

スプライシング反応中間体の会合体に関する研究		
黒田研究室	02251047	田輪みな子

【背景・目的】 翻訳後修正システムに、プロテインスプライシング反応と呼ばれ、mRNA のスプライシングのような反応が存在する。その反応によって除去される部分をインティン(イントロンに対応)、結合される部分をエクステイン(エキソンに対応)と呼ぶ。本研究室では、*Synechocystis* sp. PCC6803 由来 Dna E タンパク質のインティンタンパク質と GFP を、それぞれ N 末端領域と C 末端領域の2つのフラグメントにし、N 末同士、C 末同士の断片を連結させ、その各断片によるスプライシング反応の有無を GFP の蛍光を用いて調べることが可能と考えた。(図 1) 今まで断片化 GFP として、173 残基目で切断した GFPuv を用いてスプライシング反応に関する研究を行ってきたが、スプライシング反応に必須とされ、インティンに近接する数残基のエクステインをもたない GFP 断片同士を反応させた場合に於いて、知見通りに産物は存在しなかったが、蛍光が観測された。そこで、本研究では、原因解明の一つとして、GFP の断片化を 173 残基目から 145 残基目に変えたコンストラクトを作製し、同様にスプライシング反応を試みた。

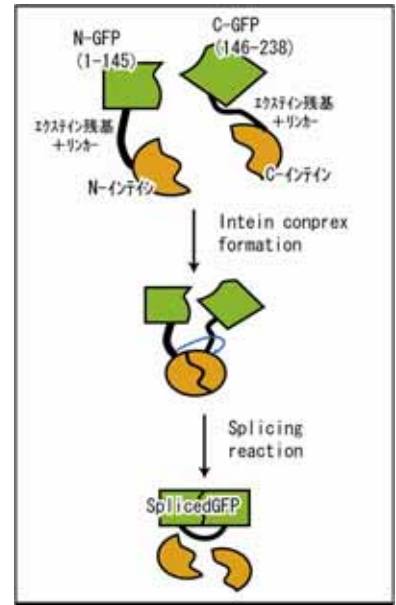


図 1、本実験のスプライシング反応模式図

【方法】 コンストラクトの作製として、145 番目で断片化した GFP とインティン断片を各々保持したプラスミドを用い、そこへエクステイン残基の導入を行い、N 末端側断片と C 末端側断片でそれぞれエクステイン残基のあるもの、無いものの計 4 種類(145(KFAEY)Int・146(CFNK)Int・145Int・146Int)について大腸菌で発現させ、His アフィニティーカラムで精製を行った。スプライシング反応にはグアニジン塩酸塩で変性させた粗精製タンパクを用い、各タンパク質断片を混ぜ合わせ、可溶化と同時にスプライシング反応を行った。反応させた後は、電気泳動による反応の確認、蛍光分光光度計でのスペクトルの測定を行った。

【結果と考察】 各断片を混ぜ合わせ、スプライシング反応させた溶液を電気泳動で確認した結果、エクステイン残基をもつ断片でのスプライシング反応産物(splicedGFPuv)が確認できた(図 2)。4 種類のスプライシング反応液それぞれにおける蛍光スペクトルの測定を行ったところ(図 3)、スプライシング反応溶液で観測される蛍光は皆同様のものであるということが判明した。これらのスペクトルで、ピークの最大吸収波長が、約 5nm 異なることは、天然エクステイン残基の影響であると考えられる。よって、145 残基目で切断した GFP を用いたスプライシング反応も、173 残基目同様、スプライシング反応産物が存在しないのに蛍光が観測され、モニター化への応用ができないことが判明した。

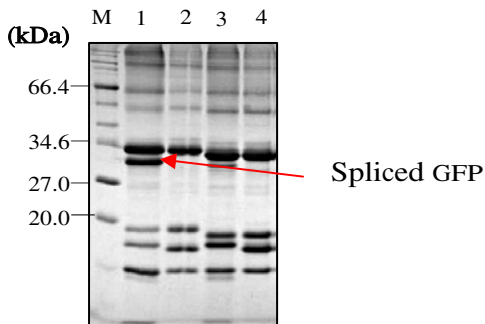


図 2. スプライシング反応の確認

Lane1:145(KFAEY)Int と 146(CFNK)Int
 Lane2:145(KFAEY)Int と 146Int
 Lane3:145Int と 146(CFNK)Int
 Lane4:145Int と 146Int

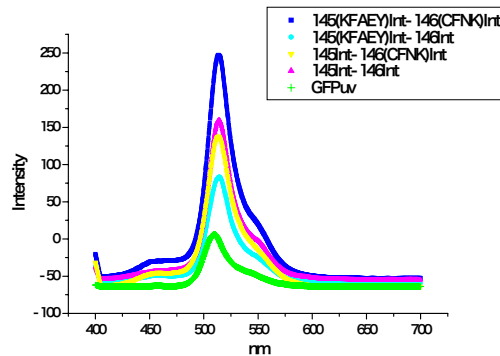


図 3. スプライシング反応液の蛍光スペクトル
 各スプライシング反応溶液は各断片が 20 μM になるように調整したものを、GFPuv は 100nM で測定した。