

原生動物 Tetrahymena pyriformis リボゾーム

R N A 遺伝子の構造に関する研究

1989年3月

麻布大学大学院獣医学研究科

分子生物学研究室

村 山 洋

原生動物 Tetrahymena pyriformis リボゾーム
RNA 遺伝子の構造に関する研究

1989年3月

麻布大学大学院獣医学研究科

分子生物学研究室

村山 洋

目次

第1章	緒論	...	1
第2章	材料と方法	...	5
	1. <u>Tetrahymena pyriformis</u> G L株のrDNAクローン	...	5
	2. 塩基配列決定のためのサブクローンの作製	...	5
	(1) サブクローン	...	5
	(2) サブクローニングの方法	...	7
	3. 形質転換	...	8
	4. プラスミドの調製(アルカリ法)	...	9
	(1) 培養	...	9
	(2) アルカリ法	...	9
	(3) 塩基配列決定用のプラスミドの調製	...	10
	5. uni-directional deletion法による欠失クローンの作製	...	10
	(1) 原理	...	11
	(2) 実際の実験操作	...	11
	6. 塩基配列決定法	...	13
	7. 電気泳動	...	14
	(1) 電気泳動用緩衝液	...	14
	(2) 0.8%アガロースゲル電気泳動	...	14
	(3) ポリアクリルアミドゲル電気泳動(塩基配列決定用)	...	15
	8. 試薬、溶液	...	16
	9. 塩基配列の解析	...	19
第3章	結果	...	21
	1. <u>T. pyriformis</u> G L株rDNAの塩基配列	...	21
	(1) Kpn I部位から末端までの塩基配列決定	...	21
	(2) 既に報告されている塩基配列との比較	...	21
	(3) <u>T. pyriformis</u> G L株のrDNAの構成	...	22
	(4) 反復配列の検索	...	23
	2. <u>Tetrahymena thermophila</u> B株との比較	...	24
	3. 他の生物種との比較	...	28
	4. 非転写スペーサー領域(NTS)の反復配列	...	28
	(1) 5'側非転写スペーサー領域の反復配列	...	28
	(2) 3'側非転写スペーサー領域の反復配列	...	29
	(3) トポイソメラーゼIの結合部位	...	31
	5. hidden break部位	...	31
第4章	考察	...	34
	1. <u>Tetrahymena pyriformis</u> G L株rDNAの塩基配列	...	34
	2. 既に報告されている <u>T. pyriformis</u> G L株rDNAの塩基配列との相違点	...	35
	3. 非転写スペーサー領域の反復配列	...	36
	4. 2種の <u>Tetrahymena</u> の比較	...	39
	5. hidden break部位	...	41
第5章	総括	...	43
	図表及び図表の解説	...	45
	参考文献	...	113
	謝辞	...	120

第1章 緒論

原生動物繊毛虫類 Tetrahymena は、通常機能の異なる2つの核（小核、大核）を持つ単細胞真核生物である。小核は有性生殖において機能する生殖核であり、大核は栄養増殖期において主たる遺伝子発現の場としての栄養核として機能する。ゲノムの大きさは、小核が2倍体（diploid）であるのに対し、大核は倍数体（polyploid）である。接合の過程で大核は消失し、その後小核の1つから大核が新生する。小核から大核が形成される過程で、小核に含まれる遺伝子複雑度（genomic complexity）の80～90%が大核に残り、10～20%の複雑度が失われる（1）。一方、大核に含まれるDNA量は小核に比べ約20倍あり、rDNAの様な特異的増幅を除いては各遺伝子が一様に増えていると考えられている（2、3）。

原生動物繊毛虫類の Tetrahymena（4）、Oxytricha（5、6）、Euplotes（7、8）、Glaucoma（9）などでは、大核中のDNAは比較的短い断片となっており、各断片には1ないし数個の遺伝子がコードされていることが知られている。これらの断片（gene-sized fragmentと呼ばれる）の末端（テロメア）には、6塩基程度の単純な配列が繰り返されており、染色体の維持または正確な複製において機能していると考えられている。テロメアの繰り返し配列は、Tetrahymena（10、14）、Oxytricha（11）、Glaucoma（9）、Stylonychia（12）、Euplotes（11）、Trypanosoma（13）、Paramecium（14）、細胞性粘菌 {Physarum（15）、Dictyostelium（16）}、Saccaromyces（17）などにも見い出されている（表1）。上記の下等真核生物以外では、最近ヒトの染色体の末端（テロメア）にもTTAGGGの配列が同様に繰り返されていることが報告され（18、19、20）、テロメアにみられる繰り返し配列が真核生物全般に共通した構造であり、

染色体において非常に重要な機能を持つことが示唆された。テロメアの繰り返し配列は、小核が大核へ分化する際に断片化したDNAの末端に付加され、この付加反応にはRNA・タンパク質複合体が関与していることが報告されている(21、22)。

Tetrahymena のリボゾームRNA遺伝子(今後、本論文においてrDNAと呼ぶ)は、大核の周縁部に分布している核小体に含まれているが、大核の他のゲノムDNAから遊離しており分子量が 1.26×10^6 (約20kb: 1kb=1,000塩基対)の非常に短い線状DNAとして存在する。この線状DNAは、中心に対して二回転対称な回文構造(パリンδροーム)を有しており、リボゾームRNA(rRNA)をコードする領域2つを対称に有する(図1)(23、24、25)。rDNAのテロメアにはCCCCAAの6塩基が繰り返されている(10)。小核にあるrDNAはゲノムDNAに組み込まれていて、半数体(haploid)当り1コピー存在する(26)。小核から大核へ分化する過程で、rDNAは小核ゲノムから切り出された2つのrDNA断片が結合して回文構造を作ると考えられている(27、28)。

Tetrahymena rDNAからの一次転写産物は、35SリボゾームRNA前駆体(35S pre-rRNA)であり(29、30)、35S pre-rRNAはプロセッシング(processing)を経てリボゾームを構成する17SリボゾームRNA、5.8SリボゾームRNA、26SリボゾームRNAになる(31)。各rRNAは35S pre-rRNA上に5'側から17S rRNA→5.8S rRNA→26S rRNAの順にならんでいる。17S rRNAと5.8S rRNAの間および5.8S rRNAと26S rRNAの間には、内部転写スペーサー領域からの転写産物が位置している。35S pre-rRNAの転写開始点は回文構造の中心(対称軸)に近い部位にあり、35S pre-rRNAはrDNAの末端に向かって転写される(32)。Tetrahymena thermophila、Tetrahymena pigmentosaでは26S rRNA遺伝子

に介在配列 (I V S : interyening sequence の略) があり、これは一度転写されたのちプロセッシングの過程でセルフ・スプライシング (self-splicing) により除かれ、成熟 26 S r R N A となる (33、34)。Tetrahymena pyriformis の 26 S r R N A について 変性条件下でポリアクリルアミドゲル電気泳動を行うと、分子のほぼ中央付近に切断が生じていることを示すバンドが検出される (31、35)。この現象はhidden breakと呼ばれ、カイコ、ショウジョウバエなどでも見出されている (36、37、38)。

真核細胞における遺伝子発現調節を調べる上で、クロマチンの構造と機能の関係は一つの重要な視点である。一般的には、遺伝子はゲノム中に組み込まれているために、全遺伝子を含むクロマチンを用いて 特定の遺伝子の発現調節を調べることは遺伝子の複雑度のため有効でない。一方、Tetrahymena の核小体は前述したように r D N A のみによって構成されており、他の遺伝子クロマチンから遊離している。しかも r D N A そのものは約 20 k b と極めて短い断片であり r R N A をコードする領域が2つだけという単純な構造であるうえ、r D N A は全 D N A 量に対して2%を占めるので他の遺伝子と比べて量が多い (2)。従って核小体を単離し、機能が既知の r D N A の単一遺伝子クロマチンを高純度に単離することができれば、クロマチンレベルでの遺伝子発現の研究にとって非常に有利な系となる。そこで、Tetrahymena の持つこの利点を生かし Tetrahymena pyriformis G L 株 (無小核系) の核小体及び r D N A を実験系として研究を進められている。T. pyriformis G L 株の核小体の単離法は東中川らにより確立されており、D N A のレベルでほぼ100%の純度で比較的容易に核小体を単離することができる。一方、T. pyriformis G L 株の細胞抽出液及び核抽出液を用いた in vitro 転写系が確立され (40、41)、転写開始点及びその上流 (5' 側) を含む K p n I - H i n d III 断片のクローン化 D N A を鋳型として転写させた場合、in vivo での転写開始点と同じ部位から転写が開始されることが分かっている (41)。現在、この

in vitro転写系をもちいてプロモーター（転写調節領域）及び転写調節因子の検索が進められている。

一方、遺伝子の本体であるDNAの一次構造つまり塩基配列を知ることは、遺伝子発現調節の研究にとって最も基礎的かつ重要なことである。前述のように Tetrahymena rDNA は Tetrahymena に極めて特徴的な構造がみられると同時にテロメアのように真核生物に共通すると思われる構造をもち、生物における特異性と普遍性の2面性が顕著に示される極めて興味深い実験系であり、したがって Tetrahymena rDNA の全塩基配列を決定し解析することは極めて有意義なことと考える。そこで、本論文において Tetrahymena pyriformis GL株のrDNAの回文構造の中心から約200塩基離れているKpnI部位から末端（テロメア）（図4、図8）までの塩基配列を決定し、決定した塩基配列についてその性状を多面的に解析した。一方、近縁種間の遺伝子について、その転写調節領域及び転写領域を含めた塩基配列を比較した例は希なことであるが、今回2種の Tetrahymena についてrDNAのほぼ全領域での比較検討が可能となった。ここでは今回決定した T. pyriformis GL株rDNAの塩基配列と Tetrahymena thermophila B株rDNAの塩基配列（J. Engbergより提供を受けた未発表データ）を用いて比較検討した。さらに、26S rRNAのhidden break部位を今回決定したrDNAの塩基配列上に予想しその部位に見られる構造を検討した。

1. Tetrahymena pyriformis G L株の r D N A クローン

T. pyriformis G L株の r D N A の塩基配列を決定するため次の2つのクローンをを用いた(図2)。

- ① pTpr4 …… r D N A の H i n d III 分解で得られる 4 kb断片をプラスミドベクター pBR3 2 2 の H i n d III 部位に挿入したクローン(42)。
- ② pTprK T …… r D N A の K p n I 部位から末端までを含む約 9.8 kb断片をクローン pTpr1 4 S (41) のベクター部分に連結して作製したクローン。連結反応は、H i n d III 部位と 9.8 kb断片の末端(テロメア側)を平滑末端にしてから行った。

上記 pTpr4、pTprK T は三菱化成生命科学研究所発生生物学研究部 東中川徹博士より供与されたものである。

2. 塩基配列決定のためのサブクロンの作製

(1) サブクローン

塩基配列を決定するために pTpr4 及び pTprK T より種々の長さの欠失クローンを作製した。欠失クローンの作製はエクソヌクレアーゼ III (E x o III) 分解を利用する uni-directional deletion法(43、44)に従った(図3)。uni-directional deletion法を適用するために pTpr4 及び pTprK T 由来の r D N A 断片をプラスミド pUC1 9 (44) のマルチクローニング部位へ挿入し、クローン化

した。以下に作製した各サブクローンについて述べる（図4、図5）。

① pRNH4K、pRNH4Kr

pTpr4由来のrDNA断片（4 kb）をpUC19のHindIII部位に挿入したもの。pRNH4KとpRNH4Krとは、挿入の向きがベクターに対して互いに逆になっている。17SrRNA、5.8SrRNA、26SrRNAの5'側に相当する領域を含む。

② pRNB2K、pRNB2Kr

pTprKTをBamHI切断して得られる2 kb断片をpUC19のBamHI部位に挿入したもの。pRNB2KとpRNB2Krとは、挿入の向きがベクターに対し互いに逆になっている。26SrRNAの3'側に相当する領域と転写終結点を含む。

③ pRNB15K、pRNB15Kr

pTprKTをBamHI切断して得られる1.5 kb断片をpUC19のBamHI部位に挿入したもの。pRNB15KとpRNB15Krとは挿入の向きがベクターに対して互いに逆になっている。3'側非転写スペーサー領域を含む。

④ pRNKS

pTprKTをKpnIとSacIで切断して得られる3 kb断片をKlenow酵素を用いて末端を平滑にした後、pUC19のSmaI部位に挿入したもの。5'側非転写スペーサー領域、外部転写スペーサー領域、17SrRNAの5'末端付近に相当する領域を含む。

⑤ pRNSEND

pTprKTをSacIとPstIで切断して得られる1.4 kb断片をpUC19のSacIとPstI部位の間につなぎ、クローン化したもの。3'側非転写スペーサー領域とテロメアの末端を含む。このサブクローンには、rDNAの一部の他に、プラスミドpBR322の一部（EcoRI-PstI断片：約0.7 kb）が含まれ

ている。

⑥pR N H c H

pTprK TをHindIIIとHincIIで切断して得られる1.5 kb断片をpUC19をHindIIIとHincII部位の間に挿入したもの。pRNB2KとpRNB15KのrDNA部分の接続点(BamHI部位)を含む。

以上サブクロンの作製においてはNilesとJainが報告しているT. pyriformis GL株rDNAの制限酵素地図(32)を参考にし、図4に今回使用した制限酵素についてその切断部位を示した。

(2) サブクロニングの方法

サブクロニングのためのベクターとしてpUC19を用いた。約1~2 μ gのpUC19のマルチクロニング部位を適当な制限酵素で切り、直鎖状にした後エタノール沈澱(1/10容の1.0M NaCl、2~2.5倍容のエタノールを加え転倒混和後ドライアイスで5分間冷却し、16,000rpm、4°Cで10~20分間遠心した。以下同様)にて回収した。真空乾燥(軽くエタノールをとばす程度)後、10~20 μ lの0.1M Tris-HCl, pH 8.0で溶かした後、大腸菌由来のアルカリホスファターゼ0.1単位を加え37°Cで30分間反応させた(この処理はサブクロニングにおいて直鎖状pUC19が、自己連結してしまうのを防ぐために行った)。フェノール:クロロホルム抽出(フェノール:クロロホルム混液(後述)を等容量加え室温で約1分間激しく混和した。以下同様)、エーテル抽出(ジエチルエーテルを等容量加え室温で数十秒間激しく混和したのちエーテル層を除いた)によりアルカリホスファターゼを除き、エタノール沈澱の後真空乾燥し、沈澱を10~20 μ lの10mM Tris-HCl, 1mM EDTA 2Na, pH 7.5 (TE溶液)に溶かした。

連結反応に先立ってDNAの量を確認するために、pTpr4またはpTprK Tの

分解産物と直鎖状pUC19とを同時に0.8%アガロースで電気泳動した。臭化エチジウム (EtBr) で染色し、紫外線 (302nm) で励起発色させてrDNA断片と直鎖状pUC19の量比をバンドの蛍光強度を目で見ても確認した。連結反応ではrDNA断片と直鎖状pUC19の量比が1:1~2:1になるように、またDNA量は全体として100~200ng以下になるようにした。連結反応には、宝酒造のライゲーションキットを用いた。DNA溶液 (rDNA断片と直鎖状pUC19を各々100ng以下を含む溶液) 1~3 μ lに対し、ライゲーションキットのA液を4倍量 (4~12 μ l)、B液 (T4リガーゼを含む溶液) を1~3 μ l (DNA溶液と同量) を加え、12~16°Cで10~12時間反応させた。反応溶液を1~2 μ l取り、10~20 μ lの大腸菌 *Escherichia coli* JM109 コンピテントセル (1~2 $\times 10^9$ bacteria/ml (宝酒造)) と混合し形質転換した。形質転換した後、アンピシリン-LB寒天培地 (後述) 上に菌液を広げ37°Cで10~12時間静置培養した。菌液を広げるときに、20 μ lの25 mg/ml X-gal (後述) と50 μ lの0.1 M IPTG (後述) を同時に広げた。この時に見られるコロニーの色は白色または青色であり白色コロニーを作る菌はrDNAが挿入されたpUC19で形質転換されたものであり、この白色コロニーからプラスミドを調製し目的のサブクローンを検索した (プラスミドの調製については後述する)。調製したプラスミドは、制限酵素で切断しフェノール:クロロホルム抽出で除タンパクした後、0.8%アガロース電気泳動で分析した。得られた泳動像と各バンドの移動度より目的のrDNA断片が挿入されたものかどうか確認した。

3. 形質転換

1~2 μ lの連結反応液と10~20 μ lの *E. coli* JM109 コンピテントセル

(宝酒造)を混合し、水中に30分間静置した。次に42℃で45秒間加温の後、速やかに水中に戻した。1～2分後に室温に5分間静置した後、200 μ lのSOC培地(後述)を加え、パラフィルムで密閉し37℃で1時間振とう培養した。菌液をアンピシリン-LB寒天培地上に広げ、37℃で一晩(10～20時間)静置培養した。

4. プラスミドの調製(アルカリ法)

プラスミドの調製はアルカリ法(45)に従った。

(1) 培養

サブクローニング及び欠失クローンの作製の際の確認においては、1～3mlのLB培地で培養したE. coli(形質転換菌)からプラスミドを調製し、塩基配列決定に使うプラスミドは5mlのLB培地で培養したE. coliから調製した。LB培地には培養直前に、50mg/mlのアンピシリンをLB培地1ml当たり1 μ l加えた。コロニーを楊子の先で拾い上記培地に植え継ぎ振とう培養(37℃、一晩)した。

(2) アルカリ法

1.5mlエッペンドルフチューブに1～1.2mlの菌液を入れ10,000rpm(マイクロ遠心器(久保田))、1分間遠心し菌を集めた。なお塩基配列決定の場合は1つのクローンにつき2本のチューブを使った。上清を除いた後100 μ lずつリゾチーム溶液(後述)を加え微量ピペット(ピペットマン(P-200))のチップの先で菌をほぐしてから軽くピペッティングした。室温で5分間放置した後、200 μ lずつアルカリSDS溶液(後述)を加えキャップを閉めて2～3回転倒混和した。水中に5分間静置し、次に5M酢酸カリウム溶液、pH4.8を150 μ lずつ加え2～3回強く転倒混和した。水中に5分間静置した後、16,000

rpm (小型冷却遠心器(サクマ))、4℃で5分間以上遠心し上層を別のチューブへ移し、900 μ lのエタノールを加えた。5分間、室温に置いてから16,000 rpm、室温で5分間遠心した。上清をアスピレーターで除き、沈澱をTE溶液に溶かした。塩基配列決定の場合は100 μ lのTE溶液に、その他は20~30 μ lのTE溶液に溶かした。サブクローニングと欠失クローン作製の時のプラスミドの確認では、20~30 μ lのプラスミド溶液から1~3 μ l取り制限酵素で切断した。

(3) 塩基配列決定用のプラスミドの調製

塩基配列決定用のプラスミドの調製はさらに次のように行った(47)。上記(2)で得られた各クローンのプラスミド溶液をそれぞれ一本のチューブにまとめた。2 μ lの50 μ g/ml RNase A (TypeXII-AあるいはTypeI(SIGMA))を加え37℃で30分間反応させた。フェノール:クロロホルム抽出(ここでは、約5秒間激しく混和した)を3回以上行い中間層がなくなったところでクロロホルム抽出(クロロホルム(後述)を等容量加え、約5秒間激しく混和した)を2回行なった。エーテル抽出(3回)でフェノールを除き、次に3/5容(120 μ l)の20%ポリエチレングリコール(平均分子量;7500(和光一級)), 2.5M NaClを加え十分に混合し水中に1時間以上静置した。16,000 rpm、4℃で20分間遠心した後上清をアスピレーターで完全に除き、真空乾燥後沈澱を20 μ lのTE溶液に溶かした。

5. uni-directional deletion 法による欠失クローンの作製

各サブクローンの欠失クローンはエクソヌクレアーゼIII (ExoIII) によるuni-directional deletion 法(43、44)に従って作製した(図3)。

(1) 原理

① uni-directional deletion 法は次のような ExoIII の 3 つの特徴を利用したものである。

- (a) 2 本鎖 DNA のうちの 1 本鎖 DNA を 3' 側 → 5' 側の方向に分解する。
- (b) 3' 突出末端から 1 本鎖 DNA を分解することはできない。
- (c) 分解反応が同調的に進み、分解する DNA 分子群の長さを調節し易い。

② 塩基配列を決定しようとする挿入 DNA と塩基配列決定に用いるプライマーのアニーリング部位との間を 2 つの制限酵素 A (または A')、B で切断する。A (A')、B には次のような酵素を選ぶ (図 3 (2))。

- (a) 酵素 A (A') には 5' 突出末端 (A) または平滑末端 (A') を作るもので、挿入 DNA に近い部位を切断するものを選ぶ。
- (b) 酵素 B には 3' 突出末端を作るものでプライマーのアニーリング部位に近い部位を切断するものを選ぶ。
- (c) 酵素 A (A')、B 共にプラスミド DNA 上に存在する切断部位が 1 ケ所のみであるものを選ぶ。

③ A (A') で切断した部位より挿入 DNA の 2 本鎖のうちの 1 本鎖を 3' 側 → 5' 側の方向に ExoIII で分解する。適当な時間で反応を止める (反応時間を変えれば時間に応じて、適当な長さの欠失クローンが得られる)。マング・ビーンヌクレアーゼ及び Klenow 酵素で残った挿入 DNA の 1 本鎖の部分を分解し、T4 リガーゼによる自己連結反応で組換え体を作り、形質転換して培養の後プラスミドを調製し目的の長さを持つ欠失クローンを検索する。

(2) 実際の実験操作

以下に実際の実験操作について記す。各種溶液及び酵素には宝酒造のキロシー

クエンス用デリベーションキット（後述）を用いた。塩基配列決定用に調製した 5 μ g のプラスミドを制限酵素 A (A')、B で切断し、フェノール：クロロホルム抽出してから水層をエタノール沈澱した。上清を除き真空乾燥後 100 μ l の ExoIII 緩衝液に溶かし 180 単位 (1 μ l) の ExoIII を加えすばやく混ぜた。37 $^{\circ}$ C に保温しながら 45 秒毎に 5 μ l ずつ取り 100 μ l の マング・ビーンヌクレアーゼ緩衝液へ加えて反応を止め水中に置いた。ExoIII 反応液からこのように 10 ~ 20 段階に分けて分取し反応を止めた。ExoIII を 65 $^{\circ}$ C、5 分間で失活させ 37 $^{\circ}$ C に戻した。50 単位 (2 μ l) の マング・ビーンヌクレアーゼを加え 37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた後、フェノール：クロロホルム抽出 (1 回)、クロロホルム抽出 (1 回) 及びエーテル抽出 (3 回) をこの順に行った。エタノール沈澱の後、上清を除き真空乾燥し 50 μ l の Klenow 緩衝液に沈澱を溶かし、2 単位 (1 μ l) の Klenow 酵素を加え 37 $^{\circ}$ C で 15 分間反応させた。エタノール沈澱の後、上清を除き真空乾燥し 10 ~ 20 μ l の TE 溶液に沈澱を溶かした。次にこの溶液 2 ~ 5 μ l と DNA ライゲーションキット (宝酒造 (後述)) の A 液と B 液を各々 20 ~ 50 μ l、3 ~ 6 μ l とを混合し 16 $^{\circ}$ C で 12 ~ 14 時間反応させた (自己連結反応)。75 ~ 150 μ l のエタノールを加えてエタノール沈澱をした後、プラスミドの検索において欠失クロンの選択効率を高めるため真空乾燥させた沈澱を制限酵素 A (A') で処理した (この処理は、最初の制限酵素 (A(A')、B) による切断において切断されずに残っているプラスミド DNA を制限酵素 A(A') で直鎖状にしこの不要なプラスミドによる形質転換の効率を低下させ、その結果として欠失クロンによる形質転換の効率を相対的に高めるための処理である)。制限酵素 A (A') の反応後反応液 2 μ l で E. coli JM109 コンピテントセル (20 ~ 50 μ l) を形質転換した。アルカリ法でプラスミドを調製し PvuII (図 5) で切断した後、分解産物を 0.8% アガロースゲル電気泳動にかけこの結果得られた泳動像を確認し、適当な長さの欠失クロンを選択した (図 6)。

6. 塩基配列決定法

塩基配列はすべてジデオキシ法(46)により決定した。18 μ lのプラスミドDNA溶液に2 μ lの2N NaOHを加え室温で5分間放置した。次に5M 酢酸アンモニウム、pH 7.4を10 μ l及びエタノールを100 μ l加えて、ドライアイスで5分間冷やした。16,000 rpm (4°C)で20分間遠心し上清をアスピレーターで除き、さらに800~900 μ lの80%エタノールで洗浄したのち真空乾燥(十分にエタノールをとばし乾燥させた)した。これをdideoxy法の鋳型として用いた。

実際には、T7ポリメラーゼ(SEQUENASE(東洋紡))(48、49)を用いたジデオキシ法により、全体にわたって2本鎖DNAの両方の鎖について塩基配列の決定を行った。放射性標識のためには $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTPを用いた。

T7ポリメラーゼの反応終了後95%ホルムアミド溶液を4/5容加え、90°Cで3分間加熱後氷水により急冷してから7M尿素-6%ポリアクリルアミドゲル(40 cm \times 15 cm \times 0.3 mm)で電気泳動した。泳動は1,500~2,000Vの定電圧で6時間、3時間45分、1時間15分と泳動時間を3段階に分けて行った。泳動終了後ゲルを濾紙(Whatman 3MM)に移しサララップをかぶせてからゲル乾燥器で乾燥し、乾燥したゲルはX線フィルム(コダック XARまたはRP)を密着させオートラジオグラフィーを行いバンドを検出した。

得られた泳動像において、合成されたDNAの2次構造が原因と思われる圧縮現象(図7①の泳動像の▲で示した部位)が見られ、この部分については相補的DNA鎖の塩基配列(図7②の泳動像で▲で示した部位)をもって正しい塩基配列とした。T7ポリメラーゼによるDNA伸長反応が鋳型であるプラスミドDNAの高次構造により阻害されることが1つの原因と考えられる電気泳動の泳動像の乱れが図7②において△で示した部位(本論文においてこの部位のバンドを

'extra band'と呼ぶことにする)に見られた。この現象は頻繁に認められたが別の欠失クローンあるいは相補的DNA鎖の塩基配列を決定した場合には多くは泳動像の乱れがなかった。したがって別のクローンをを用いたときに泳動像の乱れが見られない場合、本論文ではその塩基配列を'extra band'の見られた部位の正しい塩基配列とした。また、いずれのクローンをを用いた場合にも'extra band'がみられ塩基配列が確定できない部位が存在したが、反応基質のdGTPを2'-デオキシ-7-デアザグアノシン三リン酸(dc^7GTP) (50)に置き換えた反応系により2本鎖のうちいずれか一方のDNA鎖の塩基配列を読んだところ'extra band'の見られた部位全てについてその塩基配列を読むことができ、これを正しい塩基配列とした。但し dc^7GTP を用いた反応系ではDNA伸長反応にはKlenow酵素(7-DEAZA-シーケンシングキット(宝酒造))を用い反応温度を40~45℃にした。

7. 電気泳動

(1) 電気泳動用緩衝液

電気泳動用緩衝液として次のものを用いた。1×TBE; 0.1M Tris (TRIZMA BASE(SIGMA))、0.1M ほう酸(和光特級)、0.02M EDTA 2Na(和光特級)(pH 8.5)。10×TBE; 1M Tris、1M ほう酸、0.2M EDTA 2Na(pH 8.5)。保存溶液として10×TBEを作っておき、必要なときに10倍に希釈して1×TBEとした。

(2) 0.8%アガロースゲル電気泳動

0.4g アガロース(Agarose LO3「TAKARA」(宝酒造))と50mlの1×TBEを混ぜ、電子レンジで溶かした。水平に置いた適当な大きさのガラス

板の上に0.5～1 mm離してコームを立てておき（これでサンプルスロットを作る）、溶かしたアガロースをガラス板の上に注ぎ室温で固まらせた。固まったゲルをサブマリン式の電気泳動槽に沈め試料をサンプルスロットに注入し、100 V定電圧で泳動し、泳動時間は予想される泳動像に応じて決定した。泳動終了後約

100 mlの1×TBEまたは水にゲルを移し10 μg/mlのEtBrを1～2滴加え5分間静かに振とうした。水でゲルを洗うことで余分のEtBrを除き、紫外線ランプ（波長302 nmのトランスイルミネーター(UVP社)を用いた）でゲルを照射してDNAのバンドを検出した。ゲルの写真撮影にはポラロイド667フィルムまたは665フィルムを使用した。

(3) ポリアクリルアミドゲル電気泳動（塩基配列決定用）

塩基配列決定には7M 尿素-6%ポリアクリルアミドゲルを用いた。ゲルの作製法は次のとおりである；尿素（半井、生化学研究用）20 g、40%アクリルアミド保存溶液（後述）6 ml、10×TBE 4 ml、蒸留水15 mlを200～300 mlの三角フラスコに入れ温水（40℃位）で加温しながら混和し、尿素が完全に溶けたところでアスピレーターで脱気した。10%過硫酸アンモニウム（和光、電気泳動用）を110 μlとTEMED（N,N,N',N'-テトラメチエチレンジアミン、（和光、電気泳動用））を25 μl加え泡立たないように静かに混ぜた後ゲル板に流し込み、1時間以上重合させてから使用した。40%アクリルアミド保存溶液は190 gのアクリルアミド（半井、電気泳動用）、10 gのN,N'-メチレンビスアクリルアミド（半井、電気泳動用）を蒸留水に溶解し最終容量を500 mlに合わせ、TOYO濾紙（No.1）で1回濾過した後4℃に保存した。

8. 試薬、溶液

①フェノール：クロロホルム混液

フェノール（和光特級）をTE溶液で飽和したものとクロロホルム（後述）を体積比1：1で混合し、これにヒドロキシキノリン（和光特級）を0.1%になるように加えたものを使用した。4℃に保存した。

②クロロホルム

本論文で言うクロロホルムとは、クロロホルム（国産特級）とイソアミルアルコール（和光特級）を体積比24：1で混合したものをいう。

③LB培地

BACTO TRYPTONE (DIFCO) 5 g、酵母抽出物（イースト エキストラクト, (DIFCO)) 2.5 g、NaCl (和光特級) 5 g を蒸留水に溶かして最終体積を500 ml に合わせ、2 N NaOH を加えpH 7.5 位にpH試験紙を用いて合わせた。この後、オートクレーブにより滅菌したものを使った。

④アンピシリン-LB寒天培地

BACTO TRYPTONE (DIFCO) 5 g、酵母抽出物（イースト エキストラクト, (DIFCO)) 2.5 g、NaCl 5 g、を蒸留水に溶解して最終体積を500 ml に合わせ、LB培地と同様に2 N NaOH を加えpH 7.5 位に合わせた。5～7 g BACTO-AGAR (DIFCO) を加えオートクレーブによって滅菌すると同時にBACTO AGARを溶かした。培地の温度が50～60℃位（しばらくの間、手で持てる程度）に下がったところで50 mg/mlのアンピシリン（注射用アンピシリンナトリウム（東洋醸造））を500 μl加え十分に攪はんした後、速やかにプラスチックシャーレ（90×15 mm（岩城硝子））に培地の厚さが3～5 mm位になるように注いだ。

⑤SOC培地

形質転換に用いるSOC培地の組成は次の通りである。2% BACTO TRYPTONE、

0.5% 酵母抽出物、10 mM NaCl、2.5 mM KCl、10 mM MgSO₄、10 ml MgCl₂、20 mM グルコース (Mg²⁺溶液とグルコースを除いてオートクレーブにより滅菌し、あらかじめ0.22 μmフィルターを通しておいたMg²⁺保存溶液と2 M グルコース溶液を加えた)。Mg²⁺保存溶液の組成は1 M MgSO₄、1 M MgCl₂ である。

⑥ リゾチーム溶液

プラスミドを調製する直前にリゾチーム (生化学工業) 5 mgを1.2 ml Solution I に溶かして用いた。ここに記したのは12クローン分のプラスミドの調製に使う量である。Solution I の組成は次のとおりである; 50 mM グルコース、25 mM Tris-HCl、10 mM EDTA 2Na (pH 8.0)。

⑦ アルカリ SDS 溶液

プラスミド調製の過程で、リゾチーム溶液で溶菌している間に300 μlの10%ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) (和光特級)、48 μlの10N NaOH、2152 μlの蒸留水を混和した。ここに記したのは12クローン分のプラスミドの調製に使う量である。

⑧ 酵素類

大腸菌由来アルカリホスファターゼ及び制限酵素類は宝酒造及び東洋紡より購入したものを使用し、反応条件は宝酒造及び東洋紡の指定する条件に従った。

⑨ 各種キット

今回使用した反応キットの内容は次のとおりである

(a) キロシークエンス用デリーションキット (宝酒造)

