

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H02015

研究課題名（和文）水が引き起こす化学進化-高分解能AFMによる前生物的RNA合成のその場観察-

研究課題名（英文）Chemical evolution induced by water -in situ observation of formation of prebiotic RNA by high-resolution AFM-

研究代表者

荒木 優希（Araki, Yuki）

金沢大学・数物科学系・助教

研究者番号：50734480

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、脱水反応であるRNAの形成が原始海洋中で起こりうるか解明すべく、触媒と考えられている鉱物表面の水、およびそれに対する溶存イオンの効果を原子スケール観察によって明らかにすることを目的とする。触媒鉱物表面でのヌクレオチドの吸着挙動とその際の鉱物表面の水和構造を周波数変調原子間力顕微鏡で高分解その場観察した結果、溶存するマグネシウムイオンがヌクレオチドの吸着を顕著に増大させ、そのとき鉱物表面の水の構造が変化していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マグネシウムは生体内の酵素活性、結石の析出防止剤、整腸剤など水溶液中で起こる現象に非常によく使われている。マグネシウムが用いられる必然性は明らかにされていないが、本研究で着目した「物質表面の水への影響」がこれらの機構に関わっている可能性が高い。身近な物質であるため、近年、マグネシウムは石油掘削の潤滑剤や生分解性材料等、新たな活路を見出されており、マグネシウムが固体表面の水に及ぼす影響を継続して研究することで、これらの応用技術への波及効果が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to reveal the behavior of water on mineral surfaces and the effect of dissolved ions on the interfacial water by atomic-scale observations in order to elucidate whether RNA formation, a dehydration reaction, can occur in the primitive ocean. The adsorption of nucleotides on the surface of catalytic minerals and the hydration structure of the mineral surface during the adsorption process were observed in situ at high resolution using frequency modulation atomic force microscopy, which revealed that dissolved magnesium ions significantly increase the adsorption of nucleotides and change the hydration structure of the mineral surfaces.

研究分野：界面科学

キーワード：水和構造 前生物的RNA 周波数変調原子間力顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

RNA は、遺伝情報の蓄積と生体反応の触媒の両方を担う分子として、生命の起源に最も重要な生体高分子と考えられている。我々の体を構成する RNA は、DNA を鋳型としてタンパク質酵素によって生成されるが、生命誕生当初の RNA (前生物的 RNA) の形成は、DNA やタンパク質酵素なしにヌクレオチドが重合したと考えられる。この重合反応の触媒物質として、粘土鉱物^[1]やアルカリ土類金属、遷移金属などの金属イオン^[2]が有力視されており、Ferris らが行った、粘土鉱物 (モンモリロナイト) を添加した NaCl および MgCl₂ 水溶液中でのヌクレオチドの重合実験では、最大で 55 量体の前生物的 RNA が確認されている^[3]。しかし、ヌクレオチドの重合は脱水反応であるため、水中で重合に成功した報告例は極めて少なく、海洋中で前生物的 RNA が形成されたという説には否定的な意見が多い。実際に、Ferris らの実験ではヌクレオチドを化学的に活性化させたイミダゾリドを用いて実験が行われており、非活性のヌクレオチドでは重合反応が起こらないと言われている。このように、前生物的 RNA の形成過程や形成環境について統一的な見解が得られていない。これは、水中での反応にも関わらず、これまでの研究では界面水の影響が十分に考慮されていないためであると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、高分解能の周波数変調原子間力顕微鏡 (FM-AFM) を用いて RNA 形成 (ヌクレオチドの重合) 過程における水の挙動を分子スケールで観察し、ヌクレオチドや粘土基板表面の水に対する触媒効果を明らかにすることを目標とした。我々はこれまでに FM-AFM を用いて炭酸カルシウム結晶の水和構造をマグネシウムイオンが顕著に変化させる [論文準備中] ことや、粘土鉱物表面にイオンが吸着する際に、水の存在下で吸着イオンの分布が秩序的になるという知見を得た^[5]。これらが水中での前生物的 RNA 形成における触媒効果であると仮説を立て、ヌクレオチド表面が金属イオンによって局所的に脱水すること、水の存在によって粘土表面にヌクレオチドが秩序的に吸着することを明らかにし、生命起源における水の重要なはたらきを明らかにする。脱水反応である RNA の形成が原始海洋中で起こりうるか解明すべく、触媒と考えられている鉱物表面の水、およびそれに対する溶存イオンの効果を FM-AFM による高分解観察によって検証した。

