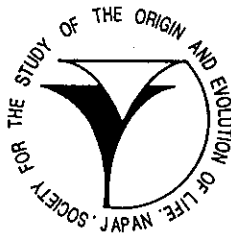


# Viva Origino

VOL.23 (No.2)

June 1995



The Society for the Study of the Origin  
and Evolution of Life  
JAPAN

# 生命の起原および進化学会 会則

地球上における生命の起原を科学的に解明することと、生物進化の攻究により、生命体の本質を明らかにしようとする。本学会は、関係諸分野の英知を集め、互の連繫によって新しい型の総合科学を確立・発展させることにより、上記の目的達成を期するものである。

第一条 本学会は、生命の起原および進化学会 (Society for the Study of the Origin and Evolution of Life-Japan, SSOEL-Japan) という。

第二条 本学会は、会員の生命の起原および進化の研究の発展と、日本における当該研究の開拓・推進をはかり、関連学(協)会および、多くの人々の当該研究に対する理解を深め、もって学術・文化の発展に寄与するものとする。

第三条 本学会は、前条の目的達成のため次の事業をおこなう。

1. 研究発表会・学術講演会の開催
2. 学会誌等の出版物の刊行
3. その他前条の目的達成のため必要な事業

第四条 本学会は前条の事業をおこなうため事務局をおく。

第五条 本学会の会員は、正会員と賛助会員とし、入会手続きは別途定める。

第五条の2 正会員は、第二条に示す研究に従事する個人で、学会が承認したものとする。

第五条の3 賛助会員は、本学会の目的に賛同し、その事業を援助する個人または個体で学会が承認したものである。

第六条 会員は、別途定められた会費等の費用を前納しなければならない。定められた期間以上これらを滞納した場合は、会員の資格は消失するものとする。

第七条 会員は、本学会のおこなう事業に参加し、本学会発刊の学会誌 Viva Origino その他印刷物の配布をうけることができる。

第八条 本学会は、会長1名、副会長1～2名および学会運営委員(以下委員と略す)を若干名、会計監査2名をおくものとする。

第九条 委員および会計監査は、正会員の互選による。選出された委員は学会運営委員会(以下委員会と略す)を構成し、学会運営の任にあたる。

第十条 会長・副会長は委員会が正会員の中から選出する。

第十一条 会長・副会長・委員・会計監査の任期は2年とする。

第十二条 委員会は、学会運営および学会事業をおこなうため、委員長1名、常任委員若干名を選出し、学会運営常任委員会(以下常任委員会と略す)を構成し、その任にあたるものとする。

第十三条 会長は学会を代表し、学会運営は委員長が総括の任にあたる。

第十四条 常任委員会は、必要なとき委員会を招集し、本学会に関する諸事項を審議・決定する。

第十五条 常任委員会は、正会員の中から専門委員を委嘱し、本学会に関する諸事項を諮問することができる。

第十六条 委員会において、本学会員として不適当と決議されたものは、会員の資格を消失するものとする。

第十七条 会員の退会届けおよび会員資格消失者については、常任委員会は退会手続きをとるものとする。

第十八条 本学会は、年1回定期総会を開き、必要ときは臨時総会を開くものとする。

第十九条 本学会会則の改正は、会員の2/3以上の出席の総会において2/3以上の同意を要する。

## 学会入会手続きに関する付則

1. 入会申し込み書に必要な事項を記入し、常任委員会へ提出のうえ会員資格の承認をうける。
2. 会員としての資格を承認されたものは、すみやかに所定の入会金、会費(1年分)、学会誌購読料(1年分)を事務局へ納入する。
3. 上記費用の納入されたものについて、常任委員会は入会手続きをとり、会員として登録する。
4. 本学会の入会は推薦によりおこない、委員会承認する。

## 会費その他に関する付則

1. 入会金(正会員のみ) 1,000円
2. 会費  
正会員 年額 5,000円  
賛助会員 年額(1口) 10,000円
3. 学生のための入会金・会費  
正会員で、大学または大学院あるいはこれに準じる学校に在学する学生は、在学証明書の添付により、次の特典を与えるものとする。  
入会金 500円、会費(年額) 2,500円
4. 学会誌 Viva Origino 購読料 年額 5,000円  
但し、会員には無料配布とする。
5. 会費その他の費用の納入の猶予期限は1年以内とする。
6. 会費払込振替口座  
(加入者名) 生命の起原および進化学会  
(口座番号) 大阪 8-3673

# Viva Origino

VOL.23 (No.2)

June 1995

The Society for the Study of the Origin  
and Evolution of Life  
JAPAN

## 目 次

### 総 説

- ◎ 地球型最小ゲノム生物の創製  
板谷光泰……………( 95)

### 論 文

- ◎ 多細胞化の進化的意義はなにか  
中村 運……………(109)
- ◎ 細胞内接合伝達仮説：オルガネラの起源における遺伝子の  
核移行機構  
吉田和夫、西川正信、A.カトー……………(121)

### 話 題

- ◎ 第30回COSPAR科学会議  
小林憲正……………(141)
- ◎ 木村資生先生を悼む  
長谷川政美……………(145)



# Creation of Terrestrial Life Having Minimal Genome

Mitsuhiro ITAYA

Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences,  
11-Minamiooya, Machida-shi, Tokyo 194, Japan

(Received/Accepted May 26, 1995)

## Abstract

Minimum genome size required for terrestrial life was estimated to be 562 kb. This figure was derived from the observation that only six out of 79 *Bacillus subtilis* chromosomal loci were indispensable for growth, whose normal genome size is 4188 kb. The hypothetical minimum genome size lies in the range of those currently determined smallest genomes for bacteria, but above those of other replicons such as viruses, mitochondria, or chloroplast. Possibilities to create bacteria with given sets of genes and to convert bacteria into viruses or vice versa are presented. Applications of hypothetical minimal genome life to basic biological research as well as to human activities are argued.

Keywords: *Bacillus subtilis*, minimal genome, indispensable genes, colony formation, growth conditions, artificial life, genome evolution, virus genome.



# 地球型最小ゲノム生物の創製

板谷光泰

三菱化学生命科学研究所  
(〒194) 東京都町田市南大谷 11

## 1. 緒言

現在、地球上で生命活動を行っている生物は3000万種を越えると言われている。それらは、形態、代謝様式、生息環境、環境変化への適応等、バリエーションが大きいにもかかわらず、DNAを情報担体とする共通の始原生物に由来することが、近年の分子生物学的研究によって示唆されている。地球型生物の基本単位は細胞である。本稿では「生物種に特有の細胞当たりのDNA全部」をゲノムDNA (ゲノム) と呼ぶ。ゲノムは全遺伝情報を含み、ゲノムDNAの大きさ (核酸塩基数) にはバリエーションがある (Table 1)。バクテリア、カビ等の単細胞生物のゲノムサイズは十数 Mb (Mb = megabase pairs,  $10^6$  塩基対) を越えない。多細胞生物体ではゲノムサイズは100 Mb より大きく、個体の細胞数増加、複雑さの増大に伴ってゲノムDNAは大きくなっていく傾向がある<sup>1)</sup>。

地球型生物が生命活動を維持するのに必要な最小限のDNAのサイズはどの程度なのだろうか。この問いに対する答は少なくとも2つのアプローチで得られるだろう。一つは、自然界から最小ゲノムをもつ生物を探し出すこと、もう一つは最小ゲノムで生育できる生物 (細胞) を創り出すことである。後述するように、最小ゲノム生物は生育環境に極端に依存すると思われるので注意が必要である。

筆者は土壌細菌の枯草菌 (*Bacillus subtilis*) を用いて、遺伝子変異を枯草菌に系統的に導入する仕事をこれまで手がけてきた。数年間にわたる研究の総括として枯草菌の生育に必須な遺伝子の割合を算出し、地球型生物の生育に必要な最小ゲノムDNA量は、562 kb (kb = kilobase pairs,  $10^3$  塩基対) であるという見積りを提示した<sup>2)</sup>。本稿では枯草菌を用いた実験事実を紹介し、地球型生物の生育にとって必要な最低限の遺伝情報に関する考察を加え、そこから派生する生物・生命観について思考をめぐらせてみたい。

Table 1. Estimated Genome size in Mb.

マイコプラズマ	0.58 ~ 1.2
バクテリア	1.65 ~ 10
真菌類	7.9 - 14.6
線虫	22
昆虫(ハエ)	165
哺乳動物	3000
植物	>100

(植物の核ゲノムサイズは種によって1000倍以上の差があり、また同じ種でもゲノム量は変動する。これは植物が種々のストレスを伴った環境への適応の過程の中で、単に表現型の変化という生理的適応のみならず、ゲノム(DNA)自身の再編成という手段をも用い、より生理的機能を高めてきた結果であると推定されている)

## 2-1. 枯草菌

近年分子生物学的手法の発展に伴い、迅速で大規模な塩基配列決定法<sup>3)</sup>と、巨大なDNA分子を実験室で扱う手法が飛躍的に発展した<sup>4)</sup>。それを契機にして、微生物(原核生物、真菌類)から動植物および人間のゲノムDNA全塩基配列決定を当面の目標とするゲノムプロジェクトが開始され、現在進行している。筆者が扱っている枯草菌はバチルス属に分類される絶対好気性グラム陽性土壌細菌であり、胞子形成能を有する。日本人にはおなじみの納豆製造に利用される納豆菌は、枯草菌の近縁種である<sup>5)</sup>。

枯草菌のゲノムサイズは4188 kb<sup>6)</sup>で原核生物の中では中間的な大きさである(Table 1)。原核生物はゲノムのDNA量(=ゲノムサイズ)だけでなく、DNAの質にもバリエーションが大きい。すなわち、ゲノム形態(註1)、グアニン+シトシン含量<sup>9)</sup>、DNAリピート配列<sup>10)</sup>等に多様性が見られ、これは原核生物の多様な生存環境に対応している。生存環境の多様性はバクテリアを特徴づけるキーワードの一つであり、最小ゲノム生物を議論する時には極めて重要になる(後述)。なお、ファージ、ウイルスは自己増殖に宿主(ならびに宿主機能の一部)を要求することから本稿では地球型生物には加えない。後で触れるが、現在報告されている最大のウイルスゲノムサイズは350 kbである<sup>11)</sup>。

枯草菌は遺伝解析が容易に行える菌である。ゲノム上の遺伝子に変異を容易に導入できるので、ある特定の遺伝子が生育に必須であるかどうかを調べる目的の研究には適している<sup>12)</sup>。導入する遺伝子変異の種類としては、薬剤耐性遺伝子などのマーカーをゲノム上のターゲット遺伝子の部位に挿入する「遺伝子破壊実験」が一般的である<sup>12)</sup>。枯草菌ゲノムはハプロイド、つまり遺伝子は細胞当たり1つしかないので、遺伝子変異を受けた枯草菌がコロニーを形成できれば、その遺伝子は枯草菌の生育には必須ではない、形成できなければ必須であると判断できる。

## 2-2. 必須遺伝子数の推定(実験的アプローチ)

遺伝子破壊実験を筆者が集めた79個の枯草菌ゲノム由来のDNA断片に対して適用した結果、2つの重要な実験事実を得た<sup>2, 6)</sup>。

一つは、79個中、6ヶ所が富栄養培地(LB培地)<sup>13)</sup>空气中37℃でコロニー形成に必須であった<sup>2)</sup>。即ちこの6ヶ所の遺伝子破壊株はコロニーを形成しなかった。79個のDNA断片のゲノム上の帰属はFig.1に示すようにゲノム上にランダムに配置していると考えられるので、最も単純に考えると枯草菌ゲノム上の6/79は必須であり、79個の



抽出がランダムであるとした統計処理計算によって、「4188 kb の枯草菌ゲノムの 13.4 %に相当する、562 kb が (LB 培地 37 °C の条件でコロニーを形成するためには) 必須である」との結果を得た。必須の 6 個のうち 3 個は、*dnaA*, *dnaB*, *rpoD* 遺伝子であり、他の 3 個の遺伝子は現在未同定 (Fig.1 の説明文参照)。

もう一つの重要な結果は、生育に必須でない部位 (73=79 マイナス 6) の変異は多数組み合わせさせてもいぜんとして生育に必須でないことであった。必須でない部位のうち最高 33 ヶ所をすべて変異させた 33 重変異株が実際得られた (Fig. 2)。ゲノム上に最高 33 個もの変異を同時に持つ枯草菌は筆者の知る限り例はなく、おそらく他の微生物でも最初の例であろう (註 2)。

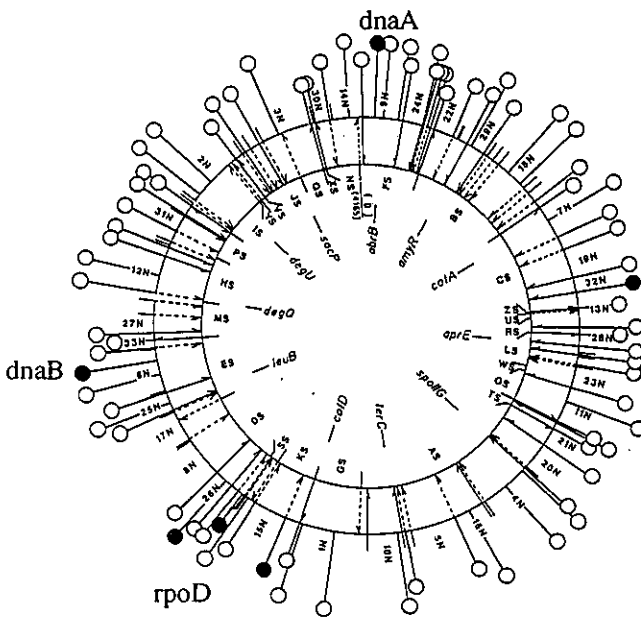


Fig. 1 Seventy nine loci of the *B. subtilis* chromosome examined for mutagenesis.

The *NotI-SfiI* physical map was re-drawn with minor modifications<sup>6)</sup>. Loci subjected for mutagenesis analysis are indicated by small circles. Six closed circles indicate indispensable loci, three of which were assigned as genes for *dnaA*, *dnaB*, and *rpoD*<sup>2)</sup>.

これらの結果を説明するために、筆者は次の 2 つの仮説を提唱した<sup>2)</sup>。

[I] The number of genetic loci to support bacterial colony formation on nutritionally rich media is strikingly small.

[II] Bacterial chromosome could be reduced in size to a minimum under defined growth conditions.

[I] は (枯草) 菌の生育にはゲノム上の遺伝子が必ずしもすべて必要ではなく、しかも必須な遺伝子は意外に少ないという仮説である。この仮説の根拠は、LB 培地という富栄養の条件で枯草菌が生育するためには、79 個のうち必須なのはわずか 6 個だったという実験事実である。ここで注意しなければならないのは必須遺伝子の数は生育条件に依存することである。例えば上述の枯草菌 33 重変異株は合成培地 (無機リン、無機窒素、無

機硫黄、グルコースで構成される)<sup>1,3)</sup>には生育しない。理由は 33 個の変異の中にアミノ酸要求変異が 3 個含まれているからであり<sup>2,6)</sup>、もし生育条件として合成培地を用いると必須遺伝子の数は増加、当然ながら必須 DNA サイズも増加する (註 3)。したがって、最小ゲノムを議論する場合生育条件の記述は非常に重要であり、筆者の実験事実の価値は 79 個の遺伝子破壊実験が全て同一の条件で行われたところにある。条件の中に同じ研究室、同一の実験者を含めるとより完全に近い (註 4)。

[II] は必須遺伝子の割合が非常に小さいという結果と、多重変異株 (現在最高 33) は生育できるという事実から導かれた仮説である (Fig. 2)。もっとも極端な言い方をすれば 4188 kb の野生型枯草菌の生育に不要な DNA 領域に変異を追加していけば最終的には LB 培地で生育するゲノムサイズ 562 kb 相当の枯草菌ができることを意味している。しかし実際はそう単純ではないだろう。この点については後述する。

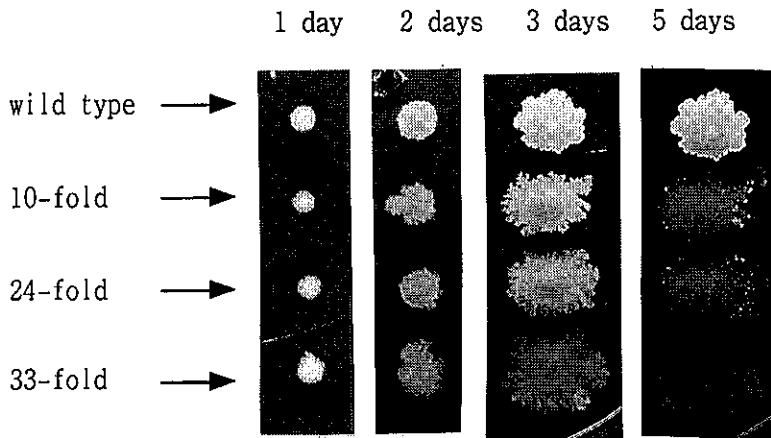


Fig. 2. *B. subtilis* mutants carrying multiple mutations.

CU741, and its derivatives tolerating multiple mutations BEST4041 (10-fold mutant), BEST4087 (24-fold mutant) and BEST4133 (33-fold mutant). Cells were grown on LB-medium kept at 30 °C for indicated time.

