

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K18783

研究課題名(和文)冥王代熱水系における二酸化炭素流体を用いた生体高分子合成実験

研究課題名(英文) Synthesis of biological components using CO₂ fluid in simulated hadean hydrothermal system

研究代表者

藤島 皓介 (Fujishima, Kosuke)

東京工業大学・地球生命研究所・准教授

研究者番号：00776411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円

研究成果の概要(和文)：原始地球環境において生体関連高分子がどのように合成されるのかは「生命の起源」研究における重要課題である。生命システムは水中では熱力学的に準安定な核酸やアミノ酸の高分子(ポリマー)が関与していることから、本研究では深海熱水系近傍に溜まるCO₂流体(液体/超臨界)の疎水性/親水性の2層環境に着目し小型高圧リアクターを用いて同環境を再現した。リアクター内でアミノ酸や核酸の構成因子の組み合わせに対する化学的变化を観察した結果、高温-高圧環境ではアミノ酸を含む反応溶液でペプチドとは異なる分子が合成され、また中温域では核酸前駆体とリン酸塩の組み合わせから極少量のヌクレオチドリン酸の合成が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命の起源の問題を考えることは、すなわち我々のルーツを探るという試みであり、その学術的意義は生命科学のみならず、人文科学や哲学といった分野にまで波及効果がある。本研究では、これまであまり注目されてこなかった初期地球環境に存在していたであろう深海の化学反応場を実験室内で再現し、これまで有機物の高分子化に重要な脱水反応が進む陸地を想定した環境とは異なる条件で初めて化学進化実験を行うことができた。同時に地球科学、有機化学、分析化学をまたがるような学際的研究を展開したことにより学術分野の発展に少なからず寄与することができたと考え

研究成果の概要(英文)：It has been a key issue in the research on the "origin of life" to consider which environments on the primitive earth are suitable for synthesizing organic molecules related to life. In this study, we focused on the hydrophobic and hydrophilic two-layer environment of CO₂ fluid (liquid/supercritical) located near the deep-sea hydrothermal system, and reproduced the same environment using a small high-pressure reactor. As a result of observing chemical changes inside the reactor with respect to combinations of amino acid and nucleic acid constituents, it was found that molecules (unknown, most likely not a dipeptide) was synthesized in the reaction solution containing amino acids at high temperature and high pressure. In the mid temperature range, a combination of nucleotide precursors and phosphate yielded very small amounts of nucleotide monophosphate.

研究分野：宇宙生物学

キーワード：化学進化 アミノ酸 核酸 二酸化炭素流体 初期地球 高分子

1. 研究開始当初の背景

原始海洋環境は生命誕生の場として有力な候補の一つである。例えば海底熱水噴出孔の近傍では海水間における温度や pH の勾配がもたらす熱力学的な非平衡状態の持続環境が存在し[1]、さらに電気化学の観点からは電子の授受による酸化還元反応によって熱水噴出孔の鉱物表面で化学進化が生じる可能性が示唆されている[2]ことから、無機物から有機物への化学進化の場として海底熱水系が注目されている。仮に熱水系において化学進化が進行し、より高分子の有機化合物が誕生したと仮定した場合、最大の問題が水中における不安定性である。既存の生命システムは DNA/RNA の核酸の鎖とアミノ酸の鎖であるタンパク質の高分子が支えているが、水の存在下では熱力学的に準安定で、加水分解反応が進みやすい[3]。従って初期ポリマーの重合と安定性に関する新しい地球化学的なプロセスの探索と実験的検証が求められている。近年、深海熱水噴出孔近傍で多量の CO₂ 流体 (液体や超臨界 CO₂) が存在することが確認されている。CO₂ 流体に対する水の溶解度は様々な温度や圧力の条件下で常に 1% 未満であることから、初期地球の熱水環境付近で有機溶媒によく似た疎水性環境が豊富に存在することを意味している。また地球化学分野における理論モデルでは冥王代 (40 億年前以前) の原始海洋環境でも同様の環境が想定されている。これまでに生命の起源の観点から高圧 CO₂ 流体の存在下で有機高分子の合成と安定性との関連性を探った研究報告例はごくわずかである[4]。

[1] Martin W et al. 2008. *Nat Rev Micro* 1–10. [2] Kitadai N et al., 2019. *Sci Adv.* 6:eaav7848 [3] Joyce GF, Orgel LE. 1999. *Cold Spring Harbor Monograph Archive* 37:49–77. [4] Mayer, C, et al. 2018. *Life* 2:16.

