

catalytic reaction regarding (1). It was found regarding (4) step that natural selection of RNA molecules could have occurred at high temperatures from random mixed sequences of RNA. We also attempted to find efficient pathways and conditions for step (3) and (4) in the absence of template DNA and enzymes. Although we have not yet found an efficient pathway for replication of RNA under the primitive earth conditions at the present time, we observed an enhancement of oligonucleotide formation directed by oligonucleotide template with an additive.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2010年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2011年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
年度			
年度			
総計	23,500,000	7,050,000	30,550,000

研究分野：生物学，総合領域

科研費の分科・細目：生物科学，情報学・進化生物学，生体生命情報学

キーワード：生命起源，人工生命システム，化学進化

1. 研究開始当初の背景

リボザイムが発見され，最初の生命体はRNAを中心として構成されていたとする「RNAワールド仮説」が提唱された。一方，試験管内で分子進化的にRNAを創成する方法が1990年に誕生した。これは，生物進化と同様に「選択」，「増幅」，「変異」を含むので，生命起源の研究法およびRNA化学進化のアナロジーとして多くの研究者に受け入れられた。またアプタマーやリボザイムの創薬手法として急速に発展している。しかし，()DNAプールや逆転写PCR法などの原始地球にはあり得なかった人工的な素材や手法が必要である，()原始地球どのような機能が出現したのかという問題の解決には迫れない，などの本質的な問題がある。このため新しい手法の登場が待たれていた。

一方我々は，(a)粘土鉱物触媒によるRNAの生成，(b)酵素が不要なRNAの鋳型指示生成，さらに，(c)生命の熱水起源について世界に先駆けて研究してきた。(a)の反応では10～50鎖長のRNAが生成する。(b)では，鋳型RNAを用いるとワトソン-クリック型相補的塩基対をつくるRNAが選択的に生成する。さらに(c)として，世界最高性能の熱水フローリアクターを開発し，RNAの熱安定性は超高温でも塩基配列に依存することを発見した。これらの我々のグループなどの研究に基づくと，耐熱性RNAは原始RNAの有力候補である。

2. 研究の目的

これらの原始地球環境におけるRNAの生成・分解反応は，まさに試験管内分子進化系を構成する素材である。本研究では，化学進化的に生成し得るこれらの原始的な素材と反応を統合し，RNAの試験管内分子進化系を創ることを目標とする。このためにAおよびBの2項目について検討した。

(A)分子進化法の各ステップの確立：(1)ランダム生成，(2)自然選択，(3)複製・増幅・変異からなるシステムを構築するために，各ステップを最適化する。(1)G(グアニン)，A(アデニン)，C(シトシン)，U(ウラシル)を含むランダムRNAを粘土触媒で生成させ条件を最適化する。(2)我々の開発した熱水フローリアクターを用いて耐熱RNAを自然選択する。(3)酵素不要なRNAの鋳型指示反応を用いてRNAを複製・増幅・変異する過程を確立する。

(B)各ステップの統合：各ステップを結合して一つのサイクルを構成し，粘土触媒で生成するランダムRNAから原始RNAを試験管内分子進化できることを実証する。

3. 研究の方法

上記の各プロセスの最適化と統合について3年間で研究を行った。最初に，(1)4種類の塩基を含むランダムRNAの生成反応の最適化を行う。また，(2)ランダムRNA鎖を模擬原始熱水環境にさらし，RNAの模擬自然選択の条件検討を行う。その成果に基づいて，RNAの鋳型指示反応を利用して

(3) 複製・増幅・変異過程を確立する。さらにランダムRNAの生成—複製・増幅・変異を繰り返し、RNAの試験管内進化系として動作することを実証する。

A. 粘土触媒を用いるランダムRNAの生成:ヌクレオチドの5'-位リン酸をイミダゾールで活性化した活性化ヌクレオチドを用いて、G, A, C, Uの4種のヌクレオチドモノマーを含む系で、ランダムRNAの生成挙動を調べる。4種類のヌクレオチドの混合系から生成するRNAについて、鎖長、4種類ヌクレオチド残基の割合、3',5'-と2',5'-RNAの割合を分析する。では生成物を各ヌクレオチドにアルカリ加水分解し分析する。

B. RNAの熱加水分解による自然選択:我々が開発した装置を用いると、最高400, 350気圧の熱水中で0.002~180秒間でRNAの熱分解を正確に追跡できる。本研究では、本装置で耐熱RNAを自然選択し、耐熱RNAの鎖長、4種のヌクレオチド残基の割合、3'-5'および2'-5'結合の割合を調べる。また、例えば10鎖長RNAのシーケンス解析を試みる。

