



Title	長鎖オリゴヌクレオチドの固相合成に関する研究
Author(s)	岩井, 成憲
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/36703
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

長鎖オリゴヌクレオチドの
固相合成に関する研究

岩井成憲

目 次

緒 論	-----	1
本 論	-----	6
第1章 オリゴヌクレオチド ブロックの固相合成とその応用	-----	6
第1節 ヌクレオチド樹脂の合成	-----	8
第2節 ヘプタマーおよびノナマー ブロックの固相合成	-----	12
第3節 担体上でのブロック縮合	-----	15
第4節 3'- <u>o</u> -クロロフェニル リン酸を有するオリゴデオキシリボ ヌクレオチドの固相合成	-----	20
第2章 リン酸アミデートを用いたオリゴリボヌクレオチドの固相合成	-	24
第1節 ノナマーの合成	-----	25
第2節 オクタデカマーの合成	-----	30
第3章 5'-レプリニルおよび2'-テトラヒドロフラニル保護を用いた ホスホアミダイト法によるオリゴリボヌクレオチドの合成	-----	34
第1節 保護されたヌクレオシドとその3'-ホスホアミダイトの合成	--	36
第2節 2'-テトラヒドロフラニルヌクレオシド 3'-ホスホアミダイトの 担体上でのカップリング	-----	37
第3節 ヒドラジン処理の検討	-----	41
第4節 デカマーの精製	-----	43
第5節 ヘンエイコサマーの合成	-----	46
結 論	-----	49
謝 辞	-----	50

実験の部	51
一般的手法	51
第1章の実験	54
第2章の実験	62
第3章の実験	67
引用文献	74

緒 論

核酸は、糖と塩基から成るヌクレオシドがリン酸ジエステル結合を介して重合した生体高分子である。リボ核酸（RNA）はD-リボフラノースとアデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、ウラシル（U）および他の微量塩基により構成されており、主として蛋白質の生合成に関与している。デオキシリボ核酸（DNA）は2-デオキシ-D-リボフラノースとアデニン、グアニン、シトシン、チミン（T）の4種類の塩基を有しており、遺伝情報の伝達をつかさどる。いずれの場合も相補的な塩基（A-UまたはT、G-C）間に特異的な水素結合（塩基対）を形成するが、糖部2'位の水酸基の有無により化学的性質や生物学的役割が異なっている。

核酸の断片であるオリゴヌクレオチド（RNAの断片はオリゴリボヌクレオチド、DNAの場合はオリゴデオキシリボヌクレオチド）の化学合成に関する研究は1950年代から開始され、合成が容易なオリゴデオキシリボヌクレオチドを中心に研究が進められてきた。一般的には、4種類のヌクレオシドを原料として、塩基部のアミノ基や糖部の反応に関与しない水酸基に保護基を導入した後リン酸化

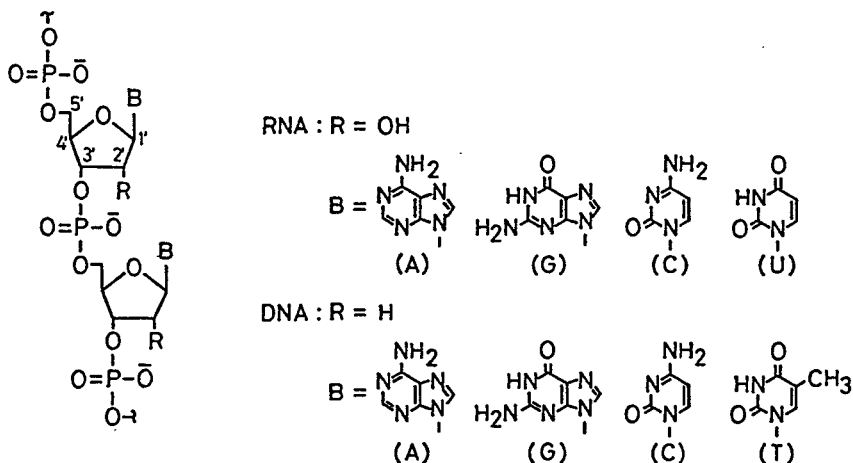


図1 核酸の構造

してヌクレオチドとし、リンを活性化して次のヌクレオシドあるいはヌクレオチドの水酸基との間にリン酸ジエステル結合を形成させることにより合成されるが、リンの活性化についていくつかの方法が開発・改良されてきた。

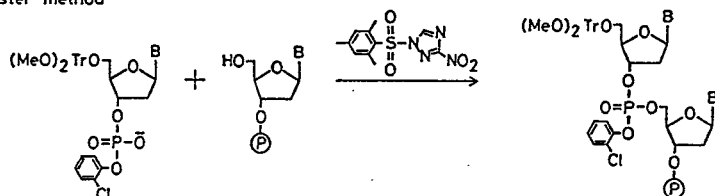
1970年代前半までにKhoranaらは、5'-リン酸モノエステルをジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)等の縮合剤により活性化してヌクレオシドの3'-水酸基と反応させる「リン酸ジエステル法」を確立し、mRNA遺伝子の断片を合成したが¹⁻³、中間体である保護されたオリゴヌクレオチドの精製や所要時間、副反応などの問題点があるため、この方法は現在ではほとんど用いられていない。

1970年代には、ヌクレオチドのリン酸残基にも保護基を導入した3'-リン酸ジエステルを、1-(メシチレン-2-スルホニル)-3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール(MSNT)⁴をはじめとする強力な縮合剤により活性化して5'-水酸基と反応させ、生成したリン酸トリエステルを最後に脱保護してジエステルとする「リン酸トリエステル法」が用いられるようになった⁵。Itakuraらは、この方法を応用して合成したオリゴデオキシリボヌクレオチドを用いてソマトスタチンやインシュリンの遺伝子を構築し、それを大腸菌中で発現させることにより、人工遺伝子による蛋白質の生産に初めて成功した^{6,7}。

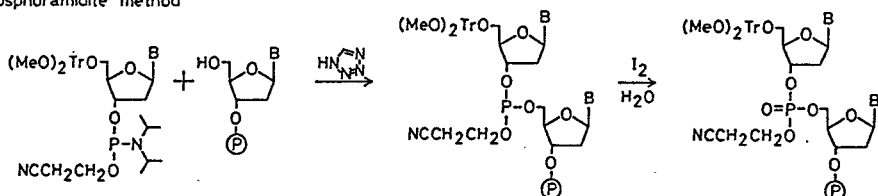
1980年代に入ると、活性な3'-垂リン酸誘導体を5'-水酸基と反応させた後酸化してリン酸トリエステルとする「ホスファイト法」が固相合成に応用された⁸。この方法は短時間のうちに高収率を得ることができるが、結合単位であるヌクレオシド3'-ホスホクロリダイトが非常に不安定であるため、安定なN,N-ジアルキルホスホアミダイトをテトラゾール等で活性化して反応させる「ホスホアミダイト法」が開発された^{9,10}。また最近では、1950年代に用いられていた「H-ホスホネート法」の改良法によるオリゴヌクレオチドの合成も報告されている^{11,12}。

ペプチド合成から導入されたオリゴヌクレオチドの固相合成法は、種々の改良が加えられた結果、1980年代に入って実用化されるようになった¹³⁻¹⁹。この方法は、不溶性担体上に固定したヌクレオシドに対して鎖長伸長反応を繰り返し、目

Phosphotriester method



Phosphoramidite method



H-Phosphonate method

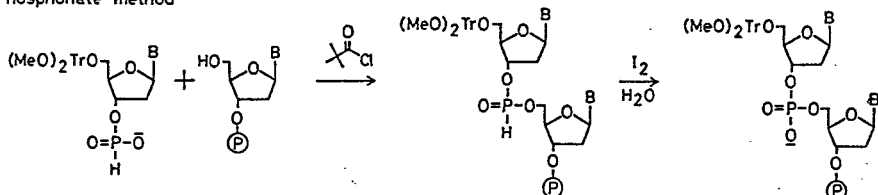


図2 オリゴデオキシリボヌクレオチドの化学合成

的鎖長に達した後担体から切断して脱保護・精製を行うというものであり、操作が単純で極めて迅速な合成が行えるという特徴を持っている。その反面、従来の液相法と比較して最終的な精製が問題となるが、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等の分離精製技術の進歩により、今日ではDNA断片をかなり容易に得ることができるようになっている。化学合成されたDNA断片は遺伝子の構築に用いられるだけでなく、プローブやプライマーとして分子生物学の発展に貢献しており²⁰、特に最近では蛋白質工学においても重要な役割を果たしている²¹。

著者は、リン酸トリエステル法によりヒト成長ホルモン人工遺伝子の断片である鎖長13-26のオリゴデオキシリボヌクレオチド数十本を固相合成したが²²⁻²⁴、縮合単位としてダイマーブロックを用いた場合、収率や精製の問題から26merがほぼ限界であることがわかった。そこで、トリエステル法固相合成によりさらに

長鎖のDNA断片を簡便に合成することを目的として、縮合単位となる保護されたオリゴヌクレオチドブロックの固相合成法を開発し、担体上でのブロック縮合を行った²⁵（第1章）。

一方、オリゴリボヌクレオチドの化学合成は、2'-水酸基の保護の問題からデオキシの場合と比較するとかなり困難である。すなわち、リボヌクレオチドの場合、塩基部アミノ基、5'-水酸基、2'-水酸基およびリンの少なくとも4種類の保護基を用いる必要があり、2'-水酸基の保護基は鎖の伸長のための反応や他の保護基の除去の際に安定でなければならない。特にオリゴデオキシリボヌクレオチドの固相合成法をリボ系に応用するためには、2'-水酸基の保護基をはずすことなく5'-水酸基の保護基（酸で容易に除去でき、発色によりヌクレオチドの結合収率を求めることができる4,4'-ジメトキシトリチル基等のトリチル誘導体が一般的に用いられている）を選択的に除去し、2'-水酸基の保護基は脱保護の最終段階で除去する必要がある。

Ogilvieらは、以前から2'-水酸基の保護基としてフルオリドイオンで除去されるtert-ブチルジメチルシリル基を用いたオリゴリボヌクレオチドの化学合成に関する研究を行っており^{26, 27}、ホスファイト法²⁸や固相合成法²⁹を導入し、最近では自動合成機を用いて³⁰⁻³²かなり長鎖のRNA断片の合成を可能にしている³³。TanakaらはUV照射により除去されるo-ニトロベンジル保護を用い、ホスホアミダイト法やH-ホスホネート法を応用してある程度の長さのオリゴリボヌクレオチドの固相合成に成功している^{34, 35}。

酸により除去されるテトラヒドロピラニル基やメトキシテトラヒドロピラニル（4-メトキシテトラヒドロピラン-4-イル）基等のアセタールやケタールも、2'-水酸基の保護基として用いられてきた^{4, 36-38}。特にテトラヒドロフラニル基³⁹は、除去が容易であるので長鎖オリゴリボヌクレオチドの合成に適していると思われる。しかし、これらの保護基を用いて通常の固相合成を行った場合、5'-水酸基を保護するトリチル誘導体を除去する際に2'位の保護基もある程度はずれてしまう

ために良好な結果は得られず⁴⁰、十数鎖長が合成の限界である⁴¹⁻⁴⁴。

そこで著者は、2'-テトラヒドロフラニル保護を用いた長鎖オリゴリボヌクレオチドの固相合成法を開発することを目的として、鎖長伸長反応中に酸処理を全く含まない方法を検討した。まずリン酸トリエステル法の場合、リン酸-p-アニシデート保護を利用して5'→3'方向に鎖を伸長する方法⁴⁵を応用し、縮合単位としてモノマーを用いてノナマーを、ダイマー ユニットを用いてオクタデカマーを合成した⁴⁶（第2章）。次に、5'-水酸基の保護基としてヒドラジンで除去されるレブリン基を組み合わせ、ホスホアミダイト法により4種類のデカマーとヘンエイコサマーを高収率で合成した^{47, 48}（第3章）。

第1章 オリゴヌクレオチド ブロックの固相合成とその応用

オリゴデオキシリボヌクレオチド*をリン酸トリエステル法により化学合成する場合、以前は液相法が一般的であった。液相法には、ヌクレオチドを1個ずつ縮合して段階的に鎖を伸ばす方法と、末端リン酸に第2の保護基を導入することによりある程度の長さのブロックとし、リン酸の保護基を選択的に除去して縮合を行う改良法（ブロック縮合法）の2通りがある。いずれの場合も、縮合反応後、シリカゲルあるいはアルキル化されたシリカゲルのカラムクロマトグラフィーにより精製を行う必要があるが、鎖長が大きくなるほど分離が困難になり、また、縮合収率も低下することから、合成できるオリゴヌクレオチドは20鎖長以下のものに限定されていた。

1980年代に入ると、固相合成法が改良されて実用的なものになった。この方法では、目的とする鎖長に達するまで担体上で伸長反応が繰り返される。一般的に、トリエステル法によりオリゴデオキシリボヌクレオチドを固相合成する場合には、コハク酸エステルを介して3'位で担体（ポリスチレンやシリカゲル）に結合したヌクレオシド樹脂に対して、次の3つの反応を行うことによりヌクレオチドを1個ずつ（縮合単位としてダイマーを用いると2個ずつ）伸ばすことができる。

- 1) ベンゼンスルホン酸やトリクロロ酢酸、あるいは臭化亜鉛により、5'-水酸基を保護するジメトキシトリチル基を除去する。
- 2) MSNT等の縮合剤を用いて、ヌクレオチドを縮合する。
- 3) アセチル化等により、縮合反応の起こらなかった5'-水酸基をふさぐ。

* 以後、本章では、特に断わりのない限り、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチドはいずれもデオキシリボ体を表す。

いずれの反応も試薬溶液の添加により開始され、濾過・洗浄により停止する。また、伸長途中で精製を全く行わないため、操作が単純で非常に迅速な合成が可能である。さらに、生化学や分子生物学で使用するのに適した量 (μmol スケール) で合成できるので、この方法は広く用いられるようになった。

一方、固相合成法では、縮合反応が起こらなかった短鎖のオリゴヌクレオチドや副反応の起こったものが担体上に蓄積し、それらが目的物と同時に切断されてくるので、最終的な精製が困難である。特にリン酸トリエステル法の縮合収率は90ないし95%であるため、前述の反応サイクルを繰り返すうちにかなりの量の「不純物」が生じてしまう。したがって、目的物を確実に得るためには、縮合回数が10数回程度のもの、すなわち、縮合単位としてモノマーを用いた場合には10数鎖長のオリゴヌクレオチドが合成の限界となる。長鎖のオリゴヌクレオチドを合成するために、モノマーの代わりに保護されたダイマー ユニット (計16種類) をあらかじめ準備しておき、これを縮合単位として用いる方法がある。しかし、その場合でも20~30merが合成の限界である。

著者は、担体上である程度の長さのオリゴヌクレオチド ブロックを用いたブロック縮合を行い、担体上での縮合回数を少なくすれば、さらに長鎖のオリゴヌクレオチドを合成することが可能であると考えた。実際に、著者らは以前にテトラマー ブロックを用いた26merの固相合成を行ったが、ダイマーを用いた同じ鎖長のものと比較すると、精製が非常に容易であった。しかし、4種類のヌクレオシドを用いた場合、トリマーでも計64種類になるので、全種類をあらかじめ準備しておくことは不可能である。また、必要に応じて準備するとしても、液相法と同じくかなりの時間を要する。そこで著者は、保護されたオリゴヌクレオチド ブロックの固相合成法の開発を行った。

1972年にOhtsukaらは、リン酸アミデート樹脂を用いたジエステル法によるリボトリマー ブロックの固相合成を報告している⁴⁹。当時はリン酸ジエステル法が用いられており、固相合成法も導入された直後で実用的ではなかったため、所要時

間、収率、精製法など問題点が多く、それ以後この方法は全く利用されていなかった。以下に述べる方法はこれの改良法ともいえるが、リン酸トリエステル法を応用し、現在の固相合成に適合させることを目的としている。

著者が本研究を行っている途中、Efimovらは著者らと同様の考え方にに基づき、スルホニルエチル基を応用したヌクレオチド樹脂によるテトラマー ブロックの固相合成と、それを用いた長鎖オリゴデオキシリボヌクレオチドの合成を報告している⁵⁰。しかし、そのようなヌクレオチド樹脂は結合部が塩基性条件に対して不安定であり、メルカプトエチル基を応用した改良法も報告されているが⁵¹、一般的な実用化には至っていない。それらと比較すると、著者が用いたリン酸アミデートを応用した方法は、鎖長伸長時に安定であり、高選択的に切断できるため、非常に有用であると考えられる。

第1節 ヌクレオチド樹脂の合成

一般的な固相合成に用いるヌクレオシド樹脂は、ヌクレオシドの3'位がコハク酸エステルを介して担体に固定されている。したがって、鎖長伸長反応を繰り返した後加水分解を行うと、切断されたオリゴヌクレオチドの3'末端は水酸基になり、しかもヌクレオシド間のリン酸の保護基も同時に除去されるため、これを縮合単位として次の反応に用いることはできない。保護されたオリゴヌクレオチドブロックを固相合成するためには、まず、ヌクレオシドと担体との結合部にリン酸トリエステルを入れ、他の保護基がはずれない条件で切断されて3'末端にリン酸ジエステルを生じるような「ヌクレオチド樹脂」を考える必要がある。著者は、亜硝酸イソアミルで除去されるリン酸アミデート保護を応用したヌクレオチド樹脂(6)を設計した。担体としてはヒト成長ホルモン遺伝子の断片を合成した際に良好な結果が得られた1%架橋ポリスチレンを用い、結合部には切断の容易なリン酸-p-アニシデート誘導体を導入することにした。

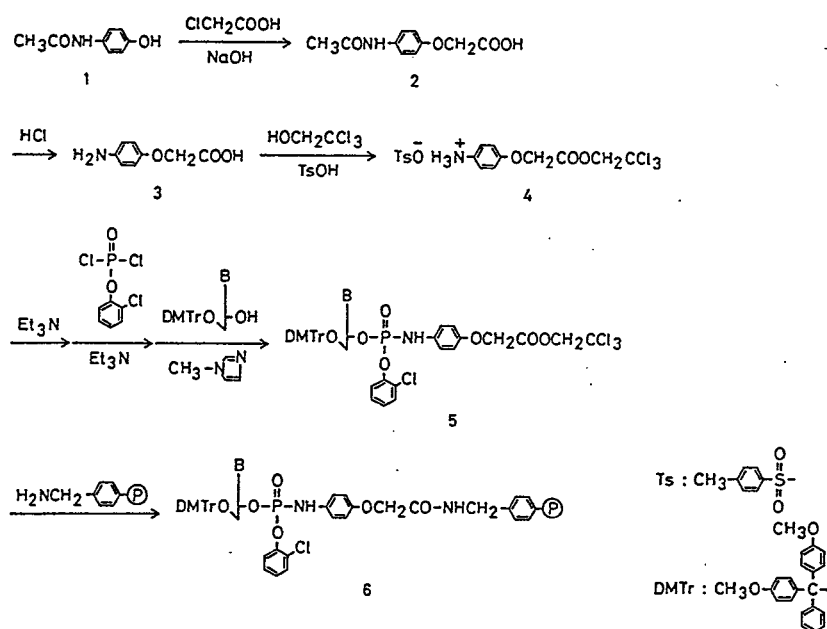


図3 ヌクレオチド樹脂の合成

ヌクレオチド樹脂 (6) は、担体上での副反応をできる限り避けるために、まずヌクレオチド部分の合成を行い、これを完全に精製した後、最後に担体と結合させることにより合成した (図3)。ヌクレオチドと担体との結合は、通常のヌクレオシド樹脂の合成と同様、担体上のアミノ基とヌクレオチド側の活性エステルの反応によるアミドの生成を利用した。そのために必要なカルボキシル基は、中性付近で亜鉛により除去できる2,2,2-トリクロロエチル基⁵²⁻⁵⁴で保護した。当初は、この保護基を選択的に除去した後、ペンタクロロフェノールと縮合することにより活性エステルとする予定であったが、トリクロロエチル エステルもペンタクロロフェニル エステル等と同様に第1級アミンと反応してアミドを生成することがわかったので、完全に保護されたヌクレオチド (5) をアミノメチル化された1%架橋ポリスチレンと反応させることにより6を得た。

ヌクレオチドの担体からの切断を確認するために、チミジン リン酸アミデート

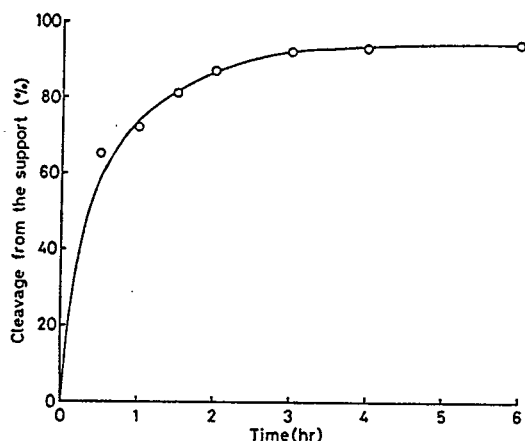


図4 担体からの切断

樹脂 (6, B=T) をピリジン-酢酸 (1:1, v/v) 混液中、亜硝酸イソアミルで処理すると、生成物は TLC および ^1H -NMR で 5'-O-dimethoxytritylthymidine 3'-(*o*-chlorophenyl)phosphate と一致した。また、同樹脂 10mg (ヌクレオチド $3.9\mu\text{mol}$) にピリジン-酢酸 (1:1, v/v) 1.0ml と亜硝酸イソアミル 0.13ml (1 mmol) を加えて 0.5 ないし 6 時間振とうし、担体上に残ったヌクレオチドをジメトキシトリチル基の発色により定量すると、回収率は図4のようになった。以上の結果より、ヌクレオチド樹脂 (6) は約 3 時間の亜硝酸イソアミル処理によりヌクレオチドがほぼ定量的に切断され、目的とする 3'-リン酸ジエステルを与えることが明かとなった。

