

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年10月22日(22.10.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/128266 A1

- (51) 国際特許分類:
C07H 21/04 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/001747
- (22) 国際出願日: 2009年4月16日(16.04.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-106642 2008年4月16日(16.04.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学 (JAPAN ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒9231292 石川県能美市旭台一丁目1番地 Ishikawa (JP). 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 藤本健造 (FUJIMOTO, Kenzo) [JP/JP]; 〒9231292 石川県能美市旭台一丁目1番地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 Ishikawa (JP). 吉村嘉永 (YOSHIMURA, Yoshinaga) [JP/JP]; 〒9231211 石川県能美市旭台二丁目13番地 J S イノベーションプラザ石川内 Ishikawa (JP).
- (74) 代理人: 佐伯憲生, 外 (SAEKI, Norio et al.); 〒1030027 東京都中央区日本橋三丁目15番8号 アミノ酸会館ビル4階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: SEQUENCE-SPECIFIC NUCLEIC ACID PURIFICATION METHOD MANNER

(54) 発明の名称: 核酸類の配列選択的な精製方法

(57) Abstract: Disclosed is a method for the purification and collection of a nucleic acid comprising a specific nucleotide sequence, which can be carried out within an extremely short period and can achieve both high sequence-specificity and a high collection rate. Specifically disclosed is a method for the purification of a target nucleic acid comprising a specific nucleotide sequence and contained in a nucleic acid mixture. The method comprises the steps of: hybridizing a photo-ligating nucleic acid having a group represented by formula (I) as a base moiety with the target nucleic acid to form a hybrid; irradiating the hybrid of the photo-ligating nucleic acid and the target nucleic acid with light to cause the photo-ligation of the hybrid; removing any un-photo-ligated nucleic acid by washing; and irradiating the hybrid of the photo-ligating nucleic acid and the target nucleic acid with light to cause the photo-cleavage of the hybrid.

(57) 要約: 本発明は、ごく短時間で行うことができ、高い配列選択性と回収率を両立させた、特定の塩基配列を備えた核酸類の精製及び回収の方法を提供する。本発明は、塩基部分として式 I で表される基を有する光連結性核酸類と、核酸類混合物中に含まれる特定の塩基配列を有する標的核酸類とを、ハイブリッド形成させる工程、ハイブリッド形成した光連結性核酸類と標的核酸類に、光照射を行って、光連結させる工程、光連結されていない核酸類を洗浄によって除去する工程、ハイブリッド形成した光連結性核酸類と標的核酸類に、光照射を行って、光開裂させる工程、を含む、核酸類混合物中に含まれる特定の塩基配列を有する標的核酸類を、精製する方法に関する。



WO 2009/128266 A1

明 細 書

発明の名称：核酸類の配列選択的な精製方法

技術分野

[0001] 本発明は、核酸類の配列選択的な精製方法に関する。

背景技術

[0002] 特定の塩基配列を備えた核酸類の精製と回収は、遺伝子工学でも重要な基本的な手段のひとつである。特定の塩基配列を備えた核酸類の精製と回収には、その特定の配列と相補的な塩基配列を有する核酸プローブとのハイブリッド形成（ハイブリダイゼーション）が、特定の塩基配列の特異的な認識を可能にする基本的原理として、永らく利用されてきている（例えば、非特許文献1参照）。

[0003] しかし、実際のハイブリッド形成の条件下においては、核酸プローブ分子との会合を、完全な相補鎖としてハイブリッド形成する標的塩基配列の核酸類のみで生じさせることは難しい。すなわち、相補鎖として不完全な非標的塩基配列の核酸類に対しても、一定のミスマッチを含む不完全なハイブリッド形成をしてしまい、核酸プローブ分子との会合が生じることが知られている。このような核酸プローブとの意図しない会合（エラー）は、後の回収段階でノイズ（不純物）として出現する。このようなノイズが出現しないように、検出の特異性を高めようとすれば、不完全なハイブリッド形成を排除することが必要となる。

[0004] 一方で、ノイズ（不純物）を低減させるためには、不完全なハイブリッド形成ができるだけ生じない条件下で処理を行うことになるが、このような条件下では目的とするハイブリッド形成もまた不安定なものとなって、その結果、標的とする核酸類の回収率が低下してしまう。

[0005] しかしながら、ハイブリッド形成による識別は平衡系における熱的安定性の差を利用しているものであって、完全なハイブリッド形成も不完全なハイブリッド形成もその違いは熱的安定性の違いに過ぎない。そのために、両者

を区別する適切な条件は目的の塩基配列によって異なり、さらに適切な条件下でもなお、熱的安定性を変化させる条件は両者に均等に作用する。厳密な温度管理を行った実験条件下であっても、この点はかわらない。すなわち、平衡系におけるハイブリッド形成の熱的安定性の差のみを、両者の区別の原理として使用する限りは、温度管理等の条件を厳密に設定した実験条件下であってもなお、精製の純度と回収率のバランスで妥協して、一定のノイズ（不純物）を甘受せざるを得なかった。

[0006] さらに、近年では、新規創薬や遺伝子診断のために、一塩基置換した塩基配列を有する核酸類の精製と回収をするための技術が求められている。特に、DNAの一塩基多型をタイピングする技術には、医療診断の分野での期待が大きい。このために、一塩基の置換を識別できるほどの高い配列選択性と、実用可能な回収率とを両立させた精製と回収の技術が特に求められている。

[0007] また、近年では、非コードRNA（ncRNA）と総称される翻訳を受けないRNAの精製と回収をするための技術が求められている。このncRNAには、サイズが小さいためにマイクロRNA（miRNA）と呼ばれる一群があり、また、従来はpolyAを有してしばしばスプライシングを受けることから単純にmRNAとされてきた分子の相当の割合がmRNA型ncRNAと呼ばれる一群に属するとも言われている。しかし、これらのRNAは、分子数が少なく多種類が存在していることに加えて、分解を受けやすく短命であるために、ごく短時間で精製と回収を進めなければならない。このために、ごく短時間で処理可能なRNAの配列選択的な精製及び回収の技術が特に求められていた。

先行技術文献

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Lambert, K. N.; Williamson, V. M. Nucleic Acids Res. 1993, 21, pp775-776.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 従って、本発明の目的は、ごく短時間で行うことができ、高い配列選択性と回収率を両立させた、特定の塩基配列を備えた核酸類の精製及び回収の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、上記目的のために、長年にわたって鋭意研究開発を行ってきた光連結技術を用いることを着想した。そして、本発明者らが開発した新規な人工塩基（人工核酸塩基）は、光連結と光開裂が可能であって、これがごく短時間の光照射で可能であることを見出し、この人工塩基（人工核酸塩基）を使用して、核酸類のハイブリッド形成、光連結、及び光開裂を組み合わせることで、上記目的を達成できることを見いだした。

[0011] すなわち、新規な人工塩基を使用した光連結を利用し、完全なハイブリッド形成を行った場合にのみ特異的に光連結させ、もはやハイブリッド形成の維持に依存することなく共有結合的に連結された試料核酸類とプローブとを、相補的二重鎖が解離する条件で十分な洗浄を行った後に、光開裂を行うことによって、高い配列選択性と回収率を両立させて、特定の塩基配列を備えた核酸類の精製及び回収を行うことができた。この精製と回収は、新規な人工塩基を光連結し光開裂させることによって、ごく短時間で行うことができるものとなっている。

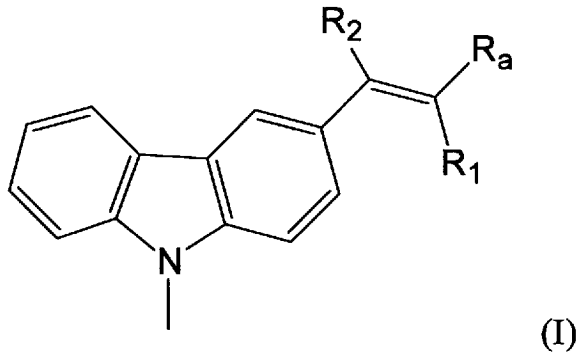
[0012] 従って、本発明は次の [1] ~ [9] にある。

[1]

塩基部分として、次の式 I :

[0013]

[化1]



[0014] (ただし、式 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_1 及び R_2 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、又は水素である。)

で表される基を有する、光連結性核酸類 (ただし、核酸類には、核酸、ペプチド核酸が含まれる) と、

核酸類混合物中に含まれる特定の塩基配列を有する標的核酸類とを、ハイブリッド形成させる工程、

ハイブリッド形成した光連結性核酸類と標的核酸類に、光照射を行って、光連結させる工程、

光連結されていない核酸類を洗浄によって除去する工程、

ハイブリッド形成した光連結性核酸類と標的核酸類に、光照射を行って、光開裂させる工程、

を含む、核酸類混合物中に含まれる特定の塩基配列を有する標的核酸類を、精製する方法。

[2]

光連結されていない核酸類を洗浄によって除去する工程が、相補的二重鎖が解離する洗浄条件で洗浄することによって行われる、[1] に記載の方法。

[3]

光連結性核酸類が、標識部位を備えている、[1] ～ [2] の何れかに記

載の方法。

[4]

光連結性核酸類が、担体に固定化されている、[1]～[2]の何れかに記載の方法。

[5]

光連結させる工程の光照射が、350～380 nmの範囲の波長の光照射によって行われる、[1]～[4]の何れかに記載の方法。

[6]

光開裂させる工程の光照射が、310～345 nmの範囲の波長の光照射によって行われる、[1]～[5]の何れかに記載の方法。

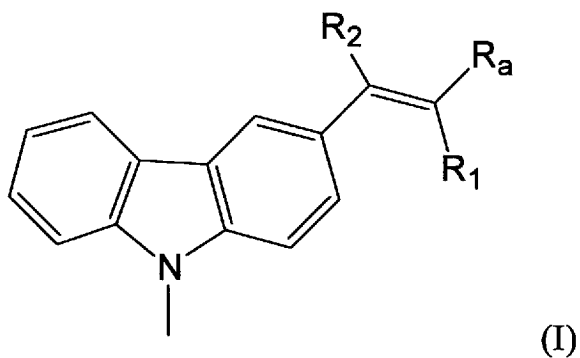
[7]

光連結させる工程が、緩衝作用のある塩を含む反応溶液中で行われる、[1]～[6]の何れかに記載の方法。

[8]

塩基部分として、次の式 I :

[0015] [化2]



[0016] (ただし、式 I 中、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、又は水素であり、

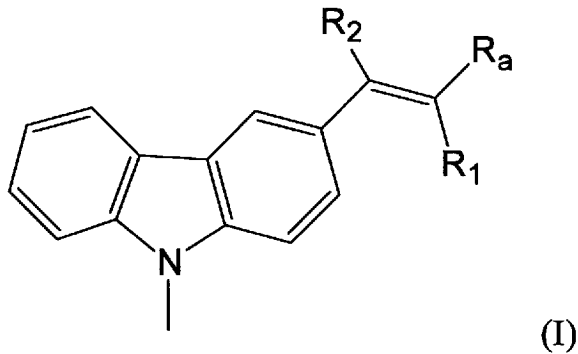
R1 及び R2 は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C2～C7のアルコキシカルボニル基、又は水素である。)

で表される基を有し、標識部位を備えている、光連結性核酸類 (ただし、核酸類には、核酸、ペプチド核酸が含まれる)。

[9]

塩基部分として、次の式 I :

[0017] [化3]



[0018] (ただし、式 I 中、R_a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、又は水素であり、

R₁及びR₂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、又は水素である。)

で表される基を有し、担体に固定された、光連結性核酸類(ただし、核酸類には、核酸、ペプチド核酸が含まれる)。

発明の効果

[0019] 本発明によれば、高い配列選択性と回収率を両立させて、特定の塩基配列を備えた核酸類の精製及び回収を行うことができる。このために、新規創薬や遺伝子診断のために注目されている、一塩基置換した塩基配列を有する核酸類の精製と回収をも可能としている。

[0020] さらに、本発明による精製と回収は、人工塩基を光連結し光開裂させることによって、ごく短時間で行うことができるものとなっている。そのために、分解を受けやすく短命なRNAをも対象として、精製と回収を可能としている。

[0021] このように、本発明による精製と回収は、高い配列選択性と回収率を両立させ、さらに短時間で行うことができるものとなっているために、特に、分子数が少なく多種類が存在していることに加えて分解を受けやすく短命であ

る非コードRNA (ncRNA) に対しても、単離精製の途を拓くものである。特に、いわゆるpolyAを持たないRNAに対しても、本発明による精製と回収は広くて適用できるものとなっており、画期的である。

図面の簡単な説明

[0022] [図1] 図1は光応答性核酸である3-cyanovinylcarbazole-1'- β -deoxyribose (CNVK)の構造式を示す図である。

[図2] 図2はODN(A^{CNVK}-GT)の光開裂した生成物のHPLCによる分析結果を示す図である。

[図3] 図3はODN(G^{CNVK}-GC)の光開裂した生成物のHPLCによる分析結果を示す図である。

[図4] 図4は光クロスリンク体の光開裂の経時変化を示す図である。

[図5] 図5はODN(A^{CNVK}-GT)の光開裂した生成物のHPLCによる分析結果を示す図である。

[図6] 図6は光クロスリンク体の光開裂の経時変化を示す図である。

[図7] 図7はDNAの配列選択的精製の一例の概略を表す説明図である。

[図8] 図8はDNAの配列選択的精製の結果を示す図である。

[図9] 図8はDNAの配列選択的精製の結果を示す図である。

[図10] 図10は光クロスリンク反応による生成物のHPLCによる分析結果を示す図である。

[図11] 図11は光クロスリンク可能なRNAの塩基を確認した実験結果を示す図である。

[図12] 図12はODN(A^{CNVK})<>RNA(GU)の光開裂した生成物のHPLCによる分析結果を示す図である。

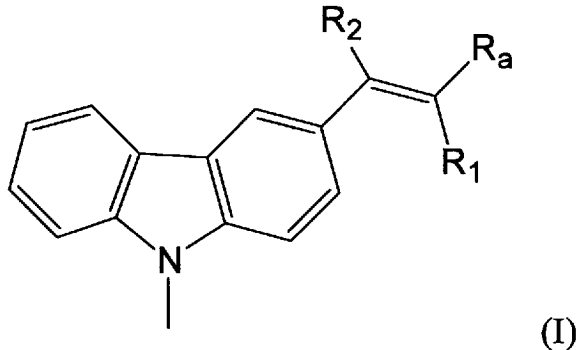
[図13] 図13はODN(G^{CNVK})<>RNA(GC)の光開裂した生成物のHPLCによる分析結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0023] 本発明の実施の形態を挙げて、本発明を以下に詳細に説明する。本発明は以下に例示された実施の形態に限定されるものではない。

[0024] 本発明は、塩基部分として、次の式 I :

[0025] [化4]



[0026] (ただし、式 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、

R₁及びR₂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、又は水素である。)

で表される基を有する、光連結性核酸類(ただし、核酸類には、核酸、ペプチド核酸が含まれる)と、

核酸類混合物中に含まれる特定の塩基配列を有する標的核酸類とを、ハイブリッド形成させる工程、

ハイブリッド形成した光連結性核酸類と標的核酸類に、光照射を行って、光連結させる工程、

光連結されていない核酸類を洗浄によって除去する工程、

ハイブリッド形成した光連結性核酸類と標的核酸類に、光照射を行って、光開裂させる工程、

を含む、核酸類混合物中に含まれる特定の塩基配列を有する標的核酸類を、精製する方法にある。

[0027] このような工程によって、本発明による精製と回収は、高い配列選択性と回収率を両立させ、さらに短時間で行うことができるものとなっている。

[0028] 式 I 中の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C2～C7、さらに好ましくはC2～C6、さらに好ましくはC2～C5、さらに好ましくはC2～C4、さらに好ましくはC2～C3、特に好ましくはC2のものを使用することができる。

[0029] 式I中のR1及びR2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C2～C7、さらに好ましくはC2～C6、さらに好ましくはC2～C5、さらに好ましくはC2～C4、さらに好ましくはC2～C3、特に好ましくはC2のものを使用することができる。

[0030] 上の式Iで表される基は、本発明による新規な人工塩基（人工核酸塩基）である。この基を、塩基部分として有する核酸は、これによって光連結性を備えたものとなる。このような光連結性は、人工核酸塩基を塩基部分として有することによって付与されるので、核酸（DNA、RNA）であってもペプチド核酸であっても、このような光連結性の付与が可能である。光連結性核酸類は、通常の核酸の製造方法に準じて製造することができる。

