

# 研究報告書

## 「染色体複製系の周期的駆動にむけた回路の再構成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研究者: 末次 正幸

### 1. 研究のねらい

生命の根幹をなす現象の 1 つに自己複製が挙げられる。細胞の自己複製は、遺伝情報を複製し、この情報をもとに自身を復元することによって達成される。遺伝情報である DNA を複製するだけであれば、古くから試験管内で再現されている。今や PCR は生命科学に欠かせない技術となっているし、また大腸菌染色体複製の反応を十数種の精製蛋白質とミニ染色体(染色体複製起点 *oriC* をもつ環状 DNA)とを用いて再現するような再構成系も構築されている(ミニ染色体複製再構成系)(Kaguni and Kornberg, 1984)。一方で、生命とはドクドクと拍動するようなシステムであり、細胞内において DNA 複製は細胞周期という自律的な拍動を通じて規則正しく、繰り返されている。

大腸菌の細胞周期においては、染色体複製開始を引き金として、染色体分配や細胞分裂といった下流のイベントがカスケード式に進行する。つまり染色体複製開始の周期的な発動が、細胞周期の拍動をもたらす制御ポイントとなっている。これまでの研究から大腸菌では、複製開始蛋白質 DnaA の活性が複製周期を通じてあたかもサイクリンのようにオシレーションすることが分かり(DnaA 活性オシレーション)、その不活性化と再活性化の分子メカニズムについても個別に明らかとなってきた(Fujimitsu et al., 2009; Katayama et al., 1998; Kurokawa et al., 1999)。興味深いことに、染色体複製サイクルにこれら DnaA 制御機構を組み込んだモデルをたてると、オシレーション回路の基本骨格である「フィードバックループと時間遅延」をみてとることができる。

本研究では、大腸菌ミニ染色体複製再構成系を基盤として、さらに複製の開始、伸長、終結、分離、のサイクルが何ラウンドも繰り返し導くことのできる「複製サイクル再構成系」の構築をめざす。そしてさらに、この系に DnaA 制御機構をうまく組み込むことによって、「DnaA 活性オシレーション」と、それによる「DNA 複製の周期的な繰り返し」を試験管内に再現することに挑戦する。

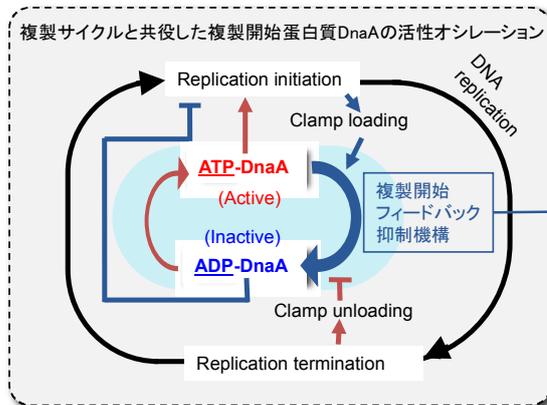
### 2. 研究成果

#### (1) 概要 (下図参照)

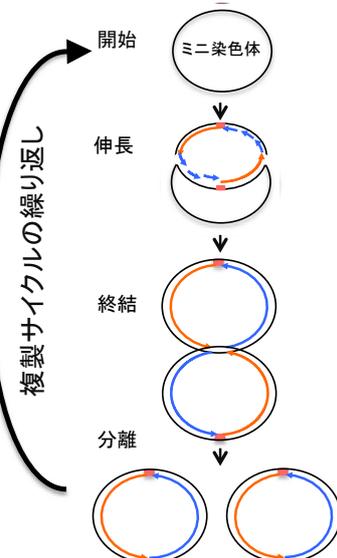
大腸菌ミニ染色体(複製起点 *oriC* をもつ環状 DNA)の複製再構成系(Kaguni & Kornberg 1984 *Cell*)を基盤に、さらに複製終結および姉妹ミニ染色体分離のプロセスを検討し、1つの反応系において、2ラウンド目以降の複製サイクルが繰り返し導かれる「複製サイクル再構成系」を構築した【成果1(学会発表<sup>2, 3, 5</sup>)】。複製サイクルの繰り返しは、「複製装置因子クランプに依存した複製開始のフィードバック制御機構」を組み込む事で、ちょうど1回のみ抑える事もできた【成果2(学会発表<sup>2, 3, 5</sup>)】。詳細な条件検討を経て最適化された複製サイクル再構成系においては、8 kb のミニ染色体であれば、環状 DNA 分子として 5,000 倍を超えての増幅が確認され、また 200 kb もの長鎖環状 DNA

の増幅も確認された【成果3（特願<sup>1</sup>）】。本研究ではまた、複製サイクルと共役した DnaA 活性オシレーションを、蛍光蛋白質発現を介して細胞内でリアルタイムに観測する系を構築した。これにより、DnaA 活性オシレーションに依存した遺伝子転写制御の原理について明らかにすることができた【成果4（学会発表<sup>1, 4</sup>）】。

