

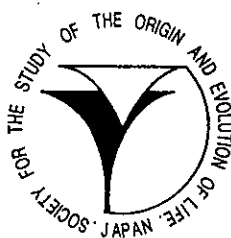
Viva Origino

VOL.23 (No.4)

December 1995

Special Issue:

“The origin of protein synthesis mechanism”



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、生物進化の究明により、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、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3/4以上の出席の総会において3/4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.4)

December 1995

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

特集 “タンパク質合成系の起原”

目 次

- ◎ “タンパク質合成系の起原”の特集にあたって
石神正浩……………(207)

論 文

- ◎ 芳香族三級アミンを用いた新規な生体外タンパク質合成系と
その翻訳系の起源研究への意義
新田 至、上田卓也、野島高彦、渡辺公綱……………(209)
- ◎ リボゾームRNAの構造と機能
遠藤弥重太、吉成茂夫……………(223)
- ◎ 原初蛋白質合成装置としてのポリtRNA構造
大西耕二……………(237)

話 題

- ◎ 1995年 生命の起源・進化学会 会員名簿 ……(255)

“タンパク質合成系の起原”の特集にあたって
Preface to the Special Issue
on “ the Origin of Protein Synthesis Mechanism”

石神 正浩 (大阪府立大学総合科学部)

Masahiro Ishigami

(College of Arts and Sciences, Osaka Prefecture University)

生命の起原に至る化学進化の過程には、いくつかの重要な飛躍がみられる。化学進化によって地球上に蓄積された物質が集まって液滴を作り、外界から物質を選択的に取り入れたり、放出したりする開放系が形成されたときがその一例であろう。RNAのように自己複製出来るような高分子が出現した時点も、その一例である。今ではRNAが酵素類似機能をもつことがわかって、RNAだけで生物進化が始まったと考えられるようになってきている。その後、自己複製出来ないタンパク質がRNAと組んで生物進化を始め、生物の機能を飛躍的に増大させたと考えられる。この機構は生物の存在を安定化し、増殖能を増大させ、多様な生物の出現を可能にしたと思われる。タンパク質合成系の出現は生命の起原における大きな飛躍であろう。おそらくタンパク質合成系の出現がなければ、原始地球に出現した生物は、現在まで存続することが無かったと思われる。

タンパク質合成系がどのような過程で出現したかはまだよく解っていない。この特集では、タンパク質合成系の起原解明の糸口になると思われるさまざまな方面の研究を紹介していただいた。特に、新田至、上田卓也、野島高彦、渡辺公綱の各氏、遠藤弥重太、吉成茂夫の各氏など当学会会員以外の方にもご寄稿願って、充実した内容のものになった。ここに深く感謝する。

1995年12月11日

A Novel Factor- and Energy- Free Translation System Promoted by Tertiary Amines and Its Implications toward the Origin of the Translation System

I. Nitta, T. Ueda, T. Nojima and K. Watanabe

Department of Chemistry & Biotechnology, Graduate School of Engineering

University of Tokyo

7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.

Phone & Fax: 03-5800-6950

(Received/Accepted September 20, 1995)

ABSTRACT

We found that a high concentration (40-60%) of pyridine, an aromatic tertiary amine catalyst, is able to promote the translation on ribosomes without soluble protein factors or chemical energy sources. This novel translation system was called the pyridine system, which could produce oligophenylalanine with chain lengths of up to decamer and polylysine with chain lengths of around 40mer, depending on the corresponding templates, poly(U) and poly(A), respectively. In poly(UC)-dependent oligo(serine-leucine) synthesis, oligopeptides with a serine and leucine alternate sequence were the main products. The template dependency is most prominent at 60% pyridine, but not observed at 40 % or 50 % pyridine. The optimal temperature range of the reaction was rather wide between 30 and 60°C, which may reflect no requirement for temperature-sensitive soluble protein factors for the reaction. The ranges of the optimal concentrations of K^+ (200-500 mM) and Mg^{2+} (1-50 mM) in the pyridine system are also rather wide, quite different from those in the usual aqueous translation system.

The naturally occurring tertiary amines such as adenine and cytosine bases, also promoted the translation in the pyridine system, which suggests that these bases might have participated in such catalytic functions in the prebiotic stage of the living system. In addition, the ribosomes used in the pyridine system can be partially deproteinized by SDS, proteinase K or phenol, being similar to the results reported by Noller *et al.* using the fragment reaction [*Science* **256**, 1416-1419(1992)]. These observations may be connected with the origin of the translation system. We expect that the pyridine system will serve as a powerful tool for the study of the origin of life.

Viva Origino 23(1995)209-222

© 1995 by SSOEL Japan

芳香族三級アミンを用いた新規な生体外タンパク質合成系と その翻訳系の起源研究への意義

新田 至、上田 卓也、野島 高彦、渡辺 公綱

東京大学大学院 工学系研究科 化学生命工学専攻

〒113 東京都文京区本郷7-3-1

Phone & Fax: 03-5800-6950

はじめに

リボソームはタンパク質合成系において中心的な役割を果たしており、タンパク質合成系の起源を議論することは、すなわちリボソームの起源を議論すると言っても過言ではない。リボソームは1960年代ごろから研究され始め¹⁾、1970年代初頭には、リボソーム各機能の活性中心はリボソームRNA(rRNA)上に存在することを示唆する実験結果が得られ始めていた。例えば、30Sサブユニットの再構成において、いずれのリボソームタンパク質を取り除いても、活性の低下はあるものの、完全な失活には至らず²⁾、これに対し、バクテリオファージの一種であるコリシンE3により、16S rRNAのリン酸ジエステル結合を一カ所切断するのみで、翻訳活性は完全に失われた^{3, 4)}。このようにRNAが触媒作用をもつという、今日リボザイムと呼ばれる概念が最初に検討されたのは、RNAのスプライシングではなく、リボソームの分野であった。しかし、MullerやBuchner以来の「酵素すなわちタンパク質」という定説や、翻訳開始複合体を形成しておけば、RNase処理後もリボソームはペプチド合成能を失わないというRichらの実験により⁵⁾、rRNA自体に触媒活性があるという考えは、当時受け入れられなかった。

現在では、リボソームの機能にrRNAが直接関与することを支持する実験結果が数多く得られている^{6, 7)}。例えば、大サブユニットについては、tRNAやリボソームを不活化する抗生物質が、ドメインVの中央ループを中心に23S rRNAと直接相互作用していることが、フットプリント法などにより示されている⁶⁾。しかしながら、裸のrRNAのみで進行する反応は、翻訳のいずれの素過程にも見つかっておらず、16S rRNAフラグメントの抗生物質やtRNAとの

相互作用部位が、リボソーム小サブユニット中の16SrRNAと同様であることが報告されているのみである⁸⁾。

タンパク質合成系のメカニズム解明を目的として、タンパク質合成系を単純化したモデル系が多数提出されてきた^{9, 10)}。それらの中でもSpirinらによる非酵素的翻訳系¹¹⁾やMonroらによるフラグメント反応系¹²⁾は、構成要素が少なく(前者は可溶性タンパク質因子を必要とせず、後者は大サブユニットとアミノアシルtRNAの3'末端のフラグメントから構成されている)、タンパク質合成系でのrRNAの働きを検討するために使用されてきた。我々も、これらモデル系を利用して、rRNAを主とするタンパク質合成系の構築を目指したが、成功には至らなかった。そこで、我々は、これらのモデル系は所詮、現存のタンパク質合成系を単純にしたに過ぎず、rRNAがリボソーム機能を担っていることを検証するには、大胆な発想に基づく新たなアッセイ系の確立が不可欠であると考え、従来とは全く異なった発想に立って、新規な生体外タンパク質合成系を構築した。本報では、この合成系の概要を紹介したのち、rRNA機能の証明につながると考えられる実験結果を報告し、他の研究者による結果と併せて議論したい。

有機溶媒を用いた生体外タンパク質合成系

我々は、ピリジンと水から構成される、有機溶媒:水の混合系において、可溶性タンパク質因子やATP、GTPを一切必要とすることなく、大腸菌のリボソーム上で¹⁴C]Phe-tRNAから鋳型ポリ(U)特異的に、Pheのオリゴマー合成反応が進行することを発見した¹³⁾。図1に示すように、ピリジンを含む反応溶液を37℃で

Component	Concentration
Ribosome	257 pmol/mL
[¹⁴ C]Phenylalanyl-tRNA	3,000 pmol/mL
mRNA	0.4 mg/mL
MgCl ₂	15 mM
KCl	120 mM
pyridine	40 - 60 % (v/v)

↓
Incubated at 37 °C for 30 - 60min

↓
deacylation by alkali

↓
Measurement of radioactivity incorporated into the products

Fig. 1. Components of the reaction mixture and an experimental procedure of the pyridine system.

30～60分インキュベート後、アルカリ処理によってtRNAからペプチドを脱離させ、生じたペプチドをシリカゲルの薄層クロマトグラム(TLC)上でブタノール：酢酸：水(4:1:1)の溶媒で展開すると、図2に示すパターン(レーン5～9)が得られた¹³⁾。対照として従来の水溶液中での反応産物が同様にレーン1～4に示されている。

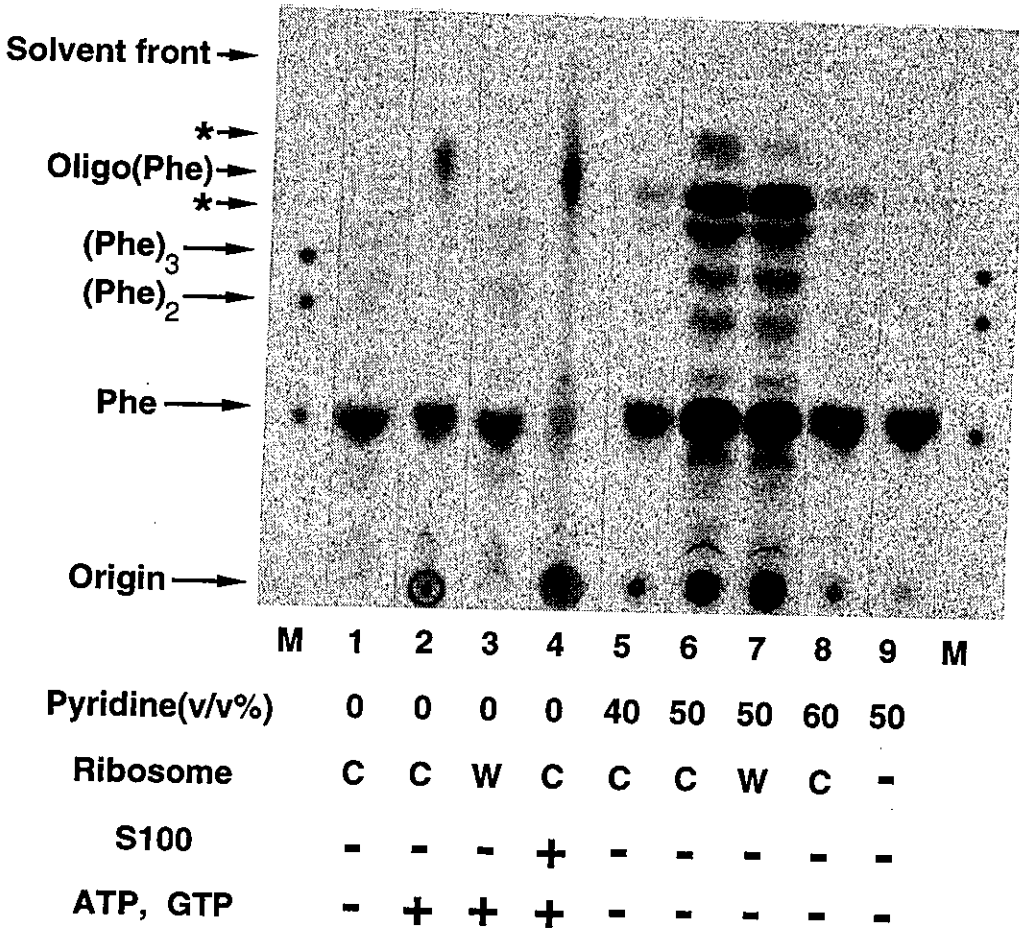


Fig. 2. Poly(U)-dependent oligophenylalanine synthesis in aqueous and pyridine systems. The radioactivities were detected by an imaging plate(Fuji Photo Film). The mixture of non-labeled mono-, di- and tri-phenylalanine was developed simultaneously(lane M). After the spots were stained by ninhydrin, [¹⁴C]Phenylalanine was added to them for visualization. Asterisks signify unidentified by-products produced in the pyridine system. (from Ref. 13 with a minor modification.)

水溶液反応ではレーン2 [リボソーム粗画分(Cはcrudeの略)とATP、GTPが存在] とレーン4 [リボソーム粗画分、可溶性タンパク質因子画分(S100)およびATP、GTPが存在] だけにPheのオリゴマーの生成が見られる。レーン3には、バックグラウンドレベルの2および3量体のみが検出されることから、塩で洗ったリボソーム(wはwashedの略)ではS100が脱離してしまうため、僅かなタンパク質合成が進行するのみであるが、リボソーム粗画分にはS100が内在しているためレーン2では新たにS100を添加せずとも、反応が進行することが分かる。レーン1はSpirinらによる非酵素的翻訳系に対応しているが、レーン3と同様に、2および3量体のみが僅かに生成している。

一方、ピリジン系ではS100とATP、GTP非存在下で、リボソームも粗画分(C; レーン5、6、8)か塩で洗浄したもの(w; レーン7)かに関わらず40~60%のピリジン添加によって反応が進行し、特に50%ピリジン存在下で生産性は極端に上がっている(レーン6、7)。こうして、ピリジンは可溶性タンパク質因子とリボソーム上のペプチド合成に必要なエネルギーとの両方に代わって、ペプチド合成反応を促進する活性をもつこと、そして、その効率は非酵素的翻訳系に比べて極めて高いことが明らかとなった(収率に関する定量的な議論は後ほど行う)。

そこでまず最初に生じる疑問は、このピリジン系が果たして従来の水溶液系と同じ機構でペプチド合成反応を行っているかである。これは大腸菌を初めとする原核生物のタンパク質合成を阻害する抗生物質である、クロラムフェニコール(Cm)、ピューロマイシン(Pm)、カナマイシン(Km)が、ピリジン系の合成反応をも阻害するという実験結果から保証された¹³⁾。また、真核生物のタンパク質合成系を阻害するシクロヘキシミドによっては、水溶液系と同様にピリジン系も阻害されない。従って、従来の水溶液系に比べピリジン系は極めて単純化されているものの、基本的な合成メカニズムは両者で同じであると考えられる。

次にこの反応が鑄型特異的であるか、またどの程度の長さのペプチドが合成されるかについて検討した。図2と同様のアッセイ系で、ポリ(U)またはポリ(A)を鑄型にした実験では、まず鑄型特異性はピリジン濃度に依存して大きく変化することが分かった¹⁴⁾。鑄型特異性は60%ピリジン下で最も顕著に観

察され、Pheではポリ(U)が存在する時だけ、Lysではポリ(A)が存在する時だけそれぞれの取り込みが促進されることが確認された。Pheの場合、40%や50%ピリジン下では鑄型の有無に関わらず取り込みは同程度起こり、鑄型依存性は全く見られなかった。Lysの場合では50%ピリジン存在下でもわずかな鑄型依存性が観察された。一方ペプチド合成活性はどちらの場合もピリジン濃度が50%の時が最も高く [Pheの場合の収率(インプットの放射エネルギーに対する2量体以上のペプチドの放射エネルギーの比)は70%]、それより高濃度でも低濃度でも活性は極端に低下した(Pheの場合、60%と40%のピリジン存在下の収率はそれぞれ36%と42%)。