[0031] 光連結性を付与された核酸類（光連結性核酸類）は、その配列と相補的な配列の核酸類に対して、通常の核酸類と同様に、ハイブリッド形成することができる。すなわち、多数の核酸類の混合物中のうちで、特定の塩基配列を有する核酸類（標的核酸類）とハイブリッド形成することができる。言い換えれば、光連結性核酸類は、特定の塩基配列を有する標的核酸類の塩基配列と相補的な塩基配列の核酸類となるように作製される。

[0032] 光連結性核酸類が、標的核酸類とハイブリッド形成をする場合に、式Iで表される人工塩基と塩基対を形成する位置に配置される塩基の種類は、どのようなものであってもよい。式Iで表される人工塩基（K）と対応する相手

方の塩基の位置には、A、T、C、G、Uのいずれが配置されていても、光連結性核酸類と、標的核酸類とは、良好にハイブリッド形成をすることができる。式Iで表される人工塩基は、核酸類の塩基配列の中のいずれの位置に配置されていてもよい。光連結性核酸類と標的核酸類とは、ハイブリッド形成が可能なものであれば、同じ種類の核酸類であってもよく、異なる種類の核酸類であってもよい。

[0033] 光連結性核酸類が、式Iで表される人工塩基を介して光連結可能な相手方の核酸類中の塩基は、ピリミジン環を有する塩基である。すなわち、T、C、Uを挙げることができる。このようにUに対して光連結することからも、本発明は、RNAを標的核酸類として好適に実施可能なものとなっている。実施例においても示すように、本発明に係る光連結は、ハイブリッド形成したときに、式Iで表される人工塩基(K)と対応する相手方の塩基の位置から、相手方の鎖において一塩基だけ3'末端側の位置にある塩基に対して、生じる。

[0034] 好適な実施の態様において、光連結性核酸類は、標識部位を備えていてもよい。標識部位としては、種々の標識を使用することができ、例えば、ビオチン標識、色素標識(蛍光色素標識を含む)、RI標識、酵素標識(発色酵素標識を含む)を使用することができる。このような標識部位を備えることによって、標的核酸類とクロスリンクした状態の光連結性核酸類を、容易に単離して回収することができる。

[0035] このような標識部分に使用される標識としては、本発明で可能となっている十分な洗浄にも耐えられる標識が好ましい。取り扱いの容易性と強い洗浄条件への耐性から、ビオチン標識又は蛍光色素標識が好ましい。ビオチン標識は、さらにアビジン部分を有する種々の標識を使用して、ビオチン-アビジン結合により検出して、あるいは固定化して、回収することができる。これらの標識部分の付加は、通常の方法によって行うことができる。光連結性核酸類は、通常は末端付近に、標識部分を有することが好ましいが、光連結及びハイブリッド形成に望ましくない影響を与えない範囲で、他のい

れの部位に標識部分を有することもできる。

[0036] 好適な実施の態様において、光連結性核酸類は、担体に固定化されていてもよい。このように担体に固定化された光連結性核酸類を使用すれば、光連結した標的核酸類は担体に固定化されて、容易に単離して回収することができる。担体としては、生化学分野の固相担体として使用されるような種々の材質の材料を使用することができる。例えば、ガラス、多孔質ガラスなどの無機物質類、ポリスチレン（PS）などの樹脂類、金などの金属類などが挙げられる。好ましいものとして、アデノシン残基を有する固相担体（オリゴアフィニティーサポート（OAS）など）、アルデヒド修飾ガラスなどが挙げられる。ガラスプレート、CPG、ポリスチレンビーズなどは好ましい。DNAチップの基材として使用される通常の方法は、好適に使用可能である。これらの材料は、このような目的に通常使用される種々の形状とすることができる、例えば、ビーズ状、粒子状、円筒状、繊維状、平面基板状とすることができる。

[0037] 好適な実施の態様において、光連結性核酸類は、担体に直接に結合して固定化されていてもよいが、リンカー部分を介して担体に固定化されていてもよい。リンカー部分としては、核酸類の化学反応に不活性で、5個以上、好ましくは10個以上の原子を有する、好ましくは直鎖状の分子種であればよい。リンカー部分としては、DNA、RNA、PNAなどの核酸や、ポリエチレングリコール、アルカン類などが好ましい。特にポリエチレングリコールが好ましく、ヘキサ（エチレングリコール）を好適に使用できる。担体に固定化された核酸類を製造する方法としては、核酸類の末端のリン酸基をリンカー部分に結合させて製造することができる。リンカー部分と核酸類を結合させて、次いで担体に結合してもよいし、逆に先に担体とリンカー部分を結合させて、次いでリンカー部分と核酸類とを結合させてもよい。核酸類と結合する位置は、通常は末端のリン酸基を用いるのが好ましいが、これに限定させるものではない。例えば、核酸類の途中の塩基部分の官能基と結合させてもよい。

- [0038] 光連結性核酸類と標的核酸類とをハイブリッド形成させる工程は、ハイブリッド形成に適した通常条件（温度、pH、塩濃度、緩衝液等）で行うことができるが、その後に行われる、光照射を行って光連結させる工程と同じ反応溶液中で行うことが作業性の点から好ましい。
- [0039] ハイブリッド形成した光連結性核酸類と標的核酸類とは、光照射を行うことによって、光連結させることができる。この光連結は、人工塩基部分の光反応によって、光連結性核酸分子と標的核酸類分子との間に、分子間の共有結合が形成されて生じることから、分子間の架橋（クロスリンク）にあたるものである。このようにクロスリンクが形成された分子と分子は、もはや単なる熱的な安定性のみで会合しているのではないので、相補的二重鎖が解離する条件におかれた場合でも、解離することなく結合している。
- [0040] 好適な実施の態様において、光連結させる工程は、緩衝作用のある塩を含む反応溶液中で行われる。緩衝作用のある塩としては、カコジル酸塩、リン酸塩、トリス塩をあげることができるが、本発明においては、特に、蛍光強度の強度増大の観点から、緩衝作用のある塩が、カコジル酸塩であることが好ましい。緩衝作用のある塩の濃度が5～250mMの範囲にあることが好ましく、特に10～100mMの範囲に有ることが好ましい。好適な実施の態様において、反応溶液のpHは、好ましくは6.5～8.0、さらに好ましくは6.5～7.5、特に好ましくは6.7～7.3の範囲にある。好適な実施の態様において、反応溶液は、アルカリ金属及び／又はアルカリ土類金属の塩を含むことが好ましい。アルカリ金属及び／又はアルカリ土類金属の塩として、例えば、塩化ナトリウム、及び塩化マグネシウム、好ましくは塩化ナトリウムを挙げることができる。
- [0041] 光連結させる工程の光照射は、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。好適な実施の態様において、光照射による光反応は、1秒から数秒以内、好ましくは1秒以内の反応時間で行われる。ただし、容器及び溶液の光透過性

を考慮して、容器を攪拌しながら、さらに時間をかけて光照射を行うこともできる。

[0042] 光連結させる工程の後に、光連結されていない核酸類を洗浄によって除去する工程が行われる。光反応によってクロスリンクが形成された分子と分子は、もはや単なる熱的な安定性のみで会合しているのではないので、相補的二重鎖が解離する条件におかれた場合でも、解離することなく結合しているために、光連結されていない核酸類を洗浄によって除去する工程が、好ましくは、相補的二重鎖が解離する洗浄条件で洗浄することによって行われる。

[0043] 相補的二重鎖が解離する洗浄条件としては、一般に知られている相補的二重鎖の解離条件を使用することができる。例えば、温度は、80～100℃、好ましくは90～100℃、特に好ましくは95～100℃の範囲の温度を使用することができる。温度は、共有結合を分解しないならば、沸点の値から達成可能な範囲で高いものであるほうがよい。pHは、共有結合を分解しない範囲で特に制限はないが、共有結合の加水分解をもたらしにくいことから中性付近が好ましい。塩の種類及び塩濃度には、操作に不都合な試料の沈殿が生じない範囲で特に制限はなく、一般には適当な濃度の塩（例えば約0.1M NaCl）の存在は、相補的二重鎖の解離を促すために好都合である。また、相補的二重鎖の解離を促進するために、変性剤として、例えば、尿素を添加することができる。さらに、相補的二重鎖の解離を促進するために、界面活性剤として、例えば、ドデシル硫酸ナトリウムを添加することができる。その他、相補的二重鎖の解離に寄与するとして知られる条件を使用することができる。

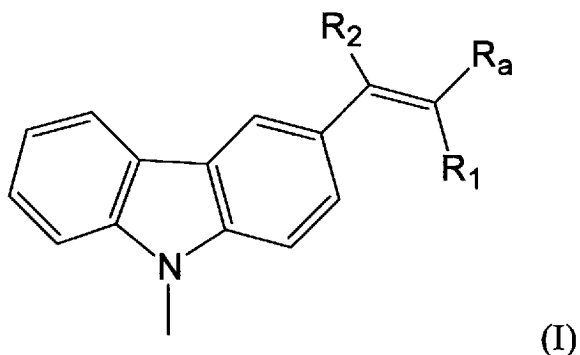
[0044] 光連結されていない核酸類を洗浄によって除去する工程を、強い洗浄条件での洗浄によって行うことができることは、本発明の優れた特徴であるが、必ずしも常に強い条件とする必要はなく、予想される不純物（ノイズ）の程度によって、適切な洗浄条件を選択することができる。例えば、塩、界面活性剤、変性剤等を使用することなく、純水を使用して洗浄することもできる。

[0045] 光連結されていない核酸類を洗浄によって除去する工程の後に、ハイブリッド形成した光連結性核酸類と標的核酸類に、光照射を行って光開裂させる工程を行うことによって、標的核酸類を回収することができる。これによって、最終的に、核酸類混合物中に含まれる特定の塩基配列を有する標的核酸類を、精製して回収することができる。本発明の光連結性核酸類による光連結と光開裂は可逆的なものであるために、このようにして得られた標的核酸類の分子は、もとの核酸類混合物中にあった状態から全く損なわれてはいない。さらに、本発明の光連結性核酸類による光連結と光開裂は可逆的なものであるために、光連結性核酸類の分子もまた、もとの状態から損なわれてはおらず、そのために、本発明によれば、光連結性核酸類は、繰り返して使用することができる。

[0046] 光開裂させる工程の光照射は、一般に310~345 nmの範囲、好ましくは310~340 nmの範囲、さらに好ましくは310~330 nmの範囲、さらに好ましくは310~320 nmの範囲、さらに好ましくは312 nmの波長を含む光が好ましく、特に好ましくは、312 nmの単波長のレーザー光である。好適な実施の態様において、光照射による光反応は、1秒から数秒以内、好ましくは1秒以内の反応時間で行われる。ただし、容器及び溶液の光透過性を考慮して、容器を攪拌しながら、さらに時間をかけて光照射を行うこともできる。光開裂によって反応溶液中へと遊離した標的核酸類は、公知の方法によって回収することができる。

[0047] 本発明で使用される光連結性核酸類は、塩基部分として、次の式 I :

[0048] [化5]



[0049] (ただし、式 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、

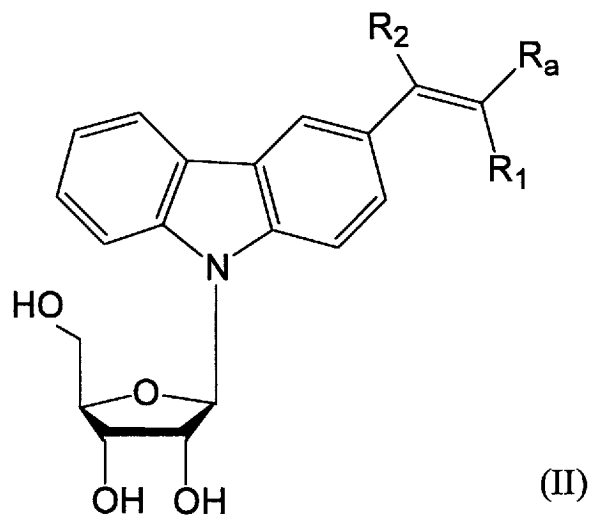
R₁及びR₂は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C 2～C 7のアルコキシカルボニル基、又は水素である。)

で表される基を有する、光連結性核酸類である。

[0050] このような光連結性核酸類には、

次の式 I I :

[0051] [化6]



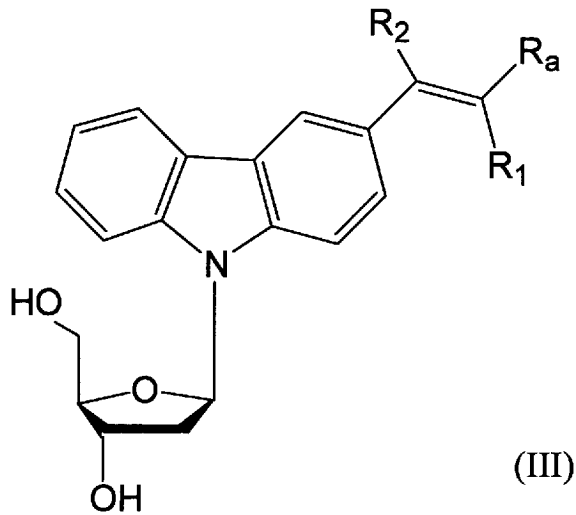
[0052] (ただし、式 I I 中の、R_a、R₁、R₂、式 I について上述した通りである。)

で表されるヌクレオシド (リボヌクレオシド) が組み込まれてなる、核酸が含まれ、

さらに、次の式 I I I :

[0053]

[化7]



[0054] (ただし、式 I I I 中の、 R_a 、 R_1 、 R_2 、式 I について上述した通りである。)

で表されるヌクレオシド（デオキシリボヌクレオシド）が組み込まれてなる、核酸が含まれる。

実施例

[0055] 以下に実施例を挙げて本発明を詳細に説明する。本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

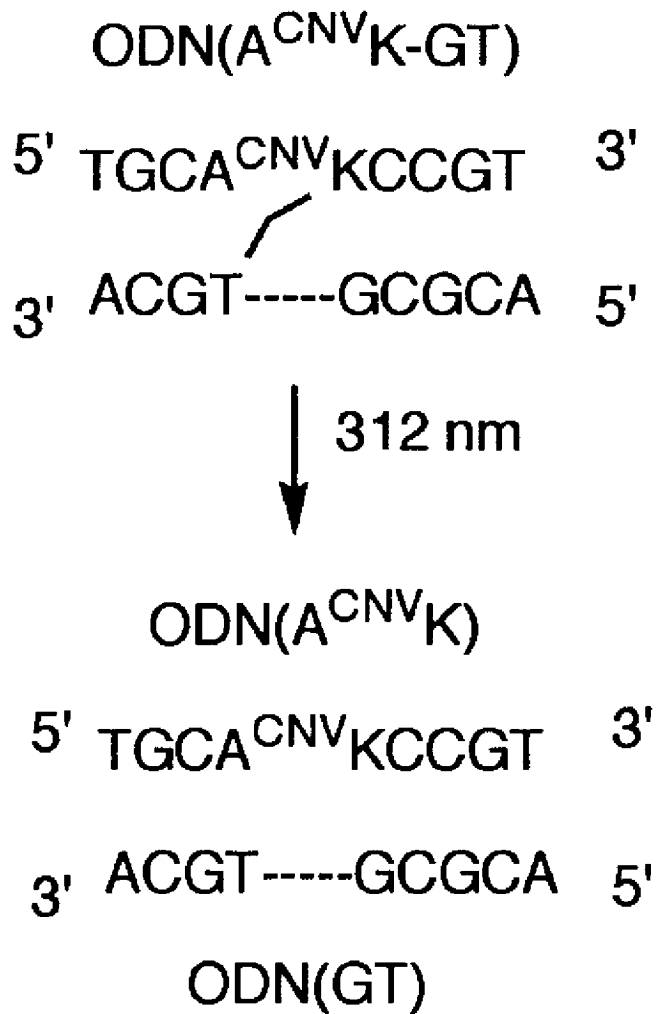
[0056] [1. 312 nm光を用いた光クロスリンク体の光開裂反応]

