

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-137628

(P2019-137628A)

(43) 公開日 令和1年8月22日(2019.8.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7H 21/04 (2006.01)	CO7H 21/04 Z N A A	4 C O 5 7
CO7H 21/02 (2006.01)	CO7H 21/02	
C12N 15/11 (2006.01)	C12N 15/11 Z	

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2018-21090 (P2018-21090)	(71) 出願人	504139662 国立大学法人名古屋大学 愛知県名古屋市千種区不老町1番
(22) 出願日	平成30年2月8日(2018.2.8)	(74) 代理人	110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
		(72) 発明者	浅沼 浩之 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大 学法人名古屋大学内
		(72) 発明者	村山 恵司 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大 学法人名古屋大学内
		(72) 発明者	栗木 琢実 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大 学法人名古屋大学内
		Fターム(参考)	4C057 AA18 BB05 DD01 MM02 MM04 MM05

(54) 【発明の名称】 ポリヌクレオチドの連結方法

(57) 【要約】

【課題】人工ポリヌクレオチドのより効率的な連結技術を提供すること。

【解決手段】(A)少なくとも一方の末端がaTNA又はSNAである一本鎖ポリヌクレオチドAと、(B)1種以上の一本鎖ポリヌクレオチドBとを、(C) 鋳型ポリヌクレオチドCと(D1) イミダゾール及びハロゲン化シアン、並びに/又は(D2) 1-シアノイミダゾールとの存在下で反応させること。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (A) 少なくとも一方の末端がaTNA又はSNAである一本鎖ポリヌクレオチドAと、
 (B) 一本鎖ポリヌクレオチドBとを、
 (C) 鋳型ポリヌクレオチドCと
 (D1) イミダゾール及びハロゲン化シアン、並びに / 又は
 (D2) 1-シアノイミダゾールと

の存在下で反応させる工程を含む、ポリヌクレオチドの連結方法。

【請求項 2】

前記一本鎖ポリヌクレオチドBにおける一本鎖ポリヌクレオチドAとの連結対象末端が、aTNA、SNA、DNA、又はRNAである、請求項 1 に記載の連結方法。 10

【請求項 3】

前記一本鎖ポリヌクレオチドBにおける一本鎖ポリヌクレオチドAとの連結対象末端が、aTNA又はSNAである、請求項 1 又は 2 に記載の連結方法。

【請求項 4】

前記鋳型一本鎖ポリヌクレオチドCが、aTNA、SNA、DNA、及びRNAからなる群より選択される少なくとも1種を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の連結方法。

【請求項 5】

前記反応が (E) 二価金属イオンの存在下で行われる、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の連結方法。 20

【請求項 6】

前記二価金属イオンが、亜鉛イオン、及びマンガンイオンからなる群より選択される少なくとも1種である、請求項 5 に記載の連結方法。

【請求項 7】

前記反応が中性域で行われる、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の連結方法。

【請求項 8】

前記反応が、前記一本鎖ポリヌクレオチドA又はBと前記鋳型ポリヌクレオチドCとの二本鎖ポリヌクレオチドのT_m値よりも5 以上低温で行われる、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の連結方法。

【請求項 9】 30

- (A) 少なくとも一方の末端がaTNA又はSNAである一本鎖ポリヌクレオチドAと、
 (B) 一本鎖ポリヌクレオチドBとを、
 (C) 鋳型ポリヌクレオチドCと
 (D1) イミダゾール及びハロゲン化シアン、並びに / 又は
 (D2) 1-シアノイミダゾールと

の存在下で反応させる工程を含む、ポリヌクレオチドの製造方法。

【請求項 10】

- (D1) イミダゾール及びハロゲン化シアン、並びに / 又は
 (D2) 1-シアノイミダゾール

を含む、 40

- (A) 少なくとも一方の末端がaTNA又はSNAである一本鎖ポリヌクレオチドAと、
 (B) 一本鎖ポリヌクレオチドBと

の連結用試薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ポリヌクレオチドの連結方法等に関する。

【背景技術】

【0002】

DNAやRNA等のポリヌクレオチドを連結するライゲーション反応は、長鎖ポリヌクレオチ 50

ドを調製する方法として必須である。従来のライゲーションは天然のDNAやRNAが主な対象のため、T4リガーゼ等の酵素が主に活用されてきた。一方で、非特許文献1では、イミダゾールとハロゲン化シアンを用いる化学ライゲーション法も検討されているが、そのライゲーション効率は低いものであった。

【0003】

一方、近年、医薬等での利用を促進すべく、aTNA、SNA、LNA、PNA、GNA等の各種人工ポリヌクレオチドが開発されている（特許文献1）。しかしながら、これらの人工ポリヌクレオチドの連結技術については、報告されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開2016-130232号公報

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Biochemistry, 1986, 25(23), pp 7423-7430.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、人工ポリヌクレオチドのより効率的な連結技術を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者は上記課題に鑑みて鋭意研究を進めた結果、(A)少なくとも一方の末端がaTNA又はSNAである一本鎖ポリヌクレオチドAと、(B)一本鎖ポリヌクレオチドBとを、(C)鑄型ポリヌクレオチドCと(D1)イミダゾール及びハロゲン化シアン、並びに/又は(D2)1-シアノイミダゾールとの存在下で反応させることにより、人工部分を含むポリヌクレオチドを効率的に連結できることを見出した。この知見に基づいて更に研究を進めた結果、本発明が完成した。

【0008】

即ち、本発明は、下記の態様を包含する。

【0009】

項1. (A)少なくとも一方の末端がaTNA又はSNAである一本鎖ポリヌクレオチドAと、(B)一本鎖ポリヌクレオチドBとを、(C)鑄型ポリヌクレオチドCと(D1)イミダゾール及びハロゲン化シアン、並びに/又は(D2)1-シアノイミダゾールとの存在下で反応させる工程を含む、ポリヌクレオチドの連結方法。

