OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ホルミルメチオニン転移リボ核酸フラグメントの合成研究
Author(s)	三宅, 哲雄
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32242
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

【10】

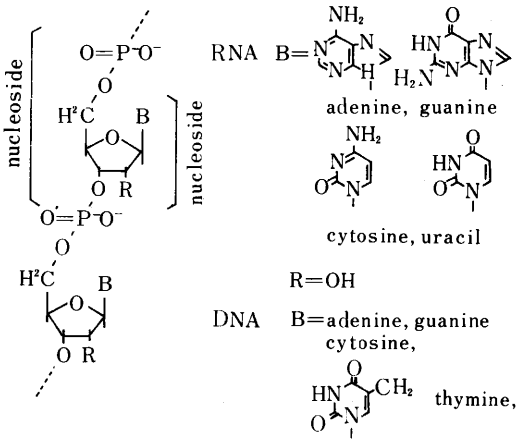
氏名・(本籍)	三宅哲雄
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 4590 号
学位授与の日付	昭和54年3月24日
学位授与の要件	薬学研究科 薬品化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**ホルミルメチオニン転移リボ核酸フラグメントの合成研究**
論文審査委員	(主査) 教授 池原 森男 (副査) 教授 上原喜八郎 教授 田村 恭光 教授 北川 勲

論文内容の要旨

緒論

核酸はFig[1]に示すように主として4種の塩基を含むpucleotide unitが3′→5′リン酸ジエステル結合を介して連らなった高分子化合物でありこれを合成することは興味ある問題である。

Fig[1]



核酸合成における基本的概念は1960年代Khorona等により確立され[1]，70年代になって特にDNAの分野において人工遺伝子の合成とin vivo.でのその機能の発現といった大きな進歩を見せている[2]。RNAの分野においてはtRNAが核酸中最小のものでありX線解析による3次構造までが明らかにさ

れている[3]にもかかわらずそれが種々の酵素等により特異的に認識される機構については今だに推論の域を脱していない[4]。

また，RNAには2′位に水酸基が存在するためその化学合成はDNAに比べ，はるかに困難であるが近年RNA fragmentの結合を触媒する酵素，RNA ligaseが発見されたことにより[5]従来不可能であった長鎖のribooligonucleotideの合成が可能となってきた[6]。そこでtRNA fragment及びその塩基配列を一部変えたfragmentを多数合成しこれをRNA ligaseにより結合してtRNA及びそのanalogの全合成を行えばその構造と機能の関係について多くの知見が得られると期待される。

そこで，演者はこの目的のために amidato 法，stepwise 法，及びRNA ligaseの反応中間体を用いる方法を検討しE. coli tRNA $^{Met}_{f}$ のfragmentの合成を行った。

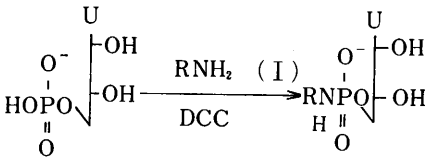
本　論

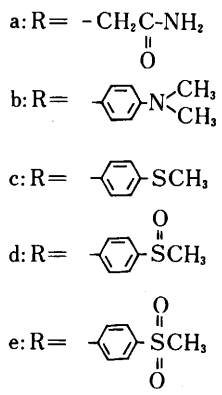
第1章　Amidate 法による oligonucleotide の合成

Oligonucleotide blockは一部塩基配列の異なるoligomerを合成する際の共通の出発原料ともなるため，これを合成しておくことは，合成手段の面から有利なことと考えられる。aniline あるいはanisidine によるphosphoramidate体は中性条件下isoamylnitriteにより選択的に脱保護できる[7]ためoligonucleotide blockを合成する際，有用な保護基となりこれにより大塚らは3′末端にリン酸基を有するtrimerを合成しこれを5′側の blockとすることによってnonamerの合成を[8]を行っている。

しかしながらdiester 法でblockを合成する際にphosphoramidete体にはその安定性になを問題があり，特に酸性条件下でより安定なamidate体が見出せればこのものは3′block ともなりうる。そこでFig. 2に示す種々のamidete体を合成し，その安定性を検討しTable[1]に示すように結果

