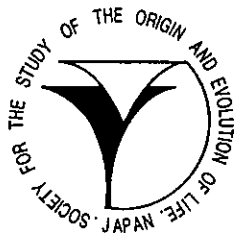


# Viva Origino

VOL.24 (No.2)

June 1996



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. 其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3/5以上の出席の総会において3/5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.24 (No.2)

June 1996

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

## 目 次

### 総 説

- ◎ 「化学進化・生命の起源」研究への放射化分析の応用  
赤星光彦、高田實彌……………(113)

### 論 文

- ◎ tRNA に共通する CCA 末端構造の機能  
田村浩二、長谷川典巳……………(125)
- ◎ 関係小器官 —ミトコンドリア、葉緑体、そしてペルオキシソーム—  
の起原と進化  
中村 運……………(137)
- ◎ アミノ酸の熱重合反応とその生成物  
今井栄一、櫻沢 繁、本多 元、松野孝一郎……………(159)
- ◎ 希土類元素と細胞との相互作用に関する探索；  
放射化分析による被処理細胞内での希土類元素の動態観察  
高田實彌、田中愛子、隅野照家、川本圭造、  
河合建一、赤星光彦……………(171)



# Application of neutron activation analysis to the study of origin of life

Mitsuhiko Akaboshi and Jitsuya Takada

Research Reactor Institute, Kyoto University  
Kumatori-cho, Sennan-gun, Osaka, 590-04, Japan

(Received May 7, 1996; Accepted June 30, 1996)

## ABSTRACT

Instrumental neutron activation analysis is one of the most sensitive analytical method for various elements, and is widely used in the determination of trace elements in biological samples. We also have performed a variety of studies on the fields of biology and biochemistry using this method. At first we applied this method to examine the nucleic acid contents in several kinds of protozoa. Secondly, the enzymic activities of P-relating enzymes, such as alkaline phosphatase and ATPase in the cells or in the materials could be successfully determined by measuring  $\beta$ -rays from  $^{32}\text{P}$  derived from the  $^{31}\text{P}(n, \gamma)^{32}\text{P}$  reaction. Finally, our attention is being denoted to the determination of rare earth elements in the fern leaves and the cells treated with REEs under various experimental conditions. Both the studies are carried out from the stand point of the chemical evolution and origin of life. The former study revealed that ferns can be separated into several groups on the basis of their REE contents which are influenced by some environmental factors where the fern was grown. The later study indicated that cellular macromolecules can recognize REEs in different manner. The present paper is concerned first with the introduction to activation analysis and then, the brief history of our studies which have been carried out by applying this method.

Key words: activation analysis, rare earth elements (REE), nucleic acid content, alkaline phosphatase, ATPase.

Viva Origino 24(1996)113–124

© 1996 by SSOEL Japan



# 「化学進化・生命の起源」研究への放射化分析の応用

赤星 光彦、高田 實彌

京都大学原子炉実験所 (〒590-04 大阪府泉南郡熊取町)

## 1. 放射化分析について

放射化分析は1934年に Joliot and Curie<sup>1)</sup> によって人工放射能が発見されてから始まった元素分析法で、試料を高エネルギーの荷電粒子、中性子または電磁波で照射し、原子核反応によって試料中の核種を放射性核種に変換せしめた後、生成した放射性核種から放出される放射線を測定することによって、試料中に存在する元素量を測定する方法である。1936年に Hevesy and Levi<sup>2)</sup> が化学分離を必要とせずに Y 中の微量 Dy や Gd 中の Eu を検出する方法として、Ra-B e 中性子線源の利用を提案したのが最初であった。当時、これらの元素(希土類元素)は互いに化学的性質がよく似ていて化学分離が困難であったので、この方法の利用によって非破壊的に元素分析が可能となったことは画期的なことであった。しかしながら、当時の技術レベルでは、線源の安定性や照射時間に限度があり、実用上多くの問題が残されていた。

近年、研究用原子炉の出現によってこの欠点が改善されると共に、放射線測定技術の進展や放射線検出器の感度と効率の向上と相まって、計算機の利用によるデータ解析技術の飛躍的な発展により、放射化分析は今や極めてすぐれた元素分析法の一つとなった。

原子炉を利用する中性子放射化分析においては衝撃粒子として熱中性子を用いることが多い。この方法の特長は「非破壊」試料中の「微量」の「多元素同時」分析が可能であるの一言に尽きる。最近、原子吸光法、原子発光法、高周波プラズマ質量分析法(ICP-MS法)等の各種分析法が開発されつつあるが、放射化分析法の持つ上に述べた特長は決して失われてはいない。したがって、この方法が研究に应用される範囲も今日なお多岐に渡る。それは隕石<sup>3)</sup>、岩石<sup>4)</sup>、石油<sup>5)</sup>等を対象とする地球・宇宙科学に始まり、地球環境汚染物質<sup>6,7)</sup>、微生物<sup>8)</sup>、植物<sup>9)</sup>、動物<sup>10)</sup>、人体<sup>11)</sup>中の細胞や組織を対象とする生物科学および考古遺物<sup>12,13)</sup>を対象とする考古学など自然科学から人文科学にまで及んでいる。本論文の意図するところは、しかしながらこれらの研究全てについて網羅することではない。それらに関しては既に優れた総説<sup>14,15)</sup>が出版されているし、放射化分析そのものに関する解説<sup>16)</sup>も出されているので、ここでは著者らが「熱中性子放射化分析の生物学的応用」として行なってきた幾つかの研究例を紹介すると共に、「生命の起源・進化の実験的研究」への応用の可能性について検討を加えることに主眼を置くことにする。

## 2. 植物体内への特定元素の集積

放射化分析の利点である「非破壊・多元素同時測定」と云う特徴は、出来る限り複雑な前処理をすることなく、試料をそのまま測定したいと云った要請がある場合に最大限に発揮される。放射化分析が鉱石や動・植物、考古遺物等の元素分析にしばしば使われてきた

のは、そうした理由による。著者らは高等植物への特定元素の集積に興味を持ち、放射化分析を利用して長らくこの問題に取り組んできた。一般に植物は土壌から必要な栄養や元素を吸収し、生長するものであるから、植物体を構成する元素組成には土壌中の元素分布が強い影響を与えることは周知の通りである。しかしながら、植物がまた土壌の元素組成に関係なく、植物に固有の特定の元素を集積することもよく知られている。褐藻類<sup>17)</sup>がヨウ素を濃縮するのは古くから有名であるし、トクサが金<sup>18)</sup>を、ヌマミズキとリョウブがコバルト<sup>19)</sup>を、イソマツ科植物とホンバツメクサが亜鉛<sup>20)</sup>を集積することもよく知られている。さらにまた、クルミ属はイッテルビウム、サマリウム、テルビウム等の希土類元素を特異的に集積するらしい<sup>21)</sup>。著者らはこれら既知の集積植物以外にも、特定の元素を集積する多くの植物が存在するものと考え、新しい集積植物の探索を目的として、一連の研究<sup>22,23)</sup>を開始した。この研究では過去十年間に渡り、重金属に汚染されていない日本各地の地域において、花崗岩、安山岩、蛇紋岩、石灰岩等を母岩とする土壌に生育する約 400 種 3000 個体の高等植物を採集し、それらの葉を規定の方法で洗浄、乾燥したものを分析試料として用いた。放射化分析のための試料の調整や原子炉照射、測定等に関する詳しい説明は文献<sup>23)</sup>に譲るとして、ここではある種の植物を特定元素に対する集積植物として提起するに至る経過について簡単に触れることにする。

Fig. 1 は、シラキ葉の乾燥標品 500 mg を KUR 気送管にて 1 時間照射した直後にマルチチャンネル波高分析器を用いて測定して得られた  $\gamma$  線スペクトルを示す。この段階で観測される  $\gamma$  線は<sup>28</sup>Al、<sup>38</sup>Cl、<sup>56</sup>Mn、<sup>49</sup>Ca 等の短寿命核種からのものが圧倒的であり、中

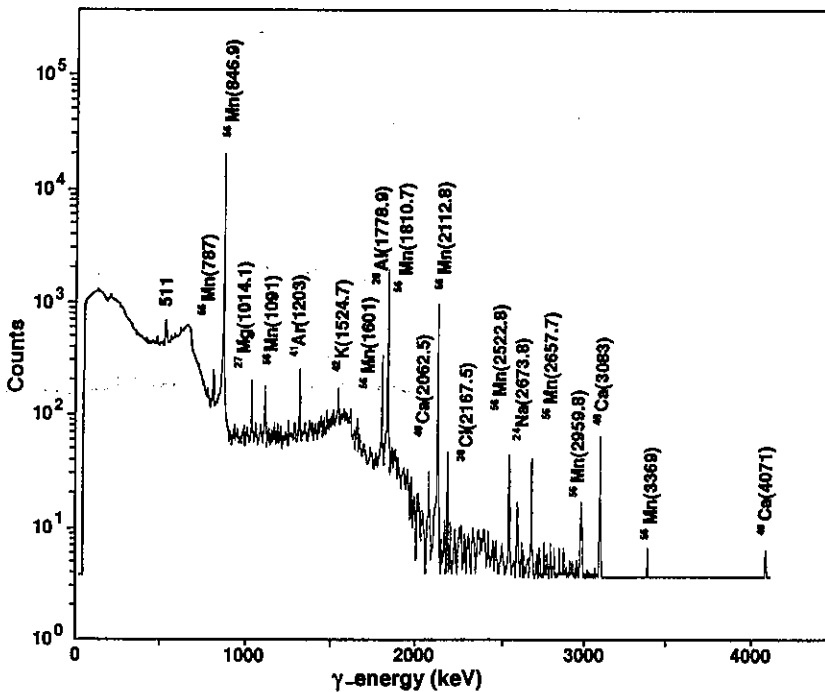


Fig. 1  $\gamma$ -ray Spectrum of Shiraki (*Sapium japonicum*) measured 3 minutes after irradiation.



寿命または長寿命核はこれらにさえぎられて殆ど観測されない。生物試料には多種類の元素が含まれているから、この様になるのが普通である。しかしながら、同じ試料を 50 日の冷却後、再び測定すると Fig. 2 を得る。ここでは長寿命核である  $^{40}\text{K}$ 、 $^{60}\text{Co}$ 、 $^{65}\text{Zn}$  によるピークのみが残存している。ピーク面積は当該元素の存在量に比例するので、同一条件で照射された既知量のスタンダードにおいて得られたピーク面積との比較により、容易に存在量を知ることが出来る。複数個の試料で得られた値を統計処理することにより、シラキ葉の Co 含量は 68.4 ppm であることが明らかになった。その他の植物とそれらに含まれ

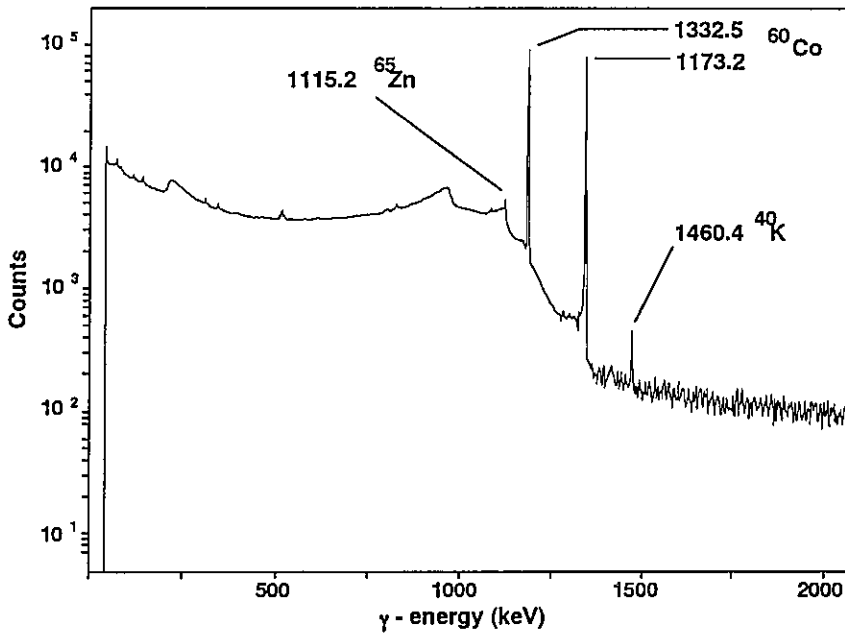


Fig. 2  $\gamma$  -ray spectrum of Shiraki ( *Sapium japonicum* ) measured 50 days after irradiation.

る各種元素量の中央値、最大値、最小値、標準偏差、変動係数等の基礎統計量を求め、それら間の比較や従来報告されている値との比較により、集積植物の仲間として取り上げてもよいと判断された植物名と集積元素を Table 1 に列記した。この数は今後の作業が進むにつれてさらに増加するであろうことが予想される。表より、集積の度合いは元素によって約 100 倍から 1000 倍にもなることが判る。この差が生育環境によるものではなく、当該植物の種としての固有の性質によるものであることの確定が必要である。

### 3. 細胞・組織内高分子物質および酵素活性の測定

生物組織には多種類の元素が存在するので、それらの元素も同時に放射化され、目的とする元素の測定に妨害を与えることがしばしばある。そうした場合には試料に前処理または後処理を施すことによって、目的とする元素の測定を容易にすることが必要となる。この場合には、「多元素同時」の特長よりも、当該元素の微量測定の方が優先されることになる。そうした、研究の例を紹介する。

Table 1. Concentrations of particular elements in accumulators and concentration ranges of those elements in plants.

| 元素         | 集積植物    |        | 含量(ppm) | 通常植物が示す元素含量の範囲 |            |
|------------|---------|--------|---------|----------------|------------|
|            | 植物名     | 科名     |         | 本研究            | Bowen のデータ |
| アルミニウム(Al) | ヒサカキ    | ツバキ    | 15,800  | 10-800         | 90-530     |
| コバルト(Co)   | シラキ     | トウダイグサ | 100     | 0.001-1.0      | 0.005-1    |
| 亜鉛(Zn)     | イヌツゲ    | モチノキ   | 850     | 2-100          | 20-400     |
| マンガン(Mn)   | コシアブラ   | ウコギ    | 25,300  | 10-2,000       | 20-700     |
| スカンジウム(Sc) | チャ      | ツバキ    | 1.06    | 0.002-0.1      | 0.01-0.03  |
| 希土類元素(La)  | コシダ     | ウラジロ   | 740     | 0.003-5        | 0.003-15   |
| 希土類元素(Lu)  | ヤシャブシ   | カバノキ   | 1.52    | 0.0005-0.1     | 0.03       |
| バナジウム(V)   | ミズゴケ    |        | 6.19    | 0.015-1.0      | 0.001-0.5  |
| クロム(Cr)    | ヤシャブシ   | カバノキ   | 3.7     | 0.02-1.0       | 0.03-10    |
| 鉄(Fe)      | ヒメヤシャブシ | カバノキ   | 820     | 20-200         | 70-700     |
| カドミウム(Cd)  | クロモジ    | クスノキ   | 19      | 0.5-2          | 0.1-2.4    |
| ルビジウム(Rb)  | クロモジ    | クスノキ   | 220     | 2-100          | 2-50       |
| バリウム(Ba)   | ウラジロ    | ウラジロ   | 880     | 10-200         | 8-150      |
| 臭素(Br)     | メタセコイア  | スギ     | 180     | 0.2-20         | 15?        |
| ヨウ素(I)     | メタセコイア  | スギ     | 8       | 0.0005-0.1     | 3-5?       |

## 3-1. 細胞内核酸の定量

蛍光色素を用いた定量法が確立される以前のことである。細胞内の微細な部分で核酸類を定量する手段として、カスパーソンの顕微分光測光法がしばしば使われてはいたが精確度に欠けるため、細胞内の核酸含量を正確に求めるには DNA と RNA を抽出した後、diphenylamine および Phloroglucinol 反応にかけるのが一般的な手法だった頃のことである。著者らは大量の試料を集めるのが困難だった原生動物類の細胞内核酸含量の定量に放射化分析を応用した。放射活性の測定は  $^{31}\text{P}(n, \gamma)^{32}\text{P}$  反応によって生じた  $^{32}\text{P}$  の  $\beta$  線に着目して行なわれたため、核酸の抽出には  $^{35}\text{Cl}(n, \alpha)^{32}\text{P}$  反応によって  $^{32}\text{P}$  を生ずる塩素を含まない酸を用いる等の工夫が必要であった。結果として DNA、RNA とともに diphenylamine、Phloroglucinol 法の約 50 倍の検出感度、またアメーバでは  $3.6 \times 10^3$  個体あれば核酸の測定が可能であった<sup>24)</sup> (Table 2)。これ以下の個体数の場合には、放射化による限度からではなく、抽出が困難になることによって測定不可能となった。

## 3-2. 細胞内各種酵素活性の定量

同じく  $^{31}\text{P}(n, \gamma)^{32}\text{P}$  反応を利用して、リン酸を切断する酵素の活性を測定した例<sup>25)</sup> を述べる。Fig. 3 に示した様に、キャピラリーとなったガラス容器の先端部を封じたマイクロセル (25  $\mu\text{l}$ ) の中で反応を起せしめた後、先端部を指で折り取ると容器はそのままペーパクロマト用のキャピラリーにかわる。濾紙上に着点後、基質と遊離したリン酸とを放射化し難い展開剤で分離する。次に、乾燥した濾紙を原子炉内で熱中性子照射し、オートラジオグラムにかけて遊離したリン酸量を測定する (Fig. 4)。遊離リン酸量は反応液中のホスファターゼ活性に対応する。培養開始後、段階を追って採集したテトラヒメナのホモジェネートを試料として用いることにより、各ステージに対応したホスファターゼ活性の変動を通常の方法の 100 倍の検出感度で測定することに成功した<sup>26)</sup>。同様な試みは ATPase 活性の測定にも応用された<sup>27)</sup>。

Table 2. Nucleic acid contents of protozoa determined by chemical and activation analysis.

| Organism               | Method                         | Number of cells determined | DNA  |                     | RNA   |       |
|------------------------|--------------------------------|----------------------------|------|---------------------|-------|-------|
|                        |                                |                            | (1)  | (2)                 | (1)   | (2)   |
| <i>T.pyriformis</i> W. | Chemical assay (diphenylamine) | $3.2 \times 10^6$          | 7.75 | 2.42                |       |       |
|                        | Chemical assay (phloroglucin)  | $3.2 \times 10^6$          |      |                     | 125.4 | 39.2  |
|                        | Chemical assay (phloroglucin)  | $1.6 \times 10^6$          |      |                     | 59.8  | 37.4  |
|                        | Activation analysis            | $8.0 \times 10^5$          | 2.22 | 2.78                |       |       |
|                        | Activation analysis            | $3.2 \times 10^5$          |      |                     | 13.45 | 42.0  |
|                        | Activation analysis            | $1.6 \times 10^5$          | 0.55 | 3.44                | 7.62  | 47.6  |
|                        | Activation analysis            | $8.0 \times 10^4$          | 0.25 | 3.13                | 3.35  | 41.9  |
|                        | Activation analysis            | $3.2 \times 10^4$          |      |                     |       |       |
| <i>E.gracilis</i>      | Activation analysis            | $3.6 \times 10^5$          | 0.15 | 0.42 <sup>(3)</sup> | 0.33  | 0.92  |
| <i>A.proteus</i>       | Activation analysis            | $5.3 \times 10^3$          | 0.26 | 49.1                | 1.56  | 294.3 |

(1) : Net content ( $\mu$ g P). (2) : Per cell ( $\mu$ g P  $\times 10^{-6}$ ). (3) : Materials were lost in the course of extraction because the amount of cell was too small.

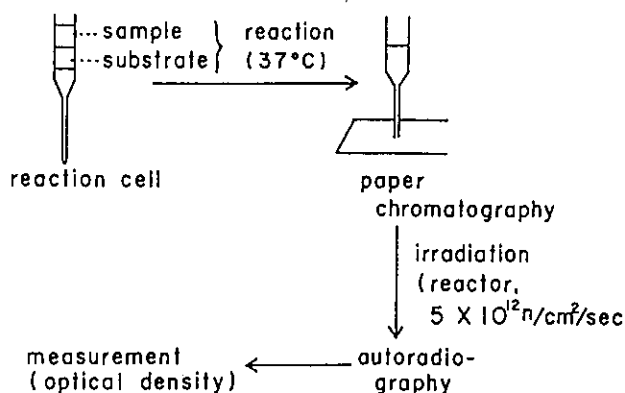
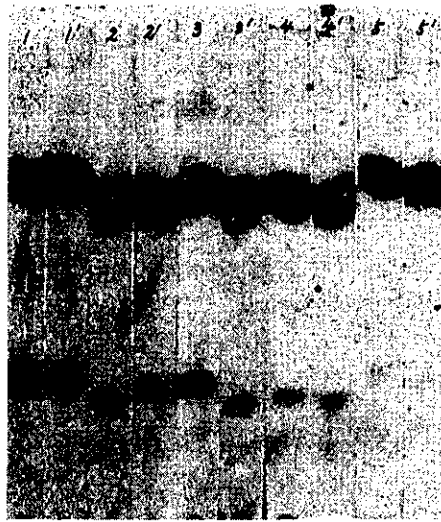


Fig. 3. Schematic diagram of enzymic assay.

