

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6430953号
(P6430953)

(45) 発行日 平成30年11月28日(2018.11.28)

(24) 登録日 平成30年11月9日(2018.11.9)

(51) Int. Cl.	F I
C07H 19/073 (2006.01)	C07H 19/073 ZNA
C07H 21/04 (2006.01)	C07H 21/04 Z
C07H 19/04 (2006.01)	C07H 19/04
C12N 15/00 (2006.01)	C12N 15/00

請求項の数 11 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2015-545312 (P2015-545312)	(73) 特許権者	503360115 国立研究開発法人科学技術振興機構
(86) (22) 出願日	平成26年10月30日(2014.10.30)		埼玉県川口市本町四丁目1番8号
(86) 国際出願番号	PCT/JP2014/078980	(74) 代理人	110000523 アクシス国際特許業務法人
(87) 国際公開番号	W02015/064718	(74) 代理人	100127133 弁理士 小坂橋 浩之
(87) 国際公開日	平成27年5月7日(2015.5.7)	(72) 発明者	藤本 健造 石川県能美市旭台一丁目1番地 国立大学 法人北陸先端科学技術大学院大学 マテリ アルサイエンス研究科内
審査請求日	平成29年10月25日(2017.10.25)	(72) 発明者	中村 重孝 石川県能美市旭台一丁目1番地 国立大学 法人北陸先端科学技術大学院大学 マテリ アルサイエンス研究科内
(31) 優先権主張番号	特願2013-225799 (P2013-225799)		
(32) 優先日	平成25年10月30日(2013.10.30)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光架橋形成抑制方法、及び自己架橋体形成抑制型光応答性核酸

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

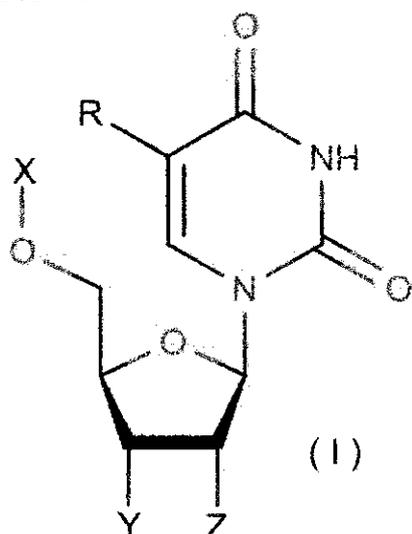
光架橋性のピニル構造を有する光応答性塩基に対して光架橋可能なチミン(T)又はウラシル(U)の塩基の、ピリミジン環の5位を、R基(ただし、Rは、-CNである)に置換することによって、光架橋性のピニル構造を有する光応答性塩基と、光架橋可能なチミン(T)又はウラシル(U)の塩基との間の、光架橋形成を抑制する方法。

【請求項2】

光架橋形成が、

光応答性核酸の塩基配列中にある、光架橋性のピニル構造を有する光応答性塩基と、該光応答性核酸の塩基配列中の光応答性塩基を含む4塩基長以上の部分塩基配列(光応答性部分塩基配列)に対して相補的な部分塩基配列(相補的部分塩基配列)を有する核酸(部分相補性核酸)の当該相補的部分塩基配列中にある、光応答性塩基に対して光架橋可能なチミン(T)又はウラシル(U)の塩基との間に、光架橋が形成される反応であり、部分相補性核酸として、相補的部分塩基配列中の光架橋可能なT又はUのヌクレオチドの少なくとも1個以上に代えて、次の式(I)：

【化 1】



(ただし、式 I において、

R は、 $-C(=N)$ であり、

X は、式 I で X に結合している O と一体となって形成されたリン酸基を表し、

Y は、水酸基を表し、

Z は、水素又は水酸基である)

20

で表される修飾ヌクレオチドがリン酸ジエステル結合して導入されてなる、部分相補性核酸を使用することによって、

光応答性核酸と部分相補性核酸との間の光架橋形成を抑制する方法である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

光応答性核酸が、光応答性部分塩基配列と相補的部分塩基配列とを、同一分子中に異なった配列領域として含み、光応答性核酸の分子と部分相補性核酸の分子とが同一の分子であり、

光応答性核酸と部分相補性核酸との間の光架橋形成を抑制する方法が、光応答性塩基及び光架橋可能なチミン (T) 又はウラシル (U) の塩基の間の光架橋によって、光応答性核酸の自己架橋体形成を抑制する方法である、請求項 1 ~ 2 のいずれかに記載の方法。

30

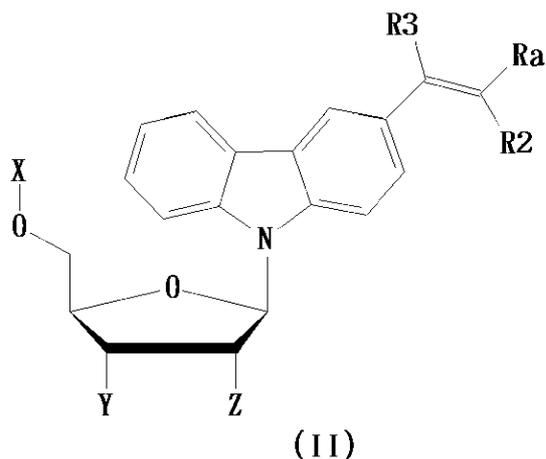
【請求項 4】

光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基が、3 - ビニルカルバゾール構造を有する光応答性塩基である、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基が、次の式 (I I) 又は式 (I I I) :

【化 2】



(ただし、式 II 中、R a は、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C 2 ~ C 7 のアルコキシカルボニル基、又は水素であり、

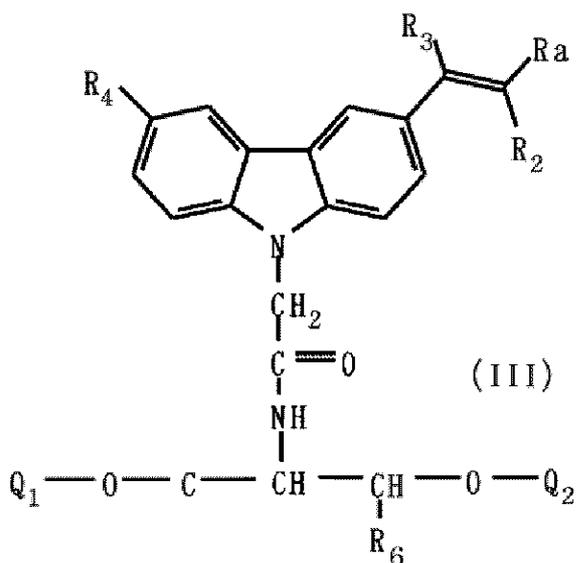
R 2 及び R 3 は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C 2 ~ C 7 のアルコキシカルボニル基、又は水素であり、

X は、式 II で X に結合している O と一体となって形成されたリン酸基を表し、

Y は、水酸基を表し、

Z は、水素又は水酸基である) ;

【化 3】



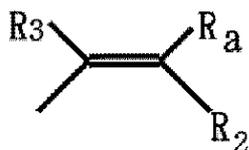
(ただし、式 III 中、

R a は、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C 2 ~ C 7 のアルコキシカルボニル基、ホスホノ基、スルホ基、又は水素原子を表し、

R 2 及び R 3 は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C 2 ~ C 7 のアルコキシカルボニル基、又は水素原子を表し、

R 4 は、水素原子、水酸基、C 1 ~ C 3 のアルコキシ基、C 1 ~ C 3 のアルキルスルファニル基、ニトロ基、フッ素原子、フッ化メチル基、C 6 ~ C 1 2 の単環式又は二環式の芳香族化合物の 1 価基、C 6 ~ C 1 2 の単環式又は二環式の複素環系芳香族化合物の 1 価基、又は、次の式 :

【化 4】



(ただし、上記式中、R a、R 2 及び R 3 は、式 I I I について上述した R a、R 2 及び R 3 とは独立に、式 I I I について上述した R a、R 2 及び R 3 として挙げられた基から選択された基を表す)

で表される 1 価基を表し、

R 6 は、水素原子、メチル基、又はエチル基を表し、

Q は、式 I I I で Q に結合している O と一体となって形成されたリン酸基を表し、

Q は、水素原子を表す)

で表される修飾ヌクレオチドの塩基部分として、上記修飾ヌクレオチドのリン酸ジエステル結合によって光応答性部分塩基配列中に導入されている、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

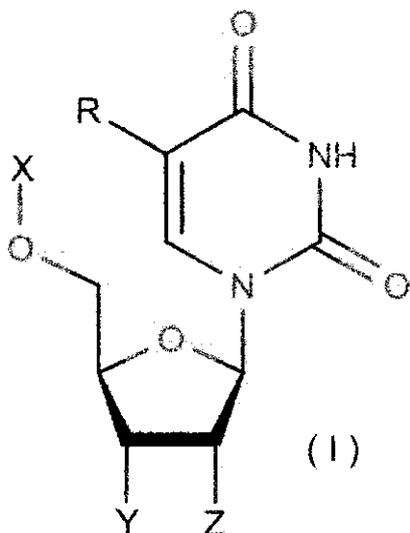
部分相補性核酸の塩基配列中の全ての T 又は U のヌクレオチドが、式 (I) で表される修飾ヌクレオチドによって置換されている、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基と、

光架橋可能な T 又は U のヌクレオチドの少なくとも 1 個以上に代えて、次の式 (I) :

【化 5】



(ただし、式 I において、

R は、 $-CN$ であり、

X は、式 I で X に結合している O と一体となって形成されたリン酸基を表し、

Y は、水酸基を表し、

Z は、水素又は水酸基である)

で表される修飾ヌクレオチドとを、

含む、自己架橋体形成抑制型光応答性核酸。

【請求項 8】

光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基が、3 - ビニルカルバゾール構造を有する光応答性塩基である、請求項 7 に記載の自己架橋体形成抑制型光応答性核酸。

【請求項 9】

光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基が、次の式 (I I) 又は式 (I I I) :