ExoIII緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0、100 mM NaCl、5 mM MgCl₂、10 mM 2-メルカプトエタノール)、マング・ビーンヌクレアーゼ緩衝液 (40 mM 酢酸ナトリウム, pH 4.5、100 mM NaCl、2 mM ZnCl₂、10% グリセロール) Klenow緩衝液 (7 mM Tris-HCl, pH

7.5、0.1 mM EDTA、20 mM NaCl、7 mM MgCl₂、0.1 mM dATP、0.1 mM dGTP、0.1 mM dCTP、0.1 mM dTTP)、エクソヌクレアーゼⅢ (180 単位/μl)、マング・ビーンヌクレアーゼ (25 単位/μl)、Klenow酵素 (2 単位/μl)

(b)'SEQUENASE' キット (放射性dCTP用) (東洋紡)

SEQUENASE緩衝液 (200 mM Tris-HCl, pH 7.5、100 mM MgCl₂、250 mM NaCl)、プライマー (0.5 μM)、0.1 M ジチオトレイトール、ラベリング溶液 (7.5 μM [dGTP, dATP, dTTP])、ターミナル溶液4種類 (80 μM [dGTP, dATP, dCTP, dTTP])、50 mM NaCl、8 μM ddNTP [G, A, T, C のいずれか1つ])、反応停止液 (95% フォルムアミド、20 mM EDTA、0.05% プロモフェノールブルー、0.05% キシレンシアノール) SEQUENASE (T7ポリメラーゼ)。

(c) 7-DEAZA シークエンシングキット (宝酒造)

10倍濃縮緩衝液 (70 mM Tris-HCl, pH 7.5、1 mM EDTA、200 mM NaCl、70 mM MgCl₂)、プライマー (0.5 μM)、dNTP-ddNTP 混合液4種類 (それぞれddNTPの内1つを含む)、チェイス混合液 (dATP、dGTP、dCTP、dTTPそれぞれ1 mMを含む)、Klenow酵素。

(d) DNAライゲーションキット (宝酒造)

反応液としてのA液及び酵素溶液 (T4リガーゼ) としてのB液がある。A、B両液についての詳しい記載がないのでここでは省いた。

⑩その他

(a) X-gal; 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシダーゼの略 (Nova Biochem)。20 mg/mlになるように N,N-ジメチルホルム

アミドに溶かした。

(b) I T P G ; イソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトシドの略 (SIGMA)。

0.1 M 水溶液にして、-20°Cに保存した。

(c) 臭化エチジウム ; 10 μg/ml 水溶液にして4°Cに保存した。染色後の廃液は塩素系の漂白剤 (キッチンハイター) と混ぜて5分以上放置してから廃棄した。

(d) [α-³²P] dC T P ; Amersham社より比活性3000 μCi/mlのものを購入した。

(e) E D T A 2 N a ; エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムの略。

(f) その他の一般試薬は和光特級を用いた。

9. 塩基配列の解析

塩基配列のコンピューター解析にはソフトウェア開発株式会社のS D C - G E N E T Y X 遺伝情報処理ソフトウェアを用いた。以下に使用したプログラム名を記し、その内容を簡単に付記する。

- | | |
|-----------------------|--------------------------|
| ① [E D I T] | 核酸塩基配列データ入力、編集 |
| ② [A U T O S Q] | DNA断片の自動編集 |
| ③ [B A S T O T] | 塩基組成の分析 (G C 含量など) |
| ④ [T Y P S E Q] | 核酸塩基配列の出力 |
| ⑤ [S Q R V C M] | DNAとRNAとの配列の変換 / 相補鎖変換 |
| ⑥ [H A R P L T] | Stadenの方法 (ハープロット) |
| ⑦ [H O M O A M] | 相同性の比較 |
| ⑧ [H O M O G A P N] | ギャップ (欠失または挿入) を考慮した相同性の |

比較

- ⑨ [MAXMH] 2つの塩基配列の間のマキシマムマッチング
- ⑩ [RESITE] 制限酵素部位の検索
- ⑪ [HAIRPIN] ヘアピン構造部位の検索 (stem-loop構造)
- ⑫ [SECST] 核酸2次構造の予測
- ⑬ [GCRI CH] GC含量分布図の作製

本論文における解析に用いた Tetrahymena 以外の生物種の rDNA の塩基配列は核酸配列情報データベース EMBL-GDB (European Molecular Biology Laboratory) より検索が可能なものを使用した

1. T. pyriformis G L株の r D N Aの塩基配列

(1) Kpn I 部位から末端までの塩基配列決定

T. pyriformis G L株のリボゾームRNA遺伝子 (r D N A) の回文構造の中心付近の Kpn I 部位から末端にあるテロメア繰返し配列 (T T G G G G) が 1 3 回繰返されたところまでの塩基配列を決定した。塩基配列決定には r D N A クローンの p T p r 4 と p T p r K T を使用した。適当な制限酵素でこれら 2 つのクローンから r D N A の断片を切り出し p U C 1 9 にサブクローニングし E x o III 分解によって欠失クローンを作製した後、これら欠失クローンの塩基配列を決定した。決定した各欠失クローンの塩基配列を順次つなぎ合わせることで全体の塩基配列を決定した。このときには、G E N E T Y X のプログラム A U T O S Q を用い 2 本鎖 D N A の両方の D N A 鎖を同時につなぎ合わせることでつなぎ方に矛盾の生じないようにした (図 6)。図 8 に今回決定した塩基配列 9 7 0 7 塩基を示した。

(2) 既に報告されている塩基配列との比較

T. pyriformis G L株の r D N A 及び r R N A の以下に示す部分について、その塩基配列が報告されている。

① r D N A の塩基配列に関する報告

- (a) 転写開始点近傍 (30、51)
- (b) 転写終結点近傍 (52)
- (c) 回文構造の中心領域 (53)

② rRNA の塩基配列に関する報告

(a) 5.8S rRNA (54)

(b) 26S rRNA の5'末端近傍 (55)

これら既報の塩基配列と今回決定した塩基配列と比較したところ一致しない部位が認められその結果を表2にまとめた(但しrRNAについてはU残基をT残基に置き換えてDNAの塩基配列に変換したものと比較した)。特にNilesらの決めた転写開始点近傍の塩基配列あるいはBaroinらの決めた26S rDNA 5'末端近傍の塩基配列との間にみられた不一致の部位が他の場合より多く、約100塩基に1塩基の割合で認められた。またEngbergにより決定された回文構造の中心領域の塩基配列とは表2に示した部分(KpnIからSau3AIまでの間)においてのみ比較でき、その結果7塩基の欠失がEngbergが決めた塩基配列に見られ他に不一致な部位が1塩基認められた。

(3) T. pyriformis GL株のrDNAの構成

① rDNAは次のような部位あるいは領域に分けて考えることができる。

(a) 5'側非転写スペーサー領域(30、51)

(b) 転写開始点(30、51、56、57)

(c) 外部転写スペーサー領域(30、51)

(d) 17S rRNAコード領域(58)

(e) 内部転写スペーサー領域1

(f) 5.8S rRNAコード領域(54)

(g) 内部転写スペーサー領域2

(h) 26S rRNAコード領域(55、52)

(i) 転写終結点(52)

(j) 3'側非転写スペーサー領域(52)

②以上の部位及び領域を今回決定した塩基配列上にマップし、図8及び図9に示した。Kpn I 部位の3'末端にあるC残基を1番目とすると各部位及び領域の位置は次のようであった。

(a) 5'側非転写スペーサー領域	1-970	番目
(b) 35S rRNA前駆体コード領域	971-(7190~7192)*	番目
(c) 転写開始点	971	番目
(d) 外部転写スペーサー領域	971-1625	番目
(e) 17S rRNAコード領域	1626-3377	番目
(f) 内部転写スペーサー領域1	3378-3509	番目
(g) 5.8S rRNAコード領域	3510-3663	番目
(h) 内部転写スペーサー領域2	3664-(3836)	番目
(i) 26S rRNAコード領域	(3837)***-(7175~7177)**	番目
(j) 転写終結点*	7190~7192	番目
(k) 3'側非転写スペーサー領域	7193-9707	番目

(注) * 転写終結点は7190~7192番目(TTT)の範囲に存在することがNilesらにより報告されている。

** 26S rRNAの3'末端は7175~7177番目(TTT)の範囲に存在することがNilesらにより報告されている。

*** 26S rRNAの5'末端領域の塩基配列は、Baroinらにより逆転写酵素プライマー伸長反応を利用して決められているが(3837番目から3'側が決定されている)、正確な5'末端の塩基は確定していない。そこで、本論文では26S rRNAの5'末端が3837番目の塩基であると仮定することにした。

(4) 反復配列の検索

T. pyriformis G L 株 (51、57)、T. thermophila (59、60)、Glaucoma

chattoni (59) の 5' 側非転写スペーサー領域には 3 種の反復配列が、また 3' 側非転写スペーサー領域については T. thermophila、G. chattoni で 2 種の反復配列が存在することが報告されている。同様な反復配列が今回決定した塩基配列に存在するかどうかを Staden の方法 (図 10 (C) で解説した) (61) を用いて検索した (図 10 (A)(B))。図から明らかなように 5' 側非転写スペーサー領域については、Niles が既に報告しているとおりの同様な反復配列 (タイプ I、II、III) の存在が確認された (図 10 (B)-(2))。3' 側非転写スペーサー領域についても T. pyriformis G L 株において反復配列 (タイプ IV、V) があることが示された (図 10 (B)-(3))。この 3' 側非転写スペーサー領域の 2 種の反復配列 (タイプ IV、V) が存在する部分から 3' 側にさらに 1 組の反復配列が認められた。これら非転写スペーサー領域に存在する反復配列についての詳細は後述する。

2. Tetrahymena thermophila B 株との比較

J. Engberg (Denmark) より T. thermophila B 株 rDNA の塩基配列 (未発表) の提供を受けこれと T. pyriformis G L 株 rDNA の塩基配列とを比較した。

Staden の方法によりこれら 2 種の Tetrahymena rDNA の塩基配列の相同性を解析した結果を図 11 に示した。非転写スペーサー領域における両遺伝子の相同性は非常に低く、これに対し 35S pre-rRNA をコードする領域 (すなわち rDNA における転写領域である) については 80% 以上の相同性を示した。この転写領域のうち T. pyriformis G L 株においては、大、小 2 つの欠失 (図 11 (1) の A、B) が認められ、そのうち大きい欠失部分 (図 11 (1) の B) は図 11 (2) で示した T. thermophila B 株の 26S rRNA に存在する介在配列 (IVS: intervening sequence) に相当する部分であった。この介在配列を挟んで 394 塩基

(5'側が191塩基、3'側が203塩基)にわたって T. pyriformis G L株と T. thermophila B株とで完全に一致していた。

次に相同性が最大になるように T. pyriformis G L株と T. thermophila B株の塩基配列を並べ、塩基が一致しない部位あるいは両 rDNA の塩基配列のいずれかに欠失あるいは挿入がある部位について (実際には、この欠失あるいは挿入は相同性が最大になるように両塩基配列を並べる際に加えたものである)、それらの10塩基毎の数の分布を図12に示した。転写開始点及び転写終結点を境として非転写スペーサー領域と転写領域の間に大きな差が認めら Stadenの方法で得た結果 (図11)と同様の結果となった。転写領域内の各部分の相同性についてみると、17S rRNAと5.8S rRNAをコードする領域 (以後17Sコード領域、5.8Sコード領域と呼ぶことにする) が各々98.9%、98.7%の高い相同性を示し、26S rRNAをコードする領域 (以後26Sコード領域と呼ぶことにする) の介在配列を除いた部分についての相同性は、5'側が95.5%で3'側が97.9%であり、17Sコード領域や5.8Sコード領域の場合と比較してわずかに低いながらも高い相同性を示した。いずれにしても成熟 rRNA (17S rRNA、5.8S rRNA、26S rRNA) をコードする領域について T. pyriformis G L株と T. thermophila B株との間で高い相同性 (95~99%) が認められた。しかし図12から分かるように、26Sコード領域では両 rDNA の間で一致しない部位がある程度局在する傾向が見られ、その局在する部位のうち図12中の (*) で示した部位は図11で認められた2つの欠失部分のうち小さい欠失部分 (A) に相当することを確かめた (図11(1))。一方、転写領域内の転写スペーサー領域の両 rDNA について見ると外部転写スペーサー領域、内部転写スペーサー領域1及び2の相同性は各々88.3%、94.7%、88.3%であり、転写領域内を見ても成熟 rRNA をコードする領域に対して転写スペーサー領域の、特に外部転写スペーサー領域と内部転写スペーサー領域2についての

相同性が相対的に低いことが確かめられた。

Tetrahymenaの rDNA は A-T 含量が高いことが CsCl 溶液中の浮遊密度 (1.699 g/ml (22, 39)) から分かっていて、今回決定した塩基配列をもとに計算した結果より得た G-C 含量 (38.45%) と浮遊密度 (1.698 g/ml) によっても確認された。そこで A-T あるいは G-C の細かい分布がどの様になっているのか非転写スペーサー領域、転写スペーサー領域及び成熟 rRNA をコードする領域について各々の G-C 含量 (G-C%) を計算し (表 3)、T. pyriformis GL 株と T. thermophila B 株とを比較したところ、内部転写スペーサー領域 2 を除く他の領域についてはいずれも同様に次のような傾向が認められた。すなわち成熟 rRNA をコードする領域の G-C 含量が最も高く内部転写スペーサー領域 1 はそれより低い G-C 含量を示し、非転写スペーサー領域が最も低い G-C 含量を示した。2 種の Tetrahymena で見られた上記のような G-C 含量の傾向が Tetrahymena に特徴的な傾向なのか、あるいは他の生物種においても見られる傾向なのかどうか比較検討したが、Tetrahymena では rDNA 全体の傾向として転写及び非転写スペーサー領域に比べ成熟 rDNA をコードする領域の G-C 含量が高い傾向にあるのに対し同様な傾向は他の生物種では必ずしも認められなかった (表 3)。

2 種の Tetrahymena では非転写スペーサー領域と転写領域との間の G-C% の差が大きく (表 3)、転写開始点及び転写終結点を境にしてその 5' 側と 3' 側とを比較した場合に G-C 含量の特徴的な分布がこれらの部位で見られることが予想される。そこで転写開始点及び転写終結点の近傍領域について G-C 含量のさらに細かい分布を次のように調べた。非転写スペーサー領域と転写領域の接続部位 (転写開始点、転写終結点) を起点にして 50 塩基毎の G-C 含量を計算し rDNA 上での G-C 含量の分布について T. pyriformis GL 株と T. thermophila B 株の間で比較した (図 13 (A)、図 14 (A))。図 13 (A) より T. pyriformis GL 株 rD

NA 転写開始点近傍領域の G-C 含量の分布の傾向を見ると、転写開始点から上流（5'側）（-150～+1）に G-C 含量が相対的に低い部分（これを“G-C%の谷”と呼ぶことにする）が存在し、この部分を挟んで5'側（-400～-150）と3'側（+1～+300）に G-C 含量が相対的に高い部分（これを“G-C%の山”と呼ぶことにする）が存在することが認められた。T. pyriformis GL株とT. thermophila B株について転写開始点近傍領域の G-C 含量の分布を比較したところ上述したT. pyriformis GL株に認められた G-C 含量の分布の傾向が2種のTetrahymenaの中で共通した傾向であることが確かめられた。すなわちT. thermophilaにおいて-250～+1に G-C%の谷がみられ-550～-250及び+1～+300に G-C%の山が認められ、5'側非転写スペーサー領域においては“G-C%の谷と山”の範囲が各々T. pyriformis GL株と比較して100から150塩基広くなっているが、これら G-C 含量の分布のパターンは非常によく似ていた。一方、転写終結点近傍領域の G-C 含量の分布を見ると5'側（転写領域の3'末端付近）と比較して3'側（3'側非転写スペーサー領域の転写終結点近傍）の方が相対的にわずかに G-C 含量が低い傾向が認められるが、転写開始点近傍に認められたように顕著な傾向はいずれのTetrahymenaにも認められなかった（図14(A)）。

他の生物種の rDNA についてその転写開始点及び転写終結点近傍領域における G-C 含量の分布をTetrahymenaと比較するために上記と同様に50塩基毎の G-C%を調べその結果を図13(B)、図14(B)に示した。転写開始点近傍領域の G-C 含量の分布の傾向はTetrahymenaで認められた傾向と共通していて相対的に G-C 含量の低い“G-C%の谷”を挟んで5'側と3'側に G-C 含量の相対的に高い“G-C%の山”が認められた。この傾向は転写開始点近傍領域全体の G-C 含量の平均値の大、小にはかかわらず共通した傾向であることが認められた。ただしこの特徴的な G-C 含量の分布を示す部分の転写開始点に対する相対的な位置は

必ずしも一致してはいなかった。一方、転写終結点近傍領域について Tetra-
hymena と他の生物種を比較したところ Tetrahymena にみられるように 3' 側非転写
スペーサー領域の G-C 含量が転写領域の 3' 末端付近と比べ必ずしも低いとは限
らず例えば Xenopus に見られるように 3' 側非転写スペーサー領域の G-C 含量が
転写領域に対して相対的に高くなっている場合もあり、G-C 含量の分布に関して
Tetrahymena と他の生物種に共通な傾向は必ずしも認められなかった。

3. 他の生物種との比較

EMBL データベースより原生動物、線虫、細胞性粘菌、昆虫、両性類、哺乳
類の rDNA の塩基配列をそれぞれ、T. pyriformis GL 株 rDNA の塩基配列と
を Staden の方法により比較した (図 15)。非転写スペーサー領域、内部転写ス
ペーサー領域において T. pyriformis GL 株との相同性はほとんど見られず、70
% 以上の相同性を示す領域は成熟 rRNA (17S rRNA、5.8S rRNA、
26S rRNA) をコードする領域に限られていた (図 15)。これら成熟 rR
NA 領域においては、各生物種を通して非常に保存された部分のあることが図
16、図 17 により明かである。

4. 非転写スペーサー領域の反復配列

(1) 5' 側非転写スペーサー領域の反復配列

T. pyriformis GL 株の 5' 側非転写スペーサーには 3 種類の反復配列が存在す
ることが Niles らによって既に報告されているが、今回決定した塩基配列につい

でも前述の通り図10においてStadenの方法により反復配列が5'側非転写スペーサー領域に存在することを確認した。今回決定した塩基配列とNilesらによる塩基配列とを比較したときに不一致の部位の存在が認められたので、反復配列等の特徴が両者の間で異なる可能性が考えられた。そこで、確認のために今回決定した塩基配列の5'側非転写スペーサー領域に存在する反復配列を検索し、その反復のパターンを図18に示した。タイプI及びタイプIIにおいて不一致の塩基が1ないし2塩基確認されたが、全体としてNilesらの示した結果と同様な反復配列とその分布のパターンが確認された。

T. pyriformis G L株とT. thermophilaとを比較した場合次に記すことが認められた(図18(1))。①各タイプの反復配列の数がT. thermophilaの方が多く、したがって反復配列の存在する領域がT. pyriformis G L株より広い。②T. pyriformis G L株のIa~Icの間とT. thermophilaのIb~Idの間の反復配列のパターンが似ている。特に、Ib~Ic(T. pyriformis G L株)とIc~Id(T. thermophila)に見られる反復配列は転写開始点に対する位置がほぼ同じである。③T. pyriformis G L株のIa~III dに見られる反復配列のパターンに類似したパターンがT. thermophilaではIa~III c及びIb~III fの2カ所に認められる。以上より5'側非転写スペーサー領域に見られる反復配列の分布のパターンは2種のTetrahymenaの間において概ね似たものであることが認められた(59)。

(2) 3'側非転写スペーサー領域の反復配列

T. thermophilaとG. chattoniの3'側非転写スペーサー領域には2種類の反復配列(タイプIV、タイプV)が報告されている(60)。T. pyriformis G L株については、Nilesらの決めた塩基配列をもとにタイプIV反復配列が3'側非転写スペーサー領域の転写終結点付近に2つ繰り返されていることが、Challonerらによって確認されている(図19(1)(2))(59)。今回新たに決定した3'側非転写

スペーサー領域の塩基配列について、T. thermophilaとG. chattoniと同様にタイプIV反復配列の下流（3'側）にタイプV反復配列が存在するかどうかを検索した。Stadenの方法により3'側非転写スペーサー領域に存在する反復配列が確認され（図10）、その部分について塩基配列を解析した結果、タイプIV反復配列についてはChallonerらの報告を確認した（図19(1)(2)）。タイプV反復配列を検索する場合には、T. thermophilaに見られるタイプV反復配列全てに共通する塩基配列をT. pyriformis G L株 rDNAの3'側非転写スペーサー領域において検索し、この共通配列を含む反復配列を解析した。図19において下線(=)で示した塩基配列(TGAATG)はT. thermophilaの8つのタイプV反復配列(Va-e, b1-b3)全てに共通していた。近縁種であるT. pyriformis G L株の3'側非転写スペーサーの反復配列にもこのTGAATGの配列が存在する可能性があると考え、この共通配列をT. pyriformis G L株において検索した。その結果TGAATGの配列が3'側非転写スペーサー領域において10カ所(T. thermophilaでは8カ所)に認められ、そのうち4カ所のTGAATGが120~130塩基の反復配列に含まれていることが確かめられた。さらに共通配列(TGAATG)は含まないが、4つの長いタイプV反復配列の一部(図19(3)T. pyriformis G L株の(b)で示した)と同一の塩基配列をもつ配列が1つ認められた。タイプVについては考察で詳しく述べる。タイプIV、タイプV反復配列に加えてT. pyriformis G L株の3'側非転写スペーサー領域にはタイプV反復配列の下流に約160塩基の長さの反復配列が認められた(図10(3)、図19(1)、図20(1))。これはT. thermophilaにはなくT. pyriformis G L株に特異的に見られたもので、本論文においてタイプVI反復配列と命名した。このタイプVI反復配列についても考察で述べる。

(3) トポイソメラーゼ I の結合部位

トポイソメラーゼ I は DNA の負の超ラセン構造を緩める方向に働く酵素であり DNA との結合部位は機能的に重要と考えられる領域（例えば転写調節領域あるいは複製開始点近傍）に見いだされている。Tetrahymena r DNA ではトポイソメラーゼ I の結合部位として共通配列 (AGACTTAGA^A/GAAA^A/T^A/T^A/T^A/T) が報告されている (62、63)。r DNA 全体でこの共通配列を 100% の相同性で検索したところ図 22 に示すように同一な塩基配列が 5' 側非転写スペーサー領域内のタイプ III 反復配列とほぼ同じ位置に認められ、85% の相同性で検索した場合には上記の他に転写開始点を挟んで 5' 側と 3' 側に 1 カ所ずつと 3' 側非転写スペーサー領域に 1 カ所存在することを確認した。一方転写領域において上記と同様の検索を行ったがトポイソメラーゼ I 認識配列は転写領域にはまったく見られず、このトポイソメラーゼ I の認識配列 (結合部位) が非転写スペーサー領域に限局されているという顕著な分布を示すことが認められた。

5. hidden break 部位

T. pyriformis GL 株の 26S rRNA を細胞より分離するとほぼ分子の中央で切断された 2 つの RNA 断片が水素結合により会合した状態になっていることが報告されている (31、35)。2 つの RNA 断片は分子量が 0.63×10^6 (F_1)、 0.58×10^6 (F_2) で、電子顕微鏡による観察から 26S rRNA の 5' 側より F_2 、 F_1 の順で並んでいることが報告されている (64)。このような 26S rRNA の断片化は調製した rRNA を変性条件下で分析したときに見られ、非変性条件下で分析した場合には見られない現象であるので、このことを hidden

breakという。このhidden break部位を上記の報告をもとに今回決定した T. pyriformis GL株 rDNA の塩基配列上で予想した (図 2 3)。Nilesら (52)、Baroinら (55) の報告より 2 6 rDNA をコードする領域を 3 8 3 7 番目から 7 1 7 7 番目までの 3 3 4 1 塩基として図 2 3 に示したように 2 つの RNA 断片 F₁、F₂ の分子量の比を基にした計算によって hidden break 部位が 5 4 5 1 番目の U に付近に存在すると予想した。但し、本来考えられる hidden break 部位は塩基と塩基の間に存在するものであるが (図 2 5 (1))、本論文ではここで予想した hidden break 部位を便宜上 5 4 5 1 番目の U 残基を指すことにした。Tetrahymena 以外の生物種、例えば カイコ、ショウジョウバエ等の昆虫においても同様な現象が認められており、図 2 5 (1) に示したように塩基配列上に hidden break 部位が実験的に決定されている (38)。これら hidden break 部位を含む部分の塩基配列がとり得る高次構造 (stem-loop 構造) には昆虫を通じて共通と考えられる 2 つの塩基配列 U A A U、C G A A A G G G (図 2 5 (2)) が含まれていて、前者は loop 部分に後者は stem 部分の起部の 3' 側に認められる。そこでまず予想した hidden break 部位が中央に位置するような領域 (5 4 0 0 番目~5 6 0 0 番目) において考え得る stem-loop 構造を検索し、得られた結果のうち stem 部分が 1 0 塩基以上あり、かつ stem 内の相補性が 7 5 % 以上であるような構造について 図 2 4 に示した。上記条件により 7 種類の stem-loop 構造が検索され、そのうち 4 種類の構造 (図 2 4 (2)~(5)) は予想した hidden break 部位 (3 4 5 1 番目の U 残基) と昆虫に見られる共通配列 (あるいはその類似配列) の両者を含む構造であった。

次に予想した hidden break 部位の近傍において昆虫の hidden break 部位に認められた 2 つの共通配列を検索し、昆虫で認められた共通配列を含む stem-loop 構造あるいはそれに類似した stem-loop 構造が存在するかどうか検討した。5 0 0 0 番目から 6 0 0 0 番目までの領域では U A A U の塩基配列が 4 カ所、C G A A A G

G G に類似した塩基配列が 3 カ所存在することが確認され、5 4 5 1 番目（予想したhidden break部位）に U A A U が位置し、これから 8 塩基だけ 5' 側にはなれた位置に C G A A A G G G 類似塩基配列が存在していた（図 2 5（2））。但し、8 塩基の共通配列 C G A A A G G G と同一の塩基配列はここで検索した領域においては認められなかった。なお 5 4 5 1 番目（図 2 4（2）の△で示した部位）に最も近い 8 塩基の共通配列に類似した配列は C A A A A G G G であり 2 番目の塩基が G から A に置換されたものであった。

さらに 5 4 5 1 番目に近接する 2 つの共通配列を含むような 2 次構造を予想し、昆虫の場合と同様に loop 部分に U A A U を含み、stem 部分に 8 塩基の共通配列に類似した配列が隣接するような構造が存在するかどうか検索した。その結果、昆虫に見られるような stem-loop 構造に最も似た 2 次構造が 1 つ予想され図 2 5（B）に示した。但し、8 塩基の共通配列の存在部位は昆虫では stem-loop 構造の 3' 側に位置しているのに対し、図 2 5 に示した 2 次構造では 8 塩基の類似の配列が 5' 側に位置していた。ところで図 2 4（2）に示した stem-loop 構造と図 2 5 の 2 次構造を見ると、いずれの場合もその形成される部位（5 4 2 3 ~ 5 5 0 0 番目の領域）が一致していた。そこで図 2 4（2）の stem-loop 構造の loop 部分にさらに stem-loop 構造を作ったところ図 2 5（B）に示した 2 次構造と同一の構造が結果として得られた。以上より 昆虫の hidden break 部位に見出された特徴的な stem-loop 構造に類似した構造が T. pyriformis G L 株において予想した hidden break 部位にも 1 つ存在することが認められた。

1. Tetrahymena pyriformis G L株 r D N Aの塩基配列決定

本論文ではTetrahymena pyriformis G L株 r D N Aの全塩基配列の決定を試み、回文構造の中央付近のKpn I部位より末端(テロメア)の繰り返し配列TTGGGGが13回繰り返されたところまでの9707塩基の塩基配列を決定した。回文構造の中央付近は既にJ. Engbergにより決定されているが(53)、今回決定した塩基配列と一致しない部分があり改めてこの部分の塩基配列を決定する必要がある。塩基配列の決定はジデオキシ法(46)により行ったが、いくつかの部位において塩基配列が確定しにくい場合があった。そのような部位の塩基配列における規則性を断定することは困難であるがG残基とC残基が存在するか、あるいは1種類の塩基が集中して存在するような場合に、塩基配列を確定しにくい傾向がみられた。これはDNAがこれらの部分において酵素反応を阻害するような構造をとるためか、あるいはポリアクリルアミドゲル電気泳動においてDNAの易動度のに影響するような構造をとるためと考えられている(47、50)。この問題に対し本論文では、2本鎖の両方のDNA鎖の塩基配列を決め、一方の不確定の塩基配列を他方の確定した塩基配列で補うことにより対処した。したがって今回はrDNAの塩基配列中どの部分においても少なくとも一方のDNA鎖の塩基配列が確定した状態にすることをもちって本論文におけるT. pyriformis G L株 r D N Aの塩基配列とした。両方のDNA鎖いずれにおいても確定できない場合にはジデオキシ法における反応基質のdGTPをdc⁷dGTP(50)に置き換える事により解決した。但し特異な構造をとると考えられるテロメアを含む部分については決定した塩基配列の正確さを保証するために化学分解法(65)による塩基配列決定

を行わなければならないであろう。

2. 既に報告されている T. pyriformis G L 株 r D N A の塩基配列との相違点

T. pyriformis G L 株 r D N A に関して回文構造の中心領域 (53)、転写開始点近傍領域 (30、51)、転写終結点近傍領域 (52) あるいは 5.8 S r R N A (54)、26 S r R N A 5' 末端領域 (55) の D N A あるいは R N A の塩基配列が報告されており、これらと今回決定した r D N A 塩基配列とを比較したところ両者に不一致な部位が存在することが認められた。これら不一致については、塩基配列の決定において双方ともに誤りがないと仮定すると次のようなことが考えられる。① 塩基配列決定に用いた r D N A クローンの由来する T. pyriformis G L 株の採集場所が違い、バッチが異なることによる種内の遺伝的多型 (polymorphism) を反映している。② 培養を繰り返す間に細胞が変異を起こした。③ 1 つの細胞中に存在する r D N A の塩基配列が不均一なため、同一バッチ由来の r D N A クローンであっても塩基配列において違いがみられる。④ r D N A のクローニングの過程において何らかの理由で人工的に塩基あるいは D N A 断片の置換や欠失・挿入が起こった。③ に関してはこれを完全に否定することはできないが、Engberg は D N A クローニングによらず大量に調製した T. pyriformis 大核の r D N A から r D N A 断片を分離し、化学分解法により塩基配列を決定していて、これは T. pyriformis の 1 つの細胞に含まれる r D N A が非常に高い均一性を有することを示唆する例と考えられる。したがって、③ が原因である可能性は低いと思われる。Niles ら (51、52)、Van Bell (54)、Baroin ら (55) の報告との違いの原因に関しては、細胞のバッチが異なっている可能性があること及び異なる実験室で維持されていることから①あるいは②が考えられる。しかし、Saiga ら (30) が

使用している rDNA クローンは本論文で使用しているクローンと同一バッチの T. pyriformis GL 株より得られたものであり Saigaらのデータとの不一致の原因は不明である。

3. 非転写スペーサー領域の反復配列

T. pyriformis GL 株の 5' 非転写スペーサー領域にみられる反復配列 (タイプ I、II、III) については Nilesら (51) により、また 3' 非転写スペーサー領域にみられる反復配列 (タイプ IV) は Nilesらのデータ (52) に基づき Challonerら (60) により報告されてる。これら反復配列を今回決定した rDNA 塩基配列において検索し (図 10、図 18、図 19)、タイプ I、II、III、IV 反復配列についてはこれらの報告と同様な結果を確認した。ただしタイプ I、タイプ II 反復配列の内 Ia、IIi には図 18 (2) の*印をつけた塩基について Nilesらの報告 (51) と違っていた。

トポイソメラーゼ I 認識配列はタイプ III 反復配列とほぼ同じ部位にあり、かつ類似の配列もほとんどが非転写スペーサー領域に存在したが、転写領域に関しては転写開始点の付近 (外部転写スペーサー領域内) に 1 カ所存在するのみであった (図 22)。これは、トポイソメラーゼ I が転写調節に極めて深く関係していることを示唆する 1 つの例となる。

T. thermophila と G. chattoni の 3' 非転写スペーサー領域にはタイプ IV 反復配列のさらに 3' 下流に存在するタイプ V 反復配列が Challonerら (59) により報告されている (図 19 (A)-(1) の T. thermophila の図を参照)。2 種類の織毛虫の比較からこのタイプ V 反復配列については転写終結点およびタイプ IV 反復配列に対する相対的な位置が似ていること、反復の単位の長さが比較的長く約 130 塩基

