

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-254279

(P2009-254279A)

(43) 公開日 平成21年11月5日(2009.11.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 0 7 H 21/04 (2006.01)	C 0 7 H 21/04 C S P Z	4 C 0 5 7

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2008-106642 (P2008-106642)	(71) 出願人	304024430 国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学 石川県能美市旭台一丁目1番地
(22) 出願日	平成20年4月16日 (2008. 4. 16)	(71) 出願人	503360115 独立行政法人科学技術振興機構 東京都千代田区四番町5-3 サイエンス プラザ5F
		(74) 代理人	100102668 弁理士 佐伯 憲生
		(74) 代理人	100127133 弁理士 小坂橋 浩之
		(72) 発明者	藤本 健造 石川県能美市旭台1-50 大学宿舍A- 22

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸類の配列選択的な精製方法

(57) 【要約】

【課題】

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。

【解決手段】

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。

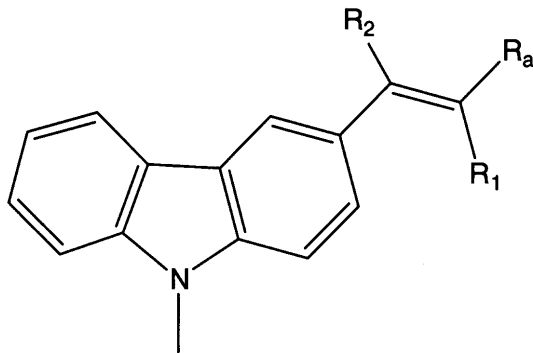
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

塩基部分として、次の式 I :

【化 1】



10

(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、

20

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

30

【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 ~ 380 nm 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。

40

【請求項 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、請求項 1 ~ 5 の何れかに記載の方法。

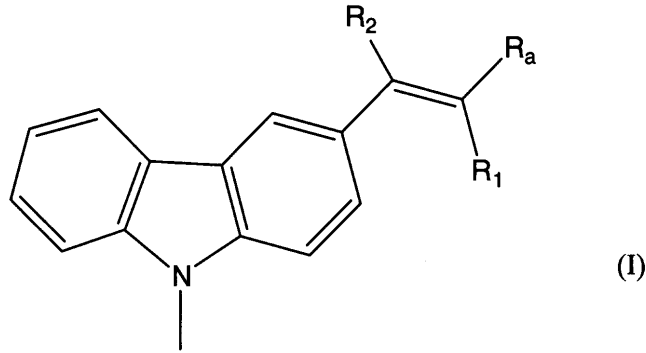
【請求項 7】

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 2】



10

(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。)

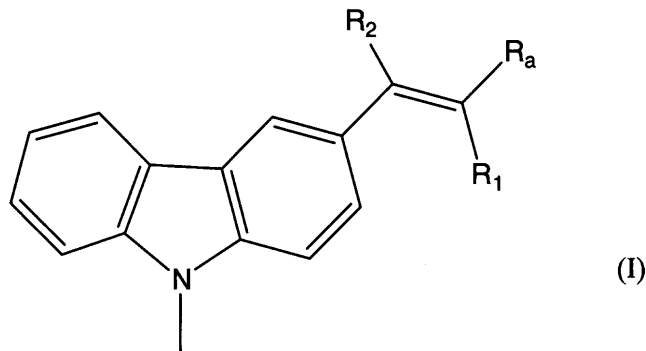
で表される基を有し、標識部位を備えている、光連結性核酸類(ただし、核酸類には、核酸、ペプチド核酸が含まれる)。

【請求項 9】

塩基部分として、次の式 I :

20

【化 3】



30

(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)。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【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】

50

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るれば、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。

10

【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のものであって、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。

20

【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。

30

【非特許文献1】Lambert, K. N.; Williamson, V. M. Nucleic Acids Res. 1993, 21, pp775-776.

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

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】

【0009】

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

50

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。

【0010】

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。

10

【0011】

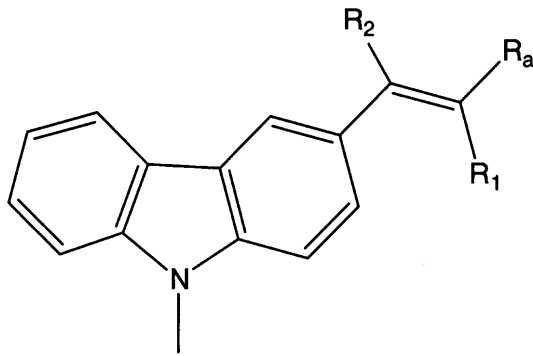
従って、本発明は次の[1]～[9]にある。

[1]

塩基部分として、次の式I：

【0012】

【化4】



20

【0013】

（ただし、式I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、又は水素であり、

30

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、

40

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。

50

[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、[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、310～345nm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]

