

【目的】近年の再構成系での人工遺伝子回路関連の研究の進展によって、再構成系を用いて人工遺伝子回路により振動現象を創り出すことが可能となりつつある。例えば、Niederholtmeyer らはマイクロ流体デバイスを用いることにより、無細胞タンパク質発現系を封入したマイクロチャンバに溶液交換機能を付加し、DNA 濃度を一定に保ちつつ、合成されたタンパク質を一定の割合で拡散により除去するシステムを構築した。これにより人工遺伝子回路を用いてマイクロチャンバ内での遺伝子発現を振動させることに成功した。また、Karzbrun らは、マイクロ流体デバイス中のマイクロチャンバ内に DNA を固定する技術を開発し、さらに前出の研究と類似した溶液交換機能を付加することにより、DNA がマイクロチャンバ内にとどまり続け、合成されたタンパク質を一定の割合で拡散により除去するシステムを構築した。これにより前出の研究と同様にマイクロチャンバ内での遺伝子発現を振動させることに成功した。しかし、これらの振動系は、いずれも合成されたタンパク質を拡散によりマイクロチャンバ外部に排出することで成り立っており、実際に細胞内で起こっているタンパク質の分解によるタンパク質濃度の低減を反映していない。今後、振動する人工遺伝子回路を用いて細胞内での現象や人工細胞内の反応を制御するためには、実際に細胞内での現象を反映した「タンパク質の分解による振動回路の構築とその理解」が必要であると考えられる。そこで本研究では、タンパク質の分解機能を付加した再構成系を作製し、タンパク質分解による振動回路の構築を目的とする。

【方法】タンパク質分解酵素 (ClpX) を発現した大腸菌から細胞抽出液を作製した。この細胞抽出液を用いて無細胞タンパク質合成・分解系を作製することにより、タンパク質の合成と分解を同時に可能な再構成系を構築した。また、大腸菌の細胞内で遺伝子発現が振動することが示されている人工遺伝子回路を参考に、再構成系で振動する人工遺伝子回路の設計と、それを実現するプラスミドの作製を行った。人工遺伝子回路を構成するプラスミド DNA をマイクロ流体デバイス中のマイクロチャンバ内に固定化し、マイクロチャンバ内に無細胞タンパク質合成・分解系を供給することにより、長時間に渡って再構成系を動作させ、その挙動を観察することが可能となった。

【結果】マイクロ流体デバイス中のマイクロチャンバ内に遺伝子発現が経時的に振動する人工遺伝子回路を構成するプラスミド DNA を固定化し、その遺伝子回路の挙動を蛍光顕微鏡により観察した。この人工遺伝子回路は、振動回路を構成する部分と、レポーター回路を構成する部分から成り、レポーター回路によって遺伝子回路の挙動を GFP 由来の蛍光強度から推測することができる。実際にマイクロチャンバ内の蛍光強度の経時変化を計測したところ、経時的な振動現象を示す結果となった。

振動する人工遺伝子回路を封入したマイクロチャンバ内の蛍光強度の経時変化

