



Prebiotic phosphorylation and trimetaphosphate chemistry

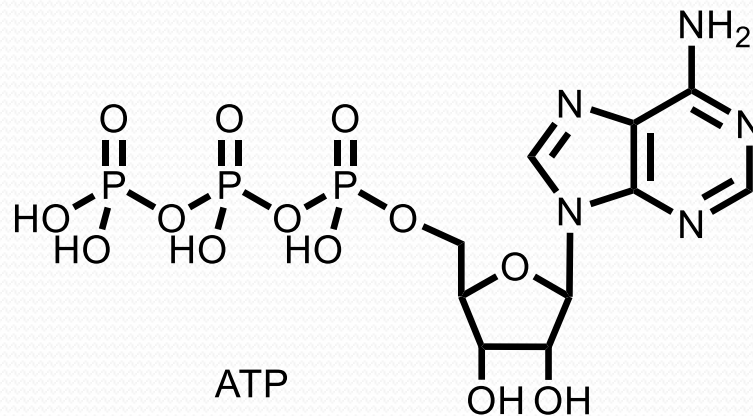
2015.1.31 (Sat)
Takumi Matsueda (B4)

Contents

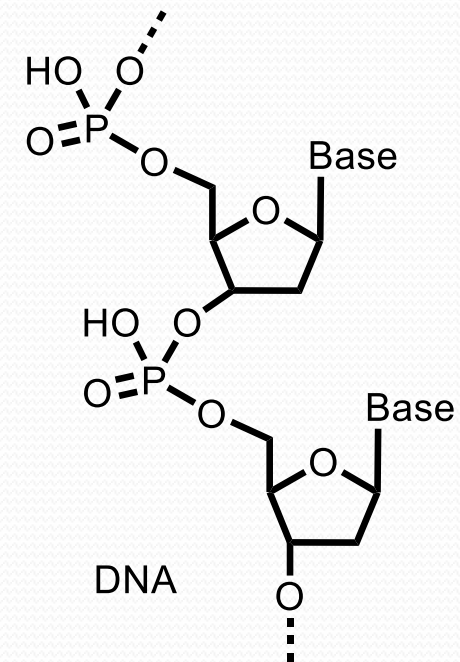
1. Introduction
2. Prebiotic phosphorylation
3. Application of TMP
4. Summary

Phosphate compound in life

Phosphate plays many important roles in life



“molecular unit of currency”

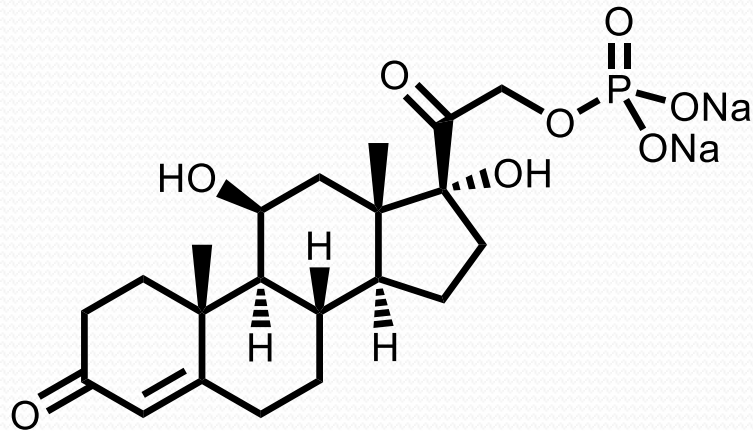


other roles: phospholipid, phosphorylation by kinase ...

Phosphoester drugs

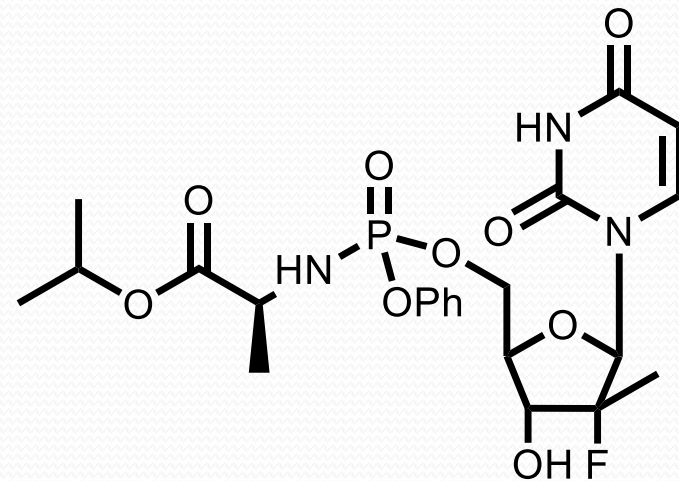
Nucleotide type anti-viral, anti-cancer drugs

ゾメ
るが、
る薬



Hydrocortison

steroidal anti-inflammatory drug



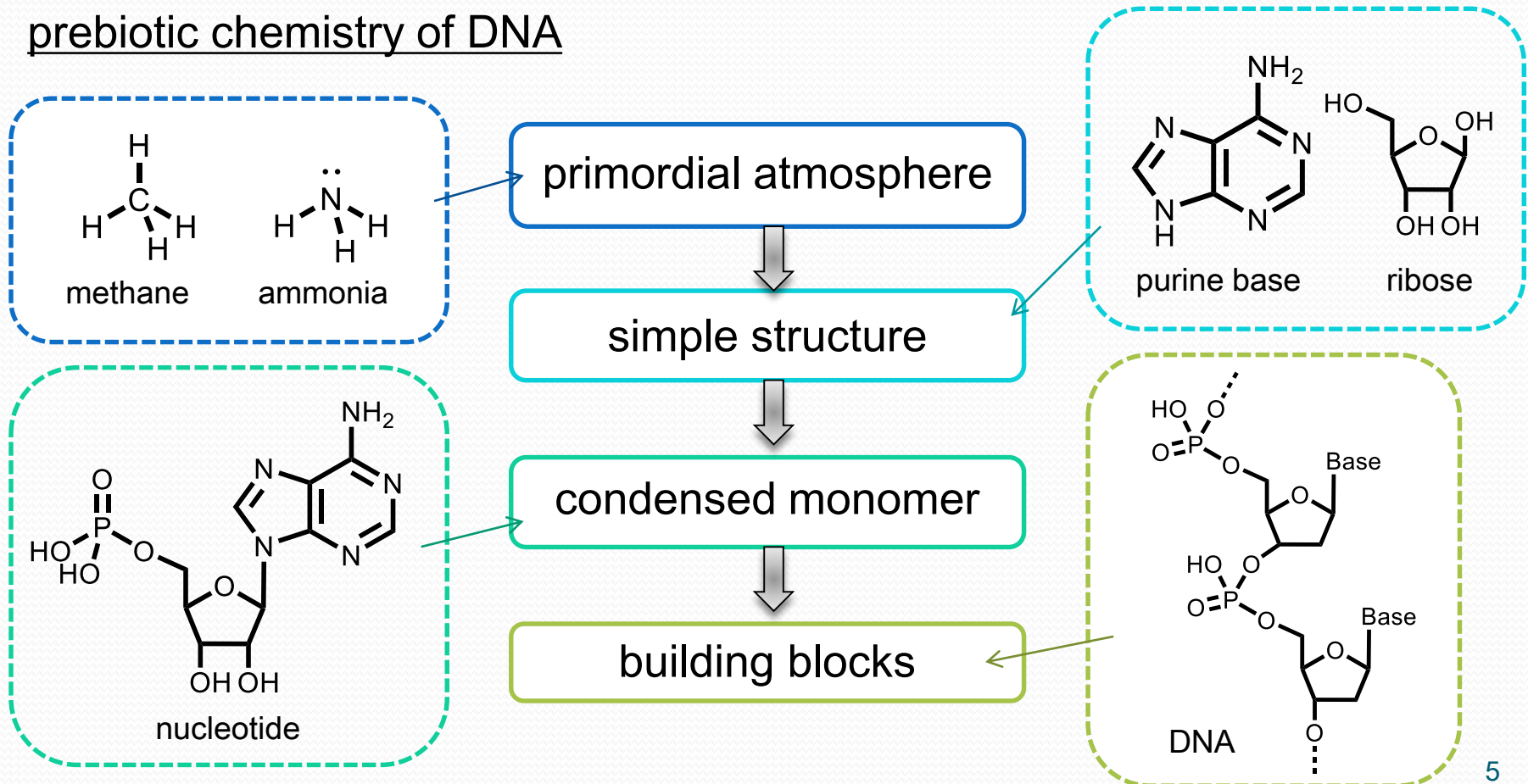
sofosbuvir

anti-virus (HCV)

What is prebiotic chemistry?

