(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5201639号
(P5201639)

(45)発行日　平成25年6月5日(2013.6.5)　(24)登録日　平成25年2月22日(2013.2.22)

(51)Int.Cl.		F I	
C12N 15/09	(2006.01)	C12N 15/00	A
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q 1/68	ZNAZ
C07D 487/14	(2006.01)	C07D 487/14	

請求項の数 6　（全 45 頁）

(21)出願番号	特願2010-502852 (P2010-502852)
(86)(22)出願日	平成21年3月11日 (2009.3.11)
(86)国際出願番号	PCT/JP2009/054675
(87)国際公開番号	WO2009/113580
(87)国際公開日	平成21年9月17日 (2009.9.17)
審査請求日	平成22年11月18日 (2010.11.18)
(31)優先権主張番号	特願2008-61751 (P2008-61751)
(32)優先日	平成20年3月11日 (2008.3.11)
(33)優先権主張国	日本国(JP)

(73)特許権者　503360115
独立行政法人科学技術振興機構
埼玉県川口市本町四丁目１番８号
(74)代理人　110000110
特許業務法人快友国際特許事務所
(72)発明者　上野　義仁
岐阜県岐阜市平和通２－２３－１－３０４
(72)発明者　北出　幸夫
岐阜県岐阜市伊奈波通３－１

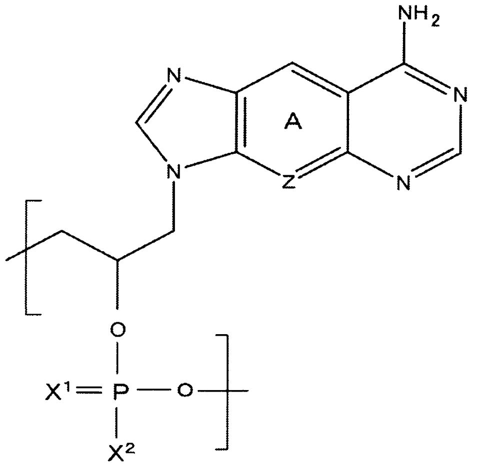
審査官　三上　晶子

最終頁に続く

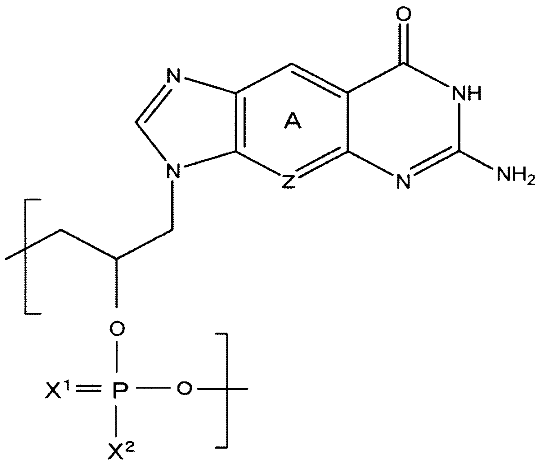
(54)【発明の名称】ＲＮＡ選択的ハイブリダイズ試薬及びその利用

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下の式（５）及び式（６）のいずれかで表される、１種又は２種以上のヌクレオチド誘導体単位を備える、ＲＮＡハイブリダイズ試薬。

【化１５】



(5)



(6)

（ただし、式（５）及び式（６）中、Ｚは、炭素原子又は窒素原子を表し、X^1は、Ｏ、Ｓ又はＳｅを表し、X^2は、ＳＨ（若しくはＳ$^-$）、Ｓ又はＳｅ$^-$、炭素数１～４個のアルキル基又はモルホリノ基を表す。）

【請求項２】

前記ヌクレオチド誘導体単位は、式（５）で表され、前記Ｚは窒素原子ある、請求項１に記載のＲＮＡハイブリダイズ試薬。

【請求項３】

前記ヌクレオチド誘導体単位を末端に備える、請求項１又は２に記載のハイブリダイズ試薬。

【請求項４】

ステムーループ構造を形成可能な塩基配列を有し、前記ループに前記ヌクレオチド誘導体単位を備える、請求項１～３のいずれか一項に記載のハイブリダイズ試薬。

【請求項５】

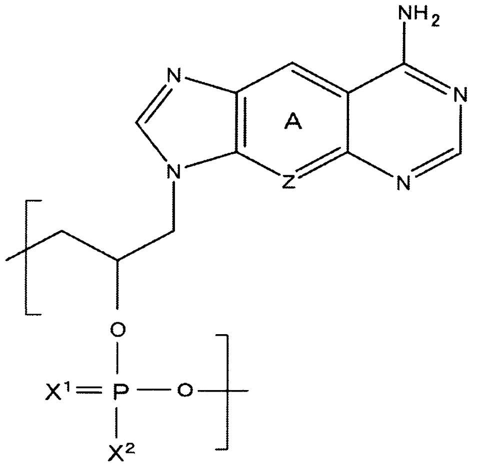
ＲＮＡ上の変異を検出するためのプローブセットであって、

以下の式（５）及び式（６）のいずれかで表される１種又は２種以上のヌクレオチド誘導体単位を前記変異部位に相当する５’末端又は３’末端に備える第１のプローブと、

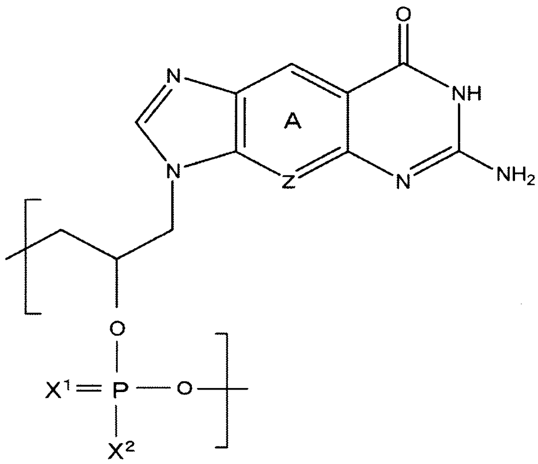
前記変異部位において存在可能性のある塩基に相補的な塩基を有するデオキシヌクレオチドを前記変異部位に相当する３’末端又は５’末端に備える１種又は２種以上の第２のプローブと、

を含むプローブセット。

【化１６】



（５）



（６）

（ただし、式（５）及び式（６）中、Ｚは、炭素原子又は窒素原子を表し、Ｘ^{1}は、Ｏ、Ｓ又はＳｅを表し、Ｘ^{2}は、ＳＨ（若しくはＳ$^-$）、Ｓ又はＳｅ$^-$、炭素数１～４個のアルキル基又はモルホリノ基を表す。）

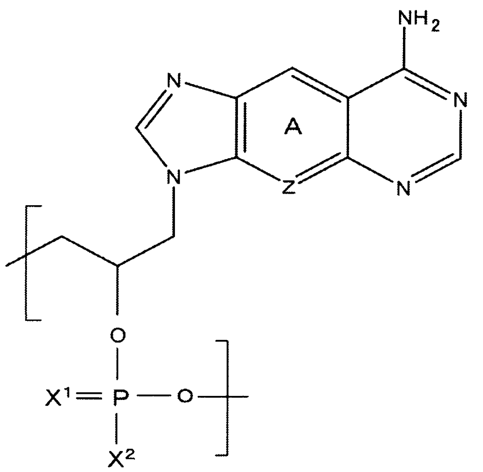
【請求項６】

一塩基多型の検出方法であって、

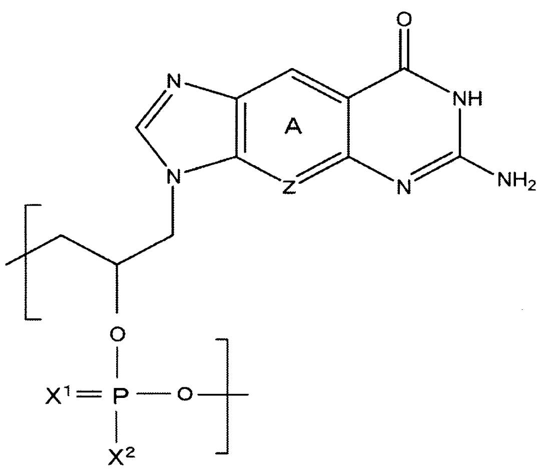
以下のプローブセット：

以下の式（５）及び式（６）のいずれかで表されるヌクレオチド誘導体単位を前記一塩基多型部位に相当する５’末端又は３’末端に備える第１のプローブと、前記一塩基多型部位において存在可能性のある塩基に相補的な塩基を有するデオキシヌクレオチドを前記一塩基多型部位に相当する３’末端又は５’末端に備える１種又は２種以上の第２のプローブと、を含むプローブセット、

【化１７】



（５）



（６）

（ただし、式（５）及び式（６）中、Ｚは、炭素原子又は窒素原子を表し、Ｘ^{1}は、Ｏ、Ｓ又はＳｅを表し、Ｘ^{2}は、ＳＨ（若しくはＳ$^-$）、Ｓ又はＳｅ$^-$、炭素数１～４個のアルキル基又はモルホリノ基を表す。）
から選択される１種の前記第１のプローブと１種の前記第２のプローブとを組み合わせて得られる１種又は２種以上の組み合わせで前記第１のプローブ及び前記第２のプローブと、前記一塩基多型を含む可能性のある遺伝子発現産物としてのＲＮＡ試料と、をハイブリダイゼーション可能に接触させる工程と、
　前記ＲＮＡ試料と前記第１のプローブと前記第２のプローブとのハイブリダイズ産物の前記第１のプローブに基づく蛍光シグナルを検出する工程と、
を備える、検出方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
　本発明は、ＲＮＡに対して高い選択性でハイブリダイズするハイブリダイズ試薬及びその用途に関する。
【背景技術】
【０００２】
遺伝子発現産物につき、種々の解析手法が知られている。例えば、in situ ハイブリダイゼーション、蛍光共鳴エネルギー移動、蛍光偏光の解消等を利用した方法等が挙げられる。これらの各種解析手法において特定の塩基配列を検出するためのプローブやプライマーなどが用いられるが、解析の目的によりプローブ等に求められる特性は相違する。

【０００３】
これまで特定の塩基配列を検出するためのプローブ等につき、種々の修飾や改変がなされたヌクレオシド誘導体が開発されてきている。例えば、ペプチド核酸（ＰＮＡ）やブリッジ型核酸（ＢＮＡ）が挙げられる。さらに、糖部開環型のヌクレオチド誘導体も各種報告されている（非特許文献１～７）。また、塩基における環拡張型の修飾も試みられている（非特許文献８、９）

【０００４】
【非特許文献１】P.E.Nielsen, M.Egholm, R.H.Berg, O.Buchardt, Science, 254, 497 (1991).
【非特許文献２】S.Obika, D.Nanbu, Y.Hari, J.Andoh, K.Morio, T.Doi, T.Imanishi, Tetrahedron Lett., 39, 5401 (1998).
【非特許文献３】K.C.Schneider, S.A.Benner, J. Am. Chem. Soc., 112, 453 (1990).
【非特許文献４】K.Augustyns, A.V.Aerschot, A.V.Schepdael, C.Urbanke, P.Herdewijn, Nucleic Acids Res., 19, 2589 (1991).
【非特許文献５】M.Azymah, C.Chavis, M.Lucas, F.Morvan, J.-L.Imbach, Nucleosides & Nucleotides, 11, 1241 (1992).
【非特許文献６】P.Nielsen, F.Kirpekar, J.Wengel, Nucleic Acids Res., 22, 703 (1994).
【非特許文献７】L.Zang, A.Peritz, E.Meggers, J. Am. Chem. Soc., 127, 4174 (2005).
【非特許文献８】N.Minakawa, N.Kojima, S.Hikishima, T.Sasaki, A.Kiyosue, N.Atsumi, Y.Ueno, A.Matsuda, J. Am. Chem. Soc., 125, 9970 (2003).
【非特許文献９】H.Liu, J.Gao, L.Maynard, Y.D.Saito, E.T.Kool, J. Am. Chem. Soc., 126, 1102 (2004).

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

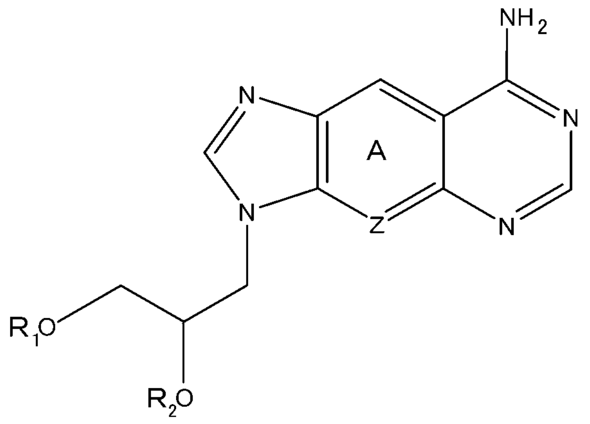
【０００５】
遺伝子発現の最初の産物は、転写産物であるＲＮＡであることから、ＲＴ－ＰＣＲでＤＮＡとして検出するよりも、ＲＮＡに対してＤＮＡよりも高い選択性でハイブリダイズするものであることが好ましい。また、ＲＮＡとハイブリダイズすることで細胞内においてＲＮＡをリアルタイムで検出することも求められる。

【０００６】
ＰＮＡは、リン酸部位の電荷を排除することで静電反発を減少させて、ＰＮＡ／ＤＮＡの二重鎖がＤＮＡ／ＤＮＡの二重鎖よりも強い結合を形成することを意図したものである。また、ＢＮＡは、リボース環の２’位と４’位とを架橋して予めＮ型構造に固定することで、標的となるＤＮＡやＲＮＡに対する結合親和性を高めている。このため、ＰＮＡ及びＢＮＡのいずれも、ＤＮＡ及びＲＮＡの双方に対して安定性を向上させてしまう。すなわち、ＲＮＡのみならずＤＮＡに対しても同様に高い親和性を示してしまう。また、各種の糖部開環型の誘導体のほとんどは、ＤＮＡおよびＲＮＡとのハイブリッドをいずれも熱的に大きく不安定化してしまうことが知られている。さらに、環拡張型ヌクレオチドは、本発明者らによれば、ＲＮＡとは安定はハイブリッドを形成しないことがわかった。

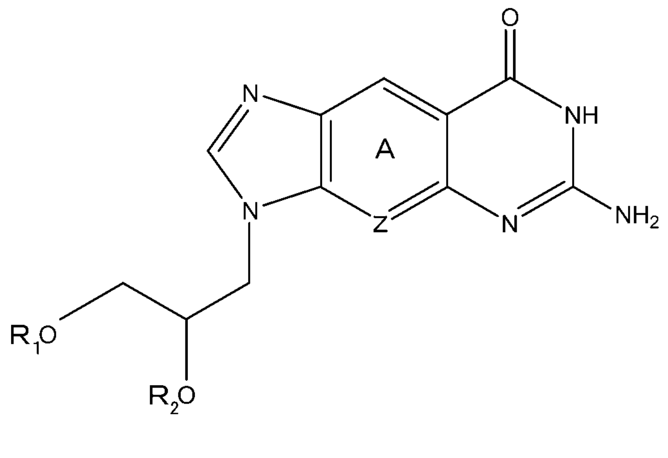
【０００７】
また、ＲＮＡに対して塩基特異性を有することで、ＳＮＰを遺伝子発現レベルで検出することができることができる程度に塩基特異性の高い対ＲＮＡ用のハイブリダイズ試薬は提供されていない。

【０００８】
そこで、本発明は、ＲＮＡに対して高い親和性を有するヌクレオシド誘導体及びその製造方法を提供することを一つの目的とする。また、本発明は、塩基識別能を有するヌクレオシド誘導体及びその製造方法を提供することを他の一つの目的とする。このようなヌクレオシド誘導体のハイブリダイズ試薬としての用途を提供することを他の一つの目的とす

る。
【課題を解決するための手段】
【０００９】
本発明者らは、ＤＮＡ／ＤＮＡ二重鎖及びＤＮＡ／ＲＮＡ二重鎖の構造比較に基づき、糖部開環のＤＮＡ／ＲＮＡ二重鎖の安定性への影響及び塩基特異性への影響を検証し、その結果を詳細に検討したうえ、ＤＮＡ／ＲＮＡ二重鎖を安定化し、しかも、塩基識別能を有するヌクレオチド構造を見出し、本発明を完成した。本発明によれば以下の手段が提供される。
【００１０】
　本発明によれば、以下の式（１）及び式（２）のいずれかで表されるヌクレオシド誘導体が提供される。
【化１】



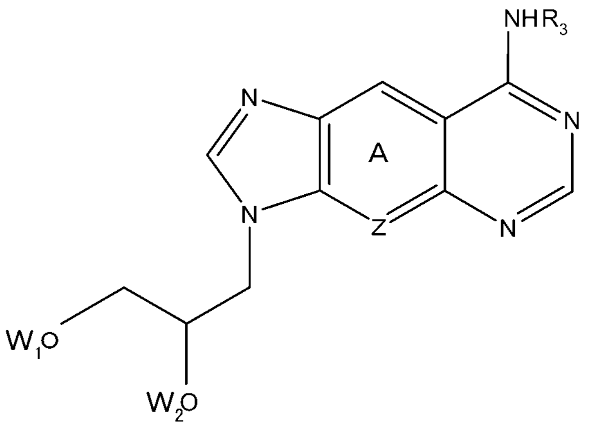
(1)



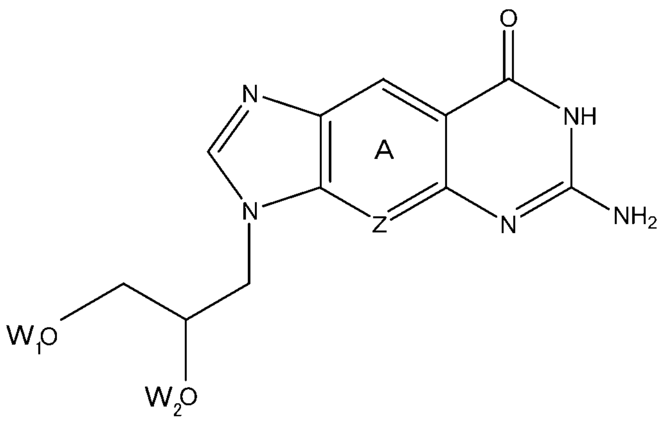
(2)

（ただし、式（１）及び式（２）中、Ｚは、炭素原子又は窒素原子を表し、Ｒ$_1$は、水素原子又は水酸基保護基を表し、Ｒ$_2$は、水素原子又はホスホジエステル基を表す。）
【００１１】
　前記ヌクレオシド誘導体は、式（１）で表され、前記Ｚは窒素原子であることが好ましい。
【００１２】
　本発明によれば、以下の式（３）及び（４）で表されるヌクレオシド誘導体が提供される。

【化２】



（3）



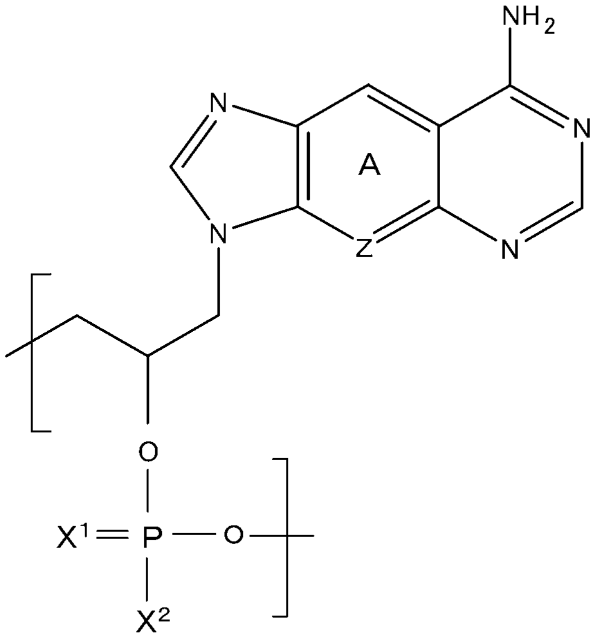
（4）

（ただし、式（３）及び式（４）中、Ｚは、炭素原子又は窒素原子を表し、Ｗ$_1$は水素原子又は水酸基保護基を表し、Ｗ$_2$は、水酸基保護基、ホスホルアミダイト基又は固相担体に結合される若しくは結合された連結基を表し、Ｒ$_3$は、水素原子又はアミノ保護基を表す。）

