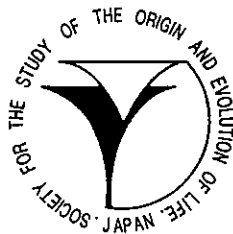


Viva Origino

VOL. 23 (No. 3)

September 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、互の連繋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とす。

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、その任にあたらせるものとする。

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 会員の退会届け者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、必要な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、会員の約以上の出席の総会において約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、委員会で承認する。

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.3)

September 1995

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

目 次

総 説

- ◎ 銀河の塵に、生命の起源をもとめて
和田節子…………… (153)

論 文

- ◎ トリプトファナーゼのD-トリプトファンに対する
反応機構の動力学的解析
島田秋彦、宍戸弘子、中村以正…………… (169)
- ◎ チトクローム c の構造からみた独立栄養化学合成細菌の
進化的位置
山中健生、藤原健智、矢野能弘、庄子和夫、福森義広…… (179)
- ◎ pH 条件の異なる水溶液中で窒素プラズマによって
引き起こされる分子状窒素の固定
胸組虎胤、原田馨…………… (189)

Search for Life Material in Galactic Dust

Setsuko WADA

Department of Chemistry, Univeristy of Electro-Communications

Chofugaoka, Chofu, Tokyo, 182

(Received/Accepted September 11, 1995)

Abstract

Many signals of carbonaceous materials in celetial objects tell us that the origin of organic materials on primitive earth might have come from outside the solar system. The aim of our work is to clarify what is the carbonaceous dust in our galaxy.

We formed carbonaceous materials in a course of cooling of methane plasma which was generated by the irradiation of microwave to methane gas. The materials, which we called QCCs, quenched carbonaceous composites, have very similar optical features to those observed in celetial objects.

The carbon-rich QCC (dark-QCC) exhibits a 220 nm extinction peak similar to the extinction hump of interstellar dust. The organic QCC (filmy-QCC) shows red fluorecence which can account for the extended red emission observed in reflection nebulae. Furthermore the ir absorption features of QCCs agree well with the ir emission features seen in carbon-rich planerary nebulae.

Keyword: dust, carbonaceous dust, interstellar extinction, extended red emission, ir emission, plasma.

銀河の塵に、生命の起源を求めて

和田節子

電気通信大学、化学教室

(〒182) 東京都調布市調布ヶ丘 1-5-1

1 生命物質

生命体を形作っているのは、有機物である。中心となる元素は炭素である。有機物は生命体のつくる特別な物質と思われていた。その確信は、尿素が人工的に合成できたことで早くも打ち砕かれることになるのだが、人類は、まずは人間を神秘化し、次には生命を特別視し、その次は有機物を特別な物としてきた。ところが尿素が合成され、生命体でなくても生体関連物質を人工的に作ることでできたのは、人類にとって非常に画期的なできごとであった。

生命および生命関連物質に関する考え方は、特別視が次々に打ち破られていった歴史をもつ。隕石中に有機物が見つかって、太陽系内に有機物が存在していることがわかり、太陽系からはなれて星雲中にも有機分子が見つかり、有機物の存在する空間ははるか遠方へと広がっていることを人類は認識してきている。

しかし、それらの有機物は何かことある時に、例えば(1)年老いた星の星周でできたものが、星間空間へ散逸している間に、あるいは(2)物質が濃集し雲となり、その中から星が生まれる時に、さらには(3)星の周りで塵が集まり惑星となる時に、すべて壊れてしまうと考えられがちであった。生き残るに厳しい関門がいくつももうけられ、銀河に存在した有機物は、地球に有機物の形ではとうていたどり着けなかったと思われていた。

われわれの銀河には炭素質物質(ここでは分子や塵になっている有機物や、より炭素に富む塵を炭素質物質と呼ぶ)が豊富に存在している。まぎれもなく、このようなものが地球の炭素源となった。しかし、元の形をどの程度とどめて原始地球へ到達したか。そして地球でどのように変わっていったか、そして生命を生みだしていったのか。

銀河の物質群から辿って、炭素質物質がどのように生命へと到達したか明らかにしたいというのが、私たち(坂田・和田)の抱いた大きな願望であった。まずはどのような炭素質物質が銀河に存在しているか、天文学の観測と私たちの実験が明らかにできたことをまとめてみたい。

2 分子や塵の天文学

天文学が化学者の研究対象になり得たのは、分子や塵が見つかったからである。古来、人間は眼を使って、すなわち星を可視光でながめていたが、紫外線や赤外線による観測

や、電波による観測から、塵や分子がはっきり見えるようになった。そうやって新たな天体像が浮かび上がってきた。星がガスを吹き出し、分子や塵ができ、冷たい暗黒星雲にも、分子や塵が見つかり、星がその中から生まれる様が、“見える”ようになったのである。

これらの仕事はすべて欧米ではじめられた。研究室で発達したスペクトル測定機器を、天体観測に応用したのである。地上観測が困難な波長帯での観測のため、1970年代から1980年代にかけて、人工衛星に機器を取り付けて観測することが行われはじめた。これらのスペクトルを生じる原因となる塵や分子は、どんなものであるか。化学者が関与したのはまずはこの部分である。一方、天文学者は分子や塵をセンサーとして用いて、星の誕生、死、銀河の運動、などを解析していった。化学者としてはスペクトル情報から、物質の変化をいろいろな場所で追わなければいけないのだが、この部分はまだほとんど手がつけられていない。最近の観測は、より高分解能観測（スペクトル分解、空間分解）へ、と向かっている。銀河における物質の変化を捉える条件は着々とそろってきている。

3 実験室で塵をつくる

3.1 QCCをつくる

塵のスペクトルが受かるようになるとすぐに、それはどんな塵かが、今まで知られた物質の中から探されはじめた。炭素質のものとしては、グラファイトが、そして酸化物系のものとしては、シリケートが、候補物質としてあげられた。しかし、既存のものではなかなか合わない。そこで、いろいろな方法で微粒子を合成し、その光学特性を測定することが行われた。

塵を生産している老化した星の大気には、酸素にくらべて炭素に富む星 ($C > O$) と、その逆の炭素にくらべて酸素に富む星 ($O > C$) とがある。どちらのタイプの大気を持つかにより、星の周囲でできる塵の種類が大きく変わる。炭素が多いと、炭素質の塵が生成される。逆に酸素が多いと炭素はCOをつくり、炭素質の塵は生成されない。私たちは、坂田らが以前星間分子の合成のため作った装置を、炭素質の塵の合成のために用いたのである。それは、マイクロ波放電により炭化水素プラズマをつくり、そのプラズマを真空槽へ放出し、そのなかから炭素質物質を作るものである。プラズマが急冷されてできた炭素質物質は、グラファイトのような構造のきちんとしたものではない。より多様な構造を含む。急冷炭素質物質 (Quenched Carbonaceous Composite; QCC) と名付けたこの物質 (群) の作り方をまずは紹介する。

3.2 実験方法

マグネトロンを用いて炭化水素プラズマをつくる。そのため、2.45GHz, 300W (電源出力) のマグネトロンから放射されたマイクロ波を、導波管で導いた。導波管には石英製の管を差し込み、その中をメタンガスを流した。マイクロ波照射前の反応管内の圧力は、約500 Paである。マイクロ波を照射すると、メタンは完全に分解し、青白い光を放つプラズマとなる。このガスを細孔から真空槽中に放出すると、ビームの中でラジカル、イオン、

分子などの化学種が冷えながら急冷炭素質物質を生成した。

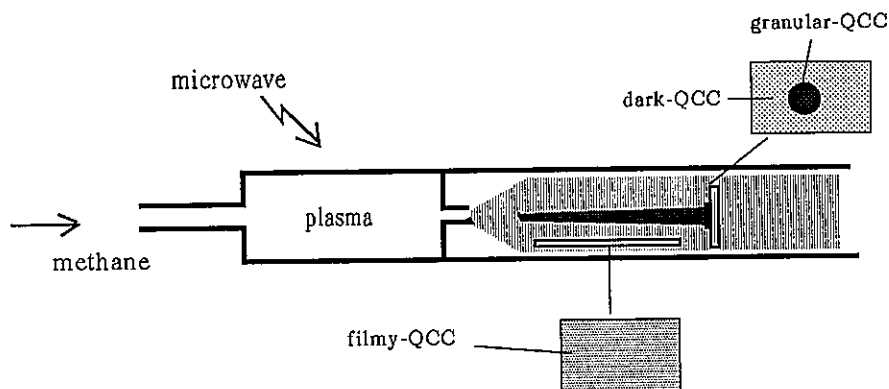


Fig.1 Apparatus of formation of quenched carbonaceous composites (QCCs).

メタンにマイクロ波を照射すると、放電開始直後はプラズマ管内の圧力や、プラズマからの発光スペクトルの変化が激しい。1-2分後にはほぼ安定する。メタンプラズマの光を分光器で分析すると、CH、H、C₂、H₂からの発光が確認された。

ラングミュアプローブ法およびスペクトル分析から、温度が求められる。電子温度として、50,000K、水素原子の電子励起温度として、6,000K、C₂のラジカルから求めた振動温度として3,000K、CHから求めた回転温度として1,500K、石英管の器壁温度として500Kが得られた。このような系では、エネルギーの受け渡しの速度が十分早くないので、物質によりあるいは状態により、いろいろな温度が得られる。

マイクロ波を石英管中のメタンに照射していると、プラズマ室の器壁のうち、マグネトロンが設置してある側に黒色の炭素質物質が付着してくる。これはマイクロ波放電を継続しにくくする。プラズマは長時間連続できない。通常、放電を約5分間ほど継続させて生成物を得た。

3.3 生成した炭素質物質

このプラズマガスからは冷却過程で3種の炭素質物質、QCC、を生じる(図1)。QCCはできる場所により、種類が異なる。プラズマビームの中心、直径約7mmに黒色の固体(granular-QCC)が、その周辺には広く茶色を帯びた黒っぽい固体(dark-QCC)が生じ、それとともに黄色から赤褐色の膜状物質(filmy-QCC)が生成された。QCCのスペクトルと観測で得られるスペクトルを、紫外線、可視光、赤外線順に比較してみよう。

4 220 nm の減光のこぶ

4.1 星間塵の減光スペクトル

星間塵とは星と星の間に薄く広がる塵のことである。1965年に Stecher¹⁾がロケットによる観測で、星間塵は220 nmに減光のこぶ(humpまたはbumpと表現される)をもつこ

とを明らかにした。最初のスペクトルは極めてノイズが多く、素人目には、本当にこぶ状ピークがあるのか心配になるようなものであったが、観測者にはその存在が確信できたようである。彼は5年後にはもっときれいなスペクトルを発表している²⁾。この紫外線領域のスペクトルを精密に測定するには、人工衛星による観測が必要であった。1970年代にはいくつかの人工衛星により、われわれの近くの紫外線を出す高温の星の観測が行われた。

星の手前に薄く広がっている塵のスペクトルを求めるには、光源となっている星とスペクトルタイプが同じで、しかも、その星と地球の間に塵がないと思われる星を探す。そして両者のスペクトルを比較することによって、塵のもつ減光スペクトルが求められる。こうして求めた塵の減光スペクトルは、地球から観測した星までにある塵の量が異なるため、比較しにくい。そこで、波長550 nmと440 nmのところで補正を行う。いろいろな天体を光源として、塵による減光スペクトルをこのように処理すると、塵の光学物性が全く同じであれば、同じスペクトルを示すことになる。

こうしたたくさんの観測から、われわれの銀河では、どこの星間塵でも220 nmに減光のこぶを示すことがわかった。極大波長位置はきわめて一定である。多少、極大波長が短波長に位置する天体や長波長に位置する天体もあるが、それは例外的な存在である³⁾。

星間塵は何種類かの塵の混合物と考えられている。しかし、220 nmのこぶを示す物質は何か。これを探すのが最も最初である。候補に挙げられた物質をあげると、まずはグラファイト微粒子。大きなグラファイト結晶の光学特性を用い、計算で微粒子にしていた時のスペクトルを求めて、220 nmの減光のこぶを示しうると結論した。しかしながら、この場合、極めて粒子径のそろったグラファイトしか存在が許されず、説は疑問視された。

炭素と水素からなる炭素質物質をつくれれば、その中から簡単に見つかると思っただ。しかし、それほど甘くない。~210 nmにピークを示す炭素質物質、~250 nmにピークを示す炭素質物質は比較的簡単にできる。220 nmを示す炭素質物質はなかなか作れない。今まで、220 nmの原因として候補に上げられ検討された物質は、炭素質物質ではQCCをはじめ、PAH (polycyclic aromatic hydrocarbon), HAC (hydrogenated amorphous carbon), coalの成分物質などがあり、酸化物系の物質では結晶欠陥を含むMgOやSiO₂、OHを含むマグネシウムケイ酸塩鉱物などがある。

4.2 老化した星の周りの塵の減光スペクトル

星間塵は老化した星の周りにつくられると考えられている。それは星間空間では物質が希薄すぎて、ここで塵が成長するとは考えられないからである。そこで塵の作られている現場の老化した星の星周塵に、この220 nmの減光のこぶを見つけようと、観測が行われた。

結論からいうとまだ見つかっていない。炭素に富む星の周りでも、酸素に富む星の周りでも、まだ見つからない。塵の減光スペクトルにこぶは無いが、あっても極大波長がずれているか、どちらかである。炭素質の塵による赤外輻射バンドがみられる天体であるHD 89353 (post-AGB star)には減光ピークは存在せず、HD 213985 (post-AGB star)には、珍しい230 nmの減光のこぶが観測された⁴⁾。後者の天体には赤外輻射バンドは見られない。一方、水素の少ない特殊な星(Heと炭素に富む)の星周塵のスペクトルに、250 nm (V348 Sgr, RY Sgr⁵⁾)の減光のこぶがあることが報告されている。

老化した星の星周塵の減光スペクトルについては、報告が少ない。それは、光源になる星のスペクトルの推定が難しいことや、紫外領域では明るくないことなどの理由による。

観測から提示されたこのような謎を解くためにも、まずは 220 nm ピーク（吸収ピークであり、散乱成分を含むと言われている）を示す物質を提示するのが重要である。QCC は星間塵のような 220 nm のピークを示すであろうか。私たちの QCC の仕事としてまず最初に行われたのが、この仕事であった。

4.3 QCC の紫外・可視減光スペクトル

4.3.1 dark-QCC の減光スペクトル

QCC を製造する装置のプラズマ室から真空中へビームとなってプラズマが放出される。ビームに垂直に基板をたて、その上に QCC を付着させる。ビームの中心は、物質濃度が高すぎる。ある程度希薄になっている部分に、すなわちビーム中心から少しはずれたところに行ける dark-QCC の紫外・可視スペクトルが測定できる。この部分には dark-QCC に加えて、有機質の filmy-QCC が付着している。これは 200 nm 付近に強い吸収をもつ。そこで、この filmy-QCC をメタノールあるいはアセトンをかけて溶かし、残った茶色を帯びた黒色の炭素質物質 (dark-QCC) のスペクトルを測定した^{6),7)}。図 2 にスペクトルを示す。217-221 nm 付近にピークがあり、他にはピークとよべるようなものは存在しない。

星間塵の減光スペクトルと比較できるように、440 nm と 550 nm の吸光度で規格化したスペクトル (Absorbance) を図に載せた。ピーク波長位置は観測値とよく合う。QCC 中のピークの原因となる構造 (電子構造) が星間塵のとよく似ていることがわかる。しかし、QCC の半値幅は観測値よりはるかに大きい。これは QCC の場合は構造の乱れはるかに大きいことを意味している。

4.3.2 熱変成 filmy-QCCC の減光スペクトル

dark-QCC と異なり、filmy-QCC はメタノールやアセトンなどの有機溶媒によく溶ける、比較的分子量の物質である。真空槽の器壁上に基板をおき、QCC を集めると、filmy-QCC のみが集まる。この filmy-QCC を石英製の真空容器に入れ、ロータリーポンプで排気したのち、真空容器の下部を電気炉に差し込み、一定の速度で昇温した。すると、filmy-QCC から物質が蒸発し、真空容器の上部の冷たい箇所へ付着する。残った filmy-QCC は色が褐色になりさらに黒色へと変わっていく。すなわち、加熱による熱重合と蒸発分離が起こっている。いろいろな温度で昇温をやめ室温にもどしてから、残った filmy-QCC の紫外・可視スペクトルを空気中で測定していった。これは、有機物を真空中で炭化していく実験である。filmy-QCC が焦げていくにつれ、200 nm 付近に存在したピークは長波長へとずれる。しかも、残った物質の量が少なくなっていくため、ピークが小さくなっていく (単位質量あたりのピークの大きさも、おそらくは少なくなっている)。ピーク波長位置は 500 °C で 219 nm になり、以後 700 °C (221 nm) までほとんど移動しなかった。この熱変成 QCC の減光スペクトルを dark-QCC と同様に可視部で規格化した。すると、dark-QCC に比べピークの減光強度は小さい。ピークの形はやはりブロードである (図 2)。

星間塵の減光のこぶは、しばしばこのこぶのみを抽出して、すなわち減光曲線のベースラインを差し引いて検討されている。中心波長として提示されている、“ $217.5 \pm 0.6 \text{ nm}$ ” はこうして抽出された feature の極大波長である⁸⁾。観測データの中心波長は極めて一定性がよい。この処理の方法は、ベースラインと別にこぶのみを示す物質（おそらくは分子を想定）があると考えての処理である。

