

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4944098号
(P4944098)

(45) 発行日 平成24年5月30日 (2012.5.30)

(24) 登録日 平成24年3月9日 (2012.3.9)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M
G O 1 N 33/58 (2006.01)	G O 1 N 33/58 A
G O 1 N 37/00 (2006.01)	G O 1 N 37/00 1 O 2
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 O 1 P
請求項の数 98 (全 43 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2008-509350 (P2008-509350)	(73) 特許権者	508020155
(86) (22) 出願日	平成18年4月28日 (2006.4.28)		ビーエーエスエフ ソシエタス・ヨーロピア
(65) 公表番号	特表2008-539703 (P2008-539703A)		ア
(43) 公表日	平成20年11月20日 (2008.11.20)		B A S F S E
(86) 国際出願番号	PCT/EP2006/004017		ドイツ連邦共和国 ルートヴィヒスハーフェン (番地なし)
(87) 国際公開番号	W02006/117161		D-67056 Ludwigshafen, Germany
(87) 国際公開日	平成18年11月9日 (2006.11.9)	(74) 代理人	100091096
審査請求日	平成19年12月26日 (2007.12.26)		弁理士 平木 祐輔
(31) 優先権主張番号	05009618.9	(74) 代理人	100096183
(32) 優先日	平成17年5月2日 (2005.5.2)		弁理士 石井 貞次
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100118773
(31) 優先権主張番号	60/676, 785		弁理士 藤田 節
(32) 優先日	平成17年5月2日 (2005.5.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分析物の高感度検出のための新規標識方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中の核酸分析物を検出するための方法であって、以下のステップ：

(i) 前記試料を、クリック反応の第1反応パートナーであるアルキン及びアザイド基から選択される少なくとも1つの官能基を含む官能化合物と、検出されるべき核酸分析物若しくはその相補体と前記化合物とが結合産物を形成する条件下で接触させるステップであって、ここで前記クリック反応が1,2,3-トリアゾール環を形成するアザイド基とアルキン基との間の(3+2)付加環化反応であり、且つ前記官能基はヌクレオシド化合物若しくはヌクレオチド化合物の核酸塩基又はそのオリゴマー若しくは核酸に付けられている、前記ステップ、

(ii) 前記結合産物を、相補的なアザイド又はアルキン基を含む前記クリック反応の第2反応パートナーと、クリック反応が第1及び第2反応パートナー間で生じる条件下にて接触させるステップであって、ここで第2反応パートナーがさらにマーカース基又はマーカース前駆体基を含む、前記ステップ、

(iii) 前記ステップ(ii)においてマーカース前駆体基を含む第2反応パートナーが使用される場合、該マーカース前駆体基をマーカース基に変換するステップ、並びに、

(iv) 前記マーカース基を検出するステップ、を含む、前記方法。

【請求項 2】

定性的検出を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

定量的検出を含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

検出されるべき核酸分析物はDNA及びRNAから選択される核酸である、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

試料は生物学的試料である、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

試料は農産物試料又は栄養試料である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

試料は臨床試料である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

検出を増幅なしで直接行う、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

検出を増幅ステップと組み合わせて行う、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

核酸分析物の配列特異的検出を行う、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記結合産物の形成は配列特異的ハイブリダイゼーション反応を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

核酸塩基は天然並びに非天然のプリン塩基及びピリミジン塩基から選択される、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

官能基はピリミジン核酸塩基の 5 位若しくは 6 位又はプリン核酸塩基の 7 位若しくは 8 位に付けられている、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

官能基はピリミジン核酸塩基の 5 位に付けられている、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

官能基はプリン核酸塩基の 7 位に付けられている、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

官能基は直接的な結合又はスペーサーを介して化合物に付けられている、請求項 1～15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記スペーサーは、フレキシブルスペーサー又は少なくとも部分的に剛性のスペーサーである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

スペーサーはアルケン基、アルキン基、環状基及びそれらの組み合わせから選択される少なくとも 1 つの基を含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記環状基が芳香族基及び複素芳香族基から選択される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記官能化合物は、

(i)官能化された核酸若しくは核酸類似体構成単位であって、該構成単位がヌクレオシド化合物又はヌクレオチド化合物である、前記官能化された核酸若しくは核酸類似体構成単位、及び／又は、

(ii)官能化された核酸若しくは核酸類似体、
から選択される、請求項 1～19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

前記結合産物の形成は前記官能化された構成単位を核酸又は核酸類似体分子中に取り込

10

20

30

40

50

むことを含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記官能化されたヌクレオチド又はヌクレオチド類似体は酵素的に核酸分子中に取り込まれる、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記結合産物の形成は前記官能化された核酸又は核酸類似体を検出すべき核酸分析物に結合させることを含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 24】

前記結合は核酸分析物へのハイブリダイゼーションを含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

プライマー伸長反応を含む、請求項 20～24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

プライマー伸長反応を核酸増幅反応と併用して含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

アッセイ条件下で検出すべき核酸分析物若しくはその相補体とハイブリダイズする少なくとも 1 つのプライマー分子を供給するステップ、及び、

少なくとも 1 つの官能化されたヌクレオチド又はヌクレオチド類似体が伸長産物中に取り込まれる、前記プライマーを伸長するステップ、
を含み、前記官能化されたヌクレオチド又はヌクレオチド類似体がアザイド基又はアルキン基により官能化されたものである、請求項 25 又は 26 に記載の方法。

【請求項 28】

アッセイ条件下で検出すべき核酸分析物若しくはその相補体とハイブリダイズする少なくとも 1 つの官能化されたプライマー分子を供給するステップ、及び、

伸長プライマー分子が形成される、前記プライマー分子を伸長するステップ、
を含み、前記官能化されたプライマー分子がアザイド基又はアルキン基により官能化されたものである、請求項 25～27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

ハイブリダイゼーション産物が形成される、アッセイ条件下で検出すべき核酸分析物若しくはその相補体とハイブリダイズする官能化されたハイブリダイゼーションプローブを供給するステップを含み、前記官能化されたハイブリダイゼーションプローブがアザイド基又はアルキン基により官能化されたものである、請求項 24～28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

アッセイ条件下で検出すべき核酸分析物若しくはその相補体とハイブリダイズする官能化されたハイブリダイゼーションプローブを供給するステップ、及び、

ハイブリダイゼーション産物を、少なくとも 1 つのミスマッチを包含するハイブリダイゼーション産物が分解される処理に供するステップ、
を含み、

ここで、前記官能化されたハイブリダイゼーションプローブがアザイド基又はアルキン基により官能化されたものであり、且つ未分解のハイブリダイゼーション産物の存在はハイブリダイゼーションプローブに完全に相補的な配列を有する核酸の存在及び／又は量を示す、

請求項 22～29 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 31】

前記処理はミスマッチ消化処理を含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

ミスマッチ消化処理は、ハイブリダイゼーション産物をミスマッチグリコシラーゼと接触させることを含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記処理はディファレンシャルハイブリダイゼーション処理を含む、請求項 30 に記載

10

20

30

40

50

の方法。

【請求項 3 4】

検出を光学的手段によって行う、請求項 1～3 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 5】

検出を電気的手段によって行う、請求項 1～3 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 6】

複数の核酸の並行検出を含む、請求項 1～3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 7】

検出を固体表面上で行う、請求項 1～3 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 8】

固相表面がマイクロアレイチップである、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

第 2 反応パートナーが光学的に検出可能なマーカー基又は酸化還元活性マーカー基から選択されるマーカー基を含む、請求項 1～3 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 0】

光学的に検出可能なマーカー基が蛍光マーカー基である、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

第 2 反応パートナーがアルデヒド基、保護されたアルデヒド基及びアルデヒド前駆体基から選択されるマーカー前駆体基を含む、請求項 1～4 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 2】

マーカー前駆体基をマーカー基に変換することがアルデヒド基周囲に金属沈着を形成することを含む、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

試料中の分析物を検出するための試薬キットであって、

(a)(i) クリック反応用の第 1 反応パートナーであるアルキン基及びアザイド基から選択される少なくとも 1 つのクリック官能基であって、ここで前記クリック反応が 1,2,3- トリアゾール環を形成するアザイド基とアルキン基との間の (3+2) 付加環化反応である、前記少なくとも 1 つのクリック官能基と、

(ii) 核酸又は核酸類似体構成単位であって、該構成単位がヌクレオシド化合物又はヌクレオチド化合物である、前記核酸又は核酸類似体構成単位と、
を含む官能化合物であって、前記官能基は核酸塩基に付けられている、前記官能化合物、及び

(b) 相補的なアザイド基又はアルキン基を含む前記クリック反応用の第 2 反応パートナーであって、ここで第 2 反応パートナーがさらにマーカー基又はマーカー前駆体基を含む、前記第 2 反応パートナー、
を含んでなる前記試薬キット。

【請求項 4 4】

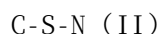
(c) マーカー前駆体基をマーカー基に変換することができるマーカー形成試薬をさらに含む、請求項 4 3 に記載の試薬キット。

【請求項 4 5】

請求項 1～4 2 のいずれか 1 項に記載の方法での 請求項 4 3 又は 4 4 に記載の試薬キットの使用。

【請求項 4 6】

試料中の核酸分析物を検出するための方法における、次式 (II) の化合物：



[式中、

C はクリック反応用の第 1 反応パートナーであるアルキン基及びアザイド基から選択されるクリック官能基であり、ここで前記クリック反応が 1,2,3- トリアゾール環を形成するアザイド基とアルキン基との間の (3+2) 付加環化反応であり、

S はスペーサーであり、及び

10

20

30

40

50

Nは核酸又は核酸類似体構成単位であり、且つ該構成単位がヌクレオシド化合物又はヌクレオチド化合物であり、

前記クリック官能基は核酸塩基に付けられている]
の使用であって、式(II)の化合物は検出されるべき核酸分析物と結合産物を形成するものである、前記使用。

【請求項 4 7】

式(II)の化合物は、マーカー基又はマーカー前駆体基を含む反応パートナーと反応するものである、請求項 4 6に記載の使用。

【請求項 4 8】

核酸塩基は天然並びに非天然のプリン及びピリミジン塩基から選択される、請求項 4 6又は4 7に記載の使用。

10

【請求項 4 9】

核酸塩基はアデニン、7-デアザアデニン、グアニン、7-デアザグアニン、シトシン、チミジン、ウラシル、イノシン及びキサンチンから選択される、請求項 4 8に記載の使用。

【請求項 5 0】

官能基はピリミジン核酸塩基の5位若しくは6位又はプリン核酸塩基の7位若しくは8位に付けられている、請求項 4 8又は4 9に記載の使用。

【請求項 5 1】

官能基はピリミジン核酸塩基の5位に付けられている、請求項 5 0に記載の使用。

【請求項 5 2】

官能基はプリン核酸塩基の7位に付けられている、請求項 5 0に記載の使用。

20

【請求項 5 3】

前記スペーサーは少なくとも部分的に剛性のスペーサーである、請求項 4 7～5 2のいずれか1項に記載の使用。

【請求項 5 4】

スペーサーは、アルケン基、アルキン基、環状基及びそれらの組み合わせから選択される少なくとも1つの基を含む、請求項 5 3に記載の使用。

【請求項 5 5】

前記環状基が芳香族基及び複素芳香族基から選択される、請求項 5 4に記載の使用。

【請求項 5 6】

前記化合物は、核酸若しくは核酸類似体又はそれらの前駆体の化学合成或いは酵素合成用の構成単位である、請求項 4 7～5 5のいずれか1項に記載の使用。

30

【請求項 5 7】

前記化合物は、ヌクレオシド三リン酸又はヌクレオシドホスホロアミダイト、H-ホスホネート若しくはホスホトリエステルである、請求項 4 7～5 6のいずれか1項に記載の使用。

【請求項 5 8】

前記ヌクレオシド三リン酸は、リボースヌクレオシド三リン酸、2'-デオキシリボースヌクレオシド三リン酸又は2',3'-ジデオキシリボースヌクレオシド三リン酸である、請求項 5 7に記載の使用。

40

【請求項 5 9】

前記化合物は、ペプチド核酸、モルフォリノ核酸、又はロックド核酸の合成用の構成単位である、請求項 4 7～5 8のいずれか1項に記載の使用。

【請求項 6 0】

官能基が10原子以下の鎖長を有するスペーサーを介して核酸塩基に付けられている、請求項 4 7～5 9のいずれか1項に記載の使用。

【請求項 6 1】

鎖長は3原子以下である、請求項 6 0に記載の使用。

【請求項 6 2】

内部に取り込まれた請求項 4 6～6 1のいずれか1項に記載の式(II)の化合物を少なく

50

とも1つ有する核酸又は核酸類似体分子であって、前記官能基がピリミジン核酸塩基の5位若しくは6位又はプリン核酸塩基の7位若しくは8位に付けられているアルキン基であり、且つ前記核酸又は核酸類似体分子は相補的核酸とハイブリダイズすることができる、前記核酸又は核酸類似体分子。

【請求項63】

官能基はピリミジン核酸塩基の5位に付けられているアルキン基である、請求項62に記載の核酸又は核酸類似体分子。

【請求項64】

官能基はプリン核酸塩基の7位に付けられているアルキン基である、請求項62に記載の核酸又は核酸類似体分子。

【請求項65】

DNA及びRNAから選択される核酸又はペプチド核酸、モルフォリノ核酸若しくはロックド核酸から選択される核酸類似体分子である、請求項62～64のいずれか1項に記載の核酸又は核酸類似体分子。

【請求項66】

請求項46～61のいずれか1項に記載の化合物(II)を含んでなるヌクレオチド若しくはヌクレオチド類似体構成単位を、核酸又は核酸類似体分子の内部に取り込むことを含む、相補的核酸とハイブリダイズすることができる核酸又は核酸類似体分子を合成する方法であって、前記構成単位がヌクレオシド化合物又はヌクレオチド化合物であり、前記官能基がピリミジン核酸塩基の5位若しくは6位又はプリン核酸塩基の7位若しくは8位に付けられているアルキン基である、前記方法。

【請求項67】

官能基はピリミジン核酸塩基の5位に付けられているアルキン基である、請求項66に記載の方法。

【請求項68】

官能基はプリン核酸塩基の7位に付けられているアルキン基である、請求項66に記載の方法。

【請求項69】

化学合成及び／又は酵素合成を含む、請求項66～68のいずれか1項に記載の方法。

【請求項70】

核酸又は核酸類似体分子を化合物(II)の第2反応パートナーと接触させること、並びに第1及び第2反応パートナー間でクリック反応を実行することをさらに含み、前記クリック反応が1,2,3-トリアゾール環を形成するアザイド基とアルキン基との間の(3+2)付加環化反応である、請求項66～69のいずれか1項に記載の方法。

【請求項71】

請求項62～65のいずれか1項に記載の核酸又は核酸類似体分子と分析物との結合産物。

【請求項72】

相補的核酸とのハイブリダイゼーション産物である、請求項71に記載の産物。

【請求項73】

農業応用のための請求項1～42のいずれか1項に記載の方法又は請求項43若しくは44に記載の試薬キットの使用。

【請求項74】

植物、植物病原体又は植物有害生物由来の核酸を検出するための請求項73に記載の使用。

【請求項75】

植物有害生物が昆虫である、請求項74に記載の使用。

【請求項76】

植物、植物病原体又は植物有害生物において遺伝的多様性を検出するための請求項73～75のいずれか1項に記載の使用。

10

20

30

40

50

【請求項 77】

遺伝的多様性がSNPsである、請求項 76に記載の使用。

【請求項 78】

菌類、昆虫若しくは植物における除草剤、殺菌剤又は殺虫剤の抵抗性、耐性又は不耐性を検出又はモニターするための請求項 73～77のいずれか1項に記載の使用。

【請求項 79】

菌類、昆虫若しくは植物における殺虫剤の抵抗性、耐性又は不耐性を検出又はモニターするための請求項 78に記載の使用。

【請求項 80】

遺伝子型決定のための、請求項 73～79のいずれか1項に記載の使用。

10

【請求項 81】

菌類、昆虫又は植物の種若しくは株の検出及び／又は識別のための、請求項 80に記載の使用。

【請求項 82】

遺伝学的に改変された生物体又は株を検出し及び／又は識別するための請求項 73～81のいずれか1項に記載の使用。

【請求項 83】

前記生物体又は株が菌類、昆虫又は植物の生物体又は株である、請求項 82に記載の使用。

【請求項 84】

20

ヒトにおける遺伝的多様性を検出するための請求項 1～42のいずれか1項に記載の方法又は請求項 43若しくは44に記載の試薬キットの使用。

【請求項 85】

遺伝的多様性がSNPsである、請求項 84に記載の使用。

【請求項 86】

薬剤抵抗性、耐性若しくは不耐性又はアレルギーを検出するための請求項 84又は85に記載の使用。

【請求項 87】

遺伝子型決定のための請求項 84又は85に記載の使用。

【請求項 88】

30

遺伝学的に改変された生物体又は株を検出するための請求項 84～87のいずれか1項に記載の使用。

【請求項 89】

前記生物体又は株が細菌又はウイルスの生物体又は株である、請求項 88に記載の使用。

【請求項 90】

遺伝子の機能及び／又は発現を検出するための請求項 1～42のいずれか1項に記載の方法又は請求項 43若しくは44に記載の試薬キットの使用。

【請求項 91】

ブランド保護のための請求項 1～42のいずれか1項に記載の方法又は請求項 43若しくは44に記載の試薬キットの使用。

40

【請求項 92】

製品中にコード化された特殊情報を検出するための請求項 91に記載の使用。

【請求項 93】

栄養的応用のための請求項 1～42のいずれか1項に記載の方法又は請求項 43若しくは44に記載の試薬キットの使用。

【請求項 94】

食品分野における栄養的応用のための請求項 93に記載の使用。

【請求項 95】

エピジェネティック解析のための請求項 1～42のいずれか1項に記載の方法又は請求

50

項 4 3 若しくは 4 4 に記載の試薬キットの使用。

【請求項 9 6】

DNAメチル化パターンの解析のための請求項 9 5 に記載の使用。

【請求項 9 7】

請求項 7 0 に記載の方法の反応産物として得られる化合物。

【請求項 9 8】

請求項 9 7 に記載の化合物と相補的核酸との結合産物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、核酸等の分析物を検出するための方法及び試薬に関する。本新規方法及び試薬は、複合生物学的試料でさえ簡便かつ感度良く検出することが可能である。

【背景技術】

【0002】

特定の標的配列（例えば、1塩基多型の存在、耐性遺伝子等のいくつかの遺伝子の存在又はmRNAの存在）についての遺伝物質の迅速な解析には、使い易く、効率的でかつ信頼性のある新たなツールが必要とされる。最大の問題は、患者の血液又は植物のような少量の生物学的試料中から目的のDNA若しくはRNAを直接検出する必要があるということである。これらの試料からは微量の分析物しか得られない。必要な感度に至るためには、通常、増幅ステップが必要とされる。このステップでは、核酸分析物が解析前に増幅されるか、又はDNA/RNA分析物から直接得られる僅かな検出シグナルを増幅する検出方法が用いられる。

【0003】

核酸分析物の増幅方法は、PCR法及び他の核酸増幅プロトコルを含む。PCR増幅は、生物学的試料から得られた異なるDNA鎖のプールの中で、目的のDNA配列のみを増幅できるという大きな利点がある。この方法は、複合生物学的試料における単一遺伝子の信頼性できる解析の基礎となる。しかし、PCR増幅は、いくつかのケースで非常に不便、かつ高価である複雑な工程段階を必要とする。検出シグナルの増幅は、所与の基質を継続的に着色産物に変換する西洋ワサビペルオキシダーゼ等の酵素を分析物に結合することで達成することができる。

