

PREBIOTIC OLIGOMERIZATION OF AMINO ACIDS UNDER HYDROTHERMAL ENVIRONMENTS

Eiichi Imai and Hajime Honda

Department of Bioengineering, Nagaoka University of Technology
1603-1 Kamitomioka-machi, Nagaoka, Niigata, 940-2188, JAPAN
imai@vos.nagaokaut.ac.jp

(Received: July 29, 2010; Accepted: October 26, 2010)

(Abstract)

We have been focusing on the chemical and physical environments in the vicinity of hydrothermal vents in the primitive ocean with regard to the chemical evolutions of life. We used a flow reactor that was constructed for simulating the pressure and temperature conditions of the hydrothermal vents. In the flow reactor, a high-temperature high-pressure fluid at 200 °C, 24 MPa was injected into a low temperature (0 °C, 24 MPa). Temperature gradient should exist at the interface between high- and low-temperature fluids in the low-temperature chamber. Identification of the oligomeric products was made with the aid of an HPLC analysis.

The yield of diglycine was adopted as an index for the capacity of oligomerization. The amount of oligomerization was found to depend on the quenching rate of the temperature. Furthermore, the rate was enhanced by the presence of proteinoid microspheres made from five kinds of amino acids. These results suggest that both chemical and physical environments at none-equilibrium states should have a powerful effects on the prebiotic oligomerizations of amino acids during chemical evolutions of life on the primitive Earth.

(Keyword)

chemical evolution, hydrothermal vents, flow reactor, oligopeptide, non-equilibrium

海底熱水噴出孔の熱水環境 とアミノ酸の重合

今井栄一, 本多 元
長岡技術科学大学・生物系
940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1
FAX 0258-47-9439
imai@vos.nagaokaut.ac.jp

1. はじめに

生命は、単純な有機化合物がより複雑な化合物へと変化し、やがて自己複製機能や代謝機能を持った系が自然発生的に出現した、とする化学進化が提唱されてきた。化学進化にはいくつかの段階があり、アミノ酸のような低分子化合物が重合して高分子化合物へと変化する過程を考えたとき、どのような環境でアミノ酸重合反応が進行したかを実験的に検証しなければならない。原始地球環境下でアミノ酸の重合が起りそうな場としては高温の原始海洋中[1]や海洋中の鉱物表面[2]、もしくは原始海洋と原始大気との境界面である干潟[3]などを想定した実験が為されてきた。

化学反応が持続するためにはエネルギーと物

質の供給が欠かせない。その中でエネルギー形態として原始地球上において容易なものとして熱エネルギーが挙げられ、原始海洋中の熱エネルギーの供給源の一つとして海底熱水噴出孔が考えられる。1978年に海底熱水噴出孔が発見され、噴出孔近傍には独自の生態系が存在していることから化学進化の舞台ではないかと注目されるようになった。海底熱水噴出孔から噴き出してくる熱水には還元ガスの濃度が通常の海水に比べて高く、多種の金属が大量に溶け込んでいる[4]。熱エネルギーの供給と相まって、化学反応が進行しやすい環境が熱水噴出孔近傍において実現されている。この海底熱水噴出孔の環境を想定した高温高圧環境における実験もなされてきた[5]。海底熱水噴出孔近傍の環境では高温の熱水が噴出孔の周りの冷水によって急冷されることによる生成物の分解の抑制が期待できる[6]。本研究で着目するのは一貫して熱水が冷水中に噴出する反応の場であり、そこではエネルギーと物質双方がたえず供給され、非平衡な環境が持続している。

2. フローリアクター

海底熱水噴出孔の熱水環境を実現するため、最大 30 MPa の圧力で最高 350 °C の熱水が冷水中に噴き出す装置を造った[7]。これをフローリアクターと呼んでいる。基本構成を Fig. 1 に示す。実際の運転時には無脈流送液ポンプで溶液をチャンバーに送り、最下流部に背圧調整弁を設けることでチャンバー内の圧力を 24 MPa の高圧下にお

