

トピックス

前生物的合成におけるイミダゾール・イミダゾリウムの役割

Imidazole and imidazolium in prebiotic synthesis

前生物的合成においては、核酸塩基、糖、アミノ酸、そして原始的な補因子がそれぞれの単位として作られ、その後それらが組み合わさって高分子やそれに結合する低分子ヌクレオチドになったと考えられていたが、最近ではピリミジンヌクレオチドの前生物的合成(文献1に紹介)など、いくつかの単位が合わさったものが一気に作られる、という考え方も浸透してきている。しかし、RNA ワールドにおける RNA の自己複製についてはやはりヌクレオシドリン酸(NMP) どちらの結合が基本であると考えられる。現在では言うまでもなくヌクレオシド三リン酸(NTP) のエネルギーを用いて RNA の伸長が行われているが、前生物的合成の頃は NTP としてのエネルギー供給系は確立していなかったもので、どのようにリン酸基を活性化していたかが問題となる。

この活性化を行うものとして最近注目されているのがイミダゾリウム(イミダゾール環を有するカチオン)の構造である。本稿では前生物的な RNA 合成におけるこの役割と、触媒としての働き、そして本来のイミダゾールの由来についての議論を合わせて紹介する。

1. RNA 伸長反応におけるイミダゾリウム

前生物的合成における NMP のリン酸基の活性化はイミダゾールによってなされると考えられてきた²⁾。現存する生物においても、例えばホスホグリセリン酸ムターゼの活性部位などリン酸基転移を行う酵素やタンパク質においてヒスチジンのイミダゾール基がリン酸化されたものが中間体として存在することから、リン酸基の活性化の一つの形態として理解できる(図1)。

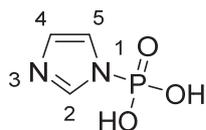


図1 イミダゾリルリン酸。正式名称は(1*H*-imidazol-1-yl) phosphonic acid。実際はリン酸基がさまざまな化合物にエステル結合している。

ところが、2016年にSzostakらのグループは2-メチルイミダゾールを結合したNMPが2分子反応して5'-リン酸基どうしがイミダゾリウムで橋渡しされた構造のものとなり、RNA伸長反応に用いられることを示した。そして、これが鋳型となるRNAに隣り合って水素結合し(図2)、その一方がもともと存在するRNA鎖(プライマー)の3'-OHによって攻撃されるメカニズムを提唱した³⁾。従来考えられてきたイミダゾールよりもイミダゾリウムの方が良好な脱離基であるため、より効率よく反応が進行することが期待される。その後、このイミダゾリウムの構造を蓄積しやすいということから、2-メチルイミダゾールは2-アミノイミダゾールに置き換えられて考えられるようになった⁴⁾。

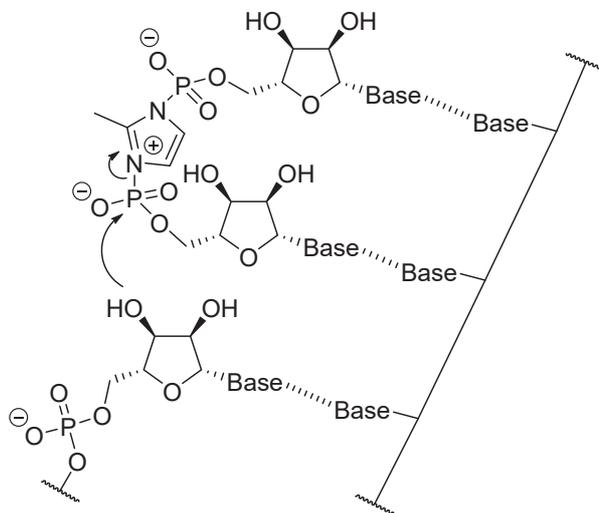


図2 2-メチルイミダゾールのイミダゾリウムで橋渡しされたNMP。これがRNAの鋳型鎖(右側に簡略化した形で示す)と塩基対を形成する。左下に示した既存のRNA(プライマー)の3'-OHが一方のリン酸エステルを攻撃し、ホスホジエステル結合の形成、RNA鎖の伸長が行われる。

