

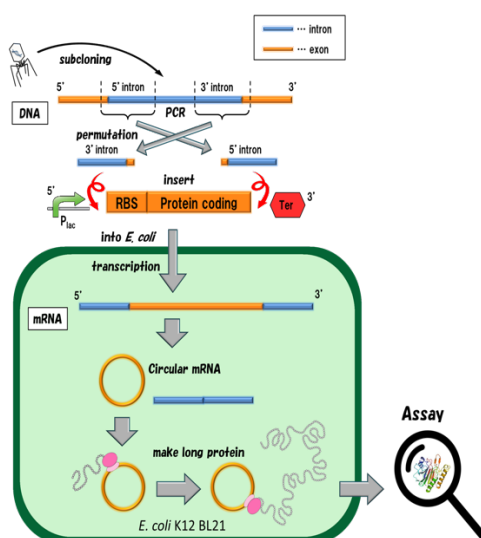
iGEM Gifu 2018 のテーマに関して

1. はじめに

iGEM Gifu 2018 では「RNA の環状化を用いた無細胞系でのタンパク質大量合成法の作製」を目標に活動することにした。RNA の環状化は iGEM Gifu 2014, 2015 が行っていたテーマであるが、これは失敗に終わっており、極めて難しいテーマといえる。なぜ失敗するかといえば、mRNA の環状化は大腸菌にとって極めて大きな負荷となるためである。タンパク質合成の律速段階が物理的に消えることで、タンパク質合成能は限りなく上昇し、ほぼ無限大にタンパク質を合成できる。ただし、大腸菌はいわば閉鎖系、すなわち closed system である。タンパク質の原材料であるアミノ酸がなくなれば、タンパク質は作れない。あまりにも早いスピードで合成が起ることで、大腸菌の生育は阻害され、効率的な方法とは言い難かった。そこで、今年度は合成に特化した無細胞系を用いて実験を行う。無細胞系とは大腸菌などから転写・翻訳に関わる因子を取り出し、これを再度チューブ内に混ぜ合わせることで、生物的に、ただし無生物の状態で作製することを指す。これを用いれば、「大腸菌よりは”マシン”な形で無限大タンパク質を作れんじやないか」というのがリーダーの狙いである。今年は無細胞系で長鎖タンパク質を作ることを目標にしているので、機能性がなくても、とにかく作れさえすれば金賞である。ただし、機能性があるものを作れば、”論文”が書けるので、当然それも狙っていく。以上が 2018 の軽い説明である。

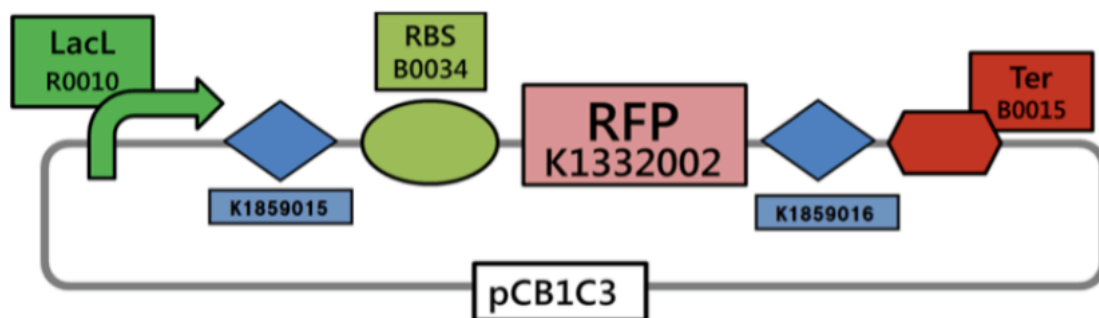
2. 実験内容

下図は環状化の流れである。T4 ファージからクローニングしたセルフスプ



ライシングを促進するリボザイム (RNA からできている酵素) をコードしたパーツを RBS と Protein coding の結合フラグメント上流と下流にそれぞれつけておくと、そこからセルフスプライシングが起き、化学的に環状化が起きる。RBS と Protein coding の結合フラグメントの中に終始コドンがなければ、リボソームが乖離することは理論上ないので、無限に翻訳が起きるのではない

かというストラテジーである。さて、以下図は 2015 年段階でのプラスミド設計図である。この図でいくと、K1859015 と K1859016 がリボザイムコーディングである。その中に RBS と RFP がある。これは大腸菌では機能するプラスミドであるが、無細胞系では useless である。なぜなら、無細胞系での多くは残念ながら T7 RNA polymerase のみを転写機能を持つ酵素として持つので、LacI と Ter をそれぞれ T7 promoter と T7 terminator に変える必要がある。したがって、これを PCR により行う。



これが終わると、次はリンカーの導入である。リンカーとはタンパク質をつなぐサイトのことであるが、今年度はポリマーをモノマー化することで機能性を維持するために、TEV protease リンカーを導入する。どのようなリンカーにするかは検討しているところであるが、こちらは完全合成で作成し、iVEC により導入する。いずれにせよ、扱うパーツは 1500 bp 以下となるので、導入効率はかなり高い。

3. コラボレーション

iGEM Botchan_Lab が作成したプロトコルに従い、実験を行う。こちらは後日詳細を送る。

4. Human Practice

何もしていない。ちょっとヤバい。