



Title	リボオリゴヌクレオチドの新合成法に関する研究
Author(s)	姥沢, 賢
Citation	大阪大学, 1972, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30564
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【2】

氏名・(本籍)	うば 焼 沢 賢
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 2514 号
学位授与の日付	昭和47年3月25日
学位授与の要件	薬学研究科薬品化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	リボオリゴヌクレオチドの新合成法に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 池原 森男 (副査) 教 授 梶井 雅一郎 教 授 田村 恭光 教 授 上原 喜八郎

論 文 内 容 の 要 旨

緒 論

核酸の生物学的役割に関しては、長年の研究により、その概観が明らかにされつつある。核酸と酵素との相互作用などの研究手段として、又、oligonucleotide のCD, NMR などの物理的性質の研究に、任意の塩基配列を持った oligonucleotide の合成が望まれる。

deoxyribonucleotide の分野では、H. G. Khoranaらが化学的に5~20の鎖長の oligomer を合成し、それらを ligase で結合し、人工的に yeast の alanine t-RNA の gene を合成している¹⁾

これに比較して ribooligonucleotide の分野では、2' 位に水酸基が存在する為、官能基の保護(特に磷酸基の保護)に問題があり、その研究は遅れており、Khorana 等が末端に磷酸基を持たない trinucleotide を64種合成し²⁾ J. Smrt 等が、uridine のみを含む hexanucleotide を合成したにとどまっている³⁾

著者は、ribooligonucleotide の合成の問題点である磷酸基の保護について検討し、磷酸 anisidate が isoamylnitrite により容易に、かつ選択的に脱保護でき、しかも縮合の条件にも満足できる安定性を有することを見出した⁴⁾。これにより、3' 末端に磷酸基を有する完全保護 di- 及び trinucleotide の一般的合成法を開発した⁴⁾

又、著者は2', 3'-cyclicphosphate がDCC と反応して生ずる phosphorylurea が phridine-acetic acide (1:1 v/v) の溶媒中で加温することにより、他の保護基を脱離することなく cyclic phosphate にもどることを見出し、RNase 反応と組合わせる事により、保護した trinucleotide を合成する方法も開発した⁵⁾

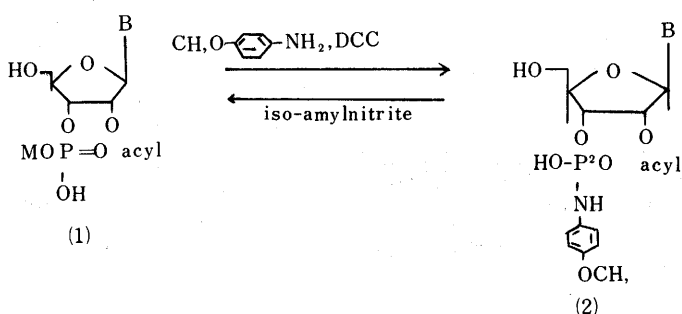
さらに、これらの block を縮合することにより、yeast の alanine t-RNA の3' 末端 hexanucleotide の合成に成功した⁶⁾。この hexanucleotide は、TEAE-cellulose カラムクロマトグラフィにより

保護基を有したまま単離する事ができ、さらに次の block を縮合し、順次鎖を延していくことが可能である。

本 論

§ 1 保護した nucleotide の anisidate の合成

5' 水酸基を monomethoxytrityl 基で、base と 2' 水酸基を acyl 基で保護した nucleotide²⁾ を 80% acetic acid により脱 monomethoxytrityl 化した後、Moffat, Khorana が nucleoside 5'-amidate を合成⁷⁾ している条件により、含水 Butanol 中 anisidine と DCC により加熱した後、脱保護したものを抽出により除き、50~90% の収率で anisidate を得た。

