The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	オリゴリボヌクレオチドの合成に関する研究
Author(s)	姥澤, 愛子
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33468
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

【13】

氏名・(本籍)	姥澤愛子（うばさわあいこ）
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 5869 号
学位授与の日付	昭和58年1月5日
学位授与の見件要	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**オリゴリボヌクレオチドの合成に関する研究**
論文審査委員	(主査) 教授 池原 森男
	(副査) 教授 北川 勲　教授 冨田 研一　教授 田村 恭光

論文内容の要旨

序　論

核酸化学の分野において，任意の塩基配列を有するオリゴ，またはポリヌクレオチドを化学的に合成することは，生物学的に有意義であるのみならず，過酷な条件に繊細な化合物をいかに収率良く合成するかということもまた興味のあるところである。

オリゴヌクレオチドの化学合成は，ヌクレオシドの反応に関与しない官能基を保護した後，リン酸化を経て，ヌクレチドの鎖を伸ばしていくものである。

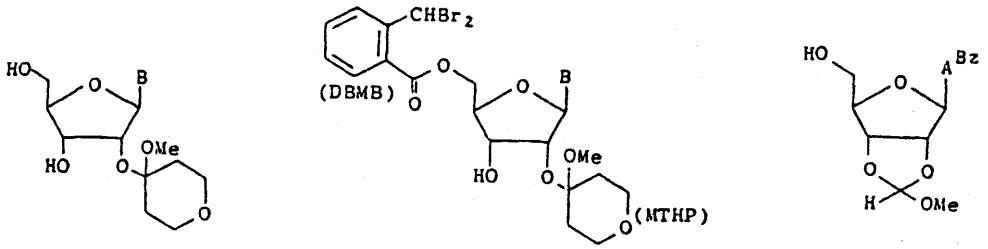
ヌクレオチド間結合を生成させる方法には，Khorana 等が開発したジェステル法と，Letsinger 等の開発したトリエステル法がある。前者は，インターヌクレオチド結合によって生じるリン酸エステルがジェステルであるために，リン酸の解離が残っているが，後者は，このリン酸基を保護することによって，リン酸トリエステルとなるので，有機溶媒に易溶となり，合成核酸の分離，精製が容易で，且つ，リン酸の解離による副反応を阻止することによって，収率の向上も著しい。

筆者は，酵母アラニン転移リボ核酸をモデル化合物として，トリエステル法によるオリゴリボヌクレオチドの合成を行った。また，この合成研究中に見い出された副反応，並びに副産物について，以下，順を追って記述する。

第一章　リボヌクレオシドの保護

オリゴヌクレオシドの合成に先立ち，その構成単位である個々の保護したヌクレオシドを合成するために，オリゴヌクレオチドの合成計画と目的に沿った適当な保護基を選択しなければならない。特に，リボ系は，デオキシ系に比較して2′水酸基が存在するために合成経路が複雑化する。

酵母アラニン転移リボ核酸の3′末端塩基配列を有するデカリボヌクレオチドの合成に使用されたヌクレオシドビルディングブロックは，図(1)に示した6種類の化合物である。5′水酸基の保護基として用いられたo-dibromomethylbenzoyl基をリボヌクレオシドに応用したのは初めてであり，且つ，以上の4種類の化合物は，全て新規化合物である。



