OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	蛋白生合成コードンAUGアナローグの合成とその性質に関する研究
Author(s)	名倉, 猛夫
Citation	大阪大学, 1976, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31401
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

【5】

氏名・(本籍)	名倉猛夫
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第3528号
学位授与の日付	昭和51年3月5日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	蛋白生合成コドン AUG アナローグの合成とその性質に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 池原森男 (副査) 教授 吉岡一郎　教授 上原喜八郎　教授 田村恭光

論文内容の要旨

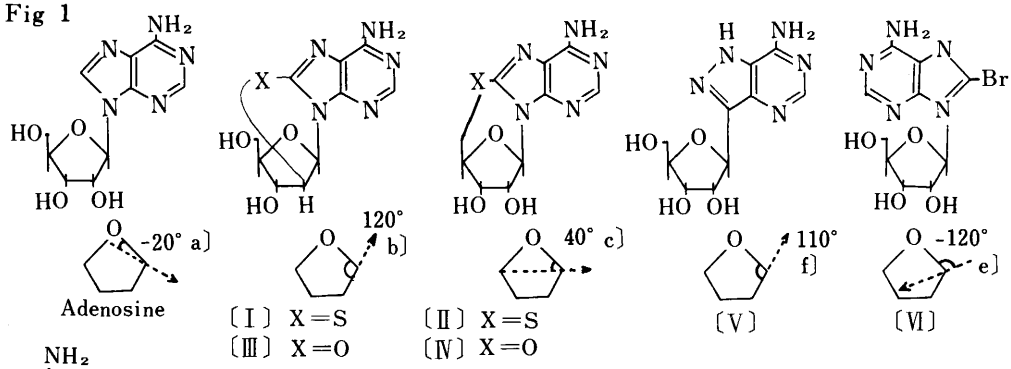
遺伝子の本体である核酸は，生体構成成分中，最も重要な物質の一つである．この核酸の生体内に於ける役割については，長年の研究により，その概観が明らかにされつつあるが，核酸と酵素の作用等については未だ不明な点もある．

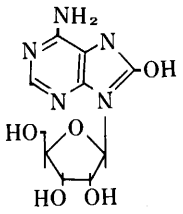
蛋白質の生合成は，DNA を鋳型として m-RNA に転写（trascription）された遺伝情報に従ってリボソーム上で m-RNA とアミノアシル-tRNA のアンチコードン部分が相補的塩基対を形成する事によって行なわれている（translation）．この遺伝情報は m-RNA の3個のヌクレオチドの塩基配列により構成されており，1個のアミノ酸を規定している（genetic code）．

Adenylyl-(3′5′)-uridylyl-(3′5′)-guanosine(AUG) はメチオニンの internal codon として又，cistron の5′末端においては，蛋白生合成の開始コドン（initiation codon）として作用し，internal codon の場合は Met-tRNA$_M^{Met}$ を認識し，initiation codon の場合は *f*Met-tRNA$_F^{Met}$(Eucaryote の場合は Met-tRNA$_F^{Met}$) を認識して蛋白合成を行なっている．しかし initiation step における AUG と *f*Met-tRNA$_M^{Met}$ 又，elongation step における AUG と Met-tRNA$_M^{Met}$ の作用様式についての知識はほとんど得られていない．

著者は，AUG のアデノシン部分の torsion angle を種々変化した時，その立体構造に又，Met-tRNA$_F^{Met}$ のリボソームへの結合にいかなる影響を与えるか更に，*f*Met-tRNA$_F^{Met}$ による initiation mechanism についての情報が得られる事を期待して，AUG のアデノシン部に torsion angle が種々の角度に固定又は，制限されたアデノシンアナローグを導入した AUG アナローグの合成を行なった．図1に合成に用いたアデノシンアナローグの構造とX線解析から得られた torsion angle の値を示す．

Fig 1





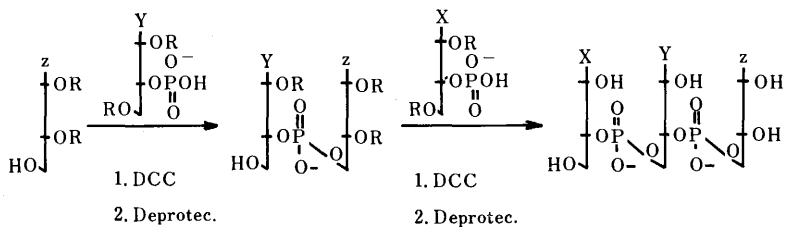
Syn form d]
〔Ⅶ〕

即ち，cyclo bond により torsion angle が $\chi=122°$[1] の Syn-Anti 境界領域に固定された 8.2′-anhydro-8-mercapto-9-(β-D-arabinofuranosyl) adenine(1)(8.2′-S-A) と 8.2′-anhydro-8-oxy-9-(β-D-arabinofuranosyl) adenine(Ⅲ)(8.2′-O-A) 又，$\chi=42°$[2] の Anti 領域に固定された 8.5′-anhydro-8-mercaptoadenosine(Ⅱ)(8.5′-S-A) と 8.5′-anhydro-8-oxyadenosine (Ⅳ)(8.5′-O-A), purine 環の 8 位置換基の立体障害により torsion angle が $X=-120°$[3] の Syn 領域に制限された 8-bromoadenosine (Ⅵ)(Br-A) と Syn 型[4] と推定されている 8-oxyadenosine(Ⅶ)(oxy-A), Syn 型も Anti 型も安定に存在し得ると考えられる formycin[5](Ⅴ)(F) である.

Ribonucleotide の化学的合成については，多くの人達により研究がなされているが，中でも Khorana 等は64種の tri-ribonucleotides の合成を行ない各アミノ酸に対応するすべてのコードンを決定している．しかし修飾塩基 (modified base or minor base) を含む oligonucleotides の化学的合成例は比較的少なく，現在まで池原[6]，Smrt[7] 等により数種の triribonucleotides が合成されているにすぎない.

著者は，Khorana 等の保護した 3′末端 nucleoside の 5′-水酸基に保護した 3′-nucleotide を縮合して順次鎖長を 5′末端へ伸長していく方法[8]（図 2）を利用し，図 1 に示す torsion angle が種々の角度に固定或は制限された修飾塩基を含む 7 種の AUG アナローグの合成を行なった．又，これらA-UG アナローグの合成に際し，二，三の新知見を得る事が出来た.

Chart 2



合成した7種のAUGアナローグのCDスペクトルを測定し，それぞれのアデノシンアナローグとウリジン，グアノシンの加算スペクトルを比較する事により，各AUGアナローグのconformafionを推定した．この推定conformfionとAUGアナローグによるMet-tRNAのリボソームへの結合促進効果との間に良い相関関係が見られ，推定conformafionを支持する結果が得られた．

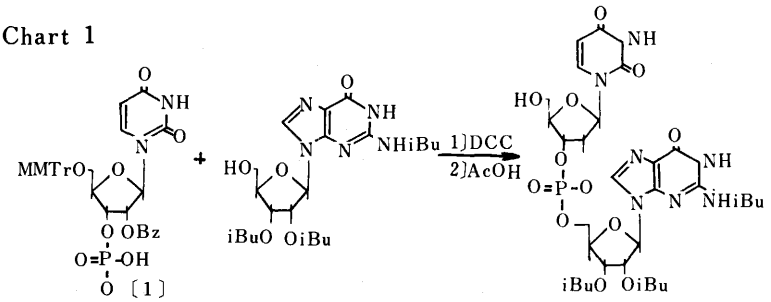
更に，アデノシン部分のtorsion angleの種々異なった修飾塩基を含むAUGアナローグをm-RNAとして用い，Nirenberg, Lederの簡易Assay法に従い，Met-tRNAのリボソームへの結合促進効果を検討した．その結果，AUGのアデノシン部分のtorsion angleはMet-tRNAのm-RNA認識に重要な影響がある事が判明した．

§1 AUGアナローグの合成

1）2′-O-Benzoyluridylyl-(3′-5′)-N,2′,3′-tri-O-isobutyrylguanosine($_{HO}Up^{BZ}G^{iBu_3}$) の合成.