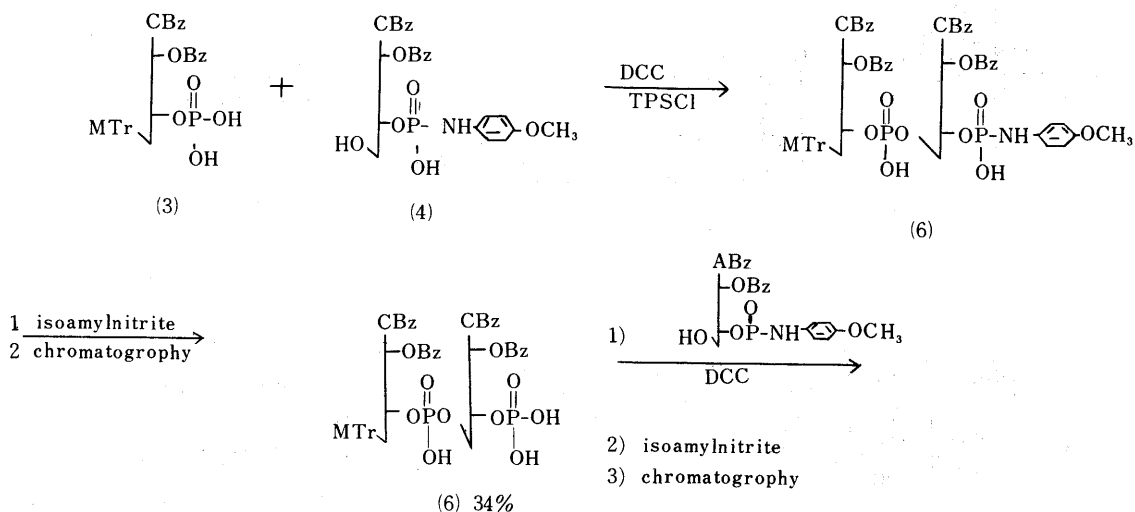


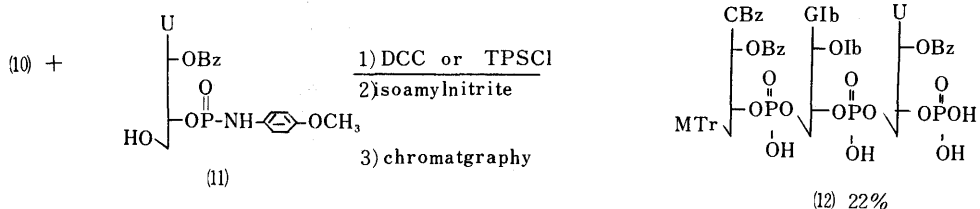
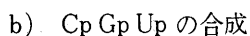
この anisidate は、pyridine-acetic acid (1 : 1 v/v) 溶媒中 isoamylnitrite で扱う事により、室温 4 時間で定量的に、かつ選択的に脱離することが明らかとなった。⁴⁾

§ 2 Anisidate 保護を用いた 3' 末端リン酸基を持つ完全保護 trinucleotide の合成

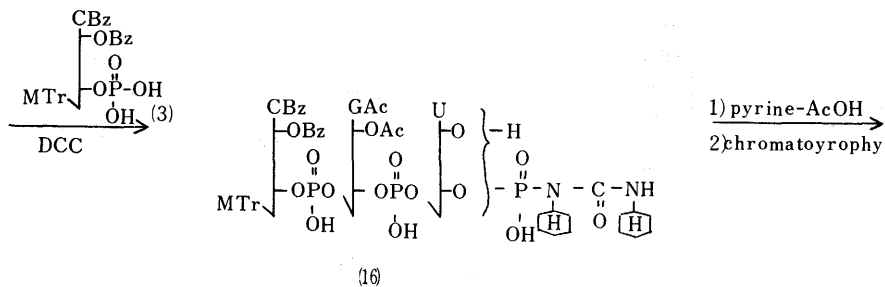
yeast alanine t-RNA の 3' 末端より 4~6 番目の Cp Cp Ap と 7~9 番目の Cp Gp Up の 2 つの trinucleotide を次式のごとく合成した。

