, 16659-64.
- Merrick, H. Zhang, Y., Grossman, A. D., and Wang, J. D. (2012) Replication-transcription conflicts in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, **10**, 449-58.
- Mukai, T., Yoneji, T., Yamada, K., Fujita, H., Nara, S. and Su'etsugu, M. (2020) Overcoming the challenges of megabase-sized plasmid construction in *Escherichia coli*. *ACS Synth. Biol.*, **9**, 1315-1327.
- Neylon, C., Kralicek, A. V., Hill, T. M. and Dixon, N. E. (2005) Replication termination in *Escherichia coli*: structure and antihelicase activity of the Tus-*ter* complex. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **69**, 501-526.
- Nirenberg, M. W. and Matthaei, J. H. (1961) The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **47**, 1588-602.
- Niwa, T., Ying, B., Saito, K., Jin, W., Takada, S. and other authors. (2009) Bimodal protein solubility



- distribution revealed by an aggregation analysis of the entire ensemble of *Escherichia coli* proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 4201-6.
- Nudler, E. (2012) RNA polymerase backtracking in gene regulation and genome instability. *Cell*, **149**, 1438-45.
- Ozaki, S., and Katayama, T. (2009) DnaA structure, function, and dynamics in the initiation at the chromosomal origin. *Plasmid*, **62**, 71-82.
- Peng, H. and Marians, K. J. (1993) Decatenation activity of topoisomerase IV during *oriC* and pBR322 DNA replication *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 8571-8575.
- Pomerantz, R. T, and O'Donnell, M. (2010) Direct restart of a replication fork stalled by a head-on RNA polymerase. *Science*, **327**, 590-2.
- Reyes, S. G., Kuruma, Y., Fujimi, M., Yamazaki, M., Eto, S. and other authors. (2021) PURE mRNA display and cDNA display provide rapid detection of core epitope motif via high-throughput sequencing. *Biotechnol. Bioeng.*, **118**, 1736-1749.
- Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T. and other authors. (2001) Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat. Biotechnol.*, **19**, 751-5.
- Smelkova, N. and Marians, K. J. (2001) Timely release of both replication forks from *oriC* requires modulation of origin topology. *J. Biol. Chem.*, **276**, 39186-39191.
- Speck, C., Weigel, C. and Messer, W. (1999) ATP- and ADP-dnaA protein, a molecular switch in gene regulation. *EMBO J.*, **18**, 6169-6176.
- Su'etsugu M., Takada, H., Katayama, T. and Tsujimoto, H. (2017) Exponential propagation of large circular DNA by reconstitution of a chromosome-replication cycle. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 11525-11534.
- Suski, C. and Marians, K. J. (2008) Resolution of converging replication forks by RecQ and topoisomerase III. *Mol. Cell*, **30**, 779-789.
- Tehranchi, A. K., Blankschien, M. D., Zhang, Y., Halliday, J. A., Srivatsan, A. and other authors. (2010) The transcription factor DksA prevents conflicts between DNA replication and transcription machinery. *Cell*, **141**, 595-605.
- van Nies, P., Westerlaken, I., Blanken, D., Salas, M., Mencía, M. and Danelon, C. (2018) Self-replication of DNA by its encoded proteins in liposome-based synthetic cells. *Nat. Commun.*, **9**, 1583.
- Villemagne, D., Jackson R. and Douthwaite, J. A. (2006) Highly efficient ribosome display selection by use of purified components for *in vitro* translation. *J. Immunol. Methods*, **313**, 140-8

## 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

### 2.1 序論

近年の合成生物学や次世代シーケンス技術の進展により、長鎖 DNA を簡便に増幅する技術への期待が高まっている。合成生物学の分野では、酵母を用いた手法によりマイコプラズマや酵母、大腸菌のゲノムの人工合成が達成されている(Gibson et al., 2010; Annaluru et al., 2014; Fredens et al., 2019)。次世代シーケンスの分野では、Oxford 社の nanopore シーケンスや Pacific Bioscience 社の SMART シーケンスにより長大なリードを取得することが可能になっている(Gabrieli et al. 2018; Jain et al., 2018; Kim et al., 2018)。これらの技術を利用することで、ゲノム DNA だけでなく、プラスミド及びファージ DNA などの全長解析が容易に行われるようになった(Wick et al., 2017; Arumugam et al., 2021)。また最近では、数百 kb 長のプラスミドやファージゲノムといった可動性の環状 DNA が見つかっており、それらは CRISPR-Cas 関連遺伝子といった有用な遺伝子をコードしている点や水平遺伝子伝播に深く関与している点で注目が高まっている(Martini et al., 2016; Al-Shayeb et al. 2020)。可動性環状 DNA は、環境中に存在する豊富な遺伝子資源であるが、長大な環状 DNA を環境中から調製することは容易でないため、増幅する技術が求められる。しかしながら、PCR 法といった従来の試験管内 DNA 増幅法では、長大な DNA や GC リッチな DNA を増幅することは困難である。また、酵母などの微生物を用いたクローニング法では、宿主に対して毒性を示す DNA の増幅は難しい。

RCR は、大腸菌の染色体複製サイクルを再構成した試験管内環状 DNA 増幅法である(Su'etsugu et al., 2017; Hasebe et al., 2018)。大腸菌染色体の複製開始起点である *oriC* を持つ環状 DNA であれば、1 分子からでも指数関数的に増幅することが可能である。さらに、その精度( $1.2 \times 10^{-8}$  エラー/塩基/サイクル)がかなり高いだけでなく、1 Mb を超える長大な DNA も増幅することができる(Mukai et al., 2020)。RCR における複製反応には *oriC* が必要なたため、RCR を用いてプラスミドやファージゲノム、微生物染色体、オルガネラ DNA といった環状 DNA を増幅するには、*oriC* を導入する必要がある。

本章では、*oriC* を持たない環状 DNA に *oriC* を導入するために、試験管内 Tn5 トランスポジション反応を利用した。この手法では、微量な環状 DNA に対しても *oriC* を導入でき、その後の RCR により増幅産物を得ることが可能であった。また、好熱菌プラスミド、大腸菌 F プラスミド、またはヒトミトコンドリア DNA の増幅も可能であった。さらに、Tn5 トランスポジション反応によって導入された *oriC* を抜き出す手法も開発した。これによって *oriC* の挿入によって破壊された遺伝子を修復することが可能だった。

## 2.2 方法

### 2.2.1 プラスミドと OriC トランスポゾンの調製

高活性変異体 Tn5 transposase (E54K/L372P)の過剰発現プラスミド(pET-His-Tn5)は、Tn5 transposase 遺伝子を pET-His vector にクローニングし構築した(Su'etsugu et al., 2017)。Tn5 transposase 遺伝子は、pTXB1-Tn5 (Picelli et al., 2014)を鋳型にプライマーSUE829 と SUE830 を用いて PCR 法により調製した。pTXB1-Tn5 は、Sandberg, R.より分与して頂いた (Addgene plasmid # 60240)。pRpoABCDZ は、MG1655 由来の *rpoDZ* 遺伝子を pGEMABC (Murakami, 2013)に挿入し構築した。pGEMABC は、Murakami, K.より分与して頂いた (Addgene plasmid # 45398)。pTT8 プラスミドは、*Thermus thermophilus* HB8 株(RIKEN BRC)から精製した。F プラスミドは、大腸菌 JM109 株(K-12 *recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 Δ (lac-proAB)* (F' *traD36 proAB lacI<sup>q</sup> ZΔM15*))から NucleoBond Xtra BAC (Takara)を用いて精製した。ヒトミトコンドリア DNA は、小田原真樹博士より分与して頂いた。pRpoABCDZ::Km-oriC は、Km-oriC トランスポゾンを用いて Tn5 トランスポジション反応を行い、その産物による形質転換体のうち、カナマイシン耐性、且つアンピシリン感受性を示す株から精製した。

OriC-1 トランスポゾンは、合成 DNA 断片(OriC-1, Eurofins Genomics)を鋳型に 5'末端がリン酸化されたプライマーSUE996 と SUE997 を用いて PCR 法により調製した。OriC-1 トランスポゾンの配列は、5'-CTGTCTCTTATACACATCTgaagatccggcagaagaatggagatggtgtaactaaagataaactcgtataatgatgctatacgaagttatacagatcgtgcgatctactGtggataactctgtcaggaagcttggatcaaccggtagttatccaagaacaactgttgcagttttgagttgtgataacccctcattctgatcccagcttatacgggccagatcaccgatcattcacagttaatgatcctttccaggtgtgactttaaagccggatcctgttatccacagggcagtcgcgatcctaataagagatcacaatagaacagatctctaaataaatagatctcttttaataaccaggatccatctatgctcgggtgctggagaaagaggaatgaaatggcttttagttacaacatactcaggtcttttcaagccgacAGATGTGTATAAGAGACA G-3' (大文字は、19 bp の ME 配列を示す。アンダーラインは、245 bp の *oriC* 最少領域を示す(Kornberg and Baker, 1992)。)である。OriC-2 トランスポゾンは、OL (OriC-loxP)カセット (Hasebe et al., 2018)を用いて同様に PCR 法により調製した。カナマイシン耐性遺伝子を有する OriC トランスポゾン(Km-oriC トランスポゾン)は、pPKOZ (Su'etsugu et al., 2017)を鋳型に 5'末端がリン酸化されたプライマーSUE814 と SUE815 を用いて PCR 法により調製した。本章で用いたプライマーの配列を表 2.1 に示した。

### 2.2.2 Tn5 transposase の精製

高活性変異体 Tn5 transposase (55 kDa)を、pET-His-Tn5 を持つ大腸菌 BL21 (DE3)株に大量発現させた。発現株は、50 μg/ml のカルベニシンを含む LB 培地において、OD<sub>600</sub>~0.75 ま

で 37°C で培養し、0.4 mM の IPTG を添加後、さらに 23°C で 4 時間培養した。リゾチーム法による溶菌液に 0.28 g/ml の硫酸アンモニウムを加えた。沈殿産物を、10 mM のイミダゾールを含む His カラムバッファー(20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10% glycerol, 500 mM NaCl, 2 mM 2-mercaptoethanol)に溶解し、HisTrap HP カラム(GE Healthcare)に添加した。カラム洗浄の後、130-230 mM のイミダゾールを含む His カラムバッファーで溶出しプールした。溶出液は、ヘパリンカラムバッファー(20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20% glycerol, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.1% Triton™ X-100)で希釈後、HiTrap 1-ml Heparin HP カラム(GE Healthcare)に添加し、300 mM の NaCl を含むヘパリンカラムバッファーで平衡化した。Tn5 transposase 分画を、490-620 mM の NaCl を含むヘパリンカラムバッファーで溶出し、プール後、-80°C で保存した。

### 2.2.3 Tn-oriC による *oriC* 挿入反応

116 nM の高活性変異体 Tn5 transposase と 144 nM の OriC-1 トランスポゾン、10 µl の Tn-oriC 形成バッファー(20 mM Tris-acetate, pH 7.5, 30% glycerol, 100 mM potassium glutamate, 2 mM DTT, 0.2 mM EDTA)において、30°C で 30 分間反応させた。0.5 µl の反応液を、環状 DNA を含む 5 µl の *oriC* 挿入バッファー(20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM potassium glutamate, 10 mM magnesium acetate, 50 ng/µl tRNA)に添加し、37°C で 15 分間反応させた後、70°C で 5 分間反応させ Tn5 transposase を失活させた。エマルジョンを用いる場合、3%の PEG8000 を含む 5 µl の *oriC* 挿入反応液を 2%の ABIL® EM90 と 0.05%の Triton X-100 を含む 250 µl のミネラルオイルに添加し、1 分間ボルテックスした。エマルジョンの平均容量は、顕微鏡写真から見積もった。*oriC* 挿入反応後、遠心操作により反応液を沈殿させ、上清のオイル画分を除いた。その後、クロロフォルム抽出を行い、水層を RCR に用いた。

### 2.2.4 RCR

RCR 反応液は、マグネシウム塩などの塩類を含む 10×Buffer I、dNTP などのヌクレオチド類を含む 10×Buffer II 及び RCR に必要な酵素類を含む 10×RE Mix から構成される (Su'etsugu et al., 2017; Hasebe et al., 2018)。0.4 µl の 10×Buffer I、0.4 µl の 10×Buffer II 及び 0.4 µl の 10×RE Mix を含む 3.6 µl の RCR 反応液を 30°C で 15 分間保温してから、0.4 µl の *oriC* 挿入反応液を加えた。等温での RCR は、30°C で行った。Cycler-RCR は、37°C で 1 分間の反応と 24°C で 30 分間の反応を 30 または 40 サイクル行った後に、RCR 反応液を RCR バッファーで 1/10 希釈し、30°C で 30 分間反応させた。RCR 後、1 µl の RCR 反応液を分取し、4 µl のストップバッファー(25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25 mM EDTA, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 0.05 mg/ml proteinase K, 5% glycerol, 0.1% bromophenol blue)に加え、0.5%のアガロースゲルを用いて電気泳動した。染色液は、SYBR Green I を用いた。ゲル写真は、Typhoon

FLA 9500 (GE Healthcare)を用いて撮影した。Fプラスミドとラムダファージ DNA の増幅では、60 nM の RecG、0.5 U/ $\mu$ l の RecJ、60 mU/ $\mu$ l の Exonuclease III (Exo III)を RCR 反応液に加えた。さらに、Fプラスミドの増幅では、3 ng/ $\mu$ l のラムダファージ DNA を RCR 反応液に加えた。ラムダファージ DNA は、RCR 反応液に含まれるコンタミネーションの DNA 分解酵素活性を阻害し、長鎖 DNA の増幅を安定化させる。

#### 2.2.5 ラムダファージ DNA の環状化

160 ng のラムダファージ DNA を 10  $\mu$ l のアニーリングバッファー (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 3 mM DTT, 50 mM potassium glutamate, 100  $\mu$ M ATP, 1 mM magnesium acetate, 4 mM creatin phosphate, 150 mM TMAC, 10% DMSO, 5% PEG8000, 20 ng/ $\mu$ l Creatin kinase)に加え、65°C で 5 min 保温後、徐々に温度を下げながら 12°C まで冷却した。その後、2  $\mu$ l の反応液を、10  $\mu$ l の 50 nM DNA polymerase I、50 nM Ligase、20 mU/ $\mu$ l Exo III、5 nM GyrAB を含む RCR バッファーに加え、30°C で 16 時間保温し、Gap Repair (GR)反応を行った。2.5  $\mu$ l の GR 反応液を分取し、2.5  $\mu$ l の 2 倍濃度のストップバッファーに加え、0.5%のアガロースゲルを用いて電気泳動した。染色液は、SYBR Green Iを用いた。ゲル写真は、Typhoon FLA 9500 を用いて撮影した。

#### 2.2.6 OriC トランスポゾンの抜き出し

各濃度の Tn5 transposase と 10 ng の pRpoABCD::Km-oriC を、5  $\mu$ l の *oriC* 挿入バッファーに加え、37°C で 16 時間反応させた後、70°C で 5 分間反応させた。1  $\mu$ l の反応液を、5  $\mu$ l の Exo III 反応液(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 20 mU/ $\mu$ l Exo III)に加え、30°C で 10 分間反応させた。その後、65°C で 5 分間反応させた後、12°C まで徐々に温度を下げた。2  $\mu$ l の反応産物を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  株を形質転換後、50  $\mu$ g/ml のカナマイシン、もしくは 100  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含む LB アガープレートを用いて、OriC トランスポゾンの切り出し効率と自己環状化効率を解析した。

表 2.1 第二章で用いたプライマーのリスト

| Name   | Sequence                                       |
|--------|------------------------------------------------|
| SUE814 | ctgtcttatacacatctgctctgccagtgtacaacc           |
| SUE815 | ctgtcttatacacatcttaacgcggtatgaaaatggat         |
| SUE829 | aaacctgtatttcagggcgggtattaccagtgcactgcatcg     |
| SUE830 | agctgcgctagtagacgagtccatgtagatttaatgccctgcgcca |
| SUE996 | ctgtcttatacacatctgaagatccggcagaagaatg          |
| SUE997 | ctgtcttatacacatctgtcggcttgagaagacctg           |

## 2.3 結果

### 2.3.1 Tn5 トランスポジション反応を用いた *oriC* の挿入

環状 DNA に *oriC* を導入するために、試験管内 Tn5 トランスポジション反応を利用した (Picelli et al., 2014; Goryshin and Reznikoff, 1998)。Tn5 トランスポジション反応は、ターゲット環状 DNA、Tn5 トランスポゾン及び高活性変異体 Tn5 transposase から構成される。Tn5 トランスポゾンは、両末端に Tn5 transposase の結合配列(ME)を持つ DNA 断片である。また、高活性変異体 Tn5 transposase は、54 番目のグルタミン酸と 372 番目のロイシンがそれぞれリジン(E54K)とプロリン(L372P)に変換されている。E54K 変異は、ME への結合を促進し、L372P 変異は、Tn5 transposase の二量体形成を促進する。

Tn5 トランスポジション反応を用いた *oriC* 導入反応では、まず、Tn5 transposase が *oriC* 配列を持つ Tn5 トランスポゾン(OriC トランスポゾン)の ME に結合する。その後、結合した Tn5 transposase 同士が二量体を形成することで、Tn5 トランスポゾーム(Tn-oriC)が構築される。そして、Tn-oriC がターゲット環状 DNA のランダムな位置に OriC トランスポゾンを挿入する(図 2.1a)。これを確かめるために、カナマイシン耐性遺伝子を持たせた OriC トランスポゾン(Km-oriC トランスポゾン)を用いて、アンピシリン耐性遺伝子を持つ 15 kb の環状 DNA (pRpoABCDZ)に対する OriC トランスポゾンの挿入実験を行った。pRpoABCDZ、Km-oriC トランスポゾン及び Tn5 transposase を混ぜ、37°C で 16 時間反応させた。その産物を用いて、大腸菌を形質転換した後、アンピシリン耐性コロニーとカナマイシン耐性コロニーを数えた。アンピシリン耐性コロニー数に対するカナマイシン耐性コロニー数の割合を図 2.1b に示した。その結果、カナマイシン耐性コロニーの出現は、Tn5 transposase に依存しており、最大で~1%の *oriC* 挿入効率があることがわかった。

### 2.3.2 Tn-oriC を用いた RCR 増幅

Tn-oriC による *oriC* 挿入反応に依存した RCR 増幅(Tn-RCR)を pRpoABCDZ を用いて検討した(図 2.2a)。OriC トランスポゾンには、*oriC* 配列の両末端に ME をつけた 0.5 kb の DNA 断片を用いた。予め、OriC トランスポゾンと Tn5 transposase を混ぜ、Tn-oriC を構築した。*oriC* 挿入反応は、pRpoABCDZ と Tn-oriC を含む反応液で 37°C で 15 分間行い、その後、70°C で 5 分間保温し、Tn5 transposase を失活させた。続けて、その産物を RCR した結果、目的のサイズの増幅産物が単量体スーパーコイル DNA として確認できた(図 2.2b)。Tn-oriC による挿入反応を行わなかった場合は、増幅産物が得られなかった。ローリングサークル複製に由来するコンカテマーや複製が未完了の産物などの開環状 DNA も見られた。

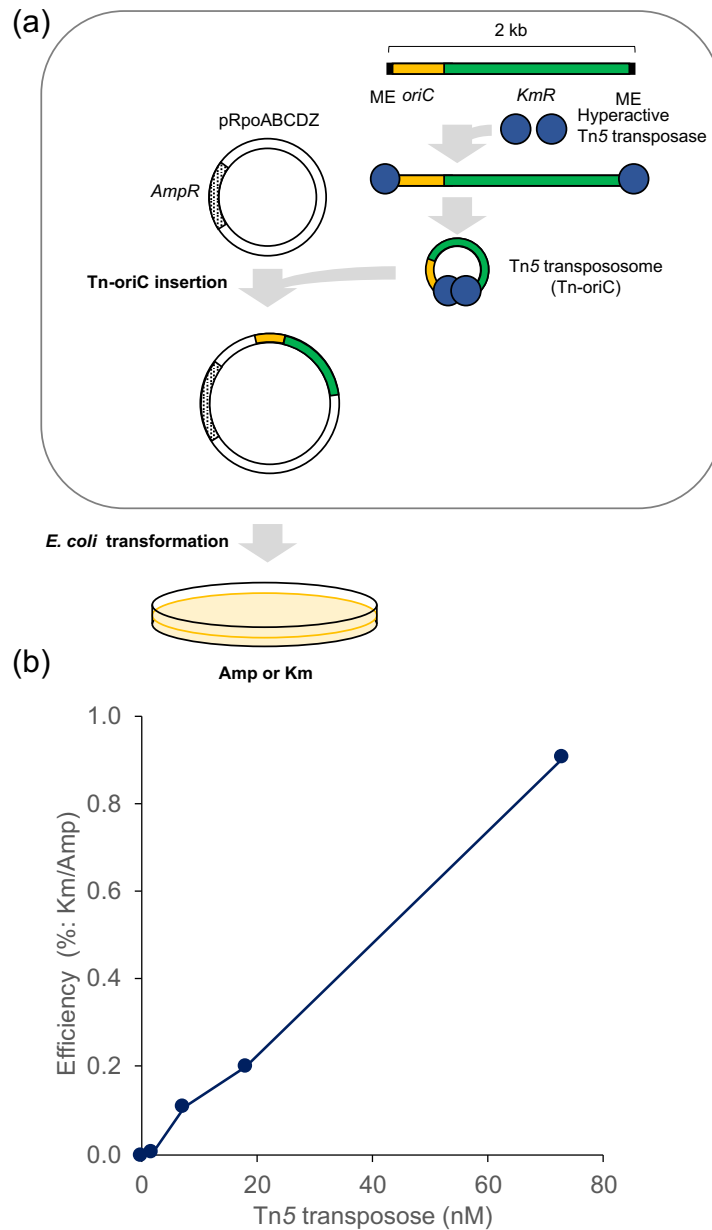


図 2.1 試験管内 Tn5 トランスポジション反応。500 ng (終濃度 5 nM)の pRpoABCDZ、5 nM の Km-oriC トランスポゾン及び Tn5 transposase を含む *oriC* 挿入バッファーで反応した。その後、大腸菌 DH5  $\alpha$  を形質転換し、100  $\mu\text{g/ml}$  のアンピシリン(Amp)、または 50  $\text{mg}/\mu\text{l}$  のカナマイシン(Km)を含むプレートを用いて、*oriC* 挿入効率を解析した。(a)Tn5 トランスポジション反応のモデル図。Tn5 transposase が Km-oriC トランスポゾンに結合し、二量体(Tn-oriC)を形成する。Tn-oriC により pRpoABCDZ に Km-oriC トランスポゾンが挿入される。(b)アンピシリン耐性コロニー数に対するカナマイシン耐性コロニー数の割合。



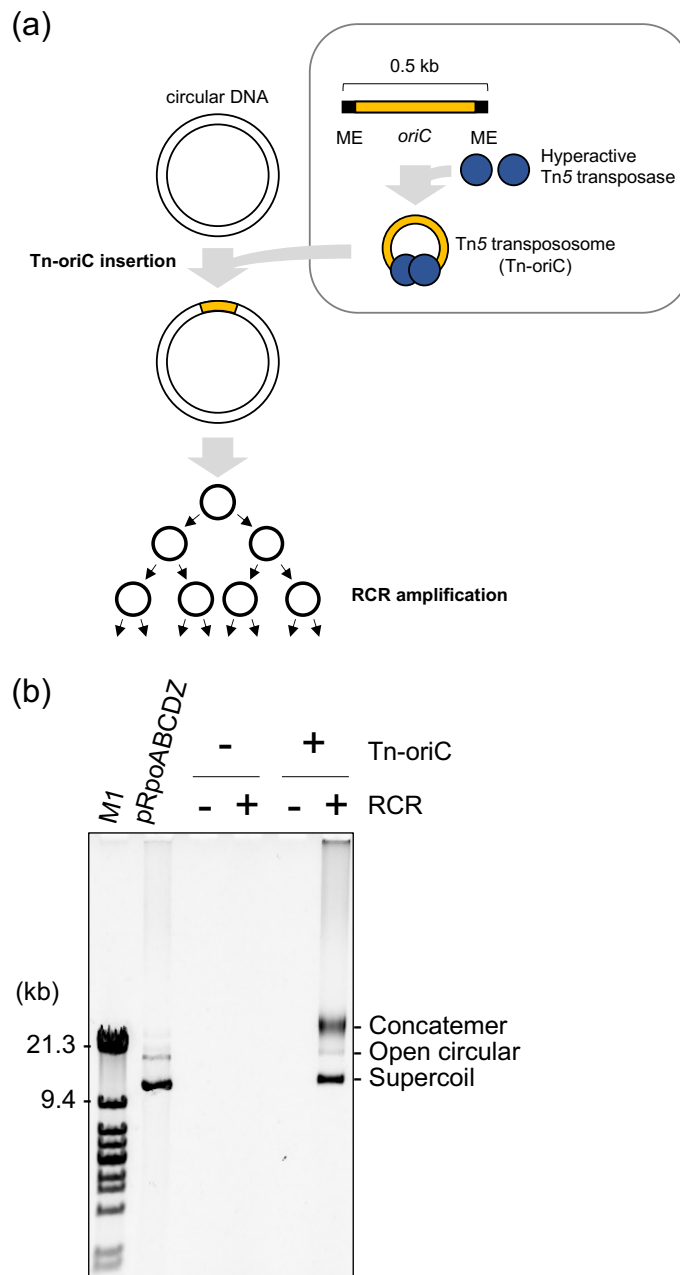


図 2.2 Tn-oriC による *oriC* 挿入反応に依存した RCR 増幅。(a)Tn-RCR のモデル図。OriC トランスポゾンと Tn5 transposase を反応させ、Tn-oriC を構築する。Tn-oriC を用いて環状 DNA に *oriC* を挿入することで、その後の RCR 増幅が可能である。(b)500 fg (終濃度 10 fM)の pRpoABCDZ を 5  $\mu$ l の *oriC* 挿入バッファーに加えた。この時さらに、(-)Tn-oriC では Tn-oriC を加えず、(+Tn-oriC では Tn-oriC を加えた。*oriC* 挿入反応後、30 $^{\circ}$ C で 4 時間の RCR にかけた。(-)RCR は、RCR 前のサンプルを示し、(+RCR は、RCR 後のサンプルを示す。M1 は、ラムダファージ DNA 由来の DNA サイズマーカーである。

### 2.3.3 Tn-RCR を用いた低濃度 DNA の増幅

次に、どのくらい低濃度の環状 DNA を Tn-RCR を用いて増幅できるか検討した。これに向けて、DNA 長の短い分子ほど複製にかかる時間が少なく増幅され易いという DNA の大きさによる増幅バイアスを抑えるために、37°C で 1 分間の反応と 24°C で 30 分間の反応を 30 回サイクルする *cycler-RCR* を開発した。RCR の複製開始反応は、28°C 以上の温度が必要である(Funnell et al., 1986)。一方で、伸長反応はそれ以下の温度で進むため、24°C で複製が進行する。次のサイクルの 37°C の反応が始まるまで、複製は停止するため、37°C と 24°C の温度サイクルによって複製サイクルが同期される。23°C での伸長速度は 1 秒あたり 250 bp であることが知られている(Yao et al., 2009)。そのため、24°C で 30 分間の反応は、両方向に複製が進んだ場合に最大で 900 kb の DNA を複製することが可能であると考えられ、15 kb のプラスミドにおいては十分な時間である。低濃度の DNA を増幅する場合に、等温の RCR では、僅かな量のコンタミネーションした DNA に由来した分子量の小さい DNA が増幅してしまったが、*cycler-RCR* では、その増幅を抑えることができた(図 2.3)。また、*cycler-RCR* を用いることで、500 fg (30000 分子)からでも特異的に増幅できることが確認できた。分子量の小さい増幅産物を配列解析した結果、Tn5 transposase を精製したときにコンタミネーションしたと思われる *oriC* を持たないプラスミド由来であった。この結果は、Tn-RCR が低濃度の DNA を増幅できることを示す。

環境中の DNA などさらに少ない量のプラスミドを増幅するために、Tn-*oriC* による *oriC* 挿入反応を油中水滴エマルジョン内で行う方法を構築した。この方法では、50 fg (3000 分子)のプラスミドを用いた場合でも増幅することが可能だった(図 2.4)。エマルジョンを用いて~100 fL の微小空間に Tn-*oriC* とプラスミドを封入することで、少量のプラスミドを用いた場合でも *oriC* の挿入が可能になったと考えられる。本実験では、4 fg のプラスミドを含む *oriC* 挿入反応液を 4  $\mu$ l の RCR 反応にかけた。この時、*OriC* トランスポゾンの挿入効率が約 1%であることから、0.04 fg (~3 分子)の *oriC* を持つプラスミドが RCR 中に初め存在したと考えられる。また、RCR において基質の枯渇などで反応が飽和状態になった場合には、~100 ng/ $\mu$ l の増幅産物が得られることから(Su'etsugu et al., 2017)、0.04 fg のプラスミドが~ $10^{10}$  倍に増幅したと推定される。3000 分子という極僅かな環状 DNA を増幅できることは、環境中に存在する DNA などの増幅し解析する技術に繋がる。

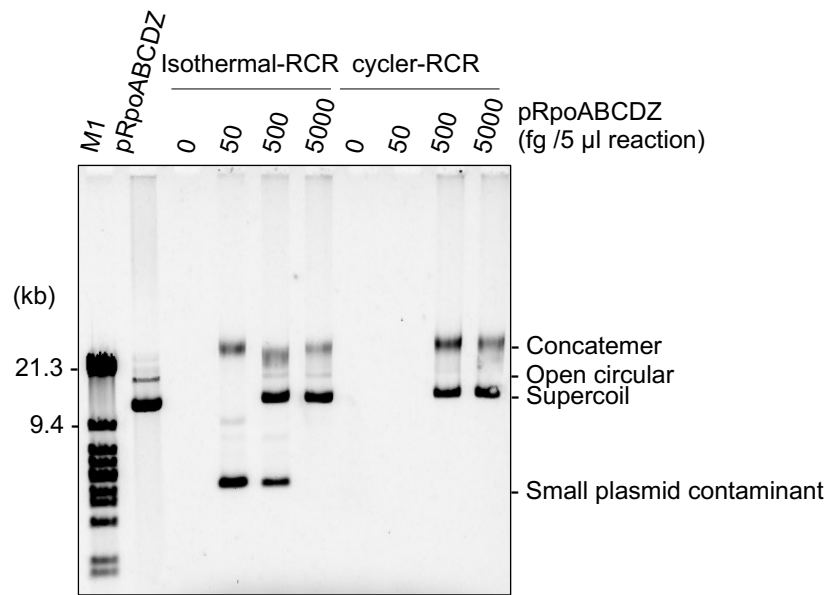


図 2.3 Tn-RCR における cyclor-RCR の検討。表記の量の pRpoABCDZ に対して *oriC* 挿入反応を行った。その後、30°C で 16 時間(isothermal-RCR)、もしくは 37°C で 1 分間と 24°C で 30 分間を 30 サイクル(cyclor-RCR)の RCR を行った。

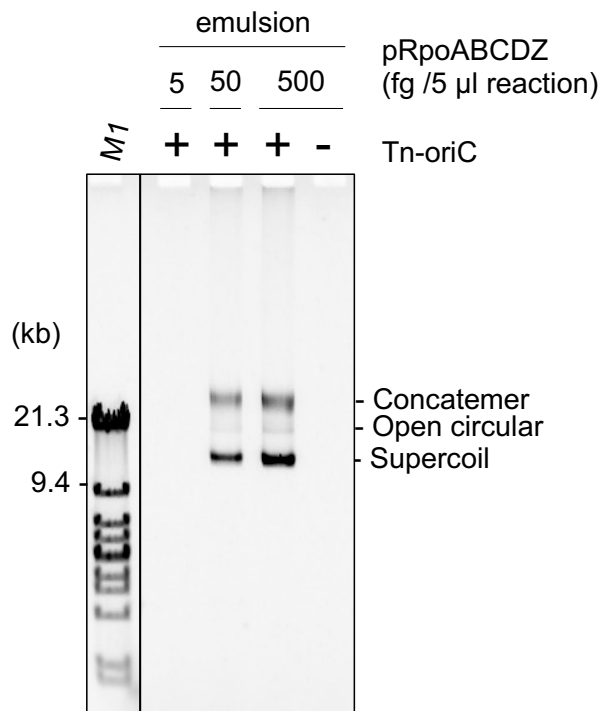


図 2.4 エマルジョンを用いた Tn-RCR。表記の量の pRpoABCDZ に対してエマルジョンを用いた *oriC* 挿入反応を行った。その後、30 サイクルの cyclor-RCR を行った。

#### 2.3.4 Tn-RCR を用いた GC リッチ DNA の増幅

GC リッチな DNA の PCR 増幅は、DNA が二次構造をとることが原因で難しい (McDowell et al., 1998)。そこで、好熱菌 *Thermus thermophilus* の pTT8 プラスミド (9.3 kb、GC 含有率 69%) を用いて、Tn-RCR で GC リッチな DNA が増幅できるか検討した。その結果、Tn-oriC による *oriC* の挿入に依存的な目的のサイズの単量体スーパーコイル DNA の増幅が確認できた (図 2.5a)。また、増幅産物を制限酵素により切断したところ、pTT8 プラスミドを切断した場合と同様のバンドパターンが得られたことから、増幅産物が目的のプラスミドであることが確認できた (図 2.5b)。制限酵素による切断を行わなかった場合、スーパーコイル DNA の割合が減少したが、これはインキュベーションによる DNA 損傷が原因である。これらの結果は、RCR が GC リッチな DNA を増幅できることを示すものである。

#### 2.3.5 Tn-RCR を用いた長鎖 DNA の増幅

大腸菌の F プラスミド (232 kb) を用いて、長鎖 DNA が増幅できるか検討した。この時 RCR には、反応液に含まれるコンタミネーションの DNA 分解酵素活性を阻害し、長鎖 DNA の増幅反応を安定させるために、ラムダファージ DNA を加えた。12 fM の F プラスミドに対して Tn-RCR を行ったところ、目的のサイズの単量体スーパーコイル構造の増幅産物を得ることができた (図 2.6a)。この増幅産物を制限酵素を用いて構造確認した結果、目的の DNA を増幅できたことが示された (図 2.6b)。制限酵素による切断産物の解析にはパルスフィールドゲルを用いたため、スーパーコイル DNA は確認できなかった。これらの結果から、Tn5 トランスポジション反応を用いて *oriC* を導入した場合でも、長鎖環状 DNA が増幅できることがわかった。

#### 2.3.6 Tn-RCR を用いたオルガネラ DNA の増幅

Tn-RCR によるオルガネラ DNA の増幅を、ヒトミトコンドリア DNA (ヒト mtDNA) を用いて検討した。近年では、ミトコンドリアに DNA を導入する技術も開発されていること (Chuah et al., 2015) から、mtDNA の増幅はその機能に関する基礎研究に寄与することが期待される。HEK293 細胞及び Hela 細胞から抽出した 16.6 kb のヒト mtDNA を Tn-RCR にかけてところ、HEK293 細胞由来 mtDNA を用いた場合でのみ 15 kb の pRpoABCDZ のスーパーコイル DNA 付近に単量体スーパーコイル構造の増幅産物が見られた (図 2.7a)。また、コンタミネーションした DNA が由来だと考えられる分子量の小さな DNA の増幅も見られた。HEK293 細胞由来 mtDNA の増幅産物を制限酵素で切断した結果、予想される切断産物が得られたため、目的の DNA を増幅できたことが確認できた (図 2.7b)。また、非特異的な増幅

産物に由来する切断産物も見られた。しかしながら、Hela 細胞由来 mtDNA では、ローリングサークル複製に由来するコンカテマーのみが見られ、目的のスーパーコイル DNA は増幅できなかった。

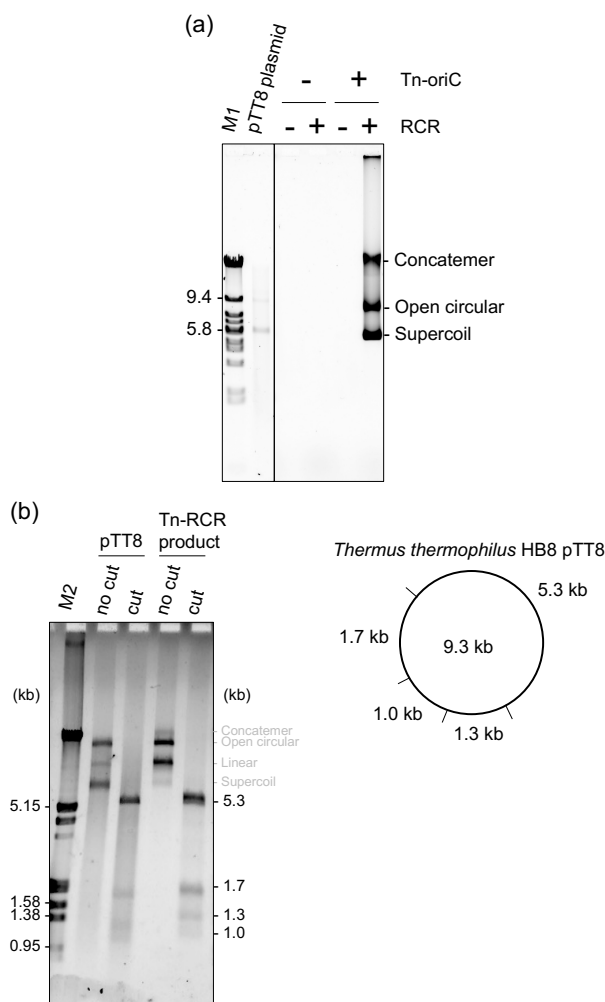


図 2.5 Tn-RCR による pTT8 プラスミドの増幅。(a)0.75 pg (終濃度 34 fM)の pTT8 プラスミドを 5  $\mu$ l の *oriC* 挿入バッファーに加えた。この時さらに、(-)Tn-oriC では Tn-oriC を加えず、(+ )Tn-oriC では Tn-oriC を加えた。*oriC* 挿入反応後、30 $^{\circ}$ C で 4 時間の RCR にかけて。( - )RCR は、RCR 前のサンプルを示し、(+ )RCR は、RCR 後のサンプルを示す。(b)精製 pTT8 プラスミド及び pTT8 プラスミドの増幅産物の制限酵素(*KpnI* と *NheI*)による構造確認。反応液に *KpnI* と *NheI* を加えなかったサンプルを no cut とし、制限酵素を加えたサンプルを cut とした。37 $^{\circ}$ C で 3 時間の反応後、1%のアガロースゲルを用いて電気泳動し、SYBR Green I を用いて染色した。M2 は、ラムダファージ DNA 由来の DNA サイズマーカーである。pTT8 プラスミドの *KpnI*/*NheI* 切断マップを右に示す。

