

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32686

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03238

研究課題名(和文) 染色体複製サイクル再構成系の高度化で探るゲノム機能

研究課題名(英文) Investigation of genome function by upgrading replication cycle reaction

研究代表者

末次 正幸 (Su'etsugu, Masayuki)

立教大学・理学部・教授

研究者番号：00363341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々が独自に開発した大腸菌染色体複製のサイクルを再構成した複製サイクル再構成系(RCR)では、ゲノムサイズの環状DNA分子の指数的な増幅が達成される。大腸菌をモデルとした研究では、複製系以外にも転写・翻訳、DNA修復、組換え、複製周期制御など、ゲノムにまつわる多くのサブシステムが個別に試験管内再構成されている。そこで本研究ではこれらサブシステムを複製サイクル再構成系に融合し、ゲノム動態を統合的に再現する系を構築した。またシステムだけでなくメガサイズスケールのゲノム(染色体)自体を試験管内に取り出してRCRにより増幅する検討も実施し、2-Mbの分断染色体の全長増幅にも至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複製サイクル再構成系(RCR)は、セルフフリーで環状DNAを増幅する技術として、世界的に注目されており、本技術を基盤とするオリシロジェノミクス社はモデルナ社に買収されたことでも脚光を浴びた。本研究でアップグレードされた複製サイクル再構成系は、DNAを基盤とするバイオ創薬への展開が期待される。また、複製を皮切りに、細胞内のゲノム動態を試験管内で、より近似していく試みは、分子生物学の新しいアプローチとして生命の理解に繋がっていくものである。

研究成果の概要(英文)：In our originally developed replication cycle reconstitution system (RCR), which reconstitutes the cycle of *E. coli* chromosome replication, exponential amplification of genome-sized circular DNA molecules is achieved. In addition to the replication system, many other genome-related subsystems, such as transcription and translation, DNA repair, recombination, and replication cycle control, have been individually reconstituted in vitro in studies using *E. coli* as a model. In this study, these subsystems were integrated into the replication cycle reconstruction system to construct an integrated system that reconstructs genome dynamics. In addition to the system, we also examined the in vitro amplification of mega-sized genomes (chromosomes), and achieved full-length amplification of a 2-Mb fragmented chromosome.

研究分野：合成生物学

キーワード：DNA複製 ゲノム動態

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は最近、大腸菌染色体複製の完全なサイクルを 25 種類の精製タンパク質によって再構成することに世界で初めて成功した(Suetsugu et al., NAR 2017)。この「複製サイクル再構成系(RCR; Replication Cycle Reaction)」では、開始、伸張、終結、分離のサイクルが等温で自律的に何度も繰り返し、ミニ染色体 (oriC 環状 DNA) 分子の指数増幅が達成される。酵母でも染色体複製の再構成研究が進んでいるが(Yeeles et al., 2015 Nature)、細胞周期制の再現の必要などもあり、そのサイクル完全再構成には遠い。大腸菌が圧倒的に先頭を進んでいる。

大腸菌研究の真髄は、このような試験管内再構成系 / 生化学反応系にあるとも言える。例えば、染色体複製では、既に 1984 年に、A. Kornberg らによって開始から伸張段階までのプロセスが再構成されている(Kaguni & Kornberg 1984 Cell)。また、RNA ポリメラーゼホロ酵素による転写反応も、関連する多くの制御因子の効果とともに生化学的解析が進んでいる。翻訳反応も精製因子によって再構成され、PURE System として反応キットが市販されているほどである(Shimizu et al., Nat. Biotech. 2001)。他にも、ミスマッチ修復系や、相同組み換え、複製開始制御など、大腸菌ゲノム動態にまつわるあらゆる反応系が試験管内で再構成されている。