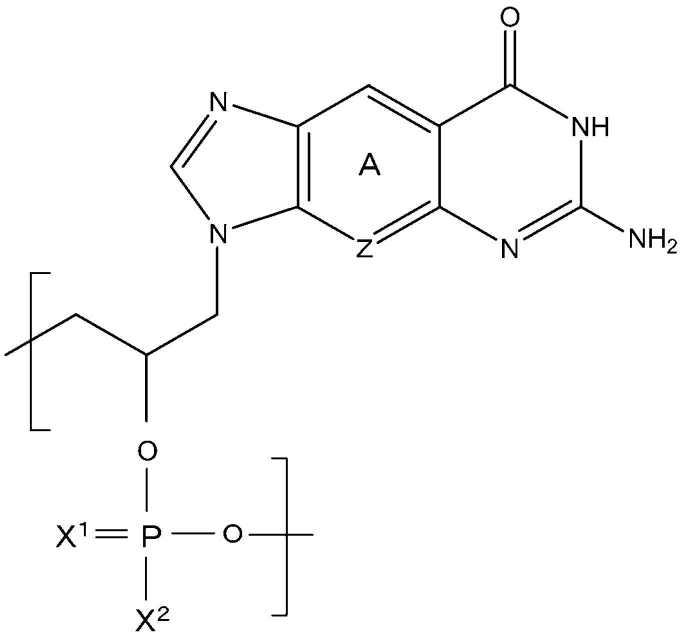
【００１３】

本発明によれば、以下の式（５）及び式（６）のいずれかで表される１種又は２種以上のヌクレオチド誘導体単位を備えるオリゴヌクレオチドが提供される。

【化３】



（5）



（6）

（ただし、式（５）及び式（６）中、Ｚは、炭素原子又は窒素原子を表し、Ｘ^{1}は、Ｏ、Ｓ又はＳｅを表し、Ｘ^{2}は、ＳＨ（若しくはＳ$^-$）、Ｓ又はＳｅ$^-$、炭素数１～４個のアルキル基又はモルホリノ基を表す。）

【００１４】

本発明によれば、上記式（５）及び式（６）のいずれかで表される１種又は２種以上のヌクレオチド誘導体単位を備える、ＲＮＡハイブリダイズ試薬が提供される。

【００１５】

本発明のハイブリダイズ試薬において、前記ヌクレオチド誘導体単位は、式（５）で表され、前記Ｚは窒素原子であることが好ましい。また、前記ヌクレオチド誘導体単位を末端に備えることも好ましい。さらに、ステム－ループ構造を形成可能な塩基配列を有し、前記ループに前記ヌクレオチド誘導体単位を備えることも好ましい。

【００１６】

本発明によれば、ＲＮＡ上の変異を検出するためのプローブセットであって、上記式（５）及び式（６）のいずれかで表される１種又は２種以上のヌクレオチド誘導体単位を前記変異部位に相当する５’末端又は３’末端に備える第１のプローブと、前記変異部位において存在可能性のある塩基に相補的な塩基を有するデオキシヌクレオチドを前記変異部位に相当する３’末端又は５’末端に備える１種又は２種以上の第２のプローブと、を含むプローブセットが提供される。

【００１７】

本発明によれば、一塩基多型の検出方法であって、前記一塩基多型を含む可能性のある遺伝子発現産物としてのＲＮＡ試料を準備する工程と、上記本発明のプローブセットから選択される１種の前記第１のプローブと１種の前記第２のプローブとを組み合わせて得られる１種又は２種以上の組み合わせで前記第１のプローブ及び前記第２のプローブと、前記ＲＮＡ試料と、をハイブリダイゼーション可能に接触させる工程と、前記ＲＮＡ試料と前記第１のプローブと前記第２のプローブとのハイブリダイズ産物の前記第１のプローブに基づく蛍光シグナルを検出する工程と、を備える、検出方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【００１８】

【図１】ＤＮＡ／ＤＮＡ二重鎖とＤＮＡ／ＲＮＡ二重鎖とのリン酸間距離及びそれに基づくヌクレオシドの改変を示す図である。

【図２】一次改変ヌクレオシド誘導体のＤＮＡ／ＤＮＡ二重鎖の熱的安定性及び塩基選択性の評価結果を示す図である。

【図３】一次改変ヌクレオシド誘導体のＤＮＡ／ＲＮＡ二重鎖の熱的安定性及び塩基選択性の評価結果を示す図である。

【図４】一次改変ヌクレオシドのＭＯＥに基づくモデリング結果を示す図である。

【図５】二次改変ヌクレオシド誘導体（本発明のヌクレオシド誘導体）の作製について示す図である。

【図６】二次改変ヌクレオシド誘導体を含むオリゴヌクレオチドのＤＮＡ／ＲＮＡ二重鎖及びＤＮＡ／ＤＮＡ二重鎖の熱的安定性（Ｔｍ値）を示すグラフ図である。

【図７】ＤＮＡ／ＲＮＡ二重鎖及びＤＮＡ／ＤＮＡ二重鎖における二次改変ヌクレオシド誘導体の塩基選択性（Ｔｍ値）を示すグラフ図である。

【図８】二次改変ヌクレオシド誘導体の蛍光スペクトルを示す図である。

【図９】本発明のプローブセットの一例を示す図である。

【図１０】実施例３においてF-3，F-4の熱安定性（DNAとの二重鎖）の評価結果を示す図である。

【図１１】実施例３においてF-3，F-4の熱安定性（RNAとの二重鎖）の評価結果を示す図である。

【図１２】実施例４において二本鎖状態にしたF-1と相補RNAとの熱的安定性を50％融解温度T_mを測定することで比較した。融解曲線とT_m値とを示す図である。

【図１３】実施例５において蛍光分光装置（日立－F4500)にて蛍光測定を行い、励起波長及び蛍光波長を示す図である。

【図１４】励起光(λ_{ex}=338 nm)を照射したときのそれぞれの蛍光波長と蛍光強度のグラフを示す図である。

【図１５】実施例７において励起光(λ_{ex}=338 nm)を照射したときのそれぞれの蛍光波長と蛍光強度のグラフを示す図である。

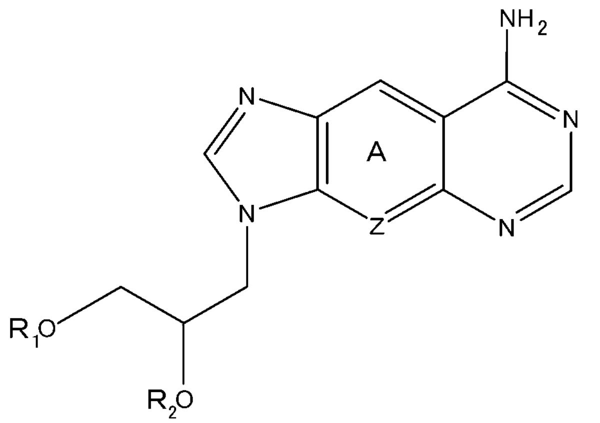
【図１６】実施例８において励起光(λ_{ex}=338 nm)を照射したときのそれぞれの蛍光波長と蛍光強度のグラフを示す図である。

【発明を実施するための形態】

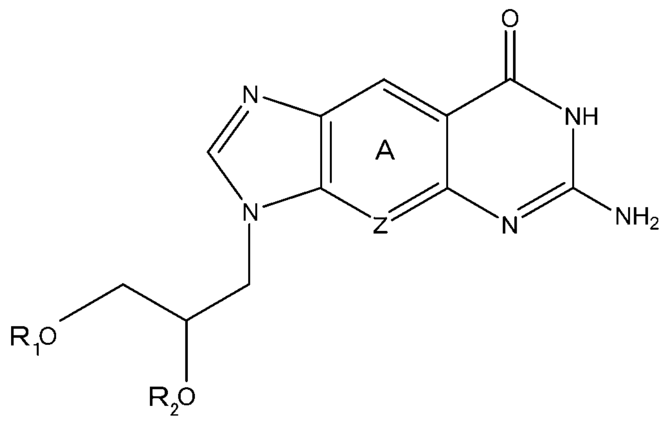
【００１９】

本発明は、以下の式（１）及び式（２）のいずれかで表される新規なヌクレオシド誘導体及びその利用に関する。

【化４】



（1）



（2）

（ただし、式（１）及び式（２）中、Ｚは、炭素原子又は窒素原子を表し、$Ｒ_1$は、水素原子又は水酸基保護基を表し、$Ｒ_2$は、水素原子又はホスホジエステル基を表す。）

【００２０】

本発明者らは、上記した課題を解決するべく、種々の検討を行った。第１に、ＤＮＡ／ＤＮＡ二重鎖及びＤＮＡ／ＲＮＡ二重鎖における隣接するリン酸間距離に着目し、次いで、リン酸間距離を減少させることのできるヌクレオシド誘導体につき、二重鎖の熱的安定性及びその楮について検討した結果、熱的安定性と塩基選択性との双方を両立する構造を見出した。

【００２１】

本発明者らは、ＲＮＡ／ＲＮＡ二重鎖（Ａ型二重鎖）のリン酸間の距離（塩基間の距離）は、ＤＮＡ／ＤＮＡ二重鎖（Ｂ型二重鎖）と比較して短いことに着目し、リン酸バックボーンのリン酸間を天然ヌクレオシドの三炭素から二炭素に減少させた。また、本発明者らは、塩基選択性を高めるために、核酸塩基部位を天然ヌクレオシドとは異なる３環性とした。こうして得られたヌクレオシドアナログによれば、ＲＮＡに対して選択的に高い親和性があることがわかった。加えて、４００ｎｍを中心として強い蛍光を発することも明らかになった。こうした親和性及び蛍光特性を備えるヌクレオシドを備えることにより、薬剤耐性に関与するＰ糖タンパク質の遺伝子の遺伝子多型を検出できるという知見も得た。

【００２２】

本発明のヌクレオシド誘導体は、従来型に比較してＲＮＡ選択性が高いことから、アンチセンス、ｓｉＲＮＡ法などＲＮＡを標的として遺伝子治療や各種研究手法に活用することができる。また、本発明のヌクレオシド誘導体は、それ自体蛍光性であるため、遺伝子多型等の検出に極めて有利である。

【００２３】

以下、本発明の概要について図面を参照しながら説明する。図１は、ＤＮＡ／ＤＮＡ二重鎖とＤＮＡ／ＲＮＡ二重鎖とのリン酸間距離及びそれに基づくヌクレオシドの改変を示す図であり、図２は、一次改変ヌクレオシド誘導体のＤＮＡ／ＤＮＡ二重鎖の熱的安定性及び塩基選択性の評価結果を示す図であり、図３は、改変ヌクレオシド誘導体のＤＮＡ／ＲＮＡ二重鎖の熱的安定性及び塩基選択性の評価結果を示す図であり、図４は、改変ヌクレオシドのＭＯＥに基づくモデリング結果を示す図であり、図５は、二次改変ヌクレオシド誘導体（本発明のヌクレオシド誘導体）の作製について示す図である。さらに、図６は、二次改変ヌクレオシド誘導体を含むオリゴヌクレオチドのＤＮＡ／ＲＮＡ二重鎖及びＤＮＡ／ＤＮＡ二重鎖の熱的安定性（Ｔｍ値）を示すグラフ図であり、図７は、ＤＮＡ／ＲＮＡ二重鎖及びＤＮＡ／ＤＮＡ二重鎖における二次ヌクレオシドの塩基選択性（Ｔｍ値）を示すグラフ図であり、図８は、二次改変ヌクレオシド誘導体の蛍光スペクトルを示す図である。

【００２４】

なお、ＭＯＥは、分子力学法に基づくプログラムであり、図４のモデリング結果は、MMFF94xの力場を用いてプログラムを実行した。

【００２５】

図１に示すように、2種類の二重鎖構造につき、リン酸間の距離の平均を計算したところ、それぞれＤＮＡ／ＤＮＡ二重鎖については6.7Å、ＤＮＡ／ＲＮＡ二重鎖については５．７オングストロームであることがわかった。すなわち、ＤＮＡ／ＲＮＡ二重鎖におけるリン酸間距離は、はＤＮＡ／ＤＮＡ二重鎖と比較して短いことがわかった。そこで、本発明者らは、リン酸間の距離の違いに着目し、リン酸間距離を小さくするように、隣接するリン酸間を二炭素（通常のヌクレオシドは三炭素であるところ）としたプロピルアデニンおよびブチルアデニンを塩基アナログ体として使用することを考案し（一次改変ヌクレオシド誘導体の考案）、これを含むオリゴヌクレオチドを合成し、そのRNA選択性について検証した。検証は、DNA/DNAおよびDNA/RNAの両二重鎖の熱的安定性をＴｍ値で比較するとともに、ＲＮＡ中の４種類の塩基に対する塩基選択性をＴｍ値で比較した。結果を図２、３に示す。

【００２６】

図２に示すように、ブチル型のものではＤＮＡ／ＤＮＡおよびＤＮＡ／ＲＮＡの両二重鎖を熱的に不安定化してしまうのに対して、プロピル型ではＤＮＡとの二重鎖を熱的に不安定化するものの、ＲＮＡとの二重鎖を若干ではあるが熱的に安定化することが分かった。また、図３に示すように、未修飾のもの（各グラフの上段の４つのバー）と比較して改変したアナログ体（各グラフの中央部４つのバー及び下段４つのバー）では塩基選択性が低いということが分かった。

【００２７】

そこで、これらの２種類のアナログ体を導入したＤＮＡ／ＲＮＡ二重鎖のＭＯＥによるモデリングを実施したところ、図４に示すように、ブチル型（図４右側）のものでは水素結合に関与する原子間の距離が水素結合可能な３Å以内であるのに対して、プロピル型（図４左側）のものではそれ以上であり、水素結合を形成する為には不十分な長さであることが分かった。本発明者らは、ブチル型のものでは相補塩基までの距離は十分であるものの側鎖のフレキシビリティーが高く、二重鎖が熱的に不安定化してしまい、プロピル型のものでは側鎖のフレキシビリティーがより低く熱的安定性はブチル型より高く保持されるものの相補塩基までの距離が不十分である為に塩基選択性が低下したのではないかと推論した。

【００２８】

そこで、本発明者らは、プロピル型のアナログの塩基部位に相補塩基までの距離を確保する為にピリジン環を導入したこれらの誘導体を二次ヌクレオシド誘導体として設計し、ＤＮＡ合成用のアミダイト化合物及びオリゴヌクレオチドを合成した（図５参照）。図５に示すように、これらはいずれも三環性の化合物である。

【００２９】

図６に示すように、二次改変ヌクレオシド誘導体を含むオリゴヌクレオチド(ＤＮＡ)は、ＤＮＡとの二重鎖では不安定化するのに対し、ＲＮＡとの二重鎖では、誘導体数が増えると逆に二重鎖の熱的安定性が上昇することが分かった。また、図７に示すように、二次改変ヌクレオシド誘導体を含むオリゴヌクレオチド(ＤＮＡ)は、ＤＮＡが相補鎖の場合は選択性が低いのに対して、ＲＮＡが相補鎖の場合には、三環性にすることで一次改変ヌクレオシド誘導体よりも塩基選択性が向上することが分かった。

【００３０】

さらに、図８に示すように、二次改変ヌクレオシド誘導体は、４００ｎｍを中心に強い蛍光を持つことが分り、ハイブリダイズ産物を直接蛍光検出できること分かった。

【００３１】

以上のことから、本発明は、オリゴヌクレオチドにおいて隣接されるリン酸間距離を減少するためにプロピル基をデオキシリボースに替えた糖部開環構造を備え、相補塩基との間で水素結合形成可能な距離を確保するためにと環拡張型塩基構造を備えることで、対ＲＮＡ二重鎖安定性と塩基識別性を備えるヌクレオシド誘導体をそれを含むオリゴヌクレオチドを提供できることが分かった。さらに、こうした改変ヌクレオシド誘導体は蛍光を有することが判明したため、一塩基識別性を付与できることもわかった。

【００３２】

以下、本発明の各種実施形態につき詳細に説明する。

【００３３】

以下、本発明の実施の形態であるヌクレオシド誘導体、オリゴヌクレオチドこれらの製造方法及びそれに用いる化合物、これらの用途について詳細に説明する。なお、本発明に関する当業者の技術の範囲内である分子生物学および核酸化学の従来の技術は、文献中で説明されている。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring HarborLaboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989年；Gait, M.J., OligonucleotideSynthesis,編集（1984年）；Hames, B.D.およびHiggins, S.J.、Nucleic Acid Hybridization, 編集（1984年）；および一連のMethodsin Enzymology, Academic Press, Inc.を参照することができる。

【００３４】

（ヌクレオシド誘導体）

本発明のヌクレオシド誘導体は、式（１）又は式（２）で表される化合物である。これらの化合物において、Ｚは、炭素原子（ＣＨ）又は窒素原子を表している。

【００３５】

また、これらの化合物における環Ａの環構成炭素原子に結合する水素原子は置換されていなくてもよいし、置換されていてもよい。置換基としては、炭素数１～４個の鎖状アルキル基とすることが好ましい。すなわち、メチル基、エチル基、ｎ－プロピル基、イソプロピル基、ｎ－ブチル基、イソブチル基及びｔｅｒｔ－ブチル基が挙げられる。立体障害等を考慮したとき、メチル基及びエチル基を好ましく用いることができる場合がある。また、置換基の数も特に限定しないが、立体障害等が問題となる場合には、１個又は２個程度とすることが好ましい。

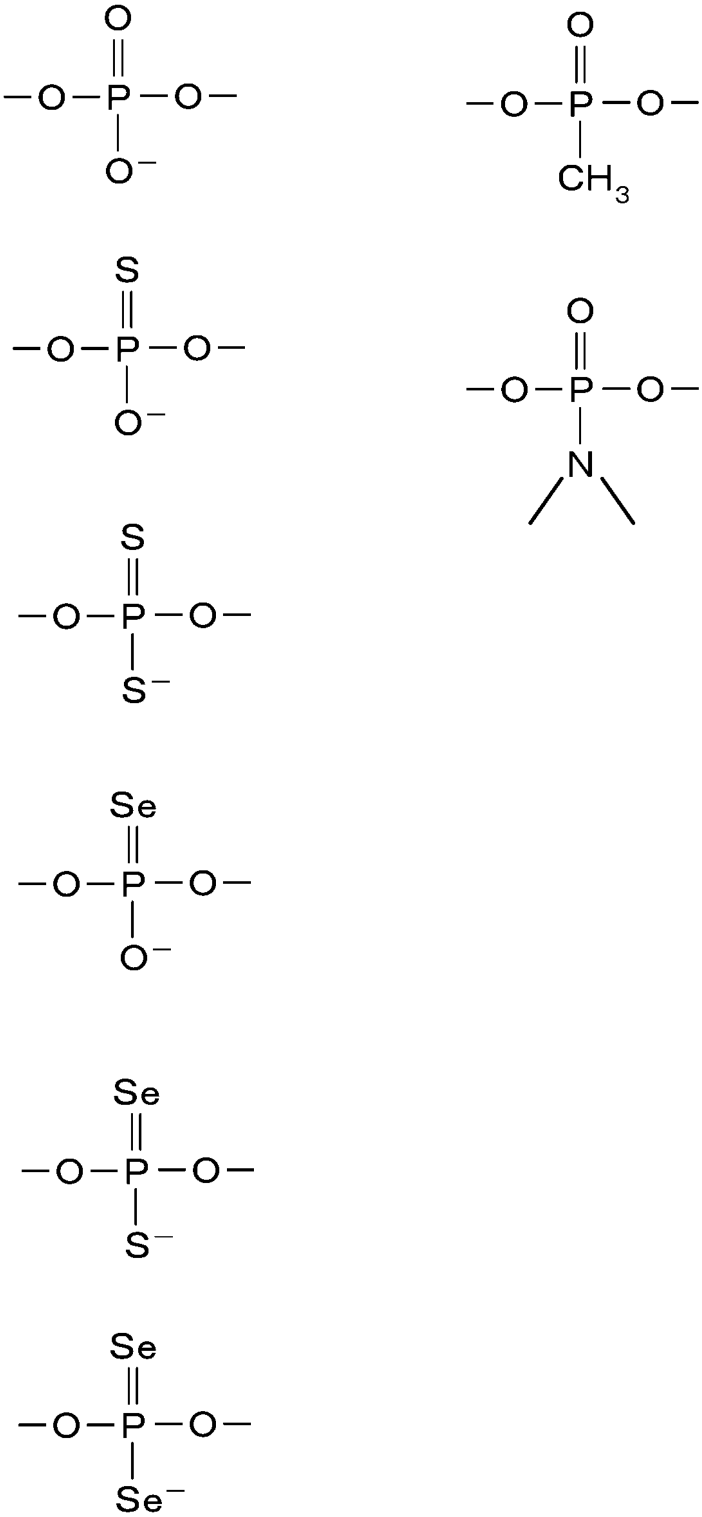
【００３６】

R_1は、水素原子又は水酸基保護基とすることができる。水酸基保護基は、公知のものを利用できる。具体例は、後段で説明するものと同様のものが挙げられる。また、R_2は、水素原子又はホスホジエステル基（PO_3）とすることができる。ホスホジエステル基としては特に限定しない。リン原子に二重結合で結合する１種の酸素原子に替えて、Ｏ、Ｓ又はＳｅとすることができ、他の水酸基（酸素イオン）に替えて、ＳＨ（若しくはS^-

