



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)	田中, 俊樹
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32240
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

氏名・(本籍)	田中俊樹
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第4589号
学位授与の日付	昭和54年3月24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 枝井雅一郎 教授 田村 恭光 教授 北川 勲

論文内容の要旨

緒論

核酸は生体内の遺伝現象をつかさどる最も重要な物質であり、その構造は塩基と糖が結合したヌクレオシドとリン酸が、ヌクレオチドを形成し、糖の3'位と5'位の phosphodiester 結合によって順次結ばれている polymer である。

核酸を化学的に合成する方法は、internucleotidic linkage のリン酸基の保護の有無によって2つの方法に分けられる。既ちinternucleotidic linkage のリン酸基が解離している従来の phosphodiester 法と、リン酸基を何らかの保護基で保護したいわゆる phosphotriester 法である。 Phosphodiester 法では internucleotidic linkage のリン酸基が解離しているため、反応の段階において反応に関与してはならないリン酸基の解離が反応に関与すること、又ヌクレオチド同士がお互い近づきにくい事等により、反応の収率が悪くなることが考えられ、収率を維持する為には大過剰のヌクレオチドを用いなければならない。又生成物の分離も、イオン交換 cellulose column chromatography によって行わなければならず、分離に長時間を要し、大量を分離するには不便である。一方 phosphotriester 法では、反応に関与する部分だけが活性化される状態であり、単離も silica gel column chromatography によって行うことができ、短時間に大量を分離することが可能である。又合成法に関し、別の分け方として3'あるいは5'側に鎖を1つずつ伸ばす stepwise 法と、1度に nucleotide block を縮合する block 法に分けることができる。Stepwise 法では生成物と原料は1 base unit の違いであるので、生成物の単離は鎖長が長くなればなる程困難となる。一方 block 合成法では一度に幾つかの block を合成することができるので全体として合成に要する時間は短縮でき、且つ生成物と原料

の分離も容易となる。そこで oligonucleotide の合成には phosphotriester 法を用い、block 合成を行うのが最良の方法であると考え、リン酸基の保護基について検討し、E. coli tRNA^{Met}^t (Fig. 1) の 5' 末端より 1~5 番目の pentanucleotide (I), 6~10 番目の pentanucleotide (II), 11~20 番目の decanucleotide (III), 3' 末端の hexanucleotide (IV) 及びその幾つかの analog の合成を行った。