1: a; B=C^{Bz}
b; B=G^{Bz}
c; B=U

2: a; B=A^{Bz}
b; B=U

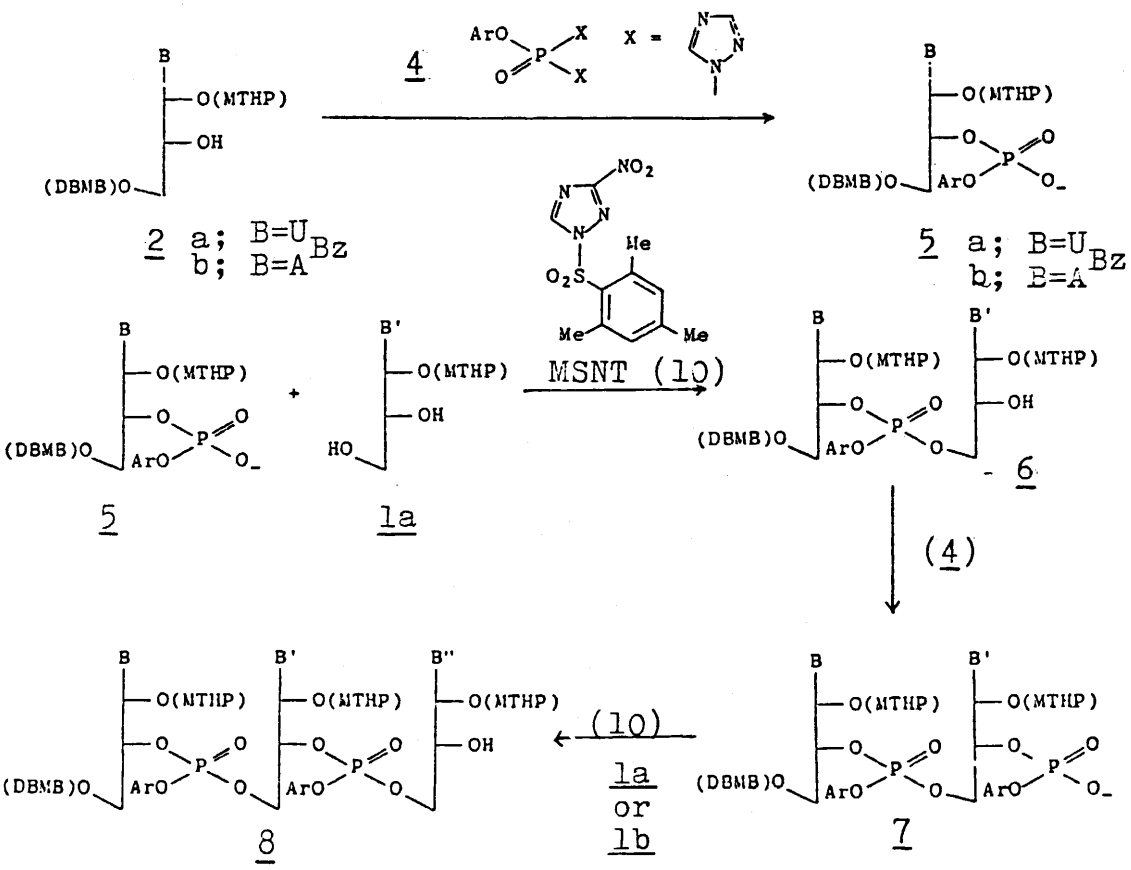
3:

A^{Bz}= 6-N-benzoyladenin-9-yl;
C^{Bz}= 4-N-benzoylcytosin-1-yl;
G^{Bz}= 2-N-benzoylguanin-9-yl;
U = uracil-1-yl;

第二章　オリゴリボヌクレオチドの合成

トリエステル法によるオリゴリボヌクレオチドの合成で，最も重要なことは，リン酸基の保護基の選択にあると思われる。置換フェニル基（o-クロロ，o-フルオロ，p-クロロフェニル）が有効であることは示唆されたが，その脱離の条件に難点があった。しかし，p-nitrobenzaldoximeの共役塩基が，ヌクレオチド間結合に大きな影響を与えずに，フェニル基を脱離することが発見されたことから，特にo-クロロフェニル基の有用性が確認された。

この事実に基づいて，以下に示す合成を行った。



図中のリン酸化反応では，o-chlorophenylphosphorodi-(1, 2, 4-triazolide)(4)を，縮合反応ではは，mesitylenesulfonyl-nitrotriazole(10)を各々の段階でのリン酸化剤として使用した。

脱保護して得られたデカリボヌクレオチド(14)は，DEAE-Sephadex A-25のクロマトグラフィーのパターン (Fig 1) に見られるように単一のピークとして得られた。

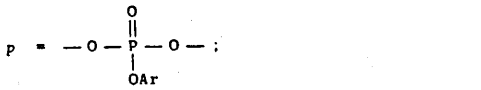
得られたデカリボヌクレオチド(14)は，アルカリ水解，ribonuclease A とcalf-spleen phosphodiesterase, さらにvenom phosphodiesterase によって水解し，正しい塩基組成の比率を得た。

第三章　オリゴヌクレオチド合成による副反応—縮合剤との反応

第二章で記述した，オリゴリボヌクレオチドの合成で，縮合剤(10)を大過剰に用いて，比較的長時間反応させると，期待された生成物を減収させるような副反応が起こることを見い出した。そこで，MSNT を縮合剤として用いた時に起こり得る副反応の性質を調べることによって，このような副反応を阻止できる方法を見い出すべく，各ヌクレオシド誘導体とMSNT との反応を検討した。

糖部，塩基部の官能基を保護したアデノシン，シチジン誘導体と，縮合剤MSNT との間には，何らの反応も検出されなかったが，ウリジン，グアノシン誘導体とは，比較的容易に反応した。特に，diphenyl phosphate の存在下では，この反応が促進されることが判った。

これらの反応生成物は，元素分析，NMR スペクトル，UV スペクトルから，また(16)を(17)に，(20)を(19)



Ar = 2-ClC_6H_4; MM = 2',3'-O-methoxymethylene; A^{Bz}, C^{Bz} and G^{Bz} = 2'-O-MTHP-*N*-benzoyl protected adenosine, cytidine and guanosine residues, respectively.

