— 原 著 —

Rana catesbeiana ミトコンドリアリボゾーム RNA の一次および二次構造*

長江 安洋

日本医科大学第1生化学教室 (主任: 岡崎太郎教授)

The primary and secondary structures of the ribosomal RNAs of *Rana catesbeiana* mitochondrion

Yasuhiro Nagae

Department of Biochemistry, Nippon Medical School

The present study was undertaken to further clarify the unique features of the structure and function of the mitochondrial ribosomal RNAs (rRNAs) of animal cells.

1) The entire mitochondrial genome of the bullfrog, *Rana catesbeiana*, was cloned into a plasmid vector pBR322 at the unique *Bam* HI site, and the nucleotide sequences of the small (12S) and large (16S) rRNA genes and their flanking ND1 and two tRNA genes were determined. The organization and the directions of the transcription of these genes were exactly the same as those of the mitochondrial genomes of the five animal species so far known.

2) The *Rana catesbeiana* 12S and 16S rRNA genes consisted of 937 and 1,585 bases, respectively. The nucleotide sequence homologies of each gene to their counterparts in other animals were in the range of 66 to 75%. These values are much lower than the 95% observed among nuclear-encoded cytoplasmic rRNAs of the five animals, indicating that mutations occur faster in the mitochondrial than in the cytoplasmic rRNAs. As to the base composition, the GC contents of the 12S and 16S mitochondrial rRNAs of *Rana catesbeiana* were 43 and 40%, respectively, which are also characteristically low as compared with the values of 55% in the *E. coli* and 60% in the cytoplasmic rRNAs.

3) The putative secondary structures of the mitochondrial rRNAs of *Rana catesbeiana* were drawn by the comparative analytical method, based on the proposed models for *E. coli* and some cytoplasmic rRNAs. In spite of the considerable differences in size and base compositions found in the rRNAs from different species and different organelles, the secondary structures of the mitochondrial rRNAs were highly conserved, implying that these structures are essential for the functioning of rRNAs.

4) The ND1 gene of *Rana catesbeiana* was encoded by 961 bases and, as deduced from the nucleotide sequence, the ND1 product consisted of 320 amino acids with a molecular weight of 35,714. The nucleotide and amino acid sequence homologies of the ND1 between *Rana* and human and between *Rana* and *Xenopus laevis* were 67 and 66%, and 70 and 74%, respectively, indicating that the ND1 sequence is conserved to similar extents as those of other mitochondrial-encoded proteins.

5) The nucleotide sequences of tRNA-Val and tRNA-Leu (UUR), adjacent to the rRNAs and ND1 genes, and the clover leaf structures of these tRNAs were also determined, which showed characteristic features seen in the mitochondrial tRNA genes of the higher animals.

Key words: mitochondrial rRNAs, gene structure, secondary structure, ND1 gene, *Rana catesbeiana*

緒 言

Correspondence to Yasuhiro Nagae, Department of Biochemistry, Nippon Medical School, 1-1-5, Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

* 本論文は学位論文である。

脊椎動物ミトコンドリアゲノムには、ミトコンドリア内膜を構成する13種の蛋白質遺伝子とともに、大小2種のリボゾームRNA (rRNA) 遺伝子および22種

の転移 RNA (tRNA) 遺伝子が含まれており、細胞質とは異なる蛋白質合成系を構成している。

rRNA は特定の蛋白質 (リボソーム蛋白質) とともにリボソームを形成し、原核細胞から真核細胞に至るすべての細胞に存在する。その大きさや種類は種属間や細胞内小器官の別によって異なり、大腸菌をはじめとする原核細胞では沈降定数 23S, 16S, 5S の 3 種がある。真核細胞の細胞質 rRNA はこれより大きく、一般に 28S, 18S, 5.8S, 5S の 4 種が区別される。一方、動物ミトコンドリア rRNA は 16S, 12S の 2 種で、両者は大腸菌の 23S, 16S, 細胞質の 28S, 18S にそれぞれ対応する。5S rRNA はミトコンドリアには存在しない。

rRNA の構造と機能は従来大腸菌において詳細に研究され真核生物におよんでいるが、近年遺伝子工学の進展とともにさらに多くの種属について rRNA の一次構造の解析が進み、またそれに基づいた二次構造の解析が行われている。その結果、各 rRNA では種属間でその大きさが異なるにもかかわらず、進化の過程で特定の構造が保存されており、その構造がリボソームの形成や機能に重要であることが示唆されている。rRNA の構造解析はこのように蛋白質合成機構を分子レベルで明らかにする上からも、また各種属の進化の過程や細胞内小器官の起源を知る上でもきわめて重要である。