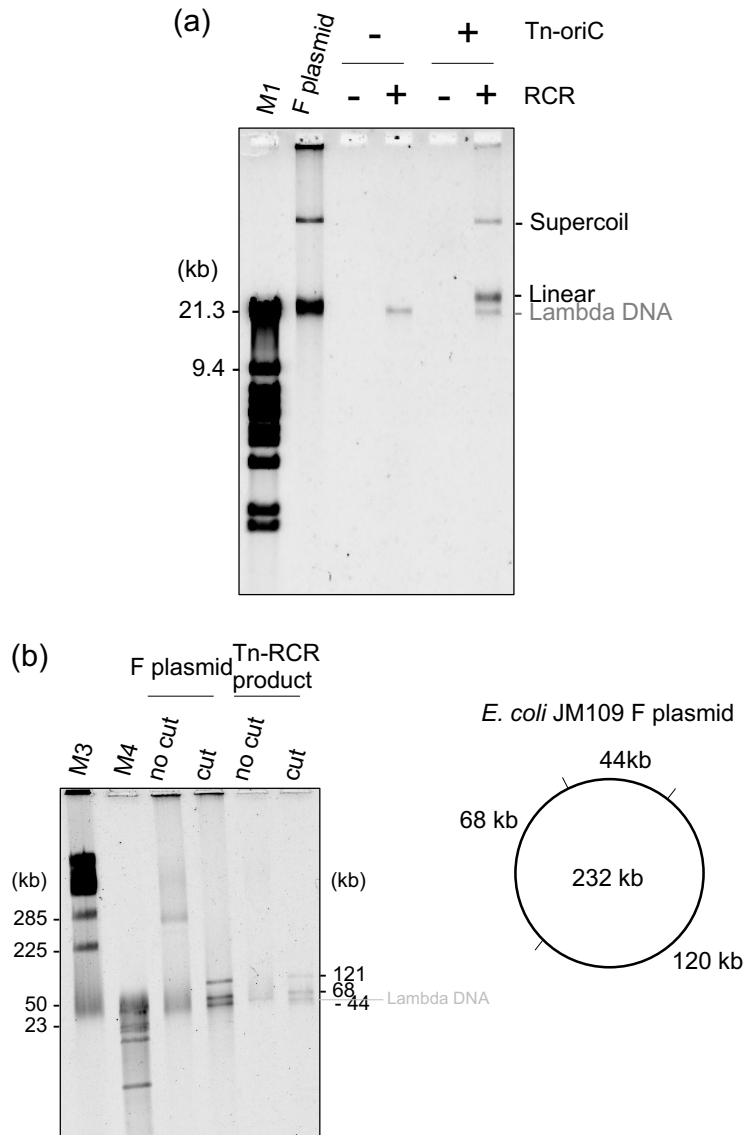


図 2.6 Tn-RCR による F プラスミドの増幅。(a)9.5 pg (終濃度 12 fM)の F プラスミドを 5  $\mu$ l の *oriC* 挿入バッファーに加えた。この時さらに、(-)Tn-oriC では Tn-oriC を加えず、(+Tn-oriC では Tn-oriC を加えた。*oriC* 挿入反応後、40 サイクルの *cycler*-RCR を行った。(-)RCR は、RCR 前のサンプルを示し、(+RCR は、RCR 後のサンプルを示す。(b)精製 F プラスミド及び F プラスミドの増幅産物の制限酵素(*PmeI*) による構造確認。反応液に *PmeI* を加えなかったサンプルを no cut とし、制限酵素を加えたサンプルを cut とした。37°C で 3 時間の反応後、0.75% のパルスフィールドアガロースゲルを用いて Pippin pulse power supply (Sage science)により電気泳動し、SYBR Green I を用いて染色した。M3 は、酵母染色体 DNA である。M4 は、T7 ファージ DNA 由来の DNA サイズマーカーである。F プラスミドの *PmeI* 切斷マップを右に示す。

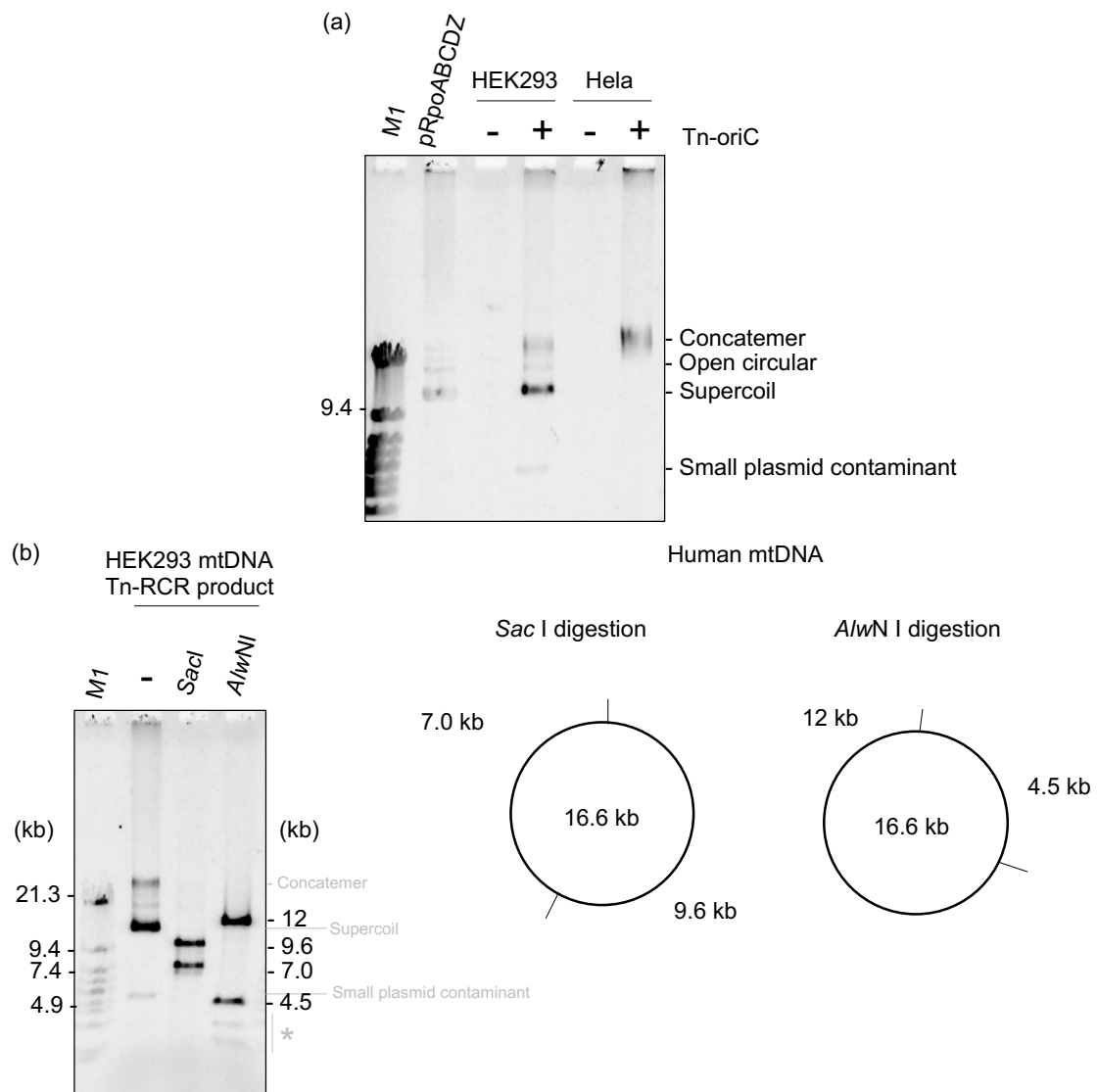


図 2.7 Tn-RCR によるヒト mtDNA の増幅。(a)3.2 ng (終濃度 60 pM)の HEK293 細胞由来 mtDNA、または 4 ng (終濃度 73 pM) の Hela 細胞由来 mtDNA を 5  $\mu$ l の *oriC* 挿入バッファーに加えた。この時さらに、(-)Tn-oriC では Tn-oriC を加えず、(+)Tn-oriC では Tn-oriC を加えた。*oriC* 挿入反応後、30°C で 4 時間の RCR にかけた。(b)HEK293 細胞由来 mtDNA の増幅産物を、制限酵素(*Sac*I、または *A/w*NI)により 37°C で 1 時間処理した。(-)は、制限酵素を反応液に加えなかった。0.5%のアガロースゲルを用いて電気泳動し、SYBR Green I を用いて染色した。ヒト mtDNA の *Sac*I 切断、または *A/w*NI 切断マップを右に示す。アスタリスク(\*)は、非特異的な増幅産物に由来する切断産物である。

### 2.3.7 直鎖状 DNA の環状化による Tn-RCR 増幅

Tn-RCR を行うためには、目的の DNA が環状構造をとる必要がある。そこで、直鎖状 DNA を環状化することでその増幅が可能か検討した。48.5 kb の直鎖状ラムダファージ DNA をターゲットとした。ラムダファージ DNA の環状化は、相同な 12 bp の 5'突出末端である *cos* 配列同士のアニーリングにより行った。その後、DNA polymerase I、Ligase 及び Exo III を用いた反応(Gap Repair: GR)により、ニックを修復した。この時さらに、Gyrase を加え、負のスーパーコイルを導入した。図 2.8a に示すとおり、Gyrase に依存して単量体スーパーコイル DNA がマーカーの 23 kb の上に見られた。また、ゲルのウェルに見られる開環状 DNA が減少した。マーカーの 23 kb 付近に見られるバンドは直鎖状である。

アニーリング反応産物及び GR 反応産物を用いて Tn-RCR を行ったところ、GR 反応に Gyrase を加えた場合でのみ、目的のサイズの単量体スーパーコイル DNA の増幅が見られた(図 2.8b)。この増幅は、Tn-oriC による *oriC* 挿入反応に依存的であった。増幅産物を制限酵素で切断したところ、予期された長さの断片が見られたため、目的のラムダファージ DNA を増幅できたことが示された(図 2.8c)。このことから、直鎖状 DNA に対しては環状化処理を行うことで Tn-RCR により増幅できることが示された。0.6 kb の切断産物のバンドは、RCR バッファーに含まれる tRNA のバンドと重なるため検出できなかった。また、不完全な切断産物や、非特異的な増幅産物に由来する切断産物も見られた。*oriC* 挿入反応に用いたラムダファージ DNA 量が少ない時ほど、コンタミネーションした DNA に由来する分子量の小さい DNA が増幅し易かった。

アニーリング反応産物を用いた場合や、Gyrase を加えずに GR 反応を用いた場合は、目的のスーパーコイル DNA の増幅が見られなかった。大腸菌内での Tn5 トランスポジション反応には、ホストファクターとして Gyrase が関わっていることや、負のスーパーコイル構造を取りやすい転写領域で DNA 挿入が起きやすいことが知られている(Isberg and Syvanen, 1982; Lodge and Berg, 1990)。これらのことから、Tn5 トランスポジション反応を用いた *oriC* の挿入には、ターゲット DNA の負のスーパーコイル構造が重要であることが示唆された。



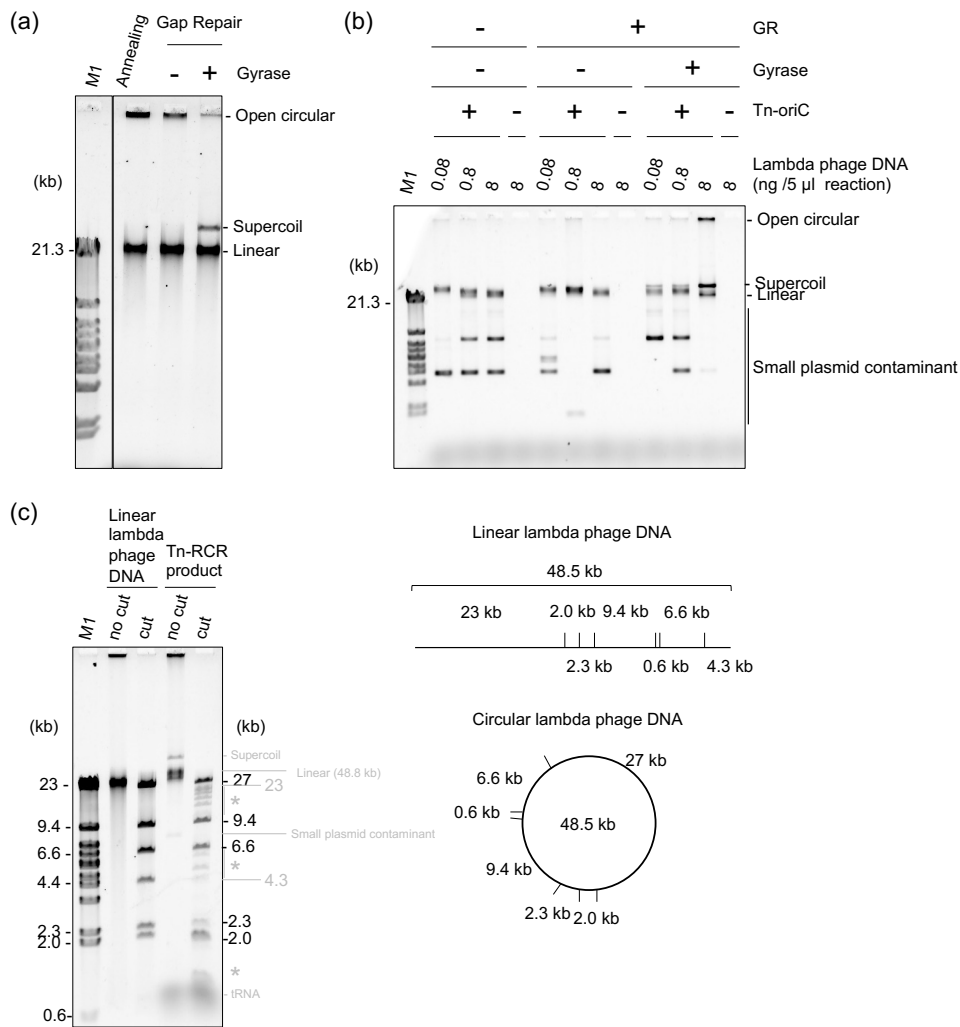


図 2.8 Tn-RCR によるラムダファージ DNA の増幅。(a)ラムダファージ DNA を末端の *cos* 配列(5'-GGGCGGCGACCT-3')のアニーリングによって自己環状化させた。その後、Gap Repair (GR)反応によりニックを修復した。この時、反応液に GyrAB を加えなかった場合を(-)Gyrase とし、GyrAB を加えた場合を(+Gyrase とした。(b)アニーリング反応産物、または GR 反応産物をラムダファージ DNA が表記の量になるように 5 μl の *oriC* 挿入バッファーに加えた。この時さらに、(-)Tn-oriC では Tn-oriC を加えず、(+Tn-oriC では Tn-oriC を加えた。*oriC* 挿入反応後、30 °C で 16 時間の RCR にかけて。(c)直鎖状ラムダファージ DNA 及びラムダファージ DNA の増幅産物の制限酵素(*Hind* II)による構造確認。反応液に *Hind*III を加えなかったサンプルを no cut とし、*Hind*III を加えたサンプルを cut とした。37 °C で 1 時間の反応後、0.5%のアガロースゲルを用いて電気泳動し、SYBR Green I を用いて染色した。ラムダファージ DNA の *Hind*III 切断マップを右に示す。アスタリスク(\*)は、非特異的な増幅産物に由来する切断産物である。

### 2.3.8 OriC トランスポゾンの抜き出し

Tn-RCR による増幅産物は、ランダムな位置に *oriC* 配列を有している。そこで、OriC トランスポゾンを環状 DNA から抜き出す手法を構築した。Tn5 transposase は、2つの ME に挟まれた配列をプラスミドから切り出す活性を持つ(Goryshin and Reznikoff, 1998)。Tn5 トランスポゾンが挿入された位置には、9 bp の重複配列が生じるため、トランスポゾンが切り出された際には、9 bp の相同配列が末端に残る(Goryshin and Reznikoff, 1998)。そこで、このメカニズムを利用して、OriC トランスポゾンの切り出しと 9 bp の相同末端を用いた自己環状化が可能か検討した(図 2.9a)。自己環状化は、3'エキソヌクレアーゼである Exonuclease III (Exo III)を用いて 5'突出末端を作り、そのアニーリングによって導いた。

OriC トランスポゾンの挿入によって破壊された遺伝子について、トランスポゾンの切り出しとその後の自己環状化により元の配列に修復できたかを検出するために、モデル DNA としてカナマイシン耐性遺伝子を持つ OriC トランスポゾン(Km-oriC トランスポゾン)が Tn5 トランスポジション反応によってアンピシリン耐性遺伝子上に挿入されたプラスミド(pRpoABCDZ::Km-oriC)を用いた。pRpoABCDZ::Km-oriC と Tn5 transposase を含む反応液を 37°C で 16 時間反応させ、その後、Tn5 transposase を熱失活させた。さらに、Exo III 処理とアニーリング反応を行い、この反応産物を用いて大腸菌を形質転換した。図 2.9b の結果から、Tn5 transposase に依存してカナマイシン耐性遺伝子を持つプラスミドが減少したことが示され、Km-oriC トランスポゾンが切り出されたことが確認できた。また、アンピシリン耐性遺伝子を持つプラスミドの割合が Exo III 処理によって増加した(図 2.9c)。この時、得られたコロニー数から、1 µg の pRpoABCDZ::Km-oriC あたり最大で  $3 \times 10^4$  の目的のアンピシリン耐性形質転換体が獲得できることがわかった。これら結果は、Tn5 transposase を用いたトランスポゾンの切り出し反応とその後の自己環状化反応を用いることで、Tn5 トランスポジション反応によって挿入された *oriC* 配列が抜き出され、その挿入箇所を元どおりの配列に修復できることを示している。抜き出された箇所が元の配列に修復されたことはサンガーシーケンス解析においても確認できた。トランスポゾンが切り出された産物について、アガロースゲル電気泳動解析を行った結果、100 nM 以上の Tn5 transposase を用いた場合にスーパーコイル構造がほぼ直鎖化され、反応が飽和状態であることが確認できた(図 2.9b、挿入図)。しかし、形質転換解析においては、300 nM の Tn5 transposase を用いた場合に、カナマイシン耐性とアンピシリン耐性の両方においてコロニー数の減少が見られた。このことから過剰の Tn5 transposase が形質転換を阻害している可能性が考えられた。

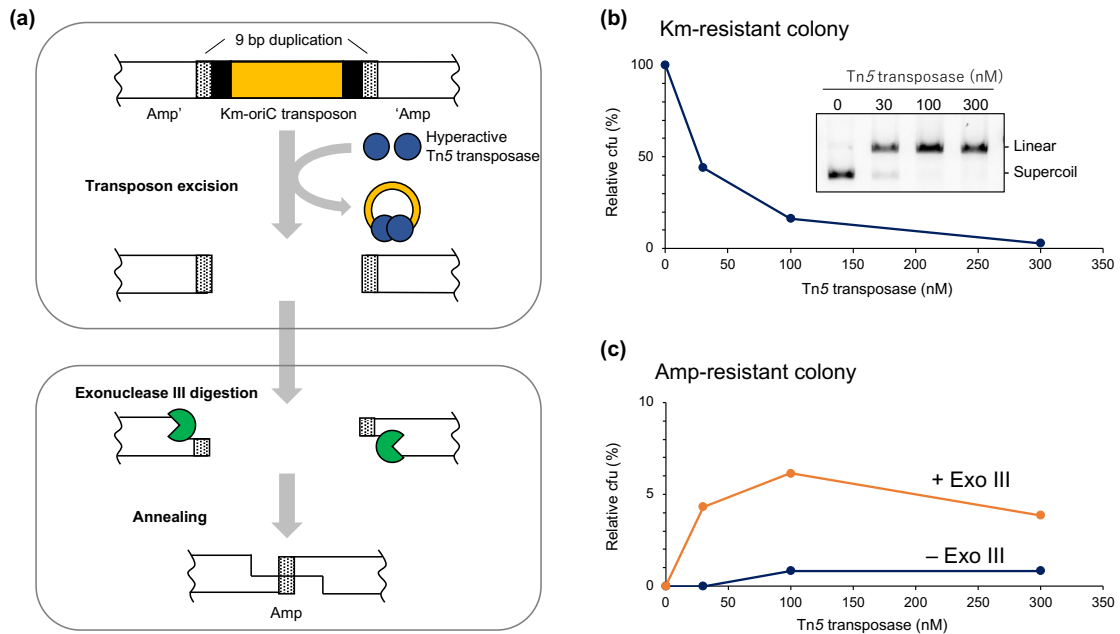


図 2.9 OriC トランスポゾンの抜き出し。(a)OriC トランスポゾンの切り出しとその後の自己環状化のモデル図。アンピシリン耐性遺伝子(Amp)内に挿入された Km-oriC トランスポゾンを Tn5 transposase を用いて切り出し、エキソヌクレアーゼ処理による末端の削り込みとそれによる露出部のアニーリングによってアンピシリン耐性遺伝子を修復する。(b、c)pRpoABCDZ::Km-oriC に対して、Km-oriC トランスポゾンの抜き出しと自己環状化を行った後、その反応産物を用いて大腸菌の形質転換アッセイを行った。カナマイシン耐性コロニー(b)と、アンピシリン耐性コロニー(c)を数えた。Relative cfu は、Tn5 transposase を用いずに反応した場合のカナマイシン耐性コロニー数に対する割合である。Km-oriC トランスポゾンの抜き出し反応後、アニーリング反応の前に Exo III を加えなかった場合を(-Exo III)とし、加えた場合を(+Exo III)とした。Km-oriC トランスポゾンの抜き出し反応後の産物を、0.5%のアガロースゲルで電気泳動した(b、挿入図)。

## 2.4 考察

トランスポゾンを用いて環状 DNA に *oriC* を挿入し、RCR によって増幅する Tn-RCR を開発した。この手法を用いることで、GC リッチな好熱菌プラスミド や 200 kb を超える大腸菌 F プラスミドなどの様々な環状 DNA を試験管内で増幅可能であることが示された。また、エマルジョンを用いた Tn-RCR は、15 kb の環状 DNA であれば 3000 分子程度の低濃度から増幅することが可能であった。このことから、僅か量の環状 DNA を高感度に増幅できる。Tn-RCR は、Tn5 トランスポジション反応を利用していることから、環状 DNA の配列情報が必要としないため、環境中の長大なプラスミドや微生物染色体、オルガネラ DNA を増幅し同定するために利用できると考えている。さらに、人の癌では、extrachromosomal DNA と呼ばれる長鎖環状 DNA が発癌性遺伝子を持っていることが知られている(Wu et al., 2019)。Tn-RCR は、extrachromosomal DNA などを増幅し解析するツールとしても有用であるだろう。

一方で、ヒト mtDNA やラムダファージ DNA の増幅では、コンタミネーションした DNA に由来する目的以外の DNA の増幅が見られた(図 2.7a、2.8b)。コンタミネーションした DNA の増幅は、目的の環状 DNA が少ない場合に特に見られた(図 2.3、2.8b)。ヒト mtDNA 溶液にはゲノム DNA などがコンタミネーションしており、この増幅によって特に HeLa 細胞由来 mtDNA では目的の増幅が見られなかったと考えられる。また、ラムダファージ DNA の増幅においては、環状のラムダファージ DNA の割合が少なかったことが、非特異的な DNA の増幅の原因であると考えられる。15 kb のプラスミドを増幅した場合と同様に、cyclcr-RCR を用いることで、目的の DNA を特異的に増幅できる。さらに、コンタミネーションしたゲノム DNA などは直鎖状 DNA であると考えられるので、エキソヌクレアーゼ処理などで直鎖状の DNA を除去することも有効になると考えられる。

RCR の鋳型 DNA は環状構造をとる必要があるため、直鎖状 DNA をターゲットとする場合は、その環状化が必要であった。環状化された DNA はさらに、Gyrase による負のスーパーコイル化を受けることで、Tn-RCR による増幅が可能になった(図 2.8b)。このことは、Tn5 トランスポジション反応による DNA の挿入には、ターゲット DNA 分子の負のスーパーコイルが重要であることを示しており、環状 DNA に対しても *oriC* 挿入反応前に Gyrase による処理を行うことで、さらに低濃度から増幅することが可能になる可能性が考えられる。

本章では、Tn5 transposase によるトランスポゾンの切り出し反応と *oriC* 挿入時にできる 9 bp の重複配列を介した自己環状化反応により、試験管内で OriC トランスポゾン環状 DNA から抜き出す手法も開発した。自己環状化反応では、Exo III を用いて 5'末端を形成し重複配列同士をアニーリングした。これまでに Exo III を用いて相同配列同士を連結し、大腸菌内でクローニングする手法が開発されており、その効率は 1  $\mu$ g のベクターあたり  $2 \times 10^3$  の形質転換体が得られるものであった(Kaluz et al., 1992)。これと比較して本研究で開

発した手法は、10 倍程度高い効率であったことから、バッファーや反応温度などが DNA のアニーリングにより適した条件であったことが考えられる。また、本手法では、アニーリング産物におけるギャップの修復は、大腸菌内のシステムに頼っていたため、完全な試験管内での DNA 修復ではなかった。GR 反応を用いることで、ギャップのない閉環状 DNA を試験管内で構築することは可能である。OriC トランスポゾンを引き出す手法は、環境中から増幅したプラスミドの宿主の探索といった機能解析に繋がると考えている。

## 2.5 参考文献

- Al-Shayeb, B., Sachdeva, R., Chen, L. -X., Ward, F., Munk, P. and other authors. (2020) Clades of huge phages from across Earth's ecosystems. *Nature*, **578**, 425-431.
- Annaluru, N., Muller, H., Mitchell, L. A., Ramalingam, A., Stracquadanio, G. and other authors. (2014) Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome. *Science*, **344**, 55-8.
- Arumugam, K., Bessarab, I, Haryono, M. A. S., Liu, X., Zuniga-Montanez, R. E. and other authors (2021) Recovery of complete genomes and non-chromosomal replicons from activated sludge enrichment microbial communities with long read metagenome sequencing. *NPJ Biofilms Microbiomes*, **7**, 23.
- Chuah, J. -A., Yoshizumi, T., Kodama, Y. and Numata, K. (2015) Gene introduction into the mitochondria of *Arabidopsis thaliana* via peptide-based carriers. *Sci. Rep.*, **5**, 7751.
- Fredens, J., Wang, K., de la Torre, D., Funke, L. F. H., Robertson, W. E. (2019) Total synthesis of *Escherichia coli* with a recoded genome. *Nature*, **69**, 514-518
- Funnell, B. E., Baker, T. A. and Kornberg, A. (1986) Complete enzymatic replication of plasmids containing the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Biol. Chem.*, **261**, 5616-24.
- Gabrieli, T., Sharim, H., Fridman, D., Arbib, N., Michaeli, Y. and Ebenstein, Y. (2018) Selective nanopore sequencing of human BRCA1 by Cas9-assisted targeting of chromosome segments (CATCH). *Nucleic Acids Res.*, **46**, e87.
- Gibson, D. G., Glass, J. I., Lartigue, C., Noskov, V. N. Chuang, R. -Y. and other authors. (2010) Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, **329**, 52-6.
- Goryshin, I. Y. and Reznikoff, W. S. (1998) Tn5 *in vitro* transposition. *J. Biol. Chem.* **273**, 7367-7374.
- Hasebe, T., Narita, K., Hidaka, S. and Su'etsugu, M. (2018) Efficient Arrangement of the Replication Fork Trap for In Vitro Propagation of Monomeric Circular DNA in the Chromosome-Replication Cycle Reaction. *Life (Basel)*, **8**, 43.
- Isberg, R. R. and Syvanen, M. (1982) DNA gyrase is a host factor required for transposition of Tn5. *Cell*, **30**, 9-18.
- Jain, M., Olsen, H. E., Turner, D. J., Stoddart, D., Bulazel, K. V. and other authors. (2018) Linear assembly of a human centromere on the Y chromosome. *Nat. Biotechnol.*, **36**, 321-323.
- Kaluz, S., Kölbl, K. and Reid, K. B. (1992) Directional cloning of PCR products using exonuclease III. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 4369-4370.
- Kim, J. H., Diltthey, A. T., Nagaraja, R., Lee, H. S., Koren, S. and other authors. (2018) Variation in

- human chromosome 21 ribosomal RNA genes characterized by TAR cloning and long-read sequencing. *Nucleic Acids Res.* **46**, 6712-6725.
- Kornberg, A. and Baker, T. A. (1992) *DNA Replication*. 2nd edn. W.H.Freeman, NY.
- Lodge, J. K. and Berg, D. E. (1990) Mutations that affect Tn5 insertion into pBR322: importance of local DNA supercoiling. *J. Bacteriol.* **172**, 5956-60.
- Martini, M. C., Wibberg, D., Lozano, M., Tejerizo, G. T., Albicoro, F. J. and other authors. (2016) Genomics of high molecular weight plasmids isolated from an on-farm biopurification system. *Sci Rep.* **6**, 28284.
- McDowell, D., Burns, N. and Parkes, H. (1998) Localised sequence regions possessing high melting temperatures prevent the amplification of a DNA mimic in competitive PCR. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 3340-3347.
- Mukai, T., Yoneji, T., Yamada, K., Fujita, H., Nara, S. and Su'etsugu, M. (2020) Overcoming the Challenges of Megabase-Sized Plasmid Construction in *Escherichia coli*. *ACS Synth. Biol.*, **9**, 1315-1327.
- Murakami, K. S. (2013) The x-ray crystal structure of *Escherichia coli* RNA polymerase  $\sigma$ 70 holoenzyme. *J. Biol. Chem.*, **288**, 9126-9134.
- Picelli, S., Björklund, A. K., Reinius, B., Sagasser, S., Winberg, G. and Sandberg, R. (2014) Tn5 transposase and tagmentation procedures for massively scaled sequencing projects. *Genome Res.*, **24**, 2033-2040.
- Su'etsugu M., Takada, H., Katayama, T. and Tsujimoto, H. (2017) Exponential propagation of large circular DNA by reconstitution of a chromosome-replication cycle. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 11525-11534.
- Yao, N.Y., Georgescu, R. E., Finkelstein, J. and O'Donnell, M. E. (2009) Single-molecule analysis reveals that the lagging strand increases replisome processivity but slows replication fork progression. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 13236-13241.
- Wick, R. R. Judd, L. M., Gorrie, C. L. and Holt, K. E. (2017) Completing bacterial genome assemblies with multiplex MinION sequencing. *Microb. Genom.*, **3**, e000132.
- Wu. S., Turner, K. M., Nguyen, N., Raviram, R., Erb, M. and other authors. (2019) Circular ecDNA promotes accessible chromatin and high oncogene expression. *Nature*, **575**, 699-703.

## 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

### 3.1 序論

微生物を用いた DNA クローニング法は、分子生物学の発展を支えてきた技術の 1 つである。例えば、大腸菌の BAC (Bacterial artificial chromosome) システムは、300 kb を超える DNA のクローニングが可能であり、ゲノムライブラリーのベクターなどに使われている (Shizuya et al., 1992; Asakawa et al., 1997)。また、2010 年のクレイグ・ベンターによるマイコプラズマ人工ゲノムの構築においても、大腸菌や酵母を用いたクローニングが多用されている (Gibson et al., 2010)。しかし、生きた生物を使うことから、培養環境の構築など手間と時間がかかるだけでなく、毒性のある DNA のクローニングは困難である。大腸菌の染色体複製サイクルを再構成した RCR は、試験管内で長大な環状 DNA を増幅できる (Su'etsugu et al., 2017; Mukai et al., 2020)。また、鋳型 DNA が *oriC* 配列さえ持っていれば、その配列が未同定であっても、増幅可能である (Nara and Su'etsugu, 2021)。そのため、RCR を基盤とすることで、試験管内で長鎖 DNA をクローニングすることや人工ゲノムを合成することが可能であると考えられる。

近年、25-60 bp の相同配列(オーバーラップ)を末端に持つ DNA 断片同士を連結する手法 (RA: Recombination Assembly) が開発された。RA は、Exonuclease III (Exo III) の削り込みによって形成された 5' 突出のオーバーラップ末端同士を、大腸菌組換え酵素 RecA を用いてアニーリングし、DNA 断片を連結する。RA を用いて *oriC* 断片と目的の DNA 断片を連結環状化し、その産物を RCR にかけることで、目的の DNA を増幅することができる (RA-RCR、図 3.1)。RCR は、わずか 1 分子の環状 DNA からでも増幅できることから、RA で数分子でも目的の環状化産物ができれば、増幅可能である。これまでに、*oriC* 断片を含む最大 51 本の DNA 断片を同時に連結した場合でも、目的の DNA の増幅に成功している (倉田ら未発表)。

RA では、25-60 bp の相同性を利用して DNA を連結するため、その特異性が高く、その後の RCR では、*oriC* 断片とオーバーラップを持つ DNA を選択的に増幅することができる。さらに、大腸菌染色体の複製開始には、負のスーパーコイルが必要であるため、直鎖状の連結中間体は増幅されない。目的の DNA のみを単量体スーパーコイル DNA として増幅できることは、試験管内クローニング技術としてアドバンテージとなる。また、RA では、アニーリングのために熱が必要ないため、熱安定性の低い長鎖 DNA の連結に利用できると考えられる。これまでに、RA-RCR を用いた長鎖 DNA の増幅についても検討が進められていた。大腸菌ゲノムを制限酵素で切断した DNA 断片に対して、末端がオーバーラップする *oriC* 断片を用いることで、最大 220 kb の大腸菌ゲノム領域を RA-RCR によって増幅できることが報告されていた (加納, 2017)。しかしながら、この場合では目的以外の DNA の増幅も見られ、目的の DNA のみを増幅することはできていなかった。



本章では、様々な DNA について、RA-RCR による試験管内クローニングを検討した(表 3.1)。ヒトミトコンドリア DNA の増幅では、Tn-RCR とは異なり、目的の DNA の特異的な増幅が可能であった。また、繰り返し配列を持つプラスミドの増幅では、大腸菌を用いたクローニング法と比較した場合に、繰り返し配列の欠損が起りにくいことが明らかになった。さらに、200 kb を超える長大な BAC クローンの試験管内クローニングも可能であった。オルガネラ DNA やプラスミドなどの環状 DNA だけでなく、ゲノム領域のクローニングも検討した。この結果、CGG リピートを含むヒトゲノム領域や、長大な大腸菌ゲノム領域に対しても、目的の DNA の特異的な増幅が可能であった。さらに、ファージ DNA などのウイルスゲノムの試験管内クローニングも可能であった。RA-RCR を用いた環状 DNA のクローニングでは、目的の環状 DNA を単一切断し直鎖化した後に、*oriC* 断片と連結再環状化する必要があった。そこで、RecA の D-loop 活性を用いて、環状 DNA を切断せずとも *oriC* を導入し増幅する手法を開発した。

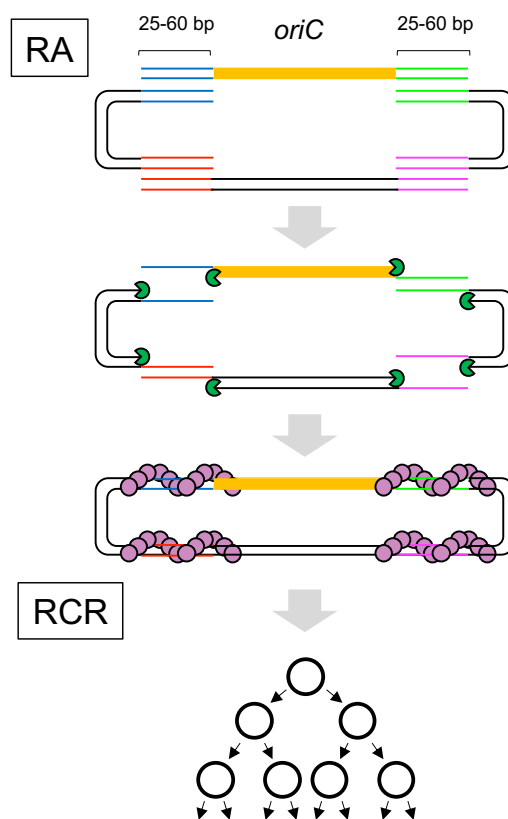


図 3.1 RA-RCR のモデル図。RA では、25-60 bp の相同配列を末端に持つ DNA 断片同士を連結する。Exonuclease III の削り込みによって露出した一本鎖領域を RecA を用いてアニーリングさせる。RA を用いて *oriC* を持つ環状 DNA を構築することで、その後の RCR 増幅が可能になる。

表 3.1 第三章で行った RA-RCR を用いた試験管内クローニング

| Figure | Target DNA                                  | Used DNA                  | Length (bp) | Preparation             |
|--------|---------------------------------------------|---------------------------|-------------|-------------------------|
| 3.3    | Human mtDNA                                 | mtDNA (HEK293 cell)       | 16,568      | <i>Xho</i> I digestion  |
|        |                                             | oriCmtDNA                 | 380         | PCR                     |
| 3.4    | Repeat sequence                             | mtDNA (Hela cell)         | 16,568      | <i>Xho</i> I digestion  |
|        |                                             | oriCmtDNA                 | 380         | PCR                     |
| 3.5    | BAC clone<br>(Baculovirus DNA)              | p601_208x12               | 4,566       | <i>Eco</i> RI digestion |
| 3.6    | BAC clone                                   | oriCp601                  | 350         | PCR                     |
|        |                                             | Bacmid                    | 146,759     | CRISPR-Cas9             |
| 3.6    | BAC clone                                   | oriC60sopC                | 564         | PCR                     |
|        |                                             | RP11-96M14                | 204,862     | CRISPR-Cas9             |
| 3.6    | BAC clone                                   | oriC60repErev             | 420         | PCR                     |
|        |                                             | RP1-247E2                 | 153,402     | CRISPR-Cas9             |
| 3.6    | BAC clone                                   | oriC60km-3nd              | 420         | PCR                     |
|        |                                             | RP11-47514                | 192,035     | CRISPR-Cas9             |
| 3.6    | BAC clone                                   | oriC60repErev             | 420         | PCR                     |
|        |                                             | CH17-81M08                | ~204k       | CRISPR-Cas9             |
| 3.7    | Alphoid DNA<br>(Human genome<br>centromere) | oriC60repErev             | 420         | PCR                     |
|        |                                             | pWTR11.32                 | 67,407      | CRISPR-Cas9             |
| 3.7    | Alphoid DNA<br>(Human genome<br>centromere) | oriC60repErev             | 420         | PCR                     |
|        |                                             | pWTR11.64                 | 127,599     | CRISPR-Cas9             |
| 3.7    | Alphoid DNA<br>(Human genome<br>centromere) | oriC60repErev             | 420         | PCR                     |
|        |                                             | pWTR11.128                | 247,983     | CRISPR-Cas9             |
| 3.8    | CGG repeat<br>(NBPF19)                      | oriC60repErev             | 420         | PCR                     |
|        |                                             | Human genome DNA          | 5,764       | <i>Eae</i> I digestion  |
| 3.9    | <i>E. coli</i> genome<br>93 kb region       | oriCNBPF19                | 420         | PCR                     |
|        |                                             | <i>E. coli</i> genome DNA | 92,806      | <i>Xba</i> I digestion  |
| 3.9    | <i>E. coli</i> genome<br>220 kb region      | Cm-oriC93kb               | 1,178       | PCR                     |
|        |                                             | <i>E. coli</i> genome DNA | 223,116     | <i>Xba</i> I            |
| 3.10   | Lambda phage<br>DNA                         | Cm-oriC93kb               | 1,178       | PCR                     |
|        |                                             | Lambda phage DNA          | 48,502      | (Linear DNA)            |
| 3.11   | T7 phage DNA                                | oriClambda                | 380         | PCR                     |
|        |                                             | T7 phage DNA fragment (1) | 10,019      | PCR                     |
| 3.11   | T7 phage DNA                                | (2)                       | 9,997       | PCR                     |
|        |                                             | (3)                       | 10,003      | PCR                     |
| 3.11   | T7 phage DNA                                | (4)                       | 10,058      | PCR                     |
|        |                                             | oriCT7                    | 380         | PCR                     |
| 3.12   | SARS-CoV-2<br>genome coding<br>plasmid      | SARS-CoV-2 DNA (1)        | 3,090       | RT-PCR                  |
|        |                                             | (2)                       | 3,000       | RT-PCR                  |
| 3.12   | SARS-CoV-2<br>genome coding<br>plasmid      | (3)                       | 6,867       | RT-PCR                  |
|        |                                             | (4)                       | 6,296       | RT-PCR                  |
| 3.12   | SARS-CoV-2<br>genome coding<br>plasmid      | (5)                       | 6,591       | RT-PCR                  |
|        |                                             | (6)                       | 5,169       | RT-PCR                  |
| 3.12   | SARS-CoV-2<br>genome coding<br>plasmid      | oriCCoV2                  | 1,311       | PCR                     |

## 3.2 方法

### 3.2.1 DNA 断片とプラスミドの調製

oriC cassette は、LterO (倉田)を鋳型 DNA として、プライマーSUE1147 と SUE1362 を用いた PCR 法により調製した。

oriCmtDNA は、oriC cassette (図 3.2)を鋳型 DNA として、プライマーSUE5356 と SUE5357 を用いた PCR 法により調製した。

oriCp601 は、OLT3 (倉田)を鋳型 DNA として、プライマーSUE2658 と SUE2659 を用いた PCR 法により調製した。

oriC60sopC は、OriC-2 トランスポゾン(Nara and Su'etsugu, 2021)を鋳型 DNA として、プライマーSUE3745 と SUE3787 を用いた PCR 法により調製した。

oriC60repErev は、oriC cassette を鋳型 DNA として、プライマーSUE4900 と SUE4901 を用いた PCR 法により調製した。

oriC60kmend は、oriC cassette を鋳型 DNA として、プライマーSUE5628 と SUE5629 を用いた PCR 法により調製した。

oriCNBPF19 は、oriC cassette を鋳型 DNA として、プライマーSUE5344 と SUE5393 を用いた PCR 法により調製した。

Cm-oriC93kb は、Cm-OLDT (Hasebe et al., 2018)を鋳型 DNA として、プライマーSUE1076 と SUE1077 を用いた PCR 法により調製した。