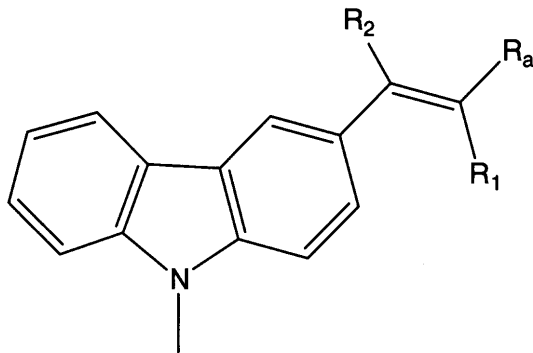
光連結させる工程が、緩衝作用のある塩を含む反応溶液中で行われる、[1]～[6]の何れかに記載の方法。

[8]

塩基部分として、次の式 I :

【 0 0 1 4 】

【 化 5 】



(I)

10

20

【 0 0 1 5 】

(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)。

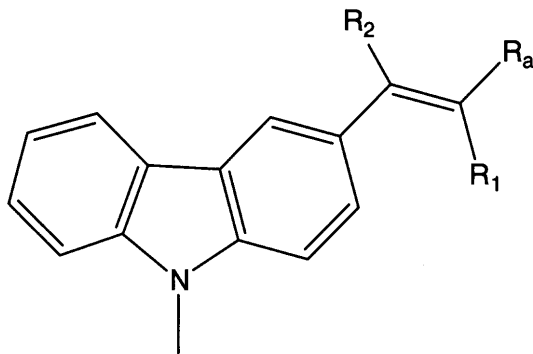
30

[9]

塩基部分として、次の式 I :

【 0 0 1 6 】

【 化 6 】



(I)

40

【 0 0 1 7 】

(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

50

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】

【0018】

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。

【0019】

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。

【0020】

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。

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

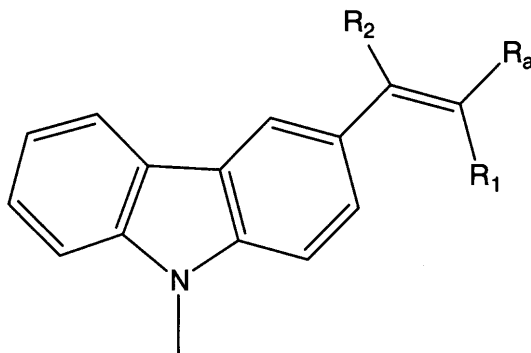
本発明の実施の形態を挙げて、本発明を以下に詳細に説明する。本発明は以下に例示された実施の形態に限定されるものではない。

【0022】

本発明は、塩基部分として、次の式I:

【0023】

【化7】



(I)

【0024】

(ただし、式I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、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。

【0025】

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。

【0026】

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。

10

【0027】

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。

20

【0028】

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、通常核酸の製造方法に準じて製造することができる。

【0029】

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。

30

【0030】

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。

40

【0031】

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。

50

【0032】

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。

【0033】

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、通常の製造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、他のいずれの部位に標識部分を有することもできる。

10

【0034】

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、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。

20

【0035】

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。

30

40

【0036】

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の方法（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。

【0037】

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

50

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。

【0038】

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 ~ 250 mMの範囲にあることが好ましく、特に10 ~ 100 mM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。

10

【0039】

光連結させる工程の光照射は、一般に350 ~ 380 nmの範囲、好ましくは360 ~ 370 nmの範囲、さらに好ましくは366 nmの波長を含む光が好ましく、特に好ましくは、366 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。

20

【0040】

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。

【0041】

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す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0.1 M 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。

30

40

【0042】

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。

【0043】

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

50

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ならず、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。

【0044】

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。

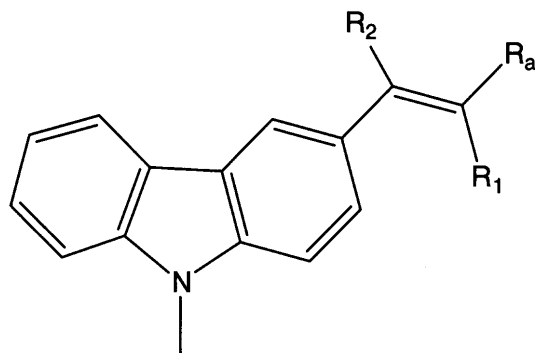
10

【0045】

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 :

【0046】

【化8】



(I)

20

30

【0047】

(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、光連結性核酸類である。

【0048】

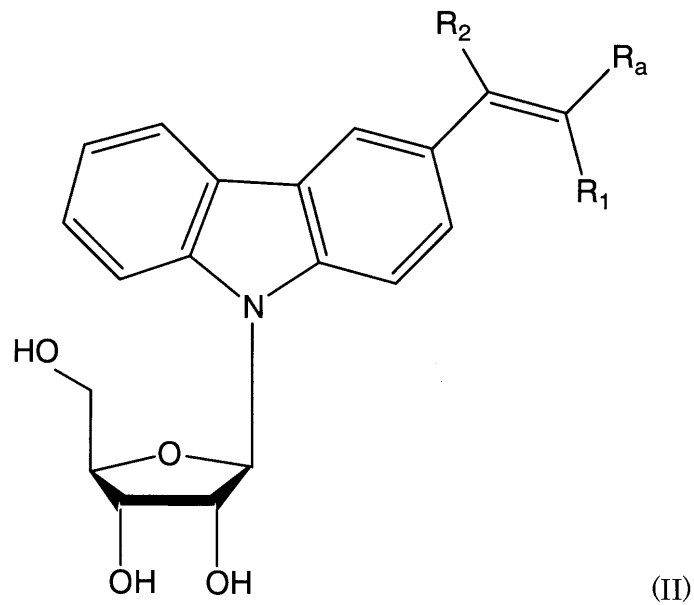
このような光連結性核酸類には、

次の式 II :

