

<科目名> 基礎生命科学実験 α 、生命科学実験 α

<担当教員名> 市橋 伯一（先進科学研究機構・教授） ichihashi@bio.c.u-tokyo.ac.jp

<講義題目> アドバンスト理科・研究入門

<講義内容>

市橋研究室では、DNA、RNA、タンパク質といった生体分子を組み合わせて、生命の持つ機能を試験管内で再構成をする研究を行っています。近年の DNA 合成技術や無細胞遺伝子発現技術の向上により、遺伝子の配列さえわかれば、そこから DNA を合成し無細胞遺伝子発現系で転写と翻訳をして、その遺伝子にコードされているタンパク質の機能を発現させることができるようになって来ました（図1）。市橋研究室ではこの技術を使って、自己複製し進化する能力をもつ分子システムを実験室で進化させたり、より複雑な生命システムを試験管内で組み立てたりしています。

市橋研究室の受講者には、好きな遺伝子を PCR 法により増やして、プロモーターと SD 配列をつけたのちに無細胞発現系でタンパク質へと翻訳し、そのタンパク質の機能を検出してもらいます。この過程で基礎的な遺伝子の操作技術、タンパク質の取り扱いや解析技術を学んでもらおうと思います。増やす遺伝子は配列がわかっているものでかつゲノム DNA が手に入るものに限りませんが、何とかなる場合もあるので選抜用課題に希望を書いてみてください。

特に好みの遺伝子がない場合は（普通はそうだと思います）こちらでいくつか候補遺伝子を用意しています。前年度から継続している研究として、リブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCO) の遺伝子を候補として考えています。RuBisCO は光合成生物が二酸化炭素の固定に使っている酵素で、世界で最も多い酵素だと言われています。この酵素は未だ無細胞系で発現させて機能させた例はありません。この酵素を発現する無細胞システムを作ることで（少しだけ）大気中に二酸化炭素削減に貢献してみましよう。

一昨年の研究入門では *Rhodospirillum rubrum* の持つ RuBisCO を試験管内と人工脂質小胞（リボソーム）内で発現させて、CO₂ から ATP を作ることに成功しました。この成果は昨年、論文にもなりました (Sugii et al. Cell-Free Expression of RuBisCO for ATP Production in the Synthetic Cells, *Synthetic Biology* 8, ysad016 (2023))。今後、この RuBisCO を試験管内で人為進化させることにより、天然では達成できないレベルの高活性な RuBisCO を生み出せたら、新しい地球温暖化対策となると考えています。ただし、今のところ RuBisCO の活性は低く、人為進化するにも足りません。そこで今年度は、最近見つかった *Gallionella* sp. のもつ高活性な RuBisCO を導入してみて、無細胞条件でも高い活性を示すかどうかを調べます（ここまですりあえず一つの成果です）。そして余裕があれば、さらに人為進化手法の確立まで目指したいと思います。

また希望する学生には学会発表をしてもらうことも可能です。論文にしたい場合は、授業期間後に結構頑張ってもらえば可能です（でも、研究なのでうまくいかない場合もあります）。その場合は受講期間後も継続してサポートを行います。

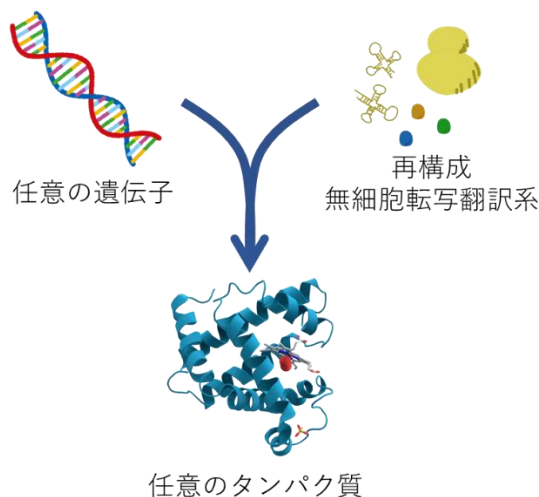


図1：無細胞転写翻訳系による遺伝子発現

本実習で用いる再構成無細胞転写翻訳系には、遺伝子の転写と翻訳に必要なすべての因子（リボソーム、翻訳タンパク質、tRNA、RNAポリメラーゼ、NTP、アミノ酸等）が含まれており、適切なプロモーターとシャイン・ダルガーノ配列をもった遺伝子を導入すれば任意のタンパク質を合成することができる。

<主な内容>

- ・PCRプライマーの設計とPCR
- ・DNAの精製
- ・無細胞遺伝子発現系を用いたRNAの転写とタンパク質の翻訳
- ・タンパク質のSDS-PAGEによる解析
- ・タンパク質の機能アッセイ
- ・希望に応じてそのほかの実験

<募集人数> 1-2名

<実験実施場所> 駒場IIキャンパス T棟301, 303号室

<個別ガイダンス>

全体ガイダンス（2024年3月21日13:00から）に引き続いて、同じZOOM会議室で市橋研究室の個別ガイダンスを行います。個別ガイダンスで選抜方法の説明をします。個別ガイダンス自体に都合がつかず参加できなくても、以下の説明を読んで選抜課題をメールで提

出してもらっても大丈夫です。

<選抜方法と選抜方針>

提出された課題の内容から選抜を行います。受講希望者は以下の選抜課題をメール添付で提出してください。

・選抜課題

1. 細胞内の分子機構のなかで非合理的だと思うことを1つ挙げて、どう作り直したら何らかの意味でもっと良くなるかを考察してみてください。

2. この実習で発現させて遺伝子があったら書いてください(無ければ書かなくていいです。評価には影響しません)。

3. そのほか、意気込みなどありましたらどうぞ。

3月24日までに上記1, 2について書いた答案をPDFにしてメール添付で以下のメールアドレスに送ってください。**3月36日**までに選抜された候補者にメールで連絡します。実習の内容や日程を相談し、合意が得られたのちに受講決定となります。

・提出先

ichihashi@bio.c.u-tokyo.ac.jp

・選抜方針

市橋研究室では、選抜において重視するのは「意欲」とDNA、RNA、タンパク質といった生体分子の「知識」です。ただ足りない知識は受講期間中に身につけると高い意欲があれば問題ありません。

・講義形式

zoom や slack などのオンラインツールの活用も予定していますが、基本的には研究室に来てもらっての対面になります。ほとんどの時間は実験を行うこととなります。デスクと実験台を用意します。