光応答性核酸である3-cyanovinylcarbazole-1'- β -deoxyriboside ($G^{CNV}K$)の構造式を図1に示す。

[0057] チミンとの光クロスリンク体であるODN($A^{CNV}K$ -GT) (20 μ M)の水溶液(2 M Urea aq. : CH_3CN = 1 : 1)で光開裂反応を行った(total volume: 30 μ L)。トランスイルミネーターを用いて312 nm光を室温で、3分間照射した(Scheme 1)。その光反応物のHPLCの分析結果を図2に示す。同様にして、シトシンとの光クロスリンク体であるODN($G^{CNV}K$ -GC) (20 μ M)の水溶液(2 M Urea aq. : CH_3CN = 1 : 1)で光開裂反応を行った(total volume: 30 μ L)。トランスイルミネーターを用いて312 nm光を室温で、3分間照射した(Scheme 2)。その光反応物のHPLCの分析結果を図3に示す。その経時変化を図4に示す。いずれの光

開裂反応においても数分単位で効率よく反応が進行することがわかった。

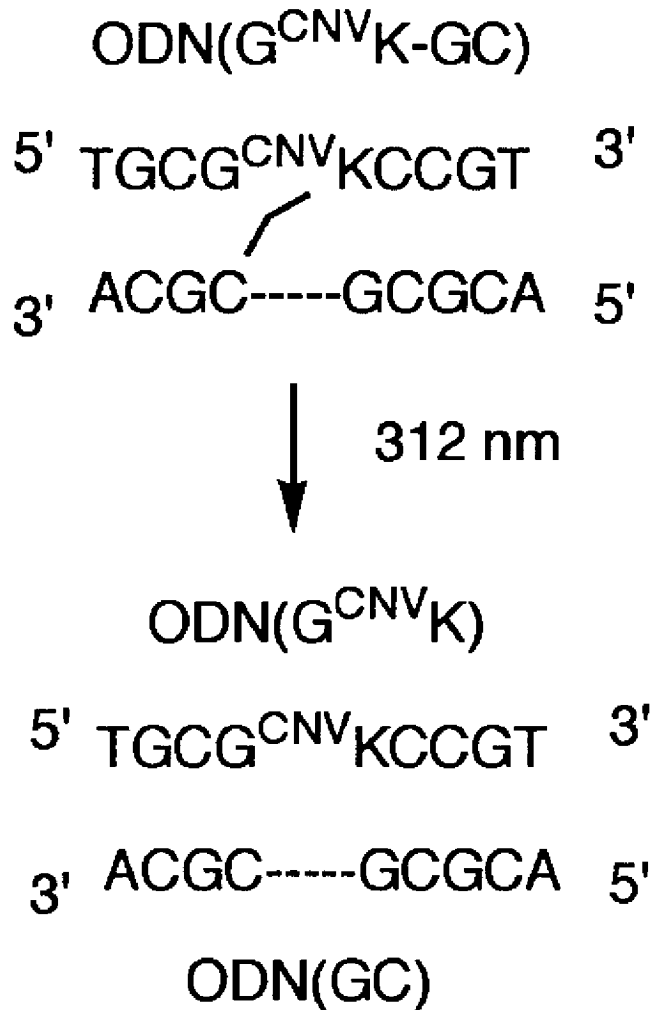
[0058] [化8]



Scheme 1.

[0059]

[化9]

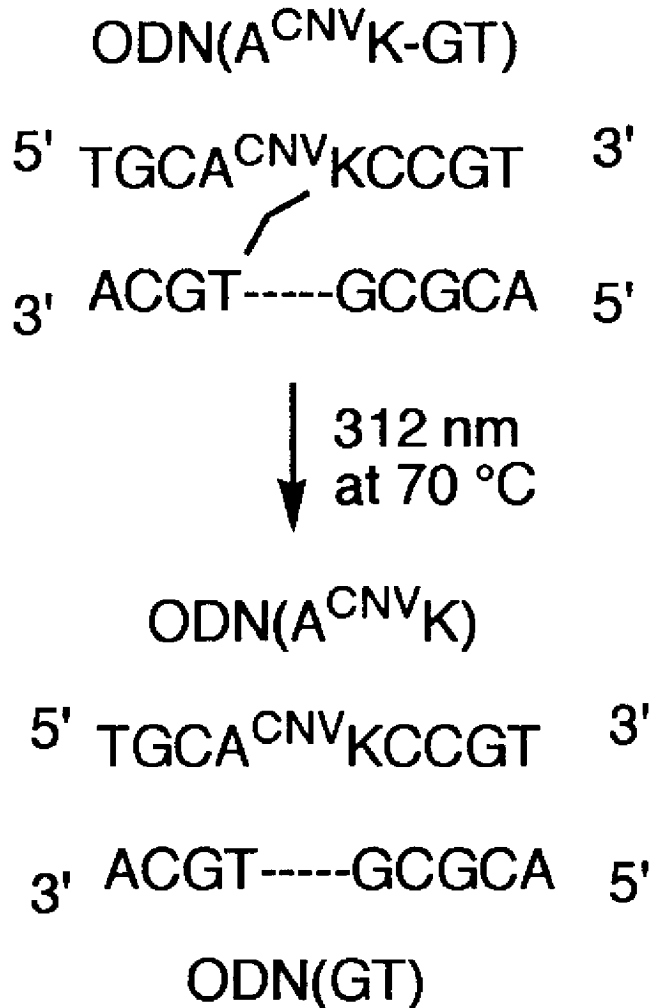


Scheme 2.

[0060] [2. 312 nm光を用いた光クロスリンク体の光開裂反応 (70°Cでの加熱)]
 ODN(A^{CNV}K-GT) (20 μM)の水溶液で光開裂反応を行った(total volume: 30 μL)。トランスイルミネーターを用いて312 nm光を70°Cで、30分間照射した(Scheme 3)。その光反応物のHPLCの分析結果を図5に示す。その経時変化を図6に示す。水溶液での光開裂反応を行ったところ、Tをクロスリンク部位に持つクロスリンク体は30分で完全に反応が進行した。

[0061]

[化10]



Scheme 3.

[0062] [3. 光遺伝子操作法によるDNAの配列選択的精製]

DNAの配列選択的精製の一例の概略を図7に示す。

[0063] DNAを配列選択的に精製するために、下記に示す2種類のDNAを1 μmol スケールで合成した。DNA合成した後、ポリスチレンビーズ(PS)を取り出し、アンモニア水を加えて55°Cで15時間インキュベートし脱保護した。PSをMilliQで5回洗浄してpHを7にした。そして、SpeedVacで1時間かけて乾燥した。

[0064] ODN1 (CNVK)-PS: 5' -ATGA^{CNV}KGCGT-SSS-PS-3'

ODN2 (CNVK)-PS: 5' -GTAA^{CNV}KTTCC-SSS-PS-3'

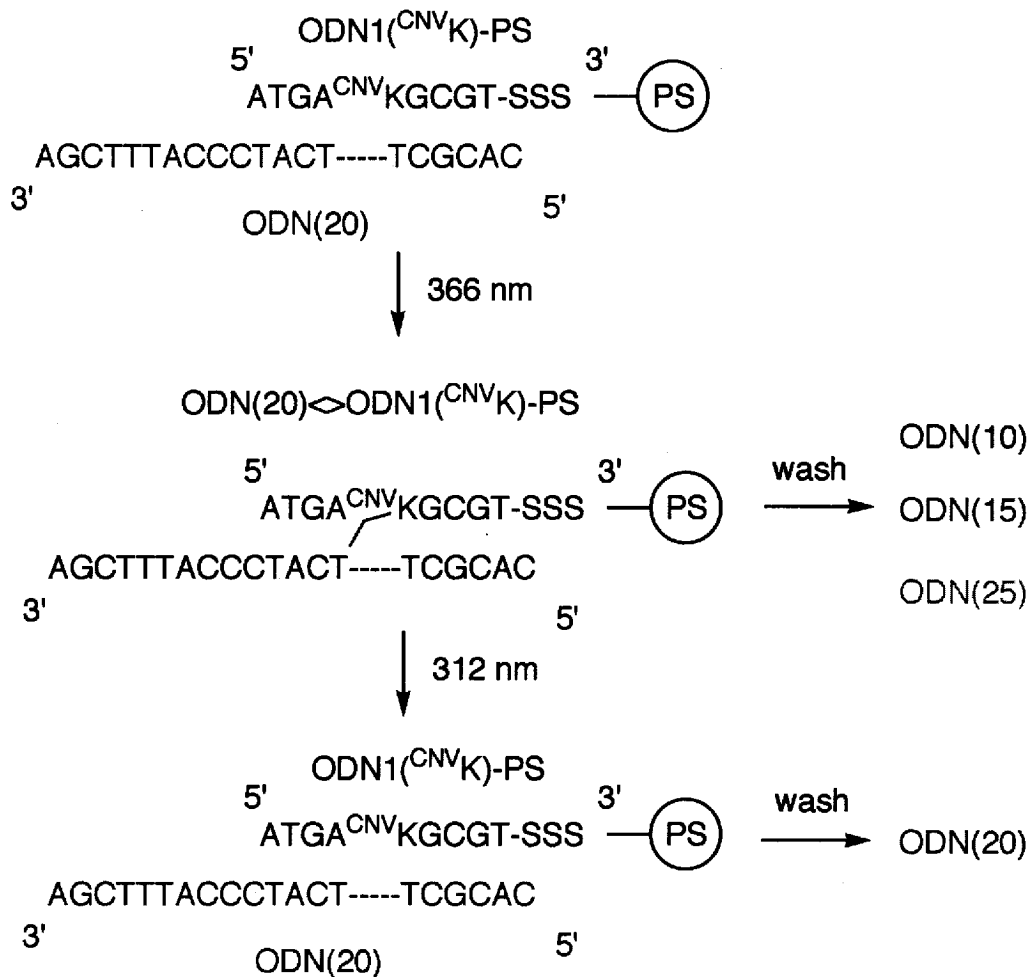
[0065] Scheme 4に従い、固相を用いたDNAの配列選択的精製を行った。

[0066] [化11]

ODN(10) 3'-ACTTTTGCGC-5'

ODN(15) 3'-ATCCTCTTTCCCGAT-5'

ODN(25) 3'-TATGGGAAATAGCTCATTGAAGGCG-5'



Scheme 4.

[0067] ODN(10)、ODN(15)、ODN(20)、ODN(25)に対してODN1(CNVK)-PS存在下で光照射を行った。反応条件はODN(10)、ODN(15)、ODN(20)、ODN(25)をそれぞれ25 μM、ODN1(CNVK)-PS (32 nmol/mg)を2 mg、カコジル酸バッファー(pH 7.0)を50 mM、NaClを1 Mとしてトータル溶液量を50 μLとした。光照射前の反応溶液をキャピラリーゲル電気泳動(IGE)で分析した(図8(a))。

[0068] この反応溶液に対して、0°CでUV-LEDを用いて366 nm光を15分間(5分間ごと

に反応溶液を攪拌)照射した。この反応溶液の上澄み溶液をCGEで分析した(図8(b))。上澄み溶液を取り出した後、超純水で5回洗浄した。得られた固相担体に超純水(50 μL)を加えて、312 nm光を15分間照射して、CGEで分析した(図8(c))。

ODN1^(CNVK)-PSを用いた際に目的とするODN(20)を回収することができた。

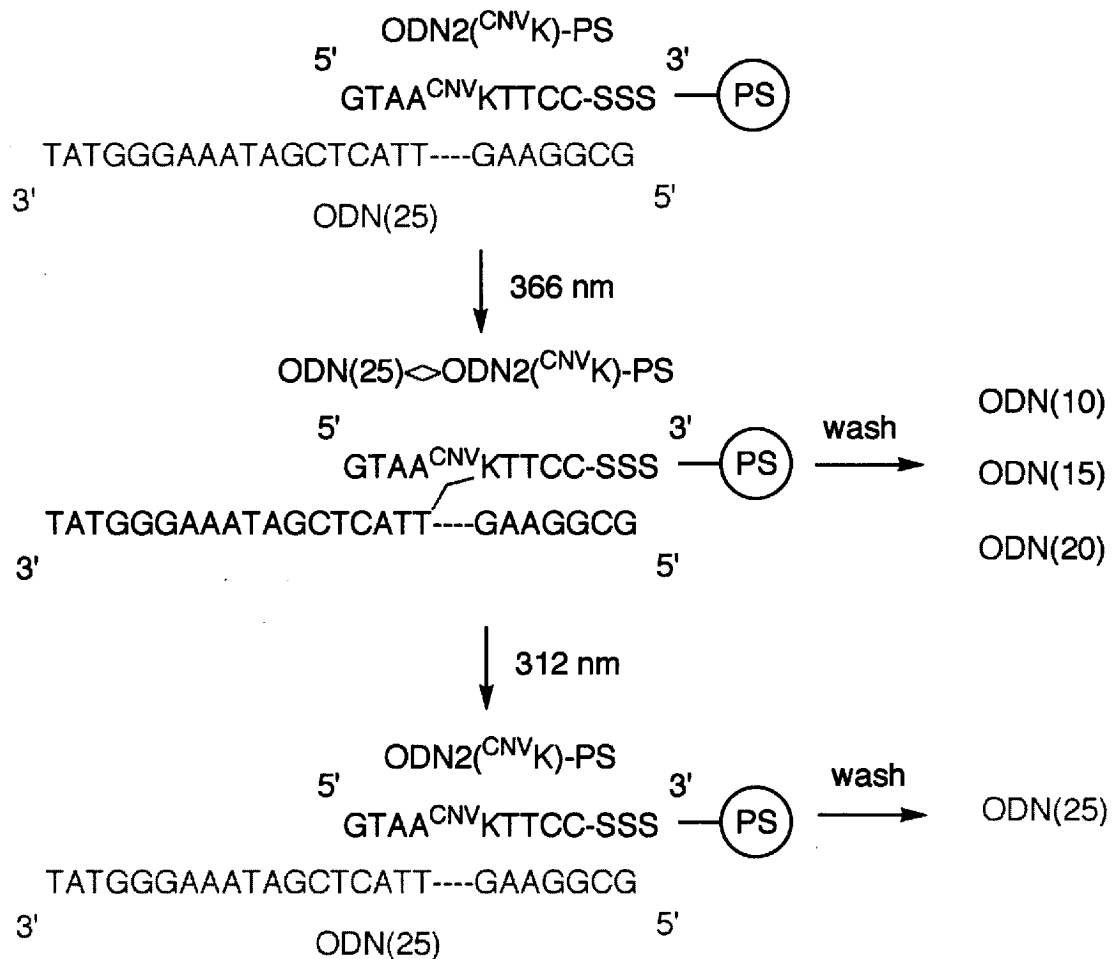
[0069] Scheme 5に従い、固相を用いたDNAの配列選択的精製を行った。

[0070] [化12]

ODN(10) 3'-TCCTTTGCGC-5'

ODN(15) 3'-ATCCTCTTTCCCGAT-5'

ODN(20) 3'-AGCTTTACCCTACTTCGCAC-5'



Scheme 5.

