— 原 著 —

Rana catesbeiana ミトコンドリア DNA の H鎖およびL鎖複製開始領域の構造解析*

米山 芳雄

日本医科大学産婦人科学教室 (主任: 荒木 勲教授)

日本医科大学第1生化学教室 (指導: 岡崎太郎教授)

The nucleotide sequences of the heavy and light strand replication origins of the *Rana catesbeiana* mitochondrial genome

Yoshio Yoneyama

Department of Obstetrics and Gynecology and

The First Department of Biochemistry, Nippon Medical School

The nucleotide sequences of the D-loop region, the light (L) strand replication origin and the seven tRNA genes of the *Rana catesbeiana* mitochondrial genome were determined and compared with their counterparts of other higher vertebrate mitochondrial genomes.

The results obtained are as follows:

1) The D-loop region consists of 2,187 nucleotides and is flanked by the cyt b gene on the 5' end and by the genes for tRNA^{Leu(CUN)}, tRNA^{Thr}, tRNA^{Pro} and tRNA^{Phe} on the 3' end. These genes are distinctly different in their organization from those in other higher vertebrates.

2) The overall sequence homology between the D-loop regions of *Rana catesbeiana* and other higher vertebrates is rather low. The sequences known as CSB-1, 2 and 3, and TAS, however, are found to be conserved also in the *Rana catesbeiana* mitochondrial genome.

3) The origin of the L-strand replication, which consists of 27 nucleotides, occurs in the middle of the five-tRNA gene cluster that is located between the genes for URF2 and CO I. The nucleotide sequence and potential secondary structure of this origin is very homologous to those in other higher vertebrates.

4) The seven mitochondrial tRNA genes of *Rana catesbeiana* show many structural features common to those of other higher vertebrates.

Key words: mitochondrial DNA, replication origins, D-loop region, nucleotide sequence, bullfrog (*Rana catesbeiana*)

Present address: Department of Obstetrics and Gynecology, Nippon Medical School, 1-1-5, Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

* 本論文は学位論文である。

本文中の省略記号

TAS: termination associated sequence, CSB: conserved sequence block, tRNA: transfer RNA, rRNA: ribosomal RNA, URF: unidentified reading frame, CO I~III: cytochrome c oxidase subunit I~III, kb: kilo base, bp: base pair, nt: nucleotide, cyt. b: cytochrome b

緒 言

ミトコンドリアにはH鎖およびL鎖からなる自己複製可能な環状2本鎖DNAが存在しており, 高等脊椎動物においてその大きさは16.5~17.6 kb^{1~5)}である。これまでに高等脊椎動物のミトコンドリアDNAに関しては, ヒト²⁾, ウシ³⁾, マウス⁴⁾ならびにアフリカツメガエル⁵⁾の全塩基配列が決定されており, いずれも

12 S, および 16 S rRNA 遺伝子, 22 種類の tRNA 遺伝子, cytochrome c oxidase subunit I, II, III, ATPase subunit 6, cytochrome b 遺伝子, および 8 種類の URF 遺伝子からなっている。これらの塩基配列には種属間に差異が見られるが, 遺伝子の構成ならびにその配列は同一である。これらのミトコンドリア DNA の遺伝子構成は非常に稠密になっており, 22 種類の tRNA 遺伝子が各構成遺伝子を区切るように配列している⁶⁾。しかも各遺伝子間には spacer が存在しても数ヌクレオチドしかなく, また一部の遺伝子には重複が見られるなど, きわめて経済的な構造をとっている。

ミトコンドリア DNA がこのように経済的な構造をとっているのにもかかわらず, Displacement loop (D-loop) と呼ばれる領域には特定の構造遺伝子が存在せず, その大きさならびに塩基配列は, ミトコンドリア DNA 中種属間で最も差異が大きい部分である。この D-loop 領域には, H 鎖複製開始領域ならびに H 鎖および L 鎖転写のプロモーターが存在しており⁷⁻⁹⁾, ミトコンドリア遺伝子の複製ならびに発現に重要な機能を果たしていると考えられている。

ミトコンドリア DNA の H 鎖および L 鎖の複製は, それぞれの複製開始点より独特な機構で行われる。H 鎖の複製は, まず D-loop 領域内に存在する H 鎖複製開始点より L 鎖を鋳型として新生短鎖 DNA (D-loop 鎖) が合成されることにより始まり, いわゆる D-loop 構造を形成して単一方向に進行する¹⁰⁾。新生 H 鎖の複製が約 2/3 進行して L 鎖複製開始点まで達するとこの部分が一本鎖 DNA の状態になり, ここで初めて L 鎖の複製が H 鎖の複製とは反対方向に開始される¹¹⁾。L 鎖複製開始領域は D-loop 領域とは異なり, その塩基配列および推定される 2 次構造は種属間できわめて良く保存されている²⁻⁵⁾。

これらの D-loop 領域ならびに L 鎖複製開始領域に存在する重要な構造と機能との関連については, 各種属間の塩基配列の比較から現在までにいくつかの保存配列が明らかにされている。しかしながらこれらの配列がどの程度調節に関与するか, また, その具体的な機構がいかなるものかについては現在のところ不明である¹²⁻¹⁵⁾。そこで今回著者は, ウシガエルミトコンドリア DNA の D-loop 領域および L 鎖複製開始領域の塩基配列を決定し, これまでに報告されているヒト, ウシ, マウス, ラット¹⁶⁾ならびにアフリカツメガエルの同領域と比較して, 機能上重要と思われる構造について検討を行った。また, 同時に同領域近傍に存在した

7 種の tRNA 遺伝子の塩基配列も決定した。

実験材料および方法

(1) ミトコンドリア DNA

藤井¹⁷⁾によりクローン化された pRcm 1 (ウシガエルミトコンドリア DNA 全長 17.6 kb を, DNA 上の唯一の BamH I 部位で切断し, プラスミドベクター pBR 322 の BamH I 部位に挿入したクローン) DNA を使用した。

(2) ベクターおよび宿主菌

クローニングベクターとして M 13 mp 11¹⁸⁾, mp 18¹⁹⁾ファージ, 宿主菌として *E. coli* K 12 株由来 JM 103 (ΔP_1 , lysogen) を使用した。

(3) 制限酵素およびその他の試薬類

制限酵素およびその他の試薬類は, 次を示す各社の製品を使用した。

制限酵素 (宝酒造社および Boehringer 社), *T*₄ DNA ligase, Exonuclease III, Bal 31 nuclease, *E. coli* DNA polymerase I large fragment (Klenow fragment) (宝酒造社), DNase I (bovine pancreas), Alkali phosphatase (calf intestine) (Boehringer 社), Low-melting point agarose (ultra pure) (B.R. L. 社), IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside), X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) (和光純薬社), Bacto-yeast extract, Bacto-tryptone (Difco 社), M1-primer (宝酒造社), Deoxycytidine 5'-[α -³²P] triphosphate, triethylammonium salt (Amersham 社), X-ray film RXO-H 100 (富士写真フイルム社)。

その他の試薬は, すべて市販の特級品を使用した。

(4) 方法

1) D-loop 領域および L 鎖複製開始領域を含む DNA 断片のクローニング

ウシガエルミトコンドリア DNA について, その制限酵素地図および URF 2 遺伝子の存在位置¹⁷⁾と, これまでに報告されている高等脊椎動物の map position の類似性^{2-5, 16)}とから D-loop 領域および L 鎖複製開始領域を含むと思われる部位を推定した。次いで pRcm 1 DNA を Fig. 1 で示した制限酵素部位でそれぞれ切断することによって, この部位を含む DNA 断片 (Hind III C 2.6 kb, Hinc II B-Bgl II 3.1 kb および Xba I B-Hind III 1.6 kb) を得た。これらの DNA 断片を, M 13 mp 11, mp 18 RF(replicative form)-DNA と *T*₄ DNA ligase により DNA 連結反応を行い, *E.*