一般にnucleotideの合成において煩雑なのはイオン交換クロマトによる分離である．これをさけるためにウリジンの2′-水酸基をbenzoyl保護した5′-O-monomethoxy-2′-O-benzoyluridine 3′-phosphate(1) とグアノシンのアミノ基と 2′,3′-水酸基を脂溶性の大きな isobutyryl 基で保護したN,2′,3′-tri-O-butyrylguanosine(2) とをDCCで縮合し，80%酢酸でmonomethoxytrityl基（$_{MM}$Tr基）を脱離した後，生成物を抽出法で分離し収率良く $_{HO}Up^{BZ}G^{iBu_3}$(3) を得た．抽出法とは，残存する原料に用いた2′-O-benzoyluridineはn-ブタノール抽出により水層へ除去され，又（2）はエーテル中に加えることにり溶解除去され，dinucleotide(3) を粉末として得る方法である．

Chart 1



2）8,2′-Anhydro-8-oxy-9-(β-D-arabinofuranosyl)adenine phosphoryl(3′-5′)-uridylyl-(3′-5′)-guanosine(8,2′-O-AUG）の合成.

Khorana等の合成法は，修飾塩基の3′-水酸基にリン酸を導入する必要がある．しかしながら現在までnucleosideの3′-水酸基のみをリン酸化する方法はまだ見出されていない．従ってnucleosideの3′-水酸基にリン酸基を導入するためには，A，B，C法によって行なわなくてはならない．

A）分離法

2′位域は3′位の水酸基のいずれかをリン酸化し，イオン交換クロマト或は再結晶により2′-リン酸化体と3′-リン酸化体を分離し，3′-リン酸化体を得る方法

B）酵素法

2′位と3′位の水酸基を2′,3′-環状リン酸としRNaseの酵素水解により特異的に3′-リン酸化体を得る方法.

C）保護法

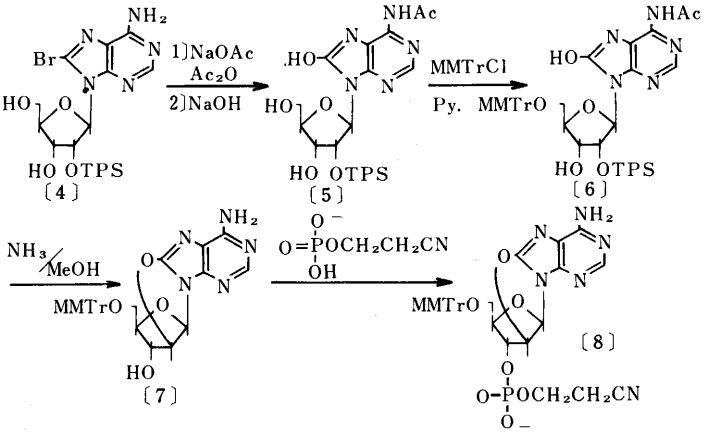
2′位と5′位の水酸基とアミノ基を保護した後3′-水酸基をリン酸化する方法.

著者は，この3法を利用して7種の修飾塩基を含むAUGアナローグを合成した.

8, 2′-O-Aは図3，4に示す様にC）法により3′位にリン酸基を導入し（9）を合成した.（8）のシアノエチル基を脱離するためメタノール性アンモニア（0℃にて飽和したもの）と反応したところ8-oxy体（10）が副生した（図4）.（10）は（9）のリン酸のO原子が隣接する2′位炭素をcyclo bondの反対側より攻撃し，cyclo bondが開裂して生成したと推定される.

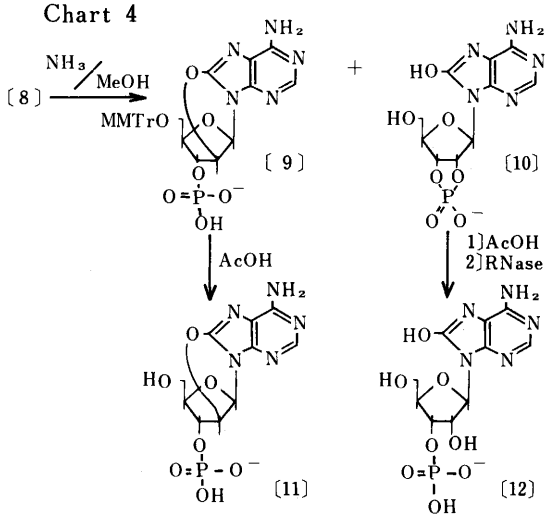
（9）と（10）の構造は，80%酢酸にて脱MMTr化した後,（10）はRNase Mにより完全に水解され（12）を与える事により又,（9）はsnake venom 5′-nucleotidaseと反応したところ8, 2′-O-cycloadenosine 5′-phosphateが50%水解される条件下でも全く水解を受けなかった事よりそれぞれ構造が確認された.

Chart 3



得られた（9）と先に合成したdinucleotide（3）とをDCCで縮合し（図5）,脱保護した後，粗成績体をDEAE-cellulose(HCO_3^-)イオン交換クロマトにて分離しFig 1の様な分離パターンを得た. 8, 2′-O-AUG（13）に相当するpeak Ⅵを更にSephadex G 15のゲル沪過により精製し単一な（13）を得た.（13）の構造は，snake venom phosphodiesteraseの酵素水解を行なうと8, 2′-O-cycloadenosine, uridine 5′-phosphate, guanosine 5′-phosphateを1.0：1.1を0.93の比率で生成する事より確認された.

Chart 4



この反応において（13）の収率は悪く，peak Ⅰがかなりの量で副生し同時に（3）を多量に回収している. この原因について種々検討したところ，phosphoryl dicyclohexylurea(14)が生成するためである事が判明した（図6）.（14）はuridine 3′-dicyclohexylureaのdicyclohexylureaが脱離される条件下[9]では全く反応せず安定である. uridine 3′-phosphoryl dicyclohexylureaのdicyclohe-