NMPのリン酸基とイミダゾール誘導体の縮合したものが生成するのはエネルギー的に不利であるが、リ

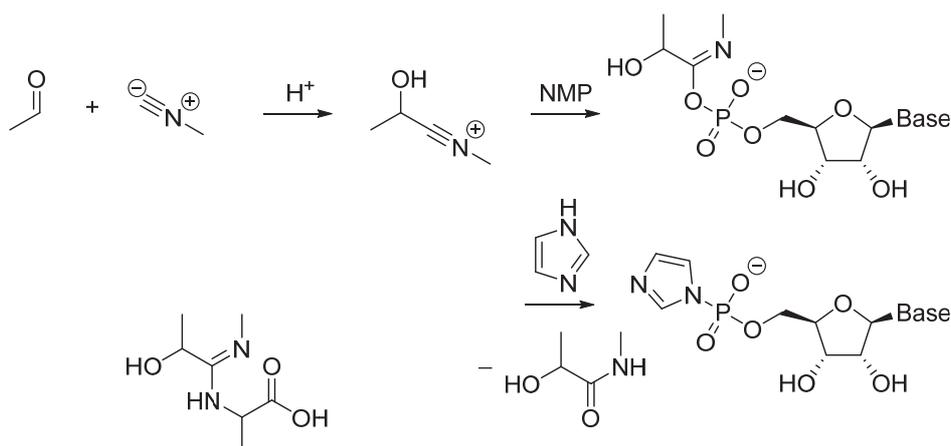


図3 予想される前生物的なイミダゾリルリン酸の生成の機構。シアンヒドリンがリン酸基の攻撃を受け、良好な脱離基である2-ヒドロキシ-1-(メチルイミノ)プロピル基となり、イミダゾールがこれと置換する。

ン酸基の活性化機構としては Sutherland らによって図3に示されるものが提唱されている⁵⁾。これは pH 6～7付近で起こり、核酸塩基を修飾することなく行われる。

ただし、この機構においてはメチルイソシアニド(イソシアノメタン) CNCH_3 が供給される必要がある。これについてはヘキサシアノ鉄(II)酸イオンの存在下、 HCN 、 CO 、 NO^+ (ニトロソニウムイオン)に紫外線が照射されることによって作られると考えている⁵⁾。この機構は文献5の Figure 3に示される通り複雑であるが、光反応によってヘキサシアノ鉄(II)酸イオンの CN^- と置換した NO^+ とメチルアミン CH_3NH_2 が反応して $\text{CH}_3\text{-N}_2^+$ (ジアゾニウムイオン)が配位子となって Fe^{2+} に配位するようになり、これにもう1分子のヘキサシアノ鉄(II)酸イオンの配位子の CN^- が求核攻撃して CNCH_3 を形成する、というものである。ここで求核攻撃を起こすのは遊離の CN^- ではなく、配位子の CN^- であり、そのために C ではなく N がメチル基に結合する原子となる。なお、この求核置換反応は光で促進されている。

この機構によれば、一旦 NMP のリン酸基が活性化されたあと、それがイミダゾール誘導体との縮合物に置き換わるので、一見無駄なことをしているようにみえるが、イミダゾリウムで橋渡しされる構造に意味があるので、無駄ではない。

Szostak らのグループはこの反応を詳細に検討し、最も効率の良い条件として、2-アミノイミダゾールは遊離の状態ではなくすべて NMP に結合した状態で存在し、既存の RNA の 2'-OH の活性化のための金属イオ

ン (Mg^{2+}) が共存する条件が最適であることを見いだした⁶⁾。

さらに、最近、このイミダゾリウムで橋渡しされた2つの NMP のモデルとして GpppG (2つの GMP がリン酸を介してつながったもの)を用い、 Mg^{2+} を配位している状態の X 線結晶解析を報告している。これによれば確かに既存の RNA 鎖(プライマー)の 3'-OH が求核攻撃を行いやすい位置にあること、そしてさまざまな糖の誘導体を用いたところ、リボースがそのエピマーであるアラビノースよりも求核攻撃に適した位置にあることが示した⁷⁾。これは、この機構が進化的に意味のあるものであることを示唆している。

