

Viva Origino

VOL.28 (No.2)

June 2000



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

生命の起原および進化学会 会則

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

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

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

第三条 本学会は、前条の目的達成のため次の事業をおこなう。

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

第四条 本学会は前条の事業をおこなうため事務局をおく。

第五条 本学会の会員は、正会員と賛助会員とし、入会手続きは別途定める。

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

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

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3/4以上の出席の総会において3/4以上の同意を要する。

学会入会手続きに関する付則

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

会費その他に関する付則

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

Viva Origino

VOL.28 (No.2)

June 2000

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

目 次

論 文

- ◎低線量ガンマー線で照射されたトリプトファナーゼの活性変化
島田秋彦、藤井紀子、中村以正 (65)
- ◎培養ウシ水晶体上皮性細胞の分化に対するL-アスコルビン酸
2リン酸の影響
常磐孝義、藤井紀子、赤星光彦 (77)
- ◎化学進化もまた段階的に進行する
赤星光彦、田中愛子、中野幸広、藤井紀子 (87)
- ◎tRNAの3'末端アデノシンとアミノアシル-tRNA合成酵素
の進化における相関関係
田村浩二、長谷川典巳 (97)

話 題

- ◎生命の起原・進化学会 ニュースレターNo. 28 (2000) (111)

低線量ガンマー線で照射されたトリプトファナーゼの活性変化

島田秋彦¹, 藤井紀子², 中村以正³

¹筑波大学応用生物化学系(〒305-8572 茨城県つくば市天王台1-1-1)

²京都大学原子炉実験所(〒590-0494 大阪府泉南郡熊取町野田)

³相模女子大学食物学科(〒208-0807 神奈川県相模原市文京2-1-2)

酵素やタンパク質にガンマー線を照射すると、照射量に応じてそれらの立体構造の変化が大きくなり、それらの生理活性は失なわれるといわれている。照射線量及び活性変化の相互関係は未だ明らかになっていないが、一般に低線量下における生物学的影響には興味を持たれるところである。本論文では、低線量γ線で照射されたトリプトファナーゼの活性が上昇したことを報告する。[L-トリプトファン:18%増加(0.12K Gy), D-トリプトファン:37%増加(0.24K Gy)]。著者らは、トリプトファナーゼの構造変化がD-トリプトファンの分解を可能にしたという仮説を提唱しているが、この活性上昇が構造変化の関係について検討中である。

INCREASING ACTIVITY CHANGE OF TRYPTOPHANASE IRRADIATED WITH A LOW DOSE OF γ -RAYS

(Received July 30, 1999; Accepted September 20, 1999)

Akihiko Shimada¹, Noriko Fuji² and Isei Nakamura³

¹Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan. ² Research Reactor Institute, Kyoto University, Kumatori, Osaka 590-0494, Japan. ³Department of Food and Nutrition, Sagami Woman's University, Sagamihara, Kanagawa 228, Japan.

ABSTRACT

It has been described that enzymes or proteins irradiated with γ -rays increasingly changes their steric conformation with their dose, and results in losing their physiological activity. Although the interaction between irradiation dose and activity change has still remained unclear, biological effects in low irradiation dose have generally intrigued us. In this study, we report increasing activity of tryptophanase irradiated with a low dose of γ rays [L-tryptophan : 18 % increase (0.12 KGY), D-tryptophan : 37 % increase (0.24 KGY)]. We have proposed that conformational

change of tryptophanase is responsible for the advent of activity for D-tryptophan, and also is now investigating whether this activity change is connected with conformational change.

Key words: γ -rays, Tryptophanase, D-tryptophan, Increasing activity change

INTRODUCTION

L-amino acid is recognized by a unique enzymatic stereospecificity.^{1,2)} If its steric conformation is modified so as to correspond to the opposite enantiomer, D-amino acid will be possibly recognized, though it is difficult to find such an enzyme active to D-amino acid by changing the steric conformation for L-amino acid.³⁻⁵⁾ We have found that tryptophanase becomes active to both D- and L-tryptophan in highly concentrated diammoniumhydrogen phosphate solution.^{6,7)} The appearance of the activity for D-tryptophan seems to be due to somewhat steric conformational change, since the tryptophanase activity reverses into the original state in the absence of diammoniumhydrogen phosphate.⁸⁾ Such a conformational change, if happened, is considered to be very limited because of its reversibility. It is interesting to know what kind of conformational change induces its activity for D-tryptophan. On the other hand, γ -rays are widely known to give proteins or enzymes tertiary conformational changes.^{9,10)} A large dosage of γ -rays deactivates enzyme because of its drastic change, while a small dosage is supposed not to deactivate because of its minor change, which is called hormesis.^{11,12)} In this study, we irradiated a low dose of γ -rays for tryptophanase and analyzed its activity change. Since the activity change of γ -tryptophanase seems to be closely related to tertiary structural change, information received upon γ -tryptophanase will help us understand a mechanism of D-tryptophan recognition in the presence of diammoniumhydrogen phosphate.

MATERIALS AND METHODS

γ -rays generate by-products from biomolecules. γ -ray irradiation also gives possible formation of by-products from tryptophanase or tryptophan. As aldehydelike by-products especially colors Ehrlich reagent to red, it is important to determine their presence or absence in advance. Thus, it was investigated whether aldehydelike by-products were generated by γ -rays from tryptophanase, L- and D-tryptophan (Trp) together with gelatin, L-alanine (Ala) and L-alanine oligomers. All the samples were prepared to a concentration of 2 mg/ml with Britton-Robinson buffer (pH 8.3) and immediately irradiated with 0, 5.0 or 15.5 KGy γ -rays at room temperature. After irradiation, they were analyzed with Ehrlich reaction in order to know whether aldehydelike by-products were formed.

Crude tryptophanase purchased from Sigma Chem. Co. (St. Louis, USA) was used for experiments without purification. The composition of reaction mixture for D-Trp degradation was different in both enzyme and substrate concentrations from that for L-Trp degradation because tryptophanase activity for D-Trp (initial velocity ($\Delta A_{570\text{nm}}/\text{min}$) = 8.0×10^{-4} , $V_m = 0.006$ units/mg and $K_m = 750$ mM in the presence of 1.2 M diammoniumhydrogen phosphate of pH 7.8) was much lower than that for L-Trp (initial velocity ($\Delta A_{570\text{nm}}/\text{min}$) = 9.4×10^{-3} , $V_m = 0.09$ units/mg and $K_m = 330$ mM in pH 8.3 Briton-Robinson buffer solution). For L-Trp degradation reaction, the reaction mixture included 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ enzyme, 245 μM L-tryptophan and 380 μM pyridoxal 5'-phosphate in pH 8.3, and for D-Trp degradation, it includes 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tryptophanase, 980 μM D-tryptophan, 1.2 M diammoniumhydrogen phosphate and 380 μM pyridoxal 5'-phosphate in pH 7.8. Prior to γ -ray irradiation, the enzyme was prepared to a concentration of 2 mg/ml in Britton-Robinson wide range buffer solution of pH 8.3. This enzyme solution was exposed to 0~28 KGy γ -ray irradiation for which a 10,000 Ci cobalt-60 source was used with a dose rate of 22.9 kGy/h. After irradiation, tryptophanase activity for L- and D-Trp was immediately assayed at 37 °C for 30 min in L-Trp degradation and for 4 h in D-Trp degradation to obtain coloration enough to detect. Indole released from tryptophan was extracted by *n*-butanol and colored with Ehrlich reagent for 30 min at 60 °C, and then its amount was calculated at $\lambda = 570$ nm.

Unless otherwise stated, reagents were obtained from Wako Pure Chem. Co. Ltd.

(Osaka). All chemicals were reagent grades. All glasswares were washed by soaking more than 3 days in a special detergent, CLEAN 99CL (Clean Chemical Co. Ltd., Osaka), thoroughly rinsed in deionized and distilled water, and then dried in an oven.

RESULTS AND DISCUSSION

1. By-products generated by γ -ray irradiation

γ -rays produce different kinds of by-products upon irradiating amino acids or proteins, among which by-products such as aldehydes sensitive to Ehrlich reaction must be carefully checked, since its reaction was mainly employed to detect indole

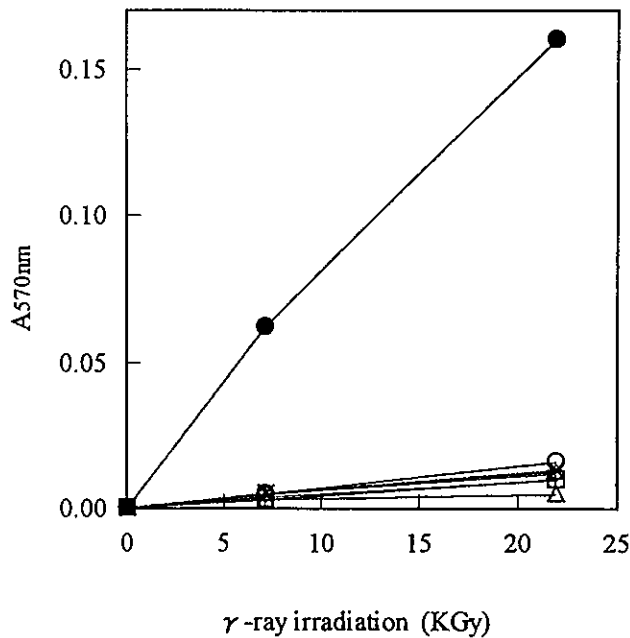


Fig.1 Aldehydelike matters produced with γ -ray-irradiated tryptophanase, D- and L-tryptophan. ●: L-Ala, +: L-Ala-L-Ala, ×: L-Ala-L-Ala-L-Ala, ◇: L-Trp, □: D-Trp ○: tryptophanase, △: gelatin.

during the course of study. Fig. 1 shows the γ -rays-irradiated aldehydes from the solutions (tryptophanase, gelatin, L- and D-Trp, L-Ala and L-alanine oligomers), among which sole Ehrlich reagent-sensitive matter was formed in the case of L-Ala. Ehrlich reagent-sensitive matter was supposed to correspond to aldehydes which were formed by $\cdot\text{OH}$ radical upon γ -irradiation. Alanine might be subsequently transformed by $\cdot\text{OH}$ radical attacks into $\text{H}_2\text{NCH}(\cdot\text{CH}_2)\text{HCOOH} \rightarrow \text{H}_2\text{NCH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{COOH} \rightarrow \text{H}_2\text{NCH}(\text{CHO})\text{COOH}$, and finally converted to $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CHO}$ or $\text{CH}_3\text{COCO}\text{OH}$ through decarboxylation or deamination. None of products sensitive to the reagent were formed in the case of tryptophanase and L- or D-Trp irradiated with γ -rays.

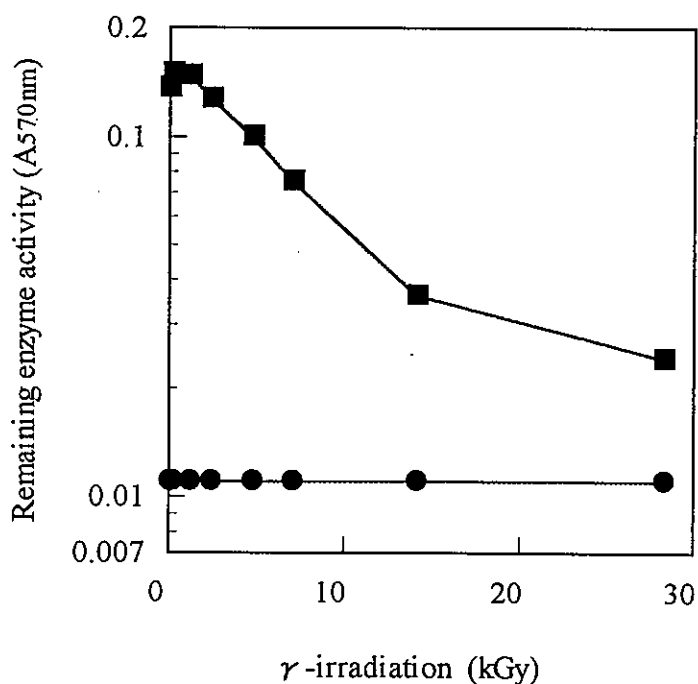


Fig.2 Remaining activity of γ -tryptophanase for D-Trp degradation. ■: presence of tryptophanase, ●: control (absence of tryptophanase).

