

機関番号：24403

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20540476

研究課題名（和文） 鉱物触媒熱水フローリアクターの開発とペプチドの化学進化の解析

研究課題名（英文） Development of Mineral-mediated Hydrothermal Flow Reactor and its Application to the Analysis of Chemical Evolution of Peptides

研究代表者

川村 邦男（KAWAMURA KUNIO）

大阪府立大学・工学研究科・助教

研究者番号：50204772

研究成果の概要（和文）：生命は原始地球の熱水環境で出現したと考えられている。しかし、そのような環境下でどのようにしてタンパク質のような生体有機物が出現したのかは不明であった。本研究では我々がこれまで構築した熱水フロー技術を発展させ、深海底熱水噴出孔をリアルに再現し、その短時間過程の観測法を開発した。本法を用いて、我々が2005年に発見したペプチド生成反応に対する天然鉱物の効果を解析し、炭酸塩鉱物がペプチド生成反応を促進することを見出した。

研究成果の概要（英文）：It is considered that a first living organisms had been emerged under hydrothermal conditions on the primitive earth. However, the mechanism how biologically important organic compounds, such as proteins, had formed under such conditions was not clearly described. Here, the hydrothermal flow reactor technology, which was established in our group, was improved and a new monitoring method was successfully developed for simulating the hydrothermal vent system as a realistic model. By using this method, the activities of naturally occurring minerals for the peptide formation reaction, which was discovered in our group at 2005, were analyzed and we found the fact that carbonate minerals possess enhancement activities for the peptide formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分析化学

科研費の分科・細目：地球惑星科学・地球宇宙化学

キーワード：宇宙科学，地球化学，化学進化，分析化学，生体分子，鉱物，ペプチド，アミノ酸

## 1. 研究開始当初の背景

化学進化によって生命が出現した過程を解明することは宇宙地球化学における重要

な課題である。近年、生命は深海底熱水噴出孔のような超高温の海水中で誕生したとする熱水起源説が有力となった。日本では熱水

噴出孔を模したフローリアクターが世界に先駆けて開発され、アミノ酸からペプチドが生成することも確かめられた[1-3]。しかしペプチドの生成効率は0.01~1%とかなり低い。もし熱水起源説が正しいのならばもっと効率的なペプチドの生成経路があったはずであるが、まだその経路は見つかっていない。この主な原因は以下の4つである。

(1) 一般的なフローリアクターで追跡できる反応は最短で数十秒から数分間であり、ミリ秒~数秒間で起こる高速過程は調べられない。

(2) アミノ酸はカルボキシル基とアミノ基の2つの官能基を持つので、伸長とともにペプチド鎖の両端の脱水によって環化し、2鎖長のペプチドからはジケトピペラジンが生成し、これは長鎖のペプチドを生成する障害であった。

(3) ペプチドの原始的生成には鉱物触媒が働き得ることも知られている。また、実際の熱水噴出孔は鉱物の隙間を熱水が通過する。すなわち、鉱物触媒があればより効率的に反応が起こるかも知れないが、その過程を調べる方法はなく、熱水噴出孔の模擬実験は鉱物を含まない反応に限られてきた。

(4) ペプチドの生成反応は脱水反応であり、熱水中では熱力学的に不利な反応である。

以上を解決するために、我々は1995年から、①熱水フローリアクターの開発と展開、②核酸およびタンパク質の化学進化を研究し、世界に先駆けてこれらの分野の新しい知見を蓄積した。その結果、ミリ秒レベルの反応を追跡できる世界最高性能の熱水フローリアクターを確立した。またジケトピペラジンの生成を避ける経路として、A：4鎖長のアラニンペプチドから5~20秒、250~310℃で5鎖長へと伸長する反応、およびB：アスパラギン酸とグルタミン酸から、約20鎖長のペプチドが数10秒間で生成する反応を発見した。上記の問題点を部分的に解決した。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者のフローリアクター技術と2つの反応に基づいて問題(3, 4)を解決し、原始ペプチドの生成経路を発見しその化学進化過程を明らかにすることを目的とする。

