

(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2004-168672
(P2004-168672A)

(43) 公開日 平成16年6月17日(2004.6.17)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07D 471/04	C07D 471/04 114A	4B024
C07H 19/23	C07H 19/23	4B063
C07H 21/04	C07H 21/04 B	4C057
C12N 15/09	C12Q 1/68 A	4C065
C12Q 1/68	C12N 15/00 ZNAF	

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2002-333326 (P2002-333326)	(71) 出願人	000206956 大塚製薬株式会社 東京都千代田区神田司町2丁目9番地
(22) 出願日	平成14年11月18日 (2002.11.18)	(71) 出願人	502417531 斎藤 烈 京都府京都市山科区勤修寺柴山1-21
		(71) 出願人	502417553 岡本 晃充 京都府京都市左京区田中大堰町107ヴィ ラヤマカワ302
		(74) 代理人	100065215 弁理士 三枝 英二
		(74) 代理人	100076510 弁理士 掛樋 悠路

最終頁に続く

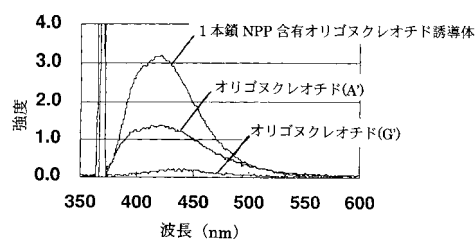
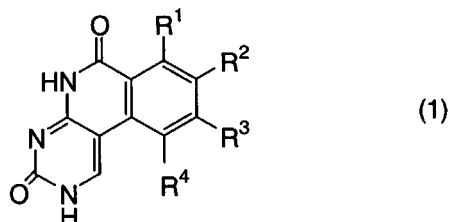
(54) 【発明の名称】 ポリヌクレオチド誘導体及びその利用

(57) 【要約】

【課題】簡便かつ正確に核酸塩基の同定を行えるポリヌクレオチド誘導体、その中間体として使用できるヌクレオシド又はヌクレオチド誘導体及び塩基化合物等を提供する。

【解決手段】以下の一般式(1)で表されるピリミジン化合物、これを含むヌクレオシド・ヌクレオチド誘導体、ポリヌクレオチド誘導体、及びポリヌクレオチド誘導体の利用。

【化1】



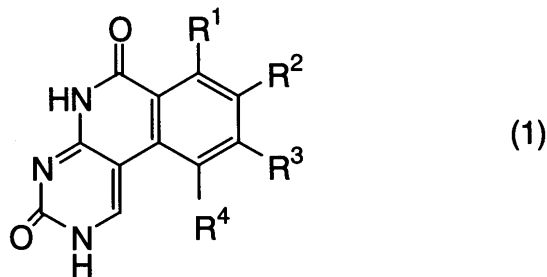
(式中、R¹、R²、R³、R⁴ は同一又は互いに異なって、水素原子、アミノ基、モノ - (低級アルキル) ア

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の一般式(1)で表される化合物。

【化 1】



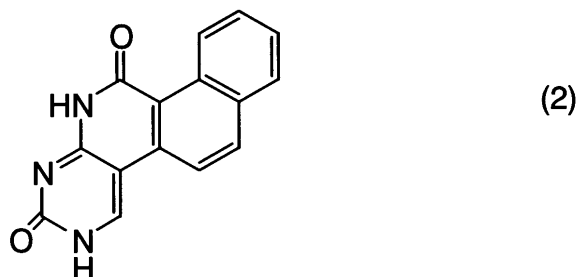
10

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 は同一又は互いに異なって、水素原子、アミノ基、モノ - (低級アルキル)アミノ基、ジ - (低級アルキル)アミノ基、水酸基、アルキル基、低級アルコキシ基、低級アルキルチオ基、アルキルチオ基、アシルオキシ基、ハロゲン原子、シアノ基、チオール基又は置換基を有してよいフェニル基を表し、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 が同時に水素原子であることはない。 R^1 と R^2 、 R^2 と R^3 、 R^3 と R^4 とが結合してフェニル基を形成していてもよい。)

【請求項 2】

以下の一般式(2)で表される請求項 1 に記載の化合物。

【化 2】

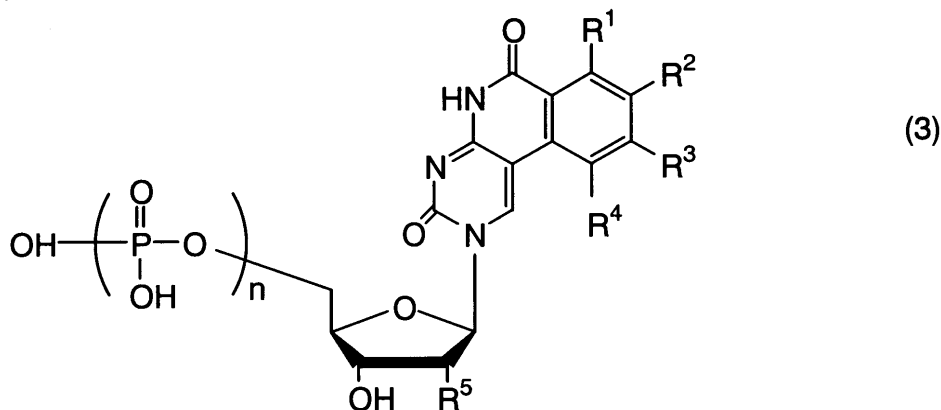


30

【請求項 3】

以下の一般式(3)で表されるヌクレオシド又はヌクレオチド誘導体。

【化 3】



40

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 は同一又は互いに異なって、水素原子、アミノ基、モノ - (低級アルキル)アミノ基、ジ - (低級アルキル)アミノ基、水酸基、アルキル基、低級アルコキシ基、低級アルキルチオ基、アルキルチオ基、アシルオキシ基、ハロゲン原子、シアノ基、チオール基又は置換基を有してよいフェニル基を表し、 R^1 、 R^2 、 R

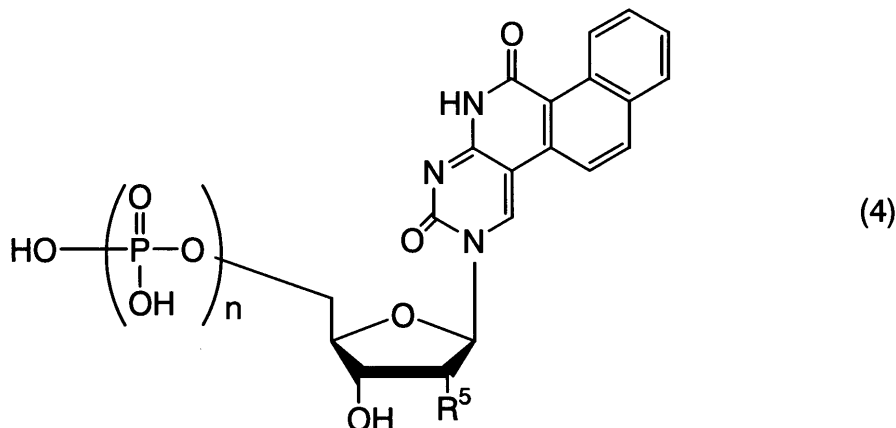
50

³ 及び R⁴ が同時に水素原子であることはない。R¹ と R²、R² と R³、R³ と R⁴ とが結合してフェニル基を形成していてもよい。R⁵ は水素原子又は水酸基を表す。n は 0、1、2 又は 3 を示す。）

