

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：35404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12144

研究課題名(和文) 3塩基ユニット複製に基づくダーウィン進化するRNA生命モデルの構築

研究課題名(英文) Construction of RNA based life-like chemical system for Darwinian evolution on the basis of the replication reaction consisting of three base units

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：3塩基を単位とする鋳型指示反応を土台として原始地球環境下における複製系を構築し、RNAが自発的に化学進化する実験系の構築をめざし、A：通常の鋳型指示反応(TD反応)および、B：2～6鎖長のオリゴヌクレオチドをモノマー単位とする短鎖鋳型指示反応(S-TD反応)を原始RNA生成モデルとして用い、(1)グルタミン酸混合物から生成するタンパク質状モデル物質の効果、(2)S-TD反応に対する鋳型配列の影響、(3)亜鉛イオンの効果の検討、(4)この解析のための分析手法の検討を行った。この結果、RNAの複製が原始地球環境下では極めて起こりにくいということを真剣に議論しなければならない結果を得た。

研究成果の概要(英文)：We attempted to make an RNA replication model on the basis of three base unit template-directed reactions, which would lead a new experimental approach for spontaneous chemical reaction system in vitro. Using two types of template-directed reactions, which are the regular template-directed reaction (TD reaction) and a template-directed reaction including 2 - 6 members of nucleoside bases (S-TD reaction). The influence for these TD reactions, (1) influence of protein-like molecules, (2) the influence of sequences of S-TD reaction, (3) the influence of zinc ions, (4) HPLC analytical method for the evaluation of these models have been investigated. According to these analyses, we emphasize that we need to make a conclusion which would be conflict to the RNA world hypothesis since the replication of RNA could hardly started under the primitive Earth conditions.

研究分野：生命の起源, 分析化学, 生体分子の化学, 熱水反応

 キーワード：RNAワールド 鋳型指示反応 オリゴヌクレオチド 化学反応速度論 生命の起源 化学進化 アストロ
 バイオロジー 原始地球

1. 研究開始当初の背景

生命は「複製」、「変異」、「選択」の3過程によって進化する。これを可能にする最も単純なシステムはRNA型生命である (Biochimie, 2012)。進化工学的にRNAを創成する in vitro selection 法 (Ellington & Szostak, Nature 1990) は、この3過程を含む生物進化のアナロジーであり、ダーウィン進化するRNA生命モデルと見なすことができる。RNA創薬への応用も盛んである。しかし、逆転写PCRなどの人工的要素が必要でありRNAワールド仮説の根拠として大きな課題であった。

従って、進化するRNAシステムを原始的な材料で構築できることを示せばこの問題は解決し、RNAワールド仮説は決定的な仮説となる。逆にRNAが模擬原始地球環境下で化学進化し、上記の3つの特性を発現できなければ、RNAワールド仮説は否定的な評価を受ける。一方で、この3つの要素を持つ人工進化系を構築すれば、RNAの新しい分子進化法の土台となる。

このためには、RNAの(1)ランダム生成、(2)変異を伴う複製、(3)自然選択の各過程を確立しなければならない。我々はこれらの過程を世界に先駆けて研究し、() 粘土鉱物触媒を用いるランダムRNAの生成に成功した (論文投稿中)。さらに、(ii) 鉱物-熱水フローリアクターを開発し、熱安定性に基づくRNAの自然選択法を確立した (Naturwissenschaften 2012)。しかし、原始的RNA複製はOrgelや我々のグループが研究してきたが、まだ誰も成功していない。この化学的原因を研究した結果、酵素がない原始環境でも3鎖長以上のオリゴマーをユニットとすれば複製反応が起こり得ることを知った (BCSJ, 2001; J. Phys. Chem. A, 2008 など)。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 3鎖長(以上)のオリゴマーをユニットとし、マイクロRNAサイズの鋳型を用いることで、複製反応と同時に変異する従来にない原始RNA複製反応を確立する。(2) この複製反応を我々がこれまでに構築したRNAランダム生成および自然選択法と組み合わせることによって、世にまだないダーウィン進化する原始RNAモデルを構築する。

3. 研究の方法

当初の計画では、3塩基をユニットとする鋳型指示反応を土台として、変異を伴う複製(増幅)系を構築し、RNAのランダム生成・自然選択と連結することで、自発的に進化する原始RNA生命システムをつくる。初年度は、3鎖長以上のオリゴヌクレオチドを1ユニットとする鋳型指示反応を構築する。次年度は、その際の変異率を明らかにし変異を伴う複製系とし、鋳型指示反応を

