

タバコrDNAスパーサー領域の構造とrRNA転写機構の解析

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード: 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/46423

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



KAKEN

1993

29

タバコ rDNA スペーサー領域の構造と
rRNA 転写機構の解析

(課題番号 04640623)

平成5年度科学研究費補助金 一般研究C 研究報告書

平成6年3月

研代表者 矢倉公隆

(金沢大学教育学部 助教授)

研究組織

研究代表者 矢 倉 公 隆 (金沢大学教育学部 助教授)

研究経費

平成4年度	1,700千円
平成5年度	300千円
計	2,000千円

研究発表

学会誌等

Nucleotide sequence of the rDNA intergenic spacer region in *Nicotiana tabacum*

(準備中)



8000-30326-4

金沢大学附属図書館

研究目的

真核細胞のリボソームを構成する5種類のrRNAの遺伝子のうち5S RNA遺伝子以外は同一rDNA上で、18S-5.8S-25Sの順に大小のスペーサーを介して直列に反復配列していることが知られている。rDNAの大スペーサー領域は、rRNAのコード領域に比べ進化の速度が速く種間での塩基配列の保存性は低いのかかわらず、プロモーターを始めとするrRNAの転写調節に必須の配列が存在する重要な領域である。

rRNAの転写制御に関する研究は動物や下等真核生物において盛んに行われているが、植物に関しては殆どなされておらず遅れをとっているのが現状である。植物におけるrRNA遺伝子は動物のそれに比べ1オーダー多く、核当たり数千コピー存在する。この事は、植物にはいわば過剰なrRNA遺伝子が存在することを暗示しており、コピー数の少ない動物のrRNA遺伝子と一部異なる転写制御を受けている可能性があると考えられる。

そこで本研究は、タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. putit Havana SR1) を材料とし以下の3点についての解析を実施して、植物におけるrRNAの転写調節機構を明らかにすることを目的としたものである。

- (1) rRNAの転写開始点、プロモーター等の転写調節領域が存在するrDNAスペーサー領域を含む断片のクローニングを行う。
- (2) クローン化したrDNA断片を使用しrDNAスペーサー領域の全塩基配列を決定する。
- (3) 転写調節機構を解析するための一つの有効な手段である *in vitro* の確立する。そのためにタバコの培養細胞から転写活性を持った細胞抽出液を調製する方法を検討する。

研究成果

(1) タバコrDNAのクローニング

タバコrDNAをクローニングするにあたってまずrDNAの反復単位当り一ヶ所を切断する制限酵素を探索するためゲノミック・サザンハイブリダイゼーションを行なった結果、XbaIが18S RNA遺伝子の5'末端を切断することが明らかになった(データ不表示)。さらに反復単位には約10.5 kbと11.5 kbの2種類があり長さの多様性があることもわかった。そこでコスミドであるCharomid 9-36をベクターとして、短い方の10.5 kb断片をクローニングした。得られたクローンをNTXRとして以後のリクローニングに使用した。

クローンNTXRよりスペーサーの全領域を含む、25S RNA遺伝子の3'末端付近に存在するEcoRIサイトから18S RNA遺伝子の5'末端付近のXbaI

サイトまでの約5.6 kbの断片を切り出し、プラスミドベクターであるpBlueSc r i p t II-SK⁺のE c o R I-X b a Iサイトにリクローンし得られたものをN T E Xとした。N T E X上の各種制限酵素切断点マップを完全消化あるいは部分消化することによって作成した(F i g 1)。その結果、タバコrDNAスペーサーのほぼ中央にH i n d IIIサイトが見られ、その他に制限酵素A c c I、B a m H I、M l u I、E c o R V、N h e Iの切断点が1ヶ所ずつ見出された。H i n d IIIサイトの下流にはほぼ等間隔で7個のC l a Iサイトが存在し、この領域が反復配列である可能性が示唆された。さらにH i n d IIIサイトの上流の、スペーサーの5'末端からN h e Iサイトまでの間には短い間隔でN c o Iサイトが多数存在しておりこの領域にも反復配列が存在していることが暗示された。これらの結果をもとに、N T E Xを2つに分けた、E c o R I-H i n d III断片とH i n d III-X b a I断片のサブクローンをp B l u e s c r i p t IIをベクターとして作成し、それぞれN T E HとN T H Xとした(F i g 1)。