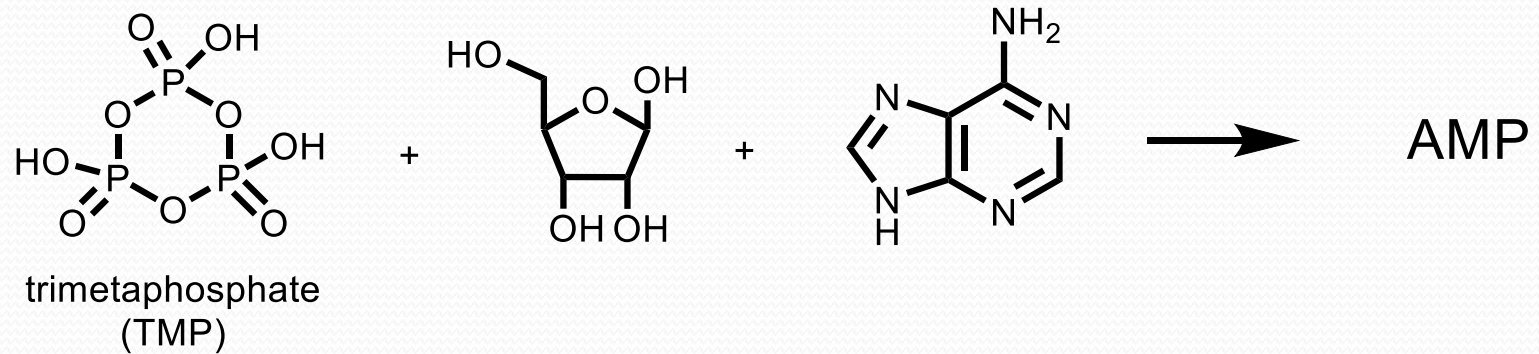
To disclose how to construct the building block of living organisms from inorganic compounds in primitive earth condition is “prebiotic chemistry”

prebiotic chemistry of DNA

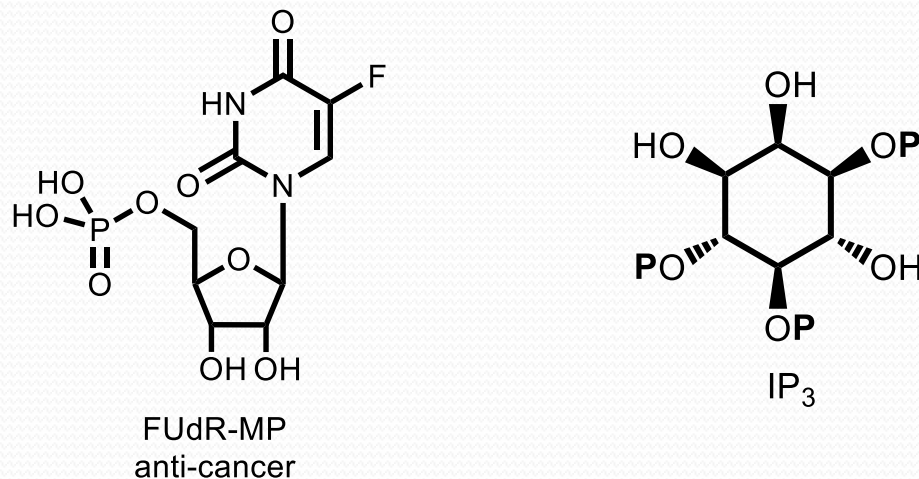



Today's topic

How to form nucleotide in prebiotic condition



Application of trimetaphosphate to anti-cancer prodrugs, IP₃ synthesis



- 
1. Introduction
 - 2. Prebiotic phosphorylation**
 3. Application of TMP
 4. Summary

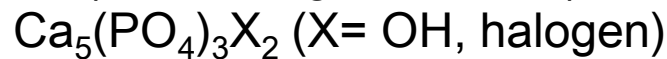
Phosphate in primitive earth

Apatite seems to be first phosphate rock form in primitive earth

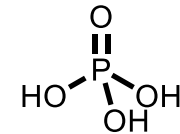
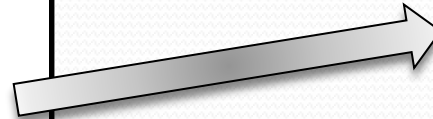


apatite

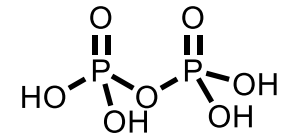
(a kind of igneous rock)



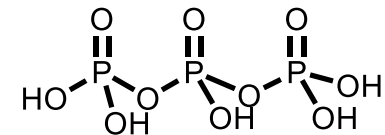
estimated the total volume of P
 $14\text{-}40 \times 10^{20}$ g (max: 0.05-0.1 M)



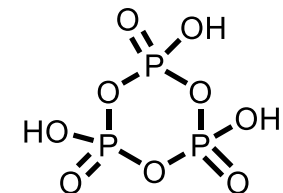
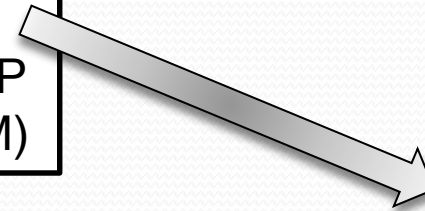
orthophosphate



pyrophosphate



linear triphosphate



trimetaphosphate
(TMP)

Orthophosphate phosphorylation

First, phosphorylation was thought to proceed with CN species

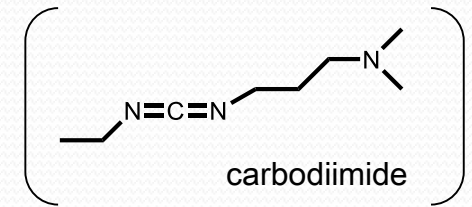
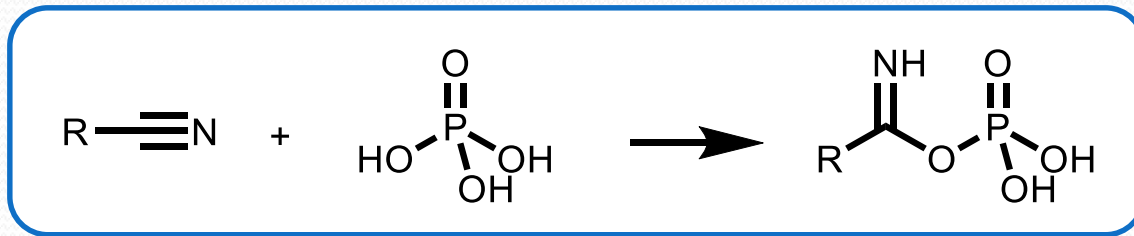


Table 2. Yields of nucleoside-5'-phosphate from a nucleoside and an inorganic phosphate under the conditions described (Table 1).

Reagent	UMP yield (%) at pH				Days to maximum yield
	5.0	6.0	7.0	8.0	
<i>At 37°C</i>					
HCOSNa		1.5	1.2	0.9	6
NC • CONH ₂		2.0	1.8	1.7	≤ 1
KOCN	1.2	0.9	0.5	< 0.5	≤ 1
Carbodiimide		3.1	3.4	2.4	≤ 1
<i>At 65°C</i>					
HCOSNa		2.1	2.2	2.0	≤ 1
NC • CONH ₂		2.9	3.3	4.0	1
NC • NH ₂		2.8	2.0	< 0.5	30
EtNC*	12	10	3	1	≤ 1
Carbodiimide		3.5	3.6	3.2	≤ 1

* Thymidine used as nucleosidic component; yields are of thymidine monophosphate.

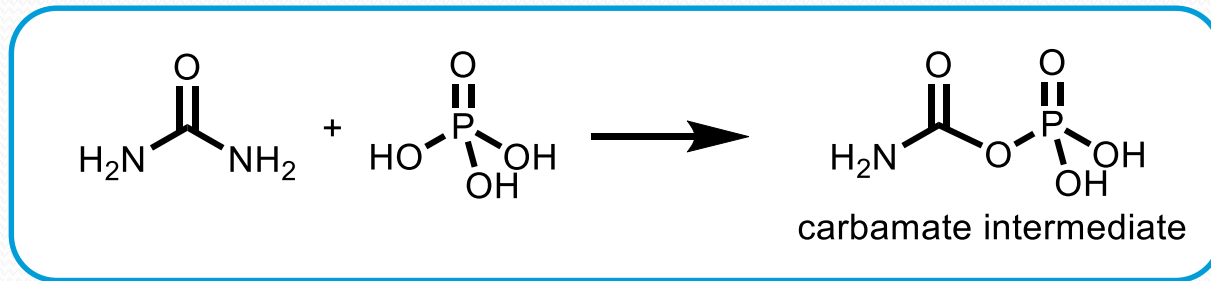
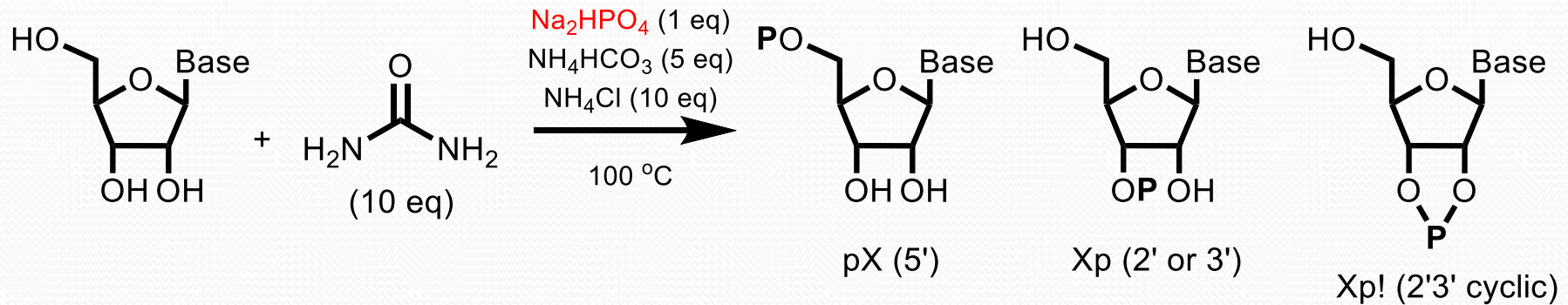
Table 7. Yields of uridine-2',3'-cyclic phosphate formed from uridine-2',(3')-phosphate under the conditions described (Table 6).

