

(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



(10) 国際公開番号

WO 2011/019031 A1

(43) 国際公開日

2011年2月17日(17.02.2011)

- (51) 国際特許分類:  
C07H 19/20 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/063529
- (22) 国際出願日: 2010年8月10日(10.08.2010)
- (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 2009-187917 2009年8月14日(14.08.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社日立製作所 (HITACHI, LTD.) [JP/JP]; 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 Tokyo (JP). 国立大学法人群馬大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION GUNMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒3718510 群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地 Gunma (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): ▲桑▼原正靖 (KUWAHARA Masayasu) [JP/JP]; 〒3768515 群馬県桐生市天神町一丁目5番1号 国立大学法人群馬大学内 Gunma (JP). 梶山智晴 (KAJIYAMA Tomoharu) [JP/JP]; 〒1858601 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社日立製作

所 中央研究所内 Tokyo (JP). 神原秀記 (KAMBARA Hideki) [JP/JP]; 〒1858601 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社日立製作所 中央研究所内 Tokyo (JP).

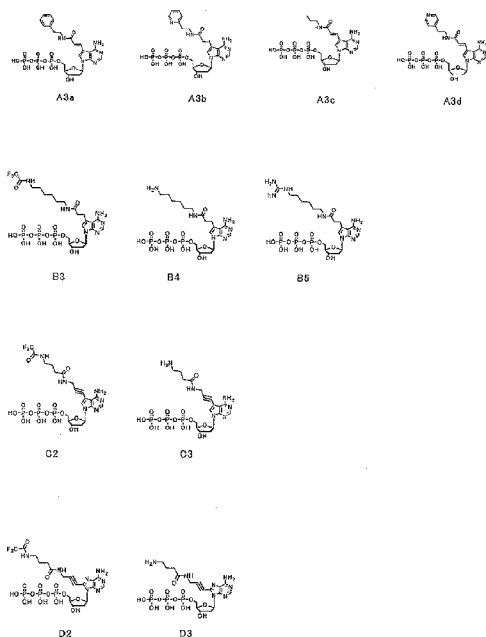
- (74) 代理人: 平木祐輔 (HIRAKI Yusuke); 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町M Tビル19階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, 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 (AL, 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, SM, TR), OAPI (BF,

[続葉有]

(54) Title: METHOD AND REAGENT FOR GENE SEQUENCE ANALYSIS

(54) 発明の名称: 遺伝子配列解析法及び試薬

[図1]



(57) Abstract: Disclosed is a nucleic acid which has nucleic acid substrate characteristics equivalent to those of dATP, has a low specificity for luciferase, exerts no undesirable effect on enzymatic reactions such as synthesis of a complementary chain and, therefore, is particularly suitable for the pyrosequencing method. As a nucleic acid substrate complementary to base T, a 7-substituted deoxyribonucleotide triphosphate, which is modified with a substituent at the 7-position of the purine group, is used as a substitute for a nucleotide α-thiotriphosphate analog.

(57) 要約: dATP と同等の核酸基質特性を持ち、ルシフェラーゼに対する基質性が低く、相補鎖合成などの酵素反応に悪影響を及ぼさない、特にパイロシーケンシング法に適した核酸基質を提供する。塩基 T に相補的な核酸基質として、ヌクレオチド α-チオ三リン酸アナログの代わりに、プリン基の 7 位が置換基で修飾された 7-置換基-デオキシリボヌクレオチド三リン酸を用いる。

WO 2011/019031 A1

BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, — 明細書の別個の部分として表した配列リスト  
SN, TD, TG). (規則 5.2(a))

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

## 明 細 書

### 発明の名称： 遺伝子配列解析法及び試薬

#### 技術分野

[0001] 本発明は、核酸分析及び遺伝子の塩基配列解析の方法に関するものであり、詳しくは遺伝子配列解析、遺伝子多型解析、遺伝子変異解析及び遺伝子発現解析の方法に関する。

#### 背景技術

[0002] DNA塩基配列決定にはゲル電気泳動と蛍光検出を用いた方法が広く用いられている。この方法ではまず、配列解析を行おうとするDNA断片のコピーを多数作製する。DNAの5'末端を始点として種々の長さの蛍光標識断片を作製する。また、これらDNA断片の3'末端の塩基種に応じて波長の異なる蛍光標識を付加しておく。ゲル電気泳動により長さの違いを1塩基の差で識別し、それぞれの断片群が発する発光を検出する。発光波長色から測定中のDNA断片群のDNA末端塩基種を知る。DNAは短い断片群から順次蛍光検出部を通過するので、蛍光色を計測することで短いDNAから順に末端塩基種を知ることができる。これにより、配列決定をする。このような蛍光式DNAシーケンサーは幅広く普及しており、また、ヒトゲノム解析にも大いに活躍した。この方法では、内径50 $\mu$ m程度のガラス細管を、多数本用い、さらに末端検出等の方法を利用し、一台あたりの解析処理数を増加する技術が開示されている（例えば非特許文献1）。

[0003] 一方、パイロシーケンシングに代表される段階的化学反应による配列決定法（例えば特許文献1及び特許文献2）は、取り扱いの簡便性から注目されている。図13（1）は、その手順を示した例である。概略は以下の通りである。ターゲットとするDNA鎖にプライマーをハイブリダイズさせ、4種の相補鎖合成核酸基質（dATP、dCTP、dTTP、dGTP）を1種類ずつ順番に反応液中加入して相補鎖合成反応を行う。図13（1）では、プライマーの3'末端に接続する核酸基質は、ターゲット上の塩基C 131と相補的であるdGTPである。そのため、

他の核酸基質（dATP、dGTP、dTTP）では伸長が生じない。反応溶液中に加えて、伸長に使用されなかった核酸基質は、アピラーゼを代表とする核酸基質分解酵素により分解される。図13（1）のdGTP注入時の様に、相補鎖合成反応が起きるとDNA相補鎖が伸長し、副産物としてピロリン酸(PPi)が生成する。この際の反応式を、図13（2）に示している。ピロリン酸は共存する酵素の働きでATPに変換され、ルシフェリンとルシフェラーゼの共存下で反応して発光（生物発光）を生じる。

[0004] 各基質注入ごとの発光を図示すると、例として図14となる。通常、この発光プロファイルを用いて、加えた核酸基質ごとに発生する発光を解析することにより、加えた相補鎖合成基質がDNA鎖に取り込まれたか否かがわかり、相補鎖の配列情報、従ってターゲットとなったDNA鎖の配列情報がわかる。

[0005] 相補鎖合成核酸基質の1種であるdATPが、生物発光の基質であるATPと類似構造をもつため、ルシフェラーゼの基質として振舞うことが知られている。これは、背景発光信号となり、検出感度を低下させる。対策として、ナイレンらはdATPの代わりにdATPのアナログ物質、具体的にはdATP  $\alpha$  Sの利用を開示している（特許文献1）。

[0006] 上述のナイレンらの方法は、パイロシーケンシングにおいて背景発光を低減し、解析時の発光検出性能の向上に貢献した。しかし、dATP  $\alpha$  Sを含むヌクレオチド  $\alpha$  -チオ三リン酸アナログを用いる方法の欠点もある。その一つは、リン酸基部分のRp異性体による酵素活性阻害である。これは、詳しくはナイレンらが開示している（特許文献3、及び非特許文献2）が、Rp異性体がポリメラーゼ活性を阻害している可能性があること、及びRp異性体はアピラーゼでは分解できないことである。ナイレンらは、その対策として、まずSp異性体のみを精製して利用する技術を開示している。また、余剰のSp異性体がアピラーゼでヌクレオチド  $\alpha$  -チオ三リン酸アナログに分解された後、その一部が酵素によりヌクレオチド  $\alpha$  -チオ三リン酸アナログに再合成される際に、Sp/Rp異性体の合成確立は50%ずつであるため、Rp異性体が合成され蓄積されてしまう課題に対し、Rp異性体をアルカリホスファターゼにより分解し

、除去している。ネイレンらは、この方法により、Rp異性体によるポリメラーゼ伸長阻害を回避できることを開示している。

[0007] さらに、dATPの代わりに用いる核酸基質として、7-デアザ-2'-デオキシアデノシン三リン酸 (C<sup>7</sup>dATP) を用いる方法が、エリクソンらにより開示されている (非特許文献3)。C<sup>7</sup>dATPは、アデニン基の7位の窒素を、炭素に換えたものである。そのため、三リン酸構造はdATPと同じであり、アピラーゼで容易に分解される。即ち、従来技術であるヌクレオチド $\alpha$ -チオ三リン酸アナログとは異なり、酵素阻害の要因と考えられている光学異性体は存在しない。そのため、エリクソンらは、酵素阻害のない核酸配列解析が可能であることを開示している。

[0008] 一方、ピロリン酸からATPを生成する反応にAPSを用いているが、これもルシフェラーゼ反応の基質となり、背景発光を与える。そのため、高感度でDNA塩基配列決定を実施するためには、APSを使用しない方法が望まれる。これを可能とする方法として、酵素ピルビン酸リン酸ジキナーゼ (PPDK) の逆反応を用いて、AMPとPPiをATPに合成する反応を利用した塩基配列決定法が開示されている (特許文献4)。これは、従来技術では背景発光成分として指摘されていたAPSを利用しないため、背景発光を格段に低減することを可能とし、高感度検出が達成されている。

### 先行技術文献

#### 特許文献

- [0009] 特許文献1：国際公開パンフレット第98/13523号  
特許文献2：国際公開パンフレット第98/28440号  
特許文献3：特表2004-508054号  
特許文献4：特開2007-97471号

#### 非特許文献

- [0010] 非特許文献1：Anal. Chem. 72:15, 3423-3430, 2000  
非特許文献2：Anal. Biochem. 301, 82-90, 2002  
非特許文献3：Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 23:10, 1583-15

94, 2004

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0011] 以上に述べた通り、従来のパイロシーケンシング法では、実質的にdATP $\alpha$ Sを含むヌクレオチド $\alpha$ -チオ三リン酸アナログを用いることが必要であった。しかし、dATP $\alpha$ Sを含むヌクレオチド $\alpha$ -チオ三リン酸アナログを用いることによる難点も明らかになってきた。
- [0012] その一つは、上述したとおり、ヌクレオチド $\alpha$ -チオ三リン酸アナログのRp異性体がポリメラーゼ活性を阻害することであり、ナイレンらにより対策が提案されている。ここでは、Sp異性体だけを精製してdATP $\alpha$ S（以下、Sp-dATP $\alpha$ S）を利用している。
- [0013] 一方、本発明者らの研究から、Sp-dATP $\alpha$ Sを用いた核酸伸長反応では、DNA 3'末端への核酸基質の取り込み効率が悪く、本来取り込まれるべき核酸基質が取り込まれず、相補鎖合成において一部のDNA相補鎖分子に未伸長（伸長未完）が発生してしまうという問題が判明した。この一部DNA分子の未伸長の発生は、特に、解析対象にTの連続塩基、つまりPoly（T）領域が含まれる場合に、読み取り塩基長の短小化など解析精度の低下を招く。それゆえ、未伸長率の低減が必要であることがわかった。
- [0014] またC<sup>7</sup>dATPを用いる技術については、本発明者らの研究から、C<sup>7</sup>dATPとATPの類似性が高いため、C<sup>7</sup>dATPがルシフェラーゼの基質として振舞うことが確認された。そのため、C<sup>7</sup>dATPをパイロシーケンシング法に応用した場合、塩基伸長反応の検出感度を、大きく低下させることが判明した。
- [0015] 従って、本発明の課題は、dATPと同等の核酸基質特性を持ち、ルシフェラーゼに対する基質性が低く、相補鎖合成などの酵素反応に悪影響を及ぼさない、特にパイロシーケンシング法に適した核酸基質を提供することである。

### 課題を解決するための手段

- [0016] 本発明者らはdATPのアナログ（dATP $\alpha$ Sを含むヌクレオチド $\alpha$ -チオ三リン酸アナログ）ではなく、dATPのアデニン基を他のプリン誘導体に変えた物質

を新しく合成し、応用した。即ち、水素結合に寄与している6位のアミノ基が結合している構造を保存した条件で、他のプリン誘導体に替えたものを新しく合成し、ルシフェラーゼの基質になりやすく、配列解析に利用できるものを選定した。その結果、鋳型核酸試料の塩基T（チミン）に対する相補核酸基質として、プリン基の7位が置換基で修飾された7-置換基-デオキシリボヌクレオチド三リン酸を用いることにより、上記課題が解決できることを見出した。

[0017] すなわち、本発明は、以下の発明を包含する。

[0018] (1) 核酸試料を鋳型とし、塩基AGTCに対する相補的核酸基質を加えて相補鎖合成を行う工程、該相補鎖合成で生成するピロリン酸から酵素によりATPを生成させる工程、及びルシフェラーゼ反応で生じる化学発光を検出して相補鎖合成の有無を判定する工程、を含む核酸分析方法であって、塩基Tに対する相補的核酸基質として、プリン基の7位が置換基で修飾された7-置換基-デオキシリボヌクレオチド三リン酸を用いることを特徴とする前記核酸分析方法。

[0019] (2) 塩基Tに対する相補的核酸基質として、エテニル基(C-C二重結合)、エチレン基(C-C単結合)又はエチニル基(C-C三重結合)を介して、プリン基の7位が置換基で修飾された7-置換基-デオキシリボヌクレオチド三リン酸を用いる、(1)に記載の核酸分析方法。

[0020] (3) 塩基Tに対する相補的核酸基質として、エテニル基(C-C二重結合)を介してプリン基の7位が置換基で修飾された7-置換基-デオキシリボヌクレオチド三リン酸を用いる、(2)に記載の核酸分析方法。

[0021] (4) プリン基の7位の置換基が芳香族基を含む置換基である、(1)～(3)のいずれかに記載の核酸分析方法。

[0022] (5) 芳香族基が、塩基性芳香族基である、(4)に記載の核酸分析方法。

[0023] (6) プリン基の7位が置換基で修飾された7-置換基-デオキシリボヌクレオチド三リン酸を含む、塩基Tに対する相補的核酸基質試薬。

[0024] (7) エテニル基(C-C二重結合)、エチレン基(C-C単結合)又はエチニル基(C-

(C三重結合)を介して、プリン基の7位が置換基で修飾された7-置換基-デオキシリボヌクレオチド三リン酸を含む、(6)に記載の試薬。

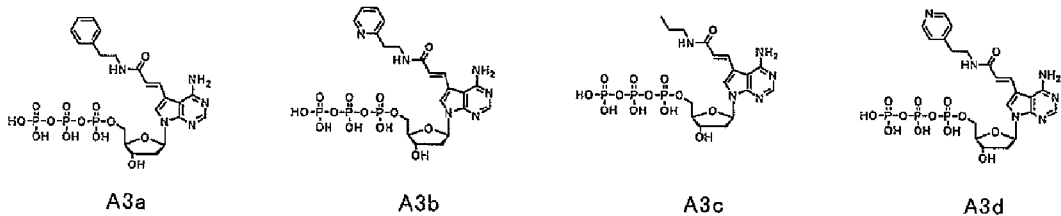
[0025] (8) エテニル基(C-C二重結合)を介してプリン基の7位が置換基で修飾された7-置換基-デオキシリボヌクレオチド三リン酸を含む、(7)に記載の試薬。

[0026] (9) プリン基の7位の置換基が芳香族基を含む置換基である、(6)~(8)のいずれかに記載の試薬。

[0027] (10) 芳香族基が、塩基性芳香族基である、(9)に記載の試薬。

[0028] (11) 以下：

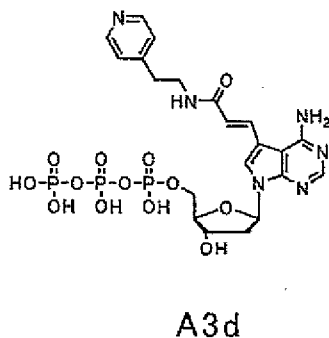
[化1]



から選択される化合物。

[0029] (12) 以下の式：

[化2]



で表される化合物。

[0030] (13) パイロシーケンシング法において使用するための、(6)~(10)のいずれかに記載の試薬。

[0031] 本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2009-187917号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。



## 発明の効果

- [0032] 本発明は、従来技術の様に三リン酸部分を改変していないため、段階的化学反应による配列決定法において課題であった、dATPアナログの使用により相補鎖合成反応が十分に進まず未伸長DNA鎖が共存してしまうという問題が回避される。その結果、誤信号が発生する影響を除去できるため、解析精度が格段に向上する。特にチミンの連続塩基を含む核酸試料の配列解析に有効である。
- [0033] また、反応効率を上げることにより未伸長となるDNA鎖を低減できるため、段階的化学反应による配列決定法においては、使用する核酸基質量の低減や、各反応段階での基質除去プロセスの簡便化が可能となる。従って、洗浄などによって基質を除去している場合は洗浄試薬量の低減が期待できる。

## 図面の簡単な説明

- [0034] [図1]実施例で合成した11種類の新規核酸基質候補を示す。
- [図2]核酸基質A種の合成方法（フロー）を示す。
- [図3]核酸基質B種の合成方法（フロー）を示す。
- [図4]核酸基質C種の合成方法（フロー）を示す。
- [図5]核酸基質D種の合成方法（フロー）を示す。
- [図6]基質として、ATP、dATP、及びdATP $\alpha$ Sを分注した場合の発光量を示す。
- [図7]合成した核酸基質について、ルシフェラーゼに対する基質特異性を測定した結果を示す。
- [図8]合成基質と塩基Tとの親和性を評価した結果を示す。
- [図9]dATP $\alpha$ SとA3cの発光プロファイルを比較したグラフを示す。
- [図10]各合成基質について、他の塩基（G, C, A）との排他性を評価した結果を示す。
- [図11]各合成基質の連続塩基Tへの取り込み性能を評価した結果を示す。
- [図12]各合成基質の連続塩基Tへの取り込み性能を評価した結果を示す。
- [図13]パイロシーケンシングに代表される段階的化学反应による配列決定法の手順を示す。

[図14]各基質注入ごとの発光を示す。なお、ACTGの順に基質を添加した。

[図15]段階的化学反应による配列決定法において、dATPの代替に合成塩基A3dを用いた場合とdATP $\alpha$ Sを用いた場合を比較した結果を示す。(1)はdATP代替として合成基質A3dを用いた場合であり(2)はdATP代替として合成基質dATP $\alpha$ Sを用いた場合である。

[図16]dATPの代替として合成塩基A3d(最終濃度2 $\mu$ M)を用いた場合の配列解析結果を示す。dATP代替として合成基質A3d(最終濃度2 $\mu$ M)を用いた場合である。

[図17]dATPの代替として基質dATP $\alpha$ S(最終濃度2 $\mu$ M)を用いた場合の配列解析結果を示す。dATP代替として、dATP $\alpha$ S(最終濃度2 $\mu$ M)を用いた場合である。

[図18]dATPの代替として基質G<sup>7</sup>dATP(最終濃度2 $\mu$ M)を用いた場合の配列解析結果を示す。dATP代替として、G<sup>7</sup>dATP(最終濃度2 $\mu$ M)を用いた場合である。

[図19]dATPの代替として基質dATP $\alpha$ S(最終濃度4 $\mu$ M)を用いた場合の配列解析結果を示す。dATP代替として、dATP $\alpha$ S(最終濃度4 $\mu$ M)を用いた場合である。

[図20]dATPの代替として基質G<sup>7</sup>dATP(最終濃度4 $\mu$ M)を用いた場合の配列解析結果を示す。dATP代替として、G<sup>7</sup>dATP(最終濃度4 $\mu$ M)を用いた場合である。