(2) rDNAスペーサー領域の塩基配列

F i g 1の結果よりスペーサー内には反復配列が存在することが考えられ読み位置の間違いを起こす可能性があるため、ダイデオキシ法によるシーケンシングの際の鑄型としてスペーサー領域の様々な長さのディレクションミュータントを作成した。その親分子としてN T E X、N T E HおよびN T H Xを用いた。各ディレクションミュータントの長短を慎重に見極め主要のものを選別してシーケンシング反応を行なった。その結果得られた全長4996 bpのスペーサー領域の全塩基配列をF i g 2に示した。A c c Iサイトの32 bp下流にTATATAAGGGGGGという配列が見出された(F i g 2、二重下線部)。この配列は今まで調査されている全ての植物のrDNAスペーサーにおいて保存されている配列である。それらのホモロジーは非常に高く、同じナス科植物(トマト、ジャガイモ)とは100%、その他のものと比較しても一つの例外を除いて80%以上であった(F i g 3)。いくつかの種ではこの配列内に、S1マッピングあるいはプライマー伸長法によって明らかにされたrRNAの転写開始点が存在することから、タバコにおいても転写開始点を含む領域であることが強く示唆される。ナス科のトマトではS1マッピングとプライマー伸長法の両解析より3番目のTの次のAが転写開始点であることが明らかにされていることを考慮に入れると、タバコにおけるrRNA転写開始点はTATATAAGGGGGGの太字のAであると思われる。以下この配列を便宜的に転写開始点と呼ぶ。

転写開始点より上流約440 bpにわたってATリッチな領域が存在することが明らかとなった。この領域のAT含有量は約81%であった。このようなATリッチ領域は他の数種の植物のrRNA転写開始点の上流にも見られるが、特にそのうち約320 bpにわたる領域はタバコの配列に対して同じナス科のトマトとジャガイモのそれとホモロジーが高く、トマトは64%、ジャガイモは68%という値を示した(F i g 4)。

またこの領域の相同性は転写開始点に近いほど高く、転写開始点より100bp上流までの範囲に限定すると3者間で約80%である。このATリッチ領域の意義は今のところ明らかではないが、その塩基配列の構成と転写開始点のすぐ上流に存在するということから、転写の際の鋳型の塩基対の巻き戻しを容易にするという機能を持っている可能性がある。しかし、単子葉植物のrDNAではこのような転写開始点上流のA-Tリッチ領域の存在は認められず、これは少なくとも双子葉植物植物に特有な機能なのかも知れない。

生物種に違いにかかわらずrDNAのスペーサー内にはサブリピートが存在することが、今まで調べられた全ての生物種において認められている。これらの機能は、アフリカツメガエルやショウジョウバエ等一部の動物では、転写の際のエンハンサーとして機能することが明らかにされている。そこでタバコrDNAスペーサーにおけるサブリピートの有無を検索した結果、少なくとも4種類のサブリピートが見出され、それぞれI、II、IIIおよびIVと名付けた。サブリピートIは転写開始点上流に存在するもので、基本的に217bpの配列(エレメント)が6回繰り返されている。しかしこのサブリピートは不完全なものであり、6つのエレメントのうちの3つは3'側が、1つは5'側がそれぞれ約90~160bpおよび650bpが欠落したものであった(Fig 5)。一方、転写開始点の下流にはII、III及びIVの3種類のサブリピートが存在する。サブリピートIIは、121bpのエレメントが直列に15回繰り返されたものであるが、それらの間には別のサブリピートであるIIIのエレメント(20bp)またはIVのエレメント(14bp)が1つずつ介在する形で構成されていた(Fig 2)。これらのサブリピートのエレメント間の塩基配列のホモロジーを見ると、サブリピートIIでは約90%以上(Fig 6A)、IIIでは80%以上(Fig 6B)、IVにおいては93%以上(Fig 6C)と高い値を示した。

一般的に、rDNAサブリピートどうしの塩基配列のホモロジーは異なる種間では認められない。しかし、近縁の種間では特定のサブリピートに関してその塩基配列がよく保存されている場合がある。例えば、ソラマメ属植物の少なくとも3種では、転写開始点上流に存在するいくつかのサブリピートの1つが互いに65%以上のホモロジーを有することが明らかにされている。また、ナス科植物でも、トマトとジャガイモのrDNAスペーサーの比較より、転写開始点上流および下流に存在するサブリピートが両者でかなり高い相同性を示すことが報告されている。そこで、サブリピート間の比較を同じナス科のタバコ、トマトおよびジャガイモの3者で行なった結果、タバコのI~IVの4種類のrDNAサブリピートは他の2種のいずれのサブリピートとは有意な塩基配列のホモロジーは見出せなかった。このことは、トマトとジャガイモがナス科において近縁関係にあるということをよく反映している。