脊椎動物ミトコンドリア rRNA に関してはその遺伝子構造の解析から、現在までにヒト¹⁾、マウス²⁾、ラット^{3,4)}、ウシ⁵⁾およびアフリカツメガエル^{6,7)}で構造が決定されている。しかしミトコンドリア rRNA および蛋白質合成機構の特徴を一層明らかにするためには、なお多くの種属における比較解析が必要である。われわれは先にウシガエルミトコンドリア DNA 全長のクローニングを行い⁸⁾、現在その全塩基配列の決定を行っている。著者は本研究において 12S および 16S rRNA 遺伝子ならびにその近傍遺伝子の塩基配列を決定するとともに、両 rRNA の二次構造に関する比較解析を行ったのでその結果を報告する。

実験材料および方法

(1) 実験材料

ウシガエル肝ミトコンドリア DNA を一カ所の *Bam* HI site で切断した後、その全長 (17.6 kb) をプラスミドベクター pBR322 の *Bam* HI site に挿入して得た組換え体 pRcm1⁹⁾を用いた。またクローニングベ

クターとして M 13 mp 11⁹⁾および mp 18¹⁰⁾ファージ、宿主大腸菌として K 12 株由来の JM 103 (ΔP_1 , lysogen) を使用した。

(2) 試薬

以下に示す各社の製品を使用した。

各種制限酵素 (宝酒造および Boehringer Mannheim) ; T4 DNA ligase, Klenow fragment, exonuclease III, *Bal* 31 nuclease (宝酒造) ; DNase I, RNase A, alkaline phosphatase (calf intestine) (Boehringer Mannheim) ; proteinase K (MERCK) ; ultrapure low-melting agarose (Bethesda Research Laboratories (BRL)) ; IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside), X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) (和光純薬) ; Bacto-tryptone, Bacto-yeast extract (Difco) ; M1-primer (宝酒造) ; [α -³²P]deoxycytidine triphosphate (400 Ci/mmol) (Amersham)

その他の試薬はすべて市販の特級品を用いた。

(3) 実験方法

1) 12S および 16S rRNA 遺伝子を含む DNA 断片のクローニング

先に Fujii ら⁸⁾、米山¹¹⁾によって解析されたウシガエルミトコンドリア DNA の制限酵素地図および同 DNA 上の 12S rRNA 遺伝子の存在位置と、これまでに報告されている高等脊椎動物ミトコンドリアゲノムにおける各遺伝子座位の類似性から、**Fig. 1** に示した制限酵素部位で pRcm 1 DNA を切断し解析を行った。pRcm 1 を制限酵素で処理した後、low melting agarose gel 電気泳動を行い、互いに重なりあう DNA 断片 (*Hin* d III G 0.8 kb, *Hin* d III F 2.2 kb, *Xba* I-*Hinc* II 1.1 kb) を精製した。*Hin* d III G および *Hin* d III F 断片はバクテリオファージ M 13 mp 11 の multi-cloning site に両方向に挿入し、また *Xba* I-*Hinc* II 断片は mp 11 および mp 18 に挿入した。この組換え体を Messing らの方法¹⁰⁾に従い *E. coli* JM 103 にトランスフォームし、複製中間体を得た。

2) DNA 塩基配列の決定および解析

Ethidium bromide-CsCl 密度勾配遠心による精製後、Barnes らの kilo-sequencing 法¹²⁾に準じて DNase I, exonuclease III, nuclease *Bal* 31 で処理し、各種欠失クローンを作成した。これらの各クローンの培養液上清のファージ粒子より一本鎖 DNA を抽出し、Sanger らの dideoxynucleotide chain termination 法¹³⁾により塩基配列を決定した。得られた塩基配列を DEC

Fig. 1 Restriction map of *Rana catesbeiana* mitochondrial DNA and the *Hind* III G, *Xba* I-*Hinc* II and *Hind* III F fragments subjected to sequence analysis
The tRNA genes are denoted by one letter amino acid notation and the polarity is indicated by ► (L-strand sense) or ◄ (H-strand sense).

社製 VAX 11/750 minicomputer 上の UWGCG sequence analysis software package および IDEAS を用いて解析した。

3) rRNA 二次構造の解析

二次構造は、ウシガエルと他の脊椎動物ミトコンドリア rRNA 遺伝子の塩基配列とを並列して比較した後、すでに報告されている大腸菌^{14,15)}および哺乳動物ミトコンドリア¹⁶⁻¹⁹⁾の二次構造モデルを基に比較分析法 (comparative analysis) を用いて決定した。

なお、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. 各遺伝子の同定

Fig. 2 に今回明らかにしたウシガエルミトコンドリア rRNA 遺伝子ならびにその近傍領域を含む DNA 断片の全塩基配列 (3,903 塩基) を示した。このうち 12S rRNA 遺伝子の一部を含む配列 (1~691 塩