繰り返すことで増幅系を構築して、ランダムRNA生成法と熱水下での自然選択法と統合することで、ダーウィン進化するRNA生命モデルとして動作することを実証する。

具体的には、3塩基をユニットとする鋳型指示反応を構築するために、(1) 種々の塩基を含む5'位リン酸修飾した3鎖長オリゴヌクレオチドを購入または、ホモポリヌクレオチドをNuclease P1等で部分加水分解して調製し、(2) 5'位をリン酸修飾オリゴヌクレオチドをイミダゾールと水溶性カルボジイミド(EDAC)で活性化して鋳型指示反応を行う。相補的なオリゴヌクレオチド存在下で反応させ、種々の配列のユニットで鋳型指示反応の効率を分析する。また、3'-5'結合と2'-5'結合を持つRNAの割合を、酵素分解によって決定する。12鎖長~18鎖長程度の3の倍数の鎖長のオリゴヌクレオチドを鋳型とする。生成物の分析には所有するキャピラリーLCおよび電気泳動装置を用いる。

鋳型指示反応に基づいて変異を伴う増幅系を構築し、システム全体を確立するために、PCRの原理と同様に、 T_m に近い温度での鋳型指示反応を行う。 T_m を挟んだ温度条件でEDAC共存下で降温昇温を繰り返す、方法を試験する。この系によって、生成するRNAの変異率を評価する。さらに、複製・増幅・変異プロセスに、作成済みのランダムRNAの生成、および自然選択過程を結合することによって、自発的に進化する原始RNA生命システムを完成する。この全体システムを用い、申請者が開発した熱水フローリアクターで100程度の原始地球に近い高温下でRNAを自然選択する。

4. 研究成果

(1) 熱ペプチド重合物を用いる鋳型指示反応の検討

鋳型指示反応は、ポリシチジル酸を鋳型として活性化したグアノシン5'-モノリン酸イミダゾリドからオリゴグアニル酸が生成する系でのみ効率良く進む。ここでは、逆の系をモデルとして熱重合ペプチドを用いて鋳型指示反応を試みた。グルタミン酸の熱重合物を180で調製し、ポリグアニル酸を鋳型とし活性化した5'-シチジンモノマーの重合に対する影響を検討した。この結果、この系ではオリゴヌクレオチドの生成は認められなかった。

(2) 18鎖長鋳型オリゴヌクレオチドを用いる6鎖長モノマーの鋳型指示反応の検討

グアニン、アデニン、シトシン、ウラシルを塩基として持つ、6鎖長のホモオリゴヌクレオチドをモノマーとして、それに対する相補的な塩基からなる18鎖長鋳型を用いて、オリゴヌクレオチドの重合反応挙動を検討した。水溶性カルボジイミド(WSC)を用いイミダゾール共存下でリン酸基を活性化す

る手法を用いた。生成物を前処理せずに HPLC 分析したところ、オリゴヌクレオチドが重合した形跡は認められなかった。一方で、この反応では原料あるいは生成物がワトソン-クリック型の相補的な塩基対を形成し、HPLC 分析を阻害した可能性が推定された。そこで、90 で 3min 加熱して分析する手法を試みたが、鑄型を完全に解離する条件を見いだすことができなかった。鑄型の有無によるクロマトグラムの比較を詳細に行った。しかし、これらの結果からは、これらのホモオリゴヌクレオチドが反応し、12鎖長あるいは18鎖長へと伸長する証拠は得られなかった。

(3) 鑄型非存在下での環化反応の検討

6鎖長程度の活性化したオリゴヌクレオチドは環化することを我々の過去の研究において報告した。そこで、鑄型が存在しない条件下での反応を行った。オリゴヌクレオチドの鎖長として、2鎖長、3鎖長および6鎖長のオリゴヌクレオチドについて、WSC 存在下で、生成物の変化を HPLC で分析した。この結果、これらの系においても環化が進行している証拠は得られなかった。また、これらに対して、相補的な塩基対を形成する12鎖長オリゴヌクレオチドを鑄型として共存させ、反応の有無を調べた。しかし、これらについても反応が進行したことを示す証拠は得られなかった。

(4) 鑄型指示反応に対する Zn^{2+} イオンの影響

鑄型指示反応においては Zn^{2+} あるいは Pb^{2+} などが反応を促進することが知られている。そこで、上述の2~6鎖長のオリゴヌクレオチドをユニットとする鑄型指示反応に対する Zn^{2+} の影響を検討した。しかし、これらにおいてもオリゴヌクレオチドが重合したことを示す根拠は得られなかった。

(5) まとめ

以上の結果からは、鑄型指示反応によって RNA が効率良く生成する系を見いだす条件は得られなかった。すなわち、鑄型指示反応は特定のモノマーとそれに対する相補的な鑄型オリゴヌクレオチドから構成される系においてのみ有効であって、ユニバーサルではない可能性を示唆するものである。すなわち、RNA ワールドの形成までの化学進化過程については、さらなる化学進化実験が行われなければならない。また、RNA ワールドの化学進化過程において、効率良い経路の発見が必要とされる。