Fig. 1 Restriction map of the *Rana catesbeiana* mitochondrial genome and sequencing strategy of the H- and L-strand replication origins and flanking genes. The restriction map and the organization of the URF2, tRNA^{TRP} and tRNA^{Asn} genes are those reported by (17). O_H and O_L: origins of H- and L-strand replication. The one-letter amino acid notation is used for each tRNA genes.

coli JM 103 にトランスフォーム²⁰⁾した。それらの組換え体ファージの選択は Messing の方法¹⁹⁾に準じて行った。

2) DNA 塩基配列の決定および解析

以上のようにして得られた各組換え体について、Barnes らの Kilo-sequencing 法²¹⁾に準じて各種欠失クローンを作成した。これらのクローンより Sanger らの方法²²⁾により 1 本鎖 DNA を調製し、dideoxynucleotide chain termination 法²³⁾によって塩基配列を決定した。これまでに報告されている高等脊椎動物のミトコンドリア DNA の D-loop 領域および L 鎖複製開始領域の塩基配列との比較ならびにその他の構造解析は、DEC 社製 VAX-11/750 minicomputer 上の UWGCG および IDEAS program を用いて行った。

すべての組換え DNA 実験は日本医科大学組換え DNA 実験安全管理規則、および文部省組換え DNA

実験指針を遵守して行った。

結 果

1. D-loop 領域

Fig. 2 に今回決定したウシガエルミトコンドリア DNA の D-loop 領域およびその近傍の塩基配列 (3,435 nt) を示した。また Fig. 3 に、これから明らかになった同領域の遺伝子構成をこれまでに報告されている高等脊椎動物のものと比較して示した。ウシガエル D-loop 領域は、5'末端が cyt b 遺伝子に、3'末端が tRNA^{Leu(CUN)}遺伝子に隣接する No. 346~2,532 に相当し、その大きさは 2,187 nt であった。また Fig. 2 の塩基配列から以下の諸点が明らかになった。

まず、D-loop 領域の両末端付近には tandem repeat が存在しており、5'末端付近のものは 40 nt が 6 回 (No. 381~620)、3'末端付近のものは 11 nt が 9 回

Fig. 2 Nucleotide sequence of the D-loop region and its flanking genes of the *Rana catesbeiana* mitochondrial genome

The L-strand sequence is shown from left to right (5'→3'). Polarity of the tRNA genes is indicated by arrows, →(L-strand) or ←(H-strand). The amino acid translation is indicated by three-letter amino acid notion below the nucleotide sequence.

Tandem repeats occurring at positions 381~620 and 2,215~2,313 are each indicated by a series of asterisks and pluses. Conserved sequence blocks (CSB) occurring at positions 1,780~1,807, 1,853~1,880, 1,979~1,996 and 2,101~2,119 and the region of the H-strand replication origin at position 1,610~1,673 are each indicated by asterisks. The tRNA genes are indicated by dashed lines delimited by asterisks above or below the nucleotide sequences. A tandem repeat including two CSB-1s (1,743~1,814 and 1,817~1,886) is shown by dashed lines delimited by oblique lines.

1,780~1,807, No. 1,853~1,880) 存在しており、CSB-1 同士の間隔は 45 nt であった。またそれぞれの CSB-1 を含む二つの領域 (No. 1,742~1,815 および No. 1,816~1,887) は tandem repeat をなしていた。さらに、CSB-1 に重複する形で dyad symmetry が存在したが、ヒト²⁴⁾ならびにマウス¹¹⁾の同様の位置に存在する dyad symmetry と比較すると、その推定される 2 次構造および塩基配列は大きく異なっていた。

CSB-2は、18 ntの大きさでC-クラスターからなる特異な配列であり、No. 1,979~1,996に存在した。このCSB-2とCSB-3との間隔は103 ntであった。またCSB-3はC-Aクラスターからなる19 ntの配列であり、No. 2,101~2,119に存在した。CSB-3とD-loop領域3'末端との間隔は、413 ntであった。

以上の諸点に関しては、**Fig. 4**に5'末端および3'末端の反復配列を、また**Fig. 5**にCSB-1, 2, 3の塩基配

列を、それぞれアフリカツメガエルないし他の高等脊椎動物のものと比較して示した。さらに **Fig. 6** には、ウシガエル CSB-1 領域の tandem repeat を図示した (考察参照)。

2. L鎖複製開始領域

Fig. 7 にウシガエルミトコンドリア DNA の L 鎖複製開始領域を含むと考えられる URF2 遺伝子の 3' 末端部分¹⁷⁾から CO I 遺伝子の 5' 末端部分までの塩基配列を示した。

これまでに報告^{2-5,11)}されている高等脊椎動物のL鎖複製開始領域は、5種のtRNA遺伝子クラスター内のtRNA^{Asn}遺伝子とtRNA^{Cys}遺伝子の間の約30 ntの非コード領域に存在することが知られている。ウシガエルでも同様の部位に、27 ntの非コード領域(No. 275~301)が存在していた。

Fig. 6 The tandem repeat found in the CSB-1 region
CSB-1 is indicated by asterisks. Positions of homology are indicated by
colons. Spaces are introduced to optimize the sequence homology.

Fig. 7 Nucleotide sequence of the L-strand replication origin and its flanking genes of the *Rana catesbeiana* mitochondrial genome

The nucleotide sequences of a part of the URF 2, and of the tRNA^{Trp} and tRNA^{Ala} genes (1-201) are those reported by (17). The L-strand sequence is shown from left to right (5'→3'). The tRNA genes are indicated by dashed lines above or below the nucleotide sequences which are delimited by asterisks. Polarity of the tRNA genes is indicated by arrows, →(L-strand) or ←(H-strand). The amino acid translation of URF 2 and CO I is indicated by three-letter amino acid notation below the nucleotide sequences.

Fig. 8 A : Possible secondary structures of the L-strand replication origins and its flanking genes of *Rana catesbeiana* and other higher vertebrates

Possible base-pairings in the stem are indicated by dashes. tRNA genes are indicated by boxes.

B : Comparison of the primary structures of the L-strand replication origins and its flanking genes of *Rana catesbeiana* and other higher vertebrates

The L-strand sequences are shown from left to right (5' → 3')

rac : *Rana catesbeiana*, hum : human, bov : bovine, mou : mouse, xel : *Xenopus laevis*

Dashes represent spaces introduced to optimize the sequence homology.

