

2가 양이온이 Thiamine Pyrophosphate에 의한 Group I Intron Ribozyme의 Splicing 억제에 미치는 영향

안성준 · 박인국*
동국대학교 생물학과

2가 양이온(Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+})이 조효소 thiamine pyrophosphate에 의한 T4 파지 티민생합성 유전자 (*td*) 인트론 RNA의 splicing에 미치는 영향을 조사하였다. Mg^{2+} 를 30 mM까지 증가시켰을 때 splicing 활성은 농도에 비례하여 증가하였다. 그러나 Mg^{2+} 이 존재하지 않는 상태에서 0.1-4 mM 농도에 걸쳐 Zn^{2+} 를 사용한 결과 약 20% 정도의 splicing이 일어났다. 이때 대부분의 splicing product는 인트론-엑손2 및 엑손2였고 엑손1-엑손2는 검출되지 않았다. 그리고 4 mM 농도에서는 RNA가 대부분 가수분해되는 현상이 나타났다. Mn^{2+} 이온은 사용한 농도 범위 (0.1-8 mM)에서 Zn^{2+} 보다는 전반적으로 약간 증가된 splicing 활성을 보였으며 8 mM 농도에서도 약 30% 정도의 splicing 활성을 보였다. Zn^{2+} 이온처럼 splicing product는 인트론-엑손2 및 엑손2였고 엑손1-엑손2는 검출되지 않았다. 반면에 splicing반응에 10 mM Mg^{2+} 를 첨가했을 때 Zn^{2+} 과 Mn^{2+} 이온은 평균 약 35-40% 정도 splicing활성을 촉진시키는 것으로 나타났다. 실험한 2가 양이온 중에서 특히 Mg^{2+} 은 가장 낮은 농도에서 thiamine pyrophosphate에 의한 억제반응을 극복하는 최고의 활성효과를 나타냈다. 이와 같은 억제 회복 효과는 Mg^{2+} 에 의한 리보자임의 *td* intron 구조적 안정성에 기인하는 것으로 추정된다.

Key words □ divalent cation, self-splicing, T4 phage, *td* intron ribozyme, thiamine pyrophosphate

T4 박테리오파지 티민 생합성 효소(thymidylate synthase)의 유전자(*td*)는 *Tetrahymena thermophila* rRNA 인트론(intron)처럼 self-splicing을 한다(2,5,13). Group 1 intron은 guanosine과 Mg^{2+} 존재하에서 스스로 자신의 RNA를 절단 및 연결하는 리보자임이다. Group 1 intron의 self-splicing을 억제하는 여러 종류의 물질들이 알려져 있다. 예로서 deoxyguanosine과 dideoxyguanosine (1), arginine (18), streptomycin (15), viomycin (17), spectinomycin (11) 등은 경쟁적 억제 물질로서 guanidino group를 공통적으로 보유하고 있다. 그러나 aminoglycoside계의 항생제인 neomycin, gentamicin, kanamycin과 tobramycin 등은 비경쟁적 억제물질로 작용한다(17). 최근 neomycin이 *td* intron RNA의 stem P4와 P5 사이에 위치한 loop과 guanosine-binding site에 인접한 촉매 부위에 결합함으로써 억제 현상이 일어남이 밝혀졌다(8).

단백질 효소처럼 리보자임(ribozyme)은 RNA splicing 촉매반응에 2가 금속이온을 필요로 한다(14). 그리고 2가 금속이온은 RNA splicing 촉매반응에서 두 가지 중요한 기능적 역할을 하는 것으로 알려졌다. 금속이온은 RNA의 3차 구조를 안정화시킬 뿐만 아니라 촉매부위에서 RNA splicing 반응을 화학적으로 촉매하는 것으로 밝혀졌다(4). 이와 같은 특성 때문에 리보자임을 금속함유효소 (metalloenzyme)라고도 부른다.

최근 본 실험실에서 조효소 FMN (9), NAD^+ (12), $NADP^+$ (미발표) 및 Coenzyme A (미발표) 등이 *td* intron ribozyme의 splicing을 억제한다는 결과를 발표하였다. 매우 흥미로운 현상은 이들 조효소들이 그 구조내 guanosine의 guanidino group를 보유하고 있지 않은데도 불구하고 splicing을 억제한다는 사실이다.

