

INNOVATIONS OF HYDROTHERMAL FLOW REACTORS FOR THE CHEMICAL EVOLUTION ON PRIMITIVE EARTH: THE NEXT STEP FOR THE EXPERIMENTAL EVALUATION OF LIFE-LIKE SYSTEMS

Kunio Kawamura

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University
Gakuen-cho 1-1, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan
kawamura@chem.osakafu-u.ac.jp

Fax: 072-254-9284

(Received July 2, 2010; Accepted October 28, 2010)

(Abstract)

The hydrothermal origin-of-life hypothesis has been experimentally verified using the hydrothermal flow reactor systems in our group. In this review, the reason why we have examined RNA and proteins from the viewpoint of the hydrothermal origin-of-life and the process for development of the hydrothermal reactors is briefly described. Based on these investigations, the importance of the stability and prebiotic formation of biopolymers under hydrothermal environments on primitive earth, and the interactions and solubility of prebiotic biomolecules will be addressed. Furthermore, the studies led to another requisites for a primitive life-like system as a living system as well as the stability, formation, interaction, and solubility of prebiotic molecules. The stability of the primitive life-like system, which is one of the requisites, would have been the base for continuous chemical evolutions towards a higher level of the system.

(Keywords)

hydrothermal origin-of-life, analytical tool, RNA, protein, requisites as alive

熱水フローリアクターの技術開発と化学進化研究への適用
: 生命的システムの実験的検証のための第2段階
川村邦男
大阪府立大学大学院工学研究科物質・化学系応用化学分野
大阪府堺市中区学園町1-1
Fax: 072-254-9284

要旨

サイエンスの進歩には、新しい物事・概念の発見と方法論・実験装置の発明が必要である。生命の起源の問題はまさにサイエンスのフロンティアであるから、この問題に挑戦するためには、既存の概念・方法論・市販装置は役に立たない場合が多いだろう。我々のグループでは、RNAワールド仮説やタンパク質ワールド仮説を生命の熱水起源という視点から検証するために様々な実験手法を工夫し研究してきた。我々が熱水起源の検証を始めた頃には研究のための良い方法論がなかったので、方法論と装置をつくることから始めた。結果として、それまでに世になかった新しい方法と装置を確立した。これらを用いて、RNAやアミノ酸・タンパク質の安定性、高温下での化学進化、高温下での生体分子の相互作用などについて実験データを蓄積し、生命の熱水起源を検証した。本総説では、RNAやタンパク質の化学進

化についてこれまでに得られた知見を簡単にまとめる。また、そのような単純な分子の集団がいかんして本物の生命に発展したかについて議論する。

1. 序論

私は1992年にレンセラー工科大学のJames P. Ferris教授の下で、生命の起源の研究を始めた。その当時はRNAワールドが登場して間もなく[1]、RNAワールド仮説を支持する先駆的な研究が次々に登場し[2-8]、RNAワールド仮説は生命の起源について最も人気のある仮説へと発展しつつあった。Ferris教授の下で行った粘土鉱物触媒を用いるRNAの生成反応もRNAワールド仮説を支持する根拠の一例である[6,9]。しかし、熱水起源仮説という視点からRNAをみるとどうなるであろうか[10]。RNAは不安定であるからすぐ分解し、熱水起源説とは矛盾するように思われる。また、生体中でRNAが多様な機能を発現するためには3次構造を保たなければならず、その構造安定性は、水素結合・疎水性相互作用などの弱い相互作用によって保たれていると考えられている。しかし熱水噴出孔のような超高温では、水素結合や疎水性相互作用などは働きそうにはない。一方で、RNAを含めて熱水起源説が想定するような300°Cにおよぶ超高温環境で、生体分子の安定性や状態を測定するための良い実験方法はなかった。さらに、RNAの安定性と言っても生命は物質やエネルギーが出入りする非平衡状態で存在するものであるから、RNAワールドを評価する場合にも平衡論的な安定性ではなく、系内での生成量と減少量から物質の量が決定するという、いわば速度論的な安定性を考えなければならない。