この領域は **Fig. 8A** に示したように G-C rich なステムおよび T-rich なループ部分からなる安定なヘアピンループ構造をとることが可能であった。さらに、この近傍を含めた塩基配列は **Fig. 8B** のように種属間で良く保存されていることから、この部分が L 鎖複製開始領域と考えられた。L 鎖の複製開始に必要であるといわれているヘアピンループ構造を各種属間で比較してみると、ウシガエルのステム部分は、同じ両棲類であるアフリカツメガエルと同一で 9 塩基対、他の哺乳動物では 11~12 塩基対からなっており、それらの大きさは異なっているものの、マウスの G-C 対が 1 カ所 A-T 対に変化している以外ほとんど差がなく、種属差の大きい D-loop 領域とは対照的であった。

3. tRNA 遺伝子

ウシガエルミトコンドリア tRNA 遺伝子の塩基配列に関しては、先に 5 種の配列が報告¹⁷⁾されているが、今回あらたに 7 種の tRNA 遺伝子の配列が明らかになった。これらのうち D-loop 領域および L 鎖複製開始領域近傍に存在する 9 種の tRNA 遺伝子の塩基配列と推定される 2 次構造を **Fig. 9A** に、他の高等脊椎動物のミトコンドリア tRNA 遺伝子^{2-5,16)}の配列との比較を **Fig. 9B** に示した。これらの結果から以下の点が指摘される。まず、ウシガエルミトコンドリア tRNA の T-loop 部分の大きさは、6~7 nt と一定でなく、保存配列 (G-T-Ψ-C-R-A) は tRNA^{Leu(CUN)}以外には存在しなかった。また tRNA の 3 次構造上重要であると考えられる T-loop 部分および D-loop 部分の特定の塩基が置換されているものも多かった。さらに G-T 対が tRNA^{Tyr}以外のすべての tRNA に存在し、G-T 対以外の mismatch も 6 種の tRNA に存在していた。次に、これらの tRNA 遺伝子とこれまでに報告²⁻⁵⁾されている高等脊椎動物のミトコンドリア tRNA 遺伝子とのホモロジーを見ると、全体的なホモロジーはアフリカツメガエルとの間で最も高かった。また領域別に見ると、D-loop 部分と T-loop 部分が他の部分と比較するとホモロジーが低く、さらに 9 種の tRNA の種属間でのホモロジーは tRNA^{Leu(CUN)}において約 75% と最も高く、tRNA^{Pro}では約 35% と低かった。

考 察

1. D-loop 領域

これまでに報告^{2-5,16)}されている高等脊椎動物の D-loop 領域ならびにその近傍の遺伝子配列は、両棲類で

あるアフリカツメガエルを含めて同一であり、D-loop 領域 5'側に tRNA^{Pro}ならびに tRNA^{Thr}遺伝子、3'側には tRNA^{Phe}遺伝子が隣接する配列をとっている。しかし、**Fig. 3** で明らかなように、ウシガエル D-loop 領域の 5'側には tRNA 遺伝子は存在せず直接 cyt b 遺伝子と隣接し、その 3'側には、tRNA^{Phe}遺伝子との間に tRNA^{Leu(CUN)}遺伝子ならびに、従来 cyt b 遺伝子の 3'側に存在する tRNA^{Thr}と tRNA^{Pro}遺伝子が介在し 4 種の tRNA 遺伝子のクラスターを形成していた。これらの遺伝子配列における差異が、D-loop 領域の機能上どのような意義を持っているかに関しては不明であるが、きわめて興味ある問題と考えられる。

今回決定したウシガエル D-loop 領域の大きさは 2,187 nt で、アフリカツメガエル D-loop 領域 (2,134 nt) とほぼ同じであった。しかし、哺乳動物の D-loop 領域 (879~1,122 nt) と比較すると約 2 倍の大きさであり、この領域の差異がアフリカツメガエルの場合と同様に、哺乳動物ミトコンドリア DNA との大きさ上の差異になっているものと考えられた。

先に述べたように、D-loop 領域の塩基配列は、ミトコンドリアゲノム中、種属間で最もホモロジーの低い部分である。しかし、現在までの解析結果から、この領域の機能上重要と思われるいくつかの配列が知られており、その多くは種属間で保存されている。例えばアフリカツメガエル D-loop 5'末端付近には、45 nt からなる反復配列が存在しており⁵⁾、これが新生 D-loop 鎖の合成終了に関与していると考えられている (termination associated sequence, TAS)¹⁵⁾。これと同様の配列は哺乳動物においても存在している。**Fig. 4~5** はそれぞれ、これらの配列について種属間で比較検討したものである。これらから TAS に関してウシガエルでは、5'末端付近に 40 nt からなる連続 6 回の反復配列が見出されたが、その塩基配列をアフリカツメガエルのものと比べると **Fig. 4A** に示したように、きわめてホモロジーの高いものであることがわかった。またウシガエル D-loop 3'末端付近に存在する 11 nt からなる連続 9 回の反復配列に関しては、**Fig. 4B** に明らかなように、アフリカツメガエルにも同様の位置にこれとほぼ同一の配列が存在するが、このような多数の反復は見られなかった。

これまでに報告^{2-5,15,16)}されている高等脊椎動物の CSB-1~3 は、**Fig. 5** に示したように H 鎖複製開始領域の 3'側近傍に CSB-1~3 の順序で存在しており、H 鎖複製開始機構において、RNA primer の合成開始な

Fig. 9A Cloverleaf structures of the nine mitochondrial tRNA genes of *Rana catesbeiana*

Watson-Crick base pairs in the stem regions are indicated by dashes or colons. G+U base pairs are indicated by pluses.