조효소 thiamine pyrophosphate는 decarboxylase와 transketolase의 prosthetic group으로서 작용한다(16). 뿐만 아니라 이 조효소는 신경충격 전달과정에서 acetylcholine 합성과 이온 수송에 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다(7). 상기한 바와 같이 금속이온이 RNA splicing을 촉매하고 조효소들이 선택적으로 *td* intron ribozyme의 splicing을 억제한다는 사실을 토대로 금속이온과 thiamine pyrophosphate 사이의 기능적 상호작용을 연구하는 것은 촉매기전을 이해하는데 유용한 정보를 제공할 것으로 사료된다.

따라서 본 연구에서는 2가 양이온이 thiamine pyrophosphate에 의한 splicing억제에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 플라스미드

본 실험에 사용한 *Escherichia coli* TG1과 HB101 균주는 Amersham에서 구입하였다. M13mp8 phage는 Bethesda Research Laboratory에서, pGEM2는 Promega corp.에서 구입하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 02-2260-3320, Fax: 02-2269-4560
E-mail: ikpark@dgu.ac.kr

시료

*EcoRI*과 *HindIII*제한효소는 New England Biolabs에서, T7 RNA polymerase는 US Biochemical에서, RNase와 RQ1 DNase는 Promega에서 구입하였다. [³²P]GTP와 nucleoside triphosphate는 Amersham에서 구입하였다

재조합 플라스미드

pGEM 재조합 플라스미드는 *E. coli* HB101세포에 transformation시킨 다음 ampicillin과 chloramphenicol을 사용하여 증폭시켰다. pGEM 재조합 플라스미드는 390 nt의 5'-exon 1, 1016 nt의 intron과 824 nt의 3'-exon 2로 구성되어 있다. *td* fragment의 promoter alignment는 0.8% agarose gel로 확인하였다.

In vitro RNA 합성

pGEM 재조합 플라스미드에 클론된 *td* fragment내 exon 2로부터 520 bp아래 위치한 부분을 *HpaI*으로 자른 후, phenol 추출과 ethanol 침전을 통해 template을 준비하였다. 전사는 전사 완충액(40 mM Tris-HCl, pH 7.5, 3 mM MgCl₂, 1 mM spermidine, 5 mM NaCl)에 10 mM DDT, 1 U/ml RNase, 0.5 mM의 각 rNTP, 5 μCi의 [³²P]GTP, 10 U의 T7 RNA polymerase를 혼합하여 30°C에서 30 분간 실시하였다. 전사 후 2.23 kb의 primary transcript는 Sephadex G-50을 사용하여 gel

filtration 하여 정제하였다.

In vitro self-splicing 반응

조효소 thiamine pyrophosphate가 splicing 반응에 미치는 영향을 조사하기 위해 0.1~10 mM 농도에 걸쳐 실험하였다. 그리고 2.5 mM thiamine pyrophosphate에서 1~30 mM 농도의 Mg²⁺을 사용하여 Mg²⁺에 의한 극복 효과를 조사하였다. 다양한 농도의 Zn²⁺ (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 1, 2, 4 mM), Mn²⁺ (0.1, 0.2, 0.6, 1, 2, 4, 6, 8 mM)을 사용하여 2.5 mM thiamine pyrophosphate가 포함된 splicing buffer (Tris-HCl, pH 7.5, 10 μM guanosine)에 10 mM Mg²⁺을 첨가했을 때와 첨가하지 않았을 때 각각 58°C에서 10 분간 incubation하여 반응시켰다. 그 다음 stop solution (95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol FF)을 첨가하여 75°C 5분간 incubation하여 반응을 정지시켰다. RNA sample을 4% polyacrylamide 8 M urea gel에 loading하고 10 mA에서 1 시간, 20 mA에서 3 시간 30 분 전기영동 하였다. 전기 영동이 끝난 gel을 X-ray film에 노출시킨 후 현상하였다. 그리고 UVI Image Analyzer (England)를 이용하여 각각의 splicing product과 splicing 되지 않은 pre-RNA의 gel density를 면적으로 환산하여 총 면적으로 계산하였다(Fig. 1). 이 총면적에 대하여 E1-E2 ligation에 해당되는 면적의 상대적 비율을 %로 표시한 수치를 relative splicing activity (%)이다.