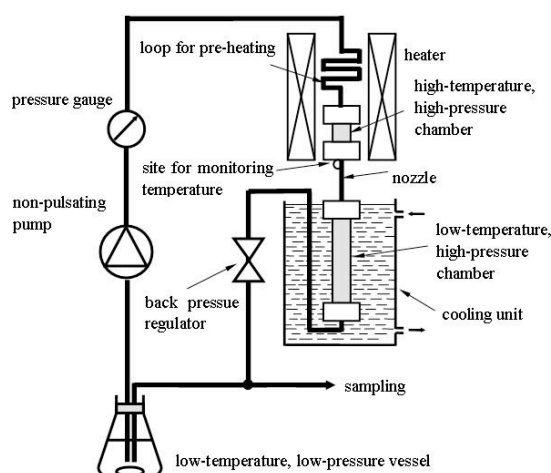


Fig. 1. Schematic representation of the flow reactor simulating a submarine hydrothermal vent. In the flow reactor, a high-temperature high-pressure fluid at 200 °C and at 24 MPa was injected into a low temperature chamber that was maintained at about the same high pressure as the fluid. The fluid circulated in a closed manner from the high temperature chamber to the low temperature one maintained at 0 °C, and again back to the high temperature compartment repeatedly.

く、この圧力は 2400 m の海底の圧力に相当し、水の臨界点圧力 21.7 MPa よりも高い。ポンプ下流側には安全装置付きの圧力計を設け、圧力が 30 MPa 以上になった場合ポンプを停止するようにした。高温高压チャンバーは内径 20 mm、長さ 50 mm、低温高压チャンバーは内径 20 mm、長さ 250 mm のステンレス製である。チャンバーは 2 基を直列に繋ぎ、上流側の高温高压チャンバーを電気炉内に設置して溶液を加熱する。熱水となった溶液はノズルを介して 2 段目のチャンバー内に噴出される。2 段目のチャンバーは全体を氷浴に浸し、冷海水環境を模擬的に造った。

3. 急冷の仕方とアミノ酸の重合

本装置の特徴は熱水の急冷方法である。実際の海底熱水噴出孔と同じように熱水を冷水中に噴出し、熱水は周りの冷海水との接触により冷却されるため、熱水と冷水との界面には大きな温度勾配が生じる。しかし、この冷却勾配の大きさを変える方法として噴出孔からの吐出量を一定にした場合、熱水と冷水との温度差を変えるか、もしくは流速を変える他ない。流速を変えるには噴出孔の孔の大きさを変えればよく、フローリアクターでノズルと呼んでいるのがこれに対応する。ノズルの内径は 0.1 mm から 1.0 mm まで変えることができる。溶液の流量を 10 ml/min にした場合の各ノズル先端の流速を計算で求め、それを Table 1 に示す。ノズルの内径が 0.25 mm, 0.50 mm, 1.0 mm のときのグリシン 2 量体の生成量 Fig. 2

Table 1. The speed of a running fluid with various inner diameter of nozzle.

Inner diameter of nozzle (mm)	Speed [m/s]
0.1	21
0.25	3.4
0.5	0.85
0.8	0.33
1.0	0.21

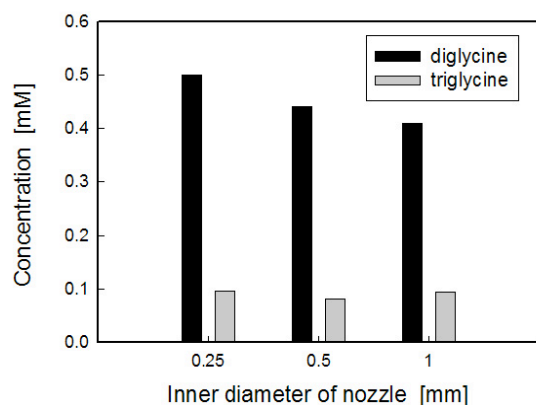


Fig. 2. Inner diameter of nozzle dependence of the yields of diglycine. Comparisons were made at 120 min after the start of the flow reactor operation.

に示す。出発反応溶液は 100 mM グリシン溶液でグリシン 2 量体の生成量を指標にした。

グリシン 2 量体の生成量はノズル径に依存し、流速の早いものほどグリシン 2 量体が増加する傾向を示すが、際立って変化があるわけではない。しかし断熱膨張による急冷を実現した実験系ではグリシンオリゴマーの生成量が非常に高い[8]。細かいチューブで構成され、熱水がそのまま冷やされるフローリアクターでは冷却速度の違いによる生成量の変化を評価できるが[9-10]、本装置では急冷を熱水と冷水の接触で行っている以上、低温チャンバーから出てくる溶液を測定せざるを得ないため、これ以上の傾向を示すことが難しい。

