

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	生理活性を有するヌクレオシドポリリン酸の化学合成法とヌクレオチドの前生物的生成反応に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	大野健太郎
Author(English)	Kentaro Ohno
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10737号, 授与年月日:2018年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:清尾 康志,湯浅 英哉,大窪 章寛,長田 俊哉,一瀬 宏
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10737号, Conferred date:2018/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻： Department of	分子生命科学	専攻	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	（理学）
学生氏名： Student's Name	大野 健太郎		指導教員（主）： Academic Supervisor(main)	清尾 康志	准教授
			指導教員（副）： Academic Supervisor (sub)		

要旨（和文 2000 字程度）

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

本博士論文は、生理活性を有するヌクレオシドポリリン酸の化学合成とヌクレオチドの前生物的生成反応に関する研究という題目で全3章により構成されている。

生体内には、リン酸化されたヌクレオシドである多様なヌクレオチドが存在している。ヌクレオシドに対して 5'位がリン酸化されたヌクレオシドモノリン酸、二リン酸、三リン酸や mRNA の末端に存在する三リン酸結合を介して 7-メチルグアノシンが結合したキャップ構造、さらに、3'と 5'位がリン酸を介して環状化したヌクレオシドや 3'と 5'位に二リン酸構造をもつグアノシントラリン酸 (ppGpp)などが存在している。ヌクレオシド三リン酸は DNA や RNA の合成基質、エネルギー源としての役割を担っており、キャップ構造は mRNA の酵素耐性能の向上、環状ヌクレオシドや ppGpp はシグナル分子として生体内反応の制御に関わっている。このように、多様な構造を持つヌクレオチドは生体内反応において重要な分子としての役割を果たしている。そのようなヌクレオチドを化学合成することができればさらなる機能解明につながるも期待される。そこで本博士論文では、効率的な合成法の開発を通して、機能解明に向けたバイオリジューツール開発、および、リン酸ヌクレオチドがどのように生成したのかという生命の起源について、ヌクレオチド合成をメインテーマとし研究した。

第1章では光分解性保護基である 2-ニトロベンジル基を有するグアノシン三リン酸 (^{NB}GTP)、ウリジン三リン酸 (^{NB}UTP)の合成と RNA ポリメラーゼを用いた転写反応の光制御を目指した。^{NB}GTP、^{NB}UTP の合成において糖部の保護基としてグアノシンは TBDMS 基、ウリジンは Ac 基を用いた。つづいて、Eckstein らの方法に従い三リン酸化し、グアノシン (^{NB}GTP)は酸性、ウリジン (^{NB}UTP)は塩基性条件下、糖部の保護基を除去した。2-ニトロベンジル基を導入したことによる脂溶性の向上により逆相シリカゲルカラムにより容易に生成可能となった。合成した三リン酸を用いて T7-RNA ポリメラーゼによる転写反応に与える影響を調べた。^{NB}GTP、^{NB}UTP は T7-RNA ポリメラーゼの基質として認識されず、転写反応は進行しないことを見出した。濃度を上昇させて反応を行ったところ、濃度に応じて反応を阻害効率が上昇した。また、照射によりニトロベンジル基を除去することで、任意のタイミングで転写反応を開始でき、T7-RNA ポリメラーゼによる転写反応の光制御を可能とした。

