

論文内容の要旨

論文題目 修飾塩基を含む RNA の化学合成

氏名 緒方 俊彦

【序論】

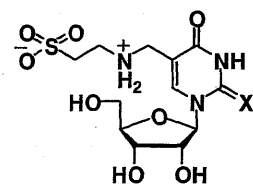
RNA 中には、一般的に存在している A、U、G、C 以外に、修飾リボヌクレオシドが数多く存在し、それぞれが特有の機能発現に寄与している。特に、tRNA 中には修飾リボヌクレオシドが数多く存在し、高次構造形成やコドン認識など、数多くの役割を担っている。その中でもアンチコドン一文字目、いわゆる wobble 位に多くの修飾体が見られ、コドン認識に重要な役割を果たしている。

wobble 位に存在する修飾体の中で、5 位に種々の置換アミノメチル基により修飾されたウリジンは、一般的にプリン塩基 (A、G) に対する認識能が上昇することが知られている。比較的最近、牛ミトコンドリア tRNA から発見された新規修飾ウリジンである 5-タウリノメチルウリジン (tm^5U 、Figure 1) 及び 5-タウリノメチル-2-チオウリジン ($\text{tm}^5\text{s}^2\text{U}$ 、Figure 1) もその例の一つである。これらの修飾塩基は、牛やヒトをはじめとする哺乳類のミトコンドリア tRNA の wobble 位に存在し、コドンの認識に重要な役割を果たしており、 tm^5U は未修飾 U と比較して G に対する認識能が上昇することがわかっている。

また、MELAS や MERRF などのミトコンドリア病患者は、これらの修飾の欠損が見られることから、ミトコンドリア病とタウリノメチル基による修飾に深い関係があることが示唆されている。

しかし、タウリノメチル基がどのようにコドン認識に関わっているかは未だ解明されていない。そこで、これらの修飾リボヌクレオシドを含む RNA オリゴマーを化学合成し、 tm^5U 及び $\text{tm}^5\text{s}^2\text{U}$ の化学的性質や構造と機能に対する知見をさらに深めることを目的とした。

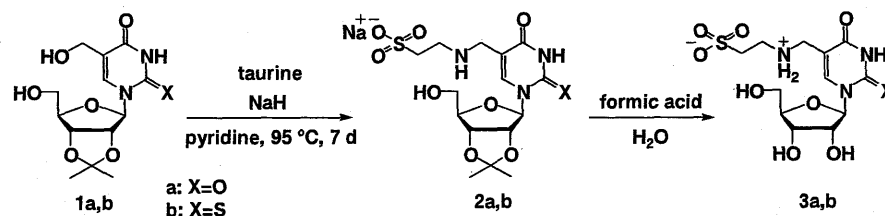
これまで当研究室では、5-ヒドロキシメチルウリジン誘導体とタウリンを反応させることにより、 tm^5U 及び $\text{tm}^5\text{s}^2\text{U}$ ヌクレオシドの合成に成功している (Scheme 1)。



X=O: tm^5U
X=S: $\text{tm}^5\text{s}^2\text{U}$

Figure 1.

Scheme 1.



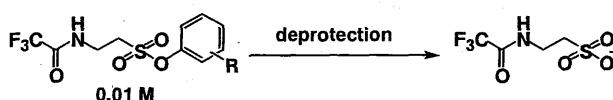
しかし、 ${}^m{}^5\text{U}$ や ${}^m{}^5\text{s}^2\text{U}$ を含む RNA オリゴマーを化学合成するためには、固相法を用いることが有効であり、固相合成を行なうには、それぞれの修飾塩基を有するモノマーユニットを合成する必要がある。しかし、スルホン酸残基と第二級アミノ基を含むタウリン骨格が遊離のままでは、効率的なモノマーユニット及びオリゴマーの合成を行なうことは困難である。そこで、オリゴマー合成を目的としたタウリン骨格への保護基導入の検討を行ない、保護されたタウリン骨格を有するモノマーの効率的な合成法、固相法を用いたオリゴマー合成への適用の検討を行なった。