Fig[2]





を得た。ここでab. pyridine中及び80%酢酸中で安定性が増加した　p-methylsulfinyl-aniline [1-d]を用いてFig[3]に示すrouteでtRNAのTΨC loopに存在するtrimer TΨCのanalog UUCを，またFig[4]に示すrouteでE. coli　tRNA$^{Met}_{f}$の5′末端tebramerとそのanalog合成を行った。

Table[1] anhydrous pyridine 50% pyridine 80% acetic acid

Amidate	1	2	4 (days)	1	2	4 (days)	1	2	4 (days)
IIa	43	35	15 %	71	66	66 %	23	17	5 %
IIb	28	14	8	83	72	61	76	70	58
IIc	63	50	33	96	93	87	67	52	42
IId	85	81	79	—	—	—	88	79	77

Fig[3]

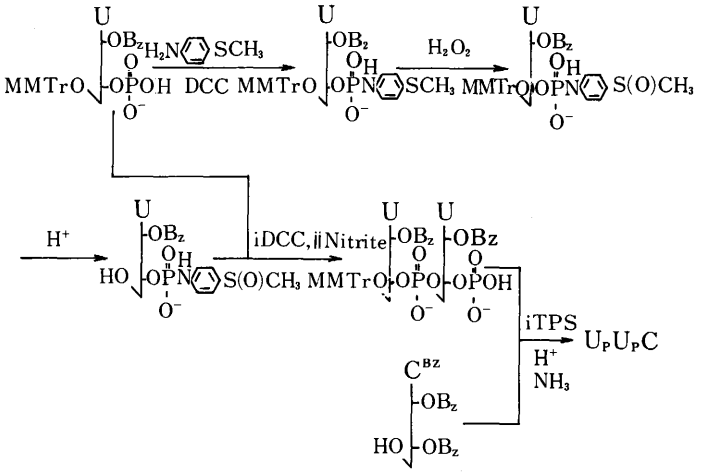
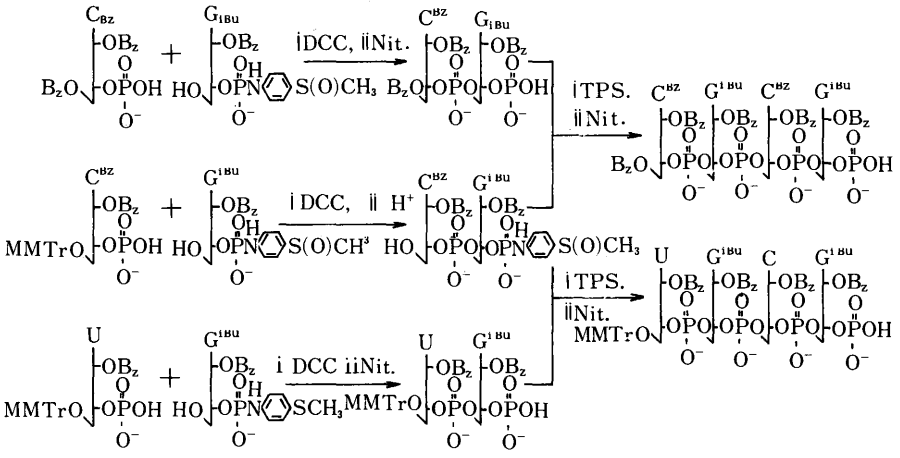


Fig. [4]