Chart 5

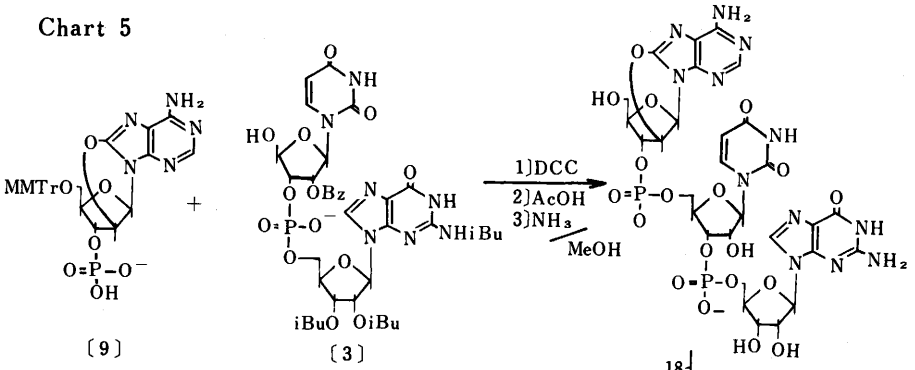
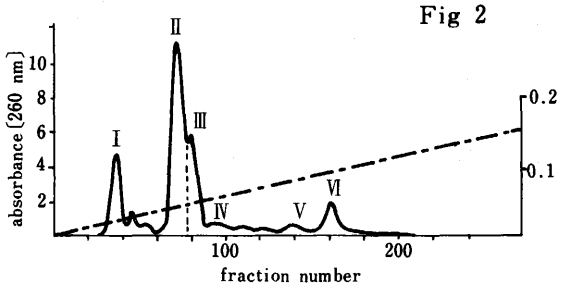
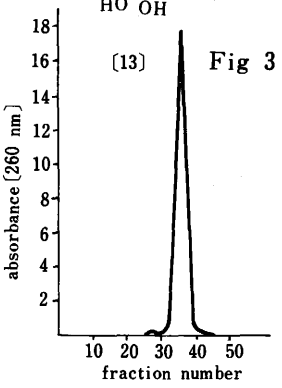


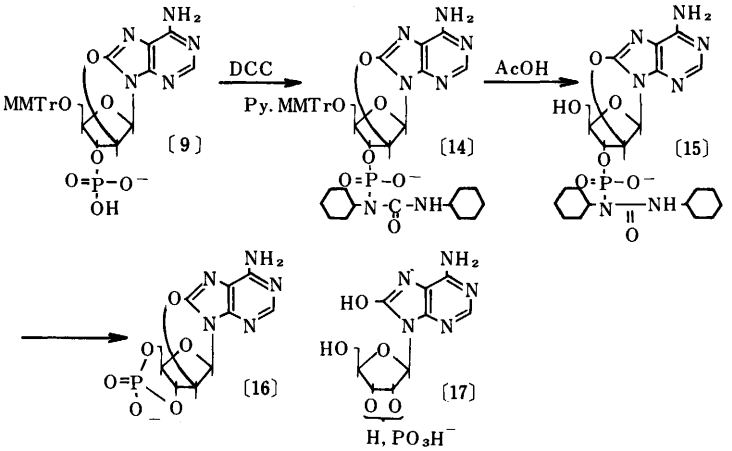
Fig 2



〔13〕 Fig 3



xylurea が脱離するのは，隣接2′-水酸基がリン酸基を攻撃して起ると考え，(14) を80%酢酸にて脱 MMTr 化し(15)とした後，酢酸中還流したところ (17) と共に (16) が得られた．(16) はホルモン作用伝達因子，サイクリックAMP のアナローグであり，phosphoryl dicyclohexylurea を活性化し3′,5′-環状リン酸エステル結合を形成し得る新知見が得られた．



3）8, 2′-Anhydro-8-mercapto-9-(β-D-arabinofuranosyl)adenine phosphoryl-(3′-5′)-uridylyl-(3′-5′)-guanosine(8, 2′-S-AUG）の合成．

2）と同様にC）法によるリン酸化を行なうために (19) を合成し，シアノエルリン酸化を行なったところ目的とする3′-リン酸化体は得られず (20) が生成した．そこで Khorana 等の方法[10]を応用しアミノ基をアセチル基で保護した (25) を合成しリン酸化を行なった．即ち (21) にピリジン，水中

2当量の NaOH を反応すると，まず N^6-diacetyl の内の1個のアセチル基が脱離する．次いで同様の操作を順次くり返すと3′-アセチル，5′-アセチルの順に脱離する事が判明した．得られた (21)(22)(23)(24)(25) の構造は，UV スペクトル，NMR，元素分析により確認した．

得られた (25) をシアノエチルリン酸化し，次いでメタノール性アンモニアにて脱シアノエチル化

Chart 7

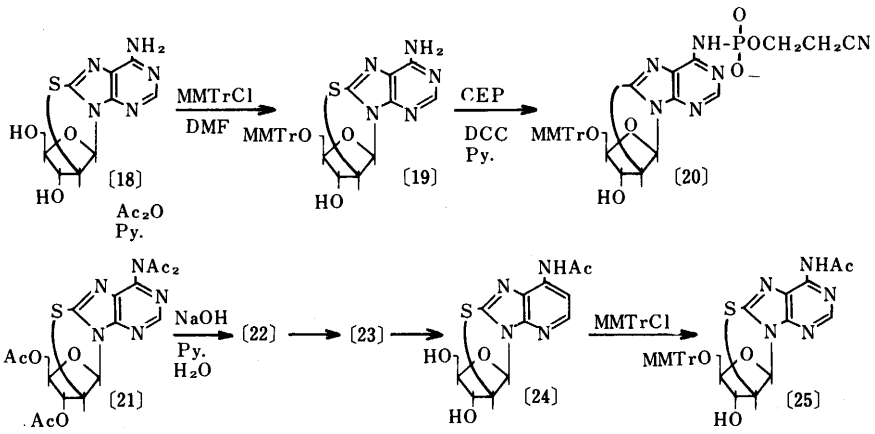
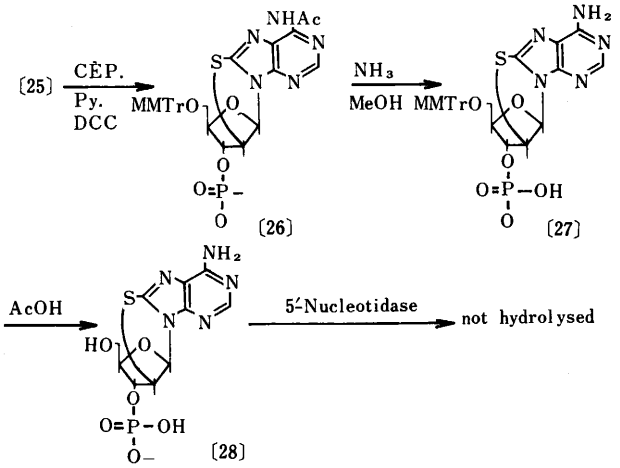


Chart 8



して (27) を高収率で得た．(27) の構造は80%酢酸にて脱 MMTr 化して (28) とした後 snake venom 5′-nucleotidase と反応させたところ 8,2′-S-cycloadenosine 5′-phosphate が50%水解される条件でも全く水解を受けなかった事より確認された．

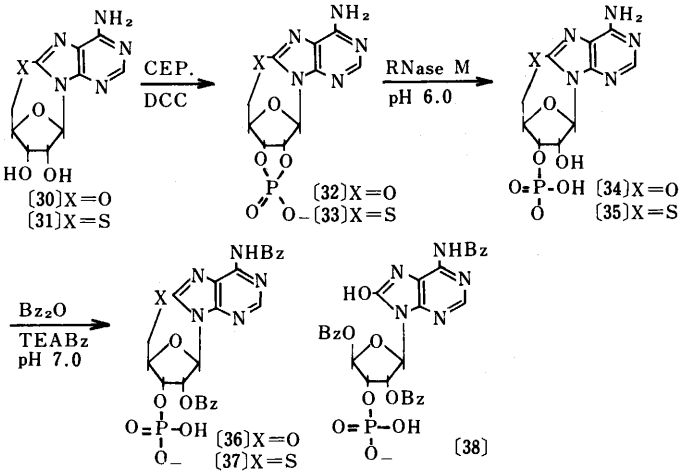
次いで (27) と先に合成した dinucleotide $_{HO}Up^{BZ}G^{iBu_2}$ (3) とを DCC により縮合し，次いで脱保護した後2) 8,2′-O-AUG(13) の合成と同様に分離操作を行ない 8,2′-S-AUG(29) を得た．

