

原核細胞メッセンジャーRNA
先導配列の化学合成とその機能の研究

石川正英

①

博士論文

原核細胞メッセンジャーRNA
先導配列の化学合成とその機能
の研究

指導教官 三浦謹一郎教授

東京大学大学院工学系研究科工業化学専門課程

博士課程 1843 石川正英

目次

序論	1
第一章　オリゴリボヌクレオチドの固相合成	8
1-1　保護ヌクレオチド	9
1-2　固相担体への保護ヌクレオチドの導入	12
1-3　5'位ジメトキシトリチル基の選択的除去	16
1-4　オリゴリボヌクレオチドの固相合成の検討	23
1-5　考察	32
第二章　f1コートタンパク質mRNAの先導配列の合成	33
2-1　f1コートタンパク質mRNAの先導配列の部分合成	34
2-2　固相合成法の改良及びf1コートタンパク質 mRNAの先導配列18量体の合成	42
2-3　考察	50
第三章　タンパク質合成開始複合体形成	52
3-1　緒言	53
3-2　リボソーム及び、開始因子の調製	55
3-3　開始複合体形成の反応条件の検討	57
3-4　f1コートタンパク質mRNAの先導配列を用いた 開始複合体形成	62
3-5　開始複合体形成反応中の先導配列の安定性	64
3-6　リボヌクレアーゼインヒビターの効果	66
3-7　考察	70

第四章	開始複合体形成反応中に安定な先導配列の合成	7 2
4-1	3'末端にトリデオキシヌクレオチドの結合した 先導配列 21 量体の合成	7 3
4-2	酵素を用いた 3' 末端へのチオホスフェイトの導入	7 5
4-3	化学合成による 3' 末端へのチオホスフェイトの導入	7 7
4-4	考察	8 3
第五章	反応中に安定な f1 コートタンパク質 mRNA の 先導配列を用いた開始複合体形成	8 5
5-1	3' 末端にチオホスフェイトを導入した先導配列 を用いた開始複合体形成	8 6
5-2	考察	8 9
結論		9 1
実験の部		9 2
参考文献		1 2 3
謝辞		1 2 7

序論

タンパク質は、その機能に応じて、合成される量は千差万別である。例えば、生物の構造を作るタンパク質は大量に合成されるのに対して、酵素やホルモンなどは、少量しか合成されず、しかも、組織や、時期によって特異的に合成される。その合成は、いわゆる、セントラルドグマにしたがって、まず、遺伝子であるDNAからmRNAが転写され、次に、mRNAの遺伝情報に従って、リボソーム上で翻訳されて合成される(図序-1)。このような、遺伝子発現の調節が、どの様に行われているのかという問題は、非常に興味ある問題である。また、最近の遺伝子工学の発展によって、DNAを自由に操作できるようになり、合成DNAや外来DNAを、プラスミド等に組み込んで、特定のタンパク質の合成が出来るようになった。1977年、板倉ら¹⁾によって、ソマトスタチンというペプチドホルモンの遺伝子が化学合成され、プラスミドに組み込まれ、大腸菌で発現されて以来、多くの報告がなされている。ここでも、目的とするタンパク質を大量に生産させるために、遺伝子発現の調節に関する研究が重要になっている。

遺伝子発現の調節機構に関しては、これまで、転写の段階がよく研究されてきた。大腸菌のラクトースオペロンの分解に関与する遺伝子群では、リプレッサー²⁾と呼ばれるタンパク質が、DNAのオペレーターと呼ばれる領域に結合して、RNAポリメラーゼがDNAと結合し、転写を開始するのを妨げていることが知られている³⁾。また、逆に、DNAと結合して、転写を促進するカタボライト活性化タンパク質(CAP)もある⁴⁾。さらに、リプレッサーがDNAと結合するのを妨げるインデューサー等も知られている³⁾。これら、転写の調節因子は、他のオペロンでも、続々と見つかり、かなり普遍的なものであると考えられている。

それに対して、翻訳における調節機構に関しては、まだあまり研究が進んでいないのが現状である。翻訳は、タンパク質合成の場であるリボソームに、

mRNAと、その開始コドンAUGに対応するfMet-tRNAが結合し、タンパク質合成開始複合体を形成することから始まる。翻訳における調節機構に関しては、真核生物において、三浦らの発見した真核生物のmRNAに共通にみられるキャップ構造⁵⁾とタンパク質合成効率の関係⁶⁾や、mRNAの5'末端付近の非暗号領域である先導配列とタンパク質合成効率との関係、及び、先導配列とmRNAとリボソームとの複合体であるタンパク質合成開始複合体形成効率の関係に付いて報告されている。それによると、mRNAの先導配列中に、リボソーム中の18SリボソームRNAの3'末端付近と相補的な塩基配列がより多く存在する方が、タンパク質合成開始複合体形成効率がよいことがわかった⁷⁾。

これは、1974年に、ShineとDalgarnoが、原核生物において提唱した、Shine-Dalgarno配列(SD配列)⁸⁾と同じ考え方である。ShineとDalgarnoは、原核生物のmRNAの多くに、5'先導配列中にプリン、すなわち、グアノシンやアデノシンに富んだ配列が存在し、この配列がリボソーム中の16SリボソームRNAの3'末端付近と相補的な配列であることを見いだした。そして、翻訳の開始段階において、mRNAとリボソームがタンパク質合成開始複合体を形成する際に、このSD配列と16SリボソームRNAの3'末端付近が塩基対を形成すると考えた(図序-2)。SD配列は、mRNAによって、その配列やタンパク質合成の開始コドンAUGからの距離が微妙に異なっており、翻訳の調節に関係していると考えられている。特に、原核細胞では、一本のmRNAにいくつかのタンパク質がコードしているポリシストロニックな構造をしており、たくさん存在するAUGの中からの本当の開始コドンAUGの認識や、各タンパク質の間の合成量の調節に、SD配列が関係するといわれている。これらを裏付ける実験が、いくつかなされている。Dunnらは、DNAのSD配列に相当する部分を人工的に改変して、SD

配列を壊し、16S rRNAの3'末端付近と相補鎖を形成しなくさせてプラスミドに組み込み、大腸菌を形質転換して、この遺伝子に相当するタンパク質の合成効率を調べたところ、そのタンパク質の合成量が下がると報告している⁹⁾。また、田中らは、SD配列の部分がmRNAの二次構造に埋もれて、オープンになりにくい状態にすると、相当するタンパク質の合成が抑えられることを報告している¹⁰⁾。その他、いくつか報告されているが、このような、DNA上でSD配列を含む配列を改変し、タンパク質の合成量を比較するという実験では、転写と翻訳の両方の過程が含まれているので、翻訳の過程での、タンパク質の合成効率を直接調べていることにならない。しかし、原核細胞では、mRNAの半減期が15分～30分と短く、非常に不安定であるため、単離することが難しく、翻訳段階のみを取り出して研究することが困難であった。そのため、RNA上でSD配列の部分を改変してタンパク質の合成量を比較し、翻訳の過程のみを直接見ている実験はほとんどない。1988年、Calogeroらは、ファージMS2のRNAをモデルにして、SD配列を持つmRNAとSD配列を持たないmRNAを、*in vitro*転写系により調製し、タンパク質合成開始複合体形成効率を調べたところ、SD配列を持つmRNAの方が効率がよいと報告している^{5,9)}。しかし、この他にはほとんど報告がないのが現状である。

本研究では、SD配列をいろいろ変えた先導配列を化学的に合成し、リボソームとの結合効率を比較したり、タンパク質合成効率を比較して、SD配列とタンパク質合成開始複合体形成効率との関係を調べると共に、最も効率よくタンパク質を合成するためには、どのような先導配列がよいかを調べることを目的としている。特に、タンパク質合成の開始段階であり、タンパク質合成効率に最も深くかかわっていると考えられるタンパク質合成開始複合体形成に注目した。

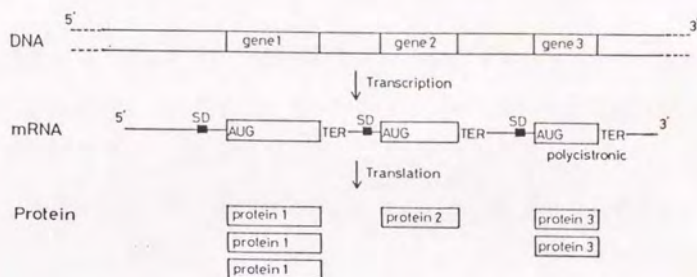
そのためには、種々の mRNA 先導配列に相当する RNA フラグメントが必要となるが、天然の RNA からフラグメントを調製する方法では、その配列に制限があり、大量に得ることも困難である。近年、Calogero らも用いていた、効率の良い *in vitro* 転写系が発達し、化学合成した任意の配列の DNA を鋳型として、RNA を得る方法が開発され¹¹⁾、RNA を用いた実験が増えつつあるが、本研究では、特定の配列のフラグメントを必要量得るために、化学的に合成する方法を用いた。RNA の化学合成は、まだ確立されたといえる方法はない。そこで、まず、迅速かつ簡便に RNA オリゴマーを得るために、RNA の簡便な固相合成法について検討した。

固相合成法は、Merrifield¹²⁾ が、ペプチド合成に用いた方法で、反応溶媒に不溶なポリマーを支持体として、末端のアミノ酸を共有結合で結び付け、これに第二のアミノ酸を反応させて長鎖長のペプチドを合成する方法である。これは、未反応のアミノ酸を、濾過、洗浄という簡便な操作で除去でき、迅速かつ簡便に、目的物を合成することができる方法である。DNA 合成では、Letsinger の開発したリン酸トリエステル法¹³⁾や、Caruthus によって開発されたリン酸アミダイト法¹⁴⁾など、縮合収率の高い合成法の発達とあいまって、現在では、DNA 自動合成機にペプチドの固相合成法が応用され、数十量体の DNA オリゴマーを迅速に合成できるようになった。しかし、RNA 合成では固相合成法は、まだ、完全に確立された方法がなく、リン酸トリエステル法では、1982 年、van Boom らによる 13 量体¹⁵⁾の合成が、最長である。また、Ogilvie らによって、1984 年、クロロホスファイト法によって 19 量体¹⁶⁾、1985 年にリン酸アミダイト法によって 15 量体¹⁷⁾が、さらに、1988 年には、77 量体¹⁸⁾が合成された。しかし、まだ、報告は少ない。

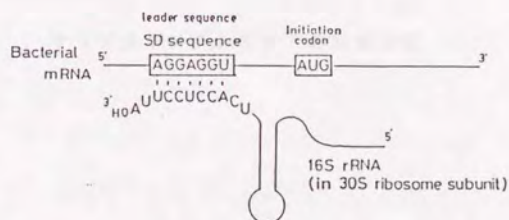
一方、固相法に対して、均一溶媒中で縮合反応を行う液相法は、大量に、RNA オリゴマーを合成することができ、1984 年には、池原、大塚らに

よって、大腸菌 mRNA 5' 半分子 33 量体が合成¹⁹⁾されるなど、多数、報告されている。しかし、液相法では、縮合反応を行う毎に、カラムクロマトグラフィーなどにより、精製する必要があり、迅速かつ簡便に、長鎖長フラグメントを合成することはできない。

本論文では、リン酸トリエステル法を用いた固相合成法を改良し、比較的大量に合成されていると思われるファージ f1 のコートタンパク質の mRNA の先導配列を合成し、大腸菌より調製した諸因子を用いて、タンパク質合成開始複合体形成実験の系を構築し、SD 配列とタンパク質合成開始複合体形成効率との関係について調べた。



図序-1 原核細胞のタンパク質合成



図序-2 SD配列と16S rRNAの3'末端

R17 A protein	GAUUCU[AGGAGGU]UUGACCU[AUG]
QB A protein	UCACUGAGUAU[A][GAGG]ACA[AUG]
R17 coat protein	CCCUCAACC[GGAG]UUU[GAAG]C[AUG]
QB coat protein	AAACUUUG[GGU]CAAUUGAUC[AUG]
f1 coat protein	UUUAAU[GGA]AACUUCUC[AUG]

図序-3 種々のmRNAの先導配列

第一章

オリゴリボヌクレオチドの固相合成

1-1 保護ヌクレオシド

オリゴリボヌクレオチドの固相合成では、正しく3'-5'リン酸ジエステル結合を形成させるために、5'位水酸基、2'位水酸基、塩基部分のアミノ基に、適当な保護基を導入する必要がある。5'位水酸基の保護基は、鎖長を延長する毎に除去されるため、比較的容易に除去できなければならない。また、RNAは、2'位水酸基を有するために、アルカリ性条件下で、容易に鎖の切断が起こる。そこで、2'位水酸基は、酸性あるいは中性の条件下で除去可能で、かつ5'位水酸基の保護基を除去する条件下では、安定でなければならない。塩基部分のアミノ基の保護基は、合成中は安定で、かつ合成後には、容易に除去できなければならない。

これまでに、いろいろな保護基が検討されてきたが、ここでは、液相合成法でよく使われていて、リボヌクレオシドへの保護基の導入が、比較的容易なものとして、5'位水酸基の保護基には、4, 4'-ジメトキシトリチル基(DMT r基)²⁰⁾を、2'位水酸基の保護基には、テトラヒドロピラニル基(THP基)²¹⁾を用いた。THP基は、脱保護の際、pH 2の条件で除去することができ、2'位、3'位間のリン酸の転移が起こらないことが知られており、有利な点が多い。これらの保護基は、どちらも酸性条件下で除去されるが、DMT r基の方が、THP基よりも、弱い酸性条件下で除去できる。DMT r基の選択的除去については後で詳しく述べる。また、塩基部分のアミノ基の保護基は、それぞれ、アデノシンにはベンゾイル基(Bz基)²²⁾、シチジンはアニソイル基(An基)²³⁾、グアノシンにはイソブチル基(iBu基)²⁴⁾を用いた。これらの保護基は、アルカリ性条件下で除去できる(図1-1)。

リボヌクレオシドへの保護基の導入は、2'位水酸基が存在するために、デオキシリボヌクレオシドの場合に比べて、複雑である。2'位水酸基と3'

位水酸基の間に、反応性の差異があまりなく、2'位水酸基のみに、選択的に保護基を収率よく導入することはこれまで困難であったが、1979年、Markiewiczらによって、1,3-ジクロロ-1,1,3,3,-テトライソプロピルジシロキサン (TIPDSiCl₂) を用いる方法が報告された。これは、TIPDSiCl₂を用いて、3'位水酸基と5'位水酸基を選択的に保護し、その後、2'位水酸基に別の保護基を導入する方法である。3',5'-O-(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 (TIPDSi基) は、中性条件下、フッ化物イオンにより、容易に除去できる。そこで、この方法をもとに保護ヌクレオシド (1-a, b, c, d) をそれぞれ合成した。(Scheme 1, 2, 3, 4)。

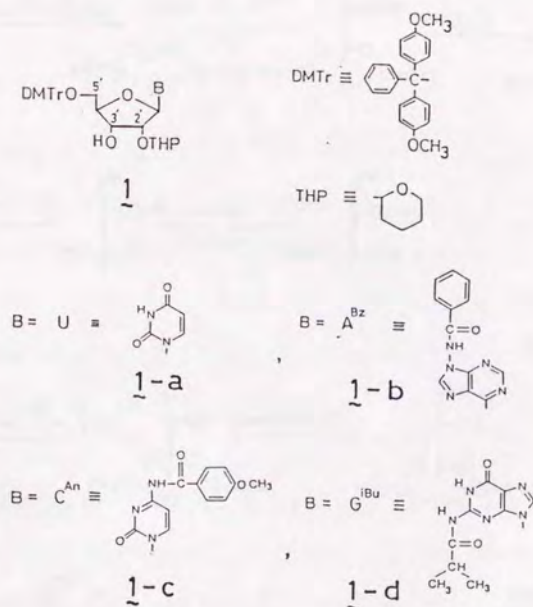
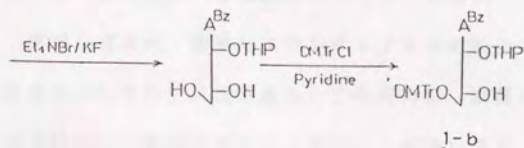
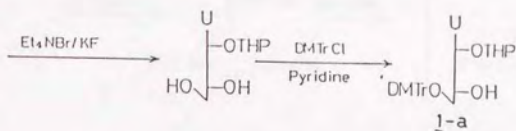
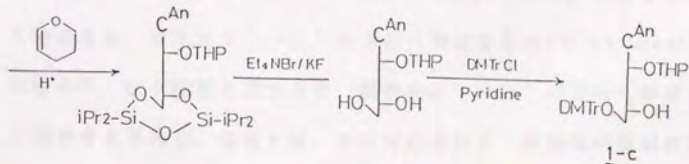
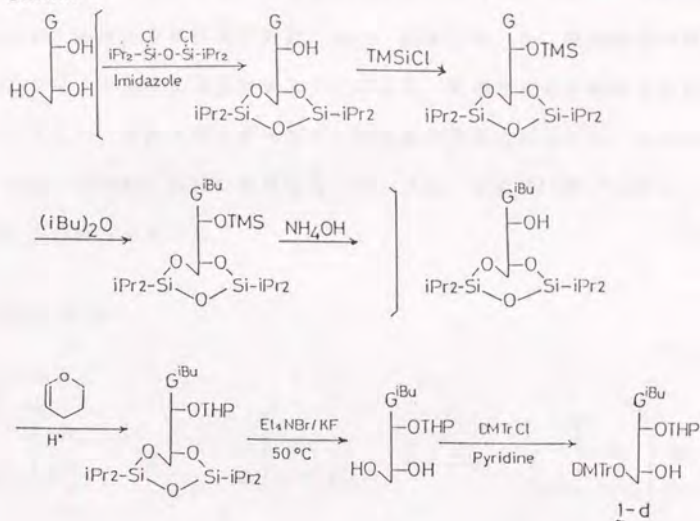


図 1-1 保護ヌクレオシド

$$\begin{array}{c} \text{U} \\ | \\ \text{—OH} \\ | \\ \text{HO—C—OH} \end{array} \xrightarrow{\text{iPr}_2\text{—Si—O—Si—iPr}_2} \begin{array}{c} \text{U} \\ | \\ \text{—OH} \\ | \\ \text{O—Si—O—Si—O—Si—O—Si—O—Si—O—Si—iPr}_2 \\ | \quad | \quad | \quad | \quad | \\ \text{iPr}_2 \quad \text{O} \quad \text{O} \quad \text{O} \quad \text{iPr}_2 \end{array} \xrightarrow[\text{H}^+]{\text{THP}} \begin{array}{c} \text{U} \\ | \\ \text{—OTHP} \\ | \\ \text{O—Si—O—Si—O—Si—O—Si—O—Si—O—Si—iPr}_2 \\ | \quad | \quad | \quad | \quad | \\ \text{iPr}_2 \quad \text{O} \quad \text{O} \quad \text{O} \quad \text{iPr}_2 \end{array}$$

$$\begin{array}{c} \text{C} \\ | \\ \text{HO}-\text{C}-\text{OH} \end{array} \xrightarrow{\text{iPr}_2\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-\text{iPr}_2} \begin{array}{c} \text{C} \\ | \\ \text{HO}-\text{C}-\text{O}-\text{Si}(\text{iPr}_2)_2 \\ | \\ \text{O}-\text{Si}(\text{iPr}_2)_2 \end{array} \xrightarrow{(\text{MeO})\text{PhCOCl}} \begin{array}{c} \text{C}^{\text{An}} \\ | \\ \text{HO}-\text{C}-\text{O}-\text{Si}(\text{iPr}_2)_2 \\ | \\ \text{O}-\text{Si}(\text{iPr}_2)_2 \end{array}$$


Scheme 4



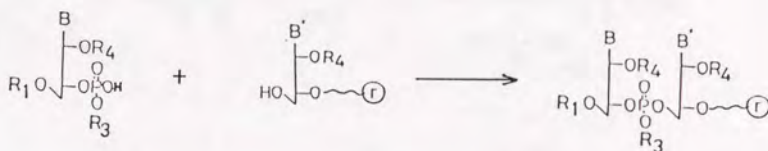
1-2 固相担体への保護ヌクレオシドの導入

固相合成法は、樹脂にヌクレオシドを共有結合で担持させ、樹脂上で、鎖長を伸ばして行く方法である。この方法は、試薬や未反応のヌクレオシドを、濾過によって簡単に除くことができ、簡便に鎖長を伸ばすことができる。

樹脂の種類や、樹脂とヌクレオシドとの結合の仕方等は、DNA合成において、詳しく検討されており、研究当初、ポリスチレン²⁵⁾とシリカゲル²⁶⁾の2種類の樹脂がよく用いられていた。また、樹脂とヌクレオシドとの結合は樹脂上の側鎖のアミノ基とヌクレオシドの糖部分の水酸基とをリンカーを介して、共有結合させる方法が一般的である。この際、樹脂を3'位水酸基と結合させ、鎖長を3' → 5'の方向へ伸ばす方法²⁷⁾ (Scheme5)と、逆に、樹脂を5'位水酸基と結合させ、鎖長を5' → 3'の方向へ伸ばす方法²⁸⁾の二種類考えられる。前者では、反応性の高い5'水酸基が固相担体に結合し

ているのに対し、後者では、反応性の低い3'水酸基が固相担体に結合しているため、前者の方が有利である。また、前者では、5'位水酸基の保護基であるDMTr基を比色定量することにより、各縮合反応の収率を求めることができたり、目的とするオリゴマーの精製が容易になるなど、利点が多く、ここでは、Scheme5の様に前者を用いた。また、樹脂は、ポリスチレンとシリカゲルの両方を用いた。

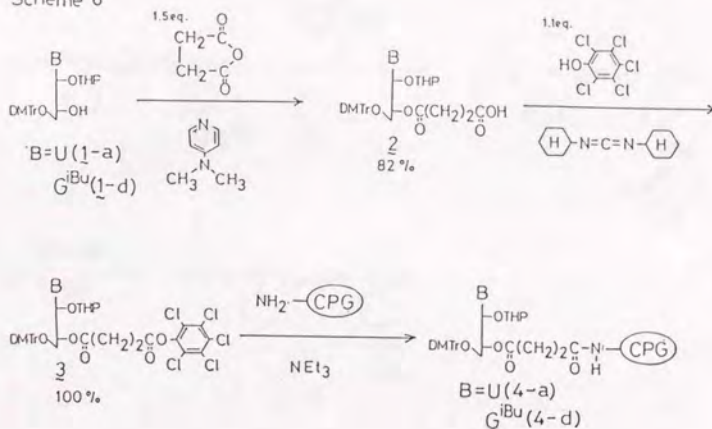
Scheme 5



1-2-1 シリカゲルへのヌクレオチドの導入

固相担体として用いるシリカゲルはControlled Pore Glass (CPG)²⁶⁾と呼ばれる、孔径のよく揃っているフナコシ薬品のCPG Bio-Supportを用いた。このCPGには既に、ヌクレオシドと共有結合するためのアミノ基が導入されているので、コハク酸をリンカーに用いて、デオキシリボヌクレオシドで用いられたItakuraらの方法²⁹⁾をもとに、CPGにウリジン誘導体及びグアノシン誘導体を担持させた (Scheme6)。

Scheme 6

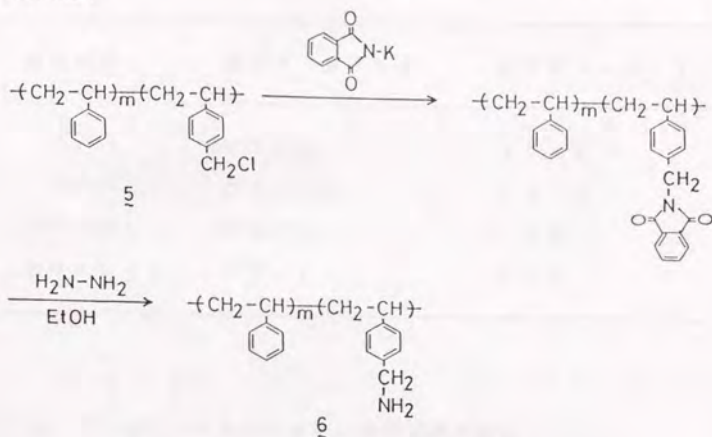


用いたCPGは、平均孔径5.47Åで、縮合の際、立体障害が小さくなる様に、リンカーの長い、long-chainと呼ばれるものを用いた。アミノ残基は、樹脂1gあたりウリジン誘導体(4-a)は11.2μmol、グアノシン誘導体(4-d)は11.4μmol導入できた。導入できなかった未反応のアミノ基は、フェニルカルバモイル化または、アセチル化で保護して、縮合反応に関与しない様にした。

1-2-2 ポリスチレン樹脂へのヌクレオシドの導入

固相合成に耐える強度を持たせるために、2%のジビニルベンゼンで架橋した、ペプチド合成用のポリスチレン樹脂を用いた。このポリスチレン樹脂には、CPGの様にはアミノ基が導入されておらず、クロロメチル基が導入されている。そこで、まず、Merrifieldらの方法²⁸⁾を用いて、クロロメチル基をアミノ基に変換した(Scheme7)。

Scheme 7



i) ポリスチレン樹脂へのウリジン誘導体の導入

以上の様にしてアミノ基を導入したポリスチレン (6) へのウリジン誘導体の導入は、CPGの場合と同様に行った。

ポリスチレン 1 g あたりにクロロメチル基が 1.28 mmol 導入されており、そのうちの 30% にあたる $384 \mu\text{mol}$ にウリジン誘導体が導入できた。

ii) ポリスチレンサポートへのアデノシン誘導体の導入

van Boom らの方法³¹⁾を用い、ポリスチレン (6) にアデノシン誘導体を導入した。ポリスチレン 1 g あたり、クロロメチル基の 18% にあたる $225 \mu\text{mol}$ に、アデノシン誘導体を導入することができた。未反応のアミノ基はアセチル化により保護した。