Reagent	pH			Days to max. yield
	5.0	6.0	7.5	
<i>37°C</i>				
NC • CONH ₂	38	23	12	≤ 1
NC • NH ₂	40	45	1.5	10
KOCN	13	1.7	0.5	≤ 1
Carbodiimide	70			≤ 1
<i>65°C</i>				
NC • CONH ₂	14	13	11	≤ 1
NC • NH ₂	73	39	1.2	6
Carbodiimide	51			≤ 1

CN species are good condensing reagents, but easy to hydrolyze

Activation by urea

Orgel thought urea is the condensing reagent in dry condition



The role of ... urea : activate phosphate

ammonium chloride : inhibition of carbamate formation with alcohol

Activation by urea

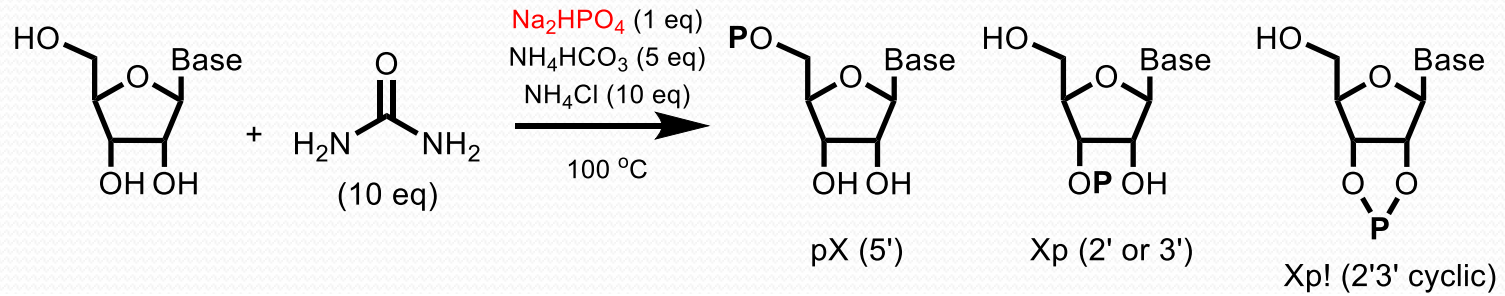


Table 4. Reaction products (percentages based on the starting material) from the phosphorylation of ^{14}C -labeled cytidine, adenosine, and guanosine with a mixture of Na_2HPO_4 , NH_4Cl , NH_4HCO_3 , and urea at 100°C .

Product	^{14}C Cytidine			^{14}C Adenosine			^{14}C Guanosine		
	1 hr	4 hr	24 hr	1 hr	4 hr	24 hr	1 hr	4 hr	24 hr
X	67.8	35.4	22.9	70.0	36.7	13.8	83.0	67.8	45.2
x (base)			2.0	3.1	6.9	24.2			2.0
Xp!	3.8	13.9	31.8	3.6	10.1	23.7	2.5	4.4	11.4
Xp ^a	9.5	7.6	6.2	7.3	6.3	4.3	4.8	7.1	5.7
pX	13.9	22.8	8.3	13.0	21.7	6.7	6.1	9.3	7.9
pXp!	1.0	10.6	18.1		7.9	15.7		4.3	12.9
pXp	3.9	9.7	6.6	3.2	8.3	7.0		7.2	10.2
Phosphate incorporation	37.0	84.9	95.7	30.3	70.5	80.1	13.4	43.8	71.2

^a This fraction also contains 2'(3')-carbaminucleoside 5'-phosphates, which are not degraded by venom phosphoesterase.

R. Lohrmanm, L. E. Orgel, *Science*, 1971, 171, 490-494

Urea in desert condition

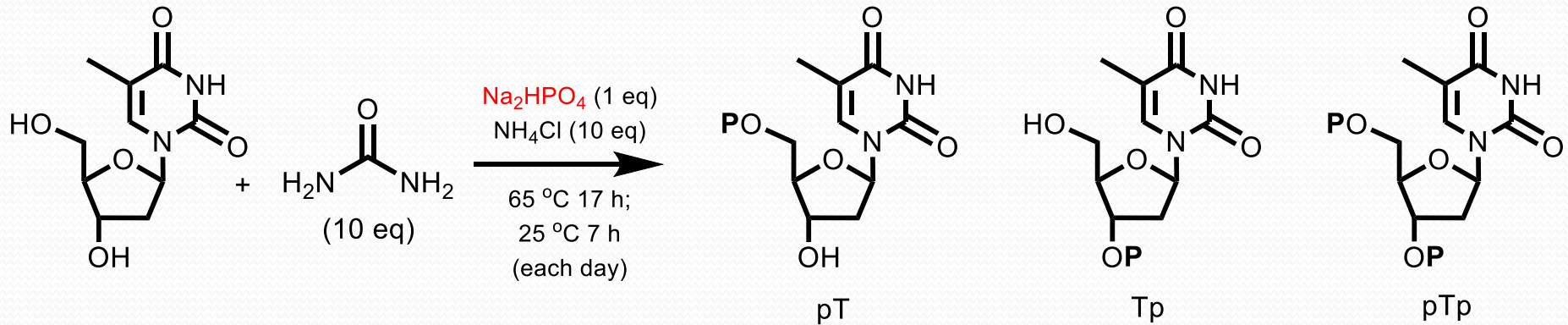


Table 3 Phosphorylation of Thymidine with Na_2HPO_4 , NH_4Cl and Urea

Days	T		Tp and pT		pTp	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
4	92.6	88.8	7.4	11.2	—	—
9	87.2	77.1	12.8	20.9	—	2.0
13	82.1	62.0	17.9	31.7	—	6.3
18	78.1	54.0	20.0	39.5	1.9	6.5
25	73.2	45.2	22.9	45.3	3.9	9.5

The molar ratio was 1 : 1 : 10 : 10, at 65° C for 17 h each day and at 25° C for 7 h, (1) kept dry and (2) wetted after 0.5 h of cooling to ambient temperature. Yields are given in % of total T present.

AMP from condensed phosphate

Adenosine phosphorylation from condensed cyclo phosphate

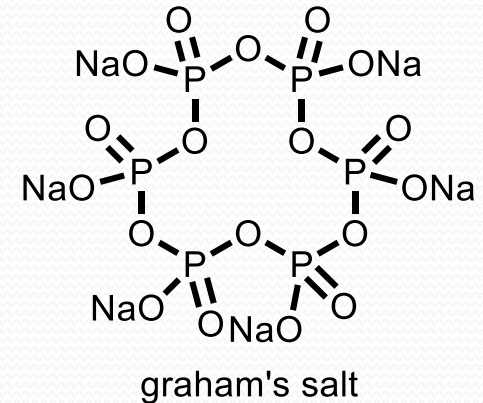
Table 1. COMPOSITIONS OF REACTION MIXTURES AND PRODUCTS OF THE PHOSPHORYLATION OF ADENOSINE

Phosphate	pH range*	Reflux (h)	Relative yields of products (%)			Total conversion of adenosine (%)
			5' AMP	2' AMP	3' AMP	
$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$	9.7-10.5	5.0	—	—	—	0
$\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_{10}$	7.5-8.0	5.0	54	18	28	1.08
Graham's salt	5.7-6.7	6.0	57	17	26	0.94
Graham's salt	9.7-10.5†	4.0	25	30	45	1.52

* The highest pH in each case was that at the start of the reaction; the lowest pH was measured at the conclusion of the reaction.

† The reaction was run at 100° C in a sealed tube in 0.75 N NH_4OH .