### 2-3. 現存生物のゲノムサイズとの比較

枯草菌はさておき、地球型生命のゲノムサイズは実際どのくらいまで小さくなっているのだろうか (どのくらい小さなゲノムの生物がいるのだろうか)。最近の信頼できる報告では、最小ゲノムサイズのバクテリアは 1.6 Mb のメタン生産古細菌である<sup>16)</sup>。次いで高度好熱菌 (グラム陰性真正細菌) の 1.74 Mb<sup>17, 18)</sup> がこれに近い。これらより小さいゲノムをもつ生物は寄生性バクテリアになってしまう。マイコプラズマ (585 - 980 kb) やリケッチャ (約 1000 kb) 等の寄生性バクテリアは通常宿主無しでは生育できないが、特殊な培地で生育する株も見い出されているので、これらを最小ゲノムをもつ地球型生物とみなしてもよい。古細菌はどこにでもいるし<sup>19)</sup>、小さいゲノムをもつ上述のバクテリアが

極限環境から分離されていることは興味深い。後述するように、温和な条件に生育する微生物は、環境変化に対応できるような遺伝子群を抱え込んでいるので、ゲノムサイズは増大することになる。しかし、極限環境は元々極限なので環境の激変を考える必要がなく、そこで長期間暮らす生物は不必要な遺伝子群を抱え込んでおく必要がないと考えられる。寄生性バクテリアの生育環境（細胞質内）は、極限に近いとみなせるほどストレスがかかっている<sup>20)</sup>。

枯草菌はどこにでも見出される土壌細菌である<sup>5)</sup>。前節で述べたように枯草菌が LB 培地でコロニーを形成するためには、最低 562 kb が必須であると実験結果から推測した。その値が、マイコプラズマ最小ゲノムの 585 kb に非常に近い。これは単なる数値上の偶然かもしれないが、自立的に自己複製できる生命体（細胞）としては、少なくとも 500 kb 程度のゲノムサイズが必要なことを示していると筆者は考えたい。余談だが、500 kb (=0.5 Mb) は塩基配列情報量としてはたかだかフロッピーディスク 1 枚 (1.3 Mb = mega bite) に収まる程度であり、我々人類の細胞当たりの核ゲノム塩基数約 3000 Mb と比較して 1000 倍以上の開きがある。

高等動植物細胞内には核ゲノムに加えて細胞内小器官ミトコンドリアゲノムや葉緑体ゲノムが存在する。因みにミトコンドリアのゲノムサイズは哺乳類で 16 kb 程度、植物ミトコンドリアは 200 kb 以上<sup>21)</sup>、葉緑体ゲノムは 140 ~ 200 kb の大きさである<sup>22)</sup>。これらの細胞内小器官は、生物進化のどこかの段階で好気性バクテリアあるいはラン藻（シアノバクテリア）が宿主細胞と共生し、宿主の核との遺伝子のやりとりを経て DNA 複製が母細胞の核支配を受けるようになったので、細胞外で独立に生育しない<sup>23-25)</sup>。葉緑体やミトコンドリアのゲノムは、独立微生物としての最小ゲノムサイズ 562 kb 以下であり、単に核支配を受けたからだけではなく、ゲノムサイズの面でも宿主から独立して生存できないようになっているのではないだろうか。

#### 2-4. ウイルスと微生物のはざま

現在報告されている中で最大ウイルスゲノムは約 350 kb である<sup>11)</sup>。今後更に大きなゲノムサイズのウイルスの報告はあるかもしれないが、この値は自立的に自己複製できる生命体としては必要なゲノムサイズ (562 kb) に達していない。やはりウイルスも独立生命体としては生存不可能で、ウイルスと微生物との境界をゲノムサイズの差異で説明できると思われる。すると次のような仮説は成り立つだろうか？

[I] ウイルスゲノムが DNA を獲得して単独で自立増殖可能な微生物（バクテリア）になる。

[II] 自立増殖可能な微生物（バクテリア）が DNA を要領よく失えばウイルスゲノムになる。

DNA 獲得と消失とが新しい微生物あるいはウイルスの起源の説明の一つになるかもしれない。現実にはこのようなことが起きている実例も、それを示唆するような報告も筆者は知らない。「ウイルスゲノム」部分を「ミトコンドリアゲノム」あるいは「葉緑体ゲノム」と置き換えてもよいが、将来は実験室での研究テーマになると期待している。

#### 2-5. 何が必須遺伝子か？

地球型生物の共通の特徴は「物質代謝を行い、エネルギーを取り出し、自己複製を行う」ことであろう。このためには(1)巨大分子構築系(Macromolecular Synthesis System)(2)エネルギー代謝系(Energy Metabolism System)(3)外界との隔離系(Closed System)が最低限必要である。従ってこれに関係する遺伝子群は必須と思われる。因みに枯草菌の実験で得られた必須遺伝子のうち3個はDNA、RNAの分子構築に関わる遺伝子である(Fig. 1の説明参照)。

バクテリアは環境(pH、温度、圧力、溶質濃度、溶質種類)の変化に対する耐性の幅が広く、例えば生育速度は、細胞分裂して倍加するのに早いもので20分、遅いものでは2ヶ月もかかる。つまり栄養環境が良くなれば、無駄なエネルギーを使わないように代謝系を調節し、環境が悪化すれば消極的、積極的な適応を行う<sup>14)</sup>。消極的な適応とは新しい環境でも生活できるように自分自身を変化させることで、積極的な適応とは環境から好ましからざる要素を排除するように外界に対して働きかけることである。細胞増殖と維持に必須な最低限の遺伝子群しかもたない最小ゲノム生物は、環境適応の余裕があるだろうか? 環境との対応・適応の結果としての淘汰が進化の原動力であり進化自身に方向性はないとの立場にたてば、最小ゲノム生物は、与えられた環境以外では生命活動を行えないだろう。従って進化は期待できず、ウイルスへの道しか残されていない? 異なる環境に適応していくためには新たな遺伝子(群)が要求され、従ってゲノムサイズの増大しかないだろう。この仮説(と呼ぶほどのものでもないが)によれば、環境の種類数に見合うだけの最小ゲノム生物を創製できることになる。そして一つの環境から別の環境への移行は直ちには不可能で、移行そして適応するための方策は、新たに付加されるべきゲノムDNAの質と量の問題に還元できると考える。別の言葉で言うと、筆者は最小ゲノム生物を用いた進化分子工学的なアプローチで実験的に検証できる可能性を感じている。微生物は環境の変化に拡散速度の範囲内で適応する点も研究材料としては有利であり<sup>26)</sup>、現存生物の遺伝子解析結果を比較する帰納的なアプローチだけでなく、今後は最小ゲノムから始まるゲノム進化を実験室で制御して行う研究展開に注意を払う必要がある。

### 3-1. 最小ゲノム生物の創製

人工生命のアイデアは目新しいものではない<sup>27)</sup>。細胞の人工合成、ことに現に存在する細胞と全く同じ細胞を合成することは、生命の本質を理解するための実験的検証手段を与えてくれるにとどまらず、医、農、薬、の広範な分野に幅広い応用が期待できる<sup>28)</sup>。しかし、それは遠い将来のことであろうが、ここに最小ゲノム生物のアイデアをもち込むともう少し実現可能性の高い実験系を考えることができる。それは、DNAと少なくとも一回分のDNA複製とに必要な構成成分とから自己増殖可能な生命体を創製するような実験系であり、そこではDNAの質と量の情報が必要である。DNAの量に関しては暗黙のうちにDNAサイズは500 kb程度と踏んでいることは理解していただけたと思う。そう遠くない将来に化学合成、あるいは無生物学的なDNA合成の効率に飛躍的な進歩があればその程度のサイズのDNAは容易に得られると思う。DNAの質の問題はつまるところ塩基配列情報で、最小必須遺伝子あるいは必須DNA領域のカatalogに従えばよい。少なくとも枯草菌のゲノム塩基配列のカatalogは、ゲノム塩基配列決定プロジェクトの成果としてそう遠くない将来に得られると期待している<sup>29, 30)</sup>。

そこまで待てない向き（筆者も含む）には、現存の微生物ゲノムから不要なDNAを順次失わせて行き、特定の生育条件で最小ゲノム株を得るアプローチはどうだろうか<sup>3</sup>

<sup>1)</sup>。これは前述の筆者の仮説 (II) Bacterial chromosome could be reduced in size to a minimum under defined growth conditions を検証することに他ならない。このアプローチを適用できる微生物は枯草菌に限らないが、現時点では枯草菌はゲノムを最も自由に操作できるバクテリアであり<sup>6, 12, 31, 32</sup>、ゲノムDNAが一部欠失した枯草菌菌株も実際に得られていることから (Fig. 3) 枯草菌が有望である。

いずれにしても最小ゲノム生物は (1) 生物学者が細胞とみなしうるもの、 (2) 蛋白質、核酸その他、生物の構成成分よりなる系、 (3) 自己増殖能のあるもの、でなければならない<sup>2, 8)</sup>。

遺伝子は進化の結果として残る。バクテリアに限っても特定の菌株がどのような遺伝子をいくつゲノム上に保持しているかについては、ゲノム解析の結果から解答がでるだろう。それらの遺伝子の全てが必ずしも常に必要ではなく、環境の変化に対応して発現する遺伝子 (群) が制御されている<sup>2, 14)</sup>。環境の変化に対応した細菌の生き残り戦略、それはおそらく多数の遺伝子発現の組み合わせによるのだろうが、まだまだ我々が知らない部分が多々ある。そうすると、前節で述べたことの繰り返しになるが、最小ゲノム生物は与えた生育環境の数だけ創製することが可能と考えられるが、それらは新しい環境変化について行けるとは考えにくい。このように最小ゲノム生物は、環境の変化に弱く異なる集団への移行が不可能、つまり安定な形質を人間が管理できることを意味する。環境変化に弱いことは逆に敏感なセンサーとしての役割を期待できるかもしれない。

最小ゲノム生物に新規な物質を生産させる応用面が考えられ、現在の遺伝子組み換え手法の制限を越えて最小ゲノム生物に様々な修飾を付加してゆく、進化分子工学的な手法を直接反映させる系を構築できるかもしれない。つぎ込む単位エネルギー当たりの生産性が最も良いのはやはり微生物であり<sup>2, 6)</sup>、この点で最小ゲノム生物は次世代の人間と共生可能な微生物の出発点となるかもしれない。

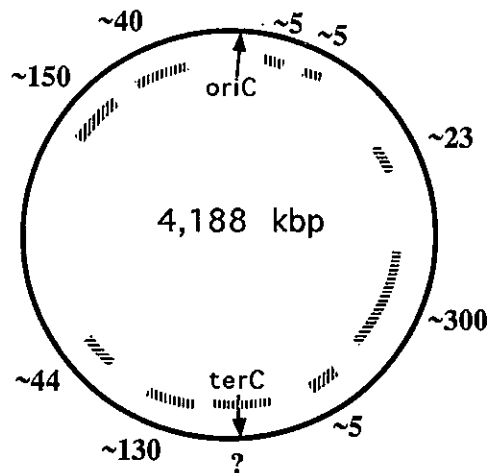


Fig. 3 Regions of the *B. subtilis* genome that can be deleted. Numbers on the circular genome are DNA sizes in kb. oriC or terC represent the site DNA replication initialize or terminate.

### 3-2. 人類に有用な生物

三菱化成生命科学研究所の初代所長である故江上不二夫博士は著書『生命を探る』の中で次のように述べている。「生命創製の目的は現在及び将来の人類の豊かで心地よい生活のためである。そうであれば現存の細菌と全く同じ細菌をつくる必要はないのである。ずっと簡単なもので、人類に有効な、生き物らしいものをつくるのである」<sup>28)</sup>。

生命創製は枯草菌で検証が可能になりつつあると筆者は思っているが、実行する機が熟しているかどうかはわからない。既に述べたように、いきなり人工生命の完全合成を試みるより、現存微生物のゲノム改変を通して新微生物の育種改変を行う方が現実的であり、将来に向けてのノウハウを蓄積する意味でも重要であると考え<sup>31)</sup>。

ゲノム改変は筆者が提唱している「枯草菌ゲノム工学」の中核をなす操作技術に基づく。詳細は文献(31)にゆずるが、大要は枯草菌のゲノムに異種微生物ゲノム全体を挿入してキメラゲノム、あるいはモザイクゲノムを有する枯草菌株を創り出すことである。異種のゲノムが共存するような枯草菌株はそれぞれのゲノムが対応できる生育環境(温度、pH、塩濃度、酸素の有無等)の幅が更に広がるのではないかの発想に基づいており、最小ゲノム生物は生育環境の幅が狭いのと対照をなす。育種改変された微生物を利用して、環境浄化、遺伝子治療・物質生産・食料増産等、農・工・医・薬を横断する幅広い応用への道が拓かれるであろうし、それらは緊急を要する地球環境問題、あるいは食料問題への対処およびその解決に貢献できると考えている<sup>31)</sup>。

我々は、大腸菌や枯草菌のたかだか 4000 個程度の遺伝子についてもまだ全部は知らないし、微生物界を見渡しても自然界に生息する微生物の 90 % 近くは実験室で純粋培養不可能であり、我々の微生物理解はまだ始まったばかりと言える<sup>33, 34)</sup>。最小ゲノム生物を考えること、それは微生物の多様性の裏を覗く発想であり、現在および近未来の地球型生物を理解するだけでなく、過去の生物進化の本質にも関わる魅力のあるテーマとなることを願ってやまない。

### 謝辞

最小ゲノムのストーリーについて議論していただいた柳川弘志、田中暉夫、菊池洋氏を初めとする多くの方々に感謝します。

(註 1) ゲノムの形態は、真核生物は例外なく線状構造(端がある)を、原核生物は一般には環状(端がない)である。最近この規則に当てはまらない線状ゲノム構造をとる原核生物が報告されている<sup>8)</sup>。

(註 2) 33 重変異株は枯草菌の一変異株ではあるが、コロニー形態、孢子形成、栄養要求性、自己溶解、形質転換能喪失の表現型を獲得した。混乱を避けるために筆者はこの株

を枯草菌変異株と呼んでいるが、バチルス属に特徴的な形質を殆ど失っている。もし 33 重変異株 を最初に見た研究者はこれを枯草菌と分類することはしないだろう。

(註 3) 内在性の遺伝子がすべて実際に発現して生理代謝機能に関与しているのではないことは、数多くの誘導遺伝子群があることは古くから指摘されており新しいことではない<sup>1)</sup>。大腸菌や枯草菌等の遺伝的解析が容易なバクテリアで多くの必須遺伝子

(indispensable gene) が同定されている。しかし、菌株の遺伝背景や培養条件の違い等からすべてが必ずしも必須遺伝子とはいえない。定義された実験条件のもとで同じ種類の変異を 79 個の遺伝子に適応したのは、おそらく筆者の例が最初であろう<sup>2, 6)</sup>。この仮説は、出芽酵母の第 3 染色体の 182 個の ORF のうち、遺伝子破壊実験によってすでに 3 遺伝子は生育に必須であるらしい観察からも一般化できそうである<sup>15)</sup> こと、ヒューマンゲノムも実際に遺伝子がコードされている部分はゲノム全体 ( $3 \times 10^{10}$ ) の数%にすぎないこと (からも一般化できそうである。特に生物が多細胞で発生分化を経て、細胞間情報伝達系を発達させ個々の細胞の果たす役割が個体内でも異なる場合にはそれぞれの役割に必須な遺伝子の割合は更に減るだろう。

(註 4) 必須遺伝子の推定は生育条件を厳密に検討しなければならない。筆者の枯草菌を用いた実験では LB 培地, 37 °C の条件で倍加するのに 2 時間を越える変異株はなかった。必須遺伝子を評価する遺伝子破壊実験では 37 °C で最長 3 日間培養した。実験上の制約で今回必須とされた (或いは今後必須とされるであろう) 遺伝子変異株の中には生育速度が極端に遅くなったものも含まれるかもしれないことは指摘しておかなければならない。更に厳密さを要求するなら、LB 培地に使用するトリプトン、酵母エキス、塩等の製品によるばらつきを避けるために Lot # まで統一しなければならないだろう。

#### 参考文献

- 1) Sparrow, A. H. and Nauman, A. F., Evolution of genome size by DNA doublings. *Science*, 192: 524-529 (1976)
- 2) Itaya, M. An estimation of minimal genome size required for klife. *FEBS Letters*, 362, 257-260 (1995)
- 3) 松原謙一、榊桂之「ゲノムプロジェクトの成立と展開」蛋白質核酸酵素、vol.38, 209-211 (1993)
- 4) 板谷光泰、酒井明. 「パルスフィールド電気泳動法」細胞工学, vol.6, 159-165 (1987)
- 5) 板谷光泰、「枯草菌ゲノムの物理地図」蛋白質核酸酵素、vol.40, 561-561 (1995)
- 6) Itaya, M. and Tanaka, T., Complete physical map of the *Bacillus subtilis* 168 chromosome constructed by a gene-directed mutagenesis method. *J. Mol. Biol.*, 220, 631-648 (1991)
- 7) Krawiec S. and Riley M., Organization of the bacterial chromosome.