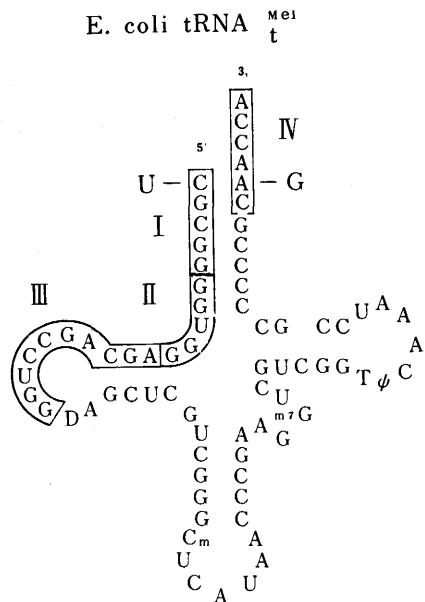


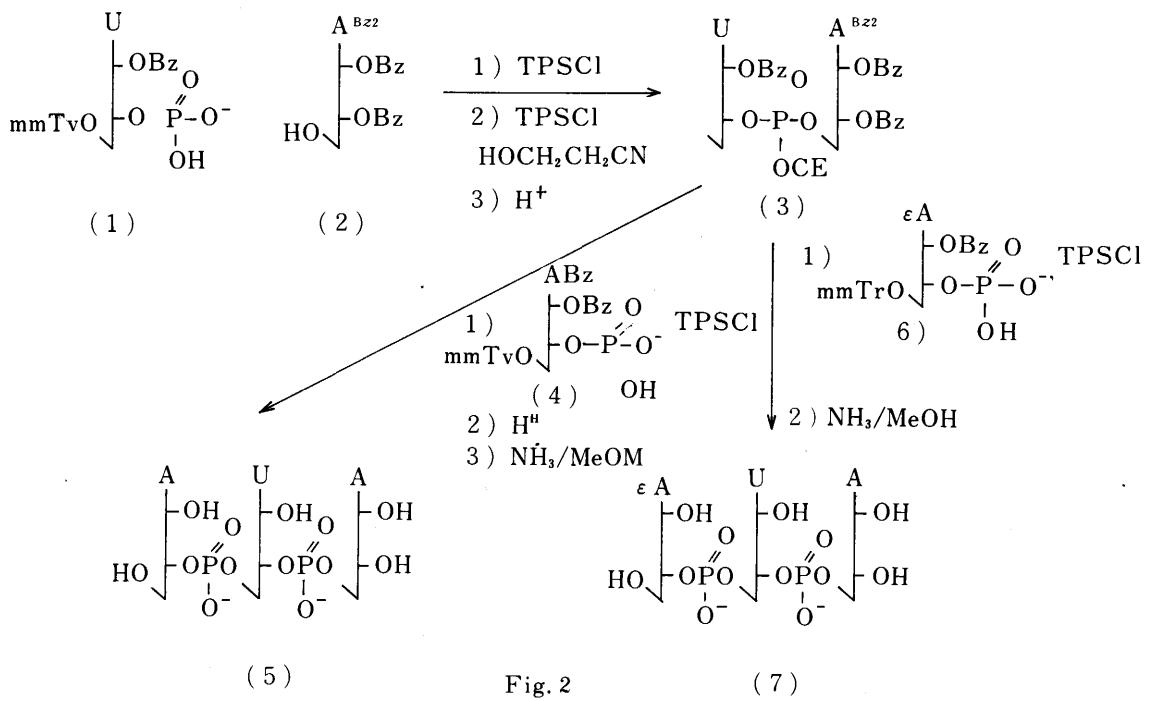
Fig. 1

第一章 Triester 中間体を用いる trinucleoside diphosphate の合成

Internucleotidic linkage のリン酸基の保護基は種々検討されているが、これは他の保護基 (5'-水酸基、2'-水酸基、塩基部のアミノ基) との兼合いから選ばなければならない。Triester type の β -cyanoethyl 基は pH 9 のアンモニア水²⁾ でも容易に除去されることにより、internucleotidic linkage のリン酸基の保護基として β -cyanoethyl 基を用い Fig. 2 に示す様に 2 種の trimer の合成を行った。1.5 当量の(1)と(2)を縮合剤として 2, 4, 6-triisopropylbenzenesulfonyl chloride (TPSCl) を用い縮合し、次いで TPSCl と β -cyanoethanol で internucleotidic linkage のリン酸基を保護し、酸処理後、silica gel column で単離し、(3)を 46% の収率で得た。次に 2.7 当量の(4)あるいは 1.2 当量の(6)を(3)と TPSCl で縮合し、脱保護後、DEAE cellulose column で分離し、(5)および(7)をそれぞれ 27.24 % の収率で得た。尚、この際 internucleotidic linkage が切断された A_p-U_p あるいは εA_pU_p は検出されなかった。

第二章 3' 末端にリン酸基を持つ oligoribonucleotide の合成

Triester 法による block 合成を行うには 3'-リン酸基のみ block を合成しなければならない。他の保護基との兼合いより 3', 5' のどちら側にも鎖を伸ばせる unit として 3'-リン酸基を中性条件 isoumyl nitrite³⁾ で除去できる anilido 基で保護することを検討した。Fig. 3 に示す様に、5'-水



酸基を monomethoxytrityl, amino 基を acyl 基, 2'-水酸基を光照射によって除去できるo-nitrobenzyl 基で保護した (8 a-c)⁴⁾ を 1.1当量の dianilido-phosphorochloridate⁵⁾ と反応し, 80%酢酸処理後 (10 a-c) をそれぞれ93, 98, 92%の収率で得た。 (8 d)⁶⁾ の場合は, リン酸化は 3'-水酸基のみならず, base 部にも起こることがUV, NMR より示唆された。しかし base 部に入った dianilidophosphoryl 基は酸に不安定で80%酢酸処理によって除くことができる。 (8 d) と 2.4 当量の dianilidophosphorochloridateを用い反応し, 80%酢酸処理後, silica gel column により分離し, (10d) を67%の収率で得た。