4) 8,5′-Anhydro-8-oxyadenylyl-(3′-5′)-uridylyl-(3′-5′)-guanosine(8,5′-O-AUG)と 8,5′-Anhydro-8-mercapto adenylyl-(3′-5′)-uridylyl-(3′-5′)-guanosine(8,5′-S-AUG) の合成．

B) の酵素法により3′位にリン酸基を導入した．即ち2′,3′-環状リン酸エステル (32),(33) を RNase M で酵素水解し，(32),(33) より 86%，80%の収率で (34),(35) を得た．(30),(31) をシアノ

エチルリン酸にてリン酸化を行なったところ，シアノエチルリン酸化体は得られず一挙に2′,3′-環状リン酸エステルに閉環した（32),(33）が得られた．(32),(33）を DEAE-cellulose イオン交換クロマトで精製し，収率56%，64%で得た．

Chart 9



シアノエチルリン酸[11]はアルカリ性で脱シアノエチル化されるリン酸の保護基として用いられて来たが，cyclonucleoside を用いる事により初めてリン酸を活性化し，leaving group として働く保護基である事が判明した．

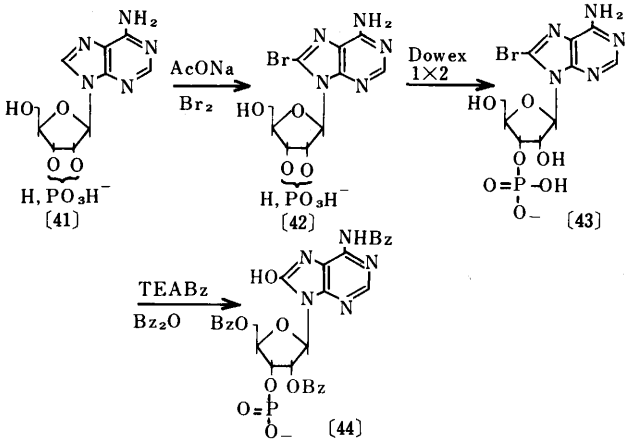
得られた（34),(35）を tetraethylammonium benzoate (pH7.0)（TEA Bz）共存下無水安息香酸にて benzoyl 化し（36)(37）を得た．しかし（34）の場合は時として（36）は得られず（38）が生成する．この事については後述する．

(36),(37）は，先に合成した dinucleotide $_{HO}Up^{BZ}G^{iBu_2}$（3）と DCC により縮合し，メタノール性アンモニアで脱保護した後，2）8,2′-O-AUG(13）の合成と同様に分離操作を行ない 8, 5′-O-AUG (39), 8, 5′-S-AUG(40）を得た．構造確認は RNase M の酵素水解により行なった．

5）8-Bromoadenylyl-(3′-5′)-uridylyl-(3′-5′)-guanosine(Br-AUG）と 8-Oxyadenylyl-(3′-5′)-uridylyl-(3′-5′)-guanosine(Oxy-AUG）の合成．

A）の分離法により 8-bromoadenosine 3′-phosphate(43）を得た．(43）は，2′及び 3′-adenylic acid の混合物（3′体を 70% 含有）を 0.14M酢酸ナトリウム緩衝液（pH 4.0）中でブロム化し，生成物を Dowex 1×2 ($HCOO^-$型）樹脂に吸着させ，0.15Mギ酸と 0.2M ギ酸アンモニアにより流出させ，(43）を45%の収率で得た．(3′-AMP からの収率は68%）(43）を TEABz，無水安息香酸で benzoyl 化を行なったところ，目的とするブロム体（50）は得られず（44）が生成した．

Chart10



そこで Gilham 等の方法[12]について検討した（図11). 副生した（49）を分離除去する操作の過程で（45）が（46）に分解する事及び試薬に用いた p-トルエンスルフォン酸が分離出来なかったので更に Khorana 等の方法[13]（図12）を検討し(47)

Chart 11

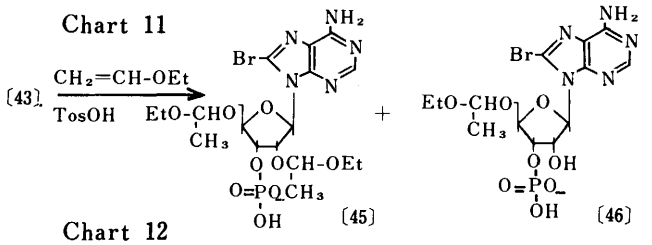
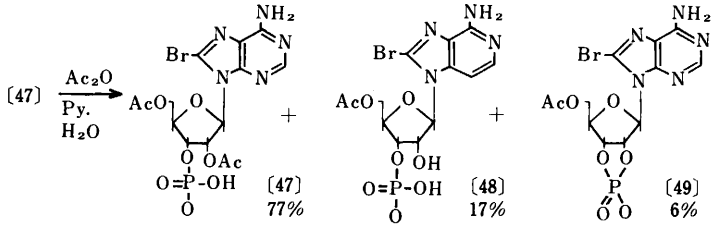


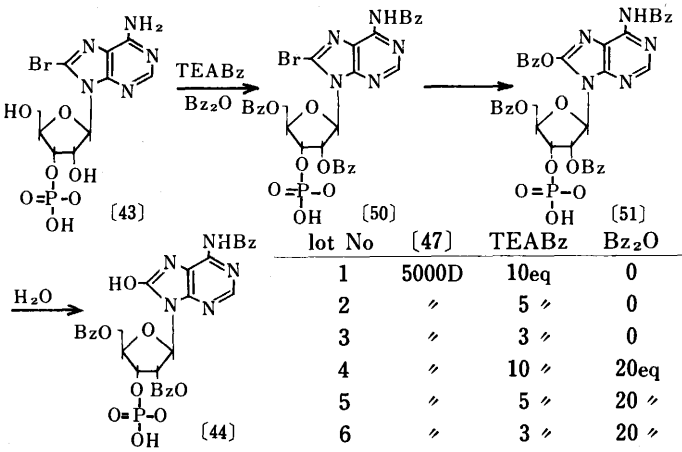
Chart 12



を合成した．即ち（43）をピリジン，水中でアセチル化すると（47），（48），（49）を77%，17%，6%の比率で生成した．この混合物をペーパークロマトにより分離し（47）を64%の収率で得た．

得られた（47）と先に合成した dinucleotide $_{HO}Up^{BZ}G^{iBu_2}$（3）とを DCC で縮合し，メタノール性アンモニアで脱保護した後，2）の 8,2′-O-AUG(13) と全く同様な分離操作を行ない Br-AUG(52) を得た．(52) の構造は RNase M と snake venom phasphodiesterase の酵素水解により確認した．

Chart 13



lot No	〔47〕	TEABz	Bz_2O
1	5000D	10eq	0
2	〃	5 〃	0
3	〃	3 〃	0
4	〃	10 〃	20eq
5	〃	5 〃	20 〃
6	〃	3 〃	20 〃

Oxy 体（44）は図13の経路で生成すると考えられる[14]〔8,5′-O-Ap（34）の場合も同様と思われる〕．そこで（43）の benzoyl 化の条件を種々検討した結果，benzoyl 化を無水，無溶媒の条件下で行なうと（44）が生成し，僅かの溶媒（ピリジン，トルエン）が共存すれば（44）を生成することなく（51）を生成する事が判明した．この事は，4）8,5′-O-cycloadenosine 3′-phosphate(34) でも同様であり再現性のある事も確認された．得られた（36），(51) を用いて dinucleotides, Br-ApG(53), 8,5′-O-ApG(54) を合成しその構造を確認した．