）、Ｓ又はＳｅ$^{-}$、炭素数１～４個のアルキル基又はモルホリノ基とすることができる。これらＸ^{1}及びＸ^{2}の組み合わせによって得られる各種のホスホジエステル基としては、例えば、以下の式（７）の各種基（ただし炭素原子に連結される酸素原子が除かれたもの）が挙げられる。

【００３７】

【化５】



(7)

【００３８】

式（１）で表されるヌクレオシド誘導体は、アデノシンアナログとして利用できる。また、式（２）で表されるヌクレオシド誘導体は、グアノシンアナログとして利用できる。

また、式（１）及び式（２）で表されるヌクレオシド誘導体は、R_2にホスホジエステル結合基を備える場合、ヌクレオチド誘導体となる。

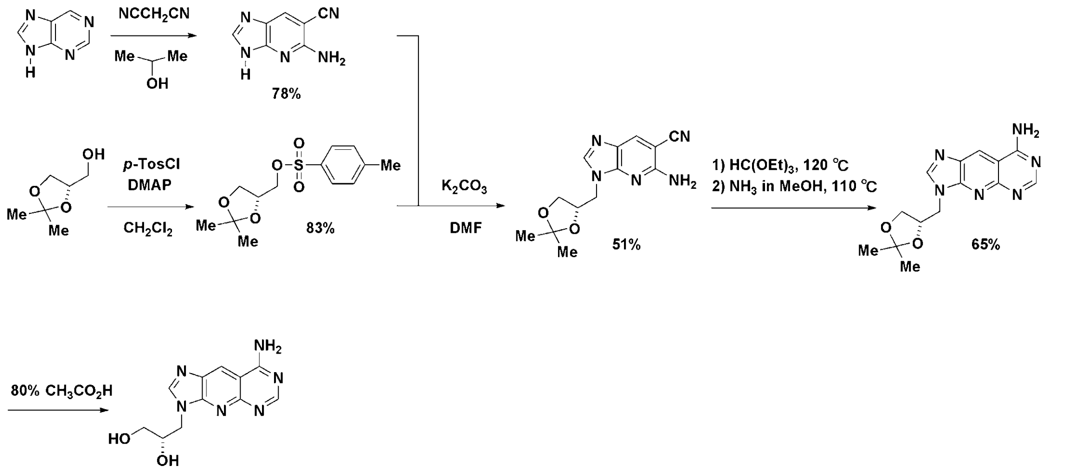
【００３９】

本発明のヌクレオシド誘導体は、また、蛍光を発することができる。すなわち、３３０ｎｍ程度とする励起波長の光を照射すると、４００ｎｍ近傍にピークを有する蛍光を発することができる。このため、特定のＲＮＡ又は特定の塩基等とのハイブリダイゼーションを容易に検出することができる。

【００４０】

本ヌクレオシド誘導体は、P.A.Harris and W.Pendergast, J. Heterocyclic Chem., 33, 319 (1996).の記載に準じて、プリン塩基において環を拡張することで、合成することができる。例えば、式（１）で表される化合物は以下のスキーム１で合成される。

【化６】



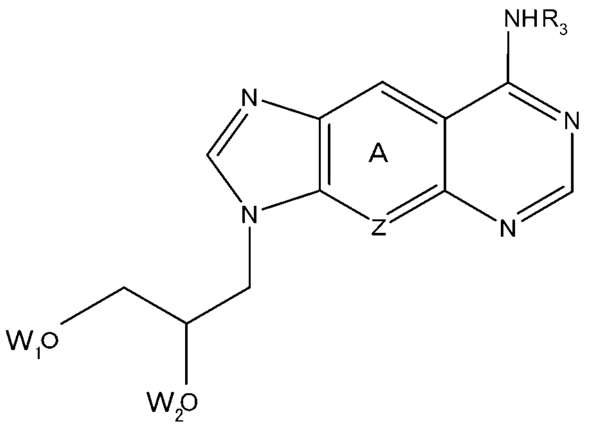
【００４１】

（オリゴヌクレオチド合成に適したヌクレオシド誘導体）

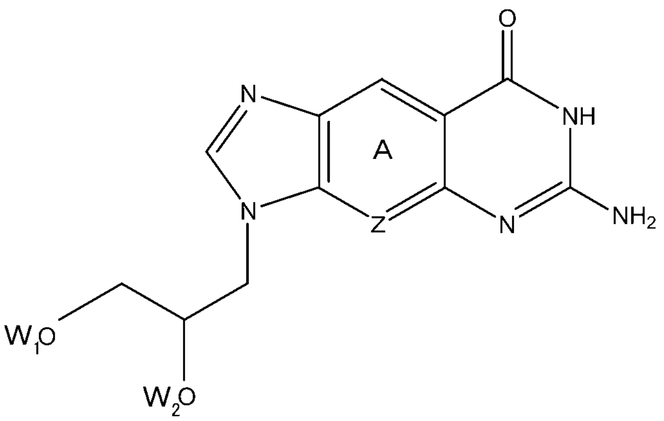
オリゴヌクレオチド合成に適したヌクレオシド誘導体としては、以下の式（３）及び式（４）で表される化合物が挙げられる。なお、式（３）及び式（４）におけるＺ及びＡ環は、式（１）及び式（２）におけるＺと同義である。

【００４２】

【化７】



（3）



（4）

【００４３】

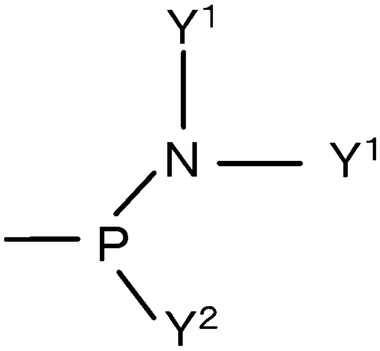
式（３）及び式（４）において、Ｗ$_1$は水素原子又は水酸基保護基を表すことができる。水酸基保護基としては、水酸基を意図しない反応から保護する基であればよい。こうした水酸基保護基としては、特に限定しないで従来公知の各種の水酸基保護基を用いることができる。本発明の好ましい保護基は、フルオレニルメトキシカルボニル基（ＦＭＯＣ基）、ジメトキシトリチル基（ＤＭＴ基）、四級ブチルジメチルシリル基（ＴＢＤＭＳ基）、モノメトキシトリチル基、トリフルオロアセチル基、レブリニル基、またはシリル基である。好ましい保護基は、トリチル基であり、例えば、ジメトキシトリチル（ＤＭＴ）及び四級ブチルジメチルシリル基（ＴＢＤＭＳ基）から選択される。

【００４４】

また、Ｗ$_2$は、水酸基保護基、ホスホルアミダイト基又は固相担体に結合される若しくは結合された連結基を表す。Ｗ$_2$がホスホルアミダイト基である化合物（アミダイト化合物）は、ホスホルアミダイト法によるホスホルアミダイト試薬として用いて、オリゴヌクレオチドを合成するのに用いることができる。なお、本発明において、ホスホルアミダイト基は、以下の式（８）で表すことができる。

【００４５】

【化８】



(8)

（式（８）中、各Ｙ^{1}は独立して、同一であっても異なっていてもよく、分枝状又は直鎖状の炭素数１～５個のアルキル基を表し、Ｙ^{2}は、分枝状又は直鎖状の炭素数１～５個のアルキル基又は置換されていてもよいアルコキシル基を表す。）

【００４６】

上記式（８）において、Ｙ^{1}は、特に限定しないがイソプロピル基が好ましいものとして挙げられ、また、Ｙ^{2}としては、$-OCH_3$、－ＯＥｔＣＮ、$-OCH_2CHCH_2$等が挙げられる。

【００４７】

また、式（３）及び式（４）においてW_2が固相担体に結合される連結基である化合物は、当該連結基とアミノ基など固相担体上の所定の官能基とを結合させることにより、固相担体に保持される。そして、式（３）及び式（４）において、W_2が固相担体に結合された連結基である化合物は、連結基を介して本発明のヌクレオシド誘導体が固相担体に結合されているため、各種の核酸固相合成法の出発材料として用いることができる。この出発材料を用いることで、式（５）や式（６）で表されるユニットを有するオリゴヌクレオチドを製造することができる。

【００４８】

ここで、固相担体とは、一般に高分子担体が用いられ、例えば、ＣＰＧ（controlled pored glass）やＨＣＰ（highly cross-linked polystyrene）、ある種のゲルなどが挙げられる。また、固相担体には適切なスペーサーを有していてもよい。連結基は、固相担体と本化合物とを連結するリンカーである。こうした連結基としては、公知のコハク酸エステルリンカー、シュウ酸エステルリンカー、シランジイルリンカー、シリルリンカーなどを用いることができる。

【００４９】

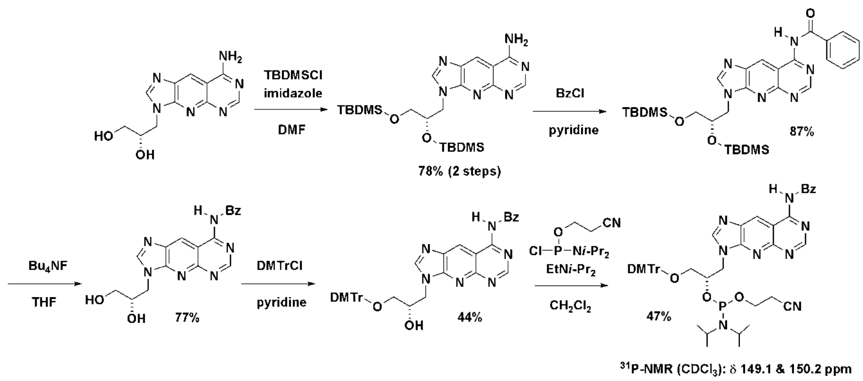
なお、式（３）におけるR_3は、水素原子又はアミノ保護基とすることができる。アデニン塩基由来の第１級アミノ基は、必要に応じて適宜保護基で保護される。このような保護方法及び保護基は当業者において周知である。アミノ保護基としては、例えば、ベンゾイル基、アセチル基、フェノキシアセチル基が挙げられる。

【００５０】

このような式（３）又は式（４）で表されるヌクレオシド誘導体は、式（１）又は式（２）で表されるヌクレオシド誘導体から既知の方法で合成される。例えば、式（３）で表される各種ヌクレオシド誘導体は、以下のスキーム２で合成される。

【００５１】

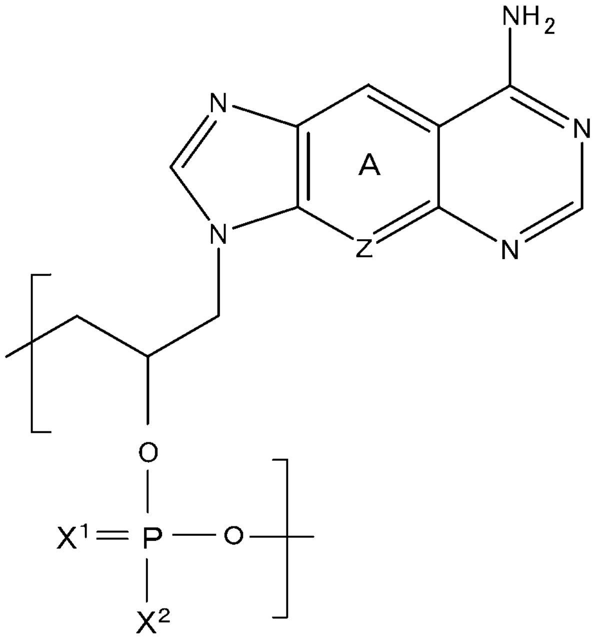
【化９】



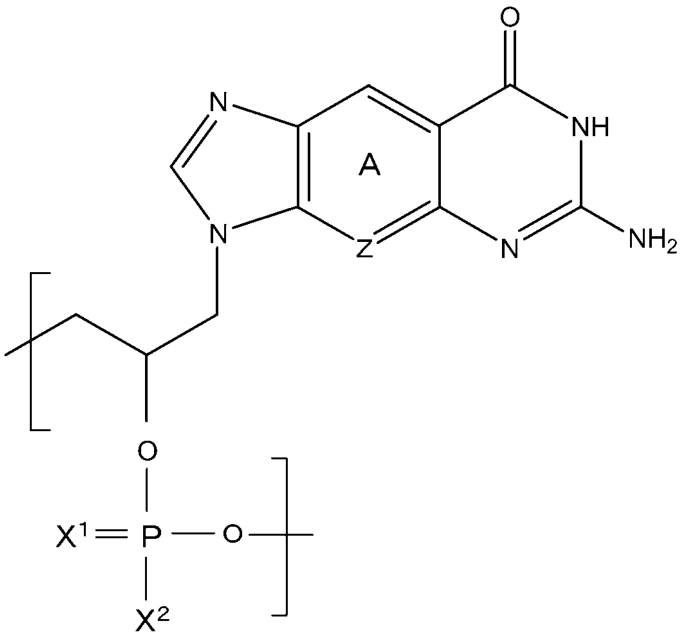
【００５２】
（オリゴヌクレオチド）

本発明のオリゴヌクレオチドは、以下の式（５）及び式（６）のいずれかで表される、１種又は２種以上のヌクレオチド誘導体単位を備えることができる。式（５）及び式（６）中のＺは、式（１）等におけるＺと同義であり、Ａ環についても、式（１）等におけるＡ環と同義である。

【化１０】



（5）



（6）

【００５３】

式（５）及び式（６）中、Ｘ^{1}は、Ｏ、Ｓ又はＳｅとすることができ、Ｘ^{2}は、ＳＨ（若しくはＳ$^-$）、Ｓ又はＳｅ$^-$、炭素数１～４個のアルキル基又はモルホリノ基とすることができる。このようなホスホジエステル基としては、式（７）に記載の各種基が挙げられる。

【００５４】

本発明のオリゴヌクレオチドにおける上記ヌクレオチド誘導体単位は、１種以上であってもよいし２種以上であってもよい。また、１個であってもよいし複数個であってもよいし、全体であってもよい。本発明のオリゴヌクレオチドに含まれるヌクレオチド誘導体単位は、オリゴヌクレオチドの用途等に応じて決定される。

【００５５】

また、オリゴヌクレオチドにおけるヌクレオチド誘導体単位の位置も特に限定されない。５’末端、３’末端及びそれ以外部分のいずれにも備えることができる。なお、本発明

のオリゴヌクレオチドにおいて５’末端には水酸基が結合されていてもよいし、リン酸基（PO_4）が結合されていてもよい。また、同様に、本オリゴヌクレオチドの３’末端には、水酸基が結合されていてもよいし、リン酸基（PO_4）が結合されていてもよい。その他５’末端及び３’末端はそれぞれ必要に応じて適切な構造を採ることができる。

【００５６】

本発明のオリゴヌクレオチドは、本発明のヌクレオチド単位以外にリボヌクレオチド及び／又はデオキシリボヌクレオチドを備えることができる。本発明のオリゴヌクレオチドは、本発明のヌクレオチド単位以外にデオキシリボヌクレオチドのみからなるオリゴヌクレオチドであってもよいし、本発明のヌクレオチド単位以外にリボヌクレオチドのみからなるオリゴヌクレオチドであってもよいし、さらに、本発明のヌクレオチド単位以外にデオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドの双方を含むオリゴヌクレオチドであってもよい。ＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖及びＲＮＡ／ＲＮＡ二重鎖は共にＡ型の二重鎖構造であるため、ＲＮＡである本発明のオリゴヌクレオチドは相補的なＲＮＡ鎖との二重鎖も安定化することができる。

【００５７】

オリゴヌクレオチドとは、ヌクレオチドをモノマー単位として該モノマー単位を複数有するポリマーを意味するものとし、オリゴヌクレオチドは、通常数個以上１００個以下程度までのヌクレオチドのポリマーを含むものとする。本発明のオリゴヌクレオチドは、用途に応じた長さとすることができるが、オリゴヌクレオチドの合成を考慮すると、１０以上３５以下とすることが好ましい。また、アンチセンスの場合には、１０以上３０以下程度にすることができ、また、ｓｉＲＮＡの場合には、Ｂ及びＣの合計の鎖長は、好ましくは１５以上３５以下、より好ましくは３０以下である。プライマーの場合には、１０以上３０以下であり、プローブの場合には１０以上３０以下であることが好ましく、モレキュラービーコンの場合には、１５以上４０以下であることが好ましい。

【００５８】

なお、本発明によれば当然に、本発明のヌクレオチド誘導体単位を備えるポリヌクレオチドも提供される。

【００５９】

また、本発明のヌクレオチド単位以外の改変されたヌクレオチドを備えていてもよい。改変されたヌクレオチドとは、ヌクレオチドの各種部分、すなわち、塩基、糖部分及びリン酸エステル部分において何らかの化学修飾が施されていることをいうものとする。

【００６０】

本発明のオリゴヌクレオチドは、記述のヌクレオシド誘導体の一種であるアミダイト体を利用する従来公知の核酸合成法によって合成することができる。

【００６１】

本発明のオリゴヌクレオチドは、本発明のヌクレオチド単位を備えているため、ＲＮＡと選択的に安定にハイブリダイズできるとともに、塩基識別性も備えているため、特定配列のＲＮＡを検出することができる。しかもそれ自体蛍光性を有しているため、一塩基多型などの遺伝子変異も検出できる。

【００６２】

また、ＲＮＡと高い選択性でハイブリダイゼーションすることから、特に細胞内でのＲＮＡ検出、細胞内における遺伝子発現のリアルタイム検出に好ましく用いることができる。さらに、これらオリゴヌクレオチドをチップやビーズ等の固相担体等に保持したものは、検査装置や診断装置又はこれらの一部として利用することができる。

【００６３】

本発明のオリゴヌクレオチドは、各種の遺伝子発現制御剤の形態を採ることができる。すなわち、アンチジーン、アンチセンス、アプタマー、ｍｉＲＮＡ及びリボザイムに用いることができる。また、本発明のオリゴヌクレオチドは、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、アンチセンス、リボザイム及びアプタマーに用いることもできる。

【００６４】

本発明のオリゴヌクレオチドは、プローブ及びプライマーに用いることができる。プローブは、設計または選択により、ターゲット核酸に特異的に規定された塩基配列を有しており、所定のストリンジェンシーの下で、ターゲット核酸とハイブリダイズするようにするに取得されたオリゴヌクレオチドである。上記したことから、本発明のオリゴヌクレオチドプローブは特に、細胞内のＲＮＡ検出、特にリアルタイム検出用に好ましく用いることができる。

