

トランスプロテインスプライシング反応条件の最適化						
L1112-08	氏名	上岡 哲矢	主査	黒田	副査	大野・長澤・稲田・津川

【はじめに】

近年、注目されている蛋白質の翻訳後修飾のひとつに、ペプチド結合部位の切断とペプチド結合の再形成によるプロテインスプライシングとがある。この反応によって除去されるペプチドをインテインといい、ライゲーションされるタンパク質をエクステインという。この反応は、*in vivo*でも *in vitro*でも観測されており、その汎用性の高さから、スクリーニング、NMRやタンパク質精製などに応用されている。本研究で用いる *Synechocystis* sp. PCC6803 由来 *Ssp* DnaE インテイン蛋白質の特徴は、N末端領域とC末端領域が別々のペプチド鎖として存在し、インテインが2つの分子からなることである。この起こす反応をトランスプロテインスプライシング反応といい、その利点は別々に前駆体タンパクを精製し利用できるために、応用の幅が広いことがある。しかし、この反応には解決すべき課題が2つ存在する。1) 全長タンパク質を2つの断片に分断する時、分断したタンパクが不溶性化してしまうこと、2) 天然エクステイン由来の反応に必須なアミノ酸残基が数残基連結部分に挿入されてしまうことである。ここに、本研究においてそれらの課題を克服する方法を開発した。

【方法及び結果】

1) 不溶性画分に存在するタンパクの可溶化がアルギニン塩酸を透析外液として用いることによって可能であることが良く知られていたため、新たな反応方法として、各断片を混合した状態で透析による反応を行い、その最適条件の検討した。その結果、1Mアルギニン塩酸 (1nMDIT) を透析外液として一晚透析した後、50mMTris-HCl (pH. 8.0) (1nMDIT) を透析外液として一晚透析した時、最も反応効率が良いことを明らかにした。

2) 反応に必須なアミノ酸残基が挿入されることを避けるために、まず、反応に必要な最小限の残基を求めた。求めた必要最小限の必須アミノ酸残基 EYCFNと分断したいタンパク (本研究では GFPuv を使用) で相同性検索を行い、その相同性の高い部位の相同でない残基を N144C、Y145F に置換し、その EY と CFN 部分で分断した各前駆体タンパクを 1) の反応方法で反応させた (Fig. 1)。また、Y と F の相同性の高さを利用し、Y145 をそのままにしたものの反応も確かめた (Fig. 2)。この置換の結果、従来の挿入される方法の反応産物 GFPuv の蛍光強度よりも強い蛍光強度が得られたことから、必須アミノ酸残基の挿入による反応産物の蛍光活性変化が押さえられた (Fig. 3)。この方法の利点は、5残基全部相同性が無くとも利用できる点にあり、連続して存在している5残基のうち3残基が相同性を示せば、利用できるということである。

【結論】

以上のことから、不溶性化による反応効率低下の問題と必須アミノ酸残基挿入という二つの問題が解消できた。今後、この結果はインテインを利用する上で、重要な知見となるだろう。

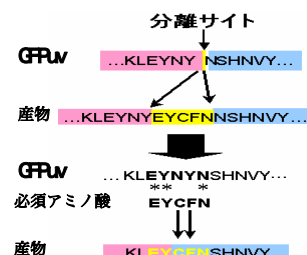


Fig. 1 相同性検索
従来の挿入される方法 (図上)
から置換する方法 (図下) へ
相同性検索結果を基に行った

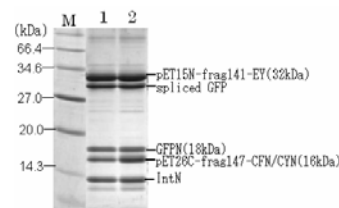


Fig. 2 必須アミノ酸残基に置換した前駆体を用いた反応
Lane 1 は pE15N frag141-EY と pE126C frag147-CFN
Lane 2 は pE15N frag141-EY と pE126C frag147-CFN

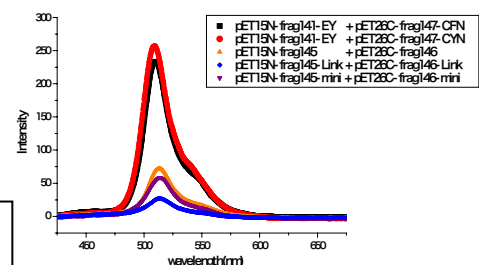


Fig. 3 各反応産物の蛍光スペクトル
各反応産物の蛍光波長を示す