8-Oxy-AUG(56) の合成は副生した（44）の benzoyl 基が acetyl 基に変った N_6-acetyl-2′,5′-di-O-acetyl-8-oxyadenosine 3′-phosphate(55) と先に合成した dinucleotide $_{HO}Up^{BZ}G^{iBu_2}$（3）とを DCC で縮合し合成した．2）の 8,2′-O-AUG(13) と同様に分離操作を行なったが（Fig, 4, peak Ⅵ），8-oxyadenosine の 6-アミノ

Fig 4

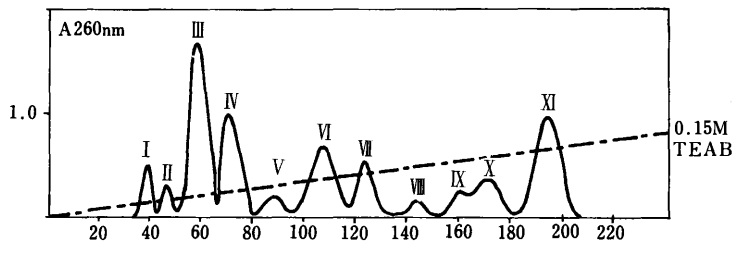
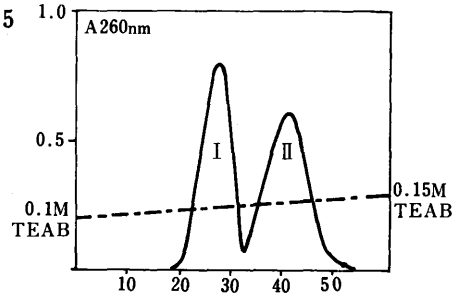


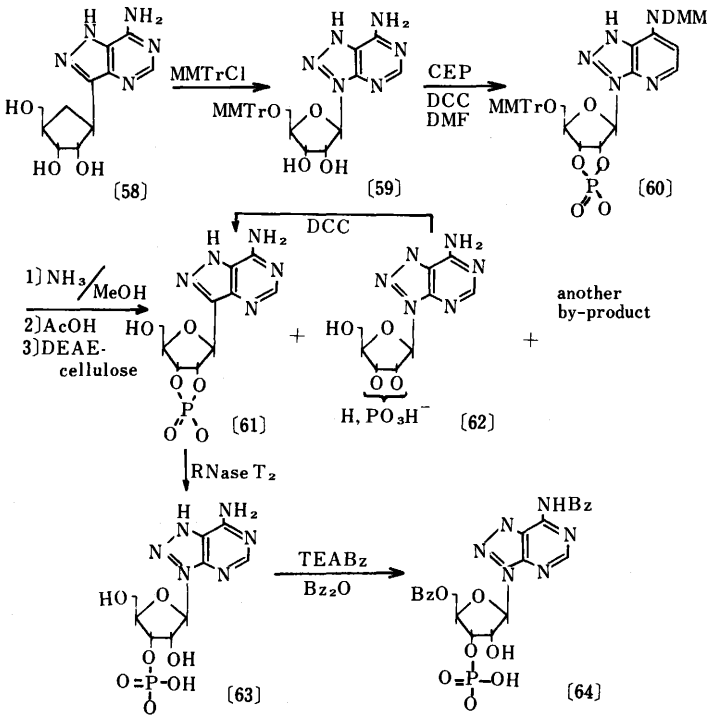
Fig 5



基のアセチル基が脱離されていない Oxy-AUG(57) が混入して来た．(56) と (57) は電気泳動，ペーパークロマトでは挙動が類似しており，分離する事は出来なかったが，Whatman DE-32の微結晶型イオン交換クロマトにより分離する事が出来た．(Fig. 5, peak Ⅱ)得られた Oxy-AUG(56)の構造は，RNase M 及び snake venom phosphodiesterase の酵素水解により確認した．

6) Formycin phosphoryl-(3′-5′)-uridylyl-(3′-5′)-guanosine(FUG) の合成．

Chart 14



B) の酵素法により3′位にリン酸基を導入し (63) を合成した．酵素法でリン酸基を3′位に導入するため (59)を合成し，シアノエチルリン酸化を行なったところアミノ基が dimethylaminomethylation された (60) が高収率で得られた．しかし (60) は酵素に対する親和性がないので，いったん保護基を脱離し，DEAE-cellulose のイオン交換クロマトにより分離し (61) を得た．副生した (62) は再度 DCC と反応し (61) とした．(61) を RNase T_2 で酵素水解し formycin 3′-phosphate(63)を70%の収率で得た．次いで (63) を TEABz，無水安息香酸で benzoyl 化し N_6-benzoyl-2′,5′-di-O-benzoylformycin 3′-phosphate(64) を合成した．得られた (64) を先に合成した dinucleotide $_{HO}Up^{BZ}G^{iBu_3}$ (3) と DCC で縮合し，メタノール性アンモニアで脱保護した後，2) の 8,2′-O-AUG(13) と同様に分離操作を行ない FUG(65) を合成した．(65) の構造は RNase M 及び snake venom phosphodiesterase の酵素水解により確認した．

以上のように合成した7種の AUG アナローグの電気泳動 Rm 値 (adenosine 2′,3′-cyclic phosphate に対する相対移動度) とペーパークロマト Rf 値及び収率を表1に示す．又構造確認のために行なった RNase M と snake venom phosphodiesterase による酵素水解の結果を表2に示す．

Table 1
Chromatographical Data and Yield

Compound	[Rm]	PPC [Rf] [A↓]	[B↓]	[C↓]	Yield[%]
8, 2′-O-AUG[13]	1.06	0.13	0.14	0.27	4.1
8, 5′-O-AUG[39]	1.16	0.02		0.24	[48 OD]
8, 2′-S-AUG[29]	1.22	0.10	0.07		39
8, 5′-S-AUG[40]	1.12	0.09	0.08		5.3
Br-AUG[52]	1.22	0.04	0.10		4.6
Oxy-AUG[56]	1.41	0.03	0.11		[45 OD]
FUG[65]	1.23	0.03	0.13		8.8

[A] i-PrOH : conc. NH_3 : H_2O = 7 : 1 : 2
[B] 1M-$AcONH_4$: EtOH = 3 : 7
[C] n-PrOH : conc. NH_3 : H_2O = 55 : 10 : 35
PEP 0.5M TEAB [pH 7.5] 850 Volt

Table 2
Enzyme Hydrolysis

Compound	Enzyme	Products	ratio
8, 2′-O-AUG	PDase	$\overset{O}{A}$: pU : pG	1.0 : 1.1 : 0.9
8, 5′-O-AUG	RNase M	$\overset{O}{A}p$: Up : G	1.0 : 0.95 : 1.0
8, 2′-S-AUG	PDase	$\overset{S}{A}$: pU : pG	1.0 : 1.0 : 1.0
8, 5′-S-AUG	RNase M	$\overset{S}{A}p$: Up : G	1.0 : 0.95 : 1.0
Br-AUG	PDase	$\overset{Br}{A}$: pU : pG	1.0 : 1.0 : 1.1
	RNase M	$\overset{Br}{A}p$: Up : G	1.0 : 0.99 : 1.0
Oxy-AUG	RNase M	$\overset{OH}{A}p$: Up : G	
	PDase	$\overset{OH}{A}$: pU : pG	0.90 : 1.0 : 1.1
AUG	RNase M	Fp : Up : G	
	PDase	F : pU : pG	1.1 : 1.0 : 0.99

Substrates [3-4ODunit] were incubated in the buffered solutions, $AcONH_4$ [pH 5.0, RNase M] and NH_4HCO_3 [pH 9.1PDase] for 3hr.