であることがその特徴として認められている。タイプV反復配列の塩基配列を見るとそれぞれの種の反復配列の中で保存されている部分と変異している部分とが認められている。T. thermophilaとG. chattoniの塩基配列を比較すると数塩基の共通配列(C C A C T T)が存在するのみで反復配列全体では相同性が低く、塩基配列に関して両者に共通しているのは保存部分及び変異部分が存在しているということである。以上よりChallonerらはタイプV反復配列の機能上重要な特徴はその転写終結点に対する相対的な位置および反復単位の長さ(約130塩基)であろうと結論づけている。Challonerらが報告した時点では、T. pyriformis G L株についてはタイプIV反復配列より3'側の塩基配列が決定されていなかったためT. pyriformis G L株のタイプV反復配列は確認されていなかった。そこで本論文では今回決定したT. pyriformis G L株 r D N Aの塩基配列において反復配列を検索したところ、3'非転写スペーサー領域にタイプV反復配列が存在し(図10、図19)T. thermophilaといくつかの点で似ていることを確認した。

T. pyriformis G L株とT. thermophilaのタイプV反復配列の塩基配列を単純に並べ比較した場合相同性は約50%と低いことが認められた。一方、次に記すような両者に共通した特徴が認められた。①反復単位が120~130塩基の配列が4つかたまって存在し、それらは転写終結点に対しほぼ同じ距離だけ離れた部位に存在することが認められた。②両者のタイプV反復配列(Va-d)にはそれぞれ保存された部分と変異した部分(図19(b)-(3)において小文字で示した部分)が存在し、変異部分が2つの保存部分に挟まれていた。③この変異部分の5'側及び3'側にはTクラスター(T残基が集中して存在している部分)が隣接していた。④3つの共通な塩基配列が存在した(図19(B)-(3), (a)(b)(c))。⑤共通配列の(a)に含まれるT G A A T Gの配列をもつ短いタイプV反復配列(Ve、Vd1-4(T. pyriformis), Va1(T. pyriformis), Vb1-3(T. thermophila))が認められた。⑥共通配列の(b)にはG. chattoniを含めた3種の原生動物に共通な塩基配列

(C C A C T T) が認められた。

以上より 3 種の原生動物ではタイプ V 反復配列における塩基配列の相同性は低い、その反復単位の長さや転写終結点に対する位置が似ていたことを考えると T. thermophila と G. chattoni との比較より導かれた Challoner らの考えが支持されたと言える。しかし、2 種の Tetrahymena について見ると塩基配列の相同性以外では上記のように共通点が多く認められ、両者のタイプ V 反復配列に見られた共通配列が機能上意味をもつ可能性は否定できない。特に 3 種の原生動物に共通した塩基配列 (C C A C T T) は少なくとも繊毛虫類の rDNA において共通の塩基配列であることが考えられ、3' 非転写スペーサー領域の持つ機能に対し重要な意味をもつ可能性がある。

T. pyriformis GL 株において 3' 非転写スペーサー領域のタイプ V 反復配列よりさらに 3' 側下流には、T. thermophila では見られなかった約 160 塩基の反復配列が認められ、本論分においてタイプ VI 反復配列と呼ぶことにした。Niles らは転写終結点付近に stem-loop 構造を予想し、その近傍に U (T) クラスタが存在することを報告している。Challoner らはタイプ V 反復配列に T クラスタが多いことから、タイプ V 反復配列は RNA ポリメラーゼ I が転写終結点を越えて DNA 上を進行してきた時その進行を停止させる機能を持つと考えている。ところでタイプ V 反復配列の T_n ($n \geq 3$) の T クラスタの数は T. pyriformis GL 株と T. thermophila において各々 4 カ所と 7 カ所であり、もしこの T クラスタの数が転写終結点を越えて進んできた RNA ポリメラーゼ I を止める効率に影響すると考えるならば、T. pyriformis GL 株ではタイプ VI 反復配列がタイプ V 反復配列の機能を補っていると考えられることができる。そこで Niles らが転写終結点付近に予想したのと同様にタイプ VI 反復配列において stem-loop 構造を検索したところ、予想した stem-loop 構造のうち T クラスタの近傍にあるものがいくつか確認され、タイプ VI が転写終結に関与する可能性のあることが示唆された (図 20

(2)(3))。

T. pyriformis G L株とT. thermophilaは小核の有無において大きなちがいがありT. thermophilaに見られる接合は無小核系であるT. pyriformis G L株では行われず接合過程に起こる小核の大核への分化に伴うDNA (rDNA)の再編成は見られない。このrDNAの再編成自体がTetrahymenaの栄養増殖期における細胞の維持に重要であると考えたとタイプVI反復配列は再編成による効果を失った代償としてT. pyriformis G L株が獲得したrDNAの塩基配列だと考えることもできる。

4. 2種のTetrahymenaの比較

Tetrahymenaの仲間の中でも非常に近い種であるT. pyriformis G L株とT. thermophila B株のそれぞれのrDNAの塩基配列を比較した結果、図11、図12に示すようにrRNAコード領域(介在配列(IVS)を除く領域)では極めて高い相同性(90%以上)があり、一方非転写スペーサー領域においては非常に大きな相違が見られその相同性の低いことが確認された。

塩基配列における低い相同性にもかかわらず非転写スペーサー領域のG-C含量をrRNAコード領域のG-C含量と比較すると相対的に非転写スペーサー領域の方がrRNAコード領域よりも低くなっている点で2種のTetrahymenaは共通し、その他各スペーサー領域及びコード領域の各々のG-C含量を比較すると内部転写スペーサー領域2を除く他の領域ではその相対的なG-C含量の大小関係は2種のTetrahymenaの間で非常に似ていた(表3)。G-C含量の分布をさらに細かくみると特に転写開始点近傍において特徴的な分布が認められた(図13)。すなわち転写開始点(+1)を含む部分("G-C%の谷")を挟んでその両側(5'

および3'側)に相対的にG-C含量の高い部分(“G-C%の山”と呼ぶことにした)が分布していることが認められた。このような“G-C%の谷”及び“G-C%の山”が分布するような特徴は他の生物種のrRNAの転写開始点近傍にも共通していることが確かめられた。これらのことより塩基配列の相同性の大小にかかわらず上述した特徴的なG-C含量の分布(“G-C%の山及び谷”)が転写開始点において正確に転写が開始されるために必要な構造であると思われる。

非転写スペーサー領域について2種のTetrahymenaを比較した場合その塩基配列の相同性は非常に低く(図11、図12)、このことは進化上この領域の保存性の極めて低いことの裏付けになると考えられる。ところが、塩基配列の相同性の低さとは逆に非転写スペーサー領域に存在する特異的な構造が非常に類似していることが2種のTetrahymenaだけではなくGlaucomaをも含めた3種の織毛虫に関して認められた(図18、図19)(60)。特異的構造とはすなわち5'非転写スペーサー領域の反復配列(タイプI、II、III)、3'非転写スペーサー領域の反復配列(タイプIV、V)であり、これら反復配列の塩基配列上の分布が3種の織毛虫を通じ、特に2種のTetrahymenaについては、非常によく似ていた。このことはrDNAの非転写スペーサー領域の機能を考える上で極めて重要な問題点である。

Westergaardら(63,64)が報告したトポイソメラーゼIの結合部位の塩基配列をT.pyriformis GL株rDNAで検索すると、この認識配列の分布が非転写スペーサー領域に限定されていることが確かめられ(図22)、これと同様のことがT.thermophila rDNAの場合にも認められた。またトポイソメラーゼI認識配列はタイプIII反復配列とほぼ同じ塩基配列をもち、非転写スペーサー領域の反復配列が機能的に意味のある配列であることを示唆している。

5. hidden break 部位

T. pyriformis GL株の26S rRNAはほぼ中央で切断されている。この事実は細胞から調製したrDNAを変性条件下で電気泳動により分析した結果明らかにされた。このような26S rRNAの断片化をhidden breakと呼びカイコ、シヨウジョウバエ等の昆虫においても見られる現象である。これら昆虫についてはhidden break部位が塩基配列上に決められており(図25(1))(36、37、38)、hidden break部位を含む特異的な構造(stem-loop構造)とその構造に含まれる2つの共通塩基配列の存在が確かめられている。Eckertら(31)および東中川(64)の報告をもとに今回決定したrDNA塩基配列上にhidden break部位を予想し(図23)、この部位において考え得るstem-loop構造を検索したところ昆虫に見られる構造に類似した特徴をもつ構造が1つ認められた(図25)。この構造は、昆虫で確かめられている2つの共通配列のうちUAAUが昆虫と同様loop部分に含まれ、別の共通配列(CGAAAGGG)に類似したCAAAAGGGがstem-loop構造の5'側に認められた(昆虫では、3'側に存在する)。hidden break部位における切断は非特異的RNA分解酵素あるいはhidden break部位特異的切断酵素のいずれかによるものと考えられる。前者の場合2つの共通配列あるいはこれらを含むstem-loop構造とリボゾームタンパク質とが特異的な結合をすることによりhidden break部位が露出しているために細胞質由来のRNA分解酵素により非特異的に分解されると考えられる。後者の場合には、hidden break部位に特異的な切断酵素が存在しその認識部位がすなわち2つの共通配列であることが考えられる。T. pyriformis GL株でも昆虫と類似した構造がhidden break部位に認められたことよりhidden breakが機能的あるいは構造的に積極的に保存される理由があり、かつ種を越えて共通のメカニズムの存在が想像される。したがってT. pyriformis GL株におけるhidden break部位を実際に決定しその部位の

構造を知ることがhidden breakの意義を考える上で重要である。さらには、T. pyriformis G L株には存在しない介在配列を有するT. thermophila rRNAにおいてT. pyriformis G L株同様にhidden breakが見られるのかどうか介在配列の意義も含めて興味深い問題である。

本論文では Tetrahymena. pyriformis G L 株 r D N A の全塩基配列の決定を試みその90%以上(9707塩基)の塩基配列を決定した。残った部分、すなわち回文構造の中心付近に関してはこの部分のD N A 高次構造に起因すると考えられる技術的困難さにより、クローニングが極めてむつかしく、今回はその塩基配列決定には至らなかった。この部分の塩基配列決定は今後に残された問題である。

しかし、転写領域とその上、下流を含む主要部分の塩基配列をほとんど決定できたので、この遺伝子の特質の解析のためには十分な情報が得られた。Tetra-
hymenaの仲間は約3~4億年前より分岐してきた種であり(54)、そのうちT.
pyriformis G L 株とT. thermophila は比較的最近分岐したと考えられている。

この非常に近い種である2種のTetrahymenaのr R N A 遺伝子の塩基配列について比較した。進化の研究などにおいては塩基配列決定にかかる労力が少なく、できるだけ多くの生物種の遺伝子の塩基配列を決定することを望むため、5.8 S

r R N A、小亜粒子のr R N A等の塩基配列を種々の生物種間で比較することは数多くなされているが、本論文のようにある遺伝子(ここではr D N A)についてそのスペーサー領域からコード領域にかけて全体を、しかも密接に関係する近縁種について比較した例は非常に希であると思われる。また、非転写スペーサー領域にみられる特徴的な構造のもつ機能を知り、さらにその機能が種の進化の過程でいかに保存されてきたのかそのメカニズムを知る手がかりを得るために今回決定した塩基配列の解析をTetrahymenaだけではなく哺乳類をも含めた広範囲の生物種との比較を含め進めていくことは、単にリボゾームR N A 遺伝子のみならず遺伝子の機能と構造を研究していくうえで非常に重要なことである。

一方、Tetrahymena r D N A は大核においては回文構造という極めて特異的な

構造をもち、小核の分化に伴うDNAの再編成が見られる特殊性をもつ反面、真核生物の染色体全般にみられると考えられる構造テロメア繰り返し塩基配列を持つという点で特殊性と普遍性の両面を兼ね備えた系である。20kbという大きな回文構造が生物学的にどのような意味を持つのか、小核の分化に伴うrDNAの再編成のメカニズムがどのようなものなのか、小染色体としてみたときの複製及びその維持のメカニズムあるいは遺伝子発現調節に対する疑問等に答えるための研究の基礎として、本論文において決定した塩基配列及びその解析は重要な意味を持つものと考えられる。そのうえ、rDNAが構成する核小体は生化学等の実験系として非常に有利な点を持っており、この遺伝子についてのこれからの研究の発展が期待される。

最近原生動物特に繊毛虫を中心として遺伝子のマイクロインジェクション等の研究が行われ、Tetrahymena rDNAも使われている。このような研究は広く真核生物に関する生物学上の知見をもたらすことが、期待されるだけでなく同じ原生動物と言うことから考えると、例えば寄生性の原生動物（原虫）等の寄生のメカニズムなどに関する研究に応用し臨床に対し貢献することが期待される。

表1 染色体末端（テロメア）の繰り返し塩基配列

下等真核生物の染色体末端（テロメア）にみられる繰り返し塩基配列の繰り返し単位となる短い塩基配列を記した。表にはDNAの5'末端からの塩基配列を記した。

表2 既に報告されている塩基配列との比較

(1) 今回決定した T. pyriformis GL株 rDNA の塩基配列と塩基配列が既に報告されている領域とを比較した。ここでは両塩基配列を GENETX のプログラム HOMOGAPN 及び MAXMH により相同性が最大になるように並べ、両塩基配列の間で不一致あるいは欠失・挿入の部位の数を数えた（このときの欠失・挿入は相同性が最大になるように上記プログラムによって加えたものである）。比較した塩基配列の長さは欠失・挿入の部位を含めた塩基数である。(d) (e) はRNAの塩基配列の報告よりUをTに置き換えDNAの塩基配列に変換してから比較した。

(2) Engbergが報告している回文構造の中央の約400塩基の配列の中でKpnI部位（この部位は T. pyriformis GL株 rDNA の回文構造の片側に1カ所のみ存在する）からSau3AI部位までの塩基配列と今回決定した塩基配列とを比較した。(一)はKpnI部位とSau3AI部位を一致させるためにEngbergのデータに欠失を導入したことを示す。*はその部位の塩基が一致することを示す。今回決定した塩基配列のKpnI部位はサブクローニングの都合上3'末端のC残基のみが残っている。

(3) (1)にまとめた不一致の部位及び欠失・挿入の部位の塩基配列を示した。左

につけた記号(a)~(e)は(1)の(a)から(e)に対応する塩基配列である。記号のついていない配列が今回決定したものであり、各塩基配列の上にある番号はこの配列塩基に付けた塩基番号である。不一致あるいは欠失・挿入が認められる部位に▼を付けた。

表3 rDNA各領域のGC含量(GC%)

非転写スペーサー領域、転写スペーサー領域、成熟rRNAコード領域の各々のGC含量を各生物種について算出し表にまとめた。ここで言うGC含量はその領域に於けるGおよびCの数の全塩基数に対する割合を百分率(%)によって示したものである(その数値計算にはGENETYXのプログラムBASTOTを使用した)。但し、T. pyriformis G L株に関しては今回塩基配列を決定したrDNAの各領域について計算したもので回文構造の中央付近については表に示した数値には含まれない。T. thermophila B株についてはJ. Engberg博士より提供された塩基配列を用い、Tetrahymena以外の生物種のrDNAの塩基配列はEMBL-GDBより検索したものを引用してそのGC含量を算出した。空欄はその領域の塩基配列の情報がないためにGC含量の計算ができなかったことを意味する。

図1 Tetrahymena pyriformisのrDNAの構造

Tetrahymenaの大核に存在する核小体を構成するrDNAは分子量 12.6×10^6 のDNA断片であり2つのrRNAコード領域が逆向きにつながり全体として大きな回文構造になっている。図において中 で示した部位が回文構造の中心

(対称軸)でこの中心から両末端に向い図のように17 rDNA及び26 S rRNAをコードする領域が並んでいる。

(注) 回文構造 (パリンδροーム) : 塩基配列にみられる回文構造とは、図に示した a 鎖と b 鎖 (a 鎖と b 鎖は互いに相補鎖である) のように、5' 側より塩基配列を読むと両鎖ともに同じように読むことができるような塩基配列を指して言うもので、逆さ言葉 (例えば、「タケヤブヤケタ」) に似ているところからついた名称である。例に挙げた回文構造の中心を▲で示した。

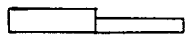
図2 Tetrahymena pyriformis GL株 rDNA のクローン

(1) 塩基配列決定に用いた rDNA クローン pTpr4 及び pTprKT の模式図である。□ で示した部分がクローニングした rDNA であり、⇨ でベクターに挿入された rDNA の方向 ((2) の ⇨ の方向に対応する) を示した。pTpr4 のベクターは pBR322 で、pTprKT のベクターには pTpr14S (41) のベクター (Kpn I-HindIII) を使っている。なお pTprKT の末端-HindIII の部位はクローニングの際に末端 (テロメア) とベクターの HindIII 部位を平滑末端にしてから連結した部位である。

(2) クローニングされた rDNA の領域を ⇨ で示した (向きは (1) の図に示した矢印の向きに一致する)。

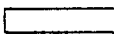
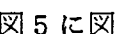
図3 uni-directional deletion 法

(1) pUC19 のマルチクローニング部位 (▨ で示す部分) にクローニングした DNA 断片 (□ で示す部分) の欠失クローンを作製する方法の原理を

示した。制限酵素A (A')、B (2)を参照)で切断した後ExoIIIによりDNA断片の2本鎖の一方の鎖を3'側から分解する(図中  の太い部分と細い部分とがそれぞれ2本鎖、1本鎖を表している。)。マング・ビーンヌクレアーゼ、Klenow酵素により1本鎖の部分を分解した後自己連結反応により種々の長さの欠失クローンを得る。←Pは、ジデオキシ法において使用するプライマーのアニール部位と塩基配列決定の向きを示す。各欠失クローンをを用いて決定される塩基配列とその方向は←で示す。▲は制限酵素の切断部位を示す。

(2) 制限酵素A (A')として、①5'突出末端(A)あるいは②平滑末端(A')を作る酵素を制限酵素Bとしては③3'突出末端を作る酵素を選択する。図では2本鎖DNAが、各々……においてそれぞれの酵素で切断され、①、③では各々5'末端、3'末端が突出した末端ができ②ではどちらも突出していないような末端が作られる。図にはA、A'、B各制限酵素としてXba I、Hinc II、Pst Iをそれぞれ例に挙げた。

図4 サブクロニングした領域

rDNAクローンpTpr4及びpTprKTのrDNA部分を適当な制限酵素で切断し  で図示した領域の断片をpUC19のマルチクロニング部位にサブクロニングした(作製したサブクロンの模式図を図5に図示した)。 はpBR322の一部がrDNA断片と共にpUC19のマルチクロニング部位に挿入された断片である。サブクロニングは、NilesとJain(32)が報告している制限酵素切断地図をもとに行った(図には本論文で用いた制限酵素に限って図示し、Hinc IIについては今回決定した塩基配列から確認した部位を新たに書き加えた)。略号の意味は以下のとおりである。A; Ava I、B; BamH I、H; Hin

dIII、Hc；HincII、K；KpnI、P；PvuII、Ps；PstI、S；SstI（あるいはSacI）。但し、H*で示したHindIII部位は実際には△の位置にあることが今回決定した塩基配列から確認された。

図5 塩基配列決定のための欠失クローン作製のサブクローン

図4に示した領域をクローニングしたサブクローンである。□がpUC19（細い実線）のマルチクローニング部位に挿入したrDNA断片であり、→はrDNA断片の向きを示す（図2(2)の矢印の方向と一致する）。各クローンは次のとおり命名した。(A) (1)pRNH4K、pRNH4Kr (2)pRNB2K、pRNB2Kr、(B) (1)pRNB15K、pRNB15Kr (2)pRNKS (3)pRNSEND (4)pRNHcH

→はジデオキシ法に用いるプライマーのアニーリング部位と塩基配列を決めるときの方角を示す。欠失クローン作製におけるExoIII分解（図3を参照）の方角もこの矢印の向きに一致する。各制限酵素切断部位の記号は次の通りである。

A；AvaI、B；BamHI、H；HindIII、Hc；HincII、K；KpnI、P；PstI、S；SacI、X；XbaI

欠失クローン作製に使用する制限酵素A（A'）[↑]およびB[↑]の切断位置を各クローンの図に示した

図6 欠失クローン

uni-directional deletion法で作製した欠失クローンをpRNH4Kの場合を例に図示した。図の左側よりExoIIIにより分解しその結果得られた欠失クローンのrDNA部分を実線で示した。従って、左側の空白の部分は欠失したrDNAの部分に相当する。矢印はその欠失クローンにおいて決められた塩基配列の位置、長さ及び方向を表している。

図7 圧縮現象

(1) ①、②は互いに相補的な部分の塩基配列の電気泳動像でpRNB15K (①) 及びpRNB15Kr (②) に認められた圧縮現象の例を示したものである。①の▲で示したバンドに圧縮現象が認められたが、これに対する相補的な②のバンドの泳動像 (▲の部位) には認められなかった。△で示した'extra band'は比較的頻繁にみられた現象である。

(2) (1)で認められた圧縮現象の起きた部分の塩基配列を①と②で比較した。①の▼印をつけた塩基を含む部分の塩基配列が圧縮現象のために読むことができなかった。△印で'extra band'を示した。

図8 Tetrahymena pyriformisGL株rDNAの塩基配列

今回決定したT. pyriformisGL株rDNAの塩基配列である(但し、表示した配列は、センス鎖(rRNAと同じ塩基配列を含むDNA鎖)の配列である)。決めたのは回文構造の中心から約200塩基はなれたKpnI部位の3'末端のC残基

から末端（テロメア）の繰り返し配列（TTGGGG）が13回繰り返されたところまでの9707塩基である。KpnI部位の3'末端C残基の塩基番号を1番目として各塩基の番号を決めた。塩基配列上に本論文において述べた部位あるいは領域を書き込んだ。

図9 Tetrahymena pyriformis GL株 rDNA の遺伝子構成

今回決定した塩基配列上に既報の部位及び領域を模式的に図示した。△、▲はそれぞれ転写開始点、転写終結点を示す。26SrRNAコード領域の5'末端の塩基が正確には決められていないため本論文では仮りに3837番目をこの領域の5'末端と考えた（第3章結果、1の(3)-②を参照）。

図10 (A) T. pyriformis GL株 rDNA の反復配列の検索

(1) Stadenの方法（図10(B)）(61)に従ってT. pyriformis GL株 rDNA同士を条件 $M \geq 20 / 25$ で比較し5'および3'側非転写スペーサー領域に反復配列が存在することを確認した。

(2) (1)で示した図中、5'側非転写スペーサー領域の部分の解析像を拡大したもの。I、II、IIIはそれぞれタイプI、II、III反復配列のことである（図18を参照）。

(3) (1)で示した図中、3'側非転写スペーサー領域の部分の解析像を拡大したもの。IV、V、VIはそれぞれタイプIV、V、VI反復配列のことである（図19、図20）。

図10 (B) Stadenの方法による2つの塩基配列の比較について

(1) Stadenの方法の原理

2つの塩基配列(図では ***ATC*** と ATC*ACC*CTG ; *は1つの塩基を示す)を比較することを考える。横の配列のTと縦の配列ATC*のTのそれぞれの前後の塩基を対応させ、設定した条件にあった場合に図にあるxの位置に点をプロットする。例えば図の中で考えてみるとxに対応する横と縦の塩基(ここでは両方ともにT)を含めて前後3塩基の内2塩基以上一致する場合にxの位置に点をプロットする。このときのプロットの条件を本論文において $M \geq 2/3$ のように表示した。xと同様にしてy, zについて調べると結果は②に示したようになる。

(2) ある程度の長さを持つ相同な配列がある場合にはプロットした点が図のように並ぶ。

(3) 反復配列が存在する場合には図のように点の並びが繰り返される。

Stadenの方法はGENETYXのプログラムHARPLTを使用して行った。

図11 Tetrahymena pyriformisGL株とT. thermophilaB株との比較(I)

(1) Stadenの方法により2種のTetrahymenaのrDNAを比較し、その相同性を調べた。5'及び3'側非転写スペーサー領域は転写領域と比べ相同性が非常に低いことが認められた。▲(A、B)で示した領域にはT. pyriformisGL株rDNAに欠失した部分が存在した。

(2) (1)の▲に見られる塩基配列である。*は塩基が一致していることを示す。

T. p. ; T. pyriformisGL株、T. t h. ; T. thermophilaB株

図 1 2 T. pyriformis G L 株と T. thermophila B 株との比較 (II)

2 種の Tetrahymena の r D N A の塩基配列を G E N E T Y X のプログラム H O M O G A P N 及び M A X M H を使用して相同性が最大になるように並べ、10 塩基毎に不一致部位の欠失・挿入部位の数の合計 (グラフの高さに相当) をヒストグラムで表した。横軸は T. pyriformis G L 株の r D N A (Kpn I - 末端) である。△、▲ は各々転写開始点、転写終結点を示す。

図 1 3 転写開始点を含む領域の G C 含量

転写開始点 (▼) を起点として 50 塩基毎の G C 含量 (G C %) を G E N E T Y X のプログラム B A S T O T によって算出しヒストグラムにした。

(A) 2 種の Tetrahymena では、転写開始点付近に特徴的な G C 含量の分布が認められ (T. pyriformis では - 4 0 0 ~ + 3 0 0、T. thermophila では - 5 5 0 ~ + 2 5 0)、さらにこのことは両者に共通していた。

(B) 他の生物種にも Tetrahymena の場合と似た G C 含量の分布が認められた。

図 1 4 転写終結点を含む領域の G C 含量

転写終結点 (▼) を起点として図 1 3 と同様にして G C 含量の分布を算出しヒストグラムにした。

(A) 2 種の Tetrahymena の G C 含量は転写終結点の前後で比較すると 3' 側がある程度低くなっていた。

(B) 他の生物種を含め全体的には共通な分布のパターンは認められなかった。

図 1 5 T. pyriformis G L 株と他の生物種との比較

Stadenの方法により図に示した条件で、(1)Dictyostelium discoideum、(2)Caenorhabditis elegans、(3)Xenopus laevis の r D N A と T. pyriformis G L 株 r D N A とを比較した。▽、▼はそれぞれ転写開始点、転写終結点をしめす。

図 1 6 小亜粒子 r R N A、5.8 S r R N A の比較

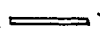
図 1 5 と同様に r R N A のコード領域について T. pyriformis G L 株と他の生物種とを Staden の方法で比較し、プロットされた点の並びを横軸の T. pyriformis の上に投影しその部分を図に  で示した。

図 1 7 大亜粒子 r R N A の比較

図 1 6 と同様にして大亜粒子 r R N A の塩基配列について T. pyriformis G L 株と他の生物種とを比較しその結果を示した。

図 1 8 T. pyriformis r D N A の 5' 側非転写スペーサー領域の反復配列

図 1 0 において確認された 5' 側非転写スペーサー領域の反復配列 (タイプ I、II、III) の (1) 位置及び (2) 塩基配列である。 T. thermophila のデータは比較のため

め Challonerらの報告(59)より引用したが、今回 Engbergより提供された T. thermophila B株の塩基配列においても同様な結果を確認した。T. pyriformis G L株のタイプ I 反復配列 I aとタイプ II 反復配列 II iにおいて*印をつけた塩基は Nilesらの報告と今回決定したデータとの間にみられた不一致の部分に相当する。

図 19 Tetrahymena rDNA の 3'側非転写スペーサー領域の反復配列

図 10において確認された 3'側非転写スペーサー領域の反復配列(タイプ IV、V)の位置(1)、塩基配列(2)(3)である。T. thermophilaの図及び塩基配列は



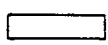
Challonerらの報告(59)より引用し Veについては本論文で新たに書き加えた。図中タイプ V 反復配列 Va~d () の  で示した部分は塩基配列では小文字で示した変異部分に相当する。(3)において(a)(b)(c)で示した塩基配列は両 Tetrahymenaに共通の塩基配列であり(4)にこれらの塩基配列を書き出した。T. pyriformis G L株のタイプ V 反復配列を決める際に検索した共通配列(T G A A T G)は下線(==)で示し、この配列の検索には G E N E T Y X のプログラム H O N O A M を使用した。

図 20 T. pyriformis G L 株の 3'側非転写スペーサー領域に存在する新しい反復配列

図 19 の図中、タイプ V 反復配列から 3'側に  で示したタイプ VI 反復配列はこれまでに報告されていない塩基配列であり、図 10 において確認された反復配列である。

(1) 相同性が最大になるように欠失・挿入部位(ー)を加えて2つのタイプVI反復配列を並べた。塩基が一致する部位には*印をつけた。

(2) VIaにおいてstem-loop構造を検索し、そのうちTの多い部分の近傍に2つ見出した。

(3) VIbについても(2)と同様にstem-loop構造を検索しその結果を図示した。

(2)(3)では、Tが集まっている部分を「——」で示した。stem-loop構造の検索は、GENETYXのプログラムHAIRPINによって行った。

図 2 1 T. thermophila B株の3'側非転写スペーサー領域

Stadenの方法によりT. thermophilaの3'側非転写スペーサー領域の反復配列を確認した。図に示したのは条件 $M \geq 20 / 25$ で解析した結果であるが、この条件を変えるとタイプIV反復配列を示す点の並びが認められたが、どの条件においてもT. pyriformis GL株で認められたタイプVIに相当する反復配列は認められなかった。

図 2 2 トポイソメラーゼ I の認識部位 (結合部位)

Westergaardら(62、63)が報告しているTetrahymena rDNAのトポイソメラーゼIの結合部位の共通配列をGENETYXのプログラムHOMOAMによって今回決定した塩基配列について検索した。a~fはセンス鎖DNA上に、g、hはそれに対する相補鎖(アンチセンス鎖DNA)に認められた共通配列の位置を示す。但し、fからhの塩基配列は共通配列に対し1ないし2塩基異なる類似

の配列である。共通配列中で、 A/G および A/T で示した塩基はそれぞれAまたはG、AまたはTのいずれかであれば共通配列として成り立つことを意味する。

図 2 3 hidden break 部位

Eckertら (31) が報告したhidden breakにより認められる2種類のrRNA断片 (F_1 、 F_2) の分子量を考慮し、T. pyriformis GL株rDNA上の26S rRNAをコードする領域にhidden break部位を予想した。 F_1 、 F_2 の並び方は東中川の報告 (64) に従い26S rRNAの5'末端を3837番目の塩基のとして3341塩基長の領域のほぼ中央の5451番目の部位にhidden break部位の存在を予想した。 F_1 、 F_2 の分子量は各々 0.62×10^6 、 0.58×10^6 である。

図 2 4 予想したhidden break部位近傍のstem-loop構造

5400~5600番目の領域のstem-loop構造をGENETYXのプログラムHAIRPINにより検索し、検索した全ての構造の内stem部分が10塩基以上ありかつその相補性が75%以上であるような構造を図示した。図23で予想したhidden break部位を△で示した。stem部分の始点と終点に相当する塩基の番号をつけ、loop部分が多い場合は塩基配列を省略し代わりに塩基数を記した。昆虫にみられる共通配列 (図25を参照) が認められる場合にはその配列を で囲んだ。(2)~(5)のstem-loop構造内にここで予想したhidden break部位が認められた。但し、ここではTをUに換えDNAの塩基配列をRNAの塩基配列に変

換して検索を行った。

図 2 5 hidden break部位にみられる構造

(A)

(1) Fujiwaraら (38) が報告しているhidden break 部位とそこに見られる stem-loop構造である。loop部分に U A A U、stem部分の 3' 側に隣接した部位に C G A A A G G G の 2 種類の共通配列が存在し、hidden break部位は→で示した部位に実験的に決められている。

(2) (1)の共通配列またはその類似の配列を T. pyriformis G L 株 r D N A 上 2 6 S コード領域内の 5 0 0 0 から 6 0 0 0 番目の部分について検索した結果である。検索は G E N E T Y X のプログラム H O M O A M を使い図には、U A A U は↑で、C G A A A G G G 類似配列は↑でその位置を示した。△は予想した hidden break部位を示しこの部位にのみ共通配列 (U A A U) と類似配列 (8 塩基) が隣接しているのが確かめられた。

(B)

(3) 予想したhidden break 部位を含む部分に考え得る R N A の 2 次構造を G E N E T Y X のプログラム S E C S T により予想し、そのなかで(1)で見られるような昆虫で考えられた構造に非常に似た構造を含むものが 1 つ得られこれを図示した。一方図 2 4 (2)の stem-loop構造がこの予想した 2 次構造の 2 6 S r R N A 上の位置と同じ位置にあることが認められた。共通配列または類似配列は で囲んだ。

表1 テロメアの繰り返し塩基配列

種名	テロメア繰り返し配列
(1) <u>Tetrahymena</u>	C C C C A A
(2) <u>Glaucoma</u>	C C C C A A
(3) <u>Paramecium</u>	C C C C A A
(4) <u>Oxytricha</u>	C C C C A A A A
(5) <u>Stylonichia</u>	C C C C A A A A
(6) <u>Euplotes</u>	C C C C A A A A
(7) <u>Trypanosoma</u>	C C C T A A
(8) <u>Physarum</u>	C C C T A _n
(9) <u>Dictyostelium</u>	C ₁₋₈ T
(10) <u>Saccharomyces</u>	C C C A _n