私たちの QCC は、紫外・可視・赤外域に減光を示し、その上 220 nm のピークをもっている。“220 nm のピーク”のみを抽出するわけにはいかない。私たちはこの吸収は QCC に含まれる一部の電子構造が示す吸収であろうと推定している。そして、熱変成 QCC でも、dark-QCC でも、吸収ピークはともに 220 nm を示す。ただし、可視光部分の減光の強度に対し規格化した 220 nm の減光強度が異なる。そこで、両者の量比を変えて混合すると、減光強度は変わるが、こぶの極大波長位置はほとんど変わらない、という減光曲線ができる。

4.3.3 ほかの炭素質物質では？

この dark-QCC も熱変成 QCC も、煤あるいは炭のようなものである。それでは、各種の炭化水素を原料として、空気中で不完全燃焼させてつくった煤は、どんな減光曲線を示すであろうか。結果は、原料ガスによって異なるピーク波長を示した。アセチレンからつくった煤は 260 nm、エチレンの煤は 240 nm、メタンの煤は 222 nm に吸収ピークがある。こうして並べてみると、原料ガスの H/C が大きくなるほど短波長にピークをもつことが分かる。

原料の H/C をメタンの 4 よりさらに大きくするため、メタンに水素を 1 対 0.5 あるいは 1 対 1 に加えた原料ガスをつくり、煤を作ってみた。水素が加わるほど煤はだんだんできにくくなるが、吸収ピークは 220 nm のまま、ほとんど移動しない。すなわち、水素に富む炭化水素原料からできた煤が 220 nm 付近にピークを示す。反対に、原料により炭素が多くなると長波長に吸収ピークをもつような煤ができる。このことから、220 nm ピークを生じる構造は、水素が原因してできると考えられる⁹⁾。しかし、このようにしてつくった煤の吸収ピークの形は、非常にブロードである。QCC よりはるかにブロードである。

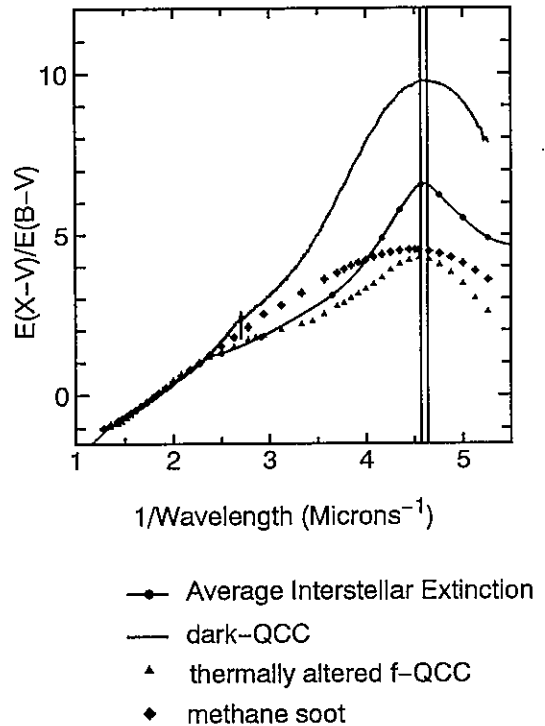


Fig.2 Comparison of normalized extinction curves of QCCs to an average interstellar extinction curve.

4.3.4 220 nm のピークの原因は？

220 nm のピークをしめす炭素質物質の共通点は、これらがすべて水素がたくさんある条件下で作られたものであった、ということである。測定時の試料の量によって、ピーク波長位置は変わらない。これはピークが主として吸収によるものと考えられる。

現在までに、たくさんの有機物の紫外吸収スペクトルが測定されている。その紫外吸収スペクトルをもとに考えると、220 nm 付近に吸収ピークを示す分子は、 π 電子しかもすこし共役して軌道が広がっている π 電子をもつ分子である。炭素質物質が合成されるときに、水素が炭素-炭素結合が続くのを妨げ、短い conjugated double bond 構造が QCC に局所的にできている、と推定している。

炭素質の塵を生成しているとみられる、老化した星の星周の塵の紫外・可視減光観測が行われた。しかし、前述のように、星間塵に見られる 220 nm の減光は観測されていない。観測が難しいために、存在していても見つからないのであろうか、あるいは 220 nm 構造は、塵が星間空間で長い間漂っているうちに変成してできるのか。あるいは一度、星雲などを形成し、その中から星形成を繰り返し幾多の変成を受ると 220 nm のこぶができ、そこから漂い出して星間塵となるのであろうか。

QCC の実験から検討してみよう。プラズマから急冷してできた炭素質物質のうち、dark-QCC と熱変成 QCC は 220 nm 構造をもっていた。しかし、前者は filmy-QCC を含んでいるため、溶媒で洗い落としてから測定している。すなわち、有機質のものを処理しないと現れない。後者は filmy-QCC を真空中で熱変成して生じる。プラズマを急冷して直接できたものではない。しかも、ピークは小さい。

炭素に富む老化した星の星周で、プラズマが急冷され QCC のような塵がつくられるならば、dark-QCC には filmy-QCC が付着するので、こぶは 200-210 nm の短波長に見られるはずである。また、もし塵が濃く星の周りを覆い、高温の蒸し焼き状態になるような塵の殻をもつならば、熱変成 QCC のように低い 220 nm hump を示すものが加わるだろう (私たちの考えでは、まだ観測が不十分で、一般的な星周塵のスペクトルは得られていないのではないか!)

filmy-QCC の付着した dark-QCC のような塵は、星間空間に放出され、filmy-QCC が取り除かれると 220 nm の減光のこぶが現れるはずである。実際、これを弱い水素プラズマにさらすと、filmy-QCC は取り除かれる。水素原子が filmy-QCC と反応し、低分子量の炭化水素をつくり、取り除いていったものと思われる。220 nm のこぶは星間の変成過程を経て現れてくると筆者らは推定している。

5 赤い輻射光

5.1 反射星雲の赤い輻射光

塵を濃く含む星雲の近くに明るい星があると、その星の光が塵で反射される。星雲の放つ光は、ほとんどが星の光の散乱光である。しかし、その散乱光を差し引いてもなお余分の光があった。これは星雲内の物質が輻射している光である。このかすかな光のスペクトルを Witt らは観測し、報告した。これは赤い色の光である。彼らはこれを extended red emission (ERE) と呼んでいる¹⁰⁾。反射星雲を光らせている星は生まれたばかりの星で

ある。ここでは星が光りだし、周りの塵を吹き払い、周囲に吹き飛ばされた塵が光っていると推定されている。

Witt と Boroson¹¹⁾によりまとめられた ERE の特徴をあげる。ERE は、波長 650 nm から 700 nm にピークをもっている。ピーク波長は一定ではない。星雲により異なるし、ひとつの星雲内でも場所により変化する。輻射ピークのバンド幅も場所により変化し、中心波長が長くなるにつれ、バンド幅が大きくなる傾向がある。散乱光の強度は、星雲により、また星雲内の場所により、変わるが、ERE の強度は散乱光の強度に比例しない。極大値が存在する。ERE の見られるのは、星雲の中でも特別の場所であり、星雲内のあらゆるところでみられるわけではない。

ERE の観測された NGC 7023, NGC 2023 には、炭素質物質による赤外輻射バンドが見られている^{12),13)}。このことから、ERE は炭素質物質による現象と考えられている。Witt らはこの原因となる塵を HAC であると考えた¹⁴⁾。そして Watanabe ら¹⁵⁾の測定した炭化水素プラズマからつくった膜の蛍光スペクトルと fitting している。

このような ERE は、反射星雲以外には、特殊な星雲の Red Rectangle^{16),17)}と、惑星状星雲の NGC 7027¹⁸⁾にあることが観測された。ともに炭素質物質の赤外輻射バンドで知られている天体である。Red Rectangle(星として HD 44179 が随伴している)は ERE の発見された天体であり、反射星雲にくらべ強い ERE を放っていることで知られている。惑星状星雲の NGC 7027 では、ERE の空間分布が調べられ、赤外輻射バンド 3.29 μ m とほぼ似た分布であるが、ERE のほうが少し広く分布していると報告されている。反射星雲とことなり、これらの 2 天体の周りの塵は、ここでつくられたばかりの塵であり、星固有の条件を強く受けていると思われる。

5.2 filmy-QCC の赤い蛍光

QCC ではこのような輻射が見られるのであろうか。filmy-QCC に紫外線ランプを照射してみた。確かに赤いきれいな蛍光がはっきり見える。かなり明るい蛍光である。ところが、空気中で紫外線を照射し続けると、filmy-QCC の蛍光はスペクトル測定している間に減衰してしまう。これは紫外線照射下で空気中の酸素と反応してしまうのであろうと推定した。そこで、今度は、filmy-QCC を真空容器に入れ、測定システムに設置し、紫外線照射を続けてみた。こんどはそれほど減衰しない。それでも 1 時間の照射で、約 20% の蛍光の減衰がみられる。蛍光を示す物質は非常に反応性に富むらしい。ただ、紫外線を当てないで真空瓶に保存しておく、1 年後でも蛍光を示す。

そこで filmy-QCC の蛍光測定には、4 面透明セルに filmy-QCC 膜をつけた石英基板をいれ、セルを真空にし、紫外線ランプを照射し、でてくる蛍光のスペクトルをできるだけ素早く測定した。輻射の測定は、タングステン標準光源で感度補正を行った測光システムを用い、励起光として Hg-Xe アークランプの 355-356 nm の光を filmy-QCC に照射した。

図 3 で、filmy-QCC の蛍光スペクトルと NGC 7023 で観測された ERE スペクトルと比べてみた。ピーク位置はたいへんよく再現できる¹⁹⁾。しかし、ここでもピークの半値幅は少しだけ QCC の方が大きい。

蛍光のピーク波長は、filmy-QCC を捕集するときの石英基板の温度によって変わる。捕集温度が低いほど短波長にピークを示す (670-725 nm)。一方、NGC 7023 では、中心波長は 656.8-694.6 nm と報告されている¹¹⁾。

この filmy-QCC を有機溶媒に溶かしてその溶液の蛍光を見ると、青から黄緑色の蛍光がでる。これもとても明るい光である。こんなに色が異なるのは、溶けているときと石英基板に付着したときとでは、別の物質が輻射しているのか、同じものでも電子状態がかなり異なることを意味している。また基板についている状態と異なり、溶媒にとけている filmy-QCC の蛍光は、比較的安定である。

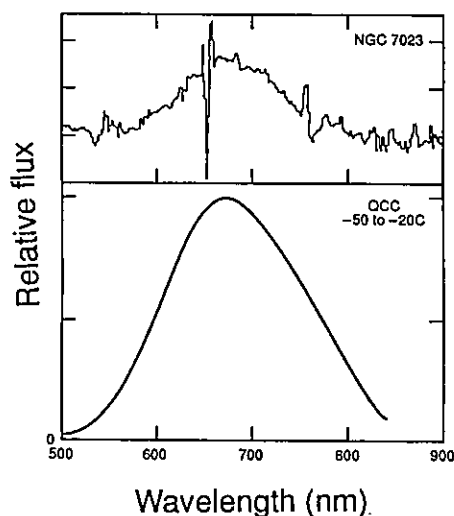


Fig.3 Comparison of fluorescence of filmy-QCC irradiated by UV lamp to the extended red emission of reflection nebula, NGC 7023.

5.3 反射星雲の塵は、いつ、どこでできたか

filmy-QCC は、反応性に富む物質である。空気中に長時間空気中に放置すると、色調が変わり、濃い茶褐色へと変わっていく。溶媒にも溶けにくくなり、重合していくことがわかる。filmy-QCC に空気中で紫外線照射すると、すみやかに蛍光が消える。蛍光を発する部分は紫外線照射下で極めて反応しやすい(おそらく酸素と)ことを示している。

基板温度を下げ、低温で捕捉した filmy-QCC の赤外スペクトルには、二重結合に加えて、三重結合結合の存在を示す C-H 振動がみられる(三重結合をもつ直線分子が分子としていろいろな分子雲で見つかっているにもかかわらず、赤外スペクトルでは、まだ検出されていない)。このような不飽和結合をもつ物質は、高温または紫外線照射下で、 H_2O やアンモニアなどと容易に反応するであろう。すなわち、いろいろな複雑な有機物の原料となりうる。

反射星雲の塵は、いろいろなところでつくられたいろいろな塵が混ざっているはずである。その中で、炭素質の塵が ERE と次に述べる赤外輻射バンドを示していると考えられている。さらに反射星雲の塵は、220 nm のこぶを示している。QCC の実験から、少なくとも ERE を示す塵と 220 nm のこぶを示す塵は炭素質の塵とはいえ、別物である。220 nm のこぶを示す QCC はより焦げている(炭素に富む)。かなり、安定である。ところが、ERE を示す QCC は活性である。起源はそれほど古くない。

現在、反射星雲の塵の起源は明らかではない。物質を合成して銀河の塵を研究する QCC の研究から、将来、炭素質の塵の起源についてより詳しい知見を与えることができるであろう。

6 赤外線輻射バンド

6.1 老化した星の塵の赤外線輻射バンド

それでは、銀河ではどのようなところで塵ができるのだろうか。

星は老化する。つまり、星の内部の核反応によるエネルギー生産と星表面からのエネルギー消費（放出）がスムーズいなくなる。このような段階になると、星からの質量放出が始まる。星の大気が星周へ流れだし、冷えるにつれて分子や塵を作り出すようになる。星は脈動を繰り返しながら、質量放出を繰り返し、やがては生成した塵で星が曇り、可視光では星が見えなくなってくる。しかし、中心星で温められた塵からは赤外線が放出され、赤外光でひかるようになる（星でも老化がどのように進むかは、議論が多いところである）。

可視光で見える光学炭素星の周辺の塵は、 $11.2\mu\text{m}$ にブロードな発光ピークをもつ。このピークは吸収ピークとして検出されたことはない。このピークはSiC微粒子に起因すると考えられている。塵の殻が厚くなると肉眼で見えなくなる。そうすると塵からの赤外線輻射で輝く赤外炭素星となる。これらの炭素星には、炭化水素分子の存在は知られており、当然、炭素質の塵は存在すると思われる。赤外線の連続輻射（黒体輻射に近い）はたぶん炭素質の塵によると思われる。しかしながら、物質についてももう少し詳しい情報が得られる炭素-水素結合の伸縮振動などのバンドスペクトルは、確認されていない（ $27\mu\text{m}$ に輻射のコブがある天体がある。これはMgSなどの硫化物微粒子によるという説が提出されている）。

一方、惑星状星雲と呼ばれる天体がある。これは、中規模の質量の星が最後の質量放出をした結果、中心星は高密度化してちいさくなり、周りにリング状に見える光った雲(HII領域)をもったものである。光った雲のわずか外側には、塵の存在領域がある。NGC 7027などの惑星状星雲の赤外スペクトルには人目をひく特徴的がある。赤外線の連続輻射に加えて、いくつかの赤外線輻射バンドが観測されている（3.3, 3.4, 6.2, 7.7, 8.6, $11.3\mu\text{m}$ ）。これは炭素質の塵のだす輻射バンドといわれてきた。しかも、惑星状星雲、反射星雲など、特殊なところでのみ観測されることから、紫外線などにより励起された炭素質の塵のだす輻射であろうと推定されきた。これはどんな塵か。赤外線領域における炭素質の塵の研究としては、この輻射バンドを出す塵の研究が中心である。

この輻射バンドは、NGC 7023などの反射星雲や、星形成の激しい銀河にやはり観測される。観測的にも目立つ存在である。これはどんな炭素質の塵か、未だに議論が多い。

6.2 QCCの赤外線吸収バンド

6.2.1 filmy-QCCの赤外線吸収バンド

実験室で積み上げられたたくさんの有機物の赤外スペクトルデータから、塵に存在する結合（例えばC-H結合があるなど）を予測するのは比較的やさしい。しかし、物質を決めるとなると難しい。有機物のスペクトルには観測データに比べてたくさんのピークが存在する。観測データはピークが少なすぎる。やはりピークが似た物質をつくってみる必要がある。

filmy-QCC は有機質の炭素質物質である。顕微鏡で見ると布がうねったような模様が見える。KBr 結晶上に析出させて、その赤外吸収スペクトルを測定した。C-H 結合、C=C 結合の振動に原因するピークが見られる。3.29*, 3.42*, 3.48*, 6.25*, 6.94*, 7.27, 11.40*, 11.96, 13.24 μm にピークがみられた²⁰⁾。*印をつけたピークに対応したピークが、観測されている。観測で見られる 7.7, 8.6 μm ピークは、空気中で酸化した filmy-QCC に見られ (図 4)、私たちは、炭素骨格についたケトン構造の酸素による、と推定した²¹⁾。

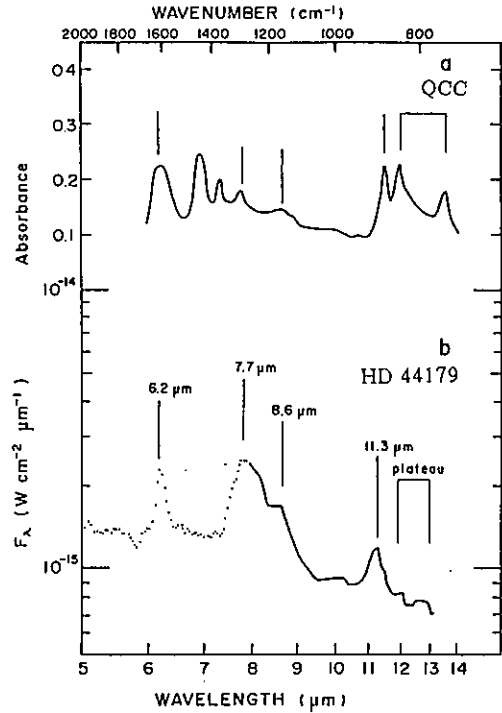


Fig.4 Comparison of absorption spectrum of oxidized filmy-QCC and observed IR emission bands of HD 44179.

