

Title	0-Nitrobenzyl保護によるリボオリゴヌクレオチドの合成研究
Author(s)	田中, 正治
Citation	大阪大学, 1978, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32032
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

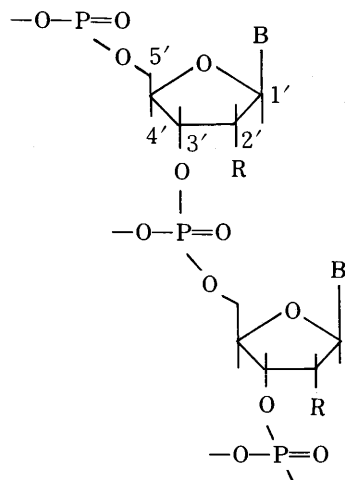
Osaka University

[2]

氏名・(本籍)	田 中 正 治
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 4 2 5 2 号
学位授与の日付	昭 和 53 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	O-Nitrobenzyl 保護によるリボオリゴヌクレオチドの合成研究
論文審査委員	(主査) 教授 池原 森男 (副査) 教授 枅井雅一郎 教授 田村 恭光 教授 佐々木喜男

論 文 内 容 の 要 旨

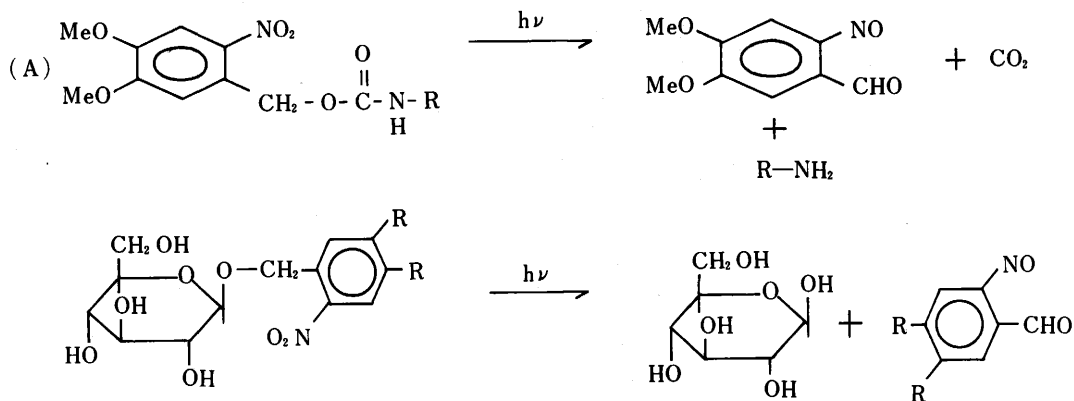
遺伝子の本体である核酸は生体構成成分中最も重要な物質の一つである。その基本構造は Fig [1] に示すように nucleoside が、3'-5' の phosphodiester を介して結合した linear な polymer である。deoxyribonucleic acid (DNA) に於いては R=H, ribonucleic acid (RNA) に於ては、R=OH で表わされる。B は前者に於て adenine (A), guanine (G), cytosine (C), thymine (T), 後者に於ては A, G, C 及び uracil (U) が一般的である。現在までの処、純有機化学的に合成される oligonucleotide は、deoxyribonucleotide で鎖長 10~20 個、¹⁾ ribonucleotide 系に於ては 9 個程度²⁾ のものが合成可能となってきている。deoxy 系の化学合成に比べ ribonucleotide の化学合成を困難にしている最大の原因の一つに 2' 水酸基の保護基の問題がある。すなわち ribo 系で 3'-5' リン酸結合を特異的に形成させる為には、予め 2' 位水酸基を、何らかの保護基で保護しておく必要がある。しかもこの保護基は他の保護基 (base 部アミノ基, 5' 水酸基, リン酸基) との兼ね合いから酸, アルカリには安定で、中性条件下 phosphodiester 結合を migrate させることなく mild な条件で除去できる保護基が最も有利と考えられる。今迄に oligoribonucleotide の出発原料として実用化されている 2' 水酸基を tetrahydropyranyl 又は methoxytetrahy-



R=H, DNA
R=OH, RNA

Fig. [1]

dropranyl³⁾ 基で保護した nucleoside を得るには無保護 nucleoside から 6~7 工程で合成しており overall yield も 5~15% である。従って rilonucleoside の 2' 位水酸基に安定な保護基を簡単に導入できれば oligoribonucleotide の合成は改善される筈である。



そこで著者は、既にペプチドの分野に於て Fig [2-A] に示す様に光照射で除去できるアミノ基の保護基として *o*-nitrobenzyloxycarbonyl 誘導体⁴⁾ が又糖化学に於ても Fig [2-B] に示す反応が報告⁵⁾ されていることから ribonucleoside の 2' 水酸基に *o*-nitrobenzyl 基を導入すれば酸、アルカリには安定で、しかも中性条件下光照射により除去できる新しい type の保護基として oligoribonucleotide の合成に適用できるのではないかと考え、まず、4 種の ribonucleoside U, A, C, G の 2' 位水酸基に選択的に *o*-nitrobenzyl 基を導入する方法について検討した。その結果 4 種の ribonucleosides の 2' 位水酸基に選択的に *o*-nitrobenzyl 基を 1~2 工程で導入する方法を見出した。一方この保護基 (エーテル型結合) は、酸、アルカリには安定で中性条件下、光照射することにより 3'-5' phosphodiester 結合の migration を伴わずにほぼ定量的に除去できることが判った。そこで、この 4 種の保護した nucleosides を用い oligoribonucleotide の合成について検討したので以下順を追って詳述する。