基) はすでに米山¹¹⁾によって報告されたものである。

Fig. 2 の塩基配列をこれまでに報告されている高等脊椎動物ミトコンドリア DNA の塩基配列と比較した結果から、この DNA 断片には 5' 端より順次 tRNA^{Phe}, 12S rRNA, tRNA^{Val}, 16S rRNA, tRNA^{Leu} (UUR), ND1, tRNA^{Ile}, tRNA^{Gln}, および tRNA^{Met} の一部、の各遺伝子が存在していることが明らかになった。またこれらの遺伝子の配列順序および転写の方向は哺乳動物およびアフリカツメガエルと同一であり、さらに各遺伝子間には一塩基のスペーサーも存在しなかった。これらの事実は動物ミトコンドリアの特徴とされているきわめて経済的な遺伝子構成が、ウシガエルミトコンドリアでも保存されていることを示すものである。

2. rRNA 遺伝子

ウシガエルミトコンドリア 12S rRNA 遺伝子は 937 塩基対、16S rRNA 遺伝子は 1,585 塩基対から成っていた。現在知られている他の脊椎動物のミトコンド

Fig. 2 Nucleotide sequence of *Rana catesbeiana* mitochondrial 12S and 16S rRNA genes and their adjacent genes
The nucleotide sequence of the L-strand is shown. The sense of each gene is represented by arrows, → (L-strand) or ← (H-strand). The deduced amino acid sequence of the ND1 is shown by one letter amino acid notation above the nucleotide sequence.

ア rRNA 遺伝子の構成塩基数は 12S rRNA が 945 ~955 塩基対, 16S rRNA が 1,559~1,631 塩基対であり, ウシガエル遺伝子はこれらとほぼ同塩基数であった。

Table 1 に示すように, ウシガエルと他動物ミトコンドリア rRNA 遺伝子の間で塩基配列のホモロジーを求めた結果は, 12S rRNA 遺伝子に関しては哺乳動物と 68~71%, アフリカツメガエルと 75%, 16S rRNA 遺伝子に関しては哺乳動物と 66~69%, アフリカツメガエルと 74%であり比較的高い値を示した。し

かし, 細胞質 rRNA については脊椎動物間でそのホモロジーが 95%以上であることが知られており²⁰⁾, 細胞質と比較するとミトコンドリア rRNA では種間の変異が多いことが明らかである。

一方, 塩基組成については, GC 含量が 12S rRNA で 43%, 16S rRNA で 40%であり, 他動物ミトコンドリア rRNA で前者が 36~46%, 後者が 35~43%であることとよく一致した (Table 1)。これに比べて, 細胞質 rRNA の GC 含量は約 60%²⁰⁻²⁵⁾, 大腸菌 rRNA では約 55%²⁶⁻²⁸⁾であり, 一般に高いことが知られてい

Table 1 The nucleotide sequence homologies and GC contents of *Rana catesbeiana* and other higher vertebrate mitochondrial rRNAs

	12S rRNA		16S rRNA	
	Sequence homology(%)	G+C content(%)	Sequence homology(%)	G+C content(%)
<i>Rana catesbeiana</i>	—	43	—	40
Human	68	46	69	43
Mouse	68	36	66	35
Rat	69	39	67	38
Bovine	71	41	68	39
<i>Xenopus laevis</i>	75	45	74	39

Sequence homologies were calculated between *Rana catesbeiana* and each animals, as $2N_1/N_1+N_2 \times 100(\%)^{49}$, where N_1 and N_2 indicate the total nucleotide numbers being compared and N indicates the number of identical residues.

る。以上の事実はウシガエルにおいても、ミトコンドリア rRNA 遺伝子の一次構造上の特徴がよく保たれていることを示している。

3. ミトコンドリア rRNA の二次構造

rRNA 遺伝子の塩基配列から、その転写産物である rRNA の二次構造を推定することができる。二次構造の解析法には従来からいくつかの確立された方法²⁹⁾があるが、今回著者は大腸菌および哺乳動物ミトコンドリア rRNA の二次構造モデルを基に、比較分析法 (comparative analysis) による推定を行った。

Fig. 3 はウシガエルのミトコンドリア 12S rRNA の塩基配列を今までに知られている脊椎動物の塩基配列と並列して比較したものである。各ボックスは二次構造上、互いに塩基対を作りえる領域を示し、それぞれの数字はダッシュの付いた数字と対になってヘリックス構造をとることができる。図のように、各ボックスの位置および対応性はウシガエルでも他動物のものとよく一致し、各動物間で rRNA 二次構造がきわめて類似していることを示唆している。またミトコンドリア 16S rRNA についても同様の解析を行い **Fig. 4** に示した。

Fig. 3 からウシガエルミトコンドリア 12S rRNA について各塩基対によって構成されるステムと、その間に介在するループとから成る二次構造モデルを作製し、これを大腸菌 16S rRNA モデルと比較して **Fig. 5** に示した^{14-16,19)}。また同様に 16S rRNA についても **Fig. 4** からその二次構造モデルを作製し、大腸菌 23S rRNA モデルと比較して **Fig. 6** に示した^{15,17-19)}。**Fig. 5** では 12S rRNA の全長を二つのドメイン (A,