- Microbiol. Rev.*, 54, 502-539 (1990)
- 8) Saint Girons, I., Old, I. G. and Davidson, B. E., Molecular biology of the *Borrelia*, bacteria with linear replicons. *Microbiology*, 140, 1803-1816 (1994)
  - 9) 図解微生物学ハンドブック, p 512 (石川他編)、丸善 (1990)
  - 10) Lupski, J. R. and Weinstock, G. M., Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.* 174, 4525-4529 (1992)
  - 11) Yamada, T., Higashiyama, T. and Fukuda, T., *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3433-3439 (1991)
  - 12) Itaya, M. and Tanaka, T., Gene-directed mutagenesis on the chromosome of *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.*, 223, 268- 272 (1990)
  - 13) Miller, J. H., In Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1972).
  - 14) Niedhardt, F. C., Ingrahm, J. L. and Schaechter, M., in Physiology of the Bacterial Cell: A molecular approach, pp. 463-481., Sinaur Associates, Inc., Sunderland Massachusetts (1990)
  - 15) 磯野克己, 「出芽酵母のゲノム解析とその意義」日本農芸化学会誌 vol.68、1130-1133、(1994)
  - 16) Stettler, R. and Leisinger, T., Physical map of the *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg chromosome. *J. Bacteriol.*, 174, 7227-7234 (1992)
  - 17) Tabata, K., Kosuge, T., Nakahara, T., and Hoshino, T., Physical map of the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27 chromosome. *FEBS Lett.*, 331, 81-85 (1993)
  - 18) Borges, K.M. and Bergquist, P.L., Genomic restriction map of the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB8. *J. Bacteriol.* 175, 103-110 (1993)
  - 19) Delong, E. F., Wu, K. Y., Prezelin, B. B., and Jovine, R. V. M., High abundance of archaea in antarctic marine picoplankton. *Nature*, 371, 695-697 (1994)
  - 20) Jeon, K. W., Bacterial endosymbiosis in amoebae. *Trends in Cell Biol.*, 5, 137-140 (1995)
  - 21) 中園幹生、平井篤志, 「高等植物のミトコンドリアゲノム」 蛋白質核酸酵素、vol.37、1091-1098 (1992)
  - 22) 武田穰, 「葉緑体ゲノムの複製」 蛋白質核酸酵素、vol.37、1081-1090 (1992)
  - 23) 小柳津広志「微生物の系統と進化」科学と生物、vol.31、569-577 (1993)
  - 24) Woose, C.R., Microbiology in transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91, 1601-1603 (1994)
  - 25) Margulis, L., Symbiosis in cell evolution: Microbial communities in the archaean and proterozoic Eons, W. H. Freeman (1993)
  - 26) 本川達雄, 「ゾウの時間ネズミの時間」, 中公新書 (1992)
  - 27) 長野敬, 「生命の起源論争」講談社, p194-240 (1994)



- 28) 江上不二夫, 「生命を探る第二版」岩波新書, (1980)
- 29) Kunst, F., Vassarotti, A. and Danchin, A., Organization of the European *Bacillus subtilis* genome sequencing project. *Microbiology*, **141**, 249-255 (1995)
- 30) Ogasawara, N., Fujita, Y., Kobayashi, Y., Sadaie, Y., Tanaka, T., Takahashi, H., Yamane, K. & Yoshikawa, H. Systematic sequencing of the *Bacillus subtilis* genome: Progress report of the Japanese group. *Microbiology*, **141**, 257-259(1995)
- 31) 板谷光泰, 「枯草菌ゲノム工学の確立に向けた基礎的研究」、日本農芸化学会誌, vol.68, 1545-1550 (1994)
- 32) Itaya, M., Integration of repeated sequences (pBR322) in the *Bacillus subtilis* 168 chromosome without affecting the genome structure. *Mol. Gen. Genet.*, **241**, 287-297 (1993)
- 33) Ward, D. M., Bateson, M. M., Weller, R., & Ruff-Roberts, A. L., Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. in *Advances in Microbial Ecology* (ed. Marshall, K. C.) vol.12, 219-286 (Plenum, New York) (1992)
- 34) 別府輝彦, 「好熱性絶対共生細菌の発見と利用」, バイオサイエンスとインダストリー, vol.53, 324-327 (1995)



# 多細胞化の進化的意義はなにか

中村 運

甲南大学理学部生物学教室

(〒658 神戸市東灘区岡本8丁目9-1)

## 要旨

生物進化の過程において約10億年前に起こった多細胞化について、その意義を議論した。その結果として、次のような3つの推論を得た。

- (1) 多細胞化は、自然淘汰に対する生命系のホメオスタシスに利益をもたらした。
- (2) 環境条件に対する形態的適応は、容易であったに違いない。
- (3) 多細胞化は、多くの細胞が関与する代謝の量的適応をもたらした。



# What is Evolutional Significance of the Multi-cellularization?

Hakobu Nakamura

Biological Institute, Faculty of Science, Konan University,  
Kobe 658, Japan.

(Received October 17, 1994; Accepted April 5, 1995)

## ABSTRACT

A significance of multi-cellularization during the evolution was discussed. As a result, the followings were deduced to be probable: (i) The multi-cellularization has a homeostatic advantage for the natural selection. (ii) It must be easier to complete morphological adaptations to the environments. (iii) It must be easier to complete mass adaptation of a metabolism for which many cells can participate. This may call functional adaptation.

### 1. Origin and evolution of the prokaryotic cell<sup>2-410</sup>

Current astronomy has been clearly determining that the chemical evolution advances on an universal scale and the products are drifting in the interstellar space and the planetary atmosphere at present. Experiments simulated the chemical evolution processes have indicated that amino acids, bases, sugars and even their polymers are possible to be synthesized without the life power. Analyses of the carbonaceous meteorites also have supported these facts. It has been widely accepted that origin of the first life, i. e., proto-cell, was approximately four billion years ago in the primitive soup. According to current microbiology, the extant Mycoplasmas have primitive organization lower than the eubacteria, of which cells are constructed by plasma membrane, ribosomes, and electron-microscopically amorphous cytosole. Molecular phylogeny also has demonstrated a phylogenetical order of the Mycoplasma, the gram-positive eubacteria and the gram-negative eubacteria. However, cellular evolution generated the various organelles with complication of metabolisms. Especially, photosynthetic prokaryotes can form various types of membrane organelles as referred to as chlorovesicle for family Chlorobiacea, chromatophore for family Rhodospirillacea, and thylakoid for class Cyanophyceae (cyanobacterium). In these prokaryotic world, some groups can form fibrous cell-assembly but do not make multi-cellular. The prokaryotic world was fundamentally uni-cellular for 2.5 billion years and the cells could not aggregate to raise the life efficiency. This problem will take up again.

Current paleontology has shown that cell size of the microfossil found became significantly large since 1.4 billion years ago and have given an interpretation for it: the eukaryotic cell(s) have been generated about 1.5 billion years ago. Although such explanation

comes from only a transition of the cell size and intracellular differentiation can observe nothing in the fossil, it is apparent that the extant eukaryotic cell is ten times on the average size as large as the prokaryotic cells. In fact, DNA content of the cell increases gradually along evolution and it is continuous from the prokaryotic to the eukaryotic worlds although increased rapidly in the higher organisms. This shows that the increased genetic information determines more kinds syntheses of the molecules including enzymes. In other words, a single cell of the eukaryota contains more life machineries and differentiates more functionally than those of the prokaryota<sup>9,10</sup>. The most excellent species in the intracellular differentiation are those belonging to Class Phytoflagellata of Phylum Protozoa. For example, a single cell of species *Paramecium* contains various kinds of organelles, such as mouth, cytopharynx, food vacuole, contractile vacuole, micronucleus, mitochondrion, Golgi-apparatus, cillium, muscle, and nerve fiber, although the latter two are very primitive. However, this makes a dead end of the cellular evolution, we can think. Therefore, it can say conclusively that there are two directions in the cell differentiation, namely for maintenance of single cell like Phytoflagellata and for multi-cellularization to the higher organisms.

A group of the eukaryotic, unicellular organisms, which is referred to as Protista, is able to say to be in a way of the dead end of the evolution. In other words, they seem to have lost their way for the multi-cellularization even in the future. Wittacker (1969)<sup>14</sup> has proposed that the Protista succeeded to generate three breakthroughs. All of them were evolutionary routes to the multi-cellularization: Plantae, Animalia and Fungi worlds. Further, he has emphasized that the extant biological world can divide phylogenetically into five groups: Monera as prokaryota, Protista as uni-cellular eukaryota, Plantae as multi-cellular, photosynthetic eukaryota, Fungi as multi-cellular, non-photosynthetic eukaryota, which is nutritionally dependent upon absorption through parasitism and saprophygy, and Animalia as multi-cellular, non- photosynthetic eukaryota, which searches and injects the foods through behavior.

## 2. What happened in the course of multi-cellularization ?<sup>1,6,11</sup>

As pointed out above, the multi-cellularization could occur in bacterial genus *Streptococcus* and filamentous cyanobacteria, e. g., genera *Anabaena* and *Oscillatoria*. However, their multi-cellularization is only a filamentous form, series of the cells, in a principle. We can not find prokaryota evolved over them. Therefore, it is apparent that the real multi-cellularization occurred in the evolutionary process from the Protista to the Plantae, Animalia, and Fungi worlds. We can find some examples which seem to be in a way of the process. One of them is genera *Volvox* and others belonging to Volvocales, an Order of Chlorophyceae, and others are genera *Sycon* and *Grantessa* of Class Calcispongiae.

A taxonomical Class Chlorophyceae, green algae, have the simplest organization in the Plantae world. The interesting point is that this group contains from uni-cellular to multi-cellular species. Although the uni-cellular bodies serve both as vegetative and reproductive

cells, the multi-cellular bodies differentiate clearly vegetative and reproductive tissues. The uni-cellular group includes flagellate and non-flagellate species and motile and non-motile species. The multi-cellular group is very complex and ranges structurally from filamentous (*Ulothrix*) to plane (*Ulva*) and three-dimensional (*Valonia*) genera. In this class Chlorophyceae, there is a very meaningful group, Order Valvocales, which includes genera *Parindorina*, *Endorina* and *Volvox*. The first genus makes morphologically sphere and consists of 8 to 18 flagellated cells, the second genus does of 32 flagellated cells, and the third genus does of fifty thousands of cells. However, these assemblages of the cells are not defined as multi-cellular organisms but as colonies, which mean that they have no relationship in nutrient, information, and adhesion among the cells gathered. Therefore, when the colonies were mechanically disrupted, the dispersed cells can live and reproduce themselves. Further, they can gather again and make assemblage as the colony, if the condition became suitable and, especially, in the *Volvox* colony, having long passed, so-called reproductive cells differentiate from the vegetative cells. In some species, the adhesive cells make cytoplasmic connection passed through both the cell walls and the plasma membranes.

Similar phenomenon can observe in the Porifera, Calcispongiae. The Calcispongiae have been considered to be the phylogenetically lowest multi-cellular organisms in the Animalia world, but some investigators have argued that they are colonial, rather than multi-cellular. The reason is as follows.

- (1) The organism has no muscle, nerve, and sensory tissues which are specific for the Eumetazoa.
- (2) The organism has no differentiated tissues derived from ectoderm, exoderm and endoderm which are specialized during development of the Eumetazoa.
- (3) When the sponge body was ground and filtered through a fine mesh, and the resulting cell suspension was incubated, they occur assemblage and make an adult body of the similar form with the original.

However, the sponge body can reproduce asexually and sexually. That is, the asexual reproduction is due to the budding and the sexual reproduction is due to the differentiation of egg and sperm in the parts of body. The fertilization proceeds to develop blastula and then the adult individual, as typically seen in species *Sycon raphanus*.

### 3. Cell-cell adhesion <sup>7,13)</sup>

Adhesion of cell-cell is mediated by specialized components and structures. First of all, physical interaction between cells are generated by various physicochemical forces including electrostatic attraction, hydrophobic interaction, hydrogen-bonding and van der-Waal's forces between both the surfaces, like colloidal particles. However, in biological systems, the interaction occurs under effects of more factors.

A number of cell-cell adhesion molecules are now known and usually may use more than one such molecule. Various types of embryonic tissues can dissociate into and reassociate from

single cells more easily than adult tissues. Mixture of dissociated cells forms aggregate preferentially with cells of a similar organ, rather than those of a different organ, even across species boundaries. For instance, mouse-liver cells adhere tightly to chick-liver cells but not so to mouse-kidney cells.

It is now apparent that cell-cell adhesion molecules in the higher animals comprise two classes of molecules: those that require  $\text{Ca}^{2+}$  for adhesion, cadherins, and those that do not it. Many cells use both types of molecules. The cadherin, E, P, or N type, is a membrane-integrated glycoprotein of 720-750 amino acids. On average, 50-60% of the sequence is identical between the different cadherins, but each has a characteristic distribution among tissues. During differentiation, nature and amount of the cell-surface cadherins change and affect many aspects of cell-cell adhesion.

#### 4. Multi-cellularization in the lower plants <sup>3,9)</sup>

Evolution of the cellular organization in the eukaryotic algae seems to have produced with five steps: (a) single cells, (b) colonialization of cells, (c) filamentous multi-cellularization, (d) two-dimensional multi-cellularization, (e) three-dimensional multi-cellularization.

(A) *Single cell age* Single cell age is the Protista world and the multi-cellular body does not occur through the cell cycle. However, we can see three directions of the evolution. First group includes those called Myxomycota (slime molds) and the cells have no wall and can conduct the amoeboid movement. Second group is flagellate photosynthetic Protista which gave both taxonomic positions of Plantae and Animalia formerly. Third groups enveloped with a hard wall, like *Chlorella*, and has an evolutionary direction to Plantae.

(B) *Colonial age* This is more evolved step than the single cell, as mentioned above and the most important step to be determined which direction to select for the multi-cellularization: World Plantae, Animalia or Fungi.

(C) *Multi-cellular age* Plantae world, unlike Animalia one, possess a lower linkage of the cells. That is, Rhodophyta, Chromophyta and Chlorophyta have both of uni-cellular phase and multi-cellular phase in their life cycle. In fact, these algae take very complicated reproductive processes that seem to show evolutionary bridges from Protista to multi-cellular Plantae. Fujita and Oshiro (1989)<sup>9)</sup> have classified the Plantae world into 19 groups. Among them, 12 groups are living in an exclusively uni-cellular state through their life cycles. However, higher land plants, Bryophyta, Pterophyta and Spermatophyta, and a subdivision of higher hydrophytes, Charophyceae, have no uni-cellular phase in their life cycles. Each cell of the plants is seemingly separated by wall but holed between the septates. Therefore, there occur actively exchanges of nutrients, water and hormones among the cells. In progression of the multi-cellularization, the transport system, especially between the inner and outer tissues of the body is of very importance for the organization as individual. Particularly, the Plantae world differentiates special lengthwise tissues for the transportation, called vascular bundle.

(i) *Filamentous growth* This style is the most primitive multi-cellularization and is seen



even in the prokaryotic world. The simplests in Chlorophyta make series of three or four cells, but very evolved ones can make filaments which are composed of one hundred and more cells. Further, some filaments fuse each other and branch, as observed in cyano- bacterial growth.

(ii) *Thallophytic growth* It has been suggested that the filamentous algae evolved morphologically thallophytic, namely two-dimensional form, like sea lettuce, *Ulva*, and sea tangle, *Laminaria*. Such organization resulted from repeated fusing the filaments. The thallophytic bodies must be convenient for hydrophytes from a view that all of the somatic cells positioned in any part can directly absorb nutrients from and excrete metabolic products to the environmental medium. It means that the algae do not need the transportation system for water, nutrients and products. In fact, the algae's tissues are very primitive and do not differentiate particular system for the transportation seen in the land plants, like the vascular bundle. Therefore, each of the algal cells is able to reproduce independently when isolated. Further, the reproductive tissues for production of the egg and sperm also are very primitive because the spread and fertilization of the reproductive cells are possible to depend on water as the fluid medium. However, the algal body possesses an part to adhere with the bottom rock, namely roots in appearance because of fixing the position not to flow.

(iii) *Three-dimensional growth* It must be natural that the two-dimensional plants evolved the three-dimensional bodies. In fact, even the thallophytic algae differentiate and develop the three-dimensional tissues partially in roots of *Laminaria* and completely in *Chara*. Particularly, the organization of *Chara* is of an evolutionary importance in that the Charaphyta is in an special bridge position to the land plant Bryophyta.

Incidentally, Coelenterata which has been taxonomically positioned in the most primitive Eumetazoans, includes only completely three-dimensional multi-cellular organisms except for reproductive cells.

## 5. What is the multi-cellularization?

There are two types of processes for the multi-cellularization: (i) the developmental process which starts from a fertilized egg in the sexual reproduction or a mother cell in the parthenogenesis, (ii) the evolutionary process building cell-blocks which occurred in the late Precambrian Age (about one billion years ago). In accordance with Haeckel's idea (1966), the former can refer to as individual multi-cellularization and the latter to as phylogenetic multi-cellularization. Needless to say, the present paper deals with the latter, but the former also is referred for the discussion. The uni-cellular age including prokaryotic and eukaryotic worlds has continued for three billion years before the phylogenetic multi-cellularization occurred. In other words, this fact means that the multi-cellularization needed so long term of cellular evolution because the colonialization itself of cells had to occur in the prokaryotic age. For multi-cellularization, development of cell-cell mechanisms for adhesion and exchanges of nutrients and informations were required, as stated above. On the other hand, high level of multi-cellularization would require further orderly and large systems for the mechanisms.

