

**INFLUENCE OF TEMPLATE OLIGONUCLEOTIDES ON THE CONDENSATION OF
OLIGONUCLEOTIDES IN THE PRESENCE OF WATER-SOLUBLE CARBODIIMIDE: SEARCH
FOR MODEL REACTIONS OF THE FORMATION OF RNA WHICH COULD BE EFFECTIVE AT
HIGH TEMPERATURES**

Kunio Kawamura*, Fumitaka Okamoto and Noriko Okuda

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University,

Gakuen-cho 1-1, Sakai, Osaka 599-8531, Japan.

Fax: +81-72-254-9903; Email: kawamura@chem.osakafu-u.ac.jp

(Received 15 January 2004 Accepted 18 February 2004)

(Abstract)

The condensation reaction of oligonucleotides was investigated to develop a prebiotic model reaction for the formation of oligonucleotides which can be examined under hydrothermal conditions. The reaction behavior of (1) the condensation of 12-mer oligonucleotide (5'-pGGGCCCCCGGrG, 5'-pGGGCCCCGGGCCrC), (2) the condensation of oligoguanylate (5'-pGGGGGrG, 5'-pGGGGGGGrG) in the absence and presence of a oligocytidylate template, (3) the condensation of mix-hexanucleotide including guanine and cytosine (5'-pGGGCCrC, 5'-pGCGCGrC, 5'-pGCCCCGrG) in the absence and presence of several 12-mer oligonucleotides, was investigated at 0 – 25 °C. In these systems, it was expected that the dimerization of the starting oligonucleotides would be enhanced using 12-mer oligonucleotides or in the presence of a template oligonucleotide. However, the cyclization of oligonucleotides proceeded as the main process and the dimerization was not efficient. The rates of the cyclization of 12-mer oligonucleotides were not much different from those of hexanucleotides determined in previous studies. The rate of cyclization of 5'-pGGGGGrG or 5'-pGGGGGGGrG was somewhat affected with a oligocytidylate template. Although the cyclization of mix-hexanucleotides was not much affected by the presence of 5'-GGGCCCCCGGG or 5'-GGGCCCCGGGCC, the condensation of mix-hexanucleotides did not proceed in the presence of 5'-GCGCGCGCGCGC or 5'-GCCCCGGGCCGG. These results indicate that cyclization of short oligonucleotides have readily proceeded even in the presence of template oligonucleotides so that the accumulation of RNA would not be efficient through the dimerization of short oligonucleotides. Conclusively, the reactions tested in this study are not suitable for the elongation model of oligonucleotide which acts under hydrothermal conditions

(Keyword)

chemical evolution of RNA, RNA world, oligonucleotide, condensation, cyclization, template-directed reaction, hydrothermal reaction

水溶性カルボジイミドを用いるオリゴヌクレオチドの縮合反応に対する鋳型オリゴヌクレオチドの影響：高温下で働くことをめざした RNA 生成モデルの探索

川村邦男*, 岡本文敬, 奥田宜子

大阪府立大学大学院工学研究科応用化学分野

〒599-8531 大阪府堺市学園町 1-1

Fax: 072-254-9903; Email: kawamura@chem.osakafu-u.ac.jp

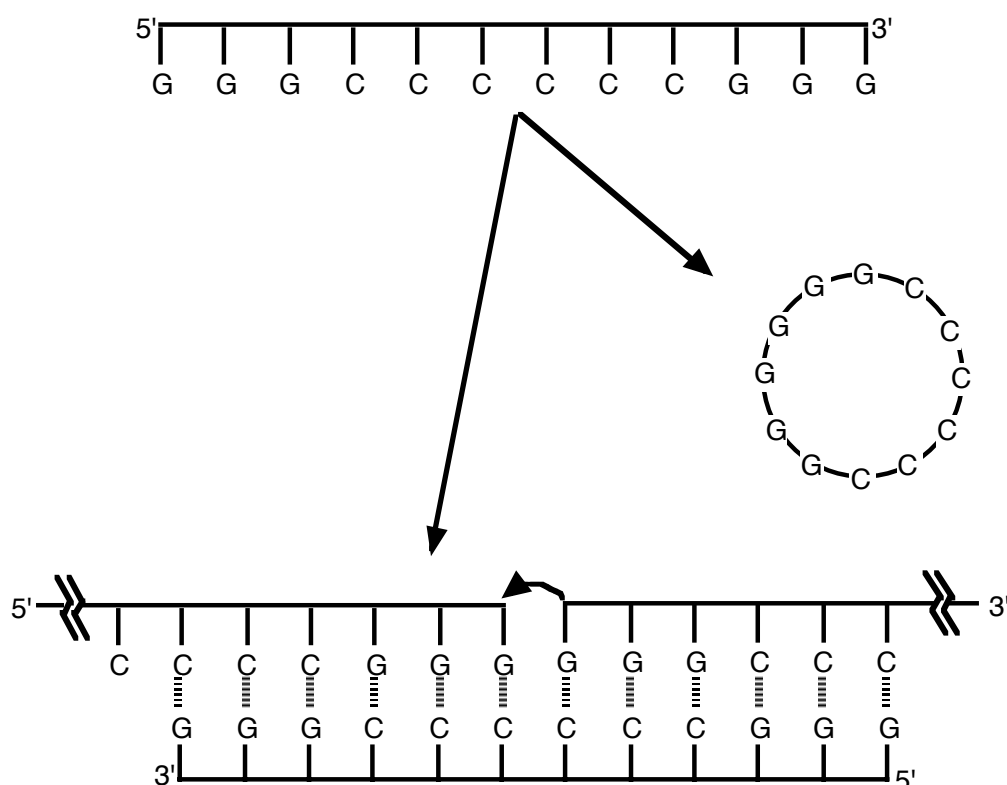
1. 序論

地球上で生命が出現する過程でリボ核酸 (RNA) は重要な役割をはたしたと考えられている (RNA ワールド仮説) [1]. しかし, この RNA ワールド仮説は生命は深海底の熱水噴出孔のような高温の海水中で誕生したとする熱水起原説からみると問題がある. 例えば RNA は高温水中では不安定であるので酵素機能や情報を保持する機能を発現することは難しそうであり, このことは RNA ワールド仮説と熱水起原説は矛盾することを示しているように思われる[2-4]. そこで著者らを含むグループでは, RNA ワールドを生命の熱水起源から検証する研究を行ってきた[4-7]. 例えば, RNA の半減期は 200℃で 2~70 s, 300℃で 0.01~0.9 s であり, これは人間の感覚を基準にすると大変短い[5]. しかし, このことをもって RNA ワールドが高温下で不可能であったと断定することはできないことを, これまでの研究で示した. また熱水中での RNA の化学進化の研究の次の段階として, 高温下で働く RNA の生成モデルを設計し, 実際にそのモデル反応を用いて RNA が分解速度よりも速く生成することを示すことが必要である[4,6,7].

