明　細　書

発明の名称 ： キャップ化ＲＮＡの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、５’末端にキャップ構造を有するキャップ化ＲＮＡの製造方法に関する。

背景技術

[0002] 真核生物のｍＲＮＡなどでは、５’末端に三リン酸結合を介して７－メチルグアニル酸が５’－５’結合した５’キャップ構造が知られている。キャップ構造は、ｍＲＮＡの翻訳を促進することが知られており、タンパク質発現系などで目的タンパク質を効率的に合成するためにｍＲＮＡにキャップ構造を効率的に導入することが求められている。

[0003] ｍＲＮＡの合成には、酵素による転写法とアミダイト法による化学合成法があるが、後者はｍＲＮＡ医薬において必須とされる化学修飾（ｍＲＮＡの安定性・翻訳能向上に寄与）を自在に導入できる点で大いに優位性がある。一方、化学合成したｍＲＮＡに対して、キャップ構造を容易に導入できる手法は存在しない。唯一、化学合成において５’末端をジリン酸化した後、酵素的にキャップを導入する手法が知られている（例えば、非特許文献１）。図１６は、この従来のキャップ導入方法を示す概念図である。この方法では、ＣＡＰ化酵素による転写合成又は化学合成によりジリン酸化したＲＮＡを用意し、これにさらにＣＡＰ化酵素によって５’末端にキャップ構造を導入している。

[0004] また、ＣＡＰ化の他の方法として、固相合成かつモノリン酸の活性化で、グアニンのメチル化を酵素で行う方法も知られている（例えば、非特許文献２参照）。本文献の方法によれば、ＲＮＡの５’末端のモノリン酸基にイミダゾール基を導入し、これにＧＤＰ（グアニンジリン酸）などのジリン酸基を反応させることで、ＲＮＡの５’末端にＣＡＰ構造を導入している。

[0005] さらに、別の方法も知られている（例えば、非特許文献３参照）。この方

法も固相合成によりＲＮＡの５’末端のトリリン酸基にイミダゾール基を導入し、これにＧＭＰ（グアニンリン酸）などのモノリン酸基を反応させることで、ＲＮＡの５’末端にＣＡＰ構造を導入している。

先行技術文献

特許文献

[0006] 非特許文献1：“Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ ａｃｔｉｖｉｔｙ ｏｆ ａｒｔｉｆｉｃｉａｌ ｍＲＮＡ ｐｒｅｐａｒｅｄ ｗｉｔｈ ｎｏｖｅｌ ｐｈｏｓｐｈｏｒｙｌａｔｉｎｇ ｒｅａｇｅｎｔｓ” Ｓｅｉｇｏ Ｎａｇａｔａ，Ｔｏｍｏｈｉｒｏ Ｈａｍａｓａｋｉ，Ｋｏｉｃｈｉ Ｕｅｔａｋｅ，Ｈｉｒｏｆｕｍｉ Ｍａｓｕｄａ，Ｋａｚｕｃｈｉｋａ Ｔａｋａｇａｋｉ，Ｎａｔｓｕｈｉｓａ Ｏｋａ，Ｔａｋｅｓｈｉ Ｗａｄａ，Ｔａｄａａｋｉ Ｏｈｇｉ，Ｊｕｎｉｃｈｉ Ｙａｎｏ，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２０１０，３８，７８４５

非特許文献2：“Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ Ｃａｐ－４ ＲＮＡ，Ｊｏｓｅｆ Ｌｅｉｔｅｒ，ｅｔ．ａｌ，ＣｈｅｍＢｉｏＣｈｅｍ ２０２０

非特許文献3：“Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ Ｕ１ ｓｎＲＮＡ Ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ”、Ａｋｉｈｉｒｏ Ｏｈｋｕｂｏ ｅｔ．ａｌ，Ｏｒｇａｎｉｃ Ｌｅｔｔｅｒ２０１３