- (1) ~ (6) 原生動物繊毛虫類
 (7) 原生動物鞭毛虫類
 (8) モジホコリカビ (細胞性粘菌)
 (9) タマホコリカビ (細胞性粘菌)
 (10) 酵母

表2 既に報告されている塩基配列との比較

(1)

	比較した塩基数	相同性 (%)	不一致の数	欠失・挿入の数
(a) Nilesら	1 4 5 4	9 9 . 2	1 0	2
(b) Saigaら	6 8 8	9 9 . 9	1	0
(c) Nilesら	4 4 0	9 9 . 5	2	0
(d) Van Bell	1 5 4	9 9 . 4	1	0
(e) Baroinら	3 5 6	9 9 . 2	2	1

- (a), (b) 転写開始点を含む領域 (30、51)
- (c) 転写終結点を含む領域 (52)
- (d) 5.8 S r R N A (54)
- (e) 2.6 S r R N A の 5' 末端を含む部分 (55)

(2)

```

          Kpn I                               Sau 3 A I
(a)  - G T G G T A C C A C T T T A T - - - - - G A T C
          * * * * *                               * * * *
(b)                C A C T T T A A A T G A G T A G A T C A G T G -
    
```

- (a) Engbergが報告した塩基配列 (53)
- (b) 今回決定した塩基配列

表2 続き

(3)

181

▼
 -TATTTGAGTAC-AGCTAGATAGGAAATAATTTT-

(a) -TATTTGAGTACAAGCTAGATAGGAAATAATTTT-

386

▼ ▼ ▼
 -ATTTTCTTGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAATAGTAGGTT-

(a) -ATTTCTTGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAGTGGGTT-

976

▼
 -GGGGAAACATCTCCGGAT-AAAAATAAAA-

(a) -GGGGAAACATCTCCGGATAAAAAATAAAA-

1132

▼▼ ▼▼ ▼
 -TGAAGGTTTTTTCTGGATTACGGCTCGTATTAGAGCAA-

(a) -TGAACCTTTTAACTGGATTACGGCTCGTATTAGTGCAA-

1431

▼▼ ▼
 (a) -AGTAAACGAAACGTAGCGGGATCTATGTGTAAAGCTT

-AGTAAACGAAACGATGCGGGATCTATGTGTAAAGCTT-

(b) -AGTAAACGAAACGATGCGGGAACTATGTGTAAAGCT

7451

▼▼
 -TGCAATTTTTTTGAGGGATTGTAGTATAGGGCGAAGTA-
 ***** *

(c) -TGCAATTTTTTTGAGGGATTGTGTT

3501

▼
 -AAAACGAAAAGAAAATTTTCAACGGTGGATAT:-

(d) AGAAAACTTTCAACGGTGGATAT-

4071

▼ 4120 ▼
 -TGAAGGGGAAGGCTTC--//--TGGGAGATAAACTTCTT-
 ***** (34塩基) *****

(e) -TGAAGGG?AGGCTTC--//--TGGGAGATAAACTCCTT-

4161

▼
 -CCGATAGCGAACCAAGTACTAGCGAAGGAAAGATGAA-

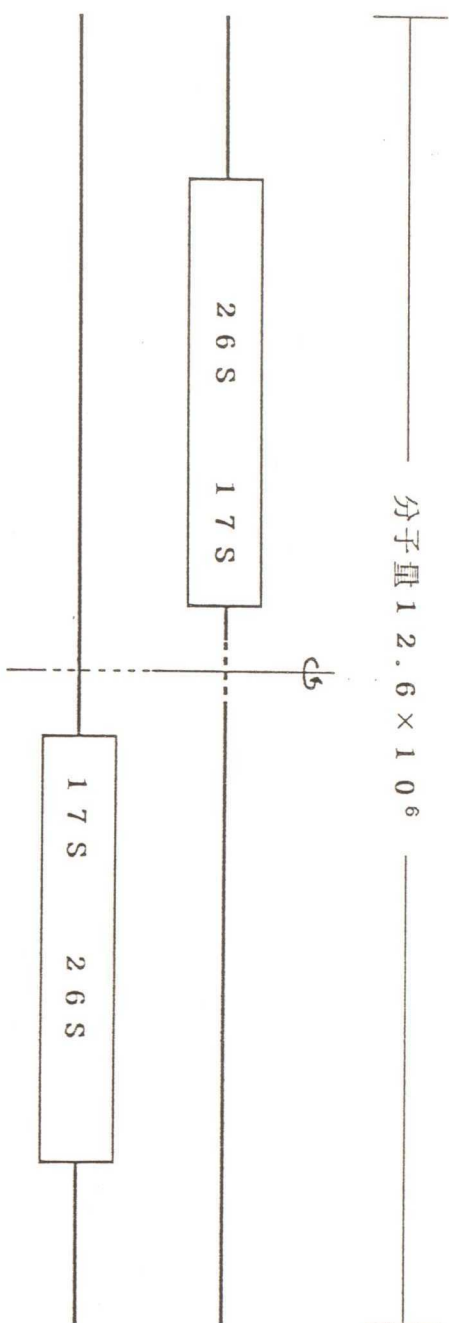
(e) -CCGATAGCGAACCAAGTACT-GCGAAGGAAAGA

表 3 rDNA各領域のG-C含量(%)

種	領域	5'非転写 ヌペーサー 領域	外部転写 ヌペーサー 領域	small sub- unit rRNA コード領域	内部転写 ヌペーサー 領域 1	5.8S rRNAコード 領域	内部転写 ヌペーサー 領域 2	large sub- unit rRNA コード領域	3'非転写 ヌペーサー 領域
<u>Tetrahymena pyriformis</u> (Gl)		28.14	39.24	42.92	31.82	44.81	39.31	44.72	29.53
<u>Tetrahymena thermophila</u> (B)		21.47	38.73	42.78	31.54	45.45	43.82	44.72	22.95
<u>Crithidia fasciculata</u>				49.73	46.72	46.20	45.19	50.43	47.89
<u>Physarum polycephalum</u>					55.14	55.48	49.80	54.30	59.73
<u>Dictyostelium discoideum</u>		47.09	46.42	42.54	27.58	43.21	43.13	43.29	
<u>Caenorhabditis elegans</u>				46.99	46.55	50.33	47.66	48.99	
<u>Xenopus laevis</u>		77.85	83.03	53.81	84.20	59.88	88.17	65.38	34.32
<u>Mus musculus</u>			71.21	56.02	70.17	57.32	74.66	66.60	
<u>Rattus norvegicus</u>				55.72	74.58	57.69	79.74	67.17	47.83

単位 %

図 1 Tetrahymena pyriformis の rDNA



(注) 回文構造 (パリンδροム)

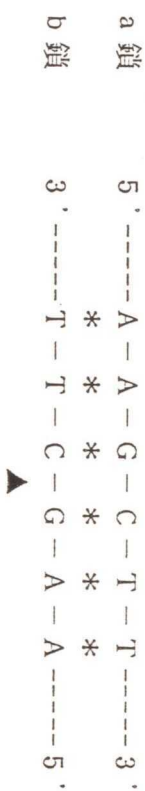
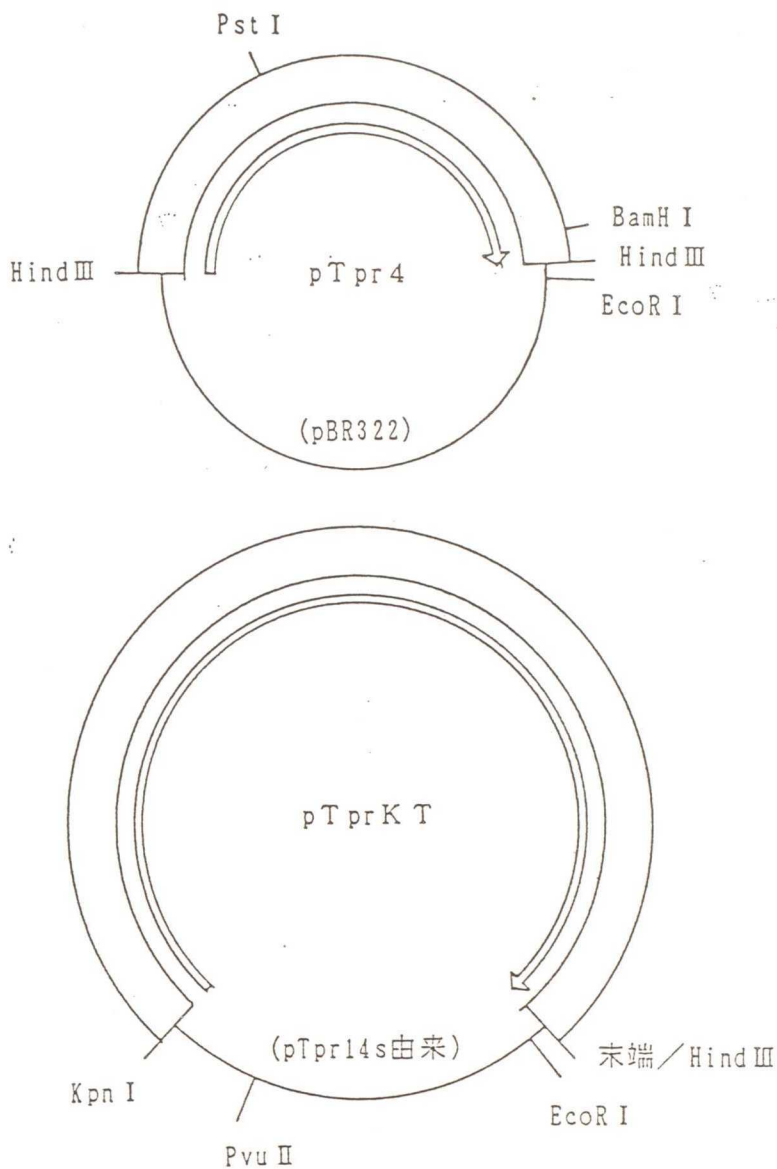


図 2 Tetrahymena pyriformis GL株の rDNAクローン

(1)



(2)

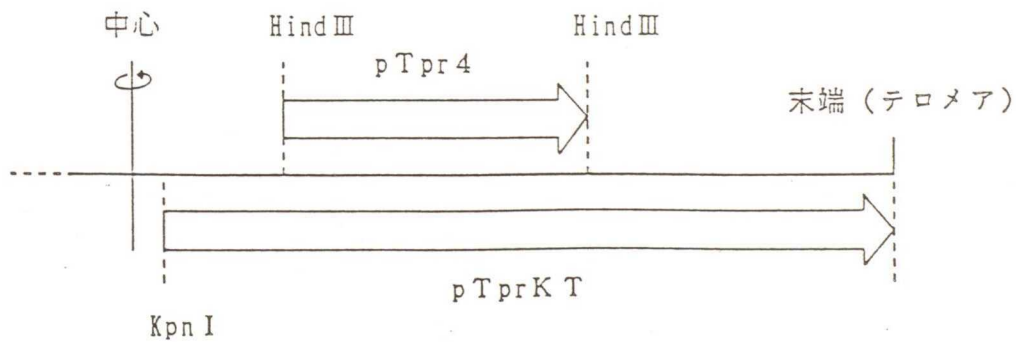
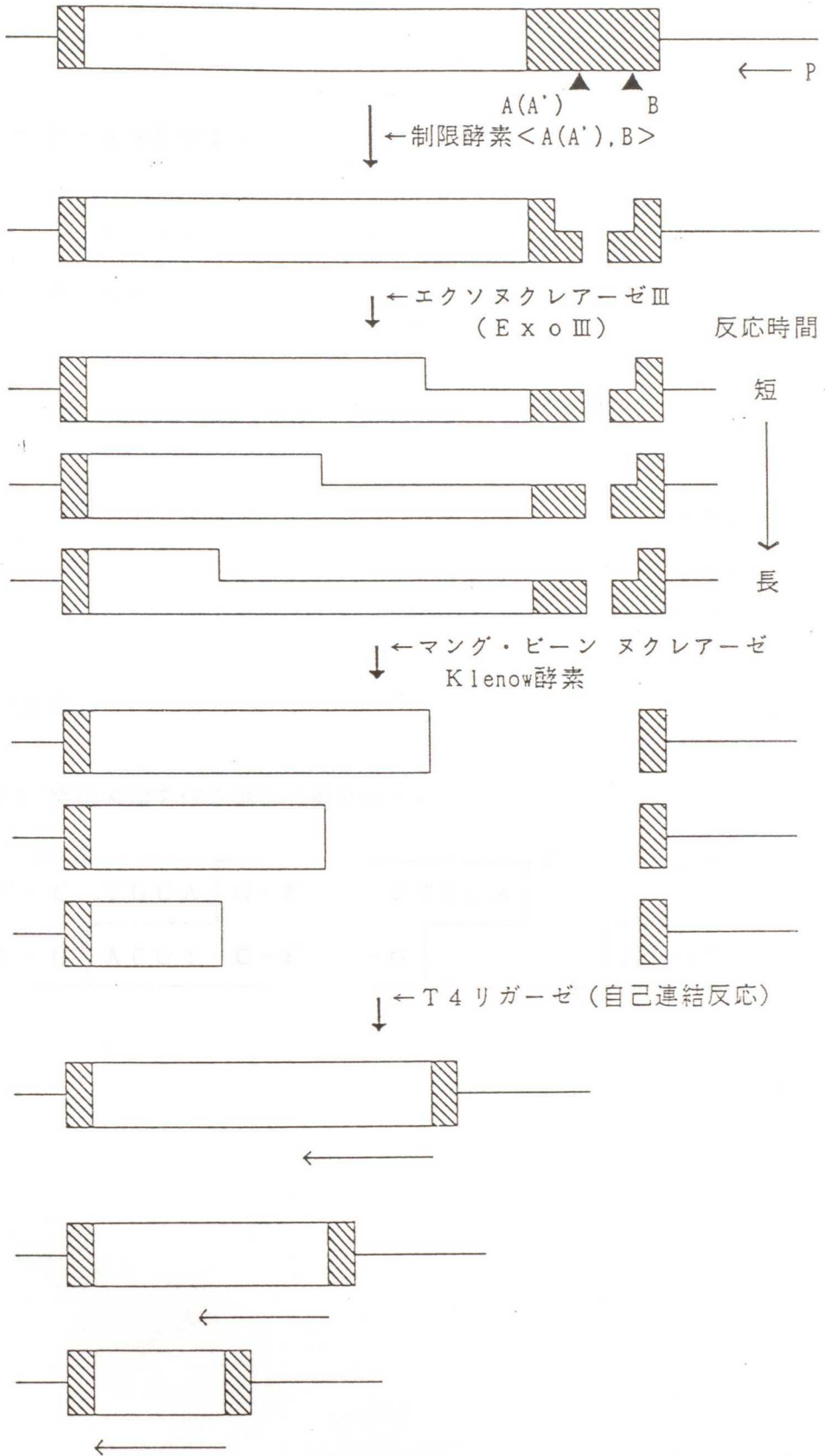


図3 uni-directional deletion法

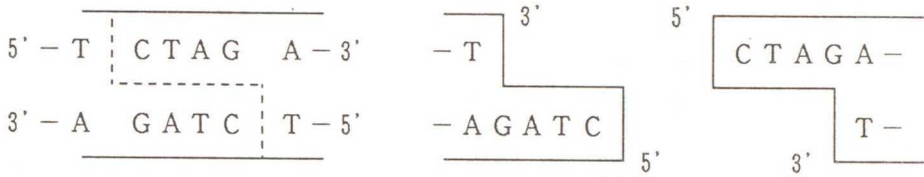
(1)



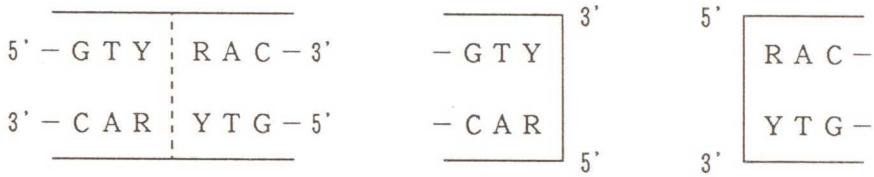
(2)

制限酵素A (A')

① 5' 突出末端を作る場合 (例 Xba I) ; A



② 平滑末端を作る場合 (例 Hinc II) ; A'



制限酵素B

③ 3' 突出末端を作る場合 (例 Pst I)

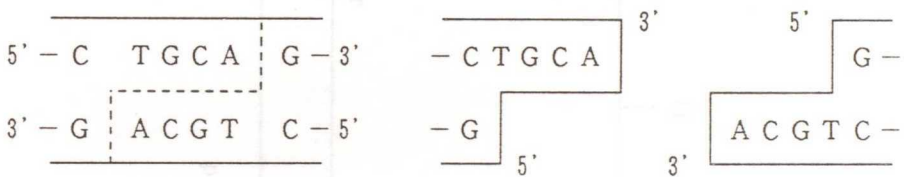


図 4 サブクロック領域

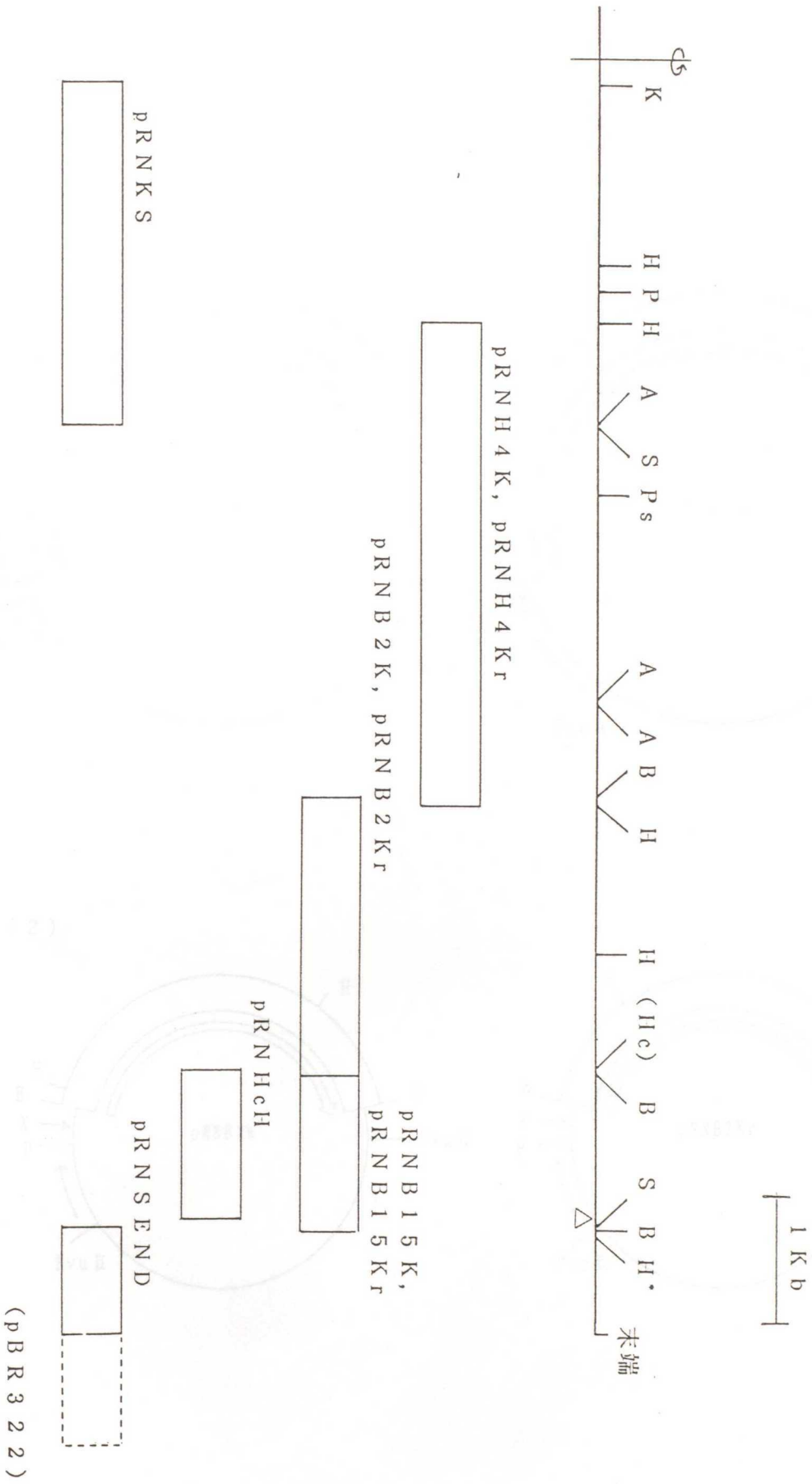
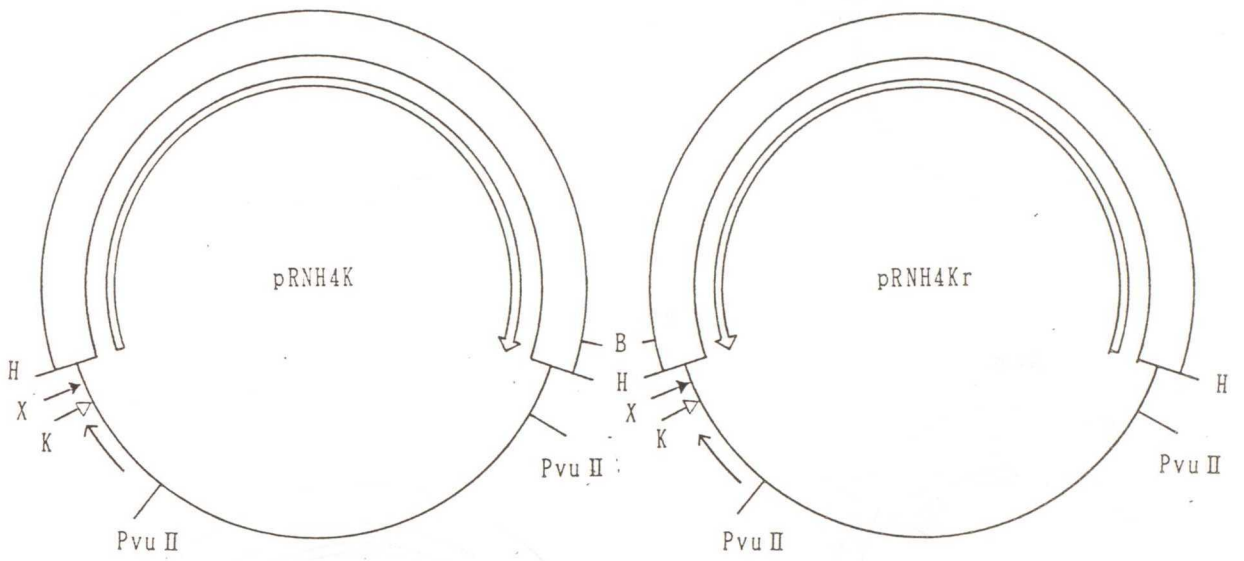
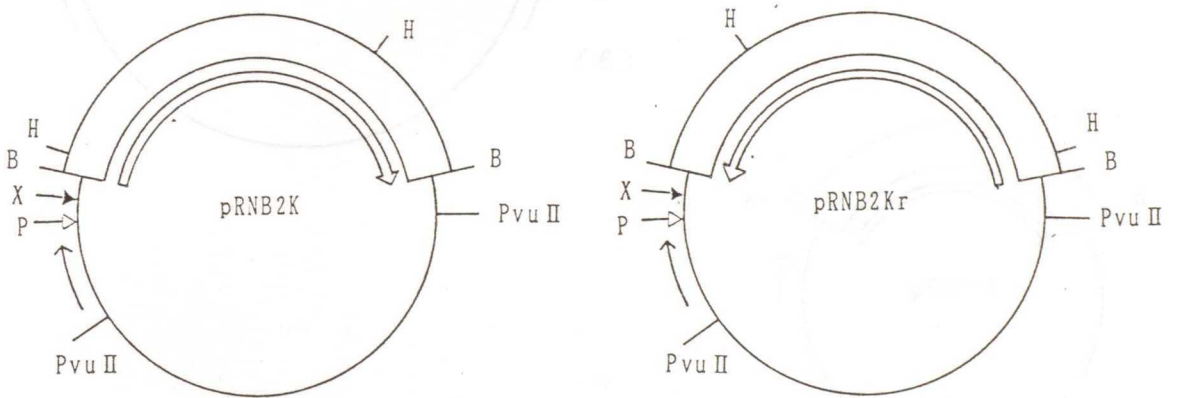


図5 塩基配列決定用に作製したサブクローン

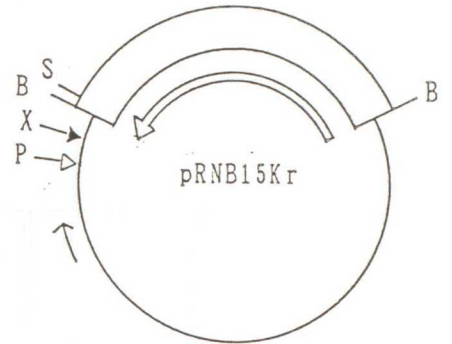
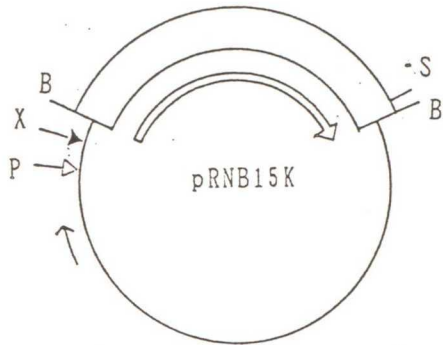
(1)



(2)

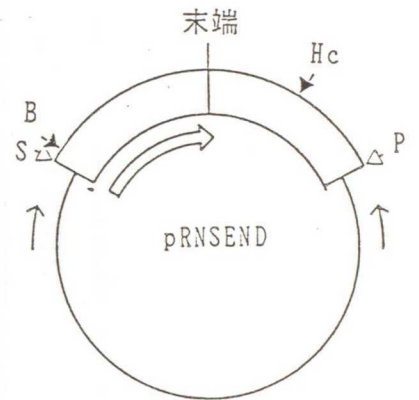
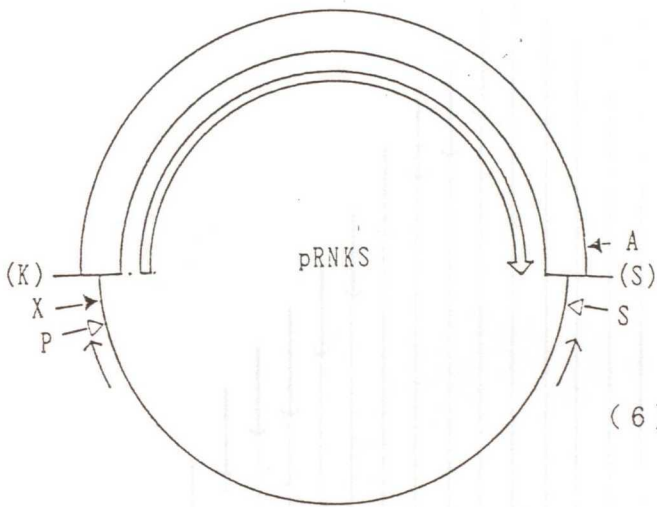


(3)



(5)

(4)



(6)

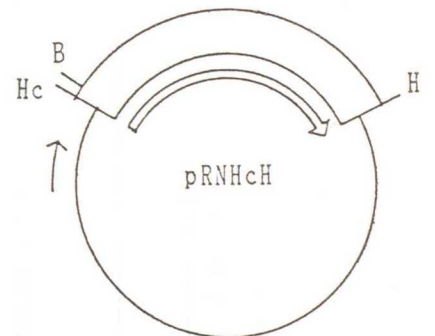


図 6 作製した欠失クローン

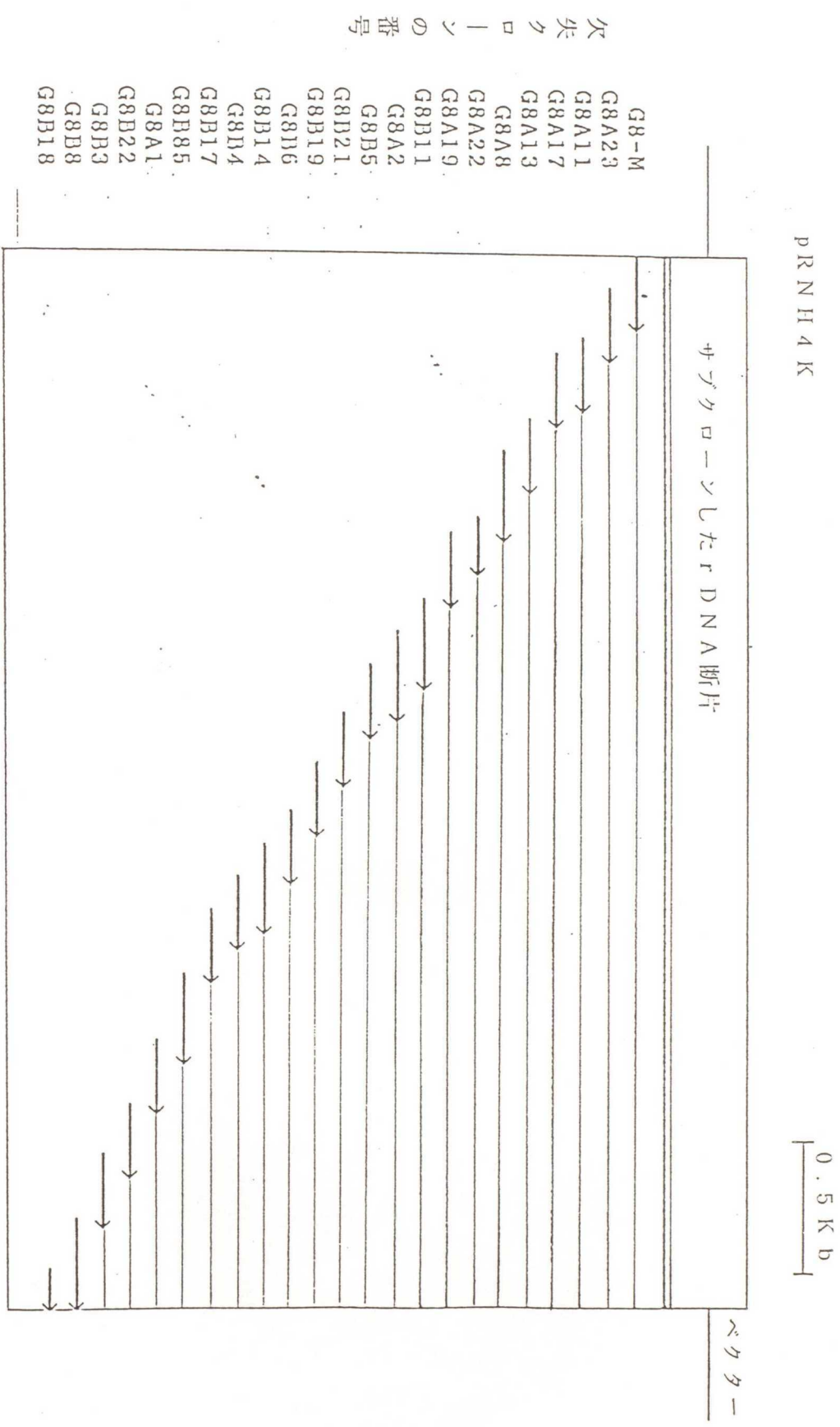
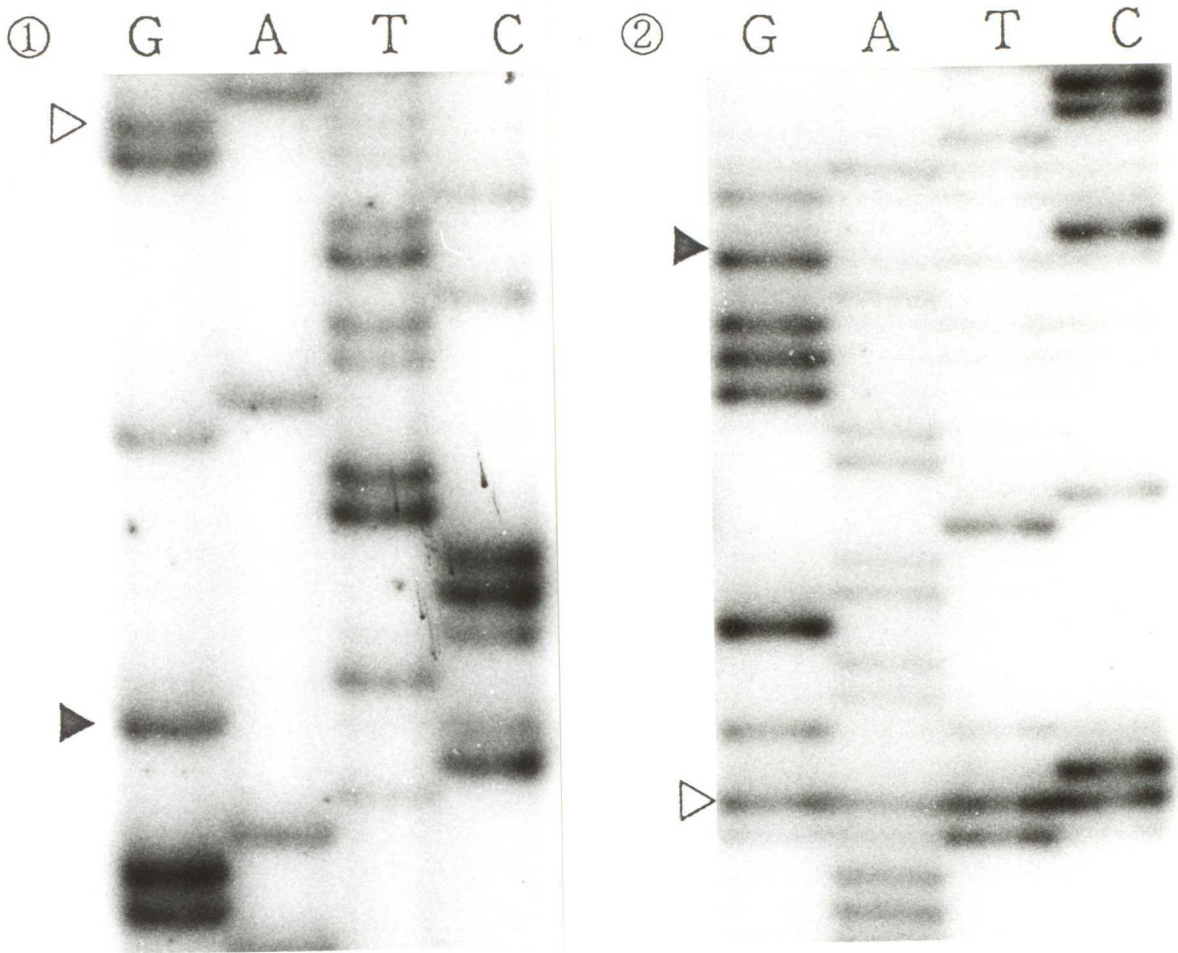


