

立教大学学術推進特別重点資金（立教 S F R）
大学院学生研究
2023年度研究成果報告書

研究科名	立教大学大学院 理学研究科 生命理学専攻		
研究代表者 (2024年3月現在 のものを記入)	在籍課程・学年		氏名
	■ 博士前期課程 2年 □ 博士後期課程 年		山岸勇太
指導教員	所属部局・職名		氏名
	理学部・教授		末次正幸
自然・人文 ・社会の別	自然	個人・共同の別	個人
研究課題	ダーウィンの分子進化と機械学習により最適化するゲノム自己複製系		
研究組織 (研究代表者 ・共同研究者) ※2024年3月現 在のものを記入	在籍研究科・専攻・課程・学年		氏名
	立教大学大学院 理学研究科 生命理学専攻 博士前期課程 2年		山岸勇太
研究期間	2023 年度		
研究経費 (1円単位)	(支出金額) 249,329円 / (採択金額) 250,000円		

研究の概要 (200~300字で記入、図・グラフ等は使用しないこと。)
生命の本質的な機能として自己複製と進化が挙げられる。これらの仕組みを既知のパーツから再構成することは、生命の構成的理解のためだけでなく、革新的なバイオテクノロジーの創出につながる。本研究では、ダーウィンの分子進化と機械学習を組み合わせ、ゲノム自己複製系を最適化することを目的とした。具体的には、試験管内でダーウィンの分子進化を再現し、自己複製能を持つ DNA から複製タンパク質を発現させることにより、DNA 自己複製系を構築する。このプロセスにおいて、変異が導入され多様化が生じ、より増幅に優れた変異を持つ DNA が自然選択により選択される。最終的に、最適化されたゲノムの解析を通じて、試験管内でのゲノムの設計原理を解明することを目指した。

キーワード (研究内容をよく表しているものを3項目以内で記入。)
{ 合成生物学 } { 試験管内再構成系 } { 人工細胞 }

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)

ダーウィン進化系の構築のためには、DNA から発現した複製タンパク質により自身の DNA が複製される、DNA の自己複製系の構築を行わなければならない。本研究では DNA 複製系に大腸菌の染色体複製の再構成系である RCR を用いた。RCR は 26 種類の複製タンパク質によって構成されており、複製起点 *oriC* を持つ環状 DNA を指数関数的に増幅することができる。DNA の自己複製系は RCR の酵素をコードした DNA から無細胞転写翻訳系である PURE system により、RCR 酵素を発現し、その酵素により DNA 自身を増幅する。この反応系を PURE-RCR と名付ける。この実験系の構築のために、まずは 26 種類の RCR 酵素をコードした RCR ゲノムの構築を行った。

RCR ゲノムの構築法の検討

一般的に数十 kb の DNA の構築は、PCR のエラーや増幅効率により構築するのに時間がかかってしまう。また本研究で用いる RCR ゲノムは様々な改変を施し、作り替えていく必要があり、構築の時間が実験のボトルネックになっていた。そのため、RCR ゲノムを迅速にかつシステムティックに構築する方法を開発した。

まず、RCR 酵素を複製開始に関わる iE (initiation Enzymes, 8genes), 複製伸長に関わる eE (elongation Enzymes, 13genes), 分離などに関わる sE (supplementary Enzymes, 5genes) の 3 つにグループ分けした。このグループごとにオペロン状にコードした DNA カセットを構築し、当研究室独自の連結法である RA-RCR 法を用いて iE(20kb), eE(30kb), sE(20kb) サブゲノムをそれぞれ構築した。次に 3 種のサブゲノムを環状 DNA 同士の連結増幅法である Fusion-RCR 法を用いることで融合した。この手法により 50 kb を超える長鎖環状 DNA について、遺伝子の順序の入れ替えや改変などを効率的に進められるようになった。

PURE-RCR 供給系の構築と、RCR ゲノムの起動

構築した RCR ゲノムからの発現により、RCR 複製が駆動するかを確認した。先行研究で、転写と複製フォークの衝突により DNA 複製が阻害されることがわかっている¹。そのため、衝突の影響を考慮せず、全ての遺伝子発現量が十分かを確認する実験系を構築した。この系は RCR ゲノムから複製タンパク質の発現を行い、その複製タンパク質により 4kb のレポーター DNA が増幅するという実験系である。この系を用いて RCR ゲノムからの遺伝子発現が複製を駆動するのに十分か確認したところ、複製開始に関わるタンパク質群 (iE group) と、以前から指摘されている SSB タンパクの不足が確認された。

次に、タンパク質発現量の上昇のため、透析による基質供給を試みた。その結果、RCR ゲノムからの遺伝子発現のみによって、RCR 複製を駆動することができ、レポーター DNA の増幅を達成できるようになった。一方で DNA 増幅効率が低かったため、さらなる検討を行ったところ、複製開始に関わる DnaG の発現を上昇させる遺伝子設計によって増幅効率をさらに高めることができた。しかし、複製効率を上昇させても、RCR ゲノム自身の複製は確認されなかった。

