



Title	tRNAフラグメントの化学合成法の研究
Author(s)	藤山, 和男
Citation	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33031
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	藤 山 和 男
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 5 4 1 9 号
学位授与の日付	昭和 56 年 9 月 24 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	tRNA フラグメントの化学合成法の研究
論文審査委員	(主査) 教 授 池原 森男 (副査) 教 授 北川 勳 教 授 柘井雅一郎 教 授 田村 恭光

論 文 内 容 の 要 旨

緒 論

核酸を化学的に合成する方法は、ジエステル法とトリエステル法に大別されるFig. I. DNAの分野では、ジエステル法により、20鎖長程度まで合成され、DNA ligaseで結合することにより、yeast tRNA^{Phe}のgene鎖長77個、E. coli tRNA^{Phe}の活性なgeneの合成がKhoranaらによってなされた¹⁾。又、近年interのリン酸の解離をおさえたトリエステル法が、その大量取扱いの容易さから次第に主流となり改良され20~30鎖長のものが、比較的短期間で合成されるようになり²⁾ DNA ligaseで結合し、いくつかの人ペプチドホルモンのgeneが合成され、大腸菌に組み込まれ、ホルモンを生産するという所まで来ている³⁾。

一方、RNAの分野では、2'-OHの存在の為、種々の困難が生じ、ジエステル法で種々のオリゴマーが合成されたが⁴⁾ 天然の塩基配列をもつ最長のもは9鎖長であった⁵⁾。近年、2'位の保護法が改良され、トリエステル法の導入により、合成が比較的容易とはなってきたが、U-Aのくり返しの14鎖長や⁶⁾、ごく最近Uのホモポリマーの16鎖長⁷⁾の報告はあるが、天然の塩基配列を持つものは10鎖長が最長となっている⁸⁾。

tRNAは、核酸中最も小さな分子であり、1965年Holleyらによってyeast tRNA^{Phe}の一次構造が決定されて以来⁹⁾、現在まで200種を越え、X線回析がなされているものもあり、タンパク-核酸相互作用のモデルとしても非常に興味を持たれる物質である。

1972年Hurwitzらによって、RNA ligaseが発見され¹⁰⁾ deoxy系と同様に合成オリゴマーを酵素で結合できるようになり、最近池原らは、2種の方法で合成した3~10鎖長のオリゴマー (Fig. 2 a

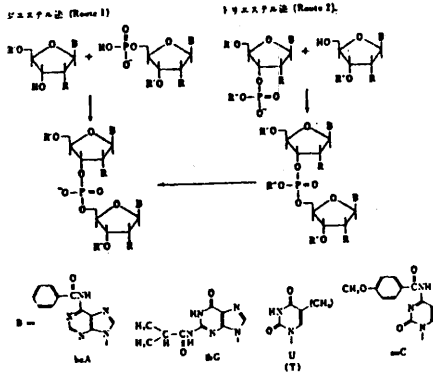


Fig. 1

～e) を結合することにより, *E. coli* tRNA^{Met} の nascent strandの全合成に成功し,¹¹⁾ tRNAの自由な合成が可能な事を示した。その時, 大きな fragmentを合成しておけば, 数stepの ligase反応で, 生化学的に興味ある tRNAの全合成ができる事となる。

そこで, tRNAの約 $\frac{1}{4}$ に相当する, リボポリヌクレオチドの合成を計画し, *E. coli* tRNA^{Met}の5'末端より数えて, 61~77番目のheptadecamer (I), 62~77番目のhexadecamer (II) (これはすでに合成されている AUCGAAAp¹²⁾ と結合する事により, eucalyoteのループを procalyoteの tRNAに導入できる), 35~54番目のeicosamer (III) をトリエステル法で合成した。Fig. 3.