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 上記の従来の方法では、ジリン酸化の効率が安定しない点や、キャップ化酵素を用いているため定量的に合成することが難しい点などから、工業的応用には適さない。このため、比較的簡易な操作でＲＮＡの５’末端に化学的にキャップを導入する手法が求められていた。

[0008] 本発明の目的は、簡易な操作でＲＮＡに化学的にキャップ構造を導入する

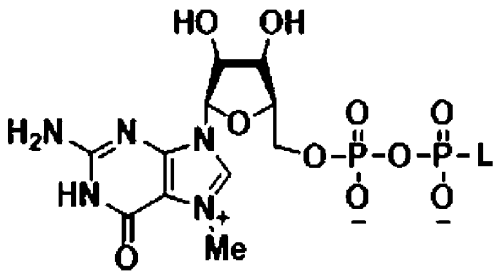
ことが可能なキャップ化ＲＮＡの製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、上記問題を解決すべく鋭意研究を重ねた。その結果、キャップ構造のジリン酸体をイミダゾールで活性化した活性化キャップ化合物を使用し、これを所定の条件下でモノリン酸ＲＮＡと反応させることで、ＲＮＡの５’末端に化学的にキャップ構造を導入できることを見出し、本発明を完成させた。

[0010] すなわち、本発明は、５’末端がキャップ修飾されたＲＮＡであるキャップ化ＲＮＡの製造方法であって、下記式（１）で示される活性化キャップ化合物と、５’末端がモノリン酸化されたモノリン酸ＲＮＡとを反応させることを特徴とするキャップ化ＲＮＡの製造方法である。

[化1]

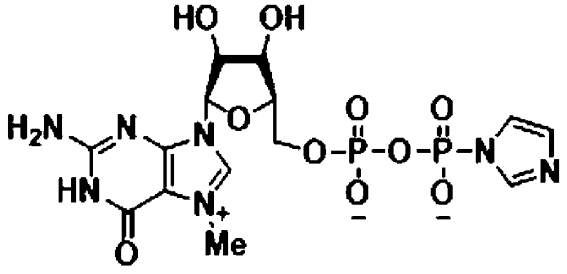


(1)

（ここで、Ｌは脱離基を示す。）

[0011] この場合において、前記活性化キャップ化合物が下記式（２）で示される化合物であることが好ましい。

[化2]



(2)

[0012] また、前記活性化キャップ化合物と、前記モノリン酸ＲＮＡとを、ヘテロ

芳香族化合物と、金属塩と、溶媒の存在下で反応させることが好ましい。

[0013] この場合において、前記金属塩がカルシウム塩であることが好ましい。

[0014] さらにこの場合、反応温度が３０～６０℃の範囲内であることが好ましい。

[0015] さらにこの場合、反応時間が１～２５時間の範囲内であることが好ましい。

[0016] さらにこの場合、前記溶媒が０～２０重量％の範囲内の水を含む有機溶媒であることが好ましい。

[0017] さらにこの場合、前記活性化キャップ化合物の濃度が５～３０ｍＭの範囲内であることが好ましい。

[0018] さらにこの場合、前記ヘテロ芳香族化合物が２－ニトロイミダゾール及び／又は１－メチルイミダゾールであることが好ましい。

発明の効果

[0019] 本発明によれば、簡易な操作でＲＮＡに化学的にキャップ構造を導入することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]本発明のキャップ化ＲＮＡの製造方法の概略を示す図である。