Cm-oriC220kb は、Cm-OLDT (Hasebe et al., 2018)を鋳型 DNA として、プライマーSUE1078 と SUE1079 を用いた PCR 法により調製した。

oriClambda は、oriC cassette を鋳型 DNA として、プライマーSUE4392 と SUE5459 を用いた PCR 法により調製した。

oriCT7 は、oriC cassette を鋳型 DNA として、プライマーSUE4633 と SUE4634 を用いた PCR 法により調製した。

oriCCoV2 の調製のために、まず、pCMV 断片の 5'末端と 60 bp の相同な配列と、polyA 断片の 3'末端と 60 bp の相同な配列を持つ oriCpCMV を調製した。oriCpCMV の調製は、oriC cassette を鋳型 DNA として、プライマーSUE6252 と SUE6253 を用いた PCR 法により行った。次に、oriCpCMV、pCMV 断片、polyA 断片及び SARS-CoV-2 DNA を用いて、RA-RCR を行った。pCMV 断片は、SARS-CoV-2 ゲノムの 5'末端と 60 bp の相同な配列を 3'末端に持ち、また、polyA 断片は、SARS-CoV-2 ゲノムの 3'末端と 60 bp の相同な配列を 5'末端に持つため、連結環状化が可能である。RA-RCR 産物の中には、oriCpCMV、pCMV 断片及び polyA 断片が連結した産物が含まれ、この産物を鋳型 DNA としプライマーSUE6420 と SUE6674 を用いた PCR 法により、oriCCoV2 を調製した。PCR 反応には、RA-RCR 産物を *NsiI* によって切断してから用いた。

oriCamp-1 は、LterCOLT2-105 を鋳型 DNA として、プライマーSUE3589 と SUE3590 を用いた PCR 法により調製した。

oriCamp-2 は、oriC cassette を鋳型 DNA として、プライマーSUE4477 と SUE4478 を用いた PCR 法により調製した。

Bacmid は、大腸菌 DH10EmBacY (Bieniossek et al., 2008) から、NucleoBond Xtra BAC (Takara) を用いて精製した。大腸菌 DH10EmBacY は、鎌田勝彦博士に分与して頂いた。

DGF298 ゲノムは、加納 (2017) を参考に調製した。

pMS277parS を構築するために、まず、*parS* 断片の調製と pMS277 (Su'etsugu et al., 2017) の切断を行った。*parS* 断片は、pPKOZ (Su'etsugu et al., 2017) を鋳型 DNA として、プライマー SUE1156 と SUE1361 を用いた PCR 法により *pre-parS* 断片を調製し、その後さらに、*pre-parS* 断片を鋳型 DNA として、プライマーSUE1692 と SUE1692 を用いた PCR 法により *parS* 断片を調製した。pMS277 の切断は、gRNA001 を用いた CRISPR 反応により行った (3.2.3 参照)。次に、*parS* 断片と pMS277 の切断産物を RA-RCR 法により連結環状化し、pMS277parS を構築した。この産物を用いて大腸菌 HST08 を形質転換し、NucleoBond Xtra BAC を用いて pMS277parS を精製した。

pUC4KoriC を構築するために、まず、pUC4K を鋳型 DNA として、プライマーSUE1156 と SUE1361 を用いた PCR 法により pUC4K 断片を調製した。次に、pUC4K 断片と oriC cassette を RA-RCR 法により連結環状化し、pUC4KoriC を構築した。その後、大腸菌 DH5 $\alpha$  の形質転換し、QIAprep Miniprep Kit (QIAGEN) を用いて精製した。

本章で用いたプライマーリストを表 3.2 に示した。

### 3.2.2 RA-RCR

RA-RCR は、3.3 プロトコルに従った。使用した DNA 断片は、表 3.1 に示した。CRISPR-Cas9 システムによる切断産物を用いて RA を行った場合、1  $\mu$ l の CRISPR 反応液を RA 反応液に加えた。BAC クローン、大腸菌ゲノム領域及び SARS-CoV-2 発現プラスミドの増幅では、60 nM の RecG、0.5 U/ $\mu$ l の RecJ、60 mU/ $\mu$ l の Exonuclease III (Exo III) 及び 3 ng/ $\mu$ l のラムダファージ DNA を RCR 反応液に加え、cyclor-RCR を行った (Nara and Su'etsugu, 2021)。ラムダファージ DNA は、RCR 反応液に含まれるコンタミネーションの DNA 分解酵素活性を阻害し、長鎖 DNA の増幅を安定化させる。また、BAC クローン及び大腸菌ゲノム領域を増幅する場合は、非特異的な DNA 増幅を抑えるために、1 nM の Cas9 (IDT) と 50 nM の gRNA001 (TTTTCATACCGCGTTATGCG) を RCR 反応液に加えた。

### 3.2.3 CRISPR-Cas9 システムによる DNA 切断

5  $\mu$ l の RCR バッファーに、20 nM Cas9、100 nM gRNA、200 mU/ $\mu$ l Exo III 及び 0.8 U/ $\mu$ l

RNase Inhibitor, Murine (NEB)を加え、CRISPR 反応液を調製した。その後、BAC クローン DNA を加え、30°C で 30 分間反応させた後、さらに 65°C で 5 分間反応させ、Cas9 を失活させた。Bacmid、pWTR11.32、pWTR11.64 及び pWTR11.128 の切断には、gRNASopC (GATTCCATCAATGCCTGTCA)を用いた。RP11-96M14、RP11-457I4 及び CH17-81M08 の切断には、gRNA012 (ATAAAGAAGGGAATGAGATA)を用いた。RP1-247E2 の切断には、gRNAmend (CCTTTAGTTACAACATACTC)を用いた。

#### 3.3.4 その他の DNA

ミトコンドリア DNA は、小田原真樹博士より分与して頂いた。p601\_208x12 は、梅原崇史博士より分与して頂いた。RP11-96M14、RP1-247E2、RP11-457I4 及び CH17-81M08 は、香月康宏准教授により分与して頂いた。pWTR11.32、pWTR11.64 及び pWTR11.128 は、大関淳一郎博士分より分与して頂いた。ヒトリンパ芽球細胞ゲノム DNA の *Eco*I 切断産物は、辻省次教授分より与して頂いた。T7 ファージ DNA の PCR 産物 (T7 ファージ DNA 断片)は、崔龍洙教授より分与して頂いた。SARS-CoV-2 の RT-PCR 断片 (SARS-CoV-2 DNA)、pCMV 断片及び polyA 断片は、牧野晶子助教に分与して頂いた。

表 3.2 第三章で用いたプライマーのリスト

| Name    | Sequence                                                                                                    |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SUE1076 | GTTGAGAAAGGTGATTATCACCATGCGAATTAACGAAGTTTTTACGGAGG<br>GAAACAATCTcgtaagaggtccaactttcacc                      |
| SUE1077 | GCCGGATAAGATGCGTCAGCATCGCATCCGGCAGGGTTTATTATTGTTTTT<br>CGCTCTAGgtcggcttgagaaagacctg                         |
| SUE1078 | CAAAACTGACATAAATCTCCAGAGATGTGTTTCAGGAGTTAGAAAGATTATT<br>TCTTCTATcgtaagaggtccaactttcacc                      |
| SUE1079 | ATGCGCGTACCCACATACCGCTGTTGTTAAAACAGGTAACCCAGCAGTGA<br>TCGCTTCTAGgtcggcttgagaaagacctg                        |
| SUE1147 | ATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCatagtatgtgtaactaaagatctac<br>tgtggataactctg                            |
| SUE1156 | CTATGCGGCATCAGAGCAG                                                                                         |
| SUE1362 | CGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCTGGCTTAACagtatgtgtaactaaa<br>gtataaaaagaagatctatttatttag                       |
| SUE1550 | TCCACGGCCCGGGCTTCAATCCATTTTCATACCGCGTTATtctttttcttgtttcacgtg<br>gaacattctgattcaactacgacaggtttcccgactg       |
| SUE1551 | ACGTCAAAAGGATCCGGATAAAACATGGTGATTGCCTCGCtttccttacgcgaaatac<br>gg                                            |
| SUE1692 | GCCGACAAAGTTGAGTAGAATCCACGGCCCGGGCTTCAAT                                                                    |
| SUE1963 | GACCCCCGCCAATGATGATGACGTCAAAGGATCCGGATA                                                                     |
| SUE2658 | ATCGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGagtatgtgtaactaaagatctactgtggataactctg                                              |
| SUE2659 | TGTA AAAACGACGGCAAGCCCGAATTagtatgtgtaactaaagtataaaaagaagatctatttatta<br>g                                   |
| SUE3589 | GGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGAagcgccgcgaagat<br>ccggcagaagaatgg                                  |
| SUE3590 | ATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAAtcggcttgagaaagacct<br>g                                             |
| SUE1361 | GTTAAGCCAGCCCCGACAC                                                                                         |
| SUE3745 | GGTCCCCTTGATTGTCGATCAGACTATCAGCGTGAGACTACGATTCCAT<br>CAATGCCTGgaagatccggcagaagaatgg                         |
| SUE3787 | CCGCACACCGAGGTTACTCCGTTCTACAGGTTACGACGACATGTCAATACT<br>TGCCCTTGAtcggcttgagaaagacctg                         |
| SUE4392 | GTCCTTCCGGTGATCCGACAGGTTACGGGGCGGCGACCTagtatgtgtaactaaa<br>gatctactgtggataactctg                            |
| SUE4477 | GGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGAagtatgtgtaactaa<br>agatctactgtggataactctg                          |
| SUE4478 | ATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAagtatgtgtaactaaagt<br>attaaaaagaagatctatttatttag                     |
| SUE4633 | TACCTTGAGTGTCTCTCTGTGTCCCTTATACACTCCGCTAagtatgtgtaactaaagat<br>ctactgtggataactctg                           |
| SUE4634 | TAGGTCCGTACACTGTGAGAACACTGATGGGCACTTTCTCagtatgtgtaactaaag<br>tataaaaagaagatctatttatttag                     |
| SUE4900 | TTTATCAAACGTGCGCACAGTCCATCCAGAGGGCTTTACAGTGACATATC<br>AACCCATATagtatgtgtaactaaagatctactgtggataactctg        |
| SHE4901 | TGTTTCACTAAGCCGAAACTGCGTAAACCGGTTCTGTAACCCGATAAAGA<br>AGGGAATGAGgtatgtgtaactaaagtataaaaagaagatctatttatttag  |
| SUE5344 | TATATAAACTGGGGAGCAATGCAAGACTGGAAGAATGTCTTGATGTGTTG<br>GAGAAGTTGagtatgtgtaactaaagtataaaaagaagatctatttatttag  |
| SUE5356 | CCTAGCCATGCACTACTCACCAGACGCCTCAACCGCCTTTTCATCAATCGC<br>CCACATCACagtatgtgtaactaaagatctactgtggataactctg       |
| SUE5367 | AATATTGAGGCGCCATTGGCGTGAAGGTAGCGGATGATTCAGCCATAATTT<br>ACGTCTCGAagtatgtgtaactaaagtataaaaagaagatctatttatttag |

---

|         |                                                                                                           |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SUE5393 | TGGTCTATCATTAACTTGTTTTGGTAAATAACTTAATCTTCATGATATGTAGT<br>CTCTTCAagtatgtgtaactaaagatctactgtggataactctg     |
| SUE5459 | AAATTTTCATAAATAGCGAAAACCCGCGAGGTCGCCGCCagtatgtgtaactaaa<br>gtataaaaagaagatctattatttag                     |
| SUE5628 | TTGCAGTTTTCAATTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCAGAATTGGTTAATT<br>GGTTGTAAagtatgtgtaactaaagatctactgtggataactctg    |
| SUE5629 | AAGTTCGATTTATTCAACAAAGCCCGTCCCGTCAAGTCAGCGTAATGCT<br>CTGCCAGTGagtatgtgtaactaaagtattaaaaagaagatctattatttag |
| SUE6252 | GCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGT<br>GGGCTCTATGGctgctctgatgcccatag                        |
| SUE6253 | GGCTATGA ACTAATGACCCCGTAATTGATTACTATTAATAACTAGTCAATAA<br>TCAATGTCgtgtcggggctggcctaac                      |
| SUE6420 | TTGTTACCTGGGAAGGTATAAACCTTTAATCG                                                                          |
| SUE6674 | TGTGACTTATGTCCCTGCACAAGAAAAG                                                                              |

---

大文字は、オーバーラップ配列を示す。

### 3.3 プロトコル

以下の手順により DNA 断片のデザインと RA-RCR を行った(奈良聖亜、末次正幸、2020)。

#### 1. DNA 断片のデザイン

*oriC* 断片を含む各 DNA 断片が 25-60 bp のオーバーラップ末端をもち、連結により環状となるよう設計した。オーバーラップ配列は PCR プライマーの 5'-tail に設計した。PCR の鋳型 DNA として用いた *oriC* 断片(*oriC* cassette)には、pUC4K、pUC18/19 及び pBeloBAC11 などのプラスミドが持つ *lacZ'* の下流に対するオーバーラップ配列が付してある(図 3.2)。この断片を鋳型 DNA として、5'-tail のついたプライマーで PCR 増幅を行い、任意のオーバーラップ配列を付与した。

#### 2. RA-RCR による DNA の連結・増幅

(1) 2×RA Mix (2 μM RecA, 160 mU/μl Exonuclease III, 40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 8 mM DTT, 100 mM potassium glutamate, 20 mM magnesium acetate, 200 μM ATP, 8 mM creatin phosphate, 300 mM TMAC, 20% DMSO, 10% PEG8000, 40 ng/μl Creatin kinase)、10×Buffer I 及び 10×Buffer II は融解後、ボルテックスでよく混ぜて氷上においた。10×RE Mix は、氷上で融解後、ボルテックスでの攪拌を 1 秒×3 回に留めた。10×Buffer I と 10×Buffer II は、それぞれマグネシウム塩などの塩類と dNTP などのヌクレオチド類を含み、また 10×RE Mix は RCR に必要な酵素類を含む(Su'etsugu et al., 2017; Mukai et al., 2020)。

(2) 表 3.1 に示す DNA 断片と *oriC* 断片を混合し、2×DNA Mix とした。連結する断片が多数の場合は、各断片を等モルに揃えた。

##### (3) RA 法による DNA の連結

氷上で、0.2 ml PCR チューブに、2.5 μl の 2×DNA Mix 及び 2.5 μl の 2×RA Mix を加え、ピペッティングでよく混ぜた。この反応液をインキュベーターを用いて 42°C で 30 分間保温した。この時、インキュベーターの蓋の温度は、49°C に設定し、予め温めておいた。反応後は、即座に 65°C(蓋は、72°C)で 2 分間保温後、氷冷し、非特異的なアニーリング産物を抑えた。

##### (4) 連結産物の RCR 増幅

氷上で、0.2 ml PCR チューブに、2.4 μl の H<sub>2</sub>O、0.4 μl の 10×Buffer I 及び 0.4 μl の 10×Buffer II を加え、ピペッティングでよく混ぜた。ここに 0.4 μl の 10×RE Mix を加え、再度ピペッティングでよく混ぜた。最後に RA 産物を 0.4 μl 加え、ピペッティングで混和し、インキュベーターを用いて 16 時間の等温反応、もしくは 37°C で 1 分間の反応と 24°C で 30 分間の反応を 40 サイクル行った(cycler-RCR、Nara and Su'etsugu, 2021)。この時、インキュベーターの蓋の温度は、37°C に設定し、予め温めておいた。



3. アガロースゲルによる増幅産物の確認

RCR産物を、RCRバッファーで1/10希釈し、30°Cで30分間反応させた。その後、1 µlを分取し、4 µlのストップバッファー(25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25 mM EDTA, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 0.05 mg/ml proteinase K, 5% glycerol, 0.1% bromophenol blue)に加え、0.5%のアガロースゲルを用いて電気泳動した。染色液は、SYBR Green Iを用いた。ゲル写真は、Typhoon FLA 9500 (GE healthcare)を用いて撮影した。

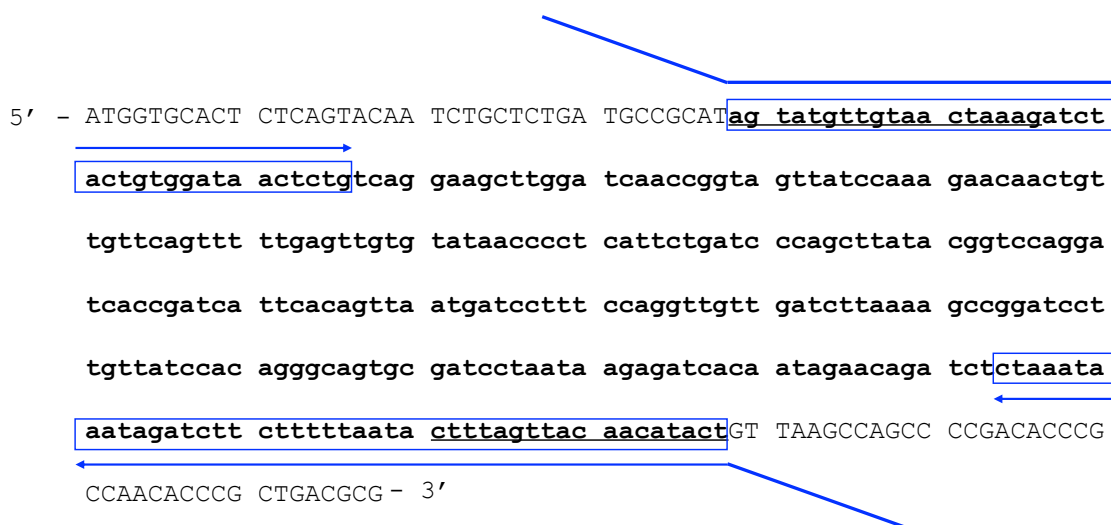


図 3.2 *oriC* 断片(*oriC* cassette)の配列とプライマーの設計。大文字は、pUC4K断片とのオーバーラップ配列である。任意のオーバーラップ配列を *oriC* につける場合は、青枠をプライマーの認識配列として、そのプライマーの5'側に25-60 bpのオーバーラップ配列を付加した。小文字は *oriC* 配列を示す。下線部は、*ter* 配列を示し、RCRにTusが含まれる場合、Tusの結合により複製フォークの過剰進行(ローリングサークル型複製)をブロックし、コンカテマーの産物を抑える。

## 3.4 結果

### 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

第二章では、*oriC* を持たない環状 DNA を RCR 増幅するために、試験管内トランスポジション反応を利用して環状 DNA に *oriC* を導入する手法について述べた。この手法では、ランダムな位置に *oriC* が挿入されるため、配列未知の環状 DNA の増幅も可能である(Nara and Su'etsugu, 2021)。一方で、*oriC* の挿入によって遺伝子が破壊される可能性があるだけでなく、コンタミネーションした DNA などのターゲット環状 DNA 以外の DNA が混じっていた場合に、ターゲット DNA を特異的に増幅することが難しかった。例えば、ヒト細胞から抽出したミトコンドリア DNA (ヒト mtDNA)をターゲットにした際には、目的の単量体スーパーコイル DNA の特異的な増幅ができなかった。

そこで、RA-RCR を用いて、ヒト mtDNA の単量体スーパーコイル DNA のみを増幅することが可能か検討した。まず、HEK293 細胞、または Hela 細胞から抽出した 16.6 kb のヒト mtDNA を、*XhoI* を用いて単一切断を行った。また、ヒト mtDNA の *XhoI* 切断末端と 40 bp のオーバーラップ配列を持つように 380 bp の *oriC* 断片(*oriCmtDNA*)を、その配列を 5'-tail にもつプライマーを用いて PCR 法により調製した。1.6 ng の HEK293 細胞由来の mtDNA 断片、または 2 ng の Hela 細胞由来の mtDNA 断片と 5 ng の *oriCmtDNA* を用いて RA を行い、その反応液の一部を RCR にかけて(図 3.3)。その結果、いずれの DNA においても目的のサイズの単量体スーパーコイル DNA のみが増幅産物として得られた。このことは、RA-RCR が、目的の DNA のみを選択的に増幅可能な試験管内 DNA クローニング法として有用であることを示している。

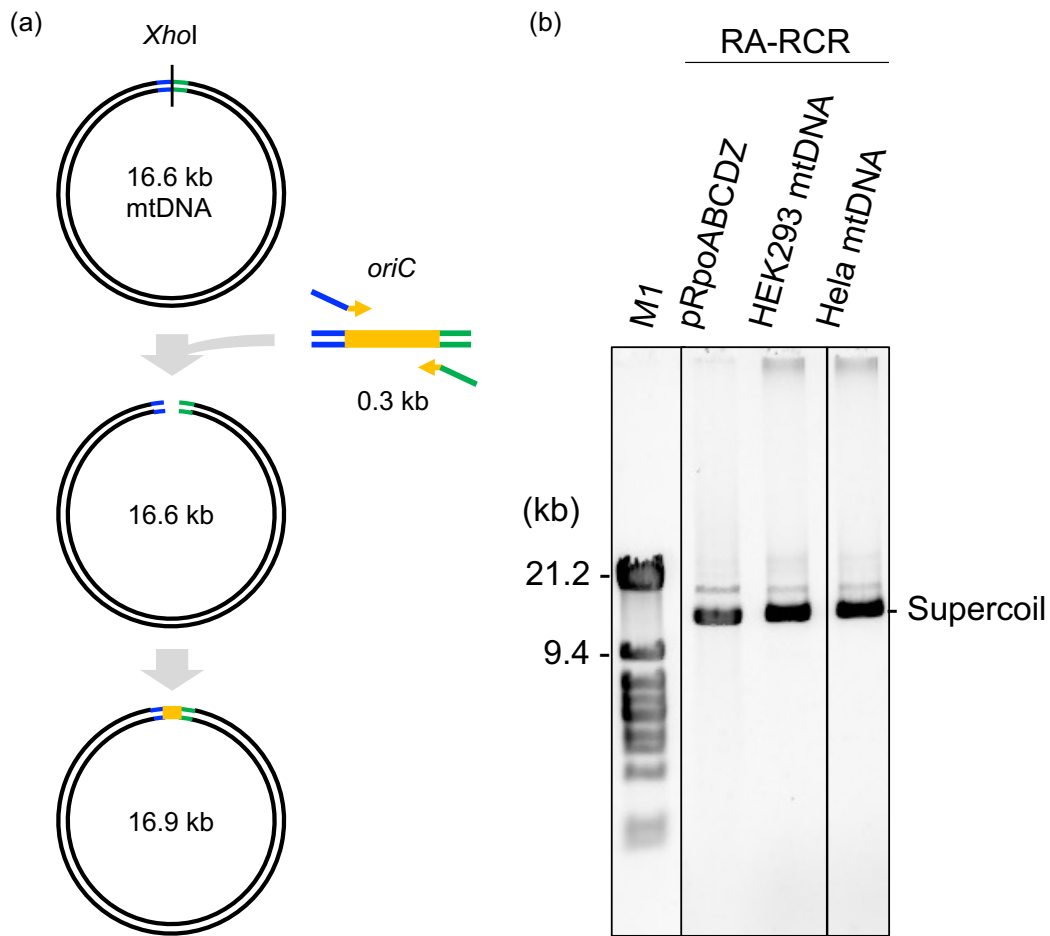


図 3.3 RA-RPCR を用いたヒト mtDNA の増幅。HEK293 細胞由来の mtDNA 及び HeLa 細胞由来の mtDNA を *XhoI* を用いて 37°C で 1 時間処理し、その産物と *oriC* 断片を用いて RA-RPCR を行った。RA 後、30°C で 16 時間の RCR を行った。(a) ヒト mtDNA と *oriC* 断片の連結環状化デザイン。*oriC* 断片は、*XhoI* 切断末端と 40 bp のオーバーラップ配列を持つ。(b) RA-RPCR 産物のアガロースゲル電気泳動解析。pRpoABCDZ は、15 kb の環状 DNA である。M1 は、ラムダファージ DNA 由来の DNA サイズマーカーである。

### 3.4.2 繰り返し配列(2.5 kb)の試験管内クローニング

微生物を用いた DNA クローニング法では、ホストが DNA 組換えシステムを持つため、繰り返し配列を持つ DNA のクローニングが難しい(Kang et al., 1995, Feschenko et al., 2003)。そこで、208 bp の 12 回繰り返し構造を持つプラスミド(p601\_208x12)を用いて、繰り返し配列が RA-RCR でクローニングできるか検討した。*EcoRI* によって単一切断した p601\_208x12 と、*EcoRI* 切断末端と 25 bp のオーバーラップ配列を持つ *oriC* 断片(*oriCp601*)を RA によって連結し、その産物を RCR にかけた(図 3.4a)。その結果、目的のサイズの単量体スーパーコイル DNA の増幅産物が確認できた(図 3.4b)。この時、ローリングサークル型複製によるコンカテマーの産物も見られたが、過剰な複製進行をブロックする *Tus-ter* システムを用いることで抑制することが可能である(Hasebe et al., 2018)。制限酵素を用いて増幅産物を構造確認したところ、予期される切断産物より分子量の小さい切断産物がラダー状に見られた(図 3.4c、レーン 4)。このことは、繰り返し配列が一部欠損した環状 DNA が増幅産物に含まれていたことを示している。

この増幅産物が、大腸菌より精製した p601\_208x12 に元から含まれる繰り返し配列が欠損した環状 DNA に由来したのか、RCR 中に繰り返し配列の欠損が起きたのかを調べるために、*oriC* を持つ p601\_208x12 (p601\_208x12*oriC*)を RCR にかける増幅産物を制限酵素を用いて切断した(図 3.4c、レーン 6)。その結果、ラダー状の切断産物はほとんど見られなかった。一方で、大腸菌を用いて p601\_208x12*oriC* をクローニングした場合は、制限酵素による切断産物にラダー状のバンドが顕著に見られた(図 3.4c、レーン 2)。これより、RCR による DNA 増幅では、大腸菌を用いたクローニング法に比べて繰り返し配列の欠損が起りにくいことがわかった。

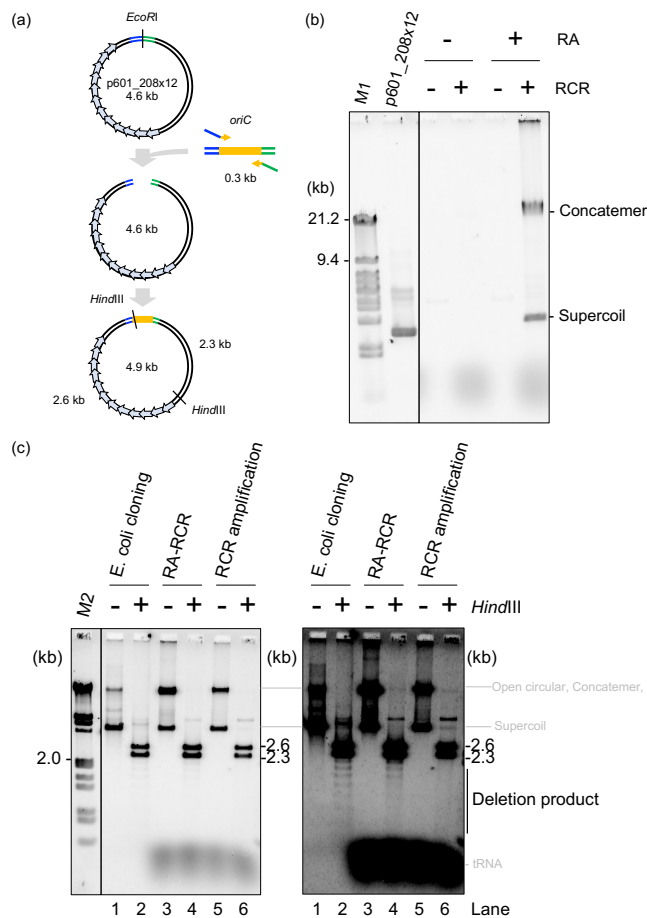


図 3.4 RA-RCR を用いた p601\_208x12 の増幅。p601\_208x12 を *EcoRI* を用いて 37°C で 30 分間処理し、その産物と *oriC* 断片を用いて RA-RCR を行った。RA 後、30°C で 16 時間の RCR を行った。(a)p601\_208x12 と *oriC* 断片の連結環状化デザインと目的 DNA の *HindIII* 切断マップ。矢印は、208 bp の繰り返し単位配列を示す。*oriC* 断片は、*EcoRI* 切断末端と 25 bp のオーバーラップ配列を持つ。(b)RA-RCR 産物のアガロースゲル電気泳動解析。(-)RA は、連結反応を行わなかったサンプルを示し、(+ )RA は、連結反応を行ったサンプルを示す。(-)RCR は、RCR 前のサンプルを示し、(+ )RCR は、RCR 後のサンプルを示す。(c)大腸菌によってクローニングした p601\_208x12oriC (レーン 1、2)、(b)の RA-RCR 産物 (レーン 3、4)及び p601\_208x12oriC を用いた RCR 産物(レーン 5、6)の制限酵素(*HindIII*)による構造確認。反応液に *HindIII* を加えなかった場合を(-)*HindIII* とし、加えた場合を(+)*HindIII* とした。37°C で 30 分間の反応後、1%のアガロースゲルを用いて電気泳動し、SYBR Green I を用いて染色した。左右の写真は、コントラストが異なる。M2 は、ラムダファージ DNA 由来の DNA サイズマーカーである。ゲルの下部に見えるバンドは、RCR バッファーに含まれる tRNA である。

### 3.4.3 長鎖環状 DNA (Bacmid (147 kb)、RP11-96M14 (205 kb)、RP1-247E2 (153 kb)、RP11-457I4 (192 kb)、CH17-81M08 (204 kb))の試験管内クローニング

RA-RCR による長鎖環状 DNA のクローニングが可能か検討するために、BAC クローンを用いた。この時 RCR には、反応液に含まれるコンタミネーションの DNA 分解酵素活性を阻害し、長鎖 DNA の増幅を安定させるために、ラムダファージ DNA を加えた。BAC クローンは、100 kb を超える長鎖 DNA を大腸菌内でクローニングするためのベクター(BAC プラスミド)を用いて構築された長鎖環状 DNA である(Shizuya et al., 1992)。これまでに、ウイルスゲノム全長や長大なヒトゲノム領域を持つ BAC クローンを構築されている。

まず、147 kb のバキュロウイルスゲノム全長がクローニングされた BAC プラスミド (Bacmid)の試験管内クローニングを検討した。Bacmid を直鎖化するために、試験管内 CRISPR-Cas9 システムを用いて BAC ベクター内の配列を単一切断した。20 ng の Bacmid 断片と、85 pg の Bacmid 断片の両末端と 60 bp のオーバーラップ配列を持つ *oriC* 断片 (*oriC60sopC*)を用いて RA を行い、その反応液の一部を RCR にかけて(図 3.5a)。その結果、目的のサイズの単量体スーパーコイル DNA が得られた(図 3.5b)。また、ゲルのウェルとマーカーの 23 kb あたりには、それぞれ開環状 DNA と切れた直鎖状 DNA が見られた。この増幅産物を用いて大腸菌の形質転換を行い、RCR の増幅効率を調べたところ、 $2 \times 10^5$  倍以上の増幅が起こっていることがわかった (図 3.5b)。この形質転換体(9 コロニー)からプラスミド精製を行い目的の DNA を保持していることを確認した(図 3.5c)。

次に、ヒトゲノム配列を持つ BAC クローンをを用いて、RA-RCR を検討した。4 種の BAC クローン(RP11-96M14 (205 kb)、RP1-247E2 (153 kb)、RP11-457I4 (192 kb)、CH17-81M08 (204 kb))について、CRISPR-Cas9 システムで単一切断し RA-RCR を行ったところ、いずれの BAC クローンにおいても目的のサイズの単量体スーパーコイル DNA の増幅産物を得ることができた(図 3.6)。これらの結果から、200 kb を超える長鎖環状 DNA に対しても、RA を用いて *oriC* 断片と連結環状化することで試験管内クローニングができることが示された。RP11-96M14 の増幅では、目的のスーパーコイル DNA の産物が僅かであったことから、200 kb を超える DNA を鋳型とした場合は RCR による複製効率が低下する可能性が考えられた。

本論文では、CRISPR-Cas9 システムを用いて RA-RCR を行う手法を、CRISPR-RA-RCR とした。長鎖 DNA の試験管内クローニングでは、DNA サイズが大きくなるほど、制限酵素を用いることが困難なため、CRISPR-Cas9 システムを用いて DNA 断片を調製する手法が有用である。

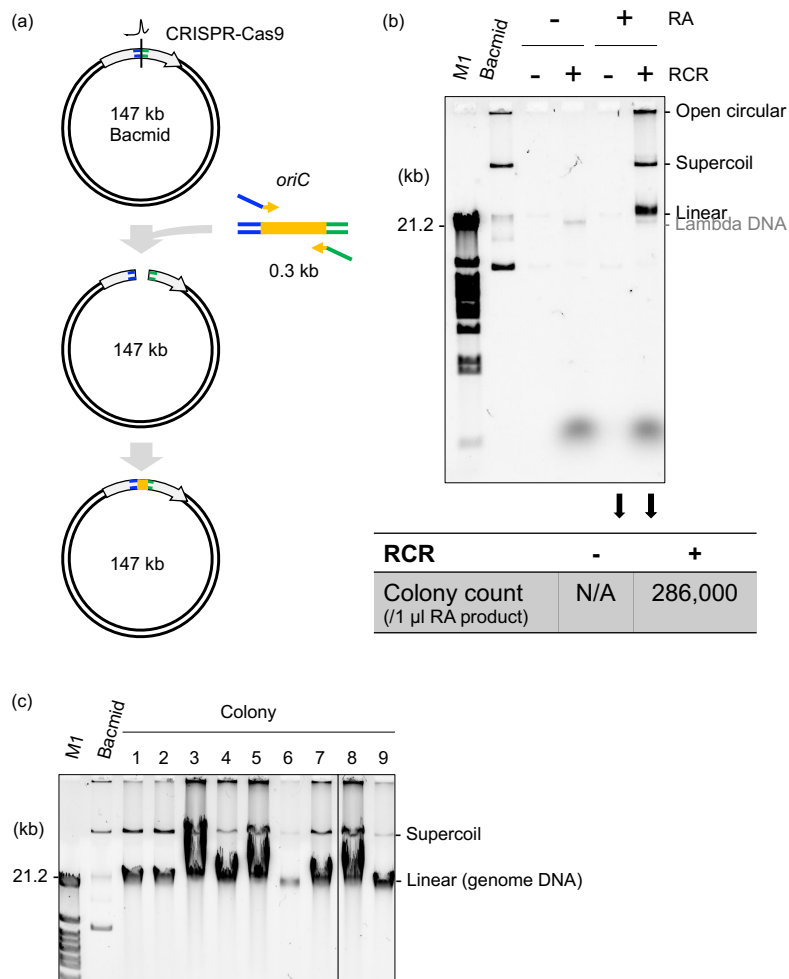


図 3.5 RA-RCR を用いた Bacmid の増幅。Bacmid を CRISPR-Cas9 システムを用いて単一切断し、その産物と *oriC* 断片を用いて RA-RCR を行った。RA 後、40 サイクルの *cycler*-RCR を行った。RCR 反応液には、ラムダファージ DNA を加えた。(a)Bacmid と *oriC* 断片の連結環状化デザイン。矢印は BAC ベクターを示す。*oriC* 断片は、切断末端と 60 bp のオーバーラップ配列を持つ。(b)RA-RCR 産物のアガロースゲル電気泳動解析。(-)RA は、連結反応を行わなかったサンプルを示し、(+)RA は、連結反応を行ったサンプルを示す。(-)RCR は、RCR 前のサンプルを示し、(+)RCR は、RCR 後のサンプルを示す。RCR 前のサンプル及び RCR 後のサンプルを用いて、大腸菌 HST08 を形質転換した。クロラムフェニコール (12.5 mg/ $\mu$ l) を含むプレートを用いて、コロニー数を計測し、1  $\mu$ l の RA 反応液あたりのコロニー数を示した。RCR 前のサンプルでは、コロニーが得られなかった(N/A)。(c)形質転換体のプラスミドの確認。クロラムフェニコール耐性のコロニーよりプラスミド精製を行い、0.5%のアガロースゲルを用いて電気泳動した。SYBR Green I を用いて染色した。マーカーの 21.2 kb の付近に見られるバンドには大腸菌ゲノム DNA が含まれる。

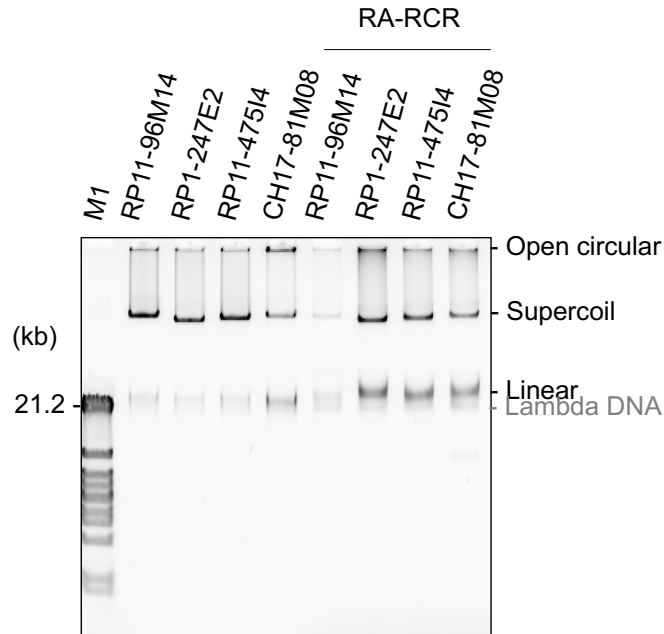


図 3.6 RA-RCR を用いた BAC クローンの増幅。RP11-96M14、RP1-247E2、RP11-475I4 及び CH17-81M08 を CRISPR-Cas9 システムを用いて単一切断し、その産物と *oriC* 断片を用いて RA-RCR を行った。*oriC* 断片は、切断末端と 60 bp のオーバーラップ配列を持つ。RA 後、40 サイクルの *cycler*-RCR を行った。RCR 反応液には、ラムダファージ DNA を加えた。



### 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

ヒトセントロメアとして機能するリピート配列(アルフォイド DNA)を持つ BAC クローンは、ヒト人工染色体(Human Artificial Chromosome: HAC)の構築に利用されている(Kouprina et al., 2003)。HAC とは、ヒト細胞に長大な遺伝子領域を導入することが可能なベクターであり、持続的な遺伝子発現が可能なことや宿主の染色体を破壊しないことが特徴である。アルフォイド DNA は、171 bp の 11 回繰り返し配列(11 mer)がさらに高次に繰り返した構造(図 3.7a)を持つため、大腸菌を用いたクローニングが難しいという課題があった。そこで、11 mer が 32 回、64 回、または 128 回繰り返したアルフォイド DNA を持つ BAC クローン(pWTR11.32、pWTR11.64、pWTR11.128)を用いて、CRISPR-RA-RCR による試験管内クローニングが可能か検討した。その結果、pWTR11.32 と pWTR11.64 では、目的のサイズの単量体スーパーコイル DNA の増幅が見られたが、pWTR11.128 では確認できなかった(図 3.7b)。pWTR11.32 では、目的サイズのバンドの上に、二量体スーパーコイル DNA と思われるバンドが見られた。また、いずれの BAC クローンにおいても、繰り返し配列が欠損したと考えられる分子量が小さいスーパーコイル DNA の副産物がラダー状に見られた。204 kb の CH17-81M08 は繰り返し配列を持たないため、目的のサイズの DNA のみを特異的に増幅できたが、240 kb のアルフォイド DNA を含む pWTR11.128 では、ラダー状の副産物の増幅により目的のサイズの DNA の増幅が阻害された考えられる。以上の結果から、120 kb のアルフォイド DNA であれば RA-RCR により増幅可能であることがわかった。

