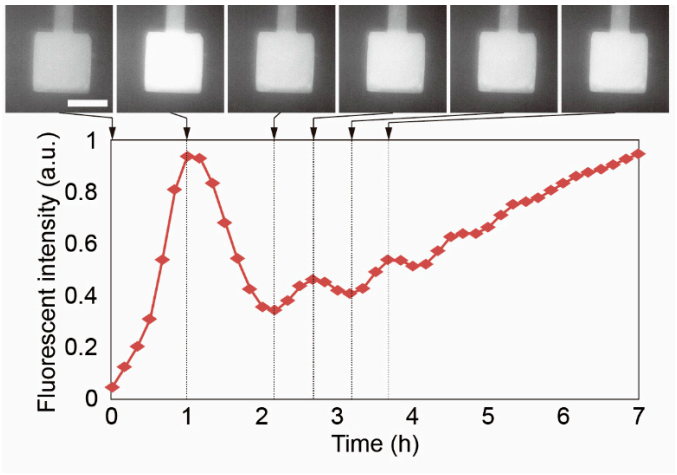
| 198　再構成系を用いた振動する人工遺伝子回路の構築 | 外岡　大志 |
|---|---|

**【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



# 198. 再構成系を用いた振動する人工遺伝子回路の構築

外岡　大志

京都工芸繊維大学 機械工学系 輸送現象制御学研究室

Key words：人工遺伝子回路，無細胞タンパク質発現，振動系，マイクロ流路

## 緒　言

人工遺伝子回路とは、宿主の遺伝子発現の時空間パターンを制御するように遺伝子の組み合わせが設計・構築された、遺伝子の相互作用ネットワークである。これまでバクテリアや哺乳類細胞内に人工遺伝子回路を構築し、遺伝子発現が経時的に振動する細胞や、細胞の二次元パターニングなどが実現されてきた。近年、これら人工遺伝子回路を細胞外、例えば細胞抽出液等を利用した再構成系で動作させる研究が進められ、基本的な人工遺伝子回路が再構成系内でも構築されている。再構成系は細胞に比べ応答の環境依存性が小さく、ブラックボックスとなる部分も少ないため、人工遺伝子回路の動作原理の理解をするためのプラットフォームとして利用されている。しかし、従来の再構成系内で構築された人工遺伝子回路は、ある特定の物質に応答して蛍光強度が上昇する回路や、二種類の物質がどちらも存在するときに蛍光強度が上昇するアンド演算回路などの非常に単純なものに限られている［1，2］。系の状態遷移を考えると、これまでの再構成系での人工遺伝子回路は、ある特定の物質が系を初期状態から定常状態への遷移を引き起こすという単純な回路に過ぎなかった。そこで近年では、より高度な機能を有する人工遺伝子回路実現への重要な一歩として、再構成系で遺伝子発現が振動する人工遺伝子回路の構築が進められてきた。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［3］。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［4］。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行った［5］。

## 方　法

### 1. 無細胞タンパク質発現・分解系の作製方法

無細胞タンパク質合成・分解系を作製するために、2 種類の大腸菌の細胞抽出液を作製した。一つは、BL21-Gold-de3 株から一般的な無細胞タンパク質発現系を作製する方法［6］と同様の手順で作製した細胞抽出液（通常の細胞抽出液）、もう一つは、BL21-Gold-de3 株に ClpX タンパク質を発現するプラスミドを導入し、ClpX タンパク質を誘導発現させた大腸菌を用いて作製した細胞抽出液（ClpX 含有細胞抽出液）である。後者の細胞抽出液には ClpX タンパク質が含まれており、細胞抽出液中に元々含まれる ClpP タンパク質と複合体（ClpXP）を形成し、タンパク質分解酵素として機能する。

**2. マイクロ流体デバイスの作製およびこれを用いた実験方法**

マイクロチャンバ（Microchamber）を備えたマイクロ流体デバイスを、シリコーンの一種であるポリジメチルシロキサン（Polydimethylsiloxane、PDMS）を用いた一般的なソフトリソグラフィー技術により作製した（図 1a）。メイン流路とマイクロチャンバの高さは、それぞれ 27 μm と 50 μm であった。メイン流路（Main channel）の左端は二股とし、それぞれに入口を配置した。2 つの入口にはそれぞれテフロンチューブを介してシリンジ（Syringe）を繋ぎ、各シリンジには細胞抽出液とその他の無細胞タンパク質合成・分解系を構成する溶液を封入した。各シリンジに封入した溶液は、1 μL/h の流量で流路内に導入した。