リン酸-p-アニシデートは液相法によるオリゴヌクレオチドの合成^{55, 56}において良好な結果が得られており、鎖長伸長のための 3 つの反応のうち、脱トリチルと縮合反応については問題がないことがわかっている。しかし、アセチル化による未反応 5'-水酸基のキャッピングは固相合成に特有であるので、この反応に対する安定性については全く調べられていない。そこで、5'-O-dimethoxytritylthymidine 3'-(*o*-chlorophenyl)phosphoro-p-anisidate (7) をピリジンに溶解し、4-ジメチルアミノピリジン (DMAPI) と無水酢酸を加えてキャッピング反

応と同じ条件にすると、7は完全に保護されているにもかかわらず何らかの反応が起こった。続いてベンゼンスルホン酸による脱トリチルを行い、後処理後放置すると2種類の生成物が得られた。TLCでの挙動から、これらの化合物は thymidine 3'-(o-chlorophenyl)phosphate (9) と N-acetyl-p-anisidine (10)

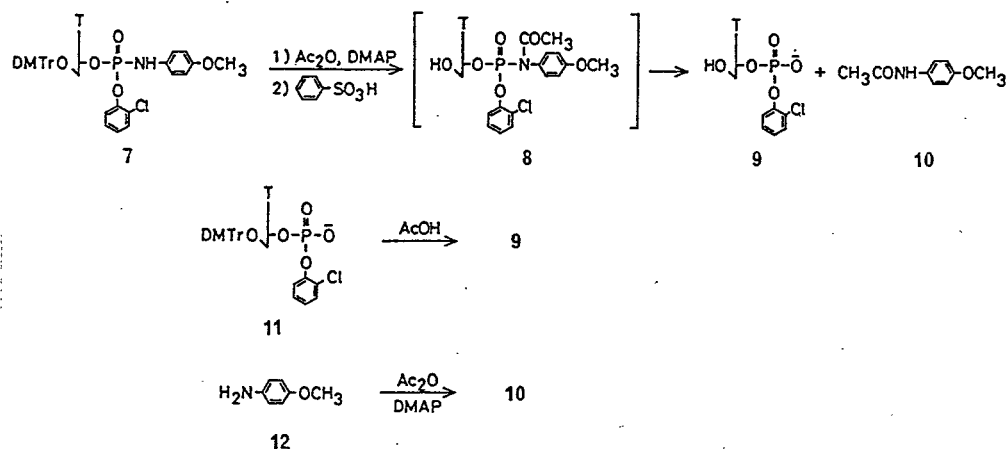


図5 キャッピングによる副反応

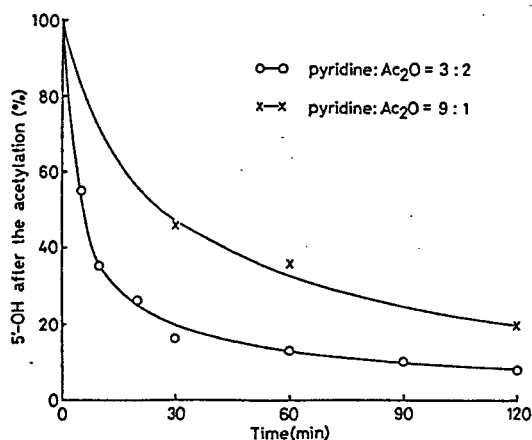


図6 アセチル化条件の検討

ではないかと考え、別途合成したものと比較すると、TLCおよび¹H-NMRで完全に一致した(図5)。すなわち、リン酸-p-アニシデートはキャッピングの条件でアセチル化され、P-N結合が著しく不安定になることがわかった。ただし、この副反応はDMAPを用いなければ起こらなかったのもので、ピリジン-無水酢酸だけのアセチル化によるキャッピングを検討した。一般的なオリゴヌクレオチドの固相合成に用いるヌクレオチド樹脂 20mg (ヌクレオチド 2.5 μmol) を脱トリチル後、ピリジンと無水酢酸を加えて一定時間振とうし、アセチル化されずに残っている5'-水酸基を、モノヌクレオチドの縮合とそれに続く脱トリチルにより定量した(図6)。その結果、ヌクレオチド樹脂(6)を用いたオリゴヌクレオチドブロックの固相合成では、キャッピングの際にピリジン-無水酢酸(3:2, v/v)を使用し、反応時間は1時間とすることにした(表1)。

第2節 ヘプタマーおよびノナマー ブロックの固相合成

前節で合成したヌクレオチド樹脂を用いて、合成ヒト神経成長因子遺伝子⁵⁷のN末端EcoRI断片にHindIIIリンカーをつけたd35mer (dAGCTTCCTCCTCTCACCCGATCTTCCACCGTGGCG) を合成するための縮合単位となる、保護されたオリゴヌクレオチドブロックの固相合成を行った。このd35merをブロックに分割する場合に、準備しなければならないヌクレオチド樹脂の種類を少なくすることと、各ブロックをできるだけ同じ長さにする事を考慮し、3'末端をdCに揃えたヘプタマーとノナマー (dAGCTTCC, dTCCTCTCAC, dCCGATCTTC, dCACCGTGGC) の4つとした(d35merの3'末端のdGは最終的な固相合成の際に担体に結合している)。このうち、最も3'側のノナマー(dCACCGTGGC)は縮合収率をブロック縮合と比較するためにダイマーあるいはモノマーを用いて段階的に伸ばすことにしたので(図9)、固相合成したブロックは3種類のヘプタマーとノナマーである(表2)。

合成の概要は図7に示したとおりである。ガラスフィルターと2方コックのつ

表1 オリゴヌクレオチド ブロックの固相合成のための鎖長伸長操作

ステップ	溶媒・試薬	量	反応時間	回数
1	CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ OH (7:3, v/v)	6 ml	0.1分	3回
2	2% ベンゼンスルホン酸 / CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ OH (7:3, v/v)	6 ml	1 分	1回
3	CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ OH (7:3, v/v)	6 ml	0.1分	1回
4	2% ベンゼンスルホン酸 / CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ OH (7:3, v/v)	6 ml	1 分	1回
5	CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ OH (7:3, v/v)	6 ml	0.1分	1回
6	2% ベンゼンスルホン酸 / CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ OH (7:3, v/v)	6 ml	1 分	1回
7	CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ OH (7:3, v/v)	6 ml	0.1分	2回
8	ピリジン	6 ml	0.1分	3回
9	ピリジン	1 ml	共沸	1回
10	ダイマー ユニット/ピリジン	0.2g/1.5ml	共沸	1回
11	MSNT/ピリジン	0.2g/1.5ml	20分(40°C)	1回
12	ピリジン	6 ml	0.1分	2回
13	ピリジン 無水酢酸	6 ml 4 ml	60分	1回
14	ピリジン	6 ml	0.1分	3回

表2 固相合成したオリゴヌクレオチド ブロックの塩基配列と収率

塩基配列	平均縮合収率	収量 (収率)
dAGCTTCC	90%	68mg (40%)
dTCCTCTCAC	85%	73mg (31%)
dCCGATCTTC	90%	79mg (33%)

いた容量40mlの反応容器を用い、デオキシシチジン リン酸アミデート樹脂 (6, B=bzC) 0.3g (50 μ mol) に対して表1の操作を繰り返した。この伸長操作は通常のオリゴデオキシリボヌクレオチドの固相合成で良好な結果が得られたものを応用しており、縮合単位としてダイマー ユニットを用いた²⁴。ヘプタマーの場合は3サイクル、ノナマーは4サイクル繰り返した後、ピリジン-酢酸 (1:1, v/v) 混液中で亜硝酸イソアミル処理を3時間行い、後処理後、C18 シリカゲルを用いた逆相カラムクロマトグラフィーにより精製した (図8、カラム: C18 シリカゲル (内径1.7cm x 15cm)、溶離液 A: 50% CH₃CN, 0.1M TEAB (200ml)、溶離液 B: 80% CH₃CN, 0.1M TEAB (200ml))。溶出液の溶媒を留去した後、ヘキササン-エーテル (1:1, v/v) を用いた粉末化を行い、ヌクレオチド樹脂からの通算収率31~40%でヘプタマーおよびノナマー ブロックを得た (表2、平均縮合収率はジメトキシトリチル カチオンの定量により求めた)。

第3節 担体上でのブロック縮合

担体上でのブロック縮合によりd35merを合成するために、まず、ヘキサマー ブロック (dACTACC) を用いて縮合条件の検討を行った (表3)。ポリスチレンを担

表3 縮合反応の条件と収率

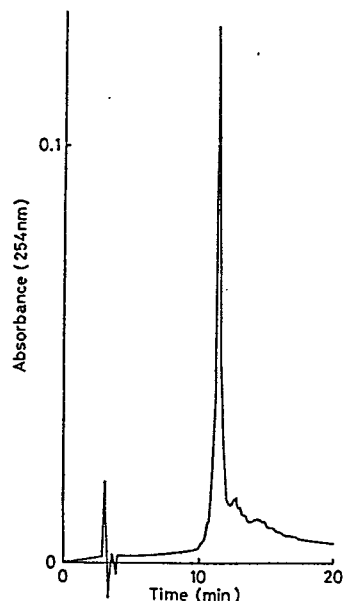
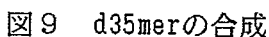
担 体	配 列	反応時間(分)	温度(°C)	収率(%)
ポリスチレン	dTC-G-Ⓟ	20	40	95
	dACTACC-G-Ⓟ	30	40	40
	dACTACC-TCTCTCG-Ⓟ	30	40	24
CPG	dACTACC-G-Ⓟ	30	40	58
	dACTACC-TCTCTCG-Ⓟ	30	40	55
	dACTACC-ATATATG-Ⓟ	60	40	68
	dACTACC-TCTCTCG-Ⓟ	90	28	64

体とするデオキシグアノシン樹脂について、脱トリチル後ダイマー ユニットを縮合し、再び脱トリチルして縮合収率を求めると95%であったが、同じ条件でヘキサマー ブロックを縮合した場合には、反応時間を延ばしても収率は非常に低かった。また、ダイマー ユニットを用いて鎖を伸ばした後ヘキサマー ブロックの縮合を行ったが、収率はさらに低下した。次に、担体としてCPG (controlled pore glass)⁵⁸を用いたものについて同様の実験を行うと、ポリスチレンの場合と比較して収率の向上がみられた。

そこで、CPG担体を用いてd35merの合成を行った。容量 2mlの反応容器中で、デオキシグアノシンの結合したCPG 24mg (1.5 μ mol) について、表4の操作により、まずダイマー ユニットを4回とモノマーを1回縮合し、続いて前節で合成したノナマーおよびヘプタマー ブロックを縮合した(図9)。伸長操作終了後、オキシム処理によりCPGからの切断とリン酸を保護するo-クロロフェニル基の除去を行い、続いてアンモニア水により塩基部アミノ基を脱保護して、C18 シリ

表4 d35merの固相合成のための鎖長伸長操作

ステップ	溶媒・試薬	量	反応時間	回数
1	CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ OH (7:3, v/v)	2 ml	0.1分	3回
2	2% ベンゼンスルホン酸 / CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ OH (7:3, v/v)	2 ml	1 分	1回
3	CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ OH (7:3, v/v)	2 ml	0.1分	1回
4	2% ベンゼンスルホン酸 / CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ OH (7:3, v/v)	2 ml	1 分	1回
5	CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ OH (7:3, v/v)	2 ml	0.1分	2回
6	ピリジン	2 ml	0.1分	3回
7	ピリジン	0.3ml	共沸	1回
8	縮合ユニット/ピリジン	8eq/0.3ml	共沸	1回
9	MSNT/ピリジン	20mg/0.2ml	(モノマー、ダイマー) 20分(40°C) (トリマー、ナマー) 120分(室温)	1回
10	ピリジン	2 ml	0.1分	2回
11	DMAP/ピリジン 無水酢酸	1.8ml 0.2ml	3 分	1回
12	ピリジン	2 ml	0.1分	3回



各100ml

流速：1.0 ml/分

カゲルを用いた逆相カラムクロマトグラフィーにより精製した(図10)。この時、目的とするd35merは5'末端にジメトキシトリチル基を有しているため、その疎水性によって短鎖のオリゴヌクレオチドより遅れて溶出される。このピークの中の1フラクションについて、脱トリチル後、逆相HPLCにより分析すると、図11のように不純物が含まれており、分取により精製した。HPLCで分離された不純物は、各サイクルでの縮合反応を通常室温ならば40分間程度行うところ、ブロック縮合では収率が低くなるので長時間(各2時間)行ったため、縮合剤による塩基部の修飾反応⁵⁹等の副反応が起こったものと考えられる。HPLCで単一ピークに精製したd35merは、Maxam-Gilbert法⁶⁰により塩基配列を確認した。

この結果より、縮合収率の上では、ダイマーとモノマーを5回繰り返した通算が54%で、ノナマーブロックを用いた場合が54%と70%であるので、ブロック縮合が有利であるとはいえない。しかし、d35merが容易に精製できたことから、長鎖オリゴヌクレオチドの合成にはこの方法が有用であると考えられる。

縮合単位の鎖長と収率の関係を詳細に調べるために、種々の長さのオリゴチミジル酸ブロックを用いて担体上での縮合を行った(図12)。まず、デオキシグアノシンの結合したCPG 33mg (0.9 μ mol)について、脱トリチルとピリジン共沸を行った後、ピリジン 150 μ l中オリゴチミジル酸 10 μ molとMSNT 15mg (50

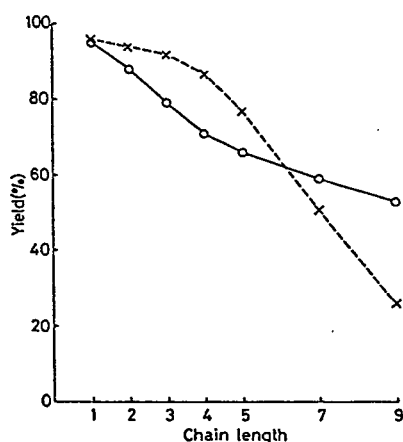


図12 縮合単位の鎖長による収率の変化
担体としてCPG(O)と1%架橋ポリスチレン(X)を用いた。

μmol)を加えて 40°C で20分間反応させ、再度脱トリチルして縮合収率を求めると、ブロックの鎖長が大きくなるほど縮合収率が徐々に低下することが明らかとなった。担体として1%架橋ポリスチレンを用いた場合には、ペンタマー以上で縮合収率が著しく低下した。ノナマー ブロックについて、反応時間を延ばしたり、大孔径($1400\text{ \AA}$ 、これまでの実験に用いたものは $500\text{ \AA}$)のCPGや長鎖アルキルアミンリンカーのついたCPGを用いて縮合を行ったが、収率の向上はみられなかった。

第4節 3'-q-クロロフェニル リン酸を有する オリゴデオキシリボヌクレオチドの固相合成

16のようなオリゴヌクレオチド ブロックの脱保護を行うと、3'末端のリン酸はすでにジエステルになっているためにこのq-クロロフェニル基だけが除去されず、3'-q-クロロフェニル リン酸を有するオリゴヌクレオチド^{45, 51}を得ることができる。そのようなオリゴヌクレオチドを鋳型DNAに結合させると、DNAポリメラーゼIのKlenow fragmentによるプライマーからの鎖の伸長を停止させることができ、自らはプライマー活性を持たないため、プライマーと組み合わせて用いることによってある一定領域だけの2本鎖DNAを取り出すことが可能である(このオリゴヌクレオチドをプライマーに対する「ストッパー」と呼ぶ)。著者は、本章第1節のヌクレオチド樹脂(6)を用いて、B型肝炎ウイルス表面抗原遺伝子を分割するためのストッパー⁶¹となる、3'-q-クロロフェニル リン酸を有するd16mer (dATGGAGAACAACATp)の固相合成を行った。

チミジン リン酸アミデート樹脂(6, B=T) 52mg ($7\mu\text{mol}$)に対して、表5の操作によりダイマーを7回とモノマーを1回縮合し(平均縮合収率: 89%)、亜硝酸イソアミル処理により担体から切断したヘキサデカマー ブロックを逆相カラムクロマトグラフィーにより精製した(図13)。続いて、オキシム処理により3'末端以外のq-クロロフェニル基、アンモニア水により塩基部のアシル基、酢酸に

表5 3'-o-クロロフェニル リン酸を有するdl6merの合成のための鎖長伸長操作

ステップ	溶媒・試薬	量	反応時間	回数
1	CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ OH (7:3, v/v)	2 ml	0.1分	3回
2	2% ベンゼンスルホン酸 / CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ OH (7:3, v/v)	2 ml	1 分	1回
3	CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ OH (7:3, v/v)	2 ml	0.1分	1回
4	2% ベンゼンスルホン酸 / CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ OH (7:3, v/v)	2 ml	1 分	1回
5	CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ OH (7:3, v/v)	2 ml	0.1分	2回
6	ピリジン	2 ml	0.1分	3回
7	ピリジン	0.3ml	共沸	1回
8	ダイマー ユニット/ピリジン (またはモノマー/ピリジン)	30mg/0.3ml (20mg/0.3ml)	共沸	1回
9	MSNT/ピリジン	30mg/0.3ml	20分(40°C)	1回
10	ピリジン	2 ml	0.1分	2回
11	ピリジン 無水酢酸	1.2ml 0.8ml	60分	1回
12	ピリジン	2 ml	0.1分	3回

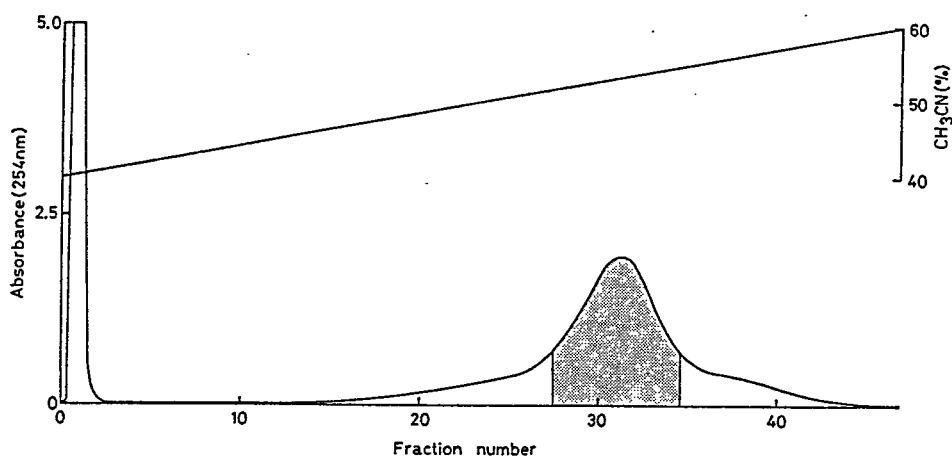


図13 ヘキサデカマー ブロックの精製

カラム: C18 シリカゲル (内径0.7cm x 11cm)

溶離液 A: 40% CH₃CN, 50mM TEAB (200ml)

B: 70% CH₃CN, 50mM TEAB (200ml)

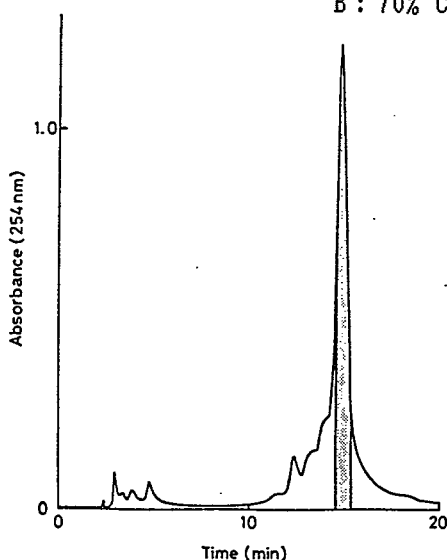


図14 3'-o-クロロフェニル リン酸を有するd16merの精製

カラム: Nucleosil 5C18

(内径4.6mm x 30cm)

溶離液 A: 5% CH₃CN, 0.1M TEAA

B: 25% CH₃CN, 0.1M TEAA

グラジエント B: 50→70% (20分)

流速: 1.0 ml/分

より5'末端のジメトキシトリチル基を順に除去し、最後に逆相HPLC (図14) で分取することにより、目的とするd16merを得た。生成物の塩基配列は、5'末端を³²PでラベルしてヌクレアーゼP1で限定分解した後、2次元ホモクロマトグラフィ⁶²により調べた (図15)。また、蛇毒ホスホジエステラーゼによる分解