本 論

第一章 ヌクレオサイドの 2' 位選択的 *o*-nitrobenzyl 化反応

i) 2'-*O*-(*o*-nitrobenzyl) uridine⁶⁾ [2] は Fig [3] に示す様に Wagner 等の方法に従い [1] を合成し、これに *o*-nitrobenzyl bromide を作用し、水-エタノールの系で分別再結することにより 2' 体 [2] を 24%, 3' 体 [3] を 3% の単離収率で得た。

[2] の構造は元素分析、UV 及び [2] を Ac₂O, Py 処理で [4] に導き、[2] と [4] の NMR を比較することにより同定した。しかし一般に NMR の検出感度から 10% 以下の isomer の contamination の検出は困難と考えられる。そこで先に得た [2] が oligoribonucleotide の合成に使用しうる purity を持つこと及び *o*-nitrobenzyl 基を光照射して既保護する際に起こり得る副反応の有無を調べる為に Fig [4] に示す route で [2] を用い dinucleoside monophosphate [7] の合成を行なった。

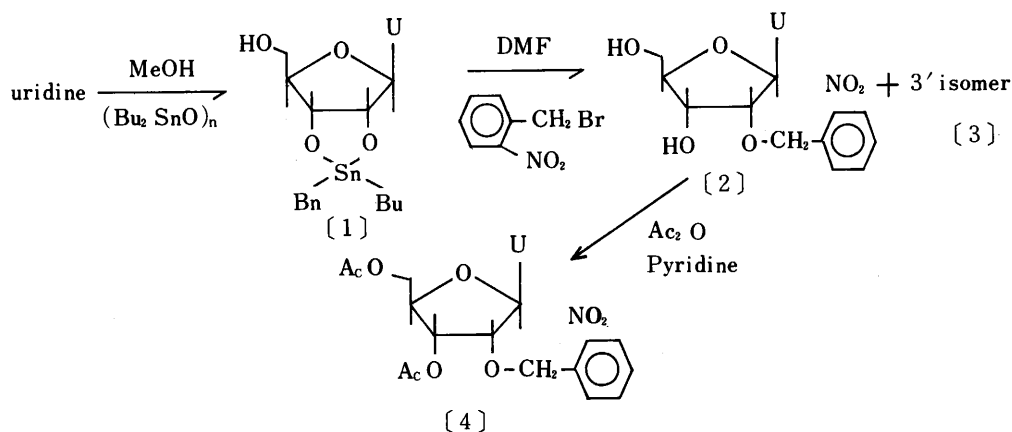


Fig. [3]

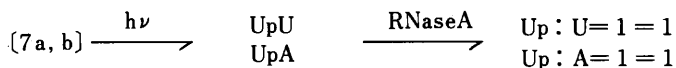
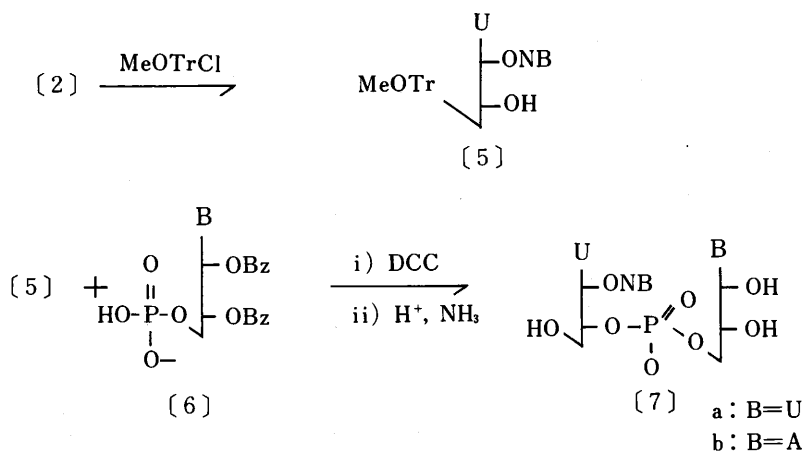


Fig [4]

次にここで得られた [7a, b] を pyrex filter を用い 2 時間光照射した処, UpU 94%, UpA 94% の収率で得られた。又この様にして得た UpU, UpA を RNase A で水解したところ完全水解されることより先に得た [2] が酵素的にも十分な purity を持つこと (この system を用いれば 2% 以上の 3' isomer の contamination は check できる) 及び 2'-0-(o-nitrobenzyl) 基が oligoribonucleotide の保護基として使用できることが判った。

ii) 2'-0-(o-nitrobenzyl) adenosine⁷⁾ [8] は adenosine を DMF 中, 1.3 当量の NaH を用い糖部 2', 3' 水酸基を優先的に解離させた後, o-nitrobenzyl bromide で処理することにより 2' 体, 3' 体, 約 5 : 3 の混合物を得, これを EtOH : H₂O 5 : 3 の系で再結することにより 2' 体 [8] を 37% の収