	A.A. stem	D. stem	D. loop	D. stem	A.C. stem	A.C. loop	A.C. stem	V. loop	T. stem	T. loop	T. stem	A.A. stem																																																		
Leu	rac:GCTTTTAAAGGAAAA-GAG-CC-CTCCACTGGTCTTAGGCGCCAGCATCTCTTGGTGCAAGT--CCAAGTAAAGCT	hum:A*****T***-C**--T-A*****T*****C***A-***A*****C*--****A*****TA	bov:A*****T*G-T***TTT-A***GT*****AA***A-***A*****C*--****A*****TA	CUN	mou:A*****T***T*-T**TA--A***A*****AA***A-***A*****C*--****A*****TA	xel:*****-C**T*-A***G*****AA***A*****A*--*****A*****	Thr	rac:GCCTTGATAGCTTAA--A--CTAAAGCACCGGTCTTGTAAAGCCGAGACTGTAGC-CTAA--CCCCTACTCAAGGCT	hum:*T*C*TG***TA***-T--*****TA***A*****A****-AGA***A*AA*----CT--TT*T*CA*G*A*A	bov:*T***TG***TAC*-T--*****TAT**T*****A***A-AGAA*G***AA*-**CTAA***C*CT***A*	ACN	mou:*T*****TA***-T--AC*TTA*T*T*****A**T*-A*A***AT*----TT*T**T*****A*A	xel:*T*C*****-T--T*****T*****A-AGA*TG**G-****A-A***C*****A**	Pro	rac:CAGGATATAGTTAG----GTAGAATGCCGGTTTGGGGACCGGT-GGTAAAGGTTAAAG--TCCTTTTATCCTGA	hum:***AGA*****A--A--T*****CTTA*C*****TG*TAA*-***GG**T*A***----A*****TCT***	bov:***GA*****A--A--*****CTT*A*C*****GT**A*-***G*GAC*GC*---GT**C*TC*T***	CCN	mou:**A**AG*****A----T*****A**A*C*****TG*T***-***GGG*AG**--*C--T*C**CT**T***	xel:*G***G*C*A***A--A--T*****TT**C*****GT*AA*-A**GG*****TG**--*****C*T**TC**	Phe	rac:ACTCTTATAGCTTAA-TAT-T-AAAGTATAGCGCTGAAAAACGCTA-AGATGAACCCCTA-A-AA-AGTTCTAGGGGTA	hum:GT*TA*G*****CC*CC-*C***C*ATA*A*****T*T*-***C*GG*T*AC*-T--CACC*C*TAAACA	bov:GT*GA*G*****C-CC--*****C*AG*A*****T**CT--***AC**C*TAAACA	UUY	mou:GT*AA*G*****TA*C--*****C*A***A*****T***T-*****G*TAA*T-G---TA*C*C*TAAACA	xel:G**TACG*****G---*--*****C*CA*****T***G-*****G*****CG**--**C*CGTAA*CA	Trp	rac:AGAACTTAGGCTAG----CACAGACCAAAGCCCTTCAAGCCTTAAG-C-GGAGGTAA-AACTCCTTCAGTTTCTG	hum:*****T*****T**A-ATA--*****GA*****C**C*-TAA*TT-GC*A---TAC*T*A*****	bov:**G**T*****T**A-A--*****GA*****C*****-AA*TA--C*ATT--TAC*T*A***C***	UGR	mou:*****GT*****A**T-A--*T**T**CGCA*****C*****-AAAAACA--C*C*---AG**T*AC*****	xel:***C*T***A*T**A---*--A*****T*GA*****C*****-A****-***G**--*TCCT*A*C***	Ala	rac:AGGGCTTTATCTTAA--T--TTAAAGGCCCTGAGTTGCATTACAGGA-GATGTAGGTTAATAT--CCTGCAAGTCCTA	hum:*A**GC***G*****-----*****T*G*****G*****TT-*****C**AG*GGGC--TT*****GTCT**	bov:GA**A***G*****-----*****T*GT***T*****ATT-*****A*G*GTAG*--*T*****TC*T**	GCN	mou:GA**TC***G*****-----*****CAAT***T*****AT*-*****A*G*AG*--*T*A**GTCT**	xel:*A*****G*****-----*****T*TT*T*****AATT-*****T*A***A*---*****C*T**	Asn	rac:TAGAATGAAGCTC-GCTGGAT-AGAGTGTTTAGCTGTTAACATAAATATACGGGATCGAG-G-CCCCTCATTTCTAG	hum:***T*****CA-*T*-***T**G***C*****GTGT**GT***T*TA**T---***A*TGG*****	bov:***T*****CA-*T*A*-CT**G*****G*****G*T*CGT**GGGT*GA*-***AC**G*****	AAV	mou:***T*****CA-*TAAT--**G**A*****T*T*CGTA**T*TA*TT--*T*C**A*****	xel:*****-T***---*TT*A*****G*G*****-*****T*****	Cys	rac:GGCCTTGGGGTGT-C-A-----ACACGTGGGGTGTGCAAAACCCCA-AGATGCAGTAT-AA-TA-CCTGCCGGGGCTT	hum:A**TCC*A***A--TT--T--T**TA*T*AA*****TT*G*--***A***CITC**A--*****	bov:A***C**T***AA-TT--T--*****T*AA*****TT*AG-***A***CITC**A--*****	UGY	mou:**T***AA***A--T---T--T**T**C*AA*****TT*G*--**G**T**AG-A**C--T**A**TAA**A**	xel:AAG*C**C***--TT-G---***T*CCA*A*****T*G*--***A***AACG--**GG-TT*****CT*C	Tyr	rac:GGTAAAGTGCCCGA---GC---AGCGCGCGAATTGTAGCTTCGA-AGACAGAGGTTTGAGT--CCCCTCTTTACCA	hum:*****A*****T***---T--G*A**ATT*G*C***AA*CTA*-----G*****A*G-----*T**T*****	bov:*****A*****T***---**--A*A**ATTAG*C***AA*CTA*--***T*****C*---*T**T*****	UAY	mou:*****A*****T***---*--T*A**ATTAGTC***AA*CTA*--*C*****A*A*---*T**T*****	xel:***G*****---*TAAT*****G*****C**T-GT*****CA***---*T**TC**T**
Thr	rac:GCCTTGATAGCTTAA--A--CTAAAGCACCGGTCTTGTAAAGCCGAGACTGTAGC-CTAA--CCCCTACTCAAGGCT	hum:*T*C*TG***TA***-T--*****TA***A*****A****-AGA***A*AA*----CT--TT*T*CA*G*A*A	bov:*T***TG***TAC*-T--*****TAT**T*****A***A-AGAA*G***AA*-**CTAA***C*CT***A*	ACN	mou:*T*****TA***-T--AC*TTA*T*T*****A**T*-A*A***AT*----TT*T**T*****A*A	xel:*T*C*****-T--T*****T*****A-AGA*TG**G-****A-A***C*****A**	Pro	rac:CAGGATATAGTTAG----GTAGAATGCCGGTTTGGGGACCGGT-GGTAAAGGTTAAAG--TCCTTTTATCCTGA	hum:***AGA*****A--A--T*****CTTA*C*****TG*TAA*-***GG**T*A***----A*****TCT***	bov:***GA*****A--A--*****CTT*A*C*****GT**A*-***G*GAC*GC*---GT**C*TC*T***	CCN	mou:**A**AG*****A----T*****A**A*C*****TG*T***-***GGG*AG**--*C--T*C**CT**T***	xel:*G***G*C*A***A--A--T*****TT**C*****GT*AA*-A**GG*****TG**--*****C*T**TC**	Phe	rac:ACTCTTATAGCTTAA-TAT-T-AAAGTATAGCGCTGAAAAACGCTA-AGATGAACCCCTA-A-AA-AGTTCTAGGGGTA	hum:GT*TA*G*****CC*CC-*C***C*ATA*A*****T*T*-***C*GG*T*AC*-T--CACC*C*TAAACA	bov:GT*GA*G*****C-CC--*****C*AG*A*****T**CT--***AC**C*TAAACA	UUY	mou:GT*AA*G*****TA*C--*****C*A***A*****T***T-*****G*TAA*T-G---TA*C*C*TAAACA	xel:G**TACG*****G---*--*****C*CA*****T***G-*****G*****CG**--**C*CGTAA*CA	Trp	rac:AGAACTTAGGCTAG----CACAGACCAAAGCCCTTCAAGCCTTAAG-C-GGAGGTAA-AACTCCTTCAGTTTCTG	hum:*****T*****T**A-ATA--*****GA*****C**C*-TAA*TT-GC*A---TAC*T*A*****	bov:**G**T*****T**A-A--*****GA*****C*****-AA*TA--C*ATT--TAC*T*A***C***	UGR	mou:*****GT*****A**T-A--*T**T**CGCA*****C*****-AAAAACA--C*C*---AG**T*AC*****	xel:***C*T***A*T**A---*--A*****T*GA*****C*****-A****-***G**--*TCCT*A*C***	Ala	rac:AGGGCTTTATCTTAA--T--TTAAAGGCCCTGAGTTGCATTACAGGA-GATGTAGGTTAATAT--CCTGCAAGTCCTA	hum:*A**GC***G*****-----*****T*G*****G*****TT-*****C**AG*GGGC--TT*****GTCT**	bov:GA**A***G*****-----*****T*GT***T*****ATT-*****A*G*GTAG*--*T*****TC*T**	GCN	mou:GA**TC***G*****-----*****CAAT***T*****AT*-*****A*G*AG*--*T*A**GTCT**	xel:*A*****G*****-----*****T*TT*T*****AATT-*****T*A***A*---*****C*T**	Asn	rac:TAGAATGAAGCTC-GCTGGAT-AGAGTGTTTAGCTGTTAACATAAATATACGGGATCGAG-G-CCCCTCATTTCTAG	hum:***T*****CA-*T*-***T**G***C*****GTGT**GT***T*TA**T---***A*TGG*****	bov:***T*****CA-*T*A*-CT**G*****G*****G*T*CGT**GGGT*GA*-***AC**G*****	AAV	mou:***T*****CA-*TAAT--**G**A*****T*T*CGTA**T*TA*TT--*T*C**A*****	xel:*****-T***---*TT*A*****G*G*****-*****T*****	Cys	rac:GGCCTTGGGGTGT-C-A-----ACACGTGGGGTGTGCAAAACCCCA-AGATGCAGTAT-AA-TA-CCTGCCGGGGCTT	hum:A**TCC*A***A--TT--T--T**TA*T*AA*****TT*G*--***A***CITC**A--*****	bov:A***C**T***AA-TT--T--*****T*AA*****TT*AG-***A***CITC**A--*****	UGY	mou:**T***AA***A--T---T--T**T**C*AA*****TT*G*--**G**T**AG-A**C--T**A**TAA**A**	xel:AAG*C**C***--TT-G---***T*CCA*A*****T*G*--***A***AACG--**GG-TT*****CT*C	Tyr	rac:GGTAAAGTGCCCGA---GC---AGCGCGCGAATTGTAGCTTCGA-AGACAGAGGTTTGAGT--CCCCTCTTTACCA	hum:*****A*****T***---T--G*A**ATT*G*C***AA*CTA*-----G*****A*G-----*T**T*****	bov:*****A*****T***---**--A*A**ATTAG*C***AA*CTA*--***T*****C*---*T**T*****	UAY	mou:*****A*****T***---*--T*A**ATTAGTC***AA*CTA*--*C*****A*A*---*T**T*****	xel:***G*****---*TAAT*****G*****C**T-GT*****CA***---*T**TC**T**							