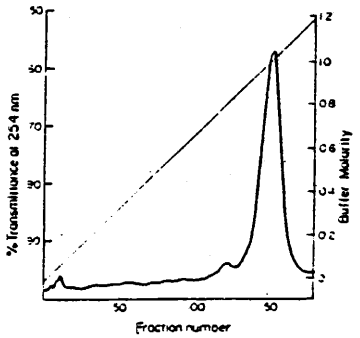
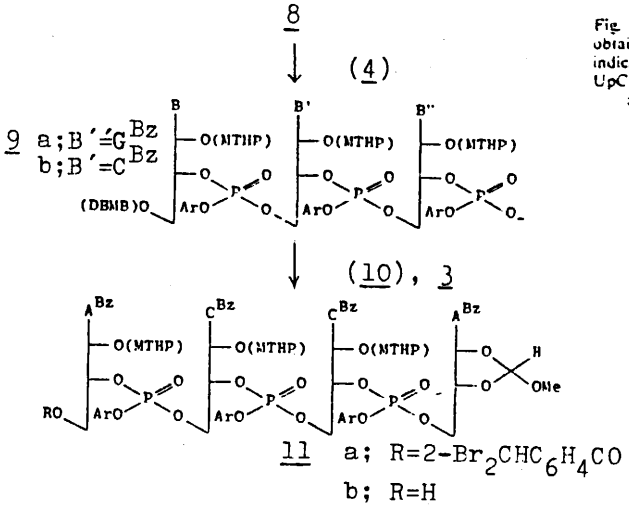
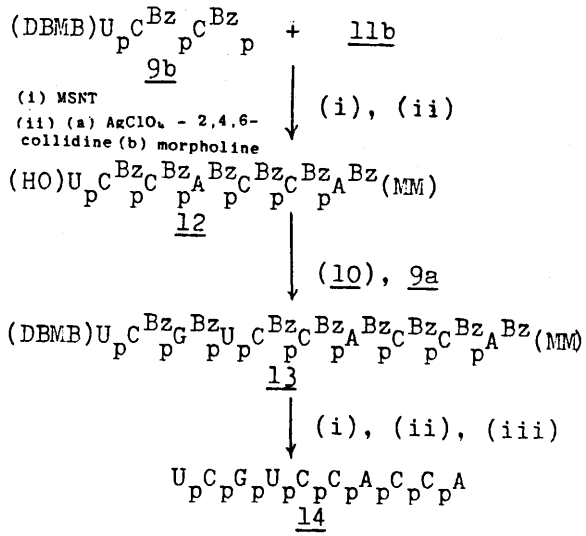
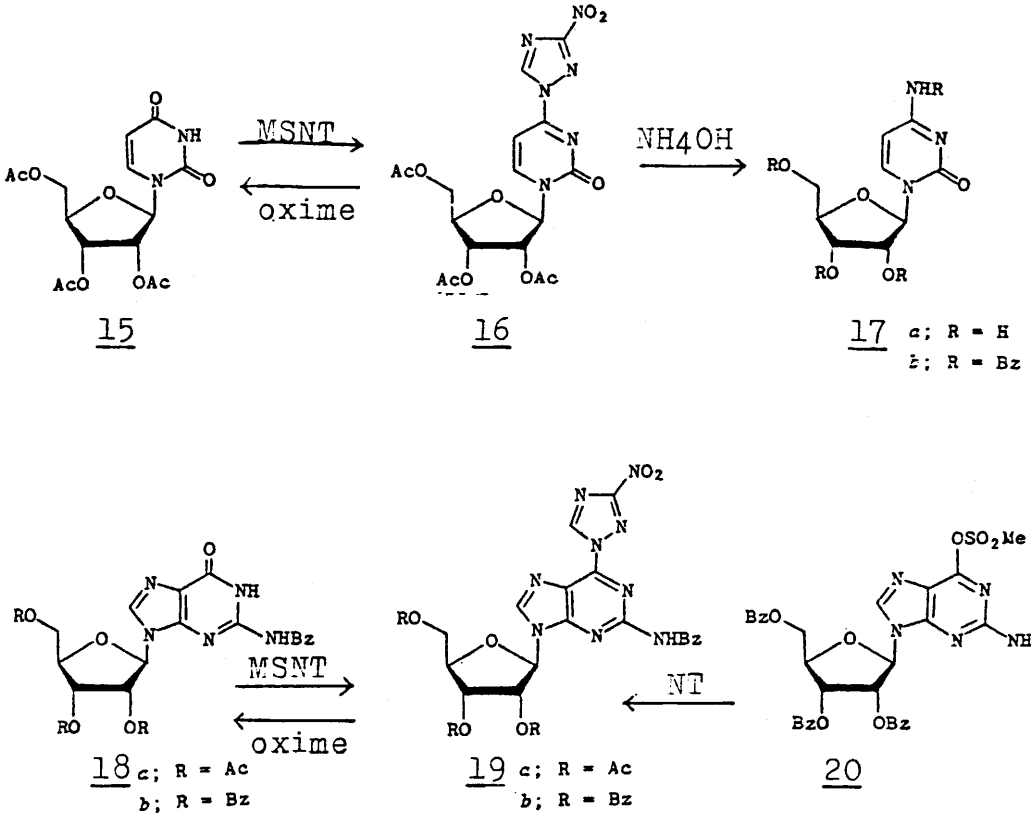