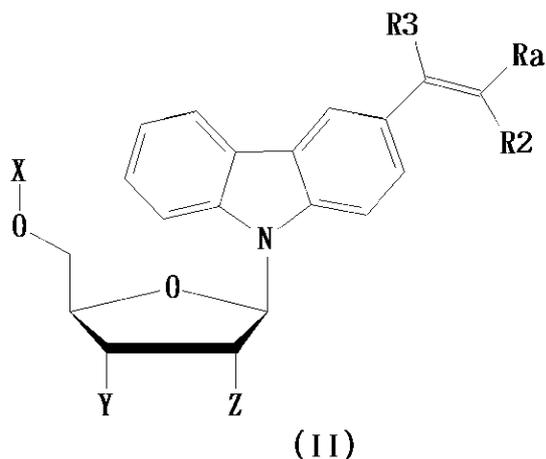
10

20

40

50

【化 6】



(ただし、式 II 中、R a は、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C 2 ~ C 7 のアルコキシカルボニル基、又は水素であり、

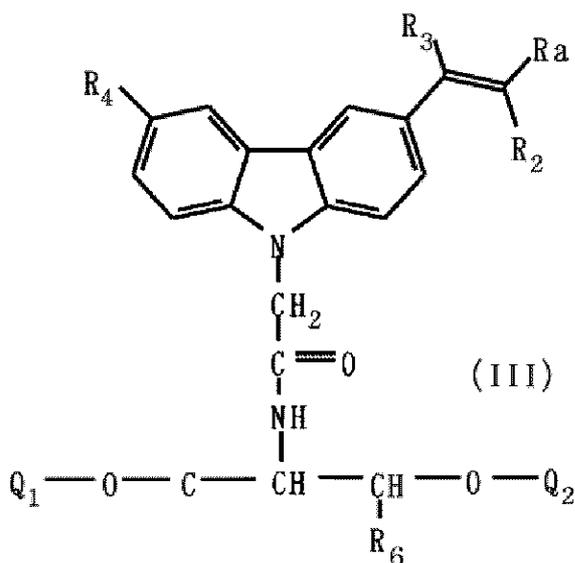
R 2 及び R 3 は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C 2 ~ C 7 のアルコキシカルボニル基、又は水素であり、

X は、式 II で X に結合している O と一体となって形成されたリン酸基を表し、

Y は、水酸基を表し、

Z は、水素又は水酸基である) ;

【化 7】



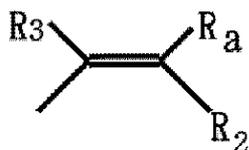
(ただし、式 III 中、

R a は、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C 2 ~ C 7 のアルコキシカルボニル基、ホスホノ基、スルホ基、又は水素原子を表し、

R 2 及び R 3 は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C 2 ~ C 7 のアルコキシカルボニル基、又は水素原子を表し、

R 4 は、水素原子、水酸基、C 1 ~ C 3 のアルコキシ基、C 1 ~ C 3 のアルキルスルファニル基、ニトロ基、フッ素原子、フッ化メチル基、C 6 ~ C 1 2 の単環式又は二環式の芳香族化合物の 1 価基、C 6 ~ C 1 2 の単環式又は二環式の複素環系芳香族化合物の 1 価基、又は、次の式 :

【化 8】



(ただし、上記式中、R_a、R₂及びR₃は、式IIIについて上述したR_a、R₂及びR₃とは独立に、式IIIについて上述したR_a、R₂及びR₃として挙げられた基から選択された基を表す)

で表される1価基を表し、

R₆は、水素原子、メチル基、又はエチル基を表し、

Q₁は、式IIIでQ₁に結合しているOと一体となって形成されたリン酸基を表し、

Q₂は、水素原子を表す)

で表される修飾ヌクレオチドの塩基部分として、上記修飾ヌクレオチドのリン酸ジエステル結合によって光応答性部分塩基配列中に導入されている、請求項7~8のいずれかに記載の自己架橋体形成抑制型光応答性核酸。

【請求項10】

自己架橋体形成抑制型光応答性核酸が、光応答性塩基を含む4塩基長以上の部分塩基配列(光応答性部分塩基配列)に対して相補的な部分塩基配列(相補的部分塩基配列)を有し、

光架橋可能なT又はUが、当該相補的部分塩基配列に位置するT又はUである、請求項7~9のいずれかに記載の自己架橋体形成抑制型光応答性核酸。

【請求項11】

自己架橋体形成抑制型光応答性核酸の塩基配列中の全てのT又はUのヌクレオチドが、式(I)で表される修飾ヌクレオチドによって置換されている、請求項7~10のいずれかに記載の自己架橋体形成抑制型光応答性核酸。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基と、光架橋可能なチミン(T)又はウラシル(U)の塩基との間の、光架橋形成を抑制する方法、及び自己架橋体形成抑制型光応答性核酸に関する。

【背景技術】

【0002】

分子生物学の分野の基本的な技術に、核酸の二重鎖形成と検出があり、これは基礎研究だけではなく、医療分野、工業分野、農業分野などで、すでに広く使用されている。核酸二重鎖形成と検出に特に有用な技術として、光応答性核酸を使用した光架橋技術がある。この光架橋技術は、すでに多くの応用があり、例えば、アンチセンスなどの核酸医薬、SNPsのセンシングなどの医療分野から、核酸を用いたDNAナノテクノロジー分野までに至る。この光応答性核酸を使用した光架橋技術は、本発明者の研究グループによって開拓されてきた分野であり、複数の光応答性人工ヌクレオチドが開発され、特許出願が行われている(特許文献1)。

【0003】

この光架橋技術の特に優れた応用として、高感度な選択的核酸増幅方法(光クランプ法)がある(特許文献2)。この方法は、PCRによる核酸増幅に先立って、光応答性核酸をクランププローブとして使用して、被検体中に量的に多数ある野生型(あるいは正常型)の塩基配列の核酸と光連結して、解離できない二重鎖を形成することによって、多数ある野生型(あるいは正常型)の塩基配列の核酸を、PCRで増幅されないように抑制し、結果として、被検体中に量的に少量である目的の変異型の塩基配列の核酸を、高感度で選択的に増幅するというものである。

10

20

30

40

50

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】国際公開第2009/066447号

【特許文献2】国際公開第2012/033190号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明者の研究グループは、上記の光クランプ法において、本来、クランププローブとして機能するはずの光応答性核酸の一部が機能せずに、いわば不活性化し、クランプ形成効率が悪化することがある、という問題を見いだした。これは、光応答性核酸の高い光反応効率からすれば、本来、あり得ないことであった。このような光応答性核酸プローブの不活性化は、光クランプ法における効率低下という問題にとどまらず、光応答性核酸プローブのあらゆるアプリケーションにおいて、問題となる可能性がある。

【0006】

そこで、本発明の目的は、光応答性核酸プローブの不活性化を防ぐ手段を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者が鋭意研究してきたところ、上記の光クランプ法における光応答性核酸プローブの不活性化は、光応答性核酸プローブが自己の塩基配列内で部分的に二重鎖を形成するような塩基配列を備えていた場合に、自己の塩基配列内で二重鎖形成した状態で光架橋されてしまい、すなわち、光応答性核酸プローブが自己架橋体を形成してしまって、本来意図していた相補鎖と二重鎖を形成して光架橋する能力を失ってしまうことによるものであることがわかった。

【0008】

この知見に基づいた不活性化抑制の手段としては、例えば、自己の塩基配列内で二重鎖形成するような塩基配列の採用をあらかじめ回避する、というものがある。しかし、このような手段は、光応答性核酸プローブの応用の範囲を限定するものとなってしまう、十分に長い塩基配列を使用したい場合には、特に厳しい制約となる。

【0009】

そこで、本発明者は、このような光応答性核酸プローブの塩基配列の制約を回避すべく、さらに研究を進めたところ、光応答性核酸プローブの光応答性核酸の光連結対象の塩基であるチミン(T)は、相補鎖との二重鎖形成が可能な範囲で種々の修飾を受けても光応答性核酸との光架橋形成能が維持されるというものであったが、チミンの5位を電子吸引性のシアノ基に置換した5-cyano-2'-deoxyuridine(^{CN}T)としたところ、相補鎖との二重鎖形成には影響を与えることなく、光応答性核酸との光架橋形成の速度が、極めて小さくなることを見いだして、本発明に到達した。すなわち、チミンの5位を電子吸引性のシアノ基に置換した5-cyano-2'-deoxyuridine(^{CN}T)を導入すれば、光応答性核酸プローブの不活性化を抑制することができる。

【0010】

また、この知見によれば、光応答性核酸プローブの自己架橋体形成による不活性化を抑制することにとどまらず、光応答性塩基近傍の塩基配列に対して相補的な塩基配列をその近傍に有しているチミン(T)又はウラシル(U)の塩基が、意図しない光架橋を形成してしまって、その結果として意図する光架橋が形成されない、あるいは光応答性核酸が浪費されて、目的の反応の効率や収率が低下してしまう、という事態を防ぐために、広く利用することができる。

【0011】

したがって、本発明は、次の(1)~にある。

(1)

10

20

30

40

50

光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基に対して光架橋可能なチミン (T) 又はウラシル (U) の塩基の、ピリミジン環の 5 位を、R 基 (ただし、R は、 $-CN$ 、又は $-CO-R'$ であり、ただし、 R' は、飽和又は不飽和の、鎖状又は分枝の、環式又は非環式の、 $C1 \sim C12$ の炭化水素基である) に置換することによって、光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基と、光架橋可能なチミン (T) 又はウラシル (U) の塩基との間の、光架橋形成を抑制する方法。

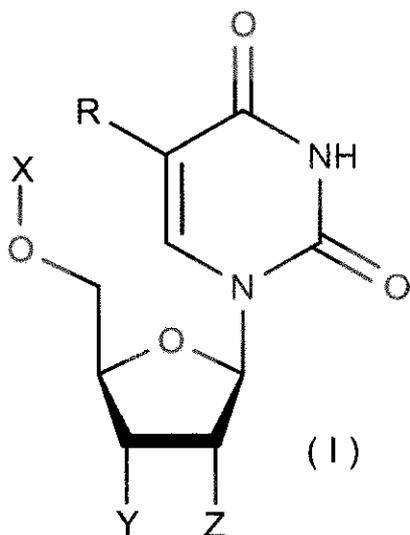
(2)

