

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：35404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657166

研究課題名(和文) 原始地球環境で生成する素材だけを用いるRNA生命の構築

研究課題名(英文) Construction of RNA life-like System Entirely from Prebiotic Materials Formed on the Primitive Earth

研究代表者

川村 邦男(Kunio, Kawamura)

広島修道大学・人間環境学部・教授

研究者番号：50204772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：原始地球上で生成したと考えられる素材だけで複製系を構築するために、ヌクレオシド-3',5'-サイクリックモノリン酸を原料とする複製系の構築、鋳物あるいはタンパク質状物質の存在下でのヌクレオチド-3',5'-モノリン酸のリン酸基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る複製系の構築、シトシンを主とする10鎖長オリゴヌクレオチドを鋳型とするRNA生成反応を検討した。以上の結果からは、モノマーを原料とする場合には、RNAが複製することは困難であり、複製系がどのように起こったかを根本的に研究し直さなければならないことを知った。

研究成果の概要(英文)：To construct a replication system of RNA molecules using entirely prebiotic materials on the primitive earth, the RNA formations were attempted. The results suggest the difficulty of RNA replication using entirely prebiotic molecules on the primitive earth.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：生命起源 人工生命 化学進化 複製の起源

### 1. 研究開始当初の背景

試験管内で分子進化工学的にRNAを創成する *in vitro* selection 法が1990年に確立された (Ellington & Szostak, Nature 1990). この方法は「増幅」、「変異」、「選択」を含むので、ダーウィン進化するRNA化学進化のモデル (= 生命起源のモデル) として多くの研究者に受け入れられた。すなわち、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」を裏付ける強い根拠となっている。また昨今は、RNAの創薬法としての展開も著しい。しかし、RNAのランダムプールや逆転写PCR法などの、原始地球にはあり得なかった素材や手法が必要であるため、RNAワールド仮説の根拠として大きな課題がある。

この問題を解決するためには、原始地球で化学進化によって生成する素材 (= 前生物的素材) だけを用いて、RNAの(1)ランダム生成、(2)自然選択、(3)複製・増幅・変異のプロセスを構築し、ダーウィン進化することを証明しなければならない。我々は各プロセスを構築するため、(A)粘土鉱物触媒によるRNAの生成、(B)核酸の高温下での自然選択、(C)酵素が不要なRNAの鋳型指示生成について、世界に先駆けて研究してきた。この結果、(A)を用い原始的ランダムRNAを調製することに成功した。また(B)では、世界に例のない鉱物-熱水系を模擬するフローリアクターを開発し、熱安定性に基づくRNAの自然選択を調べる方法を構築した。しかし(C)については、ポリシチジル酸鋳型上でオリゴグアニル酸が生成する反応 (以下、C→Gと表す) は可能だが、4種類の塩基に対する複製法は成功していない。

### 2. 研究の目的

本研究では、(C)の手法を改良・発展させることによって、(1)変異を伴う原始的な複製反応を作り、(2)これを原始RNA増幅系に発展させ、(3)ランダム生成および自然選択プロセスと結合することで、RNAの原始的進化系を構築する。前生物的素材だけを用いた増幅・変異・選択を含むRNA進化系の構築には誰も成功していない。本研究の成果は、RNAワールドの出現過程を明らかにし生命起源の問題に対して、革新的な知見をもたらす。分子進化工学においては、分子生物学的な素材を用いないので、従来と比べて数桁低コストの技術へと発展できるものと期待される。

### 3. 研究の方法

変異を伴う原始的な複製反応を構築するために、鋳型指示反応の高効率化をめざして2年間で研究を行った。

鋳型指示反応はC→Gの場合にだけ効率よく進み、U→Aでわずかに進み、G→C、A→Uでほとんど進まない (Inoue & Orgel, Science 1983, Sawai & Wada OLEB, 2000)。理由は、リン酸ジエステル結合の生成に先立って、鋳型ポリヌクレオチド上で活性化ヌクレオチド (ImpN) が配列する際の、ImpN 同士のスタッキングが弱いためである (Kawamura & Umehara BCSJ, 2001)。生体内でヌクレオシド5'-三リン酸からRNAが生成する場合には、酵素がそれを補っていると考えられる。すなわち、塩基種類にかかわらずモノマー同士が会合する反応場を整えればよい。本研究では、高効率の鋳型指示反応を実現するため、以下を検討する。