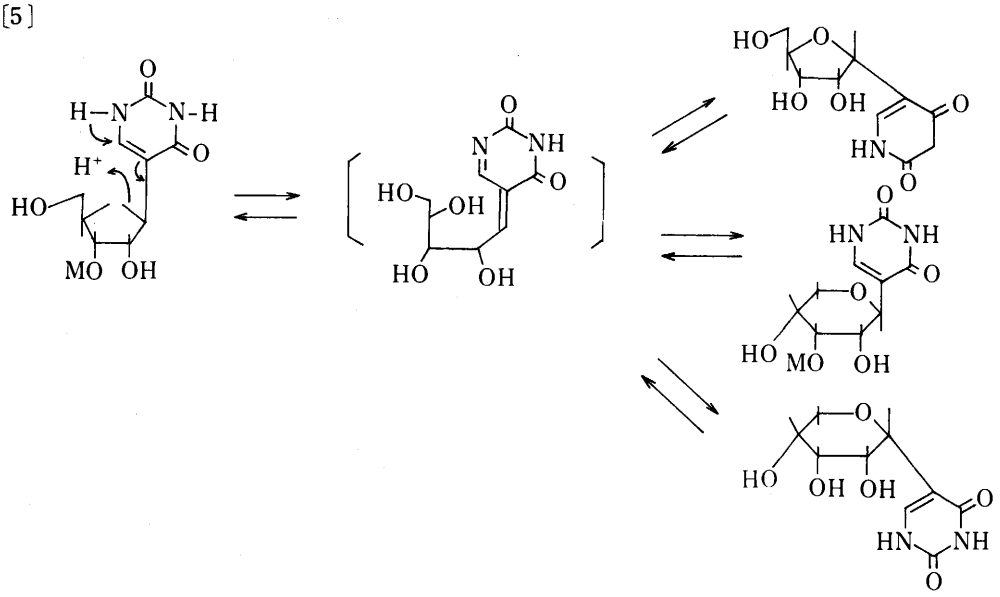
第二章　Stepwise 法による oligonucleotide の合成

第一節　Minor base を含む trimer

t RNA 中に存在する minor base にはその化学的性質から一般の縮合条件に耐えられないものが多く，また原料の入手の困難さからみても直接長鎖の ribooligomer を合成することは不利と思われる。また oligonucleotide を合成した後で nucleoside を modify するにしても鎖長が長くなるに従い，目的の nucleoside のみを選択的に修飾することは困難になってくる。そこで RNA ligase の accepterとなる最小のものが trimer であることを考え合せ，minor base を含む trimer block の合成を検討した。

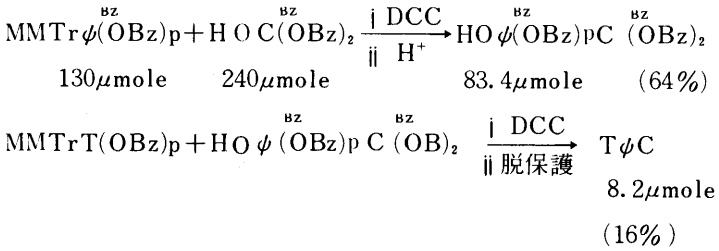
Pseudouridine[4](4)は C- C. glycosylbond を有する唯一の例として RNA 中に見い出され，このものは酸性条件下 Fig.〔5〕に示すような isomerization を起し 4 種の異性体を生じる[10]。

Fig.〔5〕



このことは 5′水酸基の保護基である MMTr 基をはずす際の酸性条件下でも同様の異性化を起す危険性を示す。そこで N- 1 位を benzoyl 基で保護することによりこの異性化を防ぎ Tψ C の合成を行った。合成ルート及び収率を Fig.〔6〕に示す。

Fig.〔6〕



このものに異性化の起っていないことは RNase M によりTp:ψp:C＝1.00: 0.92 : 0.96 に完全に水解されたことで確認した。

また，m^7G は強酸性で depurination[11]，弱アルカリ性で imidazole環の開裂[12] を招きやすく，そのため一般の縮合条件に耐えられない。そこで GUC を合成ののちguanosine の N-7位をメチル化することを検討した。

しかしながらジメチル硫酸によりメチル化を行うとguanosine ばかりか cytidine のN・3位もメチル化を受ける[13]。そこで cytidine のN- 3位がprotonotion を起すpH 4.0のbuffer 中ジメチル硫酸により GUCのメチル化を行ったところ,30%の収率で m 7 GUCを得た。このものは VPD ase により完全に水解され m^3C はまったく見い出されなかった。

第二節　Octamer GUCGUCGG の合成

nucleotide をone unit ずつ給合させて oligomer を合成する stepwise 法は末端リン酸基を保護する必要のないこと，oligomer に対し mononucleotide を大過剰に用いることができ，これにより収率の低下を防げるといった利点を有する。しかし鎖長が長くなるに従い原料と生成物との分離が困難となってくるため従来この方法では hexamer 程度が限度であった[14]。