**3. 人工遺伝子回路の作製とマイクロチャンバへの固定化方法**

遺伝子発現が経時的に振動する人工遺伝子回路は、過去に大腸菌の細胞内で振動現象を起こすことが示されている回路［7］を参考に作製した（図 1b）。これらのプラスミドを、マイクロ流路中のマイクロチャンバ内に以下の方法により固定した。2% Laponite 溶液に必要量のプラスミドを混合し、マイクロ流路内に導入した。マイクロチャンバ内に Laponite 溶液が満たされたことを確認した後に、400 mM HEPES 溶液をメイン流路に導入することにより、Laponite 溶液をゲル化させた。メイン流路に空気を通し、そのまま一晩室温で放置することにより、マイクロチャンバ内に残留したゲルを乾燥させた。

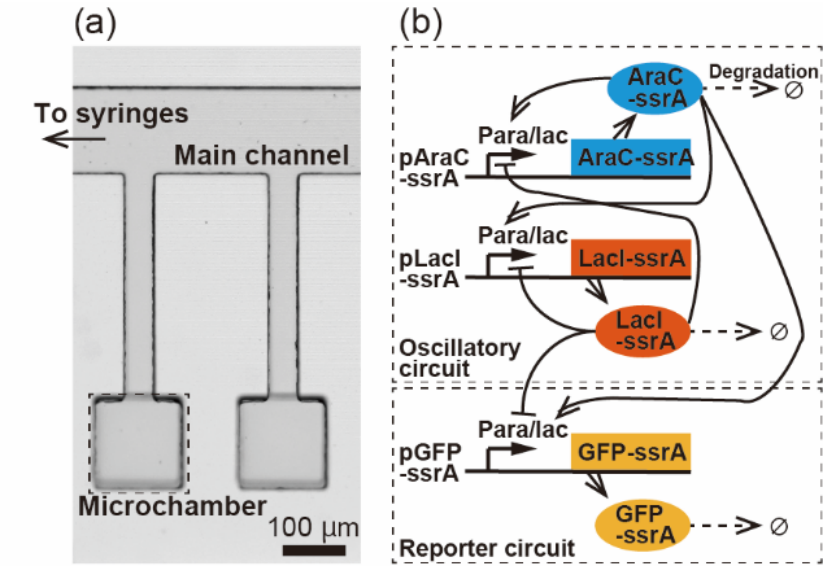



図 1. 作製したマイクロ流体デバイスおよび人工遺伝子回路

a）マイクロ流体デバイスの明視野顕微鏡写真。

b）遺伝子発現が経時的に振動する人工遺伝子回路の概念図。

## 結果および考察

**1. 作製した無細胞タンパク質合成・分解系によるタンパク質の合成と分解**

無細胞タンパク質合成・分解系の組成のうち、ClpX 含有細胞抽出液の割合を変化させ、タンパク質の合成および分解の挙動を調べた。この際、タンパク質分解の観察には、ClpXP によって認識されるアミノ酸配列（ssrA 分解タグ）を付加した GFP（GFP-ssrA）を用いた。また、タンパク質合成の観察には、常時発現のプロモーター下流に GFP 遺伝子をコードした DNA を用いた。この結果、25～50%の ClpX 含有細胞抽出液を含んだ無細胞タンパク質合成・分解系が最も効率的に GFP-ssrA を分解することがわかった（図 2a）。また、ClpX 含有細胞抽出液の割合が小さいほど、GFP の合成に適している傾向が明らかとなった（図 2b）。これらの結果から、タンパク質の合成と分解を同時に行うためには、25%の ClpX 含有細胞抽出液を含んだ無細胞タンパク質合成・分解系が適していると示唆された。以降の実験では、25%の ClpX 含有細胞抽出液を含んだ無細胞タンパク質合成・分解系をマイクロ流体デバイスに導入し、マイクロチャンバ内に無細胞タンパク質合成・分解系を構築した。

## 2. 遺伝子発現が振動する人工遺伝子回路の構築

マイクロ流体デバイス中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 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（Oscillatory circuit）と、レポーター回路（Reporter circuit）を構成する部分から成り（図 1b）、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（図 3）。今後、振動現象を示す制約条件についての検討や、振動周期および振幅の制御方法についても検討を重ねていく必要がある。これにより人工遺伝子回路を時間制御デバイスとしての応用可能性が広がるものと期待される。