【0004】

DNAの金属化は、検出シグナルを増幅するもう1つの方法である。DNA/RNAに付着した単一金属粒子(核)は、一層多くの金属の沈着を触媒する。その金属粒子は、さらに金属沈着を触媒する（参考文献1～9）。金属沈着により生じたシグナルは、その結果、指数関数的に増大する。金属沈着は、分析物が電極間に配置されている場合は電気的に、又は沈着した金属は、例えば紙上、ゲル中若しくは試験管内に黒点を生じさせるので光学的に（例えば目で）検出することができる。原理上は、反応の開始には小さな金属クラスター（核）で十分であることから、金属沈着が最も感度の高い検出方法である。しかし、実際には本方法の感度は、（例えば、分析物を保持している電極上、ゲル内又は紙上等の空間内で分析物と極めて近接している不純物を介した）非特異的な金属核形成によって制限される。実際、非特異的な金属沈着は、DNAの銀染色がオリゴヌクレオチド解析において日常的に使用されない主な理由となっている。銀染色は、さらにDNAが自身で開始核を構築できないという事実により複雑になっている。この方法は、事前の修飾を必要とする。今日最適な方法は、核酸塩基上の1級アミン基に配列非特異的な結合によってDNAと共有結合したグルタルアルデヒドを有するDNAの反応である。（参考文献7）。本付加化合物は、銀塩で処理されたならば、塩の Ag^+ を、銀原子に還元する。銀原子は、DNAに結合すると同時に必要な核として機能する。核形成されたDNAの銀塩によるさらなる処理及び試薬の還元は、指数関数的金属沈着を開始する。もう1つの可能性は、 Ag^+ によりDNA鎖上の対イオンを交換することである。これは、その後、 Ag^0 核形成部位の発生を減少させる。最大の欠点は、グルタルアルデヒドが分析物に近接した不純物又は他の化学種とも反応することで

10

20

30

40

50

ある。これは、非特異的銀沈着を再び増大させてしまう。

【0005】

また、DNAに付着するAu、Pd粒子のような金属クラスター又はPt錯体は、導線の構築に至るまでさらなる金属沈着の核形成部位として機能する（参考文献1～9）。ここで、前記クラスターは、DNAと共有結合を形成する反応基、又はDNA/RNAにインターカレートする若しくは他の方法で結合するユニットに付着している。これらの全ての方法は、生物学的試料中の全DNAを標識化するため、配列特異的な印付けをすることができず、それ故、複合生物学的試料における単一遺伝子のような標的DNAの配列特異的解析もできない。

【0006】

参考文献8には、プライマー開始された修飾テロメアリピート中へのテロメラーゼを介したアミン修飾されたヌクレオシド三リン酸の取り込みによる標識化DNAドメインの調製が記載されている。アミンを含有するテロメアは、活性化された金ナノ粒子N-スクシンイミジルエステル類（N-succinimidyl esters）で官能化され、金ナノ粒子DNA鎖を生じる。DNAに沿ったさらなる金属沈着によるこれらのナノ粒子部位の増大は、実際、DNAを鋳型とする分子ナノワイヤの構築に至るまで金属クラスターの急速な成長をもたらす。しかし、アミン修飾された三リン酸の伸長中のテロメア末端中への取り込み効率は低く、核形成部位の分配をもたらす三リン酸ドーピングを必要とする。このように、本方法は、配列特異的な標識化ができない。

【0007】

最近、DNAの部位特異的標識化も、複雑なリソグラフ法によって試みられた（参考文献4）。この方法によれば、DNA分子の部分的保護がRecAの結合によってもたらされる。その後、保護されていないDNA配列は、金属化のために配列をマーキングするグルタルアルデヒドで処理される。DNAに結合したアルデヒド機能による銀イオンの部位特異的還元は、結果的にこれらの領域に沿ったワイヤ形成をもたらす。しかしながら、複合生物学的試料中の核酸分子を配列特異的に標識することはできない。

【0008】

これらの文献は、DNAの新規標識方法という点において関心がもたれるが、マーキングを行う際の複雑な工程ゆえに、これらのシステムは実際の応用に利用されていない。特に、これらの方法は、クルードな生物学的試料の中で目的のDNA若しくはRNA配列を直接、選択的に標識できない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

よって、分析物、特に複合生物学的試料中の核酸の分析物の簡便で、効率的なかつ特異的な検出を可能にする新規方法及び試薬を提供することが本発明の目的である。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明の第1の態様は、分析物（例えば試料中の核酸等の分析物）を検出するための方法及び試薬キットに関する。本方法及び試薬キットでは、検出されるべき分析物の新規のアルデヒド官能化化合物との結合産物が形成される。本結合産物は、マーカー基（例えば、前記結合産物中のアルデヒド基周囲の金属沈着）を形成することによって配列特異的な検出を可能としている。

【0011】

より具体的には、本態様の実施形態は、試料中の分析物を検出するための方法であって、以下のステップ：

(i) 試料を供給するステップ、

(ii) 試料をアルデヒド基、保護されたアルデヒド基、アルデヒド前駆体基、又はアルデヒド基、保護されたアルデヒド基若しくはアルデヒド前駆体基を導入するためのハンドル基から選択される少なくとも1つの官能基を含む官能化化合物と、前記化合物が検出されるべき分析物と結合産物を形成する条件下で接触させるステップ、

(iii) 必要であれば、ハンドル基をアルデヒド基、保護されたアルデヒド基又はアルデヒド前駆体基を含む反応パートナーと反応させるステップ、

(iv) 必要であれば、保護されたアルデヒド基及びアルデヒド前駆体基をアルデヒド基に変換させるステップ、

(v) アルデヒド基を有する前記結合産物をマーカー試薬と、マーカー基が前記結合産物中のアルデヒド基の周囲に形成される条件下で接触させるステップ、及び、

(vi) 前記マーカー基を検出するステップ、
を含む前記方法に関する。

【0012】

本第1の態様のさらなる実施形態は、試料中の分析物を検出するための試薬キットであって、

(a) アルデヒド基、保護されたアルデヒド基若しくはアルデヒド前駆体基、又はアルデヒド基、保護されたアルデヒド基若しくはアルデヒド前駆体基を導入するためのハンドル基から選択される官能基を含む官能化合物、

(b) 任意で、アルデヒド基、保護されたアルデヒド基又はアルデヒド前駆体基を含むハンドル基用の反応パートナー、

(c) 任意で、保護されたアルデヒド基及びアルデヒド前駆体基をアルデヒド基に変換できるアルデヒド形成試薬、及び、

(d) マーカー試薬、

を含んでなる前記試薬キットに関する。

【0013】

さらに、本第1の態様のさらなる実施形態は、次式(I)の化合物に関する：

A-S-N (I)

(式中、Aはアルデヒド基、保護されたアルデヒド基又はアルデヒド前駆体基から選択される官能基であり、

Sはスペーサー又は結合、好ましくは共有結合であり、及び

Nは核酸又はヌクレオシド化合物若しくはヌクレオチド化合物のような核酸類似体構成単位である)。

【0014】

第2の態様において、本発明は、検出されるべき分析物と結合産物を形成するクリック官能化合物の使用を伴う、分析物(例えば、試料中の核酸)を検出するための方法及び試薬キットに関する。マーカー基の配列特異的導入は、クリック官能化合物をマーカー基又はマーカー前駆体基を包含する適当な反応パートナーと反応させることによって達成される。

【0015】

本第2の態様の一実施形態は、試料中の分析物を検出するための方法であって、以下のステップ：

(i) 試料を供給するステップ、

(ii) 試料をクリック反応用の第1反応パートナーである少なくとも1つの官能基を含む官能化合物と、検出されるべき分析物と前記化合物とが結合産物を形成する条件下で接触させるステップ、

(iii) 結合産物をクリック反応用の第2反応パートナーと、クリック反応が第1及び第2反応パートナー間で生じる条件下にて接触させるステップであって、ここで第2反応パートナーがさらにマーカー基又はマーカー前駆体基を含む、当該ステップ、

(iv) 必要であれば、マーカー前駆体基をマーカー基に変換するステップ、並びに、

(v) 前記マーカー基を検出するステップ、
を含む前記方法に関する。

【0016】

本第2の態様のさらなる実施形態は、試料中の分析物を検出するための試薬キットであって、

- (a) クリック反応の第1反応パートナーである少なくとも1つの官能基を含む官能化合物、
(b) マーカー基又はマーカー前駆体基をさらに含むクリック反応の第2反応パートナー、及び、
(c) 任意で、マーカー前駆体基をマーカー基に変換することができるマーカー形成試薬、を含んでなる前記試薬キットに関する。

【0017】

さらに、本第2の態様のさらなる実施形態は、次式(II)の化合物に関する：

C-S-N (II)

(式中、Cはクリック反応の第1反応パートナーである官能基であり、
Sはスペーサー又は結合、好ましくは共有結合であり、及び
Nは核酸又は例えばヌクレオシド化合物若しくはヌクレオチド化合物のような核酸類似体構成単位である)。

【0018】

第3の態様において、本発明は、検出されるべき分析物と結合産物を形成する感光性化合物の使用を伴う、分析物(例えば、試料中の核酸)を検出するための方法及び試薬キットに関する。感光物質基は、核酸中に配列特異的に導入されることが好ましい。感光物質基の存在は、感光媒体と接触させて、標識された結合産物に照射することで検出される。ここで、感光物質基の存在は、マーカー媒質中でマーカー基の部位特異的形成を選択的にもたらす。

【0019】

この第3の態様の一実施形態は、分析物と感光物質基を含む官能化合物との結合残物を形成し、エネルギー移動、特に感光物質基から感光媒体への放射エネルギーの移動を生じさせることによって試料中の分析物を検出するための方法に関する。このエネルギー移動が感光媒体中でマーカー基の選択的形成を引き起こす。

【0020】

本第3の態様のさらなる実施形態は、試料中の分析物を検出するための方法であって、以下のステップ：

- (i) 試料を供給するステップ、
(ii) 試料を、感光物質基又は感光物質基を導入するためのハンドル基から選択される少なくとも1つの官能基を含む官能化合物と、前記化合物が検出されるべき分析物と結合産物を形成する条件下で接触させるステップ、
(iii) 必要であれば、ハンドル基を感光物質基を含む反応パートナーと反応させるステップ、
(iv) 感光媒体と接触した前記結合産物に、前記感光媒体において前記結合産物中に感光物質基の存在する場合にマーカー基が形成される条件下で、照射するステップ、及び、
(v) 前記マーカー基を検出するステップ、
を含む前記方法に関する。

【0021】

さらに、本第3の態様のさらなる実施形態は、試料中の分析物を検出するための試薬キットであって、

- (a) 感光物質基又は感光物質基を導入するためのハンドル基から選択される少なくとも1つの官能基を含む官能化合物、
(b) 任意で、感光物質基を含むハンドル基用の反応パートナー、及び、
(c) 感光物質基の存在下での照射時にマーカー基を形成する感光媒体、
を含んでなる前記試薬キットに関する。

【0022】

本発明は、生物学的試料(例えば、臨床試料、環境試料又は農産物試料)中の分析物(例えば、核酸又は核酸結合タンパク質)の高感度検出を可能にする。好ましい用途は、限定はしないが、遺伝的多様性(例えば、1塩基多型(SNPs))、殺虫剤若しくは薬剤抵抗性

10

20

30

40

50

、耐性若しくは非耐性、遺伝子型決定（例えば、生物体の種若しくは株の検出、遺伝的に改変された生物体若しくは株の検出、又は病原体若しくは害虫の検出）、及び、疾患の診断（例えば、遺伝病、アレルギー疾患、自己免疫疾患若しくは感染症）が含まれる。さらなる好ましい用途としては、ブランド保護のための試料中の核酸の検出である。この検出において、農産物、食品若しくは価値のある商品のような産物／製品、及び／又はこれらの産物／製品の包装が、産物／製品固有の情報（例えば、限定はしないが、生産／製造地、生産／製造日、販売業者等）でコードされており、また本情報は上記方法で検出される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

10

本発明は、マーカー基（例えば、反応性アルデヒド基）を用いて、複合試料中の分析物の特異的な標識を可能にする方法及び試薬を提供する。好ましい実施形態において、金属沈着（例えば、銀沈着）は、検出されるべき核酸と結合したアルデヒド基上に特異的に生じることができる。さらに好ましい実施形態で、金属沈着（例えば、銀沈着）は、感光物質基から感光媒体（例えば、印画紙）中へのエネルギー移動によって特異的に生じることができる。本特異的な標識方法により、バックグラウンドは著しく減少し、また高い感度と信頼性が得られる。

【0024】

本発明は、分析物の検出を含む。本検出は、定性的検出、例えば分析物（例えば、解析されるべき試料中に存在する特定の核酸配列）の有無の測定であってもよい。一方、本発明は、分析物（例えば、解析されるべき試料中に存在する核酸配列）の定量的検出も可能である。定性的及び／又は定量的検出は、当業者に公知の方法による標識基の測定を含むことができる。

20

【0025】

検出されるべき分析物は、核酸、及びヌクレオシド結合分子、ヌクレオチド結合分子若しくは核酸結合分子（例えば、ヌクレオシド結合タンパク質、ヌクレオチド結合タンパク質若しくは核酸結合タンパク質）から選択されることが好ましい。分析物は、核酸、例えば公知の技術、特にハイブリダイゼーション技術によって検出することのできるいずれかのタイプの核酸であることがより好ましい。例えば、核酸分析物は、DNA（例えば、二本鎖若しくは一本鎖DNA）、RNA又はDNA-RNAハイブリッドから選択してもよい。核酸分析物の特定例は、ゲノムDNA、mRNA、又はそれらに由来する産物（例えば、cDNA）である。

30

【0026】

本発明の方法は、試料中の分析物の検出、特に核酸分析物の検出に適切な公知のいずれのテストフォーマットによって実行することもできる。例えば、本方法はメンブレン（例えば、サザン若しくはノザンブロットにおけるメンブレン）、チップ、アレイ又はビーズ等の粒子のような固相表面上に固定された分析物の検出を含むことができる。さらに、本検出は、ゲル内で（例えば、アガロースゲル又はポリアクリルアミドゲル等のゲル内で試料を電気泳動により分離した後に）行うことも可能である。本方法は、（例えば、チップ若しくはマイクロアレイフォーマットでの）単一の分析物の検出又は複数の分析物の並行検出を含むことができる。

40

【0027】

一の好ましい実施形態で、本検出は、分析物の指標となる結合産物を含む試料の存在下で感光媒体を照射することに関連する。ここで、結合産物は、媒質中でマーカー基を形成する感光媒体にエネルギー移動を生じさせることができる感光物質基を含む。

【0028】

試料は、検出されるべき分析物を含み得るいかなる試料であってもよい。例えば、試料は、農産物試料のような生物学的試料であってもよい。例えば、植物物質及び／又は植物が成長する場所、植物物質が保存され又は加工される場所に関連する物質を含む試料が該当する。他方、試料は、組織試料又は体液試料（血液、血清、血漿等）のような臨床試料（特に、ヒト起源の試料）であってもよい。試料のさらなる種類として、限定はしないが

50

、環境試料、土壌試料、食品試料、法医学試料、又はブランド保護のために検査される金銭的価値のある物に由来する試料が含まれる。

【0029】

その高い感度ゆえに、本発明の方法は、増幅なしに直接分析物を検出するのに適している。本発明によれば、微量な分析物でさえ、例えば0.1ng以下、好ましくは0.01ng以下、より好ましくは1pg以下、さらに好ましくは0.1pg以下、より一層好ましくは0.01pg以下、そして最も好ましくは0.001pg以下の核酸分析物でさえ、増幅なしで測定することができる。複数の修飾されたヌクレオチドを核酸分子内に取り込むことにより、保護されていないアルデヒド基を用いることにより、及び／又は最適化された染色技術を用いることにより、著しく高い感度を得ることができる。例えば、生物学的試料中の遺伝子等の分析物の検出は、サザンブロッティングと本発明の方法とを組み合わせる行うことができる。一方、本発明の方法は、増幅ステップと組み合わせた核酸の検出も可能であることに留意すべきである。増幅ステップは、PCR若しくはそれを改変したもの（非対称PCR、リアルタイムPCR、逆転写(RT)PCR等）のような公知のプロトコル、又はLCRのような他の増幅プロトコルにより実行され得る。

10

【0030】

本発明の好ましい実施形態で、分析物の配列特異的検出は、例えば、特定の配列を有する核酸を試料中の他の核酸配列から区別する、又は特定の核酸配列に結合できるポリペプチドを試料中の他のポリペプチドから区別することで実行される。このような配列特異的検出は、検出されるべき核酸配列がマーカー基若しくはマーカー前駆体基を持った化合物と結合する配列特異的ハイブリダイゼーション反応を含むことが好ましい。一方、本発明は、核酸の配列非特異的検出（例えば、試料中に存在するあらゆる核酸の検出）も可能であることに留意すべきである。

20

【0031】

検出されるべき分析物を同定するために、試料は、アルデヒド官能化合物、クリック官能化合物又は感光物質官能化合物と、核酸等の分析物との結合産物が形成される条件下で接触させることができる。アルデヒド官能化合物は官能基を含む。本官能基は、アルデヒド基、保護されたアルデヒド基、検出方法で著しく有害な影響を及ぼすことなくアルデヒド基に変換され得る基であるアルデヒド前駆体基、又はアルデヒド基、保護されたアルデヒド基若しくはアルデヒド前駆体基を導入するためのハンドル基であってもよい。

30

【0032】

官能化合物は、単一の官能基又は複数の官能基を含むことができる。例えば、官能化合物は、複数（例えば、2、3、4、5、6、7、8又はそれ以上の上記官能基）を含む樹状部分と結合することができる。樹状部分は、公知の技術で合成することができる。樹状部分は、クリック反応（例えば、実施例5で説明したような）を介して合成されることが好ましい。

【0033】

官能基は、分析物と結合産物を形成することのできる化合物に付けられる。本化合物は、ヌクレオシド化合物又はヌクレオチド化合物（例えば、ヌクレオシド若しくはヌクレオシド類似体又はヌクレオチド若しくはヌクレオチド類似体）、又は少なくとも1つの官能化合物（例えば、核酸又は核酸類似体）を含むオリゴマー若しくはポリマーであってもよい。ヌクレオシド化合物若しくはヌクレオチド化合物とは、核酸又は核酸類似体中に、例えば化学方法若しくは酵素方法によって、取り込み可能なヌクレオシド若しくはヌクレオシド類似体又はヌクレオチド若しくはヌクレオチド類似体をいう。結果的に生じる核酸又は核酸類似体は、分析物との結合産物（例えば、核酸ハイブリッド）を形成することが可能なはずである。化合物は、塩基部分（例えば核酸塩基）若しくは核酸塩基と塩基対を形成できる他の複素環塩基部分、及びヌクレオシド若しくはヌクレオチドのバックボーン部分（例えば、糖部分及び任意でリン酸部分を含む）又はヌクレオシド類似体若しくはヌクレオチド類似体の異なるバックボーン部分を含むことが好ましい。