本 論

第一章 Yeast tRNA^{Phe}の5'末 oligoribonucleotideのジエステル法による合成^{4c)}

ヌクレオチドと芳香族アミンとの phosphoroamidate [(2), (6), (8)] はピリジン: 酢酸 (1:1) 中, isoamylnitrite (isoAmONO) により室温4時間で他の保護基に影響を与える事なく分解できる¹³⁾。そこで, これを用い, yeast tRNA^{Phe}の5'末端 tetramer (CUCUp) とそれに続く trimer (CGGp) の合成を, ジエステル法で行った。Fig. 4に示す様に, (1), (2)^{4a) 14)} をDCCで縮合し, 縮合後 isoAmONOでアニシド基を除去し, TEAE-cellulose column chromatographyで(3)を35%の収率で得た。これを(2)と縮合し, 同様にして(4)を17%の収率で得た。又, (5)と(6)より同様に(7)を55%で得た。(1)と(8)を縮合した後, AcOH:CH₂Cl₂ (8:2) で脱MT_r化し, 同様に精製し, 5'方向にも鎖を延ばすことのできる(9)を21%で得た。(7)の(9)をTPSClでblock縮合し(10)を22%の収率で得た。

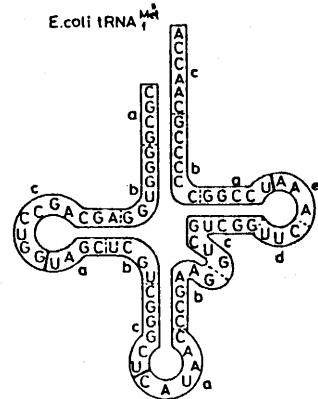


Fig. 2

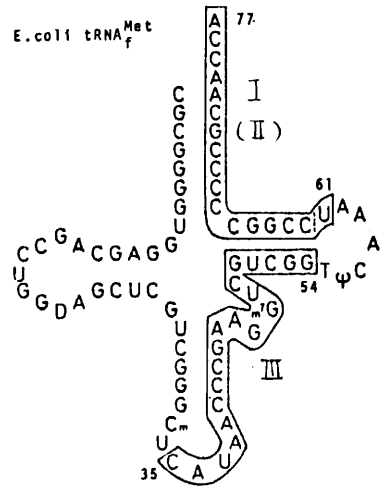
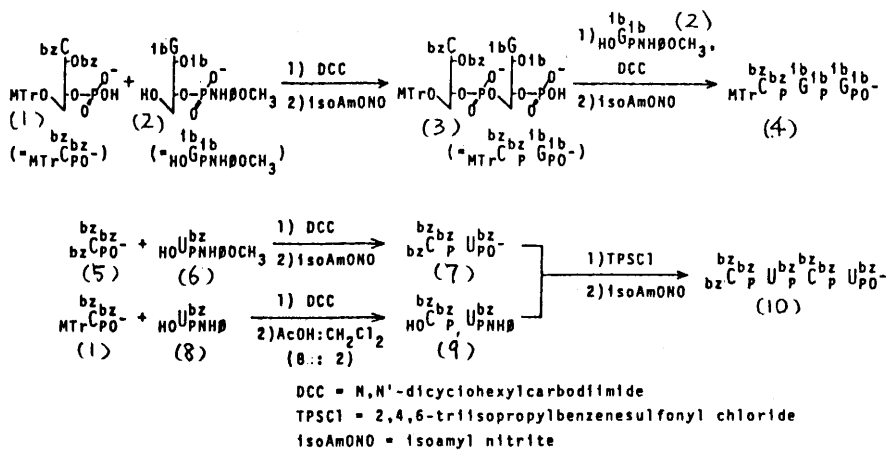


Fig. 3



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

第二章 E. coli tRNA^{M^{et}} の3'末端heptadeca-, 及びhexadecamerのトリエステル法による合成
 リボヌクレオチドの2'水酸基の保護基として大塚らによってリボオリゴマーの分野に導入された、*o*-nitrobenzyl基は、酸、アルカリ、isoAmONO処理に安定で中性条件下光照射で脱離でき、この保護基を導入する事により、リボヌクレオチドもデオキシ系と同様にができるようになった。¹⁵⁾ そして Fig. 5に示した様にして合成された monomer units^{8), 12), 16)} から出発して、トリエステル法により10鎖長までの合成が行なわれた。⁸⁾ この方法によりさらに鎖長の拡大を試みた。