Next important factor for multi-cellularization is formation of body-supportive system. The extant Animalia world developed exoskeleton in the invertebrates and endoskeleton in the vertebrates. On the other hand, hydrophytes of the Plantae world have nothing of such supportive system because they can stand up by aid of the watery buoyancy. However, land plants have a special supportive mechanism that the cell walls are filled up by cement and harden substances, but not endoskeleton. Further, trunk and vein of the land plants contain vascular bundle which consists of vessels and sieve tubes for the nutritional transportation. The multi-cellularization must be accompanied by such accomplishments of various tissues and organs. However, lower animals and plants do not evolve such body-supportive system and Eukaryomycota also do not so although they are multi-cellular.

## 6. Significance of the multi-cellularization in the biological evolution

Since the multi-cellularization occurred in the late Precambrian Age, the biological morphology was explosively diversified, and this has been said to the largest "adaptive radiation".

*A) Homeostasis* The organism has a homeostatic mechanism whether the organization is uni- or multi-cellular. Purpose of the mechanism is to defend the life system of oneself against marked changes of the environmental conditions. The homeostasis of multi-cellular organisms seems to have various selective advantages as compared to uni-cellular organisms. The most important one of them is to be able to construct the defensive mechanisms by use of many cells. Therefore, the homeostatic morphologies of multi-cellular organisms become quite diversified. Further, the multi-cellular body can easily replace old cells with new ones without loss of the life, because the cells can be adaptively reproduced.

*B) Morphological adaptation* The multi-cellular organism has respectively characteristic shape of the body as standard. However, it is basically true that the organism can change his body shape to adapt the environmental condition, physiologically or genetically. Especially, Plantae are possible easily to transform the external morphology according to the environmental or even the artificial condition. In other words, the morphological adaptation is a problem of building style of the cell-blocks. Loomis (1988) <sup>\*)</sup> has suggested that number of the morphological genes is not so many as compared to the functional genes.

*C) Functional adaptation<sup>12)</sup>* Functional adaptation includes two types of modifications: morphological, namely cell-constructive and metabolic ones. Surely, morphological adaptation also is accompanied by functional advantages for the life system. However, the present discussion will be focused on the metabolic modification for the adaptation.

The metabolism is dynamically adaptive to the environmental conditions. Synthesis of mRNA, namely transcription, is exceedingly sensitive to the environmental change and to cell division as compared to syntheses of protein and DNA. For example, the mRNA synthesis reacts soon to nutritional shift of UP or DOWN. As a result, the cell makes a new equilibrium of the metabolic balance under the conditions. There is a flexibility with wide

range in metabolic balance. However, if it was beyond the boundary of flexibility, then the organisms must die or a highly adaptive mutant must predominate over the original population after lag of long term. The biological evolution is repetitions through geological time.

It is an important fact that DNA of the extant organism contains almost all of genetic informations which have acquired and accumulated during evolution. Therefore, the cells can express the most useful information dependently on conditional changes of the environment. For example, an evolved photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*, a kind of species of purple non-sulfur bacteria, is endowed with fermentation, (anaerobic) photosynthesis, and (oxidative) respiration which have historically experienced during the earth evolution. Therefore, the species can grow by selecting the most optimal mode under at least three conditions: anaerobic and dark, anaerobic and light, and oxidative and dark ones.

Multi-cellular organism differentiates functionally various tissues and organs, although all the cells contain at least a complete genome. Therefore, a single organism can simultaneously resist to various conditions of the environment, and thus must have higher selective advantage than the uni-cellular organism.

Metabolic adaptation is a result of regulative expression of gene(s) involved. However, if the regulatory gene(s) lost ability of regulation, then the resulting metabolism becomes constitutive, always expressive, as well studied on the *lac* operon of *Escherichia coli*. Metabolism working under extreme circumstance is genetically determined to work but not regulatively. It should be pointed out here that word "physiological change" which has been widely used by physiologists, means a phenomenon that is expressed on the genetical background. This should be discriminated from "flexibility of the genetic expression", which is possible within a certain range.

D) *Adaptive radiation after the multi-cellularization*      What is a reason that the adaptive radiation occurred just after the multi-cellularization in the late Precambrian Age? We could find the reasonable reason from mass extinction repeated in the life history (Figure 1). That is, the adaptive radiation have been palaeontologically demonstrated to occur just after the mass extinction. Therefore, it is suggested that radial phylogeny could occur after "similar" phyletic line was extinct and, in other words, after a vacant seat was produced in the phylogeny by unsuitable action of inner and outer factors of the population. This may be similar to the mammalian radiation which occurred after the mass extinction of dinosaurs and others in the end of Cretaceous Period about 65 million years ago.

## 7. Conclusion

It will be reasonable to consider at present day that the biological evolution could go back to 4 billion years ago. The (unicellular) proto-organism was prokaryotic and an evolution occurred in the cell morphology from prokaryota to eukaryota before 1.5 billion years. However, the unicellular age of eukaryota had continued until the multi-cellularization which occurred one billion years ago. Therefore, in the result, 3 billion years were unicellular age

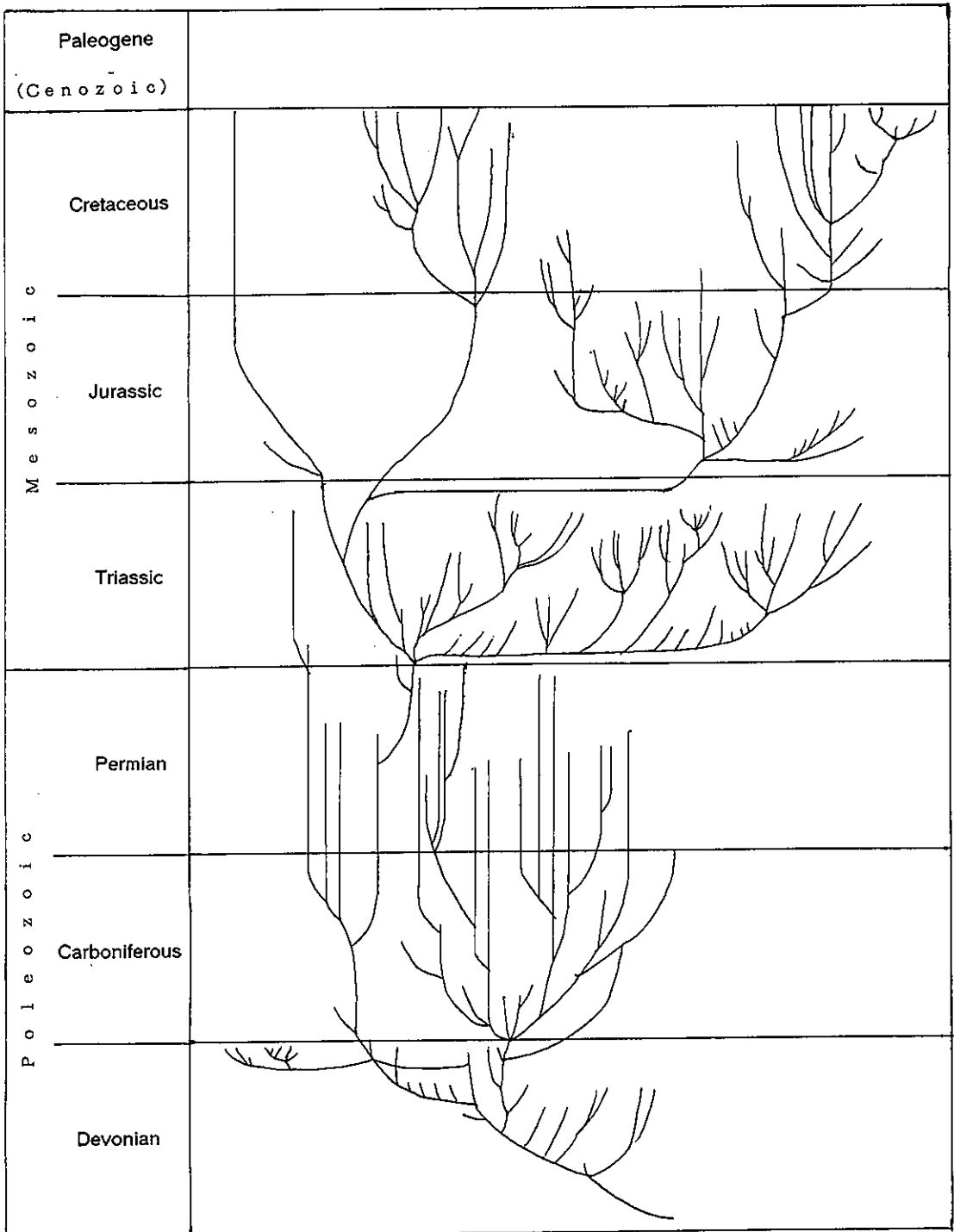


Figure 1. Phylogenesis of ammonites (proposed by Kennedy, 1977). Before the ammonites were completely extinguished in the end of Cretaceous Period of Mesozoic Era, they had repeated radiations and extinctions through Paleozoic and Mesozoic Eras.

through prokaryota to eukaryota, suggesting that the mechanism for the multi-cellularization would be very difficult to form.

Hydrophytes of Rhodophyta, Chromophyta and Chlorophyta have both uni-cellular and multi-cellular phases in their life cycles whereas other hydrophytes are exclusively uni-cellular. On the other hand, in Animalia, even the lowest Eumetazoa, Coelenterata, has no uni-cellular phase except reproductive cells. Evolution from uni-cellular to multi-cellular eukaryotes had a step of colonialization, in which the unicells gathered and made an assemblage but did not tightly adhere. In the present-day biological world, Porifera in Animaria and Volvocales in Plantae are examples.

The multi-cellularization seems to have various important significances for the organizational plan as follows.

(1) *Homeostasis*        The homeostasis of multi-cellular organisms has selective advantages in that they are able to construct the defensive mechanisms by use of many cells and in that an old or injured multi-cellular tissues can be easily repaired without loss of the life.

(2) *Morphological adaptation*        The organism can change or modify the shape of body by cell-reconstruction to adapt the environment.

(3) *Functional adaptation*        Mass adaptation of metabolism is possible by participation of many cells. Vascular bundle in the terrestrial plant stem is an example.

Adaptive radiation in the biological evolution had occurred after the multi-cellularization began from the late Precambrian Age. It can be suggested that radial phylogeny occurred after "similar" phyletic line was extincted and thus a vant seat was produced in the phylogeny.

## REFERENCES

1. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Robert, K., Watson, J. D. (1989). *Molecular Biology of the Cell (2nd Ed.)*. Garland Publishing, Inc., New York.
2. Audesirk, G. and Audesirk, T. (1986). *Biology - Life on Earth -*. Macmillan Publishing Company, New York.
3. Cowen, R. (1990). *History of Life*. Blackwell Scientific Publications, Boston.
4. De Witt, W. (1977). *Biology of the Cell - An Evolutionary Approach -*. W. B. Saunder Company, Phyladelphia.
5. Fujita, Y. and Oshiro, K. (1989). *Organisms called Cyanobacteria* (in Japanese). Tokyo University Press, Tokyo.
6. Gamlin, L. and Vines, G. (1987) (Ed.). *The Evolution of Life*. Oxford University Press, New York.
7. Giluda, N. B. (1974). Junctions between Cells. In *Cell Communication* (Ed. by Cox, R. P.). pp. 1-29, New York, Wiley.
8. Loomis, W. F. (1989). *Four Billion Years*. Sinauer Associates Inc., Sunderland.
9. Margulis, L. (1970). *Origin of Eukaryotic Cell*. Yale University Press, New Haven.
10. Margulis, L. (1981). *Symbiosis in Cell Evolution - Life and Its Environment on the Early*

*Earth* - W. H. Freeman and Company, San Francisco.

11. Nakamura, H. and Hase, A. (1991). *Tsukuba University Report of Special Research Project on Evolution of Matter*, vol.5, pp. 265-277.
12. Ragan, M. A. and Champman, D. J. (1978). *A Biochemical Phylogeny of the Protista*. Academic Press, New York.
13. Unwin, P. N. T. and Zampighi, G. (1989). Structure of junction between communicating cells. *Nature*, **283**, 545-549.
14. Whittacker, R. N. (1969). New concept of kingdoms of organisms. *Science*, N. Y. **163**, 150-159.

# 細胞内接合伝達仮説：オルガネラの起源における遺伝子の核移行機構

吉田 和夫、西川 正信、A. カトー

広島大学理学部生物科学教室 (〒724 東広島市鏡山1-3-1)

Tel: 0824-24-7455 Fax: 0824-24-0734

E-mail: r515582@ue.ipc.hiroshima-u.ac.jp

## 要旨

現在では、DNAを持つオルガネラのミトコンドリアや葉緑体の起源、進化に関する仮説として、真核生物の祖先にあたる細胞に好気性細菌やラン藻が共生して進化したという共生進化説が最も有力である。この説は、オルガネラが独自のDNAを有し、細菌類似の複製転写翻訳系や膜系を持つ上、rRNAに基づく分子系統樹では真正細菌に属することになる等の理由による。しかしながら、この共生進化説では、何故またどのような機構でミトコンドリアや葉緑体はその遺伝子の大部分を核に移行させたかについては合理的な説明が全然なされていない等大きな欠陥もある。本論文では、ミトコンドリアや葉緑体の遺伝子の核移行の理由、機構ともに簡単且つ合理的に説明できる”細胞内接合伝達仮説(Endosymbiotic Conjugation Hypothesis)”を新たな仮説として提案した。これは、従来、オルガネラの起源、進化を考える上で等閑視されて来た細菌の性と極く最近になって見出された生物界間接合現象の進化的意義について考察した結果に基づくものである。簡単に言うと、真核生物の出現以前に細菌は、既にその性、即ち一方向的遺伝子伝達性の接合系を十分進化させていて、雄細菌が細胞内に取り込まれて共生すればその接合伝達機構を使って宿主の核を雌と見なして一方向的にその遺伝子を伝達する可能性は十分にあり得たという仮説である。今のところ細胞内接合の直接の証拠はまだ得られていないものの、細菌間では広宿主域プラスドによる種属を越えての接合伝達が自然界でも起こっている事や細菌と酵母、アグロバクテリアと双子葉植物の間の生物界間接合ないしはそれに類似した乱交(Promiscuous Mating)現象の存在がこの仮説に対して理論的、実験的根拠を与えている。これについては、我々の大腸菌や土壌細菌からの酵母への生物界間接合によるプラスミド伝達の例を示した。この細胞内接合仮説は遺伝子の核移行についてその機構と理由を同時に説明できるだけでなく、この仮説を検証するためのいくつかの実験をも直接示唆する。また、ミトコンドリアや葉緑体の遺伝子が核にあるほうが何故進化生物学的に都合が良いのかを説明するのが我々の想定する移行選択機構である。これは、元々ハプロイド性でDNA修復機構を欠くオルガネラにとっては、自分自身が突然変異で直接変化するよりも核に遺伝子移行させて、核での突然変異を利用して、より機能的に進化したものを選択するほうが有利と考える。この機構によれば機能的に重要で進化しにくい遺伝子でも早く進化させることができるので、オルガネラ遺伝子の核移行の圧力を形成するというものである。この機構についてATPaseサブユニット遺伝子の分布と蛋白質のコンパートメンテーションを例に言及した。





# **Endosymbiotic Conjugation : A New Hypothetical Mechanism for Gene Transfer to the Host Nucleus during the Organelle Origin\***

**Kazuo Yoshida \*\*, Masanobu Nishikawa \*\*\* and Arthur Katoh \*\*\***

**\*\*Department of Biological Science, Faculty of Science, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima 724, Japan and \*\*\*Division of Nuclear Pathology, Mercy Hospital, Pittsburgh, Pa.15219, U.S.A.**

(Received February 23, 1995; Accepted April 11, 1995)

## **Abstract**

The idea of an endosymbiont origin of organelles, e.g. mitochondria and chloroplasts, has been widely accepted. Nevertheless, this does not clearly explain how and why the symbiotic bacteria of organelles ancestors horizontally transferred their almost all genes into the host nuclear genome. We propose here a novel "endosymbiotic conjugation hypothesis" that clearly explains the pressure and mechanism of vectorial gene transfer into nucleus during organelles evolution. The hypothesis has emerged by reexamining the evolutionary role of bacterial sex, particularly promiscuous conjugation including trans-kingdom conjugation.

**Key words:** ATPase subunit compartmentation, bacterial sex, conjugation, endosymbiotic conjugation hypothesis, organelle origin, retro-conjugation, sexduction, vectorial gene transfer.