(1) Mauro らはヌクレオシド-3',5'-サイクリックモノリン酸を原料とすると、30~120鎖長程度の原始的RNA生成反応としてはかなり長鎖のRNAが生成する現象を報告した。我々は、この反応の信憑性を確かめることと、この反応が実在するのであれば、鋳型指示反応を通して複製系を構築する素材となり得ると考えた。そこで、この反応系を土台とする鋳型指示反応を構築する。このため、本反応の追試を第1に行い、これを用いて種々の鋳型指示反応を試みる。

(2) ヌクレオチド-3',5'-モノリン酸のリン酸基をイミダゾールで活性化した活性化ヌクレオチドモノマーを用いる鋳型指示反応を促進し、塩基の種類によらずに進行する原始的条件を見いだす。現状では、鋳型としてポリシチジル酸あるいはそのオリゴマーを用いる場合には相補的塩基対を形成するグアノシンの活性化ヌクレオチドは鋳型上で重合する。しかし、その他のワトソクニック型の組合せでは鋳型指示反応はほとんど進行しない。これを促進するためには、鋳型ヌクレオチド上に活性化ヌクレオチドモノマーが整然と配列しなければならない。このため、モノマー間あるいはモノマーと伸長しつつあるオリゴマーとの間のスタッキング相互作用を増大する条件が必要であると推定した。そこでこれを促進した可能性が推定される種々の原始的な素材として、鉱物類、原始的環境下で生成するタンパク質状物質について検討する。また、0以下に温度を下げることによってスタッキング相互作用を増進する方法も検討する。

(3) 10鎖長のオリゴヌクレオチドを鋳型とする活性化ヌクレオチドを原料とする鋳型指示反応の高効率化を検討した。この際に、鋳型としてシチジンを主として他の塩基を一部含む鋳型を用いることで、スタッキング

効果を保つことにより、グアニン以外の塩基を持つヌクレオチドが鋳型指示反応により挿入されるかどうかを検討する。

(4)以上を土台として複製系を構築し、ランダム反応および加熱選択系と組み合わせることによって、人工進化するシステムを構築する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 3',5'-サイクリックモノリン酸を原料とするRNAオリゴマー生成反応

Mauroらの報告した反応条件下で、上記の原料を用いてRNAが生成するかどうかを追試した。論文で報告されているよりも広い範囲のpH(6~8)、温度(65~95℃)、反応時間(15~180min)で反応を試みた。試薬として、主に3',5'-サイクリックグアノシンモノリン酸および3',5'-サイクリックアデノシンモノリン酸を用いた。また、緩衝溶液の種類をTris, MES, HEPES, TAPSを用いるとともに、ホルムアミド(5~75%)添加して効果を調べた。さらに鋳物を添加する系での反応を調べた。生成物は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析した。この結果、これらの条件下では有意の生成量のRNAは検出されなかった。このように論文の中で報告されている条件よりも広い範囲で追試実験を行ったにもかかわらず、RNAが検出されなかったことは、この論文の報告には不明の条件が存在するか、この反応は間違いであるとい可能性を示唆している。

一方、活性化ヌクレオチドとして、グアノシン5'-リン酸-2-メチルイミダゾリド(2MeImpG)に加えて、グアノシン5'-ジリン酸(5'-GDP)およびグアノシン5'-トリリン酸(5'-GTP)をモノマーとして用い、オリゴグアニル酸が生成するかどうか9種類の種々の産地の粘土鋳物の効果を調べた。これらのモノマーは熱力学的にはオリゴヌクレオチドを生成するのに十分な自由エネルギーを持つが、酵素なしにはオリゴヌクレオチドは生成しない。一方、2MeImpGを用いる場合には鋳型と作用するポリヌクレオチドが共存すればオリゴヌクレオチドは生成するが、今回は鋳型がない条件で調べた。

この結果、いずれの場合においても、鋳物の効果は認められずオリゴヌクレオチドは生成しなかった。

##### (2) 活性化ヌクレオチドを用いる鋳型指示反応の促進条件の探索

鋳物の効果:2MeImpGを原料としポリシチジル酸(polyC)を鋳型とすると、約20~40鎖長のオリゴヌクレオチドが生成する。この反応に対して、21種類の鋳物の影響を調べた。鋳物として粘土類、トルマリン、雲母、

ゼオライト、硫化鋳物、炭酸塩鋳物、アパタイト、石英などの効果を調べた。また、反応後にEDTAを含む溶液で洗浄し、鋳物に対するオリゴヌクレオチドの吸着量を測定した。しかしこれらの鋳物が共存しても、オリゴヌクレオチドに対する促進効果は認められなかった。