【請求項 4】

以下の一般式 (4) で表される請求項 3 に記載のヌクレオシド又はヌクレオチド誘導体。

【化 4】

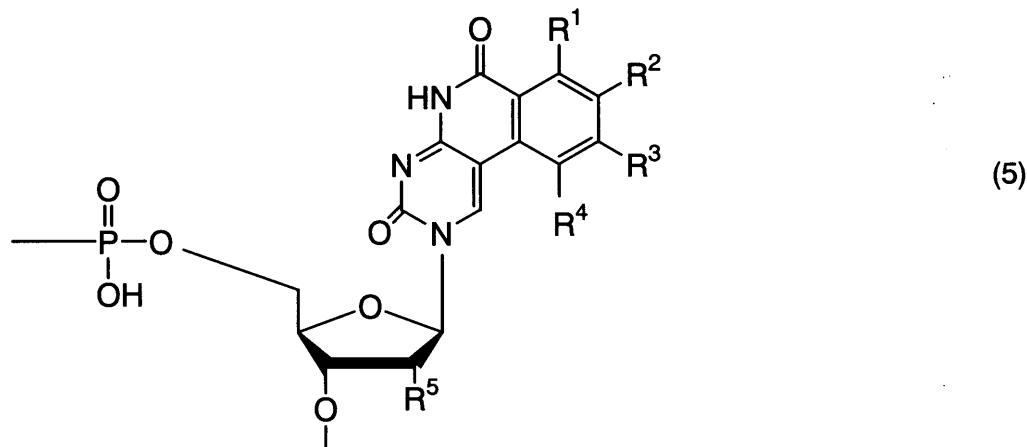


10

【請求項 5】

ポリヌクレオチドにおいて、1 又は 2 以上のヌクレオチドが以下の一般式 (5) で表されるヌクレオチド誘導体で置換されているポリヌクレオチド誘導体。

【化 5】



20

30

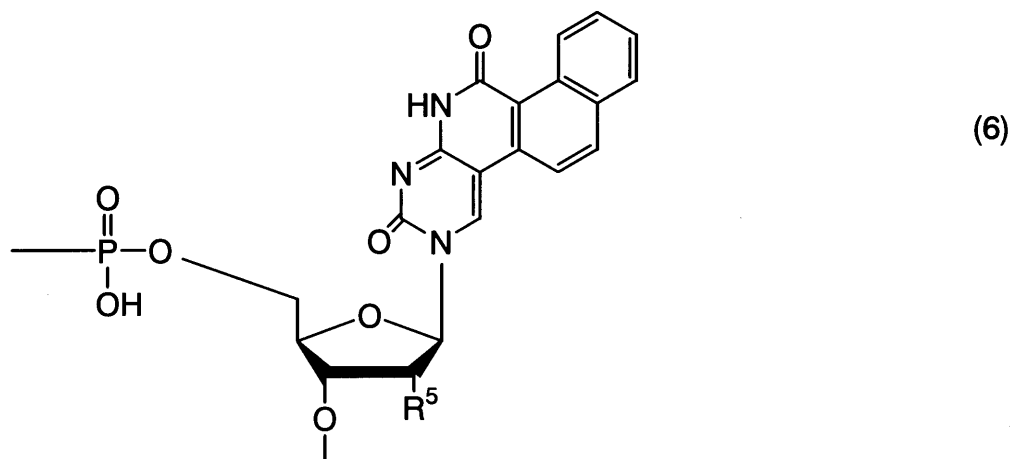
(式中、R¹、R²、R³、R⁴ は同一又は互いに異なって、水素原子、アミノ基、モノ- (低級アルキル) アミノ基、ジ- (低級アルキル) アミノ基、水酸基、アルキル基、低級アルコキシ基、低級アルキルチオ基、アルキルチオ基、アシルオキシ基、ハロゲン原子、シアノ基、チオール基又は置換基を有していてもよいフェニル基を表し、R¹、R²、R³ 及び R⁴ が同時に水素原子であることはない。R¹ と R²、R² と R³、R³ と R⁴ とが結合してフェニル基を形成していてもよい。R⁵ は水素原子又は水酸基を表す。)

40

【請求項 6】

以下の一般式 (6) で表される請求項 5 に記載のポリヌクレオチド誘導体。

【化 6】



10

【請求項 7】

プローブとして用いるための請求項 5 又は 6 に記載のポリヌクレオチド誘導体。

【請求項 8】

基体上に 1 又は複数の請求項 5 又は 6 に記載のポリヌクレオチド誘導体が固定又は吸着された DNA チップ。

【請求項 9】

請求項 5 又は 6 に記載のポリヌクレオチド誘導体を試料中の標的核酸とハイブリダイズさせる工程と；

ハイブリダイズ産物の蛍光スペクトルを測定する工程と；

この蛍光スペクトルをハイブリダイズ前の請求項 5 又は 6 に記載のポリヌクレオチド誘導体の蛍光スペクトルと比較することにより、標的核酸の特定位置のヌクレオチドの種類を同定する工程と

を含む標的核酸中のヌクレオチドの同定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、塩基配列中の特定部位の塩基の種類決定に用いられるポリヌクレオチド誘導体、その中間体であるヌクレオシド又はヌクレオチド誘導体及び塩基化合物、並びに、その利用に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、ハイブリダイゼーションを利用した核酸塩基決定は、プローブとしてのポリヌクレオチドを、蛍光ラベルされた標的核酸とハイブリダイズさせ、その融解温度を測定することにより行っている。詳述すれば、プローブの所定位置の塩基が標的核酸の対応塩基と塩基対を形成する場合としない場合とで、2 本鎖の融解温度が若干異なることを利用して、塩基の同定を行っている。

【0003】

しかし、この場合は、対合する塩基が塩基対を形成する場合としない場合との融解温度の差ができるだけ大きくなるような条件設定を、個々の標的核酸ごとに行う必要がある。また、塩基間の非特異的な吸着や塩基対形成の不安定性などによる検出エラーが生じ易い。さらに、標的核酸のラベル量を少なくせざるを得ない場合や、長時間の操作により蛍光が退色する場合には、検出誤差が大きくなる。

【0004】

なお、標的核酸配列を検出するために蛍光ラベルしたプローブを用いることも提案されている（例えば特許文献 1、2、3 及び 4）。しかし、これらの蛍光プローブは、標的核酸と塩基対を形成することにより標的核酸を標識するものにすぎず、標的核酸中の特定塩基

20

30

40

50

を同定することはできない。

【0005】

【特許文献1】

特公平3-71437号公報(第4欄一般式(I)、第5欄第5-9行)

【0006】

【特許文献2】

特表平9-505556号公報(請求項1、第15頁第11-19行)

【0007】

【特許文献3】

特開平6-135991号公報(請求項1、段落0004、段落0005)

10

【0008】

【特許文献4】

特開昭62-059293号公報(請求項1、第2頁右下欄第5-8行)

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、簡便かつ正確に核酸塩基の同定を行えるポリヌクレオチド誘導体、その中間体として使用できるヌクレオシド又はヌクレオチド誘導体及び塩基化合物、DNAチップ、並びに、標的核酸中のヌクレオチドの同定方法を提供することを主目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】

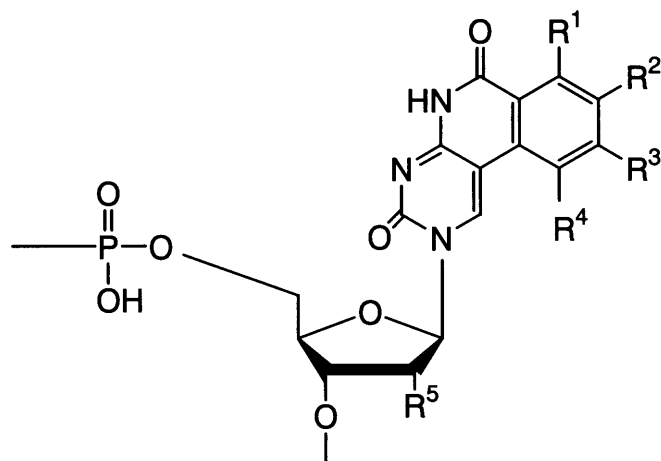
20

前記目的を達成するために本発明者は研究を重ね、以下の知見を見出した。

1 1又は2以上のヌクレオチドが以下の一般式(5)で表されるヌクレオチド誘導体で置換されているポリヌクレオチド誘導体は蛍光を発する。このポリヌクレオチド誘導体をプローブとして用いて標的核酸とのハイブリダイゼーションを行うと、相補鎖中の当該ヌクレオチド誘導体と対合するヌクレオチドの種類によって蛍光が増大したり、消光したり、蛍光発光波長がシフトしたりする。