【結果】

1. タウリン骨格の保護基の検討

オリゴマーを合成するために、タウリン骨格への保護基の導入を検討した。アミノ基の保護基としては、穏和な塩基性条件下除去可能なトリフルオロアセチル基を用いることとしたが、ホスホロアミダイトを用いた固相合成法に適用可能なスルホン酸の保護基については報告例がないため、保護基の検討を行なった。スルホン酸エステルの中で、比較的安定なアリールエステルに注目し、種々のフェニル基について検討を行なった。タウリン誘導体を用いて脱保護条件の検討を行なった結果、4-ニトロフェニル基は、酸性条件下では安定に存在したが、0.05 M K_2CO_3 / MeOH - H_2O (9:1, v/v) の条件下では、90 分で除去可能であることを見出した (Table 1)。

Table 1. タウリン誘導体を用いた脱保護条件の検討



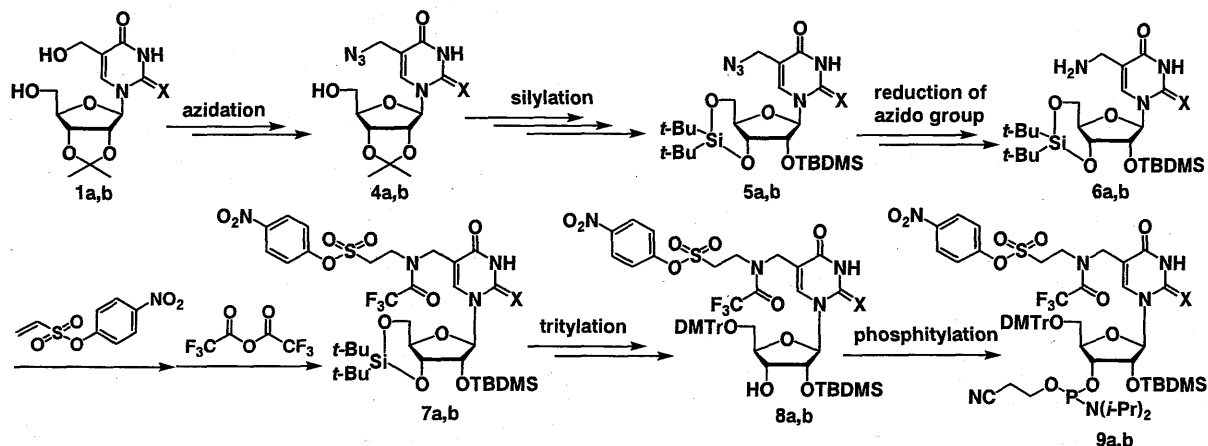
R	time	
	AcOHaq (pH 2.3)	0.05 M K_2CO_3 / MeOH - H_2O (9:1, v/v)
H	n.r.	> 2 d
2-chloro	n.r.	> 10 h
4-acetyl	n.r.	1.5 d
4-nitro	n.r.	90 min

また、このタウリン誘導体を用いて、合成サイクル中における DMT_r 基除去条件である強酸性条件下、4-ニトロフェニル基が十分安定に存在することを確認した。よって4-ニトロフェニル基をスルホン酸の保護基として採用することとした。

2. ${}^m{}^5\text{U}$ 及び ${}^m{}^5\text{s}^2\text{U}$ モノマーの合成

次に、塩基修飾部位への保護基の導入反応を検討した。有機溶媒に難溶なタウリンを直接扱うことを避け、5-アミノメチルウリジン誘導体とビニルスルホン酸フェニルエステルの Michael 付加型反応によりタウリン骨格を構築し、その後アミノ基の保護を行なうことが効率的であることがわかった。タウリン骨格構築反応において、副反応が危惧される遊離の水酸基はシリル基により保護を行なうこととした。その際、2'水酸基の保護基である TBDMS 基の位置選択的な導入も可能となる。5-ヒドロキシメチルウリジン誘導体を出発物質とし、各ステップ良好な収率で ${}^m{}^5\text{U}$ 及び ${}^m{}^5\text{s}^2\text{U}$ のモノマー合成に成功した (Scheme 2)。

