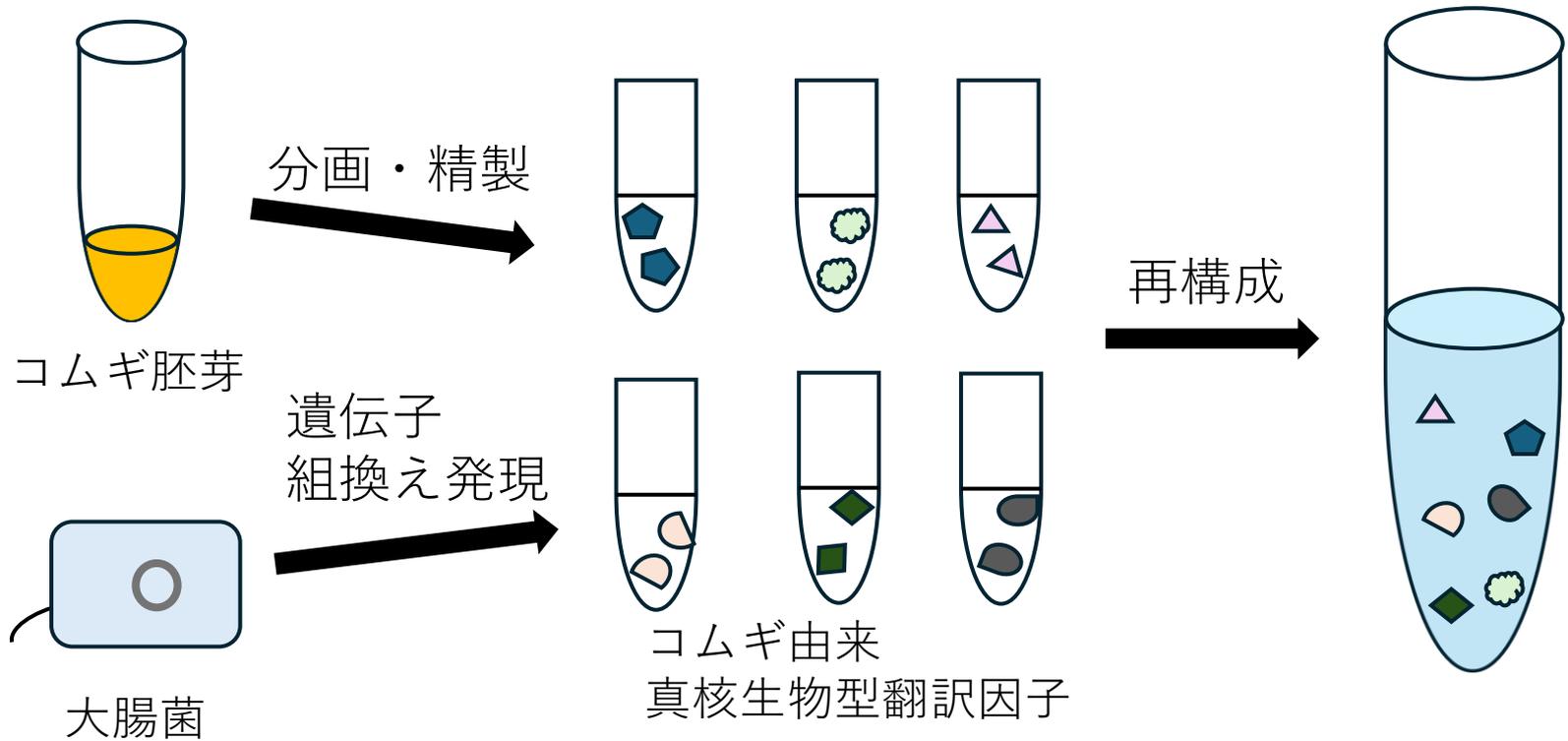


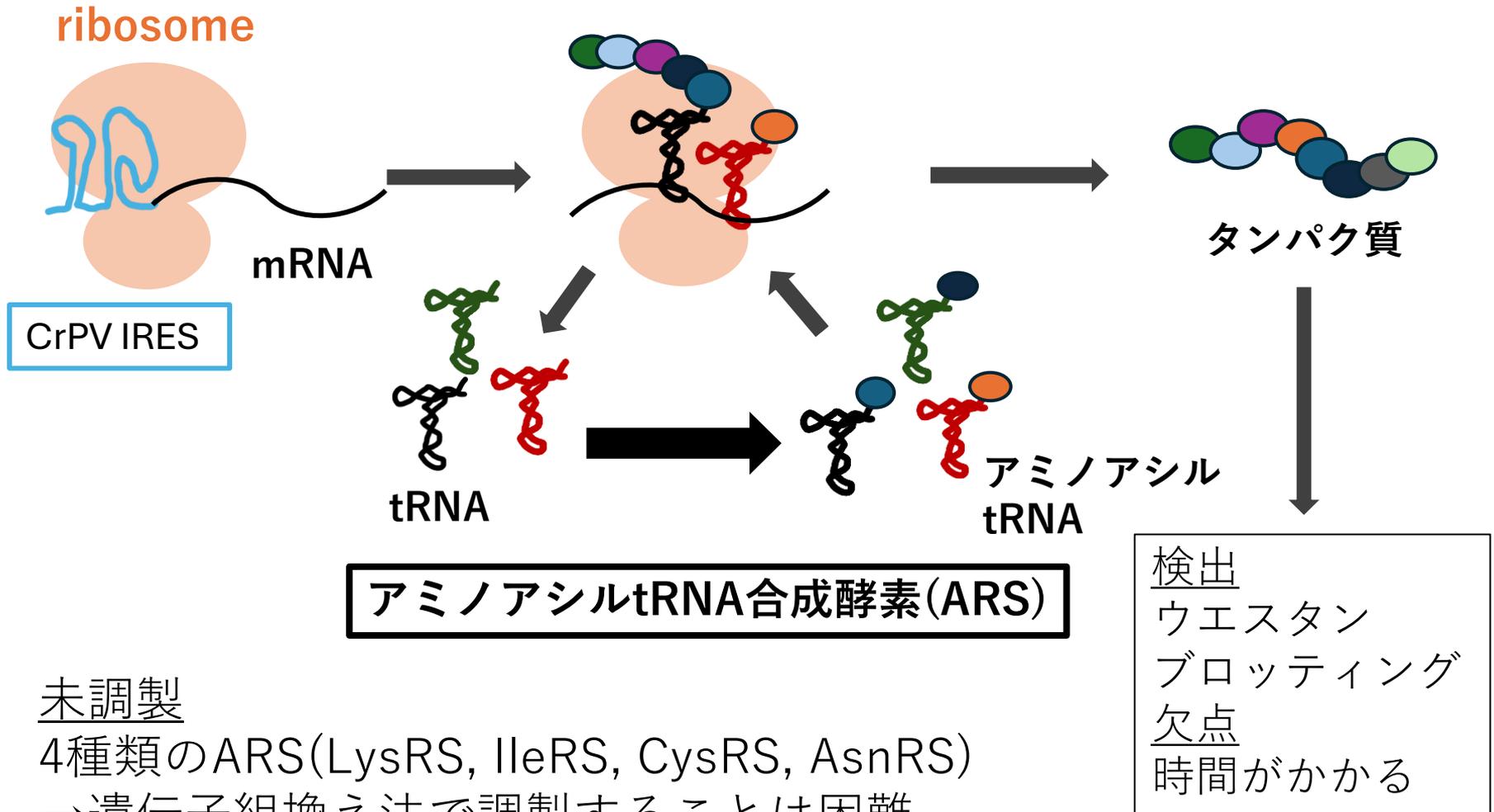
コムギリシルtRNA合成酵素と イソロイシルtRNA合成酵素 の調製の検討

化学工学研究室 藤井萌

コムギタンパク質合成系の再構成



先行研究



未調製

4種類のARS(LysRS, IleRS, CysRS, AsnRS)
→遺伝子組換え法で調製することは困難

研究目的

リシルtRNA合成酵素(LysRS)とイソロイシルtRNA合成酵素(IleRS)の調製

調製法

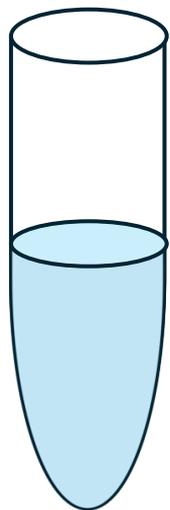
コムギ胚芽からの分画・精製

検出法

短時間かつ高感度に検出できるHiBiT合成系

HiBiT合成系

HiBiT : VSGWRLFKKIS
9種類のアミノ酸からなる11
残基のポリペプチド



+



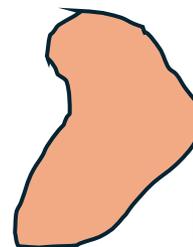
mRNA

翻訳
→

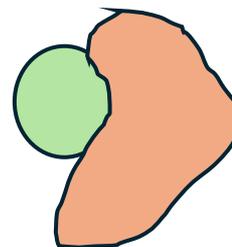
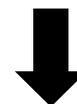