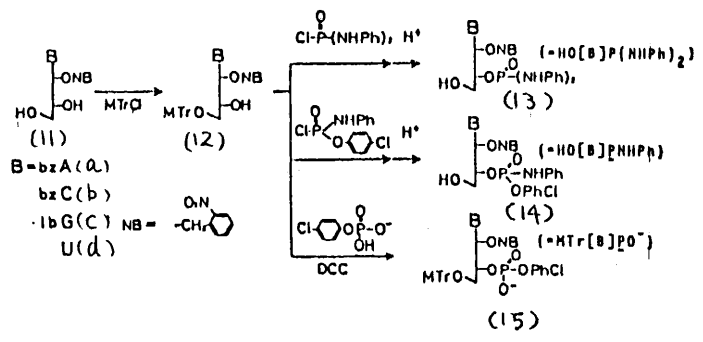
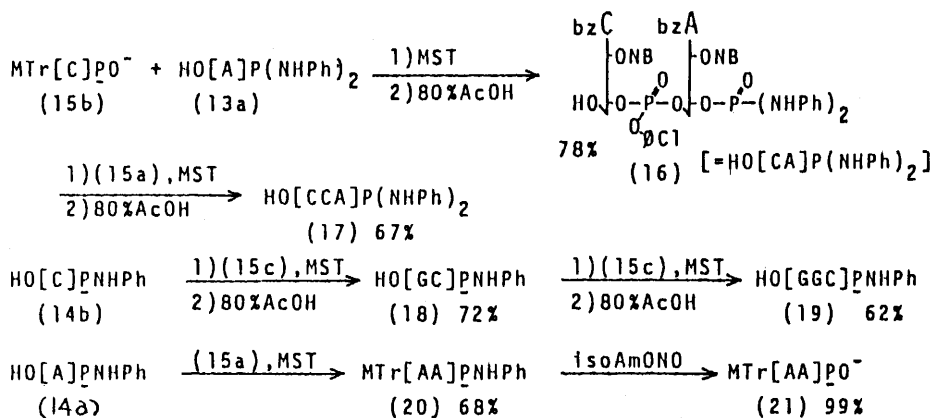


Fig. 5

i) Heptadecamerの合成

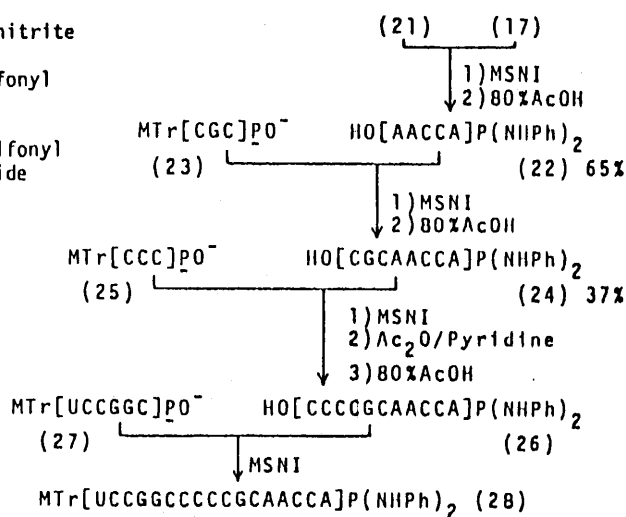
Fig. 6に示すように、(13a), (13b), (14a)に1.2~1.3当量の(15b), (15c), (15a)をMST¹⁷⁾で縮合し、シリカゲルカラムで精製し、80%酢酸で脱MTrを行ない(16), (18)を得、(15a), (15c)と縮合し trimer block (17), (19)を得た。(20)はisoAmONO処理をしてdimer block(21)とした。Trimer(17)にMSNI¹⁸⁾を縮合剤として(21), (23), (25)を順次縮合した。鎖長が長くなると通常シリカゲルではproductと原料が分離しなくなって来る。よって、脱MTrする前に、octamer(24)の時はシラナイズドシリカゲルによる逆相シリカゲルカラムも併用し、undecamer(6)の時は、Ac₂Oにより、原料(24)の5'位のアセチル化を行った。最後に、(26)と(27)を縮合し、fully-protected heptadecamer(28)とした。