率で得た。

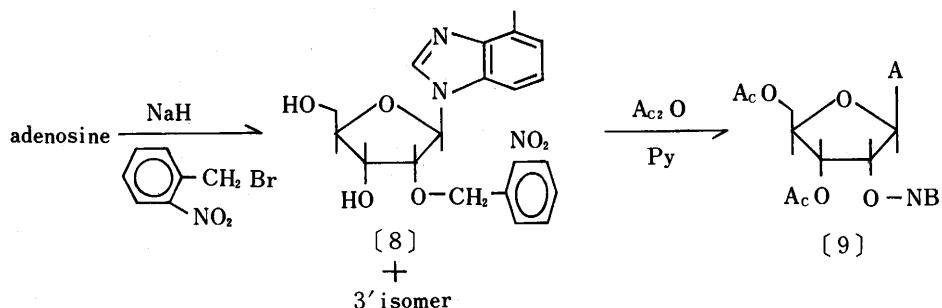


Fig [5]

[8] の構造は UV, 元素分析及び [8] を Ac_2O -Py 処理で糖部のみを acetyl 化した [9] と [8] の NMR を比較することにより同定した。

iii) 2'-O- (o-Nitrobenzyl) cytidine⁷⁾ [12] は

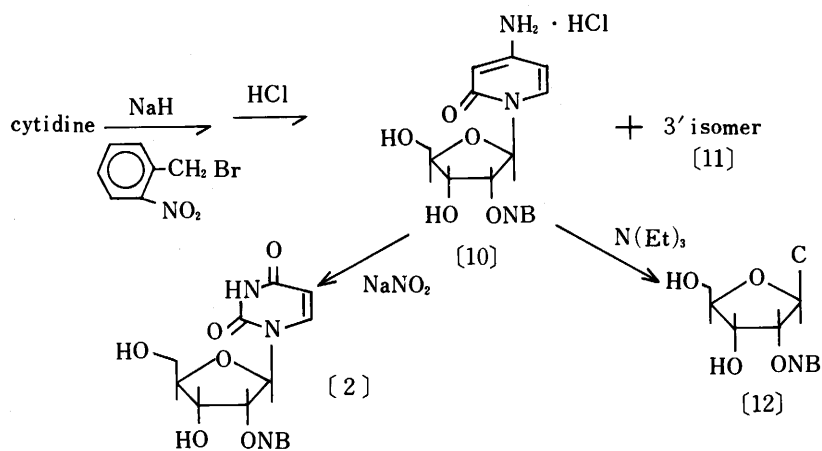


Fig [6]

adenosine と同様に NaH と o-nitrobenzyl bromide で処理し, 2' 体と 3' 体の混合物を得た。しかし free の状態では分別再結することができなかったが, これを HCl 塩にすることにより 2' 体を 26% 3' 体を 6% の収率で得た。[12] の構造は [10] を NaNO_2 で処理し deamination を行ない得られた生成物が先に別途合成した 2'-O- (o-nitrobenzyl) uridine と physical data が完全に一致することから同定した。

iv) 2'-O- (o-Nitrobenzyl) guanosine⁸⁾ [15]

guanosine の alkylation は中性条件で N_7 ⁹⁾ 位へ, アルカリ条件下では N_1 位¹⁰⁾ に起こることが知られている。又 guanosine は, 一般に有機溶媒への溶解性が悪く gel になり易いなど 4 種の nucleoside の中で最も扱いにくい nucleoside である。そこで著者は guanosine の 2 位 amino 基に isobutyryl 基を導入することにより有機溶媒への溶解度を増加させること及びアルカリ条件下で N_1 imino proton の解離を押さえることができるものと考え N_2 -isobutyryl guanosine [13] を合成しこれを用いて選択

的 *o*-nitrobenzyl 化反応について検討した。

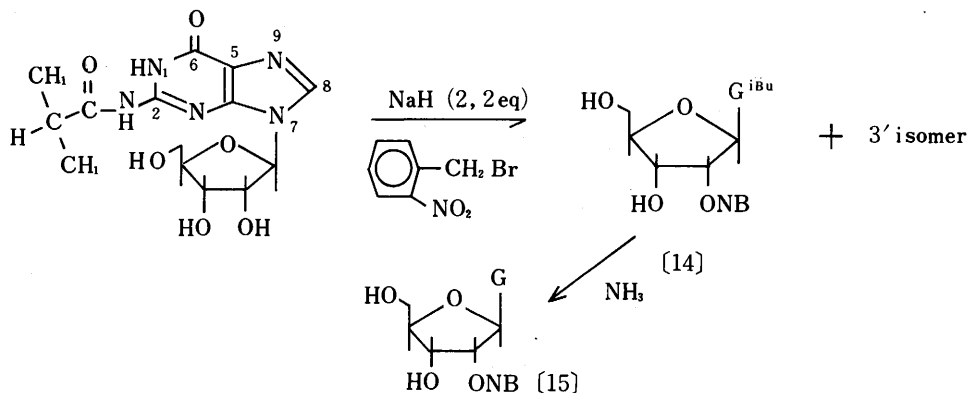


Fig [7]