【0049】

40

【化 9】



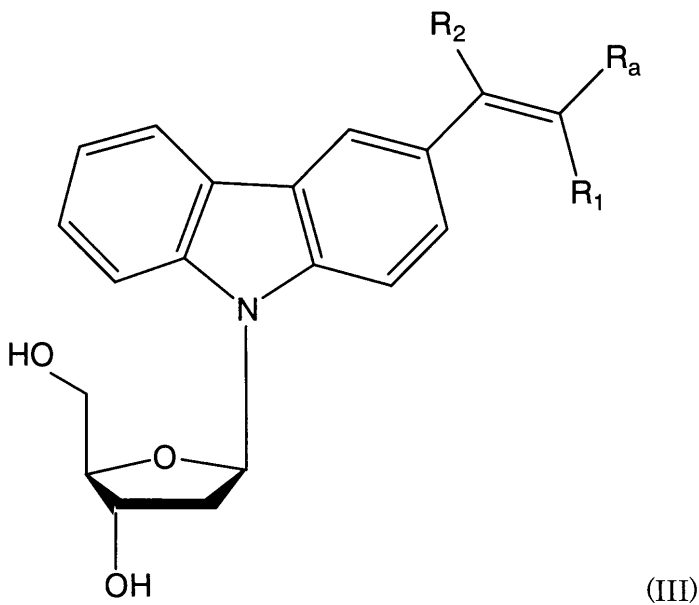
【0050】

(ただし、式 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(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 :

20

【0051】

【化 10】



30

40

【0052】

(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】

【0053】

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

50

のではない。

【 0 0 5 4 】

[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'-deoxyribose (^{CNV}K)の構造式を図1に示す。

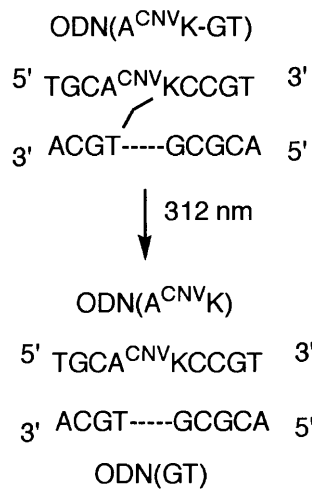
【 0 0 5 5 】

チミンとの光クロスリンク体であるODN(A^{CNV}K-GT) (20 μM)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 1)。その光反応物のHPLCの分析結果を図2に示す。同様に、シトシンとの光クロスリンク体であるODN(G^{CNV}K-GC) (20 μM)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 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。

10

【 0 0 5 6 】

【 化 1 1 】



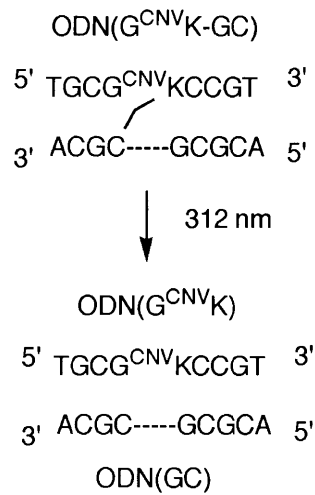
20

30

Scheme 1.

【 0 0 5 7 】

【化 1 2】



10

Scheme 2.

【 0 0 5 8】

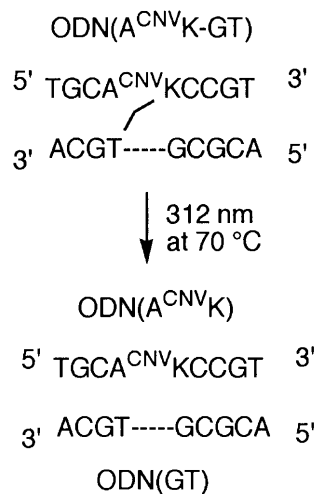
20

[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。水溶液中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。

【 0 0 5 9】

【化 1 3】



30

40

Scheme 3.