Fig. 1. DEAE-Sephadex chromatography of the products obtained after the complete unblocking [by the procedure indicated in Scheme 4] of the fully-protected UpCpGpUpCpCpApCpCpA. A linear gradient of triethylammonium bicarbonate buffer (pH 7.5) was used.





(i) N^1,N^1,N^3,N^3-Tetramethylguanidinium *syn*-4-nitrobenzaldoximate in dioxan-water (1:1 v/v), 20°C, 18-20 hr;
(ii) aqueous ammonia (*d* 0.88), 20°C, 6 days or 50°C, 24 hr;
(iii) 0.01 *M*-hydrochloric acid (pH 2), 20°C, 6 hr.



にすることにより，各々(16)，(19)の構造を持つことを同定した。

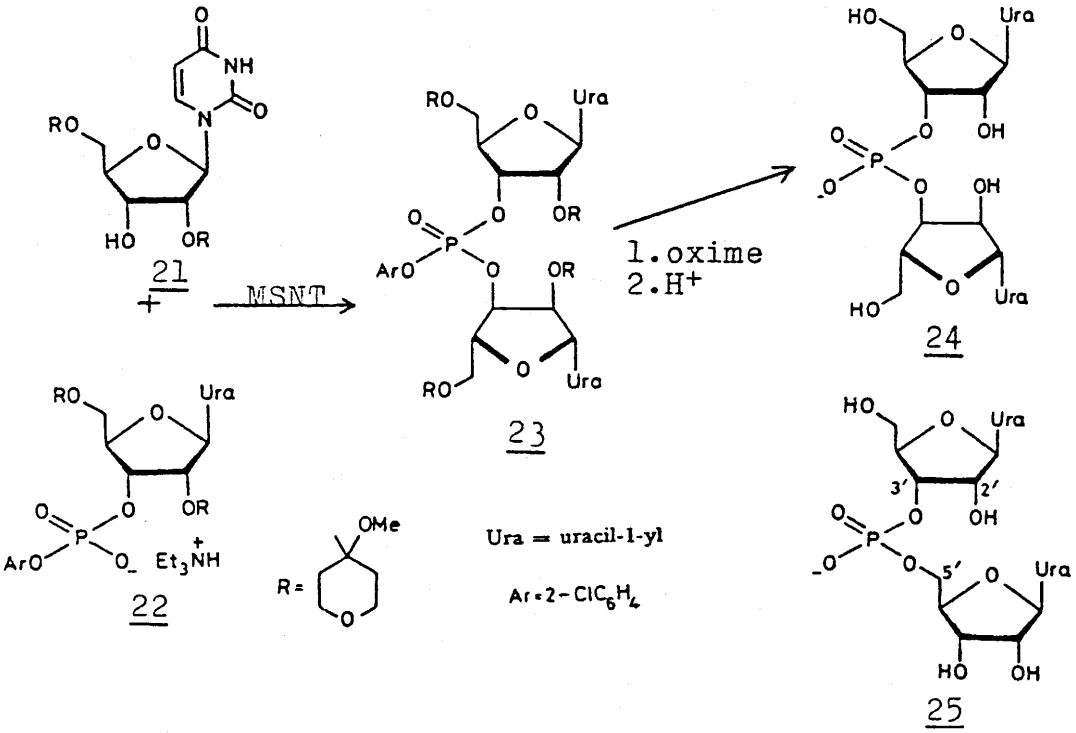
化合物(16)と(19)は，トリエステル法で合成されたオリゴヌクレオチドのリン酸保護基（フェニル誘導体）を脱離するのに用いられる$N^1, N^1_{,} -N^3_{,} N^3$-tetramethylguanidium syn-4-nitrobenzaldoximate でもとの化合物(15)と(18)に戻ることも明らかになった。