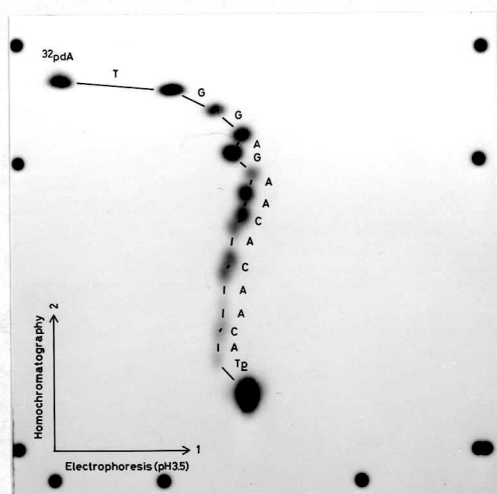


図15 3'-o-クロロフェニル リン酸を有するd16merの配列分析

の程度が小さかったことと、図15の上から15番目と16番目のスポットの間に負電荷2個分の移動度の違いがあることから、3'末端にo-クロロフェニル リン酸が残っていることが確認された。

ヌクレオチド樹脂(6)を用いて鎖長伸長を行い、まず担体上でo-クロロフェニル基を除去し、続いて亜硝酸イソアミル処理により切断した後脱保護すれば、完全に脱保護された3'-リン酸を有するオリゴヌクレオチドを合成することも可能である⁵¹。

第2章 リン酸アミデートを用いたオリゴリボヌクレオチドの固相合成

2'-水酸基の保護基としてtert-ブチルジメチルシリル基²⁹⁻³³やp-ニトロベンジル基^{34, 35}を用いてオリゴリボヌクレオチドを固相合成する場合には、オリゴデオキシリボヌクレオチドの固相合成法をそのまま応用することができる。それに対して、酸に不安定なアセタールやケタールを用いた場合には、5'-トリチル誘導体を除去する際に2'位の保護基の一部がはずれてしまう⁴⁰。特に担体に近いヌクレオチドの保護基は、鎖長伸長のための反応サイクルを繰り返すうちにほとんどはずれることになる。2'-水酸基が保護されていないオリゴヌクレオチドを用いると、この水酸基にヌクレオチドが縮合されて2'-3'結合を有する側鎖が生じる可能性があり、縮合反応が起こらなかった場合には、脱保護時に2', 3'-環状リン酸を経由して鎖の切断が起こる⁶³。そのために、2'-水酸基の保護基としてアセタールやケタールを用いたオリゴリボヌクレオチドの固相合成はほとんど行われていなかった。

著者は、2'-水酸基の保護基としてテトラヒドロフラニル基を用いたオリゴリボヌクレオチドの固相合成法の開発を行った。この保護基は水酸基の保護に一般的に用いられるテトラヒドロピラニル基より容易に除去できる⁶⁴ため、特に長鎖オリゴリボヌクレオチドの合成に有用であると考えられ、液相法ではr33merの合成に応用されている³⁹。これを固相合成に用いるためには、鎖長伸長反応の中に酸処理を全く含まない方法を考える必要がある。一つの手段として、臭化亜鉛による5'-ジメトキシトリチル基の除去^{65, 66}を応用したオリゴリボヌクレオチドの固相合成が報告されているが^{41, 42}、収率が低く、長鎖のものは得られていない。その原因として、水分の混入により酸性になったことや、担体上のオリゴヌクレオチドに結合した亜鉛が除去できなかったことなどが考えられる。そこで著者は、5'-ジメトキシトリチル保護を用いないことを前提とし、まず、リン酸アミデートを用いた5'→3'方向の固相合成法⁴⁵を応用したトリエステル法によるオリゴリボ

ヌクレオチドの固相合成を行った。この方法は、5'位で担体に結合したヌクレオシド 3'-リン酸-p-アニシデートに対して、亜硝酸イソアミル処理によるリンの脱保護とそれに続くヌクレオチドの5'-水酸基との縮合を繰り返すことにより、5'→3'方向に鎖を伸長するものである。リン酸-p-アニシデートは液相法において酸に不安定なジメトキシトリチル基やテトラヒドロフラニル基と組み合わせて用いられており^{39, 55, 56}、亜硝酸イソアミルにより他の保護基を損なうことなく選択的に脱保護することが可能である。

第1節 ノナマーの合成

5'→3'方向に鎖を伸ばすためには、5'-水酸基を保護していない4種類のモノヌクレオチド ユニット (N-acyl-2'-O-tetrahydrofuranylnucleoside 3'-(o-chlorophenyl)phosphoro-p-anisidate, 21) を準備する必要がある。そのために、まず塩基部アミノ基を保護したヌクレオシドの5'および3'-水酸基を1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサン-1,3-ジイル (TIPDS) 基⁶⁷で保護した後、2'-水酸基をテトラヒドロフラニル化し、5',3'-水酸基を脱保護した。2'-テトラヒドロフラニル ヌクレオシド (19) は、この保護基が不斉炭素有するため2種類の異性体を生じるが、シリカゲル カラムクロマトグラフィーにより分離して、各異性体を個別に使用した。次に、19について5'-ジメトキシトリチル化と3'-リン酸化を行い、最後に臭化亜鉛によりジメトキシトリチル基を除去することにより21を得た (図16)。さらに、21を5'-コハク酸エステルとしてアミノメチル化された1%架橋ポリスチレンに結合させることにより、ヌクレオチド樹脂 (23) とした。

これらを用いて、mRNAのスプライシングの研究^{68, 69}に用いるための5'-スプライス部位⁷⁰に関連した塩基配列を含む2本のr9mer (GUAAGUAUC, GUUGGUAUC) の固相合成を行った (図17)。グアニン ヌクレオチド樹脂 (23, B=ibG) 24mg (5 μmol) について、容量2 mlの反応容器中で、表6の操作を8回繰り返した。亜

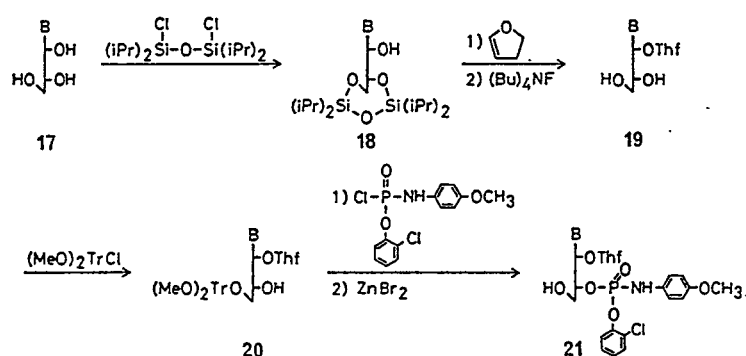


図16 モノマー ユニットの合成

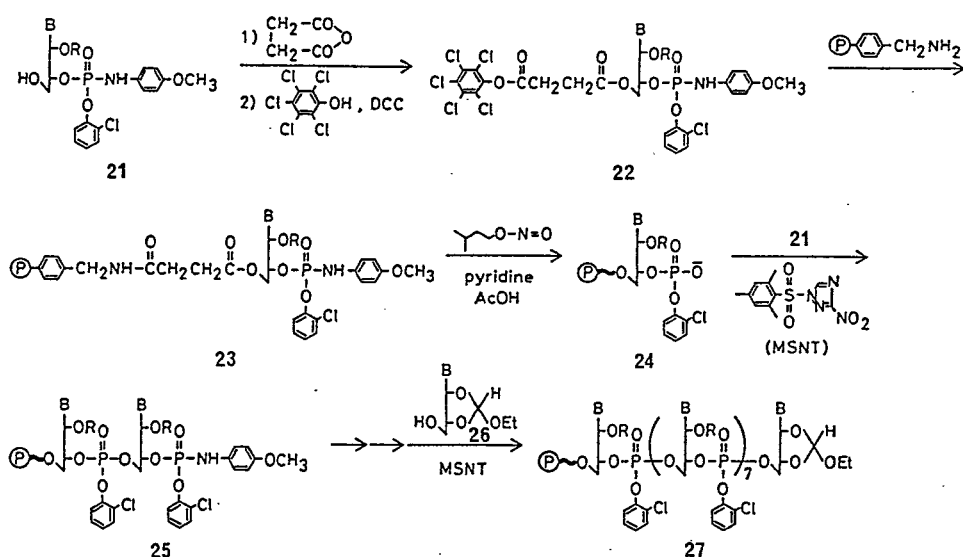


図17 r9merの固相合成



硝酸イソamil処理は2.5時間とし、その後の洗浄操作は臭化亜鉛による脱トリチルで用いられているもの¹⁵を応用した。また、3'→5'方向に伸長する場合の5'-アセチル化の代わりに、メタノールと縮合することにより未反応リン酸ジエステルのキャッピングを行った。最後の縮合には2',3'-水酸基をエトキシメチレンで保護したヌクレオシド(26)^{4,71}を用い、伸長操作終了後、オキシム処理により担

表6 オリゴリボヌクレオチドの5'→3'方向の固相合成のための鎖長伸長操作

ステップ	溶媒・試薬	量	反応時間	回数
1	ピリジン-酢酸 (1:1, v/v)	2 ml	0.1分	2回
2	亜硝酸イソアミル	0.3ml	150分	1回
	ピリジン-酢酸 (1:1, v/v)	1.5ml		
3	ピリジン	2 ml	0.1分	3回
4	0.5M TEAA / DMF	2 ml	0.1分	3回
5	ジクロロメタン	2 ml	0.1分	3回
6	エーテル	2 ml	0.1分	3回
7	テトラヒドロフラン	2 ml	0.1分	3回
8	ピリジン	2 ml	0.1分	3回
9	ピリジン	0.3ml	共沸	1回
10	縮合ユニット/ピリジン	4eq/0.3ml	共沸	1回
11	MSNT/ピリジン	22mg/0.3ml	30分(40°C)	1回
12	MSNT/メタノール- ピリジン (1:9, v/v)	22mg/0.3ml	10分	1回
13	ピリジン	2 ml	0.1分	3回

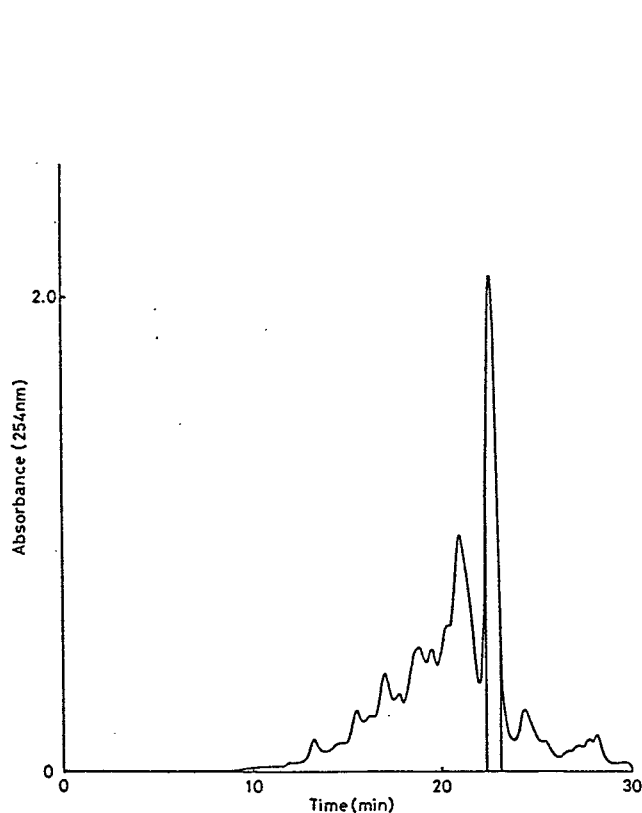


図18 イオン交換HPLCによる
r9mer (GUAAGUAUC) の精製

カラム: TSK gel DEAE-2SW
(内径7.8mm x 30cm)

溶離液 A: 20% CH₃CN

B: 1M HCOONH₄, 20% CH₃CN

グラジエント B: 40→70% (20分)

流速: 2.0 ml/分

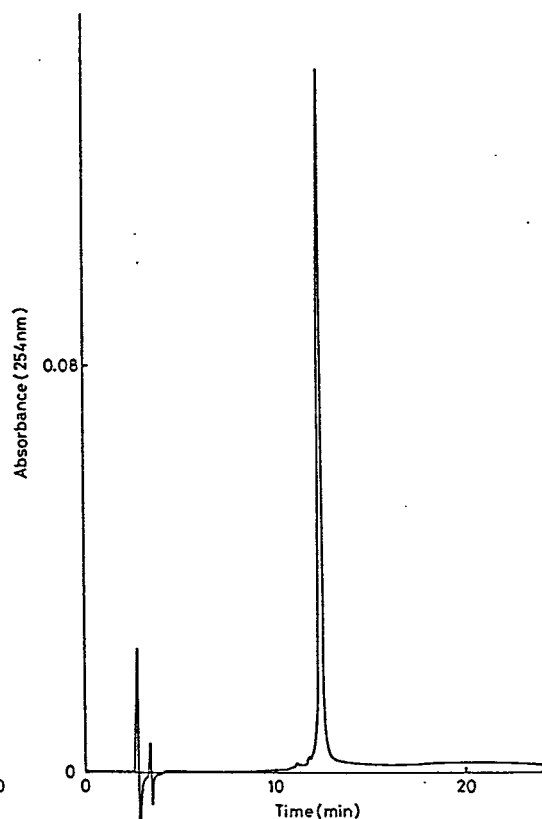


図19 逆相HPLCによる精製された
r9mer (GUAAGUAUC) の分析

カラム: TSK gel ODS-80T_M
(内径4.6mm x 25cm)

溶離液 A: 5% CH₃CN, 0.1M TEAA

B: 25% CH₃CN, 0.1M TEAA

グラジエント B: 10→50% (20分)

流速: 1.0 ml/分

体からの切断とリン酸を保護する α -クロロフェニル基の除去を行い、続いてアンモニア水により塩基部アミノ基を脱保護して、塩酸（pH2.0、3時間）によりエトキシメチレンとテトラヒドロフラン基を除去した。

この方法により合成したオリゴリボヌクレオチドには前章で用いたジメトキシトリチル基の疎水性を利用した精製法を応用することができず、逆相HPLCでは目的物のピークを判別することが困難となる場合があるので、陰イオン交換HPLCによる精製を行った。完全に脱保護した混合物をSephadex G-25のカラムを用いたゲルろ過により脱塩した後、イオン交換HPLCにより分析すると、図18のように、目的物と考えられるピークが短鎖のオリゴヌクレオチドから分離された。この部分を分取し、再度ゲルろ過により脱塩して、逆相HPLCで単一ピークのr9merが得られた（図19）。2本のr9merの各々についていずれも全量の3/10を分取し、約4 A₂₆₀ ユニットの純粋なものを得た。ヌクレオチド樹脂(23)からの通算収率は約3%であった。生成物の塩基配列は、5'末端を³²Pでラベルして蛇毒ホスホジエステラーゼで限定分解した後、2次元ホモクロマトグラフィーにより確認した（図20）。

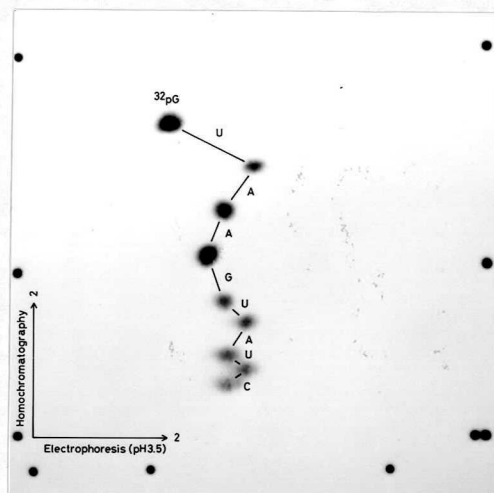


図20 r9merの配列分析

第2節 オクタデカマーの合成

この合成法により長鎖のオリゴリボヌクレオチドを合成するために、縮合単位としてダイマー ユニットを用いることにした。保護されたヌクレオシド 3'-リン酸ジエステル (28) を5'および3'-水酸基を保護していないヌクレオシド (19) と縮合し、リン酸化後脱トリチルすることにより5種類のダイマー ユニット (30, CU, UU, UC, CC, AG) を得た。また、3'-リン酸ジエステルとしたダイマー (31) を2',3'-エトキシメチレン ヌクレオシド (26) と縮合して脱トリチルすることにより、3'末端トリマー (32, GAU) とした (図21)。

これらの縮合単位を用いて、3'-スプライス部位^{7,8}に関連した塩基配列を含む r18mer (UCUUUCUUCUCCAGGAU) の固相合成を行った。表6の操作によりダイマー

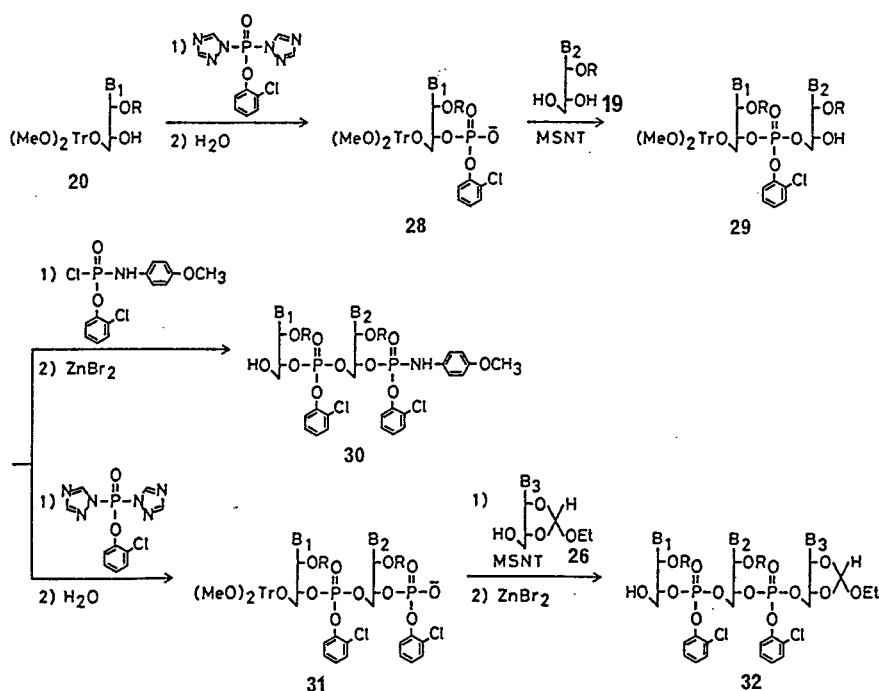


図21 ダイマー ユニットの合成

ユニットを7回と3'末端トリマーユニットを縮合した後、前節のr9merの場合と同様の脱保護・精製を行った。テトラヒドロフラニル基を除去するための酸処理について、5時間行ったものと10時間のものを比較したが、HPLCによる分析では全く変化がなかったため、5時間以内に完全に除去されたと考えられる。イオン交換HPLCによる精製（図22）では不純物が多く分離が不十分であった

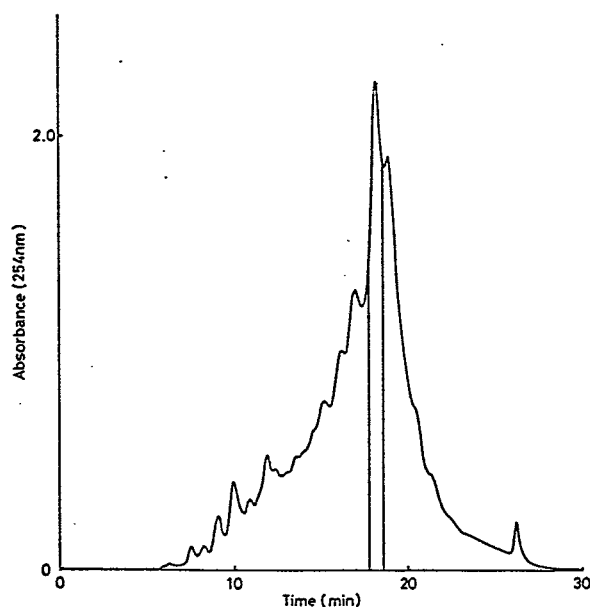


図22 イオン交換HPLCによる
r18merの精製

カラム：TSK gel DEAE-2SW

（内径7.8mm x 30cm）

溶離液 A：20% CH₃CN

B：1M HCOONH₄, 20% CH₃CN

グラジエント B：50→80%（20分）

流速：2.0 ml/分

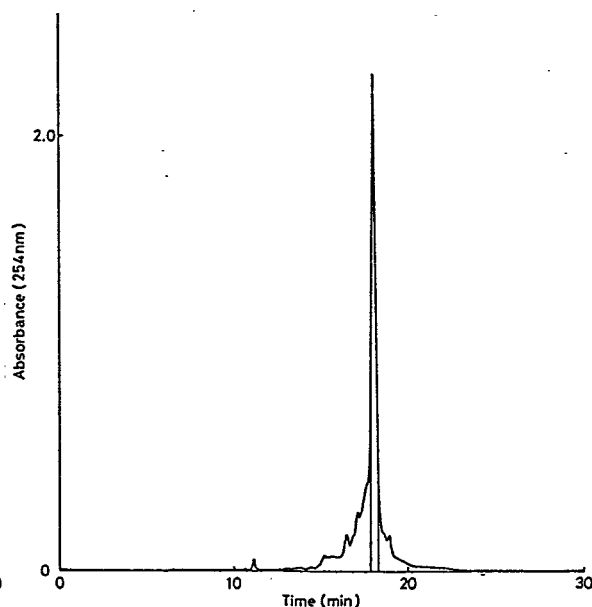


図23 逆相HPLCによる
r18merの精製

カラム：YMC A-324

（内径10mm x 30cm）

溶離液 A：5% CH₃CN, 0.1M TEAA

B：25% CH₃CN, 0.1M TEAA

グラジエント B：20→40%（20分）

流速：2.0 ml/分

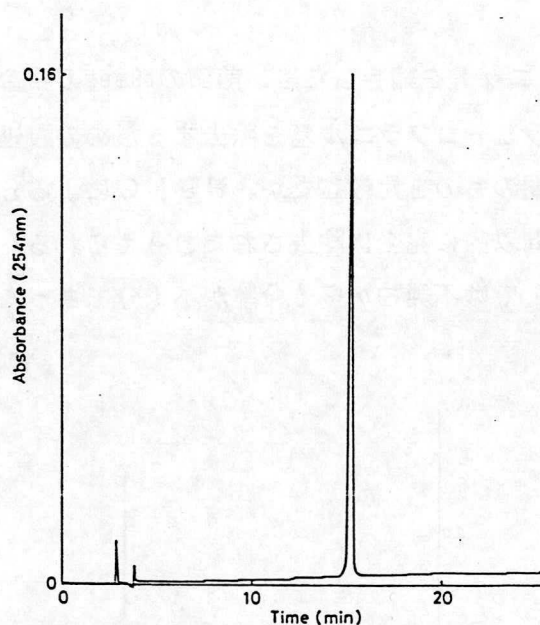


図24 逆相HPLCによる

精製されたr18merの分析

カラム：TSK gel ODS-80T_M

(内径4.6mm x 25cm)