タバコrDNAスペーサーに見られるサブリピートの存在意義は現在のところは不明であるが、アフリカツメガエル、ショウジョウバエあるいはヒト等の動物では転写開始

点上流に存在するサブリピートが転写の効率を上げるエンハンサーであることや、植物の場合ではハツカダイコン rDNA において転写開始点上流のサブリピートに結合する特異的なタンパク質が存在することが明らかにされていることなどを考え合わせると、タバコのサブリピート I の機能を推測する上で興味深い。一方、転写開始点下流におけるサブリピートの存在は、キュウリ、ソラマメ、エンドウマメ、トマトなど他の植物でも明らかにされている。その中で、キュウリでは転写開始点下流のサブリピートに結合するタンパク質が確認されており、これが転写調節等の何らかの機能を持った因子の可能性が考えられる。したがって、転写開始点下流のサブリピートもシスエレメントとして機能していることが予想される。

DNA において二次構造 (stem-loop 構造) の取りうる配列は、種々の酵素を始めとするタンパク質が結合するポテンシャルを秘めている。そこでタバコ rDNA スペーサーにおいて取りうる二次構造の検索を行なった結果、転写開始点の直後に stem-loop 構造を取りうる配列が見つかった (Fig 2、Fig 7)。このような転写開始点直後の二次構造はソラマメ属植物を始めとする数種の植物にも見られるので、転写開始に関与している可能性も考えられるが、その様な構造が認められない種もあることから必ずしもその考え方は普遍化できず、ある種に特異的な特徴かも知れない。その他、25S RNA 遺伝子と 18S RNA 遺伝子に近い位置に、stem が 6~7 塩基対からなる二次構造がそれぞれ 2ヶ所見られた (データ不表示)。これらの意義も今のところまったく不明であるが、それらの存在する位置が rRNA のコード領域とスペーサーの境界付近であることを考えると、成熟 rRNA の形成過程に起こる前駆体 RNA のプロセッシングのサイトであるのかもしれない。

以上のようにタバコ rDNA スペーサー領域内にはさまざまな構造的特徴が見出されたが、それらの存在意義、特に rRNA の転写制御との関連については殆ど不明である。それを明らかにするには、1つの有効な方法としての *in vitro* による転写系を用いた解析が必要となる。しかし、植物においては未だ効率のよい *in vitro* 転写系の確立がなされていない。

(3) *in vitro* の転写系

塩基配列が明らかにされたタバコ rDNA スペーサー内のいかなる領域が rRNA の転写調節に関与しているかを明らかにすることを目指し、*in vitro* の転写系を確立することを試みた。*in vitro* の転写系を組み立てる場合に最もクリティカルなことは、いかに活性のある細胞抽出液を調製するかということである。本研究では、抽出液をとる細胞を増殖速度の高いタバコの BY2 株を用い、まず全細胞抽出液の調製を、酵母および哺乳類における rRNA の *in vitro* 転写解析で報告されている方法を一部改変して行なった。また反応液の条件も、特に KCl、MgCl₂ 濃度に関して検討を加えた。しかし、現在までのところ、電気泳動後の転写産物のシグナルは全

く検出されていない。その原因として、タバコBY2細胞のヌクレアーゼ活性が高いため全細胞からの抽出液にヌクレアーゼの混入が多く、そのため鋳型DNAあるいは合成された転写産物が分解された可能性が考えられる。現在、ヌクレアーゼの混入を避けるため核抽出液の使用を考え、核分画のプロトプラストからの調製を検討している。

謝辞

本研究の遂行に当たっては、金沢大学教育学部教育学研究科大学院生の普神和子さん、金沢大学教育学部学生の宮西昌子および寺西道恵さんの助力を得た。ここに謝意を表すものである。