Pro	rac:CAGGATATAGTTAG----GTAGAATGCCGGTTTGGGGACCGGT-GGTAAAGGTTAAAG--TCCTTTTATCCTGA	hum:***AGA*****A--A--T*****CTTA*C*****TG*TAA*-***GG**T*A***----A*****TCT***	bov:***GA*****A--A--*****CTT*A*C*****GT**A*-***G*GAC*GC*---GT**C*TC*T***	CCN	mou:**A**AG*****A----T*****A**A*C*****TG*T***-***GGG*AG**--*C--T*C**CT**T***	xel:*G***G*C*A***A--A--T*****TT**C*****GT*AA*-A**GG*****TG**--*****C*T**TC**	Phe	rac:ACTCTTATAGCTTAA-TAT-T-AAAGTATAGCGCTGAAAAACGCTA-AGATGAACCCCTA-A-AA-AGTTCTAGGGGTA	hum:GT*TA*G*****CC*CC-*C***C*ATA*A*****T*T*-***C*GG*T*AC*-T--CACC*C*TAAACA	bov:GT*GA*G*****C-CC--*****C*AG*A*****T**CT--***AC**C*TAAACA	UUY	mou:GT*AA*G*****TA*C--*****C*A***A*****T***T-*****G*TAA*T-G---TA*C*C*TAAACA	xel:G**TACG*****G---*--*****C*CA*****T***G-*****G*****CG**--**C*CGTAA*CA	Trp	rac:AGAACTTAGGCTAG----CACAGACCAAAGCCCTTCAAGCCTTAAG-C-GGAGGTAA-AACTCCTTCAGTTTCTG	hum:*****T*****T**A-ATA--*****GA*****C**C*-TAA*TT-GC*A---TAC*T*A*****	bov:**G**T*****T**A-A--*****GA*****C*****-AA*TA--C*ATT--TAC*T*A***C***	UGR	mou:*****GT*****A**T-A--*T**T**CGCA*****C*****-AAAAACA--C*C*---AG**T*AC*****	xel:***C*T***A*T**A---*--A*****T*GA*****C*****-A****-***G**--*TCCT*A*C***	Ala	rac:AGGGCTTTATCTTAA--T--TTAAAGGCCCTGAGTTGCATTACAGGA-GATGTAGGTTAATAT--CCTGCAAGTCCTA	hum:*A**GC***G*****-----*****T*G*****G*****TT-*****C**AG*GGGC--TT*****GTCT**	bov:GA**A***G*****-----*****T*GT***T*****ATT-*****A*G*GTAG*--*T*****TC*T**	GCN	mou:GA**TC***G*****-----*****CAAT***T*****AT*-*****A*G*AG*--*T*A**GTCT**	xel:*A*****G*****-----*****T*TT*T*****AATT-*****T*A***A*---*****C*T**	Asn	rac:TAGAATGAAGCTC-GCTGGAT-AGAGTGTTTAGCTGTTAACATAAATATACGGGATCGAG-G-CCCCTCATTTCTAG	hum:***T*****CA-*T*-***T**G***C*****GTGT**GT***T*TA**T---***A*TGG*****	bov:***T*****CA-*T*A*-CT**G*****G*****G*T*CGT**GGGT*GA*-***AC**G*****	AAV	mou:***T*****CA-*TAAT--**G**A*****T*T*CGTA**T*TA*TT--*T*C**A*****	xel:*****-T***---*TT*A*****G*G*****-*****T*****	Cys	rac:GGCCTTGGGGTGT-C-A-----ACACGTGGGGTGTGCAAAACCCCA-AGATGCAGTAT-AA-TA-CCTGCCGGGGCTT	hum:A**TCC*A***A--TT--T--T**TA*T*AA*****TT*G*--***A***CITC**A--*****	bov:A***C**T***AA-TT--T--*****T*AA*****TT*AG-***A***CITC**A--*****	UGY	mou:**T***AA***A--T---T--T**T**C*AA*****TT*G*--**G**T**AG-A**C--T**A**TAA**A**	xel:AAG*C**C***--TT-G---***T*CCA*A*****T*G*--***A***AACG--**GG-TT*****CT*C	Tyr	rac:GGTAAAGTGCCCGA---GC---AGCGCGCGAATTGTAGCTTCGA-AGACAGAGGTTTGAGT--CCCCTCTTTACCA	hum:*****A*****T***---T--G*A**ATT*G*C***AA*CTA*-----G*****A*G-----*T**T*****	bov:*****A*****T***---**--A*A**ATTAG*C***AA*CTA*--***T*****C*---*T**T*****	UAY	mou:*****A*****T***---*--T*A**ATTAGTC***AA*CTA*--*C*****A*A*---*T**T*****	xel:***G*****---*TAAT*****G*****C**T-GT*****CA***---*T**TC**T**														
Phe	rac:ACTCTTATAGCTTAA-TAT-T-AAAGTATAGCGCTGAAAAACGCTA-AGATGAACCCCTA-A-AA-AGTTCTAGGGGTA	hum:GT*TA*G*****CC*CC-*C***C*ATA*A*****T*T*-***C*GG*T*AC*-T--CACC*C*TAAACA	bov:GT*GA*G*****C-CC--*****C*AG*A*****T**CT--***AC**C*TAAACA	UUY	mou:GT*AA*G*****TA*C--*****C*A***A*****T***T-*****G*TAA*T-G---TA*C*C*TAAACA	xel:G**TACG*****G---*--*****C*CA*****T***G-*****G*****CG**--**C*CGTAA*CA	Trp	rac:AGAACTTAGGCTAG----CACAGACCAAAGCCCTTCAAGCCTTAAG-C-GGAGGTAA-AACTCCTTCAGTTTCTG	hum:*****T*****T**A-ATA--*****GA*****C**C*-TAA*TT-GC*A---TAC*T*A*****	bov:**G**T*****T**A-A--*****GA*****C*****-AA*TA--C*ATT--TAC*T*A***C***	UGR	mou:*****GT*****A**T-A--*T**T**CGCA*****C*****-AAAAACA--C*C*---AG**T*AC*****	xel:***C*T***A*T**A---*--A*****T*GA*****C*****-A****-***G**--*TCCT*A*C***	Ala	rac:AGGGCTTTATCTTAA--T--TTAAAGGCCCTGAGTTGCATTACAGGA-GATGTAGGTTAATAT--CCTGCAAGTCCTA	hum:*A**GC***G*****-----*****T*G*****G*****TT-*****C**AG*GGGC--TT*****GTCT**	bov:GA**A***G*****-----*****T*GT***T*****ATT-*****A*G*GTAG*--*T*****TC*T**	GCN	mou:GA**TC***G*****-----*****CAAT***T*****AT*-*****A*G*AG*--*T*A**GTCT**	xel:*A*****G*****-----*****T*TT*T*****AATT-*****T*A***A*---*****C*T**	Asn	rac:TAGAATGAAGCTC-GCTGGAT-AGAGTGTTTAGCTGTTAACATAAATATACGGGATCGAG-G-CCCCTCATTTCTAG	hum:***T*****CA-*T*-***T**G***C*****GTGT**GT***T*TA**T---***A*TGG*****	bov:***T*****CA-*T*A*-CT**G*****G*****G*T*CGT**GGGT*GA*-***AC**G*****	AAV	mou:***T*****CA-*TAAT--**G**A*****T*T*CGTA**T*TA*TT--*T*C**A*****	xel:*****-T***---*TT*A*****G*G*****-*****T*****	Cys	rac:GGCCTTGGGGTGT-C-A-----ACACGTGGGGTGTGCAAAACCCCA-AGATGCAGTAT-AA-TA-CCTGCCGGGGCTT	hum:A**TCC*A***A--TT--T--T**TA*T*AA*****TT*G*--***A***CITC**A--*****	bov:A***C**T***AA-TT--T--*****T*AA*****TT*AG-***A***CITC**A--*****	UGY	mou:**T***AA***A--T---T--T**T**C*AA*****TT*G*--**G**T**AG-A**C--T**A**TAA**A**	xel:AAG*C**C***--TT-G---***T*CCA*A*****T*G*--***A***AACG--**GG-TT*****CT*C	Tyr	rac:GGTAAAGTGCCCGA---GC---AGCGCGCGAATTGTAGCTTCGA-AGACAGAGGTTTGAGT--CCCCTCTTTACCA	hum:*****A*****T***---T--G*A**ATT*G*C***AA*CTA*-----G*****A*G-----*T**T*****	bov:*****A*****T***---**--A*A**ATTAG*C***AA*CTA*--***T*****C*---*T**T*****	UAY	mou:*****A*****T***---*--T*A**ATTAGTC***AA*CTA*--*C*****A*A*---*T**T*****	xel:***G*****---*TAAT*****G*****C**T-GT*****CA***---*T**TC**T**																					