この結晶構造においては、プライマーの 3'-OH が Mg^{2+} に配位しており、これによってヒドロキシ基が解離した形が安定化されていると考えられる。プライマーの 3' 末端を種々の糖に置換した実験では反応速度は 3'-OH の pKa とは関連がなく、また、重水の同位体効果もみられなかったことから、律速段階は既にアルコキシドとなった 3'-OH の求核攻撃の段階であると結論している⁷⁾。

2. チアゾリウム代替物としてのイミダゾリウム

RNA ワールドを構築するためには当然リボースが必要で、他の糖と同様、これがどのように作られたかというのは化学進化を考える上で重要である。

古く 1851 年に Butlerov によって HCHO から糖が作られることが見いだされていた⁸⁾。ホルモース反応と名付けられたこの反応は $\text{Ca}(\text{OH})_2$ を触媒とし、O が Ca^{2+} に配位することでヒドリド転移を伴ってグリコー

ルアルデヒド HOCH_2CHO が生成することが初発反応と考えられ、以後アルドール縮合を繰り返して進行する。同様の反応が原始の地球においても行われていた可能性があり、ホウ酸によって糖の中でもリボースが優先的に安定化されたという説がある⁹⁾。今日の代謝につながるような炭素化合物による触媒反応としては、 CN^- で触媒されるベンゾイン縮合に類似した反応が考えられる。しかし、 CN^- による三炭糖以上の糖の安定的な合成は再現されていない。おそらく CN^- の付加によってできたニトリルの反応性が高いためであろうと思われる。

現在の生物では、チアミン二リン酸のカルベンがケトンに付加してカルボニル炭素をカルボアニオンとして安定化し、転移させる機構が確立しているが、このチアミン二リン酸の中心的な構造であるチアゾリウムに類似した構造をイミダゾリウムが有している(図4(A))。いずれも2位の炭素が活性であり、プロトンを失ってカルベンとなる(図4(B))。チアゾリウムのこの性質はチアミン二リン酸の触媒機構においてよく

知られているが、イミダゾリウムにおけるこの性質は、タンパク質のプロトン化したヒスチジン残基が2位で H^3H 交換を起こすことを利用した同残基の $\text{p}K_a$ の決定に用いられたことを想起させる¹⁰⁾。

チアミンはベンゾイン縮合を触媒するが、同様の機構でイミダゾリウムが3分子のホルムアルデヒド HCHO からジヒドロキシアセトンの合成を触媒する過程がWeberらのグループによってみつげられている(文献11, 図4(C))。

イミダゾリウムは前生物的にかなり容易に作られていたようである。Weberらのグループは当初、(おそらくホルモース反応によって生成した)ジヒドロキシアセトンとアニリン、 HCHO から作られる経路を想定していた¹¹⁾が、その後、2分子のフルフラール(リボースの脱水によって作られる)がベンゾイン縮合して酸化され、アミンと HCHO と反応して生成する経路を実験的に見いだした(文献12, 図5)。このベンゾイン縮合の段階でイミダゾリウムが触媒となるため、自己触媒的な前生物的合成経路が起り、蓄積したイミダゾ

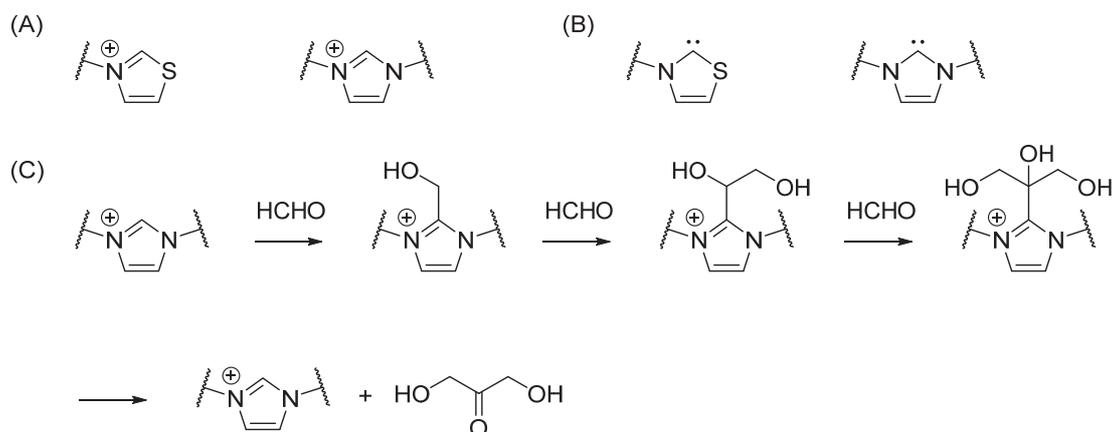


図4 (A) チアゾリウム(左)とイミダゾリウム(右)の構造の類似性. (B) それぞれがカルベンとなった構造. (C) イミダゾリウムで触媒されるホルムアルデヒドからのジヒドロキシアセトンの生成. ベンゾイン縮合を2回繰り返している。