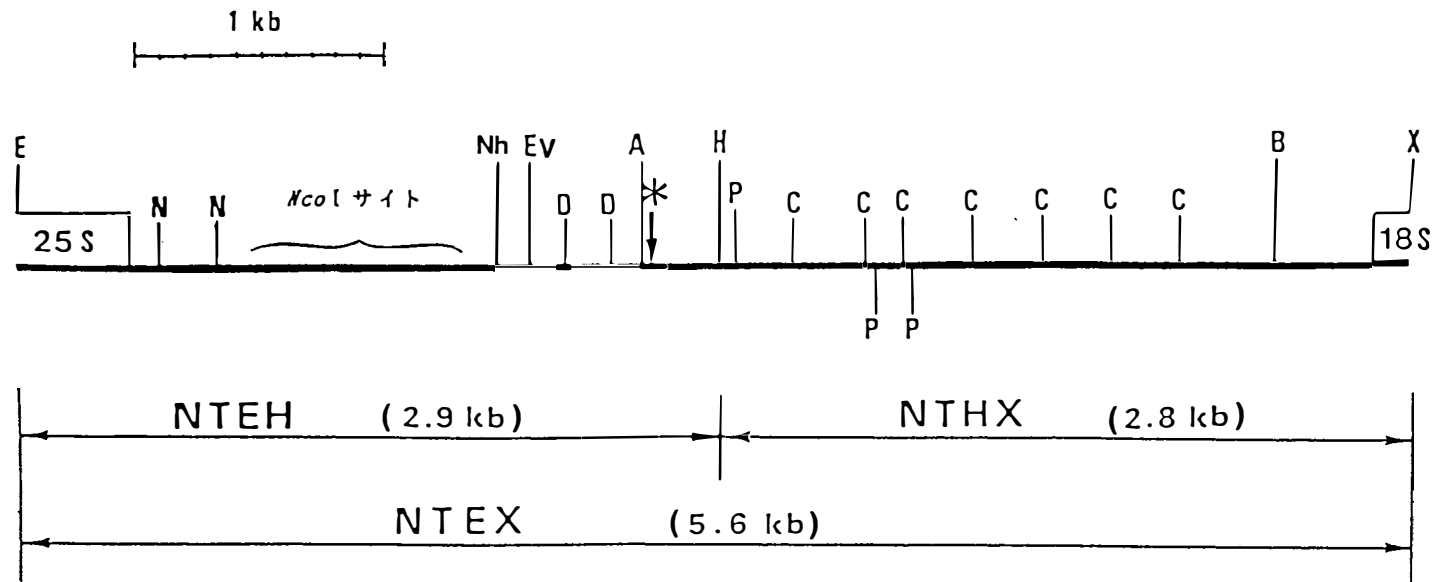


Fig. 1

タバコ rDNA のスペーサー領域内の制限酵素地図およびサブクローン。制限酵素切断点は以下の通り。E: EcoRI、N: NcoI、Nh: NheI、EV: EcoRV、D: DraI、A: AccI、H: HindIII、P: PvuII、C: ClaI、B: BamHI、X: XbaI。NTEX は、タバコ rDNA スペーサーの全領域を含む約 5.6 kb の EcoRI-XbaI 断片を、pBluescript IISK⁺ の EcoRI/XbaI サイトに組み込んだサブクローン。NTEH は、NTEX のインサートから約 2.9 kb 断片を切り出し、pBluescript IISK⁺ の EcoRI/HindIII サイトに挿入したサブクローン。NTHX は、NTEX を HindIII で切断後、NTEH のインサート部分に相当する断片を除いた残りの約 5.7 kb の断片を自己結合したサブクローン。

10	20	30	40	50	60
CCCTCCCCT	CCATTCCAAT	CAATTTATAA	CTCTTTCGAA	AAGAGGTTTA	TTCCTTCCTT
70	80	90	100	110	120
GATGCTATAT	TATATGCCAA	GTGTTGGAAA	ATCGAACAAAG	TCCTCAATAC	CATGGAACGT
130	140	150	160	170	180
ATTCTATTTG	TGTATTAAGT	GTAAATGTG	ACTTGTCACT	TAGTCGTTTT	GTGGGAAAGG
190	200	210	220	230	240
CTTGCCATG	ACGCTAAACC	CAACTTAACT	TATAGAGGTT	TTTCGAGGTG	TCGTGTGCGA
250	260	270	280	290	300
TGCCAAGGCA	CAAGCCAAGA	ATGATGTGCC	AAGGCACGAC	GTCGGACGCT	GCGGGACATG
310	320	330	340	350	360
GCACGGCGTC	GGACGTGGCC	ATGGCACGGC	GTCGGACGTG	CCCATGGCAC	AGCGTCGGAC
370	380	390	400	410	420
GTGGTAGGAC	ATGGCCATCG	CACGACATAG	GACATGATGG	GACATGGCAG	GGCGTGGCCA
430	440	450	460	470	480
TGGCACATCA	TCGGACGTGG	TATTACATGG	CCATCGCACG	ACGTAGGACA	TGATGGGACA
490	500	510	520	530	540
TAGCAGGGCG	TGGTCGTACG	TGGCAGGACA	TGACCATGGC	AGGACATGGC	AGGACGCAGG
550	560	570	580	590	600
ACATGGCAGG	GCTTGGCCAT	GGCTCGGCGT	CGGACGTGGC	CATGGCTCGG	CGTCGTACGT
610	620	630	640	650	660
GGAAGGACAT	GGCCATGACA	CGACGCAGGG	CGTGGCCATG	GCACGACATC	GGACGTCTCA
670	680	690	700	710	720
TGGCACGGCG	TCGGACGTG	CAGGACATGA	CCATGGCACG	ACGCAGGACA	TGACAGGACG
730	740	750	760	770	780
TGGCCACGGC	AGGACGCAGG	ACATGGCAGG	ACGCAGGACA	TGGCAGGGCG	TGGCCATGGC
790	800	810	820	830	840
TCGGCGTCGG	ACGTGGAAGG	ACATGGCCAT	GGTACGACGC	AGGGCATGGC	AGGGCGTGGC
850	860	870	880	890	900
CATGGCACGG	TTCGGACGT	GGTAGGATAT	GGCCATGGCA	CGACGCAGGA	CATGACGGGA
910	920	930	940	950	960
CATGGCAGGA	CGCAGGACAT	GGCAGGGCGT	GGCTATGGCC	CGACGCAGGA	CGTTCGGAC
970	980	990	1000	1010	1020
GTGGCAGGAC	ATGGCCATGG	CACGACGCAG	GACATGACAG	GACATGGCCA	CGGCAGGACG
1030	1040	1050	1060	1070	1080
CAGGACATGG	CAGGACGCAG	GACATGGCAG	GGCGTGGCCA	TGGCTCGGCG	TCGGACATGG
1090	1100	1110	1120	1130	1140
CCATGGCTCG	GCATCGGACG	TGGAAGGACA	TGGCCATGGC	ACGACGCAGG	GCGTGGCCAT
1150	1160	1170	1180	1190	1200
GGCACGGCAT	CGGACGTCTC	ATGGCACGGC	GTCGGACGTC	GCAGGACATG	GACATGGCAG
1210	1220	1230	1240	1250	1260
GACGCAGGAC	ATGGCAGGAC	GTGGCCACGG	CAGGACGCAG	GACATGGCAG	GACGCAGGAC