(Adenosine:0.1 M, P reagent: 1 M)



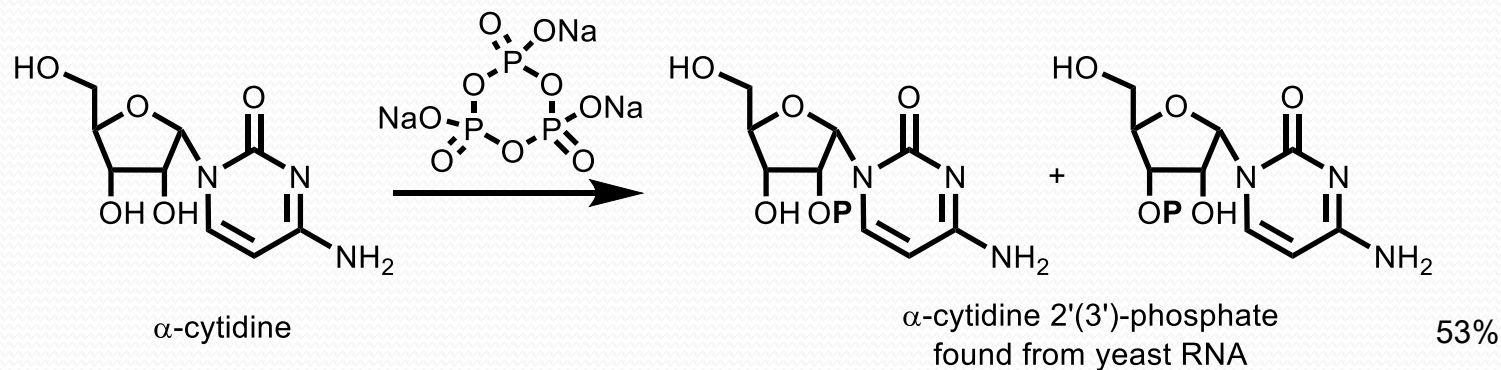
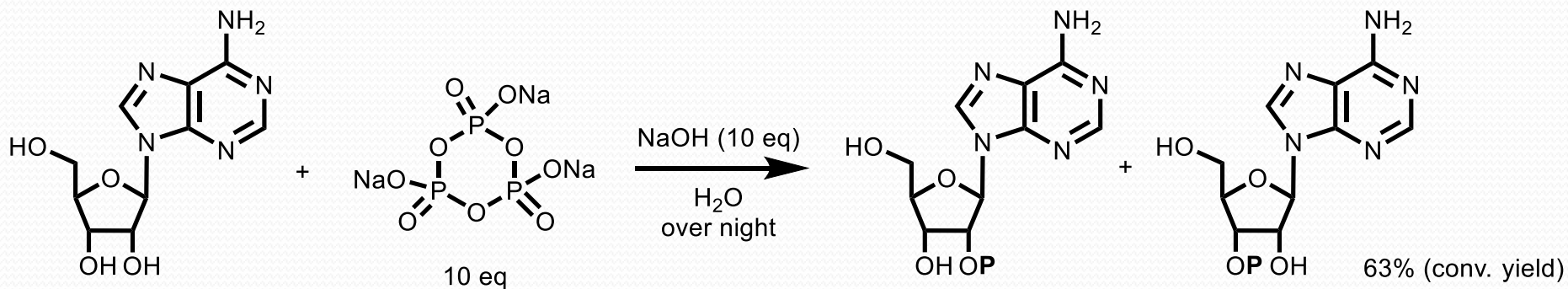
pyrophosphate case ... no reaction

basic condition (graham's salt case) ... 2',3'-AMP yield increased

AMP yield was very low, but it was found that condensed cyclo phosphate worked as phosphorylation reagent

TMP phosphorylation

2' and 3' selective phosphorylation without protecting groups



TMP phosphorylation : room temperature, non condensing reagent, 2', 3' selective

Glyceric acid phosphorylation

TMP produced cyclophosphate and pyrophosphate

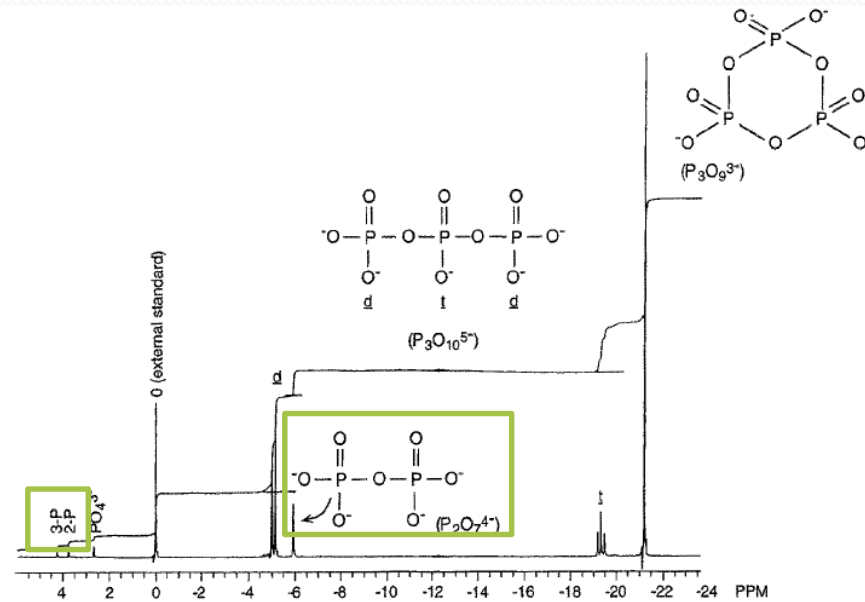
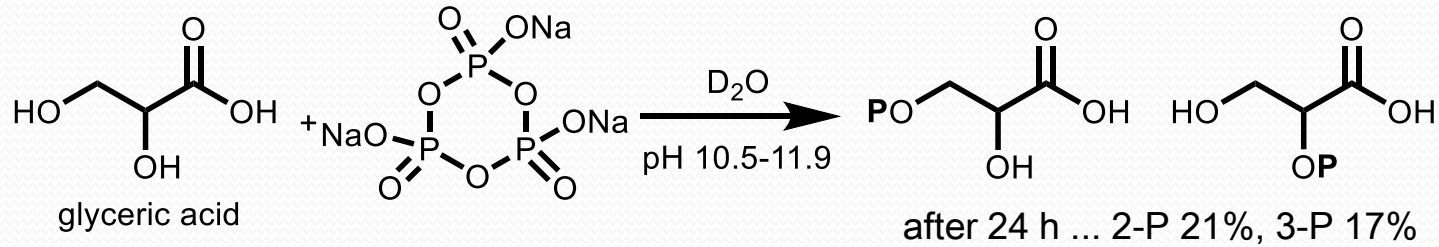


Fig. 2. Phosphorus NMR spectrum of a typical product mixture from the phosphorylation of glyceric acid by sodium trimetaphosphate.

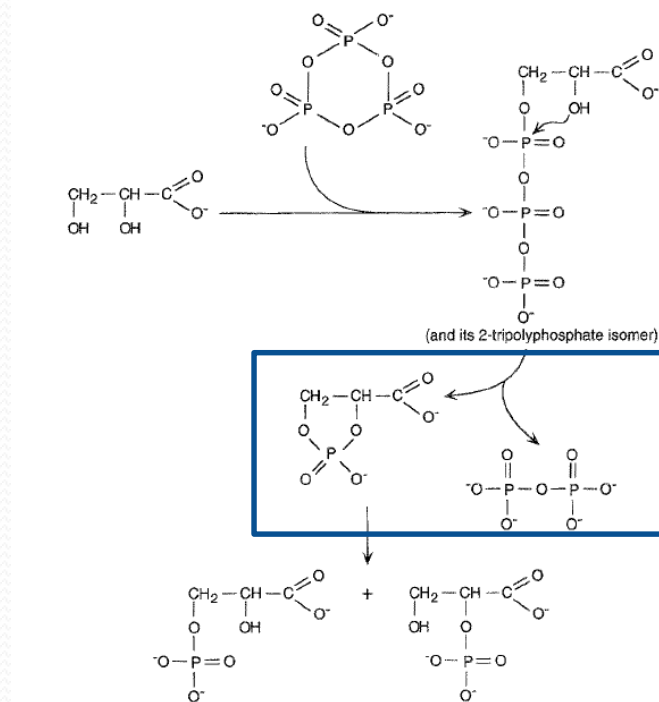
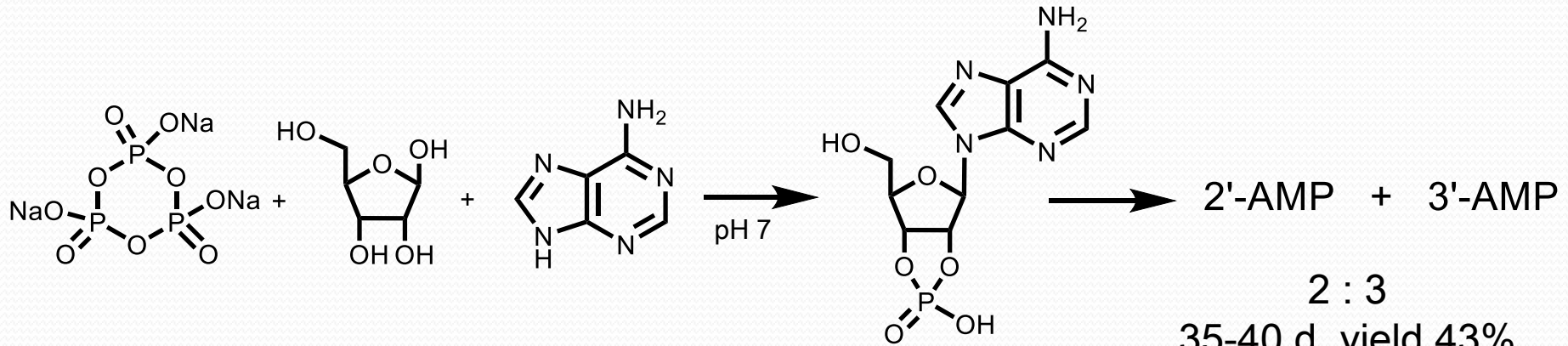