결과 및 고찰

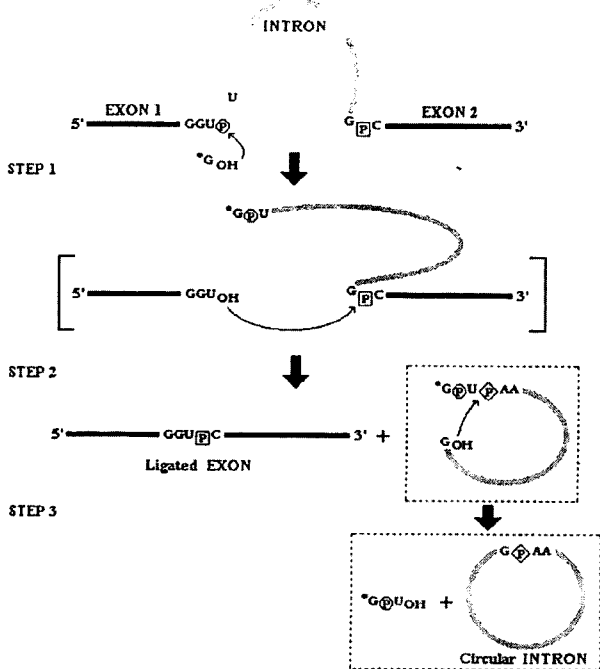


Fig. 1. Self-splicing of T4 *td* intron and cyclization of excised intron by consecutive transesterification reactions. Square brackets designate a transient intermediate. The 5' splice site phosphate is shown in a circle. The 3' splice site, which becomes the splice-junction phosphate, is shown in a square. The cyclization site is shown in a diamond. *G is guanosine cofactor.

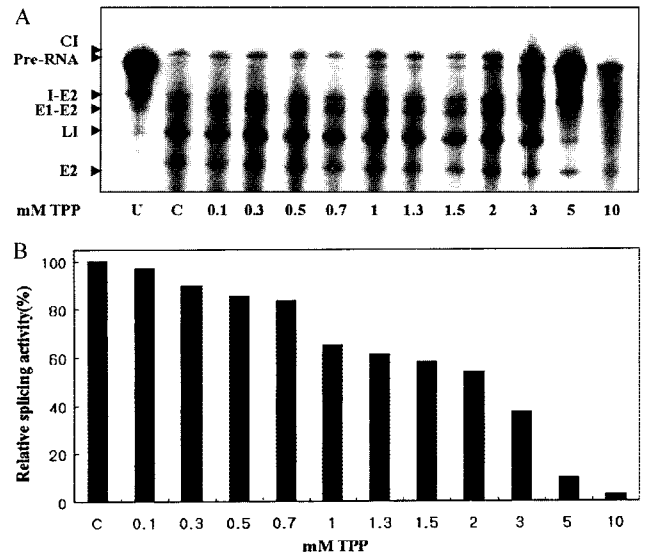


Fig. 2. Effect of thiamine pyrophosphate on the self-splicing inhibition of *td* intron RNA. A. Autoradiogram showing the effect of varying concentrations of thiamine pyrophosphate (0.1~10 mM) on self-splicing. U, unspliced pre-RNA; C, normal splicing; CI, circular intron; I-E2, intron-exon 2; E1-E2, exon 1-exon 2 ligation product; LI, linear intron; E2, exon2. B. Splicing rates of the intron RNA as a function of concentrations of thiamine pyrophosphate. The ratio of E1-E2 ligation produced in each splicing reaction to that of the normal splicing reaction was expressed as relative splicing activity.