HiBiT

+



LgBiT



+ 基質



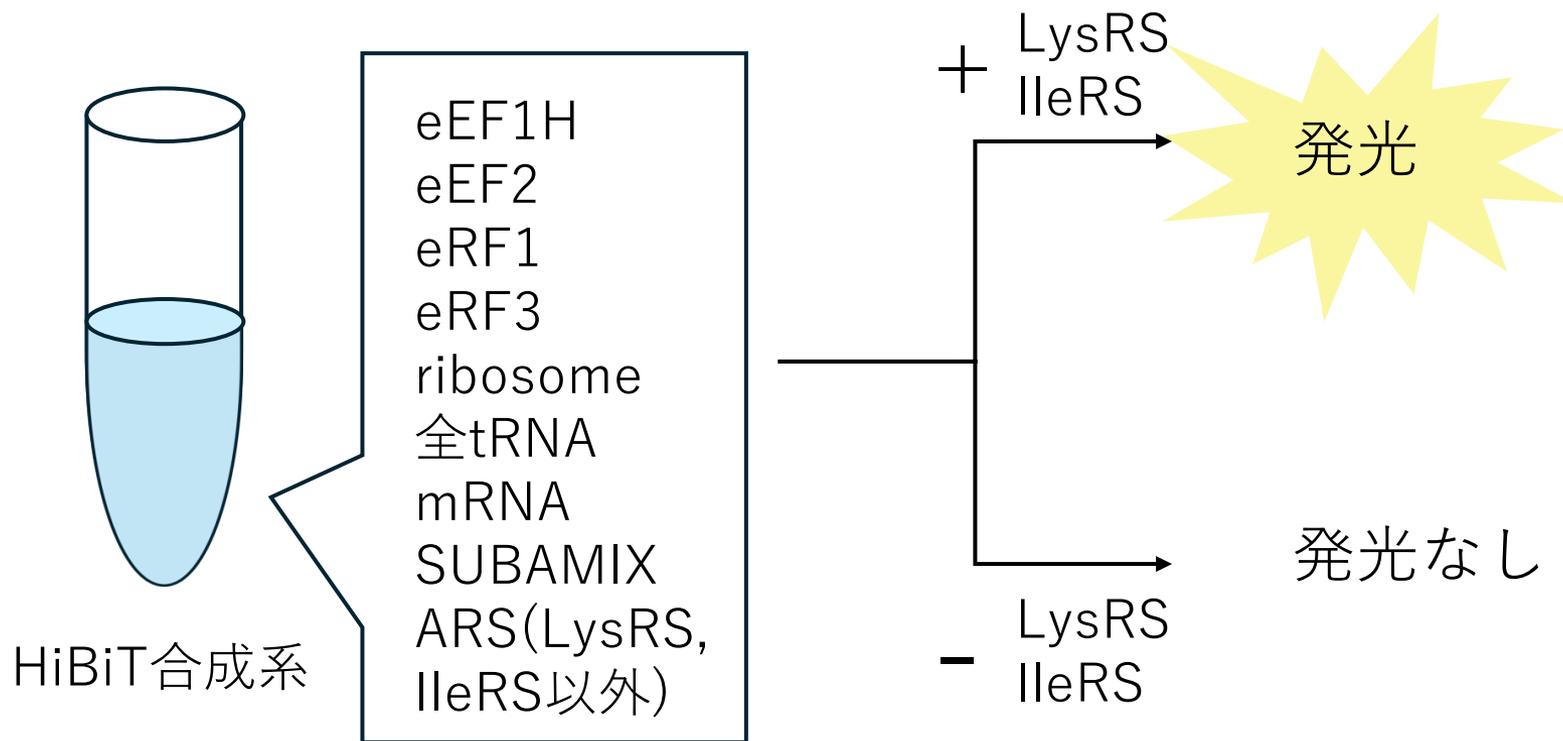
発光

翻訳に必要な因子

- ribosome
- tRNA
- ARS
- アミノ酸
- 翻訳伸長因子
- 翻訳終結因子
- :
- :
- etc

HiBiT合成系を用いたLysRS, IleRSの活性測定

LysRS, IleRS以外のARSは調製できている



実験内容

- ARS sourceを用いたHiBiT合成系の構築
- 分画したARS sourceに含まれるLysRS, IleRSの活性測定

実験内容

- ARS sourceを用いたHiBiT合成系の構築