このような反応で得られたペプチドをODSカラムのHPLCにかけアセトニトリル:水のグラジエントで溶出し、それらの溶出位置を市販の鎖長既知のオリゴマーやポリマーと比較すると、Pheの場合は約10量体までが検出されたのに対し(それ以上の鎖長のものはおそらく疎水性が強く、HPLCの溶媒に不溶と思われる)、Lysでは40量体付近に大きなピークが観察され、100量体以上まで産物の分布が確認された。こうして、ピリジン系においても十分長いペプチドを合成可能なことが証明された¹⁴⁾。

さて、ポリ(U)やポリ(A)を鑄型に使う限り、正確な読み枠で翻訳反応が進行することを検証することはできない。そこで読み枠が交互に入れ替わるポリ(UC)を用いてこの問題を検討した¹⁴⁾。読み枠が正しければ、反応産物はSerとLeuが交互に配置されたペプチドとなるはずである¹⁵⁾。 [¹⁴C] でラベルしたSer (以下Sと略す) とLeu (以下Lと略す) をポリ(UC)を鑄型として取り込ませたペプチドを、ODSカラムのHPLCで鎖長に従って分離すると、2量体としてはL-SとS-Lがほぼ等量得られたが、L-LとS-Sはバックグラウンド量しか検出されなかった。3量体以上の分画はまとめてSerのN末側ペプチド結合のみを限定的に加水分解する方法で処理する¹⁶⁾。もしもとの試料がS-Lのコポリマーのみでできていれば、この処理により生じる反応産物は3量体L-S-LとS-L-Sから生じるモノマーLとS以外は、S-Lの2量体だけのはずである。初めと同じHPLC分析によって予想通りS、L、S-Lの3つのピークが検出された他は、L-S、S-S、L-Lの2量体やそれ以上の長さの多量体を示すピークは全く検出されなかった。このようにしてピリジン系のペプチド合成反応は鑄型特異

的であることが実証された¹⁴⁾。

以上の実験結果を総合すると、ピリジン系のペプチド合成反応は基本機構として従来の水溶液中の合成反応と何ら変わりのないことが明らかとなった。しかしピリジン系の反応条件には、以下に述べるような著しい特徴がある。まず最初はピリジン系での合成反応の温度依存性である。

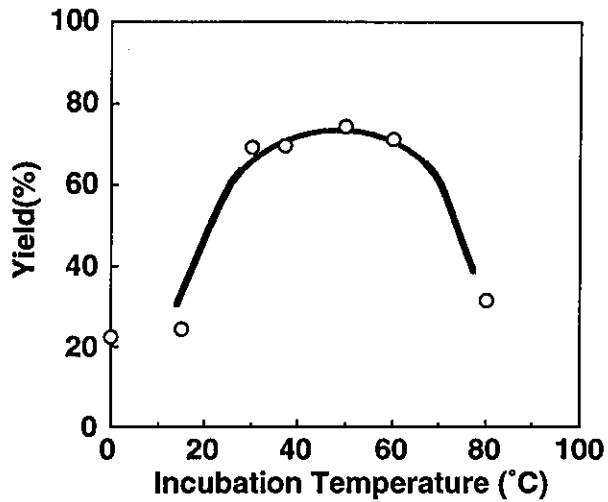


Fig. 3. Relation of yield of the products with incubation temperature in the pyridine system.

図3に示すように、通常の水溶液中の反応では急激に合成活性が低下する40°C以上でもピリジン系では全く低下が起こらず30~60°Cの範囲で殆ど同じ活性を示した。これはピリジン系では熱に不安定な可溶性酵素因子が不要なことをよく反映する現象であり、またこの系の応用面での可能性という点でも、大変有利な性質といえよう。

反応系のカチオン濃度依存性も水溶液系とピリジン系では大きな違いがある。従来の水溶液系ではカチオン濃度依存性は極めて顕著で、 Mg^{2+} が10 mM前後、 K^+ または NH_4^+ が150 mM前後の時、合成効率が最大となるのが普通である¹⁷⁾。これに対しピリジン系では図4に示すように、これらカチオンの濃度はあまり合成効率に影響を与えない。 K^+ 濃度の上昇に従って効率は緩やかに増加するがこの傾向は150 mM程度まで続き、それ以上の濃度でも効率の顕著な低下は見られない。 NH_4^+ は、むしろ反応を阻害する。 Mg^{2+} 濃度については、1~5 mMの範囲で効率は変わらず50 mMまでほぼ一定であるが、EDTAでキレートすると合成活性は完全に失われるので極く微量の Mg^{2+} はペプチド合成に必須であるといえる。

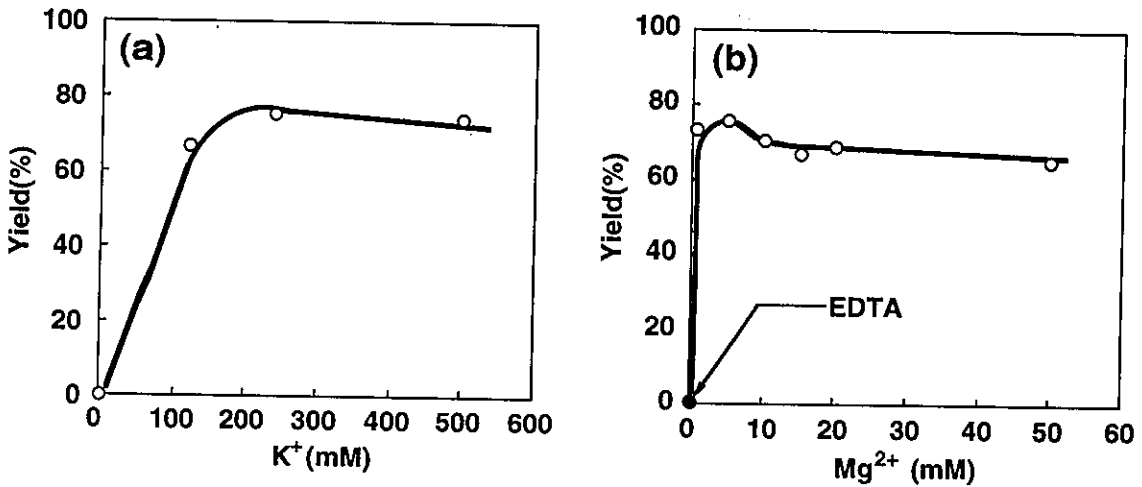


Fig. 4. Effects of K⁺ (a) and Mg²⁺ (b) concentrations on the pyridine system.

リボソームの活性中心とRNAワールド仮説

ピリジンは最も簡単な芳香族三級アミンであり、芳香族三級アミン類は広く求核置換反応を触媒することが知られている¹⁸⁾。そしてタンパク質合成の重要な素過程であるペプチド結合形成反応は、リボソーム上で進行する典型的な求核置換反応であり、ピリジンはこの反応を促進していると考えられる(図6参照)。我々はこの考え方をさらに進め、プリン、ピリミジン、さらにアデニンやシトシンなどの核酸塩基も同様の効果を有することを見出した¹⁹⁾。図5には、核酸塩基類としてアデニン、グアニン、シトシン、チミンそしてウラシルを用い、これら核酸塩基類の濃度の上昇と共にタンパク質合成が促進されるか否かを示したものである。なお、アデニンおよびグアニンの飽和溶解度は、それぞれ5および0.5mMである。この図より、アデニンとシトシンは促進効果を有していることがわかるが、これらの塩基にはピリジンと同様、分子内に芳香族性の窒素(図の構造式中○で囲んだもの)が存在している。一方

この窒素をもたないチミンやウラシルでは促進効果は殆ど見られない。この結果は、原始タンパク質合成系ではRNAを構成する核酸塩基類の芳香族性窒素がその反応の促進に直接関与していた可能性を暗示するものであり、RNAワールド仮説²⁰⁾を支持するものではないかと考えられる。

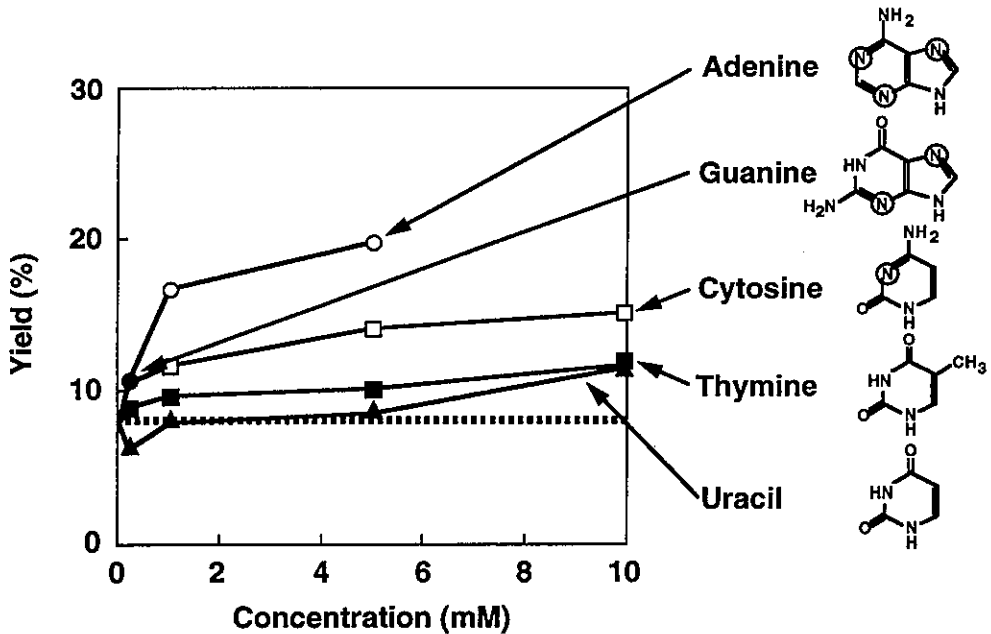


Fig. 5. Yields of polyphenylalanine at various concentrations of nucleobases. The broken line represents the yield in the absence of bases(from Ref. 19 with modifications).

同じような方向の実験結果は、NierhausらやNollerらによっても報告されている。Nierhausらは、大サブユニットの試験管内再構成技術を駆使することにより、ペプチド結合形成反応に必要な大腸菌大サブユニットの最小構成要素はL2~L4、および23S rRNAであると結論している^{21, 22)}。彼らは、23S rRNA以外にL2も重要と考えており、RNAワールド仮説を考慮しながら、慎重に検討を進めている²³⁾。いずれにしても、rRNAは必須であるのに対しリボソームタンパク質はほとんどすべてのものが無くてもすむことから、ペプチ

ド結合形成反応の活性中心がrRNA上に存在する可能性は高いといえよう。

Nollerらは、高度好熱菌のリボソーム大サブユニットに対し、SDS存在下でproteinase K処理後、さらにフェノールで入念に除タンパク質処理を行い、³⁵Sラベルにより定量した残存リボソームタンパク質量がわずかに5%となっても、ペプチド結合形成反応は全く失われなことを報告した⁷⁾。我々は、ピリジン存在下のタンパク質合成系であれば、同様に除タンパク質処理されたリボソームがタンパク質合成能をある程度保持することを確認した¹⁴⁾。大腸菌および高度好熱菌由来のリボソームを(a)SDS処理のみ、(b)SDS存在下proteinase K(PK)処理、および(c)フェノール処理したのち、このリボソームを用いて、ポリ(U)存在下ピリジン(60%)系でのポリ(Phe)合成活性を測定したところ、SDSのみの処理(a)では大腸菌、好熱菌のリボソームは共に殆どペプチド合成活性を低下させず、PK処理(b)でも好熱菌は80%、大腸菌でも34%の活性を残存させていた。しかしリボソームをフェノール処理すると大腸菌ではタンパク質が17%(280 nmと260 nmにおけるUV吸収の比から定量した²⁴⁾)残っているにも関わらず完全に失活した。一方好熱菌では24%のタンパク質が残存したりリボソームでは37℃でアッセイすると16%の活性を保持していたが、65℃のアッセイではわずか3%の活性を残すだけとなり、さらにフェノール処理を重ねるとどちらの温度でも完全に失活した。このときの残存タンパク量は10%程度である。なお、ピリジンが存在しないタンパク質合成系、すなわち非酵素的翻訳系の場合、SDS処理(a)の段階で既にリボソームは失活することから、ピリジン系はrRNA機能の解明に適した系と考えられる。図6にこれまで述べてきたピリジンによる翻訳システムの概略を示す。

以上挙げたような、リボソームの除タンパク処理によりどこまで蛋白質を除去しても翻訳活性が失われなことを検討する実験では残存タンパク質を完全に除去することは至難であるかも知れない。一つの可能性として、*in vitro*転写により得られたrRNAから出発してリボソーム機能のある活性型を組み上げる方法もあろう^{25, 26)}。この場合にはrRNAの修飾塩基が翻訳活性にどれほど関与するかという問題を同時に検討することにもなる。

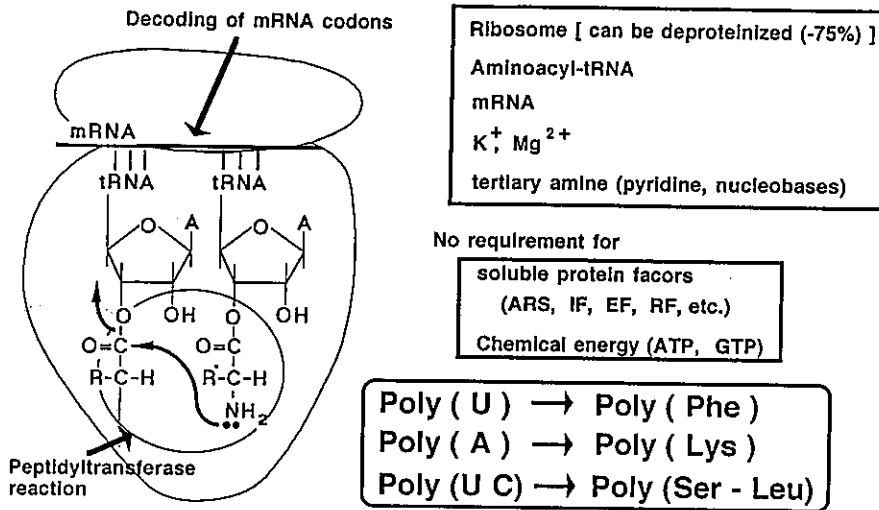


Fig. 6. Schematic drawing of the pyridine system.

おわりに

現在までのところ、リボソーム活性に全てのリボソームタンパク質は必要ないものの、rRNAのみで翻訳活性を発現させるまでには至っていない。リボソームタンパク質が翻訳活性に直接関与しているのか、あるいは単にrRNAの活性を発現させるような機能構造を組み立てるために必要なRNAシャペロンの役割を果たすだけのものなのか、今後解明すべき大きな課題である。本報で紹介したピリジン系がこの課題を解くための有力な手がかりとなり、さらには遺伝情報翻訳系の基本機構の解析に大きく貢献することを期待している。

文献

- 1) M. Nomura (1990) In W. E. Hill Eds., *The Ribosome; Structure, Function, Evolution.*, American Society for Microbiology, pp. 3-55.
- 2) M. Nomura, S. Mizushima, M. Ozaki, P. Traub and C. V. Lowry, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **34**, 49-61 (1969).
- 3) C. M. Bowman, J. E. Dahlberg, T. Ikemura, J. Konisky and M. Nomura, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **68**, 964-968 (1971).
- 4) B. W. Senior and I. B. Holland, *ibid.* **68**, 959-963 (1971).