[図2]実施例における実験例１の結果を示す図である。

[図3]実施例における実験例２の結果を示す図である。

[図4]実施例における実験例３の結果を示す図である。

[図5]実施例における実験例４の結果を示す図である。

[図6]実施例における実験例５の結果を示す図である。

[図7]実施例における実験例６の結果を示す図である。

[図8]実施例における実験例７の結果を示す図である。

[図9]実施例における実験例８の結果を示す図である。

[図10]実施例における実験例９の結果を示す図である。

[図11]実施例における実験例１０の結果を示す図である。

[図12]実施例における実験例１１の結果を示す図である。

[図13]実施例における実験例１２の結果を示す図である。

[図14]実施例における実験例１３の結果を示す図である。

[図15]実施例における実験例１４の結果を示す図である。

[図16]従来の酵素によるキャップＲＮＡの製造方法の概略を示す図である。

[図17]実施例における実験例１５の結果を示す図である。

[図18]実施例における実験例１６の結果を示す図である。

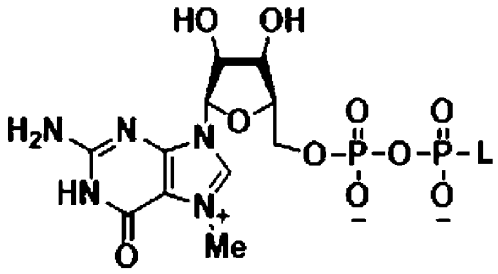
[図19]実施例における実験例１７の結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0021] 以下、本発明のキャップ化ＲＮＡの製造方法について説明する。本発明のキャップ化ＲＮＡの製造方法は、ｍＲＮＡなどのＲＮＡ分子において、５’末端にキャップを導入するための方法、すなわち、５’末端がキャップ修飾されたＲＮＡであるキャップ化ＲＮＡを製造するための方法である。図１は、本発明のキャップ化ＲＮＡの製造方法の概略を示している。

[0022] 本発明の方法では、まず、下記式（１）で示される活性化キャップ化合物と、５’末端がモノリン酸化されたモノリン酸ＲＮＡと、を用意する。

[化3]

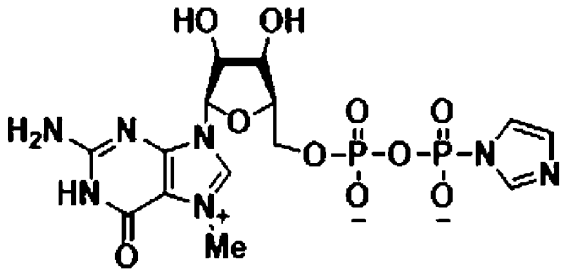


(1)

（ここで、Ｌは脱離基を示す。）

[0023] ここで、上記式（１）で示される活性化キャップ化合物としては、下記式（２）で示される化合物であることが好ましい。下記式（２）の活性化キャップ化合物は、キャップ構造のジリン酸体を脱離基Ｌのイミダゾールで活性化した化合物であり、７－メチルグアニル酸のジリン酸体にイミダゾールが結合した化合物である。

[化4]



(2)

[0024] 式（１）の脱離基Ｌとしては、上記のイミダゾール基のほかに、ピラゾール類、オキサゾール類、チアゾール類、ピリジン類、ピリミジン類、ピラジン類、トリアジン類などのヘテロ芳香環化合物などを挙げることができる。

[0025] 式（２）の活性化キャップ化合物は、グアノシンのジリン酸化、続くイミダゾールとの脱水縮合の方法で合成することができる。具体的には、後述する実施例に記載したスキームで合成することができる。その概要は、まずグアノシンのリボースの５’位をリン酸化してグアノシン一リン酸（グアノシン－５’－リン酸）を合成し、次にイミダゾールを反応させてリン酸基にイミダゾールを結合させる。続いて、リン酸トリエタノールアミンなどを反応させてグアノシン二リン酸を合成し、更にヨードメタンなどを反応させて塩基の７位をメチル化する。最後に、イミダゾールを反応させてリン酸基にイミダゾールを結合させる。

[0026] ５’末端がモノリン酸化されたモノリン酸ＲＮＡは、上記の活性化キャップ化合物が結合する標的化合物である。５’モノリン酸ＲＮＡは、５’トリリン酸ＲＮＡをＲＮＡ　５’ピロホスホヒドロラーゼ（ＲｐｐＨ）を使用して５’トリリン酸ＲＮＡからピロリン酸を除去する方法や、化学的固相合成法などで合成することができる。モノリン酸ＲＮＡのカウンター塩としては、テトラアルキルアンモニウム塩、トリアルキル酢酸塩、酢酸ナトリウム塩などを挙げることができる。特に、リン酸のカウンターカチオンを有機塩にすることで、反応性を向上することが可能である。

