

報告番号 甲第 3875 号

植物 tRNA 遺伝子の無細胞転写・プロ
セッシング系の開発と特性解析

名古屋大学大学院理学研究科
(遺伝子実験施設)

湯川 泰

要旨

これまで、植物における tRNA 遺伝子の転写の分子機構に関する研究は、ほとんど皆無であった。それは、tRNA 遺伝子が内部プロモーターを有するため既存のレポーター融合遺伝子による *in vivo* での転写解析では対応できなかったことと、植物に利用可能な無細胞 (*in vitro*) 転写系が存在しなかったことが主因である。そこで、植物 tRNA 遺伝子の *in vitro* 転写系の確立をめざした。

タバコ培養細胞 BY-2 株の単離核からの抽出液の調製法を全面的に再検討し、極めて転写活性の高い抽出液を再現性よく得る方法を開発した。ついで、シロイヌナズナの tRNA^{Scr} 遺伝子を用いて、この核抽出液で効率的に転写する反応条件を決定した。これらにより、tRNA 遺伝子を含む環状プラスミド DNA を鋳型として核抽出液中の RNA ポリメラーゼ III によって正確な転写開始と終結により tRNA 分子が合成され、これを電気泳動で直接検出することが可能となった。この *in vitro* 転写系を使用して、インゲンマメの tRNA^{Lsu} 遺伝子のプロモーター因子について詳細に解析したところ、5' 側上流に存在する TATA 様配列や CAA 配列がプロモーター因子として転写効率に関わっていることを明らかにした。

また、このタバコ培養細胞の *in vitro* 転写系は、合成された前駆体 tRNA のプロセッシングやスプライシングの活性も有していることを明らかにした。前駆体 tRNA の 5' 末端のプロセッシングは転写と同時に速い反応として起きるため、*in vivo* の実験では tRNA 遺伝子の転写開始点を正確に決定することは極めて困難である。そこで、この核抽出液をもとに硫酸沈殿による分画で、前駆体 tRNA の 5' 末端のプロセッシングに関与する RNase P 活性を部分分離し、前駆体 tRNA の正確な転写開始点と 5' 末端のプロセッシング点を同定することに成功した。

tRNA スプライシングの活性は転写と比べ遅い反応であったため、転写の反応条件そのままでは検出には不十分であった。そこでスプライシングに適する反

応条件をルスチカタバコの tRNA^{Tyr} 遺伝子を使って決定した。転写至適条件とスプライシング至適条件の大きな違いはマグネシウムイオン濃度であった。スプライシング反応には転写反応よりも高濃度のマグネシウムイオンが必要であった。この結果を踏まえ転写とスプライシングを両立する条件で反応を行い、イントロンを含むシロイヌナズナの tRNA^{Tyr} 遺伝子と tRNA^{Met} 遺伝子を使用して、正確に転写とスプライシングが進行することを確認した。また、反応系の組成を巧みに変えることにより、転写活性とスプライシング活性を合わせ持つ核抽出液であっても転写とスプライシングを分けて解析できる方法を確立した。

本研究で確立したタバコ培養細胞由来の *in vitro* 系により、植物の tRNA 遺伝子の転写からプロセッシングおよびスプライシングまでを総合的に解析することが可能となった。

目次

第1章 緒言	1
第2章 材料と方法	7
1 植物材料	7
2 鋳型 DNA	7
3 核抽出液の調製	8
4 核抽出液からの 5'プロセッシング活性の分離	9
5 <i>in vitro</i> 転写解析	10
5-1 フルサイズ転写	
5-2 プライマー伸長法解析	
6 <i>In vitro</i> スプライシング解析	12
6-1 転写との同時反応	
6-2 転写活性との分離反応	
7 ノーザン・ハイブリダイゼーション解析	12
第3章 結果	14
1 植物 tRNA 遺伝子の <i>in vitro</i> 転写系の開発	14
1-1 タバコの核抽出液の tRNA 遺伝子転写活性	
1-2 フルサイズ転写系への改良	
1-3 tRNA 遺伝子転写反応の至適条件	
2 植物 tRNA 遺伝子の 5' 領域のプロモーター機能	19
2-1 tRNA 遺伝子の 5' 上流領域の改変の影響	
2-2 tRNA 遺伝子の 5' 上流領域の GC 含量の影響	

ミトコンドリアと葉緑体の中に、核ゲノムコードのファージ型の RNA ポリメラーゼが存在することも明らかになってきた (Hedtke et al., 1997)。葉緑体中にはさらに、ファージ型とは異なる核由来の別の RNA ポリメラーゼが存在することも推測されている (Kapoor et al., 1997)。

遺伝子の中にはタンパク質をコードせず、mRNA 以外の機能を持つ RNA をコードするものも多くある。これらの RNA のうちで、翻訳に関与する代表的なものに rRNA と tRNA がある。rRNA はタンパク質と複合体をなしてリボソームを構成し、tRNA はポリペプチド合成の際に、リボソームにアミノ酸を運び転移する役割を持っている。tRNA は 73 ～ 93 ヌクレオチド (nt) の低分子 RNA で、それぞれが一つのアミノ酸を受容する。1 種類のアミノ酸に複数の tRNA が対応することがあるので、細胞質中には 40 ～ 60 種の tRNA が存在する。植物細胞においては、細胞質と葉緑体とミトコンドリアにそれぞれに固有の 1 セットの tRNA 種が存在する。このうち、細胞質の全 tRNA 種とミトコンドリアの一部の tRNA 種の遺伝子は核ゲノムに存在し Pol III により転写されると考えられている。