### 発明を実施するための形態

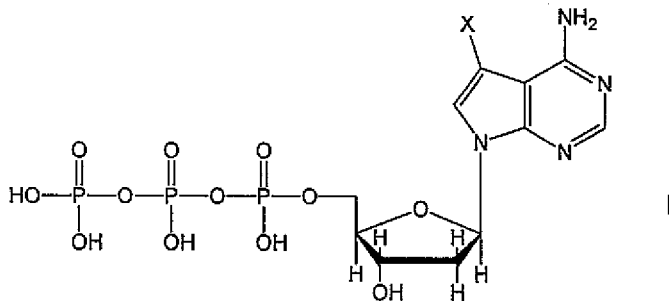
[0035] 本発明は、核酸試料を鋳型とし、塩基AGTCに対する相補的核酸基質を加えて相補鎖合成を行う工程、該相補鎖合成で生成するピロリン酸から酵素(例えば、ATPスルフリラーゼ及びピルビン酸リン酸ジキナーゼ)によりATPを生成させる工程、及びルシフェラーゼ反応で生じる化学発光を検出して相補鎖合成の有無を判定する工程を含む核酸分析方法、好ましくはパイロシーケンシング法において、塩基Tに対する相補的核酸基質として、プリン基の7位が置換基で修飾された7-置換基-デオキシリボヌクレオチド三リン酸を用いることを特徴とする。

[0036] 塩基AGTCに対する相補的核酸基質とは、鋳型である核酸試料の相補鎖合成

において、鋳型中の塩基AGTCのそれぞれに対応して、合成される相補鎖中に取り込まれる核酸基質をさす。核酸基質には、デオキシリボヌクレオチド三リン酸及びその誘導体が含まれる。通常、塩基Tに対する相補的核酸基質としては、dATP（デオキシアデノシン三リン酸）及びその誘導体を使用でき、塩基Aに対する相補的核酸基質としては、dTTP（チミジン三リン酸）及びその誘導体を使用でき、塩基Gに対する相補的核酸基質としては、dCTP（デオキシシチジン三リン酸）及びその誘導体を使用でき、塩基Cに対する相補的核酸基質としては、dGTP（デオキシグアノシン三リン酸）及びその誘導体を使用できる。核酸基質としてはdNTP（dATP、dGTP、dCTP、dTTP）のほか、ddNTPを用いることもできる。

[0037] 本発明は、塩基Tに対する相補的核酸基質として、プリン基の7位が置換基で修飾された7-置換基-デオキシリボヌクレオチド三リン酸を用いることを特徴とする。プリン基の7位が置換基で修飾された7-置換基-デオキシリボヌクレオチド三リン酸としては、プリン基の6位にアミノ基を有し、プリン基の7位の窒素が炭素で置換されており、該炭素が置換基を有するものが好ましい。従って、以下の式Iの構造（式中、Xは置換基を表す）を有するものが好ましい。

[化3]

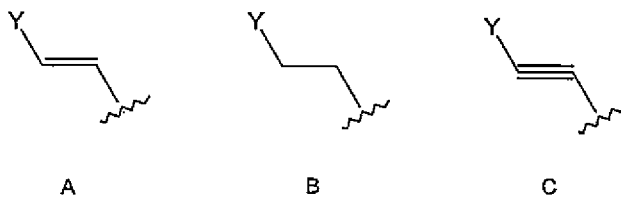


[0038] また、塩基Tに対する相補的核酸基質として、エテニル基(C-C二重結合)、エチレン基(C-C単結合)又はエチニル基(C-C三重結合)を介して、プリン基の7位が置換基で修飾された7-置換基-デオキシリボヌクレオチド三リン酸を用いることが好ましい。当該核酸基質は、ルシフェラーゼの基質性が、ATPと比

較して低く、核酸のチミン（T）と相補的であり、核酸のグアニン（G）及びシトシン（C）とは排他的である点で優れている。

[0039] エテニル基(C-C二重結合)、エチレン基(C-C単結合)又はエチニル基(C-C三重結合)を介して、プリン基の7位が置換基で修飾された7-置換基-デオキシリボヌクレオチド三リン酸は、7位の置換基、例えば、上記式Iにおける置換基Xが、それぞれ以下の式A~Cの構造を有するものである。

[化4]

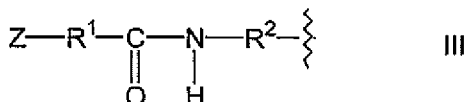
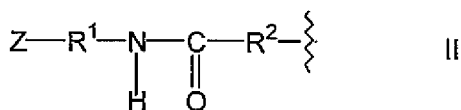


[0040] 式中、波線はプリン基への結合部位をさし、Yは有機基、好ましくは、複素原子を含んでいてもよい置換又は無置換の炭化水素基である。複素原子としては、酸素原子、窒素原子、硫黄原子、ケイ素原子、リン原子が挙げられる。置換基としては、例えば、フッ素、塩素、臭素及びヨウ素から選ばれるハロゲン原子、ヒドロキシル基、置換又は無置換のアミノ基、ニトロ基、シアノ基、置換又は無置換の炭素数1~10のアルキル基、置換又は無置換の炭素数2~10のアルケニル基、置換又は無置換の炭素数3~10のシクロアルキル基、置換又は無置換の炭素数1~10のアルコキシ基、置換又は無置換のアルコキシカルボニル基又はカルボキシル基等を挙げることができる。

[0041] プリン基の7位が置換基で修飾された7-置換基-デオキシリボヌクレオチド三リン酸、特に、エテニル基(C-C二重結合)を介して、プリン基の7位が置換基で修飾された7-置換基-デオキシリボヌクレオチド三リン酸（上記式Aで表される置換基を有するもの）は、（1）ルシフェラーゼの基質性が、ATPと比較して低く、（2）核酸のチミン（T）と相補的であり、（3）核酸のグアニン（G）及びシトシン（C）とは排他的であり、（4）チミンの連続塩基poly（T）に対して取り込まれる効率が良く、（5）取り込まれた後に、通常どおり段階的化学反应による配列決定法が実施可能である点で特に優れている。

- [0042] プリン基の7位に存在する置換基、例えば、上記式A~CにおけるYとしては、芳香族基を含む置換基が好ましい。芳香族基としては、置換又は無置換の芳香族炭化水素基、置換又は無置換の芳香族複素環基が挙げられる。
- [0043] 芳香族炭化水素基としては、フェニル基、ナフチル基、フェナントリル基、フルオレニル基、アントリル基、ピレニル基、インダニル基、テトラヒドロナフチル基、キノリル基、イソキノリル基、シンノリニル基、キナゾリニル基、キノキサリニル基、ナフチリジニル基、フタラジニル基、インドリル基、イソインドリル基、ベンゾフリル基、ベンゾチエニル基、インダゾリル基、ベンゾイミダゾリル基、ベンゾチアゾリル基が挙げられる。
- [0044] 芳香族複素環基としては、ピリジル基、ピリダジニル基、ピリミジニル基、ピラジニル基、フリル基、チエニル基、ピロリル基、イミダゾリル基、チアゾリル基、オキサゾリル基等が挙げられる。
- [0045] 芳香族基の置換基としては、例えば、フッ素、塩素、臭素及びヨウ素から選ばれるハロゲン原子、ヒドロキシル基、置換又は無置換のアミノ基、ニトロ基、シアノ基、置換又は無置換の炭素数1~10のアルキル基、置換又は無置換の炭素数2~10のアルケニル基、置換又は無置換の炭素数3~10のシクロアルキル基、置換又は無置換の炭素数1~10のアルコキシ基、置換又は無置換のアルコキシカルボニル基及びカルボキシル基等を挙げることができる。
- [0046] 芳香族基としては、塩基性芳香族基が好ましい。塩基性芳香族基としては、ピリジル基、ピロリル基、イミダゾリル基、ビピリジル基、ピラジニル基、ピリミジニル基、ピリダジニル基、インドリジニル基、インドリル基、インダゾリル基、キノニル基、プリニル基、アクリジニル基、フェナントロリニル基などが挙げられ、ピリジル基、特に4-ピリジル基が好ましい。
- [0047] 上記式A~Cにおいて、Yは、好ましくは以下の式II又はIIIで表される構造を有する。

[化5]



[0048] 式中、波線は、置換基の結合部位、すなわち、エチニル基(C-C二重結合)、エチレン基(C-C単結合)又はエチニル基(C-C三重結合)への結合部位を表し、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、それぞれ独立して、二価の有機基又は直接結合であり、Zは有機基である。

[0049] 二価の有機基としては、好ましくは複素原子を含んでいてもよい置換又は無置換の二価の炭化水素基が挙げられる。二価の炭化水素基としては、鎖員1~20、好ましくは鎖員1~10、より好ましくは鎖員1~6の飽和又は不飽和の脂肪族炭化水素基、例えば、鎖員2~20、好ましくは鎖員2~10、より好ましくは鎖員2~6のアルキレン基、鎖員2~20、好ましくは鎖員2~10、より好ましくは鎖員2~6のアルケニレン基、及び鎖員2~20、好ましくは鎖員2~10、より好ましくは鎖員2~6のアルキニレン基、鎖員3~20、好ましくは鎖員3~10、より好ましくは鎖員3~6の二価の脂環式炭化水素基等が挙げられる。上記炭化水素基においては、炭素の一部が複素原子で置換されていてもよい。複素原子としては、酸素原子、窒素原子、硫黄原子、ケイ素原子、リン原子が挙げられる。

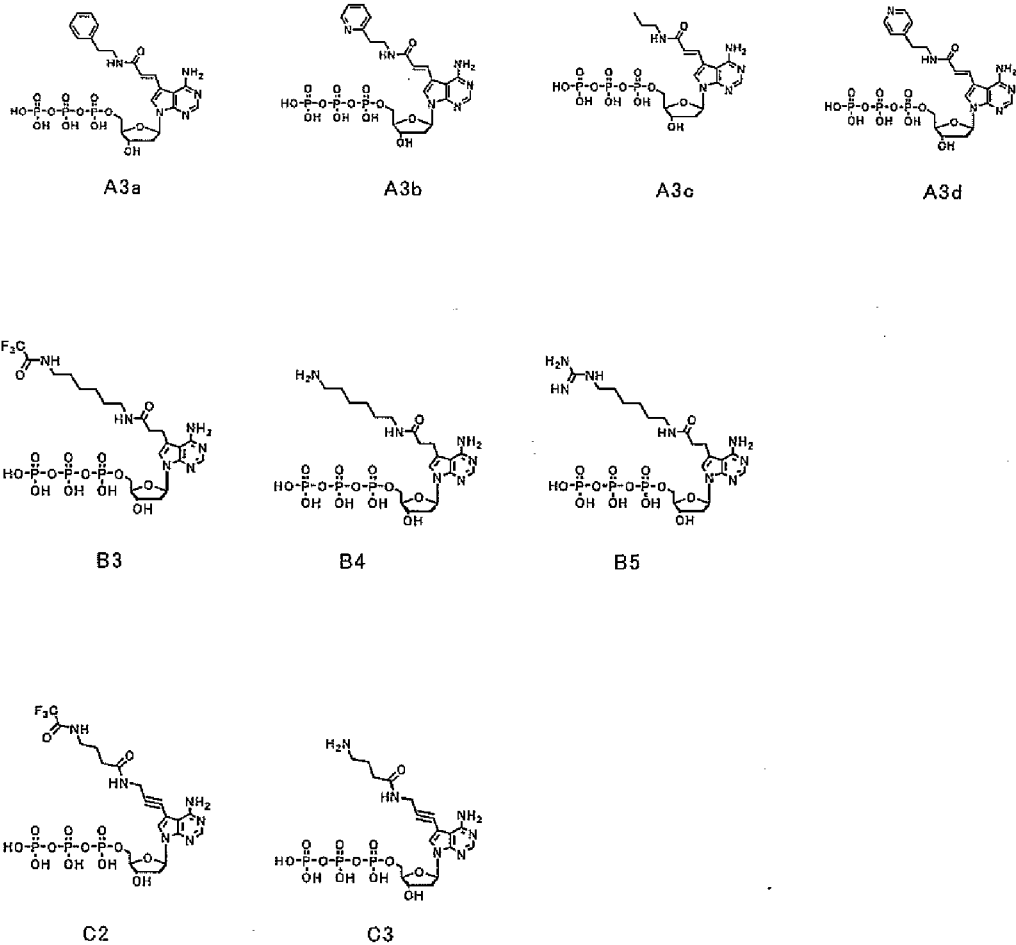
[0050] ここで置換基としては、例えば、フッ素、塩素、臭素及びヨウ素から選ばれるハロゲン原子、ヒドロキシル基、置換又は無置換のアミノ基、ニトロ基、シアノ基、置換又は無置換の炭素数1~10のアルキル基、置換又は無置換の炭素数2~10のアルケニル基、置換又は無置換の炭素数3~10のシクロアルキル基、置換又は無置換の炭素数1~10のアルコキシ基、置換又は無置換のアルコキシカルボニル基又はカルボキシ基等を挙げることができる。

[0051] 有機基Zとしては、芳香族基、フッ素、塩素、臭素及びヨウ素から選ばれる

ハロゲン原子、ヒドロキシル基、置換又は無置換のアミノ基（例えば、 $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CF}_3$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}_2$ ）、ニトロ基、シアノ基、置換又は無置換の炭素数1~10のアルキル基、置換又は無置換の炭素数2~10のアルケニル基、置換又は無置換の炭素数3~10のシクロアルキル基、置換又は無置換の炭素数1~10のアルコキシ基、置換又は無置換のアルコキシカルボニル基又はカルボキシ基等を挙げることができる。有機基Zは、好ましくは芳香族基、さらに好ましくは塩基性芳香族基、特に好ましくはピリジル基である。

[0052] 具体的には、以下から選択される7-置換基-デオキシリボヌクレオチド三リン酸が好ましく、特にA3a~A3d、とりわけA3dで表される7-置換基-デオキシリボヌクレオチド三リン酸が好ましい。A3a~A3d、特にA3dで表される7-置換基-デオキシリボヌクレオチド三リン酸は、(1) ルシフェラーゼの基質性が、ATPと比較して1/1000以下であり、(2) 核酸のチミン (T) と相補的であり、(3) 核酸のグアニン (G) 及びシトシン (C) とは排他的であり、(4) チミンの連続塩基poly (T) に対して取り込まれる効率が良く、(5) 取り込まれた後に、通常どおり段階的化学反应による配列決定法が実施可能である点で優れている。

## [化6]



[0053] 本発明の上記核酸基質を用いる核酸分析方法は、核酸試料を鋳型とし、塩基AGTCに対する相補的核酸基質を加えて相補鎖合成を行う工程、該相補鎖合成で生成するピロリン酸から酵素によりATPを生成させる工程、及びルシフェラーゼ反応で生じる化学発光を検出して相補鎖合成の有無を判定する工程を含む核酸分析方法であり、好ましくはパイロシーケンシング法である。

[0054] 本発明の核酸分析方法は、鋳型核酸試料に相補鎖結合したプライマーの伸長反応時に生成するピロリン酸 (PPi) をルシフェラーゼ反応で生じる化学発光を介して検出するものである。このルシフェラーゼに触媒される化学発光反応は、ATPを迅速、高感度に測定する方法として知られており、ルシフェリン・ルシフェラーゼ反応とも称され、ATPに依存する反応である。ルシフェリンとATPが反応し、アデニル酸ルシフェリンとなり、このアデニル酸ルシフェ



リンと酸素がルシフェラーゼの存在下で酸化的脱炭酸反応により分解され、この反応の過程において得られるエネルギーの一部が発光という反応として現れる。この発光を定量することでATPを定量することができる。

[0055] 相補鎖合成の結果生じるピロリン酸 (PPi) は、ATP生成酵素によってATPに変換される。ATPを基質として化学発光反応を触媒するルシフェラーゼを共存させることで、生成したATPに依存した化学発光が検出される。

[0056] ピロリン酸からATPを生成するATP生成酵素にはATPスルフリラーゼ、ピルビン酸オルトホスフェートジキナーゼ (PPDK) 又はフェニルアラニンラセマーゼを用いることができる。また、核酸試料は、DNA、RNAいずれであってもよい。DNAは一本鎖、二本鎖の両方を分析することができ、二本鎖DNAが鋳型となる場合は一本鎖に変性する前処理工程の後に本発明の方法を行えばよい。またRNAは、逆転写反応の後に得られた産物を本発明の方法で分析することもできる。微量のDNAを用いる場合はPCR反応で増幅した伸長産物 (増幅核酸断片) を用いることができ、微量のmRNAを用いる場合は、PCR-based oligo (G) -tailing法 (Y. Y. Kusov et al., *Nucleic Acids Res*, 29, e57 (2001)) により反応した産物を用いることができる。以下に、本発明の核酸分析方法の手順の一例を記載する。

[0057] まず、測定対象の核酸試料にプライマーをハイブリダイズさせ、相補鎖合成反応 (通常、DNAポリメラーゼによる相補鎖合成反応) を行う。その際、核酸基質試薬としてデオキシリボヌクレオチド三リン酸 (又はその誘導体) 溶液を1種類ずつ、順次加えていくと、相補鎖合成反応が起きた場合のみPPiが生じる。生じたPPiは、APS (アデノシン5' -ホスホスルフェイト) 存在下でATPスルフリラーゼにより、又はAMP (5' -アデニル酸) 及びPEPの存在下でピルビン酸リン酸ジキナーゼ (PPDK) により、ATPに変換される。変換されたATPは、マグネシウムイオン及びO<sub>2</sub> (酸素) 存在下でルシフェラーゼによるルシフェリンの酸化反応に使用され、光を発する。従って、核酸基質試薬を順番に繰り返して加え、発光の有無を検出しながら1塩基種ずつ塩基配列を決定していくことができる (Ahmadian A et al., *Analytical Biochemistry* 280 (2

000) 103-110及びZhou G et al., Electrophoresis 22 (2001) 3497-3504参照)。核酸基質試薬は、最終濃度が1~10 $\mu$ M、好ましくは2~4 $\mu$ Mとなるように添加することが好ましい。

[0058] 相補鎖合成反応後の余剰の核酸基質又はその誘導体は測定のじゃまになるため、酵素分解等によって速やかに除去することが好ましい。用いられる酵素としては、アピラーゼやピロホスファターゼ (PPase) 等を挙げることができる。また相補鎖合成に用いられるDNAポリメラーゼはエキソ型酵素活性を除去したクレノーフラグメント (Klenow fragment) が好ましい。反応液は、酵素活性と相補鎖合成反応の点から、pH7.0~8.0、温度30~45°Cの範囲に調整されることが好ましい。さらに、試薬には予め微量のピロホスファターゼ等の酵素を添加して、バックグラウンドの原因となる試薬中に含まれるPPiやATPを分解除去しておくことが好ましい。

[0059] 以下に、本発明を実施例を挙げて説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものでない。

## 実施例

[0060] (実施例1) 新規核酸基質の合成 核酸基質のdATPiは、ヌクレオチド三リン酸のリボースの1'に、6位にアミノ基を持つプリン基を有するものである。なお、6位にアミノ基を有するプリン基をアデニン基という。アデニン基がチミン基と相補的に発揮する選択的結合性は、プリン基の1位の窒素と、6位のアミノ基が関わる水素結合によるものである。そのため、核酸伸長に利用可能な基質候補としては、プリン基の6位に必ずアミノ基が存在する条件で、他の部分に修飾を施すことが重要であると考えた。さらに、プリン基の1位及び6位が相補鎖結合に寄与する部分であることから、それと遠い部位に修飾を施すこととした。そこで、プリン基の7位や8位に修飾を施したデオキシリボヌクレオチド三リン酸を、以下の通り、複数種類合成した。以下に合成方法を記述する。

