(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第7521816号
(P7521816)
(45)発行日　令和6年7月24日(2024.7.24)　(24)登録日　令和6年7月16日(2024.7.16)

(51)Int.Cl.			FI		
C12Q	*1/6876*	*(2018.01)*	C12Q	1/6876	Z ZNA
C12M	*1/00*	*(2006.01)*	C12M	1/00	A
C12N	*15/11*	*(2006.01)*	C12N	15/11	Z

請求項の数 7　(全 33 頁)

(21)出願番号　特願2021-535462(P2021-535462)
(86)(22)出願日　令和2年7月31日(2020.7.31)
(86)国際出願番号　PCT/JP2020/029441
(87)国際公開番号　WO2021/020561
(87)国際公開日　令和3年2月4日(2021.2.4)
審査請求日　令和5年3月15日(2023.3.15)
(31)優先権主張番号　特願2019-140851(P2019-140851)
(32)優先日　令和1年7月31日(2019.7.31)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

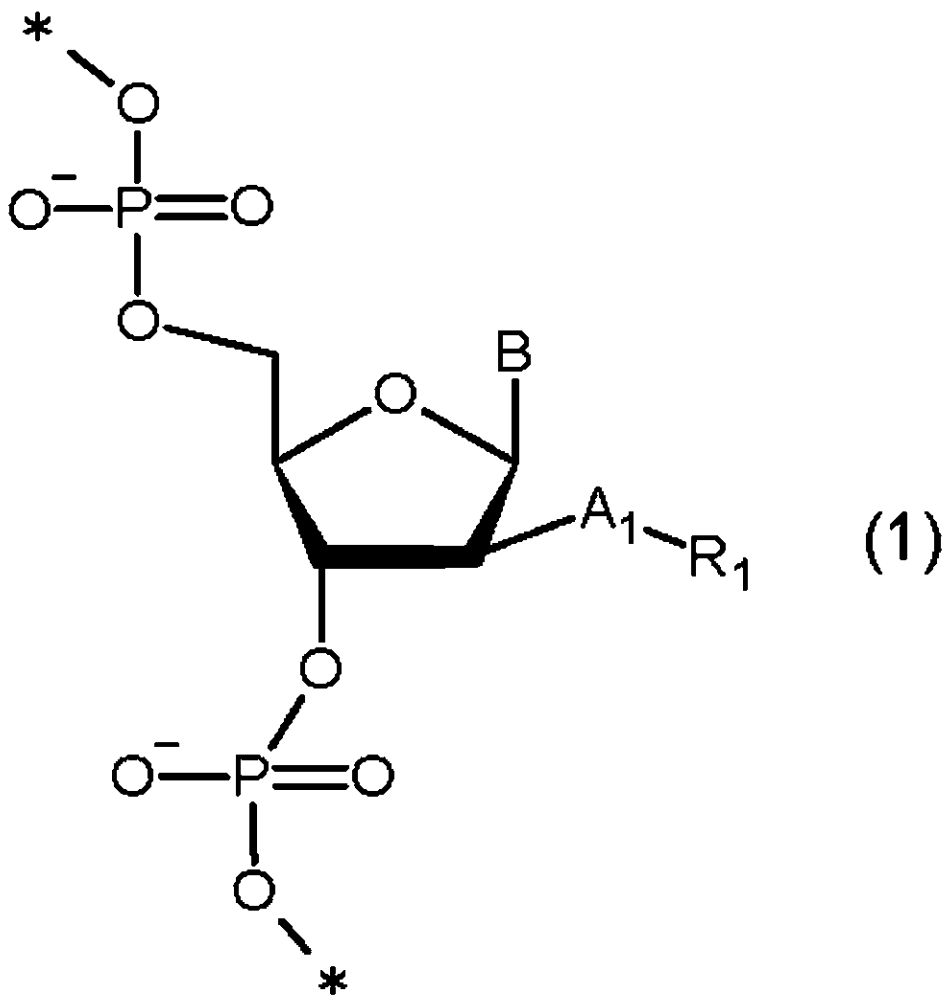
(73)特許権者　503360115
国立研究開発法人科学技術振興機構
埼玉県川口市本町四丁目１番８号
(74)代理人　110001612
弁理士法人きさらぎ国際特許事務所
(72)発明者　阿部　洋
愛知県名古屋市千種区不老町　国立大学法人東海国立大学機構　名古屋大学　大学院理学研究科　物質理学専攻化学系内
(72)発明者　阿部　奈保子
愛知県名古屋市千種区不老町　国立大学法人東海国立大学機構　名古屋大学　大学院理学研究科　物質理学専攻化学系内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】プライマー及びこれを用いた二本鎖ＤＮＡの製造装置並びに二本鎖ＤＮＡの製造方法

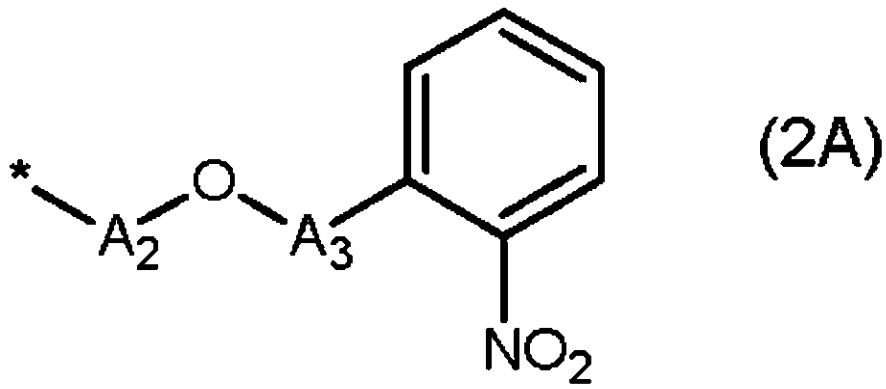
(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
核酸の増幅に使用されるプライマーであって、下記式（１）で示される構造を有し、分解性保護基R_1が下記式（２Ａ）で示される光分解性保護基、又は下記式（２Ｂ）で示されるフッ化物分解性保護基であることを特徴とするプライマー。

【化１】



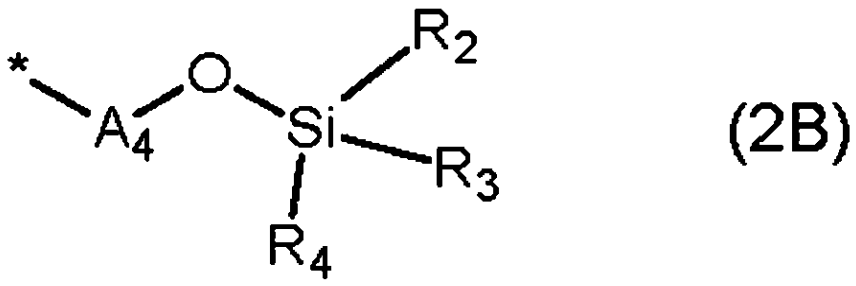
（ここで、A_1は－Ｓ－、－Ｓ－Ｓ－、又は－Ｓｅ－を示し、Ｂは塩基を示し、R_1は分解性保護基を示す。＊は隣接するヌクレオチドの糖との結合手を意味する。）

【化２】



（ここで、A_2は炭素数１～３のアルキレン基を示し、A_3は炭素数１～３のアルキレン基を示す。＊はA_1との結合手を意味する。）

【化３】



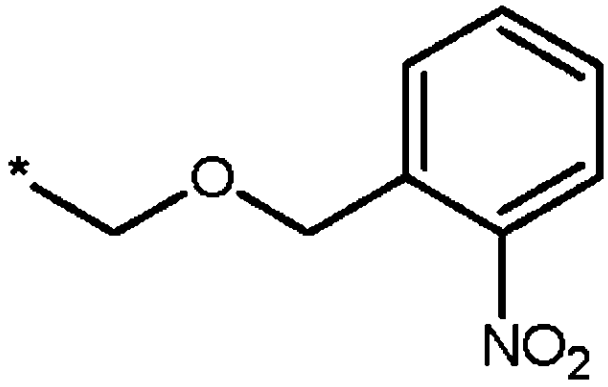
(2B)

（ここで、A_4は炭素数１～３のアルキレン基を示し、R_2～R_4は直鎖又は分岐鎖の炭素数１～４のアルキル基を示し、R_2～R_4は互いに同一であっても異なってもよい。＊はA_1との結合手を意味する。）

【請求項２】

前記R_1が下記式（３Ａ）で示される２－ニトロベンジルオキシメチル基であることを特徴とする請求項１に記載のプライマー。

【化４】

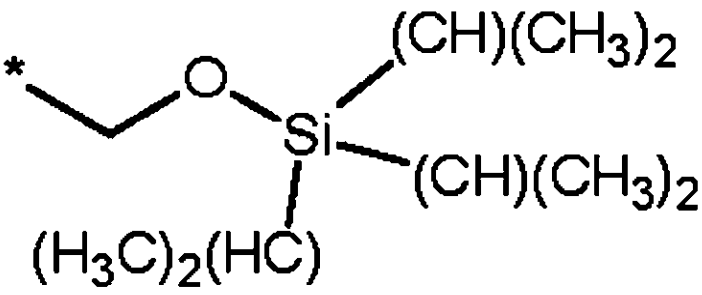


(3A)

【請求項３】

前記R_1が下記式（３Ｂ）で示されるトリイソプロピルシリルオキシメチル基であることを特徴とする請求項１に記載のプライマー。

【化５】



(3B)

【請求項４】

請求項１～３のいずれかに記載したプライマーを用いて接着末端を有する二本鎖ＤＮＡを製造するための二本鎖ＤＮＡの製造装置であって、

鋳型となるテンプレートＤＮＡのアンチセンス鎖の一部の配列と相補的であり、かつ前記式（１）で示される構造を有するフォワードプライマーと、

前記テンプレートＤＮＡのセンス鎖の一部の配列と相補的であり、かつ前記式（１）で示される構造を有するリバースプライマーと、

前記テンプレートＤＮＡを鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を複数サイクル

行い、前記フォワードプライマーが伸長したフォワード側伸長鎖と、前記リバースプライマーが伸長したリバース側伸長鎖とを生成し、前記フォワード側伸長鎖と前記リバース側伸長鎖とをアニーリングして３’末端が陥没した二本鎖ＤＮＡを生成する増幅手段と、

前記二本鎖ＤＮＡの前記３’末端をクレノウフラグメントにより平滑末端とする平滑化手段と、

前記R_1を脱保護して前記式（１）の構造部分でＤＮＡを切断し、３’末端が突出した接着末端を形成する脱保護切断手段と、

を備えることを特徴とする二本鎖ＤＮＡの製造装置。

【請求項５】

請求項１～３のいずれかに記載したプライマーを用いて接着末端を有する二本鎖ＤＮＡを製造するための二本鎖ＤＮＡの製造方法であって、

鋳型となるテンプレートＤＮＡのアンチセンス鎖の一部の配列と相補的であり、かつ前記式（１）で示される構造を有するフォワードプライマーと、前記テンプレートＤＮＡのセンス鎖の一部の配列と相補的であり、かつ前記式（１）で示される構造を有するリバースプライマーと、を準備する準備工程と、

前記テンプレートＤＮＡを鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を複数サイクル行い、前記フォワードプライマーが伸長したフォワード側伸長鎖と、前記リバースプライマーが伸長したリバース側伸長鎖とを生成し、前記フォワード側伸長鎖と前記リバース側伸長鎖とをアニーリングして３’末端が陥没した二本鎖ＤＮＡを生成する増幅工程と、

前記二本鎖ＤＮＡの前記３’末端をクレノウフラグメントにより平滑末端とする平滑化工程と、

前記R_1を脱保護して前記式（１）の構造部分でＤＮＡを切断し、３’末端が突出した接着末端を形成する脱保護切断工程と、

を備えることを特徴とする二本鎖ＤＮＡの製造方法。

【請求項６】

前記R_1が前記式（２Ａ）で示される光分解性保護基であり、脱保護切断工程は光照射により前記R_1を脱保護することを特徴とする請求項５に記載の二本鎖ＤＮＡの製造方法。

【請求項７】

前記R_1が前記式（２Ｂ）で示されるフッ化物分解性保護基であり、脱保護切断工程はフッ化物により前記R_1を脱保護することを特徴とする請求項５に記載の二本鎖ＤＮＡの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、プライマー及びこれを用いた二本鎖ＤＮＡの製造装置並びに二本鎖ＤＮＡの製造方法に関する。

【背景技術】

【０００２】

分子生物学などの分野では、遺伝子組み換えや形質転換などを行うために、標的ＤＮＡをホストに組み込んだベクターが用いられている。一般に、標的ＤＮＡは、量が少ない場合はポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）で増幅して使用される。ＰＣＲでは、標的ＤＮＡ配列を含むテンプレートＤＮＡを使用し、これに相補的に結合するプライマーを用いて熱変性とアニーリングを複数サイクル繰り返すことでテンプレートＤＮＡを増幅している。

【０００３】

ＰＣＲで増幅されたテンプレートＤＮＡの増幅産物は、そのままでは平滑末端であり、これをプラスミドＤＮＡなどのホストＤＮＡと結合（ライゲーション）させるための処理をする必要がある。一般に、そのような処理として、特定の配列を切断する制限酵素を使用するが、この方法では、結合できるＤＮＡが制限酵素の切断部位の配列に依存するため、汎用性に乏しいという問題がある。

【０００４】
制限酵素を用いない方法として、増幅産物の３’末端及び５’末端を接着末端（粘着末端、突出末端などともいう）とし、ホスト側も同様に接着末端を形成して両者をライゲーションしてベクターを構築する技術がある。例えば、近年では、Ｇｉｂｓｏｎ ａｓｓｅｍｂｌｙ法、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ法、ＳＬｉＣＥ法などが知られている。これらの方法では、いずれも二本鎖ＤＮＡ断片末端に１５ｂｐ程度の相同配列を持たせ、二本鎖中の片側の鎖をエキソヌクレアーゼ活性で消化し、接着末端を生じさせたのちに連結する。なお、Ｇｉｂｓｏｎ ａｓｓｅｍｂｌｙ法ではｉｎ ｖｉｔｒｏでＴａｑ ＤＮＡ ｌｉｇａｓｅを用いて連結し、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ法では大腸菌内の修復システムを利用して連結する。

【０００５】
これらの方法では、酵素であるエキソヌクレアーゼを使用するため、コストがかかるほか、反応条件等によって部位特異性に劣ることがあり、定量的な接着末端形成が困難であるため、連結反応の効率が低いという問題があった。このため、酵素を使用しないシームレスクローニング法が求められていた。

【０００６】
そこで、化学的手法により接着末端を有するＤＮＡを調製する方法が開発され、そのためのＰＣＲ用のプライマーとして、特許文献１に記載されたものが知られている。この文献のプライマーは、非相補ＤＮＡ部分の塩基配列中の３’末端に相当する塩基が保護基で修飾されている。この保護基は、ＤＮＡポリメラーゼによるＤＮＡ複製の進行を停止させる機能を有しており、光照射処理やアルカリ処理などによって被修飾塩基から脱離しうる。また、本文献では、保護基（置換基）を生体分子に導入するための置換基導入剤を用いて塩基に保護基をプライマーの塩基に導入している。

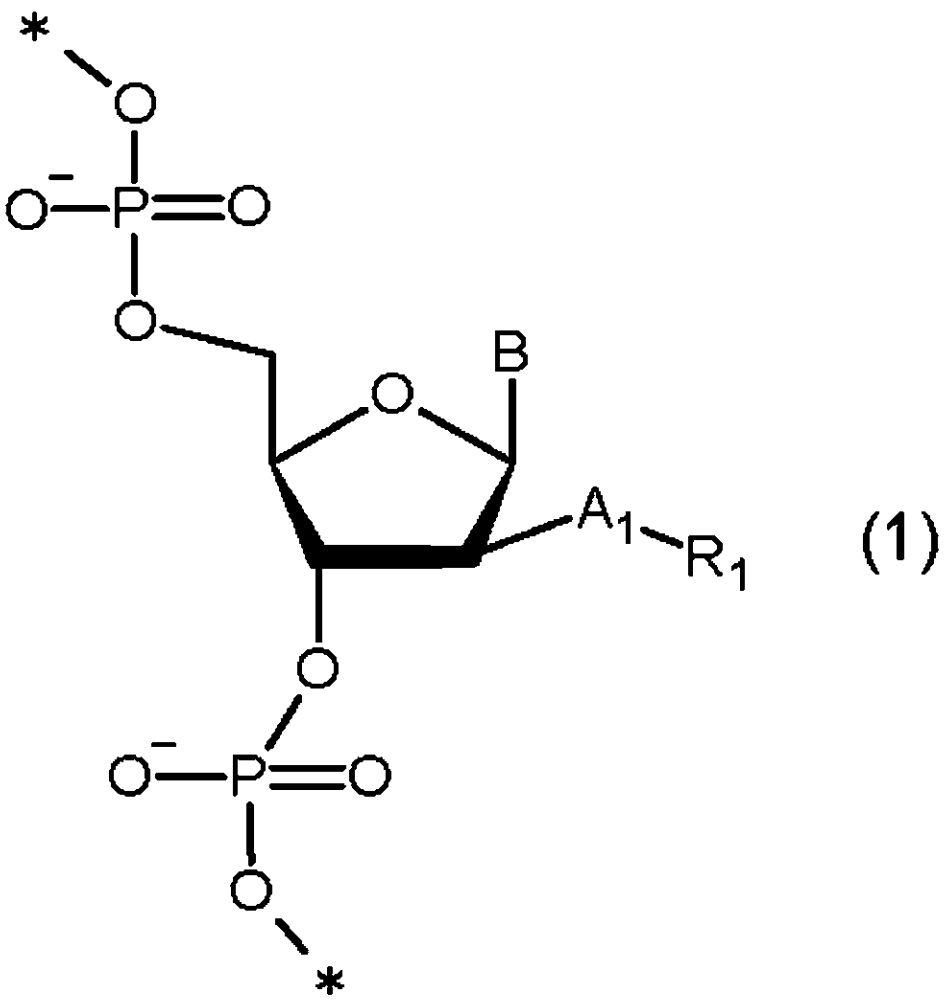
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００７】
【特許文献１】国際公開第２００９／１１３７０９号（請求項１、請求項２など）
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００８】
特許文献１では、保護基の部分でＤＮＡ複製の進行を停止するが、特定の部位で一本鎖ＤＮＡを切断して接着末端を生成するものではないため、部位特異性が低い。また、例えばＤＮＡでは塩基はアデニン、グアニン、シトシン、チミンの４種類あるが、特許文献１では塩基に保護基を導入しているため、塩基の種類に応じた方法で保護基を導入する必要があり、プライマーの製造に手間やコストがかかっていた。