2. 研究の目的

「全てのシステムが再構成されているならば、それらを統合することによって、もっと高次な、生きている細胞により近い振る舞いを試験管内に再現できるのではないか？」という考えに至った。そのような研究は未だ報告はなく、ゲノム複製サイクルの完全再構成を世界で唯一成し遂げた我々ならではの独自の提案である。具体的には、複製サイクル再構成系における in vitro のゲノム分子 (あるいは人工ミニ染色体) の振る舞いを、各システムを融合していくことによって in vivo の振る舞いに近似していく。本研究の目的は、このような統合再構成によって「ゲノム動態の試験管内再現」というゲノム機能解明のための全く新しいアプローチを提案するとともに、それによって従来の in vivo 解析では見出されてこなかったゲノム機能の新たな側面を見出していくことである。

3. 研究の方法

複製サイクル再構成系 (RCR) を基盤に、転写・翻訳、DNA 修復、複製周期制御、核様体などの様々な要素の導入を検討した。さらに従来用いていたプラスミドサイズの環状 DNA だけでなく、1Mb レベルのゲノムサイズ環状 DNA を用いた検討も進めた。

4. 研究成果

● 複製サイクル再構成系 (RCR) への転写・翻訳反応の組み込み

鋳型環状 DNA からの複製遺伝子群の転写・翻訳に依存して複製サイクルが駆動する系を構築した。この系においては、転写装置と複製装置の衝突が考えられた。そこで大腸菌内で衝突を回避に機能することが知られている幾つかの分子機構を導入したところ、より効率的に複製サイクルが進行するようになった (論文準備中、2022 年度 遺伝学会、細胞を創る研究会、分子生物学会などで発表)。

● 複製サイクル再構成系 (RCR) へのミスマッチ修復反応の組み込み

RCR にミスマッチ修復機構を導入することで、複製エラーを抑制できることを示した(2021年度 特許出願、論文準備中)。なお、もともと RCR における複製エラーは非常に低く、その検出においては、蛍光タンパク質の遺伝子変異(エラー)により大腸菌コロニーの蛍光消失を計測する系を構築し用いた。