以上のように、CPG とポリスチレンに保護ヌクレオシドを担持したが担持量は、ポリスチレンの方が多かった (表 1-1)。

表 1-1 固相担体への保護ヌクレオシドの担持量

固相担体	保護ヌクレオシド	担持量 ($\mu\text{mol/g}$)
CPG	ウリジン	11.2
CPG	グアノシン	11.4
ポリスチレン	ウリジン	38.4
ポリスチレン	アデノシン	22.5

1-3 5' 位ジメトキシトリチル基の選択的除去

1-3-1 脱ジメトキシトリチル化反応に用いられる酸

鎖長を伸ばして行くためには、樹脂に担持した合成オリゴマーの5'末端のDMTr基を除去する必要がある。5'位DMTr基は酸で除去されるが、その際に、2'位水酸基の保護基であるTHP基も同時に脱離してしまう可能性がある。そこで、5'位DMTr基のみを選択的に除去する条件が必要となってくる。DNAの固相合成で用いられる酸には、ベンゼンスルホン酸(BSA)³²⁾、p-トルエンスルホン酸(pTsoH)³³⁾、トリクロロ酢酸(TCA)³⁴⁾、トリフルオロ酢酸(TFA)³⁵⁾、ジクロロ酢酸(DCA)³⁶⁾やルイス酸である臭化亜鉛(II)(ZnBr₂)³⁷⁾等が知られている。また、5'位水酸基をDMTr基で、2'位水酸基をTHP基で保護したオリゴボヌクレオチドの液相合成法では、5'位DMTr基の除去に、2%pTsoHを用い、0℃で行うことによって2'位THP基の脱離を防いでいる³⁸⁾³⁹⁾。しかし、固相合成の場合には、0℃に冷却するのが困難であるために、室温で、5'位DMTr基のみを除去しなければならない。そこで、

まず、種々の酸性条件下、室温で2'位THP基の安定性を調べることにした。

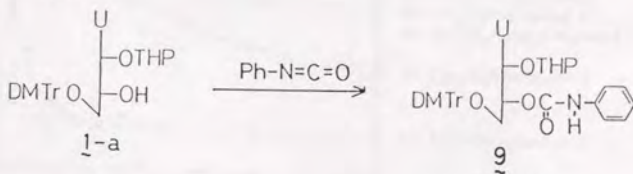
1-3-2 種々の酸に対する2'位テトラヒドロピラニル基の安定性

種々の酸に対する2'位THP基の安定性を調べるために、次のような3つの実験を行った。

(i) まず、2'位THP基の安定性を調べるために、保護ヌクレオシド合成の中間生成物である、3',5'-O-(1,1,3,3,-テトライソプロピルジシロキサン-1,3,-ジイル)-2'-O-テトラヒドロピラニルウリジン(7)をモデル化合物として、酸を一定量加え、THP基の脱離を一定時間毎にTLCによって調べた。

(ii) 次に、実際に5'位のDMTr基を除去出来る条件で、2'位THP基の安定性を調べてみる必要があり、また、実際の固相合成法では、3'位はリン酸基がついているので、その立体障害を考慮にいて、5'-O-ジメトキシトリチル-3'-O-フェニルカルバモイル-2'-O-テトラヒドロピラニルウリジン(9)を合成し(Scheme8)、それを用いて、i)と同様にTLCによって、酸に対する2'位THP基の安定性を調べた。

Scheme8



(iii) また、実際は、(i)、(ii)のような均一系でなく、樹脂上での不均一系において、脱DMTr化反応は行われるので、CPGに担持したウリジン誘導体(4-a)を用いて、同様にTLCによって2'位THP基の安定性を調べた。

(i) 3',5'-O-(1,1,3,3,-テトライソプロピルジシロキサン-1,3,-ジイル)-2'-O-テトラヒドロピランウリジン(7)を用いた検討

一定量の(7)を試験管にとり、そこへ、図1-2に示す様な酸を、一定量加え、室温で攪はんし、一定時間毎に、一定量分取し、TLCを用いて、2'位THP基が脱離した生成物(8)と出発物質(7)を単離して、UVを用いて、260nmの吸光度を測定し、求めたモル吸光係数(7: $\epsilon=9610$, 8: $\epsilon=10240$)を用いて定量した。

図1-2に示したように、2'位THP基は、1%ジクロロ酢酸-塩化メチレン溶液中、室温で最も安定であることがわかった。

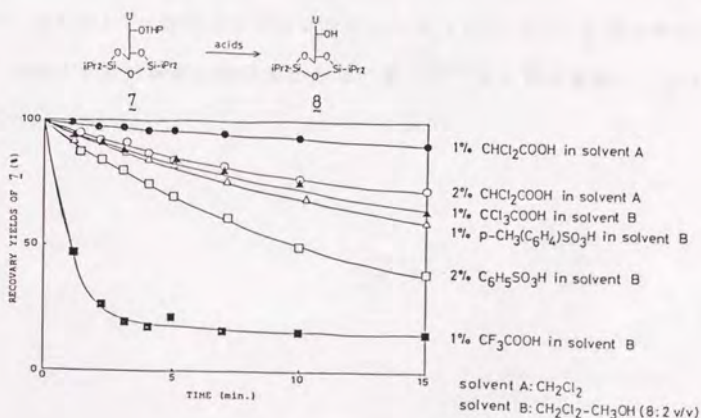


図1-2 種々の酸に対する2'位THP基の安定性-1

(ii) 5'-0-ジメトキシトリチル-3'-0-フェニルカルバモイル-2'-0-テトラヒドロピラニルウリジン(9)を用いた検討

次に、(i)で用いた酸性条件下での5'位DMTr基の選択的除去を調べるために、(9)を用いて検討した。方法は、(i)と同様に行い、その結果を図1-3に示した。図1-3でわかる様に、2%BSA-塩化メチレン/メタノール(8/2 v/v)では、2~3分で、5'位DMTr基のみならず、2'位THP基も脱離してしまうことがわかった(図1-3, a))。また、ジクロロ酢酸(DCA)を用いた場合には、溶媒である塩化メチレンにメタノールを加えると、2'位THP基の安定性が増すことがわかり、溶媒として、塩化メチレンか、塩化メチレン-メタノール(99/1 v/v)を用いた場合に、5' DMTr基の除去は2-3分で完了し、2' THP基が最も安定であることがわかった(図1-3, b), d))。しかし、溶媒として、塩化メチレン-メタノール(9/1 v/v)を用いた場合には、3%のDCAでも、5'位DMTr基の除去に時間がかかることがわかった(図1-3, c))。また、1M ZnBr₂-塩化メチレン/メタノール(8/2 v/v)溶液の場合には、5' DMTr基の除去に時間がかかり、2'位THP基も脱離してしまうことがわかった。

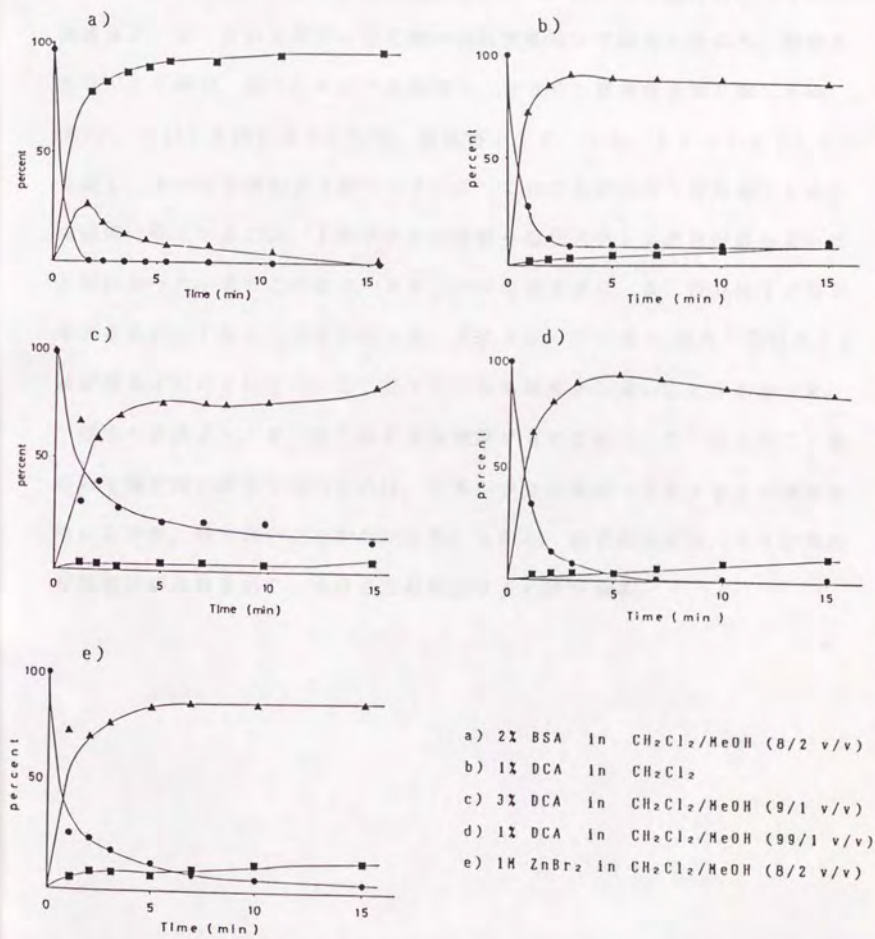
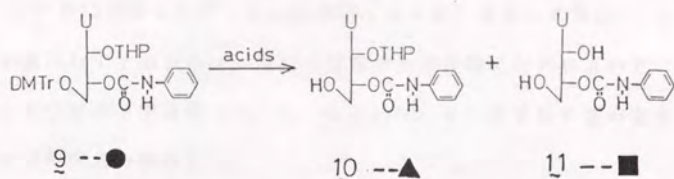


図 1-3 種々の酸に対する 2' 位 T H P 基の安定性 - 2

(iii) CPGに担持したウリジン誘導体(4-a)を用いた検討

実際の脱DMTr化反応は、樹脂に担持された状態で行われるのでCPGに担持したウリジン誘導体(4-a)を用いて、2'位THP基の安定性とDMTr基の除去を検討した。

日本ゼオンDNAマニュアル合成機を用いて、CPGに担持したウリジン誘導体の、5'位のDMTr基を種々の酸性条件下で除去したのち、樹脂を60℃で7時間、濃アンモニア水処理し、ウリジン誘導体を切り離した後、(i)、(ii)と同じようにして、生成物(12, 13, 1-a)をTLCで単離し、その比を求めた(表1-2)。このことから5'位DMTr基を選択的に除去するには、1%ジクロロ酢酸-塩化メチレン溶液が最もよいことがわかった。またこの系に、メタノールを加えると、5'位DMTr基が除去されにくくなることもわかった。また1M $ZnBr_2$ は5'位DMTr基が除去されにくい上に、2'位THP基も脱離され易いことがわかった。

以上の結果より、2'位THP基を脱離することなく、5'位DMTr基のみを選択的に除去するためには、1%ジクロロ酢酸-塩化メチレン溶液を用いるのが、最も良いことがわかった。しかし、わずかながら、THP基の脱離も認められるので、今後さらに検討する必要がある。

表1-2 CPGに担持したウリジン誘導体(4-a)を用いた2'位THP基の安定性の検討

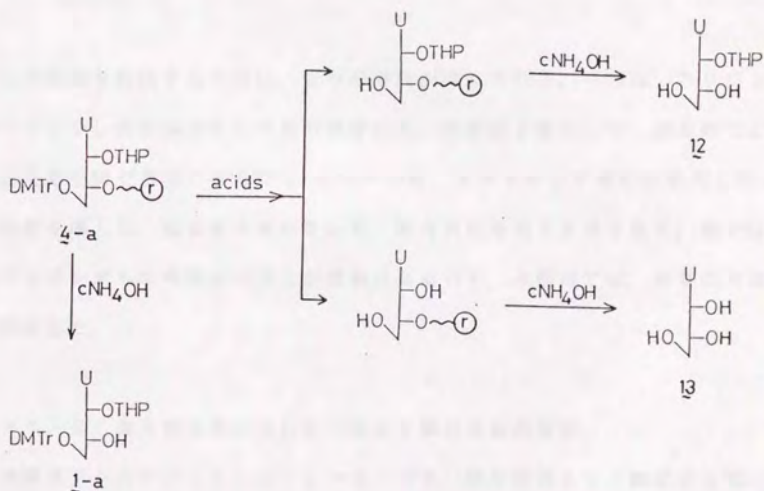
酸	U-resin(mg)	Time(min)	Content (%)		
			1-a	12	13
1%DCA/SolA	50	1	7	92	2
1%DCA/SolB	30	4	45	47	6
1MZnBr ₂ /SolC	20	10	78	3	19
1MZnBr ₂ /SolD	30	5	26	54	15

SolA=CH₂Cl₂

SolB=CH₂Cl₂/MeOH(99/1)

SolC=CH₂Cl₂/MeOH(8/2)

SolD=CH₂Cl₂/iPrOH(85/15)

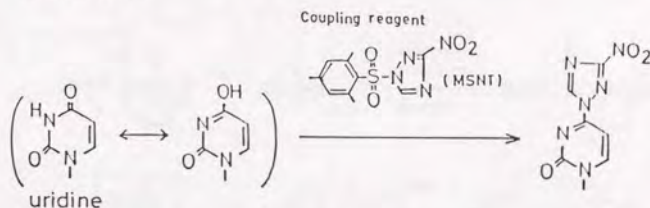


1-4 オリゴボヌクレオチドの固相合成の検討

1-4-1 スルホン酸型の縮合剤による副反応

リン酸トリエステル法によるDNAオリゴマーの固相合成は、メシチレンスルホニルニトロトリアゾリド(MSNT)⁴⁰⁾等の縮合剤を用いて、縮合反応を行う方法が一般的である。しかし、RNA合成の場合には、DNA合成よりも縮合反応に長時間要するため、ウリジンやグアノシンの塩基の部分に、例えば、Scheme 9に示すような副反応が生じることが報告されている⁴¹⁾。

Scheme 9



この問題を解決するために、2つの方法が考えられる。一つは、ウリジンやグアノシンの塩基のアミド基の部分にも、保護基を導入して、縮合剤による副反応を防ぐ方法である⁴²⁾。もう一つは、ヌクレオシド類に活性化したリン酸基を導入し、縮合剤を用いないで、縮合反応を行う方法である。前者は、ヌクレオシドへの保護基の導入が複雑になるので、本研究では、後者の方法を検討した。

1-4-2 縮合剤を用いないリン酸化と縮合反応の検討

保護ヌクレオシド(1-a~1-d)の3'位水酸基をリン酸化する時、二官能性のリン酸化試薬を用いれば、ヌクレオチドの3'位リン酸基に活性基を導入することができそのまま、縮合剤を用いないで縮合反応を行うこと

ができると考えられる（表 1-3）。

そこで、核酸合成やペプチド合成で用いられる種々の活性基を、二官能性リン酸化試薬に導入して、チミジン誘導体のリン酸化及び、樹脂に担持したチミジン誘導体との縮合反応を、TLCやDMTr基の発色等から検討した。縮合反応には、触媒として1-メチルイミダゾールを加えた（表 1-3）。その結果、活性基としてN-オキソベンゾトリアゾリル基を用いた場合に最もよく反応した。

表 1-3 リン酸化試薬と縮合反応の検討

$$\text{DMTrO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{Cl})-\text{R} + \text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{T} \xrightarrow[\text{dioxane}]{1\text{-Methylimidazole}} \text{DMTrO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{Cl})-\text{R}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{T}$$

R =

リン酸化	◎	○	×	×	×	○	○
縮合反応	◎	△	×	×	×	△	△

1-4-3 トリスクレオチドの合成

1-4-2の結果から、二官能性のリン酸化試薬である、2-クロロフェニル-0-0-ビス（1-ベンゾトリアゾリル）ホスフェイト（14）を用いて、トリチミジル酸（TpTpT）、デオキシウリジリル（5'-3'）デオキシウリジリル（5'-3'）チミジン（dUpdUpT）及びウリジリル（5'-3'）ウリジリル（5'-3'）チミジン（UpUpT）を合成した。TpTpTとdUpdUpTの

脱DMTr化反応は、DNA合成で広く用いられる2%BSA-塩化メチレン/メタノール(8/2 v/v)溶液を用い、UpUpTの場合には、1-2の結果より1%ジクロロ酢酸-塩化メチレン溶液を用いた。

保護ヌクレオシドの3'位水酸基のリン酸化は、活性基が不安定なため、合成の直前に行い、リン酸化後、直ちに縮合反応に用いた。なお、縮合反応の触媒として、1-メチylimidazoleを用いた。

日本ゼオンDNAマニユアル合成機を使い、図1-4に示す合成サイクルに従い、表1-4の操作を繰り返すことにより、トリマーを合成した。その結果は表1-5に示す、縮合収率は、除去したDMTr基を比色定量することによって求めた。

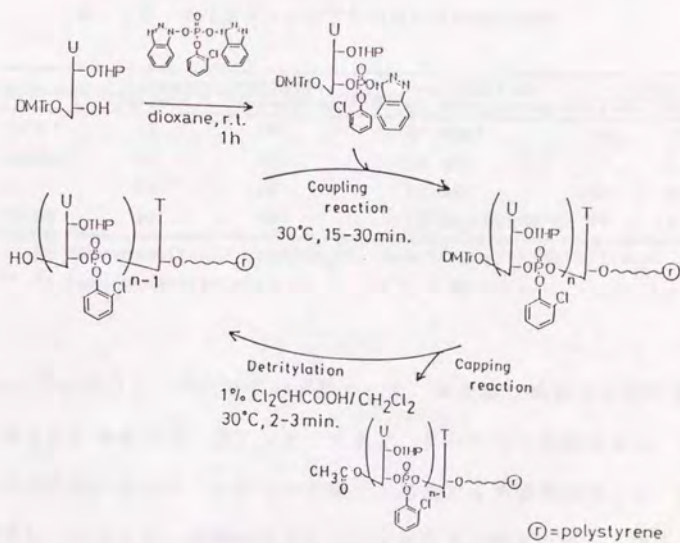


図1-4 固相リン酸トリエステル法による
トリヌクレオチドの合成サイクル

表1-4 合成サイクルの条件

Step	Solvent or reagent	Time (min.)
1	1% $\text{Cl}_2\text{CHCOOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 30°C	2.0-2.5
2	CH_2Cl_2 -MeOH (8:2 v/v)	0.2 (3 times)
3	Pyridine	0.2 (3 times)
4	Argon (flush)/40°C	10
5	0.2M Activated phosphates/ dioxane (500 μl) and 1-methyl- imidazole (50 μl), 30 or 40°C	15 or 30
6	Pyridine	0.2 (3 times)
7	10% $\text{Ac}_2\text{O}/0.1\text{M}$ DMAP/pyridine	3.0
8	Pyridine	0.2 (3 times)
9	CH_2Cl_2 -MeOH (8:2 v/v)	0.2 (3 times)

* Synthesizer: ZEON Genet DNA SYNTHESIZER

表1-5 トリヌクレオチドの合成とその縮合収率

Oligomer	Coupling reaction		Deprotection of DNTr group	Yield (%)	
	Time (min.)	Temperature (°C)		average	total
TpTpT	15	30	2% BSA*	99	98
dUpdUpT	30	40	2% BSA	91	83
	15	30	2% BSA	90	82
UpUpT	30	30	1% Cl_2CHCOOH **	94	89

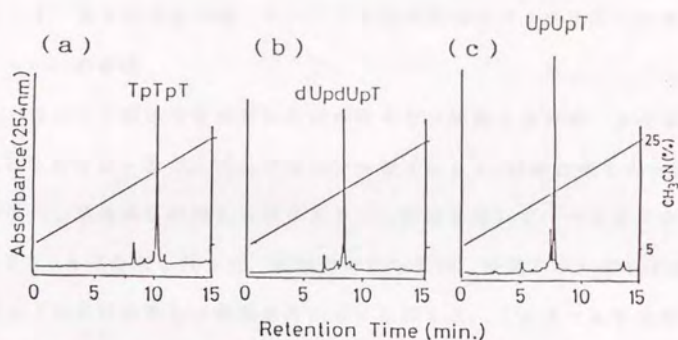
* 2% Benzenesulfonic acid/ CH_2Cl_2 -MeOH (8:2 v/v)/30°C/2 min.** 1% Dichloroacetic acid/ CH_2Cl_2 /30°C/2 min.

表1-5のように、それぞれのトリマーを、高収率で得ることができた。次に、得られた生成物を、濃アンモニア水で、55°Cで6時間処理し、また、UpUpTは、さらに、pH 2の塩酸で、室温で42時間処理して、保護基を除去し、そのまま、逆相のHPLCで分析した(図1-5)。図1-5に示す通り、各トリヌクレオチドが、メインピークとして得られた。また、UpUpTの、メインピークを分取精製し、ヌクレアーゼP1で完全分解し、各ヌクレオチド、ヌクレオシドを、逆相のHPLCで分離し、ピーク面積比

から、検量線を用いて、塩基組成を求めたところ、 $U:pU:pT=1.04:1.02:1$ と理論値と一致し、その他にピークが見られなかった。また、各トリマーのHPLCによる分析パターン(図1-5)が類似していることから、ウリジンの塩基部分への副反応、2'位THP基の脱離は少ないものと思われる。また、5'位DMTr基の除去を2%BSA-塩化メチレン/メタノール(8:2 v/v)溶液を用い、他の条件は同様にして、UpUpTを合成し、脱保護した後、逆相のHPLCで分析したところ、図1-6に示す通りピークがたくさん現れた。これは、2%BSAにより2'位THP基も脱離したため脱保護で濃アンモニア水処理をしたときに、鎖の切断が起こったためと考えられる。

これらの結果を比較すると、1-3で述べたように、脱DMTr化反応には、1%ジクロロ酢酸-塩化メチレン溶液を用いる方法が、オリゴリボヌクレオチドの固相合成に有用であることが確認された。

また、UpUpTの脱保護において、濃アンモニア水処理の時間を、6時間から12時間に延長しても、また、pH2の塩酸処理の時間を5時間から42時間の間で変化させても、脱保護後のHPLCのパターンに変化はなかった。脱保護は、完全に行われており、また、THP基の脱保護の際に、問題となるリン酸の2'3'位間での転移は起こっていないことがわかった。このことは、UpUpTがヌクレアーゼP1で完全に分解されることから支持される。



column: M&S PACK C18
mobile phase: 0.1M TEAA-CH₃CN
(pH 7.0)

図 1 - 5 トリヌクレオチドの逆相HPLCによる分析

- (a) TpTpT
- (b) dUpdUpT
- (c) UpUpT

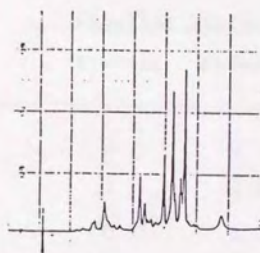


図 1 - 6 5' 位DMTr基の除去に2%BSAを用いて合成したUpUpTの逆相HPLCによる分析

1-4-4 トリウリジル酸、ペンタウリジル酸及びペンタアデニル酸 の合成

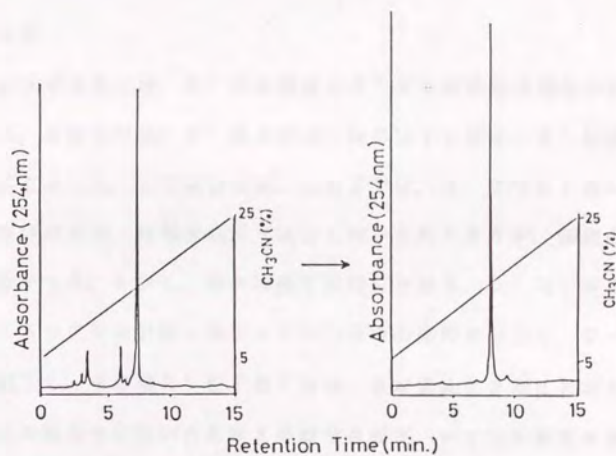
次に、ウリジン誘導体を担持したポリスチレン樹脂を用いて、トリウリジル酸 (UpUpU) 及び、ペンタウリジル酸 (Up)₄U の合成を行った。また、アデニン誘導体を担持したポリスチレン樹脂を用いて、ペンタアデニル酸 (Ap)₄A の合成も行った。固相担体としては、保護ヌクレオシドの担持量の多かったポリスチレン樹脂を用いることにして、1-2-2 で合成したウリジル誘導体及びアデニル酸誘導体を担持したポリスチレン樹脂を用い、UpUpT と同様にして、合成した。(表 1-6)。ペンタウリジル酸及びペンタアデニル酸は、精製が容易になるように、5' 末端の DMTr 基を除去せずに残しておいた。

表 1-6 トリウリジル酸、ペンタウリジル酸及び
ペンタアデニル酸の合成とその縮合収率

oligomer	Coupling yield(%)	
	Average	Overall
UpUpU	93	87
(Up) ₄ U	78	47
(Ap) ₄ A	67	30