§ 2 AUG アナローグの UV, CD sqectrum と Conformation について。

核酸の CD spectrum についての研究は，これまで多くの人達により t-RNA 或は m-RNA 等の三次構造を解明するために又これらの生物学的役割を明らかにするために行なわれている。trinucleotide の CD spectrum については，Brahms,[15] Tinoco[16] 等により研究されており，XpUpY，UpXpY(X, Y はプリンヌクレオシドを示す) 等の uridine を有する trinucleotides は base-base 間の interaction (主として stacking) が弱いと報告されている。

そこで，stacking の指標といえる hyper, hypochromicity を snake venom phosphodiesterase

Table 3

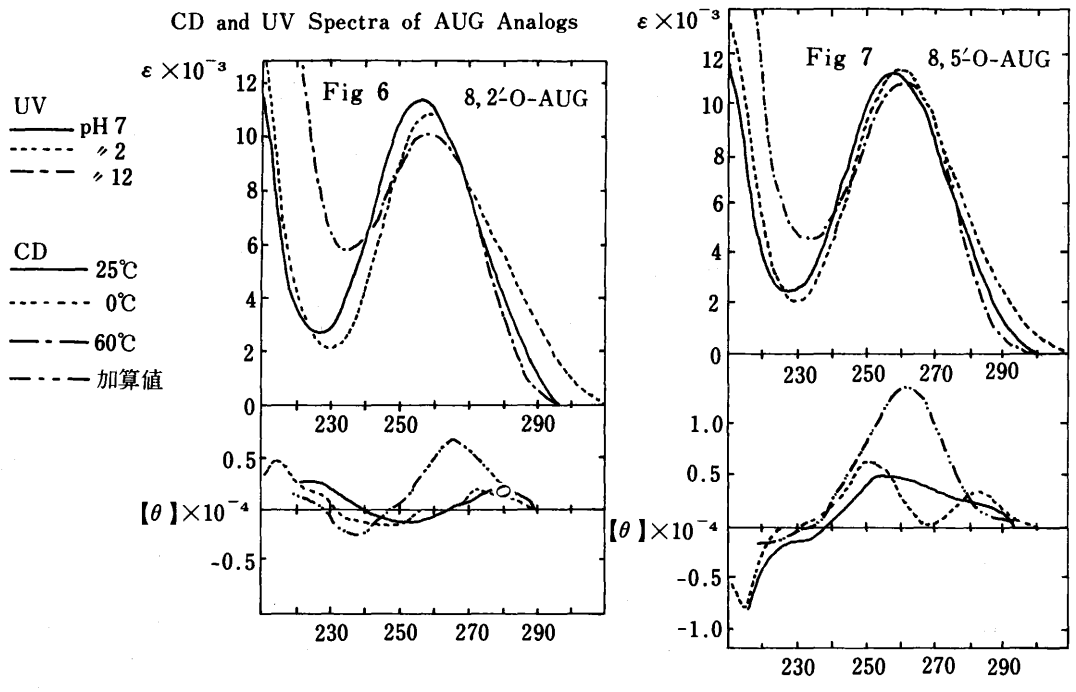
Hyper, and Hypochromicity of AUG Anglogs

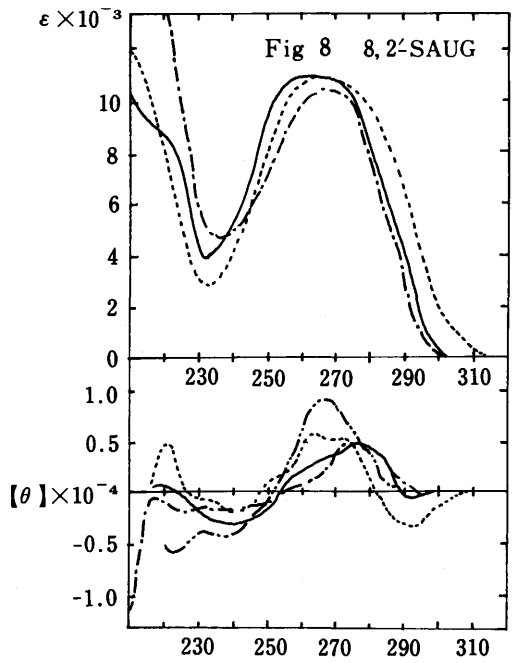
Compound	Hyperchromicity〔%〕	Hypochromicity〔%〕
8, 2′-O-AUG〔13〕	9.9	9.0
8, 5′-O-AUG〔39〕	18.0	15.3
8, 2′-S-AUG〔29〕	8.7	8.0
8, 5′-S-AUG〔40〕	6.5	6.1
Br-AUG〔52〕	8.6	7.9
Oxy-AUG〔56〕	8.0	7.4
FUG〔65〕	10.7	9.7
AUG〔66〕	10.7	9.7

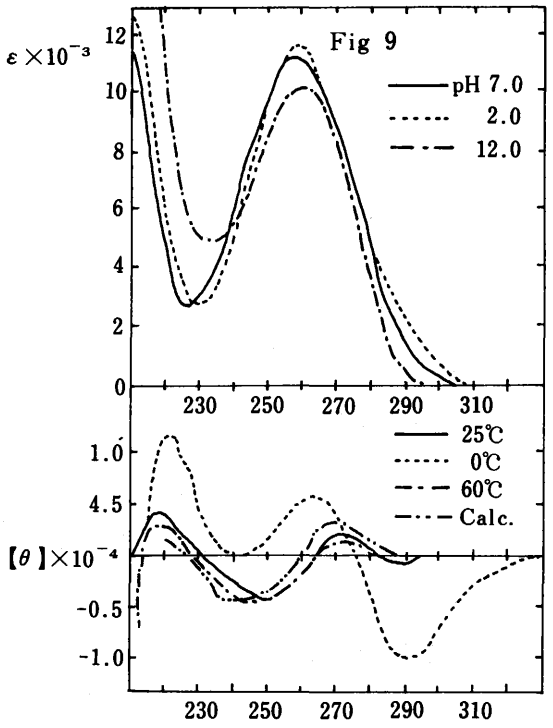
で酵素水解した後，水解前と水解後のUVspectrumの面積強度より求めた。（表3）AUGの場合 hypochromicityは9.7%の値を示している。これは井上等[17]が 260nmで測定した 9.3% に近い値を示している。他の AUG アナローグは6%～10%の値を示しており，8, 5′-O-AUGのみが異常に大きな値を示している。この hypochromicity を AUG アナローグと中で比較すると 8, 5′-O-AUG,>AUG, FUG>8, 2′-OAUG>8, 2′-S-AUG, Br-AUG>Oxy-AUG>8, 5′-S-AUG の順となる。