[0071] ODN(10)、ODN(15)、ODN(20)、ODN(25)に対してODN2^(CNVK)-PS存在下で光照射

を行った。反応条件はODN(10)、ODN(15)、ODN(20)、ODN(25)をそれぞれ25 μ M、ODN2^(CNVK)-PS (32 nmol/mg)を2 mg、カコジル酸バッファー(pH 7.0)を50 mM、NaClを1 Mとしてトータル溶液量を50 μ Lとした。光照射前の反応溶液をCGEで分析した(図9(a))。

[0072] この反応溶液に対して、0°CでUV-LEDを用いて366 nm光を15分間(5分間ごとに反応溶液を攪拌)照射した。この反応溶液の上澄み溶液をCGEで分析した(図9(b))。上澄み溶液を取り出した後、超純水で5回洗浄した。得られた固相担体に超純水(50 μ L)を加えて、312 nm光を15分間照射して、CGEで分析した(図9(c))。

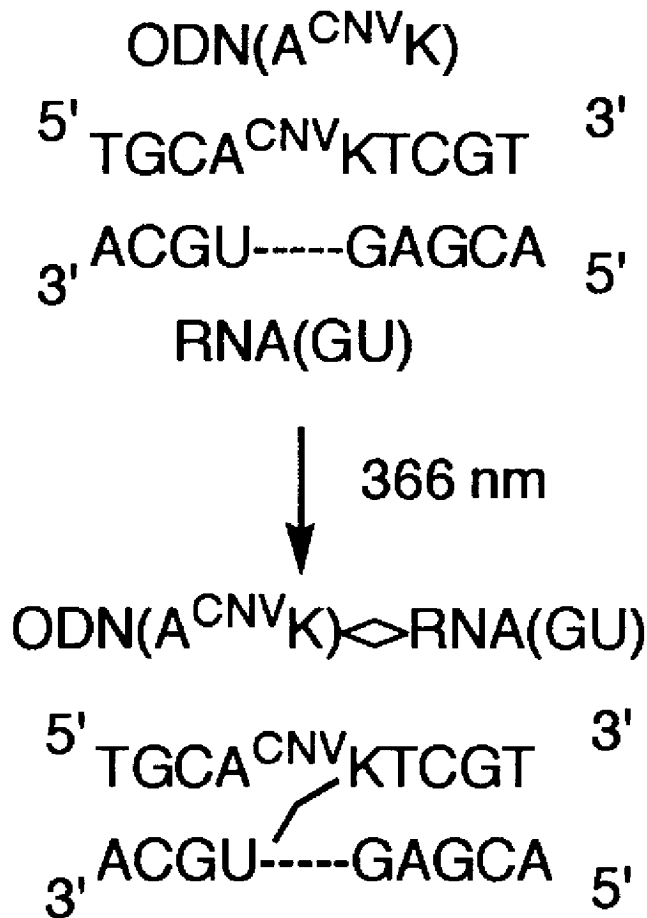
ODN2^(CNVK)-PSを用いた際に目的とするODN(25)を回収することができた。

[0073] [4. CNVKを含むODNを用いたRNAとの光クロスリンク反応]

CNVKを含むODNを用いて光照射時間1秒での光クロスリンク反応を行った。ODN(A^{CNVK}) (20 μ M)とRNA(GU) (20 μ M)の光クロスリンク反応を行った(sodium cacodylate 50 mM, NaCl 100 mM, total volume: 30 μ L)。UV-LEDを用いて366 nm光を0°Cで、1秒間照射した(Scheme 6)。その光反応物のHPLCの分析結果を図10に示す。RNA(GU)を用いて1秒での光クロスリンク反応を行ったところ、収率86%で効率よく反応が進行し、1秒でのRNA光操作が可能であることがわかった。

[0074]

[化13]



Scheme 6.

[0075] [5. CNVKを含むODNを用いた8種類の光クロスリンク反応]

CNVKを含むODNを用いて光クロスリンク反応を行った。ODN(A^{CNV}K) (10 μM)とRNA(XU) (X = A, G, C, U, 10 μM)の光クロスリンク反応を行った(sodium cacodylate 50 mM, NaCl 100 mM, total volume: 200 μL)。UV-LEDを用いて366 nm光を0 ° Cで、20秒間照射してUPLCを用いて分析した。その結果を図 1 1 (a)に示す。同様にして、Cが光クロスリンク部位となる^{CNV}Kを含むODNを用いて光クロスリンク反応を行った。ODN(G^{CNV}K) (10 μM)とRNA(XC) (X = A, G, C, U, 10 μM)の光クロスリンク反応を行った(sodium cacodylate 50 mM, NaCl 100 mM, total volume: 200 μL)。UV-LEDを用いて366 nm光を0°Cで、20秒間照射してUPLCを用いて分析した。その結果を図 1 1 (b)に示す。これらの結

果から、RNAとの光クロスリンク反応はクロスリンク相手がUとCである時に効率よく進行することがわかった。

[0076] [6. 312 nm光を用いたRNAとの光クロスリンク体の光開裂反応]

UまたはCが光クロスリンク部位である光クロスリンク体ODN(A^{GNVK})<>RNA(GU)あるいはODN(G^{GNVK})<>RNA(GC)を光反応によって調製してHPLCで分取した。そして、得られた光クロスリンク体と質量を測定した。

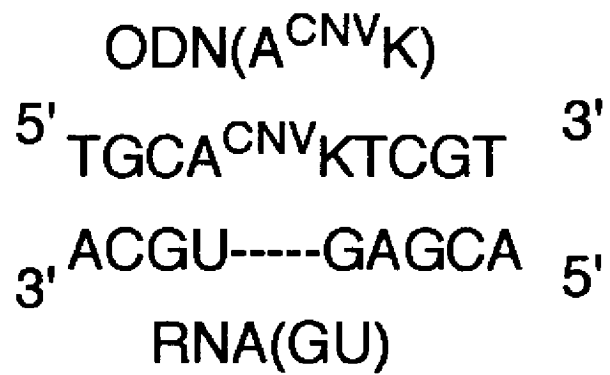
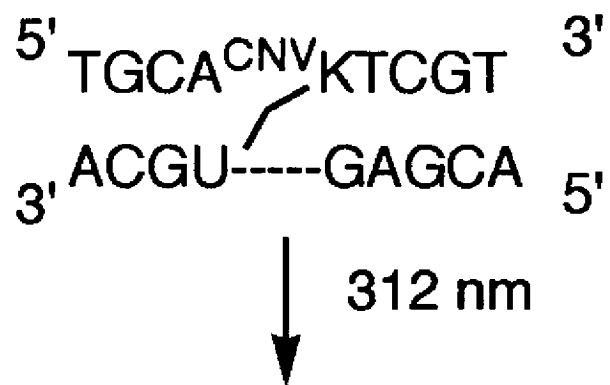
calcd. for ODN(A^{GNVK})<>RNA(GU): [(M + H)⁺] 5675.74, found 5675.25.

calcd. for ODN(G^{GNVK})<>RNA(GC): [(M + H)⁺] 5690.75, found 5690.68.

[0077] ODN(A^{GNVK})<>RNA(GU)の水溶液(2 M Urea aq. : CH₃CN = 1 : 1)で光開裂反応を行った(total volume: 30 μL)。トランスイルミネーターを用いて312 nm光を室温で、1分間照射した(Scheme 7)。その光反応物のHPLCの分析結果を図12に示す。同様にして、ODN(G^{GNVK})<>RNA(GC)の水溶液(2 M Urea aq. : CH₃CN = 1 : 1)で光開裂反応を行った(total volume: 30 μL)。トランスイルミネーターを用いて312 nm光を室温で、3分間照射した(Scheme 8)。その光反応物のHPLCの分析結果を図13に示す。312 nm光を用いて光開裂反応を行ったところ、Uをクロスリンク部位に持つクロスリンク体は1分で完全に反応が進行した。また、312 nm光を用いて光開裂反応を行ったところ、Cをクロスリンク部位に持つクロスリンク体は3分で完全に反応が進行した。

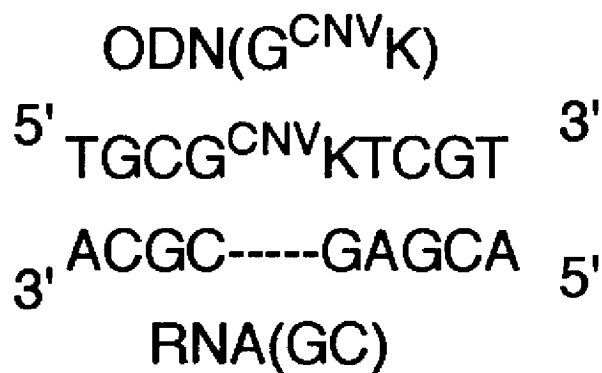
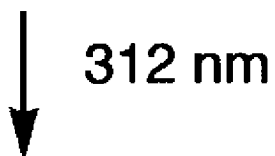
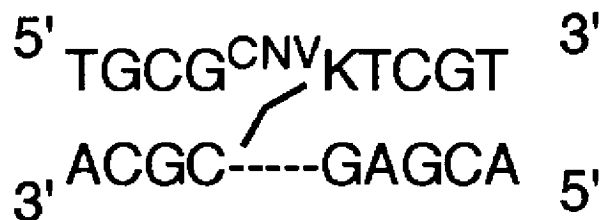
[0078]

[化14]

ODN(A^{CNV}K) \diamond RNA(GU)**Scheme 7**

[0079]

[化15]



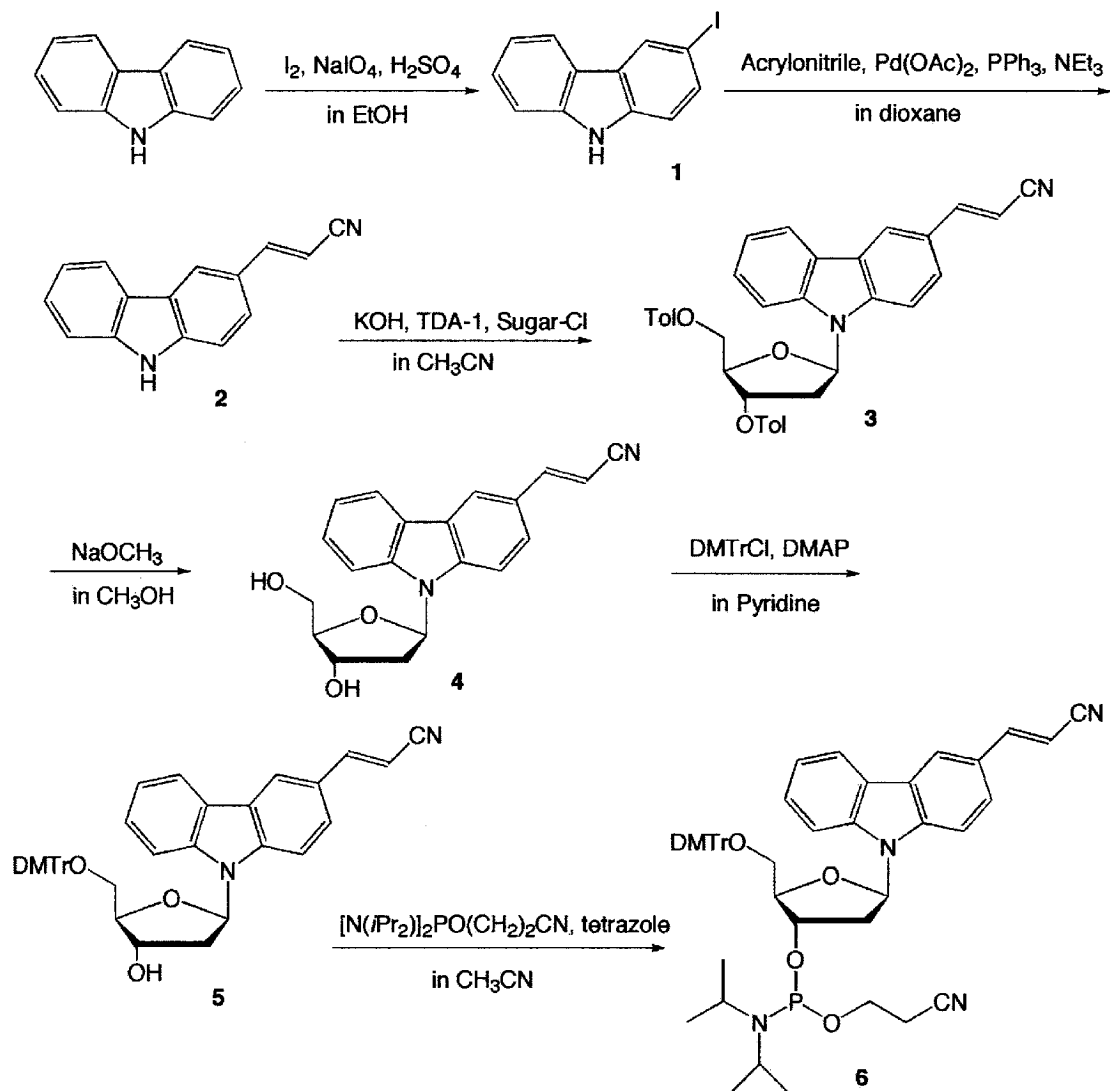
Scheme 8.

[0080] [7. ビニルカルバゾールを塩基部位に持つODN の合成]

次のScheme 9 に従い合成を進めた。以下の説明において、化合物に付した番号で化合物を表す場合がある。

[0081]

[化16]



Scheme 9

[0082] [3-Iodocarbazole (1)]

carbazole (2.50 g, 15.0 mmol)のエタノール溶液(500 mL)に $NaIO_4$ (0.80 g, 3.75 mmol)と I_2 (1.89 g, 7.45 mmol)を順に加えた後、 H_2SO_4 (1.60 mL, 30.0 mmol)のエタノール溶液(100 mL)を加えて、反応溶液を $65^\circ C$ で1時間環流した。TLC (HexH : AcOEt = 4 : 1)で原料の消失を確認し、 $NaOH$ (1.4 g)のエタノール溶液(100 mL)を加えて中和した。エタノールを除去した後、反応溶液をクロロホルムで2回抽出し、水で2回洗浄した。有機相を Na_2SO_4 で乾燥し、溶媒を除去した。カラムクロマトグラフィー(HexH : AcOEt = 4 : 1)

で精製し、白色粉末として1 (3.06 g, 70%)を得て、白色粉末として3,6-diiodocarbazole (0.47 g, 7.5%)を得た。

1: ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 11.4 (s, 1H), 8.49 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz), 8.14 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.62 (dd, 1H, $J = 8.4, 1.7$ Hz), 7.48 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.40 (m, 1H), 7.33 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.16 (m, 1H).

3,6-Diiodocarbazole: ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 11.5 (s, 1H), 8.56 (d, 2H, $J = 1.7$ Hz), 7.65 (dd, 2H, $J = 8.5, 1.7$ Hz), 7.34 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz).

[0083] [3-Cyanovinylcarbazole (2)]

Triphenylphosphine (139 mg, 0.53 μmol)のジオキサン溶液(10 mL)にPalladium acetate (40.0 mg, 0.18 μmol)とTriethylamine (0.59 μL , 4.23 mmol)を順に加えて、75° Cで5分間攪拌した。1 (1.03 g, 3.52 mmol)のジオキサン溶液(15 mL)とAcrylonitrile (0.46 μL , 7.04 mmol)を加えて、反応溶液を11.5時間環流した。TLC (HexH : AcOEt = 4 : 1)で生成物を確認した後、綿ろ過でPalladium粉末を取り除いた。カラムクロマトグラフィー(HexH : AcOEt = 4 : 1)で精製し、白色粉末として2 (0.14 g, 18%, trans : cis = 97 : 3)を得て、白色粉末として1 (0.37 g, 回収率37%)を回収した。

2: ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 11.6 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.11 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.75 (d, 1H, $J = 16.7$ Hz), 7.69–7.72 (m, 1H), 7.40–7.52 (m, 3H), 7.19–7.24 (m, 1H), 6.36 (d, 1H, $J = 16.7$ Hz).

[0084] [3-Cyanovinylcarbazole-1' - β -deoxyribose-3' ,5' -di-(p-toluoyl)ester (3)]

KOH (0.22 g, 3.87 mmol)とTDA-1 (11 mg, 34 μmol)のアセトニトリル溶液(20 mL)に室温で2 (0.26 g, 1.20 mmol)を加えて20分間攪拌した。反応溶液にChlorosugar (0.53 g, 1.24 mmol)を加えて室温で20分間攪拌し、TLC (HexH : AcOEt = 4 : 1)で原料の消失を確認した。沈殿物を除去した後、カラムクロマトグラフィー(CHCl_3)で精製し、黄色オイルとして3 (0.23 g, 33%)を得た。

3: ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.09 (s, 1H), 8.02 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.98 (d,

2H, $J = 8.4$ Hz), 7.62–7.65 (m, 1H), 7.62 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 7.49 (d, 1H, $J = 16.5$ Hz), 7.25–7.31 (m, 7H), 7.17–7.20 (m, 1H), 6.68 (dd, 1H, $J = 9.3, 5.8$ Hz), 5.78 (m, 1H), 5.76 (d, 1H, $J = 16.5$ Hz), 4.91 (dd, 1H, $J = 12.4, 2.7$ Hz), 4.78 (dd, 1H, $J = 12.4, 3.3$ Hz), 4.55–4.57 (m, 1H), 3.09–3.20 (m, 1H), 2.45–2.52 (m, 1H), 2.45 (s, 3H), 2.44 (s, 3H), HRMS (MALDI): calcd. for $C_{36}H_{30}N_2O_5Na$ [(M+ Na)⁺] 593.2053, found 593.2018.