isoAmONO = Isoamyl nitrite

MST = Mesitylene sulfonyl triazolide

MSNI = Mesitylene sulfonyl 4-nitroimidazole



ii) Hexadecamerの合成

従来、リボオリゴ系においては、脱MTrに80%酢酸が主として用いられて来た。ジエステル法では、室温2時間で反応は完了したが、トリエステル法の場合は、0.5~1.5日程度を要する。又、DMTrの脱離に用いられているベンゼンスルホン酸¹⁹⁾は、鎖長が長くなるにつれて反応速度が減少する。そこでWalkerらがmonomerの脱Trに使用したHCOOH: CHCl₃ (1:1)の条件で行った²⁰⁾この条件で行うと、いずれの鎖長でもアシル基に影響する事なく、室温30分で完全に脱MTrが行えた。Fig. 7に示すように、(14b)と(15c)をMSNT^{21-a)}で縮合し、HCOOH: CHCl₃で脱MTr化を行い、シリカゲルカラムで精製する。これをくり返しpentanmer(30)を(14b)より51%の収率で得た。全2.5日で単離し、平均収率は1 step 80%であった。(30)のアニリド基を除去しi)で得たundecamer(26)と縮合しhexadecamer(32)とした。鎖長が長くなると、このように保護したリボオリゴマーでは、シリカゲルに対する吸着速度が低下する為か、32はCHCl₃だけで溶出され、混入しているoctamerをほとんど除くことができた。