- 5) E. Kuechler and A. Rich, *Nature* **225**, 920-924(1970).
- 6) H. F. Noller, *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 191-227(1991).
- 7) H. F. Noller, V. Hoffarth, L. Zimniak, *Science* **256**, 1416-1419(1992).
- 8) P. Purohit and S. Stern, *Nature* **370**, 659-662(1994).
- 9) G. Spedding, Ed., *Ribosomes and Protein Synthesis*, IRL Press(1990).
- 10) 新田 至, 上田 卓也 & 渡辺 公綱, *高分子* **44**, 604-607(1995).
- 11) L. P. Gavrilova, E. K. O, V. E. Koteliansky, N. M. Rutkevitch and A. S. Spirin, *J. Mol. Biol.* **101**, 537-552(1976).
- 12) R. E. Monro, *Methods Enzymol.* **20**, 472-481(1971).
- 13) I. Nitta, T. Ueda and K. Watanabe: *J. Biochem.* **115**, 803-807(1994).
- 14) I. Nitta, T. Ueda, T. Nojima and K. Watanabe: *J. Biochem.* in press.
- 15) S. Nishimura, D. S. Jones and H. G. Khorana, *J. Mol. Biol.* **13**, 302-324(1965).
- 16) P. Desnuelle and A. Casal, *Biochim. Biophys. Acta* **2**, 64-75(1948).
- 17) L. P. Gavrilova and A. S. Spirin, *Methods Enzymol.* **30**, 452-462(1974).
- 18) R. B. Wagner and H. D. Zook(1953) In *Synthetic Organic Chemistry*, John Wiley & Sons, pp. 479-532.
- 19) I. Nitta, T. Ueda and K. Watanabe: *J. Biochem.* in press.
- 20) 大澤 省三 & 志村 令郎, 編 (1990), *RNAの世界*, 講談社サイエンティフィク.
- 21) H. Schulze and K. H. Nierhaus, *EMBO J.* **1**, 609-613(1982).
- 22) F. J. Franceschi and K. H. Nierhaus, *J. Biol. Chem.* **265**, 16676-16682(1990).
- 23) K. H. Nierhaus, 私信.
- 24) O. Warburg and W. Christian, *Biochemische Zeitschrift* **310**, 384-421(1941).
- 25) W. J. Krzyzosiak, R. Denman, P. R. Cunningham and J. Ofengand, *Anal. Biochem.* **175**, 373-385(1988).
- 26) C. J. Weitzmann, P. R. Cunningham and J. Ofengand, *Nucleic Acids Res.* **18**, 3515-3520(1990).

STRUCTURE AND FUNCTION OF RIBOSOMAL RNA

Yaeta Endo and Shigeo Yoshinari

Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering
Ehime University, Bunkyou-cho 3, Matsuyama, 790 Japan

(Received/Accepted September 5, 1995)

ABSTRACT

Ribosomal RNA is one of the most highly conserved classes of macromolecules found in nature. This is most likely a consequence of its central importance in protein synthesis. The notion that rRNA is simply a scaffold for the assembly of ribosomal proteins has given way to a growing body of evidence which supports the opposite viewpoint: that it is rRNA, rather than the ribosomal proteins, that defines ribosome function. In this view, the fundamental mechanism of translation is based on interactions between mRNA, tRNA, and rRNA. Such a mechanism is consistent with the idea that translation evolved from preexisting RNA-based systems.

In this review, we begin by summarizing recent progress on the study of rRNAs. We then present our study on the mechanisms of action of ribotoxins and argue a possible involvement of the toxin domain in peptide elongation reaction. Finally, Noller's recent discovery is presented, that suggests rRNA is an ribozyme catalyzing transpeptidation.

KEY WORDS: ribosomal RNA, peptide elongation cycle, functional domains, hybrid site model, ribotoxin, toxin domain, RNA switch

リボソームRNAの構造と機能

— ペプチド鎖伸長過程を中心として —

遠藤 弥重太、吉成 茂夫

愛媛大学工学部応用化学科
〒790 松山市文京町3番

1. はじめに

遺伝情報の翻訳過程は100種類以上の高分子が関与する複雑な生化学反応から成り立っている。蛋白質合成反応には、まず、素材となる20種類のアミノ酸と、そのおのおのに対応する転移RNA(tRNA)、アミノアシルtRNA合成酵素、およびアミノ酸の結合順序を指定するメッセンジャーRNA(mRNA)が必要とされる。tRNAはペプチド結合の生成に必要な高エネルギーの活性アミノ酸の担体としての役割と、遺伝暗号解読のアダプターとしての機能を合わせもっている。

リボソームは翻訳装置の本体であり、1~3分子のリボソームRNA(rRNA)と数十種類のリボソーム蛋白質(r-蛋白質)から構成された、大、小亜粒子からできている。小型の大腸菌リボソームでも、50種あまりのr-蛋白質と3種類のrRNAからなるRNA・蛋白質複合体(RNP)の巨大分子である[Fig.-1]。ほかにも蛋白質合成の各過程に種々の因子が関与する。このように、蛋白質合成システムは、生体の複合高分子系のなかでも最も高度に組織化されたものであり、このことが遺伝情報翻訳反応の正確性、高速性、さらには翻訳レベルにおける制御を保障している。

本稿では、これまでに明らかにされているペプチド鎖伸長過程におけるrRNAの構造と機能の関係について、筆者らの見いだした毒素ドメインも含めて概説する。

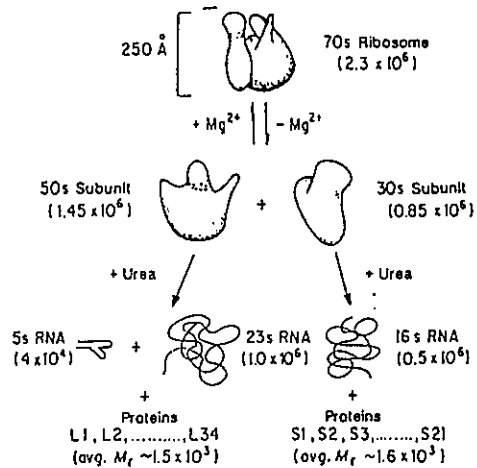


Fig.-1 The macromolecular composition of the ribosome from *E. coli*.

2. リボソーム研究

蛋白質合成反応の研究は1955年ごろから本格的に開始され、アミノ酸活性化酵素の発見、無細胞蛋白質合成系の開発、遺伝暗号の解読などが続き、1970年頃にはその大要がほぼ明らかにされた¹⁾。しかし、リボソームの機能的な実体が、“ポリペプチドポリメラーゼ”であると確信されるようになったのは比較的遅く、1960年の半ばであった²⁾。初期のリボソーム研究は、超遠心機や電子顕微鏡を用いた粒子構造の解析が行なわれ、ウサギ網状赤血球にリボソームが発見されたのは1963年である。その後、ネガティブ染色法、免疫電顕法が導入され、中性子散乱法や現在も進行中のX線結晶解析法へと進んで行くことになる。ごく最近になって、水中に包埋したリボソームの低温電子顕微鏡 (cryo-electron microscopy) 像4300枚をもとにした大腸菌リボソームの3次元構造モデルが発表された³⁾。このモデルによれば、30S亜粒子にはmRNAの通路となると思われるチャンネル、50S亜粒子には新生ポリペプチド鎖が通過すると考えられる二又に分かれたトンネルが存在しているらしい。今後の解析より、このモデルの妥当性とともによりリボソームの機能構造の実体が明らかにされることが期待される。

他方では、1960年頃からポリアクリルアミドゲル電気泳動法の開発など、生化学的手法が発展し、リボソーム成分の分析や試験管内再構成といった研究が主流になるにつれ、リボソーム研究という意味も、その構成成分の研究を主としてさすようになった。DNA技術の確立した1980年ごろには、大腸菌はもとより、種々の生物のリボソームの蛋白質とRNA成分の1次構造がDNAの塩基配列をもとに決定された⁴⁾。リボソームの構造と機能に関する研究は、生化学者の中心課題であったが、巨大なRNP分子を解析する有効な手段がみつからなかったことから難行した。リボソーム機能の基本的な担い手は蛋白質かRNAか？野村真康らによる大腸菌リボソーム30S亜粒子の再構成の成功(1968年)は、リボソーム研究の一大エポックであった⁵⁾。しかし、どのr-蛋白質も翻訳反応の部分活性を保持していないことや、どの成分を欠いても活性な粒子が再構成されないことなどが判明し、当初の期待にもかかわらず機能構造の解明には直接的には結びつかなかった。同時期、バクテリオシンの一種であるコリシンE3の作用機作が解明された⁶⁾。すなわち、大腸菌30S亜粒子中の16S rRNAの3'末端側の特定部位の1個のリン酸ジエステルを加水分解し、リボソームを不活性化するということがあった。しかしながら、当時は、rRNAの機能が注目されることはなかった。“酵素は蛋白質からできている”という、MulderやBuchner以来の常識からして、リボソーム機能もまた、r-蛋白質が主役を演じているものと信じ込まれていたからであろう。ところが、1980年代になって、rRNAの構造や機能の研究成果の発表が相次ぎ¹⁾、またリボザイムの発見^{7,8)}とも相まって、リボソーム機能の主役はr-蛋白質ではなく、rRNAが担っているものと確信されるようになってきた⁹⁾。

3. リボソームRNAの構造

大腸菌の大分子rRNAの全1次構造は遺伝子 (rDNA) の塩基配列から演繹され、16S rRNAは1542個、23S rRNAは2904個のヌクレオチド残基からなっていることが、Nollerらによって明らかにされた¹⁰⁾。修飾ヌクレオチド部位はrRNAのフィンガープリント法により決定された。5S、5.8S rRNAのような小分子rRNAの構造研究は進んでいるものの、翻訳機能との関連性については依然として不明の点が多いことから、本稿では触れないことにする。

Vasilievらは除蛋白質処理した大腸菌16S rRNAが、もとの30S亜粒子ときわめてよく似た構造をとっていることを電顕観察から見いだし¹¹⁾、この発見が刺激となって2次構造の解析が加速した。分子内の単鎖、重鎖や近接度は、化学修飾剤、リボヌクレアーゼおよび架橋剤を用いて調べられ、1983年には16S、23S rRNAの2次構造モデル構築に関する総説が、Woese, Brimacombe, Ebel, Nollerらの研究室から独立して発表された²⁾。これらのモデルは、微生物、植物細胞、動物細胞、さらにはミトコンドリアなど細胞内小器官由来のrRNAを対象としたものであるにもかかわらず、いずれも酷似したものであった。16S rRNA (および18S) はドメインI~IIIに、また23S rRNA (および28S) はドメインI~VIの構造単位に区分される¹⁰⁾。rRNAの1次構造の類似性が種間で低いということを考えると、2次構造に見られる高い相同性は大きな驚きであったらしい¹²⁾。蛋白質の構造については、種間での類似性がそれほど高くない、ということを考えあわせると、rRNAがリボソーム機能の基本成分であることを強く示唆している。

4. ペプチド鎖伸長におけるリボソームRNAの機能構造

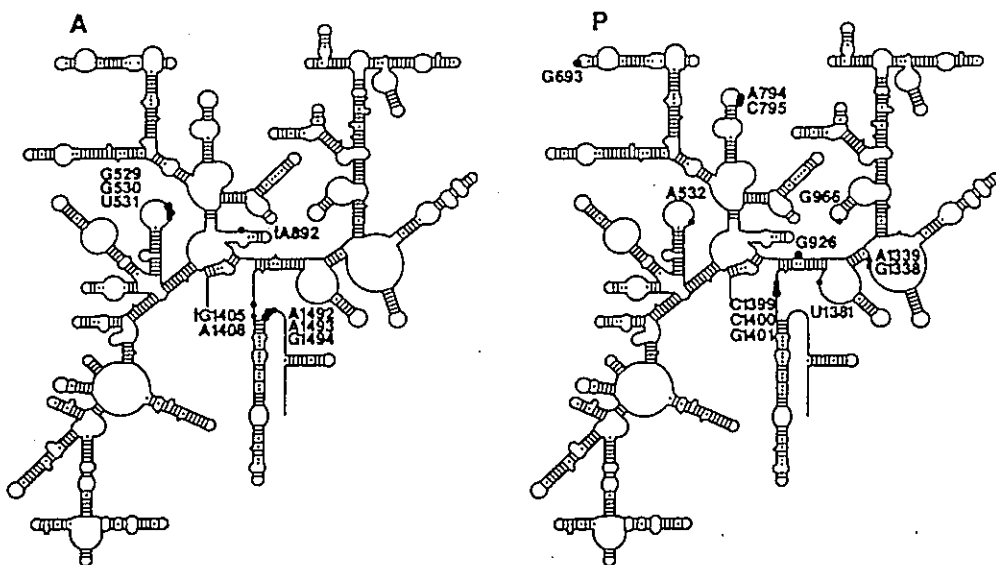
ペプチド鎖伸長反応は3つの素過程、すなわち、①コドン・アンチコドン認識、②ペプチド合成、③トランスロケーションに分けて考えることができる。mRNAとtRNAの相互作用は3塩基(うち1個はWobble対でとくに弱い結合)で行われるため、生理的温度条件下では本質的に不安定である。対合塩基数がこれより多いと、コドン・アンチコドン認識が安定化するために翻訳の正確性は増すものの、翻訳速度は低下することになる。この相反する問題を解決している装置がリボソームである。さらに、リボソームなしでは②の過程は進行せず、また、③の過程では、ペプチド結合生成後にmRNA・tRNAとリボソームが正確に3塩基だけ一方向へ相対移動する(ここではフレームシフトによる翻訳制御は除く)。このようなペプチド鎖伸長反応の分子機構はどのようになっているのでしょうか? また、酵素学における基質や生成物の結合部位から由来する概念的なりボソームのA部位、P部位、E部位の構造上の実体はどんななものでしょうか?

4-1. tRNAとrRNAの相互作用部位

a. tRNAと16S rRNA (コドン・アンチコドン認識に関連する部位)

Nollerらは30S亜粒子(以下、特別にことわらない限り大腸菌リボソームを指す)を温和な条件下で塩基修飾剤(ケトキサル)と反応させるとtRNA受容能が特異的に消失すること、またこの障害が16S rRNAの修飾に起因することを先に見いだしていた¹³⁾。この発見が契機となって、彼らは蛋白質のrRNA分子上の結合部位を同定する目的で開発したフットプリント法^{1,14)}を用いて、tRNAや抗生物質などのリガンドのリボソームへの結合によって修飾剤の攻撃から保護されるrRNA部位の解析を次々で行なった¹⁰⁾。Nierhausらは長年にわたる結合実験から、リボソーム亜粒子にはアミノアシルtRNA(aa-tRNA)を受容するA部位、ペプチジルtRNA(pep-tRNA)の類似体として*N*-アセチル-Phe-tRNA(Nac-Phe tRNA)を受容するP部位、およびデアシル化したtRNAを受容するE部位の少なくとも独立した3部位の存在することを明らかにしていた¹⁵⁾。Fig. 2 (A)は、70SリボソームにPhe-tRNA(A部位結合)またはNac-Phe-tRNA(P部位結合)を結合させた後、フットプリント実験を行ない、16S rRNAの2次構造モデル上の両リガンドで保護される部位を示したものである¹⁶⁾。A、

(A)



(B)

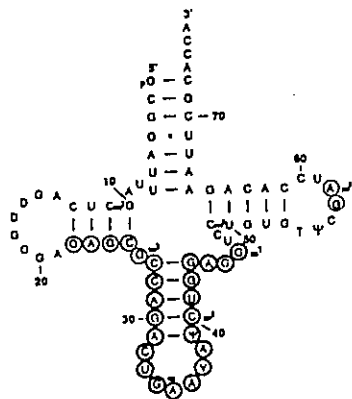


Fig.-2 Protection from chemical modification.

(A) Bases in 16S rRNA that are protected from tRNA.

A : tRNA in A site, P : tRNA in P site

(B) Protection of backbone ribose residues in tRNA by 30S ribosomal subunits. Protected residues from hydroxyl radical attack are circled.

