

人工遺伝子回路を搭載したリポソーム内でのホスホリパーゼ D の発現

(群馬理工¹・群大院理工²) ○李 水民¹・神谷 厚輝²

Encapsulation of phospholipase D expressed by artificial gene circuits into liposomes (¹*School of Science and Technology, Gunma University*, ²*Graduate School of Science and Technology, Gunma University*) ○Sumin Lee,¹ Koki Kamiya²

We developed a method for generating asymmetric liposomes, in which a symmetric membrane is converted to an asymmetric membrane at arbitrary timing. We use phospholipase D (PLD) and artificial gene circuits with AND-gate. The activity of PLD for the hydrolysis of phosphatidylcholine (PC) to phosphatidic acid (PA) was evaluated. Next, a protein expression from AND-gate DNA in the presence of both IPTG and *N*-acyl-L-homoserine lactone (AHL) was promoted into the liposomes. Finally, when IPTG and AHL were added to the outer solution of the liposomes, the conversion from PC symmetric liposomes to asymmetric liposomes with PA in the inner leaflet was observed by PLD expressed into the liposomes.

Keywords : Cell-free protein synthesis; liposome; phospholipase D

生体膜の構造は内外で組成が異なり、その非対称性は様々な機能を司っている。したがって、人工リン脂質膜リポソームの形成においても非対称膜であることが重要である。非対称膜の作製法は界面通過法やパルスジェット法などがあるが、これらによって作製されたリポソームは形成段階からリン脂質非対称膜であるため、非対称性に関与する機能が始動してしまう。本研究では、任意のタイミングでリン脂質対称膜を非対称膜に変えるという新たな非対称膜リポソーム作製法の開発を試みた。その手法としてホスホリパーゼ D (PLD) という酵素と AND-gate をもつ遺伝子回路を利用する。PLD によるホスファチジルコリン (PC) をホスファチジル酸 (PA) に加水分解する反応の活性は、吸光度測定により評価した(Fig.1)¹⁾。また、AND-gate DNA に IPTG とアシル化ホモセリンラクトン (AHL) を両方添加することで回路が起動し、リポソーム内でタンパク質発現を確認した²⁾。最後に、AND-gate によって PLD を PC 対称膜リポソーム内で発現させ、内側が PA の非対称膜リポソームへの変換を観察した。

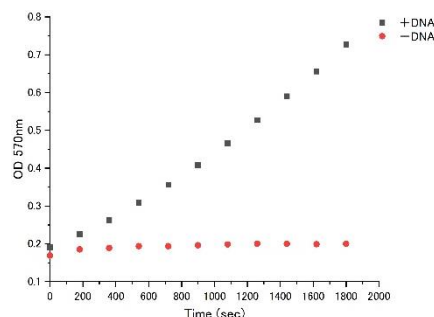


Fig.1 無細胞発現した PLD による加水分解の活性評価

1) Reika Tei, et al., bioRxiv. September 26, 2022

2) M. Schwarz-Schilling, et al., *Integr. Biol.* 2016, 8, 564-570