[13] を DMF 中 0℃ で 2.2 当量の NaH を用いて続いて *o*-nitrobenzyl bromide で処理すると mono-benzyl 体と思われるものが TLC 上 60% 生成していた。生成物を水から再結すると NMR 的に pure な [14] が 28.6% の収率で得られた。又 [14] をメタノール性アンモニアで処理すると [15] が定量的に得られる。[14] の構造は元素分析, UV, NMR 等により確認した。

この反応に於て N₁ 位への *o*-nitrobenzyl 化が抑えられることは [13] を 2.2 当量の NaH で処理することにより解離するプロトンは N₂ プロトンと糖部 2' or 3' 位プロトンであることが判る。このことは Fig [8] に示す様に N₂ にプロトンが引き抜かれて生じたアニオンは isobutyryl 基の carbonyl anion となり N₁ 位プロトンと hydrogen bond を形成することにより安定化する為、第 2 の解離は N₁ プロトンではなく糖部 2'-or 3'-位水酸基が優先的に解離して反応が進行したものと考えられる。以上 4 種の ribonucleoside の 2' 位水酸基に光照射で除去できる *o*-nitrobenzyl 基を 1~2 工程で選択的に導入することに成功した。

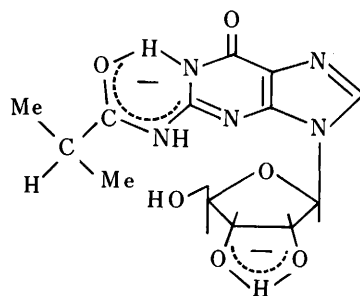


Fig [8]

第二章 部分的に *o*-Nitrobenzyl 基で保護した trinucleotide の合成

Hurwitz らにより発見された T₄ RNA ligase¹¹⁾ を用いることにより最近 ribooligomer 同士の結合の反応が行なえるようになった。

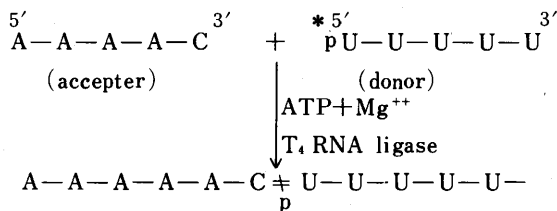


Fig [9]

しかしこの反応を preparative に用いる為には donor 分子の 3' 末端は何らかの方法で保護しておかな

ければならない。又この酵素を精製する際混入する3' exonuclease¹⁵⁾によるoligomerの水解を防ぐ為にも2'水酸基の保護は有用である。と考え先に合成した2'-0-(*o*-nitrobenzyl) adenosineを用いて trinucleotide CpCpA (ONB) [19] と CpAp (ONB) A [24] の合成を Fig [10] に示す routeで行なった。尚この二つの trimer は光照射で脱 *o*-nitrobenzyl 化すると *E. coli* RNA^{Met 16)} の3'末端 sequence に対応する。[19] の合成は diester 法により行なった。この場合 dimer [18] が18%で得られるのに対し trimer [19] は20%と収率はあまり満足すべきものではなかった。一般に diester 法で oligonucleotide を合成する場合、鎖長が長くなるにつれてその縮合率は低下していく、¹⁷⁾これは分子の大きさ、internucleotide phosphate が関与する pyro 体の生成などの副反応及びリン酸基の charge による repulsion などに基づくものと考えられる。そこで [24] の合成は、Fig [10B] に示す2つの route により合成し dimer [22] (triester) → trimer, dimer [23] (diester) → trimer へ