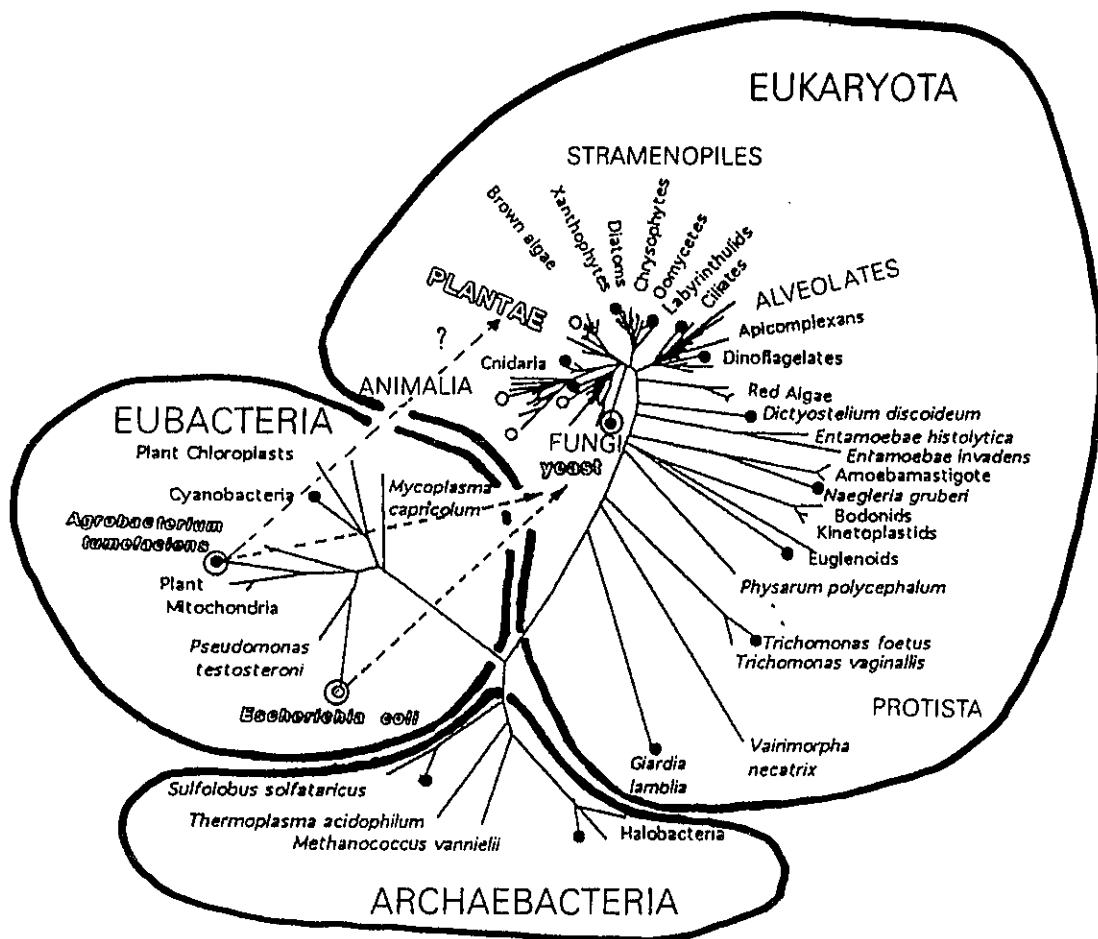
## **Introduction**

Since mitochondria and chloroplasts have their own DNA and bacteria-like structure, they are considered to be independent organelles, and, in some aspects, they have a closer kinship with free-living bacteria than other eukaryotic organelles. These characteristics have been recognized since the 1840s, and endosymbiont origin has been the major hypothesis for the origin of the eukaryotic organelles, e.g. mitochondrion and chloroplast (see Gray, 1992; Margulis, 1993; -----

\*A preliminary note appeared in Yoshida et al. (1993) and Yoshida(1995) .

\*Tel: 0824-24-7455 Fax: 0824-24-0734 E-mail: r515582@ue.ipc.hiroshima-u.ac.jp

\*Present address: Department of Legal Medicine, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu.



**Fig. 1. Trans-kingdom conjugation in a universal phylogenetic tree.**

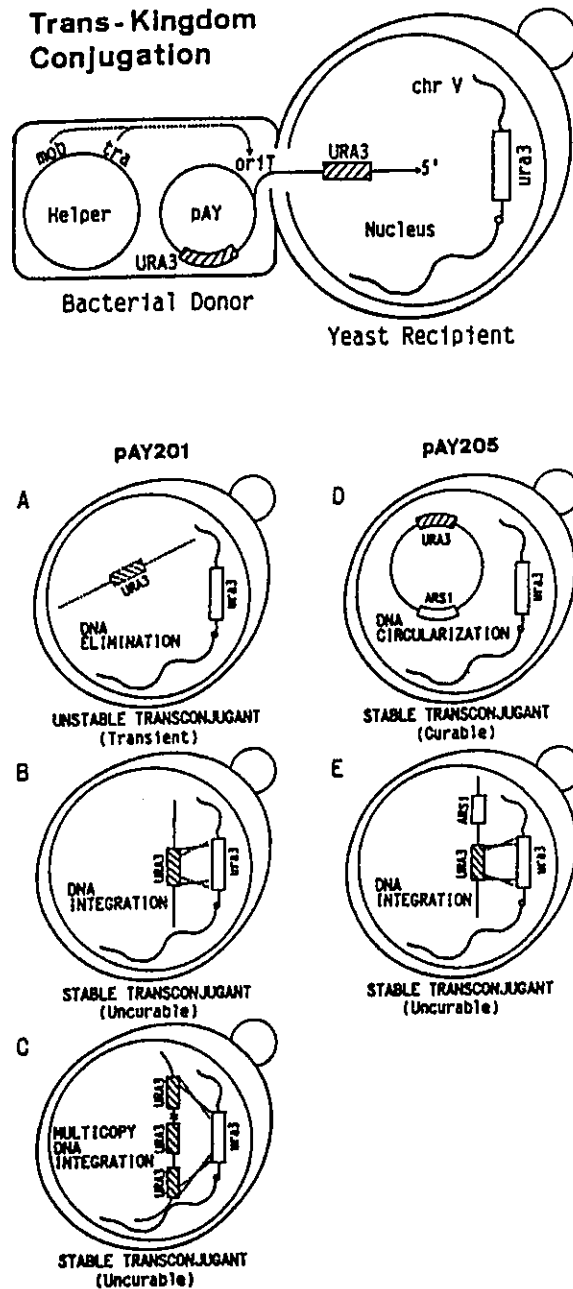
*Trans-kingdom conjugation of E. coli - yeasts and Agrobacterium - yeast is shown in a universal phylogenetic tree which is constructed on the basis upon comparison of small subunit ribosomal RNAs. The phylogenetic tree is based on the modified tree of Sogin (1992) which originally came from that of De Soete (1983). The dashed lines with an arrow indicate plasmid transfer by trans-kingdom conjugation. ? indicates trans-kingdom-like transfer of T-DNA by Ti plasmid in Agrobacterium. Note that the mitochondrion and chloroplast come from Eubacteria.*

Margulis & Sagan, 1986; Sato, 1988; Shinozaki & Sugiura, 1986; Yoshinaga, 1992). The hypothesis postulates that both aerobic bacterium and cyanobacterium invaded an ancestral eukaryotic cell and the endosymbiosis was subsequently established to generate mitochondrion and chloroplast, respectively. This is strongly supported by the transplantable characteristics of isolated mitochondria (Gunge & Sakuguchi, 1979; Yoshida, 1979; Yoshida & Takeuchi, 1980), the usage of mitochondrial codon (see Osawa et al., 1992) and the molecular phylogenetic data based on ribosomal small subunit RNA (see Fig. 1). However, the genome sizes of present mitochondria and chloroplasts are as much as 2 to 10 percent of typical bacterial genomes. This indicates that the prokaryotic bacterial symbiont transferred their almost all genes into the host nuclear genome in a unidirectional fashion during the evolution of organelles in the eukaryotic cell. Unfortunately, there is no explicit explanation of the one way (vectorial) transfer mechanism.

In this paper, we describe a novel "endosymbiotic conjugation hypothesis" which explains how and why prokaryotic symbionts transferred their almost all genes into the host nuclear genome during the evolutionary process.

## Hypothesis and Discussion

The sex of prokaryotic bacteria, particularly conjugation, has been believed to be evolved more than 3 billion years ago (see Halvorson & Monroy, 1985; Margulis & Sagan, 1986; King & Stansfield, 1990). However, the conjugation has never been seriously considered with respect to the origin and evolution of organelles or eukaryotic cells (see Dyer & Obar, 1994; Gray, 1992; Halvorson & Monroy, 1985; Margulis & Sagan, 1986; Michod & Levin, 1988; Yoshida et al., 1993). Like sex in higher organisms, the bacterial conjugation is believed to be confined within a single species. Recently, there have been several reports on promiscuous conjugation via wide host range plasmids beyond the species barrier in bacteria (see Hirsh, 1990). More recently, trans-kingdom conjugation between bacterium *Escherichia coli* and eukaryotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been reported (Heineman & Sprague, 1989; Nishikawa et al., 1990). Also, *Agrobacterium*-mediated conjugation-like transfer of plasmid DNA to plants has been known to occur in nature (see Zambryski et al., 1989). These findings encouraged us to formulate a new "endosymbiotic conjugation hypothesis for the origin of organelles" which is primarily based on the phenomena of bacterial conjugation and trans-kingdom conjugation. Before introducing the hypothesis, salient features of bacterial and trans-kingdom conjugation are quickly reviewed and summarized to aid in understanding the hypothesis.



**Fig. 2. Plausible molecular events of trans-kingdom conjugation.**

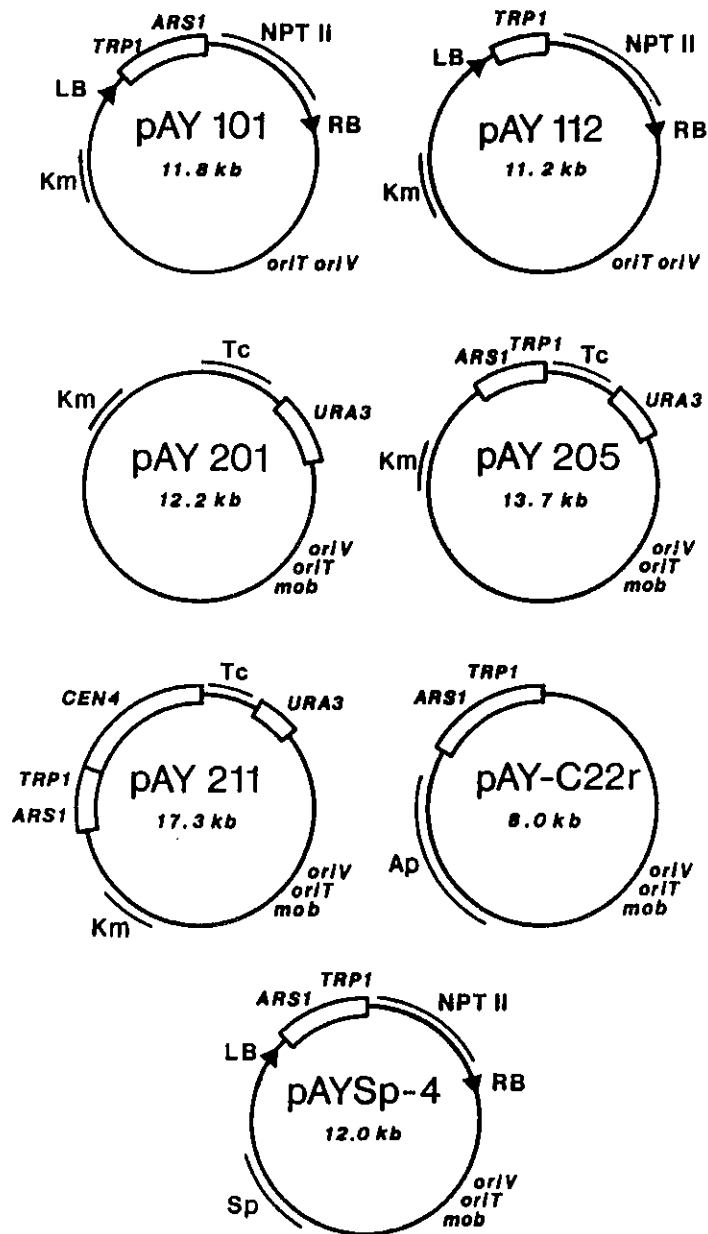
The top figure indicates a general scheme for *E. coli* - yeast trans-kingdom conjugation. The dotted lines indicate the genes' action. The typical results by ARS-less pAY201 and ARS-plus pAY205 of Table 1 are schematically shown in A to E. A, abortive micro-colony formation by transient expression of the gene on transferred plasmid; B, uncurable stable colony formation by plasmid DNA integration; C, uncurable stable colony formation by multimeric plasmid DNA integration; D, curable colony formation by transferred plasmid; E, uncurable colony formation by plasmid DNA integration. (After Nishikawa *et al.* 1992).

### ***Bacterial Conjugation***

Conventional bacterial sex is generally determined by sexual or conjugative plasmids. Usually, *oriT* (origin of conjugal transfer), *mob* (mobilization) and *tra* (transfer) genes on the plasmid are indispensable for conjugation. The most extensively studied conjugative plasmid is the F plasmid, which is endowed with the typical conjugative genes of *oriT*, *mob* and *tra* (see Willets & Skurray, 1987; Frost et al., 1994). The latter two genes are trans-acting genes, so that those genes can also be functional even when they are on a separate helper plasmid. The bacterial cell which harbors the F plasmid becomes a male bacterial cell while the cell lacking the F plasmid is designated a female. The mixture of male and female bacterial cells causes the conjugation: male cells fix female cells by sexual pili coded by *tra* genes and subsequently the conjugation tube between male and female cells is formed by the action of *tra* genes. The specific nuclease coded by the *mob* gene nicks one strand of the F plasmids at the *oriT* site. From this site, the transfer of single stranded plasmid DNA into the recipient occurs in the 5' to 3' direction. The synthesis of complementary DNA of the transferred strand and the retained strand DNA starts simultaneously. Finally, the complete plasmid is formed both in male and female cells. Thus, the transconjugant becomes a male if it receives a full copy of the F plasmid. In *E. coli* Hfr strain in which chromosome F is reversibly integrated and excised *via* insertion sequences, the integrated F can mobilize the whole bacterial chromosome although the mobilization is easily interrupted by sharing force (see Willets & Skurray, 1987 for details). As the result of inaccurate excision, i. e. illegitimate recombination, Hfr sometimes yields F' which carries an additional small amount of chromosomal DNA. F' can transfer the DNA to another female *E. coli* at a very high frequency. This is called sexduction.

### ***Trans-kingdom Conjugation***

*Agrobacterium*-induced tumorigenesis has been well known in the field of plant pathology since the 1950s. *Agrobacterium* can transfer T-DNA flanked with right (RB) and left border sequence (LB) on Ti plasmid to dicots plants. *Vir* (virulence) genes on Ti plasmid have a role corresponding to *mob* and *tra*. After the transmission, the onco-genes of T-DNA are integrated into plant genomes and subsequently induce a plant tumor. This conjugation-like process has been established as one of the gene introduction techniques in plants. Recently, the promiscuous conjugation between prokaryote and eukaryote, which is called trans-kingdom conjugation, has been reported in *E. coli* and yeasts including *S. cerevisiae* (Heineman & Sprague 1989; Nishikawa et al., 1990, 1992, 1993; Nishikawa & Yoshida, 1995), *S. kluyveri* (Nishikawa et al., 1993; Inomata et al. 1994),



**Fig. 3. Trans-kingdom conjugative plasmids between bacteria and yeasts.**

*OriV*, *oriT*, *mob* and *tra* indicate bacterial replication origin, transfer origin, mobilization and transfer gene, respectively. *Ap*, *Km* and *Tc* indicate ampicillin, kanamycin and tetracycline resistant bacterial gene, respectively. *ARS*, *LEU*, *TRP*, *URA*, *GAL* and *CEN* indicates *Saccharomyces cerevisiae*'s autonomous replication sequence, leucine-, tryptophan-, uracil-requiring and galactose-utilizing and centromere gene, respectively. *LB* and *RB* indicate left and right border sequence of *Ti* plasmid, respectively.

**Table 1. Trans-kingdom conjugation between bacteria and yeasts.\***

No.	Crosses			Selection	Transconjugant numbers		
	Donor	x Helper	x Recipient		Curable	Uncurable	Abortive
<i>Escherichia coli</i> x <i>Saccharomyces cerevisiae</i> yeast							
1	HB101 (pAY201)	x HB101 (pRK2013)	x YNN281	Ura	ND	0.7x10 <sup>-7</sup>	1.9x10 <sup>-4</sup>
2	HB101 (pAY201)		x YNN281	Ura	ND	ND	ND
3	HB101 (pAY205)	x HB101 (pRK2013)	x YNN281	Ura	2.0x10 <sup>-4</sup>	NC	ND
4	HB101 (pAY205)		x YNN281	Ura	ND	ND	ND
5	HB101 (—)	x HB101 (pRK2013)	x YNN281	Ura	ND	ND	ND
6	HB101 (YRp7)	x HB101 (pRK2013)	x YNN281	Ura	ND	ND	ND
7	HB101 (pAY101, pAY215, pRH220)		x YNN281	Trp	0.2x10 <sup>-2</sup>	NC	ND
				Leu	0.9x10 <sup>-2</sup>	NC	ND
				Trp Leu	0.2x10 <sup>-2</sup>	NC	ND
8			YNN281	Ura	ND	ND	ND
<i>Escherichia coli</i> x <i>Saccharomyces kluyveri</i> yeast							
9	HB101 (pAY201)	x HB101 (pRK2013)	x D1-15	Ura	1.0x10 <sup>-7</sup>	ND	ND
10	HB101 (pAY205)	x HB101 (pRK2013)	x D1-15	Ura	0.8x10 <sup>-6</sup>	ND	ND
11	HB101 (pAY201)		x D1-15	Ura	ND	ND	ND
12	HB101 (pAY205)		x D1-15	Ura	ND	ND	ND
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> x <i>Saccharomyces cerevisiae</i> yeast							
13	LBA 1055 (pAYS <sub>p</sub> -4)	x HB101 (pRK2013)	x YNN281	Trp	2.3x10 <sup>-6</sup>	ND	ND
14	LBA 1055 (pAYS <sub>p</sub> -4)	x HB101 (—)	x YNN281	Trp	ND	ND	ND
15	LBA 1055 (—)	x HB101 (pRK2013)	x YNN281	Trp	ND	ND	ND
<i>Escherichia coli</i> x <i>Escherichia coli</i> (Bacterial conjugation, Control)							
16	LE392 (pAY101)		x HB101 (pRH210)	Ap Km	0.9	NC	ND

\*Data from Inomata et al. (1994), Nishikawa et al. (1990, 1992, 1993) and Sawazaki et al. (1995). Transconjugant numbers are expressed by transconjugants/recipient. The inside of parentheses indicates the harboring plasmid. (—) indicates the harboring no plasmid. Selection indicates the first selection for transconjugants. Trp, Ura, Leu, Ap and Km indicate tryptophane, uracil and leucine requirement, and ampicillin and kanamycin resistant. ND indicates not detect less than 10<sup>-9</sup>. NC indicates not count.