P-フットプリントパターンに明らかな違いのあることがわかる(30S亜粒子にE部位は存在しない¹⁵⁾)。これら保護されるヌクレオチド部位がA、P部位の機能ときわめて密接にかかわっている(または、その構造部位そのもの)ということをサポートする強い状況証拠が、別の特異的なリガンドである抗生物質などを用いた実験から得られている¹⁷⁾。すなわち、ストレプトマイシンなどリボソームのaa-tRNA受容能(A部位)を阻害する一連の抗生物質は、

aa-tRNAによるフットプリントパターンと、またカスガマイシンなどのP部位機能阻害型はNac-Phe-tRNAによるそれと、ほとんど同様な保護パターンを示した。さらに、30S亜粒子とtRNA^{Phe}アンチコドン部の15塩基断片(大腸菌および酵母由来)を用いた同様な保護実験でも、上記Fig.2(A)のA, Pに見られると同じようなヌクレオチドがフットプリントされた。また、tRNA側に着目すると、30S亜粒子のP部位に結合したtRNA^{Phe}は、アンチコドンステムループ部のリボースがOHラジカルの攻撃から保護される[Fig.2(B)]¹⁸⁾。16S rRNAのフットプリント部位のなかでも、3'末端側(5'末端から1400~1500)に見られる部位は、アンチコドンのWobble塩基と架橋するC1400や、コリシンE3の作用部位であるA1493が存在し、コドン・アンチコドン認識に特に深くかかわる領域であろうと考えられる¹⁹⁾。

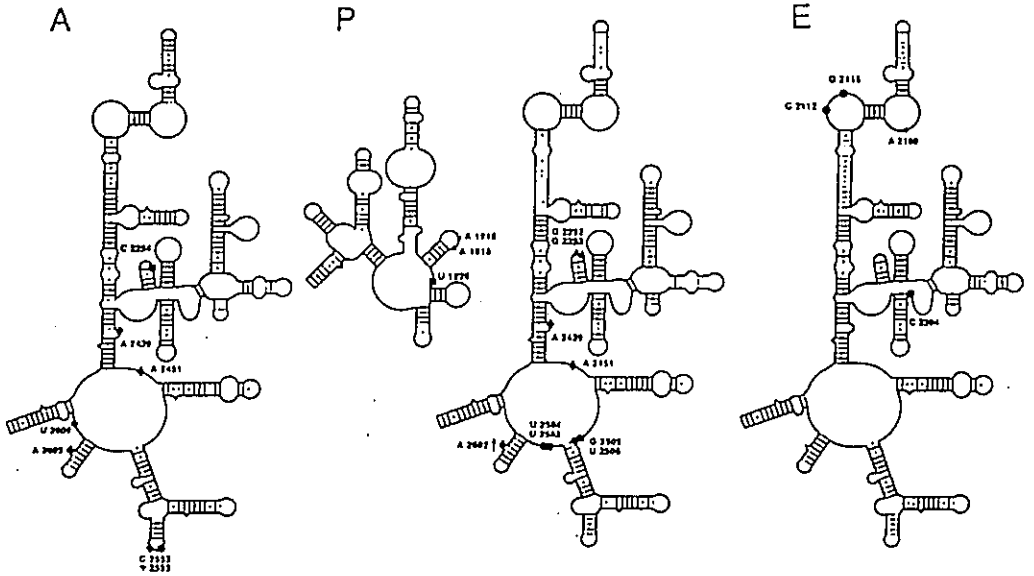
b. tRNAと23S rRNA (ペプチド転移に関与する部位)

tRNAの他端はアミノ酸を結合するCCA末端である。Nollerらは50S亜粒子についても上述と同様に、Phe-tRNA, Nac-Phe-tRNA, tRNAや抗生物質による23S rRNAの詳細なフットプリント解析を行なった¹⁰⁾。彼らの得た結果は、それまでに得られていた結合実験などの機能的な実験結果や、薬剤耐性株のrDNA変異解析の結果とよく一致するものであった。すなわち、各部位に結合したtRNAによる23S rRNA中のA-, P-, E-フットプリント部位はおもにドメインVに局在し、クロラムフェニコールなどペプチド転移活性阻害剤の耐性株の解析から名付けられたペプチジルトランスフェラーゼループ(2次構造上からはセントラルループとよばれる)の近傍に点在することである[Fig.3(A)]。

c. ハイブリッドサイトモデル (トランスロケーション)

Nollerらはペプチド鎖伸長反応におけるリボソーム-tRNA複合中間体についてフットプリント解析を行ない、これをもとに、tRNAとリボソームの相対移動に関する仮説を提出した[Fig.3(B)]²⁰⁾。ペプチド鎖伸長反応が1回転したポストトランスロケーション段階にあるリボソーム(図中a)のpep-tRNAは、30S, 50S亜粒子上のP部位に結合している(r-蛋白質との関連性は不明な点が多い)。aa-tRNA·EF·Tu·GTPの3重複合体は30SのA部位および一時的に50SのT部位(コドン・アンチコドン対合の構成にかかわると想定されている部位で、保護実験の結果は得られているわけではない)に結合する。何らかの機構で、コドン・アンチコドン対合が確認されると、GTPが加水分解し、EF·Tu·GDP複合体がリボソームから遊離し、pep-tRNAおよびaa-tRNAは両亜粒子のP, A部位で保持される(c)。ペプチド結合が生成すると、30S亜粒子上の部位はそのまま、デアシル化したtRNA, pep-tRNAは50S上のそれぞれE, P部位で固定される(d; ハイブリッド型)。EF·G·GTPの結合によって、tRNA, pep-tRNAはmRNAとともにリボソーム上を相対的に1コドン移動し、図中eの状態となって、サイクルが1回転したことになる。図中cからdの段階は、30Sと50Sが相対的にスライドするモデルも可能である。このモデルはすべての生物のリボソームが大小亜粒子からできていることの意味を説明しているかもしれない。このハイブリッドサイトモデルは翻訳反応機構を明らかにしていく上で重要な指針を与えるものと思われる。さて、このモデルの正当性は別としても、伸長因子の働きのもとに機能しているペプチド鎖伸長反応は、リボソームのどのような構造によって支えられているのであろうか?

(A)



(B)

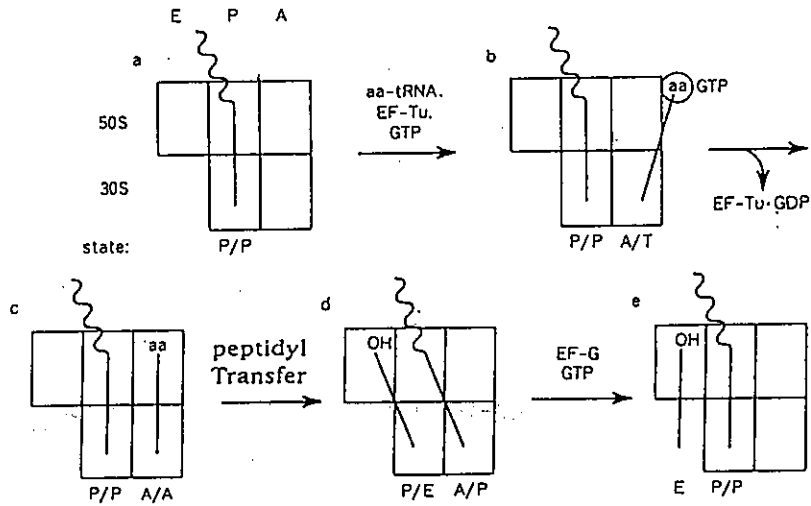


Fig.-3 (A) Protection of bases in 23S rRNA from chemical modification by binding tRNA to ribosomes in the A, P, and E sites.
 (B) Hybrid site model for the movement of tRNA during translation.

4-2. 猛毒に学んだリボソームRNAの機能構造

a. リボソーム不活性化蛋白質の分子機構

巨大分子の機能構造を探るには、抗生物質や毒素を利用するのも有効な方法である。筆者らは、2種類の細胞毒素蛋白質の作用メカニズムを解明することから、リボソームの機能構造の解析を試みた²¹⁾。ヒマの種子に含まれるライシン (ricin) は、昨年の夏の松本市、

b. 毒素ドメインの構造と機能 (RNAスイッチ仮説)

ペプチド鎖伸長反応には大きな活性化エネルギーの供給を必要とする過程が2カ所存在することが、NierhausらのtRNA結合実験で明らかにされている¹⁵⁾。aa-tRNA・EF-Tu・GTPと、EF-G・GTPがそれぞれ、リボソームのA、P部位へ結合する段階である[Fig.5 (A)]。この両過程は、反応の律速段階で、翻訳校正 (正確なコドン・アンチコドン対合) や、正確なヌクレオチド移動 (トランスロケーション) に重要な意味をもつものと説明されている。

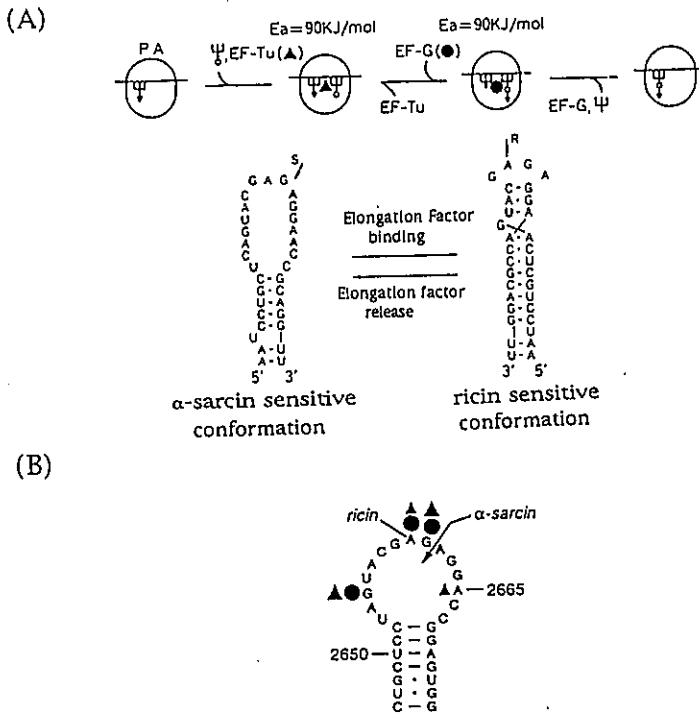


Fig.-5 (A) Possible conformational changes of the toxin loop during elongation process (RNA switch hypothesis).
 (B) The toxin domain of *E. coli* 23S rRNA, showing the sites of covalent modification by α -sarcin and ricin, and bases protected from chemical probes by EF-G (circles) and EF-Tu (triangles).

ペプチド転移反応は発エルゴンの的に進行する。Nollerらは大腸菌の毒素ドメインループ部に、伸長因子により保護される塩基が集中していることをフットプリント法を用いて明らかにした[Fig.-5 (B)]²⁵⁾。筆者らは、毒素ドメインを模した種々のRNAオリゴマーを作製し、ライシンと α -サルシンの基質特異性を検討した実験から、ライシンは毒素ドメインオリゴマーのほかGAGA4塩基ループのステムループ構造にも高い活性を示し、一方、 α -サルシンは毒素ドメインオリゴマーのみに活性を示すことを見いだした²¹⁾。すなわち、

両種の酵素は、RNAの高次構造を認識するということが判明した。また最近、リボソームを基質として用いた実験から、ライシンは伸長因子の結合したリボソームのみに活性を示す一方、 α -サルシンは伸長因子の結合していないリボソームにだけ活性を示すことを見いだしている(遠藤, 未発表)。最近、ラット28S rRNAの毒素ドメインオリゴマーの溶液中における構造がNMRによって解析された^{26,27,28}。17塩基のループ部は、ただ単なるループではなく、GAGA4塩基ループやバルジ・アウトG構造を含んだ特異な構造をとっていることが明らかになった[Fig.6]。さらに、RNAオリゴマーを用いた実験から、 α -サルシンの認識にはバルジアウトしたG [Fig.6 中のG10]が重要であるらしい (Gluckら, 論文投稿中)。これらの知見から、毒素ドメインは伸長因子の結合時にはライシン感受性へ、解離時には α -サルシン感受性へとそのコンフォメーションに変化を起こすことが示唆される[Fig.5 (A)]。

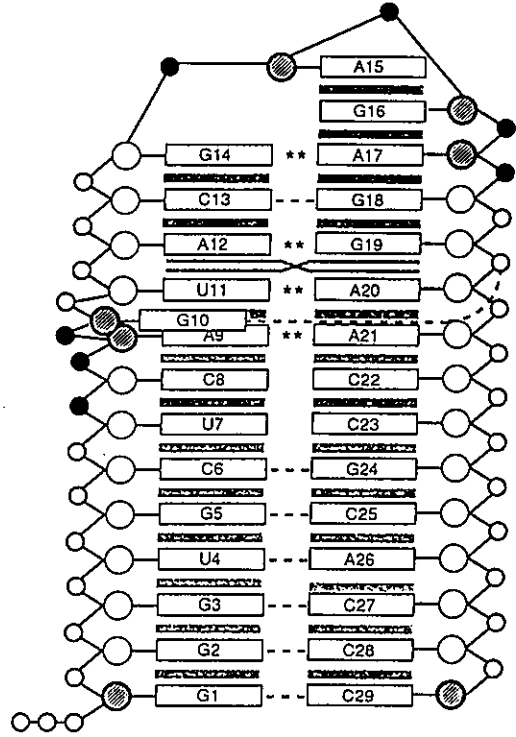


Fig.6 Schematic diagram of the toxin domain RNA oligomer.

5. リボソームRNAはペプチド合成を触媒する新型リボザイムであった

Monroらは、ホルミルメチオニルtRNAの3'末端側から切り出した5'-CAACCA・ホルミルメチオニン(リボソームのP部位に結合する)とピューロマイシン(aa-tRNAの類似体で、A部位に結合する)を大腸菌の50S亜粒子と33%エタノールの存在下で静置すると、ホルミルメチオニル・ピューロマイシンが生成することを見いだしていた²⁹。この反応はフラグメント反応と呼ばれ、30S亜粒子、mRNA、伸長因子さらにGTPも必要としない。この反応が報告されて25年間、多くのリボソーム研究者が50S粒子中のペプチジルトランスフェラーゼの正体を求めて実験を重ねたが、r-蛋白質にその活性を検出することはできなかった。Nollerらは、最近、23S rRNAそれ自体がペプチジルトランスフェラーゼであることをほぼ証明した³⁰。彼らは大腸菌や高度好熱菌から調製した50S亜粒子を材料として、種々の条件で除蛋白処理を行なったのちにフラグメント反応を用いてペプチド転移活性を調べた(Table-1)。驚いたことに、そのようにして単離した23S rRNAが50S亜粒子と同等な活性を保持していることが見いだされた。この活性が、クロラムフェニコールやカルボマイシンによって特異的に阻害されること、また、RNA分解酵素の処理によって消失することから、彼らは23S rRNAこそがペプチジルトランスフェラーゼの正体であろうと考えた。23S rRNA試料にr-蛋白質が数%程度検出されることから、論文の題目は慎重なものであったが、23S rRNAがペプチド合成を触媒する新型リボザイムであることは、“ほぼ”間違いのないことであろう。つい最近、新田らは、高濃度ピリジン存在下で、リボソームがボ

Treatment	Protein remaining (%)	Peptidyl transferase activity	
		cpm	percent
Control (no treatment)	100	1488	100
SDS, proteinase K, phenol x1	12	1308	88
SDS, proteinase K, phenol x2	7	1522	102
SDS, proteinase K, phenol x3	5	1638	110

Table-1 Peptidyl transferase activity in 50S subunits from *T. aquatica* after protein extraction

リ(U)依存のポリフェニルアラニン合成活性を示すことを見いだした³¹⁾。この系の特徴は、ATP、GTPなどのエネルギー源のほかにペプチド伸長因子も必要としない。この反応が、ピューロマイシンやクロラムフェニコールによって阻害を受けることから、ピリジンによって触媒されるリボソーム依存のポリペプチド合成反応であると結論した。さらに彼らは、ピリジンのほかに、アデニンやシトシンがこの反応を促進することを見だし、生命の誕生におけるRNA世界から蛋白質世界への転換における核酸塩基の重要性を指摘している³²⁾。