C. 複製・増幅・変異過程の構成:

() 4種の塩基を含むRNAの鋳型指示反応(ステップC1): 予備研究をもとに、第1モデルとしてCとGを多く含む10~20鎖長の3',5'-結合のモデルRNAを用い鋳型指示反応を行い解析する。

() 1本鎖RNAの生成と次世代鋳型指示反応による複製(ステップC2): ステップC1で生成した2重らせんRNAを熱変性-急冷して1重らせんとし、それぞれを鋳型として再び鋳型指示反応を行うと複製となる。この過程の、鎖長、ヌクレオチド残基の割合、複製効率を分析し、また、3',5'-結合RNAのシーケンス解析を行う。

() 粘土触媒によって生成するRNAの鋳型指示反応: 第2モデルとして、粘土触媒で生成するRNAをこの増幅系の最初の鋳型として用いる。ステップC1, C2の解析には分解能が高く少量で分析可能なマイクロHPLCを用いる。

D. 各プロセスからの原始生命モデルの構築ステップA, B, C1, C2を結合する。ステップAで生成するランダムRNAに、ステップBの自然選択で生き残るRNAを取りだし、ステップC1, C2で増幅する。

4. 研究成果

(1) ランダムRNAの生成

RNAの進化系を構築するステップAとして、粘土鉱物を触媒とする非生物的なRNA生成反応を検討した。これまで単独あるいは2種類のヌクレオチドを含むRNAの生成が試みられた。本研究では、G(グアニン)A(アデニン), U(ウラシル), C(シトシン)の4種類の塩基を含むヌクレオチドについて、ヌクレオチドのリン酸基にイミダゾールをP-N結合することで、活性化ヌクレオチドを調製し反応を試みた。このために、既存の方法に従って、各活性化ヌクレオチドを合成した。すべての活性化ヌクレオチドの純度はおおむね95%以上であり本研究で使用するのに十分な純度であることを確認した。以下、活性化ヌクレオチドモノマーをそれぞれの塩基の記号を用いて、Imp G, Imp A, Imp U, Imp Cと表す。

これらの活性化ヌクレオチドを、1種類、2種類、3種類、4種類の合計15種類の組み合わせについて検討した。生成物はイオン交換HPLCで分析した。この結果、いずれの組み合わせについても10鎖長程度までのオリゴヌクレオチドが生成したことが示唆された。しかし、活性化ヌクレオチドを2種類以上含む系では、異性体が様々に生成するために、それらの異性体の種類・量のみならず、鎖長すら正確に分析できないことを知った。

、陰イオン交換カラムを用いるHPLCでは、生成するオリゴヌクレオチドはリン酸エステル結合があり、リン酸基の負電荷の数に従ってHPLCの保持時間は大きくなる。従って、保持時間の違いによってオリゴヌクレオチドの鎖長を分析できる。しかし、厳密にはこの保持時間は、塩基の種類にも依存する。特にグアニンを含む場合には保持時間がより大きくなる傾向があった。このために、種々の塩基を含む混合系では同じ保持時間を見ても、異なる鎖長のオリゴヌクレオチドを含むことになる。これらの外観を分析することは容易ではない。そこで、これらのヌクレオチドが種類の異なる塩基を含んでも鎖長の違いだけ依存して分析できる方法の開発を試み、ほぼ目的的分析法を確立することに成功した。

一方、ゲル電気泳動法を用いて鎖長が短いRNAをどの程度効率よく分離できるか検討した。一般に、鎖長が短い核酸をゲル電気泳動法で分析しようとするときゲルを架橋する際に架橋剤濃度を高めなければならない。実際に試験したが、簡便に鎖長を分析する操作法は見いだせなかった。

これらの結果から、本法では上述したHPLC

LCを用いて、鎖長の分析、特定の鎖長中に存在する塩基の分布などを解析した。この結果、4種の活性化ヌクレオチドを含んだ混合系からも10鎖長程度のオリゴヌクレオチドが生成することを確認できた。現在、その詳細を解析し論文の準備を進めている。

(2) 熱水中におけるRNAの安定性
我々のグループでは、生命の熱水起原を検証するために熱水フローリアクターを開発してきた。本法を用いてヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、RNAの安定性をこれまで検証してきた。本法を使えば高温下で配列と鎖長の異なる種々のオリゴヌクレオチドを選別できる。本研究ではRNAの自然選別の手法として熱水フローリアクターを用いることとした。