【 0 0 6 0】

[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。

【 0 0 6 1】

50

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 $^{\circ}\text{C}$ 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。

【 0 0 6 2 】

ODN1(^{CNV}K)-PS: 5' -ATGA^{CNV}KGCGT-SSS-PS-3'

ODN2(^{CNV}K)-PS: 5' -GTAA^{CNV}KTTC-SSS-PS-3'

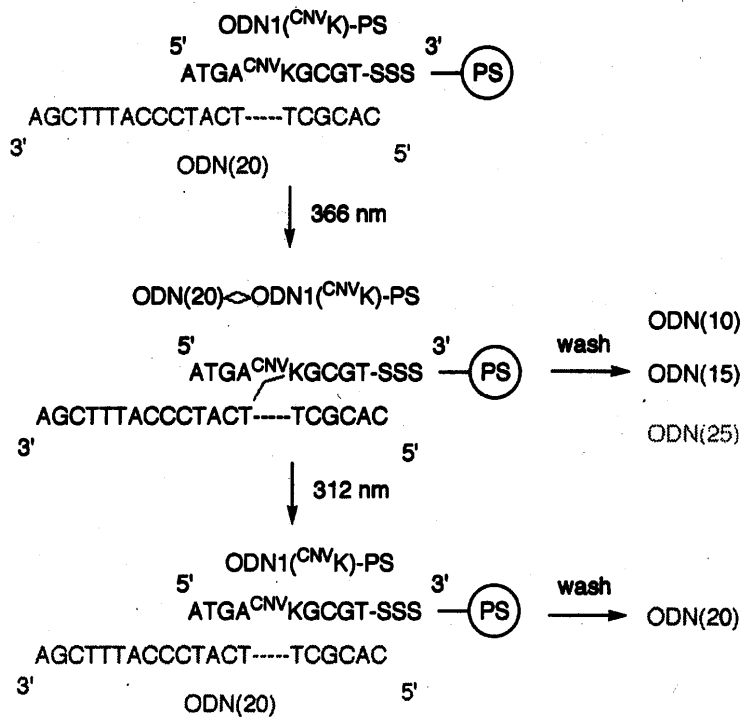
【 0 0 6 3 】

Scheme 4に従い、固相を用いたDNAの配列選択的精製を行った。

【 0 0 6 4 】

【 化 1 4 】

ODN(10) 3'-ACTTTTGCGC-5'
 ODN(15) 3'-ATCCTCTTTCCCGAT-5'
 ODN(25) 3'-TATGGGAAATAGCTCATTGAAGGCG-5'



Scheme 4.

【 0 0 6 5 】

ODN(10)、ODN(15)、ODN(20)、ODN(25)に対してODN1(^{CNV}K)-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(^{CNV}K)-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(CGE)で分析した(図8(a))。

【 0 0 6 6 】

この反応溶液に対して、0 $^{\circ}\text{C}$ 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))。

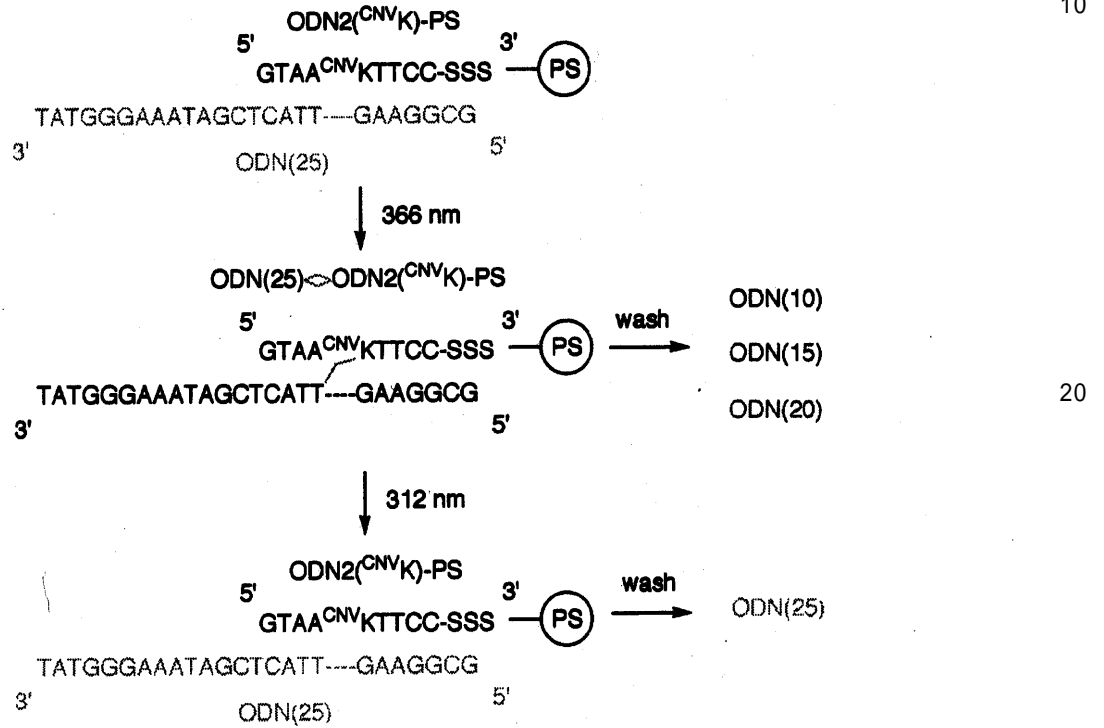
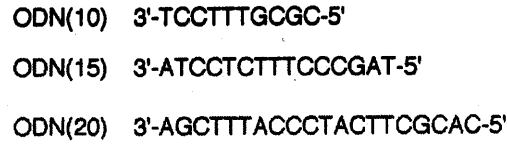
ODN1(^{CNV}K)-PSを用いた際に目的とするODN(20)を回収することができた。

【 0 0 6 7 】

Scheme 5に従い、固相を用いたDNAの配列選択的精製を行った。

【 0 0 6 8 】

【 化 1 5 】



Scheme 5.