【００６５】

本発明のオリゴヌクレオチドが含むヌクレオチド誘導体単位は、それ自体蛍光を発するため、これを利用したＲＮＡ上の変異を検出するためのプローブセットが提供される。このプローブセットは、本発明のヌクレオチド誘導体単位を有する第１のプローブと本発明のヌクレオチド誘導体単位を有しない第２のプローブとから構成できる。第１のプローブは、前記変異部位に対応する位置に本発明のヌクレオチド誘導体単位を備えるようにする。また、このようなヌクレオチド誘導体単位をプローブの３’末端又は５’末端に有するようにする。例えば、図９に示すように、第１のプローブをターゲット鎖（図９に示す例ではＲＮＡ）の３’側にハイブリダイズさせる場合には、３’末端に本発明のヌクレオチド誘導体単位を有するようにする。なお、ヌクレオチド誘導体単位は、検出しようとする変異部位において存在可能性のある塩基に対応する（相補する）塩基アナログを有するものであってもよいし、そうでなくともよい。第１のプローブは、１種類であってもよいし２種類以上であってもよい。検出しようとする変異部位に対応する位置に備える本発明のヌクレオチド誘導体単位の種類に応じて第１のプローブの種類（数）が決定される。

【００６６】

また、第２のプローブは、前記変異部位において存在可能性のある塩基に対応する（相補する）塩基を有するデオキシヌクレオチドを備えるようにする。また、この変異対応ヌクレオチドを、プローブの３’末端又は５’末端に有するようにする。例えば、図９に示すように、第２のプローブをターゲット鎖（ＲＮＡ）の５’側にハイブリダイズさせる場合には、５’末端に適切なデオキシヌクレオチドを有するようにする。第２のプローブは、１種類であってもよいし２種類以上であってもよい。検出しようとする変異部位に対応する位置に備えるデオキシヌクレオチドの種類に応じて第２のプローブの種類（数）が決定される。

【００６７】

以上のように、検出しようとする変異部位に対応する位置に本発明のヌクレオチド誘導体単位を有するプローブと同一の変異部位に存在する可能性のある塩基に相補的な通常のデオキシヌクレオチド単位を有するプローブとを作製することで、変異部位に対する第１のプローブのマッチ／ミスマッチ及び第２のプローブのマッチ／ミスマッチから、変異部位の塩基を識別することができる。例えば、変異部位に対して第１のプローブも第２のプローブもマッチするときには、第１のプローブと第２のプローブとが変異部位で競合するため、第１のプローブのヌクレオチド単位の少なくとも一部がフリップアウトして蛍光発光が可能となる。また、第１のプローブがミスマッチであり、第２のプローブがマッチするとき、第１のプローブのヌクレオチド単位は二重鎖から大きくフリップアウトしてより強度の高い蛍光を発光できるようになるのである。

【００６８】

第２のプローブを、存在可能性のあるすべての塩基を変異部位対応末端に備えるように複数準備することで、第１のプローブが一種類であっても、すべての塩基の変異を検出することができる。このようなプローブセットは、特に一塩基多型を検出するのに好ましく用いることができる。

【００６９】

なお、本発明によれば、このようなプローブセットを用いる一塩基多型の検出方法も提供される。すなわち、一塩基多型を含む可能性のある遺伝子発現産物としてのＲＮＡ試料を準備する工程と、前記プローブセットから選択される１種の第１のプローブと１種の第

２のプローブとを組み合わせて得られるすべての組み合わせで第１のプローブ及び第２のプローブと、ＲＮＡ試料と、をハイブリダイゼーション可能に接触させる工程と、前記ＲＮＡ試料と前記第１のプローブと前記第２のプローブとのハイブリダイズ産物の前記第１のプローブに基づく蛍光シグナルを検出する工程と、を備えることができる。

【００７０】

ＲＮＡ試料が各種の被験体から公知の方法で調製することができる。被験体としては、血液を含む各種体液や組織等、特に限定されない。

【００７１】

ＲＮＡ試料と第１のプローブと第２のプローブとの接触形態（順序）は、特に限定されない。ＲＮＡ試料に対して、第１のプローブと第２のプローブとを同時に接触させる形態であってもよいし、第１のプローブを接触させた後、第２のプローブを接触させてもよい。さらに、第２のプローブを接触させた後に第１のプローブを接触させてもよい。

【００７２】

ハイブリダイゼーションの条件は、ＲＮＡ試料とプローブの種類に応じて適宜決定される。また、この検出方法においても、第１のプローブ及び第２のプローブのうち少なくとも一部を固相担体に固定化させたアレイを用いることができる。

【００７３】

本発明のオリゴヌクレオチドは、ステムーループ構造を有するモレキュラービーコン型のプローブとすることもできる。すなわち、ステムとループとを形成可能に塩基配列を設計したプローブとすることもできる。このループ中に本発明のヌクレオチド単位を備えることで、塩基アナログ部分がループからフリップアウトして蛍光発色しやすくなってなり、非ハイブリダイズ時において蛍光を発すし、ハイブリダイズ時には消光するようなプローブを構築できる。このようなプローブによれば、ハイブリダイズを容易に検出できる。

【００７４】

以上のことから、本発明のオリゴヌクレオチドは、ｓｉＲＮＡやアンチセンス等として機能するよう構築することで、遺伝子発現抑制剤として利用できる。また、本発明のオリゴヌクレオチドは、ヒト及び非ヒト動物における疾患の予防・治療用医薬組成物の有効成分として用いることができる。例えば、遺伝子発現に伴う疾患に対して、遺伝子発現抑制剤として構築した本発明のオリゴヌクレオチド誘導体はこうした疾患の予防や治療に有効である。

【００７５】

さらに、本発明のオリゴヌクレオチドは、その対ＲＮＡハイブリダイゼーション機能を利用してプローブ、プライマー等のハイブリダイズ試薬（典型的には、検査試薬や診断試薬等である。）として用いることができる。ＲＮＡと高い選択性でハイブリダイゼーションすることから、特に細胞内でのＲＮＡ検出、細胞内における遺伝子発現のリアルタイム検出に好ましく用いることができる。さらに、これらオリゴヌクレオチドをチップやビーズ等の固相担体等に保持したものは、検査装置や診断装置又はこれらの一部として利用することができる。さらには、こうした検査試薬や診断薬は、他の試薬薬や診断薬あるいは装置等と組み合わせた検査用又は診断用キットとしても用いることができる。

【００７６】

本発明のオリゴヌクレオチドは遺伝発現制御剤の形態で、ヒト及び非ヒト動物の細胞における遺伝子発現抑制方法にも利用できる。さらに、本発明のオリゴヌクレオチドは、ハイブリダイズ試薬の形態で、ヒト及び非ヒト動物から取得した核酸試料における特定遺伝子又は特定変異の検出方法にも利用できる。

【００７７】

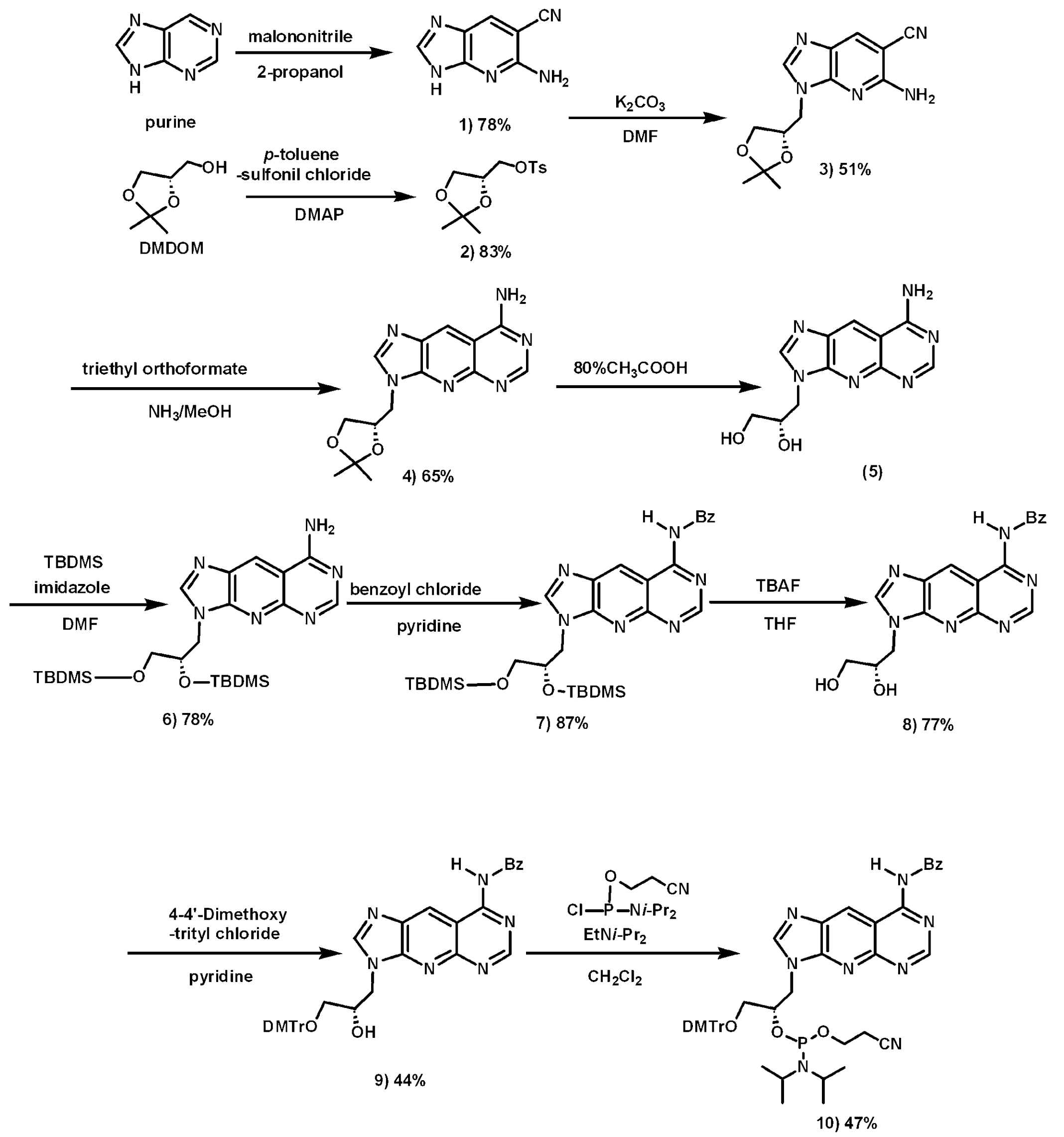
以下、本発明を、実施例を挙げて具体的に説明するが、これらの実施例は本発明を限定するものではない。

【実施例１】

【００７８】

本実施例では以下のスキーム３により３環性ヌクレオシドアナログを合成した。

【化１１】



【００７９】

なお、上記スキーム３における各生成物（１）～（１０）を取得するための実験条件は以下のとおりであった。

Reagents and conditions: (1)Malononitrile, 2-propanol, 90℃, 78 %. (2) p-toluene sulfonilchloride, DMAP, CH_2Cl,rt, 83 %. (3) K_2CO_3, DMF, 60 ℃,51 %. (4)(i)triethyl ortho-formate, 100℃,(ii) NH_3 / MeOH, 110℃, 65 %. (5) 80% CH_3COOH, 60℃. (6) TBDMS, Imidazole, DMF, 78 %. (7) Benzoyl chloride, pyridine, 87%. (8)TBAF, THF, 77%. (9) 4-4’-Dimethoxytrityl chloride, pyridine, 44 %. (10) i-Pr_2NP(Cl)OCE, Huning Base , CH_2Cl_2, rt, 47%.

【００８０】

（１）5-Aminoimdazo [4,5-b] pyrimidine-6-carbonitrileの合成

Purine 1.0 g (8.3 mmol) を2-propanol 60 mL に溶解し、Malononitrile 2.6 g (39 mmol,4.7 eq) を加え、アルゴン雰囲気下、オイルバスで90℃を保ちながら撹拌する。(黄色透明)９９時間撹拌後、原料の消失をTLCで確認し、室温に冷やす。(赤ワイン色)室温に冷やした後、溶液内に結晶物が現れるので、その結晶を氷水で冷却した2-propanolで洗い流しながら吸引ろ過し、結晶物 (1) を得た(光緑色)。得られた結晶を一晩真空ポンプで乾燥し、NMR測定をした(収量 1.5 g, 9.75 mmol, 収率58 %)。

【００８１】

^{1}H NMR (400MHz, DMSO) δ；6.58 (2H,s,6-CH and 8-CH)、8.17(3H,s,2-NH_2,9-NH)

【００８２】
（２）2,2-Dimethyl-4-（p-toluenesulfonyloxymethyl）-1,3-dioxolane の合成
　Dimethyl-1,3-dioxolane-4-methanol 1.3 g,1.2 ml （10 mmol） に、１時間乾燥させた4-Dimethyl amino pyridine 3.7g （3.0 mmol,3.0 eq） を加え、CH_2Cl_2 100 mL で溶解する。その後、p-Toluenesulfonyl chloride 2.3 g （12 mmol,1.2 eq） を加えた後、初めの３０分間冷水に着けながら室温、アルゴン雰囲気下で撹拌する （無色透明)。１８時間撹拌後、TLCで原料の消失を確認し、分液ロート(有機溶媒:$CDCl_3$)で分液し油層を無水硫酸Naで脱水する。１時間後、綿栓ろ過し、エバポレーターで濃縮したものをシリカゲルカラムクロマトグラフィー($CHCl_3$→$CHCl_3$：MeOH=100～10：１)で目的物を単離し、オイリーな液体 （2） を得た(淡黄色透明～無色透明)。得た液体を一晩乾燥し、NMR測定をした。(収量 1.85 g，8.3 mmol，収率83 %)
【００８３】
^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ；1.31 (3H, s, 2-CH_3), 1.34 (3H, d, 2-CH_3), 2.46 (3H, s,4-phenylmethyl),3.72-3.82(1H,q,4-sulfonylmethyl),3.95-4.06 (3H, m, 4 sulfonylmethyl), 4.22-4.31 (1H, m, 4-CH), 7.27-7.37 (2H, d, 5-CH_2), 7.76-7.84 (2H, d, 4-1’-CH_2)
【００８４】
（３）9-（4’-4’-dimethyl-3’,5’-dioxolane-methyl）-1carbonitrile-2-aminopurineの合成
5-Aminoimdazo[4,5-b]pyrimidine-6-carbonitrile 0.7 g （4.4 mmol） にK_2CO_3 0.73 g(5.3 mmol,1.2 eq) を加え、さらに１時間乾燥する。乾燥した後、2,2-Dimethyl-4-(p-toluene -sulfonyloxymethyl)-1,3-dioxolane 1.17 g （5.3 mmol,1.2 eq） をDMF 40 mlに溶解し、その溶液を先ほどの5-Aminoimdazo[4,5-b]pyrimidine-6-carbonitrileとK_2CO_3のフラスコに加え、アルゴン雰囲気下、オイルバスで60℃に保ちながら撹拌する。(淡赤色)
７０時間撹拌後、原料の消失を確認し、分液ロート(有機溶媒:酢エチ)で分液し、油層を無水硫酸Naで脱水する。１時間後、綿栓ろ過し、エバポレーターで濃縮したものをシリカゲルカラムクロマトグラフィー($CHCl_3$→$CHCl_3$：MeOH=100：１)で目的物を単離し、白色固体(3) を得た(収量 0.25 g，0.92 mmol，収率21 %)。
【００８５】
^{1}HNMR(400MHz,DMSO) δ；1.33(3H,s,9-4’-CH_3)、1.38(3H,s,9-4’-CH_3)1.61(1H,s,9-NH)、
3.69-3.73(2H,q,9-6’-CH_2)、4.08-4.12(2H,q,9-6’-CH_2)、4.16-4.21(2H,q,9-1’-CH_2)、4.29-4.34(2H,q,9-1’-CH_2)、4.43-4.49(1H,m,9-2’-CH)、5.11(2H,s,2-NH_2)、7.97(1H,s,6-CH)、
8.07(1H,s,8-CH)
HRMS (FAB) calcd for $C_{13}H_{15}N_5O_2$ (MH^+) ; 273.12258, found ; 273.12291
【００８６】
（４） 13-（4’-4’-dimethyl-3’,5’-dioxolane-methyl）-6-aminoimidazo-quinazolineの合成
　13-(4’-4’-dimethyl-3’,5’-dioxolane-methyl)-6-aminoimidazo quinazoline 0.27 g (1.0 mmol)に、triethyl orthofomate 8mL を加え、オイルバスで100℃を保ちながら撹拌する(無色透明)。
52ｈ撹拌後、TLCで原料の消失を確認しようとしたところ物質が壊れ始めていたので、ただちに撹拌を止め、エバポレーターで溶媒を減圧除去し濃縮した(濃黄色)。濃縮物をNH_3/MeOH に溶解し、100mLのスチール容器に移し、オイルバスで110℃を保ちながら撹拌する。121ｈ撹拌後、ＴＬＣで原料の消失を確認し、水流エバポレーターで濃縮する。濃縮したものを($CHCl_3$：MeOH＝5:1)に溶解しシリカを加え、エバポレーターで濃縮することにより物質をシリカに吸着させる。吸着後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー($CHCl_3$：MeOH=15:１→10:1)で目的物を単離し、濃黄色の固体 （4） を得た。得た固体を一晩乾燥し、NMR測定をした(収量 0.15 g，0.499 mmol，収率65.0 %)。

【００８７】
^{1}HNMR(400MHz,DMSO) δ；1.22(3H,s,12-4’-CH_3)、1.27(3H,s,12-4’-CH_3)、3.80-3.83(2H,q,12-1’-CH_2)、4.36-4.49(2H,q,12-6’-CH_2)、4.55-4.58(1H,ｍ,12-2’-CH)、7.98(2H,s,2-NH_2)、8.47(1H,s,2-CH)、8.63(1H,s,7-CH)、9.03(1H,s,11-CH)
【００８８】
（５）13-（2’-4’-hydoroxi）-6-aminoimidazo-quinazolineの合成
13-(2’-4’-hydoroxi)-6-aminoimidazo-quinazoline 0.3 g(1.0 mmol) に、80％希釈酢酸を５mL加え、オイルバスで60℃を保ちながら撹拌する。
撹拌開始９ｈ後、TLCで反応の進行を確認した後、水流エバポレーターで酢酸を減圧除去することで、黄色の固体(5) を得た。得た固体を一晩乾燥し、NMR測定をした。
【００８９】
^{1}HNMR(400MHz,DMSO) δ；1.22(1H,s,13-2’-1’’-OH)、1.27(1H,s,13-3’-1’’-OH)、3.93
(2H,s,13-1’-CH_2)、4.11-4.17(2H,q,13-1’-CH_2)、4.45-4.50(2H,q,12-3’-CH_2)、4.88(2H,t,12-3’-CH_2)、5.13-5.15(1H,s,13-2’-CH)、7.97(2H,s,6-NH_2) 、8.47(1H,s,2-CH)、8.59 (1H,s,7-CH)、9.01(1H,s,12-CH)
Elemental Anal. Calcd for $C_{11}H_{12}N_6O_2$・1/5 H_2O: C, 50.29; H, 4.74; N, 30.87.
Found: C, 50.37; H, 4.87; N, 30.89.
【００９０】
（６）13-（2’-1’’,4’-tert-butyldimethyl-silane）-6-aminoimidazo-quinazolineの合成
13-(2’-1’’,4’-tert-butyldimethyl-silane)-6-aminoimidazo-quinazoline 260 mg (1.0 mmol)に、DMF 10 ml、imidazole 544 mg(8.0 mmol,8.0 eq)、tert-butyldimethyl-chlorosilane 600 mg(4.0 mmol,4.0 eq)を加え、アルゴン雰囲気下、室温で撹拌する(濃黄色透明)。撹拌開始18ｈ後、TLCで目的物の消失を確認し、分液ロート(有機溶媒:酢酸エチル)で分液($NaHCO_3$×３→飽和食塩水×１)した後、無水Na_2SO_4で１ｈ脱水した。脱水した後、エバポレーターで濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒: $CHCl_3$:MeOH=20:1～10:1)で目的物を単離し、エバポレーターで溶媒を減圧除去することで白色の固体 (6) を得た。得た固体一晩真空ポンプで乾燥し、ＮＭＲ測定をした(収量 380 mg, 0.78 mmol, 収率 77.7 %)。
【００９１】
^{1}HNMR(400MHz,DMSO) δ；-0.71(3H,s,13-3’-2’’-CH_3)、-0.23(3H,s,13-2’-2’’-CH_3)、
-0.01(6H,s,13-2’-2’’,3’-2’’-2CH_3)、0.57(9H,s,13-3’-3’’-3CH_3)、0.82(9H,s,13-2’-3’ ’-3CH_3)、
3.57(2H,s,13-1’-CH_2)、3.58(2H,q,13-1’-CH_2)、4.16(2H,q,12-3’-CH_2)、4.19(2H,t,12-3’-CH_2)
、4.38-4.40(1H,w,13-2’-CH)、7.92(2H,s,6-NH_2) 、8.39(1H,s,2-CH)、8.50 (1H,s,7-CH)
8.93(1H,s,12-CH)
HRMS (FAB) calcd for $C_{23}H_{40}N_6O_2Si_2$ (MH^+) ; 488.27514, found ; 488.27596
【００９２】
（７）13-（2’-1’’,4’-tert-butyldimethyl-silane）-6-aminoimidazo[1’-benzoyl]-quinazolineの合成
13-(2’-1’’,4’-tert-butyldimethyl-silane)-6-aminoimidazo[1’-benzoyl]-quinazoline 530 mg
(1.1 mmol) に、pyridine 20 ml、benzoyl chloride 0.11ml,0.15 mg (1.1 mmol,1.0 eq) 、を加え、アルゴン雰囲気下、室温で撹拌する(黄緑色透明)。
撹拌開始２ｈ後、TLCの結果より、benzoyl chlorideが足りない傾向があったので0.11 ml,0.15 mg (1.1 mmol,1.0 eq) 追加した。撹拌開始７ｈ後、TLCで目的物の消失を確認し、

