ヌクレオチドの合成と分離

大塚 栄子*
森岡 茂夫*

はじめに

オリゴヌクレオチドの合成を化学的縮合によって行なう場合、官能基の保護が必要である。ごく鎖が短い場合は混合物を合成しそれらを分離するという方法も可能であるが鎖が長くなると困難である。したがって保護した中間体のオリゴヌクレオチドの分離精製は重要な問題となってくる。t-RNAの構造決定にみられるように保護基のないオリゴマーの分離精製技術はかなり進歩しているのに比べて合成中間体の単離精製法は遅れているように思われる。最近分離法の改良法として合成中間体に lipophilic な保護基を用いて有機溶媒による抽出を可能にするという試みがなされており有利な方法になりつつある。合成法については、総説もあり、¹⁾²⁾³⁾天然から得られたオリゴヌクレオチドの分離法についても実験書⁴⁾に詳しいのでここでは技術というには程遠い段階ではあるが、合成中間体の単離に限定して記述したい。少数の例は既に実験書⁵⁾に書いた通りであるが、以下リボオリゴヌクレオチドとデオキシオリゴヌクレオチドの順序で述べる。

1 リボオリゴヌクレオチドの合成と分離

1. 保護したジヌクレオシドモノホスフェート (XpY) の合成と抽出法による分離

特異的に3'→5'結合のみを持つXpYは保護したヌクレオシド3'磷酸と5'水酸基のみが無保護のヌクレオシドの縮合によって合成できる。⁶⁾2'位水酸基とアミノ基の保護にアシル基を用いるKhoranaの方法は脱離の際に磷酸ジエステルの2'→5'への転移がないことを特徴としているが、5'水酸基にトリチル誘導体を用いると酸処理により特異的に除かれ

るので5'方向に鎖を延ばすことができる。脱トリチルした中間体の分離はTEAEセルロースの含水エヌノール中のトリエチルアンモニウムアセートを用いるイオン交換クロマトグラフィーによって行なわれていた⁷⁾が、我々は抽出および沈澱によってヌクレオシド、ジヌクレオシドモノホスフェート、ヌクレオチドをアシル基を持ったまま分離する方法を用いている⁸⁾。塩基配列が異なると抽出条件を変える必要があるがアシル保護したモノヌクレオチドは紙電気泳動(PEP)で検出できるので水に難溶な保護したジヌクレオシドモノホスフェートに混在しているか否かを検べながら抽出条件を選ぶ。縮合剤としてジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)を用いると過剰の試薬はエーテル・ペンタンに溶解、反応により生じたジシクロヘキシルウレア(DCU)は50%ピリジン水から沈澱として除き得るが、アリルスルホニルクロリド類(トリイソプロピルベンゼンスルホニルクロリドTPS等)を用いると、スルホン酸誘導体や塩酸を抽出により完全に除くことが困難である。スルホン酸は解離が1個でイオン交換クロマトでもジヌクレオシドモノホスフェートと分離しないことがあるのでXpY型の化学物の縮合ではDCCの方が望ましい。

[実験例1] $C(\overset{Bz}{OBz})-P-G(\overset{iBu}{OBz})_2$ (3)の合成と分離

1) 5'-0-モノメトキシトリチルN, 2'-0-ジベンゾイルシチジン3'磷酸(MMT-C($\overset{Bz}{OBz}$)-P) (1)*の合成

シチジン2', 3'環状リン酸(4-モルホリンN, N'ジシクロヘキシルカルボキサミジニウム塩, mmols, 2.39g)²⁾をDMF(25ml)に溶かしピリジンで共沸して水を除く、モノメトキシトリチルクロリド(MMT-Cl, 6mmols)を加えて溶かす。別にピリジン1.35ml-DMF 3.0mlの混液を調製し、湿気をさけて30分

Synthesis and separation of nucleotides:

* Eiko OHTSUKA, Shigeo MORIOKA; 大阪大学薬学部 (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University)

*) 化合物番号図参照

図 1.