[0061] 今回、本発明者らは、図1の11種類の新規核酸基質候補を合成し、その特性を評価した。11種は、それぞれ、以下の様に分類できる。A3a~A3dの4種 (以

降A種とよぶ) は、エテニル基(C-C二重結合)を介して置換基をプリン基の7位に修飾した系列である。B3~B5の3種(以降B種とよぶ) は、エチレン基(C-C単結合)を介して置換基をプリン基の7位に修飾した系列である。C2とC3(以降C種とよぶ) は、エチニル基(C-C三重結合)を介して置換基をプリン基の7位に修飾した系列である。D2とD3(以降D種とよぶ) は、エチニル基(C-C三重結合)を介して置換基をプリン基の8位に修飾した系列である。それぞれの物質の合成方法は、以下の通りである。

[0062] 図2に、A種の合成方法(フロー)を示す。A種の合成方法は、以下の通りである。

[0063] <A1の合成>

真空乾燥した7-デアザヒポキサンチン(1.00g,  $7.4 \times 10^{-3}$ mol, F.W. 135.13)に $\text{PoCl}_3$ (10mL, 0.11mol, F.W. 153.3, 15eq.)を加え115°Cのオイルバスで45分間還流した。反応終了後、減圧留去し、残渣に少量の冷水を加えて反応をクエンチした。その溶液をジエチルエーテルに溶かし蒸留水で洗浄した。有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、吸引濾過し、濾液を減圧留去し、目的物1を得た。

[0064] 真空乾燥した目的物1(1.03g, 6.92mmol, F.W. 153.57)をdry-DMF(38mL)を加え懸濁させ、N-ヨードスクシンイミド(1.71g, 7.62mmol, 1.1eq.)のdry-DMF溶液(30mL)を加え、アルゴン雰囲気下、3時間室温で攪拌した。反応液の減圧留去後、残渣を酢酸エチル(70mL)に溶解させ、飽和重ソウ水(30mL)で2回洗浄した。有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、吸引濾過し、濾液を減圧留去した。残渣を酢酸エチル(10mL)に溶解させてジクロロメタンを加えて再結晶させた。これを吸引ろ過し目的物2を得た。ろ液をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(シリカゲル60, 40~50 $\mu\text{m}$ , 0~3%メタノール/酢酸エチル)で精製し目的物2を得た。

[0065] 真空乾燥させた目的物2(1.932g, 6.97mmol, F.W. 279.47)をdry-アセトニトリル(100mL)に懸濁させ、水素化ナトリウム(60% in oil, 7.61mmol, 1.1eq.)をアルゴン雰囲気下で加えて、室温で30分間攪拌した。1-( $\alpha$ )-クロロ-3, 5-

ジ-0-(p-トルオイル)-2-デオキシ-D-リボース (3.76g, 9.69mmol, 1.4eq.) を20分間かけてゆっくり加え、室温で2時間攪拌した。反応液を減圧留去し、残渣をジクロロメタン(200mL)に溶かして、炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した。有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過し、ろ液を減圧留去した。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー(シリカゲル60, 40~50 $\mu$ m, 25%メタノール/酢酸エチル)で精製し、目的物3を得た。

[0066] 目的物3(500mg, 0.791mmol, F.W. 631.85)を飽和アンモニウムエタノール溶液に懸濁させ、耐圧容器中65°Cで20時間攪拌し、反応液を減圧留去した。残渣をメタノール(30mL)に溶かし、飽和アンモニア水(30mL)を入れて、5時間攪拌し、反応液を減圧留去した。残渣を少量のメタノールに溶かし、ヘキサンで再結晶した。これを吸引ろ過し、目的物4を得た。

[0067] 真空乾燥した目的物4(300mg, 0.780mmol, F.W. 376.15)をdry-ピリジン(5mL)に溶かし、共沸を3回行い、一晩真空乾燥した。アルゴン置換後dry-DMF(6mL)に溶かし、脱気を行った。そこに、メチルアクリレート(30mL, 0.33mmol, F.W. 86.09, 420eq.)、ヨウ化銅(CuI, 41 mg, 0.215 mmol, 0.2 eq.)、トリフェニルホスフィンパラジウム(Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 125mg, 0.108 mmol, 0.1 eq.)、トリエチルアミン(0.3 mL, 2.15 mmol, 2 eq.)を順に加え65°Cで7時間攪拌した。反応液を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(シリカゲル60, 40~50 $\mu$ m, 0~5%メタノール/酢酸エチル)で精製し、オイル状の目的物5を得た。

[0068] 目的物5(35mg, 104 $\mu$ mol, F.W. 334.33)を1N NaOHaq(4ml)に溶解させ、一晩室温攪拌した。反応液を4N HClaqで中和し、析出した結晶を吸引濾過して目的物A1を得た。

[0069] <A3aの合成>

真空乾燥し、アルゴン置換した目的物A1(140mg, 437 $\mu$ mol, F.W. 320.30)、Py BOP(273mg, 524 $\mu$ mol, 1.2eq)、HOBt $\cdot$ H<sub>2</sub>O(80mg, 524 $\mu$ mol, 1.2eq)をDMF(1ml)で溶解し、そこへDIPEA(761 $\mu$ l, 4.37mmol, 10eq)、2-フェニルエチルアミン(110 $\mu$ l, 1.04mmol, 2.0eq)を加え、室温で3時間攪拌した。反応液を

減圧留去し、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製を行い、その後逆相の中圧カラムにより再度精製を行い、目的物A2aを得た。

[0070] ヌクレオシドA2a(109mg, 257  $\mu$ mol, F.W. 423.47)をDMF(2ml)で共沸した後、N,N,N',N'-テトラメチル-1,8-ナフタレンジアミン(ProtonSponge, 82mg, 385  $\mu$ mol, 1.5eq)を加えて一晩乾燥させた。これにリン酸トリメチル(1.5ml)を加えて溶解させた後、0°Cに冷却した。塩化ホスホニル(38  $\mu$ l, 411  $\mu$ mol, 1.6eq)を滴下し0°Cで45分間攪拌した。さらにトリブチルアミン(245  $\mu$ l, 1.01mmol, 4.0eq)と0.5Mピロリン酸トリブチルアンモニウムのDMF溶液(2.57mL, 1.28mmol, 5.0eq)を0°Cに加え、反応液を室温に戻し1時間反応させた。1.0M炭酸水素トリエチルアンモニウム水溶液(pH8.0, 4mL)と水(4mL)を加えて反応を止め反応液を減圧留去した。続いて残渣を水に溶かしジエチルエーテルで2回洗浄し、水相をDEAE-Sephadex A-25カラムを用い、炭酸水素トリエチルアンモニウム水溶液(pH8.0)の塩濃度勾配(0.3~1.0M)緩衝液により溶出した。これを中圧カラムで精製し、目的物A3aを得た。

[0071] <A3bの合成>

真空乾燥し、アルゴン置換したA1(120mg, 374  $\mu$ mol, F.W. 320.30)、Py BOP(234mg, 449  $\mu$ mol, 1.2eq)、HOBt  $\cdot$  H<sub>2</sub>O(68mg, 449  $\mu$ mol, 1.2eq)をDMF(650  $\mu$ l)で溶解し、そこへDIPEA(650  $\mu$ l, 3.74mmol, 10eq)、2-(2-アミノエチル)ピリジン(89  $\mu$ l, 748  $\mu$ mol, 2.0eq)を加え、室温で3時間攪拌した。反応液を減圧留去し、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製を行い、その後逆相の中圧カラムにより再度精製を行い、目的物A2bを得た。

[0072] ヌクレオシドA2b(100mg, 235  $\mu$ mol, F.W. 424.45)をDMF(2ml)で共沸した後、N,N,N',N'-テトラメチル-1,8-ナフタレンジアミン(ProtonSponge, 75mg, 352  $\mu$ mol, 1.5eq)を加えて一晩乾燥させた。これにリン酸トリメチル(1.5ml)を加えて溶解させた後、0°Cに冷却した。塩化ホスホニル(35  $\mu$ l, 376  $\mu$ mol, 1.6eq)を滴下し0°Cで45分間攪拌した。さらにトリブチルアミン(225  $\mu$ l, 940  $\mu$ mol, 4.0eq)と0.5Mピロリン酸トリブチルアンモニウムのDMF溶液(2.40mL, 1.17mmol, 5.0eq)を0°Cに加え、反応液を室温に戻し1時間反応させた。1.0M

炭酸水素トリエチルアンモニウム水溶液 (pH8.0, 4mL) と水 (4mL) を加えて反応を止め反応液を減圧留去した。続いて残渣を水に溶かしジエチルエーテルで2回洗浄し、水相をDEAE-Sephadex A-25カラムを用い、炭酸水素トリエチルアンモニウム水溶液 (pH8.0) の塩濃度勾配 (0.3~1.0M) 緩衝液により溶出した。これを中圧カラムで精製し、目的物A3bを得た。

[0073] <A3cの合成>

真空乾燥し、アルゴン置換したA1 (150mg, 468  $\mu$ mol, F.W. 320.30)、Py BOP (292mg, 561  $\mu$ mol, 1.2eq)、HOBt  $\cdot$  H<sub>2</sub>O (86mg, 561  $\mu$ mol, 1.2eq) をDMF (817  $\mu$ l) で溶解し、そこへDIPEA (817  $\mu$ l, 4.68mmol, 10eq)、n-プロピルアミン (76  $\mu$ l, 963  $\mu$ mol, 2.0eq) を加え、室温で3時間攪拌した。反応液を減圧留去し、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製を行い、その後逆相の中圧カラムにより再度精製を行い、目的物A2cを得た。

[0074] ヌクレオシドA2c (109mg, 301  $\mu$ mol, F.W. 361.40) をDMF (2ml) で共沸した後、N,N,N',N'-テトラメチル-1,8-ナフタレンジアミン (ProtonSponge, 97mg, 451  $\mu$ mol, 1.5eq) を加えて一晩乾燥させた。これにリン酸トリメチル (1.5ml) を加えて溶解させた後、0°Cに冷却した。塩化ホスホニル (45  $\mu$ l, 481  $\mu$ mol, 1.6eq) を滴下し0°Cで45分間攪拌した。さらにトリブチルアミン (288  $\mu$ l, 1.20mmol, 4.0eq) と0.5Mピロリン酸トリブチルアンモニウムのDMF溶液 (3.0mL, 1.50mmol, 5.0eq) を0°Cで加え、反応液を室温に戻し1時間反応させた。1.0M炭酸水素トリエチルアンモニウム水溶液 (pH8.0, 4mL) と水 (4mL) を加えて反応を止め反応液を減圧留去した。続いて残渣を水に溶かしジエチルエーテルで2回洗浄し、水相をDEAE-Sephadex A-25カラムを用い、炭酸水素トリエチルアンモニウム水溶液 (pH8.0) の塩濃度勾配 (0.3~1.0M) 緩衝液により溶出した。これを中圧カラムで精製し、目的物A3cを得た。

[0075] <A3dの合成>

ヌクレオシドA1 (140mg, 0.44mmol, F.W. 320)、ByBOP (274mg, 0.53mmol, F.W. 520 1.2e. q.) とHOBt (82mg, 0.53mmol, F.W. 153, 1.2e. q.) を一緒にして一晩真空乾燥させた。それを少量のDMFで溶解させ、DIPEA (500  $\mu$ L, 2.9

5mmol, 6.7eq.) を加え、10秒攪拌させ、すばやく4-(2-アミノエチル)ピリジン (105  $\mu$ L, 0.89mmol, F.W.122, 1.83eq.) を加え室温で1時間攪拌した。反応後、反応液を減圧留去し、残渣をメタノールに溶解させて中圧カラムで精製し、目的物A2dを得た。

[0076] ヌクレオシドA2d (85mg, 0.20mmol, F.W.424) をDMF (6mL) で2回、アセトニトリル (3mL) で3回共沸し、3時間真空乾燥後、N,N,N',N'-テトラメチル-1,8-ナフタレンジアミン (ProtonSponge, 65mg, 0.30mmol, 1.5 eq.) を一晩乾燥させた。これにリン酸トリメチル (1.5mL) をアルゴン雰囲気下で加えて溶かした後、0°Cに冷却した。塩化ホスホニル (30  $\mu$ L, 0.32mmol, 1.6 eq.) を滴下し0°Cで45分間攪拌した。さらにトリブチルアミン (0.19mL, 0.79mmol, 4.0 eq.) と0.5Mピロリン酸トリブチルアンモニウムのDMF溶液 (2.1mL, 1.05mmol, 5 eq.) を0°Cで加え、反応液を室温に戻し1時間反応させた。1.0M炭酸水素トリエチルアンモニウム水溶液 (pH8.0, 4mL) と水 (4mL) を加えて反応を止め反応液を減圧留去した。続いて残渣を水に溶かしジエチルエーテルで2回洗浄し、水相をDEAE-Sephadex A-25カラムを用い、炭酸水素トリエチルアンモニウム水溶液 (pH8.0) の塩濃度勾配 (0.3~1.0M) 緩衝液により溶出した。これを中圧カラムで精製し、目的物A3dを得た。

[0077] <B種の合成>

つぎに、図3に、B種の合成方法 (フロー) を示す。B種の合成方法は、以下の通りである。なお、目的物5の合成までは、先の記述と同じである。

[0078] 真空乾燥した目的物5 (262mg, 0.78mmol, F.W.336) をdry-メタノール (30mL) に溶かし、酸化白金 (IV) (10mg, 0.044mmol, F.W.227.08) を加えて、H<sub>2</sub>を風船に入れて吹き込みながら室温で2時間攪拌した。反応液を自然ろ過し、ろ液を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (シリカゲル60, 40~50  $\mu$ m, 10%メタノール/ジクロロメタン) で精製し、目的物B1を得た。

[0079] ヌクレオシドB1 (36mg, 0.11mmol, F.W.336.33) とDMAP (1.31mg, 0.011mmol, F.W.122.17, 0.1 eq.) を一晩真空乾燥し、1,6-ジアミノヘキサン (125mg, 1.1mmol, 10 eq.) のdry-メタノール (0.8mL) 溶液を加えて52°Cで24時

間還流した。反応が終了していたので反応液を減圧留去した。次に、大量に含まれている1,6-ジアミノヘキサンをできる限り除去するために、再沈殿を行った。残渣をメタノール(1mL)に溶かし、氷冷下でジエチルエーテル(45mL)を攪拌しているところに、ゆっくり滴下して沈殿を析出させた。これを吸引ろ過し目的物を含む薄い褐色の粉を70mg得た。この粗生成物の粉(70mg, 0.17mmol, F.W. 420.51)をメタノール(1.4mL)に溶かし、トリエチルアミン(0.092 mL, 0.68 mmol, 4 eq.)とトリフルオロ酢酸エチル(0.2 mL, 1.7 mmol, 10 eq.)を加えて室温で13.5時間攪拌した。反応が終了していなかったため、トリフルオロ酢酸エチル(0.2 mL, 1.7 mmol, 10 eq.)を追加して室温で1時間攪拌した。反応液を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(シリカゲル60, 40~50 $\mu$ m, 3~12%メタノール/クロロホルム)で精製し、薄い褐色の粉の目的物B2を得た。

[0080] ヌクレオシドB2 (106 mg, 0.21mmol, F.W. 516.51)をDMF(6mL)で2回、アセトニトリル(3mL)で3回共沸し、3時間真空乾燥後、N,N,N',N'-テトラメチル-1,8-ナフタレンジアミン(ProtonSponge, 66mg, 0.31mmol, 1.5 eq.)を一晩乾燥させた。これにリン酸トリメチル(1.47mL)をアルゴン雰囲気下で加えて溶かした後、0°Cに冷却した。塩化ホスホニル(31 $\mu$ l, 0.33mmol, 1.6 eq.)を滴下し0°Cで45分間攪拌した。さらにトリブチルアミン(0.20mL, 0.82mmol, 4.0 eq.)と0.5Mピロリン酸トリブチルアンモニウムのDMF溶液(2.12mL, 1.0mmol, 5 eq.)を0°Cで加え、反応液を室温に戻し1時間反応させた。1.0M炭酸水素トリエチルアンモニウム水溶液(pH8.0, 4mL)と水(4mL)を加えて反応を止め反応液を減圧留去した。続いて残渣を水に溶かしジエチルエーテルで2回洗浄し、水相をDEAE-Sephadex A-25カラムを用い、炭酸水素トリエチルアンモニウム水溶液(pH8.0)の塩濃度勾配(0.3~1.0M)緩衝液により溶出した。これを中圧カラムで精製し、目的物B3を得た。

[0081] ヌクレオチドB3 (830 $\mu$ L, 74.60D260nm,  $5.0 \times 10^{-6}$ mol, F.W. 756.44)に4Nアンモニア水(5mL)を加え室温で2時間攪拌した。反応終了後、反応液を減圧留去し残渣を中圧カラムによって精製し目的物B4を得た。



[0082] 凍結乾燥したB4 (350D260nm, 440  $\mu$ mol, F.W. 660.45)に1.0MTB1/DMF (513  $\mu$ L, 0.513mmol, 220 eq.)を加えて溶かした。TEA (0.143mL, 1.03mmol, 440 eq.)を加え、室温で7時間攪拌した。反応終了後、反応液を減圧留去し、高速液体クロマトグラフィーで精製し目的物B5を得た。

[0083] <C種の合成>

つぎに、図4に、C種の合成方法（フロー）を示す。C種の合成方法は、以下の通りである。なお、目的物4の合成までは、先の記述と同じである。

[0084] 真空乾燥した目的物4 (100mg, 0.27mmol, F.W. 376.15)とTN2 (314mg, 1.33mmol, 5 eq.)をdry-DMF (4mL)に溶かし、液体窒素で凍らせ、オイルポンプでの脱気を4回行った。そこに、ヨウ化銅 (CuI, 64mg, 0.37 mmol, 1.26 eq.)、トリフェニルホスフィンパラジウム (Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 62mg, 0.053 mmol, 0.2 eq.)、トリエチルアミン (0.074mL, 2当量)を順に加え35°Cで7時間攪拌した。反応液を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（シリカゲル60, 40~50  $\mu$ m, 3~10%メタノール/ジクロロメタン）で精製し、減圧留去した。残渣を中圧カラムで精製した。逆相カラムで脱塩し、目的物C1を得た。

[0085] ヌクレオシドC1 (95mg, 0.20mmol, F.W. 484.4)をDMF (6mL)で2回、アセトニトリル (3mL)で3回共沸し、3時間真空乾燥後、N,N,N',N'-テトラメチル-1,8-ナフタレンジアミン (ProtonSponge, 63.3mg, 0.30mmol, 1.5 eq.)を一晩乾燥させた。これにリン酸トリメチル (1.5mL)をアルゴン雰囲気下で加えて溶かした後、0°Cに冷却した。塩化ホスホニル (29.3  $\mu$ L, 0.32mmol, 1.6 eq.)を滴下し0°Cで45分間攪拌した。さらにトリブチルアミン (0.19mL, 0.79 mmol, 4.0 eq.)と0.5Mピロリン酸トリブチルアンモニウムのDMF溶液 (1.97 mL, 0.99mmol, 5 eq.)を0°Cで加え、反応液を室温に戻し1時間反応させた。1.0M炭酸水素トリエチルアンモニウム水溶液 (pH8.0, 4mL)と水 (4mL)を加えて反応を止め反応液を減圧留去した。続いて残渣を水に溶かしジエチルエーテルで2回洗浄し、水相をDEAE-Sephadex A-25カラムを用い、炭酸水素トリエチルアンモニウム水溶液 (pH8.0)の塩濃度勾配 (0.3~1.0M)緩衝液により溶出した。これを中圧カラムで精製し、目的物C2を得た。

