

(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2013-159574
(P2013-159574A)

(43) 公開日 平成25年8月19日(2013.8.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07H 19/14 (2006.01)	C07H 19/14 CSP	4B063
C07H 21/04 (2006.01)	C07H 21/04 ZNAB	4C057
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 32 頁)

(21) 出願番号 特願2012-21547 (P2012-21547)
(22) 出願日 平成24年2月3日(2012.2.3)

(71) 出願人 899000057
学校法人日本大学
東京都千代田区九段南四丁目8番24号
(74) 代理人 100092783
弁理士 小林 浩
(74) 代理人 100120134
弁理士 大森 規雄
(74) 代理人 100128761
弁理士 田村 恭子
(74) 代理人 100104282
弁理士 鈴木 康仁
(72) 発明者 齋藤 義雄
東京都千代田区九段南四丁目8番24号
学校法人日本大学内

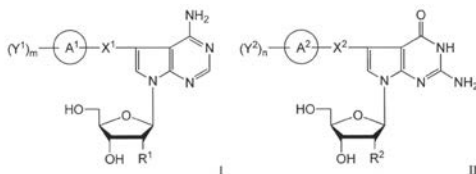
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 デアザプリンヌクレオチド誘導体、デアザプリンヌクレオチド誘導体及びポリヌクレオチド誘導体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 周囲の極性環境の違いにより蛍光発光波長が変化し、DNAに導入した場合にもDNAの二重らせん構造を不安定化しない新規な蛍光核酸及びそれを利用したプローブの提供。

【解決手段】 下記式：



[式中、環A¹及び環A²は、C₆~C₁₈芳香環であり、X¹及びX²は、炭素-炭素二重結合(-C=C-)又は炭素-炭素三重結合(-C≡C-)であり、Y¹及びY²は、C₁~C₁₀アシル基、C₁~C₁₀アルコキシカルボニル基、シアノ基又はハロゲン原子等であり、m及びnは、0、1又は2であり、R¹及びR²は、水素原子又は水酸基である。]で示されるデアザプリンヌクレオチド誘導体。

表1A 蛍光発光波長とその変化量

溶媒	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	$\Delta\lambda(\text{nm})$
MeOH	489	63
EtOH	489	54
2-PrOH	484	38
DMSO	464	38
DMF	504	78
MeCN	491	65
THF	460	34
AcOEt	458	32
CHCl ₃	426	-

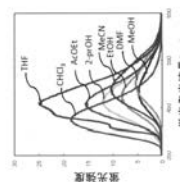
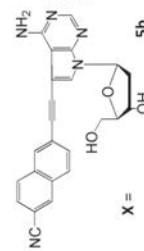


表1B DNA二重鎖を形成した時のTm値とその変化量

Duplexes	T _m (°C)	ΔT_m (°C)
ODN1 (5b) / ODN2 (T)	52.8	0.0
ODN1 (5b) / ODN2 (C)	50.1	-2.7
ODN1 (5b) / ODN2 (A)	44.2	-8.6
ODN1 (5b) / ODN2 (G)	46.7	-6.1



ODNs	Sequences
1	5'-d(CGCAATTAACGG)-3'
2	5'-d(CCGTTAATTCGG)-3'

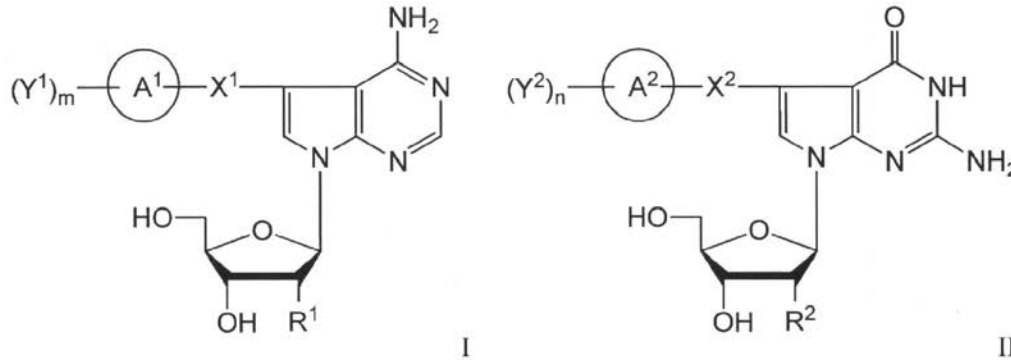
N = A, T, G or C

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式 (I) 又は (II) :

【化 1 3】



10

[式中、環 A¹ 及び環 A² は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、C₆ ~ C₁₈ 芳香環であり、

X¹ 及び X² は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、炭素 - 炭素二重結合 (- C = C -) 又は炭素 - 炭素三重結合 (- C ≡ C -) であり、

Y¹ 及び Y² は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、C₁ ~ C₁₀ アシル基、C₁ ~ C₁₀ アルコキシカルボニル基、カルボン酸アミド基 (- C (= O) - NR^a R^b で表され、R^a 及び R^b はそれぞれ互いに独立し、同一又は異なって、水素原子又は C₁ ~ C₁₀ アルキル基である。)、シアノ基、ハロゲン原子、ニトロ基、置換基を有していてもよいアミノ基 (- NR^a R^b で表され、R^a 及び R^b はそれぞれ互いに独立し、同一又は異なって、水素原子又は C₁ ~ C₁₀ アルキル基である。)、水酸基、チオール基及び C₁ ~ C₁₀ アルキル基からなる群より選ばれる置換基であり、

20

m 及び n は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、0、1 又は 2 であり、

R¹ 及び R² は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、水素原子又は水酸基であり、

但し、環 A¹ がフェニル基であり、X¹ が炭素 - 炭素三重結合 (- C ≡ C -) であり、m が 0 であり、且つ、R¹ が水素原子である場合を除く。]

30

で示されるデアザプリンヌクレオシド誘導体。

【請求項 2】

前記 R¹ 及び R² が、水素原子である、請求項 1 記載のデアザプリンヌクレオシド誘導体。

【請求項 3】

前記環 A¹ 及び環 A² が、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、フェニレン基、ナフチレン基、アントリレン基及びフェナントリレン基からなる群より選ばれるものである、請求項 1 又は 2 記載のデアザプリンヌクレオシド誘導体。

【請求項 4】

前記環 A¹ 及び環 A² が、ナフチレン基である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のデアザプリンヌクレオシド誘導体。

40

【請求項 5】

前記置換基 Y¹ 及び Y² が、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、C₁ ~ C₁₀ アシル基、C₁ ~ C₁₀ アルコキシカルボニル基、カルボン酸アミド基 (- R - C (= O) - NR^a R^b で表され、R^a 及び R^b はそれぞれ互いに独立し、同一又は異なって、C₁ ~ C₁₀ アルキル基である。)、シアノ基、ハロゲン原子、ニトロ基及びチオール基からなる群より選ばれるものである、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のデアザプリンヌクレオシド誘導体。

【請求項 6】

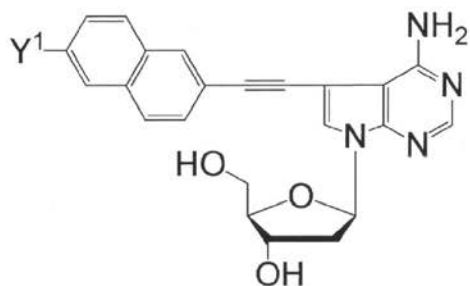
50

前記置換基 Y^1 及び Y^2 が、シアノ基である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のデアザプリンヌクレオシド誘導体。

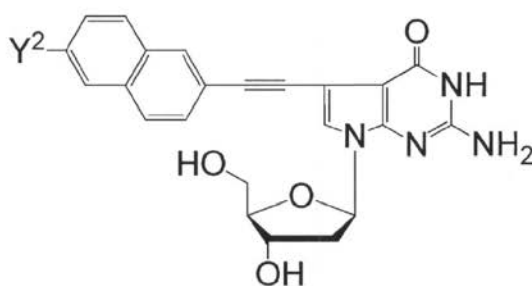
【請求項 7】

下記式 I (a) 又は II (a) のいずれかで示される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のデアザプリンヌクレオシド誘導体。

【化 1 4】



I(a)



II(a)

10

[式中、 Y^1 及び Y^2 の定義は、前記と同様である。]

【請求項 8】

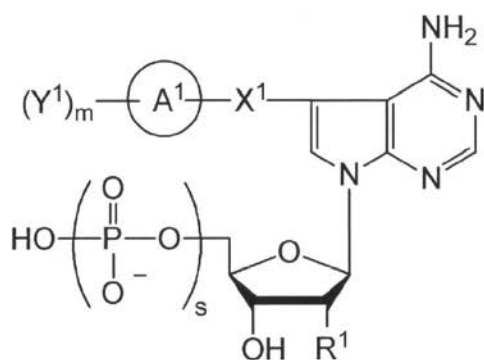
極性環境の変化に应答して蛍光発光波長が変化するものである、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のデアザプリンヌクレオシド誘導体。

20

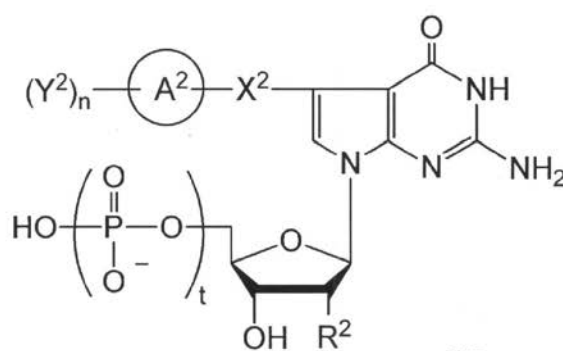
【請求項 9】

下記式 (III) 又は (IV) :

【化 1 5】



III



IV

30

[式中、環 A^1 及び環 A^2 は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、 $C_6 \sim C_{18}$ 芳香環であり、

X^1 及び X^2 は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、炭素 - 炭素二重結合 ($-C=C-$) 又は炭素 - 炭素三重結合 ($-C \equiv C-$) であり、

40

Y^1 及び Y^2 は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、 $C_1 \sim C_{10}$ アシル基、 $C_1 \sim C_{10}$ アルコキシカルボニル基、カルボン酸アミド基 ($-C(=O)-NR^aR^b$ で表され、 R^a 及び R^b はそれぞれ互いに独立し、同一又は異なって、水素原子又は $C_1 \sim C_{10}$ アルキル基である。)、シアノ基、ハロゲン原子、ニトロ基、置換基を有していてもよいアミノ基 ($-NR^aR^b$ で表され、 R^a 及び R^b はそれぞれ互いに独立し、同一又は異なって、水素原子又は $C_1 \sim C_{10}$ アルキル基である。)、水酸基、チオール基及び $C_1 \sim C_{10}$ アルキル基からなる群より選ばれる置換基であり、

m 及び n は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、0、1 又は 2 であり、

R^1 及び R^2 は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、水素原子又は水酸基であり、

50

s 及び t は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、1、2又は3であり、
但し、環 A¹ がフェニル基であり、X¹ が炭素 - 炭素三重結合 (- C ≡ C -) であり、
m が 0 であり、且つ、R¹ が水素原子である場合を除く。]
で示されるデアザプリンヌクレオチド誘導体。

【請求項 10】

前記 R¹ 及び R² が、水素原子である、請求項 9 記載のデアザプリンヌクレオチド誘導体。

【請求項 11】

ポリヌクレオチドにおいて少なくとも 1 つのヌクレオチドが請求項 9 又は 10 記載のデアザプリンヌクレオチド誘導体で置換されてなるポリヌクレオチド誘導体。

10

【請求項 12】

請求項 11 記載のポリヌクレオチド誘導体を含むプローブ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、7 - デアザプリンヌクレオシドの C 7 位に二重結合又は三重結合を介して蛍光分子が導入されてなるデアザプリンヌクレオシド誘導体に関する。また本発明は、該デアザプリンヌクレオシド誘導体を含むデアザプリンヌクレオチド誘導体、さらには少なくとも 1 つのヌクレオチドが該デアザプリンヌクレオチド誘導体で置換されてなるポリヌクレオチド誘導体に関する。