真核生物の tRNA 遺伝子の転写研究はこれまで、哺乳類や酵母の系で詳細に行われてきた。その結果、tRNA 遺伝子のプロモーターは上流にはなく tRNA 転写領域内に位置し、tRNA の D ループおよび T ψ C ループをコードする領域内の A-ボックスと B-ボックスの 2 配列が転写開始に必須であることが明らかになった。Pol III の基本転写因子である TFIIC が、A-ボックスおよび B-ボックスに結合し、さらに TATA-結合タンパク質 (TBP) を含む因子 TFIIB と複合体を形成することにより、Pol III のエンタリーを誘導し転写が開始される。

植物の場合、tRNA 遺伝子の転写機構の研究例はほとんど皆無といってよい。その理由はおそらく、植物の *in vitro* 転写系の欠如によるところが多い。植物細胞や植物個体を用いた *in vivo* による tRNA 遺伝子転写の解析は、tRNA 遺伝子のプロモーターが転写領域内に存在するため、Pol II 依存遺伝子の転写解析で一般的な

密な解釈が困難である。そこで、本研究で確立した *in vitro* 転写系を用いて、植物の tRNA 遺伝子の 5' 側の 5' 側の上流領域に正の制御の働きがあることを明らかにした。

tRNA 遺伝子はまず tRNA 前駆体として転写され、プロセッシングを経て成熟 tRNA となる。生体内では極めて速くプロセッシングが進行するため、*in vivo* で転写開始点や終止点を同定することは困難である。そこで本研究で確立した *in vitro* 転写系を、さらに生化学的手法で転写活性と 5' 末端のプロセッシング活性が分離できるように改良し、植物の tRNA 遺伝子の転写開始点を正確に同定した。

tRNA 遺伝子のいくつかは、イントロンを持つことが知られている。植物では、藻類から高等植物までの tRNA^{Tyr} 遺伝子が 11 ～ 25 bp のイントロンを (Stange and Beier, 1986; Stange et al., 1991; Fuchs et al., 1992; Akama et al., 1997)、ダイズとシロイヌナズナの tRNA^{Met} 遺伝子がともに 11 bp のイントロンを持つことが知られている (Waldron et al., 1985; Akama and Kashihara, 1996)。tRNA スプライシングは、核内でスプライシング・エンドヌクレアーゼと tRNA リガーゼの働きにより行われる。その際に tRNA の 3 次構造や特定の塩基の修飾が重要であるといわれている (Phizicky and Greer, 1993; Wesaway and Abelson, 1995)。これまで、酵母と哺乳類で前駆体 tRNA のスプライシングの機構が詳細に解析されており、植物は哺乳類よりは酵母に近い機構でスプライシングされると考えられている (van Tol et al., 1987; Goodall et al., 1991)。植物では、コムギ胚芽由来の *in vitro* tRNA スプライシング系が開発されており、植物の前駆体 tRNA のスプライシングについて多くの知見が得られている (Stange and Beier, 1987; van Tol et al., 1987; Stange et al., 1988, 1991, 1992)。しかし、強いスプライシング活性を持つコムギ胚芽の系に唯一の弱点がある。それは、信頼性の高い植物の *in vitro* 転写系が存在しなかったため、転写を HeLa 細胞の *in vitro* 系に依存していたことである。転写やプロセッシング、スプライシングは、核内で連続的に行われている過程で、核内での正しい反応と機構を調べるのに、前者と後者の反応を別々の系で行うのでは無理がある。本研究で確立した *in vitro* 系はスプ

ライシグも行うことを初めて明らかにした。

本研究により、高等植物の tRNA 遺伝子の発現 - 転写・プロセッシング・スプライシグーを総合的に解析することが可能となった。

第2章 材料と方法

1 植物材料

転写・プロセッシング活性を有する核抽出液調製用の材料として、タバコ *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2 の実生由来カルスより誘導された培養細胞 BY-2 を使用した。BY-2 細胞は長田らの方法 (Nagata et al., 1992) に従い、 KH_2PO_4 を 370 mg/l、チアミン-HCl を 1 mg/l、2,4-D を 0.2 mg/l、シヨ糖を 3% にした改変 Linsmaier and Skoog (LS) 培地 100 ml に毎週 100 倍希釈して継代維持した。26 °C 恒温の暗条件下で 130 rpm の回転で培養した。

2 鋳型 DNA

転写鋳型として使用したプラスミドは全て環状 DNA 分子で、詳細は別表にまとめた (付録 1)。In vitro 転写活性検定用として、Pol II についてはタバコの β -1,3-グルカナーゼ 遺伝子のプロモーター配列を含む pGNPS を使用し、Pol III についてはシロイヌナズナの U6 snRNA 遺伝子のプロモーター配列を含む pBAU6-28 を使用した (Fan et al., 1995)。

tRNA の転写用としては、ドイツのバイエルン・ユリウス・マクシミリアン大学の H. Beier 博士より分譲いただいたシロイヌナズナの tRNA^{Ser} (AGA) 遺伝子を含む pAtS5 と pAtS6 を使用した (Beier and Beier, 1992)。

tRNA 遺伝子の 5'上流領域のプロモーター因子的確認は、インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) の tRNA^{Leu} (CAA) 遺伝子をもとに、in vivo 系の翻訳抑制法用に作成された tRL/AMBER [tRNA^{Leu} (CUA)] と、それをもとに配列を変えて作成された一群の変異遺伝子を使用した。これらはフランス農学研究所の I. Small 博士より分譲いただいた (Choisne et al., 1998)。