そこで, 高温下で働く RNA の前生物的なモデル反応の候補として 2 種類の反応の温度依存性について研究してきた. 第 1 のモデルとして

鋳型指示反応の温度依存性を調べた[6]. この反応ではオリゴヌクレオチドの生成効率は 80℃以上ではたいへん低くなるが, これは 2 量体が生成するときにモノマーどうしの会合が温度の上昇にともなって起こりにくくなることが一因であることが分かった. また, この種の反応に適した条件を見つけるためには速度論的な解析が有効であるが, 鋳型指示反応では生成物は種々の鎖長からなるオリゴヌクレオチドを含むため反応速度解析が複雑であるという問題もあった. 第 2 のモデルとして, 6 鎖長程度のオリゴヌクレオチドは縮合剤の存在下で環化することを見だし, この環化反応を用いればリン酸ジエステル結合の生成速度とその温度依存性を調べることができることを示した[4,7]. しかし, 環化反応はリン酸ジエステル結合の生成を調べるモデルとしては良いが, ポリメラーゼモデルとしては不十分である.

そこで本研究では 3 種類の反応について検討した. 第 1 として, グアニンとシトシンを含む 12 鎖長からなるオリゴヌクレオチドの環化反応について検討した (Scheme 1). これまでは 6 鎖長程度のオリゴヌクレオチドを原料として用いたが, 鎖長を大きくすれば duplex を生成しやすくなるので 2 量体の生成効率は大きくなると期待される. 第 2 はオリゴグアニル酸の環化反応



Scheme 1. Possible pathways of the condensation of oligo-12b.

に対して鋳型となるオリゴシチジル酸を添加し、環化を抑制して 2 量化が起こる反応系を構築しようと試みた (Scheme 2)。第 3 に、同様にしてグアニンとシトシンを含むヘキサヌクレオチドの環化反応に対して、その 2 量体と相補的あるいは非相補的な塩基配列をもつ 12 鎖長のオリゴヌクレオチドを共存させて反応を行った (Scheme 3)。これらの系で期待される 2 量化反応は、環化反応よりも実際のポリメラーゼ反応のモデルとして適している。また、構成成分の種類が少ないので鋳型指示反応よりも解析が容易であると期待される。これらの反応系について期待通り 2 量化反応の効率が向上するかどうかを検討し、結果を化学進化の観点から考察した。

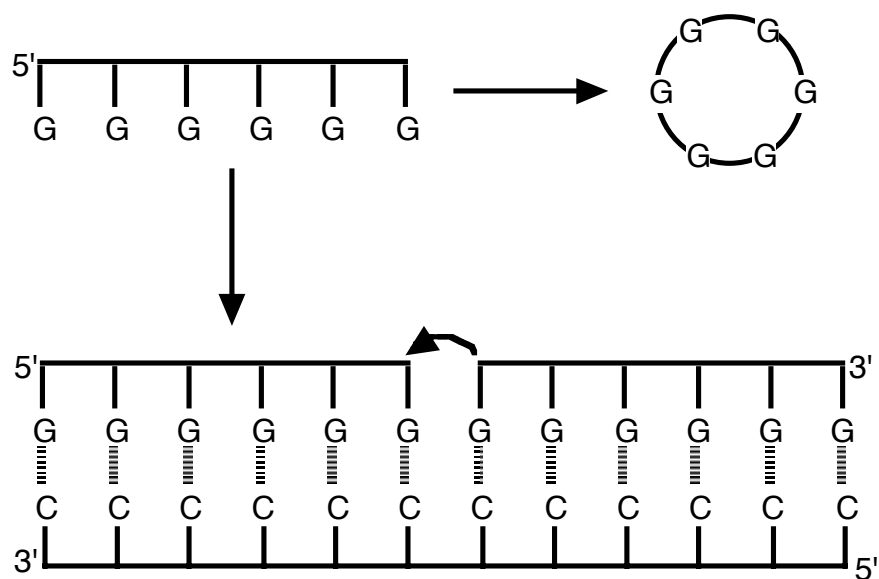
2. 実験

2-1 試薬

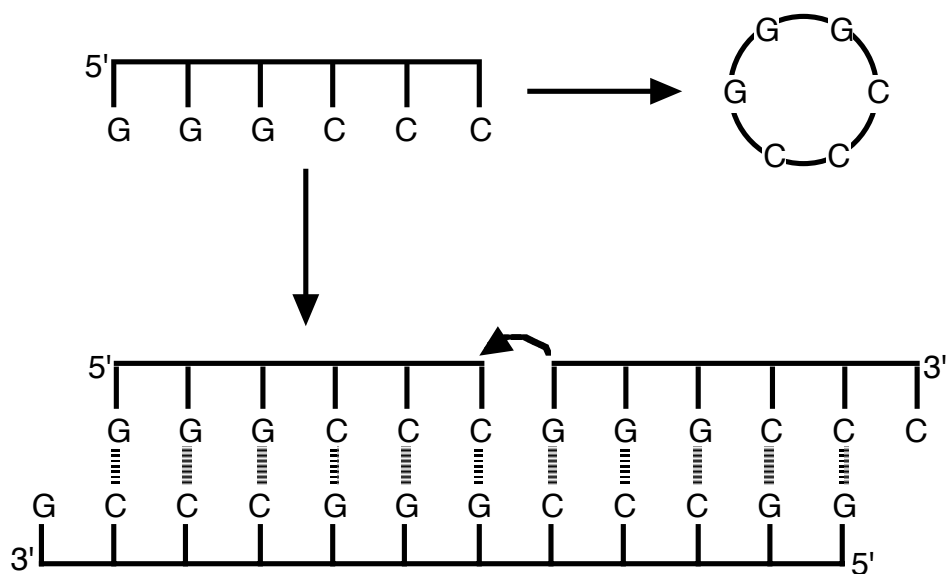
オリゴヌクレオチド (5'-pGGGCCCCCGGrG (oligo-12a), 5'-pGGGCCCCGGGCCrC (oligo-12b), 5'-pGGGGGrG (oligo-G6), 5'-pGGGGGGGrG (oligo-G8), 5'-CCCCCCCCCCCC (temp-C12), 5'-CCCCCCCCCCCCCCCC (temp-16), 5'-pGGGCCrC (oligo-6a), 5'-pGCGCGrC (oligo-6b), 5'-pGCCCGrG (oligo-6c), 5'-GGGCCCCCGGG (temp-12a), 5'-GGGCCCCGGGCC (temp-12b), 5'-GCGCGCGCGCGC (temp-12c), 5'-GCCCCGGGCCCGG (temp-12d)) はプロリゴジャパン製の HPLC 精製グレードのものをを用いた。その他の試薬は和光純薬製の特級品を用いた。