#### 4. 化学進化・生命の起源の実験研究への放射化分析の利用。

各種元素の原始海水中での濃度と生物が利用する元素との間に深い関係が見られることは、故江上博士によって、既に提起されている。江上博士は生物体が利用できた元素の海水中濃度の下限を 1 nM としてこれを Biological Critical Concentration と定義し、各元素の海水中濃度と生物体の利用度との関係に言及した<sup>28)</sup>。この命題は正しく、疑う余地は全



**Fig. 4. Autoradiograms for the determination of alkaline phosphatase activity in *Tetrahymena*.** Arabic figures show the days of culture after inoculation. The assay was attained twice each separately.

く無いが、逆は必ずしも成立しない。つまり海水中濃度の高い元素の全てが必ずしも生体利用されているわけではない。そうした元素を濃度の高さに基づいて分類すると、第一のグループとしてBrとSrが挙げられる。この二者の海水中濃度は全ての微量必須元素のそれよりはるかに高く、生体構成元素類のそれに匹敵する。第二のグループに属するものとしてBa、In、Al、U、Ti等がある。これら元素の海水中濃度は必須元素であるP、I、Fe、Cu、As、Mn等と較べて遜色はない。第三グループにはCe、Laを含む多くの元素がある。中でもCeはCo、Se、Crよりもはるかに海水中濃度が高い。著者らはこうした矛盾点について、その理由を個々に明らかにすることが「化学進化・生命の起源」を論ずる上で大いに役立つであろうと考え、Ce、La等を含む希土類元素と生物との間にどのような相互作用が見られるかを探索するための総合的研究に着手した。それは放射化分析が希土類元素の多くに対して極めて高い検出感度を持つことが最大の理由である。希土類元素は或る種の動植物体内に集積することが、幾つかの文献によって知られている<sup>29,30)</sup>が、その生理学的意義は不明である。

#### 4-1. シダ植物葉中の希土類元素含量に見られる相関性

著者らは最近、シダ植物類が希土類元素を集積することを見出だしている<sup>31)</sup>ので、その意義を明らかにすることによって、「生命と希土類元素とのかかわり」を調べる足掛かりにしようと考えた。異なる二種類の元素間の相関はそれら元素の生体内での役割に関する重要な情報を与える。例えば、ある種の希土類元素はCaイオンとの間で役割に関する互換性を持つと云われている<sup>32,33)</sup>。もしそれが普遍性をもつならば、シダ植物葉中の希土類元素とカルシウムとの相関は負の相関を与えるかも知れない。日本全国9地点から集めた142個体のシダについて実際に調べると<sup>34,35)</sup>、Fig. 5の様になる。図はシダ植物が、Laについては4ヶ所にまたがる幅広い濃度分布をもつのに反して、Caについてはほぼ一定の濃度分布をもつことを示す。つまり、CaとLaの間には何らの相関も見出だすことは出来ない。これはCaが必須元素であり、シダは土壌中の濃度には無関係に必要な量の

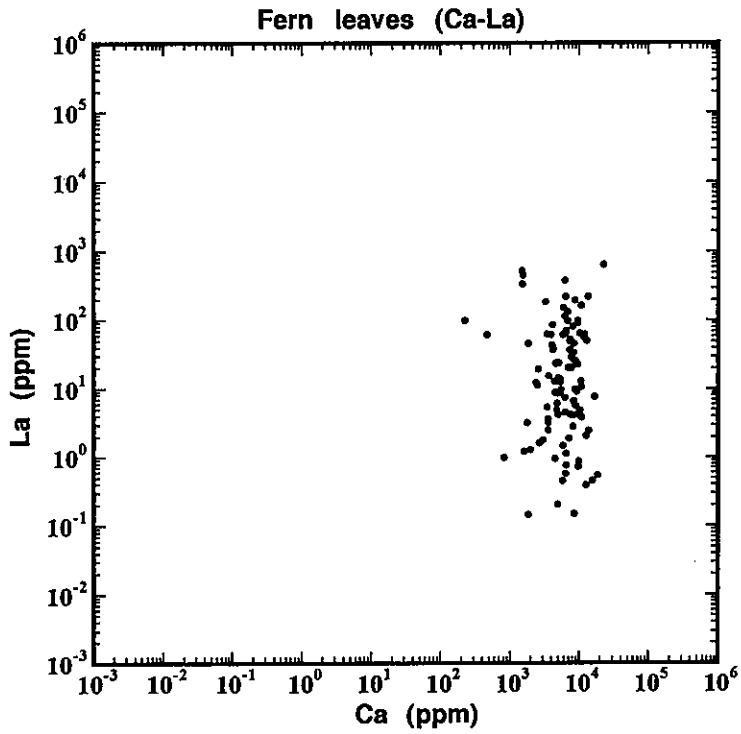


Fig. 5. Correlation between the Ca and La contents in fern leaves.

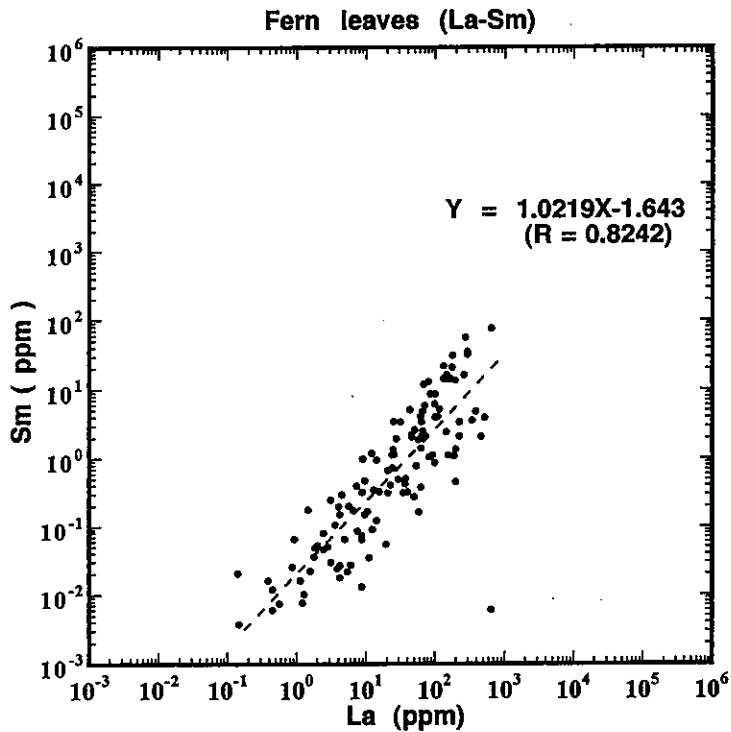


Fig. 6. Correlation between the La and Sm contents in fern leaves.

Ca を吸収するのに対し、La は土壤中濃度や植物固有の性質に依存して吸収されることによると考えられる。また、La 以外の多くの希土類元素と Ca との関係も上記の通りとなり、測定濃度域では互換性の存在は認められない。一方、多くの希土類元素相互間関係は一例として示した La と Sm との関係 (Fig. 6) の様になり、両者には強い正の相関が認められる。 $Y=1.0219X-1.643$  (相関係数  $R=0.8242$ ) で与えられる関係は両者がほぼ等しい濃度でシダ植物中に存在することを示している。どちらかに偏った選択性はうかがわれない。ところが希土類元素の中でも Eu と Tb がどちらかに関与した場合には Fig. 6 の様に散布図は Sm/Eu 比の異なる二つのグループに分かれる。このことはシダ植物の希土類元素に対する吸収・集積や土壤環境からの供給の在り方等の違いの反映であると考えることが出来る。そこでさらに詳しく検討してみた。まず、散布図上の 142 個体のシダ植物をウラジロ、シシガシラ等の 9 種類の植物種の違いに基づいて分類したところ、ウラジロとオシダは Sm、Eu 両元素の濃度が高く、シシガシラ、その他では低い傾向にあることが判り、しかもこの傾向は 2 本のラインそれぞれに独立に表れた。二つに分かれる原因は植物種の違いによるのではなかったのである。次に、全シダを 9 地点の採集地域に基づいて分類する (Fig. 7)。二つに分かれたと見えたのは実は、三つのグループであったことが判る。すなわち、滋賀、兵庫 (六甲山) 地域から採集したシダは Sm/Eu 比が最も高く (約 20)、次いで大阪、鹿児島地域からのシダ (約 5)、最後に Sm/Eu 比の最も低い (約 0.5) 岡山、沖縄地域からのシダ植物に分類されることが判った。どうやら土壤の方に原

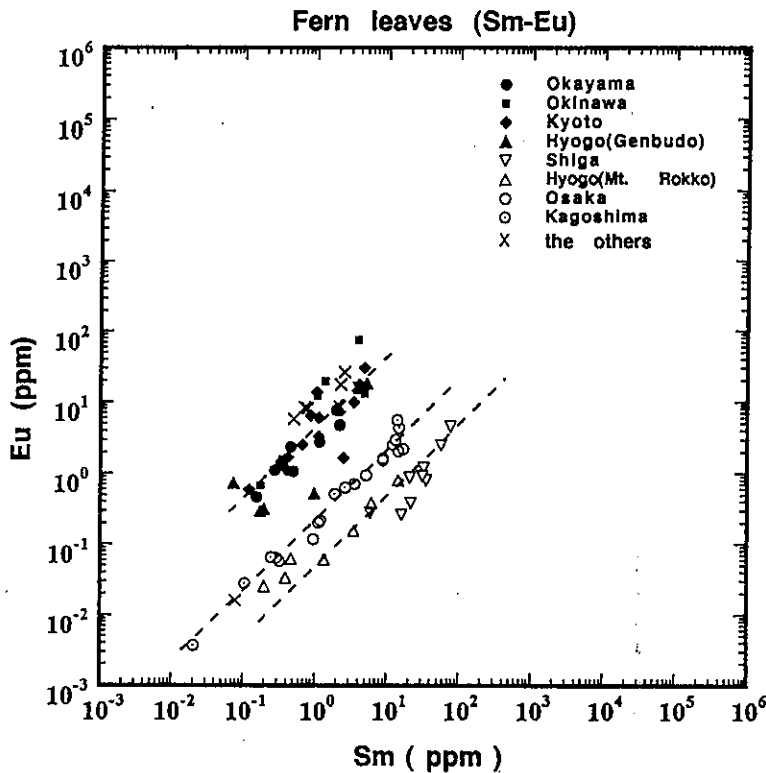


Fig. 7. Correlation between the Sm and Eu contents characterized with respect to sampling site.

因があるらしい。しかしながら、同じ9地点から採集した土壤中の Sm/Eu 比は一本の線に乗るので、単なる土壤中濃度だけでは説明がつかない。三つに分かれた機構を明らかにするには、土壤の pH やイオン交換能その他の現象を考慮した、いわゆる土壤からの可給度を含めた検討が必要であろう。

#### 4-2. 培養細胞における希土類元素の取込み

4-1 で述べた「シダ植物への希土類元素の集積」と平行して、著者らによって進められている培養細胞を用いた実験結果<sup>36)</sup>について簡単に触れる。培養細胞を低濃度の希土類元素で処理すると(37℃)、元素は細胞の中に急速に取り込まれる。希土類元素を含まない培地に置換した際の排出パターンは急速な成分とゆっくりした成分とからなる。熱処理によって殺された細胞では取込も排出も急激である。培養を 0℃ で行なった場合にも同じ傾向が伺われる。これらのことは細胞は生きている限り、また正常な代謝条件にある限り、希土類元素の大量の侵入に対して抵抗していることを示している。取り込まれた希土類元素は元素により異なった率で細胞内高分子類に結合して存在することも観察されている。意外なことに蛋白質よりも核酸の方が結合率は高い。さらにまた、細胞内への取込みでは各希土類元素は皆同じパターンを示したが、高分子への結合パターンでは異なった挙動を示した。すなわち、Ce は DNA に多く、La、Sm 及び Eu は RNA に多く結合していた。驚くべきことに、細胞内高分子類はこの様に何らかの仕組みによって、異なった希土類元素を認識しているのである。

#### 5. おわりに

「放射化分析の生物学への応用」と云う範疇で多くの研究が行なわれてきた。それらの中のほんの一例として、著者らがこれまでに行なってきた研究について概説した。後半に述べた「希土類元素と生物との相互作用」の部分は、この優れた技術である放射化分析を「化学進化・生命の起源」研究に応用する術を模索する中で生まれ、現在、著者らが最も力をいれている領域である。希土類各種元素の共通点は電子構造が  $6s^2$  であることと云うことである。各元素の電子構造の相違が 4f 準位で起こっているだけなので、化学的性質は互いによく似ている。このことが存在量の高さにもかかわらず、生物が利用できなかった理由の一つと考えられている。生体が区別出来ない多種類の元素が混ざり込んだならば、生物にとって都合が悪かろうと云うわけである。我々の現在の到達点では「何故、生物が利用しなかったのか」について、未だ何も云うことは出来ない。しかしながら、観察された事実によるならばシダ植物は希土類元素を葉組織に集積するし、集積パターンも元素によって違う。培養細胞においても、分子のレベルでは希土類元素間の違いが認識されているらしい。したがって、少なくとも上記の理由が「利用されなかった」根拠になるとは考え難い。これらの実験をさらに積み重ねることによって、「希土類元素と生物との相互作用」を明らかにしたいと考えている。

#### 謝辞

本研究の一部は文部省科学研究費（重点領域研究「希土類錯体の新展開」、No.06241107）の援助により行なわれた。

#### 文献

1. Joliot, F. and Curie, I., *Nature*, 133, 201 (1934).
2. von Hevesy, G. and Levi, H., *Danske Videnskabs Selskabs Matth. Fys. Medd.*, 14 (1936).

3. Maggi, L., Meloni, S., Valentini, M. T. and Oddone, M., *J. Radioanal. Chem.*, 57, 193 (1983).
4. Ziliacus, R., *Radiochem. Radioanal. Lett.*, 57, 137 (1983).
5. Ndiokwere, Ch. L., *Radiochem. Radioanal. Lett.*, 59, 201 (1983).
6. 高城裕之、木村敏正、岩島清、山形登、分析化学、32, 512 (1983).
7. Mishra, U. C., Shakh, G. N., *J. Radioanal. Chem.*, 78, 385 (1982)
8. Damyanova, A., *J. Radioanal. Chem.*, 77, 241 (1983).
9. Mumba, N. K., Csikai, J. and Peto, G., *Radiochem. Radioanal. Lett.*, 52, 373 (1982).
10. Manri, T., Mukai, Y. and Iritani, N., *Radiochem. Radioanal. Lett.*, 55, 67 (1982).
11. Tomza, Y. and Maenhaut, W., *J. Radioanal. Chem.*, 86, 173 (1982).
12. Cesana, A., Ciaska, A., Cuomodi Capiro, N., Terrasi, M. and Tasa, V.,  
*J. Radioanal. Chem.*, 78, 347 (1983).
13. Glascock, M. D. and Corman, M. F., *Radiochem. Radioanal. Lett.*, 57, 73 (1983).
14. Lyon, W. S. and Ross, H. H., *Anal. Chem.*, 56, 83R (1984).
15. 小山睦夫、ふんせき、12, 86 (1994).
16. 小林慎江、中性子放射化分析の原理と実験法、「研究炉の世界」、編集西原英晃、  
学術出版印刷、pp.104 (1996).
17. Lewin, R. A., "*Physiology and Biochemistry of Algae*" (Lewin, R. A., ed.), Academic Press,  
New York and London, (1962).
18. Warren, H. V. and Delavault, R. E., *Bull. Geol. Soc. Am.*, 61, 123 (1950).
19. Yamagata, N. and Murakami, Y., *Nature*, London., 181, 1808 (1958).
20. Kraus, W. "*Encyclopedia of Plant Physiology*" (Ruhland, W., ed.), vol. 4, p. 755, Springer,  
Berlin (1958).
21. Cannon, H. L., *Sciences*, N. Y., 132, 591 (1960).
22. 高田実弥、松原丘、片山幸士、西村和雄、赤星光彦、小山睦夫、*Viva Origino*, 21, 205  
(1993).
23. Takada, J., Nishimura, K., Akaboshi, M., Matsubara, T., Katayama, Y. and Koyama, M.,  
*J. Radioanal. Nucl. Chem.*, (1996) in press.
24. Akaboshi, M., Maeda, T. and Waki, A., *Biochim. Biophys. Acta*, 138, 596 (1967).
25. 赤星光彦、河合建一、脇朝子、動物学雑誌、77, 379 (1968).
26. Akaboshi, M., Kawai, K. and Waki, A., *Anal. Biochem.*, 46, 683 (1972).
27. 河合建一、赤星光彦、動物学雑誌、82, 24 (1973).
28. Egami, F., *J. Biochem.*, 77, 1165 (1975).
31. Koyama, M., Shirakawa, M., Takada, J., Katayama, Y. and Matsubara, T., *Proc. 7th Intern.  
Conf. Modern Trend in Activation Analysis* (MTAA-7015), (1986).
32. Birnbaum, E. R., Gomez, J. E. and Darnall, D. W., *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 5287 (1970).
33. Majumdar, S., Baker, R. F. and Karla, V. K., *Biochim. Biophys. Acta.*, 598, 411 (1980).
34. Takada, J., Nishimura, K., Sumino, T., Tanaka, Y. and Akaboshi, M., *J. Radioanal. Nucl. Chem.*,  
(1996) in press.
35. Takada, J., Nishimura, K., Sumino, T., Tanaka, Y. and Akaboshi, M., *Toxicol. Environ. Chem.*,  
(1996) in press.
36. 高田実弥、田中愛子、隅野照家、川本圭造、河合建一、赤星光彦、*Viva Origino*, 24  
(1996) in press.



# Functions of the universal CCA end of tRNA in translational processes

Koji Tamura\* and Tsunemi Hasegawa#

\*The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN)

2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-01, Japan

#Institute of Space and Astronautical Science

3-1-1 Yoshinodai, Sagamihara, Kanagawa 229, Japan

(Received February 5, 1996; Accepted March 1, 1996)

## ABSTRACT

To study the role of a universal CCA sequence at the 3'-end of tRNA in the translational processes, base substitutions were introduced into the transcripts of *E. coli* tRNAs and the effects on the proofreading mechanism of the erroneous aminoacyl-tRNA and on the peptidyl transfer activity were investigated. The results showed that mutations at position 76 of tRNA<sup>Val</sup> caused an appreciable level of misaminoacylation with threonine. The levels of ATP hydrolysis during threonylation in the terminal mutants were lower than those in the wild type. The mutations introduced at positions 75 and 74 also caused threonylation instead of reducing valylation, although its activity was weaker. These findings indicate that the CCA sequence, especially the base portion of the terminal adenosine residue, plays a crucial role not only in the aminoacylation efficiency with valine but also in preventing from misaminoacylation by hydrolysing the misactivated threonyl-tRNA<sup>Val</sup>. Peptidyl transferase activity, monitored by "fragment reaction" with a slight modification, was decreased by mutation at any one base of CCA. The effect of mutation was moderate in the UCA, CUA and CCG mutants. Replacement of A76 by a pyrimidine nucleotide, or replacement of either C74 or C75 by a purine nucleotide caused a marked decrease in the activity. These findings suggest that the universal CCA terminus of tRNA makes a functional interaction with ribosomal RNA by base-pairing.