前駆体 tRNA のスプライシングに関しては、H. Beier 博士より分譲いただいた

Nicotiana rustica の tRNA^{Tyr} 遺伝子を含む pNtY1 とシロイヌナズナの tRNA^{Tyr} 遺伝子を含む pAtY6-I、pAtY6-II、pBSY6-I (Stange et al., 1991)、さらに島根大学の赤間博士より分譲いただいたシロイヌナズナの tRNA^{Met} 遺伝子を含む pAtM-1、pAtM-6、pAtM-8、pMet-i を使用した (Akama and Tanifuji, 1989; Akama and Kashihara, 1996)。

3 核抽出液の調製

核抽出液調製用のタバコ BY-2 培養細胞は、7日間培養して定常期に達した BY-2 細胞 12 ml ずつを、500 ml の改変 LS 培地の入った 2 ℓ フラスコ 3 本に植え継ぎ、26 °C 恒温の暗条件下で 130 rpm で回転培養した。76 ~ 80 時間培養して対数増殖期に達した細胞 (約 180 g) は、ミラクロス (Calbiochem, 米国) で濾過回収し、酵素溶液 [2 % セルラーゼ 'Onozuka' RS (ヤクルト)、0.2 % ペクトリアーゼ Y-23 (盛進製薬)、0.38 M マンニトール、改変 LS 培地、pH 5.5] 500 ml 中で 30 °C、40 ~ 60 分間消化し、プロトプラスト化した。プロトプラストは、氷冷した 0.38 M マンニトール 700 ml で 2 回洗浄し、遠心回収した細胞のペレットをさらに 100 ml の氷冷 0.38 M マンニトールに懸濁し、1.5 × 核単離バッファー (NIB) [1 × NIB = 15 mM HEPES-KOH pH 7.9、18 % (w/v) フィコール 400、4 mM MgSO₄、1 mM NaF、1 mM EGTA、0.5 mM EDTA、3 mM DTT、0.5 mM PMSF、0.5 mM ベンザミド、1.5 μg/ml ペプスタチン A、1 μg/ml ロイペプチン] 200 ml を加え、穏やかに混ぜ合わせた。その後、プロトプラスト懸濁液を口径 20 μm のナイロンメッシュ (Nytal HD-20、SST、スイス) 1 重で一度、2 重でもう一度吸引濾過し、プロトプラストを完全に破壊した。ろ液は、2500 × g、10 分、2 °C で遠心分離し、上清を注意深く吸引して廃棄し、遠心管にこびり付いた細胞残渣をティッシュペーパーでふき取り、沈殿を 1 × NIB に再び絵筆で優しく懸濁した。2500 × g、8 分、2 °C で遠心分離し、さらにもう一度、ペレットを 1 × NIB に懸濁し、2500 × g、5 分、2 °C で遠心分離して核を単離精製した。精製した単離核は、1.5 ~ 3 ml の核抽出バッファー (NEB) [25 mM HEPES-KOH

5-2 プライマー伸長法解析

In vitro 転写物のプライマー伸長法による検出は、転写を上記の条件からグリセロール濃度を 6.6 % (v/v)、鋳型環状プラスミド DNA 量を 0.4 pmol、NTP をそれぞれ 1 mM に変更し、さらに 10 U の腓膵リボヌクレアーゼ阻害剤 (宝酒造) と 1 mM の S-アデノシルメチオニンを加えて反応を行った。28 °C で 90 分の保温後、反応を 180 µl の脱イオン水で停止し、回収標準化マーカーとして [5'-³²P] DNA 断片 (PCR 増幅したタバコ葉緑体 *psbE*145 nt 断片、約 15,000 cpm) を加え、200 µl のフェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) 処理を 2 度、200 µl のクロロホルム : イソアミルアルコール (24 : 1) 処理を 1 度行った。水相を回収し、100 fmol の [5'-³²P] 標識プライマーを加え、0.1 容量の 3 M NaOAc と 2.2 容量の純粋エタノールを加えて沈殿させた。pAtS5 と pAtS6 のプライマーは tRNA 遺伝子のコード領域 (+55 ~ +82) に相当する ATSER (5'-dCGT GAA CGG CAG GAT TCG AAC CTG CGC-3'、28塩基) を、pGNPS と pBAU6-28 に対しては pBluescript II KS+ の配列 (+644 ~ +683) に対応する T7DKS (5'-dGGG CGA ATT GGA GCT CCA CCG CGG TGG CGG CCG CTC TAG A-3'、30塩基; Fan and Sugiura, 1995) を使用した。プライマーは T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造) と [γ -³²P]ATP を使って 5' 末端を標識した。10 分間、室温で置いた後、核酸を遠心分離により回収し、80 % エタノールで一度洗浄して乾燥した。沈殿は、10 µl の 1 × 逆転写酵素バッファ (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 8 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT) に溶解し、70 °C で 5 分間熱変性し、60 °C で 10 分間アニーリングを行った。室温に戻した後、10 µl の逆転写酵素カクテル [10 U AMV 逆転写酵素 (USB、米国)、10 U 腓膵リボヌクレアーゼ阻害剤、4 mM ピロリン酸ナトリウム、各 1 mM の dNTPs] を加えて 42 °C で 2 時間反応を行った。反応は 20 µl のサンプルバッファを加えることにより停止し、前述のように PAGE で解析を行う。DNA シークエンシングは同じ鋳型 DNA とプライマーを使用し、Thermo Sequenase (Amersham、英国) を使用したサイクルシークエン