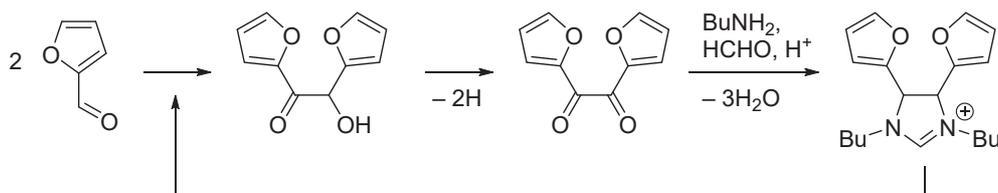


図5 イミダゾリウムの自己触媒的合成. 2分子のフルフラールのベンゾイン縮合(図の第1段階)において生成物のイミダゾリウムが触媒として働く。

リウムが糖、特にリボースの量産に貢献したことが考えられる。

3. ヒスチジンの前生物的合成

Szathmáry は現在の tRNA の原型となる、アミノ酸を結合した RNA が RNA ワールドにおいて存在したと考えている¹³⁾。これによって、純粋な RNA にはない触媒能力が獲得されたということで、Szathmáry はこれらに“アミノ酸補因子 amino acid cofactor”という名称を与えている。このアミノ酸を結合した小さな RNA は“ヌクレオチドハンドル”と呼ばれるが、現在のアンチコドンに当たる部分とアミノ酸の組合せは疎水性によって決まり (AGCU の順に疎水性が増し、疎水性のアミノ酸と対応する)、RNA の特定の塩基配列の場所に特定のアミノ酸がヌクレオチドハンドルを介して結合するという図式は早期に確立したと考えられる。おそらく、これを機に、RNA は単に自己増殖を行うだけの状態から脱し、原始の代謝に関わるようになったと思われる。

そして、この原始のアミノアシル tRNA から RNA と共存するタンパク質がつくられ、やがて代謝の触媒は多様かつ高度な触媒活性を持つタンパク質が担うようになる。RNA ワールドの主役であった RNA は自己複製を触媒する部分が rRNA となり、複製される部分はしばらく RNA のままで存在したが、DNA が出現するに至って安定性の高い DNA に遺伝情報を保存し、タンパク質の合成の土台となる部分は mRNA へと変化して行ったと考えられる。

Szathmáry の“アミノ酸補因子”の概念は、White の“現在の補酵素の原型となる原始の補因子がヌクレオチドを介して(自己複製する)RNA と塩基対を形成していた”とする考え方¹⁴⁾を発展させ、その補因子の中にアミノ酸を含めたものである。確かに現在の酵素の活性部位でアミノ酸残基が触媒を担っていることを考え合わせると、この考え方は妥当と思われる。

そうすると、ここで注目されるのがヒスチジンである。おそらくヒスチジンも Szathmáry の言うところの“アミノ酸補因子”の一つとして、小さな RNA に結合してそれが大きな RNA と塩基対を形成し、RNA の触媒機能の一端を担っていたであろう。

ヒスチジンの前生物的合成については Shen らによってエリトロース、ホルムアミジン $\text{HN}=\text{CH}-\text{NH}_2$ 、および HCN から作られる経路が提唱され(図 6A)、その反応が実際に起こることが実験的に確かめられている¹⁵⁾。出発物質のエリトロースがホルモース反応でごくわずかしか蓄積しないこと、またホルムアミジンが不安定