[0027] 次に、この活性化キャップ化合物とモノリン酸ＲＮＡとを、ヘテロ芳香族化合物と、カルシウム塩及び亜鉛塩、マグネシウム塩、ニッケル塩及び銅塩

からなる群より選択される少なくとも１種類の金属塩と、溶媒の存在下で反応させる。

[0028] ヘテロ芳香族化合物としては、イミダゾール基を有するイミダゾール化合物が好ましい。イミダゾール化合物としては、イミダゾールの窒素にアルキル基が結合したＮ－アルキルイミダゾールを挙げることができ、特にアルキル基として炭素数１～５の化合物を挙げることができる。Ｎ－アルキルイミダゾールとしては、例えば、１－メチルイミダゾール、１－エチルイミダゾール、１－プロピルイミダゾール、４－メチルイミダゾール、１－メチル－１Ｈ－イミダゾール－２－カルボン酸塩、１－メチルイミダゾール－４－カルボン酸塩、５－クロロ－１－メチル－４－ニトロイミダゾール、２－ヒドロキシメチルー１－メチルイミダゾールなどを挙げることができる。これらＮ－アルキルイミダゾールのうち、キャップ導入活性の高さの点から、１－メチルイミダゾールが好ましい。また、イミダゾール化合物としては、Ｎ－アルキルイミダゾール以外のイミダゾール類を挙げることができ、１－（２－ヒドロキシエチル）イミダゾール、２－ニトロイミダゾールなどを挙げることができる。これらのイミダゾール化合物のうち、キャップ導入活性の高さの点から、２－ニトロイミダゾールが特に好ましい。

[0029] 金属塩としては、カルシウム塩、亜鉛塩、マグネシウム塩、ニッケル塩、銅塩からなる群より選択され、これらの混合物（例えば、カルシウム塩と亜鉛塩）であってもよい。カルシウム塩としては、塩化カルシウム（$CaCl_2$）、水酸化カルシウム（$Ca(OH)_2$）などを挙げることができる。亜鉛塩としては、塩化亜鉛（$ZnCl_2$）などを挙げることができる。これらのうち、キャップ導入活性の高さの点から、$CaCl_2$が特に好ましい。

[0030] 溶媒としては、水、有機溶媒を挙げることができる。有機溶媒としては、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、アセトン、アセトニトリル、テトラヒドロフラン（ＴＨＦ）、ジオキサン、メチルエチルケトン、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）、１－メチル－２－ピロリドン（ＮＭＰ）、ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）、メタノール、エタノールなどを挙げることが

できる。これらのうち、有機塩等の溶解性の高さの点から、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）が好ましい。有機溶媒を主溶媒とすることで、副反応であるキャップ化試薬の加水分解を抑制でき、高効率なキャップ化反応が可能となる。溶媒としては、キャップ導入活性の高さの点から、０～２０重量％の範囲内の水を含む有機溶媒であることが好ましく、１～１０重量％の範囲内の水を含む有機溶媒であることがより好ましい。