[0085] [3-Cyanovinylcarbazole-1' - β -deoxyribose (4)]

3 (0.22 g, 0.39 mmol) のメタノール溶液 (20 mL) に 0.5 M methanolic NaOMe (2.3 mL, 1.2 mmol) とクロロホルム (5.0 mL) を加えて、反応溶液を室温で 3.5 時間攪拌した。TLC ($CHCl_3$: MeOH = 9 : 1) で原料の消失を確認した。溶媒を除去した後、カラムクロマトグラフィー ($CHCl_3$: MeOH = 9 : 1) で精製し、白色粉末として 4 (0.11 g, 81%) を得た。

4: ¹H NMR ($CDCl_3$) δ 8.12 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz), 8.06 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz), 7.59 (d, 1H, $J = 9.1$ Hz), 7.43–7.57 (m, 4H), 7.26–7.31 (m, 1H), 6.64 (dd, 1H, $J = 8.2, 6.9$ Hz), 5.87 (d, 1H, $J = 16.5$ Hz), 4.77–4.82 (m, 1H), 3.95–4.06 (m, 3H), 2.95 (dt, 1H, $J = 14.0, 8.2$ Hz), 2.30 (ddd, 1H, $J = 14.0, 6.9, 3.3$ Hz), HRMS (MALDI): calcd. for $C_{20}H_{18}N_2O_3Na$ [(M+ Na)⁺] 357.1215, found 357.1265.

[0086] [5' -O-(4,4' -dimethoxytrityl)-3-Cyanovinylcarbazole-1' - β -deoxyribose (5)]

ピリジン (1.0 mL \times 2) で共沸した 4 (97 mg, 0.29 mmol) にピリジン (0.5 mL) を加えた。反応溶液に 4,4' -dimethoxytritylchloride (118 mg, 0.35 mmol) と 4-(dimethylamino)pyridine (7.0 mg, 58 μ mol) のピリジン溶液 (1.0 mL) を加えて、反応溶液を室温で 18 時間攪拌した。TLC ($CHCl_3$: MeOH = 95 : 5) で生成物を確認した後、ピリジンを除去した。カラムクロマトグラフィー ($CHCl_3$: MeOH = 98 : 2) で精製し、黄色粉末として 5 (113 mg, 61%) を得た。

。

5: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8.07 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz), 8.02–8.05 (m, 1H), 7.71 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 7.62–7.65 (m, 1H), 7.45–7.52 (m, 3H), 7.33–7.37 (m, 4H), 7.25–7.28 (m, 4H), 7.12 (dd, 1H, $J = 8.8, 1.7$ Hz), 6.81 (dd, 4H, $J = 8.8, 1.7$ Hz), 6.61 (dd, 1H, $J = 8.2, 6.3$ Hz), 5.77 (d, 1H, $J = 16.7$ Hz), 4.80–4.82 (m, 1H), 4.05–4.07 (m, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.56–3.58 (m, 2H), 2.89 (dt, 1H, $J = 13.8, 8.2$ Hz), 2.23 (ddd, 1H, $J = 13.8, 6.3, 2.7$ Hz), 1.98 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz), HRMS (MALDI): calcd. for $\text{C}_{41}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_5\text{Na}$ [$(\text{M} + \text{Na})^+$] 659.2522, found 659.2485.

[0087] [5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3-Cyanovinylcarbazole-1'- β -deoxyribose-3'-O-(cyano ethoxy-N,N-diisopropylamino)phosphoramidite (6)]

アセトニトリル(1.5 mL)で共沸した5 (0.11 g, 0.17 mol)にアセトニトリル(1.5 mL)を加えた。反応溶液に2-cyanoethyl-N,N,N',N'-tetraisopropyl phosphorodiamidite (52 μL , 0.17 mol)と0.45 M tetrazole のアセトニトリル溶液(0.37 mL, 0.17 mol)を加えて、反応溶液を室温で1.0 時間攪拌した。反応溶液を脱酢酸処理した酢酸エチルで2 回抽出し、Sat. NaHCO_3 aq. と H_2O で洗浄した。有機相を MgSO_4 で乾燥し、溶媒を除去した。黄色オイルの粗生成物である6 (0.12 g) をゴムシールボトルにアセトニトリルで移し3 回共沸した後、さらなる精製をせずにDNA 合成に使用した。

[0088] [3-シアノビニルカルバゾール-1'- β -デオキシリボシド ($^{\text{CNVK}}$)を含有するODNの合成] (Synthesis of ODN containing 3-cyanovinylcarbazole-1'- β -deoxyriboside ($^{\text{CNVK}}$))

下記に示す $^{\text{CNVK}}$ を含むODN を合成した。

ODN (A^{CNVK}): 5' -TGCA $^{\text{CNVK}}$ KCCGT-3'

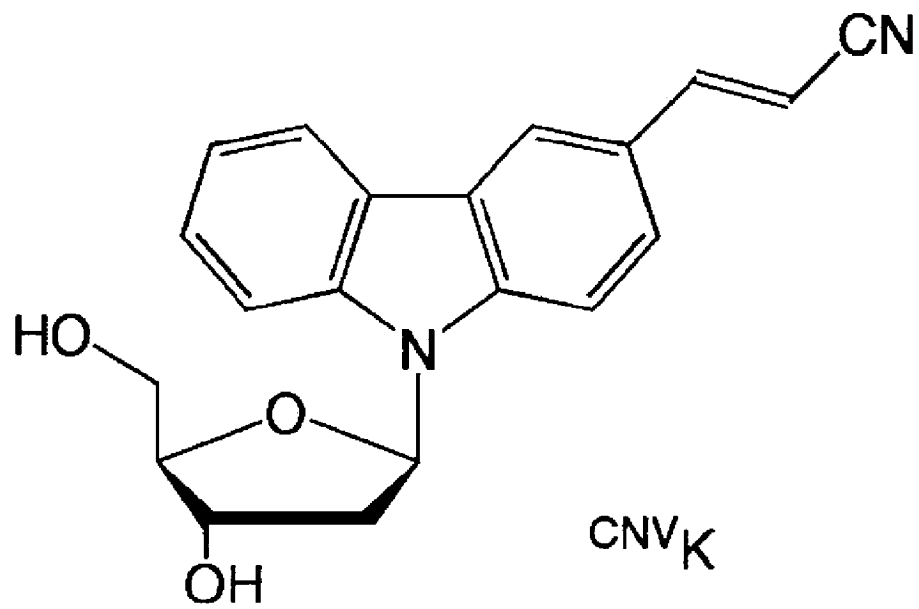
ODN (G^{CNVK}): 5' -TGCG $^{\text{CNVK}}$ KCCGT-3'

ODN (C^{CNVK}): 5' -TGCC $^{\text{CNVK}}$ KCCGT-3'

ODN (T^{CNVK}): 5' -TGCT $^{\text{CNVK}}$ KCCGT-3'

[0089]

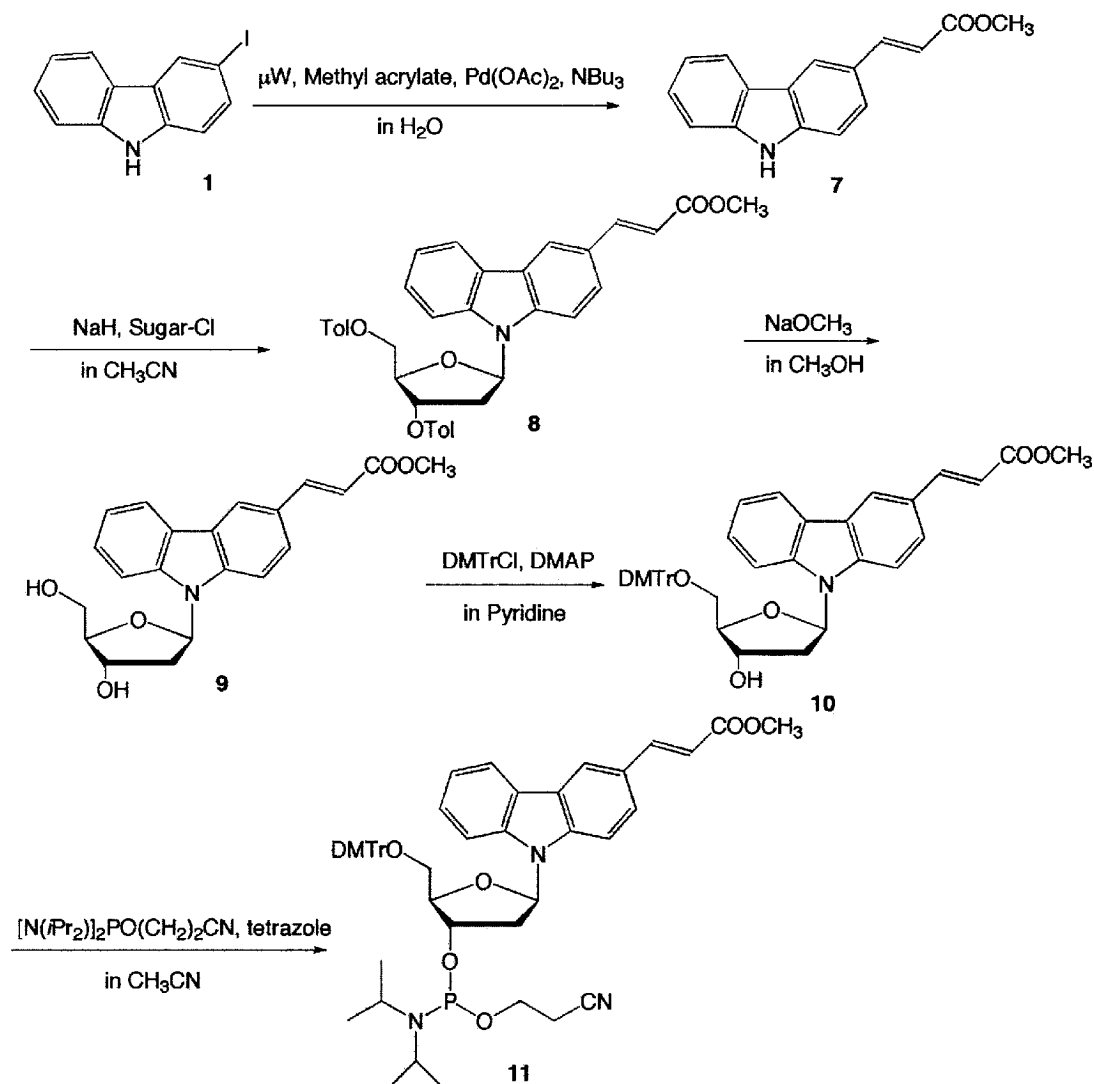
[化17]



[0090] 次のScheme 10 に従い合成を進めた。

[0091]

[化18]



Scheme 10

[0092] [3-Methoxycarbonylvinylcarbazole (7)]

Palladium acetate (38.0 mg, 0.17 μmol)のDMF 溶液(0.25 mL)に1 (0.50 g, 1.71 mmol)とTributylamine (0.41 μL , 1.71 mmol)とMethyl acrylate (0.38 L, 4.27 mmol)と H_2O (1.0 mL)を順に加えて、マイクロウェーブを用いて反応溶液を160 $^\circ\text{C}$ で10 分間反応してTLC で反応追跡したところ、1 の消失を確認した。桐山ろ過でPalladium 粉末を取り除いた後、カラムクロマトグラフィー(HexH : AcOEt = 3 : 1)で精製し、白色粉末として7 (0.26 g, 62%)を得た。

7: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8.26 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 8.07 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz)

z), 7.89 (d, 1H, J = 15.9 Hz), 7.61 (dd, 1H, J = 1.7, 8.5 Hz), 7.39–7.44 (m, 3H), 7.23–7.29 (m, 1H), 6.47 (d, 1H, J = 15.9 Hz), 3.81 (s, 3H).

[0093] [3-Methoxycarbonylcarbazole-1' - β -deoxyribose-3', 5' -di-(p-toluo yl)ester (8)]

7 (0.55 g, 2.22 mmol)のアセトニトリル溶液(49 mL)に室温でNaH (92.0 mg, 2.31 mmol)を加えて10 分間攪拌した。反応溶液にChlorosugar (1.14 g, 2.66 mmol)を加えて室温で60 分間攪拌し、TLC (HexH : AcOEt = 4 : 1) で原料の消失を確認した。沈殿物を除去した後、カラムクロマトグラフィー(He xH : AcOEt = 4 : 1) で精製し、白色粉末として8 (0.98 g, 71%)を得た。

[0094] [3-Methoxycarbonylcarbazole-1' - β -deoxyribose (9)]

8 (0.96 g, 1.59 mmol)のメタノール溶液(46 mL)に0.5 M methanolic NaOM e (9.6 mL, 4.8 mmol)とジクロロメタン(12 mL)を加えて、反応溶液を室温で 1 時間攪拌した。TLC (CHCl₃ : MeOH = 9 : 1) で原料の消失を確認した。溶媒を除去した後、カラムクロマトグラフィー(CHCl₃ : MeOH = 9 : 1) で精製 し、白色粉末として9 (0.28 g, 48%)を得た。

9: ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.20 (s, 1H), 8.06 (d, 1H, J = 7.7 Hz), 7.86 (d, 1H, J = 15.9 Hz), 7.53–7.61 (m, 3H), 7.44 (t, 1H, J = 7.1 Hz), 7.24–7.27 (m, 1H), 6.63 (dd, 1H, J = 8.2, 7.0 Hz), 6.46 (d, 1H, J = 15.9 Hz), 4.75–4.80 (m, 1H), 3.95–4.04 (m, 3H), 3.81 (s, 1H), 2.95 (dt, 1H, J = 14.0, 8.2 Hz), 2.28 (ddd, 1H, J = 14.0, 7.0, 3.6 Hz).

[0095] [5' -O-(4, 4' -dimethoxytrityl)-3-methoxycarbonylvinylcarbazole-1' - β -deoxyribose (10)]

ピリジン(1.0 mL \times 2)で共沸した9 (0.23 g, 0.63 mmol)にピリジン(0.5 mL)を加えた。反応溶液に4, 4' -dimethoxytritylchloride (0.26 g, 0.75 mmol) と4-(dimethylamino)pyridine (15.0 mg, 0.13 μ mol)のピリジン溶液(2.2 mL)を加えて、反応溶液を室温で16 時間攪拌した。TLC (CHCl₃ : MeOH = 9 : 5) で生成物を確認した後、ピリジンを除去した。カラムクロマトグラフ

イー(CHCl₃ : MeOH = 99 : 1) で精製し、黄色粉末として10 (0.21 g, 51%)を得た。

10: ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.17 (s, 1H), 8.02–8.05 (m, 1H), 7.83 (d, 1H, J = 15.9 Hz), 7.62–7.66 (m, 3H), 7.46–7.49 (m, 2H), 7.34–7.38 (m, 4H), 7.25–7.28 (m, 4H), 7.15 (d, 1H, J = 8.8 Hz), 6.81 (dd, 4H, J = 8.8, 1.4 Hz), 6.61 (dd, 1H, J = 8.5, 6.3 Hz), 6.40 (d, 1H, J = 15.9 Hz), 4.76–4.80 (m, 1H), 4.05–4.09 (m, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.56–3.57 (m, 2H), 2.89 (dt, 1H, J = 14.0, 8.5 Hz), 2.18 (m, 1H), 2.17 (d, 1H, J = 3.8 Hz).

[0096] [5' -O-(4,4' -dimethoxytrityl)-3-methoxycarbonylvinylcarbazole-1' -β-deoxyribose-3' -O-(cyanoethoxy-N,N-diisopropylamino)phosphoramidite (11)]

アセトニトリル(1.0 mL)で共沸した10 (0.20 g, 0.29 μmol)にアセトニトリル(1.3 mL)を加えた。反応溶液に2-cyanoethyl-N,N,N',N'-tetraisopropylphosphorodiamidite (92 μL, 0.29 μmol)と0.45 M tetrazole のアセトニトリル溶液(0.65 mL, 0.29 μmol)を加えて、反応溶液を室温で2時間攪拌した。反応溶液を脱酢酸処理した酢酸エチルで2回抽出し、Sat. NaHCO₃ aq. とH₂Oで洗浄した。有機相をMgSO₄で乾燥し、溶媒を除去した。黄色オイルの粗生成物である11 (0.25 g)をゴムシールボトルにアセトニトリルで移し3回共沸した後、さらなる精製をせずにDNA合成に使用した。

[0097] [修飾したODNの合成] (Synthesis of modified ODN)

ODN(AX) (5' -TGCA_XCCGT-3', X = 9)とODN(GX) (5' -TGCG_XCCGT-3', X = 9)はABI 3400 DNA合成機を用いて合成した。それぞれ得られた反応混合物のCPGを二つに分けて、ひとつの反応混合物は0.4 M NaOH in H₂O : CH₃OH = 1 : 4を用いて37°Cで17時間インキュベートして脱保護し、2 M TEAAで中和した後凍結乾燥した。もうひとつの反応混合物は0.05 M K₂CO₃ in CH₃OHを用いて室温で17時間インキュベートして脱保護し、2 M TEAAで中和した後凍結乾燥した。ODN(A^{OH}VK), ODN(G^{OH}VK), ODN(A^{OMe}VK), ODN(G^{OMe}VK)のDNAを逆相H

PLC によって精製した。それぞれのDNA を酵素分解した。単離収率はそれぞれ5, 10, 11, 13%であった。分子量をMALDI-TOF-MS で測定した。

calcd. for ODN(A^{OHV}K), 5' -TGCA^{OHV}KCCGT-3' : [(M+H)⁺] 2801.93,
found 2802.12.

calcd. for ODN(G^{OHV}K), 5' -TGCG^{OHV}KCCGT-3' : [(M+H)⁺] 2817.93,
found 2818.08.

calcd. for ODN(A^{OMeV}K), 5' -TGCA^{OMeV}KCCGT-3' : [(M+H)⁺] 2815.95,
found 2816.07.