光架橋形成が、

光応答性核酸の塩基配列中にある、光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基と、
該光応答性核酸の塩基配列中の光応答性塩基を含む 4 塩基長以上の部分塩基配列 (光
応答性部分塩基配列) に対して相補的な部分塩基配列 (相補的部分塩基配列) を有する核酸 10
(部分相補性核酸) の当該相補的部分塩基配列中にある、光応答性塩基に対して光架橋可
能なチミン (T) 又はウラシル (U) の塩基との間に、光架橋が形成される反応であり、

部分相補性核酸として、相補的部分塩基配列中の光架橋可能な T 又は U のヌクレオチド
の少なくとも 1 個以上に代えて、次の式 (I) :

【化 1】



(ただし、式 I において、

R は、 $-CN$ 、又は $-CO-R'$ であり、

ただし、 R' は、飽和又は不飽和の、鎖状又は分枝の、環式又は非環式の、 $C1 \sim C12$
の炭化水素基であり、

X は、式 I で X に結合している O と一体となって形成されたリン酸基を表し、

Y は、水酸基を表し、

Z は、水素又は水酸基である)

で表される修飾ヌクレオチドがリン酸ジエステル結合して導入されてなる、部分相補性核
酸を使用することによって、
光応答性核酸と部分相補性核酸との間の光架橋形成を抑制する方法である、(1) に記載
の方法。

(3)

光応答性核酸が、光応答性部分塩基配列と相補的部分塩基配列とを、同一分子中に異な
った配列領域として含み、光応答性核酸の分子と部分相補性核酸の分子とが同一の分子で
あり、

光応答性核酸と部分相補性核酸との間の光架橋形成を抑制する方法が、光応答性塩基及
び光架橋可能なチミン (T) 又はウラシル (U) の塩基の間の光架橋によって、光応答性
核酸の自己架橋体形成を抑制する方法である、(1) ~ (2) のいずれかに記載の方法。

(4)

式 (I) 中の R が、 - C N である、 (1) ~ (3) のいずれかに記載の方法。

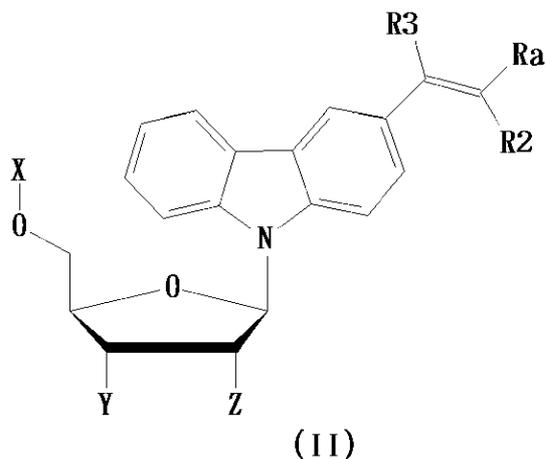
(5)

光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基が、 3 - ビニルカルバゾール構造を有する光応答性塩基である、 (1) ~ (4) のいずれかに記載の方法。

(6)

光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基が、 次の式 (I I) :

【化 2】



(ただし、式 I I 中、 R a は、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、 C 2 ~ C 7 のアルコキシカルボニル基、又は水素であり、

R 2 及び R 3 は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、 C 2 ~ C 7 のアルコキシカルボニル基、又は水素であり、

X は、式 I I で X に結合している O と一体となって形成されたリン酸基を表し、

Y は、水酸基を表し、

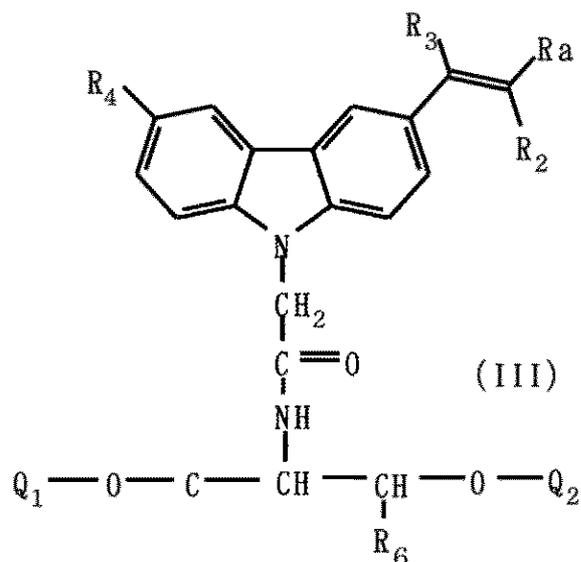
Z は、水素又は水酸基である)

で表される修飾ヌクレオチドの塩基部分として、上記修飾ヌクレオチドのリン酸ジエステル結合によって光応答性部分塩基配列中に導入されている、 (1) ~ (5) のいずれかに記載の方法。

30

(7)

光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基が、 次の式 (I I I) :



(ただし、式 I I I 中、

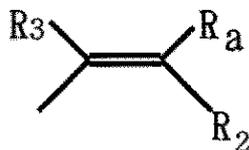
R a は、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、 C 2 ~ C 7 のアルコキシカルボニル基、ホスホノ基、スルホ基、又は水素原子を表し、

50

R₂ 及び R₃ は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシ基、C₂ ~ C₇ のアルコキシカルボニル基、又は水素原子を表し、

R₄ は、水素原子、水酸基、C₁ ~ C₃ のアルコキシ基、C₁ ~ C₃ のアルキルスルファニル基、ニトロ基、フッ素原子、フッ化メチル基、C₆ ~ C₁₂ の単環式又は二環式の芳香族化合物の 1 価基、C₆ ~ C₁₂ の単環式又は二環式の複素環系芳香族化合物の 1 価基、又は、次の式：

【化 3】



(ただし、上記式中、R_a、R₂ 及び R₃ は、式 I I I について上述した R_a、R₂ 及び R₃ とは独立に、式 I I I について上述した R_a、R₂ 及び R₃ として挙げられた基から選択された基を表す)

で表される 1 価基を表し、

R₆ は、水素原子、メチル基、又はエチル基を表し、

Q₁ は、式 I I I で Q₁ に結合している O と一体となって形成されたリン酸基を表し、

Q₂ は、水素原子を表す)

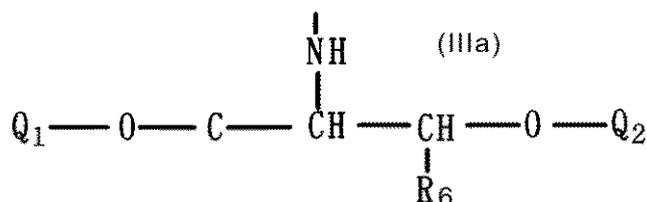
で表される修飾ヌクレオチドの塩基部分として、上記修飾ヌクレオチドのリン酸ジエステル結合によって光応答性部分塩基配列中に導入されている、(1) ~ (5) のいずれかに記載の方法。

20

(8)

式 I I I 中において、次の式 (I I I a) :

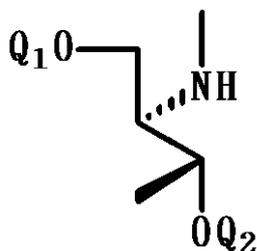
【化 4】



で表される骨格構造が、

次の式：

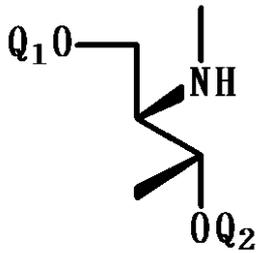
【化 5】



で表される D - トレオニノール構造、

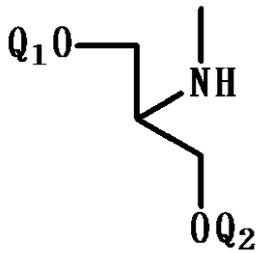
次の式：

【化 6】



で表される L - トレオニノール構造、
又は、次の式：

【化 7】



で表されるセリノール構造である、(7) に記載の方法。

(9)

部分相補性核酸の塩基配列中の全ての T 又は U のヌクレオチドが、式 (I) で表される修飾ヌクレオチドによって置換されている、(1) ~ (8) のいずれかに記載の方法。

【 0 0 1 2】

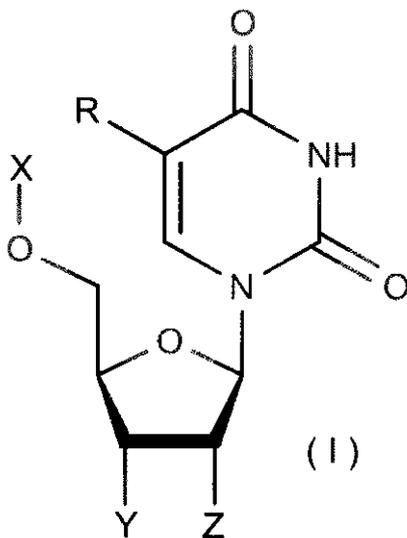
さらに、本発明は、次の (1 1) ~ にもある。

(1 1)

光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基と、

光架橋可能な T 又は U のヌクレオチドの少なくとも 1 個以上に代えて、次の式 (I) :

【化 8】



(ただし、式 I において、

R は、- CN、又は - CO - R' であり、

ただし、R' は、飽和又は不飽和の、鎖状又は分枝の、環式又は非環式の、C 1 ~ C 1 2 の炭化水素基であり、

X は、式 I で X に結合している O と一体となって形成されたリン酸基を表し、

Y は、水酸基を表し、
 Z は、水素又は水酸基である)
 で表される修飾ヌクレオチドとを、
 含む、自己架橋体形成抑制型光応答性核酸。
 (1 2)