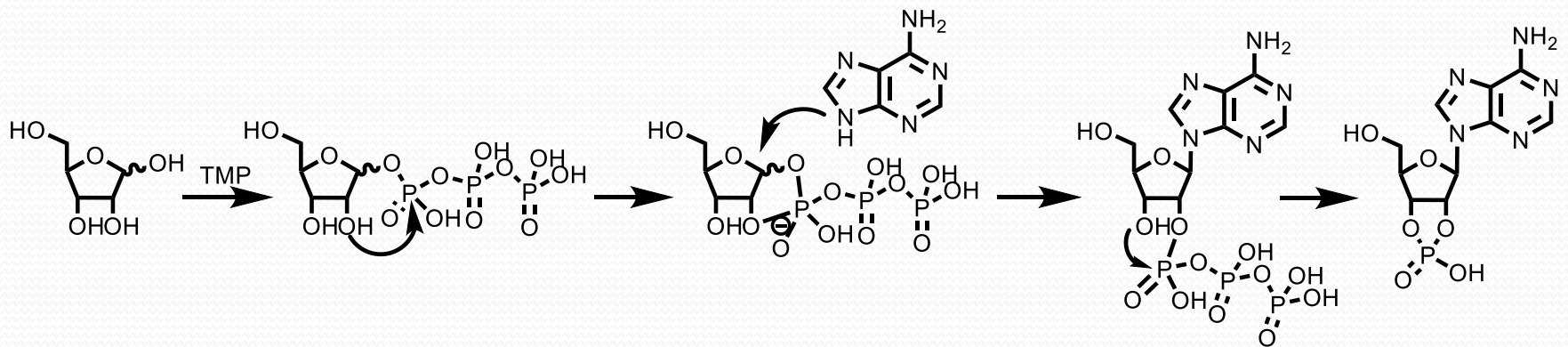
Fig. 3. The phosphorylation of glyceric acid by the trimetaphosphate ion.

Prebiotic nucleotide formation

One-pot synthesis of adenosine from D-ribose, adenine, and TMP



TMP : D-ribose : adenine = 1.5 : 1 : 1.2
 concentration of ribose = $1.85 \cdot 10^{-4}$ M (0.37mmol in 2L water)

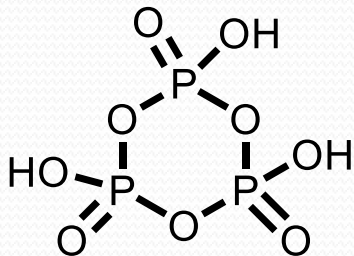


G. Micheletti, *et. al.*, *Chem Comm*, 2011, 47, 3640-3642


The merit of TMP

In prebiotic condition, why TMP is better reagent than orthophosphate?

Merit	TMP	orthophosphate
Solubility	good solubility even in the presence of Ca, Mg cation	low solubility, apatite formation with Ca cation
Mild condition	room temperature	more than 65 °C
Condensing reagent	nothing	urea

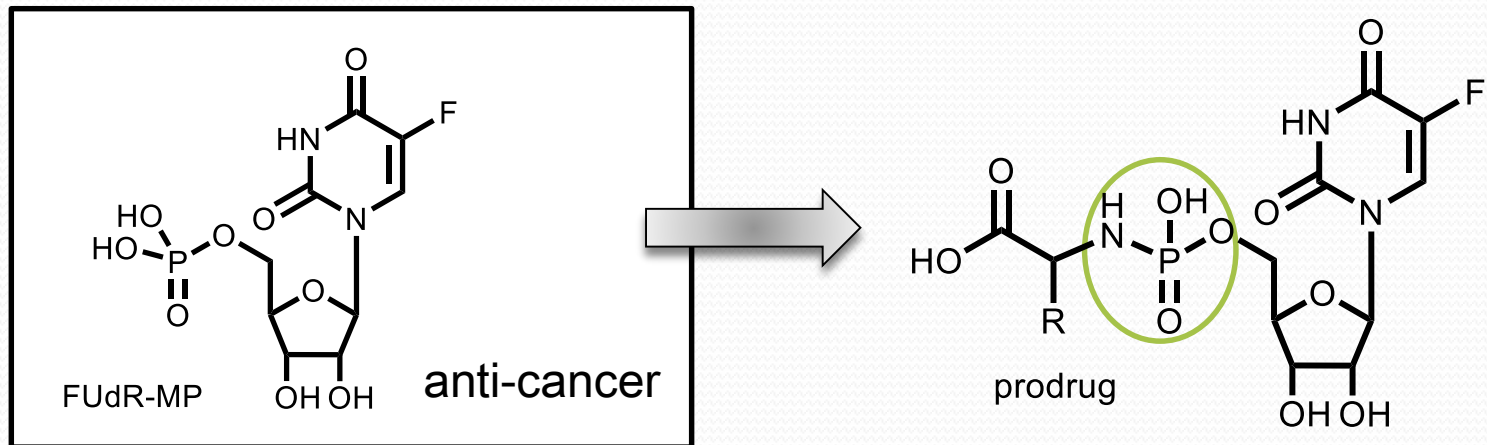


Trimetaphosphate is potentially prebiotic reagent and has some merits than orthophosphate !

- 
1. Introduction
 2. Prebiotic phosphorylation
 - 3. Application of TMP**
 4. Summary

Amino acid type prodrug

Amino acid prodrug synthesis of fluorouridine-monophosphate (FUdR-MP)

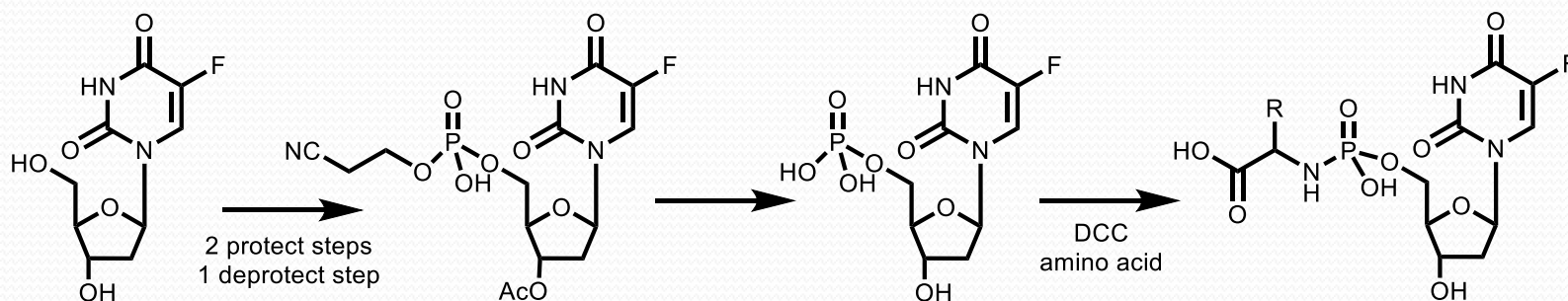


effective synthesis is needed

P ester formation

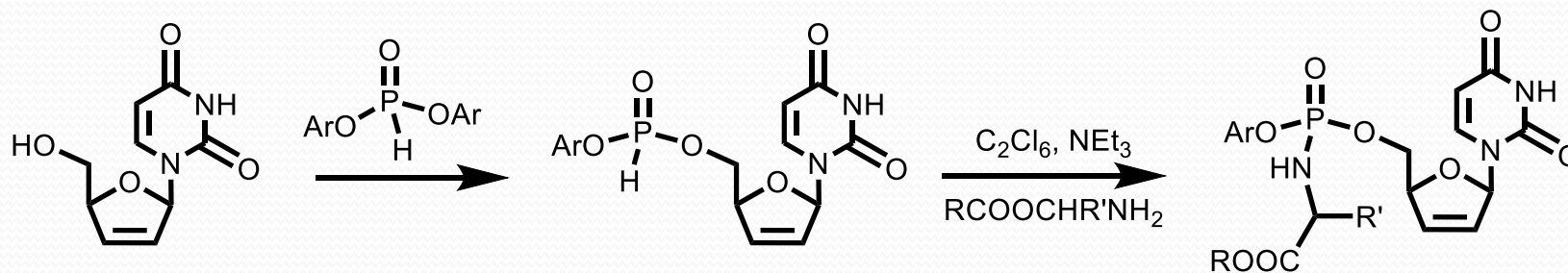
DCC and phosphite used route need some more steps than Penta-P case

