

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32686

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640116

研究課題名(和文)大腸菌染色体複製サイクル再構成による長大DNA増幅システムの開発

研究課題名(英文) Propagation of large circular DNA by reconstitution of a chromosome-replication cycle

研究代表者

末次 正幸 (Su'etsugu, Masayuki)

立教大学・理学部・准教授

研究者番号：00363341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：合成生物学の進展に伴って長鎖DNA増幅技術に対する期待が高まってきている。本研究では、独自に構築した「複製サイクル再構成系」を用いて長鎖環状DNAを増幅できるか検討した。「複製サイクル再構成」は大腸菌染色体複製に機能する全25種類の蛋白質を用いて複製の開始から姉妹環状DNAの分離までの複製サイクルの反応の繰り返しを試験管内に再構成したものである。種々の条件検討の結果、200kb環状DNAを30、3時間の等温反応にて、効率よく増幅する条件を決定した。今後、バクテリアゲノムレベルの長鎖環状DNAを増幅可能かも検討し、「ゲノム丸ごと増幅技術」としての利用を世の中に広めていきたい。

研究成果の概要(英文)：Escherichia coli has a 4.6 Mb circular chromosome with a replication origin, oriC. While the oriC replication has been reconstituted in vitro more than 30 years ago, continuous repetition of the replication cycle has not yet been achieved. Here, we reconstituted the entire replication cycle with purified enzymes that catalyze initiation at oriC, bidirectional fork progression, Okazaki-fragment maturation, and decatenation of the replicated circular products. Because decatenation provides covalently closed supercoiled monomers that are competent for the next round of replication initiation, the replication cycle repeats autonomously and continuously in an isothermal condition. This Replication-Cycle Reaction (RCR) propagates large circular DNA up to 0.2 Mb as intact covalently closed molecules. RCR provides a powerful in vitro tool to propagate large circular DNA molecules

研究分野：大腸菌ゲノム複製

キーワード：DNA複製 ゲノム 大腸菌染色体 合成生物学 合成ゲノム学

1. 研究開始当初の背景

近年、次世代シーケンサー技術や合成生物学的手法の発展により、長大な DNA を扱う研究が増えてきている。長大な DNA を編集、増幅するためには大腸菌、枯草菌または酵母といった細胞の利用が不可欠である。細胞を介する手法では、細胞内へ導入可能な DNA サイズの制限や、導入した DNA が細胞増殖に及ぼす影響等についての懸念が残るものである。そのため無細胞系(試験管内)で長大 DNA を増幅する技術が望まれる。試験管内で DNA を増幅する技術として PCR が用いられているが、PCR で増幅可能な DNA サイズはたかだか数 kb 程度であり、長大 DNA を増幅するためにはさらなる画期的な技術が必要である。細胞は「複製の開始・伸長・終結および姉妹染色体分離のプロセスからなるサイクル(複製サイクル)」を繰り返す事によって、自身の長大な染色体 DNA の増幅を達成している。そこで、「細胞がもつ巧妙な複製サイクルをそのまま再構成することによって試験管内で長大 DNA を効率よく増幅することができるようになるのではないか」と考え、本研究でこれに挑戦した。

2. 研究の目的

細胞はもともと自身の長大な染色体 DNA を安定かつ効率的に増幅するシステムを備えている。このシステムをそのまま試験管内に再現できれば長大 DNA 増幅技術として有用である。大腸菌では全て精製された因子によって染色体複製を再構成することができている。さらに我々は、この再構成系を発展させ、複製の開始・伸長・終結および姉妹染色体分離のプロセスからなるサイクルを繰り返す「複製サイクル再構成系」を構築している。そこで、複製サイクル再構成系を長大 DNA 増幅のための技術として応用することを目指した。

3. 研究の方法

大腸菌では、全て精製された既知の因子によってミニ染色体複製系が再構成されている(Kaguni et al., 1984, *Cell*)。鋳型 DNA であるミニ染色体は、複製起点 *oriC* を持つ 8 kb の環状 2 重鎖 DNA である。現在までに、染色体複製系が試験管内で再構成可能となっているのは、この大腸菌の系のみである。申請者はこの再構成系を基盤とし、さらに複製の終結、姉妹染色体分離のプロセスを検討し、複製終結後さらに 2 ラウンド以降の複製サイクルが継続して進行する「複製サイクル再構成系」を構築している。この系では 30°C の反応中に継続して複製サイ