40

50

【0034】

核酸塩基が7-dN-G、C、7-dN-A又はTであり、かつRが官能基である機能的なヌクレオシド化合物の好ましい例が、図1に示されている。

【0035】

官能基は、塩基部分（例えば、核酸塩基）に付けることが好ましい。一方で、官能基をバックボーン部分（例えば、糖部分、リン酸基若しくはヌクレオシド類似体、又はヌクレオチド類似体の場合であれば、改変された糖部分、改変されたリン酸基に、あるいはペプチドバックボーン部分等）に付けることもできる。官能基は、直接的な結合又はスペーサーを介して化合物に共有結合的に付いていることが好ましい。付着がスペーサーを介して生じているのであれば、官能基は脂肪族基若しくは脂環式基、芳香族基若しくは複素芳香族基、アルケン基及び／又はアルキン基と連結することができる。官能基は、芳香族基若しくは複素芳香族基、又はアルキン基に連結することが最も好ましい。アルデヒド基は、ベンズアルデヒドのような芳香族及び脂肪族アルデヒド基、又は三炭糖、四炭糖、五炭糖若しくはグルコースやマンノースのような六炭糖等のアルドース中のアルデヒド基を含むことが特に好ましい。

10

【0036】

官能基は、フリーのアルデヒド基にすることができる。官能基は、保護されたアルデヒド基、すなわちアッセイ条件下でアルデヒド基に変換することのできる基にしてもよい。好ましい保護されたアルデヒド基は、有機酸若しくは無機酸等の酸による処理で、フリーのアルデヒド基に変換できるアセタール基又はヘミアセタール基である。アセタール基又はヘミアセタール基の好ましい例は、プロパンジオール又はエチレングリコールのような多価アルコールで形成されたアセタール基、あるいは、グルコース若しくはガラクトース等のアルドース糖のような糖又は糖関連化合物中のヘミアセタール基である。保護されたアルデヒド基のさらなる例として、酸で処理した際にアルデヒド基を生じるイミノ基（例えば、 $=NH$ 基）、水銀塩で処理した際にアルデヒド基を生じるチオアセタール基又はジチオアセタール基（例えば、 $C(SR)_2$ 基：式中、Rはアルキルラジカルであってもよい）、酸で処理した際にアルデヒド基を生じるオキシム基（例えば、 $=NOH$ 基）、酸で処理した際にアルデヒド基を生じるヒドラゾン基（例えば、 $=N-NHR$ 基：式中、Rはアルキルラジカルであってもよい）、並びに加水分解（例えば、酸で）でアルデヒドを生じるイミダゾロン基若しくはイミダゾリジン基又はベンゾチアゾール基若しくはジヒドロベンゾチアゾール基がある。フリーの又は保護されたアルデヒド基を含む官能化合物、及びそのような化合物を調製するための方法の具体例を、図2、3a、3c、7、8、9d及び9eに示す。

20

30

【0037】

官能基は、アルデヒド前駆体基、すなわち核酸検出方法で著しく有害な効果なしにアルデヒド基に変換することができる基であってもよい。好ましいアルデヒド前駆体基は、還元でアルデヒドを生じるニトリルを含むカルボン酸及びカルボン酸誘導体、並びに酸化でアルデヒドを生じる1級アルコールから選択することができる。

【0038】

別の実施形態で、官能基は、感光物質基、すなわち感光媒体、つまり印画紙のような写真媒体へのエネルギー移動（例えば、光エネルギーの移動）を生じさせることができる基であってもよい。感光物質基は、公知の蛍光及び／又はシアニンベースのインドリン基、キノリン基のような色素標識基から選択することができる。例えばCy5又はCy5.5のような市販の蛍光基等が挙げられる。感光物質基の具体例を、図22に示す。

40

【0039】

官能基は、ハンドル基であってもよい。ハンドル基とは、適当な反応パートナー、つまり以下の基の1つを含む化合物との反応によって、アルデヒド基、保護されたアルデヒド基若しくはアルデヒド前駆体基を導入するための基、又は感光物質基を導入するための基である。好ましい実施形態で、ハンドル基は、クリック官能化された基、すなわち付加環化反応において適当な反応パートナーと反応できる基から選択される。ここで、クリック官能基と反応パートナーとの間で環式（例えば、複素環式）連結が形成され、また反応パ

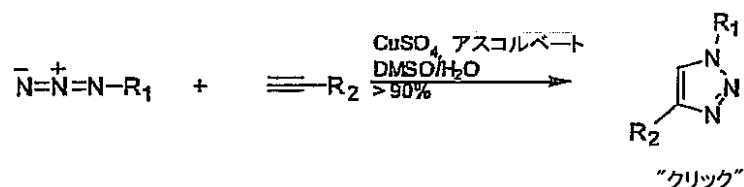
50

ートナーはアルデヒド若しくは保護されたアルデヒド基又は感光物質基を含んでいる。このようなクリック反応の特に好ましい例は、アザイド基とアルキン基間の(3+2)付加環化であり、これにより1,2,3-トリアゾール環の形成を生じる。したがって、アルデヒド基は、アザイド若しくはアルキンハンドル基、及び対応する反応パートナーとのクリック反応を行うことで生成することができる。ここで、反応パートナーは、相補的なアルキン若しくはアザイド基、さらにアルデヒド、保護されたアルデヒド基若しくはアルデヒド前駆体を含む。一方、本発明のさらなる実施形態で、クリック官能化の反応パートナーは、蛍光マーカ基又は感光物質基のような異なるマーカ基又はマーカ前駆体基を含んでいてもよい。

【0040】

クリック反応の特に好ましい実施形態は、アザイド基とアルキン基間で銅触媒された(3+2)付加環化を含む。アザイド／アルキン付加環化の結果である1,2,3-トリアゾールの不可逆的な形成は直交している。必要な化学基は、小さく（生体分子の環境破壊を最小限に留めた取り込み）、自然界で見られるアザイド及びアルキンを欠落しているため選択的である。

【0041】



(式中、 R_1 及び R_2 は有機ラジカルである)。

【0042】

クリック官能化化合物とそのような化合物を調製するための方法の具体例を、図3、図9a~c、及び図10に示す。クリック官能化化合物の反応パートナーの具体例を、図11及び12に示す。

【0043】

官能基（例えば、アルデヒドで官能化された基又はクリックで官能化された基又は感光物質で官能化された基）は、天然及び非天然のプリン並びにピリミジン塩基から選択することのできる核酸塩基に付けることが好ましい。核酸塩基は、シチジン、ウラシル、チミジン、アデニン、グアニン、7-デアザアデニン、7-デアザグアニン、イノシン及びキサンチンから選択されることが好ましい。官能基は、特に核酸中への酵素的取り込みを希望するのであれば、ピリミジン核酸塩基の5位若しくは6位の位置、より好ましくは5位の位置に、又はプリン核酸塩基の7位若しくは8位の位置、より好ましくは7位の位置に付けることが好ましい。

【0044】

官能基は、例えば直接的な結合若しくはスペーサー（例えば、最大20原子の鎖長を有するスペーサー）を介して、共有結合的に化合物に付けることができる。スペーサーは、フレキシブルスペーサーであってもよい。例えば、アルキレンベースのスペーサーであっても、任意でO、S、及び／又はNのようなヘテロ原子、あるいは少なくとも部分的に剛性のスペーサー（例えば、アルケン基、アルキン基、環状基、部分的芳香族又は複素芳香族基、さらには脂環式基及びそれらの組み合わせから選択される少なくとも1つの剛性な基を含むスペーサー）とすることができる。もしも、官能化化合物がクリック反応の第1反応パートナーであり、その後クリック反応の第2反応パートナーと反応するクリック官能化基を含むのならば、直接的結合、フレキシブルスペーサー又は部分的剛性スペーサーを介した官能基の付着が好ましい。ここで、フレキシブルスペーサーは、好ましくは、例えば最大6原子、より好ましくは最大4原子の鎖長である。また、ここで、部分的剛性スペーサーは、最大20原子（例えば、最大10原子）の鎖長を有し、かつ少なくとも一の上記で定義した剛性基及び少なくとも1つのフレキシブル基（例えば、アルキレン基）からなる。他方、官能基がアルデヒド基又は保護されたアルデヒド基又はアルデヒド前駆体基で

10

20

30

40

50

あるのならば、上記で定義したような部分的剛性スペーサー、又は2～10原子の鎖長を有する少なくとも部分的に剛性のスペーサーを介した付着が好ましい。剛性基含有スペーサー（例えば、部分的剛体スペーサー）の構造は、剛性基が直接核酸に付着するようなものが好ましい。部分的剛体スペーサーの好ましい例を図15a及びbに示す。

【0045】

官能化化合物は、検出されるべき分析物と結合産物を形成することができる。一方、官能化化合物は、核酸、又は核酸類似体中に取り込むことのできる化合物、すなわち核酸若しくは核酸類似体構成単位から選択することができる。そのような化合物の好ましい例は、ヌクレオチド若しくはヌクレオチド類似体（例えば、アルデヒド官能化ヌクレオチド若しくはそのヌクレオチド類似体）、クリック官能化ヌクレオチド若しくはそのヌクレオチド類似体、又は感光物質官能化ヌクレオチド若しくはそのヌクレオチド類似体である。一方、官能化化合物は、核酸若しくは核酸類似体（例えばアルデヒド官能化核酸若しくはその核酸類似体）、クリック官能化核酸若しくはその核酸類似体、又は感光物質官能化核酸若しくはその核酸類似体から選択することができる。

10

【0046】

本発明で「ヌクレオチド」は、特に、リボヌクレオチド、2'-デオキシリボヌクレオチド又は2',3'-ジデオキシリボヌクレオチドに関する。ヌクレオチド類似体は、糖修飾又はバックボーン修飾されたヌクレオチド（特に、核酸中に酵素的に取り込むことのできるヌクレオチド類似体の該修飾されたヌクレオチド）から選択することができる。好ましい糖修飾ヌクレオチドでは、リボース糖の2'-OH基又はH-基がOR、R、halo、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂又はCNから選択される基で置き換えられている。ここで、RはC₁-C₆アルキル、アルケニル又はアルキニルであり、またhaloはF、Cl、Br又はIである。リボース自身をシクロペンタン基若しくはシクロヘキセン基のような他の炭素環式又は複素環式の5員基若しくは6員基で置き換えることもできる。好ましいバックボーン修飾ヌクレオチドでは、リン酸（トリ）エステル基を修飾基（例えば、ホスホロチオエート基又はH-ホスホネート基）で置き換えることができる。さらに好ましいヌクレオチド類似体は、モルフォリノ核酸（morpholino nucleic acids）、ペプチド核酸（peptide nucleic acids）、又はロックド核酸（locked nucleic acids）のようなヌクレオチド類似体合成用の構成単位を含む。

20

【0047】

アルデヒド官能化、クリック官能化又は感光物質官能化核酸は、オリゴヌクレオチド（例えば、最大30ヌクレオチド（若しくはヌクレオチド類似体）構成単位の長さを有する核酸）、又は30以上のヌクレオチド（若しくはヌクレオチド類似体）構成単位の長さを有するポリヌクレオチドであってもよい。核酸及び核酸類似体は、分析物（例えば、アッセイ条件下で核酸分析物とハイブリダイゼーションすることのできる分析物）に特異的に結合することができることが好ましい。最小の長さは、好ましくは12、より好ましくは14ヌクレオチド（若しくはヌクレオチド類似体）構成単位である。

30

【0048】

官能化された核酸又は核酸類似体構成単位を、化学合成の標準的な技術によって及び／又は酵素的取り込みによって核酸中に取り込むことができる。例えば、化学合成は、標準的なホスホロアミダイトケミストリーにより、標準的な合成プロトコルの構成単位として修飾ヌクレオシドホスホロアミダイトを用いて行うことができる。化学合成の他の好ましい構成単位のタイプは、H-ホスホネート修飾ヌクレオシド又はホスホロトリエステル修飾ヌクレオシドを含む。

40

【0049】

一方、修飾ヌクレオチドは、酵素的方法によって核酸中に取り込むことができる。驚くべきことに、アルデヒド官能化ヌクレオシド三リン酸若しくはクリック官能化ヌクレオシド三リン酸は、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、逆転写酵素、又はテロメラーゼのような核酸合成酵素の酵素基質となることが判明した。例えば、修飾ヌクレオシド三リン酸は、プライマー伸長法や増幅プロトコルに一般的に用いられるDNAポリメラーゼ（例えば、実施例7で説明したようなTaqポリメラーゼ、Ventポリメラーゼ、Pfxポリメラーゼ、Pw

50

oポリメラーゼ、若しくはTherminatorポリメラーゼのような熱耐性DNAポリメラーゼ)に受け入れられる。酵素は、修飾された三リン酸を、フィデリティー（正確性）を失うことなく受け入れ、またDNA及びRNAのような核酸内に鋳型に基づいて取り込ませることができる。

【0050】

本発明の方法は、分析物検出の様々な実施形態を提供する。例えば、官能化された核酸構成単位（例えば、ヌクレオチド又はヌクレオチド類似体）を、適当な酵素と共に提供することができる。このような構成単位は、分析物と結合産物を形成する核酸分子の中に酵素的に取り込まれる。本発明では、単一タイプの官能化ヌクレオチド又は複数の異なるタイプの官能化ヌクレオチドを使用することができる。あるいは又はさらには、官能化核酸若しくは官能化核酸類似体は、（例えば、化学若しくは酵素合成によって）市販されている、及び（例えば、検出されるべき分析物へのハイブリダイゼーションにより）特異的に結合する、既存のものであってもよい。

10

【0051】

好ましい実施形態で、本方法は、プライマー伸長反応を、任意でそれに続くPCR等の核酸増幅ステップと組み合わせて含む。例えば、アッセイ条件下で検出されるべき核酸分析物又はその相補体とハイブリダイズする少なくとも1つのプライマー分子を提供することができる。その後、結合プライマーは伸長される。ここで、検出されるべき核酸分析物の存在及び／又は量を示す検出可能な伸長産物が得られる。本実施形態によれば、伸長産物内への取り込みのために、官能化されたプライマー及び／又は官能化されたヌクレオチド若しくはヌクレオチド類似体が使用されてもよい。

20

【0052】

あるいは又はさらには、本発明の方法は、アッセイ条件下で検出されるべき核酸分析物又はその相補体とハイブリダイズする官能化されたハイブリダイゼーションプローブの使用を含むことができる。この方法で、ハイブリダイゼーション産物の形成が検出されるべき核酸分析物の存在及び／又は量を示す。

【0053】

本発明の検出方法は、固体支持体の使用等を含む、いずれかの周知の核酸検出プロトコルによって行うことができる。例えば、チップ若しくはアレイ又はビーズのような粒子状物質等の固体支持体を提供することができる。固体支持体に結合された捕捉プローブは、検出されるべき分析物にハイブリダイゼーションすることができる。固相に結合した核酸分析物は、捕捉プローブとは異なる配列部分で核酸分析物とハイブリダイズする官能化されたハイブリダイゼーションプローブを使用して検出することができる。その後、結合したハイブリダイゼーションプローブの検出を、例えば金属化試薬を用いて行う。本方法は、特に農業及び臨床分野における診断的利用（例えば、遺伝的に改変された植物等の植物由来のDNA及び／又はmRNA、病原体若しくは植物有害生物等に由来するDNAの検出）に適する。

30

【0054】

特定の実施形態において、検出は、分析物と感光物質基を含む官能化化合物との結合産物を、感光媒体と接触させること（例えば、試料又は分割試料を、結合産物が感光媒体上に存在し得るように、スポットティングやピペッティング等で移すことによって）を伴い得る。照射時に、感光物質基から感光媒体へのエネルギー移行が、銀等の金属核のようなマーカー基が感光媒体中で感光物質基の存在下では形成されるが非存在下では形成されないように生じる。必要であればマーカー基は、現像方法、例えば写真技術による化学的又は光化学的現像方法に供することができる。感光媒体は、マーカー基（例えば、金属核）を形成できるどんな固体支持体又はどんな支持物質であってもよい。感光媒体は、感光紙又は支持物質上の感光乳剤若しくはゲルのような光感受性媒体であることが好ましい。感光媒体は、印画紙のような写真媒体であることが、より好ましい。照射は、例えば選択的なマーカー基の形成が感光物質基の存在下で生じるような照射光の波長及び／又は強度の条件下で行われる。照射は、媒体の感度によって赤外光で及び／又は長波可視光で行われる

40

50

のが好ましい。照射波長は、例えば、500nm以上、520nm以上、540nm以上、560nm以上若しくは580nm以上の可視光、又は700nm～10 μmの赤外光とすることができる。

【0055】

本発明の重要な態様は、遺伝的多様性（例えば、1塩基多型(SNPs)）の検出である。例えば、ヒトのゲノムは0.1%以下の平均頻度でヌクレオチド配列変異を含んでいる。したがって、これらの多様性は、複雑な疾患罹患性の原因となる遺伝的要因の同定において優れたマーカーとなる（参考文献16, 17）。SNPsの検出に利用できる技術は広範囲に及ぶが、それらの方法のほとんどは、遅く、多数の器具及びPCR増幅を必要とする（参考文献18）。一方、本方法は、高速性、高感度性及び高効率性を必要とする低、中、及び高スループットスクリーニングに適応するのに十分に安価かつ柔軟性がある。SNPs検出のために本発明の方法を用いることで完全マッチの鎖、又はミスマッチした鎖のみを選択的に標識することが可能となる。

10

【0056】

例えば、SNPs等における核酸のマッチ又はミスマッチ検出は、アッセイ条件下で検出されるべき核酸分析物又はその相補体とハイブリダイズする官能化されたハイブリダイゼーションプローブの使用を含み得る。その後、ハイブリダイゼーション産物を、少なくとも1つのミスマッチを含んだハイブリダイゼーション産物を分解し、ハイブリダイゼーションプローブに完全に相補する配列（すなわち、ミスマッチのない配列）をもつ分解されなかったハイブリダイゼーション産物の存在を核酸の存在及び／又は量で示す処理方法で処理する。

20

【0057】

ミスマッチを含むハイブリダイゼーション産物の分解処理は、ミスマッチ消化処理、すなわち、ミスマッチの存在に依存してハイブリダイゼーション産物を切断するミスマッチ検出酵素の使用を含んでもよい。このようなミスマッチ消化処理に適した酵素には、ミスマッチグリコシラーゼが含まれる。例えば、hMSH2及びhMLH1並びにMut S、Mut L及びMut Hのような遺伝子にコードされた該酵素が挙げられる。さらなるタンパク質として、MutY及びMig.Mth1がある。Mig.Mth1は、TGミスマッチからTを切り出し、MutYはAGミスマッチのAを切り出し、また酵素TDGはTGミスマッチのTを切り出す。

【0058】

あるいは又はさらには、ミスマッチを含むハイブリダイゼーション産物をハイブリダイゼーション条件の調整（例えば、温度、塩濃度及び／又はジメチル塩化アンモニウムでの洗浄を考慮した調整）に関連するディファレンシャルハイブリダイゼーション処理で分解してもよい。この処理で、ミスマッチを含むハイブリダイゼーション産物は分解され、完全に相補的なハイブリダイゼーション産物が安定して残る。

30

【0059】

さらなる実施形態で、ミスマッチ、例えばSNPsは、酵素の触媒による選択的なプライマー伸長により測定されてもよい。この目的のために、3'末端が鋳型分析物のミスマッチ可能性部位の上流に直接配置されるプライマーが提供される。プライマー伸長は、鋳型上の次の塩基に相補的なヌクレオチドが存在する場合のみ可能となる。官能化ヌクレオチドのタイプを選択すること、及びそれがプライマーの内部に取り込まれているか否かを測定することによって、ミスマッチ可能性部位の塩基を決定することができる。