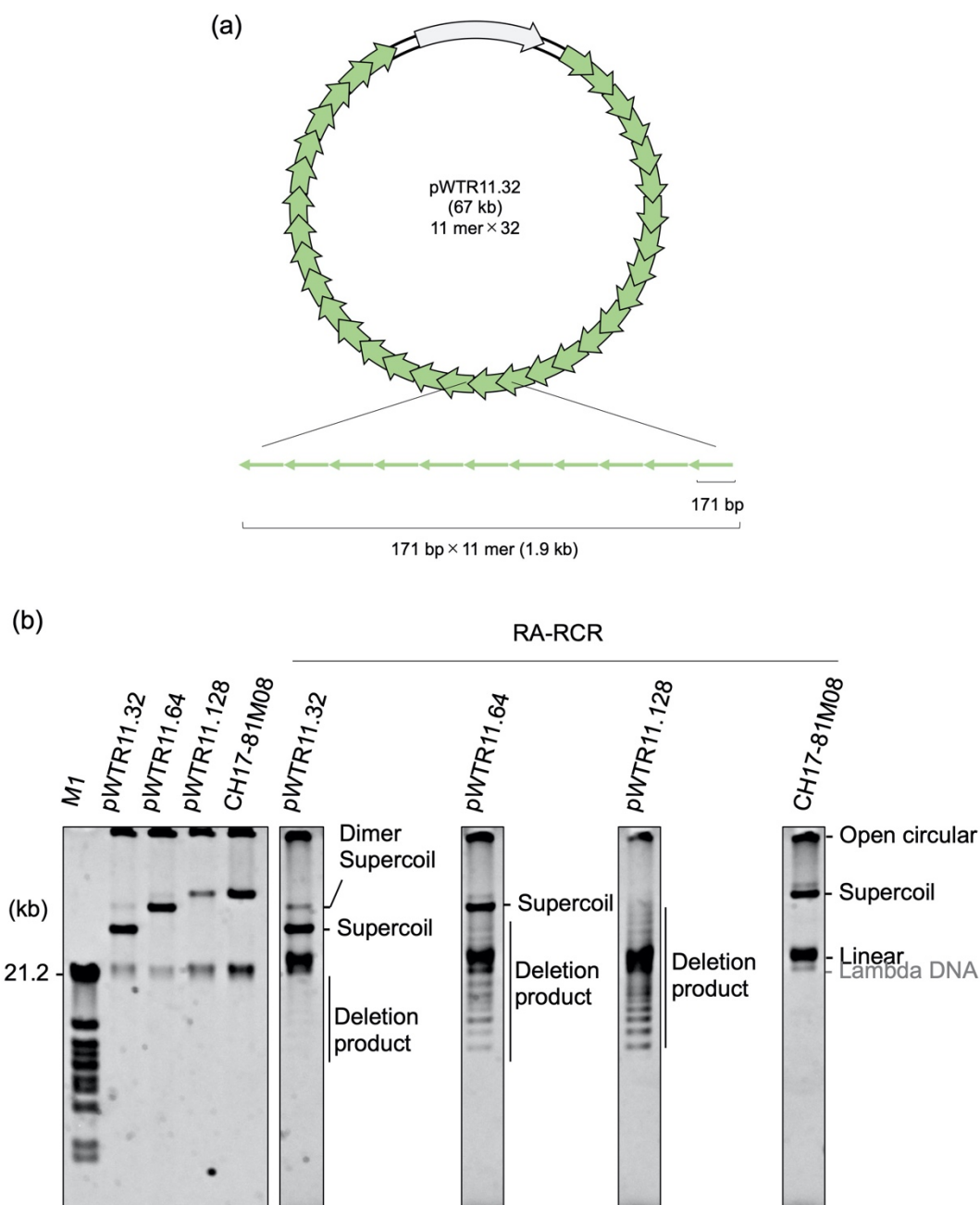


図 3.7 RA-RCR を用いたヒトセントロメア機能配列の増幅。(a)pWTR11.32 の構造。pWTR11.32 は、171 bp の 11 回繰り返し配列を、さらに 32 回繰り返した構造(アルフォイド DNA)を持つ BAC クローンである。(b)pWTR11.32、pWTR11.64、pWTR11.128 及び CH17-81M08 を CRISPR-Cas9 システムを用いて単一切断し、その産物と *oriC* 断片を用いて RA-RCR を行った。*oriC* 断片は、切断末端と 60 bp のオーバーラップ配列を持つ。RA 後、40 サイクルの *cycler*-RCR を行った。RCR 反応液には、ラムダファージ DNA を加えた。

### 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

これまでの検討では、オルガネラ DNA やプラスミドといった環状 DNA に対して単一切断によって断片化し、*oriC* と連結環状化してきた。そこで、ゲノム DNA に対しても制限酵素を用いて断片化し、ターゲットの DNA 断片と *oriC* を連結環状化後、RCR 増幅できるか検討した。ここでは、ヒトリンパ芽球細胞から抽出したゲノム DNA を *EarI* によって切断し、5.5 kb の NBPF19 遺伝子を含む DNA 断片をターゲットとした。NBPF19 遺伝子は、神経核内封入体病(NIID)の原因遺伝子であり、CGG の繰り返し配列を持つ(Ishiura et al., 2019)。CGG リピートの異常伸長は疾患の原因となるが、PCR 法ではその増幅が難しいため異常伸長を同定することが困難であった。そこで、RA-RCR を用いた試験管内クローニング法が、NBPF19 遺伝子の診断技術として利用できると考えた。ヒトゲノム DNA の *EarI* 切断産物と、NBPF19 遺伝子を含む DNA 断片の末端と 60 bp のオーバーラップ配列を持つ 420 bp の *oriC* 断片(*oriCNBPF19*)を用いて RA を行い、その産物を RCR にかけた(図 3.8a)。その結果、目的のサイズの単量体スーパーコイル DNA のみが RA に依存して増幅した(図 3.8b)。増幅産物の構造を制限酵素を用いて解析したところ、目的の DNA が増幅できたことが確認できた(図 3.8b)。この結果から、RA-RCR を用いることで、CGG の繰り返し配列を増幅できることが示された。ゲノム DNA を制限酵素によって無数に断片し、その中からターゲットの DNA 断片を特異的に増幅できたことは、RA-RCR の高い特異性を示している。

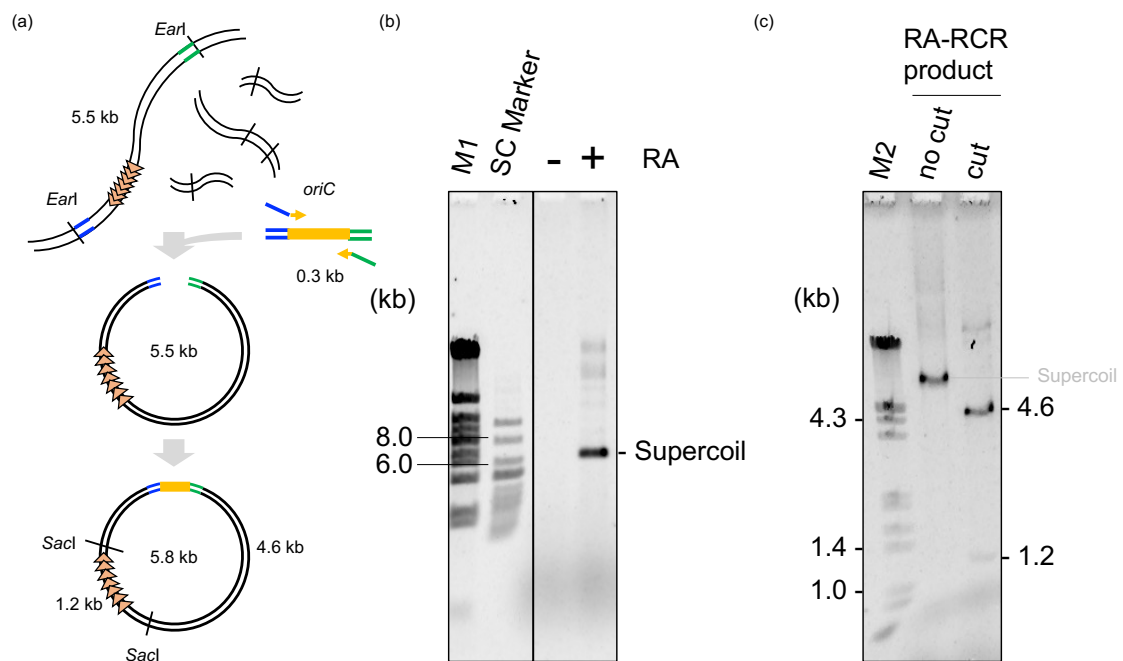
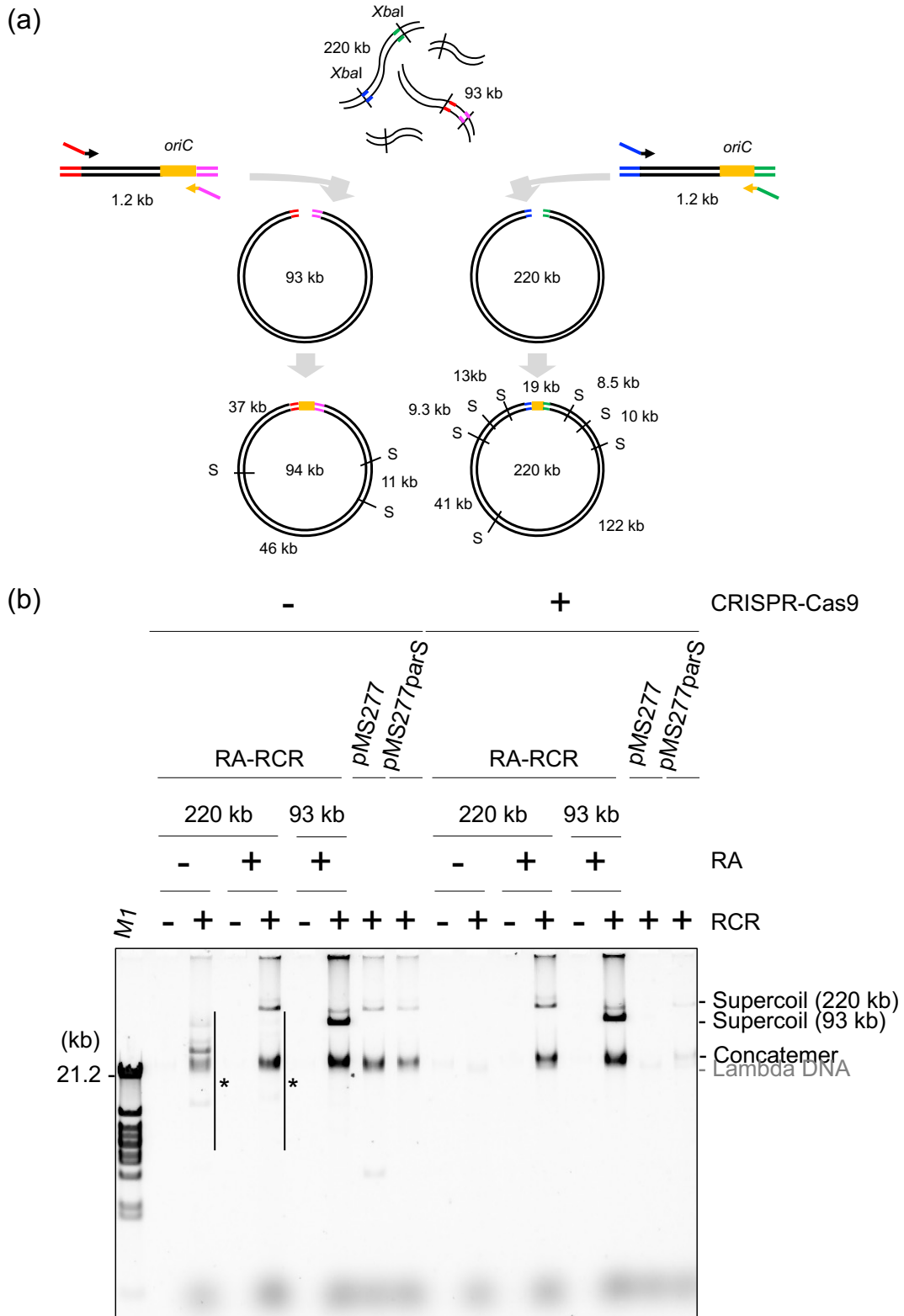


図 3.8 RA-RCR を用いた NBPf19 遺伝子領域の増幅。ヒトリンパ芽球細胞ゲノムを *EarI* によって切断した産物と *oriC* 断片を用いて RA-RCR を行った。RA 後、30°C で 16 時間の RCR を行った。(a)NBPf19 遺伝子領域と *oriC* 断片の連結環状化デザインと目的 DNA の *SacI* 切断マップ。矢印は、CGG の繰り返しを示す。*oriC* 断片は、5.5 kb の NBPf19 遺伝子を含む DNA 断片の末端と 60 bp のオーバーラップ配列を持つ。(b)RA-RCR 産物のアガロースゲル電気泳動解析。(-)RA は、連結反応を行わなかったサンプルを示し、(+)RA は、連結反応を行ったサンプルを示す。SC Marker は、スーパーコイル DNA のサイズマーカーである。(c)RA-RCR 産物の制限酵素(*SacI*)による構造確認。反応液に *SacI* を加えなかった場合を(no cut)とし、加えた場合を(cut)とした。37°C で 1 時間の反応後、1%のアガロースゲルを用いて電気泳動し、SYBR Green I を用いて染色した。

### 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

RA-RCR を用いて長大なゲノム領域の試験管内クローニングを検討した(図 3.9a)。アガロースプラグを用いた手法により大腸菌 (DGF-298 株)のゲノム DNA を精製し、*Xba*I によって断片化した。93 kb と 220 kb の DNA 断片をターゲットとし、それぞれの DNA 断片に対して末端の 60 bp とオーバーラップ配列を持つ *oriC* 断片(Cm-*oriC*93kb、Cm-*oriC*220kb)を調製した。大腸菌ゲノムの *Xba*I 切断産物と *oriC* 断片を用いて、RA-RCR を行ったところ、いずれのサイズの DNA 断片をターゲットにした場合でも、目的のサイズの単量体スーパーコイル DNA の増幅が見られた(図 3.9b)。また、マーカーの 23 kb 付近にはローリングサークル型複製に由来するコンカテマーが見られ、非特異的なスーパーコイル DNA の副産物も僅かに見られた。RA を行わなかった場合には、220 kb の単量体スーパーコイル DNA の増幅は見られなかったことから、この増幅は RA に依存的であることが示された。一方で、副産物の増幅がより顕著に見られ、ゲノム DNA 溶液に含まれる大腸菌ゲノムの *oriC* に由来している可能性が考えられた。そこで、大腸菌ゲノムの *oriC* 近傍の配列を切断する CRISPR-Cas9 システムを用いて非特異的な副産物の増幅が抑えられるか検討した。この時、ターゲット配列を認識する gRNA と Cas9 タンパク質を RCR 反応液に加え、RCR と CRISPR-Cas9 システムを同時に行った。コントロールの鋳型 DNA として、*oriC* 及びその近傍の gRNA 認識配列を持つ 200 kb の環状 DNA(pMS227)と、*oriC* を持つが近傍の gRNA 認識配列を持たない 200 kb の環状 DNA(pMS227parS)を用いたところ、CRISPR-Cas9 システムに依存して pMS227 の増幅のみを特異的に抑えることができた。CRISPR-Cas9 システムによって、*oriC* 近傍配列を持つ pMS227 が切断され直鎖状になったことで、その増幅が起きなかったと考えられる。この手法を、大腸菌ゲノム断片の増幅に用いたところ、非特異的な副産物の増幅が抑えられた。この産物を制限酵素を用いて構造確認したところ、目的のゲノム領域が増幅できたことが確認できた(図 3.9c)。また、RCR 中の CRISPR-Cas9 システムによって予想されないサイズの切断産物が減少したことからも、非特異的な DNA の増幅が抑えられたことが示された。これらの結果から、RA-RCR を用いて目的の長大なゲノム領域のみを特異的に試験管内クローニングができることがわかった。



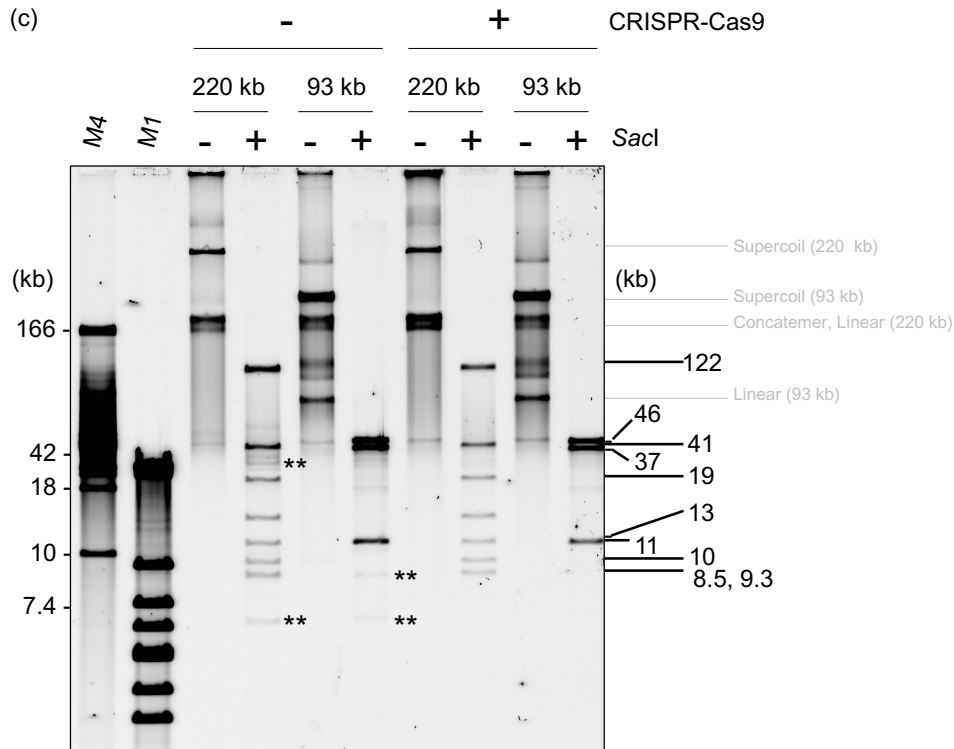


図 3.9 RA-RCR を用いた大腸菌ゲノム領域の増幅。大腸菌 DGF-298 株のゲノムを *XbaI* を用いて切断した産物と *oriC* 断片を用いて RA-RCR を行った。RA 反応後、40 サイクルの *cycler-RCR* を行った。(a)大腸菌ゲノム断片と *oriC* 断片の連結環状化デザインと目的 DNA の *SacI* 切断マップ。 *oriC* 断片(1.2 kb)は、93 kb の DNA 断片、もしくは 200 kb の DNA 断片の末端と 60 bp のオーバーラップ配列を持つ。S は、*SacI* による切断箇所を示す。(b)RA-RCR 産物のアガロースゲル電気泳動解析。RA 産物と同時に、10 fM の pMS277 及び pMS277parS を RCR にかけた。RCR 反応液には、ラムダファージ DNA を加えた。この時、大腸菌ゲノムの *oriC* 近傍配列を切断する CRISPR-Cas9 システムを導入しなかった条件を(-)CRISPR-Cas9 とし、導入した条件を(+)CRISPR-Cas9 とした。(-)RA は、連結反応を行わなかったサンプルを示し、(+)RA は、連結反応を行ったサンプルを示す。(-)RCR は、RCR 前のサンプルを示し、(+)RCR は、RCR 後のサンプルを示す。アスタリスク(\*)は、非特異的な増幅産物を示す。(c)RA-RCR 産物の制限酵素(*SacI*)による構造確認。反応液に *SacI* を加えなかった場合を(-)とし、加えた場合を(+)とした。37°C で 30 分間の反応後、0.75%のバルスフィールドアガロースゲルにより Pippin pulse power supply (Sage science)を用いて電気泳動し、SYBR Green I を用いて染色した。M4 は、T7 ファージ DNA 由来の DNA サイズマーカーである。ダブルアスタリスク(\*\*)は、非特異的な増幅産物に由来した切断産物を示す。

### 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

RA-RCR によるファージ DNA の試験管内クローニングについて、まず、48.5 kb のラムダファージ DNA を用いて検討した(図 3.10a)。ラムダファージ DNA の末端と 40 bp のオーバーラップ配列を持つ 380 bp の *oriC* 断片(*oriClambda*)を PCR 法により調製した。この時、プライマーの 5'-tail にそのオーバーラップ配列を付した。20 ng のラムダファージ DNA と 0.15 ng の *oriClambda* を用いて RA を行い、その反応液の一部を RCR にかけた(図 3.10b)。その結果、RA を行わなかった場合に、増幅産物が確認できなかった。一方で、RA を行った場合は、目的のサイズの単量体スーパーコイル DNA の増幅が確認できた。その上には、二量体スーパーコイル DNA と思われるバンドが見られた。また、ゲルのウェルに見えるバンドは、開環状 DNA であり、マーカーの 23 kb 付近に見られるバンドは直鎖状 DNA である。この産物を *HindIII* で切断したところ、予想されるサイズの断片のみが得られたことから、目的のラムダファージ DNA の増幅ができたことが確認できた。この結果から、RA-RCR は、ファージ DNA の試験管内クローニングにも利用できることが示された。

次に、DNA 断片数を増やした場合にも、ファージ DNA の試験管内クローニングができるか検討した。40 kb の T7 ファージ DNA を鋳型として、10 kb 毎に分割した 4 本の DNA 断片を隣り合う断片が 40 bp のオーバーラップを持つように PCR 法により調製した(図 3.11a)。これらの DNA 断片と T7 ファージ DNA の末端と 40 bp のオーバーラップ配列を持つ *oriC* 断片(*oriCT7*)を、分子数が同じになるように用いて RA を行い、その産物を RCR にかけた。その結果、RA に依存して目的サイズの単量体スーパーコイル DNA の増幅が見られた(図 3.11b)。この産物を制限酵素を用いて構造確認したところ、予想されるサイズの切断産物が得られたことから、目的の T7 ファージ DNA が増幅できたことが確認できた(図 3.11c)。この結果から、複数の DNA 断片を用いた場合でも、RA-RCR によって増幅できることが示された。

最後に、RA-RCR を用いて新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)ゲノム全長を CMV プロモーターの下流にコードする環状 DNA (SARS-CoV-2 発現プラスミド)の構築を検討した(図 3.12a)。SARS-CoV-2 発現プラスミドを培養細胞に導入すると、CMV プロモーターからゲノム RNA が発現し、人工コロナウイルスを産生することが可能である(Torii et al., 2021)。人工コロナウイルスの産生は、コロナウイルスの遺伝学的解析やワクチン開発に繋がる。SARS-CoV-2 のゲノム RNA を鋳型として、3-6.5 kb に分割した 6 本の DNA 断片(SARS-CoV-2 DNA)を隣り合う断片が 60 bp のオーバーラップを持つように RT-PCR により調製した。また、3'側に CMV プロモーター配列及び 5'側にポリ A 配列を持つ *oriC* 断片(*oriCCoV2*)を、SARS-CoV-2 ゲノムの末端配列と 60 bp のオーバーラップするように調製した。さらに、RA に用いる DNA 断片数を少なくするために、SARS-CoV-2 ゲノムの 3'側の断片と *oriCCoV2* を、overlap PCR 法を用いて連結した。これらの断片を用いて RA-RCR を



行ったところ、目的のサイズの単量体スーパーコイル DNA が得られた(図 3.12b)。また、この産物を制限酵素を用いて構造確認したところ、予想される切断産物が得られたことから、目的の環状 DNA が構築できたことが確認できた(図 3.12c)。SARS-CoV-2 ゲノムは、AT 含有率が 62%であることから、AT リッチな DNA も RCR 増幅できることが示された。

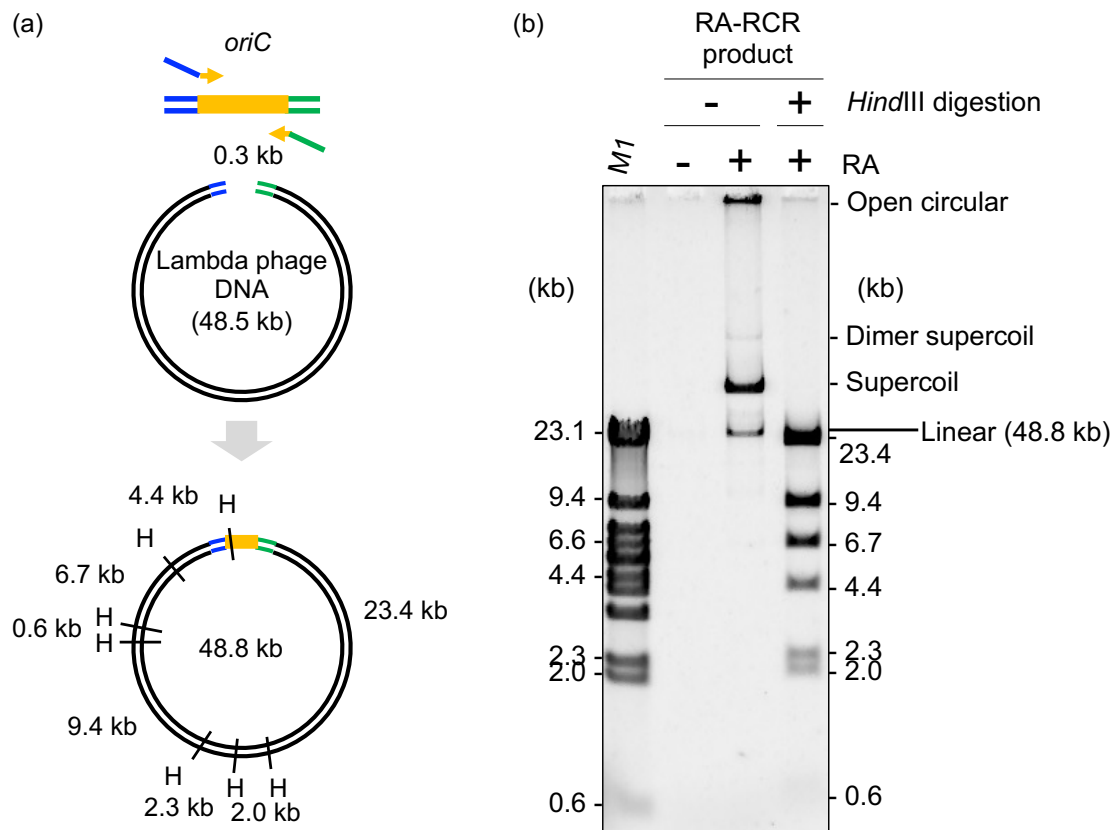


図 3.10 RA-RCR を用いたラムダファージ DNA の増幅。ラムダファージ DNA と *oriC* 断片を用いて RA-RCR を行った。RA 後、30°C で 6 時間の RCR を行った。(a)ラムダファージ DNA と *oriC* 断片の連結環状化デザインと目的 DNA の *HindIII* 切断マップ。*oriC* 断片は、ラムダファージ DNA の末端と 40 bp のオーバーラップ配列を持つ。H は、*HindIII* による切断箇所を示す。(b)RA-RCR 産物のアガロースゲル電気泳動解析。(-)RA は、連結反応を行わなかったサンプルを示し、(+ )RA は、連結反応を行ったサンプルを示す。(+) *HindIII* digestion は、RA-RCR 後、制限酵素(*HindIII*)により 37°C で 1 時間処理した。RCR 反応液をストップバッファーで 1/10 希釈し、1  $\mu$ l を泳動した。

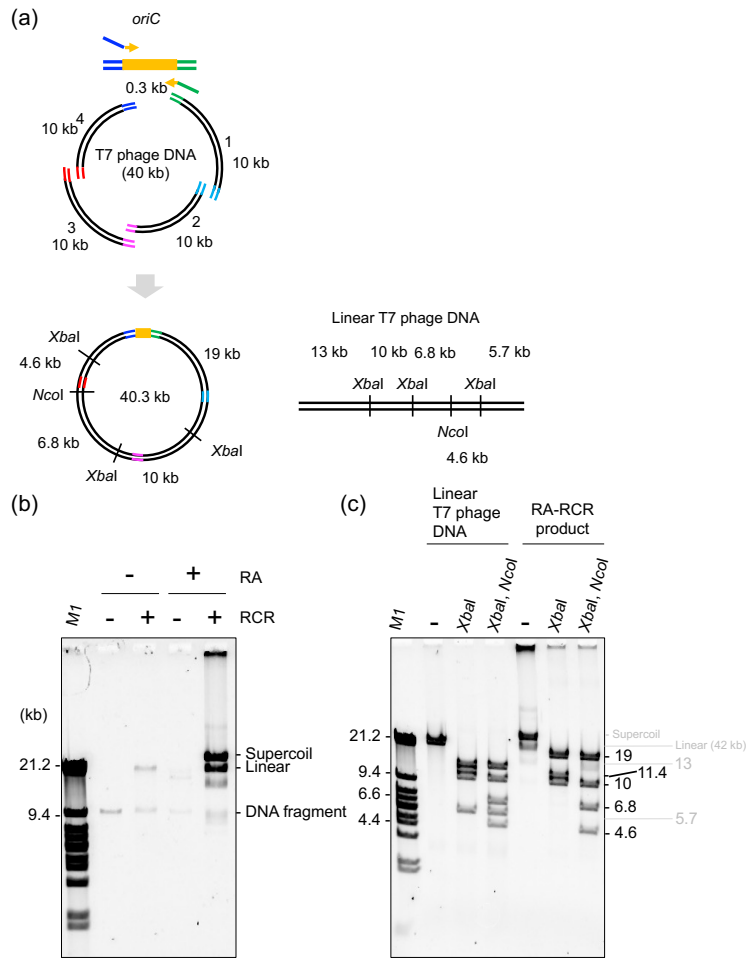


図 3.11 RA-RCR を用いた T7 ファージ DNA の増幅。T7 ファージ DNA を 10 kb 毎に分割した 4 本の DNA 断片と *oriC* 断片を用いて RA-RCR を行った。RA 後、30°C で 16 時間の RCR を行った。(a)4 本の T7 ファージ DNA 断片と *oriC* 断片の連結環状化デザインと目的 DNA の *XbaI* 及び *NcoI* 切断マップ。それぞれの DNA 断片は、隣り合う DNA 断片と 40 bp のオーバーラップ配列を持つ。右は、直鎖状 T7 ファージ DNA の *XbaI* 及び *NcoI* 切断マップである。(b)RA-RCR 産物のアガロースゲル電気泳動解析。(-)RA は、連結反応を行わなかったサンプルを示し、(+)RA は、連結反応を行ったサンプルを示す。(-)RCR は、RCR 前のサンプルを示し、(+)RCR は、RCR 後のサンプルを示す。マーカーの 9.4 kb 付近に見られるバンドは、RA に用いた T7 ファージ DNA 断片である。(c)直鎖状 T7 ファージ DNA 及び RA-RCR 産物を制限酵素(*XbaI*, *NcoI*)により 37°C で 1 時間処理した。(-)は、制限酵素を反応液に加えなかった。0.5%のアガロースゲルを用いて電気泳動し、SYBR Green I を用いて染色した。

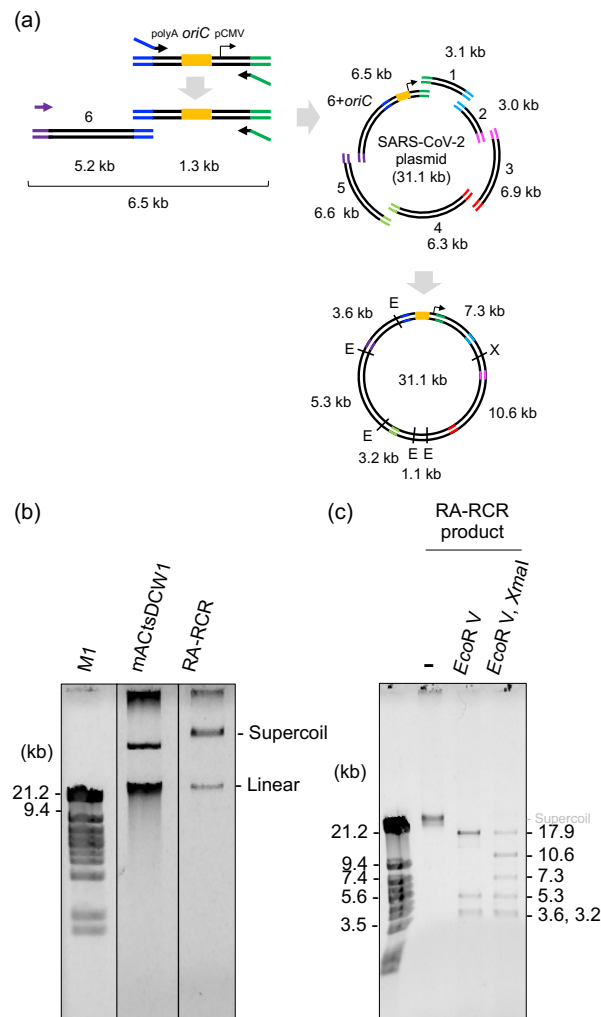


図 3.12 RA-RCR を用いた SARS-CoV-2 発現プラスミドの構築。SARS-CoV-2 ゲノムを(1)3.1 kb、(2)3.0 kb、(3)6.9 kb、(4)6.3 kb、(5)6.6 kb 及び(6)5.5 kb に分割した DNA 断片と *oriC* 断片を用いて RA-RCR を行った。RA 後、30°C で 16 時間の RCR を行った。(a) 6 本の SARS-CoV-2 ゲノム DNA 断片と *oriC* 断片の連結環状化デザインと目的 DNA の *EcoRV* 及び *XmaI* 切断マップ。*oriC* 断片は、5'側に polyA 配列と 3'側に CMV プロモーターを持つ。また、それぞれの DNA 断片は、隣り合う DNA 断片と 60 bp のオーバーラップ配列を持つ。SARS-CoV-2 ゲノムの 3'側の DNA 断片(6)と *oriC* 断片は、overlap PCR 法により連結した。E と X は、それぞれ *EcoRV* と *XmaI* による切断箇所を示す。(b)RA-RCR 産物のアガロースゲル電気泳動解析。1%のアガロースゲルを用いた。mACtsDCW1 (倉田)は、約 30 kb の環状 DNA である。(c)RA-RCR 産物を制限酵素(*EcoRV*、*XmaI*)により 37°C で一晩処理した。(-)は、制限酵素を反応液に加えなかった。0.5%のアガロースゲルを用いて電気泳動し、SYBR Green I を用いて染色した。

### 3.4.8 環状 DNA を切らない RA-RCR

RA における DNA 連結は、大腸菌の DNA 組換え酵素である RecA によって触媒される。RecA は、DNA の一本鎖領域にフィラメントを形成し、相同配列を探索することで、相同な一本鎖 DNA 同士のアニーリングを促進する(Müller and Stasiak, 1991; Shigemori et al., 2005)。一方で、D-loop 構造の形成も触媒することが知られている(Cox and Lehman, 1981)。D-loop 構造は、RecA フィラメントを形成した一本鎖 DNA が、相同な二本鎖 DNA と相補鎖を入れ替えるようにしてハイブリダイズすることによって形成される(Yang et al., 2020)。生体内では、D-loop 構造を起点にして DNA 複製が起きた場合に DNA 配列の挿入などの相同組換えが起こる(Kogoma, 1996)。そこで、このメカニズムを用いて環状 DNA に *oriC* を導入できるか検討した(図 3.13)。

まず、pUC4K の隣り合う 40 bp の配列をそれぞれ 5'-tail に持つフォワードプライマー及びリバースプライマーを用いた PCR 法により *oriC* 断片(*oriCamp\_1*)を調製した。70 pg の *oriCamp\_1* と 0.55 ng の pUC4K を用いて RA を行い、その産物を RCR にかけた(図 3.14)。また同時に、*oriC* を持つ pUC4K (pUC4K*oriC*)も RCR にかけた。その結果、RA に依存的な増幅産物が pUC4K*oriC* の増幅産物と同じ位置に見られたことから、目的の単量体スーパーコイル DNA が増幅できたことが確認できた。ローリングサークル型複製に由来するコンカテマーも僅かに見られた。環状 DNA と *oriC* 断片を用いて RA を行い RCR 増幅する手法を、Rm-RCR とした。

次に、Rm-RCR における RecA の依存性を調べたところ、RecA タンパク質を加えずに RA を行った場合は、主にコンカテマーや非特異的な DNA の増幅が見られ、目的の単量体スーパーコイル DNA の増幅は RecA に依存的であることが確認できた(図 3.15)。コンカテマーや非特異的な DNA の増幅は、Exo III によって露出した一本鎖領域の偶発的なハイブリダイゼーションが起点になっていると考えられる。また、3'-5'エキソヌクLEASEである Exo III の代わりに 5'-3'エキソヌクLEASEである T5 exonuclease を用いた場合でも目的の単量体スーパーコイル DNA の増幅が見られたことから、Rm-RCR における *oriC* 挿入反応は一本鎖領域の向きに依存しないことがわかった(図 3.16)。Exo III を用いた場合は、二量体のスーパーコイル DNA と考えられる増幅産物が見られた。マーカーの 7.4 kb の付近に見られるバンドは、二量体スーパーコイル DNA だと思われる。Rm-RCR は、環状 DNA の狙った配列に *oriC* を簡便に導入する手法として有用である。Rm-RCR を用いて既存のベクターなどに *oriC* を導入することで、RA-RCR といった RCR を用いたアプリケーションに利用することが可能である。

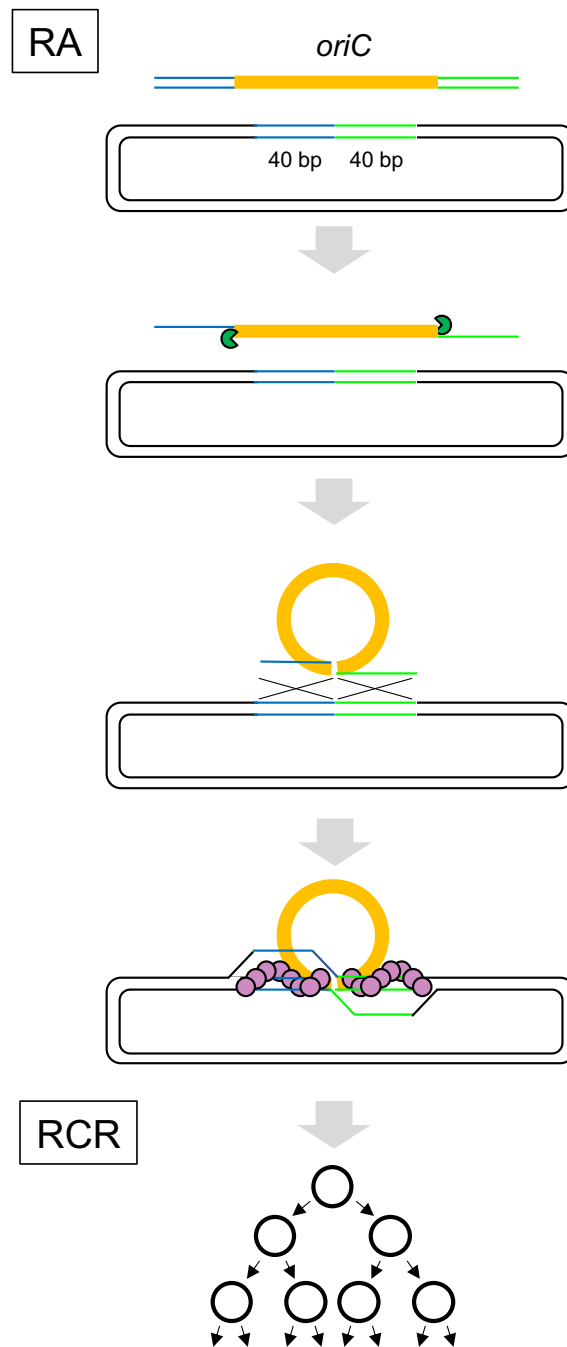


図 3.13 RecA の D-loop 活性を用いた環状 DNA への *oriC* の導入と環状 DNA の増幅。 *oriC* 断片は、ターゲット環状 DNA 内の連続する 2 箇所の 40 bp の配列とそれぞれ相同な配列を末端に持つ。RA では、*oriC* 断片の露出した末端の一本鎖領域が、RecA によってターゲット環状 DNA の相同配列と D-loop 構造をとる。この産物を RCR にか、ターゲット環状 DNA の増幅を導く (Rm-RCR)。