間で滴下する。密栓して25℃, 16時間反応させ、一部をPEP (PH7.5, 0.05 M 重炭酸トリエチルアンモニウム緩衝液⁵⁾)で検し、(MMTTrCp > R_{Cp} 0.55, Cp > R_{Cp} 0.76)反応の完結を確認後*) 氷冷下エタノール(8 ml)一濃アンモニア水(2 ml)の混液を加えて反応を止める。ピリジンを加えながら約10 ml迄濃縮し水40 mlを加え、エーテル20 mlずつで3回抽出してMMTTrOHを除く。水層をn-ブタノール酢酸エチル(1:1)混液で水層に目的物を検出しなくなる迄抽出する。有機層を合し少量の水で洗い、ピリジン存在下乾固し無水ピリジン溶液(30 ml)をエーテル(600 ml)に滴下し析出する沈澱を遠心分離して集めエーテルで3度洗いP₂O₅のデシケーター中減圧乾燥する。全量をDMF(60 ml)に溶し、水(120 ml)を加え、pHスタットを用い1 N NH₄OHでpHを7.0に調節する。RNase A 5 mgを加え、37℃, 24時間水解させる。一部をPEPにより検して原料の消失を確認後(MMTTrCp(3') R_{Cp} 0.81)エタノール(80 ml)を加えピリジン型Dowex 50 W×2カラム(2.3×25 cm)を通し、カラムをDMF-エタノール-水-ピリジン(4:6:9:1)の混液で洗出する。流出液を合し減圧下ピリジン存在下濃縮し tetraethylammonium benzoate (pH 7.0 40 mmole)⁵⁾の水溶液を加え減圧下濃縮しピリジンと共沸して乾固し無水とし、さらにトルエンと共沸して、ピリジンを除き無水安息香酸

*) 紫外ランプにより検出する。

(80 mmole)と25~30℃で24時間反応後、更に50℃で16時間加熱する。以下に述べる操作を一部について行なって反応が不十分な時は時間を延長する。反応混合物に氷冷下50%ピリジン水(60 ml)を加えn-ペンタン(60 ml)2度抽出し水層をクロロホルムで2度抽出する。クロロホルム層を水洗後濃縮し、ピリジンと扱って無水とした後無水ピリジン溶液(25 ml)をエーテル-ペンタン(3:2, 500 ml)に滴下して沈澱とし、遠心分離して集める。ピリジン(40 ml)を加えてとかし無水酢酸(20 ml)を加えて25~30℃で24時間放置後溶媒を減圧留去。氷冷下50%ピリジン水(60 ml)を加えて反応を止める。ピリジン型Dowex 50 W×2のカラム(2×25 cm)を通し25%ピリジン水で洗出、流出液と洗液を合し室温2時間放置後、20℃以下で減圧濃縮、ピリジンで無水としたピリジン溶液(25 ml)をエーテル-ペンタン(3:2, 500 ml)に滴下し沈澱を集め、エーテルで洗ってP₂O₅のデシケーター中減圧乾燥する。一部を80%酢酸で25℃1時間処理してMMTTr基を脱し溶媒A^{*)}のppcでC(=O)Bz-P (Rf 0.66, Cp 0.20)として確認する。収量 2.79 g (3.2 mmole 80%)

2) 5'-0-モノメトキシトリチルN, 2'-0-ジイソブチルグアノシン3' 磷酸(MMTTr G(OiBu)₂-P) (4)の合成

グアノシン3' 磷酸(ナトリウム塩)⁶⁾ (22700 A₂₆₀ 2 mmole)を10%ピリジン水に溶かしピリジン型Dowex 50 W×2のカラムを通してピリジン塩とした後4-モルホリンN, N'-ジシクロヘキシルカルボキサミジン⁸⁾ (4 mmole)を加え減圧乾固しピリジンで共沸して無水とした後DMF(20 ml)を加えて溶かしDMF-dimethylacetal⁹⁾ (4 ml)を攪拌下加え、室温で12時間放置する。一部をPEP(G_P^{DMM} R_{Gp} 0.95), ppc溶媒A (Rf 0.27, Gp 0.1)により検して原料の消失を確認後試薬および溶媒を留去する。残査をピリジン処理して無水とした後、無水DMF(80 ml)にとかしMMTTrCl(4 mmole)を加え、ピリジン(0.6 ml)-DMF(4 ml)の混液を2~3時間に分けて滴下後密栓して室温放置する。一部をPEP(R_{Gp}^{DMM} 0.65), PPC溶媒A (Rf 0.79, Gp: 0.10)により検する。6時間後濃アンモニア水(100 ml)を加え密栓して25℃12時間放置後、約半量迄濃縮し、0.5 Nアンモニア水(15 ml)を加えジクロルメタン(6 ml×3回)抽出してビストリチル体を除く。水層をn-ブ