(1) 鉱物触媒熱水フローリアクターの開発と検証

本研究では、反応器への鉱物の一般的な充填法と、反応器内壁への鉱物の固定化法または

鉱物固定化金属粒子の充填法を検討・確立し、鉱物触媒の存在下でミリ秒レベルで反応を行える世界初の鉱物触媒熱水フローリアクターを開発する。

(2) 鉱物触媒熱水フローリアクターを用いる高効率ペプチド生成経路の探索

①ペプチド生成反応に対する鉱物触媒の効果を探索的に調べ、従来と比べて格段に効率的な原始的ペプチド生成反応の発見をめざす。

②アミノ酸からのペプチドの生成反応が平衡論的に有利になるように、脱水剤の効果を調べる。

## 3. 研究の方法

(1) 装置の製作：350℃程度の高温下で触媒存在下での反応を実施できる新しいシステムを開発する。本システムは、高圧ポンプ、試料注入器、加熱反応器、冷却器、背圧調節器からなる。今回は触媒を充填した加熱反応器を新たに開発する。加熱反応器は本学で自作する。

①反応器：試料が高温反応器に滞在する時間をミリ秒程度に保ち、温度350℃、耐圧性能300気圧を目標とする。従って、反応器は管型で内容積が小さいものが必要である。

②触媒充填法：反応器は、高速液体クロマトグラフ用の中空カラムを用いる。パッキングの部分だけを冷却することで全体として高温に耐える構造とする。

③鉱物固定化法：中空カラムの金属内壁に鉱物の固定化をする、あるいは鉱物を固定化した金属ビーズの充填法を試みる。

(2) 装置の評価：触媒充填したシステムの加熱可能な時間と温度を評価する。

(3) 効率的なペプチド伸長反応の発見をめざしたペプチド伸長反応の探索

オリゴアラニンペプチドの伸長反応に対する鉱物と脱水剤の効果を調べる。

①鉱物触媒作用の検討：天然鉱物を一定粒径に粉砕し活性を調べる。

②脱水剤の検討：ポリリン酸、シアナミド、ジシアンアミド、ジアミノマレオニトリル、カルボジイミドなどの効果を検討する。

③アミノ酸およびペプチドの種類の影響：アミノ酸モノマーおよびオリゴアラニン種類の影響を調べる。

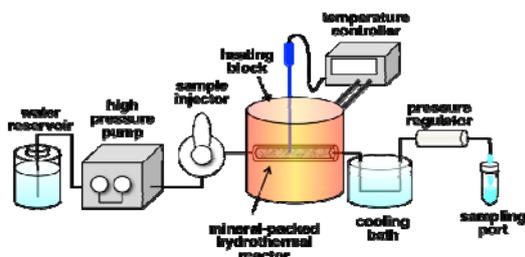
④生成物の分析法

高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、電気泳動、および質量分析装置(MALDI-MS)を用いて生成物を分析する。

## 4. 研究成果

(1) これまでに開発したリアクターシステ

ムの概念を踏襲するとともに、リアクター内に鉱物粒子を充填した新しいシステムを構築した。概念を次図に示す。本システムの基本性能を調べるために、リアクター内部に反応に対して不活性であると推定される石英を充填し、高温下で使用可能であることを確認した。この結果、本リアクターは3~200秒間の滞在時間で、少なくとも300°C、30 MPaで反応追跡できることを確認した。これに基づいて研究して以下のような結果を得た。



(2) アラニン4量体が高温下で分解する過程でその一部が5量体に伸長する現象について以下を検討した。

①縮合剤として、水溶性カルボジイミドを用いた。カルボジイミドの基本骨格は原始的な環境で生成し得ることも分かっている。しかしながら水溶性カルボジイミドは高温下で速やかに分解するために、高温下では縮合剤の機能を果たさないことが分かった。今後、例えば耐熱性の縮合剤あるいは活性化剤が必要であるが、概してそのような活性の高い物質は水中で分解しやすい。従って、息の長い検討が必要であろう。

②末端を修飾したアミノ酸モノマーあるいはジペプチドを原料として用いることで、DKP類の生成を抑えられるのではないかと期待した。アミド化したアラニンおよびN末端をアセチル化したアラニン2量体を用いた結果、DKPの生成は起こりにくかった。しかし、オリゴペプチドが生成しやすくなるという結果は得られなかった。

③アラニン4量体から5量体が生成する反応系をモデルとして、鉱物の効果を調べた。鉱物として、石英砂、トルマリン、カルサイト(3種類の産地)、ドロマイト、雲母、パイライト、カルコパイライト、スファレライト、ガレナ、アパタイト、モンモリロナイトを用いた。これらの鉱物は、企業からいただいたもの、あるいは購入したものである。最初からパウダーのものは、そのまま使い、かたまりのものは乳鉢ですりつぶした。これらを篩にかけて分粒し、適当なサイズのを内径1.5 mmのチューブに充填した。両端に金属メッシュフィルターをつけ、固体の漏れないこと及び送液がスムーズであることを確認した。これらをリアクターにセットし、高温下での反応を追跡した。リアクター内を