溶離液 A：5% CH₃CN, 0.1M TEAA

B：25% CH₃CN, 0.1M TEAA

グラジエント B：10→50% (20分)

流速：1.0 ml/分

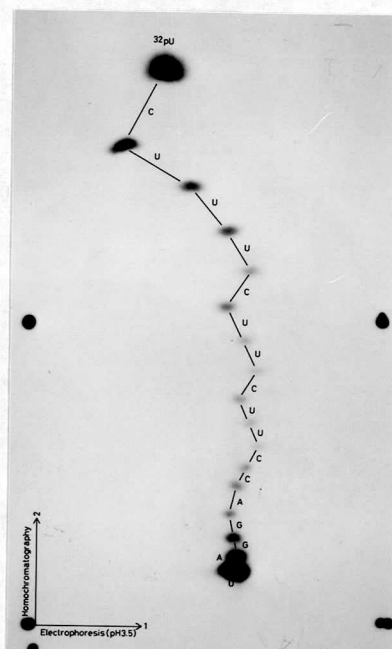


図25 r18merの配列分析

め、分取・脱塩後、さらに逆相HPLCにより精製して（図23）、単一ピークのr18merを得た（図24）。この場合には全量の1/5を精製することにより2.5A₂₆₀ユニットを得たので、通算収率は1.4%であった。塩基配列もr9merと同様の方法により分析したが（図25）、3'末端の2つのスポットの分離が不十分であったので、さらに限定分解物の20%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行うことにより鎖長を確認した。

以上の結果より、リン酸アミデートを用いた5'→3'方向の固相合成によって9ヌクレオチド程度の鎖長を有するオリゴリボヌクレオチドは容易に合成でき、HPLCで1回分取するだけで純粋なものが得られることがわかった。通算収率は約3%とあまり高くなかったが、その原因として、リン酸トリエステル法を用いていることと、担体上でリン酸ジエステルの活性化を行わなければならないことによる縮合収率の低下が挙げられる。また、一般的にリボヌクレオチドの縮合収率がデオキシリボ体ほど高くないため、同様の方法によるオリゴデオキシリボヌクレオチドの合成⁴⁵と比較しても低収率であった。r18merの合成では、長鎖である上に不純物が多く、イオン交換HPLCにより目的物のピークが分離されなかったため、この方法を用いてさらに長鎖のオリゴリボヌクレオチドを合成することは困難であると考えられる。

第3章 5'-レブリニルおよび2'-テトラヒドロフラニル保護を用いた ホスホアミダイト法によるオリゴリボヌクレオチドの合成

2'-テトラヒドロフラニル保護を用いてさらに長鎖のオリゴリボヌクレオチドを固相合成するためには、縮合収率を高くする必要がある。しかし、前章のようなリン酸トリエステル法では、最近報告されているいくつかの改良法⁷²⁻⁷⁴を用いてもある程度限界があるため、高収率を期待できるホスファイト法や長鎖オリゴデオキシリボヌクレオチドの合成に成功しているH-ホスホネート法の応用を検討した。

これらの方法を5'→3'方向の固相合成に応用する場合には、結合ユニットにあらかじめホスファイトやH-ホスホネートを入れておくことはできない（これらのリンは保護されていないので活性化される）ため、3'-水酸基の選択的脱保護、担体上でのホスファイト化あるいはH-ホスホネート化、および3'-水酸基を保護したヌクレオシドの結合を行わなければならない。著者は、3'-水酸基の保護基としてヒドラジンにより除去できるレブリニル基⁷⁵を用いた5'→3'方向の固相合成を試みた（図26）。レブリニル基はヌクレオシドの3'-水酸基²⁷や5'-水酸基³⁷の保護に用いられており、2'-テトラヒドロフラニル保護と組み合わせることが可能であると考えられる。まず、CPGに結合した4-N-benzoyl-3'-O-levulinyl-2'-O-tetrahydrofuranylcytidine (33, B=bzC) をピリジン-酢酸 (3:2, v/v) 中0.5M ヒドラジン 1 水和物で10分間処理した後、methyl phosphoroditrazolidite⁷⁶ (methyl phosphorodichloriditeを用いても同じ結果が得られた) によりホスファイト化、あるいはphosphorus tritriazoliditeとの反応と加水分解によりH-ホス

* リン酸トリエステル法では縮合 (condensation) と呼ぶが、ホスファイト法およびH-ホスホネート法では酸化を要するため結合 (coupling) という表現を用いる。

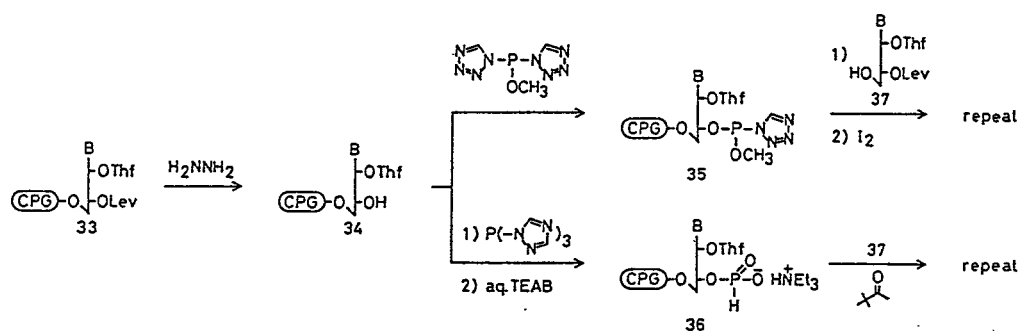


図26 5'→3'方向のホスファイト法およびH-ホスホネート法によるオリゴリボヌクレオチドの固相合成の検討

ホネート化¹¹した。次に、3'-ホスファイトは加水分解してH-ホスホネートとした後、両方についてCPGからの切断と脱保護を行い、逆相HPLCにより分析すると、3'-水酸基にリンが入っていないシチジンが10%以上残っていた。また、ホスファイト法を用いた場合には、副生成物と考えられるピークもいくつか検出された。後述のようにヒドラジン処理を10分間行くとレブリニル基はほとんど完全に除去されるので、このような方法では、3'-水酸基を完全にホスファイト化あるいはH-ホスホネート化することができず、したがって、高収率で鎖を伸ばすことは不可能であることが明かとなった。Caruthersらは、担体上での3'-水酸基のホスホアミダイト化と、5'および3'-無保護ヌクレオシドの結合・酸化を繰り返すことによりr15merの合成を行っているが⁷⁷、良い結果は得られていないようである。

そこで著者は、レブリニル基を5'-水酸基の保護に用いて、ホスホアミダイト法による3'→5'方向への固相合成を行った。5'-レブリニル保護を用い、リン酸トリエステル法によりトリマー(AAG)を4回縮合してr13mer(AAGAAGAAGAAGA)の合成が行われているが⁷⁸、それ以外にこの保護基を用いた固相合成は報告されていない。そのため、担体上でのレブリニル基の除去のための反応条件や、その際の副反応についても検討を行った。

第1節 保護されたヌクレオシドとその3'-ホスホアミダイトの合成

原料となる保護されたヌクレオシド (*N*-acyl-5'-O-levulinyl-2'-O-tetrahydrofuranylnucleoside, **38**) は、2'-テトラヒドロフランル ヌクレオシド (**19**) を 2-chloro-1-methylpyridinium iodide を用いてレブリン酸と反応させることにより合成した³⁷。この反応は5'-水酸基に選択的であると報告されているが、3'-水酸基にもレブリン化が起こった。5',3'-ジレブリン体はシリカゲル カラムクロマトグラフィーにより除去できたが、3'-レブリン体は分離が困難であったので、5'-水酸基をジメトキシトリチル化した後、逆相カラムクロマトグラフィーにより精製して**38**を得た。

ホスホアミダイト法によりオリゴデオキシリボヌクレオチドを合成する場合、*N,N*-ジイソプロピルアミダイトを用いることにより最も良好な結果が得られている¹⁰。また、リンの保護基としてメチル基³⁻¹⁰とβ-シアノエチル基^{7,9}のいずれかが用いられているが、メチル保護体の安定性の問題³⁰や脱保護時の副反応³¹について報告があるほか、シアノエチル基はアンモニア水により担体からの切断と同

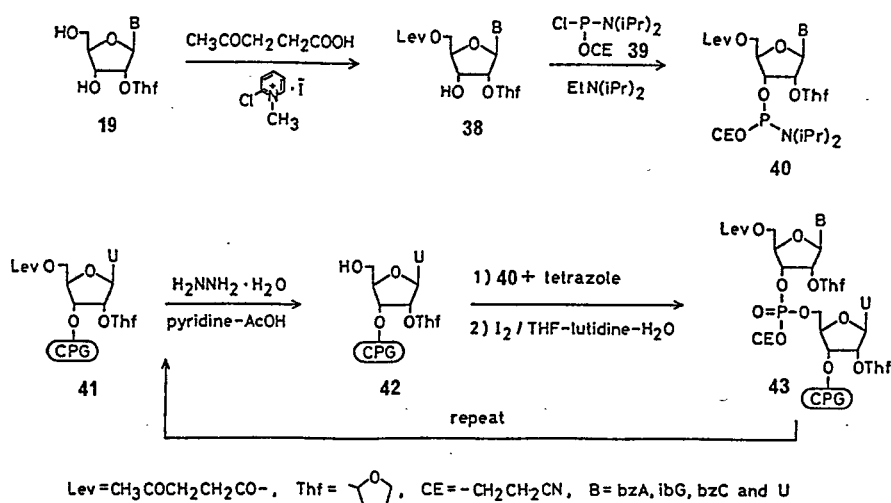
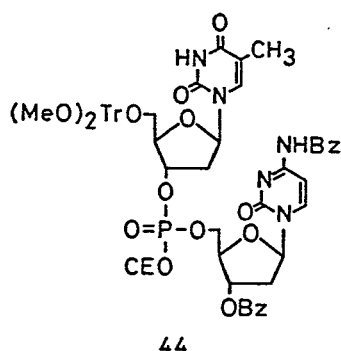


図27 ホスホアミダイト法によるオリゴリボヌクレオチドの合成

時に除去されるという簡便性を考慮してこの保護基を選び、38を β -cyanoethyl N,N-diisopropylchlorophosphoramidite (39) と反応させることにより3'-ホスホアミダイト体 (40) とした。

レブリニル基以外の保護基のヒドラジンに対する安定性を調べるために、完全に保護されたダイマー (44) を合成した。これをピリジン-酢酸 (3:2, v/v) 中0.5M ヒドラジン

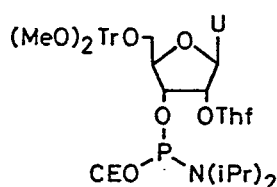


1 水和物で1～5時間処理すると、シアノエチル基はずれなかったが、TLCで完全保護ダイマーと R_f 値の異なるスポットが出現した。そこで、保護されたヌクレオシド (N-acyl-5'-O-dimethoxytrityl-2'-O-tetrahydrofuranylnucleoside 20) 4種類についてヒドラジン処理を行うと、塩基部のベンゾイル基のうちアデニンの場合には約3時間、シトシンでは約5時間で半分が除去されることがわかった。ただし、グアニンを保護するイソブチリル基は6時間処理しても全くはずれなかった。したがって、長時間ヒドラジン処理を行うと（あるいは短時間のヒドラジン処理を何度も繰り返すと）、塩基部の脱ベンゾイルに伴う副反応（塩基部へのヌクレオチドの結合など）が起こる可能性があることが明かとなった。

第2節 2'-テトラヒドロフラニルヌクレオシド 3'-ホスホアミダイトの担体上でのカップリング

2'-テトラヒドロフラニルヌクレオシド 3'-ホスホアミダイトのカップリング反応の条件を調べるために、CPGに結合した5'-ジメトキシトリチル チミジンを脱トリチルした後、テトラゾールを活性化剤として5'-O-dimethoxytrityl-2'-O-tetrahydrofuranylluridine 3'- β -cyanoethyl N,N-diisopropylphosphoramidite

(45)を反応させ、酸化後再度脱トリチルすることにより結合収率を求めた(図28)。反応には自動合成機(Applied Biosystems 381A synthesizer)を用い、ヌクレオシド 3'-ホスホアミダイト(45)は134.4mMになるようにアセトニトリルに溶解した。



45

この濃度はオリゴデオキシリボヌクレオチドの合成で高収率(図28中に+で示す)が得られている5'-O-dimethoxytritylthymidine 3'-β-cyanoethyl N,N-diisopropylphosphoramiditeの溶液の濃度に一致させたものであるが、使用した合成機のプログラムではアミダイト試薬とテトラゾールの溶液が同時に5秒間流れた後、テトラゾール溶液だけが3秒間流れるという行程を3回繰り返すため、反応時の実際の45の濃度は42.0mMとなる。この場合、デオキシ体(+)では40秒間以内に99%の結合収率が得られるのに対し、リボ体(○)

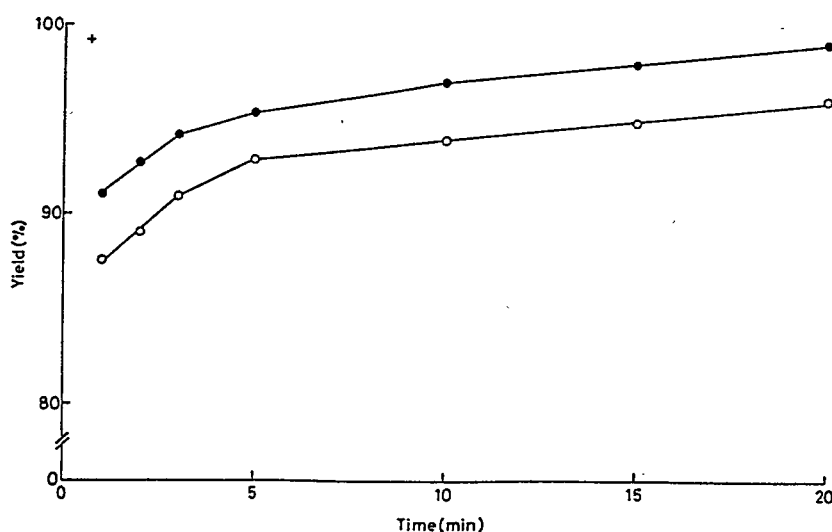


図28 反応時間による結合収率の変化

3'-ホスホアミダイトの濃度は42.0mM (○) および67.2mM (●)
+は5'-O-dimethoxytritylthymidine 3'-phosphoramiditeの収率。

では反応時間を延ばしても低収率であった。そこで、テトラゾール溶液のみを流すステップを除去することにより45の濃度を67.2mM (●) とすると収率はかなり向上したが、デオキシ体に匹敵する高収率を得るためには反応時間を20分間とする必要があることがわかった。シアノエチル基で保護されたホスホアミダイトはメチル保護のものよりも反応速度が遅いことが報告されている⁸²が、デオキシ体と比較して大きな差が生じる原因として、2'位の保護基による立体障害や糖部のコンホメーションの相違などが考えられる。

以上の結果に基づいて、5'-O-levulinyl-2'-O-tetrahydrofuranyluridine 3'- β -cyanoethyl N,N-diisopropylphosphoramidite (40, B=U) を用いることにより

表7 ホスホアミダイト法によるオリゴリボヌクレオチドの合成のための鎖長伸長反応

ステップ	試 薬	反応時間
1	0.5M ヒドラジン 1 水和物 / ピリジン-酢酸 (3:2, v/v)	10分
2	70mM 40 および 0.25M テトラゾール / アセトニトリル	20分
3	0.53M 無水酢酸 および 0.27M 4-ジメチルアミノピリジン / 2,6-ルチジン-テトラヒドロフラン (1:18, v/v)	0.5分
4	0.1M I ₂ / 2,6-ルチジン- テトラヒドロフラン-水 (10:40:1, v/v/v)	1分

UUUUUUUUU (U_{10}) を合成した (図27)。保護されたウリジンの結合したCPG (41) 33mg ($1 \mu\text{mol}$) を用いて、前述の合成機により表7 (この場合のみ、ヒドラジン処理を5分間とした) の反応サイクルを繰り返した後、アンモニア水によりCPGからの切断と5'末端レブリニル基およびシアノエチル基の除去を行い、続いて酸処理 (pH2.0、3時間) によりテトラヒドロフラニル基を除去した。中和後、逆相HPLCにより生成物を分析すると、 U_{10} と考えられるメインピークの前に短鎖のものが含まれていた (図29a)。遅れて溶出されたピークは、アンモニ

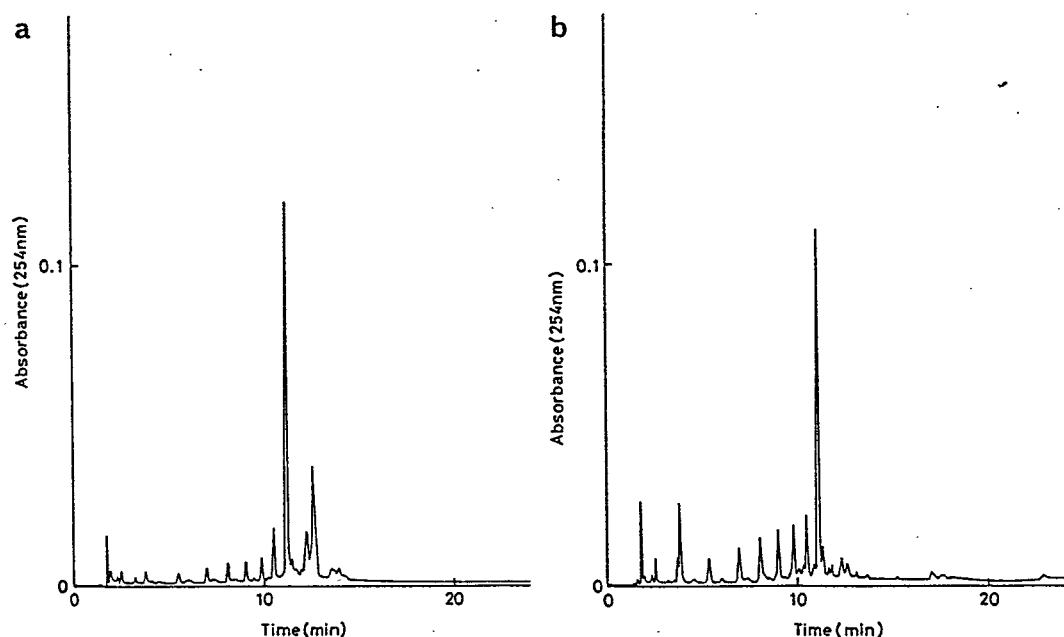


図29 逆相HPLCによる U_{10} の分析

(a : ホスホアミダイト法、b : H-ホスホネート法)

カラム : μ BONDASPHERE 5μ C18-300 Å (内径3.9mm x 15cm)

溶離液 A : 5% CH_3CN , 0.1M TEAA、B : 25% CH_3CN , 0.1M TEAA

グラジエント B : 0→30% (20分)

流速 : 1.0 ml/分

ア水の溶液での加熱を行わなかったため、あるいは酸処理が短時間であったために保護基がはずれ残ったものであると考えられる。

収率を比較するために、カップリング反応にH-ホスホネート法を用いてU₁₀を合成し、同様の脱保護と分析を行った(図29b)。デオキシリボ体を用いた予備実験で、H-ホスホネート法ではカップリング反応と活性化剤のpivaloyl chlorideによる5'-アシル化が競合し、その結果として結合収率が97%を越えないことがわかったが、U₁₀の合成においても短鎖のものがかなり含まれており、反応時間を延ばしても収率の向上は全く見られなかった。したがって、カップリングの反応速度が遅いリボ体では、H-ホスホネート法による鎖長伸長は非常に不利であることが明かとなった。

第3節 ヒドラジン処理の検討

本章第1節でヒドラジン処理により塩基部アミノ基を保護するベンゾイル基の一部が脱離することがわかったが、そのオリゴヌクレオチド合成への影響を調べるためにCCCCCCCCU (C₉U) とAAAAAAAAAU (A₉U) の合成を行った。