Viva Origino 24(1996)125-136

© 1996 by SSOEL Japan



# tRNA に共通に存在する CCA 末端構造の機能

田村浩二\*、長谷川典巳#

\*理化学研究所・生体物理化学研究室

〒351-01 埼玉県和光市広沢2-1

#宇宙科学研究所・惑星大気物理学部門

〒229 神奈川県相模原市由野台 3-1-1

## 1. はじめに

mRNA 中の塩基配列をいかにタンパク質のアミノ酸配列に解読するのかという、遺伝情報翻訳の流れの中で、tRNA は非常に重要な役割を果たしている。tRNA は mRNA 中のコドンを認識するという機能だけでなく、特異的なアミノ酸を受容し、それを伸長しつつあるポリペプチド鎖の中へ運搬していくという機能をも持っていないと行かない。従って、tRNA のタンパク質合成系における役割を明らかにすることは、極めて重要な課題である。

tRNA は分子量が25000~30000で、Dループ、アンチコドンループ、Tループから成るクローバーリーフ構造をもち、共通配列であるDループのGG配列とTループ上のΨCが水素結合することにより、全体としてはL字型の立体構造をとっている<sup>1,2)</sup>。このtRNAには3'末端にCCAという配列が存在している<sup>3)</sup>。この配列はすべてのtRNAに共通であるばかりでなく、アミノアシル-tRNA合成酵素(ARS)によるアミノアシル化は、このCCA末端のアデノシンに起こる反応であり、アミノ酸と核酸という全く異質のものを結合させる、翻訳における最も重要な反応の一つである。従って、このCCA末端のARSによる認識のされ方は、アミノアシル化の本質に関わる重要な問題であると言える。また、このCCA配列はアミノアシル化以降のリボソーム上の反応でも重要な構造であると考えられている。しかし、このCCAという余りにもよく知られている事実にもかかわらず、翻訳系の各ステップでのCCA末端の塩基の寄与の有無はまだ完全には解明されていない。

本稿では、tRNAのCCA末端が翻訳過程における役割として考え得る可能性のうち、

### A、アミノアシル化とその校正機構

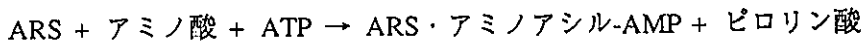
## B、ペプチド転移反応

への寄与に焦点を絞り、tRNA<sup>Val</sup>とそのCCA塩基変異体を用いた実験から得られた、CCA末端の役割について概説する。

### 2. アミノアシル化の校正機構

#### 2-1 序

tRNAのCCA末端で起こるアミノアシル化反応は20種類のアミノ酸を識別するという点で、翻訳の過程において鍵となる反応である。このアミノアシル化反応は非常に高い精度で起こらなければならない。この反応はARSにより、マグネシウムイオンの存在下で行われ、エステル結合に必要なエネルギーはATPの加水分解によって得られる2段階反応が一般的である<sup>4)</sup>。



この最初のステップでARSがアミノ酸を識別する能力は、構造の類似したアミノ酸に対してはそれほど高くない。バリン-tRNA合成酵素 (ValRS)<sup>5-7)</sup>はtRNA<sup>Val</sup>の3'末端のアデノシンの2'OHとバリンとの間にエステル結合を形成させる。しかし、この酵素はバリンと形のよく似たトレオニンをも活性化することが知られている<sup>8)</sup>。この誤って活性化されたThr-AMP・ValRSは、tRNA<sup>Val</sup>が結合することによって、加水分解を受け、誤りを次の過程に持ち込まないようにコントロールされている<sup>9,10)</sup>。

このプルーフリーディングと呼ばれる校正機構については、tRNAの3'末端リボースの水酸基が重要であると言われてきた<sup>9,11)</sup>。しかし、塩基そのものがプルーフリーディングにどのような役割をしているかについては、未だ明らかにされていない。

#### 2-2 アミノアシル化の校正機構におけるCCA塩基の役割

SampsonとUhlenbeckのT7ポリメラーゼによる*in vitro*転写反応の方法<sup>12)</sup>を一部変更して、tRNA<sup>Val</sup>の3'端のC74C75A76の各塩基を変換すると、程度に差はあるが、ValRSによりトレオニンのアミノアシル化が起きた (Fig. 1)<sup>13)</sup>。特に、76番目の塩基、つまり、3'末端のアデニンを他の塩基に変換すると、74、75番目の塩

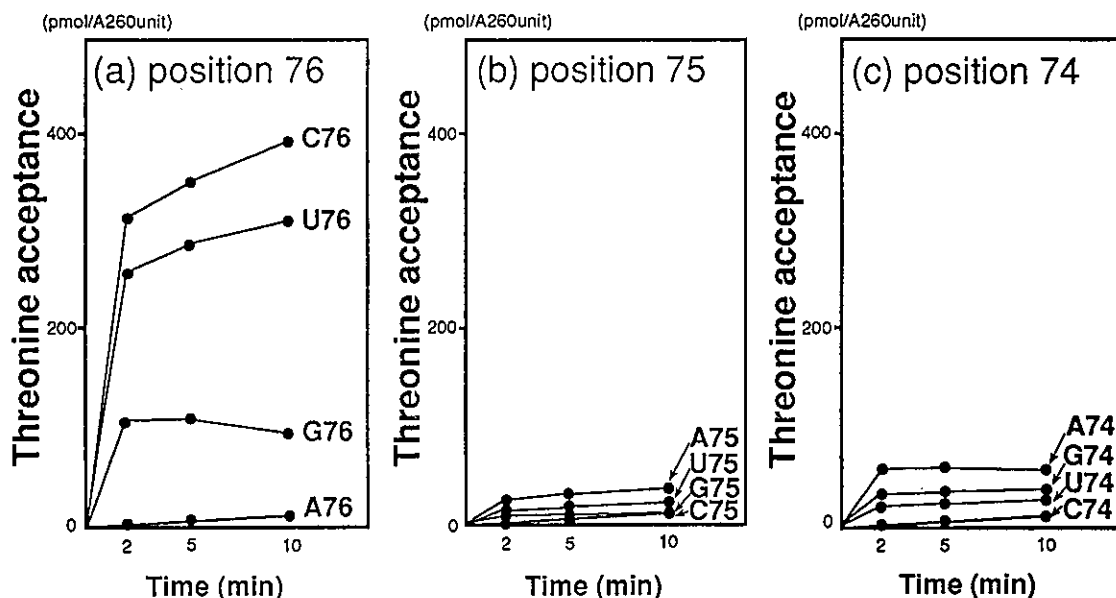


Fig. 1. Time courses of aminoacylation with threonine by valyl-tRNA synthetase for the N76 (a), N75 (b) and N74 (c) variants.

基を変換した場合に比べて、非常に高いトレオニン受容活性を示した。76番目の4種の塩基の中では、AをCやUに変換したときがGに変換したときより高いトレオニン受容活性を示したが、このGの変換でさえ、74、75番目の塩基の変換よりは、極めて高いトレオニン受容活性であった。C74C75A76配列の中ではA76が最も強くプルーフリーディングに寄与していると理解できる<sup>13)</sup>。

プルーフリーディングのメカニズムをより詳しく調べるために、トレオニンのミスアシル化活性の高いA76の変異体に対しては、反応中に生成するAMP量を測定した。ここで議論するAMPの生成量は、tRNA<sup>Val</sup>の変異体が介在した後での値であるが、これを測定することによって、プルーフリーディングにおけるCCA末端の塩基の役割が調べられることになる。

76番目にAを持つ正常なtRNA<sup>Val</sup>転写物は、トレオニンのアミノアシル化の際に、他の3つの変異体よりも多くのAMP生成が観測されたが、この場合、

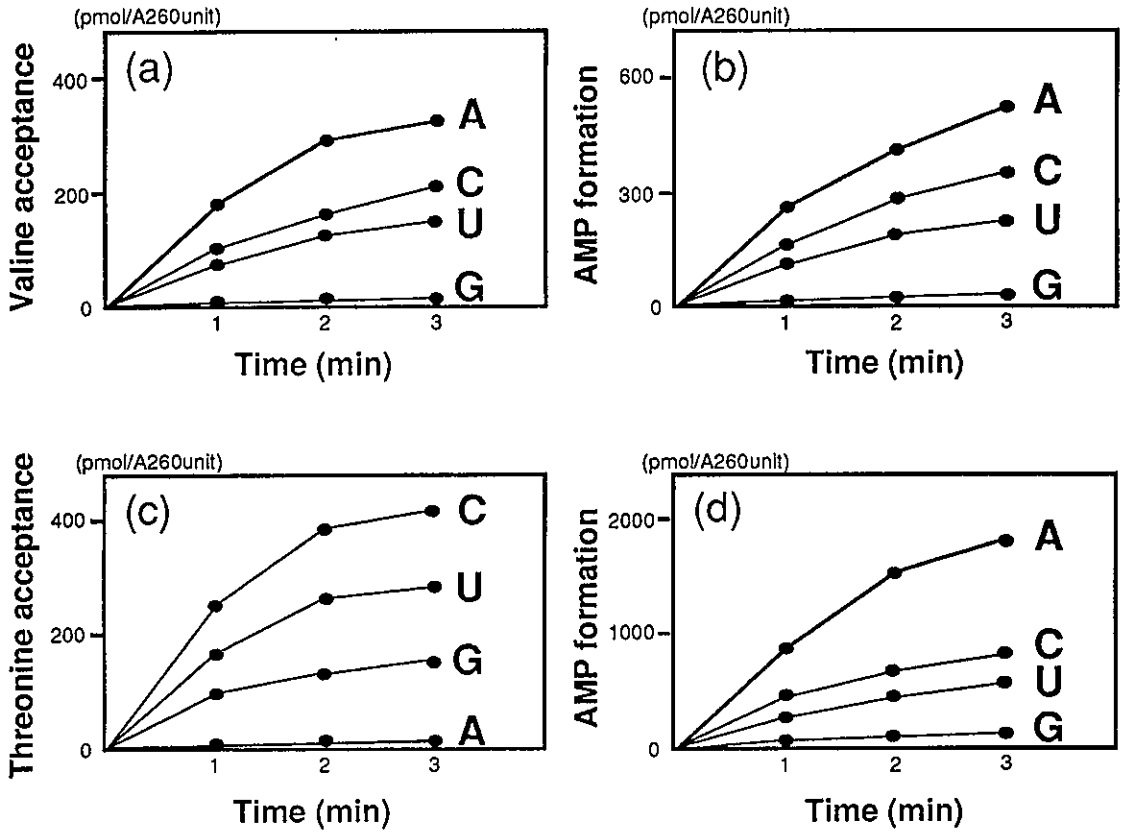


Fig. 2. Amino acid charging and AMP production activities for the N76 variants.  
 (a) Time courses of aminoacylation with valine.  
 (b) Time courses of AMP production upon valylation.  
 (c) Time courses of aminoacylation with threonine.  
 (d) Time courses of AMP production upon threonylation.

Thr-tRNA<sup>Val</sup>がほとんど生成されていないことから、プルーフリーディングの機構が効果的に働いていることがわかる (Fig. 2.(c),(d))。tRNA<sup>Val</sup>の塩基変換体 (G76、C76、U76) のバリン受容とトレオニン受容の定性的傾向は類似している (Fig. 2.(a)-(d))。正常な配列のtRNA<sup>Val</sup>はトレオニンを受容しないが、そのときのAMP生成が大きいことを考えると、バリンであれ、トレオニンであれ、そのアミノアシル化の様式は非常に似ていることがわかる。従って、ValRSにおいては同一の部位がこれらのアミノアシル化に関与していると考えられる。一

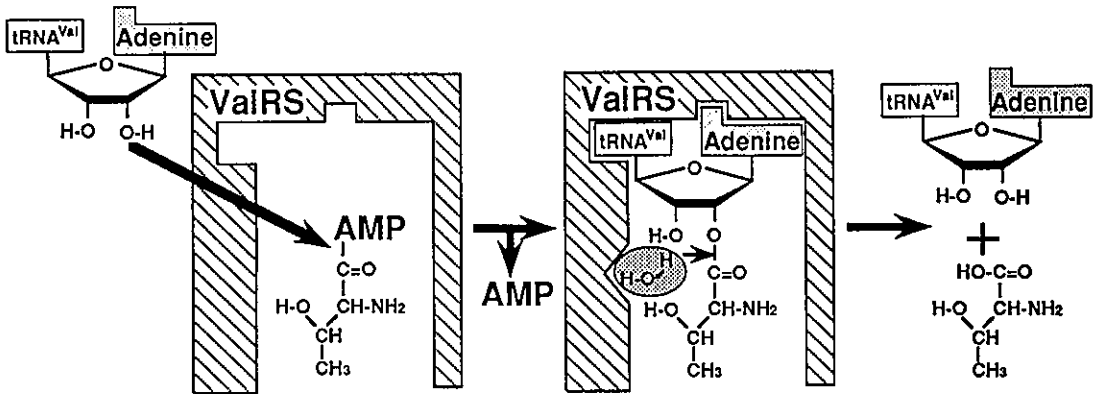


Fig. 3. Possible mechanism of the aminoacylation of wild-type tRNA<sup>Val</sup> with threonine and the hydrolysis by valyl-tRNA synthetase.

方、トレオニンを受容しない、正常な配列のtRNA<sup>Val</sup>の場合、著しくAMPが生成されたのに対し、76番目の塩基変換体は、トレオニンの受容に見合ったようなAMP生成量しか示さなかった (Fig. 2(c),(d))。これは、アミノアシルレーションの場合とは違った様式を示している。従って、このことは、トレオニンを排除するための部位がValRSに別にある、tRNAの3'末端のアデニンがValRSによって認識されると、酵素のコンフォーメーションが変化し、加水分解のための空間的な配置が最も効果的になるものと考えられる (Fig. 3)。一方、tRNAの3'末端の塩基がアデニンでないとValRSによって認識されず、加水分解をするための酵素のコンフォーメーションの変化が起きないのであろう。いずれにせよ、tRNA<sup>Val</sup>のA76がValRSによって正確に認識されることによって、トレオニンのミスアシルレーションが防がれ、アミノアシル化の高い精度が維持されることになる<sup>13)</sup>。

### 3. ペプチド転移反応

#### 3-1 序

これまで述べてきたように、翻訳過程の最初のステップであるアミノアシル化は、非常に高い精度で行われている。しかし、アミノアシル-tRNAがコドンに依存してリボソームに結合し、ひき続くステップが正確に進行しなければ、アミ

ノアシル-tRNA合成酵素の相互作用の特異性というものは無意味なものになってしまう。tRNAとリボソームとの相互作用の過程では、アンチコドンを除いて、tRNAの共通構造のみが重要な部位になってくる。従って、tRNAの3'末端のCCA配列はこれらのプロセスにおいて少なからぬ役割を果たしていると考えられる。

リボソームに内在するペプチジルトランスフェラーゼは、タンパク質合成系において非常に重要な役割を果たしている<sup>14)</sup>。化学的なフットプリンティングの実験などにより、tRNAが23S rRNAと相互作用をしているということが知られている<sup>15)</sup>。CCA末端もこうした実験によって、ペプチジルトランスフェラーゼとの相互作用が示唆されてきている<sup>15)</sup>。しかし、これまでの実験は、CCA末端の重要性を示唆するものの、個々の塩基が、このペプチジルトランスファー反応に果たす役割については、明解な解答を与えてくれてはいなかった。

ペプチジルトランスフェラーゼ活性を調べるのに有効な方法として「フラグメント反応」と呼ばれるものがある<sup>16)</sup>。この反応を用いれば、mRNAやタンパク質因子やGTPを必要とせず、N-アセチル-アミノアシル-tRNAとピューロマイシンを基質として、リボソームと適切な金属イオンと33%メタノールの存在下で、ペプチジルトランスファー反応をモニターすることができる。tRNA<sup>Val</sup>のCCA末端の塩基変換体に対して、この方法を用いることにより、CCA末端のペプチジルトランスファー反応への寄与について調べた。

### 3-2 ペプチジルトランスファーにおけるCCAの役割

ペプチジルトランスフェラーゼはリボソームに内在する酵素であり、Pサイトにあるペプチジル-tRNAのペプチジル残基をAサイトにあるアミノアシル-tRNAに転移させる働きをしている<sup>14)</sup>。本実験では、Pサイトに入ったN-アセチル-バリン-tRNA<sup>Val</sup>のCCA変異体のN-アセチル-バリン残基がピューロマイシンへ転移する反応を測定した。

実験の結果をまとめると、74番目と75番目の塩基はピリミジンで、76番目の塩基はプリンの場合に、ペプチジルトランスフェラーゼ活性を示すということになった (Fig. 4)。しかし、この条件を満たすC74C75A76以外のU74C75A76、C74U75A76、C74C75G76という変異体の場合も、その活性は低下している。従って、ペプチジルトランスフェラーゼ反応の効率を上げるためには、やはりCCAで



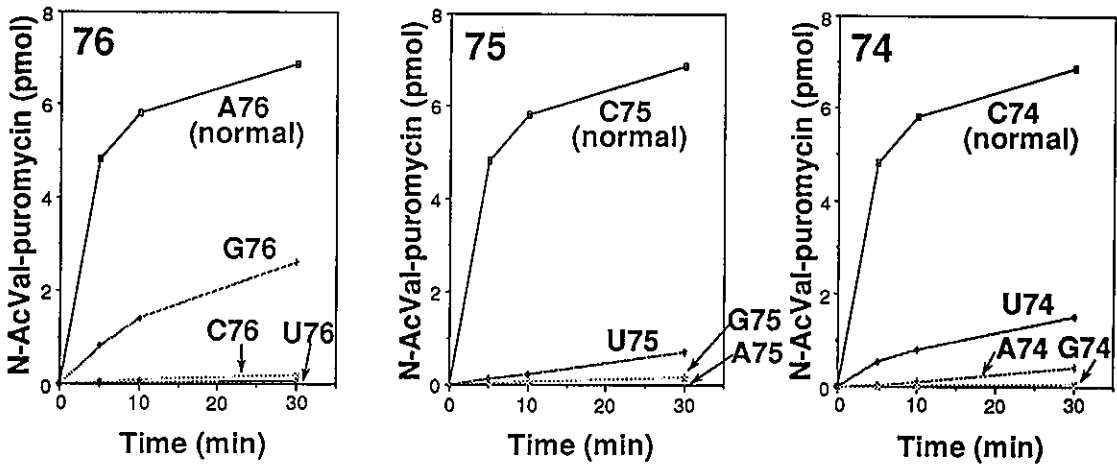


Fig. 4. Time courses of the formation of N-acetyl-valyl-puromycin in the reaction of N-acetyl-valyl-tRNA<sup>Val</sup> (N76, N75 and N74 variants) and puromycin.

あることが必要だと考えられる<sup>17)</sup>。

最近さまざまな研究によって、tRNAはリボソームの23S rRNAと相互作用することが示唆されている<sup>15,18,19)</sup>。今回の実験から、C74、C75はUでもペプチジルトランスファー活性があり、A76はGでも活性があった。とすれば、CCAとの相互作用という意味では、C74-G、C75-G、A76-Uという、ワトソン-クリック型塩基対だけでなく、U74-G、U74-G、G76-Uという、G-Uのウォブル塩基対での相互作用もある程度許す反応系であるということが出来る。これらの結果から、tRNAのCCA配列がUGG配列ないしはUGGを形成するドメインと塩基対を形成してペプチジルトランスフェラーゼ反応を確かなものになっていることが明らかになった<sup>17)</sup>。

#### 4. おわりに

遺伝暗号が正確に翻訳されるために、tRNAは非常に重要な働きをしている。tRNAはその構造がX線結晶解析によって解かれた数少ないRNAのひとつであり、しかもその3'末端には必ずCCAという配列が存在している。今や、遺伝子工学を用いたタンパク質大量発現系が生物科学研究の主流として大手を振るい、我々

の細胞における様々なメカニズムさえ解明されようとしている。しかし、研究者が当然として使っているタンパク質合成系についての本質的な理解は今だに十分ではない。かつてクリックが予言したようにtRNAは「アミノ酸の鋳型となる」機能と「配列順序を決定する」機能をもっており、tRNAのタンパク質合成系における役割を明らかにすることは、分子生物学の根幹につながる重要な課題である。

これまで見てきたように、翻訳過程においてtRNAのCCA末端の塩基は、いくつかの重要な役割を果たしている。すべてのtRNAでCCA配列が保存されていることは、何らかの必然性があるからであり、本稿で明らかにした事実も、その必然性の一部を証明したことになる。しかし、生体内では、*in vitro*の場合よりも更に苛酷な条件が課せられており、そうした中で翻訳が正しく行われるためには、この配列が不可欠になってくるのであろう。これらのより詳細な解明のためには、X線結晶構造解析などの結果を待たねばならないだろうが、今回の実験結果が今後の研究に重要な手がかりを与えることを希望したい。

## 参考文献

- 1) Kim, S. H., Suddath, F. L., Quigley, G. J., MacPherson, A., Sussman, J. L., Wang, A. H. J., Seeman, N. and Rich, A. : *Science*, **185**, 435-440 (1974)
- 2) Woo, N. H., Roe, B. A. and Rich, A. : *Nature*, **286**, 346-351 (1980)
- 3) Sprinzl, M., Hartmann, T., Weber, J., Blank, J. and Zeidler, R. : *Nucleic Acids Res.*, **17**, r1-r172 (1989)
- 4) Schimmel, P. : *Annu. Rev. Biochem.*, **56**, 125-158 (1987)
- 5) Borgford, T. J., Brand, N. J., Gray, T. E. and Fersht, A. R. : *Biochemistry*, **26**, 2480-2486 (1987)
- 6) Härtlein, M., Frank, R. and Madern, D. : *Nucleic Acids Res.*, **15**, 9081-9082 (1987)
- 7) Heck, J. D. and Hatfield, D. W. : *J. Biol. Chem.*, **263**, 868-877 (1988)
- 8) Fersht, A. R. and Kaethner, M. M. : *Biochemistry*, **15**, 3342-3346 (1976)
- 9) Igloi, G. L., von der Haar, F. and Cramer, F. : *Biochemistry*, **16**, 1696-1702 (1977)
- 10) Sprinzl, M. and Cramer, F. : *Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.*, **22**, 1-69 (1979)
- 11) von der Haar, F. and Cramer, F. : *Biochemistry*, **15**, 4131-4138 (1976)