2. 研究の目的

生命の基となる有機物がどこで作られ、どのように供給され、維持されてきたのかを考えることは、地球における生命の起源に対する理解を深める上で重要である。特に遺伝情報物質である DNA/RNA 鎖、そして多種多様な触媒反応を担うタンパク質は、生命システムを支える上で必須の生体高分子であるが、同時に水中では加水分解の標的となっている。そこで本研究ではこの問題を解決しうる初期地球環境として深海熱水系近傍に生じる疎水的な液体 CO₂ を挙げ、専用の耐圧容器内で有機物を溶かした水層と疎水性の液体 CO₂ 層が分離した状態を再現し、同高圧環境内で核酸やアミノ酸の単量体や前駆体がどの程度溶存して存在できるのか、さらにこれらの分子からより複雑な高分子が合成されるかどうかを検証し、CO₂ 流体が生体関連高分子の合成と安定に寄与する直接的な証拠を示すことを目的とした。

3. 研究の方法

初年度はまず水-液体 CO₂ の二層構造が形成されているかどうかを調べるために腐食耐性が高いステンレス鋼 SUS316 を素材とした窓付きの大型の専用高圧リアクター (日東高圧) を用いてリーク漏れがないかの確認を行う。その後、初期分析として海水中に存在する 5 種類のイオン (Cl⁻, Na⁺, Mg²⁺, K⁺, Ca²⁺) に関して液体 CO₂ 側への分配をイオンクロマトグラフを用いて測定した。

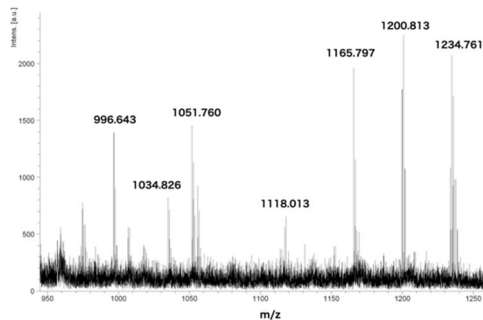
次年度では生体関連高分子の前駆体である各種アミノ酸 (Gly, Leu, Phe, Ala, Trp, Pro, Lys, Asp, Ala, β-Ala, AIB) 及び単純なペプチド Ala-Ala の溶存度の測定を質量分析装置を用いて行い、液体 CO₂ がこれらの有機物に対して溶媒として作用するかどうかを調べた。さらに溶存度が異なるアミノ酸を混合し、高圧リアクター内で反応させることで、アミノ酸の種類の違いによる縮合反応の差を評価する系を立ち上げた。反応は漏れのリスクの少ない内容積 30cc の小型高圧リアクターを用い、10mM のアミノ酸を溶かした水 2mL を加えて液体窒素でリアクターごと冷却したのち液体 CO₂ を送液し、CO₂ を液体のまま充填する。反応実験は異なる圧力 (10~14MPa) と温度域 (55~120 °C)、4 への冷却サイクルを 10 回行い (超臨界相と液体相を行き来することによるエントロピー変化) 微細な、反応後産物は OPA 誘導体化した後イオンクロマトグラフを用いて分析した。

最終年度は新型コロナの影響もあり、核酸合成に関連した実験の一部のみを検証した。具体的には D-リボースと 4 種類の塩基 (アデニン、シトシン、ウラシル、チミン) の組み合わせからヌクレオシド合成反応を、さらに核酸の前駆体のうち 5 種類のヌクレオシド (アデノシン、グアノシン、ウリジン、チミジン、キサンチン) とリン酸ナトリウムを

