



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

氏名・(本籍)	岩井成憲
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 8460 号
学位授与の日付	平成元年2月28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	長鎖オリゴヌクレオチドの固相合成に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 北川勲 (副査) 教授 岩田 宙造 教授 富田 研一 教授 枝井雅一郎

論文内容の要旨

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り、糖部2'位の水酸基の有無によりリボ核酸(RNA)とデオキシリボ核酸(DNA)に大別される。核酸の断片であるオリゴ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、まずリン酸ジエステル法、続いてリン酸トリエステル法が確立された。最近ではDNAの断片であるオリゴデオキシリボヌクレオチドの合成において、ホスホアミダイト法や固相合成法が開発・改良され、迅速かつ簡便な合成が可能となっている。一方、RNAの断片である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のため、デオキシ体の場合ほど容易ではない。

著者は、長鎖オリゴヌクレオチドの化学合成法を開発することを目的として、オリゴヌクレオチドブロックの固相合成とそのDNA合成への応用、および2'-テトラヒドロフラニル保護を用いたRNA断片の固相合成に関する研究を行った。

リン酸トリエステル法を用いてオリゴヌクレオチドを固相合成する場合、3'位で担体に結合したヌクレオシドに対してモノマーあるいはダイマーを順次縮合する方法が一般的であるが、この方法の縮合収率は90~95%であるので鎖が長くなるほど通算収率は低下し、縮合反応が起こらなかった短鎖のものや副生成物により精製が困難になるため、合成できるオリゴヌクレオチドの鎖長には限界がある。そこで、縮合単位としてある程度の長さのオリゴヌクレオチドブロックを用いることにより担体上での縮合回数を少なくすればさらに長鎖のものを合成することが可能であると考え、これに用いるブロックを固相合成する方法を検討した。

まず、ヌクレオシドの3'位と担体(1%架橋ポリスチレン)との結合部に亜硝酸イソアミルで選択

的に切断されるリン酸アミデートを応用したヌクレオチド樹脂を合成した。これをピリジン-酢酸(1:1, v/v)中亜硝酸イソアミルで処理すると、3時間でほぼ定量的に切断され、ヌクレオシド3'-リン酸ジエステルが得られた。このヌクレオチド樹脂に対してダイマーを用いた鎖長伸長操作を繰り返し、3種類のヘプタマーおよびノナーブロックを合成した。亜硝酸イソアミルで担体から切断した各ブロックは、逆相カラムクロマトグラフィーにより精製し、担体上のヌクレオチドからの通算収率は31~40%であった。

得られたオリゴヌクレオチドブロックを用いて担体上でのブロック縮合を行い、ヒト神経成長因子遺伝子の一部であるd35merを合成した。このとき、ブロックの縮合収率が比較的低かったので、縮合単位の鎖長と収率の関係を調べると、鎖が長くなるほど収率が低下し、その程度は担体の種類によって異なることが明かとなった。ブロック縮合により合成されたd35merは高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で容易に精製することができた。

オリゴヌクレオチドブロックを脱保護すると3'末端にO-クロロフェニルリン酸を有するDNA断片となり、これはDNAポリメラーゼによるプライマーからの鎖長伸長を止めるストッパーとして利用できる。そこで、前述のヌクレオチド樹脂を、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となるd16merの固相合成にも応用した。

オリゴリボヌクレオチドの化学合成のための2'-水酸基の保護基として、著者は酸により容易に脱保護されるテトラヒドロフラニル基を用いた。この保護基を用いて通常の固相合成を行うと、5'-水酸基を保護するジメトキシトリチル基を除去する際にテトラヒドロフラニル基もはずれてしまう。そこで、鎖長伸長操作中に酸処理を全く含まない固相合成法を検討した。

まず、テトラヒドロフラニル基と組み合わせることのできるリン酸アミデート保護を用いて5'→3'方向に鎖を伸長することにより、mRNA 5'-および3'-スプライス部位に関連したオリゴリボヌクレオチドの合成を行った。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-アミニデートに対して亜硝酸イソアミル処理と縮合反応を繰り返すものであり、縮合単位としてモノマーを用いてr9mer、ダイマーユニットを用いてr18merを合成した。鎖長伸長操作終了後、担体から切断して脱保護を行い、HPLCで精製することにより、担体上のヌクレオチドからの通算収率約3%でr9merを、約1.5%でr18merを得た。

上述の合成法はリン酸トリエステル法を応用したものであり、さらに、担体上でリン酸の活性化を行わなければならないので縮合収率が比較的低く、この方法により合成できるオリゴリボヌクレオチドはr18merがほぼ限界であることがわかった。そこで、より長鎖のものを合成するために、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ニル基を用い、高収率で結合反応を行うことのできるホスホアミダイト法による合成を検討した。

controlled pore glassに結合したウリジンに対して自動合成機を用いて鎖長伸長反応を行い、4種類のr10mer(A₉U, G₉U, C₉U, U₁₀)を合成した。この方法では、ヒドラジンによるレブリニル基の除去に10分間、テトラゾールを活性化剤とする結合反応に20分間を要したが、脱保護後逆相HPLCで分取するだけで純粋な目的物が得られ、担体上のウリジンからの通算収率も30%前後とかなり高いもの

であった。

そこで次に、この方法を用いて自己切断反応を起こすイモリのサテライトDNA転写物の一部であるr21merの合成を行った。脱保護後逆相HPLCとゲル電気泳動により精製して通算収率約8%で目的物を得、酵素反応と電気泳動・薄層クロマトグラフィー等により塩基配列と3'-5'リン酸ジエステル結合を確認した。

論文の審査結果の要旨

化学合成された長鎖DNAおよびRNA断片は、生化学、分子生物学の研究、蛋白質工学において重要な役割を果している。本論文は、DNAおよびRNA断片の化学合成を目指としたオリゴヌクレオチドの固相合成法の開発を行った。そして、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、縮合単位となる保護されたオリゴデオキシヌクレオチドブロックの固相合成に成功し、②2'-テトラヒドロフラニル保護を用い、リン酸-P-アニシデートを用いた5'→3'方向のオリゴリボヌクレオチド固相合成法を開発し、③2'-テトラヒドロフラニル保護、5'-レブリニル保護とホスホアミダイト法を応用し、オリゴリボヌクレオチドの固相合成に成功した。このホスホアミダイト法は、さらに長鎖のRNA断片の化学合成に応用の可能性がある。

以上の成果は、薬学博士の学位論文として充分価値あるものと認められる。