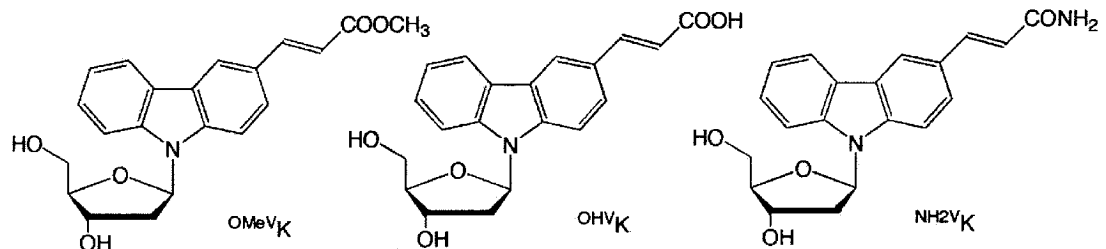
calcd. for ODN(G^{OMeV}K), 5' -TGCG^{OMeV}KCCGT-3' : [(M+H)⁺] 2831.95,
found 2831.98.

[0098] 下記に示す^{NH2V}K を含むODN を合成した。

ODN(A^{NH2V}K) : 5' -TGCA^{NH2V}KCCGT-3'

ODN(G^{NH2V}K) : 5' -TGCG^{NH2V}KCCGT-3'

[0099] [化19]



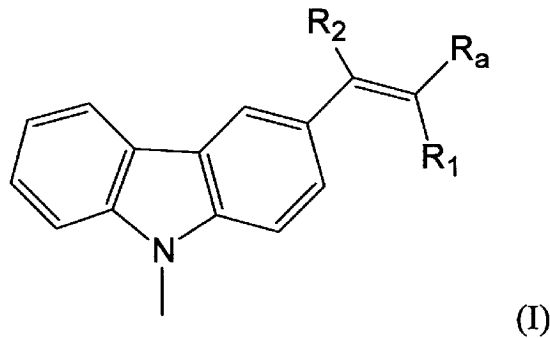
産業上の利用可能性

[0100] 本発明によれば、高い配列選択性と回収率を両立させて、特定の塩基配列を備えた核酸類の精製及び回収を行うことができる。新規創薬や遺伝子診断のために注目されている、一塩基置換した塩基配列を有する核酸類の精製と回収をも可能としており、産業上有用である。さらに、本発明による精製と回収は、人工塩基を光連結し光開裂させることによって、ごく短時間で行うことができるものとなっている。そのために、分解を受けやすく短命なRNAをも対象として、精製と回収を可能としており、産業上有用である。

請求の範囲

[請求項1] 塩基部分として、次の式 I :

[化20]



(ただし、式 I 中、R_a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、又は水素であり、

R₁及びR₂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、又は水素である。)で表される基を有する、光連結性核酸類(ただし、核酸類には、核酸、ペプチド核酸が含まれる)と、

核酸類混合物中に含まれる特定の塩基配列を有する標的核酸類とを、ハイブリッド形成させる工程、

ハイブリッド形成した光連結性核酸類と標的核酸類に、光照射を行って、光連結させる工程、

光連結されていない核酸類を洗浄によって除去する工程、

ハイブリッド形成した光連結性核酸類と標的核酸類に、光照射を行って、光開裂させる工程、

を含む、核酸類混合物中に含まれる特定の塩基配列を有する標的核酸類を、精製する方法。

[請求項2] 光連結されていない核酸類を洗浄によって除去する工程が、相補的二重鎖が解離する洗浄条件で洗浄することによって行われる、請求項1に記載の方法。

[請求項3] 光連結性核酸類が、標識部位を備えている、請求項1～2の何れか

に記載の方法。

[請求項4] 光連結性核酸類が、担体に固定化されている、請求項1～2の何れかに記載の方法。

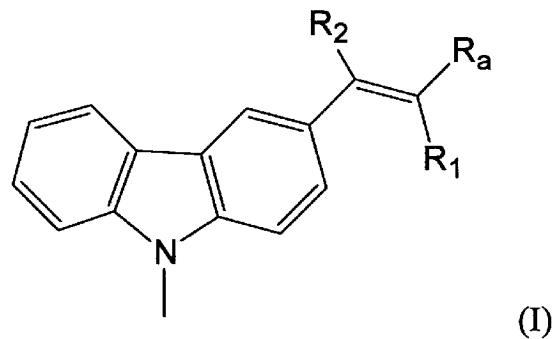
[請求項5] 光連結させる工程の光照射が、350～380nmの範囲の波長の光照射によって行われる、請求項1～4の何れかに記載の方法。

[請求項6] 光開裂させる工程の光照射が、310～345nmの範囲の波長の光照射によって行われる、請求項1～5の何れかに記載の方法。

[請求項7] 光連結させる工程が、緩衝作用のある塩を含む反応溶液中で行われる、請求項1～6の何れかに記載の方法。

[請求項8] 塩基部分として、次の式I：

[化21]

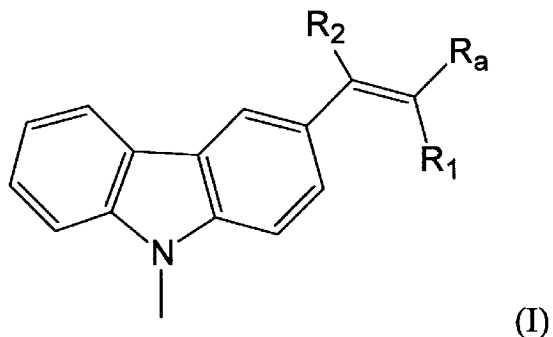


(ただし、式I中、Raは、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C2～C7のアルコキシカルボニル基、又は水素であり、

R1及びR2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、又は水素である。)で表される基を有し、標識部位を備えている、光連結性核酸類(ただし、核酸類には、核酸、ペプチド核酸が含まれる)。

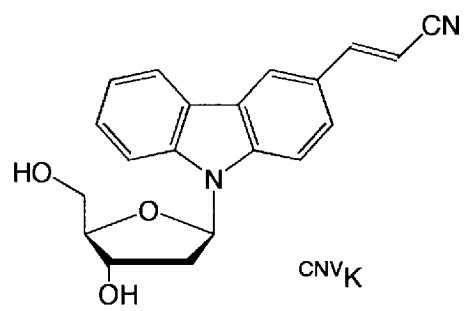
[請求項9] 塩基部分として、次の式I：

[化22]



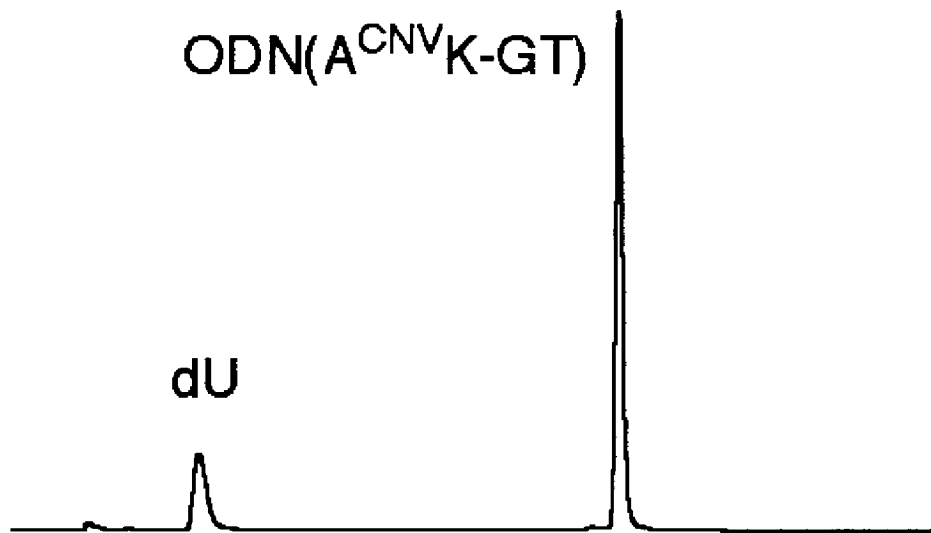
(ただし、式 I 中、R_aは、シアノ基、アミド基、カルボキシ基、C2～C7のアルコキシカルボニル基、又は水素であり、

R₁及びR₂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、又は水素である。)で表される基を有し、担体に固定された、光連結性核酸類(ただし、核酸類には、核酸、ペプチド核酸が含まれる)。

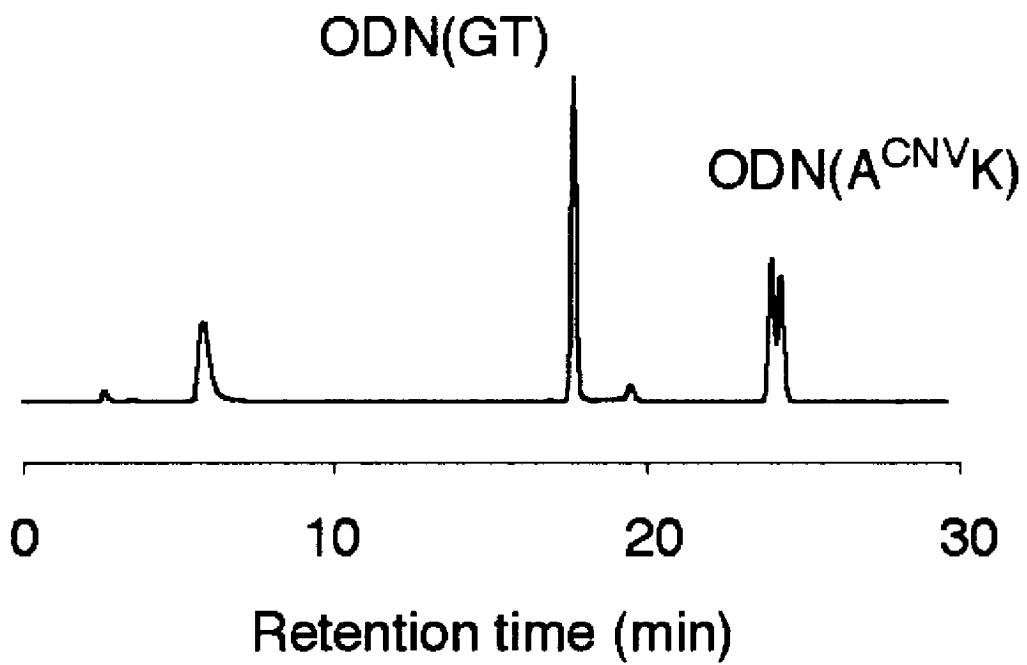
[]1]

[圖2]

(a) 0 min

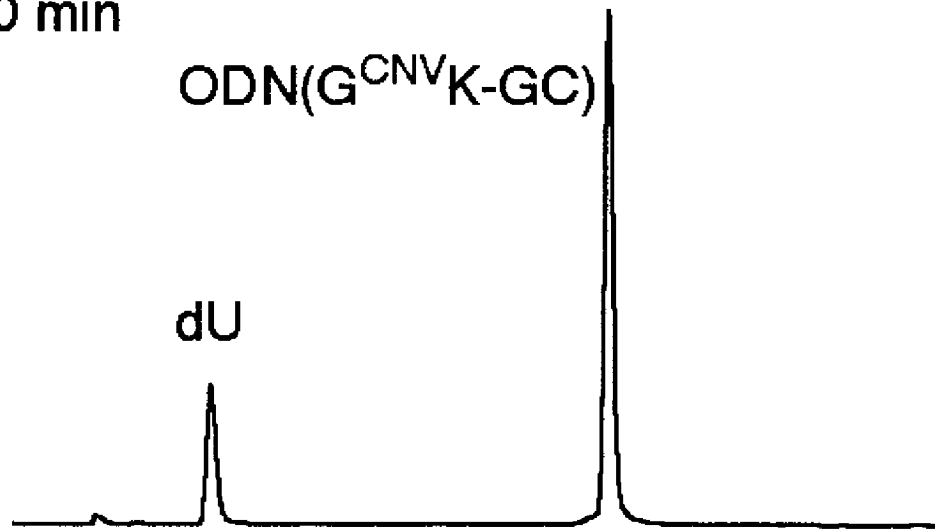


(b) 1 min

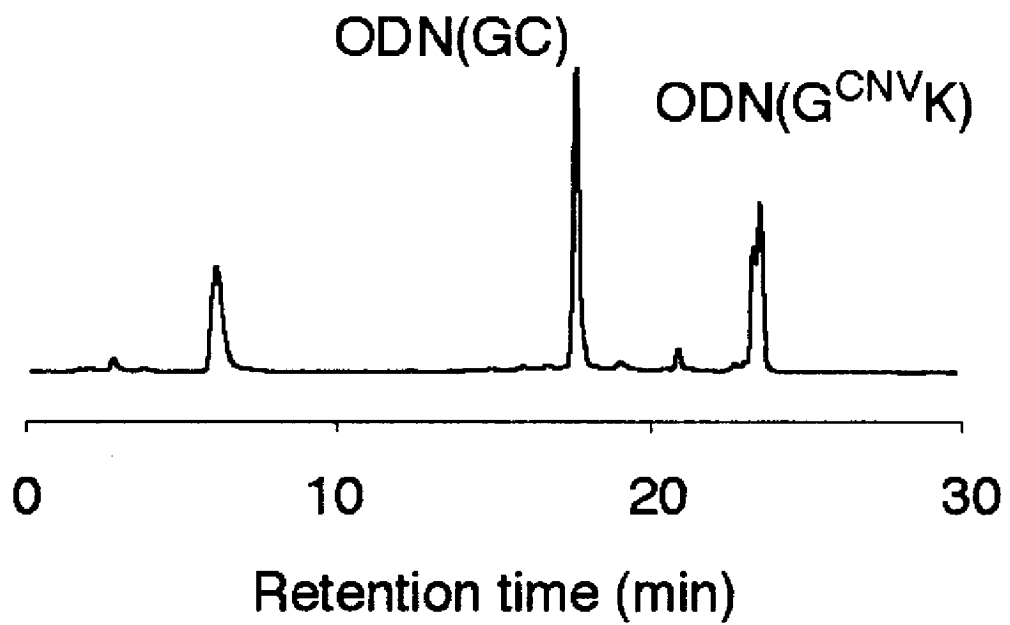


[圖3]