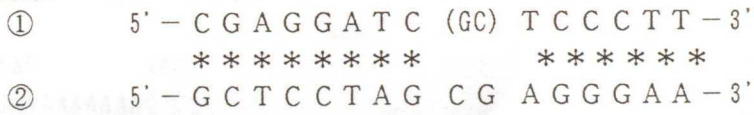
図7 圧縮現象の例

(1)

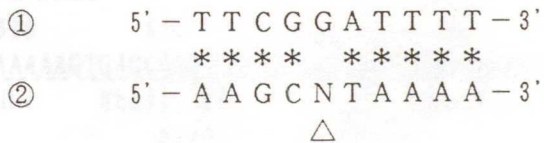


(2)

圧縮現象



'extra band'



☒ 8 (a)

```

      10      20      30      40      50      60
CACTTTAAATGAGTAGATCAGTTGATTAAGAACATTTTAAAGATGTTATGATAGAGATAA
| DraI      DpnI      DraI
KpnI      Sau3AI

      70      80      90      100      110      120
AATGATTTTAAAGAAGTGAATTGAATGCTATTAATATAAATTGGAAGAGAAATGCATGTAG
      BsmI      MboII      AvaIII
      EcoT22I

      130      140      150      160      170      180
AAATGGTGAAAAAAGGAGTATTTATCAAATTTAAGTAGTTAAACATACATAACACAGAGA
HphI

      190      200      210      220      230      240
TATTTGAGTACAGCTAGATAGGAAATAATTTTAGAAGCAAGAACATGTGCATTTTATAAC
RsaIAluI      AfIII      NlaIII
      MaeI      NlaIII

      250      260      270      280      290      300
ATGAAAAATGATTTTAAAGTATTTAATTTAATTTATTTACTGTTTGGTGT TTTTGATTTTA
      Tth111II

      310      320      330      340      350      360
TATATATAAAGGATAACTATATTCCTATTTAAGATAAAAACTATCTAAAATGAAAAAACT

      370      380      390      400      410      420
TGATTTTGAAAAATACTCATATGTTATTTCTTGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAATAGTAGG
      NdeI      I a

      430      440      450      460      470      480
TTTTTTGTTTTTCGAGACTTAGAGAAAAAACTGTTTTTTTCAAAAAAGACTTAGAAAA
      DdeI      III a      III b      DdeI
      III c      III d

      490      500      510      520      530      540
AAATGAAATATCTCCAAAAAGACTTAGAGAAAAAACAAATTTGAAAAAGACTTAGAGAA
      III c      DdeI      III d      DdeI

      550      560      570      580      590      600
AAATTTGGAAAAAAGTCCAGAAAAATGAAGCAAAGTCCAGTCAAAAAAGTGAGCGAGA
      II a      II b

      610      620      630      640      650      660
AAAGTGCAAAAAAGTGAGCGAGTCCACTCAAAAAATGTGAGCGAGACCAGTCAAAAAAGTGA
      II c      HhaII II d      Eco311 II e
      HinfI

      670      680      690      700      710      720
GTGAGTCCACTCAAAAAAGTGACCGAGCCACTCAAAAAAGTGAGTGAGCCCACTCAAAAA
      II f HhaII      MaeIII II g      BanII II h
      HinfI      TaqII      HgiIII

```


図 8 (b)

730 740 750 760 770 780
AATGAGTGAGTCCACTCAAAAAAGTGATAAGTCCAGTCAAAAAAGTGAGCGAGTTCGGTC
HhaII II i II j II k

HinFI
790 800 810 820 830 840
AAAAAATGAGTGGAGTCATAAAGTTGGAGAGAATCAGAAAAATACAAGGAAACCAGAAA
HhaII MmeI HhaII
HinfI HinfI HinfI
850 860 870 880 890 900
TTTTCTCAAAGACTTTTTTTGTGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAATATAGTAGACCGTCCGGACTT
I b AccI AccIII
HapII
910 920 930 940 950 960
TTGAGACTTAGAGAAAATTTTTCTGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTATCAGGGGGGTAAAA
III e DdeI HinfI I c

970 980 990 1000 1010 1020
ATGCATATTTAAGAAGGGGAAACATCTCCGATAAAAATAAAATATCAGTTCGATCTGAA
AvaIII ▲ 転写開始点 AccIII DpnI
EcoT22I HapII DpnII
1030 1040 1050 1060 1070 1080
CATCAGTAAGATGTCCTTTTGGGAAACCAAGGATGACGATAATGAAGTTCTAACTGAACA
EcoT14I
SecIFokI
1090 1100 1110 1120 1130 1140
GTATTTTCTCTATGGCTTCTGCGTTAAGCTGAATGCCTCTGAGTGTCTGGTGAAGGTTT
AluIBsmI DdeI HphI
MnlI
1150 1160 1170 1180 1190 1200
TTCTGGATTACGGCTCGTATTAGAGCAAATGGCCTGACTGAAATTTTCATGATGGCTGTG
BlnII NlaIII AatII
HaeI AclI
1210 1220 1230 1240 1250 1260
ACGTCGTTTCGCTGCAAAGGATTCGCAAGAAACCTTTCCAGTGAGAGTTGTTGTATCGAT
MaeII BbvI HhaII XmnI ClaI
Fnu4HI HinfI EcoRV
1270 1280 1290 1300 1310 1320
ATCTTTGCAGATATTGTTACAAATAACAGCGACACGCTAGTACTGTTATAAATCGGTGAA
MaeIII MaeI HphI
RsaI
1330 1340 1350 1360 1370 1380
ATCGCTGATATTATTAACAGCTAGCAACAAAGTTGACTTGAGTCCGAAGAGATGCGATTG
AluI ChuII HhaII MboIISfaNI
MaeI HincII HinfI
1390 1400 1410 1420 1430 1440
AGTTTTTCTCATTGTACCTTCGAAGATTCTTGCAACTAGAAGAAACAGATAGTAAACGAA
RsaI AsuII HhaII MaeI
HinfI MboII

图 8 (C)

1450 1460 1470 1480 1490 1500
 ACGATGCGGGATCTATGTGTAAAGCTTAATCTAACGATATAGCTGAGCACTGATCTATTA
 SfaNI BlnI AluI AluIHgiAI DpnI
 MosI HindIII

1510 1520 1530 1540 1550 1560
 CAACGCGTCTGTTCTTTATGAACTTTTCAAACAAGTGTACCAACCTTTTGGAACGCTAT
 AccII XmnI Tth11111 RsaI
 AflIII

1570 1580 1590 1600 1610 1620
 TCAAAAAATGAGTGAGCAGCTGGAAGATGAAAATCGGAAAGCAGCGAGCAAATTTTGGAGG
 AluI MboII BbvI MnlI
 PvuII

1630 1640 1650 1660 1670 1680
 ATAGTAACCTGGTTGATCCTGCCAGTTACATATGCTTGTCTTAAATATTAACCCATGCAT
 ▲ 17 S r R N A 5' 末端
 AvaIII
 Sau3AI Nsp(7524)I

1690 1700 1710 1720 1730 1740
 GTGCCAGTTTCAATTGAACAGCGAAACTGCGAATGGCTCATTAAAAACAGTTATAGTTTA
 HinfIII

1750 1760 1770 1780 1790 1800
 TTTGATAATTAAGATTACATGGATAACCGAGCTAATTGTTGGGCTAATACATGCTTAAA
 NlaIII AluI NlaIII
 Nsp(7524)I

1810 1820 1830 1840 1850 1860
 ATTCCGTGTCCTGTGACCGGAACGTATTTATTAGATATTAGACCAATCGCAGCAATGTGA
 HpaI MaeII BbvI
 HpaI Fnu4HI

1870 1880 1890 1900 1910 1920
 TTGAGATGAATCAAAGTAACTGATCGAATCGAAGCTTGCTTCGATAAATCATCTAAGTTT
 HhaII MaeII DpnI HhaII AluI TthHB8I DdeI
 DpnI Sau3AI HindIII

1930 1940 1950 1960 1970 1980
 CTGCCCTATCAGCTCTCGATGGTAGTATTGGACTACCATGGCAGTCACGGGTAACGGA
 AluI TthHB8I DsaI MaeIII MaeIII
 StyI

1990 2000 2010 2020 2030 2040
 GAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAAGGAGCCTGAGAAAACGGCTACTACAACCTACGGTTCGG
 HinfI
 HpaI

2050 2060 2070 2080 2090 2100
 CAGCAGGGAAGAAAAATTGGCCAATCCTAATTCAGGGAGCCAGTGACAAGAAATAGCAAGC
 MboII BclI MlaIV MaeIII AluI
 HaeIII

2110 2120 2130 2140 2150 2160
 TGGGAAACTTAGTTTCTACGGCATTGAAATGAGAAAAGTGAAATCTCTTAGCGAGGAAC
 DdeI DdeI MnlI

☒ 8 (d)

2170	2180	2190	2200	2210	2220
AATTGGAGGGCAAGTCATGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATAT					
MnlI	BanI	BbvI	AccII	AluI	
2230	2240	2250	2260	2270	2280
TAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACTTCTGTTTCAGGTTTCATTTCTCGACTCG					
	AluI			HhaI	
				HinfI	
2290	2300	2310	2320	2330	2340
TCGAGTGAAACTGGACATACGTTTGCAAATAAAATCGGCCTTCACTGGTTCGACTTAGG					
TthHB8I	MaeII		BluII		DdeI
			HaeIII	TthHB8I	
2350	2360	2370	2380	2390	2400
GAGTAAACATTTTACTGTGAAAAAATTAGAGTGTTCCAGGCAGGTTTTAGCCCGAATACA					
			MvaIBspM		HinfIII
			EcoRII		
2410	2420	2430	2440	2450	2460
TTAGCATGGAATAATGGAATAGGACTAAGTCCATTTTATTGGTTCCTGGATTTGGTAATG					
NlaIII		DdeI			
		Tth111I			
2470	2480	2490	2500	2510	2520
ATTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTAGTATTTAATAGTCAGAGGTGAAAATCCTTGATTT					
			HphI		
			MnlI		
2530	2540	2550	2560	2570	2580
ATTAAGGACTAACTAATGCGAAAGCATTGCCAAAGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAA					
2590	2600	2610	2620	2630	2640
AGTTAGGGGATCAAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATAACCGACT					
BinI	DpnI				AvaI
DpnII	MosI				HinfI
2650	2660	2670	2680	2690	2700
CGGGATCGGCTGGAATAAATGTCCAGTCGGCACCGTATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTT					
BinI		BanI			
Sau3AI					
2710	2720	2730	2740	2750	2760
CTGGGGAAAGTATGGTACGCAAGTCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAACAGCACACCAG					
	RsaI				
2770	2780	2790	2800	2810	2820
AAGTGGAACCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACGAGCGCAAGACAGAG					
BspMPnu4HI		HhaI		HhaI	
MlaIV		HinfI		SciNI	
2830	2840	2850	2860	2870	2880
AAGGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTTTGGTGGTGGTGCATGGCCGTTT					
	AluI		HhaII	TaqII	BluII DdeI
	SacI				HhgI

☒ 8 (e)

```

2890          2900          2910          2920          2930          2940
TTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTA
                                     HincII
                                     HpaI
2950          2960          2970          2980          2990          3000
ATAGTCTGCTTGTGAACAACAGGTTGTACTTCTTAGAGGGACTATTGTGCAAGAAGCCA
MaeI          RsaI  DdeIMnII
SpeI
3010          3020          3030          3040          3050          3060
ATGGAAGTTTAAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTAGACGTGCTCGGCCGACGCGC
                                     SfaNI  MaeI  HgiAI  BluII  AccII
                                     MaeII  CfrI      AccII
3070          3080          3090          3100          3110          3120
GTTACAATGACTGGCGCAGAAAAGTATTTCTGTCTCGGGAAGGTACGGGTAATCTTATTA
MaeIII       HhaI          EcoRII  RsaI
                                     SciNI          MvaI
3130          3140          3150          3160          3170          3180
ATACCAGTCGTGTTAGGGATAGTTCTTTGGAATTGTGGATCTTGAACGAGGAATTTCTAG
                                     BinI      MnlI      MaeI
                                     DpnI
3190          3200          3210          3220          3230          3240
TAAGTGCAAGTCATCAGCTTGCGTTGATTATGTCCCTGCCGTTTGTACACACCGCCCGTC
                                     AluI          RsaI
3250          3260          3270          3280          3290          3300
GCTTGTAGTAACGAATGGTCTGGTGAACCTTCTGGACTGCGGTAGCAATACTGCCGGAAA
HinfIII  HphI
MaeIII
3310          3320          3330          3340          3350          3360
ATAAGTAAACCCTACCATTTGGAACAACAAGAAGTCGTAACAAGGTATCTGTAGGTGAAC
MaeIII          HphI  BspM
3370          3380          3390          3400          3410          3420
CTGCAGATGGATCATTAAACAATTAACAAACCTTAACCTTATGTACTTTCGAAGATAGCT
17SrRNA  ▲          RsaI  AsuII  AluI
3'末端  PstI      DpnII          Nsp(7524)V
3430          3440          3450          3460          3470          3480
TCGGCTAACTTCGAGGTTTTATTGTCACACCTAGTGTGAATAAAAAATTTTCATATGTCT
MnlI          DraIII          NdeI  DdeI
TthHB8I      MaeIII  MaeI
3490          3500          3510          3520          3530          3540
AAGATCTGGATAACATCCAAAAACGAAAAGAAAATTTTCAACGGTGGATATCTAGGTTTC
BglIII       FokI          ▲ 5.8SrRNA  EcoRV  MaeI
DpnI          5'末端          MlaIV
3550          3560          3570          3580          3590          3600
CCGTGACGATGAAGAACGCGAAGATGCGATACGCAATGCGAATTGCAGAACCGCGAGT
MaeIII  MboII  BbvI          HinfIII  AccII
                                     Fnu4HI          BceR

```

図 8 (f)

	3610	3620	3630	3640	3650	3660
	CATCAGATCTTTGAAACGCAAGTGGTGGAGGTGTA AAAACCTTCATGTTGTATCAGTGTG					
	▲ BglIII		MnlI		NlaIII	
5.8srRNA	Sau3AI					
(3')	3670	3680	3690	3700	3710	3720
	GAAAGGAATCACGCATCTTAATGCGATTGAAGTTTACTTCTCTCGTTAAACGTGATGGGT					
	HhaII	SfaNI			MaeII	TaqII
	HinfI					
	3730	3740	3750	3760	3770	3780
	GGTCGAGCAATCGCCGCCAGAACGAAGTAGTCACATTTCGTGTAATGTGAACATTTCGTTCA					
	TthHB8I	Fnu4HI		HinfIII		HinfIII
			MaeIII			
	3790	3800	3810	3820	3830	3840
	GGCATAAAGGTGAATGTTCAACATGCTACTCATAGAAAAAATTA AAAATTTTCTCACTAC					
	HphI		NlaIII			▲
			Nsp(7524)I		26S rRNA 5' 末端 (未確定)	
	3850	3860	3870	3880	3890	3900
	ACCTGATAACAAGCAAGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAGTAAGCGGAGGAAAAGAA					
			NspBII	AfIII		MnlI
	3910	3920	3930	3940	3950	3960
	ACTAACTAGGATAGCCCCAGTAATGGCGAATGAACAGGCTAAAGCTCAAAGTGAAAATCT					
	MaeI		HinfIII		AluI	
	3970	3980	3990	4000	4010	4020
	GGAACAGAAATTGTAATCTAAAGAGTTAAACCCAAAGCTAAGCTCCTCGCATAAGTTCCTT					
	△小さい欠失(図11A)	ChuII		AluI	AluIMnlI	EcoT14I
		HincII		DdeI		SecI
	4030	4040	4050	4060	4070	4080
	GGAACAGGACGTCAAAGAGGGTGACAACCCCGTAGTCGGTGAGGAATGCTGGTGAAGGGA					
	AatII	HphI		HphI	BsmI	HphI
	AcyI	MnlIMaeIII		MnlI		
	4090	4100	4110	4120	4130	4140
	AGGCTTCAAAGAGTCGGGTTGTTGGGATTGCAGCCCTAAGTGGGAGATAAACTTCTTCT					
	HhaII	Tth111III	BbvI	DdeI		MboII
	HinfI		Fnu4HI			
	4150	4160	4170	4180	4190	4200
	AAAGCTAAATATACGGGAGACCGATAGCGAACAAGTACTAGCGAAGGAAAGATGAAAA					
	AluI		Eco31I		ScaIMaeI	
			TaqII		RsaI	
	4210	4220	4230	4240	4250	4260
	GAACTTTGAAAAGAGGGTTAAAAGACTTGAAACCGTTGAGAAGGAAGCTGTAGAAGAGCA					
		MnlI			AluI	MboII
	4270	4280	4290	4300	4310	4320
	ATAAACTGGACGGCGCATAAGGGGGAAGTGTTACTCACTGCGGAGTCGATACGAAAGGTC					
	HhaI		MaeIII		HhaII	TthHB8I
	SciNI				HinfI	

☒ 8 (g)

4330 4340 4350 4360 4370 4380
 GATGAGTAAGGAAAGGACACAGAACTTCTACGCCGGTCAGAAGACAAAATGAGTTCAGAT
 Cfr10I BbvII
 HpaII
 4390 4400 4410 4420 4430 4440
 TGAAGGAGTCACTGAGATCGGGGTCAAACCAGATCAAAGGGAAACTTCAGACTGGAC
 HhaII DdeIDpnI DpnI DdeI
 HinfI DpnII DpnII
 4450 4460 4470 4480 4490 4500
 TGAGGGGCCTAAGGGCGATTTTGTCAAATGGCTTCTACTGACCCGTCTTGAAACACGGAA
 MnlIBluII AvaII
 HaeIII
 4510 4520 4530 4540 4550 4560
 CCAAGGAGTCTATCAATTAAGCGAGTGATAGGGTGGAGAAACCCGTCCGCGAAAACGAAAG
 EcoT14I AccII
 StyI HinfI FnuDII
 4570 4580 4590 4600 4610 4620
 TGAGTACAAGGTGCCAAGCCGCAAGGTAGCAGCATCACCCGACCTAGATTCTCCGAAGAA
 RsaI BanI Fnu4HI BbvI HphI HhaII MboII
 HgiCI Fnu4HI HinfI
 4630 4640 4650 4660 4670 4680
 GGGTTCGAGGAAGAGCTTAATTGTTAGGACCCGAAAGATGGTGAACCTACGCTTGAATAGG
 MnlI AluI AvaII HphI HphI
 MboII Cfr13I
 4690 4700 4710 4720 4730 4740
 GTGAAGCCAGGGGAAACTCTGGTGAAGCTCGTAGCGATACTGACGTGCAAATCGTTCGT
 EcoRII AluI MaeII
 MvaI
 4750 4760 4770 4780 4790 4800
 CAAATTTGAGTGTAGGGCGAAAGACTAATCGAACCATCTAGTAGCTGGTTCCTCCGAA
 TthHB8I MaeI AluIMlaIVMnlI
 4810 4820 4830 4840 4850 4860
 GTTCTCTCAGGATAGCAAGAGCAAGTACGCAGTTTTATTAGGTAAGCGAATGATTAGA
 DdeI RsaI HinfIII MnlI
 4870 4880 4890 4900 4910 4920
 GGACTCGGGTTCCAAGAATCTCGACCTATTCTCAAACCTTAAATGGTAAGAGCCGCGG
 Aval MlaIV HhaII TthHB8I DraI AccII
 HhaII HinfI BceR
 4930 4940 4950 4960 4970 4980
 AGTTTTCTTAATTGAACTCTCGGGTAGAATGCAGTGCTCTTAGTGGCCATTTTTGGTAA
 AvaI BsmI HgiAIDdeI BluII
 HaeIII
 4990 5000 5010 5020 5030 5040
 GCAGAACTGGCGATGAGGGATGAACCTAACGTTGAGATAAGGCGCCAAATGCACGCTCA
 EcoT14I BbvI FokI AvaII MaeII AcyI
 ScaI Fnu4HI Cfr13I HhaI

図 8 (h)

5050 5060 5070 5080 5090 5100
 TCAGATACCA CAAAAGGTGTTGGTT CATATGACAGCAGGACGGTGGCTATGGAAGTTAG
 HgiEII h b NdeI HhaI
 HinfI
 5110 5120 5130 5140 5150 5160
 AATCCGCTAAGGAGTGTGTAACAACCTCACCTGCCGAATGAACTAGCCCTGAAAATGGATG
 DdeI MaeIII BspM HinfIII MaeI FokI HaeII
 HphI HinHI
 5170 5180 5190 5200 5210 5220
 GCGCTGAAGCGTGTGCCGATACTCAACCATCAGAGCAAATGCGAGGCTTTGATGAGTAG
 HhaI MnlI
 SciNI
 5230 5240 5250 5260 5270 5280
 GAGGGCGTGATCGTTGCCCTAGAAGTATTGGGCGTGAGCCTATATGGAGCAGCGATTAGTG
 MnlI DpnI MaeI BbvI
 DpnII Fnu4HI
 5290 5300 5310 5320 5330 5340
 CAGATCTTGGTGGTAGTAGCAAATATTCAAATGAGA ACTTTGAAGACCGAAGTGGAGAAG
 BglII SspI BbvII h b
 DpnII TaqII
 5350 5360 5370 5380 5390 5400
 GGTTCATGAGAACAGCAATTGTTTCATGGGTTACTCGATCCTAAGACATAGGTAACTCC
 MlaI VnlaIII MaeIII BinI DdeI ChuII
 NlaIII DpnI HincII
 5410 5420 5430 5440 5450 5460
 TTGCAATACAAGAAGACGTTCTCGTTTTCGTTGT CAAAAGGGAATGAGGTTAATATTCCT
 BbvII h b ▲
 XmnI MaeII 予想したhidden break 部位
 5470 5480 5490 5500 5510 5520
 CAAGCTGGACGTGGTATAGAGTGTAACACAAAGAAACCCGGAGACGTCAGCAGGAGCCA
 AluI MaeII MaeIII BcnI AatII MlaIV
 HpaI BbiII
 5530 5540 5550 5560 5570 5580
 CTGGAAGAGTTATCTTTTCTTTTAACTACTATGGCCATGAAAATGGATTATCCAGAGA
 MboI BalI NlaIII EcoRV
 HaeIII
 5590 5600 5610 5620 5630 5640
 TATCGGCTGTACGTATGGCAGAGCAGCTCACCTAAGAGCTGTCAGTTGCGCTTCTGATG
 MaeII AluI DdeI AluI HhaI
 RsaI BbvI HphI SciNI
 5650 5660 5670 5680 5690 5700
 ACCCTTGAAAATCTGGGGGAGACATA ATTT CACGCCAGTTCGTACCCATAACCGCATCAG
 RsaI HgiEII Eco311
 SfaNI
 5710 5720 5730 5740 5750 5760
 GTCTCCAAGGTTAGCAGCCTCTGGTCCATAGAACAATGTAGATAAGGGAAGTCGGCAAAT
 EcoT14I BbvI MnlI AvaII
 SecI Fnu4HI Cfr13I

☒ 8 (i)

5770 5780 5790 5800 5810 5820
 TGGATCCGTAAGTTCGGGATAAGGATTGGCTCTGAGGATCGGGTATAAAGGCCATTAGAT
 BamFI MaeIII DdeIBinI BluII
 BamHI DpnI HaeI

5830 5840 5850 5860 5870 5880
 GATATCCAAGCTTGTGGTGTAGTGTGGCAACATGCTGATAGACTTGGCACCAGGAATTTC
 EcoRV AluI Tth1111I NlaIII TaqII EcoRI
 HindIII

5890 5900 5910 5920 5930 5940
 TTGTGGTAGACCTCGGTCTTTATAACAATTAACGATCAACTCAGAACTGAAGCGGACA
 AccI MnlI DpnI DdeI
 TaqII MosI

5950 5960 5970 5980 5990 6000
 AAGGTAATCCGACTGTTTAATAAAAAACAAAGCATTGTGACGGCCTCAACAGGTGATGACA
 MmeI BluII HphI DraIII
 HaeIII

6010 6020 6030 6040 6050 6060
 CAATGTGATTTCTGCCAGTGCTCTGAATGTCAAAGTGACGCAATTCAACCAAGCGCGGG
 HgiAI HgaI AccII
 HhaI

6070 6080 6090 6100 6110 6120
 TAAACGGCGGGAGTAAGTACTGACTCTCTTAAGGTAGCCAAATGCCTCGTCATCTAATTAG
 MaeIII HhaII \triangle AflIII MnlII MaeIII
 HinfI IVSが挿入されている部位 (☒ 1 1 B)

6130 6140 6150 6160 6170 6180
 TGACGCGCATGAATGGATTAATGAGATTACCACTGTCCTATCTACTATCTAGCGAACCC
 AccII MaeI
 HhaI

6190 6200 6210 6220 6230 6240
 ACAGCTAAGGGAACGGGCTTAGAATAATCAGCGGGGAAAGAAGACCCTGTTGAGCTTGAC
 AluI DdeI NspBII BbvII AluI HhaII
 DdeI MboII HinfI

6250 6260 6270 6280 6290 6300
 TCTAGTCTAACTTTGTGAAATGGCAGTGGGGTATAGCCTAGGTGGGAGAGAAATCGAGC
 MaeI MaeII AvrII TthHB8I
 PmaCI EcoT14I

6310 6320 6330 6340 6350 6360
 CTGTAACCACTACCCACGTAGTCATTTTGCTATTTTCGTGAAGAAAAAACTGGTGAGA
 MaeII MboII HphI XmnI

6370 6380 6390 6400 6410 6420
 ACCAGTTCTAAAATTAAGGACATTTATTGTCTGATTTTTGCGAAAAGACATGGTTAGGGG
 AccI NlaIII

6430 6440 6450 6460 6470 6480
 GGGAGTTTGTCTGGGGCGGAATGCCTGTTAAACCATAACGCAGGCGTCCTAAGTGTAGCT
 BsmI DdeI AcyI DdeI AluI
 BbiII DdeI

☒ 8 (J)

6490	6500	6510	6520	6530	6540
CAGTGAGAACGGAAATCTCACGTAGAACAAAAGGGTAAAAGCTACATTGATTTTATTTT					
	MaeII		AluI		
6550	6560	6570	6580	6590	6600
CAGTATGAATACAAACCGCGAAAGCGTGGCCTATCGATCCTTTAACTTTACAAGTTTAA					
	AccII	BluII	BinI		AluI
	BceR	HaeI	Clal		
6610	6620	6630	6640	6650	6660
GCTAGAGGTGTCAGAAAAGTTACCAAGGGATAACTGGCTTGTGGCAGCCAAGAGTTCAT					
MaeI	MaeIII			BbvI	
MnII				Fnu4HI	
6670	6680	6690	6700	6710	6720
ATCGACGTTGCTTTTTGATCCTTCGATGTGGCTCTTCCTATCATTGTGAAGCAGAATTC					
MaeII	BinI	TthHB8I	MboII		EcoRIDraIII
	Sau3AI				
6730	6740	6750	6760	6770	6780
ACAACGTGTCGGATTGTTCAACCCGCTAATAGGGAACGTGAGCTGGGTTTAGACCGTCGTG					
AflIII	HphI		MaeIIAluI		
MaeII					
6790	6800	6810	6820	6830	6840
AGACAGGTTAGTTTTACCCTACTGATGAAACGATGTTGCGACAGTAATTTAAGTTAGTAC					
					RsaI
6850	6860	6870	6880	6890	6900
GAGAGGAACCCTTAAATCAGATAATTGGTAAATACGGTTGTCTGAAAAGACAATGCCGTG					
MlaIV					
MnII					
6910	6920	6930	6940	6950	6960
AAGCTACCATCTGTTGGATTATGACTGAAGGCCTCTAAGTCAGAATCCATGCTGGAAAGC					
		HaeI		HinfI	
		HaeIII			
6970	6980	6990	7000	7010	7020
AATGTCTAAGTGTGATGATAAACGAAAAAAAAATAAGAAATTAAGTTCGAAAGGTAGAGCG					
DdeI				AsuII	
				Nsp(7524)V	
7030	7040	7050	7060	7070	7080
GAGAAGAGCGAAAAAGCTTGATCTTAAGTCTAATCGTAATCCAAATTATCATCTACGT					
MboII	AluI	DpnI			MaeII
	HindIII				
7090	7100	7110	7120	7130	7140
AAATCTTTTGTAGACGACTTAATACGGAACGGGTATTGTAAGTATGAGAGTAGAATATTC					
	AccI				SspI
7150	7160	7170	7180	7190	7200
TACGATCTGCTGAGATTACGCCGCTCTCCTTAGATTTATCTCATCTCCCTTTATTTTTT					
DpnI	DdeIHhaII		DdeI		
DpnII	HinfI				

2 6 S r R N A 3 ' 末端 転写終結点

☒ 8 (k)

7210 7220 7230 7240 7250 7260
CTTCTGCTGGGGTTACTAACTACTTTAGGAAAATTTTTACTTTAATTAAAAAAAAAAGAAG
 IVa MaeIII MboII

7270 7280 7290 7300 7310 7320
 ATACTTTGAATTTATGTTTTGGAGATCTTTGGTCAAAGGTGATCAAAGACTTGAGTTTTC
 BglIII BclI
 XhoII Sau3AI
 7330 7340 7350 7360 7370 7380
 TTTTTTTTTTATCTGCTGGGGTTCTTAACTACTTTGTAAATTTCTGAAAAATCATCC
 IVb FokI

7390 7400 7410 7420 7430 7440
 AATTTTTTCATTGCAAAAATGAATGACACAAACACAAGAAAAAAGGGTGATCCATTCAT
 Val Tth1111I BinI
 Sau3AI

7450 7460 7470 7480 7490 7500
 TTCCACTTTTTGCAATTTTTTGAGGGATTGTAGTATAGGGCGAAGTATAGGCCTAAATAC
 MnlI BluII
 HaeIII

7510 7520 7530 7540 7550 7560
 AATTTTCATTCAAAAAAGCTGCTTTTTGGGTTTCATCGCAAAATCTCTGGAAAAAAGTGGA
 AluI
 BbvI

7570 7580 7590 7600 7610 7620
 ACAGAATGAAATGCATGTAAAGTGAAGACTTTCCATTCAAAGTTAATGGAGTCTTTGTA
 AvalIII BbvII HhaII
 EcoT22I MboII HinfI