3. 研究の方法

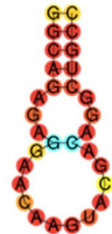
本研究では、水中でどのようにヌクレオチドの重合が安定して起こるのか? という問題を解明すべく、鉱物触媒としてマイカ、モンモリロナイト、カルサイトを、金属イオン触媒としてカルシウムイオン、マグネシウムイオンを用い、各種鉱物表面への糖分子 (RNA の材料) の吸着、および鉱物基板表面の水和構造観察を行った。観察には FM-AFM を用い、固体表面の構造や固液界面の水を原子・分子スケールで観察した。生体分子としてヌクレオチドに加え、同じく糖分子であるリボースを比較のため用いた。ヌクレオチドオリゴマーはファスマック社に合成を依頼し、リボースは試薬 (ナカライテスク社製) を用いた。まずは生体分子を溶かした純水中 (すべて RNase free water、ナカライテスク社製) で粘土表面を観察し、その後濃度調整した塩化カルシウムや塩化マグネシウム水溶液を加えて粘土基板表面の変化をその場観察した。濃度など観察条件の詳細は研究成果の項で個別に記載する。探針は市販のシリコンカンチレバー (NanoSensors、PPP-NCH、ばね定数 40 N/m) を用い、観察は 25 の恒温槽内で行った。

4. 研究成果

(1) ヌクレオチドオリゴマーの粘土表面への吸着に対する電解質の影響

重合反応の触媒の一つとされる粘土鉱物として、マイカとモンモリロナイトを基板に用いた。両者ともに天然に産する鉱物で、世界中で普遍的に見られるものである。前述の Ferris らの重合実験ではモンモリロナイトが用いられている。2 量体と 30 量体の 2 種のヌクレオチドオリゴマーを準備し、これらをそれぞれ純水中に分散させ、その液中で粘土鉱物表面を FM-AFM でその場観察した。モンモリロナイト上では 2 量体を捉えることに成功したが、一方で 30 量体の吸着は観察されなかった。個々の吸着分子の形態の特徴を捉えることは困難であったが、吸着物の高さが約 4 nm であり、過去に AFM で観察された RNA の高さと同様であった。マイカ上でも同様の観察を行ったところ、30 量体の溶液中で球状の凝集体が多数観察された。これは、オリゴマーの側鎖同士が結合してしまったことに起因すると考えられ、長いオリゴマーに特有の現象であることが窺える。30 量体オリゴマーの吸着を見ると、マイカの方がモンモリロナイトよりも吸着力が高い。どちらの鉱物も結晶構造学的要因から表面は負に帯電しているが、マイカの表面電荷密度の方がモンモリロナイトより大きいため、オリゴマーの吸着が起こりやすいと考えられる。また、DNA など生体高分子を観察した先行研究では電解質溶液を用いており、マグネシウム (Mg^{2+}) やニッケル (Ni^{2+}) イオンが基板と生体高分子のリンカーとなると考えられている。マイカ、モンモリロナイトのいずれも基板上での吸着物の分布や配向には規則性が見られなかった。

次に、電解質水溶液中での吸着挙動の変化を検証した。前述したように、直鎖型の長いヌクレオチドオリゴマーは凝集してしまうため、不純物との判別がつきにくい。そのため、特徴的な形状になるようにヌクレオチドオリゴマー（以下、合成オリゴマーと呼ぶ）（図 1）を設計し、マイカ基板上への吸着挙動に対する電解質の影響を評価した。



合成オリゴマーを 100 $\mu g/mL$ 、もしくは 1 $\mu g/mL$ 溶かした純水中でマイカ基板表面を観察したところ、吸着物は一切見られなかったが、そこにイオン濃度が系全体で 100 mM になるよう塩化マグネシウム水溶液を加えたところ、直ちにマイカ基板が吸着物で埋め尽くされる様子が観察された（図 2）。吸着物が観察視野全面に 2 次元膜状に吸着したため、個々の吸着物の形態は確認できなかった。同様に、塩化カルシウム水溶液を添加した系でも観察を行ったところ、吸着物は観察されたが、マグネシウムイオンほどの吸着促進効果は見られなかった。