*) 溶媒 A: EtOH-1 M NH₄OAc (pH 7.5), 7:3

タノール-酢酸エチル(2:1)混液により抽出し有機層を合し水洗後ピリジンの存在下に乾固する。ppc 溶媒 A (MMTr Gp Rf 0.64, Gp 0.10) (収量 12,400 A₂₆₀, 1.1 mmole), 残査を 25%ピリジン水に溶かしピリジン型 Dowex 50 W×2 カラムを通してピリジン塩とし tetrathylammonium isobutyrate 水溶液 (pH 7.5, 11 mmole) を加え, 溶媒を留去し [例 1] のベンゾイル化同様ピリジン, トルエンの順で処理する。無水酢酸 (2.2 mmole) を加えて密栓し 30°C 5 日間放置する。一部を 50%ピリジン水で 1 日処理した後溶媒を留去し, 80%酢酸で脱 MMTr し ppc 溶媒 A により検する。G(ⁱBu)₂—P Rf 0.71, Gp 0.10) 氷冷下 50%ピリジン水 (50 ml) を加えピリジン型 Dowex 50 W×2 のカラム (2.6×12 cm) を通し樹脂容量の 3 倍量の 50%ピリジン水で洗い, 流出液洗液を合し 25°C 12 時間放置する。ピリジンの存在下浴温 20°C 以下で減圧濃縮し, 無水ピリジン溶液 (15 ml) をエーテル-ペンタン (3:2, 300 ml) に滴下し沈澱を遠心分離して集めエーテルで洗い減圧乾燥する。収率はほぼ定量的。ppc 溶媒 A (Rf 0.80, Gp 0.07)

3) C(^{Bz}oBz)—P—G(ⁱBu)₂ (3) の合成¹⁰⁾

MMTr C(^{Bz}oBz)—P ピリジン塩 (1) (0.5 mmole) と G(ⁱBu)₂ (2)⁵⁾ (0.7 mmole) と合せてピリジンと共沸して無水とし, 無水ピリジン中 DCC (5 mmole) と 3 日間 23°C で反応させる。一部をとり 50%ピリジン水を加え DCC をペンタンで除いた後 15 N メタノール性アンモニアで 25°C 24 時間処理して保護基を脱し MMTr CpG の生成を PEP によって確認後全体を水-ピリジン処理し*) DCC をペンタンで抽出した後析出する DCU を汫去。ピリジンと共沸して無水とし, このピリジン溶液 (3~4 ml) をエーテル-ペンタン (3:2, 200 ml) に攪拌下滴下し沈澱を遠心分離して集め同溶媒で洗う。デシケーター中減圧乾燥後 80% 酢酸 (20 ml) 中 25°C 1 時間処理して脱 MMTr 基する。酢酸を減圧留去後水と少量のブタノールを加えて共沸をくり返し, 最後にピリジンと共沸し無水ピリジン溶液として 20~40 倍量のエーテルに滴下して沈澱させる。この時ピリジンの量が少ないとヌクレオシド (2) も共沈することがある。沈澱をエーテルで洗った後一部脱保護して ppc

溶媒 A でグアノシンがないことを確める。エーテル層に C(^{Bz}oBz)—P—G(ⁱBu)₂ (3) がないことを確かめる必要がある。沈澱には (3) 以外に原料 (1) が混在しているのでブタノール (20 ml) と水 (6 ml) に溶解して分液し水層に (1) を抽出する。水で抽出困難な場合は 10%ピリジン水またはピリジン濃度を次第に高くして抽出する。ブタノール層に原料 (1) またはそのピロ化合物がないことを確かめた後, 溶媒を留去ピリジンと共沸しピリジン溶液からエーテルまたは, エーテル-ペンタン (3:2) の混液に滴下し沈澱を遠心分離して集めエーテルで洗い減圧乾燥する。長期保存する場合はシリカゲル等と密閉容器中 20°C に保つ。収率は反応がほぼ定量的に進行するが操作中のロスがあるので 85~90% である。

2. 保護したトリヌクレオシドジホスフェート (XpYpZ) の合成と TEAE—セルロースによる分離

原理的にはダイマーとトリマーの溶解度の差を利用して抽出によって保護したトリマー (XpYpZ) を単離することが可能であるが, 前段階で抽出法を用いた場合次段階でイオン交換による分離精製を行なう方がよいと考えられる。我々は TEAE—セルロースの含水エタノール中のトリエチルアンモニウムアセテートを溶出液とするイオン交換クロマトによって末端リンのないヘキサマーまでの保護リボオリゴヌクレオチドの分離を行なった¹¹⁾が, 鎖が長くなるにつれ溶出に要するアセテートイオン強度が高くなること, また電荷の差一個が分子全体の電荷に対して占める割合が減少するので分離が悪くなることにこの方法の限界があるようである。