7630 7640 7650 7660 7670 7680
AAAAAAAAAAAAATCCACTTATCAATTTCTTTCTGTTACCAACCCTGCGGATTGAAGGG
 Va2 MaeIII

7690 7700 7710 7720 7730 7740
 AAAAGAGATAAAGTTGACTTGGGTATTCATTTCCACTTTGGGAACTTTAGTCATATTCTC
 ChuII EcoRII
 HincII MvaI

7750 7760 7770 7780 7790 7800
 CAGGGATCCCTATATATGTTTCCCTAGGGATCTTTTGGCGTATTTTGCCAAAAGTGGATTA
 BamFI AvrII BinI HhaI
 BamHI MaeI DpnI SciNI

7810 7820 7830 7840 7850 7860
GAATGAAAATACAAGAGAAGTGAAGATTTCTCATTCAAAATGAATGAAACCTTTGTCAA
 Va MboII

7870 7880 7890 7900 7910 7920
AAAAATCCACTTATCAATTTTTTTGGGAAGGGTTGGTACAATGATTCTTCGGATTTTTGC
 RsaI HhaII
 HinfI

☒ 8 (1)

7930 7940 7950 7960 7970 7980
AAAAAGTTGATTTCTCTCATGTATTATTTTTGAAGTGGTTCTTATACAAAAATGAATGAA
 NlaIII Vb

7990 8000 8010 8020 8030 8040
AAAAAAAAATCCACTTATCAATTTTTTTTTCGAGGATCGCTCCCTTGATTCTTCGGATT
 BinI HhaII

8050 8060 8070 8080 8090 8100
TGCAAAAAGTTGATTTCTCTCATGTATTATTTTTCAAGCAGTTCTCATTCAAAAATGAAT
 NlaIII Vc

8110 8120 8130 8140 8150 8160
GTAATAAAAAAAAAATCCACTTATCAATTTTTTTTCCAGGACTACCTCGCTTAGCTCTCGTC
 EcoRII MnlIEspIAluI
 MvaI DdeI

8170 8180 8190 8200 8210 8220
TTTTCAAAAAGTTGATTTCTTCAATGTATTTTTTTTGAGGTGGTTCTCATACAAAAATG
 MboII Vd MnlI

8230 8240 8250 8260 8270 8280
AATGAAAAAAAAAAAAATCCACTTATCATTTTTTTTTTCTTACACCAGCCTCAGAAAACTTA
 MboII DdeI DdeI
 MnlI

8290 8300 8310 8320 8330 8340
GGTTCAGGTCTAAAGTTGATTTTTTCATTCATTTCCACTAATATTCTTTTTTTACATA
 SspI

8350 8360 8370 8380 8390 8400
TTCCCATATAAACATAATGAGATACAGAAAAGTGGTTTTGAATGAAAAAACAAGGAAAA
 VdI

8410 8420 8430 8440 8450 8460
AAAATAACAAGGAAAAGCAAATGTTTTATTGTATTTACTATCAAACCCTTATAGGTG
 HphI

8470 8480 8490 8500 8510 8520
ATTTTCGCCGACGGAGGCCGCTATCCGTGAGCCGATTGACCAAAAAGTGGTTTTGAATGG
 HaeIII Vd2
 HhgI

8530 8540 8550 8560 8570 8580
AAAAAGAAATTTTCATGTAAAAATGAATGAACTTTGGATTTTCAGTGAGATTGTGTAATTT
 NlaIII Vd3

8590 8600 8610 8620 8630 8640
ACGCTGAAATTTGACTGAGAAAAGAAGAACCCACTCAAATCTTAAGTGAGAAAAA
 MnlI DdeI MboII MboII AflIII

☒ 8 (m)

8650 8660 8670 8680 8690 8700
 CCTCGCTGAAAAACAATGAACCTAAAAGTCTTAGAAAAATGAATGAAAACTCTATTCAA
 MnlI DdeI Vd4

8710 8720 8730 8740 8750 8760
 ATTACTATACATAATAATCCTTTATCTGTACTTATATAGACTGTATTTACTCTATTTTGT
 RsaI

8770 8780 8790 8800 8810 8820
 AGCTTATTTCTGGATTTAATAGTAAAATAACGCAAATAAGAAAACTTTAATTAACCTAGT
 AluI VIa MaeI

8830 8840 8850 8860 8870 8880
 TCTTTCATTTTTTTATTTTATACATATATAATAGGCTTTTTTATTCATGGATATTCTATTC
 NlaIII

8890 8900 8910 8920 8930 8940
 ATCTTCTCAAAGCCTTCAAATCTCTATCATTATGTCTTCTATATAGTCTTAACACTAT
 MboII BbvII MboII

8950 8960 8970 8980 8990 9000
 AGTCTCTAATGGCTAAAAAATTCACATTTTTTGCATTTAATAGTAGAATATTGCGAATA
 VIb SspI HinfIII

9010 9020 9030 9040 9050 9060
 AGGAAGGCTCAACGAACCCGGTGCCTTCATAATTTAATTTTTATTGATATATACTAGGCTA
 BanI MaeI HpaII

9070 9080 9090 9100 9110 9120
 TGTAATCATGGACATTCTATTTTAGTCGCCTAAAGCTTAAAAATGAGCTCATTGTTTGGAT
 BbrI BanII BamHI HindIII SacI BinI

9130 9140 9150 9160 9170 9180
 CCATAAAGATTTTATTAGGATAAACACCTTATATAAATACAAGGGATTTTCTTGCAGATA

9190 9200 9210 9220 9230 9240
 AAAAAATGGCTTTTCCTATATTTGAGAGTGGTTCCATTAAGAATAAGGAAAAAACATTTT
 MlaIV

9250 9260 9270 9280 9290 9300
 ATGCAGAACTTTAAATTTAATTTGCTTTTCAATTTGAGAGTTTAGTATTTTGGGCAGAC
 DraI

9310 9320 9330 9340 9350 9360
 TATACTTTAGACCTCCATTATGGGAAAATACTCTTCAAATTTCTGCCATTGTATATTTTGG
 MnlI MboII Ve

図 8 (n)

9370 9380 9390 9400 9410 9420
AATGAAGATCTTAGAACCTTTGAGCCCTAACTTAGAGCCCAAACTAGATGGTCTTTTATT
BglIII BanII DdeI BanII MaeI
MboII DdeI HgiIII HgiIII
9430 9440 9450 9460 9470 9480
CTATATAAAATCATATTTCTTAAGTAATTACTATGAATAAGAAAGAAAGATTTGACAATT
AflIII

9490 9500 9510 9520 9530 9540
GACCTTCATTTTCATTTAAATCCTTTATCTGATGTTCTTTATATATACTATCAGGCTAAA
DraI

9550 9560 9570 9580 9590 9600
TCCTACTATAACTCCAATATAAGTGAAACCCCATTCATTTTCATGGAAAATTAATCAT
NlaIII

9610 9620 9630 9640 9650 9660
CAAAGGAGTTATTCTTAGTGATTAGGGTTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGT
DdeI テロメア繰り返し配列

9670 9680 9690 9700
TGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGG

図 9 Tetrahymena pyriformis GL株 rDNAの遺伝子構成

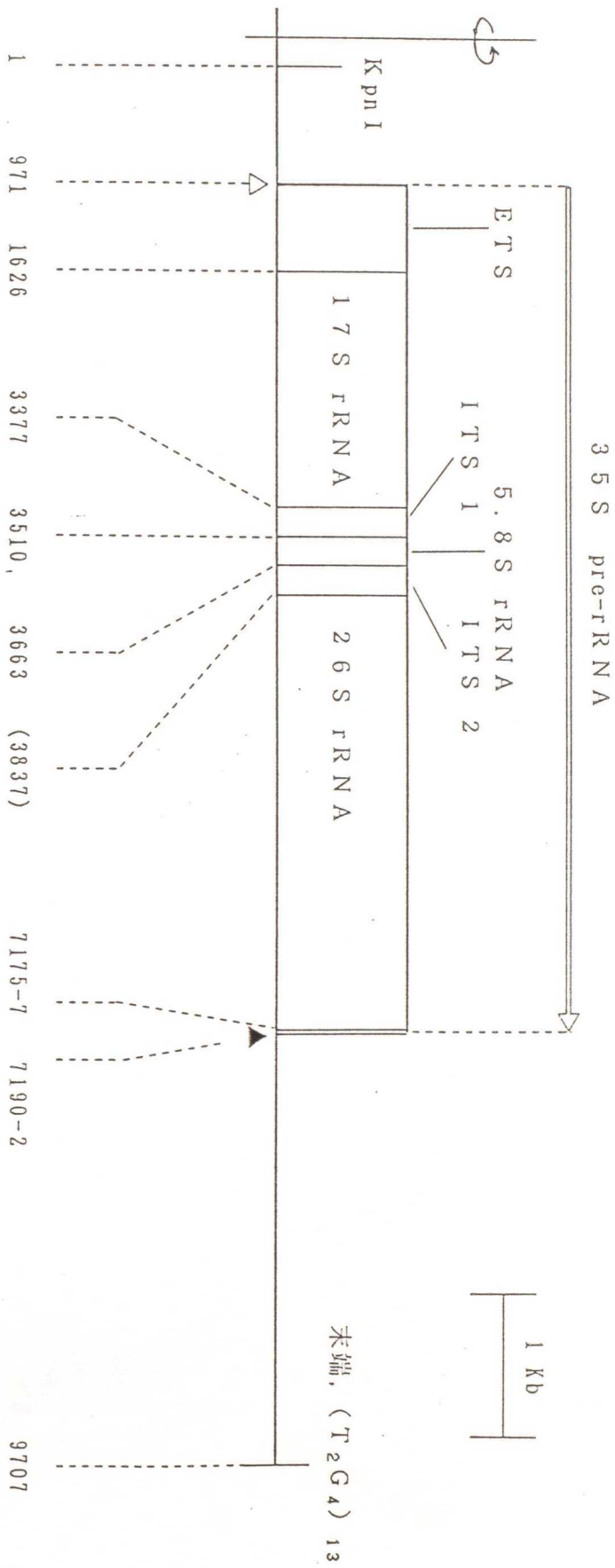
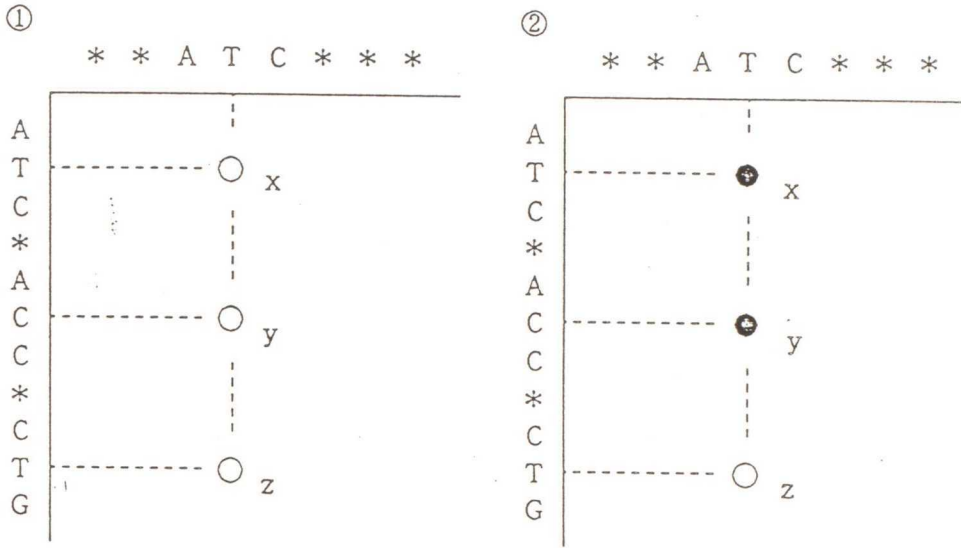
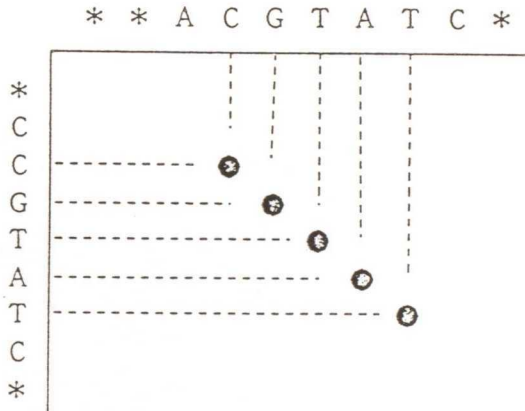


図10 (A) S tadenの方法による2つの塩基配列の比較

(1) 原理



(2) 相同性がある場合



(3) 反復配列がある場合

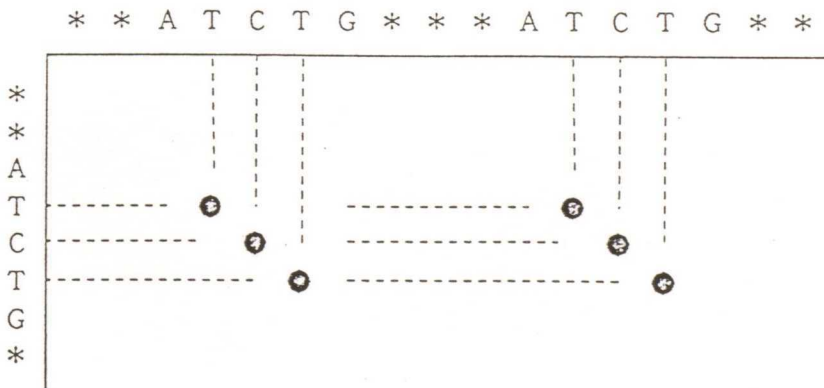
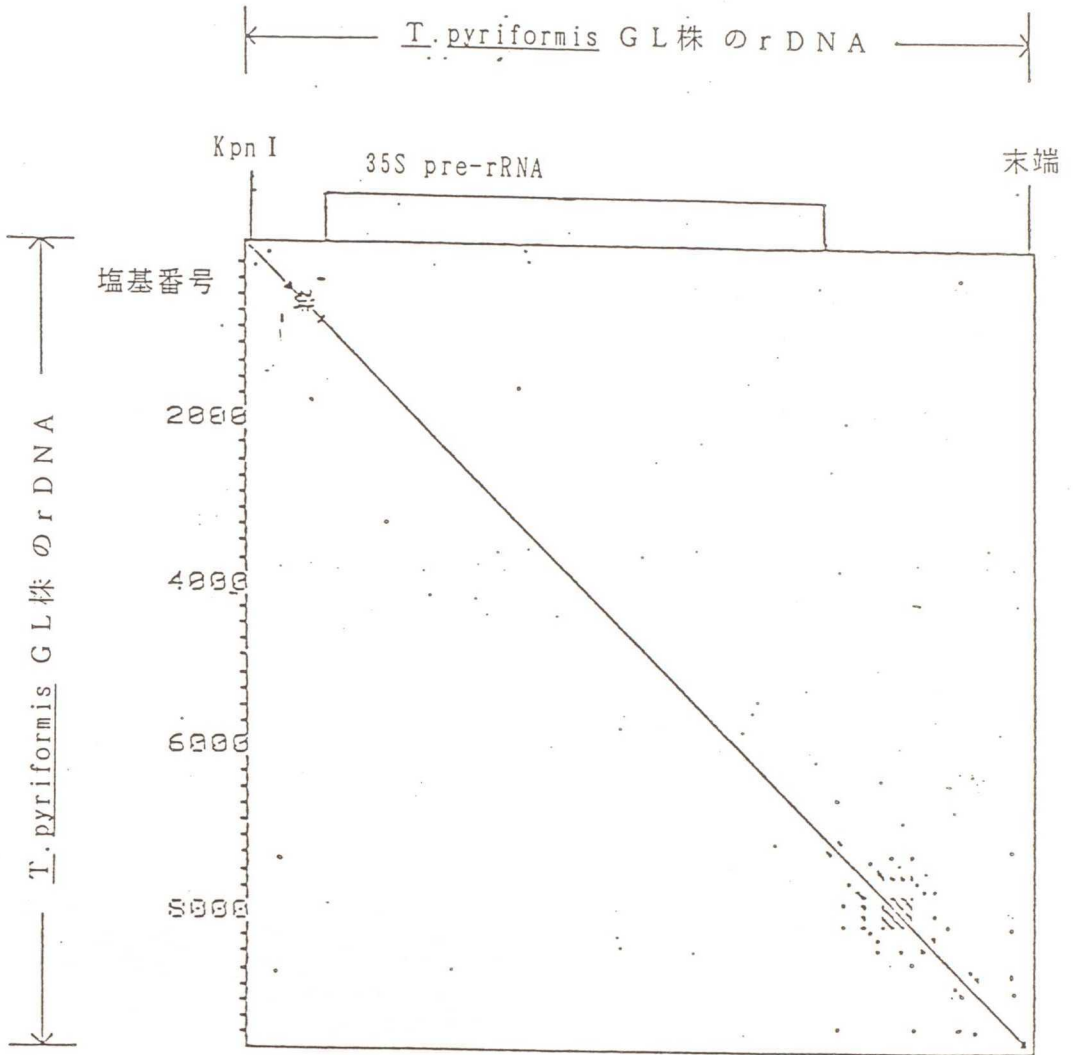


図 10 (B) T. pyriformis GL 株の反復配列の検索

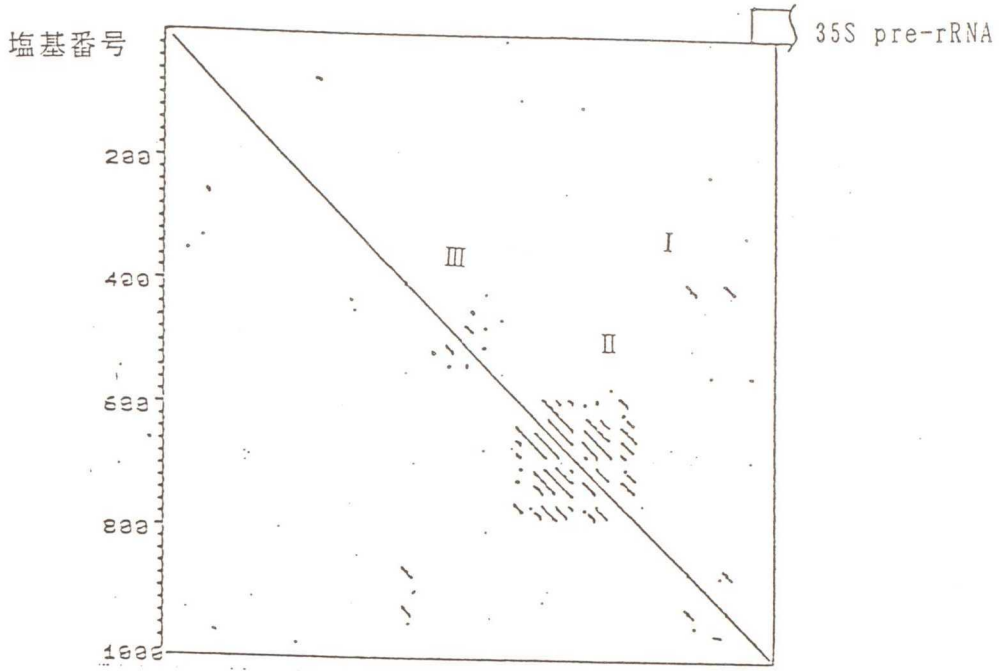
(1)



条件 $M \geq 20 / 25$

図10(C) T. pyriformis GL株の反復配列の検索

(2)



(3)

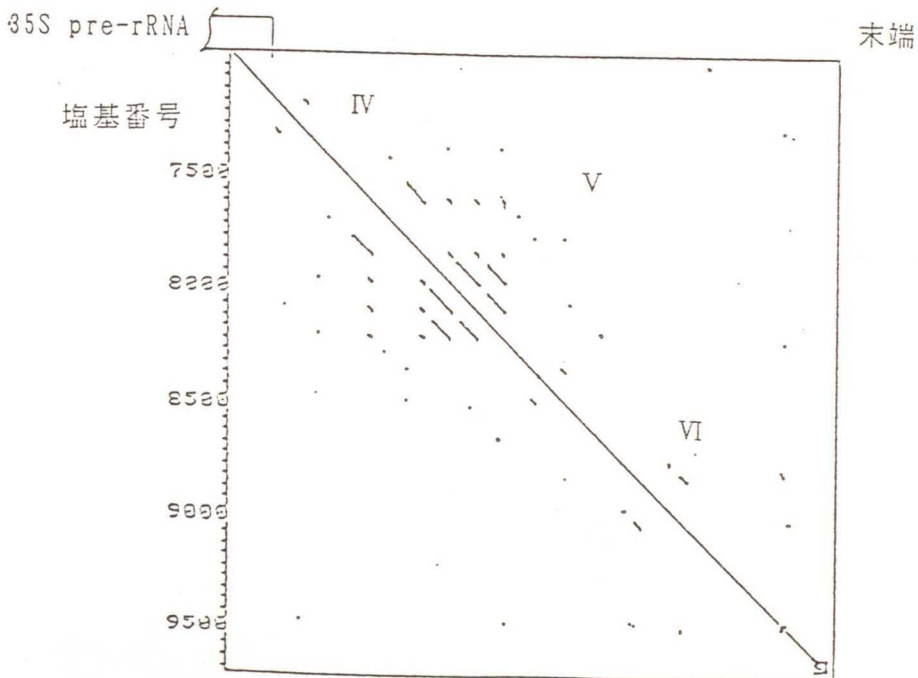
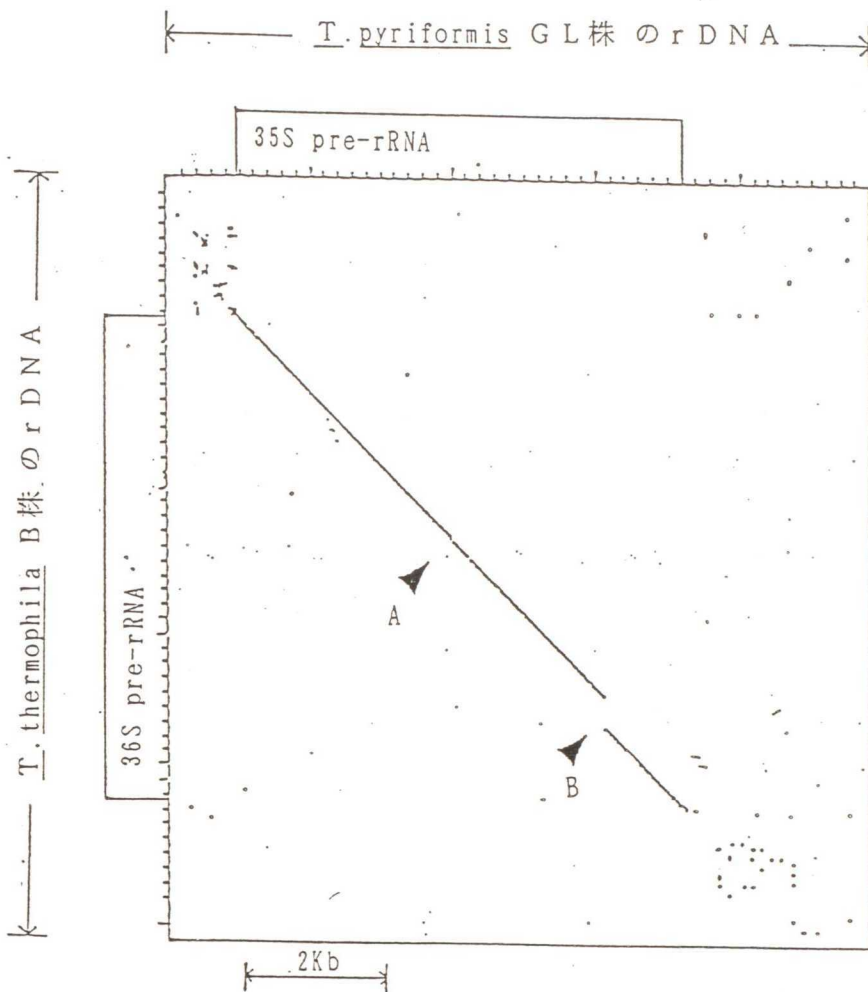


図 1 1 *T. pyriformis* GL株 と *T. thermophila* B株 との比較

(1)



条件 $M \geq 20 / 25$

(2)

欠失部分 A

T.p. -- A A T C T G G A ----- A A C A C A A C A G --
 ***** * (6塩基) *****
 T.th. -- A A T C T G A A G T G G T C A A C A C A A C A G --

欠失部分 B

T.p. -- T G A C T C T C T ----- T A A G G T A G --
 ***** (413塩基) *****
 T.th. -- T G A C T C T C T = [I V S] = T A A G G T A G --

図 12 *T. thermophila* B株 との比較

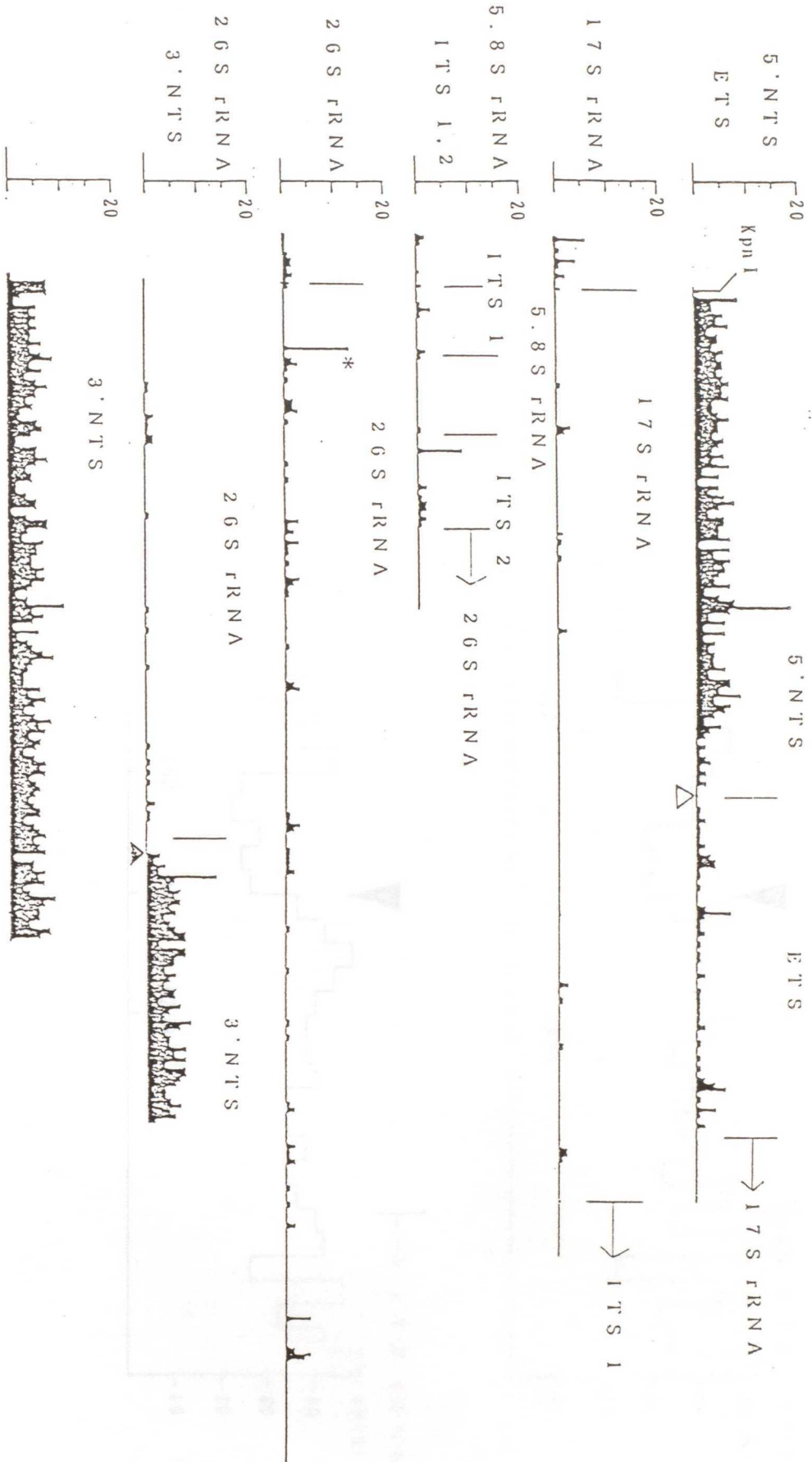
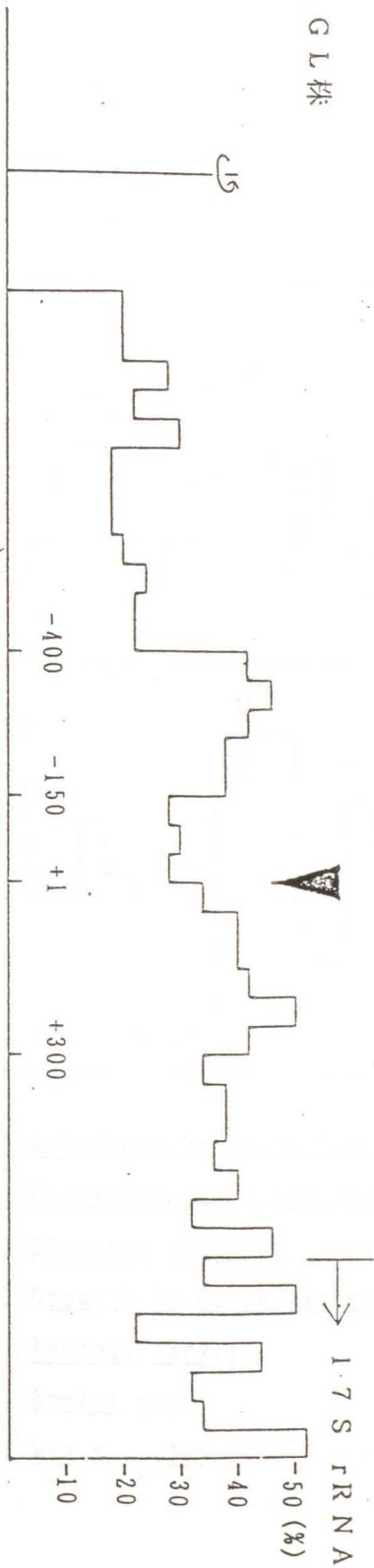