Trp	rac:AGAACTTAGGCTAG----CACAGACCAAAGCCCTTCAAGCCTTAAG-C-GGAGGTAA-AACTCCTTCAGTTTCTG	hum:*****T*****T**A-ATA--*****GA*****C**C*-TAA*TT-GC*A---TAC*T*A*****	bov:**G**T*****T**A-A--*****GA*****C*****-AA*TA--C*ATT--TAC*T*A***C***	UGR	mou:*****GT*****A**T-A--*T**T**CGCA*****C*****-AAAAACA--C*C*---AG**T*AC*****	xel:***C*T***A*T**A---*--A*****T*GA*****C*****-A****-***G**--*TCCT*A*C***	Ala	rac:AGGGCTTTATCTTAA--T--TTAAAGGCCCTGAGTTGCATTACAGGA-GATGTAGGTTAATAT--CCTGCAAGTCCTA	hum:*A**GC***G*****-----*****T*G*****G*****TT-*****C**AG*GGGC--TT*****GTCT**	bov:GA**A***G*****-----*****T*GT***T*****ATT-*****A*G*GTAG*--*T*****TC*T**	GCN	mou:GA**TC***G*****-----*****CAAT***T*****AT*-*****A*G*AG*--*T*A**GTCT**	xel:*A*****G*****-----*****T*TT*T*****AATT-*****T*A***A*---*****C*T**	Asn	rac:TAGAATGAAGCTC-GCTGGAT-AGAGTGTTTAGCTGTTAACATAAATATACGGGATCGAG-G-CCCCTCATTTCTAG	hum:***T*****CA-*T*-***T**G***C*****GTGT**GT***T*TA**T---***A*TGG*****	bov:***T*****CA-*T*A*-CT**G*****G*****G*T*CGT**GGGT*GA*-***AC**G*****	AAV	mou:***T*****CA-*TAAT--**G**A*****T*T*CGTA**T*TA*TT--*T*C**A*****	xel:*****-T***---*TT*A*****G*G*****-*****T*****	Cys	rac:GGCCTTGGGGTGT-C-A-----ACACGTGGGGTGTGCAAAACCCCA-AGATGCAGTAT-AA-TA-CCTGCCGGGGCTT	hum:A**TCC*A***A--TT--T--T**TA*T*AA*****TT*G*--***A***CITC**A--*****	bov:A***C**T***AA-TT--T--*****T*AA*****TT*AG-***A***CITC**A--*****	UGY	mou:**T***AA***A--T---T--T**T**C*AA*****TT*G*--**G**T**AG-A**C--T**A**TAA**A**	xel:AAG*C**C***--TT-G---***T*CCA*A*****T*G*--***A***AACG--**GG-TT*****CT*C	Tyr	rac:GGTAAAGTGCCCGA---GC---AGCGCGCGAATTGTAGCTTCGA-AGACAGAGGTTTGAGT--CCCCTCTTTACCA	hum:*****A*****T***---T--G*A**ATT*G*C***AA*CTA*-----G*****A*G-----*T**T*****	bov:*****A*****T***---**--A*A**ATTAG*C***AA*CTA*--***T*****C*---*T**T*****	UAY	mou:*****A*****T***---*--T*A**ATTAGTC***AA*CTA*--*C*****A*A*---*T**T*****	xel:***G*****---*TAAT*****G*****C**T-GT*****CA***---*T**TC**T**																												
Ala	rac:AGGGCTTTATCTTAA--T--TTAAAGGCCCTGAGTTGCATTACAGGA-GATGTAGGTTAATAT--CCTGCAAGTCCTA	hum:*A**GC***G*****-----*****T*G*****G*****TT-*****C**AG*GGGC--TT*****GTCT**	bov:GA**A***G*****-----*****T*GT***T*****ATT-*****A*G*GTAG*--*T*****TC*T**	GCN	mou:GA**TC***G*****-----*****CAAT***T*****AT*-*****A*G*AG*--*T*A**GTCT**	xel:*A*****G*****-----*****T*TT*T*****AATT-*****T*A***A*---*****C*T**	Asn	rac:TAGAATGAAGCTC-GCTGGAT-AGAGTGTTTAGCTGTTAACATAAATATACGGGATCGAG-G-CCCCTCATTTCTAG	hum:***T*****CA-*T*-***T**G***C*****GTGT**GT***T*TA**T---***A*TGG*****	bov:***T*****CA-*T*A*-CT**G*****G*****G*T*CGT**GGGT*GA*-***AC**G*****	AAV	mou:***T*****CA-*TAAT--**G**A*****T*T*CGTA**T*TA*TT--*T*C**A*****	xel:*****-T***---*TT*A*****G*G*****-*****T*****	Cys	rac:GGCCTTGGGGTGT-C-A-----ACACGTGGGGTGTGCAAAACCCCA-AGATGCAGTAT-AA-TA-CCTGCCGGGGCTT	hum:A**TCC*A***A--TT--T--T**TA*T*AA*****TT*G*--***A***CITC**A--*****	bov:A***C**T***AA-TT--T--*****T*AA*****TT*AG-***A***CITC**A--*****	UGY	mou:**T***AA***A--T---T--T**T**C*AA*****TT*G*--**G**T**AG-A**C--T**A**TAA**A**	xel:AAG*C**C***--TT-G---***T*CCA*A*****T*G*--***A***AACG--**GG-TT*****CT*C	Tyr	rac:GGTAAAGTGCCCGA---GC---AGCGCGCGAATTGTAGCTTCGA-AGACAGAGGTTTGAGT--CCCCTCTTTACCA	hum:*****A*****T***---T--G*A**ATT*G*C***AA*CTA*-----G*****A*G-----*T**T*****	bov:*****A*****T***---**--A*A**ATTAG*C***AA*CTA*--***T*****C*---*T**T*****	UAY	mou:*****A*****T***---*--T*A**ATTAGTC***AA*CTA*--*C*****A*A*---*T**T*****	xel:***G*****---*TAAT*****G*****C**T-GT*****CA***---*T**TC**T**																																			
Asn	rac:TAGAATGAAGCTC-GCTGGAT-AGAGTGTTTAGCTGTTAACATAAATATACGGGATCGAG-G-CCCCTCATTTCTAG	hum:***T*****CA-*T*-***T**G***C*****GTGT**GT***T*TA**T---***A*TGG*****	bov:***T*****CA-*T*A*-CT**G*****G*****G*T*CGT**GGGT*GA*-***AC**G*****	AAV	mou:***T*****CA-*TAAT--**G**A*****T*T*CGTA**T*TA*TT--*T*C**A*****	xel:*****-T***---*TT*A*****G*G*****-*****T*****	Cys	rac:GGCCTTGGGGTGT-C-A-----ACACGTGGGGTGTGCAAAACCCCA-AGATGCAGTAT-AA-TA-CCTGCCGGGGCTT	hum:A**TCC*A***A--TT--T--T**TA*T*AA*****TT*G*--***A***CITC**A--*****	bov:A***C**T***AA-TT--T--*****T*AA*****TT*AG-***A***CITC**A--*****	UGY	mou:**T***AA***A--T---T--T**T**C*AA*****TT*G*--**G**T**AG-A**C--T**A**TAA**A**	xel:AAG*C**C***--TT-G---***T*CCA*A*****T*G*--***A***AACG--**GG-TT*****CT*C	Tyr	rac:GGTAAAGTGCCCGA---GC---AGCGCGCGAATTGTAGCTTCGA-AGACAGAGGTTTGAGT--CCCCTCTTTACCA	hum:*****A*****T***---T--G*A**ATT*G*C***AA*CTA*-----G*****A*G-----*T**T*****	bov:*****A*****T***---**--A*A**ATTAG*C***AA*CTA*--***T*****C*---*T**T*****	UAY	mou:*****A*****T***---*--T*A**ATTAGTC***AA*CTA*--*C*****A*A*---*T**T*****	xel:***G*****---*TAAT*****G*****C**T-GT*****CA***---*T**TC**T**																																										
Cys	rac:GGCCTTGGGGTGT-C-A-----ACACGTGGGGTGTGCAAAACCCCA-AGATGCAGTAT-AA-TA-CCTGCCGGGGCTT	hum:A**TCC*A***A--TT--T--T**TA*T*AA*****TT*G*--***A***CITC**A--*****	bov:A***C**T***AA-TT--T--*****T*AA*****TT*AG-***A***CITC**A--*****	UGY	mou:**T***AA***A--T---T--T**T**C*AA*****TT*G*--**G**T**AG-A**C--T**A**TAA**A**	xel:AAG*C**C***--TT-G---***T*CCA*A*****T*G*--***A***AACG--**GG-TT*****CT*C	Tyr	rac:GGTAAAGTGCCCGA---GC---AGCGCGCGAATTGTAGCTTCGA-AGACAGAGGTTTGAGT--CCCCTCTTTACCA	hum:*****A*****T***---T--G*A**ATT*G*C***AA*CTA*-----G*****A*G-----*T**T*****	bov:*****A*****T***---**--A*A**ATTAG*C***AA*CTA*--***T*****C*---*T**T*****	UAY	mou:*****A*****T***---*--T*A**ATTAGTC***AA*CTA*--*C*****A*A*---*T**T*****	xel:***G*****---*TAAT*****G*****C**T-GT*****CA***---*T**TC**T**																																																	
Tyr	rac:GGTAAAGTGCCCGA---GC---AGCGCGCGAATTGTAGCTTCGA-AGACAGAGGTTTGAGT--CCCCTCTTTACCA	hum:*****A*****T***---T--G*A**ATT*G*C***AA*CTA*-----G*****A*G-----*T**T*****	bov:*****A*****T***---**--A*A**ATTAG*C***AA*CTA*--***T*****C*---*T**T*****	UAY	mou:*****A*****T***---*--T*A**ATTAGTC***AA*CTA*--*C*****A*A*---*T**T*****	xel:***G*****---*TAAT*****G*****C**T-GT*****CA***---*T**TC**T**																																																								