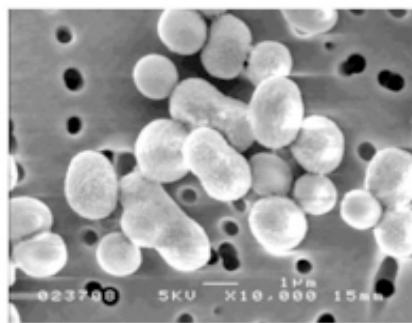
フローリアクターによる反応生成物の同定・定量は HPLC プロファイルによるピークの溶出時間 (Retention Time) およびピーク面積から定量評価した。カラムはワイエムシー社の Hydrosphere C-18(5 μ m/4.6 mm \times 250 mm) 逆相カラムを用いた。Hydrosphere C18 はシリカゲル基材に n-オクタデシル基を化学結合したもので、親水性化合物の分離に適し、核酸関連物質や有機酸、ペプチドなどの広範囲な化合物に使用できる。移動相の流量は 1.0 ml/min、測定波長は 195 nm で行った。移動相は、50 mM リン酸二水素カリウム, 7.2 mM ヘキサンスルホン酸ナトリウム, pH 2.5 の組成のものを用いた[2]。

4. プロテノイド・ミクロスフィア

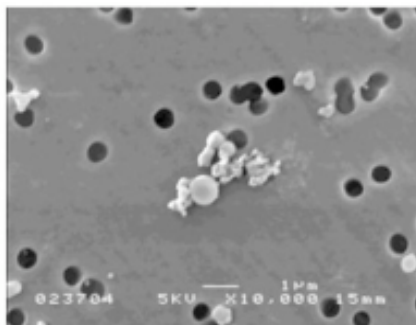
リン脂質が造るベシクルや脂肪酸ミセルを溶液の中に入れるとアミノ酸の重合が促進される[11-12]。さらにベシクル作製時に、ベシクル内部に封入するグリシン濃度に依存したグリシン 2 量体の生成が認められたことから、アミノ酸熱重合物が形成するプロテノイド・ミクロスフィアにも同様の役割の有無を検証した。リボソームが生命誕生以前の原始海洋中に存在したかどうかは不明であるが、少なくともアミノ酸が存在する原始海洋中ではプロテノイド・ミクロスフィアが存在する可能性は高い。そこでフローリアクターの出発反応溶液中に 5 種類のアミノ酸、グリシン、L-アラニン、L-グルタミン酸、L-アスパラギン酸、L-バリンによるアミノ酸熱重合物が形成する球型構造物を添加した。

プロテノイド・ミクロスフィアの製作方法は、5 種類のアミノ酸それぞれ 40 mmol をよく混ぜ、200°C で 2 時間通常雰囲気化で加熱し、その後純水を加えて煮沸し氷浴で冷した。冷却後析出したプロテノイド・ミクロスフィアを含む懸濁液を遠心機で 4000 rpm で 20 分間遠心し、沈殿物と上澄みとに分け、沈殿物に純水を入れ再度遠心機で分離する操作を行った。なお、アスパラギン酸とプロリンの 2 種類のアミノ酸からなるプロテノイド・ミクロスフィアも同様の製法で作製した。この組み合わせは均一な球型構造物を形成し、他の組み合わせと比較していろいろな知見が得られている[13]。2 種類のアミノ酸の分子数を同じにするため、アスパラギン酸とプロリンはそれぞれ 100 mmol の混合物を加熱処理した。

プロテノイド・ミクロスフィアは 5 種類のアミノ酸を加熱した場合、2 回の遠心分離後の 200 ml の懸濁液の状態では 0.6 mg/ml であるのに対して、アスパラギン酸とプロリンの 2 種類のアミノ酸で



Asp, Pro



Gly, Ala, Glu, Asp, Val

Fig. 3. Scanning electron microscopic images of proteinoid microspheres.

は 15 mg/ml と 5 種のアミノ酸に比べて約 25 倍多く形成される。5 種のアミノ酸からなる熱重合物は水溶性の高い化合物であり、構造物形成は少ないものと考えられる。それぞれの懸濁液をポアサイズ 0.6 μm のメンブレンフィルターでろ過し、自然乾燥後に Au 蒸着したものを走査型電子顕微鏡で観察した。写真を Fig. 3 に示す。球型構造物の濃度の違いを反映した観察像が得られた。