であるため、前生物的合成においては実際に起こっていないのではないかという指摘があるが、反応機構自体は現在の生合成経路ときわめてよく似ている。

想定されるヒスチジンの前生物的合成の経路には RNA は素材としては関わっていない。一方、よく指摘されるように、今日の代謝ではヒスチジンは ATP とホスホリボシル二リン酸 (PRPP) を原料とする点で核酸代謝とかかわる唯一のアミノ酸である。興味深いことに、ATP を原料とするのであればそのアデニンの中のイミダゾールの構造を使うのが一見簡単に見えるが、実際はそうではない。

PRPP が ATP のアデニンの N1 をホスホリボシル化して二リン酸が外れ(図 6B)、それによって N1 と C6 の間での加水分解が促進され、C2 と N3 の間の加アンモニア分解を通じて、N1 のホスホリボシル基が N1 と C2 を切断に用いたアンモニアの N とともに切り取る。すなわち、上記の Shen らのモデル反応で用いられたホルムアミジンを供給するものとして ATP のアデニンの一部が用いられているということになる。

その後、N1 のホスホリボシル基は開環し、アマドリ転位を経て閉環してイミダゾール環を形成し、ホスホリボシル基の残りの部分がイミダゾール環以外の炭素骨格となってヒスチジノールリン酸となる。そして元の ATP から生じた AMP の部分はアデニンの N1 と C2 が欠損した形の AICAR (5-アミノイミダゾール-4-カルボキサミドリボヌクレオチド) となって再びプリンヌクレオチドの合成に用いられる。つまり、ATP のアデニンのイミダゾール部分はリボースに結合したままサイクルを回るということになる。

アデニンに存在したイミダゾールがヒスチジンのイミダゾールにならない理由について、Vázquez-Salazar らは“アデニンの N9 が修飾された状態ではプロトン授受や求核攻撃ができず、触媒として機能できないためである”と考察している¹⁶⁾。このことは上記の“アミノ酸補因子”としてのヒスチジンを結合した RNA がこのイミダゾール部分で触媒を行っており、その機能が重要であるという考え方と合致している。

これは本稿の筆者の考えであるが、Shen らの考察と Vázquez-Salazar らの考察を照らし合わせてみると次のようなシナリオが浮かび上がってくる。現在のヒスチジンの生合成は ATP と PRPP を原料としているという点で RNA ワールドの代謝を反映していると考えられる¹⁴⁾。RNA ワールドでの対応する反応では、PRPP はある種の RNA の 3'-末端残基として存在し、それが遊離のアデニンヌクレオチドあるいは RNA のアデニンの N1 と反応し、現在の代謝と同様の反応機構でイミ