I-1

I-2

I-3

I-4

I-5

2530 2540 2550 2560 2570 2580
 CAAGTAGCGC CGCAAGGTGC CGTGCGCATG GGGCTAAACT CAGTACGTTT CGATTGCCAT

2590 2600 2610 2620 2630 2640
 CGGTTGTTGT GAGTTGTGTT TGGCATCGCT CGTGGCGGTT GATGGCTTTT GGCAACTGAA
 ▲ IV-1 ▲ II-3

2650 2660 2670 2680 2690 2700
 CGGAGAGGCC TCGTGCAAGT AGCGCCGCAA GGTGCCGTGC GCATGGGGCT AAGCCCAGTA

2710 2720 2730 2740 2750 2760
 TGTTCCGATT GCCATCGATT GTTGC GGCAA CATCGGGAGG CGACATCGCT CGTGGCGGCT
 ▲ III-2 ▲ II-4

2770 2780 2790 2800 2810 2820
 GATGGCTTTT GGCAACGGAA CGGCGAGGCC TCGTGCAAGT AGCGCCGCAA GGTGCCGTGC

2830 2840 2850 2860 2870 2880
 GCATGGGGCT AAACCTCAGTA CGTTCCGATT GCCATCGGTT GTTGTGAGTT GTGTCTGGCA
 ▲ IV-2 ▲

2890 2900 2910 2920 2930 2940
 TCGCTCGTGG CGGCTGATGG CTTTTGGCAA CGGAACGGCG AGGCCTCGTG CAAGTAGCGC

II-5

2950 2960 2970 2980 2990 3000
 CGCAAGGTGC CGTGCGCATG GGGCTAAGCT CAGTACGTTT CGATTGCCAT CGATTGTTGC
 ▲

3010 3020 3030 3040 3050 3060
 GGGCAACATC GGGAGGCGAC ATCACTCGTG GCAGCTGATG GCTTTTGGCA ACTGAACGGC
 III-3 ▲ II-6

3070 3080 3090 3100 3110 3120
 GAGGTCTCGT GCAAGTAGCG CCGCAAGGTG CCGTGCGCAT GGGGCTAAGC TCAGTACGTT

3130 3140 3150 3160 3170 3180
 CCGATTGCCA TCGATTGTTG CGGGCAACAT CGGGAGGCGA CATCGCTCGT GGCAGCTGAT
 ▲ III-4 ▲ II-7

3190 3200 3210 3220 3230 3240
 GGCTTTTGGC AACTGAACGG CGAGGTCTCG TGCAAGTAGC GCCGCAAGGT GCCGTGCGCA

3250 3260 3270 3280 3290 3300
 TGGGGCTAAA CTCAGTACGT TCCGATTGCC ATCGGTTGTT GTGAGTTGTG TTTGGCATCG
 ▲ IV-3 ▲ II-8

3310 3320 3330 3340 3350 3360
 CTCGTGGCGG TTGATGGCTT TTGGCAACTG AACGGAGAGG CCTCGTGCAA GTAGCGCCGC

3370 3380 3390 3400 3410 3420
 AAGGTGCCGT GCGCATGGGG CTAAGCCAG TATGTTCCGA TTGCCATCGA TTGTTGCGGG
 ▲

3430 3440 3450 3460 3470 3480
 CAACATCGGG AGGCGACATC GTCGTGGCG GCTGATGGCT TTTGGCAACG GAACGGCGAG
 III-5 ▲ II-9

3490 3500 3510 3520 3530 3540
 GCCTCGTGCA AGTAGCGCCG CAAGGTGCCG TGCGCATGGG GCTAAACTCA GTACGTTCCG

3550 3560 3570 3580 3590 3600
 ATTGCCATCG TTGTTGTGAG TTGTGTCTGG CATCGCTCGT GGCGGCTGAT GGCTTTTGGC
 ▲ IV-4 ▲ II-10

3610 3620 3630 3640 3650 3660
 AACGGAACGG CGAGGCCTCG TGCAAGTAGC GCCGCAAGGT GCCGTGCGCA TGGGGCTAAG

3670 3680 3690 3700 3710 3720
 CTCAGTACGT TCCGATTGCC ATCGATTGTT GCGGGCAACA TCGGGAGGCG ACATCGCTCG