(Up)₄U, (Ap)₄A は、5' 末端の DMTr 基を除去せずに残してあり、overall の収率は 4 量体までの収率である。

また、トリウリジル酸は、UpUpTと同様に脱保護し、逆相のHPLCで分取精製し、図1-7に示すように、UpUpUが得られた。また、ペンタウリジル酸及びペンタアデニル酸は、0.5Mテトラメチルグアニシン-2-ビリジナルドキシム(0.5M TMG-PAO)処理を37℃、23~40時間行い、次に、濃アンモニア水処理を、55℃、10時間を行った後、逆相のHPLCで、DMTrのついているために最後に溶出されるピークを分取し、最後にpH2の塩酸処理を室温で、26時間行った後、鎖長によって分離できる陰イオン交換HPLCで分析した(図1-8)。ペンタアデニル酸は、ほぼ単一ピークで得られた。また、ペンタウリジル酸も、若干、短い鎖長のピークが見られたが、5量体をメインピークとして得ることができた。この様に、ペンタウリジル酸において、短い鎖長うのピークが見られるのは、脱DMTr化の際、2'位THP基が脱離して、脱保護における濃アンモニア水処理によって、鎖の切断が起こったためと考えられる。



column: M&S PACK C18

mobile phase: 0.1M TEAA(pH7.0)

図 1 - 7 トリウリジル酸の逆相HPLCによる分析

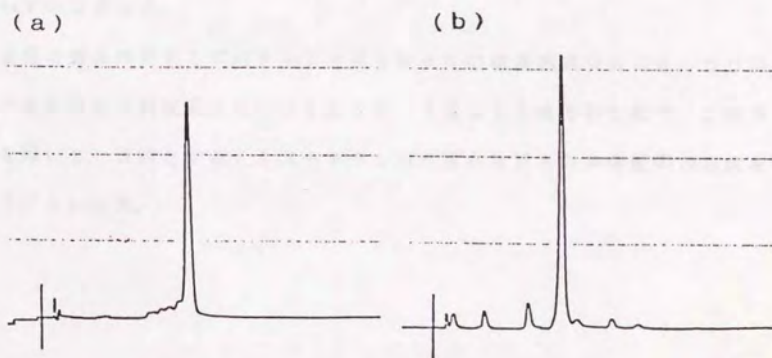


図 1 - 8 ペンタアデニル酸 (a)、ペンタウリジル酸 (b) の
陰イオン交換HPLCによる分析

1-5 考察

RNAの化学合成では、5'位水酸基と2'位水酸基の保護基の組合せが重要である。本論文では、5'位水酸基にはDMTr基を、2'位水酸基にはTHP基を用いた。この組合せは、これまでは、2'位THP基の酸に対する不安定性のため、液相合成法ではよく用いられてきたが、固相合成法では用いらなかった。しかし、種々の酸で検討した結果、5'位DMTr基の除去を、1%ジクロロ酢酸-塩化メチレン溶液の条件で行うと、2~3分間で除去が完了し、その間2'位THP基は、ほぼ安定であることがわかり、その後、この組合せを用いたRNAの固相合成が、いくつか報告される様になった⁴⁸⁾。

また、リン酸の活性基として、N-オキソベンゾトリアゾリドを用いると、縮合剤による塩基部分の副反応を起こすことなく、縮合反応を行うことができることがわかった。この方法は、van Boomらが、DNAの液相合成⁴³⁾及び固相合成⁴⁸⁾、RNAの液相合成⁴⁹⁾に用いているが、RNAの固相合成には、用いていなかった。

各種3量体のHPLCパターンとUpUpTの塩基組成分析より、ウリジンの塩基部分の副反応はおこっておらず、5量体も合成可能なので、この方法を用いて、目的とするf1コートタンパク質mRNAの先導配列の合成を行うことにした。

第二章

f1 コートタンパク質 mRNA の先導配列の合成

2-1 f1コートタンパク質mRNAの先導配列の部分合成

第一章で述べたように、RNAオリゴマーの固相合成が可能になったので、本研究の目的のために必要なmRNAの先導配列の合成を行った。mRNAとして、ファージf1の殻を構成し、タンパク質合成が活発に行われていると思われるコートタンパク質のmRNAを取り上げ、その開始コドンAUGを含む先導配列⁵⁰⁾を合成することにした(図2-1)。

ペンタウリジル酸やペンタアデニル酸の縮合反応の収率があまり高くないので、先導配列を、いくつかのフラグメントに分けて合成し、後で、RNAリガーゼで酵素的に結合して、先導配列を合成することを考えた。この際、ウリジンの2'位THP基が酸性条件下で除去され易いので、フラグメントの末端がウリジンになるようにし、図2-2に示すようなフラグメントに分けた。また、SD配列GGAをAAAに変えたフラグメントVIIも合成した。

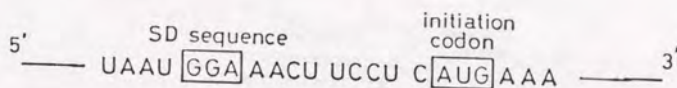


図2-1 f1コートタンパク質mRNAの先導配列

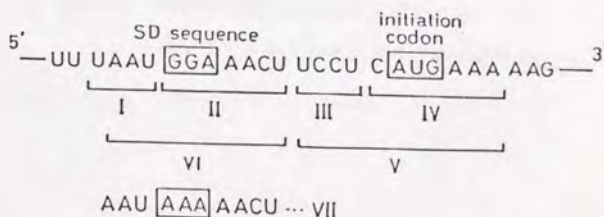


図2-2 化学合成したフラグメント

(1) 各フラグメントの合成

トリウリジル酸と同様にヌクレオシドの担持量の多いポリスチレン樹脂を固相担体として、各フラグメントを合成した(図2-3)。精製が容易なように、5'末端のDMTr基は除去せず、残しておいた。縮合反応の収率の結果を表2-1に示す。

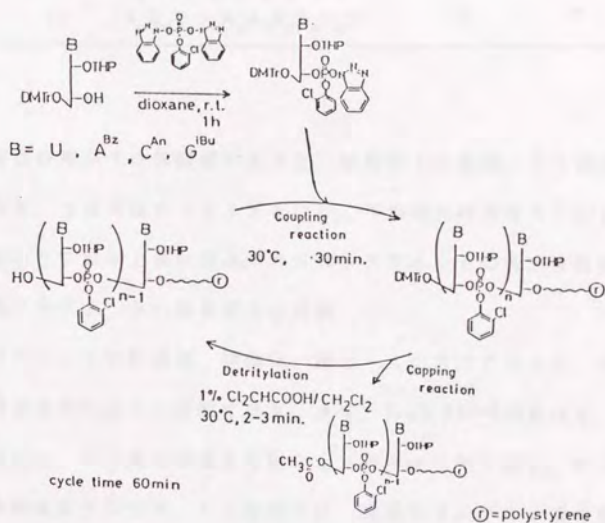


図2-3 固相リン酸トリエステル法による
オリゴボヌクレオチドの合成サイクル

表2-1 RNAフラグメントの合成とその縮合収率

Fragment	Sequence	Coupling yield (%)	
		average	overall
I	U _p A _p A _p U	85	71
II	G _p G _p A _p A _p A _p C _p U	76	25
III	U _p C _p C _p U	91	75
IV	C _p A _p U _p G _p A _p A _p A	71	18
V	U _p C _p C _p U _p C _p A _p U _p G _p A _p A _p A	79	11
VI	A _p A _p U _p G _p G _p A _p A _p A _p C _p U	70	6
VII	A _p A _p U _p A _p A _p A _p A _p A _p C _p U	72	7

平均縮合収率が70%程度であると、鎖長が10量体、11量体と長くなった場合に、全収率は6~11%となり、平均縮合収率をもう少し上げる工夫をしないとこれ以上長い鎖長のRNAフラグメントの合成は困難である。

(ii) 各フラグメントの脱保護及び精製

各フラグメントの脱保護、精製は、図2-4の方法で行った。フラグメントIIの場合を例にあげて説明すると、まず、0.5M TMG-PAO処理を、37℃で、24時間行い、リン酸の保護基を除去し、樹脂から切り離し、さらに濃アンモニア水処理を55℃で、12時間行い、塩基部分のアミノ基の保護基を除去する。次に、逆相のHPLCで最も遅く溶出するDMTr画分(図2-5(a)の矢印部分)を分取した後、pH2の塩酸で処理し、2'位THP基と、5'末端のDMTr基を除去する。最後に、逆相HPLCでメインピークを分取精製する(図2-5(b), (c))。

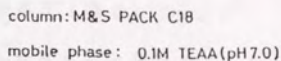
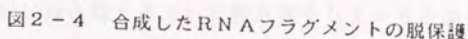


図2-5 フラグメントIIの逆相HPLCによる精製

- (a) 濃アンモニア水処理後
(b) 希塩酸 (pH 2.0) 処理後
(c) HPLCによる精製後

以上の方法により、約半分量の樹脂 10 mg から、フラグメント I, II, III, IV, V を、それぞれ、6.8 A₂₆₀, 5.3 A₂₆₀, 4.0 A₂₆₀, 3.2 A₂₆₀, 0.3 A₂₆₀ 得ることができた。また、濃アンモニア水処理後、直接、逆相 HPLC で DMT r 画分を分取すると、UV 吸収の大きなオキシメートや、鎖長の短いオリゴマーのため、HPLC パターンがみずらくなるので、以後、濃アンモニア水処理後、簡易型逆相カラムクロマトグラフィー (Sep pak, Waters 社製) を用いて前処理をしてから逆相 HPLC で DMT r 画分を分取して、脱保護精製した。半分量 15 mg の樹脂から、フラグメント VI, VII をそれぞれ 0.3 A₂₆₀ 得ることができた。

次に精製した、フラグメント I ~ IV を、長さで分離できる陰イオン交換 HPLC で分析したところ、それぞれ、4 量体、7 量体の位置に単一ピークとして確認された。(図 2-6)。

(iii) 各フラグメントのヌクレアーゼ P1 分解による塩基組成の決定

精製した各フラグメント I ~ V は、ヌクレアーゼ P1 でヌクレオチド、ヌクレオシドに完全に分解した(図 2-7)。

0.05 A₂₆₀ の各オリゴマーに、0.25 μ g のヌクレアーゼ P1 を加え、pH 5.7 で 37 °C 2 時間反応し、各ヌクレオチド、ヌクレオシドを、逆相 HPLC で分離し、各ヌクレオチド、ヌクレオシドのモル比を、ピーク面積比から、別途に作製した検量線を用いて求めた(図 2-7)。

求められたモル比は、その塩基配列から考えられる値とよく一致しており、また、他のピークがみられないことから副反応もなく純度よく目的物が得られたことが確認できた。

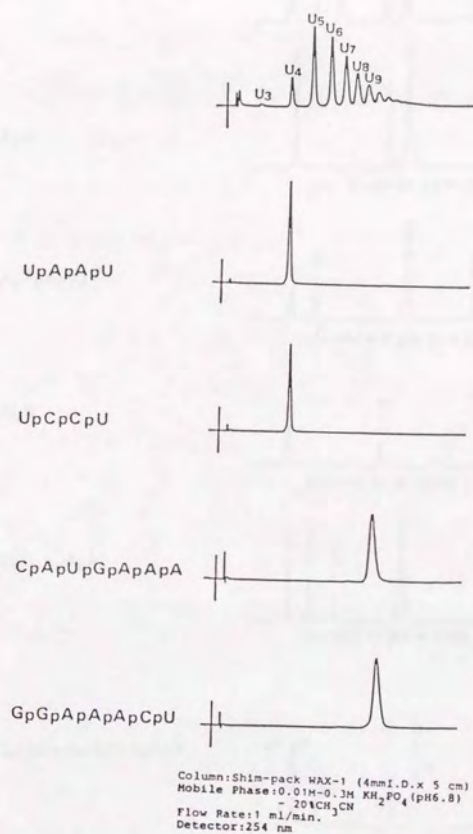
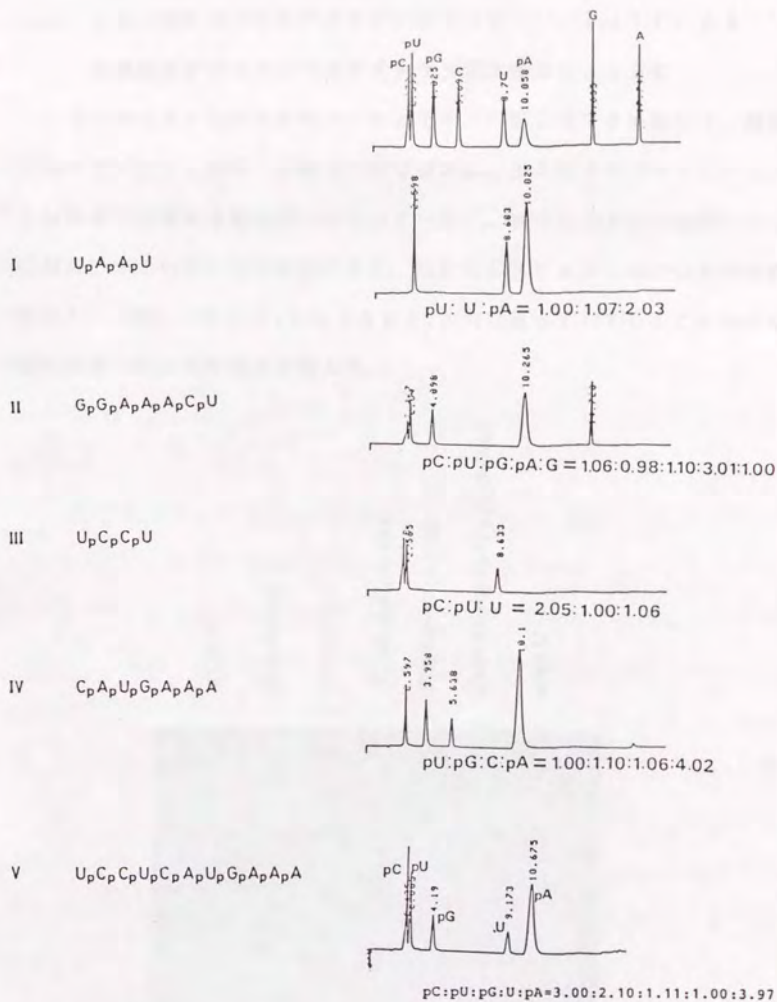


図2-6 各RNAフラグメントの陰イオン交換HPLCによる分析



Nuclease P_1 Digestion (37 °C, 1-2h)
 Column: Synchropak AX100 (4.1mm I.D. x 25 cm)
 Mobile Phase: 0.05M $NH_4H_2PO_4$ (pH 5.2) - CH_3CN
 Flow Rate: 1 ml/min.

図2-7 各RNAフラグメントのヌクレアーゼ P_1 による塩基組成分析

(iv) T4-ポリヌクレオチドキナーゼと $[\gamma-^{32}\text{P}]\text{ATP}$ による5'末端標識及びポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析

T4-ポリヌクレオチドキナーゼと $[\gamma-^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いて、精製した各フラグメントの5'末端を ^{32}P で標識し、15%ポリアクリルアミド-7M尿素ゲル電気泳動を行った(図2-8)。各フラグメントは単一バンドに精製できていることが確認できた。UCCUとUAAUのバンドの位置がずれているが、 $(\text{Up})_4\text{U}$ と $(\text{Ap})_4\text{A}$ の位置もずれていることから塩基組成の違いによるものだと考えた。

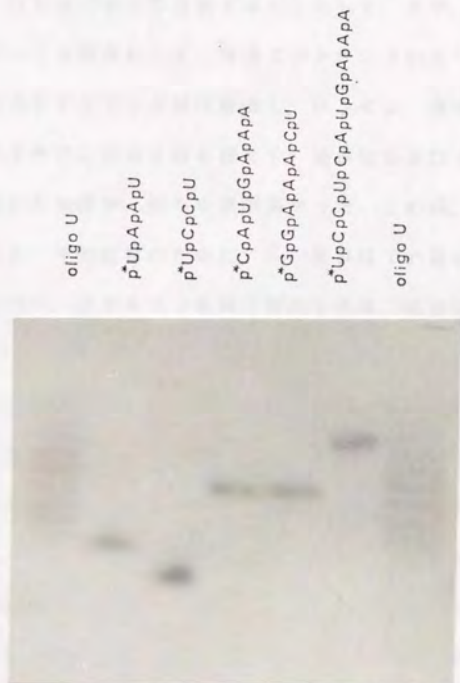


図2-8 各RNAフラグメントの15%ポリアクリルアミド-7M尿素ゲル電気泳動

2-2 固相合成法の改良及び、f1コートタンパク質mRNA

先導配列18量体の合成

以上の様に、11量体までのオリゴマーは合成できるようになったが、縮合収率があまり良くないので、これ以上の鎖長のオリゴマーは、合成できなかった。3量体や4量体に比べて、7量体、10量体、11量体の方が平均縮合収率が悪いのは、鎖長が長くなってくると、オリゴマーの側鎖である塩基部分と、ポリスチレンのベンゼン環が、スタッキングを起こして、吸着してしまい、縮合反応が起こりにくくなったためではないかと考えた。そこで、固相担体を、CPGに変えて合成することにして、まず、縮合反応の溶媒を検討した。2-1と同様にして、保護ヌクレオシドの3'位をリン酸化した後、溶媒であるジオキサンを減圧留出し、ベンゼン、塩化メチレン、アセトニトリル、ジオキサンの各溶媒を加えて、縮合反応を行ったところ、アセトニトリルを用いた場合が、最も収率が高かった。この時、未反応のHOB Tが残っていると、その酸性のために、5'位DMTr基が脱離してしまうことがわかったので、ジオキサンを減圧留出した後、無水ピリジンで一回共沸し、HOB Tを中和したところ、DMTr基の脱離は起こらず、収率も高くなることがわかった。そこで、f1コートタンパク質mRNA先導配列を、フラグメントに分けずに、一度に合成することにした。ここで、なるべく鎖長を短くするために、先導配列の3'側は開始コドンであるAUGまでとし、図2-9のような18量体を合成することにした。この塩基配列を詳しくみると、開始コドンAUGの他に、SD配列と重なるようにもう一ヶ所、AUGという配列が存在し、2ヶ所で開始複合体を形成する可能性がある。また、2次構造を、GENETYX(ソフトウエア開発(株))で解析してみると、 $\Delta G = -1.40 \text{ Kcal/mol}$ と、比較的安定な2次構造を取ることがわかった(図2-10)。そこで、5'末端から2番目のAをCに変え、2次

構造をとりにくくした18量体(RNA1)を合成することにした。また、SD配列中のGGを、それぞれ、AA、CCに変えて16SrRNAの3'末端付近と塩基対を形成しなくした18量体(RNA2, RNA3)、及び、逆に、16SrRNAの3'末端付近と、6塩基で塩基対を形成するようにした18量体(RNA4)の4種類合成することにした(図2-11)。

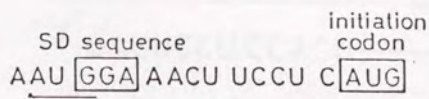
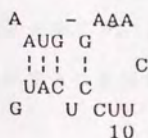
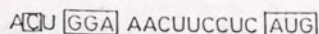
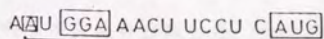
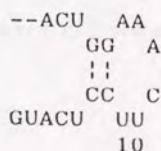


図2-9 f1コートタンパク質mRNAの先導配列18量体



Free Energy
-1.40 Kcal/mol



Free Energy
-.50 Kcal/mol

図2-10 f1コートタンパク質mRNAの先導配列18量体の2次構造

	SD sequence	initiation codon
RNA-1	ACU GGA AACUUCCUC	AUG
RNA-2	ACU AAA AACUUCCUC	AUG
RNA-3	ACU CCA AACUUCCUC	AUG
RNA-4	UAA GGA AACUUCCUC	AUG

3' HOAUUCCUCCACU—

3' terminus of E.coli 16S rRNA

図2-11 合成した先導配列18量体及びその改変体

固相担体としてCPGを用い、縮合反応溶媒をアセトニトリルとし、それに合わせて、合成サイクルを表2-2の様に变えて、それぞれ4種類の先導配列18量体を合成した。合成法を改良したことによって、縮合反応時間が30分から15分に短縮し、合成サイクルの時間も60分から25分に短縮した(図2-12)。また平均縮合収率も90%以上の高い収率で、各18量体を合成することができた(表2-3)。

表2-3 先導配列18量体の合成とその縮合収率

Sequence	Coupling yields(%)	
	average	overall
ACUGGAAACUUCCUCAUG	95	46
ACUAAAAACUUCCUCAUG	97	57
ACUCCAAACUUCCUCAUG	94	38
UAAGGAAACUUCCUCAUG	93	30

表 2-2 改良した合成サイクルの条件

Step	Solvent or reagent	Time (min.)
1	1% $\text{Cl}_2\text{CHCOOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 30°C	1.0-1.5
2	CH_3CN	0.2 (4 times)
3	Argon (flash)/30°C	1.0
4	0.29M Activated phosphates/ CH_3CN (300 l) and 1-methyl- imidazole (40 l), 30°C	15
5	CH_3CN	0.2 (3 times)
6	5% $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ - 3.5% DMAP - 5% 2,6-lutidine - THF	1.0
7	CH_3CN	0.2 (3 times)

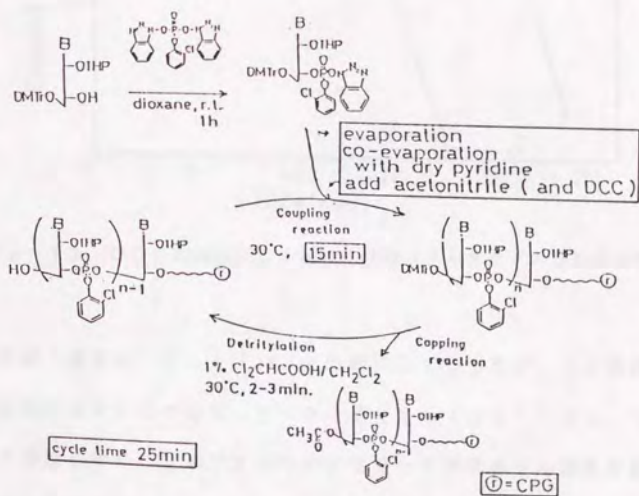


図 2-1 2 改良した合成サイクル

縮合反応溶媒をアセトニトリルに変えたことによって、活性化した保護ヌクレオシド(15)は、湿気に対して不安定となり、ウリジンを用いた二量体の合成では、調製後12時間で、縮合収率の低下がみられた。ここに脱水剤としてジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)を活性化した保護ヌクレオチドに対して5モル当量加えることにより、20時間まで安定性が増すことがわかった(図2-13)。そこで、湿度の高い時期には、DCCを添加して、合成を行った。

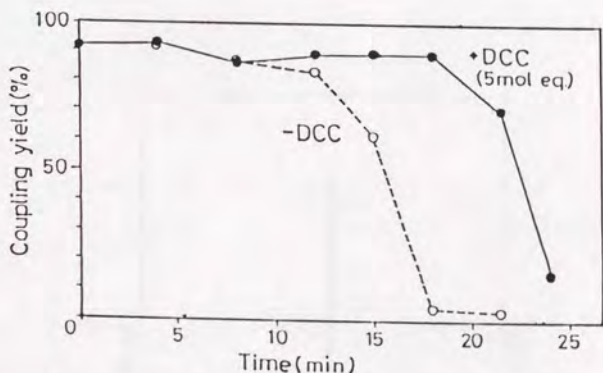


図2-13 DCCの添加による活性化保護ヌクレオチドの安定性の増大

脱保護・精製は、2-1(ii)と同様にして行ったが、18量体の場合には、逆相のHPLCでは単一ピークに見えても(図2-14)、5'末端を ^{32}P で標識して20%ポリアクリルアミド-7M尿素ゲル電気泳動(20% PAGE)で分析してみると、バンドが何本も見られ(図2-15, (a))、逆相のHPLCでは完全に精製することはできなかった。これは、鎖長が長くなってくると、5'位DMTr基を除去するための酸処理の、延べ時間も長くなるため、3'末端付近では特に、2'位THP基の脱離が少しずつ増

えてきて、脱保護の段階で、鎖の切断が起こり、鎖長の短いバンドが数本見られたのだと考えられる。そこで、20%PAGEで、最も移動度の小さいすなわち、最も鎖長の長いバンドを切り出し、溶出緩衝液(20mM トリス塩酸緩衝液(pH8.0), 0.5M 塩化ナトリウム, 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム, 1mM EDTA(pH8.0))中で、37℃一昼夜振とうした後、エタノール沈澱または、陰イオン交換からカラムクロマトグラフィー脱塩し、精製した。その一部をとり5'末端を ^{32}P で標識して20%PAGEで単一バンドにまで精製した(図2-15, (b))。