2-2 鋳型存在下での環化反応

12 鎖長のオリゴヌクレオチドの縮合反応: 0.05 mM oligo-12a または -12b, 0.1 M NaCl, 0.1 M



Scheme 2. Possible pathways of the condensation of oligo-G6 in the presence of (C)₁₂ template.
oligo-G6: 5'-pGGGGGrG.



Scheme 3. Possible pathways of the condensation of oligo-6a in the presence of temp-12d.
Oligo-6a: 5'-pGGGCCrC, temp-12d: GCCCGGGCCCCGG.

MgCl₂, 0.1 M イミダゾール, および 0.2 M 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDAC) を含む水溶液 (pH=7.5) を調製し, 温度 0℃ で最大 168 h (7 d) 反応させ経時変化を調べた. また反応後の試料 20 μL を採取し, 酢酸アンモニア緩衝溶液中 (4 mM) でリボヌク

レアーゼ T₂ (0.05 unit/100 μL) を加えて 37℃ で 6 h 処理した.

オリゴグアニル酸の環化反応に対するオリゴシチジル酸の影響: 0.1 mM oligo-G6 または oligo-G8, 0.2 M NaCl, 0.075 M MgCl₂, 0.1 M イミダゾール, および 0.2 M EDAC を含む水溶液

(pH=8.0) を調製し、温度 25℃で最大 43 h 反応させ経時変化を調べた。また鋳型として 0.1 mM temp-C12 または temp-C16 を加えて同様に検討した。

ヘキサヌクレオチドの環化反応に対する 12 鎖長オリゴヌクレオチド鋳型の影響：0.1 mM oligo-6a, -6b, または-6c, 0.2 mM temp-12a, -12b, -12c, または-12d, 0.2 M NaCl, 0.075 M MgCl₂, 0.1 M イミダゾール, および 0.2 M EDAC を含む水溶液 (pH=8.0) を調製し、温度 0℃で 168 h (7 d) 反応させた。

2-3 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) および熱測定

HPLC 分析：生成物は、HPLC 装置 (島津 LC10A) に陰イオン交換カラム (φ4.6 mm, 長さ 15 cm, DNA-NPR, 東ソー) を用いて、oligo-12a および oligo-12b の反応系では NaCl 濃度が 0.3 M (0 min), 0.6 M (30 min), 1.2 M (45 min) となるように、またその他の反応系では NaCl 濃度が 0.15 M (0 min) から 1.2 M (80 min) となるように直線グラジエントをかけて分析した。温度は 35℃, 検出波長は 253 nm とした。

融解温度 (T_m) の測定：0.63 mM oligo-G6 と 0.31 mM temp-C12, 0.2 M NaCl, 0.075 M MgCl₂, および 0.1 M イミダゾールを含む溶液を調製 (pH=8.0) し、Calorimetry Sciences Corp. (USA) 製の CSC 6100 Nano II DSC を用いて測定した。

3. 結果および考察

3-1 12 鎖長オリゴヌクレオチドの縮合反応

これまで 6 鎖長のオリゴヌクレオチドの縮合反応を主に研究してきたが、鎖長が大きくなると duplex の生成の影響も大きくなると期待される。そこで 12 鎖長のオリゴヌクレオチドの環化

反応と 2 量化の効率を検討した。生成物を HPLC で分析した結果、それぞれ原料のうしろにあらたなピークが出現した (Fig. 1)。これまでの研究で 6 鎖長のオリゴヌクレオチドの場合には環化反応が起こることが確かめられているので、生成物の同定は HPLC の保持時間とリボヌクレアーゼ T₂ による処理に基づいて行った。oligo-12a および oligo-12b の生成物の HPLC の保持時間を、原料の 2 量体すなわち 24 鎖長の対応する配列をもつオリゴヌクレオチドと比較したが一致しなかった。また、リボヌクレアーゼ T₂ で処理すると生成物が減少し原料のピークが増加した。すなわち、この生成物はリン酸ジエステル結合を持っておりかつ 2 量体ではないので、12

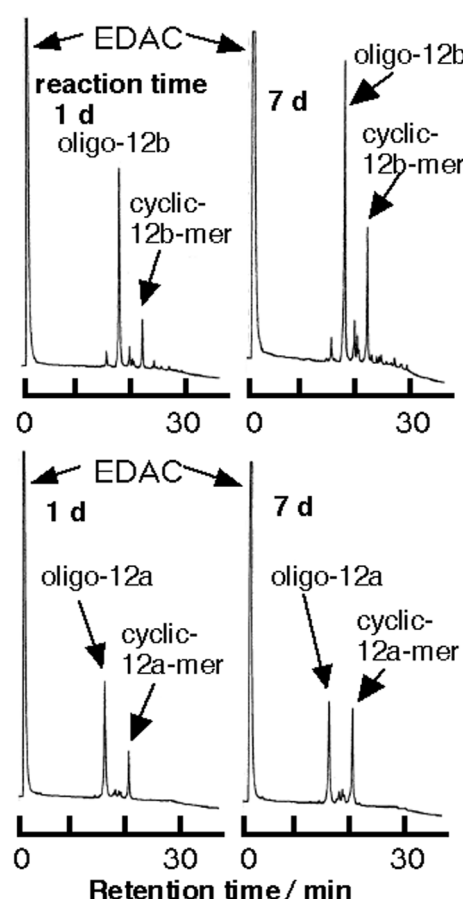


Figure 1. HPLC profiles of the condensation reaction of 5'-pGGGCCCCCGGrG (oligo-12a) and 5'-pGGGCCCCGGCCrC (oligo-12b). [NaCl] = 0.1 M, [MgCl₂] = 0.1 M, [imidazole] = 0.1 M, [EDAC] = 0.2 M, [oligo-12a or -12b] = 0.05 mM, pH = 7.5, 0 °C.