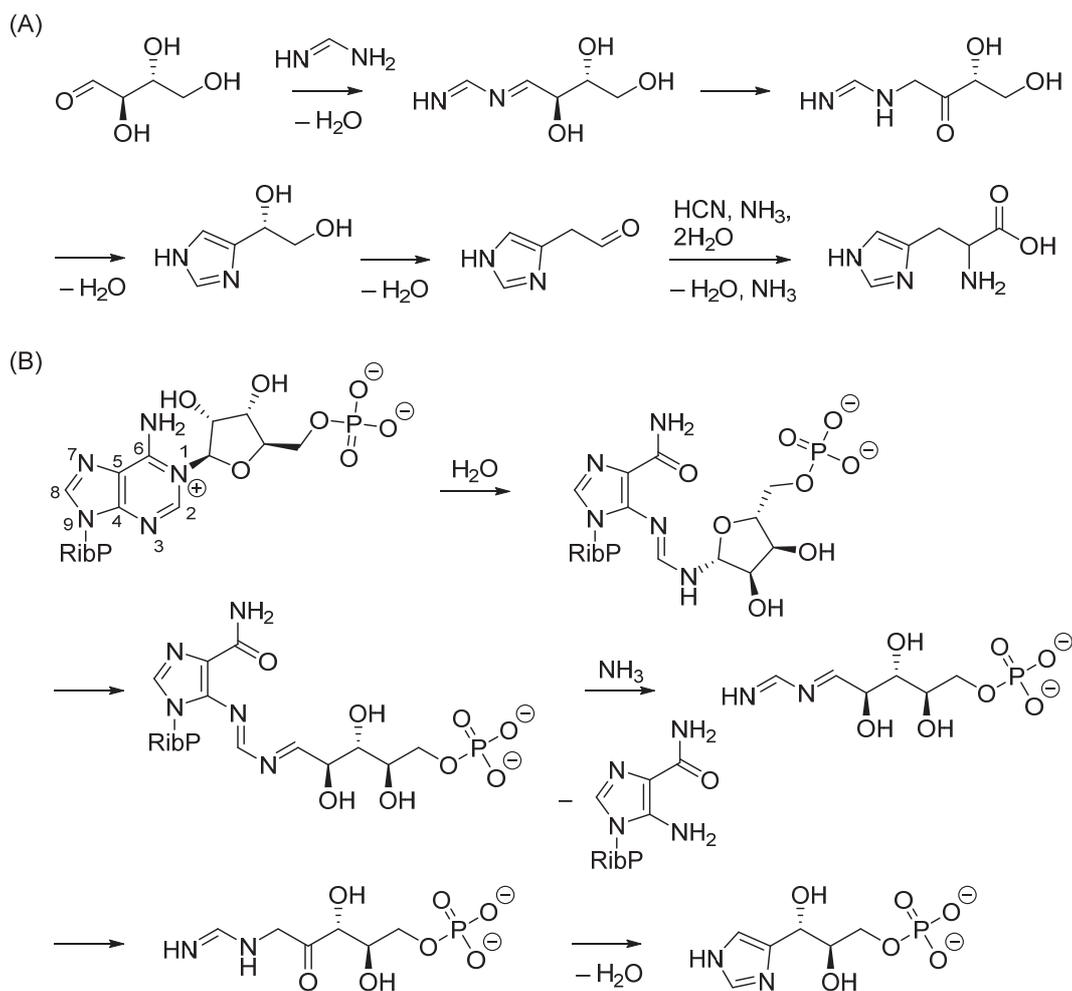


図6 (A) Shen らによって想定されたヒスチジンの前生物的合成. (B) 現在のホスホリボシル AMP からのヒスチジンの合成. イミダゾールグリセロールリン酸までを示す. RibP はリボース 5'-リン酸. ホスホリボシル AMP は ATP の N1 でのホスホリボシル化ののち, ATP 部分が加水分解して生じる.

ダゾールグリセロールリン酸を作る. ただし, PRPP が RNA の 3'-末端残基であるから, 生成したイミダゾールグリセロールリン酸もリン酸を介してその RNA の 3'-末端に結合していることになる (図7). しばらくはこのままの形で Szathmáry の言う“アミノ酸補因子”に相当する触媒機能を担っており, その後タンパク質合成系が確立する頃にイミダゾールグリセロールリン酸からヒスチジンへの経路ができたであろう. Shen らの仮説について指摘されたホルムアミジンの不安定さは ATP のアデニンから供給されることで解決される. また, 前生物的合成でほとんど蓄積されないエリトースを原料としたのは, ヒスチジンというアミノ酸にするべく Strecker 合成を考えていた (図6(A)) ために炭素数がリボースより1つ少ないものを用いたことが理由である. これも最初からアミノ酸にまで持つて行く

必要がないと考えれば, 十分に存在するリボースを骨格に使うことになり, エリトースの希少性の問題も解決しそうである.

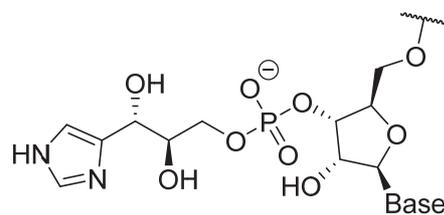


図7 RNA の 3' 末端で生じると考えられるイミダゾールグリセロールリン酸.

このようにヒスチジンの前生物的合成についてはある程度見通しが立ちつつあるが, イミダゾールのまま

では、求核攻撃を行うか、一般塩基触媒となるか、すなわちルイス塩基あるいはブレンステッド塩基としての役割を持つことになる。前2節で紹介したようなイミダゾリウムとしての働きがあったのかどうかは明確ではないが、もしも存在したとしてもそれはすぐにチアゾリウムの形でチアミンニリン酸を結合したRNAに置き換わったと思われる。現在のチアミンの生合成においては、1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸のカルボニル炭素をイミンであるデヒドログリシンが攻撃し、この二重結合にH₂Sに相当するものが供給されて閉環している。糖のカルボニル炭素をイミンが攻撃しているという点において、想定される前生物的合成の中はイミダゾリウムよりもヒスチジン(イミンの代わりにアミジンがカルボニル炭素を攻撃)の合成に似ていると言える。また、“アミノ酸補因子”としてのRNAとの関連においても、イミダゾリウムよりもヒスチジンとの関係が深いことは納得しやすい。