- 12) Sampson, J. R. and Uhlenbeck, O. C. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1033-1037 (1988)
- 13) Tamura, K., Nameki, N., Hasegawa, T., Shimizu, M. and Himeno, H. : *J. Biol. Chem.*, **269**, 22173-22177 (1994)
- 14) Maden, B. E. H., Traut, R. R. and Monro, R. E. : *J. Mol. Biol.*, **35**, 333-345 (1968)
- 15) Moazed, D. and Noller, H. F. : *Cell*, **57**, 586-597 (1989)
- 16) Monro, R. E. and Marcker, K. A. : *J. Mol. Biol.*, **25**, 347-350 (1967)
- 17) Tamura, K. : *FEBS Lett.*, **353**, 173-176 (1994)
- 18) Moazed, D. and Noller, H. F. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3725-3728 (1991)
- 19) Samaha, R. R., Green, R. and Noller, H. F. : *Nature*, **377**, 309-314 (1995)



# 関係小器官ーミトコンドリア, 葉緑体, そしてペルオキシソームーの起原と進化

中村 運

甲南大学理学部生物学教室

(〒658 神戸市東灘区岡本8丁目9-1)

## 要旨

ミトコンドリア、葉緑体、そしてペルオキシソームの3小器官は、相互に代謝的に相関している。ミトコンドリアと葉緑体は、ともにユビキノーン-シトクロム $b$ -シトクロム $c$ の電子伝達系を持ち、ATPなど細胞エネルギーの生産拠点の役割を果たしている。そこで、シトクロム $bc$ はクリステやチラコイド膜を介したプロトン輸送を行い、そのプロトン勾配がATP合成（プロトンポンプとATPシンターゼ）の電気化学的ポテンシャルをつくり出している。これらの点から、ミトコンドリアと葉緑体のエネルギー代謝は、原核時代の共通祖先をもっており、両小器官は真核細胞分化における膜による代謝分画の結果として出現した、と考えられる。ペルオキシソームは、ミトコンドリアと代謝的に強く連関している。これら3小器官は、2分裂能を有するが、この能力はDNAの含有とは関係ない。



# Origin and Evolution of the Related Organelles: Mitochondrion, Chloroplast, and Peroxisome

Hakobu Nakamura

Biological Institute, Faculty of Science, Konan University,  
Kobe 658, JAPAN

*(Received February 15, 1996; Accepted April 17, 1996)*

## 1. Introduction

Mitochondrion and chloroplast are eukaryotic organelles that produce ATP and other types of energy to maintain the cellular life and reproduce the descendants. The life activities are the "works" including chemical, physical, and physiological phenomena. On the other hand, although peroxisome differs from the mitochondrion and chloroplast in many ways and contains oxidative enzymes at a higher concentration, it has been assumed to be a figure of the vestigial mitochondrion.

Therefore, these organelles contain specific metabolisms for the production of ATP and other types of energy and they have specific membranous morphologies for these purposes, which can be easily electron-microscopically discriminated.

When the first-living cell was generated in the primitive sea as the result of chemical evolution for billions of years, the atmosphere contained little molecular oxygen and the proto-cells had incorporated ATP as a product during the chemical evolution from the sea. However, they produced ATP themselves through a very primitive metabolism, called fermentation, that did not use oxygen as an oxidant of organic substances for the energy substrates. The metabolism in the present-day cells occurs in the cytosol, which is in a gelled state and the fermentation enzymes are three-dimensionally arranged and self-assembled within it, the particle being called glycosome. It is evolutionarily important to notice that such a primitive metabolism has not been contained in the membranous organelles. Then, the reactions for ATP production are referred to as "substrate-level phosphorylation"

Abundant prokaryotes must have filled the primitive sea by active reproduction under the soup of organic substances, which were produced and accumulated during the chemical evolution. This living world would

finally exhaust the nutrients in the sea. At that time, new mutants that could produce organic substances through their own metabolism used sunlight as an energy source, CO<sub>2</sub> as carbon source, and H<sub>2</sub> or H<sub>2</sub>S as a hydrogen source, called photosynthesis. In such biological world, the photosynthetic, namely autotrophic organisms must have an absolute, selective advantage. Further, the autotrophic organisms reversely have since been supplying the nutrients for all of the heterotrophic ones. The extant photosynthetic bacteria (purple sulfur bacteria, green sulfur bacteria and purple non-sulfur bacteria) photosynthesize only under anaerobic conditions. This fact has been believed as an evidence to show that the bacterial photosynthesis originated under the anaerobic atmosphere of the primitive earth. However, more evolved photosynthetic prokaryotes, cyanobacteria, can use water (H<sub>2</sub>O) as the hydrogen source to reduce CO<sub>2</sub> in the photosynthesis. As a result, the bacteria produced O<sub>2</sub> as by-product of the water-splitting and it gradually changed into aerobic atmosphere, reaching to 21% at present. Such atmospheric change compelled cyanobacterium to adapt to the oxygen because superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) derived from it is very toxic to anaerobic organisms. The adaptation was a mutational acquirement of ability to synthesize an enzyme super-oxide dismutase which transforms O<sub>2</sub> into H<sub>2</sub>O via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. All of the aerobic organisms possess the dismutase for O<sub>2</sub> detoxification. On the other hand, they acquired genetic ability to use O<sub>2</sub> as the final acceptor of electron-transport system in so-called respiratory metabolism. Therefore, the photo-synthetic and respiratory metabolisms that produce ATP for the cellular life, were generated during the evolution of the prokaryotic world which took  $2.5 \times 10^9$  years. Eukaryotic metabolisms all inherited directly from the prokaryotic products. However, in the eukaryotic cell, these metabolisms are more compartmentalized than those in the prokaryotic ones; That is phylogenetic origins of the eukaryotic organelles. Herein, the processes of the generations of the ATP-productive reactions in the prokaryotic world and their compartmentalization during the formation of eukaryotic cell, are discussed.

## 2. Morphologies characteristic of the mitochondrion, chloroplast, and peroxisome

Both the mitochondrion and chloroplast are double membrane-bounded organelles that specialize in the synthesis of ATP, which use energy derived from the electron transport system and oxidative phosphorylation in the mitochondrion and from photosynthetic phosphorylation in the chloroplast. The organelles contain their own DNAs, ribosomes and



machinery for protein synthesis. However, not only most of the proteins but also the membrane components, such as phosphatidyl choline and phosphatidyl serine needed for mitochondrial morphogenesis are synthesized in the endoplasmic reticulum under the genetic control of nucleus and are imported. On the other hand, most of the proteins for morphogenesis of chloroplast are imported from the cytoplasm whereas the chloroplast tends to make the lipids they require. In spinach leaves, for example, all cellular fatty acid synthesis takes place in the chloroplast, although desaturation of the fatty acids occurs elsewhere.

The proteins which are imported into the organelles and reached their particular subcomponents, play the main roles for the specific functions. The mitochondrion contains two subcompartments of the internal matrix space and the intermembrane space. The compartments are in two distinct membranes, namely the inner membrane which encloses the matrix space and the outer membrane which makes an intermembrane space between the inner membrane and it and is in contact with the cytosol. It is morphologically important that the inner membrane invaginates repeatedly into the matrix space without pinching from the membrane. The topology of the inner membrane refers to as cristae (Fig. 1 A). On the other hand, chloroplast has the same two

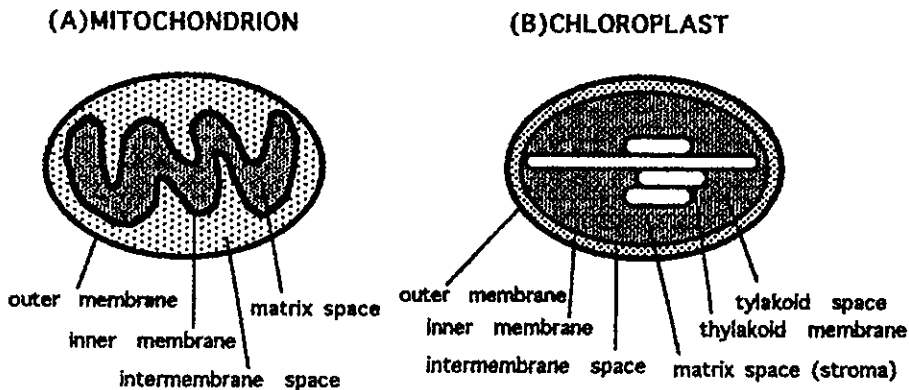


Fig. 1. Difference in the membranous compartments of the mitochondrion (A) and chloroplast in the higher plant (B). Morphogeneses of these organelles correlate with each other in a way that the invaginated inner membrane of the mitochondrion is pinched off to generate vesicles in the chloroplast. The thylakoid vesicles would evolve in this process.

subcompartments plus an additional subcompartments, called the thylakoid space, which is surrounded by the thylakoid membrane. The thylakoid membrane is originally derived from the invaginations of the inner membrane into the matrix space, stroma, of chloroplast, but the invaginated membranes are pinched off later and make a raft structure, called grana, in higher plant cells. Therefore, the grana is embedded in the stroma and isolated from the cytosol (Fig. 1 B). The

subcompartments of mitochondrion and chloroplast contain a respective set of proteins for the production of ATP. The development of mitochondrion and chloroplast by the import of proteins from the cytosol is a major but complex feat, that is, the proteins are translocated across a number of membranes in succession and end up in the specific places. The complexity comes from the fact that the proteins located mostly in the inner membrane of mitochondrion and in the thylakoid membrane of chloroplast are encoded by the nuclear genes. Furthermore, the organelle DNA-encoded polypeptides generally form protein complexes with the subunits encoded by nuclear DNA under certain genetic control for balanced composition. Furthermore, mitochondrion and chloroplast are made of membranes which are basically constructed by phospholipid bilayers. The phospholipids are differentially synthesized between the organelle and the cytosol, it depending on biological and cellular species. Peroxisome differs from mitochondrion and chloroplast in many points, morphogenetically. First, it is surrounded by only a single layered membrane and, second, it does not contain DNA and ribosomes. Therefore, it is apparent that peroxisome imports all of its own proteins by a similar and selective process from the cytosol. It has been observed that mitochondrion and chloroplast can self-replicate, although DNA polymerase and RNA polymerase are imported from the cytosol. Interestingly, some membrane-bounded organelles in the eukaryotic cell also can self-replicate without DNA, and peroxisome is a typical one as the endoplasmic reticulum. As stated above, peroxisome has a strong metabolic correlation with the mitochondrion. This problem will be discussed later.

### 3. Electron transport systems in photosynthetic bacteria, cyanobacteria and chloroplast in eukaryotic plant.

Fig. 2 shows a comparison of the electron transport systems in photosynthetic bacteria, in cyanobacteria and plant chloroplast, and in the mitochondrion. Evolution is always conservative, taking facts of the old and building upon them to create something of the new. The electron transport system is a typical example. It has come from the oldest photosystem to synthesize ATP and NADPH in the photosynthetic bacteria and evolved to the chloroplast in the higher eukaryotic plants or to the mitochondrion in the higher eukaryotic organisms. The photosynthetic world has been established after the fermentative one, as pointed above. Therefore, the first photosynthetic cell was born by mutation in the fermentative world and predominated during the declining world due to the exhaust of organic nutrients in the sea. The

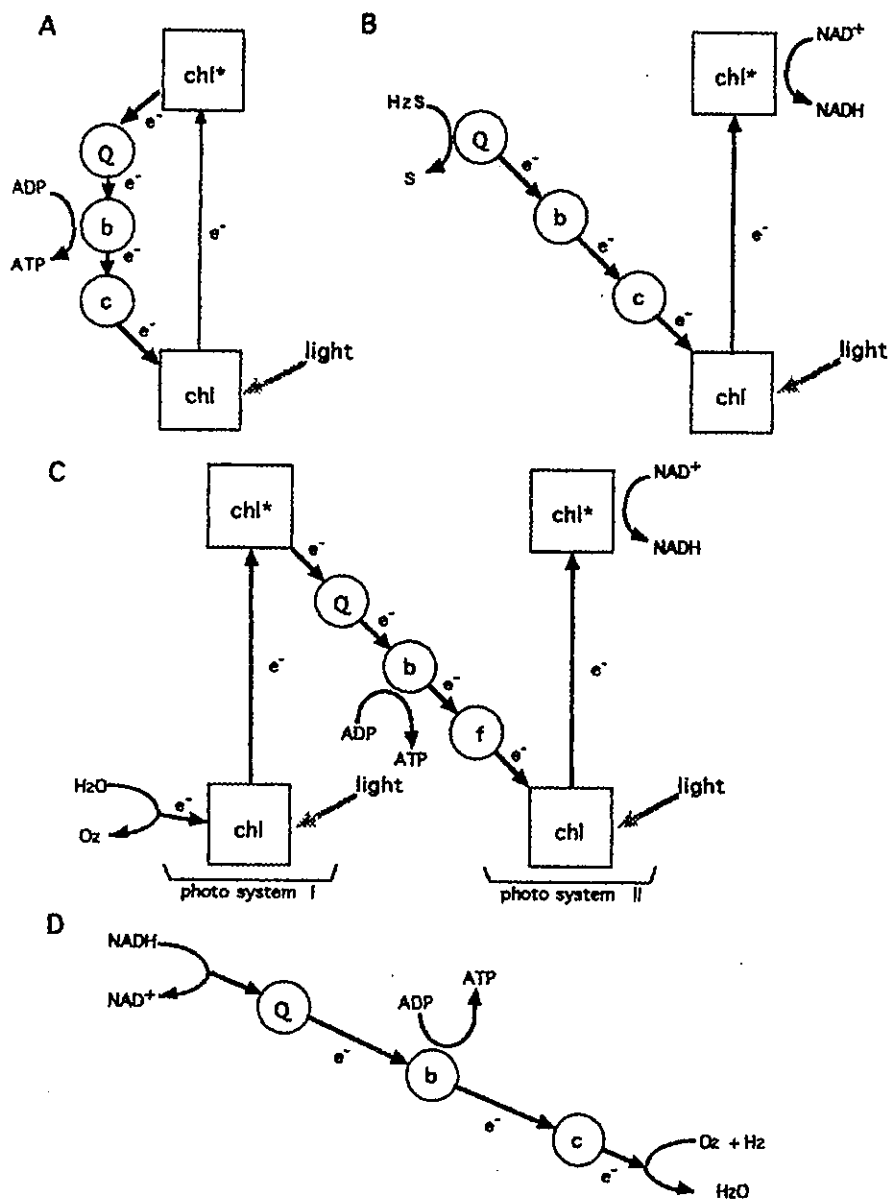


Fig. 2 The electron transport chains are homologous among (i) cyclic photo-phosphorylation of the purple non-sulfur bacterium (A), (ii) non-cyclic photosystem of the purple non-sulfur bacterium (B), (iii) photosystems I and II) of the cyanobacterium and eukaryotic plant (C) and respiratory chain of mitochondrion (D).

chl: photosynthetic pigment, chl\*: the excited pigment, Q: ubiquinone, b: cytochrome b, c or f: cytochrome c. Cytochromes b and c (or f) form bc (or f) complexes in the cells and organelles, and the complexes pump H<sup>+</sup> across each of the specific membranes.

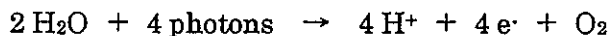
Photo-ATP synthetic system, photophosphorylation, is quite different from

the fermentative ATP synthetic system, substrate-level phosphorylation, and the former synthesizes ATP as the reaction is coupled with the electron transport-driven proton ( $H^+$ ) pumping whereas the latter's ATP synthesis does not relate with the electron movement but with only a phosphorylation of ADP to ATP, which occurs at two steps of the latter half in the fermentative (Embden-Meyerhof, EM) metabolism, reaction 1,3-bisphosphoglycerate  $\rightarrow$  3-phosphoglycerate and phosphoenolpyruvate  $\rightarrow$  pyruvate. The electron transport-derived  $H^+$  pump system of the photosynthetic bacteria consists of light-harvesting pigments, several electron carriers which make the  $H^+$  gradient across the membrane and  $ATP + P_i \rightarrow ATP$  by coupling with the  $H^+$  flow. The early fermentation processes must have provided not only ATP but also the reducing power, such as NADH or NADPH, which was required for essential biosynthesis. However, the photo-synthetic processes for the biosynthesis of ATP and NAD(P)H were independent of those of the fermentation ones. Therefore, the photosynthetic process would have not generated by modification of the fermentation processes but seems to have been generated from the beginning.

The most important, new element for the photosynthetic synthesis of ATP and NADPH was the sunlight harvester, bacteriochlorophyll. It has been believed that the pigment molecule was synthesized during chemical evolution processes, though rather complex in structure. The molecule is chemically stable and is contained even in petroleum from the deeply underground sources. Therefore, it had to have been used as the energy source since the proto-cells, being independent of the photosynthetic system stated above. The present-day purple bacteria contain a photochemical reaction center which is a large protein-bacteriochlorophyll complex and is arranged as a transmembrane protein in the plasma membrane and its derivatives. The special pairs of chlorophyll molecules in the reaction center irreversibly trap photons for excitation of electron. The excited electron is immediately passed to a chain of electron acceptors, quinones, that are tightly bound to the protein complex and then the electron is transferred to subsequent photochemical carriers. Such a photochemical center is thought to have evolved in the primitive photosynthetic bacteria much more than 3.5 billion years ago.

Cyanobacteria are thought to have evolved from purple non-sulfur bacteria about 3.5 billion years judging from their oldest fossils. Photosynthesis of cyanobacteria produces both ATP and NADPH by directly so-called non-cyclic photophosphorylation, through using  $H_2O$ , but  $H_2$  or  $H_2S$  as in the purple bacteria, as the electron donor. Because the two processes, called photosystems I and II, are used in series to the electron carriers, the electron can be transferred all the way from  $H_2O$  to NADPH, some of these energies are siphoned off for ATP synthesis. In the first photosystem, photosystem II, two moles of water are split with an

enzyme by spending four photons. As a result, four electrons are removed and one molecule of oxygen is produced as in the following reaction.



Although the electron is easier to be released from  $\text{H}_2$  or  $\text{H}_2\text{S}$  than from  $\text{H}_2\text{O}$ , the core of the reaction center of photosystem II has been conserved from cyanobacteria to the chloroplast of the eukaryotic plant. Photosystem II produces strong electron donors in the form of reduced quinone molecules in the cyanobacterial plasma membrane and in the thylakoid membrane of chloroplast. The quinones pass their electrons to a  $\text{H}^+$  pump, called cytochrome *bc* complex, which is a type of cytochrome *bc* indicated in Fig. 2. The *bc* complex pumps  $\text{H}^+$  out of the cytosol across the plasma membrane in the cyanobacterial cell or into the thylakoid space across thylakoid membrane of chloroplast. Therefore, the resulting electrochemical gradient drives the ATP synthesis by ATP synthase, as discussed later. The final electron acceptor in this electron transport chain is the second photosystem, photosystem I.

Electron entered into photosystem I are boosted to very high energy level within the pigment-protein complex activated by the photons and are passed to  $\text{NADP}^+$  to generate NADPH via iron-sulfur center in ferredoxin. This last step also takes up  $\text{H}^+$  from the medium. However, the evolved photosystems can make ATP by cyclic photophosphorylation without making NADPH. In this process, the high-energy electrons from photosystem I are transferred back to the *bc* complex to make energy for pumping  $\text{H}^+$  for ATP synthesis.

The photosynthetic metabolism is constructed by the photosystems to synthesize ATP and NADPH, and by the  $\text{CO}_2$  - fixative metabolism which is reduced pentosephosphate (or Calvin-Benson ) cycle. The former is located in the thylakoid membrane while the latter is done in the stroma.

#### 4. Mitochondrion as electron transporter for ATP synthesis

The  $\text{O}_2$  - respiration is the third metabolism that was evolutionarily acquired in the prokaryotic world after  $\text{O}_2$  had been accumulated in the atmosphere as a result of the phylogenesis and the ecological development of cyanobacteria. The mitochondrion was the product of compartmentalization of the  $\text{O}_2$  respiratory metabolism when occurred during generation of eukaryotic cell from the prokaryotic world. However, the respiration consists of three parts of metabolisms, fermentative reactions of glucose to pyruvate (EM pathway), tricarboxylic (citric) acid (TCA) cycle, and respiratory chain from NADH to  $\text{O}_2$ . In the

mitochondrion, the respiratory chain is in the cristae (membrane system) and the TCA cycle is divided into the membrane and matrix. The EM pathway is restricted in the cytosol, and it seems to be the same anaerobic system as that in the fermentative bacteria. Therefore, it is possible to say that the mitochondrion is an organelle for oxidation by molecular oxygen of pyruvate, which is the final product of EM pathway, to  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ . The energy released there is harvested so efficiently that about 38 molecules of ATP are produced per molecule of glucose oxidized. It is a striking contrast to the fact that the fermentation produces 2 molecules of ATP per molecule of glucose.