まず、U₁₀と同様にC₉Uを合成したが、レブリニル基が完全に除去されていることを確認し、同時に脱ベンゾイルの影響を比較するために、各サイクルでのヒドラジン処理を5分間ずつ行うものと10分間のものの2種類とした。合成機による鎖長伸長反応の後、アンモニア水によりCPGからの切断と5'末端レブリニル基およびシアノエチル基の除去を行い、アンモニア水の溶液のまま加熱することによりベンゾイル基を、続いて酸処理(pH2.0、5時間)によりテトラヒドロフラン基を除去した。生成物を逆相HPLCで分析すると、ヒドラジン処理を10分間行っても副生成物のピークは出現せず、逆に5分間ではレブリニル基の不完全な除去が原因と考えられる短鎖のオリゴヌクレオチドが多量に含まれていた(図30)。

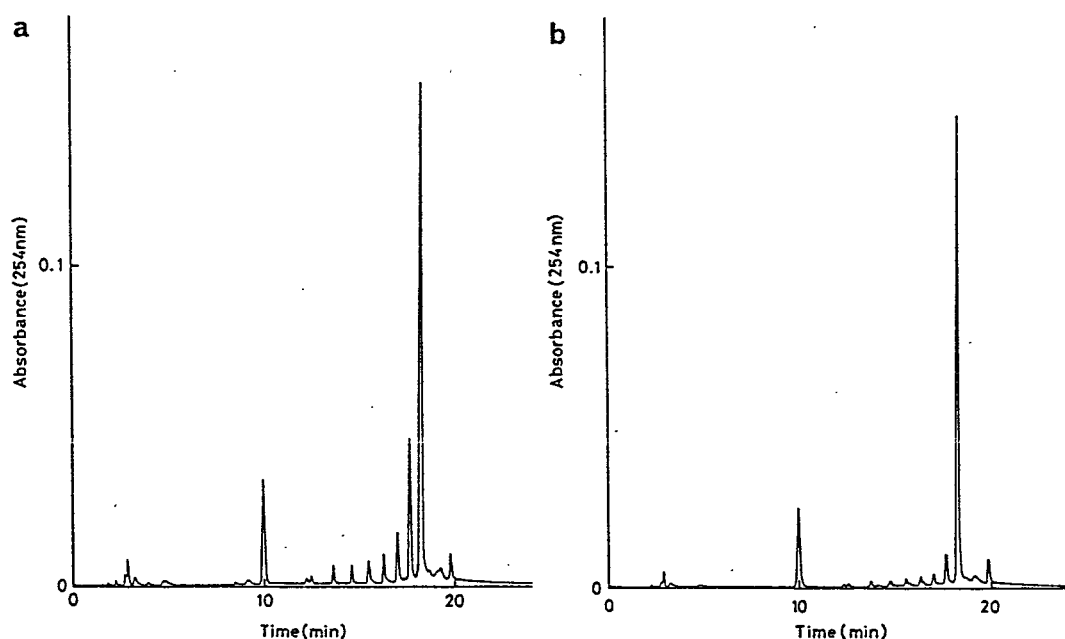


図30 逆相HPLCによるC₉Uの分析

(ヒドラジン処理 a : 5分間、b : 10分間)

カラム : μ BONDASPHERE 5 μ C18-300 Å (内径3.9mm x 15cm)

溶離液 A : 0.1M TEAA、B : 25% CH₃CN, 0.1M TEAA

グラジエント B : 0→30% (20分)

流速 : 1.0 ml/分

そこで、A₉Uについてはヒドラジン処理を各サイクルにつき10分間として合成し、そのうちの半分についてC₉Uと同様の脱保護を行った後分析すると、目的物と考えられるピークより遅れて比較的大きな不純物のピークが溶出された(図31a)。残りの半分についてテトラヒドロフラニル基を除去するための酸処理を15時間に延ばすと、この不純物のピークは小さくなり、目的物と考えられるピークが大きくなった(図31b)。これは、ヒドラジンによる脱ベンゾイルの結果塩基部のアミノ基にカップリングが起こったが、生じたリン酸アミデートが酸加水分解⁸³

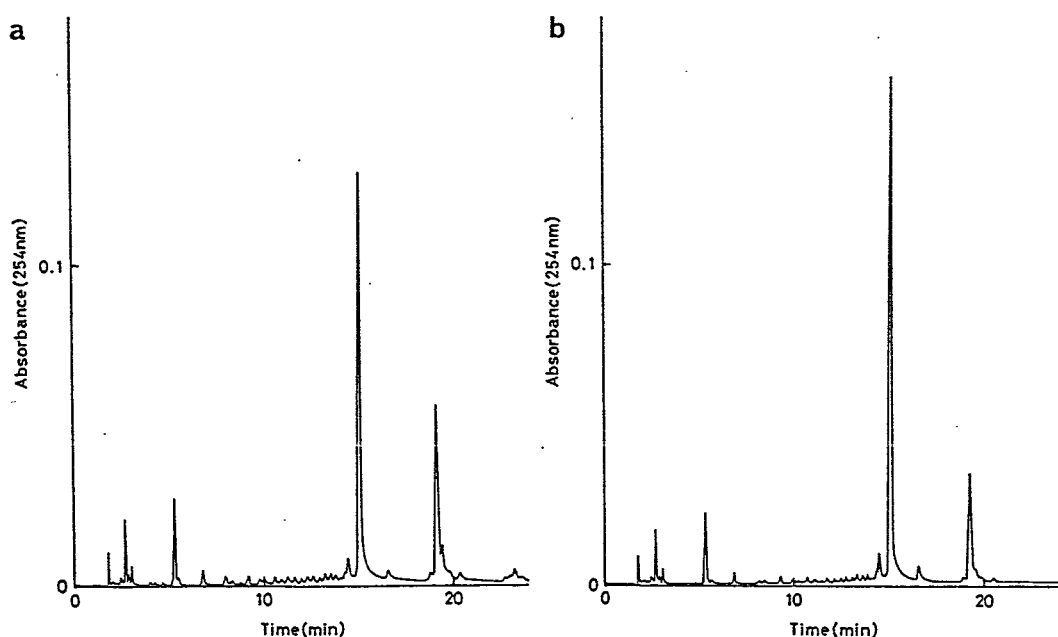


図31 逆相HPLCによるA₉Uの分析

(酸処理 a : 5 時間、b : 15時間)

カラム : μ BONDASPHERE 5 μ C18-300 Å (内径3.9mm x 15cm)

溶離液 A : 5% CH₃CN, 0.1M TEAA、B : 25% CH₃CN, 0.1M TEAA

グラジエント B : 0→30% (20分)

流速 : 1.0 ml/分

により除去されたと説明することができる。すなわち、この方法を用いてアデノシンを含む配列を合成する場合には、収量を増加させるために酸処理の反応時間を延ばす必要があることがわかった。

第4節 デカマーの精製

残りのr10merであるGGGGGGGGGU (G₉U) も同様に合成 (ヒドラジン処理は10分

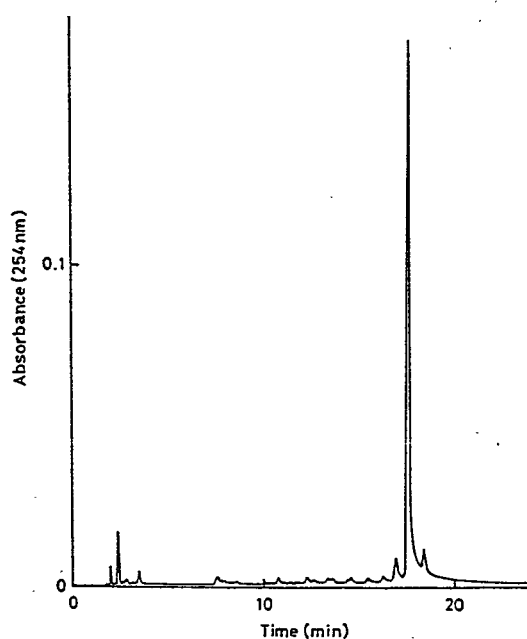


図32 逆相HPLCによるG₉Uの分析

カラム：μBONDASPHERE 5μ C18-300Å

(内径3.9mm x 15cm)

カラム温度：80°C

溶離液 A：0.1M TEAA

B：25% CH₃CN, 0.1M TEAA

グラジエント B：0→30% (20分)

流速：1.0 ml/分

表8 r10merの収量と通算収率

配 列	収 量 ^{*1}	収率 ^{*2}
AAAAAAAAAAU (A ₉ U)	0.65 A ₂₆₀ ユニット	(33%)
GGGGGGGGGGU (G ₉ U)	0.45 A ₂₆₀ ユニット	(27%)
CCCCCCCCCCU (C ₉ U)	0.32 A ₂₆₀ ユニット	(27%)
UUUUUUUUUUU (U ₁₀) ^{*3}	0.30 A ₂₆₀ ユニット	(19%)

*1 全量の1/60を逆相HPLCにより分取した。

*2 CPG上のウリジン (1 μmol) からの通算収率。

*3 ヒドラジン処理は各サイクル5分間ずつ行った。

間ずつ)と脱保護(酸処理は5時間)を行い、生成物を逆相HPLCにより分析すると、短鎖のものや副生成物はほとんど含まれていなかった(図32)。ホスホアミダイト法においてもグアニン塩基への副反応が報告されている^{84,85}が、この場合にはヨウ素によるリンの酸化の前にアセチル化によるキャッピングを行っているため、塩基の修飾が除去されたものと考えられる⁸⁶。

4種類のr10mer ($A_{10}U$, $G_{10}U$, $C_{10}U$, U_{10})は、いずれも全量の1/60を用いて逆相HPLCによりメインピークを分取し、CPG上のウリジン(1 μ mol)からの通算収率を求めた(表8、モル吸光係数は文献⁸⁷に従って算出した)。 U_{10} については各サイクルでのヒドラジン処理を5分間ずつしか行っておらず、脱保護も不十分であったためにやや収率が低かったが、その他についてはHPLCによる分析から予想されたとおりかなり高収率であった。精製された各r10mer

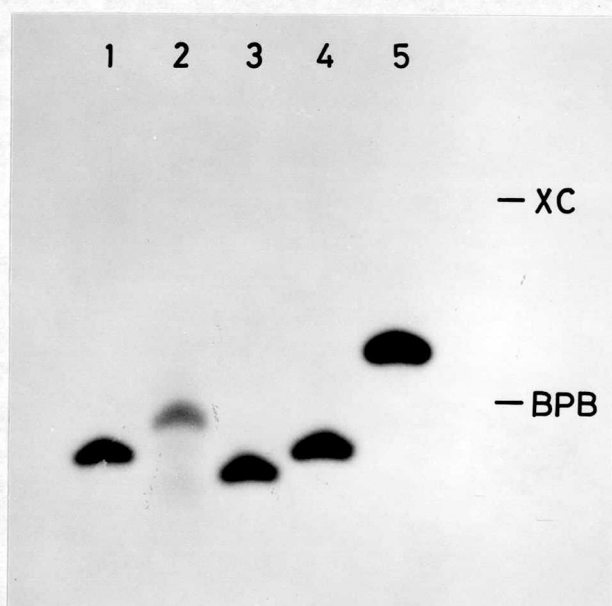


図33 精製されたオリゴリボヌクレオチドのゲル電気泳動による分析

lane 1 : $A_{10}U$, lane 2 : $G_{10}U$, lane 3 : $C_{10}U$, lane 4 : U_{10} ,
lane 5 : r21mer

は、T4 ポリヌクレオチド キナーゼと [γ - 32 P] ATPにより5'末端をラベルした後、10%ポリアクリルアミド ゲル電気泳動を行って鎖長と純度を確認した (図33)。

第5節 ヘンエイコサマーの合成

5'-レブリニルおよび2'-テトラヒドロフラニル保護を用いたホスホアミダイト法により、4種類のr10merは高収率で合成することができたので、4種類の塩基を含む長鎖オリゴリボヌクレオチドの合成を行った。合成の対象としたのは、自己切断反応を起こすイモリのサテライトDNA転写物の一部^{88,89}の塩基配列を有するr21mer (GCCUAGCUGAUGAAGGGUGAU) である。r10merの場合と同様、保護されたウリジンの結合したCPG (41) 33mg (1 μ mol) を用いて合成機による表7の鎖長伸長反応を繰り返し、CPGからの切断とアンモニア水による脱保護の後、酸処理を24時間行って、生成物を逆相HPLCにより分析した。イオン交換HPLCでもほぼ同様の分離が得られたが、脱塩の容易さを考慮して逆相HPLCにより分取した (図34)。このようにして得られたr21merは、イオン交換HPLCによる分析では単一ピーク (図35) であったが、ポリアクリルアミド ゲル電気泳動を行うと少量ではあるが1~4ヌクレオチド短いものが含まれていたもので、泳動後ゲル片を切り取って抽出することにより精製した。精製には全量の1/30を用い、0.55A₂₆₀ ユニットの純粋なr21merが得られた。ウリジン-CPGからの通算収率は約8%であった。精製されたr21merは5'末端を 32 Pでラベルした後、ヌクレアーゼP1で完全分解して電気泳動を行うことにより5'末端のグアノシンを、蛇毒ホスホジエステラーゼで限定分解して2次元ホモクロマトグラフィーにより塩基配列を確認した (図36、3'側の3つのスポットは分離されていない)。また、RNase T₂で分解した後、5'- 32 PラベルとヌクレアーゼP1処理をして2次元TLCを行うと、4種類のヌクレオシド 5'-モノリン酸 (pA, pG, pC, pU) に相

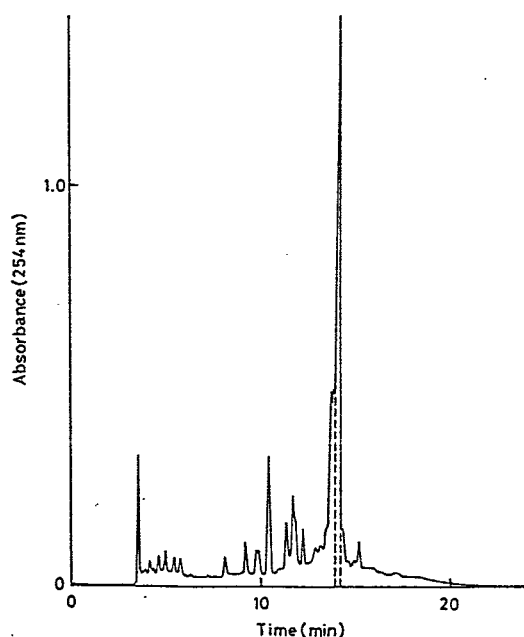


図34 逆相HPLCによる
r21merの精製

カラム：YMC A-303

(内径4.6mm x 25cm)

溶離液 A：5% CH₃CN, 0.1M TEAA

B：25% CH₃CN, 0.1M TEAA

グラジエント B：10→40% (20分)

流速：1.0 ml/分

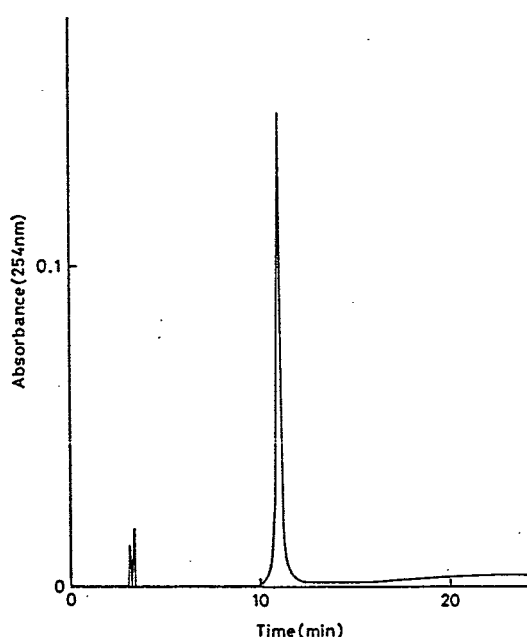


図35 イオン交換HPLCによる
精製されたr21merの分析

カラム：TSK gel DEAE-2SW

(内径4.6mm x 25cm)

溶離液 A：20% CH₃CN

B：2M HCOONH₄, 20% CH₃CN

グラジエント B：30→50% (20分)

流速：1.0 ml/分

当する4つのスポットのみが検出され⁹⁰ (図37)、このr21merが修飾塩基や2'-5' リン酸ジエステル結合を含んでいないことが証明された。

以上の結果、本章の方法を用いることにより、鎖長21までのオリゴリボヌクレオチドを簡便かつ高収率で合成することができた。r21merの合成において、不純物が比較的少なかった (図34) ことと、8%という高収率で単離されたことから

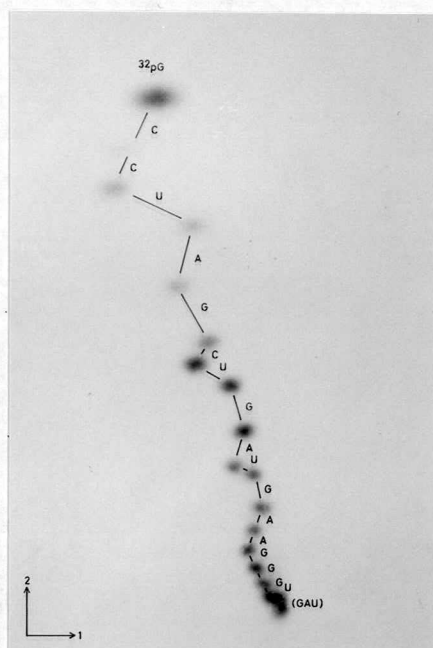


図36 r21merの配列分析

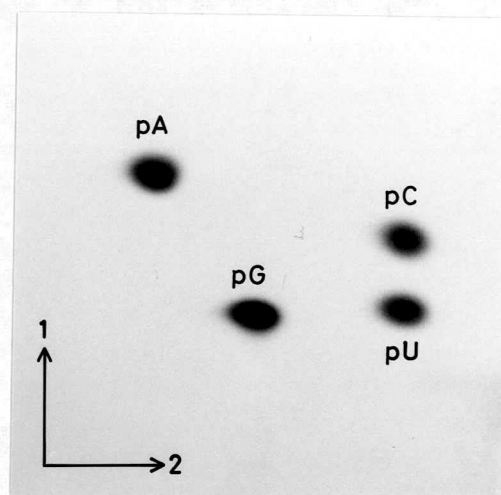


図37 r21merの組成分析

考えると、この方法を用いてさらに長鎖のRNA断片を合成することも可能であると思われる。ただし、長鎖のものではHPLCの分離に限界があるが、その場合にはゲル電気泳動による精製が有効であることがわかった。

Reeseらは最近、2'-ケタール保護を用いるために、pH 2～3の範囲でのみ除去され5'-トリチル誘導体と組み合わせることのできる1-[(2-chloro-4-methyl)-phenyl]-4-methoxypiperidin-4-yl (C t m p) 基の開発とその応用を報告しているが^{91, 92}、テトラヒドロピラニル基やメトキシテトラヒドロピラニル基等の他のアセタールやケタール保護を用いた場合でも、本研究を応用することが可能である。

結 論

- 1) リン酸アミデートを応用したヌクレオチド樹脂を用いて、保護されたオリゴデオキシリボヌクレオチド ブロックを固相合成することに成功した。このブロックを用いて、ヒト神経成長因子遺伝子の一部であるd35merと、3'末端にp-クロロフェニル リン酸を有する「ストッパー」 d16merを合成した。
- 2) 2'-テトラヒドロフラニル保護を用いてオリゴリボヌクレオチドを固相合成するために、リン酸-p-アニシデートを用いた5'→3'方向の合成法を開発した。この方法により、5'-および3'-スプライス部位に関連したr9merとr18merを合成した。
- 3) 2'-テトラヒドロフラニル保護を用いて長鎖のオリゴリボヌクレオチドを合成するために、5'-レブリニル保護とホスホアミダイト法を応用し、4種類のr10merと自己切断反応を起こす配列の一部であるr21merを高収率で合成した。

謝 辞

本研究に際し、終始、ご指導とご鞭撻を賜りました北海道大学薬学部 大塚栄子教授ならびに大阪大学 池原森男名誉教授に深く感謝いたします。

研究上の討論に加わり、有益なご助言とご協力をいただきました井上英夫博士ならびに北海道大学薬品有機化学講座の学生・大学院生の皆様に感謝いたします。

^{31}P -NMRの測定に関しご助力いただきました北海道大学薬化学講座（現、富士化学工業株式会社）菅原智旦氏に感謝いたします。

実 験 の 部

一般的手法

縮合反応には核酸合成用ピリジン（同仁化学研究所）を用い、他のピリジンは、水酸化カリウムで乾燥したものに過マンガン酸カリウムを加えて加熱還流後、蒸留した。反応に用いたジクロロメタンは、五酸化リンで乾燥したものを蒸留後、水素化カルシウムを加えて加熱還流し、再度蒸留した。ジオキサンは、ナトリウムとベンゾフェノンを加えて加熱還流後、蒸留した。以上の溶媒には、保存のためにモレキュラーシーブス 4 Å を加えた。自動合成機のアセトニトリルのうち、結合反応には核酸合成用アセトニトリル（同仁化学研究所）、洗浄には液体クロマトグラフ用アセトニトリルを用いた。

TLC は DC-Fertigplatten Kieselgel 60F₂₅₄ (MERCK) を用い、溶媒を指定していない場合には、クロロホルム-メタノール (10:1, v/v) により展開した。逆相 TLC には DC-Fertigplatten Kieselgel 60F₂₅₄ silanisiert (MERCK) を用い、アセトン-20mM 酢酸トリエチルアンモニウム (TEAA, pH 7.0) で展開した。ヌクレオシドあるいはヌクレオチドのスポットは、紫外線ランプ (254nm) により検出した後、2N 硫酸を噴霧、加熱し、糖およびジメトキシトリチル基の有無を確認した。