式 (I) 中の R が、 - C N である、 (1 1) に記載の自己架橋体形成抑制型光応答性核酸。

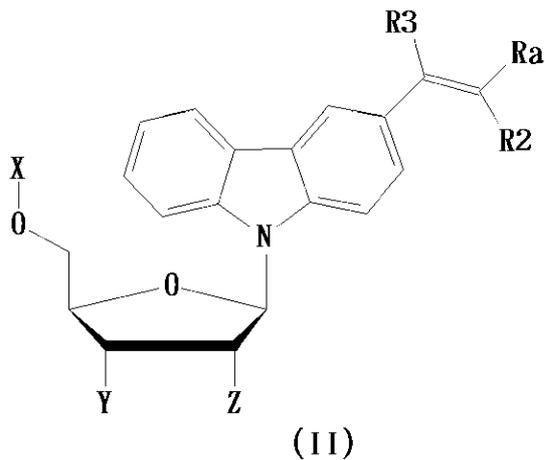
(1 3)

光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基が、3 - ビニルカルバゾール構造を有する光応答性塩基である、 (1 1) ~ (1 2) のいずれかに記載の自己架橋体形成抑制型光応答性核酸。 10

(1 4)

光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基が、次の式 (I I) :

【化 9】



(ただし、式 I I 中、R a は、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C 2 ~ C 7 のアルコキシカルボニル基、又は水素であり、

R 2 及び R 3 は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C 2 ~ C 7 のアルコキシカルボニル基、又は水素であり、 30

X は、式 I I で X に結合している O と一体となって形成されたリン酸基を表し、

Y は、水酸基を表し、

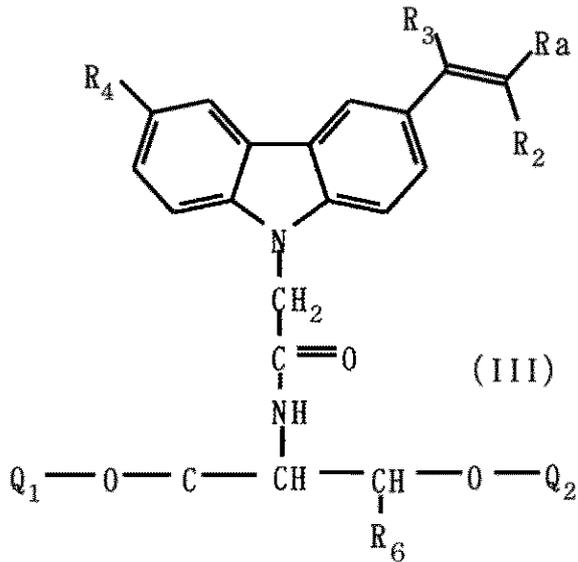
Z は、水素又は水酸基である)

で表される修飾ヌクレオチドの塩基部分として、上記修飾ヌクレオチドのリン酸ジエステル結合によって光応答性部分塩基配列中に導入されている、 (1 1) ~ (1 3) のいずれかに記載の自己架橋体形成抑制型光応答性核酸。

(1 5)

光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基が、次の式 (I I I) :

【化10】



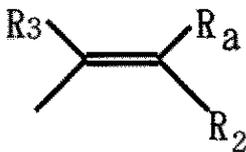
(ただし、式III中、

Raは、シアノ基、アミド基、カルボキシ基、C2～C7のアルコキシカルボニル基、ホスホノ基、スルホ基、又は水素原子を表し、

R2及びR3は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシ基、C2～C7のアルコキシカルボニル基、又は水素原子を表し、

R4は、水素原子、水酸基、C1～C3のアルコキシ基、C1～C3のアルキルスルファニル基、ニトロ基、フッ素原子、フッ化メチル基、C6～C12の単環式又は二環式の芳香族化合物の1価基、C6～C12の単環式又は二環式の複素環系芳香族化合物の1価基、又は、次の式：

【化11】



(ただし、上記式中、Ra、R2及びR3は、式IIIについて上述したRa、R2及びR3とは独立に、式IIIについて上述したRa、R2及びR3として挙げられた基から選択された基を表す)

で表される1価基を表し、

R6は、水素原子、メチル基、又はエチル基を表し、

Q1は、式IIIでQ1に結合しているOと一体となって形成されたリン酸基を表し、

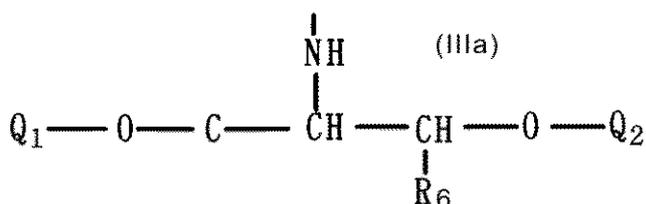
Q2は、水素原子を表す)

で表される修飾ヌクレオチドの塩基部分として、上記修飾ヌクレオチドのリン酸ジエステル結合によって光応答性部分塩基配列中に導入されている、(11)～(13)のいずれかに記載の自己架橋体形成抑制型光応答性核酸。

(16)

式III中において、次の式(IIIa)：

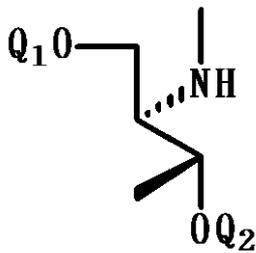
【化12】



で表される骨格構造が、

次の式：

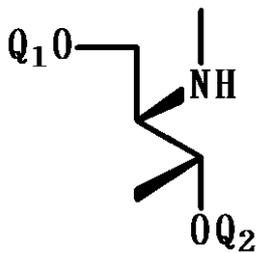
【化 1 3】



で表される D - トレオニノール構造、

次の式：

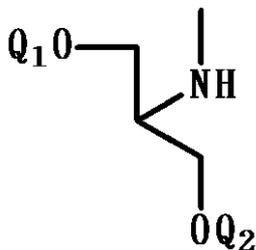
【化 1 4】



で表される L - トレオニノール構造、

又は、次の式：

【化 1 5】



で表されるセリノール構造である、(1 5) に記載の自己架橋体形成抑制型光応答性核酸

。

(1 7)

自己架橋体形成抑制型光応答性核酸が、光応答性塩基を含む 4 塩基長以上の部分塩基配列 (光応答性部分塩基配列) に対して相補的な部分塩基配列 (相補的部分塩基配列) を有し、

光架橋可能な T 又は U が、当該相補的部分塩基配列に位置する T 又は U である、(1 1) ~ (1 6) のいずれかに記載の自己架橋体形成抑制型光応答性核酸。 40

(1 8)

自己架橋体形成抑制型光応答性核酸の塩基配列中の全ての T 又は U のヌクレオチドが、式 (I) で表される修飾ヌクレオチドによって置換されている、(1 1) ~ (1 7) のいずれかに記載の自己架橋体形成抑制型光応答性核酸。

【発明の効果】

【 0 0 1 3 】

本発明によれば、光クランプ法などで使用される光応答性核酸プローブの自己架橋体形成を抑制して、プローブの不活性化を防ぐことができる。これによって、光応答性核酸プローブは、選ぶ塩基配列や塩基配列長に、特段に制約を受けることなく、反応効率 (50

収率)を向上させることができる。さらに、本発明によれば、光応答性塩基近傍の塩基配列に対して相補的な塩基配列をその近傍に有しているチミン(T)又はウラシル(U)の塩基が、意図しない光架橋を形成してしまつて、その結果として意図する光架橋が形成されない、あるいは光応答性核酸が浪費されて、目的の反応の効率や収率が低下してしまう、という事態を防ぐことができ、光応答性核酸の応用の範囲をさらに広げることができる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、Tと^{CN}Tの光反応性を比較した変性PAGE結果を表す図である。

【図2】図2は、光照射時間を延ばしたサンプルの変性PAGE解析結果を示す図である 10

【図3】図3は、^{CN}TとTの光反応性の相違を示すHPLCチャート及びグラフである。

【図4】図4は、^{CNV}K含有プローブの光架橋実験の光反応スキームとその結果を示す図である。

【図5】図5は、^{CN}Tによる^{CNV}K含有プローブの不活性化の抑制の実験の結果を示す図である。

【図6】図6は、^{CNV}D含有プローブの光架橋実験の光反応スキームを示す図である。

【図7】図7は、^{CNV}D含有プローブの光架橋実験の結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0015】

具体的な実施の形態をあげて、以下に本発明を詳細に説明する。本発明は、以下にあげる具体的な実施の形態に限定されるものではない。

【0016】

[光架橋形成]

光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基は、ピリミジン塩基に属するチミン(T)又はウラシル(U)、及びシトシンと、高い選択性を持って光架橋を形成する(特許文献1)。この光架橋形成反応は、光反応であるために、極めて迅速であり、効率が高く、また溶媒条件や温度条件は、生理的な条件を含めて、所望の条件を幅広く選択することができる。特に、3-ビニルカルバゾール構造を有する光応答性塩基は、[2+2]光環化反応によって、ピリミジン塩基と効率よく光反応して、光架橋を形成する。

【0017】

ところが、このような光架橋の形成は、ピリミジン塩基に修飾を行った場合にも、短時間で効率よく進行するために、ピリミジン塩基に修飾を行って、塩基対を形成するために必要な相補性を維持したままで、光架橋の形成を抑制することは、これまでは実現できていなかった。例えば、ピリミジン塩基が、メチルシトシン、シュドウリジンとなった場合でも、この光架橋の形成は進行するものであった。

【0018】

[光架橋形成の抑制]

ところが、本発明によれば、光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基に対して光架橋可能なチミン(T)又はウラシル(U)の塩基を、ピリミジン環の5位を、R基(ただし、Rは、-CN、又は-CO-R'であり、ただし、R'は、飽和又は不飽和の、鎖状又は分枝の、環式又は非環式の、C1~C12の炭化水素基である)に置換することによって、置換後の修飾塩基は塩基対を形成するために必要な相補性が損なわれることなく維持されたまま、光架橋形成を抑制することができる。この光架橋形成の抑制は、チミン(T)による光架橋形成反応が90%を超える効率で達成される条件(光照射時間)においても、光架橋形成反応が1%程度に抑制されているという、極めて顕著なものであった(実施例参照)。