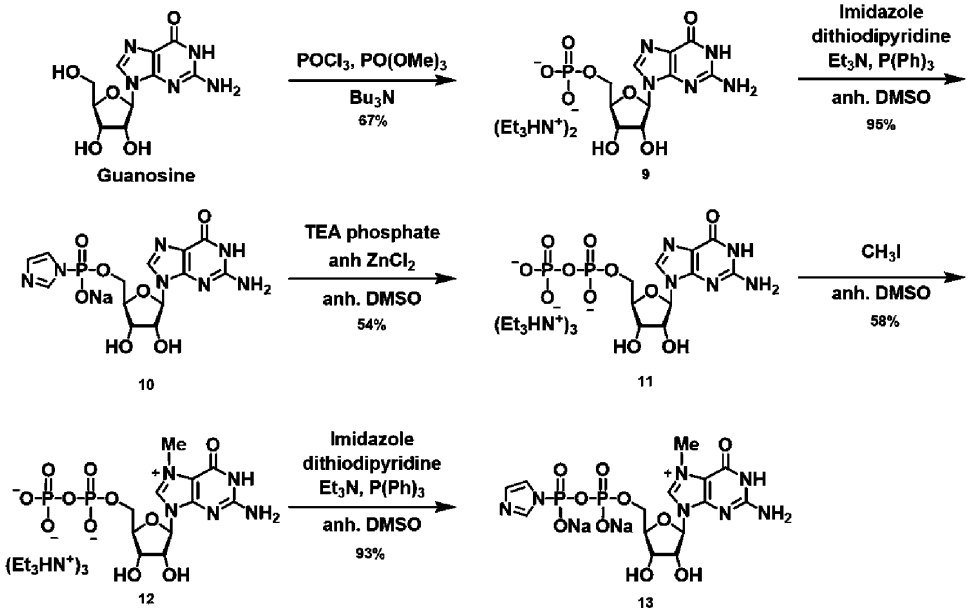
[0031] 反応液中の活性化キャップ化合物の濃度は、５～３０ｍＭの範囲内であることが好ましい。反応液中のヘテロ芳香族化合物の濃度は、０．５～２０ｍＭの範囲内であることが好ましく、５～１５ｍＭであることがより好ましく、１０ｍＭであることが特に好ましい。反応液中の金属塩の濃度は、０．５～１０ｍＭの範囲内であることが好ましい。反応条件は適宜設定することができるが、例えば、反応温度は３０～６０℃の範囲内であり、３５～４０℃の範囲内であることが好ましく、３７℃であることが特に好ましい。また、反応時間は１～２５時間の範囲内であり、５～１５時間の範囲内であることが好ましく、９時間であることが特に好ましい。これらの条件の範囲内では、キャップ導入活性が高く、効率的にキャップ構造をｍＲＮＡに導入することができる。

実施例

[0032] 以下、本発明を実施例に基づいて具体的に説明するが、これらは本発明の目的を限定するものではない。また、以下の実施例において「％」表示は特に規定しない限り質量基準（質量パーセント）である。

[0033] 以下のスキームに基づいて活性化キャップ化合物（化合物１３）を合成した。図中のパーセンテージは収率である。

[化5]



[0034] （１）化合物９の合成

グアノシン（７４８ｍｇ、２．６４ｍｍｏｌ、１．０ｅｑ．）をリン酸トリメチル（７．０ｍＬ）に懸濁させた。－１０℃で撹拌しながら塩化ホスホニル（７４３μＬ、７．９２ｍｍｏｌ、３．０ｅｑ．）を滴下し、－１０℃で２０時間攪拌した。１Ｍ　ＴＢＡＥ　Ｂｕｆｆｅｒを加え、反応をクエンチした。溶液を濃縮したのち、ＤＥＡＥ－ｓｅｐｈａｄａｘにより精製した。フラクションを回収、濃縮し、白色固体（ＴＥＡ塩）を得た。

[0035] （２）化合物１０の合成

化合物９（１．６３ｇ、４．４８ｍｍｏｌ、１．０ｅｑ．ＴＥＡ　ｓａｌｔ）、イミダゾール（３．６７ｇ、５３．９ｍｍｏｌ、１２ｅｑ．）、２，２’－ジチオジピリジン（３．３０ｇ、１４．９ｍｍｏｌ、３．３ｅｑ．）を脱水ＤＭＳＯ（１０ｍＬ）に溶かした後、ＴＥＡ（１．９０ｍＬ、１３．５ｍｍｏｌ、３．０ｅｑ）、Ph_3P（３．７４ｇ、１４．２ｍｍｏｌ、３．２ｅｑ）を加えて、室温で１８時間攪拌した。ｄｒｙ　ａｃｅｔｏｎｅ（８０ｍＬ）に溶かした過塩素酸ナトリウム（２．０４ｇ、１６．６ｍｍｏｌ、