2. Tryptophanase exposed to high γ -ray irradiation

Remaining activity of γ -tryptophanase was analyzed for D-Trp degradation. It was firstly investigated whether γ -rays gave rise to by-products as aldehydes from D-Trp. Controls (● in Fig. 2), in which only tryptophanase was eliminated from reaction mixture, were not colored at all by Ehrlich reagent in the same manner as described in Fig. 1, indicating no generation of aldehydes. When tryptophanase was exposed to strong γ -rays, it was deactivated with their dose (■ in Fig. 2). The deactivation curve of tryptophanase shows logarithmical decrease, and 80 % of the initial activity was lost at a dose of 15 kGy. High irradiation dose is considered to give tryptophanase irreversible and drastic conformational change because

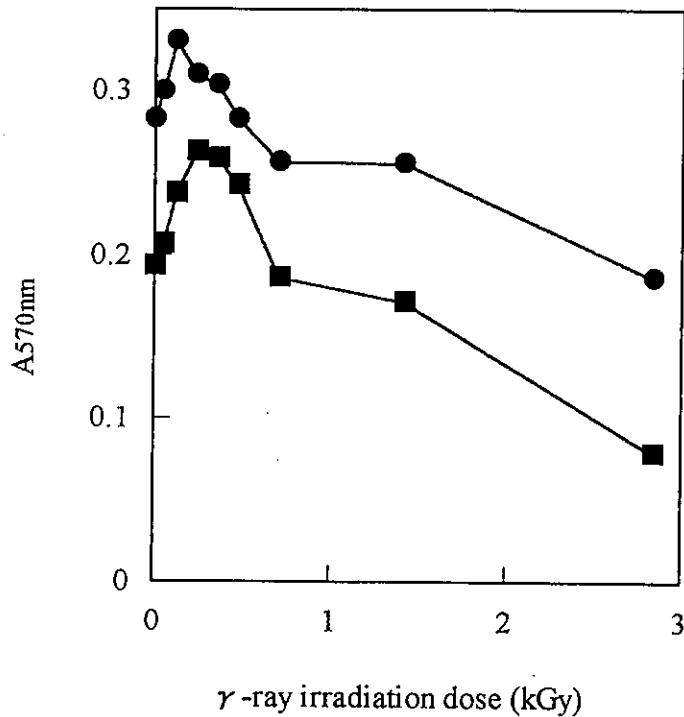


Fig. 3 Change of tryptophanase activity. ■: D-Trp, ●: L-Trp.

tryptophanase didn't resume to the original state again. On the other hand, tryptophanase was not deactivated in a range of low dosage such as several kilograys, or rather seemed to give a slight increasing trend of activity. We analyzed the activity of tryptophanase exposed to a low dosage of γ -ray irradiation in the further experiment.

3. Positive effect of low γ -ray irradiation on tryptophanase activity

Tryptophanase was irradiated between 0 and 2.8 kGy, and analyzed for its activity against L- and D-Trp (Fig. 3). Tryptophanase activity increased with increasing dose from 0 to 0.3 kGy and then decreased. The activity for L- Trp increased from 0.28 (γ -irradiation dose = 0 kGy) at absorbance of $\lambda=570$ nm to 0.33 (γ -irradiation dose = 0.12 kGy). On the other hand, that for D-Trp increased from 0.19 (γ -irradiation dose = 0 kGy) to 0.26 (γ -irradiation dose = 0.24 Kgy). The respective activity went beyond that of unirradiated tryptophanase by 18 % and 37 %, indicating that such low dose enhanced enzyme activity.

When enzyme tertiary structure of enzyme changes, it is generally known that affinity for substrate or catalytic efficiency also changes.¹³⁻¹⁵⁾ Although the structural change of tryptophanase was not really investigated, the change of tryptophanase activity might be also responsible for steric conformational change which led to increasing affinity for L- and D-Trp or catalytic efficiency. Accordingly, the activity for L- and D-Trp might increase. A rate of increasing activity for D-Trp was especially twice as much as that for L-Trp. The action of diammoniumhydrogen phosphate on D-Trp activity might be elevated by this conformational change. There is a question that the conformational change is small or not. The enzyme activity was repeatedly measured the next day after it was measured, but the increasing activity was not reappeared. Thereby, the conformational change is considered to be transient. It seems to be very small change and promptly reverse.

We have shown that diammoniumhydrogen phosphate is responsible for the advent of activity for D-Trp. We have proposed that conformational change should conduct it. It was suggested that small conformational change by low γ -ray irradiation promoted the effect of diammoniumhydrogen phosphate on the activity for

D-Trp. If such small change actually generates, it may also conduct the activity for D-Trp instead of diammoniumhydrogen phosphate. If so, low γ -ray irradiation may give tryptophanase the same action as diammoniumhydrogen phosphate. In fact, we investigated to solve that question on the appearance of the activity for D-Trp whether γ -tryptophanase irradiated at 0.24 kGy, whose dose gave the highest activity for D-Trp in Fig. 3, reacted with D-Trp in the absence of diammoniumhydrogen phosphate, but it did not have the activity for D-Trp. Judging from this lability of conformational change, it will be difficult to keep such small conformational change for long period. A dosage of 0.24 KGy will be too strong to hold such small change. Lower dosage than it should be administrated for the occurrence of the activity for D-Trp. In addition, the coexistence of D-Trp together with tryptophanase will make it easier to detect the activity for D-Trp. An optimal dose to induce the activity for D-Trp is now being explored.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a Scientific Research Grant from the Japan Ministry of Education, Culture and Science, and was also conducted in part under the Visiting Researchers Program of Kyoto University Research Reactor Institute.

REFERENCES

1. Kim K. K., Song H. K., Shin D. H., Hwang K. Y. and Suh S. W. (1997). The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor, *Structure*, **5**, 173-185.
2. Yoshimura T. Jhee-Kwang H. and Soda K. (1996). Stereospecificity for the

hydrogen transfer and molecular evolution of pyridoxal enzymes. *Biosci.*

Biotech. Biochem., **60**, 181-187.

3. Schraeder T. and Andreesen J. R. (1996) Properties and chemical modification of D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*. *Arch. Microbiol.*, **165**, 41-47.
4. Gutierrez A., Yoshimura T., Fuchikami Y., Soda K. and Esaki N. (1998). A mutant D-amino acid aminotransferase with broad substrate specificity: Construction by replacement of the interdomain loop Pro119-Arg120-Pro121 by Gly-Gly-Gly, *Protein Eng.*, **11**, 53-58.
5. Hernaiz M. J., Sanchez M. J. M. and Sinisterra J. V. (1999). Modification of purified lipases from *Candida rugosa* with polyethylene glycol: A systematic study. *Enz. Microbial Technol.*, **24**, 181-190.
6. Shimada A., Shishido, H. and Nakamura, I. (1996). Tryptophanase-catalysed degradation of D-tryptophan in highly concentrated diammoniumhydrogen phosphate solution, *Amino Acids*, **11**, 83 - 89.
7. Shimada, A., Kogure, H., Shishido, H. and Nakamura, I. (1997) [1]. Reaction pathway of tryptophanase degrading D-tryptophan, *Amino Acids*, **12**, 379 - 383.
8. Shimada A., Kogure H. and Nakamura I. (1997) [2]. Kinetic investigation of active site for D-tryptophan on tryptophanase, *Viva Origino*, **25**, 121 - 130.
9. Akaboshi M., Kawai K., Maki H., Akuta K. and Ujeno Y. (1992). Thermal neutron induced decomposition and inactivation of several biomolecules, Progress in Neutron Capture for Cancer, p. 403-405. In Allen B. J. *et al.* (ed.), Plenum Press, New York.
10. Sailer K., Viaggi S. and Nuesse M. (1996). Radiation-induced structural modifications in dsDNA analysed by FT-Raman spectroscopy, *Int. J. Radiat. Biol.*, **69**, 601-613.
11. Kojima S., Matsuki O., Kinoshita I., Valdes-Gonzalez T., Shimura N. and Kubodera A. (1997). Does small-dose gamma-ray radiation induce endogenous antioxidant potential *in vivo*? *Biol. Pharma. Bul.* **20**, 601-604.
12. Tong J., Qin L. Q. and Geng M. J. (1999). Dose-related effect of irradiation on circadian rhythm of cellular messengers in neural and immune system of mouse

- Chinese Med. J.*, **112**, 46-148.
13. Post C. B. and Ray W. J. (1995). Reexamination of induced fit as a determinant of substrate specificity in enzymatic reactions. *Biochemistry*, **34**, 15881-15885.
 14. Perona J. J. and Martin A. M. (1997). Conformational transitions and structural deformability of EcoRV endonuclease revealed by crystallographic analysis. *J. Mol. Biol.*, **273**, 207-225.
 15. Yang S. J., Ko S. J., Tsai Y. R., Jiang S. S., Kuo S. Y., Hung S. H. and Pan R. L. (1998). Subunit interaction of vacuolar H⁺-pyrophosphatase as determined by high hydrostatic pressure. *Biochem. J.* **331**, 395-402.

THE EFFECT OF L-ASCORBIC ACID ON THE DIFFERENTIATION OF BOVINE LENS EPITHELIAL CELLS IN CULTURE

Takayoshi Tokiwa*, Noriko Fujii**, and Mituhiko Akaboshi**

*Kohno Clinical Medicine Research Institute, Kitashinagwa, Shinagawa, Tokyo 140-0001, Japan **Research Reactor Institute, Kyoto University, Kumatori, Sennan, Ohsaka 590-0494, Japan

(Received April 5, 2000; Accepted May 2, 2000)

ABSTRACT

The effect of L-ascorbic acid 2-phosphate (Asc2P) on the formation of colonies and lentoids in serially subcultured bovine lens epithelial cells (LEC) were examined. When the cells were plated at low cell densities in culture medium without Asc2P, bovine LEC formed only type I colonies, which were composed of epithelial-like cells at passage 5. When they were plated in culture medium with 1 mM Asc2P, in addition to type I colonies, the cells formed type II colonies composed of fibroblast-like cells. When the cells were plated on a millicell CM, bovine LEC were induced to form larger lentoids in the presence of 1 mM Asc2P. Furthermore, the larger numbers of α A crystallin-producing cells were found in

the lentoids. These results suggest that the differentiated functions of bovine LEC can be restored by exposing the cells to Asc2P and/ or by lentoid formation even after during the late stage of passage.

Key words: lens, epithelial cells, ascorbic acid, differentiation, colony, lentoid.

INTRODUCTION

L-Ascorbic acid is present at the high concentrations in the aqueous humor of many species. Enhancement of differentiation of lens and pigment cells by L-ascorbic acid has been reported in the neural retinal cells from chick embryos in vitro (1). Sometimes lens epithelial cells (LEC) in culture can be induced to form lentoids composed of cells exhibiting the characteristics of more highly differentiated lens fiber cells (2). However, the ability of cells to produce such lentoids declines with the number of serial subcultures (2-3). To develop a cell culture system that maintains the normal differentiation capacity of LEC would be important in the study of cataractogenesis (4-9).

The present study is to examine the effect of L-ascorbic acid 2-phosphate (Asc2P) on the colony formation of serially subcultured bovine LEC. The feasibility of using lentoids as a model system for studying bovine LEC differentiation in vitro was also tested.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Bovine lenses were obtained from adult cattle within 24 hrs of slaughter. A small cut was made in the posterior capsule of the lens, the free edge was grasped with forceps, and the capsule with attached epithelium was placed in a type I collagen-coated 60 mm tissue culture dish (Iwaki, Tokyo, Japan). The epithelium was cut into two or three fragments, and an explant culture of the epithelium was carried out in a primary culture as previously described (10). For subculturing, the cells were rinsed once with phosphate-buffered saline (PBS) and then digested

with 0.2% trypsin containing 0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) for 3-5 min. Cell number was determined by trypan blue dye-exclusion test. To obtain small number of cells, cell suspensions were diluted with the culture medium.

Subculturing was routinely carried out at a cell density of 2×10^4 cells/cm² in 24-well cluster plates every 10 days. For colony-forming assay, cells were seeded into the 60 mm tissue culture dishes at 500 cells/dish. Six to ten days later, the colonies formed were fixed in methanol and stained with Giemsa. For lentoid growth, 1.2×10^6 cells were seeded onto a millicell CM insert (Millipore, Bedford, MA), which contains a nonhaptotactic membrane. The inserts were then placed into 6 well polystyrene plates (Iwaki, Tokyo, Japan). 1.0 and 1.5 ml of culture medium, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), were added to the upper and the lower chamber of the plates, respectively (11-13). The cells were cultured in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air at 37 °C. The culture medium was changed routinely every 2 days. Usually, lentoids were formed 2 or 3 days later after plating. The effect of 1 mM L-ascorbic acid 2-phosphate magnesium salt hydrate (Wako Pure Chem. Ind., Tokyo, Japan) was tested on the formation of colonies and lentoids. Insulin (Wako) was used at a concentration of 5×10^{-6} M as the control.