第3章 結果

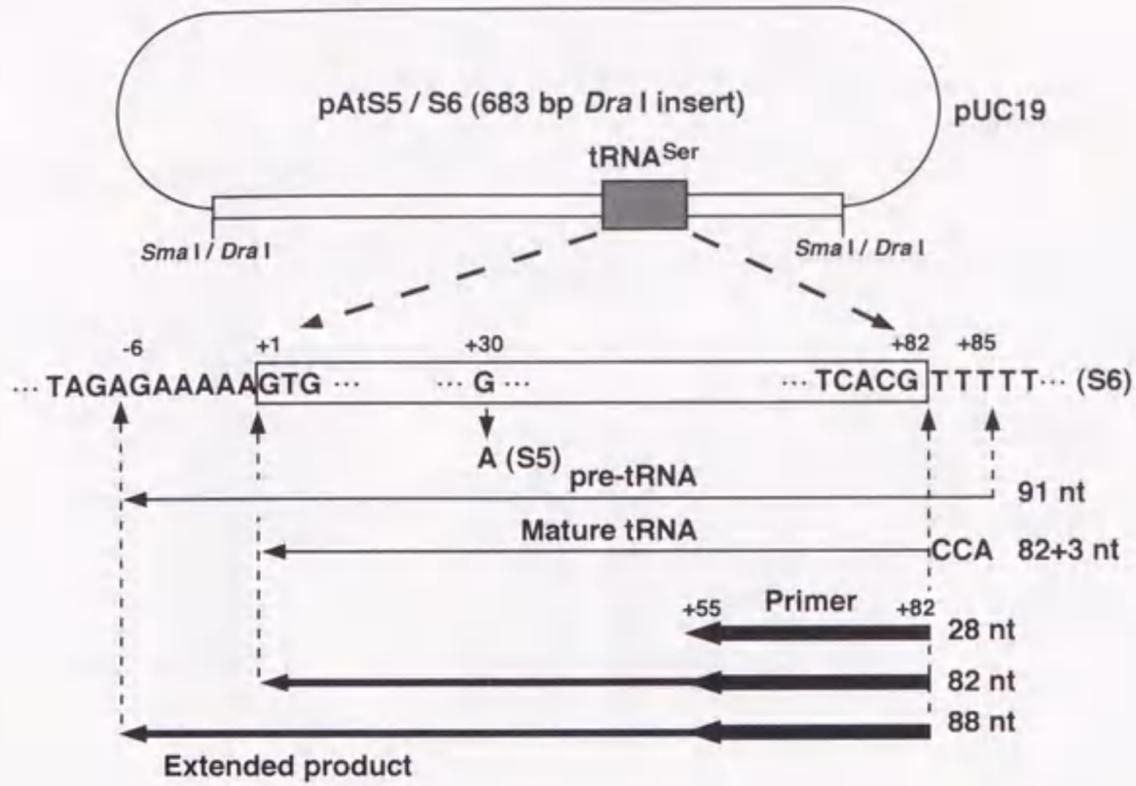
1 植物 tRNA 遺伝子の *in vitro* 転写系の開発

1-1 タバコの核抽出液の tRNA 遺伝子転写活性 (プライマー伸長法)

タバコ培養細胞 BY-2 由来の *in vitro* 転写系は、シロイヌナズナの U6 snRNA 遺伝子に対しても転写活性を示し、Pol III 活性を有することが示唆されていた (Fan et al., 1995)。したがって、Pol III で転写される tRNA 遺伝子も、この系で転写される可能性がある。そのことを確認するために、シロイヌナズナの tRNA^{Ser} 遺伝子を含むプラスミド AtS5 と AtS6 (Beier and Beier, 1992) を使用して、タバコの *in vitro* 系で転写させてみることにした。AtS5 と AtS6 の tRNA 遺伝子は、アンチコドンステムの 1 塩基を除いて (AtS5 の +30 が A であるのに対して AtS6 は G) は同じ配列である (付録 2)。HeLa 細胞と酵母の *in vitro* 転写系では、AtS5 と AtS6 ともに -6 の G の位置から転写が始まり、tRNA 遺伝子の 3' 下流領域に存在する T ストレッチからなるターミネーターで転写が終結し (+85 部位)、91 nt の前駆体 tRNA 分子を生成することが確認されている (図 1-A) (Beier and Beier, 1992)。この 2 種の tRNA 遺伝子を含む環状プラスミドを鋳型として、タバコの *in vitro* 転写系で転写反応を行い、tRNA^{Ser} の 3' 領域に相当する 28 nt のプライマー ATSER を使用して、プライマー伸長法による転写物の検出を行った (図 2-A)。AtS5 と AtS6 ともに 88、82、76 nt からなる 3 本のシグナルを確認できた。それぞれがすべて、コントロールとして使用した Pol II で転写される、β-1,3-グルカナーゼ遺伝子の転写を完全に阻害する濃度の α-アマニチン (0.3 μg/ml) に耐性であり、高濃度の α-アマニチン (100 μg/ml) に感受的であった。したがって、tRNA^{Ser} 遺伝子の転写が Pol III で行われたことを示している。