6.2.2 熱変成 filmy-QCC の赤外線吸収バンド

filmy-QCC を真空中で熱変成していくと、赤外線の吸収ピークは小さくなっていく。消滅順序がある。最後までこのころのは 3.29 μm , 11.40 μm ピークである。これらは、最後に残った水素による伸縮振動と、変角振動である。環状構造の一つ付いた水素によるソロ振動である。この 3.29 μm ピークのピーク波長位置は、高分解能観測による赤外線輻射ピークのピーク位置^{22),23)}と非常に良くあっている²⁴⁾。しかし、この QCC の吸収データを観測の輻射ピークと対比するのは難点がある。輻射ピークを議論するには、やはり QCC の赤外線輻射スペクトルを測定する必要がある。詳しい議論は今後の輻射ピーク測定の実験後に行いたい。

7 他の炭素質の塵候補

各波長帯でめだったピークをしめす炭素質物質を追い求めてきた。私たちの説のみを紹介してきたが、当然、炭素質の塵について他の説もある。対立している主な説は、PAH 説^{25),26)}、HAC 説²⁷⁾、coal like material 説²⁸⁾。である。物質的には、QCC が、とくに filmy-QCC がいちばん活性な物質である。これらで、220 nm の減光ピーク、ERE、赤外線輻射バン

ドと、全面にわたって競い合っている。全部が私たちの QCC が優勢である（と私たちは思っている）。むろん判定者は自然そのものである。そのうち、あらたなる判定基準が観測側からでてきて、決着がつくに違いない。

8 おわりに

炭素質の塵に対する QCC 説は坂田 朗さん（電気通信大学）が中心になって精力的に研究を押し進めてきたものです。いままで 10 数年かけて、諸説と闘ってきました。坂田さんは今年 5 月に急逝しました。まだまだ、たくさん残したまま…。彼の冥福を祈りつつ、今までの仕事をまとめてみました。

しかし、冥福と書いてみて気がつきました。彼は冥土を信じていません。物質の輪廻と進化を確信していました。

最後に、本原稿をよんでいただき、適切な助言をいただいた尾中 敬氏（東大・天文教室）に感謝いたします。

参考文献

- 1) Stecher, T. P., 1965, *ApJ*, **142**, 1683.
- 2) Stecher, T. P., 1969, *ApJ*, **157**, L125.
- 3) Bless, R. C., & Savage, B. D. 1972, *ApJ*, **171**, 293.
- 4) Buss, R. H., Lamers, H. J. G. L. M. & Snow, T. P. 1989, *ApJ*, **347**, 977.
- 5) Hecht, J. H., Holm, A. V., Donn, B., & Wu C. C., 1984, *ApJ*, **280**, 228.
- 6) Sakata, A., Wada, S., Okutsu, Y., Shintani, H., & Nakada, Y. 1983, *Nature*, **301**, 493.
- 7) Sakata, A., Wada, S., Tokunaga, A. T., Narisawa, T., Nakagawa, H., & Ono, H. 1994, *ApJ*, **430**, 311.
- 8) Fitzpatrick, E. L., & Massa, D. 1986, *ApJ*, **307**, 286.
- 9) Sakata, A., Wada, S., Tokunaga, A. T., & Narisawa, T., 1995, *Planetary and Space Sci.*, in press.
- 10) Witt, A. N., Schild, R. E., & Kraiman, J. B. 1984, *ApJ*, **281**, 708.
- 11) Witt, A. N., & Boroson, T. A. 1990, *ApJ*, **355**, 182.
- 12) Sellgren, K., Werner, M. W., & Dinerstein, H. D. 1983, *ApJ*, **271**, L13.
- 13) Sellgren, K., 1984, *ApJ*, **277**, 623.
- 14) Witt, A. N., & Schild, R. E. 1988, *ApJ*, **325**, 837.
- 15) Watanabe, I., Hasegawa, S., & Kurata, Y. 1982, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **21**, 856.
- 16) Cohen, M., et al., 1975, *ApJ*, **196**, 179.
- 17) Schmidt, G. D., Cohen, M., & Margon, B. 1980, *ApJ*, **239**, L133.
- 18) Furton, D. G. & Witt, A. N. 1990, *ApJ*, **364**, L45.
- 19) Sakata, A., Wada, S., Narisawa, T., Asano, Y., Iijima, Y., Omaka, T., & Tokunaga, A. T. 1992, *ApJ*, **393**, L83.
- 20) Sakata, A., Wada, S., Tanabe, T., & Onaka, 1984, *ApJ*, **287**, L51.
- 21) Sakata, A., Wada, S., Onaka, T., & Tokunaga, A. T. 1987, *ApJ*, **320**, L63.

- 22) Nagata, T., Tokunaga, A. T., Sellgren, K., Smith, R. G., Onaka, T., Nakada, Y., & Sakata, A. 1988, *ApJ*, **326**, 157.
- 23) Tokunaga, A. T., Nagata, T., Sellgren, K., Smith, R. G., Onaka, T., Nakada, Y., Sakata, A. & Wada, S. 1988, *ApJ*, **328**, 709.
- 24) Sakata, A., Wada, S., Onaka, T., & Tokunaga, A. T. 1990, *ApJ*, **353**, 543.
- 25) Léger, A., d'Hendecourt, L. & Défourneau, D. 1989, *Astron. Astrophys.*, **216**, 148.
- 26) Allamandola, L.J. 1989, *IAU Symp. No.135, Interstellar Dust (Dordrecht:Kluwar)*, ed. L.J. Allamandola & A. G. G. M. Tielens , 129.
- 27) Blanco, A. Bussoletti, E., Colangeli, L. Fonti, S., Mennella, V., & Stephens, J.R. 1993, *ApJ*, **406**, 739.
- 28) Papoular, R., Conard, J., Giuliano, M. Kister, J. & Mille, G. 1989, *Astron. Astrophys.*, **217**, 204.

Kinetic analysis of mechanism in reaction of tryptophanase with D-tryptophan

Akihiko Shimada, Hiroko Shishido and Isei Nakamura
Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba,
Tsukuba-shi, Ibaraki 305, Japan
(Received June 19, 1995; Accepted August 15, 1995)

ABSTRACT

The reason that L-amino acids was selected in the process of birth of life is ambiguous in the present day. Primarily important for this subject would be to understand the selection mechanism of enzyme functioning as a filter that can distinguish L-isomer from D-isomer. The system that can control the specificity of recognizing L-isomer would necessarily be elucidated. We found that tryptophanase that has been thought to be specific to L-tryptophan is active to D-tryptophan only in highly concentrated solution of $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. In this paper, we discuss kinetic studies on the above reaction, showing that $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ acts as an activator below 50 % saturation but as a noncompetitive inhibitor above 50 % saturation. The reaction model obtained from kinetic analysis satisfactorily fits to the experimentally observed values. We finally discuss an evolutionary significance of the above reaction .

Key words: tryptophanase, D-tryptophan, diammonium hydrogenphosphate, kinetics.

トリプトファナーゼのD-トリプトファンに対する 反応機構の動力学的解析

島田秋彦・宍戸弘子・中村以正

筑波大学応用生物化学系 (〒305 つくば市天王台1- 1- 1)

1. はじめに

生命が誕生する過程で、L-アミノ酸が選択された理由は大きな謎である。L-アミノ酸とD-アミノ酸を認識・区別する機能を持つ分子は酵素である。この謎を解く上で光学異性体に関する酵素の選択能力について理解を深めることが重要である。本研究では、トリプトファナーゼに注目した。この酵素はL-トリプトファンにのみ活性を有しD体には全く活性がなく特異性が非常に高い¹⁾。ところが、高濃度のリン酸水素二アンモニウム溶液中ではD体にも活性を示すようになる²⁾。この反応は今まで知られていないので、反応速度論に基づいて動力学的に反応機構を調べた。その結果、トリプトファナーゼとD-トリプトファンとの反応においてリン酸水素二アンモニウムの濃度が50%飽和を境にして、低濃度側ではリン酸水素二アンモニウムは活性化剤として、高濃度側では非競争阻害剤として作用することがわかった。また、動力学的解析から導出された反応モデルに基づいて理論的に計算した値は実測値とほぼ一致した。最後に、本反応の進化的意義についても考察した。

2. 材料と方法

2-1 酵素と試薬

TPase は市販品 (SIGMA CHEMICAL Co., 大腸菌由来) を使用した。購入後、等電点電気泳動装置 (BIORAD ROTOFOR CELL) により不純タンパク質を除去し精製した。この標品を SDS PAGE でチェックしたところ1本の濃厚なバンドが MW 55000 の位置にみられるのみで、精製度は良好であった。また、精製した酵素標品は精製前の酵素の3.4倍の比活性があった。こうして得られた酵素標品を実験に供した。L-Trp, PLP, AP は和光純薬から、D-Trp はペプチド研究所から購入した。水はすべて蒸留水を使用しガラス器具は CLEAN CL (クリーンケミカル (株)) で3日以上浸漬し蒸留水で洗浄したものを使用した。

2-2 反応溶液の調製と酵素活性の測定

反応溶液の調製は次のようにした。AP を沸騰水に添加し完全に溶解させたのち 37°C に冷却しAPが析出した溶液を100%飽和濃度とした。これを Britton - Robinson buffer で希釈し0~80%飽和濃度に調製した。TPase は D-Trp を基質としたときは 6.0×10^{-4} unit/ml, L-Trp を基質としたときは 1.5×10^{-4} unit/ml, PLP は 380 μ M 添加した。特

使用された略語は次の通りである。AP:リン酸水素二アンモニウム, TPase:トリプトファナーゼ, L-Trp:L-トリプトファン, D-Trp:D-トリプトファン, PLP:ピリドキサル5'-リン酸。

に断らない限り、D-Trp または L-Trp は $980 \mu\text{M}$ 添加した。反応混液の pH は 7.8 ± 0.2 であった。試験管の管口をゴム栓で締めて反応させた。indole は以下の手順で抽出した。試料と等量の水飽和ブタノールを混合し、 1000G , 10min 遠心分離機にかけた。遠心終了後、上清を抽出し等量のエールリッヒ試薬と混合し、 60°C , 30min 静置し indole を赤色に呈色させた。 570nm の吸光度を測定し検量線から indole 生成量を $\mu\text{M/hr}$ であらわし、これを TPase の活性とした。

2-3 反応の動学的解析

2-2のように AP を 20, 30, 40, 50, 60, 70% 飽和濃度に調製した反応溶液に TPase の基質である D-Trp を添加し、それぞれの濃度における反応初速度を求めた。D-Trp の初速度は 245, 294, 343, 392, 490, 980 μM とし、 37°C , 4時間反応を行い基質濃度と反応初速度の関係を Lineweaver-Burk plotした。この図に基づいてリン酸水素二アンモニウム溶液中における TPase の D-Trp に対する反応メカニズムを検討した。

2-4 D-Trpの阻害作用

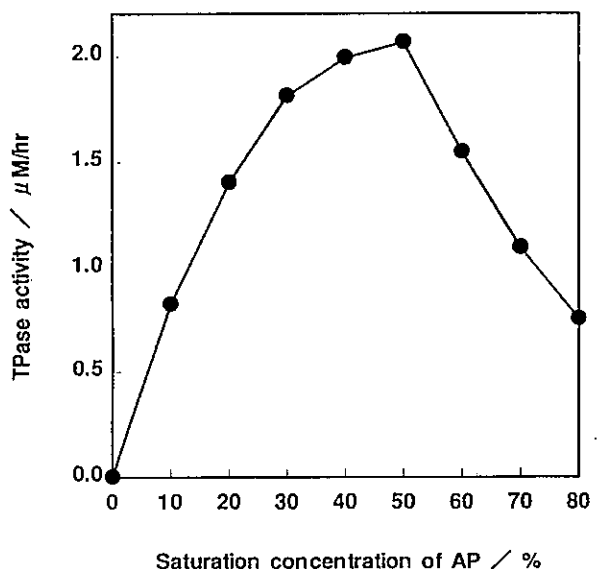
TPase, L-Trp, PLP を含む溶液に AP を添加して 20% 飽和に調製したものと AP を全く加えないものの2種類の溶液を用意した。これに 0, 245, 490, 735, 980, 1225, 1470, 1960 μM の D-Trp をそれぞれ添加した。 37°C , 30分間反応を行って TPase と L-Trp との反応における D-Trp の阻害作用を調べた。

3. 結果

3-1 リン酸水素二アンモニウムの濃度依存性

Fig. 1 に D-Trp に対する TPase の反応における AP の濃度依存性を示す。D-Trp に対する TPase の活性は AP の濃度とともに上昇し、50% 飽和濃度では最大活性になる。しかし、この濃度以上になると活性は低下する。50% 飽和濃度を境にして、TPase は AP によって低濃度側では反応を促進されるが、高濃度側では阻害される。Fig. 1 のような釣鐘型のカーブは、一般的な酵素反応にみられる pH 曲線のようなものに類似している。この対応でいけば、AP が適当量の時には TPase は活性型になり、AP が過剰の時には不活

Fig.1 Dependence on saturation concentration of AP



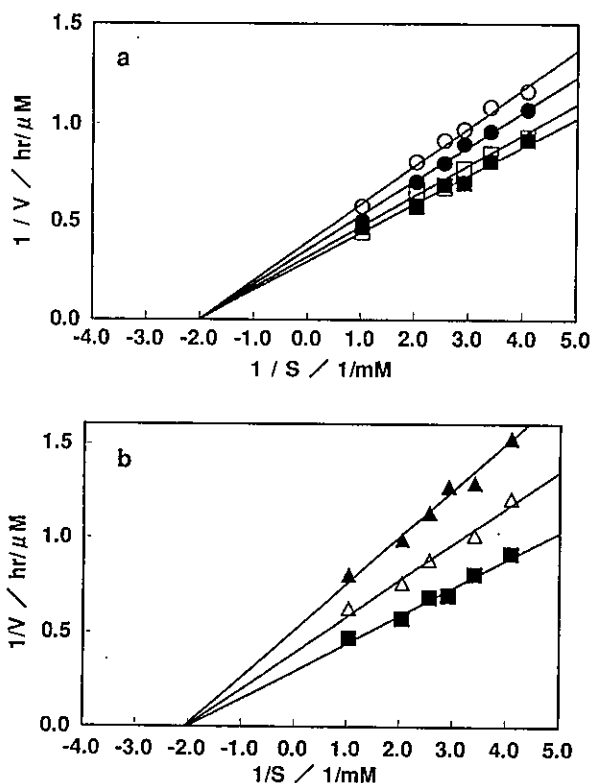
性型になるということが予想される³⁾。そこで、50% 以下の低濃度側と 50% 以上の高濃度でそれぞれ動力学を行い本反応機構について検討した。

3-2 本反応の動力学的解析

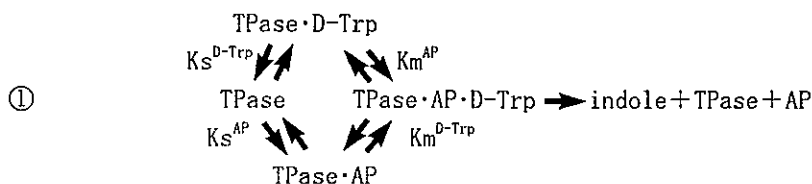
D-Trp を基質として AP 溶液中で TPase に対して動力学を行った結果, Fig. 2a, b のように AP の濃度に応じて 2 通りの結果が得られた。

Fig. 2a で, AP が 20% から 50% に飽和濃度が上昇するに従って反応初速度も上昇し, 直線群は横軸上で一点に交わる。これは AP を TPase の活性化剤として考えるとうまく説明できる⁴⁾。AP は TPase を活性化し活性型の TPase · AP · D-Trp を経て D-Trp を分解して indole を生成する作用を持つ。①では, TPase に対する AP, D-Trp, indole の結合乖離が速やかに迅速平衡にあるものと仮定した。また, TPase に対する AP, D-Trp の結合順序を定序としてもランダムとしても v の計算式は同型であるが, 今のところ結合順序は不明なのでランダムとした。

Fig.2 1/S - 1/V plot for D-Trp as substrate of TPase in 20% to 50% saturation concentration of (NH₄)₂HPO₄



Saturation concentration of (NH₄)₂HPO₄ is as follows. In a, ○; 20%, ●; 30%, □; 40%, ■; 50%, and in b, ■; 50%, △; 60%, ▲; 70% saturation, respectively.