[0086] ヌクレオチドC2 (700  $\mu$ L, 700D260nm,  $4.6 \times 10^{-6}$ mol, F.W. 725.44)に4Nアンモニア水(5mL)を加え室温で2時間攪拌した。反応終了後、反応液を減圧留去し残渣を高速液体クロマトグラフィーによって精製し目的物C3を得た。

[0087] <D種の合成>

最後に、図5に、D種の合成方法（フロー）を示す。D種の合成方法は、以下の通りである。

[0088] 真空乾燥した8-ブロモ-2'-デオキシアデノシン(100mg, 0.30mmol, F.W. 330.14)とTN2(357mg, 1.5mmol, 5 eq.)をdry-DMF(4mL)に溶かし、液体窒素で凍らせ、オイルポンプでの脱気を4回行った。そこに、ヨウ化銅(CuI, 72.6mg, 0.38 mmol, 1.26 eq.)、トリフェニルホスフィンパラジウム (Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 70 mg, 0.06 mmol, 0.2 eq.)、トリエチルアミン (0.05mL, 2 eq.) を順に加え35°Cで7時間攪拌した。反応液を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（シリカゲル60, 40~50  $\mu$ m, 3~10%メタノール/ジクロロメタン）で精製し、減圧留去した。残渣を中圧カラムで精製した。逆相カラムで脱塩し、目的物D1を得た。

[0089] ヌクレオシドD1 (78mg, 0.16mmol, F.W. 485.4) をDMF (6mL) で2回、アセトニトリル(3mL)で3回共沸し、3時間真空乾燥後、N,N,N',N'-テトラメチル-1,8-ナフタレンジアミン (ProtonSponge, 51.8mg, 0.24mmol, 1.5 eq.) を一晩乾燥させた。これにリン酸トリメチル (1.16mL) をアルゴン雰囲気下で加えて溶かした後、0°Cに冷却した。塩化ホスホニル (37.4  $\mu$ L, 0.40mmol, 1.6 eq.) を滴下し0°Cで45分間攪拌した。さらにトリブチルアミン (0.16mL, 0.64mmol, 4.0 eq.) と0.5Mピロリン酸トリブチルアンモニウムのDMF溶液 (1.61mL, 0.81mmol, 5 eq.) を0°Cで加え、反応液を室温に戻し1時間反応させた。1.0M炭酸水素トリエチルアンモニウム水溶液 (pH8.0, 4mL) と水 (4mL) を加えて反応を止め反応液を減圧留去した。続いて残渣を水に溶かしジエチルエーテルで2回洗浄し、水相をDEAE-Sephadex A-25カラムを用い、炭酸水素トリエチルアンモニウム水溶液 (pH8.0) の塩濃度勾配 (0.3~1.0M) 緩衝液により溶出した。これを中圧カラムで精製し、目的物D2を得た。

[0090] ヌクレオチドD2 (100  $\mu$ L, 100D260nm,  $1.7 \times 10^{-6}$ mol, F.W. 725.44)に4Nアンモニア水(5mL)を加え室温で2時間攪拌した。反応終了後、反応液を減圧留去し残渣を高速液体クロマトグラフィーによって精製し目的物D3を得た。

[0091] (実施例2) ルシフェラーゼ基質特異性評価 合成した核酸基質につき、ルシフェラーゼの基質になるか否かの評価を、以下の手順で行った。まず、表1の条件1で示す発光試薬を調製した。

[表1]

表1. 発光試薬組成

組成	発光試薬条件1	発光試薬条件2	発光試薬条件3
Tricine	25 mM	25 mM	25 mM
EDTA	0.5 mM	0.5 mM	0.5 mM
Mg-Acetate	5 mM	5 mM	5 mM
DTT	0.5 mM	0.5 mM	0.5 mM
ATP sulfurylase	2 U/mL	2 U/mL	2 U/mL
Luciferase	262 GLU/mL	131 GLU/mL	131 GLU/mL
Luciferin	0.4 mM	0.4 mM	0.4 mM
APS	0.002 mM	0.002 mM	0.002 mM
Apyrase	1 U/mL	1 U/mL	1.5 U/mL

[0092] この発光試薬20  $\mu$ Lを反応溶液とし、そこに評価対象の核酸基質0.2  $\mu$ Lを注入し、その際に発生する発光を評価した。図6は、基質として、ATP、dATP、C<sup>7</sup>dATP、及びdATP  $\alpha$ Sを分注した場合の発光量である。横軸 (C) は、反応試薬中の最終濃度であり、例えば1  $\mu$ Mの基質を0.2  $\mu$ L分注する場合、その最終濃度は約0.01  $\mu$ Mとなる。縦軸の発光量 (U) は、ATPの0.01  $\mu$ Mにおける発光量

を1と規格化して示した。この図より、発光量 (U) は、最終濃度 (C) と比例関係にあることがわかる。そのため、ルシフェラーゼの基質特異性 (或いは基質反応性) として、単位濃度あたりの発光量を示す数値 (S) を、下記の通りに定義する。

[0093] 基質特異性 (S)  $\equiv$  発光量 (U) / 最終濃度 (C) [ $\mu$ M]  $\times 0.01$

(この定義では、ATPの基質特異性は、1に規格化される。)

合成した核酸基質について、上記の通りにルシフェラーゼに対する基質特異性を測定した結果を、図7に示した。図の左側4点は、それぞれ、ATP、dATP、dATP  $\alpha$ S、及び $C^{14}$ dATPの基質特異性 (S) を示す。パイロシーケンシングに代表される段階的化学反应による配列決定法では、1塩基の伸長で発生するピロリン酸から生成されるATP量は、ターゲットの全てが伸長したとした場合、反応溶液に存在するターゲット量と等しい。また、複数塩基の伸長については、その複数倍となる。一般的には、配列決定のために1回あたりに分注する核酸基質の量は、解析するターゲット量の約100倍程度が必要である。これは、配列決定部位に同じ塩基が10塩基程度連続している場合が稀にあることと、この配列決定法の反応溶液には、基質分解酵素が共存し、核酸伸長と基質分解が競合して実施されるためである。基質の不足により、伸長が未完となると、それに継続する配列解析が実施できなくなり、解析誤差の拡大や不能が発生する。その予防として、一般的に用いるターゲット量の約100倍程度の基質を、1回あたりに分注することが好ましい。

[0094] 以上のことから、1塩基の伸長で発生するATPの発光を、確実に測定するためには、分注した核酸基質の基質特異性 (S) は、ATPに対し1/1000以下であることが理想的である。従来より用いられていた擬似核酸基質のうち、dATP  $\alpha$ SはATPに対し1/10000以下と優れた基質特異性を有している。一方 $C^{14}$ dATPは、ATPに対し約1/250程度であり、理想的な条件である1/1000以下を満たさない。そのため、 $C^{14}$ dATP由来の背景発光が、配列解析の精度に影響すると予想できる。

[0095] 次に、本実施例で合成した核酸基質の評価結果を述べる。まず、図7より、

ルシフェラーゼに対する基質特異性を低くするためには、修飾基としてエチニル基(C-C二重結合)、又はエチレン基(C-C単結合)を用いることが好ましいことがわかる。

[0096] なお、本実施例では、合成した核酸基質を液体クロマトグラフィーにて精製しているが、合成時に混入するピロリン酸の除去には、液体クロマトグラフィー精製だけでは不十分である場合があった。その場合、本発明者らは、合成核酸基質をピロリン酸分解酵素 (PPase) で処理することにより、ピロリン酸を分解した。具体的には、合成核酸基質を反応溶液 (100mM Tris-Acetate, 0.5mM EDTA, 5mM Mg-Acetate, 1mM DTT, pH7.5) に濃度500 $\mu$ Mで希釈し、PPaseを0.2mU/ $\mu$ Lとなる様に加えて、温度30°Cで30分間反応させることにより、溶液中のピロリン酸を分解した。この方法は1例であるが、核酸基質中のピロリン酸を確実に分解することから、正しい基質特異性 (S) の評価や、精度の良い配列決定に有効である。なお、比較実験に用いたATP、dATP、dATP $\alpha$ S、及びC<sup>7</sup>dATPについても、同様に含有ピロリン酸の除去を実施して評価した。

[0097] (実施例3) 核酸への取込性能の評価

dATPに替わる核酸基質としては、以下の必要条件がある。

[0098] (1) 塩基Tと相補的結合が行えること (親和性があること)。

[0099] (2) 塩基G、塩基C、塩基Aとは、排他的であること。

[0100] (3) 塩基Tの連続について、連続的に取り込まれること。

[0101] これらの条件を、以下の様に確認した。下記は、評価に用いたオリゴDNAの配列である。配列の左端が5'末端であり、右端が3'末端である。

[0102] 配列TG(配列番号1) :

gactgaat ataaacttgt ggtagttgga gctgttggcg taggcaagag tgccttgacgatacag  
ctaa ttc

配列GA(配列番号2) :

gactgaat ataaacttgt ggtagttgga gctagtggcg taggcaagag tgccttgacgatacag  
ctaa ttc

配列CG(配列番号3) :

gactgaat ataaacttgt ggtagttgga gctgctggcg taggcaagag tgccttgacgatacag  
ctaa ttc

配列AG(配列番号4) :

gactgaat ataaacttgt ggtagttgga gctgatggcg taggcaagag tgccttgacgatacag  
ctaa ttc

配列5T(配列番号5) :

acgttttttggcg taggcaagag tgcctt

配列P(配列番号6) :

aaggc actct tgcct acgcc a

なお、配列Pは、プライマーである。これは、上記の配列の下線部分に、相補的に結合することが可能である。その他の配列は、プライマーが相補的結合をした場合に、プライマーの3'末端が伸長する場合に取り込まれる塩基の鋳型配列を示している。例えば、配列TGは、プライマーの3'末端の伸長する部位の鋳型塩基、つまりプライマーの結合する部分の5'側に繋がる配列が、TとGであることを示している。また、配列5Tは、同様に、プライマーの結合する部分の5'側に繋がる配列がTの5連結であることを示している。

[0103] 核酸への取り込みは、以下の様に評価した。上記配列のうちの1つをターゲットとし、プライマーと相補的に結合させ、その試料について、各核酸基質を用いた伸長実験を実施した。合成した核酸基質は、塩基Tとの親和性(相補性)と、他の塩基(G, C, A)との排他性が必要である。塩基Tとの親和性は、配列TGとプライマーを用いて評価した。他の塩基(G, C, A)との排他性は、それぞれ、配列GA、配列CG、配列AGとプライマーを用いて評価した。また、塩基Tへの連続取り込み性能は、配列5Tを用いた。

[0104] 段階的化学反应による配列決定法は、以下の通りである。まず、5 $\mu$ Lのハイブリ用バッファー(10mM Tris-Acetate, 20mM Mg-Acetate, pH7.75)に、超純水35 $\mu$ L、解析対象(ターゲット)のオリゴDNA(10 $\mu$ M)及びプライマー(20 $\mu$ M)各5 $\mu$ Lを混合し(試料溶液:最終容量50 $\mu$ L)、94 $^{\circ}$ Cで20秒間過熱

後、プライマーの $T_m$ 温度で2分間反応させる。この試料溶液 $0.5\mu\text{L}$ （ターゲット $0.5\text{pmol}$ 、プライマー $1\text{pmol}$ ）と、表1の条件2で示す発光試薬 $20\mu\text{L}$ 、及びポリメラーゼ酵素 $0.2\mu\text{L}$ （最終濃度： $0.05\text{U}/\mu\text{L}$ ）を混合し、反応試薬とした（最終容量 $20.7\mu\text{L}$ ）。この反応試薬に、 $100\mu\text{M}$ の核酸基質 $0.4\mu\text{L}$ （最終濃度 $2\mu\text{M}$ ）を注入すると、核酸伸長が生じた場合には、その伸長反応生成物のピロリン酸由来の生物発光が観測できる。その反応は、図13（2）で示した化学反応式に従い、反応開始から数秒後に発光ピークをもち、その後、漸近的に減衰する形の発光プロファイルを示す。この発光ピーク値は、生じたピロリン酸量にほぼ比例する関係があるため、ピーク値を測定することで、核酸伸長の度合いを評価することが可能である。

[0105] 図8は、ターゲットとして配列TGを用い、合成基質と塩基Tとの親和性を評価した結果である。ターゲット81とプライマー82は、図8（1）の様に相補鎖結合している。加えた合成基質は、プライマーの3'末端塩基である塩基A 83に、塩基T 84と相補的に結合できる場合に結合・伸長する。伸長により生じたピロリン酸は、図13（2）の化学反応によりATPに変換され、ルシフェラーゼ発光を誘導する。本実験では、その後、dCTPを分注した。これは、伸長反応によりプライマーの3'末端が合成基質となった後に、隣接塩基である塩基G 85に相補的な基質であるdCTPを分注し、合成基質末端への基質の取り込みが、通常通り実施されるか否かを確認するためである。図8（2）～（4）は、ルシフェラーゼ発光の発光量を評価した結果である。左部分は、各種の合成基質を分注した際の発光量であり、右部分は、その後にdCTPを分注した際の発光量である。なお、発光量は、従来技術であるdATP  $\alpha$ Sを用いた場合の1塩基分の発光量811及び821を1として、規格化して表示した。また、各基質の背景発光成分は、差分を取り補正した。各合成塩基を用いた場合の発光は、A3a、A3b、A3c、及びA3dが、それぞれ、812、813、814及び815である。また、それらの試料に、続けてdCTPを分注した際の発光量が、それぞれ、822、823、824及び825である。

[0106] この結果、以下のことが導かれる。まず、図8（2）より、A種の4つの合成

基質は、従来技術であるdATP  $\alpha$  Sを用いた場合と同様に、塩基Tに対する相補的な基質として利用できることがわかった。この中で、基質A3cは、他の基質と異なり、10~20%程度、発光量が高くなることがわかった。これは、基質A3cは、核酸伸長反応が、他の基質より速度が速いことによる。図9は、dATP  $\alpha$  Sと、A3cの発光プロファイルと比較したものである。破線91は、dATP  $\alpha$  Sのプロファイルであり、実線92はA3cのプロファイルである。比較のため、両者の最大値を1に規格化して図示した。これより、A3cの立ち上がりカーブが急峻で、反応速度が速いことがわかる。本反応は、核酸伸長により供給されたピロリン酸由来の発光と、アピラーゼ分解酵素による基質分解のための消光の競合反応であるため、立ち上がり速度が速いほど、アピラーゼ分解に抗して発光が立ち上がるため、発光最大値が高くなる。その結果、A3cは、他の基質より10~20%程度、発光量が高くなると考えられる。

[0107] 次に、図8 (3) より基質B種は、A種と同様に、塩基Tに対する相補的な基質として利用できるが、反応速度が比較的遅いことがわかった。また、図8 (4) から、基質C種も、同様に塩基Tに対する相補的な基質として利用できることを確認した。最後に、基質D種は、伸長しないことがわかった。これは、塩基Tに対する相補的な基質として作用しないのか、3'末端に接続する能力が低いのかは不明であるが、いずれにしても、塩基Tに対する相補的な基質として利用することは不可能であることがわかった。基質D種は、プリン体の8位に修飾を施した合成基質であり、8位修飾体は本目的には適していないことがわかった。

[0108] つぎに、各合成基質について、他の塩基 (G, C, A) との排他性を、それぞれ配列GA、配列CG、配列AGとプライマーを用いて評価した。結果を、図10に示した。各発光量は、配列GA、配列CG及び、配列AGと、それぞれ親和性のある基質dCTP 1001、dGTP 1002及びdTTP 1003を用いた際の発光量を1として規格化した。また、先の図と同様に、背景発光成分は、差分により補正している。

[0109] この結果、以下のことがわかった。A種については、A3aで3種全ての塩基に



ついて発光が見られ（101、102、及び103）、A3cは塩基Gに対する排他性が若干劣っているが（104）、概ね良好である。塩基A3b（105、106、107）及びA3d（108、109、110）は排他性に優れ、従来技術であるdATP  $\alpha$ Sより良い。塩基A3b及びA3dは、両者とも「置換基として、エテニル基（C-C二重結合）を介して塩基性の芳香族を含む置換基をプリン基の7位に修飾したもの」である。B種は、塩基Gに対して排他性が少し低く、B4について発光が見られているが（1004）、概ね良好である。C種及D種は、排他性が良いことが分かる。ただし、D種については、先に述べた通り、塩基Tの場合でも親和性が良くないため、塩基伸長性能自身が低いと推定できる。

[0110] 次に、配列5Tを用い、各合成基質の連続塩基Tへの取り込み性能を、以下の様に評価した。反応試薬の調製は、先の1塩基分に伸長を評価した際と同じであり、ターゲットオリゴとして配列5Tを用いた。この場合、ターゲットオリゴ111とプライマー112は、図11（1）の様に相補鎖結合をしている。そのため、この反応試薬に、基質としてdATPを分注すると、プライマーの3'末端113に接続する様に、1ターゲット分子あたり5分子の基質が接続伸長し、5分子のピロリン酸が放出される。もし、5塩基分全ての伸長が完了しない場合は、1本鎖状態の塩基T部分が残る。そのため、再度、基質dATPを分注すると、未伸長部分が残存している場合だけ、その部分の伸長が生じ、ピロリン酸放出が発光として検出される。今回、各種合成基質の連続塩基への接続伸長性能を評価するため、反応試薬への合成基質（最終濃度2  $\mu$ M）分注を3回連続して実施した。また、続けて塩基G 114に相補的である基質dCTPを2度分注して発光検出を行い、合成基質5塩基分が取り込まれた状態で、接続伸長が生じるか否かも検証した。その結果を、図11（2）、及び図11（3）に示した。図11（2）は、A種の合成基質についての評価結果である。また、図11（3）は、B種の合成基質についての評価結果である。縦軸の発光量は、基質としてdATPを用いた伸長を行い、その後dCTPを用いて塩基Gの相補鎖伸長を実施した場合のdCTP取り込み伸長による発光量を1として規格化した。

[0111] この結果、以下のことが導かれる。まず、基質dATP  $\alpha$ Sを用いる伸長では、

3回目の分注においても、未伸長由来の発光が検出される。つまり、従来技術であるdATP  $\alpha$ Sは、連続取り込み伸長時に、未伸長が発生してしまうという課題があることが分かる。一方、A種の4種類の合成基質を用いた評価では、2回目の分注時には、まだ未伸長由来の発光が見られるが、その量はdATP  $\alpha$ Sの場合と比較して小さい。さらに、3回目の分注時には、未伸長由来の発光はほとんど見られない。このため、2回目までの反応により、5連続塩基T部分の伸長がほぼ完了したことが分かる。また、それに続くdCTP分注時の信号も、1塩基分の伸長が検出できており、A種の合成基質が、dATPの代わりに十分機能していることが分かる。一方、図11 (3) より、B種については、連続取り込みが完全には行われていないことがわかる。具体的には、B種の基質を分注した際の発光量が低いことと、それに接続するdCTP分注時に発光が全く見られないことから、ターゲットオリゴのうち、5連続塩基Tについて完全に相補鎖伸長したものが、ほとんど存在しないことが導かれる。この結果、A種の合成基質が、dATPの代替として適していることが得られた。