カラムクロマトグラフィーには Wakogel C-300 (和光純薬工業) を用い、クロロホルム中メタノールの濃度を段階的に増加させることにより溶出した。逆相カラムには PREPARATIVE C18 (Waters Associates) を用い、アセトン-0.1%ピリジン水により溶出した。

¹H-NMR は、JEOL JNM-FX100 (100MHz) を用いて測定した。³¹P-NMR は、リン酸トリメチルを内部標準として、JEOL JNM-FX90Q (36.25MHz) により測定した。

紫外および可視吸収スペクトルは、Shimadzu UV-240を用いて測定した。

オリゴヌクレオチド ブロックおよび脱保護したオリゴヌクレオチドの精製は、PREPARATIVE C18を内径0.7cm x 15cmのEcono-Column (BIO-RAD) に詰め、ポンプ (Eldex MODEL E)、UVモニター (GILSON 111B)、レコーダー (Linear 1200) およびフラクションコレクター (GILSON FC-80K) により構成されるシステムを用いて分画した。

HPLCは、Shimadzu LC-3A、LC-6A型またはGILSON生体高分子用システム (いずれも高圧グラジエント方式) を用い、カラムと溶出条件は本論の図中に記したとおりである。溶媒はすべてメンブランフィルター (ADVANTEC TOYO A045A047AまたはGelman Sciences Nylaflo、いずれも孔径0.45 μ m、直径47mm) を通し、サンプルの前処理にはMILLIPORE SJHVL04NSまたはGelman Sciences EKICRODISK 13を用いた。

デオキシヌクレオシドのN-アシル-5'-O-ジメトキシトリチル体は、文献⁹³に従って合成した。リボヌクレオシドのN-アシル化も同様にを行い、3'-および5'-水酸基を1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサン-1,3-ジイル基⁹⁴で保護した後、2'-水酸基をテトラヒドロフラニル化した⁹⁵。テトラヒドロフラニル基の不斉炭素により生じる2つの異性体はシリカゲルカラムにより分離し、個別に使用した。保護されたヌクレオチドについて、リンの不斉により生じる異性体は分離せずに使用した。保護されたヌクレオシドおよびヌクレオチドは、カラムクロマトグラフィーにより精製後、TLCで純度を、¹H-NMRで構造を確認した。これらの化合物は、結晶化が困難であるので粉末状あるいは泡状として得られたが、吸湿性のものや不安定なものが多く、元素分析は行っていない。

3'-コハク酸エステルを介して結合した通常のヌクレオシド樹脂は、文献¹³に従って合成した。担体上での縮合収率は、脱トリチルのステップでのベンゼンスルホン酸反応溶液と洗液を集め、ジクロロメタンを加えて20mlとした中の0.2ml (5

μmol スケールでの合成の場合)について溶媒を留去した後、過塩素酸(60%) - エタノール(3:2, v/v) 3mlを加えて500nmにおける吸光度を測定することにより求めた。

合成したオリゴヌクレオチドの塩基配列は以下のように分析した。

オリゴヌクレオチドの5'末端標識

オリゴヌクレオチド 0.2nmol を滅菌水 2 μl に溶解し、緩衝液(0.25M Tris-HCl(pH9.6), 50mM MgCl_2 , 10mM spermine, 50mM dithiothreitol, 0.5M KCl) 1 μl 、100 μM ATP 0.5 μl 、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 1 μl (1 μCi)、およびT4 polynucleotide kinase (宝酒造より購入、オリゴリボヌクレオチドの場合には大腸菌A19株より生産したもの) 0.5 μl (1 unit)を加えて、37°Cで1時間反応させた。反応混合物をDEAE-セルロースプレート(MACHERY-NAGEL POLYGRAM CEL300DEAE/HR-2/15)にスポットし、Homo-mix[®]を用いて展開した。プレートを乾燥させてオートラジオグラフィ(-80°C、30分間)を行った後、検出されたスポットに相当する部分を削り取って、エタノールで洗浄、1M 重炭酸トリエチルアンモニウム(TEAB)で溶出した。溶出液を濃縮後、水と共沸することによりTEABを除き、滅菌水 50 μl に溶解したものを以下の実験に用いた。

蛇毒ホスホジエステラーゼによる限定分解

^{32}P で標識したオリゴヌクレオチドの溶液 7 μl に、緩衝液(0.25M Tris-HCl (pH8.0), 50mM MgCl_2) 1 μl とvenom phosphodiesterase (Boehringer Mannheim) 2 μl (2 μg)を加えて37°Cの水浴に入れ、2、5、10、20、30分後に2 μl ずつを採取して、5mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 5 μl 中に加えた後、沸騰水浴中に2分間入れることにより反応を停止した。そのうち1 μl についてホモクロマトグラフィを行い、オートラジオグラフィ(-80°C、一晚)により分解を確認した。

ヌクレアーゼ P 1 による限定分解

nuclease P1 (ヤマサ醤油) 20ng を用いて、0.2M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH5.0) 中25°Cで、蛇毒ホスホジエステラーゼの場合と同様の操作を行った。

2次元ホモクロマトグラフィーによる塩基配列の分析

限定分解後の溶液 2 μ l を 7M 尿素を含む酢酸ピリジニウム緩衝液 (pH3.5) で湿らせた酢酸セルロース膜 (2.5cm x 40cm) にスポットし、電気泳動 (5,000V、15分間) を行った。これを DEAE-セルロース プレート上に置き、水で湿らせた濾紙 (Whatman 3MM) を重ねて30分間加圧した後、Homo-mixを用いて展開し、オートラジオグラフィー (-80°C、一晚) を行った。

5'末端ヌクレオチドの分析

32 P で標識したオリゴヌクレオチドの溶液 2 μ l に滅菌水 5 μ l、0.2M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH5.0) 2 μ l および nuclease P1 1 μ l (1 μ g) を加え、37°C で1時間反応させた後、沸騰水浴中に2分間入れて反応を停止した。この混合物のうち5 μ lを濾紙 (ADVANTEC TOYO 51A) にスポットし、0.2M 酢酸モルホリニウム緩衝液 (pH3.5) 中で4種類のヌクレオシド 5'-モノリン酸と共に電気泳動 (700 V、2時間) 後、オートラジオグラフィー (-80°C、一晚) を行った。

第1章の実験

(4-Acetoaminophenoxy)acetic acid (2)

文献⁹⁶に従い、p-acetamidophenol (25.0g, 165mmol)、chloroacetic acid (15.6g, 165mmol)、50% NaOH水溶液 (26.5g, 330mmol) および水 (250ml) の混合物を加熱し、約半量になった後、chloroacetic acid (7.8g, 83mmol)、50% NaOH水溶液 (13.2g, 165mmol) および水 (125ml) を追加して、再度加熱した。TLCで原料の消失を確認した後、冷却して析出した結晶を濾取し、希塩酸および水で洗浄した。収量 (1水和物) : 36.0g (158mmol, 96%)。

R_f (nBuOH:AcOH:H₂O=4:1:1) : 0.64. mp : >300°C. ¹H-NMR (DMSO-d₆/TMS) δ [ppm] : 1.98(s, 3H, CH₃CO-), 4.10(s, 2H, -OCH₂CO-), 6.76(d, 2H, arom), 7.39(d, 2H, arom).

(4-Aminophenoxy)acetic acid (3)

文献⁹⁶に従い、(4-acetoaminophenoxy)acetic acid (2) monohydrate (22.7g 100mmol) に 1N HCl (250ml) を加えて浴温120°Cで6時間加熱した。TLC

(nBuOH:AcOH:H₂O=4:1:1) で原料の消失を確認した後、NaHCO₃で中和し、析出した結晶を濾取して水およびエタノールで洗浄した。収量 : 12.2g (73mmol, 73%)

R_f (nBuOH:AcOH:H₂O=4:1:1) : 0.34. mp : 220°C(dec.). ¹H-NMR (DMSO-d₆/TMS) δ [ppm] : 4.47(s, 2H, -OCH₂CO-), 6.55(d, 2H, arom), 6.61(d, 2H, arom).

4-[(2,2,2-Trichloroethoxy)carbonylmethoxy]anilinium tosylate (4)

(4-aminophenoxy)acetic acid (3) (8.36g, 50mmol)、2,2,2-trichloroethanol (38.4ml, 400mmol)、p-toluenesulfonic acid monohydrate (19.0g, 100mmol) およびtoluene (250ml) の混合物を、Dean-Stark trapで還流下、22時間加熱した。室温に戻した後、エーテルを加えて析出した沈澱を濾取してエーテルで洗浄し、エタノール (200ml) から再結晶して針状晶を得た。収量 : 19.1g (41mmol, 81%)。

R_f (CHCl₃:MeOH=10:1) : 0.55. mp : 165-167°C. ¹H-NMR (DMSO-d₆/TMS) δ [ppm] : 2.30(s, 3H, CH₃-), 4.99(s, 2H, -CH₂-), 5.05(s, 2H, -CH₂-), 7.16(d, 2H arom), 7.19(d, 2H, arom), 7.20(d, 2H, arom), 7.50(d, 2H, arom). Anal. Calcd for C₁₇H₁₃NO₆SCl₃ : C, 43.37; H, 3.85; N, 2.98; S, 6.81; Cl, 22.59. Found : C, 42.93; H, 3.90; N, 2.94; S, 6.80; Cl, 22.01.

5'-O-Dimethoxytritylthymidine 3'-(o-chlorophenyl)phosphoro-p-[(2,2,2-trichloroethoxy)carbonylmethoxy]anilidate (5, B=T)

4 (4.71g, 10mmol) をエーテル (40ml) に懸濁し、氷冷下、triethylamine (2.5ml, 18mmol) を加えて5分間攪拌した。この反応混合物の上清を o-chlorophenyl phosphorodichloridate (1.3ml, 8mmol) のエーテル溶液 (5ml) に加えて1時間攪拌した後、沈澱を濾別し、エーテルで洗浄した。濾液と洗液を合わせて溶媒を留去し、ピリジン共沸後、5'-O-dimethoxytritylthymidine (1.63g, 3mmol) を加えて再度ピリジン共沸を行った。この残渣をジオキサン (12ml) に溶解し、1-methylimidazole (1.0ml, 12mmol) を加えて2時間攪拌した。TLCでヌクレオシドの消失を確認した後、溶媒を留去し、残渣をクロロホルムに溶解して飽和重曹水および水で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥した。クロロホルム留去後、残渣をシリカゲル (100g) のカラム (内径6.5cm x 8cm) により精製し、3~4% メタノールで溶出された画分を濃縮してヘキサン中に滴下することにより粉末とした。収量：1.86g (1.84mmol, 61%)。

R_f (CHCl₃:MeOH=10:1) : 0.51, 0.56. ¹H-NMR (CDCl₃/TMS) δ [ppm] : 1.41(s, 3H, -CH₃), 2.3-2.7(m, 2H, H-2'), 3.3-3.5(m, 2H, H-5'), 3.26(s, 6H, CH₃O-x2), 4.2-4.3(m, 1H, H-4'), 4.70(s, 2H, -CH₂-), 4.80(s, 2H, -CH₂-), 5.2-5.5(m, 1H, H-3'), 6.13(t, 1H, H-1'), 6.6-7.5(m, 22H, H-6, arom).

Thymidine phosphoramidate resin (6, B=T)

aminomethylated polystyrene (1% divinylbenzene, 100-200 mesh, NH₂:0.21 mmol/g) (0.95g, 0.2mmol) を N,N-dimethylformamide (DMF) (5ml) に懸濁し、5 (B=T) (1.02g, 1mmol) と triethylamine (0.03ml, 0.22mmol) を加えて、30°Cで42時間振とうした。反応液を濾過し、樹脂を DMF およびピリジンで洗浄した後、ピリジン (6ml) と無水酢酸 (4ml) を加えて1時間振とうし、再度濾過してピリジン、ジクロロメタン、エーテルで順次洗浄した。ヌクレオチド含量：

97 μ mol/g。

deoxycytidine phosphoramidate resin (6, B=bzC) も同様に合成した。

Dimer unit (13, dAA)

1,2,4-triazole (6.38g, 92.4mmol) をピリジン共沸してジオキサン (84ml) に溶解し、o-chlorophenyl phosphorodichloridate (4.61ml, 28mmol) を加えた後、氷冷攪拌下、triethylamine (8.20ml, 58.8mmol) を滴下した。室温に戻して1時間攪拌を続けた後、不溶物を濾別することにより、o-chlorophenyl phosphoroditriazolidide のジオキサン溶液 (1mmol/3ml) を得た。

6-N-benzoyl-5'-O-dimethoxytrityldeoxyadenosine (9.87g, 15mmol) をピリジン共沸した後、o-chlorophenyl phosphoroditriazolidide のジオキサン溶液 (63ml 21mmol) を加えて30分間攪拌した。TLCで原料の消失を確認した後、ethylene cyanohydrin (2.6ml, 37.5mmol) と1-methylimidazole (3.6ml, 45mmol) を加えて1時間攪拌し、30%ピリジン水 (50ml) を加えた。約1/3量に濃縮してクロロホルムで抽出し、有機層を0.5M KH_2PO_4 (pH5.0) および水で洗浄した後、溶媒を留去した。残渣をトルエン共沸後クロロホルム (278ml) に溶解し、氷冷攪拌下、benzenesulfonic acid monohydrate (25g/375ml メタノール) (119ml, 45mmol) を加えた。10分後、飽和重曹水 (100ml) を加えてクロロホルムで抽出し、有機層を飽和重曹水および水で洗浄した後、 Na_2SO_4 で乾燥して溶媒を留去した。残渣をシリカゲル (100g) のカラム (内径4.5cm x 12cm) により精製し (3~5% メタノールにより溶出された)、ヘキサン-エーテル (1:1, v/v) 中に滴下して粉末の 6-N-benzoyldeoxyadenosine 3'-[(o-chlorophenyl)-(β -cyanoethyl)]phosphate を得た。収量: 5.87g (9.80mmol, 65%)。

6-N-benzoyl-5'-O-dimethoxytrityldeoxyadenosine (6.58g, 10mmol) をピリジン共沸した後、o-chlorophenyl phosphoroditriazolidide のジオキサン溶液 (42ml 14mmol) を加えて30分間攪拌した。30%ピリジン水 (10ml) を加えて濃縮後、ク

クロロホルムで抽出し、有機層を0.1M TEABで洗浄して溶媒を留去した。残渣をピリジン共沸後クロロホルム (50ml) に溶解し、1% triethylamineを含むヘキサン-エーテル (1:1, v/v) (1000ml) 中に滴下して粉末状の6-N-benzoyl-5'-O-dimethoxytrityldeoxyadenosine 3'-(p-chlorophenyl)phosphateを得た。収量: 8.28g (8.72mmol, 87%)。

6-N-benzoyl-5'-O-dimethoxytrityldeoxyadenosine 3'-(p-chlorophenyl)-phosphate (1.90g, 2.0mmol) と6-N-benzoyldeoxyadenosine 3'-[(p-chlorophenyl)-(β-cyanoethyl)]phosphate (0.96g, 1.6mmol) をピリジン共沸後ピリジン (5ml) に溶解し、1-(mesitylene-2-sulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazole (MSNT) (1.19g, 4.0mmol) を加えて20分間攪拌した。TLCで一方の原料の消失を確認した後溶媒を留去し、残渣をクロロホルムに溶解して水洗した。Na₂SO₄で乾燥後、溶媒を留去して、残渣をシリカゲル (50g) のカラム (内径4.5cm x 6cm) により精製し (3~4% メタノールにより溶出された)、ヘキサン中に滴下して完全に保護されたダイマー (dAA) を得た。収量: 1.94g (1.36mmol, 85%)。

他の配列を有するダイマーも同様に合成した。

完全に保護されたダイマー (1g) をpyridine-triethylamine (3:1, v/v) (8ml) に溶解して水 (2ml) を加え、5分後濃縮してピリジン共沸を3回行った。残渣をクロロホルム (5ml) に溶解し、1% triethylamineを含むヘキサン-エーテル (1:1, v/v) (100ml) 中に滴下することにより粉末状のダイマー ユニット (13) を得た。

担体からの切断条件の検討

thymidine phosphoramidate resin (6, B=T) (10mg) をピリジン-酢酸 (1:1, v/v) で3回洗浄し、ピリジン-酢酸 (1:1, v/v) (1ml) とisoamyl nitrite (0.13ml, 1mmol) を加えて0.5ないし6時間振とうした。濾過後、樹脂をピリジンで3回洗浄し、表4ステップ1~5の操作により担体上に残ったヌクレオチドを定

量した(図4)。

キャッピングによる副反応の解析

5'-O-dimethoxytritylthymidine 3'-(o-chlorophenyl)phosphoro-p-anisidate (7) (0.84g, 1mmol) に0.1M 4-dimethylaminopyridineピリジン溶液(9ml) と acetic anhydride (1ml) を加えて、10分間攪拌した。溶媒を留去し、トルエン共沸を2回行った後、残渣をクロロホルム(37ml) に溶解し、氷冷下、benzene-sulfonic acid monohydrate (25g/375ml メタノール) (15.9ml, 6mmol) を加えて10分間攪拌した。triethylamineにより中和して溶媒を留去した後、残渣をクロロホルムに溶解し、水洗した。有機層をNa₂SO₄で乾燥後溶媒を留去し、シリカゲル(30g)のカラム(内径4cm x 6cm)によりdimethoxytrityl alcoholを除去した。溶出液に水を加えて分液し、有機層および水層について溶媒を留去した。水層の残渣はthymidine 3'-(o-chlorophenyl)phosphate (9)、有機層の残渣はN-acetyl-p-anisidine (10) とTLCおよび¹H-NMRで一致することを確認した。

thymidine 3'-(o-chlorophenyl)phosphate (9) は、dimer unitの合成中間体である5'-O-dimethoxytritylthymidine 3'-(o-chlorophenyl)phosphate (11) (0.25g, 0.3mmol) に80%酢酸(5ml)を加えて20分後酢酸を留去し、0.1M TEABに溶解して酢酸エチルで洗浄することにより得た。

N-acetyl-p-anisidine (10) は、p-anisidine (12) (0.12g, 1mmol) に0.1M 4-dimethylaminopyridineピリジン溶液(2.7ml) とacetic anhydride (0.3ml) を加え、10分後溶媒を留去して水から再結晶した。

アセチル化条件の検討

deoxyguanosineの結合したポリスチレン(20mg, 2μmol) に対して、表4ステップ1～5の操作により脱トリチルした後、樹脂をピリジンで3回洗浄して、ピリジン-無水酢酸(3:2または9:1, v/v) (1ml) を加え、5分間ないし2時間振とう

した。樹脂をピリジンで3回洗浄し、表4ステップ7～10の操作により5'-O-di-methoxytrityl-2-N-isobutyryldeoxyguanosine 3'-(p-chlorophenyl)phosphateを縮合した後、再度脱トリチルすることによりアセチル化されなかった5'-水酸基を定量した(図6)。

オリゴヌクレオチド ブロックの固相合成

deoxycytidine phosphoramidate resin (G, B=bzC) (0.3g, 50 μ mol) に対して表1の操作を繰り返した後、樹脂をピリジン-酢酸(1:1, v/v)で3回洗浄し、ピリジン-酢酸(1:1, v/v) (6ml)とisoamyl nitrite (0.67ml, 5mmol)を加えて30°Cで振とうした。3時間後、樹脂を濾別してピリジンで洗浄し、濾液と洗液を合わせて約10mlに濃縮した。この溶液をヘキサン-エーテル(1:1, v/v) (200 ml)中に滴下し、沈澱をクロロホルムに溶解して0.1M TEABで洗浄した後、溶媒を留去した。残渣を図8のように逆相カラムクロマトグラフィーにより精製し、目的物を含む画分について、溶媒留去とピリジン共沸を行った後、クロロホルム(0.5ml)に溶解して1% triethylamineを含むヘキサン-エーテル(1:1, v/v) (10ml)中に滴下した。塩基配列と収量は表2に示した。

d35merの固相合成

deoxyguanosine-CPG (Applied Biosystems Inc.) (55mg, 1.5 μ mol) に対して表4の操作を繰り返した後、1M 1,1,3,3-tetramethylguanidinium 2-pyridine-aldoximate (TMG-PAO) ジオキサン溶液(0.5ml)、ジオキサン(0.4ml)、および水(0.1ml)を加えて30°Cで振とうした。15時間後、CPGを濾別して50%ピリジン水で洗浄し、濾液と洗液を合わせて溶媒を留去した。残渣をピリジン(1ml)に溶解し、アンモニア水(10ml)を加えて60°Cに加熱した。5時間後、アンモニア水を留去し、残渣を図10のように逆相カラムクロマトグラフィーにより精製した。目的物を含む1画分について、溶媒を留去して水と共沸した後、80%

酢酸 (1ml) を加えて20分間放置した。酢酸を留去した後、残渣に水と酢酸エチルを加えて分液し、水層を濃縮してHPLCにより分析した (図11)。

担体上でのオリゴチミジル酸 ブロックの縮合

deoxyguanosineの結合したCPG (33mg, 0.9 μ mol) またはポリスチレン (10mg, 2 μ mol) に対して、表4ステップ1~10の操作により脱トリチルと縮合を行った。縮合反応は、オリゴチミジル酸 ブロック 10 μ mol、MSNT 15mg (50 μ mol) およびピリジン 150 μ l を用いて、40°Cで20分間行った。縮合後、再度脱トリチルし、収率を求めた (図12)。