【0011】

【化7】



(5)

30

40

【0012】

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 は同一又は互いに異なって、水素原子、アミノ基、モノ-(低級アルキル)アミノ基、ジ-(低級アルキル)アミノ基、水酸基、アルキル基、低級アルコキシ基、低級アルキルチオ基、アルキルチオ基、アシルオキシ基、ハロゲン原子、シアノ基、チオール基又は置換基を有してよいフェニル基を表し、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 が同時に水素原子であることはない。 R^1 と R^2 、 R^2 と R^3 、 R^3 と R^4 とが結合してフェニル基を形成していてもよい。 R^5 は水素原子又は水酸基を表す。)

2 例えば、上記一般式(5)において、 R^1 と R^2 とが結合してベンゾ環を形成し、 R^3 、 R^4 及び R^5 が水素原子である場合には、相補鎖中の当該ヌクレオチド誘導体と

50

対合するヌクレオチドがアデニル酸である場合には発光極大波長における蛍光強度が増大し、グアニル酸である場合に消光する。

3 標的核酸に相補的なポリヌクレオチドの所定位置のヌクレオチドに代えてこのヌクレオチド誘導体を導入したものをプローブとして用いることにより、標的核酸の所定位置の塩基を簡単かつ正確に同定できる。

【0013】

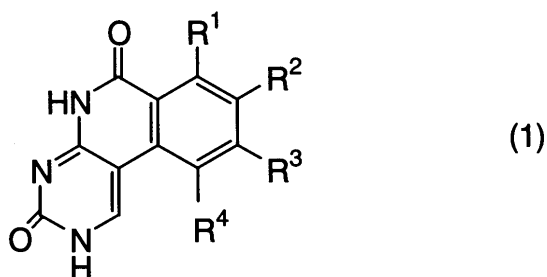
前期知見に基づき、本発明は以下の化合物、ヌクレオシド又はヌクレオチド誘導体、ポリヌクレオチド誘導体、DNAチップ及び標的核酸中のヌクレオチドの同定方法を提供する。

【0014】

項1. 以下の一般式(1)で表される化合物。

【0015】

【化8】



10

20

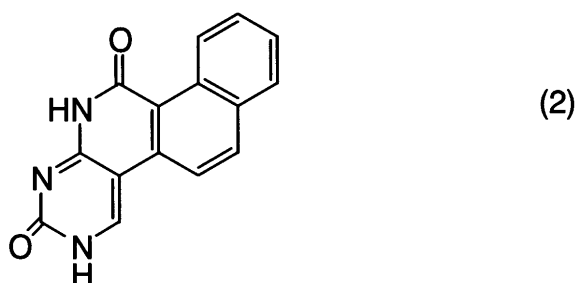
【0016】

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 は同一又は互いに異なって、水素原子、アミノ基、モノ-(低級アルキル)アミノ基、ジ-(低級アルキル)アミノ基、水酸基、アルキル基、低級アルコキシ基、低級アルキルチオ基、アルキルチオ基、アシルオキシ基、ハロゲン原子、シアノ基、チオール基又は置換基を有してよいフェニル基を表し、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 が同時に水素原子であることはない。 R^1 と R^2 、 R^2 と R^3 、 R^3 と R^4 とが結合してフェニル基を形成していてもよい。)

項2. 以下の一般式(2)で表される項1に記載の化合物。

【0017】

【化9】



30

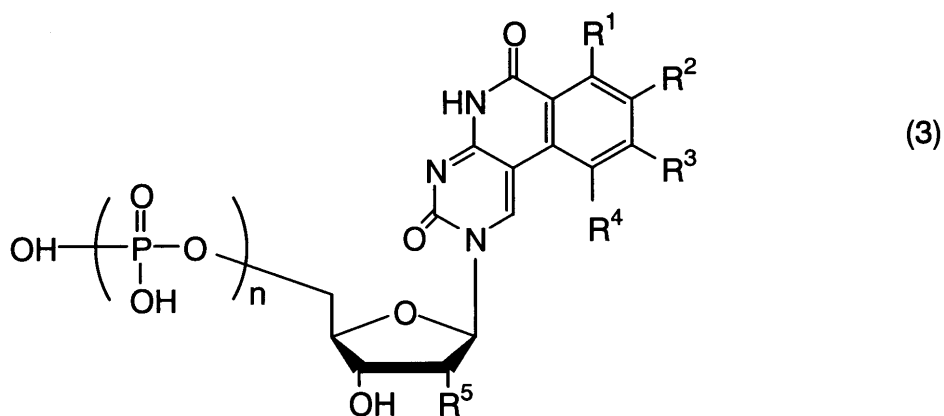
40

【0018】

項3. 以下の一般式(3)で表されるヌクレオシド又はヌクレオチド誘導体。

【0019】

【化10】



10

【0020】

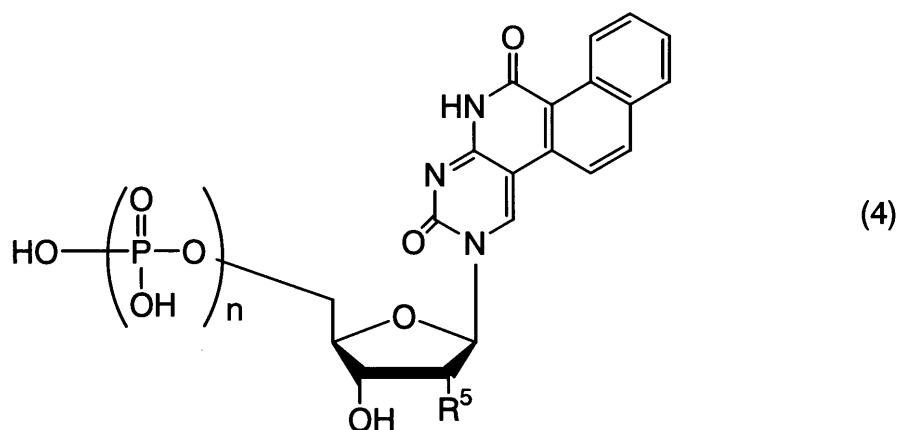
(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 は同一又は互いに異なって、水素原子、アミノ基、モノ- (低級アルキル)アミノ基、ジ- (低級アルキル)アミノ基、水酸基、アルキル基、低級アルコキシ基、低級アルキルチオ基、アルキルチオ基、アシルオキシ基、ハロゲン原子、シアノ基、チオール基又は置換基を有してよいフェニル基を表し、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 が同時に水素原子であることはない。 R^1 と R^2 、 R^2 と R^3 、 R^3 と R^4 とが結合してフェニル基を形成していてもよい。 R^5 は水素原子又は水酸基を表す。 n は0、1、2又は3を示す。)