[0112] 次に、分注する基質の量を上記の2倍量（最終濃度4  $\mu$ M）として、同様の実験を行った。基質分注量を2倍にすることにより、未伸長の現象は幾分緩和されることが分かっている。この理由は以下の通りである。図13 (2) 及び図13 (3) に示したとおり、段階的化学反应による配列決定法は、ターゲットDNAへの基質の取り込みと、アピラーゼによる基質分解が、反応試薬内で競合して行われる。未伸長現象は、連続塩基の様に多量の塩基を必要とする場合、伸長完了前に基質分解が実施されてしまうことにより発生する。そのため、注入する基質量が増えれば、基質分解の所要時間が増加するため、基質が完了しやすい。しかし、基質量の増加は、基質分解の負担が増えるため、未分解基質の残留が起こりやすくなり、新たな課題（先読み等）が発生している。通常、本発明者らの試薬条件では、基質分注は最終濃度2~4  $\mu$ M程度が適しており、それ以上の分注では未分解基質の残留が生じてしまう。そのため、最終濃度4  $\mu$ M以下で、1度の分注にて、伸長が完了することが理想的である。本実験の結果を、図12に示した。これより、以下のことが導かれる。まず、

基質dATP  $\alpha$  Sを用いる伸長では、基質量を2倍にしたにも関わらず、3回目の分注において未伸長由来の発光が検出される。そのため、従来技術であるdATP  $\alpha$  Sでは、5塩基連続伸長において、未伸長の課題の回避が不可能であることがわかる。一方、合成基質A種を用いた検討では、2度目の分注時の未伸長由来発光を、低く抑えることができた。つまり、A種は、1回目の分注だけで、5連続塩基伸長をほとんど完了することができたと言える。ここで、未伸長率Eを以下の式で定義すると、各基質の未伸長は表2となる。

[0113] 1回目分注後の未伸長率 (E1) = (2~3回目の発光量) / (1~3回の発光量の和)

2回目分注後の未伸長率 (E2) = (3回目の発光量) / (1~3回の発光量の和)

[表2]

表2. 5連続塩基未伸長度

基質名	1回分注後 未伸長度 (%)	2回分注後 未伸長度 (%)
dATP $\alpha$ S	36.8 $\pm$ 7.8	13.6 $\pm$ 5.1
A3a	3.8 $\pm$ 0.8	1.2 $\pm$ 0.2
A3b	11.2 $\pm$ 2.9	2.2 $\pm$ 0.3
A3c	3.0 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.1
A3d	3.5 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.0

[0114] これより、A種は1回目分注後の未伸長率が15%以下であり、特に、A3a、A3c及びA3dの3種は、1回目分注後の未伸長率が、4%以下である。また、A3a、A3c及びA3dの3種は2回分注する場合には、未伸長率は約1%程度に抑えることが可能である。また、A3bについても、2回分注することにより、2%程度まで未伸長率を低減できる。そのため、従来より課題となっていた、dATP  $\alpha$  Sを用いた場合の伸長阻害が、本発明の合成基質により解消できることが示された。ま

た、図12 (2) より、基質B種は、やはり連続伸長に課題があることが分かった。

[0115] 以上より、A種、即ち「プリン基の7位をエテニル基(C-C二重結合)を介して置換基で修飾したもの」は、背景発光を実用レベルに抑え、かつ連続取り込み時の伸長性能の良いdATP代替基質として有効であることが判明した。特にA3dは、全ての検討において良好な性能を示した。

[0116] 次に、開発した基質を利用して、実際に塩基配列解析を実施した。図15は、段階的化学反应による配列決定法において、dATPの代替に合成塩基A3dを用いて配列解析を行った結果(パイログラム)である。解析を実施したオリゴ配列S1及びプライマーP2は、以下の通りである。

[0117] 配列S1(配列番号7) :

gatttgggat agaggagcat tagttgcoat taatccaggg tgcattgctgg tacttcaaca

配列P2(配列番号8) :

tgttgaagta ccagcatgca c

なお、配列P2は、プライマーである。これは、上記の配列S1の下線部分に、相補的に結合することが可能である。また、配列解析に用いた試薬の条件を、表1の条件3に示した。

[0118] 図15の(1)は基質A3d(最終濃度2 $\mu$ M)を用いた場合である。また、比較として、従来技術であるdATP $\alpha$ S(最終濃度2 $\mu$ M)を用いた場合を(2)に示した。各図の下段に、注入した核酸基質の種類(注入塩基種)を示した。このうち、「A」で示される基質は、それぞれ、(1)ではA3d、(2)ではdATP $\alpha$ Sである。また、上段は、本オリゴに取り込まれる塩基種を示した。即ち、オリゴ配列S1において、プライマーP2が相補的に結合した部分(S1配列の下線部)から、上流側に連なる配列の相補鎖配列である。例えば、プライマーP2の3'末端に連なる塩基は、配列S1の下線部の左隣であり、塩基Gの2連続となっている。そのため、その相補鎖配列は、塩基Cの2連続となり、図15の通り、「CC」が最初となる。また破線は、得られた発光量を塩基量に変換する基準値である。例えば、上記の「CC」において、2塩基分の発光が観測されており、そ

の結果から、塩基Cが2塩基取り込まれたことが分かる。図15より、本実験では、本発明の基質も、従来技術のdATP $\alpha$ Sも、解析対象のオリゴにつき、塩基配列解析が可能であることが分かる。このオリゴは、連続塩基が最大2塩基であるため、両者に差異は見られない。しかし、A3dは連続塩基での取り込み性能が、dATP $\alpha$ Sより優れているため、塩基Tの連続が続く試料の解析において、効果的であると考えた。

[0119] そのため、以下の様に、塩基Tの3連続配列を有する配列の解析を比較した。解析を実施したDNA配列S2及びプライマーP3は、以下の通りである。

[0120] DNA配列S2(配列番号9) : tgttgaagta ccagcatgca ccatggggga cgctgctcat  
cttcttaaag atttgatddd tctoccataa aatgttdddd ctctttctgg taggacaaat att  
ggcaaat ttgacatgat ttgggataga ggagcattag ttgccattaa tccaggtgat cgcaaa  
tggt aagtaatddd

配列P3(配列番号10) : taatggcaac taatgctcct

なお、配列P3は、プライマーである。これは、上記のDNA配列S2の下線部分に、相補的に結合することが可能である。配列解析を実施した結果を、図16～図20に示した。また、試薬条件を以下の表3に纏めた。

[表3]

表3. 発光試薬組成(PPDK 利用)

組成	発光試薬条件4
Tricine	25 mM
EDTA	0.5 mM
Mg-Acetate	5 mM
DTT	0.5 mM
PPDK	33.8 U/mL
Luciferase	523 GLU/mL
Luciferin	0.4 mM
AMP	0.4 mM
Apyrase	1 U/mL
PEP	0.08 mM

[0121] なお、この実験では、PPiをATPに変換する酵素系として、従来技術（特許文献4）で記述したごとく、PPDKによりPPiとAMPをATPに変換する酵素系を利用した。図の表記は、図15と同じである。各図の下段は注入塩基種を示し、上段は解析対象のDNA配列に相補的に取り込まれる塩基種を示している。基質は、「塩基A→T→C→G」の順序で、7周分を解析した。ターゲット配列の示す通り、本解析では、塩基Aが3連続で取り込まれる箇所が2ヶ所（4周目及び7周目）存在する。そのため、塩基Aとして用いる核酸基質の連続取り込み性能の差異を評価できる。以下、詳細を述べる。

[0122] まず、3種の基質（A3d、dATP $\alpha$ S、及びC<sup>7</sup>dATP）を、最終濃度2 $\mu$ M条件で用い、配列解析した結果について、説明する（図16～図20）。図16は、本発明の基質A3d（最終濃度2 $\mu$ M）を用いた配列解析結果である。注入塩基種のA（○で囲んである）の分注時に、A3dを用いた。基質A3dは、先の実験（図7）の通り、dATP $\alpha$ Sと比較し約1桁高い基質特異性があるため、1周目のAのシグナルが示す通り背景発光が観測される。そのため、塩基Aの発光シグナルは、常に、背景発光分の増加が含まれている。図中の●は、試料の塩基配列に合致する伸長発光である。一方、塩基配列に合致しない主な発光に、▽を記した。図17は、同様に基質dATP $\alpha$ S（最終濃度2 $\mu$ M）を用いた配列解析結果である。注入塩基種のA（○で囲んである）の分注時に、dATP $\alpha$ Sを用いた。得られたパイログラムと、試料の塩基配列を比較した。図中の●は、試料の塩基配列に合致する伸長発光である。一方、塩基配列に合致しない主な発光に、▽を記した。図18は、同様に基質C<sup>7</sup>dATP（最終濃度2 $\mu$ M）を用いた配列解析結果である。注入塩基種のA（○で囲んである）の分注時に、C<sup>7</sup>dATPを用いた。基質C<sup>7</sup>dATPは、先の実験（図7）の通り、dATP $\alpha$ Sと比較し約2桁高い基質特異性があるため、1周目のAのシグナルが示す通り大きな背景発光が観測される。そのため、塩基Aの発光シグナルは、常に、背景発光分の増加が含まれている。図中の×は、この背景発光のみのシグナルである。●は、試料の塩基配列に合致する伸長発光である。ただし（●）は、伸長由来の発光と背景発光の両方を含んでいる。一方、塩基配列に合致しない主な発光に、▽を記した。

[0123] 図16～図18を比較し、以下のことが導かれる。まず、4周目の3連続取り込み性能の差として、以下の点が挙げられる。(1) dATP $\alpha$ Sを用いた実験（図17）では、4周目の3塩基伸長シグナルの減少が見られ、未伸長が発生していることが類推できる。その結果、4周目塩基T及び5周目塩基Gなどのシグナルも減少している。さらに、7周目の塩基A及び塩基Tの3連続についても、シグナルの減少が発生している。(2) 一方、A3dを用いた実験（図16）では、いくつかのノイズ信号▽は見られるものの、7周目の塩基Gまで確実に配列解析が

可能であることがわかる。(3) また、 $C^7dATP$ を用いた実験(図18)では、基質由来の背景発光が大きく、正確な配列同定が難しいことが分かる。また、5周目の塩基Gや、その後の7周目の塩基A(3連続)など、伸長不足と思われるシグナルも見られる。

[0124] 上記の通り、 $dATP\alpha S$ 及び $C^7dATP$ を用いた実験では、 $dATP\alpha S$ は連続塩基の取り込みに課題があり、 $C^7dATP$ は高い背景発光由来の精度劣化に課題があることがわかる。また、 $C^7dATP$ では、5周目以降において、未伸長と思われる減少も見られた。そのため、上記、2種の基質において、塩基Aについてのみ基質の最終濃度を2倍( $4\mu M$ )として実験を行った。図19及び図20は、それぞれ塩基Aとして、 $dATP\alpha S$ 及び $C^7dATP$ を、最終濃度 $4\mu M$ で反応させた実験結果である。これより、以下のことが導かれる。

[0125] 図19より、分注する $dATP\alpha S$ を2倍量とすることにより、未伸長が改善できていることが分かる。ただし、5周目の塩基Aのシグナルが、約2塩基分の量に近いことから、未伸長は完全には解消されておらず、5周目の塩基Aのシグナルにある程度含まれていると思われる。また、図20より、 $C^7dATP$ を2倍量とした結果では、5周目の塩基Gの未伸長は改善しておらず、背景発光は基質量と比例関係のため2倍化しており、結論として良い結果は得られなかった。

[0126] 以上より、連続取り込み事象における、本発明の核酸基質の有効性が示された。

### 産業上の利用可能性

[0127] 本発明は、遺伝子配列解析のうち、ルシフェラーゼ発光も利用した段階的化学反应による配列決定法の核酸基質試薬として利用が可能である。ルシフェラーゼ発光も利用した段階的化学反应による配列決定法は、励起光を用いずに解析が可能であるため、小型簡易解析装置や大規模並列型解析装置として、適用されている。本発明の物質は、それらの解析装置において利用が可能である。また、本発明は、標識化ターゲットを用いるDNAチップ解析技術や1塩基伸長による多型解析技術などにも応用が可能である。

### 符号の説明



[0128] 81 : ターゲット (核酸試料) 、82 : プライマー、83 : 塩基A、84 : 塩基T、85 : 塩基G、812 : A3aを用いた場合の発光、813 : A3bを用いた場合の発光、814 : A3cを用いた場合の発光、815 : A3dを用いた場合の発光、822 : A3aに続けてdC TPを分注した際の発光量、823 : A3bに続けてdGTPを分注した際の発光量、824 : A3cに続けてdGTPを分注した際の発光量、825 : A3dに続けてdGTPを分注した際の発光量、91 : dATP  $\alpha$  Sのプロファイル。92 : A3cのプロファイル、101-103 : A3aを用いた場合の発光量、104 : A3cを用いた場合の発光量、105-107 : A3bを用いた場合の発光量、108-110 : A3dを用いた場合の発光量、1001-1003 : dC TPを用いた場合の発光量、1004 : B4を用いた場合の発光量、111 : ターゲットオリゴ、112 : プライマー。113 : プライマーの3' 末端、114 : 塩基G、131 : 塩基C

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

## 請求の範囲

- [請求項1] 核酸試料を鋳型とし、塩基AGTCに対する相補的核酸基質を加えて相補鎖合成を行う工程、  
該相補鎖合成で生成するピロリン酸から酵素によりATPを生成させる工程、及び  
ルシフェラーゼ反応で生じる化学発光を検出して相補鎖合成の有無を判定する工程、を含む核酸分析方法であって、  
塩基Tに対する相補的核酸基質として、プリン基の7位が置換基で修飾された7-置換基-デオキシリボヌクレオチド三リン酸を用いることを特徴とする前記核酸分析方法。
- [請求項2] 塩基Tに対する相補的核酸基質として、エテニル基(C-C二重結合)、エチレン基(C-C単結合)又はエチニル基(C-C三重結合)を介して、プリン基の7位が置換基で修飾された7-置換基-デオキシリボヌクレオチド三リン酸を用いる、請求項1に記載の核酸分析方法。
- [請求項3] 塩基Tに対する相補的核酸基質として、エテニル基(C-C二重結合)を介してプリン基の7位が置換基で修飾された7-置換基-デオキシリボヌクレオチド三リン酸を用いる、請求項2に記載の核酸分析方法。
- [請求項4] プリン基の7位の置換基が芳香族基を含む置換基である、請求項1～3のいずれか1項に記載の核酸分析方法。
- [請求項5] 芳香族基が、塩基性芳香族基である、請求項4に記載の核酸分析方法。
- [請求項6] プリン基の7位が置換基で修飾された7-置換基-デオキシリボヌクレオチド三リン酸を含む、塩基Tに対する相補的核酸基質試薬。
- [請求項7] エテニル基(C-C二重結合)、エチレン基(C-C単結合)又はエチニル基(C-C三重結合)を介して、プリン基の7位が置換基で修飾された7-置換基-デオキシリボヌクレオチド三リン酸を含む、請求項6に記載の試薬。
- [請求項8] エテニル基(C-C二重結合)を介してプリン基の7位が置換基で修飾さ

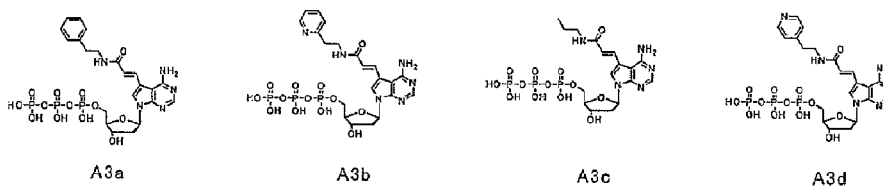
れた7-置換基-デオキシリボヌクレオチド三リン酸を含む、請求項7に記載の試薬。

[請求項9] プリン基の7位の置換基が芳香族基を含む置換基である、請求項6～8のいずれか1項に記載の試薬。

[請求項10] 芳香族基が、塩基性芳香族基である、請求項9に記載の試薬。

[請求項11] 以下：

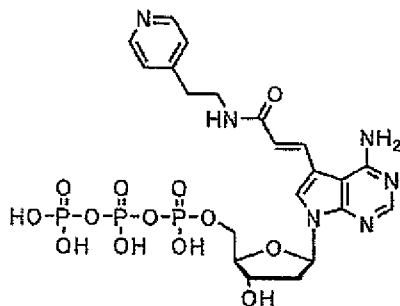
[化1]



から選択される化合物。

[請求項12] 以下の式：

[化2]



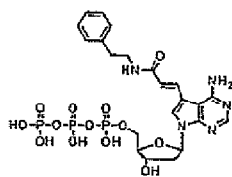
A3d

で表される化合物。

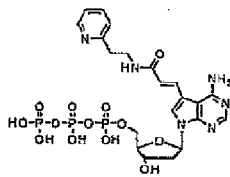
[請求項13] パイロシーケンシング法において使用するための、請求項6～10のいずれか1項に記載の試薬。

[図1]