クルが何度も繰り返されるため、ミニ染色体を増幅する事が可能である。この複製サイクル再構成系は、もともと染色体 DNA (4.6 Mb) の複製に機能しているシステムを再現したものであるため、長大な DNA を正確に増幅するための能力に卓越しているはずである。一方で、これまで鋳型として用いてきたミニ染色体のサイズは 10 kb 程度にとどまり、長大 DNA を複製する能力については調べられていなかった。そこで本研究では、複製サイクル再構成系を用いた長大 DNA の増幅法について検討を行った。

これまで M13 ファージ DNA に複製起点 *oriC* (400 bp) をクローニングした DNA (8 kb) を鋳型となるミニ染色体として用いていたが、この方法では、調製できるサイズに限度がある。本研究では、ファージの組換え系 (Datsenko & Wanner, 2000, *PNAS*) を応用利用し、大腸菌細胞内組換えによりミニ染色体 DNA を調製する手法を開発した。その方法は次の通りである。薬剤耐性遺伝子カセットの両端に抜き出したい染色体領域の両端と相同的な DNA 配列 (40bp) を付加する。この DNA 断片を ファージの組換え蛋白質を発現している大腸菌に導入する。*oriC* を含む染色体領域を抜き出すように設計しておく、ポップアウトによって生じた環状 DNA は自律複製可能なミニ染色体として機能する。ミニ染色体をもつ大腸菌は薬剤により選択可能である。抜き出す染色体領域を広げていく事によって、簡便に望みのサイズまで長大化したミニ染色体を構築する事が可能である。この方法を用いた検討により、200 kb までの長大な *oriC* 環状 DNA を調製した。

4. 研究成果

「複製サイクル再構成系」における DNA 増幅の鋳型として機能するために必要な DNA 構造は大腸菌複製起点 *oriC* を有すること、環状構造をとっていることである。長鎖 DNA の増幅法開発における課題の一つは、増幅の目標とする数百 kb レベルの *oriC* 長鎖 DNA の鋳型となる DNA をいかにして試験管内に環状構造を保ったまま単離してくるか? ということであった。特に DNA は 100kb を超える長鎖となると著しく物理的安定性が低下し、切断された直鎖状 DNA になりやすい。直鎖状となった DNA はもはや複製サイクル再構成系における DNA 増幅の鋳型としては機能しない。そこでまず、細胞内における ファージの組換え系を利用した *oriC* 長鎖環状 DNA の調製法を開発した。この方法によって、*oriC* を含む染色体領域をうまく環状プラスミド化して抜き出すことに成功した。一方で、抜き出す染色体領域が長大(数十 kb 以上)となると、細胞自身がその長鎖環状 DNA をうまく保持できなく

なるという問題が生じた。この問題は、Fプラスミドの持つ DNA 分配システム (*parABC*) (Ogura & Hiraga, 1983, *Cell*) を当該環状 DNA に導入する事で、解決可能であることを見出した。また、大腸菌細胞内から長鎖環状 DNA を高収率、高純度で単離するための方法も確立し、200kb までの長鎖環状 DNA の試験管内調製に至った。本研究ではさらに 500kb の *oriC* 環状 DNA の調製も試みたが、このサイズの *oriC* 環状 DNA を有する大腸菌株は構築することができなかった。

「複製サイクル再構成系」での DNA 増幅効率をより改善するために、反応組成の詳細な検討を進めた。この検討においては 10kb の比較的小さい *oriC* 環状 DNA を鋳型として用いた。その結果、鋳型量がほんの 1 分子しか入っていない反応液からも、その環状 DNA の増幅を行うことが可能なレベルにまで至った。そして、この改良型の「複製サイクル再構成系」を用いた検討を進め、80kb 及び 200kb の長鎖 *oriC* 環状 DNA の増幅に成功した。この時、増幅産物が確かに目的の 80kb あるいは 200kb 環状 DNA であるかについては、制限酵素を用いた構造確認を行い、示した。