【0019】

[光架橋形成のための二重鎖形成]

光応答性塩基とチミン(T)又はウラシル(U)の塩基との間の光架橋は、光照射に先 50

立って、光応答性塩基を含む塩基配列と、チミン（T）又はウラシル（U）の塩基を含む塩基配列とが、その相補性によって二重鎖を形成して、光架橋反応が進行可能に配置されて、その状態で光照射を受けることによって、光反応が好適に進行して、形成される。そこで、好適な実施の態様において、光応答性塩基を含む光応答性核酸の塩基配列中の光応答性塩基を含む部分塩基配列（光応答性部分塩基配列）に対して、チミン（T）又はウラシル（U）の塩基を含む部分塩基配列は、相補的な塩基配列（相補的部分塩基配列）である。好適な実施の態様において、光応答性部分塩基配列と、相補的部分塩基配列とは、二重鎖の領域を形成できる程度に安定化されたものであり、例えば、4塩基長、好ましくは5塩基長、さらに好ましくは6塩基長、さらに好ましくは7塩基長、さらに好ましくは8塩基長の長さを少なくとも有するものである。

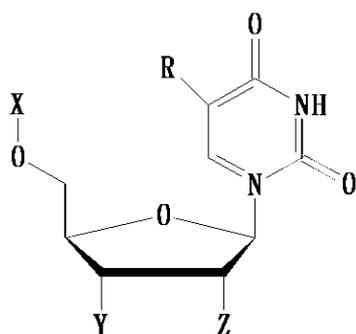
10

【0020】

[光架橋形成抑制性修飾塩基及び修飾ヌクレオチド]

光架橋可能なチミン（T）又はウラシル（U）の塩基に代えて導入することによって、光架橋の形成を抑制する修飾塩基（光架橋形成抑制性修飾塩基）は、ピリミジン環の5位が、R基（ただし、Rは、 $-CN$ 、又は $-CO-R'$ であり、ただし、 R' は、飽和又は不飽和の、鎖状又は分枝の、環式又は非環式の、 $C1 \sim C12$ の炭化水素基である）に置換されたものであり、この修飾塩基を塩基部分として備えた修飾ヌクレオチド（光架橋形成抑制性修飾ヌクレオチド）は、次の式（I）：

【化16】



(I)

で表される修飾ヌクレオチドである。

30

【0021】

式Iにおいて、Rは、 $-CN$ 、又は $-CO-R'$ であり、好ましくは $-CN$ （シアノ基）である。R'は、Rが電子吸引性の基となるR'であれば、使用することができ、例えば、飽和又は不飽和の、鎖状又は分枝の、環式又は非環式の、 $C1 \sim C12$ の炭化水素基である。このような基としては、例えば、 $C1 \sim C3$ のアルキル基、シクロヘキシル基、フェニル基、ベンジル基、トリル基、ナフチル基を挙げることができる。

【0022】

式Iにおいて、Xは、式IでXに結合しているOと一体となって形成されたリン酸基を表し、Yは、水酸基を表し、Zは、水素又は水酸基を表す。

【0023】

[光架橋形成抑制性修飾塩基及び修飾ヌクレオチドの合成]

上記の光架橋形成抑制性修飾塩基及び修飾ヌクレオチドは、公知の手段によって合成することができ、そのアミダイト体を合成した後にDNAシンセサイザー等を使用する等の公知の手段によって、これらが光架橋可能なチミン（T）又はウラシル（U）の塩基に代えて導入された核酸（修飾核酸）を製造することができる。また、所望により、チミン（T）又はウラシル（U）の塩基、あるいはその他の修飾塩基を含む核酸（修飾核酸）をいったん製造した後に、これに対して修飾反応を行って、光架橋形成抑制性修飾塩基へ変化させることによって、光架橋形成抑制性修飾塩基が光架橋可能なチミン（T）又はウラシル（U）の塩基に代えて導入された核酸（修飾核酸）を製造することができる。

40

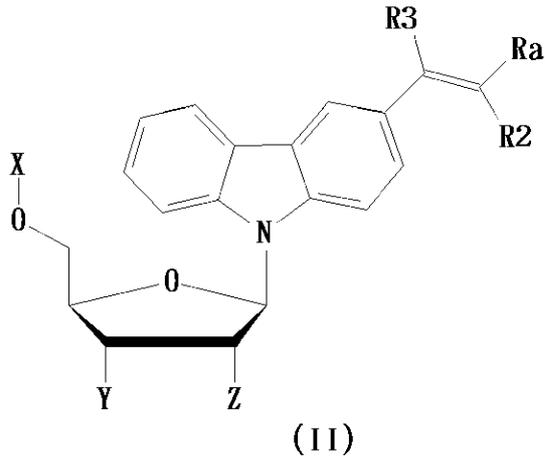
【0024】

50

[光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基]

光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基は、好ましくは 3 - ビニルカルバゾール構造を有する光応答性塩基であり、さらに好ましくは、次の式 (I I) :

【化 1 7】



で表される修飾ヌクレオチドの塩基部分である。

【 0 0 2 5】

式 I I において、R a は、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C 2 ~ C 7 のアルコキシカルボニル基、又は水素であり、

R 2 及び R 3 は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C 2 ~ C 7 のアルコキシカルボニル基、又は水素であり、

X は、式 I I で X に結合している O と一体となって形成されたリン酸基を表し、

Y は、水酸基を表し、

Z は、水素又は水酸基である。

【 0 0 2 6】

好適な実施の態様において、式 I I の R a は、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、又は水素であり、好ましくは、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、又は水素であり、さらに好ましくは、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、又はアルコキシカルボニル基である。アルコキシカルボニル基は、好ましくは C 2 ~ C 7、さらに好ましくは C 2 ~ C 6、さらに好ましくは C 2 ~ C 5、さらに好ましくは C 2 ~ C 4、さらに好ましくは C 2 ~ C 3、特に好ましくは C 2 のものを使用することができる。

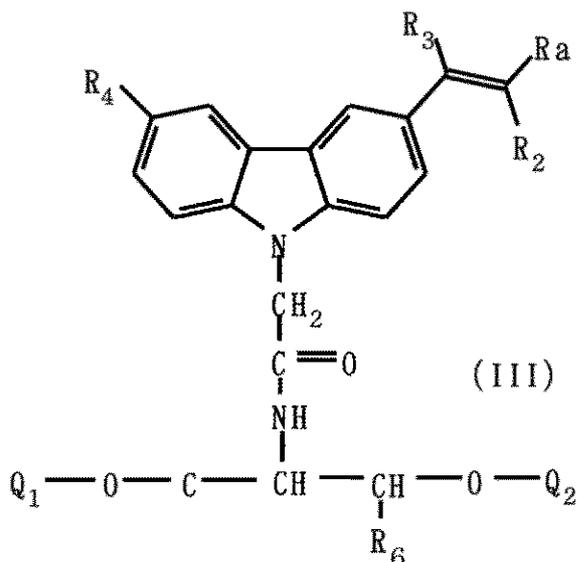
【 0 0 2 7】

好適な実施の態様において、式 I I の R 2 及び R 3 は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、又は水素であり、好ましくは、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、又は水素であり、さらに好ましくは、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、又はアルコキシカルボニル基である。アルコキシカルボニル基は、好ましくは C 2 ~ C 7、さらに好ましくは C 2 ~ C 6、さらに好ましくは C 2 ~ C 5、さらに好ましくは C 2 ~ C 4、さらに好ましくは C 2 ~ C 3、特に好ましくは C 2 のものを使用することができる。

【 0 0 2 8】

本発明の好適な実施の態様において、光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基は、次の式 (I I I) :

【化18】



で表される修飾ヌクレオチドの塩基部分である。

【0029】

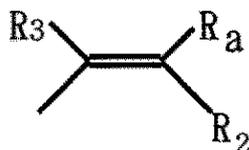
式IIIにおいて、

Raは、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C2～C7のアルコキシカルボニル基、ホスホノ基、スルホ基、又は水素原子を表し、

R2及びR3は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C2～C7のアルコキシカルボニル基、又は水素原子を表し、

R4は、水素原子、水酸基、C1～C3のアルコキシ基、C1～C3のアルキルスルファニル基、ニトロ基、フッ素原子、フッ化メチル基、C6～C12の単環式又は二環式の芳香族化合物の1価基、C6～C12の単環式又は二環式の複素環系芳香族化合物の1価基、又は、次の式：

【化19】



(ただし、上記式中、Ra、R2及びR3は、式IIIについて上述したRa、R2及びR3とは独立に、式IIIについて上述したRa、R2及びR3として挙げられた基から選択された基を表す)

で表される1価基を表し、

R6は、水素原子、メチル基、又はエチル基を表し、

Q1は、式IIIでQ1に結合しているOと一体となって形成されたリン酸基を表し、

Q2は、水素原子を表す。

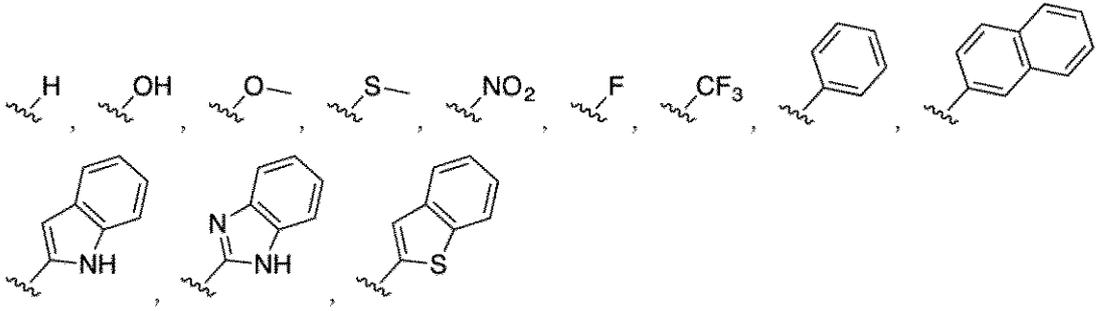
式IIIにおけるRa、R2及びR3は、それぞれ独立に、式IIについて上述したRa、R2及びR3とすることができる。