これらの議論は、私がRNAワールド仮説を熱水起源説から検証する研究を始めた頃は推論にとどまっていた。これらの推論を検証するためには、まず実験データを収集しなければならない。そこで、熱水中でのRNAの熱安定性について正確なデータを出すことを目標として熱水反応を調べる方法論の開発に取り組んだ。

2. 方法論の開発

最初はガラス封管にアデノシン5'-三リン酸(ATP)などを含む水溶液を入れ、封入した後に中身を取り出して分析するという方法で安定性を調べた[11]。ATPはリン酸基が加水分解し脱離しアデノシン5'-二リン酸(ATP)、アデノシン5'-一リン酸(AMP)、アデノシンとなり、さらにN-グリコシド結合が切れてアデニンとなり、さらにヒポキサンチンとなるが、高温ではこれらの過程が速やか進むので、ATPからADPが生成する

過程などは 150°C程度までしか測定できなかった。もし、もっと高温で反応の過程を調べようとすれば、より短時間に試料溶液を加熱し反応後は瞬間的に冷却しなければならない。そのために2種類の方法が考えられる。第1は、封管のサイズを可能な限り小さくし、熱伝達速度を上げて短時間で反応させるという方法である。この方法の問題点は、加熱時間を正確に制御できるかどうかということと、封管サイズを小さくすると、試料量も小さくなるので分析が難しくなることである。第2は、あらかじめ加熱したチューブに試料を流してそこを通過する時間だけ加熱するというフロー法である。この場合には、第1で予想される2つの問題は解決できる。すなわち、流速を一定にすればフロー系に注入する試料体積によらずに加熱装置の中を通過する時間は一定であり、流速制御の精度の範囲内で加熱時間を制御できる。しかもポンプを用いれば流速の制御は精度良くできる。ただしフロー系であるので、試料の希釈を考慮しなければならない。この他にも、封管のサイズを小さくする方法では、複数の試料を反応させる場合にはその数だけ試料を作り、加熱ししかも封入しなければならないという難点もある。一方、フロー法であれば、試料を調製するところまでは同じ作業が必要だが、封管等への封入は不要である。これらの試料溶液を加熱装置の中を通過する時間はフロー系の流速を変えて次々に注入すれば、加熱反応時間を变化させた試料が短時間に得られる。このように、フロー法の方がいくつかの点で優れていると予想されるので、フロー系に基づいて高温水溶液反応の短時間過程追跡法を開発した。

最初の装置を 1998 年に発表した[12]。ほぼ同じ時期に、今井・松野らのグループでは深海底熱水噴出孔を模擬した熱水フローリアクターが発表された[13]。我々の方法の目標は反応を観測することであり、今井らの方法では熱水噴出孔をシミュレーションすることにある。本法の基本概念

を以下に説明する (Fig. 1)。加熱装置の内部はチューブでありその中を試料が通過する。本法の技術的要点は2つある。第1は、試料は主に水溶液であるが、ある温度に加熱する場合にはその蒸気圧以上に系全体の圧力を高く保たなければならないことである。このために、当初は細いチューブから製作した背圧管を用いたが、市販の圧力自動調節器などを使用することも可能である。第2は、試料が通過する時間はポンプ流速あるいはチューブサイズ (内径と長さ) を変えることによって簡単に変更可能であるということである。上で述べたように、加熱時間は試料の注入体積には依存しない。最初の装置では、350°C、加熱時間 1 ~ 3 秒での測定が可能であった。

この原理に基づいて、チューブサイズ (内径と長さ) を小さくして、どこまで短時間の反応を追跡できるか限界を調べた。このためにチューブとしてガスクロマトグラフィーあるいはキャピラリー電気泳動法で用いる溶融シリカキャピラリーを用いた。溶融シリカキャピラリーは簡単に手に入る最も細い市販のチューブである。内径は最小で 0.005 mm のものが市販されている。これによって、最小加熱時間 0.002 秒を達成し、2 ~ 50 ミリ秒、温度 300°C 以上でヌクレオチドの分解曲線を得ることに成功した[14,15]。