*Kluyveromyces lactis*, *Pichia angusta*, *Pachysolen tannophilus* (Hayman & Bolen, 1993) and *Schizosaccharomyces pombe* (Sikorski *et al.*, 1990) and in *Agrobacterium tumefaciens* and *S. cerevisiae* (Sawazaki *et al.*, 1995). Fig. 1 illustrates the relationship to a universal phylogeny based upon comparisons of ribosomal small subunit RNAs with the direction of trans-kingdom conjugation (see the dashed arrows). The conjugation mechanism is believed to be essentially the same as in bacterial conjugation, as shown in Fig. 2. The trans-kingdom conjugative plasmids require at least *oriT*, *mob* and *tra* genes as bacterial conjugative plasmids. Since *mob* and *tra* are trans-acting genes, these two genes can be harbored by a separate helper plasmid as in bacterial conjugation. Fig. 3 shows our trans-kingdom conjugative plasmids. These conjugative plasmids have *oriT*, *oriV* (origin of vegetative replication), *mob*, *ARS* (autonomous replication sequence of *S. cerevisiae*) and marker genes of antibiotic resistance or nutrient requirement. The conjugative results by these plasmids upon their transfer are summarized in Table 1. This clearly indicates that no transconjugant appeared without conjugative plasmids and/or helper plasmids (Cross No. 2, 4, 5, 11, 12, 14, 15). The transmitted plasmids are usually present as an independent plasmid in a transconjugant since the transconjugant's plasmids are easily curable under the non-selective conditions (Cross No. 3, 7, 9, 10, 13). However, at a rare rate of about  $10^{-7}$ , the plasmids are sometimes integrated into the host chromosomes (Cross No. 1). *ARS*-less plasmid, which is incapable of replicating in *S. cerevisiae* yeast, is transiently expressed and forms an abortive micro-colony of transconjugant (Nishikawa *et al.*, 1992). This reflects that the transmission does not always depend on the plasmid's replicability in transconjugants. In other words, *oriT*, *mob* and *tra* system mobilizes any DNA following to *oriT* sequence. These conjugal events have been distinctly verified by Southern hybridization and back-transformation (Nishikawa *et al.*, 1990; Nishikawa *et al.*, 1992; Nishikawa *et al.*, 1993). The conjugation events between *E. coli* and *S. cerevisiae* in Table 1 (Cross No. 1-6) are schematically summarized in Fig. 2A-E (see Nishikawa *et al.*, 1992). pAY201 and pAY205 originally constructed for *S. cerevisiae* were successfully transferred into different species of yeast *S. kluyveri* by trans-kingdom conjugation and quite functional in it (Cross No.9-10). Cross 13 shows a successful conjugation between *Agrobacterium tumefaciens* and *S. cerevisiae*. An experimental design that been shown in Fig. 4 to get further insight whether conjugative plasmid can move back from yeast to bacteria in the reverse direction during trans-kingdom conjugation. This possibility was also investigated as Table 2 that shows the experimental result of trans-kingdom retro-conjugation between *E. coli* and *S. cerevisiae*. If tetracycline and kanamycin-resistant *E. coli* appears in cross no. 3, then pAY205 plasmid of yeast



### Trans-Kingdom Retro-Conjugation

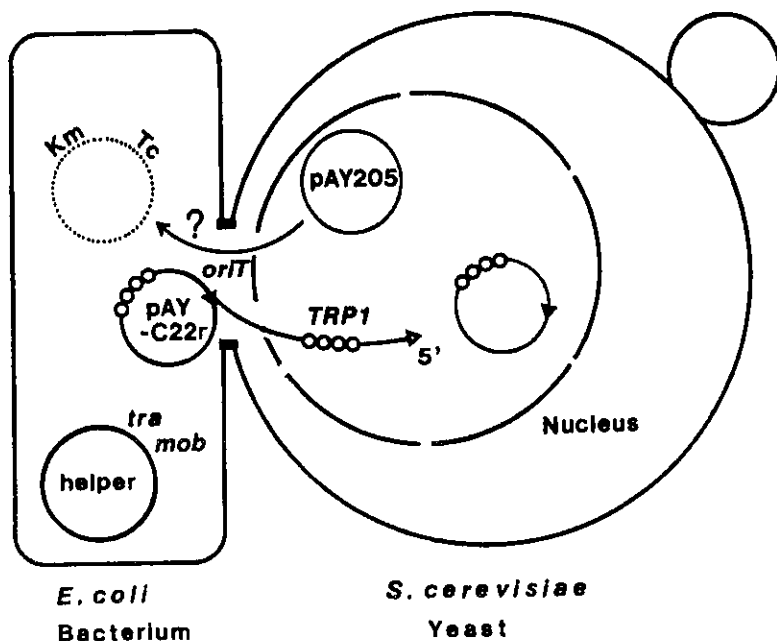


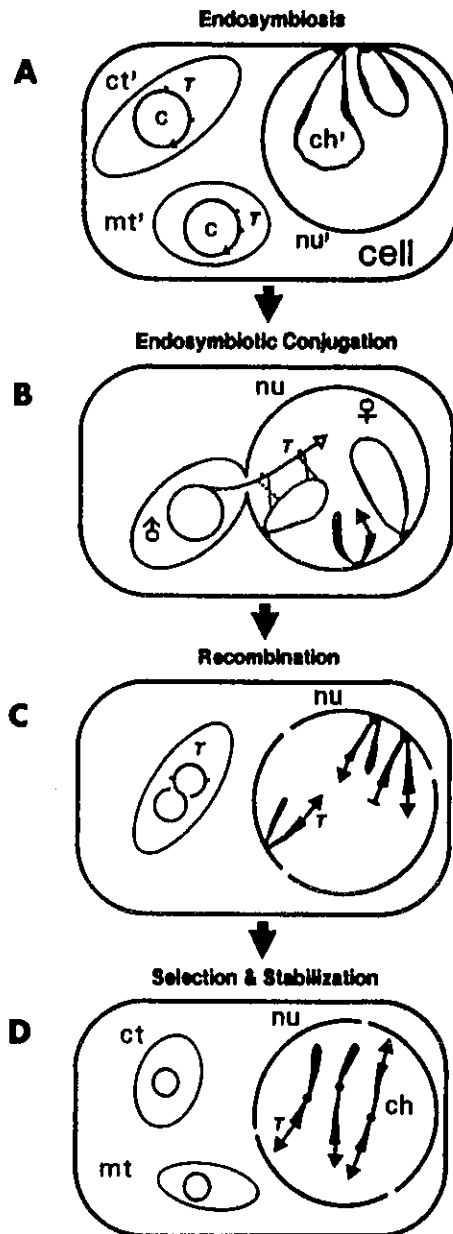
Fig. 4. Experimental design to detect trans-kingdom retro-conjugation between *E. coli* bacterium and *S. cerevisiae* yeast.

? indicates the direction of plasmid transfer by retro-conjugation. Km and Tc indicates kanamycin and tetracycline resistant markers on each plasmid.

Table 2. Trans-kingdom retro-conjugation between *E. coli* and *S. cerevisiae* yeast.

No.	Crosses	Selection	Transconjugant numbers
<i>Escherichia coli</i> x <i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
1	HB101 (pAY-C22r, pRH220) x YNN281 (——)	Trp	1.4x10 <sup>-3</sup>
2	HB101 (pAY-C22r, ——) x YNN281 (——)	Trp	ND
3	HB101 (pAY-C22r, pRH220) x YNN281 (pAY205)	Cyh Km Tc	ND

Transconjugant numbers are expressed by transconjugants/recipient. Cyh and Tc indicate cycloheximide and tetracycline resistant, respectively. Others are same as in Table 1.



**Fig. 5. Endosymbiotic conjugation mechanism for organelles origin.**

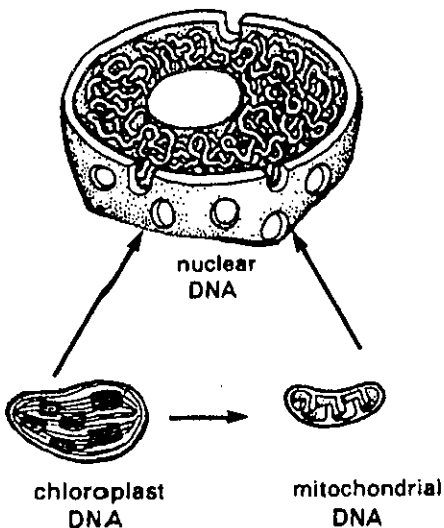
*A, the establishment of endosymbiosis among eukaryote ancestor and organelle ancestral bacteria; B, vectorial gene transmission by endosymbiotic conjugation or sexduction between symbiotic organelle ancestors and nucleus; C, gene integration into nuclear genome and disintegration by recombination; D, stabilization by selection and environment stress. Ct, ct', mt, mt', nu, nu', ch, ch' and T indicate chloroplast, chloroplast ancestor, mitochondrion, mitochondrion ancestor, nucleus, nucleus ancestor, chromosome, chromosome ancestor and transfer region, respectively.*

cell is expected to be transferred into *E. coli* during trans-kingdom conjugation. However, the above results clearly indicate that during trans-kingdom conjugation the transfer is unidirectional, that is to say, the conjugative plasmid is transferred only from *E. coli* or *A. tumefaciens* to yeast cells but never in the reverse direction.

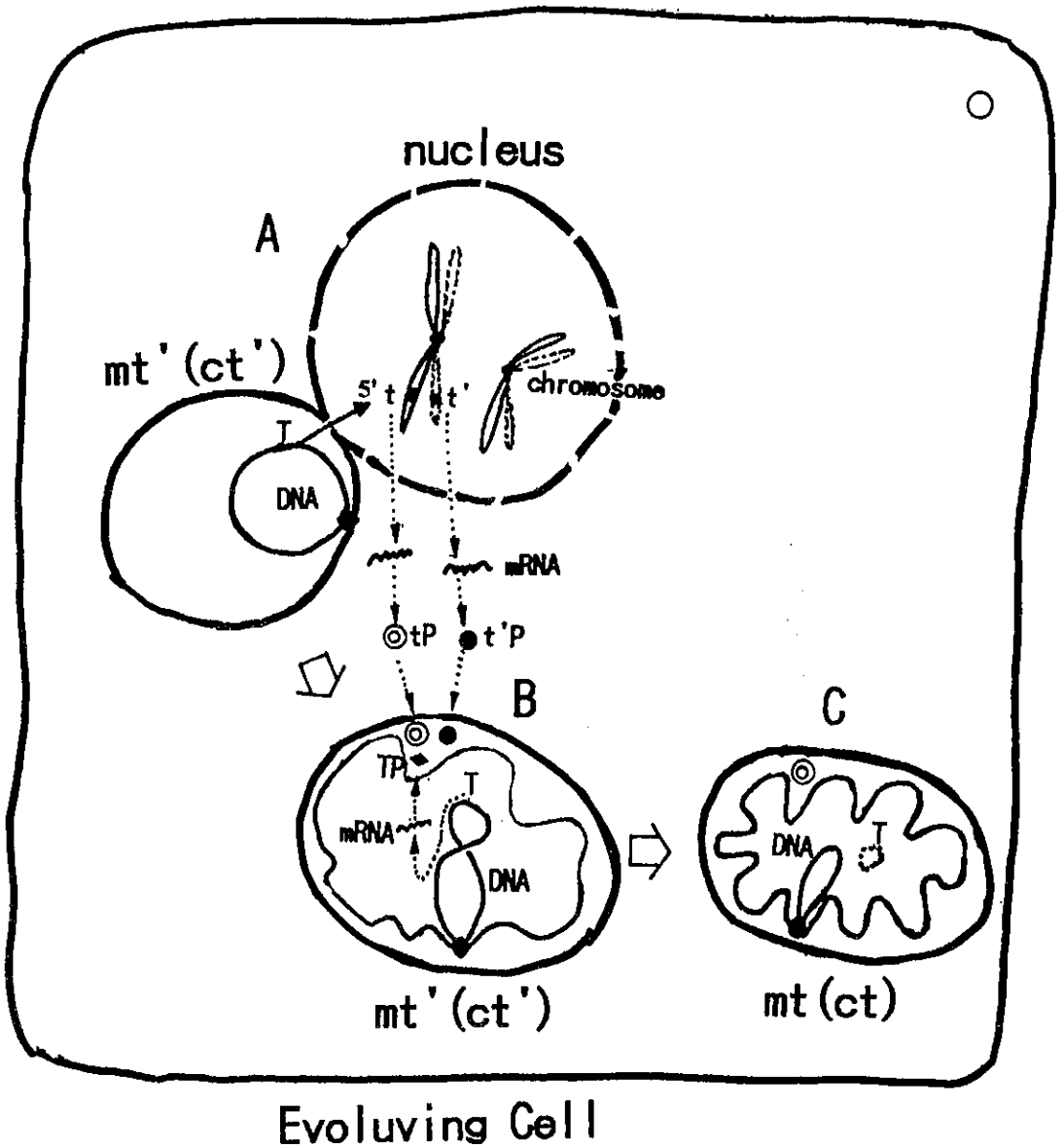
### ***Endosymbiotic Conjugation as Gene Transfer Mechanism***

Our endosymbiotic conjugation hypothesis is based on the following assumptions: 1) the prokaryotic conjugation system was evolved well before the appearance of the eukaryotic cell; 2) the endosymbiotic conjugation or sexduction may occur inside a host cell. The former assumption has been generally accepted (see Halvorson & Monroy, 1985; Margulis & Sagan, 1986; King & Stansfield, 1990), while the latter assumption is introduced as a new hypothesis in this paper. However, circumstantial data described above support its possibility. Our hypothesis is schematically shown in Fig. 5. The bacterial candidates (ancestors) for organelles enter into a host eukaryotic cell candidate (ancestor) and the endosymbiosis is subsequently established. The symbiotic male bacterium recognizes the host cell's nucleus as "female bacterium" so that the conjugative gene transmission or sexduction occurs from the symbionts to the host nucleus. The transmission is only unidirectional because of its conjugative characteristics. If the nucleus itself had evolved from another symbiotic bacterium, this would be more easy to explain. Finally, the extra DNA copy is removed by self-recombination in the symbiotic bacteria as shown in Fig. 5. As

the result of horizontal gene transfer, the symbionts finally evolve into organelles. This hypothesis explains why and how the organelles ancestors transferred their major genes into the host nuclear genome. Further, it also explains why the vectorial transfer of genes goes from organelles to nucleus and never in the reverse direction as shown in Fig. 6 (Lewin, 1984). The figure also indicates that the new symbiont of chloroplast ancestor could transfer the genes to mitochondrion as well as nucleus. This fact is a favorable evidence to our hypothesis.



**Fig. 6. Transfer of DNA segments among organelles. The arrows indicate documented transfer. (After Lewin 1984).**



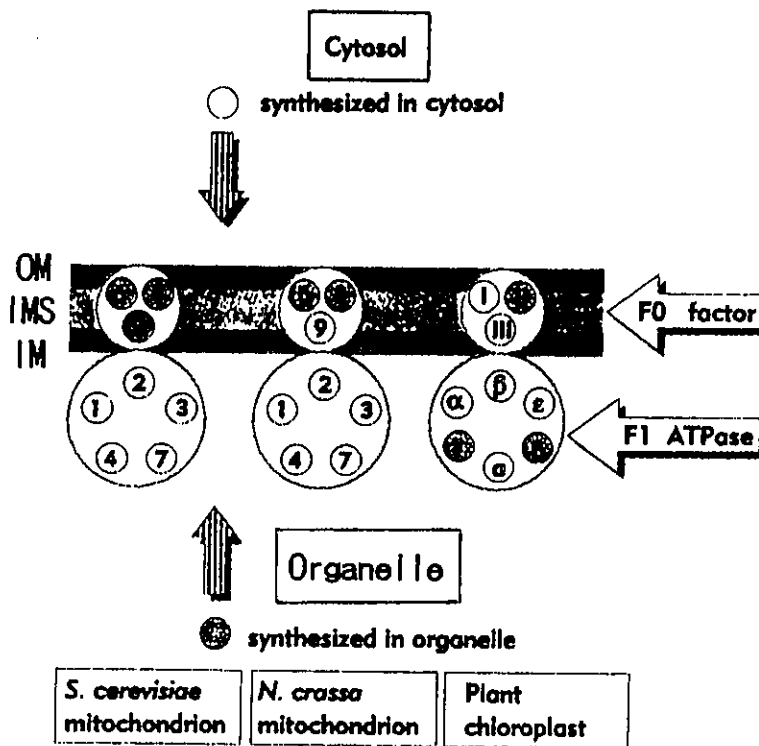
**Fig. 7. Pressure of gene transfer during organelles' evolution.**

A, conjugative transfer of organelle ancestral DNA into nuclear chromosomes on which mutation causes T to be t or t'; B, competition among T, t and t'; C, survival of t gene and loss of T gene. mt'(ct') and mt(ct) indicate mitochondrial(chloroplast) ancestor and mitochondrion (chloroplast), respectively. TP, tP and t'P indicate the gene product of gene T, t and t', respectively. Dotted chromosomes indicate duplicative ones.