B) に、**Fig. 6** では 16S rRNA の全長を六つのドメイン (A~F) に分けて示してある。図のようにウシガエルと大腸菌の構造を比較すると、両者の間で二次構造が著しく異なった領域と、きわめて相似性の高い領域のあることが分かる。すなわち、図のシャドーで示した領域では塩基対の長さやループの形が大きく違い、これは進化に伴うヘリックス構造の短縮や欠失が主としてこの領域に起こったためと思われる。これに対して、他の領域では両者の二次構造が高度に保持されていることが明らかである。以上の結果からミトコンドリア rRNA は二次構造の上からシャドーで示した変異領域 (variable region) とそれ以外の保存領域 (conserved region) との二つの領域に大きく分けられることが示唆される。変異領域、保存領域の差をさらに明らかにするために、**Fig. 7** に両領域における大腸菌とウシガエルミトコンドリア rRNA の塩基数 (長さ) を示した。また、**Fig. 8** は各動物ミトコンドリア rRNA 間の塩基配列上のホモロジーを、同様に **Fig. 9** はその GC 含量を、いずれも変異および保存領域に分けて比較したものである。これらの結果はいずれも種属間の構造上の変異が保存領域に比べて変異領域に多く起こっていることを示しており、保存領域の構造がミトコンドリア rRNA の機能上、より重要であることを示唆している³⁰⁾。

4. ND1 遺伝子^{31,32)}

Fig. 2 に示したごとくウシガエルミトコンドリア ND1 遺伝子は 961 塩基より構成され、これから推定される ND1 蛋白質はアミノ酸 320 残基より成り、分子量は 35,714 であった。塩基配列およびこれから推定さ

Fig. 3 Compilation of the nucleotide sequences of mitochondrial 12S rRNAs of higher vertebrates

The 12S rRNA sequences of human¹⁾ (H.), mouse²⁾ (M.), rat³⁾ (Rt.), bovine⁵⁾ (B.), *Xenopus laevis*^{6,7)} (X.) and *Rana catesbeiana* (Rn.) are aligned to maximize homology in the primary structure. Boxed areas having paired-numbers (1-1' and so on) indicate sequences involved in putative helices in the secondary structure model.

れるアミノ酸配列上のホモロジーは Table 2 に示すごとくであった。開始コドンは普遍コドンの ATG と異なり ATA であり、また終止コドンは存在せず T で

終了していた。これはポリアデニル化により終止コドン TAA が出現すると考えられているミトコンドリアの蛋白質遺伝子の特徴によく一致した^{1,33)}。

(423) — 7 —

Symbols and abbreviations used are the same as described in Fig. 3. The nucleotide sequence of rat 16S rRNA gene has been reported in (4).

E. coli 16S rRNA

Rana catesbeiana mitochondrial 12S rRNA

Fig. 5 A putative secondary structure model for *Rana catesbeiana* mitochondrial 12S rRNA

Secondary structure is drawn according to the proposed models and compared with the model for *E. coli* 16S rRNA^(14-16,19). The structure is divided into two domains (A and B) and the connections between domains are indicated by arrows. A-U and G-C base pairs are represented by (-), while G-U base pairs are represented by (+).

Shaded areas denote variable regions.

Fig. 6 A putative secondary structure model for *Rana catesbeiana* mitochondrial 16S rRNA

The structure being divided into 6 domains (A-F) is drawn according to the proposed models and compared with the model for *E. coli* 23S rRNA^{15,17-19}. Symbols used are the same as described in Fig. 5.

5. tRNA 遺伝子

Fig. 10 は今回決定した 2 種の tRNA 遺伝子, tRNA^{Val}および tRNA^{Ile}(UUR)について, クローバー葉構造を示したものである。両者とも細胞質 tRNA あるいは原核細胞 tRNA が有するいくつかの共通構造

を欠いていた。すなわち tRNA^{Val}は普遍塩基配列である 'T ψ C' loop の G-T- ψ -C-Pu-A 配列, 'DHU' loop の GG 配列を欠いており, tRNA^{Leu}(UUR) はアンチコドンの一つ手前の塩基が T ではなく C に置き変わっていた。また両者ともステム内に A-C などの非塩

Fig. 7 Lengths of the variable and conserved regions of *Rana catesbeiana* mitochondrial rRNAs relative to those of the corresponding *E. coli* rRNAs

Calculations were made by taking the lengths of each regions of *E. coli* rRNAs as 100%.