【0010】

項2. 前記一本鎖ポリヌクレオチドBにおける一本鎖ポリヌクレオチドAとの連結対象末端が、aTNA、SNA、DNA、又はRNAである、項1に記載の連結方法。

【0011】

項3. 前記一本鎖ポリヌクレオチドBにおける一本鎖ポリヌクレオチドAとの連結対象末端が、aTNA又はSNAである、項1又は2に記載の連結方法。

【0012】

項4. 前記鑄型一本鎖ポリヌクレオチドCが、aTNA、SNA、DNA、及びRNAからなる群より選択される少なくとも1種を含む、項1～3のいずれかに記載の連結方法。

【0013】

項5. 前記反応が(E)二価金属イオンの存在下で行われる、項1～4のいずれかに記載の連結方法。

【0014】

項6. 前記二価金属イオンが、亜鉛イオン、及びマンガンイオンからなる群より選択される少なくとも1種である、項5に記載の連結方法。

10

20

30

40

50

【0015】

項7. 前記反応が中性域で行われる、項1～6のいずれかに記載の連結方法。

【0016】

項8. 前記反応が、前記一本鎖ポリヌクレオチドA又はBと前記鑄型ポリヌクレオチドCとの二本鎖ポリヌクレオチドのTm値よりも5以上低温で行われる、項1～7のいずれかに記載の連結方法。

【0017】

項9. (A)少なくとも一方の末端がaTNA又はSNAである一本鎖ポリヌクレオチドAと、(B)一本鎖ポリヌクレオチドBとを、(C)鑄型ポリヌクレオチドCと(D1)イミダゾール及びハロゲン化シアン、並びに/又は(D2)1-シアノイミダゾールとの存在下で反応させる工程を含む、ポリヌクレオチドの製造方法。

10

【0018】

項10. (D1)イミダゾール及びハロゲン化シアン、並びに/又は(D2)1-シアノイミダゾールを含む、(A)少なくとも一方の末端がaTNA又はSNAである一本鎖ポリヌクレオチドAと、(B)一本鎖ポリヌクレオチドBとの連結用試薬。

【発明の効果】

【0019】

本発明によれば、aTNA又はSNAを含む人工一本鎖ポリヌクレオチドと他の一本鎖ポリヌクレオチドとを効率的に連結することができる。

【図面の簡単な説明】

20

【0020】

【図1】試験例1の連結反応試験の電気泳動結果を示す。各レーンの上方にレーン番号を示し、各レーンの下に、各一本鎖ポリヌクレオチド及びBrCNの有無(+/-)を示す。

【図2】試験例2の連結反応試験の電気泳動結果を示す。各レーンの下に、インキュベーション温度を示す。

【図3】試験例3の連結反応試験の電気泳動結果を示す。各レーンの下に、反応液中の二価金属イオンを示す。

【図4】試験例4の連結反応試験の電気泳動結果を示す。各レーンの上方にレーン番号及び連結対象の一本鎖ポリヌクレオチドを示し、各レーンの下に、鑄型一本鎖ポリヌクレオチドを示す。

30

【図5】本発明の連結方法における、一本鎖ポリヌクレオチドA、一本鎖ポリヌクレオチドB、及び鑄型ポリヌクレオチドCの関係を表す概略図を示す。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本明細書中において、「含有」及び「含む」なる表現については、「含有」、「含む」、「実質的にからなる」及び「のみからなる」という概念を含む。

【0022】

1. ポリヌクレオチドの連結方法

本発明は、(A)少なくとも一方の末端がaTNA又はSNAである一本鎖ポリヌクレオチドAと、(B)一本鎖ポリヌクレオチドBとを、(C)鑄型ポリヌクレオチドCと(D1)イミダゾール及びハロゲン化シアン、並びに/又は(D2)1-シアノイミダゾールとの存在下で反応させる工程を含む、ポリヌクレオチドの連結方法(本明細書において、「本発明の連結方法」と表記することもある。)に関する。以下にこれについて説明する。

40

【0023】

<1-1. 一本鎖ポリヌクレオチドA>

aTNA (acyclic Threoninol Nucleic Acid) 及びSNA (Serinol Nucleic Acid) は人工核酸として知られているものであり、特に制限されない。aTNAには、互いに異性体の関係にある2種、L-aTNAとD-aTNAが含まれる。これらの中でも、好ましくはL-aTNA、SNAが挙げられ、より好ましくはL-aTNAが挙げられる。