図 13 (A) 転写開始点を含む領域の G-C 含量

(1) *T. pyriformis* GL株



(2) *T. thermophila* B株

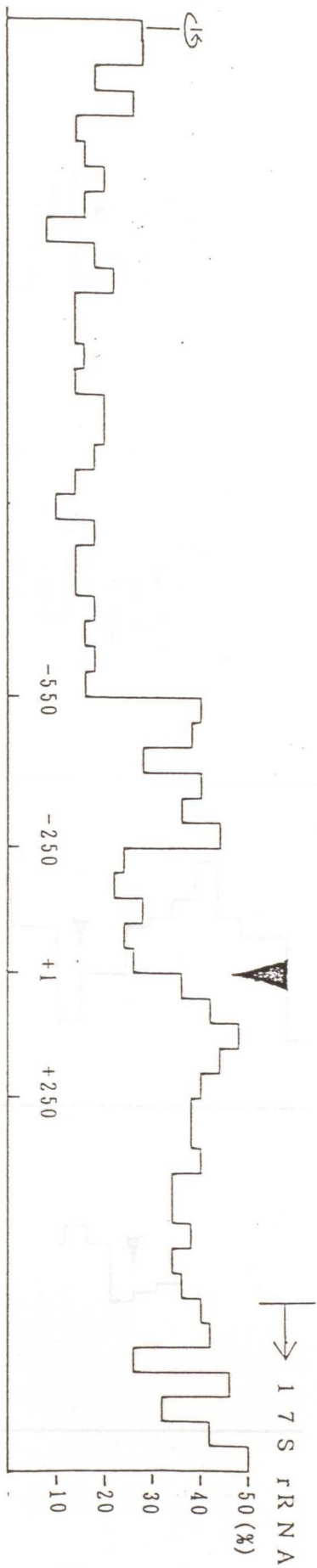


図 1 3 (B) 転写開始点近傍の G-C 含量

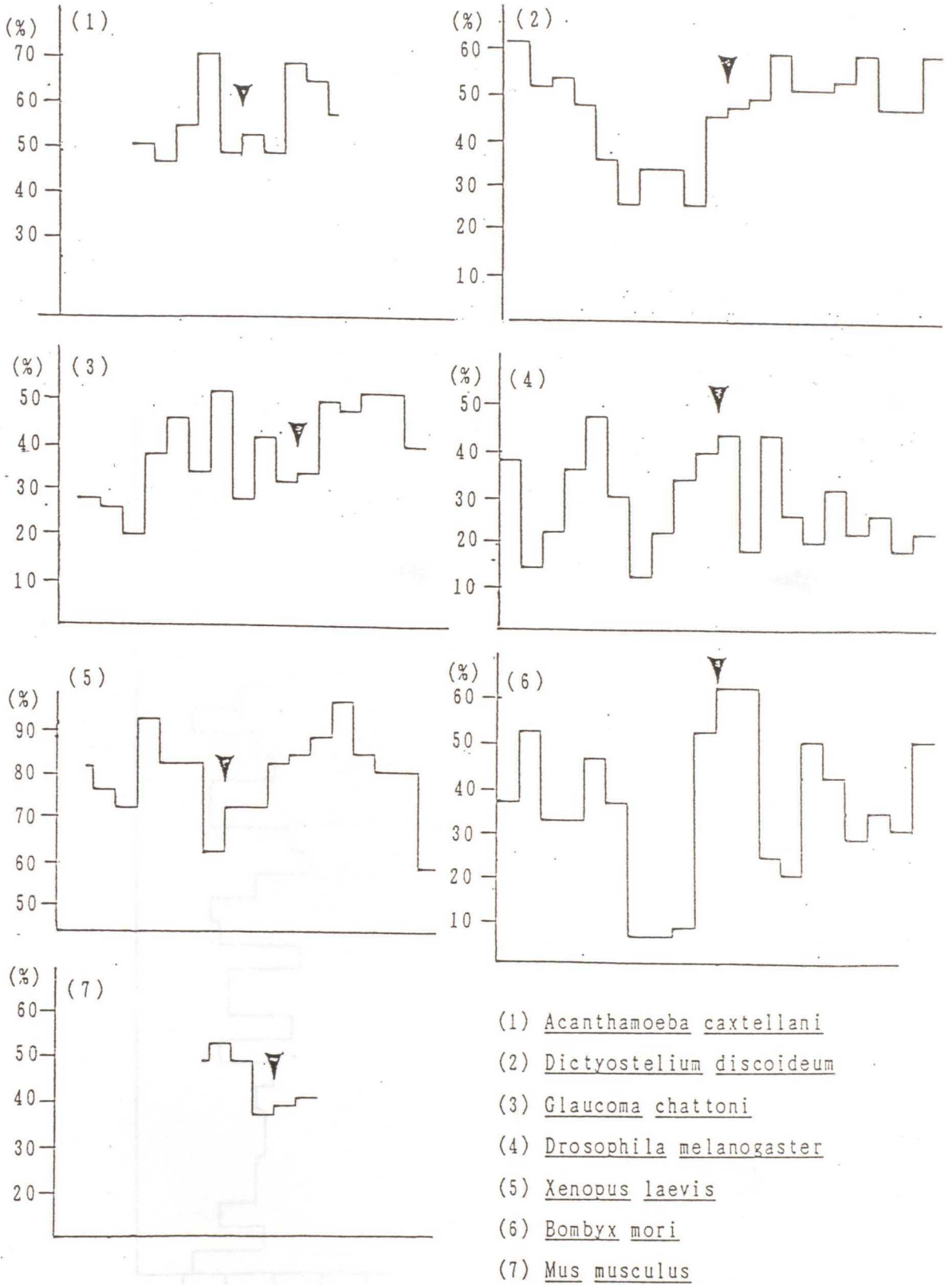
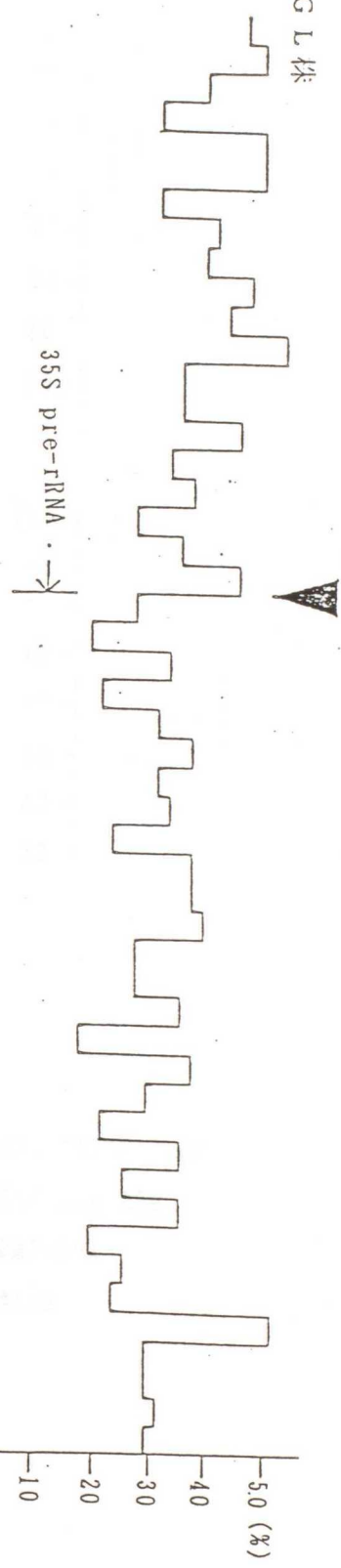


図 14 (A) 転写終結点を含む領域の G-C 含量

(1) *T. pyriformis* GL株



(2) *T. thermophila* B株

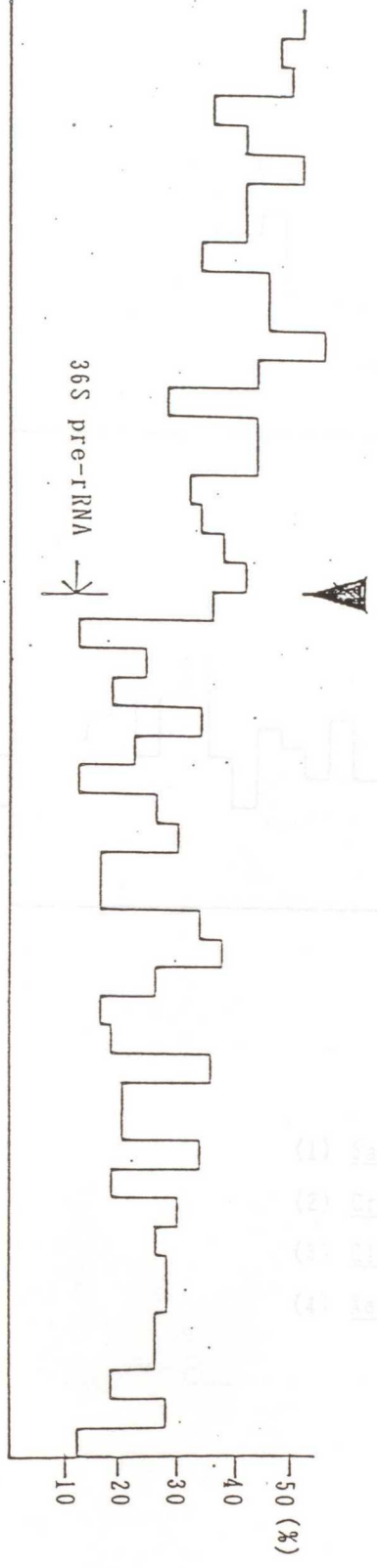
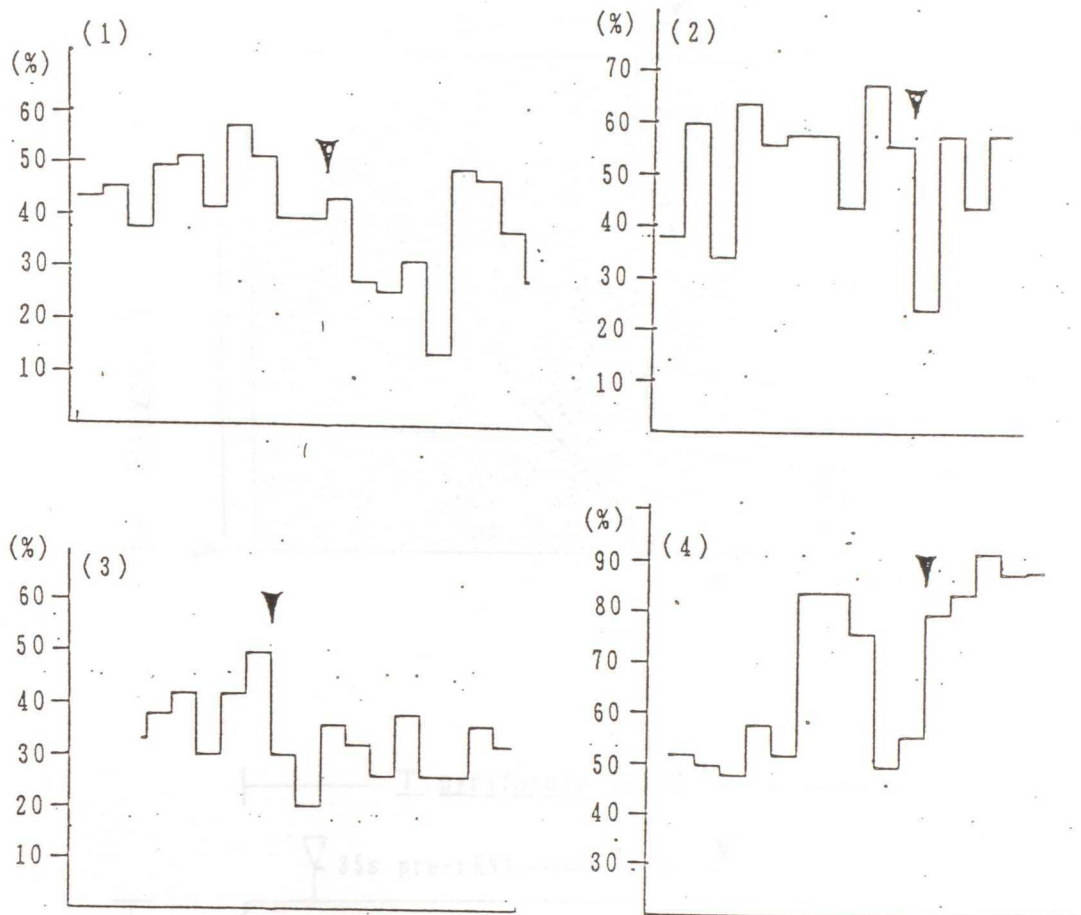


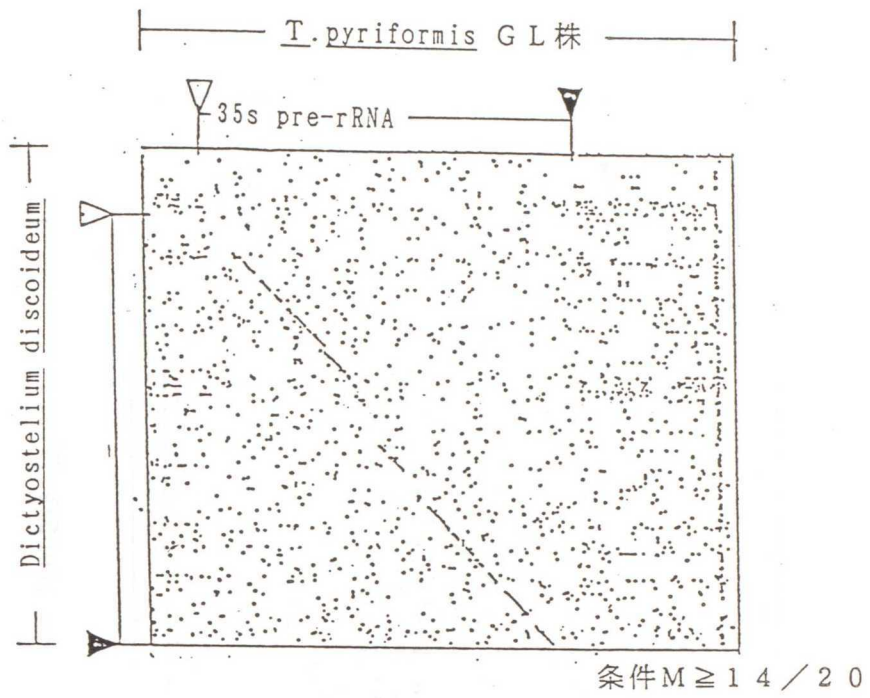
図 1 4 (B) 転写終結点近傍の G-C 含量



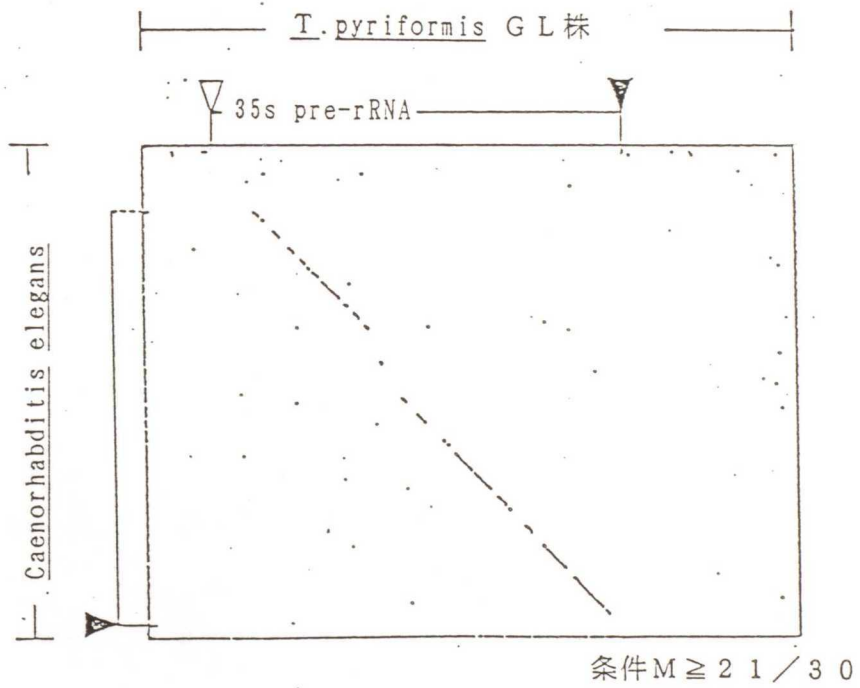
- (1) Saccharomyces cerevisiae
- (2) Crithidia fasciculata
- (3) Glaucoma chattoni
- (4) Xenopus laevis

図15 T. pyriformis GL株と他の生物種との比較

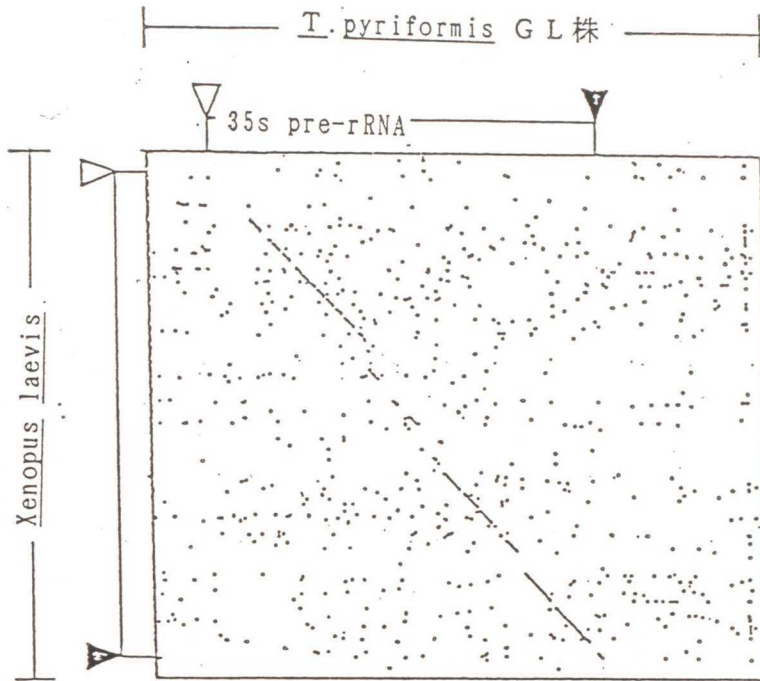
(1)



(2)



(3)



条件 $M \geq 14 / 20$

図 16 小亜粒子 rRNA、5.8S rRNA の比較

小亜粒子 rRNA

5.8S rRNA

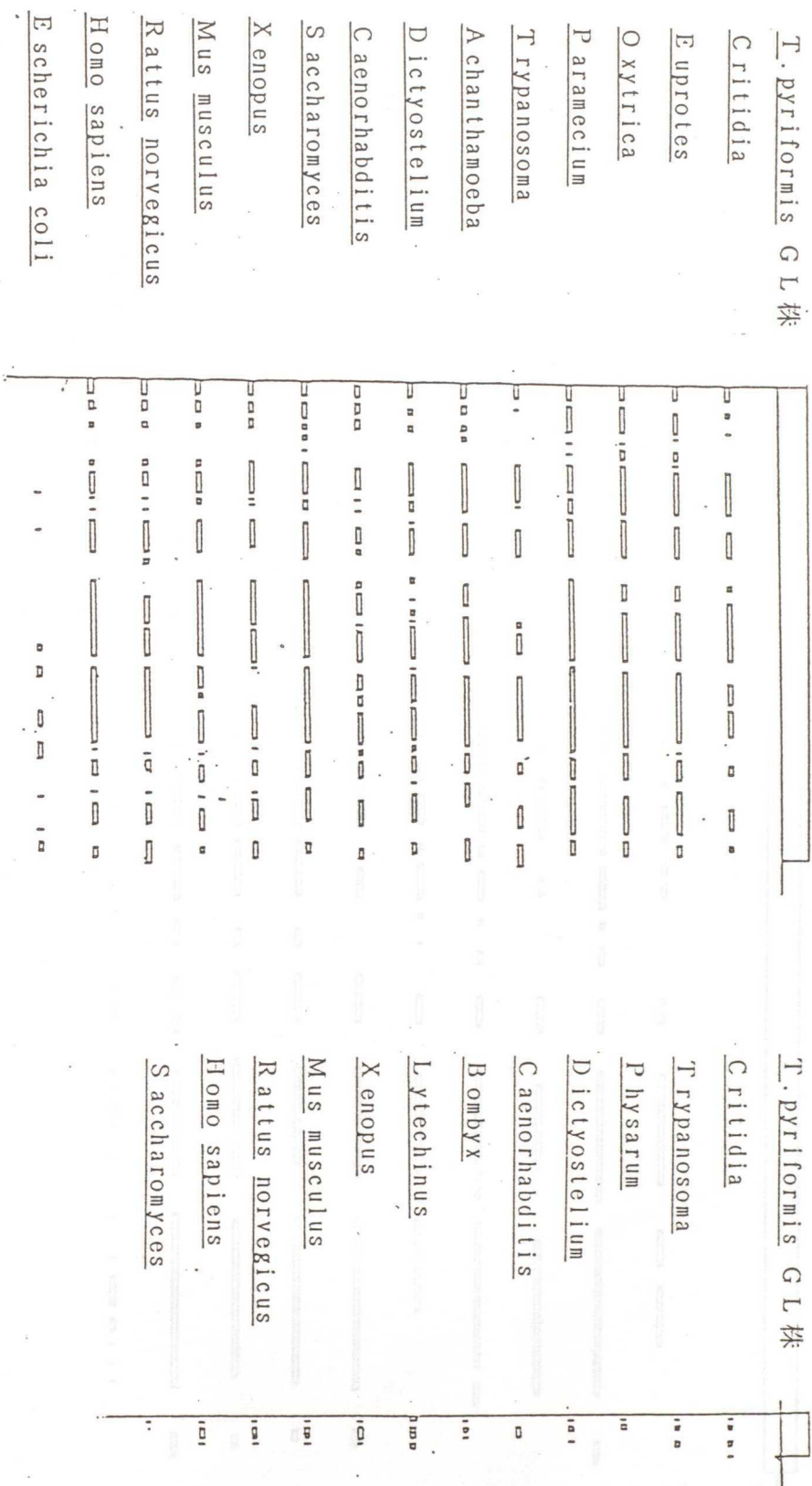


図 17 大亚粒子 rRNA の比較

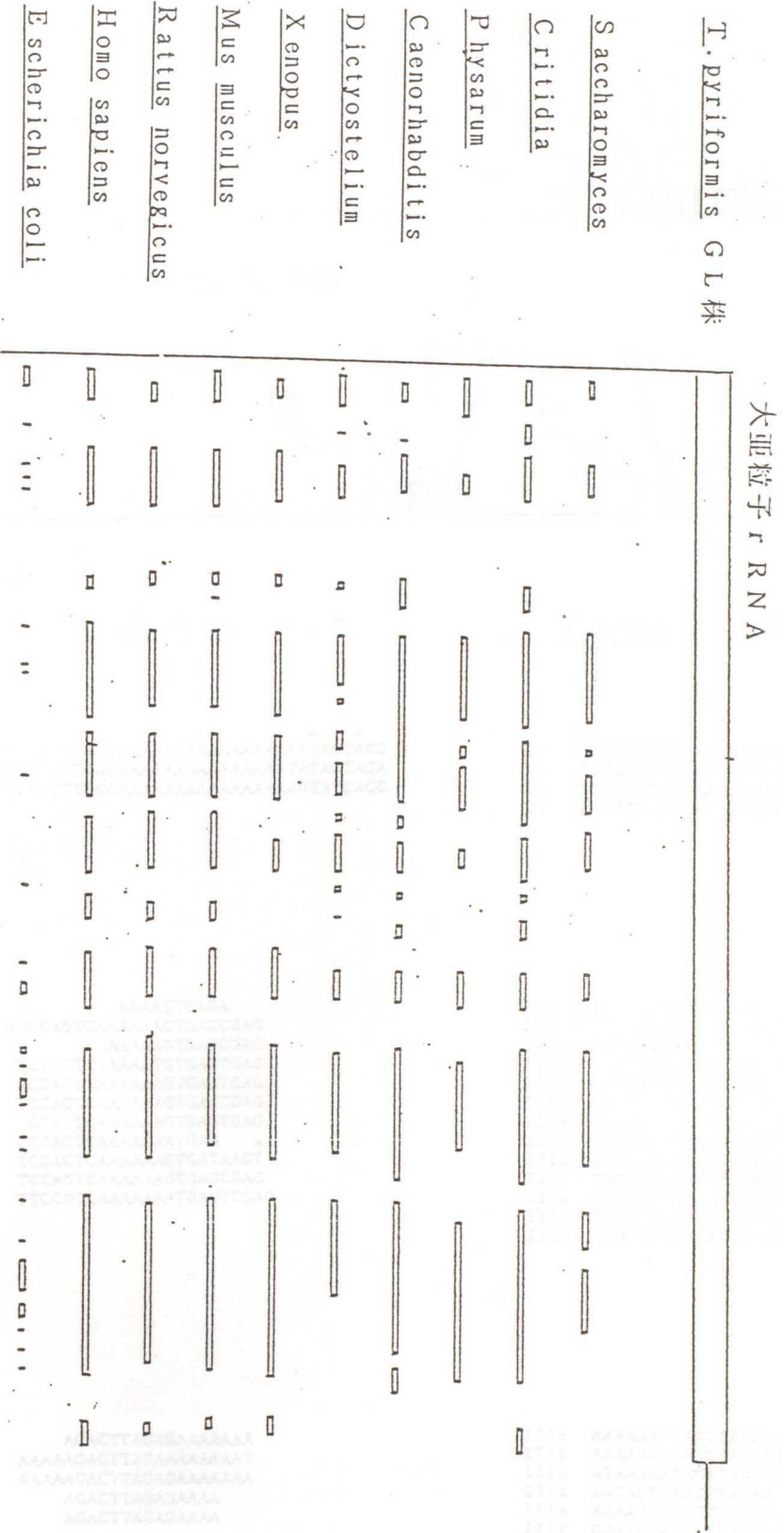
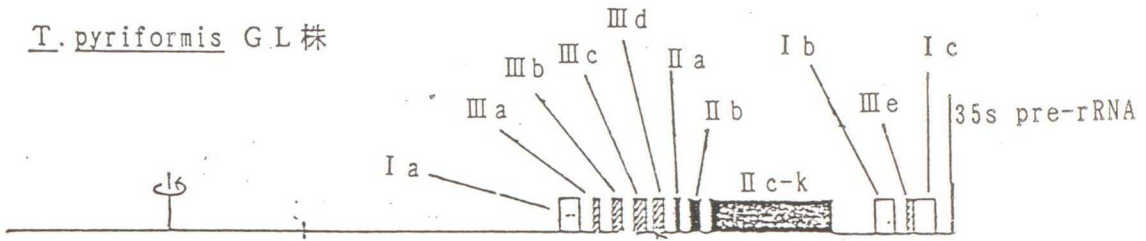


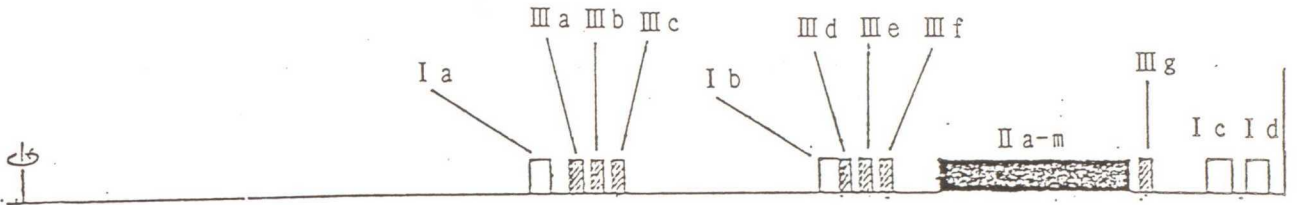
図 18 *Tetrahymena* rDNA の 5' 側非転写スペーサー領域の反復配列

(1)

T. pyriformis GL株



T. thermophila B株



(2)

T. pyriformis GL株

T. thermophila B株

タイプ I

Ia TTTTCTGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAATAGTAGG
 Ib TTTTTGTGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAATAGTAGA
 Ic TTTTCTGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTATCAGG

Ia TTTTTTGGCAAAAAAAAAAAAAAAAACAAAAATAGTAA
 Ib TTTTTTGGCAAAAAAAAAAAAAAAAACAAAAATAGTAA
 Ic TTTTTTGGCAAAAAAAAAAAAAAAAACAAAAATAGTAA
 Id ATTCTTTGGCAAAAAAAAAATAAAAATAATATCAG

タイプ II

IIa AAAAGTCAGA
 IIb GTCCAGTCAAAAAAGTGAGCGAG
 IIc AAAAAAGTGAGCGAG
 IId TCCACTCAAAAAATGTGAGCGAG
 IIe ACCAGTCAAAAAAGTGAGTGAG
 II f TCCACTCAAAAAAGTGAGCGAG
 IIg CCACTCAAAAAAGTGAGTGAG
 IIh CCCACTCAAAAAATGAG *
 III TCCACTCAAAAAAGTGATAAGT
 IIj TCCAGTCAAAAAAGTGAGCGAG
 IIk TCCCGTCAAAAAATGAGTGGAG

IIa CACTTACAAAAAATGACGGGA
 IIb CTCGCTCAAAATATTTAAGTGG
 IIIc ACTCGCATAAAATGAGTGAG
 IIId TCACTAAAAAATTAAGTGAA
 IIIe CTCACTTAAAAATGAGTGGAG
 IIIf CCACTCAAAAAATTAAGTGA
 IIIg CTCACTTAAATATTCGGCGGAG
 IIIh TTAACAAAAATAAGTGGGA
 IIIi CTCACAGAAAAATTAAGCGGAT
 IIIj TCCGCTAAAAAATGAGTGGA
 IIIk CTCGCTTAAAAATGAGTGGAG
 IIIl CCACTCAAAAAGTTAGCAGAG
 IIIm CCACTTAAAAATTTAGCTTA

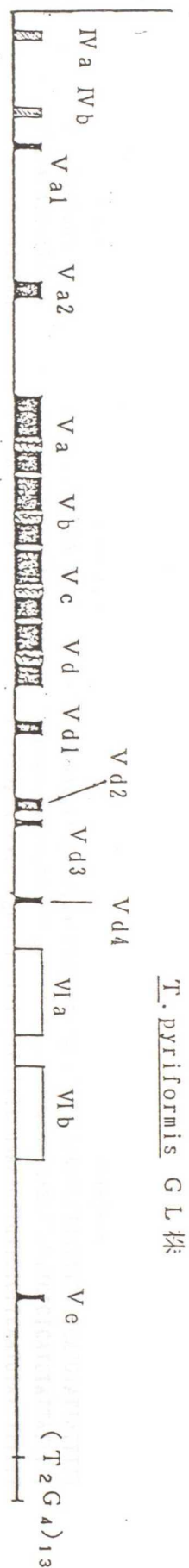
タイプ III

IIIa AGACTTAGAGAAAAAA
 IIIb AAAAAAGACTTAGAAAAAAAT
 IIIc AAAAAAGACTTAGAGAAAAAA
 IIId AGACTTAGAGAAAA
 IIIe AGACTTAGAGAAAA

IIIa AAAAAAGACTTAGAAAAAA
 IIIb AAAAAAGACTTAGAGAAAA
 IIIc AAAAAAGACTTAGAGAAAA
 IIId AATAGTAAACTTAGAAAAAT
 IIIe AAAAAAGACTTAGAGAAAA
 III f GAAAAAGACTTAGAAAAAT
 IIIg TAAATTAGACTTAGTGA

図 19 (A) Tetrahymena rDNA の 3' 側非転写スベーター領域の反復配列

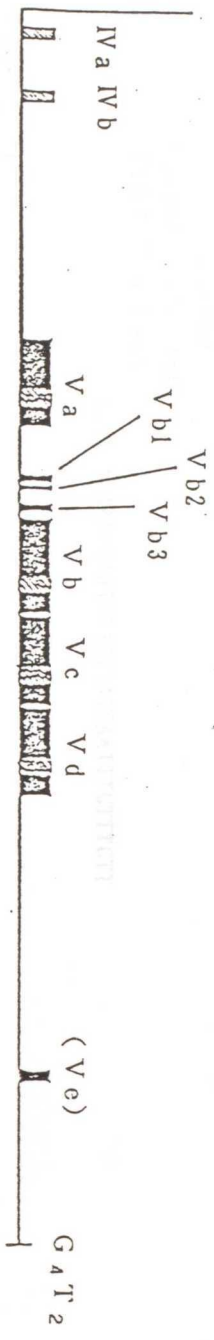
(1) 35s pre-rRNA



T. pyriformis G L 株

T. thermophila B 株

(2)



T. pyriformis G L 株

T. thermophila B 株

(2) タイプ IV 反復配列

IVa TCTGCTGGGGTTACTAA
IVb TCTGCTGGGGTTCTTAA

IVa TCTGCTGGGGTTGTTAA
IVb CTCACT-GGGTTATTAA

図 19 (B)

(3) タイプ V 反復配列

T. pyriformis G L 株

Va GAG-AITTCATTG-AAAATGAAATGAAACCTTGTCCAAAAAATCCACTTATCAATTTTTGGgaaggllgglacaatgallclleggatTTTGCMAAAAGTTGATTTCTCATGATTAATTTTT
 Vb GAAGCTGTTCTTATACAAAAATGAAATGAA-----AAAAAATCCACTTATCAATTTTTTTCgagagalegclcccllgallclleggatTTTGCMAAAAGTTGATTTCTCATGATTAATTTTT
 Vc CAAGCAGTTCTCATTCAAAAAATGAAATGTA-----AAAAAATCCACTTATCAATTTTTTTTccaggaclacclegcllagclclcgclTTTGCMAAAAGTTGATTTCTCATGATTAATTTTTTT
 Vd GAGCTGTTCTCATACAAAAATGAAATGAA-----AAAAAATCCACTTATCAATTTTTTTTclcaaccagclcagaanaacllagglTCAGGCTAAAGTTGATTTTTCATTCATTT
 Val CAAAAATGAAATGACA
 Vd1 AAAAGTGGTTTTGAAATGAAAAAACAA
 Vd2 AAAAGTGGTTTTGAAATGAAAAAGAAA
 Vd3 TAAAAATGAAATGAAAC
 Vd4 AGAAAAATGAAATGAAAAAC
 Ve ATATTTTGAATGAAAGA
 Va2 AAAAAAAAAAATCCACTTATCAATTTCTTCTT

T. thermophila B 株

Va GCAAAATGAAATGAAAAAATTTTAGTATTTTATMAAAATTTCTTCATTCAAA-TTTTACCACCTTATCAATTTATTTTTTllglfaclaaagcagllccagag-CCTTCTCTMAAAAGTTGAATTTTATTAACAA
 Vb GCAAAATGAAATGAAAAAATCTTTCGATTTTAAACAAAATTTTTCATTCAAAATTTCCACCACCTTATCAATTTTTTTTclccagccglcaagacclalalIGTTTTC-CTMAAAAGTTGACTTTTATTAAGAA
 Vc ACMAAAATGAAATGAAAAAATCTTTCGATTTTAAACAAAATTTTTCATTCAAAATTTCCACCACCTTATCAATTAATTTTTTTTlaagllccglccaglaalalTCTTTC-CTMAAAAGTTGACTTTTATTAAGAA
 Vd GCAAAATGAAATGAAAAAATCTTTCGATTTTAAACAAAATTTTTCATTCAAAATTTCCACCACCTTATCAATTAATTTTTTTTGGgacaacaanaagacclaaagatTTGATTTTMAAAAGTTGACTTTTTCAAAGAA
 Vb1 ATMAAAATGAAATGAAAA
 Vb2 TGAATGTAAAAAT
 Vb3 TGAATGAAAA
 Ve TGAATGAAAA