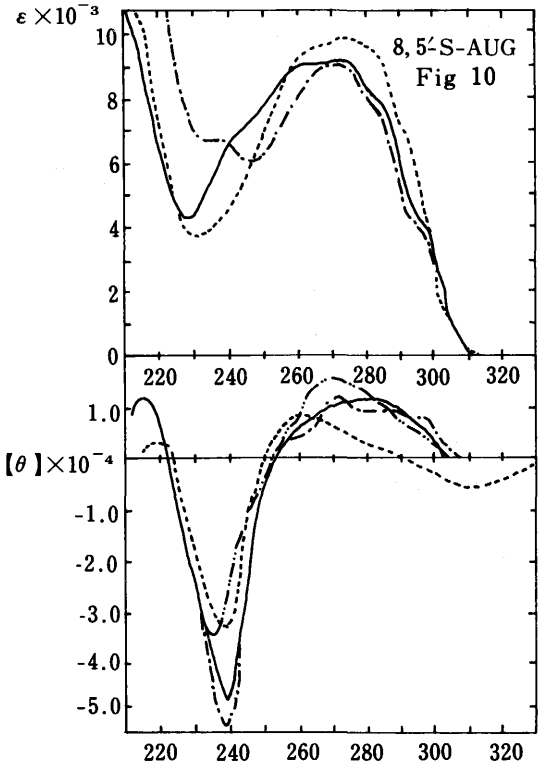
Torsion angle が Anti 型の AUG 又，torsion angle が比較的自由な値を取り得る FUG は大きな hypochromicity を示している。後述する Met-tRNA のリボソームへの結合促進効果で共に大きな活性を示している事は興味ある事と考える。Syn-型の Br-AUG, Oxy-AUG は小さな値を示している。又，torsion angle が Syn-Anti 領域の 8, 2′-O-AUG, 8, 2′-S-AUG が Anti 型の 8, 5′-S-AUG より大きな値を示している事は矢野等の dinucleotides の研究結果[18]とも良く一致している。8, 5′-O-AUG が異常に大きな値を示しているが，現在のところこの起因については説明が困難である。

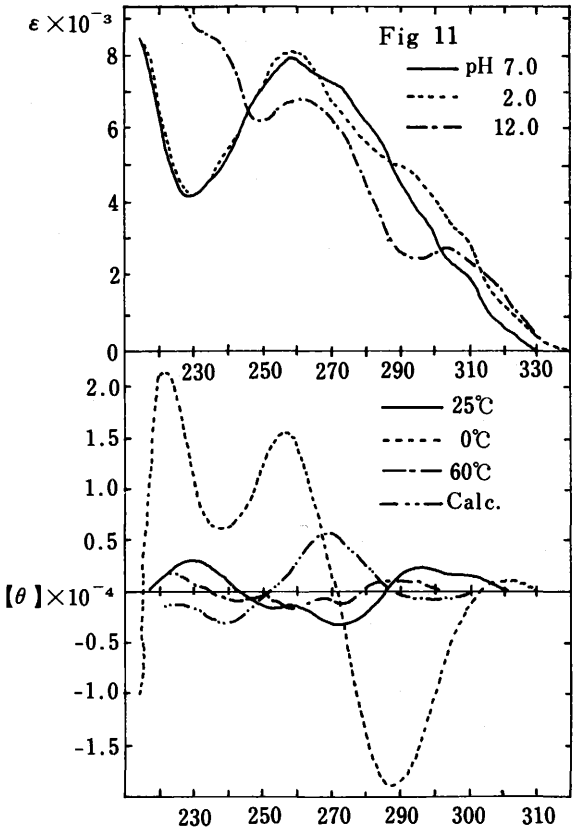
次に AUG アナローグの CD spectrumとその conformation について検討した。0.1MKF, 0.05M

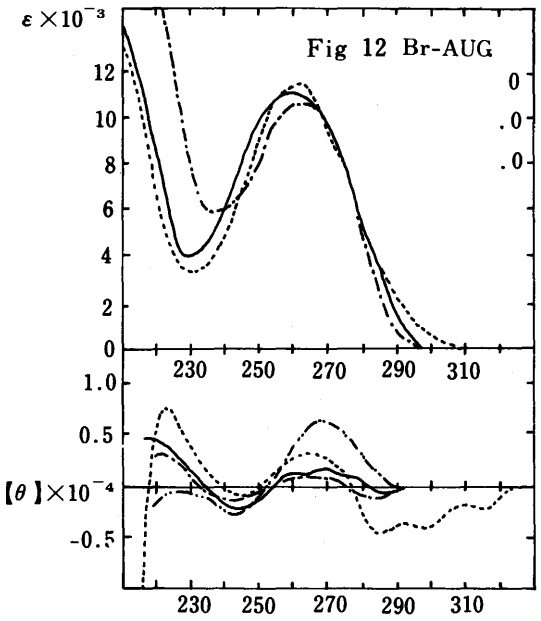


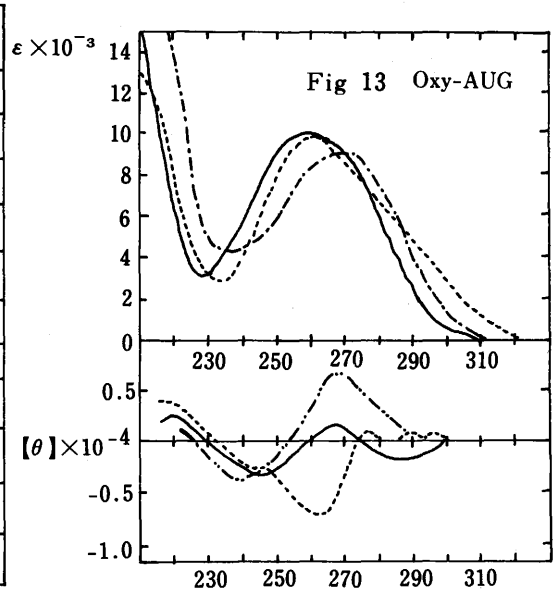

Fig 8 8,2'-SAUG
ε ×10⁻³
[θ] ×10⁻⁴


Fig 9
pH 7.0
2.0
12.0
25℃
0℃
60℃
Calc.
ε ×10⁻³
[θ] ×10⁻⁴


8,5'-S-AUG
Fig 10
ε ×10⁻³
[θ] ×10⁻⁴


Fig 11
pH 7.0
2.0
12.0
25℃
0℃
60℃
Calc.
ε ×10⁻³
[θ] ×10⁻⁴





リン酸緩衝液（pH 7.0）中0°, 25°, 60°C で測定したCD spectrumと mononucleoside のCD spectrum を加算して得た spectrum を Fig 6-13 に示す。図中上方は UV spectrum を，下方は CD spectrum を示す。ここでいう 0℃とは−20℃で氷結したサンプルを 0℃で溶解したもので，25℃のサンプルを 0℃に冷却しても同一 Chart は得られない。25℃のものを 0℃で測定したものは，25℃で測定した spectrum とほとんど同一であったので chart からは省略した。この 0℃ から 60℃ までの温度変化に対し CD パターンには大きな変化が認められない事より 0℃ から 60℃ までの間には大きな構造変化はないものと推定される。

25℃の CD spectrum と mononucleoside の CD spectrum を加算した spectrum を比較すると，AUG, 8, 5′-S-AUG は良く類似している。又 8, 2′-O-AUG, 8, 2′-S-AUG, 8, 5′-O-AUG, Br-AUG, は若干異なったパターンを示しているが，その cotton band のサインは同一である。例えば 8, 2′-O-AUG の場合は長波長領域より両者共に＋，−，＋である。従って，これら AUG アナローグはすべて mononucleoside の時の conformation[19]を trinucleotide に於いても維持していると考えられ，conformation は表6のように推定される。FUG, Oxy-AUG の場合はいずれも mononucleoside の加算 CDspectrum の cotton band と逆転したパターンを示している。formycin, oxyadenosine は溶液状態で Syn 型[4,5]と推定されている事より，これらの trinucleotide の formycin, oxyadenosine の torsion angle が Syn 型から Anti 型に変化している事が考えられ，conformation は表のように推定される。又0℃で(−20°→0℃)は，25°, 60℃の CD パターンと著しく異なったパターンを示している。中でも，Met-tRNA のリボソームへの結合促進効果で強い活性を示した AUG, FUG は類似した特徴的なパターンを示している。これは 5MKF の高塩濃度で測定する事による aggregation に起因する事が明らかとなった。