【０００９】
本発明の目的は、特定の部位で一本鎖を特異的に切断可能で、かつ安価に製造することが可能なプライマーを提供することにある。また、本発明の他の目的は、このようなプライマーを用いた、接着末端を有する二本鎖ＤＮＡの製造装置及び二本鎖ＤＮＡの製造方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】
【００１０】
本発明者らは、上記問題を解決すべく鋭意研究を重ねた。その結果、ヌクレオシドの糖の部分に特定のリンカーを介して分解性保護基を導入したプライマーを開発した。そして、その保護基を分解することでそのヌクレオシドの部分で一本鎖を切断することで、接着末端を有する二本鎖ＤＮＡを作製することできることを見出し、本発明を完成させた。

【００１１】
すなわち、本発明は、核酸の増幅に使用されるプライマーであって、下記式（１）で示される構造を有することを特徴とするプライマーである。

【化１】



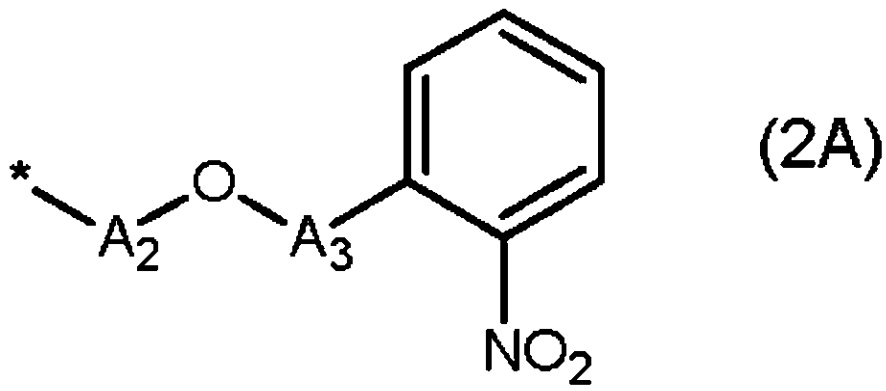
(1)

（ここで、A_1は－Ｓ－、－Ｓ－Ｓ－、又は－Ｓｅ－を示し、Ｂは塩基を示し、R_1は分解性保護基を示す。＊は隣接するヌクレオチドの糖との結合手を意味する。）

【００１２】

この場合において、前記R_1が下記式（２Ａ）で示される光分解性保護基であることが好ましい。

【化２】



(2A)

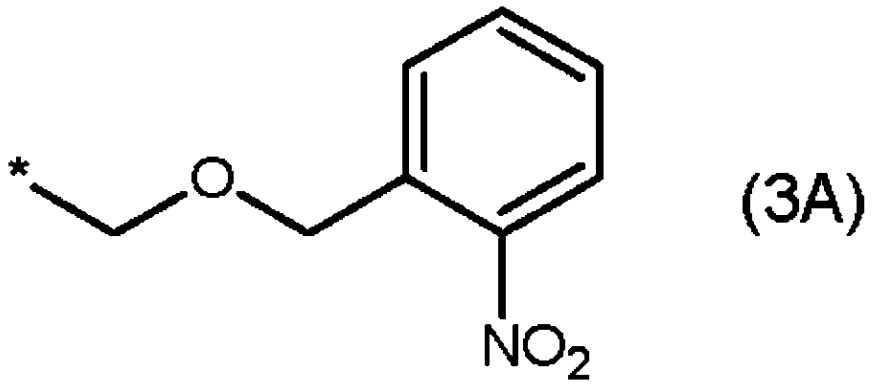
（ここで、A_2は炭素数１～３のアルキレン基を示し、A_3は炭素数１～３のアルキレン基を示す。＊はA_1との結合手を意味する。）

【００１３】

さらに、前記R_1が下記式（３Ａ）で示される２－ニトロベンジルオキシメチル基であ

ることが好ましい。

【化３】

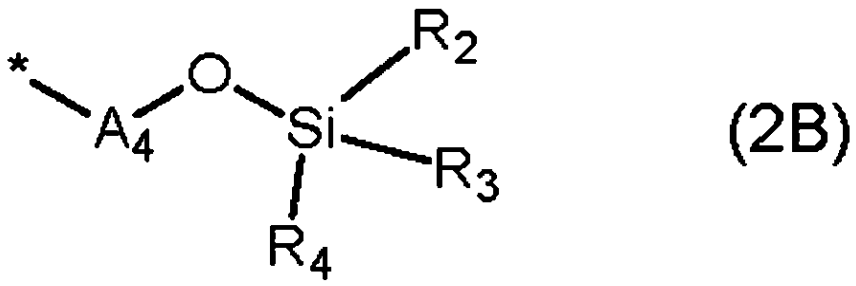


(3A)

【００１４】

あるいはまた、前記R_1が下記式（２Ｂ）で示されるフッ化物分解性保護基であることが好ましい。

【化４】



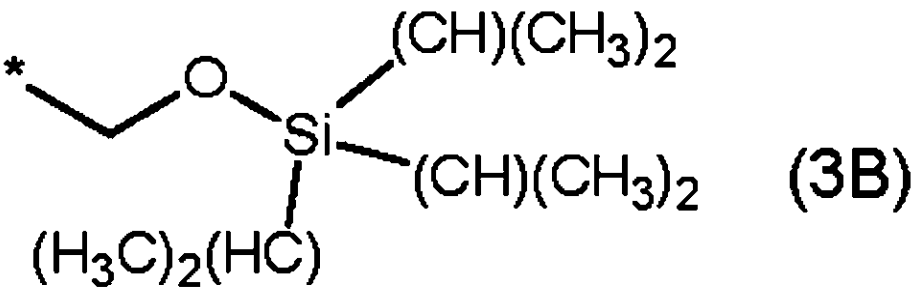
(2B)

（ここで、A_4は炭素数１～３のアルキレン基を示し、R_2～R_4は直鎖又は分岐鎖の炭素数１～４のアルキル基を示し、R_2～R_4は互いに同一であっても異なってもよい。＊はA_1との結合手を意味する。）

【００１５】

この場合において、前記R_1が下記式（３Ｂ）で示されるトリイソプロピルシリルオキシメチル基であることが好ましい。

【化５】



(3B)

【００１６】

また、本発明は、上記のいずれかに記載のプライマーを用いて接着末端を有する二本鎖ＤＮＡを製造するための二本鎖ＤＮＡの製造装置であって、鋳型となるテンプレートＤＮＡのアンチセンス鎖の一部の配列と相補的であり、かつ前記式（１）で示される構造を有するフォワードプライマーと、前記テンプレートＤＮＡのセンス鎖の一部の配列と相補的であり、かつ前記式（１）で示される構造を有するリバースプライマーと、前記テンプレートＤＮＡを鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を複数サイクル行い、前記フォワードプライマーが伸長したフォワード側伸長鎖と、前記リバースプライマーが伸長した

リバース側伸長鎖とを生成し、前記フォワード側伸長鎖と前記リバース側伸長鎖とをアニーリングして３’末端が陥没した二本鎖ＤＮＡを生成する増幅手段と、前記二本鎖ＤＮＡの前記３’末端をクレノウフラグメントにより平滑末端とする平滑化手段と、前記R_1を脱保護して前記式（１）の構造部分でＤＮＡを切断し、３’末端が突出した接着末端を形成する脱保護切断手段と、を備えることを特徴とする二本鎖ＤＮＡの製造装置である。

【００１７】

さらに、本発明は、上記のいずれかに記載のプライマーを用いて接着末端を有する二本鎖ＤＮＡを製造するための二本鎖ＤＮＡの製造方法であって、鋳型となるテンプレートＤＮＡのアンチセンス鎖の一部の配列と相補的であり、かつ前記式（１）で示される構造を有するフォワードプライマーと、前記テンプレートＤＮＡのセンス鎖の一部の配列と相補的であり、かつ前記式（１）で示される構造を有するリバースプライマーと、を準備する準備工程と、前記テンプレートＤＮＡを鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を複数サイクル行い、前記フォワードプライマーが伸長したフォワード側伸長鎖と、前記リバースプライマーが伸長したリバース側伸長鎖とを生成し、前記フォワード側伸長鎖と前記リバース側伸長鎖とをアニーリングして３’末端が陥没した二本鎖ＤＮＡを生成する増幅工程と、前記二本鎖ＤＮＡの前記３’末端をクレノウフラグメントにより平滑末端とする平滑化工程と、前記R_1を脱保護して前記式（１）の構造部分でＤＮＡを切断し、３’末端が突出した接着末端を形成する脱保護切断工程と、を備えることを特徴とする二本鎖ＤＮＡの製造方法である。

【００１８】

この場合において、前記R_1が前記式（２Ａ）で示される光分解性保護基であり、脱保護切断工程は光照射により前記R_1を脱保護することが好ましい。

【００１９】

あるいは、前記R_1が前記式（２Ｂ）で示されるフッ化物分解性保護基であり、脱保護切断工程はフッ化物により前記R_1を脱保護することが好ましい。

【発明の効果】

【００２０】

本発明によれば、特定の部位で一本鎖を特異的に切断可能で、かつ安価に製造することが可能なプライマーを提供することが可能となる。また、本発明によれば、このようなプライマーを用いた、接着末端を有する二本鎖ＤＮＡの製造装置及び二本鎖ＤＮＡの製造方法を提供することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【００２１】

【図１】接着末端を有する二本鎖ＤＮＡの製造方法及び製造装置を示す模式図である。

【図２】光切断アナログを含むオリゴヌクレオチドの切断反応の実験を示す図である。

【図３】光切断反応による接着末端形成を利用したクローニング反応の実験を示す図である。

【図４】光切断アナログを含むオリゴヌクレオチド切断反応の実験結果を示す図である。

【図５】フッ素切断アナログを含むオリゴヌクレオチドの切断反応の実験結果を示す図である。

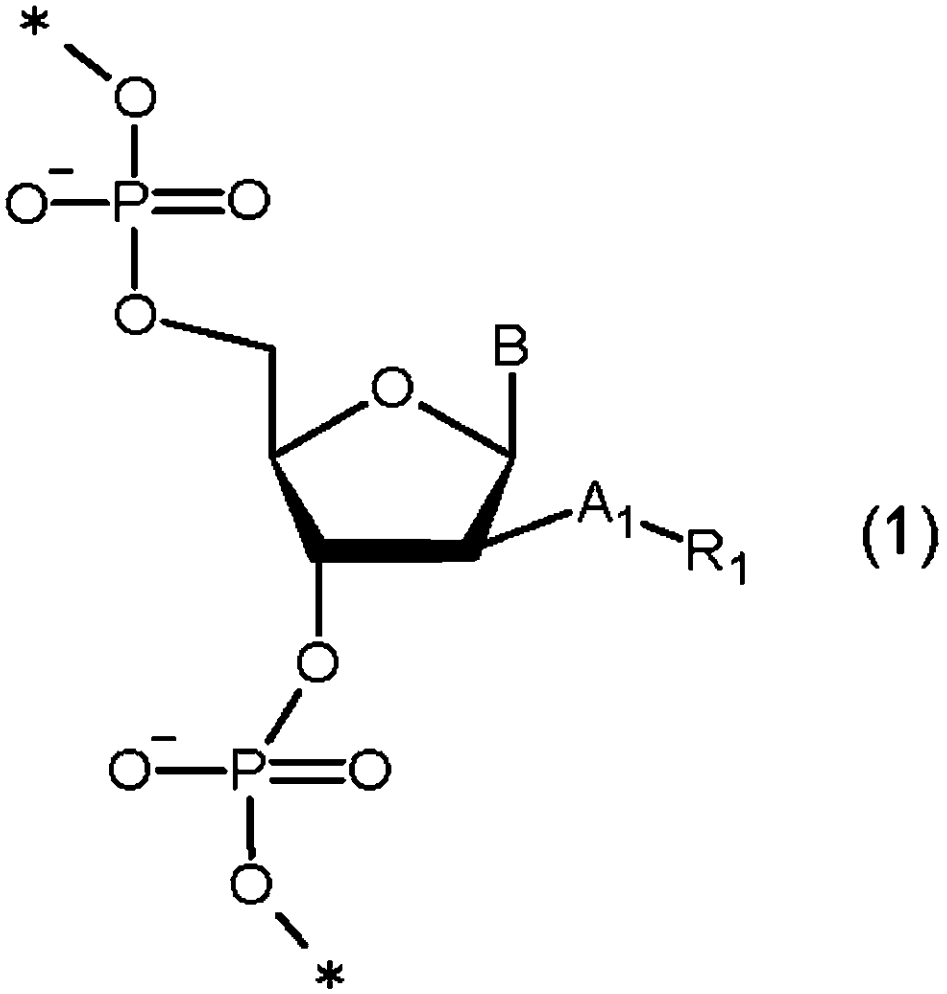
【発明を実施するための形態】

【００２２】

１．プライマー

以下、本発明のプライマーについて説明する。本発明のプライマーは、核酸の増幅に使用されるプライマーであって、下記式（１）で示される構造を有する。

【化６】



（ここで、A_1は－Ｓ－、－Ｓ－Ｓ－、又は－Ｓｅ－を示し、Ｂは塩基を示し、R_1は分解性保護基を示す。＊は隣接するヌクレオチドの糖との結合手を意味する。）。なお、結合手＊のうち、式（１）の３’側の結合手は、３’側において隣接するヌクレオチドの糖の５’炭素に結合し、５’側 の結合手は、５’側において隣接するヌクレオチドの糖の３’炭素に結合する。

【００２３】

Ｂは塩基であり、具体的には、ＤＮＡプライマーの場合はアデニン、グアニン、シトシン、チミンから選択され、ＲＮＡプライマーの場合はアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルから選択される。

【００２４】

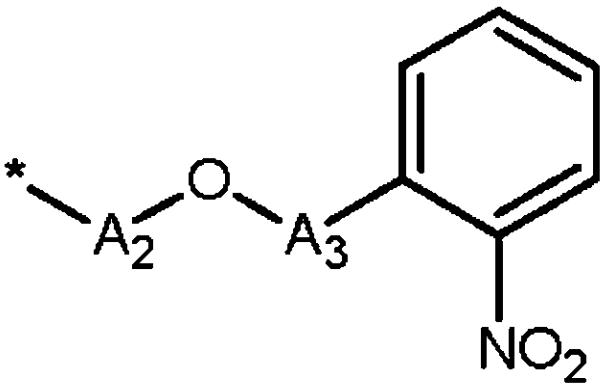
R_1の分解性保護基とは、何らかの処理により分解する保護基（置換基）を意味する。ここでいう処理としては、光照射処理、還元処理、アルカリ処理、酸処理、酸化処理、脱シリル化処理、熱処理、エステラーゼ処理、ホスファターゼ処理などを挙げることができる。

【００２５】

（１）光分解性保護基

処理が光照射である場合、R_1が下記式（２Ａ）で示される光分解性保護基であることが好ましい。

【化７】



(2A)

（ここで、A_2は炭素数１～３のアルキレン基を示し、A_3は炭素数１～３のアルキレン基を示す。＊はA_1との結合手を意味する。）

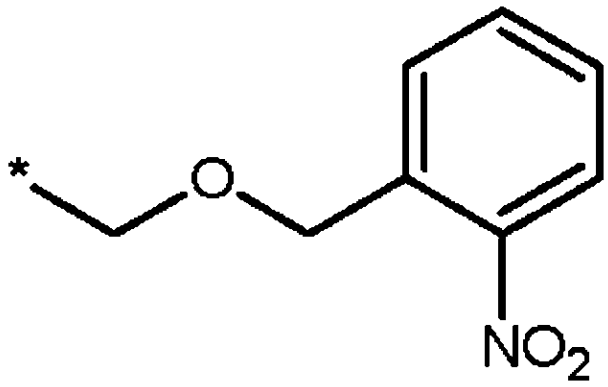
【００２６】

炭素数１～３のアルキレン基としては、メチレン基、エチレン基、プロピレン基を挙げることができる。

【００２７】

特に、R_1が下記式（３Ａ）で示される２－ニトロベンジルオキシメチル基であることが好適である。

【化８】



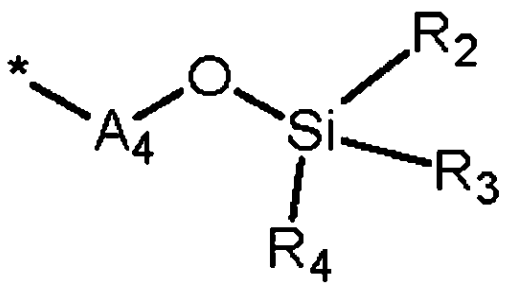
(3A)