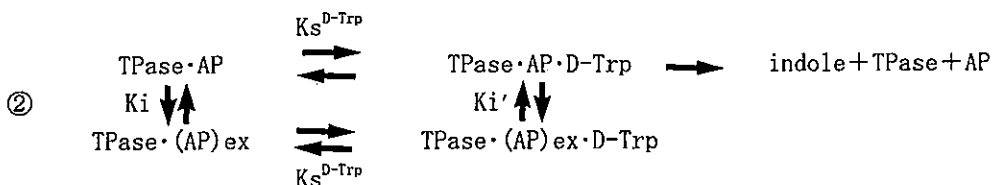


これから得られるvの式は

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{K_s^{AP}}{[AP]}\right) + \frac{K_s^{D-Trp}}{V_m} \left(1 + \frac{K_s^{AP}}{[AP]}\right) \frac{1}{[D-Trp]}$$

ここで、v の式で K_s^X は X の基質定数、 K_m^X は X の Michaelis 定数、 V_m は最大初速度を表す。TPase に対する AP と D-Trp の結合は互いに独立で $K_m^{D-Trp} = K_s^{D-Trp}$ 、 $K_m^{AP} = K_s^{AP}$ とした。Fig. 2a より、 $K_m^{D-Trp} = 490 \mu M$ 、 $K_s^{AP} = 16.7\%$ 、 $V_m = 4.5 \mu M/hr$ が得られた。

一方、50% 以上の高濃度側では AP 濃度の上昇につれて反応は低下する。Fig. 2b は非競争阻害型反応を示す。このモデルによれば、②式のように阻害剤としての AP はフリーの酵素及び酵素基質複合体のいずれにも結合可能で、酵素・基質・阻害剤の三者複合体は不活性型となる⁵⁾。ただし、(AP)ex は過剰な AP が TPase に結合していることを示す。



ただし、 K_s は基質定数、 K_i 、 K_i' は阻害定数である。v の式は下式のようになり、Fig. 2b より $K_i = 19.6\%$ 、 $K_i' = 18.5\%$ が得られた。ただし、% は AP の飽和濃度を表す。

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{[AP]}{k_i'}\right) + \frac{K_s^{D-Trp}}{V_m} \left(1 + \frac{[AP]}{K_i'}\right) \frac{1}{[D-Trp]}$$

上の反応式①②は反応速度論から推定したモデルなので、実際にモデル式にある中間体が存在するかどうか確かめる必要がある。①と②の反応式に共通する部分は TPase・AP・D-Trp 複合体である。この場合、AP 存在下で D-Trp が TPase に結合することは、D-Trp から indole が生成することから判断して自明である。したがって、TPase と AP の複合体の存在を明らかにすれば、TPase・AP・D-Trp の三者複合体の存在を明らかにしたことになる。しかし、一般に中間体の存在を直接確かめるのは困難なので、TPase と L-Trp との反応における D-Trp の阻害反応を利用して間接的に調べた。

3-3 L-Trpを基質としたときのTPaseに対するD-Trpの阻害作用

一般に、酵素が物質に作用するというはその物質と酵素が何らかの結合をして複合体を形成していると考えられる⁶⁾。これに従えば、L-Trp と TPase との反応においてD-Trp が共存しているとき、D-Trp は反応に何の影響も与えないなら D-Trp は TPase・L-Trp 複合体と独立かまたはフリーの状態にある。しかし、逆に 阻害作用を示すなら、D-Trp は TPase・L-Trp 複合体と何らかの結合をし TPase・L-Trp・D-Trp 複合体を形成していることになる。

そこで、Fig. 3 で、L-Trp と TPase との反応において、D-Trp が AP の有無に応じてどのように作用するか調べた。TPase と L-Trp のD-Trp を加えないときのの活性を100%として相対活性であらわした。これより、D-Trp は AP が存在するときだけ約 20% 阻害することがわかった。上の議論でいけば、AP 存在下でのみ D-Trp は TPase と結合できることになる。この結果、TPase・AP・D-Trp 複合体の存在が明らかとなった。ただし、予備実験で、TPaseとL-Trp の反応で、AP を加えないときと AP が 20% 飽和濃度のときの TPase の活性はほとんど変わらないことを確認した。また、この反応時間内で D-Trp から分解してできる indole は L-Trp から分解してできる indole の 1/20 以下であることを確認しているので、D-Trp から生じた indole の寄与は無視した。

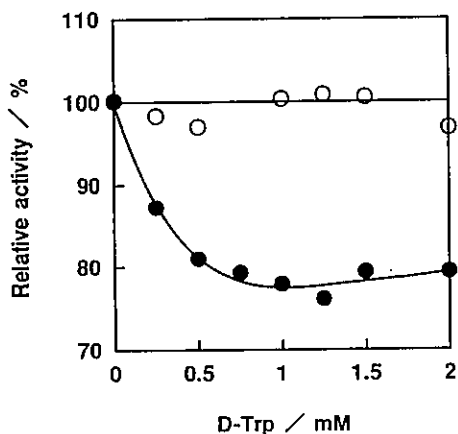
L-Trp は AP が存在しなくても TPase に結合できるが、D-Trp は AP の存在を前提にしなければ、TPase と結合できない。このことは、AP と D-Trp の TPase への結合順序が TPase・AP → TPase・AP・D-Trp であることを強く示唆するものである。

4. 考察

4-1 反応モデル

反応を動学的に検討した結果、50% 以下では、AP は TPase に作用して D-Trp との反応を引き起こす活性物質として作用する。一方、50% 以上になると過剰の AP によって TPase・(AP)_{ex} の複合体が優勢になり非競争阻害をする。これらのことを考え併せて 3-2 の①式と②式をまとめ、

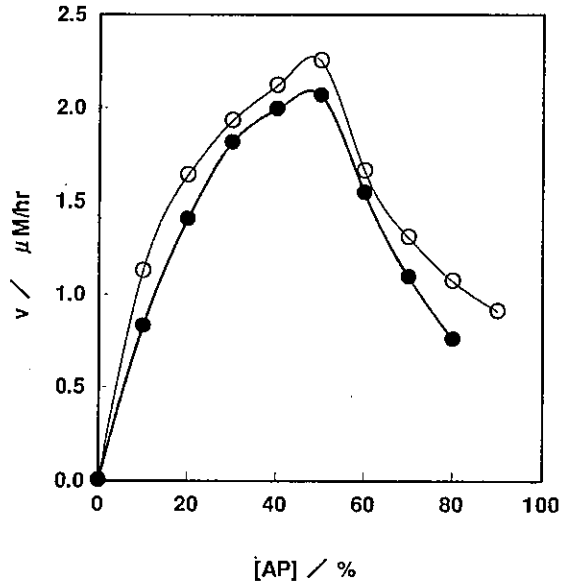
Fig.3 Inhibition of D-Trp in the reaction of TPase with L-Trp



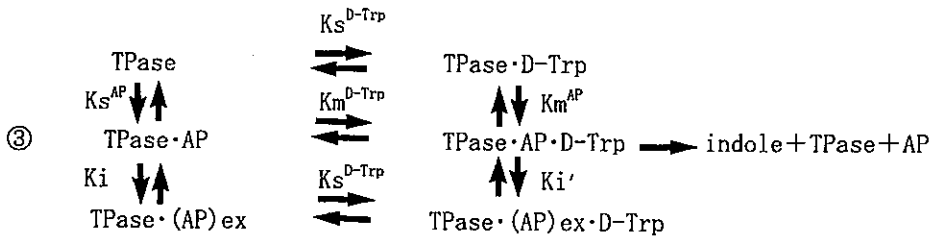
Indole from coexisting D-Trp is very small compared to one from L-Trp. Lowering of the relative activity is almost responsibility for D-Trp. ○; no inhibition of D-Trp in reaction mixture uncontainng AP, ●; inhibition of D-Trp in reaction mixture containing AP of 20% saturation.

③のような反応式のスキームを得た⁷⁾。さらに、③の反応式に基づいて v を求めた。ここで、AP 結合にともなって TPase \rightarrow TPase \cdot AP \rightarrow TPase \cdot (AP)ex およびこれらに D-Trp が結合した TPase \cdot D-Trp, TPase \cdot AP \cdot D-Trp, TPase \cdot (AP)ex \cdot D-Trp の複合体が迅速平衡にあるとする。また、TPase \cdot AP \cdot D-Trp のみが活性型で indole と TPase \cdot AP に分解するものとする。(AP)ex は AP が阻害剤として働くことをあらわす。したがって、AP > 50% で [(AP)ex] = AP - 50, AP \leq 50% では [(AP)ex] = 0 とする。

Fig.4 Simulated v from theoretical equation



●; v values from experiment measurements,
○; v values from theoretical equation.



反応式③にもとづいて v の式を求めると

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} \left(\frac{[(AP)ex]}{K_i'} + 1 + \frac{K_m^{AP}}{[AP]} \right) + \frac{K_m^{D-Trp}}{V_m} \left(\frac{[(AP)ex]}{K_i} + 1 + \frac{K_s^{AP}}{[AP]} \right) \frac{1}{[D-Trp]}$$

となる。

上式にもとづいて、D-Trp に対する TPase 活性の AP 濃度依存性をシミュレーションした。Fig. 2 a, b で求めた実測値 D-Trp=980 μ M, V_m =4.5 μ M/hr, K_m =490 μ M, K_s =16.7%, K_i =19.6%, K_i' =18.5% などを用いた。Fig. 4 は Fig. 1 の実測値の結果と上式の計算結果を較べたグラフである。理論値は実測値を全体的に上回った値をとるが、ほぼ重ね合わせることができる。AP 濃度が高いところでは、理論値と実測値の乖離が大きくなるのでさらに反応細部について検討する必要があるが、反応全体の基本的骨格は上式でよいとみなすことができる。

4-2 本研究の進化的意義

生物が D-アミノ酸を排除して L-アミノ酸のみを選択し代謝する機構を保持できるのは、酵素がそのフィルター役目をしているからである⁸⁾。基質に対する酵素の特異性は非常に高いものから低いものまでいろいろだが、アミノ酸光学異性体に関しては必ず厳格で可変性に乏しい⁹⁾。現存酵素の先祖である原始酵素はもともとL-アミノ酸にしか活性を有していなかったという可能性もあるが、原始酵素がラセミ体で占められた原始地球から誕生した以上、L 体と D 体の両型のアミノ酸に反応できたと考えても不思議ではない。もし、現在の酵素でもそのような性質を保持しているなら、適当な条件を設定することにより D 体と反応するのではないかという可能性がでてくる¹⁰⁾。そこで、酵素の一次構造を変えたり化学的修飾を施したりせず、そのままの状態に光学異性体に対する選択能力は絶対的に変えられないものなのかどうか今少し検討する余地があるように思われる。本研究では、酵素とその周囲の環境との相互作用がこの選択能力を決定し、特殊な反応ではなく一般的な酵素反応速度論で説明することができることを示した。しかし、多くの塩類の中でなぜリン酸水素二アンモニウムがトリプトファナーゼの D-Trp に対する活性を上昇させるのか物理化学的に説明できないだけでなく、タンパク質合成系の酵素をはじめとしてほかの酵素でも、本研究のような手段を使ってL-アミノ酸に対する特異性に变化をおこすことができるのかどうかもわかっていない。それにもかかわらず、光学異性体の起源で「酵素とそれを取り囲む環境との相互作用」の重要性を示した本研究の結果は意義深い¹¹⁾。

謝辞

本研究費の一部は文部省科学研究費補助金によってサポートされたことに感謝いたします。

文献

- 1) Behbahani-Nejad, I., Dye, J.L. and Suelter, C.H. (1987), *Methods in Enzymology*, 142, 414-422.
- 2) 島田秋彦, 中村以正 (1992), *Viva Origino*, 20, 147-162.
- 3) Metzler, D.E. (1977), *Biochemistry*, Academic press, pp.336-339.

- 4) 中村隆生 (1993), 酵素キネティクス, 学会出版センター, pp.55-60.
- 5) Rocque, W.J., Mcwherter, C.A., Wood, D.C. and Gordon, J.I. (1992), *J. biol. Chem.*, 268, 9964-9971.
- 6) Walsh, C. (1979), *Enzymatic Reaction Mechanism*, W.H. Freeman and Company, pp.29-35.
- 7) Morino, Y. and Snell, E.E. (1967), *J. Biol. Chem.*, 242, 2800-2809.
- 8) Shimada, A., Yuasa, S. and Imahori, K. (1980), *Sci., Rep., Osaka Univ.*, 29, 43-52.
- 9) Fujii, N. and Harada, K. (1992), *Report of Special Research Project on Evolution of Matter*, 5, pp.287-302.
- 10) Yuasa, S., Shimada, A., Isoyama, M., Fukuhara, T. and Itoh, M. (1985), *Evolution and Morphogenesis*, pp.289-297.
- 11) 島田秋彦, 福原敏行, 磯山正治, 伊藤正祉, 湯浅精二 (1989), *Viva Origino*, 17, 53-62.

チトクロム c の構造からみた独立栄養化学合成細菌の進化的位置

山中健生¹、藤原健智²、矢野能弘²、庄子和夫¹、福森義宏²

1. 日本大学理工学部工業化学科（〒101 東京都千代田区神田駿河台1-5）
2. 東京工業大学生命理工学部生命理学科（〒227 横浜市緑区長津田町4259）

要旨

著者らが決定した *Nitrobacter winogradskyi*, *Thiobacillus novellus*, *Nitrosomonas europaea* のチトクロム c の全アミノ酸配列、および *Thiobacillus ferrooxidans* チトクロム c の部分アミノ酸配列にもとづき、これらの細菌の進化的位置を検討した。*N. winogradskyi*, *T. novellus*, *T. ferrooxidans* のチトクロム c は互いに似ており、また光合成細菌のチトクロム c_2 や真核生物のチトクロム c に似ていたが、*N. europaea* のチトクロム c は上記3種類のチトクロム c とは異なっており、*Pseudomonas aeruginosa* のチトクロム c に似ていた。チトクロム c の構造からすると *N. europaea* はシアノバクテリアの出現と同じくらい早くから地球上に生息していたが、*N. winogradskyi*, *T. novellus*, *T. ferrooxidans* は進化的に *N. europaea* より真核生物にずっと近いように思われる。

Evolutional Position of Chemoautotrophic Bacteria Based on the Structure of Cytochrome *c*

Tateo Yamanaka¹, Taketomo Fujiwara², Takahiro Yano^{2*} Kazuo Shoji¹ and Yoshihiro Fukumori²

¹Department of Industrial Chemistry, College of Science and Technology, Nihon University, Kanda-Surugadai 1-5, Chiyoda-ku 101, Tokyo and ²Department of Life Science, Faculty of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama 227, Japan

(Received July 20, 1995; Accepted August 31, 1995)

Abstract

On the basis of the complete amino acid sequences of cytochromes *c* from *Nitrobacter winogradskyi*, *Thiobacillus novellus* and *Nitrosomonas europaea* and the partial sequence of cytochrome *c* from *Thiobacillus ferrooxidans*, evolutionary positions of these bacteria were examined. Cytochromes *c* from *N. winogradskyi*, *T. novellus* and *T. ferrooxidans* were similar to one another, and similar to photosynthetic bacterial cytochrome *c*₂ and eucaryotic cytochrome *c*. Cytochrome *c* of *N. europaea* differed from the above three cytochromes *c* and similar to *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome *c*. On the basis of the structures of cytochromes *c*, *N. europaea* seems to have lived from as early as the appearance of cyanobacteria, while *N. winogradskyi*, *T. novellus* and *T. ferrooxidans* seem to be evolutionally much closer to eucaryote than *N. europaea*.

Key words: chemoautotrophic bacteria, cytochrome, energy acquiring system

Introduction

Nitrobacter winogradskyi is a typical nitrite oxidizing bacterium and its nitrite-oxidizing system is composed of nitrite-cytochrome *c* oxidoreductase (cytochrome *a*₁*c*₁), cytochromes *c*-550(s) and/or *c*-550(m) and cytochrome *c* oxidase (cytochrome *aa*₃) (1,2). Cytochrome *c*-550(s) is similar to eucaryotic cytochrome *c* in many aspects (3). *Thiobacillus novellus* is a facultative autotrophic sulphur-oxidizing bacterium. Its sulphite-oxidizing system is composed of sulphite-cytochrome *c* oxidoreductase, cytochrome *c*-550 and cytochrome *c* oxidase (cytochrome *aa*₃) (4). The cytochrome *c*-550 of the organism has many properties similar to those of eucaryotic cytochrome *c* (5). *Thiobacillus ferrooxidans* oxidizes Fe²⁺ to Fe³⁺ at pH 2 and its iron-oxidizing system is composed of Fe(II)-

*Present address: The Scripps Research Institute, 10666 North Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037, U. S. A.

cytochrome *c* oxidoreductase, cytochrome *c*-552(s), rusticyanin and cytochrome *c* oxidase (cytochrome *aa₃*) (6). Cytochrome *c*-552(s) is similar to cytochrome *c*₂ in the amino acid sequence (7), and its reduced form is stable even at pH 2.5 (8). Finally, *Nitrosomonas europaea* is a typical ammonia-oxidizing bacterium and oxidizes ammonia to nitrite via hydroxylamine (9). Its hydroxylamine-oxidizing system is composed of hydroxylamine oxidoreductase, cytochrome *c*-554, cytochrome *c*-552 and cytochrome *c* oxidase (cytochrome *aa₃*) (2, 10). Cytochrome *c*-552 is similar to *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome *c*-551 in the enzymatic properties (10, 11) and amino acid sequence (12).