【0030】

例えば、式IIIのR4として、次に挙げる基を使用することができる。(ただし、波線は遊離原子価の位置を示している。)

【0031】

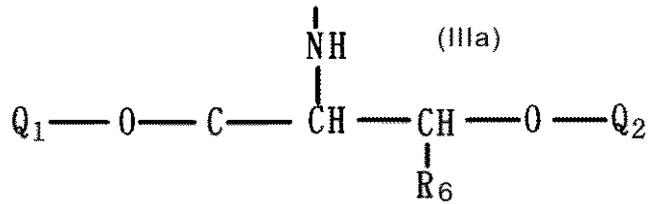
【化 2 0】



【0032】

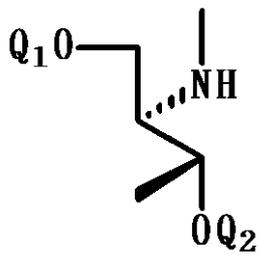
好適な実施の態様において、式 I I I 中において、次の式 (I I I a) :

【化 2 1】



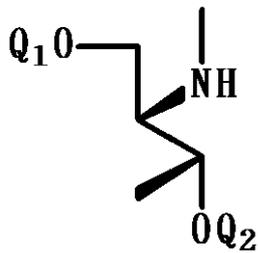
で表される骨格構造が、
次の式：

【化 2 2】



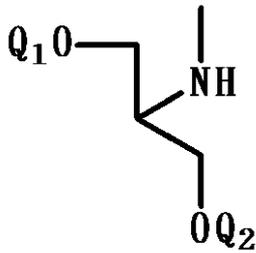
で表される D - トレオニノール構造、
次の式：

【化 2 3】



で表される L - トレオニノール構造、
又は、次の式：

【化 2 4】



で表されるセリノール構造である。

10

【 0 0 3 3】

上記式 I I I で表される修飾ヌクレオチドは、天然のヌクレオチドや式 I I の修飾ヌクレオチドであればリボース（又はデオキシリボース）構造の糖骨格である部分が、上記式 I I I a で表される骨格構造で代替されたものとなっている。そこで、式 I I I で表される修飾ヌクレオチドは、光応答性人工ヌクレオチドアナログということもできる。驚くべきことに、式 I I I の修飾ヌクレオチドは、このような骨格構造の相違にも関わらず、核酸への組み込みと光応答性に関しては、光応答性塩基として振る舞う。本発明者はこの発見に基づいて、すでに日本国特許出願（特願 2 0 1 3 - 7 0 3 8 1）を行った。

【 0 0 3 4】

〔自己架橋体形成の抑制〕

20

本発明による光架橋形成の抑制は、光応答性塩基と、チミン（T）又はウラシル（U）の塩基が、異なる核酸分子に含まれていて、異なる核酸分子間の光架橋を形成する場合においても、当然に有用であるが、光応答性塩基と、チミン（T）又はウラシル（U）の塩基が、同じ核酸分子に含まれていて、核酸分子内の自己架橋を形成する場合において、特に有用である。例えば、光クランプ法で使用される光応答性核酸プローブが、その核酸分子内の塩基配列によっては、核酸分子内で部分的に二重鎖を形成してしまうと考えられるが、その部分的に形成された二重鎖の領域のなかに、光応答性塩基とチミン（T）又はウラシル（U）の塩基が、光架橋可能に位置している場合には、光応答性核酸プローブは、自己の分子内部において、自己架橋を形成してしまい、本来、意図していた光架橋反応に参加することができず、結果としてプローブの利用効率（収率）が非常に悪化する。この

30

ような場合に、光応答性核酸プローブの自己架橋体形成を抑制すれば、プローブの損失を防いで、利用効率（収率）は良好なものとなる。すなわち、好適な実施の態様において、光応答性部分塩基配列と、相補的部分塩基配列とが、同一の核酸分子中に含まれており、これによって自己架橋体の形成が抑制される。

【 0 0 3 5】

〔全てのチミン（T）又はウラシル（U）の塩基の置換〕

本発明によれば、核酸分子中の光架橋可能なチミン（T）又はウラシル（U）の塩基のうち、少なくとも 1 個以上を光架橋形成抑制性修飾塩基に置き換えることで、そのチミン（T）又はウラシル（U）の塩基に関して、光架橋抑制を実現することができる。したがって、少なくとも 1 個を置換すれば、本発明の範囲内にあたる。

40

【 0 0 3 6】

一方で、本発明の光架橋形成抑制性修飾塩基によって置換された核酸は、置換前のチミン（T）又はウラシル（U）の塩基の核酸と比較して、T_m値に変化がなく、二重鎖の形成能がそのまま維持されているという点で、優れたものである。つまり、本発明の光架橋形成抑制性修飾塩基による置換は、二重鎖の形成能に影響を与えないことから、置換数を最小にすることなく、対象とする核酸分子のチミン（T）又はウラシル（U）の塩基の全てを、光架橋形成抑制性修飾塩基によって置換することができる。全てのチミン（T）又はウラシル（U）の塩基を置換する場合には、相補鎖構造の検討を何ら行う必要がなく、一律な置換によって、あらゆる望まれない光架橋形成を、一律に抑制することができるという点で、有利である。例えば、多種類の塩基配列の光応答性核酸プローブを製造する場

50

合において、特に有利である。

【0037】

[光架橋形成抑制の反応条件]

本発明によれば、従来から知られている光架橋形成の条件において、光架橋形成を抑制することができる。例えば、光架橋のために照射される光は、一般に350～380nmの範囲、好ましくは360～370nmの範囲、さらに好ましくは366nmの波長を含む光が好ましく、特に好ましくは、366nmの単波長のレーザー光であるが、これらの光照射条件において、光架橋形成を抑制することができる。

【実施例】

【0038】

以下に実施例をあげて、本発明を詳細に説明する。本発明は、以下に例示する実施例に限定されるものではない。

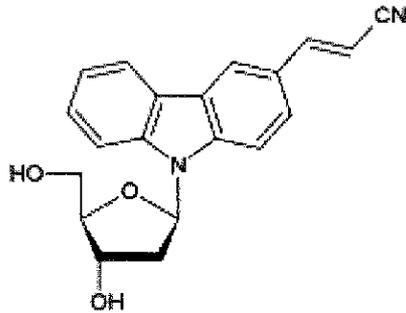
【0039】

[^{CNV}K含有ODNの合成]

次の式：

【0040】

【化25】



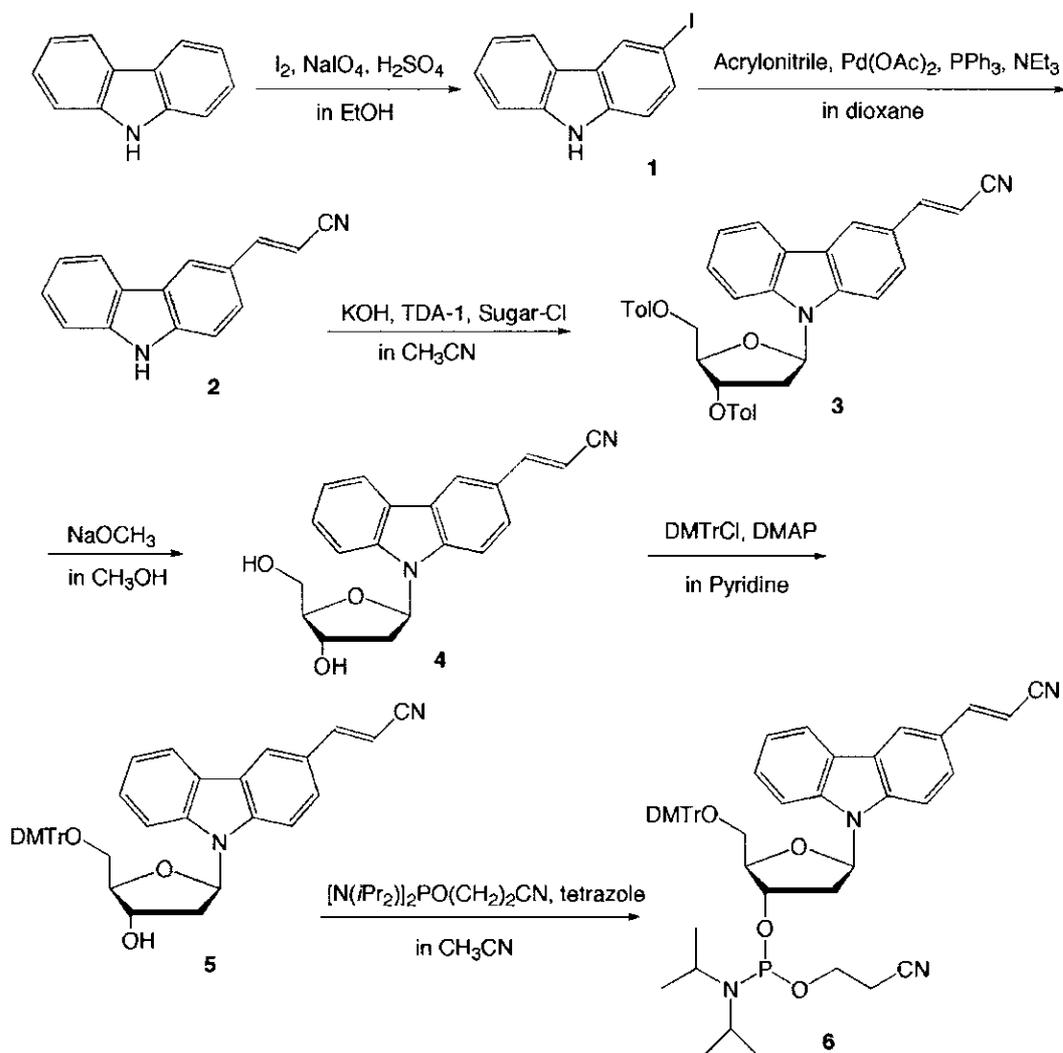
3-cyanovinylcarbazole(^{CNV}K)

