

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成 18 年 4 月 27 日 (2006.4.27)

【公開番号】特開 2005-13173 (P2005-13173A)

【公開日】平成 17 年 1 月 20 日 (2005.1.20)

【年通号数】公開・登録公報 2005-003

【出願番号】特願 2003-186151 (P2003-186151)

【国際特許分類】

**C 1 2 P 19/34 (2006.01)**

**C 1 2 N 15/09 (2006.01)**

【F I】

C 1 2 P 19/34 Z N A Z

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成 18 年 3 月 13 日 (2006.3.13)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 特定の塩基を有したヌクレオチド配列が 3' 側に存在するヌクレオチド鎖に、前記特定の塩基を有したヌクレオチドに特異的な分解酵素を作用させることにより、ヌクレオチド鎖の 3' 末端に修飾物質に対して反応性を有する官能基を形成し、このヌクレオチド鎖の 3' 末端に直接に前記修飾物質を結合させるヌクレオチド鎖修飾方法。

【請求項 2】 特定の塩基を有したヌクレオチド配列が、主鎖となすヌクレオチド鎖の 3' 側に位置し、前記特定の塩基が前記主鎖に存在しない塩基である請求項 1 記載のヌクレオチド鎖修飾方法。

【請求項 3】 反応性を有する官能基がアルデヒド基である請求項 1 または請求項 2 のいずれかに記載のヌクレオチド鎖修飾方法。

【請求項 4】 特定の塩基がヒポキサンチンであり、分解酵素が 3 - メチルアデニン DNA グリコシラーゼである請求項 1 ~ 請求項 3 のいずれかに記載のヌクレオチド鎖修飾方法。

【請求項 5】 特定の塩基を有したヌクレオチド配列は、テーリング法により付加する請求項 1 記載のヌクレオチド鎖修飾方法。

【請求項 6】 特定の塩基を有したヌクレオチド配列が存在するヌクレオチド鎖として、化学合成されたヌクレオチド鎖を使用する請求項 1 記載のヌクレオチド鎖修飾方法。

【請求項 7】 分解酵素を作用させるに先だって、特定の塩基と相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを添加する請求項 1 記載のヌクレオチド鎖修飾方法。

【請求項 8】 修飾物質が、ヌクレオチド鎖をラベル化、標識化する物質である請求項 1 記載のヌクレオチド鎖修飾方法。

【請求項 9】 修飾物質が、遺伝子解析のための基板への結合能を有した物質である請求項 1 記載のヌクレオチド鎖修飾方法。

【請求項 10】 ヌクレオチド鎖の 3' 末端の官能基に反応する修飾物質がアミノ基を有する請求項 1 または請求項 3 のいずれかに記載のヌクレオチド鎖修飾方法。

【請求項 11】 修飾物質が、アミノ酸、オリゴペプチド、またはタンパク質である請求項 10 記載のヌクレオチド鎖修飾方法。

【請求項 12】 修飾物質が、アミノアルカンチオールまたはアミノシランカップリ

ング化合物である請求項 10 記載のヌクレオチド鎖修飾方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0016】

上述したヌクレオチド鎖のラベル化、標識化、固定化の課題を解決するものとして、ヌクレオチド鎖の 3' 末端部を直接的に修飾物質で修飾する方法が提案されている（特許文献 10 参照）。この方法は、ヌクレオチド鎖の 3' 側に 2 つ以上のウラシル塩基を付加させ、付加したウラシルのグリコシド結合をウラシル DNA グリコシラーゼで分解して、3' 末端にアルデヒド基を形成させ、このアルデヒド基とアミノ基を有する修飾物質とを共有結合させることにより、ヌクレオチド鎖の 3' 末端を修飾する。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0026

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0026】

【特許文献 10】特開 2003 - 246794 公報

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0031

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0031】

【非特許文献 2】ベック（Beck.S.）、「メソッズ・イン・エンザイモロジー（Methods Enzymol.）」、216 巻、143 頁、1992 年

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0032】

【非特許文献 3】ブロンシュタイン（Bronstein.I.）ら、「メソッズ・イン・エンザイモロジー（Methods Enzymol.）」、217 巻、398 頁、1993 年

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0052

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0052】

【非特許文献 23】ミュリス（Mullis.K.B.）ら、「メソッズ・イン・エンザイモロジー（Methods Enzymol.）」、155 巻、335 頁、1987 年

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0064

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0064】

この問題を解決するものとして特許文献 10 記載の方法が提案されており、ヌクレオチド鎖の鎖長に関係なく、ヌクレオチド鎖の 3' 側を直接的に簡便に任意の修飾物質で修飾して、安定に保持可能な方法であるが、その一方で、付加したウラシルのグリコシド結合をウラシル DNA グリコシラーゼにより分解する原理から理解されるように、ヌクレオチド鎖中にウラシル塩基の配列が存在しない時しか実施できないという制約を有している。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0070

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0070】

反応性を有する官能基として、アルデヒド基を形成することができる。

特定の塩基がヒポキサンチンであり、分解酵素が 3 - メチルアデニン DNA グリコラーゼであるのが好ましい。特定の塩基および分解酵素は種々の組合せが可能であるが、たとえばウラシル塩基のヌクレオチド鎖への組み込みは、遺伝子解析の様々な手法の中で汎用されているため、これを特定の塩基として利用することは望ましくない場合がある。汎用頻度の低いヒポキサンチン塩基とその分解酵素を利用することで、ヌクレオチド鎖の 3' 末端修飾を実施する際の利用者の利便性を大幅に向上することが可能となる。また、ヌクレオチド鎖の塩基の構成や鎖長に関わらず、ヌクレオチド鎖の 3' 末端側を直接的に簡便に、任意の修飾物質で、定量的、安定的に修飾することが可能となる。ヌクレオチド鎖内への不必要な塩基配列、修飾された塩基の取り込みを排除し、ヌクレオチド鎖の 3' 末端に限定して修飾物質で修飾できる方法である。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0082