(3) RNAの分析法の確立
上述したランダムRNAの生成過程の解析、および、複製系を確立するために種々の可能性を検討する過程で、生成物をより精度良く分析することが不可欠であることを知った。すなわち、本反応系の生成物は種々の塩基を含む混合物であり、リン酸ジエステル結合も2',5'-と3',5'-結合の両方を含むなど、異性体の混合物である。従って、これらの混合物の動態を効率よく分析する方法があれば研究を大幅に促進することにつながる。そこで本研究ではキャピラリーLC(以下CLCと略す)を用いて核酸を分析する手法の開発を試みた。

CLCは市販の装置が販売されており、主に質量分析装置と組み合わせてLC-MSとして利用されている。一般のLCのような分析法として利用されることはむしろ頻度は少なかった。そこで、第1にCLCに利用しやすいカラムを選択した。オリゴヌクレオチドの分離は通常のLCでは陰イオン交換カラムが有効であるが、溶離液に対しイオンを添加すれば逆相カラムをつかって分離することも可能である。現在までにCLC用のイオン交換カラムは市販されていないので、イオン対分配逆相モードでの分離を試みた。市販の数種類のカラムを試験したが、(1)コンディショニングに時間を要する、(2)流路やカラムがきわめて詰まりやすい、というCLC固有の難点があった。種々の逆相系カラムを試験したが、モノリス型の逆相カラムが最も適していた。以下、これを用いてオリゴヌクレオチドの分離挙動を検討した。

鎖長の異なるオリゴヌクレオチドを準備し、CLCで分析し保持時間を調べた。種々の条件を検討し、イオン対試薬としてトリエチルアミンを添加し、メタノール濃度を60

分間で1~30%に増加するグラジエントを用い、カラム温度60℃、流速25μ/minと最適化した。

本法を用いると種々の塩基の種類の本モオリゴヌクレオチドを1鎖長の違いで完全分離できた。例えば、鎖長21と22のオリゴアデニル酸を完全分離できた。これは通常の逆相系HPLCでは難しい。

応用として、一塩基多型の検出を試みた。例えば、ガン抑制遺伝子のTP35の塩基配列(25鎖長)の14番目のGを他の塩基で置換したものをを用いてCLCの分離挙動を調べた。その結果、1塩基の違いによってこれらはほぼ完全に分離することを知った。

(4) 複製系の構築
複製系を構築するためには、まず鑄型ポリヌクレオチド存在下で相補的なオリゴヌクレオチドが生成する系を構築しなければならない。非生物的条件下では、ポリシチジル酸(polyC)を鑄型としてオリゴグアニル酸(oligoG)が生成するが(鑄型指示反応)、その他の鑄型に対しては相補的なオリゴヌクレオチドがほとんど生成しないことが知られていた。本研究では、原始的な素材を用いて、その効率を高め、4種類のポリヌクレオチド鑄型に対して同程度の効率でオリゴヌクレオチドが生成する条件や方法の開発を試みた。

polyC鑄型に対するoligoG生成効率の向上法の探索を第1に試みた。そこで、以下の2種の反応系を用いた。活性化ヌクレオチドとしてImpGに加えて、このイミダゾールの代わりに2-メチルイミダゾールで修飾した活性化ヌクレオチド(2MeImpG)を検討した。ImpGを用いる鑄型指示反応では促進剤としてZn(II)やPb(II)などのイオンが必要だが、2MeImpGを用いる場合には不要であり解析が容易である。また、反応中にこれらの金属イオンが沈殿するという問題も起こらない。また、鑄型としてpolyCを使う代わりに10鎖長のoligoCを使用することを試みた。これによって、生成物を分析する際に、あらかじめpolyCを系から除去するためにリボヌクレアーゼで処理する操作を省略できる可能性があり、分析が格段に簡単になる。また、平行して、ウリジル酸鑄型(polyUまたはoligoU)に対してImpAあるいは2MeImpAを反応させる系などの、他の組み合わせについて反応効率を調べた。また、これらの系に対して、種々のタンパク質状物質、金属イオン、鉱物などを添加して反応の促進の有無を調べた。

結果として，反応を促進する系は見いだせなかった．そこで，鑄型指示反応を促進する補助剤を系統的にかつ効率よく調べるべきであると考え，鑄型指示反応そのものを行うのではなく，polyG と polyC が生成する 2 重らせん構造の安定性に対する補助剤の影響を調べることにした．補助剤として，タンパク質状物質やポリペプチドに加えて，DNA 2 重らせんを安定化させることの知られているアクリジン骨格をもつ色素と，臭化エチジウムの効果を調べた．2 重らせん DNA あるいは RNA の溶融温度 (T_m) を紫外可視分光計で測定し，補助剤の効果を調べた．その結果，芳香環を持つ物質存在下では 2 重らせん構造は安定化した．そこで，これらを上記の鑄型指示反応に添加した結果，わずかではあるが，反応が促進された．現在詳細を検討中である．