40

【0060】

本発明の方法は、分析物と官能化化合物との結合産物の中に取り込まれたマーカー基の検出を含む。マーカー基は、金属沈着形成基（例えば、アルデヒド官能化された基）から、蛍光性又は蛍光形成基から、又は酸化還元活性基から選択されることが好ましい。

【0061】

金属沈着の形成には、アルデヒド基を金属化試薬（例えば、アルデヒド基の周囲に還元等により選択的に沈着することのできるAg、Au、Bi、Cu、Pd若しくはPtから選択される金属原子及び／又はイオンを含む試薬）で処理する必要がある。金属化試薬は銀-アンモニウム錯体のようなAg⁺塩を含むもの、すなわちトレンス試薬が好ましい。金属化試薬のさ

50

らに好ましい例は、 $\text{Cu}(\text{NO}_3)/\text{I}_2$ 、 $[\text{Pt}(\text{terpy})\text{Cl}]\text{Cl}$ のようなプラチナ-テルピリジン錯体、 $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ 又は KAuCl_4 である。

【0062】

さらに、官能化された基は、他のマーカー基、例えば蛍光マーカー基等を付着するためのハンドル（取り掛かり）として機能することもできる。例えば、アミノ基を持ったマーカー化合物は、シアノ水素化ホウ素ナトリウムのような還元剤存在下で還元的アミノ化によってアルデヒド基に結合することができる。あるいは、ヒドラゾン形成又はオキシム形成を使用してマーカー基を提供することができる。

【0063】

マーカー基の検出は、公知の方法に従って行うことができる。例えば、金属沈着を、視覚的方法及び／又は電気的方法により定性的に及び／又は定量的に測定することができる。好ましい実施形態で、固体表面上の金属沈着は、電気的パラメータ（例えば、伝導率）を測定することにより決定することができる。蛍光マーカー基を公知の蛍光測定方法（例えば、レーザーの等の適切な光源による励起と放出される蛍光の検出）によって定性的に及び／又は定量的に測定することができる。

【0064】

さらなる実施形態で、本発明は、分析物と官能化化合物との結合産物中の感光物質基の存在下で、感光媒体中において部位特異的に形成されるマーカー基の検出を含む。感光物質基は、蛍光基又は発光基から選択されることが好ましい。感光物質基は、直接、又はハンドルを介して（例えば、上記で詳述したクリック反応を介して）結合産物中に取り込まれ得る。感光媒体は、感光物質基の存在下で照射したときに、標準的な写真技術にしたがって（例えば、化学又は光化学的現像技術によって）現像することのできる金属核のような検出可能なマーカー基を形成する基を含む。

【0065】

また、本発明は、分析物検出用の試薬キットに関する。例えば、分析物は、少なくとも1つの上記の官能基を付けた官能化化合物を含む試料中の核酸分析物である。一般に、キットは式(III)の化合物を含んでいてもよい。

F-S-N(III)

（式中、Fは上記官能基、例えば式(I)で定義したA基、式(II)で定義したC基及び／又は感光物質基であり、

Sはスパーサー又は結合、好ましくは共有結合であり、及び

Nは核酸又は例えばヌクレオシド化合物又はヌクレオチド化合物のような核酸類似体構成単位である）。

【0066】

試薬キットは、任意でアルデヒド形成試薬若しくはクリック反応用の第2パートナー、及びマーカー若しくはマーカー形成試薬又は感光媒体を含んでいてもよい。本キットは、上記方法で使用されることが好ましい。

【0067】

さらに、本発明は、前述の式(I)のアルデヒド官能化化合物又は式(II)のクリック官能化化合物に関する。官能化化合物は、核酸若しくは核酸類似体又はそれらの前駆体の化学合成あるいは酵素合成用の構成単位であってもよい。好ましい化合物は、酵素的に核酸中に取り込むことのできるヌクレオシド三リン酸、特にリボースヌクレオシド三リン酸、2'-デオキシリボースヌクレオシド三リン酸若しくは2'-,3'-ジデオキシリボースヌクレオシド三リン酸、又はそれらの類似体である。

【0068】

さらに、化合物は、核酸、又はペプチド核酸、モルフォリノ核酸若しくはロックド核酸のような核酸類似体の化学合成用の構成単位であってもよい。この末端には、ヌクレオシドホスホロアミダイト、H-ホスホネート、ホスホトリエステル、又はFmoc及び／若しくはBocで保護された核酸塩基アミノ酸が適している。

【0069】

本発明はまた、式(I)及び／又は式(II)の少なくとも一の化合物をその内部に取り込んだ核酸又は核酸類似体分子に関する。分子は、DNA及びRNA、又は核酸類似体（例えば、上記で詳述したペプチド核酸、モルフォリノ核酸若しくはロックド核酸から選択される該類似体）から選択することができる。

【0070】

さらに、本発明は、化合物(I)及び／又は(II)を含む少なくとも一のヌクレオチド又はヌクレオチド類似体の構成単位を核酸又は核酸類似体分子内に取り込むことを含む、核酸又は核酸類似体分子の合成方法に関する。本方法は、化学合成及び／又は酵素合成を含んでいてもよい。

【0071】

さらに、本発明は、核酸を含むアルデヒド官能化合物を上記で詳述したような金属化試薬で処理することによって得られる上述の核酸又は核酸分子の金属化産物に関する。

【0072】

さらに、本発明は、上記分析物と上述の核酸又は核酸類似体分子との結合産物に関する。結合産物は、相補的核酸とのハイブリダイゼーション産物であることが好ましい。

【0073】

好ましい実施形態では、本発明の方法及び試薬キットは農業的用途に使用される。例えば、本発明は、植物、植物病原体、又はウイルス、細菌、菌類若しくは昆虫のような植物有害生物に由来する核酸の検出に適している。さらに、本発明は、植物若しくは植物の一部、植物病原体、又は昆虫のような植物有害生物におけるSNPs等の遺伝的多様性を検出するのに適している。

【0074】

さらなる用途は、除草剤、殺菌剤若しくは殺虫剤に対する抵抗性、耐性又は不耐性（例えば、生物体又は生物集団中の菌類、昆虫若しくは植物の抵抗性、耐性又は不耐性）を検出すること、あるいはモニタリングすることである。本発明は、迅速な遺伝子型決定（例えば、菌類、昆虫若しくは植物の種又は株の検出及び／又は区別）にも適している。さらに、遺伝学的に改変された生物体若しくは株（例えば、菌類、昆虫若しくは植物の生物体又は株）の検出及び／又は区別が可能である。

【0075】

本発明の高い感度により、病原体の早期診断が可能である。すなわち、病原体の存在を示す初期症状前の診断で明らかとなる。これはダイズさび病(*Phakospora pachyrhizi*)や他の病原体（例えば、うどん粉病菌(*Blumeria graminis*)、葉枯病菌(*Septoria tritici*)若しくは卵菌(*Oomycetes*)又はその存在を視覚的に認識できる前に検出されたならば、その抑制だけは可能な他の病原体）の診断に特に重要である。

【0076】

さらに、本発明は、ヒト若しくは動物の医薬等における、例えばヒト病原体又は家畜若しくは愛玩動物の病原体等の病原体からの核酸の検出のための、医学的な、診断上の、及び法医学的な応用に適している。

【0077】

さらに好ましい用途は、SNPs等のヒトの遺伝的多様性の検出、あるいは薬剤抵抗性、耐性若しくは非耐性又はアレルギーの検出を包含する。さらに、本発明は、遺伝子型決定、特に疾患、アレルギー及び不耐性の素因又はリスク強度に関連する変異を測定するためのヒトの遺伝子型決定に適している。また、本発明は、遺伝学的に改変された生物体若しくは株、細菌の生物体若しくは株、又はウイルスで、さらには遺伝学的に改変された家畜等の検出に使用することもできる。本発明は、特に疾患（例えば、遺伝病、アレルギー疾患、自己免疫疾患又は感染症）の迅速な診断に適している。

【0078】

さらに、本発明は、遺伝子の機能及び／又は発現を、例えば研究目的で、検出するのに適している。

【0079】

さらに、さらなる実施形態として、ブランド保護、例えば、金銭的価値の高い物のような製品中にコードされた特定の情報を検出するための方法の利用がある。そのような金銭的価値の高い物には、植物保護製品、医薬品、化粧品及びファインケミカル（例えば、ビタミンやアミノ酸）、並びに飲料製品、燃料製品（例えば、ガソリンやディーゼル等）、消費家電製品などが挙げられる。さらに、前記製品及びその他の製品の包装に標章を付すことができる。情報は、製品中に及び／又は製品の包装中に取り込まれた核酸又は核酸類似体によってコードされている。情報は、製造業者の身元、製造場所、製造日及び／又は販売業者に関していてもよい。本発明を用いて、製品特有のデータの迅速な検出を行うことが可能となる。試料を製品の分割試料から調製し、その後、試料内の核酸にコードされた情報の存在を検出可能な、一又はいくつかの配列特異的官能化ハイブリダイゼーションプローブと接触させることができる。

10

【0080】

本発明は、栄養分野にも適している。例えば、食料地域において、動物の栄養となる食物（例えば、トウモロコシ）には、プロピオン酸のような防腐剤が多量に添加されている。本発明の方法を適用することで、防腐剤の添加を減らすことができる。さらに、本発明の方法を用いたゲノム解析によって個体の能力を予測して特定の栄養物を利用すること（栄養遺伝学）が可能となる。

【0081】

さらに、さらなる好ましい実施形態は、エピジェネティクスの分野について言及する。本実施形態は、特にDNAの分析、例えばシトシン塩基のメチル化に関するゲノムDNAに言及する。本実施形態では、DNAをシトシン特異的な試薬（例えば、ヒドラジン及び／又はヒドロキシルアミン）で処理することができる。本処理により、シトシン残基又はメチルシトシン残基のいずれかの選択的反応が起こる。例えば、ヒドロキシルアミンでの処理は、シトシン残基の選択的修飾をもたらす。試薬は、（例えば、シトシン残基の）部分的修飾をするために半化学量論的量で加えられることが好ましい。その後、処理されたDNAは、上述のような少なくとも一の修飾核酸構成単位（例えば、dU及び／又はdC塩基）を用いて、例えばプライマー伸長反応によって解析される。クリック修飾された塩基（例えば、アルキン修飾された塩基）を用いることが好ましい。プライマー伸長反応は、修飾されたdC又は5-メチル-dC塩基での反応の停止に起因した特徴的な配列ラダーを生じる（図26参照）。

20

30

【0082】

さらに好ましい実施形態は、感光媒体（例えば、印画紙）又は他の光感受性媒体に対するレポーター核酸分子の使用に言及する。レポーター分子は、感光物質基及びクエンチャー基を有していることが好ましい。分析物がない場合には、感光物質基は消光されている。例えば、レポーター分子は、感光物質基及びそれに空間的に接近した関係で当該分子の末端若しくはその近傍にクエンチャー基をもつヘアピン構造を有していてもよい。レポーター分子がヘアピン構造として存在しているとき場合には、（公知の分子ビーコン技術によれば）感光物質基は消光される。したがって、完全なヘアピン構造をもつレポーター分子は、感光媒体に光を照射したときに感作を引き起こすことができない。分析物の存在下では、ヘアピン構造は壊れる。分析物は、ヘアピン構造を開裂する相補的な核酸鎖若しくは酵素、又はヘアピン構造に結合してその構造を破壊するタンパク質であってもよい。感光物質基はクエンチャー基から離れ、それによって光感作が可能となる。この場合、光の照射により感光媒体の感作がもたらされ、分析物の検出につながる（図27参照）。

40

【0083】

本実施形態で、本発明は試料中の分析物を検出するための方法であって、以下のステップ：

(i) 試料を供給するステップ、

(ii) 感光物質基又は感光物質基を誘導するためのハンドル基及びクエンチャー基を含むレポーター分子を供給するステップであって、感光物質基は検出されるべき分析物がない場合は消光される当該ステップ、

50

(iii) 試料をレポーター分子と、分析物の存在下で感光物質基の消光を少なくとも部分的に低減するか若しくは終了する条件下で接触させるステップ、

(iv) 必要であれば、ハンドル基を感光物質基を含む反応パートナーと反応させるステップ、

(v) 感光媒体と接触した前記レポーター分子に対して、該レポーター分子に非消光感光物質基が存在する前記感光媒体中でマーカ基が形成される条件下において照射するステップ、及び、

(vi) 前記マーカ基を検出するステップ、
を含む前記方法に関する。

【0084】

10

さらに、本実施形態は、試料中の分析物を検出するための試薬キットであって、

a) 感光物質基又は感光物質基を導入するためのハンドル基、及びクエンチャー基を含むレポーター分子(ここで、感光物質基は検出されるべき分析物がない場合は消光される)、

b) 任意で、感光物質基を含むハンドル基用の反応パートナー、並びに、

c) 非消光感光物質基の照射でマーカ基を形成する感光媒体、
を含んでなる前記試薬キットに関する。

【0085】

本方法及び試薬キットの好ましい態様、並びに好ましい適用については、上記で説明している。

【0086】

20

本発明は、さらに以下の図面及び実施例により説明される。

【実施例1】

【0087】

アルデヒド修飾されたヌクレオシド及びヌクレオチドの合成

アルデヒド修飾された核酸塩基をもつヌクレオシド及びヌクレオシド三リン酸が、適当に修飾されたヌクレオシドから合成された。このヌクレオシドは、1のような脱離基を、好ましくは図1で示すピリミジン塩基(例えば、T、U及びC)の5位又はプリン塩基(例えば7-desaza G、7-desaza A、G及びA)の7位のいずれかの位置に有する。これらの位置の修飾は全て、DNAの主溝から突き出ている。

【0088】

30

アルデヒド修飾されるT(U)ヌクレオシドホスホロアミダイトの合成は、図2で示したように、まず菌頭反応を介したアルキニル化を経由し(参考文献20)、その後適当な官能基との反応が行われた。アルデヒド官能基はアセタール基として保護されている。アセタール保護基は、酸による処理で取り除くことができる。修飾ヌクレオシドホスホロアミダイトは、化学合成によって核酸中に取り込むことができる。

【0089】

アセタールで修飾されるヌクレオシド三リン酸の合成を、図3aで示したように行った。さらに、アルキン(クリック反応用)、アセタール及びヘミアセタールで修飾されるヌクレオシド三リン酸を図3bに示す。修飾されたヌクレオシド三リン酸は、酵素合成によって核酸中に取り込むことができる。

40

【0090】

菌頭/鈴木(参考文献20)のようなPd触媒C-C形成反応の使用は、異なる修飾核酸塩基と共に異なるアルデヒド基を用いたアルデヒド修飾されたヌクレオシド及びヌクレオチドの合成のための一般的な合成法を提供する。さらに、異なる立体的、電子的及び機能的特徴をもつアルデヒド基を合成することができる。

【実施例2】

【0091】

アルデヒド修飾されたヌクレオシド及びヌクレオチドのオリゴヌクレオチド内への取り込み

2.1 化学合成による取り込み

50

アセタール／アルデヒド修飾されたヌクレオシドホスホロアミダイトの取り込みは、従来の固相合成法（参考文献 2 1）で行われた。一又は複数のアセタール／アルデヒド修飾された核酸塩基を含むいくつかのDNAオリゴヌクレオチドを表 1 で示したように調製した。アセタール基の脱保護により、アルデヒド修飾されたDNAオリゴヌクレオチドが利用可能となった。

【0092】

二本鎖DNA分子を得るために、オリゴヌクレオチドが相補的DNA鎖と塩基対を形成する能力についてテストされた。アルデヒド基の存在は、二本鎖の安定性にさほど大きな影響を与えないことが明らかとなった。二本鎖の融点は、1 修飾あたりほんの2℃程下がるだけである。しかし、この程度の不安定量は、意図する用途の完全な許容範囲である。

【表 1】

固相合成法により合成されたオリゴデオキシヌクレオチド

		T _m [°C]
1	TTTTTXXTTTT	
2	TTTTTXXTTTT	
3	GCCGAXGCGC	53,8 (56,5 非修飾コントロール)
4	GCGXATAXATCGC	48,4 (53,7 非修飾コントロール)
5	TTXTTXXTTXTTX	

【0093】

2.2 酵素方法による取り込み

アセタール修飾された三リン酸モノマーは図 3 に従って調製された。三リン酸合成の最も選りすぐりの方法は、以下のLudwig & Eckstein（参考文献 1 1、1 2）の方法である。この方法は弱酸性なので、アルデヒド及びアセタール-TTPの混合物が得られる。この混合物は、所望であればHPLCで分離可能である（参考文献 1 3）。

【0094】

実験は、アセタール及びアルデヒド三リン酸の両方、並びに様々な異なるDNAポリメラーゼを用いて行われた。全ポリメラーゼが修飾された三リン酸を基質とすることができること、及びそれらが選択的に修飾塩基を取り込むことが明らかとなった。また、複数の取り込みも問題にはならないことが判明した。以下のポリメラーゼがプライマー伸長法及びPCRでテストされた。実験は、アセタール保護されたチミジン、また、脱保護されたアルデヒド官能化チミジンで行われた。

【0095】

プライマー伸長法	PCR
Therminator (NEB)	Pfx (A)
Vent	Taq (A)
Vent (exo ⁻)	Vent (B)
Taq	

【0096】

本願発明者らはまた、合成三リン酸（アセタール及びアルデヒド）で置換されたTPPでPCR実験を行った。PCR実験により、修飾塩基を2400塩基対長の完全な遺伝子内に取り込むことがわかった。これにより、本願発明者らは、数百に及ぶアルデヒド由来の核形成部位で特異的に標識された遺伝子を作製することのできる手法を確立した。

【実施例 3】

【0097】

標識されたオリゴヌクレオチド及び遺伝子の検出

アルデヒド上に金属沈着させる好ましい方法は、トレンステスト（参考文献 1 4）に基づく。

【0098】



上記反応では、銀-アンモニア錯体がアルデヒドによって減少する。アルデヒド濃度が高い場合には、反応管内部に固体銀薄膜が観察できる。

【0099】

ヌクレオシドを含むアルデヒド、及び化学的に合成されたアルデヒド修飾された核酸のいずれも、アルデヒド官能基を示す銀染色テストで検出することができた（図4）。一方、非標識のDNA鎖は、同一条件で明らかに陰性の結果を示した。この結果は、特定のDNA配列中に選択的に導入されたアルデヒドにより、これらの修飾された配列の選択的な検出が可能となることを示している。

【0100】

銀染色によるアルデヒド修飾された核酸の検出は、ゲルでも行われた。DNA上のアルデヒド基は、ゲル中の銀イオンを十分に減少させた。DNAでのプロセスによって形成されるシード（種）は、沈着した銀から形成される明瞭な黒いバンドがゲル上で認識できるまで生じることができる。

【0101】

これは、プライマー伸長反応由来及びPCR由来のアルデヒド修飾された核酸（それぞれ、図5(I)及び(II)）を染色することによって立証された。

【0102】

図5で示したように、修飾されたヌクレオシドを含むDNAのみが銀染色され、非修飾DNAは染色されないままである。これは、伸長プライマーとPCR産物のいずれにもあてはまる。染色方法はSilverXPressキット(Invitrogen)に基づくが、より強いトレンス溶液を用いている。他の方法に従った染色も可能である。