■ *R. catesbeiana* mitochondrial rRNAs
□ *E. coli* 16S and 23S rRNAs

Fig. 8 Comparison of the nucleotide sequence homologies of *Rana catesbeiana* to other higher vertebrate mitochondrial rRNAs in the variable and conserved regions

The method of calculation of homology is the same as described in Table 1.

■ variable region
□ conserved region

基対部分が存在したり、あるいはループの構成塩基数が異なるなど変異が数多く認められた。これらの点はい他の脊椎動物も同様であり、動物細胞ミトコンドリアの特徴とされているものである³⁴⁾。

Fig. 9 Comparison of the GC contents in the variable and conserved regions of higher vertebrate mitochondrial rRNAs

■ variable region
□ conserved region

考 察

ミトコンドリアには環状2本鎖DNAから成る独自のゲノムが存在する。高等脊椎動物においては、現在までにヒト、ウシ、マウス、アフリカツメガエルの4種属においてその全塩基配列が決定されている。これらのミトコンドリアゲノムはすべて同一種類の遺伝子(cytochrome c oxidase サブユニット I-III, cytochrome b, ATPase サブユニット 6 および 8, NADH dehydrogenase サブユニット ND1-6 および 6L, 12S および 16S rRNA, 22 種の tRNA, をコードする遺伝子)を含んでおり、各遺伝子の配列順序も同一である。また遺伝子間にはスペーサーがほとんど存在せず、それぞれの蛋白質および rRNA 遺伝子の間には tRNA 遺伝子が区切りとなって存在しており、きわめて緻密な経済的構造を取っている。

ミトコンドリア DNA はこのように種属間に共通の特徴ある構造を保持している。しかし、その反面、各遺伝子の塩基配列に関しては種属間のホモロジーが比較的低く、ミトコンドリア DNA の進化過程における塩基置換速度は核内 DNA に比べると約 10 倍速いといわれている³⁵⁾。rRNA 遺伝子の種属間ホモロジーにしても、細胞質 rRNA では 95% 以上であるのに対して、今回の結果にもみられるようにミトコンドリア

Table 2 Characteristics of the higher vertebrate ND 1 genes and deduced products

	Nucleotide sequence homology(%)	Amino acid sequence homology(%)	No. of amino acids	Initiation/ Termination codons
<i>Rana catesbeiana</i>	—	—	320	ATA/ *
Human	67	66	318	ATA/ *
Mouse	67	66	315	ATT/ *
Bovine	67	69	318	ATG/ *
<i>Xenopus laevis</i>	70	74	323	ATG/ *

The nucleotide and amino acid sequence homologies were calculated between *Rana catesbeiana* and each animals, as described in Table 1. Asterisks indicate that the termination codons are created by polyadenylation of the transcription products (mRNA).

Fig. 10 Secondary structure of *Rana catesbeiana* tRNAs

Watson-Crick base pairs are represented by (:) and (+), respectively. Comparison with the tRNAs of other vertebrates is also shown. Asterisks indicate identical nucleotides with *Rana catesbeiana*.

Rn: *Rana catesbeiana*, Xe: *Xenopus laevis*, Bo: bovine, Mo: mouse, Hu: human.

rRNA では 66~75%であった。しかし、このホモロジーはミトコンドリア内の他の遺伝子のホモロジーがおおむね 50~60%であるのに比較すれば高いといえる³⁶⁾。このことはミトコンドリアゲノム内では rRNA 遺伝子に対する進化上の選択圧が他の遺伝子に比べ高いことを示唆している。

周知のように、rRNA はリボソーム重量の 50~60%

以上を占め、大小二つのリボソームサブユニットの骨格を成しているが、同時に他の RNA (アミノアシル tRNA, mRNA, snRNA) や諸種の蛋白質因子との相互作用を通じて蛋白質合成の諸段階に関与している。rRNA あるいはリボソームの構造と機能については従来から大腸菌 rRNA で詳細な研究が行われてきたが、近年他の多くの種属に関しても rRNA の塩基配

列, リボゾームの形態的観察が報告されている。これらの研究から, 現在では rRNA の示す特定の機能はその立体構造に依存することが明らかである。実際に rRNA の塩基配列にみられる相補性や, RNase や他の薬剤に対する抵抗性などから rRNA が特定の立体構造をとることは十分な論拠を有している。rRNA の二次構造の解析はやはり大腸菌を中心に行われ, 多くのモデルが提示されている¹⁴⁻¹⁹⁾。塩基配列からの二次構造の推定法には, 現在, 比較分析法 (comparative analysis), コンピューター法 (computer analysis, free energy prediction), 実験解析法 (experimental analysis) の三つがある²⁹⁾。コンピューター法は自由エネルギーが最小となるような二次構造を求める方法であるが, rRNA のような大きな RNA 分子ではこの方法のみでは不十分である。今回の結果には示さなかったが, ウシガエル rRNA においても本法によって求めた二次構造モデルは著しく妥当性を欠いていた。これに対して実験解析法には諸種の化学薬剤や酵素により RNA 分子中の一本鎖あるいは二本鎖部分を検出する方法や, 直接電子顕微鏡や NMR で確認する方法などが含まれる。しかしこれらの方法のうちで現在最も有力な方法とされるのは比較分析法である。この方法の原理となるものは, ①比較しようとする rRNA が基本的に同一の二次構造を有すると仮定する, ②両者の塩基配列をホモロジーが最大になるように配列する, ③推定されるヘリックス間に相補的な塩基置換があればそのヘリックスの存在が確実視される, ことである。著者は今回この方法によって, ウシガエルミトコンドリア rRNA の塩基配列を他動物ミトコンドリア rRNA と比較して二次構造を推定し, これを大腸菌および細胞質 rRNA の構造と対照した。