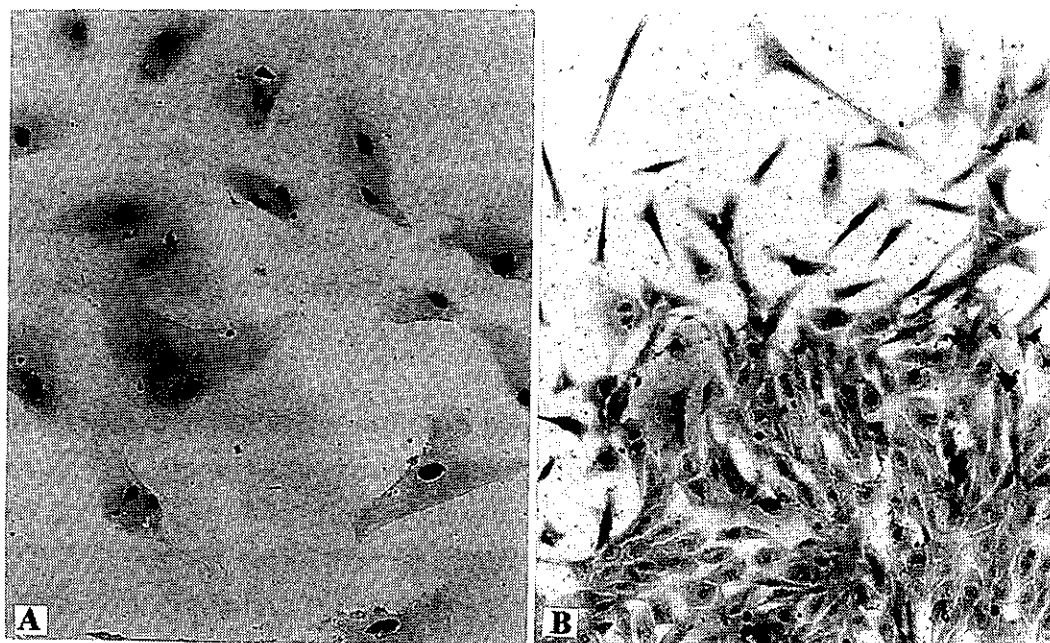


Fig. 1. A) A colony (type I) composed of epithelial-like cells. B) A colony (type II) composed of fibroblast-like cells. Giemsa. x 100.

Immunocytochemistry

Cells were fixed in a buffered 10% formalin solution. Sections were prepared from lentoids formed on a millicell CM membrane, as described previously (11,13). For immunocytochemistry, rabbit anti-human α A crystallin was used as a primary antibody. Staining was carried out using the LSAB kit containing 3-amino-9-ethylcarbazole as the substrate of horseradish peroxidase (Dako, Japan) according to the previous reports (13-14). CHO-K1 cells were used as the negative control.

RESULTS AND DISCUSSION

Bovine LEC were cultured well in vitro as a monolayer and could be passaged 11 times. The population doubling level (PDL) was 20. α A crystallin production by the cells was declined markedly with serial subcultures (data not shown).

The colonies were formed when bovine LEC were plated at a low density in culture medium with or without Asc2P at passage 5. The colonies were morphologically classified into two types, type I and II (Fig. 1). As shown in Table 1, only type I colonies, which were composed of flat epithelial-like cells, were formed when the cells were plated in the absence of Asc2P. When the cells were plated in culture medium with Asc2P, however, bovine LEC not only formed type I colonies, but also type II. The number of the type II colonies was not high and the type II colonies were composed of fibroblast-like cells. Most of the type I colonies were small in size and composed of less than 50 cells per colony, but type II colonies were relatively large in size. The plating efficiency of bovine LEC was slightly increased when culture medium contained Asc2P or insulin. Concerning the formation of type II colonies, Asc2P was more effective than the insulin used as the control (15). The expression of α A crystallin increased with L-ascorbic acid 2-phosphate (data not shown).

LEC were shown to be a developmental transition into fiber cells of the lens cortex. This process is characterized by distinct biochemical changes, such as the synthesis of fiber-specific proteins, and morphological changes, such as cell elongation, loss of cellular organelles and disintegration of the nucleus (16). The fibroblast-like cells in the type II colonies are reminiscent of differentiated fiber cells in vivo.

Table 1 The Effect of Insulin or Ascorbic Acid 2-Phosphate on the Colony Formation of Bovine Lens Epithelial Cells in Culture

Colony Type	Plating Efficiency(%)*					
	None		Insulin		Ascorbic acid 2P	
	S**	L***	S	L	S	L
I	3.4	0.2	6.3	0.2	4.5	0.7
II	0	0	0	0.4	0.5	0.6

* Mean of three experiments

** Colonies composed of less than 50 cells

*** Colonies composed of more than 50 cells

The proliferation of skin fibroblasts is stimulated in the presence of Asc2P (17). The addition of Asc2P to the medium induces the growth and/or differentiation of porcine liver epithelial cells (Mukaiyama et al., personal communications). Asc2P is a cofactor for the hydroxylation of proline and lysine residues in collagen, and has been reported to increase both the rate of transcription of procollagen genes and stability of procollagen mRNA (18). It has been demonstrated that the synthesis of collagen is essential for the maintenance of functions of cultured rat hepatocytes (17). These facts suggest that collagen synthesis stimulated by Asc2P may also be involved in the mechanism of differentiation of bovine LEC shown here.

In vitro, the cultured LEC from chick, quail, and human have been observed to differentiate into spheroid aggregates, termed lentoids, which can produce several lens-specific proteins, such as crystallins (2). Such a differentiation would be expected in three dimensional configuration of cells in the lentoids as observed in



Fig. 2. Lentoids formed when bovine LEC were plated in culture medium with insulin (B) or Asc2P (C) and without the reagents (A). Phase contrast. Bar, 10 μ m.

other tissues as well (11-13,19). Lentoids have therefore been of great interest to study differentiation. However, lentoid formation using standard tissue-culture techniques have been shown to take a long time. Early passage human LEC formed lentoids after 40-50 days on standard tissue culture surfaces (2), but required only 2-7 days on a nonhaptotactic membrane such as the Millicell CM used here. Bovine LEC were induced to form larger lentoids when they were plated on Millicell CM in the presence of Asc2P or insulin. However, the large lentoids were not developed in the absence of these reagents (Fig. 2).

Lentoids expressed α A crystallin more than monolayer cultures (data not shown). Furthermore, a larger number of crystallin-producing cells was present in the lentoids when Asc2P was added to the medium (Fig. 3).

Retinal pigmented epithelial cells proliferated when they were cultured to induce dedifferentiation. By the addition of ascorbic acid, the dedifferentiated cells accumulated and formed a large number of lentoids (20). Based on the results from the present experiments, it is likely that the addition of Asc2P induced the accumulation of differentiated bovine LEC and caused them to form larger lentoids.

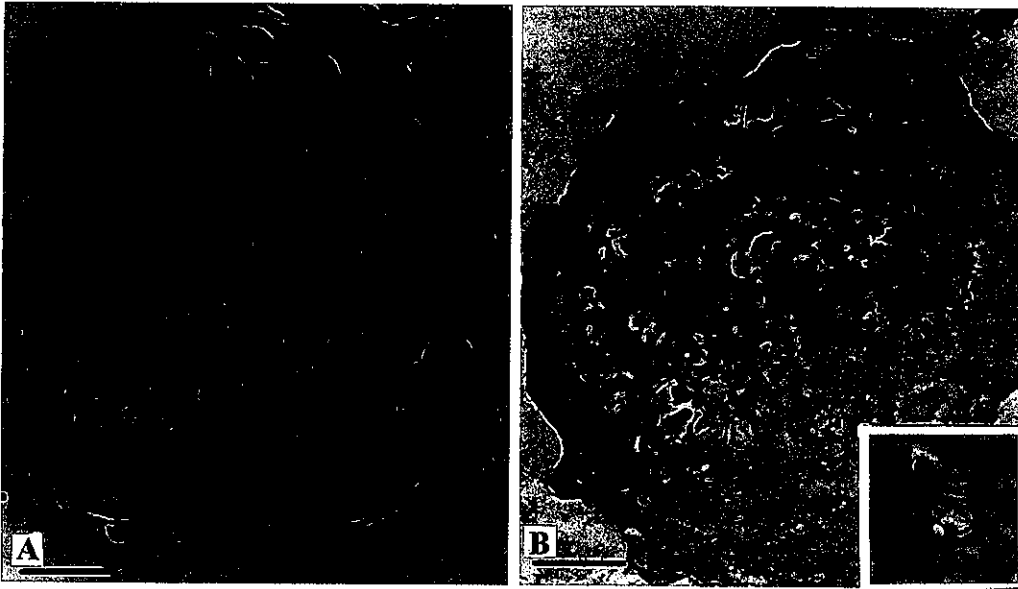


Fig. 3. Lentoids formed when bovine LEC were plated in culture medium with (B) or without (A) Asc2P by immunostaining using anti α A crystallin. Bar, 10 μ m. Inset, a lens-like structure found in a lentoid.

REFERENCES

1. Okada, T.S., Eguchi, G. and Takeichi, M. (1971). The expression of differentiation by chicken lens epithelium in vitro cell culture. *Dev. Growth Differ.* 13, 323-336.
2. Kidd, G.I., Reddan, J.R. and Russel, P. (1994). Differentiation and angiogenic growth factor message in two mammalian lens epithelial cell lines. *Differentiation* 56, 67-74.
3. Fleming, T.P., Song, Z. and Andley, U.P. (1998). Expression of growth control and differentiation genes in human lens epithelial cells with extended life span. *Invest. Ophthalmol.* 39, 1387-1398
4. Fujii, N., Satoh, K., Harada, K. and Ishibashi, Y. (1994). Simultaneous stereoinversion and isomerization at specific aspartic acid residues in α A-crystallin from aged human lens. *J. Biochem.* 116, 663-669.
5. Fujii, N., Ishibashi, Y., Satoh, K., Fujino, M. and Harada, K. (1994).

- Simultaneous racemization and isomerization at specific aspartic acid residues in aB-crystallin from aged human lens *Biochem. Biophys. Acta* 1204, 157-163.
6. Fujii, N., Momose, Y. and Harada, K. (1996). Kinetic study of racemization of aspartyl residues in model peptides of aA-crystallin. *Int. J. Pep. Protein Res.* 48, 118-122.
 7. Fujii, N., Momose, Y., Ishibashi, Y., Uemura, T., Takita, M. and Takehana, M. (1997). Specific racemization and isomerization of the aspartyl residue of aA-crystallin due to UV- B irradiation. *Exp. Eye Res.*, 65, 99-104.
 8. Fujii, N., Harada, K., Momose, Y., Ishii, N. and Akaboshi, M. (1999). D- and b-amino acid formation induced by a chiral field within a human lens protein during aging. *Biophys. Biochem. Res. Commun.* 263, 322-326.
 9. Fujii, N., Momose, Y., Ishii, N., Takita, M., Akaboshi, M. and Kodama, M. (1999). The mechanisms of simultaneous stereoinversion, racemization, and isomerization at specific aspartyl residues of aged lens proteins. *Mech. of Age. and Develop.* 107, 347-358.
 10. Zhou, X.D., Tokiwa, T., Kano, J. and Kodama, M. (1998). Isolation and primary culture of adult pig hepatocytes. *Methods in Cell Science.* 19, 1-8.
 11. Tokiwa, T., Kano, J., Kodama, M. and Matsumura, T. (1997). Multicellular rat hepatocyte aggregates formed on expanded polytetrafluoroethylene surface. *Cytotechnology.* 25, 137-144.
 12. Tokiwa, T., and Kodama, M. (1997). Multilayer hepatocytes on porous expanded polytetrafluoroethylene. *In Vitro Cell. Dev. Bio.* 33, 150-151.
 13. Tokiwa, T., Kano, J., Noguchi, M., Kodama, M. and Tateishi, T. (1998). Restoration of differentiated functions in multicellular aggregates of a human liver epithelial cell line. *Material Sci. & Engineering* 6, 249-252.
 14. Kano, J., Noguchi, M., Kodama, M. and Tokiwa, T. (2000). The in vitro differentiating capacity of nonparenchymal epithelial cells derived from adult porcine livers. *Amer. J. Pathol.* (in press).
 15. Wride, M.A. and Sanders, E.J. (1998). Nuclear degeneration in the developing lens and its regulation by TNF alpha. *Exp. Eye Res.* 66, 371-383.
 16. Maisel, H., Harding, C.V., Alcalá, J.R., Kuszak, J. and Bradley, R. (1981). In *Molecular and cellular biology of the lens*, ed. H. Bloemendal, pp. 49-84. John Wiley and Sons, New York.
 17. Hata, R. and Senoo, H. (1989). L-Ascorbic acid 2-phosphate stimulates

- collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three dimensional tissue like substance by skin fibroblasts. *J Cell Physiology* 1989, 138, 8-16.
18. Senoo, H. and Hata, R. (1994). Extracellular matrix regulates and L-ascorbic acid 2-phosphate further modulates morphology, proliferation, and collagen synthesis os perisinusoidal stellate cells. *Biophys. Biochem. Res. Commun* 200, 999-1006.
19. Tokiwa, T., Kano, J., Meng, X. Y., Bahulekar, R., and Kodama, M. (1996). Formation of non-spheroidal aggregates by adult rat hepatocytes on polyacrylamide coated substrates. *Biotech. Tech* 10, 845-848.
20. Kosaka, M., Kodama, R. and Eguchi, G. (1998). In vitro culture system for iris-pigment epithelial cells for molecular analysis of transdifferentiation. *Exp. Cell Res.* 15, 245-251.