水-液体 CO₂ の共存下で反応させ、リン酸化反応によって生じる各種ヌクレオチドの存在有無を高速/超高速高分離液体クロマトグラフ(HPLC/UPLC)、液体クロマトグラフ-質量分析装置(LC-MS)で分析した。反応時の温度、圧力と時間は 60、7.4MPa、24 時間とした。

4. 研究成果

初年度は液体 CO₂ と海水相の 2 層構造を再現するための大型の専用耐圧容器を用いたプレ実験としてシンプルに海水中の 5 種類のイオン (Cl⁻, Na⁺, Mg²⁺, K⁺, Ca²⁺) の液体



CO₂ への分配率を測定する系を立ち上げた。しかし耐圧容器から何度もリークが発生する問題に直面した。そこでリーク問題を解決する間に当初の予定にはなかった初期地球 CO₂ 流体のアナログとして沖縄沖海底より回収した天然 CO₂ 流体のサンプルの分析を行った。溶存している有機分子の種類と分布をマトリックス支援レーザー脱離イオン化分析装置(MALDI-MS)で測定した結果、複数の高分子有機化合物を検出したが、その質量から既知の分子を推定することは現時点ではできていない(図 1)。

図 1. 沖縄沖海底由来天然 CO₂ 流体の MALDI-MS 分析結果 (Mass range: 950-1350)

2 年目からは当初の研究実施計画に基づき生体関連分子であるアミノ酸の水層-液体 CO₂ 層への溶存を確認した。学生 RA のサポートのもと、タンパク質を構成するアミノ酸(Gly, Leu, Phe, Ala, Trp, Pro, Lys, Asp, Ala)に加え炭素質隕石などからも発見されている β-Ala, AIB さらにジペプチド Ala-Ala の溶存度の測定を行った。しかし液体 CO₂ 画分を直接回収することが難しく再現性が取れなかったため、誘電率が近い非プロトン溶媒の酢酸エチルへの各物質の溶解度を測定した。質量分析で得られたピーク面積の比較結果により、環構造を持つ Phe, Trp, Pro の溶解度が最も高く、次いで疎水性側鎖を持つ Leu、β-Ala、AIB、逆に溶けにくいアミノ酸として側鎖が小さい Gly と Ala、さらに酸性アミノ酸の Asp はほぼ溶けない事がわかった。そこで溶解度が異なる 2 種類のアミノ酸(Ala と Phe)を単体及び混合した溶液を用い、異なる圧力、温度、10 回の冷却サイクルで実験を行った。その結果、2 種類のアミノ酸を混合した場合のみ 120°C、14MPa という高温高圧環境で未知のピークが確認できた(図 2)。またこのピークは Ala と Phe の縮合によって生じるペプチド分子ではない事が標準品との比較によって明らかとなった。