【0041】

で表されるヌクレオチド(^{CNV}K)のアミダイト体の合成を、次のScheme 1(スキーム1)にしたがって行った。合成は、特許文献1(国際公開公報WO2009/066447号)に開示された手順にしたがって行った。

【0042】

【化26】

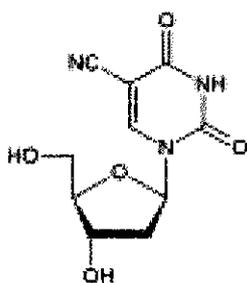


【0043】

また、同様にして、次の式：

【0044】

【化27】



5-cyano-2'-deoxyuridine (CNT)

【0045】

で表されるヌクレオチド (CNT) のアミダイト体を合成した。

【0046】

合成した光応答性人工核酸 3 - cyanovinylcarbazole nucle 50

otide (^{CNV}K) のアミダイト体、5 - cyano - 2' - deoxyuridine (^{CN}T) のアミダイト体をアセトニトリルで100mMに調整し、ABI3400にてODNを合成した。合成したODN配列は下記Table 1に示す。合成後、28%アンモニア水を用いて55℃で8時間脱保護を行った。その後、HPLCにて精製を行い、質量分析により目的配列であることを確認した。

【0047】

【表1】

表1 実験に使用したODN

	配列(5'-3')	塩基数
ODN 1	TGCA ^{CNV} KACGT	9
ODN 2	ACGTGTGCA	9
ODN 3	ACGTG ^{CN} TGCA	9
ODN 4	GTA ^{CNV} KAGAGTGTA	13
ODN 5	G ^{CN} TA ^{CNV} KAGAG ^{CN} TG ^{CN} TA	13
ODN 6	AGAGTACACTCTATACTGAG	20

【0048】

[^{CNV}Kと^{CN}Tの光反応性の解析]

20μM ODN1と20μM ODN2もしくは20μM ODN3をbuffer (20 100mM NaCl、50mMカコジル酸ナトリウム)中で90℃で5分間加熱した後、ゆっくり4℃までアニーリングを行った。その後、UV-LED照射機を用い、366nmのUV照射を4分間で行い、光照射による光架橋体の確認を変性PAGEにより解析した。この結果を、図1に示す。

【0049】

図1は、Tと^{CN}Tの光反応性を比較した変性PAGE結果を表す図である。図1において、各レーンは、M:10DNA Ladder Maker、Lane1~5:Target塩基がTの場合、Lane6~10 Target塩基が^{CN}Tの場合、をそれぞれ表す。光照射時間はそれぞれ0s(秒)、0.1s、0.5s、1s、2sである。ODN1とODN2は、ハイブリダイズして二重鎖を形成し、光応答性塩基である^{CNV}Kの5'側 30に隣接する位置にある塩基と相補的な位置にあたる塩基(ターゲット塩基)であるTと、^{CNV}Kとが、光照射に応じて光架橋を形成して、電気泳動においてクロスリンク体が検出されている。ODN1とODN3もまた、ハイブリダイズして二重鎖を形成する配列となっており、^{CNV}Kの5'側に隣接する位置にある塩基と相補的な位置にあたる塩基(ターゲット塩基)として、^{CN}Tが位置している。

【0050】

ODN1とODN2の組み合わせの場合、すなわち、ターゲット塩基がTの場合には、2秒の光照射で原料となる9merのバンドがほぼ消失している。一方、ODN1とODN3の組み合わせの場合、すなわち、ターゲットが^{CN}Tの場合には2秒の光照射でもクロスリンク体のバンドが確認されなかった。この結果より^{CNV}Kの架橋塩基がTと^{CN}Tの場合で反応性に大きな差があることがわかった。^{CN}Tが架橋塩基の場合には、そもそも架橋 40反応が進行しないのか、ゆっくり反応するのかを調べるために、さらに光照射時間を延ばしたサンプルでの変性PAGE解析を行った。この結果を図2に示す。

【0051】

図2は、光照射時間を延ばしたサンプルの変性PAGE解析結果を示す図である。各レーンは、Mは10bp DNA Ladder Maker、及び光照射時間0秒、1秒、5秒、10秒、30秒、60秒、120秒、300秒をそれぞれ示している。

【0052】

図2に示されるように、ODN1とODN3の組み合わせの場合も、光照射時間を極端に延ばすことによって、うっすらと光架橋体らしきバンドが確認できた。よって、チミン 50

の5位をシアノ基に置換した^{CN}Tは、チミン(T)と比較して、^{CNV}Kとの架橋速度が圧倒的に遅いことがわかった。

【0053】

より定量的な議論をするためにHPLC解析を行い、ODN3の減少量から光架橋率を算出した。この結果を図3に示す。

【0054】

図3は、図3の(A)において、ODN1とODN3のクロスリンク反応のHPLC解析を示しており、光照射時間0s(秒)、0.1s、0.5s、1s、2s、5sについて、それぞれ横軸をリテンションタイム(分)としたチャートを示している。図3は、図3の(B)において、ODN2(T)とODN3(^{CN}T)の光反応性の比較のグラフを示してあり、横軸は光照射時間(秒)、縦軸は光架橋率(%)を示している。図3の(B)の上側の近似曲線はODN2(T)、下側の近似曲線はODN3(^{CN}T)を示す。

【0055】

HPLCの結果からも、秒単位の光照射では^{CN}Tと^{CNV}Kの光架橋反応はほとんど進行していないことがわかった。ODN3の光照射による減少量から光架橋率を算出したところ、ターゲットがTの場合は光照射時間1秒で90%以上なのに対して、ターゲットが^{CN}Tの場合は光照射1秒で1%前後となった。カーブフィティングにより近似曲線を求めたところ、ターゲットが^{CN}Tの場合は、ターゲットがチミンの場合の約1/80の速度で光架橋反応がゆっくり進行することがわかった。

【0056】

[^{CNV}K含有プローブの不活性化の抑制]

^{CNV}Kはその光応答能の高さのために、最安定な構造ではなく一時的に形成した二本鎖状態を架橋することも考えられる。特に自己架橋構造の形成は^{CNV}K含有プローブを不活性化させる要因の一つになると考えられる。上記で得られた^{CN}Tが^{CNV}Kとの光応答性が低いという知見から出発して、^{CNV}K含有プローブの不活性化の抑制の実験を行った。

【0057】

一連の実験に先立って、まず、塩基配列に関しては、自己架橋を形成するような配列をスクリーニングして選択し、ODN4の配列を使用することに決定して実験を行った。

20 μM Probe ODN(ODN4もしくはODN5)と20 μM ODN6をbuffer(100 mM NaCl、50 mM カコジル酸ナトリウム)中で90 °Cで5分間加熱した後、ゆっくり25 °Cまでアニーリングを行った。Lane 5、6はサンプル作成後、90 °Cで5分間加熱し、すぐに25 °Cに移し急冷を行った。Lane 7、8は20 μM Probe ODNと4 μM ODN6とし、プローブをターゲットの5倍量とした。これらサンプルをUV-LED照射機を用い、366 nmのUV照射を25 °Cで10秒間行った。そして、変性PAGEによる解析を行った。これらの操作の流れ及び結果を、図4に示す。

【0058】

図4は、^{CNV}K含有プローブの光架橋実験の光反応スキームとその結果を示す図である。図4の(A)は、光架橋による^{CNV}K含有プローブの光反応スキームを示す説明図である。図4の(B)は、この実験の変性PAGE結果を示す図である。図4の(B)において、各レーンは、レーンMは10 bp DNA Ladder Maker、レーン1と2はProbeのみ、レーン3と4はProbeとTarget、レーン5と6はProbeとTargetを急冷したもの、レーン7と8はTargetに対してProbeが5倍量(5当量)入ったものである。レーン2、4、6、8には、光照射を行い、レーン1、3、5、7には、光照射を行っていない。

【0059】

今回使用している^{CNV}K含有プローブでは、光照射後に原料バンドよりも少し低分子量側に新たなバンドが現れている。これは、光照射しない場合には現れないこと、^{CNV}K含有プローブ(ODN4)のみを加えた場合でも現れること、変性条件下の電気泳動でもODN4のバンドと区別されて現れること、などにより、^{CNV}K含有プローブ(ODN4)

が自己分子内で光架橋して生成した自己架橋体のバンドだと考えられる。

【 0 0 6 0 】

さらに、ODN 4に含まれるTをすべて^{CN}Tに置換したプローブを用いて同様の実験を行った。この結果を、図5に示す。

【 0 0 6 1 】

図5は、^{CN}Tによる^{CNV}K含有プローブの不活性化の抑制の実験の結果を示す図である。図5の(A)は、通常のプローブを使用し、図5の(B)は、^{CN}T置換プローブを使用している。各レーンは、レーンMは10bp DNA Ladder、レーン1と2はProbeのみ、レーン3と4はProbeとTarget、レーン5と6はProbeとTargetを急冷したもののレーン7と8はTargetに対してProbeが5倍量(5当量)入ったものである。レーン2、4、6、8には、光照射を行い、レーン1、3、5、7には、光照射を行っていない。

【 0 0 6 2 】

上記の結果から示されるように、^{CNV}K含有プローブ(ODN 4)に含まれるTを^{CN}Tに置換することによって、自己架橋体のバンドは確認されなくなった。また、クロスリンク体のバンドも明瞭に確認できるようになった。このように、^{CNV}K含有プローブに含まれるTを^{CN}Tに置換することによって、^{CNV}K含有プローブのターゲットであるODN 6との二重鎖形成と光架橋反応は阻害されることなく、^{CNV}K含有プローブ(ODN 5)内での自己架橋のみを抑制し、プローブの不活性化を抑制することが可能となった。