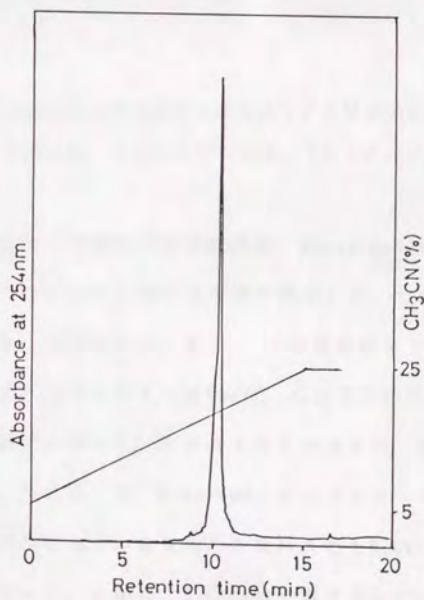


図2-14 先導配列18量体RNA1の逆相HPLC

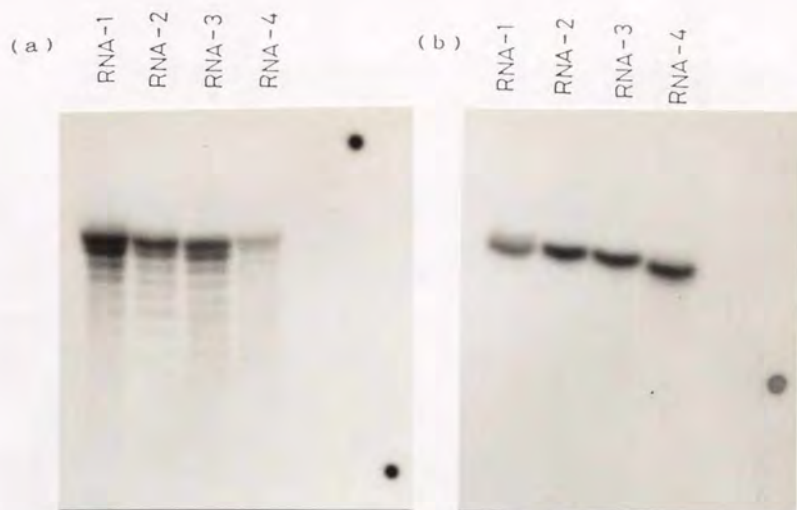


図2-15 先導配列18量体の20%ポリアクリルアミド-7M尿素ゲル電気泳動 (a) HPLC後、(b) PAGE精製後

精製した先導配列18量体の塩基配列は、Donis-Keller法と呼ばれる、塩基特異的リボヌクレアーゼを用いる方法で決定した。リボヌクレアーゼとして、Gに特異的なリボヌクレアーゼT₁、Aに特異的なリボヌクレアーゼU₂、AとUに特異的なリボヌクレアーゼPhyM、CとUに特異的なB.Cereusリボヌクレアーゼの4種類を用いて、RNA1とRNA2の、塩基配列を確認した(図2-16)。RNA1で、B.CereusリボヌクレアーゼでGも切られているが、塩基配列のわかっている天然のもRNAでもB.CereusリボヌクレアーゼでGも切られていることから、B.CereusリボヌクレアーゼにリボヌクレアーゼT₁が混入していると考えた。また、アルカリ加水分解のレーンにマイナーなバンドがみられるが、これは、分解の中間生成物であるサイクリックモノホスフェイトと思われる。

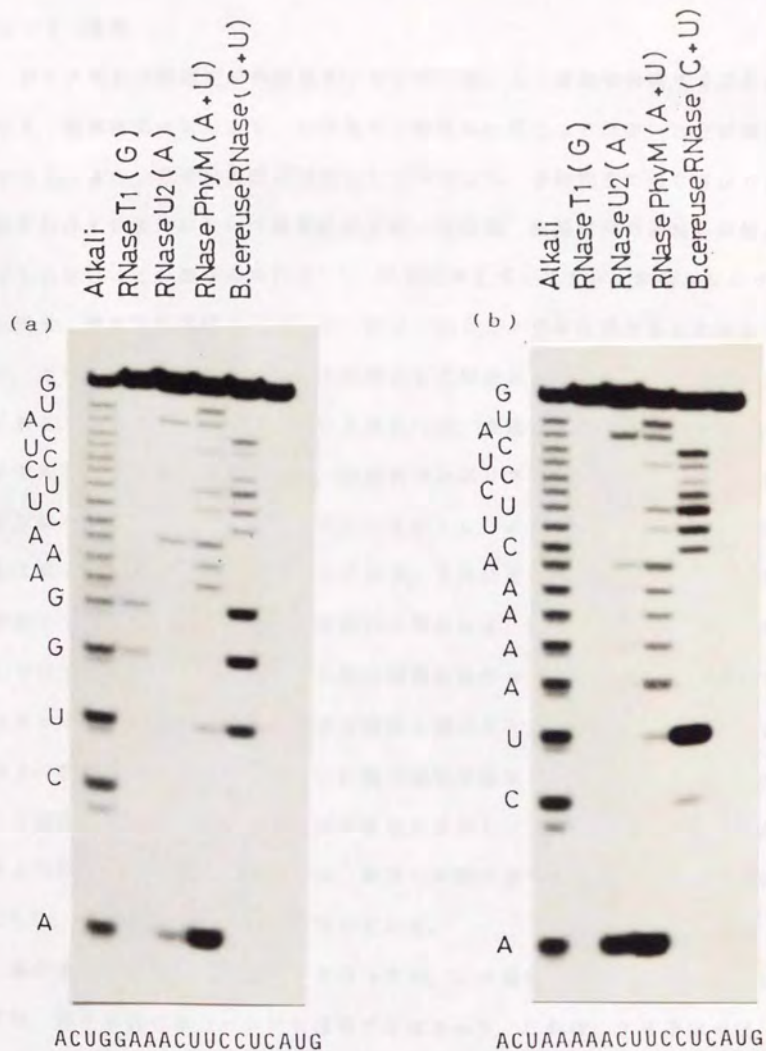


図2-16 Donis-Keller法による塩基配列の確認

(a) RNA1、(b) RNA2

2-3 考察

ポリスチレン樹脂を固相担体とする合成では、11量体を合成することができ、塩基組成分析により、塩基部分の副反応が起こっていないことが確認できた。また、CPGを固相担体とした場合にも、当研究室で同じ方法で合成された19量体について塩基組成を調べた結果、塩基部分の副反応は起こっていないことが確かめられた^{5,11}。固相担体をポリスチレン樹脂からCPGに変え、縮合反応溶媒をジオキサンからアセトニトリルに変えることによって、平均縮合収率が、90%以上に向上した理由としては、次のように考えられる。ポリスチレン樹脂を用いた場合には、合成したオリゴリボヌクレオチドの鎖長が長くなってくると、塩基部分とポリスチレン樹脂のベンゼン環とが疎水性の相互作用でスタッキングを起こし、オリゴマーが、樹脂に吸着して縮合反応が起こりにくくなっている。それに対して、CPGでは、吸着が起こりにくい。また、CPGを用いた場合には、溶媒を変えるとき、一度ピリジンで共沸するため、リン酸の活性があがっている。また、CPGで、ヌクレオシドの担持量と縮合収率の関係を調べたところ、 $10 \mu\text{mol/g}$ 以上の担持量では、担持量の多い程縮合収率が低かったことから、ポリスチレン樹脂のヌクレオチドの担持量が数百 $\mu\text{mol/g}$ と多すぎることなどが考えられる。ポリスチレン樹脂は、強度に問題があり、現在では、固相担体として、ほとんどCPGが用いられている。

脱保護・精製は、常法に従って行ったが、18量体では逆相HPLCだけでは、電気泳動で単一バンドに精製できなかった。これは、18量体では、脱DMTr化の延べ時間が長くなり、2'位THP基も一部脱離したため、後の脱保護の濃アンモニア処理の段階で鎖の切断が起こったためと考えられる。これ以上の鎖長のオリゴマーを合成するためには、保護基の選択を考えなければならない。Ogilvieらは、中性条件で脱保護可能なシリル基を、2'

位の保護基として用いて、77量体の合成に成功している¹⁸⁾。また、大塚らは、5'位の保護基として、ヒドラジンで除去可能なリブロイル基を用い、2'位の保護基として、THP基よりも弱い酸性条件で脱保護可能なTHF基を用いて21量体の合成を行っている⁵²⁾。

タンパク質合成開始複合体形成

3-1 緒言

序論でも述べたように、翻訳は、タンパク質合成開始複合体(initiation complex)を形成することから始まる。開始複合体は、リボソーム、ホルミルメチオニル転移RNA (fMet-tRNA)とmRNAの複合体で、その形成には、3種の開始因子(IF-1、2、3)が必要である。形成機構の詳細はまだ明らかになっていないが、現在のところ、次のように考えられている。まず、70Sリボソームが、30Sサブユニットと50Sサブユニットに解離し、30Sサブユニットに2種類のIF-1、3が結合する。次に、mRNAが開始コドンAUGの付近で結合し、さらに、fMet-tRNAとIF-2とGTPの3者複合体が結合し、IF-3が解離して、30S開始複合体を形成する。次に、50Sサブユニットが結合し、GTPが加水分解するとともに、IF-1、2が解離して、70S開始複合体が形成される(図3-1)。そこで、開始複合体に必要なこれら諸因子を、大腸菌より調製し、開始複合体形成の実験系の確立を行った。

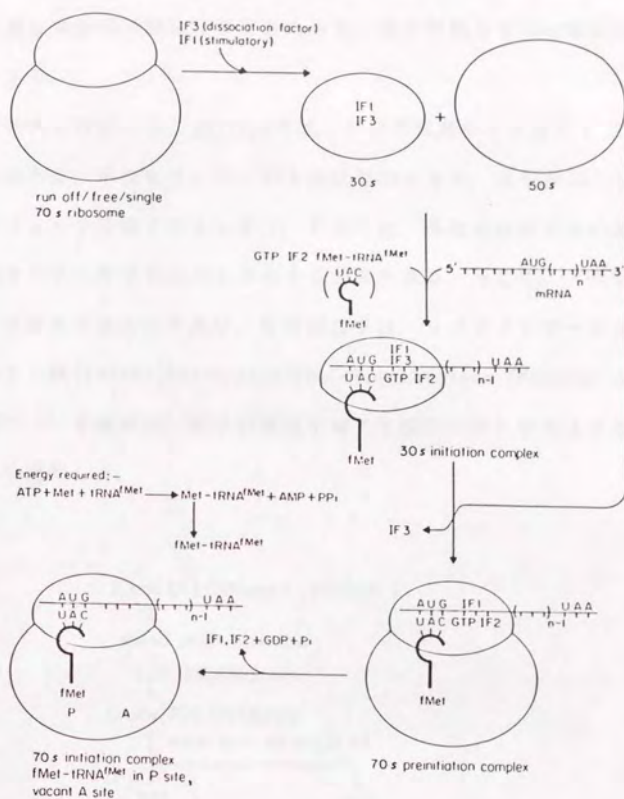


図3-1 原核細胞のタンパク質合成開始複合体形成機構

3-2 リボゾーム及び、粗開始因子の調製

開始複合体形成実験を行うにあたって、最も問題となるのは mRNA の安定性である。

大腸菌の mRNA は、*in vivo* では、その半減期が 15 分位であるといわれているように、不安定で、タンパク合成を終えると、速やかに、リボヌクレアーゼによって分解されてしまう。そのため、開始複合体形成の反応系中のリボヌクレアーゼをなるべく排除する必要がある。そこで、70S リボゾーム、30S サブユニット及び、粗開始因子は、リボヌクレアーゼが少ない大腸菌 Q13 株 (RNase I⁻, polynucleotide phosphorylase (PNPase) 欠損株) より文献^{53) 54)}を参考に、若干の改良を加えて図 3-2 に示すような手順にしたがって調製した。

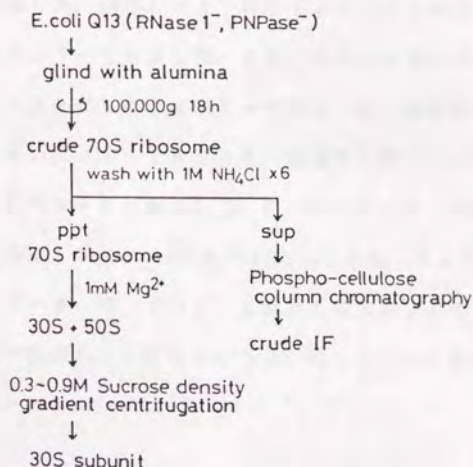


図 3-2 大腸菌 Q13 株より 70S リボゾーム、30S サブユニット及び粗開始因子の調製

リボヌクレアーゼの混入を最小限に抑えるために、いろいろ試みた結果、70Sリボゾームの調製では、1M塩化アンモニウムを含む緩衝液での洗浄を4回繰り返す、その際、ガラス製バンドホモジナイザーを用いて丁寧に懸濁するのが最も良いことがわかった。しかし、これ以上洗浄すると、リボソーム活性が低下してしまうことがわかった。また、ショ糖密度勾配遠心法により30Sサブユニットに分離し精製すると、リボヌクレアーゼは完全に除けることがわかった。しかし、粗開始因子からは、リボヌクレアーゼを完全に除くことはできなかった。

また、fMet-tRNAは、当研究室の堀弘幸氏より供与された大腸菌A19株(RNaseI欠損株)のtRNA^{fMet}を、大腸菌Q13株より調製したS-100画分を用いて、太田らの方法⁵³⁾に従って、ホルミルメチオニル化した。メチオニンは $[^{35}\text{S}]$ で標識されたものを用い、fMet-tRNAを $[^{35}\text{S}]$ で標識した。調製した $[^{35}\text{S}]$ fMet-tRNAは、液体シンチレーションカウンターで定量した。また、ホルミル基のドナーである葉酸誘導体によりホルミル化したfMet-tRNAと、葉酸誘導体を加えずホルミル化していないMet-tRNAを、塩基性条件下(pH9)で脱アミノ化し、 $[^{35}\text{S}]$ Metを対象にして、アビセルセルロース薄層クロマトグラフィー(展開溶媒: nBuOH:AcOH:H₂O=4:1:1)した後、オートラジオグラフィーし、デンスitomーターで、fMetとMetのスポットの濃さを調べたところ、メチオニル化されたtRNAのうち、約50~70%がホルミル化されていた(図3-3)。

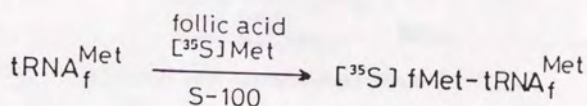
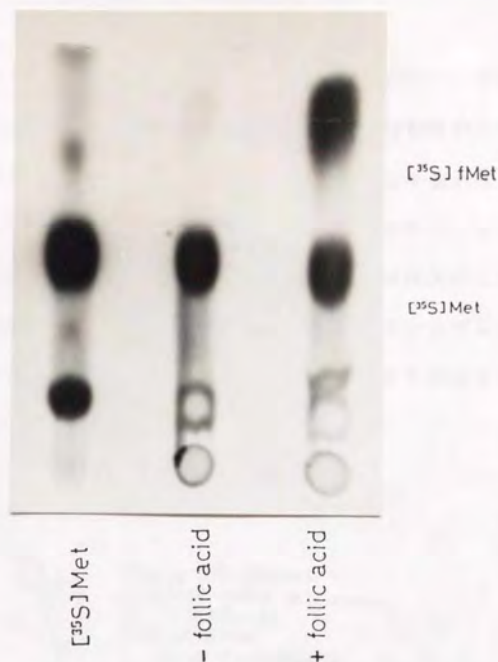


図3-3 fMet-tRNAのホルミル化率

3-3 開始複合体形成の反応条件の検討

3-2で調製した各因子及び、液相法により別途に合成した3量体AUGを用いて、ニトロセルロースフィルターアッセイ法により、開始複合体形成の反応条件を検討した。ニトロセルロースフィルターアッセイ法は、リボソームが、ニトロセルロースフィルターに吸着する性質を利用した方法である。エッペンドルフチューブ中に、リボソーム、開始因子、RNAオリゴマー、

[^{35}S] fMet-tRNA、GTPを加え、緩衝液中で、所定温度、所定時間、保温して、開始複合体を形成させた後、緩衝液で希釈して反応を停止し、ニトロセルロースフィルターで濾過し、開始複合体を形成し、リボソームに結合した [^{35}S] fMet-tRNAのみをフィルター上に残し、リボソームに結合していない [^{35}S] fMet-tRNAは洗浄した後、フィルター上に結合した [^{35}S] fMet-tRNAを液体シンチレーションカウンターで定量することによって、開始複合体の形成量を測定する方法である (図3-4)。

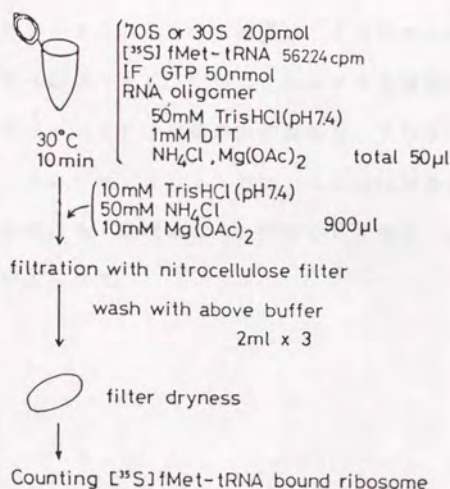


図3-4 ニトロセルロースフィルター法による開始複合体形成量の測定

Gassenらの条件⁵⁵⁾をもとに、反応温度及びAUG量、マグネシウムイオン濃度、アンモニウムイオン濃度の最適条件を、次のようにして決定した。

70Sリボソームまたは30Sサブユニット各20 pmol、粗開始因子(0.38 A₂₈₀/ml) 12 μ l、1 mM GTP、50 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.4)、1 mM ジチオトレイトール、[³⁵S] fMet-tRNA 5, 6 pmol (56000 cpm)及び、AUG、塩化アンモニウム、酢酸マグネシウムを含む反応液50 μ lを各反応温度で10分間保温し、緩衝液で希釈し反応を停止した後、ニトロセルロースフィルターアッセイ法により反応温度及び、AUG量は、図3-5に示すとおり、37℃よりも30℃の方が、開始複合体形成量が大きく、また、AUG量は250 pmol付近で、形成量の飽和がみられた。またアンモニウムイオン濃度は、100 mM以上では結合量はほぼ一定であった(図3-6)。マグネシウムイオン濃度は、70Sリボソームと30Sサブユニットでは最適濃度が異なり、70Sリボソームでは、5 mMが最適で、30Sサブユニットでは、15 mMが最適であった(図3-7)。いずれの場合も、粗開始因子に依存したリボソームへのfMet-tRNAの結合がみられた。

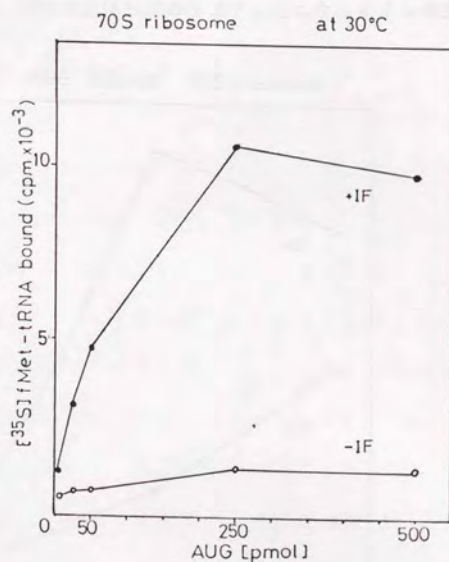
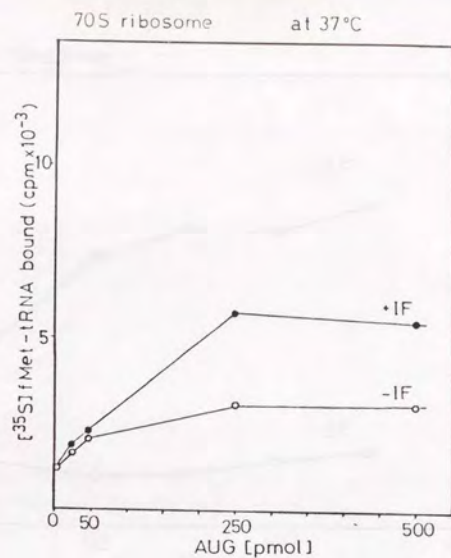


図3-5 AUGに依存した開始複合体形成

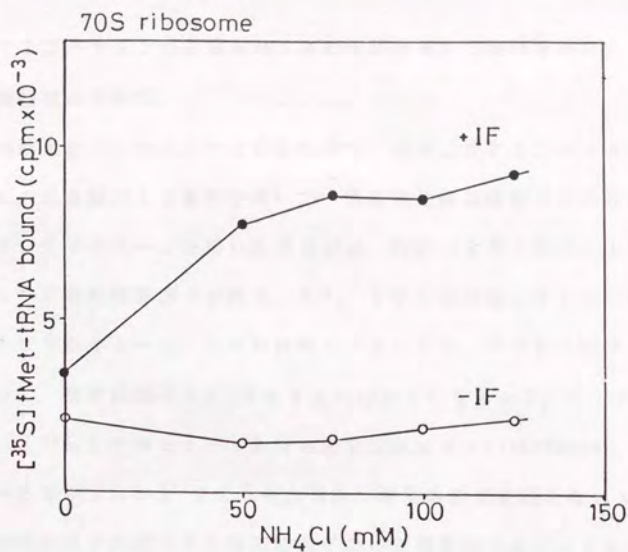


図3-6 開始複合体形成の至適アンモニウムイオン濃度

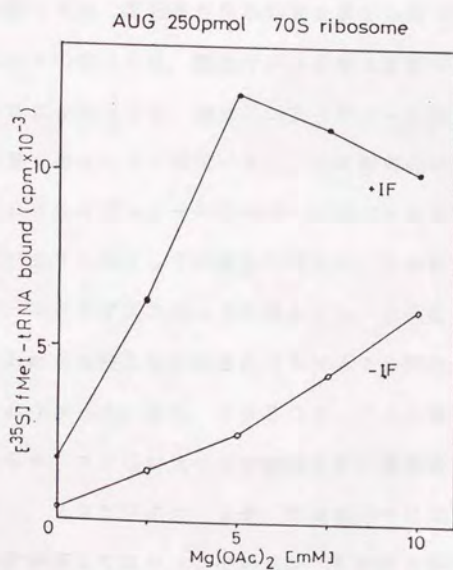


図3-7 開始複合体形成の至適マグネシウムイオン濃度

3-4 f1コートタンパク質mRNAの先導配列18量体を用いた

開始複合体形成

3-3の結果より、次のような反応条件で、合成したf1コートタンパク質mRNAの先導配列18量体を用いて、開始複合体形成効率の経時変化を調べた。70Sリボソームを用いる場合には、反応液全量100 μ l中に、50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)、100mM塩化アンモニウム、1mMジチオトレイトール、5mM酢酸マグネシウム、70Sリボソーム20pmol、粗開始因子(0.343A₂₈₀/ml)24 μ l、GTP100nmol、[³⁵S]fMet-tRNA約20pmol(141770cpm)、RNAオリゴマー250pmolをそれぞれ含み、粗開始因子を加えない(-IF)場合は、粗開始因子の代わりに粗開始因子の保存緩衝液である40%グリセロール緩衝液を同量加えて、30°Cで保温し、所定時間に、16 μ lずつ分取し洗浄液で希釈した後、開始複合体形成量を測定した(図3-8)。また、30Sサブユニットの場合には、酢酸マグネシウム濃度を15mM、30Sサブユニットを20pmolし、他は70Sリボソームの場合と同様にして、開始複合体形成量を測定した(図3-9)。先導配列のモル数は、同様の塩基配列をもつDNAオリゴマーのHypochromicityを参考にして、18量体のhypochromicityを35%として計算して求めた。その結果、70Sリボソームの場合にも、30Sサブユニットの場合にも、SD配列を持つ先導配列RNA1と、SD配列を持たない先導配列RNA2の間に、開始複合体形成効率の差は見られなかった。また、70Sリボソームの場合には、先導配列18量体のどちらも、AUGに比べて開始複合体形成効率は低かった。3-2で述べたように、70Sリボソームや、開始因子中には、除けなかったリボヌクレアーゼが存在しており、この結果が、開始複合体形成反応中に先導配列が分解してしまうためではないかと考え、先導配列の安定性を調べた。

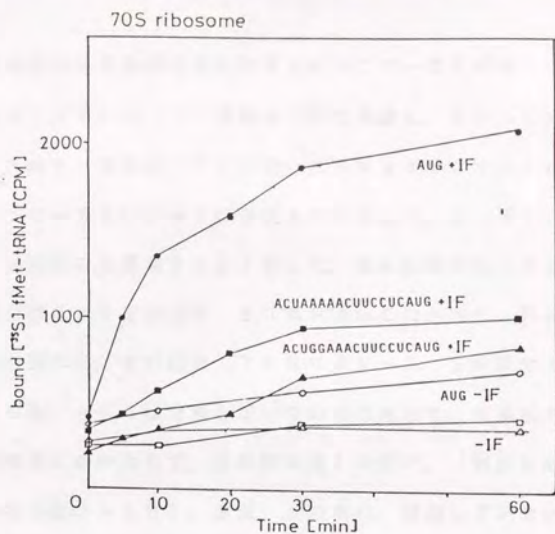


図3-8 AUG、RNA 1及びRNA 2による
70S開始複合体形成の経時変化

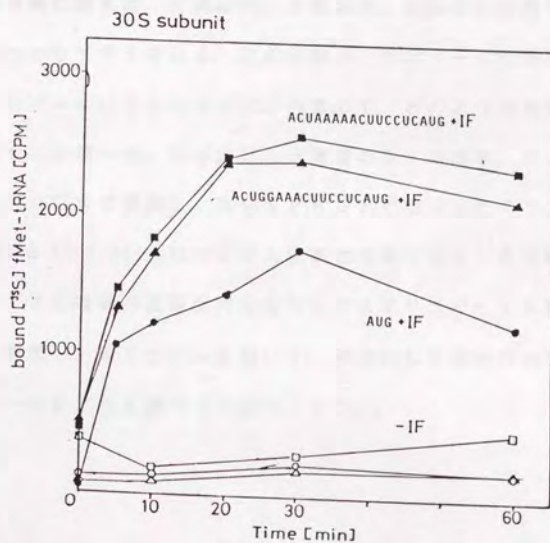


図3-9 AUG、RNA 1及びRNA 2による
30S開始複合体形成の経時変化

3-5 開始複合体形成反応中のRNAオリゴマーの安定性

各RNAオリゴマーの、5'末端を ^{32}P で標識し、20%PAGEにより精製した。この5'末端を ^{32}P で標識したRNAオリゴマー1 pmolを、RNAオリゴマー250 pmolの代わりに加えて、3-2で述べた反応条件に従い、反応液の全量を25 μl として、各反応時間に、5 μl ずつ分取し、色素混合液3 μl を加えて、20%PAGEによって、RNAオリゴマーの安定性を調べた。その結果、70Sリボソーム、30Sサブユニットの場合、どちらも、AUGは分解していないのに対して、先導配列18量体は、SD配列の有無にかかわらず、反応開始後10分で、一部が分解していることがわかった(図3-10)。また、この系に、標識していないRNAオリゴマー250 pmolを加えても、分解の仕方は変わらなかった。分解の仕方は、70Sリボソームの方が30Sサブユニットよりも若干激しく、開始複合体形成実験の結果は、先導配列18量体が、反応中に分解していることが原因の一つとして考えられる。この分解は、リボソームや開始因子に混入する、ヌクレアーゼによるものと思われるので、どのような種類のヌクレアーゼによるものか調べた。先導配列18量体の3'末端を、RNAリガーゼを用いて、 ^{32}pCp で標識し、20%PAGEで精製したオリゴマー、あるいは、Applied Biosystems社のDNA自動合成機で合成した先導配列18量体RNA1, 2と同様の塩基配列をもつDNAオリゴマー18量体の5'末端を ^{32}P で標識したオリゴマーを用いて、同様にして開始複合体形成反応中のオリゴマーの安定性を調べた(図3-11)。