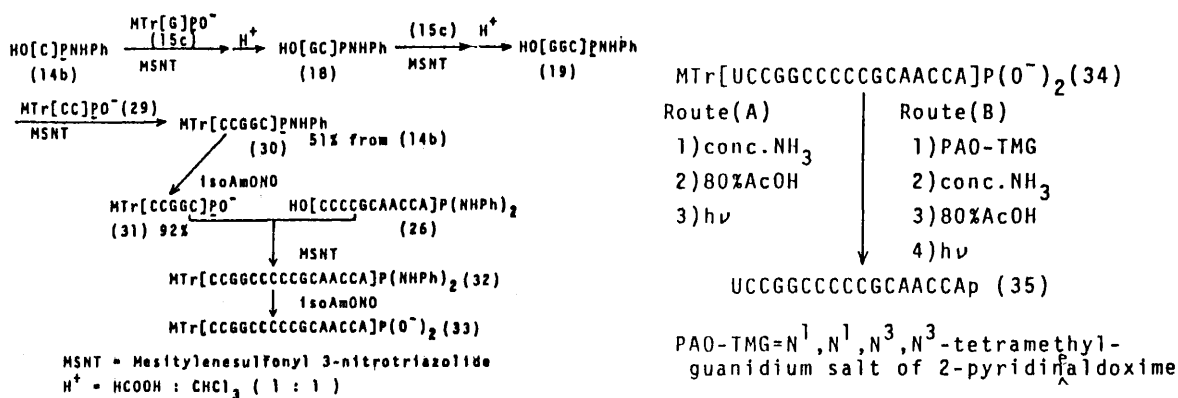


Fig. 7

Fig. 8

第三章 Hexadeca-, heptadecamerの脱保護及び精製

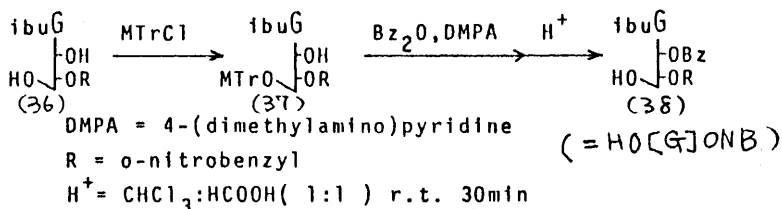
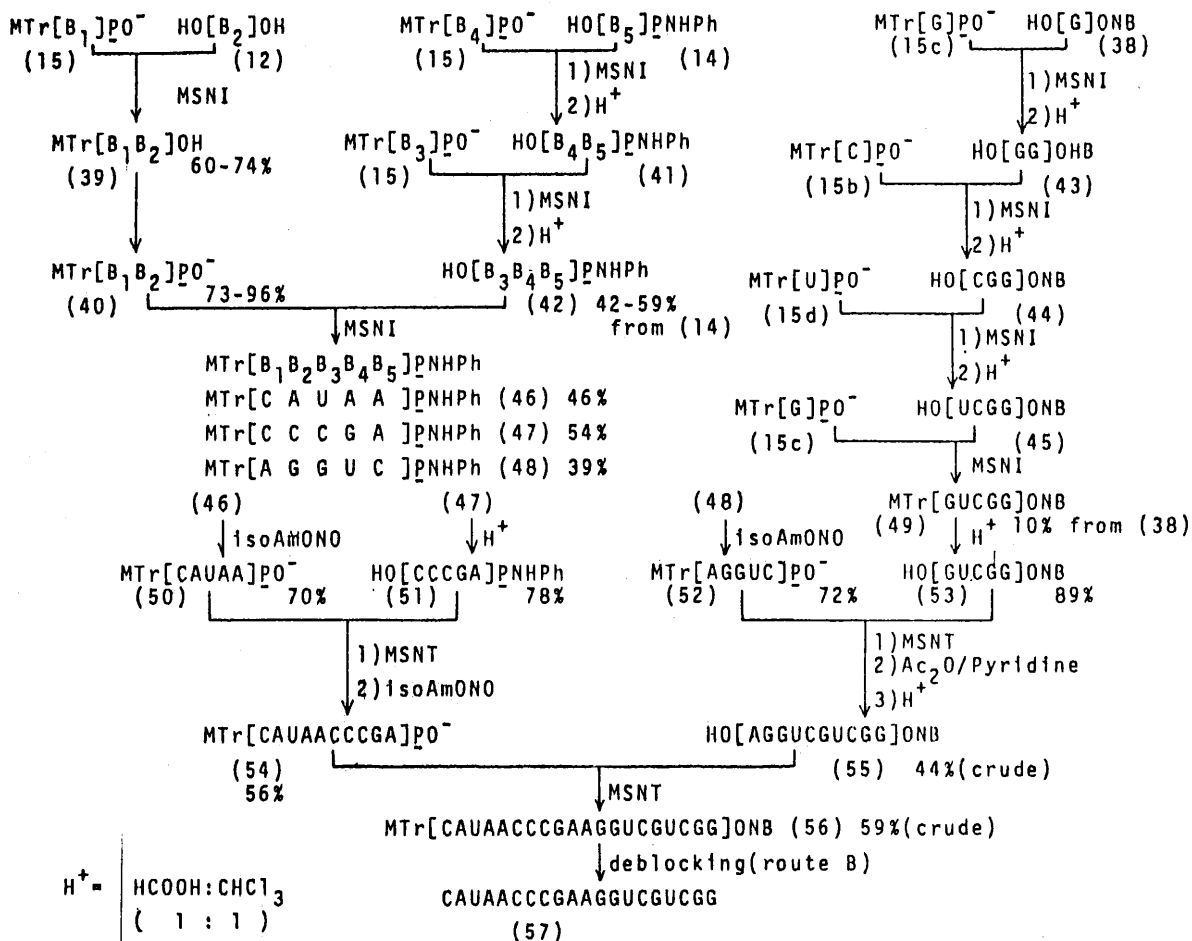
第二章で得た heptadecamer (28) を isoAmONO で 3' 末端のリン酸を free とし Fig. 8 の route (A) に従って、1) でアシル基を、2) で MTr 基を、3) で *o*-nitrobenzyl 基をそれぞれ脱保護し、種々精製を試みたが、満足する結果は得られなかった。鎖長が長くなると、リボ系においてはデオキシ系と違い急激に、脱保護効率が低下するようである。そこで、MTr [AACCA]P(O)₂ を用いて、アルカリ処理、照射について、HPLC (Permaphase AAX) を用いて検討した。数種の条件を検討した結果、route (B) のように、最近 Reese らが inter のリン酸基の保護基である *o*-chlorophenyl 基の脱離に用いた pyridinealdoxime²¹⁾ を用いると、デオキシ系と違う数段の改善が見られた。そこで、(B) route で 0.5M PAO-TMG (ジオキササン：水 = 1 : 1) を用いて、脱保護し、DEAE-Sephadex A-25 でカラムクロマトグラフを行った後、HPLC (Hypersil ODS) で分取を試みた所、これにより、長鎖のリボオリゴマーが単離精製できる事がわかった。Partially-protected hexadecamer (32) を 0.5M PAO-TMG を用い、route (B) で脱保護し、Sephadex G-50 でゲル濾過し、DEAE-Sephadex A-25 でカラムクロマトグラフを行った。それぞれの fraction は、HPLC (Hypersil ODS) 分析で product を追跡し、main の fraction のみを精製した。最後に、HPLC (Hypersil ODS) で分取し、ca 1% の収率で無保護の hexadecamer を得た。塩基組成分析、20% acrylamide GEP、2次元シークエンシングを行い満足する結果を得た。Heptadecamer (34) も同操作で脱保護精製し、20% acrylamide GEP、2次元シークエンシングを行い満足する結果を得た。