Mitochondria are usually depicted as bacterial form with a diameter of 0.5 to 1  $\mu$  m. However, time-lapse microcinematography of living cells shows that the form always changes with time into very elongated cylinders and they fuse together. The whole figure appears like the roots of a tree. However, in some phases it separates again and the mitochondrial behaviors are dynamic along the microtubule's arrangement in the cytoplasm. The symbiotic theory that the mitochondrion is a transformant of the symbiotic bacterium in the cytoplasm, is incorrect and the mitochondrial morphogenesis is within the cellular life phenomenon. In fact, the mitochondria are provided directly to a site of unusually high consumption of ATP. A typical example is the filamentous mitochondria wraps tightly around the sperm tail.

A single mitochondrion is bounded by two highly differentiated membranes, inner and outer. The inner membrane creates two separate mitochondrial compartments ; the internal matrix space and a much narrower intermembrane space. The outer membrane is not so metabolically active but forms large aqueous channels through the lipid bilayer. Although the outer membrane is permeable to all small molecules including soluble proteins, the inner membrane contains many kinds of proteins for the metabolisms and transports and thus is impermeable to the substances, especially to ions, such as proton ( $\text{H}^+$ ). The matrix enzymes include those that metabolize CoA produced from pyruvate and fatty acids through the TCA cycle. The principal end products of the TCA cycle are  $\text{CO}_2$  and NADH, and the latter flows out to the respiratory chain that is essential to the process of so-called oxidative phosphorylation for generation of ATP. Most of the protein species of the chain are intrinsic components of the inner membrane. The most important one is the ATP synthase, also called  $\text{F}_0\text{F}_1$  ATPase, which constitutes about 15% of the total inner membrane protein. Both the photosynthetic bacterial membrane and the chloroplast have been evidenced also to contain very similar protein complex as the mitochondrial ATP synthase. As shown in Fig.3, the transmembrane portion of the protein complex works as a  $\text{H}^+$  carrier, and the large head portion,  $\text{F}_1$  ATPase, synthesizes ATP when  $\text{H}^+$  passes through it down the

Mitochondrion, chloroplast and peroxisome

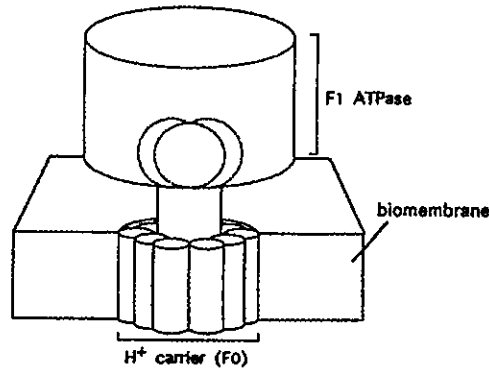


Fig. 3 F 1 ATP synthase (as lollipop head) and H<sup>+</sup> carrier of transmembrane (as F o, H<sup>+</sup> pump).

electrochemical gradient. These points have been demonstrated by using the liposome system, which was composed of the purified ATP synthase from mitochondria and the purified bacteriorhodopsin (highly driven H<sup>+</sup> pump of an extreme halophilic bacteria which can photophosphorylate ) as sketched in Fig. 4. When the liposome system were exposed to light, the

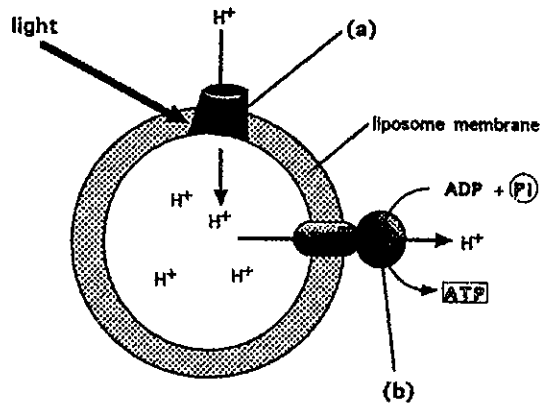


Fig. 4 ATP synthase is driven by H<sup>+</sup> flow. The experimental system is constructed of a purified bacteriorhodopsin (a), an ATP synthase purified from ox heart mitochondria (b), and a liposome of phospholipids. The bacteriorhodopsin is excited by light to pump H<sup>+</sup> into the liposome, and the concentrated protons pass through the ATP synthase outside to drive the reaction  $ADP + P_i \rightarrow ATP$ .

H<sup>+</sup> pumped into the liposomelumen by the bacteriorhodopsin flowed back out through the ATP synthase. Consequently, ATP is made in the medium outside, nevertheless the sources of bacteriorhodopsin and ATP synthase were different one. This means that the H<sup>+</sup> pump and the ATP synthase act independently.

## 5. Proton pumping across the membrane

When isolated mitochondria were suspended with a suitable substrate and oxygen for oxidation, the  $H^+$  flow through ATP synthase occurs and results in acidification of the medium. This indicates that free energy released by electron transport in the respiratory chain causes  $H^+$  pumping across the inner membrane from the matrix and the  $H^+$  flows back through ATP synthase, resulting in reaction  $ADP + Pi \rightarrow ATP$ . This mechanism is common in principle to the plasma membrane and its derivatives of the

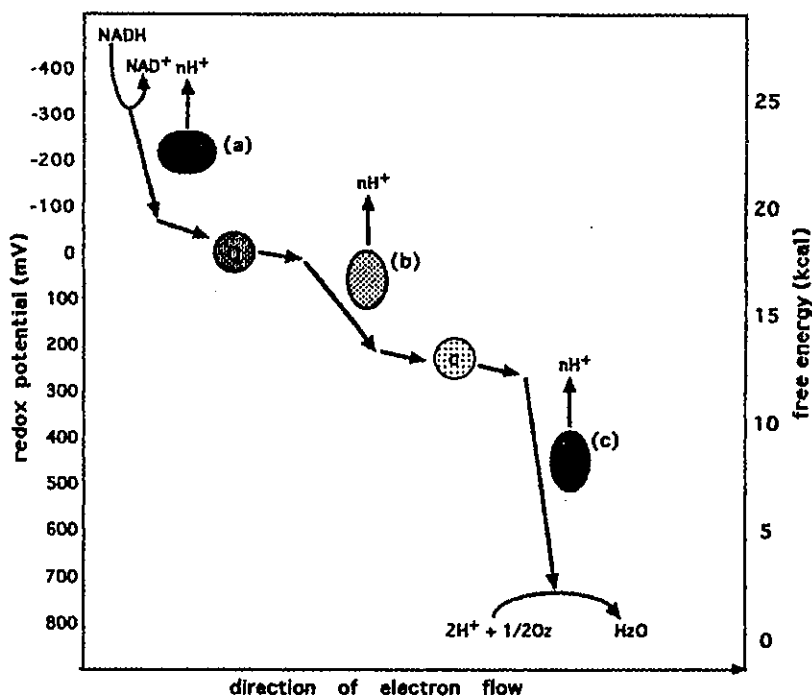


Fig. 5 Redox potential changes in the respiratory chain. The potentials drop in three large steps that consist of NADH dehydrogenase complex (a), *bc<sub>1</sub>* complex (b), and cytochrome oxidase complex (c). Each the complex works to pump  $H^+$  across the inner membrane of the mitochondrion. (After Alberts *et al.*, 1994)

photosynthetic bacteria and cyanobacteria, chloroplast as well as mitochondrion.

For example, the redox potentials in the mitochondrial electron transport system drops in three large steps from NADH to  $O_2$ , as shown in Fig.5, and the electron passes across each the enzyme complex of NADH dehydrogenase complex, cytochromes *bc<sub>1</sub>* complex and cytochrome oxidase complex in series. The change in redox potential between any two electron carriers is directly proportional to the free energy released



between them. Each complex is an energy-converter that harnesses the free energy released to make a  $H^+$  gradient across the inner membrane, as demonstrated by an experiment outlined in Fig.4. Fig. 6 explains

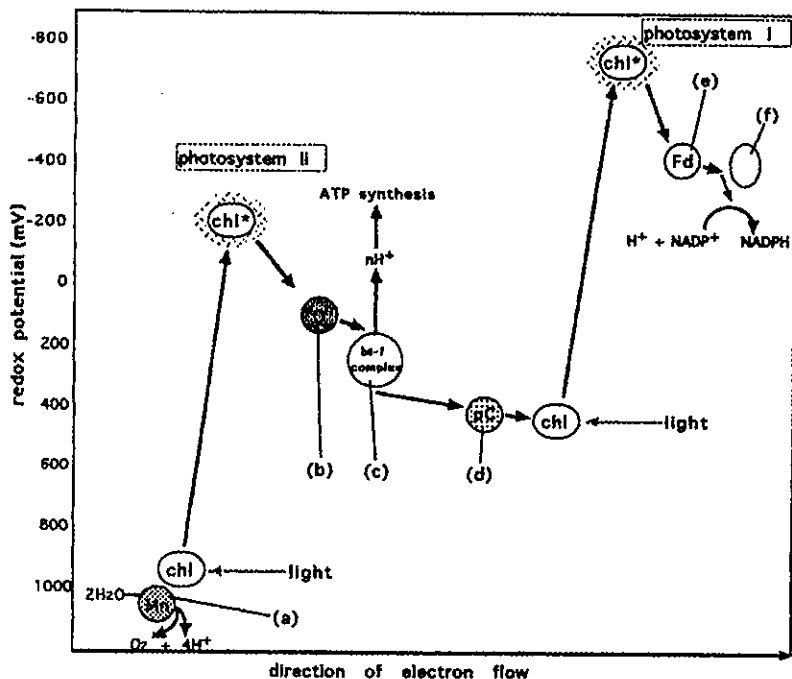


Fig. 6 Redox potential changes in the photosystems of cyanobacterium and eukaryotic plant cell. The potentials rise by irradiation of sunlight but drop after the photosynthesis works that include the  $H^+$  pump leading to ATP synthesis in photosystem II and the NADPH formation in photosystem I.

a: water splitting enzyme, b: plastoquinone, c: *bc<sub>1</sub>* complex, d: plastocyanin, e: ferredoxin, f: NADH reductase, chl: chlorophyll, chl\*: excited chlorophyll. (After Alberts *et al.*, 1994)

changes in redox potential during photosynthesis, showing a change of the potential along electron flow in photosystem II, in which the  $H^+$  pumping occurs in the cytochromes *bc<sub>1</sub>* complex to make an electrochemical gradient. In other words,  $H^+$  is pumped across the membrane three times in the respiratory flow of electron whereas once in the photosystem flow of it.

## 6. Evolution of the electron transport system.

The green sulfur bacteria or purple sulfur bacteria may be the most primitive photosynthetic bacteria because the formers are completely anaerobes and the latter microaerobes. The purple non-sulfur bacteria

had to evolve beyond the anaerobic bacteria. The purple non-sulfur bacteria can generally respire  $O_2$  in the presence of a suitable organic nutrient, but their photosynthesis is performed only anaerobically. However, recently a variant that can aerobically photosynthesize has been found in nature. The purple non-sulfur bacteria have been demonstrated to have the electron transport system, ubiquinone  $\rightarrow$  cytochrome  $b$   $\rightarrow$  cytochrome  $c$ , that is commonly used for both the photosynthesis and the respiration as shown in Fig. 7. This is true in the cyanobacterial

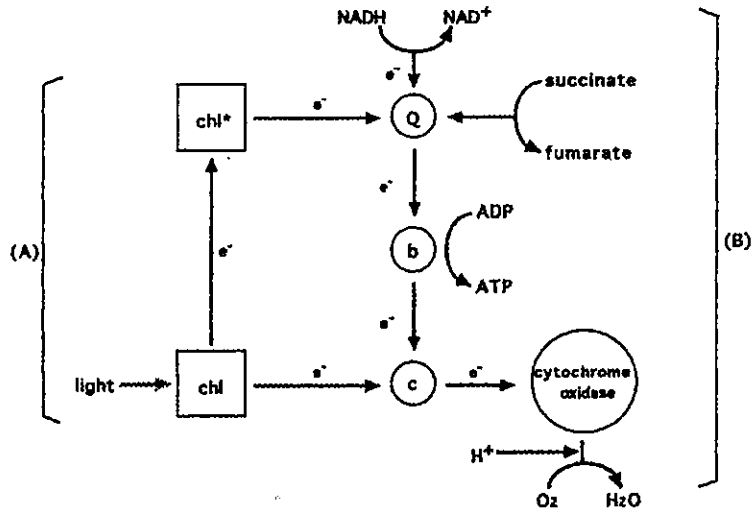


Fig. 7 Common usage of the electron transport system between photosynthesis (A) and respiration (B) in the purple non-sulfur bacterium (*Rhodospseudomonas*). When the respiration is inhibited (for example, anaerobiosis), the cell can live by photosynthesis, and when the photosynthesis is inhibited (for example, darkness), the cell can live by respiration.

photosynthesis and respiration. However, as discussed above, the first producer of oxygen is considered to be cyanobacteria that have evolutionally acquired the water splitting reaction. Therefore, the purple non-sulfur bacteria would have secondarily adapted to oxygen as the photosynthetic product of the cyanobacteria. The cyanobacterial taxonomy is very complex and there seem to be many phylogenetic metabolic variants. On the other hand, as the purple bacteria have been of interest also in photosynthetic evolution, the metabolism has been well studied. Therefore, the electron-transport principle in the transitional stage from the photosynthesis to the  $O_2$  - respiration would be that as illustrated in Fig. 7, and it would be divided into the photosystem and the respiratory chain and compartmentalized to chloroplast and mitochondrion, respectively, by the intracellular membranes of a cyanobacterium during the eukaryotic differentiation about 1.5 billion years ago.

Here, we have to point out the following facts : The present-day chloroplast has a clearly differentiated granum (pl. grana) structure, thylakoid membrane aggregation, in the higher plant cells but not anything in lower plant cells. Therefore, the photosynthetic compartments have evolved even in the plant world. The photosynthetic membranes in the cells also differentiate in the prokaryotic world. In the purple and green sulfur bacteria, there are many types of intracellular membranes involved in the photosynthetic metabolism and derived from their plasma membranes. These intracellular photosynthetic membranes can be seen in the actively photosynthetic cells of the purple non-sulfur bacteria. Two or more names are cytologically given to these prokaryotic intracellular membranes; chlorobium vesicle, mesosome, and chromatophore. However, as their definitions are not clear, we here will use chromatophore, but some investigators think that both the photosynthetic and respiratory metabolisms are contained in the chromatophore. Furthermore, name mesosome is given to an organelle that is electron-microscopically found in the non-photosynthetic bacteria and has been considered to contain metabolisms of  $O_2$  - respiration, DNA replication, nucleoid separation in cell division, and others. The photosynthetic intracellular membranes in the cyanobacterial cells are generally referred to as thylakoid, and their non-photosynthetic membranes, which can be discriminated by a histochemical techniques, are separately called mesosome by some investigators. However, it is difficult to differentiate between them. Therefore, we need in mind that the organelles usually called chromatophores may contain not only the electron transport systems of photosynthesis but also that of respiration. This is because both the systems belong to membranous reactions.

Prokaryotic membranous organelles as mesosomes, chromatophores, and thylakoids are derivatives of the plasma membranes, as mentioned above. Then, some ones remain to be continuous with the plasma membranes in all the cell cycle but others are separated to isolate into the cytoplasm. On the other hand, mitochondrial cristae are always continuous with the inner membrane but do not isolate as membrane units. However, when the chloroplast develops from the proplastid that is small double-membraned organelle, the inner membrane occurs invagination in many sites and becomes like cristae finally to cut off from the inner membrane. In the lower plant, the chloroplast matures by formation of a simple arrangement of flatted thylakoid vesicles from one to several. However, in the chloroplast of higher plants, the thylakoid vesicles increase in number and make so-called grana.

The invaginations of the plasma membrane, as seen in the prokaryotic cells, and of the inner membrane, as seen in the mitochondria, build up a quite different microcompartment for the  $H^+$  pumping and ATP synthesis from the thylakoid vesicles isolated from the inner

membrane as seen in the chloroplast. That is, the invagination of a membrane generates an intermembrane space between the inner membrane and the outer (or plasma) membrane (Fig. 1A), and the vesicle formation makes intermembrane space within the closed membrane (Fig. 1B). Such membranous differentiation gives different systems in the flow of  $H^+$  and the orientation of ATP synthase, as shown in Fig. 8. Therefore,

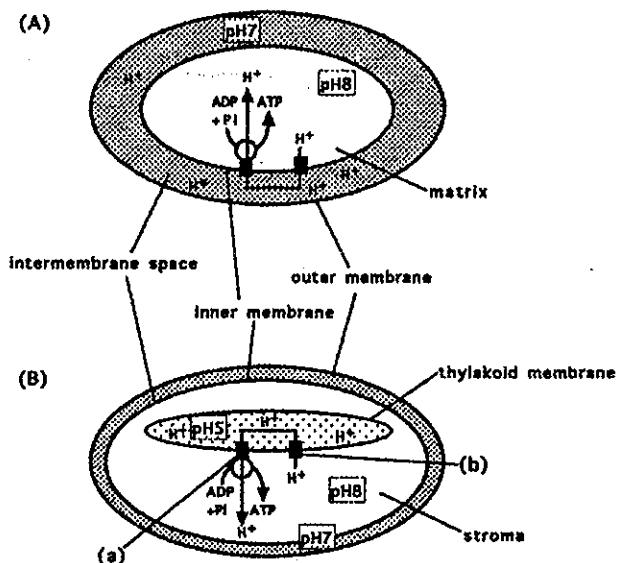


Fig. 8. Comparison the  $H^+$  flows and ATP syntheses in the membranes of mitochondrion (A) and chloroplast (B). The  $H^+$  motive force across the inner membrane of mitochondrion directs from the matrix to intermembrane space (see Fig. 1A), and the  $H^+$  motive force across the thylakoid membrane of the chloroplast directs from stroma to thylakoid space (see Fig. 1B). The increased  $H^+$  concentration in both spaces decreases the pH and the  $H^+$  flow passing through ATP synthase drives ATP synthesis.

a:  $H^+$  pump, b: ATP synthase. ATP synthesis occurs within the matrix in the mitochondrion and within the stroma in the chloroplast.

we can conclude as follows. (1) A weak  $H^+$  gradient across the membrane was naturally formed by the formation of phospholipid bilayer in the proto-cells. (2) A protein evolved to function as transmembrane  $H^+$  pumps. Furthermore, when the fermentative metabolism was evolutionally acquired, some of them synthesized organic acid as an end product and excreted  $H^+$  outside of the cells. (3) Function of a protein as primitive ATP synthase to catalyze a reaction  $ADP + Pi \rightarrow ATP$  by passage through  $H^+$  across the synthase complex, was developed in the membrane protein. (4) Proteins of the  $H^+$  pumping and the ATP synthesis coupled with the electron transfer system driven by the sunlight energy. This was an origin of photosynthetic cell. However, there are

two kinds of photophorylative mechanisms in the present-day bacteria; bacteriorhodopsin system (as in *Halobacterium halobium*) and bacteriochlorophyll system (as in green or purple bacteria). (5) The photophosphorylation mechanism inherited from ancestors of the purple non-sulfur bacteria and cyanobacteria, and differentiated into two kinds of the organelles, mitochondrion and chloroplast, during the process of cellular evolution to the eukaryota, as formerly discussed.

Although the peroxisome differs from the mitochondrion and chloroplast in many ways in the present-day cells, it has been considered to be the devoluted remain of the mitochondrion. However, this idea is a wrong conclusion. Peroxisomes are found in all eukaryotic cells. They possess oxidative enzymes, such as catalase, peroxidase and urate oxidase, at high concentrations. Like the mitochondrion, the peroxisome is a major site of oxygen utilization. One hypothesis explains the presence of peroxisomes in the eukaryotic cells as that they have served to lower the intracellular concentration of oxygen and also to employ its chemical activity for useful oxidative reactions.

However, the most important function of the mitochondrion that produces ATP and reducing power can not be carried out in the peroxisome. Nevertheless many of the same reactions are common in both the organelles. Peroxisomes contain one or more kinds of peroxidases that use molecular oxygen to remove hydrogen atoms from specific organic substrates, producing hydrogen peroxide. Catalase destroys the hydrogen peroxide generated by peroxidases and consequently produces water. These reactions are useful for the detoxication of some organic substances, such as phenols, formic acid, formaldehyde and alcohol.