３．７ｅｑ．）を加え、４℃で静置した。析出した固体を吸引ろ過、ｄｒｙ，　ｃｏｌｄ　ａｃｅｔｏｎｅにより洗浄した。得られた固体を真空下で乾固させ、白色粉末（Ｎａ塩）を得た。

[0036] （３）化合物１１の合成

化合物１０（５００ｍｇ、１．２１ｍｍｏｌ、１．０ｅｑ．）を脱水ＤＭＳＯ（８．０ｍＬ）に懸濁させた。室温で撹拌しながら塩化亜鉛（８４９ｍｇ、６．２３ｍｍｏｌ、５．１ｅｑ．）、トリエチルアミンリン酸塩（１．０ｇ、５．０２ｍｍｏｌ、４．１ｅｑ．、脱水ＤＭＳＯ　ａｑ．）を加え、室温で１６時間攪拌した。１Ｍ　ＴＢＡＥ　Ｂｕｆｆｅｒを加え、反応をクエンチした。生じた沈殿を吸引ろ過により取り除き、溶液を濃縮した。ＤＥＡＥ－ｓｅｐｈａｄａｘにより精製した。フラクションを回収、濃縮し、白色固体（ＴＥＡ塩）を得た。

[0037] （４）化合物１２の合成

化合物１１（１００ｍｇ、０．２２６ｍｍｏｌ、１．０ｅｑ．ＴＥＡ　ｓａｌｔ）を脱水ＤＭＳＯ（３．０ｍＬ）に溶かした。よう化メチル（９０μＬ、１．４２ｍｍｏｌ、６．３ｅｑ．）を室温で加え、１８時間攪拌した。１Ｍ　ＴＢＡＥ　Ｂｕｆｆｅｒを加え、反応をクエンチした。ジエチルエーテルと分液し、水槽を回収、濃縮した。ＤＥＡＥ－ｓｅｐｈａｄａｘにより精製した。フラクションを回収、濃縮し、白色固体（ＴＥＡ塩）を得た。

[0038] （５）化合物１３の合成

化合物１２（２０ｍｇ、４３．７μｍｏｌ、１．０ｅｑ．ＴＥＡ　ｓａｌｔ）、イミダゾール（４６．６ｍｇ、０．６８５ｍｍｏｌ、１５ｅｑ．）、２，２’－ジチオジピリジン（６１．３ｍｇ、０．６８５ｍｍｏｌ、６．０ｅｑ．）を脱水ＤＭＳＯ（４００μＬ）に溶かした後、ＴＥＡ（１８．０μＬ、０．１２９ｍｍｏｌ、３．０ｅｑ）、Ph_3P（５７．７ｍｇ、０．２２０ｍｍｏｌ、５．０ｅｑ）を加えて、室温で４．０時間攪拌した。ｄｒｙ　ａｃｅｔｏｎｅ（３．６ｍＬ）に溶かした過塩素酸ナトリウム（６８．２ｍｇ、０．６０６ｍｍｏｌ、１４ｅｑ．）を加え、４℃で静置した。析出した