- 分画したARS sourceに含まれるLysRS, IleRSの活性測定

コムギ胚芽のタンパク質粗精製画分 (ARS source)

コムギ胚芽

↓ 破碎

↓ 抽出

S30

↓ 超遠心

S240

↓ 硫酸分画 (40-70%)

↓ 透析

↓ DEAE-Sepharoseカラム (20-250 mM KClで溶出)

HiBiT合成系

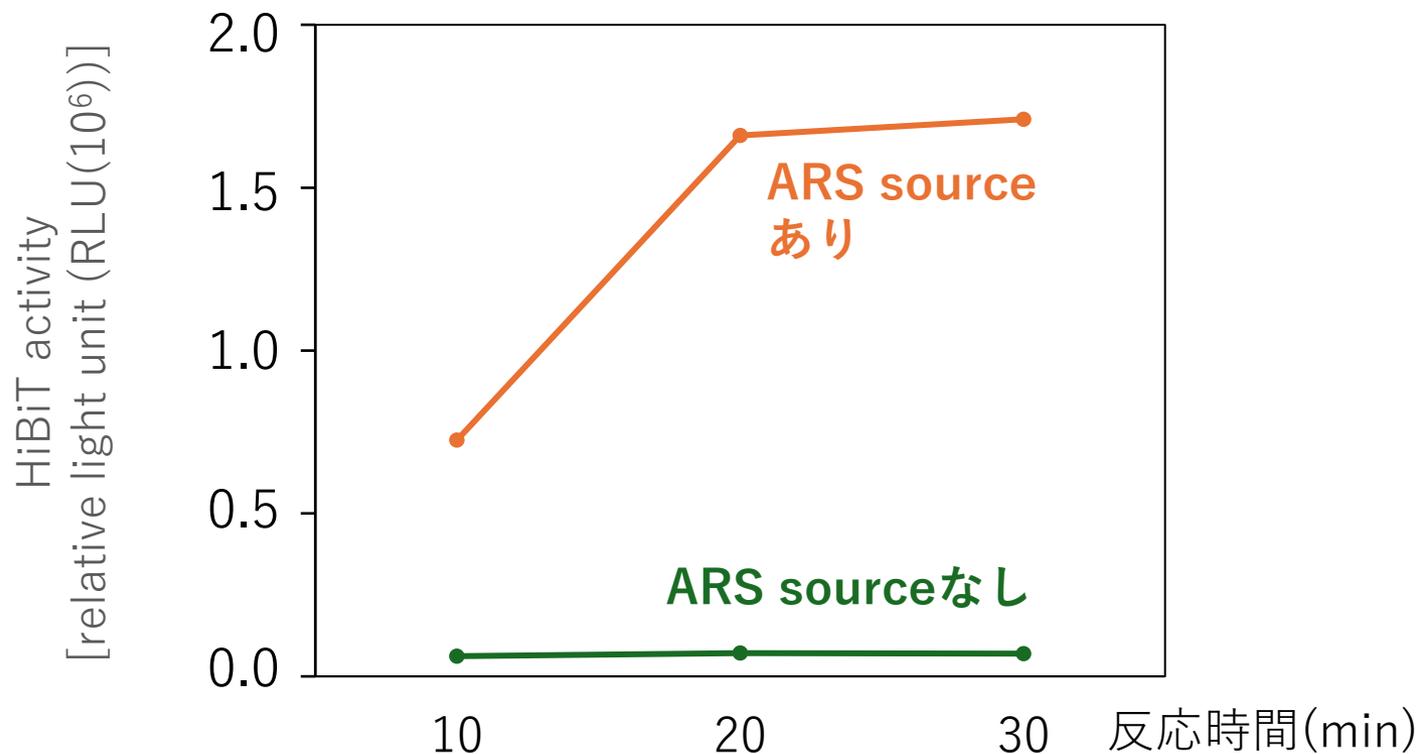
濃度(μ M)	因子
2.8	eEF1H
0.4	eEF2
0.5	eRF1
0.5	eRF3
2.1	ribosome
124	tRNA
	mRNA(CrPV IRES HiBiT)
	SUB-AMIX
	ARS source