第四章 E. coli tRNA^{Met} の 5' 末端より 35—54 番目に相当する eicosamer の合成

リボヌクレオチドでも長鎖のフラグメント同士十分縮合が行え、HPLC (Hypersil ODS) で単離できるので、さらに長鎖の eicosamer の合成を行った。合成のすべての段階で、通常のシリカゲルカラムと逆相のシリカゲルカラム (シラナイズド・シリカゲル) を必要に応じて両方又は一方を使用した。Fig. 9 に示すような lock に分けて合成し、dimer block は、3', 5' 無保護の (12) と²²⁾ (15) を MSNI で縮合し (39) を得、リン酸化して (40) を得た。Trimer block は (14) に (15) を 2 回縮合し (42) を得た。これらを縮合し、5' 側から 3 番目までの pentamer block (46) (47) (48) を得た。3' 側の pentamer は stepwise で合成した。3' を *o*-nitrobenzyl で 2' を benzoyl で保護した (38)²²⁾ (Fig. 10) に、(15c), (15b), (15d), (15c) を MSNI

で順次縮合し(49)を得た。この時、脱MTr後のギ酸は、抽出のみで除き直ちに次の縮合に用いた。このようにして得た pentamer block は、 isoAmONO 処理をした(50),(52)と、酸処理した(51),(53)とを MSNT で縮合し、脱アニリデートして(54)を、酸処理して(55)を得、両者を MSNT で縮合し、 eicosamer(56) を得た。これを第三章と同じ操作で脱保護し、DEAE-Sephadex A-25 でカラムクロマトグラフを行い、HPLC (Hypersil ODS) で精製し、2.8%の単離収率で無保護の eicosamer(57)を得、同定した。

以上のようにして合成し脱保護し単離した hexadeca-eicosamer はすでに合成されている AUCG-AAA_p と共に RNA ligase の基質として使用された。そして、eucalyote のループを持つ procalyote



の tRNA^{Met} の半分子は、2 step の ligase 反応でつくられた。

結 論

1. ジエステル法により Yeast tRNA^{Trp} の 5' 末端 tetramer CUCUp と trimer CGGp を合成した。
2. トリエステル法により E. coli tRNA^{Met} の 5' 末端より数えて 61—77 番目の heptadecamer sequence, 35—54 番目の eicosamer sequence を化学的に合成し脱保護し単離した。これらは現在の所、化学合成リボオリゴマーとしては最長である。
3. 同様に、62—77 番目の hexadecamer sequence を合成した。このものは、上記 eicosamer と共に RNA ligase の基質として使用され、tRNA 半分子の合成が大幅に短縮された。