DCC condensation



J. Wagner, *et. al.*, *J. Med. Chem.*, 1996, 39, 4569-4575

Phosphite route

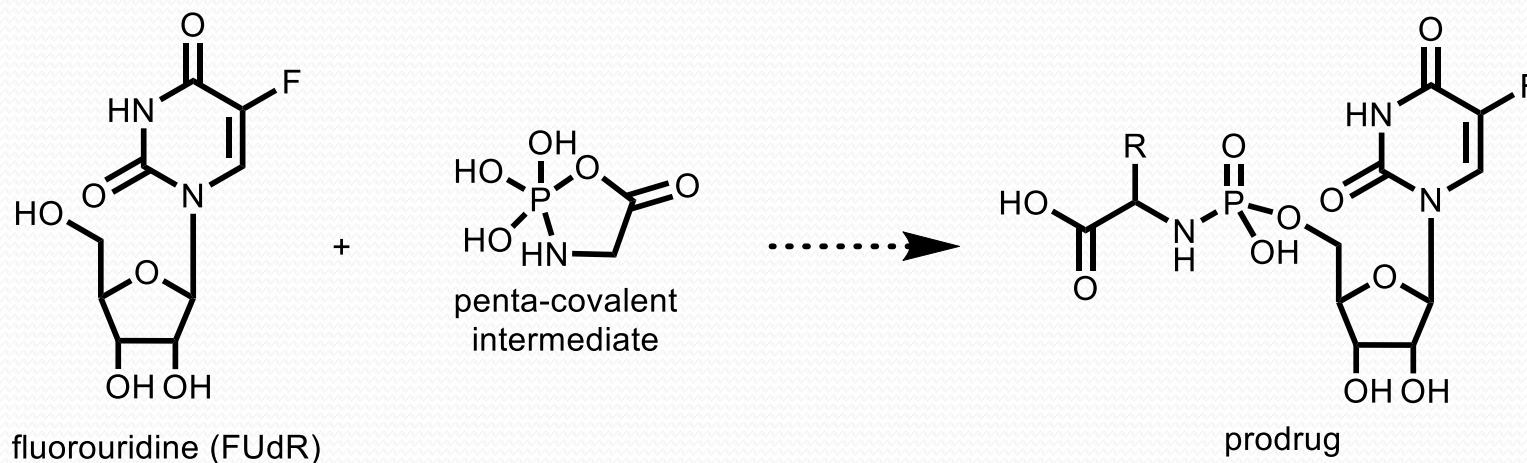
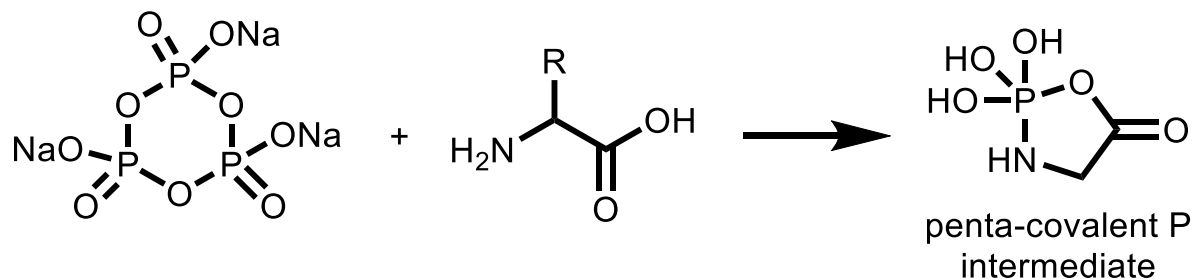


Y. Zhao, *et.al*, *Synlett*, 2004, 14, 2600-2602

Penta-covalent P

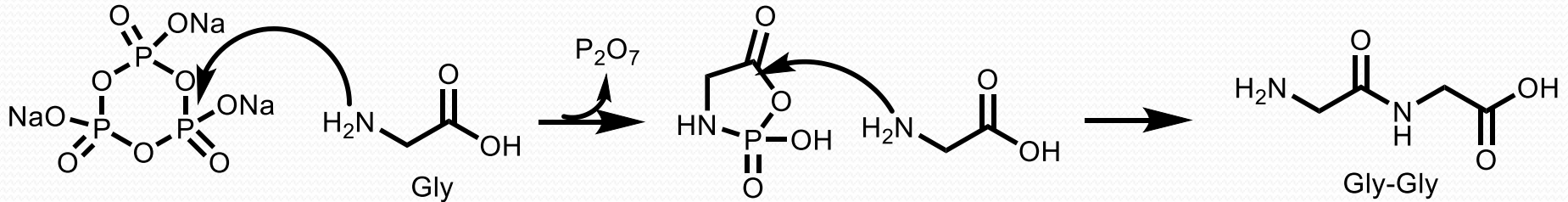
Penta-covalent P intermediate will produce P-amino acid ester

Zhao Yufen's group idea



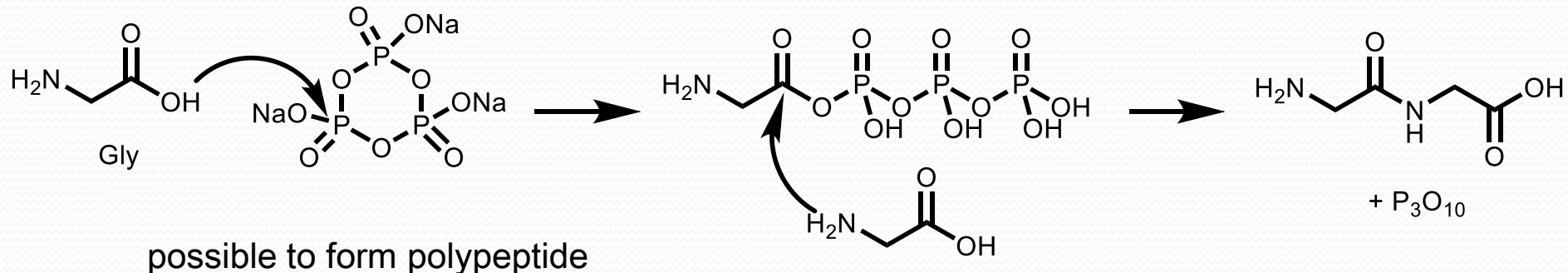
Peptide bond with TMP

TMP as condensing reagent in basic condition



less than 0.1% tripeptide, not found tetrapeptide

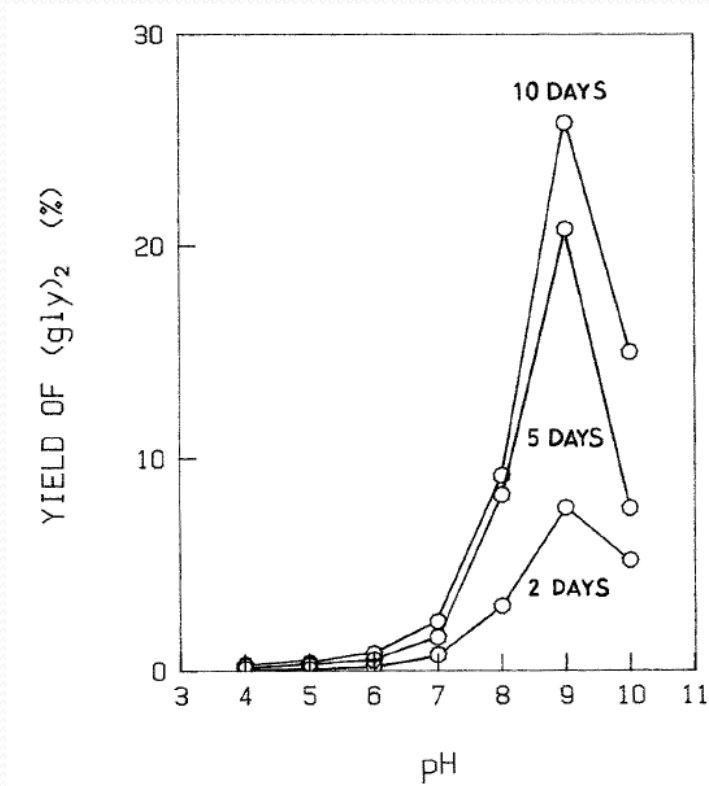
Polypeptide formation in acidic condition