[実験例 2] G(ⁱBu)₂—P—C(^{Bz}oBz)—P—G(ⁱBu)₂ (5) の合成と分離¹⁰⁾

C(^{Bz}oBz)—P—G(ⁱBu)₂ (3) (9,700 A₂₆₀, 0.27 mmole) と MMTr G(ⁱBu)₂—P (4) (7,250 A₂₆₀, 0.45 mmole) を 50%ピリジンに溶かし, ピリジン型 Dowex 50 W×2 の小カラムを通し, 無水ピリジン溶液からエーテル中に沈澱させた後, ピリジン共沸し無水ピリジン (5 ml) 中 DCC (10 mmoles) を 27°C 5 日間反応させる。水 (4 ml) とペンタンを加え室温 12 時間放置後ペンタン抽出。汫過を行ない, 無水ピリジン溶液をエーテル-ペンタン (3:2) に加えて沈澱とする。一部を 80%酢酸処理 (1 時間) 次に 15 N メタノール性アンモニア処理を行なって溶媒 B*)

*) 室温数時間または 4°C 12 時間程度に止める方がアシル保護の分解を防ぐ上から好ましい。複雑なピロ磷酸を分解する為にはかなり長時間を要する。たとえば $\begin{matrix} \text{CEpT} \\ | \\ \text{CEpT} \end{matrix}$ を CEpT に分解するには反応を 50%ピリジン水で止めてから約 48 時間を要した。

*) 溶媒 B : 2・プロパノール : 濃アンモニア : 水, 7 : 1 : 2

の ppc によって GpCpG (Rf 0.02) の生成を検べる。Gp (Rf 0.09), CpG (Rf 0.20) の反応の進行を確認後脱 MMTTr 基を行ない (80% 酢酸 1 時間) 酢酸を水、エタノールで共沸して除き、ピリジン (5 ml) に溶解し、80% エタノールで全量 100 ml として TEAE セルロース (アセテート型) のカラムにかける。カラムは次のように調製する。TEAE-セルロース (30 g) を一度水に懸濁後ろ取り 0.5 N NaOH (500 ml) に懸濁してゆるやかに約 20 分攪拌しヌッチェでゆるやかに減圧ろ過し、再度この操作をくり返す。水洗後 0.5 N HCl (500 ml) に懸濁して 20 分攪拌後十分水洗いし、再度 0.5 N NaOH (500 ml) に懸濁して攪拌する。ろ取りして十分水洗後、水に懸濁し、2 N 酢酸によって pH を 4 附近に合わせる。吸引ろ取りした後 1 M-アンモニウムアセテート (500 ml) に懸濁させ pH が変化しないことを確認後吸引ろ取り十分水洗いする。最後にゆるやかに吸引ろ取りした後直ちにアセトン (約 2~3 l) に攪拌下懸濁させカラム (2 × 60 cm) の上約 1.5 m 程度の圧をかけてつめる。この後 80% エタノールにアセトンを置換する。試料のアルコール溶液をアプライする。カラムを先づ 80% エタノールで洗い、次に 80% エタノール (2 l) とトリエチルアミン

図 2.

0.1 M と酢酸 0.2 M の 80% エタノール溶液 (2 l) からなる直線濃度勾配を用いて溶出する。溶出パターンは図 (2) に示す。ピーク III がトリヌクレオチド (5) (2,640 A₂₆₀) 20%, I は (3) (2,390 A₂₆₀), II は原料 (4) の脱 MMTTr 体 (2,710 A₂₆₀) である。ピーク III に相当するアルコール溶液を集め減圧下に溶媒留去後ブタノールに溶かし、紫外線吸収をもつ物質の移行のないことを確認しながら十分水洗いする。減圧下に溶媒留去し、無水ピリジン溶液をエーテル-ペンタン (3:2) に滴下し析出する沈澱を遠心分離して集めエーテルで洗って P₂O₅ デシケーター中減圧乾燥する。一部完全脱保護したダイヌクレオチド CpG, トリヌクレオチド GpCpG を

各々 RNase A, RNase M により水解して生ずるモノマーの比が CpG (Cp:G, 1:1), GpCpG (Gp:Cp:G, 1:1:1) の理論値とほぼ一致することより同定する。