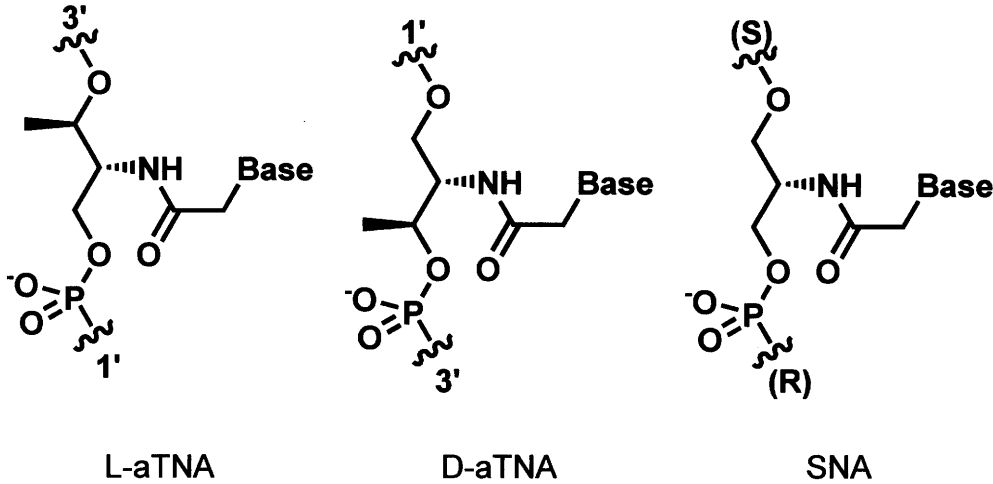
【0024】

50

L-aTNA、D-aTNA、及びSNAの典型的な構成単位（ヌクレオチドに対応する構成単位）の具体例を以下に示す。

【0025】

【化1】



10

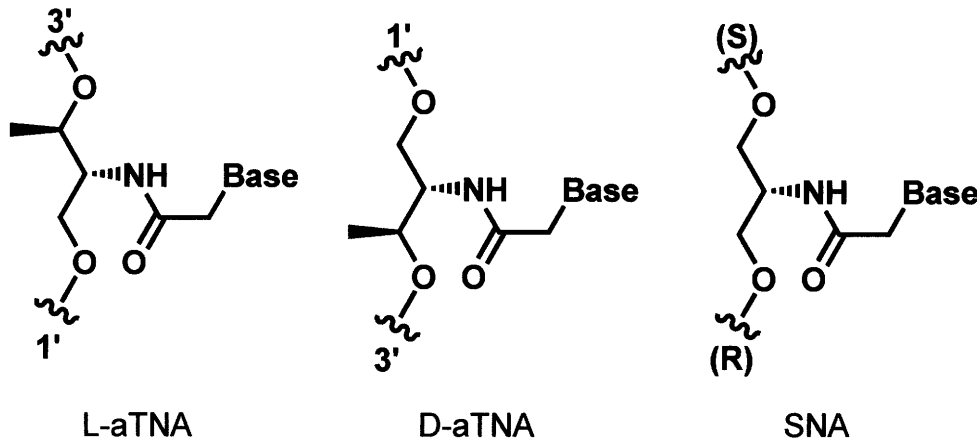
【0026】

L-aTNA、D-aTNA、及びSNAの典型的な構成単位（ヌクレオチドに対応する構成単位）の具体例を以下に示す。

20

【0027】

【化2】



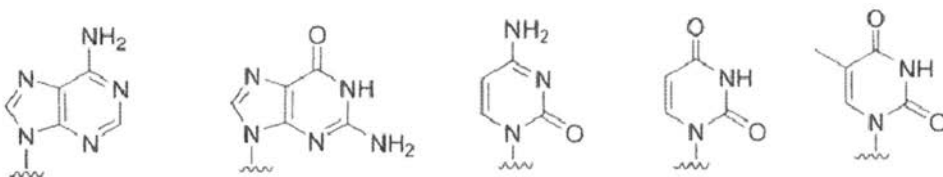
30

【0028】

上記具体例中、Baseは核酸を構成する塩基を示す。該塩基として、例えば、アデニン、グアニン、シトシン、ウラシル、チミン等が挙げられる。より具体的には、Baseとしては、以下に示す基が挙げられる。

【0029】

【化3】



40

【0030】

また、上記以外にも、人工核酸、例えば2,6-ジアミノプリン、G-Clamp等も挙げられる。

【0031】

一本鎖ポリヌクレオチドAにおいては、2つの末端の内、少なくとも一方の末端がaTNA又

50

はSNAである、より具体的には、少なくとも一方の末端における構成単位がaTNA又はSNAである。本発明の連結方法においては、aTNA又はSNAである末端が、後述に説明する一本鎖ポリヌクレオチドBとの連結対象末端となる。

【0032】

限定的な解釈を望むものではないが、本発明の連結方法においては、(D1)イミダゾール及びハロゲン化シアン、並びに/又は(D2)1-シアノイミダゾールを用いた反応において、末端のaTNA又はSNAが環状構造を含まない鎖状構造であることに起因する構造の柔軟性が、連結効率の向上に寄与していると考えられる。

【0033】

なお、aTNA又はSNAである「末端」の構成単位の数(塩基数)は、特に制限されず、例えば1~2、1~3、1~5、1~8である。本明細書において、最も末端の構成単位のこと、すなわちaTNA又はSNAである「末端」の構成単位の数(塩基数)が1である場合の当該構成単位のことを、「最末端」の構成単位と示す。

【0034】

aTNA又はSNAである末端の構成単位の数(塩基数)が一本鎖ポリヌクレオチドAの構成単位の数(塩基数)に占める割合は、例えば5%以下、10%以下、30%以下である。

【0035】

aTNA又はSNAである末端において、構成単位は同一であることが好ましい。すなわち、該末端を構成する構成単位が、全てL-aTNAであること、全てD-aTNAであること、又は全てSNAであることが好ましい。

【0036】

一本鎖ポリヌクレオチドAにおいて、aTNA又はSNAである末端以外の構成単位は、特に制限されず、天然核酸、aTNA及びSNAを含む各種人工核酸の構成単位を採用することができる。採用し得る核酸として、具体的には、DNA、RNA等の他にも、次に例示するように、公知の化学修飾が施されたものであってもよい。ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、各ヌクレオチドのリン酸残基(ホスフェート)を、例えば、ホスホロチオエート(PS)、メチルホスホネート、ホスホロジチオネート等の化学修飾リン酸残基に置換することができる。また、各リボヌクレオチドの糖(リボース)の2位の水酸基を、-OR(Rは、例えばCH₃(2'-O-Me)、CH₂CH₂OCH₃(2'-O-MOE)、CH₂CH₂NHC(NH)NH₂、CH₂CO NHCH₃、CH₂CH₂CN等を示す)に置換してもよい。さらに、塩基部分(ピリミジン、プリン)に化学修飾を施してもよく、例えば、ピリミジン塩基の5位へのメチル基やカチオン性官能基の導入、あるいは2位のカルボニル基のチオカルボニルへの置換などが挙げられる。さらには、リン酸部分やヒドロキシル部分が、例えば、ピオチン、アミノ基、低級アルキルアミン基、アセチル基等で修飾されたものなどを挙げることができるが、これに限定されない。また、ヌクレオチドの糖部の2'酸素と4'炭素を架橋することにより、糖部のコンフォメーションをN型に固定したものであるBNA(LNA)等もまた、好ましく用いられ得る。

【0037】

一本鎖ポリヌクレオチドAにおいて、aTNA又はSNAである末端以外の構成単位は、1種単独であってもよいし、2種以上の組み合わせであってもよい。

【0038】

一本鎖ポリヌクレオチドAにおいて、aTNA又はSNAである末端以外の構成単位も、全てaTNA又はSNAであることが好ましい。すなわち、一本鎖ポリヌクレオチドAの構成単位は、全てaTNA又はSNAであることが好ましい。この場合も、末端の場合と同様に、構成単位は同一であることが好ましい。すなわち、一本鎖ポリヌクレオチドAを構成する構成単位が、全てL-aTNAであること、全てD-aTNAであること、又は全てSNAであることが好ましい。