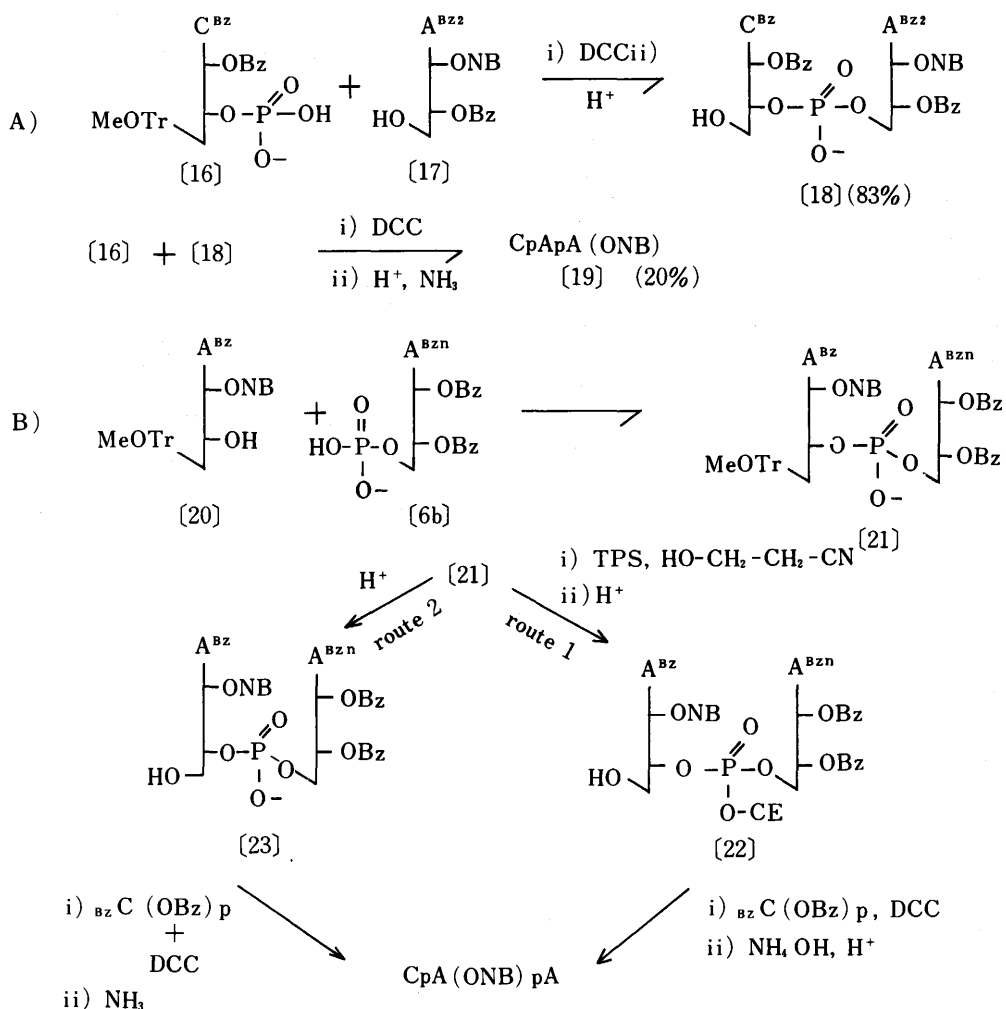


Fig [10]

の縮合収率について検討した。その結果 [21]→[22] が (59%) あるのに対し [23]→[24] は (36%) であった。従って [22] に示す様なリン酸トリエステル体を収率よく合成することができれば route (1) の方法が有利と考えられる。

又、以上のようにして合成した CpCpA (ONB) [19] は T₄ RNA ligase 反応に於て acceptor として働かないことから donor 分子の 3' 末端に 2'-o- (o-nitrobenzyl) 基を導入すれば donor 分子の self-cyclization 及び selfpolymerization を防ぐことが期待出来、又 CpA (ONB) pA [16] も acceptor 分子として十分働くことが判った。¹⁹⁾

第三章 Phosphotriester 法による oligoribonucleotide の合成

長鎖の oligonucleotide を純化学的に合成する場合、生成物の分離、精製及び縮合収率の点から phosphotriester 法による合成が有利と考えられる。しかし phosphotriester 法を ribo 系に適用する場合 2' 水酸基と internucleotide linkage の phosphate の保護基の選択が問題となる。すなわち、最終段階で脱保護する際、2' 水酸基の保護基の保護基を除去する前に internucleotide linkage の phosphate の保護基を除去することが必要である。先に CpAp (ONB) A を合成した際 internucleotide linkage の phosphate を 3-cyanoethyl 基で保護した。しかしリン酸 triester の保護基としての 3-cyanoethyl 基は安定性に問題があった。そこで著者は、2' 位水酸基を o-nitrobenzyl 基、internucleotide linkage の phosphate を cyanoethyl 基より安定な p-chlorophenyl 基²⁰⁾ で保護する方法について検討した。まず monomer unit は Fig [11] に示す A, B 2 つの route で合成した。[27] の精製はシリカゲルカラムを用い [28] は抽出法により精製した。

