

腸管寄生虫 *Giardia intestinalis* のスプライソソーム構成因子同定の試み

沈 茹菁 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 稲垣 祐司 (筑波大学 生命環境系)

## 要旨

寄生性真核生物 *Giardia intestinalis* (以下 *Giardia* と称す) では、他の真核生物にはみられない特殊なトランススプライシングによって一部の遺伝子の成熟 mRNA が生成されることが知られている。このトランススプライシングを行うために、*Giardia* のスプライソソームには特異的な構成因子が存在すると考えられる。しかしながら、スプライソソームの構成成分については、*in silico* 解析によって同定された一部の因子以外はほとんど不明である。そこで、*Giardia* のスプライソソームを精製しその構成成分を明らかにすることを目的として研究を行っている。真核生物のスプライソソームに広く保存されている 3 種類のタンパク質、SmD1, SmD3, Lsm3 に注目し、これらにタグを付けて *Giardia* 細胞内に発現させ、それぞれと相互作用をする因子を網羅的に同定するための実験を計画した。現在、これら 3 種類の遺伝子を発現プラスミドに導入したコンストラクトの作成を完了し、*Giardia* の形質転換を行っている。

## 1. はじめに

寄生性真核生物 *Giardia* において、HSP90 やダイニン $\alpha$ 鎖などの遺伝子のエクソン領域は染色体上の非常に離れた領域に分割されてコードされており、それに伴ってイントロンも分割されている (1)。成熟 mRNA を生成するために、分割イントロンを介したトランススプライシングが行われているが、その分子機構の詳細は未だ不明である。他の真核生物では見いだされないこの特殊なトランススプライシングを行うために、*Giardia* のスプライソソームには特異的な構成因子が存在すると考えられる。真核生物全体で広く保存されているスプライソソーム構成因子については、すでに *in silico* 解析によってそれらのホモログが特定されているが (2)、トランススプライシング特異的因子を含め *Giardia* スプライソソームの全体像は不明である。それを明らかにし、トランススプライシングの分子機構を解明するためには、タンパク質・RNA 複合体であるスプライセオソームを生化学的に精製しその構成成分を解析する必要がある。これにより、*Giardia* が持つトランススプライシングとシススプライシング両方を行うスプライソソームを、ヒトや酵母などが持つシススプライシングを主に行うスプライソソーム、トリパノソーマ (3) などが持つほぼトランススプライシングを行うスプライソソームと比較することが可能になり、スプライソソームの進化的意義の解明や構成タンパク質の働きを更に精査することができるものと期待される。これまで *Giardia* においてはリボソーム (4)、プロテアソーム (5) などの超分子複合体が精製されている。とくに後者では、*Giardia* にタンパク質を発現させるプラスミドベクターを用いて構成成分の特定のタンパク質にタグを付けることにより、プロテアソーム全体を精製し、MS 解析によってその構成成分を明らかにしている。本研究ではこのプロテアソームの精製に成功したプラスミドベクター (AN ベクター) を用いて、スプライソソームの精製と構成成分の解析を試みることにした。

ANベクターには小さなタグである SF TAP tag がクローニングサイトの 5' 側についている。このタグを用いると短い時間かつマイルドな条件でジメチル化の必要のない精製が可能であるので、タグを付加したタンパク質と相互作用する因子を網羅的に精製することができる。

## 2. 材料と方法

常法に従って *Giardia* を培養し (4)、ゲノム DNA を抽出し、PCR の鋳型とした。スプライソソームを構成する Small nuclear ribonucleo proteins (SnRNPs) の中心部に位置し真核生物全体で広く保存されている Sm proteins のうち、SmD1, SmD3, Lsm3 にタグをつけることとした。SmD1, SmD3, Lsm3 の各遺伝子 (ORF) の全長の 5' 末側に BamHI、3' 末側に NotI の配列を付加した DNA 断片を PCR により増幅・精製した。それを BamHI と NotI で切断した AN ベクターにライゲーションすることにより 3 種類のコンストラクトを作成し、挿入断片の塩基配列を確認した。

## 3. 結果

正しい挿入断片をもつ 3 種類のコンストラクトの作成に成功した。塩基配列を確認した結果、間違いが見いだされなかったため、現在、これらのコンストラクトを用いて *Giardia* を形質転換しタグ付きタンパク質を発現させるために、エレクトロポレーションの実験を進めている。

## 参考文献

- (1) Kamikawa et al. (2011) *Curr. Biol.* 21: 311-315
- (2) Bujnicki et al. (2012) *Nucleic Acids Res.* 40(15): 7046-7065
- (3) Shulamit et al. (2010) *J. Biol. Chem.* 285: 27982-27999
- (4) Shirakura et al. (2001) *Mol. Biochem. Parasitol.* 112: 153-156
- (5) Svärd et al. (2012) *Eukaryot Cell.* Jul;11(7): 864-73