Ⅱ デオキシリボオリゴヌクレオチドの合成と分離

既に Khorana 等により化学合成と酵素的合成を巧みに組合せて鎖長 77 個よりなる酵母のアラニン t-RNA の遺伝子の合成がなされている。¹²⁾ デオキシオリゴヌクレオチドの合成は、主に 5' 側ヌクレオシド (X) またはヌクレオチド (pX) の 3' 水酸基に 3' 側ヌクレオチド (pY) を縮合して 3' → 5' 結合を得る方法が用いられている。分離法についてはリボオリゴヌクレオチドの項で述べたのと同様イオン交換セルロースクロマトによる方法のほか、分離法に特徴のある合成法も幾つか報告されている。たとえば種々のポリマー支持体を用いる合成がある。これは 5' 末端または 3' 末端のヌクレオシド、ヌクレオチドをポリマー支持体に固定し、次々と次のヌクレオチドを縮合してゆく方法で反応後、ポリマーに結合した生成物をろ過により未反応ヌクレオチドおよび試薬から分離可能なことを特徴とする。反応、分離操作の簡便さという点では優れているが、必ずしも各段階の縮合収率が定量的でないでポリマーに結合した種々の長さのオリゴマーの混ざりとなる難点がある。これについては著者らの記述があるので参照されたい。¹⁾ またオリゴヌクレオチドの燐酸をトリエステル型として鎖を次々と延長し有機溶媒による抽出あるいはシリカゲルクロマトの併用により目的のオリゴヌクレオチドを分離精製する方法も報告されている。この場合燐酸基の保護基として β,β,β トリクロロエチル^{13a)}, フェニル^{13b)}, O-クロロフェニル^{13c)}, β-シアノエチル基^{13c)} が用いられている。しかし比較的短いオリゴヌクレオチドであればトリエステルでなく、ジエステル型であっても lipophilic な保護基を水酸基または、燐酸基に結合することにより抽出による分離が可能である。しかし鎖が増すと電荷の数が増し、原料との溶解度の差がなくなるため抽出による分離が困難となるが比較的短かいオリゴマーの合成分離法としては優れている。

1. 保護したジヌクレオシドモノホスフェート (XpY) の合成と抽出法による分離

5' 側成分としてその 5' 水酸基を lipophilic な MMTTr 基で保護したヌクレオシド (MMTTrX) を用い、

- 31 -

件下に分解を併うので我々はN-トリフェニルメチルアミノフェール(トリチルアミノフェノール, TrNH-Ph-OH)を用い磷酸基をフェノールエステルとして保護するオリゴヌクレオチド合成法を開発した¹⁶⁾。脱保護はアセトンまたはDMF-緩衝液の混合溶媒中ヨウ素による酸化により行なうがこの方法ではチミジル酸ではトリヌクレオチド, その他の塩基を含むヌクレオチドの場合は, ジヌクレオチドの抽出と分別再沈澱を組合せた合成と分離が可能である。チミジル酸を含むダイマーの場合はその他のジヌクレオチドと若干溶解度の差があるので分別再沈澱の条件を変える必要があるが, 他のは実験例4に示す条件でよい。抽出操作ごとに分離を検査する必要があるが TrNH-Ph-OH 保護を用いた場合は緩和な酸処理でトリチル基のみを脱保護したフェノールエステルの形で容易にPEPにより検することができる利点がある。

【実験例4】 $\text{d-TrNH-Ph-opA}^{\text{Bz}}\text{-p-C}^{\text{An}}(\text{OAC})$ (13)の合成と抽出法による分離¹⁷⁾