↓ 26°C, 10~30 min

↓ HiBiT活性の測定

<u>SUB-AMIX</u>	
濃度(mM)	因子
30	HEPES-KOH(pH7.6)
100	KOAc
2.7	Mg(OAc) ₂
0.4	spermidine
2.5	DTT
0.3	amino acids
1.2	ATP
0.25	GTP
0.4	Cr-P

HiBiT活性の測定結果



ARS sourceを用いるとHiBiTが合成された
→活性のあるLysRS, IleRSが含まれている



ARS sourceを分画し、LysRS, IleRSを単離・精製したい

実験内容

- ARS sourceを用いたHiBiT合成系の構築
- 分画したARS sourceに含まれるLysRS, IleRSの活性測定

ARS sourceの分画

ARS source

↓ DEAE-Sepharoseカラム

HEPES Buffer-50, 150, 250 mM KCl

↓ 12% SDS-PAGE

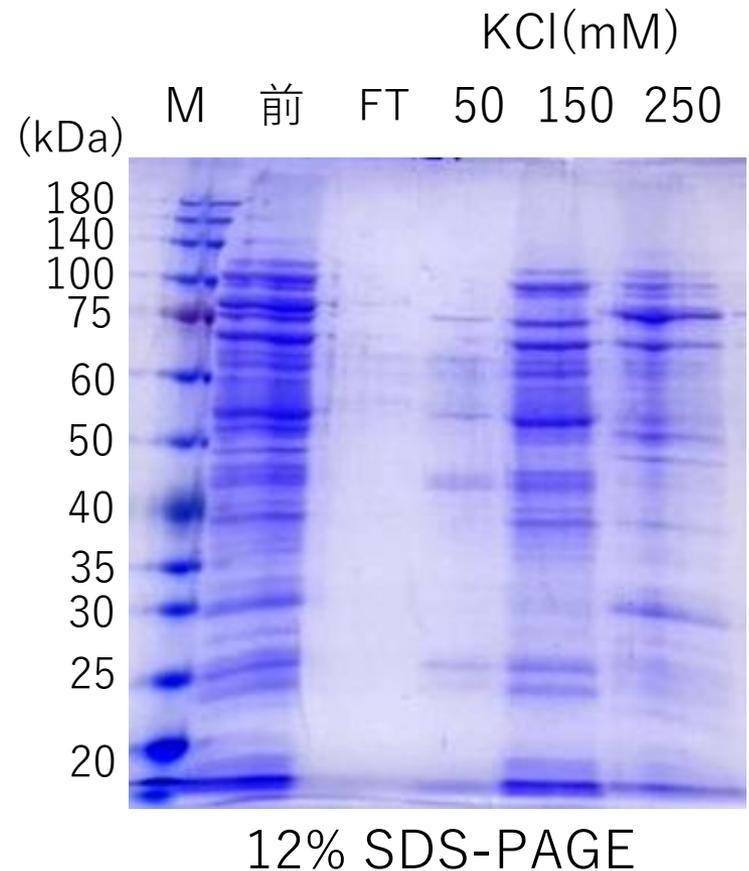
HEPES Buffer-X

20 mM HEPES/KOH(pH7.5)