すでに述べたように, この結果からウシガエル rRNA の二次構造には大腸菌と比較して高度に保存されている領域 (conserved region) と, これとは反対に著しく相違している領域 (variable region) とが明瞭に区別された。一般に動物細胞ミトコンドリアの 12S および 16S rRNA は, これに対応する大腸菌の 16S および 23S, あるいは真核細胞細胞質の 18S および 28S rRNA に比べると大きさ (塩基数) がかなり小さい。またその塩基組成に関しても, GC 含量が大腸菌 rRNA の 55%, 細胞質 rRNA の 60% に比べて低い。興味深いことは, 各 rRNA 間におけるこれらの一次構造上の相違がいずれも二次構造の上では一定領域 (variable region) に限定していることである。今回ウ

シガエルと大腸菌の間でもこの事実が明瞭に認められた。すなわちミトコンドリア rRNA はその機能に必要な最小限の構造を保持しているものと思われる。実際, ミトコンドリア rRNA にも保存されている最小限の保存領域がリボゾーム機能に重要であることはクロラムフェニコール耐性においても明らかである。クロラムフェニコールはミトコンドリアにおいて特異的にペプチルトランスフェラーゼに作用して蛋白質合成系を阻害すると考えられている。しかし, クロラムフェニコールに耐性を示す哺乳動物細胞³⁷⁻⁴⁰⁾, 酵母⁴¹⁾ではミトコンドリア rRNA 内に一塩基置換が存在することが証明されており, この領域がペプチルトランスフェラーゼとの相互作用に重要であることが明らかにされている。また, これらの塩基置換部位は Fig. 6 に示すドメイン E 中央部のループ構造に集中しており, こうした二次構造をとることが rRNA 機能に必要と考えられる。

ところで, rRNA 分子内には立体構造の保持に必要な塩基配列とともに, 他の RNA との相互作用に必要な多くの一本鎖配列があると考えられる⁴²⁻⁴⁴⁾。通常大腸菌の 16S (小サブユニット) rRNA の 3' 末端付近に存在する 5'-A-C-C-U-C-C-U-U-3' 配列は, mRNA 開始コドンの上流約 10 塩基にある塩基配列 (Shine-Dalgarno 配列⁴⁵⁾) と相補性を有し, rRNA と mRNA との相互作用を示す典型的な例として有名である。しかし現在までに知られている高等動物ミトコンドリア rRNA の 3' 末端にはいずれもこの配列が存在せず, 今回のウシガエル 12S rRNA においても見出せなかった。ミトコンドリア mRNA には非翻訳領域がほとんどなく, これに対応してリボゾームによる開始コドンの認識機構はかなり単純化されていると考えられる。これらの事実から, ミトコンドリアでは蛋白質合成の翻訳レベルにおける調節は細胞質に比べ弱いものと思われる。調節の主体が転写レベルにあることが示唆される^{46,47)}。

結 論

1) ウシガエルミトコンドリア 12S, 16S rRNA 遺伝子, ND1 遺伝子および 2 種の tRNA 遺伝子の塩基配列を決定した。この部位の遺伝子配列およびその方向性は他の脊椎動物のものと一致した。また各遺伝子間にはスパーサーが存在せず, きわめて密に配列していた。

2) 12S rRNA 遺伝子は 937 塩基, 16S rRNA 遺伝

子は1,585塩基からなり、他の脊椎動物との相同性は、それぞれ68~75%、66~74%であった。一方、二次構造は塩基配列の違いにもかかわらず高度に保存されていた。

3) 12S および 16S rRNA の二次構造には大腸菌モデルと比較して塩基の欠失の起こっている領域が明瞭に区別された。これらの領域の塩基配列は他種 rRNA と異なるのみでなく、ミトコンドリア rRNA 間においても相同性が低かった。また GC 含量も特にこの領域で低かった。

4) ND1 遺伝子は 961 塩基から成り、アミノ酸 320 残基に相当した。塩基およびアミノ酸配列の相同性は、それぞれヒトと 67%、66%、アフリカツメガエルと 70%、74%であった。