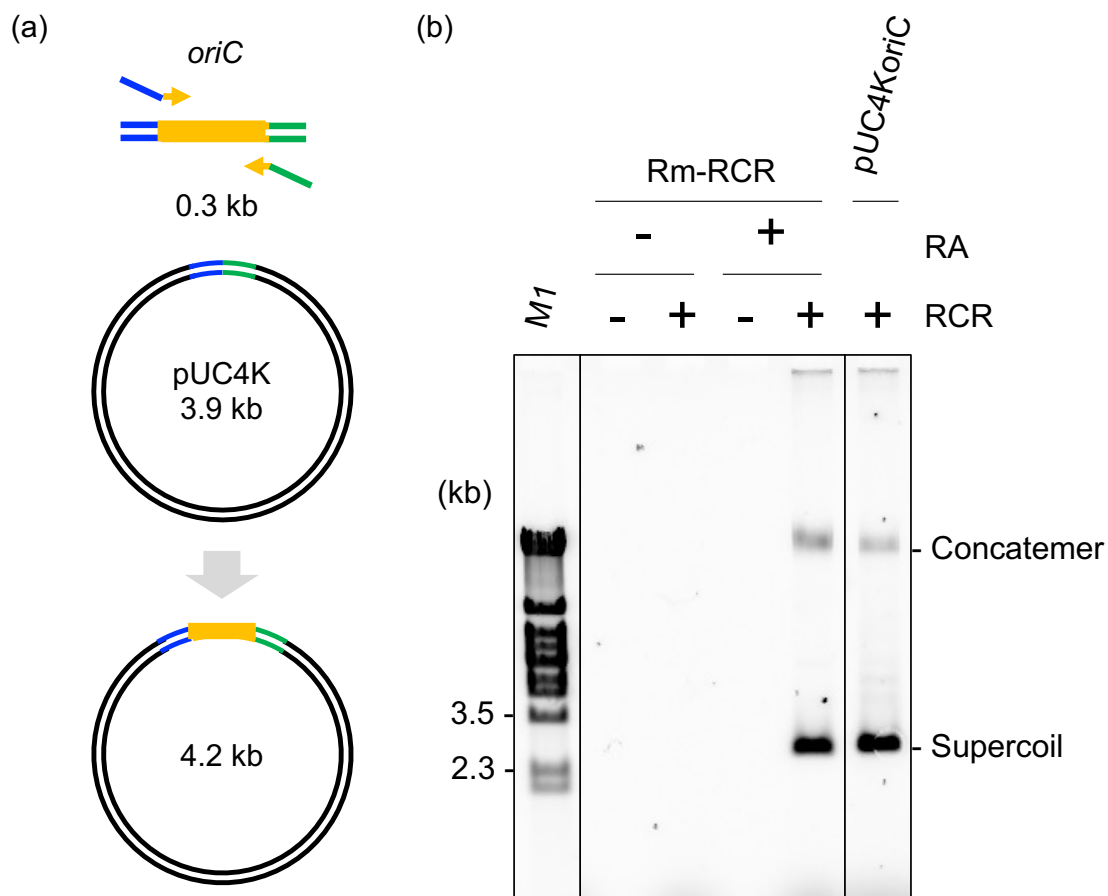


図 3.14 *oriC* 断片と環状 DNA による RA-RCR。pUC4K と *oriC* 断片(*oriCamp\_1*)を用いて RA を行い、その産物を 30°C で 16 時間の RCR にかけた。(a)pUC4K への *oriC* 導入のデザイン。*oriC* 断片は、pUC4K 内の配列と相同な 40 bp の配列を末端に持つ。(b)RA-RCR 産物のアガロースゲル電気泳動解析。RA 産物と同時に、30 pg/μl の pUC4KoriC を RCR にかけた。(-)RA は、RA を行わなかったサンプルを示し、(+ )RA は、RA を行ったサンプルを示す。(-)RCR は、RCR 前のサンプルを示し、(+ )RCR は、RCR 後のサンプルを示す。

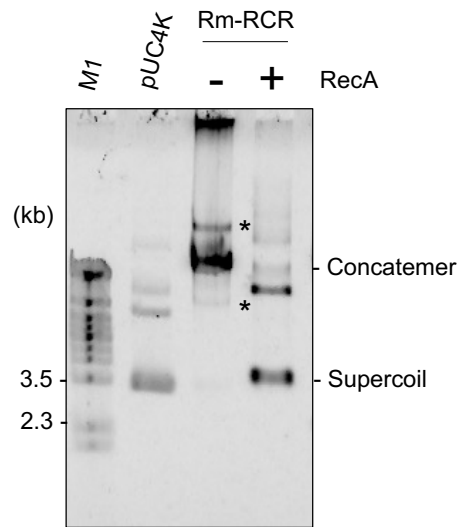


図 3.15 Rm-RCR における RecA 依存性。pUC4K と *oriC* 断片(*oriCamp\_2*)を用いて RA を行い、その産物を 30°C で 16 時間の RCR にかけた。(–) RecA は、RA に 1 μM の RecA を加えなかった場合を示し、(+)RecA は、RecA を加えた場合を示す。アスタリスク(\*)は、非特異的な増幅産物を示す。

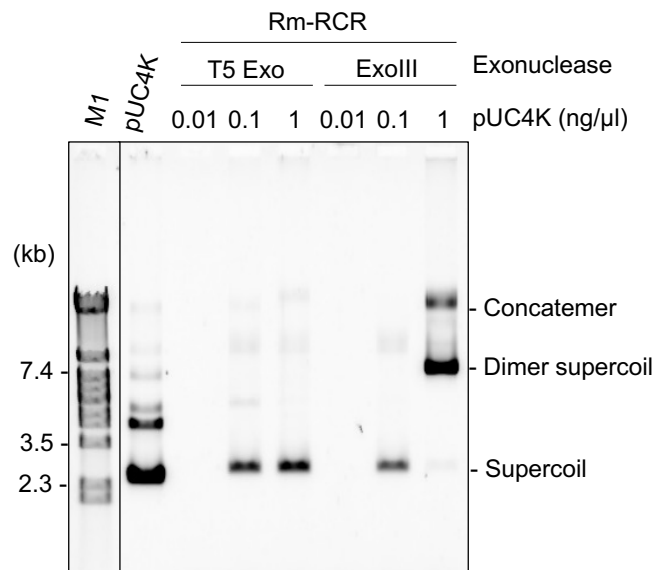


図 3.16 Rm-RCR におけるエキソヌクレアーゼの検討。表記の濃度の pUC4K と *oriC* 断片(*oriC* cassette)を用いて RA を行い、その産物を 30°C で 16 時間の RCR にかけた。*oriC* 断片は、pUC4K と分子数が揃うように加えた。RA には、0.6 mU/μl の T5 exonuclease (T5 Exo、NEB)、もしくは 80 mU/μl の Exonuclease III (Exo III、NEB)を加えた。



### 3.5 考察

RA-RCR を用いることで、ヒト mtDNA、200 kb を超える長鎖プラスミドや大腸菌ゲノム領域及びファージ DNA などの様々な DNA の試験管内クローニングが可能であった。本手法は、DNA 溶液に目的以外の DNA が混在していた場合でも、目的の DNA を選択的に増幅することができ(図 3.3、3.8、3.9)、RA による DNA 連結における特異性の高さを示している。従来の試験管内 DNA 増幅法である PCR では、熱によるアニーリングを用いるため、繰り返し配列の増幅が困難であった(Ordway and Detloff, 1996; Hommelsheim et al., 2014)。また、微生物を宿主とした DNA クローニング法では、宿主が持つ DNA 組換え活性により、繰り返し配列が欠損する可能性があった(Kang et al., 1995, Feschenko et al., 2003)。一方で、RCR では、試験管内で繰り返し配列の増幅ができるだけでなく(図 3.4、3.7、3.8)、大腸菌を用いた DNA クローニング法に比べて繰り返し配列の欠損が起こりにくかった(図 3.4)。また、複数の DNA 断片を同時に連結することで、T7 ファージ DNA や SARS-CoV-2 発現プラスミドといった環状 DNA の試験管内構築が可能であった(図 3.11、3.12)。これまでに、大腸菌による DNA クローニング法を基盤にした遺伝子工学的手法が多く開発されていき。例えば、Bacmid は、昆虫細胞でタンパク質を産生するためのベクターとして使われるが、目的の遺伝子を導入するために大腸菌が使われてきた(Bieniossek et al., 2008)。RA-RCR による Bacmid の試験管内クローニング(図 3.5)は、繰り返し配列を持つ遺伝子や大腸菌に毒性を示す遺伝子を Bacmid に導入する技術に繋がる。また近年では、ファージセラピーと呼ばれるファージの宿主特異性を利用した療法が注目されている(Ando et al., 2015)。RA-RCR を用いることで宿主特異性をデザインしたファージ DNA の試験管内構築が可能になるだろう。

第二章では、試験管内 Tn5 トランスポジション反応を用いて *oriC* を環状 DNA に導入し、RCR 増幅する手法(Tn-RCR)について述べた。Tn-RCR は、環状 DNA の配列情報を必要としないため、配列未知の環状 DNA にも利用することが可能であった(表 3.3)。これにより、環境中の DNA などを増幅し、解析する技術に繋がる。しかしながら、*oriC* がランダムな位置に挿入されるため、環状 DNA の遺伝子を破壊する可能性があった。一方で、RA-RCR は、制限酵素や CRISPR-Cas9 システムを用いて切断した箇所に *oriC* を連結し、増幅する手法である。これによって、目的の構造を持った環状 DNA を特異的に増幅することが可能であった。本章ではさらに、環状 DNA を切断せずに *oriC* を目的の配列に挿入し、増幅する手法(Rm-RCR)をも開発した結果についても述べた。Rm-RCR では、制限酵素や CRISPR-Cas9 システムによる処理を必要としないため、既存のベクターなどに *oriC* を簡便に導入する手法として有用である。RCR の DNA 増幅法としてのアプリケーションは、今後、生物学の発展に貢献できると期待される。

表 3.3 RCR 増幅のための *oriC* 導入法の比較

|                  | Tn-RCR        | RA-RCR                | Rm-RCR                                 |
|------------------|---------------|-----------------------|----------------------------------------|
| ターゲット DNA の配列情報  | 不要            | 必要                    | 必要                                     |
| ターゲット DNA の構造    | 環状            | 直鎖状                   | 環状                                     |
| <i>oriC</i> 導入方法 | ランダム導入        | 末端連結                  | 相同組換え挿入                                |
| 利用方法             | 環境中 DNA の解析など | 試験管内クローニング、人工ゲノムの構築など | 環状 DNA への <i>oriC</i> の導入、試験管内クローニングなど |

### 3.6 参考文献

- Ando, H., Lemire, S., Pires, D. P. and Lu, T. K. (2015) Engineering modular viral scaffolds for targeted bacterial population editing. *Cell Syst.*, **1**, 187-196.
- Asakawa, S., Abe, I., Kudoh, Y., Kishi, M., Wang, Y., Kubota, R., Kudoh, J., Kawasaki, K., Minoshima, S. and Shimizu, H. (1997) Human BAC library: construction and rapid screening. *Gene*, **191**, 69-79.
- Bieniossek, C., Richmond, T. J. and Berger, I. (2008) MultiBac: multigene baculovirus-based eukaryotic protein complex production. *Curr. Protoc. Protein. Sci.*, Chapter 5, Unit 5. 20.
- Cox, M. M. and Lehman, I. R. (1981) *recA* protein of *Escherichia coli* promotes branch migration, a kinetically distinct phase of DNA strand exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 3433-7.
- Feschenko, V. V., Rajman, L. A. and Lovett, S. T. (2003) Stabilization of perfect and imperfect tandem repeats by single-strand DNA exonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 1134-9.
- Gibson, D. G., Glass, J. I., Lartigue, C., Noskov, V. N., Chuang, R. -Y. and other authors. (2010) Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, **329**, 52-6.
- Hasebe, T., Narita, K., Hidaka, S. and Su'etsugu, M. (2018) Efficient arrangement of the replication fork trap for in vitro propagation of monomeric circular DNA in the chromosome-replication cycle reaction. *Life (Basel)*, **8**, 43.
- Hommelsheim, C. M., Frantzeskakis, L., Huang, M. and Ülker, B. (2014) PCR amplification of repetitive DNA: a limitation to genome editing technologies and many other applications. *Sci. Rep.*, **4**, 5052.
- Ishiura, H., Shibata, S., Yoshimura, J., Suzuki, Y., Qu, W. (2019) Noncoding CGG repeat expansions in neuronal intranuclear inclusion disease, oculopharyngodistal myopathy and an overlapping disease. *Nat. Genet.*, **51**, 1222-1232.
- Kang, S., Jaworski, A., Ohshima, K. and Wells, R. D. (1995) Expansion and deletion of CTG repeats from human disease genes are determined by the direction of replication in *E. coli*. *Nat. Genet.*, **10**, 213-8.
- 加納巧希 (2017) 複製サイクル再構成系を用いた長鎖ゲノム領域クローニング、及び改変法、立教大学大学院理学研究科修士論文 (未公刊).
- Kogoma, T. (1996) Recombination by replication. *Cell*, **85**, 625-7.
- Kouprina, N., Ebersole, T., Koriabine, M., Pak, E., Rogozin, I. B. and other authors. (2003) Cloning of human centromeres by transformation-associated recombination in yeast and generation of functional human artificial chromosomes. *Nucleic. Acids. Res.*, **31**, 922-34.

- Mukai, T., Yoneji, T., Yamada, K., Fujita, H., Nara, S. and Su'etsugu, M. (2020) Overcoming the challenges of megabase-sized plasmid construction in *Escherichia coli*. *ACS Synth. Biol.*, **9**, 1315-1327.
- Müller, B. and Stasiak, A. (1991) RecA-mediated annealing of single-stranded DNA and its relation to the mechanism of homologous recombination. *J. Mol. Biol.*, **221**, 131-45.
- Nara, S. and Su'etsugu, M. (2021) *In vitro* amplification of whole large plasmids via transposon-mediated *oriC* insertion. *Biotechniques*, **71**, 528-533.
- 奈良 聖亜、末次 正幸 (2020) 大腸菌いらずのセルフリー長鎖 DNA クローニング, 実験医学, **38**, 1023-1028.
- Ordway, J. M. and Detloff, P. J. (1996) In vitro synthesis and cloning of long CAG repeats. *Biotechniques*, **21**, 609-10, 612.
- Shigemori, Y., Mikawa, T., Shibata, T. and Oishi, M. (2005) Multiplex PCR: use of heat-stable *Thermus thermophilus* RecA protein to minimize non-specific PCR products. *Nucleic Acids Res.*, **33**, e126.
- Shizuya, H., Birren, B., Kim, U. J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y. and Simon M. (1992) Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 8794-7.
- Su'etsugu M., Takada, H., Katayama, T. and Tsujimoto, H. (2017) Exponential propagation of large circular DNA by reconstitution of a chromosome-replication cycle. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 11525-11534.
- Torii, S., Ono, C., Suzuki, R., Morioka, Y., Anzai, I and other authors. (2021) Establishment of a reverse genetics system for SARS-CoV-2 using circular polymerase extension reaction. *Cell Rep.*, **35**, 109014.
- Yang, H., Zhou, C. Dhar, A. and Pavletich. N. P. Mechanism of strand exchange from RecA-DNA synaptic and D-loop structures. *Nature*, **86**, 801-806.

## 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

### 4.1 序論

近年の合成生物学では、生命システムを再構成することで人工細胞を創生するアプローチが広く行われている(Kurihara et al., 2011; Mizuuchi and Ichihashi, 2020)。生命システムの再構成は、多くの生化学反応をバランスよく統合させることによって達成される。生命システムの根幹となるのは、「複製」と「転写翻訳」を統合したセントラルドグマである。さらには、ゲノム DNA にコードされた遺伝情報が、「転写翻訳」され、自身のゲノム DNA を「複製」という複製と転写翻訳の共役は、DNA の自己複製に繋がる。DNA の自己複製システムの構築によって、そのメカニズムが明らかになるだけでなく、その過程では、複製・転写・翻訳の個々の生化学反応が共役して働くために必要な新たな要素の発見が期待される。

モデル生物である大腸菌では、多くの代謝系が再構成されている。転写翻訳においては、T7 RNA polymerase による転写反応と大腸菌の翻訳システムからなる試験管内タンパク質合成系(PURE system)が構築されている(Shimizu et al., 2001)。さらに、PURE system と Q $\beta$  レプリカーゼによる RNA 複製反応を組み合わせた、「複製」と「転写翻訳」の共役系が構築されている(Ichihashi et al., 2013; Mizuuchi and Ichihashi, 2020)。しかし、Q $\beta$  レプリカーゼによる RNA 複製は、その鋳型 RNA にコードできる遺伝情報が僅かであり、多数の遺伝情報を複製することはできない。また、PURE system と  $\Phi$ 29 ファージの DNA 複製システムによる共役系の構築も行われている(van Nies et al., 2018)。しかし、 $\Phi$ 29 ファージの DNA 複製システムは、鋳型 DNA の増幅効率が低いため、遺伝情報の持たない分子量の小さな DNA が副産物として増幅してしまい、結果として複製サイクルを繰り返すことが難しいという問題があった。最近の研究では、 $\Phi$ 29 DNA polymerase による DNA 複製と Cre-loxP 部位特異的組換えシステムを組み合わせた DNA 増幅反応を用いた共役系の構築や(Sakatani et al., 2018)、PURE system と  $\Phi$ 29 DNA polymerase による DNA 複製反応の共役系を用いて、PURE system を構成するタンパク質を遺伝子としてコードする鋳型 DNA の複製とその遺伝子の発現を同時に行う研究も報告されている(Libicher et al., 2020)。しかしながら、ゲノムレベルの長大な DNA の複製システムを用いた共役系の構築は行われていなかった。

大腸菌の染色体複製システムについては、30 年以上も前にアーサー・コーンバーグらによって再構成されていたが、鋳型 DNA が繰り返し複製されるような複製サイクルの再構成には至っていなかった(Kaguni and Kornberg, 1984)。2017 年に、複製の開始・伸長・終結・分離システムの統合によって、複製のサイクルが可能な染色体複製反応(RCR)が再構成された(Su'etsugu et al., 2017)。RCR では、複製開始起点である *oriC* から両方向に進行した複製フォークが *oriC* の対極部分で衝突すると、複製産物である二分子の環状 DNA 分子は分離され、元の鋳型 DNA と同様の構造をとるため、複製が繰り返される。さらに、複

製フォークの過剰進行を防ぐシステム(*ter-Tus*)を導入することで、単量体スーパーコイル DNA として複製サイクルを繰り返すことが可能になった(Hasebe et al., 2018)。これらのメカニズムは、鋳型環状 DNA のみを効率よく増幅することを可能にし、DNA の自己複製に繋がる特徴である。さらに、大腸菌そのものの染色体複製システムを利用しているため、長大なゲノム DNA の複製ができるだけでなく、大腸菌という見本を参考にしながら様々な生化学反応と統合することが可能である。

RCR と PURE system の共役系は、大腸菌染色体の複製メカニズムを基盤とした DNA の自己複製システムの構築に繋がる。この共役系の最終目標は、RCR に使われる 26 種類すべてのタンパク質を遺伝情報としてコードしたゲノムを鋳型 DNA とし、PURE system で発現した複製タンパク質を用いて鋳型 DNA を複製することである(図 4.1)。これまでに、RCR を構成する全てのタンパク質を PURE system で生産することが可能であり、そのタンパク質が RCR で機能することがわかっている(長谷部, 2019)。また、*oriC* からの複製開始反応は、PURE system で発現したタンパク質を用いてすでに再構成されている(Fujiwara et al., 2013)。本章では、まず、T7 フェージの転写システムを用いた RCR と PURE system の共役系の構築を検討した。その結果、同一鋳型 DNA 上で複製と転写が行われる条件では、鋳型 DNA の複製阻害が見られた。この原因として、進行中の複製フォークと転写装置が衝突している可能性が考えられたことから、次に、大腸菌内で働く複製と転写の衝突を回避する機構の導入を検討した。そのためにまず、大腸菌 RNA polymerase (*E. coli* RNAP)を用いた RCR と PURE system の共役系の構築を行ったところ、鋳型 DNA の増幅が見られた。さらに、複製と転写の衝突を回避するいくつかの機構を導入したところ、鋳型 DNA の増幅が促進された。これにより、RCR と PURE system の共役には、複製と転写の衝突を回避する機構が重要であることが明らかになった。

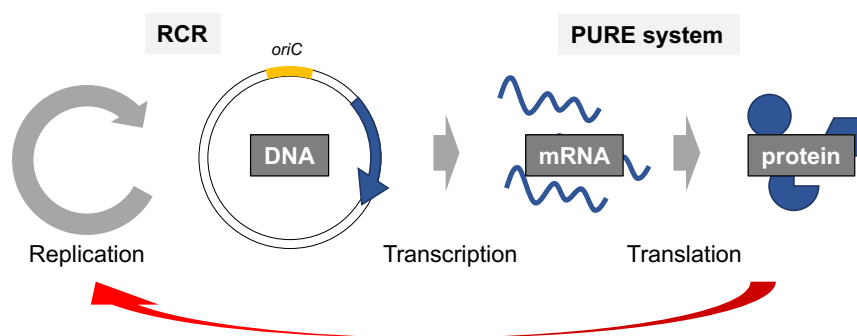


図 4.1 RCR と PURE system の共役による DNA の自己複製。RCR に必要なタンパク質を遺伝子としてコードし、また *oriC* を持つ環状 DNA を鋳型として、PURE system によって遺伝子を発現する。その後、発現したタンパク質によって、鋳型 DNA の複製が導かれることで、DNA の自己複製は達成される。

## 4.2 方法

### 4.2.1 環状 DNA の構築

pOriT7AG、pOriT7G、pOris70AG、pOris70G、pOris70AGp3、pOris70Gp3、pOris70AGter 及び pOris70Gter を構築するために表 4.2 に示す DNA 断片を調製した。

*dnaA* 断片は、MG1655 を鋳型としプライマー SUE5828 と HT100 を用いて PCR 法により調製した。また、*sfGFP* (ORF)断片は、PRM-GFP を鋳型としプライマー SUE5364 と SUE5365 を用いて PCR 法により調製した。PRM-GFP (Huan et al., 2012)は、Maharbiz, M.より分与していただいた。(Addgene plasmid # 40127)。*dnaA*-*sfGFP* 断片の調製のために、まず、*sfGFP* (ORF)断片を鋳型 DNA としプライマー HT101 と SUE5365 を用いた PCR 法により、*sfGFP* (*dnaA*)断片を調製した。次に、プライマー SUE5828 と SUE5365 を用いた overlap PCR 法により、*sfGFP* (*dnaA*)断片と *dnaA* 断片を連結し、*dnaA*-*sfGFP* 断片を調製した。

*dnaA* の上流に T7 プロモーターを付与するための T7 promoter (*dnaA*)断片は、pET-His-Tnp (Picelli et al., 2014)を鋳型 DNA としプライマー SUE5507 と SUE5829 を用いた PCR 法により調製した。pTXB1-Tn5 は、Sandberg, R.より分与していただいた(Addgene plasmid # 60240)。

*sfGFP* 遺伝子の上流に T7 プロモーターを付与するための T7 promoter (*sfGFP*)断片は、pET-His-Tnp を鋳型 DNA としプライマー SUE5360 と SUE5361 を用いた PCR 法により調製した。

*dnaA* の上流に s70 コンセンサスプロモーターを付与するための s70 promoter (*dnaA*)断片の調製のために、まず、s70 promoter spacer 断片と pre s70 promoter (*dnaA*)を調製した。s70 promoter spacer 断片は、pET-His-Tnp を鋳型 DNA としプライマー SUE5507 と SUE6375 を用いた PCR 法により調製した。また、pre s70 promoter (*dnaA*)は、プライマー SUE5750 と SUE5365 を用いた primer extension 法により調製した。次に、プライマー SUE5507 と SUE5829 を用いた overlap PCR 法により、s70 promoter spacer 断片と pre s70 promoter (*dnaA*)を連結し、s70 promoter (*dnaA*)断片を調製した。

*sfGFP* 遺伝子の上流に s70 コンセンサスプロモーターを付与するための s70 promoter (*sfGFP*)断片は、プライマー SUE5507 と SUE6251 を用いた overlap PCR 法により、s70 promoter spacer 断片と pre s70 promoter (*dnaA*)を連結し調製した。

pOriT7AG の構築に用いた T7-*dnaA*-*sfGFP* 断片の調製のために、まず、pET-His-Tnp を鋳型 DNA としプライマー SUE5366 と SUE5367 を用いた PCR 法により、T7 terminator 断片を調製した。次に、プライマー SUE5507 と SUE5367 を用いた overlap PCR 法により、T7 promoter (*sfGFP*)断片、*sfGFP* (ORF)断片及び T7 terminator 断片を連結し、T7-*dnaA*-*sfGFP* 断片を調製した。

pOriT7G の構築に用いた T7-*sfGFP* 断片は、プライマー SUE5507 と SUE5367 を用いた overlap PCR 法により、T7 promoter (*dnaA*)断片、*dnaA*-*sfGFP* 断片及び T7 terminator 断片を

連結し調製した。

pOris70AG の構築に用いた s70-dnaA-sfGFP\_1 断片は、プライマーSUE5507 と SUE5367 を用いた overlap PCR 法により、s70 promoter (*dnaA*)断片、dnaA-sfGFP 断片及び T7 terminator 断片を連結し調製した。

pOris70G の構築に用いた s70-sfGFP\_1 断片は、プライマーSUE5507 と SUE5367 を用いた overlap PCR 法により、s70 promoter (*sfGFP*)断片、sfGFP (ORF)断片及び T7 terminator 断片を連結し調製した。

pOris70AGp3 の構築に用いた s70-dnaA-sfGFP\_2 断片は、プライマーSUE5507 と SUE8075 を用いた overlap PCR 法により、s70 promoter (*dnaA*)断片、dnaA-sfGFP 断片及び T7 terminator 断片を連結し調製した。

pOris70Gp3 の構築に用いた s70-sfGFP\_2 断片は、プライマーSUE5507 と SUE8075 を用いた overlap PCR 法により、s70 promoter (*sfGFP*)断片、*sfGFP* (ORF)断片及び T7 terminator 断片を連結し調製した。

pOris70AGter の構築に用いた s70-dnaA-sfGFP\_3 断片の調製のために、まず、プライマーSUE5366 と SUE5368 を用いた primer extension 法により、pre T1 terminator 断片を調製した。次に、プライマーSUE5750 と SUE5368 を用いた overlap PCR 法により、pre s70 promoter (*dnaA*)断片、dnaA-sfGFP 断片及び pre T1 terminator 断片を連結し、pre s70-dnaA-sfGFP\_3 を調製した。最後に、プライマーSUE5507 と SUE8641 を用いた overlap PCR 法により、s70 promoter spacer 断片と pre s70-dnaA-sfGFP-3 を連結し、s70-dnaA-sfGFP\_3 断片を調製した。

pOris70Gp3 の構築に用いた s70-sfGFP\_3 断片の調製のために、まず、プライマーSUE5750 と SUE6251 を用いた primer extension 法により、pre s70 promoter (*sfGFP*)断片を調製した。次に、プライマーSUE5750 と SUE5368 を用いた overlap PCR 法により、pre s70 promoter (*sfGFP*)断片、sfGFP (ORF)断片及び pre T1 terminator 断片を連結し、pre s70-sfGFP\_3 断片を調製した。最後に、プライマーSUE5507 と SUE8641 を用いた overlap PCR 法により、s70 promoter spacer 断片と pre s70-sfGFP-3 を連結し、s70-sfGFP\_3 断片を調製した。

pOriT7AG を構築するために、まず、*oriC* (*lacZ*)断片と *lacZ* (ORF)断片を調製した。*oriC* (*lacZ*)断片は、*oriC* cassette (図 3.2)を鋳型 DNA としプライマーSUE5504 と SUE5505 を用いた PCR 法により調製した。また、*lacZ* (ORF)断片は、*lacZ* fragment (Su'etsugu et al., 2017)を鋳型 DNA としプライマーSUE5506 と SUE5358 を用いた PCR 法により調製した。次に、RA-RCR 法 (第三章)により、*oriC* (*lacZ*)断片、*lacZ* (ORF)断片及び T7-dnaA-sfGFP 断片と連結し、pOris70AG を構築した。

pOriT7G は、RA-RCR 法により、*oriC* (*lacZ*)断片、*lacZ* (ORF)断片及び T7-sfGFP 断片と連結し、pOris70AG を構築した。

pOris70AG は、RA-RCR 法により、*oriC* (*lacZ*)断片、*lacZ* (ORF)断片及び s70-dnaA-sfGFP-1 断片と連結し、pOris70AG を構築した。

pOris70G は、RA-RCR 法により、*oriC* (*lacZ*)断片、*lacZ* (ORF)断片及び s70-sfGFP-1 断片を



連結し構築した。

pOris70AGp3 を構築するために、まず、*oriC* (bla-lacI)断片と bla-lacI 断片を調製した。*oriC* (bla-lacI)断片は、*oriC* cassette を鋳型 DNA としプライマーSUE9054 と SUE5505 を用いた PCR 法により調製した。また、bla-lacI 断片は、pET-polIII\* (Su'etsugu et al., 2017)を鋳型 DNA としプライマーSUE9055 と SUE1786 を用いた PCR 法により調製した。次に、RA-RCR 法により、*oriC* (bla-lacI)断片、bla-lacI 断片及び s70-dnaA-sfGFP-2 断片を連結し、pOris70AGp3 を構築した。

pOris70Gp3 は、RA-RCR 法により、*oriC* (bla-lacI)断片、bla-lacI 断片及び s70-sfGFP-2 断片を連結し構築した。

pOris70AGter を構築するために、まず、pET-His-Tnp を鋳型 DNA としプライマーSUE8642 と SUE5367 を用いた PCR 法により、T1 terminator spacer 断片を調製した。次に、プライマーSUE8642 と SUE5506 を用いた overlap PCR 法により、T1 terminator spacer 断片と lacZ (ORF)断片を連結し、lacZ-T1 断片を調製した。最後に、RA-RCR 法により、*oriC* (lacZ)断片、lacZ-T1 断片及び s70-dnaA-sfGFP-3 断片を連結し、pOris70AGter を構築した。

pOris70Gter は、RA-RCR 法により、*oriC* (lacZ)断片、lacZ-T1 断片及び s70-sfGFP-3 断片を連結し構築した。

pEToriT7polIII\*を構築するために、まず、*oriC* (PsiI)断片、PsiI-clamp loader 断片及び Core-PsiI 断片を調製した。*oriC* (PsiI)断片は、*oriC* cassette を鋳型 DNA としプライマーSUE1881 と SUE1882 を用いた PCR 法により調製した。PsiI-clamp loader 断片は、pET-polIII\*を鋳型 DNA としプライマーSUE1786 と SUE7094 を用いた PCR 法により調製した。Core-PsiI 断片は、pET-polIII\*を鋳型 DNA としプライマーSUE7095 と SUE1785 を用いた PCR 法により調製した。次に、RA-RCR 法により、*oriC* (PsiI)断片、PsiI-clamp loader 断片及び Core -PsiI 断片を連結し、pEToriT7polIII\*を構築した。

pEToris70polIII\*を構築するために、まず、PsiI-s70 promoter 断片、s70 promoter-clamp loader 断片、Core-T1 terminator 断片及び T1 terminator-PsiI 断片を構築した。PsiI-s70 promoter 断片は、PsiI-clamp loader 断片を鋳型 DNA としプライマーSUE1786 と SUE6375 を用いた PCR 法により調製した。s70 promoter-clamp loader 断片は、PsiI-clamp loader 断片を鋳型 DNA としプライマーSUE5750 と SUE7094 を用いた PCR 法により調製した。Core-T1 terminator 断片は、pET-polIII\*を鋳型 DNA としプライマーSUE7095 と SUE7484 を用いた PCR 法により調製した。T1 terminator-PsiI 断片は、pET-polIII\*を鋳型 DNA としプライマーSUE5369 と SUE1785 を用いた PCR 法により調製した。次に、RA-RCR 法により、*oriC* (PsiI)断片、PsiI-s70 promoter 断片、s70 promoter-clamp loader 断片、Core-T1 terminator 断片及び T1 terminator-PsiI 断片を連結し、pEToris70polIII\*を構築した。

pRpoABCDZ ( $\beta$ H1244Q)を構築するために、まず、H1244Q-1 断片と H1244Q-2 断片を調製した。H1244Q-1 断片は、pRpoABCDZ (Nara and Su'etsugu, 2021)を鋳型 DNA としプライマーSUE7804 と SUE7995 を用いた PCR 法により調製した。また、H1244Q-2 断片は、

pRpoABCDZ を鋳型 DNA としプライマー-SUE7807 と SUE7996 を用いた PCR 法により調製した。次に、H1244Q-1 断片と H1244Q-2 断片を用いた iVEC 法(Nozaki and Niki, 2019)により、pRpoABCDZ (BH1244Q)を構築した。

RA-RCR 法により構築した環状 DNA は、RCR 反応液に 5 倍量の PB buffer (QIAGEN)を加え、スピнкаラム (QIAGEN)にアプライ後、1 分間室温で遠心(13,000 rpm)しカラムに吸着させた。その後、0.75 mL の PE buffer (QIAGEN)でカラムを洗浄後、50  $\mu$ l の EB buffer (QIAGEN)により溶出し、精製した。iVEC 法により構築したプラスミドは、QIAprep Miniprep Kit (QIAGEN)を用いて精製した。*rpoB* 遺伝子の変異は、サンガーシーケンス法により確認した。

環状 DNA の構築で用いたプライマーのリストを表 4.3 に示した。

#### 4.2.2 本章で使用したタンパク質

*E. coli* RNAP は、*E. coli* RNA polymerase, Holoenzyme (NEB)を用いた。0.6  $\mu$ M の GreAB は、GreA と GreB をそれぞれ 0.3  $\mu$ M 含む。GreA、GreB、UvrD 及び Rep は、当研究室で精製したタンパク質を用いた。

#### 4.2.3 PURE system を用いた DnaA の生産

5  $\mu$ l のタンパク質合成反応液を、0.375  $\mu$ l の solution B (PURExpress, NEB)、1  $\mu$ l の 5 $\times$ T buffer (250 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 40 mM DTT, 750 mM potassium glutamate, 100 mM creatine phosphate, 10 mM ATP, 10 mM GTP, 5 mM CTP, 5 mM UTP, 7.5 mg/ml *E. coli* tRNA, 2 mM spermidine, 0.05 mg/ml folmyl donor, 0.5 mM NAD, 60 mM magnesium acetate)、0.1 mM Amino Acid Mixture (Promega)、0.8 mU/ $\mu$ l RNase Inhibitor, Murine (NEB)、3% (w/v) Dextran200,000 (Fujifilm)及び 0.1  $\mu$ l の FluoroTect™ Green Lys (Promega)を混合し調製した。鋳型 DNA として、s70-dnaA-sfGFP\_1、もしくは、T7-dnaA-sfGFP を用いた。鋳型 DNA を加えた後、30°C で 6 時間反応した。反応後、5  $\mu$ l のサンプルバッファー (25 mM Tris-HCl, pH 6.8, 5% glycerol, 2% sodium dodecyl sulfate, 20 mM EDTA, 1% 2-mercaptethanol, 0.05% bromophenol blue)を加え、65°C で 2 分間温めた。半量を、10% SDS-PAGE を用いて電気泳動した。FluoroTect™ Green Lys による蛍光を、Typhoon FLA 9500 (GE healthcare)を用いて撮影した後、ゲルを CBB 染色液で染色し、スキャナーGT-X970 (EPSON)を用いて撮影した。

#### 4.2.4 PURE system と RCR の共役系

PURE<sup>EcR</sup>-RCR 反応液(5  $\mu$ l)を、0.5  $\mu$ l の 10 $\times$ RE mix (Su'etsugu et al., 2017)、0.375  $\mu$ l の solution B、1  $\mu$ l の 5 $\times$ T buffer、0.4 mM の dNTP、0.1 mM の Amino Acid Mixture、0.8 mU/ $\mu$ l

の RNase Inhibitor, Murine 及び 3%(w/v)の Dextran200,000 を混合し調製した。10×RE mix は、RCR に必要な酵素類を含み、必要に応じて、DnaA、もしくは DNA polymerase III を含まない溶液を用いた。鋳型 DNA を加えた後、30°C で記述の時間反応させた。エマルジョンを用いる場合、PURE<sup>EcR</sup>-RCR 反応液を 2% ABIL® EM90 と 0.05% Triton X-100 を含む 25 µl のミネラルオイルに添加し、1 分間ボルテックスした。反応後、1 µl の PURE<sup>EcR</sup>-RCR 反応液を分取し、4 µl のストップバッファー(25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25 mM EDTA, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 0.05 mg/ml proteinase K, 5% glycerol, 0.1% bromophenol blue)に加え、アガロースゲル電気泳動用サンプルとした。必要に応じて、1 µl の PURE<sup>EcR</sup>-RCR を、100 ng/µl の RNaseA を含む RCR バッファーで 1/4 希釈し、30°C で 30 分間の反応により、RNase 処理を行った後に、1 µl の 5 倍濃度のストップバッファーを加え、アガロースゲル電気泳動用サンプルとした。エマルジョンを用いた場合は、遠心操作により反応液を沈殿させ、上清のオイル画分を除いた。その後、クロロフォルム抽出を行い、1 µl の水層を 4 µl のストップバッファーに加え、アガロースゲル電気泳動用サンプルとした。アガロースゲル電気泳動は、0.5%のアガロースゲルを用いた。染色液は、SYBR Green I を用いた。ゲル写真は、Typhoon FLA 9500 を用いて撮影した。エマルジョンの染色に使う染色用ミネラルオイルの調製のために、Bobo-3 iodide 溶液を 2% ABIL® EM90 と 0.05% Triton X-100 を含むミネラルオイルに 1/10 量で加え、1 分間ボルテックス後、23°C で 1 時間静置した。その後、遠心操作を行い上清のオイル画分を染色用ミネラルオイルとした。エマルジョン反応液は、Bobo-3 iodide を含む染色用ミネラルオイル 1:2 の割合で混ぜ、室温で一晩染色した(Ueno et al, 2021)。エマルジョンの顕微鏡写真は、BZ-X710 (KEYENCE) を用いて撮影した。

#### 4.2.5 PURE<sup>EcR</sup>-RCR 産物の qPCR 定量

PURE<sup>EcR</sup>-RCR 反応液を、1 mM EDTA, pH 8.0 で 1/20 希釈し、1 µl を 20 µl の qPCR 反応液 (SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus), Takara)に加えた。スタンダードには、pOris70AG を用いた。qPCR 用のプライマーには、SUE550 (5'-CACTGCCCTGTGGATAACAA-3')と SUE551 (5'-CCTCATTCTGATCCCAGCTT-3')を用いた。DNA の蛍光は、Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara)を用いて測定した。