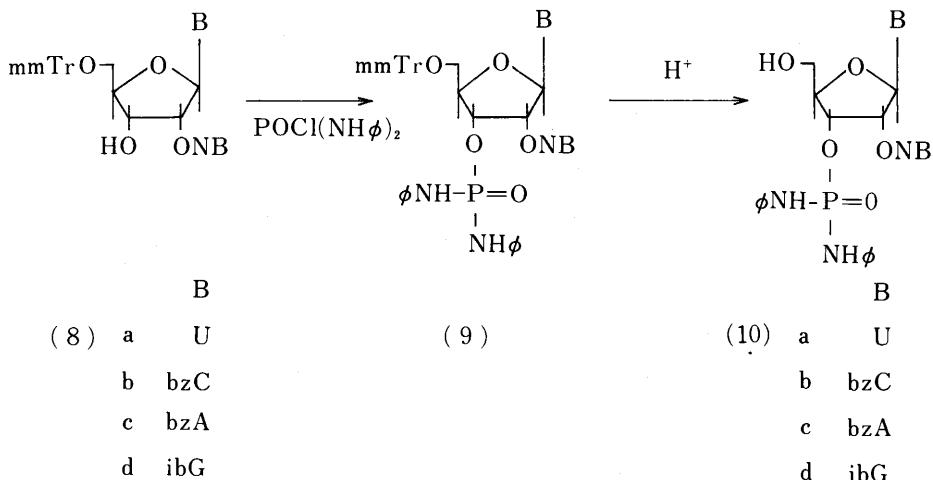


Fig. 3

3'末端のリン酸基を dianilido 基で保護した dimer, trimer の合成は Fig. 4 に示す様に行った。即ち (11a, b) を 1.3~1.5当量の (a, b, d) と DCC で縮合し、次に TPSCl と β -cyanoethanol を用い (12 a-c) を合成した。(12a) は silica gel column により単離し、収率58%で得た。この物質は鎖を 5'あるいは 3'側のどちらにも伸ばすことのできる dimer であり、isoamyl nitrite 处理によって定量的に(13)を得た。又 (14a, b) は (12b, c) を silica gel column で分離後、80%酢酸処理し、それぞれ42, 46%の収率で得た。次に(13)と (14b) を TPSCl を縮合剤として用い室温で反応すると完全に (14b) は消失した。次いで TPSCl と β -cyanoethanol を加え internucleotidic linkage のリン酸基の保護を行った。しかし TLC 上で (16a) の spot はほとんど得られず、脱保護して調べると main product は 3'末端の guanine base が modify された tetramer であった。(13) と (14b) の縮合の条件を種々検討した所、TPSCl を用いて 4℃の低温で行うと、末端 guanosine の base 部が modify されたものはほとんど検出されなかった。しかし β -cyanoethyl 化を完全に行なうことはできず80%酢酸処理後、(15b, 16b) の混じりとして収率47%で tetramer を得た。

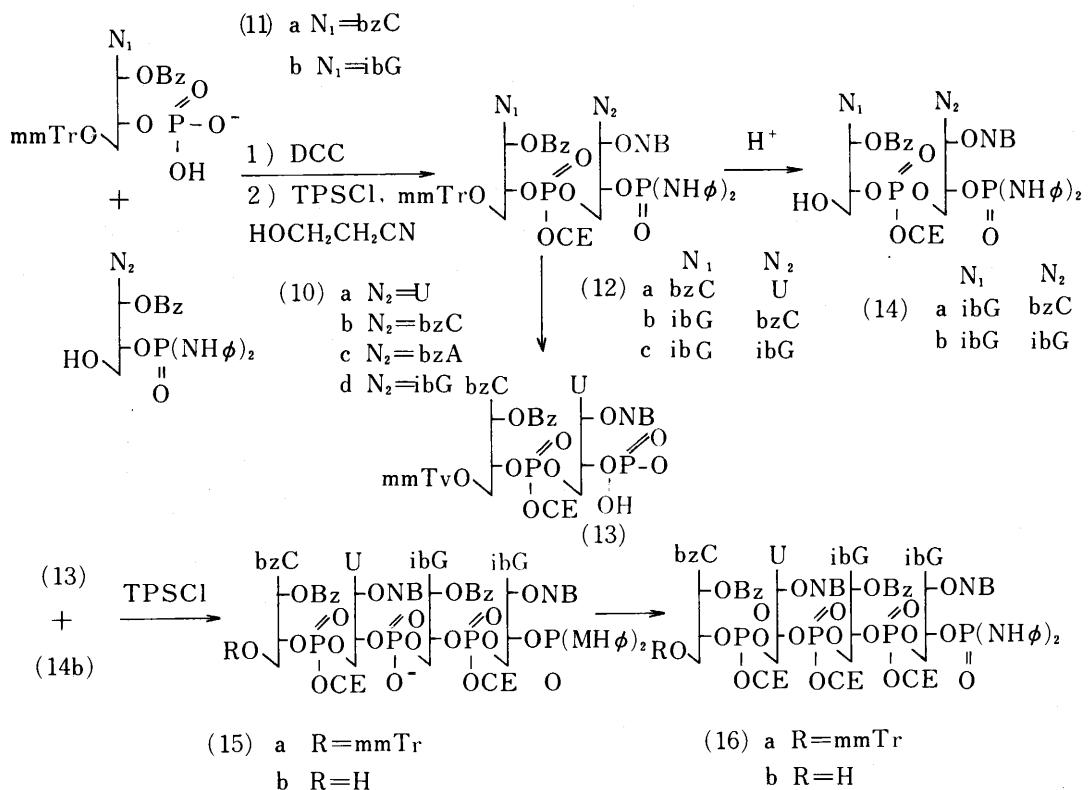


Fig. 4

第二章 Phosphotriester 法による decanucleotide の合成

Internucleotidic linkage のリン酸基の保護基として β -cyanoethyl 基はその安定性に問題がある

ため、2'位にアルカリにより安定な保護基として p-chlorophenyl 基⁷を用いることを検討し、 oligonucleotide 合成における key intermediate として二種の nucleotide (20), (21) を合成した。即ち p-chlorophenyl-phosphoroichloridate⁸ (17) と aniline より合成した p-chlorophenyl N-phenylphosphoro amido chloridate⁹ (18) を用い (8 a-d) と反応し、80%酢酸処理後 (20a-d) を silica gel column で分離し、65~85%の収率を得た。又 5'側に1つ鎖を伸ばす internal unit として (21a-d) は (19) を isoamyl nitrite 处理することによって得られるが (8 a-d) を p-chlorophenylphosphate⁸ と DCC を用い 3'-水酸基をリン酸化し 88%~96%の収率を得た。これらを用い deca nucleotide の合成を行った。