以上の通りミリ秒レベルでの測定が可能になり、ほぼ当初の目標を達成した。さてここで、溶融シリカキャピラリーの素材は石英であるので、そこに紫外可視吸光検出器などを接続すれば、超高温溶液のスペクトル情報がその場で得られる。そこで、このような概念の紫外可視吸光スペクトル測定装置の開発を試みた[16]。この研究ではマツダ財団の援助も受け、短期間に目的とする装置を製作した。最高温度 400°C で数 10 ミリ秒から数秒でその場観測できる。この装置を用いて、高温下での分子間相互作用の測定を行った[16]。現在はこの装置の実用化をめざして企業とともに研究を進めている[17]。

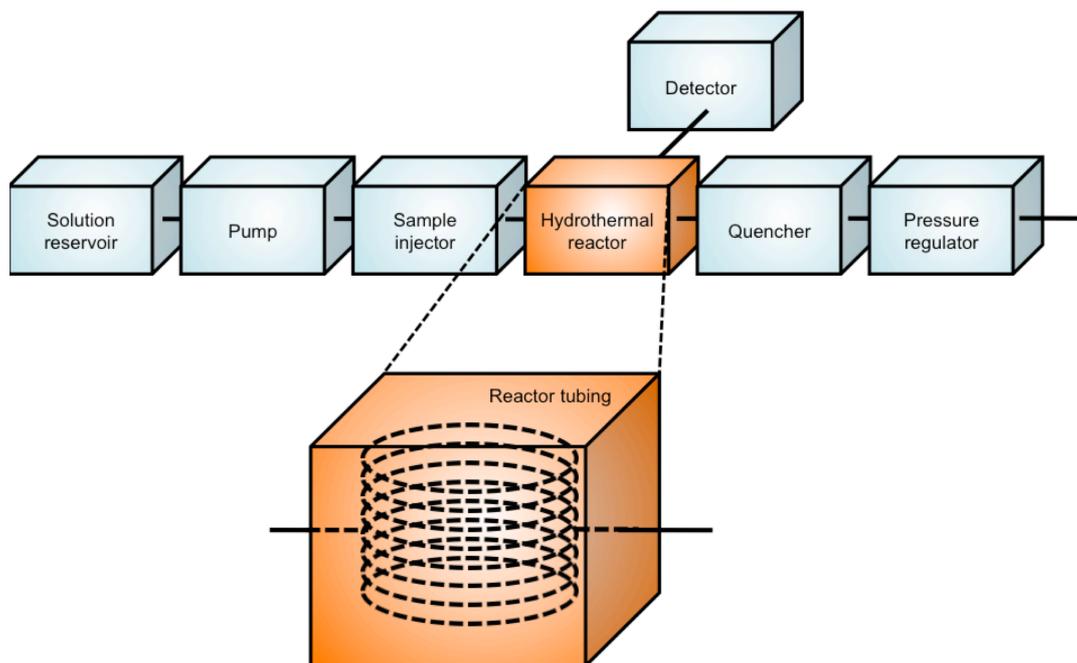


Figure 1. Hydrothermal flow reactor system.

3. 生命の熱水起源の検証

これらの装置を用いて、RNA ワールドを熱水起源から検証する研究を進めた。また、RNA とタンパク質のどちらがより熱水中で有利であるか、そしてこれらの物質を土台として生命的システムを熱水中で構築できるかどうかを議論するための基礎データを得た。ヌクレオチドモノマー、オリゴマー、ポリマー、またアミノ酸、ペプチド、タンパク質の安定性を高温下で調べ、また、核酸およびタンパク質等の原始的生成と高温下での相互作用について既報にまとめた[10,12-14,18-23]。核酸類と比べるとアミノ酸・ペプチド・タンパク質は安定だが、基本的には熱水中では速やかに分解する。生成反応についてはRNA の種々の原始ポリメラーゼ反応の温度依存性を調べ、高温でも条件を整えば生成する可能性があることを示した。また、熱水中での新しいペプチド生成反応を発見した。安定性を議論するためには、あくまで、系内での生成過程（あるいは系内への流入過程）と分解過程（流出過程）を考慮しなければならない。そのような観点が無い議論はナンセンスである。RNA やタンパク質は様々な機能を生み出すポテンシャルを持つ物質であるが、化学進化の実験に非平衡環境という視点を加えれば生命の起源の問題により近づけるだろう。一方、分子内あるいは分子相互作用の点では核酸とタンパク質のどちらがより有利であるという証拠は得られていない。