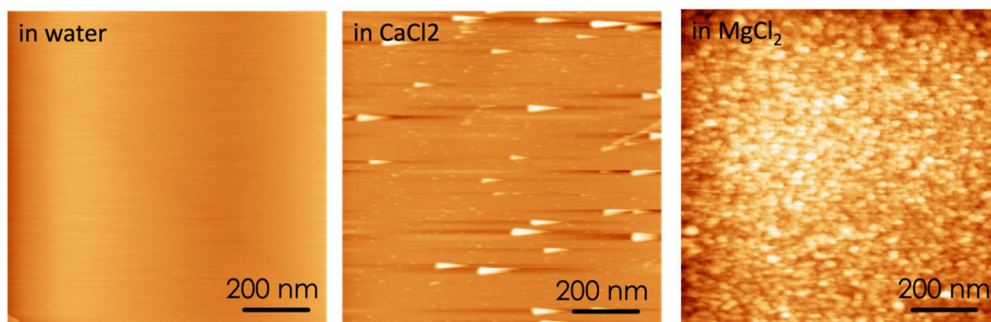


図 2 マイカ上への合成オリゴマーの吸着。左から純水中、塩化カルシウム溶液中、塩化マグネシウム溶液中。

合成オリゴマーだけでなく、直鎖型の五炭糖である D リボースを用いて同様の実験を行なったところ、合成オリゴマーの時と同様に純水中では吸着が見られなかった一方、電解質水溶液中で吸着量が増大し、塩化マグネシウム水溶液中の方が塩化カルシウム水溶液中よりも吸着量が

顕著に増大することがわかった。また、合成オリゴマーおよびリボースの吸着を炭酸カルシウム結晶(カルサイト)表面でも観察を行なったところ、塩化マグネシウム水溶液中での吸着量の増大が同様に観察された。カルサイト上ではマグネシウムイオンの存在下でもマイカ上のように観察視野全体を覆うほどの吸着は見られなかったが、これは観察したマイカ(001)面に比べ、カルサイト(104)面の表面電荷密度が小さいことに起因すると考えられる。一般的には、溶液中の電解質は基板表面に吸着し、さらに生体高分子と結合してリンカーの役割を果たすと考えられているが、基板表面への電解質の吸着量は基板の表面電荷密度に依存し、電解質自体の表面電荷密度には依らない。しかし、本研究の観察では電解質の種類に依存して吸着量に変化が見られた。したがって、本研究では冒頭で述べたとおり、電解質は基板表面の脱水和エネルギーを下げる効果があると予測しており、電解質の水分子との結合力(水和エネルギー)の違いに応じてその効果に変化が生じると仮説を立てた。

(2) 電解質が基板結晶の水和構造に与える影響

マグネシウムイオンの存在下でのヌクレオチドの吸着量増大と基板鉱物表面の水和構造との関係を明らかにするため、塩化マグネシウム溶液中でのカルサイト表面近傍の水和構造観察を行った。マイカ表面でも同様の観察を行なったが、マイカの場合には表面のSi-O四面体で構成される六員環の中心にカチオンの吸着が起こってしまうため、本研究で想定している溶存するイオンによる水和構造変化を検証するためには最適でないと判断した。本研究課題開始以前に行なった水和構造観察から、0.1M溶液中でカルサイトの第一水和水の3次元分布が塩化マグネシウム水溶液中で顕著に変化し、さらに第一水和水からの探針に対する斥力が増大することがわかっている。この結果から、固液界面を拡散するマグネシウムイオンが水和構造を擾乱する効果がある(=実効的に結晶表面の脱水和エネルギーを下げる)と仮説を立て、その仮説が真ならばマグネシウムイオンの濃度が大きければより水和層の面内構造に変化が見られるはずであると予測し、3Mの高濃度水溶液中で観察を行った。3次元の水和構造イメージは得られなかったが、塩化カルシウム溶液中、塩化マグネシウム水溶液中ともに2次元の水和構造イメージでは結晶表面に平行な面内での水分子の分布に0.1Mの時と大きな変化は見られなかった。塩化マグネシウム水溶液中で、カルサイト結晶表面に最近接の第一水和水からの斥力が増大していること明らかとなった(図3)。しかし、0.1Mの結果と比較すると、第一水和斥力の増大比率には濃度依存性は見られなかった。これは、0.1Mでも固液界面でのマグネシウム濃度が飽和している可能性を示唆する。なお、マグネシウムイオンの存在下で水和斥力が増大する現象はマイカ上の水和構造観察でも見られた。