20

【背景技術】

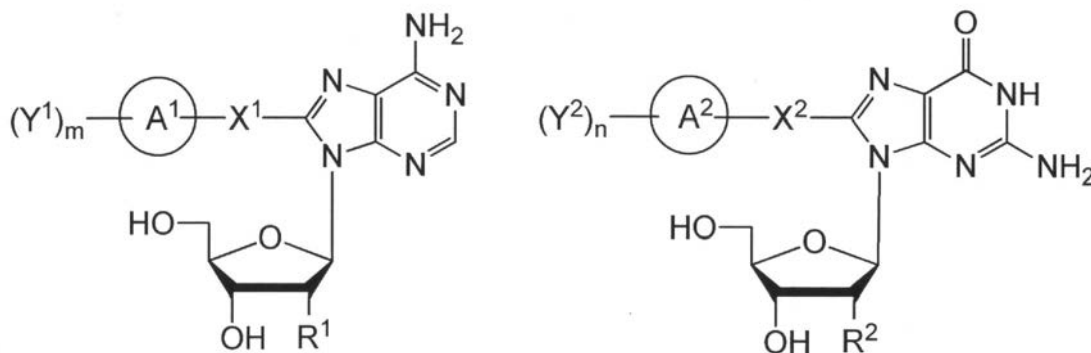
【0002】

周囲の極性環境の違いによって蛍光発光波長を変化させる化合物については、これまでも多く報告されている。同様の蛍光ヌクレオシドについても報告例がある。

本願発明者らも、先に、プリン塩基の C 8 位に二重結合又は三重結合を介して蛍光分子を導入してなる化合物 (次式で示される化合物。以下、「C 8 位置換プリン塩基誘導体」という。) が周囲の極性環境の違いによって蛍光発光波長を大きく変化させることを報告した (例えば、特開 2011 - 37796 号公報 (特許文献 1) 、Tetrahedron Letters 51 (2010) 2606-2609 (非特許文献 1) 参照。)

30

【化 1】



40

[式中、環 A¹ 及び環 A² は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、2価又は3価の芳香環であり、X¹ 及び X² は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、炭素 - 炭素二重結合 (- C = C -) 又は炭素 - 炭素三重結合 (- C ≡ C -) であり、Y¹ 及び Y² は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、アシル基、アルコキシカルボニル基、カルボン酸アミド基、シアノ基、チオール基、ハロゲン原子、水酸基、ニトロ基、アミノ基及び C₁ ~ C₂₀ 炭化水素基からなる群より選ばれる置換基であり、m 及 n は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、1又は2であり、R¹ 及び R² は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、水素原子又は水酸基である。]

50

周囲の極性環境の違いによって蛍光発光波長を変化させる化合物は、対象物質の極性環境の変化を色の違いによって検出できるため、遺伝子検出用のプローブ、タンパク質又は細胞内の局所的な極性環境の調査用のプローブなどとしての利用が期待される。例えば、DNA中の識別したい塩基の対面に蛍光ヌクレオシドを導入したプローブDNAを作製し、対面塩基とのマッチ - ミスマッチの違いによる周辺極性環境の変化を利用することで、目的とする塩基の種類を色の違いで識別することができるため、このような化合物は遺伝子検出用のプローブとして有用である。

しかし、一般的に、プリン塩基のC8位に置換基を導入すると、置換基とDNAの糖 - リン酸バックボーンとが衝突し、その上、ヌクレオシドの糖と塩基とが通常のanti配座からsyn配座へと反転しやすくなってしまいうため、C8位に置換基を導入したヌクレオシドを用いた場合にはDNAの二重らせん構造が不安定化することが知られている。DNAの二重らせん構造が不安定化すると、その影響によっても周囲の極性環境が変化してしまうため、蛍光ヌクレオシドと対面塩基とのマッチ - ミスマッチの違いによる周辺極性環境の変化を正確に検出できない場合がある。

先のC8位置置換塩基誘導体は、光学特性の面では優れていたが、より精度の高い遺伝子検出用のプローブとして実用化するためには分子の改良が必要とされている。

ところで、Synthesis, June 1996, 726-730 (非特許文献2)では、7 - デアザアデノシンのC7位に三重結合を介してフェニル基を導入してなる化合物が記載されているが、この論文は7 - アルキニル - 2' - デオキシツベルシジンの合成方法に関するものであり、化合物の蛍光発光波長の変化や蛍光プローブとしての利用については着目されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】特開2011-37796号公報(特許文献1)

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Tetrahedron Letters 51 (2010) 2606-2609

【非特許文献2】Synthesis, June 1996, 726-730

【非特許文献3】Tetrahedron Letters 52 (2011) 4726-4729

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

このような状況下、従来分子の良い光学特性を維持しつつ、DNAに導入した場合にもDNAの二重らせん構造を不安定化しない新規な蛍光核酸及びそれを利用したプローブの開発が求められている。

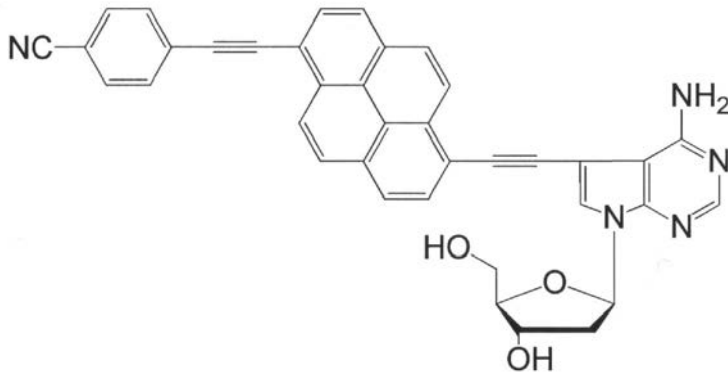
【課題を解決するための手段】

【0006】

本願発明者らは、従来技術の課題を解決するため、DNAを構成する天然のヌクレオシドであるアデノシン又はグアノシンと同様の水素結合パターンを有する7 - デアザプリンヌクレオシドを用いて新規な蛍光核酸の開発を試みた。アデノシン又はグアノシンの7位は窒素原子であるため7位での化学修飾は通常不可能であるが、7 - デアザアデノシン又は7 - デアザグアノシンでは、7位がCHとなっており、その位置での化学修飾が可能である。また、プリン塩基の7位はDNAに導入した際にDNAの主溝に位置し、大きな空間が空いていることから、C8位を修飾した時のようなDNAの二重らせん構造の不安定化は見られないと考えられる。さらに、先の化合物では、周囲の極性環境の違いによる蛍光発光波長の変化をより大きくするために、分子内に電子供与性及び電子吸引性の置換基を導入するように設計しており、核酸塩基が電子供与性基の役割を担っていたが、分子計算を行った結果、7 - デアザプリン塩基は天然の核酸塩基と同程度がそれ以上の電子供与性を示すと予測され、この点からも好ましい分子設計であるといえる。

本願発明者らは、これらの予測の下、7-デアザアデノシンのC7位に効果的に共役構造を形成するように三重結合を介して電子供与性の蛍光分子を導入してなる化合物を合成した (Tetrahedron Letters 52 (2011) 4726-4729 (非特許文献3)、下記式参照。)

【化2】



10

しかし、この化合物は、蛍光発光波長を大きく変化させることはできるものの、DNAに導入した場合にDNAの二重らせん構造を十分に安定化することができなかった。

そこで、本願発明者らは、さらに鋭意研究した結果、式(I)又は(II)で示される化合物が、従来のヌクレオシド誘導体の良い光学特性を維持しつつ、DNAに導入した場合にDNAの二重らせん構造を不安定化しないことを見出して、本発明を完成させるに至った。

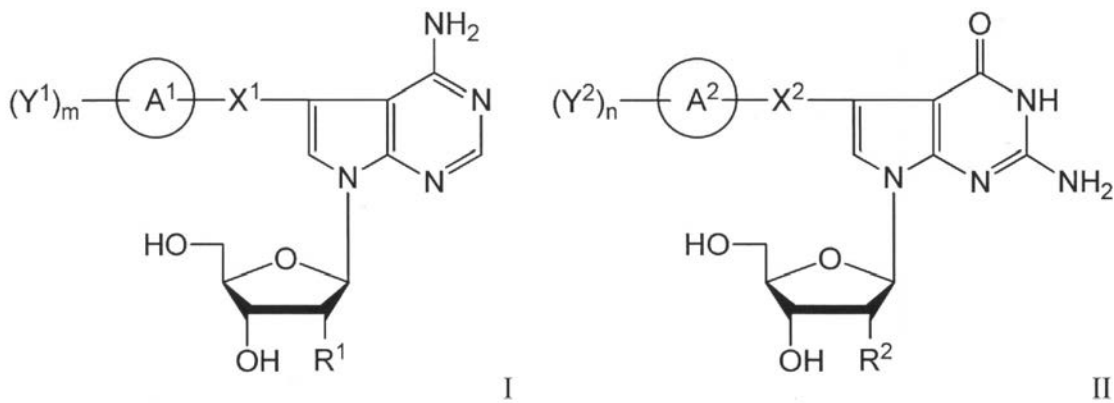
20

【0007】

すなわち、本発明は、以下に示したデアザプリンヌクレオシド誘導体、デアザプリンヌクレオチド誘導体及び少なくとも1つのヌクレオチドがデアザプリンヌクレオチド誘導体であるポリヌクレオチド誘導体ならびに該ポリヌクレオチド誘導体を含むプローブに関するものである。

[1] 下記式(I)又は(II)：

【化3】



30

40

[式中、環A¹及び環A²は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、C₆~C₁₈芳香環であり、

X¹及びX²は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、炭素-炭素二重結合(-C=C-)又は炭素-炭素三重結合(-C≡C-)であり、

Y¹及びY²は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、C₁~C₁₀アシル基、C₁~C₁₀アルコキシカルボニル基、カルボン酸アミド基(-C(=O)-NR^aR^b)で表され、R^a及びR^bはそれぞれ互いに独立し、同一又は異なって、水素原子又はC₁~C₁₀アルキル基である。)、シアノ基、ハロゲン原子、ニトロ基、置換基を有してい

50

てもよいアミノ基 (- N R^a R^b で表され、R^a 及び R^b はそれぞれ互いに独立し、同一又は異なって、水素原子又は C₁ ~ C₁₀ アルキル基である。)、水酸基、チオール基及び C₁ ~ C₁₀ アルキル基からなる群より選ばれる置換基であり、

m 及び n は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、0、1 又は 2 であり、

R¹ 及び R² は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、水素原子又は水酸基であり、

但し、環 A¹ がフェニル基であり、X¹ が炭素 - 炭素三重結合 (- C ≡ C -) であり、m が 0 であり、且つ、R¹ が水素原子である場合を除く。]

で示されるデアザプリンヌクレオシド誘導体。

[2] 前記 R¹ 及び R² が、水素原子である、[1] 記載のデアザプリンヌクレオシド誘導体。 10

[3] 前記環 A¹ 及び環 A² が、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、フェニレン基、ナフチレン基、アントリレン基及びフェナントリレン基からなる群より選ばれるものである、[1] 又は [2] 記載のデアザプリンヌクレオシド誘導体。

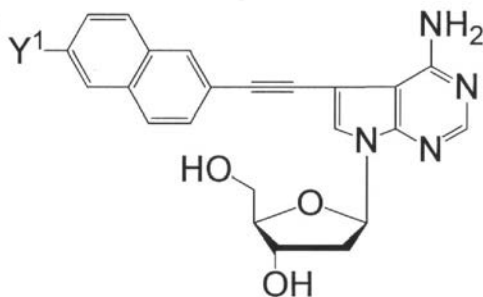
[4] 前記環 A¹ 及び環 A² が、ナフチレン基である、[1] ~ [3] のいずれか 1 項に記載のデアザプリンヌクレオシド誘導体。

[5] 前記置換基 Y¹ 及び Y² が、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、C₁ ~ C₁₀ アシル基、C₁ ~ C₁₀ アルコキシカルボニル基、カルボン酸アミド基 (- C (= O) - N R^a R^b で表され、R^a 及び R^b はそれぞれ互いに独立し、同一又は異なって、水素原子又は C₁ ~ C₁₀ アルキル基である。)、シアノ基、ハロゲン原子、ニトロ基及びチオール基からなる群より選ばれるものである、[1] ~ [4] のいずれか 1 項に記載のデアザプリンヌクレオシド誘導体。 20

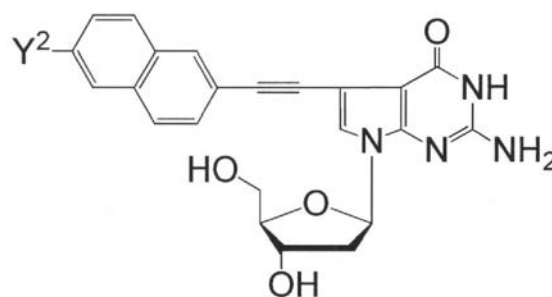
[6] 前記置換基 Y¹ 及び Y² が、シアノ基である、[1] ~ [5] のいずれか 1 項に記載のデアザプリンヌクレオシド誘導体。