そこで，演者は以下に示すように未反応物の除去法を改良し，高速液体クロマトグラフィーによる精製を行うことによってoctamer の合成に成功した。合成の route を Fig.[7]に示す。

Fig.[7]

ibG(iB)$_2$

↓ i) DCC　ii) 80% AcOH　iii) TEAE-Cellulose Column

(MeOTr)ibG(Bz)$_P$

ibG(Bz)-ibG(iB)$_2$

(MeOTr)bzC(Bz)$_P$ ↓

bzC(Bz)-ibG(Bz)-ibG(iB)$_2$

(MeOTr)U(Bz)$_P$ ↓

U(Bz)-bzC(Bz)-ibG(Bz)-ibG.(iB)$_2$

(MeOTr)ibG(Bz)$_P$ ↓

ibG.(Bz)-U(Bz)-bzC(Bz)-ibG(Bz)-ibG(iB)$_2$

(MeOTr)bzC(Bz)$_P$ ↓

bzC(Bz)-ibG(Bz)-U(Bz)-bzC(Bz)-ibG(Bz)-ibG(iB)$_2$

(MeOTr)U(Bz)$_P$ ↓

U(Bz)-bzC(Bz)-ibG(Bz)-U(Bz)-bzC(Bz)-ibG(Bz)-ibG(iB)$_2$

(MeOTr)ibG(Bz)$_P$

↓ i) DCC　ii) 80% AcOH　iii) NH_3　iv) DE-23 Cellulose Column

G-U-C-G-U-C-G-G

47　54

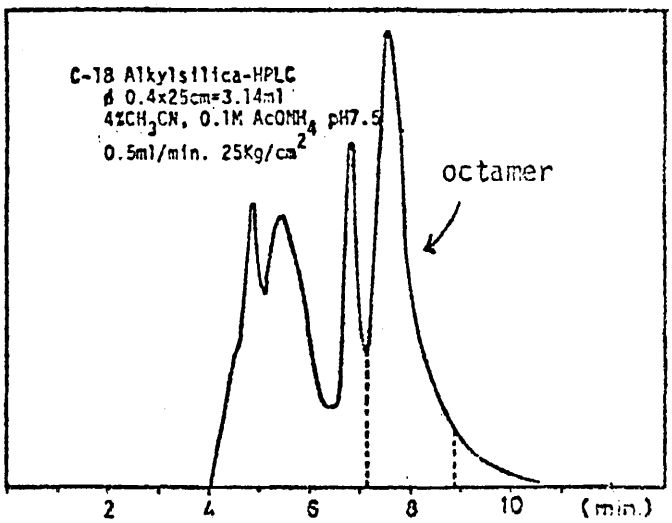
pentamer までは3′側の oligomer に対し，2～10等量の保護した mononucleotide をDCC を用いて縮合を行い酸処理によってMMTr 基を脱したのち，dimer は抽出でtrimer 以後は TEAE - Cellulose column により精製を行い dimer, trimer, tetramer, pentamer をそれぞれ46%, 27%, 30%, 18%の収率で得た。

hexamer以後は反応中に internucleotide のリン酸基が関与して副生する pyrophosphate 体の分解と未反応のoligomerの5′-水酸基をacetyl基で保護するために，無水酢酸で処理し，酸処理ののちTEAE cellulose のshort column により monomer unit のみを除いたのち，次の保護した mononucleotide を縮合させた。

以上の操作を繰り返すことにより octamer を合成し脱保護ののち7M Urea を含むDEAE cellulose column で精製を行い，さらにC-10 alkylsilica を担体[15]とする高速液体クロマトグラフィーにより精製を行って pure な octamer を得た。高速液体クロマトグラフィーの溶出 pattern をFig.[8] に示す。

またこのものは1次元目に pH 3.5の電気泳動，2次元目に homochromatography の展開を行って塩基配列の同定を行った。

Fig.[8]



