



Title	芳香族リン酸アミデート-トリエステル法によるオリゴヌクレオチドの合成研究
Author(s)	谷山, 佳央
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33369
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)	谷 山 佳 央
学 位 の 種 類	薬 学 博 士
学 位 記 番 号	第 6 0 2 6 号
学位授与の日付	昭 和 58 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	芳香族リン酸アミデート-トリエステル法による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 北川 勲 教 授 栢井雅一郎 教 授 田村 恭光

論 文 内 容 の 要 旨

核酸は糖の種類により DNA と RNA の 2 種に大別され、これらの任意の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの化学合成は、純化学的な興味のみならず、その分子生物学への応用という面においても非常に価値がある。合成法としては DNA においては Khorana らにより確立されたジエステル法にかわり、インターヌクレオチドのリン酸も保護して結合するトリエステル法が Letsinger らにより導入され、さらに改良され、合成の大量化、時間短縮がなされ、生物学的要求に応えることが可能となり、Itakura らの合成オリゴマーによる人工遺伝子の合成、及び大腸菌でのそれらのホルモンの産生という研究が報告され、以後人工遺伝子の合成を初め、プローブ、プライマー、リンカーとして合成デオキシオリゴヌクレオチドの必要性は増大しつつある。最近では分離精製法の開発が進み、少量での合成が可能なことより固相法が広く行なわれている。一方、RNA においては糖部の 2' 位水酸基のため DNA に比べてその化学合成は困難であったが、Ikehara らは合成したリボオリゴヌクレオチドを RNA ligase により結合し、鎖長 77 の E. coli tRNA^{Met} の nascent strand の全合成に成功し、そのアミノ酸受容活性を認め、化学合成のレベルで DNA に近づきつつあることを示した。

第一章において、E. coli tRNA^{Met} の全合成を比較的、大量に取り扱う際に役立つと考えられる 5' 末端より 21—34 番目に対応するテトラデカリボヌクレオチドを、リン酸の保護基としてパラクロロフェニル基とアニリド基を用いトリエステル法により合成した。また、このリボオリゴマーの合成法をデオキシ系に応用し、バクテリオロドプシン cDNA のプライマーとして役に立った 2 種のドデカデオキシリボヌクレオチドを合成した。

第二章において、デオキシオリゴマーの合成をさらに容易にするべく、リン酸の保護基をオルトクロロフェニル基とパラアニシド基に改良し、これらでリン酸基を完全に保護したデオキシヌクレオチドを合成した。前者は脱保護の際、容易に除去され、後者はその電子供与性の置換基の効果により、かなりアニリド基に比べて、はずれ易く、時間短縮が可能となった。このモノマーユニットを用いて多数の完全に保護したダイマー及びトリマーのブロックを中間体として準備した。つづいてこれらを用い、RNAポリメラーゼの結合部位として理想的な塩基配列と考えられる配列を含み、制限酵素切断配列を両端に持つ二重鎖ペンタデカマーを合成した。このものは遺伝子組み換え操作を利用して天然のフラグメントと入れ換えられ、実際にプロモーター活性を示すことがわかった。

第三章においては前章で組み込んだ理想的な塩基配列TATAATGの1塩基対の役割を調べるべく、1塩基ずつ異なるドデカマーの合成の必要から、それらを効率良く合成する方法を検討し、その結果、中間体の精製を必要としない固相法を用い、ダイマーブロックを3種混合することより、1塩基異なる3種のドデカデオキシリボヌクレオチドを同時に合成した。結果は予想通り逆相の高速液体クロマトグラフィーにより、脱保護後、3種を単離することができた。なお、この際用いたブロックは前章で合成したものをピリジン—酢酸混液中イソアミルナイトライトで処理すること（ナイトライト処理）により、パラアニシド基を除去したものである。この様な方法を用いれば実際に1塩基が異なる多数のオリゴマーを比較的短時間に合成可能である。

第四章ではB型肝炎ウィルスの遺伝子において、限定した部分のみをクローニングする際の有効な手段となりうるプライマーに対するストッパー（DNAポリメラーゼIによる鎖長の伸長を阻止する）として3'末端修飾オリゴマーに注目し、4種の3'末端オルトクロロフェニルリン酸ドデカデオキシリボヌクレオチドを合成した。この際、合成法として5'→3'方向の固相法を検討し、固相上（ポリスチレン）のパラアニシド基が液相の場合と同様、ナイトライト処理で定量的に除去されること、また従来不利であると考えられていた固相上のリン酸ジエステル縮合剤による活性化が容易であることを見出した。ここで示した5'→3'方向のブロック縮合による固相合成法は最初の例である。この様にリン酸の保護基としてアニリド基あるいはパラアニシド基という芳香族アミデートを用い、中間体となるダイマー及びトリマーブロックを合成し、液相法及び固相法に応用し、生物学的に利用価値の高い種々のオリゴヌクレオチドをトリエステル法により合成した。

論文の審査結果の要旨

谷山君は先ずアニリドとp-クロロフェニル基を保護基とするリン酸化試薬を用いE. coli tRNA^{Phe}の21—34番目に相当するオリゴヌクレオチドを合成した。又、同じリン酸化剤によっ

てバクテリオロドプシンDNA検索の為のプライマーとなるドデカデオキシリボヌクレオチド
おも合成した。

この経験により、より容易に脱保護の出来るo-クロルフェニルとp-アニシド基を有する新試
薬を合成し、これを用いてDNAの発現調節プロモーターのPribnow box部を変換すること
に成功した。これを更に延長して、この部分の一塩基のみの異なる3種のドデカデオキシヌクレ
オチドを合成する為、固相法の混合ヌクレオチドによる方法を試み、その分離精製にも成功し
た。次に3'末端に何らかの保護基を有するオリゴマーを、DNA転写のストッパーとする為、
固相担体上で5'→3'方向への鎖の伸長法を考案し、3'末端にオルトクロルリン酸を持つドデカ
デオキシヌクレオチドの合成に成功した。

これらの成果は博士論文請求に値するものと認める。