固体を吸引ろ過、ｄｒｙ，　ｃｏｌｄ　ａｃｅｔｏｎｅにより洗浄した。得られた固体を真空下で乾固させ、白色粉末（Ｎａ塩）を得た。

[0039] 生成条件は以下のとおりである。

・Ｃｏｌｕｍｎ：

ＤＥＡＥ　Ｓｅｐｈａｄａｘ

・Ｅｌｕｅｎｔ：

Ａ）ＭＱ

Ｂ）１．５Ｍ　ＴＥＡＢ　Ｂｕｆｆｅｒ＋１０％ＡＣＮ

・Ｇｒａｄｉｅｎｔ：

０－１０ｍｉｎ　Ｂ　ｃｏｎｃ．　０％

１０－２１０ｍｉｎ　Ｂ　ｃｏｎｃ．　０－１００％

２１０－２４０ｍｉｎ　Ｂ　ｃｏｎｃ．　１００％

２４０ｍｉｎ－　Ｂ　ｃｏｎｃ．　０％

・Ｆｌｏｗ　ｒａｔｅ：

５ｍｌ／ｍｉｎ

・Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ：

２６０ｎｍ

[0040] １．実験例１（実施例１）：温度条件検討

室温、３７℃（実施例１－１）、５５℃（実施例１－２）で検討した。

（１）実験項

ＲＮＡ、活性化キャップ化合物、$CaCl_2$をそれぞれ必要量混合した。この溶液を遠心エバポレーターにより乾固させた。ａｎｈ．　ＤＭＳＯを加え、室温（ｒ．ｔ．）、３７℃又は５５℃、ｏｖｅｒ　ｎｉｇｈｔでインキュベートした。アミコン（３Ｋ）により脱塩し、反応をクエンチした。反応効率はゲル電気泳動により分析した。その結果を図２に示す。この図の（ａ）は反応溶液中の各成分の濃度を、（ｂ）は電気泳動の結果を、（ｃ）は収率を示している。

（２）結果

ｒ．ｔ．と３７℃では、反応の進行は確認されなかった。５５℃においては、低効率ではあるが反応の進行が確認された。モノリン酸活性化体の場合では、５５℃において反応効率が２０％程度改善したことがわかった。

[0041] ２．実験例２（実施例２）：MCl_2の検討

ルイス酸として、$NiCl_2$（参考例２－１）、$ZnCl_2$（参考例２－２）、$CaCl_2$、（実施例２－１）、$MgCl_2$（実施例２－２）、$CuCl_2$、（参考例２－３）、$FeCl_2$（参考例２－４）の計６つの金属塩を検討した。

（１）実験項

ＲＮＡ、活性化キャップ化合物、MCl_2をそれぞれ必要量混合した。この溶液を遠心エバポレーターにより乾固させた。ａｎｈ．　ＤＭＳＯを加え、５５℃、１７時間インキュベートした。アミコン（３Ｋ）により脱塩し、反応をクエンチした。反応効率はゲル電気泳動により分析した。その結果を図３に示す。この図の（ａ）は反応溶液中の各成分の濃度を、（ｂ）は電気泳動の結果を、（ｃ）は収率を示している。

（２）結果

$CaCl_2$（実施例２－１）、$MgCl_2$（実施例２－２）で反応効率が改善されたことがわかった。

[0042] ３．実験例３（実施例３）：１－メチルイミダゾールの添加、反応時間検討

$ZnCl_2$、$CaCl_2$について、１－メチルイミダゾールを添加して反応を検討した。

（１）実験項

ＲＮＡ、活性化キャップ化合物、MCl_2をそれぞれ必要量混合した。この溶液を遠心エバポレーターにより乾固させた。１－メチルイミダゾール、ａｎｈ．　ＤＭＳＯを加え、５５℃、１７時間インキュベートした。アミコン（３Ｋ）により脱塩し、反応をクエンチした。反応効率はゲル電気泳動により分析した。その結果を図４に示す。この図の（ａ）は反応溶液中の各成分の濃度を、（ｂ）は電気泳動の結果を、（ｃ）は収率を、（ｄ）は収率の

グラフを示している。

（２）結果

塩の種類を問わず１－メチルイミダゾールを添加することで全体として収率が向上したことがわかった。

[0043] ４．実験例４（実施例４）：１－メチルイミダゾールの濃度検討

１－メチルイミダゾールの添加により反応効率が改善したため、その濃度条件を検討した。

（１）実験項

ＲＮＡ、活性化キャップ化合物、$CaCl_2$をそれぞれ必要量混合した。この溶液を遠心エバポレーターにより乾固させた。１－メチルイミダゾール、ａｎｈ．ＤＭＳＯ（無水ジメチルスルホキシド）をそれぞれ必要量加え、５５℃、３時間インキュベートした。アミコン（３Ｋ）により脱塩し、反応をクエンチした。反応効率はゲル電気泳動により分析した。その結果を図５に示す。この図の（ａ）は反応溶液中の各成分の濃度を、（ｂ）は電気泳動の結果を、（ｃ）は収率を示している。