フローリアクターの反応溶液中にプロテノイド・ミクロスフィアを入れ運転したところ、プロテノイド・ミクロスフィアの量に依存したグリシン 2 量体の生成が認められた。それを Fig. 4 に示す。アスパラギン酸とプロリンの 2 種のアミノ酸では溶液中のプロテノイド・ミクロスフィアの濃度を 0.00 $\mu\text{g/ml}$ から 0.63 $\mu\text{g/ml}$ まで変えて濃度依存性を確認したが、5 種のアミノ酸ではももとの形成量が少ないため 0.053 $\mu\text{g/ml}$ のみである。2 種のアミノ酸のプロテノイド・ミクロスフィアと同濃度付近のグリシン 2 量体生成量と比較すると、5 種のアミノ酸によるプロテノイド・ミクロスフィアにおいても、グリシン 2 量体の増加傾向を示している。

5. 熱エネルギーの供給の仕方

熱水が冷たい冷海水中に噴出する環境下において、アミノ酸重合反応が進行するためのアミノ酸への熱エネルギーの与え方を変える実験系を新たに導入した。それを Fig. 5 に示す。前述のフローリアクターとの違いは冷海水中の熱水環境を想定した低温チャンバー内に、従来どおりの熱水の噴出孔の他に、周りの冷海水の供給を担う冷水供給孔を増設した点にある。さらにこの実験系は熱水噴出孔と冷水供給孔の溶液組成を変えることを目的としているため、従来の循環式ではなく反応炉に送られた溶液は熱水環境を通過した

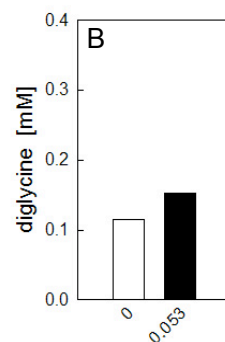
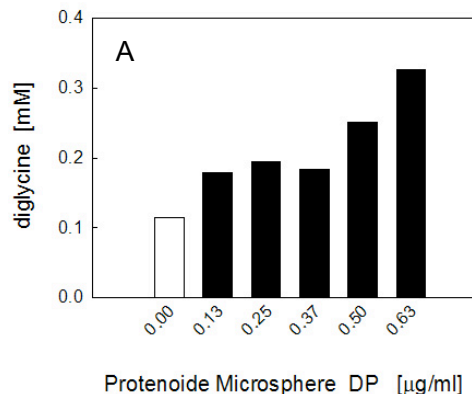


Fig. 4. Concentration of proteinoid microsphere dependence of the yields of diglycine. Comparisons were made at 120 min after the start of the flow reactor operation. We compared two different kinds of proteinoid microspheres made of DP (L-Asp and L-Pro: in panel A) or ADEGV (L-Ala, L-Asp, L-Glu, Gly and L-Val: in panel B).

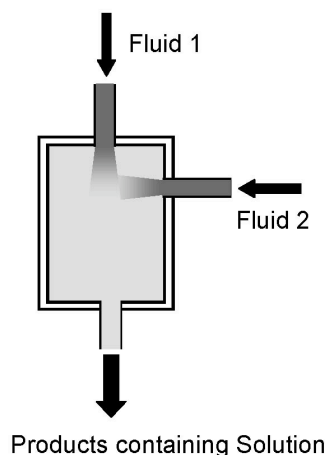


Fig. 5. A schematic representation of a low temperature chamber for supplying thermal energy into glycine solution. Fluid 1 at high temperature was mixed with low temperature fluid -2 in the reaction chamber followed by the ejection of the products from the bottom of the chamber.

のちにそのまま排水される非循環式の反応炉とした。

アミノ酸への熱エネルギーの与え方は、高温高压チャンバーから熱水として流入するノズル (Fig. 5 の Fluid 1) と冷水供給用ノズル (Fig. 5 の Fluid 2) の溶液組成の組み合わせを変えることで行った。アミノ酸溶液に純水を加熱した熱水を接触させて熱エネルギーを与える場合 (Fluid 1 に Milli-Q, Fluid 2 に 200 mM Gly) と、従来どおりアミノ酸溶液を加熱し熱水となって冷海水に噴出する場合 (Fluid 1 に 200 mM Gly, Fluid 2 に Milli-Q) を比較した。またその中間として噴出孔からの熱水および周りから供給される冷水供給孔双方にアミノ酸溶液を用いた場合 (Fluid 1 に 100 mM Gly, Fluid 2 に 100 mM Gly) で同様の実験を行った。アミノ酸溶液はグリシン 200 mM のものを使用した。それぞれのノズルからの吐出量は 5.0 ml/min であり、単位時間あたりに低温チャンバーに供給されるアミノ酸の分子数は 100 mM グリシン溶液を 10 ml/min で送った場合と同じ条件で実験を行った。その結果を Fig. 6 に示す。