さらに、これらの測定を通して、熱水中での生体分子の溶解度は熱水起源を考える上で重要な条件であることを知った[18,24]。例えばDNA は低温では2重らせんを形成するが、そのために溶解度は大きい。これが1重鎖になると共存陽イオン（特にマグネシウムイオン）と相互作用し電荷が中和されるため溶解度が低下する。また、さまざまなタンパク質でも溶解度は低下した。この理由は、タンパク質の3次構造の破壊やDNA の場合と同様に、共存イオンとイオン対を作り溶解度が低下するなどが考えられるであろう。

以上の結果から、熱水中でRNA やタンパク質が生命的システムを構築したとして、どちらが適

しているかについてTable 1にまとめる。多くの項目について核酸とタンパク質が熱水起源説からみて優劣をつけることは難しいように思われる。熱水中ではRNA はタンパク質よりも安定性は低いが、本質的にはどちらも不安定である。しかも、非平衡論的な環境を想定すればどちらもが熱水中で蓄積し生体機能を発現した可能性がある。今後は、これらの本質的には不安定な核酸やタンパク質のような物質の集合体から、いかにして生命的システムが構築されたかという視点で、さらに実験研究を進めることが必要である。また、核酸とタンパク質とが相互作用しながら化学進化したということの方が、現在の生命体を考えると妥当なので、その視点も実験に組み込むべきである。例えば、RNA の複製系が出現したとするならば、そこにタンパク質状物質がどのように関わり、そのタンパク質状物質の機能をどのようにコード化されたかという共進化を理解することが必要である。このような視点の研究として、RNA の鋳型支持反応や、RNA の安定性に対するタンパク質状物質の影響を調べたが、タンパク質状物質には基本的には大きな効果はないことが分かった[25-27]。

4. 生命のシステムとしての安定性

以上のように生体分子の熱安定性と熱水中での化学進化過程を研究してきた。一方で、生命の定義、生物の生命らしさをもたらす属性は何か、簡単な分子の集団からどのように生命体と呼べるシステムへと発展したかなど、生命とその起源の本質にせまるため研究を進めてきた[28-31]。これらの研究結果を総合すると、ある化学システムが生命体になるためには、生命システムの安定性は基本的制約であり、このことに焦点をあてて研究すべきであることが明らかになった。例えばこの観点から見ると、RNA やタンパク質状物質などの単なる分子集団は、生命の前駆体としては不十分である。RNA ワールド仮説もタンパク質ワールド仮説[32]も、私の知る限りこのような視点を考慮していない。

生命には生命らしさを表すいくつかの属性が

Table 1. Comparison of RNA and protein from the viewpoint of the hydrothermal origin of life.

	RNA	protein
Thermal stability (relative degradation rate)		
monomer	1	10000
oligomer	1	100
Formation under hydrothermal conditions	It would be possible if the elongation starts from 3-mer and longer in the presence of additives.	Oligopeptides form at 250~330°C.
Accumulation under hydrothermal conditions	It would be possible if the formation rate is greater than the degradation rate.	
Hydrophobic interaction and hydrogen bonding	These interactions decrease with increasing temperatures.	
Solubility	The solubility of RNA and protein would decrease with increasing temperature.	