デオキシグアノシン誘導体でも同様の反応は起こるが，チミジン誘導体とは，ほとんど反応しないことも判明した。

第四章　Di-uridine 3′-phosphate

筆者はトリエステル法によるオリゴヌクレオチドの合成方法として，3′-(2-chlorophenyl)-phosphate であるモノーまたはダイヌクレオチドと，3′,5′位に遊離の水酸基を持つ2′-O-methoxytetrahydropyranyl ribonucleoside とを縮合させる方法を選んだ。このとき，後者の5′位水酸基が，反応に関与する特異性は，極めて高いけれども，3′→3′結合が混在する可能性も否めない。そこで特殊な3′→3′結合を持つ化合物として，di-uridine 3′-phosphate を合成し，その性質を検討した。

一般に，2′水酸基が保護されたリボヌクレオシド誘導体の3′→3′結合反応は，その立体障害のために反応は極めて遅く，これまで副産物として得られた報告はあるが，それを目的として合成された例はない。



(21)と(22)をMSNT(10)で縮合すると，前章で述べたようにウリジンの塩基部4位にニトロトリアゾール化が起こるこたに，(23)とともに，(23)よりRf値の高い化合物が得られたが，この化合物を0.1m炭酸カリウム水溶液で処理してやると，速かに(23)となり，80%の収率で目的物(23)が得られた。(23)を脱保護して得られた(24)は，高速液体クロマトグラフィーで単一のピークを示した。(24)はuridylyl-(3′-5′)-uridine(25)に比較すると，0.045m炭酸ナトリウム緩衝液(pH10.9)中で容易に水解されてuridineとuridine-2′,3′-cyclic phosphateになることが判った。

結　論

1．酵母アラニン転移リボ核酸3′末端の塩基配列を有するデカリボヌクレオチドを合成した。なお，この合成に使用されたリボヌクレオシド構成単位は，全て新規化合物である。

2．オリゴヌクレオチド合成の縮合剤として使用されている1-(mesitylene-2-sulphonyl)-3-nitro-1,2,4-triazoleによって誘発される副反応，ニトロトリアゾール化を解明した。

3．3′→3′結合をもつdi-uridine 3′-phosphateを合成し，対応する3′→5′結合をもつ化合物と，それらの性質を比較検討した。

引用文献

1) R. Lohrman, D. Söll, H. Hayatsu, E. Ohtsuka and H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc., **88**, 819 (1966)

2) R. L. Letsinger and V. Mahadevan, J. Amer. Chem. Soc., **87**, 3526 (1965)

3) J. B. Chattopadhyaya, C. B. Reese and A. H. Todd, J. Chem. Soc. Chem. (omm., 987 (1979)

4) C. B. Reese, Tetrahedron Report, No 56 (1978)
5) R. C. Titmas, C. B. Reese and L. Yau, Tetrahed. Letts., 2727(1978)

論文の審査結果の要旨

申請者はアラニンtRNAの3′末端デカヌクレオチドの合成のため初めてo-ヂブロモメチルベンゾイル基を用いてモノヌクレオシドを保護し，収率よく当該目的物を合成した。その反応の途次，ウラシルの4位のC=0及びグアニンの6位のC=0基に副反応の起ることを発見し，これが縮合剤のアリルスルホニルによるスルホニル化を経由して，3-ニトロトリアゾールの置換した化合物であることを同定した。又，この副反応の防止の為にはアリルエーテル保護が必用であることを示した。

次にウリヂンの3′燐酸を用いてヂウリヂン3′-燐酸を合成し，このものの安定性が3′→5′結合のものより著しく不安定であることを発見した。

以上の研究は博士号請求に値いするものと認める。