分液ロート(有機溶媒:$CHCl_3$)で分液($NaHCO_3$×２→飽和食塩水×１)した後、無水Na_2SO_4で１ｈ脱水した。脱水した後、エバポレーターで濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒:CHCl3→$CHCl_3$:MeOH=10:1) で目的物を単離し、エバポレーターで溶媒を減圧除去することで淡緑色の固体 (7) を得た。得た固体を一晩真空ポンプで乾燥し、ＮＭＲ測定をした(収量 557 mg, 0.94 mmol, 収率87.0 %)。

【００９３】

^{1}HNMR(400MHz,DMSO) δ；-0.46(3H,s,13-3’-2’’-CH_3)、-0.07(3H,s,13-2’-2’’-CH_3)、
0.09(6H,s,13-2’-2’’,3’-2’’-2CH_3)、0.79(9H,s,13-3’-3’’-3CH_3)、0.93(9H,s,13-2’-3’ ’-3CH_3)、
3.60-3.64(2H,s,13-1’-CH_2)、3.71-3.74(2H,q,13-1’-CH_2)、4.24-4.25(2H,q,12-3’-CH_2)、4.67-4.72(2H,t,12-3’-CH_2)、4.38-4.40(1H,w,13-2’-CH) 、8.39-8.49(3H,q,6-1’-C_6H_5)、
7.51(1H,s,2-CH)、7.55 (1H,s,7-CH)、7.60(1H,s,12-CH)、9.60(1H,s,6-NH)

【００９４】

（８）13- (2’-4’-hydoroxi) - 6-aminoimidazo[1’-benzoyl]-quinazolineの合成

13-(2’-4’-hydoroxi)- 6-aminoimidazo[1’-benzoyl]-quinazoline 557 mg (0.94 mmol) にTHF 20 ml、tetrabutylammonium fluoride,1.0M solution in tetrahydro furan 3.4 g, 3.76 ml (3.76 mmol,4.0 eq) 、を加え、アルゴン雰囲気下、室温で撹拌する(黄緑色透明)。撹拌開始２ｈ後、TLCで目的物の消失を確認し、エバポレーターで濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒:$CHCl_3$:MeOH=20:1〜7:1)で目的物を単離し、エバポレーターで溶媒を減圧除去することで淡緑色の固体 (8) を得た。得た固体を一晩真空ポンプで乾燥し、ＮＭＲ測定をした(収量 265 mg, 0.73 mmol, 収率77.3 %)。

【００９５】

^{1}HNMR(400MHz,DMSO) δ；1.25(1H,s,13-2’-1’’-OH)、1.26(1H,s,13-3’-1’’-OH)、3.91
(2H,s,13-1’-CH_2)、4.21-4.27(2H,q,13-1’-CH_2)、4.60-4.69(2H,q,12-3’-CH_2)、4.85-4.90
(2H,t,12-3’-CH_2)、5.20-5.25(1H,s,13-2’-CH)、7.60-7.79(3H,q,6-1’-C_6H_5)、8.12(1H,s,2-CH)、8.60 (1H,s,7-CH)、8.79(1H,s,12-CH)、9.42(1H,s,6-NH)

【００９６】

（９）13- [2’-hydoroxi-4’-(4,4’-dimethoxytrityl)] - 6-aminoimidazo[1’-benzoyl]-quinazolineの合成

13-(2’-4’-hydoroxi)-6-aminoimidazo[1’-benzoyl]-quinazoline 260 mg (0.71 mmol) に、4-4’-Dimethoxytrithyl chloride 240 mg (0.71 mmol,1.0 eq)、pyridine 20 mLを加え、アルゴン雰囲気下、室温で撹拌する。撹拌開始2時間後、TLCの結果より4-4’-Dimethoxytrithyl chlorideが足りない傾向があったので、240 mg (0.71 mmol,1.0 eq)追加した。撹拌開始７時間後、TLCよりこれ以上反応が進まない感じであったので、分液ロート(有機溶媒:$CHCl_3$)で分液(飽和$NaHCO_3$×２→飽和食塩水×１)した後、無水硫酸ナトリウムで１ｈ脱水した。脱水後、エバポレーターで濃縮し、中性シリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒:$CHCl_3$〜$CHCl_3$:MeOH=50:1)で目的物を単離し、エバポレーターで溶媒を減圧除去することで淡黄色の化合物 (9) を固体で得た(収量210 mg,0.314 mmol, 収率44.0 %)。

【００９７】

^{1}HNMR(400MHz, $CDCl_3$,D_2O) δ；1.25(1H,s,13-2’-1’’-OH)、1.26(1H,s,13-3’-1’’-OH)、3.91
(2H,s,13-1’-CH_2)、4.21-4.27(2H,q,13-1’-CH_2)、4.60-4.69(2H,q,12-3’-CH_2)、4.85-4.90
(2H,t,12-3’-CH_2)、5.20-5.25(1H,s,13-2’-CH)、7.60-7.79(3H,q,6-1’-C_6H_5)、8.12(1H,s,2-CH)、8.60 (1H,s,7-CH)、8.79(1H,s,12-CH)、9.42(1H,s,6-NH)

【００９８】
（１０）13- [2’-[(N,N-diisopropylamino)phosphinyl] -4’-(4,4’-dimethoxytrityl)] - 6-amino -imidazo[1’-benzoyl]-quinazolineの合成
13- [2’-hydoroxi-4’-(4,4’-dimethoxytrityl)] - 6-aminoimidazo[1’-benzoyl]-quinazoline 135 (0.20 mmol)をCH2Cl2 2 mlで溶解した後、Huning Base 68μl(0.40 mmol, 2.0 eq)、i-Pr$_2$NP(Cl)OCE 67μl(0.30 mmol, 1.5 eq)を加え、アルゴン雰囲気下、室温で撹拌した。30分後、TLCで反応の進行を確認した後、撹拌を停止した。その後、分液ロート(有機溶媒:$CHCl_3$)で分液(飽和$NaHCO_3$×２→飽和食塩水×１)した後、無水硫酸ナトリウムで数分脱水処理した。脱水後、エバポレーターで濃縮し、中性シリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒:酢エチ)で目的物を単離し、エバポレーターで溶媒を減圧除去することで淡黄色の化合物 (9) を固体で得た。また、乾燥後、^{31}P NMRにて目的のピーク(149.1, 150.2 ppm)を確認した(収量122.1 mg, 0.314 mmol, 収率47.0 %)。
【実施例２】
【００９９】
本実施例では、実施例１で合成したアミダイト体を用いてオリゴヌクレオチドを合成した。
【０１００】
DNA合成機を用いて、合成した化合物10のアミダイト体を下記配列のＸ部分に導入した４種類のオリゴヌクレオチドを合成、精製した。また、以下の配列の内、Ｆ-１とＦ-２はモレキュラービーコンのようなステム-ループ構造を指向した配列になっており、配列下線部はステム部分、下線部無しがループ部分になる。
【０１０１】
F-1 5’- d (TTC TGA CTT X TTT TCA GAA) -3’ (19 mer)
F-2 5’- d (TTC TGA CTA X ATT TCA GAA) -3’ (19 mer)
F-3 5’- d (AAG GAA AX GAG GAA AGA) -3’ (17 mer)
F-4 5’- d (AAG GAA XX GAG GAA AGA) -3’ (17 mer)
【０１０２】
なお、合成機によりカップリングした後、28％NH_4OH 1.2mlにCPGを懸濁し、インキュベーターで55℃に保ちながら12時間インキュベートした。CPG懸濁液をエッペンドルチューブに移し、さらにH_2O:MeOH=3:1溶液1ml×２回で洗浄、上清液の溶媒をスピードバックで遠心減圧除去した。減圧後、これをloading solution 200μlで回収し電気泳動をし、目的のバンドをゲル溶出液と共に撹拌することで目的のオリゴヌクレオチドを溶出させた。溶出液をSep-pak C18逆相カラムを用いて粗精製し、この溶出液をスピードバックで遠心減圧除去した。
【０１０３】
MALDI-TOF / MSを用いて、オリゴヌクレオチドの定量を行った。結果を以下の表に示す。F-1, 3, 4はTOF / MSの結果のより、目的のオリゴヌクレオチドであると判断した。F-２の測定値が記されていないのは、ＯＤ値が極めて微量なためであり、検出できなかった。
【０１０４】
【表１】

MALDI-TOF / MSによるオリゴヌクレオチドの定量結果

No.	配列	observed	calculated
F-1	5'-d (TTC TGA CTT X TTT TCA GAA) -3'	5779.9	5774.01
F-2	5'-d (TTC TGA CTA X ATT TCA GAA) -3'	-	5792.02
F-3	5'-d (AAG GAA AX GAG GAA AGA) -3'	5365.3	5365.01
F-4	5'-d (AAG GAA XX GAG GAA AGA) -3'	5380.6	5373.99

【実施例３】
【０１０５】

F-3，F-4の熱安定性の評価：T_m測定

本実施例では、F-3，F-4とそれぞれ相補的なＤＮＡ及びＲＮＡとの二重鎖の熱安定性をＴｍ値で評価した。なお、T_m測定におけるそれぞれの鎖の濃度は3μMになるように、測定用緩衝液(10mM NaPhosphate (pH7.0) - 100mM NaCl) 200μLに溶解させ、95℃で３分間アニーリングした後、１時間放置し常温に戻し、15分間の脱気を行った。そのサンプルの内150μLを専用セルに入れ測定した。F-3，F-4及び相補DNA，RNAの配列は以下の表に記す。

【０１０６】

【表２】

オリゴ	配列
F－3	5’ -d (AAG - GAA - AQ - GAG - GAA - AGA) -3’
F－4	5’ -d (AAG - GAA - QQ - GAG - GAA - AGA) -3’
相補DNA	3’ -d (TTC - CTT - XX - CTC - CTT - TCT) -5’
相補RNA	3’ -r (UUC - CUU - XX - CUC - CUU - UCU) -5’

【０１０７】

・　表中のQは３環性アナログを、相補DNAのXXはTA，TT，TG，TC、相補RNAのXXはUA，UU，UG，UCを示す。

【０１０８】

図１０及び図１１に示すように、いずれのプローブもDNAとの二重鎖を大きく不安定化するのに対して、RNAが相補である場合にはアナログの数が増えると逆に二重鎖の熱的安定性が上昇することが分かった。

【実施例４】

【０１０９】

F-1の熱安定性の評価：T_m測定

本実施例では、F-1とそれぞれ相補的なＲＮＡとの二重鎖の熱安定性をＴｍ値で評価した。F-１のT_m測定におけるそれぞれの鎖の濃度は3μMになるように、測定用緩衝液(10mM NaPhosphate (pH7.0) - 100mM NaCl) 200μLに溶解させ、95℃で３分間アニーリングした後、１時間放置し常温に戻し、15分間の脱気を行った。

【０１１０】

F-1及びその相補RNAの配列は以下の表に記す。

【０１１１】

【表３】

オリゴ	配列	塩基数
F－1	5’ -d (TTC - TGA - CTT - Q - TTT - TCA - GAA) -3’	19 mer
相補鎖	5’ -r (UUC - UGA - AAA - X - AAG - UCA - GAA) -3’	19 mer

【０１１２】

※表中のQは３環性アナログを、相補RNAのXはA，U，G，Cを示す。またＦ-1の配列中の下線部分の配列はステム部位を、中央の5 merはループ部分を示している。

【０１１３】

２本鎖状態にしたF-1と相補RNAとの熱的安定性を50％融解温度T_mを測定することで比較した。融解曲線とT_m値を図１２に示す。

【０１１４】

図１２に示すように、F-1は、プローブ内で二重鎖を形成するときよりも、相補ＲＮＡと二重鎖を形成するときに極めて良好な熱的安定性を呈することがわかった。

【実施例５】

【０１１５】

３環性アナログ体の蛍光特性と極性依存度の測定

本実施例では、実施例１で合成した化合物５を用いて、3環性アナログ体の蛍光特性を評価した。化合物５を１mg量りとりDMSO 500μlに溶解した。十分に溶解した後、10μlを

新たなエッペンドルチューブに移し、蒸留水を990μl加えた。その後、蛍光分光装置(日立－F4500)にて蛍光測定を行った。励起、蛍光波長を図１３に示す。また、化合物(５)を1 mg量り取り、DMSO 500μlに十分に溶解した後、10μlづつを新たなエッペンドルチューブ３本にそれぞれ移し、H_2O(蒸留水)、dry MeOH、dry $CHCl_3$それぞれを990μlづつ加えて、３種類のサンプルを作成した。それぞれのサンプルを蛍光セル容器に移し、蛍光分光装置（日立－F4500)にて蛍光測定を行った。励起光(λ_{ex}=338 nm)を照射したときのそれぞれの蛍光波長と蛍光強度のグラフを図１４に示す。

【０１１６】

図１３に示すように、化合物５は、約３３８ｎｍで吸光し、約４００ｎｍの蛍光を発することがわかった。また、図１４に示すように、蒸留水中で最も強い蛍光を発し、メタノール中でも蛍光を発したが、クロロホルム中では蛍光を発しないことがわかった。

【実施例６】

【０１１７】

３環性アナログの結合したCPGの合成

本実施例では、３環アナログの結合したCPG unit (11)を作製した。すなわち、化合物(9) 143 mg (0.21 mmol) をpyridine (2 mL) に溶解させ、DMAP 0.5 μg (4.2μmol,0.02 eq)、無水コハク酸63 mg (0.63 mmol, 3.0 eq) を加え、Ar雰囲気下、室温で撹拌した。110時間後、TLCでこれ以上反応が進行しないことを確認し、酢酸エチルで希釈し、水 (×2),NaHCO3 (×１),飽和NaCl水溶液 (×1)で抽出・洗浄を行い、酢酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を除去した。そこから、DMF (4mL) に溶解させ、CPG 0.62 g (0.047 mmol, 1.0 eq) を反応液になじませ、WSC 36 mg (0.188 mmol,4 eq) を加えた。室温で２日間、振とうし、その後、pyridineで洗浄、乾燥させた後に、無水酢酸 1.5 mL, pyridine 13.5 mL, DMAP 0.183 g [0.1 M DMAP in pyridine：Ac_2O (9：1)] を加え、室温で15時間振とうさせた。洗浄液を、Pyridine、MeOH及びアセトンの順に替えて洗浄し乾燥させた。この結果、31.2 μmol / gの活性で生成物を得た。なお、活性は、乾燥したCPG樹脂6 mgをガラスフィルターにのせ、$HClO_4$：EtOH=3：2の溶液を流し込み、その濾液のUV 498 nmの波長(DMTr基の波長) の吸光度を求め、以下の式に代入することにより算出した。

【０１１８】

【数１】

$$\frac{Abs.(498\mathrm{nm}) \times Vol.(\mathrm{solution})(\mathrm{mL}) \times 14.3}{\mathrm{Weight(support)(mg)}} = \text{活性}(\mu\mathrm{mol}/\mathrm{g})$$

【実施例７】

【０１１９】

末端に３環性アナログを組み込んだオリゴヌクレオチド (FK-1, FK-3の合成)

本実施例では、DNA合成機を用いて、合成したCPG unite (11)（蛍光性アナログＱ）請求項を用いて下記塩基配列のX部分（３’末端）に導入した１種類のオリゴヌクレオチド（FK-1）を合成、精製した。また、以下のターゲット配列からなるＲＮＡ及びＤＮＡ（ウラシルに替えてチミンを塩基とする）を合成、精製した。また、FK-2配列の５’末端のNに、dA, dT, dG, dCそれぞれが組み込まれた４種類のオリゴヌクレオチドも合成、精製した。なお、本実施例で用いる以下のターゲット配列（ＲＮＡ）は、薬物トランスポーターＭＤＲ１（Ｐ糖タンパク質）の遺伝子多型の一つである２６７７Ｇ／Ａ／Ｔを含んでいる（２６７７位がＹに相当している。）

【０１２０】

ターゲットRNA：5’ -r (GAC - UCA - CCU -UCC - CAG- X -
- ACC - UUC - UAG - UUC - UUU) -3’　　(31 mer)
ＦK-１：5’- d (AAA - GAA - CTA - GAA - GGT - Q) -3’　(16 mer)
ＦK-２：5’- d (Y- CTG - GGA - AGG - TGA - GTC) -3’　(16 mer)

【０１２１】

なお、ＤＮＡ合成機の使用にあたっては、実施例２と同様に操作して、精製したオリゴ

ヌクレオチドを取得した。

【実施例８】

【０１２２】

ターゲット鎖に対する2種類のプローブのハイブリダイゼーション及び蛍光測定その１

実施例６で合成したFK-1、FK-2（Y：dA、dT、dG、dCの４種類）、及びターゲットＲＮＡ鎖（Ｘ：rU）の３種のオリゴヌクレオチドをそれぞれの鎖の濃度が3μMになるように、測定用緩衝液(10mM NaPhosphate (pH7.0) - 100mM NaCl) 1 mLに溶解させ、95℃で３分間アニーリングした後、１時間放置し常温に戻し、15分間の脱気を行った。計４種類のハイブリダイゼーションサンプルに加えて、FK1-単独のサンプルを蛍光セル容器に移し、蛍光分光装置（日立－F4500)にて蛍光測定を行った。励起光(λ_{ex}=338 nm)を照射したときのそれぞれの蛍光波長と蛍光強度のグラフを図１５に示す。

【０１２３】

図１５に示すように、ターゲット鎖のＸ（ｒＵ）にそれぞれ相補的なFK-1とFK-2（Y：dA）のハイブリダイゼーションサンプルにおいては、最も強い蛍光を示し、その他のハイブリダイゼーションサンプルについては、ほぼFK-1単独サンプルとほぼ同等であった。すなわち、FK-1とFK-2（Ｙ：dA）をターゲット鎖に対するプローブとして用いたとき、FK-1とFK-2との競合により、図９に示すように、蛍光性アナログ塩基であるＱが二重鎖からフリップアウトされて、蛍光を発したと考えられた。また、その他のハイブリダイゼーションサンプルにおいては、それぞれのFK-2プローブがFK-1と競合するプローブでなかったために、蛍光性塩基Ｑは二重鎖からフリップアウトされることがなかったため蛍光を呈しなかった。

【実施例９】

【０１２４】

ターゲット鎖に対する2種類のプローブのハイブリダイゼーション及び蛍光測定その２

実施例６で合成したFK-1、FK-2（Y：dA、dT、dCの３種類）、及びターゲットＲＮＡ鎖（Ｘ：rU、rG、rA）を所定の組み合わせで、３種のオリゴヌクレオチドをそれぞれの鎖の濃度が3μMになるように、測定用緩衝液(10mM NaPhosphate (pH7.0) - 100mM NaCl) 1 mLに溶解させ、95℃で３分間アニーリングした後、１時間放置し常温に戻し、15分間の脱気を行った。計４種類のハイブリダイゼーションサンプルに加えて、FK1-単独のサンプルを蛍光セル容器に移し、蛍光分光装置（日立－F4500)にて蛍光測定を行った。励起光(λ_{ex}=338 nm)を照射したときのそれぞれの蛍光波長と蛍光強度のグラフを図１６に示す。