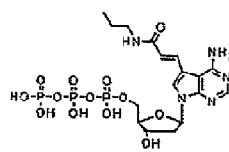
図 1



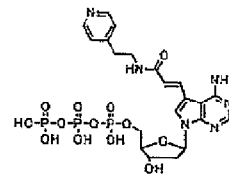
A3a



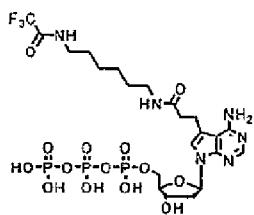
A3b



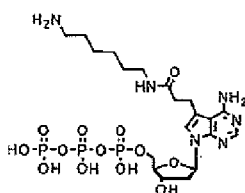
A3c



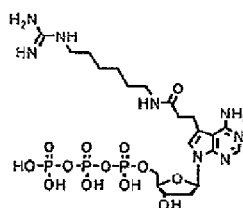
A3d



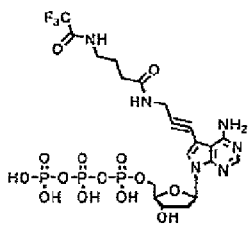
B3



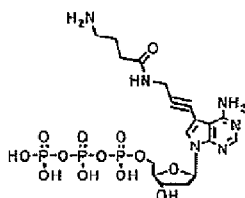
B4



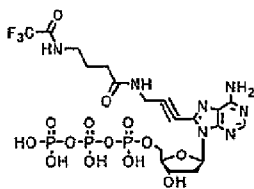
B5



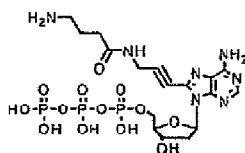
C2



C3

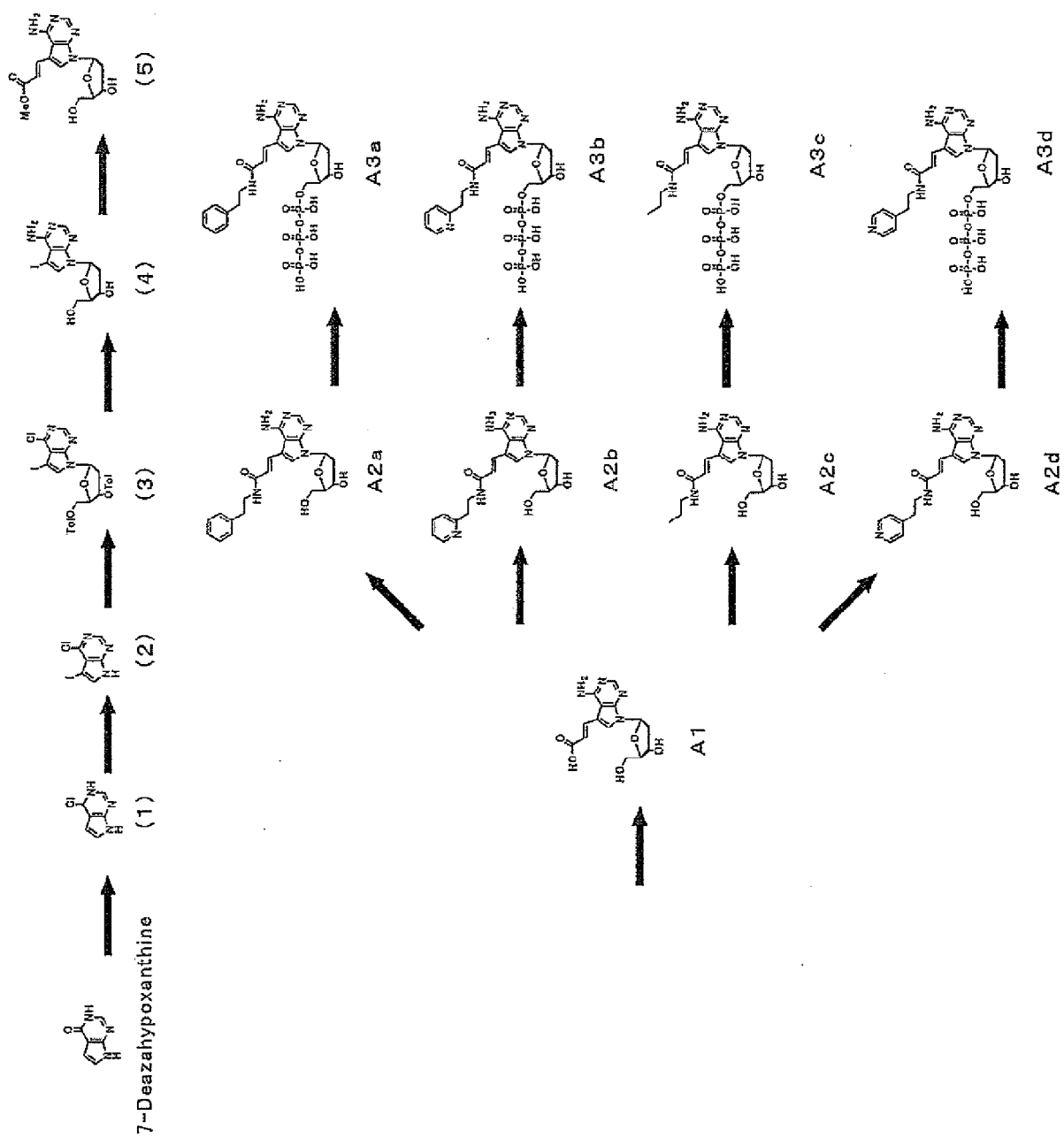


D2



D3

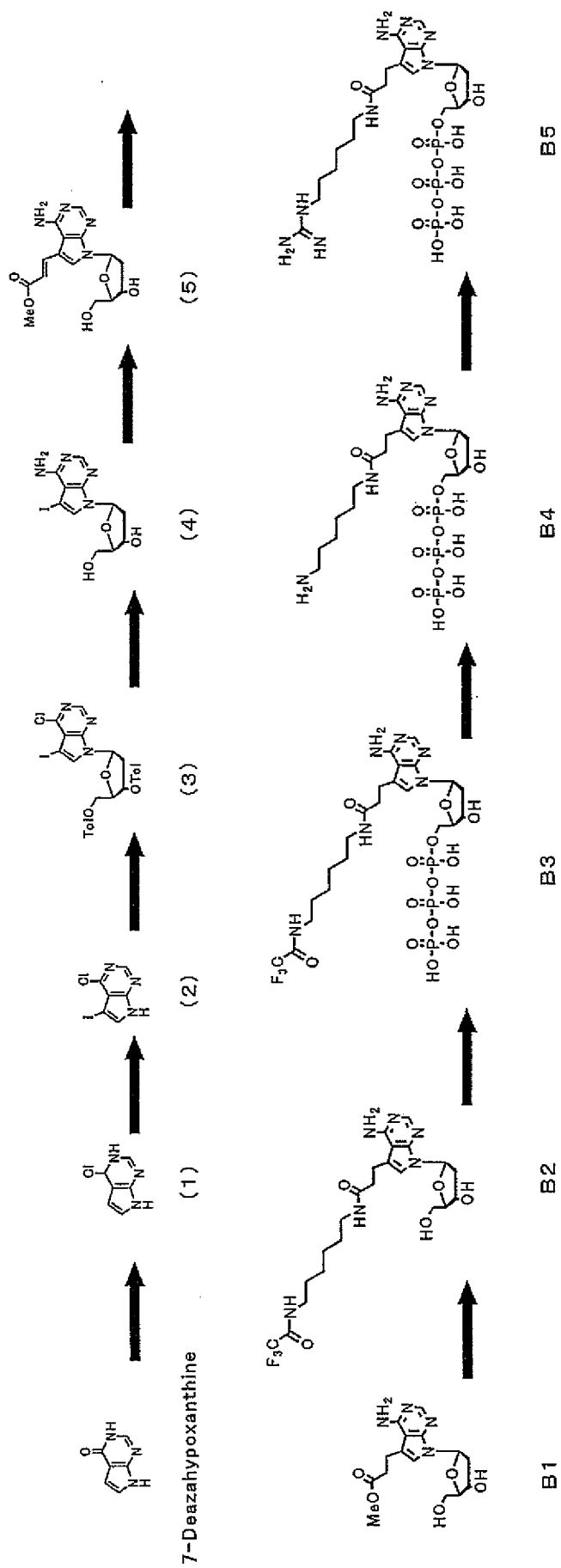
[2]



[2]

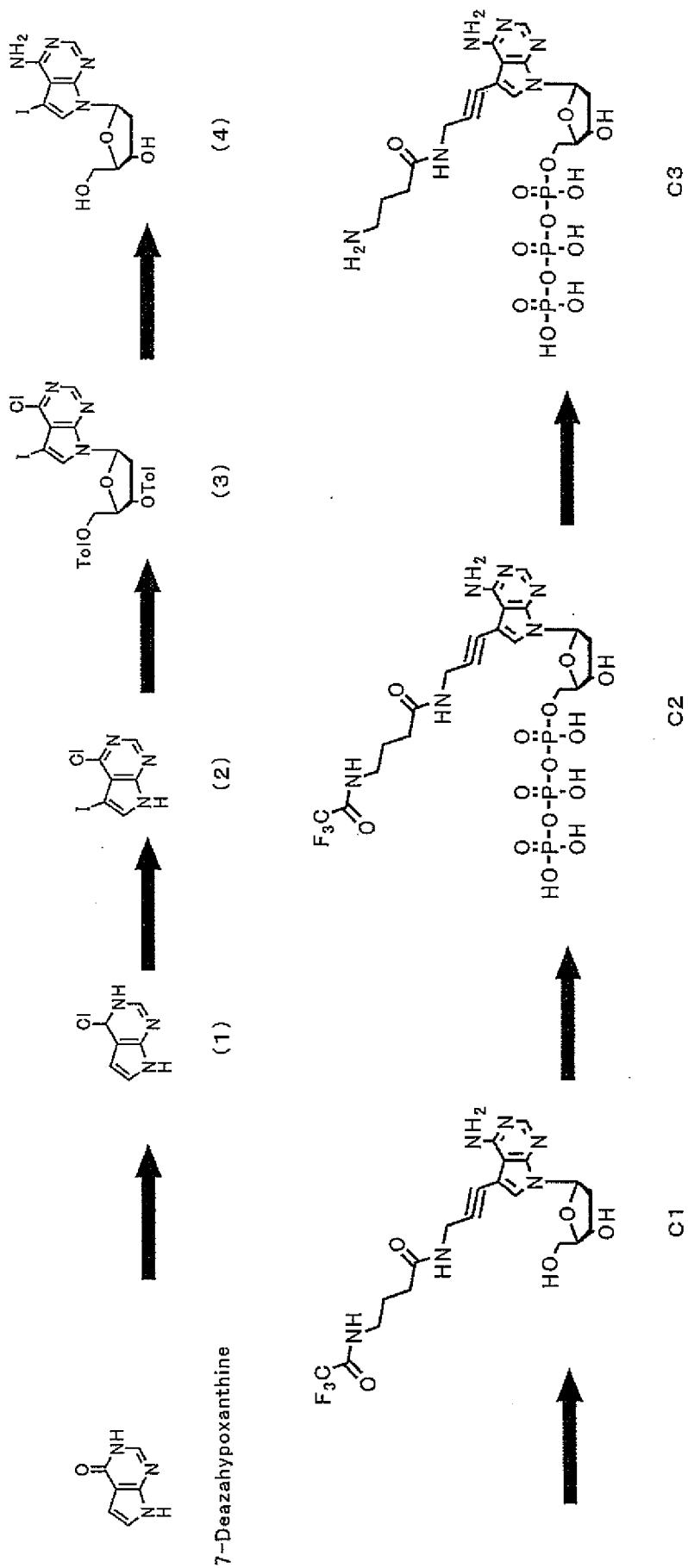
[ 3 ]

[ 3 ]



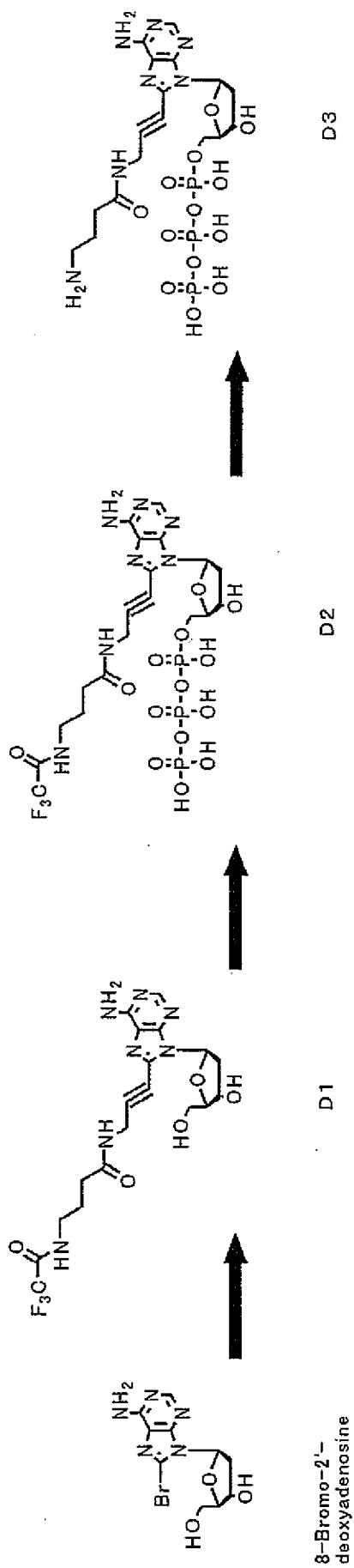
[圖4]

圖 4



[ 5 ]

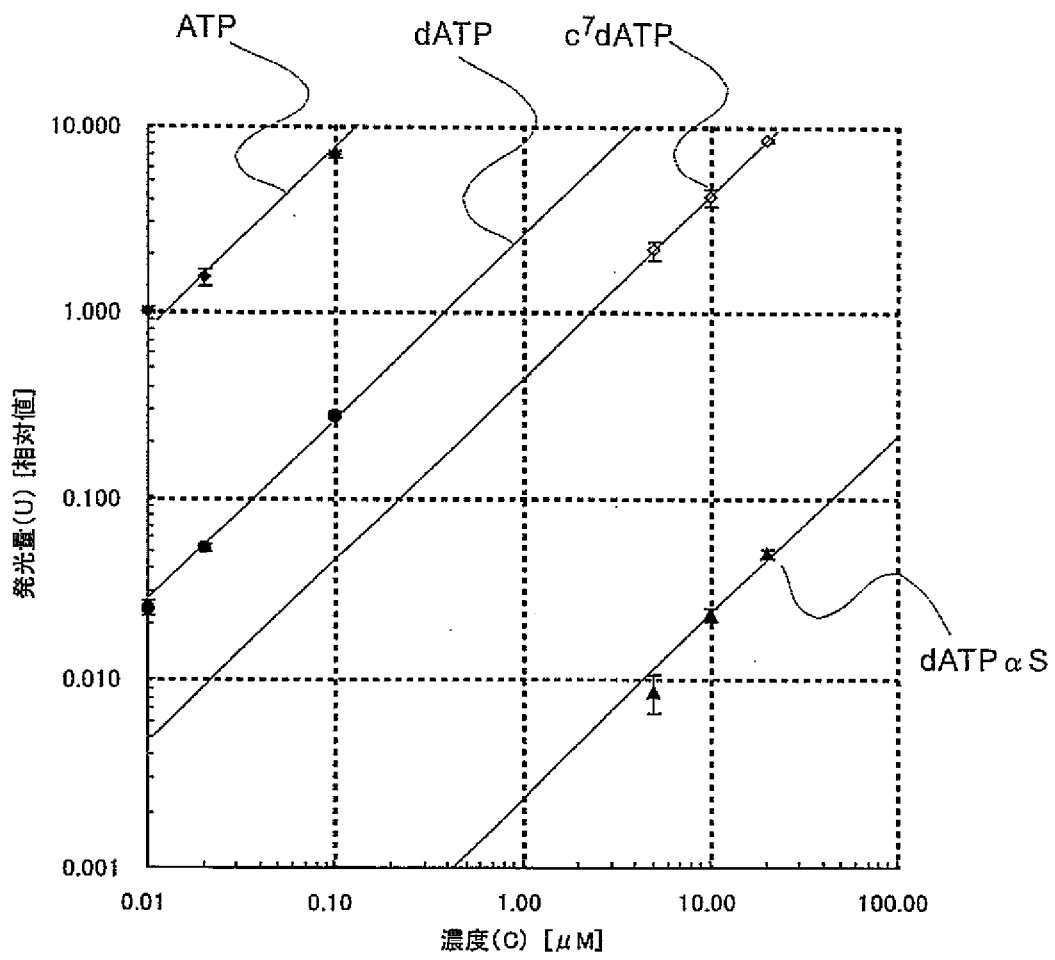
[ 5 ]





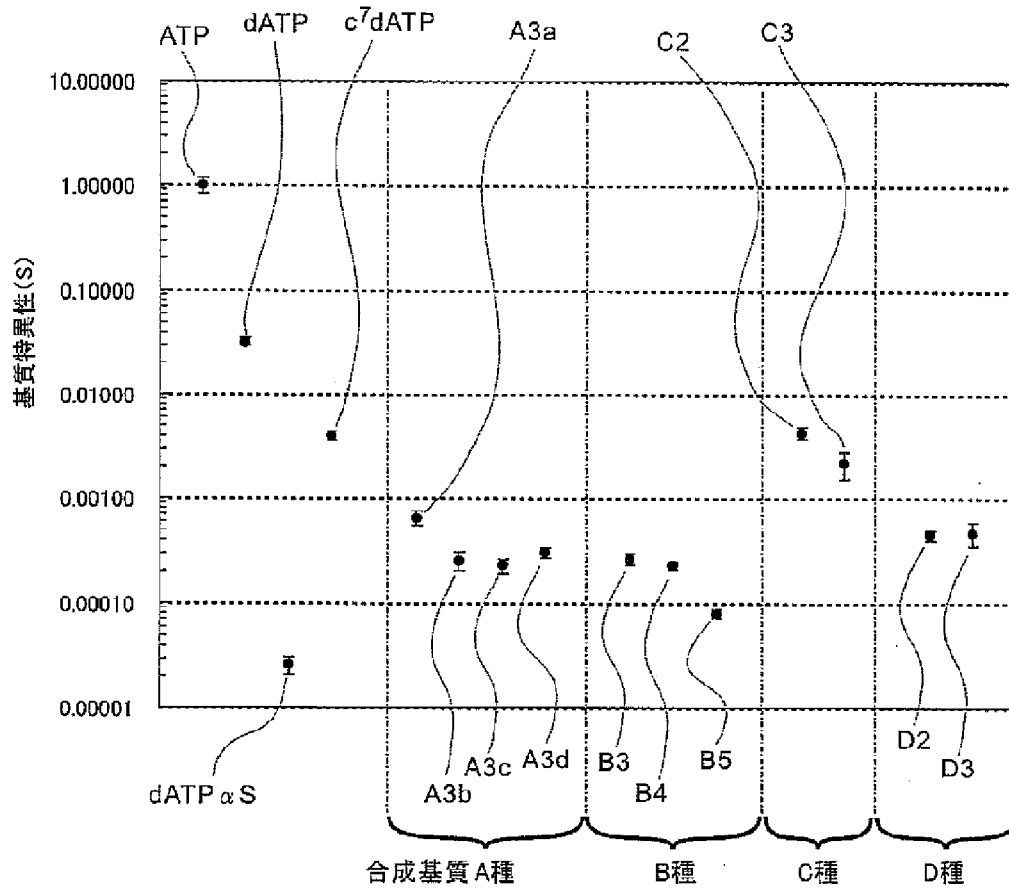
[図6]

図 6

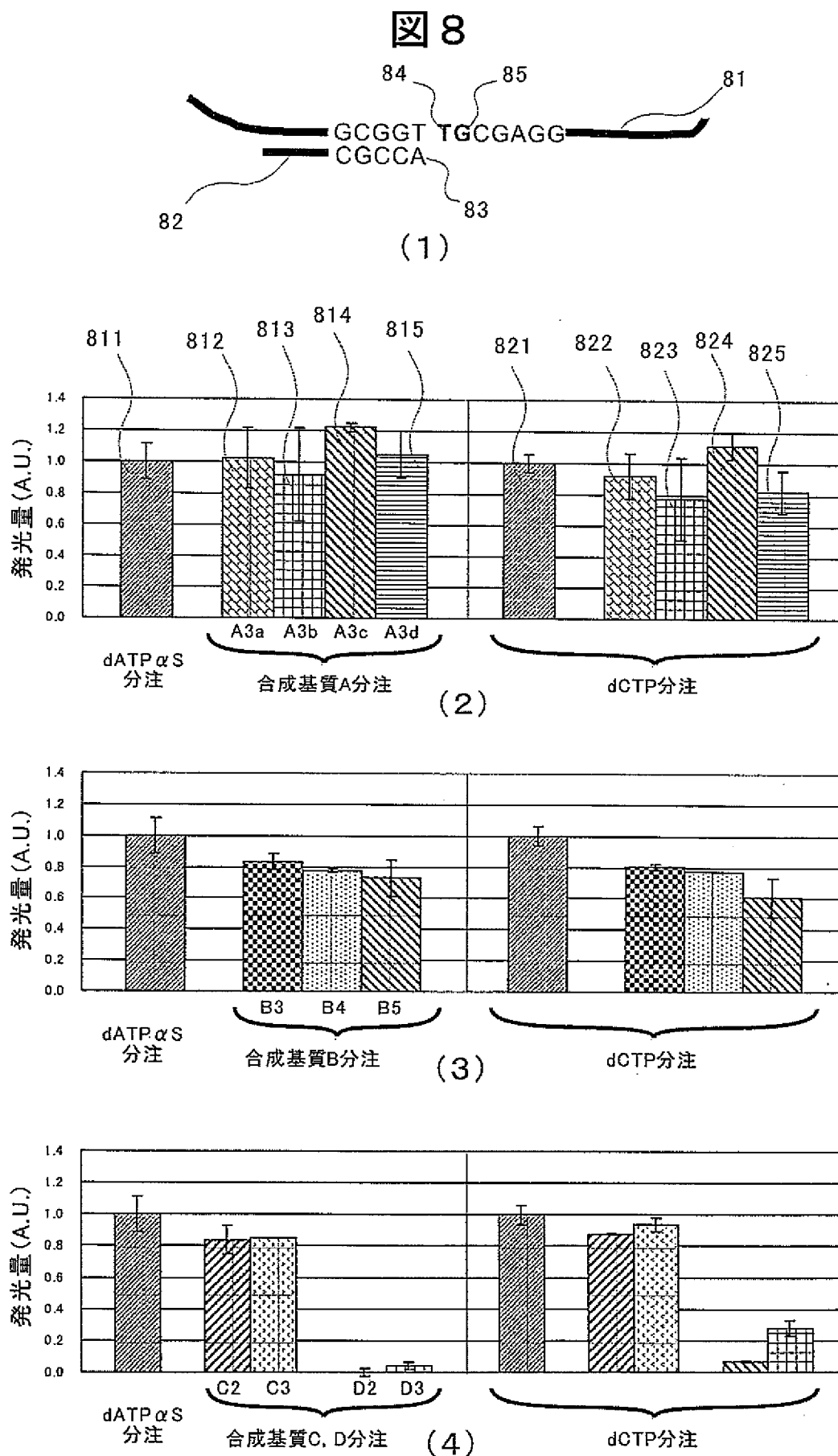


[図7]