a) Cp Cp Up の合成⁴⁾





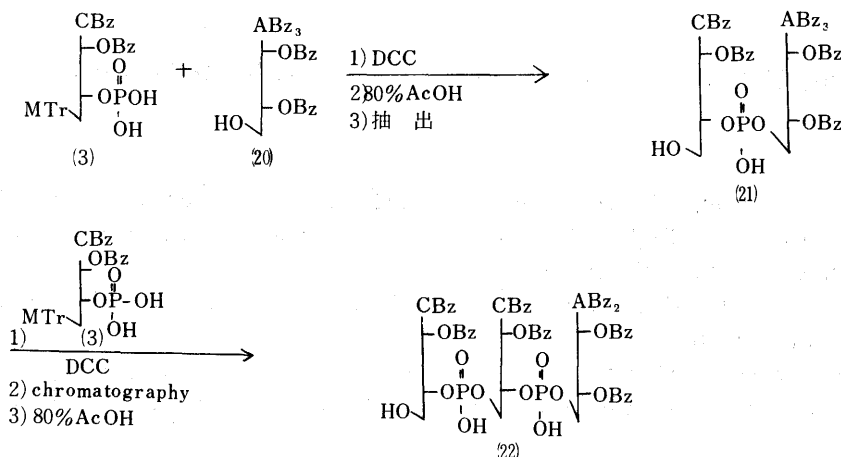
§ 3 Cyclicphosphate を用いた完全保護 Cp Gp Up の合成⁵⁾



(13)と(14)、(3)と(15)をDCCで縮合する際、uridineの2', 3'末端磷酸は、phosphorylureaとなり、不活性化され副反応を防止している。(16)をpyridine-acetic acid (1:1 v/v)の水溶液中で加温する事により、(17)を得た。(17)をPancreatic RNaseで水解し、3'-phosphateとし、次いでacetyl化して(18)を得た。(13)からの通算収率は9%。この方法は、baseの保護のいらぬuridineを3'末端に有するblockの合成に適している。

§ 4 yeast alanine t-RNA 3'末端 trinucleotide Cp Cp A blockの合成

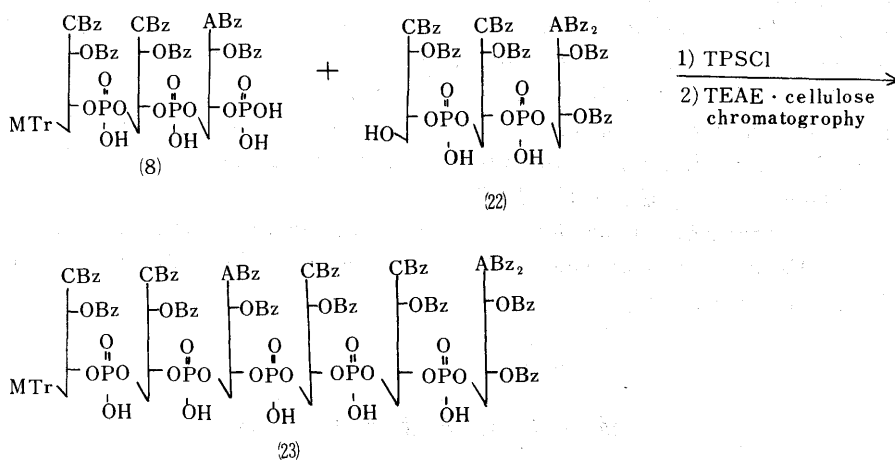
Khoranaの3'末端磷酸を持たないtrinucleotideの合成法²⁾をmodifyして合成した。



(22)の(3)からの通算収率は25%

§ § 5 保護した trinucleotide の縮合反応⁶⁾

(8)と(22)を1:1.3のモル比でpyridine中TPSCl (triisopropylbenzenesulfonyl chloride)で縮合し、TEAE-celluloseカラムクロマトグラフィによりhexanucleotide (23)を収率9%で単離した。



(23)は、5' monomethoxytrityl基を脱離し、さらにtrinucleotide block(12)と縮合し、nonanucleotideを合成中である。