References

- 1) R. Biegail, E. L. Brown, H. J. Fritz, M. J. Gait, R. G. Less, K. E. Norris, T. Sekiya, R. Contreras and H. G. Khorana, Abstracts of the 172nd Meeting of the American Chemical Society, CARB 12, San Francisco (1976)
- 2) a) 水野義久, 光延旺洋, 畑辻 明, ヌクレオシド, ヌクレオチドの合成 (丸善)
b) 池原森男, 上田 亨, 大塚栄子, 核酸有機化学 (化学同人) 等
- 3) K. Itakura, T. Hirose, R. Crea, A. D. Riggs, H. L. Heyneker, F. Bolivar and H. W. Boyer. Science, **198**, 1056 (1977)
- 4) a) E. Ohtsuka, K. Murao, M. Ubasawa and M. Ikehara, J. Am. Chem. Soc., **92**, 3441 (1970)
b) E. Ohtsuka, M. Ubasawa and M. Ikehara, *ibid.*, **93**, 2296 (1971)
c) E. Ohtsuka, K. Fujiyama, M. Ohashi and M. Ikehara, Chem. Pharm. Bull., **24**, 570 (1976)
d) E. Ohtsuka, E. Nakagawa, T. Tanaka, A. F. Markham and M. Ikehara, *ibid.*, **26**, 2998 (1978)
- 5) E. Ohtsuka, M. Ubasawa, S. Morioka and M. Ikehara, J. Am. Chem. Soc., **95**, 4725 (1973)
- 6) J. H. Van Boom and P. M. J. Burgars, Recl. Trav. Chim. (Pays-Bas), **97**, 73 (1978)
- 7) K. K. Ogilvie and M. J. Memer, Can. J. Chem. **58**, 1389 (1980)
- 8) E. Ohtsuka, T. Tanaka and M. Ikehara, J. Am. Chem. Soc., **101**, 1389 (1980)
- 8) E. Ohtsuka, T. Tanaka and M. Ikehara, J. Am. Chem. Soc., **101**, 6409 (1979)
- 9) R. W. Holley, J. Apgar, G. A. Everett, J. T. Madison, M. Marquise, S. M. Merrill, J. R. Penswick and A. Zamir, Science, **147**, 1 462 (1965)
- 10) R. Silber, V. G. Marathi and J. Hurwitz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **69**, 3009 (1972)
- 11) E. Ohtsuka, A. F. Markham, S. Tanaka, T. Tanaka, T. Miyake, E. Nakagawa, T. Wakabayashi, Y. Taniyama, K. Fujiyama, S. Nishikawa, R. Fukumoto, T. Doi, T. Tokunaga and M. Ikehara, Nucleic Acids Res., Symposium Series, No. 7, 335 (1980)
- 12) E. Ohtsuka, S. Tanaka and M. Ikehara, J. Am. Chem. Soc., **100**, 8210 (1978)

- 13) E. Ohtsuka, K. Murao, M. Ubasawa and M. Ikehara, *ibid.*, **91**, 1537 (1969)
- 14) R. Lohrmann, D. Soll, H. Hayatsu, E. Ohtsuka and H. G. Khorana, *ibid.*, **88**, 819 (1966)
- 15a) E. Ohtsuka, T. Tanaka and M. Ikehara, *Nucleic Acids Res.*, **1**, 1531 (1974)
 - b) *idem*, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 949 (1977)
 - c) *idem*, *Synthesis*, 453 (1977)
 - d) E. Ohtsuka, T. Wakawayashi, S. Tanaka, T. Tanaka, K. Oshie, A. Hasegawa and M. Ikehara, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 318 (1981)
- 16) E. Ohtsuka, T. Tanaka, S. Tanaka, and M. Ikehara, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 4580 (1978)
- 17) N. Katagiri, K. Itakura and S. A. Narang, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 7332 (1975)
- 18) G. R. Gough, C. K. Singleton, H. K. Weith and P. T. Gilham, *Nucl. Acids Res.*, **6**, 1557 (1979)
- 19) J. Stawinski, T. Hozumi, S. A. Narang, C. P. Buhl and R. Wu, *ibid.*, **4**, 353 (1977)
- 20) R. C. Bieaney, A. S. Jones and R. T. Walker, *ibid.*, **2**, 699 (1975)
- 21) a) C. B. Reese, R. C. Titmas and L. Yau, *Tetrahedron Letters*, 2727 (1978)
 - b) C. B. Reese and L. Yau, *ibid.*, 4443 (1978)
- 22) E. Ohtsuka, T. Wakabayashi and M. Ikehara, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 759 (1981)

論文の審査結果の要旨

藤山君は早くから酵母チロシン tRNA 5'-末端の合成をジエステル法により試み、磷酸アニシデートを用いて CUCUp と CGGp の合成に成功した。その後、大腸菌ホルミルメチオニン tRNA の合成に転じ、2'-オルトニトロベンジル及びアニリドホスホ基を用いて新規トリエステル法を考究し、3'-末端15及び-16残基に相当するデオキシオリゴヌクレオチドの合成を行った。特にデカヌクレオチドとペンタ及びヘキサヌクレオチドを縮合したのは初めてのことである。これらの脱保護法にも種々の工夫をし、又、精製法に各種のクロマトグラフィー、特に HPLC を活用して純粋なものを得た。次に同 tRNA の 35~54 残基に相当する 20 鎖長のオリゴマーの合成を試み、2+3, 5+5, 10+10 の長鎖オリゴマーの縮合に成功し、現在では最長のリボオリゴマーの合成に成功した。これらの成果は博士号の請求に充分なものと認める。