表 4.1 pOriT7AG、pOriT7G、pOris70AG、pOris70G、pOris70AGp3、pOris70Gp3、pOris70AGter、pOris70Gterの構築に用いた DNA 断片のリスト

| Name                                           | Primer 1 | Primer 2 | method           | Template DNA                                                                           |
|------------------------------------------------|----------|----------|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>oriC</i> ( <i>lacZ</i> )                    | SUE5504  | SUE5505  | PCR              | <i>oriC</i> cassette                                                                   |
| <i>oriC</i> ( <i>bla-lacI</i> )                | SUE9054  | SUE5505  | PCR              | <i>oriC</i> cassette                                                                   |
| <i>lacZ</i> (ORF)                              | SUE5358  | SUE5506  | PCR              | <i>lacZ</i> fragment                                                                   |
| <i>bla-lacI</i>                                | SUE9055  | SUE1786  | PCR              | pET-polIII*                                                                            |
| <i>lacZ</i> -T1                                | SUE8642  | SUE5506  | overlap PCR      | T1 terminator spacer<br><i>lacZ</i> (ORF)                                              |
| <i>dnaA</i>                                    | SUE5828  | HT100    | PCR              | MG1655                                                                                 |
| <i>sfGFP</i> (ORF)                             | SUE5364  | SUE5365  | Primer extension |                                                                                        |
| <i>sfGFP</i> ( <i>dnaA</i> )                   | HT101    | SUE5365  | PCR              | <i>sfGFP</i> (ORF)                                                                     |
| <i>dnaA</i> - <i>sfGFP</i>                     | SUE5828  | SUE5365  | overlap PCR      | <i>dnaA</i><br><i>sfGFP</i> ( <i>dnaA</i> )                                            |
| T7 promoter<br>( <i>dnaA</i> )                 | SUE5507  | SUE5829  | PCR              | pET-His-Tnp                                                                            |
| T7 promoter<br>( <i>sfGFP</i> )                | SUE5360  | SUE5361  |                  | pET-His-Tnp                                                                            |
| pre <i>s70</i> promoter<br>( <i>dnaA</i> )     | SUE5750  | SUE5829  | Primer extension |                                                                                        |
| pre <i>S70</i> promoter<br>( <i>sfGFP</i> )    | SUE5750  | SUE6251  | Primer extension |                                                                                        |
| <i>s70</i> promoter<br>spacer                  | SUE5507  | SUE6375  | PCR              | pET-His-Tnp                                                                            |
| <i>s70</i> promoter<br>( <i>dnaA</i> )         | SUE5507  | SUE5829  | overlap PCR      | <i>s70</i> promoter spacer<br>pre <i>s70</i> promoter ( <i>dnaA</i> )                  |
| <i>s70</i> promoter<br>( <i>sfGFP</i> )        | SUE5507  | SUE6251  | overlap PCR      | <i>s70</i> promoter spacer<br>pre <i>S70</i> promoter ( <i>dnaA</i> )                  |
| T7 terminator                                  | SUE5366  | SUE5367  | PCR              | pET-His-Tnp                                                                            |
| pre T1 terminator                              | SUE5366  | SUE5368  | PCR              | Primer extension                                                                       |
| T1 terminator<br>spacer                        | SUE8642  | SUE5367  | PCR              | pET-His-Tnp                                                                            |
| T7- <i>dnaA</i> - <i>sfGFP</i>                 | SUE5507  | SUE5367  | overlap PCR      | T7 promoter ( <i>dnaA</i> )<br><i>dnaA</i> - <i>sfGFP</i><br>T7 terminator             |
| T7- <i>sfGFP</i>                               | SUE5507  | SUE5367  | overlap PCR      | T7 promoter ( <i>GFP</i> )<br><i>sfGFP</i> (ORF)<br>T7 terminator                      |
| <i>s70</i> - <i>dnaA</i> -<br><i>sfGFP</i> _1  | SUE5507  | SUE5367  | overlap PCR      | <i>s70</i> promoter ( <i>dnaA</i> )<br><i>dnaA</i> - <i>sfGFP</i><br>T7 terminator     |
| <i>s70</i> - <i>sfGFP</i> _1                   | SUE5507  | SUE5367  | overlap PCR      | <i>s70</i> promoter ( <i>sfGFP</i> )<br><i>sfGFP</i> (ORF)<br>T7 terminator            |
| <i>s70</i> - <i>dnaA</i> -<br><i>sfGFP</i> _2  | SUE5507  | SUE8075  | overlap PCR      | <i>s70</i> promoter ( <i>dnaA</i> )<br><i>dnaA</i> - <i>sfGFP</i><br>T7 terminator     |
| <i>s70</i> - <i>sfGFP</i> _2                   | SUE5507  | SUE8075  | overlap PCR      | <i>s70</i> promoter ( <i>sfGFP</i> )<br><i>sfGFP</i> (ORF)<br>T7 terminator            |
| pre <i>s70</i> - <i>dnaA</i> -<br><i>sfGFP</i> | SUE5750  | SUE5368  | overlap PCR      | <i>s70</i> promoter ( <i>dnaA</i> )<br><i>dnaA</i> - <i>sfGFP</i><br>pre T1 terminator |

|                  |         |         |             |                                                                                                    |
|------------------|---------|---------|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| s70-dnaA-sfGFP_3 | SUE5507 | SUE8641 | overlap PCR | s70 promoter spacer                                                                                |
| pre s70-sfGFP    | SUE5750 | SUE5368 | overlap PCR | pre s70-dnaA-sfGFP<br>pre S70 promoter ( <i>sfGFP</i> )<br><i>sfGFP</i> (ORF)<br>pre T1 terminator |
| s70-sfGFP_3      | SUE5507 | SUE8641 | overlap PCR | s70 promoter spacer<br>pre s70-sfGFP                                                               |

表 4.2 環状 DNA 構築に用いたプライマーのリスト

| Name    | Sequence                                                                                                  |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HT100   | tcatatTTTTTctccttaggtttacgatgacaatgttctgattaaattgaaaaatcttcttg                                            |
| HT101   | aacattgtcatcgtaaacctaggaggaaaaaaatagagcaaaggaga                                                           |
| SUE1785 | taaatcaaaagaatagaccgagatagg                                                                               |
| SUE1786 | taagggattttgccgatttcg                                                                                     |
| SUE1881 | aacaacactcaaccctatctcggcttattctttgattataacttcgtataatgtatgctatacgaagtattctgctctgatg<br>ccgcatag            |
| SUE1882 | catttttaaccaatagcccgaatcggcaaaatcccttagtcggggctggcttaacag                                                 |
| SUE5358 | ttattttgacaccagaccaactggtaatg                                                                             |
| SUE5360 | caatagaacagatctctaaataatagatctcttttaataacttttagttacaacatactgcccaaggaaatgggcatg                            |
| SUE5361 | accatctaattcaacaagaattgggacaactccagtgaaaagtctctcctttgctcatggtatctctctcttaaagt<br>aaacaaaattattctagagg     |
| SUE5364 | atgagcaaaggagaagaactttcactg                                                                               |
| SUE5365 | ttattttagagctcatccatgccatgtg                                                                              |
| SUE5366 | cttctgagtttgaactgctgctgggattacacatggcatggatgagctctacaataaatggactcgtctactagcgc<br>agc                      |
| SUE5367 | gcggaattccagctgagcgcggctcgtaccattaccagttggtctgggtcaaaaataatggggctcagagtgccgt<br>aaag                      |
| SUE5368 | aacgaaaggcccagctcttcgactgagccttcgttttatttattgctcagcggggcagcagcctaggttaattaagct<br>gcgctagtagacgagtcctat   |
| SUE5369 | ataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggctttcgtttatctgaaaggaggaactatatccggattgg                                    |
| SUE5504 | agggttttcccagtcacgacggtgtaaaacgacggcagtgaaatccgtaatcatggtcatagtatgttgaactaaaga<br>tctactgtggataactctg     |
| SUE5505 | aggccccgtggccggggactgttggcgccatctccttgcacatgaccattccttgcggcagtatgttgaactaaa<br>gtattaaaaagaagatctatttttag |
| SUE5506 | atgaccatgattacggattcactgg                                                                                 |
| SUE5507 | gccgcaaggaaatgggtgcatg                                                                                    |
| SUE5750 | ggaaaatttttcaaaagtaattgacatccctatcagtgatagatataatgctgcatcctctagaataatttgtttaa<br>cttaagaaggagatat         |
| SUE5828 | atgtctaaaataaaatcactttcgtttggcagcag                                                                       |
| SUE5829 | gacactgctgccaagcgaaagtattttatttagacatggtatctcctcttaaagttaacaaaattattctagag<br>g                           |
| SUE6251 | ttgggacaactccagtgaaaagtctctcctttgctcatggtatctccttctaaagttaacaaaattattctagagg                              |
| SUE6375 | actgataggatgtcaattactttgaaaaaaatfttccctcgatcctctacgccggac                                                 |
| SUE7094 | gtgcgccctaggttatttaaatcctg                                                                                |
| SUE7095 | tgattaattaacctcaggttttaataacctaggccgcacaagaaggagatatacatatgagcactgcaattac                                 |
| SUE7484 | aacgaaaggcccagctcttcgactgagccttcgttttatttattgctcagcgggtggcagc                                             |
| SUE7804 | gacgacaagatgcaagcgcgttcaccgggtcttacagcctggttactcagcag                                                     |
| SUE7807 | atggagcaaaaccgcagtc                                                                                       |
| SUE7995 | gacgacaagatgcaagcgcgttcaccgggtcttacagcctggttactcagcag                                                     |
| SUE7996 | accggtggaacgcgttgcacatctgtcgtcgaccaggtggtcagttcagc                                                        |
| SUE8075 | tggggtcaggtgccgtaaag                                                                                      |
| SUE8641 | gatatagttcctcttcagataaaacgaaaggcccagctcttcgactgagcctttcgttttatttattgctcagcgggtggc                         |

---

|         |                                                                                                   |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
|         | agc                                                                                               |
| SUE8642 | gactgggccttcgtttatctgaaggagggaactatatccgattgg                                                     |
| SUE9054 | aaatTTTgTaaatcagctcattTTTaaaccaataggccgaaatcgcaaaatcccttaagtatgTgtaactaaagatc<br>actgtggataactctg |
| SUE9055 | ctctaateggggctcccttagggTccgatttagTgctTtacggcacctcgacccagacaccatcgaatggcgc<br>aaaac                |

---

## 4.3 結果

### 4.3.1 T7 RNA polymerase を用いた RCR と PURE system の共役

RCR と PURE system の共役系(PURE-RCR)において鋳型となる *oriC* を持つ環状 DNA (*oriC* 環状 DNA)は、RCR を構成するタンパク質を遺伝子としてコードする。この鋳型 DNA を、PURE system、鋳型 DNA に遺伝子としてコードされたタンパク質を除く RCR 酵素 mixture 及びアミノ酸やヌクレオチドなどの基質を含む反応液で、30°C の等温反応を行うことで、PURE system によるタンパク質の生産に依存した鋳型 DNA の増幅が期待される (図 4.2)。ここでは、PURE system として、T7 RNA polymerase (T7 RNAP)が内在する PURExpress (NEB)を用いた。

鋳型 DNA として、T7 プロモーターから転写される *dnaA* 遺伝子を持つ *oriC* 環状 DNA (pOris70AG)を構築した。DnaA は、複製の開始を制御し、鋳型 DNA の増幅を主として導く因子である。DnaA を除く RCR 酵素 mixture を用いて DnaA 生産に依存した鋳型環状 DNA の増幅を検討した結果、目的のスーパーコイル DNA の増幅は見られなかった(図 4.3)。一方で、T7 プロモーターを持たない *oriC* 環状 DNA (pOris70G)を鋳型として、*dnaA* 遺伝子を持つ直鎖状 DNA(T7-*dnaA*-sfGFP 断片)を同時に加えた場合、目的のスーパーコイル DNA の増幅が見られた。このことから、複製と転写の鋳型 DNA が別分子だった場合は、鋳型 DNA の複製が可能であり、同一鋳型 DNA 上で複製と転写が行われる場合は、鋳型 DNA の複製が阻害されることが示された。また、精製された DnaA タンパク質を反応系に加え、T7 プロモーターのみを持つ *oriC* 環状 DNA (pOriT7G: *dnaA* 遺伝子を持たない)を複製の鋳型 DNA として用いた場合では、Tus タンパク質に依存的に目的のスーパーコイル DNA の増幅が阻害された。Tus タンパク質は、鋳型 DNA の *oriC* の両側にある *ter* 配列に結合する。その結果、複製フォークの過剰進行によるコンカテマーDNA の増幅を抑制し、単量体スーパーコイル DNA のみの増幅を可能にする(Hasebe et al., 2018)。一方で、Tus タンパク質を加えなかった場合は、コンカテマーDNA、及び単量体スーパーコイル DNA の増幅が起こる。このことから、Tus タンパク質によるコンカテマーDNA の増幅抑制作用によって、T7 プロモーターを持つ鋳型 DNA の増幅が阻害された可能性が考えられた。このメカニズムとして、Tus タンパク質を加えなかった場合は、複製の鋳型にならないコンカテマーDNA が転写の鋳型として働き、その結果、複製と転写の鋳型 DNA が別分子となったことで、目的のスーパーコイル DNA の増幅が可能であり、一方、Tus タンパク質を加えた場合は、スーパーコイル DNA が複製と転写の両方の鋳型となり、その結果、同一鋳型 DNA 上で複製と転写が行われたため、増幅が阻害されたと考えられた。また、DnaA は精製タンパク質として加えているため、その量が不足している可能性は考えられず、T7 RNAP による転写が複製を阻害していると推測される。その原因として、複製と転写が衝突している可能性を考えた。

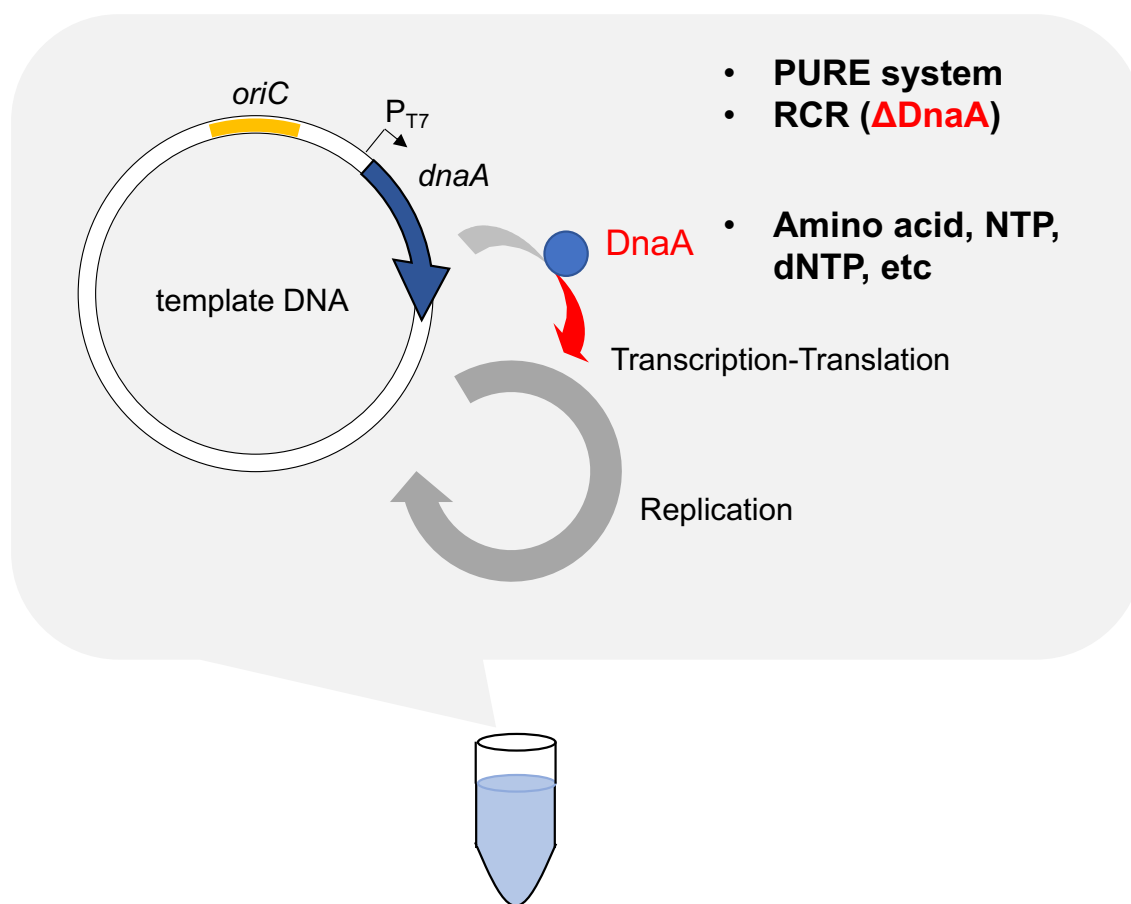


図 4.2 PURE<sup>EcR</sup>-RCR のモデル図。RCR の構成タンパク質である *dnaA* を遺伝子としてコードし、また *oriC* を持つ環状 DNA を鋳型として、*E. coli* RNAP による転写反応とその後の翻訳反応により DnaA が生産する。反応液には DnaA が含まれないため、DnaA の生産に依存して RCR が行われる。



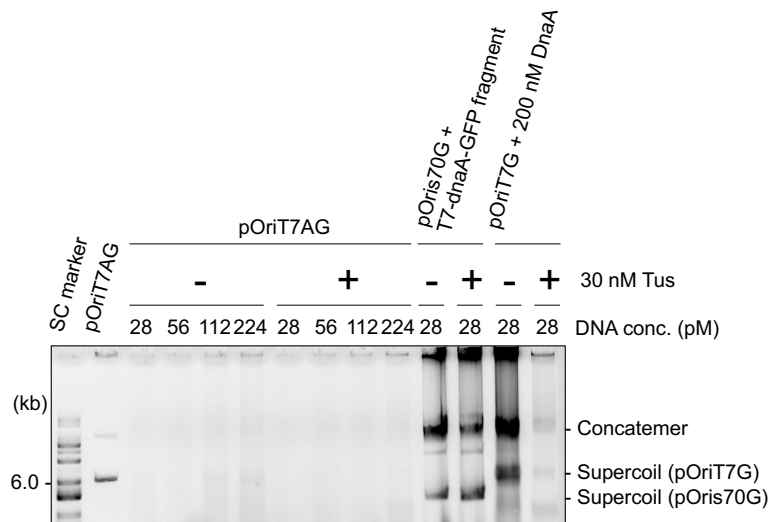


図 4.3 T7 RNA polymerase を用いた RCR と PURE system の共役系。表記の濃度の pOriT7AG、28 pM の pOri70G、または 28 pM の pOriT7G を鋳型 *oriC* 環状 DNA とし、15 mU/μl の *E. coli* RNAP を用いて 30°C で 6 時間の PURE-RCR を行った。pOriT7AG は、T7 プロモーターから転写される *dnaA* 遺伝子と *sfGFP* 遺伝子を持つ。pOri70G は、T7 プロモーターを持たない。pOriT7G は、T7 プロモーターを持つが *dnaA* 遺伝子を持たない。pOri70G と pOriT7G を鋳型として用いた場合は、それぞれ 28 pM の T7-dnaA-sfGFP 断片と 200 nM の DnaA を加えた。T7-dnaA-sfGFP 断片は、T7 プロモーターからの転写される *dnaA* 遺伝子と *sfGFP* 遺伝子を持つ直鎖状 DNA である。SC marker は、スーパーコイル DNA のサイズマーカーである。

#### 4.3.2 大腸菌 RNA polymerase を用いた RCR と PURE system の共役系の構築

T7 プロモーターを用いた RCR と PURE system の共役では、複製と転写の衝突によって鋳型 DNA の増幅が阻害されている可能性が考えられた。これまでに大腸菌においても、複製と転写の衝突が染色体の損傷に関わることが知られている(Merrikh et al., 2012)。一方でその衝突を回避する機構も明らかになっている(Dutta et al., 2011; Tehranchi et al., 2010; Pomerantz and O'Donnell, 2010; Brüning and Mariani, 2021; Boubakri et al., 2006)。そこでこれらの機構を導入するために、大腸菌 RNA polymerase (*E. coli* RNAP)を用いた PURE system と RCR の共役系(PURE<sup>EcR</sup>-RCR)の構築を検討した。

PURE<sup>EcR</sup>-RCR を構築するために、まず、*E. coli* RNAP を用いた PURE system による DnaA の生産を検討した(図 4.4)。鋳型 DNA として、大腸菌シグマ 70 (s70)プロモーターのコンセンサス配列から転写される *dnaA* 遺伝子を持つ直鎖状 DNA(s70-*dnaA*-sfGFP 断片)を用いた。検討の結果、*E. coli* RNAP に依存した DnaA の生産が確認できた。しかしながら、T7 RNAP を用いた場合と比較すると DnaA 生産量は僅かであったことから、その向上のためにまず、転写促進因子である GreAB を検討した。GreAB は、*E. coli* RNAP のバックトラッキング状態を解消させ、転写を促進することが知られている(Laptenko et al., 2003)。GreAB を加えた結果、DnaA 生産量の向上が見られた。この結果は、先行研究を再現するものであった(de Maddalena et al., 2016)。

次に、s70-*dnaA*-sfGFP 断片と *oriC* 断片を用いて s70 コンセンサスプロモーターから転写される *dnaA* 遺伝子を持つ *oriC* 環状 DNA (pOris70AG)を構築し、これを鋳型 DNA として、PURE<sup>EcR</sup>-RCR における DnaA 生産に依存した鋳型 DNA の増幅を検討した(図 4.5)。その結果、*E. coli* RNAP、及び GreAB に依存的な目的の単量体スーパーコイル DNA の増幅が見られた。またこの時、バッファーに含まれるデキストラン濃度を検討したところ、3%以上のデキストランに鋳型 DNA の増幅が依存していることが示された。これまでに、PURE system などの試験管内転写翻訳系では、クラウディング効果によってタンパク質生産が促進されることが報告されている(Li et al., 2014; Vibhute et al., 2020)。このことから、グルコースのポリマーであるデキストランがクラウディング分子として働き、DnaA 生産量が向上した可能性が考えられた。一方で RCR については、ポリエチレングリコール(PEG)などのポリマーが鋳型 DNA の増幅を阻害することが知られていた(高橋, 2016)。そこで、デキストランが RCR における鋳型 DNA の増幅に与える影響を調べた(図 4.6)。ここでは、s70 コンセンサスプロモーターから転写される *sfGFP* 遺伝子を持つ *oriC* 環状 DNA (pOris70G)を鋳型 DNA とし、DnaA は精製タンパク質として加えた。その結果、3%以上のデキストランを加えた場合に、目的のスーパーコイル DNA の増幅が阻害された。またこの時、*E. coli* RNAP を反応液に加えたところ、5%のデキストランを用いた場合に、鋳型 DNA の増幅が見られなかった。このことから、高濃度のデキストランを加えた条件では、*E. coli* RNAP による転写が複製を阻害する可能性が示唆された。一方で、*E. coli* RNAP と GreAB

を同時に反応液に加えた場合、高濃度のデキストラン条件でも鋳型 DNA の増幅が見られたことから、GreAB による転写促進作用が転写による増幅阻害を解消する可能性が示唆された。さらに、*E. coli* RNAP と GreAB を加えた条件をデキストランのみの条件と比較すると、鋳型 DNA の増幅量が増加した。このことから、クラウディング条件での RCR では、転写によって鋳型 DNA の複製が促進される可能性が考えられた。これまでに、ポリビニルアルコール(PVA)を用いた大腸菌の DNA 複製再構成系では、RNA polymerase が必要であることが報告されていた(Kaguni and Kornberg, 1984)。また、*oriC* 近傍の転写が *oriC* にトポロジカルな影響を与え、複製開始を促進することも知られていることから(Baker and Kornberg, 1988)、s70 コンセンサスプロモーターからの転写が複製開始を促進したと考えられた。以上のことから、DnaA 生産に依存した PURE<sup>EcR</sup>-RCR では、デキストランによって複製阻害が起こるが、転写によってその阻害は打ち消され、さらにはクラウディング効果による DnaA 生産量の向上が結果的に鋳型 DNA の増幅を可能にしたと考えられる。

DnaA を遺伝子として供給する PURE<sup>EcR</sup>-RCR における転写反応及び翻訳反応の依存性を確認するために、転写阻害剤であるリファンピシン、または翻訳阻害剤であるピューロマイシンを PURE<sup>EcR</sup>-RCR に加えたところ、目的のスーパーコイル DNA の増幅が見られなかった(図 4.7)。これらの結果から、PURE<sup>EcR</sup>-RCR における鋳型 DNA の増幅は、*E. coli* RNAP による転写と、翻訳によるタンパク質合成に依存することが示された。

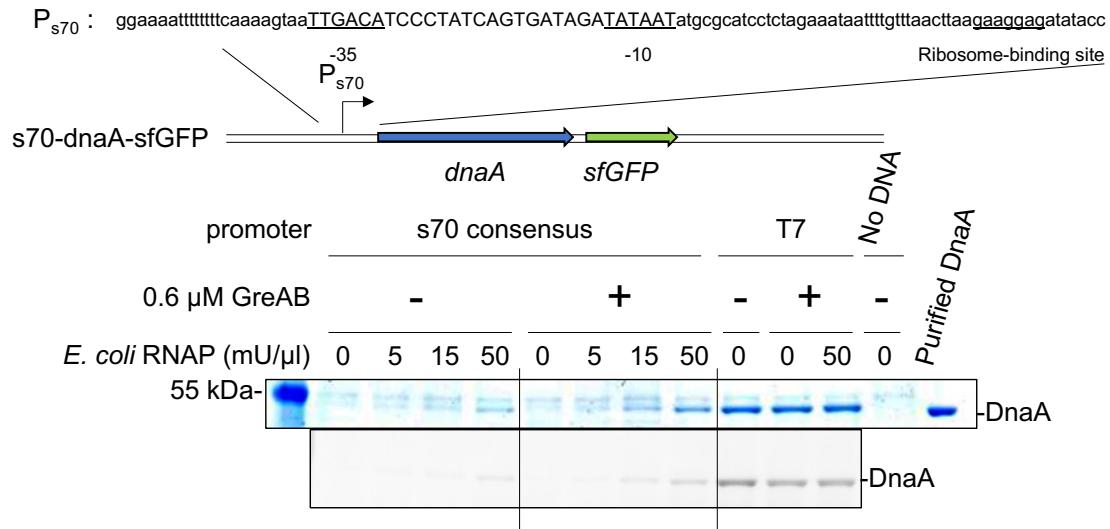


図 4.4  $s70$  プロモーターのコンセンサス配列と PURE system による *dnaA* (53 kDa) の発現。 $P_{s70}$  は、 $s70$  コンセンサスプロモーターを含むプロモーター領域である。大文字は、 $s70$  プロモーターのコンセンサス配列を示す。表記の濃度の *E. coli* RNA polymerase (*E. coli* RNAP) を含むタンパク質合成反応液に、0.9 nM の  $s70$ -*dnaA*-sfGFP 断片、もしくは T7-*dnaA*-sfGFP 断片を加えて、タンパク質合成反応を行った。No DNA は、鋳型 DNA を加えなかった。CBB 染色及び FluoroTect™ Green Lys による蛍光を検出した。 $s70$  コンセンサスプロモーターは、de Maddalena (2016) を参考にした。

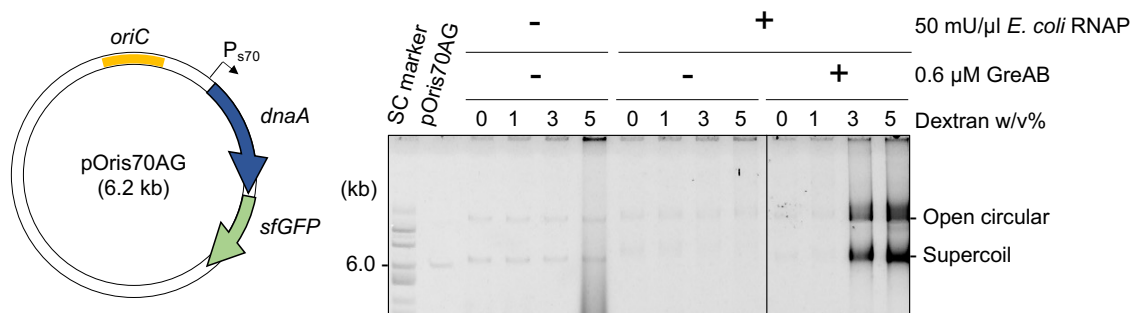


図 4.5 PURE<sup>EcR</sup>-RCR による pOris70AG の増幅。56 pM の pOris70AG(左)を鋳型 DNA とし、30 °C で 10 時間の PURE<sup>EcR</sup>-RCR を行った。表記の濃度のデキストランを加えた。

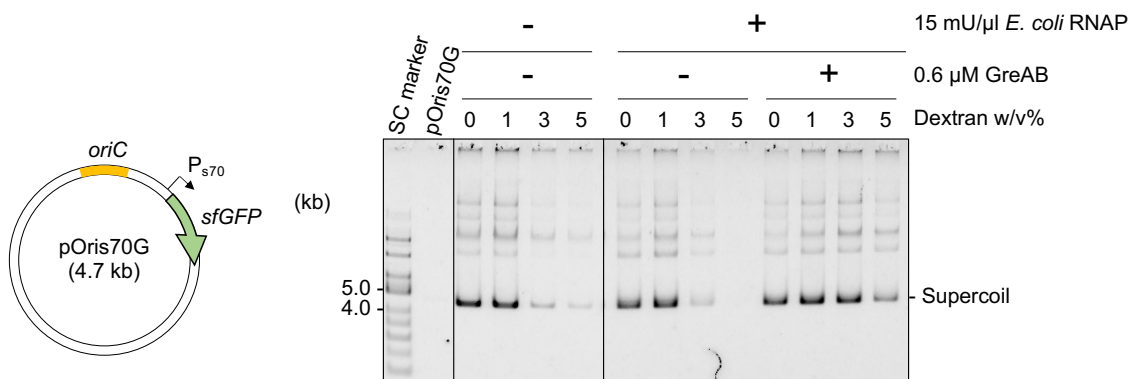


図 4.6 RCR 増幅に対するデキストランの影響。28 pM の pOris70G (左)を鋳型 DNA とし、30°C で 3 時間の RCR(第二章、第三章参考)を行った。表記の濃度のデキストランを加えた。

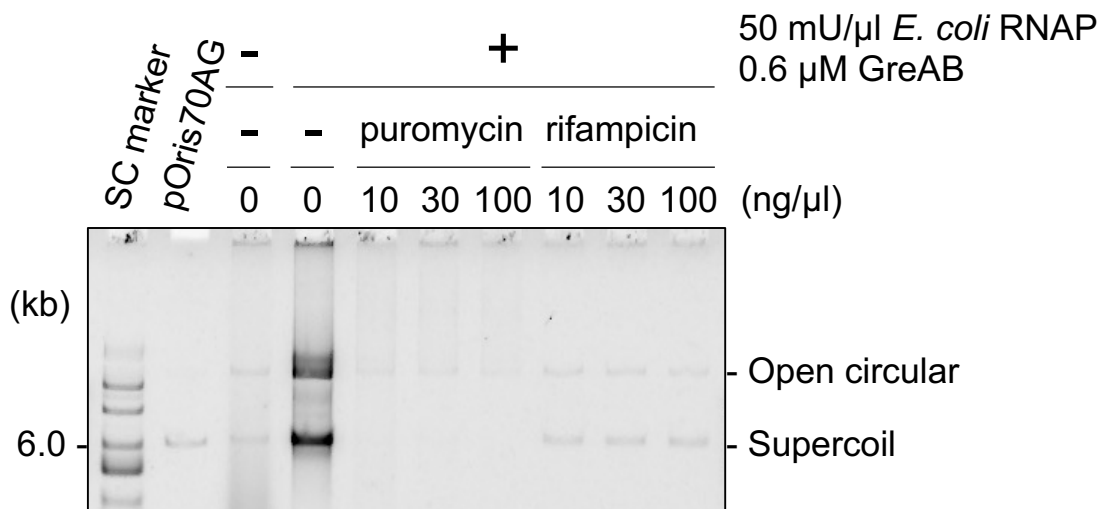


図 4.7 PURE<sup>EcR</sup>-RCR における転写・翻訳の依存性。56 pM の pOris70AG を鋳型 DNA とし、30°C で 10 時間の PURE<sup>EcR</sup>-RCR を行った。表記の濃度のピューロマイシン、もしくはリファンピシンを加えた。

#### 4.3.3 PURE<sup>EcR</sup>-RCR における DNA 増幅効率

PURE<sup>EcR</sup>-RCR において、どのぐらい低濃度の鋳型環状 DNA を増幅できるか検討した。その結果、GreAB を加えなかった場合、112 pM の鋳型 DNA を増幅することが可能であった(図 4.8)。GreAB を加えることで、より低濃度(56 pM)の鋳型 DNA を増幅することが可能であった。反応の時間に対する DNA 増幅量を見るために、qPCR 定量法を用いて鋳型 DNA の増幅倍率を測定した(図 4.9)。その結果、56 pM の鋳型 DNA を用いた場合は、10 時間の反応で 200 倍程度に鋳型 DNA が増幅することがわかった。また、56 pM の鋳型 DNA は、反応時間を長くすることで GreAB を加えずとも増幅できることがわかった。さらに低濃度(28 pM)の DNA では、長時間反応を行った場合でも、鋳型 DNA の増幅が GreAB に依存していた。これらの結果から、鋳型 DNA 量が少ない時ほど、GreAB による転写促進作用が重要であることがわかった。また、PURE<sup>EcR</sup>-RCR における *E. coli* RNAP の濃度を検討した。その結果、15 mU/μl の *E. coli* RNAP を用いた場合に、目的のスーパーコイル DNA の増幅量が最も多く、50 mU/μl の *E. coli* RNAP を用いた場合は、増幅量が僅かに減少した(図 4.10、4.13b)。このことから、PURE<sup>EcR</sup>-RCR における最適な *E. coli* RNAP 濃度は、15 mU/μl であり、高濃度の *E. coli* RNAP (50 mU/μl)による過剰な転写は鋳型 DNA の増幅を阻害する可能性が考えられた。

DNA の自己複製システムにおいては、複製された DNA が転写鋳型としての機能を維持したまま複製が繰り返されるという複製の再起性が必要である。そこで、PURE<sup>EcR</sup>-RCR による増幅産物を鋳型 DNA として、再度 PURE<sup>EcR</sup>-RCR を行い、PURE<sup>EcR</sup>-RCR の再起性を検討した。56 pM の鋳型 DNA を用いて、10 時間の PURE<sup>EcR</sup>-RCR を行った後、その産物を 1/200 になるように希釈し、再度 PURE<sup>EcR</sup>-RCR にかけてところ、同様に目的のスーパーコイル DNA の増幅産物が得られた(図 4.11)。この結果から、PURE<sup>EcR</sup>-RCR では鋳型 DNA の機能を保ったまま再起的な複製サイクルが可能であることがわかった。

また、DNA の自己複製においては他にも、鋳型 DNA から発現したタンパク質が、自身の鋳型となった DNA 分子を複製するという表現型と遺伝型の対応が必要ある。そこで、油中水滴エマルジョンを用いて反応液を区画化し、発現したタンパク質が拡散しない条件で PURE<sup>EcR</sup>-RCR を行った(図 4.12)。その結果、高濃度の鋳型 DNA を用いた場合は、目的のスーパーコイル DNA の増幅は見られたが、低濃度(56 pM)の鋳型 DNA を用いた場合は、目的のスーパーコイル DNA の増幅は見られなかった。PURE<sup>EcR</sup>-RCR 後、エマルジョン内の DNA を Bobo-3 iodide により染色し、顕微鏡を用いて観察したところ、DNA の蛍光が検出されないエマルジョンが見られたことから、鋳型 DNA の増幅が起こっていないエマルジョンがあることが明らかになった(図 4.12c)。この原因として、エマルジョン内に均等に鋳型 DNA が封入されず、DNA 分子数が相対的に少ないエマルジョンでは鋳型 DNA が複製されない可能性が考えられた。また、エマルジョンを用いなかった場合には 56 pM の鋳型 DNA の増幅が見られたことから、エマルジョンによってそれぞれの反応区画毎に数分子の

鋳型 DNA を封入した場合は、僅かな量の DNA 分子を鋳型として複製と転写が起こることで、同一鋳型 DNA 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が考えられた。

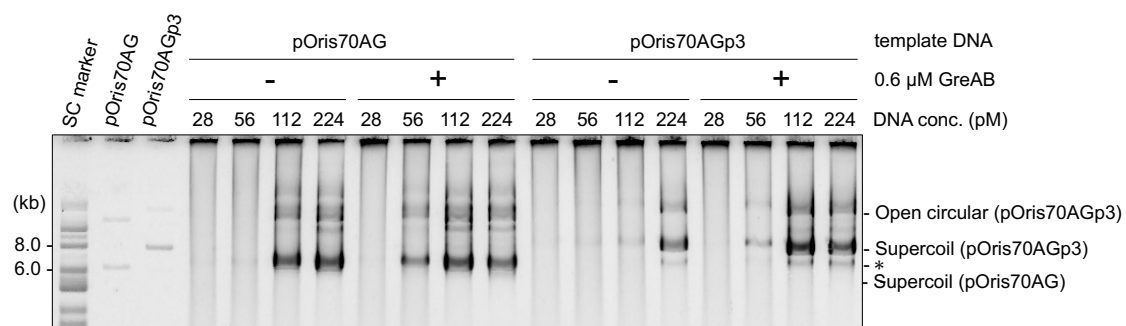
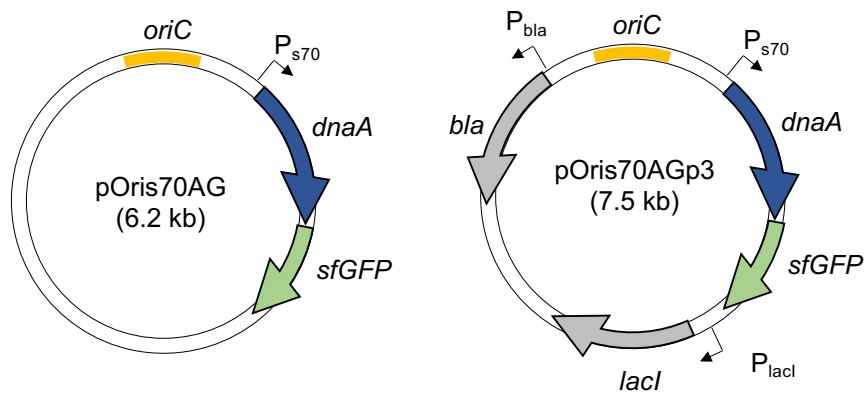


図 4.8 PURE<sup>EcR</sup>-RCR における鋳型 DNA 濃度の検討。表記の濃度の pOris70AG (上左)、または pOris70AGp3 (上右)を鋳型 DNA とし、15 mU/μl の *E. coli* RNAP を用いて 30 °C で 6 時間の PURE<sup>EcR</sup>-RCR を行った。アスタリスク(\*)は、pOris70AGp3 に含まれるコンタミネーションした DNA が由来した増幅産物である。スメア状に見える産物は、反応液に含まれる RNA である。



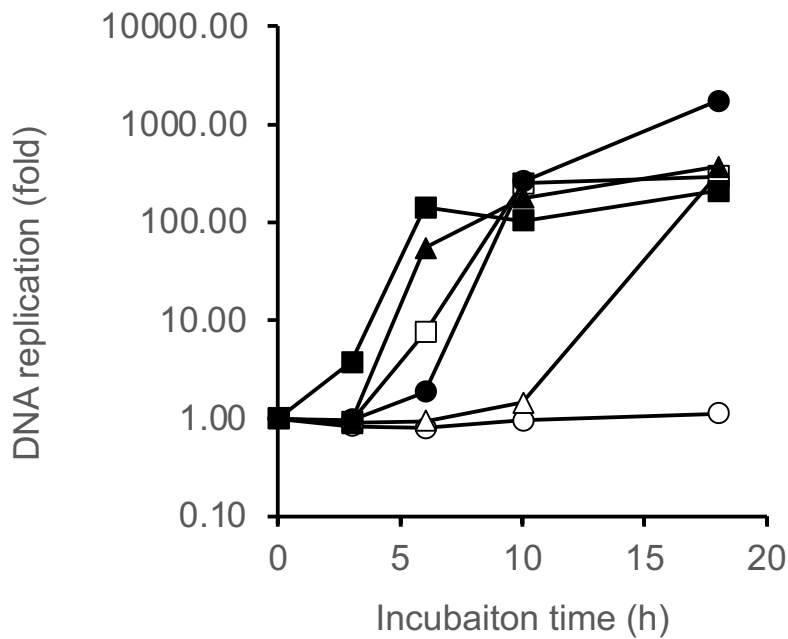


図 4.9 PURE<sup>EcR</sup>-RCR における反応時間の検討。28 pM (○)、56 pM (△)及び 112 pM (□)の pOris70AG を鋳型 DNA とし、15 mU/μl の *E. coli* RNAP を用いて 30°C で PURE<sup>EcR</sup>-RCR を行った。反応前と反応後に、qPCR 定量法により pOris70AG 量を測定し、反応前の値に対する反応後の値を DNA replication とした。白抜きは、0.6 μM の GreAB を反応液に加えなかった場合を示し、黒塗りは、GreAB を加えた場合を示す。