30

【 0 0 6 9 】

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 μM、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 μLとした。光照射前の反応溶液をCGEで分析した(図9(a))。

【 0 0 7 0 】

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 μL)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。

【 0 0 7 1 】

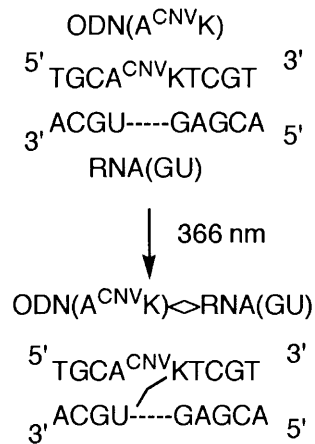
[4. CNVKを含むODNを用いたRNAとの光クロスリンク反応]

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 μM)とRNA(GU) (20 μM)の光クロスリンク反応を行った(sodium cacodylate 50 mM, NaCl 100 mM, total volume: 30 μL)。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。

50

【 0 0 7 2 】

【 化 1 6 】



10

Scheme 6.

【 0 0 7 3 】

[5. CNVKを含むODNを用いた8種類の光クロスリンク反応]

20

^{CNV}K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、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。

30

【 0 0 7 4 】

[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^{CNV}K)⟨⟩RNA(GU)あるいはODN(G^{CNV}K)⟨⟩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^{CNV}K)⟨⟩RNA(GU): [(M + H)⁺] 5675.74, found 5675.25.

calcd. for ODN(G^{CNV}K)⟨⟩RNA(GC): [(M + H)⁺] 5690.75, found 5690.68.

【 0 0 7 5 】

ODN(A^{CNV}K)⟨⟩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 1 2 に示す。同様に、ODN(G^{CNV}K)⟨⟩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 1 3 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。

40

【 0 0 7 6 】

【化17】

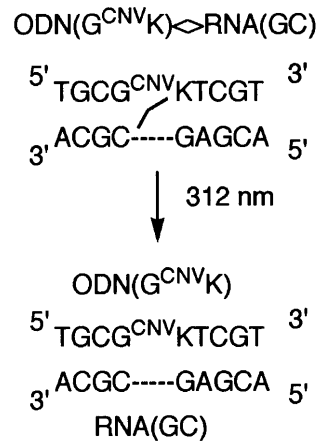


10

Scheme 7

【0077】

【化18】



20

30

Scheme 8.

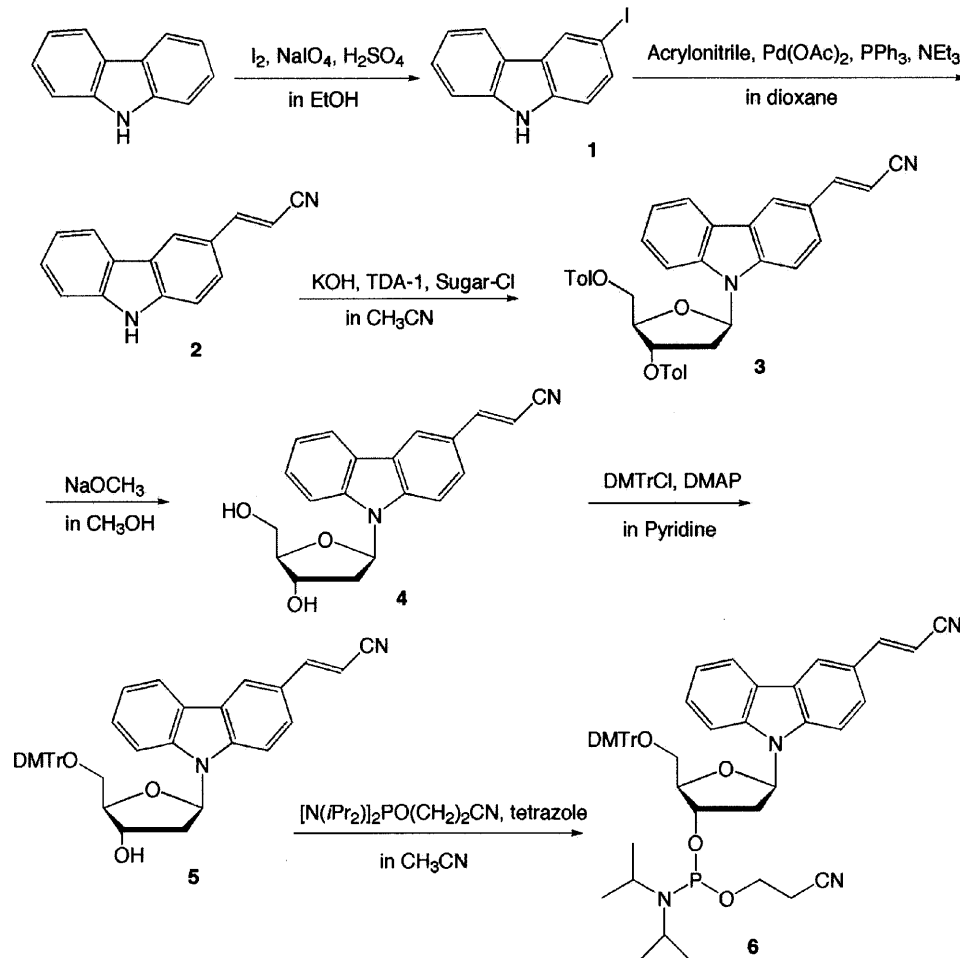
【0078】

[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。

【0079】

【化 19】



Scheme 9

【 0 0 8 0 】

[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°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-diiiodocarbazole (0.47 g, 7.5%) を得た。