ある[31] (Table 2). 分子レベルでみると, 代謝・複製・変異・情報と機能の対応付けなどがその属性としてあげられる[28-30]. 一方, システムとしてみると, 生命は環境を認識し環境を自身に取り込み, また環境に対してシステム側から働きかける能力を持っている. このためには, 生命にはシステムとしての柔軟性が必要である. また環境と相互作用するためには, 自己と環境を認識する能力が必要である. 外界の環境だけでなく同じ種に所属する他を認識する能力も備わっている. 一方, 生命には一つのまとまり (一体性) をもち, そのまとまりは空間的および時間的に継続するという安定性をもつ. 私は, 原始化学システムが生命に至った際に, 一体性と安定性は最もプリミティ

ブな属性であり, それらを獲得した後に, 環境との関係や, 柔軟性, 認識能などの生命らしさを獲得したと考えている.

この安定性を保持するためにシステムは2つの制約を満たさなければならないだろう. 第1として, 構造的なまとまりがなければならない. つまり一体性は安定性を保つことと関連している. 第2として, 非平衡状態としての安定性を保たなければならない. 以上から, 化学進化と各時点においてどのような要素がシステムに加わっていったかについて Fig. 2 に簡単にまとめる. 単純な分子の集団が, 最初のステップで各分子同士が緩やかに相互作用した化学システムへと変化した. 次に, その中から自己複製系などの化学反応

Table 2. Attributes for a system to regard as alive.

Attributes	Descriptions
Inside of the system	
Metabolism	Chemical networks for controlling inflow and outflow, and formation and degradation.
Replication	Based on the replication of DNA and RNA.
Mutation	Based on the error during the replication of DNA and RNA.
Functional as a system	
Subjectivity to environments	Ability to subjectively adapt to the environments.
Flexibility	The system is flexible to adapt to the change of outer stress.
Cognition	Ability to cognize itself, others, species, and environments.
Individuality	A system is integrated as a unit.
Stability	Continuity of the system.

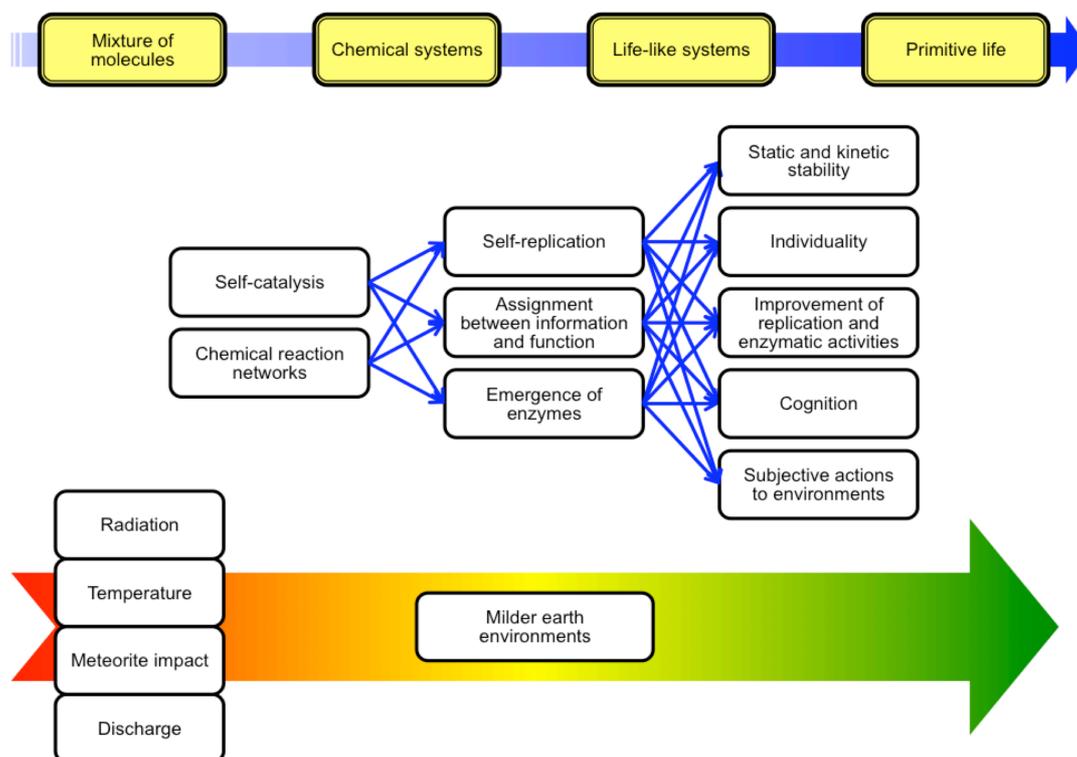


Figure 2. A scenario for the emergence of life.