【成果1】 精製タンパク質による複製サイクル再構成系



【成果2】 複製サイクルの1回性の制御



【成果4】 DnaA活性オシレーションを介して遺伝子転写が周期制御される。その原理について、蛍光を利用したin vivoリアルタイム観測系を構築し、解明した。

【成果3】 複製サイクル再構成系の反応(30°C, ~2h)で、長鎖環状DNA (8 ~ 200 kb)を指数的に増幅

## (2) 詳細

### (A) in vitro 再構成

#### 「ミニ染色体複製系の検討」 【成果1(学会発表<sup>2, 3, 5</sup>)】

複製開始には環状のミニ染色体がねじれたスーパーコイル構造をとっている必要がある。DnaA 蛋白質による複製開始反応後、複製起点 *oriC* から両方向に複製フォークが進行し、*oriC* と対極に位置する *ter* 領域で複製が終結する。複製後に生じた姉妹ミニ染色体は絡み合ったままなので、これらは分離されなければならない。分離された姉妹ミニ染色体は元のスーパーコイル構造に戻るため、それらは次のラウンドの複製サイクルへと引き続き進行する事が可能と思われる。この想定のもと、ミニ染色体複製系において、複製後に絡まった姉妹染色体 DNA を分離するための検討を行った。そして、DNA 分離機構の導入に依存して2ラウンド目以降の複製サイクルを繰り返し導くことができる系(複製サイクル再構成系)を構築に至った。

一方で、複製サイクルの繰り返しとともに副次的な長鎖 DNA が産生してくるという問題が生じてきた。そこで再構成系にさらに、*ter* 領域での複製フォークトラップ機構や部位特異的組換え機構の導入を検討した。その結果、どちらの機構を用いても、うまく副次的な DNA 産物の産生を抑える事ができた。

複製サイクル再構成系においては多数の精製蛋白質が必要となる。これらの多くについて、本研究ではより効率の良い精製法を新規に開発した。また、長大なミニ染色体や複製終結領域を持つミニ染色体などを簡便に調製するため、大腸菌細胞内での組換えポップアウトを利用した手法を開発した。このような、本研究遂行の中で構築した手法も、大きな成果といえよ

う。

「長鎖環状 DNA の新規増幅技術(目標外の成果)」 【成果3(特願<sup>1</sup>)】

構築した再構成系では複製サイクルを繰り返すたびに環状 DNA 分子を倍化できるので、DNAを指数的に増幅する技術として有用である。実際、詳細な条件検討により最適化した複製サイクル再構成系においては、8 kb のミニ染色体であれば、環状分子として 5,000 倍を超えての増幅が可能であった。また 200 kb もの長鎖環状 DNA の増幅も確認する事ができた。さらに大腸菌から組換え反応によって取り出したミニ染色体でなくとも、複数の DNA 断片同士を連結して人工的に環状化した DNA についても(*oriC* 配列を含む)、増幅反応の鋳型となることを見出した。

「DnaA 不活性化系の融合」 【成果2(学会発表<sup>2,3,5</sup>)】

DnaA は複製開始後、複製装置因子クランプに依存した機構によって、フィードバック的に不活性化される。この「不活性化系」を「複製サイクル再構成系」に融合したところ、複製サイクルの進行がちょうど1ラウンドのみに抑えられた。この結果は、再構成系においてみられていた複製サイクルの繰り返しが、うまく DnaA の複製開始活性に依存して導かれているということを示すものである。

(B) 合成生物学的再構成(in vivo) 【成果4(学会発表<sup>1,4</sup>)】

大腸菌細胞内における DnaA 活性オシレーションをリアルタイムに検出すべく、蛍光を利用した系を構築した。この系を利用した解析により、DnaA 活性オシレーションと共役した遺伝子転写制御の原理を明らかにすることができた。

### 3. 今後の展開

「複製サイクル再構成系」に「DnaA 不活性化系」融合して、複製サイクルを1ラウンドのみに抑える事ができた。今後は、1ラウンド目の複製終結ののち、クランプが DNA から外れて(DnaA のフィードバック抑制が解除されて)、「DnaA 再活性化系」をうまく機能させることができるか？が課題である。これが実現できれば、制御的な2ラウンド目以降の複製が導かれるので、それに伴った DnaA 活性オシレーションも導くことができるのではないかと考えている。

複製サイクル再構成系で複製される DNA は遺伝情報そのものである。転写翻訳によってその情報を引き出すことができる。環状 DNA 上に複製サイクル再構成系を構成する全ての蛋白質(20 種以上)を遺伝子の情報にして集積したミニゲノムを構築し、その情報を発現させることができれば、「複製された情報に基づいて、複製サイクル再構成系のハードウェア自体の複製をつくりだす」ことが可能と思われる。複製されたハードウェアは、さらなる世代のミニゲノムの複製を導くだろう。よってこの系は、「自己複製の繰り返し」という、まさに生命の根幹的な現象を再構成することに繋がるのではないだろうか。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