(21d) と (10d), (21b) と (20a) あるいは (21d) と (20b) を、縮合剤として mesitylenesulfonyl triazolide (MST)⁷ を用い反応し、silica gel column で分離後、(22), (23), (24) のdimer をそれぞれ 85, 84, 75%の高収率で得た。又 (24) を (21c) と縮合し trimer (25) を 63%で得た。 (23) の isoamyl nitrite 处理によって定量的に得られる (26) と (22) を用い block 緩合を行った所、62%の高率で tetramer (27) を得た。次に (25) の isoamyl nitrite 处理によって定量的に得られる (28) と (27) を MST で縮合し heptamer (29) を 38%の収率で得た。(29) を 3 当量の (28) と縮合し完全に保護した decamer (30) を合成し、脱保護後 7 M urea を含む DEAE cellulose column (Cl⁻型) により分離し、(31) を得た。尚この decamer は E. coli tRNA^{Met}_f の 5'末端より 11~20番目に対応する sequence である。

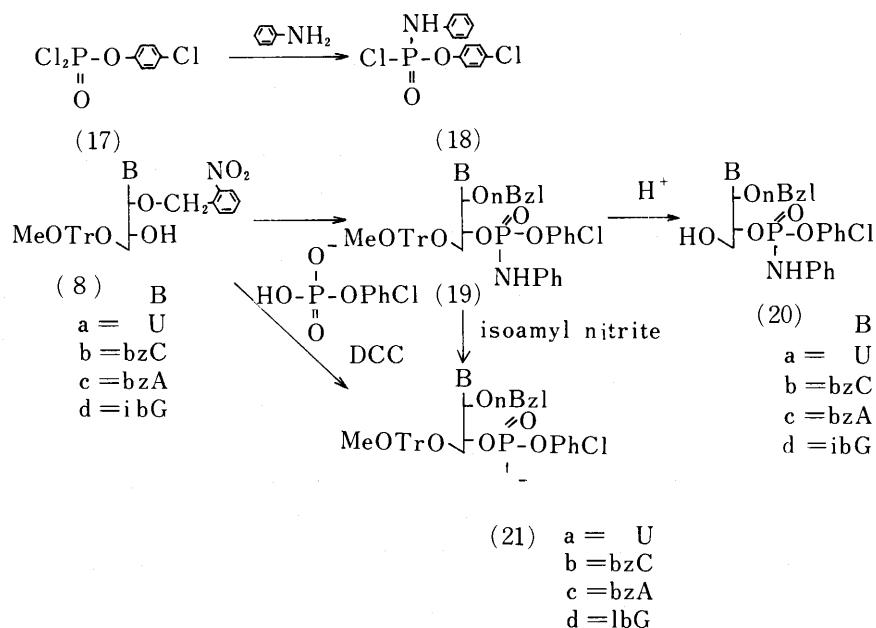