【実施例4】

【0103】

感度の測定

検出方法の感度を測定するために、希釈実験法を行った（図6）。標準的な銀染色キットを用いたアルデヒド官能化DNAの染色は、エチジウムブロマイドによる染色(50bp長のDNAあたり約0.5ng)よりも少なくとも5倍以上の感度があることがわかった。

【0104】

この非常に優れた感度は、大雑把な視覚的検出であっても得られる。

【実施例5】

【0105】

アザイド及びアルキン修飾されたヌクレオシド並びにヌクレオチドの合成

アザイド修飾及びアルキン修飾された塩基を有するヌクレオシド及びヌクレオシド三リン酸を、実質的に実施例1に記載したように合成した。

【0106】

5.1 アルキン修飾されたヌクレオチドの合成

アルキン修飾されたヌクレオシド三リン酸の合成に関する詳細な反応スキームを、図10に示す。

【0107】

ヌクレオシド(1)及びそれに対応する三リン酸(2)の調製を、以前のように行った（参考文献23、24）。

【0108】

完全に脱気した化合物3（1.00g、1.72mmol.）（参考文献3）、Pd(PPh₃)₄（0.198g、0.172mmol.）及びCuI（0.065g、0.344mmol.）を含むDMF（3mL）溶液に、脱気したN,N-ジイソプロピルエチルアミン（1.5mL、8.59mmol.）を加え、反応混合物を室温で10分間攪拌した。脱気した4-ペンチン-1-オール（320μl、3.44mmol.）を含むDMF（1mL）溶液を、1滴ずつ1時間にわたって反応混合物に加えた。全てを加えた後に、反応混合物を室温で一晩攪拌した。真空中で濃縮後、クルードな混合物を酢酸エチル（200mL）で希釈し、有機層を塩水（3回×50mL）と、続いて水（50mL）で洗浄した。有機層を(MgSO₄)で乾燥させ、濾過後、真空中で濃縮した。酢酸エチル：イソヘキサン（1：1）の勾配と、その後、酢酸

10

20

30

40

50

エチル：イソヘキサン(2：1)の勾配で溶出するFlashカラムクロマトグラフィー(SiO_2)により、淡黄色の泡状物質として化合物4 (0.790g, 86 %)が得られた。 ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.01 (s, 3 H, OSiCH_3), 0.00 (s, 3 H, OSiCH_3), 0.05 (s, 3 H, OSiCH_3), 0.07 (s, 3 H, OSiCH_3), 0.81 (s, 6 H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 0.85 (s, 6 H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 1.74 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$), 1.95 (m, 1H, H-2 β), 2.20 (m, 1H, H-2 α), 2.42 (t, 2 H, J = 6.0 Hz, $\text{C}\equiv\text{C-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$), 3.67 (dd, 1H, J = 11.4, 2.1 (CDCl_3 , 75.5 MHz): δ 5.4 (SiCH₃), -5.3 (SiCH₃), -4.8 (SiCH₃), -4.6 (SiCH₃), 16.7 ($\text{C}\equiv\text{C-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$), 18.0 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 18.5 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 26.1 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 26.4 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 31.5 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ H), 42.3 (C-2'), 61.9 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$), 63.3 (C-5'), 72.4 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 72.7 (C-3'), 86.0 (C-1'), 88.7 (C-4'), 95.0 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 100.9 (C-5), 101.0 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 141.9 (C-6), 149.6 (C-2), 162.4 (C-4). $\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{NaO}_6\text{Si}_2$ 561.2792 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺について計算したHRMS (ESI, +ve)によれば、561.2803であった。

【0109】

化合物4 (0.300g, 0.56mmol.)を含むジクロロメタン (5mL) の攪拌溶液に、デス・マーチン・ペルヨージナン (Dess-Martin periodinane) (0.378g, 0.89mmol.)を含むジクロロメタン (5mL) 溶液を1滴ずつ5分間にわたって、室温で窒素雰囲気下にて加えた。反応混合物を2時間攪拌した後、飽和チオ硫酸ナトリウム溶液(10mL)で反応を和らげた。その後、クルードな混合物をジクロロメタン(200mL)で希釈し、有機層を塩水 (2回×30mL) と水 (2回×30mL) で洗浄した。その後、有機層を (MgSO_4) で乾燥させて、濾過後、真空中で濃縮した。35%酢酸エチルのイソヘキサン溶液で溶出するカラムクロマトグラフィー(フラッシュシリカ(flash silica))で淡黄色の泡状物質として化合物5 (0.193 g, 65 %) が得られた。 ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz): δ 0.07 (s, 3 H, OSiCH_3), 0.00 (s, 3 H, OSiCH_3), 0.05 (s, 3 H, OSiCH_3), 0.06 (s, 3 H, OSiCH_3), 0.81 (s, 6 H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 0.85 (s, 6 H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 1.95 (m, 1H, H-2 β), 2.21 (m, 1H, H-2 α), 2.61 (t, 2 H, J = 7.2 Hz, $\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$), 2.67 (t, 2 H, J = 7.2 Hz, $\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$), 3.68 d(d, 1 H, J = 11.4, 2.4 Hz, H-5'), 3.81 (dd, 1 H, J = 11.4, 2.4 Hz, H-5'), 3.89 (m, 1 H, H-4'), 4.32 (m, 1 H, H-3'), 6.20 (dd, 1 H, J = 7.2, 6 Hz, H-1'), 7.84 (s, 1 H, H-6), 8.99 (bs, 1 H, N-H), 9.72 (s, 1 H, CHO). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150.8 MHz): δ 3.8 (SiCH₃), -3.7 (SiCH₃), -3.1 (SiCH₃), -2.9 (SiCH₃), 14.4 ($\text{C}\equiv\text{C-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$), 19.7 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 20.1 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 27.4 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 27.7 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 43.7 (C-2'), 44.1 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CHO}$), 64.6 (C-5'), 74.0 (C-3' and $\text{C}\equiv\text{C}$), 87.5 (C-1'), 90.0 (C-4'), 94.3 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 101.9 (C-5), 143.8 (C-6), 150.9 (C-2), 163.7 (C-4), 201.6 (CHO). $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{NaO}_6\text{Si}_2$ 559.2635 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺について計算したHRMS (ESI, +ve)によれば、559.2634であった。

【0110】

化合物5 (0.530g, 1.00mmol.) 及び K_2CO_3 (0.269g, 1.98mmol.) を含む無水メタノール (20mL) 溶液に、1-ジアゾ-2-オキソ-プロピル-ホスホン酸ジメチルエステル(0.261g, 1.19 mmol.)を含む無水メタノール(5mL)溶液を、室温で、窒素雰囲気下にて加えた。反応混合物を室温で一晩攪拌し、濾過後、真空中で濃縮した。クルードな混合物を酢酸エチル(200 mL)に溶かし、有機層を塩水 (2回×30mL) と水 (2回×30mL) で洗浄した。その後、(MgSO_4) で乾燥させて、真空中で濃縮した。20%酢酸エチルのイソヘキサン溶液で溶出するカラムクロマトグラフィー(フラッシュシリカ)により無色の泡状物質として化合物6 (0.290 g, 55%) が得られた。 ^1H NMR (CDCl_3 , 600 Mhz): δ 0.00 (s, 3 H, OSiCH_3), 0.01 (s, 3 H, OSiCH_3), 0.06 (s, 3 H, OSiCH_3), 0.07 (s, 3 H, OSiCH_3), 0.82 (s, 6 H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 0.86 (s, 6 H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 1.93 (m, 1H, H-2 β), 1.95 (s, 1 H, $\text{C}\equiv\text{C-H}$), 2.22 (m, 1H, H-2 α), 2.39 (dt, 2 H, J = 8.4, 2.4 Hz, $\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$), 2.55 (t, 2 H, J = 8.4 Hz, $\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$), 3.68 (dd, 1 H, J = 11.4, 2.4 Hz, H-5'), 3.81 (d, 1 H, J = 11.4, 2.4 Hz, H-5'), 3.89 (m, 1 H, H-4'), 4.33 (m, 1 H, H-3'), 6.20 (dd, 1 H, J = 7.8, 6 Hz, H-1'), 7.85 (s, 1 H, H-6), 8.33 (bs, 1 H, N-H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150.8 MHz): δ 7.0 (SiCH₃), -6.9 (SiCH₃), -6.4 (SiCH₃), -6.2 (SiCH₃), 16.5 ($\text{C}\equiv\text{C-CH}_2$

CH₂), 16.9 (C≡C-CH₂CH₂), 17.0 (SiC(CH₃)₃), 18.2 (SiC(CH₃)₃), 24.2 (SiC(CH₃)₃), 24.5 (SiC(CH₃)₃), 40.4 (C-2'), 61.4 (C-5'), 67.9 (C≡C-H), 70.8 (C-3'), 70.9 (C≡C), 80.9 (C≡C), 84.1 (C-1'), 86.8 (C-4'), 91.2 (C≡C), 98.7 (C-5), 140.6 (C-6), 147.5 (C-2), 159.9 (C-4). C₂₇H₄₃N₂O₅Si₂ + H 533.28670 [M+H]⁺について計算したHRMS (FAB, +ve)によれば、533.26009であった。

【0111】

化合物6 (0.270、0.51 mmol.)を含むTHF(5mL)の冷却溶液(0°C)に、TBAF (1.0M、1.52mL、1.52mmol.)を窒素雰囲気下で加えた。反応混合物を3時間攪拌し、氷酢酸(1.0mL)で反応を和らげ、真空中で濃縮した。10%メタノールの酢酸エチルにて溶出するカラムクロマトグラフィー(フラッシュシリカ)により無色油として化合物7 (0.127 g、82 %)が得られた。10
¹H NMR (d₆-DMSO, 400 MHz): δ 1.88 (s, 1 H, C≡C-H), 2.07 (m, 2 H, H-2'), 2.36 (dt, 2 H, J = 7.2, 2.4 Hz, -CH₂CH₂-), 2.54 (t, 2 H, J = 6.8 Hz, -CH₂CH₂-), 3.53 (dd, 1 H, J = 12.0, 4.0 Hz, H-5'), 3.58 (dd, 1 H, J = 12.0, 4.0 Hz, H-5'), 3.76 (m, 1 H, H-4'), 4.19 (m, 1 H, H-3'), 5.07 (bs, 1 H, O-H), 5.23 (bs, 1 H, O-H), 6.08 (t, 1 H, J = 6.4 Hz, H-1'), 8.11 (s, 1 H, H-6), 11.55 (bs, 1 H, N-H). ¹³C NMR (CDCl₃, 150.8 MHz): δ 17.6 (C≡C-CH₂CH₂), 18.9 (C≡C-CH₂CH₂), 39.5 (C-2'), 60.7 (C-5'), 70.0 (C-3'), 73.7 (C≡C-H), 75.1 (C≡C), 84.6 (C-1'), 87.3 (C-4'), 89.1 (C≡C), 93.0 (C≡C), 100.2 (C-5), 144.7 (C-6), 151.0 (C-2), 163.2 (C-4). C₁₅H₁₆N₂O₅ + Na [M+Na]⁺ 327.28771について計算したHRMS (FAB, +ve)によれば、327.09635であった。C₁₅H₁₆N₂O₅ + AcO⁻ [M+AcO]⁻ 363,1198について計算したHRMS (F
T-ICR MS -)によれば、363,1221であった。C₁₅H₁₅N₂O₅⁻ [M⁻] 303,1について計算したMS-MSによれば、303,1であった。20

【0112】

化合物7 (0.060g、0.197mmol.)及び1,8-ビス(ジメチルアミノ)ナフタレン (プロトンスポンジ、0.068 g、0.316mmol.)を含むリン酸トリメチル(2mL)の冷却溶液(0°C)に、オキシ塩化リン (22 μL、0.237mmol.)を1滴ずつ5分間にわたって窒素雰囲気下で加えた。反応混合物を3時間、0°Cで攪拌した。トリブチルアンモニウムピロリン酸(0.080g、0.237mmol.)を含む無水DMF溶液(2.0 mL)を混合物に加え、1分間攪拌した後、重炭酸トリエチルアンモニウム(1.0M、20mL、pH=8.5)で反応を和らげた。反応混合物を2時間攪拌し、一晚凍結乾燥した。RP-HPLC精製(0~50% 0.1M酢酸トリエチルアンモニウム→20:80 H₂O:MeC
N (流速 5 mL/min.で45分間にわたる0.1 M酢酸トリエチルアンモニウム勾配をもつ))によりトリエチルアンモニウム塩として化合物8 (17.7 min.)が得られた。³¹P NMR (D₂O, 81 MHz): δ 22.4 (t, 1 P, J = 19.8 Hz, P-β), -10.5 (d, 1 P, J = 20.3 Hz, P-α), -9.7 (d, 1 P, J = 19.8 Hz, P-γ). MALDI-TOF (ATT matrix, negative mode): 271 [M + 2 H]²⁻, 542 [M + 2 H]⁻。30

【0113】

5.2 樹状アザイド官能化クリック反応パートナーの合成

複数のヘミアセタール基 (保護されたアルデヒド基) を含むアザイド官能化デンドリマーの合成に関する詳細な反応スキームを図11に示す。

【0114】

Cu(I)触媒トリアゾールライゲーション反応の一般的方法

化合物9 (7.31g、0.0256mol.)及び化合物10 (3.00g、0.0128mol.)を含むTHF:水(3:1、40mL)の溶液にCuSO₄ (0.103 g、0.641mmol.)を含むH₂O(3mL)溶液を加え、続いて、固体状のアスコルビン酸ナトリウム(0.253 g、1.28mmol.)を加えた。反応混合物を室温で一晩攪拌した。懸濁液をH₂O(50mL)で希釈し、0°Cに冷却した後、濃縮したNH₄OH(5mL)で10分間処理した。反応混合物をジクロロメタン(500mL)で希釈し、有機層を塩水(2回×50mL)で洗浄した後、H₂O(2回×50mL)で洗浄した。有機層を放置し、(MgSO₄で)乾燥した後、真空中で濃縮した。1:1の酢酸エチル:ペトロリウム・スピリットで溶出するカラムクロマトグラフィー(フラッシュシリカ)により無色の泡状産物として化合物9 (2.76g)、モノクリック産物(化合物11、3.94g)を、続いて化合物12 (4.92 g、48%)が得られた。その後、50

モノ・クリック産物(11)を同等量の化合物9と反応させて、定量的に検査した後、それ以上の精製を行わずに化合物12を得た。

【0115】

^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz): δ 1.29 (s, 6 H, C- CH_3), 1.35 (s, 6 H, C- CH_3), 1.38 (s, 6 H, C- CH_3), 1.49 (s, 6 H, C- CH_3), 4.19 (m, 4 H, H4'/H5'), 4.32 (dd, 2 H, J = 4.8, 2.4 Hz, H 2'), 4.46 (dd, 2 H, J = 14.4, 8.4 Hz, H6''), 4.50 (s, 2 H, - CH_2 -), 4.62 (m, 2 H, H 3'), 4.64 (m, 2 H, H 6'), 5.18 (s, 4 H, - CH_2 -), 5.51 (d, 2 H, J = 4.8 Hz, H 1'), 6.59 (t, 1 H, J = 1.8 Hz, Ar-H), 6.64 (d, 2 H, J = 1.8 Hz, Ar-H), 7.79 (s, 2 H, C=CH-). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150.8 Mhz): δ 24.4 (C- CH_3), 24.7 (C- CH_3), 25.9 (C- CH_3), 26.0 (C- CH_3), 46.1 (CH_2 -), 50.6 (- CH_6 ' / H6''), 62.2 (Ar- CH_2 -), 67.0 (CH_4 '), 70.1 (CH_2 '), 70.5 (CH_3 '), 70.9 (CH_5 '), 96.0 (CH_1 '), 102.0 (Ar-CH), 107.9, 109.1, 110.0, 124.0 (C=CH), 139.6, 143.4, 160.0. ESI-MS m/z 806 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

10

【0116】

CuSO_4 (0.008 g, 0.047 mmol.)及びアスコルビン酸ナトリウム (0.019 g, 0.094 mmol.)の存在下で化合物13 (1.53 g, 1.88 mmol.)及び化合物10 (0.220 g, 0.94 mmol.)の反応により、カラムクロマトグラフィー(フラッシュ SiO_2 ; 酢酸エチル:メタノール=9:1)後、無色の泡状物質として化合物14 (1.65 g, 95%)が得られた。

【0117】

^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz): δ 1.26 (s, 12 H, C- CH_3), 1.27 (s, 6 H, C- CH_3), 1.34 (s, 12 H, C- CH_3), 1.35 (s, 12 H, C- CH_3), 1.48 (s, 6 H, C- CH_3), 4.19 (m, 8 H, H4'/H5'), 4.32 (m, 4 H, H 2'), 4.46 (m, 4 H, H6''), 4.47 (s, 2 H, - CH_2 -), 4.62 (m, 4 H, H 3'), 4.64 (m, 4 H, H 6'), 5.12 (s, 8 H, - CH_2 -), 5.15 (s, 4 H, - CH_2 -), 5.40 (s, 4 H, - CH_2 -), 5.49 (bd, 4 H, J = 4.8 Hz, H 1'), 6.50 (m, 4 H, Ar-H), 6.55 (m, 2 H, Ar-H), 6.58 (m, 1 H, Ar-H), 6.61 (m, 2 H, Ar-H), 7.59 (s, 2 H, C=CH-), 7.78 (s, 4 H, C=CH-). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150.8 MHz): δ 24.4 (C- CH_3), 24.9 (C- CH_3), 25.9 (C- CH_3), 26.0 (C- CH_3), 45.9 (CH_2 -), 50.4 (- CH_6 ' / H6''), 53.9 (Ar- CH_2 -), 61.8 (Ar- CH_2 -), 61.9 (Ar- CH_2 -), 67.0 (CH_4 '), 70.1 (CH_2 '), 70.5 (CH_3 '), 71.1 (CH_5 '), 96.1 (CH_1 '), 101.6, 101.7, 107.2, 108.0, 109.0, 109.9, 122.9, 124.2, 136.7, 140.0, 143.2, 144.1, 159.5, 160.0. MALDI-TOF (ATT, positive mode): m/z 1859 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

20

30

【0118】

樹状塩化物をアザイドに変換する一般的方法

化合物12(4.84g、6.01mmol.)を含むアセトン:水(4:1、100mL)の溶液に、 NaN_3 (0.586 g、9.01mmol.)を加え、窒素雰囲気下で3時間、加熱還流した。反応混合物を酢酸エチル(600mL)で希釈し、有機層を塩水(2回×50mL)と、続いて水(2回×50mL)で洗浄した。有機層をそのまま保持して(MgSO_4)で乾燥した。真空中で濃縮し、白い不定形固体として化合物13 (4.72g、97%)を得た。