そこで、示唆されていた SSB の発現を上昇させる遺伝子設計を構築し、その複製活性を確認した。SSB の発現量上昇により、これまで増幅が確認されていなかった RCR ゲノム自身の自己複製を達成することができた。

ダーウィン進化系に向けた検討

ダーウィン進化のためには、1 分子の RCR ゲノムから複製タンパク質を発現し、RCR ゲノム自身の増幅を行わなければならない。そのためには、同一 DNA 上で起こる転写と複製の衝突の影響を低減させる必要がある。eE サブゲノムでは複製開始関連の iE と sE タンパク質を供給することで自己複製が可能であるもののその効率はまだ低い。そこで、eE サブゲノム自己複製系において、余剰な転写を抑える検討を行った。その結果、T7 RNA polymerase の濃度を従来の 1/4 の濃度に減らすことにより、自己複製効率の上昇に顕著に寄与した。

研究成果の概要 (つづき)

さらに転写の終結効率も重要では無いかと考え、T7 terminator をより強力な T7hyb10 Terminator に変えた DNA コンストラクトをテストした。その結果終結効率を上昇させることで自己複製効率の上昇に顕著に寄与した。元々使用していた T7 terminator の転写終結効率は 70%程度であると知られており²、終結せずに DNA 鎖上に残ってしまった T7 RNA polymerase が複製を阻害していたのでは無いかと考えられる。以上より、自己複製に重要なゲノム構造を見出すことに成功した。

また、ダーウィン進化のためには遺伝型と表現型を対応づける区画が重要であるため、検討した。区画には Water in Oil(W/O) Droplet を用いた。eE サブゲノムの自己複製を W/O Droplet の中で確認したところ、Bulk の反応と同じく複製を確認できた。しかし、1つの Droplet 内に 1つの eE サブゲノムが含まれる条件では自己複製が確認されなかった。低分子状態では上で記した転写と複製の衝突の問題が大きくなると考えられるため、さらなる検討が必要である。

以上の結果より、本研究で初めて RCR ゲノムからの転写翻訳によって RCR システム全体を発現することに成功した。この結果は、RCR ゲノムの自己複製系の構築に近づいただけではなく、RCR のタンパク質をもはや大腸菌から精製せずに、DNA と PURE system のセルフリー系のみで作成させることができることを示した。

さらに RCR ゲノム自身の自己複製系の構築にも成功し、自己複製に重要なゲノム構造を見出した。これらの知見を組み合わせることや大腸菌の複製の再活性化のシステムを導入することで、1分子由来の RCR ゲノムの自己複製を達成することができると考えている。

参考文献

1. Brüning, J.-G. & Marians, K. J. Bypass of complex co-directional replication-transcription collisions by replisome skipping. *Nucleic Acids Res.* 49, 9870–9885 (2021).
2. Calvopina-Chavez, D. G., Gardner, M. A. & Griffiths, J. S. Engineering efficient termination of bacteriophage T7 RNA polymerase transcription. *G3* 12, (2022).

研究発表 (研究によって得られた研究成果を発表した①~④について、該当するものを記入してください。該当するものが多い場合は主要なものを抜粋してください。なお、成果発表を確認できる資料を合わせて研究成果報告書提出フォームより提出してください(紙媒体等、研究成果報告書提出フォームから提出できない場合は、別途リサーチ・イニシアティブセンターへ提出してください)。

- ①雑誌論文(著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年、ページ)
- ②図書(著者名、出版社、書名、発行年、総ページ数)
- ③シンポジウム・公開講演会等の開催(会名、開催日、開催場所)
- ④その他(学会発表、研究報告書の印刷等)

※修士論文・博士論文は含みません。

④その他(学会発表、研究報告書の印刷等) 4件

○山岸勇太, 川上直貴, 長谷部友憲, 末次正幸.”複製遺伝子群の転写翻訳で駆動する環状 DNA 自己複製系”, 第 19 回 21 世紀大腸菌研究会, 21 世紀大腸菌研究会、2023 年 6 月 29 日, 優秀ポスター受賞

○山岸勇太、園山能基、川上直貴、長谷部友憲、末次正幸、“複製遺伝子群の転写翻訳で駆動する環状 DNA 自己複製系”、「細胞を創る」研究会 16.0、「細胞を創る」研究会、2023 年 9 月 26 日

○山岸勇太、園山能基、川上直貴、長谷部友憲、末次正幸、“複製遺伝子群の転写翻訳で駆動する環状 DNA 自己複製系の構築に向けた検討”、第 46 回日本分子生物学会年会、2023 年 12 月 8 日

○Yamagishi Yuta, Sonoyama Naoki, Kawakami Naoki, Hasebe Tomonori, Su'etsugu Masayuki, “TOWARD A CONSTRUCTION OF SELF-REPLICATING SYSTEM DRIVEN BY TRANSCRIPTION AND TRANSLATION OF REPLICATION GENES”, Asian Synthetic Biology Association 2023、2023 年 12 月 15 日