A major function of the oxidative reactions carried out in the peroxisomes is so-called  $\beta$ -oxidation of fatty acids to produce acetyl CoA. Acetyl CoA produced in the peroxisomes is exported to the cytosol for reuse in biosynthetic reactions and, furthermore, to the mitochondria for production of energy through the TCA cycle and respiratory chain. Interestingly, the  $\beta$ -oxidation in mammalian cells occurs both in the mitochondria and peroxisomes, whereas in yeast and plant cells, this essential reaction is restricted to the peroxisomes.

Peroxisomes have quite diverse functions even in the different cells of a single organism, that is, they contain very different sets of enzymes. The composition of the reactions is very adaptive to the conditions. For example, yeast cells grown on sugar have small peroxisomes, whereas the peroxisomes of cells grown become large and oxidize methanol. Furthermore, when yeast cells are grown on fatty acids, their large peroxisomes can break down fatty acids through  $\beta$ -oxidation. The peroxisomes plays further complex roles in plants. For example, the peroxisomes present in leaves associate with chloroplasts and materials

are exchanged between the organelles during photorespiration. It has been reported also that in a fat-storing cotyledon cells of tomato seeds 4 days after germination, the peroxisomes (also called glyoxysomes in plant physiology) are associated with the lipid body and gluconeogenesis, conversion from fatty acids to carbohydrates, occurs during the germination (papers of Gruber, P. J. and Newcomb, E. H., Frederick, S. E. and Newcomb, E.H., cited in *Molecular Biology of the Cell*, Third Edition, by Alberts, B. *et al.*, 1994). These findings suggest strongly that the morphogenesis and the genetic transformation involved occur in response to species-specific, life-cycle specific, and environment-adaptive differentiation. Such a conclusion will further be strengthened by the dynamic chloroplast behavior.

Chloroplast is the most prominent member of the plastid family. All plastids develop from proplastids, which are small organelles seen in the immature cells of plant meristem. In plants grown in darkness, the proplastids in the cells enlarge and develop into etioplasts, which have semicrystalline membranes containing a chlorophyll precursor instead of chlorophyll. When exposed to light, the etioplasts rapidly develop into a matured chloroplasts pigments, new membranes photosynthesizing enzymes, and components for electron-transport, into a matured chloroplast. On the other hand, leucoplasts are plastids that occur in many epidermal and internal tissues that do not become green on exposure to light. A common form of the leucoplast is amyloplast which the accumulates starch in storage tissue. We have to emphasize an important realization that the plastids are not either just sites for photosynthesis or for the deposition of storage materials, or the sites for productions of more than the energy and reducing power (as ATP and NADPH) that is used for the plant-biosynthetic reactions, of purine and pyrimidine, of most amino acids, of all the fatty acids and so on. However, it must be pointed out that the enzymes to produce these compounds are mainly synthesized under nuclear control. On the other hands, in the animal cells, these compounds are produced in the cytosol. Here, we conclude that the arrangements of the genomes in the cells are dynamic according to biological evolutions and environmental conditions.

## 7. Conclusion

The organelles closely interact to function and to support cell life as a whole. It is natural for the metabolisms compartmentalized into each organelle to be connected. In this sense, the lipid bilayers in the membrane compartments become barriers against communication among the organelles.

The purpose of the present study is to search the differential origin

and the evolutionary processes of the mitochondrion, chloroplast, and peroxisome through their metabolic facts that many of the same reactions are distributed among these organelles. One example is shown between mitochondrion and chloroplast. There is a transmembrane electrochemical proton gradient that works in the electron transport systems in both mitochondrion and chloroplast; ubiquinone  $\rightarrow$  cytochrome *b*  $\rightarrow$  cytochrome *c*. In the mitochondrion, the cytochromes *bc* complex, and in the chloroplast cytochromes *bf* complex contain ATP synthase (F<sub>o</sub> F<sub>1</sub> ATPase), in which F<sub>o</sub>, namely transmembrane H<sup>+</sup> pump, makes the proton concentration gradient across the membrane and F<sub>1</sub> ATPase synthesizes ATP by reaction  $ADP + P_i \rightarrow ATP$ , when the proton passes through it. These phosphorylatory enzymes must have inherited from a prokaryotic ones as common ancestor in the photosynthetic green and purple sulfur bacteria that are evolutionarily generated much more than 3,5 billion years ago. Thereafter, the system developed to that in the photosynthetic purple non-sulfur bacteria and then the cyanobacteria, and was inherited into mitochondrion and chloroplast when the cell morphogenized as eukaryota about 1,5 billion years ago. Fig.9 shows a hypothetical process of the phosphorylation system in the biological evolution.

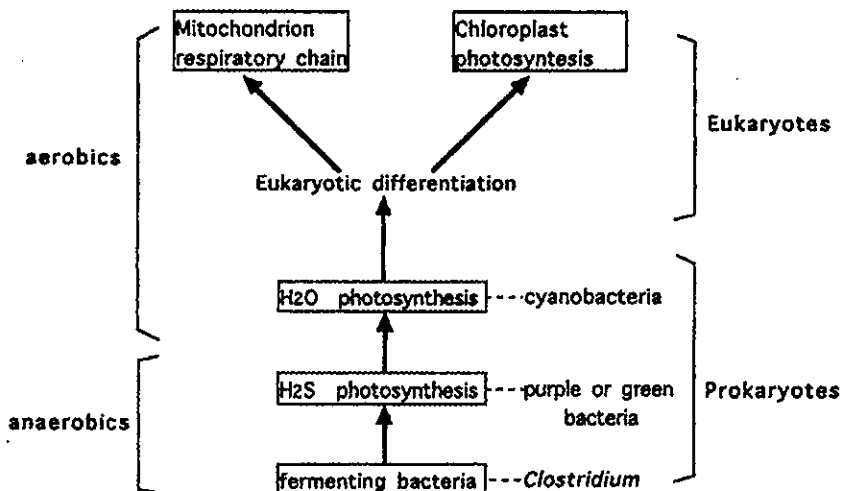


Fig. 9 A phylogeny of the electron transport system accompanied by the cellular evolution.

The mitochondrion and peroxisome contain many of enzymes in common. One hypothesis says that the peroxisome is a devolutional remain of the mitochondrion. However, the synthetic conclusion on the basis of the many lines of evidences demonstrated suggests strongly that the metabolic compartments between the mitochondrion and peroxisome result from genetic arrangement in the genome in the process of the

organelle's differentiation during cell division. In conclusion, genetic and then metabolic arrangements are dynamic during the processes of cellular evolution and of cell division in the extant meristematic tissues. Intracellular morphogenesis is not genetically and morphogenically fixed as previously considered by the symbiotic theorists.

### References

The following references were synthetically cited in many parts in this paper. Therefore, the concept that is here constructed is derived from all of them and thus each of the references is not assigned.

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. D. *Molecular Biology of the Cell* (3rd Ed.), Garland Publishing, Inc., New York (1994).
- Bereiter-Hahn, J. Behavior of mitochondria in the living Cell. *Int. Rev. Cytol.*, 122, 1-63 (1990).
- Blobel, G. Intracellular protein topogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 1496-1500 (1980).
- Darnell, J., Lodish, H. and Baltimore, D. *Molecular Cell Biology* (2nd Ed.), W. H. Freeman and Company, New York (1990).
- Deshaies, R. J. and Schekman, R. A. A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.*, 105, 633-645 (1987).
- Draws, G. and Dawes, E. A. *Molecular Biology of Membrane-bound Complex in Phototrophic Bacteria*, Plenum Press, New York (1990).
- Dutton, P. L. and Wilson, D. F. Redox potentiometry in mitochondrial and photosynthetic bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* 346, 165-212 (1974).
- Fay, P. and Van Baalen, C. *The Cyanobacteria*, Elsevier, Amsterdam (1987).
- Fogg, G. E., Stewart, W. D. P., Fay, P. and Walsby, A. E. *The Blue-Green Algae*, Academic Press, London (1973).
- Gottlieb, L. and Jain, S. (Ed.) *Plant Evolutionary Biology*, Chapman and Hall, London (1988).
- Hader, D. and Tevini, M. *General Photobiology*, Pergamon Press (1987); Hames, B. D. and Glover, D. M. (Ed.) *Gene Rearrangement*, IRL Press, Oxford (1990).
- Hartman, H. and Matsuno, K. (Ed.) *The Origin and Evolution of the Cell*, World Scientific, Singapore (1992).
- Hatefi, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu. Rev. Biochem.*, 54, 1015-1070 (1985).
- Lazarow, P.B. and Fujiki, Y. Biogenesis of peroxisomes. *Annu. Rev. Cell*



- Biol.*, 1, 489-530 (1985).
- Lazarow, P. B. Genetic approaches to studying peroxisome biogenesis. *Trends Cell Biol.*, 3, 89-93 (1993).
- Lehninger, A. L. *Principles of Biochemistry*, Worth, New York (1982).
- Lipps, J. T. (Ed.) *Fossil Prokaryotes and Protists*, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1993).
- Margulis, L. *Origin of Eukaryotic Cell*, Yale University Press, New Haven (1970).
- Margulis, L. In *Evolutionary Biology*, Vol. 7, Plenum Press, New York (1974), p. 45.
- Margulis, L. *Symbiosis in Cell Evolution - Life and Its Environment on the Early Earth*, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1981).
- Margulis, L. and Olendzenski, L. *Environmental Evolution*, The MIT Press, Cambridge (1992).
- Morden, C. W., Delwiche, C. F., Kuhsel, M. and Palmer, J. D. Gene phylogenies and the endosymbiotic origin of plasmid. *BioSystems*, 28, 75-90 (1992).
- Nakamura, H. *Origin and Evolution of the Cell*, Baifukan Publishing Company, Tokyo (1982) (in Japanese).
- Nakamura, H. *Cellular Evolution*, Baifukan Publishing Company, Tokyo (1987) (in Japanese).
- Nakamura, H. *Biological Evolution on the Aspect of Microorganisms*, Baifukan Publishing Company, Tokyo (1983) (in Japanese).
- Nakamura, H. *Evolution of the Life for Four Billion Years*, Kagaku-doizin Publishing Company, Kyoto (1994) (in Japanese).
- Nakamura, H. Cellular evolution leading to generation of eukaryotic cell. In *The Origin and Evolution of the Cell* (Eds. Hartman, H. and Matsuno, K.) World Scientific, Singapore (1992) pp. 183-204.
- Nakamura, H. Metabolic and membranous differentiation leading to non-symbiotic origin of eukaryotic cell. In *Endocytobiology V*, Tübingen University Press, Tübingen (1993) pp. 335-342.
- Nakamura, H. Origin of eukaryota from cyanobacterium: membrane evolution theory. In *Evolutionary Pathways and Enigmatic Algae* (Ed. Seckbach, J.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1994) pp. 3-18.
- Nei, M. *Molecular Evolutionary Genetics*, Columbia University Press, New York (1987).
- Olson, J. M. and Pierson, B. K. Evolution of reaction centers in photosynthetic prokaryotes. *Int. Rev. Cytol.*, 108, 209-248 (1987).
- Pearson, L. C. *The Diversity and Evolution of Plants*, CRC Press, Inc., Boca Raton (1995).
- Pfanner, N., Rassow, J., Wienhues, U. et al. Contact sites between inner and outer membranes: structure and role in protein translocation into the mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 1018, 239-242 (1990).
- Pon, L., Moll, T., Vestweber, D., Marshallsay, B. and Schatz, G. Protein

- import into mitochondria: ATP-dependent protein translocation activity in a submitochondrial fraction enriched in membrane contact sites and specific proteins. *J. Cell Biol.*, 109, 2603-2616 (1989).
- Racker, E. and Stoeckenius, W. Reconstruction of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation. *J. Biol. Chem.*, 249, 662-663 (1974)
- Sadava, P. E. *Cell Biology: Organelle Structure and Function*, Jones and Bartlett Publishers, Boston (1993).
- Sato, S., Ishida, M. and Ishikawa, H. (Eds.) *Endocytobiology V.*, Tübingen University Press, Tübingen (1993).
- Schiff, J. A. (Ed.) *On the Origins Chloroplasts*, Elsevier/North-Holland (1982).
- Smith, J. M. *Evolutionary Genetics*, Oxford University Press, Oxford (1989).
- Srere, P. A. The structure of the mitochondrial inner membrane-matrix compartment. *Trends Biochem. Sci.*, 7, 375-378 (1982).
- Stölz, J. F. *Structure of Phototrophic Prokaryotes*, CRC Press Inc., Boca Raton (1991).
- Stryer, L. *Biochemistry* (3rd Ed.), W. H. Freeman, New York (1988).
- Tobin, A. K. (Ed.) *Plant Organelles; Compartmentation of Metabolism in Photosynthetic Tissue*, Society for Experimental Biology, Cambridge University Press, Cambridge (1992).
- Tolbert, N. E., Essner, E. Microbodies: peroxysomes and glyoxysomes. *J. Cell Biol.*, 91, 271s-283s (1981).
- Tzagoloff, A. *Mitochondria*, Plenum Press, New York (1982).
- Voelker, D. R. Organelle biogenesis and intracellular lipid transport in eukaryotes. *Microbiol. Rev.*, 55, 543-560 (1991).
- Warren, G. Membrane partitioning during cell division. *Ann. Rev. Biochem.* 62, 323-348 (1993).

# Thermal Properties and Thermal Products of Amino Acids

Eiichi Imai, Shigeru Sakurazawa, Hajime Honda  
and Koichiro Matsuno

Department of BioEngineering,  
Nagaoka University of Technology,  
Kamitomiokamachi, Nagaoka 940-21

(Received June 8, 1996; Accepted June 22, 1996)

## Abstract

Thermal products of amino acids exhibit a wide variety of thermal properties. We reviewed the properties by consulting mainly the products from aspartic acid and proline, among others. Although those thermal products were versatile in their chemical specification, they exhibited rather unique thermal characteristics. In particular, thermal relaxation times of the thermal products in aqueous milieu depended upon the environmental conditions such as the temperature and pH value. Typical values of the thermal relaxation times were of the order of several hours or more. This observation suggests a possibility that when the environmental condition changes cyclically, for instance, due to the diurnal cycle, those thermal products could store thermal energy locally and could utilize it for further chemical synthesis if component monomers are available.

Keyword: Amino acids, aspartic acid, diurnal cycle, proline, thermal products, thermal relaxation



# アミノ酸の熱重合反応とその生成物

今井栄一、櫻沢 繁、本多 元、松野孝一郎

長岡技術科学大学・生物系 (〒940-21 新潟県長岡市上富岡町 1603-1)

## 1. はじめに

原始地球上における還元性大気を想定した実験系においてアミノ酸が生成された結果が既に報告され[1-2]、原始地球上でアミノ酸が生成されたか、あるいは地球外で生成された後に地球に送り込まれて来たことはほぼ確実である[3-10]。このアミノ酸がどのように存在形態を変え、またどのように核酸と相互作用していったかは化学進化にとって必要な課題の一つである。

アミノ酸のような低分子化合物が重合して高分子化合物へと変化する過程においては、この化学反応に深く関わるエネルギー源が重要な要因となる。可能となるエネルギー形態には放射線エネルギーの他に、熱エネルギーが容易に想像される。

アミノ酸単分子に熱エネルギーを加えその際に生じる様々な変化は既に幾人かの研究者において為されて来た[11-16]。アミノ酸単分子を加熱すると水中で微小な球型構造物を形成する。ここではアミノ酸の熱重合反応とそれによって生成された化合物の熱的性質について、われわれが現在までに調べてきたことの概要を示す。

## 2. アミノ酸熱重合反応

アミノ酸の熱重合物として調べた代表例はアスパラギン酸とプロリンの混合物である。熱重合反応により生成された反応物は、水中で直径数 $\mu\text{m}$ の球型構造物(Fig. 1)を形成するものと水に溶解しているものが混在する。形成された球型構造物を自然乾燥し、Auイオン蒸着を施したものを走査電子顕微鏡(日本電子, JSM-6301F)で観察した。

アスパラギン酸とプロリンはそのいずれもがミラーの放電実験およびこれに類する実験によって生成が確認され、G, Cのみによってコード化されるアミノ酸である。かつ、プロリンはその環状構造のため、プロリンを含む重合物に構造安定性をもたらし得る。

2-1. アミノ酸混合物

原始大気を想定したアミノ酸の生成実験から収率の高い6種のアミノ酸(グリシン、アラニン、バリン、アスパラギン酸、プロリン、グルタミン酸)を選び、これらのアミノ酸から2~6種を取り出す全ての組み合わせについて、球形構造物の形成確認実験を行った。実験手順はL型アミノ酸単分子をビーカーに入れ混合した後、イナートオープン(ヤマト科学, DN43HI)で通常雰囲気下200°C, 3 hr加熱し、アミノ酸混合物1gに対して10mlの純水を加え煮沸し氷浴で冷却した。

形成が認められた微小球形構造物

は微分干渉光学顕微鏡で粒径と単位体積あたりの個数を測定した。粒径は顕微鏡像をCCDカメラを介してビデオ録画し、得られたビデオ信号をコンピュータ画面上で球の円周3点から求めた。粒径と個数から算出した球形構造物生成の収率はアスパラギン酸とプロリンの組み合わせにおいて最大であった(Fig. 2)。以後、この組み合わせに限定して実験を行った。

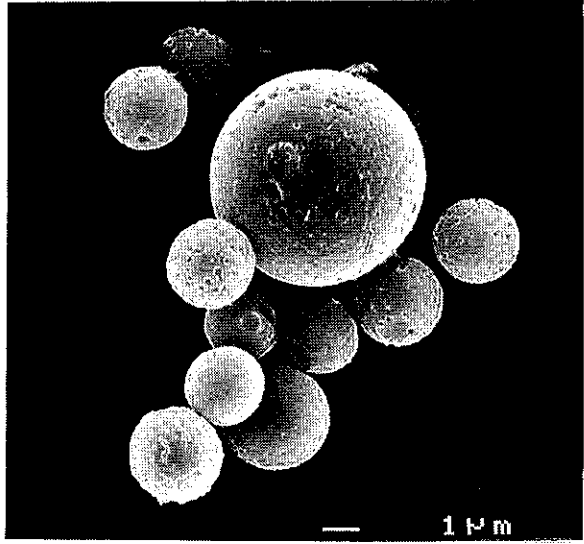


Fig. 1. A scanning electron micrograph of typical microspheres taken at 10kV.

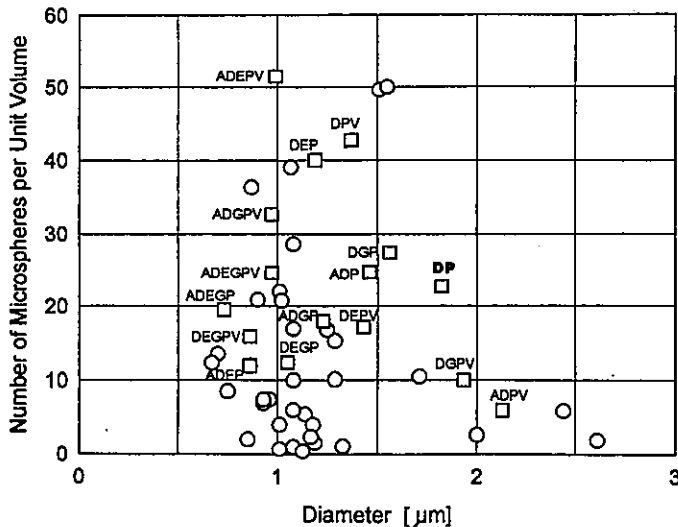


Fig. 2. Production of microspherical particles from the thermal products of six different kinds of amino acid, in which the abscissa denotes the average diameter of the particles and the ordinate represents the average number of the particles in a unit volume( $3.6 \times 10^5 \mu\text{l}$ ). Abbreviation : aspartic acid(D), proline(P), alanine(A), glutamic acid(E), glycine(G), valine(V).