鋳型指示反応に対するポリリジンの効果:ポリリジンが鋳型指示反応に対して弱い促進効果を持つことを、これまでに行った予備研究が示した。そこで、この反応系を最後に行い促進効果を持つかどうかを検証した。原料として2MeImpGまたはグアノシン5'-リン酸イミダゾリド(ImpG)を、鋳型としてpolyCを用い、オリゴグアニル酸(oligoG)の生成が促進するかどうか調べた。この結果、ポリリジンによって鋳型指示反応が促進されるという明確な証拠は得られなかった。

低温下での鋳型指示反応に対する促進効果について:低温では鋳型指示反応が促進されることが知られている。そこで、2MeImpGを原料とし、鋳型としてpolyCあるいは10鎖長のオリゴヌクレオチドを用いてRNAの生成量を分析した。その際に、グリセリン、リボース、エタノール、高濃度の塩化マグネシウムあるいは塩化カルシウムを共存させ、0℃以下での反応を可能にした。これらの添加によって、おおむね凍結せず溶液状態で反応を行った。低温下ではpolyC鋳型存在下で2MeImpGからのoligoGの生成は促進された。しかし、同様に10鎖長のオリゴアデニル酸鋳型(oligoT10)存在下で2MeImpAを反応させたが、oligoAの生成は認められなかった。低温下でグアニンの場合にスタッキングが促進される程度の条件でもアデニンでは効果的でないためと推定される。

インターカレータの効果:インターカレータを用いるとpolyC鋳型を用いる反応では反応効率が上昇した可能性がこれまでの研究で示唆された。そこで今回は、10鎖長から成る相補的なオリゴヌクレオチドを鋳型として用い、2MeImpG, 2MeImpA, 2MeImpU, および2MeImpCを原料として反応を行った。温度は上述の結果を踏まえて0℃とした。この結果、2MeImpGからはオリゴグアニル酸が生成したが、他の系では反応は進行しなかった。

(3) シチジン以外の塩基を含む10鎖長オリゴヌクレオチド上での鋳型指示反応:シチジンを主に含む10鎖長のオリゴヌクレオチドを鋳型として2MeImpGおよび鋳型に対して相補的な塩基対を生成する活性化ヌクレ

オチドを共存させ、それらの G 以外の塩基を含むオリゴヌクレオチドが生成するかどうか検討した。上述の温度条件を踏まえて、反応は 0 で行った。これらの結果、基本的に鑄型指示反応は、G 以外のヌクレオチドが挿入されないために、そこで反応が停止することが確認された。

#### (4) まとめ

鑄型指示反応は、polyC あるいは oligoC を鑄型としオリゴグアニル酸が生成する場合には効率良く進むが、その他の組合せでは反応効率が低い。このため、化学進化の過程で複製反応がどのように起こったかという問題は未だに解決されておらず、RNA ワールド仮説の土台も極めて弱い。このために本課題では、原始的な素材をターゲットとして、鑄型指示反応を促進する素材の探索を広い範囲で行った。しかし現時点では、鑄型指示反応が効率良く進む条件や添加物は明らかにならなかった。このことは、1 塩基を単位とするモノマーヌクレオチドの鑄型指示反応は困難であることを示唆している。同時に、複数の塩基からなる短鎖長のヌクレオチドを単位とする鑄型指示反応を構築することが新たな経路の可能性として期待される。

#### 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 8 件)

1. 川村邦男, 文明の生命システム論からみる地球環境保全 -教育と研究活動の役割-, 人間環境学研究, 12, 65-83, 2014. 査読なし
2. Koichi Nagafuchi, Atsushi Nagira, Hidenori Akiyama, Mitsuru Sasaki, Kunio Kawamura, Oligopeptide production from alanine monomer by pulsed corona discharge plasma in ambient and supercritical argon, *Chemical Engineering and Science*, 1 (3), 41-45, 2013. 査読有り
3. Kunio Kawamura, Yoshimi Maruoka, Kazuyasu Hamahiga, Noriko Konagaya, Difficulty of the self-replication of prebiotic RNA molecules, Goldschmidt Abstract, 1440, Mineralogical Magazine, 2013. Florence, Italy, August 25-30, 2013 査読有り
4. Kunio Kawamura, Recent progress for the peptide synthesis using hydrothermal-microflow reactor systems, *Peptide Science*, 123-124, 2012. 査読有り
5. Nizar El-Murr, Marie-Christine Maurel, Martina Rihova, Jacques Vergne, Guy Hervé, Mikio Kato, Kunio Kawamura, Behavior of a hammerhead ribozyme in aqueous solution