チアミンの前生物的合成については不明の点が多いが、イミダゾリウム・イミダゾール(ヒスチジン)との関連における今後の進展を期待したい。

Key words :imidazole, imidazolium, RNA world, prebiotic synthesis, RNA elongation, thiamine, histidine, benzoin condensation, Amadori rearrangement

Department of Chemistry, Division of Liberal Arts, Osaka Medical College, Takatsuki 569-8686, Japan
大阪医科大学総合教育講座化学教室
林 秀行

利益相反自己申告：申告すべきものなし

(2022.2.9 受付)

文 献

- 1) 林秀行(2009)ピリミジンリボヌクレオチドの前生物的合成. *ビタミン* **83**, 621-623
- 2) Lohrmann, R., Orgel, L.E. (1973) Prebiotic activation processes. *Nature* **244**, 418-420
- 3) Walton, T., and W. Szostak, J. (2016) A highly reactive imidazolium-bridged dinucleotide intermediate in nonenzymatic RNA primer extension. *J Am Chem Soc* **138**, 11996-12002
- 4) Walton, T., and W. Szostak, J. (2017) A kinetic model of nonenzymatic RNA polymerization by cytidine-5'-phosphoro-2-aminoimidazolide. *Biochemistry* **56**, 5739-5747
- 5) Mariani, A., A. Russell, D., Javelle, T., and D. Sutherland, J. (2018) A light-releasable potentially prebiotic nucleotide activating agent. *J Am Chem Soc* **140**, 8657-8661
- 6) Zhang, S.J., Duzdevich, D., and Szostak, J.W. (2020) Potentially prebiotic activation chemistry compatible with nonenzymatic RNA copying. *J Am Chem Soc* **142**, 14810-14813
- 7) Giurgiu, C., Fang, Z., Aitken, H. R. M., Kim, S. C., Paziienza, L., Mittal, S., and Szostak, J. W. (2021) Structure-activity relationships in nonenzymatic template-directed RNA synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* **60**, 22925-22932
- 8) Boutlerow, A. (1861) Formation synthétique d'une substance sucrée. *CR Acad Sci* **53**, 145-147
- 9) Ricardo, A., Carrigan, M.A., Olcott, A.N., Benner, S.A. (2004) Borate minerals stabilize ribose. *Science* **303**, 196
- 10) Matsuo, H., Ohe, M., Sakiyama, F., Narita, K. (1972) A new approach to the determination of pK_a's of histidine residues in proteins. *J Biochem* **72**, 1057-1060
- 11) Clairmont, R. M., Bommaris, A.S., Weber, A.L. (2015) Imidazolium catalysts formed by an iterative synthetic process as a model system for chemical evolution. *J Mol Evol* **81**, 1-9
- 12) Weber, A.L., Rios, A.C. (2019) Imidazolium-catalyzed synthesis of an imidazolium catalyst. *Orig Life Evol Biosph* **49**, 199-211
- 13) Szathmáry, E. (1999) The origin of the genetic code: amino acids as cofactors in an RNA world. *Trends Genet* **15**, 223-229
- 14) White, H.B. (1976) Coenzymes as fossils of an earlier metabolic state. *J Mol Evol* **7**, 101-104
- 15) Shen, C., Yang, L., Miller, S. L., and Oró, J. (1990) Prebiotic synthesis of histidine. *J Mol Evol* **31**, 167-174
- 16) Vázquez-Salazar, A., Becerra, A., and Lazcano, A. (2018) Evolutionary convergence in the biosyntheses of the imidazole moieties of histidine and purines. *PLoS One* **13**, e0196349. なお、当論文の Fig. 3 の PRFAR は色分けが誤っており、イミダゾールから右に伸びる部分の最初の -N=CH-NH- が緑、その右がすべて青であり、PRFAR の下の青く示されたホスホリボシル基が緑である。