アミノ酸溶液を加熱し 200°C の熱水を低温環境下に噴出した場合のグリシン 2 量体の生成量はおよそ 0.2 mM であるのに対して、冷たいグリシン水溶液に 200°C の純水を接触させてアミノ酸重合反応を期待したが、グリシン 2 量体の生成はほとんど認められなかった。100 mM グリシンの熱水を 100 mM の冷たいグリシン溶液中に噴出させた場合は 0.05 mM 程度のグリシン 2 量体の形成が認められた。

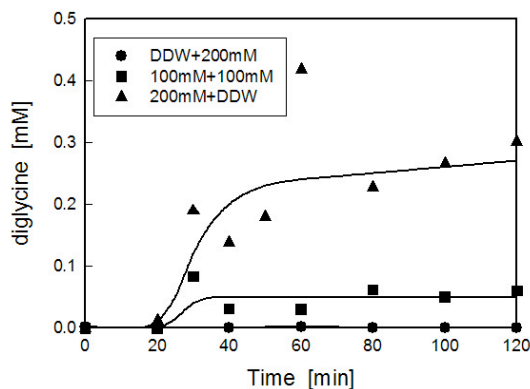


Fig. 6. Time dependence of the yields of diglycine for the three ways of fluid injected into a low temperature chamber.

6. 加熱温度とアミノ酸の重合

アミノ酸溶液は電気炉内に置いた予備加熱ループで加熱された後に、高温高压チャンバーに送られる。同チャンバーの容積は 15.7 ml で、流量 10 ml/min で送液する場合、熱水の高温高压チャンバー滞在時間はおおよそ 95 秒である。電気炉の温度を変え、高温高压チャンバーの出口の熱水の温度を変化させグリシン 2 量体の生成量を比較した。熱水の温度はステンレス製ノズル外側の温度を指標とした。

熱水の温度は 1 時間ごとに 200°C, 250°C, 290°C, 340°C と設定値を上昇させ、グリシンとグリシン 2 量体の濃度の経時変化を追った。結果を図 7

に示す。200°C ではグリシン単量体濃度はもとの反応溶液の濃度と同じ値を維持しているが、250°C 以上になると減少し 290°C 以上では 10 mM まで減少した。グリシン 2 量体の濃度は 200°C で最大値を示し、その後温度の上昇とともに減少したが、この実験系ではグリシン 2 量体の分解が進んだのか、元となるグリシン単量体が減少したことによるものかを区別できない。

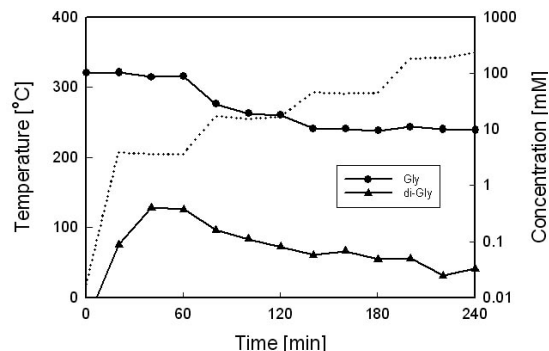


Fig. 7. Time dependence of the yields of diglycine at various temperatures.

7. 考察

2400 m の深海の海底熱水噴出孔近傍の熱水環境を実現するため、24 MPa の圧力で 200°C の熱水が冷水中に噴き出す本装置では、低温高压反応容器内では実際の海底熱水噴出孔と同様、熱水と冷水との界面に大きな温度勾配が存在する。熱水が噴き出す際の流速を変えることは、熱水と冷水の界面に生じる温度勾配が変わり、熱水の冷却速度の変化として現れる。グリシン溶液のみを出発反応溶液にしたとき、流速の違いはグリシンオリゴマーの生成量に違いが生じた。しかしその差は有意であるものの、低温高压チャンバーからの最終流出溶液を測定しているため変化が的確に反映されたものとは言い難い。

次に 100 mM グリシン溶液を出発反応溶液として 200°C, 24 MPa で 2 時間、フローリアクターの運転を行った結果、2 種のアミノ酸による熱重合物が形成するプロテノイド・ミクロスフィア存在下のグリシン 2 量体の生成量がプロテノイド・ミクロスフィア非存在下に比べて 3 倍に増大した。グリシン 2 量体の生成量は溶液中のプロテノイド・ミクロスフィアの濃度と有意な相関があったことから、非平衡熱水環境におけるグリシンの重合反応においては、反応溶液中にアミノ酸熱重合物がつくる構造物が介在することにより、重合反応が促進することが認められた。