第三章　RNA ligase 反応における反応中間体を用いる oligonucleotide の合成

RNA ligase は ATP 及びMg^{2+} イオン存在下，RNA fragment の結合を触媒する酵素であり，大塚らは長鎖の ribooligonucleotide を合成する際に有用な手段となることを証明し[6]，かつその反応中間体が補酵素由来の Adeosine 5′-pyrophosphate 体であり，このものはATPが存在しなくても ligase により acceptor と反応することを報告している[16]。また RNA ligase 反応においてdonor 同士の重合，環化といった副反応が知られており，これが長鎖の oligomer を合成する際の大きな問題となっている。

そこで著者はこのような副反応を防ぐため，保護基として3′末端にのみ ethoxymethylidee 基（EM）を有する oligonucleotide　の合成を企図したがこういった type の長鎖の oligonocleotide

を化学的に合成することは他の保護基とのかねあいを考えると困難である。そこでA 5′)ppN(EM) (N=A, U, G, C) を化学的に合成し。これを RNA ligase により反応させて acceptor の 3′未端に pN(EM) を結合させることを計画した。Fig.[9-b]

Fie[9-a]

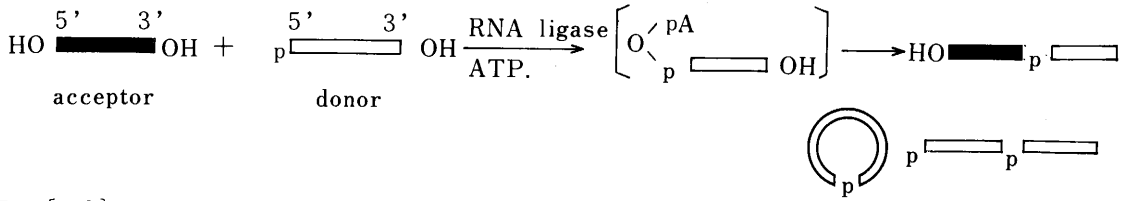
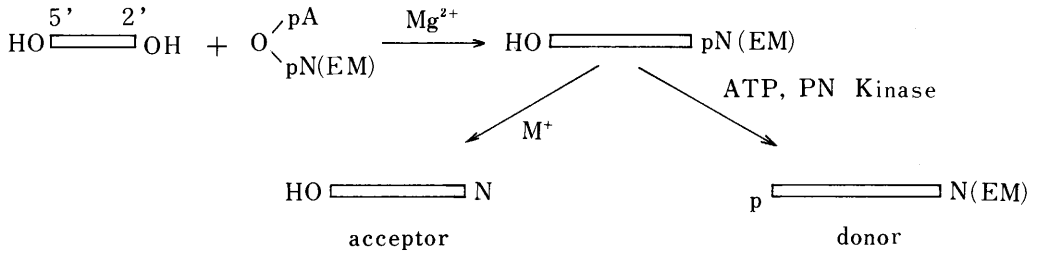


Fig.[9-b]



まず種々の trimer を acceptor とし, A(5′)ppN(EM)との反応性を検討し Table[2] に示す結果を得た。いずれの場合でも高収率で product が得られることが判ったので E. Coli $tRNA_f^{Met}$ の 3′未端 tetramer とその analog NCCA.(EM)(N=A, U, G, C) の合成を行い, RPC-5の高速液体クロマトグラフィーで精製を行った。