本研究によって目的である長鎖 DNA の増に至ったものの、反応後の増幅産物には、目的の環状 DNA だけでなく、反応中に擦り切れて生じた直鎖状 DNA も多く存在することが見られた。今後、反応中における長鎖 DNA の切断を抑えることで、より高効率な長鎖環状 DNA 増幅法とすることができるものと期待される。

バクテリアの中でもゲノムサイズが微小であるカルソネラ・ルディアイはわずか 160kb ほどのゲノムサイズである。今回我々は 200kb という長大な DNA の試験管内増幅に成功しており、このことより、原理的にはバクテリアゲノム丸ごとを試験管内で増幅可能な技術開発に至ったと言っても良いであろう。またヒト単純ヘルペスウイルスのような長鎖 DNA ウイルスも、そのサイズは 150kb 程度であり、そのゲノムを試験管内で増幅可能であると考えられ、これらのような長鎖な異種ゲノム DNA を生物学的宿主を用いずに試験管内で酵素的に調製する手法として、本研究で開発した「長鎖環状 DNA 増幅法」は大変有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 20 件)

末次正幸、ゲノム複製の試験管内再構成系とその合成生物学的展開、第 13 回原子・分子・光科学 (AMO) 討論会「合成生物学 試験管の中でゲノムや器官を創る」、理化学研究所 (埼玉県和光市)、2016 年 6 月 3 日

末次正幸、徳永翼、高田啓、辻本寛子、

ゲノム複製サイクル試験管内再構成系における変異誘発と分子進化、日本進化学会第 18 回大会ワークショップ「再構築型進化学研究 - 人工細胞から原始生物まで -」、東京工業大学 (東京都目黒区)、2016 年 8 月 25 日

末次正幸、辻本 寛子、高田 啓、大腸菌染色体複製サイクルと転写翻訳反応との統合再構成、第 89 回日本生化学会大会シンポジウム「生化学の基盤戦略：試験管内再構成」、東北大学 (宮城県仙台市)、2016 年 9 月 27 日

末次正幸、平田 稜、倉田竜明、篠原 昶、辻本 寛子、10 万塩基を超える長鎖環状 DNA の無細胞クローニング、第 11 回ゲノム微生物学会年会シンポジウム「微生物での合成生物工学」、慶応義塾大学 (神奈川県藤沢市)、2017 年 3 月 3 日

末次正幸、辻本寛子、複製開始・終結・分離サイクルの統合再構成系における環状染色体のふるまい、第 23 回 DNA 複製・組換え修復ワークショップ、焼津グランドホテル (静岡県焼津市)、2015 年 10 月 19 日

末次正幸、松本健佑、小林寛子、片山勉、大腸菌複製サイクルの繰り返しによるミニ染色体 DNA の試験管内増幅、第 11 回 21 世紀大腸菌研究会、ホテル大観 (岩手県盛岡市)、2014 年 6 月 5 日

〔図書〕(計 1 件)

末次正幸、ゲノム複製サイクル再構成系とその展望、人工細胞の創製とその応用 (植田充美 監修)、シーエムシー出版、2017、215 (172-180)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 3 件)

名称：環状 DNA の複製または増幅方法
発明者：末次正幸
権利者：科学技術振興機構
種類：特許
番号：特願 2017-037489
出願年月日：2017.2.28
国内外の別：国内

名称：環状 DNA の増幅方法
発明者：末次正幸、小林寛子
権利者：科学技術振興機構
種類：特許
番号：特願 2016-099157
出願年月日：2016.5.17
国内外の別：国内

名称：環状 DNA の増幅方法
発明者：末次正幸、小林寛子
権利者：科学技術振興機構
種類：特許
番号：PCT/JP2015/082356
出願年月日：2015.11.18
国内外の別：国外

〔その他〕
ホームページ等
<http://www2.rikkyo.ac.jp/web/sue-lab/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

末次 正幸 (SUETSUGU Masayuki)
立教大学・理学部・准教授
研究者番号：00363341