【0119】

^1H NMR (d_6 -アセトン, 400 MHz): δ 1.28 (s, 6 H, C- CH_3), 1.35 (s, 6 H, C- CH_3), 1.36 (s, 6 H, C- CH_3), 1.44 (s, 6 H, C- CH_3), 4.30 (dd, 2 H, J = 3.6, 2.0 Hz, H 6'/6''), 4.32 (dd, 2 H, J = 3.2, 1.6 Hz, H 5'), 4.36 (dd, 2 H, J = 7.6, 1.6 Hz, H 4'), 4.39 (dd, 2 H, J = 4.8, 2.4 Hz, H 2'), 4.61 (d, 2 H, J = 3.6 Hz, H 6'/6''), 4.64 (s, 2 H, - CH_2), 4.70 (dd, 2 H, J = 7.6, 2.4 Hz, H 3'), 5.20 (s, 4 H, - CH_2 -), 5.47 (d, 2 H, J = 4.8 Hz, H 1'), 6.73 (m, 3 H, Ar-H), 8.07 (s, 2 H, C=C-H). ^{13}C NMR (d_6 -アセトン, 150.8 MHz): δ 25.7 (C- CH_3), 26.1 (C- CH_3), 27.2 (C- CH_3), 27.4 (C- CH_3), 47.6 (CH_2 -), 52.0 (- CH_6 ' / H6''), 63.4 (Ar- CH_2 -), 68.8 (CH_4 '), 72.0 (CH_2 '), 72.5 (CH_3 '), 72.9 (CH_5 '), 98.2 (CH_1 '), 103.3 (Ar-CH), 109.9 (Ar-CH), 110.4, 111.2, 126.3 (C=CH), 141.9, 144.8, 161.8. $\text{C}_{37}\text{H}_{49}\text{N}_9\text{O}_{12}\text{Na}$ 834.3398 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ について計算したHRMS (ESI, +ve)によれば834.3404であった。

40

50

【0120】

化合物14 (1.51g、0.81mmol)及びNaN₃ (0.079g、1.22mmol)の反応は、白色の無定形固体として化合物15 (1.45 g、96%)を生じた。¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ 1.27 (s, 12 H, C-CH₃), 1.34 (s, 12 H, C-CH₃), 1.37 (s, 12 H, C-CH₃), 1.48 (s, 12 H, C-CH₃), 4.19 (m, 8 H, H4' / H5'), 4.24 (s, 2 H, -CH₂-), 4.32 (m, 4 H, H2'), 4.46 (dd, 4 H, J = 13.8, 8.4 Hz, H6''), 4.62 (m, 4 H, H3'), 4.64 (m, 4 H, H6'), 5.12 (s, 4 H, -CH₂-), 5.18 (s, 8 H, -CH₂-), 5.43 (s, 4 H, -CH₂-), 5.49 (bd, 4 H, J = 4.8 Hz, H1'), 6.50 (m, 2 H, Ar-H), 6.55 (m, 4 H, Ar-H), 6.58 (m, 1 H, Ar-H), 6.60 (m, 2 H, Ar-H), 7.78 (s, 2 H, C=CH-), 7.79 (s, 4 H, C=CH-). ¹³C NMR (CDCl₃, 150.8 MHz): δ 24.4 (C-CH₃), 24.8 (C-CH₃), 25.8 (C-CH₃), 25.9 (C-CH₃), 45.9 (CH₂-), 50.4 (-CH6' / H6''), 54.6 (Ar-CH₂-), 62.0 (Ar-CH₂-), 62.1 (Ar-CH₂-), 67.1 (CH4'), 70.3 (CH2'), 70.7 (CH3'), 71.1 (CH5'), 96.2 (CH1'), 101.7, 101.8, 107.4, 107.7, 109.0, 109.9, 124.0, 124.2, 137.8, 143.1, 143.4, 144.1, 159.7, 159.9. C₈₇H₁₁₀N₂₁O₂₆Na 1886.7829 [M+Na+H]⁺について計算したHRMS (ESI, +ve)によれば1887.7862であった。

10

【0121】

樹状イソプロピリデン脱保護の一般的方法

TFA: 水(1:1; 10mL)の混合物に化合物13 (0.020 g、24.7 μmol)を窒素雰囲気下で添加した。反応混合物を50℃で4時間加熱し、続いて真空中で濃縮した。水(20ml)を混合物に加え、水層をDCMで数回洗浄(3回×20mL)した。そのまま放置した後、一晚凍結乾燥を行い、淡黄色の泡状物質として化合物16 (0.015g、63 %)を得た。MALDI-TOF (ATT, positive mode): m/z 652 [M+H]⁺。

20

【0122】

TFA: 水(1:1; 20mL)と化合物15 (1.40g、0.75mmol)の反応は、淡黄色の無定形固体として化合物17 (1.05g、90 %)を生じた。MALDI-TOF (ATT, positive mode): m/z 1545 [M+H]⁺。

【実施例6】

【0123】

アザイド修飾及びアルキン修飾されたヌクレオシド並びにヌクレオチドの核酸中への取り込み

30

アザイド修飾及びアルキン修飾されたヌクレオシド並びにヌクレオチドは、実質的に実施例2で説明したように、化学合成又は酵素合成によって核酸中に効率的に取り込まれる。その結果得られる修飾核酸は、所望の用途に従って、例えば、蛍光標識化や金属沈着により特異的に標識化することができる。

【0124】

本標識方法は、PCR増幅を必要とすることのない核酸、核酸配列及び遺伝子検出の高速、かつ極めて感度の高い方法である。

【0125】

最初の実験で、DNA構造物内でのクリック反応の性能を調べるために、ヌクレオシド1及び2 (図9a及びb)を調製し、標準的な固相合成プロトコルによってオリゴヌクレオチド中に取り込ませた。クリック反応の効果を、ベンジルアザイド、CuSO₄、還元剤(アスコルベート又はTCEP)、及び銅(I)安定化リガンドを用いて検証した。これらの結果を、表2にまとめている。剛性塩基の化合物1を含むオリゴヌクレオチドは、フレキシブルなアルキンを含む化合物2と比較すると、一貫してクリック産物の収率が低かった。温度(10~40℃)はクリック反応の収率には影響しなかった。

40

【0126】

その後、検出に適した性質を示すアザイドタイプの機能について、クリック反応の効果を解析した(図12)。フルオレセインアザイドは、非常に高感度な蛍光マーカー(ほぼ単一の蛍光量子収率)であるのに対し、クマリンアザイドは、トリアゾール形成で蛍光がスイッチオンされたときにクリックマーカーの証拠を示した(参考文献19)。

50

【表 2】

ベンジルアザイド、CuSO₄及びTCEPを用いたクリック反応の概要

ODN 配列	X = 1			X = 2		
	収率(%)					
	出発物質	所望産物	他の産物	出発物質	所望産物	他の産物
3'-GCG CTT ACX TGT CGC G-5'	3	97	-	-	100	アザイド還元
3'-GCG CTT ACX XGT CGC G-5'		84	16 (モノクリック)	-	100	アザイド還元
3'-GCG CTT ACX TGX CGC G-5'		94	6 (モノクリック)	-	100	アザイド還元
3'-GCG CTX ACX TGX CGC G-5'		84	16 (ビスクリック)	NA	NA	NA

10

【0127】

ベンジルアザイドの使用に関連した実験と一致して、剛性アルキンを含むオリゴデオキシヌクレオチドでは、クリック変換収率が低かった。対照的にフレキシブルなアルキンを含むオリゴヌクレオチドでは、HPLC及びMALDI-TOFによれば、ほぼ量的な変換が見られた。DNAの標識は、再度ゲル上で直接行うことができた。修飾された核酸塩基を含むDNAをゲル電気泳動によって他のDNA鎖から分離し、その後そのゲルをフルオレセインアザイドとCu(I)で処理し、クリック反応を実行した。ゲルの洗浄により、ゲル中で染色されたDNAの背後に残った過剰なフルオレセインを除いた（図13）。

20

【0128】

これらの実験からアルキン修飾された塩基を含むDNAをフルオレセインで選択的に標識できることを明確に推定できる。CYBR greenは、DNAを非特異的に染色する。それ故、A2のレーン1及びB2のレーン3（図13）のようにクリック反応前に非修飾のDNAもマーキングされる。

【0129】

フルオレセインは、モノマーでも、またDNAにクリッキングした後でも、いずれも強い蛍光を発する分子である。したがって、フルオレセインを用いたクリック反応後に、染色されたDNAの背後に残った過剰なフルオレセインを除くためにゲルを洗浄しなければならない。

30

【0130】

クマリンは、もう1つの蛍光分子であるが、モノマーでは蛍光を発しない。この分子は、クリック反応後、アザイドがトリアゾールに変換されたときにのみ蛍光を発し始める。クマリンの蛍光は、下記実験の反応チューブ内で見られるように、クリック後に効率的にオンに切り替わる（図14）。同様の実験をゲル上で行うこともできる。

【0131】

さらなる実験において、クリック反応の効率を、ヌクレオシド2（図15）を取り込んだオリゴデオキシヌクレオチド（ODN）で検証した。このヌクレオシドは、対応するホスホロアミダイト1（図15）を用い、標準的な固相合成プロトコルを介してオリゴヌクレオチド中に取り込まれた。単一又は複数のアルキンレポーター基を含むオリゴヌクレオチドを表3に示す。

40

【表 3】

ODN配列	X = 19	
	質量	
	出発物質	産物
3'-GCG CTT ACX TGT CGC G-5'	ODN1 4952 (calc) 4955 (obs)	ODN1-P 5157 (calc) 5157 (obs)
3'-GCG CTT ACX XGT CGC G-5'	ODN2 5042 (calc) 5042 (obs)	ODN2-P 5452 (calc) 5455 (obs)
3'-GCG CTT XXX XXX CGC G-5'	ODN6 5407 (calc) 5413 (obs)	ODN6-P 6637 (calc) 6646 (obs)

【0132】

クリック方法は、アザイド3（図15）（DMSO溶液、10mM、50当量）、CuSO₄/リガンド（参考文献29）複合体（DMSO溶液、0.05M、20当量）及びTCEP（水溶液、0.1M、40当量）溶液の、対応するODNの0.2mM溶液への連続的な添加を伴った。反応混合物を室温で一晩振盪した。その後試料をメンブレンで脱塩し、その質量をMALDI-TOF（HPA matrix）で測定した。

【実施例7】

【0133】

修飾されたdNTPを用いたDNA鋳型のPCR増幅

7.1 酵母由来のポリメラーゼ(pol) η のPCR増幅

PCR実験に使用した鋳型及びプライマー：

フォワード・プライマー：5'-GATTTGGCCGGATTTGTTTC

リバース・プライマー：3'-TTTTATGCTATCTCTGATACCCTTG

鋳型：酵母の318bpの配列（Rad30の483～800番目のヌクレオチド）：

GGGCCGGATTTGTTTCAATATGCTAATGTTTGATAATGAGTACGAGCTT
ACAGGCGACTTGAAACTGAAAGATGCATTAAGCAATATTCGTGAGGCTT
TTATAGGGGGCAACTATGATATAAATTCCCATCTACCTCTTATACCCGAA
AAGATAAAGTCTCTGAAGTTTGAAGGCGATGTTTTCAATCCAGAGGGCA
GAGATCTGATCACAGATTGGGACGATGTAATACTTGCACTAGGATCTCA
GGTATGCAAGGGTATCAGAGATAGCATAAAAGATATTCTCGGTTATACT
ACTTCGTGTGGTTTGTCTAGCAC

【0134】

前記318bpの鋳型は、59.75% [A+T] 及び40.25% [C+G] を含む。

【0135】

一連の市販の耐熱性ポリメラーゼを、PCR反応を用いて修飾されたデオキシウリジン三リン酸2及び8（図10）を取り込む能力について検証した。使用したDNAポリメラーゼは、以下の通りであった。

- ・Pwo及びTaq(exo⁻)DNAポリメラーゼ(Roche社)、
- ・Vent、Vent(exo⁻)、therminatorポリメラーゼ(New England Biolabs社製)、並びに
- ・Taq(promega社)

【0136】

代表的なPCR反応は、サッカロミセス・セレビシアエ(*S. cerevisiae*) YPH499株のゲノム0.05 μg又は鋳型DNA (pDest17-Poleta 酵母[1-1889])0.5 μg、フォワード及びリバースプ

ライマー各0.3mM、ポリメラーゼ1.25U、マグネシウム含有10×ポリメラーゼバッファー、並びに各非修飾dNTP (dATP、dCTP 及びdGTP ; NEB社)200 µM及び修飾dUTP 200 µMを含んだ。コントロール用に、天然の三リン酸(dATP、dCTP、dGTP及びdTTP)を使用した。総容量50 µLで反応を行った。PCR実験は、Eppendorf社 Mastercycler Personalで行われた。

【0137】

増幅にはホットスタート (94℃2分) を用い、続いて10サイクルの増幅 (94℃15秒、53℃30秒、72℃45秒)、25サイクルの増幅 (94℃15秒、56℃30秒、72℃45秒)、最後に72℃で2分間のインキュベーションを行った。PCR産物は、エチジウムブロマイド染色により2%アガロースゲルで解析された (図16)。PCR産物をQIAquick PCR purification kit (Qiagen社)で精製し、銀染色、配列決定又は消化に用いた。PCR反応の産物を、エチジウム
10
ブロマイドを含有した2%アガロースゲル電気泳動で分離した。産物をUltra-Violet Products CCDカメラで記録した。

【0138】

7.2 ヒト由来のポリメラーゼ(pol)HのPCR増幅

代表的なPCR反応は、DNA鋳型(pDest17-plH ヒト[1-2142])0.5 µg、フォワード及びリバースプライマー各0.3mM、Pwoポリメラーゼ1.25U、及びマグネシウム含有10×ポリメラーゼバッファー、並びに各非修飾dNTP(dATP、dCTP 及びdGTP ; NEB社)200 µM及び修飾dUTP 200 µMを含んだ。コントロール用に天然の三リン酸(dATP、dCTP、dGTP及びdTTP)を使用した。反応は総容量50 µLで行われた。PCR実験は、Eppendorf社 Mastercycler Personalで
20
行われた。

【0139】

増幅にはホットスタート (94℃2分) を用い、続いて10サイクルの増幅 (94℃15秒、53℃30秒、72℃210秒)、30サイクルの増幅 (94℃15秒、56℃30秒、72℃210秒)、最後に72℃で7分間のインキュベーションを行った。PCR産物を1%アガロースゲルでエチジウムブロマイド染色によって解析した。PCR産物をQIAquick PCR purification kit (Qiagen社)で精製し、消化又は配列決定に用いた。

【0140】

PCR反応産物をエチジウムブロマイドを含有した1%アガロースゲル電気泳動で分離した。その産物をUltra-Violet Products CCDカメラで記録した。結果を図17に示す。

【0141】

検査用に、0.1MのHClを6 µL加え、プローブを遠心分離した(6000 rpm、5分間)。消化物をHPLC (interchim社 Interchrom Uptisphere 3 HD0 カラム(150×2.1mm)、バッファーA : 2mM TEA/HOAc水溶液 ; バッファーB : 2mM TEA/HOAc水溶液 : MeCN=1 : 4 ; 0→30分 ; 0%→30% B ; 30→32分 ; 30%→100% B ; 32→36分 ; 100 % B ; 36→38分 ; 100%→0% B ; 38→60分 ; 0% B ; 流速0.2 mL/分)で解析した (図18)。異なるピークを、同一条件を用いて、共導入、UV、及びFT-ICR-HPLC-MS-MSにより割り当てた。

【0142】

7.3 アルキン介在ヌクレオチドを取り込んだPCR断片(318mer)の酵素消化

酵素消化のために、修飾されたヌクレオチド8 (図10) を含む318bpのDNA鋳型 (100 µLの水に約10 µg) を、10 µLのバッファーA (300mM酢酸アンモニウム、100mM CaCl₂、1mM ZnSO₄、pH5.7) 、22ユニットのヌクレアーゼP1(Penicilinum citrium)、及び0.05ユニットの子牛脾臓ホスホジエステラーゼIIの中でインキュベートした。その試料を37℃で3時間振とうした。12 µLのバッファーB(500mM Tris-HCl、1mM EDTA)、10ユニットのアルカリホスファターゼ(CIP)及び0.1ユニットの蛇毒ホスホジエステラーゼI (Crotalus adamanteus (ヒガシダイヤガラガラヘビ) 毒) の添加により消化を完了した。試料を37℃で3時間再度振とうした。

【0143】

7.4 糖アザイドと修飾された二本鎖DNAとのポリアクリルアミドゲルにおけるCu(I)触媒トリアゾール連結反応の一般的方法

全クリック実験は、化合物2又は8 (図10) のいずれかを含む318bpのPCR断片で、dTTP
50

の存在下にて行われた。修飾されたPCR断片を5%ポリアクリルアミドゲルで分離した後、各ゲルを1:1のMeOH:H₂O溶液(25mL)を含む槽に浸した。糖アザイド(0.1M、3mL)溶液を槽に添加し、続いてCuSO₄溶液(0.1M、600μL)及び、最後にTCEP(0.1M、1.2mL)を加えた。これらの溶液を室温にて一晩穏やかに振盪した。

【0144】

7.5 二本鎖DNAに連結された糖アザイドの銀染色の一般的方法

クリック溶液を注ぎ、各ゲルを1:1のMeOH:H₂Oで洗浄し(3回×50 mL、各洗浄あたり10分間)、続いて、H₂O(3×50mL、各洗浄あたり10分間)で洗浄した。その後、各ゲルをトレンス試薬(40mL)と共に30分間インキュベートした(トレンス試薬の調製:80mLの水にAgNO₃(0.5M、5mL)、続いてNaOH(3.0M、1.0mL)、最後にNH₄OH(NH₄OH:H₂O=1:1の濃度、2.2mL)を加えた)。続いてH₂Oで洗浄(3×50mL、各洗浄あたり10分間)した後、ゲルを100mLの水、クエン酸(1%、250μL)及びホルムアルデヒド(35%、80~200μL)を含む現像液で現像した。ホルムアルデヒド濃度により現像処理を2分間から20分間まで変えることができる。

【0145】

結論

提供する本発明は、修飾された三リン酸の効率的取り込みを介することによる核酸の部位特異的標識の新しいモジュール方法に関連する。これらの修飾された三リン酸は、ユーザーの必要に応じてさらに官能化、マーキング、又は染色の可能な基を含む。RNA標識は、これらの方法と、さらにRNAポリメラーゼ及び逆転写酵素のそれぞれを同様に使用することで達成できると予測できる。したがって、宿主内のウイルスゲノムの早期かつ効率的検出を達成できる。報告した新規核酸標識プロトコルは、簡単、効率的、高感度、かつ高度に選択的である。

【実施例8】

【0146】

写真処理を用いた核酸の検出

白黒写真処理は、公知の最も高感度な化学方法の1つである。印画紙上に捕捉された光子により、小さな銀の核形成が開始される。この核は、その後、現像処理の期間内でさらなる銀沈着を触媒する(参考文献22)。これにより、Ag⁺の10⁵の化学的還元とAg⁺の10¹の光化学的還元間のシグナル増幅因子を生じる。これは、PCRを用いて得られるそれと類似する。

【0147】

本願発明者らは、核酸に繋げられた感光色素を利用した高感度方法を開発した。本方法は、フェムトモル以下の感度で特定の遺伝子の検出を可能にする(図21)。この新規方法は、簡単(従来の写真材料を使用できる)で、早く(数分で検出)、効率的で(生体分子あたり、感光分子を1個だけを必要とする)、及び高感度(現在の非最適化感度レベルは約10⁻¹⁴~10⁻¹⁵molである)。本方法と、プライマー伸長法及びPCR技術のような遺伝子特異的生化学的ツールとの組み合わせは、核酸や他の分析物の検出のための新規かつ強力な方法を提供する。

【0148】

写真処理で感光物質として機能する能力について、多数の蛍光シアニンインドリン(化合物1及び2)及びキノリン色素誘導体(化合物3)を検証した(図22)。化合物1~3の可視吸収最大値は、それぞれ546nm、646nm、及び607nmである。