【００２８】

（２）フッ化物分解性保護基（シリル系保護基）

処理が還元処理の場合、R_1が下記式（２Ｂ）で示されるフッ化物分解性保護基（シリル系保護基）であることが好ましい。

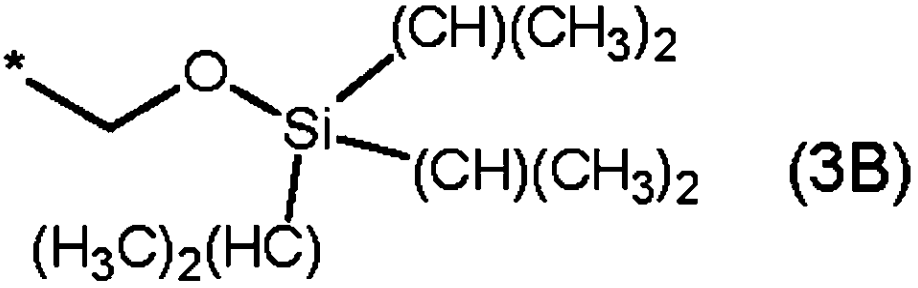
【化９】



(2B)

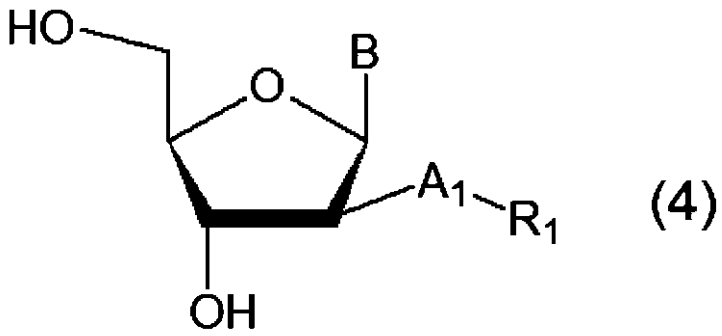
（ここで、A_4は炭素数１～３のアルキレン基を示し、R_2～R_4は直鎖又は分岐鎖の炭素数１～４のアルキル基を示し、R_2～R_4は互いに同一であっても異なってもよい。＊はA_1との結合手を意味する。）

【００２９】
直鎖又は分岐鎖の炭素数１～４のアルキル基としては、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、ｓｅｃ－ブチル基、イソブチル基、ｔｅｒｔ－ブチル基を挙げることができる。
【００３０】
特に、R_1が下記式（３Ｂ）で示されるトリイソプロピルシリルオキシメチル基であることが好適である。
【化１０】



【００３１】
（３）その他の分解性保護基
アルカリ処理により被修飾塩基から脱離し得る分解性保護基としては、イソブチリル基、ベンゾイル基、アセトキシメチル基などを挙げることができる。酸処理により被修飾塩基から脱離し得る分解性保護基としては、トリチル基を挙げることができる。酸化処理により被修飾塩基から脱離し得る分解性保護基としては、アリルオキシメチル基、ジメトキシベンジルオキシメチル基、トリメトキシベンジルオキシメチル基などを挙げることができる。脱シリル化処理により被修飾塩基から脱離し得る分解性保護基としては、ｔ－ブチルジメトキシシリルオキシメチル基、ｔ－ブチルジフェニルシリルオキシメチル基などを挙げることができる。熱処理により被修飾塩基から脱離し得る分解性保護基としては、イソシアネート基を挙げることができる。エステラーゼ処理により被修飾塩基から脱離し得る分解性保護基としては、アセトキシメチル基を挙げることができる。ホスファターゼ処理により被修飾塩基から脱離し得る分解性保護基としては、リン酸メチル基を挙げることができる。
【００３２】
本発明のプライマーは、特にＰＣＲで好適に使用される一本鎖ＤＮＡ又は一本鎖ＲＮＡであり、上記式（１）で示される構造を分子内に有するオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドである。プライマーの塩基対の数は、標的ＤＮＡなどの配列等に応じて適宜設定することができるが、一般にオリゴヌクレオチドでは例えば２０塩基対以下、ポリヌクレオチドでは例えば２０塩基対超である。ポリヌクレオチドの塩基対の数の上限としては特に制限はないが、一般的に使用されるプライマーとしては例えば４０塩基対以下が好ましい。また、オリゴヌクレオチドの塩基対の数の下限としては、プライマーとして使用できる長さであれば特に制限はないが、一般的に使用されるプライマーとしては例えば５塩基対以上が好ましい。
【００３３】
２．プライマーの製造方法
本発明のプライマーは、下記式（４）の構造を有する修飾ヌクレオシド（以下、「ヌクレオシド誘導体」ということがある）を合成し、これに非修飾のヌクレオチドをホスホロアミダイト法などの固相合成法で連結することで製造することができる。

【化１１】



(4)

（ここで、A_1、R_1は上記式（１）で定義したとおりであり、Ｂは塩基又は修飾塩基を意味する。）

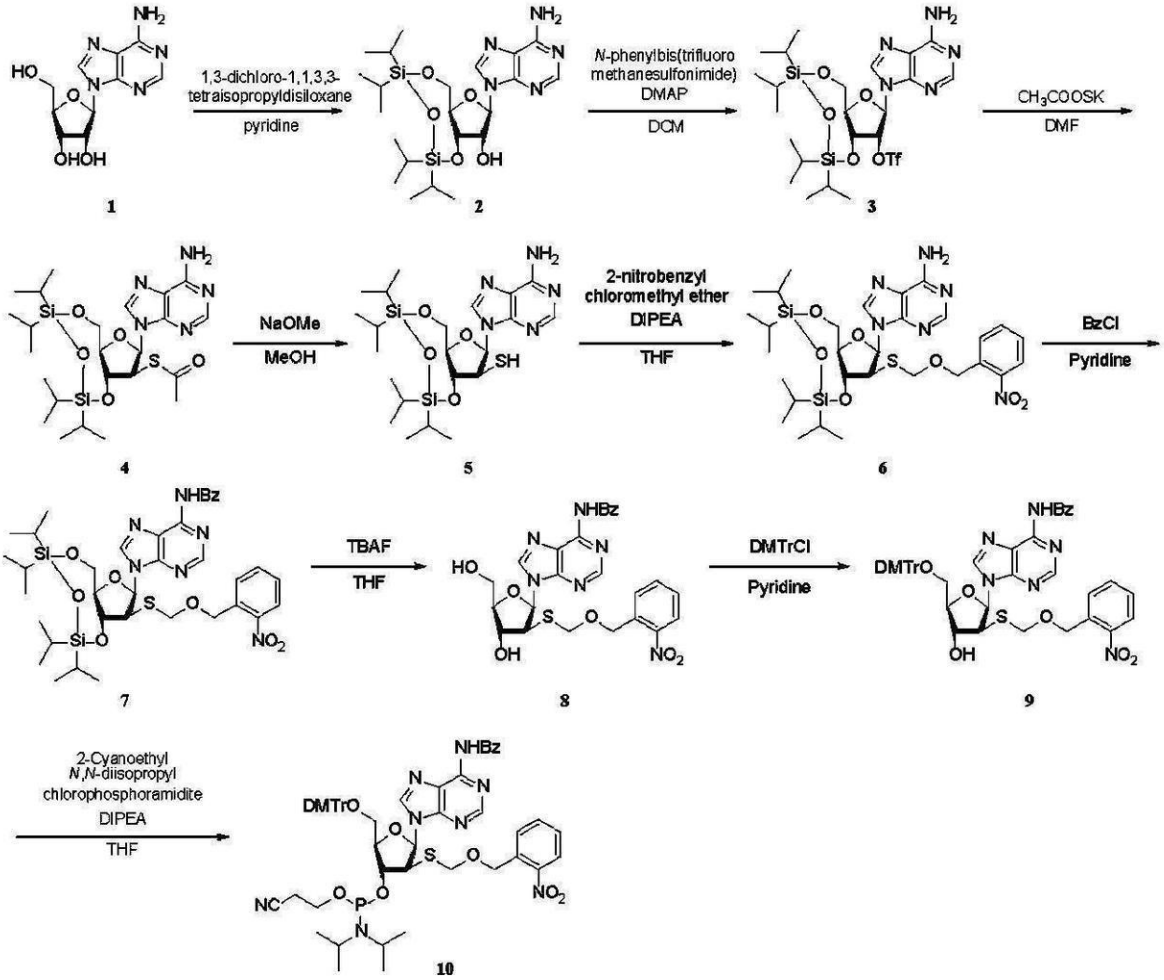
【００３４】

プライマーの合成方法の概要としては、まずヌクレオシドの３’ヒドロキシル基と５’ヒドロキシル基を保護し、２’ヒドロキシル基をリンカー元素A_1で置換し、このA_1に分解性保護基R_1を結合させたのち、３’ヒドロキシル基と５’ ヒドロキシル基を脱保護する。その後、ホスホロアミダイトなどを反応させ、固相合成法で非修飾のヌクレオチドを連結させてプライマーを合成する。以下、実施例に掲載したいくつかのプライマーの具体的な製造方法について詳細に説明する。

【００３５】

（ａ）光分解性保護基を有するヌクレオシド誘導体１（※A_1が－Ｓ－基、R_1が２－ニトロベンジルオキシメチル基の化合物）及びプライマーの合成

【化１２】



【００３６】

上記の合成スキームに沿って説明する。以下で説明する合成スキームにおいて、数字は化合物の番号を表す。まず、ヌクレオシド（下記スキームではアデノシン）を出発物質として用意する（化合物１）。次に、ヌクレオシドに１，３－ジクロロ－１，１，３，３－テトライソプロピルジシロキサンをピリジンなどの溶媒中で反応させる。これにより、リボースの３’ヒドロキシル基と５’ヒドロキシル基との間でシロキサン結合の環状構造を形成させ、３’位と５’位のヒドロキシル基を保護する（化合物２）。

【００３７】

次に、Ｎ－フェニルトリフルオロメタンスルホンイミドを添加して、Ｎ，Ｎ－ジメチル－４－アミノピリジン（ＤＭＡＰ）などの求核剤をジクロロメタン（ＤＣＭ）などの溶媒中で反応させて、リボースの２’位をトリフルオロスルホン酸基とする（化合物３）。次に、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）などの存在下でチオ酢酸カリウムなどのチオール基を有する化合物を反応させて、リボースの２’位にチオエステルを形成させる（化合物４）。さらにアンモニア／メタノール溶液中で反応させることでチオエステル基をチオール基に変換する（化合物５）。

【００３８】

続いて、２－ニトロベンジルクロロメチルエステル、Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＰＥＡ）、テトラヒドロフラン（ＴＨＦ）を添加して、分解性保護基である２－ニトロベンジルオキシメチル基をチオールに結合させる（化合物６）。さらに、塩化ベンゾイル（ＢｚＣｌ）、ピリジンを添加し、塩基のアミノ基にベンゾイル基を結合させる（化合物７）。この状態で、フッ化テトラ－ｎ－ブチルアンモニウム（ＴＢＡＦ）とテトラヒドロフラン（ＴＨＦ）とを添加してリボースの３’位と５’位の保護基を脱離させて

ヒドロキシル基にする（化合物８）。このようにしてヌクレオシド誘導体（化合物８）を合成することができる。

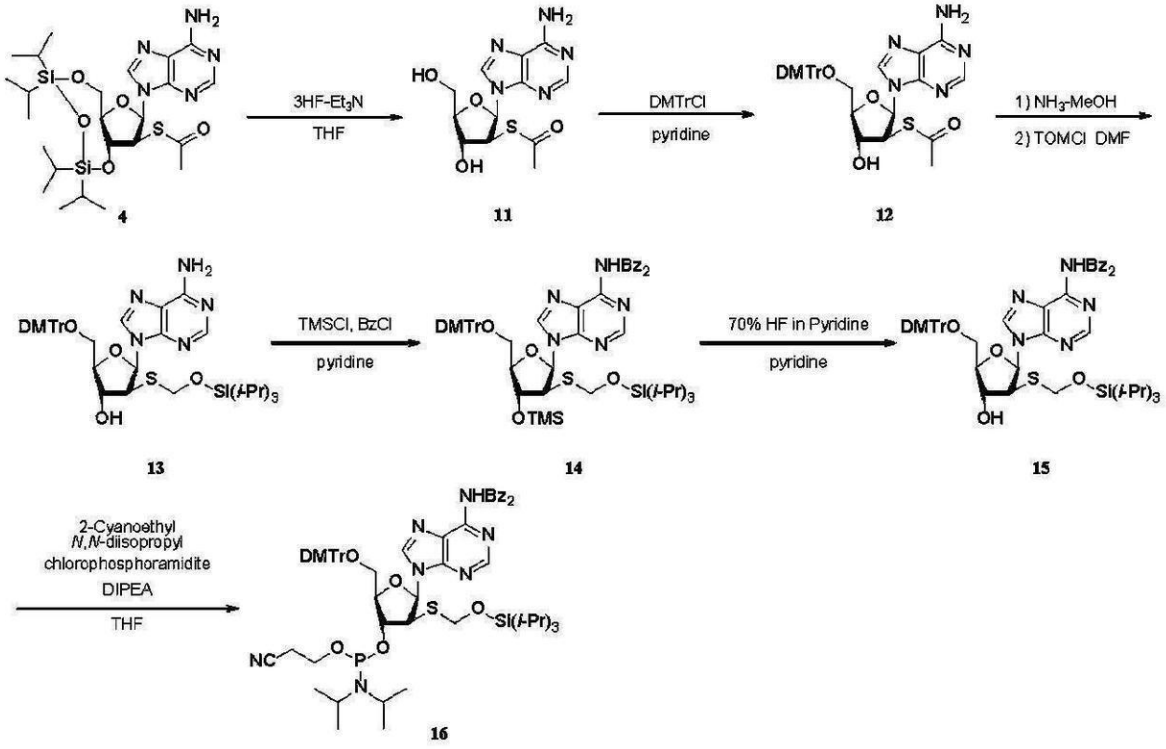
【００３９】

次に、ホスホロアミダイト法によりヌクレオシド誘導体に他のヌクレオチドを連結してプライマーを製造するために、ヌクレオシド誘導体を修飾する。まず、ヌクレオシド誘導体に４，４’－ジメトキシトリチルクロリド（ＤＭＴｒＣｌ）、ピリジンを加え、リボースの５’ヒドロキシル基に４，４’－ジメトキシトリチルクロリド基を結合させる（化合物９）。次に、２－シアノエチルＮ，Ｎ－ジイソプロピルクロロホスホルアミダイトを、ＴＨＦ、ＤＩＰＥＡに添加し、リボースの３’ヒドロキシル基にホスホロアミダイトを結合させる（化合物１０）。その後は常法により、所望の配列となるようにヌクレオチドを固相合成してプライマーを合成する。

【００４０】

（ｂ）フッ素分解性保護基を有するヌクレオシド誘導体３（※A_1が－Ｓ－基、R_1がトリイソプロピルシリルオキシメチル基の化合物）及びプライマーの合成

【化１３】



【００４１】

化合物４までの合成スキームは上記のヌクレオシド誘導体１の合成の場合と同じである。次に、３ＨＦ－Et_3N（無水フッ化水素（ＨＦ）、トリエチルアミン（Et_3N）のモル比が３：１）などのフッ素化合物と、ＴＨＦとを添加してリボースの３’位と５’位の保護基を脱離させてヒドロキシル基にする（化合物１１）。続いて、ＤＭＴｒＣｌ、ピリジンを加え、リボースの５’ヒドロキシル基に４，４’－ジメトキシトリチルクロリド基を結合させる（化合物１２）。次に、アンモニアメタノール（NH_3－ＭｅＯＨ）、ＤＭＦなどの存在下でクロロメトキシトリイソプロピルシラン（ＴＯＭＣｌ）などのシラン化合物を反応させて、リボースの２’位にトリイソプロピルシリルオキシメチル基を結合させる（化合物１３）。