Group 1 intron RNA는 여러 종류의 작은 분자들에 의해 splicing이 억제된다. 그 대표적인 예로서 aminoglycoside 계통과 nonaminoglycoside 계통의 항생제가 있다. Aminoglycoside 계통의 항생제인 neomycin, gentamicin, kanamycin, tobramycin 등은 모두 group I intron RNA의 self-splicing에 비경쟁적 억제 현상을 나타낸다(15,17). Spectinomycin도 aminoglycoside 항생제의 일종이며 본 실험실에서 연구한 결과 다른 aminoglycoside 항생제들처럼 혼성 비경쟁적 억제반응을 나타냈다(11).

Fig. 2는 상이한 여러 농도의 조효소 thiamine pyrophosphate가

T4파지 티민 생합성 유전자(*td*) 인트론 리보자임의 self-splicing에 미치는 영향을 나타낸 것이다. Thiamine pyrophosphate 농도가 증가할수록 splicing 반응의 활성이 비례적으로 감소하였다. Thiamine pyrophosphate 농도가 2.5 mM일 때 splicing 활성이 약 50% 정도로 감소하였으며 10 mM thiamine pyrophosphate에서 splicing 활성은 거의 나타나지 않았다. Thiamine pyrophosphate는 그 구조 내 guanidino group을 보유하고 있지 않는 데도 불구하고 선택적 억제를 하는 특이성을 보였다(9,12). 이러한 현상은 다른 조효소 즉 FMN (9), NAD^+ (11), $NADP^+$ (미발표)

