



Title	In vitro constitution of an artificial DNA replication system coupling with gene expression
Author(s)	酒谷, 佳寛
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72599
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (酒谷 佳寛)	
論文題名	<i>In vitro</i> constitution of an artificial DNA replication system coupling with gene expression (遺伝子発現と共役する人工DNA複製系の <i>in vitro</i> 構成)
<p>論文内容の要旨</p> <p>The reconstitution of cellular functions <i>in vitro</i> using defined molecules for the production of useful biological materials is considered as a new technology, and has attracted considerable levels of attention. Such reconstituted systems have successfully produced useful proteins and nucleic acids, which were produced in insignificant amounts by natural cells or traditional chemical synthesis. However, humans must dedicate considerable levels of time and effort, and keep developing reconstituted systems for achieving biological material production, because the reproductive function has not been achieved in reconstituted systems yet. The first step in reconstituting a system exhibiting reproductive ability is the reconstitution of a DNA replication system, a blueprint for reproduction, and its gene expression. The purpose of this dissertation is to reconstitute a DNA replication system.</p> <p>In Chapter 1, I described the general background and design of a DNA replication system. I planned the construction of a replication system consisting of circular DNA, using phi29 DNA polymerase and Cre recombinase. The phi29 DNA polymerase was encoded in the circular DNA and expressed from it in a reconstitution translation system.</p> <p>In Chapter 2, I described the construction of a DNA amplification system, which is a part of the desired DNA replication system that enables evolutionary DNA modifications to occur, using phi29 DNA polymerase and a reconstituted translation system. A major problem with this plan was found to be that the reconstituted translation system significantly inhibited the DNA synthesis reaction, which occurred in the presence of phi29 DNA polymerase, and the translation and DNA synthesis did not couple with each other. To reduce the inhibition of DNA synthesis by a reconstituted translation system, I used the customized concentrations of the seven components of the reconstituted translation system and successfully demonstrated the synthesis of linear DNA by the phi29 DNA polymerase expressed from circular DNA. The DNA was amplified up to 10 fold in 12 hours.</p> <p>In Chapter 3, I aimed to develop the desired DNA replication system that also exhibited gene expression. First, I found that Cre recombinase had an inhibitory effect on the DNA synthesis reaction in the presence of phi29 DNA polymerase. Next, I attempted to reduce the inhibition attributable to Cre recombinase through evolutionary engineering, using the DNA amplification system that was constructed as shown in Chapter 2. For that purpose, I repeatedly performed mutagenesis and used a selection cycle for a DNA sequence, including for the phi29 DNA polymerase gene approximately 50 times, and obtained a DNA sequence that could synthesize DNA via a process in which the inhibition by Cre recombinase was lower. Finally, I observed that the desired circular DNA replication system was achieved using the DNA sequence obtained with the customized reconstituted translation system. The circular DNA was replicated up to 5 fold in 16 hours, using the DNA replication system.</p> <p>Chapter 4 includes the concluding statements. This gene expression-coupled DNA replication system is expected to represent an important step towards the construction of a reproductive reconstituted system, because such a DNA replication system is essential for producing a reproductive reconstituted system, which would lead to the highly efficient, low-cost production of proteins and amino acids that are not compatible with natural cells.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (酒 谷 佳 寛)			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	教授	松田 史生
	副 査	教授	前田 太郎
	副 査	教授	清水 浩
	副 査	教授	若宮 直紀
	副 査	教授	松田 秀雄
	副 査	招へい教授	市橋 伯一 (東京大学)

論文審査の結果の要旨

本論文は天然の細胞では扱えない有用物質の生産に向けた新技術として、天然の細胞の機能のうち必要なものだけを試験管内で人工的に再構成する「人工細胞」の作成を目指したものである。本論文は人工細胞を生産するために必要な、遺伝子発現と共役するDNA複製系の構築を志向している。これまでに、環状DNAを鋳型にして直鎖状DNAを合成するDNA合成酵素と、直鎖状DNAを環状に組換える酵素を用いることで、DNAの複製系を構成しうることが提案されている。本論文は、その実装を試みている。環状DNAを鋳型にして直鎖状DNAを合成するphi29DNA合成酵素と、直鎖状DNAを環状に組換えるCre組換え酵素を用いて、環状DNAの複製系を構築することを目的としている。

第1章は序論である。本研究の背景と目的について述べている。

第2章では無細胞翻訳系がphi29DNA合成酵素のDNA合成反応を阻害するために目的のDNA複製系を構築できないという問題に取り組んだ。無細胞翻訳系に含まれる7成分の濃度の最適化によってこの問題を解決することを目指した。これにより、無細胞翻訳系によるphi29DNA合成酵素の阻害を解消し、遺伝子発現で合成されたphi29DNA合成酵素によって直鎖状DNAが合成される系が構築できたことを示している。

第3章では、この系をもちいて、Cre組換え酵素がphi29DNA合成酵素を阻害する課題に進化工学的な手法で取り組んだ。phi29DNA合成酵素の遺伝子配列に対して変異導入と選択を約50回繰り返すことで、Cre組換え酵素に阻害されずDNA合成できるphi29DNA合成酵素の遺伝子を得ている。さらに、改良後のphi29DNA合成酵素遺伝子がコードされたDNAと最適化後の無細胞翻訳系を使うことで、遺伝子発現で合成されたphi29DNA合成酵素とCre組換え酵素が働き、目的の環状DNA複製系の構築が達成できたことを確かめている。

第4章では、本研究で得られた知見をまとめ、展望について述べている。

このように、本論文では遺伝子発現と共役するDNA複製系の構築にむけ、無細胞翻訳系の最適化(第2章)、進化工学によるphi29DNA合成酵素の最適化を行い、環状DNAを鋳型にして直鎖状DNAを合成するphi29DNA合成酵素と、直鎖状DNAを環状に組換えるCre組換え酵素を用いて、環状DNAを複製する系の構築に初めて成功した(第3章)。本研究をもとに、環状DNAに人工細胞の構成分子の遺伝子をコードすることで人工細胞による人工細胞の生産が可能になれば、増殖や自律的進化の機能をもつ人工細胞が実現され、天然の細胞に適合しない物質の高効率で低コストな生産が可能になるなどの応用が可能であり、情報科学の発展に寄与することが期待される。したがって、本論文は博士(情報科学)の学位論文として価値のあるものと認める。