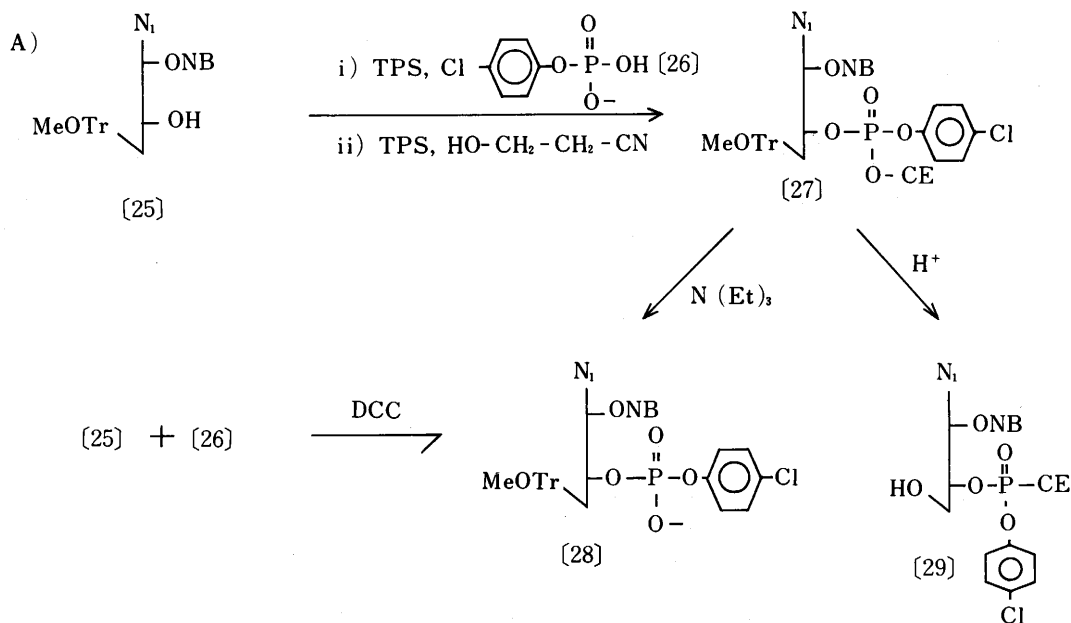


Fig. [11]

次に 3' 末端リン酸基をもつ完全保護した dimer block を Fig [12] に示す様に縮合剤として mesityl-

enesulfonyl triazolide (MST)²¹⁾ を用いて縮合したところ高収率で3'末端リン酸基をもつ完全保護したdimer blockを得ることができた。なお、生成物の分離、精製は、全てシリカゲルカラムを用いて行なった。

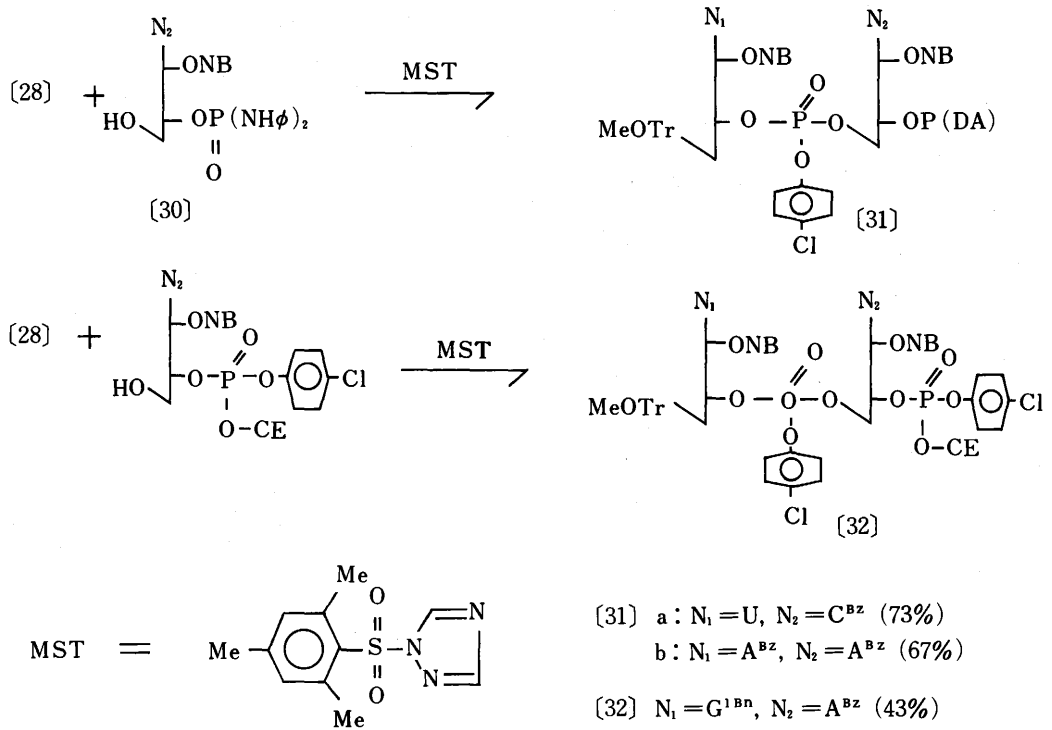


Fig [12]

次に [31a] を80% AcOHで脱MeOTr化することにより [33] としこれと [28a] をMSTで縮合した処, trimer [34] を61%の収率で得た。一方 [32] をN(Et)₃処理で定量的に [35] としこれと [31b] を脱MeOTr化した [36]とをMSTで縮合することにより tetramer [37] を68%の高収率で得た。