【0039】

一本鎖ポリヌクレオチドAにおける、一本鎖ポリヌクレオチドBとの連結対象である最末端、又は後述の一本鎖ポリヌクレオチドBにおける、一本鎖ポリヌクレオチドAとの連結対象である最末端は、リン酸基である。好ましくは、両者のいずれか一方のみがリン酸基で

10

20

30

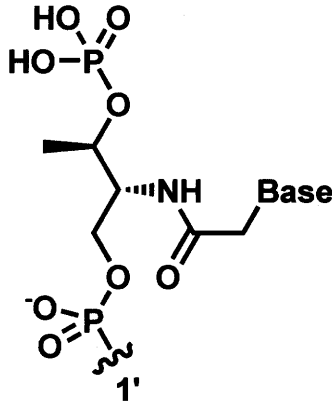
40

50

ある。一方のみがリン酸基である場合、そのリン酸基である側は、両末端のいずれの側でもよい。本発明の好ましい一態様においては、L-aTNAであれば3'側、D-aTNAであれば1'側、SNAであれば(S)側、DNAであれば5'側、RNAであれば5'側が好ましく、その他の核酸の場合は、これらに対応する側が好ましい。最末端のリン酸基を含む構造として、例えば、連結対象である最末端の構成単位がL-aTNAであり、且つ該最末端が3'側である場合の構造を以下に示す。

【0040】

【化4】



10

L-aTNA

20

【0041】

一本鎖ポリヌクレオチドAは、他の分子が連結されたものであってもよい。他の分子としては、特に制限されず、例えば蛍光標識物、ビオチン、アジド、エチニル基等が挙げられる。蛍光標識物としては、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド、テトラメチルローダミン、カルボキシローダミン、フィコエリスリン、6-FAM(商標)、Cy(登録商標)3、Cy(登録商標)5、Alexa Fluor(登録商標)のシリーズ等が挙げられる。

【0042】

一本鎖ポリヌクレオチドAの塩基数は、特に制限されない。該塩基数の下限は、例えば3、好ましくは5、より好ましくは6、さらに好ましくは8である。該塩基数の上限は、例えば10000、5000、3000、1500、1000、500、300、150、100、50、30である。該塩基数の範囲は、例えば3~10000、好ましくは3~1000、より好ましくは5~500、さらに好ましくは5~100である。

30

【0043】

一本鎖ポリヌクレオチドAは、公知の遺伝子工学的手法、人工核酸の製造手法等に従って容易に作製することができる。例えば、PCR、制限酵素切断、核酸連結技術、in vitro 転写・翻訳技術等を利用して作製することができる。

【0044】

<1-2. 一本鎖ポリヌクレオチドB>

一本鎖ポリヌクレオチドBは、一本鎖ポリヌクレオチドAとの連結対象となるポリヌクレオチドである。一本鎖ポリヌクレオチドBにおける、一本鎖ポリヌクレオチドAとの連結対象末端は、一本鎖ポリヌクレオチドAの連結対象末端であるaTNA又はSNAの、もう一方の末端に対応する側となる。例えば、一本鎖ポリヌクレオチドAにおける該末端が3'側L-aTNAであり、且つ一本鎖ポリヌクレオチドBにおける該連結対象末端がL-aTNAである場合、該連結対象末端は1'側である。また、一本鎖ポリヌクレオチドAにおける該末端が1'側L-aTNAであり、且つ一本鎖ポリヌクレオチドにおける該連結対象末端がDNAである場合、該連結対象末端は5'側である。

40

【0045】

一本鎖ポリヌクレオチドBにおいて、構成単位は、特に制限されず、天然核酸、aTNA及

50

びSNAを含む各種人工核酸の構成単位を採用することができる。採用し得る核酸として、具体的には、aTNA、SNA、DNA、RNA等の他にも、次に例示するように、公知の化学修飾が施されたものであってもよい。ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、各ヌクレオチドのリン酸残基（ホスフェート）を、例えば、ホスホロチオエート（PS）、メチルホスホネート、ホスホロジチオネート等の化学修飾リン酸残基に置換することができる。また、各リボヌクレオチドの糖（リボース）の2位の水酸基を、-OR（Rは、例えばCH₃（2'-O-Me）、CH₂CH₂OCH₃（2'-O-MOE）、CH₂CH₂NHC(NH)NH₂、CH₂CONHCH₃、CH₂CH₂CN等を示す）に置換してもよい。さらに、塩基部分（ピリミジン、プリン）に化学修飾を施してもよく、例えば、ピリミジン塩基の5位へのメチル基やカチオン性官能基の導入、あるいは2位のカルボニル基のチオカルボニルへの置換などが挙げられる。さらには、リン酸部分やヒドロキシル部分が、例えば、ピオチン、アミノ基、低級アルキルアミン基、アセチル基等で修飾されたものなどを挙げるができるが、これに限定されない。また、ヌクレオチドの糖部の2'酸素と4'炭素を架橋することにより、糖部のコンフォメーションをN型に固定したものであるBNA（LNA）等もまた、好ましく用いられ得る。

10

【0046】

一本鎖ポリヌクレオチドBにおいて、構成単位は、1種単独であってもよいし、2種以上の組み合わせであってもよい。本発明の好ましい一態様においては、一本鎖ポリヌクレオチドBを構成する構成単位は全て同一の構成単位であること、すなわち一本鎖ポリヌクレオチドBはaTNA、SNA、DNA、RNA等の構成単位の内の1種のみで構成されていることが好ましい。

20

【0047】

一本鎖ポリヌクレオチドBにおける、一本鎖ポリヌクレオチドAとの連結対象末端は、好ましくはaTNA、SNA、DNA、又はRNAである、より具体的には、一本鎖ポリヌクレオチドAとの連結対象末端における構成単位がaTNA、SNA、DNA、又はRNAである。これらの中でも、好ましくはaTNA、SNA、RNAが挙げられ、より好ましくはaTNA、SNAが挙げられ、さらに好ましくはL-aTNA、SNAが挙げられ、よりさらに好ましくはL-aTNAが挙げられる。