§ 3　AUG アナローグによる Met-tRNA のリボソームへの結合促進効果。

Nirenberg, Mathaei は，リボソーム，^{14}C-アミノアシル-tRNA, m-RNA の三者が複合体を形成し，放射能がリボソーム画分に検出され，m-RNA の代りに塩基配列の判った trinucleotide を使用した場合にもヌクレオチド配列に対応するアンチコードンを持つアミノアシル-tRNAがリボソームへ結合する簡易 Assay 法[20]を発見した。この事により各アミノ酸に 対応するほとんどすべてのコードンが決定された。その後更に修飾塩基を含むヌクレオチドを用いて m-RNA の研究が多くの人達により行なわれている。しかし，修飾塩基を含むヌクレオチドとは，酵素的に合成され得る polynucleotide, copolymer, trinucleotide に限られている。

著者は，torsion angle が種々の角度に固定又は，制限された AUG アナローグを化学的に合成した事により，AUG のアデノシン部の torsion angle と Met-tRNA のリボソームへの結合促進効果との関係を明らかにする事が出来た。

測定は，Nirenberg, Leder の系[21]を利用し，表4に示す条件で行なった。結果を表5に示す。

Table 4

Incubation Mixture of Binding Studies

A-U-G analogs	0.1 OD·Unit
^{14}C-Met-tRNA	283 $\mu\mu$moles
Ribosome	12.5 OD·Unit
Tris-HCl pH7.5	0.1 M
$Mg(OAc)_2$	0.01M ~ 0.02M
KCl	0.05M
Total	0.250ml
^{14}C-Methionine	5μc/μmole

マグネシウムイオン濃度 10mM と 20mM で検討し AUG の場合 10mM の時に比較し，20mM の時は △cpm74と △184に比較し著しく減少している。逆に A-UG アナローグでは増加しているものもある。これは Sundararajan[22]の実験結果と良く一致している。AUG の至適塩濃度は 10mM である事より 10mM で AUG アナローグの活性をみると，torsion angle が Syn 型に制限された Br-AUG, Oxy-AUG, 又 Syn-Anti 領域に固定された 8, 2′-O-AUG, 8, 2′-S-AUG はほとんど活性を示していない。torsion angle が Anti 型に固定された 8, 5′-O-AUG, 8, 5′S-AUG は若干の活性が認められる。又 FUG は AUG と同程度の強い活性が認められる。FUG に，AUG と同程度の活性が認められた事は，formycin の torsion angle が比較的自由に変化し得るために binding の条件に最も適したアデノシンに近い forsion angle を取り得るためと推定される。8, 5′-O-AUG, 8, 5′S-AUG に若干の活性が認められた事は，アデノシン部の torsion angle がアデノシンの torsion angle に近い値を有している

Table 5

Binding Assay of ^{14}C-Met-tRNA Using AUG Analogs

Compound	^{14}C-Met-tRNA bound							
	10 mM $Mg(OAc)_2$				20 mM $Mg(OAc)_2$			
	cpm	△cpm	pmole	%	cpm	△cpm	pmole	%
None	49				68			
8, 2′-O-AUG〔13〕	68	19	3.8	10	95	27	5.4	36
8, 5′-O-AUG〔39〕	88	39	7.8	21	112	44	8.8	59
8, 2′-S-AUG〔29〕	49	0	0	0	77	9	1.6	12
8, 5′-S-AUG〔40〕	103	54	10.8	29	112	54	10.6	73
Br-AUG〔52〕	53	4	0.6	2	65	-3	-0.6	-4
Oxy-AUG〔56〕	68	19	3.8	10	101	33	6.6	45
FUG〔65〕	253	204	40.8	111	151	83	17.6	119
AUG〔66〕	233	184	36.8	100	112	74	14.8	100

ためと考えられる。

以上のように AUG のアデノシン部の torsion angle は Met-tRNA による m-RNA の認識に重要な影響を与えている事が判明した。この事実より fMet-tRNA$_F^{Met}$ を用いた AUG アナローグによる initiation step の研究に期待が持たれる。

Table 6

X-U-G	φCH	Activity		conformation	hypo. [%]
		10mM Mg	20mM Mg		
X=A	-20°	+++	+++	Anti-Anti-Anti	9.7
A^s	-120°	−	−	Boundary-	8.0
A^o		−	−	Anti-Anti	9.0
A^s	-40°	+	++	Anti-Anti-Anti	6.1
A^o		+	++		15.3
HO-A	Syn	−	+	Syn-Anti-Anti Anti-Anti-Anti	7.4
Br-A	+120	−	−	Syn-Anti-Anti	7.9
F	-110	+++	+++	Anti-Anti-Anti	9.7

− ; no activity
+ ; slight activity
++ ; moderate activity
+++ ; high activity

表 6 に推定 conformation と Met-tRNA のリボソームへの結合促進効果の相関関係を示す。いずれも conformation を支持している。担し、Oxy-AUG の場合, CD spectrum からは Anti-Anti-Anti と推定されたにもかかわらず Binding 活性が認められていない。しかし Mg^{++}20mM において45%の活性を示している事より，高塩濃度では Anti-Anti-Anti 型になっている事も考えられる。

結　論

AUG のアデノシン部の torsion angle が種々の角度に固定或は制限された修飾塩基を含む7種の AUG アナローグの合成を行なった。この AUG アナローグの UV 及び CD spectrum を測定し，その conformation を推定した。推定 conformation と AUG アナローグによる Met-tRNA のリボソームへの結合促進効果との間に良い相関関係が見られ，推定 conformation を支持する結果が得られた。又，AUG アナローグによる Met-tRNA のリボソームへの結合促進効果を検討し，AUG のアデノシン部の torsion angle は Met-tRNA の m-RNA 認識に重要な影響がある事が判明した。

論文の審査結果の要旨

蛋白生合成の際メチオニンのコードンとして知られるトリヌクレオチド ApUpG の中，第一のアデニル酸を 8, 2′-S 及び O-, 8, 5′-S 及び O-シクロアデノシン，8-ブロモ及び8-オキシアデノシン，更に抗生物質フォルマイシン 3′-燐酸と置き換えた7種のトリヌクレオチドを合成した。その際，β-cyanoethyl 基が脱離基となる cyclic 燐酸の直接合成法，燐酸基の攻撃とシクロヌクレオシド結合の同時切断による 2′, 3′-cyclic 8-oxyadenyl 酸の合成等の新知見を見出した。

これらの AUG アナローグにつき，その UV 及び CD の測定結果から三つの塩基間の stacking の順序は，フォルマイシン pUpG＞ApUpG＞8, 5′-S 及び O-シクロ ApUpG＞8, 2′-S 及び O-シクロA-

pUpG＞8-オキシApUpG＞8-プロモApUpGの順であることを見出した。更にこれらトリヌクレオチドのメチオニルtRNAのリボゾームへの結合促進作用を検し，この順序と署々同一であることを見出し，コード認識にはメッセンジャーRNAの三次構造が重要であることを推論した。以上の研究は学位請求に値いするものと認める。