In the present study, *N. winogradskyi* cytochrome *c*-550(s) (13), *T. novellus* cytochrome *c*-550 (14), *T. ferrooxidans* cytochrome *c*-552(s) (7) and *N. europaea* cytochrome *c*-552 (12) were compared on the basis of their amino acid sequences. The evolutionary relationships of the chemoautotrophic bacteria mentioned above to photosynthetic bacteria, denitrifying bacteria, sulphate-reducing bacteria and eucaryotes were discussed on the basis of the sequences, and molecular and enzymatic properties of their cytochromes *c*.

General properties of cytochromes *c* purified from chemoautotrophic bacteria

N. winogradskyi cytochrome *c*-550(s): As the cytochrome *c* has the α absorption peak at 550 nm and is solubilized in the absence of detergents, it is called cytochrome *c*-550(s) to distinguish it from the membrane-bound counterpart, cytochrome *c*-550(m) (15). The cytochrome shows many properties similar to those of eucaryotic cytochrome *c*; it reacts with cow cytochrome *c* oxidase fairly rapidly, reacts with yeast cytochrome *c* peroxidase as rapidly as eucaryotic cytochrome *c*, and reacts very poorly with *P. aeruginosa* nitrite reductase (3). It reacts rapidly with *N. winogradskyi* cytochrome *c* oxidase (16).

Table 1. Reactivities with some redox enzymes of several cytochromes *c*

Cytochrome <i>c</i>	Molecular mass (kDa)*	Relative reactivity			
		Cow cyt <i>c</i> oxidase		Yeast cyt <i>c</i> peroxidase	<i>P. aeruginosa</i> nitrite reductase
		- Tween 20	+Tween 20		
Horse	12.5	100	100	100	0.53
<i>P. aeruginosa</i>	9.3	0	4.5	0	100
<i>N. europaea</i>	9.1	0	44	0	56
<i>C. limicola</i>	9.4	19	53	0	55
<i>N. winogradskyi</i>	12.4	16	ND	90	7.0
<i>T. novellus</i>	12.8	23	ND	108	6.0
<i>T. ferrooxidans</i>	14.0**	ND	ND	ND	ND

Bold letters mean that the values are taken as 100% for the reactivity with each enzyme. ND, not determined. * Calculated from the amino acid sequence. ** Estimated by gel electrophoresis in the presence of SDS.

T. novellus cytochrome *c*-550: The cytochrome *c* is called cytochrome *c*-550 also according to the position of its α absorption peak. The cytochrome shows many properties similar to those of *N. winogradskyi* cytochrome *c*-550(s) (2,3,14,17). It reacts rapidly with *T. novellus* cytochrome *c* oxidase (18).

N. europaea cytochrome *c*-552: The cytochrome *c* is called cytochrome *c*-552 as it shows the α absorption peak at 552 nm. The cytochrome reacts rapidly with *P. aeruginosa* nitrite reductase and does not react with either cow cytochrome *c* oxidase in the absence of detergents or yeast cytochrome *c* peroxidase (2,19).

T. ferrooxidans cytochrome *c*-552(s): The cytochrome *c* used in the present study is called cytochrome *c*-552(s) as it shows the α absorption peak at 552 nm and is solubilized in the absence of detergents (8). The microorganism has two membrane-bound cytochromes *c* besides cytochrome *c*-552(s), cytochromes *c*-552(m) and *c*-550(m) (20). The cytochrome has been partially sequenced; *N*-terminal sequence until 50th residue has been determined (7). The reactivities with cow cytochrome *c* oxidase, yeast cytochrome *c* peroxidase and *P. aeruginosa* nitrite reductase of the cytochrome have not been determined. The cytochrome reacts with *T. ferrooxidans* cytochrome *c* oxidase around pH 3 (21).

The reactivities of cytochromes *c* mentioned above with several redox enzymes are shown in Table 1.

Comparison of the amino acid sequences of cytochromes *c* from chemoautotrophic bacteria

The amino acid sequences of *N. winogradskyi* cytochrome *c*-550(s) (13), *T. novellus* cytochrome *c*-550 (14) and *N. europaea* cytochrome *c*-552 (12) were compared with those of several bacterial and eucaryotic cytochromes *c*. In the sequence, *N. europaea* cytochrome *c*-552 resembled *P. aeruginosa* cytochromes *c*-551 (23) and *Chlorobium limicola* cytochrome *c*-555 (24) (Fig. 1), while *N. winogradskyi* and *T. novellus* cytochromes *c*-550 resembled eucaryotic cytochrome *c* and cytochrome *c*₂ (22) (Fig. 2). The sequence of *T. ferrooxidans* cytochrome *c*-552(s) until 50th residue was similar to the *N*-terminal sequences of *T. novellus* (14), *N. winogradskyi* (13) and horse (27) cytochromes *c* and *Rhodospirillum rubrum* cytochrome *c*₂ (28) (Table 2). Therefore, the chemoautotrophic bacteria studied in the present investigation are classified into two groups on the basis of the primary structures of their cytochromes *c*; *N. winogradskyi*, *T. novellus* and *T. ferrooxidans* belong to one group, and *N. europaea* to the other group. A similar conclusion has been suggested also by the study of 16S rRNA (30), and an evolutional relationship of *N. winogradskyi* cytochrome *c* to other cytochromes *c* has been reported (31).

(a) <i>N. europaea</i> (12)	DADLA KKNNC I A CHQ V E T K V
(b) <i>P. aeruginosa</i> (23)	EDPE V L F K N K G C V A C H A I D T K M
(c) <i>C. limicola</i> (24)	YDAAAGKATY D A S - C A M C H - - K T G M
(d) <i>Synechococcus</i> sp. (25)	ADIADGAKVF S A N - C A A C H - M G G G N
(e) <i>D. vulgaris</i> (26)	ADGAALY - K S - C V G C H - G A D G S

- (a) VGPALKDI AAK YADKDDAATY LAGKIKGGSSGVW - G
 (b) VGPAYKDV AAK FAGQAGA EAE LAQR IKNNGSQGVW - G
 (c) MG - A PK - VGDK AAWAPHI AKGMNVMVAN S IKG YKGT
 (d) V - - VMA - NKTL KKEALEQF - GMNS - ADA IMYQVQNG
 (e) KQAMGVGHAVK GQKADEL FKK LMG - YADGSY GGE - K
- (a) Q I P M P P N V - N V S - - D A D A K - A L A D W I L T L K
 (b) P I P M P P N A - - V S - - D D E A Q - T L A K W V L S Q K
 (c) K G M M P A K G G N P K L T D A Q V G N A V A Y M V G Q S K
 (d) K N A M P A F G G - - R L S E A Q I E N V A A Y V L D Q S S N K W A G
 (e) K A V M T N L V K - - R Y S D E E M K A M A D Y M S K L

Fig. 1. The amino acid sequences of *N. europaeae* cytochrome *c*-552 and its relatives.

Evolutional positions of chemoautotrophic bacteria

The first organism appeared on the earth seems to have originated in the environment where various kinds of organic compounds were present, as almost all kinds of organic compounds are thought to have been produced by the chemical evolution (32). Therefore, the first organism seems to have been heterotrophic. However, it is very doubtful whether free reducing sugars, especially reducing hexoses, were present among the organic compounds which were produced by the chemical evolution, because when the energy required for abiotic synthesis of the organic compounds by the chemical evolution was supplied to the mixture of reducing sugars and amino acids, these compounds seem to have inevitably made condensation products between them.

- (a) *T. novellus* (14) E ? P D P D P A K G A N V F W - K - - C M A C H A V G E
 (b) *N. winogradskyi* (13) G D V E A G K A A F N - K - - C K A C H E I G E
 (c) *R. rubrum* (28) E G D A A A G E K V S K - K - - C L A C H T F D Q
 (d) *T. ferrooxidans* (7) A G G A G G P A P Y R I S W D C M V C H G M P G
 (e) Horse (27) G D V E K G K K I F V Q K - - C A Q C H T V E K

- (a) G A K N K - V G P E L N G I I G R K M G S I E G F N Y S D T L K E H N A
 (b) S A K N K - V G P E L N G L D G R H S G A V E G Y A Y S P A N K - - - -
 (c) G G A N K - V G P E L F G V F E N T A A H K D N Y A Y S E S Y T E M K A
 (d) N N T - - P I V P E L A G Q H K G Y L E T Q - L K A F K D -
 (e) G G K H K - T G P N L H G L F G R K T G Q A P G F T Y T D A N K N - - -

- (a) K G D V W T A E I L S Q Y L A N P K G Y M - - - - - P G - - V K M V F
 (b) S G I T W T E A E F K E Y I K D P K A K V - - - - - P G - - T K M V F
 (c) K G L T W T E A N L A A Y V K D P K A F V L E K S G D P K A K S K M T F
 (e) K G I T W K E E T L M E Y L E N P K K Y I - - - - - P G - - T K M I F

- (a) A G L P K E I R A D D L E A Y L K T F N A D G T K
 (b) A G I K K D S E L D N L W A Y V S Q F D K D G K V K A K
 (c) K - L T K D D E I E N V I A Y L K T L K
 (e) A G I K K K T E R E D L I A Y L K K A T N E

Fig. 2. The amino acid sequences of *T. novellus* cytochrome *c*-550 and its relatives.

If the reducing hexoses were not present on the primeval earth, the first organism was not able to get energy for its life processes by fermentation of the hexoses, e.g. by lactic acid fermentation. As lactic acid has been produced by Miller's experiment (33), it seems possible that the first organism got the energy by oxidizing lactic acid by evolution of H₂ catalysed by hydrogenase (hydrogenase organism) (34). Methanogens may have appeared soon after the appearance of the hydrogenase organisms. As methanogens consume H₂ evolved by the hydrogenase organisms, the latter organisms grow easily when they live together with methanogens. Therefore, the energy acquiring reactions in the first organism seem to have been rather similar to those of the autotrophs than those of heterotrophs.

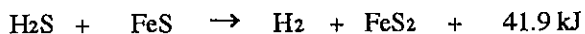
Table 2. Comparison of the primary structures of several cytochromes *c*

Organism	Number of identical residues*									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. <i>N. europaea</i>	81									
2. <i>P. aeruginosa</i>	44	82								
3. <i>C. limicola</i>	17	16	86							
4. <i>Synechococcus</i> sp.	13	15	14	87						
5. <i>D. vulgaris</i>	19	18	18	13	79					
6. <i>R. rubrum</i>	13	14	17	21	16	112				
7. <i>T. ferrooxidans</i> **	(15)	(13)	(14)	(15)	(15)	(23)	(130)			
8. <i>T. novellus</i>	17	13	13	16	11	35	(25)	113		
9. <i>N. winogradskyi</i>	14	22	13	15	13	41	(25)	50	109	
10. Horse	11	14	12	13	9	39	(20)	50	50	104

* Alignment of the amino acid sequences was made according to Moore and Pettigrew (29).

** The cytochrome was assumed to be composed of 130 amino acid residues (8). As its sequence only until 50th residue has been determined, each value was multiplied by 2.5.

As a large quantity of H₂S seems to have been evolved from the thermal vent in the deep sea, H₂S may have supplied the energy for the life processes by the reaction (35):



Unfortunately, this reaction is not found in nowadays organisms. The green sulphur bacteria may have appeared next to the hydrogenase organisms. The bacteria oxidize H₂S to elemental sulphur and/or sulphate using light energy. Therefore, sulphate may have occurred on the earth before the appearance of O₂. Then, the organisms which oxidized H₂ by elemental sulphur or sulphate may have appeared. Cytochrome *c-555* of the green sulphur bacteria and cytochrome *c-553* of sulphate reducing bacteria are similar to each other in their molecular aspects (2, 29). The hydrogenase system which functioned in the H₂ evolution of the hydrogenase organisms may have served the utilization of H₂ in the organisms which oxidized H₂ by elemental sulphur and/or sulphate. The organisms which oxidized H₂ by elemental sulphur and/or sulphate produced H₂S. The enzyme which functioned in the oxidation of H₂S by *C. limicola* may have acted as a H₂S producing enzyme. Indeed, sulphide-cytochrome *c* reductase of *C. limicola* acts as an elemental sulphur reducing enzyme with a potential reducing reagent (36). The green sulphur bacteria are autotrophs, and elemental sulphur- and sulphate-reducing bacteria are also autotrophs when they utilize H₂ as the electron donor. From these aspects of the energy acquiring reactions, the earlier organisms mentioned above seem to have been autotrophic.

After the photosynthetic bacteria had appeared, a lot of organic compounds were produced, and the sulphate-reducing bacteria seem to have oxidized also the organic compounds by sulphate. Then, the denitrifying bacteria also may have appeared around the same time when the sulphate-reducing bacteria appeared. Because cytochrome *c-551* of the denitrifying bacteria, e.g. *P. aeruginosa* cytochrome *c-551* (23) is similar to *C. limicola* cytochrome *c-555* (24) and *Desulfovibrio vulgaris* cytochrome *c-553* (2,26,29) in the molecular aspects. There is still a heavy controversy on the presence of nitrate on the ancient earth where O₂ was not present. However, the finding that the salt is present in the aqueous inclusion of nepheline-basalt (37) makes it likely that the denitrifying bacteria occurred before the appearance of O₂ by which ammonia was oxidized to nitrate by the nitrifying bacteria. Meanwhile, the purple sulphur bacteria and cyanobacteria may have appeared. After the appearance of cyanobacteria, O₂ was utilizable, and then, the ammonia-oxidizing bacteria appeared.

Chemoautotrophic bacteria studied in the present investigation require O₂ for their respiration. Molecular oxygen is thought to have been produced by the photosynthesis of cyanobacteria for the first time (38). Therefore, the chemoautotrophic bacteria treated in the present study may have appeared after O₂ accumulated by the photosynthesis of cyanobacteria. However, a recent study on cytochrome *c* oxidase indicates that the oxidase occurred before the evolutionary separation of eubacteria and archaebacteria (39). As cytochrome *c* oxidase functions only in the presence of O₂, this substance may have already occurred at the point of the evolutionary separation of eubacteria and archaebacteria. As the affinity for O₂ of cytochrome *c* oxidase is less than 1 μM (40), some of the aerobic bacteria including *N. europaea* may have lived soon after cyanobacteria appeared even before the accumulation of O₂. K_m for NH₃ of ammonia monooxygenase of *N. europaea* is also fairly small, approximately 20 μM (41). Therefore, it could be that the chemoautotrophic bacteria such as *N. europaea* occurred from as early as the evolutionary separation of eubacteria and archaebacteria. Cytochrome *c* oxidase of *N. europaea* shows a low affinity for CO; the CO-complex

of the oxidase is formed only in 100% CO atmosphere and the CO-complex is dissociated by introduction of air (42). This is very different from the case of other cytochrome *c* oxidases; e.g. the CO-complex of the *N. winogradskyi* oxidase is not dissociated by introduction of air. Namely, *N. europaea* cytochrome *c* oxidase is more resistant to CO than other cytochrome *c* oxidases. This may mean that *N. europaea* occurred on the earlier earth where CO was present. *N. europaea* cytochrome *c*-552 and cyanobacterial cytochromes *c₆* are similar to each other in the reactivity with some redox enzymes (2,34). Therefore, *N. europaea* among chemoautotrophs could have appeared considerably earlier in the evolution.

N. winogradskyi and *T. novellus* cytochromes *c*-550 are similar to eucaryotic cytochrome *c* in the amino acid sequence (14) and in the reactivity especially with yeast cytochrome *c* peroxidase (2). Although cytochromes *c₂* of the non-sulphur purple bacteria are also similar to eucaryotic cytochromes *c* in the amino acid sequence, their reactivity with the yeast enzyme is not so high as that of *N. winogradskyi* and *T. novellus* cytochromes *c*-550 (2). In any case, as *N. winogradskyi* cytochrome *c*-550(s) and *T. novellus* cytochrome *c*-550 are similar to eucaryotic cytochrome *c*, and *T. ferrooxidans* cytochrome *c*-552(s) is fairly similar to eucaryotic cytochrome *c* and cytochrome *c₂* in the amino acid sequence (7) (Table 2), these organisms seem to have evolutionally appeared more recently than *N. europaea*. Therefore, the earth may have been polluted with nitrite in the period between the appearance of *N. europaea* and that of *N. winogradskyi*. However, as *P. aeruginosa* which denitrifies nitrite may have appeared before the appearance of *N. europaea* as mentioned above, and *N. europaea* itself decomposes nitrite (43), the accumulation of nitrite may not have occurred.

In conclusion, the chemoautotrophic bacteria seem to be divided into two groups; the bacteria classified in evolutionally older group including *N. europaea* may have lived from as early as the beginning of the production of O₂ by the photosynthesis of cyanobacteria, while *N. winogradskyi*, *T. novellus* and *T. ferrooxidans* seem evolutionally closer to eucaryotes than *N. europaea*. Namely, some of chemoautotrophs may have lived from the very early time of evolution of the earth.