 ▲ III-6 ▲ II-11

3730 3740 3750 3760 3770 3780
 TGGCGACTGA TGGCTTTTGG CAACGGAACG GCGAGGCCTC GTGCAAGTAG CGCCGCAAGG

3790 3800 3810 3820 3830 3840
 TGCCGTGCGC ATGGGGCTAA GCTAAGTACG TGCCGGTTGC CATCGGTTGT TGTGAGTTGT
 3850 3860 3870 3880 3890 3900
 GTCTGGCATC GCTCGTGGCG GCTGATGGCT TTTGGCAACG GAACGGCGAG GCCTTGTGCA
 3910 3920 3930 3940 3950 3960
 AGTAGCGCCG CAAGGTGCCG TGCGCATGGG GCTAAGCTCA GTACGTTCCG ATTGCCATCG
 3970 3980 3990 4000 4010 4020
 ATTGTTGCGG GCAACATCGG GAGGCGACAT CGCTCGTGGC GGCTGATGGC TTTTGGCAGC
 4030 4040 4050 4060 4070 4080
 GGAACTGCGA GGCCTCGTGC AAGTAGCGCC GCAAGGTGCC GTGCGCACGG GGCTAAGCTA
 4090 4100 4110 4120 4130 4140
 AGTACGTGCC GATTGCCATC AGTTGTTGTG AGTTGTGT CTGGCATCGCTC TTGGCGGTTG
 4150 4160 4170 4180 4190 4200
 ATGGCTTTTG GCAACGGAAC GGCGAGGCCT CATGCACGTA GCACCGCAAG GTGCCGTGCG
 4210 4220 4230 4240 4250 4260
 CATGGGGCTA AGCTAAGTAC GTGACGATTG CCATCGATTG TTGGGTGCAA CATCGGGTGG
 4270 4280 4290 4300 4310 4320
 CGGCATCGCT CGTGGCAGCT GATGGCTTTT GGCAATGGAA TGGCGAGGCC TCGTGCAAGT
 4330 4340 4350 4360 4370 4380
 AGCGCCGCAA GGTGCCGTGC GCATGGGGCT GAGTTTAGTA CATGTTGAAG GTCGTGCGGT
 4390 4400 4410 4420 4430 4440
 TGTTGTGGGT TGTGTCTGTG GCTTTTATTT ATGGCGCCTT GTTCGTTTAT ATACTCCAAT
 4450 4460 4470 4480 4490 4500
 GGTTGCTGCC TGGCGGGGCT TGTCTTGGCT TTGCAATGTT GGCATTGGCA ACAACACATG
 4510 4520 4530 4540 4550 4560
 GCTACGCGTC GCGTGTTGGG GCTGTTGTCG GCATGTATCG GCGAGGCAAG TGTACGTGCG
 4570 4580 4590 4600 4610 4620
 GCACATGAGT GGTGTTGCGC TTGTGTGGCT AGGTTGGATC CCTGCTTGTG CAGCGACGTC
 4630 4640 4650 4660 4670 4680
 CTAGCCCGCA TGCCATCTCA GTCATGGCAC AAGCGCAAAT TAGGCTTGTG CGGCGTCGGT
 4690 4700 4710 4720 4730 4740
 TTTCTGTGTT GCATACCTAA TGCCAGGCA TTATCAAGCA CAATCGGTTG CCTTTCGCCC
 4750 4760 4770 4780 4790 4800
 CTCGCGTTCG ACGTGCGGGG TGAACCAAAA GCTGCAGTTG TGTCCCACGC CATCCTCGCT
 4810 4820 4830 4840 4850 4860
 TCGTCGTGCG ATGTCTAGGT CCATGACTAG TATGCTCGGA CTCTCGGATT CGGTAAACGC
 4870 4880 4890 4900 4910 4920
 AATGGGCATG GGGTCTTCAT TGGCTCCTAT CTGCCCAAAG AATGCTCCTT ACGAATGACG
 4930 4940 4950 4960 4970 4980
 GTCGTGCTCG TCTTGGACTT GGCCGTGGCC TTTGGGTCGG CCATGCTCAT GCGGTGCCGA
 4990
 CGTCAATGAG GAATGC