20

項4. 以下の一般式(4)で表される項3に記載のヌクレオシド又はヌクレオチド誘導体。

【0021】

【化11】



30

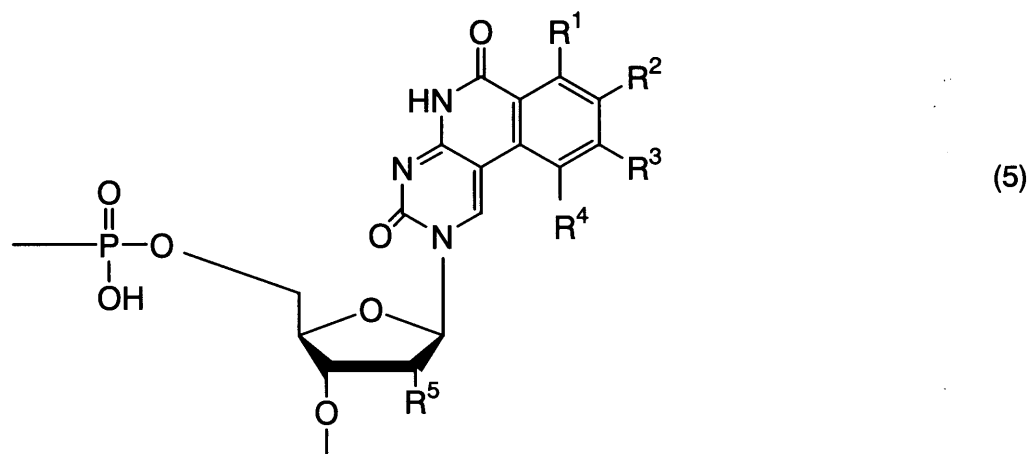
【0022】

項5. ポリヌクレオチドにおいて、1又は2以上のヌクレオチドが以下の一般式(5)で表されるヌクレオチド誘導体で置換されているポリヌクレオチド誘導体。

40

【0023】

【化12】



10

【0024】

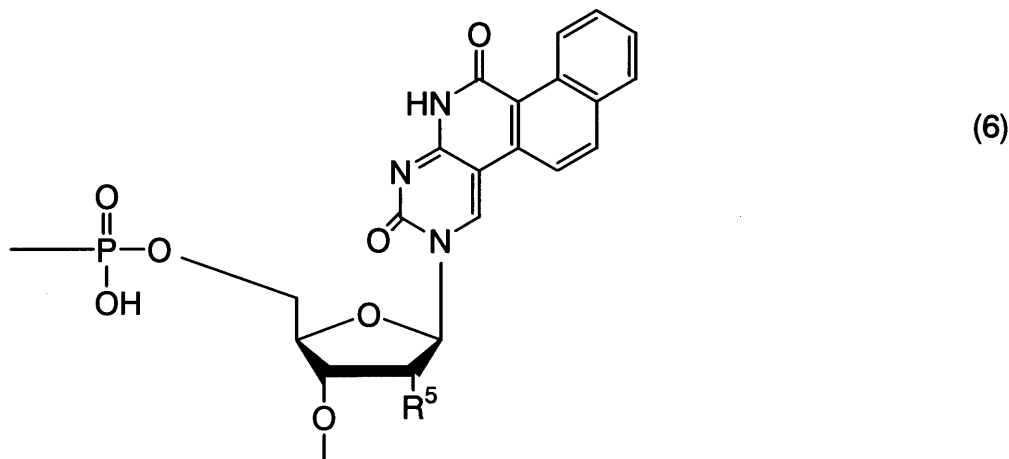
(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 は同一又は互いに異なって、水素原子、アミノ基、モノ - (低級アルキル) アミノ基、ジ - (低級アルキル) アミノ基、水酸基、アルキル基、低級アルコキシ基、低級アルキルチオ基、アルキルチオ基、アシルオキシ基、ハロゲン原子、シアノ基、チオール基又は置換基を有してよいフェニル基を表し、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 が同時に水素原子であることはない。 R^1 と R^2 、 R^2 と R^3 、 R^3 と R^4 とが結合してフェニル基を形成していてもよい。 R^5 は水素原子又は水酸基を表す。)

20

項 6 . 以下の一般式 (6) で表される項 5 に記載のポリヌクレオチド誘導体。

【0025】

【化13】



30

【0026】

項 7 . プロブとして用いるための項 5 又は 6 に記載のポリヌクレオチド誘導体。

【0027】

項 8 . 基体上に 1 又は複数の項 5 又は 6 に記載のポリヌクレオチド誘導体が固定又は吸着された DNA チップ。

40

【0028】

項 9 . 項 5 又は 6 に記載のポリヌクレオチド誘導体を試料中の標的核酸とハイブリダイズさせる工程と ;

ハイブリダイズ産物の蛍光スペクトルを測定する工程と ;

この蛍光スペクトルをハイブリダイズ前の項 5 又は 6 に記載のポリヌクレオチド誘導体の蛍光スペクトルと比較することにより、標的核酸の特定位置のヌクレオチドの種類を同定する工程と

を含む標的核酸中のヌクレオチドの同定方法。

【0029】

50

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

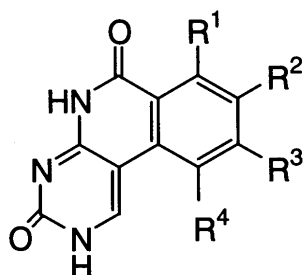
本発明の化合物

<塩基化合物>

本発明の化合物は、文献未記載の新規化合物であり、以下の一般式(1)で表される。

【0030】

【化14】



(1)

10

【0031】

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 は同一又は互いに異なって、水素原子、アミノ基、モノ-(低級アルキル)アミノ基、ジ-(低級アルキル)アミノ基、水酸基、アルキル基、低級アルコキシ基、低級アルキルチオ基、アルキルチオ基、アシルオキシ基、ハロゲン原子、シアノ基、チオール基又は置換基を有してよいフェニル基を表し、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 が同時に水素原子であることはない。 R^1 と R^2 、 R^2 と R^3 、 R^3 と R^4 とが結合してフェニル基を形成していてもよい。)

20

本明細書において、低級アルキル基、モノ-(低級アルキル)アミノ基、ジ-(低級アルキル)アミノ基及びアルキルチオ基の低級アルキルとしては、例えばメチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル等の炭素数1~4個程度の直鎖又は分岐状のアルキルが挙げられる。

【0032】

また、低級アルコキシ基としては、例えばメトキシ基、エトキシ、*n*-プロポキシ基、イソプロポキシ基、*n*-ブトキシ基、*sec*-ブトキシ基、*tert*-ブトキシ基等の炭素数1~4個程度の直鎖又は分岐状のアルコキシ基が挙げられる。

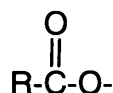
30

【0033】

またアシルオキシ基としては、以下の一般式(7)において、 R が例えば低級アルキル基、置換基を有してよいフェニル基、ハロゲン原子等である置換基が挙げられる

【0034】

【化15】



(7)

【0035】

また、ハロゲン原子としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等が挙げられる。

40

【0036】

また、アリアル基としては、フェニル基、ナフチル基等が挙げられる。これらのアリアル基は、例えばアミノ基、モノ-(低級アルキル)アミノ基、ジ-(低級アルキル)アミノ基、水酸基、アルキル基、低級アルコキシ基、低級アルキルチオ基、アシルオキシ基、ハロゲン原子、シアノ基、チオール基等の置換基を有していてもよい。

【0037】

R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 の好適な組み合わせとしては、例えば R^1 及び R^2 が結合してベンゾ環を形成し R^3 及び R^4 が水素原子である組み合わせ； R^1 ~ R^4 がフッ素原子で

50

ある組み合わせ； R^3 がニトロ基であり R^1 、 R^2 及び R^4 が水素原子である組み合わせ； R^3 がアミノ基であり R^1 、 R^2 及び R^4 が水素原子である組み合わせ； R^3 がジアルキルアミノ基であり R^1 、 R^2 及び R^4 が水素原子である組み合わせ等が挙げられる。

【0038】

特に、 $R^1 \sim R^4$ が電子供与基又はベンゾ環である化合物が好ましく、中でも R^1 及び R^2 が結合してベンゾ環を形成している化合物がより好ましい。最も好ましいのは、 R^1 及び R^2 が結合してベンゾ環を形成し R^3 及び R^4 が水素原子である化合物である。