【 0 0 6 3 】

^{CNV}K含有プローブが自己架橋するような塩基配列は、ごく一部の配列に限られる。しかし、生体内に存在する様々な配列をターゲットにする場合や、長鎖のプローブを用いる場合などには、望まれない自己架橋は起こり得る現象だと考えられる。上記のように、^{CN}V含有プローブに含まれるTを^{CN}Tに置換することによって、このような望まれない自己架橋の形成を抑制することができる。Tを^{CN}Tに置換することによってはプローブの二重鎖形成能と光架橋反応性は損なわれないので、全てのTを^{CN}Tに置換することができる。また、例えば、シミュレーションによってある程度の自己架橋を形成するような構造を予測することによって、自己架橋の形成に関与すると予測される箇所のTのみを^{CN}Tに置換することも可能である。上記の知見を用いることによって、より幅広いアプリケーションに^{CNV}K含有プローブを用いることができ、より幅広い配列への応用が可能となる。

【 0 0 6 4 】

[Tm値]

ODN 1とODN 2のTm値と、ODN 1とODN 3のTm値は、測定可能な差が見られなかった。すなわち、Tを^{CN}Tに置換した場合にも、二重鎖形成能は維持されていた。

【 0 0 6 5 】

[^{CNV}D含有ODNの合成]

次の式で表されるヌクレオチドアナログ(^{CNV}D)を、Scheme 2(スキーム2)に従って行った。さらに、ヌクレオチドアナログ(^{CNV}D)のアミダイト体を合成し、これを用いて、上記^{CNV}K同様にODNを合成して、^{CN}Tとの光反応性の解析に使用した。

【 0 0 6 6 】

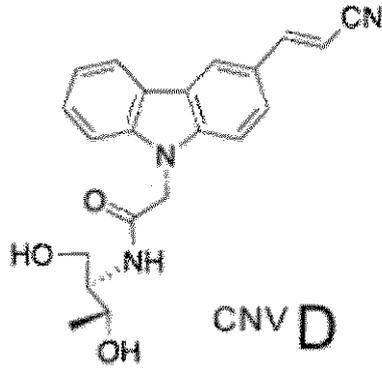
10

20

30

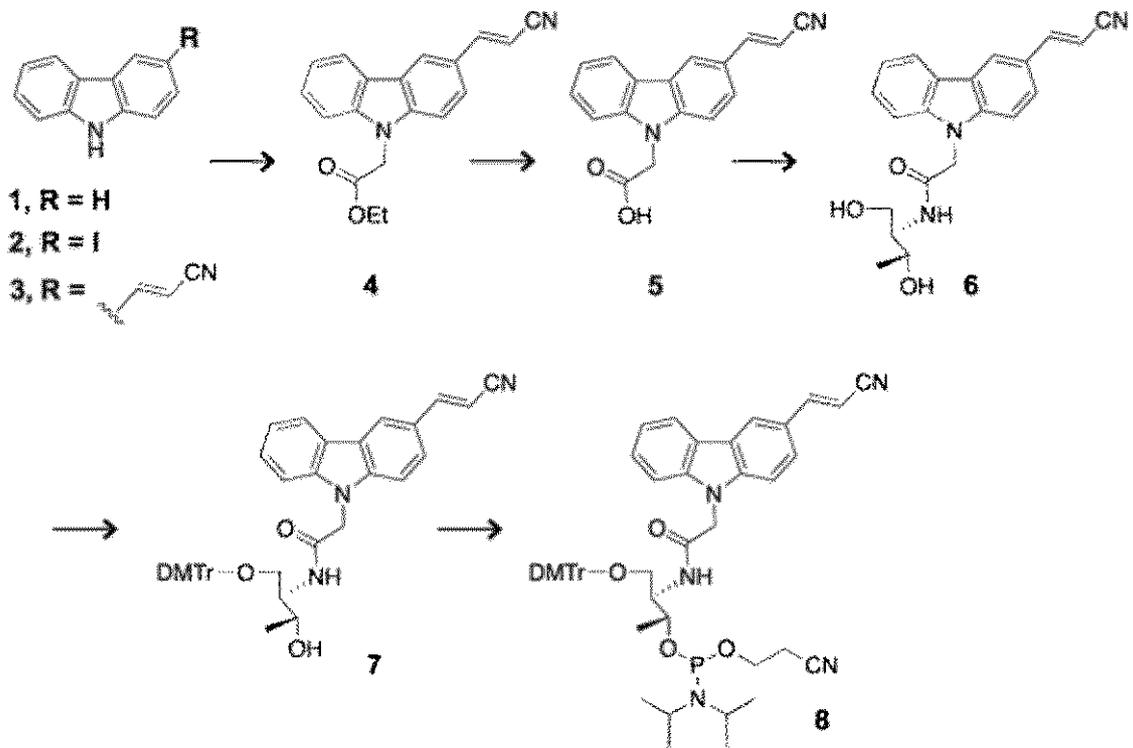
40

【化 2 8】



【 0 0 6 7】

【化 2 9】



(Scheme 2)

【 0 0 6 8】

[^{CNV}D と ^{CN}T の光反応性の解析]

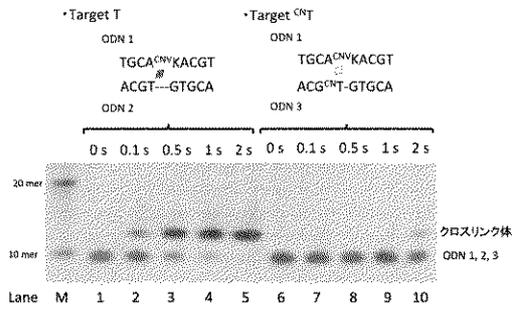
^{CNV}K に代えて ^{CNV}D を含有する ODN を使用して、^{CNV}K による上記実験と同様に、^{CN}T との光反応性を、^{CNV}D と対比して、解析した。図 6 は、^{CNV}D 含有プローブの光架橋実験の光反応スキームを示す図である。図 7 は、^{CNV}D 含有プローブの光架橋実験の結果を示すグラフである。図 7 の結果から示されるように、^{CNV}D の光架橋反応を T ターゲットの場合と比較して、^{CN}T を用いることによって約 15% にまで抑制することができた（照射時間は 1 秒の時点での比較）。

【産業上の利用可能性】

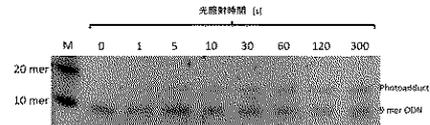
【 0 0 6 9】

本発明によれば、光クランプ法などで使用される光応答性核酸プローブの自己架橋体形成を抑制して、プローブの不活性化を防ぐことができる。本発明は、産業上有用な発明である。

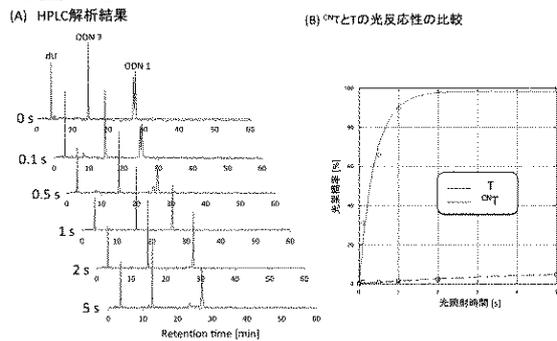
【図1】



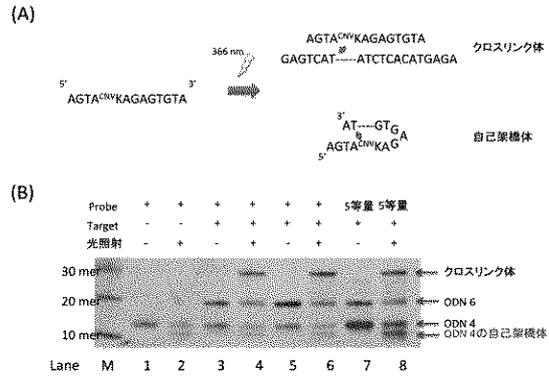
【図2】



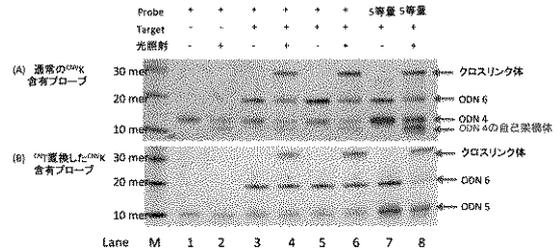
【図3】



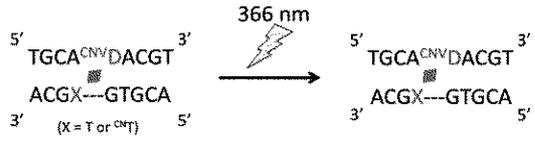
【図4】



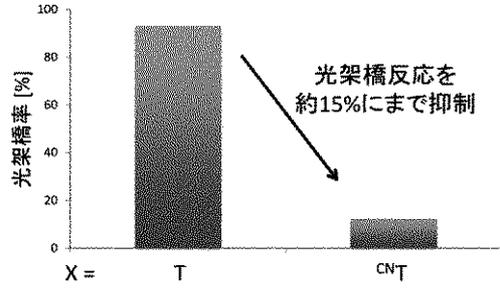
【図5】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 配列表 】

0006430953000001.app

フロントページの続き

審査官 西澤 龍彦

- (56)参考文献 国際公開第2009/066447(WO, A1)
国際公開第2014/014106(WO, A1)
国際公開第2014/157565(WO, A1)
CROUCH,GJ et al, Synthesis of 2' deoxyuridine nucleosides with appended 5 position carbonyl crosslinking groups, Nucleosides & Nucleotides, 1994年, Vol.13, No.4, p.939-944
GAI,XS et al, A Sensitive Multispectroscopic Probe for Nucleic Acids, Journal of Physical Chemistry B, 2010年, Vol.114, No.23, p.7958-7966

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C07H

C12N

CAplus/REGISTRY(STN)