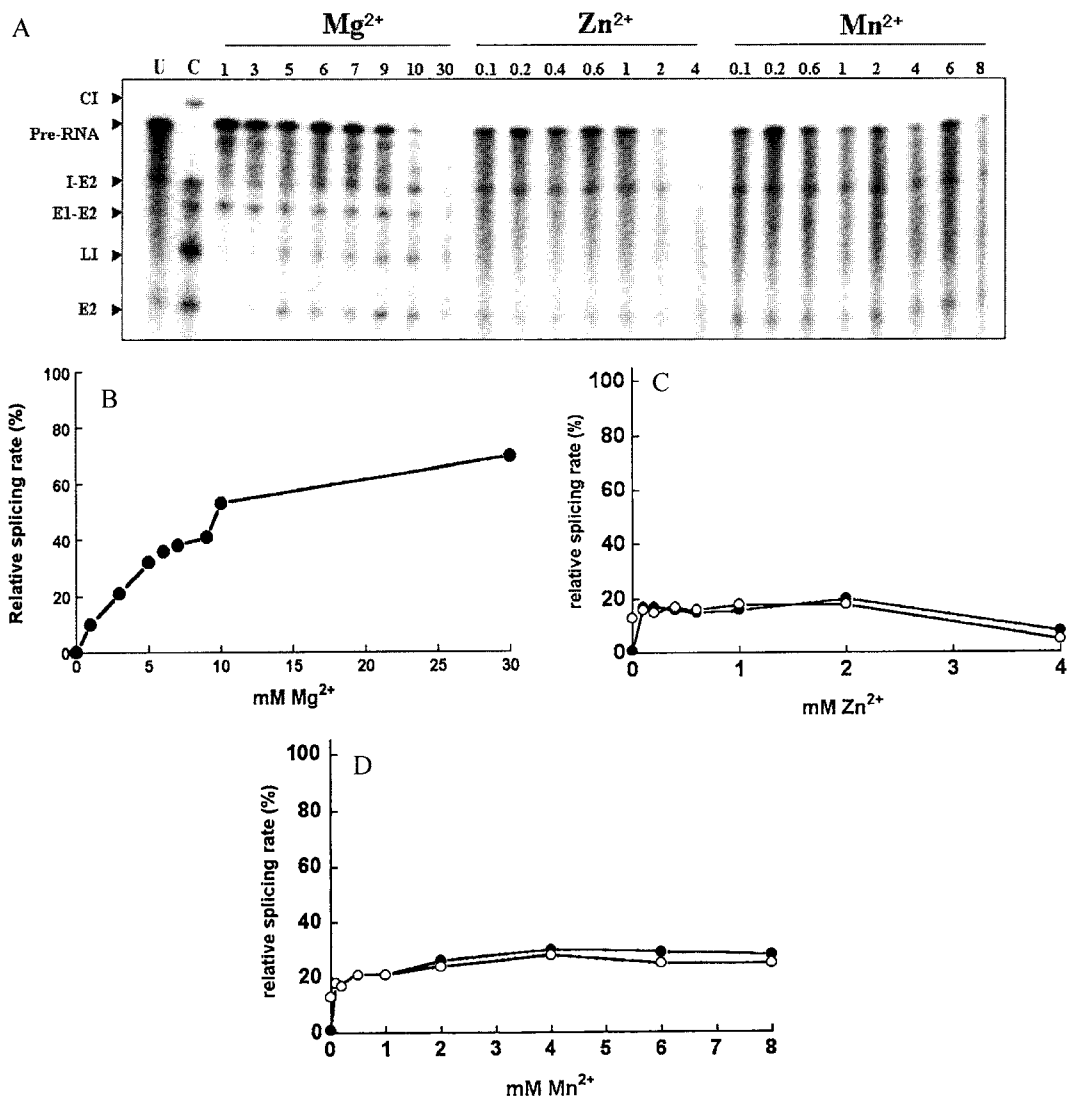


Fig. 3. Effect of divalent cations on the self-splicing inhibition of *td* intron RNA by thiamine pyrophosphate. A. Autoradiogram showing the effect of varying concentrations of divalent cations (Mg^{2+} , 1~30 mM; Zn^{2+} , 0.1~6 mM; Mn^{2+} , 0.1~8 mM) on self-splicing in the presence of 2.5 mM thiamine pyrophosphate. U, unspliced pre-RNA; C, normal splicing; CI, circular intron; I-E2, intron-exon 2; E1-E2, exon 1-exon 2 ligation product; LI, linear intron; E2, exon 2. The ratio of E1-E2 ligation produced in each splicing reaction to that of the normal splicing reaction was expressed as relative splicing activity. B. Splicing rates of the intron RNA as a function of concentrations of Mg^{2+} . ●, the rate of E1-E2 formation. C. Splicing rates of the intron RNA as a function of concentrations of Zn^{2+} . ●, the rate of I-E2 formation; ○, the rate of E2 formation. D. Splicing rates of the intron RNA as a function of concentrations of Mn^{2+} . ●, the rate of I-E2 formation; ○, the rate of E2 formation. In the case of Zn^{2+} and Mn^{2+} experiment the ratio of I-E2 and E2 ligation produced in each splicing reaction to that of the normal splicing reaction was expressed as relative splicing activity.

그리고 coenzyme A (미발표)의 경우에도 나타났다. 아직 확실한 억제기능의 기전은 규명되지 않은 상태이지만 세포내 조효소로 작용하는 상이한 coenzyme들이 리보자임의 self-splicing 촉매반응을 특이적으로 억제한다는 것은 매우 흥미로운 사실이다.

Fig. 3은 Mg^{2+} , Zn^{2+} 및 Mn^{2+} 이온이 2.5 mM thiamine pyrophosphate의 존재 하에서 T4과지의 티민 생합성 유전자 인트론 RNA의 splicing 억제의 회복에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 1 mM Mg^{2+} 에서 splicing 활성은 정상적 splicing 활성(splicing product가 CI, I-E2, E1-E2, LI 등으로 생성되었을 때)의 약 10%에 불과하였다(Fig. 3B). 그러나 Mg^{2+} 농도를 30 mM까지 증가시켰을 때 splicing 활성은 Mg^{2+} 농도에 비례하여 증가하였다.

이때 splicing 활성은 정상적인 splicing 활성의 약 70% 정도까지 회복되었으나 원형 인트론(circular intron)은 거의 검출되지 않았으며 약간의 RNA는 가수분해하기 시작하였다. 이 결과는 Mg^{2+} 이온이 group I intron 리보자임의 self-splicing 촉매반응에 필수적인 인자로서 요구되지만 고농도(30 mM)에서는 RNA 가수분해를 촉진시킨다는 사실을 알 수 있었다. 따라서 조효소 thiamine pyrophosphate가 리보자임 촉매 반응과정에서 리보자임의 Mg^{2+} -결합부위(Mg^{2+} -binding site)에 경쟁적으로 결합함으로써 splicing 반응을 억제하는 것으로 추정된다(8).