Fig. 5

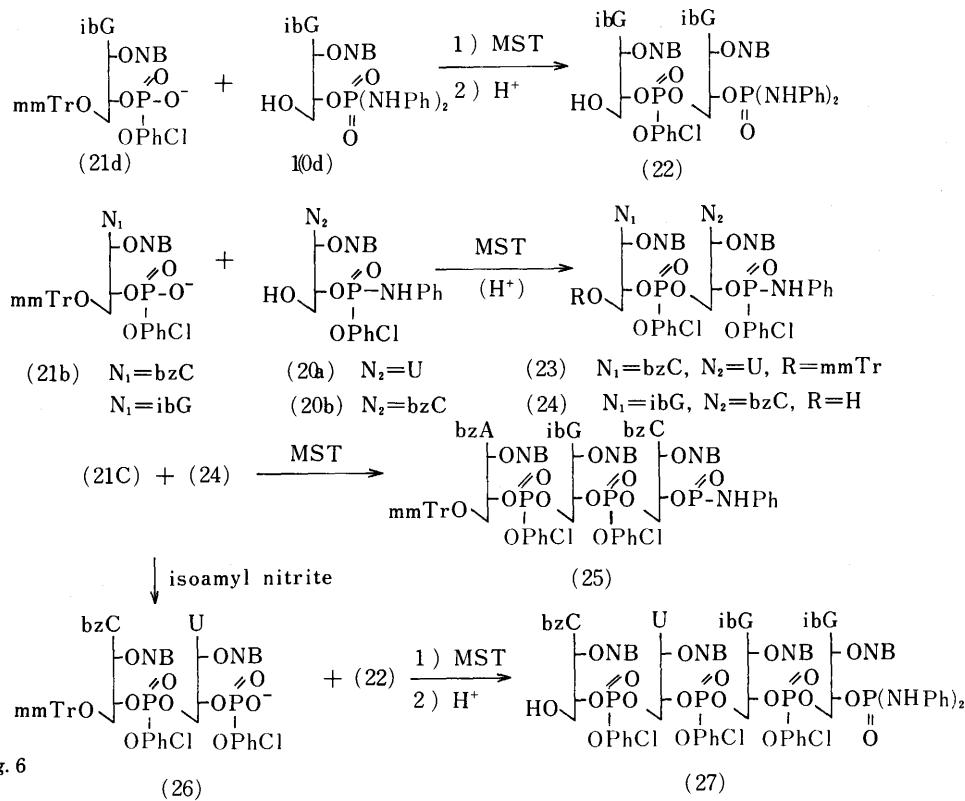


Fig. 6

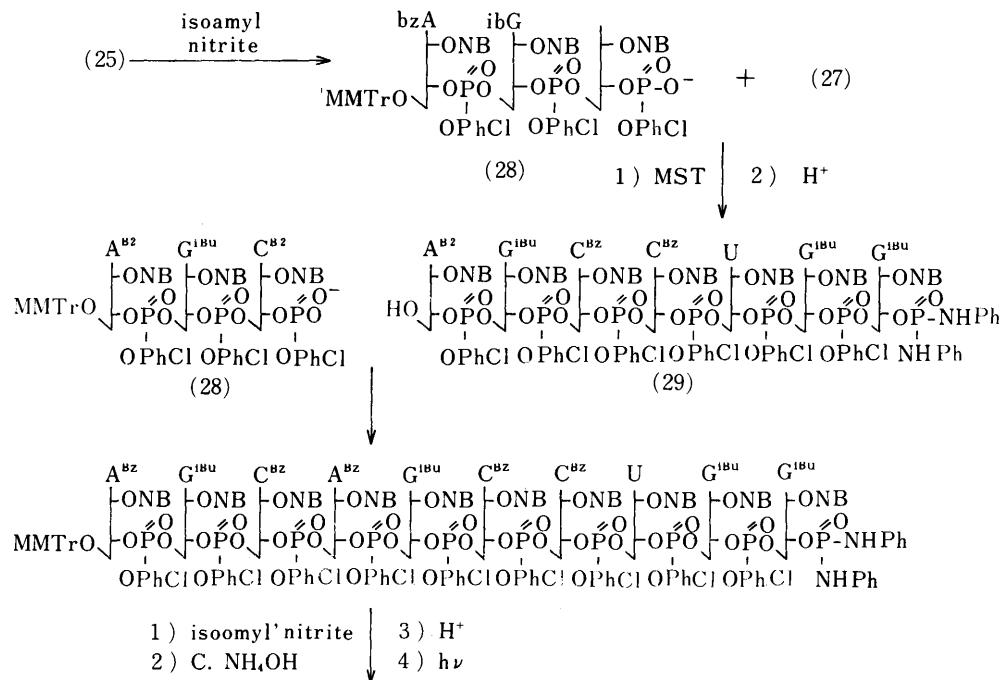


Fig. 7

ApGpCpApGpCpCpUpGpGp

第四章 E. coli tRNA_f^{Met} の 3', 5'末端 fragment の合成

E. coli tRNA_f^{Met} の 3'末端の hexamer (CAACCA) と 5'末端より 1~5 番目の pentamer (CG CGG), 6~10 番目の pentamer (GGs⁴UGG) の合成を第三章と同様の方法により行った。又 Huritz らによって発見された T₄ RNA ligase¹⁰ は、最近 RNA 合成に利用されている¹¹ (8). Donor 分子と

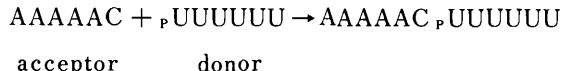


Fig. 8

しては、5'末端にリン酸基を持つことが必要であり、self-polymerization, self-cyclization¹²などの副反応を防ぐためには、3'側を何らかの方法で保護する必要がある。そこで 3', 5'のどちらにもリン酸基を持った oligonucleotide の合成について検討した。

