

ニンジンにおける mRNA 核外輸送因子 Rae1/Gle2 の同定

作物生産生物学講座 植物機能開発学分野
藤井裕美

【背景と目的】 核膜孔複合体 (NPC) は核質と細胞質の間の選択的物質輸送を担う構造であり, mRNA, tRNA, リボソーム前駆体, 核タンパク質などがこの構造によって輸送される。NPC は核膜を貫通する軸対称の 8 量体からなり, 植物, 動物および酵母の NPC が類似した形態を持つことから, 真核生物の NPC を構成するタンパク質はいずれも共通していると予想されている。事実, 動物と酵母の NPC を構成するおよそ 30 種類のタンパク質についてそれぞれの対応関係がほぼ明らかになっている。一方, 植物では, 性格の明らかにされた NPC タンパク質は僅かである。

先行研究において同定されたニンジン FEN1 は, ヒトの NPC タンパク質 Nup98 や対応する酵母タンパク質とアミノ酸レベルにおいて 20%程度の一貫性しか示さなかったが, 推定される機能領域の分子内での配置から Nup98 であることが示唆された。動物の Nup98 は核外輸送因子 Rae1 と結合することが分かっており, 酵母の対応する因子として Gle2 が同定されている。本研究では, Rae1-Nup98 結合の普遍性とその意義を探るために, ニンジン Rae1 を同定し, 大腸菌で発現させたタンパク質を用いて, Rae1 と FEN1 の結合能について調べた。

【材料と方法】 GenBank/EMBL/DDBJに登録されているRae1 およびGle2 の塩基配列をもとに作製した縮重プライマーを用い, PCRによってニンジンcDNAを増幅したのち, Rae1 (DcRae1/Gle2) の塩基配列を決定した。精製と検出のためのヒスチジン 6 残基配列 (His6x) を付加したDcRae1/Gle2 (His-DcRae1) はpET16bベクターを用いて, 大腸菌の系によって合成した。他方, FEN1 のRae1 結合配列 (GLEBS, Gle2-binding sequence) を予測し, それに対応するcDNA配列を含む領域をpGEX-6p-1 ベクターに挿入し, GST (glutathione S-transferase) との融合タンパク質 (GST-DcGLEBS) として大腸菌を用いて発現させた。タグは市販の抗His6x抗体および抗GST抗体を用いて検出した。

【結果と考察】 PCRによって増幅された cDNA は, 分子質量 38kDa, 等電点 8.1 のタンパク質をコードしていると推定された。アミノ酸配列は既知 Rae1/Gle2 と 50%以上の相同性を示し, モチーフ検索により分子内の 4 か所に WD リピートが見出された。それらの位置は他生物種由来 Rae1/Gle2 における WD リピートの位置と類似していた。His-DcRae1 は, 電気泳動したのち膜に転写した GST-DcGLEBS および GST-DcGLEBS で修飾したセファロースゲルと結合した。一方, ニンジン細胞破碎物から得た可溶性画分を GST-DcGLEBS-セファロースゲルと混合し, 結合したタンパク質を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した。その結果, Rae1 と推定されるタンパク質が検出された。

現時点で, FEN1 と DcRae1/Gle2 の結合を確実に再現するには至っていないが, Nup98 と Rae1/Gle2 の結合が動物, 植物, 酵母において保存されていること, その結合には WD リピートからなる構造 (WD ドメイン) と GLEBS との相互作用が関与している可能性が示唆された。