として必要な性質を獲得し、生命的システムとなる。これらから、さらに生命の属性として重要な、安定性、一体性、自己・種・環境などの認識能、環境を取り込みあるいは環境の変化に対応する能力（柔軟性や適応性）を獲得し、原始生命へと進化するシナリオである。これらの属性がどのような順序で形成されたかは今のところ不明であるが、システムとしてのまとめ（一体性）と安定性がその前提となると考えている。

5. まとめと展望

我々の研究に基づくと、生命の熱水起源仮説はRNAワールド仮説やタンパク質ワールド仮説と矛盾するものではない。従って、それらの単純な分子集団からどのようにして環境を認識し環境の変化に対応できる本物の生命体になったのかという過程を解明することが次のステップである。そのような場面でも新しい実験方法論の構築が必要であろう。

本総説で述べたとおり、RNAワールド仮説やタンパク質ワールド仮説のような分子レベルでのアプローチから登場した仮説には、生命らしさという本質的問題に対する視点は欠如しているように思う。すなわち生命の起源が分かったというためには、これらの分子集団がどのようにして生命らしさを獲得したかを明らかにしなければならない。生命とは何かという問題は、生命の起源を明らかにしようとする研究と深く関わっている。従って、生命とは何かということの研究し、生命の起源についても何らかの知見を得るといふアプローチを粘り強く試みなければならぬだろう。例えば、天体の運行に関するわずかな観測事実から物質の間に働く法則が見出されたように、生命をじっくりと観察すれば生命の背景に隠されている法則を見出すことは不可能ではないだろう。