## Endosymbiotic conjugation hypothesis for organelles origin

The another important question is what merit causes organelles to transfer their genes to nucleus. We speculate that by gene transfer, organelles have a better chance to select the best out of two or three gene products and evolve more quickly without causing mutation on their haploid DNAs themselves as illustrated in Fig. 7. This mechanism by gene transfer and competitive mutational selection is very favorable especially for the evolution of functionally important proteins because organelles are believed to lost DNA repair system during evolution. The present compartmentation of ATPase's subunits in organelles may also reflect this as shown in Fig. 8. For this merit, organelles may still retain the pressure of horizontal gene transfer even after their loss of conjugative characteristics and emergence of eukaryotic sex.

At present, there is no direct evidence for endosymbiotic conjugation. However, this new hypothesis encourages and directs our efforts in finding such phenomena. Experiments along this line are now in progress in our laboratory. It may be, however, that cells as they exist today have



**Fig. 8. Compartmentation of ATPase subunits in organelles.**

*1-4, 7, α and α - ε* indicates subunits of F<sub>1</sub> ATPase, respectively. *6, 8-9 and I-III* indicates subunits of F<sub>0</sub> membrane factor of ATPase. *IM, IMS and OM* indicate inner membrane, intermembrane space and outer membrane, respectively. The original figure of Lewin (1994) was modified.

evolved to acquire an immune-like protection system against foreign DNA during evolution. Therefore, we cannot completely exclude the possibility of the involvement of endosymbiotic conjugation or sexduction in the origin of organelles even though we cannot detect symbiotic conjugation in the cells that have evolved to the present. Another approach to consolidate the hypothesis is to detect DNA sequence fossils, for example, *oriT*, *mob* and *tra* remaining in mitochondria and chloroplast DNAs by Southern and computer analysis. Along this line, we have recently determined the first complete DNA sequence of yeast mitochondrion (Sekito *et al.*, 1994, 1995). As a result, this mitochondrion of *Hansenula wingei* yeast has 7 genes for subunits of NADH dehydrogenase which were previously believed to be completely lacking in mitochondrial DNAs of yeasts including *S. cerevisiae* and *S. pombe* (Okamoto *et al.*, 1994). This offers one of the best experimental survey systems to investigate how and why genes of organelles were horizontally transferred into nuclear genomes. Recently, the similar loss of NADH dehydrogenase genes has been reported in the chloroplast of a black pine *Pinus thunbergii* (Wakasugi *et al.*, 1994).

## Acknowledgement

We thank our colleagues who provided comments on the manuscript. K. Yoshida was supported by a Short-Term Visiting Professorship from the Ministry of Education, Science and Culture, Japan. This study was in part supported by research grants from the Ministry of Education, Science and Culture, Japan and from Electric Foundation of Chugoku to K. Y.

## Literature

1. De Soete, G. A. (1983). A least squares algorithm for fitting additive trees to proximity data. *Psychometrika*, **48**, 621-626.
2. Dyer B. D. and Obar, R. A. (1994). Tracing the History of Eukaryotic Cells. The ENIGMATIC SMILE. Columbia University Press, New York.
3. Frost, L. S., Ippen-Ihler, K. and Skurray, R. A. (1994). Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor. *Microbiol. Review*, **58**, 162-210.
4. Gray, M. W. (1992). The Endosymbiont Hypothesis Revisited. *Int. Rev. Cytol.*, **141**, 233-357.
5. Gunge, N. and Sakaguchi, K. (1979). Fusion of mitochondria with protoplasts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, **170**, 243-249.

Endosymbiotic conjugation hypothesis for organelles origin

6. Halvorson, H. O. and Monroy, A. (eds). (1985). *The Origins and Evolution of Sex*. Alan R. Liss, New York.
7. Hayman, G. T. and Bolen, P. L. (1993). Movement of shuttle plasmids from *Escherichia coli* into yeasts other than *Saccharomyces cerevisiae* using trans-kingdom conjugation. *Plasmid*, **30**, 251-257.
8. Heinerman, J. A. and Sprague, G. F., Jr. (1989). Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. *Nature*, **340**, 205-209.
9. Hirsh, P. R. (1990). Factors limiting gene transfer in bacteria. In *Bacterial Genetics in Natural Environments*. (ed. Fry, J. C. & Martin, J. D.), pp. 31-40, Chapman and Hall, London.
10. Inomata, K., Nishikawa, M. and Yoshida, K. (1994). The yeast *Saccharomyces kluyveri* as a recipient eukaryote in transkingdom conjugation: Behavior of transmitted plasmids in transconjugants. *J. Bacteriol.*, **176**, 4770-4773.
11. King, R. C. and Stansfield, W. D. (1990). "sex" in *A Dictionary of Genetics*, 4th edition, pp.289, Oxford University Press, New York.
12. Lewin, B. (1994). *GENES V*, p.738, Oxford University Press, Oxford.
13. Lewin, R. (1984). No genome barriers to promiscuous DNA. *Science*, **224**, 970-971.
14. Margulis, L. (1993). *Symbiosis in Cell Evolution*. W.H. Freeman, Boston.
15. Margulis, L. and Sagan, D. (1986). *Origin of Sex*. Yale University Press, New Haven.
16. Michod, R. E. and Levin, R. E. (eds). (1988). *The Evolution of Sex*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
17. Nishikawa, M., Suzuki, K. and Yoshida, K. (1990). Structural and functional stability of IncP plasmids during stepwise transmission by trans-kingdom mating: Promiscuous conjugation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Jpn. J. Genet.*, **65**, 323-334
18. Nishikawa, M., Suzuki, K. and Yoshida, K. (1992). DNA integration into recipient yeast chromosomes by trans-kingdom conjugation between *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, **21**, 101-108.
19. Nishikawa, M., Inomata, K., Sekito, T., Suzuki, K. and Yoshida, K. (1993). Trans-kingdom conjugation as a symbiotic plasmid transfer between bacteria and yeasts. in *Endocytobiology V*, pp.537-544, Tubingen University Press.
20. Nishikawa, M. and Yoshida, K. (1995). The trans-kingdom conjugation more frequently induces the gene replacement than the transformation does in *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Genet. Res.*, submitted.

21. Okamoto, K., Sekito, T. and Yoshida, K. (1994). The mitochondrial genome of yeast *Hansenula wingei* encodes NADH dehydrogenase subunit genes *ND4L* and *ND5*. *Mol. Gen. Genet.*, **243**, 473-476.
22. Osawa, S., Jukes, T. H., Watanabe, K. and Muto, A. (1992). Recent Evidence for Evolution of the Genetic Code. *Microbial. Rev.*, **56**, 229-264 .
23. Sato, H. (1988). *Saiboshinkaron* (Origin and evolution of cells), Tokyo University Press. Tokyo. (in Japanese).
24. Sawazaki, Y., Inomata, K. and K. Yoshida. (1995). The trans-kingdom conjugation between *Agrobacterium tumefaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Plant & Cell Physiol.*, submitted.
25. Sekito, T., Okamoto, K., Kitano, H. and Yoshida, K. (1994). Yeast *Hansenula wingei* mitochondrial genome's complete DNA sequence demonstrated unique characteristics. *Nucleic Acids Symposium Series*, **31**, 233-234.
26. Sekito, T., Okamoto, K., Kitano, H. and Yoshida, K. (1995). The complete mitochondrial DNA sequence *Hansenula wingei* reveals new characteristics of yeast mitochondria. *Curr. Genet.*, in press.
27. Shinozaki, K. and Sugiura, M. (1986). Structure and expression of chloroplast genes. (Review Article), *Jpn. J. Genet.*, **61**, 371-409. (in Japanese)
28. Sikorski, R. S., Michaud, W., Levin, H. L., Boeke, J. D. and Hieter, P. (1990). Trans-kingdom promiscuity. *Nature*, **345**, 581-582.
29. Sogin, M. L. (1992). Comments on genome sequencing. in *The Origin and Evolution of The Cell.* (ed. Hartman, H. & Matsuno, K.), pp.387-391.
30. Wakasugi, T., Tsudzuki, J., Ito, S., Nakashima, K., Tsudzuki, T. and Sugiura, M. (1994). Loss of all *ndh* genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thunbergii*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **91**, 9794-9798.
31. Willetts, N. and Skurray, R. (1987). Structure and function of the F factor and mechanism of conjugation. in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. (eds. Neidhardt, F.C. et al.) vol.2, pp.1110-1133, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
32. Yoshida, K. (1979). Interspecific and intraspecific mitochondria-induced cytoplasmic transformation in yeasts. *Plant & Cell Physiol.*, **24**, 851-856.
33. Yoshida, K. and Takeuchi, I. (1980). Cytological studies on mitochondria-induced cytoplasmic transformation in yeasts. *Plant & Cell Physiol.*, **21**, 497-509.



Endosymbiotic conjugation hypothesis for organelles origin

34. Yoshida, K., Nishikawa, M., Inomata, K., Sekito T. and Matsumoto, Y.(1993). Trans-kingdom conjugation as an environmental response.in *Environmental Responses and Gene Expression of Eukaryotic Microbes*.(ed. Yoshida, K. & Ootaki, T.), IGE16, pp.21-37., Institute of Genetic Ecology, Tohoku University Press. (in Japanese)
35. Yoshida, K. (1995). A new hypotheis of gene transfer in mitochondrion origin. *Viva Origino*, **23**, 60-61. (in Japanese)
36. Yoshinaga, K. (1992). Evolution of chloroplast as deduced from gene structure. *Viva Origino*, **20**, 269-286.(in Japanese)
37. Zambryski, P., Tempe, J. and Schell, J. (1989). Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. *Cell*, **56**, 193-201.



## 第30回COSPAR科学会議

小林憲正

横浜国立大学工学部物質工学科物性化学  
(〒240 横浜市保土ヶ谷区常盤台156)

1994年7月11日から21日にかけて、ドイツ北部のハンブルクにおいて第30回 COSPAR (The Committee on Space Research)の第30回科学会議 (Science Assembly) が開催された。これは原則として2年に1度開催される、宇宙科学全般にわたる国際会議であり、前回は1992年に国際宇宙年を記念してThe World Space Congressとして米国の首都ワシントンで開催された。

COSPARはA～Gの7つの委員会 (Commission) に分かれており、それらは

- A. Space Studies of the Earth's Surface, Meteorology and Climate
- B. Space Studies of the Earth-Moon System, Planets, and Small Bodies of the Solar System
- C. Space Studies of the Upper Atmosphere of the Earth/Planets including Ref. Atmosphere
- D. Space Plasmas in the Solar System, including Planetary Magnetospheres
- E. Research in Astrophysics from Space
- F. Life Sciences as Related to Space
- G. Materials Sciences in Space

である。さらにそれぞれは、いくつかずつの小委員会(Sub-commission)に分かれており、例えばF (宇宙生物科学) はF 1 (無重力生物学)、F 2 (放射線生物学)、F 3 (惑星生物学と生命の起源)、F 4 (閉鎖系生態学) の4小委員会を有する。この各小委員会毎に科学会議においていくつかのシンポジウムやセッションを開催するわけである。その運営にあたってはCOSPAR 以外の組織も運営に参加することがあり、われわれにもっとも関係の深いF 3小委員会のシンポジウムは国際生命の起源学会 (ISSOL) が深く関与している。

今回、COSPAR のF 3小委員会は次の7つのシンポジウムを開催した。

- F3.1 Role of Solar UV in Origin, Evolution and Distribution of Life
- F3.2 Origin and Early Evolution of Basic Biological Structures and Functions
- F3.3 Pre-biotic Chemistry in Space. II. Low Temperature Chemistry and Exobiology
- F3.4 Life Below the Freezing Point
- F3.5 Planetary Protection for Solar System Exploration
- F3.6 The Earth's Early Biosphere
- F3.8 Mineral and Inorganic Markers for Environments Conducive or Indicative of Liquid Water and/or Life on Mars

ご覧になってわかるように、シンポジウムの内容は必ずしも宇宙科学に直結するものとは

限らず（例えばF 3. 2やF 3. 6）、生命の起源に関係するものならばすべて、このF 3のテーマとなりうるのである。また、F 3. 3がPart IIとなっているのは、今回、F 3と委員会B（惑星科学）とがシンポジウムを共催することになり、Part IIは

#### B1.4 Pre-biotic Chemistry in Space. I. Organic Chemistry in Comets, Asteroids and Interplanetary Dust

としてF 3. 3に先だって開催されたからである。

COSPARの会期は約2週間と、普通の国際会議の約2倍であるが、委員会Fのシンポジウムはすべて前半（7月16日まで）の6日間に納まっていた。F 3のシンポジウムはすべて同一会場で開かれるため、その会場に6日間いればすべてのF 3の講演が聴けるわけである。F 3の会場にはだいたい40人前後の聴衆がおり、活発な議論がなされていた。各シンポジウムには原則として1名の座長(chairperson)と1名のレフェリーがおり、その他に数名の組織委員が指名されている。また、口頭発表の他、ポスター発表も選択できる。発表者は発表内容を論文にして予め提出しておき、レフェリーはその論文と発表をもとに内容を審査し、合格と判定された論文はレフェリーの意見を入れて改訂された後、COSPARの機関誌であるAdvances in Space Researchに掲載される。

今回は開催地がヨーロッパであったため、前回とは異なり、米国からの参加者が少なく、ヨーロッパ、特にドイツ、フランスからの参加者が目だった。日本からの参加者はF 3以外には結構いたようであるが、今回のF 3には私と東工大の小池惇平氏の2名しか発表者・参加者がいなかった。

会期中に委員会毎、小委員会毎のミーティングが開かれ、それぞれの議長や、次回のシンポジウムのテーマを決めたり、アジェンダを採択したりした。委員会Fの議長候補としてはF. Raulin（パリ大学）とD.DeVincenzi（NASA）が指名され、投票の結果、DeVincenziが当選した。また、次回、1996年の第31回COSPARは英国のバーミンガムで開催されるが、この時のF 3のシンポジウムのテーマは

- Complex Organic Molecules in Space
- Exobiology and Upcoming Space Missions
- Planetary Protection

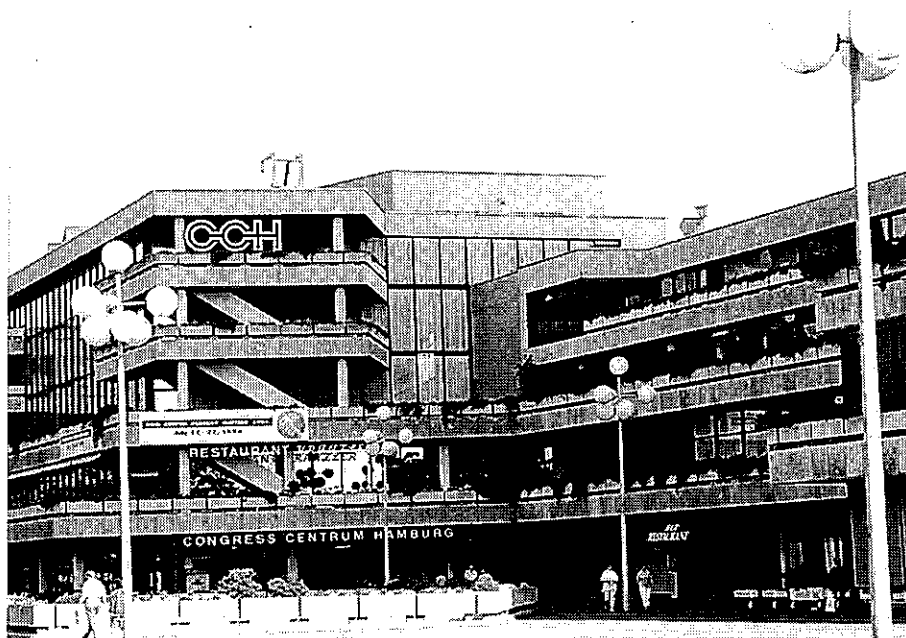
の3つが決定し、さらにPlanetary Engineeringというタイトルでのイーブニングセッションを開くこととした。

ニュースとしては、次々回、第32回のCOSPARが1998年7月に日本の名古屋で開催されることであろう。その時のF 3の生命の起源セッションを盛り上げるためには、日本からの、特に生命の起原および進化学会の方々の協力が必要になることと思う。また、その時のシンポジウムのテーマなどは1996年7月15日～23日(予定)のバーミンガムでのCOSPAR会期中に決まるので、この会議にもできるだけ多くの方の参加が期待される。1996年7月にはフランス、オルレアンでISSOLも開催されるが、その運営委員長のA.BrackはISSOLをCOSPARの直前に開催して、両方の会議に参加しやすくするよう努力するそうである。なお、COSPARには誰でも参加できる。