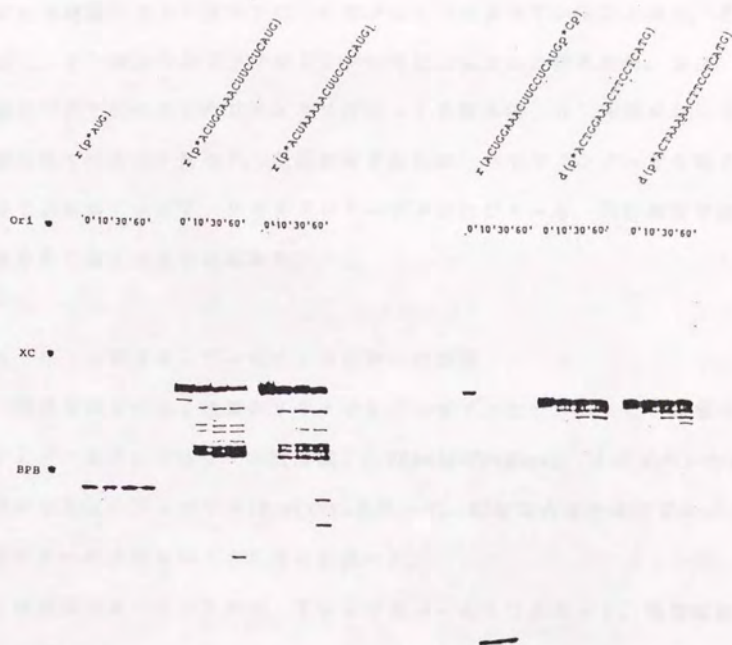


図3-10 開始複合体形成反応中の
RNAオリゴマーの安定性

図3-11 開始複合体形成反応中の
各種オリゴマーの安定性

その結果、3'末端を ^{32}P C pで標識した18量体は、反応開始後10分で、モノマーの位置にバンドがみられ、分解途中のバンドが見られず、5'末端を標識した18量体では、分解が途中で止まっていることから、この分解は、3'側からのエクソヌクレアーゼによるものと思われる。また、5'側を ^{32}P でラベルしたDNAオリゴマー18量体は、3'末端が2~3塩基削られているだけだった。粗開始因子からは、リボヌクレアーゼを除くことはできなかったので、リボヌクレアーゼインヒビターを、開始複合体形成の反応系に加えることを試みた。

3-6 リボヌクレアーゼインヒビターの効果

市販されている3種類のリボヌクレアーゼインヒビター、ヒト胎盤リボヌクレアーゼインヒビター(宝酒齋)、RNasin(Promega)、リボヌクレオシドーバナジルコンプレックス(BioLabs)を用いて、開始複合体形成反応中のリボヌクレアーゼ活性を抑えられないか調べた。

反応液全量 $50\mu\text{l}$ 中に、70Sリボソーム 20pmol 、粗開始因子($0.59\text{A}_{260}/\text{ml}$) $4\mu\text{l}$ 、標識していないfMet-tRNA約 10pmol 、 $5\times\text{Binding buffer}$ (70S) $10\mu\text{l}$ 、5'末端を ^{32}P で標識したRNA1 1pmol を含みヒト胎盤由来のリボヌクレアーゼインヒビター119unitを加えて、 37°C で15分間保温した後、一部取り出し、20%PAGEで調べたところ、ヒト胎盤由来のリボヌクレアーゼインヒビターは効果がなかった(図3-12)。

また、同様に、反応液全量 $10\mu\text{l}$ 中に、70Sリボソーム 10pmol 、粗開始因子($0.59\text{A}_{260}/\text{ml}$) $2\mu\text{l}$ 、 $5\times\text{Binding buffer}$ (70S) $2\mu\text{l}$ 、5'末端を ^{32}P で標識したRNA1 1pmol を含み、RNasin 20unitまたは、リボヌクレオシドーバナジルコンプレックス 10mM を加

えて、37℃で、15分間保温した後、一部取り出し、20%PAGEで調べたところ、RNasinは効果がなかったが、リボヌクレオシド-バナジルコンプレックスは効果がみられ、開始複合体形成反応中に、RNA1の分解が見られなくなった。(図3-12)。RNasinも起源はヒト胎盤のリボヌクレアーゼインヒビターであり、リボヌクレアーゼAに対して作用するものであり、開始複合体反応系に混入しているリボヌクレアーゼは、リボヌクレアーゼAではないと考えられる。それに対して、リボヌクレオシド-バナジルコンプレックスは、阻害効果がみられたが、10mMでは、開始複合体形成反応も阻害されることがわかった。そこで、リボヌクレオシド-バナジルコンプレックスの濃度を変えて、開始複合体形成反応系中のリボヌクレアーゼに対する阻害と、開始複合体形成に対する影響を調べた(図3-13)。その結果、開始複合体形成反応系中のリボヌクレアーゼに対する阻害は、4mM以上の濃度が必要であるのに対して、開始複合体形成反応は、1mMで強く阻害され、リボヌクレオシド-バナジルコンプレックスも、使用できない結果となった。

RNA1
 + RNasin
 + リボヌクレオシド-バナジルコンプレックス
 70S リボゾーム + 粗開始因子
 + ヒト胎盤由来のリボヌクレアーゼインヒビター

図3-12 リボヌクレアーゼインヒビターの効果

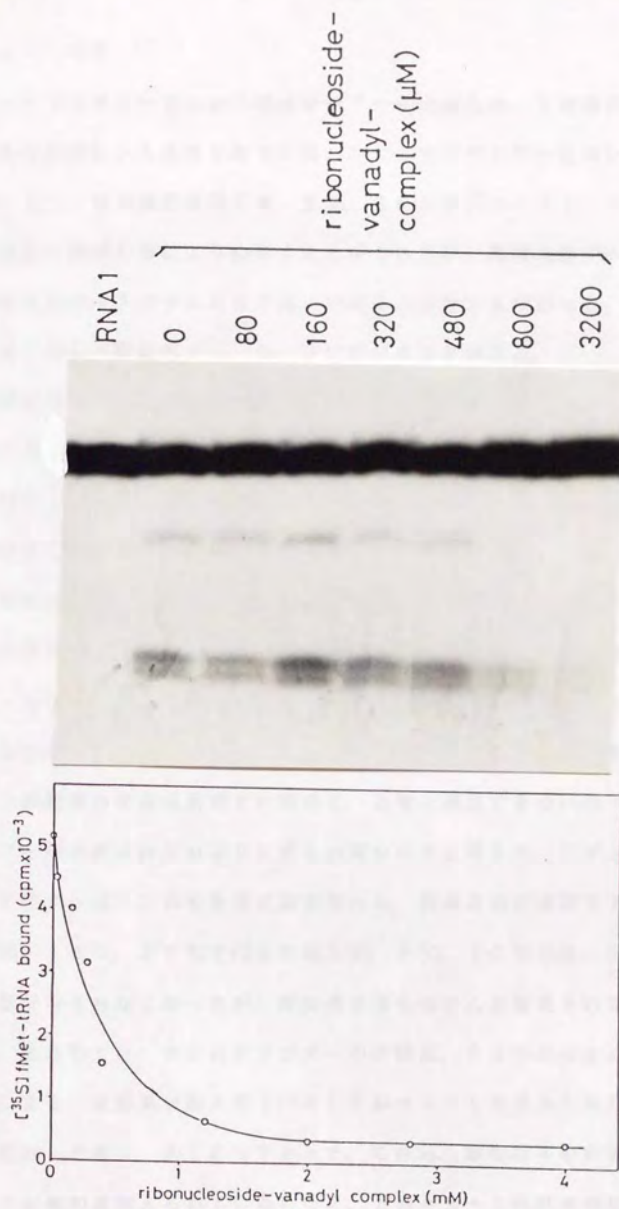


図 3-13 リボヌクレオシド-バナジル コンプレックスの効果

3-7 考察

70Sリボソームへのリボヌクレアーゼの混入は、1M塩化アンモニウム入り緩衝液による洗浄をガラス製ハンドホモジナイザーを用いて繰り返すことにより、ある程度解消でき、また、30Sサブユニットへの混入は、ショ糖密度勾配遠心法によりのぞくことができたが、粗開始因子への混入は、リン酸セルロースカラムだけでは、のぞくことはできなかった。さらに、精製を繰り返し、開始因子1、2、3に分ける必要がある。

開始複合体形成反応を行った結果、70Sリボソームの系では、AUGに比べて先導配列RNA1、RNA2のほうが、形成効率が悪くSD配列に関係がなく、また、30Sサブユニットの系では、先導配列のほうが、形成効率は良くなったが、SD配列による差は見られなかった。そこで、開始複合体形成反応中の、先導配列18量体の安定性を調べてみると、反応開始後、10分で、一部が分解していることがわかった。開始複合体形成反応の結果が、RNAオリゴマーが、開始複合体形成反応中に分解されたためのみとは思われないが、少なくとも、RNAオリゴマーが分解される系では、SD配列と開始複合体形成効率との関係を、正確に議論できないので、RNAオリゴマーが分解されないようにする必要があると考えた。リボヌクレアーゼインヒビターは、どれも使用に適さないし、形成反応の温度を下げる方法は、0℃、10℃、20℃で行ってみたが、0℃、10℃では、RNAオリゴマーは分解されなくなったが、開始複合体もほとんど形成されなくなった。また、20℃では、RNAオリゴマーの分解は、30℃の場合と大差がなかった。また、反応系に加えた[^{35}S]fMet-tRNAに対してリボソームに結合した量は、約10%であった。これは、開始因子の精製度が悪く開始因子が飽和量加えられていないこと、fMet-tRNA中にホルミル化がされていないものが30%程度含まれていることなどが、原因として考えら

れる。

次に、先導配列の方を、リボヌクレアーゼによって、分解しないように工夫することを試みた。

第四章

開始複合体形成反応中に安定な先導配列の合成

4-1 3'末端にトリデオキシヌクレオシドの結合した先導配列21量体の合成

3-5の結果より、開始複合体形成反応中のRNAオリゴマーの分解は、3'側のエクソヌクレアーゼによるものと考えられること、また、DNAオリゴマーは3'末端が、2~3塩基しか分解されていないことから、先導配列18量体の3'側に、さらにトリデオキシヌクレオチドのついた、21量体(RNA1-D~RNA4-D)を合成することにした。トリヌクレオチドの塩基配列は、2次構造をとりにくいことなどを考慮して、d(AAC)とした。本学助手平尾一郎博士より供与された、デオキシシチジンを担持したCPG(担持量23, 8 $\mu\text{mol/g}$) 50mgを用いて、第二章で述べた先導配列18量体の合成と同様にして、21量体(RNA1-D~RNA4-D)及びr(AUG)d(AAC)(AUG-D)の6量体を、表4-1に示すように、平均縮合収率90%以上で、合成した。脱保護、精製も同様にして行い、20%PAGEで単一バンドにまで精製した。各オリゴマーの5'末端を ^{32}P で標識し、3-5と同様にして、開始複合体形成反応中の各オリゴマーの安定性を30Sサブユニットの系で調べた(図4-1)。その結果、3'末端にトリデオキシヌクレオチドのついていない先導配列18量体に比べて、分解されにくくなっていたが、まだ少し分解していた。そこで、さらにオリゴマーが分解されにくくなるよう工夫した。

表4-1 3'末端にd(AAC)の結合した先導配列
21量体の縮合収率

Sequence	Coupling yields(%)	
	average	overall
RNA1-D r(ACUGGAAACUCCUCAUG)d(AAC)	96	42
RNA2-D r(ACUAAAAACUCCUCAUG)d(AAC)	93	25
RNA3-D r(ACUCCAAACUCCUCAUG)d(AAC)	93	26
RNA4-D r(UAAGGAAACUCCUCAUG)d(AAC)	93	23

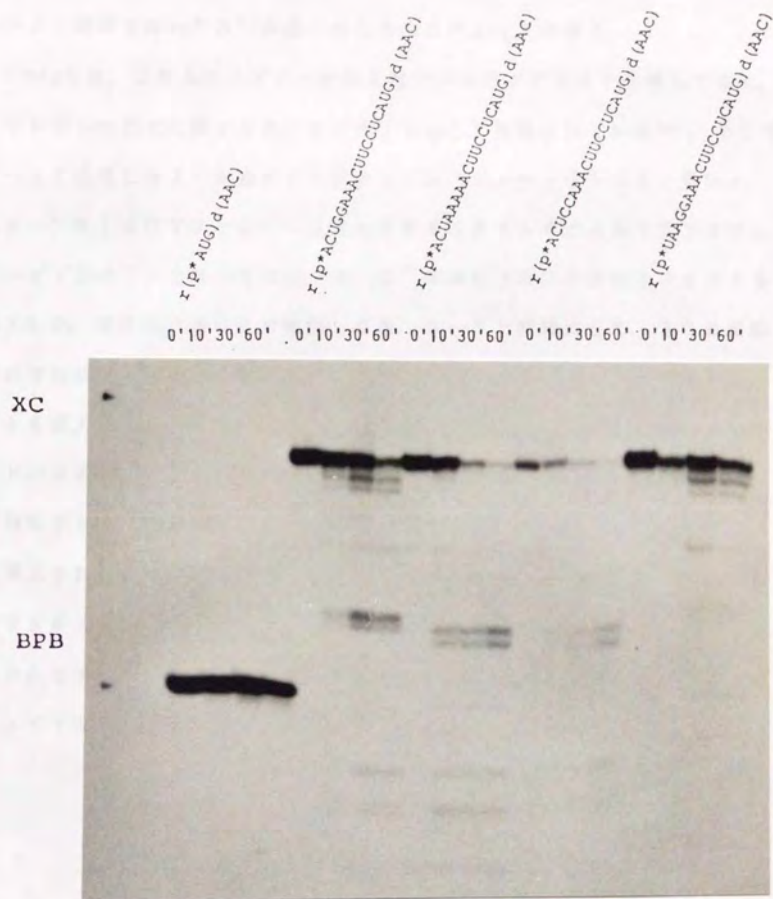


図4-1 3'末端にトリデオキシヌクレオチドをもつ
 先導配列21量体の開始複合体形成反応中の安定性

4-2 酵素を用いた3'末端へのチオホスフェイトの導入

Steinらは、DNAオリゴマーの両末端にチオホスフェイトを導入すると、ヌクレアーゼP1に対する抵抗性が増大することを報告している⁵⁶⁾。そこで、4-1で合成した3'末端にトリデオキシヌクレオチドをもつ21量体と、 $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]$ dCTPとをターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)を用いて反応させ、3'末端にさらにチオホスフェイトを導入した。20%PAGEで精製した後、3-5と同様にして、30S開始複合体形成反応中の安定性を調べた(図4-2)。その結果、チオホスフェイトを導入することによって、分解はかなり抑えられることがわかった。バンドが2本見られるのは、チオホスフェイトを導入した後、20%PAGEで精製する際、分離が悪く、チオホスフェイトが1つ導入されたものと、2つ導入されたものが両方含まれたためと思われる。ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いる方法は、反応効率が小さいうえに、導入されるチオホスフェイトの数が、制御できないので、化学的に、チオホスフェイトを導入することを考えた。

$r(\text{ACUGGAAACUUCUCAUG})d(\text{AAC})$
 $r(\text{ACUAAAAACUUCUCAUG})d(\text{AAC})$
 $r(\text{ACUCCAAACUUCUCAUG})d(\text{AAC})$
 $r(\text{UAAAGAAACUUCUCAUG})d(\text{AAC})$

$[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dCTP}$
 $\xrightarrow{\text{Terminal deoxynucleotidyl transferase}}$

$r(\text{ACUGGAAACUUCUCAUG})d(\text{AAC})(\text{s}^*\text{C})_n$
 $r(\text{ACUAAAAACUUCUCAUG})d(\text{AAC})(\text{s}^*\text{C})_n$
 $r(\text{ACUCCAAACUUCUCAUG})d(\text{AAC})(\text{s}^*\text{C})_n$
 $r(\text{UAAAGAAACUUCUCAUG})d(\text{AAC})(\text{s}^*\text{C})_n$

$\text{s}^* = \text{thiophosphate}$
 $n = 1 \text{ or } 2$

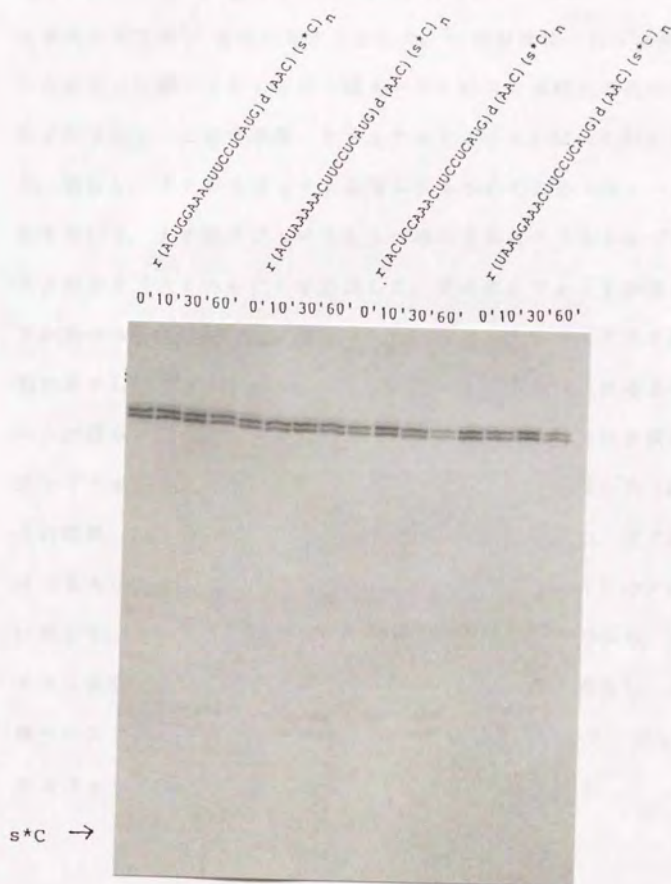


図4-2 ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ
 による3'末端へのチオホスフェイトの導入とその安定性

4-3 化学合成による3'末端へのチオホスフェイトの導入

第二章で述べたRNAオリゴマーの固相合成法で、チオホスフェイトを導入するためには、リン酸化試薬に硫黄を導入しておく必要があるが、試薬の合成が困難である。そこで、SteinらがDNAオリゴマーへチオホスフェイトを導入した方法⁵⁶⁾を用いることにした。この方法は、DNA自動合成機で用いられるリン酸アミダイト法(図4-3)のヨウ素酸化の代わりに、5%硫黄/ピリジン・二硫化炭素・トリエチルアミン(9.53:9.53:1)溶液を用いて、硫化し、チオホスフェイトを導入するものである(図4-4)。この方法を用いて、チオホスフェイトを1つ導入されたd(AAsC)及び2つ導入されたd(AsAsC)を合成した。チオホスフェイトが完全に導入できたか調べるために、d(AAsC)の一部を濃アンモニア水で脱保護し、逆相のHPLCにかけたところ、ジアステレオマーと思われる2本のメインピークが得られた(図4-5)。それぞれを分取し、別途に合成したチオホスフェイトを含まないd(AAC)と³¹P-NMRで比較した(図4-6)。その結果、外標準物質であるリン酸のピーク(Pi)の、すぐ高磁場側に、d(AAC)は2つのリン酸に相当する2本のピーク(PO)が見られるのに対して、d(AAsC)はどちらも、2本のピークのうち、チオホスフェイトに由来すると思われる低磁場側のピークが完全に消失し、大きく低磁場側へシフトした(PS)。この結果は、Steinらの報告と一致しており、チオホスフェイトはほぼ完全に導入されていると思われる。

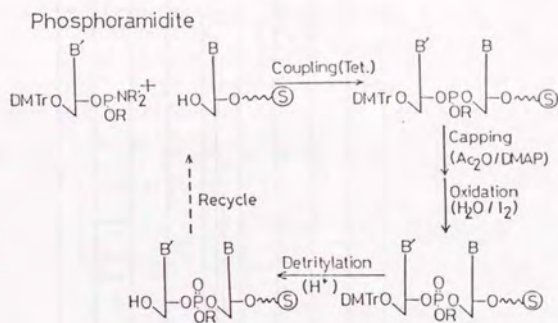


図 4-3 DNA 自動合成機によるリン酸アミダイト法

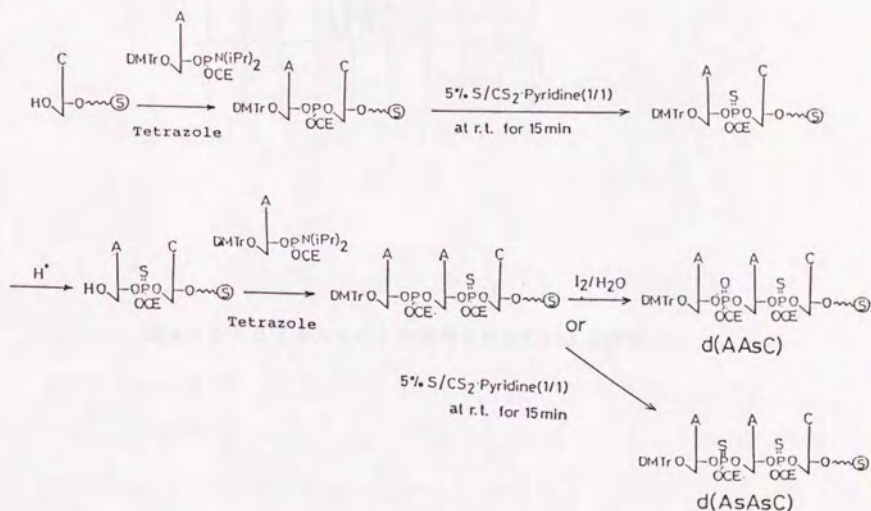


図 4-4 化学合成によるチオホスフェイトの導入

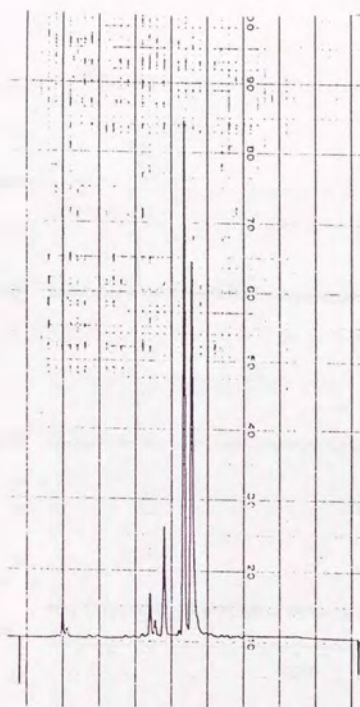


図4-5 d(AAsC)の逆相HPLCによる分析

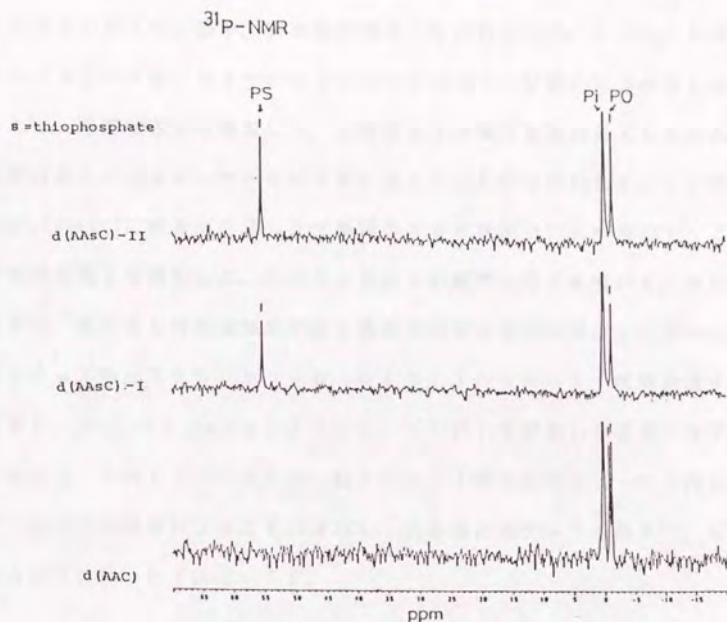


図4-6 d(AAsC)の ^{31}P -NMRチャート

そこで、d(AAsC)の担持したCPGを固相担体として、その5'側にAUGのついた6量体r(AUG)d(AAsC)(AUG-DS)及びf1コートタンパク質mRNAの先導配列のついた21量体(RNA1-DS及びRNA2-DS)を、第二章と同様にして、それぞれ90%以上の平均縮合収率で合成することができた(表4-2)。これまでと同様にして脱保護、精製した。