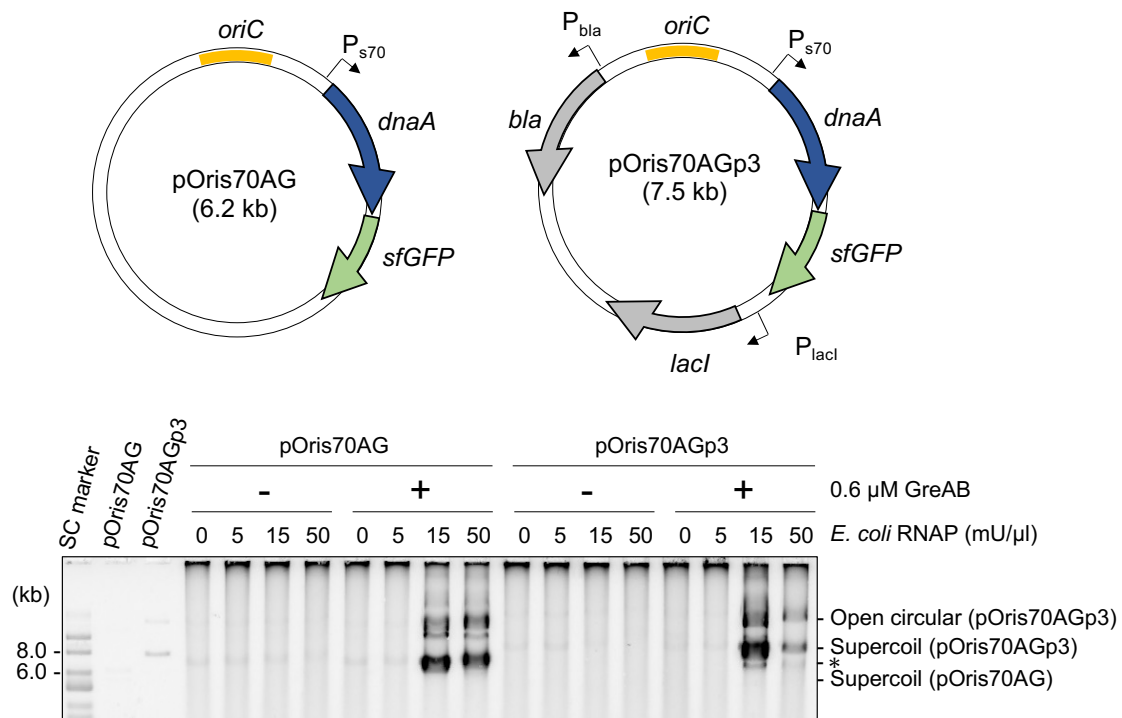


図 4.10 PURE<sup>EcR</sup>-RCR における *E. coli* RNAP 濃度の検討。56 pM の pOris70AG (上左)、または pOris70AGp3 (上右) を鋳型 DNA とし、表記の濃度の *E. coli* RNAP を用いて 30°C で 10 時間の PURE<sup>EcR</sup>-RCR を行った。アスタリスク(\*)は、pOris70AGp3 に含まれるコンタミネーションした DNA が由来した増幅産物である。スメア状に見える産物は、反応液に含まれる RNA である。

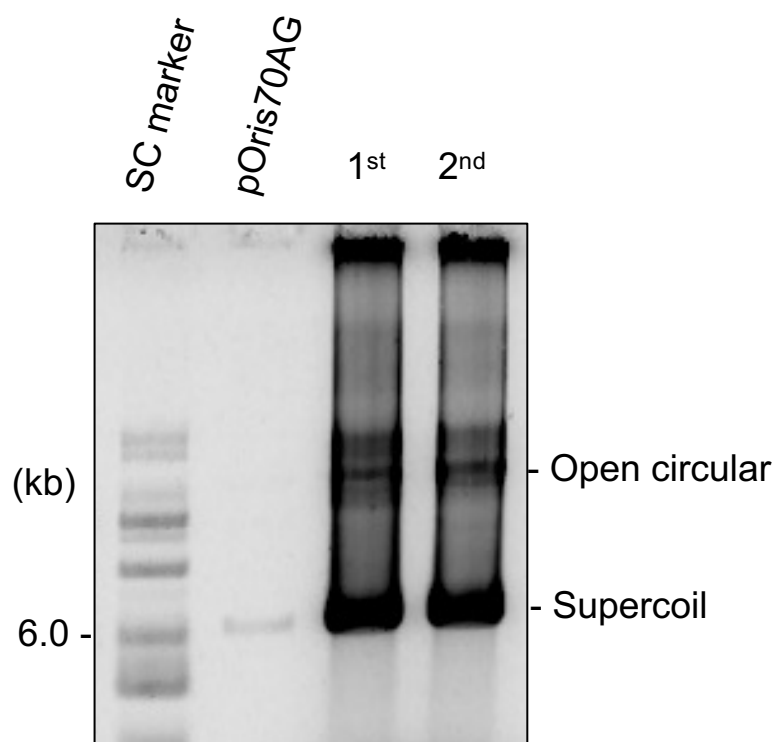


図 4.11 PURE<sup>EcR</sup>-RCR における鋳型 DNA の再起的な増幅。56 pM の pOris70AG を鋳型 DNA とし、30°C で 10 時間の PURE<sup>EcR</sup>-RCR を行った(1<sup>st</sup>)。その増幅産物が 1/200 倍希釈されるように PURE<sup>EcR</sup>-RCR に加え、再度 30°C で 10 時間の PURE<sup>EcR</sup>-RCR を行った(2<sup>nd</sup>)。いずれの PURE<sup>EcR</sup>-RCR においても 15 mU/μl の *E. coli* RNAP、及び 0.6 μM の GreAB を用いた。

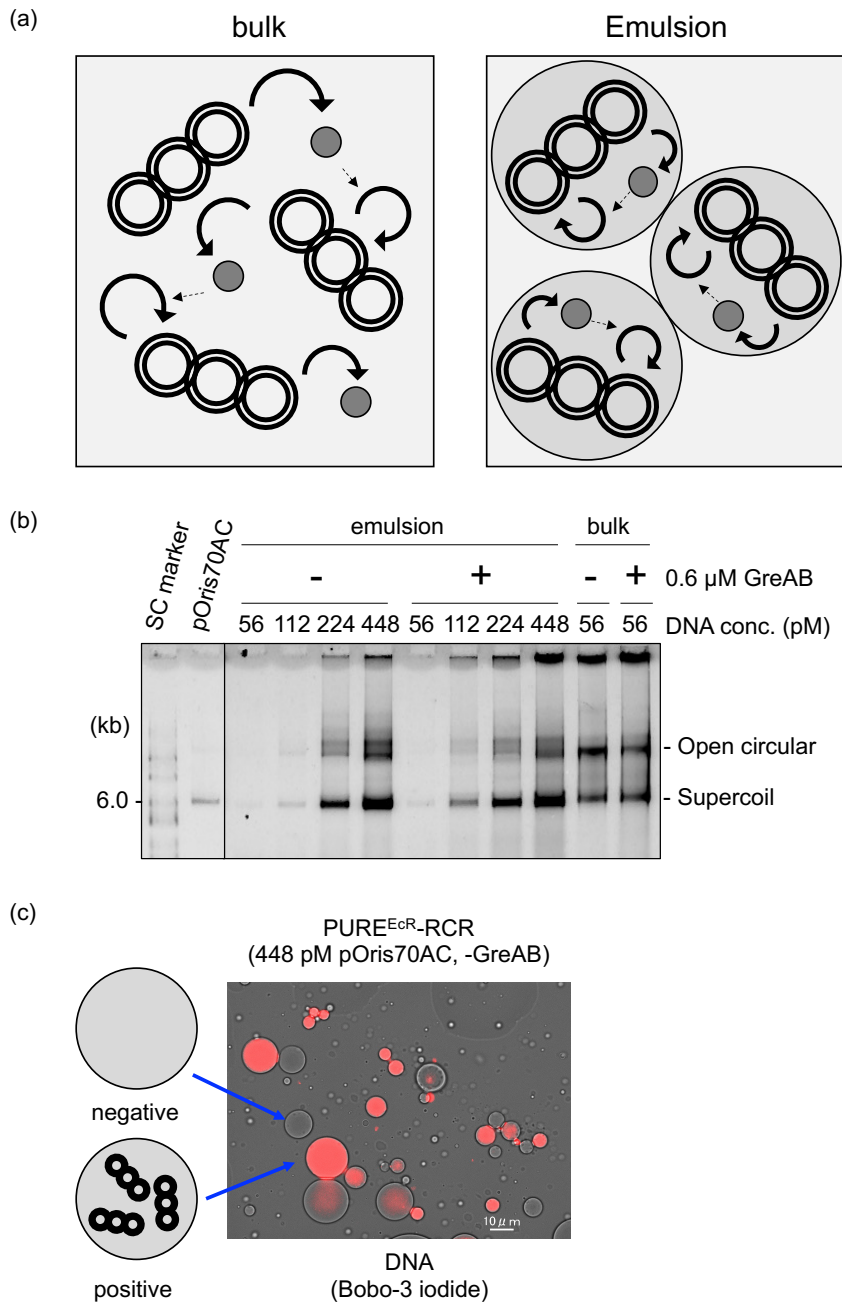


図 4.12 エマルジョンを用いた PURE<sup>EcR</sup>-RCR。(a)エマルジョン内での PURE<sup>EcR</sup>-RCR のモデル図。Bulk は、エマルジョンを用いなかった場合を示す。(b)表記の濃度の pOris70AC を鋳型 DNA とし、15 mU/ $\mu$ l の *E. coli* RNAP を用いて 30°C で 18 時間の PURE<sup>EcR</sup>-RCR を行った。pOris70AC は、*oriC* 及び *s70* プロモーターから転写される *dnaA* と CFP 遺伝子を持つ環状 DNA である。(c)エマルジョンを用いた PURE<sup>EcR</sup>-RCR 産物の顕微鏡写真。赤は、Bobo-3 iodide によって染色された DNA を示す。

#### 4.3.4 PURE<sup>EcR</sup>-RCR におけるターミネーター配列の効果

pOis70AG は、*sfGFP* 遺伝子の下流にターミネーター配列を持たないため、非翻訳領域の転写が過剰に起こっている可能性が考えられた。そこで、*sfGFP* 遺伝子の下流に大腸菌リボソーム RNA オペロン *rrnB* の T1 ターミネーターを導入した鋳型 *oriC* 環状 DNA (pOris70AGter)を構築し、PURE<sup>EcR</sup>-RCR を行った(図 4.13a)。その結果、56 pM の鋳型 DNA を用いた場合に、pOris70AG の増幅(図 4.8)と比べると増幅量の上昇が見られた。一方で、*E. coli* RNAP の濃度を検討したところ、pOris70AGter の増幅は pOris70AG の場合と比べると大きな違いは見られなかった(図 4.13b)。これらのことから、ターミネーター配列の効果は、*E. coli* RNAP のターンオーバーを早くすることであり、*dnaA* 遺伝子の発現速度の上昇に伴って、鋳型 DNA の増幅速度の上昇が起こったと考えられる。

#### 4.3.5 PURE<sup>EcR</sup>-RCR におけるプロモーター数の影響

高濃度の *E. coli* RNAP を用いた PURE<sup>EcR</sup>-RCR では、鋳型 DNA の増幅量が僅かに減少したことから、*E. coli* RNAP による転写が過剰である場合に、DNA 増幅が阻害される可能性が考えられた(図 4.10、4.13b)。そこで、*dnaA* 遺伝子を転写する *s70* プロモーターの他に 2 つのプロモーターを持つ *oriC* 環状 DNA (pOris70AGp3)を構築し、これを鋳型としてプロモーター数による影響を検討したところ、112 pM の鋳型 DNA の増幅が阻害された(図 4.8)。このことは、プロモーター数が増えたことによる鋳型 DNA あたりの転写量の増加によって、DNA 増幅が阻害されたことを示している。一方で、GreAB を加えた場合、112 pM の鋳型 DNA が増幅できたことから(図 4.8)、GreAB によって転写による複製阻害が解消されたことが示唆された。大腸菌内においても同様に、複製と転写が衝突し、複製フォークの進行を阻害することが知られており(Merrikh et al., 2012)、リボソーム RNA オペロンなどの転写量が多い遺伝子上で顕著に見られている(Srivatsan et al., 2010; Boubakri et al., 2006)。また、衝突の原因として、*E. coli* RNAP がバックトラックし、DNA と安定な複合体としてその場で停滞することも知られており(Nudler, 2012)、GreAB のバックトラック状態を解消させる働きが、この衝突の回避にも効いていると考えられている(Dutta et al., 2011)。PURE<sup>EcR</sup>-RCR において見られた転写による複製の阻害と、GreAB によるその解消は大腸菌内での現象を再現するものである。しかしながら、GreAB を加えた場合においても、56 pM の鋳型 DNA ではその増幅量が減少していた。また、*E. coli* RNAP 濃度を検討したところ、50 mU/μl の *E. coli* RNAP を用いた場合では、鋳型 DNA の増幅量の減少が見られた(図 4.10)。これらのことから、GreAB による複製と転写の阻害の解消は部分的であると考えられる。

また、大腸菌内では、GreAB の他に、DNA helicase である UvrD や Rep が転写と複製の衝突の解消に働いていることが知られている(Guy et al., 2009; Brüning and Marians, 2021;

Boubakri et al., 2006)。そこで、PURE<sup>EcR</sup>-RCR における UvrD 及び Rep の効果を検討した。pOris70AGp3 を鋳型として、高濃度の *E. coli* RNAP 用いた PURE<sup>EcR</sup>-RCR に、UvrD、または Rep を加えたところ、いずれのタンパク質を加えた場合でも目的のスーパーコイル DNA の増幅が促進された(図 4.14)。このことから、UvrD 及び Rep においても、大腸菌内の現象を再現する結果が示された。Rep では、加える量が多くなるほど、増幅促進の効果が見られなくなった。

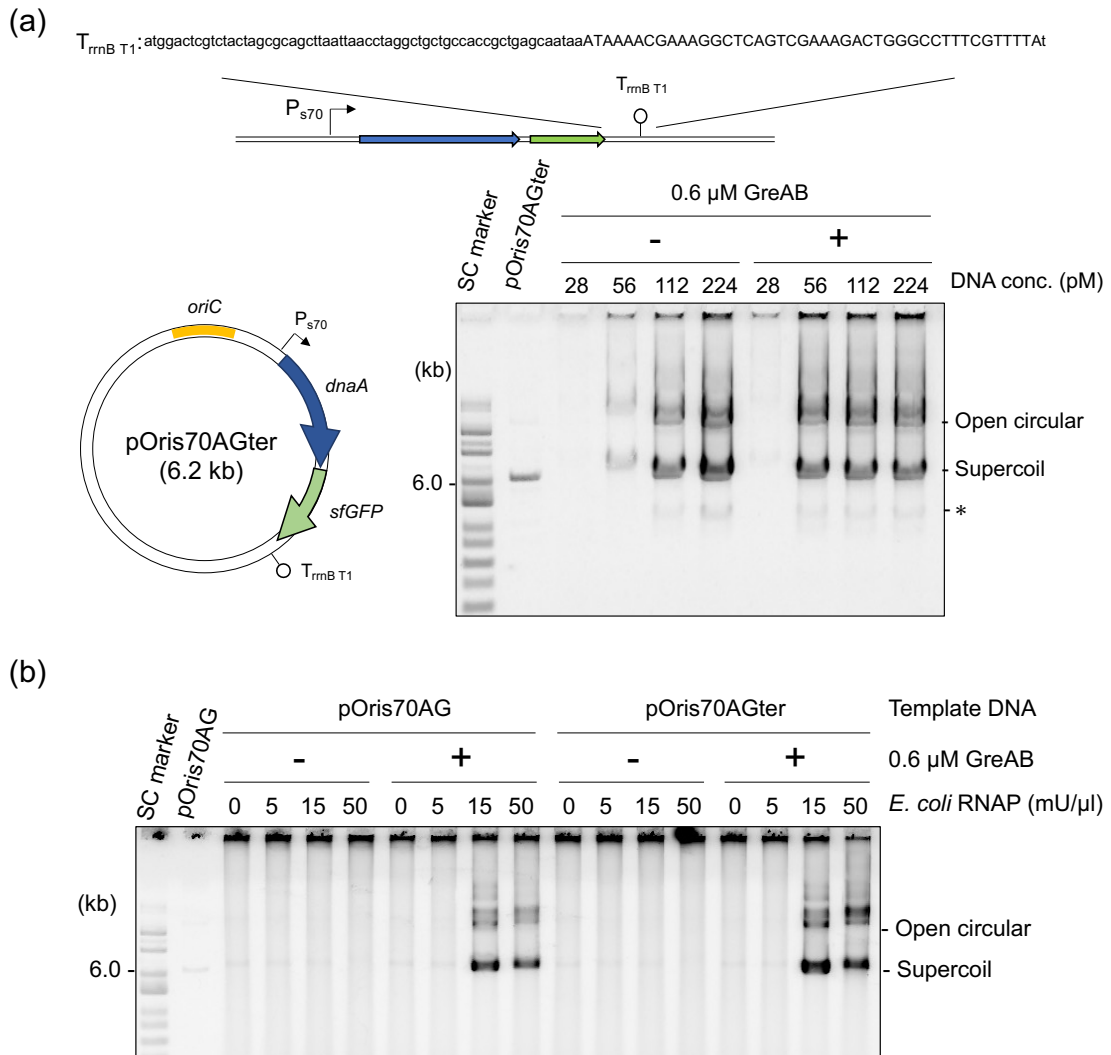


図 4.13 PURE<sup>EcR</sup>-RCR におけるターミネーター配列の検討。(a)  $T_{rrnB T1}$  は、*rrnB T1* ターミネーターを含む終始コドンより下流の領域である。大文字は、*rrnB T1* ターミネーター配列を示す。表記の濃度の pOris70AGter (左) を鋳型 DNA とし、15 mU/μl の *E. coli* RNAP を用いて 30°C で 6 時間の PURE<sup>EcR</sup>-RCR を行った。アスタリスク(\*)は、pOris70AGter に含まれるコンタミネーションした DNA が由来した増幅産物である。(b) 56 pM の pOris70AG、または pOris70AGter を鋳型 DNA とし、表記の濃度の *E. coli* RNAP を用いて 30°C で 10 時間の PURE<sup>EcR</sup>-RCR を行った。スメア状に見える産物は、反応液に含まれる RNA である。





#### 4.3.6 RCR と PURE system の共役系における *E. coli* RNAP の効果

PURE<sup>EcR</sup>-RCR では、*E. coli* RNAP による転写が RCR 増幅を阻害している可能性が示唆された。また、GreAB や、UvrD、Rep によって鋳型 DNA の増幅が促進された。そこでまず、転写翻訳反応を行うが生産されたタンパク質に鋳型 DNA の増幅が依存しない PURE<sup>EcR</sup>-RCR を行い、*E. coli* RNAP の転写が鋳型 DNA の増幅を阻害するかを調べた。鋳型 DNA として、s70 コンセンサスプロモーターから転写される *sfGFP* 遺伝子をコードする *oriC* 環状 DNA (pOris70G) を用いた。pOris70G を、PURE system、26 種全ての含む RCR 酵素 mixture 及びアミノ酸やヌクレオチドなどの基質を含む反応液に加え、30°C で 4 時間の RCR を行った(図 4.15)。この反応に、*E. coli* RNAP を加えたところ、高濃度(50 mU/μl)の *E. coli* RNAP を加えた場合、目的のスーパーコイル DNA の増幅が阻害された(図 4.16)。また、リファンピシンを加えた場合、DNA 増幅の阻害が起こらなかったことから、*E. coli* RNAP による転写が RCR 増幅を阻害することが明らかになった。鋳型 DNA として、プロモーターを 3 つ持つ環状 DNA (pOris70Gp3) を用いた場合でも、同様の結果が得られた。

次に、GreAB や、UvrD、Rep による PURE<sup>EcR</sup>-RCR の促進効果の要因が、*E. coli* RNAP の転写による増幅阻害の解消であるかを調べた。図 4.16 の反応にさらに、GreAB に加えたところ、予想に反して増幅阻害の解消は顕著に見られなかった。一方で、s70 コンセンサスプロモーターから転写される *sfGFP* 遺伝子を持つ別の *oriC* 環状 DNA (pUP\_GFP) を用いた場合、*E. coli* RNAP によって阻害された RCR 増幅が、GreAB によって促進される様子が見られた(図 4.17)。このことから、PURE<sup>EcR</sup>-RCR において、GreAB が複製と転写の衝突の解消に効いていると考えられる。

pOris70Gp3 を用いて、転写による増幅阻害に対する UvrD 及び Rep の効果を検討した(図 4.18)。その結果、UvrD 及び Rep のいずれのタンパク質を加えた場合においても、*E. coli* RNAP による増幅阻害の解消が見られた。Rep では、図 4.14 と同様に加える量が多くなるほど、増幅阻害の解消の効果は見られなくなった。

転写による複製の阻害は、転写反応と複製フォークの物理的な衝突だけでなく、転写産物である mRNA が鋳型 DNA とハイブリダイズすることによっても起こることが知られている(Gan et al., 2011)。この阻害は、RNaseH が mRNA を分解することによって解消される(Drolet et al., 1995, Brüning and Marians, 2021)。PURE<sup>EcR</sup>-RCR には、RNA プライマーを分解するために RNaseH が含まれているが、RCR 増幅には必須ではない(長谷部, 2019)。そこで、*E. coli* RNAP を加えて RCR を行った場合に、RNaseH が必須になるか検討した。その結果、目的のスーパーコイル DNA の増幅が、*E. coli* RNAP を加えなかった場合は、RNaseH の濃度に依存しなかったのに対して、*E. coli* RNAP の加えた場合は、その濃度の上昇に伴って RNaseH に対する依存性が強くなった(図 4.19)。

これらの結果から、RCR と PURE system の共役には、複製と転写の衝突解消システムといたった転写と複製を協調的に進行するためのシステムが重要であると言える。

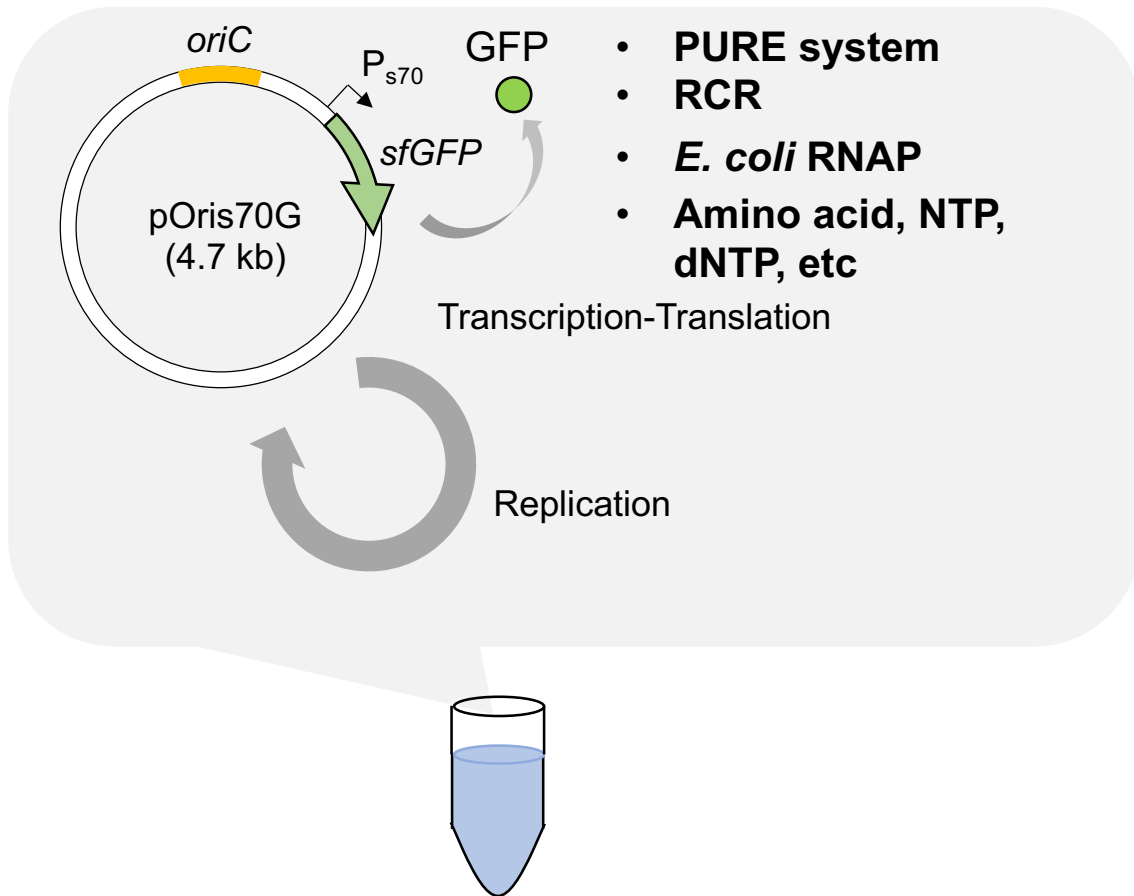


図 4.15 生産されたタンパク質に依存しない PURE<sup>EcR</sup>-RCR のモデル図。鋳型として、s70 コンセンサスプロモーターから転写される *sfGFP* 遺伝子をコードし、また *oriC* を持つ環状 DNA を用いた。反応液には、RCR を構成する 26 種全てのタンパク質が含まれるため、生産されたタンパク質に依存しない DNA 増幅が起こる。

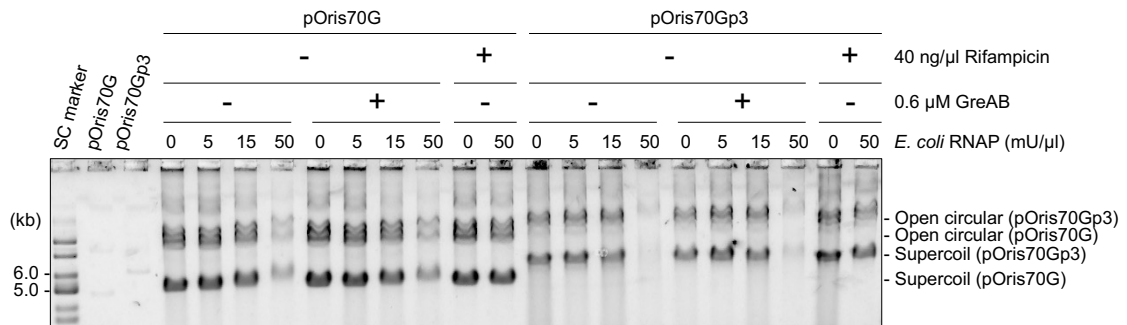
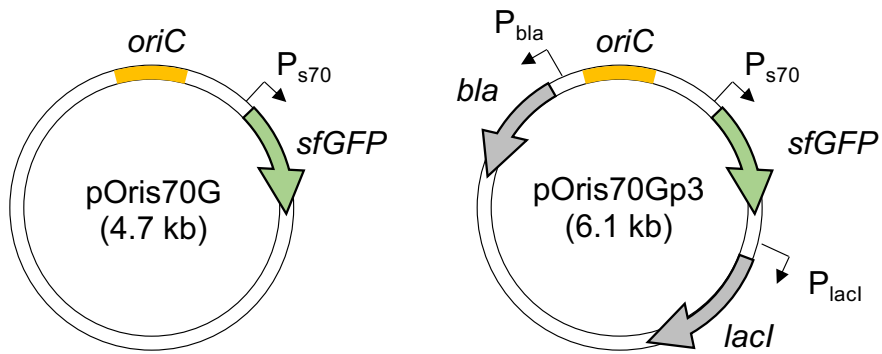


図 4.16 RCR と PURE system の共役系における *E. coli* RNAP の効果。56 pM の pOris70G (上左)、または 56 pM の pOris70Gp3 (上右) を鋳型 DNA とし、表記の濃度の *E. coli* RNAP を加えて 30 °C で 4 時間の PURE<sup>EcR</sup>-RCR を行った。反応液には、RCR を構成する 26 種全てのタンパク質を用いた。

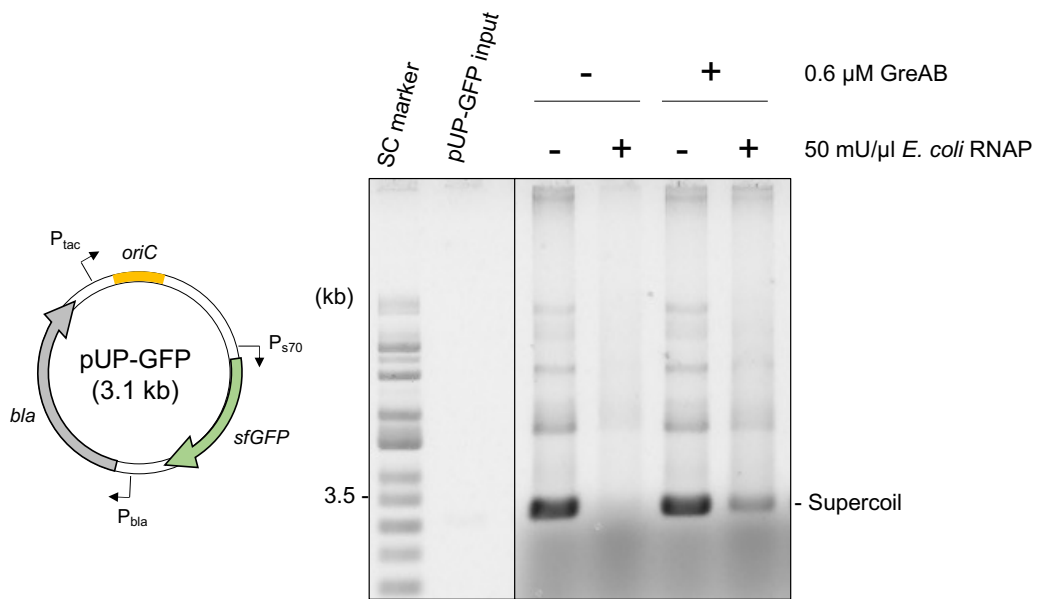


図 4.17 RCR と PURE system の共役系における *E. coli* RNAP の効果。56 pM の pUP-GFP (左, PD 角) を鋳型 DNA とし、30°C で 4 時間の PURE<sup>EcR</sup>-RCR を行った。反応液には、RCR を構成する 26 種全てのタンパク質を用いた。pUP-GFP input は、反応前の pUP-GFP を示す。

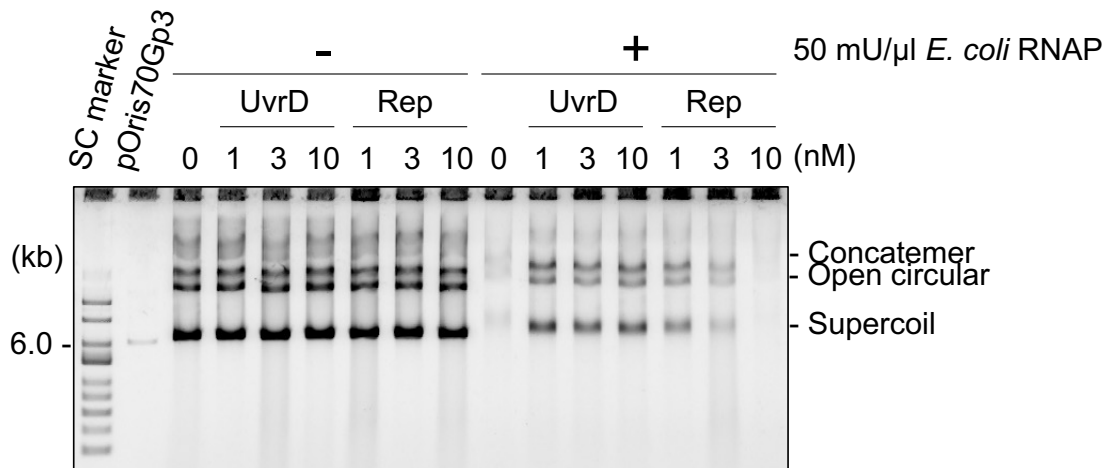


図 4.18 RCR と PURE system の共役系における UvrD 及び Rep の効果。56 pM の pOris70Gp3 を鋳型 DNA とし、30°C で 4 時間の PURE<sup>EcR</sup>-RCR を行った。反応液には、RCR を構成する 26 種全てのタンパク質を用いた。また、表記の濃度の UvrD、または Rep を加えた。

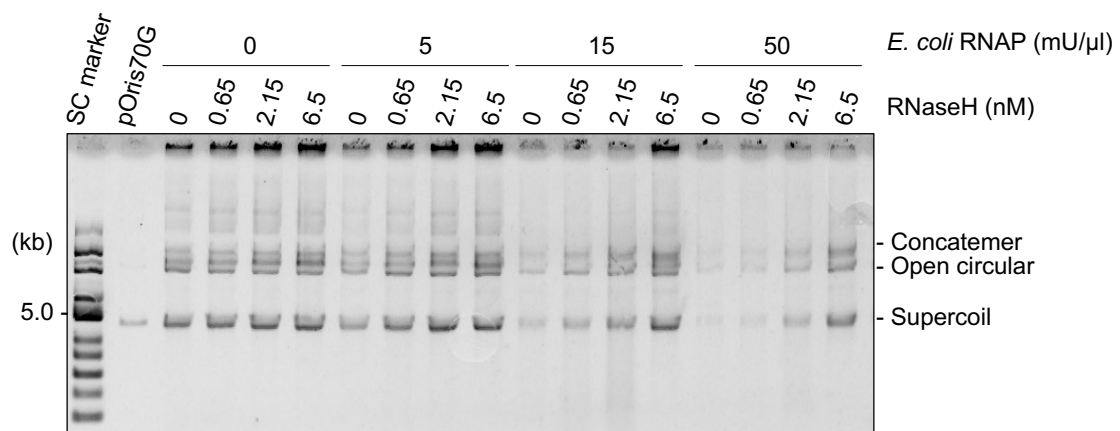


図 4.19 RCR と PURE system の共役系における RNaseH 依存性。56 pM の pOris70G を鋳型 DNA とし、表記の濃度の *E. coli* RNAP を加えて 30 °C で 4 時間の PURE<sup>EcR</sup>-RCR を行った。反応液には、RCR を構成する 26 種全てのタンパク質を用いた。また、RNaseH は、表記の濃度で用いた。

#### 4.3.7 DNA polymerase III の生産に依存した PURE<sup>EcR</sup>-RCR

DNA polymerase III (Pol III)の遺伝子を持つ *oriC* 環状 DNA を鋳型として、Pol III を含まない RCR 酵素 mixture を用いた PURE<sup>EcR</sup>-RCR が可能か検討した。DNA polymerase III holoenzyme は、DnaE、DnaQ 及び HolE からなるコア部位、HolA、HolB、HolC、HolD 及び DnaX からなるクランプローダー部位、そしてクランプである DnaN から構成される (Fijalkowska et al., 2012)。ここでは、s70 コンセンサスプロモーターの下流にコア部位とクランプローダー部位からなる DNA polymerase III\* (Pol III\*)の遺伝子(*dnaE*、*dnaQ*、*holE*、*holA*、*holB*、*holC*、*holD*、*dnaX*)を持つ鋳型 *oriC* 環状 DNA (pEToris70polIII\*)を構築した(図 4.20)。pEToris70polIII\*は、s70 コンセンサスプロモーターの他に、2つのプロモーターを持つ。pEToris70polIII\*を鋳型 DNA として、PURE<sup>EcR</sup>-RCR を行ったところ、僅かに増幅産物が見られた(図 4.20)。さらに、UvrD や Rep を加えたところ、増幅産物が増加した。しかしながら、目的のスーパーコイル DNA 以外の増幅産物が主であった。このことから、鋳型 DNA から Pol III\*の生産は起こっているが、RCR 増幅において最適な生産量でないため、目的のスーパーコイル DNA を特異的に増幅することができなかったと考えられる。

UvrD helicase は、*E. coli* RNAP と直接結合することが知られていることから(Epshtein et al., 2014)、UvrD による鋳型 DNA の増幅促進が *E. coli* RNAP に依存しているかを検討した。そのため、s70 コンセンサスプロモーターの代わりに T7 プロモーターを持つ鋳型 *oriC* 環状 DNA (pEToriT7polIII\*)を構築し、PURE<sup>EcR</sup>-RCR を行った。その結果まず、Tus を含まない反応条件では、目的のスーパーコイル DNA らしき増幅産物が見られたが、Tus を含む反応条件では、分子量の小さな DNA の増幅が見られ、目的のスーパーコイル DNA らしき増幅産物が減少した。そして、pEToriT7polIII\*を鋳型 DNA とした場合は、pEToris70polIII\*を鋳型 DNA とした場合と異なり、UvrD helicase による DNA 増幅に対する促進的な効果は見られなかった。このことから、UvrD helicase の転写と複製の衝突を解消する働きは、*E. coli* RNAP との結合が必要であり、*E. coli* RNAP による転写反応の場合に特異的である可能性が考えられた。



#### 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<sup>EcR</sup>-RCR

*E. coli* RNAP は、 $\alpha$  サブユニット(RpoA)、 $\beta$  サブユニット(RpoB)、 $\beta'$ サブユニット(RpoC)、 $\omega$  サブユニット(RpoZ)及び  $\sigma 70$  因子 (RpoD)から構成される。その内の  $\beta$  サブユニットの 1244 番目のヒスチジンをグルタミンに変えた変異体 RNAP (*rpoB*\*35)は、バックトラック活性を示さないことが知られている(Dutta et al., 2011)。そこで、この変異体 *E. coli* RNAP を PURE<sup>EcR</sup>-RCR に用いることで GreAB の効果を相補できるか検討した。

そのためにまず、変異体 *E. coli* RNAP を簡便に供給するための手法として、*E. coli* RNAP を遺伝子として供給し、発現した *E. coli* RNAP を用いて PURE<sup>EcR</sup>-RCR を行う RNAP カスケードを構築した(図 4.21a)。これにより、*E. coli* RNAP 遺伝子に塩基置換を導入するだけで、変異体 *E. coli* RNAP の供給が可能になる。*E. coli* RNAP を構成する各サブユニットを T7 プロモーターから転写する遺伝子としてコードするプラスミド(pRpoABCDZ)を構築した。PURE<sup>EcR</sup>-RCR を構成する PURE system には、元から T7 RNAP が含まれるため、pRpoABCDZ を鋳型に *E. coli* RNAP の生産が起こる。その後、生産された *E. coli* RNAP によって鋳型 *oriC* 環状 DNA 上の  $\sigma 70$  コンセンサスプロモーターから転写が起こり、生産されたタンパク質によって鋳型 DNA の増幅が導かれる。pOris70AG を鋳型とし、DnaA の生産に依存した PURE<sup>EcR</sup>-RCR を検討したところ、0.15 ng/ $\mu$ l 以上の pRpoABCDZ を加えた場合に、GreAB に依存した目的のスーパーコイル DNA の増幅が見られた。このことから、*E. coli* RNAP を遺伝子として供給することが可能であることがわかった(図 4.21b)。

次に、pRpoABCDZ 上の *rpoB* に  $\beta$  サブユニットの 1244 番目のヒスチジンがグルタミンに変異するような一塩基置換を加えた pRpoABCDZ ( $\beta$ H1244Q)を構築し、PURE<sup>EcR</sup>-RCR に加えた。その結果、0.5 ng/ $\mu$ l の pRpoABCDZ ( $\beta$ H1244Q)を加えた場合に、GreAB に非依存的な目的のスーパーコイル DNA の増幅が見られた。また、GreAB を用いた条件では、0.15 ng/ $\mu$ l の pRpoABCDZ ( $\beta$ H1244Q)を加えた場合に、野生型(pRpoABCDZ)と比べて増幅産物が増加した。このことから、PURE<sup>EcR</sup>-RCR において *E. coli* RNAP のバックトラック活性が目的の DNA の増幅を阻害することがわかった。