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0082】

なお、この実施の形態 1 では、ヒポキサンチン塩基を有するヌクレオチド (A) をテーリングさせ、3 - メチルアデニン DNA グリコシラーゼ II 型を作用させる例を示したが、これに限らず、以下の表 1 に例示する DNA グリコシラーゼあるいは DNA 修復酵素と各塩基を有するヌクレオチドのテーリングとを組み合わせても、同様にしてヌクレオチド鎖の 3' 末端を修飾物質で直接的に修飾できる。

【手続補正 10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0083

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0083】

【表 1】

ヌクレオチドの塩基	酵素
・ヒポキサンチン	・ヒポキサンチン DNA グリコシラーゼ
・3-メチルアデニン      ・3-エチルアデニン	・3-メチルアデニン DNA グリコシラーゼⅠ型
・3-メチルアデニン      ・ヒポキサンチン ・3-メチルグアニン      ・7-メチルグアニン ・1, N <sup>6</sup> -エタノアデニン ・8-オキソグアニン ・7-エチルプリン      ・3-エチルプリン ・7, 3-ジエチルプリン ・1-カルボキシエチルアデニン ・7-カルボキシエチルグアニン ・O <sup>2</sup> -メチルピリミジン ・7 (2-エトキシエチル) グアニン ・7 (2-ヒドロキシエチル) グアニン ・7 (2-クロロエチル) グアニン ・1, 2-ビス (7-グアニル) エタン ・3-エチルチオエチルプリン ・N <sup>2</sup> , 3-エタノグアニン ・N <sup>2</sup> , 3-エテノグアニン ・5-ヒドロキシメチルウラシル ・5-ホルミルウラシル ・1, N <sup>4</sup> -エテノシトシン ・1, N <sup>2</sup> -エテノグアニン ・3, N <sup>2</sup> -エテノグアニン	・3-メチルアデニン DNA グリコシラーゼⅡ型
・ウラシル      ・5-ヒドロキシウラシル ・5, 6-ジヒドロキシウラシル ・5-フルオロウラシル	・ウラシル DNA グリコシラーゼ
・チミングリコール      ・5, 6-ジヒドロチミン ・5, 6-ジヒドロキシジヒドロチミン ・ヒドロキシシトシン      ・ウレア ・5-ヒドロキシ-5-メチルヒダントイン ・6-ヒドロキシ-5, 6-ジヒドロキシピリミジン ・5-ヒドロキシウラシル ・5-ヒドロキシ-6-ヒドロチミン ・5, 6-ジヒドロウラシル      ・ウラシルグリコール ・5-ヒドロキシ-6-ヒドロウラシル	・エンドヌクレアーゼⅢ
・8-オキソグアニン ・7, 8-ジヒドロ-8-オキソグアニン ・8-オキソアデニン      ・ホルムアミドグアニン ・メチルホルムアミドグアニン	・8-オキソグアニン DNA グリコシラーゼ
・7-メチルグアニン ・1, 6-ジアミノ-5-ホルムアミドピリミジン ・ホルムアミドグアニン ・メチルホルムアミドグアニン ・ホルムアミドアデニン ・8-オキソアデニン      ・8-オキソグアニン ・7, 8-ジヒドロ-8-オキソグアニン ・ヒドロキシシトシン      ・5-ヒドロキシウラシル ・アフラトキシン結合イミダゾール開環状グアニン ・イミダゾール開環状N-2-アミノフルオレン-8-グアニン	・ホルムアミドピリミジン DNA グリコシラーゼ
・8-オキソグアニン ・アデニン/グアニンミスマッチ	・Mut Y-DNA グリコシラーゼ
・1, N <sup>4</sup> -エテノシトシン ・ウラシル/グアニンミスマッチ	・ミスマッチウラシル DNA グリコシラーゼ
・ピリミジンダイマー	・ピリミジンダイマー-DNA グリコシラーゼ
・チミン/グアニンミスマッチ ・グアニン/グアニンミスマッチ	・チミン DNA グリコシラーゼ

目的とするヌクレオチド鎖が化学合成可能な数十ヌクレオチド鎖長のものであれば、予め特定の塩基の配列を有するヌクレオチド鎖を合成しておくことで、第1段階の反応を省略することも可能である。

(実施の形態2)

本発明の実施の形態2を図2に基づいて説明する。図中、mは、0または任意の自然数を表わし、Baseは、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル等の任意の塩

基を示す。

【手続補正 1 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 8 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 8 6】

フルオレセインのほかに、アミノ基を有するテキサスレッド、ローダミン、C y 3・C y 5 に代表されるシアニン系化合物、ジゴギシゲニン、ピオチン等を用いて同様に、ラベル化、標識化することが可能である。

【手続補正 1 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 1 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 1 4】

これは、テーリングしたヒボキサンチンのヌクレオチド鎖部分にオリゴデオキシシトシンがランダムにアニールするため、部分的に2本鎖が形成されず、3 - メチルアデニン D N A グリコシラ<sub>ゼ</sub>II型が作用しない箇所が存在してしまうためである。