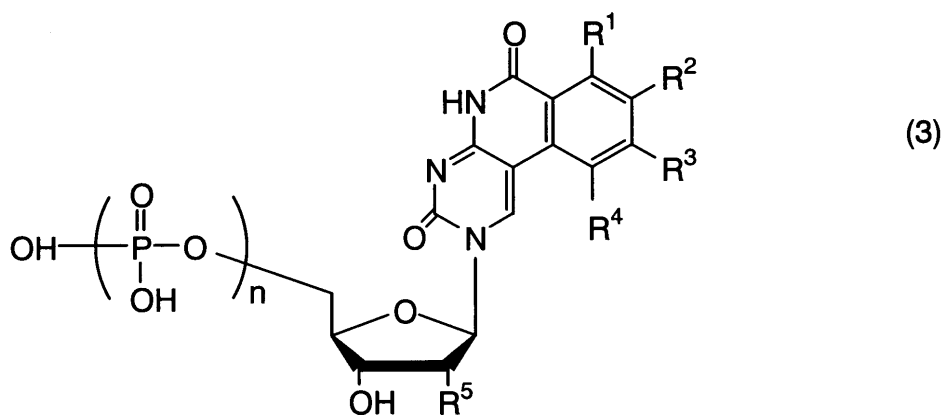
<ヌクレオシド又はヌクレオチド誘導体>

本発明のヌクレオシド又はヌクレオチド誘導体は、文献未記載の新規化合物であって、以下の一般式(3)で表される化合物である。

10

【0039】

【化16】



20

【0040】

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 は同一又は互いに異なって、水素原子、アミノ基、モノ- (低級アルキル) アミノ基、ジ- (低級アルキル) アミノ基、水酸基、アルキル基、低級アルコキシ基、低級アルキルチオ基、アルキルチオ基、アシルオキシ基、ハロゲン原子、シアノ基、チオール基又は置換基を有してよいフェニル基を表し、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 が同時に水素原子であることはない。 R^1 と R^2 、 R^2 と R^3 、 R^3 と R^4 とが結合してフェニル基を形成していてもよい。 R^5 は水素原子又は水酸基を表す。 n は 0、1、2 又は 3 を示す。)

30

R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 については前述した通りである。

【0041】

R^5 が水素原子である場合には、上記化合物はデオキシリボヌクレオシド又はデオキシリボヌクレオチド誘導体であり、 R^5 が水酸基である場合には、上記化合物はリボヌクレオシド又はリボヌクレオチド誘導体である。

【0042】

また、 n が 0 である場合すなわちリン酸基が存在しない場合には、上記化合物はヌクレオシド誘導体であり、 n が 1、2 又は 3 である場合には、上記化合物はヌクレオチド誘導体である。

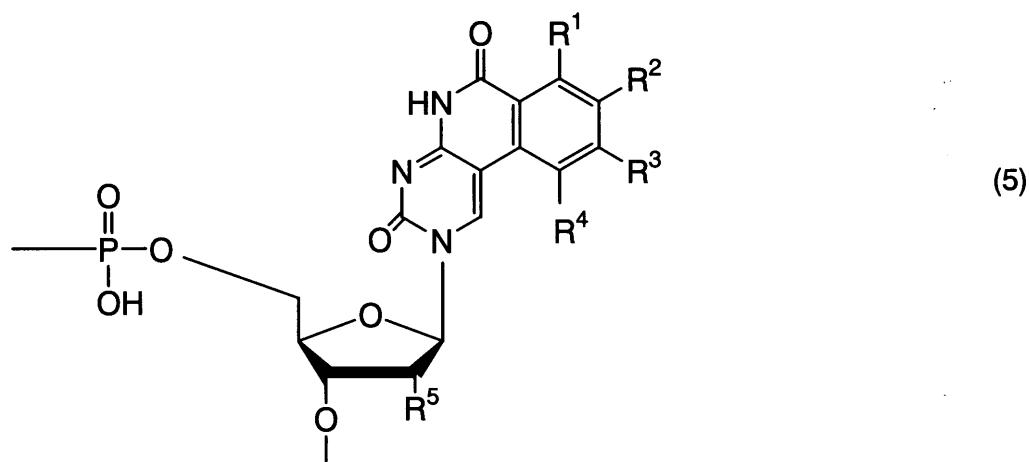
40

<ポリヌクレオチド誘導体>

本発明のポリヌクレオチド誘導体は、ポリヌクレオチドにおいて、1 又は 2 以上のヌクレオチドが以下の一般式(5)で表されるヌクレオチド誘導体で置換されているポリヌクレオチド誘導体である。

【0043】

【化17】



10

20

30

40

50

【0044】

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 は同一又は互いに異なって、水素原子、アミノ基、モノ- (低級アルキル)アミノ基、ジ- (低級アルキル)アミノ基、水酸基、アルキル基、低級アルコキシ基、低級アルキルチオ基、アルキルチオ基、アシルオキシ基、ハロゲン原子、シアノ基、チオール基又は置換基を有してよいフェニル基を表し、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 が同時に水素原子であることはない。 R^1 と R^2 、 R^2 と R^3 、 R^3 と R^4 とが結合してフェニル基を形成していてもよい。 R^5 は水素原子又は水酸基を表す。) R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及び R^5 については前述した通りである。

【0045】

本発明のポリヌクレオチド誘導体はDNAであってもよく、RNAであってもよい。

【0046】

本発明のポリヌクレオチド誘導体のヌクレオチド数は特に限定されないが、例えば、最大100個程度、好ましくは最大50個程度、より好ましくは最大30個程度、さらにより好ましくは最大20個程度のヌクレオチドからなるものが挙げられる。すなわち、本発明のポリヌクレオチドにはオリゴヌクレオチドも含まれる。

【0047】

本発明のポリヌクレオチド誘導体は、全体のヌクレオチド数により異なるが、上記ヌクレオチド誘導体を20個程度まで有してよい。より好ましくは5個程度までである。上記ヌクレオチド誘導体が余りに多いと塩基間相互作用により蛍光波長が移動してしまう可能性がある。本発明の範囲であればこのような問題は生じない。

化合物の製造方法

<塩基化合物>

<ヌクレオシド又はヌクレオチド誘導体>

本発明のヌクレオシド誘導体は、例えば以下の方法で合成できる。5-ヨードデオキシチヂンを適当な溶媒に溶解させた溶液に対して、トリブチルジメチルクロライド及びイミダゾールを添加し、室温下で攪拌する。次いで、得られた化合物をピリジンに溶解し、ベンゾ環の各炭素原子にそれぞれ $R^1 \sim R^4$ が結合した塩化ベンゾイルを添加して室温下で攪拌する。

【0048】

次いで、得られた化合物を適当な溶媒に溶解し、プロピレンオキシドを添加し、光を照射した。得られた化合物をアンモニア水/メタノール/クロロホルムに溶解し攪拌する。

【0049】

次いで、得られた化合物を適当な溶媒に溶解し、同溶媒に溶解させたテトラブチルアンモニウムを添加し、室温下で攪拌する。これにより本発明のヌクレオシド誘導体を得られる。

【0050】

ヌクレオチド誘導体は当該ヌクレオシド誘導体から常法により得ることができる。すなわ

ち、 POCl_3 及びリン酸トリメチルを添加することにより、ヌクレオチド ($n = 1$) が得られる。さらに、ピロリン酸トリブチルアンモニウム塩を添加することにより、三リン酸体を得られる。

< ポリヌクレオチド誘導体 >

本発明のポリヌクレオチド誘導体は、例えば核酸自動合成機を用いたフォスフォロアミダイト法による化学合成方法において、特定ヌクレオシドに代えて本発明のヌクレオシド誘導体を用いることにより合成できる。