Y. Yamagata, *et. al.*, *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 1988, 18, 165-178

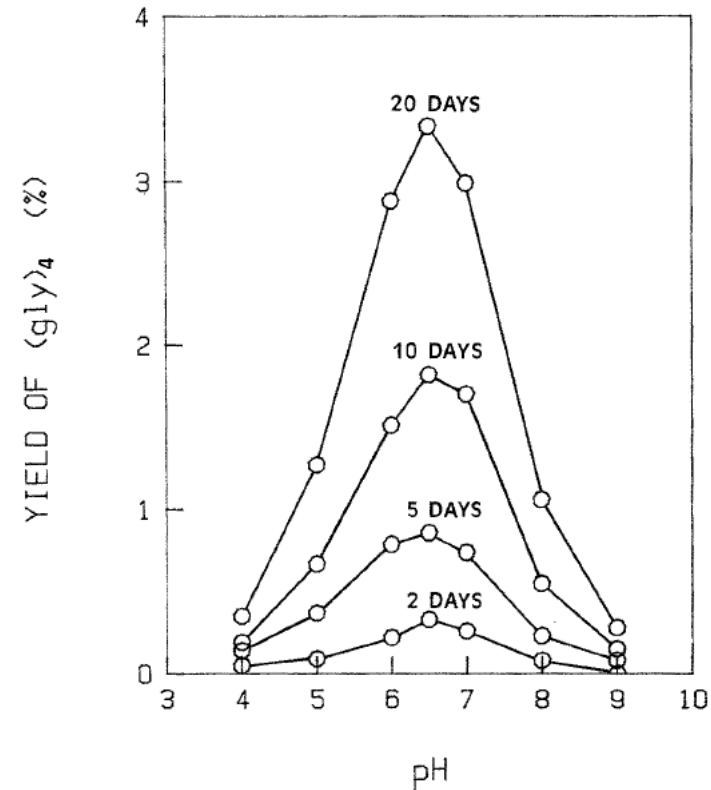
Peptide bond with TMP

Condensation of $(\text{gly})_2$ proceeds in weak acidic condition



$(\text{gly})_2$ formation

gly: 0.5 M, TMP: 0.5 M, 38 °C



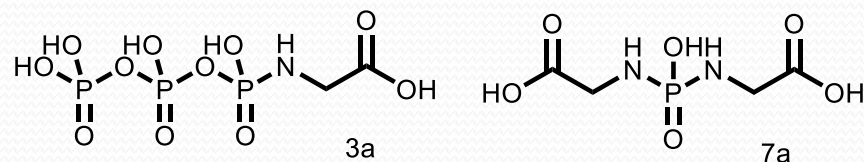
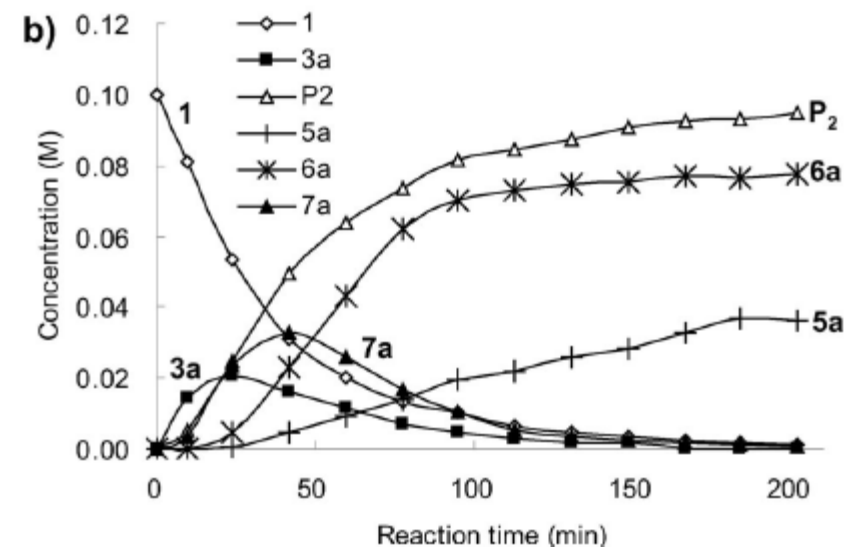
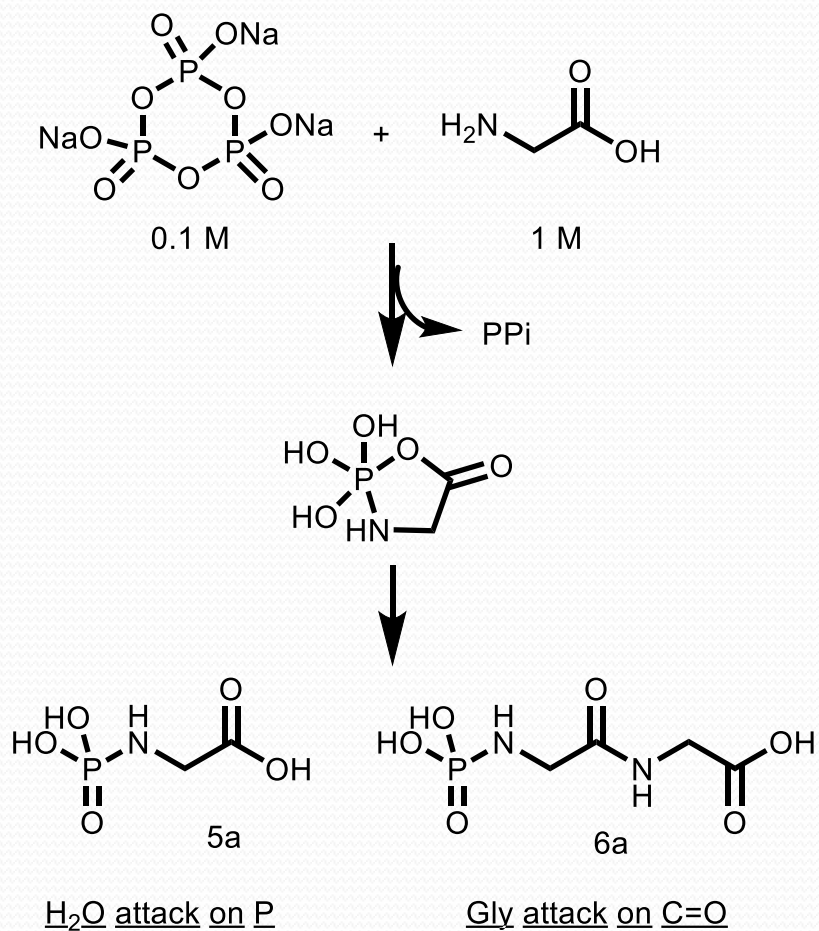
$(\text{gly})_4$ formation

$(\text{gly})_2$: 0.5 M, TMP: 0.5 M, 38 °C

Y. Yamagata, *et. al.*, *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 1988, 18, 165-178

N-Phosphoryl amino acids

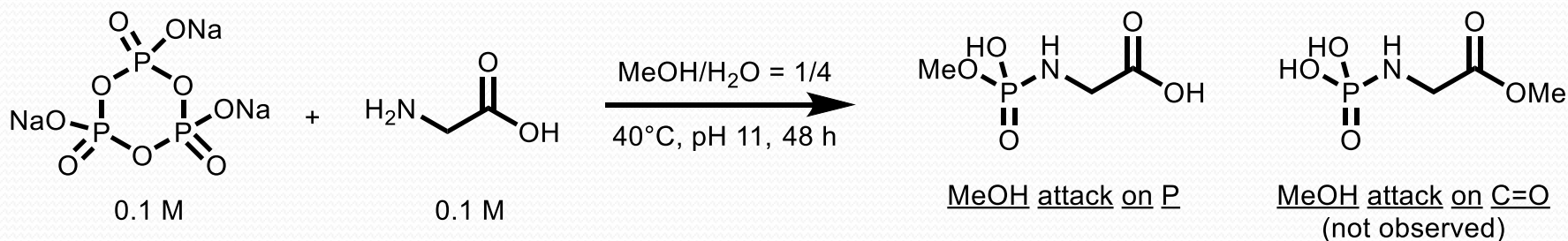
amino acid and TMP give N-phosphoryl aminoacid (or dipeptide)



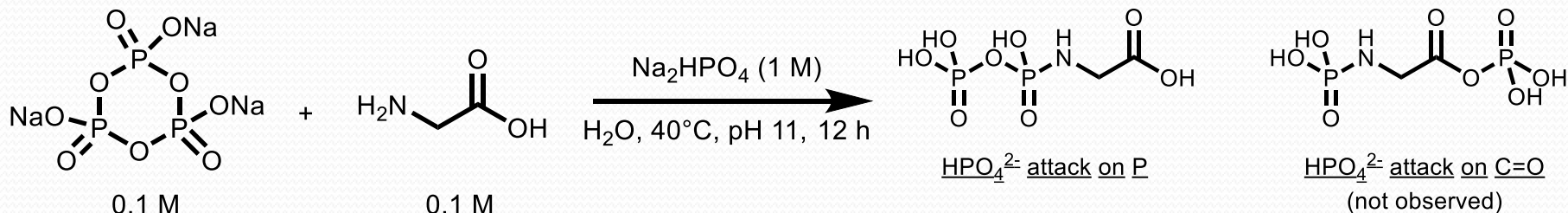
Y. Zhao, *et. al.*, *Eur. J. Org. Chem*, 2009, 3026-3035

Nucleophilic attack on NPAAAs

Alcooxide and phosphate attack on P position of penta P intermediate

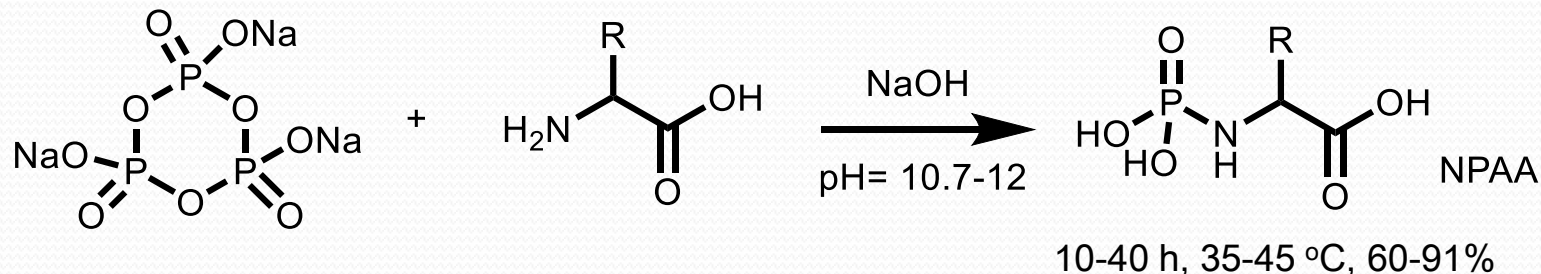


5a and 6a are also observed
(each yield ... unknown)