at medium to high temperatures, *Naturwissenschaften*, 99, 731-738, 2012. 査読有り

6. Kunio Kawamura, Takayuki Nakai, Keisuke Ikoma, Hideaki Hisamoto, High-throughput Ru(III) analysis using the hydrothermal flow reactor-mediated FIA by the extreme acceleration of Ru(III) complexation with 1,10-phenanthroline, *Talanta*, 99, 415-419, 2012. 査読有り
7. Kunio Kawamura, Drawbacks of the ancient RNA-based life-like system under primitive earth conditions, *Biochimie*, 94 (7), 1441-1450, 2012. 査読有り
8. Yuji Fujii, Terence G. Henares, Kunio Kawamura, Tatsuro Endo, Hideaki Hisamoto, Bulk- and surface-modified combinable PDMS capillary sensor array as easy-to-use sensing device with enhanced sensitivity to elevated concentrations of multiple serum sample components, *Lab Chip* 12 (8), 1522-1526, 2012. 査読有り

##### [学会発表](計 11 件)

1. 生命の定義を再考する, 川村邦男, 生命の起原および進化学会第 39 回学術講演会, 広島, 2014 年 3 月 13-15 日
2. 水中ナノバルス放電におけるアラニルアラニンの反応経路及び反応機構, 坂井夕華・柳楽篤史・佐々木満・後藤元信・川村邦男, 化学工学会 第 45 回秋季大会, 2013 年 9 月 16-18 日, 岡山市.
3. 文明の生命システム論からみる環境問題に対する教育と科学技術の役割, 川村邦男, 日本環境学会 東広島大会(第 39 回研究発表会), 2013 年 6 月 15-17 日, 東広島.
4. Environment harmless technology on the basis of old-fashioned chemistry: usage of classical analytical reactions for highly sensitive and selective, high-through put, small sample size metal analyses, Kunio Kawamura, The 2nd *Environment* International Conference on "Human Vulnerability and Global Environmental Change", May 15-17, 2013, Pataya, Thailand.
5. The role of education and invention for global environmental protection on the basis of the biosystem view of civilization, Kunio Kawamura, The 2nd *EnvironmentAsia* International Conference on "Human Vulnerability and Global Environmental Change", May 15-17, 2013, Pataya, Thailand.
6. Effect of pulsed discharge plasma irradiation on the elongation of alanine and

- alanylalanine under ambient aqueous and hydrothermal conditions, Mitsuru Sasaki, Atsushi Nagira, Koichi Nagafuchi, Armando T. Quitain, Wahyudiono, Motonobu Goto, Kunio Kawamura, ISPlasma2013 January 28-February 1, 2013 Nagoya, Japan.
7. 10～200 における水溶液中でのハンマーヘッドリボザイムの自己切断挙動, Nizal El-Murr, Marie-Christine Maurel, Martina Říhová, Jacques Vergne, Guy Hervé, 加藤幹男, 川村邦男, 第38回生命の起源および進化学会学術講演会, 福岡, 2013年3月14-16日
  8. 熱水マイクロフローリアクター技術を用いるペプチド生成反応に関する最近の進展, 2012年11月7-9日, ペプチド討論会(要旨集 pp. P002 X 鹿児島), 川村邦男.
  9. 鉱物 熱水フローリアクターを用いる原始ペプチド生成モデルの解析, 川村邦男・竹家均・櫛部崇夫・古泉ゆか(広島修道大人間環境・大阪府大院工), 2012年度日本地球化学会年会, 2012年9月11-13日、福岡.
  10. Elucidation of factors affecting elongation of alanine and alanyl alanine in discharged plasma induced hydrothermal treatment, Atsushi Nagira, Koichi Nagafuchi, Mitsuru Sasaki, Kunio Kawamura (Japan), BIOELECTRICS 2012, 9th International Bioelectrics Symposium September 5 – 8, 2012, Kumamoto, KKR Hotel Kumamoto, Japan.
  11. Peptide synthesis from amino acid by pulsed discharge plasma in pressurized fluids, Koichi Nagafuchi, Atsushi Nagira, Hidenori Akiyama, Mitsuru Sasaki, Kunio Kawamura (Japan), BIOELECTRICS 2012, 9th International Bioelectrics Symposium September 5 – 8, 2012, Kumamoto, KKR Hotel Kumamoto, Japan.

〔図書〕(計1件)

1. 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, pp123-144, 2012. 査読有り

〔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