転写開始部位を正しく同定するため、同じ環状プラスミドとプライマーを使用

A



B

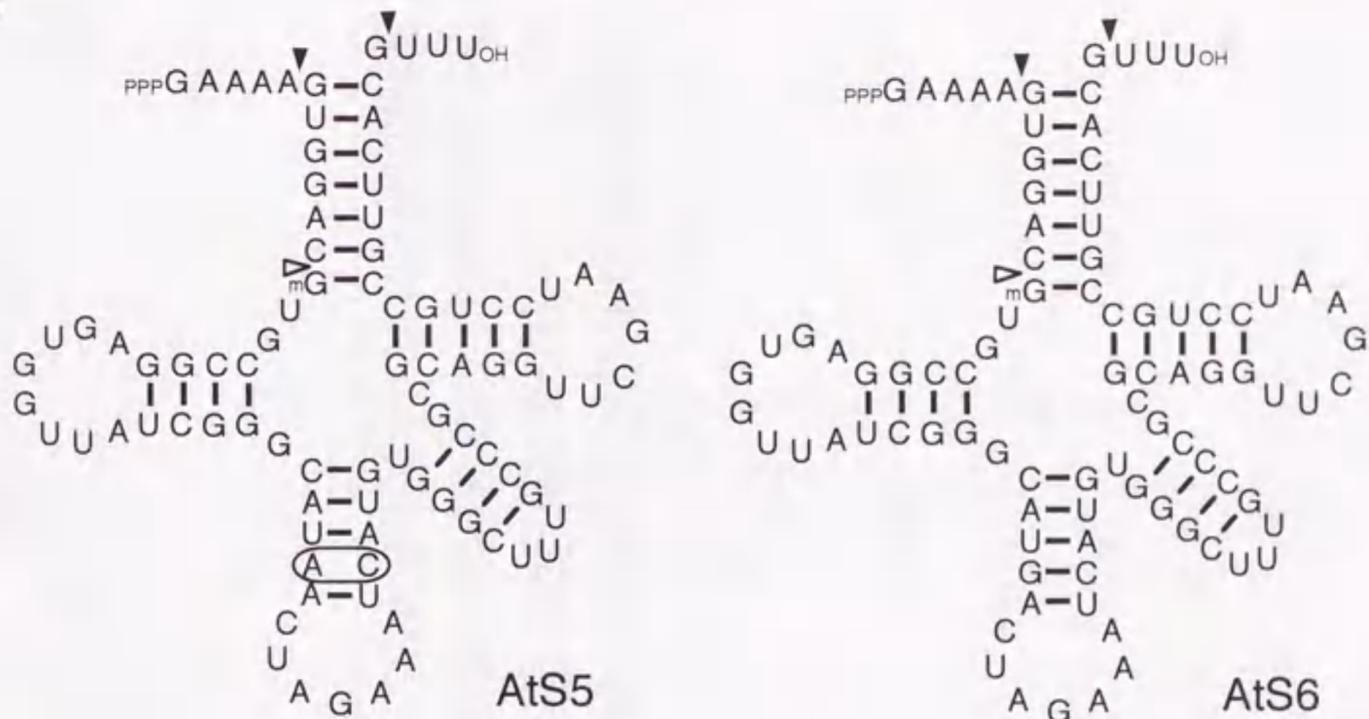


図1 シロイヌナズナの tRNA^{Ser} 遺伝子と tRNA^{Ser} 分子

A. シロイヌナズナの tRNA^{Ser} 遺伝子を含んだプラスミド pAtS5/S6 の概要図。AtS5 と AtS6 は、+30 の 1 塩基のみ異なる。細い矢印は、HeLa 細胞の *in vitro* 転写系で合成された tRNA 分子を示し、91 nt の前駆体 tRNA と 3' 末端に CCA のついた 85 nt の成熟 tRNA を生成する (Beier and Beier, 1992)。太い矢印は、タバコの系の確認に使用した、プライマー伸長法の概要を示す。28 nt のプライマーより、前駆体に対して 82 nt、成熟体に対して 88 nt の伸長産物を生ずる。

B. pAtS5/S6 遺伝子より生成される tRNA 分子。AtS5 は丸印で囲ったところがミスマッチとなる。黒矢印はプロセッシング点を、白ぬき矢印はメチルグアノシンによる逆転写反応の停止点を示す。

る。それは、単にベクター由来の配列が転写制御配列として働いた、もしくは単純に配列の GC 含量が影響しているという可能性である。これらの説明を否定するために、以下のクローンをを用いた実験を行った。 $\Delta 7EK$ は $\Delta 7$ をもとに、ベクターを pBluescript II KS- から pBluescript II KS+ に組換えたものである。この $\Delta 7EK$ をもとに、tRNA^{Leu} 遺伝子の -29 領域より 5' 側を、シロイヌナズナ由来の AT リッチ配列 (73% AT 含量) と置き換えた AT16、AT18 と、細菌の一種 *Bordetella pertussis* 由来の GC リッチ配列 (66% GC 含量) に置き換えた BP7、BP17 を使用して転写量を比較した (図 9-B)。AT16、AT18 の AT リッチ配列が $\Delta 7EK$ より転写量が増加しているが、BP17 も同等のレベルにあり、ベクター配列および CG 含量が、直接に転写量に関わるという可能性は否定できる。

3 植物 tRNA のプロセッシング・スプライシング系の開発

前駆体として転写された tRNA は、核内で様々なプロセッシングを受けて機能的な成熟 tRNA となる。しかし、*in vivo* では前駆体 tRNA のプロセッシングは極めて速く進行するため、前駆体 tRNA は生体内にほとんど蓄積せず、詳細なプロセッシング過程の解析は困難である。したがって、プロセッシング機構の解析を可能とする *in vitro* 系が必須である。以下に、BY-2 細胞の核抽出液がこれらプロセッシング活性を合わせ持ち、*in vitro* 系で転写とプロセッシングを同時に解析することが可能であることを示す。

3-1 5' 末端プロセッシング活性の分離

第 3 章で、*in vitro* 系で転写した tRNA^{Ser} (AtS6) が、成熟 tRNA のサイズ (85 nt) であったことを述べた。またプライマー伸長法解析 (図 2) によつては、5' 末端のプロセッシングが確認できた。以上の結果は、タバコの核抽出液に RNase P 活性が含まれていることを示している。この RNase P 活性について、タバコと HeLa 細胞の