【0048】

上記連結対象末端の構成単位の数（塩基数）は、特に制限されず、例えば1~2、1~3、1~5、1~8である。

【0049】

上記連結対象末端の構成単位の数（塩基数）が一本鎖ポリヌクレオチドBの構成単位の数（塩基数）に占める割合は、例えば5%以下、10%以下、30%以下である。

30

【0050】

上記連結対象末端において、構成単位は同一であることが好ましい。すなわち、該末端を構成する構成単位が、全てL-aTNAであること、全てD-aTNAであること、全てSNA、全てDNAであること、又は全てRNAであることが好ましい。

【0051】

一本鎖ポリヌクレオチドBにおいて、上記連結対象末端以外の構成単位も、全てaTNA、SNA、DNA、又はRNAであることが好ましい。すなわち、一本鎖ポリヌクレオチドBの構成単位は、全てaTNA、SNA、DNA、又はRNAであることが好ましい。この場合も、末端の場合と同様に、構成単位は同一であることが好ましい。すなわち、一本鎖ポリヌクレオチドBを構成する構成単位が、全てL-aTNAであること、全てD-aTNAであること、全てSNA、全てDNAであること、又は全てRNAであることが好ましい。

40

【0052】

一本鎖ポリヌクレオチドBは、他の分子が連結されたものであってもよい。他の分子としては、特に制限されず、例えば蛍光標識物、ピオチン、アジド、エチニル基等が挙げられる。蛍光標識物としては、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド、テトラメチルローダミン、カルボキシローダミン、フィコエリスリン、6-FAM（商標）、Cy（登録商標）3、Cy（登録商標）5、Alexa Fluor（登録商標）のシリーズ等が挙げられる。

【0053】

50

一本鎖ポリヌクレオチドBの塩基数は、特に制限されない。該塩基数の下限は、例えば3、好ましくは5、より好ましくは6、さらに好ましくは8である。該塩基数の上限は、例えば10000、5000、3000、1500、1000、500、300、150、100、50、30である。該塩基数の範囲は、例えば3~10000、好ましくは3~1000、より好ましくは5~500、さらに好ましくは5~100である。

【0054】

一本鎖ポリヌクレオチドBは、公知の遺伝子工学的手法、人工核酸の製造手法等に従って容易に作製することができる。例えば、PCR、制限酵素切断、核酸連結技術、in vitro 転写・翻訳技術等を利用して作製することができる。

【0055】

<1-3. 鋳型ポリヌクレオチドC>

鋳型ポリヌクレオチドCは、本発明の連結方法の反応において、一本鎖ポリヌクレオチドA及び一本鎖ポリヌクレオチドBの鋳型（相補鎖）となる限りにおいて特に制限されない。具体的には、鋳型ポリヌクレオチドCは、一本鎖ポリヌクレオチドAと一本鎖ポリヌクレオチドBとがその連結対象末端同士で隣り合って配置された場合に、連結部（一本鎖ポリヌクレオチドAと一本鎖ポリヌクレオチドBとの境目）の両側を含む一定領域の塩基配列に対して、相補的な塩基配列を含む（図5）。

【0056】

「相補的」とは、塩基の完全な相補関係（完全相補的：例えばAとT又はU、及びGとC）のみならず、ストリンジェントな条件でハイブリダイズすることができる程度の相補関係も包含される。ストリンジェントな条件は、Berger and Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, San Diego CA) に教示されるように、核酸の融解温度(T_m)に基づいて決定することができる。例えばハイブリダイズ後の洗浄条件として、通常「1×SSC、0.1%SDS、37℃」程度の条件を挙げることができる。かかる条件で洗浄してもハイブリダイズ状態を維持するものであることが好ましい。特に制限されないが、より厳しいハイブリダイズ条件として「0.5×SSC、0.1%SDS、42℃」程度、さらに厳しいハイブリダイズ条件として「0.1×SSC、0.1%SDS、65℃」程度の洗浄条件を挙げることができる。

【0057】

具体的には、鋳型ポリヌクレオチドCの塩基配列は、連結部の両側を含む一定領域の塩基配列（図5）の完全相補的な塩基配列に対して、例えば85%以上の同一性、好ましくは90%以上の同一性、より好ましくは95%以上の同一性、さらに好ましくは98%以上の同一性、よりさらに好ましくは99%以上の同一性、特に好ましくは100%の同一性を有する塩基配列である。

【0058】

鋳型ポリヌクレオチドCにおいて、連結部から一本鎖ポリヌクレオチドA側の領域に対応する領域（図5：領域A）の塩基数は、特に制限されない。該塩基数の下限は、例えば3、好ましくは5、より好ましくは6、さらに好ましくは8である。該塩基数の上限は、例えば10000、5000、3000、1500、1000、500、300、150、100、50、30である。該塩基数の範囲は、例えば3~10000、好ましくは3~1000、より好ましくは5~500、さらに好ましくは5~1000である。領域Aの塩基数は、一本鎖ポリヌクレオチドAの全塩基数100%に対して、例えば10%以上、好ましくは30%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、よりさらに好ましくは95%以上、特に好ましくは100%である。

【0059】

鋳型ポリヌクレオチドCにおいて、連結部から一本鎖ポリヌクレオチドB側の領域に対応する領域（図5：領域B）の塩基数は、特に制限されない。該塩基数の下限は、例えば3、好ましくは5、より好ましくは6、さらに好ましくは8である。該塩基数の上限は、例えば10000、5000、3000、1500、1000、500、300、150、100、50、30である。該塩基数の範囲は、例えば3~10000、好ましくは3~1000、より好ましくは5~500、さらに好ましくは5~1000である。領域Bの塩基数は、一本鎖ポリヌクレオチドBの全塩基数100%に対して、例えば

10

20

30

40

50

10%以上、好ましくは30%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、よりさらに好ましくは95%以上、特に好ましくは100%である。

