

【目的】染色体構造は、長鎖DNAを細胞の核内に収納するだけでなく、染色体を構成するタンパク質やDNAが化学修飾を受けることで、ゲノム情報に依存しないエピジェネティックな経路で遺伝子の発現制御に重要な機能を持っている。この構造を人工的に再構成することは、細胞の新規制御法の確立や、非天然修飾による染色体構造制御機構の開発、染色体構造の生化学的な機能解明など様々な分野・技術開発に重要である。しかし、未だ、染色体構造を再構成し、非細胞環境下で転写・翻訳することや、エピジェネティック制御の細胞外再構成は達成されていない。その理由として、細胞外で、Widom 601 配列などのヒストンタンパク質と相互作用しやすい配列を用いずにヌクレオソーム構造を再構成することが困難である、という課題が挙げられる。そこで、ヌクレオソーム構造を脂質二重膜小胞（リポソーム）に封入し、セルソーターによってヌクレオソーム構造を検出・分取することで、再構成効率の低いヌクレオソームを精製できるようになり、人工染色体の作製と発現系の開発が可能になると考えた。具体的には、ヌクレオソーム構造を形成していないDNAを内封したリポソーム内では、活性化されたCas13aによりRNase Alertの蛍光が検出され、ヌクレオソーム構造が形成されている場合には、リポソーム内で赤色蛍光タンパク質が無細胞翻訳されることで、蛍光の種類によってヌクレオソームの有無を識別し、分取する手法の開発に取り組んでいる。本研究では、その基盤技術となるCas13aの精製、無細胞翻訳系によるCas13aの合成、Cas13aのRNA切断活性の検出を行った。

【方法】再構成無細胞翻訳系 PUREfrefx 1.0 を用いて Cas13a を合成した。その後、独自に設計した crRNA と target RNA を加え、RNA 切断により蛍光が検出できる RNase Alert を用いて、無細胞翻訳した Cas13a の酵素活性を検出した。まず、UV ランプによる切断された RNase Alert の蛍光検出と plate reader を用いて Cas13 の有無による相対的な蛍光輝度を測定した。

【結果】再構成無細胞翻訳系によって合成された Cas13a が構造を形成し、酵素活性を有すること、および本研究でデザインした crRNA および target RNA が機能することを示した。しかし、Cas13a の分子数に対して、crRNA、target RNA 分子が不足しており、RNase Alert 切断量が低いためにフローサイトメーターを用いて蛍光を検出できない可能性が示唆された。そのため、無細胞翻訳系で Cas13a を合成した後に精製するため、N 末端に His-tag を導入し、精製、濃度の決定と RNA 濃度の検討を行う必要がある。RNase Alert を RNaseA で切断した場合にはフローサイトメーターで蛍光を検出できたため、Cas13a の活性を上げることで、セルソーターでの検出は可能になると考えられる。

ヌクレオソーム構造がないときのリポソーム内蛍光検出の概略