鎖長のオリゴヌクレオチドの場合でも6鎖長のオリゴヌクレオチドと同様に環化反応が主反応として起こったということができる。この反応の原料の減少速度を1次プロットして反応速度定数を決定した結果、oligo-6a, oligo-6b, oligo-6cなどの場合と比べてoligo-12aではほぼ同じ範囲でありoligo-12bでは少し大きかった (Table 1)。

Table 1. The rate constants for the cyclization of 12-mer and 6-mer oligonucleotides.

System	$k_{\text{cyc}} / \text{s}^{-1}$
oligo-12a	$(4.4 \pm 0.2) \times 10^{-7}$
oligo-12b	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^{-6}$
oligo-6a ^{a)}	$(4.6 \pm 0.1) \times 10^{-7}$
oligo-6b ^{a)}	$(6.3 \pm 0.1) \times 10^{-7}$
oligo-6c ^{a)}	$(2.7 \pm 0.1) \times 10^{-7}$

[NaCl] = 0.1 M, [MgCl₂] = 0.1 M, [imidazole] = 0.1 M, [EDAC] = 0.2 M, [oligo-12a or -12b] = 0.05 mM, pH = 7.5, 0 °C.

a: Data from reference [7], [oligo-6a, -6b, or -6c] = 0.1 mM was added instead of oligo-12a or -12b.

また、この反応のoligo-12bの2量体に対応する24鎖長のオリゴヌクレオチドのHPLC保持時間は、原料のoligo-12bよりも小さかった。これは陰イオン交換カラムで通常は電荷数の増加に伴って保持時間が大きくなる傾向と異なっている。この理由はHPLC上で水素結合形成による3次構造を形成し、有効に働く電荷が見かけ上小さくなったためと考えられる。

以上のように、これまでの研究で調べたものよりも鎖長の大きなオリゴヌクレオチドを用いて、水素結合の数を増やし会合体を安定化させ2量化を起りやすくするというモデルは有効に働かなかった。

3-2 オリゴグアニル酸の環化反応に対する鋳型の影響

oligo-G6 および oligo-G8 の環化反応を鋳型な

しに追跡するとともに、それぞれ temp-C12 および temp-C16 の存在下で同様に環化反応を行って鋳型の影響を調べた。ここでオリゴグアニル酸モノマーと鋳型オリゴシチジル酸の組み合わせを選んだ主な理由は、ヌクレオシド 5'-モノリン酸イミダゾリドをモノマーとして用いる鋳型指示反応の研究によってグアニンを含むモノマーとシトシンを含む鋳型の組み合わせがもっとも効率良く重合することが分かっており、本系でも効率が高いと期待したことにある[8]。原料のoligo-G6をHPLCで分析した結果、HPLC上に数本のピークが出現した (Fig. 2)。グアニンだけからなるヌクレオチド鎖は4量体を生成することが知られているので[9]、数本のHPLCピークが現れたことはoligo-G6がこの種の会合体を生成したためであると考えられる。この会合体は温度の上昇にともない融解し解離するので、oligo-G6を100℃の水中で1~3 min加熱してから分析した結果、1本のピークが得られた (Fig. 2)。また、いったん加熱したoligo-G6を12 h間

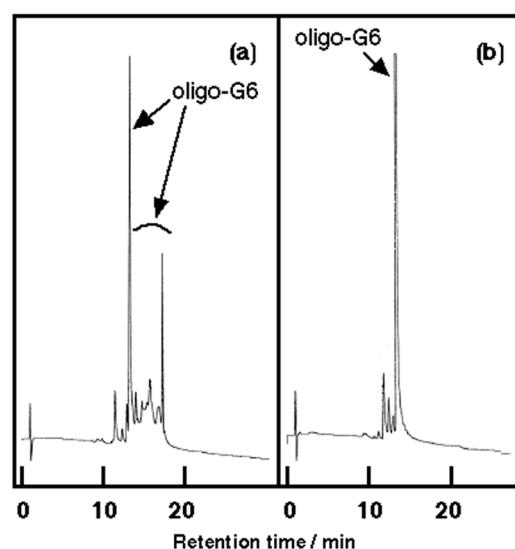


Figure 2. HPLC profiles of 5'-pGGGGGrG (oligo-G6) on anion-exchange column. (a) oligo-G6 was injected without any treatment, (b) oligo-G6 was heated for 3 min at 100 °C.

4℃で放置してもピークはほとんど変化しなかった。そこで、以後、oligo-G6 はこの加熱操作をしてから使用した。しかし、この加熱操作をつけ加えた方法で反応させた試料を HPLC で分析した結果、4 量体と推定されるピークが oligo-G6 では少し現れた。また、oligo-G6 の反応では鑄型のない場合には原料のピークに近いところにあらたに生成物に対応するピークが確認された (Fig. 3a)。この生成物は oligo-G6 が 2 量化した場合に生成するものと同じ鎖長をもつ (G)₁₂ と比べて保持時間がかなり短かった。また、これまでのオリゴヌクレオチドの環化反応の研究の結果、グアニンおよびシトシンを含む 6 鎖長のオリゴヌクレオチドは環化し、HPLC 上で原料の直鎖状のオリゴヌクレオチドと比較的近い位置に新しいピークを与えることが確認されている [7]。したがって、oligo-G6 系でも環化反応が起こったと考えられる (Scheme 2)。しかし、これまでに研究した他のオリゴヌクレオチドの場合