1: $^1\text{H NMR}$ (DMSO-d_6) 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-Diiiodocarbazole: $^1\text{H NMR}$ (DMSO-d_6) 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).

【 0 0 8 1 】

[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: $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) 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).

【 0 0 8 2 】

[3-Cyanovinylcarbazole-1' - -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。

10

3: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) 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 $\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5\text{Na}$ [(M+ Na) $^+$] 593.2053, found 593.2018.

20

【 0 0 8 3 】

[3-Cyanovinylcarbazole-1' - -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: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) 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 $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$ [(M+ Na) $^+$] 357.1215, found 357.1265.

30

【 0 0 8 4 】

[5' -O-(4,4' -dimethoxytrityl)-3-Cyanovinylcarbazole-1' - -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 μmol)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 (13 mg, 61%)を得た。

40

5: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) 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 $\text{C}_{41}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_5\text{Na}$ [(M+ Na) $^+$] 659.2522, found 659.2485.

【 0 0 8 5 】

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

50

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'-tetraisopropylphosphorodiamidite (52 μ L, 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 時間撹拌した。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。

【 0 0 8 6 】

[3 - シアノビニルカルバゾール - 1 ' - - デオキシリボシド (^{CNV}K) を含有する O D N の合成] (Synthesis of ODN containing 3-cyanovinylcarbazole-1' - -deoxyribose (^{CNV}K))

10

下記に示す^{CNV}K を含むODN を合成した。

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

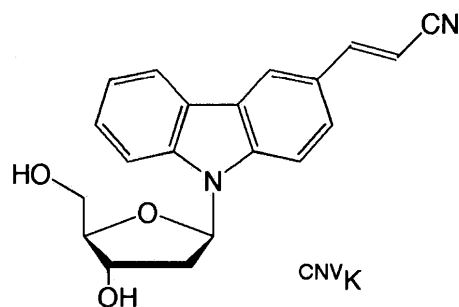
ODN(G^{CNV}K): 5' -TGCG^{CNV}KCCGT-3'

ODN(C^{CNV}K): 5' -TGCC^{CNV}KCCGT-3'

ODN(T^{CNV}K): 5' -TGCT^{CNV}KCCGT-3'