Fig. 9 B Comparison of the nucleotide sequences of the nine mitochondrial tRNA genes of *Rana catesbeiana* and other higher vertebrates

The L-strand sequences are shown from left to right (5' → 3')

rac: *Rana catesbeiana*, hum: human, bov: bovine, mou: mouse, xel: *Xenopus laevis*

The nucleotide sequences of the tRNA^{Trp} and tRNA^{Ala} genes of *Rana catesbeiana* were determined by (17).

Asterisks indicate positions of homology among all species. Dashes represent spaces introduced to optimize the sequence homology.

らびに RNA から DNA 合成への変換シグナルとして機能している重要な配列であると考えられている²⁵⁾。ウシガエルの H 鎖複製開始点の 3' 側にもそれらと類似した配列が存在しており、特に CSB-1 はアフリカツメガエル同様に 2 カ所存在し、しかもウシガエルの場合はその近傍を含めた配列は Fig. 6 に示すようにほぼ同一であることから、duplication により生じたものと推測されるが機能上の意味は不明である。CSB-2~3 は哺乳動物間ではきわめて類似しているが、ウシガエルの場合はそれに比べればホモロジーは低い。特にウシを除く哺乳動物の CSB-3 は、マウスで 1 カ所異なっている以外同一であり、それらの配列と比較するとウシガエルのホモロジーは約 70% 程度である。またアフリカツメガエル CSB-3 との比較においてはホモロジーはさらに低く 58% 程度であった。

このようにウシガエル D-loop 領域には、これまで報告されている高等脊椎動物の D-loop 領域同様に、機能上重要であると考えられている諸種の配列が若干の差異はあるものの保存されていた。この事実は、ウシガエルの本領域が他の高等脊椎動物の D-loop 領域と本質的に同様の機能を有することを示唆している。

2. L 鎖複製開始領域

緒言で述べたように、高等脊椎動物のミトコンドリア DNA の L 鎖複製は新生 H 鎖の複製が L 鎖複製開始領域に達し、この部分が一本鎖 DNA の状態になって初めて H 鎖の複製とは逆方向に開始される²⁶⁾。

L 鎖複製開始機構に関しては、ヒト¹²⁾ならびにマウス¹¹⁾で *in vivo* における新生 L 鎖の 5' 末端の塩基配列を決定することにより、正確な L 鎖複製開始点が同定された。さらにヒト KB 細胞のミトコンドリアから DNA primase, DNA polymerase およびその他の蛋白因子を含む画分が精製され²⁷⁾, *in vitro* で、ヒト L 鎖複製開始領域を含む一本鎖 DNA を鋳型として、新生 L 鎖合成反応が行われた^{28,29)}。その結果、L 鎖複製開始領域のループ部分に存在する T-rich な部分から RNA primer の合成が開始され、ステム部分に隣接した tRNA^{Cys}遺伝子の特定の塩基配列 (5'-GCCGG-3') の部分で、RNA から DNA 合成への変換が起こることが明らかとなった。5'-GCCGG-3' の塩基配列がこの変換の認識部位として重要なことは、この部位に 1 塩基対の人工的変異を起こすと、DNA 合成の効率が 50~80% 減少することからも確かめられている。