3'末端にo-クロロフェニル リン酸を有するdl6merの固相合成

thymidine phosphoramidate resin (6, B=T) (52mg, 5 μ mol) に対して表5の操作を繰り返した後、樹脂をピリジン-酢酸 (1:1, v/v) で3回洗浄し、ピリジン-酢酸 (1:1, v/v) (1ml) とisoamyl nitrite (0.13ml, 1mmol) を加えて30°Cで振とうした。3時間後、樹脂を濾別してピリジンで洗浄し、濾液と洗液を合わせて約3mlに濃縮した。この溶液をヘキササン-エーテル (1:1, v/v) (50ml) 中に滴下し、沈澱をクロロホルムに溶解して0.1M TEABで洗浄した後、溶媒を留去した。残渣を図13のように逆相カラムクロマトグラフィーにより精製し、目的物を含む画分について、溶媒を留去して水と共沸した後、1M TMG-PAOジオキサン溶液 (1ml) と水 (1ml) を加えて、30°Cで攪拌した。12時間後、溶媒を留去して残渣をピリジン (1ml) に溶解し、アンモニア水 (10ml) を加えて60°Cに加熱した。5時間後、アンモニア水を留去し、Sephadex G-25のカラム (内径1.5cm x 38cm) により脱塩して溶媒を留去した。残渣を水と共沸し、80%酢酸 (2ml) を加えて20分間放置した後、酢酸を留去し、水と酢酸エチルを加えて分液した。水層を1mlに濃縮し、そのうち120 μ lについて図14のように逆相HPLCにより分取して、1.66 A₂₆₀ ユニットのdl6merを得た。

第2章の実験

N-Acyl-2'-O-tetrahydrofuranylnucleoside 3'-(o-chlorophenyl)phosphoro-p-anisidate (21)

N-acyl-5'-O-dimethoxytrityl-2'-O-tetrahydrofuranylnucleoside (20) (1 mmol) をピリジン共沸後ジクロロメタン (5ml) に溶解し、1-methylimidazole (0.16ml, 2mmol) を加えた。氷冷攪拌下、o-chlorophenyl phosphoro-p-anisidochloridate (0.22g, 0.67mmol) を30分おきに3回加え、添加後さらに1時間攪拌を続けた。TLCで原料の消失を確認した後、ジクロロメタンを加えて飽和重曹水および水で洗浄した。Na₂SO₄で乾燥して溶媒を留去した後、残渣をシリカゲル (20g) のカラム (内径4cm x 3cm) で精製した (1% メタノールで溶出された)。溶出液を濃縮してトルエン共沸を2回行った後、残渣に1M zinc bromideジクロロメタン-イソプロパノール (85:15, v/v) 溶液 (40ml) を加えて1時間攪拌した。TLCで原料の消失を確認した後、ジクロロメタンを加えて1M 酢酸アンモニウム水溶液、飽和重曹水および水で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲル (20g) のカラム (内径4cm x 3cm) で精製し (2~3% メタノールで溶出された)、溶出液を濃縮後ヘキサン中に滴下することにより粉末とした。収量 (B=U) : 0.367g (0.60mmol, 60%)。

6-N-Benzoyl-2'-O-tetrahydrofuranyladenine 3'-(o-chlorophenyl)phosphoro-p-anisidate (21, B=bzA)

R_f (CHCl₃:MeOH=10:1) : 0.47. ¹H-NMR (CDCl₃/TMS) δ [ppm] : 1.6-1.9(m, 4H, Thf), 3.6-4.0(m, 4H, H-5', Thf), 3.77(s, 3H, -OCH₃), 4.59(br, 1H, Thf) 4.8-5.5(m, 3H, H-2', 3', 4'), 6.00(d, 1H, H-1'), 6.27(d, 1H, 5'-OH), 6.7-8.2(m, 14H, arom, H-2), 8.78(s, 1H, H-8), 9.24(br, 1H, -NH-).

2-N-Isobutyryl-2'-O-tetrahydrofuranylguanosine 3'-(o-chlorophenyl)phosphoro-p-anisidate (21, B=ibG)

R_f (CHCl₃:MeOH=10:1) : 0.39. ¹H-NMR (CDCl₃/TMS) δ [ppm] : 1.21 (d, 6H, ib), 1.6-2.0 (m, 4H, Thf), 2.6-2.9 (m, 1H, ib), 3.6-4.0 (m, 4H, H-5', Thf), 3.76 (s, 3H, -OCH₃), 4.41 (br, 1H, Thf), 4.9-5.9 (m, 4H, H-1', 2', 3', 4'), 6.51 (d, 1H, 5'-OH), 6.6-7.8 (m, 9H, arom, H-8), 10.16 (br, 1H, -NH-), 12.23 (br, 1H, -NH-).

4-N-Benzoyl-2'-O-tetrahydrofuranylcytidine 3'-(o-chlorophenyl)phosphoro-p-anisidate (21, B=bzC)

R_f (CHCl₃:MeOH=10:1) : 0.42. ¹H-NMR (CDCl₃/TMS) δ [ppm] : 1.6-1.9 (m, 4H, Thf), 3.6-3.9 (m, 7H, H-5', Thf, -OCH₃), 4.29 (br, 1H, Thf), 4.7-5.5 (m, 3H, H-2', 3', 4'), 5.87 (d, 1H, H-1'), 6.43 (d, 1H, 5'-OH), 6.6-8.0 (m, 14H, arom, H-6), 8.10 (d, 1H, H-5), 9.4 (br, 1H, -NH-).

2'-O-Tetrahydrofuranyluridine 3'-(o-chlorophenyl)phosphoro-p-anisidate (21, B=U)

R_f (CHCl₃:MeOH=10:1) : 0.40, 0.44. ¹H-NMR (CDCl₃/TMS) δ [ppm] : 1.6-2.2 (m, 4H, Thf), 3.7-4.0 (m, 4H, H-5', Thf), 3.76 (s, 3H, -OCH₃), 4.32 (br, 1H, Thf), 4.4-5.5 (m, 3H, H-2', 3', 4'), 5.6-5.9 (m, 2H, H-1', H-5), 6.54 (d, 1H, 5'-OH), 6.7-7.5 (m, 8H, arom), 7.97 (t, 1H, H-6), 9.41 (br, 1H, -NH-).

Guanosine resin (23, B=ibG)

2-N-isobutyryl-2'-O-tetrahydrofuranylguanosine 3'-(o-chlorophenyl)-phosphoro-p-anisidate (21, B=ibG) (0.36g, 0.5mmol) をピリジン共沸してジクロロメタン (2ml) に溶解し、4-dimethylaminopyridine (0.092g, 0.75mmol) と succinic anhydride (0.075g, 0.75mmol) を加えて2時間攪拌した。TLCで原料の消失を確認した後、ジクロロメタンを加え、0.5M KH₂PO₄水溶液 (pH5.0) および水で洗浄した。Na₂SO₄で乾燥して溶媒を留去した後、残渣をシリカゲル (5g)

のカラム（内径1.6cm x 5cm）で精製した（1~2%メタノールにより溶出された）。溶出液を濃縮後、ヘキサン-エーテル（1:1, v/v）中に滴下することにより粉末状の5'-succinyl体（0.395g, 0.44mmol）を得た。

これをDMF（3ml）に溶解し、pentachlorophenol（0.13g, 0.48mmol）と1,3-dicyclohexylcarbodiimide（0.14g, 0.66mmol）を加えて20時間攪拌した。TLCで原料の消失を確認した後、不溶物を濾別して溶媒を留去し、残渣にベンゼンを加えて析出した不溶物を濾別してベンゼンを留去した。残渣をクロロホルムに溶解し、ヘキサン中に滴下して粉末状の活性エステル体（22）（0.585g）を得た。

22（0.585g）をDMF（4ml）に溶解し、aminomethylated polystyrene（1% divinylbenzene, 100-200 mesh, NH_2 :0.23mmol/g）（0.65g, 0.15mmol）とtriethylamine（0.07ml, 0.5mmol）を加えて、16時間振とうした。反応液を濾過し、樹脂をピリジンで洗浄した後、ピリジン（6ml）と無水酢酸（4ml）を加えて1時間振とうし、再度濾過してピリジン、ジクロロメタン、メタノールで順次洗浄した。ヌクレオチド含量：0.21mmol/g。

uridine resin（23, B=U）も同様に合成した。

Dimer unit（30, UC）

5'-O-dimethoxytrityl-2'-O-tetrahydrofuranyluridine（0.49g, 0.8mmol）をピリジン共沸した後、o-chlorophenyl phosphoroditriazolidideのジオキサン溶液（3.36ml, 1.12mmol）を加えて30分間攪拌した。30%ピリジン水（2ml）とクロロホルムを加え、0.1M TEABで洗浄した後、溶媒を留去してピリジン共沸を2回行った。残渣に4-N-benzoyl-2'-O-tetrahydrofuranylcytidine（0.42g, 1mmol）を加えて再度ピリジン共沸を行い、残渣をピリジン（2ml）に溶解してMSNT（0.47g, 1.6mmol）を加えた。40分間攪拌してTLCで一方の原料の消失を確認した後、30%ピリジン水（2ml）とクロロホルムを加え、水洗した。溶媒留去後、

残渣を逆相カラム（内径4cm x 4cm）で精製し（アセトン：0.1%ピリジン水=65：35で溶出された）、溶媒を留去してピリジン共沸を3回行った。残渣をジクロロメタン（5ml）に溶解して1-methylimidazole（0.10ml, 1.2mmol）を加え、氷冷攪拌下、*o*-chlorophenyl phosphoro-*p*-anisidochloridate（0.13g, 0.4mmol）を30分おきに3回加えた。添加後さらに1.5時間攪拌を続け、逆相TLCで原料の消失を確認した後、ジクロロメタンを加えて飽和重曹水および水で洗浄した。溶媒留去後、残渣を逆相カラム（内径4cm x 4cm）で精製し（アセトン：0.1%ピリジン水=65：35ないし70：30で溶出された）、溶媒を留去してピリジン共沸を行った。残渣をトルエン共沸し、1M zinc bromideジクロロメタン-イソプロパノール（85:15, v/v）溶液（30ml）を加えて1時間攪拌した。TLCで原料の消失を確認した後、ジクロロメタンを加えて1M 酢酸アンモニウム水溶液、飽和重曹水および水で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲル（15g）のカラム（内径2cm x 9cm）で精製し（2.5~3%メタノールにより溶出された）、溶出液を濃縮後ヘキサン中に滴下することにより粉末とした。収量：0.40g（0.33mmol 42%）。

他の配列を有するダイマー ユニットも同様に合成した。

r9merの固相合成

guanosine resin (23, B=ibG) (24mg, 5 μ mol) に対して表6の操作を繰り返した後、1M TMG-PAOジオキサン溶液（0.5ml）、ジオキサン（0.4ml）および水（0.1ml）を加えて30°Cで16時間振とうした。樹脂を濾別して50%ピリジン水で洗浄し、濾液と洗液を合わせて濃縮した後、Dowex 50x2（ピリジニウム型）のカラム（内径0.7cm x 4cm）に通して30%ピリジン水（20ml）で溶出した。溶媒留去後、残渣をピリジン（1ml）に溶解し、アンモニア水（10ml）を加えて55°Cに加熱した。5時間後アンモニア水を留去し、残渣を水に溶解して酢酸エチルで洗浄した後、溶媒を留去した。残渣に0.01N 塩酸（10ml）を加え、0.1N 塩酸でpH2.0に

して室温で3時間攪拌した後、0.1M アンモニア水で中和した。溶液を濃縮した後、Sephadex G-25のカラム（内径1.4cm x 40cm）に通し（0.1M TEABで溶出）、素通り画分を集めて濃縮した。水と共沸してTEABを除いた後、残渣を水1.4 mlに溶解し、そのうち400 μ lについて、図18のようにイオン交換HPLCで分取してSephadex G-25のカラム（内径1.4cm x 40cm）により脱塩した。収量：3.86 A_{260} ユニット（全量に分取すると、13.5 A_{260} ユニット（約0.15 μ mol）、担体上のグアノシンから約3%）。

r18merの固相合成

uridine resin (23, B=U) (24mg, 5 μ mol) に対して表6の操作を繰り返した後、1M TMG-PAOジオキサン溶液（0.5ml）、ジオキサン（0.4ml）および水（0.1ml）を加えて30°Cで16時間振とうした。樹脂を濾別して50%ピリジン水で洗浄し、濾液と洗液を合わせて濃縮した後、Dowex 50x2（ピリジニウム型）のカラム（内径0.7cm x 4cm）に通して30%ピリジン水（20ml）で溶出した。溶媒留去後、残渣をピリジン（1ml）に溶解し、アンモニア水（10ml）を加えて55°Cに加熱した。5時間後アンモニア水を留去して残渣に0.01N 塩酸（10ml）を加え、0.1N 塩酸でpH2.0にして室温で5時間攪拌した後、0.1M アンモニア水で中和した。溶液を濃縮後、Sephadex G-25のカラム（内径1.4cm x 40cm）に通し、素通り画分を集めて濃縮した。水と共沸してTEABを除いた後、残渣を水1.5mlに溶解し、そのうち300 μ lについて、図22のようにイオン交換HPLCで分取してSephadex G-25のカラム（内径1.4cm x 40cm）により脱塩した。水と共沸してTEABを除いた後、図23のように逆相HPLCで再分取した。溶出液を濃縮後、水と共沸することにより脱塩した。収量：2.51 A_{260} ユニット（全量に分取すると、12.6 A_{260} ユニット（約0.07 μ mol）、担体上のウリジンから約1.4%）。

第3章の実験

N-Acyl-5'-O-levulinyl-2'-O-tetrahydrofuranylnucleoside (38)

N-acyl-2'-O-tetrahydrofuranylnucleoside (19) (3mmol) をジオキサン (24 ml) に溶解し、2-chloro-1-methylpyridinium iodide (1.53g, 6mmol) のアセトニトリル懸濁液 (6ml) 中に滴下した。この懸濁液に levulinic acid (1.23ml, 12mmol) と 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (1.62g, 14.4mmol) のジオキサン溶液 (12ml) を滴下して、30分間攪拌した。クロロホルムと2%重曹水を加えて分液し、水層をクロロホルムで抽出した後、有機層を合わせて Na₂SO₄ で乾燥した。溶媒を留去してピリジン共沸を行った後、残渣をピリジン (5ml) に溶解し、4,4'-dimethoxytrityl chloride (0.51g, 1.5mmol) を加えて1時間攪拌した。メタノール (1ml) とクロロホルムを加えて水洗し、溶媒留去後、残渣を逆相カラム (内径 3cm x 6cm) で精製した (アセトン : 0.1% ピリジン水 = 25 : 75 で溶出された)。溶出液を濃縮後、ピリジンおよびトルエンと共沸し、残渣をシリカゲル (20g) のカラム (内径 3cm x 5.5cm) で精製した (1% メタノールにより溶出された)。5'-O-levulinyl-2'-O-tetrahydrofuranyluridine (38, B=U) は溶媒を留去することにより泡状とし、他の3種類はクロロホルムに溶解してヘキサン-エーテル (1:1, v/v) 中に滴下することにより粉末とした。

6-N-Benzoyl-5'-O-levulinyl-2'-O-tetrahydrofuranyladenine (38, B=bzA)

収量 : 0.61g (1.13mmol, 38%)

R_f (CHCl₃:MeOH=10:1) : 0.45. ¹H-NMR (CDCl₃/TMS) δ [ppm] : 1.9-2.1 (m, 4H, Thf), 2.19 (s, 3H, Lev), 2.5-2.9 (m, 4H, Lev), 3.43 (d, 1H, 3'-OH), 3.8-4.1 (m, 2H, Thf), 4.3-4.5 (m, 4H, H-3', 4', 5'), 4.92 (t, 1H, H-2'), 5.34 (br, 1H, Thf), 6.15 (d, 1H, H-1'), 7.5-8.1 (m, 5H, arom), 8.29 (s, 1H, H-2), 8.80 (s, 1H, H-8), 9.06 (s, 1H, -NH-).

2-N-Isobutyryl-5'-O-levulinyl-2'-O-tetrahydrofuranylguanosine (38, B=ibG)

収量: 0.98g (1.88mmol, 63%)

R_f (CHCl₃:MeOH=10:1) : 0.41. ¹H-NMR (CDCl₃/TMS) δ [ppm] : 1.27(d, 6H,ib), 1.8-2.1(m,4H,Thf), 2.16(s,3H,Lev), 2.5-2.9(m,5H,Lev,ib), 3.34(d, 1H,3'-OH), 3.8-4.1(m,2H,Thf), 4.3-4.6(m,4H,H-3',4',5'), 4.77(t,1H,H-2'), 5.19(br,1H,Thf), 5.85(d,1H,H-1'), 7.82(s,1H,H-8), 9.34(s,1H,-NH-).

4-N-Benzoyl-5'-O-levulinyl-2'-O-tetrahydrofuranylcytidine (38, B=bzC)

収量: 0.45g (0.87mmol, 29%)

R_f (CHCl₃:MeOH=10:1) : 0.51. ¹H-NMR (CDCl₃/TMS) δ [ppm] : 1.9-2.2 (m,4H,Thf), 2.22(s,3H,Lev), 2.5-2.9(m,4H,Lev), 3.62(d,1H,3'-OH), 3.8-4.6 (m,7H,H-2',3',4',5',Thf), 5.58(br,1H,Thf), 5.91(d,1H,H-1'), 7.4-8.0(m,6H arom,H-6), 8.26(d,1H,H-5), 8.75(br,1H,-NH-).

5'-O-Levulinyl-2'-O-tetrahydrofuranyluridine (38, B=U)

収量: 0.40g (0.97mmol, 32%)

R_f (CHCl₃:MeOH=10:1) : 0.41. ¹H-NMR (CDCl₃/TMS) δ [ppm] : 1.9-2.1 (m,4H,Thf), 2.20(s,3H,Lev), 2.5-2.9(m,4H,Lev), 3.36(d,1H,3'-OH), 3.8-4.5 (m,7H,H-2',3',4',5',Thf), 5.41(br,1H,Thf), 5.80(d,1H,H-5), 5.90(d,1H,H-1'), 7.68(d,1H,H-6), 8.99(br,1H,-NH-).

N-Acyl-5'-O-levulinyl-2'-O-tetrahydrofuranylnucleoside 3'-(β-cyano-ethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidite (40)

N-acyl-5'-O-levulinyl-2'-O-tetrahydrofuranylnucleoside (38) (0.5mmol) をテトラヒドロフラン (5ml) に溶解してN,N-diisopropylethylamine (0.35ml, 2mmol) を加え、(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylchlorophosphoramidite (0.24 ml, 1mmol) を滴下して1時間攪拌した。酢酸エチルを加えて飽和重曹水で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲル (10g) のカラム (内径3cm

x 3cm)で精製し(0.1%ピリジンを含む1%メタノールにより溶出した)、溶出液を濃縮してn-ペンタン(50ml)中に滴下し、沈澱をクロロホルムに溶解して溶媒を留去することにより泡状とした。収量: B=bzA, 0.29g (0.39mmol, 77%); B=ibG, 0.29g (0.41mmol, 81%); B=bzC, 0.25g (0.35mmol, 70%); B=U, 0.28g (0.45mmol, 90%)。

R_f (CHCl₃:MeOH=10:1): B=bzA, 0.55; B=ibG, 0.48; B=bzC, 0.57; B=U, 0.46. ³¹P-NMR (CDCl₃/trimethyl phosphate) δ [ppm]: B=bzA, 147.74, 148.62; B=ibG, 148.01, 148.62; B=bzC, 147.47, 148.15; B=U, 147.74, 148.01.

Uridine-CPG (41)

22と同様に合成したpentachlorophenyl (5'-O-levulinyl-2'-O-tetrahydrofuranlyluridine-3'-)succinate (0.12mmol)をDMF (1.5ml)に溶解し、aminopropyl-CPG-550 Å (120-200 mesh, NH₂:114 μmol/g, Fluka) (0.44g, 50 μmol)とtriethylamine (17 μl, 0.12mmol)を加えて、9時間振とうした。反応液を濾過し、CPGをDMFおよびピリジンで洗浄した後、0.1M 4-dimethylaminopyridineピリジン溶液(4.5ml)とacetic anhydride (0.5ml)を加えて10分間振とうし、再度濾過してピリジンおよびジクロロメタンで洗浄した。ヌクレオシド含量: 30 μmol/g。

保護されたダイマー (44)

40と同様に合成した5'-O-dimethoxytritylthymidine 3'-(β-cyanoethyl)-N, N-diisopropylphosphoramidite (0.37g, 0.5mmol)をアセトニトリル(4ml)に溶解し、4-N,3'-O-dibenzoyldeoxycytidine (0.26g, 0.6mmol)と0.5M tetrazoleアセトニトリル溶液(4ml)を加えて10分間攪拌した。氷冷下、水(1ml)とクロロホルムを加え、飽和重曹水および水で洗浄してNa₂SO₄で乾燥後、溶媒を留去した。

残渣に0.1M iodineルチジン-テトラヒドロフラン-水 (10:40:1, v/v/v) 溶液 (10ml) を加え、40分間攪拌した後、氷冷して0.2M sodium thiosulfate水溶液 (40ml) を加えた。クロロホルムで抽出して溶媒を留去した後、残渣を逆相カラム (内径3cm x 3cm) で精製し (アセトン: 0.1%ピリジン水=65:35で溶出された)、溶出液を濃縮してピリジン共沸を行った。残渣をクロロホルムに溶解し、ヘキサン中に滴下することにより粉末とした。収量: 0.33g (0.30mmol, 60%)。

R_f (CHCl₃:MeOH=10:1) : 0.38. ³¹P-NMR (CDCl₃/trimethyl phosphate) δ [ppm] : -4.76, -4.83.