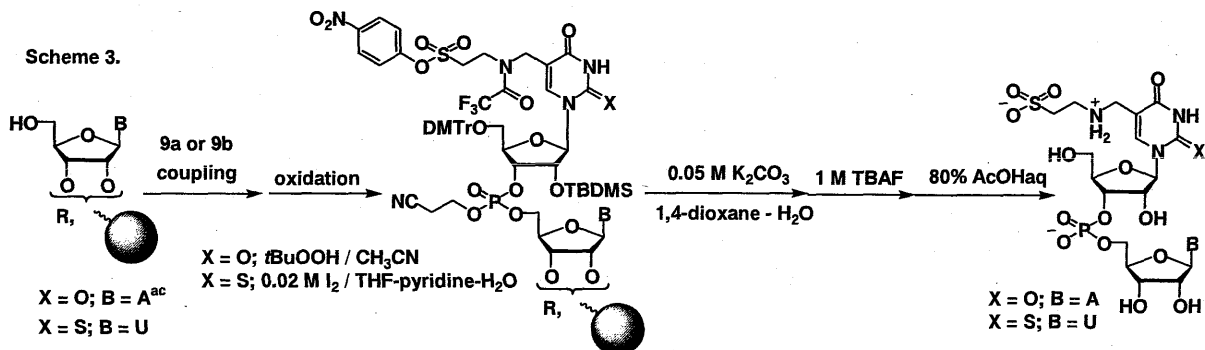
Scheme 2.



s^2U 誘導体 (1b) について、アジド化の際、4a 合成時と同様に有機溶媒難溶のアジ化ナトリウムを用いると、加熱を要するために硫黄原子へのアルキル化を伴う副反応が起こることがわかった。そこで、より穏和な条件下で反応を行なうために、より脂溶性の高いアジド化剤であるテトラメチルグアニジニウムアジドを用いることとした。室温で反応を試みたところ、良好な収率で 4b を得ることに成功した。

3. 固相法への応用

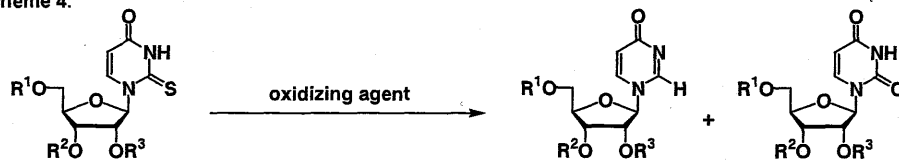
モノマー合成を達成したので、9a、9b を用いて固相上での RNA 鎖伸長反応を行ない、二量体を合成することで、固相法への応用を試みた (Scheme 3)。tRNA のアンチコドン配列では、 tm^5U 、 tm^5s^2U の下流側にはそれぞれ A、U が存在することが多いことを考慮して、 tm^5UpA 及び tm^5s^2UpU の合成を行なうこととした。縮合反応時の活性化剤として、 tm^5U についてはベンズイミダゾリウムトリフラート、 tm^5s^2U については N-フェニルイミダゾリウムトリフラートをそれぞれ用いた。



いずれのモノマーも、良好な収率で縮合反応が進行していることを DMTr^+ 定量により確認した。縮合後、それぞれについて固相担体からの切り出し及び脱保護を行ない、RP-HPLC 及び MALDI-TOF-MS による分析を行なった。 tm^5UpA については主生成物として目的物が得られることがわかった。しかし tm^5s^2UpU については、目的物は得られているものの、脱硫体である tm^5UpU をはじめとする種々の副反応生成物が確認された。

一般に、 s^2U 誘導体は種々の酸化反応条件下において、脱硫などの副反応が報告されている (Scheme 4)。これらの副反応生成物は硫黄原子が酸化され、硫酸イオンや亜硫酸イオンとして脱離することにより生じるものと考えられている。

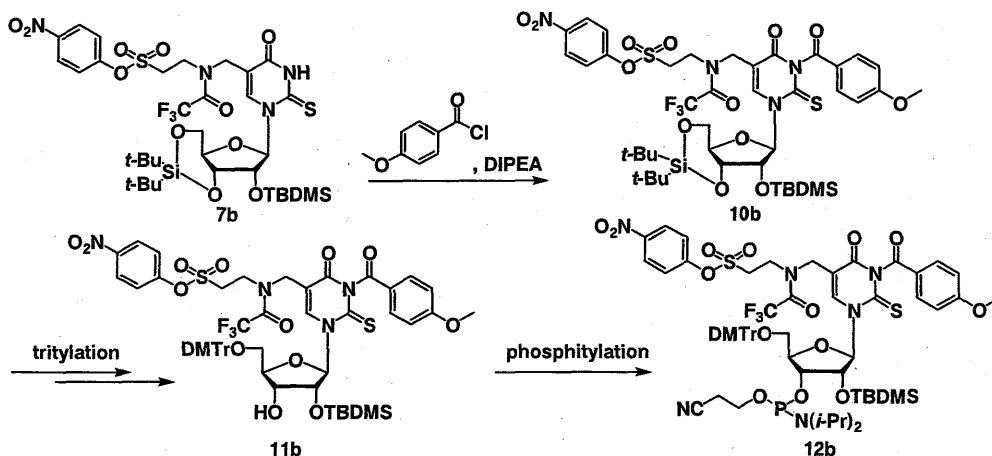
Scheme 4.



