

VII-29

グラム陽性細菌 *Bacillus megaterium* MB1株で発見された

group II intronの転写能力とその環境バイオテクノロジーにおける応用の可能性

東北学院大学工学部土木工学科 学生員○石井 秀学
東北学院大学工学部土木工学科 鈴木 貴之
科学技術振興事業団 黄 介辰
東北学院大学工学部 正会員 遠藤 銀朗

1.はじめに

DNAから転写されたRNAはそのまま働くとは限らず、さらにいくつかの工程を経て成熟RNAとなり、生体分子としての活性をもつようになることが多い。mRNA前駆体がタンパク質に翻訳される配列部分(exon;エキソン)は翻訳されない配列部分(intron;イントロン)によって複数の分節に分けられるため、成熟mRNAを形成する過程(splicing;スプライシング)が遺伝子発現とその調節の重要な段階の一つとなっている。この過程は細胞核内にある低分子RNAとタンパク質からなる粒子(spliceosome;スプライセオソーム)によって触媒される通常のsplicingと、RNA自身によって触媒され、自己を除去する自己スプライシング(self splicing)の2種類がある。

一方、splicingによって抜け落ちたイントロンのRNAは、self splicingする物に限って、splicingするだけでなくDNA上に挿入することが明らかとなっている。self splicing後、イントロンのRNAは変形することにより酵素活性と同様の状態になり、他の部位に移動する。このようにself splicingするイントロンが別のDNA上の挿入部位に挿入する現象をホーミング(homing)と呼ばれている。

これまでの研究で、本研究室で単離した水銀耐性細菌*Bacillus megaterium* MB1を解析した結果、水銀耐性トランスポゾンの中にgroup IIに属するイントロンが挿入されていることが分かった。group IIに属するself splicingできるイントロンは、しばしば真核生物のミトコンドリア発見されている。ミトコンドリアは、原始的な細菌と真核細胞の共存がその始まりであることと言われ、そこで発見したgroup IIイントロンと真核生物のイントロンのsplicingメカニズムが類似していることからイントロンの起源と進化について興味が深まっている。一般的な細菌類におけるイントロンの発見、つまり*Bacillus megaterium* MB1のgroup IIに属するイントロンの発見は、原始生物が古くからgroup IIイントロンを継続して持ち続けてきたことを示唆している。このことからこのイントロンは分子進化学や、遺伝子の水平伝達等の研究に応用できる可能性を示すものとして注目される。そこで本研究はMB1株で発見したイントロンの基礎研究を行い、その環境バイオテクノロジーにおける応用の可能性を探った。

2. 実験方法とその結果

(1) 好気性水銀耐性細菌*Bacillus cereus* RC607のトランスポゾン上のイントロンの探索

PCR法によるDNA断片の増幅と、電気泳動によるDNA断片の比較を行い、また、イントロン領域内のDNAをプローブとするサザンハイブリダイゼーションによって、イントロンの存在の検証を行った。その結果、電気泳動ではMB1株のトランスポゾン領域の方がRC607株のトランスポゾン領域よりもイントロンの長さと一致する約2.7kbpだけ長くなっていることがわかった。(Fig.2) また、サザンハイブリダイゼーションでは検出シグナルが見られなかったため、RC607株のトランスポゾン上にはイントロンが存在しないことが示唆された。

(2) pYW33のシーケンスの解析

RC607株由来のDNA断片を持つプラスミドpYW33から、イントロンのジャンクション領域と思われる部位のDNA断片をサブクローニングし、シーケンスを行い塩基配列を決定した。シーケンスの結果から、イントロンを挟むジャンクション領域の配列はFig.1の通りであった。

Fig. 1

AATAATCGGG CCAGATTGTG GAACAAACT TTTAAAGAAA ATTGGATATC



このことからRC607株にはイントロンそのものは存在しないが、MB1株と同様のイントロンのジャンクション領域が存在することが分かった。

(3) Group II イントロンのsplicing活性の確認

MB1株のgroup II イントロンが明確なエクソンを持ってないため、イントロンを含む領域をT7プロモーターの下流に置いたプラスミドpGMBJを、in vivo でT7RNA polymeraseによりpre-mRNAを大量に転写させ

た。これをAGPC法によってRNAを抽出し、そのRNAを逆転写酵素を用いて逆転写し、かつPCR法によって増幅をおこなった。また、RC607株のイントロンのジャンクション領域をPCR法で増幅したものと比較するために電気泳動を行った。また、これにイントロンのジャンクション領域をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、同じ長さであることが分かった。(Fig.3) また、サザンハイブリダイゼーションでは両方とも検出シグナルが見られた。このことから、MB1株のgroup II イントロンはself splicingを起こすことが明らかとなった。

3. 考察と結論

本研究の結果、電気泳動ではMB1株のトランスポゾン領域の方がRC607株のトランスポゾン領域よりもイントロンと一致する約2.7kbpだけ長くなっていることがわかった。また、サザンハイブリダイゼーションでは検出シグナルが見られなかったため、RC607株のトランスポゾン上にはイントロンが存在しないことが分かった。一方、シーケンスの結果から、RC607株にはMB1株と同様のイントロンを挟むDNA領域、つまり、イントロンのジャンクション領域が存在することが分かった。self splicing後のRNAのジャンクション領域はもとのRC607のDNA上にみられるジャンクション領域と同じ長さであることが分かった。また、サザンハイブリダイゼーションでは両方とも検出シグナルが見られた。このことから、group II イントロンはself splicingによりイントロン領域のRNAが抜け出したことが明確となった。つまり、MB1株のgroup II イントロンが活性をもつことが分かった。また、MB1株のgroup II イントロンがself splicingすることから、このイントロンはhomingできることが示唆される。そのため、今後はsplicing後のRNAのジャンクション領域をRT-PCR法により増幅し、このRT-PCR産物をイントロンがhomingするターゲットとして用いたhomingの実験を行う必要があると考えられる。

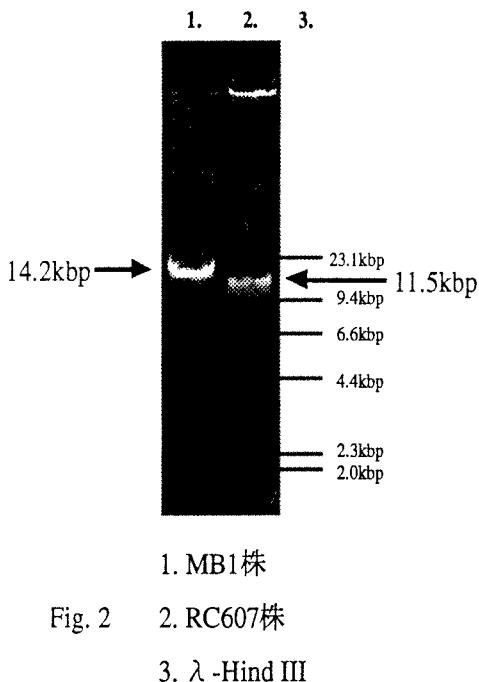


Fig. 2

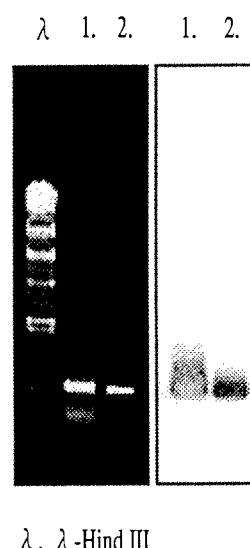


Fig. 3 1. pGMBJのRT-PCR産物

2. RC607株のジャンクション領域のPCR産物