Table [2] Yield of XYZN(EM) %

N	A	U	G	C
ACC	91.6	85.8	93.6	92.1
UCC	94.2	90.7	94.0	86.2
UUC	54.8 (81.5)	43.7 (70.8)	84.2	70.9
TUC	80.4	83.8	92.6	82.5

( ) 内 15% DMSO 存在下

Reaction Condition

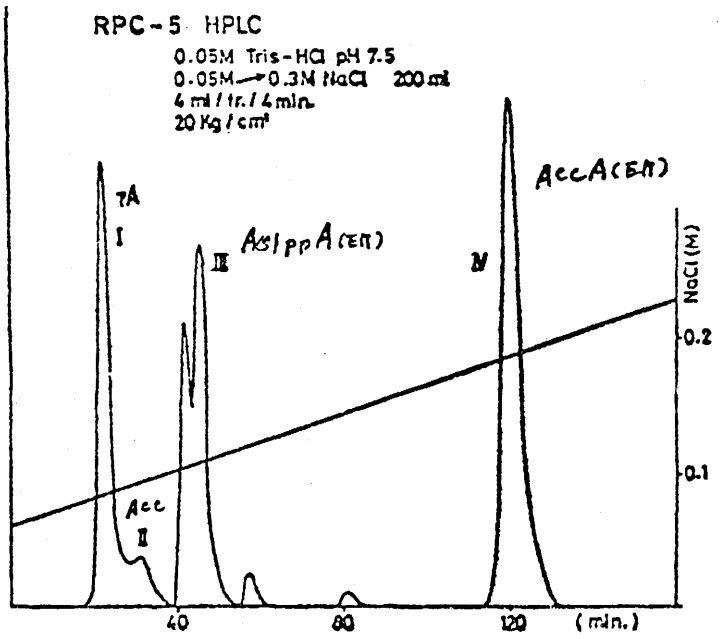
XpYp---1mM A(5′)ppN(EM)---2mM
HEPES-NaOH (pH 8.3)---50mM
$MgCl_2$---10mM DTT---10mM
BSA---10mg RNAligase- - - 87.5U/ml

25℃ 2 l l

ACC+A(5′) ppA(EM) を例にその溶出 pattern をFig.[10] に示す。

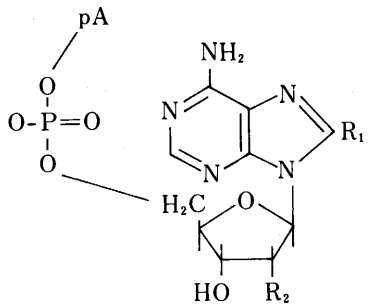
また同定は nearest neighbour analysis により 3′末端の nucleoside が adenosine であることにより行った。

Fig.[10]



統いて，trimer ACC への adeosine analog の導入を検討した。結果をFig.[11] に示す。

Fig.[11]



R_1 R_2

Af=H, F

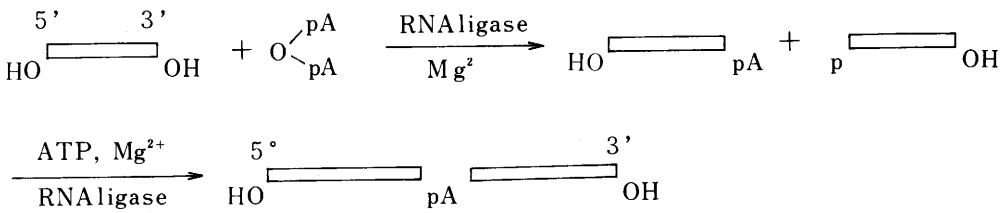
Az=H, N_3

brA=Br, OH

acceptor	donor	yleld(%)
ACC	Af(5')ppAf	0
	Az(5')ppAz	0
	brA(5')ppbrA	0
	A(5')ppbrA(EM)	81
	A(5')pp A	70
	A(5')ppAf	79
	A(5')ppAz	75
	A(5')ppbrA	89