【0060】

鋳型ポリヌクレオチドCの塩基数は、特に制限されない。該塩基数の下限は、例えば6、好ましくは10、より好ましくは12、さらに好ましくは16である。該塩基数の上限は、例えば20000、10000、6000、3000、2000、1000、600、300、200、100、60である。該塩基数の範囲は、例えば6~20000、好ましくは6~2000、より好ましくは10~1000、さらに好ましくは10~200である。鋳型ポリヌクレオチドCの塩基数は、一本鎖ポリヌクレオチドAの全塩基数と一本鎖ポリヌクレオチドBの全塩基数の合計数100%に対して、例えば10%以上、好ましくは30%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、よりさらに好ましくは95%以上、特に好ましくは100%以上である。該割合の上限は、例えば10000%、5000%、2000%、1000%、500%、200%、150%である。

10

【0061】

鋳型ポリヌクレオチドCにおいて、構成単位は、特に制限されず、天然核酸、aTNA及びSNAを含む各種人工核酸の構成単位を採用することができる。採用し得る核酸として、具体的には、aTNA、SNA、DNA、RNA等の他にも、次に例示するように、公知の化学修飾が施されたものであってもよい。ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、各ヌクレオチドのリン酸残基(ホスフェート)を、例えば、ホスホロチオエート(PS)、メチルホスホネート、ホスホロジチオネート等の化学修飾リン酸残基に置換することができる。また、各リボヌクレオチドの糖(リボース)の2位の水酸基を、-OR(Rは、例えばCH₃(2'-O-Me)、CH₂CH₂OCH₃(2'-O-MOE)、CH₂CH₂NHC(NH)NH₂、CH₂CONHCH₃、CH₂CH₂CN等を示す)に置換してもよい。さらに、塩基部分(ピリミジン、プリン)に化学修飾を施してもよく、例えば、ピリミジン塩基の5位へのメチル基やカチオン性官能基の導入、あるいは2位のカルボニル基のチオカルボニルへの置換などが挙げられる。さらには、リン酸部分やヒドロキシル部分が、例えば、ビオチン、アミノ基、低級アルキルアミン基、アセチル基等で修飾されたものなどを挙げるができるが、これに限定されない。また、ヌクレオチドの糖部の2'酸素と4'炭素を架橋することにより、糖部のコンフォーメーションをN型に固定したものであるBNA(LNA)等もまた、好ましく用いられ得る。

20

【0062】

鋳型ポリヌクレオチドCにおいて、構成単位は、1種単独であってもよいし、2種以上の組み合わせであってもよい。鋳型ポリヌクレオチドCを構成する構成単位は全て同一の構成単位であること、すなわち鋳型ポリヌクレオチドCはaTNA、SNA、DNA、RNA等の構成単位の内の1種のみで構成されていることが好ましい。

30

【0063】

鋳型ポリヌクレオチドCの構成単位として、好ましくはaTNA、SNA、DNA、RNAが挙げられ、より好ましくはaTNA、SNA、RNAが挙げられ、さらに好ましくはaTNA、SNAが挙げられ、よりさらに好ましくはaTNAが挙げられる。

【0064】

鋳型ポリヌクレオチドCは、他の分子が連結されたものであってもよい。他の分子としては、特に制限されず、例えば蛍光標識物、ビオチン、アジド、エチニル基等が挙げられる。蛍光標識物としては、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド、テトラメチルローダミン、カルボキシローダミン、フィコエリスリン、6-FAM(商標)、Cy(登録商標)3、Cy(登録商標)5、Alexa Fluor(登録商標)のシリーズ等が挙げられる。

40

【0065】

鋳型ポリヌクレオチドCは、公知の遺伝子工学的手法、人工核酸の製造手法等に従って容易に作製することができる。例えば、PCR、制限酵素切断、核酸連結技術、in vitro転写・翻訳技術等を利用して作製することができる。

【0066】

<1-4. 反応>

本発明の連結方法においては、一本鎖ポリヌクレオチドAと、一本鎖ポリヌクレオチドB

50

とを、鑄型ポリヌクレオチドCと、(D1)イミダゾール及びハロゲン化シアン、並びにノ又は(D2)1-シアノイミダゾールとの存在下で反応させる。

【0067】

反応は、通常、溶媒中で行われる。溶媒としては、一本鎖ポリヌクレオチドA、一本鎖ポリヌクレオチドB、及び鑄型ポリヌクレオチドCを溶解可能な溶媒である限り特に制限されず、代表的には水が用いられる。

【0068】

反応液中の一本鎖ポリヌクレオチドA、一本鎖ポリヌクレオチドB、及び鑄型ポリヌクレオチドCそれぞれの濃度は、特に制限されないが、例えば0.01~1000 μ M、好ましくは0.1~100 μ M、より好ましくは0.2~30 μ M、さらに好ましくは0.5~15 μ Mである。

10

【0069】

ハロゲン化シアンとしては、特に制限されず、例えばフッ化シアン、塩化シアン、臭化シアン、ヨウ化シアン等が挙げられる。これらの中でも、好ましくは臭化シアンが挙げられる。

【0070】

反応液がイミダゾール及びハロゲン化シアンを含有する場合、イミダゾールの濃度は、特に制限されないが、例えば0.2~2000mM、好ましくは2~200mM、より好ましくは4~100mM、さらに好ましくは10~30mMである。また、この場合、ハロゲン化シアンの濃度は、特に制限されないが、例えば0.4~4000mM、好ましくは4~400mM、より好ましくは8~200mM、さらに好ましくは15~60mMである。

20

【0071】

反応液が1-シアノイミダゾールを含有する場合、1-シアノイミダゾールの濃度は、特に制限されないが、例えば0.2~2000mM、好ましくは2~200mM、より好ましくは4~100mM、さらに好ましくは10~30mMである。

【0072】

反応は、(E)二価金属イオンの存在下で行われることが好ましい。二価金属イオンとしては、例えば亜鉛イオン、マンガンイオン等が挙げられ、好ましくは亜鉛イオンが挙げられる。

【0073】

反応液が二価金属イオンを含有する場合、二価金属イオンの濃度は、例えば0.2~2000mM、好ましくは2~200mM、より好ましくは4~100mM、さらに好ましくは10~30mMである。