今回決定した、ウシガエル L 鎖複製開始領域の塩基配列をこれまでに報告^{2~5)}されている高等脊椎動物のものと比較すると、T-rich なループ部分および tRNA^{Cys}遺伝子の特定の塩基配列を含めて、その構造が良く保存されていることがわかる。このことからウシガエルの同領域も他の高等脊椎動物の L 鎖複製開始領域と同じ機能を有するものと考えられた。

3. tRNA 遺伝子

高等脊椎動物のミトコンドリア DNA には、22 種類の tRNA 遺伝子がコードされている^{2~5)}。これらの tRNA の T-loop 部分の大きさは 3~9 nt と一定でなく、保存配列 (G-T-Ψ-C-R-A) が存在しない場合が多い。また、3 次構造上非常に重要な機能を果たしていると思われる T-loop 部分および D-loop 部分に存在する特定の塩基も置換されていることが多く、細胞質 tRNA とはかなり異なる構造をとっていることが知られている。さらに、ミトコンドリア tRNA のステム部分には G-T 対の mismatch が存在していることが多い。この mismatch 自体はらせん構造に大きなねじれを起こすことはほとんどなく、ゆらぎ説³⁰⁾によればこのような塩基対の存在は可能である。しかし、ミトコンドリア tRNA のステム部分にはそれ以外の塩基対の組み合わせの mismatch もあり、細胞質 tRNA と比較すると 3 次構造上不安定な部分が存在している。

結 論

1) ウシガエルのミトコンドリアゲノム上の D-loop 領域、L 鎖複製開始領域ならびに近傍に存在する 7 種の tRNA 遺伝子の塩基配列を決定した。

2) ウシガエル D-loop 領域は 2,187 nt からなっていた。その近傍の遺伝子の配列順序は、ヒト、ウシ、マウスおよびアフリカツメガエルの同領域における配列が同一であるのに反して異なっていた。

3) ウシガエルと他の高等脊椎動物の D-loop 領域の塩基配列を比較してみると、従来と同様に種属間のホモロジーは低かった。しかし、特に D-loop 領域の機能上重要であると考えられている配列に関しては、良く保存されていた。

4) L 鎖複製開始領域は D-loop 領域とは異なり、他の高等脊椎動物との間に高いホモロジーを示した。

5) D-loop 領域および L 鎖複製開始領域近傍に存在する 7 種のミトコンドリア tRNA 遺伝子は、高等脊椎

動物のミトコンドリア tRNA 遺伝子に共通な構造上の特徴を有していた。

稿を終えるにあたり、終始御指導を賜りました第1生化学教室後藤至孝助教授および藤井裕之助手、ならびに御助言、御協力をいただきました教員各位に深く感謝の意を表します。

文 献

- Altman, P.L. and Katz, D.D.: Part I Shape and length of mitochondrial DNA. "Biological Handbooks. I. Cell Biology", p. 217~219, Federation of American Societies for Experimental Biology, Bethesda, Md., 1976.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M. H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D. P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R. and Young, I.G.: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290, 457~465, 1981.
- Anderson, S., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Eperon, I. C., Sanger, F. and Young, I.G.: Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.*, 156, 683~717, 1982.
- Bibb, M.J., Van Etten, R.A., Wright, C.T., Walberg, M.W. and Clayton, D.A.: Sequence of gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell*, 26, 167~180, 1981.
- Roe, B.A., Ma, D.P., Wilson, R.K. and Wong, F.H.: The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome. *J. Biol. Chem.*, 260, 9759~9774, 1985.
- Ojala, D., Merkel, C., Gelfand, R. and Attardi, G.: The tRNA genes punctuate the reading of genetic information in human mitochondrial DNA. *Cell*, 22, 393~403, 1980.
- Clayton, D.A.: Transcription of the mammalian mitochondrial genome. *Annu. Rev. Biochem.*, 53, 573~594, 1984.
- Chang, D.D. and Clayton, D.A.: Precise identification of individual promoters for transcription of each strand of human mitochondrial DNA. *Cell*, 36, 635~643, 1984.
- Bogenhagen, D.F., Applegate, E.F. and Yoza, B.K.: Identification of a promoter for transcription of the heavy strand of human mt-DNA: in vitro transcription and deletion mutagenesis. *Cell*, 36, 1105~1113, 1984.
- Berk, A.J. and Clayton, D.A.: Mechanism of mitochondrial DNA replication in mouse L-cells. *J. Mol. Biol.*, 86, 801~824, 1974.
- Martens, P.A. and Clayton, D.A.: Mechanism of mitochondrial DNA replication in mouse L-cells; Localization and sequence of the light-strand origin of replication. *J. Mol. Biol.*, 135, 327~351, 1979.
- Tappe, D.P. and Clayton, D.A.: Mechanism of replication of human mitochondrial DNA. *J. Biol. Chem.*, 256, 5109~5115, 1981.
- Bogenhagen, D. and Clayton, D.A.: Mechanism of mitochondrial DNA replication in mouse L-cells. *J. Mol. Biol.*, 119, 49~68, 1978.
- Bogenhagen, D., Lowell, C. and Clayton, D.A.: Mechanism of mitochondrial DNA replication in mouse L-cells; Replication of unidirectional dimer molecules. *J. Mol. Biol.*, 148, 77~93, 1981.
- Walberg, M.W. and Clayton, D.A.: Sequence of properties of the human KB cell and mouse L-cell D-loop regions of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.*, 9, 5411~5421, 1981.
- Sekiya, T., Kobayashi, M., Seki, T. and Koike, K.: Nucleotide sequence of a cloned fragment of rat mitochondrial DNA containing the replication origin. *Gene*, 11, 53~62, 1980.
- 藤井裕之: *Rana catesbeiana* ミトコンドリア全ゲノムのクローニングと URF および近傍遺伝子の塩基配列の決定. 日医大誌, 54, 277~289, 1987.
- Messing, J. and Vierira, J.: A new pairs of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments. *Gene*, 19, 269~276, 1982.
- Messing, J.: New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.*, 101, 20~78, 1983.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. and Hsu, L.: Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria; Genetic transformation of *Escherichia coli* R-Factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 2110~2114, 1972.
- Barnes, W.M.: Kilo-sequencing; Creation of an ordered nest of asymmetric deletions across a large target sequence carried on phage M13. *Methods Enzymol.*, 101, 98~122, 1983.
- Sanger, F., Coulson, A.R., Barrell, B.G., Smith, A.J.H. and Roe, B.A.: Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J. Mol. Biol.*, 143, 161~178, 1980.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463~5467, 1977.
- Crews, S., Ojala, D., Posakony, J., Nishiguchi, J. and Attardi, G.: Nucleotide sequence of a region of human mitochondrial DNA containing the precisely identified origin of replication. *Nature*, 277, 192~198, 1979.
- Gillum, A.M. and Clayton, D.A.: Mechanism of mitochondrial DNA replication in mouse L-cells; RNA priming during the initiation of heavy-strand synthesis. *J. Mol. Biol.*, 135, 353~368, 1979.
- Clayton, D.A.: Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*, 28, 693~705, 1982.
- Wang, T.W. and Clayton, D.A.: Isolation and characterization of a DNA primase from human mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 260, 11530~11535, 1985.
- Wang, T.W. and Clayton, D.A.: In vitro replication of human mitochondrial DNA; Accurate initiation at the origin of light strand synthesis. *Cell*, 42, 951~958, 1985.
- Hixson, J.E., Wang, T.W. and Clayton, D.A.: Both the conserved stem-loop and divergent 5'-flanking sequences are required for initiation at the human mitochondrial origin of light-strand DNA replication. *J. Biol. Chem.*, 261, 2384~2390, 1986.
- Crick, F.H.R.: Codon-anticodon pairings; The wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.*, 19, 548~555, 1966.

(受付: 1986年12月25日)