6. おわりに

リボソームRNAがその正体を現わしはじめ、アミノ酸の活性化に始まる蛋白質合成のすべての段階でRNAが中心的な役割を演じていることが確実となってきた。リボザイムの発見以来、RNAが遺伝機能と触媒機能の両方を有することから、生命誕生のキー物質であろうといわれるようになり、そのシナリオが語られるまでになってきた。すなわち、生命はRNAの支配するRNA世界から、RNP世界を経て、現在の生命形態のDNA世界へと進化してきた、というものである¹⁹⁾。RNA世界やRNP世界とは、原始rRNAや、原始リボソームの支配する原始生命世界であったということもできるであろう。リボソームの研究は、生命誕生の壮大なドラマの謎解きにもつながってきたようである。

引用文献

- 1) Moore, P. B. : *Nature*, **331**, 223-227 (1988)
- 2) Wittmann-Liebold, B., Kopke, A. K. E., Arndt, E., Komer, W., Hatakeyama, T., Wittmann, H. G. : in *The Ribosome* (eds. Hill, W. E., Dahlberg, A., Garret, R. A., Moore, P. B., Schlessinger, D., Waner, J. R.), pp.598-616, American Society for Microbiology, Washington, D. C. (1990)
- 3) Frank, J., Zhu, J., Penczek, P., Li, Y., Srivastava, S., Vershoor, A., Radermacher, M., Grassucci, R., Lata, K. M., Agrawal, R. K. : *Nature*, **376**, 441-444 (1995)
- 4) 鈴木克之・青山祐二・遠藤弥重太 : *蛋白質核酸酵素*, **38**, 1062-1074 (1993)
- 5) Traub, P., Nomura, M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **59**, 777-784 (1968)

- 6) Bowman, C. M., Dahlberg, J. E., Ikemura, T., Konisky, J., Nomura, M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 964-968 (1971)
- 7) Kruger, K., Grabowski, P. J., Zaug, A. J., Sands, J., Gottschling, D. E., Cech, T. R. : *Cell*, **31**, 147-157 (1982)
- 8) Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., Altman, S. : *Cell*, **35**, 849-857 (1983)
- 9) 遠藤弥重太: *現代化学*, **260**, 38-44 (1992)
- 10) Noller, H. F. : *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 191-227 (1991)
- 11) Vasiliev, V. D., Selivanova, O. M., Koteliansky, V. E. : *FEBS Lett.*, **95**, 273-276 (1978)
- 12) Gutell, R. R., Weiser, B., Woese, C. R., Noller H. F. : *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, **32**, 156-216 (1985)
- 13) Noller, H. F., Chaires, J. B. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 3115-3118 (1972)
- 14) Moazed, D., Stern, S., Noller, H. F. : *J. Mol. Biol.*, **187**, 339-416 (1986)
- 15) Nierhaus, K. H., Aldung, R., Hausner, T.-P., Schilling-Bartetzko, S., Twardowski, T., Triana, F. : *in The Translational Apparatus* (eds. Nierhaus, K. H., Franceschi, F., Subramanian, A. R., Erdman, V. A., Wittmann-Liebold, B.) pp.263-272, Plenum Press, New York (1993)
- 16) Moazed, D., Noller, H. F. : *Cell*, **47**, 985-994 (1986)
- 17) Moazed, D., Noller, H. F. : *Nature*, **327**, 389-394 (1987)
- 18) Huttenhofer, A., Noller, H. F. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7851-7855 (1992)
- 19) Noller, H. F. : *in The RNA World* (eds. Gesteland, R. F., Atkins, J. F.) pp.137-156, Cold Spring harbor Press, New York (1993)
- 20) Moazed, D., Noller, H. F. : *Nature*, **342**, 142-148 (1989)
- 21) Wool, I. G., Gluck, A., Endo, Y. : *TIBS*, **17**, 266-269 (1992)
- 22) Endo, Y., Mitsui, M., Motizuki, Y., Tsurugi, K. : *J. Biol. Chem.*, **262**, 5908-5912 (1987)
- 23) Endo, Y., Wool, I. G. : *J. Biol. Chem.*, **257**, 9054-9060 (1982)
- 24) Chan, F., Schachter, E. M., Rich, A. : *Biochim. Biophys. Acta*, **209**, 512-520 (1970)
- 25) Moazed, D., Robertson, J. M., Noller, H. F. : *Nature*, **334**, 362-364 (1988)
- 26) Szewczak, A. A., Chan, Y.-L., Moore, P. B., Wool, I. G. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 9581-9585 (1993)
- 27) Orita, M., Nishikawa, F., Shimayama, T., Taira, K., Endo, Y. : *Nucleic Acids Res.*, **21**, 5670-5678 (1993)
- 28) Szewczak, A. A., Moore, P. B. : *J. Mol. Biol.*, **247**, 81-98 (1995)
- 29) Morro, R. E., Marcker, K. E. : *J. Mol. Biol.*, **25**, 347-350 (1967)
- 30) Noller, H. F., Hoffath, V., Zimniak, L. : *Science*, **256**, 1416-1419 (1992)
- 31) Nitta, I., Ueda, T., Watanabe, K. : *J. Biochem.*, **115**, 803-807 (1994)
- 32) Ueda, T., Nitta, I., Watanabe, K. : *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **31**, 267-268 (1994)

原初蛋白質合成装置としてのポリtRNA構造：

プロトtRNAから原初的mRNAへの進化

大西 耕二

新潟大学理学部生物学教室

(950-21 新潟市五十嵐2の町8050)

要旨

枯草菌 *Bacillus subtilis* (BSU) の *trrND* オペロンは 5' [16S rRNA-23S rRNA-5S rRNA-(tRNA)₁₆] 3' の構造をもつ。このオペロンの長いRNA転写物の中の tRNA クラスター ("ポリtRNA構造") は 16 個の tRNA のタンDEM型配列から成り、そのアミノ酸特異性の配列順序は、"NSEVMDFTYWHQGCLL" である。このアミノ酸配列をもつ 16-アミノ酸残基長の仮説的原始ペプチドを考え、それに最も似た(蛋白質の)aa配列域を NBRF-PIR 蛋白質配列データベースからサーチすると、大腸菌 (*E. coli*) のグリシルtRNA合成酵素 (GlyRS) α サブユニットの 139-156番アミノ酸残基の配列域が見つかった。さらに解析したところ、GlyRS をコードする GlyS 遺伝子のほかにラン菌 *Synechococcus* 6301 の F₀-ATPase a subunit をコードする a 遺伝子もまた、

BSU *trrND* ポリ-tRNA域と相同であることが分かった。これらの発見は mRNA と遺伝コードの起源に関する「ポリtRNA学説」(Ohnishi, 1993a) の正しさを示すものである。すなわち、*trrND* poly-tRNA 域は、初期生命体において *trrND* -ペプチド様原始的ペプチドを合成するための原始ペプチド合成用 RNA 分子の痕跡(レリック)であることがほぼ証明された。ここに遺伝暗号起源論の最もパラドキシカルな難解部分が基本的に解決したものと思われる(大西, 1995a, b)。リボソーム RNA もまた、*trrND*-ポリ tRNA に由来することや、*trrND*-ポリ tRNA 構造そのものの起源についても論じた。

ポリtRNA学説を一般化した「ポリ-X学説」を提唱して、ポリ-X構造が数詞系などの一般のコーディング・システムの起源と進化において果たす一般進化論理について論じた。また、コドンとアミノ酸の対応関係の恣意性 (arbitrariness) とシニール言語学におけるシニフィエとシニフィアンとの対応関係の恣意性が、記号過程 (semeiogenesis) としての共通論理に基づいて進化した証拠を提示し、遺伝暗号起源論を記号学として解析することの重要性を喚起した。

POLY-tRNA STRUCTURES
AS EARLY PROTEIN-SYNTHESIZING RNA APPARATUS :
EVOLUTION FROM PROTO-tRNA TO MOST PRIMITIVE mRNA'S

Koji Ohnishi

Department of Biology, Faculty of Science, Niigata University,
Ikarashi-2, Niigata 950-21, Japan.

(Received/Accepted September 1, 1995)

Abstract. The *Bacillus subtilis* (BSU) *trnD* operon has a structure of 5' [16S rRNA-23S rRNA-5S rRNA-(tRNA)₁₆] 3', where (tRNA)₁₆ is a gene cluster consisting of 16 tandemly repeated tRNA genes (denoted by "poly-tRNA structure"). The ordering of amino acid (aa) specificities of these tRNAs in this poly-tRNA region is "NSE VMDFTYWHQGCLL". An ancient "*trnD*-peptide" possessing this aa sequence was hypothesized, and protein sequence regions similar to *trnD*-peptide were searched for from PIR Proein Sequence Database. The aa's 139-156 in the *Escherichia coli* Glycyl-tRNA synthetase (GlyRS) a subunit was found to be most similar to this peptide. Further analysis revealed that not only the *E. coli* GlyS gene encoding GlyRS a, but also the *a* gene of *Synechococcus* 6301 encoding F₀-ATPase a subunit, are both true homologues of the BSU *trnD* poly-tRNA region. These findings strongly support the recently proposed "poly-tRNA theory" (Ohnishi, 1993a) on the origin of mRNA and genetic codes. Thus it has now been concluded that the *trnD* poly-tRNA region is a relic of a most primitive RNA molecule capable of synthesizing a *trnD*-peptide-like primitive peptide in early life. The most paradoxical problem on the origin of genetic codes seems to have been basically solved from the aspect of poly-tRNA theory. Origin of rRNAs and poly-tRNA structures are also analysed.

Poly-X theory for the origin of general coding/informative systems is presented by generalizing poly-tRNA theory. The origin and evolution of arbitrariness in genetic codes was compared with that in language system, and discussed from an aspect of de Saussure's linguistical standpoint, suggesting that common logic underlies the evolution of both informative systems.

Key Words: poly-tRNA theory, origin of genetic codes, first codon, poly-X theory, arbitrariness,

1. Introduction

RNA emerged earlier than DNA, although it is yet unknown whether RNA first began to exist as a first replicating molecular organism in primitive soup-like environment, or whether it began as a replicator RNA-gene within early living protocell-organism (Ohnishi, 1990; 1992 a). Whichever of these alternatives might have occurred throughout evolution, RNA must have evolved as a replicator, which was either an individual RNA-organism or an RNA gene within a protocell-organism. A most important unsolved problem is how early RNA(s) had acquired peptide-synthesizing activity, or, how triplet-anticodons first came to be made. Transfer-RNA-like sequences have recently been found not only in various ribozymes and rRNAs (Bloch et al., 1983; Bloch & Staves, 1986; Ohnishi, 1990, 1992a,b), but also in mRNAs for several house-keeping enzymes (Ohnishi, 1990, 1992a,b). These strongly suggest that proto-tRNA in ancient era before the emergence of triplet genetic codes must have evolved to become a primitive mRNA. Based on these observations, a theoretical model ("poly-tRNA model", see Fig. 1) was made which is capable of explaining both the origin of anticodon-possessing tRNAs and the origin of primitive mRNA(s) consisting of triplet codons (Ohnishi, 1992c, 1993a,b). Anticodon-possessing-tRNAs and most primitive mRNAs must have co-evolved to emerge via their mutual interactions.

An RNA transcript from the *Batillus subtilis* (BSU) *trnD* operon has a structure of 5'[16S rRNA-23S rRNA-5S rRNA-(tRNA)₁₆] 3', where (tRNA)₁₆ is an array of 16 tRNAs with short spacers (shown in Fig. 1 A; Warousek et al., 1984). This tandem array of tRNAs (termed "poly-tRNA") has recently been proposed to be a relic of an early peptide-synthesizing RNA molecule (Ohnishi, 1992c, 1993a, b, c,d, 1994). The order of the 16 tRNAs is 5' [tRNA^{Asn} - tRNA^{Ser} - tRNA^{Glu} - ... - tRNA^{Leu}] 3'. The poly-tRNA theory states that this transcript was a large RNA molecule for making a hexadecapeptide, "NSEVMDFTYWHQGCLL" (termed "*trnD*-peptide"), in which the order of amino acids is determined by the order of amino acid specificities of these 16 tRNAs in the transcript (See Fig. 1 B). This hypothesis is further supported by the recent reports that amino acid sequence motifs very similar to *trnD*-peptide were found in the *E. coli* Glycyl-tRNA synthetase (Gly-RS) a subunit, the *Synechococcus* 6301 a gene encoding F₀-ATPase a subunit, and other ion channels (Ohnishi, 1993a,b,c, 1994).

In this paper, further evidences will be presented, substantiating not only that the *trnD* transcript is indeed a relic of *trnD*-peptide-making RNA, but also that the *trnD* poly-tRNA itself was an early mRNA from which contemporary mRNAs coding for various peptides such as Gly-RS a and F₀-ATPase a subunit had evolved. The fundamental problem concerning the origin of mRNA and the genetic codes has, most probably, been basically solved (1995a, b). We have, therefore, now reached a new situation well overlooking wider landscapes of an early RNA world. Origin and evolution of general informative and/or coding systems will also be discussed from a viewpoint of poly-tRNA theory.

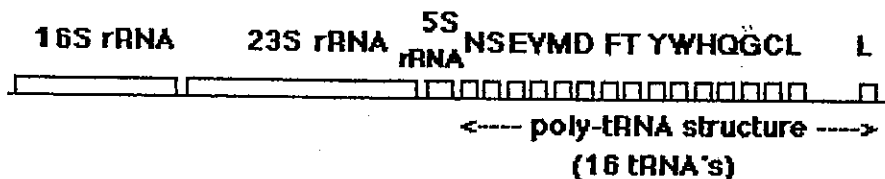
2. Poly-tRNA Theory

2.1. Theory and Methods

The base sequences of the BSU *trnD* operon (Warousek et al., 1984) was used for this analysis. A 48-base RNA, termed "*trnD*-mRNA", is an RNA hypothesized to be complementary to a 48-base RNA composed of the 16 triplet codons, in which the k-th

[A]

trrD operon (*Bacillus subtilis*)



[B]

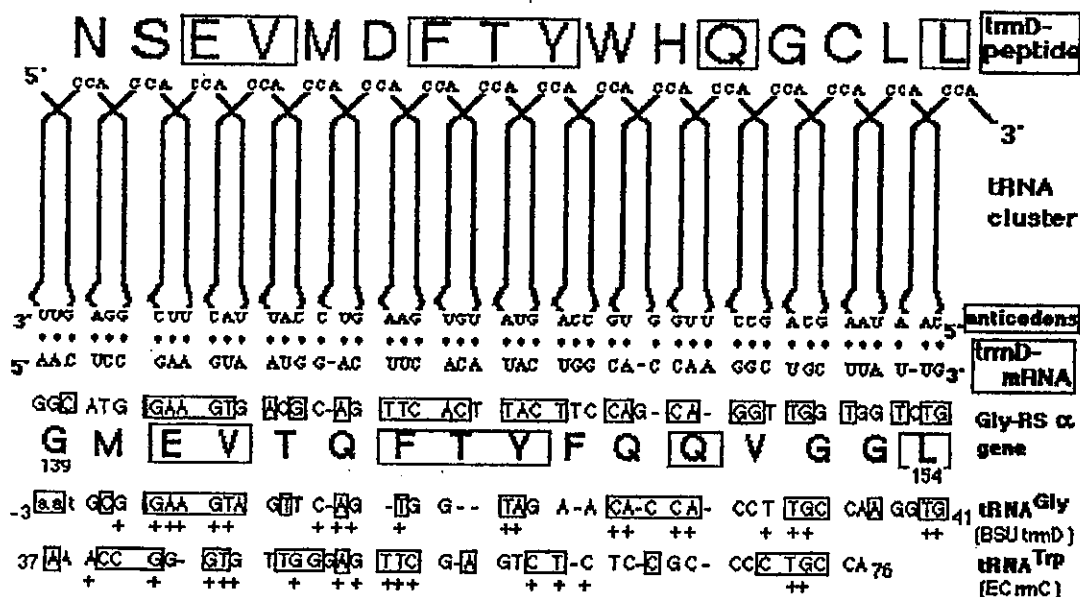


Fig. 1. [A] An RNA-transcript from the *Bacillus subtilis* (BSU) *trrD* operon is shown. Amino acid specificity of each tRNA in the poly-tRNA region is given in one-letter abbreviations. Poly-tRNA theory hypothesizes that this RNA transcript would be a relic of an RNA molecule capable of synthesizing a hexadecapeptide ("trrD-peptide"), NH₂NSEVMDFTYWHQGLL_{COOH}.