カップリング条件の検討

5'-O-dimethoxytrityl-2'-O-tetrahydrofuranylluridine 3'-(β -cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidite (45) を40と同様に合成し、自動合成機 (Applied Biosystems 381A) により、thymidine-CPGカラム (1 μ mol) に対して次のように送液を行った。

- ① 3% trichloroacetic acidジクロロメタン溶液 (100秒)
- ② アセトニトリルで洗浄
- ③ 45のアセトニトリル溶液 (134.4mM) + 0.5M tetrazoleアセトニトリル溶液 (15秒)

または、上記混液 (5秒) とtetrazole溶液のみ (3秒) を3回繰り返す

- ④ 送液停止 (60ないし1200秒)
- ⑤ アセトニトリルで洗浄
- ⑥ 0.1M iodineルチジン-テトラヒドロフラン-水 (10:40:1, v/v/v) 溶液 (60秒)
- ⑦ アセトニトリルで洗浄
- ⑧ 3% trichloroacetic acidジクロロメタン溶液 (100秒)
- ⑨ アセトニトリルで洗浄

①と⑧のトリチル発色を比較することにより結合収率を求めた(図28)。

5'-O-Levulinyl-2'-O-tetrahydrofuranyluridine 3'-hydrogenphosphonate

phosphorus trichloride (0.26ml, 3mmol) と N-methylmorpholine (3.30ml, 30mmol) をジクロロメタン (25ml) に溶解し、1,2,4-triazole (0.69g, 10mmol) を加えて30分間攪拌した。氷冷下、5'-O-levulinyl-2'-O-tetrahydrofuranyluridine (0.27g, 0.65mmol) の1% N-methylmorpholineを含むジクロロメタン溶液 (12ml) を滴下し、室温に戻して20分間攪拌した。TLCで原料の消失を確認した後、1M TEAB (10ml) を加えて濃縮し、逆相カラム (内径3cm x 3cm) で精製した (0.1%ピリジン水で溶出した)。溶出液を濃縮し、ピリジンおよびトルエンと共沸した後、5% triethylamineを含むクロロホルム (2ml) に溶解してヘキサン-エーテル (1:1, v/v) (50ml) 中に滴下した。沈澱をクロロホルムに溶解し、溶媒を留去することにより泡状とした、収量: 0.27g (0.47mmol, 72%)。

^{31}P -NMR ($\text{CDCl}_3/\text{trimethyl phosphate}$) δ [ppm]: -1.19.

H-ホスホネート法によるU₁₀の合成

uridine-CPG (41) (33mg, 1 μ mol) のカラムを合成機 (Applied Biosystems 381A) に取り付け、0.5M hydrazine monohydrateピリジン-酢酸 (3:2, v/v) 溶液を300秒間流してアセトニトリルで洗浄した後、0.1M 5'-O-levulinyl-2'-O-tetrahydrofuranyluridine 3'-hydrogenphosphonateアセトニトリル-ピリジン (1:1, v/v) 溶液と0.5M pivaloyl chlorideアセトニトリル-ピリジン (1:1, v/v) 溶液を15秒間流して90秒間止めるという送液を9回繰り返した。アセトニトリルおよび98%ピリジン水で洗浄した後、0.1M iodineピリジン-水 (98:2, v/v) 溶液を900秒間流し、98%ピリジン水およびアセトニトリルで洗浄した。カラムにアンモニア水 (2ml) を1時間かけて通し、溶出液のアンモニア水を留去した後、残渣に0.01N 塩酸を加えた。0.1N 塩酸でpH2.0にして3時間攪拌した後、0.1M ア

ンモニア水で中和して逆相HPLCにより分析した(図29b)。

r10merの固相合成

uridine-CPG (41) (33mg, 1 μ mol) のカラムを合成機 (Applied Biosystems 381A) に取り付けて表7の反応を繰り返した後、カラムにアンモニア水 (2ml) を1時間かけて通し、溶出液を55°Cに5時間加熱した (U₁₀の場合のみ、加熱を行わなかった)。アンモニア水を留去した後、残渣に0.01N 塩酸を加え、0.1N 塩酸でpH2.0にして3ないし15時間攪拌した。A₉UとC₉Uの場合のみ溶液をエーテルで洗浄した後、0.1M アンモニア水で中和して図29~32のように逆相HPLCで分析した。溶液のうち100 μ lについて逆相HPLCで分取し、濃縮後、水と共沸した (収量は表8)。その一部について、5'末端を³²Pで標識した後、10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った (図33)。

r21merの固相合成

r10merの場合と同様に合成とCPGからの切断を行い、溶出液を55°Cに5時間加熱した後、アンモニア水を留去した。残渣に0.01N 塩酸を加え、0.1N 塩酸でpH2.0にして24時間攪拌した後、0.1M アンモニア水で中和した。溶液のうち200 μ lについて、図34のように逆相HPLCで分取し、溶出液を濃縮後、水と共沸することにより脱塩した。残渣を10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製し、切り取ったゲル片に水を加えて振とうすることにより溶出した。Sephadex G-25のカラム (内径1.7cm x 40cm) で脱塩後、溶出液を濃縮して水と共沸した。収量: 0.55 A₂₆₀ ユニット (全量を分取すると、16.4 A₂₆₀ ユニット (約0.08 μ mol), CPG上のウリジンから約8%)。

RNase T₂による分解

r21mer (0.025 A₂₆₀ ユニット) にRNase T₂の50mM 酢酸アンモニウム (pH4.5)

溶液 ($2\mu\text{l}$, 1 unit) を加えて 37°C で 2 時間反応させた。沸騰水浴中に 2 分間入れた後濃縮し、残渣を滅菌水 ($5.5\mu\text{l}$) に溶解して、kination 用緩衝液 ($2\mu\text{l}$)、 $100\mu\text{M}$ ATP ($1\mu\text{l}$)、 $[\gamma - ^{32}\text{P}]$ ATP ($1\mu\text{l}$, $0.16\mu\text{Ci}$) および T4 polynucleotide kinase ($0.5\mu\text{l}$, 2.5 units) を加えた。 37°C で 1 時間反応させた後、沸騰水浴中に 2 分間入れ、溶液のうち $1\mu\text{l}$ を濃縮して滅菌水 ($3\mu\text{l}$)、 0.2M 酢酸アンモニウム緩衝液 ($\text{pH}5.0$) ($1\mu\text{l}$) および nuclease P1 ($1\mu\text{l}$, $1\mu\text{g}$) を加えた。 37°C で 1.5 時間反応させた後、沸騰水浴中に 2 分間入れ、 $10\text{cm} \times 10\text{cm}$ のセルロース プレート (アビセル SF, フナコシ薬品) にスポットして、まずイソ酪酸-アンモニア水-水 ($66:1:33$, v/v/v)、続いて 0.1M リン酸ナトリウム水溶液 ($\text{pH}6.8$) - 硫酸アンモニウム-n-プロパノール ($100:60:2$, v/w/v) で展開してオートラジオグラフィー (-80°C 、一晚) を行った (図 37)。

引 用 文 献

1. K.L.Agarwal, H.Büchi, M.H.Caruthers, N.Gupta, H.G.Khorana, K.Kleppe, A.Kumar, E.Ohtsuka, U.L.RajBhandary, J.H.van de Sande, V.Sgaramella, H.Weber and T.Yamada, *Nature*, 227, 27 (1970)
2. H.G.Khorana, K.L.Agarwal, P.Besmer, H.Büchi, M.H.Caruthers, P.J.Cashion, M.Fridkin, E.Jay, K.Kleppe, R.Kleppe, A.Kumar, P.C.Loewen, R.C.Miller, K.Minamoto, A.Panet, U.L.RajBhandary, B.Ramamoorthy, T.Sekiya, T.Takeya and J.H.van de Sande, *J.Biol.Chem.* 251, 565 (1976)
3. H.G.Khorana, *Science*, 203, 614 (1979)
4. S.S.Jones, B.Rayner, C.B.Reese, A.Ubasawa and M.Ubasawa, *Tetrahedron* 36, 3075 (1980)
5. S.A.Narang, *Tetrahedron*, 39, 3 (1983)
6. K.Itakura, T.Hirose, R.Crea, A.D.Riggs, H.L.Heyneker, F.Bolivar and H.W.Boyer, *Science*, 198, 1056 (1977)
7. R.Crea, A.Kraszewski, T.Hirose and K.Itakura, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 75, 5765 (1978)
8. M.D.Matteucci and M.H.Caruthers, *J.Am.Chem.Soc.*, 103, 3185 (1981)
9. S.L.Beaucage and M.H.Caruthers, *Tetrahedron Lett.*, 22, 1859 (1981)
10. L.J.McBride and M.H.Caruthers, *Tetrahedron Lett.*, 24, 245 (1983)
11. B.C.Froehler, P.G.Ng and M.D.Matteucci, *Nucleic Acids Res.*, 14, 5399 (1986)
12. P.J.Garegg, I.Lindh, T.Regberg, J.Stawinski, R.Strömberg and C.Henrichson, *Tetrahedron Lett.*, 27, 4051 (1986)

13. K.Miyoshi, R.Arentzen, T.Huang and K.Itakura, *Nucleic Acids Res.*, 8, 5507 (1980)
14. F.Chow, T.Kempe and G.Palm, *Nucleic Acids Res.*, 9, 2807 (1981)
15. H.Ito, Y.Ike, S.Ikuta and K.Itakura, *Nucleic Acids Res.*, 10, 1755 (1982)
16. T.Tanaka and R.L.Letsinger, *Nucleic Acids Res.*, 10, 3249 (1982)
17. T.P.Patel, T.A.Millican, C.C.Bose, R.C.Titmas, G.A.Mock and M.A.W.Eaton, *Nucleic Acids Res.*, 10, 5605 (1982)
18. M.J.Gait, H.W.D.Matthes, M.Singh, B.S.Sproat and R.C.Titmas, *Nucleic Acids Res.*, 10, 6243 (1982)
19. V.Kohli, A.Balland, M.Wintzerith, R.Sauerwald, A.Staub and J.P.Lecocq, *Nucleic Acids Res.*, 10, 7439 (1982)
20. K.Itakura, J.J.Rossi and R.B.Wallace, *Ann.Rev.Biochem.*, 53, 323 (1984)
21. 大塚栄子, 岩井成憲, *細胞工学*, 5, 402 (1986)
22. M.Ikehara, E.Ohtsuka, T.Tokunaga, Y.Taniyama, S.Iwai, K.Kitano, S.Miyamoto, T.Ohgi, Y.Sakuragawa, K.Fujiyama, T.Ikari, M.Kobayashi, T.Miyake, S.Shibahara, A.Ono, T.Ueda, T.Tanaka, H.Baba, T.Miki, A.Sakurai, T.Oishi, O.Chisaka and K.Matsubara, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 81, 5956 (1984)
23. T.Tokunaga, S.Iwai, H.Gomi, K.Kodama, E.Ohtsuka, M.Ikehara, O.Chisaka and K.Matsubara, *Gene*, 39, 117 (1985)
24. E.Ohtsuka, S.Iwai, T.Tokunaga and M.Ikehara, *Chem.Pharm.Bull.*, 33, 3153 (1985)
25. S.Iwai, M.Koizumi, M.Ikehara and E.Ohtsuka, *Tetrahedron*, 43, 59 (1987)

26. K.K.Ogilvie and N.Y.Theriault, *Can.J.Chem.*, 57, 3140 (1979)
27. K.K.Ogilvie and M.J.Nemer, *Can.J.Chem.*, 58, 1389 (1980)
28. K.K.Ogilvie, N.Y.Theriault, J.-M.Seifert, R.T.Pon and M.J.Nemer, *Can.J.Chem.*, 58, 2686 (1980)
29. K.K.Ogilvie and M.J.Nemer, *Tetrahedron Lett.*, 21, 4159 (1980)
30. R.T.Pon and K.K.Ogilvie, *Tetrahedron Lett.*, 25, 713 (1984)
31. K.K.Ogilvie, M.J.Nemer and M.F.Gillen, *Tetrahedron Lett.*, 25, 1669 (1984)
32. N.Usman, R.T.Pon and K.K.Ogilvie, *Tetrahedron Lett.*, 26, 4567 (1985)
33. N.Usman, K.K.Ogilvie, M.-Y.Jiang and R.J.Cedergren, *J.Am.Chem.Soc.*, 109, 7845 (1987)
34. T.Tanaka, S.Tamatsukuri and M.Ikahara, *Nucleic Acids Res.*, 14, 6265 (1986)
35. T.Tanaka, S.Tamatsukuri and M.Ikehara, *Nucleic Acids Res.*, 15, 7235 (1987)
36. J.A.J.den Hartog and J.H.van Boom, *Recl.Trav.Chim.Pays-Bas*, 100, 275 (1981)
37. J.A.J.den Hartog, G.Wille and J.H.van Boom, *Recl.Trav.Chim.Pays-Bas*, 100, 320 (1981)
38. D.G.Norman, C.B.Reese and H.T.Serafinowska, *Tetrahedron Lett.*, 25, 3015 (1984)
39. E.Ohtsuka, A.Yamane, T.Doi and M.Ikehara, *Tetrahedron*, 40, 47 (1984)
40. I.Hirao, M.Ishikawa and K.Miura, *Nucleic Acids Res.*, Symp.Ser.No.16, 173 (1985)
41. E.Ohtsuka, J.Matsugi, A.Yamane, H.Morioka and M.Ikehara, *Chem.Pharm.Bull.*, 33, 4152 (1985)

42. T.Tanaka, K.Fujino, S.Tamatsukuri and M.Ikehara, Chem.Pharm.Bull., 34, 4126 (1986)
43. R.Kierzek, M.H.Caruthers, C.E.Longfellow, D.Swinton, D.H.Turner and S.M.Freier, Biochemistry, 25, 7840 (1986)
44. H.Tanimura, T.Fukazawa, M.Sekine, T.Hata, J.W.Efcavitch and G.Zon, Tetrahedron Lett., 29, 577 (1988)
45. E.Ohtsuka, Y.Taniyama, S.Iwai, T.Yoshida and M.Ikehara, Chem.Pharm. Bull., 32, 85 (1984)
46. S.Iwai, E.Yamada, M.Asaka, Y.Hayase, H.Inoue and E.Ohtsuka, Nucleic Acids Res., 15, 3761 (1987)
47. S.Iwai and E.Ohtsuka, Tetrahedron Lett., 29, 5383 (1988)
48. S.Iwai and E.Ohtsuka, Nucleic Acids Res., 16, 9443 (1988)
49. E.Ohtsuka, S.Morioka and M.Ikehara, J.Am.Chem.Soc., 94, 3229 (1972)
50. V.A.Efimov, A.A.Buryakova, S.V.Reverdatto, O.G.Chakhmakhcheva and Yu.A.Ovchinnikov, Nucleic Acids Res., 11, 8369 (1983)
51. E.Felder, R.Schwyzer, R.Charubala, W.Pfleiderer and B.Schulz, Tetrahedron Lett., 25, 3967 (1984)
52. R.B.Woodward, K.Heusler, J.Gosteli, P.Naegeli, W.Oppolzer, R.Ramage, S.Ranganathan and H.Vorbrüggen, J.Am.Chem.Soc., 88, 852 (1966)
53. J.F.Carson, Synthesis, 1979, 24
54. G.Just and K.Grozinger, Synthesis, 1976, 457
55. E.Ohtsuka, S.Shibahara and M.Ikehara, Chem.Pharm.Bull., 29, 3440 (1981)
56. E.Ohtsuka, Y.Taniyama, R.Marumoto, H.Sato, H.Hirosaki and M.Ikehara, Nucleic Acids Res., 10, 2597 (1982)

57. S.Iwai, A.Imura, Y.Inoue, H.Inoue, K.Miura, T.Tokunaga, M.Ikehara and E.Ohtsuka, *Chem.Pharm.Bull.*, 34, 4724 (1986)
58. H.Köster, J.Biernat, J.McManus, A.Wolter, A.Stumpe, Ch.K.Narang and N.D.Sinha, *Tetrahedron*, 40, 103 (1984)
59. C.B.Reese and A.Ubasawa, *Nucleic Acids Res.*, *Symp.Ser.No.7*, 5 (1980)
60. A.Maxam and W.Gilbert, *Methods Enzymol.*, 65, 499 (1980)
61. O.Chisaka, S.Iwai, E.Ohtsuka and K.Matsubara, *Gene*, 45, 19 (1986)
62. E.Jay, R.Bambara, R.Padmanabhan and R.Wu, *Nucleic Acids Res.*, 1, 331 (1974)
63. C.B.Reese and P.A.Skone, *Nucleic Acids Res.*, 13, 5215 (1985)
64. C.G.Kruse, F.L.Jonkers, V.Dert and A.van der Gen, *Recl.Trav.Chim. Pays-Bas*, 98, 371 (1979)
65. V.Kohli, H.Blöcker and H.Köster, *Tetrahedron Lett.*, 21, 2683 (1980)
66. M.D.Matteucci and M.H.Caruthers, *Tetrahedron Lett.*, 21, 3243 (1980)
67. W.T.Markiewicz, E.Biala, R.W.Adamiak, R.Kierzek, A.Kysezewski and M.Wiewiórowski, *Nucleic Acids Res.*, *Symp.Ser.No.7*, 115 (1980)
68. K.Tatei, K.Takemura, A.Mayeda, Y.Fujiwara, H.Tanaka, A.Ishihama and Y.Ohshima, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 81, 6281 (1984)
69. A.Mayeda, K.Tatei, H.Kitayama, K.Takemura and Y.Ohshima, *Nucleic Acids Res.*, 14, 3045 (1986)
70. S.M.Mount, *Nucleic Acids Res.*, 10, 459 (1982)
71. S.Chladek, J.Zemlicka and F.Sorm, *Collect.Czech.Chem.Comm.*, 31, 1785 (1966)
72. B.S.Sproat, P.Rider and B.Beijer, *Nucleic Acids Res.*, 14, 1811 (1986)

73. V.A.Efimov, O.G.Chakhmakhcheva and Yu.A.Ovchinnikov, *Nucleic Acids Res.*, 13, 3651 (1985)
74. V.A.Efimov, A.A.Buryakova, I.Y.Dubey, N.N.Polushin, O.G.Chakhmakhcheva and Yu.A.Ovchinnikov, *Nucleic Acids Res.*, 14, 6525 (1986)
75. R.D.Guthrie and T.J.Lucas, *Carbohydr.Res.*, 33, 391 (1974)
76. T.M.Cao, S.E.Bingham and M.T.Sung, *Tetrahedron Lett.*, 24, 1019 (1983)
77. M.H.Caruthers, D.Dellinger, K.Prosser, A.D.Barone, J.W.Dubendorff, R.Kierzek and M.Rosendahl, *Chemica Scripta*, 26, 25 (1985)
78. G.A.van der Marel, G.Wille and J.H.van Boom, *Recl.Trav.Chim.Pays-Bas* 101, 241 (1982)
79. N.D.Sinha, J.Biernat, J.McManus and H.Köster, *Nucleic Acids Res.*, 12 4539 (1984)
80. G.Zon, K.A.Gallo, C.J.Samson, K.Shao, M.F.Summers and R.A.Byrd, *Nucleic Acids Res.*, 13, 8181 (1985)
81. X.Gao, B.L.Gaffney, M.Senior, R.R.Riddle and R.A.Jones, *Nucleic Acids Res.*, 13, 573 (1985)
82. B.H.Dahl, J.Nielsen and O.Dahl, *Nucleic Acids Res.*, 15, 1729 (1987)
83. J.G.Moffatt and H.G.Khorana, *J.Am.Chem.Soc.*, 83, 649 (1961)
84. R.T.Pon, M.J.Damha and K.K.Ogilvie, *Nucleic Acids Res.*, 13, 6447 (1985)
85. J.S.Eadie and D.S.Davidson, *Nucleic Acids Res.*, 15, 8333 (1987)
86. R.T.Pon, N.Usman, M.J.Damha and K.K.Ogilvie, *Nucleic Acids Res.*, 14, 6453 (1986)
87. M.M.Warshaw and I.Tinoco,Jr., *J.Mol.Biol.*, 20, 29 (1966)

88. L.M.Epstein and J.G.Gall, *Cell*, 48, 535 (1987)
89. M.Koizumi, S.Iwai and E.Ohtsuka, *FEBS Lett.*, 228, 228 (1988)
90. M.Silberklang, A.Prochiantz, A.-L.Haenni and U.L.RajBhandary, *Eur.J. Biochem.*, 72, 465 (1977)
91. C.B.Reese, H.T.Serafinowska and G.Zappia, *Tetrahedron Lett.*, 27, 2291 (1986)
92. T.S.Rao, C.B.Reese, H.T.Serafinowska, H.Takaku and G.Zappia, *Tetrahedron Lett.*, 28, 4897 (1987)
93. 池原森男, 大塚栄子, 蛋白質 核酸 酵素, 26, 531 (1981)
94. W.T.Markiewicz, *J.Chem.Res.*, 1979, (S) 24, (M) 0181
95. E.Ohtsuka, A.Yamane and M.Ikehara, *Chem.Pharm.Bull.*, 31, 1534 (1983)
96. W.A.Jacobs and M.Heidelberger, *J.Am.Chem.Soc.*, 39, 2196 (1917)