## 2-2. 熱重合反応

アスパラギン酸とプロリン等モルから成る混合物を加熱した際の熱的挙動をみるため、熱重量測定および示差熱測定を行った。

熱重量測定では、アミノ酸混合物を窒素還流下に置き、混合物の重量変化を測定した。温度制御されたオイルバスの中にアミノ酸混合物を入れた試験管を浸し、一定時間毎に取り出して元の重量に対する減少率を求めた。加熱による混合物の温度上昇に伴って、アスパラギン酸、プロリン各1分子から水分子が最大三つ取れることに相当する重量減少が認められた(Fig. 3)。

示差熱測定では、アミノ酸混合物および標準試料(アルミナ) 0.2g をガラス製の試料容器に入れ、5.0°C/minの昇温速度で加熱し試料と標準試料の温度差をK型熱電対を用いて測定した。混合物は190°C付近から始まる吸熱反応を示し、アスパラギン酸、プロリンとは異なる独自の反応であることが明らかになった(Fig. 4)。この反応は通常雰囲気下および窒素雰囲気下においても同様であった。

次に熱重合反応と生成物の関連を見るため、熱重合反応時に最大の示差熱を示す温度において試料を取り出し、水を加え煮沸・冷却の後、乾燥させるという一連の操作を行った。重合物の確認は赤外スペクトルの吸収パターンで判定した(Fig. 5)。重合反応による吸熱の終了時には既に重合物の生成が認められ、多段階の反応を伴わない一過性、かつ、短時間で熱重合が終了することが明らかになった。

## 2-3 反応生成物の加熱条件依存性

熱重合反応は190°Cを超える一過性の加熱過程で重合反応が起こることが判明したが、

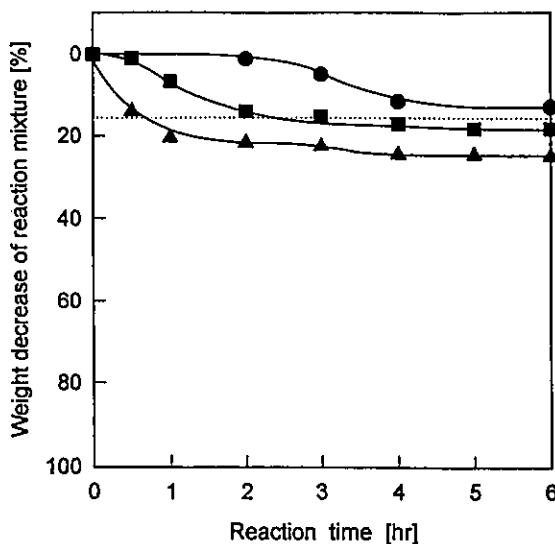


Fig. 3. Measurement of the weight decrease of the mixture of aspartic acid and proline during heating. 200°C(▲), 180°C(●) and 170°C(■). The broken line represents the case of losing two water molecules from one aspartic acid and one proline molecule.

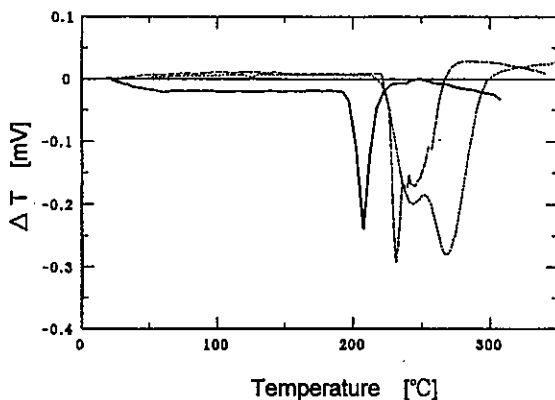


Fig. 4. Differential thermal analysis for amino acids in which shorter broken line is for aspartic acids, longer broken line for proline and solid line for the mixture of the two.

重合反応終了後も加熱を継続させた場合、見かけの分子量が反応後の加熱条件に依存して変化することが明らかになった。見かけの分子量の推定は直径 1.2cm、長さ 30cm のゲルろ過カラムを用い、重力による自由落下で溶媒を流した(Fig. 6)。樹脂はの Cellulofine GCL-90-sf (生化学工業) を用い、溶出液の組成は

0.1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  Buffer (pH9.2)

10mM NaCl

である。見かけの分子量は加熱温度が高くなるに従い、また加熱時間が長くなるに従って小さくなるのが判明した。

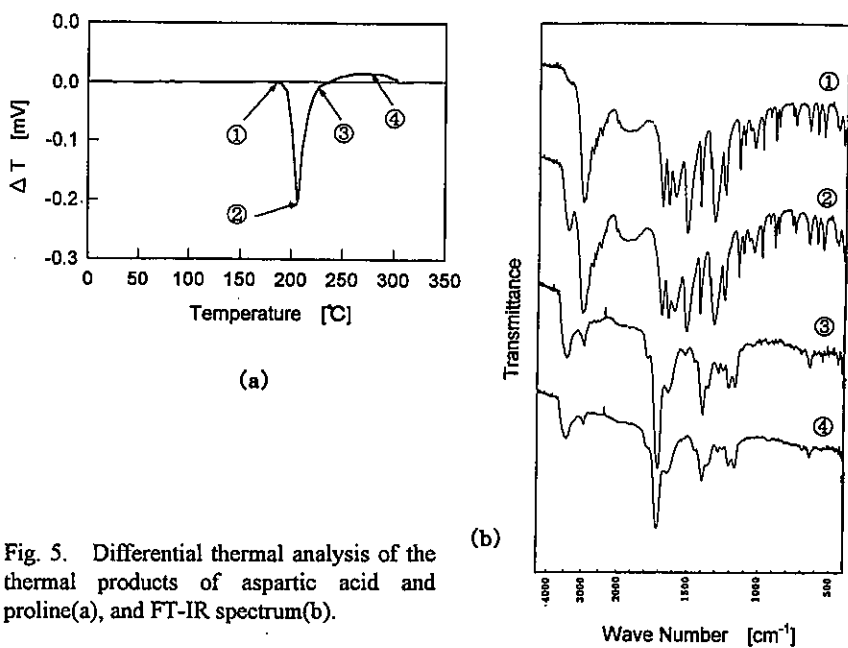


Fig. 5. Differential thermal analysis of the thermal products of aspartic acid and proline(a), and FT-IR spectrum(b).

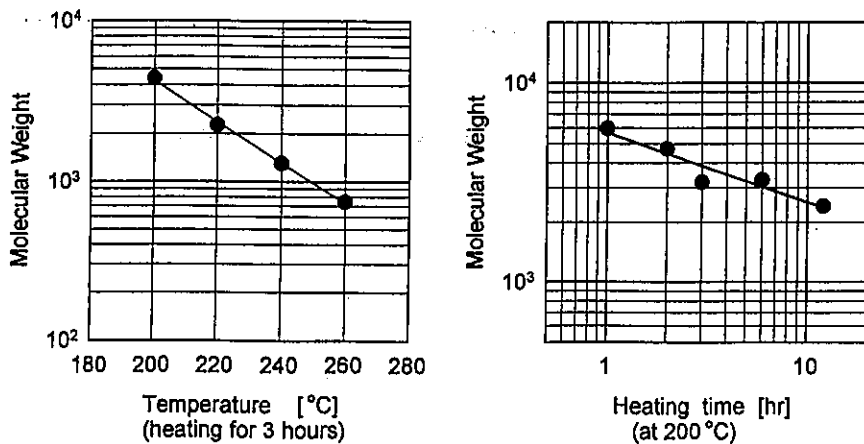


Fig. 6. Molecular weights of thermal products of aspartic acid and proline and their temperature of heating.



### 3. 熱重合生成物

アスパラギン酸とプリロンの混合物の熱重合反応による生成物は、水中で球型構造物を形成するものと溶解しているものとの二成分に大きく分けられる。水中で沈澱する球型構造物は水溶液の pH を高めると溶解する。

#### 3-1 紫外吸収

構造物を pH の高い緩衝液で溶解した場合、これは紫外域(～300nm)に固有な吸収を持つ(Fig. 7)。吸光度測定には U-2000 (日立製作所) を用いた。この波長は緩衝液に依存せず、吸光度は重合物の濃度に比例する。

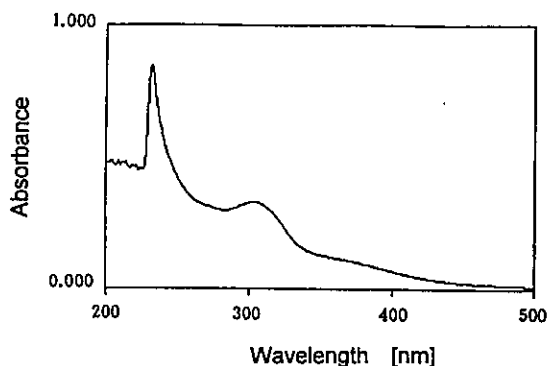


Fig. 7. Adsorption spectra of DP1 at pH=9.2.

#### 3-2 分子量

加熱条件によって見かけの分子量が変化するが、一連の実験に用いている熱重合物の生成条件では、球型構造物を形成する分子種はおよそ 4000 を示し、もともと水に溶解しているものは 1400 を示した(17)。われわれは球型構造物を形成する分子種を [DP 1] と名づけ、溶解している分子種を [DP 2] と呼ぶことにした。

#### 3-3 塩析・塩溶

球型構造物を形成する分子種 [DP 1] は硝酸アンモニウム、硝酸カリウム、硫酸カリウム、塩化カリウムに対して、これらの塩濃度が高くなるとその溶解度が増すことが判明した。しかし硫酸アンモニウムに対しては逆に溶解度の減少が見られた(Fig. 8)。硫酸アンモニウムによる塩析はタンパク質と同様であるが、硝酸カリウムではタンパク質とは逆の塩溶を示している。

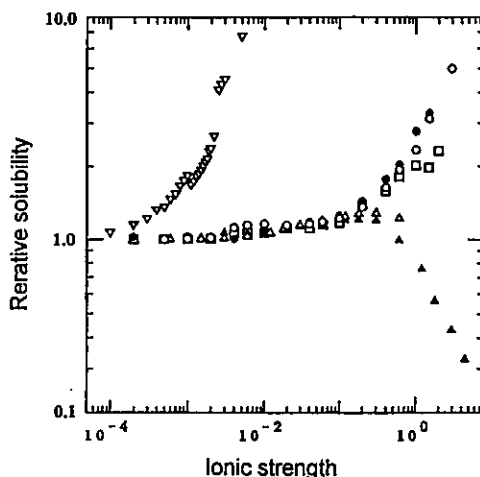


Fig. 8. Solvability of DP1 molecules in ionic solutions: nitric ammonium(○), nitric potassium(●), potassium sulfate(△), ammonium sulfate(▲), potassium chloride(□), potassium hydroxide(▽). The solvability is represented as its ratio to the one observed in water.

#### 3-4 蛍光スペクトル

構造物を落射蛍光顕微鏡 TMD-EF2 (ニコン) で観察すると蛍光を

発することが確認された。構造物をりん酸トリメチル水溶液で溶解し、蛍光分光光度計 F-4010 (日立製作所) を用いて 250nm で励起させた場合 300-400nm と 400-500nm の幅広い範囲で蛍光スペクトルを示し、Gly-KOH 緩衝液で溶解したものは 400-500nm にピークを示した (Fig. 9)。この幅広いピークは多くの分子種が混在していることを示唆している。またこの蛍光スペクトルは試料の濃度を変化させることで蛍光スペクトルのピーク波長が移動することも明らかになった。

#### 4. 構造物形成

球型構造物は 20°C 前後の水中では長期間 (1 年以上) 安定な構造を形成し続けている。水溶液の温度を上げると溶解し、冷却すると再び構造物を形成する。懸濁液の昇温、降温サイクルを繰り返し与えても、冷却した段階においては球型の構造体を形成している。

構造物は自己吸着型の沈殿であり、飽和溶解度を持たない。構造物を形成する構成分子の化学量論的な関係をみると、熱重合分子二分子が水素結合して構造物に集積し形成していると考えられる (18)。

##### 4-1 構造物の粒径変化

構造物は煮沸後の冷却過程における構造体形成時に、冷却温度勾配を変えると粒径が変化した (Fig. 10)。またその影響を与える温度範囲は 40°C から 20°C の間に限定された。さらに粒径が最も大きくなる温度勾配が存在していた。その時の値は 28.8°C/day であった。温度変化と構成分子の集積解離速度における緩和速度の相対関係がこの現象の背後にある。

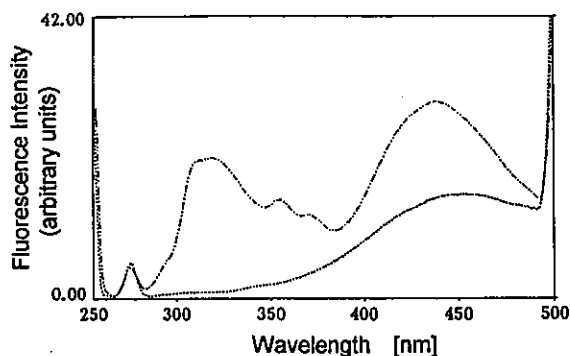


Fig. 9. Fluorescence spectrum of DPI molecules in which excitation was made at wavelength (250nm). Two-dot broken line for the solution of 5.0M trimethyl phosphate, and broken line for 1.0M glycine-KOH buffer.

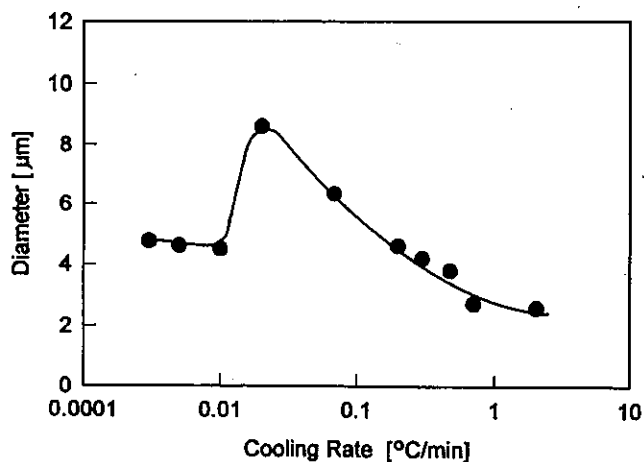


Fig. 10. Cooling rate versus the average diameter of phase-separated microspheres.

#### 4-2 内部構造

自然乾燥させた構造物を機械的に破壊し、内部の状況を走査電子顕微鏡で観察した。形成後の構造物は内部が充填されていることが判明したが(Fig. 11)、pH環境を5より増大させると内部が溶出し、殻状構造体を形成することも明らかになった(Fig. 12)。



Fig. 11. A scanning electron micrograph of typical microspheres taken at 10kV (scale bar, 5  $\mu$ m). A broken microsphere in the center is the one demolished by applying mechanical stress.

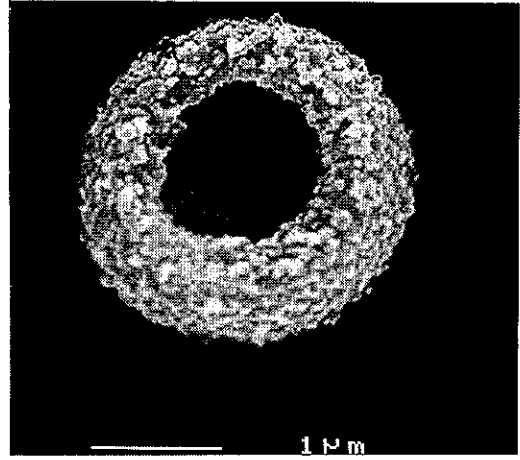


Fig. 12. A scanning electron micrograph of a shell-like structure, taken at 10kV.

#### 4-3 温度履歴

球型構造物を含む懸濁液を加熱すると温度上昇に伴い構造物の溶解が進み、80°C付近で完全に溶解する。その後、冷却により再び球型構造物が析出、形成される過程を懸濁液の濁度の測定でもって計量した(Fig. 13)。懸濁液(濃度 1.23mg/ml)を 3.85°C/min の温度勾配で加熱し、その後 1.21°C/min の温度勾配で冷却し、濁度を 632.8nm の He-Ne レーザー光で測定した。

昇温時の完全に溶解する温度と冷却時に析出が始まる温度が異なり、昇温時と降温時では経路が異なることが判明した。

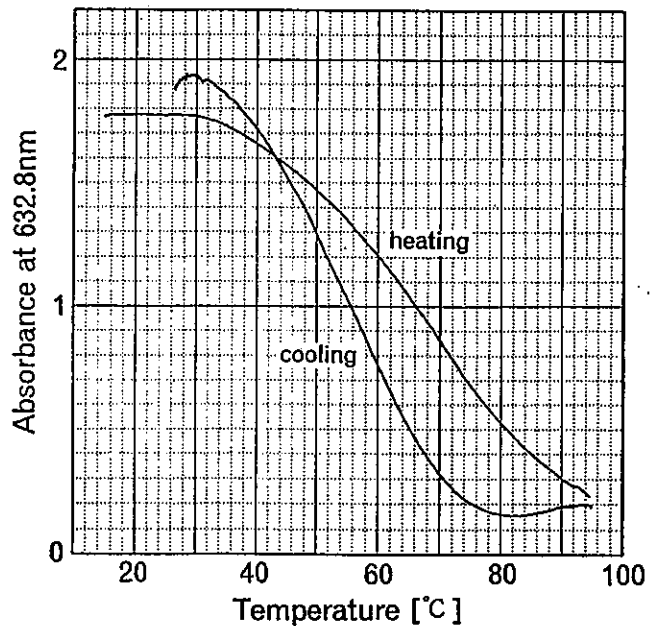


Fig. 13. Turbidity of the suspension versus temperature.

## 5. 構造物の低分子化合物の吸着能

ここでの球型構造物をアミノ酸や核酸塩基を含む溶液中に置くと、ある種のアミノ酸および核酸塩基を選択的に吸着することが判明した(19)。

構造物は塩基性アミノ酸であるリジン、ヒスチジン、アルギニンを吸着する。ヌクレオチドはアデニンを吸着する。またヌクレオシドについてはアデノシン、シチジンを吸着する。

## 6. まとめ

原始地球の大気を還元性大気で模擬化した実験でアミノ酸の生成が認められる。また、原始大気が還元性ではなく、アミノ酸の起源そのものが地球外であっても、隕石あるいは彗星によって地球に運ばれて来た可能性は高い。そのアミノ酸が高温にさらされ、水で洗われる環境を想定すると、原始地球上においてもアミノ酸熱重合物が存在した可能性も高い。このアミノ酸熱重合物が原始地球上で生起する各種化学反応に如何なる役割を果たしたのか、がここでの関心事である。

熱重合反応は示差熱分析から 190°C を超える環境下では容易に起こることが判明した。原始地球上で広範に起こり得たと考えられるのは加熱による反応であり、原始地球上でのアミノ酸熱重合物の存在を大きく示唆するひとつの事実である。しかし、様々な温度環境下で生成される熱重合分子は多様である。見かけの分子量一つを取ってみても大きく異なっている。

アスパラギン酸とプロリンからなるアミノ酸混合物の熱重合反応で形成されるアミノ酸熱重合物は、水分子存在下で集積解離を行う。このイオン会合を伴う吸着過程により集積構造物の表面は外界の環境の影響を大きく受ける(18)。さらに、この構造物が原始地球上において各種化学反応の場を提供して来た可能性は高い。

個々の球型構造物はその外界の環境が変わる時、例えば pH、イオン強度、温度が変化する時、多様な形状変化と機能変化を示す。さらに球型構造物、あるいはそれを構成するアミノ酸熱重合物には温度履歴特性が認められる。このことは温度変化を周期的に与えることにより、構造物あるいは熱重合物にエネルギーを注入することが出来ることを示唆する。このエネルギーが低分子化合物の重合の際のエネルギー源として使われるなら、アミノ酸熱重合物、あるいはそれから成る構造物が原始地球上において微小な局所的反応の場を提供した可能性が生じてくる。

## 参考文献

- (1) S. L. Miller : J. Am., Chem. Soc., 77, 2351, 1955.
- (2) Y. Wolman, W. H. Haverland, S. L. Miller : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, No. 4 809, 1972.
- (3) Briggs, R., Ertem, G., Ferris, J. P., Greenberg, J. M., McCain, P. J., Mendoza-Gomez, C. X. and Schutte, W. : Origins of life and Evolution of the Biosphere 22, 287, 1992.

- (4) Hoyle, F. and Wickramasinghe, C. : In: Ponnampetuma C. (ed.), *Comets and Origin of Life*, Reidel, Dordrecht, pp. 227-239, 1981
- (5) Greenberg, J. M. : *Origins of life and Evolution of the Biosphere* 14, 25, 1984.
- (6) Kissel, J. and Krueger, F. R. : *Nature* 326, 755, 1987.
- (7) Anders, E. : *Nature* 342, 255, 1989.
- (8) Steel, D. : *Origins of life and Evolution of the Biosphere* 21, 339, 1992.
- (9) Greenberg, J. M. and Mendoza-Gomez, C. X. : *Adv. Space Res.* 11, (4)169, 1992.
- (10) Basiuk V. A. and Navarro-Gonzalez R. : *Origins of life and Evolution of the Biosphere* 25, 457, 1995.
- (11) Fox, S. W. and Harada, K. : *Science* 128, 1214, 1958.
- (12) Fox, S. W. and Dose, K. : "Molecular Evolution and the Origin of Life" , 1977.
- (13) Yanagawa, H. and Egami, F. : *BioSystems* 12, 147, 1980.
- (14) Yanagawa, H., Kobayashi, Y. and Egami, F. : *J. Biochem.* 87, 855, 1980.
- (15) Yanagawa, H. and Kojima, K. : *J. Biochem.* 97, 1521, 1985.
- (16) Yanagawa, H., Ogawa, Y. Kojima, K. and Ito, M. : *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 18, 179, 1988.
- (17) Imai, E., Shirasawa, J. Honda, H., and Matsuno, K. : *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 21: 243, 1992.
- (18) Honda, H., Maezawa, M., Imai, E., and Matsuno, K. : *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 23: 177, 1993.
- (19) Honda, H., Sakurazawa, S., Kimura, H., Imai, E., and Matsuno, K. : *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 25: 443, 1995.