海底熱水噴出孔近傍の熱水環境は非平衡状態が持続していると考えられる。化学反応を駆動する熱エネルギーの供給の仕方を変えた実験結果からは、アミノ酸を加熱して冷却する過程が有効であることを示している。冷たいアミノ酸溶液に熱水を接触させ、熱水塊がもつ熱エネルギーを利用したアミノ酸重合反応が進行することは難しい結果となった。アミノ酸溶液に熱を加え高温してから急冷する過程が有効であることを補強する結果となった。

熱水の温度は 200°C から 340°C まで段階的に上

昇させたところ、200°Cの温度域がアミノ酸の重合に適していることが顕著に現れた。温度が200°Cから250°Cに上昇するに従ってグリシンの濃度の減少がみられたことから、アミノ酸重合反応が進行する温度域の上限は過去の実験で用いた温度に比べ低い値に留まるようだ。ただ、200°Cの温度域の滞在時間が95秒に固定された実験系であるため、それよりも長い時間高温に晒された場合について検討する必要がある。

海底熱水噴出孔の熱水環境を模倣したフローリアクターではあるが、実験の制約があつていろいろな条件下の長時間運転には支障が出る事例を経験している。析出物が流路を塞ぐことによる圧力の上昇が長時間の運転を困難にしている。現在、熱水は上から下に噴出しているが、その流れは実際の噴出孔とは逆になっている。これを熱水噴出孔と同じように正立させると多くの実験デザインの実行が可能となってくる。現在新型フローリアクターの建設を進めている。

参考文献

1. Yanagawa, H., Kobayashi Y. and Egami, F. Characterization of marigranules and marisomes, organized particles with elastin-like structure, *J. Biochem.* 87, 855-869 (1980).
2. Bujdak, J., Faybikova, K., Eder, A., Yongyai, Y. and Rode, B. M. Peptide chain elongation: A possible role of montmorillonite in prebiotic synthesis of protein precursors, *Origins Life Evol. Biosphere* 25, 431-441 (1995).
3. Fox, S. W. and Harada, K. Thermal copolymerization of amino acids to a product resembling protein, *Science* 128, 1214 (1958).
4. Schoell, M. Multiple origins of methane in the earth. *Chemical Geology* 71, 1-10 (1988).
5. Yanagawa H. and Kojima K. Thermophilic microspheres of peptide-like polymers and silicates formed at 250 degrees C, *J Biochem* 97, 1521-1524 (1985).
6. Shock, E. L. Geochemical constraints on the origin of organic compounds in hydrothermal systems, *Origins Life Evol. Biosphere* 20, 331-367 (1990).
7. Imai, E.-I. Honda, H. Hatori, K. Brack, A. and Matsuno, K. Elongation of oligopeptides in a simulated submarine hydrothermal system, *Science* 283, 831-833 (1999).
8. Futamura, Y. Fujioka, K. and Yamamoto, K. Hydrothermal treatment of glycine and adiabatic expansion cooling: implications for prebiotic synthesis of biopolymers, *J. Mater. Sci.* 43, 2442-2446 (2008).
9. Kawamura, K. and Yukioka, M. Kinetics of the racemization of amino acids at 225-275 °C using a real-time monitoring method of hydrothermal reactions, *Thermochemica Acta* 375, 9-16 (2001).
10. Islam, Md. N., Kaneko, T. and Kobayashi, K. Reaction of amino acids in a supercritical water-flow reactor simulating submarine hydrothermal systems, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 76, 1171-1178 (2003).
11. Tsukahara, H., Imai, E.-I., Honda, H., Hatori, K. and Matsuno, K. Prebiotic oligomerization on or inside lipid vesicles in hydrothermal environments, *Origins Life Evol. Biosphere* 32, 13-21 (2002).
12. [Furuuchi, R., Imai, E.-I., Honda, H., Hatori, K. and Matsuno, K. Evolving lipid vesicles in prebiotic hydrothermal environments, *Origins Life Evol. Biosphere* 35, 333-343 (2005).
13. 今井栄一, 櫻沢 繁, 本多 元, 松野孝一郎. アミノ酸の熱重合反応とその生成物, *Viva Origino* 24, 159-170 (1996).