1) $\text{d-TrNH-Ph-opA}^{\text{Bz}}$ (12b)の合成と分離

トリチルクロリドとアミノフェノールを無水ピリジン中反応させシクロヘキサンより再結晶して得た TrNH-Ph-OH (6 mmole)と $\text{d-pA}^{\text{Bz}}(\text{OAC})$ ピリジン塩 (1.6 mmole)無水ピリジン(15 ml)中室温 DCC(10 mmole)を加えて3日間反応させる。一部をとりPEPで泳動すると, 目的のフェノールエステル(12a)は水に難溶な為, 原点に留まるので泳動する原料の残存を検出するか, または80%酢酸で2~3分処理して泳動させると脱Trしたヌクレオチドのフェノールエステル $\text{d-NH}_2\text{-Ph-opA}^{\text{Bz}}(\text{OAC})$ (R_{pA} 0.40)として検出できる。反応溶液に水(15 ml)を加えて反応を止め更に50%ピリジン水(20 ml)を加えたのちペンタンでDCCを抽出除去後, ジクロルメタン(30 ml)を加え析出するDCUを滌去する。分液後有機層を水洗し, 未反応ヌクレオチドを除去後, ピリジン存在下溶媒留去し, 無水ピリジン溶液(10 ml)をエーテル-ペンタン(3:2, 200 ml)に滴下し沈澱を遠心分離して集め, エーテルで洗い, 減圧乾燥する。4種のどのヌクレオチドについても同操作により行なえる。上の粉末を60%ピリジン水にとかし氷浴で冷却下冷2N-カセイソーダ水溶液を加え2~3分攪拌する。反应用液にピリジン型樹脂Dowex 50 W×2を加えて中和後別に用意した同じ樹脂のカラム(容量30 ml)を通す。カラムを50%ピリジン水(100 ml)で洗い, 流出液と合し常法により無水ピリジン溶液からエーテル-ペンタンに滴下して沈澱を得る。

収量 16,300 A₂₆₀ (0.97 mmole, 62%)

2) $\text{d-TrNH-Ph-opA}^{\text{Bz}}\text{-p-C}^{\text{An}}(\text{OAC})$ (13)の合成と分離

$\text{d-TrNH-Ph-opA}^{\text{Bz}}$ (12b) (0.47 mmole)と $\text{d-pC}^{\text{An}}(\text{OAC})$ ピリジン塩(7) (0.53 mmole)をピリジンと扱って無水とする。この時(7)は無水ピリジンに不溶で析出するがそのまま共沸をくり返す。乾燥箱中でTPS(1.84 mmole)を加えて激しく振とうすると澄明な溶液となる。20℃5時間放置する。反応の進行は一部をとり50%ピリジンにとかし乾固後80%酢酸で2~3分処理後PEPを行なって検べる。紫外ランプにより原料由来の $\text{NH}_2\text{-Ph-opA}^{\text{Bz}}$ は青色スポット ($R_{\text{d-pA}^{\text{Bz}}}\text{C}^{\text{An}}(\text{OAC})$ 0.64)。目的物由来の $\text{NH}_2\text{-Ph-opA}^{\text{Bz}}\text{-pC}^{\text{An}}(\text{OAC})$ はケイ光を発するスポット ($R_{\text{d-pC}^{\text{An}}}\text{C}^{\text{An}}(\text{OAC})$ 0.81)として検出される。氷浴中冷却下トリ-n-ブチルアミン(3.7 mmole)を加えたのち水(4 ml)を加えて反応を止め50%ピリジン水(4 ml)を加え室温で8時間放置する。ジクロルメタン(20 ml)を加え振とう後分液し有機層を十分水洗いし, 原料(7)および副成分を完全に除く。抽出操作ごとにPEPにより検べる。目的物 $\text{TrNH-PhOpA}^{\text{Bz}}\text{-pC}^{\text{An}}(\text{OAC})$ (13)は原点に留まるが(7)および副成分は泳動するので後者の消失を確認する。(12b)より(13)への転換率はほぼ定量的であるが少量の未反応(12b)の除去は次の分別沈澱法により行なう。ジクロルメタン溶液をピリジン存在下溶媒留去し無水ピリジン溶液(11 ml)をエーテル-酢酸エチル(1:1)の混合溶媒(300 ml)に少しづつ滴下する。沈澱を遠心分離して集めエーテルで洗い減圧乾燥する。沈澱を上記の方法で検してなお原料(12b)を検出するときは分別沈澱操作をくり返す。エーテル層に(13)が移行している時は少量のピリジン溶液からの再沈澱を行なう。収量 0.39g (0.28 mmole 60%)

3) $\text{d-pA}^{\text{Bz}}\text{-p-C}^{\text{An}}(\text{OAC})$ (14)の合成

(13)の粉末(0.28 mmole)をアセトン(15 ml)-1 M アンモニウムアセテート緩衝液(pH 7~7.5, 6 ml)に溶かしヨウ素(5.6 mmole)を加え室温3~5時間放置する。アセトンおよび過剰のヨウ素を留去後, 水(20 ml)を加え, エーテル(10 ml)で3回ヨウ素を抽出除去する。次に水で共沸してヨウ化水素酸を除く。50%ピリジン水を加えてピリジン型Dowex 50 W×2のカラム(1.8×25 cm)を通しアンモニア除去後ピリジン存在下に溶媒留去し, ピリジン溶液(5 ml)をエーテル-酢酸エチル(3:1, 200 ml)に滴下して析出する沈澱を遠心分離して集めエーテルで洗い減

