



Title	長鎖リボヌクレオチドの合成研究
Author(s)	松儀, 実広
Citation	大阪大学, 1986, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35133
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【6】

氏名・(本籍)	まつ	ぎ	じつ	ひろ
学 位 の 種 類	松	儀	実	広
学 位 記 番 号	薬	学	博	士
学 位 授 与 の 日 付	第	7 2 4 7	号	
学 位 授 与 の 要 件	昭 和 61 年 3 月 25 日			
	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	長鎖リボ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 枝井雅一郎 教 授 田村 恭光			

論 文 内 容 の 要 旨

核酸は、DNA 及び RNA に大別する事ができその化学合成は、近年大きく進歩した。デオキシリボヌクレオチドの化学合成は、リン酸トリエステル法、ホスファイト法、固相法の導入で迅速かつ容易なものとなった。しかし一方のリボヌクレオチドの化学合成は、2'水酸基の保護基の問題等まだ解決すべき多くの問題が残っている。

現在、目的とするリボヌクレオチドを合成する際には、化学合成と酵素反応を用いる合成の二通りの方法がある。以前当研究室で全合成された大腸菌ホルミルメチオニン tRNA では、あらかじめ短鎖のヌクレオチドを化学的に合成して、それを酵素的に結合する事で完成された。しかし酵素を用いる結合反応はヌクレオチドの三次構造や、結合部位の塩基の種類によって収率が大きく左右され、また反応の規模が限られる等の欠点がある。また化学反応による合成の欠点としては、多大な時間を要する点がある。そこで筆者は、固相法を用いて長鎖リボヌクレオチドの合成が可能になれば、酵素反応の回数も減り、また合成の時間も飛躍的に短縮されるものと考えこれを検討した。2'水酸基、5'水酸基の保護にはそれぞれ、テトラハイドロフラニル基、ジメトキシトリチル基を用いる事とした。第一章では、テトラマー二種 (C-A-U-A) 及び (U-C-A-U) を合成して基礎となる反応条件を検討し、担体にはポリスチレンが適している事、及び臭化亜鉛処理でフラニル基を安定に保ったままテトラマーの合成が容易かつ迅速に行なえる事を示した。第二章では、タンパク質合成開始コドンの繰り返しより成るドデカマー (A-U-G)₄ を固相法で合成した。この章では、固相法で十数鎖長のリボヌクレオチド 合成が可能である事を示し、また合成ブロックとしては、ダイマーブロックが縮合収率の面から見て最も適している事を示した。また固相法の問題としては、精製が困難だという事があげられるが、リボヌクレオチド

の固相合成でも、デオキシリボヌクレオチドの固相法同様、脱保護段階でジメトキシトリチル基を残した状態での精製が非常に有効である事がわかった。第三章では、第一章、第二章で得られた知見を基にして、大腸菌ホルミルメチオニンtRNA変換体のフラグメントとなるノナデカマー、デカマー、ノナマーを固相法で合成した。合成はモノマー及びタイマーブロックを用いて行ない各収率は80%前後と満足のいくものであった。脱保護後、HPLCを用いて精製を行ない、mobility shift analysisでその塩基配列の正しい事を確認した。このノナデカマーは固相法で合成されたものとしては最も長鎖のものである。以上の実験より、十数鎖長のリボヌクレオチドは固相法を用いて迅速に合成でき、その合成時間を大幅に短縮できることがわかった。

リボヌクレオチド合成の第二の問題点としては、修飾塩基の存在があげられる。修飾塩基は、多くはtRNA中に存在するが含まれる量が微量であること、また不安定なものも多い事などから実験の対象にするには困難が伴なう。しかし筆者は、修飾塩基の生体内での役割を知るには、修飾塩基含むリボヌクレオチドの合成が不可欠なものと考え第四章ではこれを検討した。プソイドウリジン、リボシルチミンはtRNA中TψCループと呼ばれる部分にその配列が保存されており、これらの修飾塩基の果たす役割はまだほとんどわかっていない。そこでプソイドウリジン、リボシルチミンを含むトリマー(G-T-ψ)を合成した。プソイドウリジンは、酸性条件下異性化する事が知られているため、できるだけ緩和な条件で合成、脱保護しなければならない。そこでNMR等を用いて脱保護の際の異性化について検討したが、フラン基を除去する際の条件では異性化しない事を見出した。合成、脱保護後のトリマーは、2次元TLC及び360MHz¹H-NMRで同定した。第五章では、この知見をもとに更に長鎖のリボヌクレオチド(24mer)の合成を行なった。長鎖のリボヌクレオチドを合成するには、その反応の確認が問題となるが、筆者は最近生体高分子等の解析に用いられているFAB massを用いて各合成ブロックを同定する事とした。その結果、塩基配列の確認及び修飾塩基に対して付加反応等が起こっていない事を確認する事ができた。合成ブロックは、トリマー及びテトラマーとして、ブロック縮合を行なって更に長鎖のブロックとしていった。合成した完全保護24merは、FAB massで約m/z 13,700に分子イオンピークを認めた事で同定した。なおこの分子量は、今まで質量分析で測定された化合物の中では最も大きいものである。24merは脱保護を行なった後、HPLCで精製して純粋と思われる部分を得た。同定は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動及び2次元TLCによって行なった。この24merは、今まで合成された修飾塩基を含むリボヌクレオチドの中で最長のものである。

論文の審査結果の要旨

同君は前に液相法に用いて成功した2'-O-テトラハイドロフラン基保護法を用い固相法によってオリゴリボヌクレオチドCAUA, UCAU, (AUG)₄等の合成を試み、臭化亜鉛によるトリチル基の脱離及びジヌクレオチド延長法が最適であることを見出した。この方法を用いて修飾塩基リボチミジン及びプソイドウリジンを含むオリゴヌクレオチドの合成に成功した。

ついで大腸菌 tRNA_f^{Met} のフラグメント 9, 10, 19鎖長のオリゴヌクレオチドを合成し、又、上記修飾塩基を含む 14 鎖長のオリゴマーの合成に成功した。

又この合成中間体である完全保護 19-mer の質量分析を行い、このものの塩基配列の決定に役立つことを示した。

以上の成果は博士論文として充分に価値あるものと認める。