

Ssp.DnaE インテイン蛋白質の精製に対する発現系の構築		
黒田研究室	学籍番号 103251506	上岡哲矢

【背景及び目的】

シアノバクテリアなどでは、タンパク質翻訳後にRNAのスプライシングに似たタンパク質スプライシング機構が存在する。このタンパク質スプライシング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。この反応は自己触媒作用によるもので、①インテインのN末端システインのアシル転位②CエクステインのN末端システインとtransエステル化反応、そして、③インテインのC末端アスパラギンによるペプチド切断反応という3段階の反応機構に分けられる。最近では、このタンパク質スプライシング反応を、スクリーニング、NMRやタンパク質精製に応用した報告がされている。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。そのため、ポリペプチド鎖を個々に発現・精製した後、N、C末端タンパク質断片を融合させることができ、部分ラベルしたNMR試料の作成を可能にする。しかし、2分子インテインにおけるスプライシング反応効率は、N、C末端断片同士が沈殿現象などを起こさず効率よく会合することに依存し、部分ラベルしたタンパク質の作製の効率は非常に悪い。そのため、本研究の目的として、N、C末端インテイン間の相互作用を向上させる手法として、強い分子間相互作用をするペプチドを各インテインに付加した発現系を構築する。

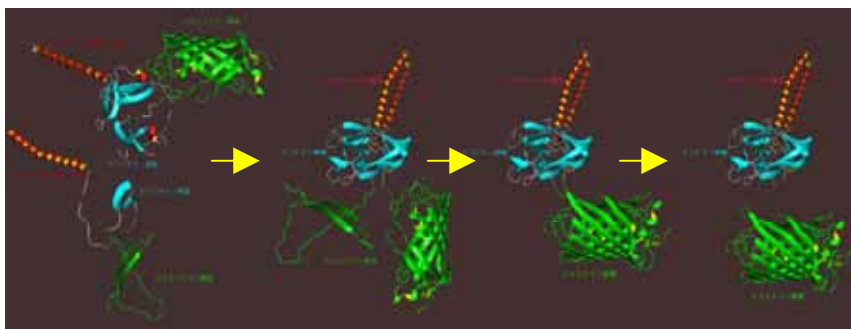


図1. 左から各タンパク質断片がタンパク質間相互作用により会合し、インテインが自己触媒的にタンパク質スプライシング反応をし、エクステインが生成される過程の模式図。赤色の α -ヘリックスがコイルドコイル構造を形成するペプチド、水色がN、C末端の各インテインである。

【方法】

本研究では、インテインに付加するペプチドとして強い分子間相互作用を有するコイルドコイル構造を形成するペプチドを用いる。また、エクステインにはGFPを断片化したものに各インテインとの間に、リンカーと、これまでに報告されている天然のエクステイン領域アミノ酸残基がタンパク質スプライシング反応に必要なということから、エクステイン残基を付加したタンパク質断片を大腸菌に発現させ精製する。精製したタンパク質断片を室温で24、48、72時間反応させ、タンパク質スプライシング反応をSDS-PAGEで確認する。

【結果と考察】

エクステイン残基を挿入したプラスミドを作製し、大腸菌による発現を行い、タンパク質を精製した。精製の後、タンパク質をSDS-PAGEとMS-TOFを用いて同定した結果、目的とするタンパク質と確認した。精製過程における目的タンパク質の一般的な手順では、不溶画分に行く問題が生じた。そのため、精製には、6M グアニジンを用いて目的タンパク質を変性状態で可溶化させ、1M アルギニンHCl (pH7.0)を透析外液として透析した後、アルギニンを透析外液にトリスバッファー (pH7.0)を用いて透析除去することで、可溶化が可能であることを明らかにした。現在、この手順で精製した各タンパク質断片を用いてタンパク質スプライシング反応の条件を調べている。また、現在アンチパラレルコイルドコイル構造を形成するペプチドを選択し、インテインのN、C末端同士がうまく会合するための配列の設計を進めている。今後は、コイルドコイル構造付加によるタンパク質スプライシングの効率を求める予定である。