i) E. coli tRNA_f^{Met} の 3'末端の hexanucleotide の合成

3'末端の hexanucleotide (CAACCA_p) の合成は Fig. 9 に示す様に行なった。Trimer(34) を

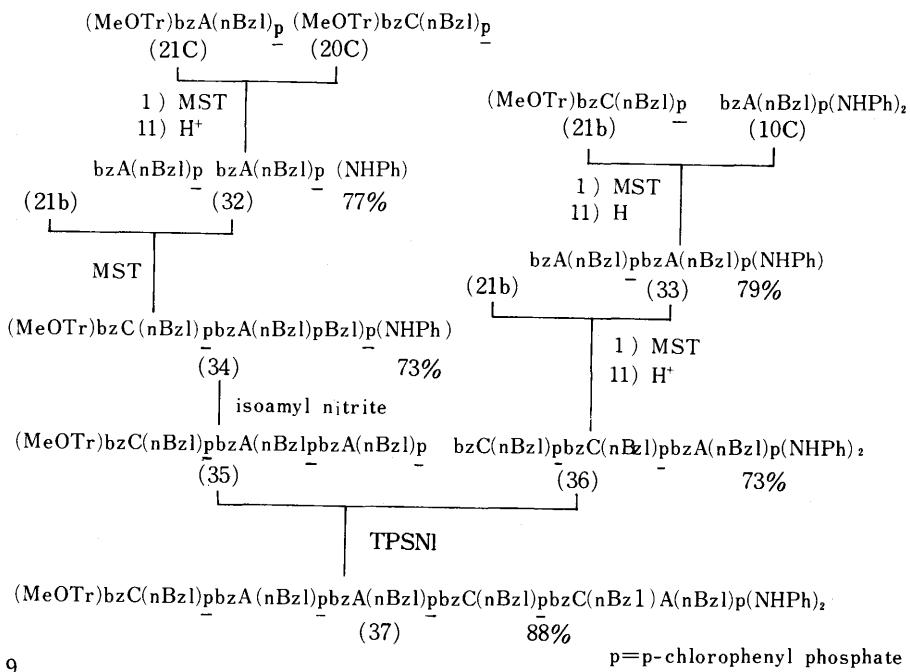


Fig. 9

isoamyl nitrite 处理によって定量的に得られる (35) と (36) を 2, 4, 6-trisopropylbenzenesulfonyl 4-nitroimidazolide (TPSNI)¹³ で縮合し hexamer (37) を得た。又 5'側の cytosine base と base pair を形成する様に modify した hexamer (CGACCA) の合成も同様に行なった。次に

(37) を 80% 酢酸処理し (38) とし、これを dianilidophosphorochloridate で 5'-水酸基をリン酸化し、silica gel column で (39) を分離し、脱保護後 pCAACCA_P (40) を 7 M urea を含む DEAE cellulose column で分離した。

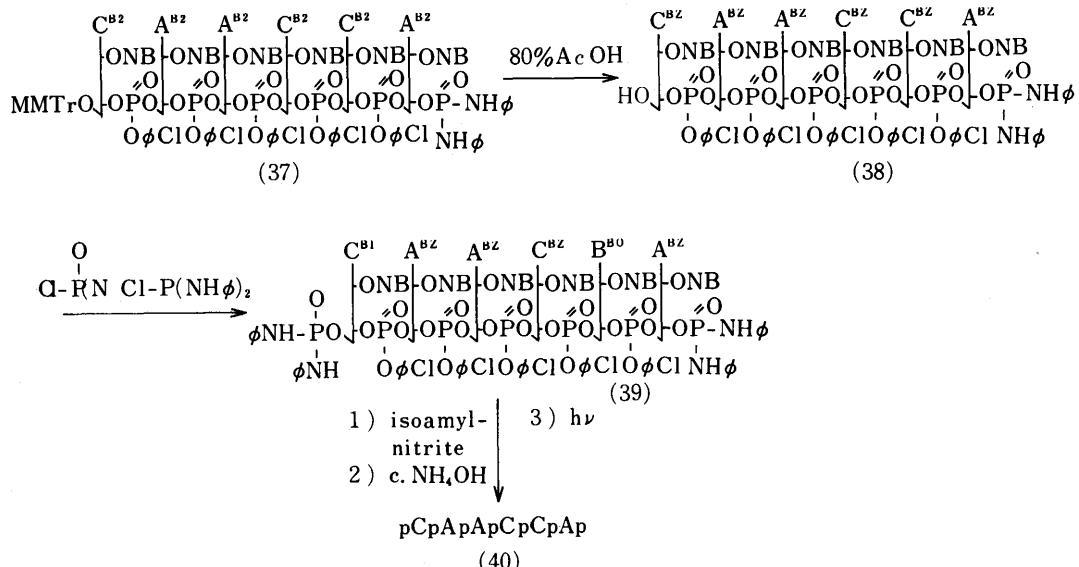


Fig. 10

ii) *E. coli* tRNA_f^{Met} の 5'末端の pentanucleotide の合成

E. coli tRNA_f^{Met} 5'末端の pentanucleotide (CGCGG) と 3'末端の adenine base と base pair を形成出来る様に modify した pentanucleotide (VGC GG) を Fig. 11 に示す様に合成し、脱保護、(44), (46) を DEAE cellulose column により分離した。

E. coli tRNA_f^{Met} の 5'末端より 6 ~ 10番目の pentanucleotide (GGs⁴UGG) の合成は、4-thiouridine がアンモニア処理、酸処理に不安定¹⁴⁾ であるため、GGCGGより液体硫化水素¹⁵⁾ を用いて cytidine を 4-thiouridine に変える方法により行った。又 dianilidophosphorochloridate によるリン酸化は、guanine base にもリン酸化が起こり、反応の control が難かしくなる。そこで Fig. 12 に示した route で (50) を合成した。