謝辞

本研究の一部は科学研究費補助金（20540476 および 21200004）によって行われた。深甚の謝意を表します。

References

- Gilbert, W. The RNA world, *Nature* 319, 618-618 (1986).
- Ellington A. D. and Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature* 346, 818-822 (1990).
- Tuerk, C. and Gold. L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science* 249, 505-510 (1990).
- Terfort, A. and Von Kiedrowski, G. Self-replication by condensation of 3-aminobenzamides and 2-formylphenoxyacetic acids, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, 31, 654-656 (1992).
- Beaudry, A. A. and Joyce, G. F. Directed evolution of an RNA enzyme, *Science* 257, 635-641 (1992).
- Ferris, J. P. and Ertem, G. Oligomerization of ribonucleotides on montmorillonite: reaction of the 5'-phosphorimidazolide of adenosine, *Science* 257, 1387-1389 (1992).
- Sievers, D. and Von Kiedrowski, G. Self-replication of complementary nucleotide-based oligomers, *Nature* 369, 221-224 (1994).
- Nemoto, N. and Husimi, Y. A model of the virus-type strategy in the early stage of encoded molecular evolution, *J. Theor. Biol.* 176, 67-77 (1995).
- Kawamura, K. and Ferris, J. P. Kinetics and mechanistic analysis of dinucleotide and oligonucleotide formation from the 5'-phosphorimidazolide of adenosine on Na⁺-montmorillonite, *J. Am. Chem. Soc.* 116, 7564-7572 (1994).
- Kawamura, K. Behavior of RNA under hydrothermal conditions and the origins of life, *Inter. J. Astrobiol.* 3, 301-309 (2004), およびその中の引用文献。
- Kawamura, K., Yosida, A. and Matumoto, O. Kinetic investigations for the hydrolysis of adenosine 5'-triphosphate at elevated temperatures: Prospects for the chemical evolution of RNA, *Viva Origino* 25, 177-190 (1997).
- Kawamura, K. Kinetic analysis of hydrothermal reactions by flow tube reactor -hydrolysis of adenosine 5'-triphosphate at 398 - 573 K -, *Nippon Kagaku Kaishi*, 255-262 (1998).
- Imai, E., Honda, H., Hatori, K., Brack, A., Matsuno, K. Elongation of oligopeptides in a simulated submarine hydrothermal system, *Science* 283, 831-833 (1999).
- Kawamura, K. Monitoring hydrothermal reactions on the millisecond time scale using a micro-tube flow reactor and kinetics of ATP hydrolysis for the RNA world hypothesis, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 73, 1805-1811 (2000).
- 高温高圧溶液反応の高速追跡方法及びそれに用いる装置, 出願人: 科学技術振興事業団, 発明者: 川村邦男, 特許: 3378936
- Kawamura, K. *In situ* UV-VIS detection of hydrothermal reactions using fused-silica capillary tubing within 0.08 - 3.2 s at high temperatures, *Anal. Sci.* 18, 715-716 (2002).
- 仲井和之, 川村邦男, 平成 21 年度戦略的基盤技術高度化支援事業 (経済産業省)「高性能化学合成プロセス効率化ツール: 高温高圧近赤外スペクトロメータの実用化」, 成果報告書, 2010 年 3 月.
- Kawamura, K., Nagayoshi, H. and Yao, T. *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* 667, 88-95 (2010).
- Kawamura, K., Nishi, T. and Sakiyama, T. Consecutive elongation of alanine oligopeptides at the second time range under hydrothermal condition using a micro flow reactor system, *J. Am. Chem. Soc.* 127, 522-523 (2005).
- Kawamura, K. and Shimahashi, M. One-step formation of oligopeptide-like molecules from Glu and Asp in hydrothermal environments, *Naturwissenschaften* 95, 449-454 (2008).
- Kawamura, K. Possible pathways before and after the RNA world on the basis of experimental and theoretical evidences, *Viva Origino* 33, 258-258 (2005).
- 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*, 37, 31-42 (2009), およびその中の引用文献。
- Kawamura, K., Nagayoshi, H. and Yao, T. 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* 35, 879-891 (2009).
- Kawamura, K. and Nagayoshi, H. Behavior of DNA under hydrothermal conditions with MgCl₂ additive using an in situ UV-visible spectrophotometer, *Thermochimica Acta* 466, 63-68 (2007).
- Kawamura, K., Kuranoue, K., Nagahama, M. Prebiotic inhibitory activity of protein-like molecules to the template-directed formation of oligoguanylate from guanosine 5'-monophosphate 2-methylimidazolide on a polycytidylic acid template, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 77, 1367-1375 (2004).
- Kawamura, K., Nagahama, M., Kuranoue, K. Chemical evolution of RNA under hydrothermal conditions and the role of thermal copolymers of amino acids for the prebiotic degradation and formation of RNA, *Adv. Space Res.* 35, 1626-1633 (2005).
- Kawamura, K., Nagahama, M., Yao, T. Inhibitory activity of thermal copolymers of amino acids for the metal-catalyzed hydrolysis of an RNA dinucleotide, *Adv. Space Res.* 38, 1220-1226 (2006).
- Kawamura, K. The origin of life from the life of subjectivity, pp. 563-575, in Palyi, G., Zucchi, C. and Caglioti, L. Eds., *Fundamentals of Life*, Elsevier, Paris, 2002.
- Kawamura, K. Relativity of the roles of genes, subjectivity, and self-organization for the origin and evolution of life, pp. 218-238, in Levit, G. S., Popov, I.Y., Hofbeld, U., Olsson, L. and Breidbach, O. Eds., *In the Shadow of Darwinism*.

- Alternative Evolutionary Theories in the 20th Century, Fineday Press, St-Petersburg, 2003.
30. 川村邦男, 生命の主体性に基づく生命系の時間発展の理論 -化学進化, 生物進化, 文化・文明の発展を生命現象としてみる-, Viva Origino 33, 17-35, 2005.
 31. Kawamura, K. Civilization as a biosystem examined by the comparative analysis of biosystems, BioSystems 90, 139-150 (2007).
 32. Ikehara, K. Possible steps to the emergence of life: The [GADV]-protein world hypothesis, Chem. Rec. 5, 107-118 (2005).