Zn^{2+} 이온의 경우 0.1~4 mM 농도에 걸쳐 splicing 반응을 실험

시킨 결과 정상적인 splicing 활성화에 비해 약 20% 정도의 splicing만 일어났다(Fig. 3C). Splicing product를 분석해보면 I-E2 (intron-exon 2)와 E2 (exon 2)로 구성되어 있으며 E1-E2 (exon 1-exon 2) 생성물, CI 및 LI는 거의 검출되지 않았다.

그리고 4 mM 농도에서는 RNA가 대부분 가수분해되는 것으로 나타났다. 따라서 Zn^{2+} 이온은 매우 저 농도에서 *td* intron 리보자임의 촉매반응을 억제할 뿐만 아니라 splicing product 생성도 부분적으로 일어남을 알 수 있다. 즉 불완전한 splicing product가 형성된다.

Mn^{2+} 이온의 경우 0.1~8 mM 농도에 걸쳐 splicing 반응을 실험시킨 결과 Zn^{2+} 이온의 경우보다는 약간 더 splicing 반응을 촉진시키는 것으로 나타났다(Fig. 3D). 4 mM Mn^{2+} 농도에서 약 30% 정도의 splicing 활성을 나타내었다. Splicing product의 생성물을 분석해보면 Zn^{2+} 이온처럼 E1-E2 생성물, CI 및 LI는 검출되지 않아 불완전한 splicing 반응이 일어남을 암시하고 있다. 그러나 Zn^{2+} 이온과는 달리 Mn^{2+} 이온은 고농도의 8 mM에서도 RNA의 가수분해가 일어나지 않은 채 약 28% 정도의 splicing 활성을 유지하였다.

Fig. 4는 2.5 mM의 thiamine pyrophosphate와 10 mM Mg^{2+} 농도 하에서 Zn^{2+} 이온과 Mn^{2+} 이온의 splicing 활성화에 미치는 영향을 조사한 것이다. Mg^{2+} 이온의 존재 하에서 Zn^{2+} 이온은 0.1, 0.2, 0.4 mM 농도에서 각각 약 36, 37, 41% 정도 더 splicing 활성을 촉진시키는 것으로 나타났다. 그러나 0.6 mM Zn^{2+} 에서 서서히 촉매활성이 감소하는 것으로 나타났다.

Mn^{2+} 이온은 Zn^{2+} 이온과 매우 유사한 촉진반응을 나타내었는데, Zn^{2+} 이온보다는 훨씬 더 높은 농도의 범위에서 촉진반응이 일어나는 것으로 나타났다. 그리고 8 mM의 고농도에서는 거의 27% 정도의 splicing 활성을 유지하는 것으로 보아 Zn^{2+} 이온보다는 *td* intron 리보자임의 splicing 활성화반응에 억제영향을 덜 주는 것으로 나타났다.

Mn^{2+} 이온은 모든 2가 양이온 중에서 Mg^{2+} 이온과 그 화학적 성질이 가장 유사하지만 *td* intron 리보자임 splicing 반응에 미치는 영향은 현저히 다르게 나타났다. 이러한 현상은 *td* intron 리보자임과 동일한 group I intron 리보자임의 self-splicing group에 속한 *Tetrahymena thermophila* rRNA 리보자임과는 현저히 다른 양상을 나타내는 것이다(1,2).

Tetrahymena thermophila rRNA 리보자임은 그 self-splicing 반응에서 Mn^{2+} 이온이 Mg^{2+} 이온의 촉매 역할을 거의 대체할 수 있다.

Group I intron 리보자임의 self-splicing 반응에서 Mg^{2+} 이온 같은 2가 양이온은 group I intron 리보자임 구조를 활성 있는 구조로 전환시켜 splicing 반응을 촉매하는 것으로 알려져 있다(14). 본 연구에서 조효소 thiamine pyrophosphate는 그 구조내 인산기가 self-splicing 반응에 참여하는 2가 양이온(Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) 등을 chelation 함으로써 splicing 촉매 반응을 억제할 가능성이 매우 높지만, Fig. 3의 Mg^{2+} 실험결과를 보면 그 상관관계가 고농도의 경우에는 Mg^{2+} 농도와 비례하지 않음을 알 수 있다. 이러한 현상은 thiamine pyrophosphate의 splicing 억제 반응