【0149】

インドリン色素(化合物1)は、3×10⁻¹⁴mol.(30fmol)に至るまで容易に検出することができるが、化合物2の検出限界は、約1~3fmol(図22a及び22b)であった。キノリンシアニン色素(化合物3)の検出は、インドリン色素よりも、より高感度である(検出限界:約0.3fmol)ことがわかった(図22c)。強い光で照射した際にバックグラウンドのモヤが生じるかもしれないが、感度は幾分低くなるものの、モヤ自体は低強度の赤外線光源を使用することで抑制することができる(図22d~f)。

【0150】

非修飾オリゴデオキシリボヌクレオチド (ODN-1、ODN-2、ODN-3) を用いたコントロール実験 (図 2 3) は、50nmol (つまり、3 桁異なる) のレベルで高エネルギー照射した際に、小さなバックグラウンドのネガティブな写真反応が生じた。照射を赤外線ランプで 5 分間行った場合には、ネガティブバックグラウンドのレベルを完全に抑制することができる (図 2 3 b)。要するに、非修飾 DNA は染色には関係しない。

【0151】

ODN に繋がれた市販の色素 Cy5 ($\lambda_{\max}=646\text{nm}$, ODN-4)、及び Cy5.5 ($\lambda_{\max}=646\text{nm}$, ODN-5) の希釈系列を続いてテストした (図 1 6)。ODN-4 の検出限界は、100fmol であることがわかった。一方、Cy5.5 ODN-5 の検出感度は 10 倍高かった (検出限界 10fmol)。したがって、非連結のコントロールと比較すると、感度の僅かな減少がシアニン色素を結合した ODN で見られるものの、本結果は、感光物質の連結した ODN 等の生体分子の写真を、高感度分析ツールに使用できることをはっきりと示している。

10

【0152】

感光色素、例えば化合物 4 又は 5 は、クリックケミストリー (図 2 5) を通して核酸中に導入することも可能である。

【0153】

結論

写真方法を光増感色素-核酸と併せることで、分析物 (例えば、核酸) 検出用の素早く、簡単に効率的かつ高感度な方法を開発できる。

20

【0154】

感光物質基の適当な例は、図 2 2 で示したキノリンベースのシアニン色素 (例えば、化合物 3) 又はインドリン色素 (例えば、化合物 1 若しくは 2) である。これらは、少なくとも 10fmol (化合物 1)、1fmol (化合物 2) 又は 0.1fmol (化合物 3) の感度を示す。

【0155】

オリゴデオキシリボヌクレオチドに繋がれた Cy5 及び Cy5.5 のようなインドリンベースの色素は、それぞれ 100fmol 及び 10fmol のレベルであっても検出することができる。

【0156】

参考文献

- (1) E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, G. Ben-Yoseph, *Nature* 1998, 391, 775.
- (2) M. Mertig, L. C. Ciacchi, R. Seidel, W. Pompe, A. De Vita, *Nano Letters* 2002, 2, 841.
- (3) J. Richter, *Physica E* 2003, 16, 157.
- (4) K. Keren, M. Krueger, R. Gilad, G. Ben-Yoseph, U. Sivan, E. Braun, *Science* 2002, 297, 72.
- (5) F. Patolsky, Y. Weizmann, O. Lioubashevski, I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 2323.
- (6) E. Katz, I. Willner, *Angewandte Chemie-International Edition* 2004, 43, 6042.
- (7) K. Keren, R. S. Berman, E. Braun, *Nano Letters* 2004, 4, 323.
- (8) Y. Weizman, F. Patolsky, I. Popov, I. Willner, *Nano Letters* 2004, 4, 787.
- (9) C. F. Monson, A. T. Woolley, *Nano Letters* 2003, 3, 359.
- (10) S. Brakmann, S. Lobermann, *Angewandte Chemie-International Edition* 2001, 40, 1427.
- (11) K. Burgess, D. Cook, *Chemical Reviews* 2000, 100, 2047.
- (12) J. Ludwig, F. Eckstein, *Journal of Organic Chemistry* 1991, 56, 1777.
- (13) A. Roychowdhury, H. Illangkoon, C. L. Hendrickson, S. A. Benner, *Organic Letters* 2004, 6, 489.
- (14) B. Tollens, *Chem. Ber.* 1882, 15, 1635.
- (15) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 2

30

40

50

004.

(16) B. W. Kirk, M. Feinsod, R. Favis, R. M. Kliman, F. Barany, *Nucleic Acids Res.* 2002, 30, 3295.

(17) X.-b. Zhong, R. Reynolds, J. R. Kidd, K. K. Kidd, R. Jenison, R. A. Marlar, D. C. Ward, *PNAS* 2003, 100, 11559.

(18) A. C. Syvanen, *Nat. Rev. Genet.* 2001, 2, 930.

(19) K. Sivakumar, F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill, Q. Wang, *Organic Letters* 2004, 6, 4603.

(20) J. D. Kahl, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 598-604.

(21) R. Micura, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41 813), 2265-2269.

(22) T. H. James, in *Advances in Photochemistry Vol. 13* (Eds. D. H. Volman, K. Gollnick, G. Hammond), John Wiley & Sons New York, 1986, p. 329ff.

(23) P. J. Barr, A. S. Jones, P. Serafinowski, R. T. Walker, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1978, 10, 1263.

(24) L. Otvos, J. Szecsi, J. Sagi, T. Kovacs, *Nucleic Acids Symp. Ser.* 1987, 18, 125.

(25) K. Fujimoto, S. Matsuda, N. Takahashi, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 5646.

(26) F. MorisVaras, X. H. Qian, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 7647.

(27) D. C. M. Kong, M. von Itzstein, *Carbohydrate Research* 1997, 305, 323.

(28) D. Graham, J. A. Parkinson, T. Brown, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1998, 1131-1138.

(29) Q. Wang, T.R. Chan, R. Hilgraf, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, M.G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 3192-3193.

【図面の簡単な説明】

【0157】

【図1】図1は、オリゴヌクレオチド内へのマーカー基の酵素的取り込みのための異なる核酸塩基7-dN-G、C、7-dN-A及びTにおける官能基(R) (例えば、アルデヒド官能化基)の好ましい付着部位を示す。

【図2】図2は、核酸の固相合成のためのアルデヒド官能化ヌクレオシド構成単位の合成の概略図である。

【図3a】図3aは、核酸の酵素合成のためのアセタール(保護されたアルデヒド)官能化ヌクレオシド三リン酸の合成の概略図である。図3で示された化合物は、PCRによるDNA中への効率的取り込みに適する。

【図3b】図3bは、DNAにおける効率的なクリックケミストリーのためのアルキン官能化ヌクレオシド三リン酸の一例を示す。式中、nは0~4であることが好ましい。図3で示された化合物は、PCRによるDNA中への効率的取り込みに適する。

【図3c】図3cは、保護されたアルデヒド官能化三リン酸の一例を示す。図3で示された化合物は、PCRによるDNA中への効率的取り込みに適する。

【図4】図4は、トレンス試薬をアルデヒド修飾塩基と接触させることによる金属化反応の結果を示す。(1) 参照用糖溶液、(2) アルデヒド修飾基を1つ有するDNA、(3) アルデヒド基を2つ有するDNA、及び(4) 非修飾DNA。

【図5】図5は、(I) 銀で染色したプライマー伸長産物(a)又は標準的な蛍光色素を用いたプライマー伸長産物(b)、及び(II) 蛍光色素(a)又は銀(b)で染色した2142bpのPCR産物を示す。I.1a: プライマー伸長におけるアルデヒド修飾したTTP、I.1b: プライマー伸長におけるアセタール修飾したTTP、I.3a: 非修飾DNA。銀染色はレーン1及び2でのみ陽性。I.1b~3b: 非特異的に蛍光色素で染色した同一のゲル。II.2a: PCRにおけるアセタール修飾したTTP、M: マーカー、II.1b: PCRにおけるアルデヒド修飾したTTP、2: PCRにおけるアセタール修飾したTTP、II.3b: 非修飾DNA。

【図6】図6は、単一のアルデヒド官能基を含む合成DNA分子を用いた希釈系列の結果を

示す(銀染色により検出)。

【図7】図7は、アセタール(保護されたアルデヒド)官能基を有する異なる核酸塩基を持つヌクレオシドの例を示す。これらは、核酸の化学合成のための対応するホスホロアミダイト、H-ホスホネート又はトリエステルに変換することができ、或いは核酸の酵素的取り込みのための5'-三リン酸に変換することができる。

【図8】図8は、還元的アミノ化を介した金属化に代わる手段としての蛍光タグをもつアルデヒド修飾されたDNA又はPNAの誘導体化を示す。

【図9】図9は、アルキン修飾された(a, b)、アザイド修飾された(c)、並びに保護されたアルデヒドで修飾された(d, e)ヌクレオシド及びヌクレオチドモノマーを示す。式中、nは0~4であることが好ましい。

【図10】図10は、アルキン官能化ヌクレオシド及びヌクレオシド三リン酸の合成の概略図である。

【図11】図11は、保護されたアルデヒド基を含むアザイド官能化デンドリマーの合成の概略図である。

【図12】図12は、アルキン修飾若しくはアザイド修飾されたヌクレオチド又は核酸を用いるクリック反応のマーカ―又はマーカ―前駆体基を有するアザイド誘導体並びにアルキンアザイド誘導体の例を示す。

【図13】図13は、上部において、修飾塩基2(図9b)及びクリックパートナーとしてのフルオレセインアザイド(m: 495)を含むオリゴヌクレオチドを用いたクリック反応物のMALDI-TOF解析、及び下部において、化合物2のモノマー及びフルオレセインアザイドで修飾したDNAのクリック反応物のゲル電気泳動を示す。A1: 蛍光イメージ; レーン1: クリック反応前の出発物質、2, 3: 未加工の反応混合物、4: クリック条件下のアザイド。A2: SYBR Greenで染色した同一ゲル。B1: レーン1, 2: 未加工の反応混合物、3: 出発物質。B2: SYBR Greenで染色した同一ゲル。

【図14】図14は、DNA中にクマリンアザイドを導入するクリック反応が蛍光産物を生じることを示す(右反応チューブ)。

【図15】図15は、(a)アルキン修飾されたホスホロアミダイト、(b)アルキン修飾されたヌクレオシド、及び(c)アザイド修飾されたガラクトースを示す。

【図16】図16は、化合物8、dATP、dCTP及びdGTPを200 μ M、サッカロミセス・セレビシアエ(*S. cerevisiae*)499由来のゲノムDNAを0.05 μ g、マグネシウム添加した10 $\times$ ポリメラーゼバッファー、各プライマーを0.3 mM、並びにポリメラーゼを1.25U用いたPCRアッセイを示す。レーン1) Ventポリメラーゼ、2) Vent(exo⁻)ポリメラーゼ、3) Pwoポリメラーゼ、4) Taq(exo⁻)ポリメラーゼ(Roche製)、5) Terminatorポリメラーゼ、6) Taqポリメラーゼ(Promega製)、及び7) マーカ―。

【図17】図17は、修飾された三リン酸化合物1又は8(図10)でdTTPを置換した2142 bpのDNAのPCR増幅を示す。アガロースゲル(2%)を使用し、エチジウムブロマイドで染色した。PCRを総計35サイクル行い、各インキュベーション時間は45秒とした。レーン1) NEB社2-log DNAラダー(0.1~10.0kb)、レーン2) ネガティブコントロール(-dTTP)、レーン3) 基質(1)でdTTPを置換した、レーン4) 基質(8)でdTTPを置換した、及びレーン5) ポジティブコントロール(dTTPを用いた)。

【図18】図18は、HPLCクロマトグラムを示す: (a) 図10の三リン酸化合物8を取り込んだPCR断片(318mer)の酵素消化物; (b) dTTPを取り込んだPCR断片の酵素消化物; (c) 図10のヌクレオシド7。

【図19】図19は、三リン酸化合物1及び2を取り込んだ318bpのPCR断片の希釈系列と、それに続く「ゲル上」クリックと銀染色を示す。(a) 化合物1を取り込んだPCR断片の希釈系列(レーン1: 7.0ng、レーン2: 3.5ng、レーン3: 1.3ng、レーン4: 0.7ng)及び化合物2を取り込んだPCR断片の希釈系列(レーン5: 7.0ng、レーン6: 3.5ng、レーン7: 1.3ng、レーン8: 0.7ng)をTBE-ウレアPAAGゲルで泳動した。ゲルをアザイド3を用いた「ゲル上」クリックに供し、その後、銀染色に供した。(b) 化合物2を取り込んだPCR断片の希釈系列の比較検出: (i) 選択的銀染色法による((a)に従って)、

10

20

30

40

50

及び(ii) SYBR green IIによる(レーン1:7ng、レーン2:3.5 ng、レーン3:1.3 ng、レーン4:0.9 ng、レーン5:0.5 ng、レーン6:0.3 ng)。(c)化合物2を取り込んだPCR断片の希釈系列(レーン1:7ng、レーン2:3.5 ng、レーン3:1.3 ng、レーン4:0.9 ng、レーン5:0.5 ng、レーン6:0.3 ng)及び化合物2を取り込んだPCR断片の希釈系列(レーン1:7.0ng、レーン2:3.5ng、レーン3:1.3ng、レーン4:0.7ng)をTBE-ウレアPAAGゲルで泳動した。その後、ゲルをアルデヒド修飾されたアザイド4を用いた「ゲル上」クリッキングに供し、その後、銀染色に供した。(d)化合物2を取り込んだPCR断片の希釈系列(レーン1:7ng、レーン2:3.5 ng、レーン3:1.3 ng、レーン4:0.9 ng、レーン5:0.5 ng、レーン6:0.3 ng)をTBE-ウレアPAAGゲルで泳動した。その後、ゲルをアルデヒド修飾されたアザイド5を用いた「ゲル上」クリッキングに供し、その後、銀染色に供した。

10

【図20-1】図20は、AFM像:銀染色条件に曝露後の天然DNA(a)及びアルデヒド修飾されたDNA(b)、並びに銀染色後、現像なし(c)、2分間の現像(d)及び2分間の現像を2回(e)行った後のアルデヒド修飾されたDNAを示す。

【図20-2】図20-1の続きである。

【図20-3】図20-2の続きである。

【図21】図21は、白黒写真の原理を利用した分析物(例えばDNA分析物)の検出方法の概念図である。配列選択的プライマーの存在下でのDNA分析物の最初の複製により、増感体(S)でタグ化された標的配列が生じる。照射後、それに続く写真現像により、例えば印画紙のような感光媒体上で分析物を検出することができる。

20

【図22】図22は、シアニン色素(1)~(3)を示す。(a)シアニン色素1;(b)シアニン色素2;及び(c)シアニン色素3を用い、520nmのカットオフフィルターを装備したオーバーヘッドプロジェクターの光源で10秒間照射したシアニン色素の希釈系列、又は(d)シアニン色素1;(e)シアニン色素2;及び(f)シアニン色素3を用い、赤外線ランプで5分間照射したシアニン色素の希釈系列。スポット実験は、以下の希釈に対応する。スポット1: 1×10^{-11} mol、スポット2: 1×10^{-12} mol、スポット3: 3×10^{-13} mol、スポット4: 1×10^{-13} mol、スポット5: 3×10^{-14} mol、スポット6: 1×10^{-14} mol、スポット7: 3×10^{-15} mol、スポット8: 1×10^{-15} mol、スポット9: 3×10^{-16} mol、スポット10: 1×10^{-16} mol。

【図23】図23は、オリゴデオキシリボヌクレオチドODN-1(5'-GCG ATT CGT TCG TCG C-3')、ODN-2(5'-CGC GAA TGA ACA GCG C-3')及びODN-3(5'-GCG ACC GAT TCG C-3')のスポットテストを示す。いずれも50nmolで、(a)高エネルギー照射とカットオフフィルター(520nm);及び(b)赤外線ランプを用いた長期曝露(5分間)による低エネルギー照射を用いて行った。

30

【図24】図24は、シアニン色素Cy5及びCy5.5を示す。ODNに連結したシアニン色素の希釈系列について、(a)ODN-4(5'-Cy5-GCG CTG TTC ATT CGC G-3'); (b)ODN-5(5'-Cy5.5-GCG CTG TTC ATT CGC G-3')を520nmカットオフフィルターを装備したオーバーヘッドプロジェクターランプを用いた10秒間の照射に、又は(c)ODN-4;(d)ODN-5を赤外線ランプによる5分間の照射に供した。スポット実験は、以下の希釈に対応する。スポット1: 1×10^{-11} mol、スポット2: 3×10^{-12} mol、スポット3: 1×10^{-12} mol、スポット4: 3×10^{-13} mol、スポット5: 1×10^{-13} mol、スポット6: 3×10^{-14} mol、スポット7: 1×10^{-14} mol、スポット8: 3×10^{-15} mol。

40

【図25】図25は、「クリック及び撮影(Click and photograph)」法の工程の概念図である。目的の配列(例えば遺伝子)を具体的に選択し、アルキン修飾された三リン酸(dU*TP)及び遺伝子選択的プライマーを用いたPCRを介して増幅する。これらのアルキン官能基を、光増感DNAハイブリッドを産生する適当な感光物質(S)を用いたクリックケミストリーを介してタグ化することができる。印画紙上の試料への照射、及びそれに続く現像により、超高感度かつ遺伝子特異的検出のための新規の方法が提供される。

【図26】図26は、シトシン特異的化学修飾によるDNAのメチル化パターンを同定するための方法の概略図である。DNA分析物を、シトシン(又はメチルシトシン)特異的修飾

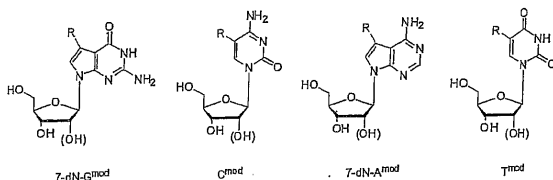
50

剤(例えばヒドロキシルアミン)と、好ましくは部分的に修飾されたシトシン残基(C^*)を提供するために準化学量論的量で、反応させる。アルキン修飾された塩基を用いたプライマー伸長反応を行う。この反応は、修飾されたシトシン残基で終わる。その結果、特有の長さをもった伸長産物の「ラダー」が生じる。プライマー伸長産物を、例えばゲル上で分離した後、アザイド修飾されたマーカー基(例えば修飾された糖)を用いたクリック反応、及びその後のマーカー基の検出(例えば、銀染色を介して)を行う。DNA試料のメチル化パターンを、メチル化されたDNA試料由来の伸長産物と、同一処理に供したメチル化されていないDNA試料由来の伸長産物とを比較することによって測定することができる。

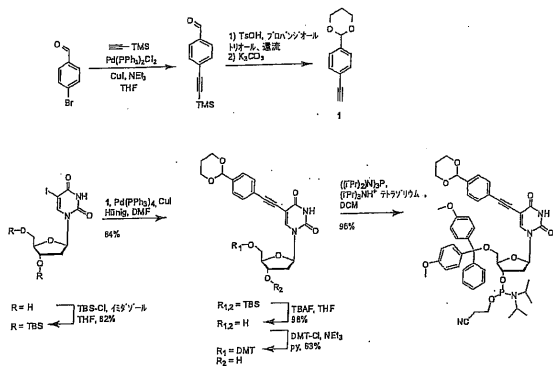
【図27】図27は、感光媒体における分子ビーコン検出法の概略図である。蛍光基(F)及び消光基(Q)を有するレポーター分子を示す。分析物がない状態では、レポーター分子はヘアピン構造をとり、蛍光は消光されている。分析物が存在する場合、消光基は蛍光基から引き離され、その結果、蛍光基は非消光状態(F^*)となる。試料を、印画紙又は他の感光性物質等の写真媒質の存在下で照射し、現像する。