合成したRNA1-DSの5'末端を ^{32}P で標識し、3-5と同様にして、RNA-1及び、RNA-1Dと共に、開始複合体形成反応中のオリゴマー

の安定性を調べた。その結果、チオホスフェイトを導入したことによって、RNA1-DSは、若干、安定性が増すことがわかった。しかし、RNA1やRNA1-Dをこれまでの結果と比べてみると、分解の仕方が激しかった。これは、粗開始因子を調製した、大腸菌Q13株に雑菌が混入したために、雑菌由来のリボヌクレアーゼが大量に混入したためと思われる。ここで、RNaseI, RNaseIIの両方が欠損した大腸菌S296株が手に入ったので、これより粗開始因子を調製した。S296株由来の粗開始因子を用いて、次の様な条件で、開始複合体形成反応中の先導配列の安定性を同様にして調べた。全量15 μ l中に70Sリボソーム(Q13)10 pmol、粗開始因子(S296、0.70 A₂₈₀/ml)3 μ l、[³²P]で標識した各オリゴマー1 pmol、fMet-tRNA 約8 pmolを含み他は3-5と同じ条件で、各反応時間毎に3 μ lずつ分取し、色素混合液2 μ lを加えて、20% PAGEを行った(図4-7)。

表4-2 3'末端にd(AsAsC)の結合した先導配列
21量体の縮合収率

	Sequence	Coupling yields(%)	
		average	overall
RNA1-DS	r(ACUGGAAACUCCUCAUG)d(AsAsC)	93	31
RNA2-DS	r(ACUAAAAACUCCUCAUG)d(AsAsC)	92	24



図4-7 RNA1-ds、RNA2-dsの
開始複合体形成反応中の安定性

その結果、チオホスフェイトを導入していないRNA 1-D及び、RNA 2-Dでは、3'末端付近が削られているのに対して、チオホスフェイトを導入したRNA 1-D SおよびRNA 2-D Sでは、それに比べてあまり分解が起こっていなかった。分解の仕方が、図4-1と少し異なっているのは、粗開始因子をQ 13株由来のものからS 296株由来のものに変えたためであると思われる。S 296株の方が、菌体内のリボヌクレアーゼの量が少ないのであろう。開始複合体形成反応中に先導配列が安定な実験系が出来たので、S D配列と開始複合体形成効率の関係を調べることにした。

4-4 考察

複合体形成反応中に分解されないように3'末端にd(AAC)をつけた先導配列21量体の合成を行ったが、本研究で使用しているオリゴリボヌクレオチドの固相合成法は、このように、RNAとDNAの分子内キメラ分子の合成にも適した方法である。この方法では、末端だけではなく、オリゴマーの中央にDNA分子を導入することもできる。3'末端にd(AAC)をつけたことにより、若干はオリゴマーの分解が抑えられたが、完全に抑えることはできなかった。

チオホスフェイトを導入することによるヌクレアーゼに対する抵抗性の増大は、DNAでいくつか報告がある。前述したように、Steinらは、チオホスフェイトをDNAの両末端に導入することにより、ヌクレアーゼP1に対する抵抗性が増すことを報告している。また、DNA中のチオホスフェイトが存在する部位では、ある種の制限酵素による切断が抑制されることがわかっている。RNAオリゴマーの3'末端にチオホスフェイトを導入する方法としては、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いる方法は、大量にオリゴマーを得るには、効率が悪いので、化学的に導入する方

法をとった。van Boomら⁵⁷⁾は、チオホスフェイトの導入されたリン酸化試薬を用いて合成に成功しているが、そのリン酸化試薬の調製が容易でないので、Steinらの方法を用いた。

大腸菌Q13株を何回か植えついでいるうちに雑菌が混入した形跡がみられリボヌクレアーゼの混入が多くなったので、別の種類の大腸菌S296株をもちいて開始因子を調製することにした。大腸菌S296株は、リボヌクレアーゼI,IIの両方が欠損している株である。RNA1-D, RNA2-D及びRNA1-DS, RNA2-DSの形成反応中の安定性を調べてみると、RNA1-D, RNA2-Dでは、d(AAC)の部分が削られているのに対して、RNA1-DS, RNA2-DSでは、あまり分解されていない。Q13株由来の開始因子を用いた場合と分解のされかたが違っているのは、S296株のほうがリボヌクレアーゼの量がQ13株より少なく、逆に、デオキシリボヌクレアーゼの量が多いためだと思われる。

第五章

反応中に安定な f1 コートタンパク質 mRNA の 先導配列を用いた開始複合体形成

5-1 3' 末端にチオホスフェイトを導入した先導配列を用いた

開始複合体形成

以上のようにして、開始複合体形成反応中に先導配列が安定である実験系が確立したので、SD配列の違いによる、開始複合体形成効率の差異を調べた。第三章では、AUG, RNA 1, RNA 2のモル数をほぼ同じにして、経時変化を調べたが、RNA 1及びRNA 2のモル数は、hypochromicityを35%と仮定して求めたもので、正確ではなかった。そこで、今回は、オリゴマーのモル数を横軸にとって、開始複合体の形成量が飽和する条件で比較することにした。反応条件は、反応液全量20 μ l中に、70Sリボソーム(Q13)または30Sサブユニット(Q13)10 pmol、粗開始因子(S296, 0.70 A₂₈₀/ml)3 μ l、[³⁵S]fMet-tRNA 約10 pmol (60700cpm)、5×Binding Buffer (70S)または(30S)4 μ l、オリゴマー各モル数を含み、30℃で15分間保温したのち、洗浄用緩衝液800 μ lを加え希釈して反応を停止したのち、ニトロセルロースフィルターアッセイ法によって、開始複合体形成量を測定した。RNA 1-DS, RNA 2-DSのモル数は、hypochromicityを35%として計算した。まず、チオホスフェイトを導入したことによる、開始複合体形成反応への影響を調べるために、AUG、AUG-D、AUG-DSの3種類に対して、開始複合体形成量を比較したところ、AUGの3'側にトリデオキシヌクレオチドがついたり、チオホスフェイトがついても、開始複合体形成には、あまり影響がないことがわかった(図5-1)。そこで、70S開始複合体形成量をAUG-DS、RNA 1-DS、RNA 2-DSについて、比較してみた結果、先導配列の間で比較すると、SD配列をもつ、RNA 1-DSの方が、SD配列をもたないRNA 2-DSよりも開始複合体形成効率がよく、SD配列の効果が見られた。また、図3-8と同様に、AUG-DSの場合

が最も開始複合体形成量は多かった。(図5-2)。また、30S開始複合体形成量についても、同様に調べてみると、30S開始複合体の場合には、AUG-DSとSD配列をもたないRNA2-DSに対して、SD配列を持つRNA1-DSの方が、開始複合体形成量は多く、SD配列の効果がみられた(図5-3)。

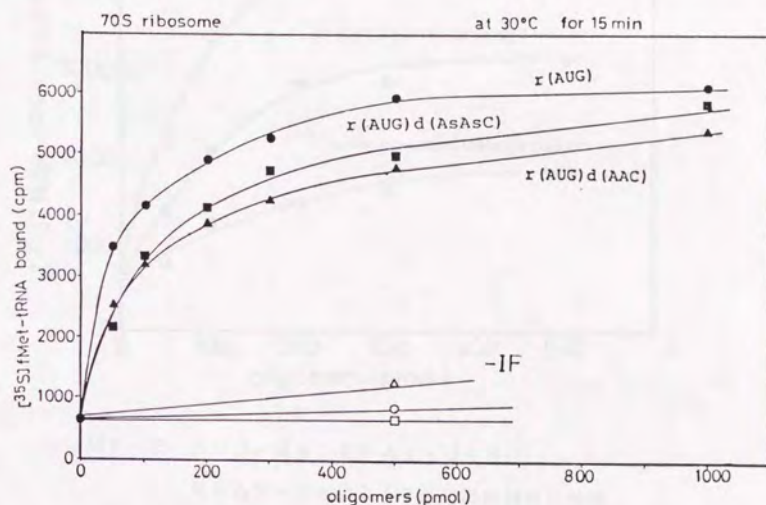


図5-1 チオホスフェイトの導入による開始複合体形成反応への影響

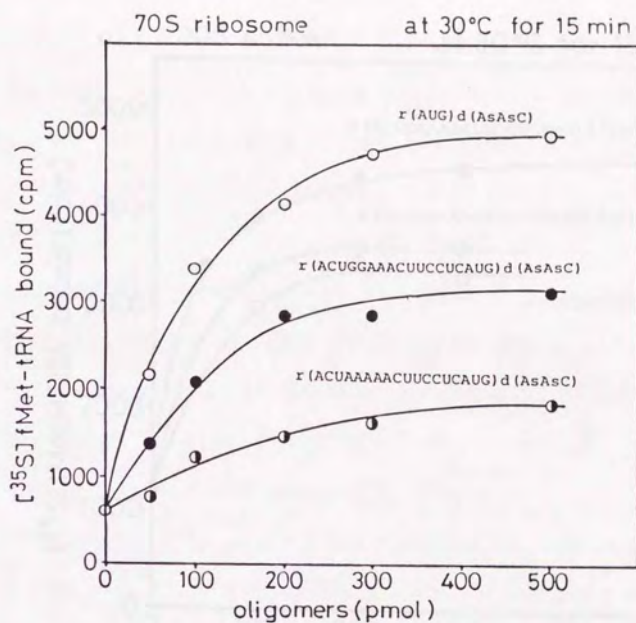


図5-2 AUG-ds、RNA1-ds及び
RNA2-dsによる70S開始複合体形成

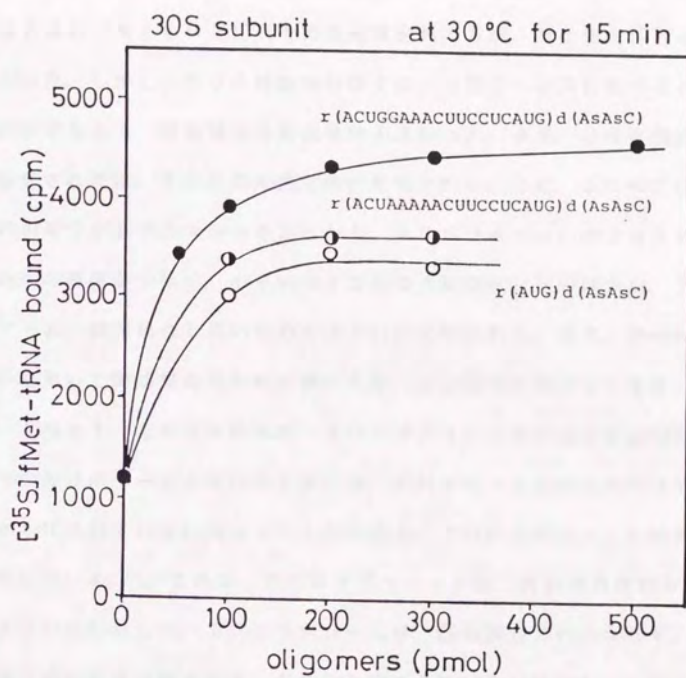


図5-3 AUG-ds、RNA1-ds及び
RNA2-dsによる30S開始複合体形成

5-2 考察

3' 末端にチオホスフェイトを導入した先導配列を用いることによって、SD配列の有無による、開始複合体形成効率の差がみられ、70S、30S開始複合体のどちらもSD配列を持つ先導配列の方が、開始複合体形成効率は良かった。しかし、70S開始複合体では、AUG-DSに比べると、先導配列はどちらも、開始複合体形成量は小さかった。まず、30S開始複合体が形成された後、70S開始複合体が形成されることと、30Sでは、先導配列のほうが若干大きかったことから、70Sリボソームの30Sサブユニットへの解離が少なく、小さい分子であるAUG-DSのほうが、70Sリボソームへ直接結合し易いためではないかと思われる。また、Gassenらは、AUGを用いて開始複合体形成を調べた際、30Sサブユニットを用いたときは、fMet-tRNAのみが、30Sサブユニットに結合するのに対して、70Sリボソームを用いたときには、fMet-tRNAばかりでなく、ホルミル化されていないMet-tRNAも、70Sリボソームに結合すると報告している⁵⁵⁾。これは、30Sサブユニットは、開始複合体のみしか形成できないのに対して、70Sリボソームは、開始複合体のみならず、タンパク質合成の延長段階である、ホルミル化されていないMet-tRNAと70Sリボソームとの結合が観測されるためではないかと思われる。しかし、この原因は、さらに実験を行って、確認する必要がある。

結 論

本研究により、縮合剤を用いなくて、二官能性のリン酸化試薬を用いた、リン酸トリエステル-固相合成法により、f1 コートタンパク質 mRNA の先導配列 18 量体を合成することができた。

合成した先導配列を用いて、タンパク質合成開始複合体形成を行ったところ、RNA オリゴマーが分解していることがわかった。

先導配列の 3' 末端に、チオホスフェイトを持つトリデオキシヌクレオチドを導入し、リボヌクレアーゼの少ない大腸菌 S296 株より、粗開始因子を調製することによって、先導配列が開始複合体形成反応中に安定に存在させることができ、SD 配列とタンパク質合成開始複合体形成効率との関係を調べる実験系を確立した。

この系を用いて、SD 配列と開始複合体形成効率との関係を調べたところ、SD 配列が存在する先導配列のほうが、タンパク質合成開始複合体形成効率が良い結果が得られた。

試薬類

無水ピリジン

市販のもの（特級）に、p-トルエンスルホンクロリドを加え、半日、加熱還流した後蒸留し、さらに、水素化カルシウムを加え、半日、加熱還流した後、再び蒸留し、モレキュラーシーブをいれて保存した。

無水ジメチルホルムアミド（無水DMF）

液クロ用（半井）に、モレキュラーシーブをいれて保存した。

無水アセトニトリル

液クロ用（半井）に、水素化カルシウムを加え、半日、加熱還流した後、蒸留し、モレキュラーシーブをいれて保存した。

無水ジオキサン

液クロ用（半井）に、リチウムアルミニウムハイドライドを加え、半日、加熱還流した後蒸留し、モレキュラーシーブをいれて保存した。

トリエチルアミン

特級（半井）を、ピリジンと同様にして蒸留した。

2-クロロフェニルホスホロジクロリデート

同仁化学製を、減圧蒸留した。

1-メチルイミダゾール

東京化成工業製（特級）を、減圧蒸留した。

ジクロロ酢酸（DCA）

半井製（特級）を、減圧蒸留した。

固相単体、ヌクレオシド、ヌクレオチド類

ポリスチレン樹脂

クロルメチル基 1.28mmol/g 含有、 和光純薬
粒径 200~400 mesh

Controlled Pore Glass (CPG)

CPG-Bio-Support Long-chain-Amino-CPG フナコシ薬品
アミノ基 126 μ mol/g 含有、
粒径 20~80 mesh

5'-ジメトキシトリチルチミジン

栗林茂雄氏より供与された。

N⁶-ベンゾイル-5'-ジメトキシトリチルデオキシアデノシン

栗林茂雄氏より供与された。

N⁶-ベンゾイル-5'-ジメトキシトリチルデオキシシチジンを担持したCPG

本学助手平尾一郎博士より供与された。

AUG

本学助手平尾一郎博士より供与された。

DNA自動合成機に用いた試薬

ウリジン、アデノシン、シチジン、グアノシン

ウリジン5'-リン酸(5'UMP)

アデノシン5'-リン酸(5'AMP)

シチジン5'-リン酸(5'CMP)

グアノシン5'-リン酸(5'GMP)

アデノシン5'-三リン酸(ATP)

グアノシン5'-三リン酸(GTP)

シチジン3'-リン酸(3'CMP)

Applied Biosystems

ヤマサ醤油

ヤマサ醤油

ヤマサ醤油

ヤマサ醤油

ヤマサ醤油

ヤマサ醤油

Boehringer Mannheim

Boehringer Mannheim

他の試薬は、市販のものを、そのまま使用した。

標識化合物

アデノシン5' [γ -³²P]三リン酸([γ -³²P]ATP)

>5000 Ci/mmol, 10mCi/ml

Amersham

デオキシシチジン5' [α -³⁵S]三リン酸([α -³⁵S]dCTP)

650 Ci/mmol, 10mCi/ml

Amersham

L-[³⁵S]メチオニン([³⁵S]Met)

Amersham

1065 Ci/mmol, 15mCi/ml

酵素類

T4-ポリヌクレオチドキナーゼ	Boeringer
RNAリガーゼ	Pharmacia
ターミナルデオキシヌクレオチジル トランスフェラーゼ (TdT)	宝酒造
ヒト胎盤リボヌクレアーゼインヒビター	Amersham
RNasin	Promega
リボヌクレオシド-バナジル コンプレックス	Biolabs
リボヌクレアーゼ T1、U2、PhyM	Pharmacia
B.cereusリボヌクレアーゼ	Pharmacia
ヌクレアーゼ P1	ヤマサ醤油

緩衝液

5 × k i n a t i o n b u f f e r

0. 5 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7. 6)

0. 1 M 塩化マグネシウム

50 mM ジチオトレイトール

1 mM スベルミジン

1 mM EDTA (pH 8. 0)

5 × l i g a t i o n b u f f e r

250 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7. 4)

75 mM 塩化マグネシウム

17. 5 mM ジチオトレイトール

50 μg/ml 牛血清アルブミン

5 × T d T b u f f e r

700 mM カコジル酸ナトリウム (pH 7. 2)

150 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7. 4)

5 mM 塩化コバルト

0. 5 mM ジチオトレイトール

5 × binding buffer (70S)

250 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4)

500 mM 塩化アンモニウム

25 mM 酢酸マグネシウム

5 mM ジチオトレイトール

5 mM GTP

5 × binding buffer (30S)

250 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4)

500 mM 塩化アンモニウム

75 mM 酢酸マグネシウム

5 mM ジチオトレイトール

5 mM GTP

10 × TPE

0.8 M トリスーリン酸緩衝液 (pH 7.8)

20 mM EDTA (pH 8.0)

色素混合液

10 ml ホルムアミド

10 mg キシレンシアノール (XC)

10 mg ブロムフェノールブルー (BPB)

0.2 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

機器類

DNAマニユアル合成機

日本ゼオン社 Zeon genet

DNA SYNTHESIZER

DNA自動合成機

Applied Biosystems社 381A

超遠心機

Beckman社 L5-50B

超遠心ローター

Beckman社 50Ti、SW40Ti

液体シンチレーションカウンター

LKB社 1216 RACKBETA model 43

pHメーター

F. 8E HORIBA

凍結乾燥機

FTS systems社 FLEXI-DRY

分光光度計

島津デジタルダブルビーム分光光度計 UV-150-02型

HITACHI U-3210 spectrophotometer

クロマトグラフィー

高速液体クロマトグラフィー

GILSON

model 302 (pump)

model 811 (dynamic mixer)

model 802 (manometric module)

model 111B (UV detector)

model 201 (fraction collector)

model 201-202 (controller)

Shimadzu LC-6A

SPD-6A (UV spectrophotometric
detector)

SCL-6A (system controller)

C-R3A chromatopak

HPLC用逆相カラム

エムエス機器(株)社

M&S PACK C18 4.6mmIDx150mm

Rainin Instrument 社

Microsorb C18 4.6mmIDx150mm

HPLC用陰イオン交換カラム

島津製作所

WAX-1 4.0mmIDx50mm

HPLC用溶媒

Solvent I

5%アセトニトリル/0.1M TEAA (pH7.0)

Solvent II

25%アセトニトリル/0.1M TEAA (pH7.0)

Solvent III

50%アセトニトリル/0.1M TEAA (pH7.0)

Solvent IV

20%アセトニトリル/10mM KH_2PO_4 (pH6.8)

Solvent V

20%アセトニトリル/10mM KH_2PO_4 (pH6.8)

TEAA=トリエチルアンモニウムアセテート

簡易型逆相クロマトグラフィー

Waters 社 SEP-PAK C18

シリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC)

Merck 社製 60F₂₅₄

展開溶媒

Solvent A 塩化メチレン-メタノール (9:1 v/v)

Solvent B 塩化メチレン-メタノール (19:1 v/v)

Solvent C 塩化メチレン-メタノール (39:1 v/v)

シリカゲルカラムクロマトグラフィー

Wakogel C-300 (和光)

第一章

保護ヌクレオシドの合成

リボヌクレオシドへの保護基の導入は、既知の方法をもとに、一部改良して行った。詳細は、修士論文⁵⁸⁾で述べた。

CPGへのウリジン誘導体の導入

ウリジン誘導体(1-a)のスクシニル化

(1-a) 1.26g(2.0mmol)と4, 4-ジメチルアミノピリジン(DMAP) 0.36g(3.0mmol)を無水ピリジンで3回共沸した後、無水コハク酸 0.30g(3.0mmol)、無水ピリジン 8mlを加え、室温で26時間半攪拌した。溶媒を減圧下留去し、塩化メチレン 20mlを加え、0.2M NaH_2PO_4 で3回、蒸留水で2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、濾過し、濾液を減圧下濃縮乾固し、トルエンを加えて、ピリジン臭がなくなるまで、溶媒を減圧下、共沸留去した。得られた残渣を、ピリジン処理シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、(2)を82%(1.20g)の収率で得た。

ウリジン誘導体(2)の活性エステル化

(2) 1.20g(1.64mmol)とペンタクロロフェノール 0.862g(3.27mmol)を無水ピリジンで2回、無水ジメチルホルムアミド(無水DMF)で1回共沸後、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC) 0.677g(3.28mmol)、無水DMF 13.5mlを加え、室温で、20時間攪拌した。濾過し、濾液を減圧下濃縮乾固し、残渣をベンゼン 2mlに溶解し、n-ヘキサンより再沈澱し、(3)を100%(1.61g)の収率で得た。

CPGへのウリジン誘導体の導入

乾燥したCPG 1gに、(3) 0.783g(0.8mmol)、無水DMF 6ml、無水トリエチルアミン 121.1 μ l(0.88mmol)を加え、室温で23時間攪拌した。濾過後、樹脂をDMF及びピリジンで洗浄し、真空デシケーター中、五酸化リン上で半日乾燥した。次に、この樹脂に、無水ピリジン 2.6ml、フェニルイソシアネ

ート 0.285ml を加え、室温で3時間攪拌した。濾過後、樹脂をピリジン及び液クロ用メタノールで洗浄し、真空デシケータ中、五酸化リン上で半日乾燥し、(4-a)を得た。

DMTr 基の定量

(4-a) 10mg 中の 5' 位 DMTr 基を、2%ベンゼンスルホン酸-塩化メチレン-メタノール溶液(8:2 v/v)で除去し、除去した液を集め、塩化メチレンで 50ml にメスアップし、0.3ml を試験管に分注し、溶媒を減圧留去した残渣に、60%過ヨウ素酸-エタノール(3:2 v/v)を 3ml 加え、500nmの吸光度(A_{500})を測定した。下記の式により、CPGに担持したウリジン誘導体のモル数 n を計算した。 $A_{500} = 0.017$ であった。

$$A_{500} = \epsilon_{500} \cdot c \cdot l = \epsilon_{500} \cdot n \cdot l / V$$

$$n = A_{500} \cdot V / \epsilon_{500} \cdot l$$

$$\epsilon_{500} = 71,700$$

$$c = \text{モル濃度 (mol/l)}$$

$$l = \text{セルの長さ (cm)}$$

$$n = 0.017 \times 3 / 0.3 \times 50 \times 10^{-3} / 71,700 \times 1 = 1.19 \times 10^{-7} \text{ mol} / 10\text{mg} \cdot \text{resin}$$

$$= 11.2 \mu\text{mol} / \text{g} \cdot \text{resin}$$

CPG 1g 当たり に担持したウリジン誘導体は $11.2 \mu\text{mol}$ で、CPGのアミノ基の 9.4% に担持された。

ポリスチレンへの保護ヌクレオシドの導入

ポリスチレンへのアミノ基の導入

乾燥したポリスチレン樹脂(5) 5g ($1.28\text{mmol} \cdot \text{Cl/g}$)に、フタルイミドカリウム 5.55g (30mmol)、DMF 100ml を加え、 120°C で6時間攪拌する。濾過後、樹脂を hotDMF、DMF-蒸留水(1:1 v/v)、蒸留水、蒸留水-ジオキサン(1:1 v/v)、ジオキサン、エタノール、メタノールで洗浄し、真空デシケータ中で乾燥した。この樹脂に、ヒドラジン 4.53ml (136mmol)、エタノール 113.2ml を加え、3時間加熱還流した。濾過後、エタノール、DMF、以下同様に洗浄し、真空デシケータ中で乾燥し、(6)を得た。

(6)へのウリジン誘導体の導入

(6) 1.5g に、(3) 1.74g(1.21mmol)、無水DMF 9ml、無水トリエチルアミン 181.8 μ l を加え、室温で22時間攪拌した。以後、CPGと同様に後処理し、ポリスチレン樹脂にウリジン誘導体を導入した。

樹脂 30mg からDMTr基の定量を行ったところ、 $A_{500}=1.654$ となり、ポリスチレン1g当たりのウリジン誘導体の担持量は、384 μ mol であった。これは、ポリスチレン樹脂のクロロメチル基の30%にあたる。