References

1. Yamanaka, T. and Fukumori, Y. (1988) *FEMS Microbiol. Rev.* **54**, 259-270
2. Yamanaka, T. (1992) *The Biochemistry of Bacterial Cytochromes*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin.
3. Yamanaka, T., Tanaka, Y. and Fukumori, Y. (1982) *Plant Cell Physiol.* **23**, 441-449.
4. Yamanaka, T., Yoshioka, T. and Kimura, K. (1981) *Plant Cell Physiol.* **22**, 613-622.
5. Yamanaka, T. and Kimura, K. (1974) *FEBS Lett.* **48**, 253-255.
6. Yamanaka, T., Yano, T., Kai, M., Tamegai, H., Sato, A. and Fukumori, Y. (1991) In *New Era of Bioenergetics* (Mukohata, Y., ed.) Academic Press, Tokyo, pp. 223-246.
7. Yano, T. (1992) Dissertation for Ph. D. Degree at Tokyo Institute of Technology.
8. Sato, A., Fukumori, Y., Yano, T., Kai, M. and Yamanaka, T. (1989) *Biochim Biophys. Acta* **976**, 129-134.
9. Hofman, T. and Lees, H. (1953) *Biochem. J.* **54**, 579-583.
10. Yamanaka, T. and Shinra, M. (1974) *J. Biochem.* **75**, 1265-1273.
11. Yamanaka, T. and Okunuki, K. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* **67**, 379-397.
12. Fujiwara, T., Yamanaka, T. and Fukumori, Y. (1995) *Curr. Microbiol.* **31**, 1-4.

13. Tanaka, Y., Fukumori, Y. and Yamanaka, T. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **707**, 14-20.
14. Yamanaka, T., Nagano, T., Shoji, K. and Fukumori, Y. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1058**, 48-51.
15. Nomoto, T., Fukumori, Y. and Yamanaka, T. (1993) *J. Bacteriol.* **175**, 4400-4404.
16. Yamanaka, T., Kamita, Y. and Fukumori, Y. (1981) *J. Biochem.* **89**, 265-273.
17. Yamanaka, T., Takenami, S., Akiyama, N. and Okunuki, K. (1971) *J. Biochem.* **70**, 349-358.
18. Yamanaka, T. and Fujii, K. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **591**, 53-62.
19. Yamanaka, T. and Fukumori, Y. (1981) *Plant Cell Physiol.* **22**, 1223-1230.
20. Tamegai, H., Kai, M., Fukumori, Y. and Yamanaka, T. (1994) *FEMS Microbiol. Lett.* **119**, 147-154.
21. Kai, M., Yano, T., Tamegai, H., Fukumori, Y. and Yamanaka, T. (1992) *J. Biochem.* **112**, 816-821.
22. Meyer, T. E. and Kamen, M. D. (1982) *Adv. Protein Chem.* **35**, 105-212.
23. Ambler, R. P. (1963) *Biochem. J.* **89**, 349-378.
24. Van Beeumen, J., Ambler, R. P., Meyer, T. E., Kamen, M. D., Olson, J. M. and Shaw, E. K. (1976) *Biochem. J.* **159**, 757-774.
25. Aitken, A. (1979) *Eur. J. Biochem.* **101**, 297-308.
26. Nakano, K., Kikumoto, Y. and Yagi, T. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 12409-12412.
27. Margoliash, E., Smith, E. L., Kreil, G. and Tuppy, H. (1961) *Nature* **192**, 1121-1127.
28. Dus, K., Sletten, K. and Kamen, M. D. (1968) *J. Biol. Chem.* **243**, 5507-5518.
29. Moore, G. R. and Pettigrew, G. W. (1990) *Cytochromes c*, Springer-Verlag, Berlin.
30. Woese, C. R., Stackebrandt, E., Weisburg, W. G., Paster, B. J., Madigan, M. T., Fowler, V. J., Hahn, C. M., Blanz, P., Gupta, R., Nealson, K. H. and Fox, G. E. (1984) *System. Appl. Microbiol.* **5**, 315-326.
31. Sone, N. and Toh, H. (1994) *FEMS Microbiol. Lett.* **122**, 203-210.
32. Noda, H. (ed.) (1978) *Origin of Life*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
33. Miller, S. L. (1953) *Science* **117**, 528-529.
34. Yamanaka, T. (1973) *Space Life Sci.* **4**, 490-504.
35. Wachtershauser, G. (1988) *System. Appl. Microbiol.* **10**, 207-210.
36. Yamanaka, T. (1994) *Methods Enzymol.* **243**, 463-472.
37. Sugawara, K., Oana, S. and Koyama, T. (1949) *Proc. Japan Acad.* **25**, 103-106.
38. Broda, E. and Peschek, G. A. (1979) *J. Theor. Biol.* **81**, 201-212.
39. Castresana, J., Lubben, M., Saraste, M. and Higgins, G. (1994) *EMBO J.* **13**, 2516-2525.
40. D'Mello, R., Hill, S. and Poole, R. K. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 867-870.
41. Suzuki, I., Kwok, S.-C., Dular, U. and Tsang, D. C. Y. (1981) *Can. J. Biochem.* **59**, 477-483.
42. Yamazaki, T., Fukumori, Y. and Yamanaka, T. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **810**, 174-183.
43. Stuken, R., Vollmer, M. and Bock, E. (1992) *Arch. Microbiol.* **158**, 439-443.

pH条件の異なる水溶液中で窒素プラズマによって 引き起こされる分子状窒素の固定

胸組虎胤*、原田馨†,††

* 小山高専物質工学科 (〒323 栃木県小山市中久喜771番地)

† 筑波大学化学系 (〒305 茨城県つくば市天王台1-1-1)

†† (現在 松蔭女子学院短期大学 (〒653 神戸市灘区))

要旨

非還元的大気に含まれる分子状窒素の固定は、原始水圏におけるアミノ化合物や酸性物質の生成に重要であったと考えられる。我々は、太陽風プラズマが非還元的大気下の原始水圏に到達したシミュレーションとして、水中で窒素プラズマによって引き起こされる反応について調べてきた。窒素プラズマを水溶液に吹き込む反応で、得られたアンモニア、硝酸イオン、亜硝酸イオンの収率が水溶液のpHに依存していることが、以下のように示された。(1) アンモニア、硝酸イオンの生成のためには、酸性のpHの方が、中性、塩基性のpH条件よりも適している。(2) 亜硝酸イオンの生成のためには、塩基性のpHの方が、中性、酸性のpH条件よりも適していた。これらの結果は、窒素を含む非還元的大気下でアンモニアや硝酸が生成するためには、原始水圏が酸性であった方が、中性や塩基性の場合よりも都合がよかったことを示唆している。

Molecular Nitrogen Fixation Induced by Nitrogen Arc Plasma in Aqueous Solutions under Different pH Conditions

Toratane Munegumi* and Kaoru Harada†,††

*Department of Materials Chemistry and Bioengineering, Oyama National College of Technology, Oyama, Tochigi 323, Japan

†Department of Chemistry, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan
(Received September 4, 1995; Accepted October 15, 1995)

Abstract

The fixation of molecular nitrogen contained in the non-reducing atmosphere is important for the formation of amino compounds and acidic compounds in the primitive hydrosphere. We have examined the reactions induced by the nitrogen arc plasma in aqueous solution as a simulation of solar winds blowing into the primitive hydrosphere under the non-reducing atmosphere. In the nitrogen plasma blowing into aqueous solutions, the dependency of the yield of ammonia, nitrate (NO_3^-), and nitrite (NO_2^-) on the pH of the aqueous solution was shown as follows. (1) The acidic pH region was more suitable for the formation of ammonia and nitrate than the neutral and basic pH regions. (2) The basic region was more suitable for the formation of nitrite than neutral and acidic regions. These results suggested that the primitive hydrosphere had been acidic rather than neutral or basic for the formation of ammonia and nitric acid under the non-reducing atmosphere containing nitrogen.

Key word: N_2 fixation, N_2 plasma, pH condition, primitive hydrosphere

Introduction

It is considered that the primitive atmosphere (non-reducing atmosphere)¹⁻⁴⁾ generated from the inside of the primitive earth was mainly composed of nitrogen (N_2), carbon dioxide (CO_2), and water (H_2O). The gaseous phase discharge experiments in the assumed non-reducing atmospheres plus hydrogen gas have only succeeded⁵⁻⁷⁾ to produce various organic compounds. The simulational experiments

††Present Address: Shoin Women's University, Nada-ku, Kobe 653, Japan

using gaseous phase discharge⁵⁻⁷⁾ in the assumed non-reducing atmosphere have produced amino acids in much lower yields compared with those of discharge in the assumed reducing atmospheres($\text{CH}_4, \text{NH}_3, \text{H}_2\text{O}$)⁸⁻¹⁰⁾. While molecular nitrogen and carbon dioxide are very inert compounds, their reducing compounds (ammonia and methane) easily yield⁸⁻¹⁰⁾ bioorganic compounds like amino acids using gaseous phase electrolysis. If such reducing reactions in the non-reducing atmosphere had not occurred, bioorganic compounds would not have been on the primitive earth. Therefore, some sort of reducing reaction pathways from non-reducing gases to bioorganic compounds must have existed under the non-reducing atmosphere on the primitive earth.

On the other hand, the discharge electrolysis^{11,12)} and the blowing of a plasma jet^{13,14)} against aqueous solutions under the assumed non-reducing atmosphere have shown several experimental results of the synthesis of reducing compounds. We have emphasized both the reducing and oxidizing actions of water molecules in the prebiotic reactions.^{15,16)} Our opinion is that the hydrogen radicals produced by the disproportionation of water in aqueous solutions have played an important role in the reducing reactions in the primitive hydrosphere. Our scenario is that water molecules contained in the primitive hydrosphere were dissociated by the action of lightning, solar winds, cosmic rays, and the entry of meteors or meteorites passing through the primitive atmosphere into the primitive hydrosphere. The resulting hydrogen radicals and hydroxyl radicals would have reduced and oxidized inorganic compounds and simple organic compounds. Although several simulation experiments using the glow discharge^{11,12)} and plasma jet^{13,14)} as a model of lightning or solar winds have been carried out to support our scenario, the conditions of these experiments have been in a limited pH range (almost pH 2-3 or sometimes pH 11). Therefore, the pH dependency of the reaction products has not been clarified. It has been pointed out⁵⁾ that the pH of the primitive hydrosphere became neutral (pH 7-8) in an early time after the primitive earth was born.⁴⁾ This period would be important for the formation of lower molecular weight compounds. However, which pH was suitable for the synthesis of the compounds is still under discussion.

In this study, we wish to describe which pH is suitable for the reducing reactions in the hydrosphere induced by the action of nitrogen plasma under the non-reducing atmosphere. Nitrogen plasma would have been formed by the action of many kinds of energy sources as previously described. Our experiments were carried out using a plasma torch for welding in order to generate the nitrogen plasma.

Experimental

Reaction Apparatus and reaction conditions: A Well Pen PLA-J

(Japan Welding) was used as the plasma generator. The plasma torch equipped with the plasma generator was immersed into a reaction solution (350ml) in a glass apparatus as shown in Fig. 1. The outside of the glass reaction apparatus was cooled with flowing water, and the temperature of the solution was kept at 35-50°C. The pH of the reaction solutions was kept constant by using inorganic salt buffers as described in the next section. The voltage and the current of the power supply were adjusted to 20 A and 20 V, respectively. The plasma jet was blown into the reaction solution. The solution removed from the reaction vessel was analyzed using an amino acid analyzer and an ion chromatograph.

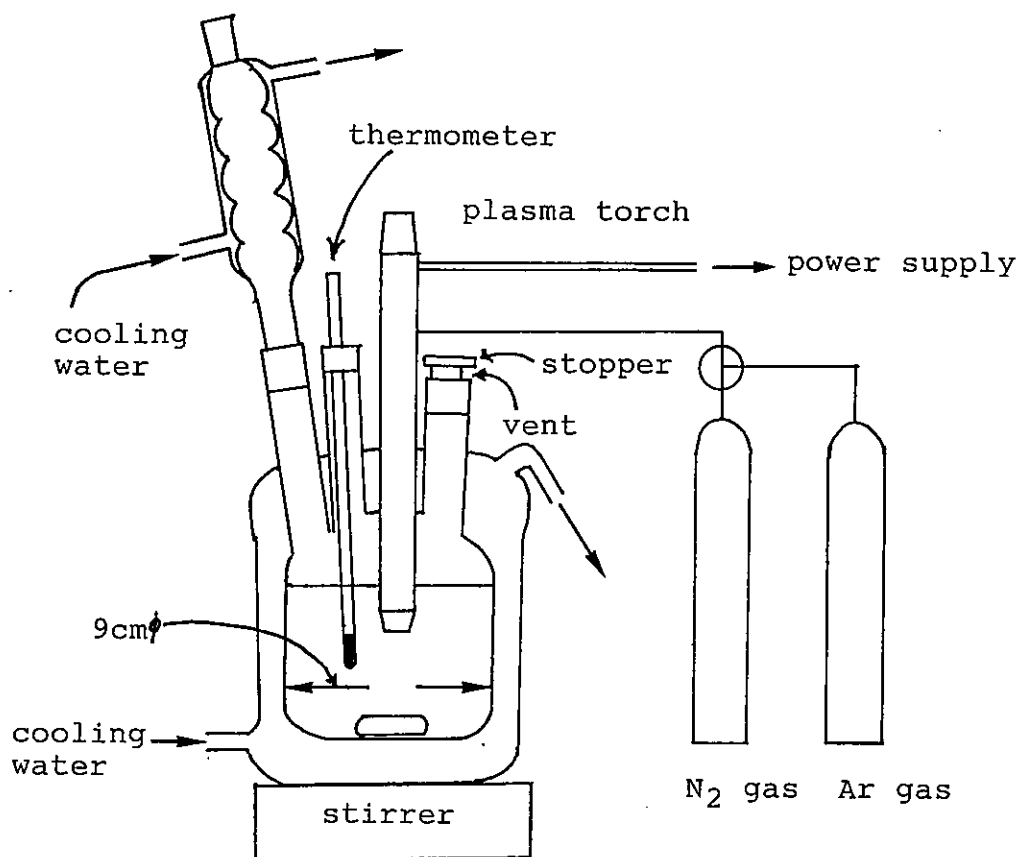


Fig. 1. The apparatus for the reactions induced by nitrogen arc plasma.

Materials: Sodium sulfate, sodium borate, sodium phosphate, and sodium carbonate, purchased from Wako Pure Chemical Company were used for the preparation of the reaction solution buffers. Ten mM sodium hydrogen sulfate was used in the region of pH 1 to 4. Ten mM sodium hydrogen phosphate was used at pH 6.5. Ten mM sodium borate was used in the region of pH 8 to 13.

Analysis of reaction solutions : Ammonia in the reaction mixture was

analyzed using a Hitachi 835 amino acid analyzer. Nitrate (NO_3^-) and nitrite (NO_2^-) were analyzed with a Dionex 2000i ion chromatograph equipped with a TSK IC-Anion PW column (50mm x 4.6mm I.D.). A sodium borate buffer (360mg H_3BO_3 , 500mg $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 5.0g glycerol, 300mg potassium gluconate, 120ml CH_3CN , 30ml 1-butanol were diluted with distilled water in a 1000ml solution) was used as the eluant solution at a flow rate of 1.2 ml/min. Conductivity of the eluted solution was detected and recorded with a chromatocoda I. A typical ion chromatogram is shown in Fig. 2. The peaks due to nitrate ion (NO_3^-), nitrite ion (NO_2^-), and sulfate ion (SO_4^{2-} ; contained in buffers of the reaction solutions) were clearly separated on the chromatogram.

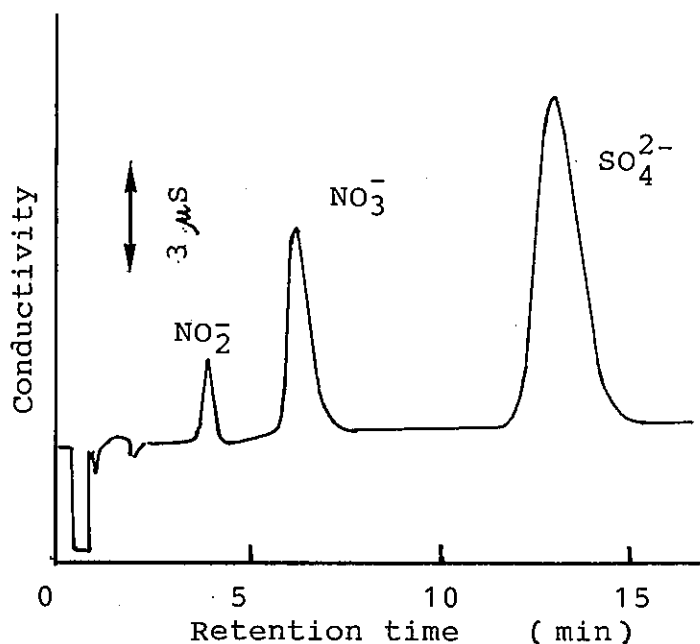


Fig. 2. Ion chromatographic separation of nitrate, nitrite, and sulfate ions. Column: TSK IC-Anion PW (50mm x 4.6mm I.D.); Eluant: Borate buffer, pH 8.5; Flow rate: 1.2ml/min; Detection: Conductivity.