【００４２】

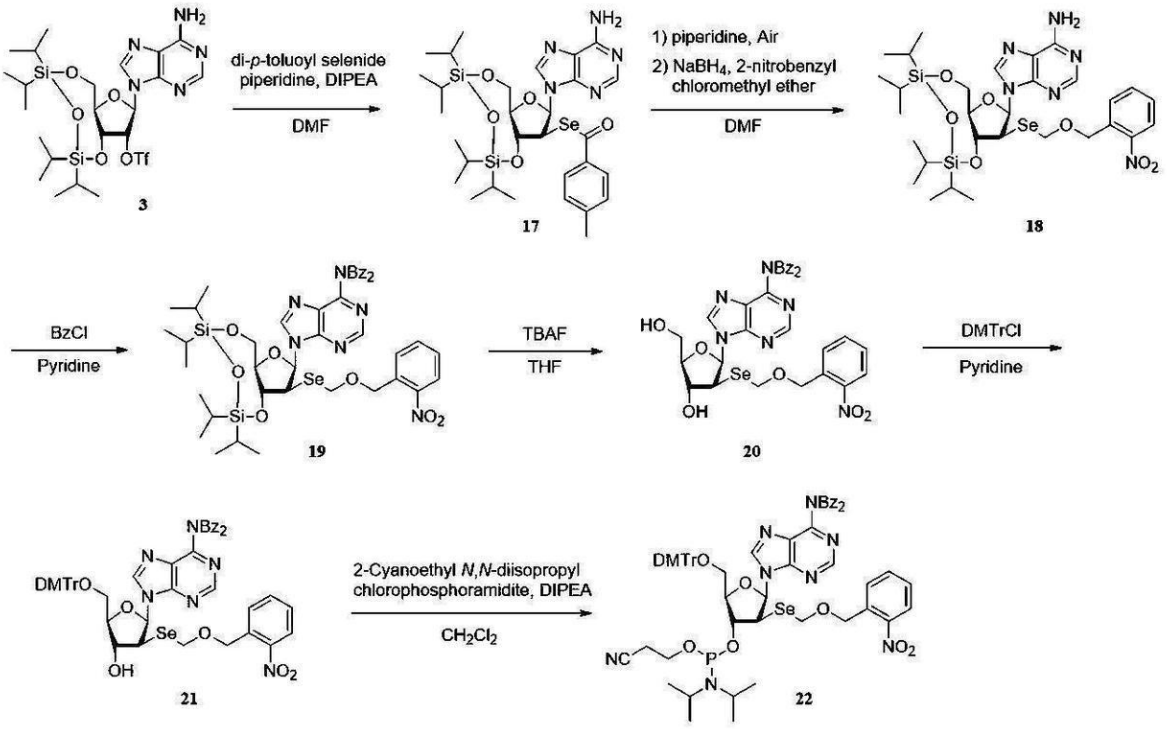
次に、ホスホロアミダイト法によりヌクレオシド誘導体に他のヌクレオチドを連結してプライマーを製造するために、ヌクレオシド誘導体を修飾する。まず、クロロトリメチルシラン（ＴＭＳＣｌ）、ＢｚＣｌ、ピリジンを添加し、塩基のアミノ基にベンゾイル基を、リボースの３’ヒドロキシル基にトリメチルシランを結合させる（化合物１４）。次に

、ＨＦ、ピリジンを反応させてリボースの３’位をヒドロキシル基にする（化合物１５）。そして、ヌクレオシド誘導体１の合成の場合と同様に、リボースの３’ヒドロキシル基にホスホロアミダイトを結合させる（化合物１６）。

【００４３】

（ｃ）光分解性保護基を有するヌクレオシド誘導体３（※A_1が－Ｓｅ－基、R_1が２－ニトロベンジルオキシメチル基の化合物）及びプライマーの合成

【化１４】



【００４４】

化合物３までの合成スキームは上記のヌクレオシド誘導体１の合成の場合と同じである。次に、ジ－ｐ－トルオイルセレニド、ピペリジン、ＤＩＰＥＡをＤＭＦ等の溶媒中で反応させる（化合物１７）。さらに、ピペリジン、空気（Ａｉｒ）、ＮａＢＨ４、２－ニトロベンジルクロロメチルエステルを、ＤＭＦ等の溶媒中で反応させて、リボ－スの２’位に光分解性保護基を有するセレノ化合物を結合させる（化合物１８）。

【００４５】

その後はヌクレオシド誘導体１の合成スキームと同様に処理を行い、化合物１９～２０を順次合成する。さらには、ホスホロアミダイト法によりヌクレオシド誘導体に他のヌクレオチドを連結してプライマーを製造する。これも、ヌクレオシド誘導体１の合成スキームと同様に処理を行い、化合物２１及び化合物２２を順次合成する。

【００４６】

３．接着末端を有する二本鎖ＤＮＡの製造方法及び製造装置

つぎに、接着末端を有する二本鎖ＤＮＡの製造方法及び製造装置について説明する。本発明の二本鎖ＤＮＡの製造装置は、本発明のプライマーを用いて接着末端を有するための装置である。また、本発明の二本鎖ＤＮＡの製造方法は、標的ＤＮＡ配列を含むテンプレートＤＮＡを使用し、本発明のプライマーを用いて接着末端を有する方法である。以下、図１を参照して説明する。

【００４７】

まず、試薬としてフォワードプライマーとリバースプライマーを含むＰＣＲ増幅用プライマーセットを準備する（準備工程）。フォワードプライマーは、テンプレートＤＮＡのアンチセンス鎖の一部の配列と相補的であり、かつ式（１）で示される構造を有する。また、リバースプライマーは、テンプレートＤＮＡのセンス鎖の一部の配列と相補的であり

、かつ式（１）で示される構造を有する。

【００４８】

図の（ａ）に示すように、フォワードプライマーとリバースプライマーは、増幅したい標的ＤＮＡ配列を挟むように配列を決定する。また、プライマーにおける式（１）の分解性保護基を有するヌクレオチドの位置は、目的とする接着末端の配列（図の（ｄ））において、５’陥没側における最も５’末端側のヌクレオチドの５’側に隣接する位置となるように設計する。すなわち、式（１）の構造のヌクレオチドに隣接する３’側のヌクレオチドが、接着末端の５’末端のヌクレオチドとなるようにする。その他の試薬としては、ＰＣＲに使用するポリメラーゼ（Ｔａｑポリメラーゼなど）、バッファー、ｄＮＴＰなどである。

【００４９】

次に、ＰＣＲ装置（増幅手段）を用いてテンプレートＤＮＡの配列を増幅する（増幅工程）。ＰＣＲ装置は、テンプレートＤＮＡを鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を複数サイクル行い、フォワードプライマーが伸長したフォワード側伸長鎖と、リバースプライマーが伸長したリバース側伸長鎖とを生成し、フォワード側伸長鎖とリバース側伸長鎖とをアニーリングして３’末端が陥没した二本鎖ＤＮＡ（図の（ｂ））を生成する。

【００５０】

ＰＣＲでは、熱変性、アニーリング、伸長反応を繰り返して、テンプレートＤＮＡの配列を増幅する。ＰＣＲの条件にもよるが、熱変性は約９５℃、１～３分間、アニーリングはプライマーのＴｍ±５℃、伸長反応は１～１０分間で行う。ＰＣＲのサイクル数は特に制限はないが、一般に２４～４０サイクル程度である。

【００５１】

図のように、ＰＣＲ増幅産物には３’末端が陥没した二本鎖ＤＮＡが含まれる。これは、プライマーを鋳型として相補鎖が合成される際に、式（１）の分解性保護基がポリメラーゼ反応を阻害し、反応を停止させるためである。

【００５２】

次に、図の（ｃ）に示すように、クレノウフラグメント（Ｋｌｅｎｏｗ　Ｆｒａｇｍｅｎｔ：平滑化手段）により、この陥没した３’末端をＦｉｌｌ－ｉｎ反応により平滑末端とする（平滑化工程）。この反応の試薬としては、Ｋｌｅｎｏｗ　Ｆｒａｇｍｅｎｔ（酵素）の他に、ｄＮＰＴ、バッファーなどが挙げられる。Ｆｉｌｌ－ｉｎ反応の条件は適宜設定することができるが、例えば３７℃、１０～３０分間とし、その後７０℃、１０分間で酵素を失活させる。

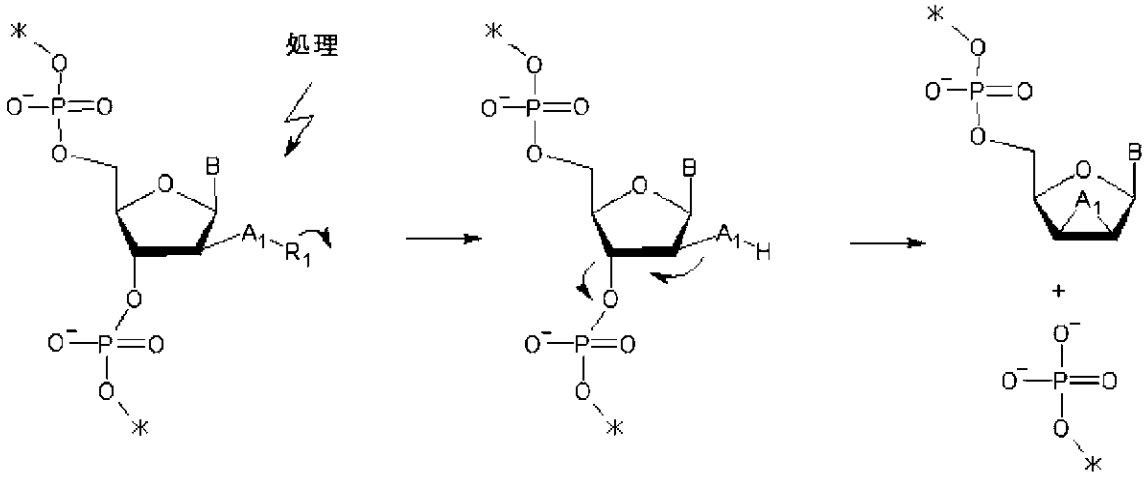
【００５３】

その後、図の（ｄ）に示すように、所定の処理によりR_1を脱保護して式（１）の構造部分で一本鎖ＤＮＡを切断し、３’末端が突出した接着末端を形成する（脱保護切断工程）。所定の処理は、R_1を脱保護するための処理であり、上記の光照射処理、還元処理などを挙げることができる。

【００５４】

以下、切断メカニズムについて説明する。下記式に示すように、所定の処理を施すと、式（１）の分解性保護基R_1が脱離し、リンカーA_1に水素が結合する。リンカーA_1はリボースの２’炭素と３’炭素と三員環からなるヘテロ環（例えば、A_1が硫黄の場合はチイラン環）を形成し、これにより３’炭素のリン酸結合が切断される。

【化１５】



【００５５】

光照射処理としては、例えば、光源装置（脱保護切断手段）により３００～４００ｎｍの波長の光を１～３０分間照射する方法を挙げることができる。また、還元処理としては、例えば、フッ化テトラ－ｎ－ブチルアンモニウム（ＴＢＡＦ）などのフッ化物イオンを用い、例えば７０～８０℃、１～３０分間処理する方法を挙げることができる。これにより、プライマーの式（１）のヌクレオシドを含む５’末端側の一本鎖ＤＮＡが切断され、３’突出末端（５’陥没末端）を有する二本鎖ＤＮＡを合成することができる。その他の処理についても同様に、分解性保護基を脱保護する装置（脱保護切断装置）を使用して脱保護と一本鎖ＤＮＡの切断を行う。

【００５６】

本発明では、制限酵素などによらずに自由自在に接着末端を設計することができるため、所望の配列を有するＤＮＡを自由に連結することができる。例えば、標的ＤＮＡとベクターの両方の配列を設計し、脱保護切断処理により両者に共通の接着末端を形成させてライゲーションを行って組換えＤＮＡを調製し、これをクローニングやライブラリーの作成、大量発現系の構築などに使用することができる。また、接着末端を有する複数のゲノム配列を連結することで、試験管内でゲノムビルドアップ反応を行うことができる。あるいは、平滑末端の状態で細胞内に二本鎖ＤＮＡを導入し、細胞内で脱保護切断処理を行うことで、細胞内でゲノムビルドアップ反応を行うこともできる。

【実施例】

【００５７】

以下、本発明を実施例に基づいて具体的に説明するが、これらは本発明の目的を限定するものではない。また、以下の実施例において「％」表示は特に規定しない限り質量基準（質量パーセント）である。

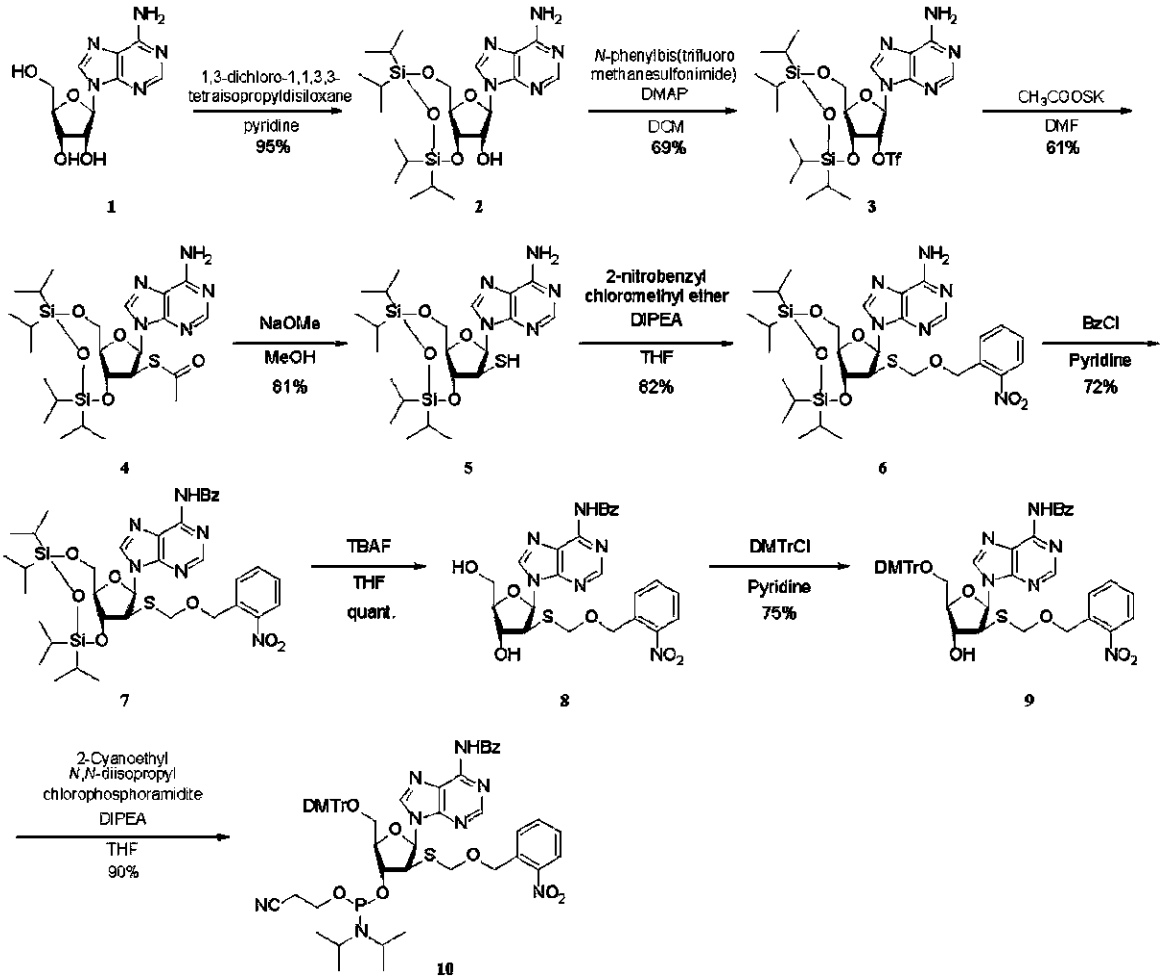
【００５８】

１．光切断アナログ（Ｓ）

１－１．光切断アナログ（Ａ＊）の合成

以下に光切断アナログの合成スキームを示す。以下、この合成スキームに従って、光切断アナログの合成手順を説明する。

【化１６】



【００５９】

（１）３’，５’－Ｏ－（１，１，３，３－テトライソプロピル－１，３－ジシロキサンジイル）アデノシン（化合物２）

１，３－ジクロロ－１，１，３，３－テトライソプロピルジシロキサン（３．９ｍＬ、１２．３ｍｍｏｌ）を、ピリジン（１１２ｍＬ）中のアデノシン（化合物１、３．００ｇ、１１．２ｍｍｏｌ）溶液に加え、反応混合物を０℃で１時間撹拌した。その後、反応混合物を室温まで温め、５．５時間撹拌した。溶媒を真空中で蒸発させ、残渣をH_2O及びCH_2Cl_2で抽出した。有機相を１Ｍ　ＨＣｌ溶液、飽和$NaHCO_3$溶液、食塩水で洗浄し、乾燥し（Na_2SO_4）、真空中で濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（CH_2Cl_2／ＭｅＯＨ、１００／０～９５／５ｖ／ｖ）で精製し、化合物２（５．４３ｇ、１０．６５ｍｍｏｌ、９５％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－d_6）：δ０．９５－１．０７（ｍ，８Ｈ），３．９２（ｄｄ，Ｊ＝１２．８，２．８Ｈｚ，１Ｈ），３．９７－４．０１（ｍ，１Ｈ），４．０５（ｄｄ，Ｊ＝１２．８，３．２Ｈｚ，１Ｈ），４．５１（ｄ，Ｊ＝５．６Ｈｚ，１Ｈ），４．７９（ｄｄ，Ｊ＝８．８，５．２Ｈｚ，１Ｈ），５．６０（ｂｒｓ，１Ｈ），５．８６（ｄ，Ｊ＝１．２Ｈｚ，１Ｈ），７．３０（ｂｒｓ，２Ｈ），８．０６（ｓ，１Ｈ），８．２０（ｓ，１Ｈ）；ＬＲＭＳ（ＥＳＩ$^+$）ｃａｌｃ．ｍ／ｚ　５１０．２６（Ｍ＋Ｈ$^+$），５３２．２４（Ｍ＋Ｎａ$^+$），ｆｏｕｎｄ　ｍ／ｚ　５１０（Ｍ＋Ｈ$^+$），５３２（Ｍ＋Ｎａ$^+$）。