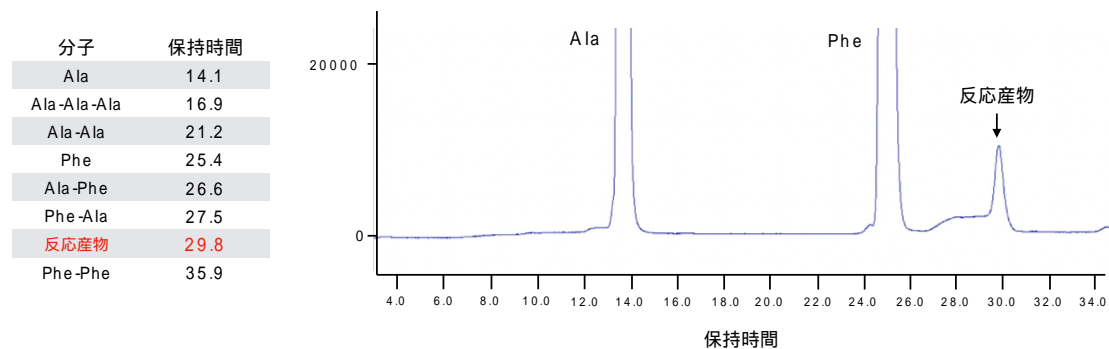
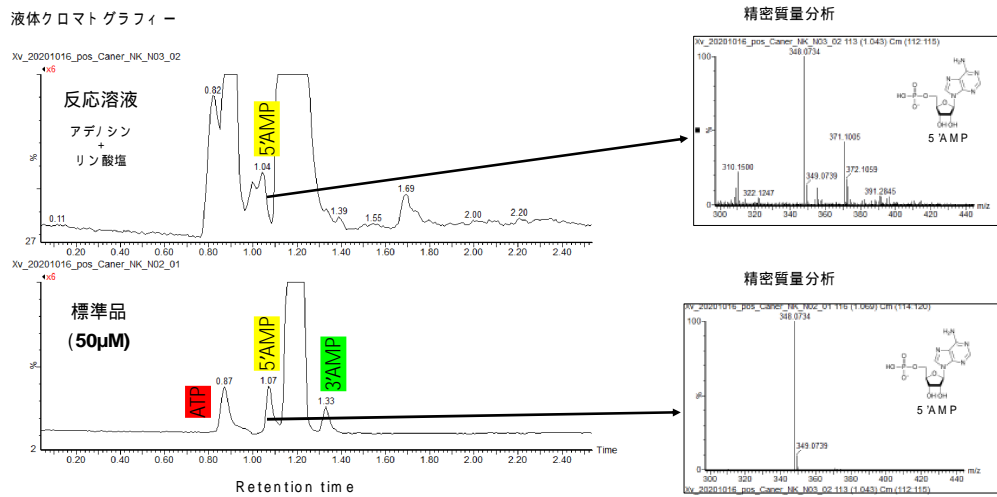


図 2. 2 種類のアミノ酸の CO₂ 流体存在下での反応生成物の分析結果

最終年度は新型コロナの影響を受け、核酸合成に関連した反応の一部(五炭糖と塩基からのヌクレオチド合成、及びヌクレオチドのリン酸化によるヌクレオチド合成)のみを行った。まず計 4 種類の核酸塩基と D-リボースの反応によるヌクレオチド合成を試みた。超純水に溶解後、小型高圧リアクター内に封入し、液体 CO₂ を注入して 40°C、10MPa、1 時間でインキュベーションを行い、生成物を HPLC で分析したが、いずれの組み合わせにおいてもヌクレオチドの標準品に対応するピークは検出されなかった。そこで次に 5 種類(アデノシン、グアノシン、シチジン、チミジン、キサンチン)のヌクレオチドとリン酸塩の組み合わせから CO₂ 流体存在下でヌクレオチド合成の有無を確認した。ヌクレオチドを 1 種類ずつリン酸塩と混ぜて超純水に溶解後、60°C、7.3MPa、24 時間インキュベーションし、反応産物を UPLC で分析した。その結果、アデノシンとリン酸塩の組み合わせにおいてのみ、複数のピークが検出されたため、標準品の 5'及び 3'アデノシン-リン酸(AMP)との比較分析を LC-MS によって実施したところ、極微量(合成量 < 0.1%)の 5'AMP が検出された。水中でのアデノシンのリン酸化反応は熱力学的に進み

にくく、現に水のみでの反応溶液からは 5'及び 3'AMP に対応するピークは確認できなかったことから、CO₂ 流体の存在がリン酸化反応に寄与している可能性が示唆された。

図 3. アデノシンとリン酸塩の CO₂ 流体存在下での反応産物の LC-MS 分析



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 CANER AKIL
2. 発表標題 Supercritical fluids in the search for origins-of-life in Earth and beyond
3. 学会等名 JpGU-AGU Joint Meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------