30

【0074】

反応は、(F)塩化ナトリウム等の塩の存在下で行われることが好ましい。塩としては、ポリヌクレオチドを安定化させる性質を有するものであれば特に制限されず、代表的には塩化ナトリウムが用いられる。

【0075】

反応液が塩化ナトリウム等の塩を含有する場合、該塩の濃度は、特に制限されないが、例えば1~10000mM、好ましくは10~1000mM、より好ましくは20~500mM、さらに好ましくは50~150mMである。

【0076】

反応液には、一本鎖ポリヌクレオチドA、一本鎖ポリヌクレオチドB、及び鑄型ポリヌクレオチドC以外の他のポリヌクレオチドが含まれていてもよい。このようなポリヌクレオチドとしては、一本鎖ポリヌクレオチドA及びノ又は一本鎖ポリヌクレオチドBとの連結対象末端を有する一本鎖ポリヌクレオチドD、該一本鎖ポリヌクレオチドDに直接、又は他の1つ以上的一本鎖ポリヌクレオチドを介して間接的に連結可能な連結対象末端を有する一本鎖ポリヌクレオチドE、一本鎖ポリヌクレオチドA、B、D、Eの任意の2つ的一本鎖ポリヌクレオチドの鑄型となる鑄型ポリヌクレオチドF等が挙げられる。一本鎖ポリヌクレオチドD、Eが含まれる場合、鑄型ポリヌクレオチドCは、一本鎖ポリヌクレオチドA及び一本鎖ポリヌクレオチドBのみの鑄型であってもよいし、これらの鑄型であると同時に、一本鎖ポリヌクレオチドD、Eの全部または一部の鑄型であってもよい。一本鎖ポリヌクレオチド

40

50

D、E、鑄型ポリヌクレオチドFについては、一本鎖ポリヌクレオチドA、B、鑄型ポリヌクレオチドCと同様である。一本鎖ポリヌクレオチドD、E、必要に応じて鑄型ポリヌクレオチドFを用いることにより、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、又はそれ以上の複数の一本鎖ポリヌクレオチドを、本発明の連結反応によって連結して、より長鎖のポリヌクレオチドを得ることができる。

【0077】

反応液には、連結反応を著しく阻害しない限りにおいて、他の成分が含まれていてもよい。他の成分としては、特に制限されないが、例えば緩衝剤が挙げられる。反応がイミダゾールの存在下で行われる場合は、該イミダゾールが緩衝剤の機能を果たし得る。

【0078】

反応は、中性域で行われることが好ましい。具体的には、反応液のpHは、好ましくは6.5~8.0、より好ましくは6.7~7.7、さらに好ましくは6.8~7.5、よりさらに好ましくは6.9~7.2、特に好ましくは6.9~7.1である。これらのpHを採用することにより、より効率的に連結反応を行うことができる。

【0079】

反応の温度は、特に制限されないが、通常、一本鎖ポリヌクレオチドA又はBと前記鑄型ポリヌクレオチドCとの二本鎖ポリヌクレオチドのT_m値よりも低温である。該温度は、連結効率の観点から、該T_m値よりも、例えば5 以上、好ましくは10 以上、より好ましくは15 以上低温であることが好ましい。該温度は、例えば0~60 、好ましくは10~50、より好ましくは20~40 である。

【0080】

反応の時間は、特に制限されないが、例えば1~72時間、好ましくは2~48時間、より好ましくは4~24時間、さらに好ましくは8~16時間である。

【0081】

反応終了後は、必要に応じて、生成物であるポリヌクレオチドを、クロマトグラフィー法等の通常の方法で単離精製することができる。また、生成物の構造は、元素分析、MS (FD-MS) 分析、IR分析、¹H-NMR、¹³C-NMR等により同定することができる。

【0082】

本発明の連結方法により、一本鎖ポリヌクレオチドAと一本鎖ポリヌクレオチドBとが連結してなるポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを得ること、すなわち該ポリヌクレオチドを製造することができる。

【0083】

得られたポリヌクレオチドは、各種分野において、例えば医薬、試薬等として利用することができる。

【0084】

2. ポリヌクレオチドの連結用試薬

本発明は、(D1)イミダゾール及びハロゲン化シアン、並びに/又は(D2)1-シアノイミダゾールを含む、(A)少なくとも一方の末端がaTNA又はSNAである一本鎖ポリヌクレオチドAと、(B)一本鎖ポリヌクレオチドBとの連結用試薬(本明細書において、「本発明の試薬」と表記することもある。)に関する。以下にこれについて説明する。

【0085】

本発明の試薬は、(D1)イミダゾール及びハロゲン化シアン、並びに/又は(D2)1-シアノイミダゾールを含有する限りにおいて特に制限されず、必要に応じてさらに他の成分を含んでもよい。他の成分としては、薬学的に許容される成分であれば特に限定されるものではないが、例えば基剤、担体、溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、増粘剤、保湿剤、着色料、香料、キレート剤等が挙げられる。

【0086】

本発明の試薬は、キットの形態であってもよい。キットの場合は、1つの容器に各種成分が含まれたものであっても、2つ以上の容器に各種成分が含まれたものであってもよい

10

20

30

40

50

。キットの場合、必要に応じて、本発明の連結方法の実施に必要な他の試薬、器具等を適宜含んでいてもよい。

【実施例】

【0087】

以下に、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0088】

試験例1．連結反応試験1

表1に示される一本鎖ポリヌクレオチドを用いて連結反応を行った。表1中、pはリン酸基を示し、Cy3及びFAMは標識を示し、「Temp」は鋳型一本鎖ポリヌクレオチドを示す。

【0089】

【表1】

aTNA 8A	L-aTNA	3'-Cy3-GCATCAGT-1'	-
aTNA 8B		3'-pCTCATAGG-1'	-
aTNA 8Temp		1'-CGTAGTCA GAGTATCC-3'	配列番号1
DNA 12A	DNA	5'-FAM-GGTATCGCAATC-3'	配列番号2
DNA 12B		5'-pAGTTCGTGGATG-3'	配列番号3