(4) 共通配列

- (a) AAATGAAATGAA
- (b) TCCACTTATCAAT
- (c) AAAGTTGA

図 20 T. pyriformis G L 株 rDNA の 3' 側非転写ヌーサー領域に存在する新しい反復配列

(1) タイプ VI 反復配列

8763

VI a — CTTA TTTCTGGATT TTAATA GATAAATA AACGCA AATAAGAA AACTTTAA TTAACCTA GTTCTTTC ATTTT
 * * * * *
 VI b — CATT TTTTGACAT TTTAATA GATAAATA TTGGCA ATTAAGGA AGGCTCA ACCCGG TGCCCTTC ATTAATTTA

8965

ATTTTATACATATATATAAATAAGGCTTTTATTCATGGATATTCTAATTCATCTTCTC-AAAAGCTTCAAAAT-CFC

 ATTTTATTTGATATATATACTAAGGCTAATGTA CTCACTGACATGGACATTTCTAATTTTAGTTCGCCCTAAAGCTT-AAAATGAGC

8919

T-ATGCATTTTATGTC-
 * * * * *
 TCATTTGTTGGATCC-

9122

図 2 1 T. thermophila B株の3'側非転写スペーサー領域

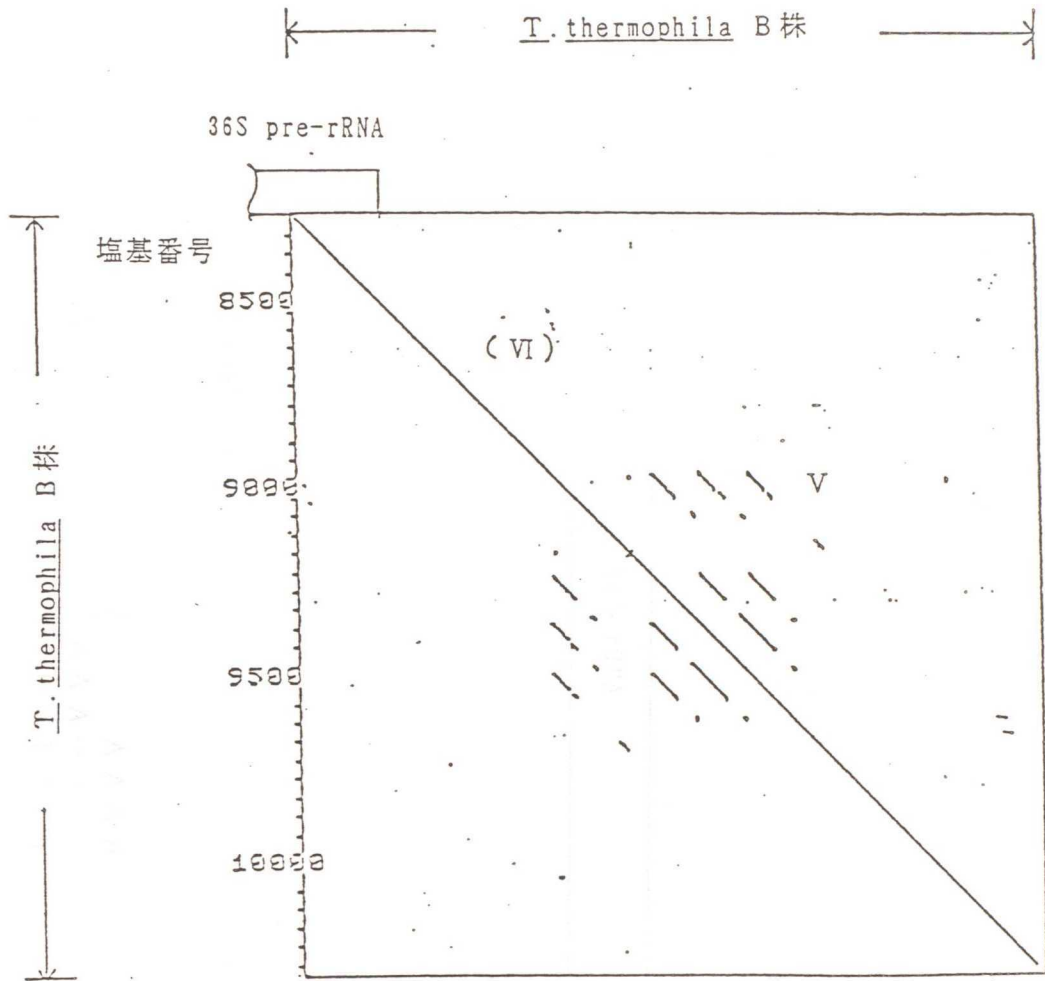
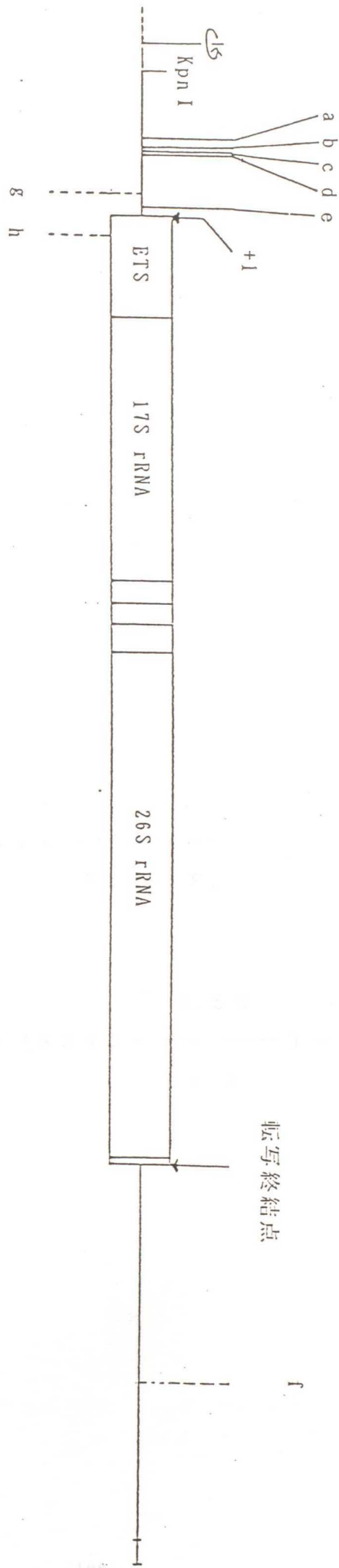


図 2 2 トポイソメラーゼ I の結合部位

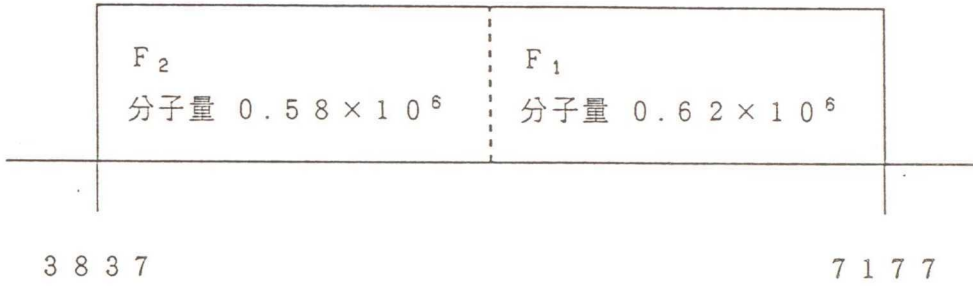


トポイソメラーゼ I の結合部位



図 2 3 hidden break部位

26 S rRNAコード領域

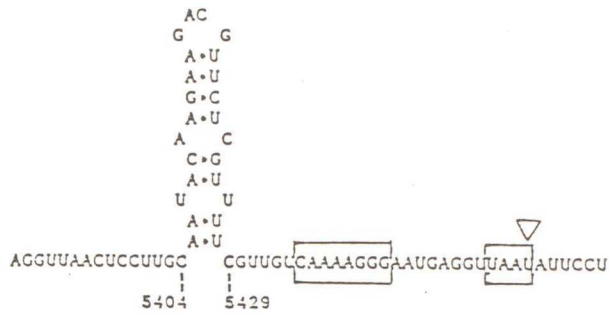


$$3836 + \left(3341 \times \frac{F_2}{F_2 + F_1} \right)$$

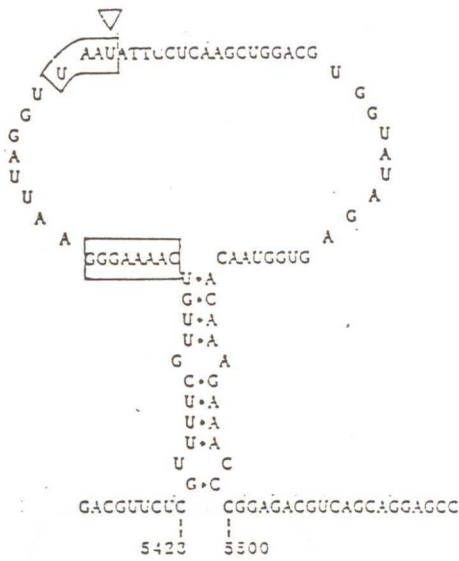
$$= 3836 + \left(3341 \times \frac{0.58}{1.2} \right) = 5451$$

図 2 4 予想したhidden break部位の近傍の構造

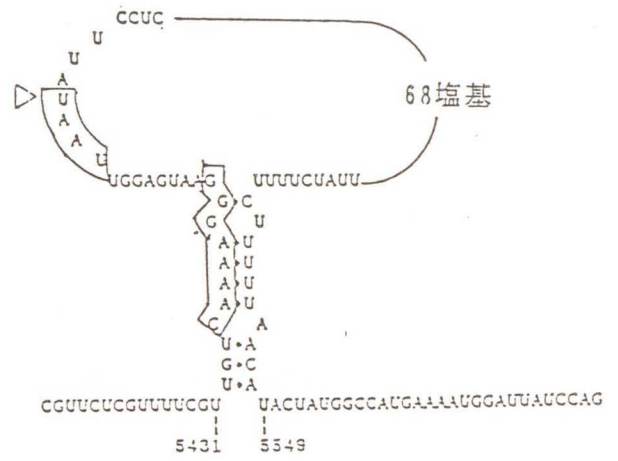
(1)



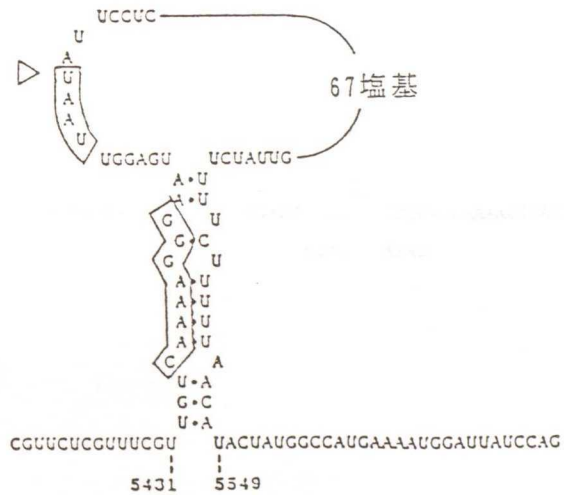
(2)



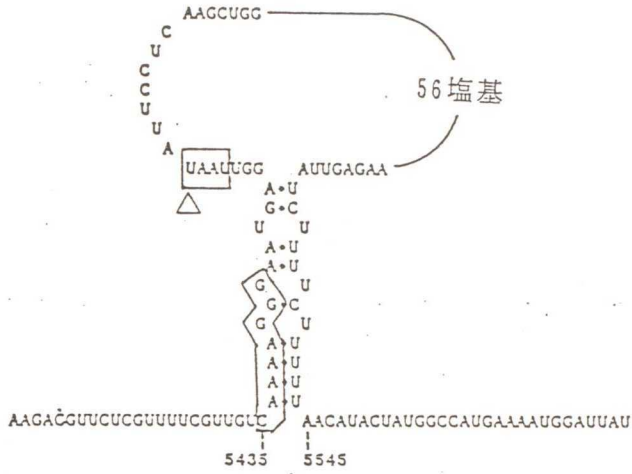
(3)



(4)



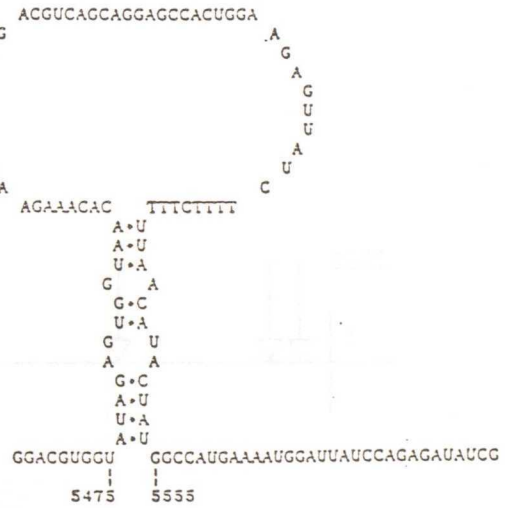
(5)



(6)



(7)

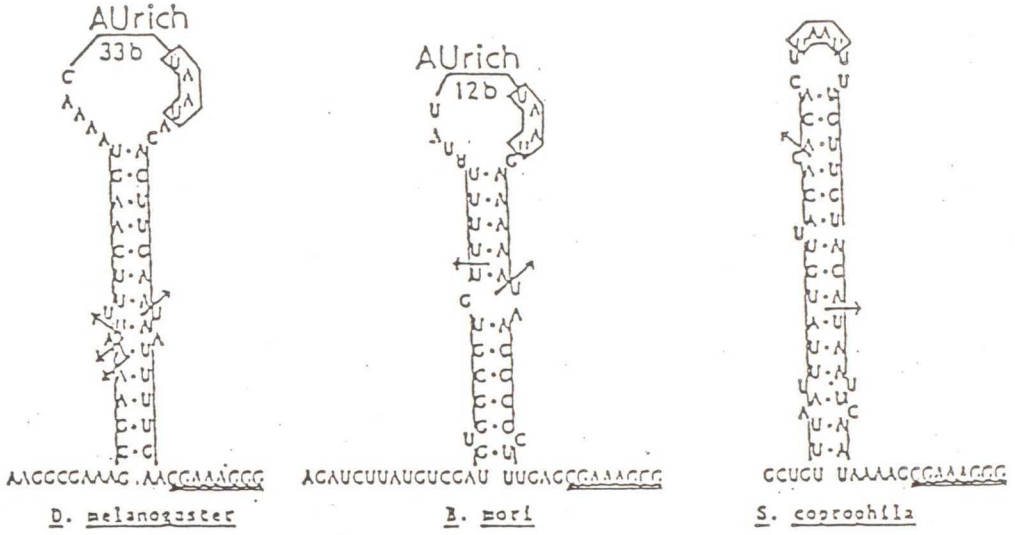


(a) UAAU (↓)

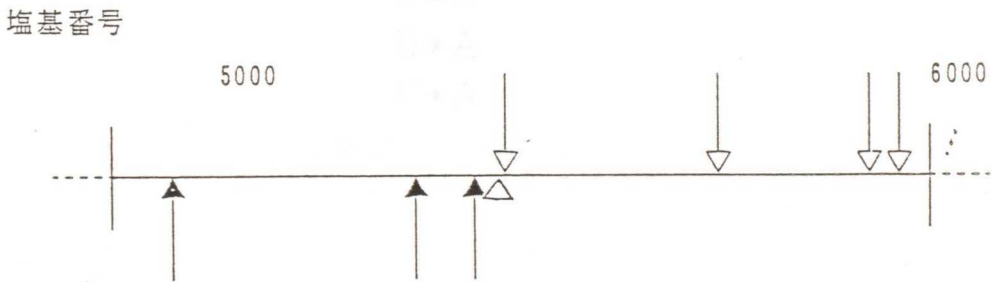
(b) GGAAAGGGに対して7塩基以上一致の塩基配列 (↑)

図 25 (A) hidden break部位

(1) 昆虫に見られるhidden break部位



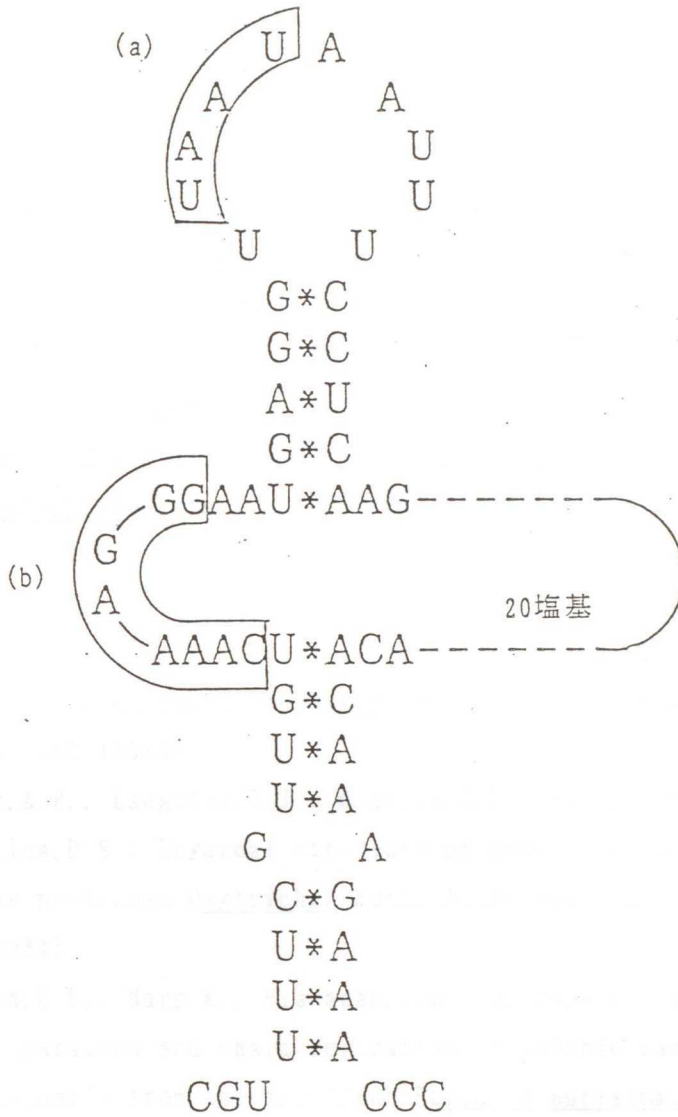
(2) 共通配列の検索



(a) UAAU (▽)

(b) CGAAAGGGに対して7塩基以上一致する
 塩基配列 (▲)

図 25 (B) 予想したhidden break部位の2次構造



参考文献

1. Yao, M.-C., and Gorovsky, M.A. : Comparison of the sequence of macro- and micronuclear DNA of Tetrahymena pyriformis. *Chromosoma* 48, 1-18 (1974).
2. Yao, M.-C., Kimmel, A.R., and Gorovsky, M.A. : A small number of cistrons for ribosomal RNA in the germinal nucleus of a eukaryote, Tetrahymena pyriformis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 3082-3086 (1974).
3. Iwamura, Y., Sakai, M., Mita, T., and Muramatsu, M. : Unequal gene amplification and transcription in the macronucleus of Tetrahymena pyriformis. *Biochemistry* 18, 5289-5294 (1979)
4. Altschuler, M. I., and Yao, M.-C. : Macronuclear DNA of Tetrahymena thermophila exists as defined subchromosomal-sized molecules. *Nucl. Acids Res.* 13, 5817-5831 (1985).
5. Laughlin, T. J., Herrmann, A. L., and Olins, D. E. : Fractionation of the gene-size macronuclear chromatin fragments of the binucleated eukaryote Oxytricha. *Mol. Cell. Biochem.* 62, 157-163 (1984).
6. Butler, A. P., Laughlin, T. J., Cadilla, C. L., Henry, J. M., and Olins, D. E. : Physical structure of gene-sized chromatin from the protozoan Oxytricha. *Nucl. Acids Res.* 12, 3201-3217 (1984).
7. Cadilla, C. L., Harp, K., Flanagan, J. M., Olins, A. L., and Olins, D. E. : Preparation and characterization of soluble macronuclear chromatin from the hypotrich Euplotes eurystomus. *Nucl. Acids Res.* 14, 823-841 (1986).
8. Cadilla, C. L., Roberson, A. E., Harp, J., Olins, A. L., and Olins, D. E. : Subfractionation of soluble macronuclear chromatin and enrichment of specific genes as chromatin from Euplotes eurystomus. *Nucl. Acids Res.* 14, 8501-8512 (1986).
9. Katzen, A. L., Cann, G. M., and Blackburn, E. H. : Sequence-specific fragmentation of macronuclear DNA in a holotrichous ciliate. *Cell* 24, 313-320 (1981).

10. Blackburn, E.H., and Gall, J.G.: A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA gene in Tetrahymena. J. Mol. Biol. 120, 33-53 (1978).
11. Klobutcher, L.A., Swanton, M.T., Donini, P., and Prescott, D.M.: All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and unusual 3' terminus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3015-3019 (1981).
12. Oka, Y., Shiota, S., Nakai, S., Nishida, Y., and Okubo, S.: Inverted terminal repeat sequence in the macronuclear DNA of Stylonychia pustulata. Gene 10, 301-306 (1980).
13. Van der Ploeg, L.H., Liu, A.Y.C., and Borst, P.: Structure of the growing telomeres of Trypanosomes. Cell 36, 459-468 (1984).
14. Yao, M.-C., and Yao, C.-H.: Repeated hexanucleotide C-C-C-C-A-A is present near free ends of macronuclear DNA of Tetrahymena. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7436-7439 (1981).
15. Johnson, E.M.: A family of inverted repeat sequences and specific single-strand gaps at the termini of the Physarum rDNA palindrome. Cell 22, 875-886 (1980).
16. Emery, H.S., and Weiner, A.M.: An irregular satellite sequence is found at the termini of the linear extrachromosomal rDNA in Dictyostelium discoideum. Cell 26, 411-419 (1981).
17. Blackburn, E.H., Budarf, M.L., Challoner, P.B., Cherry, J.M., Howard, E.A., Katzen, A.L., Pan, W.-C., and Ryan, T.: DNA termini in ciliate macronuclei. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47, 1195-1207 (1983).
18. Roberts, L.: Chromosomes, The ends in view. Science 240, 982-983 (1988).
19. Allshire, R.C., Gosden, J.R., Cross, S.H., Cranston, G., Rout, D., Sugawara, N., Szostak, J.W., Fantes, P.A., and Hastie, N.D.: Telomeric repeat from T. thermophila cross hybridizes with human telomeres. Nature 322, 656-659 (1988).
20. Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, L.L., Jones, M.D., Meyne, J., Ratliff, R.L., and Wu, J.-R.: A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA

- 85, 6622-6626 (1988).
21. Spangler, E. A., Ryan, T., and Blackburn, E. H. : Developmentally regulated telomere addition in Tetrahymena thermophila. Nucl. Acids Res. 16, 5569-5585 (1988).
 22. Greider, C. W., and Blackburn, E. H. : Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extract. Cell 43, 405-413 (1985).
 23. Gall, J. G. : Free ribosomal RNA genes in the macronucleus of Tetrahymena. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3078-3081 (1974).
 24. Karrer, K. M., and Gall, J. G. : The macronuclear ribosomal DNA of Tetrahymena pyriformis is a palindrome. J. Mol. Biol. 104, 421-453 (1976).
 25. Engberg, J., Andersson, P., Leick, V., and Collins, J. : Free ribosomal DNA molecules from Tetrahymena pyriformis GL are giant palindromes. J. Mol. Biol. 104, 455-470 (1976).
 26. Yao, M.-C., and Gall, J. G. : A single integrated gene for ribosomal RNA in a eucaryote, Tetrahymena pyriformis. Cell 12, 121-132 (1977).
 27. Yao, M.-C. : Ribosomal RNA gene amplification in Tetrahymena may be associated with chromosome breakage and DNA elimination. Cell 24, 765-774 (1981).
 28. Yao, M.-C., Zhu, S.-G., and Yao, C.-H. : Gene amplification in Tetrahymena thermophila / Formation of extrachromosomal palindromic genes coding for rRNA. Mol. Cell. Biol. 5, 1260-1267 (1985).
 29. Niles, E. G. : Isolation of a high specific activity 35S ribosomal RNA precursor from Tetrahymena pyriformis and identification of its 5' terminus, pppAp. Biochemistry 17, 4839-4844 (1978).
 30. Saiga, H., Mizumoto, K., Matsui, T., and Higashinakagawa, T. : Determination of the transcription initiation site of Tetrahymena pyriformis rDNA using in vitro capping of 35S pre-rRNA. Nucl. Acids Res. 10, 4223-4236 (1982).
 31. Eckert, W. A., Kaffenberger, W., Krohne, G., and Franke, W. W. : Introduction of hidden breaks during rRNA maturation and ageing in Tetrahymena pyriformis. Eur. J. Biochem. 87,

- 607-616 (1978).
32. Niles, E.G., and Jain, R.K.: Physical map of the ribosomal ribonucleic acid gene from Tetrahymena pyriformis. *Biochemistry* 20, 905-909 (1981).
 33. Din, N., and Engberg, J.: Extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena / Structure and evolution. *J. Mol. Biol.* 134, 555-574 (1979).
 34. Cech, T.R., and Rio, D.C.: Localization of transcribed regions on extrachromosomal ribosomal RNA genes of Tetrahymena thermophila by R-loop mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5051-5055 (1979).
 35. Bostock, C.J., Prescott, D.M., and Lauth, M.: Lability of 26S ribosomal RNA in Tetrahymena pyriformis. *Exp. Cell Res.* 66, 260-262 (1971).
 36. Ishikawa, H., and Newburgh, R.W.: Studies of thermal conversion of 28 S RNA of Galleria mellonella(L.) to an 18 S product. *J. Mol. Biol.* 64, 135-144 (1972).
 37. Ware, V.C., Renkawitz, R., and Gerbi, S.A.: rRNA processing / removal of only nineteen bases at the gap between 28S α and 28S β rRNAs in Sciara coprophila. *Nucl. Acids Res.* 13, 3581-3597 (1985).
 38. Fujiwara, H., and Ishikawa, H.: Molecular mechanism of introduction of the hidden break into the 28S rRNA of insects / implication based on structural studies. *Nucl. Acids Res.* 14, 6393-6401 (1986).
 39. Higashinakagawa, T., Sezaki, M., and Kondo, S.: Isolation of nucleoli from Tetrahymena pyriformis. *Develop. Biol.* 69, 601-611 (1979).
 40. Sutiphong, J., Matzura, C., and Niles, E.G.: Characterization of a crude selective PolI transcription system from Tetrahymena pyriformis. *Biochemistry* 23, 6319-6326 (1984).
 41. Matsuura, T., Matsui, T., Saiga, H., Mita, T., and Higashinakagawa, T.: Faithful initiation of the in vitro transcription of a cloned rDNA from Tetrahymena pyriformis. *Gene* 49, 225-233 (1986).

42. Higashinakagawa, T., Sakaki, Y., Iio, M., Saiga, H., and Mita, T.: Cloning of DNA fragment coding for Tetrahymena ribosomal RNA with Escherichia coli plasmid pBR322. J. UOEH 2, 449-462 (1980).
43. Henikoff, S.: Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. Gene 28, 351-359 (1984).
44. Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J.: Improved M13 phage cloning vectors and host strains / nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33, 103-119 (1985).
45. Birnboim, H. C., and Doly, J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7, 1513-1523 (1979).
46. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467 (1977).
47. Hattori, M., and Sakaki, Y.: Dideoxy sequencing method using denatured plasmid templates. Anal. Biochem. 152, 232-238 (1986).
48. Tabor, S., and Richardson, C.C.: DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4764-4771 (1987).
49. Kristensen, T., Voss, H., Schwager, C., Stegemann, J., Sproat, B., and Ansorge, W.: T7 DNA polymerase in automated dideoxy sequencing. Nucl. Acids Res. 16, 3487-3496 (1988).
50. Mizusawa, S., Nishimura, S., and Seela, F.: Improvement of the dideoxy chain termination method of DNA sequencing by use of deoxy-7-deazaguanosine triphosphate in place of dGTP. Nucl. Acids Res. 14, 1319-1324 (1986).
51. Niles, E.G., Sutiphong, J., and Haque, S.: Structure of the Tetrahymena pyriformis rRNA gene / nucleotide sequence of the transcription initiation region. J. Biol. Chem. 256, 12849-12856 (1981).
52. Niles, E.G., Cunningham, K., and Jain, R.: Structure of the Tetrahymena pyriformis rRNA gene / nucleotide sequence of the

- transcription termination region. J. Biol. Chem. 256, 12857-12860 (1981).
53. Engberg, J.: Strong sequence conservation of a 38bp region near the center of the extrachromosomal rDNA palindrome in different Tetrahymena species. Nucl. Acids Res. 11, 4939-4946 (1983).
 54. Van Bell, C. T.: The 5S and 5.8S ribosomal RNA sequences of Tetrahymena thermophila and T. pyriformis. J. Protozool. 32, 640-644 (1985).
 55. Baroin, A., Perasso, R., Qu, L.-H., Brugerolle, G., Bachellerie, J.-P., and Adoutte, A.: Partial phylogeny of the unicellular eukaryotes based on rapid sequencing of a portion of 28S ribosomal RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 3474-3478 (1988).
 56. Higashinakagawa, T., Saiga, H., Shintani, N., Narushima-Iio, M., and Mita, T.: Localization of putative transcription initiation site on the cloned rDNA fragment of Tetrahymena pyriformis. Nucl. Acids Res. 9, 5905-5916 (1981).
 57. Niles, E. G.: Identification of multiple sites in the promoter region of the Tetrahymena pyriformis rRNA gene which bind the Escherichia coli catbolite regulatory protein. J. Biol. Chem. 260, 672-678 (1985).
 58. Niles, E. E.: 5'- and 3'-terminal nucleotide sequences of Tetrahymena pyriformis 17S rRNA. Biochemistry 16, 2380-2383 (1977).
 59. Challoner, P. B., Amin, A. A., Pearlman, R. E., and Blackburn, E. H.: Conserved arrangements of repeated DNA sequences in nontranscribed spacers of ciliate ribosomal RNA genes / evidence for molecular coevolution. Nucl. Acids Res. 13, 2661-2680 (1985).
 60. Engberg, J., Din, N., Saiga, H., and Higashinakagawa, T.: Nucleotide sequence of the 5'-terminal coding region for pre-rRNA and mature 17S rRNA in Tetrahymena thermophila rDNA. Nucl. Acids Res. 12, 959-972 (1984).
 61. Staden, R.: An interactive graphics program for comparing and aligning nucleic acid and amino acid sequences. Nucl. Acids

- Res. 10, 2951-2961 (1982).
62. Andersen, A. H., Gocke, E., Bonven, B. J., Nielsen, O. F., and Westergaard, O.: Topoisomerase I has a strong binding preference for a conserved hexadecameric sequence in the promotor region of the rRNA gene from Tetrahymena pyriformis. Nucl. Acids Res. 13, 1543-1557 (1985).
 63. Bonven, B. J., Gocke, E., and Westergaard, O.: A high affinity topoisomerase I binding sequence is clustered at DNAase I hypersensitive sites in Tetrahymena r-chromatin. Cell 41, 541-551 (1985).
 64. 東中川徹 : 「遺伝子観察への旅」山岸秀夫 編 東京大学出版会 pp189-191 (1981).
 65. Maxam, A. M., and Gilbert, W.: A new method for sequencing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560-564 (1977)

第5章 謝 辞

本論文にまとめた研究は、三菱化成生命科学研究所発生生物学研究部、東中川徹博士の指導のもとに行ったものです。東中川 徹博士は、未熟な私を根気よく指導して下さいました。心より感謝致します。また同研究部の皆様の暖かい応援に何度となく助けられました。特に槇田 直子さんは、技術的な相談相手として多くの貴重な意見を聞かしてくれました。心より感謝致します。指導教授の麻布大学分子生物学研究室、藤谷 英男教授は、三菱生命研で研究をしたいという私の我がままを快く許し、そのうえ折りにふれては力強く励まして下さいました。心より感謝致します。また同研究室の皆様の協力のおかげで論文をまとめることができました。心より感謝致します。なお、本研究は、三菱化成生命科学研究所より援助を受けて行いました。

1989年3月