用途

本発明の塩基化合物、及び、ヌクレオシド又はヌクレオチド誘導体は、ポリヌクレオチド誘導体の合成に供することができる。

10

【0051】

本発明の化合物及びヌクレオシド又はヌクレオチド誘導体は蛍光を発するところ、これを含む本発明のポリヌクレオチド誘導体は、標的核酸とハイブリダイズさせると、1本鎖の場合に比べて、対合するヌクレオチドの種類によって蛍光の発光強度が増大したり、低減したり、発光波長がシフトしたりする。

【0052】

例えば、一般式(5)において、 R^1 及び R^2 が結合してベンゾ環を形成し、 R^3 、 R^4 及び R^5 が水素原子である場合には(ナフトピリドピリミジン(NPP)含有オリゴデオキシリボヌクレオチド)、NPP含有ヌクレオチドに対合するヌクレオチドがアデニル酸である場合には蛍光の発光強度が増大し、グアニル酸である場合に蛍光が消光する。本発明のポリヌクレオチド誘導体は、この現象を利用して以下の用途に使用できる。

20

i) 標的核酸と相補的なポリヌクレオチド誘導体は、プローブとして用いることにより、標的核酸の特定位置のヌクレオチドの種類を決定できる。同様の方法で1塩基多型の検出に利用できる。

ii) DNAチップにおいて、ポリヌクレオチドに代えて基板上に固定ないしは吸着させることにより、特定核酸配列を有するか否かを確認できる。特に、標的核酸の特定位置のヌクレオチドの種類を決定できる。

iii) アンチセンスポリヌクレオチドに代えて使用する場合には、通常のポリヌクレオチドとは異なるために、核酸分解酵素(例えば制限酵素)や核酸結合タンパク質(例えば転写因子)等の標的核酸への結合を阻害できる。このことから、これらの作用を利用した実験用試薬として利用できる。

30

iv) それ自体蛍光を発するため、核酸の蛍光ラベルに使用できる。

v) DNA複製において、複製されるDNAと相補的なプローブとして使用することによりDNA複製のリアルタイム検出ができる。同様に、RNAへの転写において、転写されるRNAと相補的なプローブとして使用することによりRNA転写のリアルタイム検出ができる。

vi) 相補的配列とハイブリダイズすることにより蛍光波長のシフトが起こるようなポリヌクレオチド誘導体である場合は、蛍光波長のシフトにより当該ポリヌクレオチド誘導体の酸化還元電位が変化する。このため、電極上に本発明のポリヌクレオチド誘導体を固定しておき、被験ポリヌクレオチドをこの電極に作用させて酸化還元電位を測定する方法で、核酸配列応答性のバイオセンサーとして利用できる。

40

vii) 本発明のポリヌクレオチドは、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)に供される蛍光性プローブとして利用できる。

プローブ

前述したように、本発明のポリヌクレオチド誘導体は、プローブとして使用して試料中に含まれる標的核酸の特定位置の塩基の種類を決定できる。

【0053】

プローブとして使用する場合は、試料の種類によって異なるが、ヌクレオチド数は例えば4~100個程度、好ましくは10~30個程度とすることができる。

【0054】

50

試料が細胞抽出液等のヌクレアーゼを含むものである場合には、ヌクレアーゼにより切断され難いように、ホスホロチオエートDNA又はRNA、H-ホスホネートDNA又はRNA等の修飾核酸であってもよい。

【0055】

ハイブリダイズに際しては、標的核酸を含む試料に対して本発明のポリヌクレオチド誘導体を1 nM ~ 1 mM程度、特に1 μ M ~ 50 μ M程度添加することが好ましい。また、ハイブリダイズ条件はポリヌクレオチドの長さによっても異なるが、例えば0 ~ 60程度、特に15 ~ 40程度の温度で、例えば5 ~ 60分間程度、特に5 ~ 10分間程度行うことができる。また、ハイブリダイズさせる試料は、例えばpH 5.5 ~ 8.0程度、特にpH 6.5 ~ 8.0程度に調整すればよい。

10

【0056】

また、試料から抽出及び精製された標的核酸と本発明のポリヌクレオチド誘導体とをハイブリダイズさせる場合には、ポリヌクレオチドの長さによって異なるが、例えば室温(25程度) ~ 50程度、10 ~ 48時間程度、2 ~ 6 \times SSC程度の条件とすることができる。さらに、同程度の濃度のSSC溶液で3 ~ 5回程度洗浄すればよい。

DNAチップ

本発明のDNAチップ(又はDNAアレイ)は、基体上に本発明のポリヌクレオチド誘導体が固定又は吸着されたものである。固定には共有結合などによる結合も含まれる。

【0057】

基体上へのDNAのスポット径は特に限定されないが、例えば50 ~ 200 μ m程度とすることができる。またスポットピッチは特に限定されないが、例えば100 ~ 500 μ m程度とすることができる。

20

【0058】

基体の材料は特に限定されず、例えばガラス、シリカ、金等を用いることができる。また、基体の形状は、板状(基板状)、ビーズ状等のどのような形状のものであってもよい。

【0059】

基体上に本発明のポリヌクレオチド誘導体を結合する場合には、本発明のポリヌクレオチド誘導体の一端を、例えば金属-硫黄結合などの方法を使用して、基体に結合させることができる。

【0060】

DNAチップに固定等される本発明のポリヌクレオチド誘導体のヌクレオチド数は、試料の種類によって異なるが、例えば10 ~ 200個程度、好ましくは50 ~ 100個程度とすることができる。

30

【0061】

試料が細胞抽出液等のヌクレアーゼを含むものである場合には、本発明のポリヌクレオチド誘導体は、ヌクレアーゼにより切断され難いように、ホスホロチオエートDNA又はRNA、H-ホスホネートDNA又はRNA等の修飾核酸であってもよい。

【0062】

ハイブリダイズに際しては、基体に固定された本発明のポリヌクレオチド誘導体に対して、試料を例えば0.1 μ M ~ 100 μ M程度、特に1 μ M ~ 10 μ M程度添加することができる。また、ハイブリダイズ条件はポリヌクレオチド誘導体の種類によって異なるが、例えば0 ~ 60程度、特に20 ~ 40程度の温度で、例えば1 ~ 30分間程度、特に1 ~ 5分間程度とすることができる。また、ハイブリダイズさせる試料は例えばpH 5.5 ~ 8.0程度、特にpH 6.5 ~ 8.0程度に調整しておくことが好ましい。

40

【0063】

ハイブリダイズ後は、チップの種類に適した洗浄液で2 ~ 5回程度洗浄すればよい。

【0064】

また、試料から抽出及び精製された標的核酸を用いる場合には、標的核酸を例えば2 ~ 6 \times SSC程度のハイブリダイズ溶液に溶解させたものを本発明のDNAチップに作用させるのが好ましい。温度、時間、洗浄条件については、未精製の標的核酸を用いる場合と同

50

様である。

本発明のヌクレオチドの同定方法

本発明のヌクレオチドの同定方法は、上記説明した本発明のポリヌクレオチド誘導体を試料中の標的核酸とハイブリダイズさせる工程と；

ハイブリダイズ産物の蛍光スペクトルを測定する工程と；

この蛍光スペクトルをハイブリダイズ前の本発明のポリヌクレオチド誘導体の蛍光スペクトルと比較することにより、標的核酸の特定位置のヌクレオチドの種類を同定する工程を含む方法である。

【0065】

試料は、核酸を含むものであればよく、細胞抽出液、血液のような体液、PCR産物、オリゴヌクレオチド等が挙げられる。

【0066】

ハイブリダイズ条件は、プローブ又はDNAチップについて説明した通りである。

【0067】

蛍光スペクトルは、常法に従い、照射波長250～600nm程度で測定すればよい。ハイブリダイズ前のポリヌクレオチド誘導体の蛍光スペクトル測定と、ハイブリダイズ産物の蛍光スペクトル測定とは、同じ媒体に溶解又は懸濁させた状態で行うことが好ましい。通常はハイブリダイゼーション溶液に溶解又は懸濁させた状態で測定すればよい。