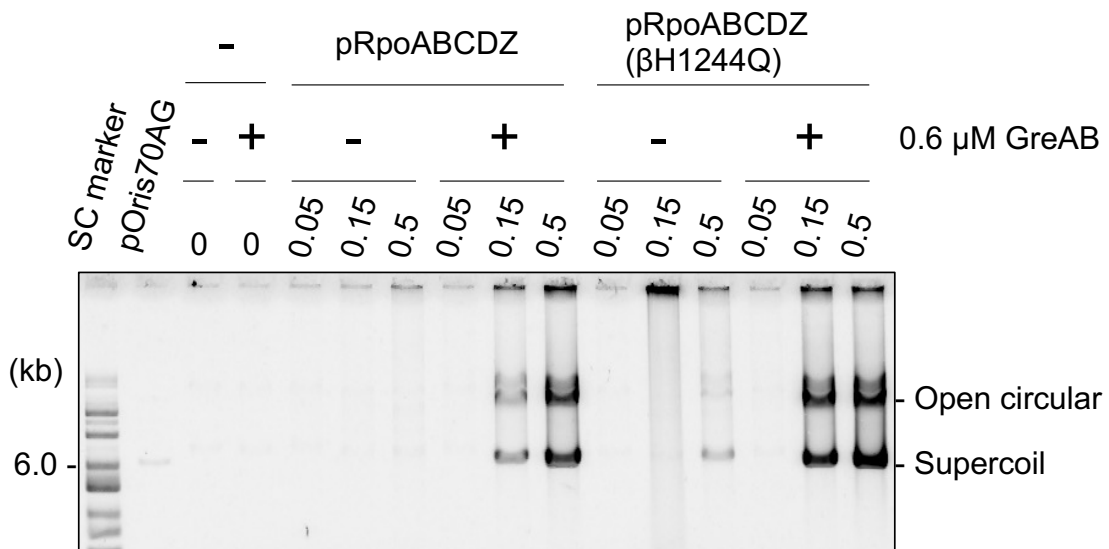
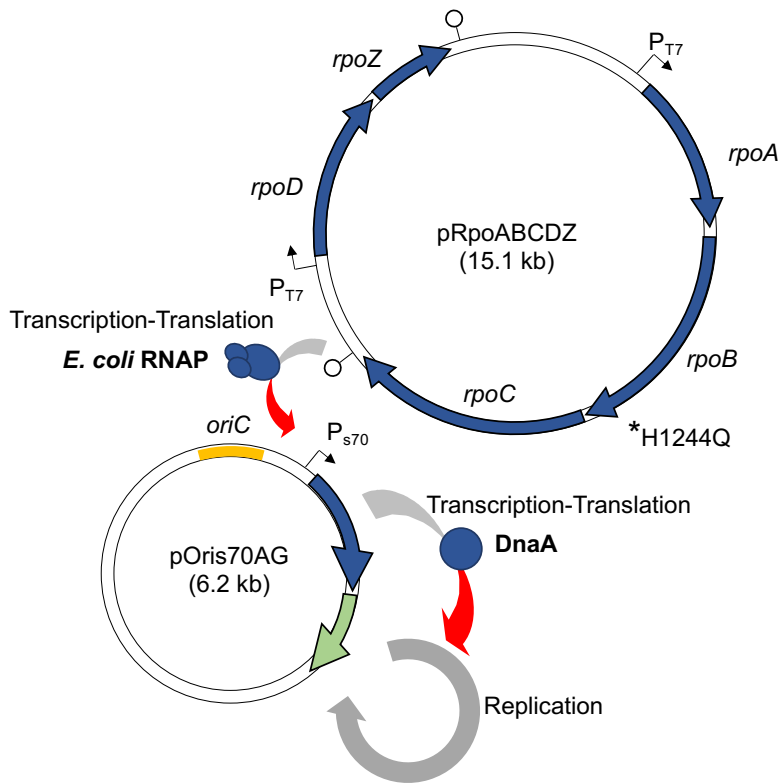


図 4.21 RNAP カスケードを用いた PURE<sup>EcR</sup>-RCR。(a)RNAP カスケードを用いた PURE<sup>EcR</sup>-RCR のモデル図。アスタリスク(\*)は、pRpoABCDZ に導入した一塩基置換を示す。(b)PURE<sup>EcR</sup>-RCR のアガロースゲル電気泳動解析。56 pM の pOris70AG を鋳型 DNA とし、表記の濃度の pRpoABCDZ、もしくは pRpoABCDZ (βH1244Q)を用いて 30°C で 10 時間の PURE<sup>EcR</sup>-RCR を行った。

#### 4.4 考察

本章では、RCR と PURE system の共役系である PURE<sup>EcR</sup>-RCR を構築した。PURE<sup>EcR</sup>-RCR では、鋳型となる環状 DNA にコードされた遺伝情報が転写翻訳され、その産物により鋳型の複製が導かれる。PURE<sup>EcR</sup>-RCR は、転写の鋳型としての機能を保持したまま鋳型 DNA の複製を繰り返すことができるだけでなく、エマルジョンを用いて区画化された微小空間中でも DNA 増幅が可能であった。このような特徴は、DNA の自己複製システムの構築に繋がる。また、大腸菌内で行われる複製・転写・翻訳を再構成した反応系は世界で初めてであり、この反応系を用いてセントラルドグマの協調的な進行に、複製と転写の衝突回避機構が重要であることを明らかにした。

PURE system を基盤とした生化学反応の再構成系では、タンパク質の生産量がボトルネックになる(van Nies et al., 2018; Libicher et al., 2020)。さらに、*E. coli* RNAP による転写を用いた PURE system では、*E. coli* RNAP のバックトラック活性などが影響して、T7 RNAP を用いた PURE system と比べるとタンパク質の生産量が少ないことが報告されている(de Maddalena et al., 2016)。一方で、バックトラック状態の解消に働く GreAB は、タンパク質の生産量を上昇させ、T7 RNAP を用いた PURE system と同程度以上のタンパク質生産が可能になる(de Maddalena et al., 2016)。本章でも、GreAB によって DnaA の生産量の増加が確認できた(図 4.4)。しかしながら、T7 RNAP を用いた場合と比較すると 1/10 倍程度の生産量であった。この原因として、*E. coli* RNAP による転写を用いた PURE system では、タンパク質の生産量が鋳型 DNA の濃度に依存することから、鋳型 DNA 濃度が充分でなかったことが考えられる。PURE<sup>EcR</sup>-RCR においては、DNA 複製に必要な量のタンパク質さえ生産できれば鋳型 DNA の増幅が導かれるため、それによる相乗的なタンパク質の生産量の上昇が期待される。

PURE<sup>EcR</sup>-RCR において、*E. coli* RNAP による転写によって鋳型 DNA の増幅が阻害される結果を示した。この原因の1つとして、*E. coli* RNAP のバックトラックによる停滞などによって複製と転写が衝突している可能性が示唆された。大腸菌染色体複製においては、複製フォークの進行速度(500-1000 nt/s)は、転写装置の進行速度(~50 nt/s)と比較してかなり速く(Kornberg and Baker, 1992; Fijalkowska et al., 2012)、鋳型 DNA 上では複製フォークと転写反応の衝突するため、DNA 複製が阻害されることが知られている(図 4.22; Merrikh et al., 2012)。またこの阻害は、*E. coli* RNAP のバックトラックに依存することや、転写が盛んに行われるリボソーム RNA オペロンで顕著に起こることが報告されている(Dutta et al., 2011; Nudler 2012; Srivatsan et al., 2010; Boubakri et al., 2006)。これに対して、GreAB や、DNA helicase である UvrD 及び Rep といった因子が解消に働くことが見られている(Guy et al., 2009; Boubakri et al., 2006; Dutta et al., 2011)。PURE<sup>EcR</sup>-RCR でも、これらの因子によって、鋳型 DNA の増幅が促進され、大腸菌内のシステムを試験管内で再現することが可能であった。また、バックトラック活性を示さない *E. coli* RNAP の *rpoB* 変異体(H1244Q)が、

*greAB* 欠損を相補することが知られており (Dutta et al., 2011)、PURE<sup>EcR</sup>-RCR においても GreAB の代わりにこの変異体 RpoB を用いることで、鋳型 DNA の増幅が見られた。このことから、*E. coli* RNAP のバックトラックが鋳型 DNA の増幅に阻害的に働くことが示された。バックトラック活性は、RNA 合成のエラー修復に関わっていることから、バックトラック活性を示さない変異体 RpoB を用いた場合、RNA 合成のエラー率が上昇している可能性が考えられる。

PURE<sup>EcR</sup>-RCR における GreAB による増幅促進の効果は、低濃度の鋳型 DNA を用いた場合に見られた。この要因として、GreAB によるタンパク質生産量の向上及び複製と転写の衝突回避のいずれかもしくはその両方が考えられる。図 4.4 では、GreAB による DnaA の生産量の上昇が見られ、図 4.8 では、鋳型 DNA 上の転写量の上昇に伴う複製阻害に対して GreAB による解消が見られた。これらのことから、GreAB によるタンパク質生産量の向上と複製と転写の衝突回避の両方が要因となって、PURE<sup>EcR</sup>-RCR における鋳型 DNA の増幅促進が見られたと考えられる。一方で、高濃度の *E. coli* RNAP を用いた場合は、転写による複製阻害に対する解消効果は部分的であり、また生産されたタンパク質に依存しない条件で PURE<sup>EcR</sup>-RCR を行った場合は、その効果は鋳型環状 DNA の構造に特異的であった。以上のことから、PURE<sup>EcR</sup>-RCR における GreAB の効果は、タンパク質生産量の向上による要因がより大きいと考えられる。これまでに、GreAB の複製と転写の衝突回避機構は試験管内で見られていなかった。本研究の結果は、転写による複製阻害に対して GreAB が直接働くことを示したものである。

UvrD や Rep については、これまでに転写による複製阻害を解消する効果が *in vitro* で再現されていた (Guy et al., 2009; Hawkins et al., 2019; Brüning and Mariani, 2021)。UvrD や Rep は、DNA に結合したタンパク質を剥がすことが知られており、*E. coli* RNAP を DNA から剥がすことで、転写と複製の衝突の解消に効いていることが示唆されている (Guy et al., 2009; Hawkins et al., 2019; Brüning and Mariani, 2021)。PURE<sup>EcR</sup>-RCR においても、転写による複製阻害の解消効果が再現できたが、高濃度の Rep を用いた場合、鋳型 DNA の増幅が阻害された (図 4.14, 4.18)。Rep や UvrD は、1A2A1B2B のサブドメインからなり、二量体で helicase 活性を示すことが知られている (Cheng et al., 2001; Brendza et al., 2005)。2B サブドメインが helicase 活性を自己抑制するため、単量体では translocase 活性を示すが helicase 活性を示さない (Brendza et al., 2005; Makurath et al., 2019)。Helicase 活性には、2B サブドメインは必要なく、二量体ではその形成による 2B のサブドメインの構造変化が関連していることが示唆されている (Brendza et al., 2005; Nguyen et al., 2017; Makurath et al., 2019)。一方で、Rep の DNA 結合タンパク質を剥がす活性には、2B のサブドメインが必須であることが報告されている (Brüning et al., 2018; Hawkins et al., 2019)。このことから、二量体形成による 2B のサブドメインの構造変化が DNA 結合タンパク質を剥がす活性を抑制する可能性が考えられ、これを要因として、高濃度の Rep を PURE<sup>EcR</sup>-RCR に用いた場合は、転写による複製阻害の解消効果が見られなかったと考えられる。

また、鋳型 DNA と転写産物 RNA からなる R-loop も複製の進行を阻害する(Drolet et al., 1995, Brüning and Marians, 2021)。これに対して RNaseH が、鋳型 DNA のハイブリダイズした mRNA の分解を行っていると考えられる。RCR を構成するタンパク質の 1 つである RNaseH は、RCR における DNA 増幅には必須でなかったが、PURE<sup>EcR</sup>-RCR では必須であることが示された(図 4.19)。

これらの結果は、DNA の自己複製において、複製と転写の協調的な進行が重要であることを示している。PURE<sup>EcR</sup>-RCR の最終目標は、複製に必要な 26 種のタンパク質全てを遺伝子として鋳型 DNA から供給することである。さらに言えば、DNA の自己複製システムを完全に再構築する上では、*E. coli* RNAP の各サブユニットや PURE system の構成タンパク質、tRNA、rRNA についても遺伝子として鋳型 DNA にコードする必要がある。長大な DNA を増幅可能な RCR を基盤にした PURE<sup>EcR</sup>-RCR だからこそ、多くの遺伝子を DNA にコードすることが可能である。鋳型 DNA がコードする遺伝子が複数になってくる場合には、今回見出した DNA helicase などの衝突回避機構が重要になってくるだろう。また、エマルジョンやリポソームなどの微小空間に反応系を封入した DNA の自己複製系は、遺伝情報と生産されたタンパク質が対応するため、複製エラーによる遺伝子変異とそれによる進化を試験管内で再現することに繋がる。試験管内でゲノムを進化させることは、進化学による機能の優れた人工細胞創生にも繋がると期待される。

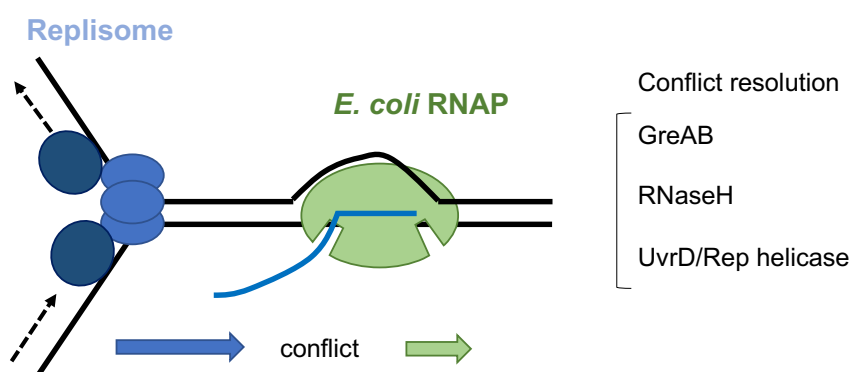


図 4.22 複製と転写の衝突のモデル図

#### 4.5 参考文献

- Baker, T. A. and Kornberg, A. (1988) Transcriptional activation of initiation of replication from the *E. coli* chromosomal origin: an RNA-DNA hybrid near *oriC*. *Cell*, **55**, 113-23.
- Boubakri, H, de Septenville A. L., Viguera, E., and Michel, B. (2010) The helicases DinG, Rep and UvrD cooperate to promote replication across transcription units *in vivo*. *EMBO J.*, **29**, 145-57.
- Brendza, K. M., Cheng, W., Fischer, C. J., Chesnik, M. A. Niedziela-Majka, A. and Lohman, T. M. (2005) Autoinhibition of *Escherichia coli* Rep monomer helicase activity by its 2B subdomain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 10076-81.
- Brüning, J. G., Howard, J. A. L. Myka, K. K. Dillingham, M. S. and McGlynn, P. (2018) The 2B subdomain of Rep helicase links translocation along DNA with protein displacement. *Nucleic. Acids. Res.*, **46**, 8917-8925.
- Brüning, J. G. and Marians, K. J. (2021) Bypass of complex co-directional replication-transcription collisions by replisome skipping. *Nucleic. Acids. Res.*, **49**, 9870-9885.
- Cheng, W., Hsieh, J., Brendza, K. M. and Lohman, T. M. (2001) *E. coli* Rep oligomers are required to initiate DNA unwinding *in vitro*. *J. Mol. Biol.*, **310**, 327-50.
- de Maddalena, L. L., Niederholtmeyer, H., Turtola, M., Swank, Z. N., Belogurov, G. A. and Maerkl, S. J. (2016) GreA and GreB enhance expression of *Escherichia coli* RNA polymerase promoters in a reconstituted transcription-translation system. *ACS Synth. Biol.*, **5**, 929-35.
- Drolet, M., Phoenix, P., Menzel, R., Massé, E., Liu, L., F. and Crouch, R. J. (1995) Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli*  $\Delta topA$  mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 3526-30.
- Dutta, D., Shatalin, K., Epshtein, V., Gottesman, M. E. and Nudler, E. (2011) Linking RNA polymerase backtracking to genome instability in *E. coli*. *Cell*, **146**, 533-43.
- Epshtein, V., Kamarthapu, V., McGary, K., Svetlov, V., Ueberheide, B. and other authors. (2014) UvrD facilitates DNA repair by pulling RNA polymerase backwards. *Nature*, **505**, 372-7.
- Fijalkowska, I. J., Schaaper, R. M. and Jonczyk, P. (2012) DNA replication fidelity in *Escherichia coli*: a multi-DNA polymerase affair. *FEMS Microbiol Rev.*, **36**, 1105-21.
- Fujiwara, K., Katayama, T. and Nomura, S., M. (2013) Cooperative working of bacterial chromosome replication proteins generated by a reconstituted protein expression system. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 7176-83.
- Gan, W., Guan, Z., Liu, J., Gui, T., Shen, K. and other authors. (2011) R-loop-mediated genomic instability is caused by impairment of replication fork progression. *Genes Dev.*, **25**, 2041-56.

- Guy, C. P., Atkinson, J., Gupta, M. K., Mahdi, A. A., Gwynn, E. J. and other authors. (2009) Rep provides a second motor at the replisome to promote duplication of protein-bound DNA. *Mol. Cell.*, **36**, 654-66.
- 長谷部友憲 (2019) 転写・翻訳反応と共役した mini-chromosome 複製サイクル再構成, 立教大学大学院理学研究科修士論文 (未公刊).
- Hasebe, T., Narita, K., Hidaka, S. and Su'etsugu, M. (2018) Efficient arrangement of the replication fork trap for in vitro propagation of monomeric circular DNA in the chromosome-replication cycle reaction. *Life (Basel)*, **8**, 43.
- Hawkins, M., Dimude, J. U., Howard, J. A. L. Smith, A., J., Dillingham, M. S. and other authors. (2019) Direct removal of RNA polymerase barriers to replication by accessory replicative helicases. *Nucleic. Acids. Res.* **47**, 5100-5113.
- Huang, D., Holtz, W. J. and Maharbiz, M. M. (2012) A genetic bistable switch utilizing nonlinear protein degradation. *J. Biol. Eng.*, **6**, 9.
- Ichihashi, N., Usui, K., Kazuta, Y., Sunami, Y., Matsuura, T. and Yomo, T. (2013) Darwinian evolution in a translation-coupled RNA replication system within a cell-like compartment. *Nat. Commun.*, **4**, 2494.
- Kaguni, J. M. and Kornberg, A. Replication initiated at the origin (*oriC*) of the *E. coli* chromosome reconstituted with purified enzymes. *Cell*, **38**, 183-90.
- Kornberg, A. and Baker, T. A. (1992) *DNA Replication*. 2nd edn. W.H.Freeman, NY.
- Kurihara, K., Tamura, M., Shohda, K. -I., Toyota, T., Suzuki, K. and Sugawara, .T. (2011) Self-reproduction of supramolecular giant vesicles combined with the amplification of encapsulated DNA. *Nat. Chem.*, **3**, 775-81
- Laptenko, O., Lee, J., Lomakin, I., and Borukhov, S. (2003) Transcript cleavage factors GreA and GreB act as transient catalytic components of RNA polymerase. *EMBO J.*, **22**, 6322-6334
- Li, J, Gu, L, Aach, J. and Church, G. M. (2014) Improved cell-free RNA and protein synthesis system, *PLoS One.*, **9**, e106232.
- Libicher, K., Hornberger, R., Heymann, M. and Mutschler, H. (2020) In vitro self-replication and multicistronic expression of large synthetic genomes. *Nat. Commun.*, **11**, 904.
- Makurath, M. A., Whitley, K. D., Nguyen, B., Lohman, T. M. and Chemla, Y. R. (2019) Regulation of Rep helicase unwinding by an auto-inhibitory subdomain. *Nucleic. Acids. Res.*, **47**, 2523-2532.
- Merrikh, H. Zhang, Y., Grossman, A. D., and Wang, J. D. (2012) Replication-transcription conflicts in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, **10**, 449-58.
- Mizuuchi, R. and Ichihashi, N. (2020) Translation-coupled RNA replication and parasitic replicators in membrane-free compartments. *Chem. Commun. (Camb.)*, **56**, 13453-13456.
- Nara, S. and Su'etsugu, M. (2021) *In vitro* amplification of whole large plasmids via transposon-

- mediated *oriC* insertion. *Biotechniques*, **71**, 528-533
- Nguyen, B. Ordabayev, Y. Sokoloski, J. E., Weiland, E. and Lohman, T. M. (2017) Large domain movements upon UvrD dimerization and helicase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **114**, 12178-12183.
- Nozaki, S. and Niki, H. (2019) Exonuclease III (XthA) enforces *in vivo* DNA cloning of *Escherichia coli* to create cohesive ends. *J. Bacteriol.*, **201**, e00660-18.
- Nudler, E. (2012) RNA polymerase backtracking in gene regulation and genome instability. *Cell*, **149**, 1438-45.
- Picelli, S., Bjo̊rklund, A. K., Reinius, B., Sagasser, S., Winberg, G. and Sandberg, R. (2014) Tn5 transposase and tagmentation procedures for massively scaled sequencing projects. *Genome Res.*, **24**, 2033-2040.
- Pomerantz, R. T. and O'Donnell, M. (2010) Direct restart of a replication fork stalled by a head-on RNA polymerase. *Science*, **327**, 590-2.
- Sakatani, Y., Yomo, T. and Ichihashi, N. (2018) Self-replication of circular DNA by a self-encoded DNA polymerase through rolling-circle replication and recombination. *Sci. Rep.*, **8**, 13089.
- Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K. and Ueda, T. (2001) Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat. Biotechnol.*, **19**, 751-5.
- Srivatsan, A., Tehranchi, A., MacAlpine, D. M. and Wang, J. D., (2010) Co-orientation of replication and transcription preserves genome integrity. *PLoS Genet.*, **6**, e1000810.
- Su'etsugu M., Takada, H., Katayama, T. and Tsujimoto, H. (2017) Exponential propagation of large circular DNA by reconstitution of a chromosome-replication cycle. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 11525-11534.
- 高橋淳 (2016) 染色体複製サイクル再構成系における長鎖環状 DNA の安定増幅, 立教大学大学院理学研究科修士論文 (未公刊).
- Tehranchi, A. K., Blankschien, M. D., Zhang, Y., Halliday, J. A., Srivatsan, A., Peng, J., Herman, C. and Wang, J. D. (2010) The transcription factor DksA prevents conflicts between DNA replication and transcription machinery. *Cell*, **141**, 595-605.
- Ueno, H., Sawada, H., Soga, N., Sano, M., Nara, S. and other authors. (2021) Amplification of over 100 kbp DNA from single template molecules in femtoliter droplets. *ACS Synth. Biol.*, **10**, 2179-2186.
- van Nies, P., Westerlaken, I., Blanken, D., Salas, M., Mencía, M. and Danelon, C. (2018) Self-replication of DNA by its encoded proteins in liposome-based synthetic cells. *Nat. Commun.*, **9**, 1583.
- Vibhute, M. A., Schaap, M. H., Maas, R. J. M., Nelissen, F. H. T., Spruijt, E. and other authors. (2020) Transcription and translation in cytomimetic protocells perform most efficiently at distinct macromolecular crowding conditions. *ACS Synth. Biol.*, **9**, 2797-2807.

## 第五章 総合討論

### 5.1 総合討論

試験管内環状 DNA 増幅法である RCR の主な特徴は、大腸菌染色体複製サイクルの再構成系であること、*oriC* を持つ環状 DNA を指数関数的に増幅すること、及び 1 Mb を超える長大な環状 DNA が増幅できることである (Su'etsugu et al., 2017; Hasebe et al., 2018; Mukai et al., 2020)。これらの特徴から、RCR は染色体複製を基盤にした生命現象の再構成やバイオテクノロジーの分野で期待される。そこで本研究では、RCR と様々な生化学反応を組み合わせ、有用なツールの開発と染色体複製に関わる新たな生理学的原理の解明を目的とした。

RCR は、試験管内で環状 DNA を増幅し解析する技術や、試験管内 DNA クローニング法として利用することが可能である。しかしながら、鋳型環状 DNA が *oriC* を持つ必要があるため、*oriC* を環状 DNA に簡便に導入する手法が求められた。そこで第二章では、Tn-RCR と呼ばれる試験管内 Tn5 トランスポジション反応を用いて *oriC* を環状 DNA に導入し、RCR 増幅する手法の開発について述べた (図 2.2; Nara and Su'etsugu, 2021)。Tn-RCR は、3000 分子程度の環状 DNA や PCR 法では増幅が難しい GC リッチな DNA の増幅が可能であった (図 2.4, 2.5)。また、Tn-RCR による増幅産物は、ランダムな位置に *oriC* を持つため、挿入された *oriC* を環状 DNA から抜き出す手法も開発した (図 2.9)。Tn-RCR は、環状 DNA の配列情報を必要としないため、環境中の環状 DNA などを増幅し解析する技術として利用可能である。近年では、メタゲノム解析と呼ばれる環境中の遺伝子情報の網羅的な解析が広く行われている。メタゲノム解析では、環境中の生体組成や特定の遺伝子を探索することが可能であるが、ゲノム全長配列を決定することやプラスミドやウイルス DNA といった可動性の環状 DNA を特定することは難しい。これまでの環境中環状 DNA の増幅法として、 $\Phi 29$  ファージの DNA polymerase を利用した手法が用いられてきたが (Kav et al., 2013)、この手法では、環状 DNA を特異的に増幅するためのゲノム DNA のクリーンアップが必要だけでなく、小さな DNA ほど優位に増幅してしまうという増幅バイアスが生じる。Tn-RCR では、環状 DNA に対する増幅特異性が高いだけでなく、温度サイクルを用いた RCR (cyclar-RCR) により増幅バイアスを抑えることができるため (図 2.3)、プラスミドやウイルス DNA のみを増幅し網羅的に解析する手法として有用であるだろう。これによって、新規のプラスミドやウイルス DNA、さらには有用な遺伝子の発見をもたらすだけでなく、病原性ウイルスの伝播や多剤耐性菌の出現を追うことができると考えている。ゲノムレベルの長大な DNA を増幅できる点では、いずれは難培養微生物などの環状ゲノムを丸ごと全長増幅することも可能であるだろう。また、Tn-RCR で増幅した DNA は環状構造を維持しているため、その配列を解析する以外にもバクテリアに導入しその機能を解析するなど、さらなる研究の発展にも繋がる。

一方で、Tn-RCR は、目的の環状 DNA を狙って増幅するには不向きであった (図 2.7)。そ



ここで第三章では、組換えタンパク質を用いた DNA 連結法(RA)により *oriC* を導入し、RCR 増幅する手法(RA-RCR)を検討した結果を述べた(図 3.1、倉田ら未発表)。RA は、DNA 末端の 25-60 bp の相同な配列のアニーリングにより DNA 同士を連結することから、その特異性が高いため、目的の DNA のみを *oriC* と連結し RCR 増幅することができる。これによって、ヒトミトコンドリア DNA や長大なゲノム領域の試験管内クローニングが可能であった(図 3.3、3.9)。また、RA-RCR を用いて繰り返し配列の増幅を検討したところ、大腸菌を用いたクローニング法と比べて、RCR による DNA 増幅では繰り返し配列の欠損が起こりにくかった(図 3.4)。これにより、ヒトセントロメアとして機能するリピート配列や遺伝子疾患に関わる CGG リピートの増幅が可能であった(図 3.7、3.8)。これらの結果から、RA-RCR が試験管内クローニング法として有用であることが示された。RA を用いて環状 DNA に *oriC* を導入するためには、制限酵素や CRISPR-Cas9 システムを用いて環状 DNA を切断しなければならなかった。そこで、環状 DNA を切らずに *oriC* を狙った箇所に導入し、RCR 増幅する手法(Rm-RCR)を開発した(図 3.13)。Rm-RCR は、既存のベクターなどに簡便に *oriC* を導入することができる手法である。これまでの長鎖 DNA クローニングでは、大腸菌や酵母に依存しており、数 kb の BAC や YAC(酵母人工染色体)といったベクターを用いていた。RA-RCR は、300 bp ほどの *oriC* を連結するだけで、試験管内で増幅できる点で画期的であるだろう。近年では、BAC や YAC だけでなく、HAC (ヒト人工染色体)や MAC (マウス人工染色体)も開発されており (Kouprina et al., 2003; Hasegawa et al., 2015; Abe et al., 2021)、例えば、100 kb のヒト MHC 表面受容体遺伝子領域など、真核生物が持つ巨大な遺伝子を細胞に保持させることができる(Hasegawa et al., 2015)。HAC への遺伝子の導入は、組換え用ベクターを介して細胞内で行われるため、組換え用ベクターに遺伝子を導入する必要がある(Abe et al., 2021)。こういった場合に、Rm-RCR を用いて、組換え用ベクターに *oriC* を導入し、さらには RA-RCR を用いて、巨大な遺伝子を持つ組換え用ベクターを簡単に構築することが可能である。RA-RCR は、GC リッチな DNA や繰り返し配列、或いは大腸菌に毒性を示すような遺伝子といったこれまでの手法では増幅が困難であった DNA を増幅する技術であり、環状ゲノムの試験管内構築の基盤になる。RA-RCR は、まだ改善の余地があり、RCR が染色体を複製システムを利用していることからいずれは Mega-base レベルの長大な環状ゲノムの構築が可能になるだろう。

第四章では、RCR が大腸菌の染色体複製サイクルの再構成系であることに着目し、転写翻訳の再構成系である PURE system (Shimizu et al., 2001)との共役によるセントラルドグマの完全な再構成を目指した(図 4.1)。この共役系では、RCR を構成するタンパク質を遺伝子としてコードし、また *oriC* を持つ環状 DNA を鋳型とし、PURE system によって発現したタンパク質により鋳型 DNA が増幅されることを期待した。T7 RNA polymerase (T7 RNAP) による転写を用いた共役系では、複製と転写の衝突が問題となり、鋳型 DNA の増幅が見られなかった(図 4.2)。これに対して、大腸菌 RNA polymerase (*E. coli* RNAP)を代用したところ、鋳型 DNA の増幅が見られた(図 4.8)。*E. coli* RNAP は、T7 RNAP と比べると転写活

性が弱いことから、複製と転写の衝突頻度が減少し、鋳型 DNA の増幅が見られた可能性が考えられる。また、*E. coli* RNAP を用いた共役系では、GreAB による鋳型 DNA の増幅促進が見られた (図 4.8)。これは、*E. coli* RNAP のバックトラックが GreAB によって解消し、転写量の増加、及び複製と転写の衝突回避が起こったことによると考えられた (de Maddalena et al., 2016; Dutta et al., 2011)。RCR と PURE system の共役系では、複製反応には十分な量のタンパク質の生産が必要である。一方で、過剰な転写は複製阻害の原因となる。以上のことから、T7 RNAP と *E. coli* RNAP を比較した場合は、複製と転写の衝突回避機構を持つ *E. coli* RNAP が有用であると考えられる。実際に、*E. coli* RNAP を用いた場合でも鋳型 DNA のプロモーター数を増やして鋳型分子あたりの転写量を増加させた時には、複製と転写の衝突が見られたが、DNA helicase である UvrD や Rep といった複製と転写の衝突回避機構をさらに導入することで、鋳型 DNA の増幅が可能であった (図 4.14)。

ゲノムの自己複製では、鋳型 DNA から発現したタンパク質分子が自身の鋳型 DNA 分子を複製することが必要である。これを行うためにエマルジョンによって反応液が区画化された RCR と PURE system の共役系を検討したが、低濃度の鋳型 DNA を用いた場合にその増幅産物が見られなかった (図 4.12)。つまり、1 分子の鋳型 DNA が反応区画毎に封入され、遺伝子発現と複製が同一分子上で起こる条件では、鋳型 DNA の複製が阻害されている可能性が考えられた。この原因として、エマルジョンによるクラディング効果によって *E. coli* RNAP の拡散が抑えられ (Vibhute et al., 2020)、鋳型 DNA 上での転写頻度が上昇し、それによる複製と転写の衝突が起こっている可能性が考えられる。多分子の鋳型 DNA が存在し遺伝子発現と複製が異なる分子上で起こる場合では、ゲノムの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、発現したタンパク質が他のゲノム分子を複製してしまうため、複製エラーなどで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、ゲノムの進化が起きない可能性も考えられる。今後、ゲノムの自己複製システムの構築を進める上では、エマルジョンなどの区画化内で 1 分子鋳型 DNA からの複製・転写・翻訳を起こすことが必要になるだろう。

## 5.2 参考文献

- Abe, S., Honma, K., Okada, A., Kazuki, K., Tanaka, H. and other authors. (2021) Construction of stable mouse artificial chromosome from native mouse chromosome 10 for generation of transchromosomal mice. *Sci. Rep.*, **11**, 20050
- Boubakri, H., de Septenville A. L., Viguera, E., Michel and B. (2010) The helicases DinG, Rep and UvrD cooperate to promote replication across transcription units *in vivo*. *EMBO J.*, **29**, 145-57.
- Brüning, J. G. and Marians, K. J. (2021) Bypass of complex co-directional replication-transcription collisions by replisome skipping. *Nucleic. Acids. Res.*, **49**, 9870-9885.
- de Maddalena, L. L., Niederholtmeyer, H., Turtola, M., Swank, Z. N., Belogurov, G. A. and Maerkl, S. J. (2016) GreA and GreB enhance expression of *Escherichia coli* RNA polymerase promoters in a reconstituted transcription-translation system. *ACS Synth. Biol.*, **5**, 929-35.
- Dutta, D., Shatalin, K., Epshtein, V., Gottesman, M. E. and Nudler, E. (2011) Linking RNA polymerase backtracking to genome instability in *E. coli*. *Cell.*, **146**, 533-43.
- Hasebe, T., Narita, K., Hidaka, S. and Su'etsugu, M. (2018) Efficient Arrangement of the replication fork trap for *in vitro* propagation of monomeric circular DNA in the chromosome-replication cycle reaction. *Life (Basel)*, **8**, 43.
- Hasegawa, Y., Ishikura, T., Hasegawa, T., Watanabe, T., Suzuki, J. and other authors. (2015) Generating a transgenic mouse line stably expressing human MHC surface antigen from a HAC carrying multiple genomic BACs. *Chromosoma*, **124**, 107-18.
- Kav, A. B., Benhar, I. and Mizrahi, M. (2013) A method for purifying high quality and high yield plasmid DNA for metagenomic and deep sequencing approaches. *J. Microbiol. Methods.*, **95**, 272-9
- Kouprina, N., Ebersole, T., Koriabine, M., Pak, E., Rogozin, I. B. and other authors. (2003) Cloning of human centromeres by transformation-associated recombination in yeast and generation of functional human artificial chromosomes. *Nucleic. Acids. Res.*, **31**, 922-34.
- Mukai, T., Yoneji, T., Yamada, K., Fujita, H., Nara, S. and Su'etsugu, M. (2020) Overcoming the challenges of megabase-sized plasmid construction in *Escherichia coli*. *ACS Synth. Biol.*, **9**, 1315-1327.
- Nara, S. and Su'etsugu, M. (2021) *In vitro* amplification of whole large plasmids via transposon-mediated *oriC* insertion. *Biotechniques*, **71**, 528-533.
- Pomerantz, R. T. and O'Donnell, M. (2010) Direct restart of a replication fork stalled by a head-on RNA polymerase. *Science*, **327**, 590-2.
- Sakatani, Y., Yomo, T. and Ichihashi, N. (2018) Self-replication of circular DNA by a self-encoded DNA polymerase through rolling-circle replication and recombination. *Sci. Rep.*, **8**,

13089.

- Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K. and Ueda, T. (2001) Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat. Biotechnol.*, **19**, 751-5.
- Su'etsugu, M., Takada, H., Katayama, T. and Tsujimoto, H. (2017) Exponential propagation of large circular DNA by reconstitution of a chromosome-replication cycle. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 11525-11534.
- Tehranchi, A. K., Blankschien, M. D., Zhang, Y., Halliday, J. A., Srivatsan, A., Peng, J., Herman, C. and Wang, J. D. (2010) The transcription factor DksA prevents conflicts between DNA replication and transcription machinery. *Cell*, **141**, 595-605.
- van Nies, P., Westerlaken, I., Blanken, D., Salas, M., Mencía, M. and Danelon, C. (2018) Self-replication of DNA by its encoded proteins in liposome-based synthetic cells. *Nat. Commun.*, **9**, 1583.
- Vibhute, M. A., Schaap, M. H., Maas, R. J. M., Nelissen, F. H. T., Spruijt, E. and other authors. (2020) Transcription and Translation in cytomimetic protocells perform most efficiently at distinct macromolecular crowding conditions. *ACS Synth. Biol.*, **9**, 2797-2807.

## 謝辞

本論文は、立教大学理学部バクテリア細胞生物学研究室において、末次正幸教授の指導の下で得られた研究成果をまとめたものです。末次正幸教授には研究の基礎から応用まで直接ご指導頂きました。また、実験技術のことだけでなく、研究成果のまとめ方や研究費申請のノウハウまで、研究者としての基礎を築いてくださいましたことを心より深く御礼申し上げます。本研究を遂行するにあたり、不便のない研究環境を与えてくださり、また、研究室内外でのマネジメントまで、多くの助言をくださったことに感謝いたします。

立教大学理学部分子生物学研究室の関根靖彦教授には、研究生を送るにあたり、多くの助言とお取り計らい頂き心より御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、大腸菌 DH10EmBacY を分与して頂いた理化学研究所の鎌田勝彦博士に御礼申し上げます。ミトコンドリア DNA を分与して頂いた理化学研究所の小田原真樹博士に御礼申し上げます。p601\_208x12 を分与して頂いた理化学研究所の梅原崇史博士に御礼申し上げます。RP11-96M14、RP1-247E2、RP11-457I4 及び CH17-81M08 を分与して頂いた鳥取大学の香月康宏准教授に御礼申し上げます。pWTR11.32、pWTR11.64 及び pWTR11.128 を分与して頂いたかずさ DNA 研究所の大関淳一郎博士に御礼申し上げます。ヒトリンパ芽球細胞ゲノム DNA の *EarI* 切断産物を分与して頂いた東京大学の辻省次教授に御礼申し上げます。T7 ファージ DNA の PCR 産物 (T7 ファージ DNA 断片) を分与して頂いた自治医科大学の崔龍洙教授に御礼申し上げます。SARS-CoV-2 の RT-PCR 断片 (SARS-CoV-2 DNA)、pCMV 断片及び polyA 断片を分与して頂いた京都大学の牧野晶子助教に御礼申し上げます。

研究の知識や技術を一から教えてくださった立教大学理学部生命理学科の先生方に、改めて御礼申し上げます。

研究活動、及び、日常生活で困った時に支えてくださった RA の山田佳代子氏、今谷瑛美氏、萩生田絵美氏、高橋真美氏、佐賀加奈子氏、大石愛佳史に大変深く御礼申し上げます。向井崇人助教には、研究アイデアや論文作成まで多くの助言を頂きましたこと、心より御礼申し上げます。野崎晋五助教には、研究の面白さやノウハウを多くご指導頂き、心から感謝申し上げます。鈴木祥太助教には、論文作成などの研究面だけでなく研究以外でも大変お世話になりましたこと御礼申し上げます。角悟博士には、日々の研究生生活において多くの助言を頂き深く感謝致します。また、pUP-GFP を分与して頂いたこと御礼申し上げます。倉田竜明博士(現ウメオ大学)には、実験技術などの研究面のことだけでなく今後の人生で役立つ多くのことを研究室の内外問わず学ばせてくださり心より御礼申し上げます。また、Lter、OLT3 及び mACtsDCW1 を分与して頂いたこと御礼申し上げます。

バクテリア細胞生物学研究室の先輩であり後輩である加納巧希氏には研究生生活面から実験技術についてだけでなく、研究生生活外についても助言いただき心より御礼申し上げます。バクテリア細胞生物学研究室の後輩である皆様には、研究環境の維持のためにお骨折り下

さりましたことに感謝いたします。

最後に、本研究を進めるにあたり様々な場面で支えてくれた両親に心より感謝致します。