アデノシン誘導体(1-b)のスクシニル化

(1-b) 0.758g(1.0mmol)とDMAP 60mg(0.5mmol)と無水ピリジンで3回共沸後、無水ピリジン2ml、無水コハク酸80mg(0.8mmol)を加え、室温で、12時間攪拌した。溶媒を減圧下留去し、トルエンを加え、ピリジン臭がなくなるまで、溶媒を共沸留去した。残渣を塩化メチレン 7ml に溶解し、10%クエン酸水溶液で2回、蒸留水で2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、濾過し、濾液を減圧下濃縮乾固し、残渣を塩化メチレン 3ml に溶解し、n-ヘキサン 80ml で再沈殿することにより、(2-b)を得た。

ポリスチレン樹脂へのアデノシン誘導体(2-b)の導入

(2-b) 0.429g(0.5mmol)を無水ピリジンで2回、無水ジオキサンで1回共沸した後、DCC 0.155g(0.75mmol)及び無水ジオキサン 5ml を加え、室温で攪拌し、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT) 101.3mg(0.75mmol)を無水ピリジンで2回、無水ジオキサンで1回共沸後、前記の反応液に加え、室温で5時間攪拌させた。一方ポリスチレン樹脂(6) 1gを無水ピリジンで2回、無水ジオキサンで1回共沸後、前記の反応液をアルゴン雰囲気下、濾過した濾液を加え、室温で19時間攪拌した。濾過後、樹脂をジオキサン、アセトニトリル、メタノール、塩化メチレンで洗浄し、真空デシケータ中で乾燥した。次に、この樹脂に無水酢酸 1.5ml、2,6-ルチジン 1.5ml、1-メチルイミダゾール 0.5ml、ジオキサン 6.5ml をくわえ、室温で3時間攪拌した。濾過後、樹脂をジオキサン、メタノール、塩化メチレンで洗浄し、真空デシケータ中で乾燥した。

樹脂 20mg から、DMTr 基の定量を行うと、 $A_{500}=0.646$ となり、ポリスチレン 1g 当たりのアデノシン誘導体の担持量は $225\mu\text{mol}$ であった。これは、ポリスチレン樹脂のクロロメチル基の 18% にあたる。

5' 位ジメトキシトリチル基の選択的除去

種々の酸に対する 2' 位 THP 基の安定性

(7) を用いた検討

(7) は、(1-a) の合成の途中の段階で、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製したものをを用いた。

精製した (7) 13.3mg を試験管に取り、酸を 1ml 加え、室温で攪拌し、酸を加えてから、1、2、3、4、5、7、10、15 分後に、それぞれ $10\mu\text{l}$ ずつ、 $8\text{cm}\times 3\text{cm}$ の TLC の下端から 15mm の位置に、直径 8mm 程度のスポットになる様にうち、Solvent C で 3 回、または、Solvent B で 1 回展開し、(7) 及び (8) に相当するスポットを UV ランプで確認し、それぞれ、エッペンドルフチューブにかきとり、Solvent A を 1ml 加え、ボルテックスで 5 秒攪拌し、6000rpm で数秒間遠心し、上澄みの 260nm の吸光度を測定した。別に求めたモル吸光係数 ϵ_{260} (7: $\epsilon=10240$ 、8: $\epsilon=9610$) から、各時間における、(7) のモル分率を求めた。(図 1-2)

用いた酸は、図 1-2 に示す通りである。

5'-O-ジメトキシトリチル-3'-O-フェニルカルバモイル-2'-O-テトラヒドロピラニルウリジン (9) の合成

(1-a) 0.315g (0.5mmol) を無水ピリジンで 3 回共沸後、無水ピリジン 20ml、フェニルイソシアネート 2ml (18.4mmol) を加え、室温で 3 時間攪拌した。氷水を加え、室温で 30 分攪拌した後、塩化メチレン-水を加え、塩化メチレン 10ml で 2 回抽出し、水で 3 回逆洗した。フェニルカルバミン酸と思われる白い沈澱物が見られたので濾過して除き、濾液を硫酸マグネシウム

で乾燥し、濾過後、濾液を減圧下濃縮乾固すると、フェニルカルバミン酸と思われる白い針状物質が見られたので、もう一度、塩化メチレンに溶解し、1.2% Na_2CO_3 -0.65% NaHCO_3 混合水溶液で3回、蒸留水で2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後、濾液を減圧下濃縮乾固した。残渣を塩化メチレン 2ml に溶解し、n-ヘキサン 80ml で再沈澱して、(9)を59%(0.222g)得た。

(9)を用いた検討

(9) 18.3mg を試験管にとり、酸を 1ml 加えて室温または30℃で攪拌し、以後、(7)を用いた検討と同様にして、(9)，(10)，(11)に相当するスポットをかきとり、Solvent A 1ml で抽出し、260nm の吸光度より、(9)，(10)，(11)の各時間における含有率を求めた。

用いた酸は、図1-3に示す通りである。

(4-a)を用いた検討

(4-a) 50mg をDNAマニユアル合成機のセル中に入れ、塩化メチレン-メタノール(8:2 v/v)で10分間膨潤した後、1%ジクロロ酢酸-塩化メチレン溶液を用い、30℃で5秒ずつ7回に分け、全体で1分間、樹脂を処理し、塩化メチレン-メタノール(8:2 v/v)で樹脂を3回洗浄し、アルゴン気流下、30℃で10分間乾燥した。樹脂をナスフラスコに移し、濃アンモニア水を2ml 加え、60℃で7時間放置した。濾過後、樹脂を塩化メチレン-メタノール(1:1 v/v)で洗浄し、濾液と洗浄液を減圧下、濃縮乾固し、塩化メチレン-メタノール(1:1 v/v) 0.5ml を加え、残渣を溶解し、20 μ l を、8cm \times 3cmのTLCに載せ、塩化メチレン-メタノール(27:3 v/v)で2回展開して、(1-a)，(12)，(13)に相当するスポットの部分をかきとり、以下前項と同様にして、(1-a)，(12)，(13)の存在比を求めた。

他の酸についても同様にして求めた。

オリゴリボヌクレオチドの固相合成

ホスホリル化試薬の検討

2-クロロフェニル-0-0-ビス(1-ベンゾトリアゾリル)

ホスフェイト(14)の合成

1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT) 135.1mg(1mmol)を無水ピリジンで3回共沸した後、無水ジオキサン 2.5ml、無水ピリジン 80.9 μ l(1mmol)、2-クロロフェニルホスホロジクロリデート 82.3 μ l(0.5mmol)を加え、室温で攪拌後、1時間放置した。この上澄み液をホスホリル化試薬としてそのまま用いた。

表1-3に示す他のホスホリル化試薬も同様に合成した。

5'-0-ジメトキシトリチルチミジンの3'ホスホリル化反応

5'-0-ジメトキシトリチルチミジン 114.1mg(0.21mmol)を無水ピリジンで3回共沸後、ホスホリル化試薬 1mlを加え、室温で1時間反応させ、TLC(SolventB)で、反応の進行状況を調べた。

チミジンダイマー合成による縮合反応の検討

チミジン誘導体を担持した市販のポリスチレン樹脂(吉富製薬)を、日本ゼオンDNAマニユアル合成機のセル中に入れ、塩化メチレン-メタノール(8:2 v/v)で10分間膨潤した後、5'位DMTr基を2%ベンゼンスルホン酸(BSA)-塩化メチレン-メタノール(8:2 v/v)溶液で除去し、塩化メチレン-メタノール(8:2 v/v)、無水ピリジンで洗浄し、アルゴン気流下40℃で10分間乾燥した後、前項で調製したチミジル酸誘導体 700 μ l、1-メチルイミダゾール 70 μ lを加え、30℃で15分間、時々攪拌した。反応液を濾過し、樹脂を無水ピリジン、塩化メチレン-メタノール(8:2 v/v)で洗浄し、再び2%BSA-塩化メチレン-メタノール(8:2 v/v)溶液で5'位DMTr基を除去し、以後の洗浄を繰り返した。1回目と2回目のDMTr基の発色によって、縮合反応の収率を調べた。

トリヌクレオチドの合成

UpUpTの合成

(1-a) 132.3mg(0.21mmol)を無水ピリジンで3回共沸した後、調製した2-クロロフェニル-0-0-ビス(1-ベンゾトリアゾリル)ホスフェイト(14) 1.0ml(0.2mmol)を加え、室温で40分間放置した。一方、日本セオンDNAマニユアル合成機にセルをセットし、チミジン誘導体を担持したポリスチレン 20mg をセル中に入れ、塩化メチレン-メタノール(8:2 v/v)で10分間膨潤した後、1%ジクロロ酢酸で5'位DMTr基を除去し、この除去した液によりDMTr基の定量を行った。樹脂は塩化メチレン-メタノール(8:2 v/v)で3回、無水ピリジンで3回洗浄後、アルゴン気流下40℃で10分間乾燥した後、ホスホリル化したチミジンを500μl、1-メチルイミダゾール 50μlを加え、30℃で30分間、時々攪拌した。濾過後、ピリジンで3回洗浄し、キャッピング試薬(DMAP 0.36g、無水酢酸 3ml、ピリジン 27ml)を適量加え、3分間、未反応の5'水酸基をマスクした。再びピリジンで3回、塩化メチレン-メタノール(8:2 v/v)で3回洗浄した。以上を1サイクルとして、もう一度以上の操作を繰り返し、最後に5'位DMTr基を除去し、塩化メチレン-メタノール(8:2 v/v)で3回洗浄し、乾燥した。

UpUpTの脱保護

UpUpTを合成した樹脂 10mg を首長フラスコにとり、濃アンモニア水 2mlを加え、密栓をし、針金で栓が飛ばないようにし、60℃で6時間放置した。冷凍庫で冷却した後、パスツールに石英綿をつめて濾過し、樹脂をピリジン-水(1:1 v/v)で充分洗浄し、濾液と洗液をまとめ、減圧下濃縮乾固した。残渣にpH2の塩酸を3ml加え、室温で、5時間放置した。希アンモニア水で中和し、減圧下溶媒を留去し、滅菌水 5mlを加え、酢酸エチルで5回洗浄し、減圧下濃縮乾固させ、滅菌水で溶解して、逆相のHPLCで精製した。

HPLC装置は Gilson modelを用いた。

カラムは M&S pack C18 (4.6mm I.D.×15cm)

グラディエント

time(min)	0	15	17	18	20
solvent I (%)	100	0	0	100	100
solvent II (%)	0	100	100	0	0

TpTpT、dUpdUpTも、基本的には同様に合成し、脱保護を行った。異なる点は表1-5に載せた。

UpUpTのヌクレアーゼP1分解

逆相HPLCにより精製したUpUpT 68μl(0.68 A₂₆₀)に、1M酢酸ナトリウム(pH 5.7) 4μl、ヌクレアーゼP1(10mg/5ml) 20μlを加え、37°Cで24時間放置した。

UpUpTの塩基組成分析

UpUpTのヌクレアーゼP1完全分解物を、逆相のHPLCで各ヌクレオシド、ヌクレオチドに分離した。

HPLC装置は Shimazu LC-6Aを用いた。

カラム MICROSORB C18 (4.6mm I.D.×15cm)

グラディエント

time(min)	0	5	15	25	26
0.05M NH ₄ H ₂ PO ₄ (pH5.7)(%)	100	100	50	50	100
25%CH ₃ CN-0.05M NH ₄ H ₂ PO ₄ (pH5.7)(%)	0	0	50	50	0

市販の Authentic な各ヌクレオシド、ヌクレオチドの保持時間を下に示す。

5' CMP	2.4min	シチジン	5.7min
5' UMP	2.6min	ウリジン	8.7min
5' GMP	4.0min	グアノシン	14.7min
5' AMP	10.1min	アデノシン	17.7min

上記の Authentic と比較して、UpUpT の分解物のピークを同定した。

また、ピーク面積比を求め、Authentic を用いて、作製した検量線よりモル比に換算して、塩基組成を求めた。

UpUpT の hypochromicity の測定

精製した UpUpT ($0.34 A_{260}$) $34 \mu\text{l}$ に滅菌水 $10 \mu\text{l}$ 、 1 M 酢酸ナトリウム ($\text{pH} 5.7$) $2 \mu\text{l}$ を加え、そこから $40 \mu\text{l}$ をとり出し、滅菌水 1 ml を加え、同濃度の酢酸ナトリウム溶液を対象として、 260 nm の吸光度 $A_{260}(1)$ を求めた。また、UpUpT のヌクレアーゼ P1 分解物 $40 \mu\text{l}$ をとり、滅菌水 1 ml を加え、同濃度の酢酸ナトリウム-ヌクレアーゼ P1 溶液を対象として、 260 nm の吸光度 $A_{260}(2)$ を求めた。UpUpT の hypochromicity を次式により求められた。

$$\text{hypochromicity}(\text{UpUpT}) = (A_{260}(2) - A_{260}(1)) / A_{260}(2)$$

UpUpT の hypochromicity は、 9.1% であった。

また、UpUpT の 260 nm のモル吸光係数 ϵ_{260} は、 $25,700$ となった。

UpUpU の合成

ウリジンを担持したポリスチレン樹脂 30 mg を用いて、UpUpT と同様に合成し、脱保護は濃アンモニア水処理を 60°C で 6 時間、 $\text{pH} 2$ の塩酸処理を室温で 5 時間行い、以後 UpUpT と同様に精製した。

UpUpU の hypochromicity の測定

精製した UpUpU ($40.1 A_{260}/\text{ml}$) $25 \mu\text{l}$ に、 1 M 酢酸ナトリウム ($\text{pH} 5.7$) $20 \mu\text{l}$ 、滅菌水 $955 \mu\text{l}$ を加え、同濃度の酢酸ナトリウム溶液を対象として、 260 nm の吸光度 $A_{260}(1)$ を求め、ここから、 $975 \mu\text{l}$ をとり、ヌクレアーゼ P1 $25 \mu\text{l}$ を加え、 37°C で 3 時間放置した。同濃度の酢酸ナトリウム-ヌクレアーゼ P1 溶液を対象として、ヌクレアーゼ P1 分解物の 260 nm の吸光度を測定し、UpUpT と同様にして、hypochromicity を求めた。

$$\text{hypochromicity}(\text{UpUpU}) = 3.3\%$$

$$(\text{UpUpU}) \epsilon_{260} = 28,760$$

第二章

Fl コートタンパク質 mRNA の先導配列の合成 部分合成

i) 活性化した保護ヌクレオチドの合成

縮合一回当たり 108.1mg の HOB T を、無水ビリジンで 2 回共沸し、無水ビリジン 64.8 μ l、無水ジオキサン 1ml、2-クロロフェニルホスホロクロリデート 65.8 μ l を加え、攪拌後、室温で 1 時間静置した。ビリジンの塩酸塩が沈殿した上清を、あらかじめ無水ビリジンで 3 回共沸しておいた保護ヌクレオシド 0.11mmol に 500 μ l 加え、室温で 1 時間、ときどき攪拌した。

ii) 合成サイクル

- 7)ヌクレオシドを担持したポリスチレン樹脂 20mg を日本ゼオン DNA マニュアル合成機のセル中に入れ、塩化メチレン-メタノール(8:2 v/v) で 10 分間膨潤させた。
- 8) 1% ジクロロ酢酸-塩化メチレン溶液で、30°C、2~3 分間、5' 位 DMT r 基を除去した。除去した液は試験管にとり、DMT r 基の定量を行った。
- 9) 塩化メチレン-メタノール(8:2 v/v) で、3 回洗浄した。
- 10) 無水ビリジンで 3 回洗浄した。
- 11) アルゴン気流下 40°C で 10 分間乾燥した。
- 12) i) で合成した、活性ヌクレオチド 500 μ l、1-メチルイミダゾール 50 μ l を加え、30°C で 30 分間、ときどき攪拌した。
- 13) 無水ビリジンで 3 回洗浄した。
- 14) キャッピング試薬(DMAP 0.36g、無水酢酸 3ml、ビリジン 27ml)を適量加え、室温で 3 分間、未反応の 5' 水酸基をアセチル化した。
- 15) 無水ビリジンで 3 回洗浄した。
- 16) 塩化メチレン-メタノール(8:2 v/v) で、3 回洗浄した。

イ)~コ)を繰り返して、鎖長を伸ばしていった。

但し、最後のサイクルだけは、ク)、ケ)を行わないで、コ)を行った後、アルゴン気流下、30℃で10分間乾燥した。

iii)各フラグメントの脱保護・精製

フ)ii)で合成したフラグメントを担持したポリスチレン樹脂の約半分量に、0.5Mテトラメチルグアニジン-2-ピリジナルドキシム/ピリジン-水(9:1 v/v) 溶液 200 μ l を加え、37℃、24時間攪拌した。

イ)滅菌したパスツールの底に、石英綿をつめ、フ)を濾過し、樹脂をピリジン-滅菌水(1:1 v/v) で数回洗浄し、濾液と洗液を首長フラスコに集め、減圧下、濃縮乾固した。

ウ)イ)に濃アンモニア水2ml を加え、密栓をし、針金で栓が飛ばない様に、しっかりと留め、55℃で12時間放置した。

エ)ウ)を減圧下、濃縮乾固し、フラグメントI~Vは、そのまま、オ)の操作を行った。フラグメントVI、VIIは、簡易型逆相クロマトグラフィー(SEP-PAK)を行った。

SEP-PAK 逆相クロマトグラフィー

a)90%アセトニトリル-50mMTEAB(pH8.0)を10ml 流した。

b)50mMTEAB(pH8.0)を5ml 流した。

c)ウ)と濃縮乾固した残渣を50mMTEAB(pH8.0) 5ml に溶かした溶液を流した。

d)50mMTEAB(pH8.0)を5ml 流した。

e)15%アセトニトリル-50mMTEAB(pH8.0)を20ml 流した。

f)35%アセトニトリル-50mMTEAB(pH8.0)を10ml 流した。

g)50%アセトニトリル-50mMTEAB(pH8.0)を10ml 流した。

h)90%アセトニトリル-50mMTEAB(pH8.0)を10ml 流した。

TEAB=トリエチルアンモニウムカーボネート

フ)は1ml ずつ、他は2~3ml ずつ分取し、各画分の260nmの吸光度を測定し、f)の吸光度の大きい画分を集め、減圧下、濃縮乾固した。

オ)残渣を5%アセトニトリル-0.1MTEAA(pH7.0) 500 μ l に溶解し、

逆相HPLC(Gilson)でDMTr画分を分取し、凍結乾燥した。

HPLC(Gilson)

カラム M&S pack C18 (4.6mm I.D.×15cm)

グラディエント

time(min)	0	15	17	18	20
solvent I (%)	100	0	0	100	100
solvent III (%)	0	100	100	0	0

か)にpH2の塩酸 3ml を加え、室温で24時間放置した。

き)かに約2.8%アンモニア水 40μl を加え、中和し、pH試験紙でpH7を確認した後、減圧下、濃縮乾固した。

く)きに滅菌水約 10ml を加え、酢酸エチルで5回洗浄し、減圧下、濃縮乾固した。

け)くに滅菌水 500μl を加え、逆相HPLC(Gilson)でメインピークを分取し、精製した。

HPLC(Gilson)

カラム M&S pack C18 (4.6mm I.D.×15cm)

グラディエント

time(min)	0	15	17	18	20
solvent I (%)	100	0	0	100	100
solvent II (%)	0	100	100	0	0

こ)け)を凍結乾燥し、-20℃で保存した。

各フラグメントの陰イオン交換HPLC分析

フラグメントI~IVについて、陰イオン交換HPLCで分析した。

陰イオン交換HPLC

カラム WAX-1 (4.0mm I.D.× 50mm)

グラディエント

Time(min)	0	15	16	20
Solvent IV (%)	100	0	100	100
Solvent V (%)	0	100	0	0

各フラグメントのヌクレアーゼ P 1 分解

フラグメント I ~ V を各 0.05 A₂₆₀、1 M 酢酸ナトリウム (pH 5.7) 2 μ l、ヌクレアーゼ P 1 (10mg/5ml) 1 μ l に滅菌水を加え、全量を 40 μ l にし、37°C で、1 時間インキュベートした。

各フラグメントの塩基組成分析

UpUpT の塩基組成分析と同様にして、分解物を逆相 HPLC (Shimadzu) で分離し、ピーク面積比から、Authentic を用いて作製した検量線を使って、各ヌクレオチド、ヌクレオシドのモル比を求め、塩基組成を算出した。

各フラグメントの 5' 末端の [³²P] 標識

逆相 HPLC で精製したフラグメント I ~ V の各溶液 I ... 13.6 A₂₆₀/ml、II ... 10.5 A₂₆₀/ml、III ... 8.0 A₂₆₀/ml、IV ... 6.5 A₂₆₀/ml、V ... 1.5 A₂₆₀/ml を各 1 μ l、5 \times kination buffer 2 μ l、T4 polynucleotide kinase (8unit/ μ l) 0.1 μ l、[γ -³²P]ATP 0.2 μ l (2 μ Ci)、滅菌水 6.7 μ l を加え、37°C で 1 時間インキュベートした。

15% ポリアクリルアミド-7M 尿素ゲル電気泳動

40% アクリルアミド溶液 30ml に 10 \times TPE 溶液 8ml、尿素 33.6g、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED 40 μ l を加え、滅菌水で 80ml にし、10% 過硫酸アンモニウム溶液 800 μ l を加えて、2 枚のガラス板の間に流しこみ、15% ポリアクリルアミド-7M 尿素ゲルを作製した。TPE 溶液を用いて、一晚 500V でプレランを行った。

前項で調製した各フラグメントの kination 溶液 1~3 μ l に、等量の色素混合液を加え、ゲルのレーンに載せ、1200V で 2 時間半泳動した。

片側のガラス板をはがし、ゲルをラップでおおい、X 線フィルムを重ねて、オートラジオグラフィーを行ったあと、X 線フィルムを現像した。

先導配列 18 量体の合成

i) 活性化した保護ヌクレオシドの合成

無水ピリジンで 3 回共沸した保護ヌクレオシド (1-a ~ d) 0.066mmol に、前述の方法で調整した (14) 300 μ l (0.06mmol) を加え、室温で 30 分反応させた後、溶媒を減圧下留去し、無水ピリジンで一回共沸し、無水アセトニトリル 250 μ l に溶解して、縮合反応一回分の活性化した保護ヌクレオシドとした。(14) は、縮合反応を 9 回繰り返した後、新しく調製し直した。

ii) 合成サイクル

7) ヌクレオシドを担持した CPG 50mg あるいは 60mg を日本ゼオン DNA マニュアル合成機のセルに入れ、アセトニトリルで 1 回洗浄した。

4) Applied Biosystems 社のキャッピング試薬を適量加え、30°C で 3 分間攪拌し、フリーの 5' 位水酸基をアセチル化した。

8) 無水アセトニトリルで 3 回洗浄した。

1) 1% ジクロロ酢酸-塩化メチレン溶液で、30°C で、1 ~ 2 分間、5' 位 DMT r 基を除去した。除去した液は試験管にとり、DMT r 基の定量を行い、縮合収率を求めた。

9) 無水アセトニトリルで 4 回洗浄した。

6) i) で調製した活性ヌクレオチド 300 μ l 及び 1-メチルイミダゾール 30 μ l を加え、30°C で 30 分間、ときどき攪拌した。

5) 無水アセトニトリルで 3 回洗浄した。

3) i) ~ 5) を繰り返して、鎖長を伸ばした。

但し最後のサイクルは、9) まで行った後、5' 位 DMT r 基を除去しないで、脱保護した。

先導配列 18 量体の脱保護・精製

前述のフラグメントと同様にして、逆相 HPLC を行った後、5' 末端を標識しないで、そのまま 1 A₂₆₀ 分を、20% ポリアクリルアミド-7M 尿素

ゲル電気泳動 (20% PAGE) を行った。ゲル板をはがし、UV 照射して、最も移動度の小さいメインバンドを切り出し、エッペンドルフチューブに入れ、溶出緩衝液 (20mM Tris-HCl (pH8.0)、0.5M NaCl、1mM EDTA、0.1% SDS) 400 μ l を加えて、37°C で14時間振とうし、遠心してゲルを沈澱させて、上清を別のエッペンドルフチューブに移し、冷エタノールを1ml 加え、攪拌した後、-80°C で、3時間放置した。15000rpm 15分間遠心して上清を除き、95% エタノールで2回洗浄した後、減圧下、乾燥し、滅菌水を加え、260nm の吸光度を測定した。

Donis-Keller 法による塩基配列の決定

精製した先導配列18量体の5' 末端を [32 P] で標識し、20% PAGE で、バンドを切り出し精製し、液体シンチレーションカウンターでカウントを測定した。

RNase T1、RNase U2、RNase Phy M による限定分解

5' 末端を [32 P] で標識した18量体 1 μ l (10000cpm) に緩衝液 (20mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0)、7M 尿素、1mM EDTA、0.25mg 大腸菌 tRNA、0.025% キシレンシアノール (XC)、0.025% ブロムフェノールブルー (BPB)) 19 μ l を加え、50°C で5分間加熱後、氷水中で急冷する。これに、各RNase (1unit/ μ l) 1 μ l ずつ加え、50°C で反応を行った後、冷水中で反応を停止した。

B. cereus RNase による限定分解

5' 末端を [32 P] で標識した18量体 1 μ l (10000cpm) に緩衝液 (20mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0)、1mM EDTA、0.25mg 大腸菌 tRNA、0.025% XC、BPB) 9 μ l を加え、50°C で5分間加熱後、氷水中で急冷する。これに B. cereus RNase (1unit/ μ l) を 1 μ l 加え、50°C で保温し、20分、40分、60分後に、それぞれ 3.3 μ l ずつ取り出し、等量の色素混合液を加え、冷水中で反応を停止する。