5) tRNA^{Val} および tRNA^{Leu} (UUR) 遺伝子はいずれも高等動物ミトコンドリア tRNA 遺伝子に共通の構造上の特徴を有していた。

稿を終えるにあたり、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博士、ならびに御助言、御協力いただきました教室員各位に深く謝意を表します。

文 献

- 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.
- Bibb, M.J., Van Etten, R.A., Wright, C.T., Walberg, M.W. and Clayton, D.A.: Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell*, 26, 167~180, 1981.
- Kobayashi, M., Seki, T., Yaginuma, K. and Koike, K.: Nucleotide sequences of small ribosomal RNA and adjacent transfer RNA genes in rat mitochondrial DNA. *Gene*, 16, 297~307, 1981.
- Saccone, C., Catatore, P., Gadaleta, G., Gallerani, R., Lanave, C., Pepe, G. and Kroon, A.M.: The nucleotide sequence of the large ribosomal RNA gene and the adjacent tRNA genes from rat mitochondria. *Nucleic Acids Res.*, 9, 4139~4148, 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; Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.*, 156, 683~717, 1982.
- Roe, B.A., Ma, D.-P., Wilson, R.K. and Wong, J.F.-H.: The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome. *J. Biol. Chem.*, 260, 9759~9774, 1985.
- Dunon-Bluteau, D. and Brun, G.: The secondary structures of the *Xenopus laevis* and human mitochondrial small ribosomal subunit RNA are similar. *FEBS Lett.*, 198, 333~338, 1986.
- Fujii, H., Shimada, T., Goto, Y. and Okazaki, T.: Cloning of the mitochondrial genome of *Rana catesbeiana* and the nucleotide sequences of the ND2 and five tRNA genes. *J. Biochem.*, 103, 474~481, 1988.
- Messing, J.: New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.*, 101, 20~78, 1983.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J.: Improved M13 phage cloning vectors and host strains; Nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33, 103~119, 1985.
- 米山芳雄: *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. *日医大誌*, 54, 429~440, 1987.
- Barnes, W.M., Bevan, M. and Son, P.H.: 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., Nicklen, S. and Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463~5467, 1977.
- Woese, C.R., Gutell, R., Gupta, R. and Noller, H.F.: Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.*, 47, 621~669, 1983.
- Maly, P. and Brimacombe, R.: Refined secondary structure models for the 16S and 23S ribosomal RNA of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, 11, 7263~7286, 1983.
- Huysmans, E. and De Wachter, R.: Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Res.*, 14(Suppl.), r73~r118, 1986.
- Glitz, C., Zwieb, C., Brimacombe, R., Edwards, K. and Kossel, H.: Secondary structure of the large subunit ribosomal RNA from *Escherichia coli*, *Zea mays* chloroplast, and human and mouse mitochondrial ribosomes. *Nucleic Acids Res.*, 9, 3287~3306, 1981.
- Branlant, C., Krol, A., Machatt, M.A., Pouyet, J. and Ebel, J.P.: Primary and secondary structures of *Escherichia coli* MRE 600 23S ribosomal RNA; Comparison with models of secondary structure for maize chloroplast 23S rRNA and for large portions of mouse and human 16S mitochondrial rRNAs. *Nucleic Acids Res.*, 9, 4303~4324, 1981.
- Brimacombe, R.: Conservation of structure in ribosomal RNA. *Trends Biochem. Sci.*, 9, 273~277, 1984.
- Chan, Y.L., Gutell, R., Noller, H.F. and Wool, I.G.: The nucleotide sequence of a rat 18S ribosomal ribonucleic acid gene and a proposal for the secondary structure of 18S ribosomal ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.*, 259, 224~230, 1984.
- Raynal, F., Michot, B. and Bachelier, J.P.: Complete nucleotide sequence of mouse 18S rRNA gene; Comparison with other available homologs. *FEBS Lett.*, 167, 263~268, 1984.
- Selim, M. and Maden, B.E.H.: Nucleotide sequence of *Xenopus laevis* 18S ribosomal RNA inferred from gene sequence. *Nature*, 291, 205~208, 1981.
- Hassouna, N., Michot, B. and Bachelier, J.P.: The complete nucleotide sequence of mouse 28S rRNA gene;