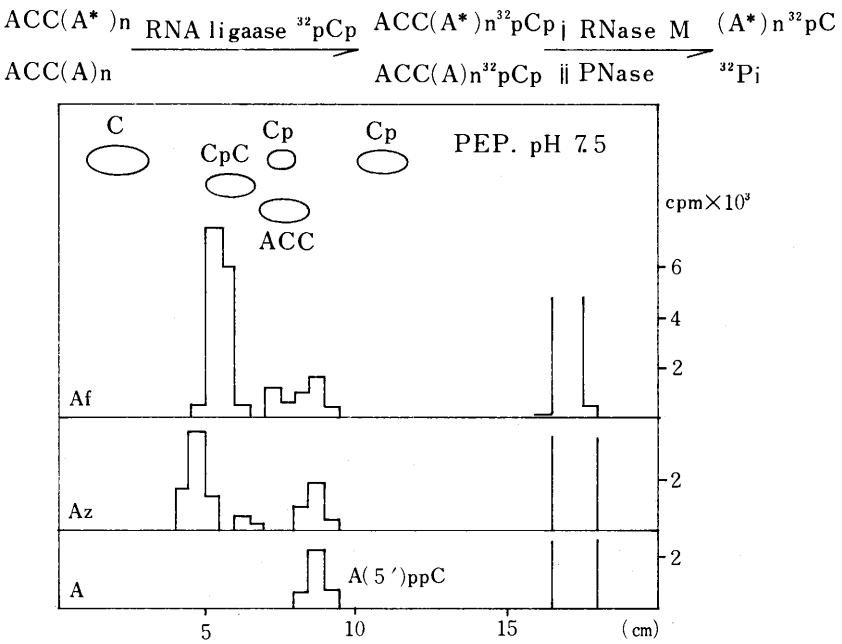
両方の adenosine が modify された中間体 A*(5′) では反応はまったく進行せず片方のみが modify されているものでは興味あることに multiple addition が認められた。このことは反応中間体のうち ATP 由来の unit はadenosine でなくてはならず，一方donor 由来の unit 及び acceptor 側にはかなりの許容性のあることを示している。特に 3′ 未端の nucleoside が modify されている。oligonucleotide でも acceptor となりうるということは Fig.[12] に示すように全塩基配列中ただ一ケ所のみ modify された nucleotideを含むRNAの合成が可能なことを初めて示したものであり，これは生化学的にも，物理化学的にも興味ある問題である。

Fig.[12]



また同定は 2′ 置換体が RNase に対し抵抗性を示すことを利用して行った。結果を Fig.[13] に示す。

Fig.[13]



結　論

1）p-methylsolfinylanilidate 体が従来の amidate 体より安定なことを見い出し，これにより trimer UUC, tetramer CGCGp, UGCGp の合成を行った。

2）化学的性質から取り扱いの困難な minor base を含む trimer TψC, m^7GUC の合成に成功した。

3）未反応物の除去法を改良し，高速液体クロマトグラフィーを利用することにより，stepwise 法による octamer GUCGUCGG の合成を行った。

4）RNA ligase 反応における反応中間体（adenosine 5′-pyrophosphote 体）の反応性を検討し，この中間体を用いて ribooligonucleotide の3′未端に，one nucleotide を結合させ，4種の tetramer NCCA(EM) (N=A, U, G, C) を高収率で合成した。

引用文献

1）K. K. Agarwal, A. Yamazaki, P. J. Cashion & H. G. Khorana. Angew. Chem. internat. Ed, **11**, 451 (1971).

2）a)R. Belegaie, E. L. Brown, H. J. Fritz, M. J. Gaits, R. G. Less, K. E. Norris, T. Sekiya, R. Contreras & H. G. Khorana, Abstracts of the 172 nd Meeting the American Chemical Society, CARB 12, San Francisco (1977).

b) K. Itakura, T. Hirose, R. Crea, ß. D. Riggs, H.L. Heyneker, F. Boliver, H. W. Boyer, Science **198**, 1056 (1977)

3）a) S. H. Kim, F. L. Suddath, G. J. Quigley, A. McPherson, J.L. Sussman, A. H. J. Wang, N. C. Seeman & A. Rich, Science. **185**, 435 (1974)

b) J. D. Robertus. J. E. Ladner, J. T. Finch. D. Rhodes, R. S. Brown. B. F. C. Clark & A. Klug. Nature, **250**, 546 (1974)

4）瀬野慎二，生物物理 **13** 172 (1973) and references therein

5）R. Silber, V. G. Malathi & J. Hurwitz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **69**, 3009 (1972)

6）a) E. Ohtsuka, S. Nishikawa, A. F. Markham, S. Tanaka, T. Miyake, T. Wakabayashi, M. Ikehara & M. Sugiura, Biochem., 17, 4894 (1978)

b) 西川諭，三宅哲雄，上野春樹，大塚栄子，池原森男，第1回日本分子生物学会年会1978年12月（東京）

7）a) E. Ohtsuka, K. Murao, M. Ubasawa & M. Ikehara, J. Amer. Chem. Soc., **92**, 3441 (1970)

b) E. Ohtsuka. M. Ubasawa & M. Ikehara, J. Amer. Chem. Soc., **93**, 2296 (1971)

c) E. Ohtsuka, T. Sugiyama & M. Ihehara, Chem. Pharm, Bull, **23**, 2257 (1975)