Chemical Evolution might take place stepwise

Mitsuhiko Akaboshi, Yoshiko Tanaka, Yukihiro Nakano and Noriko Fujii

Research Reactor Institute, Kyoto University
Kumatori, Sennan, Osaka-590-0494, Japan)

(Received March 24, 2000; Accepted May 16, 2000)

ABSTRACT

Huxley proposed that the process of biological evolution proceeded stepwise. In this report, we present a few experimental evidences which show that the process of chemical evolution also took place in a stepwise manner. We proposed two stages which are supposed to be responsible for the stepwise chemical evolution. The first stage was shown from the dilution effect of radiation which is an universally observed phenomenon in the field of radiation chemistry.. The second stage was shown from the action of rare earth element (REE) to hydrolyze nucleotides and to inhibit catalytic activity of proteins. The low "transition from quantitative change to qualitative change" seems to be valid for the principal cause of the stepwise chemical-evolution.

Key words: Chemical evolution, Stepwise chemical-evolution, Rare earth element, Radiation, Dilution effect

化学進化もまた段階的に進行する

赤星光彦、田中愛子、中野幸広、藤井紀子

京都大学原子炉実験所
大阪府泉南郡熊取町野田 (〒590-0494)

要旨

Julian Huxley はその著「進化とは何か」(長野敬、鈴木善次訳)の中で生物の進化が段階的に引き起こるものであることを述べている。我々は生物進化のみでなく、化学進化もまた段階的に生起するものであることを提起したい。その根拠として二つの実験結果をあげる。一つは放射線による化学変化において普遍的に知られる希釈効果である。例えばグリシンにガンマ線を照射するとアラニン、グルタミン酸等他のアミノ酸やアミン類が生成する。その生成収量(G-値)は被照射グリシンの濃度に著しく依存する。グリシン分解の効率も他のアミノ酸、アミン類生成の効率も被照射グリシンの濃度が高いほど高くなる。低い濃度(10^{-5} 、 10^{-6} M)と高い濃度(10^{-1} M)では2~3桁以上も分解収量に差が生じる。希釈溶液では同じ線量の放射線エネルギーが蓄積されたとしても、分解も新たな化合物の生成も起きないのである。原料がある濃度以上に集積された後、放射線による分解・生成反応は効率よく進むのである。第二番目の根拠として希土類元素によるリン酸エステル切断作用とタンパク質の生化学的活性に対する阻害作用および同元素がタンパク質と特異的・選択的に結合する事実があげられる。原始海洋に含まれる希土類元素による両作用は原始タンパクの生成によって希土類元素が結合され、フリーな希土類元素が減少するまでは作用し続ける。

しかしながら、一度条件が満たされると、アミノ酸タンパク質系とヌクレオチド、核酸系との間の複雑な相互作用のルネッサンスが一斉に開花することが予想される。

生命の進化にみられた段階性の一つのステップはこれらの過程で生起すると考えることが出来る。

はじめに

Julian Huxley はその著書 *Evolution of Action*¹⁾ (1953) (進化とは何か、長野敬、鈴木善次訳、講談社)の中で、約 35 億年にわたる生物進化の歴史を俯瞰したときに、進化が急激に展開した時期と空白の時期とが繰り返り起きていることが見られることすなわち、生物進化が段階的に起こるとの考え方を提示すると共にそれらの段階とそれらが生起する必然性について述べている。Huxley によると、最初の段階は生物が単細胞生物から多細胞生物に移行した際に現れる。単細胞型生物は単細胞であると言う限界の中で長い年月をかけて多様かつ複雑な進化を遂げるのであるが、単細胞であるが故にそれ以上の進化はできず、袋小路にはまりこむ。しかし多細胞型への進化の道を選んだ生物は多様性、複雑性において単細胞型生物にはおよびもつかない高次の生物に進化する可能性をもつことになる。すなわち、エンゲルス²⁾の「量の変化が質の変化に転化する」典型的な例を達成することになるのであるが、その様な飛躍的な進化が起こるためには単細胞型生物としての長い歴史の蓄積が必要となる。生物の進化が段階的に進む由縁である。次の飛躍的な進化の段階が生物進化の道筋のどこで現れるかについては、異論もあるであろうが、Huxley の考えを採るならば、第二は鳥類と人間にのみ起きた「体温調節能」を獲得した段階、第三は「色覚」を獲得した段階となる。彼はさらに第四段階として「言葉と心」の世界が開かれたことを付け加えたいと述べているが、生物が海から陸へ進出した段階については触れていない。

さて筆者らは長年の研究経験の中で、生物進化のみでなく、化学進化もまた段階的に起きることを示す幾つかの実験的根拠を得てきたので、それを提起すると共にその根拠と必然性について明らかにしたい。

化学進化の過程も段階的に生起したことを示唆する実験的根拠

1. 希土類元素の役割

筆者らは京都大学原子炉実験所において 36 年間、生命の起源および化学進化における放射線の役割を実証するための実験研究に取り組んできた³⁾。近年、放射線を離れて希土類元素の役割に関する研究にも着手したところであるが、その過程で Ce(IV)を始めとする各種希土類元素がリン酸モノエステル化合物に対する強い加水分解作用をもつことを見出した⁴⁾ (Fig. 1)。

このリン酸エステル切断作用が蛋白質の存在によって強く抑制され⁵⁾ (Fig. 2)、かつタンパク質類が希土類元素を特異的・選択的に結合するところから、原始の海洋において核酸よりもタンパク質の方が先に合成されたという仮説を提出した⁶⁾。そこで今度はタンパク質と希土類元素との結合の実体を明らかにしたいと考え、アルカリホスファターゼやリゾチーム等生理活性をもつタンパク質を用い希土類元素との結合によって、これらの活性がどのように影響を受けるかを調べると共に、原子炉を利用して調製した希土類元素類の RI を用いてタンパク質を始めとする生体高分子類との結合動態を詳しく検討した⁷⁾。この結果希土類元素が結合することによってこれらタ

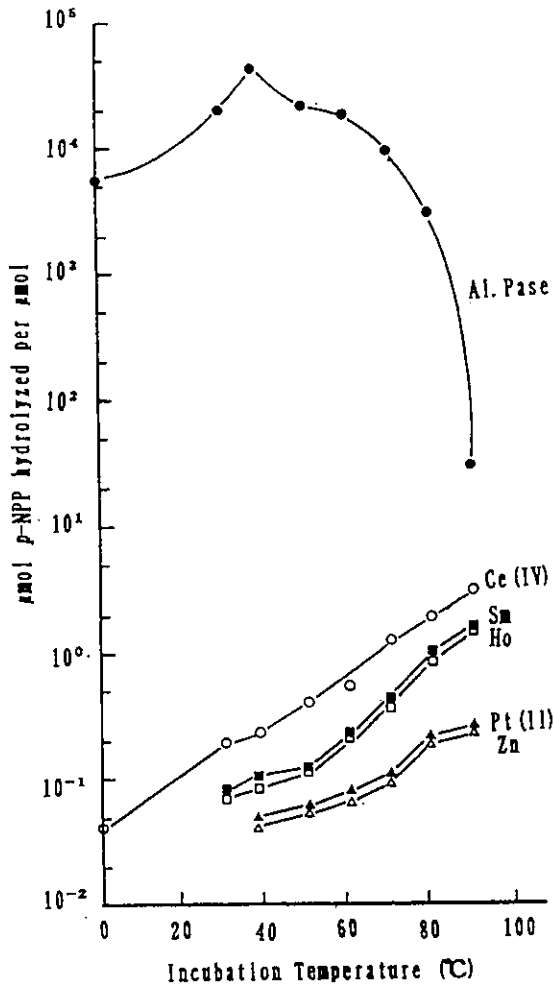


Fig.1. Variations in the hydrolyzing activities of rare earth elements and the other metals with different temperature.

ンパク質の酵素作用もまた著しく阻害されることを見出した(Fig. 3)。

これらの結果に基づき、化学進化の道筋で希土類元素が果たしたであろう重要な役割は以下の一連のシナリオとしてまとめることができる。

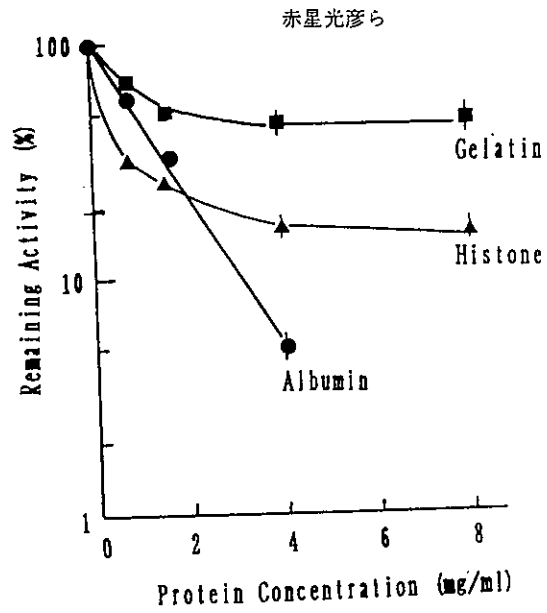


Fig. 2. The suppressive effect of various proteins on the hydrolyzing activity of Ce(IV). Values given are means \pm SD from three separate experiments.

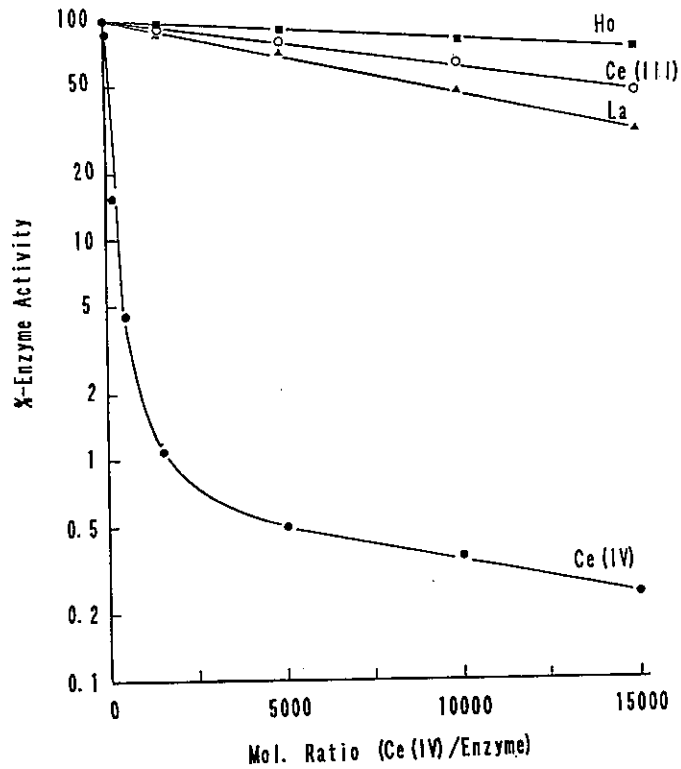


Fig. 3. Inhibition of alkaline phosphatase activity by rare earth elements.

原始海洋における分子間高次相互作用のシナリオ (希土類元素の役割)

1. 原始海洋に溶存したと考えられる希土類元素はリン酸エステル化合物を加水分解する。従って、希土類元素が存在する限り、ヌクレオチド類や核酸類は合成されない。
2. タンパク質が合成されると、希土類元素がタンパク質と結合するので、ヌクレオチドや核酸合成が開始される。
3. タンパク質は希土類元素との結合によって、酵素作用等の活性を失う。従って、タンパク質が活性を示すためにはやはりタンパク質（原始タンパク質？）が希土類元素を結合することによって、そうした作用が不活性化するのを待たなければならない。
4. 従って、ヌクレオチド合成が開始される時はタンパク質の活性も同時に発生することになる。
5. ヌクレオチド類の合成とタンパク質の活性とが同時に開始されることによって、タンパク質と核酸との相互作用が一斉に開始されることになる。
6. この後に生起するタンパク質と核酸とのより複雑な相互作用すなわち、（生命体に限定される20種類のアミノ酸の確定、遺伝コードの起源と確立、不斉の確立等々）とそこからの生命誕生のステップが効率よく進むためにはタンパク質の活性とヌクレオチド類の合成とが同時に開始することが必要だったとする作業仮説が生まれる。そしてこの仮説は同時に原始タンパク質が合成された後、海洋中に溶存する希土類元素を消費するまでは高次の相互作用は生起し得ないことを物語る。アミノ酸—タンパク質系とヌクレオチド—核酸系との相互作用のルネッサンスはこの後、一斉に開花するのである。

生命の進化にみられたと同様な段階性の一つのステップが化学進化におけるこの過程でも生起すると考えることが出来る。

2. 放射線作用の濃度依存性

化学進化もまた段階的に進むことを提起するもう一つの根拠を多少古い但我々の実験例に基づき提示することにする。

Table1 はアミノ酸であるグリシンにガンマ線を照射した際のグリシンの分解とそれに対応するアラニン、グルタミン酸等他のアミノ酸やアミン類の生成収量 (G-値) を被照射グリシンの濃度に対して解析したものである⁷⁾。表から明らかな通り、グリシン分解の効率も他のアミノ酸、アミン類生成の効率も被照射グリシンの濃度が高ければ高くなる。この表では 10^{-3} M 以下の濃度ではどのようになるか記載がないので判らないが、被照射アスパラギン酸の分解の G-値を示した次の図 (Fig. 4) では 10^{-5} 、 10^{-6} M と 10^{-1} M では 2~3 桁以上も分解収量に差があることが判る⁸⁾。

すなわち、希釈溶液では同じ放射線エネルギーが蓄積されたとしても、分解も新た

な化合物の生成も起きないのである。放射線による分解・生成反応が効率よく進むためには原始海洋中でこれらの物質がある程度の濃度まで集積されていなければならない。これはまさしく「量の変化が質の変化に転化する」ことを示す典型と言える。量（密度）が増えるまでは何も起きないがある程度以上に蓄積されるとそこからは飛躍的な変化が生起することを図は示している。

Table 1. G-values for the decomposition of glycine, and the formation of amino acids and amines.