【００６０】

（２）３’，５’－Ｏ－（１，１，３，３－テトライソプロピル－１，３－ジシロキサンジイル）－２’－Ｏ－トリフリル－アデノシン（化合物３）

Ｎ－フェニルトリフルオロメタンスルホンイミド（４．５７ｇ、１２．８ｍｍｏｌ）を、化合物２（５．４３ｇ、１０．７ｍｍｏｌ）の溶液及びCH_2Cl_2（１０６ｍＬ）中のＤＭＡＰ（３．９０ｇ、３２．０ｍｍｏｌ）に０℃で加えた。反応混合物を０℃で１時間、室温で２時間撹拌した。混合物を、冷却した０．１ＭのＡｃＯＨ溶液及びCH_2Cl_2で抽出した。有機相を、飽和$NaHCO_3$溶液及び食塩水で洗浄し、乾燥し（Na_2SO_4）、真空中で濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン／ＥｔＯＡｃ、１／１ｖ／ｖ）で精製して化合物３（４．７６ｇ、７．４２ｍｍｏｌ、６９％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－d_6）：δ０．９８－１．１１（ｍ，２８Ｈ），３．９４－４．０８（ｍ，３Ｈ），５．３７（ｄｄ，Ｊ＝９．６，５．６Ｈｚ，１Ｈ），６．０８（ｄ，Ｊ＝４．８Ｈｚ，１Ｈ），６．４５（ｓ，１Ｈ），７．４２（ｂｒｓ，２Ｈ），８．０３（ｓ，１Ｈ），８．２６（ｓ，１Ｈ）；ＬＲＭＳ（ESI^+）ｃａｌｃ．ｍ／ｚ６４２．２１（$M+H^+$），６６４．１９（$M+Na^+$），ｆｏｕｎｄｍ／ｚ　６４２（$M+H^+$），６６４（$M+Na^+$）。

【００６１】

（３）９－［３，５－Ｏ－（１，１，３，３－テトライソプロピル－１，３－ジシロキサンジイル）－２－デオキシ－２－アセチルチオ－β－Ｄ－アラビノフラノシル］アデニン（化合物４）

化合物３（１．０６ｇ、１．６５ｍｍｏｌ）及びCH_3COOSK（３０２ｍｇ、２．６４ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（４．１ｍＬ）に溶解し、室温で２０時間撹拌した。反応混合物を飽和$NaHCO_3$溶液及びヘキサン／ＥｔＯＡｃ（１／３ｖ／ｖ）で抽出した。有機相を食塩水で洗浄し、乾燥し（Na_2SO_4）、真空中で濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン／ＥｔＯＡｃ、２／１～１／２ｖ／ｖ）で精製し、化合物４（０．５７ｇ、１．００ｍｍｏｌ、６１％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－d_6）：δ１．０１－１．１８（ｍ，２８Ｈ），２．１９（ｓ，３Ｈ），３．８９－３．９８（ｍ，２Ｈ），４．１７（ｄｄ，Ｊ＝１１．６，６．４Ｈｚ，１Ｈ），４．６２（ｄｄ，Ｊ＝１０，８．０Ｈｚ，１Ｈ），５．２６（ｔ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，１Ｈ），６．３９（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，１Ｈ），７．３４（ｂｒ　ｓ，２Ｈ），８．０２（ｓ，１Ｈ），８．１０（ｓ，１Ｈ）；ＨＲＭＳ（ESI^+）　ｃａｌｃ．　ｍ／ｚ　５６８．２４（$M+H^+$），５９０．２３（$M+Na^+$），ｆｏｕｎｄ　ｍ／ｚ　５６８．２４６７（$M+H^+$），５９０．２２８６（$M+Na^+$）。

【００６２】

（４）９－［３，５－Ｏ－（１，１，３，３－テトライソプロピル－１，３－ジシロキサンジイル）－２－デオキシ－２－チオ－β－Ｄ－アラビノフラノシル］アデニン（化合物５）

ＭｅＯＨ（２５ｍＬ）中の化合物４（２．１１ｇ、３．７２ｍｍｏｌ）の溶液に、触媒量のナトリウムメトキシドの２８％ＭｅＯＨ溶液を加えた。混合物を室温で４時間撹拌し、H_2O及びＥｔＯＡｃで抽出した。有機相をH_2O及び食塩水で洗浄し、乾燥させ（Na_2SO_4）、真空中で濃縮して化合物５（１．９６ｇ、３．７２ｍｍｏｌ、ｑｕａｎｔ．）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ１．０４－１．１４（ｍ，２１Ｈ），１．１８（ｓ，７Ｈ），３．８１－３．９２（ｍ，２Ｈ），４．０６（ｄｄ，Ｊ＝１３．２，　３．２Ｈｚ，１Ｈ），４．２２（ｄｄ，Ｊ＝１３．２，　３．６Ｈｚ，１Ｈ），４．６０－４．６５（ｍ，１Ｈ），５．６４（ｓ，１Ｈ），６．３８（ｄ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，１Ｈ），８．１０（ｓ，１Ｈ），８．３４（ｓ，１Ｈ）。

【００６３】

（５）９－［３，５－Ｏ－（１，１，３，３－テトライソプロピル－１，３－ジシロキサンジイル）－２－デオキシ－２－（２－ニトロベンジルオキシメチル）チオ－β－Ｄ－アラビノフラノシル］アデニン（化合物６）

２－ニトロベンジルオキシメチルクロリド（１ｍＬ、１．３０ｍｍｏｌ）の１．３Ｍ溶

液を、CH_2Cl_2（４．０ｍＬ）中の化合物５（０．５３ｇ、１．００ｍｍｏｌ）及びＤＩＰＥＡ（５２４μＬ、１．３０ｍｍｏｌ）の溶液に０℃で加え、１時間撹拌した。混合物をH_2O及びCH_2Cl_2で抽出した。有機相を飽和$NaHCO_3$溶液及び食塩水で洗浄し、乾燥し（Na_2SO_4）、真空中で濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（CH_2Cl_2／ＭｅＯＨ、５０／１～２０／１ｖ／ｖ）で精製し、化合物６（０．５７ｇ、０．８２ｍｍｏｌ、８２％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、$CDCl_3$））：δ１．００－１．１１（ｍ　２１Ｈ），１．１７（ｓ，７Ｈ），３．８８－３．９８（ｍ，２Ｈ），４．０４（ｄｄ，Ｊ＝１２．８，２．８Ｈｚ，１Ｈ），４．１９（ｄｄ，Ｊ＝１３．２，４．４Ｈｚ，１Ｈ），４．６７－４．８４（ｍ，５Ｈ），７．４４－７．４８（ｍ，１Ｈ），７．６２－７．７２（ｍ，２Ｈ），７．９４（ｓ，１Ｈ），８．０７（ｄｄ，Ｊ＝８．０，１．２Ｈｚ，１Ｈ），８．２３（ｓ，１Ｈ）。

【００６４】

（６）N^6－ベンゾイル－９－［３，５－Ｏ－（１，１，３，３－テトライソプロピル－１，３－ジシロキサンジイル）－２－デオキシ－２－（２－ニトロベンジルオキシメチル）チオ－β－Ｄ－アラビノフラノシル］アデニン（化合物７）

ピリジン（５ｍＬ）中の化合物６（０．５６ｇ、０．８１ｍｍｏｌ）の溶液に、塩化ベンゾイル（２８２μＬ、２．４３ｍｍｏｌ）を加え、混合物を室温で３時間撹拌した。混合物を０℃に冷却し、H_2O（２ｍＬ）を加え、混合物を０．５時間撹拌した。ｃｏｎｃ．　NH_3（水溶液）（２ｍＬ）を加え、混合物を０．５時間撹拌した。反応混合物をH_2O及びＥｔＯＡｃで抽出した。有機相を飽和$NaHCO_3$溶液及び食塩水で洗浄し、乾燥し（Na_2SO_4）、真空中で濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン／ＥｔＯＡｃ、１／１ｖ／ｖ）で精製し、化合物７（０．４６ｇ、０．５８ｍｍｏｌ、７２％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ　１．０１－１．１０（ｍ，２１Ｈ），１．１８（ｓ，８Ｈ），３．９３－４．０９（ｍ，２Ｈ），４．２１（ｄｄ，Ｊ＝１２．８，３．６Ｈｚ，１Ｈ），４．６９－４．８３（ｍ，５Ｈ），７．４６－７．５６（ｍ，３Ｈ），７．６０－７．６９（ｍ，３Ｈ），７．９６（ｄｄ，Ｊ＝８．０，１．２Ｈｚ，１Ｈ），８．０５－８．１１（ｍ，２Ｈ），８．７３（ｓ，１Ｈ），８．７９（ｄｄ，Ｊ＝５．２，１．６Ｈｚ，１Ｈ）。

【００６５】

（７）N^6－ベンゾイル－９－［２－デオキシ－２－（２－ニトロベンジルオキシメチル）チオ－β－Ｄ－アラビノフラノシル］アデニン（化合物８）

ＴＨＦ（５ｍＬ）中の化合物７（０．４７ｇ、０．５９ｍｍｏｌ）の溶液に、ＴＢＡＦ（ＴＨＦ中１Ｍ、１．２ｍＬ）を加え、室温で１．５時間撹拌した。反応混合物を真空中で濃縮し、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（CH_2Cl_2／ＥｔＯＡｃ、５０／１～２０／１ｖ／ｖ）により精製し、化合物８（０．３３ｇ、０．５９ｍｍｏｌ、定量的）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ３．１６（ｄ，Ｊ＝５．６Ｈｚ，１Ｈ），３．６４－３．７０（ｍ，１Ｈ），３．７３－３．７８（ｍ，１Ｈ），３．８０－３．８４（ｍ，１Ｈ），３．９７（ｄｄ，Ｊ＝７．２，２．８Ｈｚ，１Ｈ），４．３８－４．４５（ｍ，１Ｈ），４．６１－４．８４（ｍ，４Ｈ），５．１２（ｔ，Ｊ＝５．６Ｈｚ，１Ｈ），５．８５（ｄ，Ｊ＝６．０Ｈｚ，１Ｈ），６．６２（ｄ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，１Ｈ），７．５３－７．５９（ｍ，３Ｈ），７．６２－７．６７（ｍ，２Ｈ），７．７３－７．７７（ｍ，１Ｈ），８．０２－８．０６（ｍ，３Ｈ），８．６１（ｄ，Ｊ＝４．８Ｈｚ，２Ｈ），１１．１１（ｓ，１Ｈ）。

【００６６】

（８）N^6－ベンゾイル－９－［５－Ｏ－（４，４’－ジメトキシトリチル）－２－デオキシ－２－（２－ニトロベンジルオキシメチル）チオ－β－Ｄ－アラビノフラノシル］アデニン（化合物９）

ピリジン（４．０ｍＬ）中の化合物８（０．３３ｇ、０．５９ｍｍｏｌ）の溶液に、４，４－ジメトキシトリリルクロリド（０．２４ｇ、０．７１ｍｍｏｌ）を加えた。反応混合物を室温で７．５時間撹拌した。混合物をH_2O及びＥｔＯＡｃで抽出した。有機相を飽和$NaHCO_3$溶液及び食塩水で洗浄し、乾燥し（Na_2SO_4）、真空中で濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（CH_2Cl_2／ＭｅＯＨ、６０／１～２０／１ｖ／ｖ）で精製し、化合物９（０．３８ｇ、０．４４ｍｍｏｌ、７２％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ１．０４（ｄ，Ｊ＝６．０Ｈｚ，５Ｈ），２．１７（ｓ，１Ｈ），３．１８（ｄ，Ｊ＝３．２Ｈｚ，１Ｈ），３．５６（ｄ，Ｊ＝４．４Ｈｚ，２Ｈ），３．７８（ｄ，Ｊ＝１．２Ｈｚ，６Ｈ），３．８５（ｄｄ，Ｊ＝７．６，１．６Ｈｚ，１Ｈ），４．０７－４．１１（ｍ，１Ｈ），４．６２－４．７１（ｍ，３Ｈ），４．８４（ｄ，Ｊ＝１２．Ｈｚ，１Ｈ），４．９４（ｄ，Ｊ＝１４．４Ｈｚ，１Ｈ），６．６５（ｄ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，１Ｈ），６．８０－６．８３（ｍ，４Ｈ），７．２０－７．３３（ｍ，４Ｈ），７．４２－７．６４（ｍ，７Ｈ），８．０３－８．０６（ｍ，３Ｈ），８．２０（ｓ，１Ｈ），８．７２（ｓ，１Ｈ），９．０７（ｓ，１Ｈ）。

【００６７】

（９）N^6－ベンゾイル－９－｛３－Ｏ－［２－シアノエトキシ（ジイソプロピルアミノ）ホスファニル］－５－Ｏ－（４，４’－ジメトキシトリチル）－２－デオキシ－２－（２－ニトロベンジルオキシメチル）チオ－β－Ｄ－アラビノフラノシル｝アデニン（化合物１０）

２－シアノエチルＮ，Ｎ－ジイソプロピルクロロホスホルアミダイト（２４１μＬ、１．０８ｍｍｏｌ）を、ＴＨＦ（２．５ｍＬ）中の化合物９（０．４２ｇ、０．４９ｍｍｏｌ）及びＤＩＰＥＡ（４１７μＬ、２．４５ｍｍｏｌ）の溶液に添加し、室温で１時間撹拌した。反応混合物を飽和$NaHCO_3$溶液及びＥｔＯＡｃで抽出した。有機相を食塩水で洗浄し、乾燥し（Na_2SO_4）、真空中で濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン／ＥｔＯＡｃ、１／２ｖ／ｖ）で精製し、化合物１０（０．４６ｇ、０．４９ｍｍｏｌ、９０％）を得た。^{31}Ｐ－ＮＭＲ（１５９ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ１５０．４，１５０．７。

【００６８】

１－２．光切断アナログ（Ａ＊）を含むオリゴヌクレオチドの切断反応

図２は、光切断アナログを含むオリゴヌクレオチドの切断反応が光照射と加熱に依存することを示す実験を示す図である。この図の（ａ）は、用いた２０塩基長のオリゴヌクレオチド配列と構造及び予想される反応機構を示す化学式であり、（Ｆ）はフルオレセイン基による修飾を示す。この図の（ｂ）は、切断反応の変性ポリヌクレオチドゲル電気泳動分析の結果であり、（ｃ）は、（ｂ）に示した電気泳動結果から算出した、切断反応生成物の定量結果を示すグラフである。

【００６９】

オリゴヌクレオチド（５’ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｉｎ－ｄ（ＡＣＧＡＣＴＣＡ＊ＣＴＡＴＡＧＧＧＣＧＡＡ）、１μＭ）を１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．５）、５０ｍＭ　$MgCl_2$、１０ｍＭ　ジチオスレイトール（ＤＴＴ）を含む緩衝液中に混合した。

【００７０】

本溶液４０μＬを９６穴マルチウェルプレートのウェルに加え、ＭＡＸ－３０５光源装置（朝日分光）により４ｍＷ／ｃｍ^{2}の光量で３６５ｎｍの光を０分、１分、５分、又は１０分間照射した。続いて、同溶液を１０μＬずつチューブに分注し、７２℃で０分、５分、又は１０分間加熱した。氷上で冷却後、１０μＬの２×ホルムアミドローディング溶液（８０（ｖ／ｖ）％ホルムアミド、５０ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ８．０））を添加し、７．５Ｍ尿素を含む２０％変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）により解析した。ゲル中のオリゴヌクレオチドは５’末に標識した。フルオレセイン基の蛍光によりＣｈｅｍｉＤｏｃ　ＸＲＳ＋イメージングシステム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を用いて検出した。

【００７１】
１μＭ オリゴヌクレオチド、１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．５）、５０ｍＭ $MgCl_2$、１０ｍＭ ＤＴＴ（４０μＬ）に４ｍＷ／cm^2の光量で３６５ｎｍ光を５分間照射し、７２℃で５分間加熱した。ＺｉｐＴｉｐ μ－Ｃ１８レジン充填ピペットチップを用いて脱塩、濃縮したものをサンプルとし、ｕｌｔｒａｆｌｅｘ ＩＩＩ（Ｂｒｕｋｅｒ Ｄａｌｔｏｎｉｃｓ）によりＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ分子量解析を行った。マトリクスとしては３－ヒドロキシピコリン酸を使用した。図の（ａ）に示した原料オリゴヌクレオチド（ｉ）とその脱保護後体（ｉｉ，ｉｉｉ）、及び切断産物（ｉｖ，ｖ）のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ ＭＳ法による検出結果を下記表に示す。

【００７２】

【表１】

分子種	$[MH]^+$ 計算値	$[MH]^+$ 実測値（差）
i	6869.7	6874.4 (+4.7)
ii	6734.6	6736.5 (+1.9)
iii	6704.6	6708.4 (+3.8)
iv	2931.1	2933.7 (+2.6)
v	3775.5	3777.5 (+2.0)

【００７３】
図の（ｂ）、（ｃ）に示すように、光照射５分の条件で切断産物が増えており、光照射１０分の条件では切断産物がより増加していることがわかる。また、図（ｂ）から、特に光照射１０分、加熱時間５分以上の条件で、原料のバンドが薄くなり、切断産物のバンドが濃くなっていることから、この条件が切断反応に好ましいことがわかる。

【００７４】
１－３．光切断反応による接着末端形成を利用したクローニング反応
以下、図３を参照して、クローニング及び形質転換について説明する。図は、光切断アナログを使用したＧＦＰ発現ベクター作成法を示している。概要としては、まず、ｐＥＴ２１ｄ，ｐＡｃＧＦＰ１を鋳型にしてＰＣＲ反応を行い、それぞれベクター断片、インサート断片を得る。次いで、光照射と加熱により接着断片を生成したのち両者の混合物で大腸菌を形質転換し、連結産物をプラスミドＤＮＡとして得る。以下、詳細に説明する。