図 7

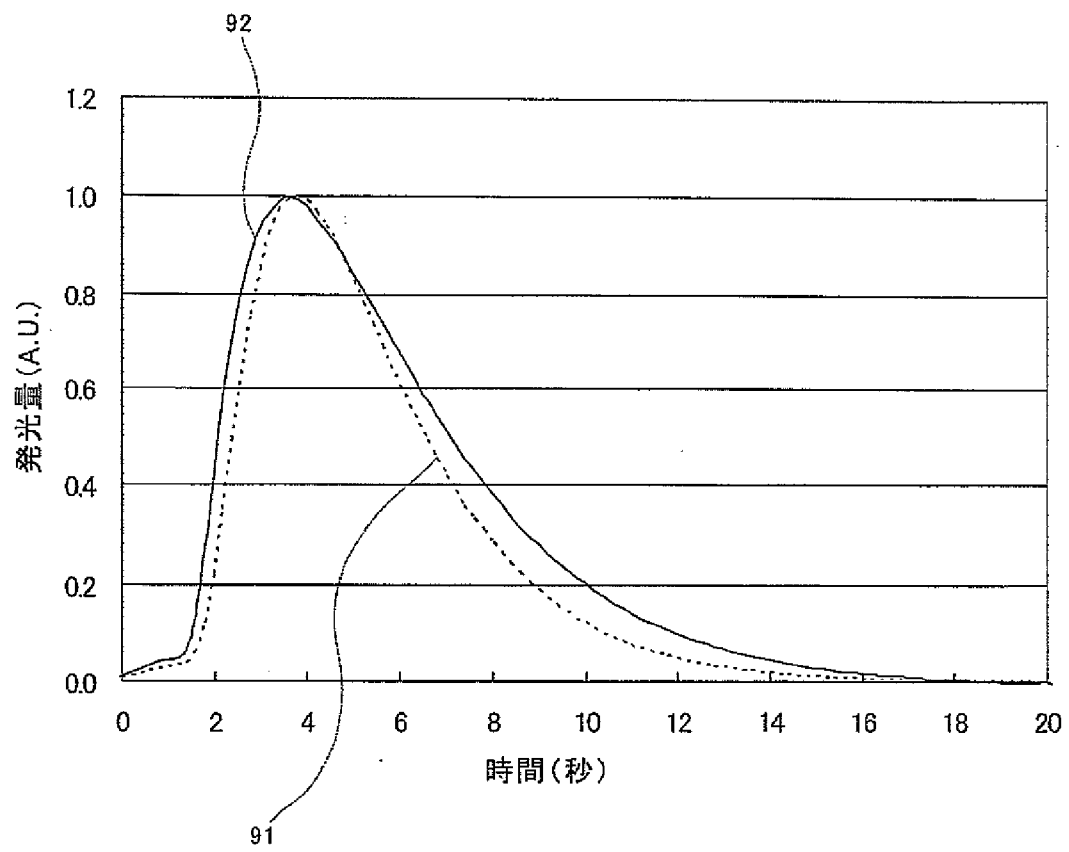


[図8]



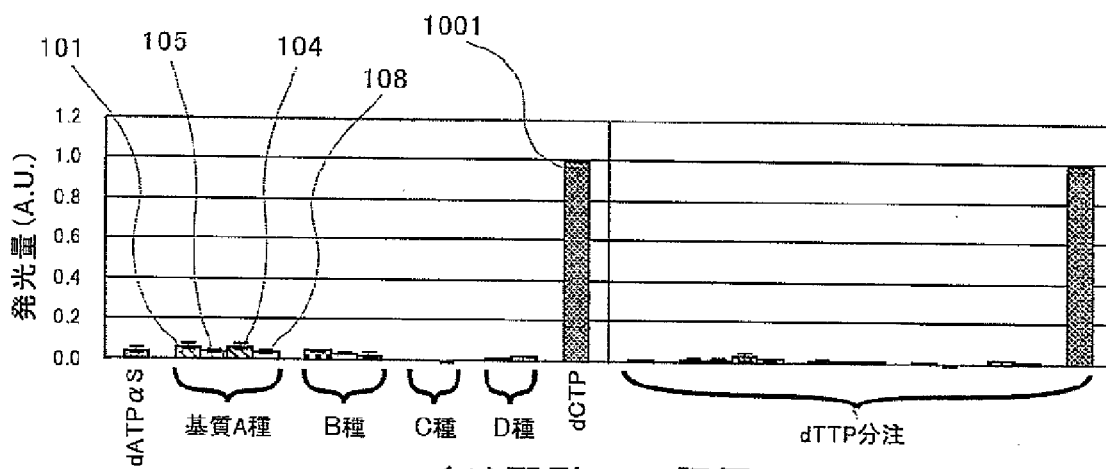
[図9]

図9

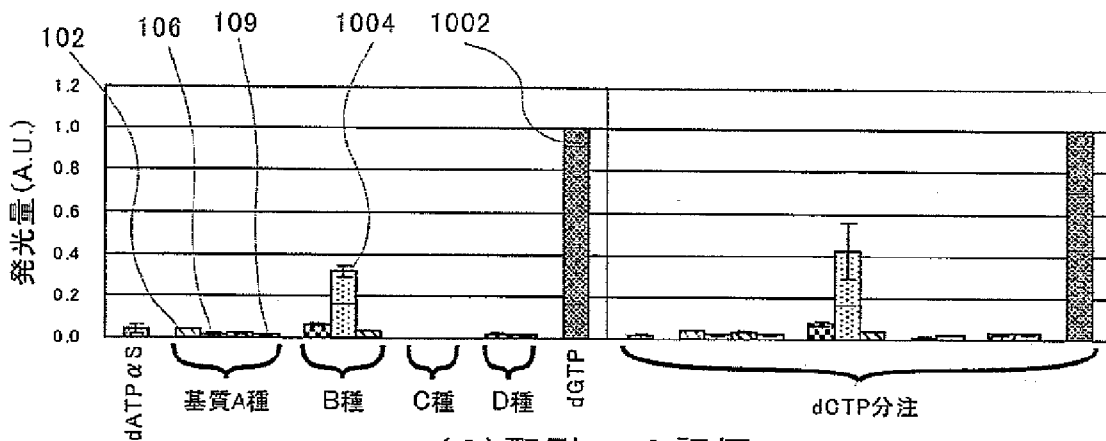


[図10]

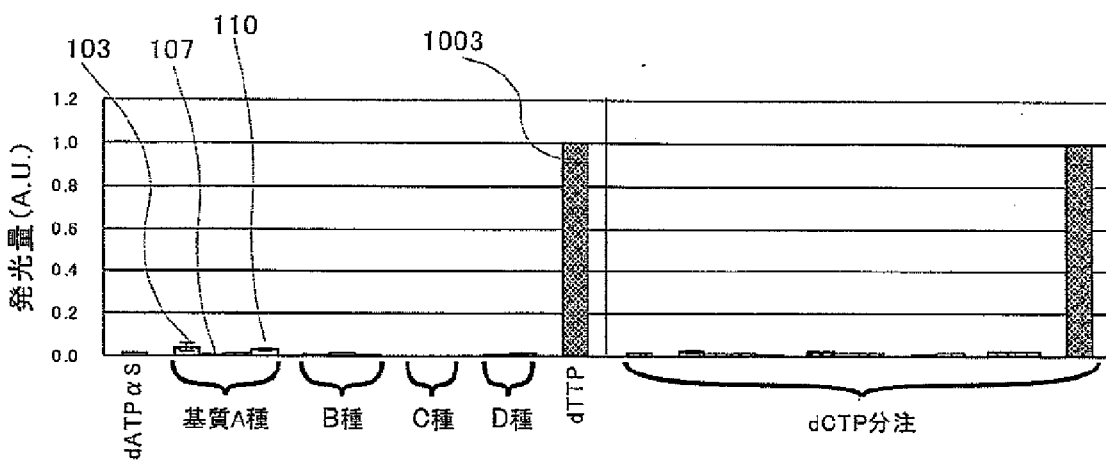
図10



(1) 配列GAの評価



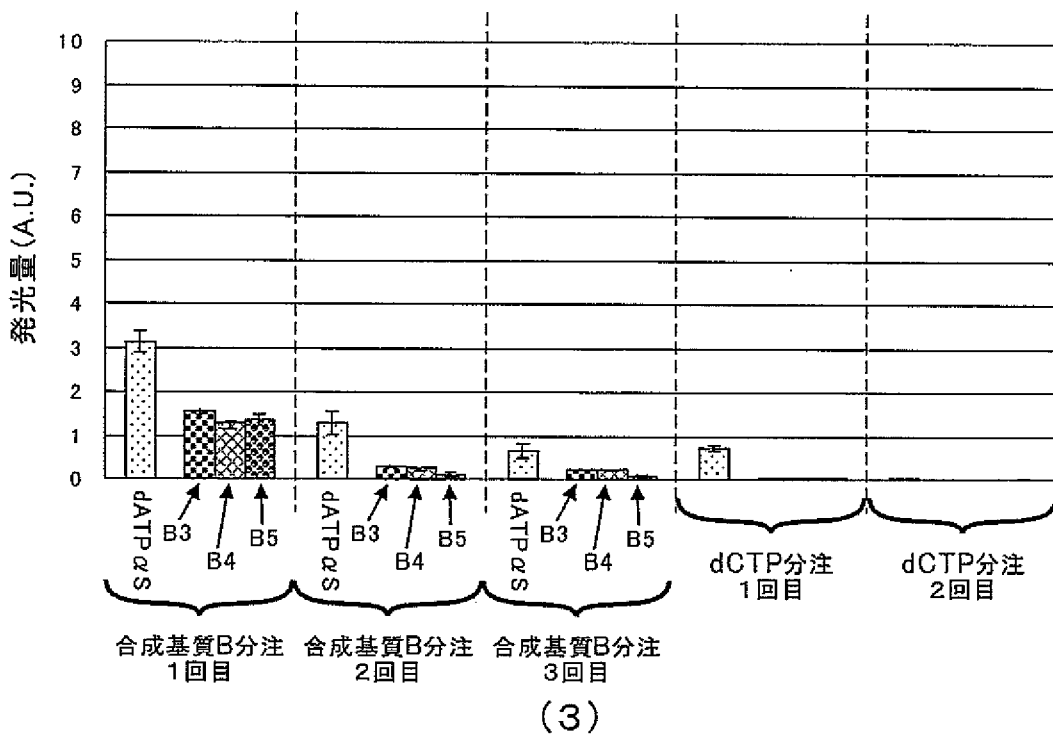
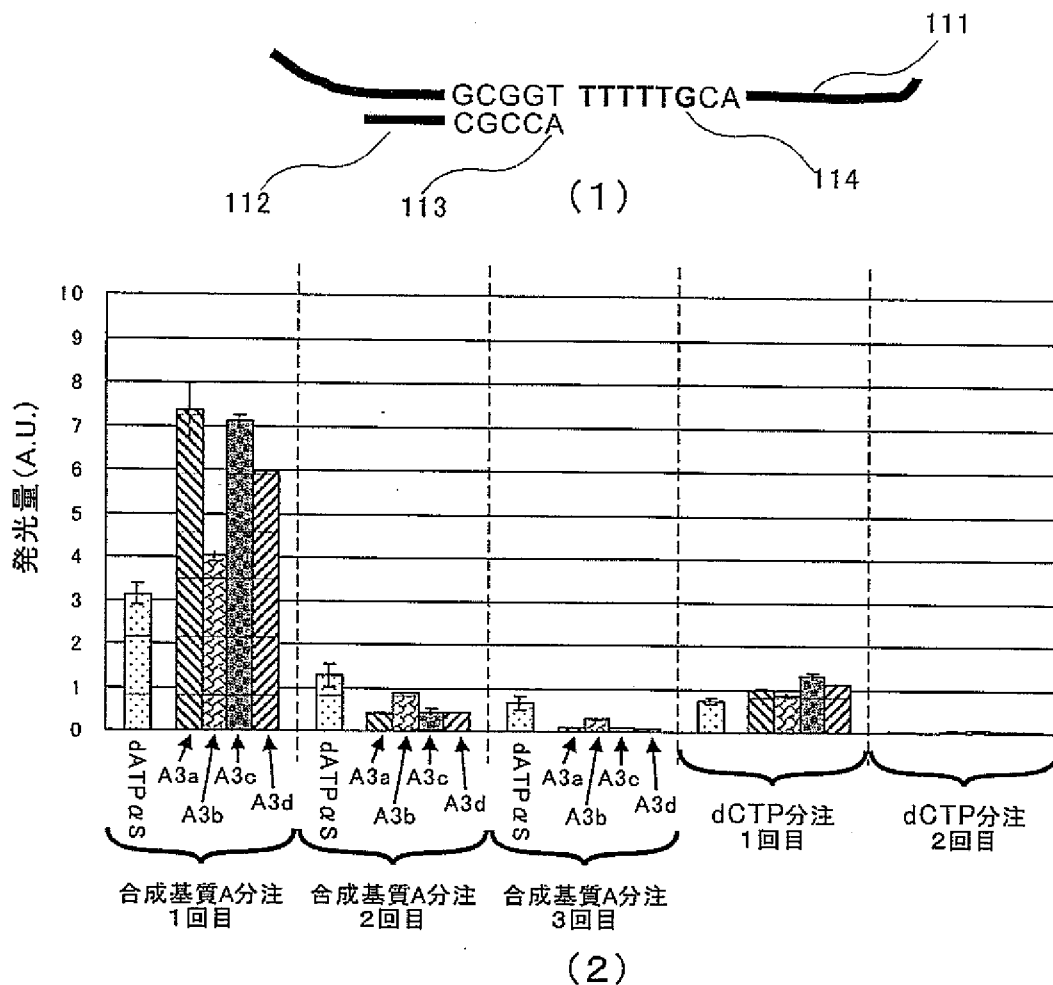
(2) 配列CGの評価



(3) 配列AGの評価

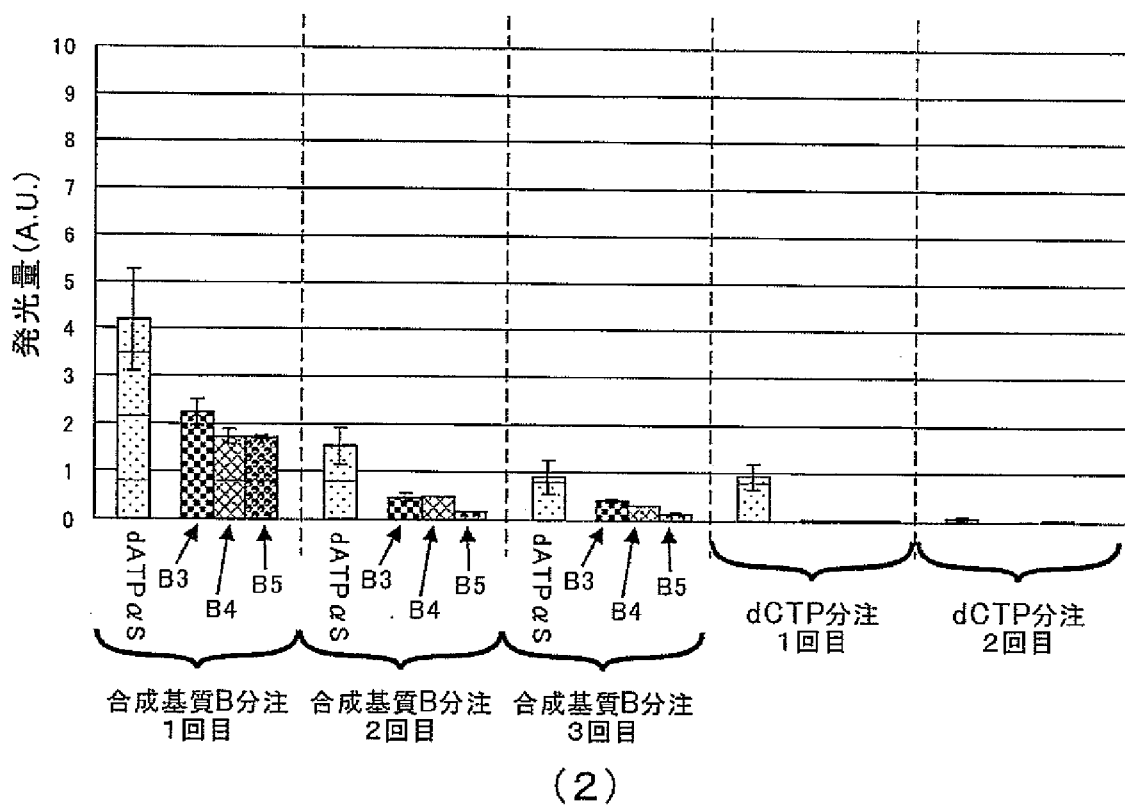
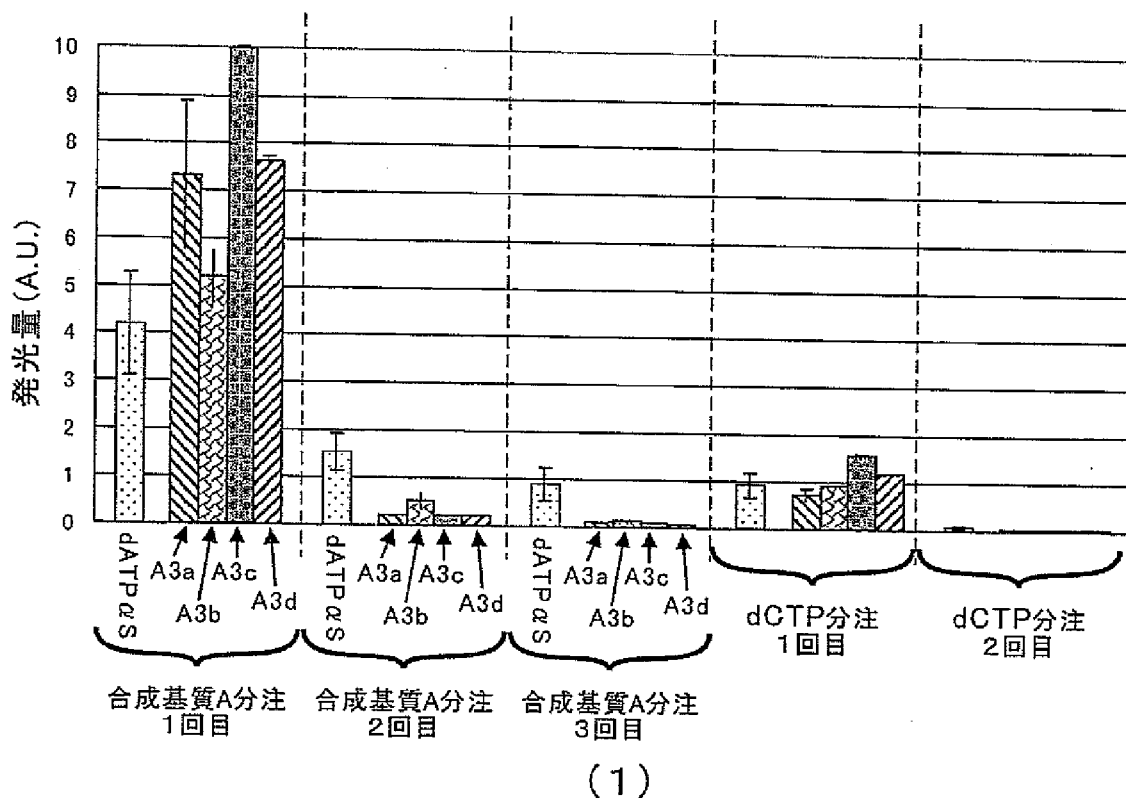
[図11]