Fig. 2

タバコ rDNA のスペーサー領域 (4996 bp) の全塩基配列。スペーサー内に存在する 4 種類のサブリピート (I、II、III、IV) をさまざまな下線で表示している。二重下線部は植物 rDNA においてよく保存されている rRNA 転写開始点を含む配列。転写開始点のすぐ下流の向かい合った白抜きの矢印は二次構造を取る部分を示す。

<i>Nicotiana tabacum</i>	TATA-TAAGGGGGG	
tomato	+++++ ^網 +++++	(100%)
potato	+++++ ^網 +++++	(100%)
<i>Pisum sativum</i>	+++++-++++A	(86%)
<i>Vicia faba</i>	+++++ ^網 -++++A	(86%)
<i>Vicia angustifolia</i>	+++++T++++	(93%)
<i>Vicia hirsuta</i>	+++++-++++	(93%)
<i>Vigna radiata</i>	+++++T++++	(93%)
<i>Hordeum bulbosum</i>	G++++--CCC+CA	(43%)
wheat	+++G+ ^網 -+++A++	(79%)
rice	+++G+-++++	(86%)
maize	+++G+ ^網 -++++T	(79%)
<i>Cucumis sativus</i>	+++++-++++	(93%)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	+++++ ^網 -++++	(93%)
radish	+++++ ^網 -++++T	(86%)

Fig. 3

rRNA転写開始点領域の植物間での比較。タバコの配列にたいするホモロジーを右のかっこ内にパーセントとして表示している。+は、タバコの配列と一致する塩基、-は塩基の欠落を表す。異なる塩基は塩基記号で表示している。網掛けの部分は、S1マッピング法あるいはプライマー伸長法によって明らかにされた転写開始点の塩基を示す。

320 300
 C. S. aTTTT·TAcg···TTTaTTAtTTTTtAcGT·cT·aTtTTAtaAaTTaAaaTtTa·tAAATTTtaTa
 タバコ GTTTTATAAAATATTTATTATTTT++ATGT++GTTATATTATTACTTGATGTATTGGAAATTTTCTC
 芋テト A-----+---CGG++-----TT-C--AAC-+--T----A-A--A-AA-T-ACT-----+A-A
 トマト A-----+---CGC++----T---A---TT-C---+C-CT-T---AA-A--A-AA-T-ATT-----A-A

250
 ·aTttaaggTT·aCtATATTTATtTgtgAAtttt·gg·gtTaATTTtcaTATTTTTTTtGaTATTTT·tcTAT
 CATTGTTTTTTT++CTATATTTAT++++AA+++++TAATTTTCTTATTTTTTTTG+TATTTTAT+TAT
 G--CTAAGG--+A-----TTGTG--TTTTGGTGT-----+A-----A-----T-C---
 +T--TAAGG--CA-+-----TTGTG--TTTTCGGAGT-G-----+A-----C-A-----CCC---

200
 tT·TTaTT·aaTTT·ATtAcTAA·TaTTT·gg·aATTt·gAAAAAAATaaaaATtAaaaaaaTTgTTG·A
 GTATTTTTTCGTTTTAT+ATAAAATATTT++++ATT+++AAAAAAAT++++ATTA+++++TTTTTTGTA
 T-G--A--+AA-----T-C---+-----CGGAA---TCCG-----AAAA---AAAAAA--G----+
 T-T--A--+AA-----T-C---T-T---+GG+A---TTTG-----AAAA--C-AAAAAA--G----+

150 100
 AAA·TATtT·tTTTAtA·ATaTt·AAAaGTCA·TTtgTG·AA·gcT·AtgTgtGTTtGTACcTTaGa·c·G
 AAA+TATATCATTTACA+ATGTTTAAAAGTCA+TTTGTG+AATATATTAGCTAAGTT+GTAC+TTCGGTTTG
 ---C---T--+T---T-T--A-++-----+-----G--+GC-A-TG-GT---T---C--A-AAC+-
 ---A---T--+T---T-C--A-++-----+-----A--A+---+GGC-G-TG-GT---T---C--A-ACC+-