[7] 下記式 I (a) 又は II (a) のいずれかで示される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のデアザプリンヌクレオシド誘導体。

【化 4】



I (a)



II (a)

[式中、Y¹ 及び Y² の定義は、前記と同様である。]

[8] 極性環境の変化に応答して蛍光発光波長が変化するものである、[1] ~ [7] のいずれか 1 項に記載のデアザプリンヌクレオシド誘導体。

[9] 下記式 (III) 又は (IV) :

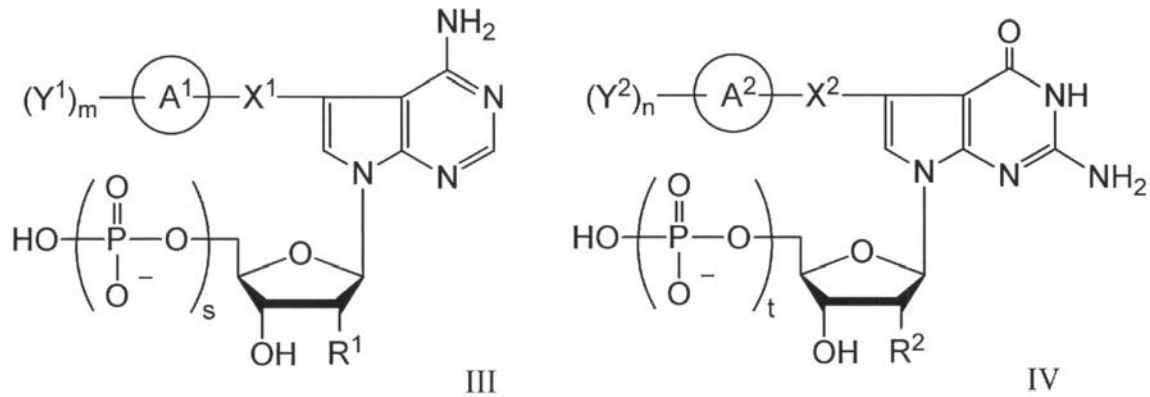
10

20

30

40

【化 5】



10

[式中、環 A¹ 及び環 A² は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、C₆ ~ C₁₈ 芳香環であり、

X¹ 及び X² は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、炭素 - 炭素二重結合 (- C = C -) 又は炭素 - 炭素三重結合 (- C ≡ C -) であり、

Y¹ 及び Y² は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、C₁ ~ C₁₀ アシル基、C₁ ~ C₁₀ アルコキシカルボニル基、カルボン酸アミド基 (- C (= O) - NR^a R^b) で表され、R^a 及び R^b はそれぞれ互いに独立し、同一又は異なって、水素原子又は C₁ ~ C₁₀ アルキル基である。)、シアノ基、ハロゲン原子、ニトロ基、置換基を有していてもよいアミノ基 (- NR^a R^b) で表され、R^a 及び R^b はそれぞれ互いに独立し、同一又は異なって、水素原子又は C₁ ~ C₁₀ アルキル基である。)、水酸基、チオール基及び C₁ ~ C₁₀ アルキル基からなる群より選ばれる置換基であり、

20

m 及び n は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、0、1 又は 2 であり、

R¹ 及び R² は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、水素原子又は水酸基であり、

s 及び t は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、1、2 又は 3 であり、

但し、環 A¹ がフェニル基であり、X¹ が炭素 - 炭素三重結合 (- C ≡ C -) であり、m が 0 であり、且つ、R¹ が水素原子である場合を除く。]

30

で示されるデアザプリンヌクレオチド誘導体。

[10] 前記 R¹ 及び R² が、水素原子である、[9] 記載のデアザプリンヌクレオチド誘導体。

[11] ポリヌクレオチドにおいて少なくとも 1 つのヌクレオチドが [9] 又は [10] 記載のデアザプリンヌクレオチド誘導体で置換されてなるポリヌクレオチド誘導体。

[12] [11] 記載のポリヌクレオチド誘導体を含むプローブ。

【発明の効果】

【0008】

本発明によれば、7 - デアザプリン塩基の C7 位に二重結合又は三重結合を介して蛍光分子を導入してなる新規なデアザプリンヌクレオチド誘導体、該デアザプリンヌクレオチド誘導体にリン酸がエステル結合してなるデアザプリンヌクレオチド誘導体、さらには少なくとも 1 つのヌクレオチドが、該デアザプリンヌクレオチド誘導体で置換されてなるポリヌクレオチド誘導体を得られる。

40

本発明の好ましいデアザプリンヌクレオチド誘導体は、周囲の極性環境の違いによって蛍光発光波長を変化させることができる。このような本発明のデアザプリンヌクレオチド誘導体を導入してなるポリヌクレオチド誘導体は、周囲の極性環境の変化を色の変化によって検出することができるので、遺伝子検出用プローブあるいはタンパク質又は細胞内の局所的な極性環境の調査用プローブなどとして利用可能である。

【図面の簡単な説明】

50

【 0 0 0 9 】

【図 1】本発明の実施例化合物であるデアザプリンヌクレオシド誘導体(5b)を各種溶媒に溶かして得られる溶液の蛍光発光波長を示したグラフ及び蛍光発光波長とその変化量を示した表(表 1 A)、ならびに本発明のデアザプリンヌクレオシド誘導体(5b)を含むオリゴヌクレオチド D N A (ODN1(5b))に各種相補鎖(ODN2(N) (N = A,G,C,T))を加えたときのTm値とその変化量を示した表(表 1 B)である。

【図 2】本発明の実施例化合物であるデアザプリンヌクレオシド誘導体(5c)を各種溶媒に溶かして得られる溶液の蛍光発光波長を示したグラフ及び蛍光発光波長とその変化量を示した表(表 2 A)、ならびに本発明のデアザプリンヌクレオシド誘導体(5c)を含むオリゴヌクレオチド D N A (ODN1(5c))に各種相補鎖(ODN2(N) (N = A,G,C,T))を加えたときのTm値と
10
その変化量を示した表(表 2 B)である。

【図 3】比較例化合物である化合物(C1)を各種溶媒に溶かして得られる溶液の蛍光発光波長を示したグラフ及び蛍光発光波長とその変化量を示した表(表 3 A)、ならびに比較例化合物である化合物(C1)を含むオリゴヌクレオチド D N A (ODN1(C1))に各種相補鎖(ODN2(N) (N = A,G,C,T))を加えたときのTm値とその変化量を示した表(表 3 B)である。

【図 4】比較例化合物である化合物(C2)を各種溶媒に溶かして得られる溶液の蛍光発光波長を示したグラフ及び蛍光発光波長とその変化量を示した表(表 4 A)、ならびに比較例化合物である化合物(C2)を含むオリゴヌクレオチド D N A (ODN1(C2))に各種相補鎖(ODN2(N) (N = A,G,C,T))を加えたときのTm値とその変化量を示した表(表 4 B)である。

【図 5】比較例化合物である化合物(C3)を各種溶媒に溶かして得られる溶液の蛍光発光波長を示したグラフ及び蛍光発光波長とその変化量を示した表(表 5 A)、ならびに比較例化合物である化合物(C3)を含むオリゴヌクレオチド D N A (ODN1(C3))に各種相補鎖(ODN2(N) (N = A,G,C,T))を加えたときのTm値とその変化量を示した表(表 5 B)である。
20

【図 6】比較例化合物である化合物(C4)を各種溶媒に溶かして得られる溶液の蛍光発光波長を示したグラフ及び蛍光発光波長とその変化量を示した表(表 6 A)、ならびに比較例化合物である化合物(C4)を含むオリゴヌクレオチド D N A (ODN1(C4))に各種相補鎖(ODN2(N) (N = A,G,C,T))を加えたときのTm値とその変化量を示した表(表 6 B)である。

【図 7】本発明の実施例化合物であるデアザプリンヌクレオシド誘導体(5b)を各種溶媒に溶かして得られる溶液の蛍光発光を観察した写真である。

【発明を実施するための形態】

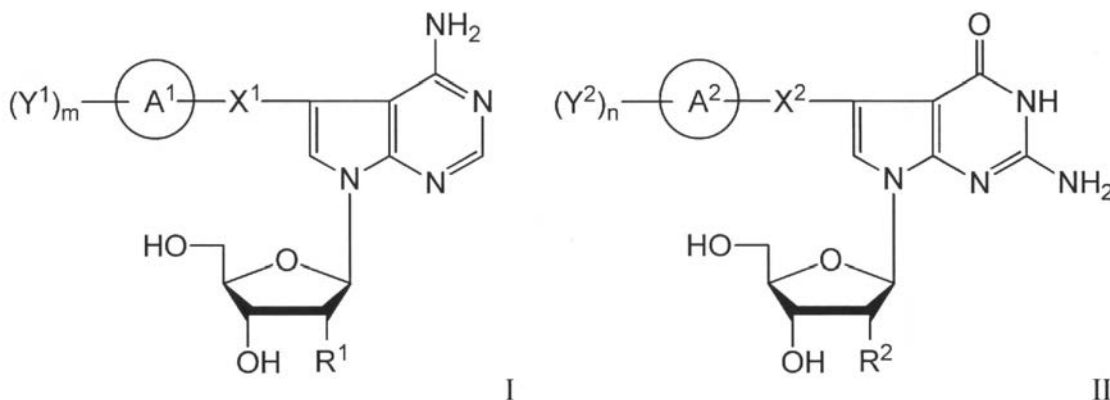
【 0 0 1 0 】

以下、本発明のデアザプリンヌクレオシド誘導体、デアザプリンヌクレオチド誘導体、ポリヌクレオチド誘導体及びプローブ等について詳細に説明する。

【 0 0 1 1 】

本発明のデアザプリンヌクレオシド誘導体は、下記式 (I) 又は (I I) で示される化合物である。

【化 6】



10

20

30

40

50

[式中、環 A¹ 及び環 A² は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、C₆ ~ C₁₈ 芳香環であり、

X¹ 及び X² は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、炭素 - 炭素二重結合 (- C = C -) 又は炭素 - 炭素三重結合 (- C ≡ C -) であり、

Y¹ 及び Y² は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、C₁ ~ C₁₀ アシル基、C₁ ~ C₁₀ アルコキシカルボニル基、カルボン酸アミド基 (- C (= O) - NR^a R^b で表され、R^a 及び R^b はそれぞれ互いに独立し、同一又は異なって、水素原子又は C₁ ~ C₁₀ アルキル基である。)、シアノ基、ハロゲン原子、ニトロ基、置換基を有していてもよいアミノ基 (- NR^a R^b で表され、R^a 及び R^b はそれぞれ互いに独立し、同一又は異なって、水素原子又は C₁ ~ C₁₀ アルキル基である。)、水酸基、チオール基及び C₁ ~ C₁₀ アルキル基からなる群より選ばれる置換基であり、

m 及び n は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、0、1 又は 2 であり、

R¹ 及び R² は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、水素原子又は水酸基であり、

但し、環 A¹ がフェニル基であり、X¹ が炭素 - 炭素三重結合 (- C ≡ C -) であり、m が 0 であり、且つ、R¹ が水素原子である場合を除く。]

【0012】

本発明のデアザプリンヌクレオシド誘導体は、7 - デアザプリン骨格の C7 位に炭素 - 炭素二重結合又は炭素 - 炭素三重結合を介して蛍光分子を導入するように設計されている。本発明の好ましいデアザプリンヌクレオシド誘導体は、周辺環境たとえば極性環境の変化にตอบสนองして蛍光発光波長が変化するため、周辺環境 (極性環境) の変化を色の変化によって識別するプローブ等として利用可能である。

【0013】

本発明のデアザプリンヌクレオシド誘導体において、7 - デアザプリン塩基と結合する五炭糖は、2 - デオキシリボースでもリボースでもよく、R¹ 及び R² は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、水素原子又は水酸基である。本発明のデアザプリンヌクレオシド誘導体をヌクレオチドに導入して DNA 型のプローブとして用いるときは、R¹ 及び R² は水素原子が好ましく、RNA 型のプローブとして用いるときは、R¹ 及び R² は水酸基が好ましい。

【0014】

X¹ 及び X² は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、炭素 - 炭素二重結合 (- C = C -) 又は炭素 - 炭素三重結合 (- C ≡ C -) である。X¹ 及び X² は、共役構造をより高めるため、炭素 - 炭素三重結合が好ましい。