図 1 1



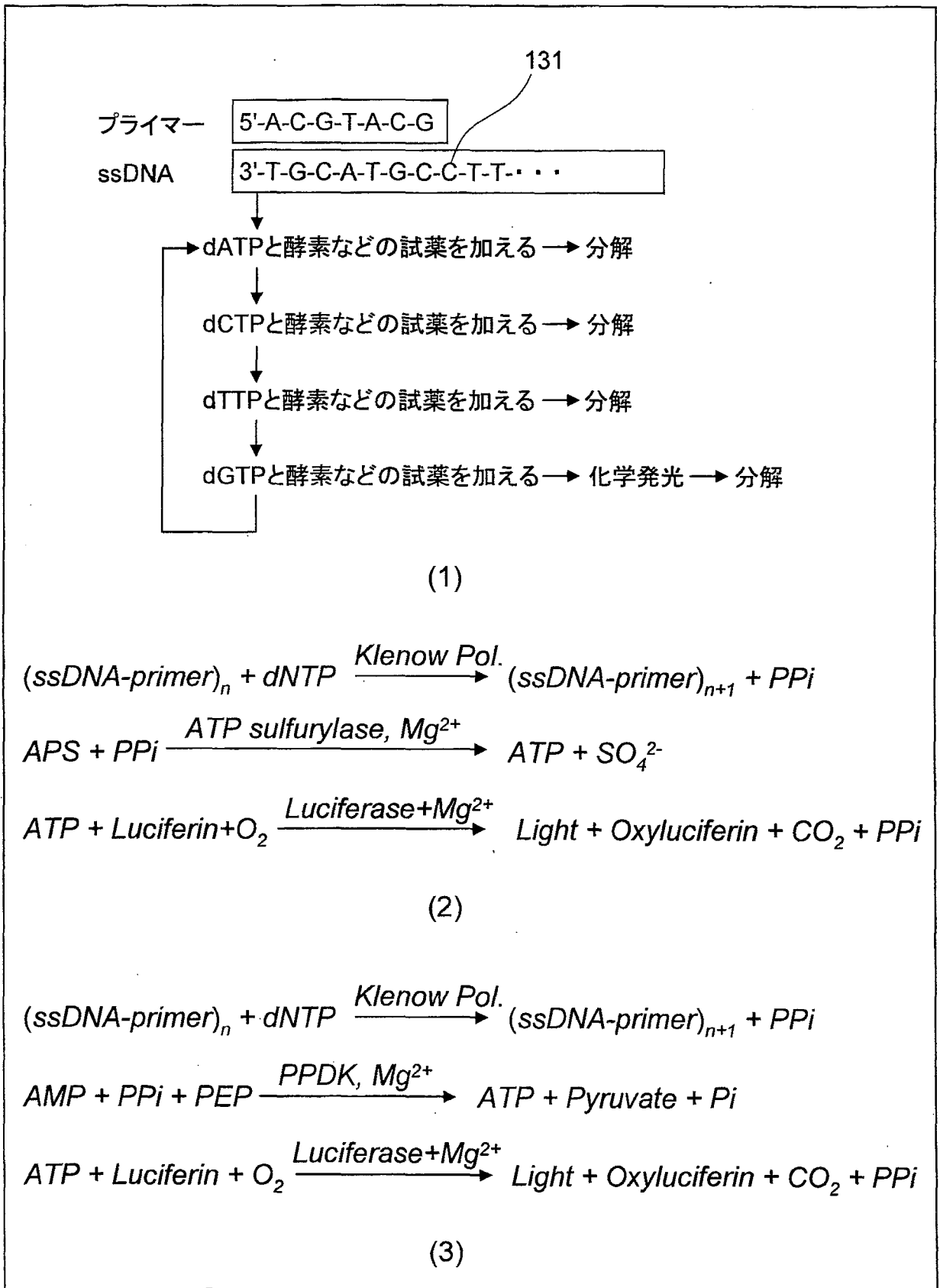
[図12]

図 1 2



[図 13]

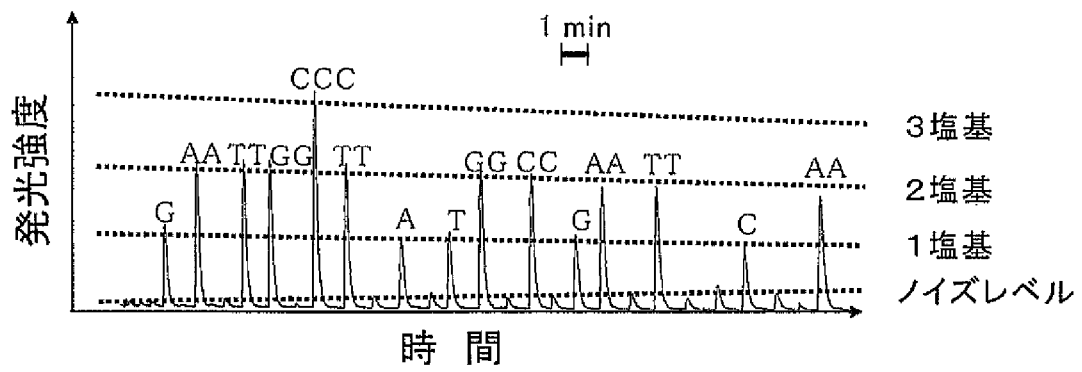
図 13





[図14]

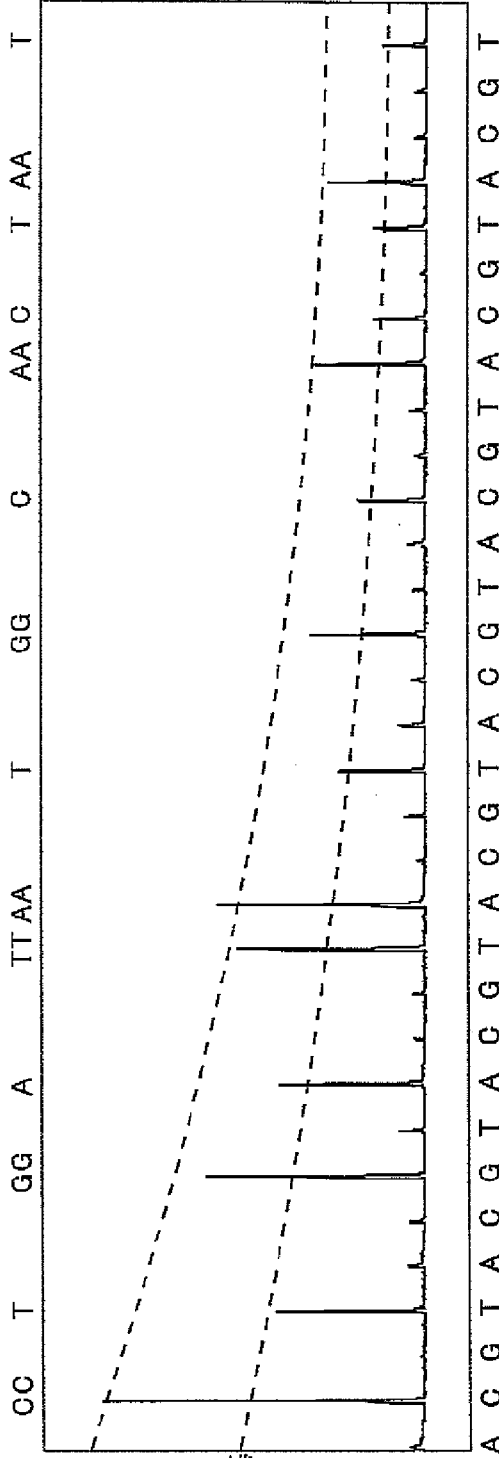
図 1 4



[図15]

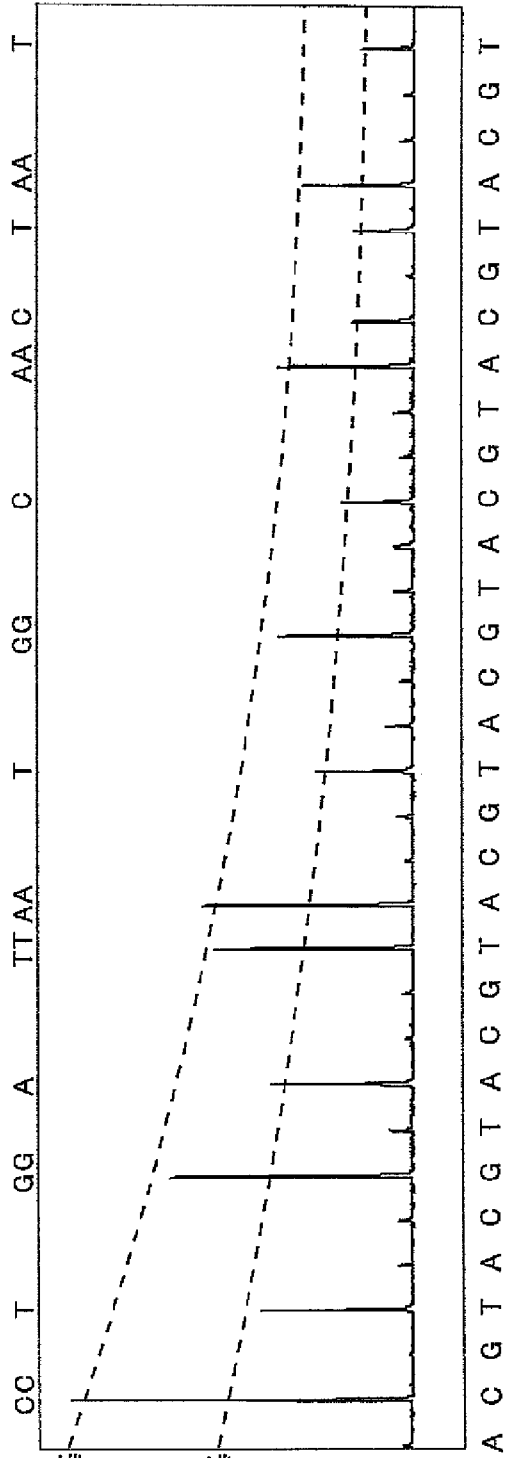
図15

(1) ターゲット配列



注入塩基種

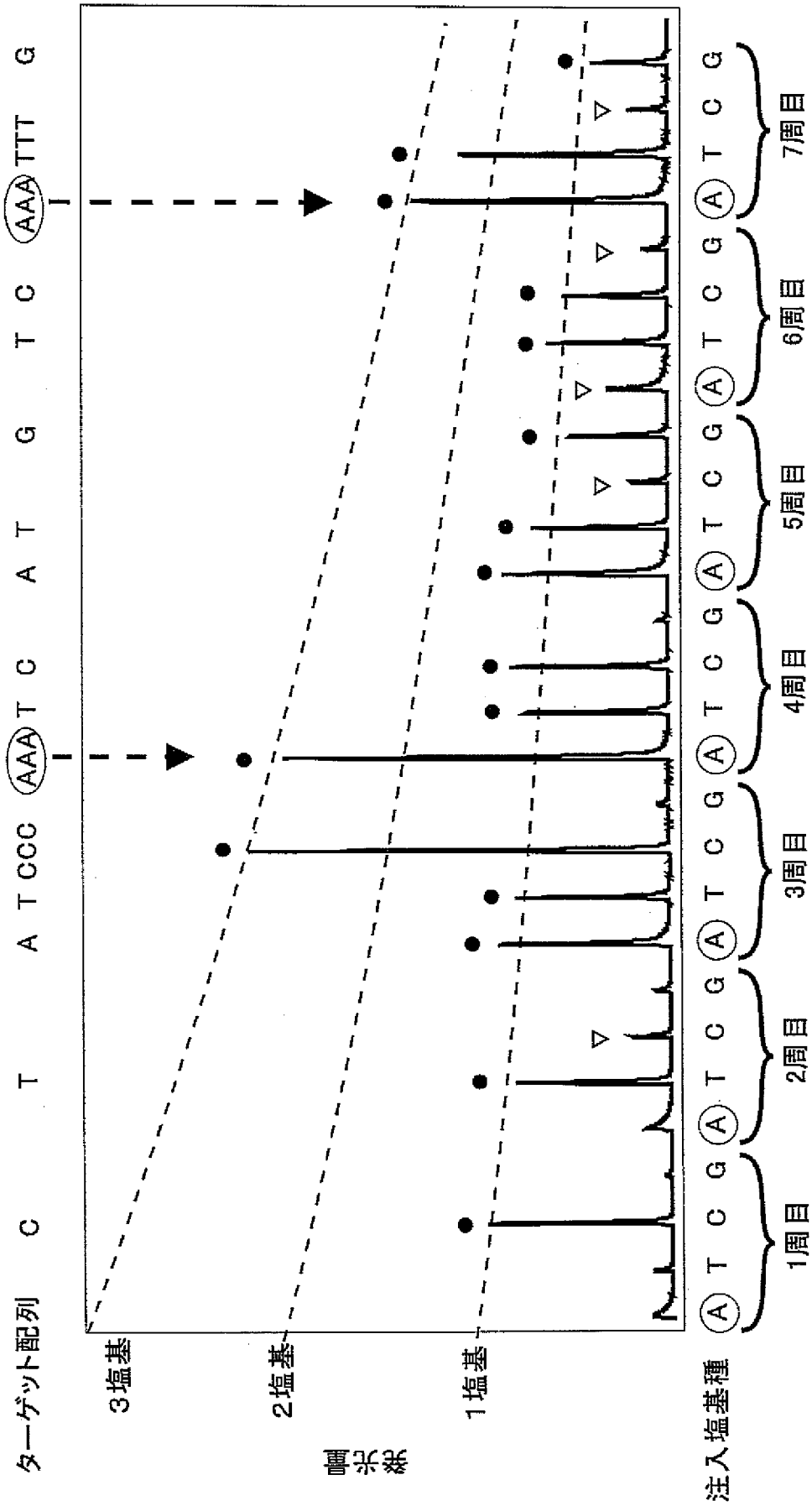
(2) ターゲット配列



注入塩基種

[図16]

図16











## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/063529

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H19/20(2006.01) i, C12Q1/68(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)

C07H19/20, C12Q1/68

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	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

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

CAplus/REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	JP 2007-56001 A (National University Corporation Gunma University), 08 March 2007 (08.03.2007), entire text (Family: none)	6-10/1-5, 13/ 11, 12
X/Y/A	KUWAHARA Masayasu et al., Substrate property and incorporation accuracy of various dATP analogs during enzymatic polymerization using thermostable DNA polymerases Nucleic Acids Symposium Series, 2006, No.50, pp.31-32	6-8/1-5, 13/ 9-12

 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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
26 August, 2010 (26.08.10)Date of mailing of the international search report  
07 September, 2010 (07.09.10)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/063529

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 2008/144315 A1 (HELICOS BIOSCIENCES CORP.), 27 November 2008 (27.11.2008), fig. 1 & JP 2009-516749 A                      & US 2008/0103053 A1 & US 2007/0190546 A1                      & US 2007/0076908 A1 & EP 2057175 A1                              & EP 1973926 A1 & WO 2008/144315 A1                      & WO 2008/016906 A2	6, 7/1, 2, 13
Y	WO 98/13523 A1 (PYROSEQUENCING AB.), 02 April 1998 (02.04.1998), entire text & JP 2001-501092 A                      & US 6210891 B1 & EP 932700 A1	1-5, 13
Y	ERIKSSON J. et al., 7-deaza-2'-deoxyadenosine- 5'-triphosphate as an alternative nucleotide for the pyrosequencing technology, NUCLEOSIDES NUCLEOTIDES & NUCLEIC ACIDS, 2004, 23(10), pp.1583-1594	1-5, 13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07H19/20(2006.01)i, C12Q1/68(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. C07H19/20, C12Q1/68		
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 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2010年 日本国実用新案登録公報 1996-2010年 日本国登録実用新案公報 1994-2010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/REGISTRY (STN)		
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
X/Y/A	JP 2007-56001 A (国立大学法人群馬大学) 2007.03.08, 全文 (ファミリーなし)	6-10/1-5, 13/11, 12
X/Y/A	KUWAHARA Masayasu et al., Substrate property and incorporation accuracy of various dATP analogs during enzymatic polymerization using thermostable DNA polymerases Nucleic Acids Symposium Series, 2006, No. 50, pp. 31-32	6-8/1-5, 13/9-12
X/Y	WO 2008/144315 A1 (HELICOS BIOSCIENCES CORPORATION) 2008.11.27,	6, 7/1, 2, 13
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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、一般的な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 26.08.2010	国際調査報告の発送日 07.09.2010	
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) 植原 克典 電話番号 03-3581-1101 内線 3492	4 P   9840

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
	FIGURE1 など & JP 2009-516749 A & US 2008/0103053 A1 & US 2007/0190546 A1 & US 2007/0076908 A1 & EP 2057175 A1 & EP 1973926 A1 & WO 2008/144315 A1 & WO 2008/016906 A2	
Y	WO 98/13523 A1 (PYROSEQUENCING AB) 1998.04.02, 全文 & JP 2001-501092 A & US 6210891 B1 & EP 932700 A1	1-5, 13
Y	ERIKSSON J. et al., 7-deaza-2'-deoxyadenosine-5'-triphosphate as an alternative nucleotide for the pyrosequencing technology, NUCLEOSIDES NUCLEOTIDES & NUCLEIC ACIDS, 2004, 23(10), pp. 1583-1594	1-5, 13

## 第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. c の続き)

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、提出された以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 提出手段
- 紙形式
- 電子形式
- b. 提出時期
- 出願時の国際出願に含まれていたもの
- この国際出願と共に電子形式により提出されたもの
- 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの
2.  さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しを提出した場合、出願後に提出した配列の写し若しくは追加して提出した配列の写しが、出願時に提出した配列と同一である旨又は出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見：