共同研究者である前川祐毅博士、山本貴博教授(東京理科大学)による分子動力学計算では、4Mの塩化マグネシウム水溶液中でカルサイトの第一水和層の周期構造が乱れる結果が得られており、今後、実験データとの照合を行って界面におけるマグネシウムイオンの挙動、それに伴う水和構造変化によってもたらされる脱水和エネルギーの変化について継続して研究していく。

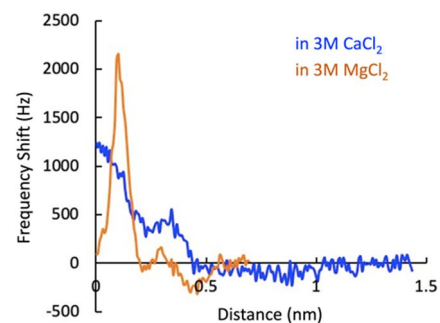


図3 カルサイト上の水和構造の周波数シフトカーブ。青線が塩化カルシウム溶液中、塩化マグネシウム溶液中。

<引用文献>

- Ferris and Ertem (1992) *Science* **257**, 1387-1389.
Sawai (1976) *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 7037-7039.
Ferris, Hill, Liu and Orgel (1996) *Nature* **381**, 59-61.
Araki *et al.*(2017) *Surf. Sci.* **665**, 32-36.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 荒木優希、塚本勝男、高木良介、宮下知幸、大藪範昭、小林圭、山田啓文	4. 巻 65
2. 論文標題 炭酸カルシウム結晶の相転移過程における水和構造その場観察	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 表面と真空	6. 最初と最後の頁 520 ~ 525
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1380/vss.65.520	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 荒木優希、古川善博
2. 発表標題 マグネシウムイオンによる水和構造変化に起因する 粘土上へのヌクレオチド吸着
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合2021年大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒木優希
2. 発表標題 周波数変調原子間力顕微鏡による 固液界面その場観察 - 鉱物-水-生命の関係を原子スケールで紐解く -
3. 学会等名 WaTUSイブニングセミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒木優希
2. 発表標題 バイオミネラリゼーションにおける 界面のミクロ構造研究の重要性
3. 学会等名 第4回日本表面真空学会若手部会研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒木優希, 小林圭, 山田啓文
2. 発表標題 添加物による水和構造への影響
3. 学会等名 第49回日本結晶成長学会国内会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Araki
2. 発表標題 Prebiotic RNA evolution in liquid environment -in situ observation by FM-AFM-
3. 学会等名 Virtual ELSI Colloquium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Araki, Masahiko Okumura, Yasunobu Ando, Kei Kobayashi, Hirofumi Yamada
2. 発表標題 Influence of interface water of clay minerals on ion adsorption
3. 学会等名 12th International Symposium on Atomic Level Characterizations for New Materials and Devices '19 (ALC '19) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Araki, Masahiko Okumura, Yasunobu Ando, Kei Kobayashi, Hirofumi Yamada
2. 発表標題 Atomic-scale Visualization of Ion Behavior on Clay Minerals
3. 学会等名 International Conference on Crystal Growth and Epitaxy (ICCGE-19) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荒木優希, 奥村勝彦, 安藤康伸, 小林圭, 山田啓文
2. 発表標題 周波数変調原子間力顕微鏡による粘土表面のセシウム吸着の原子スケールその場観察
3. 学会等名 第47回可視化情報シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

立命館大学メソスコピック物理学研究室webページ http://mesoscopic.site

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
研究分担者	古川 善博 (Yoshihiro Furukawa) (00544107)	東北大学・理学研究科・准教授 (11301)	

	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
研究協力者	山本 貴博 (Yamamoto Takahiro) (30408695)		
研究協力者	前川 侑毅 (Maekawa Yuki)		

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
---------	---------