【００７５】
ベクター側断片は以下のようにして調製した。反応液［０．５μＭ プライマー鎖（ｐＥＴ２１ｄ＿Ｆｗ及びｐＥＴ２１ｄ＿Ｒｅｖ，表２）、０．８ｎｇ／μＬ ｐＥＴ２１ｄ（Ｎｏｖａｇｅｎ）、１×ＰＣＲ Ｂｕｆｆｅｒ ｆｏｒ ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－Ｎｅｏ、１．５ｍＭ $MgSO_4$、 ０．２ｍＭ ｄＮＴＰｓ、 ０．０２Ｕ／μＬ ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－Ｎｅｏ（東洋紡）］をアプライドバイオシステムズ２７２０サーマルサイクラーにて（９５℃，３０秒→５０℃，３０秒→７２℃，３分間）／サイクル、３０サイクルの条件で調製した。ＰＣＲ反応後の反応液２００μＬに制限酵素ＤｐｎＩ（１６Ｕ／μＬ、東洋紡）２μＬを添加し３７℃で１時間加温した。これにＴＥ飽和フェノール（ナカライテスク）とクロロホルムの等量混合液２００μＬを加え、激しく混和したのち遠心１４，０００×ｇ、３分間）し、水層を分離した。同様にクロロホルム２００μＬで反応液を抽出したのち、３Ｍ ＮａＯＡｃ（ｐＨ５．２）２０μＬとイソプロピルアルコール２２０μＬを加えた。－３０℃で１時間冷却した後、遠心（２０，０００×ｇ、２０分間）する

ことでＤＮＡを回収した。目的とするＰＣＲ産物をアガロースゲル電気泳動（ＧｅｌＲｅｄ（和光純薬工業）を含む、０．８％　ＡｇａｒｏｓｅＳ（和光純薬工業））により精製した。切り出したゲル片からＷｉｚａｒｄ　ＳＶ　Ｇｅｌ　ａｎｄ　ＰＣＲ　Ｃｌｅａｎ－Ｕｐ　Ｓｙｓｔｅｍ（プロメガ）を用いてＤＮＡを抽出した（収量１．２７μｇ　ＤＮＡ）。

【００７６】

インサート側断片は以下のようにして調製した。反応液［０．５μＭ　プライマー鎖（ｐＡｃＧＦＰ１＿Ｆｗ及びｐＡｃＧＦＰ１＿Ｒｅｖ，表２）、０．８ｎｇ／μＬ　ｐＡｃＧＦＰ１（タカラバイオ）、１×ＰＣＲ　Ｂｕｆｆｅｒ　ｆｏｒ　ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－Ｎｅｏ，１．５ｍＭ　$MgSO_4$，０．２ｍＭ　ｄＮＴＰｓ，０．０２Ｕ／μＬ　ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－Ｎｅｏ）］をアプライドバイオシステムズ２７２０サーマルサイクラーにて（９５℃，３０秒→５５℃，３０秒→７２℃，１分間）／サイクル、３０サイクルの条件で調製した。ＰＣＲ反応後の反応液１００μＬに制限酵素ＤｐｎＩ（１６Ｕ／μＬ，東洋紡）１μＬを添加し３７℃で１時間加温した。これにＴＥ飽和フェノール（ナカライテスク）とクロロホルムの等量混合液１００μＬを加え、激しく混和したのち遠心（１４，０００×ｇ，３分間）し、水層を分離した。同様にクロロホルム２００μＬで反応液を抽出したのち、３Ｍ　ＮａＯＡｃ（ｐＨ５．２）１０μＬとイソプロピルアルコール１１０μＬを加えた。－３０℃で１時間冷却した後，遠心（２０，０００×ｇ，２０分間）することでＤＮＡを回収した。目的とするＰＣＲ産物をアガロースゲル電気泳動（ＧｅｌＲｅｄ（和光純薬工業）を含む１．５％　Ａｇａｒｏｓｅ　Ｓ（和光純薬工業））により精製した。切り出したゲル片からＷｉｚａｒｄ　ＳＶ　Ｇｅｌ　ａｎｄ　ＰＣＲ　Ｃｌｅａｎ－Ｕｐ　Ｓｙｓｔｅｍ（プロメガ）を用いてＤＮＡを抽出した（収量５．３３μｇ　ＤＮＡ）。ポスト切断ＰＣＲプライマー配列を下記表に示す。配列中のＡ＊は光切断アナログ（図２）を示す。

【００７７】

【表２】

PCRプライマー名	DNA配列
pET21d_Fw	5′ TCCGGCTGCT**A*** ACAAAGCCCGAAAGGAA 3′
pET21d_Rev	5′ TATCTCCTTCTT**A*** AAGTTAAACAAAATTATTTC 3′
pAcGFP1_Fw	5′ TAAGAAGGAGAT**A*** TACCATGGTGAGCAAGGGCGCC 3′
pAcGFP1_Rev	5′ TAGCAGCCGG**A*** TCTCACTTGTACAGCTCATCCAT 3′

【００７８】

ベクター断片溶液（６ｎｇ／μＬ　ＤＮＡ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、５ｍＭ　$MgCl_2$、１０ｍＭ　ＤＴＴ）及びインサート断片溶液（８．４ｎｇ／μＬ　ＤＮＡ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、５ｍＭ　$MgCl_2$、１０ｍＭ　ＤＴＴ）をそれぞれ５０μＬずつ９６穴マルチウェルプレートのウェルに加え、ハンディＵＶランプ（フナコシ）により約４ｍＷ／cm^2で３６５ｎｍ光を５分間照射した。続いて、同溶液２つを１本の１．５ｍＬチューブに回収し、７２℃で１０分間加熱した。３Ｍ　ＮａＯＡｃ（ｐＨ５．２）１０μＬとイソプロピルアルコール１１０μＬを加え、－３０℃で１時間冷却した後、遠心（２０，０００×ｇ，２０分間）してＤＮＡを回収した。ＤＮＡを５μＬの水に溶解し、うち４．７μＬを大腸菌コンピテントセル溶液５０μＬ（ＮＥＢ　５－ａｌｐｈａ　Ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ　Ｅ．ｃｏｌｉ（Ｈｉｇｈ　Ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ）、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）に添加した。これを５０μｇ／ｍＬアンピシリンナトリウムを含むＬＢ寒天培地に塗布し３７℃で一晩培養した。光照射と加熱を行ったサンプルからは９クローンの連結産物を得た。これに対し光照射と加熱を行わなかったコントロールサンプルからは２クローンの連結産物を得た。

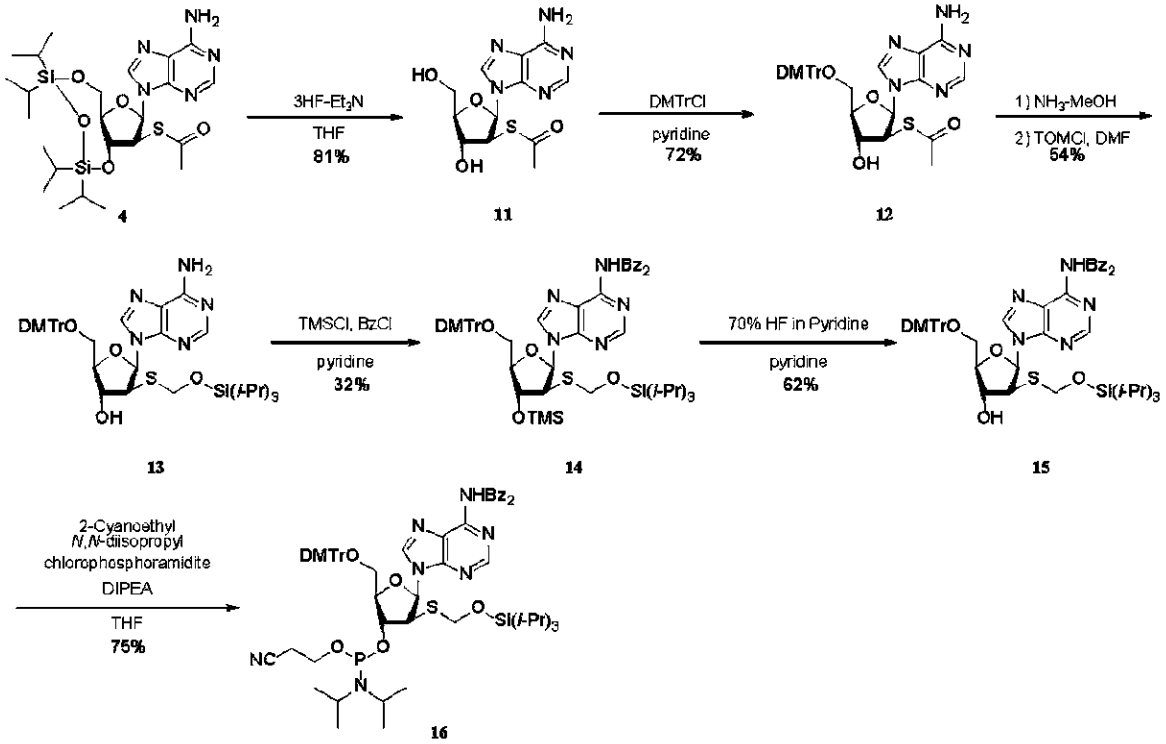
【００７９】

２．フッ素切断アナログ

２－１．フッ素切断アナログ（Ａ＊＊）の合成

以下にフッ素切断アナログの合成スキームを示す。以下、この合成スキームに従って、フッ素切断アナログの合成手順を説明する。

【化１７】



【００８０】

（１）９－［２－デオキシ－２－チオ－β－Ｄ－アラビノフラノシル］アデニン（化合物１１）

ＴＨＦ（１０ｍＬ）中の化合物４（５７２ｍｇ、１．００ｍｍｏｌ）の溶液に、３ＨＦ－Ｅｔ$_3$Ｎ（４０９μｌ、２．５１ｍｍｏｌ）を加え、反応混合物を室温で２時間撹拌した。混合物を真空中で濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（ＣＨＣｌ$_3$／ＭｅＯＨ、９２／８ｖ／ｖ）で精製し、化合物１１（２６５ｍｇ、０．８１ｍｍｏｌ、８１％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）：δ２．１５（ｓ，３Ｈ），３．６４－３．８７（ｍ，３Ｈ），４．３４（ｄｄ，Ｊ＝１０．０，７．６Ｈｚ，１Ｈ），４．５０（ｄｄ，Ｊ＝１６．８，１０　Ｈｚ，１Ｈ），５．１２（ｔ，Ｊ＝５．２Ｈｚ，１Ｈ），５．８０（ｄ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，１Ｈ），６．４２（ｄ，Ｊ＝７．６　Ｈｚ，１Ｈ），７．３０（ｂｒ　ｓ，２Ｈ），８．１０（ｓ，１Ｈ），８．２２（ｓ，１Ｈ）；ＨＲＭＳ（ＥＳＩ$^+$）ｃａｌｃ．ｍ／ｚ　３２６．０９（Ｍ＋Ｈ$^+$），３４８．０７（Ｍ＋Ｎａ$^+$）　ｆｏｕｎｄ　ｍ／ｚ　３２６．３７９８（Ｍ＋Ｈ$^+$），３４８．０８００（Ｍ＋Ｎａ$^+$）。

【００８１】

（２）９－［５－Ｏ－（４，４’－ジメトキシトリチル）－２－デオキシ－２－チオ－β－Ｄ－アラビノフラノシル］アデニン（化合物１２）

ピリジン（８．０ｍＬ）中の化合物１１（２６５ｍｇ、０．８１５ｍｍｏｌ）の溶液に、４，４’－ジメトキシトリリルクロリド（４１３ｍｇ、１．２２ｍｍｏｌ）を加え、反応混合物を室温で２．５時間撹拌した。反応混合物をＨ$_2$Ｏ及びＣＨＣｌ$_3$で抽出した。有機相を飽和ＮａＨＣＯ$_3$溶液及び食塩水で洗浄し、乾燥し（Ｎａ$_2$ＳＯ$_4$）、真空中で濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（ＣＨＣｌ$_3$／ＭｅＯＨ、１００／０～９５／５ｖ／ｖ）で精製し、化合物１２（３７１ｍｇ、０．５９ｍｍｏｌ、７２％）を得た。

^{1}H－NMR（４００MHz，DMSO－d$_6$）：δ２．１７（ｓ，３H），３．１６（ｄ，Ｊ＝８．４Hz，１H），３．４５（ｄｄ，Ｊ＝１０．４，７．６Hz，１H），３．６９（ｓ，３H），３．７１（ｓ，３H），４．０２－４．０７（ｍ，１H），４．３７（ｄｄ，Ｊ＝１０．０，８．０Hz，１H），４．６７（ｄｄ，Ｊ＝１６．８，８．４Hz，１H），５．７７（ｄ，Ｊ＝５．６Hz，１H），６．４７（ｄ，Ｊ＝８．０Hz，１H），６．７２（ｄ，Ｊ＝８．８Hz，２H），６．７８（ｄ，Ｊ＝９．２Hz，２H），７．１４－７．２１（ｍ，７H），７．２９－７．３３（ｍ，４H），７．９６（ｓ，１H），８．１４（ｓ，１H）；^{13}C－NMR（１００MHz，DMSO）：δ３０．０，５１．２，５４．９，６３．７，７２．２，８２．５，８３．３，８５．４，１１２．９，１１３．０，１１９．１，１２６．５，１２７．６，１２９．６，１２９．７，１３５．４，１３５．５，１４０．１，１４４．８，１４８．７，１５２．３，１５６．０，１５７．９，１５８．０，１９３．９；HRMS（ESI$^+$）ｃａｌｃ．ｍ／ｚ ６２８．２２（M＋H$^+$），６５０．２０（M＋Ｎａ$^+$），ｆｏｕｎｄ ｍ／ｚ ６２８．２２１６（M＋H$^+$），６５０．２０５４（M＋Ｎａ$^+$）。

【００８２】

（３）９－［５－Ｏ－（４，４’－ジメトキシトリチル）－２－デオキシ－２－トリイソプロピルシリルオキシメチルチオ－β－Ｄ－アラビノフラノシル］アデニン（化合物１３）

ＭｅＯＨ（６．０ｍＬ）中の化合物１２（７４９ｍｇ、１．１９ｍｍｏｌ）の溶液に、ＭｅＯＨ（６．０ｍＬ）中の２８％ＮａＯＭｅを加えた。反応混合物を室温で１５分間撹拌し、真空中で濃縮した。残渣をＣＨ$_2$Ｃｌ$_2$で希釈し、飽和ＮａＨＣＯ$_3$溶液及び食塩水で洗浄した。有機相を乾燥し（Ｎａ$_2$ＳＯ$_4$）、真空中で濃縮した。さらに精製することなく、得られた残渣をＴＨＦ（１２ｍＬ）に溶解した。溶液にＤＩＰＥＡ（１．４ｍＬ、８．３３ｍｍｏｌ）、（トリイソプロピルシロキシ）メチルクロリド（３０４μＬ、１．３１ｍｍｏｌ）を加え、０℃で１６．５時間撹拌した。反応混合物をＨ$_2$Ｏ及びＣＨ$_2$Ｃｌ$_2$で抽出した。有機相を飽和ＮａＨＣＯ$_3$溶液及び食塩水で洗浄し、乾燥し（Ｎａ$_2$ＳＯ$_4$）、真空中で濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン／ＥｔＯＡｃ、１／１～１／２ｖ／ｖ）で精製し、化合物１３（４９９ｍｇ、０．６５ｍｍｏｌ、５４％）を得た。

^{1}H－NMR（４００MHz、DMSO－d$_6$）：δ０．９５－１．００（ｍ，２１H），３．１９（ｄ，Ｊ＝８．４Hz，１H），３．４５（ｄｄ，Ｊ＝１０．８，７．６Hz，１H），３．７０（ｓ，３H），３．７１（ｓ，３H），３．８８（ｔ，Ｊ＝７．６Hz，１H），３．９７－４．０１（ｍ，１H），４．４９（ｄｄ，Ｊ＝１４．４，８．８Hz，１H），４．６７（ｄ，Ｊ＝１０．４Hz，１H），４．７６（ｄ，Ｊ＝１０．８Hz，１H），５．７５（ｄ，Ｊ＝６．０Hz，１H），６．４９（ｄ，Ｊ＝７．２Hz，１H），６．７７（ｄ，Ｊ＝８．８Hz，２H），６．８１（ｄ，Ｊ＝９．２Hz，２H），７．１８－７．２６（ｍ，９H），７．３５－７．３６（ｍ，２H），８．０２（ｓ，１H），８．１１（ｓ，１H）；^{13}C－NMR（１００MHz，DMSO）：δ１１．２，１７．６，１７．７，５２．５，５４．９，６３．５，６３．８，７４．２，８２．９，８４．０，８５．４，１１３．０，１１８．７，１２６．６，１２７．７，１２９．６，１３５．４，１３５．５，１３９．４，１４４．８，１４９．０，１５２．３，１５５．９，１５７．９，１５８．０；HRMS（ESI$^+$）ｃａｌｃ．ｍ／ｚ ７９４．３４（M＋Ｎａ$^+$），ｆｏｕｎｄ ｍ／ｚ ７９４．３１１３（M＋Ｎａ$^+$）。

【００８３】

（４）Ｎ^6－Ｎ^6－ジベンゾイル－９－［５－Ｏ－（４，４’－ジメトキシトリチル）－２－デオキシ－２－トリイソプロピルシリルオキシメチルチオ－３－Ｏ－トリメチルシリル－β－Ｄ－アラビノフラノシル］アデニン（化合物１４）