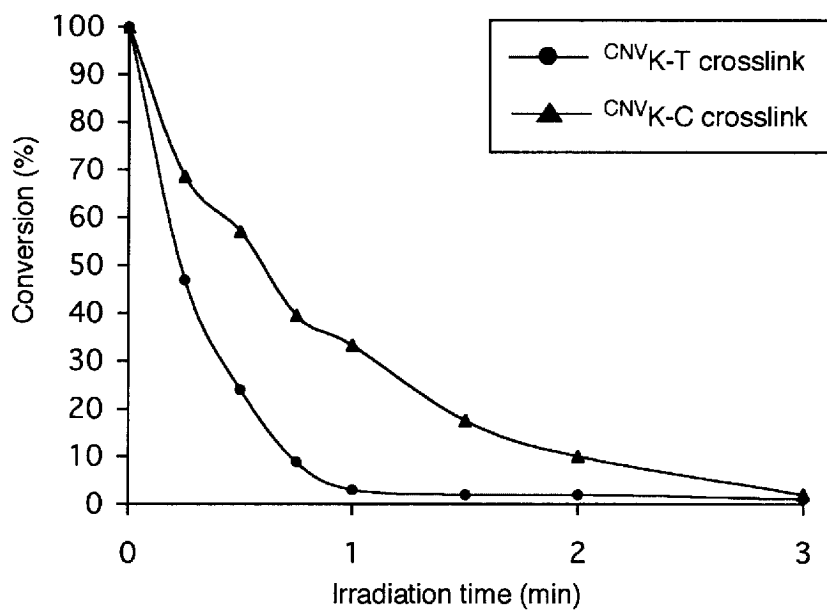
(a) 0 min



(b) 3 min

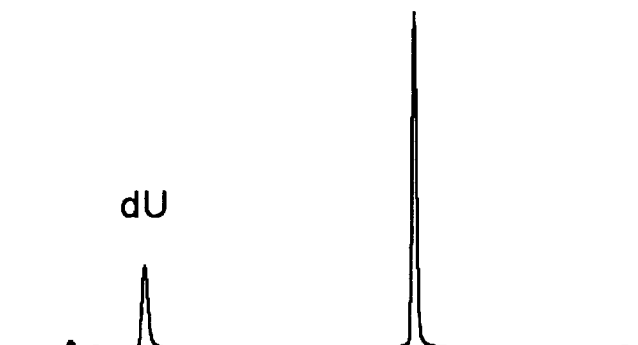


[図4]



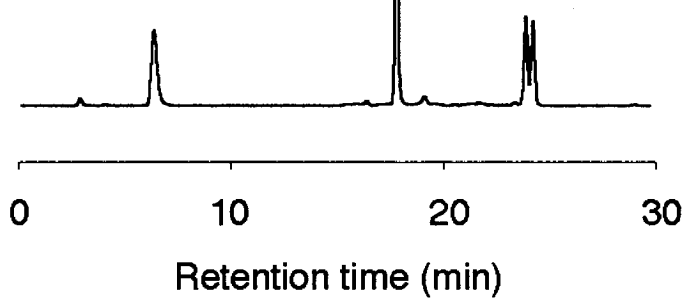
[図5]

(a) 0 min

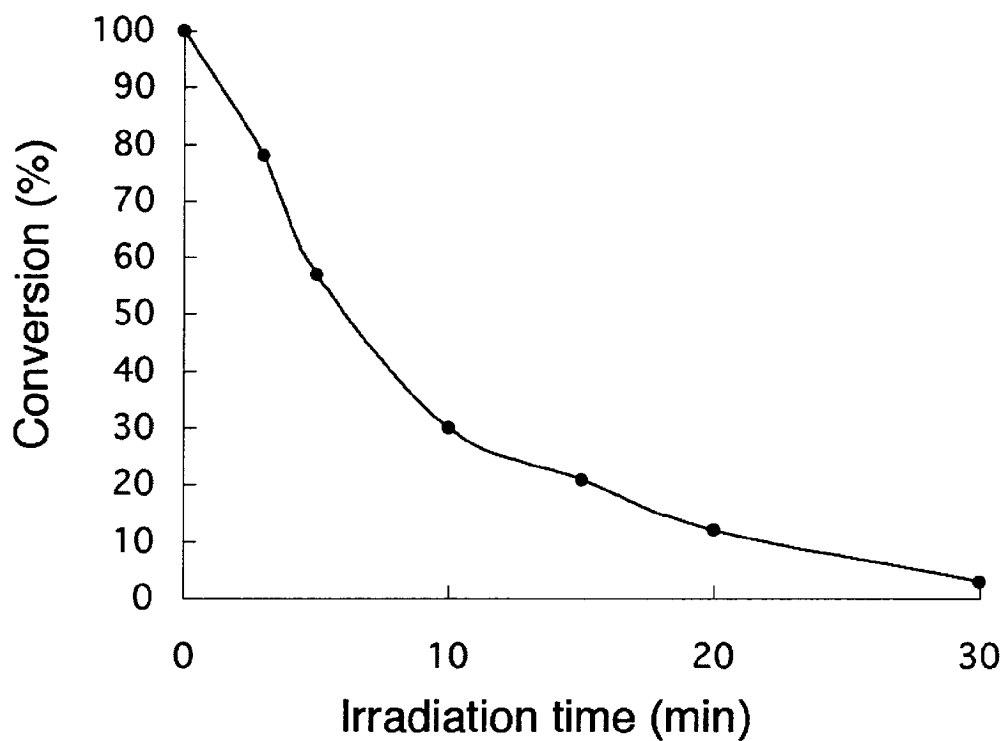
ODN(A^{CNV}K-GT)

(b) 30 min

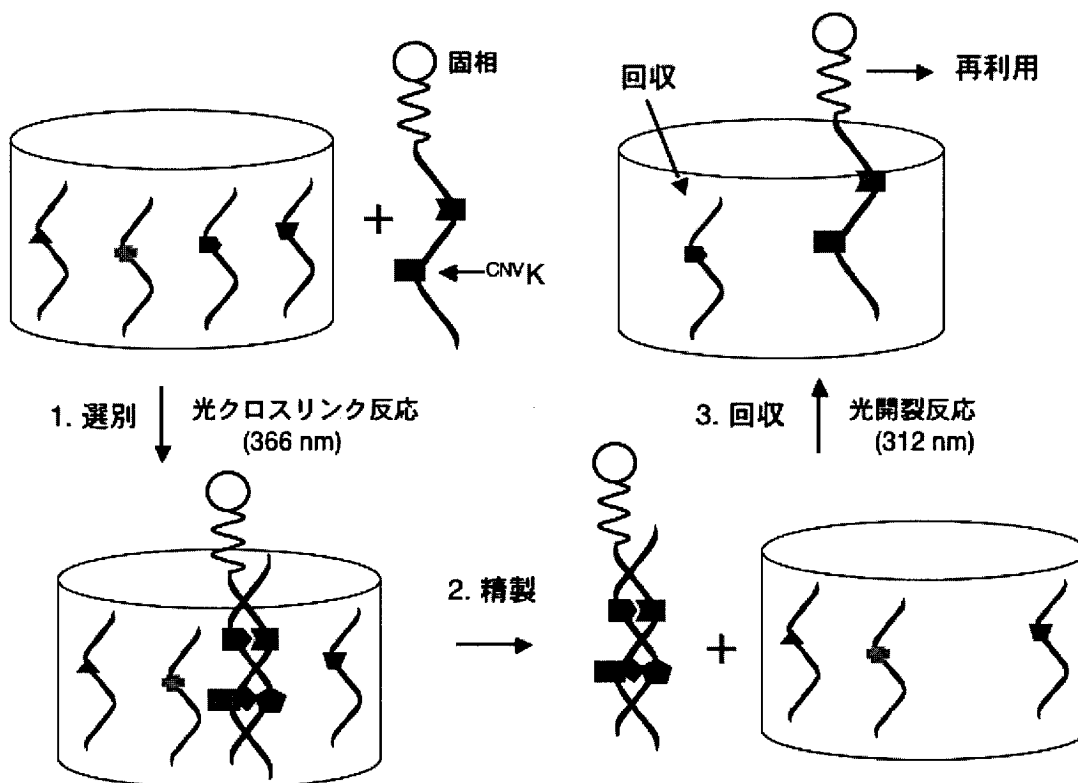
ODN(GT)

ODN(A^{CNV}K)

[図6]

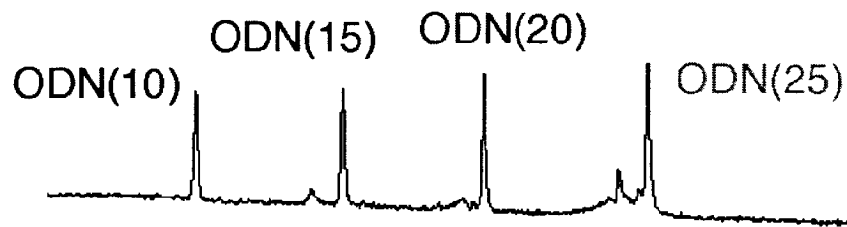


[図7]



[圖8]

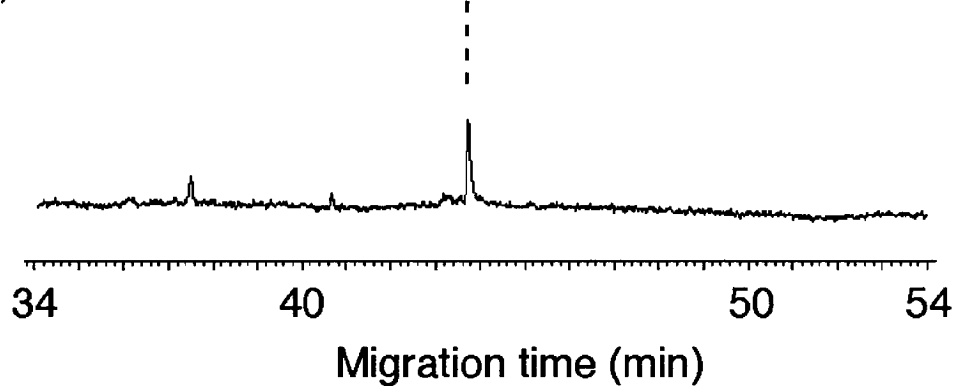
(a) 0 min



(b) 366 nm, 15 min, wash

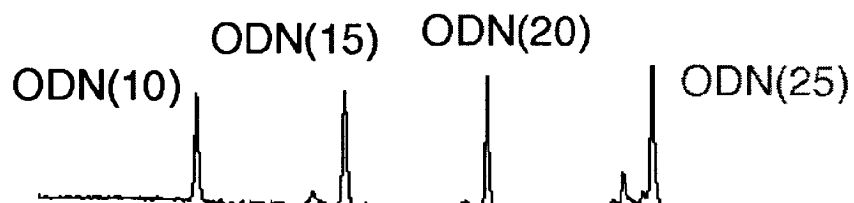


(c) 312 nm, 15 min

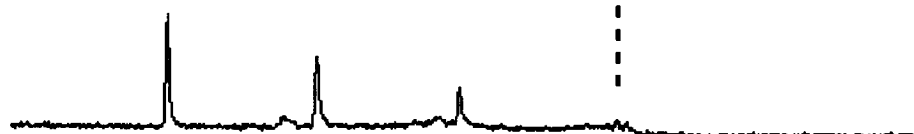


[圖9]

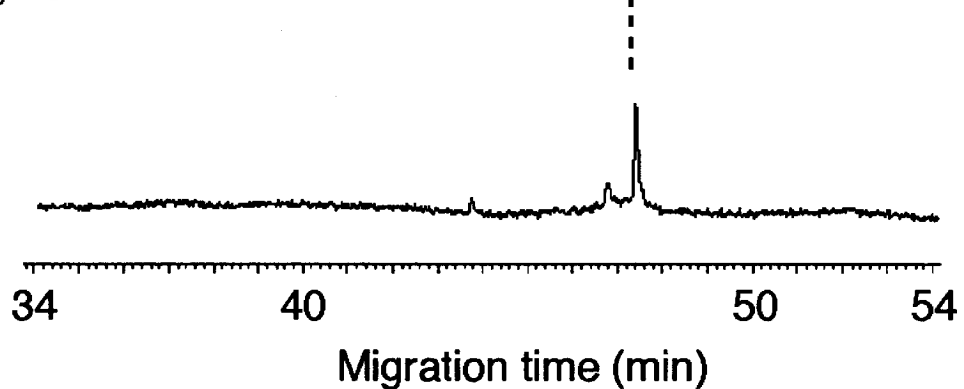
(a) 0 min



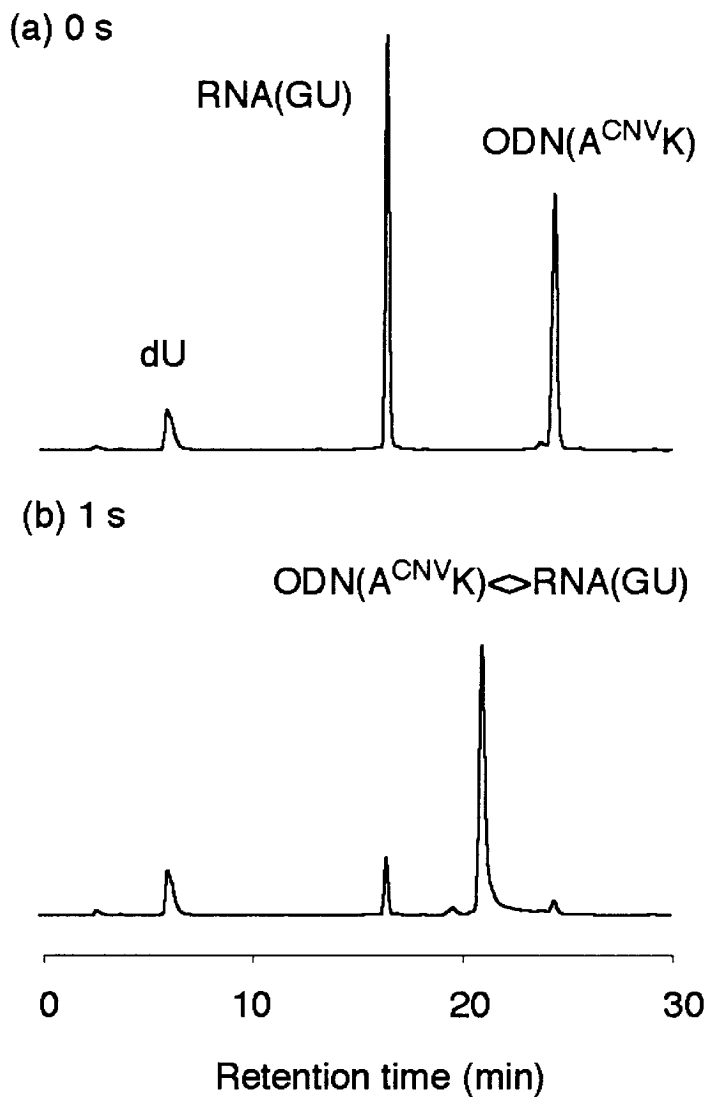
(b) 366 nm, 15 min, wash



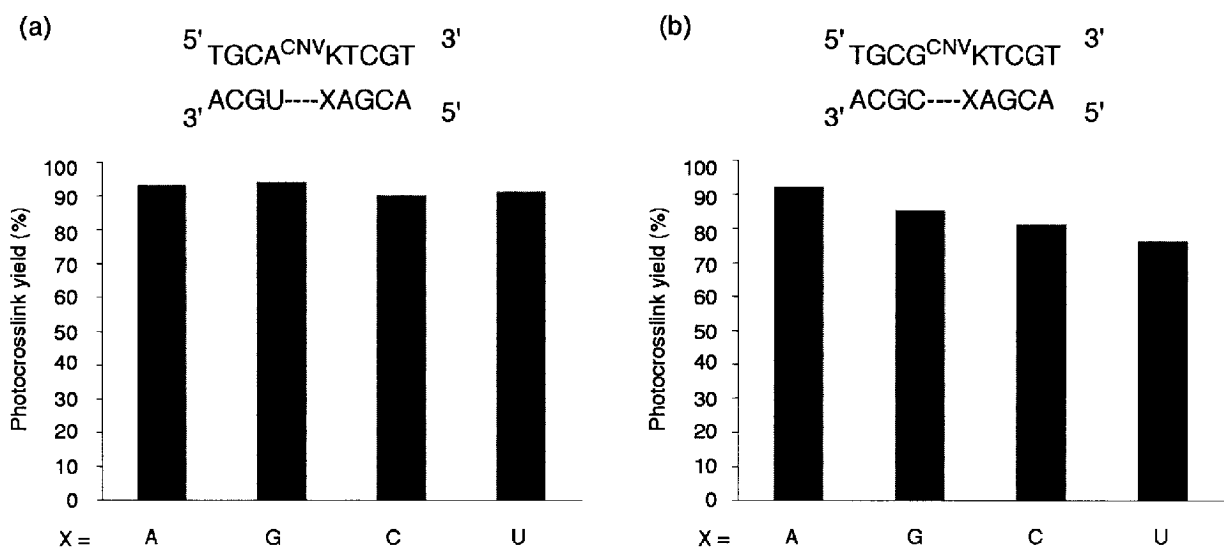
(c) 312 nm, 15 min



[Fig. 10]