【0090】

反応水溶液(20mM imidazole、20mM HCl、100mM NaCl、20mM ZnCl₂、40mM BrCN、一本鎖ポリヌクレオチド(各1μM)、水、pH=7.0、反応液量30μL)を調製して、反応を行った。具体的には、BrCN以外の成分を混合した後、BrCNを添加して、25℃で終夜インキュベーションした。なお、インキュベーションは温度設定したサーマルサイクラーで行った。インキュベーション終了後、反応液を20% AA 変性PAGEにより電気泳動し、aTNA 8A中のCy3由来の蛍光、又はDNA 12A中のFAM由来の蛍光を検出することにより、バンドを検出した。

【0091】

結果を図1に示す。lane 2において、新しいバンドがaTNA 8Aのバンドの上に観察された。これは、aTNA 8AとaTNA 8Bが結合したライゲーション生成物に由来するものであると考えられる。また、lane 2とlane 5を比較すると、DNAよりもaTNAのライゲーション反応は高効率で進んでいると思われる。テンプレートを加えていないlane 3ではライゲーション生成物のバンドは確認できなかったが、aTNA 8Aの下に新しいバンドが出現した。なお、ライゲーション生成物の収率(=ライゲーション生成物を示すバンド濃度値/全バンド濃度値の合計値)は、lane 2において96.4%であり、lane 5において32.5%であった。

【0092】

試験例2．連結反応試験2

一本鎖ポリヌクレオチドとしてaTNA 8A、aTNA 8B、及びaTNA 8Tempを用いて、インキュベーション温度を30℃、40℃、又は50℃とする以外は、試験例1と同様にして連結反応を行った。

【0093】

結果を図2に示す。原料のバンドは40℃で反応させたときにもっとも薄くなり、50℃の温度で反応させると副生成物のバンドが出現した。なお、ライゲーション生成物の収率(=ライゲーション生成物を示すバンド濃度値/全バンド濃度値の合計値)は、左のレーンから、81.5%、92.2%、70.4%であった。

【0094】

試験例3．連結反応試験3

一本鎖ポリヌクレオチドとしてaTNA 8A、aTNA 8B、及びaTNA 8Tempを用いて、亜鉛イオンに代えて他の二価金属イオンを用いる以外は、試験例1と同様にして連結反応を行った。

。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 5 】

結果を図3に示す。亜鉛イオンに代えて他の二価金属イオンを用いても、高効率で連結反応が進むことが分かった。ライゲーション生成物の収率（＝ライゲーション生成物を示すバンド濃度値 / 全バンド濃度値の合計値）は、左のレーンから、97.5%、98.2%であった。

【 0 0 9 6 】

試験例4．連結反応試験4

表2に示される一本鎖ポリヌクレオチドを用いて、試験例1と同様にして連結反応を行った。表2中、pはリン酸基を示し、Cy3及びFAMは標識を示す。

【 0 0 9 7 】

10

【表2】

aTNA 8A	L-aTNA	3'-Cy3-GCATCAGT-1'	-
aTNA 8B		3'-pCTCATAGG-1'	-
aTNA 8Temp		1'-CGTAGTCA GAGTATCC-3'	配列番号1
DNA 8B	DNA	5'-pCTCATAGG-3'	-
DNA 8Temp		3'-CGTAGTCA GAGTATCC-5'	配列番号1

【 0 0 9 8 】

結果を図4に示す。DNA、RNAをテンプレートとしてaTNA8AとaTNA8Bのライゲーションが確認された。L4はL2と同じ位置にバンドが現れたが、L3では低い位置にバンドが現れた。これはライゲーション生成物がL2とL4ではaTNA/RNAと二重鎖を形成して流れており、L3ではaTNA/DNAの安定性が低いため一本鎖で流れているからであると考えている。また、RNAテンプレート上で、aTNA 8AとDNA 8Bのライゲーションが示された。なお、ライゲーション生成物の収率（＝ライゲーション生成物を示すバンド濃度値 / 全バンド濃度値の合計値）は、L2から右へ、97.0%、95.2%、88.3%、79.2%であった。

20

【 0 0 9 9 】

参考試験例1．Tm値解析

反応水溶液（20mM imidazole、100mM NaCl₂、一本鎖ポリヌクレオチド（各2μM）、水、pH=7.0）を調製して、降温条件下におけるTm値及び昇温条件下におけるTm値を測定した。結果を表3に示す。

30

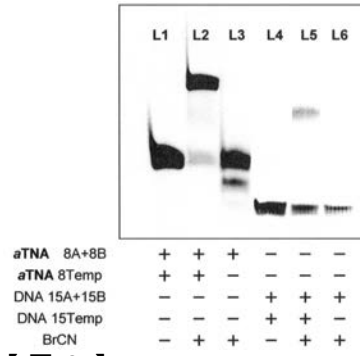
【 0 1 0 0 】

【表3】

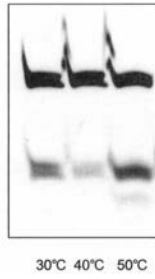
	降温(°C)	昇温(°C)
aTNA 8A / aTNA 8Temp	63.3	63.7
aTNA 8B / aTNA 8Temp	59.2	58.6
DNA 12A / DNA 12Temp	50.6	51.0
DNA 12B / DNA 12Temp	50.5	51.4
aTNA 8A / RNA 8temp	49.5	51.2

40

【 図 1 】



【 図 2 】



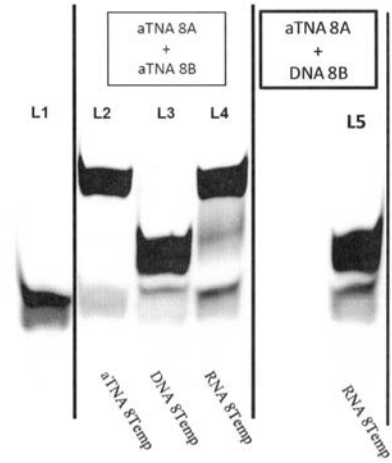
【 図 3 】



【 配列表 】

201913762800001.app

【 図 4 】



【 図 5 】

