OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	テトラハイドロフラニル保護によるリボオリゴヌクレオチドの合成研究
Author(s)	山根, 明男
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33788
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

【1】

氏名・(本籍)	山根明男
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第6147号
学位授与の日付	昭和58年6月29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	テトラハイドロフラニル保護によるリボ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 冨田 研一　教授 田村 恭光

論文内容の要旨

近年，核酸合成の進歩は著しく，デオキシリボオリゴヌクレオチドではリン酸トリエステル法あるいはホスファイト法による迅速な合成が可能となり，遺伝子工学の発展に大いに貢献している。

しかしながら，リボオリゴヌクレオチドでは，デオキシリボオリゴヌクレオチドに比べてさらに2′−水酸基の保護基が必要であり，現在でも長鎖のリボオリゴヌクレオチドの合成はかなり困難で，分子生物学的あるいは物理化学的要求に十分応えられる方法は確立されていない。そこで，本研究では，リボオリゴヌクレオチド合成の2′−水酸基の保護基としてテトラハイドロフラニル基（Thf基）を導入し，リボオリゴヌクレオチドの迅速かつ容易な合成法を検討した。

テトラハイドロフラニル基は，テトラハイドロピラニル基あるいはメトキシテトラハイドロピラニル基同様酸性で除去可能な保護基であるが，原料のジヒドロフランの入手が容易であり，またそれらの保護基と比較してより緩和な条件で除去可能と期待される。

第一章では，塩基部をアシル基で保護したリボヌクレオシドの2′−水酸基にテトラハイドロフラニル基を導入する方法を検討し，1，3−ジクロル−1，1，3，3−テトライソプロピルジシロキサンを用いて糖部の5′および3′−水酸基を保護する方法により，高収率で2′−O−テトラハイドロフラニルヌクレオシドが得られることがわかった。さらに，この2′−テトラハイドロフラニル誘導体を用いて2種類のトリマーを合成し，テトラハイドロフラニル基が核酸合成の種々の条件で安定で，しかもリン酸ジエステル結合の開裂あるいは異性化を伴うことなく容易に除去できることが明らかになった。なお，リン酸の保護基にはO−クロルフェニル基，縮合剤にはメシチレンスルホニルテトラゾリッドを用いた。

第二章では，さらに長鎖のリボオリゴヌクレオチドを合成するために，ブロック縮合を検討した。一

般に，3′−水酸基は5′−水酸基に比べて反応性が低いことから，5′−水酸基と3′−リン酸ジエステルとの縮合が行なわれているが，今回，3′−水酸基と5′−リン酸ジエステルとの縮合によりpU−U−U−U−U−U を合成した。その結果，5′−水酸基と3′−リン酸ジエステルとの縮合に比べてやや反応性は劣るものの，ほぼ妥当な収率でブロック縮合を行なうことができた。なお，この方法はブロック縮合に際して5′−水酸基の保護基を必要としない点に特徴がある。

さらに，この方法を用いて蛋白合成の開始コドンであるA−U−Gの繰り返えし配列をもつヘキサマーおよびノナマーを合成したが，縮合する3′−水酸基の塩基がグアニンの時は，反応性がかなり低下し，このようなブロック縮合ではグアノシン部分での縮合を避けるように合成を計画しなければならないことがわかった。

第三章では，リボヌクレオシドの3′−水酸基の保護基にテトラハイドロフラニル基を応用し，蛋白合成阻害物質オリゴ2−5Aの合成を行なった。その結果，テトラハイドロフラニル基を2′−水酸基の保護基に用いた時と同様，高収率で目的とする $pA^{2'}p^{5'}A^{2'}p^{5'}A$ を合成することができ，大量合成にも応用できるものと思われる。さらに，$pA^{2'}p^{5'}A^{2'}p^{5'}A$ のイミダゾール法によるTP化反応の副生成物についても検討し，その副生成物の構造に関しては明らかにすることはできなかったが，アンモニア処理することにより目的物に変換できることがわかった。

第四章では，さらに長鎖のリボオリゴヌクレオチドの合成を目的とし，臭化亜鉛による脱ジメトキシトリチル化を検討した。一般に，2′−水酸基の保護基に酸性で除去可能な保護基を用いた場合，5′−水酸基の保護基として同様に酸性で除去されるジメトキシトリチル基を使うことは困難であり，そのような場合，5′−水酸基の保護基には他の条件で除去される保護基が考案されている。しかしながら，ジメトキシトリチル基は核酸合成の5′−水酸基の保護基としてはきわめて有用であり，今回ジメトキシトリチル基とテトラハイドロフラニル基を同時に用いる方法を検討した。その結果，臭化亜鉛のジクロルメタン−イソプロパノール溶液で処理すると，テトラハイドロフラニル基を安定に保ったまま選択的にジメトキシトリチル基を除去できることがわかった。そこで，この方法を用いてブロック縮合の3′末端ユニットを合成し，さらに物理化学的性質を調べる目的でG−G−C−Upを，また $tRNA_f^{Met}$ のアンチコドン部分の変換ユニットとしてX−C−A−Up（X＝A, C, G, UpU）をそれぞれ合成した。また，この方法を蛋白合成の終止コドンU−A−G（アンバー）の繰り返えし配列をもつドデカマーの合成に応用し，迅速かつ高収率で目的物が得られることを示した。

第五章では，本研究の方法でどの程度の長さのリボオリゴヌクレオチドが合成可能かを調べる目的で E coli $tRNA_2^{Gly}$ の5′末端から33番目までのトリトリアコンタマーを合成した。12種類のダイマーあるいはトリマーブロックを合成し，必要に応じて5′−水酸基の保護基であるジメトキシトリチル基を臭化亜鉛処理により除去した。また，ブロックの3′末端のリン酸の保護基にはo−クロルフェニル基とp−アニシド基を用い，p−アニシド基を除去してジエステルとしブロック縮合に用いた。11回のブロック縮合で目的とするトリトリアコンタマーを合成した。脱保護後は，ゲル沪過および逆相の高速液体クロマトグラフィーで精製し，ゲル電気泳動により鎖長を確認すると同時に，二次元クロマトグラフィーによって塩基配列が正しいことを確認した。

以上のように，リボオリゴヌクレオチド合成の2′−水酸基の保護基にテトラハイドロフラニル基を導

入し，従来の方法に比べて大量かつ効率的な合成法を確立した。さらに，この方法を用い，今までに化学合成されたリボオリゴヌクレオチドでは最長のトリトリアコンタマーの合成に成功した。

論文の審査結果の要旨

山根君はリボオリゴヌクレオチドの合成に必須の条件である2′−OH基の保護法を検討し，テトラハイドロフラニル基に着目し，その有効な導入法を見出した。この基によって保護されたモノヌクレオチドを原料として先づ普遍的応用可能なダイマーの合成法を確立した。次にこれを出発点とし，トリマーAUG，UAG等8種類を合成，又G−G−C−UP等のテトラマーの合成にも成功した。この間5′−ジメトキシトリチル基の除去に$ZnBr_2$を無水状態で用うる方法を開発し，テトラヒドロフラニル基との共用を可能にした。これらの方法は更に蛋白質生合成阻害物質（2−5）Aの合成に適用して満足すべき結果を得た。

又，従来法と異る3′−水酸基と5′−リン酸ジエステルとの縮合によるオリゴヌクレオチド合成法を開発し，$(AUG)_3$，$(UAG)_3$ 等のノナマーの合成を行った。更に如上の方法を駆使した大腸菌グリシン $tRNA_2$ の5′側33マーの合成によって，本法の有用性を確証した。以上の研究は博士号請求に妥当なものと認める。