ピリジン（７．０ｍＬ）中の化合物１３（４８８ｍｇ、０．６３ｍｍｏｌ）の溶液に、

室温でＴＭＳＣｌ（９６μＬ、０．７６ｍｍｏｌ）を加えた。１時間撹拌した後、ＢｚＣｌ（２１８μＬ、１．９０ｍｍｏｌ）を加え、混合物を室温で２時間撹拌した。反応混合物にH_2O（１１ｍＬ）を添加し、１０分間撹拌した。次いで、２８％NH_3水溶液（１４ｍＬ）を添加し、混合物を１５分間撹拌した。反応混合物をH_2O及びCH_2Cl_2で抽出した。飽和$NaHCO_3$溶液及び食塩水で有機相を洗浄し、乾燥（Na_2SO_4）し、真空中で濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン／ＥｔＯＡｃ、３／１～２／１ｖ／ｖ）で精製し、化合物１４（２１１ｍｇ、０．２０ｍｍｏｌ、３２％）を得た。

^1H－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－d_6）：δ－０．０５（ｓ，９Ｈ），０．９５－１．０５（ｍ，２１Ｈ），３．２０（ｄ，Ｊ＝８．８Ｈｚ，１Ｈ），３．３９（ｄｄ，Ｊ＝１１．２，６．８Ｈｚ，１Ｈ），３．６８（ｓ，３Ｈ），３．６９（ｓ，３Ｈ），３．９７－４．０２（ｍ，２Ｈ），４．５４－４．６３（ｍ，３Ｈ），６．６８（ｄ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，１Ｈ），６．７８（ｄ，Ｊ＝３．６Ｈｚ，２Ｈ），６．８１（ｄ，Ｊ＝３．６Ｈｚ，２Ｈ），７．１５－７．２１（ｍ，７Ｈ），７．３２－７．３４（ｍ，２Ｈ），７．４０（ｔ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，４Ｈ），７．５５（ｔ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，２Ｈ），７．７５（ｄ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，４Ｈ），８．６０（ｓ，１Ｈ），８．６５（ｓ，１Ｈ）；^{13}C－ＮＭＲ（１００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－d_6）：δ０．３，１１．２，１７．６，１７．７，５２．２，５５．０，６５．８，６９．５，７４．３，８２．７，８４．７，８５．６，１１３．１，１２６．６，１２７．１，１２７．７，１２８．９，１２９．６，１２９．７，１３３．３，１３３．４，１３５．２，１３５．５，１４４．４，１４６．１，１５０．８，１５１．６，１５２．４，１５８．０，１７８．９；ＨＲＭＳ（ＥＳＩ$^+$）ｃａｌｃ．ｍ／ｚ １０５２．４５（Ｍ＋Ｈ$^+$），ｆｏｕｎｄ ｍ／ｚ １０５２．４４８０（Ｍ＋Ｈ$^+$）。

【００８４】

（５）N^6－N^6－ジベンゾイル－９－［５－Ｏ－（４，４’－ジメトキシトリチル）－２－デオキシ－２－トリイソプロピルシリルオキシメチルチオ－β－Ｄ－アラビノフラノシル］アデニン（化合物１５）

ピリジン（１．５ｍＬ）中の化合物１４（１６０ｍｇ、０．１５ｍｍｏｌ）の溶液に、ピリジン（１１μＬ、０．４２ｍｍｏｌ）中の７０％ＨＦを加え、反応混合物を室温で２時間撹拌した。反応混合物をH_2O及びCH_2Cl_2で抽出した。有機相を飽和$NaHCO_3$溶液及び食塩水で洗浄し、乾燥（Na_2SO_4）し、真空中で濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン／ＥｔＯＡｃ、２／１ｖ／ｖ）で精製し、化合物１５（９３ｍｇ、０．０９ｍｍｏｌ、６２％）を得た。

^1H－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－d_6）：δ０．９４－１．０５（ｍ，２１Ｈ），３．２０（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，１Ｈ），３．４６（ｄｄ，Ｊ＝１０．８，７．６Ｈｚ，１Ｈ），３．６８（ｓ，３Ｈ），３．６９（ｓ，３Ｈ），３．９２－４．０５（ｍ，２Ｈ），４．４１（ｄｄ，Ｊ＝１５．２，８．８Ｈｚ，１Ｈ），４．６５（ｄ，Ｊ＝１０．４Ｈｚ，１Ｈ），４．７６（ｄ，Ｊ＝１０．８Ｈｚ，１Ｈ），６．６４（ｄ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，１Ｈ），６．７８（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，２Ｈ），６．８０（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，２Ｈ），７．１３－７．２１（ｍ，７Ｈ），７．３１－７．３３（ｍ，２Ｈ），７．４２（ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，４Ｈ），７．５７（ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，２Ｈ），７．７５（ｄ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，４Ｈ），８．５４（ｓ，１Ｈ），８．５８（ｓ，１Ｈ）；^{13}C－ＮＭＲ（１００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－d_6）：δ１１．２，１７．６，１７．７，５２．５，５４．９，６３．６，６６．０，７４．１，８３．０，８４．８，８５．４，１１３．０，１２６．６，１２７．１，１２７．７，１２８．９，１２９．５，１２９．８，１３３．３，１３３．５，１３５．２，１３５．８，１４４．６，１４６．０，１５０．８，１５１．６，１５２．４，１５２．９，１５８．０，１７１．９；ＨＲＭＳ（ＥＳＩ$^+$）ｃａｌｃ．ｍ／ｚ ９８０．４１（Ｍ＋Ｈ$^+$），ｆｏｕｎｄ ｍ／ｚ ９８０．４３３１（Ｍ＋Ｈ

$^{+}$）。

【００８５】

（６）N^{6}－N^{6}－ジベンゾイル－９－｛３－Ｏ－［２－シアノエトキシ（ジイソプロピルアミノ）ホスファニル］－５－Ｏ－（４，４’－ジメトキシトリチル）－２－デオキシ－２－トリイソプロピルシリルオキシメチルチオ－β－Ｄ－アラビノフラノシル｝アデニン（化合物１６）

ＴＨＦ（９５０μＬ）中の化合物１５（９３ｍｇ、０．０１ｍｍｏｌ）の溶液に、２－シアノエチルＮ，Ｎ－ジイソプロピルクロロホスホルアミダイト（４２μＬ、０．１９ｍｍｏｌ）及びＤＩＰＥＡ（８０μＬ、０．４７ｍｍｏｌ）を加え、室温で１時間撹拌した。反応混合物をH_2O及びＥｔＯＡｃで抽出した。有機相を飽和$NaHCO_3$溶液及び食塩水で洗浄し、乾燥（Na_2SO_4）し、真空中で濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン／ＥｔＯＡｃ、２／１ｖ／ｖ）で精製し、化合物１６（８３ｍｇ、０．０７ｍｍｏｌ、７０％）を得た。

^{31}Ｐ－ＮＭＲ（１５９ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－d_6）：δ１４９．１、１４９．９、ＨＲＭＳ（ESI^{+}）ｃａｌｃ．ｍ／ｚ　１１８０．５２（$M+H^{+}$）、ｆｏｕｎｄ　ｍ／ｚ　１１８０．５３６３（$M+H^{+}$）。

【００８６】

２－２．オリゴヌクレオチドの合成

オリゴヌクレオチドはホスホロアミダイト法に基づきＤＮＡ合成機を用いて合成した。５’末端の蛍光標識には６－ＦＡＭ　ａｍｉｄｉｔｅ（Ｃｈｅｍｇｅｎｅｓ）を用いた。合成した各切断アナログのアミダイトは終濃度５０ｍＭのアセトニトリル溶液とし、ＤＮＡ合成機を用いてＤＮＡプライマー内部に導入した。脱保護は定法に従って行い、各ＤＮＡは２０％　ＰＡＧＥにより精製し、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ／ＭＳ（Ｂｒｕｋｅｒ）を用いて構造を確認した。合成したＤＮＡの配列を以下の表に示す。

【００８７】

【表３】

配列	calcd. MS	observed MS ($[M+H]^{+}$)
5’-FAM-ACGACTC**A***CTATAGGGCGAA-3’	6672.5	6676.2
5’-FAM-ACGACTC**A****CTATAGGGCGAA-3’	68923.1	6892.6
5’-TCGGTGCT**A***ACAAAGCCCGAAAGGAA-3’	8797.8	8797.0
5’-TATCTCCTTCTT**A***AAGTTAAACAAAATTATTTC-3’	10216.7	10216.2
5’-TAAGAAGGAGAT**A***TACCATGGTGAGCAAGGGCGCC-3’	11100.3	11100.2
5’-TAGCAGCCCGG**A***TCTCACTTGTACAGCTCATCCAT-3’	10046.6	10047.3

【００８８】

３－３．フッ素切断アナログ（Ａ＊＊）を含むオリゴヌクレオチドの切断反応

オリゴヌクレオチド（５’ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｉｎ－ｄ（ＡＣＧＡＣＴＣＡ＊＊ＣＴＡＴＡＧＧＧＣＧＡＡ），１μＭ）を１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．５）、５０ｍＭ　$MgCl_2$、１０ｍＭ　ジチオスレイトール（ＤＴＴ）を含む緩衝液中に混合した後、同量の１Ｍ　ＴＢＡＦ　ｉｎ　ＴＨＦ溶液を加え、７２℃で１０分間加熱した。氷上で冷却後、遠心エバポレータより溶媒を除き、１０μＬの２×ホルムアミドローディング溶液（８０（ｖ／ｖ）％　ホルムアミド、５０ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ８．０））に再度溶解した。得られたサンプルを７．５Ｍ　尿素を含む２０％変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）により解析した。ゲル中のオリゴヌクレオチドは５’末に標識した。フルオレセイン基の蛍光によりＣｈｅｍｉＤｏｃ　ＸＲＳ＋イメージングシステム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を用いて検出した。図４に、電気泳動ゲルの写真を示す。この図に示すように、切断反応によりオリゴヌクレオチドが切断されたことがわかる。

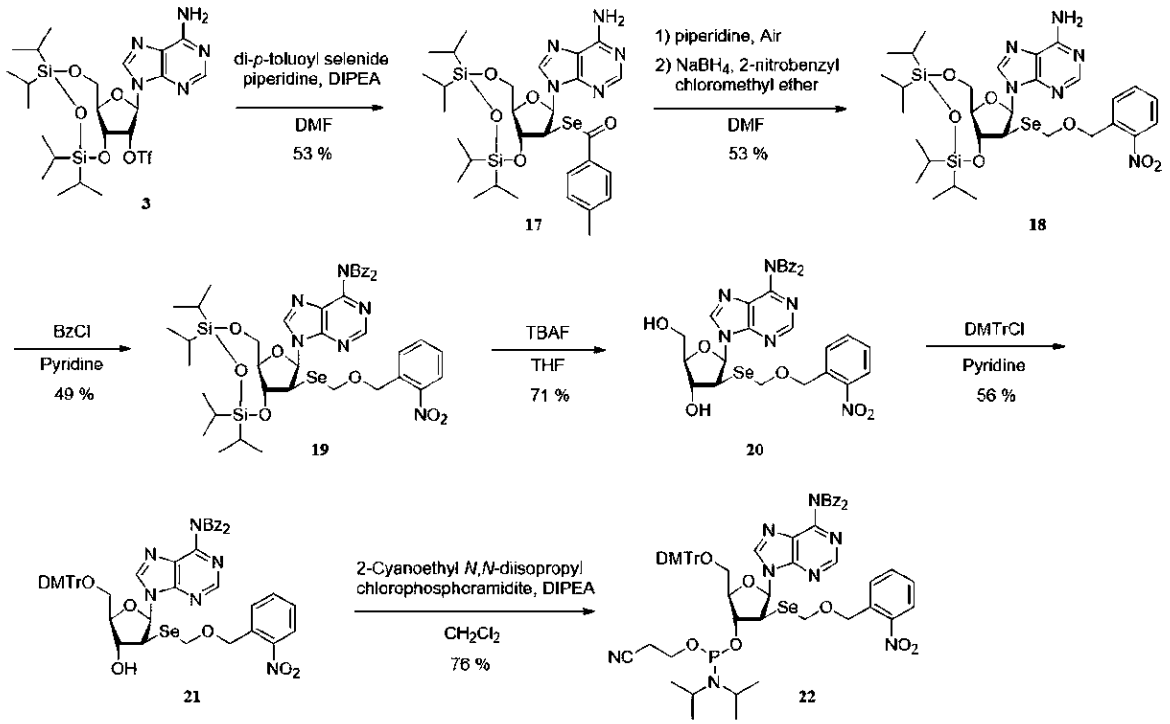
【００８９】

３．光切断アナログ（Ｓｅ）

３－１．光切断Ｓｅアナログ（ＡＳｅ）の合成

以下に光切断Ｓｅアナログの合成スキームを示す。以下、この合成スキームに従って、光切断アナログの合成手順を説明する。

【化１８】



【００９０】

（１）９－［３，５－Ｏ－（１，１，３，３－テトライソプロピル－１，３－ジシロキサンジイル）－２－デオキシ－２－ｐ－トルオイルセレノ－β－Ｄ－アラビノフラノシル］アデニン（化合物１７）

ＤＭＦ（１６０ｍＬ）中のジ－ｐ－トルオイルセレニド（１４．８ｇ、４６．７ｍｍｏｌ）の溶液に、ピペリジン（４．３ｍＬ、４３．７ｍｍｏｌ）及びＤＩＰＥＡ（８．２ｍＬ、４６．７ｍｍｏｌ）を加え、室温で撹拌した。５分間撹拌した後、化合物３（１０ｇ、１５．６ｍｍｏｌ）を上記混合物に加え、６０℃で１時間撹拌した。ＡｃＯＥｔを反応混合物に加え、１Ｎ　ＨＣｌ水溶液、飽和ＮａＨＣＯ$_3$水溶液で洗浄した。食塩水で洗浄し、Ｎａ$_2$ＳＯ$_4$で乾燥し、蒸発させて粗化合物を得た。この粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（Ｈｅｘ／ＡｃＯＥｔ＝１／１～１／４、ｖ／ｖ）で精製し、化合物１７（５．７ｇ、５３％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ８．１６（１Ｈ，ｓ），７．９２（１Ｈ，ｓ），７．５６（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ），７．１５（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ），６．４７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．６Ｈｚ），６．０９（２Ｈ，ｂｒｓ），５．２５（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１０．０，８．０Ｈｚ），４．７２（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１０．４，７．６Ｈｚ），４．２７（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１２．０，４．８Ｈｚ），４．０３－４．０１（２Ｈ，ｍ），２．３４（３Ｈ，ｓ），１．１８－０．９９（２８Ｈ，ｍ）；^{13}Ｃ－ＮＭＲ（１００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ１９２．５，１５５．２，１５１．９，１４９．４，１４５．３，１４０．２，１３５．５，１２９．６，１２７．５，１２０．１，８５．０，８４．３，７３．５，６２．１，５０．４，２１．８，１７．６，１７．５，１７．４，１７．３，１７．１，１３．７，１３．２，１２．９，１２．５；^{77}Ｓｅ－ＮＭＲ（７５ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ５３５．６；ＨＲＭＳ（ＥＳＩ$^+$）ｃａｌｃ．ｍ／ｚ　６９２．２１９７［Ｍ＋Ｈ］$^+$

，ｆｏｕｎｄ　ｍ／ｚ　６９２．２２００［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$。

【００９１】

（２）９－［３，５－Ｏ－（１，１，３，３－テトライソプロピル－１，３－ジシロキサンジイル）－２－デオキシ－２－（２－ニトロベンジルオキシメチル）セレノ－β－Ｄ－アラビノフラノシル］アデニン（化合物１８）

空気条件下で、ピペリジン（１４３μＬ、１．４ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（４ｍＬ）中の化合物１７（４００ｍｇ、０．５８ｍｍｏｌ）の溶液に添加し、反応混合物を室温で１６時間撹拌した。次いで、雰囲気をアルゴンと交換し、溶液をアルゴンガスで１０分間バブリングし、続いて$NaBH_4$（５３ｍｇ、１．４ｍｍｏｌ）を加え、室温で撹拌した。１５分後、反応混合物を０℃に冷却し、ＤＭＦ（２ｍＬ）中の２－ニトロベンジルオキシメチルクロリド（０．８７ｍｍｏｌ）の溶液を添加し、０℃で１時間撹拌した。H_2Oの添加により反応をクエンチし、ＡｃＯＥｔで抽出し、食塩水で洗浄し、Na_2SO_4で乾燥し、蒸発させた。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（$CHCl_3$／ＭｅＯＨ＝２５／１、ｖ／ｖ）によって精製し、化合物１８（２２６ｍｇ、５３％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ８．１４（１Ｈ，ｓ），８．０１－７．８６（２Ｈ，ｍ），７．６８－７．３２（３Ｈ，ｍ），６．３７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．６Ｈｚ），６．１５（２Ｈ，ｂｒｓ），５．０２（１Ｈ，ｓ，ｄｉａｓｔｅｒｅｏｔｏｐｉｃ），４．９７（１Ｈ，ｓ，ｄｉａｓｔｅｒｅｏｔｏｐｉｃ），４．８６（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１０．０，　８．０Ｈｚ），４．７７（１Ｈ，ｓ，ｄｉａｓｔｅｒｅｏｔｏｐｉｃ），４．７５（１Ｈ，ｓ，ｄｉａｓｔｅｒｅｏｔｏｐｉｃ），４．１３（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１２．８，　４．４Ｈｚ），４．０１－３．９４（２Ｈ，ｍ），３．８４－３．８２（１Ｈ，ｍ），１．１１－０．９５（２８Ｈ，ｍ）；^{13}Ｃ－ＮＭＲ（１００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：１５５．８，　１５２．８，　１４９．６，　１４７．４，　１３９．２，　１３３．７，　１３３．５，　１２９．１，　１２８．４，　１２４．８，　１１９．６，　８４．８，　８４．１，　７４．９，　６９．５，　６７．９，　６１．６，　４８．７，　１７．６，　１７．５，　１７．４，　１７．２，　１７．１，　１７．０，　１３．７，　１３．１，　１３．０，　１２．６；^{77}Ｓｅ－ＮＭＲ（７５ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ２３１．７；ＨＲＭＳ（ＥＳＩ$^{+}$）ｃａｌｃ．ｍ／ｚ　７３９．２２０４［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$，ｆｏｕｎｄ　ｍ／ｚ　７３９．２２０８［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$。