圧乾燥する。収量 (5.670 A₂₆₀, 0.25 mmole, 89%)
ppc 溶媒 A (Rf 0.41) PEP (R_{pC} 0.69), dpApC
(アンモニア処理) ppc 溶媒 B (R_{pC} 0.54), 溶媒 C
(Rf 0.38, pC Rf 0.45)

4) 保護したテトラヌクレオチドの合成と抽出法による分離

先に述べたように lipophilic な保護基を 5' 側成分に用いて、順次縮合をくり返すとその溶解度の差から原理的には原料と目的物の抽出分離が可能である。しかし実際問題として図(3)経路(1)によれば保護したダイマー(8b)とトリマー(10)との分離はその塩基がチミンよりなるもの以外は困難であり、また鎖長が増すと磷酸の解離の数が増加し親水性が増し lipophilic な保護基の寄与が減少してしまい、もう一方の原料(9)との性質も似てくるため分離が難しくなる。改良法として原料にジヌクレオチドブロックを使った例について述べる。図(3)の経路 2 によれば目的物(11)と原料(8b), (14)の各々の分離がより容易になると考えられる。我々はこの経路により MMTrC^{An}_p-C^{An}_p-A^{Bz}_p-C^{An}_p(OAC)(11)の抽出法による合成と分離を行なった。ただしチミジル酸のみよりなるトリマー(TrNH-Ph-opTpTpT)とダイマー(TrNH-Ph-OpTpT)とは抽出による分離が可能である。¹⁶⁾以上のことよりさらに長鎖のものの分離には新たな工夫が必要と思われる。

【実験例 5】 d-MMTrC^{An}_p-C^{An}_p-A^{Bz}_p-C^{An}_p(OAC)(11)の合成と抽出法による分離¹⁷⁾

MMTrC^{An}_p-C^{An}_p(OAC)(8a)を【例 4-1】の項で示した条件(氷冷下, アルカリ)により 3' 水酸基の選択的脱保護後, ピリジン塩としたもの, MMTr-CpC^{An}_p(8b)(0.19 mmole)と pA^{Bz}_p-C^{An}_p(OAC)(14)ピリジン塩(2.960 A₂₆₀, 0.13 mmole)をピリジンで共沸して無水とし, トリー n-ブチルアミン(0.58 mmole)の存在下ピリジン(0.6 ml)中, TPS(0.7 mmole)により縮合する。20 °C 12 時間後 トリー n-ブチルアミン(1.4 mmole)を氷冷下加えたのち, 水(0.6 ml)を加えて室温 12 時間放置する。ピリジン存在下溶媒留去し残渣をブタノール-酢酸エチル(2:1, 30 ml)に溶かし 5~10%ピリジン水で有機層に PEP で検べて泳動する物質がなくなる迄抽出をくり返す。有機層を溶媒留去後残渣にクロロホルム(30 ml)を加え 40%ピリジン水で(11)を抽出する。一部をメタノール性アンモニアにより脱保護後 PEP(d-MMTr CpCpApC, R_{pC} 0.63), ppc 溶媒 B (R_{pC} 2.08), ppc 溶媒 C (R_f 0.72 pC R_f 0.45)により検べる。テ

トラマー(11)がクロロホルム層に残存する時は、更に抽出をくり返す。水層をピリジンの存在下溶媒留去し無水ピリジン溶液をエーテル-ペンタン(3:2)に滴下し遠心分離して沈澱を集めエーテルで洗い減圧乾燥する。収量 0.139g (49%) 脱保護ヌクレオチド d-CpCpApC, PEP (R_{pC} 0.74), ppc 溶媒 C (Rf 0.38, pC: Rf 0.40)。合成したダイマー, テトラマーは蛇毒ホスホジェステラーゼで水解して, 生ずるモノマーの比が CpC (C: pC, 1:1) pApC (pA: pC, 1:1), CpCpApC (C: pC: pA, 1:2:1) の理論値とほぼ一致することにより確かめる。