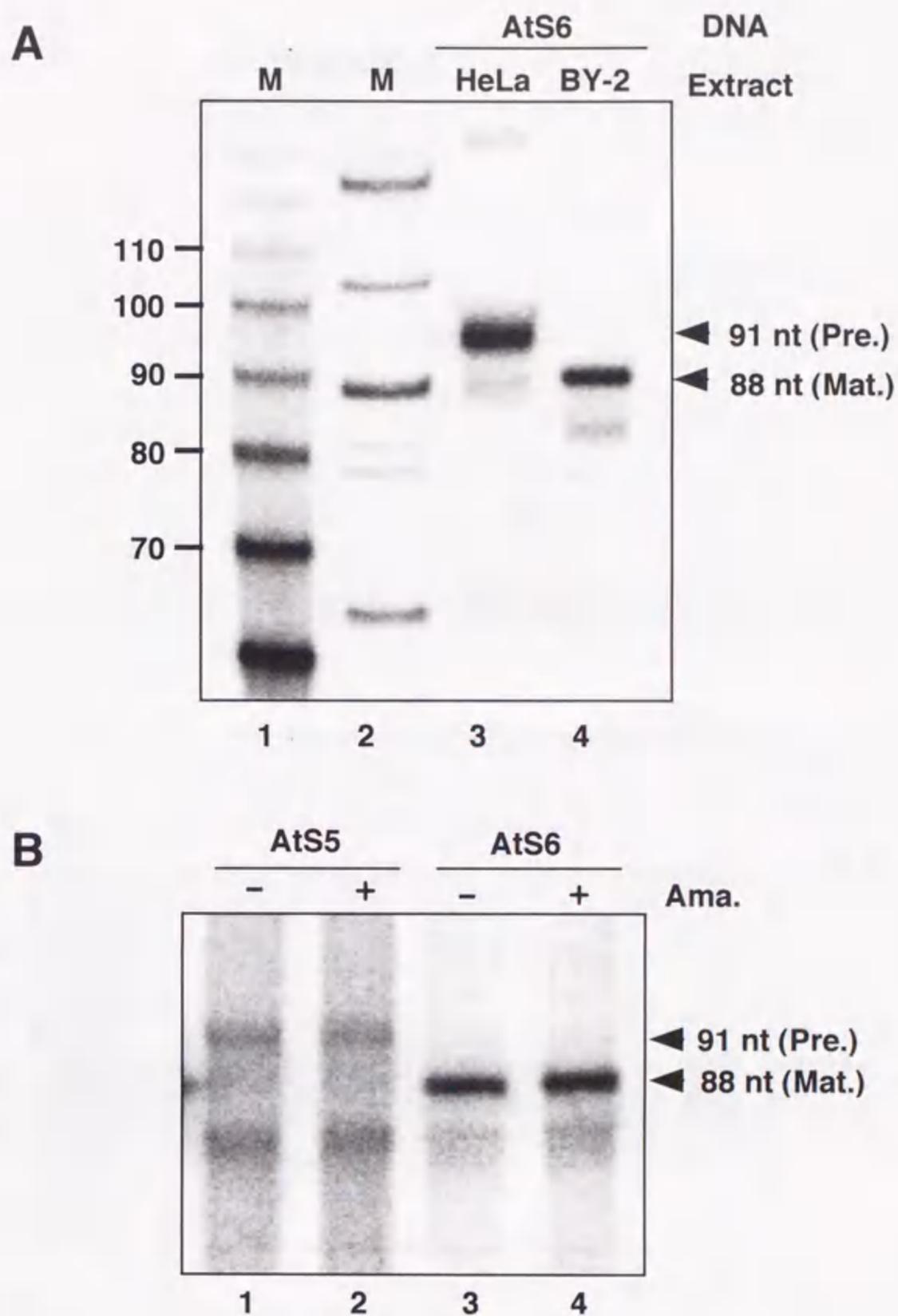


図 10 シロイヌナズナ tRNA^{Ser} 遺伝子の5'末端プロセッシング

A. tRNA^{Ser} 遺伝子 (AtS6) の5'末端プロセッシング活性を HeLa 細胞とタバコの *in vitro* 転写系で比較。HeLa 細胞の核抽出液はプロメガ製を使用。転写反応は両系ともにタバコで決定した至適条件で行った。サイズマーカーは 10 bp DNA ラダー (BRL) と pBR322 / Hae III を使用。Pre. は前駆体 tRNA、Mat. は成熟 tRNA に相当するバンドを示す。電気泳動は 12 % の変性ポリアクリルアミドゲルを使用。B. タバコ *in vitro* 系による AtS5 と AtS6 遺伝子のプロセッシング活性比較。転写は α-アマンチンの存在下 (+) および非存在下 (-) で行った。Pre. は前駆体 tRNA、Mat. は成熟 tRNA に相当するバンドを示す。電気泳動は 12 % の変性ポリアクリルアミドゲルを使用。

(5) リガーゼ促進剤の効果

DNA リガーゼの促進剤であるポリエチレングリコール (PEG 6000)、T4 RNA リガーゼの促進剤であるジメチルスルフォキシド (DMSO)、塩化ヘキサアンミンコバルト (HCC) について調べたのが図 16 である。PEG、DMSO はともに転写を阻害するだけで、スプライシング促進の効果は認められなかった。HCC は転写を阻害するものの、明らかにスプライシングに対しての促進の効果が認められた。また、その効果は添加量に応じて増加していた。転写活性を阻害してしまうため、転写とスプライシングの同時反応系での使用は、ごく低濃度である 0.1 mM が適していたが (データは示していない)、転写反応と分離してスプライシングを行う場合は、1 mM 程度の濃度で反応を大きく促進した。