【０１２５】

図１６に示すように、ターゲット鎖（X:rG）に対してFK-1とFK-2（Y:dC）をハイブリダイゼーションさせたとき、ターゲット鎖とFK-2とが強くハイブリダイゼーション（GC塩基対）した結果、FK-1の蛍光性塩基Qが強くフリップアウトして最も強い蛍光を発した。次いで、ターゲット鎖（X:rA）に対してFK-1とFK-2（Y:dT）をハイブリダイゼーションさせたとき、ターゲット鎖とFK-2とがハイブリダイゼーションした結果、FK-1の蛍光性塩基Qがフリップアウトして強い蛍光を発した。さらに、ターゲット鎖のＸ（ｒＵ）にそれぞれ相補的なFK-1とFK-2（Ｙ：dA）のハイブリダイゼーションサンプルにおいては、これらの次いで蛍光を発した。

【０１２６】

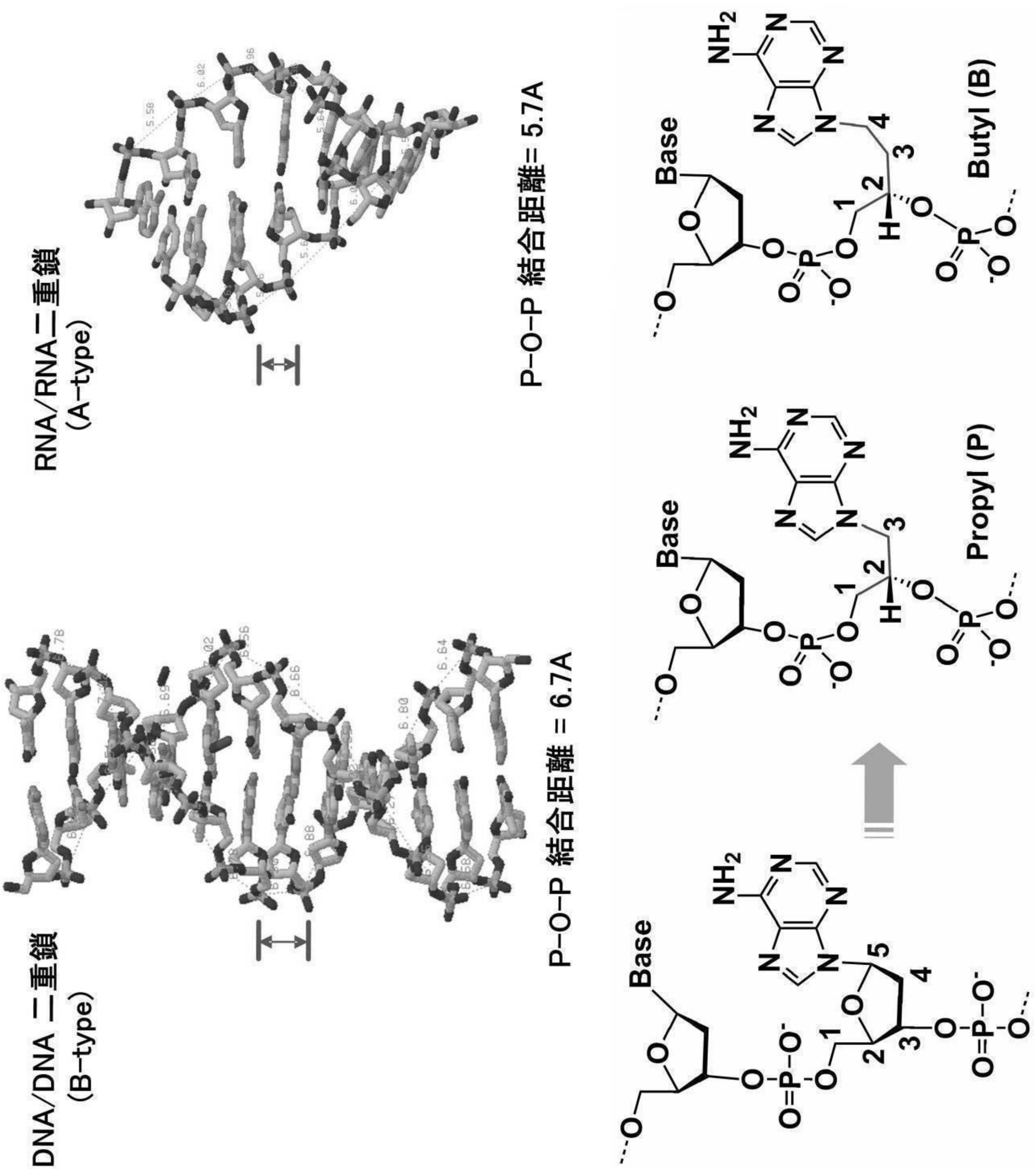
以上のことから、ターゲットRNA中のXに対応する位置（5’末端）にXとして存在可能性のある塩基に相補的な通常の塩基のプローブ（FK-2）とXに対応する位置（3’末端）に蛍光性塩基Qを備えるプローブ(FK-1) とをハイブリダイゼーションさせることにより、蛍光性塩基Qのフリップアウトの程度により、蛍光強度が異なるため、これを利用して、ターゲットRNA中のXの塩基を検出することができる。

【配列表フリーテキスト】

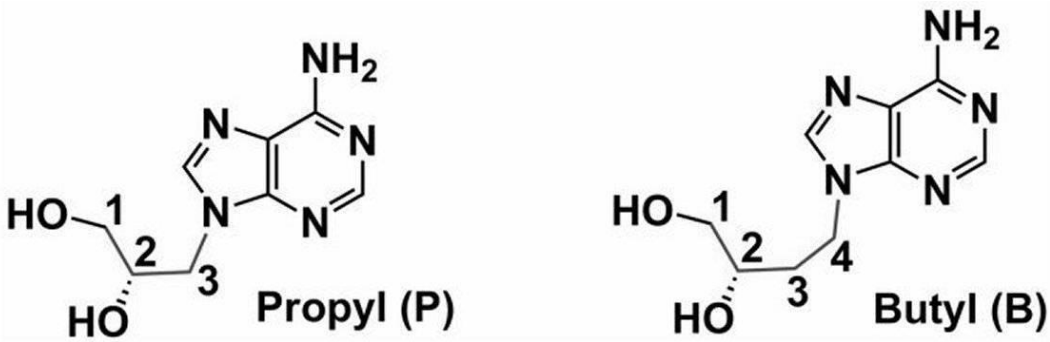
【０１２７】

配列番号１～７、９，１０：合成オリゴヌクレオチド

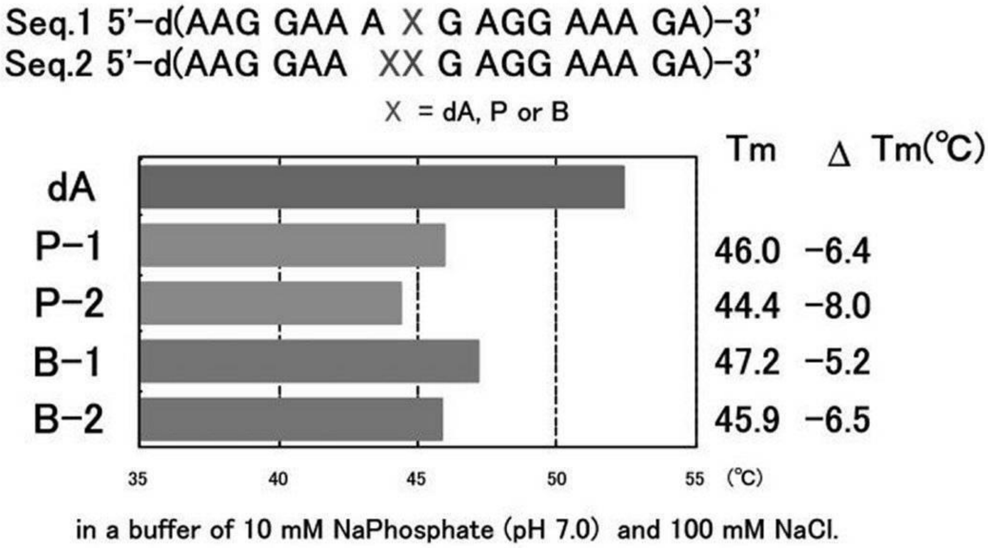
【図１】


DNA/DNA 二重鎖
(B-type)
P-O-P 結合距離 = 6.7A
RNA/RNA二重鎖
(A-type)
P-O-P 結合距離= 5.7A
Propyl (P)
Butyl (B)

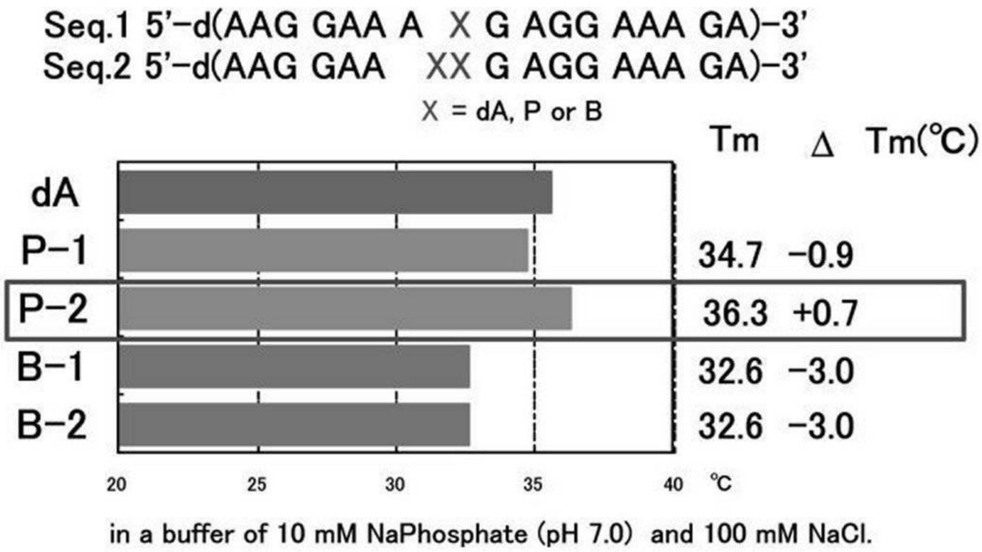
【図２】



Propyl (P)
Butyl (B)

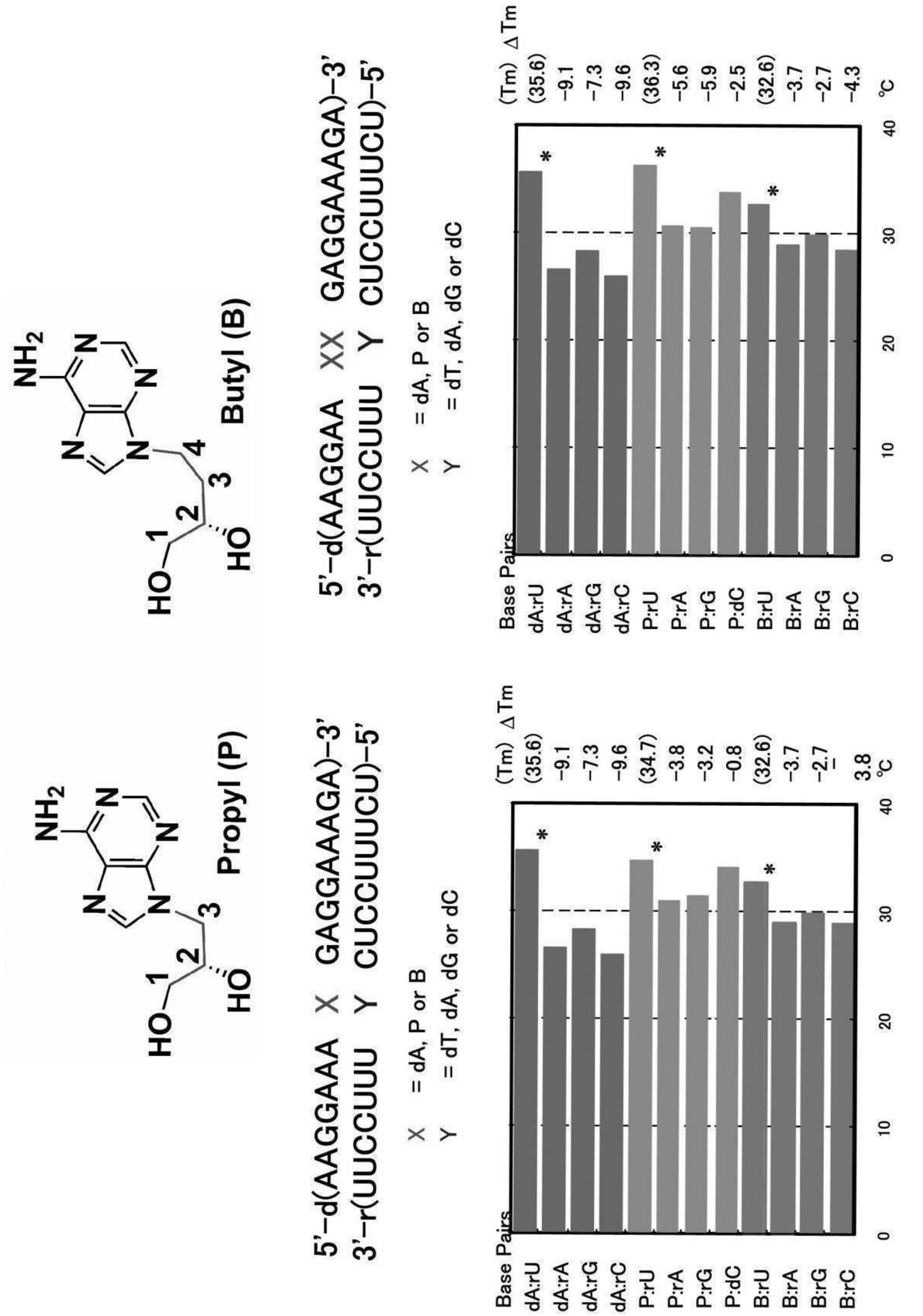


Seq.1 5'-d(AAG GAA A X G AGG AAA GA)-3'
Seq.2 5'-d(AAG GAA XX G AGG AAA GA)-3'
X = dA, P or B
Tm Δ Tm(℃)
dA
P-1 46.0 -6.4
P-2 44.4 -8.0
B-1 47.2 -5.2
B-2 45.9 -6.5
35 40 45 50 55 (℃)
in a buffer of 10 mM NaPhosphate (pH 7.0) and 100 mM NaCl.



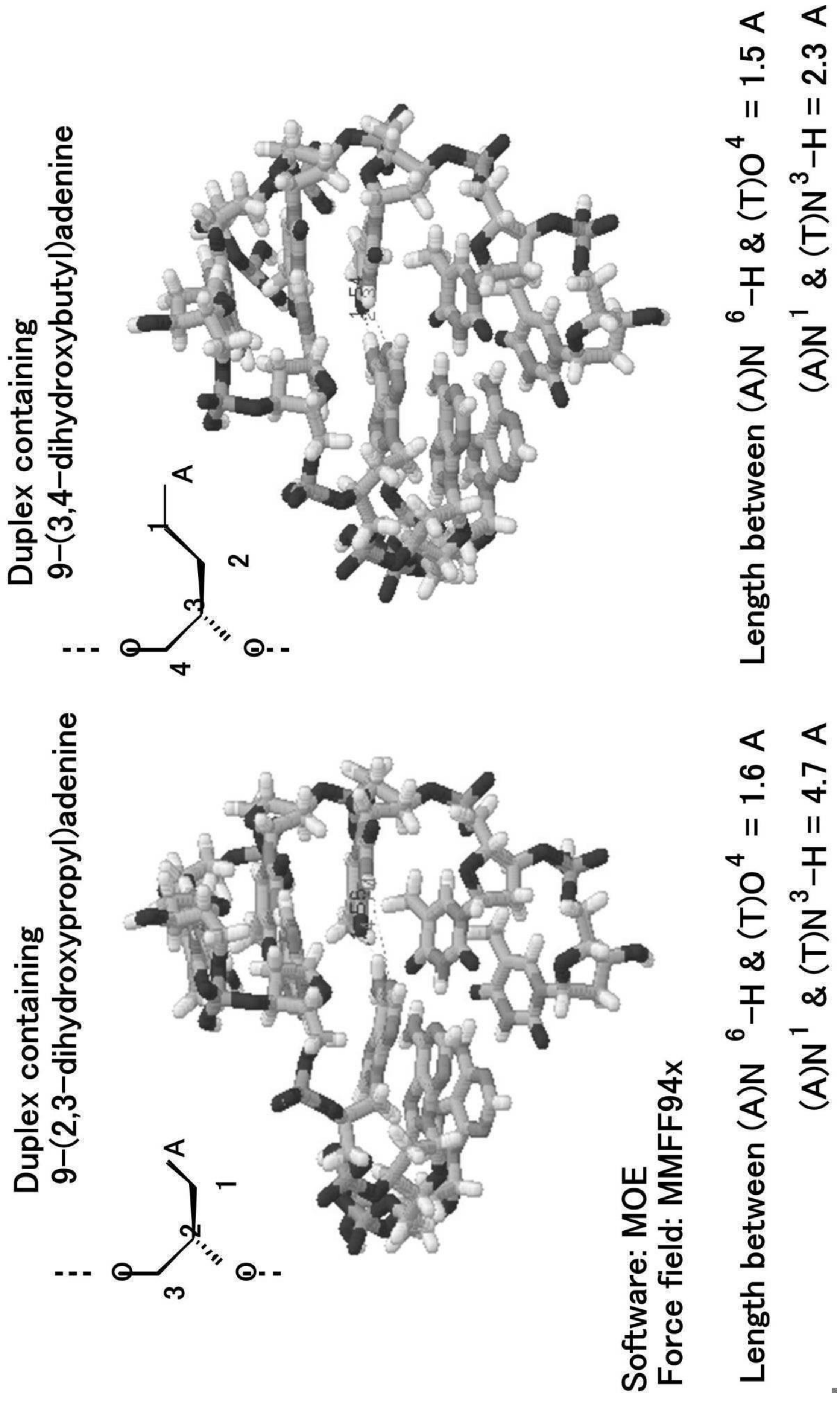
Seq.1 5'-d(AAG GAA A X G AGG AAA GA)-3'
Seq.2 5'-d(AAG GAA XX G AGG AAA GA)-3'
X = dA, P or B
Tm Δ Tm(℃)
dA
P-1 34.7 -0.9
P-2 36.3 +0.7
B-1 32.6 -3.0
B-2 32.6 -3.0
20 25 30 35 40 ℃
in a buffer of 10 mM NaPhosphate (pH 7.0) and 100 mM NaCl.