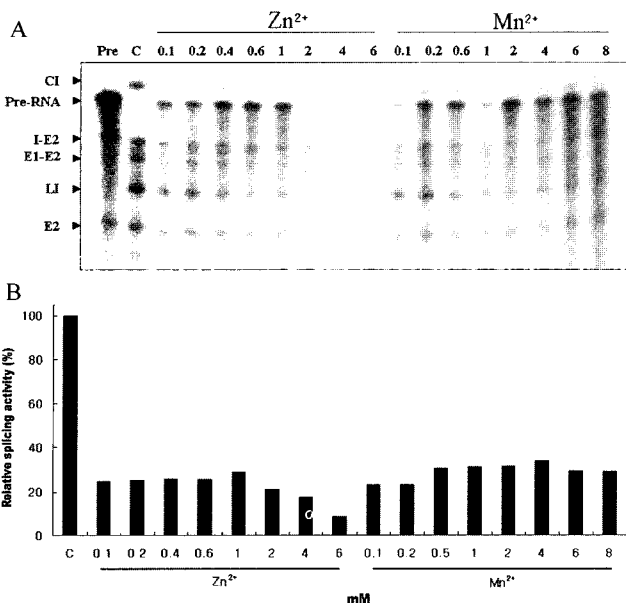


Fig. 4. Effect of Mn^{2+} and Zn^{2+} on the self-splicing inhibition of *td* intron RNA by thiamine pyrophosphate in the presence of 10 mM Mg^{2+} . A. Autoradiogram showing the effect of varying concentrations of Zn^{2+} (0.1~6 mM) and Mn^{2+} (0.1~8 mM) on self-splicing in the presence of 2.5 mM thiamine pyrophosphate and 10 mM Mg^{2+} . U, unspliced pre-RNA; C, normal splicing; CI, circular intron; I-E2, intron-exon 2; E1-E2, exon 1-exon 2 ligation product; LI, linear intron; E2, exon 2. B. Splicing rates of the intron RNA as a function of concentrations of Mn^{2+} and Zn^{2+} . The ratio of E1-E2 ligation produced in each splicing reaction to that of the normal splicing reaction was expressed as relative splicing activity.

이 2가 양이온의 chelation 작용이외에 또 다른 기능적 역할을 thiamine pyrophosphate가 수행하고 있음을 시사한다. 결론적으로 사용한 2가 양이온중 Mg^{2+} 이온이 *td* intron 리보자임의 splicing에 최적 이온인 것으로 나타났으며, Zn^{2+} 와 Mn^{2+} 이온들은 매우 저조한 splicing 반응을 나타내었다. 특히 Zn^{2+} 와 Mn^{2+} 이온들은 불완전한 splicing 생성물 형성을 일으켰고 CI, E1-E2 및 LI 등의 형성은 일어나지 않았다. 그러므로 *td* intron 리보자임은 다른 group I intron 리보자임과 달리 splicing 반응에서 Mg^{2+} 이온이 가장 효과적인 촉매 역할을 하는 것으로 나타났다.

감사의 말

본 연구는 2000년도 학술진흥재단 연구비 지원으로 수행하였습니다(KRF-2000-015-DP0378).