【 0 0 8 7 】

【 化 2 0 】



20

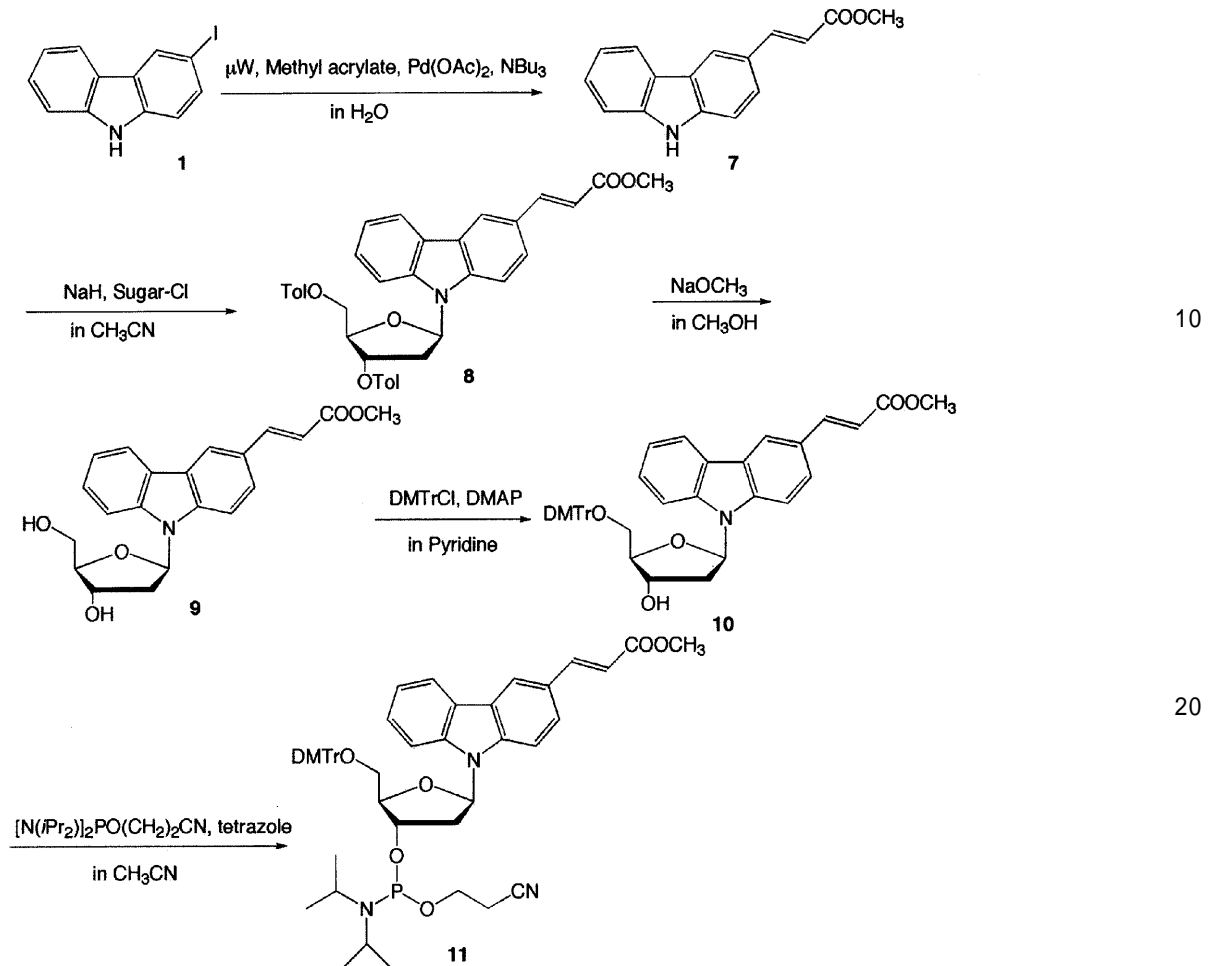
【 0 0 8 8 】

次のScheme 10 に従い合成を進めた。

【 0 0 8 9 】

30

【化 2 1】



Scheme 10

【 0 0 9 0】

[3-Methoxycarbonylvinylcarbazole (7)]

Palladium acetate (38.0 mg, 0.17 μ mol) の DMF 溶液 (0.25 mL) に 1 (0.50 g, 1.71 mmol) と Tributylamine (0.41 μ L, 1.71 mmol) と Methyl acrylate (0.38 mL, 4.27 mmol) と H₂O (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 °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: ¹H NMR (CDCl₃) 8.26 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 8.07 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 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).

【 0 0 9 1】

[3-Methoxycarbonylcarbazole-1'-beta-D-ribofuranoside-3',5'-di-(p-toluoylester) (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 (HexH : AcOEt = 4 : 1) で精製し、白色粉末として 8 (0.98 g, 71%) を得た。

【 0 0 9 2】

[3-Methoxycarbonylcarbazole-1'-beta-D-ribofuranoside (9)]

10

20

30

40

50

8 (0.96 g, 1.59 mmol) のメタノール溶液 (46 mL) に 0.5 M methanolic NaOMe (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) 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).

【 0 0 9 3 】

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

ピリジン (1.0 mL × 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 μmol) のピリジン溶液 (2.2 mL) を加えて、反応溶液を室温で 6 時間攪拌した。TLC (CHCl₃ : 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 (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) 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).

【 0 0 9 4 】

[5' -O-(4,4' -dimethoxytrityl)-3-methoxycarbonylvinylcarbazole-1' - -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。

【 0 0 9 5 】

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

ODN (AX) (5' -TGCA^{OHV}KCCGT-3' , X = 9) と ODN (GX) (5' -TGCG^{OHV}KCCGT-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^{OHV}K), ODN (G^{OHV}K), ODN (A^{OMeV}K), ODN (G^{OMeV}K) の DNA を逆相 HPLC 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.

10

20

30

40

50

【 0 0 9 6 】

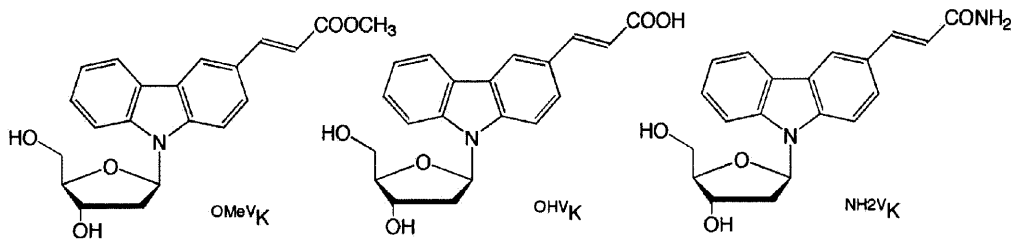
下記に示す NH_2VK を含むODNを合成した。

ODN($\text{A}^{\text{NH}_2\text{VK}}$): 5' -TGCA NH_2VK KCCGT-3'

ODN($\text{G}^{\text{NH}_2\text{VK}}$): 5' -TGCG NH_2VK KCCGT-3'

【 0 0 9 7 】

【 化 2 2 】



10

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 9 8 】

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

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 9 9 】

【 図 1 】 図 1 は光応答性核酸である3-cyanovinylcarbazole-1'-deoxyriboside (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。

30

【 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 9 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。

40

【 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。

【 図 1 】

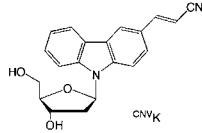


Figure 1. Structure of 3-cyanovinylcarbazole-1'-β-deoxyribose.