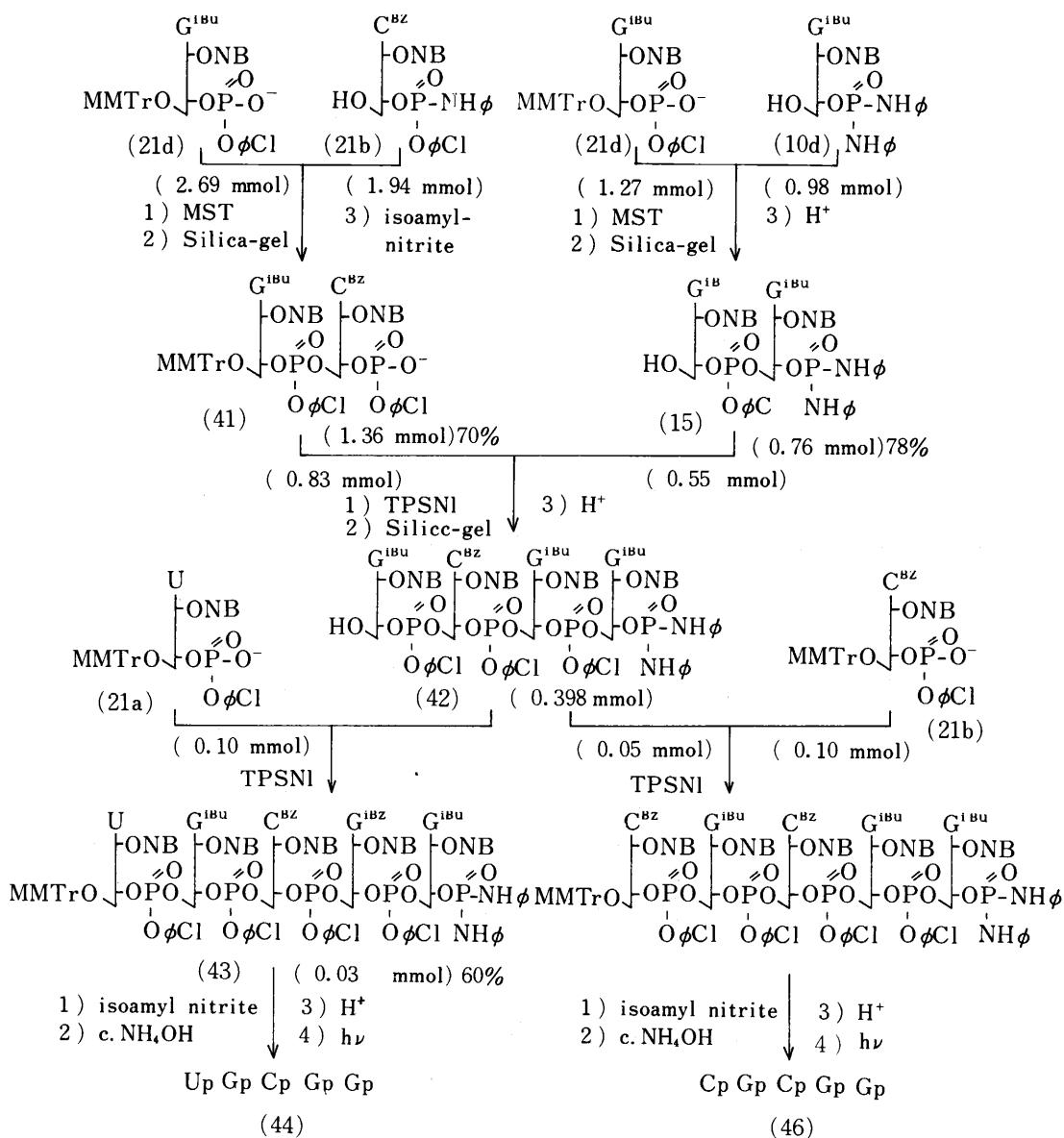


Fig. 11

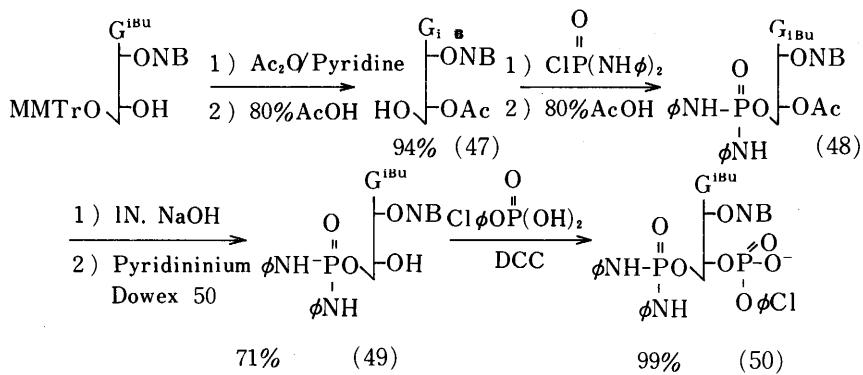


Fig. 12

(50) と (42) を TPSNI を用いて縮合し, (51) を silica gel column で分離した後, 脱保護し, (52) を DEAE cellulose column で分離した。 (52) を stainless cylinder 中, 液体硫化水素と 30°C, 140時間反応し (53) を得た。