Conc. (M)	G(-Gly)	G(+Asp)	G(+Thr)	G(+Ser)	G(+Glu)	*G(+A. A)	G(+MeNH ₂)	G(+EtNH ₂)	G(+NH ₃)
10 ⁻³	0.286	0.00024	0.00012	0.00004	0.00002	0.00042	0.0013	0.0010	0.0023
10 ⁻²	0.556	0.00041	0.00015	0.00010	0.00003	0.00069	0.0079	0.0031	0.0230
10 ⁻¹	3.08	0.00048	0.00045	0.00022	0.00016	0.00131	0.0117	0.0141	0.061
Dry	23.97	0.00084	0.00041	0.00013	0.00064	0.00202	0.0145	0.0330	0.187

*means the G-value of the sum of four kinds of amino acids.

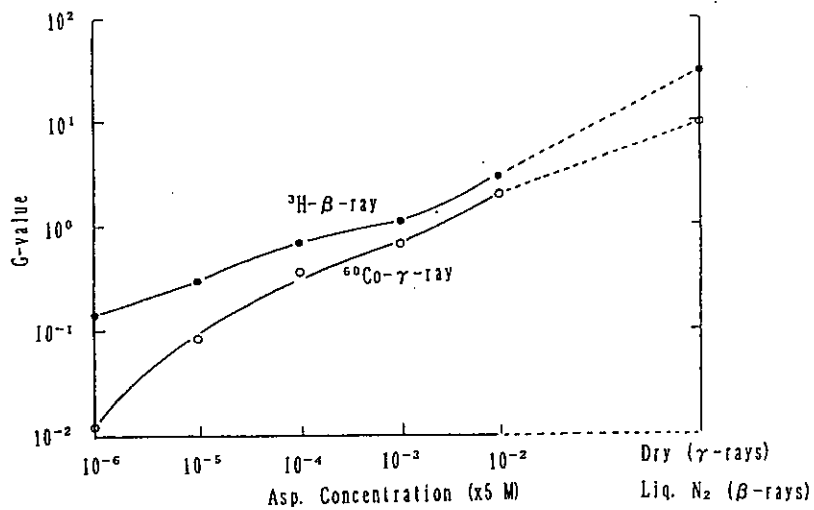


Fig. 4. G-values for ³H-β- and ⁶⁰Co-γ-irradiated aspartic acid plotted as a function of amino acid concentration.

先に例としてあげた希土類元素の場合にも同じことが言える。すなわち、原始海洋中の希土類元素によるヌクレオチド分解作用やタンパク質の生理活性に対する阻害作用は原始タンパク質が大量に生成され、これら希土類元素を結合し、その作用を不活性化させるに至るまでは維持され続けるのである。ひとたび、大量に生成された原始タンパク分子が希土類元素を結合し尽くすと、始めてヌクレオチド類の合成が開始され、同時に生理学的、生化学的な活性をもったタンパク質分子も合成され始める。上記 6)の仮説を導く元となる原始海洋中での希土類元素の作用も、「量の変化が質の変化」を作り出す典型例であると考えることが出来る。

すなわち、生物進化のみでなく化学進化の過程もまた生物進化の過程と同じく、段階的に進行するものなのである。

References

- 1) Huxley J. *Evolution in Action*. Penguin Books (1953).
- 2) Engels F. *Dialectics in Nature*. (1873-1883) translated by Oouchi H and Hosokawa K. Ootsuki Press Co. 1968).
- 3) Akaboshi M., Kawai K., Tanaka Y., Kawamoto K. and Fujii N., "The role of Radiation in the Origin and Evolution of Life" ed by Akaboshi M. et al., Kyoto Univ. Acad. Press, Kyoto, pp. 163-173 (2000).
- 4) Akaboshi M., Tanaka Y., Nakano Y., Kawai K. and Fujii N., *Viva Origino*, 27, 189-195 (1999).
- 5) Akaboshi M., Tanaka Y., Nakano Y., Kawai K. and Fujii N., *Orig. Life Evol. Biosphere* (1999) in press
- 6) Akaboshi M., Tanaka Y., Kawai K., Kawamoto K. and Fujii N., *Viva Origino*, 28, 46 (2000).
- 7) Akaboshi M., Kawamoto K. and Kawai K., *Viva Origino*, 22, 61-69 (1994).
- 8) Akaboshi M., Kawai K., Tanaka Y. and Fujii N., "Advances in BioChirality", ed. By Palyi G., et al., Elsevier Sciences S. A. pp387-392 (1999).

THE 3'-TERMINAL ADENOSINE OF tRNA AND ITS RELATIONSHIP WITH THE EVOLUTION OF AMINOACYL-tRNA SYNTHETASES

Koji Tamura^{1,2} and Tsunemi Hasegawa^{3,4}

¹*The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN),
2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan*

²*Present address : The Scripps Research Institute, BCC-379,
10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, U.S.A.*

³*Department of Material and Biological Chemistry, Faculty of Science,
Yamagata University, Yamagata 990-8560, Japan*

⁴*Institute of Space and Astronautical Science,
3-1-1 Yoshinodai, Sagamihara, Kanagawa 229-8510, Japan*

(Received May 21, 2000; Accepted June 5, 2000)

ABSTRACT

The CCA sequence is common to the 3'-ends of all tRNAs and aminoacyl-tRNA synthetases (aaRSs) can be divided into two groups on the basis of differences in the structure of their active sites. In tRNAs belonging to the class I aaRSs, decreased aminoacylation activities resulted from the substitution of A76 with a pyrimidine, whereas in tRNAs belonging to the class II aaRSs, decreased aminoacylation activities resulted from the substitution with guanine. The results suggest that the 3'-terminal adenine base of tRNA is very much related with the early evolutionary aspect of aaRSs. Aminoacylation of proto-tRNA might have started through the direct hydrophobic (or stacking) interaction between the large, hydrophobic amino

acid residue (now utilizing a class I aaRS) of aminoacyl-AMP and the 3'-terminal adenine. The shorter distance between the adenine and the 2'-OH position than the 3'-OH position, and the bulkiness and hydrophobicity of amino acids may be important reasons why class I aaRSs select the 2'-OH position in aminoacylation. Molecular mechanics-based conformation modeling also indicated that the resulting positioning of the adenine-base and the aminoacyl residue of 2'-aminoacyl-adenosine for large and hydrophobic amino acid is in proximity, which is advantageous for the hydrophobic interaction. In contrast, in the case of small amino acids (with class II aaRSs) which were not able to use this interaction, a protein enzyme might have participated in the aminoacylation reaction from an early stage. The active-site folds of aaRSs belonging to each class reflect the history of evolution: evolved nucleotide-binding fold (Rossmann fold) (class I aaRSs), and primitive fold, found also in the family of adenylate-forming enzymes (class II aaRSs).

KEY WORDS : tRNA, CCA sequence, Aminoacyl-tRNA synthetase, Evolution

1. INTRODUCTION

In the processes involved in the translation of genetic information, tRNAs play crucial roles. Among these processes, aminoacylation is the first step in which tRNAs participate. The 3'-terminal three nucleotides (CCA 3'-end) are universal among all tRNAs (Sprinzl *et al.*, 1989), and aminoacylation is performed uniquely at the 2'- or 3'-OH of the ribose of the terminal adenosine residue by each aminoacyl-tRNA synthetase (aaRS). The CCA end is clearly not responsible for discrimination by noncognate aaRSs. However, these three terminal nucleotides are located in the vicinity of the active site of the aaRS and the elucidation of the influence of the nucleotides in the CCA sequence on the efficiency of aminoacylation

should give us clues toward understanding aminoacylation and its evolution, including the problem of opposite stereochemistries of aminoacylation.

The studies using deletion or insertion technique (Kirschenbaum and Deutscher, 1976; Roy and Tener, 1967; von der Haar and Gaetner, 1975), chemical modification (Maelicke *et al.*, 1974; Schulman and Pelka, 1977; Sprinzl *et al.*, 1972; Sprinzl *et al.*, 1973; Uretsky *et al.*, 1968; Ward *et al.*, 1969) and X-ray crystallography (Biou *et al.*, 1994; Cusack *et al.*, 1996a; 1996b; Goldgur *et al.*, 1997; Rould *et al.*, 1989; Ruff *et al.*, 1991) have been performed extensively. We also investigated the role of the CCA sequence in aminoacylation (Tamura *et al.*, 1994) and peptidyl transfer reaction (Tamura, 1994). However, these studies have not given us an answer concerning the significance of the CCA sequence from the standpoint of evolution.

aaRSs can be divided into two groups on the basis of differences in the structure of their active sites, and class I aaRSs share a "Rossmann nucleotide-binding fold" (Carter, 1993), whereas class II aaRSs possess an antiparallel β -sheet in their active sites (Cusack *et al.*, 1995). In addition, class I aaRSs position the 2'-OH of the terminal ribose to attack the carbonyl of the aminoacyl-AMP, whereas class II aaRSs place the 3'-OH in the reactive position (Eriani *et al.*, 1990). The minimal structure of the RNA substrate is now considered to reside in the acceptor stems of tRNAs, and the corresponding minimal primordial aaRS is thought to have recognized these regions (Schimmel *et al.*, 1993). However, an explanation of the origin of such opposite stereochemistries of aminoacylation has not been given yet.

Bearing the above-mentioned questions in mind, we investigated the effects of base substitutions in the CCA sequence of several *E. coli* tRNA species by using the T7 RNA polymerase transcription system and performed molecular mechanics-based conformation modeling for aminoacyl-mono- and tri-nucleotides. From these results, we considered the relationship between the 3'-end of tRNA and the early stage of evolution of aaRSs.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Preparation of template DNAs and in vitro transcripts

Synthetic DNA oligomers carrying the T7 promoter and tRNA genes were ligated into pUC19 and transformed into *E. coli* strain JM109 (Sampson and Uhlenbeck, 1988). Transcripts of the tRNA genes were prepared in a reaction mixture containing 40 mM Tris-HCl (pH 8.1), 5 mM dithiothreitol, 2 mM spermidine, 10 mM MgCl₂, bovine serum albumin (50 µg/ml), 2.0 mM of each NTP, 20 mM 5' GMP (or 5' AMP, 5' CMP), *ScrFI*- or *EcoT22I*- digested template DNA (0.2 mg/ml); 2 units of inorganic pyrophosphatase (Sigma), and pure T7 RNA polymerase (50 µg/ml) (Himeno *et al.*, 1989; Sampson and Uhlenbeck, 1988). The transcripts were purified by electrophoresis on 15% polyacrylamide gels.

2.2. Aminoacylation assay

Aminoacylation was performed at 37 °C in a 50-µl reaction mixture containing 60 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mg/ml bovine serum albumin, 2.5 mM ATP, 0.01-5.0 µM transcript RNA, various concentrations of *E. coli* Q13 aaRSs and L-[U-¹⁴C]-labeled amino acids.

2.3. Molecular modeling

The molecular modeling study was performed using InsightII/Discover (MSI) on the Silicongraphics OCTANE workstation. The Biosym CVFF force field was used to perform molecular mechanics calculation for searching of the conformation of the several kinds of aminoacyl-mononucleotide and trinucleotides.

3. RESULTS AND DISCUSSION

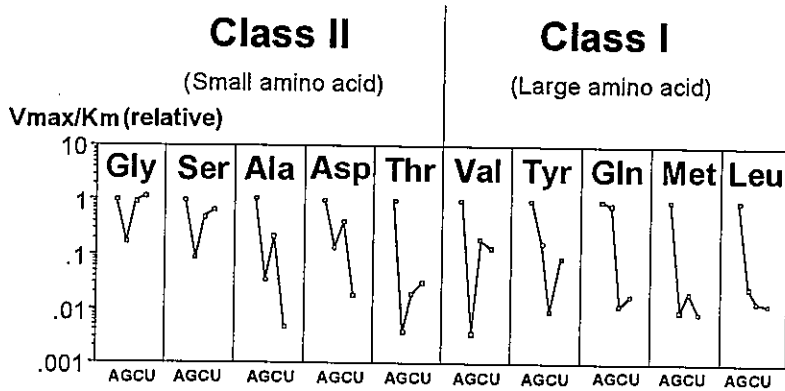


Fig. 1. Aminoacylation activity with each aminoacyl-tRNA synthetase for the mutants of the terminal adenosine of various tRNAs. Each parameter was determined from a Lineweaver-Burk plot.