# **Uptake, release and binding of rare earth elements in cultured mammalian cells as determined by instrumental neutron activation analysis**

Jitsuya Takada, Yoshiko Tanaka, Teruie Sumino, Keizo Kawamoto, Kenichi Kawai  
and Mitsuhiko Akaboshi

Research Reactor Institute, Kyoto University,  
Kumatori-cho, Sennan-gun, Osaka, 590-04, Japan

(Received May 7, 1996; Accepted June 30, 1996)

## **ABSTRACT**

HeLa S-3 cells were treated with rare earth elements (REE, 1 mM) under various conditions, and the amounts of the elements incorporated into the cells were examined using instrumental neutron activation analysis (INAA). The incorporation of all the REE used in this experiment (La, Sm, Eu and Ce) showed a similar pattern, namely, a quick incorporation until 3 hr and a quick release with a slow component after 1 hr. This tendency was more marked in the heat-killed cells than in normal living cells, and in 0 °C treated cells than in 37 °C treated cells. Thus, it seemed that cells, as far as they are living, resist against the penetration of these elements within the cells. About several % of the total cellular REE of these elements was bound to cellular important molecules such as DNA, RNA and proteins. La, Sm and Eu were bound to RNA, while Ce bound to DNA preferentially.

Key words: activation analysis, rare earth elements (REE), HeLa cell, La, Ce, Sm, Eu.





# 希土類元素と細胞との相互作用に関する探索 放射化分析による被処理細胞内での希土類元素の動態観察

高田 實彌、田中 愛子、隅野 照家、川本 圭造、河合 建一、赤星 光彦

京都大学原子炉実験所 (〒590-04 大阪府泉南郡熊取町野田)

## 1. はじめに

Ce や La を始めとする多くの希土類元素がクルミ種<sup>1)</sup>や哺乳動物の骨組織<sup>2)</sup>に集積することが古くから知られているが、その生理学的意義は不明であった。近年、中国において希土類元素を散布した地域で農作物の収量が上昇することが報ぜられ、その生理学的作用と動物体への集積や毒性に関する研究が開始された<sup>3,4)</sup>。しかしながら、研究の歴史が未だ浅く、これらの問題点について明確な結論を提出するには至っていない。

希土類元素の多くは原子核内に熱中性子を吸収し易く、新たな放射性核を形成し易い性質を持つので、元素の定量分析にあたって放射化分析法の利用が極めて有効な元素類である。

この方法はまた、誘導された $\gamma$ 線のエネルギーとその半減期の決定によって、多種類の微量元素量を同時に測定できると言う利点を持っている。京大原子炉 (KUR) では放射化分析法の利用の歴史が長く、経験も豊富で、如何なる試料であろうとも簡便に望む元素を定量するために改良された技術とシステムとをもっている。そこで我々は「希土類元素と細胞との相互作用」を探索するにあたって、希土類元素の分析が主要な技術となる動態観察の部分放射化分析を利用して遂行することにした。本研究課題にあっては二つの主題が平行に進められている。すなわち、一つは「シダ植物葉組織内への希土類元素の集積」であり、著者等はすでにシダ植物が希土類元素を特異的に集積することを見出だし<sup>5,6)</sup>、その原因や土壌、植物種との関連について検索を進めている<sup>7,8)</sup>。本報告は第二の主題として進められている「希土類元素と細胞との相互作用」についての実験的研究の第一歩である。すなわち、生物にとって必要ではないとされている希土類元素が細胞の中へ取り込まれるのかどうか、また、取り込まれた場合の存在形態と排出に際する動態等々の諸問題に触れたい。培養 HeLa 細胞を材料として用い、上記の観点から行なわれた実験結果について報告する。

## 2. 材料と方法

HeLa細胞を希土類各種元素を含む培地中で、0℃または37℃の温度で3時間処理した。また、希土類元素としては、いずれも和光純薬より購入した特級クラスの試薬 (LaCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O、SmCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O、Eu(III)Cl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O および Ce(III)Cl<sub>3</sub> · 7H<sub>2</sub>O) をそのまま用い、培地中に希土類元素として 1 mM となるよう調整した。ただし、Eu に関しては放射化され易

く他の核種の分析に際して妨害を与えることが予想されたので、加える量を  $1/10$  ( $0.1$  mM) に減らした。処理後、遠沈にて新鮮培地に置き換え、さらに培養を続けて細胞からの希土類元素を遊離せしめた。終了後、冷生理的食塩水にて一度洗浄し、99.9% エタノールで固定し、濾紙上で乾燥したものを放射化分析用の試料とした。また対比のため、細胞浮遊液の入った試験管を沸騰水中約10分処理することによって殺した細胞を用いて、同様な試料を調製した。さらにまた、被処理細胞の DNA, RNA および蛋白質分画中の希土類元素を定量する際の分画法としては Schneider 法<sup>9)</sup>を用いた。

試料は一試料毎にポリエチレン袋に封入し、5MW 稼働中の KUR 気送管を用いて 1 時間照射し(熱中性子束密度:  $2.75 \times 10^{13} \text{ n} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )、約 1 週間のクーリングの後、Ge (Li) - 半導体検出器を装備したマルチチャンネル波高分析器を用いて誘導放射能を分析した。同様に処理された既知量のスタンダード試料に誘導された放射能との比較から、処理細胞に含まれる希土類元素量を定量した。

### 3. 結果

Fig. 1は各種条件において処理された HeLa 細胞内の希土類元素の動態を示す。図において縦軸はカウントされた放射活性を表しており、その高さは必ずしも元素の細胞内濃度と対応するものではない。むしろ、各元素の放射化分析による検出感度に対応するものである。元素濃度として ppm で表すこともできるが、そうすると全ての曲線が収束して区別出来なかったので、本図ではこの様に表現することとした。つまり、細胞に取り込まれた各元素濃度には大きな差はなく、Sm, La は検出感度が高く、Ce は低いことを示している。Eu は培地に加えた濃度が  $1/10$  であった点から判断すると高い方に属する。同じ元素の取込みを示す曲線間では高さは細胞内濃度比を表すと考えてよい。さて、テストされた希土類元素は例外なく、処理時間と共に細胞内に速やかに取り込まれ、また新鮮培地に置き換えることによって速やかに流失する。流出曲線は新鮮培地に置換してから直後の傾きの急激な成分と、長時間処理後の緩やかな成分との二成分に分かれると見られるが、この曲線からは半減期の正確な評価は難しい。しかし、元素によって、また細胞の処理によってこれらの傾きが少しずつ異なることが伺われる。例えば、沸騰水処理によって殺された細胞での希土類元素取込量は他の処理に較べて全ての元素で著しく高い。また  $0^\circ\text{C}$  で培養された細胞でも同じ傾向が見られる。また排出も正常細胞に較べて早い。

細胞内に取り込まれた希土類元素が細胞内のどのような分画に存在するかを明らかにするために、 $37^\circ\text{C}$ -1 hr 処理された細胞から Schneider 法を用いて分画された各分画中の希土類元素を定量した(Table 1)。本来、細胞内に存在するこれらの分画の中では蛋白質の量 ( $2.47 \times 10^{-9} \text{ g/cell}$ ) が最も多く、DNA ( $1.90 \times 10^{-11} \text{ g/cell}$ ) および RNA ( $2.72 \times 10^{-11} \text{ g/cell}$ ) の 100 倍以上にのぼる。しかしながら、蛋白質分画中に存在する希土類元素量は DNA 分画中の量と同程度であり、RNA 分画中の量よりもはるかに少ない。希土類元素は蛋白質よりも核酸と結合し易いものと考えられる。同じ核酸のなかでも、RNA には La, Sm, Eu が、一方、DNA には Ce がよく結合する傾向が伺われる点が興味深い。

### 4. 討論

低濃度の希土類元素を含む培地中で処理された培養細胞内に、処理条件に対応して各種希土類元素が取り込まれることが確かめられた。新鮮培地に置換後、希土類元素は細胞から排出されるが、排出には早い成分と緩やかな成分とが観察された。熱処理によって殺し

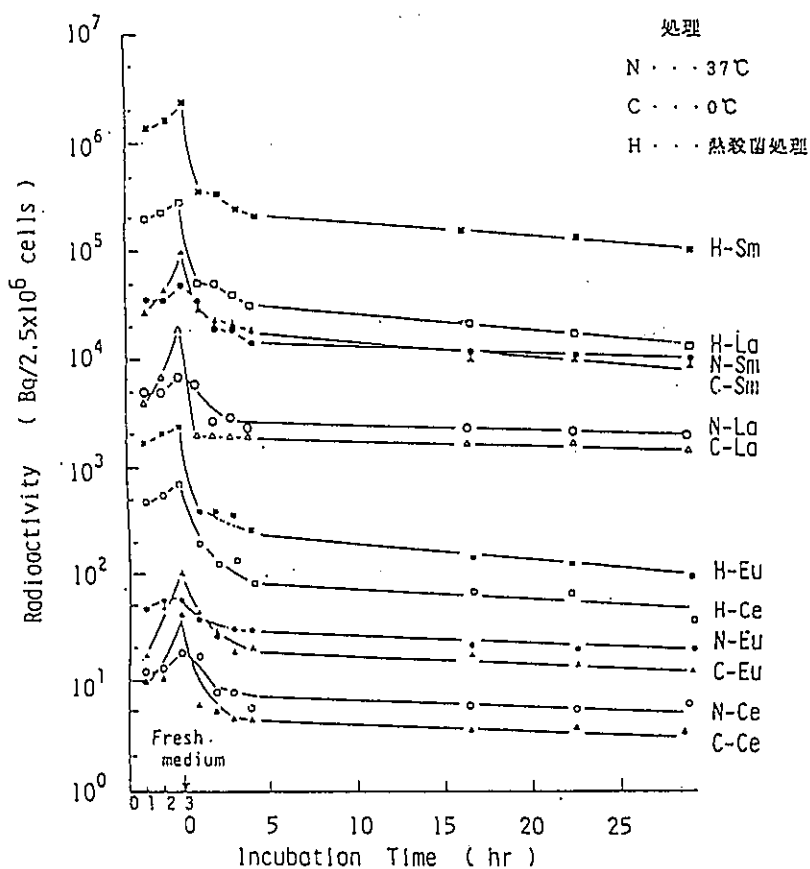


Fig. 1. Variation in rare earth content of HeLa cells after different treatments.

Table 1. Rare earth content in each fraction of HeLa cell .

|          | content<br>(g/cell)    | La<br>(10 <sup>-15</sup> g/cell) | Sm<br>(10 <sup>-15</sup> g/cell) | Eu<br>(10 <sup>-15</sup> g/cell) | Ce<br>(10 <sup>-15</sup> g/cell) |
|----------|------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| DNA      | 1.90X10 <sup>-11</sup> | 15.5                             | 26.2                             | 2.68                             | 8.41                             |
| RNA      | 2.72X10 <sup>-11</sup> | 75.1                             | 122                              | 4.59                             | 3.59                             |
| protein  | 2.47X10 <sup>-9</sup>  | 20.0                             | 20.5                             | 1.88                             | 5.21                             |
| TCA-sol. | —                      | 431                              | 446                              | 16.0                             | 29.6                             |

た細胞では取り込みの量も高く速度も早いが出速度も早い。同じことは 0℃ 処理した細胞でも観察された。このことは細胞は生きている限り、また正常な代謝条件にある限り、希土類元素の細胞内への大量の侵入に対して抵抗していることを示している。取り込まれた希土類元素は元素により異なった率で細胞内高分子類に結合して存在することが観察された。Table 1に示された結果をもとに、各希土類元素のそれら高分子類への結合量を細胞内に取り込まれた全量に対するパーセントで表したのがTable 2である。細胞に取り込まれた希土類元素が数/10%から数%のオーダでDNA、RNA および蛋白質等の細胞内高分子と結合して存在することが判る。各分子への結合率は元素によって異なり、Ce はDNAに、La、Sm および Eu はRNA分画により多く結合していた。一方、存在量としては最も多い蛋白質分画への結合がいずれの元素(Ceを除く)でも低かった。

Table 2. % - distribution of rare earths in each cellular fraction

| cell (g) | La<br>$1.5 \times 10^{-12}$ | Sm<br>$1.5 \times 10^{-12}$ | Eu<br>$1.8 \times 10^{-12}$ | Ce<br>$1.7 \times 10^{-12}$ |
|----------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| DNA      | 1.03                        | 1.75                        | 0.149                       | 0.495                       |
| RNA      | 5.01                        | 8.13                        | 0.255                       | 0.211                       |
| protein  | 1.33                        | 1.36                        | 0.140                       | 0.306                       |
| TCA-sol. | 28.7                        | 29.7                        | 0.889                       | 1.74                        |

La を一例として DNA 分子との結合比がどの程度であるか評価してみる。細胞内に存在する DNA 量は  $1.9 \times 10^{-11}$  g/cell と与えられており、一方、結合したLaの量は  $15.5 \times 10^{-15}$  g/cell であるから、今、DNAとLaとの分子様の比を約 6 (350/57)と考えると  $1.9 \times 10^{-11} / 15.5 \times 10^{-15} \times 6 \approx 204$  となる。すなわち、この条件での DNA 分子へのLaの結合は204ヌクレオチド当たり1原子となる。他の希土類元素においてもこの値はあまり変わらない。これだけの量の希土類元素が細胞内重要分子に結合した場合の生理学的作用に関しては別の論文に詳しくのべる<sup>10)</sup>。

次に、放射化分析による希土類元素の定量に関する論議に移りたい。Fig. 1 に示された値は実測値で、 $2.5 \times 10^6$  細胞当たりの Bq (1 decay/sec) 単位で与えられている。図より、最も検出感度の高かった Sm の場合、その最高値は  $2.5 \times 10$  Bq/ $2.5 \times 10^6$  cells を越えることが明らかである。すなわち、この場合 1Bq あれば計数可能であるとするならば、被処理細胞1個の中に含まれる Sm 量を測定出来ることになる。本実験の場合、試料は希土類元素で処理された細胞そのものであったり、そこから抽出された各分画である等、Na やCl等の妨害元素を多く含む極めて悪い条件下の測定ではあったが、それでもTable 3 に示された量の各種希土類元素を容易に測定していることになる。なお、表には参考のため同じ元素を ICP を利用して測定した場合の検出感度を付記した。放射化法では個体、ICP

**Table 3. Comparison of the detection limits between the two methods  
Activation Analysis(AA) and ICP.**

|                         | Sm                  | Dy                  | La                  | Eu                  | Gd                  | Nd                 | Ce                 | Sc                 |
|-------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| AA (g) <sup>a)</sup>    | $5 \times 10^{-14}$ | $3 \times 10^{-14}$ | $5 \times 10^{-13}$ | $5 \times 10^{-12}$ | $1 \times 10^{-10}$ | $5 \times 10^{-8}$ | $1 \times 10^{-9}$ | $1 \times 10^{-9}$ |
| ICP (ppb) <sup>b)</sup> | <50                 | 10                  | 200                 | <5                  | 20                  | 100                | 200                | <5                 |

a) Present work

b) The measurement was carried out by one of the present authors under an ideal condition where 1 ml each of the standard solutions was applied for each test.

では液体中の元素量を測定することになるので、値の単純な比較は出来ないが、Sm、Dy、La および Eu では放射化の方が 4~6ケタ、Gd、Nd、Ce では 1~2ケタで検出感度が高く、Sc になると両者が拮抗している。なお、ここで ICP の測定はスタンダード試料を用いて理想的な状態で行なわれたものであること、および「多元素同時」・「非破壊」と云ったメリットをも考慮に入れるならば、この種の研究において放射化分析が圧倒的に優位であることには疑問の余地はない。

#### 謝辞

本研究は文部省科学研究費（重点領域研究「希土類錯体の新展開」No.06241107）の援助により、行なわれた。

#### 文献

1. Robinson, W. O., Bastron, H. and Murata, K. J., *Geochim. Cosmochim. Acta*, 14, 55 (1958).
2. Schofield, A. and Haskin, L., *Geochim. Cosmochim. Acta*, 28, 437 (1964).
3. Yunjing, J., Mingzhen, C., Yijia, W. and Xiqiao, Z., In *New Frontiers in Rare Earth Science and Applications*, vol. 1, ed. Xu, G. X. and Xiao, J. M., Science Press, Beijing, p. 700 (1985).
4. Qiang, T., Xiao-rong, W., Li-qing, T. and Le-mei, D., *Environ. Pollut.*, 85, 345 (1994).
5. Koyama, M., Shirakawa, M., Takada, J., Katayama, Y. and Matsubara, T., *Proc. Intern. Conf. Modern Trends in Activation Analysis*. (1986).
6. 高田実弥、松原丘、片山幸士、西村和雄、赤星光彦、小山睦夫、*Viva Origino*, 21, 205 (1993).
7. Takada, J., Nishimura, K., Akaboshi, M., Matsubara, T., Katayama, Y. and Koyama, M., *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, (1968) in press.
8. Takada, J., Nishimura, K., Sumino, T., Tanaka, Y. and Akaboshi, M., *Toxicol. Environ. Chem.*, (1996) in press.
9. Schneider, W. C., *J. Biol. Chem.*, 164, 745 (1961).
10. Akaboshi, M., Sumino, T., Tanaka, Y., Takada, J., Kawai, K. and Kawamoto, K., *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, (1996) in press.



## ☆ 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、それぞれの手引書を参照のこと。

### 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

## <1996、1997年度役員>

名 誉 会 長 野田 春彦  
会 長 原田 肇  
副 会 長 長野 敬、中村 運、大島 泰郎

### 〔運営委員会〕

委 員 長：湯浅 精二 会計責任者：松野孝一郎 編集責任者：赤星 光彦  
委 員：秋山雅彦、石神正浩、大西耕二、小林憲正、佐藤七郎、島田 秋彦  
清水幹夫、下山 晃、長谷川政美、藤井紀子、伏見 譲、松野孝一郎、  
胸組 虎胤、柳川弘志、山中健正

会 計 監 査 佐藤七郎、 山中 健生

学会本部事務局 〒560 豊中市待兼山町1-16  
大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻内  
Tel: 06-850-5823(call-in), Fax: 06-850-5817  
E-mail: syuasa@bio.sci.osaka-u.ac.jp  
責任者 湯浅 精二

経理部事務局 〒940-21 長岡市上富岡町  
長岡技術科学大学生物系  
Tel: 0258-46-6000(Ex.4518), Fax: 0258-46-8163  
E-mail: kmatsuno@voscc.nagaokaut.ac.jp  
責任者 松野孝一郎

編 集 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  
Tel: 0724-52-0901, Fax: 0724-52-7364  
E-mail: akaboshi@rri.kyoto-u.ac.jp  
責任者 赤星 光彦

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 24巻2号

1996年6月5日 印刷  
1996年6月10日 発行

|                  |   |
|------------------|---|
| 編集者              | 〒590 大阪府泉南郡熊取町野田1010 京都大学原子炉実験所内<br>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<br>和泉出版印刷㈱ TEL 0725-45-2360 FAX 0725-45-6398 |
| 発行者<br>及び<br>出版者 | 〒590 大阪府泉南郡熊取町野田1010 京都大学原子炉実験所内<br>生命の起原および進化学会事務局<br>責任者 赤星 光彦  |





## Contents

### REVIEW

- ◎ Application of neutron activation analysis to the study of origin of life  
M. Akaboshi and J. Takada ..... (113)

### ARTICLES

- ◎ Functions of the universal CCA end of tRNA in translational processes  
K. Tamura and T. Hasegawa ..... (125)
- ◎ Origin and evolution of the related organelles: Mitochondria, chloroplast  
and peroxisome  
H. Nakamura ..... (137)
- ◎ Thermal properties and thermal products of amino acids  
E. Imai, S. Sakurazawa, H. Honda and K. Matsuno ..... (159)
- ◎ Uptake, release and binding of rare earth elements in cultured mammalian  
cells as determined by instrumental neutron activation analysis  
J. Takada, Y. Tanaka, T. Sumino, K. Kawamoto,  
K. Kawai and M. Akaboshi ..... (171)