50
 tGCATaTTTGG·GTTGTACATtTtcATTATGATTCTCTGG·AAAA·CATGTCTACTCCTGTCCaTGGG·
 TGCAT+TTTGGTGTGTACATGTCTATTATGATTCTCTGGCCAAAA++CATGTCTACTCCTGTCACTTGGG+
 -----A-----+-----T-TC-----+-----AT-----A-----T
 C---A-----+-----T-TC-----+-----TC-----A-----C

tttttTTTTTTAAG·CATATATAAGGGGGGTAGTGGTGTGgA·GGCA
 TTTTTTTTTTTAAGACATATATAAGGGGGGTAGAGGTGTG+AAAGGCA
 -----+-----G-+----- 68.0% (82.9%)
 AAAAC-----+-----G-+----- 63.8% (78.3%)

Fig. 4 タバコの AT-rich 領域と、ジャガイモ及びトマトの AT-rich 領域との塩基配列の比較

記号は、- : タバコと一致する塩基、+ : 塩基の欠落をそれぞれ示し、塩基が異なる部分はその塩基記号(A, C, G, T)で示した。白抜きの記号は転写開始点と思われる配列であり、これより320bp 上流までのタバコの塩基配列に対する相同性をそれぞれ%で示し、100bp 上流までの塩基配列に対する相同性を()内に%で示した。配列の上の数字は、タバコの転写開始点と思われる配列からの距離(bp)。コンセンサス配列は 3つの塩基が一致する部分は大文字、2つの塩基が一致する部分の小文字で示した。

A

C. S. CATCGCTCGTGGCGGCTGATGGCTTTTGGCAACGGAACGGCGAGGCCTCGTGCAAGTAGCGCCGCAA

```

1. -----T-----C-----GA--G-----
2. -----A-----T-----T-----
3. -----T-----T-----A-----
4. -----
5. -----
6. ---A-----T-----T-----
7. -----T-----T-----
8. -----T-C-----T-----A-----
9. -----
10. -----
11. -----
12. -----T-----
13. -----T-----
14. -----T-----T-----A-----C-----A-----
15. -----A-----T-----T-----

```

C. s. GGTGCCGTGCGCATGGGGCTAAGCTCAGTACGTTCCGATTGCCATCGATTGTTG

```

1. -----A-A-----T---T-----A-----AG----- (90%)
2. -----A-----G----- (96%)
3. -----C---T----- (96%)
4. -----A-----G----- (98%)
5. ----- (100%)
6. ----- (98%)
7. -----A-----G----- (97%)
8. -----C---T----- (95%)
9. -----A-----G----- (98%)
10. ----- (100%)
11. -----A-----G--G-----G----- (96%)
12. ----- (99%)
13. -----C-----A-----G-----AG----- (95%)
14. -----A-----GA----- (91%)
15. -----G-T-T---A-GTT--AG-T-G-GCG----- (93%)

```

B

C. s. CGGGCAACATCGGGAGGCGA

```

1. -----A----- (95%)
2. ---+----- (95%)
3. ----- (100%)
4. ----- (100%)
5. ----- (100%)
6. ----- (100%)
7. ----- (100%)
8. G-T-----T---G (80%)

```

C

C. s. TGAGTTGTGTCTGG

```

1. -----T--- (93%)
2. ----- (100%)
3. -----T--- (93%)
4. ----- (100%)
5. ----- (93%)
6. ----- (93%)

```

Fig. 6

転写開始点下流に存在するサブリピートの各エレメント間の塩基配列の比較。A：サブリピートⅡ、B：サブリピートⅢ、C：サブリピートⅣ。C. Sはエレメント間のコンセンサス配列を表す。—はコンセンサス配列と一致する塩基を表し、異なる塩基は塩基記号(A, G, C, T)で示した。かっこ内の数字は、コンセンサス配列に対する各エレメントの塩基配列のホモロジーをパーセントとして表示している。

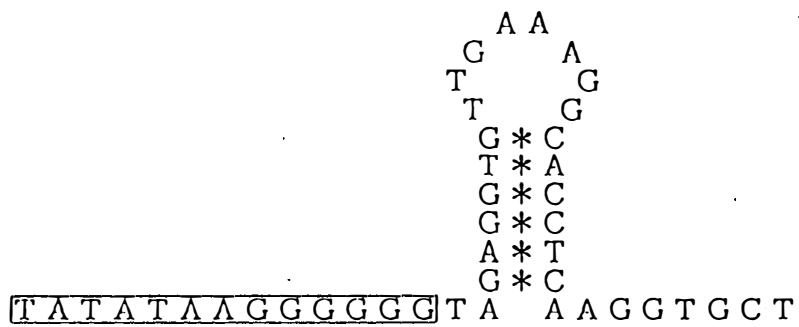


Fig. 7

タバコ rRNA 転写開始点のすぐ下流に見られる二次構造。ボックスで囲んだ部分は転写開始点を含むと思われる塩基配列。