- 複製サイクル再構成系 (RCR) への複製開始制御機構の組み込み
複製開始制御の主要なターゲットは複製タンパク質 DnaA と複製開始 DNA 領域 oriC である。DnaA は RIDA と呼ばれる機構により不活性化の制御を受ける。oriC は DNA ヘミメチル化を介した機構により機能制御を受ける。我々はこれら 2 つに機構を RCR に組み込むことに成功し、複製サイクルの進行速度を制御できるようにした。なおこのために、複製サイクルの進行をリアルタイムで計測可能なリアルタイム RCR 技術を新たに開発した(論文準備中)。
- 複製サイクル再構成系 (RCR) をもちいたゲノムサイズ環状 DNA の増幅
大腸菌染色体を三分割し、1-Mb からなる 3 つの分断染色体からなる大腸菌株を構築した。この株から抽出した 1-Mb 分断染色体について、環状スーパーコイル分子としてその全長を RCR によりセルフリー増幅することに成功した (Mukai et al., 2020, *ACS Synthetic Biol.*; Yoneji et al., 2021, *NAR*)。更にその後、2-Mb 分断染色体の全長増幅にも成功し、セルフリーでの DNA 増幅長の記録を更新した (Fujita et al., 2022, *ACS Synthetic Biol.*)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 末次正幸	4. 巻 40
2. 論文標題 長鎖DNA合成技術と合成細胞 人工デザインされたゲノムの合成と評価にむけて	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 実験医学 増刊 セントラルドグマの新常識	6. 最初と最後の頁 264~
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 末次正幸	4. 巻 41
2. 論文標題 1) 概論 なぜ今、長鎖DNA合成なのか	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 420~
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18958/7189-00002-0000372-00	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujita Hironobu, Osaku Ayane, Sakane Yuto, Yoshida Koki, Yamada Kayoko, Nara Seia, Mukai Takahito, Su'etsugu Masayuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Enzymatic Supercoiling of Bacterial Chromosomes Facilitates Genome Manipulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 3088 ~ 3099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.2c00353	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nara, S. and Su'etsugu, M.	4. 巻 71
2. 論文標題 In vitro amplification of whole large plasmids via transposon-mediated oriC insertion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioTechniques	6. 最初と最後の頁 528-533
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2144/btn-2021-0068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoneji, T., Fujita, H., Mukai, T., and Su'etsugu, M.	4. 巻 49
2. 論文標題 Grand scale genome manipulation via chromosome swapping in Escherichia coli programmed by three one megabase chromosomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	6. 最初と最後の頁 8407-8414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab298	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ueno, H., Sawada, H., Soga, N., Sano, M., Nara, S., Tabata, K. V., Su'etsugu, M. and Noji, H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Amplification of over 100 kbp DNA from Single Template Molecules in Femtoliter Droplets	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Synth. Biol.	6. 最初と最後の頁 2179-2186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.0c00584	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mukai Takahito, Yoneji Tatsuya, Yamada Kayoko, Fujita Hironobu, Nara Seia, Su'etsugu Masayuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Overcoming the Challenges of Megabase-Sized Plasmid Construction in Escherichia coli	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 1315 ~ 1327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.0c00008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 末次 正幸	4. 巻 57
2. 論文標題 第22回 OriCiro Genomicsのセルフリー長鎖環状DNA合成技術	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 218 ~ 220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.57.3_218	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 SU' ETSUGU Masayuki	4. 巻 60
2. 論文標題 In vitro Reconstitution of Replication Cycle of the Escherichia coli Chromosome and its Impact on Synthetic Biology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 284 ~ 287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.60.284	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 末次 正幸
2. 発表標題 In vitro再構成で明らかになってきた複製・転写・翻訳の協調的進行
3. 学会等名 日本遺伝学会第94回大会 (ワークショップ) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 末次 正幸
2. 発表標題 ゲノム合成の技術進展
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会 (シンポジウム)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 末次 正幸
2. 発表標題 In vitro統合再構成で紐解く細菌ゲノムの自己複製原理
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 (ワークショップ) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 末次正幸
2. 発表標題 人工ゲノムのセルフリー合成
3. 学会等名 バイオインダストリー協会 発酵と代謝研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 末次正幸
2. 発表標題 大腸菌のメガサイズゲノムの合成と移植の技術
3. 学会等名 第73回 日本生物工学会大会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 末次正幸
2. 発表標題 なぜ今、合成生物学なのか
3. 学会等名 日本科学哲学会第54回大会 特別講演（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 末次正幸
2. 発表標題 メガサイズ染色体のバクテリア細胞への出し入れおよび増幅の技術
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会ワークショップ「細胞核を造る」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向井崇人、末次正幸
2. 発表標題 大腸菌ゲノムの分断化とポータブル化
3. 学会等名 第17回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田光輝、向井崇人、末次正幸
2. 発表標題 大腸菌サブ染色体の他細胞への移植
3. 学会等名 第17回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田裕寛、末次正幸
2. 発表標題 大腸菌ゲノムの試験管内複製
3. 学会等名 第17回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川上直貴、長谷部友憲、高田啓、末次正幸
2. 発表標題 複製遺伝子群をコードする環状DNAを鋳型にしたセントラルドグマの試験管内再構成
3. 学会等名 第17回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奈良聖亜、末次正幸
2. 発表標題 大腸菌染色体複製再構成系と転写・翻訳系との協調
3. 学会等名 第17回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加納 巧希、末次 正幸
2. 発表標題 DNA メチル化による大腸菌染色体複製サイクル再構成系の制御
3. 学会等名 第16回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小山拓也、末次正幸
2. 発表標題 人工ゲノム合成における DNA 配列エラーの解析
3. 学会等名 第16回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奈良聖亜、末次正幸
2. 発表標題 大腸菌染色体複製と転写翻訳の協調的進行
3. 学会等名 第16回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 末次正幸
2. 発表標題 メガスケールのDNA合成技術とその応用
3. 学会等名 第2回 東京理科大学総合研究院合成生物学研究部門シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 In vitro amplification of mega-sized circular DNA and its applications
2. 発表標題 Masayuki Su'etsugu
3. 学会等名 I2BCParisSaclay virtual seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 エラー除去法	発明者 末次正幸	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、未公開	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

末次研究室HP https://www2.rikkyo.ac.jp/web/sue-lab/
--

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------