【0015】

環 A¹ 及び環 A² は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、C₆ ~ C₁₈ 芳香環である。前記芳香環は、炭素 - 炭素二重結合又は炭素 - 炭素三重結合を介してデアザプリン塩基との間に共役構造を形成できるものであれば特に制限されない。このような芳香環としては、フェニレン基、ナフチレン基、アントリレン基、フェナントリレン基及びピレニレン基などが挙げられる。中でも、フェニレン基、ナフチレン基、アントリレン基及びフェナントリレン基が好ましく、ナフチレン基が特に好ましい。

【0016】

環 A¹ 及び環 A² は、置換基 Y¹ 又は Y² を一つ又は二つ有していてもよい。

置換基 Y¹ 及び Y² は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、C₁ ~ C₁₀ アシル基、C₁ ~ C₁₀ アルコキシカルボニル基、カルボン酸アミド基 (- C (= O) - NR^a R^b で表され、R^a 及び R^b はそれぞれ互いに独立し、同一又は異なって、水素原子又は C₁ ~ C₁₀ アルキル基である。)、シアノ基、ハロゲン原子、ニトロ基、置換基を有していてもよいアミノ基 (- NR^a R^b で表され、R^a 及び R^b はそれぞれ互いに独立し、同一又は異なって、水素原子又は C₁ ~ C₁₀ アルキル基である。)、水酸基、チオール基及び C₁ ~ C₁₀ アルキル基からなる群より選ばれる。

中でも、置換基 Y¹ 及び Y² としては、電子吸引性の基であることが好ましい。置換基

10

20

30

40

50

Y^1 及び Y^2 が電子吸引性の基であると、二重結合又は三重結合を介して、デアザプリン塩基部分と置換基 Y^1 又は Y^2 を有する環 A^1 及び環 A^2 との間で、共役電子の「push-pull」構造が形成されるため、蛍光発光波長の変化をより大きくすることができ、蛍光発光の色による識別をより容易にすることができる。具体的には、 $C_1 \sim C_{10}$ アシル基、 $C_1 \sim C_{10}$ アルコキシカルボニル基、カルボン酸アミド基 ($-C(=O)-NR^aR^b$ で表され、 R^a 及び R^b はそれぞれ互いに独立し、同一又は異なって、水素原子又は $C_1 \sim C_{10}$ アルキル基である。)、シアノ基、ハロゲン原子、ニトロ基及びチオール基からなる群より選ばれる置換基が好ましい。特にシアノ基が好ましい。

置換基 Y^1 及び Y^2 は、それぞれ、前記芳香環のいずれの位置で結合していてもよい。共役構造がより安定化することから、少なくとも一つは炭素-炭素二重結合又は炭素-炭素三重結合に対してパラ位で結合していることが好ましい。

10

【0017】

m 及び n は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、0、1又は2であり、1が好ましい。

【0018】

なお、本明細書において、「 $C_1 \sim C_{10}$ アシル基」は、 $C_1 \sim C_{10}$ アルキルカルボニルが好ましく、 $C_1 \sim C_6$ アルキルカルボニルがより好ましく、 $C_1 \sim C_4$ アルキルカルボニルがさらに好ましい。アシル基の例としては、制限するわけではないが、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル、バレリル、イソバレリル、ベンゾイル、メチルベンゾイル、ジメチルベンゾイル、メチルエチルベンゾイル、ジエチルベンゾイル、ベンジルカルボニル等が挙げられる。

20

【0019】

本明細書において、「 $C_1 \sim C_{10}$ アルコキシカルボニル基」は、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシカルボニル基が好ましく、 $C_1 \sim C_4$ アルコキシカルボニル基がより好ましい。アルコキシカルボニル基の例としては、制限するわけではないが、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、プロポキシカルボニル、ブトキシカルボニル、ペンチルオキシカルボニル等が挙げられる。

【0020】

本明細書において、「カルボン酸アミド基」は、 $-C(=O)-NR^aR^b$ で表される基である。式中、 R^a 及び R^b はそれぞれ互いに独立し、同一又は異なって、水素原子又は $C_1 \sim C_{10}$ アルキル基であり、水素原子又は $C_1 \sim C_6$ アルキル基が好ましく、水素原子又は $C_1 \sim C_4$ アルキル基がより好ましい。

30

【0021】

本明細書において、「ハロゲン原子」は、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素が挙げられる。

【0022】

本明細書において、「 $C_1 \sim C_{10}$ アルキル基」は、線状でもよいし、枝分かれでもよく、 $C_1 \sim C_6$ アルキル基が好ましく、 $C_1 \sim C_4$ アルキル基がより好ましい。アルキル基の例としては、制限するわけではないが、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、 n -ブチル、 sec -ブチル、 $tert$ -ブチル、ペンチル、ヘキシル、ドデカニル等が挙げられる。

40

【0023】

本明細書において、「置換基を有していてもよいアミノ基」は、 $-NR^aR^b$ で表される。式中、 R^a 及び R^b はそれぞれ互いに独立し、同一又は異なって、水素原子又は $C_1 \sim C_{10}$ アルキル基である。置換基を有していてもよいアミノ基の例としては、制限するわけではないが、アミノ基、ジメチルアミノ基、メチルアミノ基、ジエチルアミノ基、エチルアミノ基等が挙げられる。

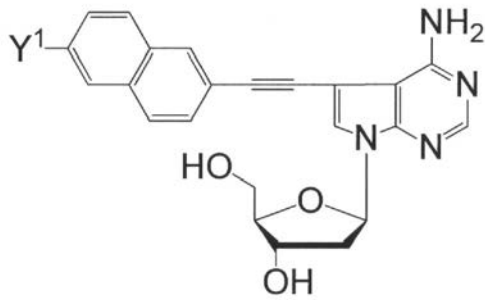
【0024】

本発明の好ましいデアザプリンヌクレオシド誘導体としては、下記式 I (a) 又は II (a) で示される化合物が挙げられる。式中の Y^1 及び Y^2 の定義は上記と同じである。

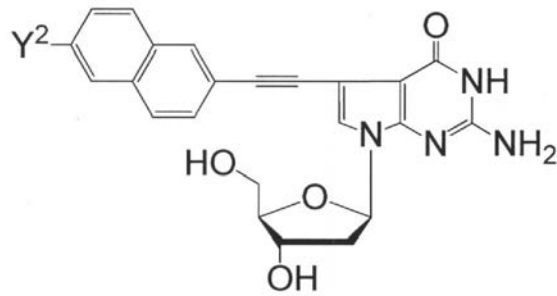
【0025】

50

【化 7】



I (a)



II (a)

10

【 0 0 2 6 】

上記のとおり、本発明のデアザプリンヌクレオシド誘導体は、デアザプリン骨格の C 7 位に二重結合又は三重結合を介して蛍光分子を導入し共役構造を形成させることで、蛍光発光波長が変化するように設計されている。蛍光発光波長の変化の程度は、周囲の極性環境によって異なる。本発明のデアザプリンヌクレオシド誘導体を利用することで、周囲の極性環境の違いを蛍光発光の色の変化によって識別することが可能である。例えば、本発明のデアザプリンヌクレオシド誘導体は、DNA 又は RNA 中の局所的な極性環境の違いにより対面塩基の種類を識別する遺伝子検出用のプローブとして利用することができる。また、本発明のデアザプリンヌクレオシド誘導体は、タンパク質又は細胞内の局所的な極性環境の調査用プローブとして利用することができる。

20

【 0 0 2 7 】

本発明のデアザプリンヌクレオシド誘導体は、7 - デアザアデノシン又は 7 - デアザグアノシンなどの C 7 位に蛍光分子を導入することにより簡便に製造することができる。

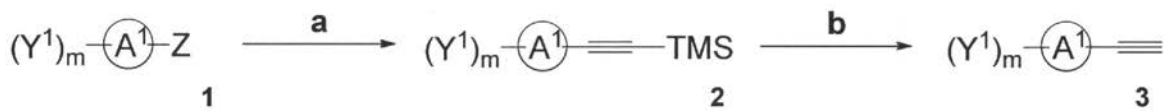
【 0 0 2 8 】

本発明の式 (I) で示されるデアザプリンヌクレオシド誘導体は、例えば、下記のスキーム A に従って製造することができる。

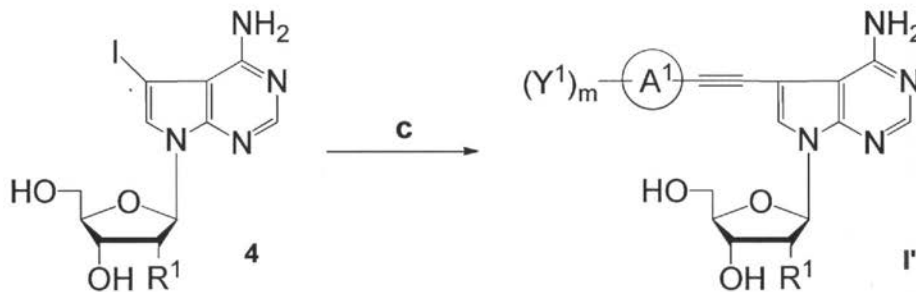
30

【化 8】

<Scheme A>



Z = Br or I



反応試薬及び反応条件:

(a) Pd(PPh₃)₄, TMSA, Cul, TEA, DMF (b) TBAF, THF (c) Pd(PPh₃)₄, Cul, TEA, DMF

【 0 0 2 9 】

<工程 (a) >

まず、化合物 1 を溶媒に溶かし、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム (0) 、ヨウ化銅、トリメチルシリルアセチレン、トリエチルアミンを加えて、40 ~ 60 の範囲内で 1 ~ 4 時間撹拌する。その後、反応溶媒を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して化合物 2 を得る。

トリメチルシリルアセチレンは、化合物 1 に対して等モルないしやや過剰に用いることが好ましく、その使用量は、化合物 1 に対して 1 . 2 ~ 1 . 5 (モル倍量) が好ましい。

テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム (0) 及びヨウ化銅は、触媒量で用いればよく、化合物 1 に対して 0 . 0 1 ~ 0 . 1 (モル倍量) が好ましい。

トリエチルアミンは、化合物 1 に対して 5 ~ 1 0 (モル倍量) の範囲で用いることが好ましい。

溶媒は、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテルなどのエーテル系溶媒、塩化メチレン、*o*-ジクロロベンゼンなどのハロゲン化炭化水素、*N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) などのアミド、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド、ベンゼン、トルエン、キシレン等の芳香族化合物などを用いることができる。

【 0 0 3 0 】

<工程 (b) >

次に、化合物 2 を溶媒に溶かし、テトラブチルアンモニウムフルオリドを加えて、室温 (20 ~ 25) で 1 ~ 3 時間撹拌する。その後、分液操作を行い、反応物を抽出した有機層を減圧濃縮する。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して化合物 3 を得る。

テトラブチルアンモニウムフルオリドの使用量は、化合物 1 に対して 1 . 1 ~ 1 . 2 (モル倍量) の範囲で用いることが好ましい。

溶媒は、工程 (a) で用いたものと同じものを用いることができる。

【 0 0 3 1 】

10

20

30

40

50

スキーム B の工程 (a) 及び (b) はそれぞれ、スキーム A の工程 (a) 及び (b) と同じである。スキーム B の工程 (c) は、化合物 4 に代えて、化合物 4 ' を用いることを除いてスキーム A の工程 (c) と同様である。なお、化合物 4 ' は、公知の化合物であり、Synthesis, June 1996, 726-730 (非特許文献 2) 記載の方法により簡便に製造することができる。また市販品を用いてもよい。例えば、2Daybiochem Co., Ltd., 社製「7-Deaza-a-7-iodo-2 ' -deoxyguanosine」などを用いることができる。

【 0 0 3 6 】

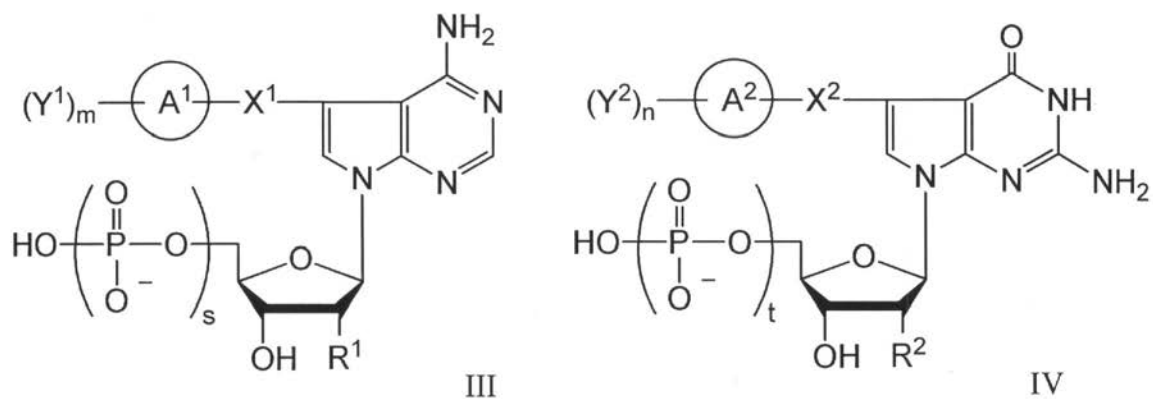
本発明のデアザプリンヌクレオシド誘導体は、上記のように 7 - デアザヌクレオシドを利用して簡便な方法で製造することができるので、実用性が高い。

【 0 0 3 7 】

次に、本発明のヌクレオチド誘導体について述べる。

本発明のヌクレオチド誘導体は、上述した本発明のデアザプリンヌクレオシド誘導体にリン酸がエステル結合したものであり、下記式 (I I I) 又は (I V) :

【 化 1 0 】



[式中、環 A ¹ 及び環 A ² は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、C ₆ ~ C ₁₈ 芳香環であり、

X ¹ 及び X ² は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、炭素 - 炭素二重結合 (- C = C -) 又は炭素 - 炭素三重結合 (- C ≡ C -) であり、

Y ¹ 及び Y ² は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、C ₁ ~ C ₁₀ アシル基、C ₁ ~ C ₁₀ アルコキシカルボニル基、カルボン酸アミド基 (- C (= O) - N R ^a R ^b で表され、R ^a 及び R ^b はそれぞれ互いに独立し、同一又は異なって、水素原子又は C ₁ ~ C ₁₀ アルキル基である。)、シアノ基、ハロゲン原子、ニトロ基、置換基を有していてもよいアミノ基 (- N R ^a R ^b で表され、R ^a 及び R ^b はそれぞれ互いに独立し、同一又は異なって、水素原子又は C ₁ ~ C ₁₀ アルキル基である。)、水酸基、チオール基及び C ₁ ~ C ₁₀ アルキル基からなる群より選ばれる置換基であり、

m 及び n は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、0、1 又は 2 であり、

R ¹ 及び R ² は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、水素原子又は水酸基であり、

s 及び t は、それぞれ互いに独立し、同一又は異なって、1、2 又は 3 であり、

但し、環 A ¹ がフェニル基であり、X ¹ が炭素 - 炭素三重結合 (- C ≡ C -) であり、m が 0 であり、且つ、R ¹ が水素原子である場合を除く。]

で示される。

【 0 0 3 8 】

式 (I I I) 又は (I V) における A ¹、A ²、X ¹、X ²、Y ¹、Y ²、R ¹、R ²、m、n は、式 (I) 又は (I I) における A ¹、A ²、X ¹、X ²、Y ¹、Y ²、R ¹、R ²、m、n と同義であり、好ましい例も同じである。

s 及び t はそれぞれ 1、2 又は 3 であるが、1 又は 3 が好ましく、ポリヌクレオチド誘

10

20

30

40

50

導体に容易に導入できることから 3 が特に好ましい。

【0039】

本発明のヌクレオチド誘導体 (I I I) 又は (I V) の一リン酸体 (s , t = 1) は、通常、本発明のデアザプリンヌクレオシド誘導体 (I) 又は (I I) をトリメチルホスファイトなどの溶媒に溶解し、0 でオキシ塩化リンを加えて反応させた後に水を加えることで簡単に合成することができる。また、三リン酸体 (s , t = 3) は、水を加える前にトリブチルアンモニウムピロリン酸 (ニリン酸) を加えるステップを加えることを除いて一リン酸体と同様に合成することができる。

【0040】

また、本発明のヌクレオチド誘導体 (I I I) 又は (I V) の三リン酸体は、PCR法を用いてDNAに容易に導入することができ、ポリヌクレオチドにおいて少なくとも1つのヌクレオチドが本発明のヌクレオチド誘導体で置換された本発明のポリヌクレオチド誘導体を得ることができる。あるいは、実施例2に示したように、本発明のデアザプリンヌクレオシド誘導体にN,N-ジメチルホルムアミドジエチルアセタールを反応させ、その後、触媒量の4,4'-ジメトキシトリチルクロリドを加えて反応させて得られる化合物を、トリエチルアミンの存在下、更に2-シアノエチルテトライソプロピルホスホロアミジトと反応させて、得られたアミジト体を直接DNA自動合成機にかけることで、本発明のポリヌクレオチド誘導体を得ることができる。

10

【0041】

本発明において、ポリヌクレオチド誘導体はオリゴヌクレオチド誘導体であってもよい。本発明のオリゴヌクレオチド誘導体の塩基数は特に制限されなく、例えば2から1000が好ましく、2から200がより好ましく、2から100が特に好ましい。

20

【0042】

本発明のポリヌクレオチド誘導体は、DNA中の局所的な極性環境の違いを利用して対面塩基の種類を識別する塩基識別型蛍光核酸塩基 (遺伝子検出用プローブ) として、あるいは、タンパク質又は細胞内の局所的な極性環境の調査用のプローブとして用いることができる。

【0043】

本発明のプローブを標的DNAとハイブリダイズさせフルマッチしたときの極性環境の変化による前記プローブの蛍光発光の色の違いで標的DNAの対面塩基を識別することができる。

30

【0044】

以下、本発明を実施例に基づいて説明するが、本発明は、下記の実施例に制限されるものではない。

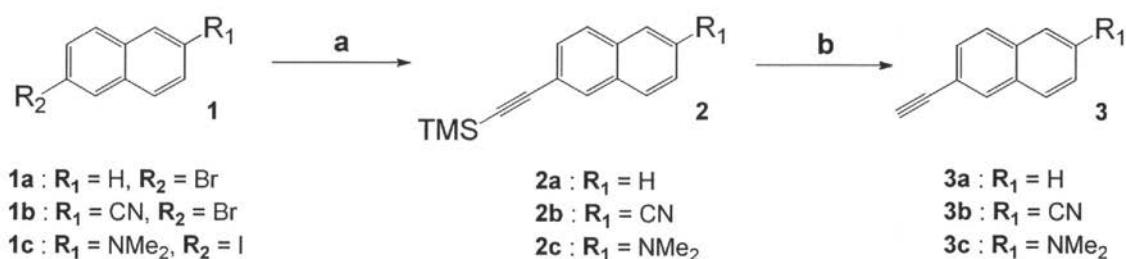
【実施例1】

【0045】

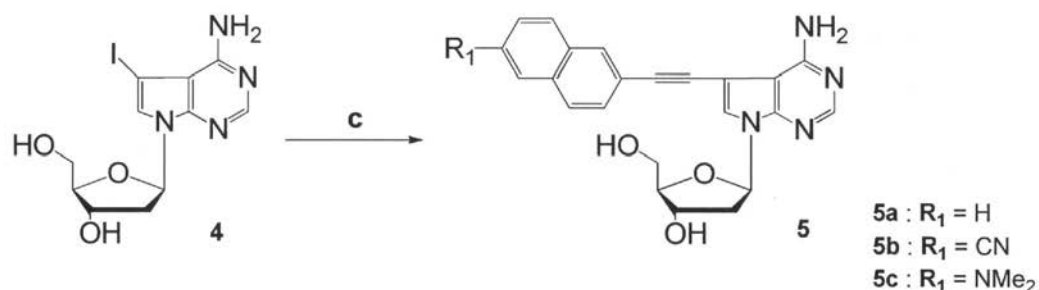
下記スキーム1に従って本発明のデアザプリンヌクレオシド誘導体を合成した。

【化 1 1】

<Scheme 1>



10



反応試薬及び反応条件:

(a) Pd(PPh₃)₄, TMSA, CuI, TEA, DMF (b) TBAF, THF (c) Pd(PPh₃)₄, CuI, TEA, DMF

20

【 0 0 4 6 】

化合物(2a)の製造

化合物(1a)(500mg, 2.41mmol)を無水DMF(5ml)に溶かし、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(0)(27.9mg, 0.024mmol)、ヨウ化銅(4.6mg, 0.024mmol)、トリメチルシリルアセチレン(409 μl, 2.89mmol)、トリエチルアミン(0.5ml)を加えて、60 °Cで1時間撹拌した。その後、反応溶媒を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサンのみ)で精製して化合物(2a)(0.4207g, 77.67%)を得た。

30

【 0 0 4 7 】

化合物(2b)の製造

化合物(1b)(500mg, 2.15mmol)を無水DMF(5ml)に溶かし、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(0)(24.9mg, 0.021mmol)、ヨウ化銅(4.1mg, 0.021mmol)、トリメチルシリルアセチレン(365 μl, 2.58mmol)、トリエチルアミン(0.5ml)を加えて、60 °Cで1時間撹拌した。その後、反応溶媒を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル=3:1)で精製して化合物(2b)(0.5068g, 94.35%)を得た。

【 0 0 4 8 】

化合物(2c)の製造

化合物(1c)(100mg, 0.34mmol)を無水DMF(5ml)に溶かし、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(0)(38.7mg, 0.034mmol)、ヨウ化銅(6.4mg, 0.034mmol)、トリメチルシリルアセチレン(71.1 μl, 0.50mmol)、トリエチルアミン(0.5ml)を加えて、60 °Cで1時間撹拌した。その後、反応溶媒を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル=3:1)で精製して化合物(2c)(0.100g, quantitative)を得た。

40

【 0 0 4 9 】

化合物(3a)の製造

化合物(2a)(400mg, 1.78mmol)をTHF(10ml)で溶かし、テトラブチルアンモニウムフルオリド(557 μl, 1.96ml)を加えて、室温で3時間撹拌した。薄層クロマトグラフィー(TLC)で原料の消失を確認した後、分液操作を行い(酢酸エチル/10% HCl水)の条件で反応物を抽

50

出した有機層を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサンのみ)で精製して化合物(3a)(0.2699g, 94.58%)を得た。

【0050】

化合物(3b)の製造

化合物(2b)(453mg, 1.81mmol)をTHF(17ml)で溶かし、テトラブチルアンモニウムフルオリド(620 μ l, 2.18ml)を加えて、室温で2時間攪拌した。薄層クロマトグラフィー(TLC)で原料の消失を確認した後、分液操作を行い(酢酸エチル/10% HCl水)の条件で反応物を抽出した有機層を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル=5:1)で精製して化合物(3b)(0.3211g, 99.18%)を得た。

【0051】

化合物(3c)の製造

化合物(2c)(100mg, 0.374mmol)をTHF(8ml)で溶かし、テトラブチルアンモニウムフルオリド(161 μ l, 1.12ml)を加えて、室温で3時間攪拌した。薄層クロマトグラフィー(TLC)で原料の消失を確認した後、分液操作を行い(酢酸エチル/10% HCl水)の条件で反応物を抽出した有機層を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル=3:1)で精製して化合物(3c)(0.0928g, quantitative)を得た。

【0052】

化合物(5a)の製造

化合物(4)(100mg, 0.36mmol)と化合物(3a)(42.1mg, 0.43mmol)をDMF(5ml)で溶かし、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(0)(42.1mg, 0.036mmol)、ヨウ化銅(2.1mg, 0.010mmol)、トリエチルアミン(5ml)を加えて、60 $^{\circ}$ Cで1時間攪拌した。反応溶媒を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(メタノール:クロロホルム=1:10)で精製して化合物(5a)(0.1343g, 91.99%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz) 2.24 (ddd, $J = 2.6, 5.8, 13.1$ Hz, 1H), 2.54 (m, 1H, overlapped with DMSO), 3.52-3.64 (complex, 2H), 3.86 (m, 1H), 4.38 (m, 1H), 5.09 (m, 1H), 5.31 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 6.54 (m, 1H), 6.87 (br, 2H), 7.57-7.60 (complex, 2H), 7.66-7.69 (complex, 2H), 7.94-7.97 (complex, 4H), 8.23 (s, 1H)

【0053】

化合物(5b)の製造

化合物(4)(150mg, 0.39mmol)と化合物(3b)(84.8mg, 0.478mmol)をDMF(5ml)で溶かし、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(0)(46.0mg, 0.04mmol)、ヨウ化銅(7.6mg, 0.04mmol)、トリエチルアミン(0.5ml)を加えて、60 $^{\circ}$ Cで1時間攪拌した。反応溶媒を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(メタノール:クロロホルム=1:30)で精製して化合物(5b)(0.1400g, 84.00%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz) 2.24 (ddd, $J = 2.8, 6.0, 13.2$ Hz, 1H), 2.54 (m, 1H, overlapped with DMSO), 3.55-3.63 (complex, 2H), 3.86 (m, 1H), 4.38 (m, 1H), 5.12 (m, 1H), 5.32 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 6.54 (dd, $J = 6.0, 7.8$ Hz, 1H), 6.88 (br, 2H), 7.82-7.86 (complex, 2H), 7.98 (s, 1H), 8.09-8.14 (complex, 2H) 8.18 (s, 1H), 8.34 (m, 1H), 8.61 (m, 1H)

【0054】

化合物(5c)の製造

化合物(4)(50mg, 0.13mmol)と化合物(3c)(28.5mg, 0.15mmol)をDMF(5ml)で溶かし、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(0)(76.8mg, 0.07mmol)、ヨウ化銅(12.6mg, 0.07mmol)、トリエチルアミン(0.3ml)を加えて、55 $^{\circ}$ Cで1時間攪拌した。反応溶媒を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(メタノール:クロロホルム=1:10)で精製して化合物(5c)(0.0490g, 84.98%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) 2.35 (ddd, $J = 2.7, 6.0, 13.4$ Hz, 1H), 2.66 (ddd, $J = 5.9, 8.0, 13.4$ Hz, 1H), 3.05 (s, 6H), 3.73 (dd, $J = 3.6, 12.1$ Hz, 1H), 3.81 (dd, $J = 3.3, 12.1$ Hz, 1H), 4.02 (m, 1H), 4.53 (m, 1H), 6.51 (dd, $J = 6.0, 8.0$ Hz, 1H), 6.92 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.22 (dd, $J = 2.6, 9.1$ Hz, 1H), 7.39 (dd, $J = 1.6$

10

20

30

40

50

, 8.6 Hz, 1H), 7.61 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.66-7.68 (complex, 2H), 7.85 (m, 1H), 8.11 (s, 1H)

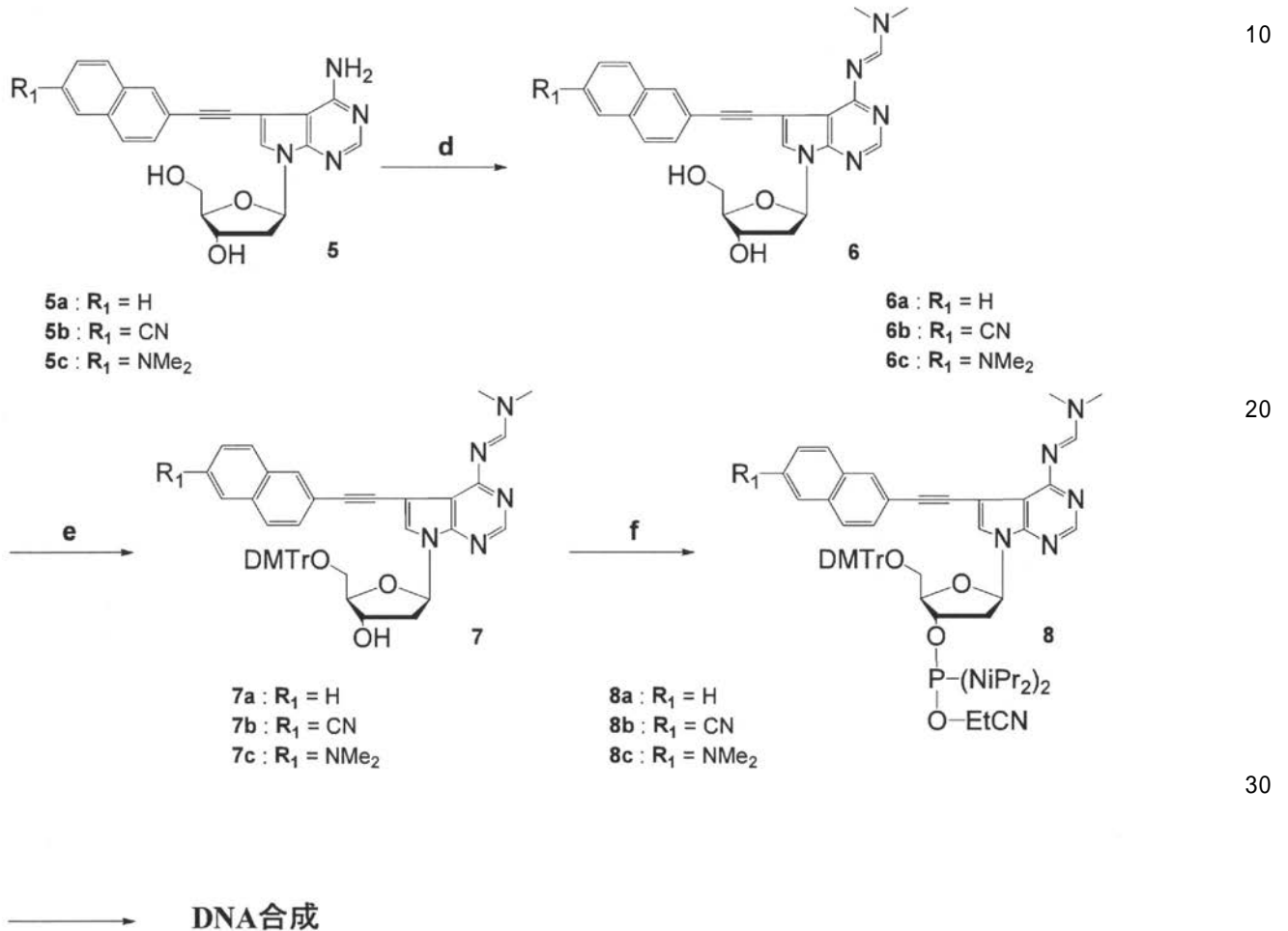
【実施例 2】

【0055】

下記スキーム 2 に従って本発明のデアザプリンヌクレオシド誘導体を DNA 鎖に導入した。

【化 1 2】

<Scheme 2>



反応試薬及び反応条件:

(d) DMF-diethylacetal, DMF (e) DMTrCl, pyridine (f) (NiPr₂)₂POCl(CH₂)₂CN, acetonitrile, TEA

【0056】

化合物(6a)の製造

化合物(5a)(180mg, 0.449mmol)をDMF(5ml)で溶かし、DMFジエチルアセタール(95μl, 0.585mmol)を加えて、60℃で2時間撹拌した。薄層クロマトグラフィーで原料の消失を確認した後、反応溶媒を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(メタノール:クロロホルム=1:30)で精製して化合物(6a)(0.2033g, 99.40%)を得た。

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) 2.28 (m, 1H), 2.98 (ddd, J = 5.1, 9.2, 13.1 Hz, 1H), 3.07 (s, 3H), 3.19 (s, 3H), 3.76 (m, 1H), 3.96 (dd, J = 1.6, 12.4 Hz, 1H), 4.18 (m, 1H), 4.71 (m, 1H), 6.27 (dd, J = 5.6, 9.2 Hz, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.42-7.48 (complex, 2H), 7.54 (dd, J = 1.5, 8.5 Hz, 1H), 7.71-7.79 (complex, 3H), 8.00 (m, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.68 (s, 1H)

10

20

30

40

50

【 0 0 5 7 】

化合物(6b)の製造

化合物(5b)(120mg, 0.282mmol)をDMF(5ml)で溶かし、DMFジエチルアセタール(55 μ l, 0.338mmol)を加えて、60 $^{\circ}$ で2時間攪拌した。薄層クロマトグラフィーで原料の消失を確認した後、反応溶媒を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(メタノール:クロロホルム=1:30)で精製して化合物(6b)(0.1248g, 95.00%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) 2.29 (m, 1H), 3.04 (ddd, $J = 5.1, 9.4, 13.4$ Hz, 1H), 3.14 (s, 3H), 3.22 (s, 3H), 3.78 (m, 1H), 3.98 (dd, $J = 1.7, 12.6$ Hz, 1H), 4.19 (m, 1H), 4.74 (m, 1H), 6.26 (dd, $J = 5.6, 9.4$ Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.58 (dd, $J = 1.4, 8.4$ Hz, 1H), 7.65 (dd, $J = 1.5, 8.3$ Hz, 1H), 7.81 (complex, 2H), 8.01 (m, 1H), 8.17 (m, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.76 (s, 1H)

10

【 0 0 5 8 】

化合物(6c)の製造

化合物(5c)(60mg, 0.135mmol)をDMF(3ml)で溶かし、DMFジエチルアセタール(26 μ l, 0.162mmol)を加えて、60 $^{\circ}$ で2時間攪拌した。薄層クロマトグラフィーで原料の消失を確認した後、反応溶媒を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(メタノール:クロロホルム=1:10)で精製して化合物(6c)(0.0640g, 95.08%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) 2.27 (m, 1H), 3.07-3.15 (complex, 10H), 3.22 (s, 3H), 3.80 (m, 1H), 4.01 (dd, $J = 1.7, 12.6$ Hz, 1H), 4.21 (m, 1H), 4.79 (m, 1H), 6.24 (dd, $J = 5.6, 9.5$ Hz, 1H), 6.87 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.16 (dd, $J = 2.6, 9.1$ Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.46 (dd, $J = 1.6, 8.6$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.64 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.88 (m, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.74 (s, 1H)

20

【 0 0 5 9 】

化合物(7a)の製造

化合物(6a)(200mg, 0.439mmol)を無水ピリジン(8ml)に溶解し、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド(193mg, 0.571mmol)を加えて、室温で6時間攪拌した。薄層クロマトグラフィーで原料の消失を確認した後、減圧留去して分液操作を行い(酢酸エチル/炭酸水素ナトリウム水溶液)、有機層を回収して繰り返し減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(メタノール:クロロホルム/トリエチルアミン=30:1/10ml)で精製し、化合物(7a)(0.3101g, 93.17%)を得た。

30

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) 2.50 (ddd, $J = 4.4, 6.4, 13.6$ Hz, 1H), 2.59 (m, 1H), 3.12 (s, 3H), 3.24 (s, 3H), 3.36 (dd, $J = 4.8, 10.2$ Hz, 1H), 3.44 (dd, $J = 4.4, 10.2$ Hz, 1H), 3.72 (s, 6H), 4.11 (m, 1H), 4.61 (m, 1H), 6.76 (m, 1H), 6.82 (m, 2H), 6.85 (m, 2H), 7.19 (m, 1H), 7.30 (m, 2H), 7.34 (m, 2H), 7.36 (m, 2H), 7.44-7.52 (complex, 4H), 7.54 (dd, $J = 1.6, 8.5$ Hz, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.76-7.83 (complex, 3H), 7.99 (m, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.75 (s, 1H)

【 0 0 6 0 】

化合物(7b)の製造

化合物(6b)(100mg, 0.208mmol)を無水ピリジン(10ml)に溶解し、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド(91.6mg, 0.270mmol)を加えて、室温で6時間攪拌した。薄層クロマトグラフィーで原料の消失を確認した後、減圧留去して分液操作を行い(酢酸エチル/炭酸水素ナトリウム水溶液)、有機層を回収して繰り返し減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(メタノール:クロロホルム/トリエチルアミン=30:1/10ml)で精製し、化合物(7b)(0.1800g, quantitative)を得た。

40

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) 2.52 (ddd, $J = 4.4, 6.3, 13.5$ Hz, 1H), 2.60 (m, 1H), 3.16 (s, 3H), 3.25 (s, 3H), 3.37-3.45 (complex, 2H), 3.72 (s, 6H), 4.12 (m, 1H), 4.64 (m, 1H), 6.75 (m, 1H), 6.82 (m, 2H), 6.85 (m, 2H), 7.19 (m, 1H), 7.30 (m, 2H), 7.35 (m, 2H), 7.37 (m, 2H), 7.45-7.47 (complex, 2H), 7.60-7.65 (complex, 3H), 7.82-7.84 (complex, 2H), 7.98 (m, 1H), 8.20 (m, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.79 (s, 1H)

50

【 0 0 6 1 】

化合物(7c)の製造

化合物(6c)(80mg, 0.160mmol)を無水ピリジン(6ml)に溶解し、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド(70mg, 0.209mmol)を加えて、室温で6時間攪拌した。薄層クロマトグラフィーで原料の消失を確認した後、減圧留去して分液操作を行い(酢酸エチル/炭酸水素ナトリウム水溶液)、有機層を回収して繰り返し減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(メタノール:クロロホルム/トリエチルアミ=25:1/10ml)で精製し、化合物(7c)(0.1032g, 80.53%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) 2.48 (ddd, $J = 4.6, 6.4, 13.6$ Hz, 1H), 2.58 (m, 1H), 3.07 (s, 6H), 3.10 (s, 3H), 3.22 (s, 3H), 3.35 (dd, $J = 5.0, 10.1$ Hz, 1H), 3.43 (dd, $J = 4.6, 10.1$ Hz, 1H), 3.72 (s, 6H), 4.10 (m, 1H), 4.59 (m, 1H), 6.74 (m, 1H), 6.82 (m, 2H), 6.85 (m, 2H), 6.88 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.16 (m, 1H), 7.20 (m, 1H), 7.30 (m, 2H), 7.34 (m, 2H), 7.36 (m, 2H), 7.42-7.46 (complex, 3H), 7.51 (s, 1H), 7.57 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.63 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.84 (m, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.71 (s, 1H)

10

【 0 0 6 2 】

化合物(8a)の製造

化合物(7a)(70mg, 0.0923mmol)を無水アセトニトリル(1.5ml)に溶解し、トリエチルアミン(1ml)、2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホアミジト(150 μl)を加えて、室温で1時間攪拌した。薄層クロマトグラフィーで原料の消失を確認した後、分液操作を行い(酢酸エチル/炭酸水素ナトリウム水溶液)、有機層を回収して繰り返し減圧留去した。残渣を無水アセトニトリル600 μl で溶解し、コスモナイスフィルターSでろ過した。ろ液を減圧留去し、目的の化合物(8a)を粗生成物として得た。DNA合成には化合物(8a)の粗生成物をそのまま用いた。

20

【 0 0 6 3 】

化合物(8b)の製造

化合物(7b)(100mg, 0.1277mmol)を無水アセトニトリル(2.0ml)に溶解し、トリエチルアミン(1ml)、2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホアミジト(150 μl)を加えて、室温で1時間攪拌した。薄層クロマトグラフィーで原料の消失を確認した後、分液操作を行い(酢酸エチル/炭酸水素ナトリウム水溶液)、有機層を回収して繰り返し減圧留去した。残渣を無水アセトニトリル600 μl で溶解し、コスモナイスフィルターSでろ過した。ろ液を減圧留去し、目的の化合物(8b)を粗生成物として得た。DNA合成には化合物(8b)の粗生成物をそのまま用いた。

30

【 0 0 6 4 】

化合物(8c)の製造

化合物(7c)(60mg, 0.0749mmol)を無水アセトニトリル(2.0ml)に溶解し、トリエチルアミン(1ml)、2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホアミジト(150 μl)を加えて、室温で1時間攪拌した。薄層クロマトグラフィーで原料の消失を確認した後、分液操作を行い(酢酸エチル/炭酸水素ナトリウム水溶液)、有機層を回収して繰り返し減圧留去した。残渣を無水アセトニトリル600 μl で溶解し、コスモナイスフィルターSでろ過した。ろ液を減圧留去し、目的の化合物(8c)を粗生成物として得た。DNA合成には化合物(8c)の粗生成物をそのまま用いた。

40

【 0 0 6 5 】

DNA合成

得られた化合物(8a)、(8b)及び(8c)をそれぞれ、アセトニトリル600 μl に溶解し、DNA自動合成機(製造元:アプライドバイオシステムズ社、型番:3400 DNAシンセサイザー)を用いてDNA鎖へ導入した。

【 実施例 3 】

【 0 0 6 6 】

[1] 蛍光スペクトルの測定

50

実施例 2 で得られた化合物 (5b) 及び (5c) について、それぞれ、各種溶媒 (メタノール (MeOH)、エタノール (EtOH)、2 - プロパノール (2-prOH)、N, N - ジメチルホルムアミド (DMF)、アセトニトリル (MeCN)、テトラヒドロフラン (THF)、酢酸エチル (AcOEt)、クロロホルム (CHCl₃)、水 (water)) に溶解したときの蛍光スペクトル (λ_{max}) 及びその変化量 ($\Delta \lambda_{\text{max}}$) を次の手順に従って測定した。

化合物 (5b) 及び (5c) を各溶媒に溶解させ、濃度 10 μM (全量 1ml) に調製した。600 μl を石英セルに移し、分光蛍光光度計 (製造元: 島津製作所、型番: RF-5300PC) を用いて蛍光スペクトル (λ_{max}) を測定した。また、溶媒ごとの λ_{max} から変化量 ($\Delta \lambda_{\text{max}}$) を算出した。

測定結果を図 1 及び 2 のグラフ及び表 (表 1 A 及び 2 A) にそれぞれ示す。参考として、C 8 位置換塩基誘導体及び Tetrahedron Letters 52 (2011) 4726-4729 (非特許文献 3) 記載の化合物についても同様の方法で各種溶媒に溶解したときの蛍光スペクトルの変化を観察した。測定結果を図 3 ~ 6 のグラフ及び表 (表 3 A ~ 6 A) にそれぞれ示す。

10

【0067】

図 1 及び 2 のグラフ及び表に示されるとおり、本発明のデアザプリンヌクレオシド誘導体 (5b) 及び (5c) をそれぞれ各種溶媒に溶解すると、溶媒の種類 (極性環境) に応じて蛍光発光波長が変化した。特に化合物 (5b) では、蛍光発光波長の変化をより大きくすることができた。これは、化合物 (5b) が置換基 Y¹ に電子吸引性のシアノ基を有しており、三重結合を介して、デアザプリン塩基とシアノ基を有するピフェニル環との間で、共役電子の「push-pull」構造が形成されるため、極性環境の変化にตอบสนองして蛍光発光波長の変化をより効果的にすることができるためであると考えられる。

20

C 8 位置換塩基誘導体である化合物 (C1)、(C2) 及び (C3)、さらには Tetrahedron Letters 52 (2011) 4726-4729 (非特許文献 3) 記載の化合物 (C4) を用いた場合にも、極性環境の変化にตอบสนองして蛍光発光波長が変化した。

【0068】

[2] DNA 高次構造の熱安定性の評価

T_m値 (融解温度: melting temperature) は、特定の条件下における固有の DNA 高次構造の熱安定性の指標である。実施例 2 で得られた本発明の化合物 (8b) 及び (8c) をそれぞれ DNA 鎖に導入してなるオリゴヌクレオチド DNA (ODN1(X)、X = 5b, 5c) に各種相補鎖 (N = A, G, C, T) を加えたときの T_m値及びその変化量 ΔT_m を次の手順に従って測定し、DNA 二重らせん構造の熱安定性を評価した。

30

濃度 2.5 μM に調製した DNA 溶液を 8 連マイクロセルに移し、紫外可視分光光度計 (製造元: 島津製作所、型番: UV-2550) を用いて 4 ~ 90 nm の範囲で測定を行い、中線法を用いて T_m値を算出した。また、天然オリゴヌクレオチド DNA の T_m値をもとに、変化量 ΔT_m を算出した。

測定結果を図 1 及び 2 の表 1 B 及び表 2 B にそれぞれ示す。参考として、C 8 位置換塩基誘導体及び Tetrahedron Letters 52 (2011) 4726-4729 (非特許文献 3) 記載の化合物についても同様の方法で T_m値及びその変化量 ΔT_m を測定した。測定結果を図 3 ~ 6 の表 3 B ~ 表 6 B にそれぞれ示す。

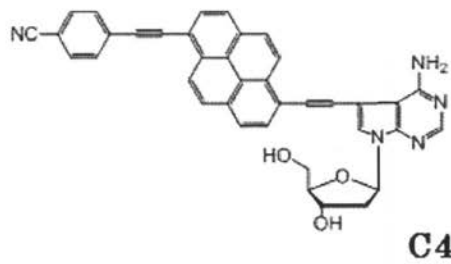
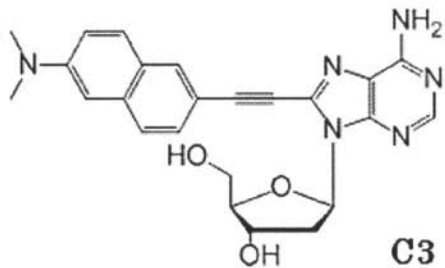
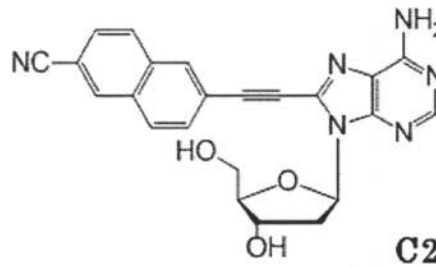
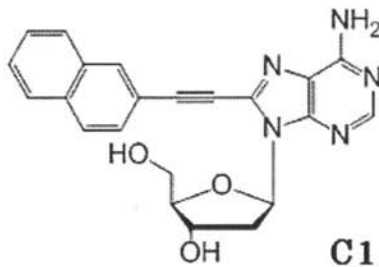
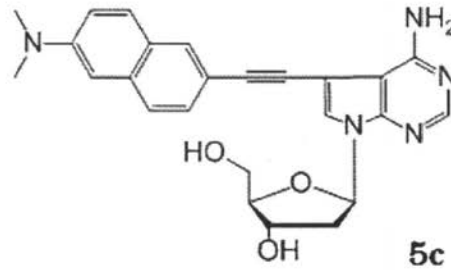
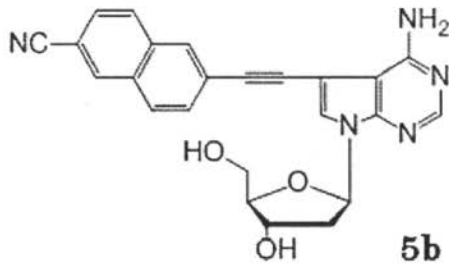
【0069】

40

なお、本測定に用いたオリゴヌクレオチド DNA の塩基配列は下表に示したとおりである。

【表 1】

ODN1 (5b)	5'-d(CGCAATXTAACGC)-3'	X = 5b	(配列番号 1)
ODN1 (5c)	5'-d(CGCAATXTAACGC)-3'	X = 5c	(配列番号 2)
ODN1 (C1)	5'-d(CGCAATXTAACGC)-3'	X = C1	(配列番号 3)
ODN1 (C2)	5'-d(CGCAATXTAACGC)-3'	X = C2	(配列番号 4)
ODN1 (C3)	5'-d(CGCAATXTAACGC)-3'	X = C3	(配列番号 5)
ODN1 (C4)	5'-d(CGCAATXTAACGC)-3'	X = C4	(配列番号 6)
ODN2 (N)	5'-d(GCGTTANATTGCG)-3'	N = A, G, C, T	(配列番号 7)



【0070】

表 1 B 及び 2 B に示されるとおり、本発明の化合物(5b)及び(5c)をそれぞれ DNA 鎖に導入したときは、 T_m 値の変化量が小さく、天然の核酸塩基と同程度の DNA 二重鎖安定性を示した。特に、本発明の化合物(5b)を DNA 鎖に導入した場合、相補鎖の対面塩基とマッチしたとき(すなわち ODN1(5b)/ODN2(T)のとき)の T_m 値の変化量は 0 であり、天然の核酸塩基と同じ DNA 二重鎖安定性を示した。一方、表 3 B ~ 6 B に示されるとおり、比較例化合物(C1) ~ (C4)を用いた場合は T_m 値の変化量が大きく、DNA の二重らせん構造を不安定化した。

【0071】

以上の結果に示されるとおり、本発明のデアザプリンヌクレオシド誘導体は、周囲の極性環境の違いに回答して蛍光発光波長を変化させることができ、しかも DNA の二重らせん構造を不安定化することもないため、本発明のデアザプリンヌクレオシド誘導体を DNA 中の識別したい塩基の対面に導入したプローブを作製し、対面塩基とのマッチ - ミスマ

10

20

30

40

50

ッチの違いによる周辺極性環境の変化を利用することで、目的とする塩基の種類を蛍光発光の色の違いで識別することができる。本発明のプローブは、発光強度ではなく、蛍光発光の色の違いで識別することができるので、検査用キットとして一般の人にも利用しやすい。また、周囲の極性の程度を色で示すことができるので、タンパク質や細胞内の局所的な極性環境の調査を目的とするプローブとしても利用することができる。

【産業上の利用可能性】

【0072】

本発明のデアザプリンヌクレオシド誘導体は、周囲の極性環境の違いによって蛍光発光波長を変化させることができ、しかもDNA鎖に導入したときにDNA二重らせん構造を不安定化しないため、遺伝子検出用のプローブあるいはタンパク質又は細胞内の局所的な極性環境の調査用プローブなどとして幅広く利用できる。

10

【配列表フリーテキスト】

【0073】

- 配列番号1：合成DNA
- 配列番号2：合成DNA
- 配列番号3：合成DNA
- 配列番号4：合成DNA
- 配列番号5：合成DNA
- 配列番号6：合成DNA
- 配列番号7：合成DNA