참고문헌

1. Bass, B. and T.R. Cech. 1996. Ribozyme inhibitors: deoxyguanosine and dideoxyguanosine are competitive inhibitors of self-splicing for the *Tetrahymena* ribosomal ribonucleic acid precursor. *Biochem.* 25, 4473-4477.
2. Cech, T.R., N.K. Tanner, I. Tinoco, Jr., B.R. Wein, M. Zuker, and P. S. Perlman. 1983. Secondary structure of the *Tetrahymena* ribosomal RNA intervening sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 3903-3907.
3. Chowrira, B.M., A. Berzal-Hersanz, and J.M. Burke. 1993. Ionic requirements for RNA binding, cleavage, and ligation by the hairpin ribozyme. *Biochem.* 32, 1088-1095.
4. Christian, E.L. and M. Yarus. 1993. metal coordination sites that contribute to structure and catalysis in the group I intron from *Tetrahymena*. *Biochem.* 32, 4474-4480.
5. Chu, F.K., G.F. Maley, F. Maley, and M. Belfort. 1984. Intervening sequence in the thymidylate synthase gene of bacteriophage T4. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 3049-3053.
6. Dahm, S.C. and O.C. Uhlenbeck. 1991. Role of metal ions in the hammerhead RNA cleavage reaction. *Biochem.* 30, 9464-9466.
7. Delvin, T. M. 1993. Biochemistry with Clinical Correlations. 3rd ed., Wiley-Liss, Inc., New York.
8. Hoch, I., O. Berenes, E. Westhof, and R. Schroeder. 1998. Antibiotic inhibition of RNA catalysis: Neomycin B binds to the catalytic core of the *td* group I intron displacing essential metal ions. *J. Mol. Biol.* 282, 557-569.
9. Kim, J.Y. and I.K. Park. 2000. The flavin coenzymes: a new class of group I intron inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta.* 1475, 56-71.
10. Park, I.K. and J.S. Sung. 2000. K^+ and Mg^{2+} ions promote the self-splicing of the *td* intron RNA inhibited by spectinomycin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1492, 94-99.
11. Park, I.K., E.H. Lim, and S. Shin. 2000. Spectinomycin inhibits the self-splicing of the group I intron. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269, 574-579.
12. Park, I.K. and J.Y. Kim. 2001. NAD^+ inhibits the self-splicing of the group I intron. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 206-211.
13. Sung, J.S. and I.K. Park. 1996. Effect of K^+ ion on *in vitro* RNA splicing of T4 phage thymidylate synthase gene. *J. Microbiol.* 34, 49-53.
14. Symons, R.H. 1989. Self-cleavage of RNA in the replication of small pathogens of plants and animals. *Trends Biochem. Sci.* 14, 445-450.
15. Von Ahsen, U. and R. Schroeder. 1991. Streptomycin inhibits splicing of group I intron by competition with guanosine substrate. *Nucleic Acids Res.* 19, 2261-2265.
16. Walsh, C. 1979. Enzymatic Reaction Mechanisms. pp.683-684, Freeman W. H. and Co., San Francisco.
17. Wank, H., J. Rogers, J. Davies, and R. Schroeder. 1994. Peptide antibiotics of the tuberactinomycin family as inhibitors of group I intron RNA splicing. *J. Mol. Biol.* 236, 1001-1010.
18. Yarus, M. 1988. A specific amino acid binding site composed of RNA. *Science* 240, 1751-1758.

(Received November 15, 2001/Accepted November 28, 2001)

ABSTRACT : Effects of Divalent Cations on the Self-splicing Inhibition of Group I Intron by the Coenzyme Thiamine Pyrophosphate**Sung Joon Ahn and In Kook Park*** (Department of Biology, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea)

Effects of divalent cations such as Mg^{2+} , Mn^{2+} and Zn^{2+} on the self-splicing inhibition of the T4 phage thymidylate synthase (*td*) intron by the coenzyme thiamine pyrophosphate have been investigated. The splicing activity increased in proportion to the concentration of Mg^{2+} up to 30 mM. Without Mg^{2+} in the splicing reaction the Zn^{2+} ion tested in the range of 0.1-6 mM concentration only produced the splicing activity about 20% that of the normal splicing rate. A majority of the splicing products were I-E2 and E2 but E1-E2 ligation product, CI and LI were not detected. Similar patterns of splicing products were also observed with Mn^{2+} . At 6 mM Zn^{2+} the intron RNA was hydrolyzed. Mn^{2+} produced a little higher splicing activity than that of Zn^{2+} over the range of concentrations used and at 8 mM about 28% splicing activity was observed. In contrast, Mn^{2+} and Zn^{2+} ions promoted the splicing activity about 35-40% on an average in the presence of 10 mM Mg^{2+} . Of all divalent cations tested, Mg^{2+} exhibited the maximum activation effect to counteract the splicing inhibition by thiamine pyrophosphate. This appears to be due to the stabilizing effect of *td* intron ribozyme structure essential for the catalytic function by Mg^{2+} .