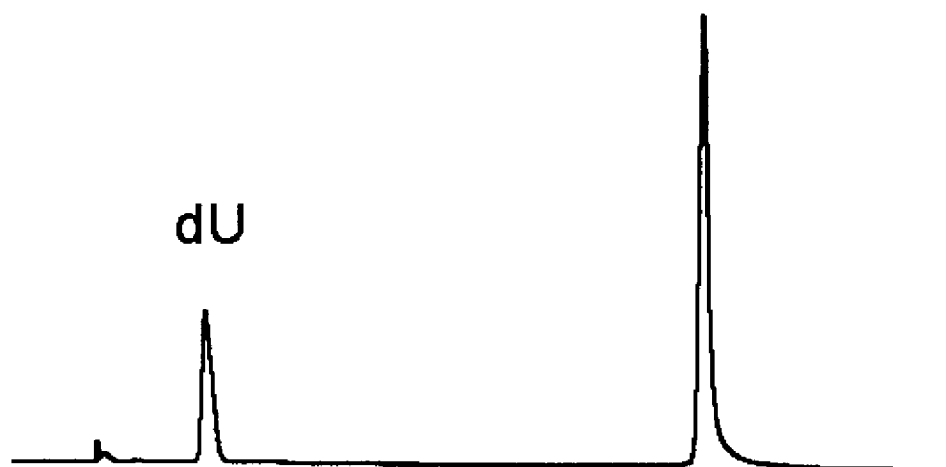


[Fig. 11]



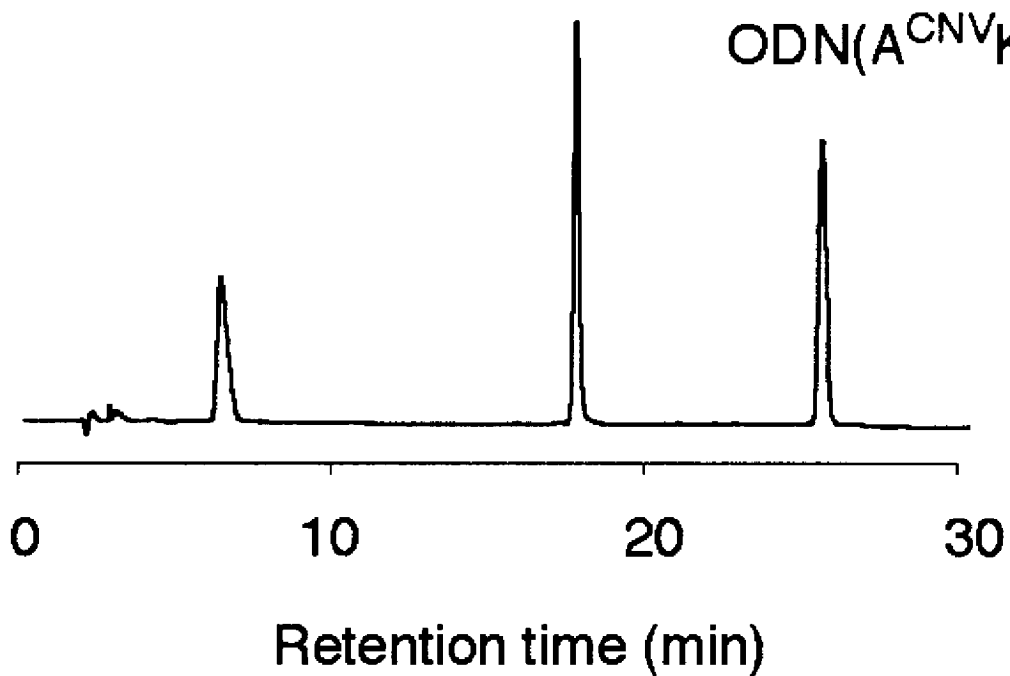
[圖12]

(a) 0 s

ODN(A^{CNV}K) \diamond RNA(GU)

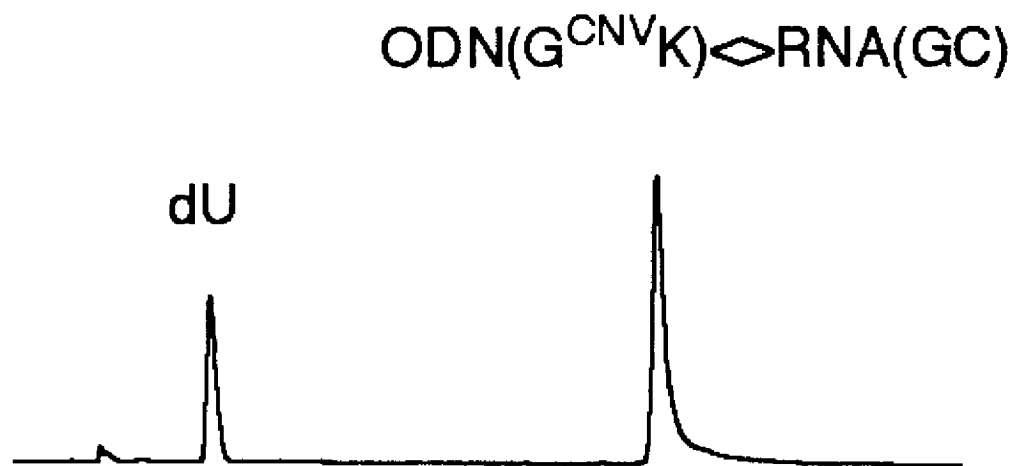
(b) 60 s

RNA(GU)

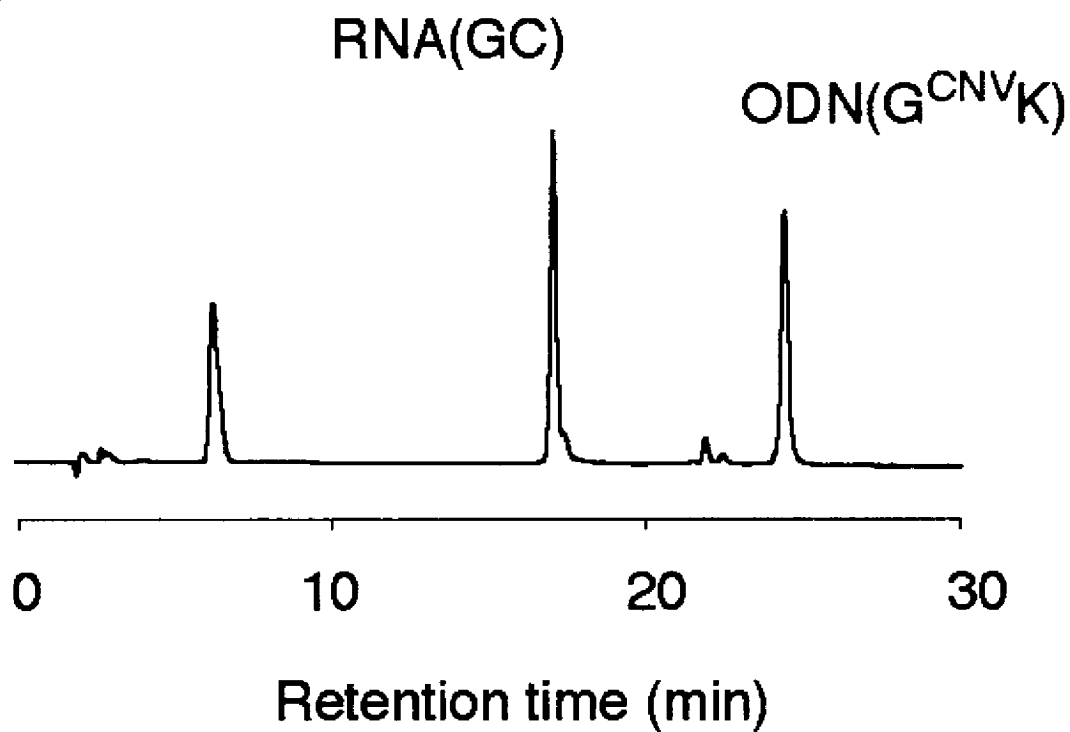
ODN(A^{CNV}K)

[圖13]

(a) 0 s



(b) 3 min



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/001747

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H21/04 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07H21/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAplus (STN), MEDLINE (STN), REGISTRY (STN), JSTPlus (JDreamII),

JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YOSHIMURA, Y., et al., Catalytic Repair of a Thymine Dimer in DNA via Carbazole Nucleoside, Chem. Lett., 35(4), pp.386-387 (2006)	1-9
A	Yoshinaga YOSHIMURA et al., "Carbazole Gan'yu Kakusan o Mochiita Thymine Dimer no Shokubaiteki Hikari Shufuku Hanno", Polymer Preprints, Japan, 55(2), page 4840 (Yoko Bango 2Pf152) (2006)	1-9
A	JP 2001-348398 A (Japan Science and Technology Corp.), 18 December, 2001 (18.12.01), & WO 2001/066556 A1 & JP 3753942 B2	1-9

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 May, 2009 (20.05.09)Date of mailing of the international search report
02 June, 2009 (02.06.09)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/001747

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2001-139594 A (Japan Science and Technology Corp.), 22 May, 2001 (22.05.01), & WO 2001/016151 A1 & EP 1125945 A1 & EP 1125945 B1 & US 6593088 B1 & DE 60002821 E & TW 239337 B1	1-9
A	Yoshiaki KYOI et al., "Hikari Otosei Cytosine Yudotai o Mochiita DNA Ichi Enki Tagata no Kenshutsu", 87th Annual Meeting on Chemical Society of Japan in Spring (2007) Koen Yokoshu II, page 1292 (Yoko Bango 2 J2-50) (2007)	1-9
A	Takehiro AMI et al., "Hikari Renketsusei o Motsu Keiko Enki o Fukumu Kakusan Gosei", 85th Annual Meeting on Chemical Society of Japan in Spring (2005) Koen Yokoshu II, page 1474 (Yoko Bango 1 PB-107) (2005)	1-9
P,X	YOSHIMURA, Y., et al., Ultrafast Reversible Photo-Cross-Linking Reaction: Toward in Situ DNA Manipulation, Org. Lett., 10(15), pp.3227-3230 (2008)	1-9
P,X	Yoshinaga YOSHIMURA et al., "Cyanovinyl Carbazole Gan'yu Kakusan o Mochiite Hikari Kagyakuteki DNA Cross Link Hanno", The Society of Polymer Science, Japan Hokuriku Shibu Kenkyu Happyo Koenkai Koen Yoshishu, 57, page 133 (2008)	1-9
P,A	Yoshinaga YOSHIMURA et al., "Hikari Zokanzai Gan'yu Kakusan o Riyo shita Hikari Kagyakuteki Idenshi Sosaho no Kaihatsu", The Society of Polymer Science, Japan Hokuriku Shibu Kenkyu Happyo Koenkai Koen Yoshishu, 57, page 136 (2008)	1-9
P,A	FUJIMOTO, K., et al., A Light-Controlled Reversible DNA Photoligation via Carbazole-Tethered 5-Carboxyvinyluracil, Org. Lett., 10(3), pp.397-400 (2008)	1-9

Claims 1-9:

Claims 1, 8 and 9 describe a photo-ligating nucleic acid. However, the statements relating to the photo-ligating nucleic acid are unclear for the reasons stated below. With regard to this point, the description is not described to such an extent that the meaning of the statements is fully supported by the description.

(1) It is described that the nucleic acid has a structure represented by formula (I) as a base moiety. However, this statement is unclear as to whether or not the base moiety is limited to the structure represented by formula (I) or as to whether or not there is any other structure that can be included within the scope of the base moiety.

(2) It is described that the nucleic acid includes a nucleic acid and a peptide nucleic acid. However, although the peptide nucleic acid includes those peptide nucleic acids of which structures and physical properties (including hybridization carried out in the operation step) may largely influence success or failure, it is only clearly stated that the structure of the peptide nucleic acid is similar to that of DNA or RNA and it is unclear as to what structure the peptide nucleic acid has or how degree the peptide nucleic acid resembles DNA or RNA in structure.

Therefore, the statements of claims 1-9 of the present application are unclear and include matters which are not fully supported by the description. For this reason, it cannot be considered that claims 1-9 are described clearly and satisfactorily to such an extent that persons skilled in the art can carry out the inventions of the present application (PCT Article 5 and PCT Article 6).

As stated above, the inventions of the present application are not fully supported. Thus, it should be noted that, for the preparation of this international search report, a search through the prior art was made only on a part of the description within a reasonable scope of burden in the light of the contents of the description.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07H21/04(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07H21/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国实用新案公報	1922-1996年
日本国公開实用新案公報	1971-2009年
日本国实用新案登録公報	1996-2009年
日本国登録实用新案公報	1994-2009年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus(STN), MEDLINE(STN), REGISTRY(STN),
JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	YOSHIMURA, Y., <i>et al.</i> , Catalytic Repair of a Thymine Dimer in DNA via Carbazole Nucleoside, Chem. Lett., 35(4), pp. 386-387 (2006)	1-9
A	吉村 嘉永ら, カルバゾール含有核酸を用いたチミンダイマーの触媒的光修復反応, 高分子学会予稿集, 55(2), p. 4840(予稿番号 2Pf152) (2006)	1-9

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20.05.2009

国際調査報告の発送日

02.06.2009

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

荒木 英 則

4 P

9736

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2001-348398 A (科学技術振興事業団) 2001. 12. 18, & WO 2001/066556 A1 & JP 3753942 B2	1 - 9
A	JP 2001-139594 A (科学技術振興事業団) 2001. 05. 22, & WO 2001/016151 A1 & EP 1125945 A1 & EP 1125945 B1 & US 6593088 B1 & DE 60002821 E & TW 239337 B1	1 - 9
A	京井 祥哲ら, 光応答性シトシン誘導体を用いたDNA一塩基多型の検出, 日本化学会第 87 春期年会(2007)講演予稿集 II, p. 1292(予稿番号 2 J2-50) (2007)	1 - 9
A	網 健裕ら, 光連結性を持つ蛍光塩基を含む核酸合成, 日本化学会第 85 春季年会(2005)講演予稿集 II, p. 1474(予稿番号 1 PB-107) (2005)	1 - 9
P X	YOSHIMURA, Y., <i>et al.</i> , Ultrafast Reversible Photo-Cross-Linking Reaction: Toward in Situ DNA Manipulation, <i>Org. Lett.</i> , 10(15), pp. 3227-3230 (2008)	1 - 9
P X	吉村 嘉永ら, シアノビニルカルバゾール含有核酸を用いて光可逆的 DNA クロスリンク反応, 高分子学会北陸支部研究発表講演会講演要旨集, 57, p. 133 (2008)	1 - 9
P A	吉村 嘉永ら, 光増感剤含有核酸を利用した光可逆的遺伝子操作法の開発, 高分子学会北陸支部研究発表講演会講演要旨集, 57, p. 136 (2008)	1 - 9
P A	FUJIMOTO, K., <i>et al.</i> , A Light-Controlled Reversible DNA Photoligation via Carbazole-Tethered 5-Carboxyvinyluracil, <i>Org. Lett.</i> , 10(3), pp. 397-400 (2008)	1 - 9

○請求項1から9について

請求項1、8、及び9には、光連結性核酸類に関し記載されている。しかし、当該記載は以下の点でその内容が不明確なものであり、また、この点に関する明細書において、当該記載が意味するところを十分に裏付けられるように記載されていない。

- (1) 式Iで表される構造が塩基部分として有するものであると記載されているが、このような記載では、塩基部分が式Iで表される構造のもののみであることを指すのか、あるいはその他にも塩基部分に含まれる構造が存在するのかが明らかではない。
- (2) 核酸類に核酸とペプチド核酸が含まれると記載されているが、このうちペプチド核酸に関しては、操作工程にハイブリダイズ等、構造と物性によってその成否が大きく影響を受けるものが含まれているにも関わらず、その構造がDNAやRNAに類似していることが明確になっているのみで、どのような構造を有しているか、どの程度類似していればよいかという点に関しては明らかではない。

したがって、本願の請求項1から9の記載は不明確なものであるとともに、明細書により十分な裏付けがなされていないものを含み、この点において当業者が本願発明を実施できる程度に明確かつ十分に記載されたものということができない（PCT5条及び6条）。

そして、本願発明はこのように十分な裏付けを欠くものであるから、国際調査報告の作成に際しては、明細書の記載からみて合理的な範囲のみを先行技術調査の対象として判断を示した点に留意されたい。