おわりに

保護したオリゴヌクレオチドの合成と分離精製についての技術を中心に述べたが、現段階ではジヌクレオチドの合成分離法としては抽出法がほぼ常法化しているが、テトラヌクレオチドがその限界となっている。さらに長鎖のものの合成分離にも用いる原料フラグメントを巧みに組合せれば原理的には抽出法の利用が十分可能と思われるが、実際には反応の際、分解物や複雑な化合物を生ずるのでイオン交換体による分離に頼っているのが現状である。しかしこの方法も長鎖になる程分離が悪くなり限界がある。したがって分離法の改良とともに、保護基、縮合試薬の改良やその他分解物の生成を防ぐ手立てが必要である。しかし比較的短鎖の合成中間体が大量に容易に合成が可能となれば、近い将来任意の塩基配列を持った長鎖のヌクレオチドの合成も可能となり、生化学、物理学、遺伝学のほか医療への応用など、化学合成の果す役割も大となるものと思われる。

文 献

- 1) 大塚英子:「生化学」44, 99 (1972)
- 2) 池原森男:「蛋白, 核酸, 酵素」別冊生物化学実験法 Xp113 (1968)
- 3) 水野義久, 野村哲士:「核酸化学」(下) 朝倉書店 (1970)
- 4) a) 竹村彰祐:「蛋白, 核酸, 酵素」別冊 核酸実験法 上 p207 (1972)
b) 原田文夫: ibid., p215 (1972)
- 5) 大塚栄子: ibid., p106
- 6) R. Lohrmann and H. G. Khorana: *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 4188 (1964)
- 7) R. Lohrmann, D. Söll, H. Hayatsu, E. Ohtsuka and H. G. Khorana: *J. Am. Chem. Soc.*, **88**,

- 819 (1966)
- 8) J. G. Moffatt and H. G. Khorana : *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 649 (1961)
- 9) a) H. Bredereck, G. Simchen, S. Rebsdatt, W. Kantlehner, P. Horn, R. Wahl, H. Hoffmann, P. Grishaber : *Ber.*, **101**, 41 (1968)
b) S. Arnold, M. Kornilov : *Collect. Czech. chem. Comm.*, **92**, 645 (1964)
- 10) 大塚栄子, 姥沢賢, 本田愛子, 池原森男: 第 45 回生化学会大会 (東京 1972, 11月)
- 11) E. Ohtsuka, M. Ubasawa and M. Ikehara : *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 2296 (1971)
- 12) a) 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, T. Yamada : *Nature*, **227**, 27 (1970)
b) H. G. Khorana, K. L. Agarwal, H. Büchi, M. H. Caruthers, U. L. RajBhandary, J. H. van de Sande, V. Sgaramella, T. Terao, H. Weber and T. Yamada : *J. Mol. Biol.*, **72**, 209 (1972)
- 13) a) F. Eckstein, and I. Rizk : *Chem. Ber.*, **102**, 2362 (1969)
b) T. Neilson : *Chem. Commun.*, 1139 (1969)
; T. Neilson and E. S. Werstiuk : *Can. J. Chem.*, **49**, 3004 (1971)
c) C. B. Reese and R. Staffbill : *Chem. Commun.*, 767 (1968)
d) R. L. Letsinger, K. K. Ogilvie : *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 3350 (1969)
- 14) E. Ohtsuka, M. Ubasawa and M. Ikehara : *ibid.*, **92**, 5507 (1970)
- 15) K. L. Agarwal, A. Yamazaki, H. G. Khorana : *ibid.*, **93**, 2754 (1971)
- 16) 大塚栄子, 森岡茂夫, 池原森男: 第 45 回生化学会大会 (東京, 1972, 11月)
- 17) idem.: 日本薬学会第 93 年会 (東京, 1973, 4月)

「生物物理」編集実行委員会よりのお知らせ

学会誌「生物物理」の編集を会員の皆様のご要望を生かして進めていきたいと思っておりますので、次のような項目について、皆様の積極的なご意見をお待ちしております。

1. 綜説について テーマおよび推薦される執筆者名。
2. 特集号について 分野およびできれば複数の執筆者名。
3. 技術、図書室、探訪についてもご要望、ご推薦をお願いいたします。
4. 編集方針に対するご批判、ご意見を歓迎いたします。

また「生物物理投稿規定」をご参照の上、会員皆様方の積極的なご投稿をお願いいたします。特に談話室、学会ニュースをどしどしご利用いただき、会員間の交流をより活潑なものにしたいと思います。すぐれた外国の研究者の簡単な紹介も歓迎いたします。

なお綜説に対する反響、反論もご投稿ください。誌上討論会などに発展できればと思っております。