The analyses indicated that the influence of each nucleotide of the CCA sequence on the efficiency of aminoacylation differs among the present-day amino acid-specific tRNAs. However, in spite of individual differences, we noticed the following facts about the substitution of A76: in tRNAs belonging to the class I aaRSs, decreased aminoacylation activities resulted from the substitution of A76 with a pyrimidine, whereas in tRNAs belonging to the class II aaRSs, decreased aminoacylation activities resulted from the substitution with guanine. The extents of the decreases of the aminoacylation activities were less than 20% for both cases (pyrimidine substitution for tRNAs belonging to class I aaRSs (GlnRS, LeuRS, MetRS, TyrRS, ValRS) and G substitution for tRNAs belonging to class II aaRSs (AlaRS, AspRS, GlyRS, SerRS, ThrRS)) compared with those of the A76 transcripts (Fig. 1). These results suggest the existence of a remnant of a hydrophobic (or stacking) interaction between A76 and the corresponding amino acid residue on aminoacyl-AMP in class I aaRSs and the importance of strict recognition of A76 by the aaRS in class II aaRSs, unrelated to hydrophobicity or stacking. Generally, aaRSs for large, hydrophobic amino acids belong to class I aaRSs, whereas those for small, charged amino acids are classified as class II (Table 1). Compared with the cases of small amino acids, it is easy for large amino acids to interact with adenine via

	Class I	Class II
Active-site fold	Parallel β -sheet (Rossman fold)	Antiparallel β -sheet
Characteristic	Typical nucleotide-binding fold	Similarity with nonribosomal peptide synthetases
Oldness	New	Old
Amino acid	Large Hydrophobic	Small Charged
Aminoacylation site	2'-OH	3'-OH

Table 1. Principal features of the two classes of amino-acyl tRNA synthetases.

hydrophobic (or stacking) interactions. It is not advantageous to small amino acids to use such kinds of interactions. The style of strict recognition of A76, which becomes possible relatively easily in the case of charged amino acids, may result from similar causes.

Class I aaRSs share a common "Rossman nucleotide-binding fold" characterized by five parallel β -strands and four α -helices (Carter, 1993), while class II aaRSs possess a seven-stranded antiparallel β -sheet buttressed by three α -helices (Cusack *et al.*, 1995) (Table 1). Studies using RNA helical oligonucleotides corresponding to the acceptor stems of tRNAs, i.e. minihelix and microhelix (Francklyn and Schimmel, 1989; 1990; Francklyn *et al.*, 1992; Frugier *et al.*, 1992; Martinis and Schimmel, 1992; 1993; Rudinger *et al.*, 1992; Sampson and Saks, 1993; Shi *et al.*, 1992), have suggested that early synthetases acquired tRNA binding specificity firstly through acceptor stem interactions with the activation domain and later by addition of extra tRNA-binding domains. Thus, it is thought that aaRSs which originated from primordial enzymes consisting of either the class I or class II catalytic fold subsequently acquired the distinctive accessory domains of modern aaRSs (Schimmel *et al.*, 1993). These views are consistent with recent X-ray crystallographic structures of aaRSs, indicating that they have common core structures for amino acid activation and variable accessory structures for anticodon recognition (Arnez and Moras,

1997; Cusack, 1995; Francklyn *et al.*, 1997). However, still unanswered is why aaRSs have two such different types of core structures. We think that the origin of the classes of aaRSs is very much related with the opposite stereochemistries of aminoacylation. As is well known, class I aaRSs position the 2'-OH of the terminal ribose to attack the carbonyl of the aminoacyl-AMP, whereas class II aaRSs place the 3'-OH in the reactive position (Eriani *et al.*, 1990) (Table 1). Our data give some answers to the question why class I aaRSs position the 2'-OH, rather than the 3'-OH, of the terminal ribose to attack the carbonyl of the aminoacyl-AMP. As described above, hydrophobic (or stacking) interaction of adenine at position 76 may have an important role in aminoacylation by class I aaRSs. In solution, adenine nucleotides such as AMP and ATP are known to possess the *anti*-conformation (Feldman *et al.*, 1968; Schweizer *et al.*, 1968). In addition, analysis using NMR has indicated that the trinucleotide diphosphate CpCpA in aqueous solution also has the *anti*-conformation, although it prefers a C(3')-endo ribose conformation (Cheng *et al.*, 1980). In these cases, the physical distance between the adenine base and the acylated amino acid on the 2'-OH of the terminal ribose is shorter than the distance when the amino acid is on the 3'-OH, which means that having the amino acid on the 2'-OH is advantageous for hydrophobic (or stacking) interaction.

To reinforce the speculation, we performed molecular mechanics calculations for aminoacyl-mononucleotide and trinucleotides which correspond to the 3'-end of aminoacyl-tRNA studied in this study. Molecular mechanics-based methods are more efficient and accurate as a conformational analysis compared to the routine application of semiempirical calculation (Zhang *et al.*, 1994). CVFF force field is an adequate tool for modeling (Zhang *et al.*, 1994). Although these simulation determines the conformation of the base and the aminoacylation residue after the aminoacylation, these positioning could give sufficient basis for above-mentioned hypothesis. The resulting conformation of 2'-leucyl-adenosine indicated that the adenine-base and the leucine residue are located in the near position (Fig. 2), which is advantageous for hydrophobic (or stacking) interaction between them, whereas that of 2'-leucyl-cytidine

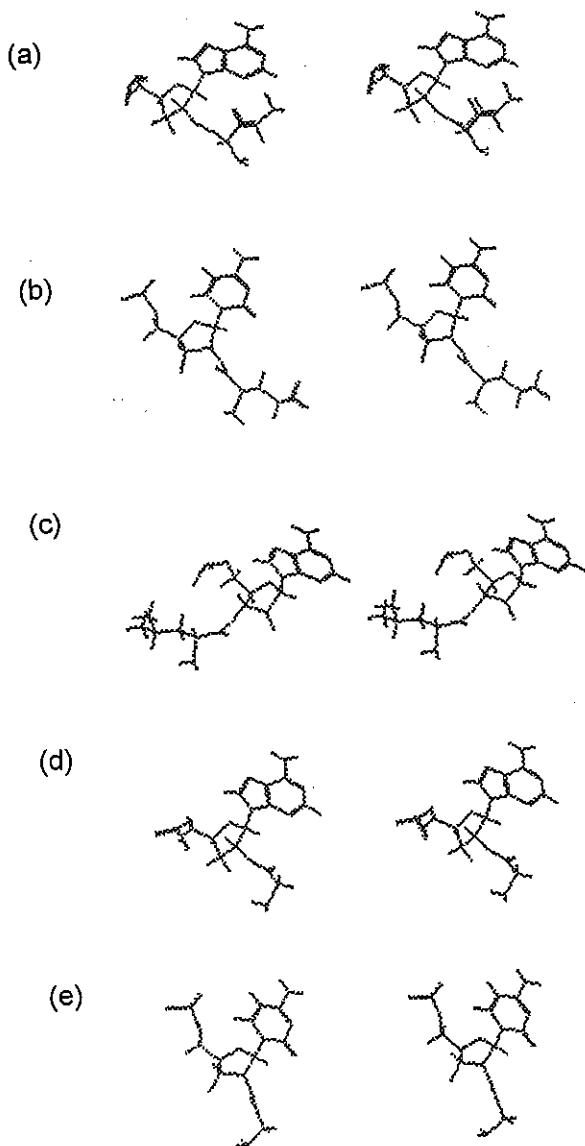


Fig. 2. Stereo view of the lowest energy conformation for several aminoacyl-mononucleotide using molecular mechanics calculation. CVFF force field was used as a tool for modeling.

- (a) 2'-leucyl-adenosine.
 (b) 2'-leucyl-cytosine.
 (c) 3'-leucyl-adenosine.
 (d) 2'-glycyl-adenosine.
 (e) 2'-glycyl-cytosine.

showed that the cytosine-base and leucine residue are apart from each other (Fig. 2). In contrast, 3'-leucyl-adenosine did not show such near positioning between adenine-base and leucine residue. One of the reasons why adenine has been selected as the base of 3'-end of leucine tRNA and why leucine is positioned at 2'-OH could be due to this hydrophobic interaction. Such differences between the base and amino acid could not find in the case of small amino acids. The case of glycine was shown as an example (Fig. 2).

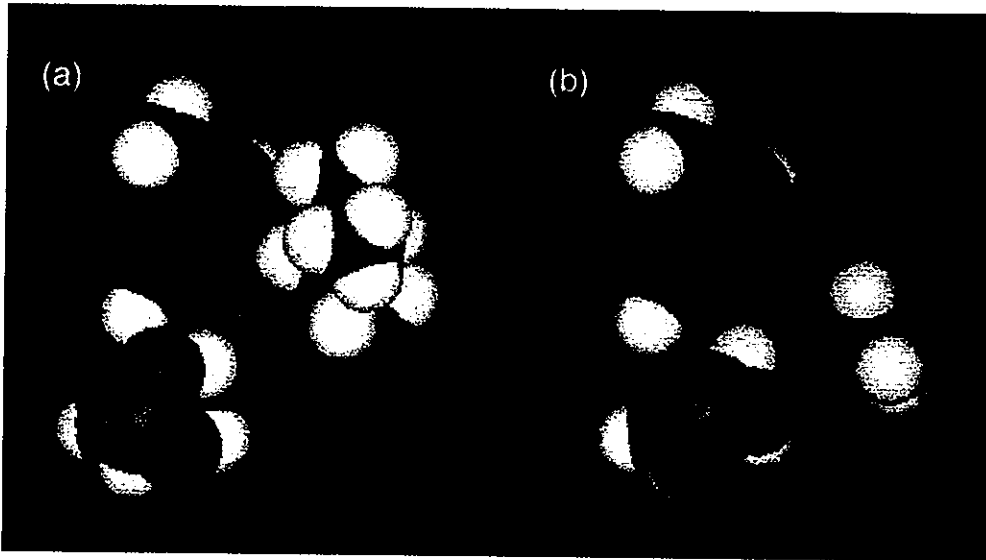


Fig. 3. CPK presentation of the lowest energy conformation using molecular mechanics calculation. CVFF force field was used as a tool for modeling. (a) 2'-leucyl-adenosine and (b) 2'-glycyl-adenosine.

The CPK-representations clearly show the differences between 2'-leucyl-adenosine and 2'-glycyl-adenosine (Fig. 3).

The partition of aaRSs into two mutually exclusive and structurally different classes might reflect two different pathways in the replacement process. We think that at first aminoacylation occurred through direct interaction between the large and hydrophobic amino acid residue of aminoacyl-AMP and the 3'-terminal adenine of proto-tRNA with some help from a ribozyme (Fig. 4). In the case of large and hydrophobic amino acids, such kinds of aminoacylation might have continued for a relatively long period (Fig. 4). The reason is that once the amino acid residue of the aminoacyl-AMP interacts with the adenine of the 3'-terminal proto-tRNA, the dimensionality of the possible encounter is reduced compared with the non-interacting case, which is functionally advantageous for aminoacylation. It has been indicated that the diffusional encounter between enzyme and substrate can be enhanced by reducing the dimensionality in which diffusion takes place from three-dimensional space to two-dimensional surface diffusion (Adam and Delbrück, 1968). The Rossman-

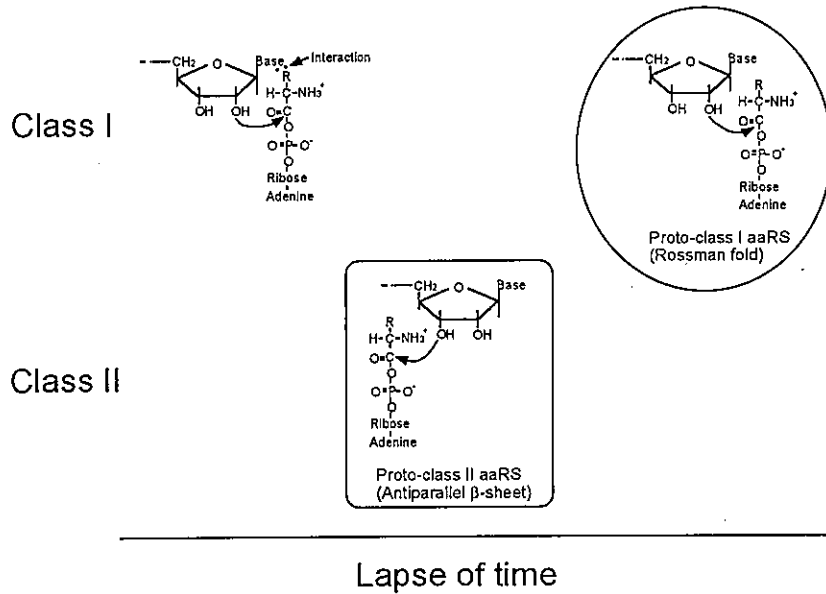


Fig. 4. Schematic representation of a possible process of the evolution of two classes of aminoacyl-tRNA synthetases at an early stage.

fold, found in class I aaRSs, is a typical nucleotide-binding motif that is thought to be a relatively evolved structure (Table 1). The recruitment of such a protein into the aminoacylation reaction might have occurred in a later period than that of class II aaRSs because the above-described direct interaction might have reduced the need for the help of a protein enzyme (Fig. 4). In contrast, in the case of small amino acids, a protein enzyme might have been necessary to help the aminoacylation reaction between aminoacyl-AMP and proto-tRNA because of the lack of the direct interaction of adenine and amino acid (Fig. 4). In addition, the processes involving ribosomes, which utilize the 3'-OH-esterified aminoacyl-tRNA, might have required the same stereochemistry for aminoacylation by proto-class II aaRSs.