[B] Poly-tRNA model for early peptide-synthesis. Poly-tRNA region of the RNA-transcript in [A] is shown together with anticodons and 3'-terminal CCA's. Amino acid specificities of these tRNAs are given at the uppermost. An RNA complementary to the arrangement of the 16 anticodons in the order of tRNAs is shown as "trrD-mRNA", and base-pairings between anticodons and trrD-mRNA are indicated by asterisks (*). An *E. coli* GlyS gene segment (encoding trrD α subunit), tRNA^{Gly} gene in the trrD operon (BSU), and tRNA^{Trp} gene in The *E. coli* (EC) *trnC* operon are aligned against the trrD-mRNA. This alignment is based on the alignments given in Fig. 2 and Fig. 3. Base-matches to trrD-mRNA and translated amino acid-matches to the trrD-peptide are boxed, and base-matches to the GlyRS gene are indicated by "+". (Modified from Ohnishi, 1995a, c).

anticodon (3'X_kY_kZ_k5') is the anticodon of the k-th tRNA (tRNA_k) in the *trnD* transcript RNA (k = 1, 2, ..., 16), as shown in the scheme of Fig. 1. It is important to note that the k-th triplet codon (5'X_kY_kZ_k3') in this *trnD*-mRNA is complementary to the k-th anticodon 3'Z_kY_kX_k5' (in tRNA_k). The resulting base sequence of *trnD*-mRNA is shown in Fig. 1 and Fig. 2.

The *trnD*-mRNA is hypothesized to synthesize *trnD*-peptide by interacting with the anticodons in the poly-tRNA structure composed of primitive tRNAs, in such a way as shown in Fig. 1 (Ohnishi, 1992a, b; 1993a, c). The k-th primitive tRNA (denoted by tRNA_k) in the poly-tRNA structure could have interacted with an amino acid at their 3'-terminal "DCCA" (DCCA_k), where "D" denotes the so-called "discriminator" base-residue. And moreover, if DCCA_k is located near the k-th loose codon-anticodon complex [(X_kY_kZ_k / X_kY_kZ_k), consisting of the k-th codon and the k-th anticodon] in the most primitive state before the establishment of triplet genetic codons [as has been suggested by Shimizu's C4N theory (1982, 1992)], then these stereochemical interactions would have selected a specific amino acid (aa_k) suitable for interacting with DCCA_k. In the most primitive state in which the poly-tRNA was a mere repeat of proto-tRNA whose anticodon region was a common ancestral triplet (being 3'X'Y'Z'5', which is termed "proto-anticodon"), the anticodons, X_kY_kZ_k (k = 1, 2, ..., 16) are proto-anticodon triplets, X'Y'Z'. Therefore, base-exchange mutations in the k-th anticodon to such triplets more suitable for base-pairing with the corresponding k-th triplet codon (X_kY_kZ_k) would have generated more suitable interactions between the poly-tRNA and an early proto-tRNA-like-RNA (which was ancestral to the *trnD*-mRNA). These evolutionary steps might have occurred at the primitive P and A sites on a primitive ribosome consisting exclusively of rRNAs, because the contemporary *trnD* transcript possesses a complete set of the three rRNAs and 16 tRNAs, and further because peptidyl-transferase activity seems to lie on 23S rRNA (Steiner, G., 1988; Noller et al., 1992; Ohnishi & Tanaka, 1992).

Accordingly, *trnD*-mRNA-like gene segments encoding *trnD*-peptide-like amino acid sequence motifs in contemporary proteins are candidates for relics of most primitive peptide-encoding mRNAs. Sequence motifs similar to the *trnD*-peptide were searched for from the NBRF-PIR Protein Sequence Database, by employing a FORTRAN Program "HOMOPIR" made by the author. This program can output, from PIR Database, all n-amino acid-long sequence segments sharing m or more amino acids with any imputed n-amino acid sequence for any input value of n and m. Another FORTRAN program "HOMOGB", made by the author, was also used for searching from files of "GenBank Database" for similar sequence segments. This also outputs all n-base sequence segments sharing m or more amino acids with any imputed n-base sequence for any input value of m.

In the resulting alignment, base-match levels were statistically evaluated by

$$P_{\text{nuc}}(m, n) = \sum_{i=m}^n [n! / (i!(n-i)!)] (1/4)^i (3/4)^{n-i}. \quad \text{Here, } P_{\text{nuc}}(m, n) \text{ gives a probability}$$

that m or more base-matches are observed in an n-base alignment of two sequences, assuming equal occurrences of four different bases. $P_{\text{nuc}}(m, n)$ was computed as described before (Ohnishi, 1990, 1992a).

2.2. Results and Discussions

The search for *trnD*-peptide-like segments by "HOMOPIR" Program made a finding that the 16-amino acid sequence segment, aa's 139-154, of the *E. coli* GlyRS share seven identical residues with the *trnD*-peptide, as shown in Fig. 1 (Ohnishi, 1992a, c). Further search for similar sequence motifs in ion channels (Ohnishi, 1993b, c) has revealed that a sequence motif, aa's 27-39, in F_0 -sector a subunit from the *Synechococcus* 6301 (blue green bacteria) H^+ -ATPase (F_0 -ATPase) also shows a marked similarity to the *trnD*-peptide (Fig. 2).

Based on these findings, the *E. coli* *GlyS* gene encoding a and b subunits of GlyRS and the *a* gene encoding the F_0 -ATPase a subunit from *Synechococcus* 6301 were compared with the poly-tRNA region in the BSU *trnD* operon. Based on the preliminary findings of sequence similarities between *trnD*-mRNA and tRNA-like RNAs (tRNAs, 5S rRNA and U1 snRNA), the *trnD*-mRNA and the (*trnD*-peptide-like) motif-encoding DNA regions in *GlyS* and F_0 *a* genes were further compared with every tRNA gene in the *trnD* operon.

Among the 16 tRNAs in the BSU *trnD* operon, tRNA^{Gly} was found to show the highest base-match (58.1%) to the *trnD*-mRNA, giving $P_{nuc}(25,43) = 0.39 \times 10^{-5}$ (Fig. 2), and a 49.0% base-match to *GlyS* ($P_{nuc} = 0.25 \times 10^{-3}$). Based on these results, the alignment between the *trnD* tRNA^{Gly} region and the gene (DNA) segment of *GlyS* encoding the *trnD*-peptide-like motif in GlyRS a (aa's 139-154) (found in Fig. 2) was further extended to both the 5'- and 3'-directions, as shown in Fig. 3. This extension of alignment was accomplished by making cross-comparison of the nucleotide sequences and therefrom deduced amino acid sequences given in Fig. 3. Similar alignment was also made for the F_0 -ATPase a subunit gene, in its *trnD*-mRNA-like segment (encoding aa's 27-39) and the regions upstream to and down-stream to this region. Cross comparison of these *GlyS* and F_0 *a* genes and the *trnD* poly-tRNA region has resulted in the final alignment shown in Fig. 3. This cross comparison in Fig. 3 has permitted us to determine more reasonable gap-positions, and to refine the alignments in Fig. 1 and Fig. 2. In thus obtained final alignment of these sequences, base-match levels and P_{nuc} values are shown in Fig. 2. The *trnD*-mRNA was found to show a highest base-match, 63.8% ($P_{nuc}(30,47) = 0.22 \times 10^{-7}$) to *GlyS*, and a 51.2% match ($P_{nuc} = 0.20 \times 10^{-3}$) to tRNA^{Asn} gene in the *trnD*. The DNA region encoding aa's 27-39 in the F_0 *a* gene gives 52.5% ($P_{nuc} = 0.32 \times 10^{-3}$) and 51.4% ($P_{nuc} = 0.51 \times 10^{-3}$) base-matches to *trnD*-mRNA and *GlyS*, respectively.

In the alignment in Fig. 2, the triplet anticodons in the tRNAs (for Asn, Gly, Trp, Phe) correspond to 41 GCU 43 in *trnD*-mRNA, and to the 5' GGT 3' codons for Gly-152 in the *B. subtilis* *GlyS* gene and for Gly-172 in the *E. coli* *AlaS* gene. Close similarities are remarkable not only between *trnD*-mRNA and tRNA^{Gly} base-sequences (58.1%), but also between the "5' GCC 3'" anticodon in the *trnD* tRNA^{Gly} and "41 GCU 43" in *trnD*-mRNA. This strongly suggests a possibility that the first anticodon was "GCC" (or "GCU"), which is well conserved in contemporary Gly-(or Cys-)anti-codon. If 5' GCC 3' (or GCU) be indeed the first anticodon, then a most likely first codon would be 5' GGC 3' (or AGG) [which is a contemporary Gly-codon (or Cys-codon)], which well coincides with Eigen's

theory (Eigen & Schuster, 1979) that first codon was 5' RRY 3' (purine-purine-pyrimidine). Thus we can now conclude that the "5' GGC 3'" is a most plausible candidate for the first codon worth being further studied. The 5' CCA 3' anticodon in the tRNA^{Trp} gene in the *E. coli trnC* operon does not seem to be conserved in other RNAs in Fig. 2, and therefore, the previous hypothesis that "5' CCA 3'" was the first anticodon (Ohnishi, 1992a, b; 1993a) seems to be wrong. This erroneous result was based on the former alignment in which the triplet anticodon "5' CCA 3'" in the *E. coli* tRNA^{Trp} was misaligned with its 3'-terminal "74 CCA 76" in the previous papers. However, the alignment of the "5' CCA 3'" anticodon in *E. coli* tRNA^{Trp} with its "73 GGC 75" in Fig. 2 seems to represent a genuine homology.

In Fig. 3, DNA region encoding the N-terminal 170 aa's of the GlyRS α , and that encoding the F₀ α subunit were aligned against the *trnD*-poly-tRNA region. A 50.6% base-match and $P_{nuc}(239,472) = 0.63 \times 10^{-32}$ were obtained between GlyS and F₀ α , which confirms their close evolutionary kinship.

More importantly, the poly-tRNA region (for tRNA^{Gly}-tRNA^{Gln}-tRNA^{Cys}-tRNA^{Leu}-tRNA^{Leu}) in BSU *trnD* operon gives a 44.7% base-match to F₀ α , and 44.8% to GlyS in this alignment, confirming genuine homology of these protein-encoding genes to the *trnD* poly-tRNA region. The mRNA segments transcribed from these protein genes are, therefore, undoubtedly true homologues of the *trnD* poly-tRNA, and had evolved from an early poly-tRNA which is ancestral to the contemporary *trnD* transcript.

Furthermore, alignment of 5S rRNA, U1 snRNA, and the ribosomal protein S8 gene in the *E. coli rpsH* operon clearly shows that these RNAs and genes are also closely related to *trnD*-mRNA, the *trnD*-poly-tRNA region, and the *E. coli* GlyS gene.

Thus we have now reached an important conclusion that these protein-encoding mRNAs must have evolved from a primitive *trnD*-like poly-tRNA molecule. This means that a most primitive poly-tRNA ancestral to the *trnD* poly-tRNA region was capable of making a *trnD*-peptide-like peptide by interacting with the self-poly-tRNA molecule by a way similar to the scheme in Fig. 1 B. After basic codon-anticodon relationships had been evolved by natural selection of adaptive base-change mutations generating stable base-pairings between primitive anticodon and primitive codon, tRNAs have become amino acid-carrying RNA molecules in genetic apparatus. As a result of later gene-shufflings, similar poly-tRNA relics disappeared throughout evolution, and therefore can not be found in *E. coli* and other contemporary gram-negative prokaryotes.

In Fig. 4 (Ohnishi, 1994c), proto-anticodon is assumed to be "5' GCC 3'" based on these results, and the tRNA^{Gly} gene in BSU *trnD* and hypothetical *trnD*-mRNA are compared to this 5' (GCC)₁₆3' sequence. Base-matches in 13-15 base-positions are observed in these comparisons. The present theory states that base-exchange mutations occurred both in the 5' (GCC)₁₆3' proto-anticodon-series and in primitive proto-tRNA-like RNA ancestral to *trnD*-mRNA would have generated more Watson-Crick-type base-pairings, and thereby stabilized the interactions between poly-tRNA and ancestral *trnD*-mRNA.

These interacting processes must have directed the evolution of the poly-proto-tRNA to contemporary poly-tRNA, and the evolution of the proto-tRNA-like ancestral *trnD*-mRNA to primitive mRNA. Amino acid specificities in the tRNAs in this poly-tRNA structure would

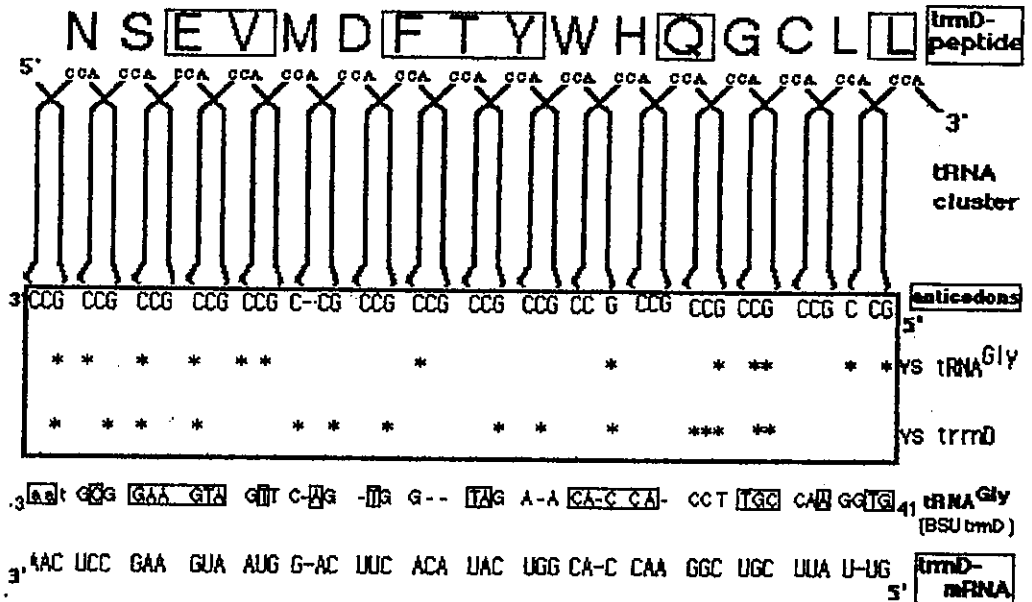


Fig. 4. Evolution from proto-tRNA-like proto-mRNA to *trrnD*-mRNA by natural selection of base-exchange mutations adaptive for generating Watson-Crick-type base-pairings between *i*-th triplet proto-codon and *i*-th "5' GCC 3'" proto-anticodon. Asterisks indicate possible base-pairings (of Watson-Crick types and G:U wobble type) between hypothetical "5' GCC 3'" proto-anticodons and *B. subtilis trrnD* tRNA^{Gly} or *trrnD*-mRNA.

