

# 好熱性真正細菌 *Geobacillus* sp. Kps3 の Flagellin をコードする遺伝子 *hag* mRNA の選択的スプライシング

## Alternative Splicing of *hag* mRNA Coding for Flagellin from a Thermophilic Eubacterium *Geobacillus* sp. Kps3

応用化学専攻 石田 達矢

ISHIDA Tatsuya

### 1. 緒言

多くの真核生物、原核生物の遺伝子領域には、アミノ酸に翻訳されない領域であるイントロンと呼ばれる配列が存在する<sup>(1)</sup>。イントロンは RNA への転写後にスプライシング反応によって除去される。

近年、当研究室で、好熱性真正細菌を単離し *Geobacillus* sp. Kps3 と呼んでいる。当研究室のこれまでの研究の結果、*Geobacillus* sp. Kps3 の Flagellin をコードする *hag* 遺伝子には二つのイントロン様の配列が存在することが分かっている<sup>(2)</sup>。Flagellin とは、真正細菌のべん毛を構成する主要なタンパク質の一つであり、数万分子の Flagellin が積み重ねられることによって鞭毛の繊維構造が形成されている<sup>(3)</sup>。

二つのイントロン用の配列のうち、intron a についてはグループ I イントロンであることが明らかになっている<sup>(4)</sup>。Intron b については二次構造予測からグループ I イントロンであることが予想されているが、グループ I イントロンであることは確認されていない。

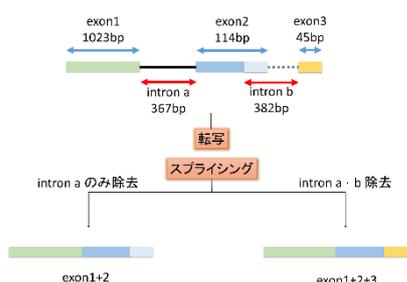


Fig. 1 *Geobacillus* sp. Kps3 の *hag* モデル図

Fig. 1 のように、二つのイントロン様の配列は試験管内での選択的スプライシングによって二種類のタイプの Flagellin を生じさせ得る。二種類の *hag* 遺伝子を組み込んだプラスミドで *Bacillus subtilis* を形質転換し、Flagellin を発現させたところ、両者ともに機能的であることが分かっている<sup>(5)</sup>。

以上から、私はもう一つのイントロン様の配列

がグループ I イントロンであるかどうかを調べることに、また *Geobacillus* sp. Kps3 生体内で *hag* mRNA が選択的スプライシングしているのかを調べることを目的とした。真正細菌での選択的スプライシングの報告例はなく、確認されれば本菌が初めての発見となる。

### 2. 実験

#### 2-1. *hag* mRNA exon1 + exon2 + intron b + exon3 type の作製

遺伝子上流に T7 promoter を付加した intron a を除去した *hag* DNA (exon1 + exon2 + intron b + exon3 type) を mRNA に転写し、Mg<sup>2+</sup> を取り除くために、Zymoclean™ Gel RNA Recovery Kit (ZYOM RESEARCH) を用いて単離精製し、*hag* mRNA exon1 + exon2 + intron b + exon3 type を作製した。

#### 2-2. Intron b のスプライシング実験

グループ I イントロンは保存された二次構造を持ち、スプライシングの際に Mg<sup>2+</sup> 及び GTP が必要である。Intron b がグループ I イントロンであるかどうかを調べるためには、Mg<sup>2+</sup> 及び GTP の要求性を確かめる必要がある。*hag* mRNA exon1 + exon2 + intron b + exon3 type を Mg<sup>2+</sup>、GTP の有無を変えた 4 種の splicing buffer それぞれに加え、60°C で 5 分反応させた。

#### 2-3. Flagellin の精製

*Geobacillus* sp. Kps3 の至適生育温度は 60°C である。*Geobacillus* sp. Kps3 を 60°C、下限生育温度である 37°C、培地の塩濃度を 3% の条件でそれぞれ培養し、集菌し、培地を洗浄した。その後、vortex でべん毛を分離させ、遠心分離で菌体部分を取り除き、超遠心によりべん毛を精製した。

## 2-4. *Geobacillus* sp. Kps3 は生体内で選択的スプライシングをするか？

至適生育温度である 60°C、下限生育温度である 37°C、培地の塩濃度を 3% の条件でそれぞれ培養した *Geobacillus* sp. Kps3 から精製した Flagellin を SDS-PAGE を行い、ゲルから切り出して、アミノ酸配列解析を行った。これにより、生体内で選択的スプライシングを行っているかどうかを調べた。