Results and Discussion

Dependency of product yield on the mix ratio of nitrogen to argon in the plasma jet.

The plasma jet generator (Well Pen PLA-J) used in this study can make nitrogen plasma composed of pure nitrogen, while the old type of generator (Well Pen NP-7)^{13,14} can not make only nitrogen plasma jet. The maximum¹⁴ mix ratio of

nitrogen to argon was 0.8 l/min to 1.2 l/min in order to maintain a constant plasma jet flow. A comparison of the nitrogen fixation by Well Pen PLA-J with that by Well Pen NP-7 is shown in Table 1.

Table 1. Formation of ammonia (NH_3), nitrate (NO_3^-), and nitrite (NO_2^-) induced by nitrogen arc plasma in aqueous solution at pH 3.

Reaction No.	Flow rate (l/min)		Concentration of products (mM) ^{c)}		
	N ₂	Ar	Ammonia	Nitrate	Nitrite
1a)	0.8	1.2	0.26	3.90	0.62
2a)	0.6	1.4	0.88	6.36	0.72
3a)	0.4	1.6	1.04	3.58	0.43
4a)	0.2	1.8	0.35	3.58	0.40
5a)	0.0	2.0	0.00	0.00	0.00
6b)	0.5	1.5	0.20 ^{d)}	1.30 ^{d)}	0.38 ^{d)}
7b)	2.0	0.0	0.82	3.43	0.87

a) Well Pen NP-7 was used as the plasma jet generator (40A, 10V).¹⁴⁾

b) Well Pen PLA-J was used as the plasma jet generator (20A, 20V).

c) Concentration after a 40 minute reaction.

d) Concentration after a 45 minute reaction.

When the flow rate of nitrogen and argon was 0.8 and 1.2 l/min, respectively, a 40 minute plasma reaction using the Well Pen NP-7 gave ammonia (0.26 mM), nitrite (0.62 mM), and nitrate (3.90 mM). When the flow rate of nitrogen and argon was 0.5 and 1.5 l/min, respectively, a 45 minute reaction using Well Pen PLA-J gave ammonia (0.20 mM), nitrate (1.30 mM), and nitrite (0.38 mM). In this case, the yield of nitrate (1.30 mM) is slightly lower than those in the reactions using the old type of generator. On the other hand, when the flow rate of nitrogen was 2.0 l/min without argon (reaction No.7), the 40 minute reaction using the Well Pen PLA-J gave ammonia (0.82 mM), nitrate (3.43 mM), and nitrite (0.87 mM). Although the yield (0.87 mM) of nitrite was slightly higher compared with that (0.43 mM) in reaction No. 3, which gave the best yield of ammonia in the reactions using the old type of generator, the yields of the other two products were almost similar to reaction No. 3. The results in Table 1 generally show that the two plasma jet generators did not make a significant difference in the proportion of products. However, the nitrogen plasma jet blowing without argon may be a better simulation experiment than the nitrogen plasma with argon for the molecular nitrogen fixation under the non-reducing atmosphere, because argon is considered to be a minor component of the non-reducing atmosphere. Thus, the nitrogen plasma blowing with only nitrogen (No.7) as shown in Table 1 may appropriately

simulate the molecular nitrogen fixation by nitrogen plasma on the primitive earth under the non-reducing atmosphere. Therefore, the Well Pen PLA-J was used for the plasma jet generator with only nitrogen in the experiments using different pH conditions as described below.

Molecular nitrogen fixation under different pH conditions.

The nitrogen plasma jet with a nitrogen flow rate of 2.0ml/min was immersed in the solutions of different pHs. The time courses of ammonia, nitrate, and nitrite under different pH conditions (pH3, 6.5, 12.7) are shown in Figs. 3, 4 and 5, respectively.

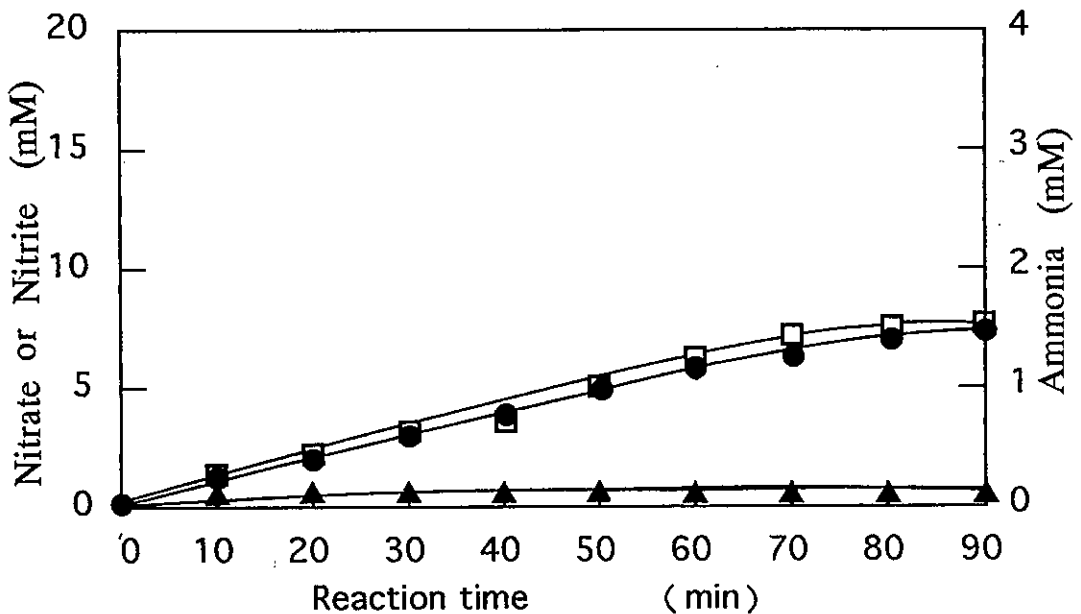


Fig. 3. Formation of ammonia (\square), nitrate (\bullet), and nitrite (\blacktriangle) in a pH 3 solution induced by nitrogen arc plasma.

In the reaction at pH 3, while ammonia and nitrate increased with the reaction time, nitrite did not increase. The reaction at pH 6.5 gave ammonia, nitrate, and nitrite with a lower concentration compared with the reaction at pH 3.

In the reaction at pH 12.7, nitrite increased with the reaction time faster than nitrate and ammonia.

The rate of formation of these compounds depended on the pH conditions. The yields of these compounds under different pHs at the same reaction time (50 minutes) were compared with each other in Fig. 6.

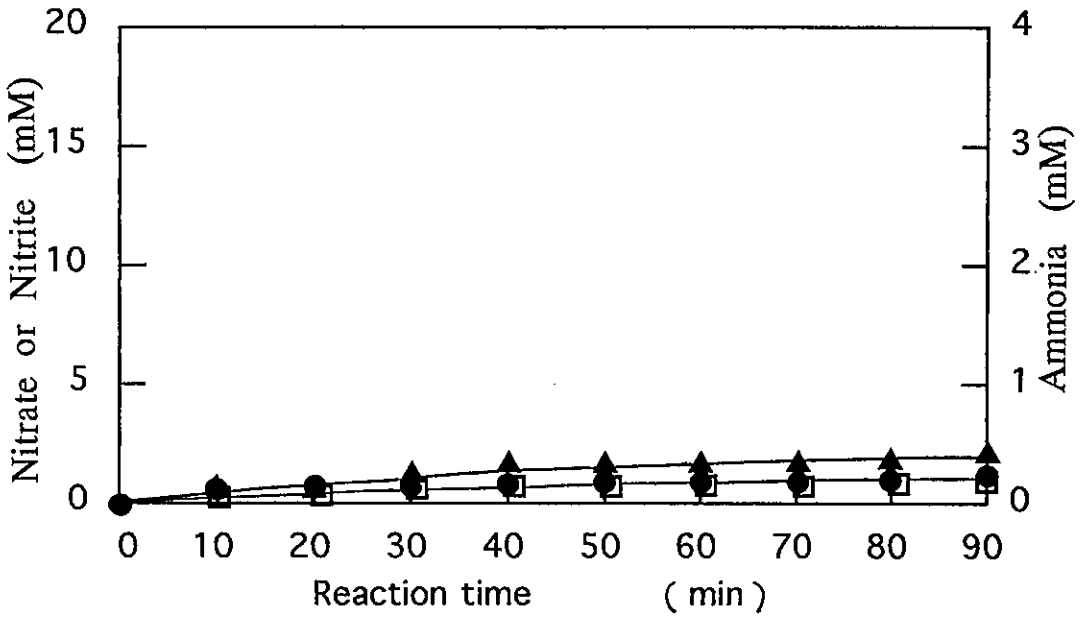


Fig. 4. Formation of ammonia (\square), nitrate (\bullet), and nitrite (\blacktriangle) in a pH 6.5 solution induced by nitrogen arc plasma.

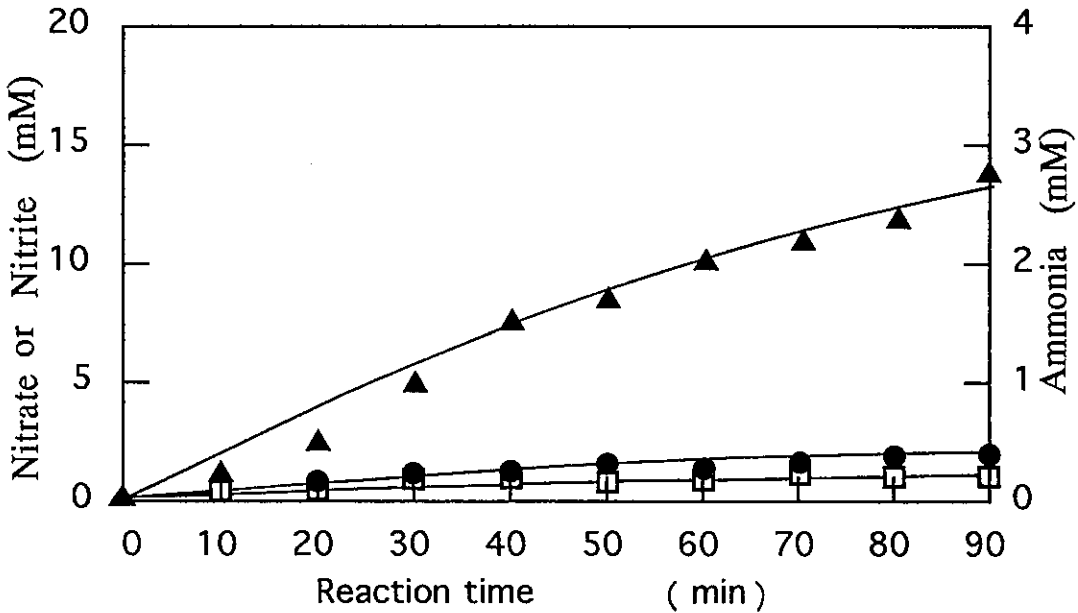


Fig. 5. Formation of ammonia (\square), nitrate (\bullet), and nitrite (\blacktriangle) in a pH 12.7 solution induced by nitrogen arc plasma.

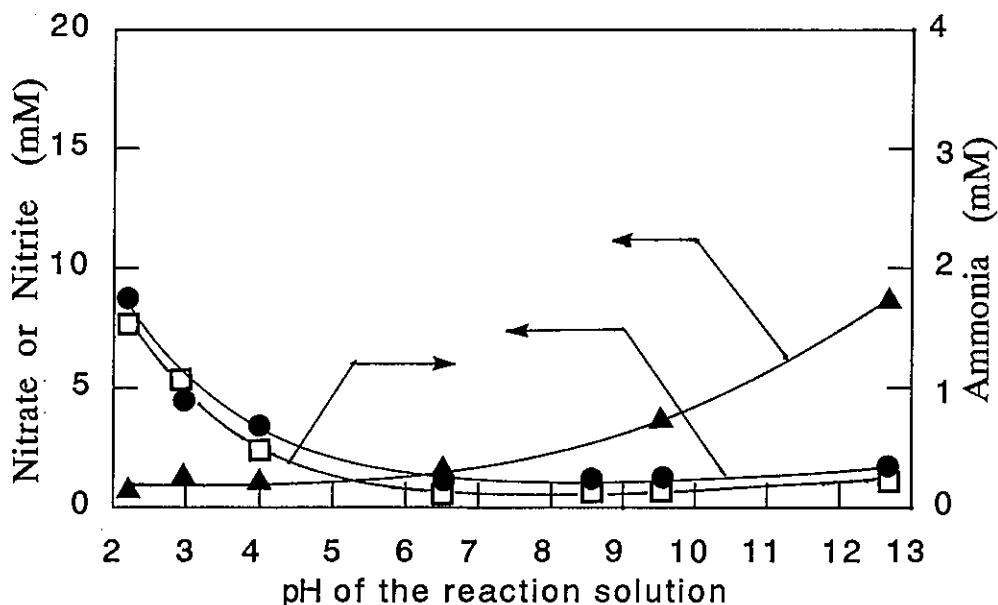


Fig.6. Formation of ammonia (\square), nitrate (\bullet), and nitrite (\blacktriangle) in aqueous solutions of different pHs induced by nitrogen arc plasma.

Generally, more acidic condition was suitable for the formation of ammonia and nitrate, while more basic condition was suitable for the formation of nitrite. On the other hand, neutral condition was not important for the formation of these compounds using nitrogen plasma. Therefore, the results described above suggest that the more acidic condition in the primitive hydrosphere is more important for the reduction of nitrogen to ammonia and for oxidation of nitrogen to nitrate. However, the acidic condition is not suitable for the nitrite formation.

Table 2 shows the G-value of ammonia, nitric acid, and nitrous acid in a 50 minute reaction of nitrogen arc plasma blowing into aqueous solutions of the pH 3, 6.5, and 12.5. The G-values for the formation of ammonia, nitrate, and nitrite at pH 3 were 0.0027 ($G(\text{NH}_3)$), 0.0133 ($G(\text{NO}_3^-)$), and 0.0024 ($G(\text{NO}_2^-)$), respectively. The G-values of this study are larger than the values ($G(\text{NH}_3) = 0.0018$; $G(\text{NO}_3^-) = 0.0008$; $G(\text{NO}_2^-) = 0.0000$) calculated from the data of the contact glow discharge electrolysis.¹²⁾ And also the G-values of this study are much larger than the values ($G(\text{Gly}) = 0.000001$) found in the literature of gaseous electric discharge.⁹⁾ These results indicate that the nitrogen plasma blowing into the primitive hydrosphere might have effectively produced much more ammonia compared with other types of reactions on the primitive earth.

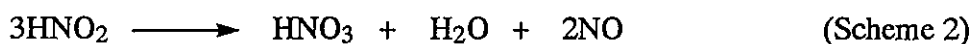
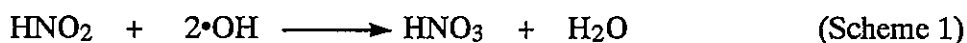
Table 2. G-Value of the products obtained in the 50 minute reaction of a nitrogen plasma blowing into aqueous solutions of different pHs

pH conditions	G-Value ^{a)}		
	ammonia	nitrate	nitrite
pH 3	0.0027	0.0133	0.0024
pH 6.5	0.0002	0.0019	0.0028
pH 12.7	0.0004	0.0046	0.0222

a)Number of product molecule per 100eV.

Degradation of nitrate and nitrite in acidic or basic solution during plasma jet blowing.

Nitrous acid may be readily oxidized to nitrous acid by hydroxyl radicals formed by the action of nitrogen plasma (Scheme 1). It is known that nitrite can readily degrade to nitric acid and nitrogen monoxide in a high temperature solution¹⁷⁾ as shown in Scheme 2, while nitrous acid is not stable in acid solution.¹⁷⁾



We examined the degradation of nitrate (NO_3^-) and nitrite (NO_2^-) during nitrogen plasma blowing into acidic or basic solutions containing nitrate or nitrite. Figs. 7 and 8 show the time course of ammonia, nitrate, and nitrite during nitrogen plasma blowing into acidic (pH 3) solution containing nitrate or nitrite, respectively. As shown in Fig. 7, while nitrate increased to 10.9mM for a 90-minute reaction, only a slight amount (<0.7mM) of nitrite was formed. The formation rate of nitrite was similar to that of the reaction of a nitrogen plasma jet blowing into an aqueous solution as shown in Fig. 3. On the other hand, for the plasma blowing into 10mM nitrite solution, nitrite decreased and nitrate increased with time as shown in Fig. 8. Since the degradation of nitrite was very fast in acidic solution, nitrite formed by the plasma jet blowing was degraded rather than accumulated in the reaction solution.