シンポジウムの内容などについてふれるスペースもなくなってしまったが、個人的にはセッション全体としては前回のバルセロナでのISSOL以上に興味深いものであった。ご興味のある方は小林まで連絡して下さい。プログラムやアブストラクトのコピーなどをお送りします。

写真1 COSPAR の会場となったCongress Centrum Hamburg

写真2 レセプション風景。中央がF 3 部門の常連のGreenberg教授。





## 木村資生先生を悼む

統計数理研究所

長谷川政美

木村資生先生が、昨年11月13日70歳の生涯を閉じられた。この日は丁度先生の70歳の誕生日であった。先生の突然の死は、われわれ進化学を学ぶものにとって、大きな衝撃であった。ご自身で基礎を築かれた分子進化学の華々しい発展がこれから始まるであろうという矢先に、それを見届けることなく逝かれてしまわれたことは、ご自分でも無念であったことと推察される。

木村先生の業績に関しては、いまさら紹介するまでもないであろう。一般には、1968年にNatureに発表された分子進化の中立説で有名であるが、それ以前にも集団遺伝学の理論的な研究ですでに歴史に残る業績を挙げておられた。しかしながら先生の偉大な点は、単に理論的な研究に留まらず、その当時発展しつつあった分子生物学の具体的なデータに基づいた研究を推し進められたことにあるだろう。理論家に有りがちな現実を無視した理論のための理論に陥ることなく、本当の生物学的な理論を築きあげられたのには、先生のナチュラルリストとしての側面も見逃せないであろう。先生はランの育種家としても有名なのである。

本学会と関連して思い出されるのは、学会の発起人になっていただくことをお願いするために1974年に三島の遺伝研にお邪魔したことである。その当時、「生命の起原」だけでは、科学的な研究テーマにはなかなかなりにくいということで、「(生命が出来上がったあとの)進化」の研究が当面大切であるというようなお話をされたように思う。「生命の起原および進化学会」という名称の本当の由来は思い出せないが、木村先生の考えも反映していたように思う。ただし、晩年には、生命の起原の問題も次第に科学的なテーマになりつつあると考えておられたようである。1975年に本学会の設立記念講演会にも参加していただき、中立説について講演していただいた。その後、1981年にも本学会の年会で、「自然選択」と題したシンポジウムが企画され、木村先生に講演していただいたこともある。

個人的な話題になるが、1990年9月にCold Spring Harbor Laboratory

の創立 100 周年を記念した “Evolution: Molecules to Culture” と題した Cold Spring Harbor Symposium が開催され、日本から木村先生と私の二人だけが参加したことが、私にとっては特に思い出に残ることである。先生は、講演のなかでご自身の中立説の紹介と共に、抽象的な議論に陥りがちな進化の研究の問題点を指摘された上で、前年に宮田隆氏らが中心になって発表した全生物界の系統樹の根の位置を決定したわれわれの論文を紹介して下さり、このような具体的な成果の積み重ねが大事であることを強調された。この思い出深いシンポジウムの際に撮らせていただいた写真をここに添えて、先生のご冥福をお祈りしたい。この写真は、先年、中高生のために分子系統学の本を書いた際に、中立説の紹介と共に使わせていただいたものである。本当は、もっとよく撮れたものを使いたかったのであるが、あいにくと私自身が撮った先生の写真というものは、唯一これしかなかったのである。ところが、先生は拙書の出版をととても喜んで下さり、何部かご自身でお買い上げになって、郷里の岡崎市の高校その他に寄付して下さったと、後で伺った。とても恐縮したものである。

このように、ご自分の学説が若い世代にどのように伝えられていくかということ、大変気にしておられたようである。私のように、分子進化学において自分の研究を始めた時点ですでに中立説というものが存在していた世代にとっては、すんなりと受け入れられる中立説の考えも、創始者自身にとってはそれほど容易に受け入れられるものではなかったようである。自然淘汰万能の考えが染み込んでいたので、データを説明するために自分自身で中立説を提唱したものの、心底からそれを受け入れることができるようになるためには、先生自身かなりの年月を要したようである。偉大な先駆者は亡くなったものの、その基礎の上に立って、分子進化学はこれから大きな発展期を迎えるであろう。





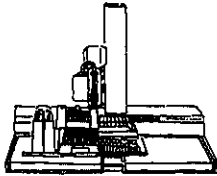
故 木 村 資 生 先 生



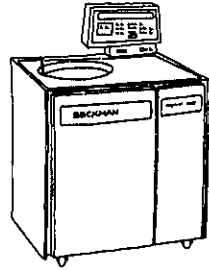
BECKMAN

# Imagine the Future

ベックマンは科学機器業界をリードする  
*Global Company*です。



未来の鍵をにぎるライフサイエンス、いまベックマンはその頂点にあります。つねに先端技術の集約とオリジナリティあふれる創意工夫、そしてたゆまざる努力のすべは、人類のあしたに向けて、科学技術の進歩と生命の根源にせまるあゆみをつづけていきます。

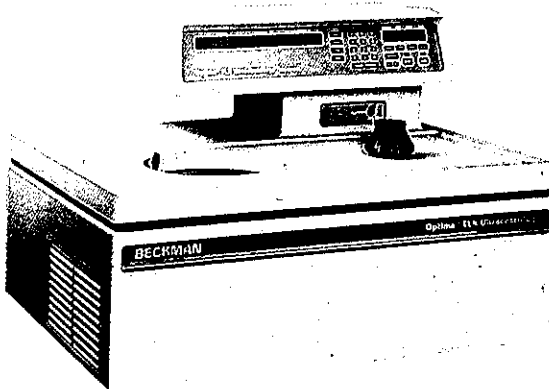


## ベックマン株式会社

本社 〒102 東京都千代田区三番町6番地 ☎(03)3221-5831#

●札幌☎(011)222-5761# ●仙台☎(022)264-7148# ●つくば☎(0298)52-6640# ●名古屋☎(052)971-4381# ●大阪☎(06)203-2821# ●広島☎(082)241-7821# ●福岡☎(092)271-0962#

## 革新的な性能と環境保全 ベックマンの卓上型超遠心機 "Optima™ TLX & TLシリーズ"



- 120,000rpm、625,000gを有し、実用面において、少量サンプルの迅速分離は、業界の規準です。
- 5年間の完全ドライブ保証で生産性と信頼性が向上。
- 広範囲なアプリケーション。
- 2.5時間のDNA分離。
- 1時間のRNA分離。
- 55分間でのタンパク質のレートゾナル分離。
- 20分以内の細胞分画。
- 1時間のウイルス分離。
- 15分の膜分離。

## ベックマン株式会社

本社 〒102 東京都千代田区三番町6番地 ☎(03)3221-5831#

●札幌☎(011)222-5761# ●仙台☎(022)264-7148# ●つくば☎(0298)52-6640# ●名古屋☎(052)971-4381# ●大阪☎(06)203-2821# ●広島☎(082)241-7821# ●福岡☎(092)271-0962#

## ☆ 学会誌 Viva Origino 投稿規定

### I. 論文の種類

投稿は、以下の区分1～3のいずれかに分類する(Ⅲ-4参照)。

1. Review: 解説または総説。
2. Article: オリジナルな研究結果の報告。
3. News and Views:
  - a) 研究報告, 解説, 総説に対するコメント。
  - b) 研究に対するプリンシプル, アイデア, 意見。
  - c) 国内外の関係学会報告。
  - d) 教育・研究体制に関する意見。
  - e) その他。

### II. 論文の体裁

1. 使用言語は日本語または英語とする。
2. Review および Article については、本文が英文の場合は和文要旨を、また本文が和文の場合は英文の要旨を添える。
3. 著者名の下に所属機関の名称・所在地・郵便番号を付記する。
4. 引用文献は、引用順に肩つきの通し番号で表示し、本文末尾に引用文献表を付してまとめる。雑誌の省略表示は、Chemical Abstract 等に採用されている標準表示の様式に従う。
5. 図表および写真は下記の基準によって準備する。
  - a) 図および写真には Fig. 1, Fig. 2 等, また表には Table 1, Table 2 等の通し番号をつける。
  - b) 原図は黒インクで明確に墨入れし, そのまま写真製版できる仕上がりとする。写真はプリントした陽画とする。
6. 単位と記号は、国際的に慣用されているものを用いる。単位は CGS (MKS) 系または SI 系を原則とし、両者を混用しない。
7. 術語および略語は、IUPAC-IUB の勧告を基準とする。化合物名等で英語表記がよいと判断されるものは、英語表示とする。その他は一般に関係学会誌等で使用されているものにならう。
8. 和・英文とも原稿作成にあたっては、それぞれの手引きを参照のこと。

### III. 論文の提出と受理

1. 原稿原本のはかにコピー1部を添えて Viva Origino 編集委員会事務局(以下、事務局という)に提出する。
2. 投稿受理日は、原稿が事務局に到着した日とする。ただしレフェリーの指摘による訂正などで、再提出

がいちじるしく遅れる場合には、再提出日を受理日とすることがある。

3. 採否は、事務局が依頼したレフェリーの審査を経て決定する。
4. 投稿区分はレフェリーの意見を参照の上、事務局が承諾を得て決定する。

### IV. 投稿の資格

1. 著者は、生命の起原および進化学会の会員であるか、あるいは会員の紹介を経ることが望ましい。
2. 会員以外の著者に原稿を依頼することができる。

### V. 校正

校正は、事務局が形式の統一等に関して校正した後、著者の責任において行う。校正段階での新たな変更等は、技術的な理由から原則として認めない。

### VI. 掲載経費の負担

製版・トレース等、別途の費用が必要な場合の実費は、著者が負担する。

### VII. 別刷

著者は、校正に同封した申込用紙により別刷を有料で申込むことができる。

## ☆ 写真製版英文原稿作成の手引き

英文原稿は原寸大の写真製版(和文要旨を除く)とするので、以下の規定による。

1. タイプの文字は elite 12ピッチ、シングル・スペースとし、鮮明に印字する。
2. 厚手のタイプ用紙を用い、横14cm×縦21cmの枠内に収める。
3. 第1ページに表題、著者名、所属機関等を、この順序に記す。
  - ア) 表題は大文字とし、9行目から始める。
  - イ) 表題のあと、4行あけて著者名を記す。
  - ウ) 著者名のあと、1行あけて著者の所属と所在地(郵便番号付記)を英文で記す。
  - エ) 所在地のあと、4行あけて ABSTRACT を記す。
  - オ) 1行あけて KEY WORDS (10語以内)を記す。
4. 原寸大の図表は所定の位置に貼る。縮尺を要する図表は別紙に記し、本文には相当する空白を設け、空白中央に図表番号を鉛筆で指示する。
5. 見出しは、区切りの大きいものから順に下記ア)〜ウ)の通りとする。各見出しのゴチ指定、改行等については、既刊の実例にならう。
  - ア) ORIGIN OF LIFE・・・のごとく、全部大文字

とし、左端から記す。見出しの上を2行あけ、下を1行あける。

イ) Origin of life . . .のごとく、最初の1文字のみ大文字とする。見出しの上を1行あけ、下を1行あける。

ウ) 文節の最初に記し、文頭を下げない(インデントなし)。Origin of life.のごとくアンダーラインを引き、ピリオドを打ち、行を変えずに文章を続ける。

6. 各ページとも、タイプ枠外の右上隅に第一著者名とページを鉛筆で記す。この記入は整理のためであり、印刷されない。

7. 別に和文要旨を添える。要旨冒頭に和文表題、著者名、所属機関、その所在地(郵便番号を付記)を、この順序に記す。要旨本文の長さはなるべく400字以内とする。

#### ☆ 写真製版和文原稿作成の手引き

和文原稿も英文原稿同様直接写真製版が可能な原稿をワープロを用いて作成することが望ましい。

1. 文字は24ドット以上の明朝体とする。
2. 厚手の用紙を用い、横17cm×縦25cmの枠内に1行40文字、40行を印字する。すべての文字および、図、表、写真は80%に縮小されて印刷される。
3. 第1ページに、表題、著者名、所属機関とその所在地(郵便番号付記)をこの順に記す。  
ア) 表題は4倍角文字とし、4行目から始める。文字の大きさが変えられない場合はそのまま(全角)の文字を使う。  
イ) 表題のあと、4行あけて、著者名を記す。  
ウ) 著者名のあと1行あけて、著者名の、所属とその所在地(郵便番号付記)を記す。  
エ) 所在地のあと、4行あけて、本文を記す。

4. 見出しは、区切りの大きいものから順に下記ア)～ウ)の通りとする。  
ア) 1, 2, 3, . . .  
イ) 1-1, 1-2, . . ., 2-1, 2-2, . . .  
ウ) a), b), c), . . .

各見出しのゴチ指定、改行等は既刊の実例にならう。

5. 図、表、写真は所定の位置に貼る。図、表、写真の番号、表題、説明は和文原稿の場合にも英文で記すことが望ましく、そのまま写真製版出来るよう図、写真の下、表の上および下に記す。

6. 和文原稿の場合には英文要旨をつける。

英文要旨冒頭には、表題、著者名、所属機関、その所在地(郵便番号付記)をこの順で記す。続いて、4行あけた後、ABSTRACT, KEY WORDS (10語以内)を記す。

7. 英文要旨は英文原稿作成の手引きを参考にして記す。
8. 英文要旨は表題から KEY WORDS まで含めて1頁以内に納める。

#### ☆ 和文原稿作成の手引き

1. 原稿は400字詰め原稿用紙に横書きで記す。ワープロを使用の場合は、25字×16行とする。
2. 第1ページに和文表題、著者名、所属機関、その所在地(郵便番号を付記)を、この順序に記す。第2ページには英文要旨を記す。第3ページ以下に本文を記す。
3. 見出しは、区切りの大きいものから順に下記ア)～ウ)の通りとする。各見出しのゴチ指定、改行等は、既刊の実例にならう。  
ア) 1, 2, 3, . . .  
イ) 1-1, 1-2, . . ., 2-1, 2-1, . . .  
ウ) a), b), c), . . .
4. 図、写真および表は別紙とし、原稿中にはそれぞれの挿入箇所を指定する。
5. 和文原稿の場合にも、図、写真および表の表題および説明文は英文で記すことが望ましい。
6. 英文要旨冒頭には、表題、著者名、所属機関、その所在地(郵便番号を付記)を、この順序で記す。
7. 英文要旨の後に KEY WORDS (10語以内)を記す。(日本語でのキーワードは不必要。)

# 生命の起原および進化学会

## <1994、1995年度役員>

名 誉 会 長 野田 春彦  
会 長 原田 馨  
副 会 長 佐藤 七郎、山中 健生

### 〔運営委員会〕

委 員 長：赤星 光彦 会計責任者：沢井 宏明 編集責任者：湯浅 精二  
委 員：秋山雅彦、石神正浩、大島泰郎、大西耕二、小林憲正、佐藤七郎、  
清水幹夫、下山 晃、伏見 譲、中村 運、長野 敬、野田春彦、  
松野孝一郎、長谷川政美、原田 馨、柳川弘志、山中健正

会 計 監 査 石本 真、福田育二郎

学会本部事務局 〒590-04 大阪府泉南郡熊取町野田1010  
京都大学原子炉実験所内  
TEL 0724-52-0901 FAX 0724-52-7364  
責任者 赤星 光彦

経理部事務局 〒376 桐生市天神町1-5-1  
群馬大学工学部内  
TEL 0277-22-3181 FAX 0277-44-4599  
責任者 沢井 宏明

編 集 事 務 局 〒560 豊中市待兼山町1-16  
大阪大学理学部生物学教室内  
TEL 06-850-5823 FAX 06-850-5817  
責任者 湯浅 精二

編 集 顧 問 秋山 雅彦 石神 正浩 大島 泰郎 下山 晃  
長野 敬 柳川 弘志 山中 健生 湯浅 精二

編 集 委 員 居原 秀 大西 耕二 川本 圭造 後藤 公彦  
小林 憲正 島田 秋彦 長田 洋子 長谷川典巳  
藤井 紀子 本多 元 三田 肇 胸組 虎胤

Special Reporter Rafael Navarro-Gonzalez(National University of Mexico)

Viva Origino 23巻2号

1995年6月10日 印 刷  
1995年6月15日 発 行

編集者	〒560 大阪府豊中市待兼山町1-16 大阪大学理学部生物学教室内 生命の起原および進化学会編集部
印刷者	〒594 大阪府和泉市池上町460-33 和泉出版印刷㈱ TEL 0725-45-2360 FAX 0725-45-6398
発行者 及び 出版者	〒590 大阪府泉南郡熊取町野田 京都大学原子炉実験所内 生命の起原および進化学会事務局 責任者 赤星 光彦



## Contents

### REVIEW

- ◎ Creation of terrestrial life having minimal genome  
M. Itaya ..... ( 95)

### ARTICLES

- ◎ What is evolutionary significance of the multi-cellularization?  
H. Nakamura ..... (109)
- ◎ Endosymbiotic conjugation: A new hypothetical mechanism for  
gene transfer to the host nucleus during the organelle origin  
K. Yoshida, M. Nishikawa and A. Katoh ..... (121)

### NEWS and VIEWS

- ◎ The 30th Science Assembly of the Committee on Space Research  
(COSPAR)  
K. Kobayashi ..... (141)
- ◎ Memory of Professor Motoo Kimura  
M. Hasegawa ..... (145)