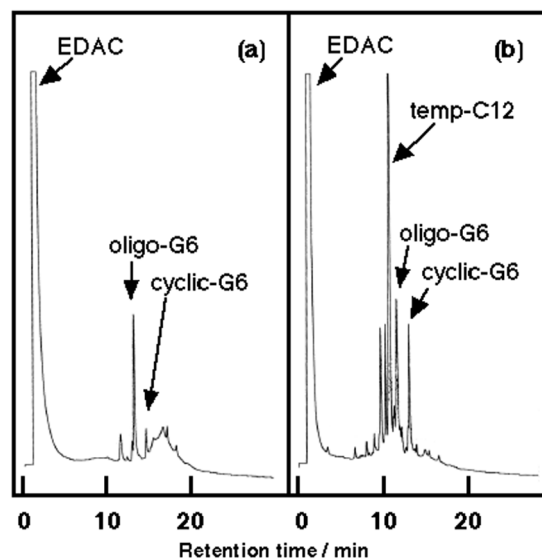


Figure 3. HPLC profiles of the reaction products of oligo-G6 in the absence and presence of (C)₁₂ (temp-C12).

Reaction conditions: [NaCl] = 0.2 M, [MgCl₂] = 0.075 M, [imidazole] = 0.1 M, [EDAC] = 0.2 M, [oligo-G6] = 0.1 mM, pH = 8.0, 25 °C.

(a) no template, 18 h, (b) [template] = 0.1 mM, 24 h.

と比べると環化生成物の量が小さく、この理由は環化反応の過程で 4 量体が生成する反応を抑制できなかったためであると推測される。この反応曲線を Fig. 4 (黒丸) に示すが、鑄型が存在しない場合の減少曲線にはこのような会合体の生成による影響が含まれている。同様に、oligo-G8 の反応について調べた。4 量体の生成を抑制するため oligo-6G の時と同様に 100℃ の水中で 1~3 min 加熱してから原料として用いたが、反応後の試料を HPLC で分析すると 4 量体と考えられるピークが大きく現れたため解析は困難であった。

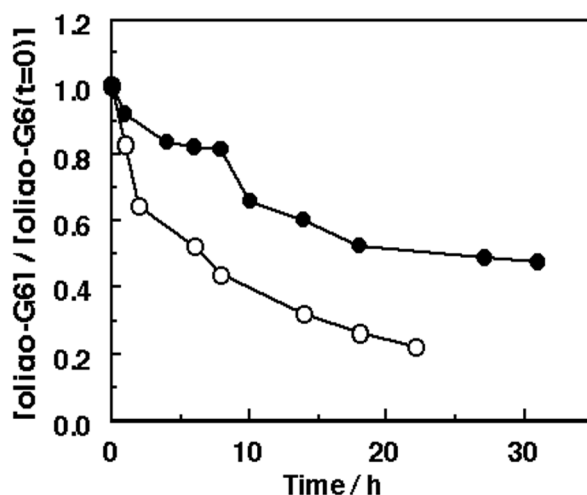


Figure 4. Reaction curves of the disappearance of oligo-G6 in the absence and presence of temp-C12. Reaction conditions: [NaCl] = 0.2 M, [MgCl₂] = 0.075 M, [imidazole] = 0.1 M, [EDAC] = 0.2 M [oligo-G6] = 0.1 mM, pH = 8.0, 25 °C.

Closed circles: no template, open circles: [template] = 0.1 mM.

一方、鑄型が存在する場合の oligo-G6 の反応では鑄型のピークの少し後ろに原料のピークが現れた (Fig. 3b)。このときは、HPLC 上で原料のピークは鑄型がない場合よりも鋭くなった。これは oligo-G6 では鑄型と duplex を形成するため、4 量体の生成が抑制されたためだと推定される。このときの oligo-G6 の減少の反応曲線を Fig. 4 (白丸) に示す。しかし、oligo-G8 では原料のピークは 4 量体の生成によるものと思われ

る多数のピークを含んでいた。またどちらの鎖長の場合にも 2 量体の生成は確認されなかった。このように oligo-G6 および oligo-G8 系では生成物の分析が難しいという問題点があるが、原料の減少の初速度に基づいて反応速度定数を得た (Table 2)。これらの速度定数は oligo-G6 で鋳型がある場合以外の系では 4 量体の生成の影響を含んでいると見なされる。oligo-G8 では oligo-G6 よりも反応速度が大きくなった。これはオリゴシチジル酸の場合に鎖長の増加にともなって環化速度が増加する傾向と一致しているが、4 量体の生成による影響を含むと考えられる。一方、oligo-G6 の系で鋳型が存在する場合の速度定数はほぼ環化反応の速度定数と見なすことができるが、過去の研究で調べた他のオリゴヌクレオチドの環化速度定数とあまり変わらず、鋳型の影響は小さいとすることができる。

Table 2. The rate constants for the disappearance of oligoguanylates in the absence and presence of polycytidylic acid template.

System	$k_{\text{deg}} / \text{s}^{-1}$
oligo-G6 without temp-C12 ^{a)}	$(1.8 \pm 0.2) \times 10^{-5}$
oligo-G6 with temp-C12 ^{b)}	$(9.7 \pm 0.8) \times 10^{-6}$
oligo-G8 without temp-C16 ^{a)}	$(6.6 \pm 1.8) \times 10^{-5}$
oligo-G8 with temp-C16 ^{a) b)}	$(3.2 \pm 0.4) \times 10^{-5}$
oligo-6a ^{c)}	$(2.4 \pm 0.1) \times 10^{-5}$
p(C) ₃ rC ^{d)}	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^{-5}$

[NaCl] = 0.2 M, [MgCl₂] = 0.075 M, [imidazole] = 0.1 M, [EDAC] = 0.2 M, [oligonucleotide] = 0.1 mM, pH = 8.0, 25 °C.

a: The rate constants involve the influence of the quadraxhelix formation of oligo-G6 or oligo-G8.

b: [template] = 0.1 mM.

c: Data from reference [7]

d: Data from reference [4]