(5) まとめ

第 1 に原始的環境下で 4 種類の塩基を含む RNA を生成することができることを知った．また我々の熱水フローリアクターを用いれば，熱安定性を淘汰圧として選別できることを知った．一方，現時点では，鑄型指示反応の効率を高め，4 種類の塩基を含むヌクレオチドで効率よく鑄型指示反応が進む系を見いだすことは出来なかった．ただし，わずかではあるが，反応が促進する系を見いだした．鑄型指示反応の効率をさらに向上させるためにどのような条件が必要かのヒントが得られ，複製反応を構築する糸口がつかめた．

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

Kunio Kawamura, Drawbacks of the ancient RNA-based life-like system under primitive earth conditions, *Biochimie*, 査読あり, 94, 1441-1450, 2012.

Kunio Kawamura, Hitoshi Takeya, Takao Kushibe, Yuka Koizumi, Mineral-enhanced hydrothermal oligopeptide formation at the second time scale, *Astrobiology*, 査読あり, 11 (5), 461-469, 2011.

Kunio Kawamura, Keisuke Ikoma, Shukuro Igarashi, Hideaki Hisamoto, Toshio Yao, Flow injection analysis combined with a hydrothermal flow reactor: application to kinetic determination of trace amounts of iridium using a water-soluble porphyrin, *Talanta*, 査読あり, 84 (5), 1318-1322, 2011.

Kunio Kawamura, Development of micro-flow hydrothermal monitoring

systems and their applications to the origin of life study on earth, *Anal. Sci.*, 査読あり, 27, 675-683, 2011.

川村邦男, 生命起源の解明をめざした熱水フローリアクターシステムの開発, *ぶんせき*, 査読あり, 2011 (2) 104-107.

Kunio Kawamura, Innovations of hydrothermal flow reactors for the chemical evolution on primitive earth: the next step for the experimental evaluation of life-like systems, *Viva Origino*, 査読あり, 38, 40-45, 2010.

Kunio Kawamura, Temperature limit for the emergence of life-like system deduced from the prebiotic chemical kinetics under the hydrothermal conditions, *Proceedings of the Twelfth International Conference on the Simulation and Synthesis of Living Systems* (Edited by, H. Fellermann, M. Dörr, M. M. Hanczyc, L. L. Lauren, S. Maurer, D. Merkle, P.-A. Monnard, K. Støy, S. Rasmussen), 査読あり, 37-44, 2010.

Kunio Kawamura, Hiroki Nagayoshi, Toshio Yao, In situ analysis of proteins at high temperatures mediated by capillary-flow hydrothermal UV-Vis spectrophotometer with a water-soluble chromogenic reagent, *Anal. Chim. Acta*, 査読あり, 667, 88-95, 2010.

Kunio Kawamura, Hitoshi Takeya, Takao Kushibe, Effect of condensation agents and minerals for oligopeptide formation under mild and hydrothermal conditions in relation to chemical evolution of proteins, *Advances in Space Research*, 査読あり, 44, 267-275, 2009.

Kunio Kawamura, Hiroki Nagayoshi, Toshio Yao, Stability of ribonuclease A under hydrothermal conditions in relation to the origin-of-life hypothesis: Verification with the hydrothermal micro-flow reactor system, *Research on Chemical Intermediates*, 査読あり, 35, 879-891, 2009.

川村邦男, 前生物的化学に基づいて RNA ワールド仮説を検証する, *Viva Origino*, 査読あり, 37, 31-42, 2009.

[学会発表](計 19 件)

川村邦男, 鉱物充填熱水フローリアクターの開発とオリゴペプチド生成反応に対する鉱物の効果, 第 37 回生命の起源および進化学会学術講演会, 高槻, 2012 年 3 月 7-9 日

Kunio Kawamura, Possible RNA-based life-like systems under hydrothermal

environments, the Symposium "The Future of RNA Worlds", Acides Nucléiques et BioPhotoNique - UPMC 4 Place Jussieu Paris UPMC, February 24, 2012. (Invited lecture)

Kunio Kawamura, Behaviors of RNA and peptides under the hydrothermal environments towards the ancient life-like system, Invited Seminar, University de Strasbourg and JSPS Strasbourg office, February 17, 2012. (Invited lecture)

川村邦男, 化学の挑戦：生命起源の解明をめざして, 環境分析化学分野セミナー, 仙台, 2011年11月25日(招待講演).