アルカリによる非特異的限定分解

5' 末端を [32 P] で標識した18量体 1 μ l (10000cpm) に緩衝液 (50mM 炭酸ナトリウム (pH9.0)、1mM EDTA、0.25mg 大腸菌 tRNA) を加え、

50 μ l のキャピラリー 2 本に分けて封管し、90℃で、それぞれ、14 分間、28 分間加熱し、氷冷した後、エッペンドルフチューブに移し、等量の色素混合液を加える。

各反応液を、20% PAGE し、オートラジオグラフィーを行った。

第三章

大腸菌からの70Sリボソーム、30Sサブユニット、粗開始因子の調製

粗開始因子の調製

大腸菌をLB培地中、37°Cで増殖させた。培地は1lにつきバクトトリプトン 10g、酵母エキス 1g、NaCl 5g を水に溶解し、高圧滅菌した後、別に高圧滅菌した50%グルコースを培地1lにつき4ml 加え、あらかじめ一晚培養しておいた大腸菌 5ml を加えて、37°Cで約3時間振とうし、中期対数増殖期 ($A_{550} = 0.4 \sim 0.6$) まで培養し、集菌後、緩衝液A (10mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.6)、60mM 塩化アンモニウム、10mM 酢酸マグネシウム、6mM 2-メルカプトエタノール) で洗浄した。この後の操作はすべて4°Cで行った。湿菌体重量の2倍量のアルミナを加え、約10分間磨砕する。菌体の2倍容の緩衝液Aで懸濁した後、トミー精工No.4ローターで、10000rpm、15分間遠心しアルミナを除き、上清をさらに、ベックマン50Tiローターで、21000rpm、30分間遠心する。この上清をベックマン50Tiローターで、33000rpm、18時間遠心し、リボソームを沈殿させる。上清を除き、沈殿を1M塩化アンモニウムを含む緩衝液Aで懸濁し、ベックマン50Tiローターで、33000rpm、18時間遠心すると、開始因子は上清に、リボソームは沈殿に回収できる。上清は、緩衝液B (20mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.4)、1mM ジチオトレイトール) で10倍に希釈し、リン酸セルロースカラム (0.6cm × 10cm) に吸着させ、100mM 塩化アンモニウムを含む緩衝液Bを100ml 流した後、0.8M塩化アンモニウムを含む緩衝液Bで溶出し、100mM 塩化アンモニウムを含む緩衝液Bに対して透析した後、280nm の吸光度を測定し、80%グリセロールを等量加え、粗開始因子として-20°Cで保存した。この状態で、約6カ月安定である。

70Sリボソームの調製

リボソームの沈殿に、1M塩化アンモニウムを含む緩衝液Aを加え、ガラス製ハンドホモジナイザーで丁寧に懸濁した後、ベックマン50Tiローターで、33000rpm、18時間遠心した。この操作を4回繰り返した後、緩衝液Aに懸濁し、260nm の吸光度を測定し、70Sリボソームとして-80°Cで保存した。

この状態で、約6カ月安定である。

30Sサブユニットの調製

前項で調製した70Sリボソームを、緩衝液C(20mM トリス塩酸緩衝液(pH7.6)、0.5M 塩化アンモニウム、0.5mM 酢酸マグネシウム、5mM 2-メルカプトエタノール)に懸濁し、緩衝液D(20mM トリス塩酸緩衝液(pH7.6)、0.1M 塩化アンモニウム、1mM 酢酸マグネシウム、5mM 2-メルカプトエタノール)に対して、6時間透析し、70Sリボソームを完全に解離させた後、250~300A₂₆₀/mlになるように緩衝液Dで希釈した。SW40Ti用のニトロセルロース製遠心管(日立工機社製)中に、0.3-0.9Mショ糖密度勾配を作り、遠心管1本あたり、300μlずつ解離させた70Sリボソームをのせ、バックマンSW40ローターで22500rpm、15時間遠心した後、遠心管の底部よりサイフォンで、400μlずつ分取し、260nmの吸光度を測定し、30Sサブユニットに相当する画分を集めて、バックマン50Tiローターで、45000rpm、15時間遠心し、沈澱を40%グリセロール入り緩衝液Aに懸濁し、260nmの吸光度を測定し、30Sサブユニットとして-80℃で保存した。この状態で、約1カ月安定である

[³⁵S] fMet-tRNAの調製

堀弘幸氏より供与された大腸菌A19株のtRNA^{fMet} 18nmolに、溶液A(500mM トリス塩酸緩衝液(pH7.4)、100mM 酢酸マグネシウム、100mM 塩化カリウム、100mM 2-メルカプトエタノール、20mM ATP) 150μl、溶液B(100mM クレアチンリン酸、0.5mg/ml クレアチンキナーゼ) 75μl、N⁵-ホルミルテトラヒドロ葉酸 225nmol、[³⁵S]メチオニン(10Ci/nmol) 22.5nmol 大腸菌Q13株より調製したS-100画分(9.8A₂₆₀/ml)90μlを加え、滅菌水で全量を1.5mlにし、37℃、10分間保温し、ホルミルメチオニル化した。氷冷した滅菌水 3.5ml、2M酢酸カリウム(pH5.0)を加え反応を停止した後、氷冷した水飽和フェノール 5.5mlを加え、4℃で、20分間ときどき攪拌した。トミー精工No.4ローターで、4℃、5000rpm、10分間遠心した後、上層を分取し、下層にさらに0.1M酢酸カリウム(pH5.0) 4mlを加え、20分間、ときどき攪拌した後、5000rpm、10分間遠心し、上層を合わせた。エーテル 8mlを加

え、攪拌した後、5000rpm、10分間遠心し、エーテル層を除いて、水層に冷エタノール 16ml を加え、よく攪拌した後、 -20°C で一晩放置した。10000rpmで10分間遠心し、沈澱を冷エタノールで1回洗浄した後、緩衝液(5mM 酢酸カリウム(pH5.0)、1mM EDTA、1mM 2-メルカプトエタノール) 500 μl に溶解し、同じ緩衝液に対して、2回透析した後、別の緩衝液(1mM 酢酸カリウム(pH5.0)、1mM 2-メルカプトエタノール)に対して1回透析し、酢酸マグネシウムを 10mM になるように加え、 30°C 、5分保温した後、 -20°C で保存した。

10 μl 、20 μl を分取し、4%過塩素酸水溶液を 900 μl 加えた後、ワットマングラスフィルターFで濾過し、フィルターを0.4% 過塩素酸水溶液 2ml で3回、エタノールで2回洗浄した後、乾燥し、フィルターをトルエンシンチレーター 5ml 中に浸して、液体シンチレーションカウンターで $[^{35}\text{S}]$ の放射活性を測定し、0.3mM $[^{35}\text{S}]$ メチオニンを標準物質として、モル数を計算した。

また、 $[^{35}\text{S}]$ fMet-tRNA 10 μl に1Mグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液(pH10.0) 1 μl を加え、 37°C で1時間保温した後、アビセルロース薄層クロマトグラフィー(展開溶媒 n-ブチルアルコール:酢酸:蒸留水(4:1:1 v/v))で展開した後、オートラジオグラフィーし、デンストメーターで、ホルミルメチオニンとメチオニンの比を求めた。

タンパク質合成開始複合体形成実験

ニトロセルロースフィルター法による、開始複合体形成量の測定

エッペンドルフチューブに、Binding Buffer、リボソーム及び粗開始因子を反応条件に従って加え、最後に $[^{35}\text{S}]$ fMet-tRNAを、所定量加えて、 30°C に保温し、反応を開始した。所定時間反応した後、氷冷した緩衝液I(10mM トリス塩酸緩衝液(pH7.4)、100mM 塩化アンモニウム、10mM 酢酸マグネシウム)を 900 μl 加え、反応を停止した後、ただちに、ニトロセルロースフィルター(ミリポア社製0.45 μm)で濾過し、フィルターを緩衝液I

2ml で5回洗浄した。フィルターを乾燥後、トルエンシンチレーター 5ml に浸し、液体シンチレーションカウンターで、フィルターの [^{35}S] の放射活性を測定した。

先導配列 18 量体を用いた開始複合体形成反応

次のような反応条件で、合成した f1 コートタンパク質 mRNA の先導配列 18 量体を用いて、開始複合体形成効率の経時変化を調べた。70S リボソームを用いる場合には、反応液全量 100 μl 中に、5 \times Binding Buffer (70S) 20 μl 、70S リボソーム 20 μmol 、粗開始因子 (0.343 A_{280}/ml) 24 μl 、[^{35}S] fMet-tRNA 約 20 μmol (141770 cpm)、RNA オリゴマー 250 μmol をそれぞれ含み、粗開始因子を加えない (-IF) 場合は、粗開始因子の代わりに粗開始因子の保存緩衝液である 40% グリセロール緩衝液を同量加えて、30°C で保温し、所定時間に、16 μl ずつ分取し、洗浄液で希釈した後、開始複合体形成量をニトロセルロースフィルターアッセイ法により、測定した。また、30S サブユニットの場合には、5 \times Binding Buffer (30S) を用いて、30S サブユニットを 20 μmol とし、他は 70S リボソームの場合と同様にして、開始複合体形成量を測定した。各 RNA オリゴマーのモル数は、同様の塩基配列をもつ DNA オリゴマーの Hypochromicity を参考にして、18 量体の hypochromicity を 35% として計算して求めた。

開始複合体形成反応中のオリゴマーの安定性

ニトロセルロースフィルター法と同じ様にエッペンドルフチューブに各因子を加え、最後に、5' 末端を [^{32}P] で標識したオリゴマーを 1 μmol 加えて 30°C で保温して反応を開始した。所定時間に一定量を分取し、色素混合液を加えて、90°C で2分間加熱したあと、氷水中で急冷したあと、20% PAGE を行い、オートラジオグラフィーにより、オリゴマーのバンドを検出した。

RNA 1 の 3' [^{32}P] pCp 標識

シチジン 3' - リン酸 200pmol に 5 × Kination buffer 1 μl 、[γ - ^{32}P] ATP (19.2Ci/mmol) 200pmol、ポリヌクレオチドキナーゼ 2.5unit 加え 5 μl 中、37°C で 1 時間保温した後、90°C で 2 分間加熱し、キナーゼを失活させた。氷中で急冷した後、RNA 1 1nmol、ATP 2nmol、5 × Ligation buffer 3 μl 、RNA リガーゼ 9.5unit を加え、全量 15 μl として、4°C で 15 時間反応した。色素混合液 10 μl 加え、90°C で 2 分間加熱した後、急冷し、20% PAGE した後、先導配列 18 量体を同様にしてバンドを切り出し、精製した。

先導配列 18 量体と同じ塩基配列を持つ DNA 18 量体の合成

Applied Biosystems 社の DNA 自動合成機 381A を用いて、0.2 μmol のスケールで、常法通り合成し、脱保護・精製した。

第四章

AUG-D、RNA1-D、RNA2-D、RNA3-D、RNA4-D の合成

保護したデオキシアデノシン (N⁶-ベンゾイル-5'-ジメトキシトリチルデオキシアデノシン) 0.132mmol を無水ピリジンで3回共沸した後、2-クロロフェニル-0-0-ビス(1-ベンゾトリアゾリル)ホスフェイト (14) 0.12mmol (600 μ l) 加え、室温で30分間以上反応した後、溶媒を減圧下留去し、無水ピリジンで1回共沸し、無水アセトニトリル 500 μ l に溶解した。また、活性化した4種類の保護リボヌクレオチドを同様にして調製し、デオキシシチヂンを担持したCPG 50mg と、先導配列18量体の合成法と同様に、順次縮合反応を繰り返し、6量体AUG-Dおよび21量体RNA1~RNA4-Dを合成した。また、脱保護・精製も先導配列18量体と同様に行った。

ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼによる

チオホスフェイトの導入

前項で精製したAUG-D、RNA1-D、RNA2-D、RNA3-D、RNA4-D、各 50pmol に、5 \times TdT buffer 1.2 μ l、[α -³⁵S] dCTP (650Ci/mmol) 50pmol、RNasin 32unit、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ 4.2unit を加え、滅菌水で全量 6 μ l とし、37 $^{\circ}$ Cで10分間保温し、色素混合液 4 μ l を加え、20%PAGEして、オートラジオグラフィーし、バンドを切り出し、溶出後、DE52セルロースカラムクロマトグラフィーで脱塩後、500 μ l の滅菌水に溶解した。そのうち5 μ l をニトロセルロースフィルターに吸着させ、トルエンシンチレーター中、液体シンチレーションカウンターにより放射活性を測定し、[α -³⁵S] dCTPを標準物質として、定量した。

d(AAsC)、d(AsAsC)の合成

Applied Biosystems社のDNA自動合成機により、10 μ molスケールのデオキシシチヂンを担持したCPG (ABI社製) を用い、10 μ molスケールの合

成サイクル (ABI) に従って、合成を行った。チオホスフェイトを導入する時には、合成サイクル中のヨウ素酸化の前のステップで合成を中止し、固相担体のカラムを合成機よりはずし、二硫化炭素-ピリジン(1:1 v/v) 10ml で洗浄した後、5%硫黄/二硫化炭素-ピリジン-トリエチルアミン(71.5:71.5:7.5 v/v) 2ml で、CPGを浸し、室温で15分間静置し、二硫化炭素-ピリジン(1:1 v/v) で洗浄した後、カラムを自動合成機に戻し、ヨウ素酸化の次のステップから、合成を続けた。また、5'末端のDMTr基は除去しないで残した。

d(AAsC)の脱保護・精製

d(AAsC)を合成したCPG 100mgの5'位DMTr基を1%ジクロロ酢酸-塩化メチレン溶液で除去した後、常法に従って脱保護し、RNAフラグメントの脱保護・精製の⁹⁾と同様にして逆相のHPLCでメインピーク2本をそれぞれ分取し、凍結乾燥した。

d(AAsC)の³¹P-NMRの測定

Applied Biosystems社のDNA自動合成機で合成したd(AAC)も同様に脱保護・精製し、それぞれ、20%PAGEで単一バンドである事を確認した後、本学薬学部助教授西村善文博士に³¹P-NMRを測定して戴いた。

AUG-DS、RNA1-DSおよびRNA2-DSの合成

Applied Biosystems社のDNA自動合成機で合成したd(AAsC)の担持したCPGを固相担体として、先導配列18量体と同様にして、チオホスフェイトの導入されたAUG-DS及び、21量体RNA1-DS及びRNA2-DSを合成した。脱保護・精製も、先導配列18量体と同様に行った。

第五章

AUG-DS、RNA1-DS、RNA2-DSを用いた

開始複合体形成反応

次の様な反応条件で、開始複合体形成反応を行った。反応液全量20 μ l中に、70Sリボソーム(Q13)または、30Sサブユニット(Q13)10 μ mol、粗開始因子(S296、0.70A₂₈₀/ml)3 μ l、[³⁵S]fMet-tRNA約10 μ mol(60700cpm)、5 \times Binding Buffer(70S)または(30S)4 μ l、オリゴマー各モル数を含み、30℃で15分間保温したのち、洗浄用緩衝液800 μ lを加え希釈して反応を停止したのち、ニトロセルロースフィルターアッセイ法によって、開始複合体形成量を測定した。

参考文献

- 1) Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A.D., Heyneker, H.L., Balivar, F. and Boyer, H.W. (1977) Science, 198, 1056.
- 2) Beyreuther, K., Alder, K. Geisler, N. and Kamm, A. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 70, 3576.
- 3) Berkley, K. and Bourgeois, S. (1978) "The Operon", Univ. Tokyo Press, Tokyo, p. 77.
- 4) Anderson, W.B., Snider, A.B., Emmer, M., Perelman, R.L. and Pastan, J. (1971) J. Biol. Chem., 246, 5929.
- 5) Furuichi, Y. and Miura, K. (1975) Nature, 253, 374.
- 6) Shimotozono, K., Kodama, Y., Hashimoto, J. and Miura, K. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 2734.
- 7) Yamaguchi, K., Hidaka, S. and Miura, K. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 1012.
- 8) Shine, J. and Dalgarno, L. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 71, 1342 ; ibid., (1975) Nature, 254, 34-38.
- 9) Dunn, J.J., Bugash-Pollet, E. and Studier, F.W. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77, 3590-3594.
- 10) Nomura, M., Ohsuye, K., Mizuno, A., Sakuragawa, Y. and Tanaka, S. (1984) Nucleic Acids Res., Symp. Ser., 15, 173.
- 11) Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K. and Green, M.R. (1984) Nucleic Acids Res., 12, 7035-7056.
- 12) Merrifield, R.B. (1965) Science, 150, 178.
- 13) Letsinger, R.L. and Ogilvie, K.K. (1967) J. Am. Chem. Soc., 89, 4801.
- 14) Beauchage, S.L. and Caruthers, M.H. (1981) Tetrahedron Lett., 22, 1959.
- 15) van der Marel, G.A., Wille, G. and van Boom, J.H. (1982) Recl. Trav. Chim., Pays-Bas, 101, 241-246.

- 16) Ogilvie, K.K., Nemer, M.J. and Gillen, M.F. (1984) Tetrahedron Lett., **25**, 1669-1672.
- 17) Usman, N., Pou, R.T. and Ogilvie, K.K. (1985) Tetrahedron Lett., **26**, 4567-4570.
- 18) Ogilvie, K.K., Usman, N., Nicoghossian, K. and Cedergren, R.J. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **85**, 5164-5168.
- 19) Ohtsuka, E., Yamane, A., Doi, T. and Ikehara, M. (1984) Tetrahedron, **40**, 47-57.
- 20) Swith, M., Rammler, D.H., Goldberg, I.H. and Khorana, H.G. (1962) J. Am. Chem. Soc., **84**, 430.
- 21) Smith, M., Rammler, D.H., Goldberg, I.H. and Khorana, H.G. (1962) J. Am. Chem. Soc., **84**, 430.
- 22) Hall, R.H. (1964) Biochemistry, **3**, 769.
- 23) Schaller, H., Weimann, G., Lerch, B. and Khorana, H.G. (1963) J. Am. Chem. Soc., **85**, 3821.
- 24) Ohtsuka, E., Nakagawa, E., Tanaka, T. and Markham, A.F. (1978) Chem. Pharm. Bull., **26**, 2998.
- 25) Ito, H., Ike, Y., Ikuta, S. and Itakura, K. (1982) Nucleic Acids Res., **10**, 1755.
- 26) Adams, S.P., Kauka, K.S., Wykes, E.J., Holder, S.B. and Galluppi, G.R. (1983) J. Am. Chem. Soc., **105**, 661.
- 27) Letsinger, R., Caruthers, M.H. and Jerina, D.M. (1967) Biochemistry, **6**, 1379.
- 28) Hayatsu, H. and Khorana, H.G. (1966) J. Am. Chem. Soc., **88**, 3182.
- 29) Miyoshi, K., Miyake, T., Hozumi, T. and Itakura, K. (1980) Nucleic Acids Res., **8**, 5473-5489.
- 30) Mitchell, A.R., Erickson, B.W., Ryabtsev, M.N., Hodges, R.S. and Merrifield, R.B. (1976) J. Am. Chem. Soc., **98**, 7357-7362.
- 31) Marugg, J.E., Piel, N., McLaughlin, L.W., Tromp, M., Veeneman, G.H., van der Marel, G.A. and van Boom, J.H. (1984) Nucleic Acids Res.

- 12, 8639-8651.
- 32) Stawinski, J., Hozumi, T., Narang, S.A., Bahl, C.P. and Wu, R. (1977) Nucleic Acids Res., **4**, 353.
- 33) Takaku, H., Yoshida, M. and Nomoto, T. (1983) J.Org.Chem., **48**, 1399-1403.
- 34) Gait, M.J., Matthes, H.W.D., Singh, M. and Titmas, R.C. (1982) Chem.Comm., **37**; Tanaka, T. and Letsinger, R.L. (1982) Nucleic Acids Res., **10**, 3249.
- 35) Kume, A., Sekine, M. and Hata, T. (1982) Tetrahedron Lett., **23**, 4365.; (1982) idem., ibid., **23**, 5287.; Efimov, V.A., Reverdatto, S.V. and Chakhmakheva, O.G. (1982) Nucleic Acids Res., **10**, 667.
- 36) Adams, S.P., Kauka, K.S., Wykes, E., Holder, S.B. and Galluppi, G.R. (1983) J.Am.Chem.Soc., **105**, 661.
- 37) Matteucci, M.D. and Caruthers, M.H. (1980) Tetrahedron Lett., **21**, 3243.; Kohli, V., Blocker, H. and Koster, H. (1980) ibid., **21**, 2683.; Kierzek, R., Ito, H., Bhatt, R. and Itakura, K. (1981) ibid., **22**, 3761.; Chow, F., Kempe, T. and Palm, G. (1981) Nucleic Acids Res., **9**, 2807.; Ito, H., Ike, Y., Ikuta, S. and Itakura, K. (1982) ibid., **10**, 1755.
- 38) Smit, J. (1973) Collet.Czcheck.Chem.Comm., **38**, 3189.
- 39) Takaku, H., Nomoto, T. and Kamaike, K. (1981) Chem.Lett., 543.
- 40) Jones, S.S., Rayner, B., Reese, C.B., Ubasawa, A. and Ubasawa, M. (1980) Tetrahedron, **36**, 3075.
- 41) Reese, C.B. and Ubasawa, A. (1980) Tetrahedron Lett., **21**, 2265-2268.
- 42) Kamiura, T., Tsuchiya, M., Urakami, K., Koura, K., Sekine, M., Shinosaki, K., Miura, K. and Hata, T. (1984) J.Am.Chem.Soc., **106**, 4552-4557.
- 43) van der Marel, G., van Boeckel, C.A.A., Mrs Wille, G. and van Boom, J.H. (1981) Tetrahedron Lett., **22**, 3887-3890.

- 44) van Boom, J.H., Burgers, P.M., Owen, G.R., Reese, C.B. and Saffhill, R. (1971) Chem. Comm., 869.
- 45) Miyoshi, K. and Itakura, K. (1980) Nucleic Acids Res. Symp. Ser., 7, 281.
- 46) Nefkens, G.H.L., Tesser, G.I. and Nivard, R.J.F. (1962) Rec. Trav. Chim. Pay-Bas, 81, 683.
- 47) Anderson, G.W., Zimmerman, J.E. and Callahan, F.M. (1964) J. Am. Chem. Soc., 86, 1839.
- 48) Kierzek R., Caruthers, M.H., Largfellow, C.E., Swinton, D., Turner, D.H. and Freier, S.M. (1986) Biochemistry, 25, 7840-7846.
- 49) Wreesmann, C.T.J., Fidder, A., van der Marel, G.A. and van Boom, J.H. (1983) Nucleic Acids Res., 11, 8389-8405.
- 50) Pieczenik, G., Model, P. and Robertson, H.D. (1974) J. Mol. Biol., 90, 191-214.
- 51) Hirao, I., Ishikawa, M., Hori, H., Watanabe, K. and miura, K. in preparation.
- 52) Iwai, S. and Ohtsuka, E. (1988) Nucleic Acids Res., 16, 9443-9456.
- 53) 日本生化学会編 タンパク質の生合成 上・下 生化学実験講座7 (1975)
- 54) Ohta, T., Sarkar, S. and Thach, R.F. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 58, 1638.
- 55) Schmett, M., Manderschied, U., Kyriatsoulis, A., Brinckmann, U. and Gassen, H.G. (1980) Eur. J. Biochem., 109, 291-299.
- 56) Stein, C.A., Subaringhe, C., Shinozuka, K. and Cohen, J.S. (1988) Nucleic Acids Res., 16, 3209-3221.
- 57) Marugg, J.E., McLaughlin, L.W., Piel, N., Tromp, M., van der Marel, G.A. and van Boom, J.H. (1983) Tetrahedron Lett., 24, 3989-3992.
- 58) 石川正英 修士論文
- 59) Calogro, R.A., Pon, C.L., Canonaco, M.A. and Gualerzi, C.O. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 6427-6431.

謝 辞

本研究を行うにあたり、終始、温かい御指導、御鞭撻を賜りました本学教授三浦謹一郎博士に深く感謝の意を表します。

また、直接、実験を御指導下さい、本研究を導いて下さいました本学助手平尾一郎博士に感謝致します。

本研究を行うにあたり、有益な御助言を戴きました本学講師熊谷 泉博士、東工大教授渡辺公綱博士、同教授畑 辻明博士、同講師関根光雄博士に感謝致します。

共同実験者として協力戴きました宇都宮龍馬氏、池袋一典氏に感謝致します。また、保護ヌクレオシドを供与戴いた栗林茂雄氏、大久保光晴氏、渡辺洋一氏、原田政博氏、玉腰雅忠氏に感謝致します。

大腸菌Q 1 3 株を御供与戴いた国立遺伝学研究所遺伝実験生物保存研究センター微生物保存研究室並びに、大腸菌S 2 9 6 株を御供与戴いた理化学研究所今本文男博士に感謝致します。また、大腸菌の培養に御協力戴いた三菱化成生命化学研究所田中暉夫博士に感謝致します。 ^{31}P -NMRの測定をして戴いた本学助教授西村善文博士に感謝致します。また、tRNA^{met}を御供与戴いた堀弘幸氏に感謝致します。

研究室において、いろいろと御助言や御助力を戴いた河野享子博士、奈良岡哲志氏、日比野威氏及び、脇山素明氏をはじめとする三浦研究室の皆様感謝致します。

日本育英会には、援助を戴き感謝致します。