10

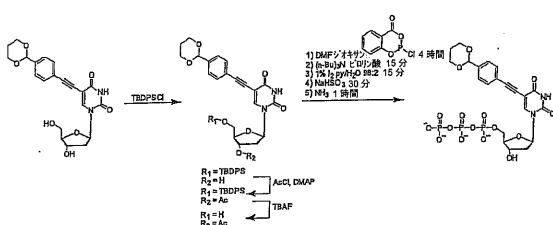
【図1】



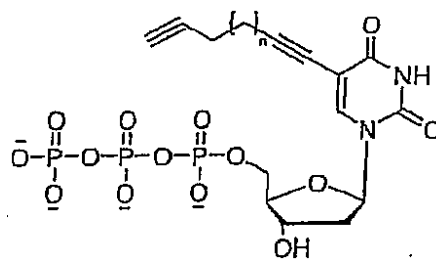
【図2】



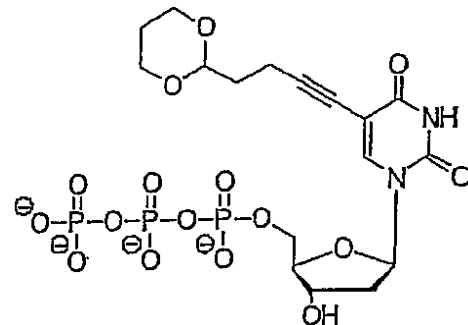
【図3a】



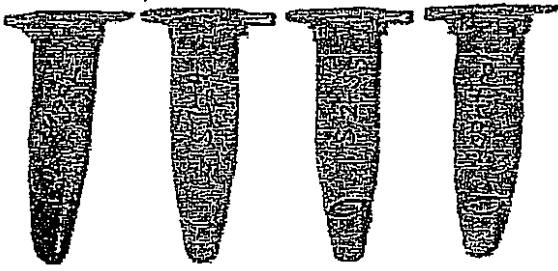
【図3b】



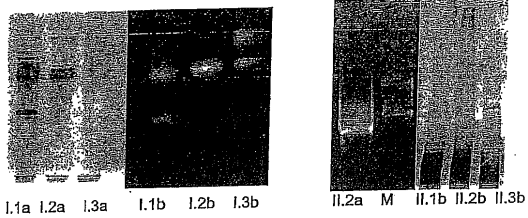
【図3c】



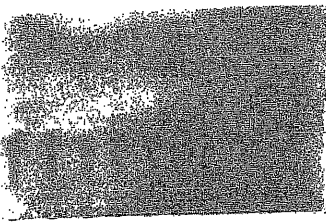
【図 4】



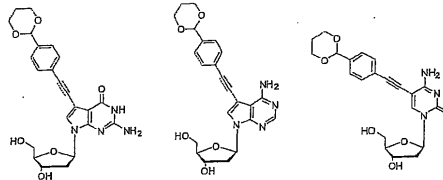
【図 5】



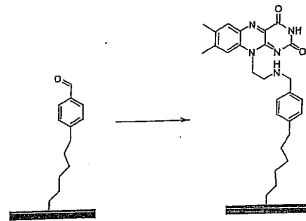
【図 6】



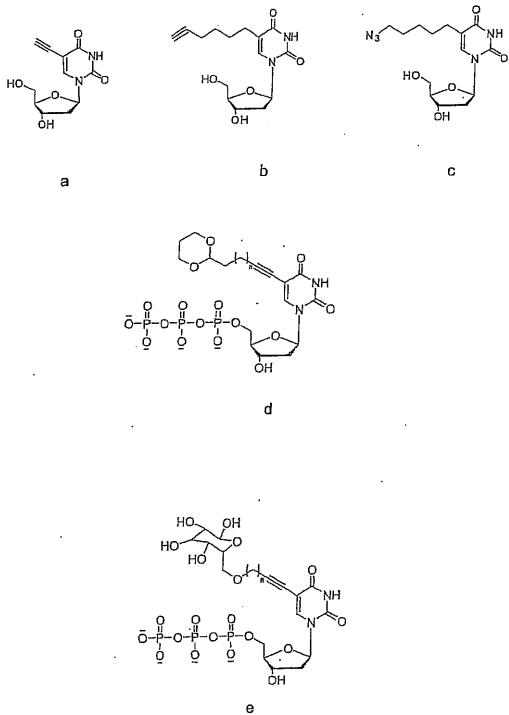
【図 7】



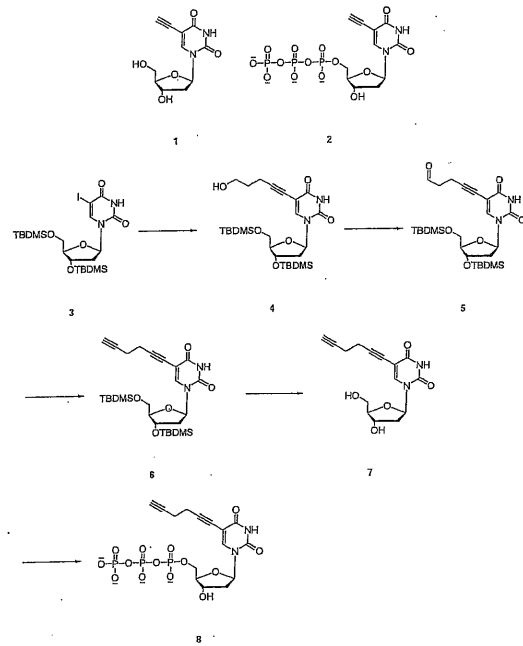
【図 8】



【図 9】



【図 10】

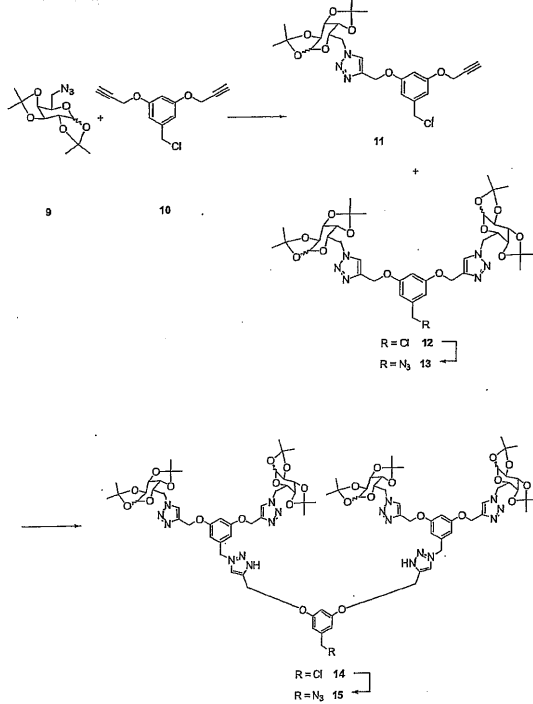


スキーム 1

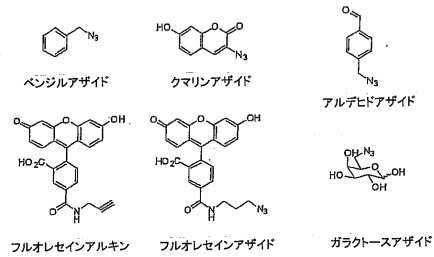
【図 1 1】

デンドリマー合成

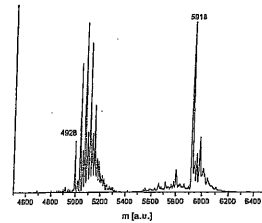
化合物 9(参考文献 26) 及び脱保護された糖(参考文献 27) の調製については既に報告されている。



【図 1 2】



【図 1 3】



フルオレseinクリック

A1



CYBR による一般的染色

A2



フルオレseinクリック

B1

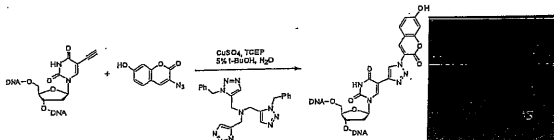


CYBR による一般的染色

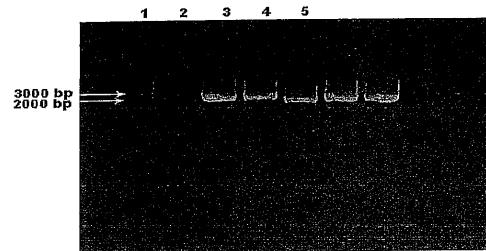
B2



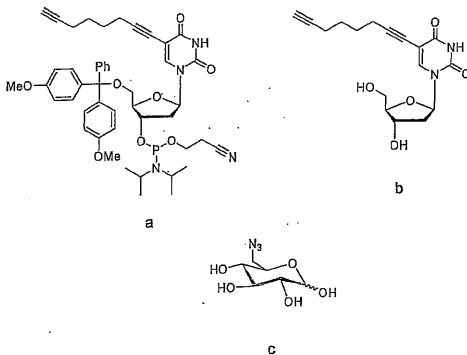
【図 1 4】



【図 1 7】



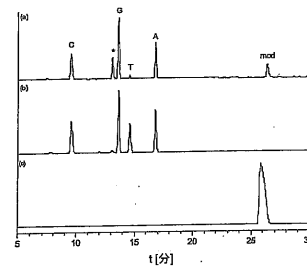
【図 1 5】



【図 1 8】

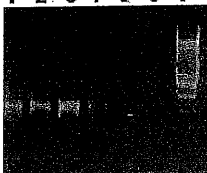
HPLC
ピーク同定

9.5 分 シチジン
13.1 分 イノシン(蛇毒の副産物として)
13.6 分 グアノシン
14.6 分 テミジン
16.7 分 アデノシン
26.3 分 化合物 7



【図 1 6】

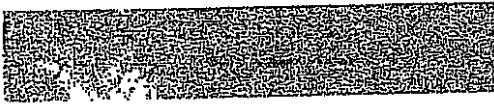
1 2 3 4 5 6 7



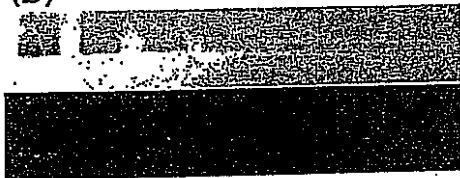
← 500 bp
← 300 bp

【図 19】
希釈系列

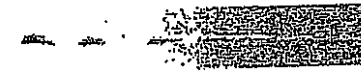
(a)



(b)



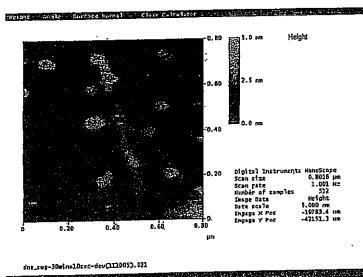
(c)



(d)

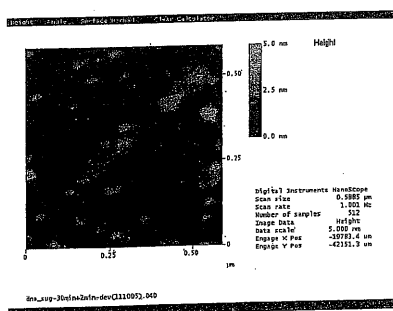


【図 20 - 2】
20c



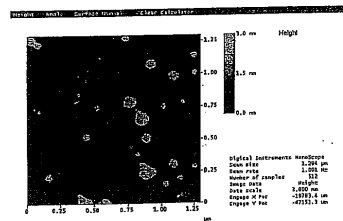
現像なしの銀染色後の糖修飾された DNA

20d



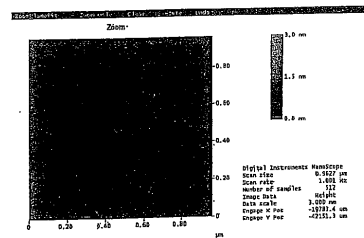
銀染色及び 2 分間の現像後の糖修飾された DNA

【図 20 - 1】
20a



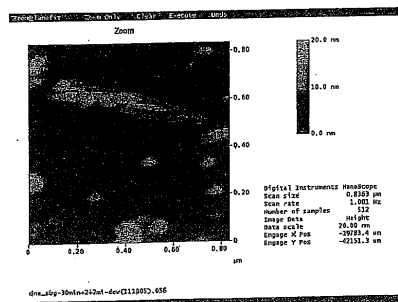
銀染色条件に DNA を曝露した後の天然 DNA

20b



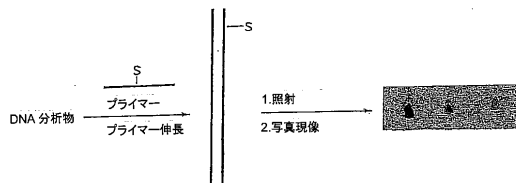
糖修飾された DNA

【図 20 - 3】
20e

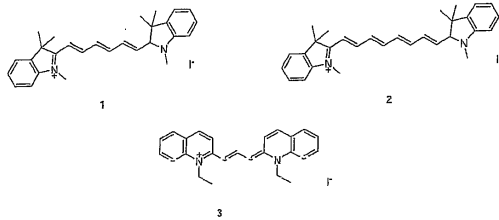


銀染色及び 2 分間 2 回の現像後の糖修飾された DNA

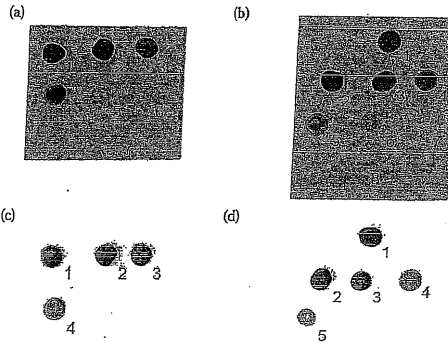
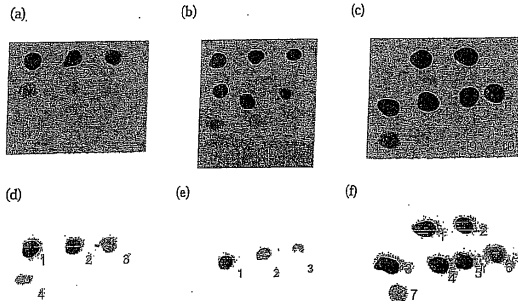
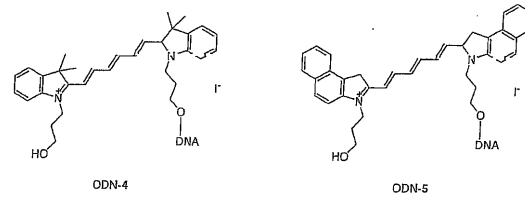
【図 21】



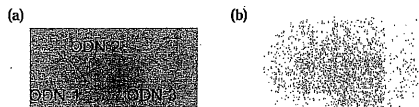
【図 2 2】



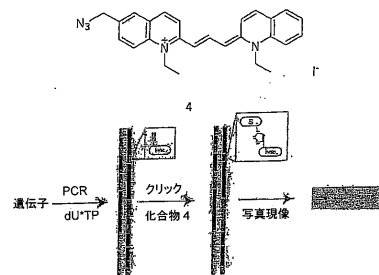
【図 2 4】



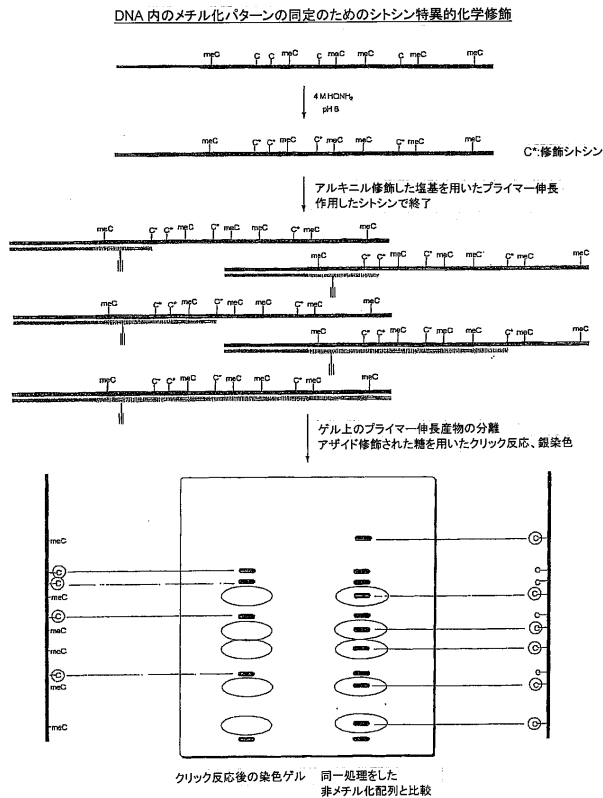
【図 2 3】



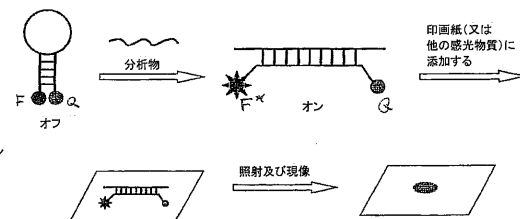
【図 2 5】



【図 2 6】



【図 2 7】



【配列表】

0004944098000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

(31)優先権主張番号 05027370.5

(32)優先日 平成17年12月14日(2005.12.14)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(31)優先権主張番号 60/750,100

(32)優先日 平成17年12月14日(2005.12.14)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 カレル, トーマス

ドイツ連邦共和国 8 2 1 5 2 クライリング, ヘルプストヴェーク 1 3

(72)発明者 シュヴェーグラー, アンヤ

ドイツ連邦共和国 6 8 1 6 5 マンハイム, ハインリッヒ・ランツ・シュトラッセ 3

(72)発明者 ブルレイ, グレン, アシュレイ

ドイツ連邦共和国 8 0 8 0 1 ミュンヘン, アインミレルシュトラッセ 3 6

(72)発明者 ギーアリヒ, ヨハンネス

ドイツ連邦共和国 8 1 3 6 9 ミュンヘン, パッサオ・アーシュトラッセ 3 5

(72)発明者 モフィド, モハメド, レーザ

ドイツ連邦共和国 8 1 2 4 2 ミュンヘン, トラオンゼーシュトラッセ 3 3

審査官 横田 倫子

(56)参考文献 国際公開第1 9 8 9 / 0 0 2 4 7 5 (WO, A 1)

国際公開第2 0 0 3 / 1 0 1 9 7 2 (WO, A 1)

国際公開第0 1 / 0 4 2 5 0 5 (WO, A 1)

Nucleosides Nucleotides, 15 (1996) p.1287-1305

J Am Chem Soc., 125 (2003) p.11545-11552

J Am Chem Soc., 125 (2003) p.9588-9589

Angew Chem Int Ed Engl., 40[11] (2001) p.2004-2021

Org Biol Chem, 2 (2004) p.2103-2112

Bioorganic Medicinal Chemistry Lett., 6[1] (1996) p.39-42

Bull Chem Soc Jpn., 59 (1986) p.1915-1919

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/68

C12N 15/00-15/90

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed