

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6481161号
(P6481161)

(45) 発行日 平成31年3月13日(2019.3.13)

(24) 登録日 平成31年2月22日(2019.2.22)

(51) Int.Cl.			F I		
C O 7 H	21/04	(2006.01)	C O 7 H	21/04	Z
C O 7 H	19/04	(2006.01)	C O 7 H	19/04	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z N A Z
C 1 2 Q	1/68	(2018.01)	C 1 2 Q	1/68	

請求項の数 13 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2014-224574 (P2014-224574)	(73) 特許権者	304024430
(22) 出願日	平成26年11月4日(2014.11.4)		国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学
(65) 公開番号	特開2016-86724 (P2016-86724A)		石川県能美市旭台一丁目1番地
(43) 公開日	平成28年5月23日(2016.5.23)	(74) 代理人	110000523
審査請求日	平成29年10月27日(2017.10.27)		アクシス国際特許業務法人
		(74) 代理人	100127133
			弁理士 小坂橋 浩之
		(72) 発明者	藤本 健造
			石川県能美市旭台一丁目1番地 国立大学
			法人北陸先端科学技術大学院大学 マテリ
			アルサイエンス研究科内
		(72) 発明者	中村 重孝
			石川県能美市旭台一丁目1番地 国立大学
			法人北陸先端科学技術大学院大学 マテリ
			アルサイエンス研究科内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光架橋核酸二重鎖の光架橋を光開裂させる方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

核酸二重鎖内の鎖間に光応答性塩基によって形成された光架橋を有する、光架橋核酸二重鎖に対して、光照射して、光架橋を光開裂させる方法であって、

光架橋核酸二重鎖は、光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基を有する光応答性修飾核酸の鎖と、該光応答性修飾核酸に対して相補的な配列を有する被光架橋性核酸の鎖とによって二重鎖形成され、

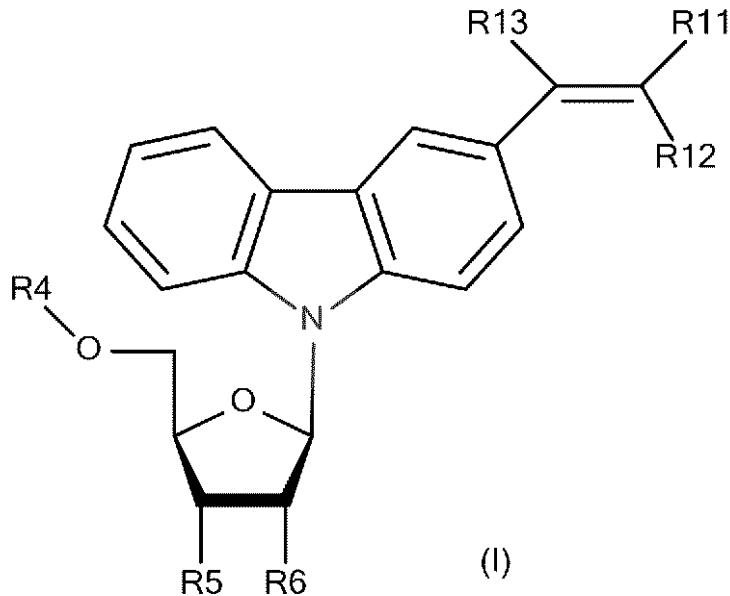
光応答性修飾核酸の鎖と被光架橋性核酸の鎖とは、光応答性塩基によって光架橋され、

光架橋核酸二重鎖は、二重鎖の末端に一重鎖部分を有しており、

該末端の一重鎖部分を有する鎖の一重鎖部分と二重鎖部分に対して相補的な配列を有する挿入核酸の鎖を、光架橋核酸二重鎖と溶液中で接触可能に添加して、光照射する工程、を含む、方法であり、

光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基を有する光応答性修飾核酸が、次の式(Ⅰ)：

【化 1】



10

(ただし、式 I 中、R 1 1 は、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C 2 ~ C 7 のアルコキシカルボニル基、又は水素であり、

20

R 1 2 及び R 1 3 は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C 2 ~ C 7 のアルコキシカルボニル基、又は水素であり、

R 4 は、水素を表し、

R 5 は、水酸基を表し、

R 6 は、水素又は水酸基である)

で表される修飾ヌクレオシドが、光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基として、リン酸ジエステル結合によって塩基配列中に導入されてなる修飾核酸である、方法。

【請求項 2】

光応答性塩基によって形成された光架橋が、

光応答性修飾核酸の塩基配列中の光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基と、

被光架橋性核酸の塩基配列中の T 又は U との間に形成された光架橋である、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 3】

末端の一重鎖部分を有する鎖が、光応答性修飾核酸の鎖、又は挿入核酸の鎖であり、

該末端の一重鎖部分が、光応答性修飾核酸の鎖の 3' 末端又は 5' 末端、または挿入核酸の鎖の 3' 末端又は 5' 末端である、請求項 1 ~ 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4】

光架橋核酸二重鎖の末端の一重鎖部分が、1 ~ 30 塩基の塩基長である、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

末端の一重鎖部分を有する鎖の一重鎖部分と二重鎖部分に対して相補的な配列を有する挿入核酸の鎖が、一重鎖、又は一重鎖部分を有する二重鎖である、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 6】

末端の一重鎖部分を有する鎖が、光応答性修飾核酸の鎖であり、

末端の一重鎖部分が、光応答性修飾核酸の鎖の 3' 末端又は 5' 末端であり、

挿入核酸の鎖が、光応答性修飾核酸に対して相補的な配列を有する一重鎖である、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

光照射が、312 ~ 400 nm の範囲の波長の光照射によって行われる、請求項 1 ~ 6

50

のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

光照射が、1～60 の範囲の温度において行われる、請求項 1～7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

光照射が、4～40 の範囲の温度において行われる、請求項 1～7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

請求項 1～9 のいずれかに記載の方法によって、
核酸二重鎖内の鎖間の光架橋を光開裂させて、光架橋されていない光応答性修飾核酸を 10
製造する方法。

【請求項 11】

請求項 1～9 のいずれかに記載の方法によって、
核酸二重鎖内の鎖間の光架橋を光開裂させて、光架橋されていない被光架橋性核酸を、
製造する方法。

【請求項 12】

請求項 1～9 のいずれかに記載の挿入核酸からなる、光架橋核酸二重鎖用光開裂促進剤
。

【請求項 13】

請求項 1～9 のいずれかに記載の挿入核酸の、光架橋核酸二重鎖内光開裂促進のための 20
使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、光架橋核酸二重鎖の光架橋を光開裂させる方法に関する。

【背景技術】

【0002】

分子生物学的の分野において、核酸の連結と切断は、あらゆる応用の基礎となる重要な
基本技術である。

【0003】

光反応による核酸の連結の技術として、5 - シアノビニルデオキシウリジンを使用した
光連結技術（特許文献 1：特許第 3753938号、特許文献 2：特許第 3753942
号）、3 - ビニルカルバゾール構造を塩基部位に持つ修飾ヌクレオシド又はヌクレオシド
アナログを使用した光架橋技術（特許文献 3：特許第 4814904号、特許文献 4：特
許第 4940311号、特許文献 5：国際公開 WO 2014 / 157565 A 1号公報）
がある。これらの技術によって核酸二重鎖の鎖間に光架橋を形成することができる。この
光架橋は、共有結合による架橋であり、化学的に安定であるが、光反応によって再び開裂
することができる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】日本国特許第 3753938号

【特許文献 2】日本国特許第 3753942号

【特許文献 3】日本国特許第 4814904号

【特許文献 4】日本国特許第 4940311号

【特許文献 5】国際公開 WO 2014 / 157565 A 1号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

上記のように、3 - ビニルカルバゾール構造を塩基部位に持つ修飾ヌクレオシドによっ 50

て、核酸二重鎖の鎖間に形成された光架橋は、光反応による開裂（光開裂）が可能である。しかし、核酸二重鎖の鎖間に形成された光架橋の開裂を、十分に効率よく進行させるためには、加熱条件下（例えば90℃）で、短波長（例えば312nm）の光照射を行うことが必要であった。このような加熱や短波長の光は細胞にとって好ましいものではない。

【0006】

したがって、本発明の目的は、従来よりも低温で、従来よりも長波長の光照射によって、核酸二重鎖の鎖間に形成された光架橋を、高い効率で開裂させる方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者は、上記の光応答性修飾核酸によって形成された二重鎖内の光架橋の光開裂について、鋭意研究してきたところ、二重鎖の末端に一重鎖部分を設けて、該末端の一重鎖部分を有する鎖の一重鎖部分と二重鎖部分に対して相補的な配列を有する挿入核酸の鎖を、光架橋核酸二重鎖と溶液中で接触可能に添加して、光照射すると、従来よりも低温で、従来よりも長波長の光照射によっても、光開裂が高い効率で進行することを見いだして、本発明に到達した。

【0008】

したがって、本発明は次の（1）以下にもある。

（1）

核酸二重鎖内の鎖間に光応答性塩基によって形成された光架橋を有する、光架橋核酸二重鎖に対して、光照射して、光架橋を光開裂させる方法であって、

光架橋核酸二重鎖は、光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基を有する光応答性修飾核酸の鎖と、該光応答性修飾核酸に対して相補的な配列を有する被光架橋性核酸の鎖とによって二重鎖形成され、

光応答性修飾核酸の鎖と被光架橋性核酸の鎖とは、光応答性塩基によって光架橋され、

光架橋核酸二重鎖は、二重鎖の末端に一重鎖部分を有しており、

該末端の一重鎖部分を有する鎖の一重鎖部分と二重鎖部分に対して相補的な配列を有する挿入核酸の鎖を、光架橋核酸二重鎖と溶液中で接触可能に添加して、光照射する工程、を含む、方法。

（2）

光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基が、光架橋性のビニルカルバゾール構造を有する光応答性塩基である、（1）に記載の方法。

（3）

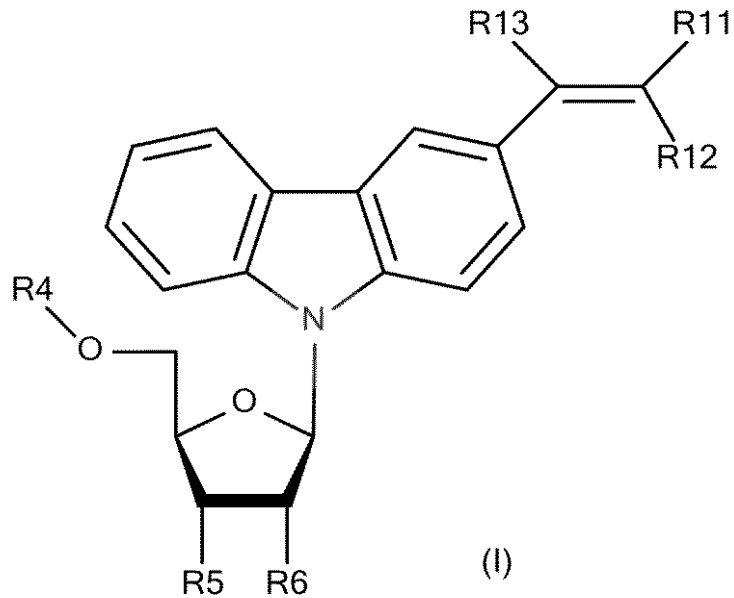
光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基を有する光応答性修飾核酸が、次の式（I）：

10

20

30

【化1】



10

(ただし、式 I 中、R 1 1 は、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C 2 ~ C 7 のアル
コキシカルボニル基、又は水素であり、

20

R 1 2 及び R 1 3 は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C 2 ~
C 7 のアルコキシカルボニル基、又は水素であり、

R 4 は、水素を表し、

R 5 は、水酸基を表し、

R 6 は、水素又は水酸基である)

で表される修飾ヌクレオシドが、光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基として、リ
ン酸ジエステル結合によって塩基配列中に導入されてなる修飾核酸であり、

光応答性塩基によって形成された光架橋が、

光応答性修飾核酸の塩基配列中の光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基と、

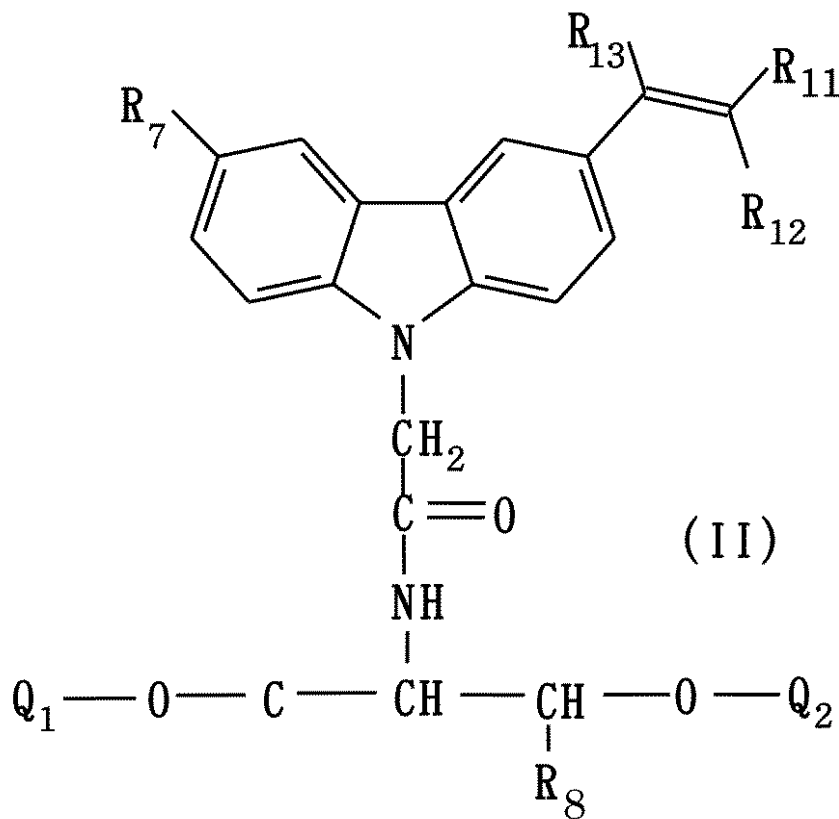
被光架橋性核酸の塩基配列中の T 又は U との間に形成された光架橋である、(1) に記
載の方法。

30

(4)

光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基を有する光応答性修飾核酸が、次の式 (I
I) :

【化2】



10

20

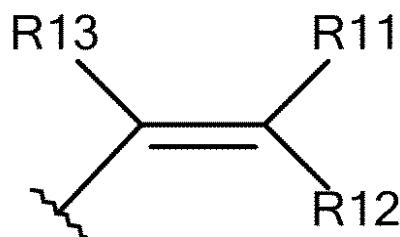
(ただし、式 I I 中、

R 1 1 は、シアノ基、アミド基、カルボキシ基、C 2 ~ C 7 のアルコキシカルボニル基、ホスホノ基、スルホ基、又は水素原子を表し、

R 1 2 及び R 1 3 は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシ基、C 2 ~ C 7 のアルコキシカルボニル基、又は水素原子を表し、

R 7 は、水素原子、水酸基、C 1 ~ C 3 のアルコキシ基、C 1 ~ C 3 のアルキルスルファニル基、ニトロ基、フッ素原子、フッ化メチル基、C 6 ~ C 1 2 の単環式又は二環式の芳香族化合物の 1 価基、C 6 ~ C 1 2 の単環式又は二環式の複素環系芳香族化合物の 1 価基、又は、次の式：

【化3】



40

(ただし、上記式中、R 1 1、R 1 2 及び R 1 3 は、式 I I について上述した R 1 1、R 1 2 及び R 1 3 とは独立に、式 I I について上述した R 1 1、R 1 2 及び R 1 3 として挙げられた基から選択された基を表す)

で表される 1 価基を表し、

R 8 は、水素原子、メチル基、又はエチル基を表し、

Q₁ は、式 I I I で Q₁ に結合している O と一体となって形成されたリン酸基を表し、

50

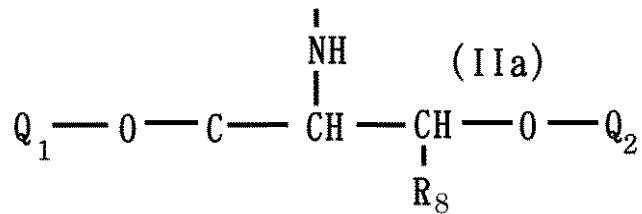
Q_2 は、水素原子を表す)

で表される修飾ヌクレオチドの塩基部分として、上記修飾ヌクレオチドのリン酸ジエステル結合によって光応答性部分塩基配列中に導入されている、(1)~(3)のいずれかに記載の方法。

(5)

式II中において、次の式(IIa)：

【化4】

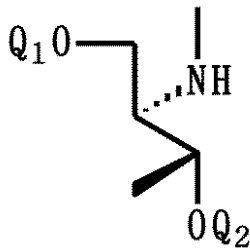


10

で表される骨格構造が、

次の式：

【化5】

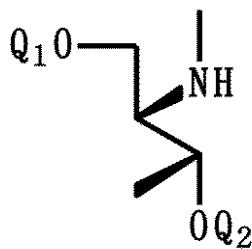


20

で表されるD-トレオニノール構造、

次の式：

【化6】

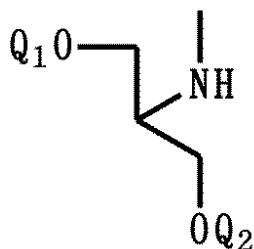


30

で表されるL-トレオニノール構造、

又は、次の式：

【化7】



40

で表されるセリノール構造である、(4)に記載の方法。

(6)

50

末端の一重鎖部分を有する鎖が、光応答性修飾核酸の鎖、又は挿入核酸の鎖であり、該末端の一重鎖部分が、光応答性修飾核酸の鎖の3'末端又は5'末端、または挿入核酸の鎖の3'末端又は5'末端である、(1)~(5)のいずれかに記載の方法。

(7)

光架橋核酸二重鎖の末端の一重鎖部分が、1~30塩基の塩基長である、(1)~(6)のいずれかに記載の方法。

(8)

末端の一重鎖部分を有する鎖の一重鎖部分と二重鎖部分に対して相補的な配列を有する挿入核酸の鎖が、一重鎖、又は一重鎖部分を有する二重鎖である、(1)~(7)のいずれかに記載の方法。

10

(9)

末端の一重鎖部分を有する鎖が、光応答性修飾核酸の鎖であり、末端の一重鎖部分が、光応答性修飾核酸の鎖の3'末端又は5'末端であり、挿入核酸の鎖が、光応答性修飾核酸に対して相補的な配列を有する一重鎖である、(1)~(8)のいずれかに記載の方法。

(10)

光照射が、312~400nmの範囲の波長の光照射によって行われる、(1)~(9)のいずれかに記載の方法。

(11)

光照射が、1~60の範囲の温度において行われる、(1)~(10)のいずれかに記載の方法。

20

(12)

光照射が、4~40の範囲の温度において行われる、(1)~(10)のいずれかに記載の方法。

(13)

(1)~(12)のいずれかに記載の方法によって、核酸二重鎖内の鎖間の光架橋を光開裂させて、光架橋されていない光応答性修飾核酸を、製造する方法。

(14)

(1)~(12)のいずれかに記載の方法によって、核酸二重鎖内の鎖間の光架橋を光開裂させて、光架橋されていない被光架橋性核酸を、製造する方法。

30

(15)

(1)~(12)のいずれかに記載の挿入核酸からなる、光架橋核酸二重鎖用光開裂促進剤。

(16)

(1)~(12)のいずれかに記載の挿入核酸の、光架橋核酸二重鎖内光開裂促進のための使用。

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、従来よりも低温で、従来よりも長波長の光照射によっても、光開裂を高い効率で進行させることができる。そのために、生体分子に穏和な条件で光開裂が可能であり、あるいは細胞内や生体内で光開裂することも可能となる。

40

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1は光架橋形成を示す説明図である。

【図2】図2は光開裂のスキームを示す説明図である。

【図3】図3は光開裂の促進の配列選択性を示す実験結果の写真である。

【図4】図4は光開裂の促進を示す実験結果のグラフである。

【図5】図5は光開裂の促進の配列選択性を示す実験結果のグラフである。

50

【図6】図6は光開裂の促進の波長依存性を示す実験結果のグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0011】

具体的な実施の形態をあげて、以下に本発明を詳細に説明する。本発明は、以下にあげる具体的な実施他の形態に限定されるものではない。

【0012】

[光架橋の光開裂]

本発明は、核酸二重鎖内の鎖間に光応答性塩基によって形成された光架橋を有する、光架橋核酸二重鎖に対して、光照射して、光架橋を光開裂させる方法であって、光架橋核酸二重鎖は、光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基を有する光応答性修飾核酸の鎖と、該光応答性修飾核酸に対して相補的な配列を有する被光架橋性核酸の鎖とによって二重鎖形成され、光応答性修飾核酸の鎖と被光架橋性核酸の鎖とは、光応答性塩基によって光架橋され、光架橋核酸二重鎖は、二重鎖の末端に一重鎖部分を有しているとしたうえで、該末端の一重鎖部分を有する鎖の一重鎖部分と二重鎖部分に対して相補的な配列を有する挿入核酸の鎖を、光架橋核酸二重鎖と溶液中で接触可能に添加して、光照射する工程を行うことによって実施される。

10

【0013】

好適な実施の態様において、光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基は、光架橋性のビニルカルバゾール構造を有する光応答性塩基である。

【0014】

本発明によれば、光架橋された核酸二重鎖を光開裂するために光照射する際に、上記挿入核酸を、添加することによって光開裂反応を促進して、従来よりも低温で且つ長波長の光照射によっても、高い効率で光開裂された核酸を得ることができる。

20

【0015】

本発明によるこの優れた効果が生じるメカニズムについて、本発明者は、鎖交換反応が関与していると考えている。図1に示すような光架橋の形成は、光照射によって逆反応を進行させることが知られている。従来は、312nmといった紫外領域の光照射を加熱下（例えば90℃）で行うことが、光開裂の効率の観点から必要とされていた。このような条件では、生体内や細胞内での光開裂の実施は、現実的には行えない。ところが、本発明による挿入核酸の添加を行うと、挿入核酸の鎖が、光架橋核酸二重鎖の末端の一重鎖部分（sticky end）に付着して、図2に示すような鎖交換反応が進行すると考えられる。そして、低温で長波長の光照射によって光開裂が生じた場合に、鎖交換が行われる結果、光開裂反応の逆反応が生じるチャンスを極めて低減することによって、光反応を一方向に進行させて、上記の優れた効果を実現すると考えられる。したがって、以下の具体的な実施の態様に限られずに、上記挿入核酸による鎖交換反応によって、光架橋された核酸二重鎖の光開裂を促進する技術は、本発明の範囲内にある。

30

【0016】

[光架橋核酸二重鎖]

光架橋核酸二重鎖は、光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基を有する光応答性修飾核酸の鎖と、該光応答性修飾核酸に対して相補的な配列を有する被光架橋性核酸の鎖とによって二重鎖形成されている。光架橋核酸二重鎖は、本発明の実施が可能である限り、さらに修飾されていてもよく、例えば、いずれかの鎖が修飾されて、検出や定量的ための標識部位が設けられていてもよく、例えば、いずれかの鎖が修飾されて、ビーズやプレートなどの基材や担体に固定されていてもよい。

40

【0017】

光架橋核酸二重鎖の二重鎖部分の塩基長は、本発明の実施が可能である限り、特に制限はないが、例えば、10~10000塩基、20~1000塩基、20~100塩基の塩基長とすることができる。

【0018】

[末端の一重鎖部分]

50

光架橋核酸二重鎖は、二重鎖の末端に一重鎖部分を有する。この末端の一重鎖部分(sticky end)に、挿入核酸が付着して、鎖交換反応が進行すると考えられる。そのため、この末端の一重鎖部分は、本発明の実施が可能である限り、二重鎖のいずれの鎖の末端に存在していてもよく、3'末端又は5'末端のいずれの末端に存在していてもよい。例えば、光応答性修飾核酸の鎖の3'末端、光応答性修飾核酸の鎖の5'末端、被光架橋性核酸の鎖の3'末端、又は被光架橋性核酸の鎖の5'末端に存在するものとする。

【0019】

末端の一重鎖部分の塩基長は、本発明の実施が可能である限り、特に制限はないが、例えば、1~30塩基、1~20塩基、1~10塩基、3~10塩基、4~10塩基、6~10塩基、4~8塩基、6~8塩基の塩基長とすることができる。

10

【0020】

[光架橋]

光架橋核酸二重鎖では、光応答性修飾核酸の鎖と被光架橋性核酸の鎖とが、光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基の光反応によってあらかじめ光架橋されている。好適な実施の態様において、光架橋は、光応答性修飾核酸の塩基配列中の光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基と、被光架橋性核酸の塩基配列中のT又はUとの間に形成された光架橋である。この光架橋は、公知の手段によって形成することができる。

【0021】

光架橋された塩基から、末端の一重鎖部分の塩基までの距離は、本発明の実施が可能である限り、特に制限はないが、例えば、1~50塩基、2~10塩基の塩基長とすることができる。

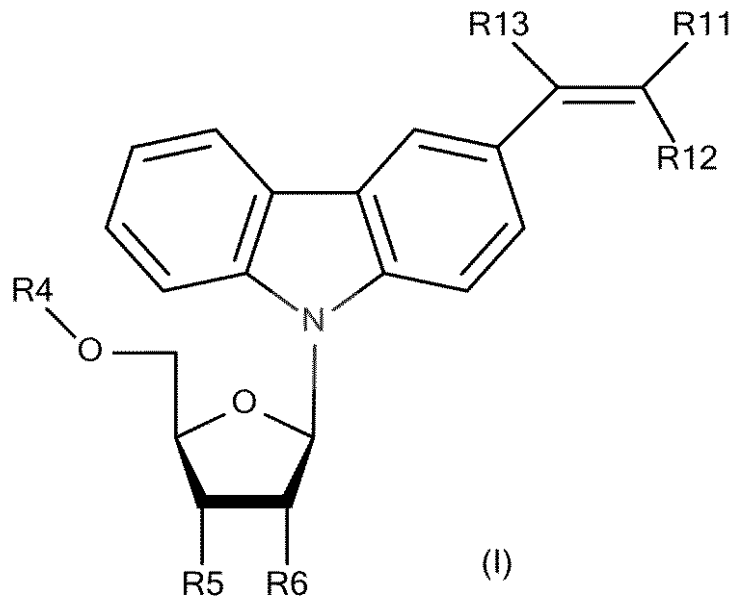
20

【0022】

[光応答性修飾核酸]

好適な実施の態様において、光応答性修飾核酸は、次の式(I)：

【化8】



30

40

で表される修飾ヌクレオシドが、光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基として、リン酸ジエステル結合によって塩基配列中に導入されてなる修飾核酸である。

【0023】

式Iにおいて、R11は、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C2~C7のアルコキシカルボニル基、又は水素を表し、

R12及びR13は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C2~C7のアルコキシカルボニル基、又は水素を表し、

R4は、水素を表し、

50

R 5 は、水酸基を表し、

R 6 は、水素又は水酸基を表す。

【 0 0 2 4 】

好適な実施の態様において、式 I の R 1 1 は、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、又は水素であり、好ましくは、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、又は水素であり、さらに好ましくは、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、又はアルコキシカルボニル基である。アルコキシカルボニル基は、好ましくは C 2 ~ C 7、さらに好ましくは C 2 ~ C 6、さらに好ましくは C 2 ~ C 5、さらに好ましくは C 2 ~ C 4、さらに好ましくは C 2 ~ C 3、特に好ましくは C 2 のものを使用することができる。

10

【 0 0 2 5 】

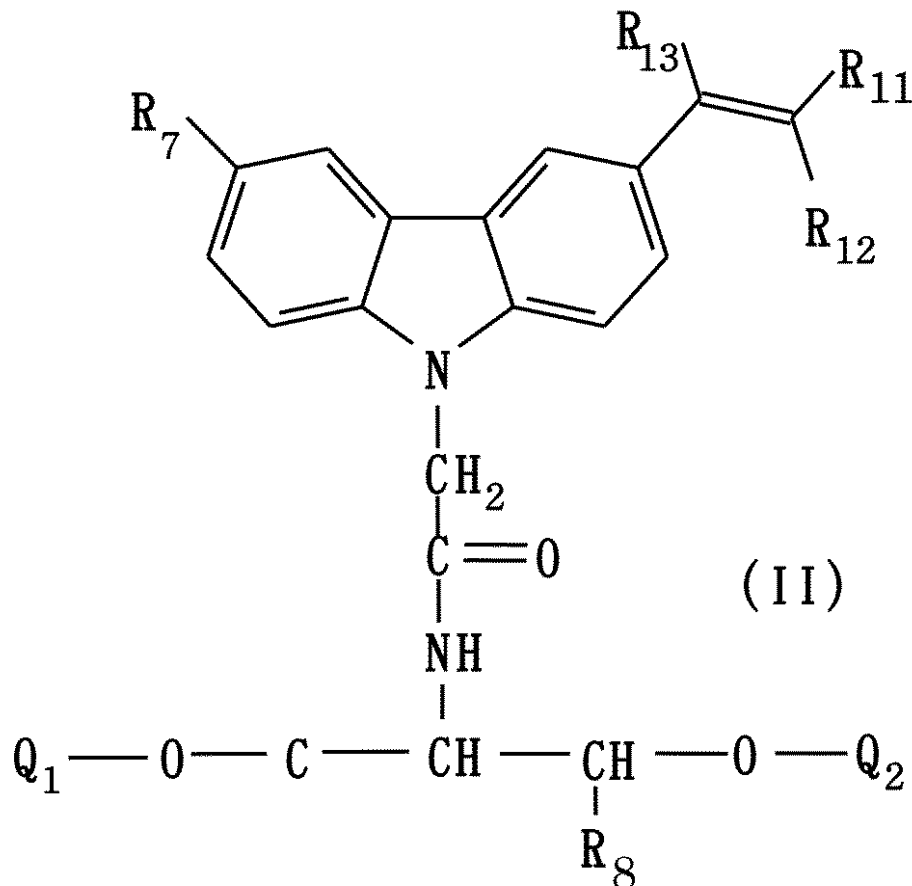
好適な実施の態様において、式 I の R 1 2 及び R 1 3 は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、又は水素であり、好ましくは、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、又は水素であり、さらに好ましくは、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、又はアルコキシカルボニル基である。アルコキシカルボニル基は、好ましくは C 2 ~ C 7、さらに好ましくは C 2 ~ C 6、さらに好ましくは C 2 ~ C 5、さらに好ましくは C 2 ~ C 4、さらに好ましくは C 2 ~ C 3、特に好ましくは C 2 のものを使用することができる。

【 0 0 2 6 】

好適な実施の態様において、光応答性修飾核酸は、次の式 (I I) :

20

【 化 9 】



30

40

で表される修飾ヌクレオシドが、光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基として、リン酸ジエステル結合によって塩基配列中に導入されてなる修飾核酸である。

50

【0027】

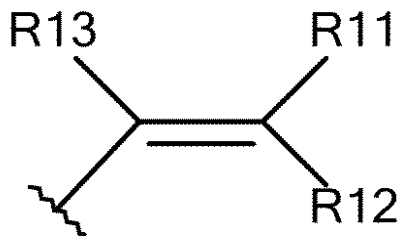
式IIにおいて、

R11は、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C2～C7のアルコキシカルボニル基、ホスホノ基、スルホ基、又は水素原子を表し、

R12及びR13は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C2～C7のアルコキシカルボニル基、又は水素原子を表し、

R7は、水素原子、水酸基、C1～C3のアルコキシ基、C1～C3のアルキルスルファニル基、ニトロ基、フッ素原子、フッ化メチル基、C6～C12の単環式又は二環式の芳香族化合物の1価基、C6～C12の単環式又は二環式の複素環系芳香族化合物の1価基、又は、次の式：

【化10】



(ただし、上記式中、R11、R12及びR13は、式IIについて上述したR11、R12及びR13とは独立に、式IIについて上述したR11、R12及びR13として挙げられた基から選択された基を表す)

で表される1価基を表し、

R8は、水素原子、メチル基、又はエチル基を表し、

Q₁は、式IIでQ₁に結合しているOと一体となって形成されたリン酸基を表し、

Q₂は、水素原子を表す。

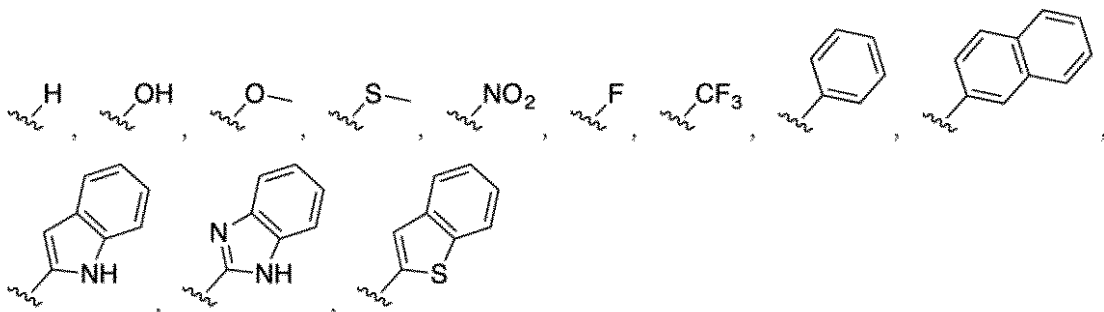
式IIにおけるR11、R12及びR13は、それぞれ独立に、式Iについて上述したR11、R12及びR13とすることができる。

【0028】

例えば、式IIのR7として、次に挙げる基を使用することができる。(ただし、波線は遊離原子価の位置を示している。)

【0029】

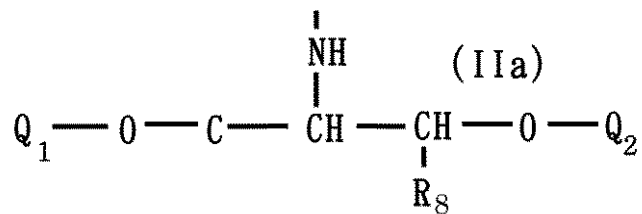
【化11】



【0030】

好適な実施の態様において、式II中において、次の式(IIa)：

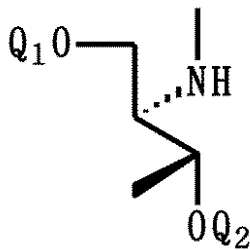
【化 1 2】



で表される骨格構造が、

次の式：

【化 1 3】

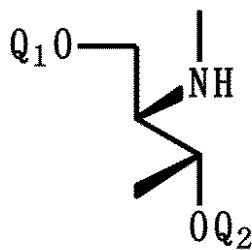


10

で表される D - トレオニノール構造、

次の式：

【化 1 4】

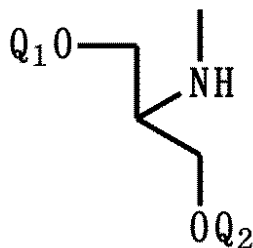


20

で表される L - トレオニノール構造、

又は、次の式：

【化 1 5】



30

で表されるセリノール構造である。

【0031】

上記式 II で表される修飾ヌクレオチドは、天然のヌクレオチドや式 I の修飾ヌクレオチドであればリボース（又はデオキシリボース）構造の糖骨格である部分が、上記式 II a で表される骨格構造で代替されたものとなっている。そこで、式 II で表される修飾ヌクレオチドは、光応答性人工ヌクレオチドアナログということもできる。驚くべきことに、式 II の修飾ヌクレオチドは、このような骨格構造の相違にも関わらず、核酸への組み込みと光応答性に関しては、光応答性塩基として振る舞う。本発明者はこの発見に基づい

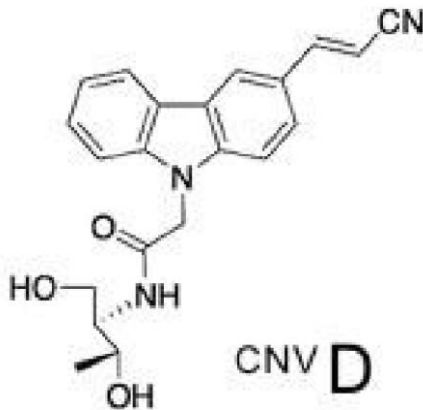
50

て、すでに日本国特許出願（特願 2013-70381）を行った。

【0032】

好適な実施の態様において、上記式 I I で表される修飾ヌクレオチドは、配列中に、次の式で表される $cnvD$ を、光応答性修飾塩基を有するヌクレオシドとして、リン酸ジエステル結合して有している。

【化16】



10

【0033】

[被光架橋性核酸]

被光架橋性核酸は、光応答性修飾核酸に対して相補的な塩基配列を有しており、この相補性によって二重鎖を形成している。光応答性修飾核酸に対する相補性は、二重鎖を形成して本発明を実施できる範囲内であればよい。特に、光応答性修飾核酸の塩基配列中の光架橋性のビニル構造を有する光応答性塩基は、いわゆる水素結合による塩基対を形成しないので、被光架橋性核酸の塩基配列中において光応答性塩基と相補的な位置にある塩基は、いずれの塩基であってもよい。例えば、被光架橋性核酸は、光架橋核酸二重鎖の二重鎖部分において、光応答性修飾核酸に対して、90%以上、94%以上、95%以上、96%以上、98%以上、99%以上相補的な塩基配列とすることができる。好適な実施の態様において、被光架橋性核酸は、被光架橋性核酸の塩基配列中において光応答性塩基と相補的な位置にある塩基を除いて、光架橋核酸二重鎖の二重鎖部分において光応答性塩基に対して完全に相補的な塩基配列とすることができる。

20

30

【0034】

[挿入核酸]

挿入核酸は、光架橋核酸二重鎖の末端の一重鎖部分を有する鎖の一重鎖部分(sticky end)に対して相補的な塩基配列を有し、さらに連続してその一重鎖部分を有する鎖の二重鎖部分に対しても相補的な塩基配列を有する。このような相補的な塩基配列によって、光架橋核酸二重鎖の末端の一重鎖部分(sticky end)に付着した挿入核酸が、鎖交換反応を行って、光開裂部位に達して、光開裂反応を促進するものと考えられる。そこで、挿入核酸は、一重鎖部分を有する鎖の二重鎖部分に対して、光架橋核酸二重鎖のもう一方の鎖と比較して、同程度以上に高い相補性を有する塩基配列とすることが好ましい。

40

【0035】

例えば、光架橋核酸二重鎖の末端の一重鎖部分を有する鎖が、光応答性修飾核酸である場合には、挿入核酸は、一重鎖部分に対して相補的な塩基配列を有し、さらに連続して光応答性修飾核酸の二重鎖部分の鎖に対して相補的な塩基配列を有し、特に、被光架橋性核酸の鎖よりも、光応答性修飾核酸の二重鎖部分の鎖に対して、同じ又はより高い割合で相補的な塩基配列を有していることが好ましい。

【0036】

好適な実施の態様において、挿入核酸の塩基長は、光架橋核酸二重鎖の末端の一重鎖部分を有する鎖と同じ塩基長であり、例えば、光応答性修飾核酸又は被光架橋性核酸と同じ

50

塩基長とすることができる。

【0037】

好適な実施の態様において、挿入核酸の鎖は、一重鎖として添加される。しかし、一重鎖を生成可能な二重鎖の形態で添加することもできる。挿入核酸の鎖の中で、光架橋核酸二重鎖の末端の一重鎖部分に対する相補的な鎖が一重鎖として露出して、鎖交換反応が進行可能な二重鎖の形態で、挿入核酸の鎖を添加してもよい。

【0038】

[光照射]

本発明による光開裂の促進は、広範な波長範囲において実現されるために、光照射は、光開裂が可能な波長であれば、特に制限なく使用できる。例えば、300～400 nm、312～400 nm、320～400 nmの波長を使用できる。本発明は、従来は光開裂の効率が低かった長波長（例えば366 nm）の光照射によっても、十分に高い効率となるまで光開裂を促進できる点で、特に優れている。

10

【0039】

本発明による光開裂の促進は、広範な温度範囲において実現されるために、光照射する温度条件は、特に制限なく使用できる。例えば、1～60、1～40、4～40、20～40の温度とすることができる。本発明は、従来は光開裂の効率が低かった低温での光照射によっても、十分に高い効率となるまで光開裂を促進できる点で、特に優れている。

【0040】

本発明は、光反応による架橋開裂反応を促進しているために、光照射の際に使用される溶液の種類、塩濃度、pH等には、特に制限はない。例えば、中性付近で、例えば、pH 6.8～pH 7.8の範囲で、例えば公知の緩衝液を使用して、行うことができる。

20

【0041】

[本発明の優位性]

本発明の優位性は、例えば、次の表1のようにまとめることができる。

【0042】

【表1】

	使用波長	加熱	配列選択性
従来法	312 nm	必要	なし
本手法	312 nm – 400 nm	不必要	あり

30

【0043】

本発明による光開裂の促進は、光架橋核酸二重鎖に対して、上述の関係を満たす挿入核酸の添加によって、実現される。そのため、多様な塩基配列の光架橋核酸二重鎖が存在している場合にも、挿入核酸の塩基配列によって選択的に、特定の塩基配列の光架橋核酸二重鎖の光開裂が促進される。加熱や短波長照射による光開裂の促進は、一律の促進であるために、このような塩基配列選択性を有しない。本発明による光開裂の促進は、多様な塩基配列の光架橋核酸二重鎖の混合物から配列選択的な核酸回収ができる等の点で、特に優れている。本発明は、挿入核酸を使用した、光架橋核酸二重鎖の光開裂の配列選択的促進方法にもある。

40

【実施例】

【0044】

以下に実施例をあげて、本発明を詳細に説明する。本発明は、以下に例示する実施例に限定されるものではない。

【0045】

50

[光架橋核酸二重鎖の光架橋の光開裂]

[核酸鎖の調製]

次の表 2 に示す配列を有する核酸の鎖を調製した。

【 0 0 4 6 】

【 表 2 】

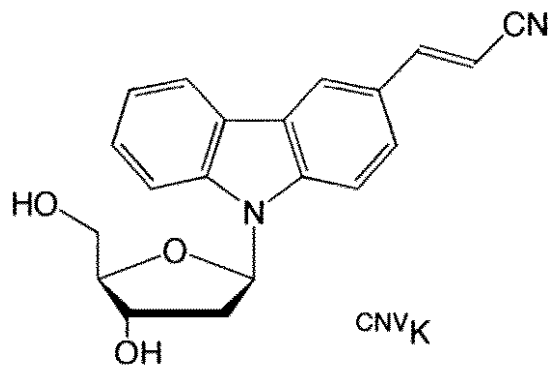
Entry	The Sequence of ODNs(5'-3')
ODN-temp	CCTGGAAGGCG ^{CNV} KAACTTAGCCACTGTGAA
ODN-pass	Cy3-TTCACAGTCCGTAAGTTCCGC
ODN-inv	TTCACAGTGGCTAAGTTCCGCCTTCCAGG

10

【 0 0 4 7 】

表中、光応答性修飾核酸 (ODN-temp) は、配列中に、次の式で表される c n v K (3 - シアノビニルカルバゾール - 1 ' - - デオキシリボシド) を、光応答性修飾塩基を有するヌクレオシドとして、リン酸ジエステル結合して有している。

【 化 1 7 】



20

【 0 0 4 8 】

表中、被光架橋性核酸 (ODN-pass) は、光応答性修飾核酸に対して相補的な配列を有しており、末端に標識部位として、蛍光色素 (Cy 3) を有している。光応答性修飾核酸は被光架橋性核酸よりも配列長が長いために、光応答性修飾核酸の鎖と被光架橋性核酸の鎖とによって形成される二重鎖は、末端に一重鎖部分 (sticky end) を有する。この二重鎖に光照射すると、光応答性修飾核酸の配列中の c n v K の位置に対して相補的な位置にある被光架橋性核酸の配列中の G に、被光架橋性核酸の配列中の 3 ' 側に隣接して位置する T と、 c n v K とが、光架橋を形成する。図 1 はこの光架橋形成を示す説明図である。

30

【 0 0 4 9 】

表中、挿入核酸 (ODN-inv) (invader) は、光応答性修飾核酸に対して相補的な配列を有し、上記末端の一重鎖部分を有する鎖に相補的な配列をも有する。

40

【 0 0 5 0 】

[光照射による光開裂]

光応答性修飾核酸 (ODN-temp) と被光架橋性核酸 (ODN-pass) との二重鎖に光照射して光架橋された光架橋核酸二重鎖 (dsDNA) を調製した。この光架橋 10 μ M dsDNA、10 μ M 挿入核酸 (ODN-inv) (Invader strand) と 100 mM NaCl が 50 mM カコジル酸ナトリウム (pH 7.4) に溶けた溶液を 37 ° C で 1 時間 インキュベートした後、37 ° C で 366 nm の光照射を行った。この光開裂のスキームを図 2 に示す。サンプリングしたサンプルを変性剤 8M Urea ホルムアミド溶液で 10 倍希釈したものを変性 PAGE により解析した。サンプル 2 μ M と 6x 1 loading buffer 1 μ M を混合し、ゲルにアプライした。変性 PAGE には 8M Urea 入りの 15% アクリルアミドゲルを使用し、150 V で 60 分間電気泳動を行った後、Cy3 蛍光でのゲルのイメ

50

ージングを行った。ゲル結果から、架橋体のバンドは泳動度が小さく、開裂体のバンドは泳動度が大きく出るため、バンド強度から開裂率の定量を行った。この結果を、図3及び図4に示す。Inv (+)は挿入核酸(ODN-inv)を添加して実験の結果を示し、Inv (-)は挿入核酸(ODN-inv)を添加しない対照実験の結果を示す。

【0051】

このように、挿入核酸(ODN-inv)を添加すると、37 °Cにおいて、3時間の照射で60%以上の開裂反応が進行していた。挿入核酸(ODN-inv)を添加しない場合には30%程度の開裂で頭打ちになっていた。この結果から、挿入核酸による光開裂の促進は、動物や細胞の生存可能な温度範囲内で、十分に発揮されることがわかった。

【0052】

[光開裂の配列選択性]

[核酸鎖の調製]

次の表3に示す配列を有する核酸の鎖を調製した。

【0053】

【表3】

Entry	The Sequence of ODNs(5'-3')	Toehold	Brach migration
ODN-inv	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCCTTCCAGG	Match	Match
ODN-inv_rev_1	CGCCTTGAATCGGTGACACTTCTTCCAGG	Match	Mismatch
ODN-inv_rev_2	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCGGACCTTC	Mismatch	Match
ODN-inv_rev_3	CGCCTTGAATCGGTGACACTTGGACCTTC	Mismatch	Mismatch