5% glycerol

1 mM DTT

X mM KCl



HiBiT合成系を用いたアミノアシル化 活性測定

HEPES Buffer

150, 250 mM KCl溶出画分

↓ 硫酸沈殿 (70%)

↓ 透析

混合溶液

↓ 26°C, 0 -20 min

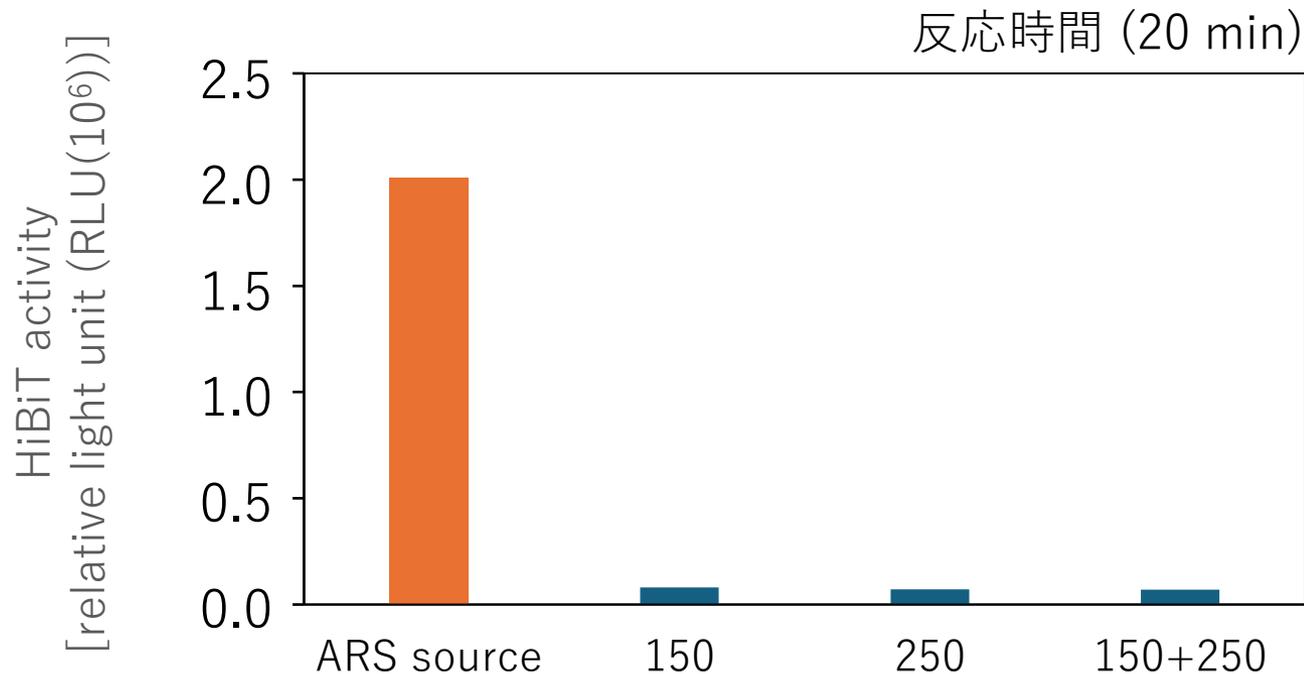
↓ 活性測定

2.8 μM	eEF1H
0.4 μM	eEF2
0.5 μM	eRF1
0.5 μM	eRF3
2.1 μM	ribosome
124 μM	tRNA
	mRNA(CrPV IRES HiBiT)
	SUB-AMIX
	ARS (LysRS, IleRS以外)

+

150 : 150 mM KCl溶出画分
250 : 250 mM KCl溶出画分
150+250 : 150, 250 mM KCl溶出画分

HiBiT合成系を用いたアミノアシル化 活性測定の結果



ARS source : HiBiTを合成できた

ARS sourceを分画した画分 : HiBiTを合成できなかった

→LysRS, IleRSが分画の過程で失活した？

今後の展望

- ・ Lys-tRNA, Ile-tRNAを試験管内で調製し, 既知の因子のみからなるHiBiT合成系の構築
- ・ LysRS, IleRSそれぞれ一方ずつの活性測定

謝辞

愛媛大学 澤崎達也 先生
野澤彰 先生

ご清聴ありがとうございました