## 3. 結果及び考察

### 3-1. Intron b はグループ I イントロンか？

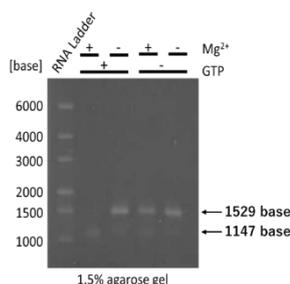


Fig. 2 Intron b のスプライシング実験

Fig. 2 より、 $Mg^{2+}$  と GTP がともに含まれている splicing buffer でのみ、スプライシングが確認された（スプライシング前は 1529base、スプライシング後は 1147base）。これにより、intron b はスプライシングの際に  $Mg^{2+}$  と GTP が必要であることが分かった。つまり、intron b はグループ I イントロンであることが分かった。

### 3-2. *Geobacillus* sp. Kps3 の Flagellin 精製

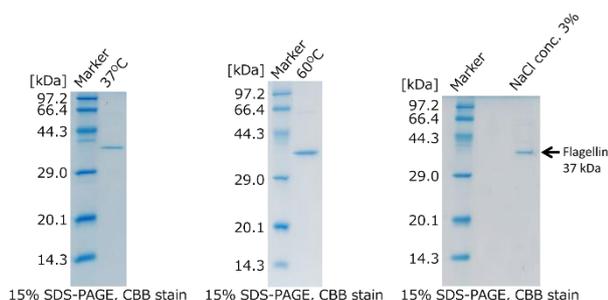


Fig. 3 各条件下での Kps3 培養から精製した Flagellin

Fig. 3 より、それぞれ目的位置 (37kDa) に単一バンドがみられた。よって、各条件下で培養した Kps3 から Flagellin を精製できたことが確認できた。

### 3-3. *Geobacillus* sp. Kps3 は生体内で選択的スプライシングをするか？

Fig. 4 より、至適生育温度 60°C の通常条件で培養した *Geobacillus* sp. Kps3 は、exon1+2+3 type の Flagellin で構成されたべん毛を用いてい

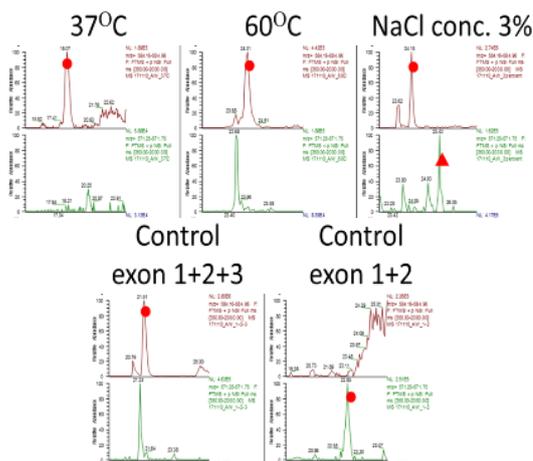


Fig. 4 アミノ酸配列解析結果

ることが分かった。また、下限生育温度である 37°C の条件でも exon1+2+3 type の Flagellin を用いていることが分かった。一方、塩濃度 3% の培地で培養した Kps3 では、exon1+2 type の Flagellin も用いていることが分かった。このことから、*Geobacillus* sp. Kps3 は、高塩濃度の条件下において生体内で選択的スプライシングを行い、Flagellin を使い分けていることが示唆された。

## 4. 結論

Intron b はスプライシングの際に、 $Mg^{2+}$  及び GTP の要求性があり、グループ I イントロンであることが分かった。また、*Geobacillus* sp. Kps3 は、通常条件下においては、exon1+2+3 type の Flagellin を用いていることが明らかとなった。さらに、高塩濃度下では、exon1+2 type の Flagellin も用いており、高塩濃度の条件下では、Kps3 は生体内で選択的スプライシングをすることが示唆された。

## 引用文献

- (1) Berget, SM., Moore, C., Sharp, PA., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1977**, 74(8), 3171-3175
- (2) 早川准平, 博士論文, 2009 年度
- (3) Yonekura, K., Maki-Yonekura, S., and Namba, K., *Nature*, **2003**, 424, 643-650
- (4) Hayakawa, J., and Ishizuka, M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2012**, 76(2), 410-413
- (5) 千葉献人, 学士論文, 2015 年度

## 対外発表

- 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017 年 (ポスター)  
第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 (ポスター)