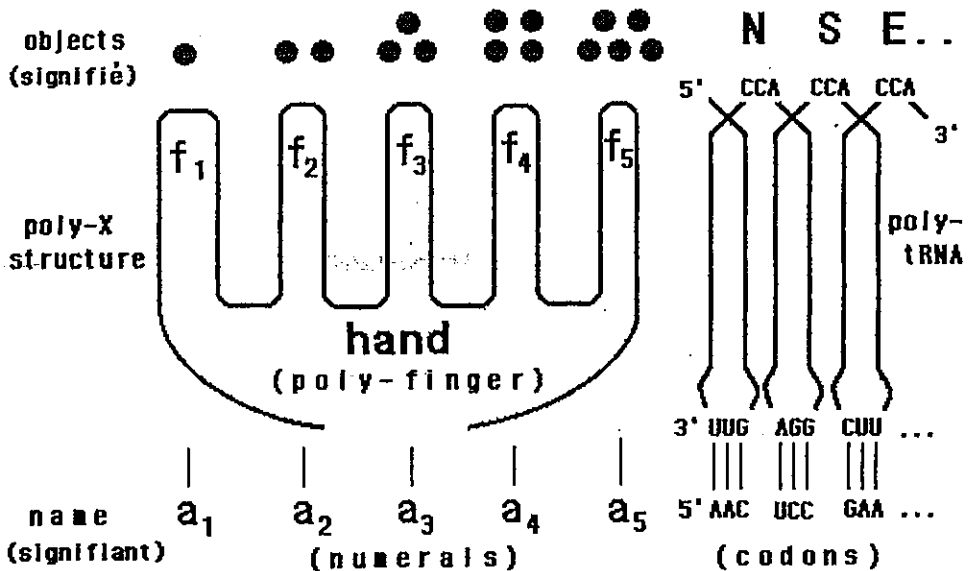


Fig. 5. Simplified scheme for Poly-X-mediated early evolution of general information system. Poly-finger-mediated (= hand-mediated) emergence of numeral system in human language is schematically compared with poly-proto-tRNA-mediated emergence of amino acid-encoding triplet-codon system.

have been acquired via stereochemical interactions among proto-anticodon, proto-codon, proto-discriminator, and amino acid, as can be suggested by Shimizu's C4N theory (Shimizu, 1982). Accordingly, natural selection of those base-exchanges adaptive for such base-pairings was the most essential process throughout evolution from poly-proto-tRNA to the peptide-making *trnD*-type poly-tRNA.

In conclusion, these results strongly substantiate the recently proposed poly-tRNA theory on the origin and evolution of mRNA and genetic codes. The most paradoxical problem concerning the origin of genetic codes and mRNA has now been basically solved. Further analysis of primitive genes from the aspect of this theory would bring about clear solutions of basic problems not only on the origin of genetic systems, but also on the origin of life.

3. Origin of codes in general information systems

Next important questions are ; Why genetic codes had originated as a poly-tRNA-mediated system ? Was it only an casual or accidental event ? Were there many other possible peptide-encoding ways before the emergence of poly-tRNA structure ?

The most important role of poly-tRNA structure in early evolution of peptide-encoding seems to be the fact that the " one-dimensional ordering " of proto-tRNAs in poly-proto-tRNA structure can make a suitable situation in which " division of labour " of each proto-tRNA could have efficiently evolved. This means that , in the poly-tRNA model (in Fig. 1 [B]), the k-th proto-tRNA can interact exclusively with a corresponding "k-th" proto-codon region in a primitive proto-tRNA-like RNA ancestral to *trnD*-mRNA. Amino acid specificity of each tRNA in *trnD*-poly tRNA must have been acquired by such specific interaction.

If "one-dimensional ordering" is the most essential feature in the origin of genetic codes, a much more important question arises;

[Q1] Were there other information systems which first emerged by " one-dimensional ordering rule " ?

If the answer to the question [Q1] were " there have not been any informative system which emerged by the one-dimensional ordering rule ", then another important question would arise ;

[Q2] Why " one-dimensional ordering rule " efficiently worked exclusively in the emergence of genetic information system, and did not work in emergences of all other information systems ?

In this hypothetical case, [Q2] seems to be much more paradoxical than the well-known paradoxical problem (although the paradox seems to be now solved, as described above) on the origin of genetic codes. The extreme difficulty to answer the question [Q2] seems to suggest that some informative and/or coding system(s) other than genetic codes "must" have first emerged by the " one-dimensional ordering rule ".

Among a lot of different information systems on the earth (or in the universe), numeral systems in human language seem to have first emerged by the rule of one-dimensional

ordering, as shown in Fig. 5. In this scheme, the different states (existence of 1 object, existence of 2 objects, ... , existence of 5 objects) were efficiently recognized by human with the aid of "one-dimensional ordering" of five fingers on the hand, and early naming (a_1, a_2, \dots, a_k ; $k \leq 5$; for example, $a_1 = \text{"one"}$, $a_2 = \text{"two"}$, ... , $a_5 = \text{"five"}$) of these different states began to evolve, and the early naming a_i ($i = 1, 2, \dots, k$) was used in close connection to the i -th finger (f_i ; $i = 1, 2, \dots, k$). Most primitive a_i ($i = 1, 2, \dots, k$) did not need to be different with one another, because they worked together with f_i . In a most simplified hypothetical case, the first numeral (proto-numeral) was $*a$, which can be applied for every a_i ($i = 1, 2, \dots, k$), and $*a$ was unexceptionally used with an appropriate finger f_i . Early differentiation of such proto-numeral $*a$ to primitive numerals, $*a_1, *a_2, \dots, *a_k$, occurred, and such differentiation made it possible for human to occasionally use $*a_i$ without any aid of f_i , which further accelerated later differentiation of $*a_i$ to a_i (which can fully work without any aid of f_i), a complete acquisition of coding capacity of numerals. Accordingly, both numerals and genetic codons first began to encode different states of object, based on the aid of one-dimensional ordering of finger or proto-tRNA, and such interaction between individual specific state (i -th state) and i -th finger / i -th proto-tRNA would have generated a new situation in which "division of work" among fingers or proto-tRNAs can efficiently accelerate specific interaction between i -th state (object) and i -th proto-code (proto-numeral / proto-codon) with the aid of i -th "connector or linker" (i -th finger / i -th proto-tRNA). Thus "hand" and "tandem proto-tRNA-repeat" are "poly-finger" and "poly-proto-tRNA", and therefore we can find a generalized rule that "poly-X structure" (one-dimensional repeat of X) can accelerate early beginning of coding system, in which i -th X (X_i) specifically mediates close and stable interaction between i -th code (C_i) and i -th state of object (O_i). C_i is numeral (a_i) or triplet codon, and O_i is number "i" or i -th amino acid, in numeral system or peptide-encoding system, respectively.

In terms of de Saussure's structural linguistics, O_i is "signifie" or "signified" (something to be signified), and C_i is "signifiant" or "signifier" (de Saussure, 1916). The arbitrary correspondence of signifiant (C_i) to signifie (O_i) is an essential feature of information system including language system, numeral system, and triplet-codon system, as de Saussure (1916) pointed out long ago (Sibatani, 1985, 1989). Two examples concerning the poly-X-mediated origin of information systems discussed above tell us how poly-X-structure could mediate early beginning steps of primitive information systems to further evolve to complex informative systems. Ohno (1991, p.73) also pointed out the observed arbitrariness between genetic codes and their corresponding amino acids, and considered, based thereupon, that primordial gene sequences might have been already made in earliest tRNA(s) before the first linking of base sequences to amino acid sequences. Ohno's concept well coincides with the evolutionary process from proto-tRNA to mRNA hitherto discussed based upon poly-tRNA theory.

The discussions given here might open a new area of evolutionary informatics and semeio-evolutionary sciences. The poly-tRNA theory might be the first case in which early processes giving rise to the origin of contemporary bio-informative system has been exactly analyzed with detailed evidences. Further analysis of other informative systems from a viewpoint of poly-X

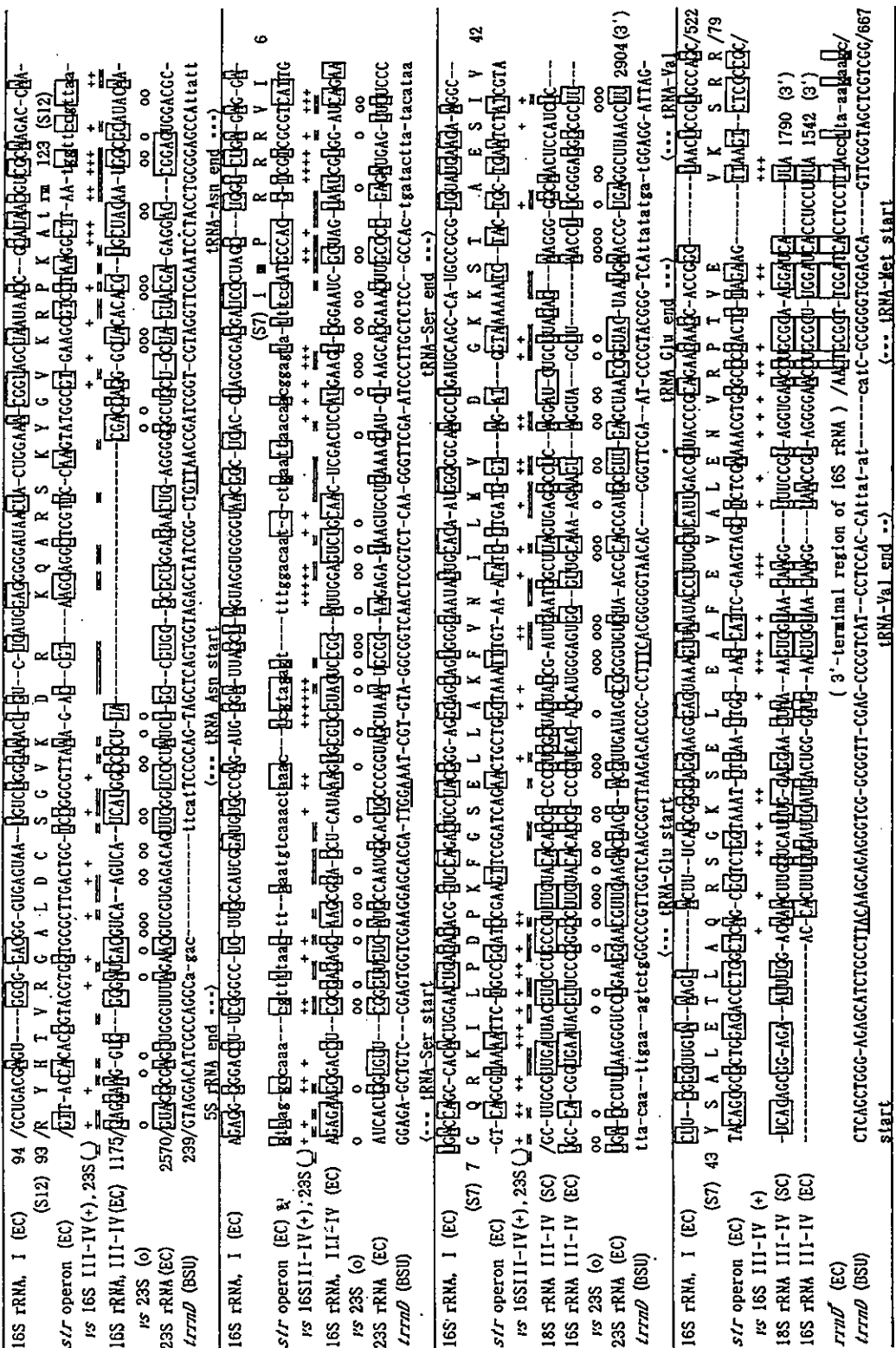


Fig. 6. Alignment of *E. coli* (EC) and *Saccharomyces cerevisiae* (SC) 16S/18S rRNA (domains III-IV and domain I), EC 23S rRNA, and the S12-87 ribosomal protein region of the EC *str* operon against the [5S rRNA-tRNA^{Asn}-tRNA^{Ser}-tRNA^{Glu}-tRNA^{Val}-tRNA^{Met}] region of the *Bacillus subtilis* (BSU) *trnMD* operon. Base-matches to *trnMD* are boxed. Other base matches (+, o) are indicated by symbols in parenthesis. Sequence data are from GenBank Database. Lower-case letters are bases in spacer region. Anticodons are underlined.

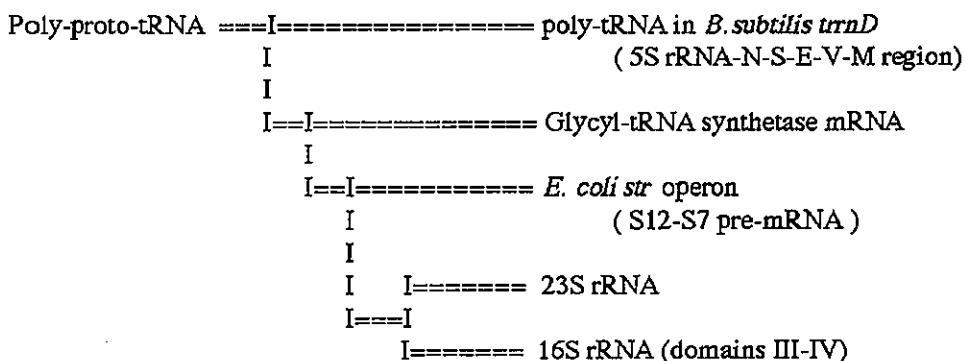
theory (or one-dimensional ordering theory) might bring about new evolutionary logics underlying origin and evolution of general information system. Further semeio-evolutionary discussions on poly-tRNA theory and other informative systems (including languages) have recently made by the author (Ohnishi, 1995a,b).

4. Origin of ribosomal RNAs

In the alignment shown in Fig. 6 (Ohnishi, 1993d), the 16S rRNA III-IV domains (1175-1542) share 49.5% of bases with the BSU *trnD* poly-tRNA region in 323 aligned base positions (excluding gap positions), giving a highly significant level of base sequence similarity, $P_{\text{nuc}}(160, 323) = 0.23 \times 10^{-20}$. The 23S rRNA (bases 2570-2904) and the S12-S7 ribosomal protein-encoding region of the *E. coli str* operon share 43.9% ($P_{\text{nuc}} = 0.11 \times 10^{-11}$) and 42.5% ($P_{\text{nuc}} = 0.96 \times 10^{-16}$) of bases, respectively, with the *trnD*. Similarity level between 23S rRNA and the 16S rRNA (domains III-IV) is also weakly significant (39.9% base match, $P_{\text{nuc}} = 0.18 \times 10^{-7}$). The *str* region, from Arg-90 in S12 to Ile-41 in S7, is more highly homologous to 23S (40.0% match, $P_{\text{nuc}} = 0.84 \times 10^{-8}$). Homology between the domain I of 16S rRNA to *trnD* is very weak.

From these results, we can conclude that 16S rRNA (domains III-IV), 23S rRNA (from 2570 to 3'-terminus), and the *E. coli str* operon (S12/S7 region) are all homologues of the BSU *trnD* poly-tRNA region (from 5S rRNA to tRNA^{Met} as shown in Fig. 6).

A most plausible evolutionary tree is ;



Thus 16 and 23S rRNAs had evolved from an *str*-like pre-mRNA, and therefore, poly-tRNA molecule is concluded to be most primitive.

The next question then arises concerning the origin of the *B. subtilis trnD*-type poly-tRNA structure. *Bacillus subtilis* is known to possess another type of poly-tRNA-containing operon, *rtnB* operon. In Fig. 7, *trnD*-related poly-tRNA structures in Gram-positive bacteria and *Aspergillus nidulans* are compared and the corresponding anticodones are also compared and aligned with one another. This clearly shows that both *trnD* and *rtnB* operons in *B. subtilis* are

derived from an ancestral long poly-tRNA structure closely similar to the tRNA gene cluster in *S. aureus*. In Gram negative bacteria such as *E. coli*, tRNA gene cluster(s) more or less similar to that of *Staphylococcus* seem to have had disappeared throughout evolution.

Acknowledgements: The author acknowledges Drs. Hiroshi Yanagawa, Michiko Go, and Atsuhiko Sibatani for stimulating discussions. This paper is partly supported by a Scientific Research Grant (# 06302085) from the Ministry of Education, Science, and Culture.