It has recently been found that the class II aaRS catalytic domain fold is present in BirA, a biotin-protein ligase that attaches biotin to various key metabolic proteins involved in carboxylation and decarboxylation (Artymiuk *et al.*, 1994). In addition, sequence data and evolutionary arguments suggest that a similarity may exist between class II aaRSs and proteins involved in the nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics,

and more generally, proteins belonging to the family of adenylate-forming enzymes (Di Giulio, 1996) (Table 1). These facts suggest that class II synthetases had a common ancestor which was capable of activating small molecules with ATP. Class II synthetases would then have evolved when an activation domain, specialized to an amino acid, also became able to transfer the amino acid to the 3'-end of a tRNA molecule.

In conclusion, we speculate that aminoacylation on proto-tRNA started through the direct interaction between the large, hydrophobic amino acid residue of aminoacyl-AMP and the 3'-terminal adenine. In contrast, in the case of small amino acids which were not able to use the interaction, a protein enzyme might have participated in the aminoacylation reaction at an early stage (Fig. 4). The active-site folds of aaRSs belonging to each class reflect the history of evolution: evolved nucleotide-binding fold (Rossmann fold) (class I aaRSs) and primitive fold found also in the family of adenylate-forming enzymes (class II aaRSs) (Fig. 4, Table 1).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (No. 09278226 and 09680635) from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan, and in part by a Grant from "Research for the Future" Program of the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS-RFTF97I00301).

REFERENCES

- Adam, G. and Delbrück, M. (1968) In: Davidson N, Rich A (Ed) *Structural chemistry and molecular biology*. Freeman, San Francisco, p 198-215.
- Arnez, J. G. and Moras, D. (1997) *Trends. Biochem. Sci.* **22**, 211-216.
- Artymiuk, P. J., Rice, D. W., Poirrette, A. R. and Willet, P. (1994) *Nature Struct. Biol.* **1**, 758-760.
- Biou, V., Yaremchuk, A., Tukalo, M. and Cusack, S. (1994) *Science* **263**, 1404-1410.

- Carter, C. W. (1993) *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 715-748.
- Cheng, D. M., Danyluk, S. S., Dhingra, M. M., Ezra, F. S., MacCoss, M., Mitra, C. K. and Sarma, R. H. (1980) *Biochemistry* **19**, 2491-2497.
- Cusack, S. (1995) *Nature Struct. Biol.* **2**, 824-831.
- Cusack, S., Yaremchuk, A. and Tukalo, M. (1996a) *EMBO J.* **15**, 2834-2842.
- Cusack, S., Yaremchuk, A. and Tukalo, M. (1996b) *EMBO J.* **15**, 6321-6334.
- Di Giulio, M. (1996) *BioSystems* **39**, 159-169.
- Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J. and Moras, D. (1990) *Nature* **347**, 203-206.
- Feldman, I. and Agarwal, R. P. (1968) *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 7329-7333.
- Francklyn, C. and Schimmel, P. (1989) *Nature* **337**, 478-481.
- Francklyn, C. and Schimmel, P. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8655-8659.
- Francklyn, C., Shi, J.-P. and Schimmel, P. (1992) *Science* **255**, 1121-1125.
- Francklyn, C., Musier-Forsyth, K. and Martinis, S. A. (1997) *RNA* **3**, 954-960.
- Frugier, M., Florentz, C. and Giegé, R. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3990-3994.
- Goldgur, Y., Mosyak, L., Reshetnikova, L., Ankilova, V., Lavrik, O., Khodyreva, S. and Safro, M. (1997) *Structure* **5**, 59-68.
- Himeno, H., Hasegawa, T., Ueda, T., Watanabe, K., Miura, K. and Shimizu, M. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 7855-7863.
- Kirschenbaum, A. H. and Deutscher, M. P. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **70**, 258-264.
- Maelicke, A., Sprinzl, M., von der Haar, F., Khwaja, T. A. and Cramer, F. (1974) *Eur. J. Biochem.* **43**, 617-625.
- Martinis, S. A. and Schimmel, P. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 65-69.
- Martinis, S. A. and Schimmel, P. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 6069-6072.
- Rould, M. A., Perona, J. J., Söll, D. and Steitz, T. A. (1989) *Science* **246**, 135-142.

- Roy, K. L. and Tener, G. M. (1967) *Biochemistry* **6**, 2847-2852.
- Rudinger, J., Florentz, C., Dreher, T. and Giegé, R. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 1865-1870.
- Ruff, M., Krishnaswamy, S., Boeglin, M., Poterszman, A., Mitschler, A., Podjarny, A., Rees, B., Thierry, J. C. and Moras, D. (1991) *Science* **252**, 1682-1689.
- Sampson, J. R. and Saks, M. E. (1993) *Nucleic Acids Res.* **21**, 4467-4475.
- Sampson, J. R. and Uhlenbeck, O. C. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1033-1037.
- Schimmel, P., Giegé, R., Moras, D. and Yokoyama, S. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8763-8768.
- Schulman, L. H. and Pelka, H. (1977) *Biochemistry* **16**, 4256-4265.
- Schweizer, M. P., Broom, A. D., Ts'o, P. O. P. and Hollis, D. P. (1968) *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 1042-1055
- Shi, J.-P., Martinis, S. A. and Schimmel, P. (1992) *Biochemistry* **31**, 4931-4936.
- Sprinzi, M., von der Haar, F., Schlimme, E., Sternbach, H. and Cramer, F. (1972) *Eur. J. Biochem.* **25**, 262-266.
- Sprinzi, M., Scheit, K.-H. and Cramer, F. (1973) *Eur. J. Biochem.* **34**, 306-310.
- Sprinzi, M., Hartmann, T., Weber, J., Blank, J. and Zeidler, R. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, Supplement r1-r172.
- Tamura, K. (1994) *FEBS Lett.* **353**, 173-176.
- Tamura, K., Nameki, N., Hasegawa, T., Shimizu, M. and Himeno, H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 22173-22177.
- Uretsky, S. C., Acs, G., Reich, E., Mori, M. and Altwerger, L. (1968) *J. Biol. Chem.* **243**, 306-312.
- von der Haar, F. and Gaetner, E. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 1378-1382.
- Ward, D. C., Cerami, A., Reich, E., Acs, G. and Altwerger, L. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 3243-3250.
- Zhang, Y.-L., Tropsha, A., McPhail, A. T. and Lee, K.-H. (1994) *J. Med. Chem.* **37**, 1460-1464.



SSOEL - Japan Newsletter

生命の起原および進化学会

No.28 June 2000

1. 第 25 回学術講演会開催

第 25 生命の起原および進化学会学術講演会が、2000 年 3 月 14 日より 16 日にかけて横浜国立大学大学会館ホールにおいて開催された。

2. 1999 年第 2 回運営委員会議事録

日時：年月日午後時分から

会場：学会内会場

出席者：柳川弘志（委員長）、赤星光彦、石神正浩、大西耕二、川村邦男、
小林憲正、島田秋彦、長谷川典巳、藤井紀子、松野孝一郎、三田肇、胸組虎胤、
山中健生、湯浅精二

欠席者：秋山雅彦、川本圭造、澤井宏明、長田洋子、原田和雄、伏見謙

議事：

i. 総務関係（柳川）

ア) 次期運営委員の選挙結果が島田、三田両選挙管理委員より上記の通り発表された。

イ) 会員の動向：入会者 17 名退会者 9 名の承認をした（別紙参照）。

ウ) 学生の学会参加者に対する旅費援助が下記の通り承認された。

神戸大学：二名（古結 俊行、田中 真人）各 18,000 円
大阪府立大：三名（岡本 文敬、楓 千佳、蔵之上 和博）
各 18,000 円

新潟大学：一名（首藤 洋）10,000 円 以上支出合計 10 万円

エ) 第 7 回「生命の起原」夏の学校への援助が承認された（会計報告参照）。

オ) 第 26 回学術講演会を大阪大学湯浅精二会員が開催責任者として
2001 年 3 月に開催することを決定した。

カ) 第 27 回学術講演会の開催予定責任者として島田秋彦会員が承認された。

キ) 今後の事業計画として、日本に 2005-ISSOL の開催責任が回ってくる
可能性が柳川委員長より提起され、そのための心構えが要請された。

ク) 本学会が日本学術会議の登録学会となり、研究連絡委員会、科学研究費審査
員枠等の権利を得るためには、さしあたり欠落する条件として会員数が 300
名に満たないことがあげられ、会員数増加のために努力することが申し合わ
された。

ケ) 経理関係（松野）および編集関係（赤星）からの報告を承認した（別紙参照）

ii 編集関係（赤星）

[編集委員会]

日時：2000 年 3 月 14 日 18:00~19:00

場所：横浜国立大学大学会館

出席者：赤星光彦（長）、川村邦男、後藤公彦、小林憲正、島田秋彦、三田 肇

欠席者：大西耕二、川本圭造、長田洋子、長谷川典巳、原田和雄、藤井紀子、
本多元、胸組虎胤

8 年前、湯浅編集委員長の下で設定された編集委員会規定「三年間に渡り、編集
委員会に出席出来ないほど多忙な人には本業に専念出来るように配慮する」に基
づき判断したところ「今回は該当する人はなかった」との委員長からの報告の後、
協議に入った。

ア) 報告事項：

Viva Origino Vol. 27 (1999) は 4 号（総ページ数 248 ページ）まで恙なく発行
された。Vol. 28 については手持ちの原稿（2）と現在執筆依頼中の（1~2 編）
を No.2 にあて、さらに、本学術講演会での 2 件のシンポジウムの特集企画が予
定されているので、No.3 および No.4 の発行は目途がついている。

イ) 協議事項：

次期編集委員長候補として、藤井紀子氏が承認された。なお、これにはアルバイ
ト代として学会より 10 万円の補助を支出するとの条件付きであったが、翌日の
運営委員会において候補者および条件ともに承認された。

編集委員より提起された Viva Origino 誌の将来（Chemical Abstract, Med-
line, 電子-Journal 化）については引き続き、分担者を決めて前向きに検討と作
業を行うことが了承された。

ウ) 次期編集体制：

運営委員会で承認された藤井次期編集委員長の依頼により、浦田秀仁会員（大
阪薬大）に次期編集委員会委員としてご尽力戴くことになった。

経理関係 (松野)

平成11年度決算報告は下記の通りです。

平成 11 年度決算報告

会計幹事 松野孝一郎

単位:円

項目	収入	支出
前年度繰越金	2,885,544	
会費 正会員	915,000	
学生会員	42,500	
入会金 正会員	5,000	
学生会員	3,000	
郵便貯金利子	3,383	
銀行利息	28	
英文抄録利用許諾料	6,720	
印刷代(Viva Origino Vol. 27, No. 1~No. 4)		586,110
郵送料(Viva Origino Vol. 27, No. 1~No. 4)		58,735
封筒代		27,300
郵便振替払込手数料		8,170
銀行払込手数料		3,045
学会参加補助		59,000
夏の学校講師補助		52,580
コピー代(ニューズレター等)		20,000
経理事務雑費(郵送料等)		5,443
次年度繰越金		3,040,792
合計	3,861,175	3,861,175

上記のとおり相違ないことを確認しました。

平成 12 年 3 月 7 日

会計監査

山中健生

3. 入会者および退会者

2000年3月3日現在（1999年度）

入会者：

そ合憲三（東京理科大学）
菊池邦生（山形大学）
首藤 洋（新潟大学）
山田隆司
井戸賀和美
今井竹夫（立教大学）
小野盛司（東大英数理教室）
蔵之上和博（大阪府立大学）
岡本文敬（大阪府立大学）
楓 千佳（大阪府立大学）
児玉洋子（神戸大学）
古結俊行（神戸大学）
高橋淳一（NTT）
田中真人（神戸大学）
常磐孝義（河野臨床医学研）
百瀬祐子（通産省工業技術院）
田中愛子（京都大学）