20

【 図 1 】

表1A 蛍光発光波長とその変化量

溶媒	λ_{max} (nm)	$\Delta\lambda_{\text{emr,max}}$
MeOH	489	63
EtOH	480	54
2-prOH	464	38
DMF	504	<u>78</u>
MeCN	491	65
THF	460	34
AcOEt	458	32
CHCl ₃	426	-

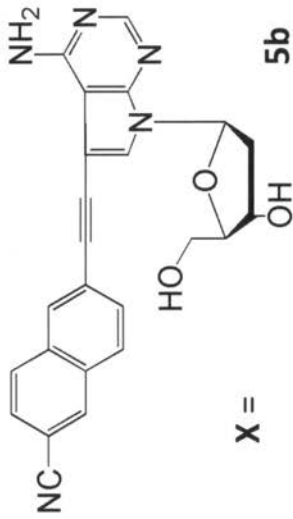
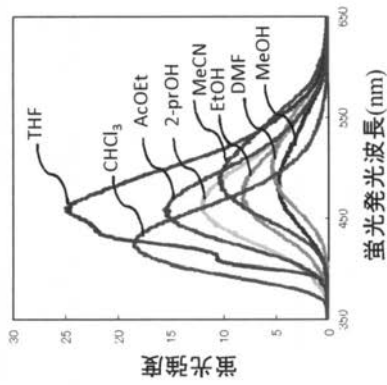


表1B DNA二重鎖を形成した時のTm値とその変化量

Duplexes	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
ODN1 (5b) / ODN 2 (T)	<u>52.8</u>	0.0
ODN1 (5b) / ODN 2 (C)	50.1	-2.7
ODN1 (5b) / ODN 2 (A)	44.2	-8.6
ODN1 (5b) / ODN 2 (G)	46.7	-6.1

ODNs	Sequences
1	5'-d(CGCAATXTAACGC)-3'
2	5'-d(GCGTTANATTGCG)-3'

N = A, T, G or C

表2A 蛍光発光波長とその変化量

溶媒	λ_{max} (nm)	$\Delta\lambda_{\text{em, max}}$
water	-	9
MeOH	424	4
2-prOH	419	<u>19</u>
DMF	434	16
MeCN	431	4
THF	419	4
AcOEt	419	4
CHCl ₃	415	-

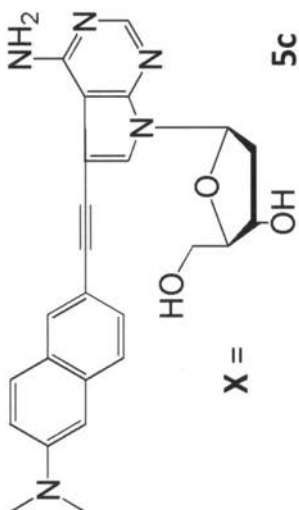
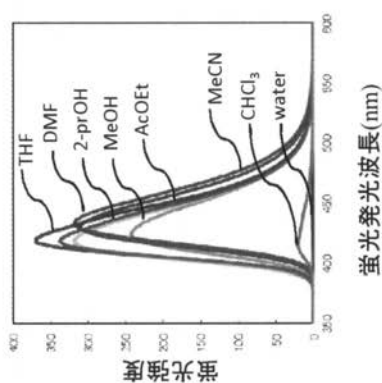


表2B DNA二重鎖を形成した時のTm値とその変化量

Duplexes	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
ODN1 (5c) / ODN 2 (T)	<u>51.0</u>	-1.8
ODN1 (5c) / ODN 2 (C)	46.5	-6.8
ODN1 (5c) / ODN 2 (A)	40.0	-12.8
ODN1 (5c) / ODN 2 (G)	44.9	-7.9

ODNs	Sequences
1	5'-d(CGCAATXTAACGC)-3'
2	5'-d(GCGTTANATTGCG)-3'

N = A, T, G or C

【 図 3 】

表3A 蛍光発光波長とその変化量

溶媒	λ_{max} (nm)	$\Delta\lambda_{em,max}$
MeOH	395	19
EtOH	383	7
2-PrOH	382	6
MeCN	389	13
DMF	429	<u>53</u>
CHCl ₃	376	-
AcOEt	385	9

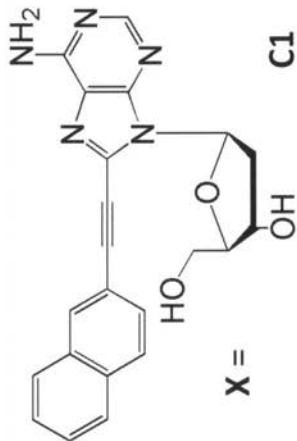
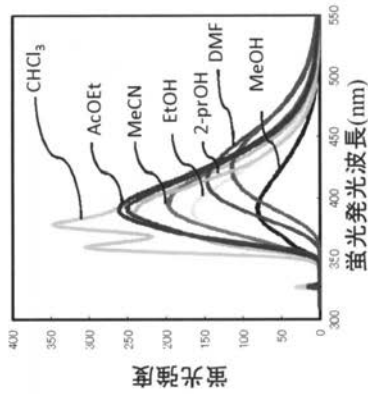


表3B DNA二重鎖を形成した時のTm値とその変化量

Duplexes	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
ODN1 (C1) / ODN 2 (T)	42.2	-10.6
DON1 (C1) / ODN 2 (C)	<u>45.2</u>	-7.6
ODN1 (C1) / ODN 2 (A)	42.4	-10.4
ODN1 (C1) / ODN 2 (G)	45.0	-7.8

ODNs	Sequences
1	5'-d(CGCAATXTAACGC)-3'
2	5'-d(GCGTTANATTGCG)-3'

N = A,T,G or C

【 図 4 】

表4A 蛍光発光波長とその変化量

溶媒	λ_{max} (nm)	$\Delta\lambda_{em,max}$
MeOH	462	55
EtOH	455	48
2-PrOH	447	40
MeCN	455	48
DMF	480	<u>73</u>
CHCl ₃	407	-
AcOEt	438	31

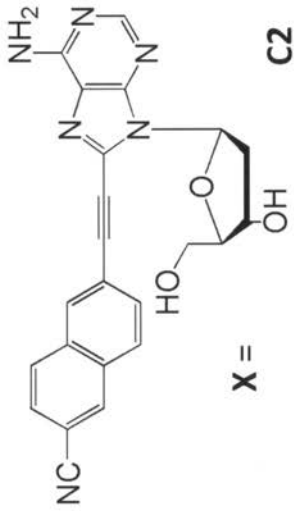
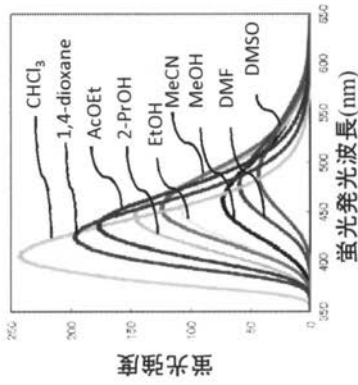


表4B DNA二重鎖を形成した時のTm値とその変化量

Duplexes	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
ODN1 (C2) / ODN 2 (T)	<u>48.7</u>	-4.6
ODN1 (C2) / ODN 2 (C)	47.0	-5.8
ODN1 (C2) / ODN 2 (A)	44.9	-7.9
ODN1 (C2) / ODN 2 (G)	45.7	-7.1

ODNs	Sequences
1	5'-d(CGCAATXTAACGC)-3'
2	5'-d(GCGTTANATTGCG)-3'

N = A,T,G or C

表5A 蛍光発光波長とその変化量

溶媒	λ_{max} (nm)	$\Delta\lambda_{\text{em, max}}$
MeOH	503	57
EtOH	494	48
2-PrOH	481	35
MeCN	484	38
DMF	478	32
CHCl ₃	454	8
EtOAc	446	-

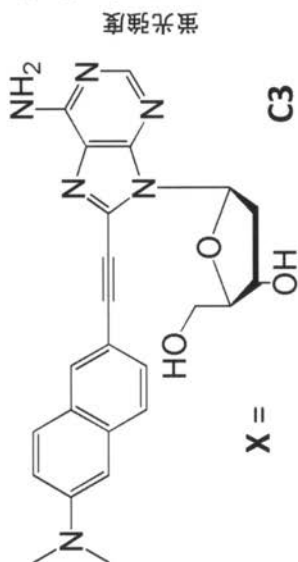
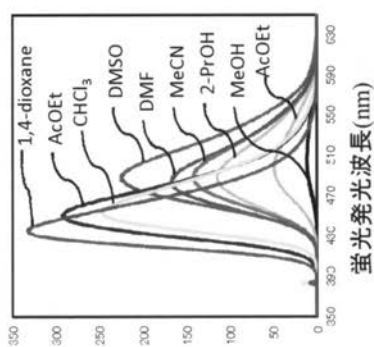


表5B DNA二重鎖を形成した時のTm値とその変化量

Duplexes	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
ODN1 (C3) / ODN 2 (T)	43.3	-9.5
ODN1 (C3) / ODN 2 (C)	43.0	-9.8
ODN1 (C3) / ODN 2 (A)	40.2	-12.6
ODN1 (C3) / ODN 2 (G)	43.8	-9.0

ODNs	Sequences
1	5'-d(CGCAATXTAACGC)-3'
2	5'-d(GCGTTANATTGCG)-3'

N = A,T,G or C

表6A 蛍光発光波長とその変化量

溶媒	λ_{max} (nm)	$\Delta\lambda_{\text{em,max}}$
MeOH	501	17
DMF	530	46
MeCN	512	28
THF	510	26
AcOEt	501	17
CHCl ₃	484	-

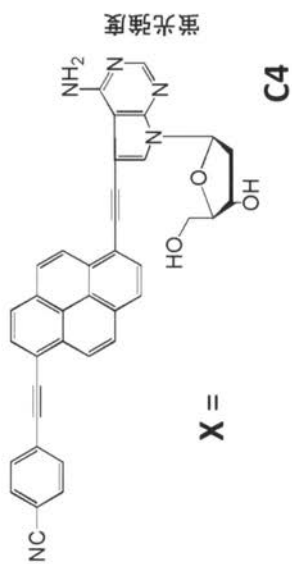
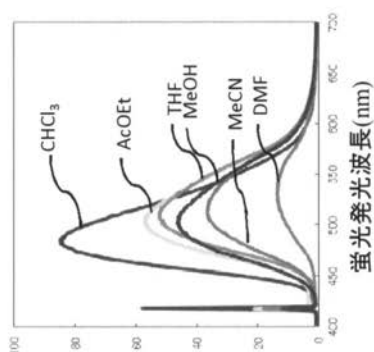


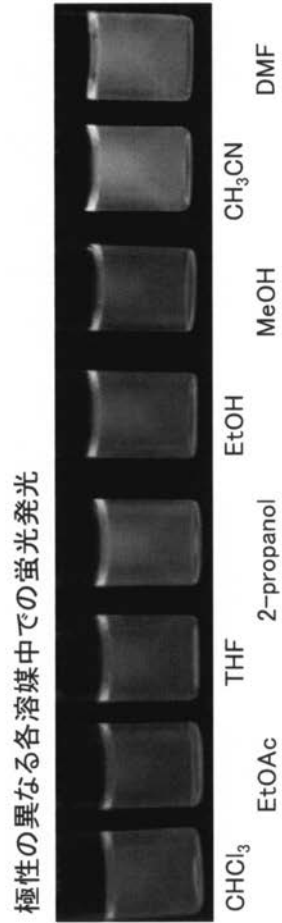
表6B DNA二重鎖を形成した時のTm値とその変化量

Duplexes	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
ODN1 (C4) / ODN 2 (T)	45.5	-7.3
ODN1 (C4) / ODN 2 (C)	46.7	-6.1
ODN1 (C4) / ODN 2 (A)	43.4	-9.4
ODN1 (C4) / ODN 2 (G)	43.4	-9.4

ODNs	Sequences
1	5'-d(CGCAATXTAACGC)-3'
2	5'-d(GCGTTANATTGCG)-3'

N = A, T, G or C

【 図 7 】



【 配列表 】

[2013159574000001.app](#)

フロントページの続き

- (72)発明者 齋藤 烈
東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内
- (72)発明者 鈴木 梓
東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内
- (72)発明者 石下 真也
東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内
- Fターム(参考) 4B063 QA01 QQ42 QR55 QS34 QS36 QX02
4C057 BB02 BB05 DD01 LL26 MM04 MM09

【要約の続き】

【選択図】図1