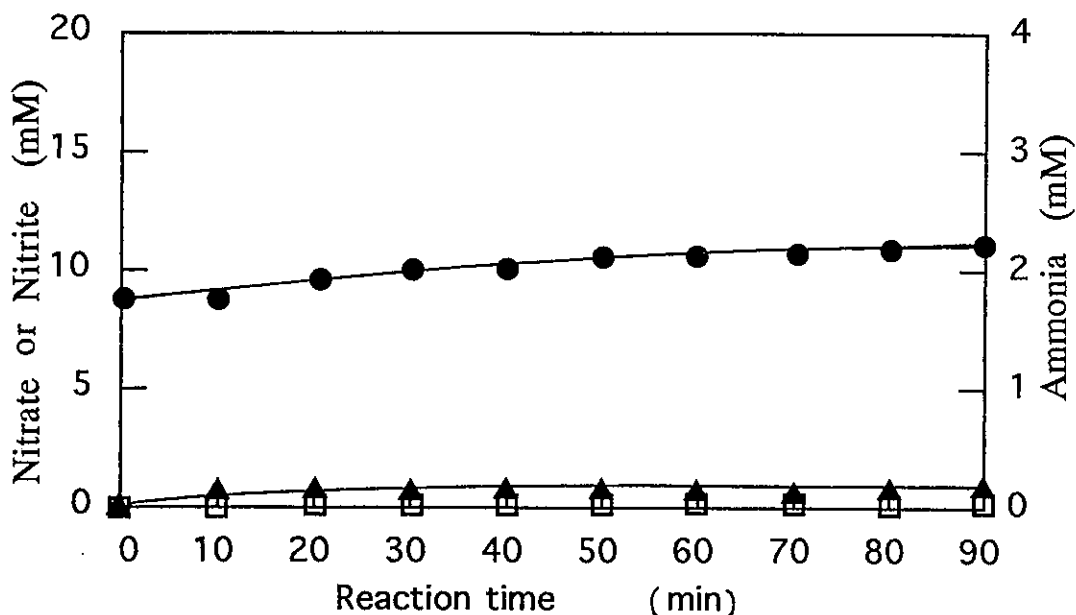


Fig. 7. Degradation of nitrate (NO_3^-) during the nitrogen plasma blowing into a solution containing 10mM nitrate at pH 3. [ammonia (□); nitrate (●); nitrite (▲)]

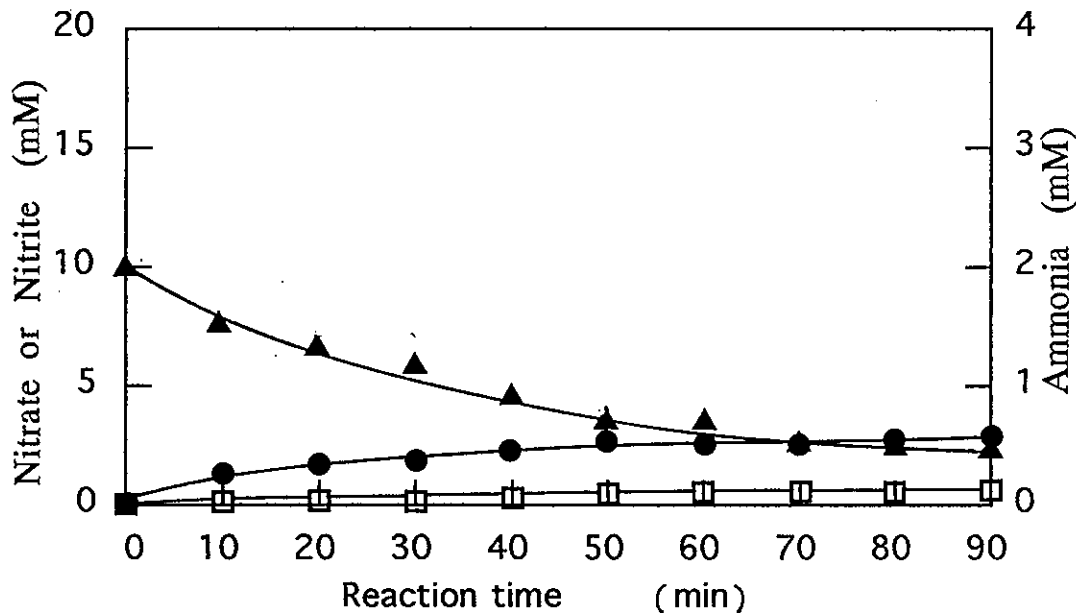


Fig. 8. Degradation of nitrite (NO_2^-) during the nitrogen plasma blowing into a solution containing 10mM sodium nitrite at pH 3. [ammonia (□); nitrate (●); nitrite (▲)]

Figs. 9 and 10 show the time course of the products during the nitrogen plasma blowing into basic solution (pH12.7) containing nitrate or nitrite, respectively.

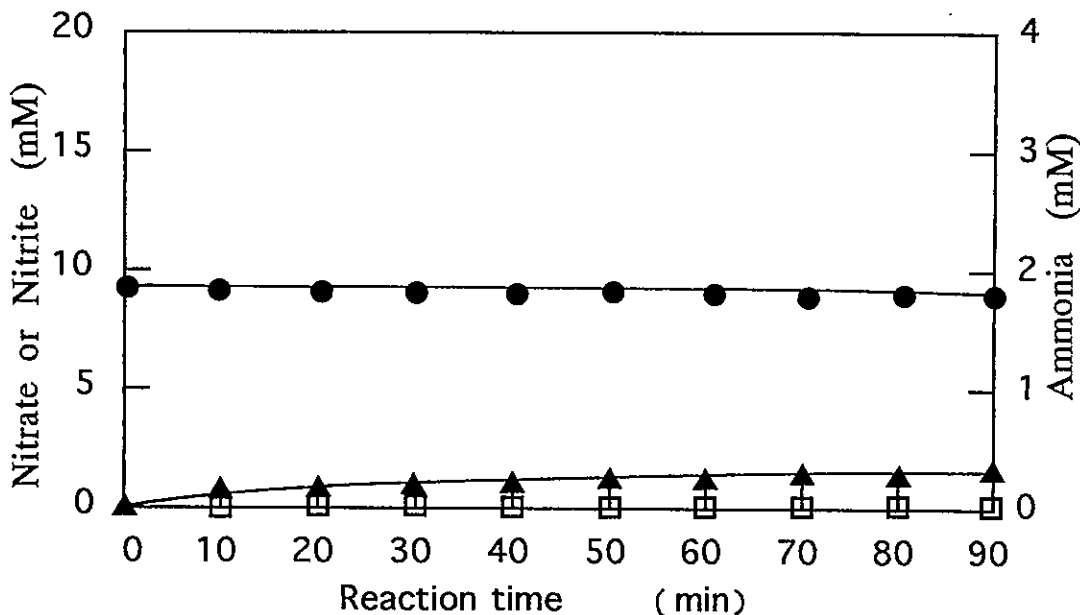


Fig. 9. Degradation of nitrate during the nitrogen plasma blowing into a solution containing 10mM sodium nitrate at pH 12.7. [ammonia (□); nitrate (●); nitrite (▲)]

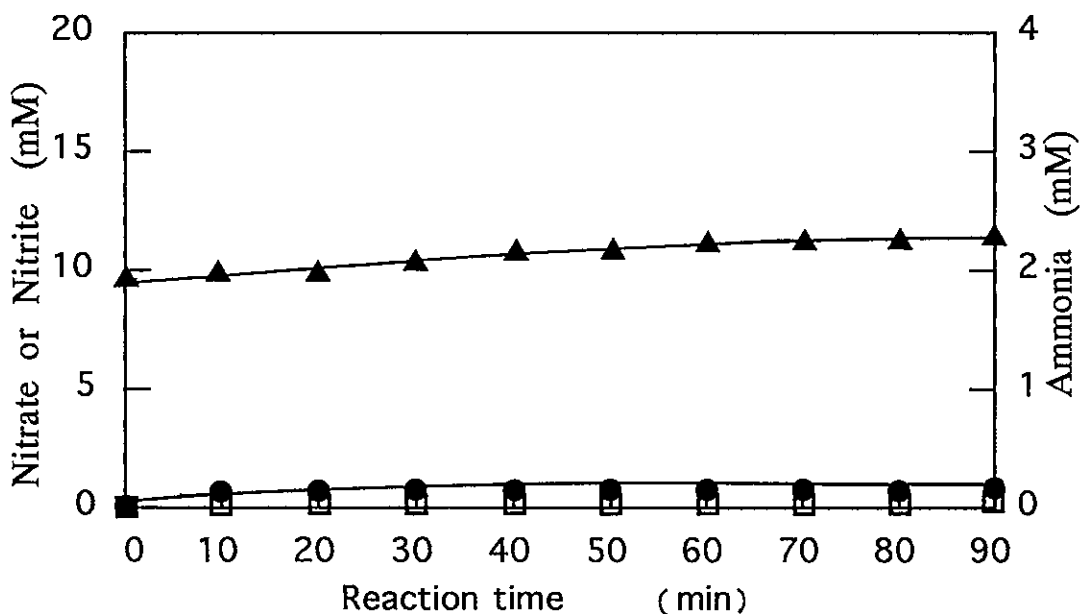


Fig. 10. Degradation of nitrite during the nitrogen plasma blowing into a solution containing 10mM sodium nitrite at pH 12.7. [ammonia (□); nitrate (●); nitrite (▲)]

These results show that nitrate and nitrite are stable during the nitrogen plasma blowing into the basic solution containing nitrate or nitrite.

In conclusion, the results of the plasma jet blowing into aqueous solutions under different pH conditions showed that the acidic pH would have been better than the other pH regions for the reductive fixation of molecular nitrogen in the primitive hydrosphere. Also, the much higher G-value of ammonia compared with other abiotic syntheses using glow discharge into an aqueous solution or gaseous discharge suggested the higher efficiency of nitrogen plasma blowing into the primitive hydrosphere for the reductive fixation of molecular nitrogen.

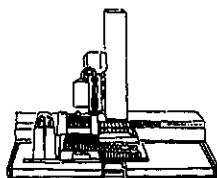
References

- (1) W.W. Rubey, *Bull. Geol. Soc. Am.*, **62**, 1111(1951).
- (2) A. Henderson-Sellers and A. J. Meadows, *Nature*, **270**, 589(1977).
- (3) T. Owen, R. D. Cess, and V. Ranmanthan, *Nature*, **277**, 640(1979).
- (4) R. A. Kerr, *Science*, **210**, 42(1980).
- (5) P. H. Abelson, *Pro. Natl. Acad. Sci., USA*, **54**, 1490(1965).
- (6) G. Schlesinger and S. L. Miller, *J. Mol. Evol.*, **19**, 376(1983).
- (7) G. Schlesinger and S. L. Miller, *J. Mol. Evol.*, **19**, 383(1983).
- (8) S. L. Miller, *Science*, **117**, 528(1953).
- (9) S. L. Miller, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 2351(1955).
- (10) D. Ring, Y. Walman, N. Friedmann, and S. L. Miller, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 765(1972).
- (11) K. Harada, S. Igari, M. Takasaki, and A. Shimoyama, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1986**, 1384.
- (12) K. Harada, S. Igari, T. Munegumi, M. Takasaki, and A. Shimoyama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **64**, 1776(1991).
- (13) M. Takasaki and K. Harada, *Chem. Lett.*, **1987**, 365.
- (14) M. Takasaki and K. Harada, *Chem. Lett.*, **1987**, 437.
- (15) M. Takasaki and K. Harada, *Tetrahedron*, **41**, 4463(1985).
- (16) K. Harada, *J. Syn. Org. Chem. Jpn.*, **48**, 522(1990).
- (17) F.A. Cotton and G. Wilkinson, "Advanced Inorganic Chemistry. A Comprehensive Text", 4th edition, John Wiley & Sons, New York(1980).

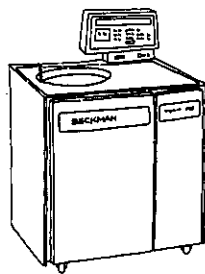
BECKMAN

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ては、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

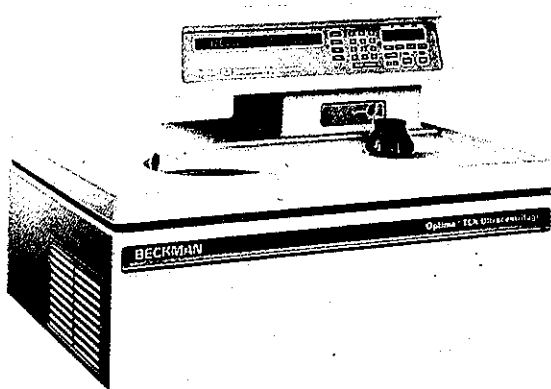
本社 〒102 東京都千代田区三番町 6 番地 ☎(03)3221-5831(代)

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

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、小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ーナル分離。
- 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(代)

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

☆ 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. 原稿原本のほかにコピー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、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, 2-2, …

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

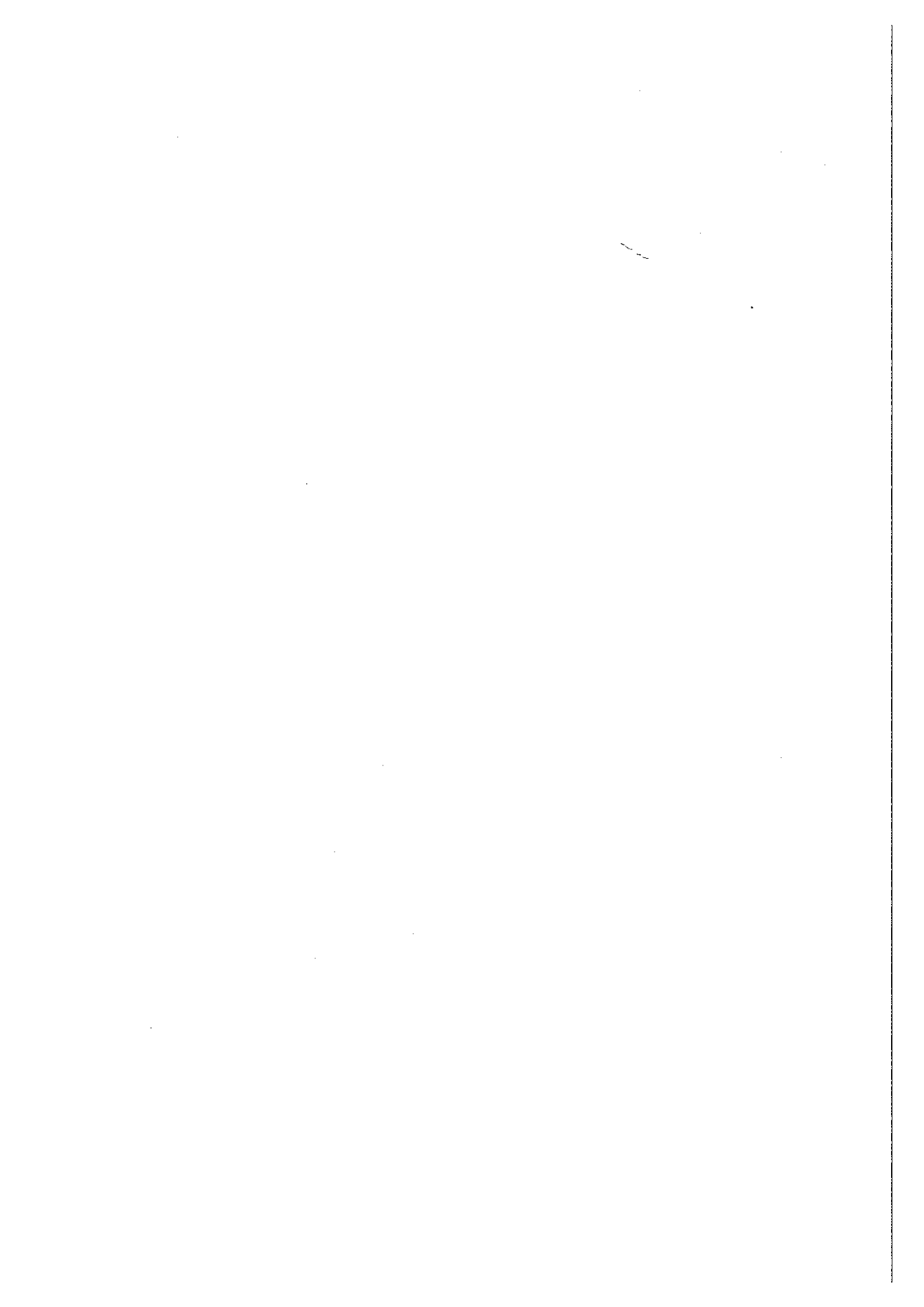
編 集 委 員 居原 秀 大西 耕二 川本 圭造 後藤 公彦
小林 憲正 島田 秋彦 長田 洋子 長谷川典巳
藤井 紀子 本多 元 三田 肇 胸組 虎胤

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

Viva Origino 23巻3号

1995年9月25日 印 刷
1995年9月30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

- © Search for life material in galactic dust.
S. Wada (153)

ARTICLES

- © Kinetic analysis of mechanism in reaction of tryptophanase with
D-tryptophan.
A. Shimada, H. Shishido and I. Nakamura (169)
- © Evolutional position of chemoautotrophic bacteria based on the structure
of cytochrome *c*.
T. Yamanaka, T. Fujiwara, T. Yano, K. Shoji and Y. Fukumori (179)
- © Molecular nitrogen fixation induced by nitrogen arc plasma in aqueous
solutions under different pH conditions.
T. Munegumi and K. Harada (189)