8）E. Ohtsuka, M. Ubasawa, S. Morioka & M. Ikehara, J. Amer. Chem. Soc., **95**, 4725 (1973)

9）C. Yu, F. W. Allen, Biochim. Biophys. Acta., **32**, 393 (1959)

10）R. W. Chambers, V. Kurkov & R. Shapiro, Biochem, **2**, 1192 (1963)

11）P. D. Lawley & P. Brookes, Biochem, J., **89**, 127 (1963)

12) E. Krick & P. Emelot, Biochem., **2**, 733 (1963)

13) R. L. C. Brimacombe, B. E. Griffin, J. Haines, W. J. Haslam & C. B. Reese, Biochem., **4**, 2452 (1965)

14) a) E. Ohtsuka, K. Fujiyama, M. Ohashi & M. Ikehara, Chem. Pharm. Bull., **24**, 570 (1976)

a) E. Ohtsuka, E. Nakagawa, T. Tanaka, A. F. Markham & M. Ikehara, Chem. Pharm. Bull., **26**, 2998 (1978)

15) H. J. Fritz, R. Belagaje, E. L. Brown, R. H. Fritz, R. A. Jones, R. G. Lees, H. G. Khorana, Biochemistry, **17**, 1257 (1978)

16) E. Ohtsuka, S. Nishikawa, M. Sugiura & M. Ikehara, Nucleic Acids Res., **3**, 1613 (1976)

17) R. D. Wells, S. C. Harides, G. T. Horn, B. Klein, J. E. Larson, S. K. Nevendri, N. Panayotatos, P. K. Patient & E. Selsing, Methods in Enzymology, in press.

研究報告

1) New phosphoramidates as protecting groups in ribooligonucleotides synthesis.
E. Ohtsuka, T. Miyake & M. Ikehara, Nucleic Acids Res., **3**, 653 (1976)

2) An approach to the synthesis of intermediate sized oligoribonucleotides.
A. F. Markham, T. Miyake, E. Ohtsuka & M. Ikehara, Heterocycles, **8**, 229 (1977)

3) Studies on transfer ribonucleic acids and related compoukds. XXV. Synthesis of E. coli $tRNA_f^{Met}$ 5′-terminal tetranucleotide C-G-C-Gp and its sequence analog U-G-C-Gp.
E. Ohtsuka, T, Miyake & M. Ikehara, Chem. Pharm. Bull., **27**. 349 (1979)

参考論文

1) Studies on transfer ribonucleic acids and related compounds. XVII. Studies on protecting groups of trisubstituted phosphates in the synthesis of ribooligonucleotides.
E. Ohtsuka, H. Tsuji, T. Miyake & M. Ikehara, Chem. Pharm. Bull., 25, 2844 (1977)

2) Joining of 3′-modified oligonucleotides by T4 RNA ligase. Synthesis of a heptadecanucleotide correponding to the bases 61-77 from Escherichia coli $tRNA^{fMet}$.
E. Ohtsuka, S. Nishikawa, A. F. Markham, S. Tanaka, T Miyake, T. Wakabayashi, M. Ikehara & M. Sugiura, Biochemistry, 17. 4894 (1978)

論文の審査結果の要旨

蛋白生合成の開始に与かっているホルミルメチオニンtRNAの合成の為,同君はまず,燐酸基の新しい保護基として p-metlylslfinyl anilidate を開発し，これらを用いて，3種のトリヌクレオチド，2種のテトラヌクレオチド，及び1種のオクタヌクレオチドを合成した。これはphosphodiester stepwise法によるリボヌクレオチドとしては現在迄最長のものである。

次にRNA ligase 反応を利用して，任意のオリゴヌクレオチドの3′未端に1残基を導入する方法として，先に発見されたAppX型の中間体を多数合成し，これを用いて，，A, G, C, Uの2′，3′-ethoxymethylidene 体，8-bromoA, 2′-deoxy-2′-fluoroA 及び-azidoA の導入に成功した。

これらの成果は博士論文請求に価するものと考える。