【 図 2 】

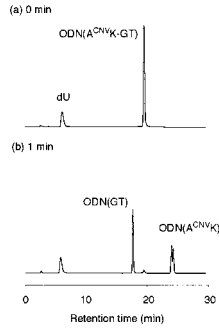


Figure 2. HPLC analysis.

【 図 3 】

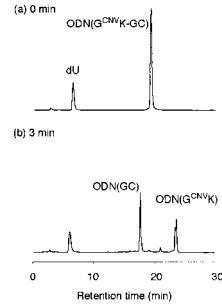


Figure 3. HPLC analysis.

【 図 4 】

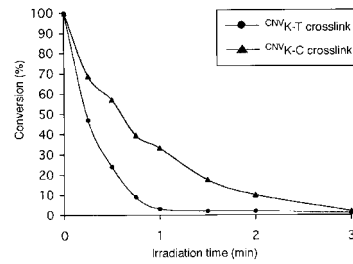


Figure 4. Time course of photosplitting of ODN(A^{CNVK}-GT) (●) and ODN(G^{CNVK}-GC) (▲).

【 図 5 】

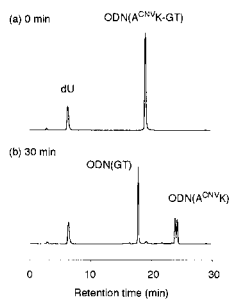


Figure 5. HPLC analysis.

【 図 7 】

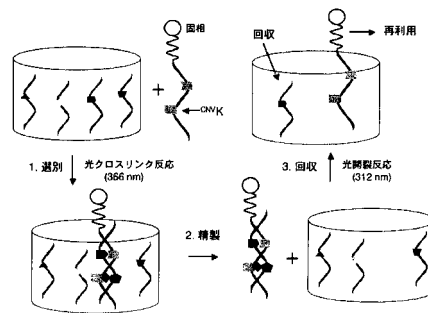


Figure 7. Strategy for the sequence specific purification of DNA.

【 図 6 】

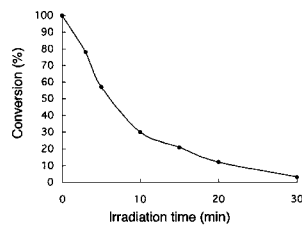


Figure 6. Time course of photosplitting of ODN(A^{CNVK}-GT).

【 図 8 】

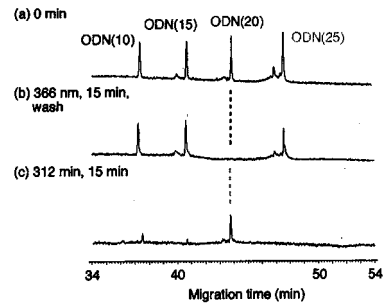


Figure 8. CGE analysis.

【 図 9 】

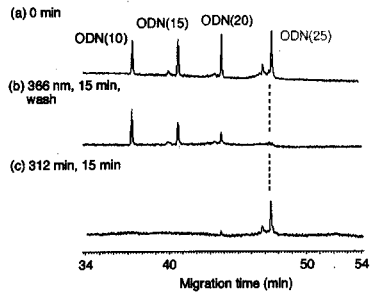


Figure 9. CGE analysis.

【 図 1 0 】

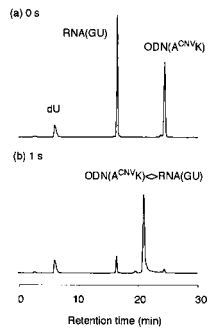


Figure 10. HPLC analysis.

【 図 1 3 】

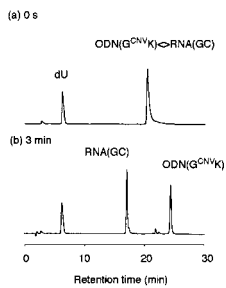


Figure 13. HPLC analysis.

【 図 1 1 】

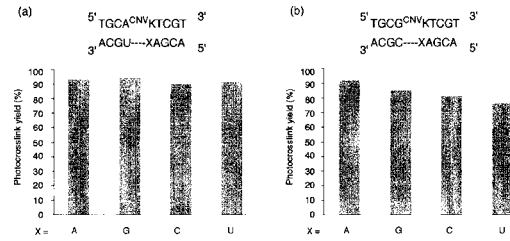


Figure 11. Photocrosslinking reaction of various sequences.

【 図 1 2 】

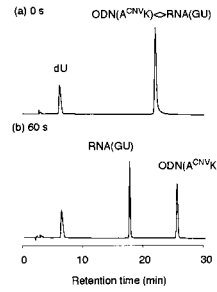


Figure 12. HPLC analysis.

フロントページの続き

(72)発明者 吉村 嘉永

石川県石川郡野々市町栗田4 - 9 8 - 2 シティハウス202号室

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA11 HA12 HA13

4C057 BB02 CC03 DD01 MM04