試料溶液が通過する時間は、ポンプの流速を変えて3~200秒に調節した。これらの鉱物の中でカルサイトあるいはドロマイト共存下ではアラニン5量体の生成量は増加し、より鎖長の大きいと推定されるオリゴペプチドの量は増加した。一方、硫化物鉱物は生命の出現において重要な役割を果たしたとする仮説が提唱されているが、本研究で検討した、ガレナ(方鉛鉱)、スファレライト(閃亜鉛鉱)、カルコパイライト(黄銅鉱)、およびパイライト(黄鉄鉱)にはアラニン5量体の生成を促進するという証拠は検出されなかった。論文投稿中なので詳細については説明を割愛する。

④本研究では、熱水と鉱物が接触する中でどのような化学進化が起こったかということ調べる方法論として、新しく鉱物を充填した熱水フローリアクターを開発し、300°Cで3~200秒の反応を追跡できることを確認した。これは熱水反応に対する鉱物の役割とその秒スケールでの反応過程を追跡する世界最初の方法論である。またこの新手法を用いて、我々が発見していたアラニン4量体の伸長反応を炭酸塩鉱物が促進することを見出した。

## 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9件)

- ① 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.
- ② 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, 37, 2010 in press.
- ③ 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.
- ④ 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.

- ⑤ 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.
- ⑥ 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.
- ⑦ Kunio Kawamura, Hitoshi Takeya, Takao Kushibe, Effect of condensation agents and minerals for oligopeptide formation under mild and hydrothermal conditions in related to chemical evolution of proteins, Advances in Space Research, 査読あり, 44, 267-275, 2009.
- ⑧ Kunio Kawamura, Jun Maeda, Kinetics and activation parameter analysis for the prebiotic oligocytidylate formation on Na<sup>+</sup>-montmorillonite at 0 - 100 °C, J. Phys. Chem. A, 査読あり, 112, 8015-8023, 2008.
- ⑨ Kunio Kawamura, Masanori Shimahashi, One-step formation of oligopeptide-like molecules from Glu and Asp in hydrothermal environments, Naturwissenschaften, 査読あり, 95, 449-454, 2008.

[学会発表] (計 19 件)

- ① 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.
- ② 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.
- ③ 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.
- ④ 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)
- ⑤ 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原」(木津川), 2010 年 2 月 26 - 27 日 (招待講演).

- ⑥ 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原」(木津川), 2009 年 12 月 11 - 12 日 (招待講演).
- ⑦ 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原」(木津川) 2009 年 9 月 25-26 日 (招待講演).
- ⑧ 川村邦男・竹家均・榎部崇夫, 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.
- ⑨ 川村邦男, 化学の冒険: 生命の起原への挑戦, 第 201 回自然環境論セミナー (神戸大学) (神戸), 2008 年 12 月 10 日 (招待講演).
- ⑩ 竹家均・川村邦男・八尾俊男, マイクロフロー高温高压液相反応分析法の展開: オリゴペプチドの水熱合成, Separation Sciences 2008 (分離と検出の科学) (野田), 2008 年 11 月 13 - 14 日.
- ⑪ 川村邦男・竹家均・嶋橋政徳・秋吉藍・西輝之・崎山智文, 熱水マイクロフローリアクターを用いるオリゴペプチドの非生物的生成反応の速度解析, 2008 年度日本地球化学会年会 (東京), 2008 年 9 月 17 - 21 日 (依頼講演).
- ⑫ Kunio Kawamura, Hitoshi Takeya, Ai Akiyoshi, Masanori Shimahashi, Oligopeptide formation under hydrothermal conditions using a micro-flow hydrothermal reactor, 15th International Conference on the Origin of Life: 12th ISSOL meeting, Florence, Italy, 24 - 29 August 2008.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 固体充填フロー型高温高压液相反応装置およびオリゴペプチドの合成法

発明者: 川村邦男

権利者: 大阪府立大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-21576

出願年月日: 平成 22 年 2 月 2 日

国内外の別: 国内

名称: オリゴペプチドの製造方法

発明者: 川村邦男

権利者: 大阪府立大学

種類：特許

番号：特願 2009-248365

出願年月日：平成 21 年 10 月 29 日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川村 邦男 (KAWAMURA KUNIO)

大阪府立大学・工学研究科・助教

研究者番号：50204772