以上17名

退会者：

坂本正義（ジャルデー研究所）（逝去）
有川良博（長岡技術科学大学）
田中正寛（大阪医科大学）
山本和彦
吉野大資
本田泰洋（鳴門教育大学）
田川邦夫（大阪大学）
根平邦人（広島大学）
長谷川政美（統計数理研究所）

以上9名

2000年3月3日現在の会員数 248名

宛先不明者：

大浜宏文（東京田辺製薬）
木村真子
酒井鉄博
野田昭三（大阪学院大学）
古田弘幸（大分大学）
三義英一

佐藤哲也
諏訪牧子（東京農工大学）
武田哲男
竹田真子
田中幹衛
梨本正之（日本たばこ産業）
二宮淳一郎（別府大学）

以上 13 名

4. 第 25 回学術講演会を終えて（小林憲正）

平成 12 年 3 月 14 日（火）から 16 日（木）の 3 日間、横浜国立大学の大学会館におきまして第 25 回学術講演会を開催させていただきました。一般講演、シンポジウム「元気の出る進化研究」（コンピーナー：飯田一浩氏）、シンポジウム「原始環境からみた生命の起源・進化」（コンピーナー：小林）をあわせて、全部で 50 件の講演が行われました。参加者はシンポジウムの招待講演者を含め 88 名を数え、まずまずの規模だったと思います。参加者の方々に厚くお礼申し上げます。

会場の横浜国立大学キャンパスの交通の便がわるいこと、運営の不便などで、いろいろとご迷惑をおかけしました。特に、要旨集の編集におきまして、原稿の取り違えがあったことを深くお詫び申し上げます。なお、要旨集の正しい原稿（講演番号 5, 32, 33）は会場でお配りいたしましたが、お受け取りになれなかった方、参加者以外で、訂正原稿がはさみこまれていない Viva Origino を受け取られた方がおられましたら、小林まで、電子メール、はがきなどでご連絡下さい。送らせていただきます。

プログラム・要旨集作成にあたりましては、編集事務局の赤星光彦先生・藤井紀子先生にお世話になりました。また企画の段階では前回の大会委員長の澤井宏明先生に貴重なアドバイスをいただきました。シンポジウム講演者の方々には、ご多忙中のところ、無理を申してご講演をしていただきました。また実際の運営におきましては、横浜国立大学の金子竹男氏に負うところ大でした。この場を借りて、お礼を申し上げます。

第 25 回大会委員長

横浜国立大学工学部物質工学科

（〒240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-5）

小林憲正

Tel/Fax 045-339-3938

e-mail kkensei@cms.ynu.ac.jp

5. 第26回学術講演会（案内）

第26回学術講演会が、2001年3月15日（木）から17日（土）、大阪大学豊中キャンパス内 大阪大学共通教育B棟1F講義室で開催されます。第26回学術講演会に関するアンケート調査（下記）を実施しますのでご協力願います。

学術講演会の案内とアンケートは、「第26回大会学術講演会ホームページ」
(<http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/~syuasa/society/index.html>)

でもご覧頂けます。講演やシンポジウムの大枠をこのアンケートに基づいて決定したいと考えていますので、ご意見をお寄せ下さい。8月以降に講演やシンポジウムの募集を行いたいと考えています。郵送（FAXも）や上記のホームページの利用を考えています。

シンポジウムに関しては、21世紀の当該課題の展望を示すようなテーマが期待されます。

現在、シンポジウム「生命の起原と進化における膜系の役割」（オーガナイザー：中村運）の開催が予定されています。

本学会は、「若手研究者の学会への参加を鼓舞する」ために、交通費の一部を援助するポリシーを実施しています。「会員でありかつ学会で講演する」大学院学生は、大会委員長に対して応募（後日公募）することができますので、積極的に学会に参加して当該分野の研究の発展に貢献して下さい。（第26回大会委員長 湯浅精二）

第26回学術講演会アンケートについて

第26回学術講演会が会員の皆さんにとって興味のあるものになるように、内容の充実をはかりたいと考えています。以下のアンケートを参考にして、第26回学術講演会の次を決めたいと思います。2000年7月31日までにご回答願います。

なお、ご回答は下記書式に従い、郵送、Fax、E-mailのいずれかの方法により湯浅までご返送下さい。アドレスは下記の通りです。

ご協力有り難うございました。

湯浅精二

大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻

〒560-0043 豊中市待兼山町1-16

Tel:(06)6850-5823, Fax:(06)6850-5817

E-mail: syuasa@bio.sci.osaka-u.ac.jp

URL: <http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/~syuasa/>

----- アンケート -----

1) 氏名と連絡先

氏名：

連絡先：

電話：

FAX:

E-mail:

2) 第26回学術講演会に参加しますか？（いずれかに○印をつける）

参加します

参加できません

参加できるかどうかわかりません

3) 一般講演の他にあなたの希望をお選びください（○印をつける：複数可能）

シンポジウム

ポスター

記念講演

4) 開催すべきシンポジウムの数をお尋ねします（○印をつける）

1

2

3

5) 第26回学術講演会についての希望をお聞かせ下さい

6. 生命の起原および進化学会若手の会

「生命の起原・夏の学校」開催のご案内

幹事 筑波大学化学系下山研究室

寺崎正紀・新濱史親・三田 肇

新緑の候、皆様には益々ご健勝のこととお喜び申し上げます。

さて、本年度の「生命の起原・夏の学校」を、下記の日程で実施することに致しましたのでご案内申し上げます。学会員の皆様、あるいはこの分野の研究をされている方のご参加をお待ちしています。また、指導されている学生さんなどへ本会をご紹介いただければ幸いです。（生命の起原および進化学会の会員である必要はありません。）

今回は初めての試みとして国立青年の家を利用します。交通が多少不便な点・生活面での規則が煩い点で、面倒な点もありますが、費用が安く済みますのでご了承願います。また、これまでは関東・長岡の学生が中心になっておりましたが、関西方面の学生さんにも参加いただけるよう、この場所を選択しました。ぜひ、多くの方にご参加いただけるようご案内いたします。

記

日時：8月7日（月）午後～8月9日（水）午前の2泊3日

場所：国立乗鞍青年の家（岐阜県高山市岩井町913）

JR利用の場合、高山駅から定期バスにて約50分

車利用の場合、長野自動車道松本ICより車で約3時間、高山市内より約40分

会費：8,000円（食費・懇親会費・運営費などを含む <宿泊費は無料です>）

講師：赤星光彦先生

内容：講師の先生の講演、参加者による研究発表、懇親会など

発表時間は職・学年によりますが、できるだけ参加者は研究発表をして下さい。

参加を予定される方は、研究室ごとにとりまとめて、次の事項を5月20日までにお知らせ下さい。（追伸：参加申込は上記をもって締め切りましたが、若干の人数の変更は可能ですので、これから参加を希望される方は下記連絡先までご照会下さい。）

スケジュール、予稿原稿の提出などは後日、各代表の方にご連絡致します。

*連絡代表者の氏名、連絡先（所属、E-mail、住所、電話番号）

*参加予定者全員の氏名、住所、職又は学年、男女の別、発表の有無（都合により、遅れて参加、先に帰られる場合、あらかじめその予定を付記して下さい。）

提出先および連絡先（ご意見、ご質問、ご要望も承ります）

筑波大学化学系下山研究室 新濱 史親 まで

E-mail egami@first.tsukuba.ac.jp, TEL 0298-53-4134（下山研究室）

なお、郵送の場合は、

〒305-8571 茨城県つくば市天王台1-1-1 筑波大学化学系 三田 肇 まで

☆ 学会誌 Viva Origino 投稿規定

I. 論文の種類

投稿は、以下の区分1~3のいずれかに分類する(III-4参照)。

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

II. 論文の体裁

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

III. 論文の提出と受理

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

がいちじるしく遅れる場合には、再提出日を受理日とすることがある。

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

M. 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7)~ウ)の通りとする。各見出しのゴチ指定、改行等については、既刊の実例にならう。
 - ア) ORIGIN OF LIFE . . . のごとく、全部大文字

とし、左端から記す。見出しの上を2行あけ、下を1行あける。

- イ) Origin of life . . .のごとく、最初の1文字のみ大文字とする。見出しの上を1行あけ、下を1行あける。
 - ウ) 文節の最初に記し、文頭を下げない(インデントなし)。Origin of life.のごとくアンダーラインを引き、ピリオドを打ち、行を変えずに文章を続ける。
6. 各ページとも、タイプ枠外の右上隅に第一著者名とページを鉛筆で記す。この記入は整理のためであり、印刷されない。
 7. 別に和文要旨を添える。要旨冒頭に和文表題、著者名、所属機関、その所在地(郵便番号を付記)を、この順序に記す。要旨本文の長さはなるべく400字以内とする。

☆ 写真製版和文原稿作成の手引き

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

1. 文字は24ドット以上の明朝体とする。
2. 厚手の用紙を用い、横17cm×縦25cmの枠内に1行40文字、40行を印字する。すべての文字および、図、表、写真は80%に縮小されて印刷される。
3. 第1ページに、表題、著者名、所属機関とその所在地(郵便番号付記)をこの順に記す。
 - ア) 表題は4倍角文字とし、4行目から始める。文字の大きさが変えられない場合はそのまま(全角)の文字を使う。
 - イ) 表題のあと、4行あけて、著者名を記す。
 - ウ) 著者名のあと1行あけて、著者名、所属とその所在地(郵便番号付記)を記す。
 - エ) 所在地のあと、4行あけて、本文を記す。
4. 見出しは、区切りの大きいものから順に下記ア)～ウ)の通りとする。
 - ア) 1, 2, 3, . . .
 - イ) 1-1, 1-2, . . ., 2-1, 2-2, . . .
 - ウ) a), b), c), . . .各見出しのゴチ指定、改行等は既刊の実例にならう。
5. 図、表、写真は所定の位置に貼る。図、表、写真の番号、表題、説明は和文原稿の場合にも英文で記すことが望ましく、そのまま写真製版出来るよう図、写真の下、表の上および下に記す。

6. 和文原稿の場合には英文要旨をつける。

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

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

☆ 和文原稿作成の手引き

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

生命の起原および進化学会

<2000、2001年度役員>

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

[運営委員会]

委 員 長：松野孝一郎 会計責任者：小林 憲正 編集責任者：藤井 紀子
委 員：赤星光彦、秋山雅彦、石神正浩、大西耕二、川村邦男、川本圭造、
澤井宏明、島田秋彦、長田洋子、長谷川典巳、原田和雄、伏見 譲、
三田 肇、胸組虎胤

会 計 監 査 山中 健生、後藤 公彦

学会本部事務局 〒940-2137 長岡市上富岡町
長岡技術科学大学生物系内
Tel : 0258-46-6000 (Ex.4518), Fax : 0258-47-9420
E-mail : kmatsuno@vos.nagaokaut.ac.jp
責任者 松野孝一郎

経 理 部 事 務 局 〒240-8501 横浜市保土ヶ谷区常磐台79-5
横浜国立大学工学部物質工学科
Tel・Fax : 045-339-3938
E-mail : kkensei@ynu.ac.jp
責任者 小林 憲正

編 集 事 務 局 〒590-0494 大阪府泉南郡熊取町野田1010
京都大学原子炉実験所
Tel : 0724-51-2496, Fax : 0724-51-2630
E-mail : nfujii@HL.rri.kyoto-u.ac.jp
責任者 藤井 紀子

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 浦田 秀仁 大西 耕二 川村 邦男 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 原田 和雄 本多 元 三田 肇
胸組 虎胤

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

学会ホームページ：<http://www2.prf.or.jp/ssael/>

Viva Origino 28巻2号

2000年6月10日 印 刷
2000年6月20日 発 行

編集者	〒590-0494 大阪府泉南郡熊取町野田1010 京都大学原子炉実験所内
	生命の起原および進化学会編集部
発行者 及び 出版者	〒940-2137 長岡市上富岡町 長岡技術科学大学生物系内
	生命の起原および進化学会事務局
	責任者 松野 孝一郎
印刷所	〒594-0083 大阪府和泉市池上町460-33
	和泉出版印刷(株) TEL0725-45-2360 FAX0725-45-6398



Contents

ARTICLES

- ◎ Increasing activity change of tryptophanase
irradiated with a low dose of γ - rays
A. Shimada, N. Fujii and I. Nakamura (65)

- ◎ The effect of L- ascorbic acid on the differentiation
of bovine lens epithelial cells in culture
T. Tokiwa, N. Fujii and M. Akaboshi (77)

- ◎ Chemical Evolution might take place stepwise
○M. Akaboshi, Y. Tanaka and N.Fujii (87)

- ◎ The 3'- terminal adenosine of tRNA and its relationship
with the evolution of aminoacyl- tRNA synthetases
K. Tamura and T. Hasegawa (97)

NEWS and VIEWS

- ◎ SSOEL - Japan Newsletter No. 28 (2000) (111)