ここで、oligo-G6 系での鋳型の影響を考察するために oligo-G6 と temp-C12 の濃度比 2 : 1 の混合系の T_m を環化反応と同じ緩衝溶液中で測定した結果、52°C であった。また、ヌクレオチドとして oligo-G6 だけを含む溶液の T_m を DSC を

用いて測定したが、エンタルピー変化は検出されなかった。従って、HPLC による oligo-G6 の分析結果は oligo-G6 の 4 量体の生成を示唆したが、化学両論的な 4 量体の生成だけでなくそのほかのアグリケーションの影響を含んでいるものと推察される。以上の結果から、本実験条件下では oligo-G6 と temp-C12 の混合系ではこれらからなる duplex を生成し得たと推定される。また、temp-C12 を添加した系の方が HPLC 上で oligo-G6 のピークが明瞭に現れたこともこのことを支持している。ただし本実験条件下では、Scheme 2 に示すような oligo-G6 および temp-C12 の化学両論比が 2:1 からなる duplex だけを含むかどうかについてはさらに確認が必要である。また以上の結果は、duplex の生成は 2 量化の効率を上げることにただちに結びつくものではないことを示唆している。一方、我々の先行研究では、oligo-6a は自己相補的な配列であり T_m 以下では duplex を生成するが、duplex の生成による影響はほとんどないことが示された[4]。また、澤井らの poly(A)上での oligo(U)の 2 量化反応に対する研究では、2 量化は進行するが効率はあまり高くなかった[10]。一方、poly(U)を鋳型とし oligo(A)を伸長する反応系では金属イオン触媒を用いると効率が高くなることが知られている[11]。従って、本系で鋳型を添加しても 2 量体の顕著な増加が認められなかったことは、2 量化の生成反応の効率を高めるためには鋳型を加えるだけでは不十分であることを示唆している。

3-3 ヘキサヌクレオチドの環化に対する 1 2 鎖長鋳型の影響

我々の先行研究では、グアニンおよびシトシンを含むヘキサヌクレオチド (oligo-6a, -6b, -6c)

を用いてその環化反応の温度依存性を調べる研究をおこなった．この環化反応に対してヘキサヌクレオチドと相補的あるいは非相補的な塩基配列を含む 4 種類の 12 鎖長のオリゴヌクレオチド (temp-12a, -12b, -12c, -12d) を加えて影響を調べ、鋳型を加えない場合の結果と比較した．

生成物を HPLC で分析し保持時間を調べ、先行研究で得た環化生成物と 2 量体生成物に対応する HPLC の保持時間と比較して生成物を帰属した (Fig. 5)．2 量体と鋳型とが同じ塩基配列の場合には、2 量体の構造は 5'-末端にリン酸基がついていることとリボースを含む点で鋳型の構造とは完全には同じではないが、HPLC では分離されなかった．また、相補的でない種々の 12 鎖長のオリゴヌクレオチドを含む場合にも環化生成物あるいは 2 量体生成物のピークと 12 鎖長オリゴヌクレオチドは、HPLC 上で同じ位置にピークを持つ場合があるので、十分注意深く HPLC チャートを読み生成物の割合を計算した (Table 3)．

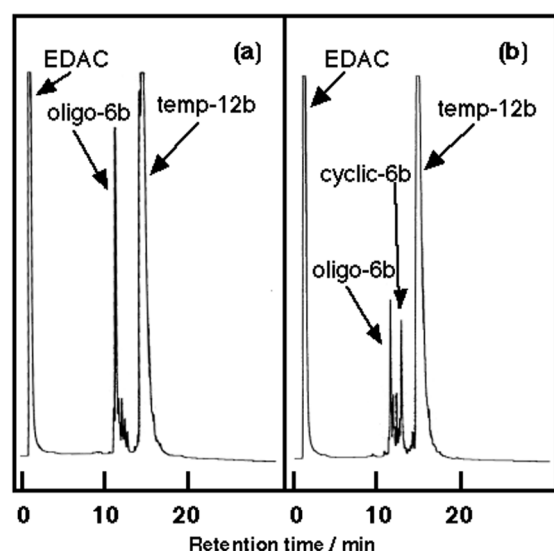


Figure 5. HPLC profiles of the condensation reaction of 5'-pGCGCGrC (oligo-6b) in the presence of 5'-GGGCCCCCGGG (temp-12b) template.

Reaction conditions: [NaCl] = 0.2 M, [MgCl₂] = 0.075 M, [imidazole] = 0.1 M, [EDAC] = 0.2 M, [oligo-6b] = 0.1 mM, [temp-12b] = 0.2 mM, pH = 8.0, 0 °C.

Reaction time: (a) 0 h, (b) 168 h.

oligo-6a の環化は temp-12a の存在下で少し抑制され、また temp-12c あるいは temp-12d の存在下では全く環化は進行しなかった．2 分子の oligo-6a と相補的な duplex を形成し得る temp-12b の存在下では、oligo-6a の生成物と鋳型のピークは重なるが、原料 oligo-6a と環化生成物の HPLC 面積の和は反応前後でほぼ一定であることから、2 量体は存在したとしてもその生成量は低いと推定される．oligo-6b では、temp-12a または temp-12b を添加しても鋳型としての効果はほぼ認められなかった．また oligo-6b の 2 分子と相補的な配列をもつ temp-12c を添加した場合には、環化反応生成物は検出されなかった．また oligo-6b の 2 量体と temp-12c の HPLC ピークは重なるが、原料 oligo-6b の HPLC ピーク面積の temp-12c に対する比は反応前後でほぼ一定であったので、2 量体は生成しなかったと考えられる．またさらに、temp-12d を加えた場合には環化生成物も 2 量体生成物のどちらも認められなかった．oligo-6c に対して temp-12a あるいは 12b を加えた場合は、鋳型と 2 量体生成物とは HPLC ピークは重ならないが、これらでは環化生成物の生成量はあまり変化しなかった．一方、temp-12d を加えると環化反応の収率は減少した．また、temp-12c を加えた場合には temp-12c と環化生成物の HPLC ピークは重なるので環化生成物の収量を直接測定することはできない．しかし、原料のピーク面積の鋳型のピーク面積に対する比は反応時間 0 d と 7 d でほぼ同じであり、2 量体の生成率は非常に小さいと推定される．