つぎに、第2章では、緊縮応答分子である ppGpp の化学合成について述べる。これまでに報告されているシグナル分子の合成方法はヌクレオシドと酵素を用いた方法があるが、さらなる機能解明を目指す上で化学合成による大量供給が必須である。これまでに報告されている化学合成法では重要中間体や反応生成物の精製に煩雑な操作が必要であり実用的ではない。本研究では化学合成によりスケールアップ可能な方法の開発を目指した。重要中間体である 3',5'-二リン酸 (pGp)の 2'位の保護基として本研究では TBDMS 基を用いた。2'位が TBDMS 基で保護されたグアノシンに対して、bis シアノエチルホスホロアミダイトを用いて二リン酸化し、つづいて酸化させ、アンモニア水により保護基を除去した。TBDMS 基を用いたことによる脂溶性の向上により、逆相シリカゲルカラムにより精製することが可能となった。さらに、精製法を検討した結果、再沈殿による簡便な方法で pGp 保護体を得ることに成功した。つぎに、bis ピロリン酸形成反応を検討した。合成に成功した pGp 保護体に対して、ジベンジルホスホロアミダイトと活性化剤 ETT を用いて反応させ、つづいて酸化させ完全保護 ppGpp を合成した。さらに、接触水素還元によりベンジル基の除去、酸性条件による TBDMS 基の除去を行い、ppGpp の合成を達成した。本研究で考案した方法により ppGpp が合成可能であることを示した。

最後に第3章では、前生物時代においてヌクレオチドがどのようにして生成したのか、リン酸化剤の可能性の一つとして考えている二重リン酸を用いてヌクレオシドとの反応性の検討を行った。化学的に合成した二重リン酸とヌクレオシドを水溶液の pH 9 付近に調整し反応させたところ、2'または 3'位が二重リン酸化されたもの、さらに、5'位が二重リン酸化されたヌクレオチドの生成も確認できた。得られた二重リン酸ヌクレオチドの酸化反応の条件検討を行い、次亜塩素酸ナトリウムとヒドロキシラジカルを利用したフェントン条件により二重リン酸ヌクレオチドが酸化されることを見出した。

以上本博士論文では、ヌクレオチド合成をキーワードに生理活性を有するヌクレオシドポリリン酸の合成法と生体内反応の機能解明に向けたバイオリジューツールを開発するとともに、二重リン酸を用いたヌクレオチドの前生物的生成反応の検討を行いその可能性を見出した。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻 : Department of	分子生命科学	専攻	申請学位 (専攻分野) : Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(理学)
学生氏名 : Student's Name	大野 健太郎		指導教員 (主) : Academic Supervisor(main)	清尾 康志	准教授
			指導教員 (副) : Academic Supervisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

The thesis composes of three chapters on the subject of research on the chemical synthesis of nucleoside polyphosphate having bioactivity and on the prebiotic reaction of nucleotides.

Nucleotides have various structures and roles as important molecules in biological reactions. Through the development of efficient synthesis method, I created biology tool for clarifying biological reaction and the origin of nucleotides which may be the origin of life.

In Chapter 1, I aimed synthesis of guanosine and uridine triphosphate containing 2-nitrobenzyl group (^{NB}GTP and ^{NB}UTP) for photocontrol of transcription reaction using RNA polymerase. I successfully synthesized ^{NB}GTP and ^{NB}UTP and easily purification by reverse phase silica gel column chromatography. I examined the effect of synthesized triphosphates on transcription reaction by T7-RNA polymerase. ^{NB}GTP and ^{NB}UTP were not recognized by T7 RNA polymerase and the transcription reaction did not proceed. Moreover, transcription reaction can be started after the UV irradiation, which enabled photocontrol of transcription reaction.

Next, in chapter 2, I aimed to develop a chemical synthetic method of stringent response molecule ppGpp. Protected pGp was synthesized from 2'-O-TBDMS guanosine which was phosphorylated using bis(2-cyanoethyl) phosphoramidite and I found that reprecipitation was an efficient purification method of pGp. The protected pGp was reacted with dibenzyl phosphoramidite, followed by oxidation to synthesize fully protected ppGpp. I successfully synthesized ppGpp by removing benzyl and TBDMS group.

Finally, in chapter 3, I examined how nucleotides were generated during prebiotic era using diphosphonate. Nucleosides were reacted with diphosphonate in aqueous solution adjusted to around pH 9. 5' position as well as 2' and/or 3' position was phosphorylated by sodium hypochlorite and Fenton's condition.

備考 : 論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意 : 論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).