【0068】

【発明の効果】

本発明によれば、簡便かつ正確に核酸塩基の同定を行えるポリヌクレオチド誘導体、その中間体として使用できるヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体及び塩基化合物が提供される。

【0069】

また本発明によれば、簡便かつ正確に核酸塩基の同定を行えるDNAチップ及び簡便かつ正確に核酸塩基の同定を行える方法が提供される。

【0070】

さらにいえば、本発明のヌクレオチド誘導体を含むポリヌクレオチド誘導体は、標的核酸とハイブリダイズさせると、標的核酸における当該ヌクレオチド誘導体と対合するヌクレオチドの種類によって、蛍光強度が増大したり、消光したり、発光波長特に極大波長がシフトしたりする。

【0071】

従来は、プローブと標的核酸との特定位置における塩基対形成の有無により、2本鎖の融解温度が若干異なることに基づいて塩基の同定を行っていたところ、検出可能な程度に融解温度差を大きくするために、個々の標的核酸ごとにハイブリダイズ条件設定を行う必要があった。これに対して本発明では、蛍光の増大、低減、波長のシフト等により塩基の同定を行うため、このような手間のかかるハイブリダイズ条件設定が不要である。

【0072】

また、2本鎖の融解によらないため、融解が生じ難いような長いポリヌクレオチド誘導体とすることもできる。

【0073】

また、塩基間の非特異的な吸着や塩基対形成の不安定性などによる検出エラーが生じ難い。

【0074】

また、対合するヌクレオチドにより蛍光発光の波長がシフトする場合には、特定ヌクレオチドと対合した場合の蛍光波長に合わせたフィルター（特定の数十nmの波長の光だけを透過するフィルターであり、市販されている）を使用してこのフィルターに蛍光を通すことにより、特定波長の蛍光だけを検出することができ、対合ヌクレオチドの検出感度が増大する。

【0075】

10

20

30

40

50

また、他の長波長蛍光色素を反応系中に添加することにより、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用して検出感度を向上させたり、目で見える色の蛍光に変化させることができる。

【0076】

【実施例】

以下、本発明を実施例を示してより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1 (NPP含有ヌクレオシド誘導体の合成)

図1を参照して説明する。5-ヨードデオキシシチジン (IDC) (5.0 g、14.2 mmol) (図1化合物(a)) の70 mlジメチルホルムアミド (DMF) 溶液に対して、トリブチルジメチルシリルクロライド (TBDMSCl) (4.7 g、31.2 mmol) 及びイミダゾール (2.1 g、31.2 mmol) を添加し、室温下90分間撹拌した。

【0077】

次いで、得られた生成物のうちの3 g (5.2 mmol) を30 mlのピリジンに溶解し、3当量の塩化ナフトイル (2.4 ml) を加え、5時間室温下で撹拌した。これにより、図1(b)に示す化合物が得られた。

【0078】

次いで、化合物(b)のうちの300 mg (0.36 mmol) をベンゼン150 mlに溶かし、プロピレンオキシド3 mlを加え、高圧水銀灯によって生じる光を7分間照射した。これにより、図1の(c)に示す化合物が得られた。

【0079】

次いで、これを25%アンモニア水/メタノール/クロロホルム (1:1:1) 3 mlに溶解し、50℃で20時間撹拌した。

【0080】

次いで、得られた生成物のうちの130 mg (0.21 mmol) をテトラヒドロフラン (THF) 5 mlに溶かし、1MテトラブチルアンモニウムフルオライドTHF溶液を0.5 ml (0.5 mmol) 加え、室温で2時間撹拌した。これにより、図1(d)に示す本発明の1実施態様である化合物が得られた。この化合物は、塩基としてピリミジン誘導体であるナフトピリドピリミジン (NPP) を有するヌクレオシド誘導体である。

実施例2 (NPP含有オリゴヌクレオチドの合成)

図1を参照して説明する。実施例1で得られたNPP含有ヌクレオシド誘導体66 mg (0.17 mmol) のピリジン溶液5 mlにジメトキシトリチルクロライド (70 mg、0.2 mmol) を加え、室温下で10時間撹拌した。

【0081】

次いで、得られた生成物のうちの31 mg (45.5 μmol) を2 mlのアセトニトリルに溶解し、テトラゾール (4 mg、54.6 μmol) 及びN, N, N', N'-テトライソプロピル-2-シアノエチルジフォスフォロアミダイト (18 μl、54.6 μmol) を加え、2時間室温で撹拌した。これにより図1(e)に示す化合物が得られた。

【0082】

化合物(e)を用いてアプライドバイオシステム392 DNA/RNAシンセサイザーを用いてフォスフォロアミダイト法によりNPP含有オリゴデオキシリボヌクレオチド誘導体5'-CGCAATXTAACGC-3' (配列番号1) (Xは、NPP含有デオキシリボヌクレオチド) を合成した。

< 蛍光分析 >

実施例2により得られたNPP含有オリゴデオキシリボヌクレオチド誘導体を、2.5 μMとなるように、0.1 M塩化ナトリウムを含む50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解させた溶液を調製した。この溶液の蛍光スペクトルを蛍光分光光度計 (島津製作所社製RF5300PC) を用いて約25℃で測定したところ、励起波長370 nm、発光波長420 nmであり、420 nmにおける蛍光強度は、1.6であった。

10

20

30

40

50

【0083】

上記溶液に、NPP含有オリゴデオキシリボヌクレオチド誘導体とNPP含有ヌクレオチド以外の部分が相補的な、別途合成したオリゴデオキシリボヌクレオチド(A')；5'-GCGTTAAATTGCG-3'(配列番号2)及び(G')；5'-GCGTTAGATTGCG-3'(配列番号3)をそれぞれ2.5 μ Mとなるように添加し、ポルテックスミキサーにて混合した。

【0084】

これらの溶液の420nmにおける蛍光強度を蛍光スペクトルを蛍光分光光度計を用いて測定したところ、オリゴデオキシリボヌクレオチド(A')を加えた場合には、420nmにおける蛍光強度は3.1であり、オリゴデオキシリボヌクレオチド(G')を加えた場合には、420nmにおける蛍光強度は0.2であった。

10

【0085】

このように、実施例2により得られたNPP含有オリゴデオキシリボヌクレオチド誘導体は、相補鎖上のNPP含有ヌクレオチドと対合するヌクレオチドがアデニル酸である場合には蛍光が増大し、グアニル酸である場合には蛍光が87%消光した。蛍光スペクトルを図2に示す。

<熱力学パラメーター>

実施例2により得られたNPP含有オリゴデオキシリボヌクレオチド誘導体を、2.5 μ Mとなるように、0.1M塩化ナトリウムを含む50mMリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解させた溶液に、別途合成したオリゴデオキシリボヌクレオチド(A')、オリゴデオキシリボヌクレオチド(T')5'-GCGTTATATTGCG-3'(配列番号4)、オリゴデオキシリボヌクレオチド(G')及びオリゴデオキシリボヌクレオチド(C')5'-GCGTTACATTGCG-3'(配列番号5)をそれぞれ2.5 μ Mとなるように添加し、ポルテックスミキサーにて混合した。

20

【0086】

オリゴデオキシリボヌクレオチド(A')、(T')、(G')及び(C')を添加した場合のそれぞれについて、形成された2本鎖の融解温度 T_m を、波長260nmにおける吸収スペクトルの変化を測定することにより評価した。また、2本鎖形成によるエンタルピー変化(- H°)及びエントロピー変化(- S°)を、融解温度曲線に対するカーブフィッティング法で測定した。