以上の結果、鋳型として temp-12a あるいは temp-12b を加えた場合には環化に対してあまり影響はなく、2 量体の生成率は向上しなかった．

この理由は、12 鎖長のオリゴヌクレオチド自身が自己相補的な配列をもつため duplex を生成し、

Table 3. The yield of cyclic-hexanucleotide and the dimer of hexanucleotide in the presence of a possible template oligonucleotide

system		yield (%)		
Hexanucleotide	template	reactant	cyclic- hexanucleotide	Dimer
Oligo-6a	temp-12a	72	28	0
	temp-12b ^{a)}	(49)	(51)	(0)
	temp-12c	100	0	0
	temp-12d	100	0	0
	no template	44	51	5
Oligo-6b	temp-12a	53	47	0
	temp-12b	51	48	0
	temp-12c ^{a)}	100	0	(0)
	temp-12d	100	0	0
	no template	45	53	2
Oligo-6c	temp-12a	59	41	0
	temp-12b	68	32	0
	temp-12c ^{a)}	(87)	(13)	(0)
	temp-12d ^{a)}	100	0	(0)
	no template	62	30	8

[NaCl] = 0.2 M, [MgCl₂] = 0.075 M, [imidazole] = 0.1 M, [EDAC] = 0.2 M, [oligonucleotide] = 0.1 mM, [template] = 0.2 mM, pH = 8.0, 0 °C, reaction time: 168 h.

a: These data were estimated values since one of the products was co-eluted with the template oligonucleotide on the anion-exchange HPLC column.

Scheme 3 に示す duplex との競争となり、目的とする duplex がうまくつくられなかったためであるかも知れない。一方, temp-12c あるいは temp-12d を加えると環化反応が進まなくなる傾向があることが分かった。この理由として、鋳型と原料が部分的に duplex を生成し環化を抑制したことなどが考えられるが、今後詳しい研究が必要である。

3 - 4 これらの反応の化学進化的な意味と RNA の生成モデルとしての評価

本研究では、オリゴヌクレオチドの環化反応を抑制し 2 量化が効率よく進行する条件を見だし、高温下で機能するオリゴヌクレオチドの生成系を構築するために 3 種類の反応を調べた。第 1 に従来の研究で用いたオリゴヌクレオチド

より鎖長の大きな 12 鎖長のオリゴヌクレオチドを用いて、環化反応を調べた。その結果、これらの系では単純に環化反応が進行するだけであり 2 量化は進まなかった。第 2 および 3 として、6 または 8 鎖長のオリゴヌクレオチドの環化反応に対して原料のオリゴヌクレオチドと相補的な塩基配列を持つ 2 倍の鎖長のオリゴヌクレオチドを添加してその影響を調べた。これらの鋳型が存在する系でも主として環化が進行し、鋳型となり得るオリゴヌクレオチドの影響は小さかった。また、環化が抑制された場合でも 2 量化の進行に対してはあまり効果はなかった。すなわち、短鎖オリゴヌクレオチドの 2 量化反応に対してその相補的な塩基配列をもつ 2 倍鎖長のオリゴヌクレオチドを添加する系は、高温下で働く RNA の生成モデルとしていまのところ

適していない。これらの系では 5'-末端のリン酸基がイミダゾールの存在下で EDAC によってイミダゾリドとなり、活性化され原料として利用されるので、このイミダゾリドの生成過程が環化と 2 量化の効率に影響を与えたかも知れない。これを検証するために、イミダゾリドを 5'-位置にもつオリゴヌクレオチドを Joyce らの方法で調製したところ[12]、合成途中で環化反応が起こりイミダゾリドの純度は低かった。したがって、オリゴヌクレオチドのイミダゾリドを原料として用いるためには工夫が必要である。また、グアニンを含むホモオリゴヌクレオチドは会合体を形成しやすいため、陰イオン交換 HPLC で分析するときに複数のピークを生じるなど、解析が複雑になりやすかった。この点でもこの系は良いモデルとは言えない。

一方、本研究で行った条件下では、6 鎖長から 12 鎖長のオリゴヌクレオチドは非生物的環境では鋳型指示的には伸長しにくいことが示された。すなわち、短鎖 RNA オリゴマーを経由してそれらが鋳型指示的に伸長する反応系は、環化反応を抑制する経路がなければ原始地球環境下では起こりにくかったことを示唆している。3 鎖長の系でも鋳型指示的な伸長を起こすためには 5'-および 3'-末端に工夫が必要であることも[13]、これを間接的に支持していると思われる。また例えば、粘土のような触媒上である程度長いオリゴヌクレオチドが生成しても、粘土からオリゴヌクレオチドが脱着して水中で伸長が進行する場合には環化反応が障害となったことが考えられる。実際、粘土存在下でも環化反応は伸長反応の効率を低下させることが示されており[14]、環化反応はオリゴヌクレオチドの蓄積に対して障害となった可能性を支持している。

4 まとめ

RNA ワールド仮説は生命の起源のモデルとして重要である。また、試験管内分子進化法で種々のリボザイムを創出できることや、化学進化実験で RNA が生成する事実は RNA ワールド仮説を強く支持している。しかし、熱水起源説との関係を議論するためには、そのような環境で働くモデルを構築しその化学反応としての特性を詳しく解析することによって、高温下でそれらの反応が起こりやすかったのかどうかを検証しなければならない。このようなモデルを構築するために本研究で探索した比較的短鎖長のオリゴヌクレオチドを用いる反応系は、2 量化を起こす方法としては効率は低かった。この種のネガティブデータは捨て去られがちであるが、化学進化の研究においては様々な条件下での反応に関する知識を収集する作業が必要である[15]。また、本研究で得られた結果は、環化を抑制するためには鋳型を加えるだけでは不十分であることを示唆しているが、熱水中では RNA の生成反応は起こらないことを断定するものでもない。実際、好熱性細菌の存在は、酵素を用いれば RNA の生成反応は高温下でも可能であることを示している。このような好熱性細菌の酵素のモデルとして、原始環境で自発的に生成するタンパク質状物質がこのような高度な機能を直ちに発揮するかどうかは分からないが、RNA を重合するような機能を原始酵素が持ち得たかどうかということ視野にいれることも必要である。またオリゴヌクレオチドを分析する方法の改良も必要であることを知った。