(6) 界面活性剤の効果

コムギ胚芽の *in vitro* スプライシング系では、界面活性剤であるトリトン X-100 や ノニデット P-40 が、スプライシング反応を促進すると報告されている (Stange and Beier, 1987)。そこで、トリトン X-100 の効果について調べたのが図 17 である。調べた 0.2 % 以上の全ての濃度で転写物の量が大きく減少した。したがって、転写とスプライシングの同時反応には添加できないことが判明した。ただし、転写とスプライシングの分離反応を行う際に、その転写活性阻害・スプライシング活性促進の効果は利用価値がある。

(7) 反応のタイムコース

以上の結果を総合すると、転写とスプライシングの同時反応の至適条件は、単純に転写至適条件から MgSO_4 濃度のみを 3 mM から 5 mM に変更したものであった。この条件で最後にタイムコースをとってみた (図 18-A)。 Mg^{2+} 濃度が 5 mM なので 15 分の反応時で、すでに前駆体を確認することはできなかった。認められるのは

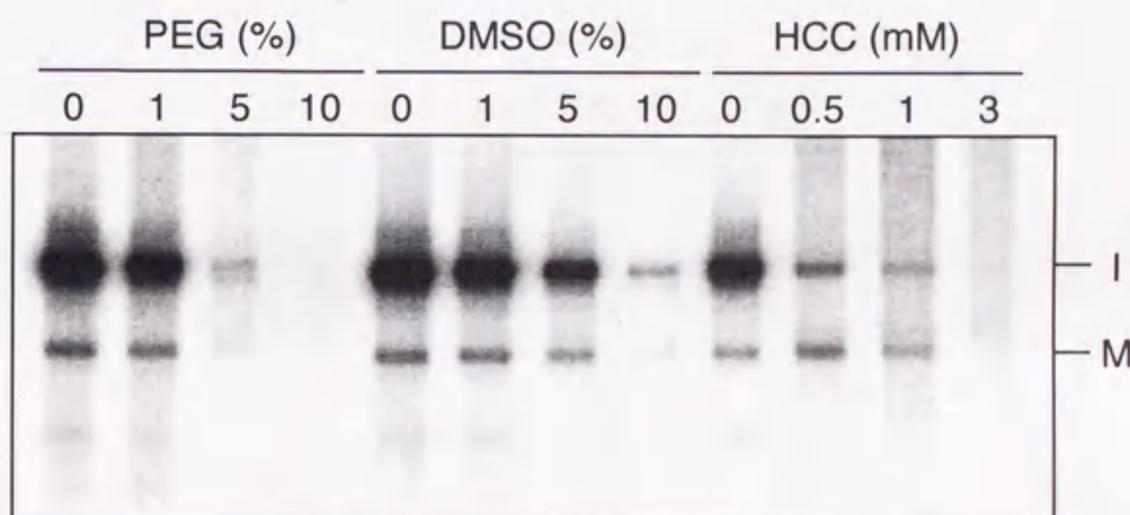


図 16 タバコ *in vitro* スプライシング系の核抽出液量による活性比較

タバコの核抽出液を使用した転写とスプライシングの同時反応系で、リガーゼ促進剤による活性変化を比較した。使用した促進剤は、PEG: ポリエチレングリコール 6000、DMSO: ジメチルスルフォキシド、HCC: 塩化ヘキサアンミンコバルト。鋳型 DNA は *Nicotiana rustica* の tRNA^{Tyr} 遺伝子 (pNtY1) を使用した。核抽出液は 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ タンパク質濃度のものを 5 μl 使用した。反応は、転写至適条件から Mg²⁺ を 5 mM に変更した条件で、28 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間行った。電気泳動は 12% の変性ポリアクリルアミドゲルで行った。検出されるバンドはそれぞれ、I: 中間体 tRNA、M: 成熟 tRNA に相当する。

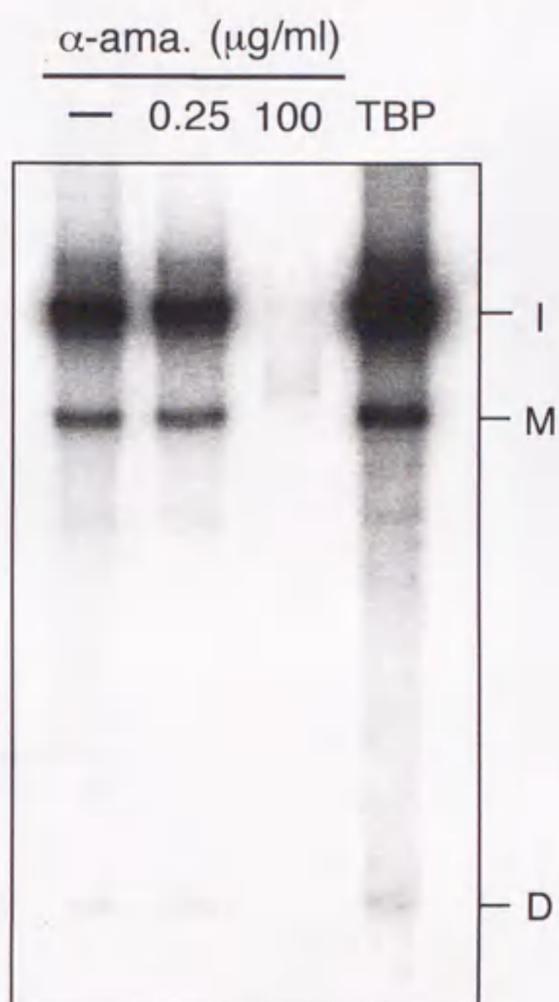


図 21 タバコ *in vitro* 系の RNA ポリメラーゼの確認

タバコ *in vitro* 転写・スプライシング系で検出された、tRNA を生成した RNA ポリメラーゼの特性について調べた。転写・スプライシングの同時反応条件で、 α -アマニチンと TATA 結合タンパク質 (TBP) を添加して反応し、転写活性を比較した。TBP はプロメガ製の HeLa 細胞由来で、 10 ng タンパク質 / $20 \mu\text{l}$ 反応液を使用した。電気泳動は 12% の変性ポリアクリルアミドゲルで行い、検出されるバンドはそれぞれ、I: 中間体 tRNA、M: 成熟 tRNA、D: tRNA 切断産物に相当する。