【図３】

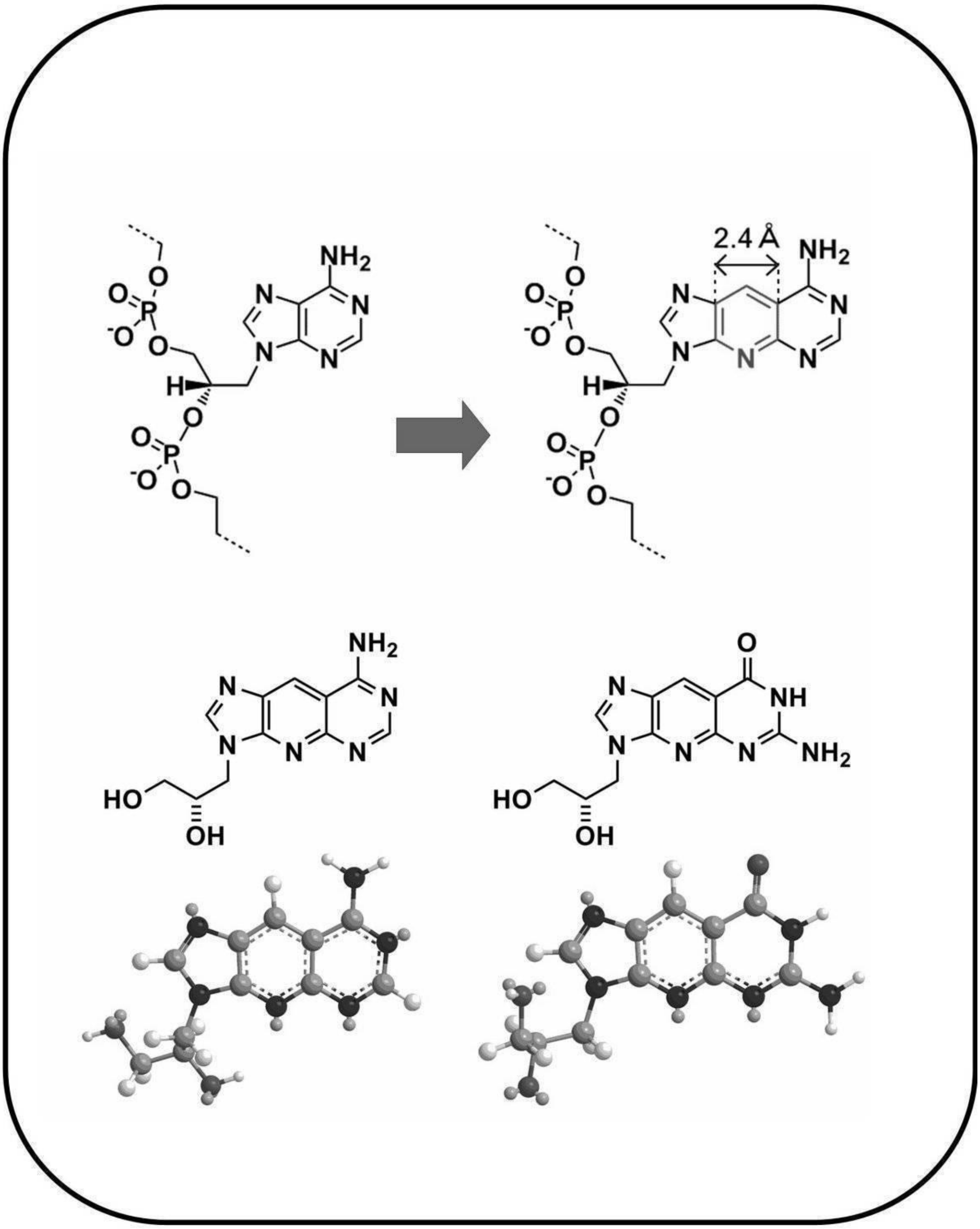


T_m values at 3 μM of duplex concentration in a buffer of 10 mM NaPhosphate (pH 7.0) containing 100 mM NaCl.
* indicates T_ms of duplexes with match base pairs.

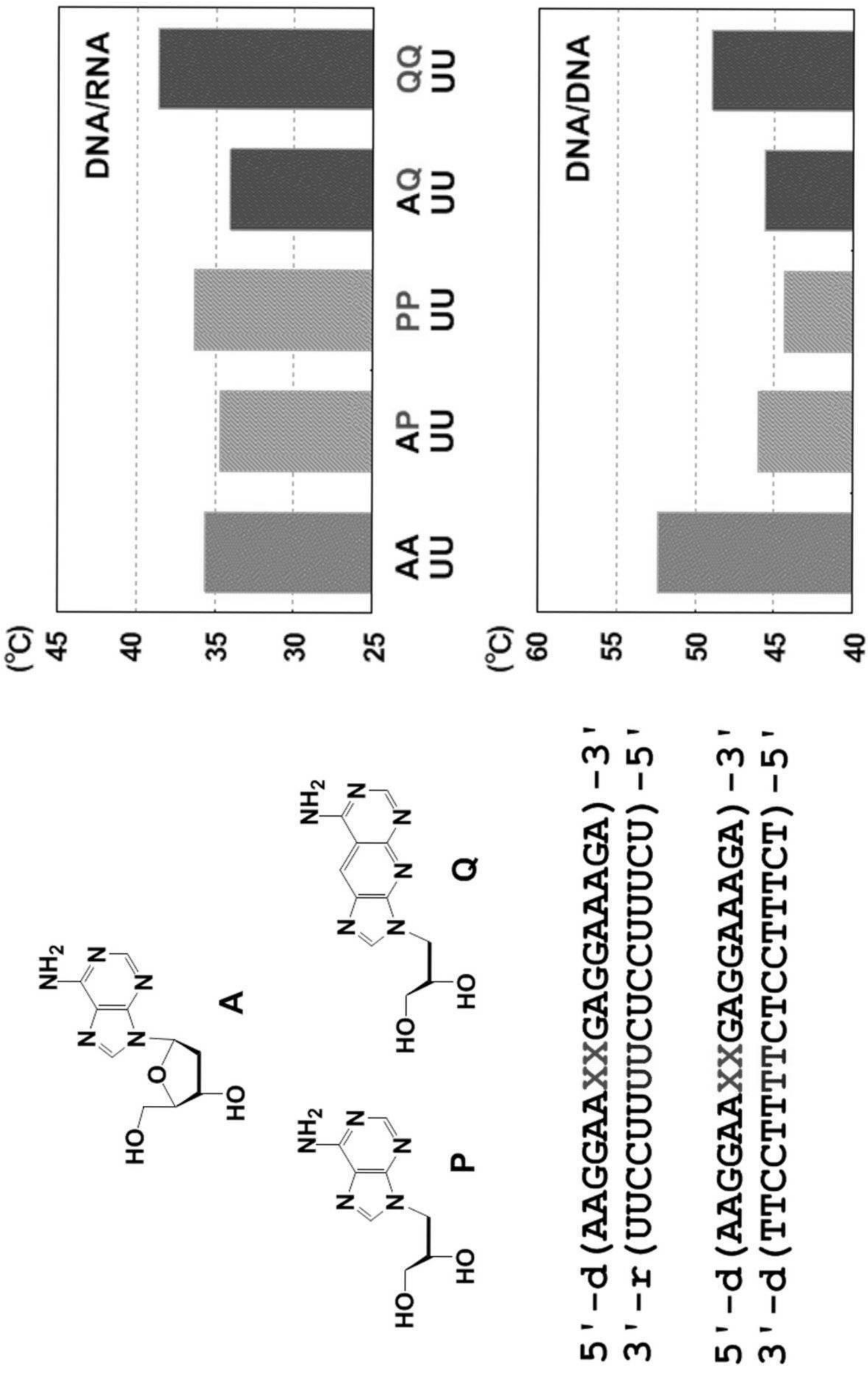
【図４】


Duplex containing
9-(2,3-dihydroxypropyl)adenine
Duplex containing
9-(3,4-dihydroxybutyl)adenine
Software: MOE
Force field: MMFF94x
Length between (A)N 6-H & (T)O4 = 1.6 A
(A)N1 & (T)N3-H = 4.7 A
Length between (A)N 6-H & (T)O4 = 1.5 A
(A)N1 & (T)N3-H = 2.3 A

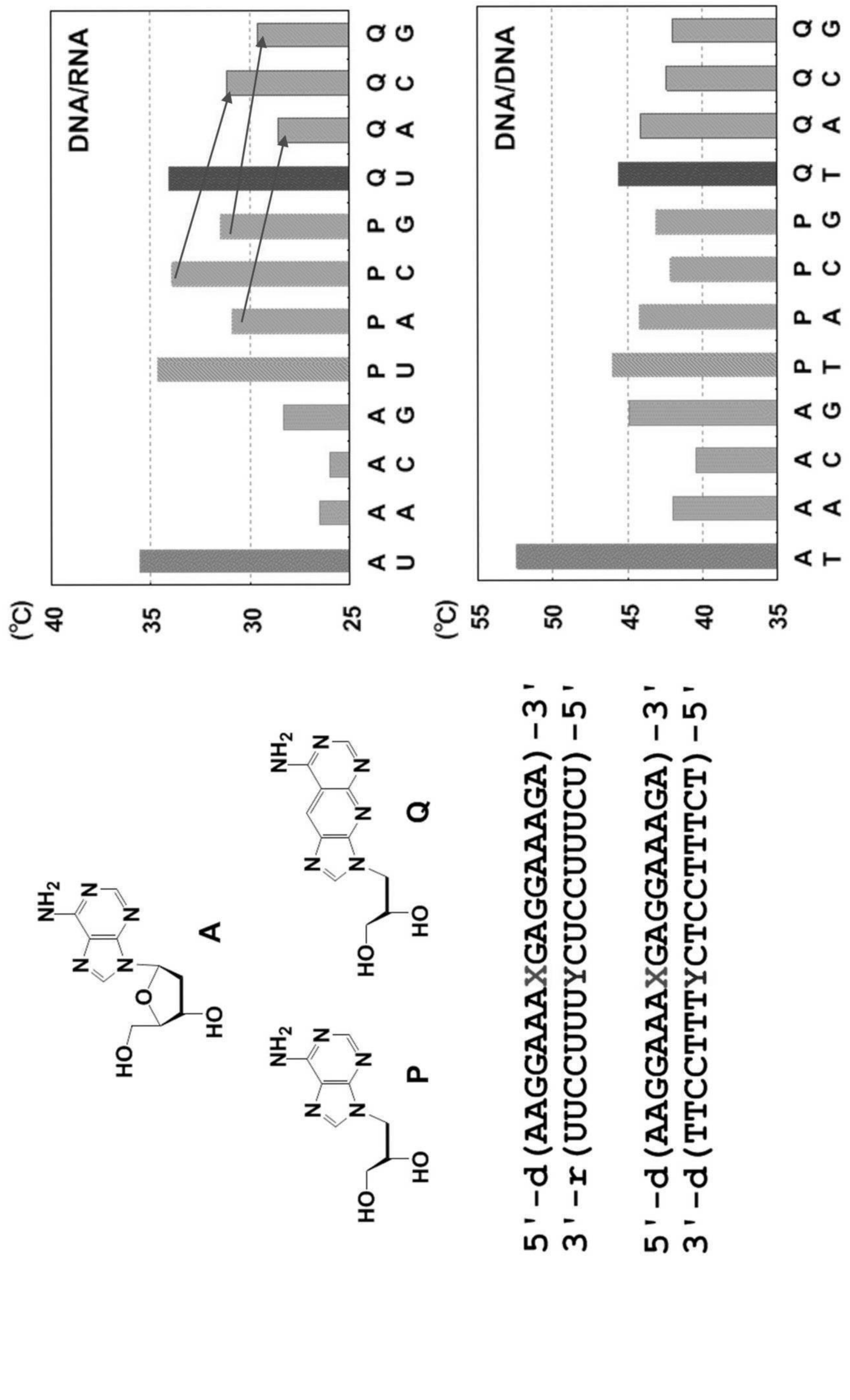
【図５】



【図６】

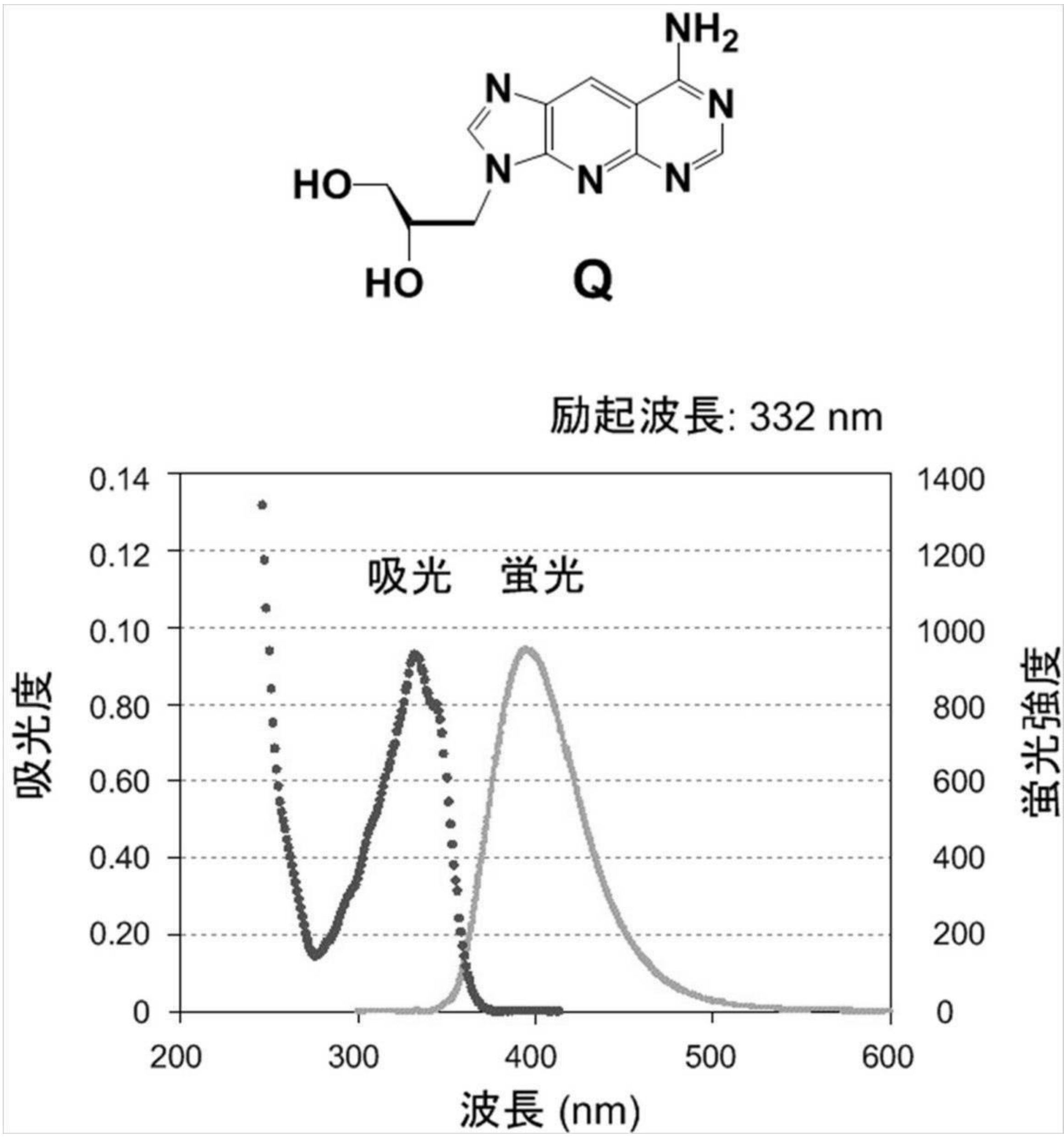

DNA/RNA
DNA/DNA
(°C)
45
40
35
30
25
60
55
50
45
40
AA UU
AP UU
PP UU
AQ UU
QQ UU
A
P
Q
NH2
HO
N
O
5'-d(AAGGAAXXGAGGAAAGA)-3'
3'-r(UUCCUUUUUCUCCUUUCU)-5'
5'-d(AAGGAAXXGAGGAAAGA)-3'
3'-d(TTCCTTTTTCTCCTTTCT)-5'

【図７】

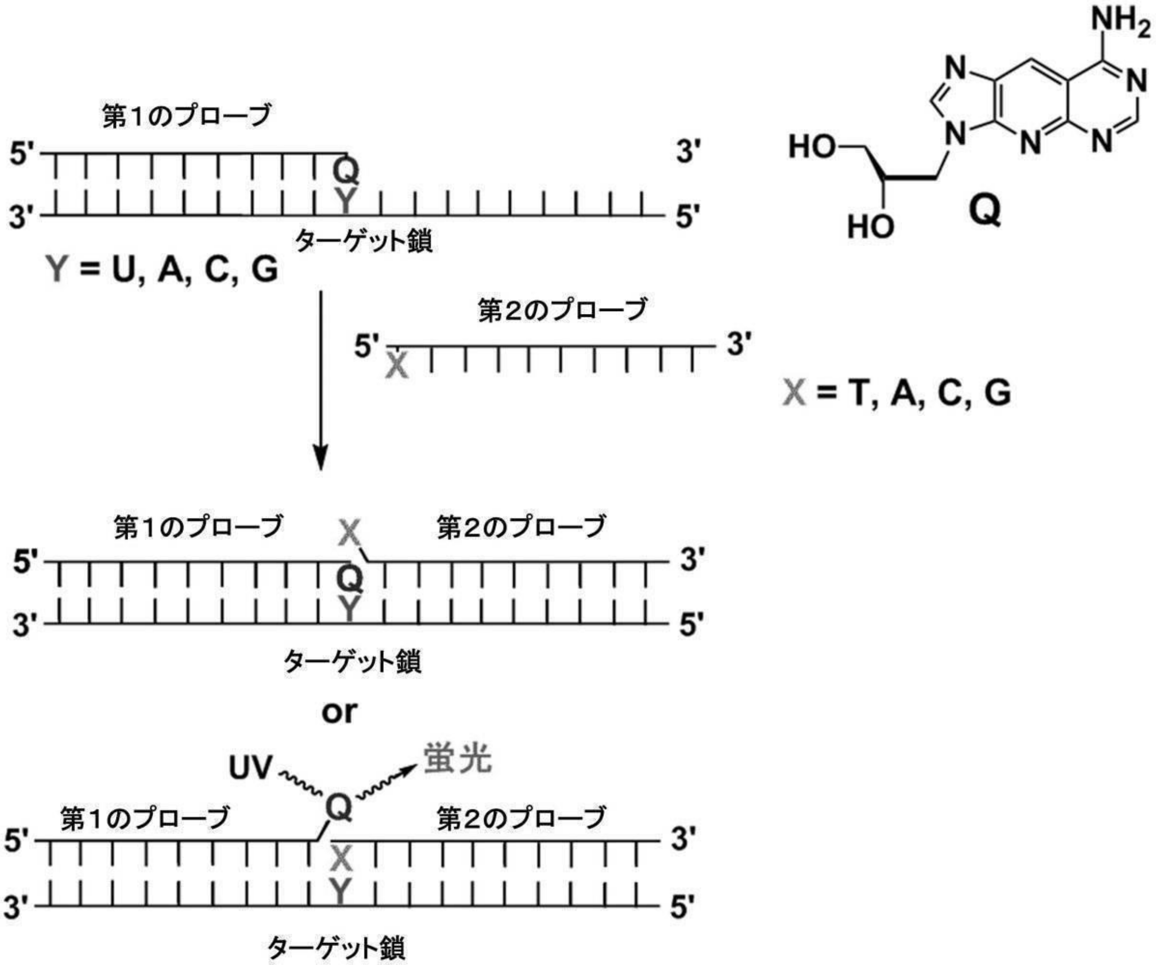


DNA/RNA
DNA/DNA
(°C)
A A A A P P P P Q Q Q Q
U A C G U A C G U A C G
A A A A P P P P Q Q Q Q
T A C G T A C G T A C G
A
P
Q
5'-d(AAGGAAAXGAGGAAAGA)-3'
3'-r(UUCCUUUYCUCCUUUCU)-5'
5'-d(AAGGAAAXGAGGAAAGA)-3'
3'-d(TTCCTTTYCTCCTTTCT)-5'

【図８】

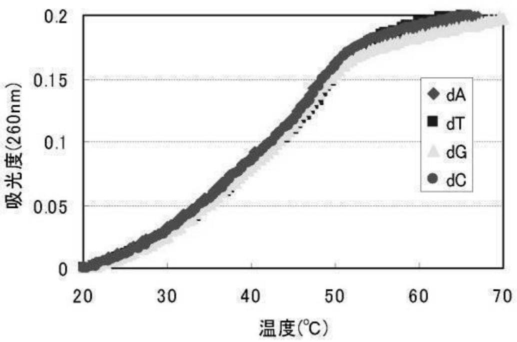

NH2
N
N
N
N
N
HO
HO
Q
励起波長: 332 nm
0.14
0.12
0.10
0.80
0.60
0.40
0.20
0
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
吸光
蛍光
吸光度
蛍光強度
200
300
400
500
600
波長 (nm)