References

- Bloch, D., Kuechler, E. and Steiner, G. : 1983, *J. molec. Evol.* **19**, 420-428.
- Bloch, D. and Staves, M. : 1986, *Origins of Life* **16**, 309-310.
- Cozens, G. and Walker, J.E. : 1987, *J. mol. Biol.* **194**, 359-383.
- Deuster, G.L., and Holmes, W.M. : *Nucleic Acids Res.* **8**, 3793-3807.
- de Sausseure, F. : 1916 (publie par Ch. Bally et A. Secehayé, 1949), *Cours de Linguistique generale*, Payot, Lausanne et Paris.
- Eigen, M and Schuster, P. : 1979, *The Hypercycle*, Springer, Berlin.
- Green, C.J. and Vold, B.S. : 1993, *J. Bacteriol.* **175**, 5091-5096.
- Koechel, H.G., Lazarus, C.M., Bazak, N. and Kuenzel, H. : 1981, *Cell* **23**, 625-633.
- Marotta, C.A., Varricchio, F., Smith, I., Weismann, S.M. and Sogin, M.L. : 1976, *J. Biol. Chem.* **251**, 3122-3127.
- Muto, A., Adachi, Y., Yuzawa, H., Yamao, F. and Osawa, S. : 1990, *Nucleic Acids Res.* **18**, 5037-5043.
- Noller, H.F., Hoffarth, V. and Zimniak, L. : 1992, *Science* **256**, 1416-1419.
- Ohnishi, K. : 1990, In: *Symmetries in Science IV*, ed. by B. Gruber and J.H. Yopp, pp. 147-176, Plenum, NY
- Ohnishi, K. : 1992a, *Endocytobiosis and Cell Res.* **8**, 109-120.
- Ohnishi, K. : 1992b, *Viva Origino* **20**, 225-256 (In Japanese with English summary and legends.)
- Ohnishi, K. : 1992c, *Nucleic Acids Res. Symp. (Oxford)* **27**, 145-146.
- Ohnishi, K. : 1993a, In: *Endocytobiology V*, ed. by S. Sato, M. Ishida and H. Ishikawa, pp. 407-414, Tubingen University Press, Tubingen.
- Ohnishi, K. : 1993b, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **707**, 524-528.
- Ohnishi, K. : 1993c, In: *Genome Informatics Workshop IV*, ed. by T. Takagi, H. Imai, S. Miyano, S. Mitaku, and M. Kanehisa, pp. 325-331, University Academy Press, Tokyo.
- Ohnishi, K. : 1993d, *Nucleic Acids Res. Symp. (Oxford)* **29**, 163-164.
- Ohnishi, K. : 1994, *Origins of Life*, **24**, 191-192.
- Ohnishi, K. : 1995a, *Seibutsu Kagaku (Biological Science) (Tokyo)* **47(1)**, 10-23.
- Ohnishi, K. : 1995b, *Seibutsu Kagaku (Biological Science) (Tokyo)* **47(3)**, in press.
- Ohnishi, K. : 1995c, *Origins of Life*, submitted.
- Ohnishi, K. and Tanaka, J. : 1992, *Endocytobiosis and Cell Res.* **8**, 121-126.
- Ohno, S. : 1991, *Ooi-naru Kasetsu — DNA karano Messeezi (Great Hypotheses — Messages from DNA)*, Tokyo-Daigaku Shuppankai, Tokyo.
- Putney, S.D., Royal, N.J., De Vegvar, H.N., Herlihy, W.C., Biemann, K. and Schimmel, P. : 1981, *Science* **213**, 1497-1501.
- Shimizu, M. : 1982, *J. mol. Evol.* **18**, 297-303.
- Shimizu, M. : 1992a, *Viva Origino* **20**, 195-206. (In Japanese with English summary and legends.)
- Sibatani, A. : 1985, *Revista di Biologia* **78**, 373-397.
- Sibatani, A. : 1989, In: *Dynamic Structure in Biology*, Edinburgh University Press, Edinburgh. [Japanese ed. (1991): In: *Seibutsugaku ni totte Koozoo-shugi towa Nani ka*, ed by A. Sibatani, N. Houkyo, and Y. Saitou, pp. 15-23, Yoshioka shoten, Kyoto]
- Steiner, G., Kuechler, E. and Barba, A. : 1988, *EMBO J.* **7**, 3949-3955.
- Stenman, G. and Sager, R. : 1987, *Proc. natn. Acad. Sci. USA* **84**, 9094-9098.
- Warousek, E.F., Narasimhan, N. and Hansen, J.N. : 1984, *J. biol. Chem.* **259**, 3694-3702.
- Webster, T.A., Gibson, B.W., Keng, T., Biemann, K. and Schimmel, P. : 1983, *J. biol. Chem.* **258**, 10635-10641.
- Yang, R.A. : 1987, *J. biol. Chem.* **254**, 12725-12731.

「生命の起原・進化学会」会員名簿
(1995年12月現在)

: 名前 : 勤務先

1	相原惇一	静岡大学 理学部 化学科
2	赤星光彦	京都大学原子炉実験所
3	秋山雅彦	信州大学 理学部 地質
4	朝倉浩一	慶應義塾大学 理工学部 応用化学科
5	天野 洋	慶応大学 医学部 中検臨床免疫
6	荒川久雄	
7	猪狩俊一郎	地質調査所 地球化学課
8	池田浩一	日本化薬(株)高崎研究所
9	石神正浩	大阪府立大学 総合科学部 生命科学
10	石川洋二	大林組東京本社宇宙開発プロジェクト部
11	石田政弘	
12	石本 真	
13	石渡良志	東京都立大学 理学部 化学
14	磯山正治	蛋白質研究奨励会 資料室
15	板谷光泰	三菱化学生命科学研究所
16	伊藤雅彦	名古屋大学 太陽地球環境研究所 東山分室
17	糸島由起子	鹿児島大学 教養部
18	井上長三	昭和電工(株)総合研究所 有機材料研究部
19	猪飼 篤	東京工大 理学部 生体機構
20	猪股勝彦	金沢大学 理学部 化学
21	居原 秀	大阪府立大学 総合科学部
22	今井栄一	長岡技術科学大学 生物系
23	上野陽里	
24	宇佐見正一郎	
25	卯西昭和	福井大学 工学部 材料化学科
26	梅本公子	国際基督教大学 理学部 化学
27	遠藤 忠	青山学院大学 理工 化学
28	大内将吉	東京農工大学 工学部 物質生物工学科
29	大島泰郎	東京薬科大学 生命科学部 細胞機能学研究室
30	大西耕二	新潟大学 理学部 生物
31	大浜宏文	東京田辺製薬株式会社 研究開発本部
32	大矢雅則	東京理科大 理工学部
33	小笠原京子	大阪大学蛋白質研究所
34	小川洋子	三菱化学生命科学研究所
35	奥田早希子	
36	小沢幸重	日本大学 松戸歯学部 第2解剖

: 名前 : 勤務先

37	加藤憲二	信州大学 医療技術短期大学
38	加藤幹男	大阪府立大学 総合科学部 生命科学
39	河合建一	京都大学原子炉実験所
40	川久保良治	埼玉県立鳩ヶ谷高等学校
41	川城克博	徳島大学 工学部 化工
42	川村邦男	大阪府立大学 工学部 応用化学科
43	川本圭造	京都大学原子炉実験所
44	菊地慎太郎	室蘭工業大学 化学工学科
45	菊池忠寿	
46	北崎茂樹	大阪府立寝屋川養護学校
47	寄藤高光	信州大学 農学部 農化
48	木野世紀	熊本県庁
49	木村真子	筑波大学大学院 環境科学研究科
50	金城政孝	北海道大学応用電気研究所 生理
51	久米啓子	徳島県庁
52	黒田 稔	大阪大学蛋白質研究所
53	郷 道子	名古屋大学 理 生物
54	古賀理和	愛媛大学 工学部 応用化学科
55	古賀洋介	産業医科大学 医学部 化学教室
56	木暮ひとみ	筑波大学 応用生物化学系
57	小島清嗣	オリンパス光学工業(株)
58	児島高和	日本曹達(株)小田原研究所 S C 研
59	後藤仁敏	鶴見大学 歯学部 解剖
60	後藤公彦	自治医科大学 法医学
61	小林邦彦	名古屋大学医療技術短期大学 理学療法学科
62	小林憲正	横浜国立大学工学部 物質工学
63	小宮弘之	名古屋女子文化短期大学
64	古宮正利	通産省工業技術院地質調査所 燃料資源部
65	斉藤 威	東京大学 宇宙線研究所
66	酒井鉄博	
67	坂本正義	(株) ジャルデー研究所
68	桜井邦朋	神奈川大学 工学部 物理
69	櫻沢 繁	長岡技術科学大学 生物系 松野研
70	佐藤七郎	
71	佐藤哲也	東京農工大学 大学院
72	沢井宏明	群馬大学 工 高分子化学

: 名前 : 勤務先

73	四方哲也	大阪大学 工 応用生物学
74	重政好弘	鳥取大学 工学部 工化
75	宍戸弘子	筑波大学大学院 環境科学研究科
76	篠原久典	名古屋大学 理学部 化学科
77	芝 清隆	癌研究所 細胞生物部
78	島田秋彦	筑波大学 環境科学研
79	清水 晃	奈良女子大学 理学部 生物学教室
80	清水幹夫	宇宙科学研究所
81	下山 晃	筑波大学 化学系
82	寿岳 潤	
83	白井浩子	岡山大学 理学部附属臨海実験所
84	白倉徳子	筑波大学大学院 理工学研究科
85	杉原富人	新田ゼラチン中央研究所
86	杉山敏郎	長岡技術科学大学 生物系 松野研
87	鈴木範男	金沢大学理学部付属能登臨界実験所
88	鈴木裕之	弘前大学 農学部
89	須田省三	神戸女子大 教育
90	隅野照家	京都大学原子炉実験所
91	諏訪牧子	東京農工大学 工学部 物質生物工学科
92	高田実弥	京都大学原子炉実験所
93	高橋 詢	
94	多賀谷真	鹿児島大学 理学部 生物学科
95	田川邦夫	大阪大学医学部 分子生理化学
96	田口一雄	
97	武田哲男	
98	田中亜希子	慶應義塾大学 理工学部 応用化学科
99	田中幹衛	大阪大学 教養部 生物
100	田中航二	大阪商業大学 一般教養
101	田中正寛	大阪医科大学 教養学部 物理
102	谷口茂彦	愛知学院大学 歯学部 生化学教室
103	樽谷 修	東京理科大学 基礎工学部
104	千浦 博	国際基督教大学 理学部 生物学教室
105	次田 皓	東京理科大学
106	都留信也	(社)環境情報科学センター
107	遠山 鴻	愛媛大学 理学部 生物学教室
108	中川直哉	

: 名前 : 勤務先

109	中沢弘基	無機材質研究所
110	中嶋マサ江	東京純心女子高等学校
111	永田 宏	オリンパス光学工業(株)
112	長田洋子	姫路工業大学 生物
113	長野 敬	
114	中村 寧	旭電化工業(株) 技情センター
115	中村和夫	宇都宮大学 教養生物
116	中村 運	甲南大学 理学部 生物学
117	梨本正之	日本たばこ産業株式会社 生命科学研究所
118	奈良岡浩	東京都立大学 理学部 化学
119	西垣功一	埼玉大学工学部 環境科学工学
120	西 信之	九州大学 理学部 化学教室
121	二宮淳一郎	別府大学 生物
122	根平邦人	広島大学 総合科学部 生物
123	根本直人	埼玉大学工学部機能材料 工学科伏見研究室
124	野田浩司	筑波大学 地球科学系
125	野田昭三	大阪学院大学 生物研究室
126	野田春彦	創価大学工学部 生物工学科
127	萩原正義	筑波大大学院 理工学研究科
128	橋爪秀夫	無機材質研究所
129	長谷 篤	大阪環境科学研究所
130	長谷川典巳	宇宙科学研究所
131	長谷川政美	統計数理研究所
132	早川 明	
133	原田 馨	松蔭女子短期大学
134	半田暢彦	名古屋大学 大気水圏研究所
135	日野精一	
136	平野聡伺	オロナイトジャパン
137	平林憲次	
138	平林 淳	帝京大学 薬学部 生物化学教室
139	広瀬 豊	金沢大学 理学部物理 生物物理
140	福田育二郎	
141	福田俊一	
142	福原敏行	東京農業工業大 一般教養 生物
143	福村 隆	大阪市立大学 理学部 生物学

： 名前 ： 勤務先

144	藤井紀子	工業技術院 生命工学工業技術研究所 生体情報部 神経情報研究室
145	藤谷英男	麻布大学 獣医学部 分子生物
146	伏見 譲	埼玉大学 工学部 環境
147	古田弘幸	大分大学 工学部 一般教育
148	古澤 力	東京大学 大学院 総合文化研究科
149	朴 真淑	三菱化学生命科学研究所
150	星野嘉恵子	新潟大学 医学部 第2解剖
151	堀田 進	東京経済大学 地学
152	本多 元	長岡技術科学大学 生物系
153	本多泰洋	鳴門教育大学
154	本波康由	東京電力(株) エネルギー環境研究所
155	牧野 純	(有)地質技術研究所
156	牧野良子	(有)地質技術研究所
157	松浦輝男	竜谷大学 理工学部 物質化学科
158	松永慎一	
159	松野孝一郎	長岡技術科学大学 生物系
160	松久明生	扶桑薬品(株) 開発センター
161	真野勝友	筑波大学 学校教育部
162	水谷 広	石巻専修大学 理工学部 基礎理学科
163	水本博二	扶桑化学工業 開発部
164	三田 肇	筑波大学 化学系
165	宮崎正澄	名古屋大学 理学部 分子生物
166	宮田 隆	京都大学 理学部 生物物理学教室
167	宮田真人	大阪市大 理学部 生物学
168	宮本悦子	横浜国立大学大学院 工学研究科
169	三義英一	
170	胸組虎胤	小山工業高等専門学校物質工学科
171	村田義夫	
172	村山徹郎	愛媛大学 理学部 生物
173	桃谷好英	
174	森下日出旗	大阪生物環境科学研究所
175	森本史郎	
176	屋代彰子	
177	柳川弘志	三菱化成生命科学研究所
178	柳下 剛	

: 名前 : 勤務先

179	矢野隆明	昭和大学教養学部
180	山形行雄	金沢工業大学
181	山岸明彦	東京薬科大学 生命科学部 細胞機能学研究室
182	山岸皓彦	北海道大学 理学部 高分子化学科
183	山口智彦	通商産業省工業技術院 物質工学工業技術研究所 化学システム部
184	山腰信明	K. K. 帝国臓器製薬 化学研究部
185	弥益輝文	琉球大学 教養学部 生物
186	山中健生	日本大学 理工学部 工業化学科
187	山中淳平	新技術事業団 橋本プロジェクト
188	山根 剛	
189	山元皓二	
190	山本和彦	大阪女子大学 学芸学部 化学
191	山本哲生	北海道大学理学部 地球惑星科学教室
192	湯浅精二	大阪大学 理学部 生物学教室
193	横尾広光	杏林大学 保健学部
194	横村英一	奈良女子大学 理学部 生物
195	横山裕文	筑波大学 化学系 下山研究室
196	吉田和夫	広島大学 理学部 生物化学教室
197	吉野大資	帝塚山学院大学
198	吉羽興一	
199	吉松広延	
200	吉村泰一	大阪府立大学 総合科学部大学院
201	和田敬四郎	金沢大学 理学部 生物
202	和田節子	電気通信大学
203	和田善信	中嶋水産株式会社
204	薫科宗博	大阪市立環境科学研究所

☆ 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図画とする。
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、説明は英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4号

1995年12月25日 印 刷
1995年12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 和泉出版印刷株式会社 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

- © Preface to the special issue on "The origin of protein synthesis mechanism"
M. Ishigami (207)

ARTICLES

- © A novel factor- and energy- free translation system promoted by tertiary amines and its implications toward the origin of the translation system
I. Nitta, T. Ueda, T. Nojima and K. Watanabe (209)
- © Structure and function of ribosomal RNA
Y. Endo and S. Yoshinari (223)
- © Poly-tRNA structures as early protein-synthesizing RNA structures: Evolution from proto-tRNA to most primitive mRNA's
K. Ohnishi (237)

NEWS and VIEWS

- © Membership list of the "SSOEL" Japan (1995) (255)