とスプライシングの反応が進行したことを示している。この方法により、検出時間の短縮がはかれるようになった。同時に、分離した活性の使い方次第では、転写とプロセッシングの分子機構のより詳細な解析に応用可能である。

るようになった。それはまた、核抽出液の転写活性が高まったからこそ可能となったことであった。反応組成に10%グリセロールを含ませることも、バックグラウンド低減に効果的であった。反応時間が長いほど転写量は増加したが、実験時の利便性を考えて90分が適当であった。また、tRNAはRNaseに極めて強いため、RNase阻害剤を使う必要はなかった。条件の検討に使用したtRNA^{Ser}遺伝子は、他のtRNA遺伝子に比べてその転写活性は弱い部類に属するが、それでも改良された系では解析が可能であった。

*In vitro*で合成したtRNAを直接検出すると、検出時間を短くできる利点がある。プライマー伸長法を使用した間接検出に比べ、反応が1回少ないことの意義は、数多くの解析を必要とする際には極めて大きい。そして、最大の利点は、tRNA転写とプロセッシングの様子を正確に把握できることである。

図2に示したように、プライマー伸長法によって、正確な転写開始と5'末端のプロセッシング点が同定され、タバコの*in vitro*系が、tRNAのプロセッシング活性を合わせ持つことを判明した。シロイヌナズナのtRNA^{Ser}遺伝子のAtS5は、AtS6と1塩基のみ異なり、アンチコドンステムの塩基対がミスマッチとなり(付録2)、5'末端のプロセッシングが起きない偽遺伝子であるとされていた(Beier and Beier, 1992)。プライマー伸長法でみる限り、タバコの*in vitro*系ではAtS5がAtS6に比べ、プロセッシングが若干弱い傾向にあるものの、プロセッシングはほとんど同程度認められた。一方、フルサイズ転写で直接AtS5、AtS6遺伝子の転写物を確認したのが図10-Bである。プライマー伸長法の結果と対照的に、AtS5遺伝子の主要な転写物は前駆体で、AtS6遺伝子の主要な転写物は成熟tRNAであった。AtS5遺伝子がAtS6遺伝子より5'末端プロセッシング活性が弱いという結果を反映しているのは、明らかにフルサイズ転写を行った場合であり、この系の優れた検出特性を示している。

Beierらによると、tRNA^{Ser}は91ntの前駆体として転写され、5'、3'末端のプ

参考文献

- Akama, K., and Tanifuji, S. (1989) Nucleotide sequence of a methionine initiator tRNA gene of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 13: 599-600.
- Akama, K., and Kashihara, M. (1996) Plant nuclear tRNA^{Met} genes are ubiquitously interrupted by introns. *Plant Mol. Biol.* 32: 427-434.
- Akama, K., Naß, A., Junker, V. and Beier, H. (1998) Characterization of nuclear tRNA^{Tyr} introns: their evolution from red algae to higher plants. *FEBS Lett.* 417: 213-218.
- Arends, S., and Schön, A. (1997) Partial purification and characterization of nuclear ribonuclease P from wheat. *Eur. J. Biochem.* 244: 635-645.
- Arias, J. A., Dixon, R. A. and Lamb, C. J. (1993) Dissection of the functional architecture of a plant defense gene promoter using a homologous *in vitro* transcription initiation system. *Plant Cell* 5: 485-496.
- Arnold, G. J. and Gross, H. J. (1987) Unrelated leader sequences can efficiently promote human tRNA gene transcription. *EMBO J.* 5: 237-246.
- Beier, D. and Beier, H. (1992) Expression of variant nuclear *Arabidopsis* tRNA^{Ser} genes and pre-tRNA maturation differ in HeLa, yeast and wheat germ extracts. *Mol. Gen. Genet.* 233: 201-208.
- Betzner, A. S., Oakes, M. P. and Huttner, E. (1997) Transfer RNA-mediated suppression of amber stop codons in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 11: 587-595.
- Champbell-Raymond, K., Raymond, G. J. and Johnson, J. D. (1985) *In vitro* modulation of yeast tRNA gene expression by 5'-flanking sequences. *EMBO J.* 4: 2649-2656.
- Choisne, N., Martin-Canadell, A. and Small, I. (1997) Transactivation of a target gene using a suppressor tRNA in transgenic tobacco plants. *Plant J.* 11: 597-604.
- Choisne, N., Carneiro, V. T. C., Pelletier, G. and Small, I. (1998) Implication of 5'-flanking sequence elements in expression of a plant tRNA^{Leu} gene. *Plant Mol. Biol.* in printing.
- Cooke, R. and Peonon, P. (1990) *In vitro* transcription from cauliflower mosaic virus promoters by a cell-free extract from tobacco cells. *Plant Mol. Biol.* 14: 391-405.
- Dingermann, T., Burke, D. J., Sharp, S., Schaack, J. and Söll, D. (1982) The 5' flanking sequences of *Drosophila* tRNA^{Arg} genes control their *in vitro* transcription in a *Drosophila* cell extract. *J. Biol. Chem.* 257: 14738-14744.