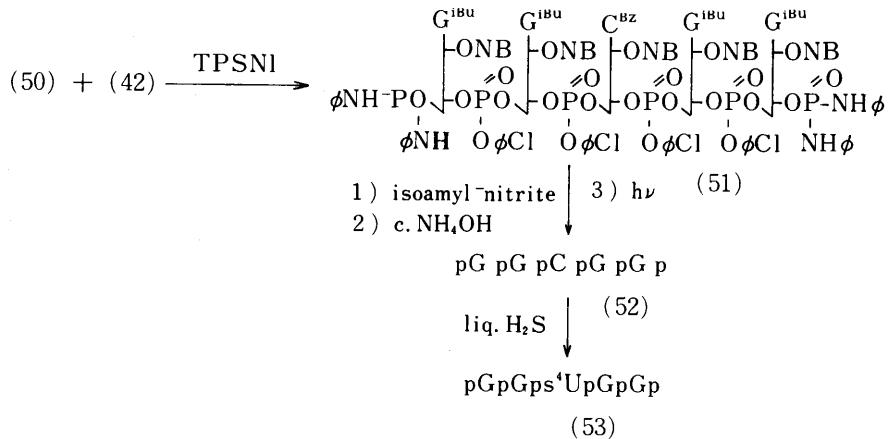


Fig. 13

結論

- 1) β -cyanoethyl 保護による phosphotriester 法によって di-, trinucleotide を合成し, その有用性を見出した。
- 3) 3'位のリン酸基を dianilido 基で保護した 4種の nucleotide を合成した。これは fragment の

3'末端に用いられ、3'にリン酸基を持った fragment の合成に重要である。

- 3) p-chlorophenyl 基と anilido 基でリン酸基を完全に保護した nucleotide と、p-chlorophenyl 基でリン酸基の解離を1つ保護した nucleotide を合成した。これらは oligonucleotide の合成に重要な中間体である。
- 4) 上述の2), 3) を用い、*E. coli* tRNA^{Met} の fragment の合成を行い、現在の所、天然の sequence で最長の decanucleotide (AGCAGCCUGG_P) を合成した。又 5'末端より1~5番目の2種の pentanucleotide (CGCGG_P, UGC GG_P) を合成した。更に 3'末端の2種の hexanucleotide (CGACCA_P, CAACCA_P) を合成した。
- 5) RNA ligase 反応において donor として重要な5'末端にリン酸基を持った hexanucleotide (_PCAACCA_P) と pentanucleotide (_PGGCGG_P) を合成した。
- 6) *E. coli* tRRNA^{Met} の'末端より6~10番目の sequence である。minor base を含んだ pentanucleotide (_PGGs⁴UGG_P) を合成した。

引用文献

- 1) S. K. Dube, K. A. Marcker, B. F. C. Clark and S. Cory, *Nature*, **218**, 232 (1968).
- 2) E. Ohtsuka, M. W. Moon and H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 360 (1965).
- 3) E. Ohtsuka, K. Murao, M. Ubasawa and M. Ikehara, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 1537 (1969).
- 4) a) E. Ohtsuka, S. Tanaka and M. Ikehara, *Nucleic Acids Res.*, **1**, 1351 (1974).
b) E. Ohtsuka, S. Tanaka and M. Ikehara, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 949 (1977).
- 5) Houben-Weyl 1 : Methoden der Organischen Chemie Bd. 12/2 p445 .
- 6) E. Ohtsuka, S. Tanaka and M. Ikehara, *Synthesis*, 453 (1977).
- 7) N. Katagiri, K. Itakura and S. A. Narang, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 7332 (1975).
- 8) G. R. Owen, C. B. Reese, C. J. Ransom, J. H. van Boom and J. D. H. Herscheid, *Synthesis*, 704 (1974).
- 9) E. Ohtsuka, T. Tanaka, T. Wakabayashi, Y. Taniyama and M. Ikehara, *J. C. S. Chem. Comm.*, 824 (1978).
- 10) R. Silber, V. G. Malathi and J. Hurwitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 3009 (1972).
- 11) G. C. Walker, O. C. Uhlenbeck, E. Bedows and R. I. Gumpert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 122 (1975).
- 12) G. Kaufmann, T. Klein and U. Z. Littauer, *FEBS Lett.*, **46**, 271 (1974).
- 13) J. H. van Boom, P. M. J. Burgers, G. van der Marel, C. H. M. Verdegaal and Mrs G. Wille, *Nucleic Acids Res.*, **4**, 1047 (1977).
- 14) M. N. Lipsett, *J. Biol. Chem.*, **240**, 3975 (1965).
- 15) a) T. Ueda, M. Imazawa and K. Miura, *Tetrahedron Letters*, 2507 (1971).
b) K. Miura, M. Shiga and T. Ueda, *J. Biochem.*, **73**, 1279 (1973).

論文の審査結果の要旨

従来行われて来た磷酸チエステル法の欠点を補い、更に長鎖のオリゴマーを合成する為。先づ、中間位磷酸の解離を β -cyanoethyl 基で保護する方法を検討し、更に p-chlorophenyl 及び anilidate を有する磷酸試薬を開発した。これを用いて、オリゴマーを 3'-及び 5'-の両方向に延長する方法として、モノマー、ダイマーを多数合成し、それらの組合せによって、ホルミルメチオニン転移 RNA の 5'-末端のペントマー 2 種、更に 11~20 番目のスクレオチドに対応するデカマーの合成に成功した。このものは現在迄合成された最長のリボオリゴスクレオチドである。更に同様の方法で、同 tRNA の 3' 末端のヘキサマー及び、そのアナローグの合成にも成功した。又、オリゴスクレオチド中の C 残基を直接 s^4U に変換する反応も行った。以上の成果は、学位請求に倣するものと考える。