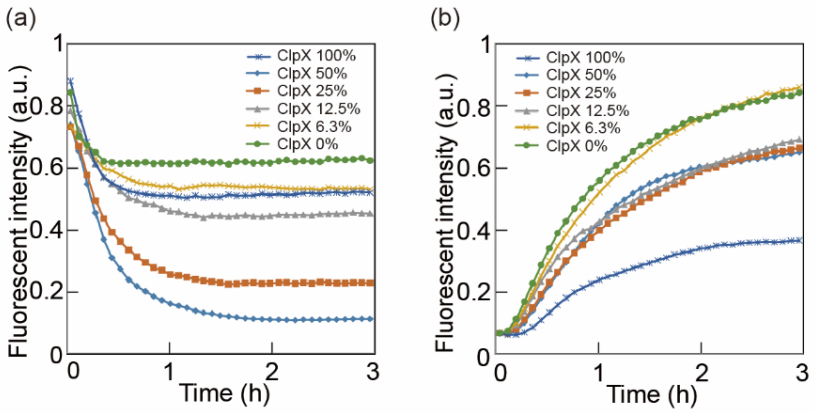



図 2. 作製した無細胞タンパク質合成・分解系を用いた GFP の分解および合成

a）分解タグ付きGFP（GFP-ssrA）の分解（初期のGFP-ssrAの濃度は2μM）。

b）GFPの合成。

凡例に示すClpXの割合は、無細胞タンパク質合成・分解系を構成する細胞抽出液の内、ClpX含有細胞抽出液の割合を示す。すなわち、ClpX 0%は通常の細胞抽出液のみから　成る無細胞タンパク質合成・分解系を、ClpX 100%はClpX含有細胞抽出液のみから成る無細胞タンパク質合成・分解系を示す。

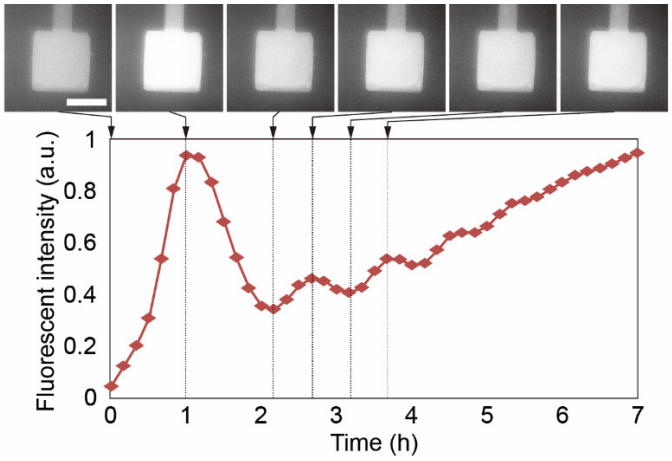



図 3. 構築した人工遺伝子回路を封入したマイクロチャンバ内の蛍光強度の経時変化

グラフ上部の写真は各時刻でのマイクロチャンバの蛍光顕微鏡画像である。蛍光強度のグラフは各時刻でのマイクロチャンバ内蛍光強度の平均値を示す。

スケールバーは 100μm を示す。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、カリフォルニア大学サンディエゴ校 Chemistry and Biochemistry 所属の Henrike Niederholtmeyer 博士、カリフォルニア大学サンディエゴ校 BioCircuits Institute 所属の Lev Tsimring 教授、カリフォルニア大学サンディエゴ校 Biological Sciences 所属の Jeff Hasty 教授である。最後に、本研究に対しご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

## 文　献

1) Garamella J, Marshall R, Rustad M, Noireaux V. The All E. coli TX-TL Toolbox 2.0: A Platform for Cell-Free Synthetic Biology. ACS Synthetic Biology. 2016 Apr 15;5(4):344-55. Epub 2016 Feb 9. PMID: 26818434 DOI: 10.1021/acssynbio.5b00296

2) Adamala KP, Martin-Alarcon DA, Guthrie-Honea KR, Boyden ES. Engineering genetic circuit interactions within and between synthetic minimal cells. Nature Chemistry. 2017 May;9(5):431-439. Epub 2016 Nov 14. PMID: 28430194 DOI: 10.1038/nchem.2644

3) Niederholtmeyer H, Stepanova V, Maerkl SJ. Implementation of cell-free biological networks at steady state. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013 Oct 1;110(40):15985-15990. Epub 2013 Sep 16. PMID: 24043836 DOI: 10.1073/pnas.1311166110

4) Karzbrun E, Tayar AM, Noireaux V, Bar-Ziv RH. Programmable on-chip DNA compartments as artificial cells. Science. 2014 Aug 15;345(6198):829-832. Epub 2019 Jun 17. PMID: 25124443 DOI: 10.1126/science.1255550

5) Tonooka T, Niederholtmeyer H, Tsimring L, Hasty J. Artificial Cell on a Chip Integrated with Protein Degradation. Proceedings of the IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems. 2019 Jan;8870666:107-109. DOI: 10.1109/MEMSYS.2019.8870666

6) Sun ZZ, Hayes CA, Shin J, Caschera F, Murray RM, Noireaux V. Protocols for Implementing an Escherichia coli Based TX-TL Cell-Free Expression System for Synthetic Biology. Journal of Visualized Experiments. 2013 Sep 16;79:e50762. PMID: 24084388 DOI: 10.3791/50762

7) Stricker J, Cookson S, Bennett MR, Mather WH, Tsimring LS, Hasty J. A fast, robust and tunable synthetic gene oscillator. Nature. 2008 Nov 27;456(7221):516–519. Epub 2008 Oct 29. PMID: 18971928 DOI: 10.1038/nature07389