NPAAs synthesis

Increase the NPAAs yield, substrate scope




R = side chain of Gly, Ala, Leu, Val, Ser, Thr, Glu, Phe, Trp, Met, Pro, Arg, Homo-Ser(=CH₂CH₂OH)
(Asn, Gln... instable in alkali)

R	G	A	L	V	S	T	E	F	W	M	P	R	HS
Time(h)	16	24	20	30	15	16	20	35	40	15	10	18	10
Temp(°C)	45	45	40	40	35	35	35	40	45	35	35	40	35
pH	11.4	11.3	11.2	11.2	10.7	11.8	11.3	10.8	11.0	10.8	12.0	11.3	11.0
yield(%)	60	63	84	86	90	75	91	64	89	88	60	80	70

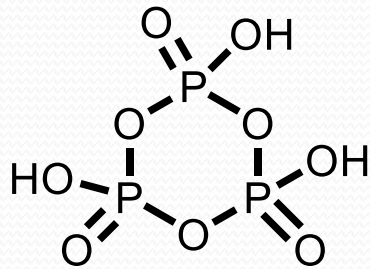


Y. Zhao, *et. al.*, *Green, Chem*, 2009, 11, 569-573

- 
1. Introduction
 2. Prebiotic phosphorylation
 3. Application of TMP
 - 4. Summary**

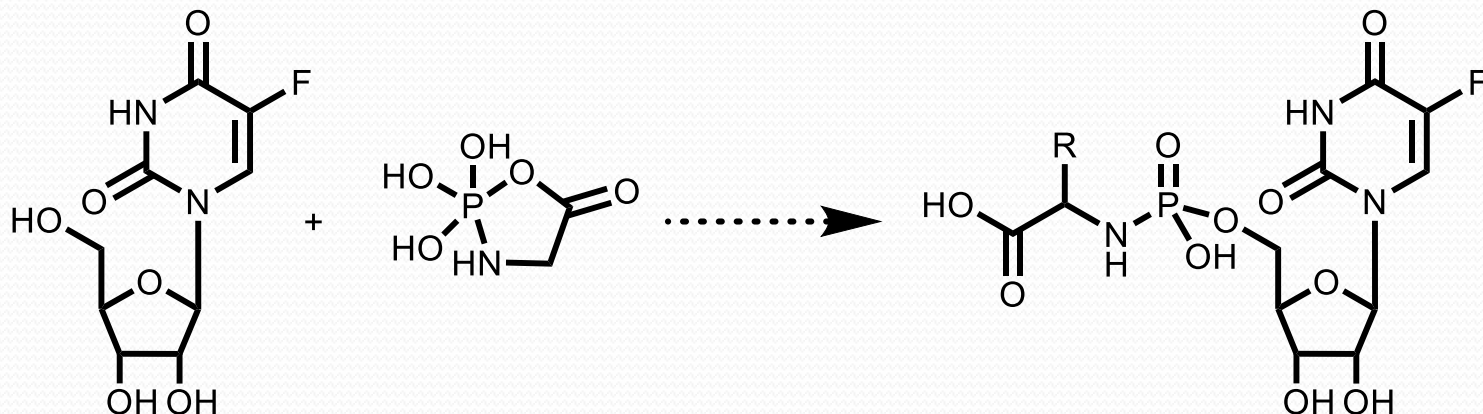
Summary

Trimetaphosphate is important phosphorylation reagent in prebiotic chemistry



- ✓ Produced from magmatic condition
- ✓ High solubility in water
- ✓ Needless of condensing reagent
- ✓ Mild condition

Easy synthesis of phosphorodiamidite prodrug from penta-coordinate phosphorus



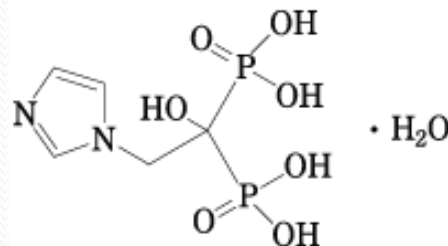
Q & A

•ハイドロコートンにおけるリン酸の役割

ステロイド骨格単体では水溶性が足りないため、体内のエステラーゼによる加水分解を受けるような官能基としてリン酸基が入っています。こちらに関してはリン酸が反応点に直接関係する要素ではなく、あくまで水溶性向上という目的で導入されているようです。

•核酸アナログ以外のリン酸構造を持つ骨格の有無について

C-P結合を有する例になってしまいましたが、こちらに示すゾメドロン酸一水和物（商品名:ゾメタ）はビスホスホネート骨格を有する薬物で、骨の表面と強く結合することによって破骨細胞による骨吸収を阻害する効果を持っており、骨粗鬆症などの骨に異常をきたす病気の治療薬として売り出されています。



ゾメタ（ノバルティス）

•プレバイオティクスにおいて砂漠条件を適用している理由

今回は特に水中でということの水溶媒中のリン酸化について重きを置いて説明しましたが、自発的反応は必ずしも水中である必要はなく例えばリン鉱石の表面上でリン酸ソースがある条件でやるなどの状況を想定して様々な手法が取られています。砂漠条件もその一例であり、今回については尿素が縮合剤たりうる例というのを示したかったのでこちらの例を適用しました。補足ですが、ドライな条件では溶媒無しで反応剤（固体）を反応させているようです。

•結局トリメタリン酸が最も優れたリン酸化剤なのか

プレバイオティクスでない条件ではなんとでもやりようがあるのでプレバイオティクスでの話になりますが、あくまで自分自身はそうだと結論づけています。ただし、研究分野としてトリメタリン酸がリン酸化剤であるという共通認識は特にあるわけではなく、現在でもオルトリン酸を用いたプレバイオティクなリン酸化の研究は行われています。

•Graham's salt の生成機構

縮合リン酸の実験ではオルトリン酸を650°Cで加熱することで得られているようです。一方でYamagataら(*Nature*,1991,352,516-519)はリン酸鉱石火山条件での縮合リン酸生成をさせた結果、昇華性を持つ五酸化ニリンの加水分解物のみが得られていたため原始地球に存在していたかは不明のままです。

•トリメタリン酸とリニアトリリン酸の違い

トリメタリン酸のアニオン性の低さによりアルコールに対する求電子力に差が出ているのではないかと考えられます。アニオン性が高いリニアトリリン酸は電子豊富なため求核攻撃を受けにくのではないかと予想しています。

•5位でリン酸化が起こらない理由

一番多かった質問がこれでした。これについては気になって調べてはみたのですが、選択性に言及している報告例が見られず正確な機構については不明なままです。すいません。特に文献を見たという訳ではないのですが、塩基のない糖類の場合だと五員環と六員環のタイプが平衡して存在していて、一級アルコールの5'位が環形成に使われているためリン酸が入りにくいとかはあるのかもしれないかなと調べてはみました。塩基が入っている場合はこれが適用できないためこの説明では不十分であるとは思いますが...

•3'位と5'位でリン酸基転移は起こらないのか

p16(Chem Comm 2011年の例)では3'位のみリン酸化した生成物と5'位のみでリン酸化した生成物が2%以下で得られているのが確認されました。このことから、3'位5'位を結ぶサイクリックなリン酸中間体が生じたと思われるため、リン酸転移は起こりうるだろうと考えられます。

- 1960-1970年代のリン酸化における収率計算について

14Cのような放射性同位体を用いて実験をしてから、反応終了後は標準サンプルと照らし合わせつつワットマンペーパーを用いた電気泳動で分離します。収率は放射線測定を行い検出回数で収率を求めていました。

- 選択性などはともかくリン酸が入ればよいという場合に使うべき試薬は何か

一般にリン酸つきたいとなった時に使われるのはPOCl₃だと思います。この場合はピリジンを溶媒量使うことが多いです。あるいはO-Ar基を脱離基とした求核置換的なものや、p20に示したようなホスファイトを用いた後に酸化する方法があります。

•Dr. ZhaoらはどうしてNPAAAsを用いたリン酸エステル合成の報告をだしていないか

考えられる可能性としては、環状中間体がすぐに加溶媒分解してしまい、開いたNPAAAsが平衡で有利になってしまうというケースです。最終的には一級アルコールが水に勝たなくてはいけないため、水溶液中でやるというのは厳しそうな印象を受けました。

•トリメタリン酸を用いたペプチド結合の持つ応用の余地について

ポリペプチド形成において酸性条件に付せば重合は確かに起こりますが、どうしても反応時間の長さが問題になってくるような気がします。また、同じアミノ酸同士の縮合ならともかく混合されている溶液中で行おうとした場合選択性をだすのが難しいような印象を受けたので、あまり現実的でないような気はします。