【００９２】

（３）N^6，N^6－ジベンゾイル－９－［３，５－Ｏ－（１，１，３，３－テトライソプロピル－１，３－ジシロキサンジイル）－２－デオキシ－２－（２－ニトロベンジルオキシメチル）セレノ－β－Ｄ－アラビノフラノシル］アデニン（化合物１９）

ピリジン（３ｍＬ）中の化合物１８（２００ｍｇ、０．２７ｍｍｏｌ）の溶液に、塩化ベンゾイル（１２５μＬ、１．０８ｍｍｏｌ）を加え、混合物を室温で４時間撹拌した。ＡｃＯＥｔを反応混合物に加え、H_2O及び食塩水で洗浄し、Na_2SO_4で乾燥し、蒸発させた。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン／ＡｃＯＥｔ＝２／１から１／２、ｖ／ｖ）で精製し、化合物１９（１２６ｍｇ、４９％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ８．５４（１Ｈ，ｓ），８．１３（１Ｈ，ｓ），８．０４－７．２８（１４Ｈ，ｍ），６．４７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．６Ｈｚ），５．０５－４．７９（５Ｈ，ｍ），４．１９－３．８５（４Ｈ，ｍ），１．１３－０．９５（２８Ｈ，ｍ）；^{13}Ｃ－ＮＭＲ（１００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ１７２．３，　１５２．９，　１５２．０，　１５１．９，　１４７．６，　１４３．８，　１３４．２，　１３３．７，　１３３．２，　１３３．０，　１２９．６，　１２９．３，　１２８．７，　１２８．６，　１２８．０，　１２４．９，　８５．４，　８４．３，　７５．２，　６９．７，　６８．２，　６１．７，　４９．１，　１７．６，　１７．５，　１７．４，　１７．２，　１７．１，　１４．２，　１３．７，　１３．１，　１３．０，　１２．６；^{77}Ｓｅ－ＮＭＲ（７５ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ２３４．４；ＨＲＭＳ（ＥＳＩ$^{+}$）ｃａｌｃ．ｍ／ｚ　９４７．２７２９［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$，ｆｏｕｎｄ　ｍ／ｚ　９４７．２７２７［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$。

【００９３】
（４）N^6，N^6－ジベンゾイル－９－［２－デオキシ－２－（２－ニトロベンジルオキシメチル）セレノ－β－Ｄ－アラビノフラノシル］アデニン（化合物２０）
ＴＨＦ（１ｍＬ）中の化合物１９（１２５ｍｇ、０．１３ｍｍｏｌ）の溶液に、ＴＢＡＦ（ＴＨＦ中１Ｍ、２９０μＬ）を添加し、室温で１時間撹拌した。反応混合物を真空中で濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（$CHCl_3$／ＭｅＯＨ＝２５／１、ｖ／ｖ）によって精製し、化合物２０（６５ｍｇ、７１％）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ８．５６（１Ｈ，ｓ），８．５１（１Ｈ，ｓ），８．０２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ），７．８１（４Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），７．６０－７．３０（９Ｈ，ｍ），６．５５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．６Ｈｚ），５．０２（２Ｈ，ｓ），４．８３－４．６９（３Ｈ，ｍ），３．９８－３．７５（４Ｈ，ｍ）；^{13}Ｃ－ＮＭＲ（１００ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ １７２．４，１５２．６，１５２．１，１５１．９，１４７．７，１４４．６，１３３．９，１３３．８，１３３．２，１３２．７，１３０．１，１２９．５，１２８．９，１２８．４，１２７．５，１２５．０，８６．２，８５．１，７３．５，６９．５，６８．５，５９．９，４９．７；^{77}Ｓｅ－ＮＭＲ（７５ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ２５０．１。
【００９４】
（５）N^6，N^6－ジベンゾイル－９－［５－Ｏ－（４，４’－ジメトキシトリチル）－２－デオキシ－２－（２－ニトロベンジルオキシメチル）セレノ－β－Ｄ－アラビノフラノシル］アデニン（化合物２１）
ピリジン（０．８ｍＬ）中の化合物２０（６０ｍｇ、０．０８５ｍｍｏｌ）の溶液に、４，４’－ジメトキシトリチルクロリド（３５ｍｇ、０．１０２ｍｍｏｌ）を加えた。反応混合物を室温で２時間撹拌した。反応混合物を$AcOEt$で希釈し、飽和H_2Oで洗浄した。$NaHCO_3$水溶液。食塩水で洗浄し、Na_2SO_4で乾燥し、蒸発させた。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン／$AcOEt$＝１／１、ｖ／ｖ）によって精製し、化合物２１（４８ｍｇ、５６％）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ８．５２（１Ｈ，ｓ），８．２１（１Ｈ，ｓ），８．０３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ），７．８３－７．８１（４Ｈ，ｍ），７．５７－７．１５（１８Ｈ，ｍ），６．７９－６．７７（４Ｈ，ｍ），６．６０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），５．０４－４．７２（４Ｈ，ｍ），４．６６（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝８．８Ｈｚ），４．０５－４．０３（１Ｈ，ｍ），３．９３（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝８．８，７．２Ｈｚ），３．７２（６Ｈ，ｓ），３．５２－３．５０（２Ｈ，ｍ）；^{13}Ｃ－ＮＭＲ（１００ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ１７２．３，１５８．７，１５２．７，１５２．２，１５１．９，１４７．８，１４４．４，１４３．８，１３５．７，１３５．６，１３４．２，１３３．８，１３３．０，１３２．５，１３０．１，１２９．５，１２９．０，１２８．７，１２８．３，１２８．０，１２７．０，１２５．１，１１３．３，８６．９，８５．４，８３．３，７６．５，６９．５，６８．６，６２．９，５５．３，４９．６；^{77}Ｓｅ－ＮＭＲ（７５ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ２５２．０；ＨＲＭＳ（ESI^+）ｃａｌｃ．ｍ／ｚ １００７．２５１３［Ｍ＋Ｈ］$^+$，ｆｏｕｎｄ ｍ／ｚ １００７．２５３６［Ｍ＋Ｈ］$^+$。
【００９５】
（６）N^6，N^6－ジベンゾイル－９－｛３－Ｏ－［２－シアノエトキシ（ジイソプロピルアミノ）ホスファニル］－５－Ｏ－（４，４’－ジメトキシトリチル）－２－デオキシ－２－（２－ニトロベンジルオキシメチル）セレノ－β－Ｄ－アラビノフラノシル｝アデニン（化合物２２）
２－シアノエチルＮ，Ｎ－ジイソプロピルクロロホスホルアミダイト（２５μＬ、０．１１ｍｍｏｌ）を、２１（４５ｍｇ、０．０４５ｍｍｏｌ）及びCH_2Cl_2（０．５ｍＬ）中の化合物ＤＩＰＥＡ（４７μＬ、０．２７ｍｍｏｌ）の溶液に添加し、０℃で１時

間撹拌した。反応混合物をＡｃＯＥｔで希釈し、飽和ＮａＨＣＯ$_3$水溶液及び食塩水で洗浄し、Ｎａ$_2$ＳＯ$_4$で乾燥し、蒸発させた。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン／ＡｃＯＥｔ＝１／１、ｖ／ｖ）によって精製し、化合物２１（４１ｍｇ、７６％）を得た。

^{31}Ｐ－ＮＭＲ（１５９ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ１５０．６，　１５０．３；ＨＲＭＳ（ＥＳＩ$^+$）ｃａｌｃ．ｍ／ｚ　１２０７．３５９２［Ｍ　＋　Ｈ］$^+$，ｆｏｕｎｄ　ｍ／ｚ　１２７０７．３６２４［Ｍ　＋　Ｈ］$^+$。

【００９６】

３－２．オリゴヌクレオチドの合成

合成した切断アナログＡ$_{se}$のアミダイトは終濃度５０ｍＭのアセトニトリル溶液とし、ホスホロアミダイト法に基づきＤＮＡ合成機を用いてＤＮＡオリゴマーを合成した。脱保護は定法に従って行い、逆相ＨＰＬＣ［日立ハイテクサイエンス社製　ＬａＣｈｒｏｍ　Ｅｌｉｔｅ；　カラム，ＹＭＣ社製Ｈｙｄｒｏｓｐｈｅｒｅ　Ｃ１８（２５０×１０ｍｍ）］により精製し、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ／ＭＳ（Ｂｒｕｋｅｒ）を用いて構造を確認した。合成したＤＮＡの配列を以下の表に示す。

【００９７】

【表４】

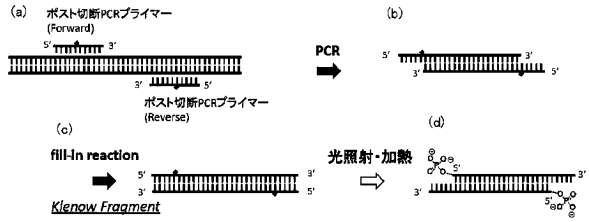
配列
5’-ACGACTCA$_{Se}$CTATAGGGCGAATTCGAGCTCGGT-3’

【００９８】

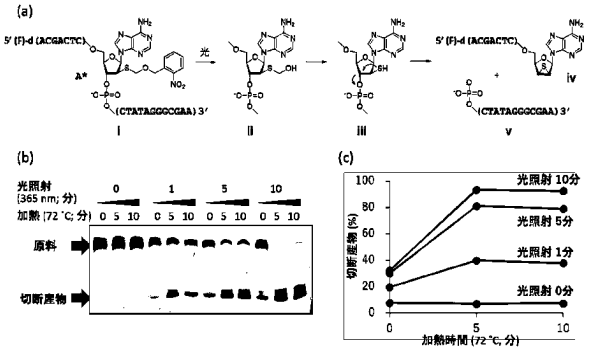
３－３．光切断アナログ（Ａ$_{se}$）を含むオリゴヌクレオチドの切断反応

１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．５），　５ｍＭ　ＭｇＣｌ$_2$，　１０ｍＭ　ジチオスレイトール（ＤＴＴ）を含む緩衝液中にオリゴヌクレオチド（３μＭ）を混合した後、光照射装置　ＭＡＸ－３０５（朝日分光）により波長３６５ｎｍの光を約４ｍＷ／ｃｍ^{2}で１０分間照射した。得られたサンプルをホルムアミドローディング溶液（８０（ｖ／ｖ）％ホルムアミド，　５０ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ８．０））にて２倍希釈した後、７．５Ｍ尿素を含む１５％変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）により解析した。ゲル中のオリゴヌクレオチドはＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　ＩＩ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｇｅｌ　Ｓｔａｉｎにより染色し、ＣｈｅｍｉＤｏｃ　ＸＲＳ＋イメージングシステム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を用いて検出した。結果を図５に示す。この結果から、緩衝液中、室温下での１０分間の光照射により、切断産物がみられた。

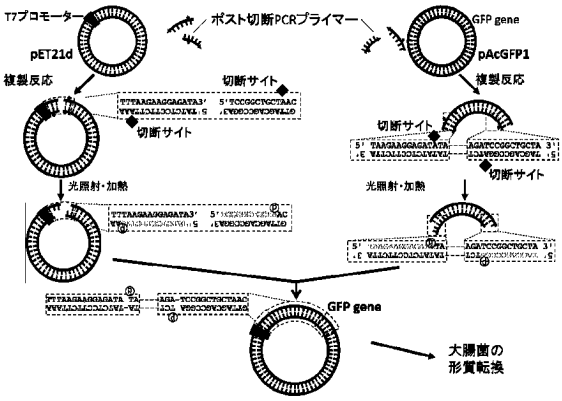
【図１】


(a)
ポスト切断PCRプライマー
(Forward)
PCR
(b)
ポスト切断PCRプライマー
(Reverse)
(c)
fill-in reaction
Klenow Fragment
(d)
光照射・加熱

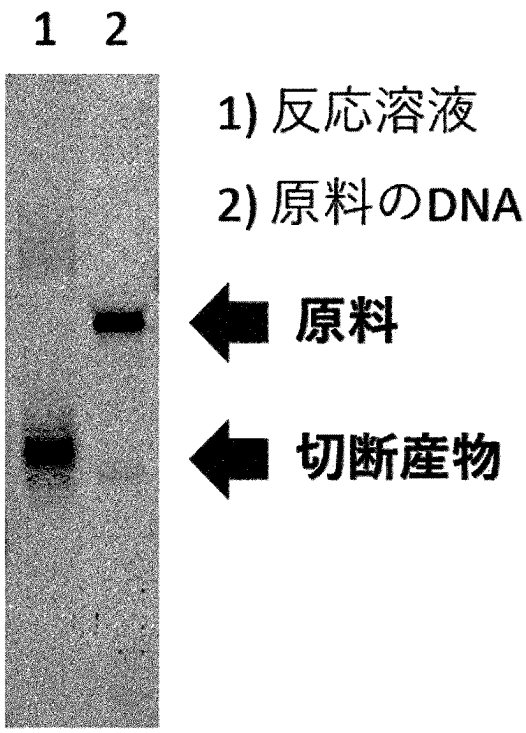
【図２】


(a)
光
(CTATAGGGCGAA) 3′
I
II
III
V
(b)
光照射
(365 nm; 分)
加熱 (72 °C; 分)
原料
切断産物
(c)
光照射 10分
光照射 5分
光照射 1分
光照射 0分
切断産物 (%)
加熱時間 (72 °C; 分)

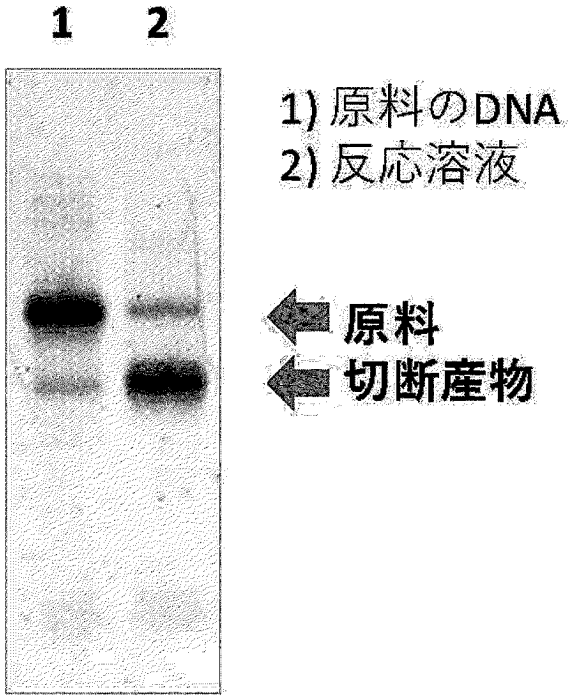
【図３】


T7プロモーター
pET21d
ポスト切断PCRプライマー
GFP gene
pAcGFP1
複製反応
切断サイト
光照射・加熱
GFP gene
大腸菌の
形質転換

【図４】


1 2
1) 反応溶液
2) 原料のDNA
原料
切断産物

【図５】


1 2
1) 原料のDNA
2) 反応溶液
原料
切断産物

フロントページの続き

(72)発明者　中本　航介
愛知県名古屋市千種区不老町　国立大学法人東海国立大学機構　名古屋大学　大学院理学研究科物質理学専攻化学系内
(72)発明者　村瀬　裕貴
愛知県名古屋市千種区不老町　国立大学法人東海国立大学機構　名古屋大学　大学院理学研究科物質理学専攻化学系内
(72)発明者　木村　康明
愛知県名古屋市千種区不老町　国立大学法人東海国立大学機構　名古屋大学　大学院理学研究科物質理学専攻化学系内

審査官　斉藤　貴子

(56)参考文献　国際公開第２００９／１１３７０９（WO，Ａ１）
国際公開第２０１９／１７２３９４（WO，Ａ１）
OZAKI, H. et al., Post-synthetic functionalization of oligodeoxyribonucleotides at the 2'-position, Tetrahedron Letters, 2001年, Vol. 42, P. 677-680
HAMM, M. L. and PICCIRILLI, J. A., Synthesis and Characterization of Oligonucleotides Containing 2'-S,3'-O-Cyclic Phosphorothiolate Termini, J. Org. Chem., 1999年, Vol. 64, P. 5700-5704
DANTZMAN, C. L. and KIESSLING, L. L., Reactivity of a 2’-Thio Nucleotide Analog, J. Am. Chem. Soc., 1996年, Vol. 118, P. 11715-11719
村瀬裕貴　ほか，ゲノム合成のためのDNAアセンブリ法の開発，日本化学会春季年会講演予稿集，2020年03月05日，Vol. 100th，Page. ROMBUNNO.1E6-59

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｑ
Ｃ１２Ｍ
Ｃ１２Ｎ
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）