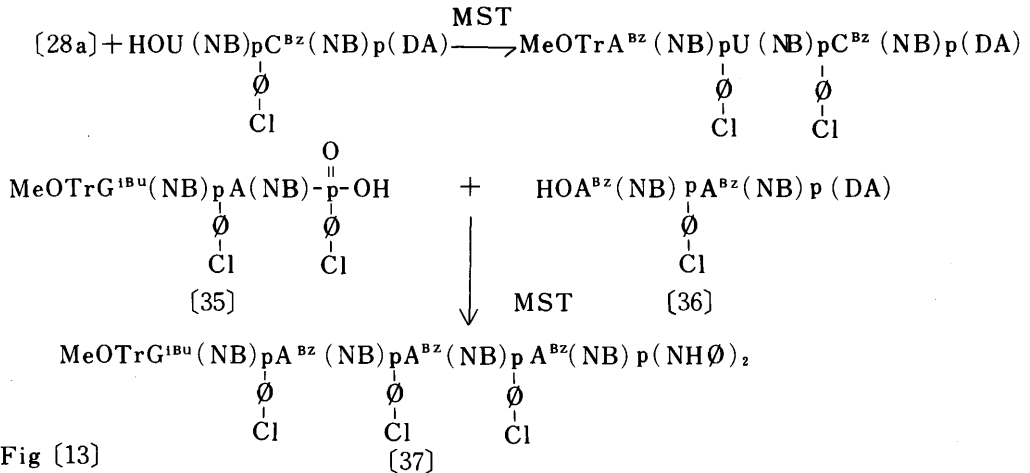
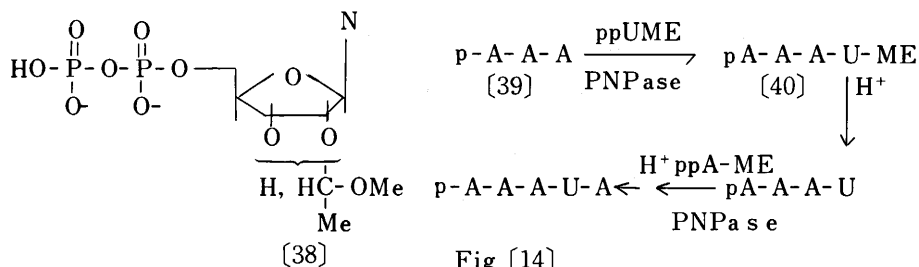


Fig [13]

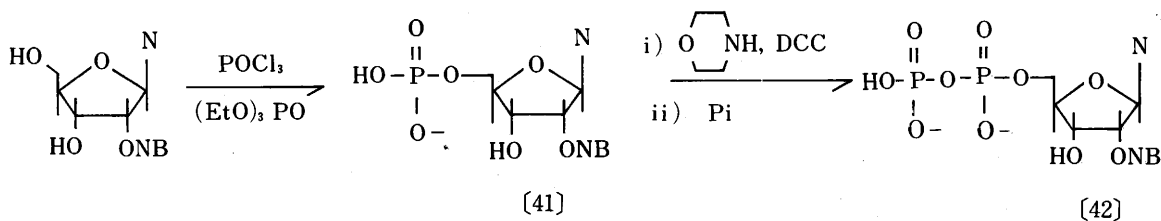
以上今迄合成困難であった3'末端にリン酸基を持つ完全保護した trimer block, tetramer block を収率よく large scale (trimer [34] 946mg, tetramer [37] 637mg) で合成することに成功した。この保護した block は酸処理することにより5'方向へ又 isoamyl nitrite 処理することにより3'方向へ更に鎖長を延すことができ、この保護した trimer block [34] と tetramer block [37] を用い pro-caryote tRNA^{Met} T ϕ C loop に対応する Eucaryote tRNA^{Met} の sequence A-U-C-G-A-A-Ap の合成を行なった。

第四章 Polynucleotide phosphorylase を用いる oligoribonucleotide の合成

任意の塩基配列を持つ oligoribonucleotide の酵素的合成法の一つに polynucleotide phosphorylase (PNPase と以下略称) を用いる方法がある。この酵素は rilonucleoside 5'-diphosphate を基質として random な polynucleotide を生成する酵素であるが Gilham 等²²⁾ により 2'(3')-O-(α -Methoxy ethyl) nucleoside 5'-diphosphate [38] を基質に用いると primer の3'末端に one nucleotide unit が付加した段階で反応が止まることが見いだされた。



これにより [40] の3'末端保護基を除いた後、この反応を繰り返せば原理的には任意の塩基配列を primer の3'方向に延長していくことが可能となった。しかし Bennett²³⁾ 等により、この反応の真の基質が2'位水酸基が保護された nucleoside 5'-diphosphate であることが、明らかにされたにもかかわらず、糖部2',3'水酸基の選択的保護の困難さから今迄この反応に用いられてきた保護基 (α -methoxy ethyl,²²⁾ isovaleryl,²⁴⁾ dihydrocinnamoyl²⁵⁾ 基) は全て2'体と3'体の混合物であった。そこで著者は2'-O-(*o*-nitrobenzyl) 基が水溶液中安定であり光照射により mild な条件で除去できることに着目し、第一章で合成した4種の2'-O-(*o*-nitrobenzyl) nucleosides をその5'-diphosphate 体に導き PNPase を用いる oligoribonucleotide の酵素的合成法について検討した。まず5'-diphosphate 体の合成は Fig [15] に示す様に行なった。



triester法を用い収率よく large scaleで合成することに成功した。又、この保護したblockを用い procaryote tRNA^{Met}のT ϕ C loopに対応する eucaryote tRNA^{Met}のsequence A-U-C-G-A-A-Apの合成を行なった。