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3件)

1. Kunio Kawamura, Marie-Christine Maurel,

Walking over 4 Gya: Chemical evolution from photochemistry to mineral and organic chemistries leading to an RNA world, *Origins Life Evol. Biopsheres*, on line first. DOI 10.1007/s11084-017-9537-2 (査読有り)

2. Kunio Kawamura, A hypothesis: life initiated from two genes, as deduced from the RNA world hypothesis and the characteristics of life-like systems, *Life* 2016, 6(3), 29; doi:10.3390/life6030029 (registering DOI) - published 2 August 2016. (査読有り)
3. Kunio Kawamura, Laura Da Silva, Mari Ogawa, Noriko Konagaya, and Marie-Christine Maurel, Verification of chemical evolution of RNA under hydrothermal environments on the primitive Earth, *BIO Web of Conferences* 4, 00011 (2015). DOI: 10.1051/bioconf/20150400011 (査読有り)

[学会発表](計11件)

1. A l'occasion de deux conférences données le lundi 7 septembre 2015 dans le cadre de l'accord JSPS-CNRS porté par Marie-Christine MAUREL Professeur de Biologie UPMC et MNHN, Kunio Kawamura, Professeur à l'Hiroshima Shudo University « Experimental verifications of the chemical evolution of RNA and proteins from the viewpoint of primitive hydrothermal environnements ». (Invited)
2. Opening remarks: Drawbacks on the chemical evolution of RNA, Kunio Kawamura, "The international Seminar on the Origin of Life and Chemical Evolution of RNA" in Hiroshima Shudo University, 2015年10月30日, 広島
3. Kunio Kawamura, Drawbacks regarding the chemical evolution of biopolymers under the primitive hydrothermal earth environments, *Pacificchem* 2015, December 15-20, 2015, Honolulu.
4. Kunio Kawamura, Difficulty of spontaneous formation and replication of oligonucleotides containing 4 kinds of nucleotide residues using the monomeric activated nucleotides, *Pacificchem* 2015, December 15-20, 2015, Honolulu.
5. 熱水環境下におけるペプチド伸長反応に対する鉱物の効果およびより低温下でのペプチド伸長反応, 川村邦男・丸岡佳美・小長谷紀子, 生命の起原および進化学会第41回学術講演会, 2016年3月14-16日, 鳴門.
6. Kunio Kawamura, Roles of minerals for the chemical evolution of RNA and peptides under the primitive hydrothermal earth environments, *CECAM Atomistic*

simulations in prebiotic chemistry – a dialog between experiment and theory at University Pierre and Marie Curie, June 20-22, Paris. (Invited)

7. Kunio Kawamura, Oligopeptide formation in the presence and absence of naturally occurring minerals under the hydrothermal environments, European Astrobiology Network Association (EANA), September 27-30, Athens.
8. Kunio Kawamura, Chemical Evolution of RNA and peptides under the extreme ancient Earth environments, Seminar at Sandrine Sagan Laboratoire des BioMolecules-LBM, UMR 7203 CNRS-ENS-UPMC, February 15, 2017. (Invited)
9. Kunio Kawamura, Origins of life on the Earth in 4.6 billion years towards modern civilizations, Conference, Maison Universitaire France-Japon, February 16, 2017. (Invited)
10. Kunio Kawamura, Chemical evolution and the origin of life in relation to the enzymatic and informational molecules, Seminar for Master's students invited by Professor Dominique Guianvarc'h, UPMC, February 17, 2017. (Invited)
11. 仮説：生命は2つの遺伝子から始まった，川村邦男，生命の起原および進化学会 第42回学術講演会，2017年3月28-30日，飯塚．

〔図書〕(計1件)

1. Kunio Kawamura, Chapters “Activated Nucleotide”, “Nucleotide Phosphirimidazolide”, and “Oligonucleotide”, in “Encyclopedia of Astrobiology”, Eds. by M. Gargaud, W. M. Irvine, R. Amils, J. Cernicharo Quintanilla, H. J. Cleaves, D. Pinti, D. Rouan, T. Spohn, S. Tirard, M. Viso, 2763p, Springer, 2015. 1- 1853p. (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

(4)研究協力者

Marie-Christine Maurel

University Pierre and Marie CURIE・Institut de Systématique, Evolution, Biodiversité・教授

小長谷紀子 (KONAGAYA NORIKO)

安田女子大学・家政学部・准教授

丸岡佳美 (MARUOKA YOSHIMI)