【図９】



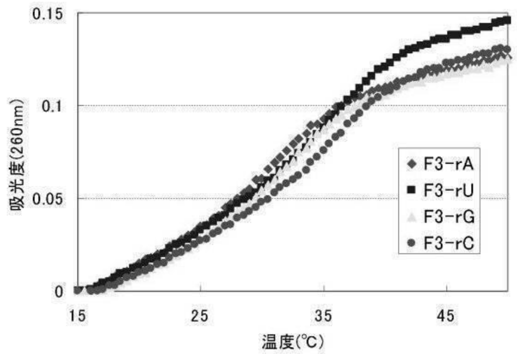
第1のプローブ
5'
3'
Q
Y
3'
5'
ターゲット鎖
Y = U, A, C, G
NH2
N
N
N
HO
N
N
N
HO
Q
第2のプローブ
5'
X
3'
X = T, A, C, G
第1のプローブ
X
第2のプローブ
5'
3'
Q
Y
3'
5'
ターゲット鎖
or
UV
Q
蛍光
第1のプローブ
第2のプローブ
5'
3'
X
Y
3'
5'
ターゲット鎖

【図１０】



塩基対	Tm℃	ΔTm℃
dA:dT	52.4	—
F3:dA	44.1	−1.5
F3:dT	45.6	(−6.8)
F3:dG	42.0	−3.6
F3:dC	42.4	−3.2

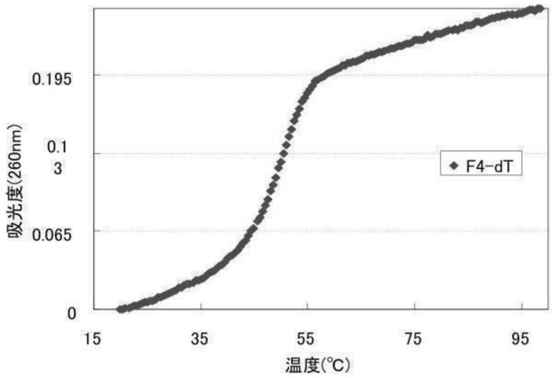
()内は、天然型と比較したときの値であり、他は、F3:dTと比較したときの値



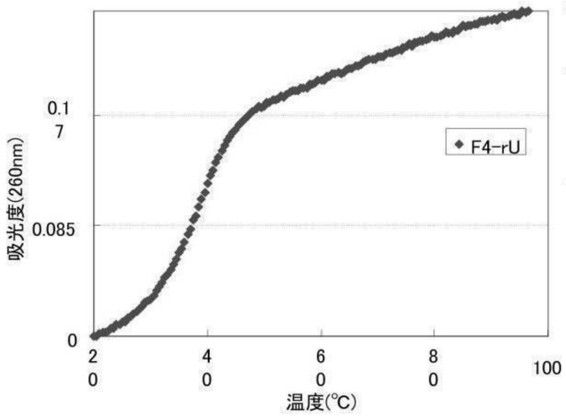
塩基対	Tm℃	ΔTm℃
dA:rU	35.6	—
F3:rA	28.6	−5.5
F3:rU	34.1	(−1.5)
F3:rG	29.6	−4.5
F3:rC	31.2	−2.9

()内は、天然型と比較したときの値であり、他は、F3:rUと比較したときの値

【図１１】

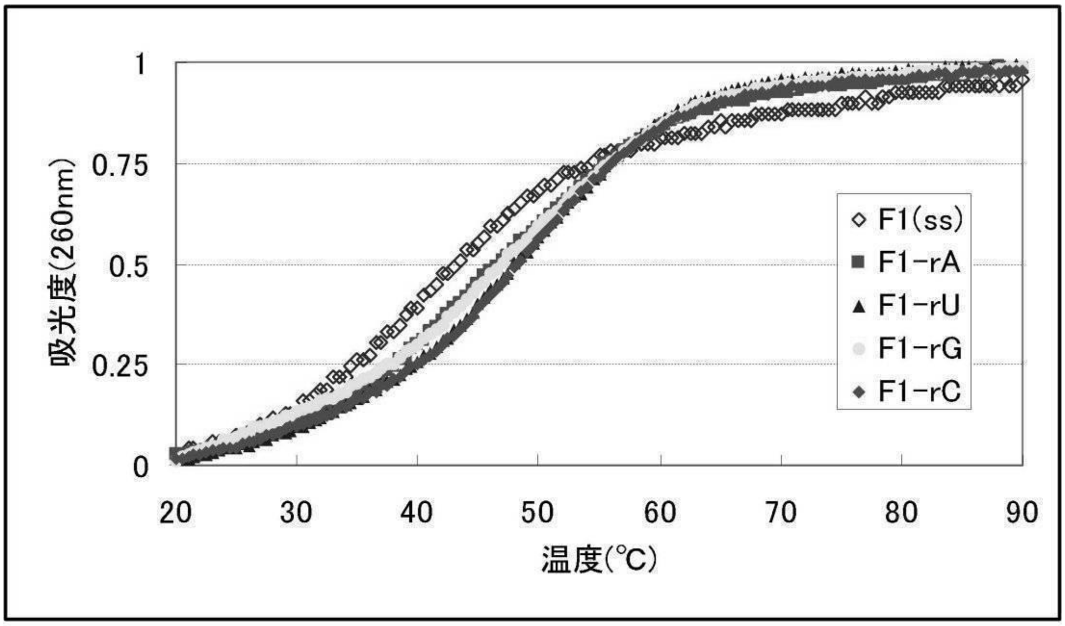


塩基対	Tm℃	ΔTm℃
dA:dT	52.4	—
F4:dT	49.0	-3.4



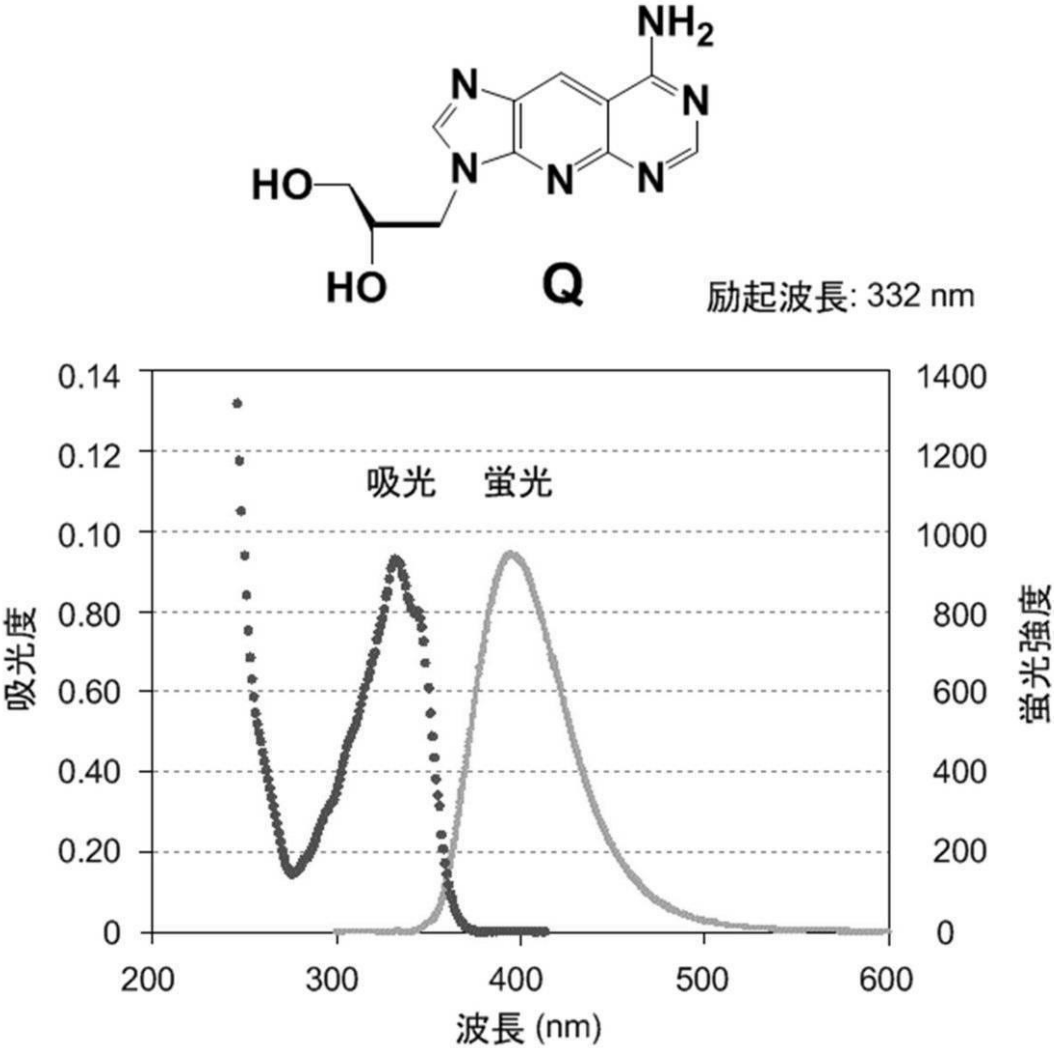
塩基対	Tm℃	ΔTm℃
dA:rU	35.6	—
F4:rU	38.6	3.0

【図１２】

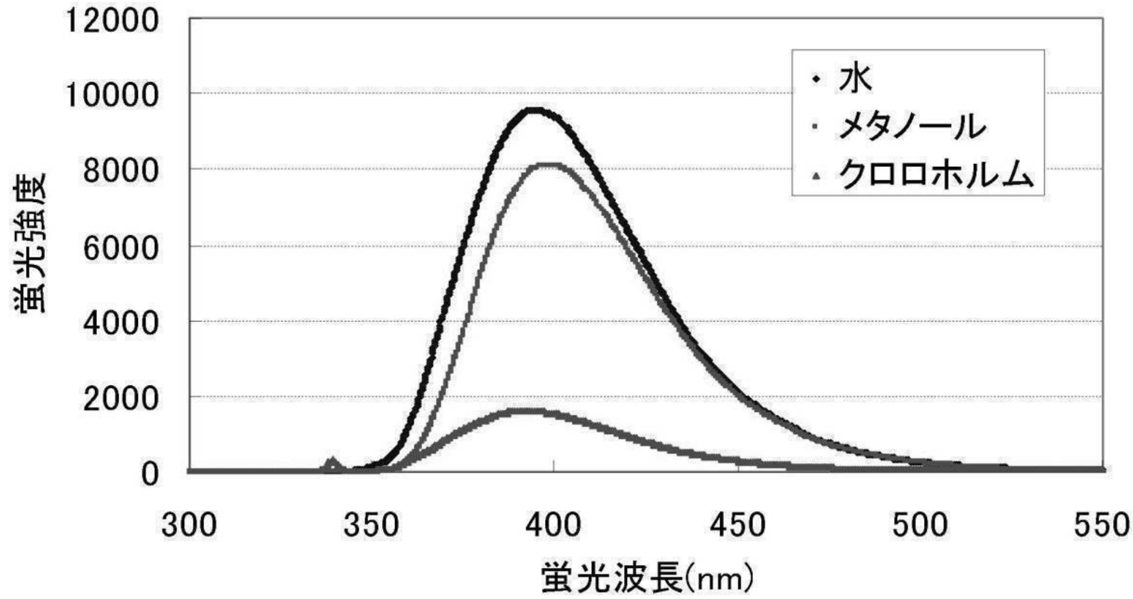


塩基対	Tm℃	ΔTm℃
F1(ss)	41．0	—
F1:rA	45．6	4．6
F1:rU	47．7	6．7
F1:rG	47．3	6．7
F1:rC	48．4	7．4

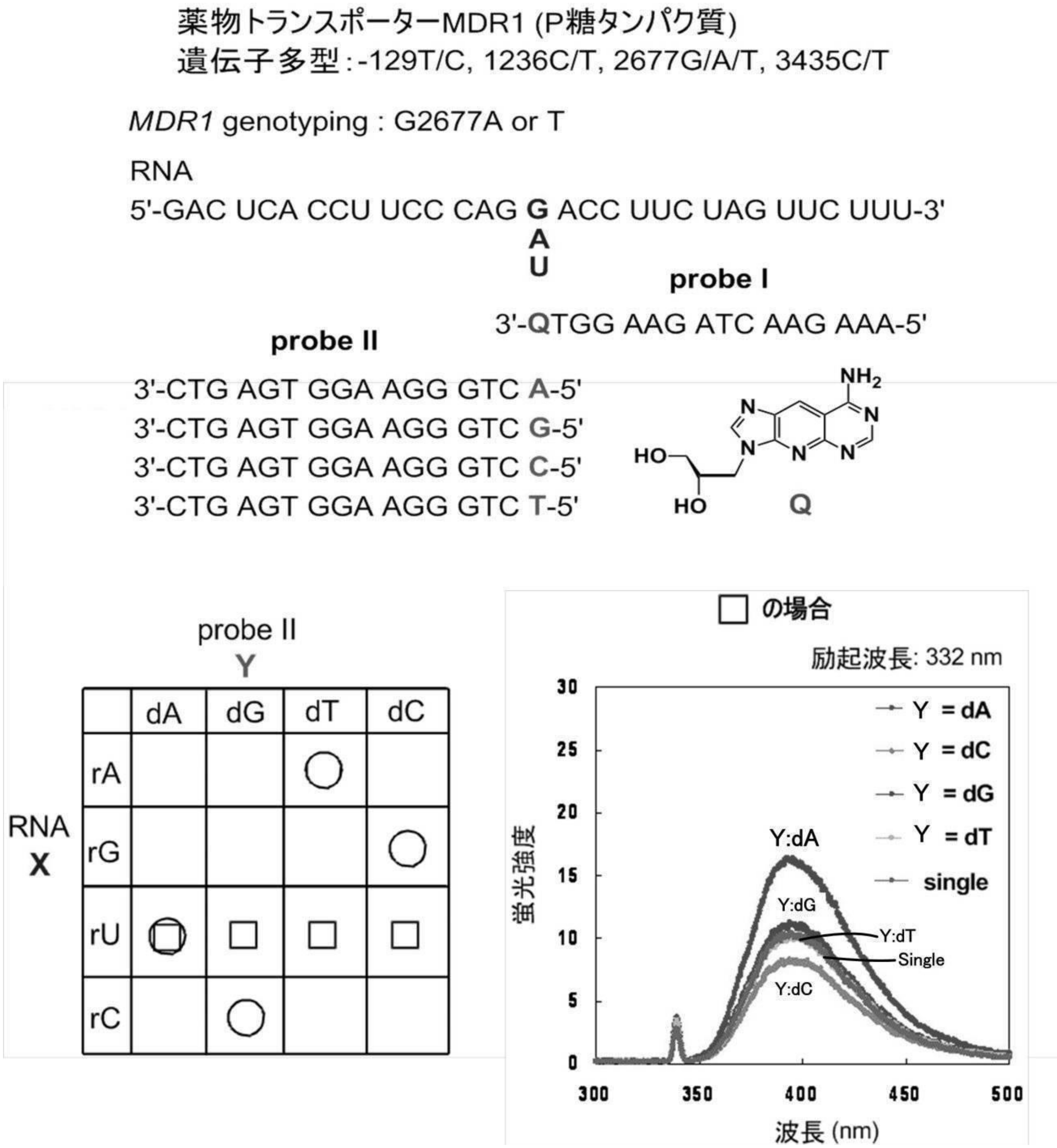
【図１３】


NH2
N
N
N
N
N
HO
HO
Q
励起波長: 332 nm
0.14
0.12
0.10
0.80
0.60
0.40
0.20
0
吸光度
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
蛍光強度
吸光
蛍光
200
300
400
500
600
波長 (nm)

【図１４】

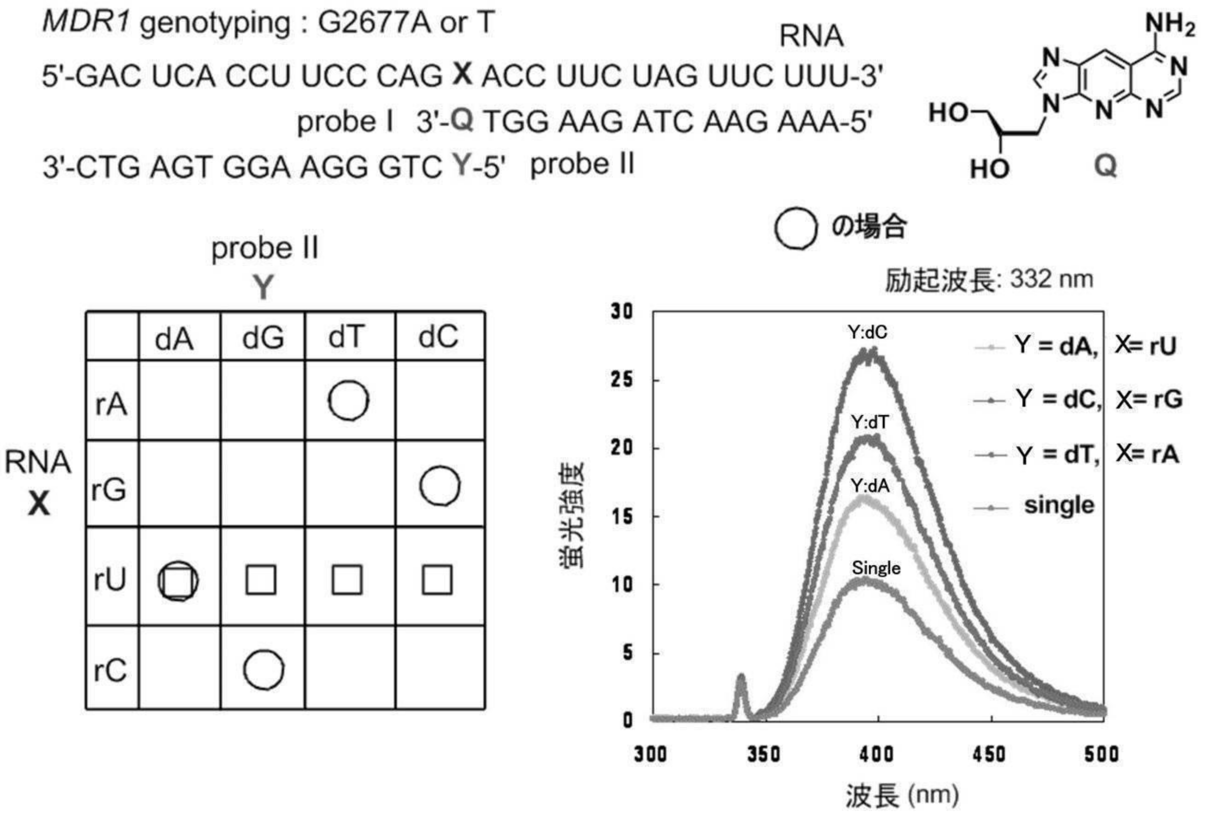

12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
蛍光強度
水
メタノール
クロロホルム
300
350
400
450
500
550
蛍光波長(nm)

【図１５】



薬物トランスポーターMDR1 (P糖タンパク質)
遺伝子多型：-129T/C, 1236C/T, 2677G/A/T, 3435C/T
MDR1 genotyping : G2677A or T
RNA
5'-GAC UCA CCU UCC CAG G ACC UUC UAG UUC UUU-3'
A
U
probe I
3'-QTGG AAG ATC AAG AAA-5'
probe II
3'-CTG AGT GGA AGG GTC A-5'
3'-CTG AGT GGA AGG GTC G-5'
3'-CTG AGT GGA AGG GTC C-5'
3'-CTG AGT GGA AGG GTC T-5'
NH2
HO
HO
Q
probe II
Y
dA dG dT dC
RNA
X
rA
rG
rU
rC
の場合
励起波長: 332 nm
Y = dA
Y = dC
Y = dG
Y = dT
single
Y:dA
Y:dG
Y:dT
Single
Y:dC
蛍光強度
波長 (nm)
0 5 10 15 20 25 30
300 350 400 450 500

【図１６】



【配列表】
0005201639000001.app

フロントページの続き

(56)参考文献 Collection of Czechoslovak Chemical Communications, １９８８年, Vol.53, No.8, pp.1779-1794
Journal of Organic Chemistry, ２００５年, Vol.70, No.2, pp.639-647
Journal of the American Chemical Society, ２００４年, Vol.126, No.4, pp.1102-1109
Science (Washington DC, United States), ２００３年, Vol.302, No.5646, pp.868-871
Synlett, ２００２年, No.9, pp.1483-1486
Journal of American Chemical Society, ２００５年, Vol.127, No.12, pp.4174-4175

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C07D487/00-491/22
C12N 15/00- 15/90
C12Q 1/00- 3/00
CAplus/REGISTRY(STN)