結 論

1. Isoamylnitrite により選択的に脱離する事のできる燐酸の anisidate 保護により、3' 末端 燐酸を有する完全保護 di 及び trinucleotide の一般的合成法を開発した。
2. Pyridine-酢酸中で加温する事により他の保護基を脱す事なく、phosphorylurea を cyclic-phosphate にする事と、RNase 反応を組み合わせ、完全保護 trinucleotide Cp Gp Up の合成を行った。
3. これらの完全保護 trinucleotide を用い、block 縮合により、保護した hexanucleotide を合成する事に成功した。
4. 以上の研究結果、更に nucleotide 鎖を延長することにより、t-RNA 分子の部分合成が可能になった。

References

- 1) K. L. Agarwal, H. Büchi, M. H. Caruthers, N. Gupta, H. G. Khorana, K. K. Kleppe, A. Kumar, E. Ohtsuka, U. L. RajBandary, J. H. Van de Sande, V. Sgaramella, H. Weber, T. Yamada, *Nature*, 227, 27 (1970).
- 2) R. Lohrmann, D. Söll, H. Hayatsu, E. Ohtsuka, and H. G. Khorana, *J. Amer. Chem. Soc.*, 88, 819 (1966).
- 3) J. Smrč and F. Šorm, *Collect. Czech. Chem. Comm.*, 29, 2971 (1964).
- 4) E. Ohtsuka, K. Murao, M. Ubasawa, and M. Ikehara, *J. Amer. Chem. Soc.*, 92, 3441 (1970).
- 5) E. Ohtsuka, M. Ubasawa, and M. Ikehara, *J. Amer. Chem. Soc.*, 92, 3445 (1970).
- 6) E. Ohtsuka, M. Ubasawa, and M. Ikehara, *J. Amer. Chem. Soc.*, 93, 2269 (1971).
- 7) J. G. Moffatt and H. G. Khorana, *J. Amer. Chem. Soc.*, 83, 650 (1961).

研究論文

- 1) A New Method for the Synthesis of Protected Ribooligonucleotides with 3'-Phosphate End Groups.
J. Amer. Chem. Soc., 91, 1537 (1969).
- 2) Studies on Transfer Ribonucleic Acids and Related Compounds. I. Synthesis of Ribooligonucleotides Using Aromatic Phosphoramidates as a Protecting Group.
J. Amer. Chem. Soc., 92, 3441 (1970).
- 3) Studies on Transfer Ribonucleic Acids and Related Compounds. II. A Method for Synthesis of Protected Ribooligonucleotides Using a Ribonuclease.
J. Amer. Chem. Soc., 92, 3445 (1970).
- 4) Studies on Transfer Ribonucleic Acids and Related Compounds. III. Synthesis of Hexanucleotide Having the Sequence of Yeast Alanine Transfer Ribonucleic Acid 3'-End.
J. Amer. Chem. Soc., 93, 2269 (1971).

論文の審査結果の要旨

核酸の性状をより深く理解する為塩基配列の定ったオリゴリボヌクレオチドの合成法を開発する目的で次の研究を行った。

- 1) 燐酸基の保護に芳香族アニリドを用い、又そのものを亜硝酸イソアミルで分解する方法を

発見した。

- 2) 如上の方法により Alanine t-RNA 3' 末端 $C\beta^{22}C\beta^{22}A\beta^{22}$ の完全保護ヌクレオチドを合成した。
- 3) 同じく末端 $C\beta^{22}C\beta^{22}A\beta^{22}$ を 5' 側に鎖を延長する方法で合成した。
- 4) 同じく末端 $C\beta^{22}G\beta^{22}Up$ を合成する際、副生する phosphorylurea 体を緩和な方法で分解して 2', 3'-cyclic 磷酸に導く方法を発見した。
- 5) 同法及び amidate 法を用いて $C\beta^{22}G\beta^{22}Up$ を合成した。
- 6) $C\beta^{22}C\beta^{22}A\beta^{22}$ と $C\beta^{22}C\beta^{22}A\beta^{22}$ との縮合により完全保護ヘキサリボヌクレオチドを合成した。

以上の研究により t-RNA 全分子の合成への端緒を開いたものとして薬学博士の称号を与えるにふさわしい研究として認めるものである。