川村邦男, 溶融シリカキャピラリーを用いる分光法:高温高压液相反応のその場観測, 第31回キャピラリー電気泳動シンポジウム, 鶴岡, 2011年11月9-11日.

Kunio Kawamura, Hitoshi Takeya, Takao Kushibe, Yuka Koizumi, The role of minerals for the formation of oligopeptide using a newly developed mineral-mediated hydrothermal reactor system, ISSOL and IAU meeting, July 3 - 8, 2011, Montpellier.

生駒佳祐, 久本秀明, 川村邦男, キャピラリー-HPLC を用いる短鎖核酸の分離分析法の開発, 第22回クロマトグラフィー科学会議, 仙台, 2011年10月20-22日.

生駒佳祐, 久本秀明, 川村邦男, モノリスカラムを用いる1~30鎖長ヌクレオチドのキャピラリー-LC分離挙動, 日本化学会第91春季年会, 横浜, 2011年3月26-29日.

Kunio Kawamura, Evaluation of the RNA world hypothesis and the GADV hypothesis on the basis of the hydrothermal origin-of-life hypothesis, Narasaho-Seminar on the Origin of Life, Nara, January 17, 2011. (Invited lecture)

Kunio Kawamura, Keisuke Ikoma, Tomoko Yasuda, Hiroki Nagayoshi, Hitoshi Takeya, Shukuro Igarashi, Hideaki Hisamoto, Toshio Yao, Development of micro-flow analytical techniques for hydrothermal reactions, The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pachifichem 2010), Honolulu, Hawaii, 15 - 20 December 2010.

Kunio Kawamura, Temperature limit for the emergence of life-like system deduced from the prebiotic chemical kinetics under the hydrothermal conditions, Artificial Life 12, Odense, Denmark, 19 - 23 August 2010.

Kunio Kawamura, Chemical evolution of life-like system under hydrothermal environments: prebiotic formation, degradation, and functions regarding protein-like molecules and RNA, COSPAR Scientific Assembly 2010, Bremen, Germany,

18 - 24 July 2010.

川村邦男, 熱水分析技術の開発と化学進化研究への展開, 生命の起原および進化学会第35回学術講演会(函館), 2010年3月15 - 17日, (依頼シンポジウム講演)

川村邦男, 生命の定義と化学進化研究に基づいてリアルな原始生命体を描く, 国際高等研究所フェロー(池原)研究会「生命の本質 - 遺伝子、遺伝暗号、タンパク質および生命の起源」(木津川), 2010年2月26 - 27日(招待講演).

Kunio Kawamura, Hitoshi Takeya, Takao Kushibe, Presentation title is not publishable, Gordon Research Conference: Origin of Life, 2010, January, 10-15, Galveston, USA,

川村邦男, タンパク質の化学進化と生命の熱水起原, 国際高等研究所フェロー(池原)研究会「生命の本質 - 遺伝子、遺伝暗号、タンパク質および生命の起源」(木津川), 2009年12月11 - 12日(招待講演).

生駒佳祐, 安田知子, 八尾俊男, 川村邦男, 高温高压溶液反応を用いたリアルタイム高速分析法の開発, 第48回フローインジェクション分析講演会(堺), 2009年11月27日.

川村邦男, 生命らしさからみるRNAワールド, 国際高等研究所フェロー(池原)研究会「生命の本質 - 遺伝子、遺伝暗号、タンパク質および生命の起源」(木津川)2009年9月25-26日(招待講演).

川村邦男・竹家均・櫛部崇夫, 原始地球環境におけるオリゴペプチド生成反応に対する縮合剤および鉱物の影響, 2009年度日本地球化学会年会(東広島), 2009年9月17 - 21日.

[図書](計2件)

Kunio Kawamura, "Reality of the emergence of life-like systems from simple prebiotic polymers on primitive earth" in "GENESIS - IN THE BEGINNING: Precursors of Life, Chemical Models and Early biological Evolution" Eds. by Joseph Seckbach and Richard Gordon, Springer, 査読あり, pp. 123-144, 2012.

Kunio Kawamura, Chapters "Activated Nucleotide", "Oligonucleotide", and "Nucleotide Phosphorimidazole" in "Encyclopedia of Astrobiology", Eds. by Ricardo Amils, Muriel Gargaud, Jose Cernicharo Quintanilla, Henderson James Cleaves, William M. Irvine, Daniele Pinti, Michel Viso, 1853p, Springer, 査読あり, 2011.

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://ns1.shudo-u.ac.jp/~kawamura/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

川村 邦男（KAWAMURA KUNIO）

広島修道大学・人間環境学部・教授

研究者番号：50204772