研究目的の達成状況

大腸菌ミニ染色体の複製開始、伸長、終結、分離、そして再複製開始のサイクルが繰り返し導かれるための反応を精製蛋白質によって再構成できた。これは、ミニ染色体が複製を次々と繰り返すための必要十分条件を明らかにしたという点で大きな意義がある。さらに、目的外の成果ではあるが、長鎖環状 DNA を指数的に増幅する革新的な技術の開発に至った。近年の合成生物学や遺伝子工学の潮流とともに、長鎖 DNA 合成技術への期待が増してきている事を考えると、その科学技術及び社会・経済への波及効果は大きい。

一方で、当初の目的である複製の繰り返しを「周期的」に導くにはいまだ至っていない。原因の1つは複製終結後、「クランプを DNA から外して、DnaA のフィードバック抑制経路を解除する」機構がよく分かっていないためであると考えられる。この点、今後さらなる解析的な研究が必要と思われる。このように具体的課題が浮き彫りになってきたことも、試験管内再構成系を用いた解析を進めてきた成果のひとつかもしれない。

#### 研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

多数の蛋白質を大量精製したり、再構成系における詳細な反応条件を検討したりするのは、かなりの労力が必要であったが、研究補助者の大きな貢献のおかげで、なんとか想定通りに進める事が出来た。また、それぞれの作業を効率的に進めるための機器を購入する事ができたため、特に立教大学准教授として研究室を新たに立ち上げる際にも、研究設備に大きく不自由する事はなかった。

当初、数理モデルを用いた反応パラメーターの最適化なども計画し、進めていたが、実際のところ、再構成系の最適化のためには、ヌクレアーゼのコンタミの除去の検討や、使用するプラスチック製品の検討などといった地道な最適化の貢献が大きかった。

#### 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

大腸菌の染色体複製サイクルに関わる機構を試験管内に再構成する事によって、環状 DNA を指数的に増幅する革新的な技術を開発した。本技術が普及すれば、DNA 増幅に、PCR のようなプライマーや温度制御サイクル、さらには細胞を用いた煩雑なクローニング操作はもはや不要である。目的の DNA 断片を *oriC* 断片と連結、環状化して、それを酵素群の詰まった反応液キットと混ぜて 30℃で2時間程度保温するだけである。外来生物由来の DNA をもつ大腸菌を作る必要はないので、もはや多くの研究室での DNA クローニング実験は、遺伝子組換えの規制対象外となるかもしれない。

多数の DNA 断片をシームレスかつ簡便に連結して、DNA を長鎖環状化する技術は近年進歩しており、Gibson Assembly などが開発されている(Gibson, DG. et.al., 2009 *Nature Methods*)。一方で得られた長鎖環状 DNA を増幅するためには、未だ細胞に頼らざるを得ないのが現状である。本研究で構築した長鎖環状 DNA 増幅法を、このような DNA 連結技術と組み合わせれば、試験管内反応だけで、遺伝子を繋げていって、自在に遺伝子回路やバクテリアゲノムといった長大 DNA を合成する事が出来るのではないだろうか。このようなことが出来るようになれば、合成生物学の分野に大きなインパクトを与える事につながるだろう。

(2)研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

大腸菌ミニ染色体の複製サイクルの繰り返しの反応を、精製蛋白質によって再構成を可能にしました。このさきがけ期間に、この領域の趣旨に合致した素晴らしいシンセティックバイオロジーの成果を達成されました。できれば、例えば、試験管の中で160kbのミニ染色体を作って、駆動させることで、一般の方々にも分かるようにすれば、大きな反響があると思います。

是非、アウトリーチの活動を含めて、活動の幅を広げていって頂き、もう一つ大きな世界へ突き抜けて欲しいと思います。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

- |   |
|---|
| 1. Su'etsugu, M., Harada, Y., Keyamura, K., Matsunaga, C., Kasho, K., Abe, Y., Ueda, T. and Katayama, T. DnaA N-terminal domain interacts with Hda to facilitate replicase clamp-mediated inactivation of DnaA. <i>Environ. Microbiol.</i> , <b>15</b> , 3183–3195 (2013) |
|---|

(2)特許出願

研究期間累積件数: 1件(非公開)

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

1. 末次正幸、松本健佑、小林寛子、大腸菌遺伝子転写の細胞周期制御、「細胞を創る」研究会 7.0、東京、2014年11月
2. 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、盛岡、2014年6月
3. 末次正幸、小林 寛子、松本 健佑、片山 勉、再構成アプローチによる大腸菌染色体複製周期の解析. 日本農芸化学会 2014 年度大会シンポジウム「ゲノム改変による潜在能力覚醒を基にした細菌研究の新展開」、東京、2014年3月
4. Su'etsugu, M., Kobayashi, H. and Katayama, T., An approach to reconstruction of cell cycle oscillation of DnaA activity for replication initiation and transcription regulation. CBI 学会 2013 年大会、東京、2013年10月
5. 末次正幸、小林 寛子、藤光 和之、片山 勉、大腸菌染色体「複製サイクル」再構成にむけた試験管内反応系. 第36回日本分子生物学会年会ワークショップ「ボトムアップテクノロジーで細胞システムは創れるのか?」、神戸、2013年12月