- Implications for the process of size increase of the large subunit rRNA in higher eukaryotes. *Nucleic Acids Res.*, 12, 3563~3583, 1984.
- 24) Hadjiolov, A.A., Georgiev, O.L., Nosikov, V.V. and Yavachev, L.P.: Primary and secondary structure of rat 28S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.*, 12, 3677~3693, 1984.
 - 25) Ware, V.C., Tague, B.W., Clark, C.G., Gourse, R.L., Brand, R.C. and Gerbi, S.A.: Sequence analysis of 28S ribosomal DNA from the amphibian *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Res.*, 11, 7795~7817, 1983.
 - 26) Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J. and Noller, H.F.: Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 4801~4805, 1978.
 - 27) Carbon, P., Ehresmann, C., Ehresmann, B. and Ebel, J.P.: The sequence of *Escherichia coli* ribosomal 16S RNA determined by new rapid gel methods. *FEBS Lett.*, 94, 152~156, 1978.
 - 28) Brosius, J., Dull, T.J. and Noller, H.F.: Complete nucleotide sequence of a 23S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 201~204, 1980.
 - 29) Noller, H.F.: Structure of ribosomal RNA. *Annu. Rev. Biochem.*, 53, 119~162, 1984.
 - 30) Brimacombe, R. and Stiege, W.: Structure and function of ribosomal RNA. *Biochem. J.*, 229, 1~17, 1985.
 - 31) Chomyn, A., Mariottini, P., Cleeter, M.W.J., Ragan, C.I., Yagi, A.M., Hatefi, Y., Doolittle, R.F. and Attardi, G.: Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH dehydrogenase. *Nature*, 314, 592~597, 1985.
 - 32) Mariottini, P., Chomyn, A., Riley, M., Cottrell, B., Doolittle, R.F. and Attardi, G.: Identification of the polypeptides encoded in the unassigned reading frames 2, 4, 4L, and 5 of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 1563~1567, 1986.
 - 33) Ojala, D., Montoya, J. and Attardi, G.: tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*, 290, 470~474, 1981.
 - 34) Attardi, G.: Animal mitochondrial DNA; An extreme example of genetic economy. *Int. Rev. Cytol.*, 93, 93~145, 1985.
 - 35) Brown, W.M., George, M., Jr. and Wilson, A.C.: Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 1967~1971, 1979.
 - 36) Ferris, S.D., Brown, W.M., Davidson, W.S. and Wilson, A.C.: Extensive polymorphism in the mitochondrial DNA of apes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 6319~6323, 1981.
 - 37) Blanc, H., Wright, C.T., Bibb, M.J., Wallace, D.C. and Clayton, D.A.: Mitochondrial DNA of chloramphenicol-resistant mouse cells contains a single nucleotide change in the region encoding the 3' end of the large ribosomal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 3789~3793, 1981.
 - 38) Kearsey, S.E. and Craig, I.W.: Altered ribosomal RNA genes in mitochondria from mammalian cells with chloramphenicol resistance. *Nature*, 290, 607~608, 1981.
 - 39) Blanc, H., Adams, C.W. and Wallace, D.C.: Different nucleotide changes in the large rRNA gene of the mitochondrial DNA confer chloramphenicol resistance on two human cell lines. *Nucleic Acids Res.*, 9, 5785~5795, 1981.
 - 40) Koike, K., Taira, M., Kuchino, Y., Yaginuma, K., Sekiguchi, T. and Kobayashi, M.: Mutations of the rat mitochondrial genome. "Mitochondria 1983, Nucleo-Mitochondrial Interactions" (Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F. eds.), p. 371~387, de Gruyter, Berlin, 1983.
 - 41) Dujon, B.: Sequence of the intron and flanking exons of the mitochondrial 21S rRNA gene of yeast strains having different alleles at the ω and rib-1 loci. *Cell*, 20, 185~197, 1980.
 - 42) Barta, A., Steiner, G., Brosius, J., Noller, H.F. and Kuechler, E.: Identification of a site on 23S ribosomal RNA located at the peptidyl transferase center. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 3607~3611, 1984.
 - 43) Prince, J.B., Taylor, B.H., Thurlow, D.L., Ofengand, J. and Zimmermann, R.A.: Covalent crosslinking of tRNA^{Val} to 16S rRNA at the ribosomal P site; Identification of cross-linked residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 5450~5454, 1982.
 - 44) Brow, D.A. and Noller, H.F.: Protection of ribosomal RNA from kethoxal in polyribosomes; Implication of specific sites in ribosome function. *J. Mol. Biol.*, 163, 27~46, 1983.
 - 45) Shine, J. and Dalgarno, L.: The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA; Complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 1342~1346, 1974.
 - 46) Gelfand, R. and Attardi, G.: Synthesis and turnover of mitochondrial ribonucleic acid in HeLa cells; The mature ribosomal and messenger ribonucleic acid species are metabolically unstable. *Mol. Cell. Biol.*, 1, 497~511, 1981.
 - 47) Christianson, T.W. and Clayton, D.A.: In vitro transcription of human mitochondrial DNA; Accurate termination requires a region of DNA sequence that can function bidirectionally. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 6277~6281, 1986.
 - 48) Woese, C.R. and Fox, G.E.: Phylogenetic structure of the prokaryotic domain; The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5088~5090, 1977.

(受付: 1987年12月22日)