【0054】

挿入核酸(ODN-inv)は、光応答性修飾核酸(ODN-temp)に対して、光架橋二重鎖の分子中で二重鎖となっている塩基配列の領域においても、末端の一重鎖となる塩基配列の領域においても、いずれも相補的な塩基配列となっている。ODN-inv_rev_1は、光応答性修飾核酸(ODN-temp)に対して、光架橋二重鎖の分子中で二重鎖となっている塩基配列の領域においては相補的でないが、末端の一重鎖となる塩基配列の領域においては、相補的な塩基配列となっている。ODN-inv_rev_2は、光応答性修飾核酸(ODN-temp)に対して、光架橋二重鎖の分子中で二重鎖となっている塩基配列の領域においては相補的な塩基配列となっているが、末端の一重鎖となる塩基配列の領域においては、相補的ではない。ODN-inv_rev_3は、光応答性修飾核酸(ODN-temp)に対して、光架橋二重鎖の分子中で二重鎖となっている塩基配列の領域においても相補的ではなく、末端の一重鎖となる塩基配列の領域においても、相補的ではない。これらを用いて、架橋開裂反応の確認を行った。

【0055】

[照射による光開裂]

光応答性修飾核酸(ODN-temp)と被光架橋性核酸(ODN-pass)との二重鎖に照射して光架橋された光架橋核酸二重鎖(dsDNA)を調製した。この光架橋10 μM dsDNA、10 μM Invader strandと100 mM NaClが50 mMカコジル酸ナトリウム(pH7.4)に溶けた溶液を25 °Cで1時間インキュベートした後、25 °Cで366 nmの照射を行った。サンプリングしたサンプルを変性剤8M Ureaホルムアミド溶液で10倍希釈したものを変性PAGEにより解析した。サンプル2 μMと6x loading buffer 1 μMを混合し、ゲルにアプライした。変性PAGEには8M Urea入りの15%アクリルアミドゲルを使用し、150 Vで60分間電気泳動を行った後、Cy3蛍光でのゲルのイメージングを行った。ゲル結果から、架橋体のバンドは泳動度が小さく、開裂体のバンドは泳動度が大きく出るため、バンド強度の開裂率の定量を行った。この結果を、図5に示す。Inv (+)は挿入核酸(ODN-inv)を添加して実験の結果を示し、Inv (-)は挿入核酸(ODN-inv)を添加しない実験の結果を示す。図において、ODN-inv_rev_1、ODN-inv_rev_2、ODN-inv_rev_3を使用した実験の結果を、それぞれRev 1、Rev 2、Rev 3として示す。

10

20

30

40

50

【0056】

このように、挿入核酸 (ODN-inv) を添加すると、25 において、3時間の光照射で60%以上の開裂反応が進行していた。一方、光応答性修飾核酸 (ODN-temp) との相補性が不完全な塩基配列 (ODN-inv_rev_1、ODN-inv_rev_2、ODN-inv_rev_3) を添加した場合には、挿入核酸 (ODN-inv) を添加しない場合と同様に、光架橋の開裂反応は進行していなかった。この結果から、挿入核酸による光開裂の促進は、高い配列選択性を有していることがわかった。

【0057】

[光開裂の波長依存性]

同様に、光架橋体 20 μ M dsDNA、20 μ M Invader strand と 100 mM NaCl が 50 mM カコジル酸ナトリウム (pH7.4) に溶けた溶液を 25 で 1 時間 インキュベートした後、25 で、320 nm、330 nm、340 nm の各波長の光照射を一時間行った。サンプリングしたサンプルを変性剤 8M Urea ホルムアミド溶液で 10 倍希釈したものを変性 PAGE により解析した。サンプル 2 μ M と 6x loading buffer 1 μ M を混合し、ゲルにアプライした。変性 PAGE には 8M Urea 入りの 15% アクリルアミドゲルを使用し、150 V で 60 分間電気泳動を行った後、Cy3 蛍光でのゲルのイメージングを行った。ゲル結果から、架橋体のバンドは泳動度が小さく、開裂体のバンドは泳動度が大きく出るため、バンド強度の開裂率の定量を行った。この結果を図 6 に示す。

10

【0058】

このように、挿入核酸 (ODN-inv) を添加すると、320 nm、330 nm、340 nm のいずれの波長でも、光開裂が促進されることがわかった。この結果から、挿入核酸による光開裂の促進は、広い波長範囲にわたることがわかった。

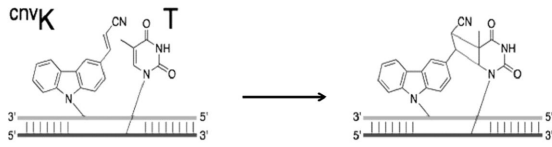
20

【産業上の利用可能性】

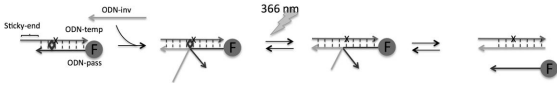
【0059】

本発明は、従来よりも低温で、従来よりも長波長の光照射によっても、光開裂を高い効率で進行させる技術を提供する。本発明は産業上有用な発明である。

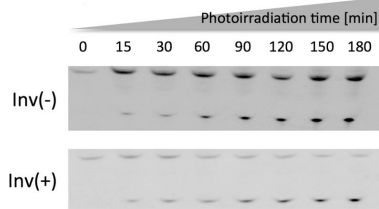
【 図 1 】



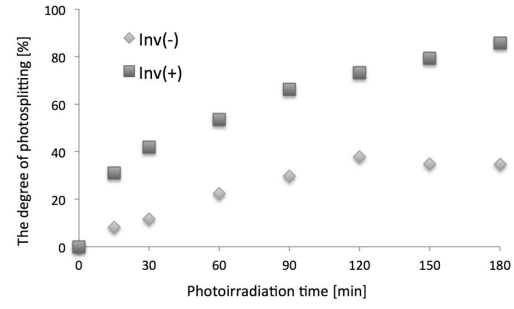
【 図 2 】



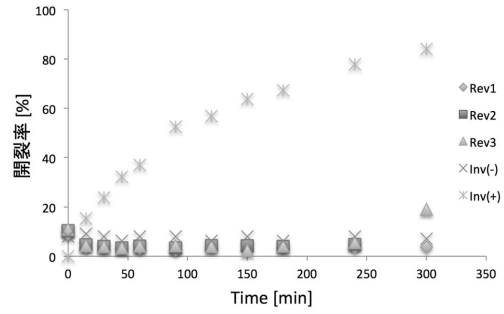
【 図 3 】



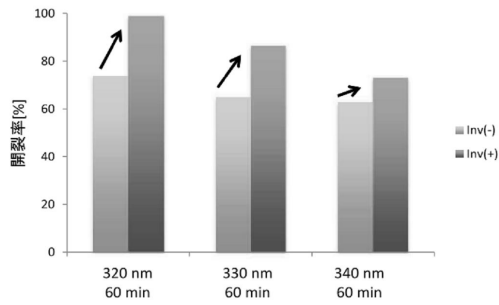
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



フロントページの続き

審査官 三上 晶子

(56)参考文献 特開2009-254279(JP,A)
特許第6210484(JP,B2)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07H 1/00 - 99/00

C12N 15/09

C12Q 1/68

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/REGISTRY(STN)