30

【0087】

対照として、NPP含有オリゴデオキシリボヌクレオチド誘導体においてNPP含有ヌクレオチドをデオキシチミジル酸としたオリゴデオキシリボヌクレオチド(C')について、同様にしてオリゴデオキシリボヌクレオチド(A')、(G')、(C')及び(T')とそれぞれ2本鎖を形成させ、それぞれ T_m 、- H° 及び- S° を測定した。

【0088】

また、対照として、NPP含有オリゴデオキシリボヌクレオチド誘導体においてNPP含有ヌクレオチドをデオキシチミジル酸としたオリゴデオキシリボヌクレオチド(T')について、同様にしてオリゴデオキシリボヌクレオチド(A')と2本鎖を形成させ、それぞれ T_m 、- H° 及び- S° を測定した。

40

【0089】

結果を以下の表1に示す。

【0090】

【表1】

		融解温度 T_m ($^{\circ}\text{C}$)	$-\Delta H^{\circ}$ (kcal/mol)	$-\Delta S^{\circ}$ (cal/kmol)
C	G'	56.0	93.1	256
	A'	40.2	95.5	278
	C'	36.4	83.1	241
	T'	40.4	90.4	261
T	A'	52.5	109.6	310
NPP	G'	56.1	92.8	254
	A'	55.3	104.3	291
	C'	52.0	80.6	221
	T'	50.4	89.3	249

10

【0091】

表1に示すように、NPP含有オリゴデオキシリボヌクレオチド誘導体ではオリゴデオキシリボヌクレオチド(G')と対合させた場合には、オリゴデオキシリボヌクレオチド(C)をオリゴデオキシリボヌクレオチド(G')と対合させた場合と同様の T_m 、 $-\Delta H^{\circ}$ 、 $-\Delta S^{\circ}$ を示した。

【0092】

また、NPP含有オリゴデオキシリボヌクレオチド誘導体ではオリゴデオキシリボヌクレオチド(A')と対合させた場合には、オリゴデオキシリボヌクレオチド(T)をオリゴデオキシリボヌクレオチド(A')と対合させた場合と同様の T_m 、 $-\Delta H^{\circ}$ 、 $-\Delta S^{\circ}$ を示した。

20

【0093】

このことから、dNPPと対合するヌクレオチドがアデニル酸又はグアニル酸である場合に、ハイブリダイズし易く、安定な2本鎖を形成できることが分かる。

【0094】

さらに、オリゴデオキシリボヌクレオチド(C)では、オリゴデオキシリボヌクレオチド(G')と2本鎖を形成した場合に、オリゴデオキシリボヌクレオチド(A')、(C')、(T')と2本鎖を形成した場合に比べて T_m が高いのに対して、NPP含有オリゴデオキシリボヌクレオチド誘導体では、オリゴデオキシリボヌクレオチド(G')、(A')、(C')、(T')のいずれと2本鎖を形成した場合にも略同等の T_m を示した。

30

【0095】

このことから、NPP含有オリゴデオキシリボヌクレオチド誘導体では、NPP含有ヌクレオチド誘導体と対合するのがいずれのヌクレオチドであっても安定な2本鎖を形成することが分かる。NPP含有ヌクレオチド誘導体は、グアニル酸、アデニル酸、シチジル酸、チミジル酸のいずれとも水素結合による塩基対を形成していない可能性が示唆される。

【0096】

【配列表】

40

SEQUENCE LISTING

<110> OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.
<120> polynucleotide derivative and use thereof
<130> 56602JP
<160> 5
<170> PatentIn version 3.1 10

<210> 1
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<400> 1 20
cgcaatxtaac gc 1
2

<210> 2
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial sequence 30

<400> 2
gcgttaaatt gcg 13

<210> 3
<211> 13
<212> DNA 40
<213> Artificial sequence

<400> 3

gcgtagatt gcg

13

<210> 4

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial sequence

10

<400> 4

gcgttatatt gcg

13

<210> 5

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial sequence

20

<400> 5

gcgttacatt gcg

13

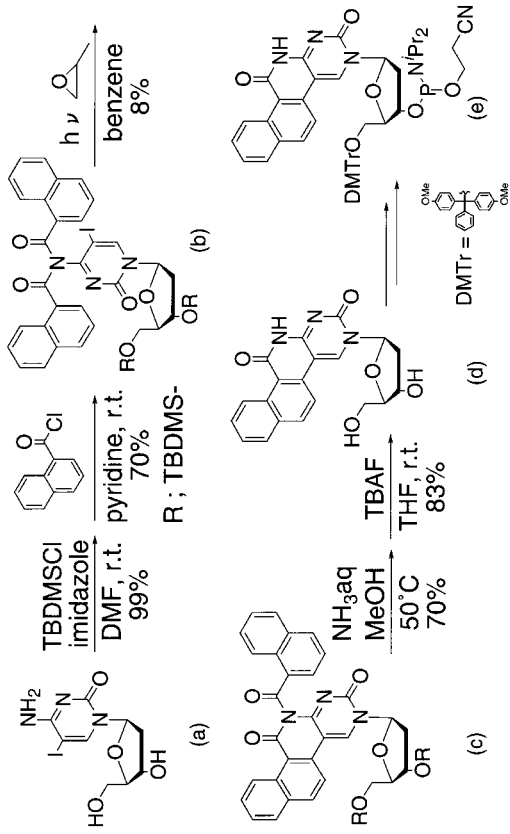
【図面の簡単な説明】

30

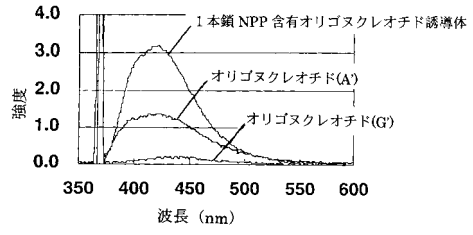
【図 1】本発明のヌクレオシド誘導体及びポリヌクレオチド誘導体の 1 実施態様の合成手順を示す図である。

【図 2】N P P 含有オリゴデオキシリボヌクレオチドを各種プローブとハイブリダイズさせた場合の蛍光スペクトルの変化を示す図である。

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

- (74)代理人 100086427
弁理士 小原 健志
- (74)代理人 100090066
弁理士 中川 博司
- (74)代理人 100094101
弁理士 舘 泰光
- (74)代理人 100099988
弁理士 斎藤 健治
- (74)代理人 100105821
弁理士 藤井 淳
- (74)代理人 100099911
弁理士 関 仁士
- (74)代理人 100108084
弁理士 中野 睦子
- (72)発明者 斎藤 烈
京都府京都市山科区勤修寺柴山 1 - 2 1
- (72)発明者 岡本 晃充
京都府京都市左京区田中大堰町 1 0 7 ヴィラヤマカワ 3 0 2
- (72)発明者 田井中 一貴
京都府京都市左京区吉田下大路町 5 グランドール大路 3 0 1
- (72)発明者 飯田 満
徳島県鳴門市撫養町立岩字元地 2 3 2 - 1
- (72)発明者 加藤 輝久
徳島県徳島市川内町加賀須野 4 6 3 - 3 0 今切寮 E 2 2 5
- F ターム(参考) 4B024 AA20 CA05 CA09 EA04 HA12 HA19
4B063 QA01 QA11 QQ42 QR32 QS34
4C057 LL41 LL44 LL45 LL50 MM05 MM09
4C065 AA04 BB09 CC09 DD02 EE02 HH01 JJ04 KK01 LL04 PP03

【要約の続き】

ミノ基、ジ - (低級アルキル) アミノ基、水酸基、アルキル基、低級アルコキシ基、低級アルキルチオ基、アルキルチオ基、アシルオキシ基、ハロゲン原子、シアノ基、チオール基又は置換基を有してよいフェニル基を表し、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 が同時に水素原子であることはない。 R^1 と R^2 、 R^2 と R^3 、 R^3 と R^4 とが結合してフェニル基を形成していてもよい。))

【選択図】 図 2