謝辞

大阪府立大学大学院農学研究科深田はるみ助教授には DSC 測定についてお世話になりました。本研究は日本学術振興会科学研究費補助金

(15550150) の援助をいただきました。以上の方々に謝意を表します。

引用文献

- [1] Gilbert, W. The RNA World, Nature 319, 618 (1986); Gesteland, R. F. and Atkins J. F. Ed., The RNA World, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1993.
- [2] White, R. H. Hydrolytic stability of biomolecules at high temperatures and its implication for life at 250 °C, Nature 310, 430-432 (1984); Yanagawa, H. and Kojima, K. Thermophilic microspheres of peptide-like polymer and silicates formed at 250 °C. J. Biochem. 97, 1521-1524 (1985); Baross, J. A. and Hoffman, S. E. Submarine hydrothermal vents and associated gradient environments as sites for the origin and evolution of life, Origins Life 15, 327-345 (1985); Miller, S. L. and Bada, J. L. Submarine hot springs and the origin of life, Nature 334, 609-611(1988); Holm, N. G. Ed., Special Issue-Marine Hydrothermal Systems and the Origin of Life; Origins Life Evol. Biosphere 22, 5-242 (1992) and therein.
- [3] Kawamura, K. Inspection of the RNA world hypothesis from the viewpoint of the hydrothermal origin of life: Reconstruction of the scenario on the origin of life, Viva Origino 28, 129-138 (2000).
- [4] Kawamura, K., Nakahara, N., Okamoto, F. and Okuda, N. Temperature dependence of the cyclization of guanine and cytosine mix hexanucleotides with water-soluble carbodiimide at 0 - 75 °C, Viva Origino 31, 221-232 (2003).
- [5] Kawamura, K. Kinetics and activation parameter analyses of hydrolysis and interconversion of 2',5'- and 3',5'-linked dinucleotide monophosphate at extremely high temperatures, Biochim. Biophys. Acta 1620, 199-210 (2003); Kawamura, K. Kinetic analysis of the cleavage of the ribose phosphodiester bond within guanine and cytosine-rich oligonucleotides and dinucleotides at 65 - 200 °C and its implications concerning the chemical evolution of RNA, Bull. Chem. Soc. Jpn., 76, 153-162 (2003); Kawamura, K. Hydrolytic stability of ribose phosphodiester bonds within several oligonucleotides at high temperatures using a real-time monitoring method for hydrothermal reactions, Chem. Lett. 1120-1121 (2001); Kawamura, K., Kameyama, N. and Matumoto, O. Kinetics of hydrolysis of ribonucleotide polymers in aqueous solution at elevated temperatures: Implications of chemical evolution of RNA and primitive ribonuclease, Viva Origino 27, 107-118 (1999).
- [6] Kawamura, K. and Umehara, M. Kinetic analysis of the temperature dependence of the template-directed formation of oligoguanylate from the 5'-phosphorimidazolide of guanosine on a poly(C) template with Zn^{2+} , Bull. Chem. Soc. Jpn. 74, 927-935 (2001).
- [7] Kawamura, K. and Okamoto, F. Condensation reaction of hexanucleotides containing guanine and cytosine with water soluble carbodiimide, Nucleic Acids. Symp. Ser. 44, 217-218 (2000); Kawamura, K. and Okamoto, F. Cyclization and dimerization of hexanucleotides containing

- guanine and cytosine with water-soluble carbodiimide, *Viva Origino* 29, 162- 167 (2001).
- [8] Lohrmann, R. and Orgel, L. E. Reactions of adenosine 5'-phosphorimidazolid with adenosine analogs on a polyuridylic acid template, *J. Mol. Biol.* 113, 193-198 (1977); Lohrmann, R. and Orgel, L. E. Efficient catalysis of polycytidylic acid-directed oligoguanylate formation by Pb^{2+} , *J. Mol. Biol.* 142, 555-567 (1980).
- [9] Sen, D. and Gilbert, W. Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis, *Nature* 334, 364-366 (1988).
- [10] Sawai, H. and Wada, M. Nonenzymatic template-directed condensation of short-chained oligouridylates on a poly(A) template, *Origins Life Evol. Biosphere* 30, 503-511 (2000).
- [11] Kanaya, E. and Yanagawa, H. Template-directed polymerization of oligoadenylate using cyanogen bromide, *Biochemistry* 25, 7423-7430 (1986).
- [12] Joyce, G. F., Inoue, T. and Orgel, L. E. Non-enzymatic template-directed synthesis on RNA random copolymers, Poly(C,U) templates, *J. Mol. Evol.* 176, 278-306 (1984).
- [13] Terfort, A. and von Kiedrowski, G. Self-replication by condensation of 3-amino-benzamidines and 2-formylphenoxyacetic acids, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 31, 654-656 (1992); von Kiedrowski, G. A Self-replicating hexadexynucleotide, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25, 932-935 (1986); Sievers, D. and von Kiedrowski, G. Self-replication of complementary nucleotide-based oligomers, *Nature* 369, 221-224 (1994).
- [14] Prabahar, J. K., Cole, T. D. and Ferris, J. P. Effect of phosphate activating group on oligonucleotide formation on montmorillonite: The regioselective formation of 3',5'-linked oligoadenylate, *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 10914-10920 (1994); Ding, P. Z., Kawamura, K. and Ferris, J. P. Oligomerization of uridine phosphorimidazolidines on montmorillonite: A model for the prebiotic synthesis of RNA on minerals, *Origins Life Evol. Biosphere* 26, 151-171 (1996); Prabahar, J. K. and Ferris, J. P. Adenine derivatives as phosphate-activating groups for the regioselective formation of 3',5'-linked oligoadenylates on montmorillonite: Possible phosphate-activating groups for the prebiotic synthesis of RNA, *J. Am. Chem. Soc.* 119, 4330-4337 (1997).
- [15] Kawamura, K., Kuranoue, K. and Umehara, M. Chemical evolution of RNA monomers and RNA polymerases: Implication from search for the prebiotic pathway of formation of RNA from adenosine 5'-triphosphate in the presence of thermal condensation products of amino acids as primitive enzymes. *Viva Origino* 30, 123-134 (2002).