今回の固相合成の際に用いた 0.02 M I_2 溶液は、未修飾 s^2U 誘導体について、上述の副反応が起こらないことが知られている酸化反応条件である。それにもかかわらず、 tm^5s^2U について副反応が進行した理由として、タウリン骨格に電子求引性の保護基を導入したことで N^3 位イミドの酸性度が上昇し、反応中に生成するチオラートが酸化剤と反応したことが考えられる。

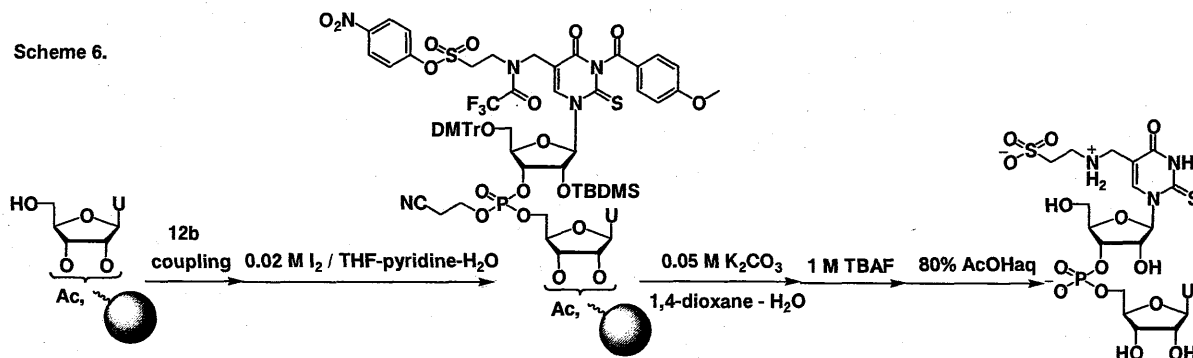
そこで、N³位をアニソイル基で保護することで、硫黄原子の電子密度を下げ、またチオラートの生成を抑制することで硫黄原子に対する酸化反応を抑制することを検討した (Scheme 5)。

Scheme 5.



得られた $\text{tm}^5\text{s}^2\text{U}$ モノマーについて、固相法により $\text{tm}^5\text{s}^2\text{UpU}$ の合成を行なった (Scheme 6)。酸化反応条件は0.02 M I_2 溶液を用いた。

Scheme 6.



縮合後、固相担体からの切り出し及び保護基を除去し、RP-HPLC 及び MALDI-TOF-MS による分析を行なったところ、酸化剤による副反応が顕著に抑制されていることが確認された。以上のように、 $\text{tm}^5\text{s}^2\text{U}$ について、N³位を保護したモノマーを用いることで、固相合成に適用可能となった。

【結論】

本研究では、タウリン骨格に存在する酸性度の大きなスルホン酸残基を4-ニトロフェニル基で保護することにより、 tm^5U 及び $\text{tm}^5\text{s}^2\text{U}$ モノマーを合成することに成功した。また $\text{tm}^5\text{s}^2\text{U}$ については、N³位をアニソイル基で保護することにより、酸化反応条件下における副反応を抑制することに成功した。これらのモノマーは、固相合成法に適用可能であり、 tm^5U 及び $\text{tm}^5\text{s}^2\text{U}$ を含む RNA オリゴマーを化学合成することが可能となった。この手法で得られたオリゴマーを用いて、tRNA のアンチコドンステム-ループ構造を NMR により解析や、コドン-アンチコドンの二本鎖安定性を T_m 値として測定することが可能になるものと期待できる。

【発表論文】

1. Chemical synthesis of RNA including 5-taurinomethyluridine. Ogata, T.; Wada, T. *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* **2006**, *50*, 9-10.
2. Chemical synthesis of RNA including 5-taurinomethyluridine and 5-taurinomethyl-2-thiouridine. Ogata, T.; Wada, T. *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* **2008**, *52*, 323-324.
3. Chemical synthesis and properties of 5-taurinomethyluridine and 5-taurinomethyl-2-thiouridine. Ogata, T. *et al. submitted.*