- 4) 2'-O- (o-Nitrobenzyl) nucleoside 5'-diphosphateを合成しこれがPNPaseを用いる酵素的 oligoribonucleotide合成に於て優れた基質となることを見出した。

引用文献

- 1) Büchi. H, Khorana. H. G. J. Moi, Biol., **72**, 251 (1972)
- 2) a) Ohtsuka. E, Ubasawa, M, Morioka. S, Ikehara. M, J. Amer. Chem. Soc., **95**, 4725 (1973)
a) Neilson. T, Werstiuk. E. S., J. Amer. Chem. Soc., **96**, 2295 (1974)
- 3) a) C. B. Rees, R. Saffhill, and J. E. Sulston, J. Amer. Chem. Soc., **81**, 3366 (1967)
b) C. B. Rees, R. Saffhill, and J. E. Sulston., Tetrahedron **26**, 1023 (1970)
c) J. H. Van Boom, G. R. Owen, J. Preston, T. Ravindranthan, and C. B. Reese., J. Chem. Soc., 3230 (1971)
- 4) Pachornik. A, Amit. B, and Woodward. R. B., J. Amer. Chem. Soc., **92**, 6333 (1970)
- 5) Zehavi. U, Amit. B, and Pachornik. A, J. Org. Chem., **37**, 2281 (1972)
- 6) E. Ohtsuka, S. Tanaka, and M. Ikehara., Nucleic Acids. Res., **1**, 1351 (1974)
- 7) E. Ohtsuka, S. Tanaka, and M. Ikehara., Chem Pharm. Bull., **25**, 949 (1977)
- 8) E. Ohtsuka, S. Tanaka, and M. Ikehara., Synthesis., 453 (1977)
- 9) H. Brederbeck, and A. Murtini., Chem. Ber., **80**, 401 (1947)
- 10) P. Brookes, A. Dipple, and P. D. Lawley.) J. Chem. Soc., C 2026 (1968)
- 11) Silber. R, Malathi. U. G. and Hurwitz. J., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **69**, 3009 (1972)
- 14) Walker. G. L., Uhlenbeck. O. C, Bedows. E, and Gumport. R. I Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **72**, 122 (1975)
- 15) S. K. Niyogi, and A. K. Datta., J. Biol. Chem., **250**, 7307 (1975)
- 16) S. K. Dube, K. A. Marcker, B. F. C. Clark, and S. Cory., Nature., 218 (1968)
- 17) a) Jacob. T. M, Khorana. H. G., J. Amer. Chem. Soc., **87**, 2971 (1965)
b) E. Ohtsuka, I. Fugiyama, M. Ohashi, and M. Ikehara.) Chem. Pharm. Bull., **24**, 570 (1976)
- 18) E. Ohtsuka, M. Ubasawa, and M. Ikehara., J. Amer. Chem. Soc., **93**, 2296 (1971)
- 19) E. Ohtsuka, S. Nishikawa, R. Fukumoto, S. Tanaka, A. F. Markham, M. Ikehara, and M. Sugiura., Eur. J. Biochem, in press
- 20) K. Itakura, N. Katagiri, C. P. Bahl, R. H. Wightman, and S. A. Narang., J. Amer. Chem. Soc., **97**, 7327 (1975)
- 21) N. Katagiri, K. Itakura, and S. A. Narang., J. Amer. Chem. Soc., **97**, 7332 (1975)

- 22) J. K. Mackey, and P. T. Gilham., *Nature.*, **233**, 551 (1971)
- 23) G. N. Bennett, J. K. Mackey, J. L. Wiebers, and P. T. Gilham., *Biochemistry.*, **12**, 3956 (1973)
- 24) G. C. Walker, and O. C. Uhlenbeck., *Biochemistry.*, **14**, 817 (1975)
- 25) Y. Kikuchi, K. Hirai, and K. Sakaguchi., *J. Biochem.*, **77**, 469 (1975)
- 26) M. Ikehara, S. Tanaka, T. Fukui, and E. Ohtsuka., *Nucleic Acids, Res.*, **3**, 3203 (1976)

論文の審査結果の要旨

田中君は、リボヌクレオシド4種の2'-水酸基に光照射により脱離し得る *o*-ニトロベンジル基の導入に成功しこれを用いて、各種のリボオリゴヌクレオチドの合成に適する様、3'位に燐酸を持ったモノヌクレオチド4種を合成した。

オリゴヌクレオチドとして CpCpA (ONB), CpA (ONB)pA を合成し、これらが、RNAリガーゼ反応に於て有用であることを示した。次にトリエステル法に応用し、3'-*p*-chlorophenyl 燐酸を用いて、各種のトリ-及びテトラヌクレオチドを大量に合成する方法を開発した。これを用いて、procaryote tRNA^{Met} の T ϕ Cループに相当する eucaryote の AUCGAAp を合成した。又、*o*-NB-NDP を用いて polynucleotice phosphorylase の制限付加反応を行った。

これらの業績は博士号請求に値するものと認める。