（２）結果

濃度変化は反応効率には影響しないことがわかった。

[0044] ５．実験例５（実施例５）：核酸の濃度検討

反応効率に核酸濃度が影響するかを調べた。

（１）実験項

ＲＮＡ、活性化キャップ化合物、$CaCl_2$をそれぞれ必要量混合した。この溶液を遠心エバポレーターにより乾固させた。１－メチルイミダゾール、ａｎｈ．ＤＭＳＯをそれぞれ必要量加え、５５℃、３時間インキュベートした。アミコン（３Ｋ）により脱塩し、反応をクエンチした。反応効率はゲル電気泳動により分析した。その結果を図６に示す。この図の（ａ）は反応溶液中の各成分の濃度を、（ｂ）は電気泳動の結果を、（ｃ）は収率を示している。

（２）結果

核酸濃度は反応効率にあまり影響しないことがわかった。

[0045] ６．実験例６（実施例６）：水存在下での検討

水存在下での反応効率を調べた。

（１）実験項（レーン１（実施例６－１）、レーン２（実施例６－２））

ＲＮＡ、活性化キャップ化合物、$CaCl_2$をそれぞれ必要量混合した。この溶液を遠心エバポレーターにより乾固させた。１－メチルイミダゾール、各溶媒（ａｎｈ．ＤＭＳＯ／ＭＱ（超純水）＝１／１　ｏｒ　ａｎｈ．ＤＭＳＯ）をそれぞれ必要量加え、５５℃、３時間インキュベートした。アミコン（３Ｋ）により脱塩し、反応をクエンチした。反応効率はゲル電気泳動により分析した。

（２）実験項（レーン３（実施例６－３））

活性化キャップ化合物、$CaCl_2$をそれぞれ必要量混合した。この溶液を遠心エバポレーターにより乾固させた。１－メチルイミダゾール、ａｎｈ．ＤＭＳＯ、ＲＮＡをそれぞれ必要量加え、５５℃、３時間インキュベートした。アミコン（３Ｋ）により脱塩し、反応をクエンチした。反応効率はゲル電気泳動により分析した。その結果を図７に示す。この図の（ａ）は反応溶液中の各成分の濃度を、（ｂ）は電気泳動の結果を、（ｃ）は収率を示している。

（３）結果

レーン２をポジティブコントロールとし、他レーンを比較すると、５０％ＭＱの条件（レーン１）では反応効率が大きく減少しているが、約１０％ＭＱの条件（レーン３）では少し反応効率が向上していることがわかった。

[0046] ７．実験例７（実施例７）：$CaCl_2$の濃度検討

反応効率に塩濃度が影響するかを調べた。

（１）実験項

活性化キャップ化合物、$CaCl_2$をそれぞれ必要量混合した。この溶液を遠心エバポレーターにより乾固させた。１－メチルイミダゾール、ａｎｈ．ＤＭＳＯ、ＲＮＡをそれぞれ必要量加え、５５℃、３時間インキュベートし

た。アミコン（３Ｋ）により脱塩し、反応をクエンチした。反応効率はゲル電気泳動により分析した。その結果を図８に示す。この図の（ａ）は反応溶液中の各成分の濃度を、（ｂ）は電気泳動の結果を、（ｃ）は収率を示している。

（２）結果

反応を高効率に進める上では、ある程度の塩濃度が必要ではあるが、高濃度の場合では、効率が落ちることがわかった。

[0047] ８．実験例８（実施例８）：活性化キャップ化合物の濃度検討

活性化キャップ化合物の濃度が反応効率に影響するかを調べた。

（１）実験項

活性化キャップ化合物、$CaCl_2$をそれぞれ必要量混合した。この溶液を遠心エバポレーターにより乾固させた。１－メチルイミダゾール、ａｎｈ．ＤＭＳＯ、ＲＮＡをそれぞれ必要量加え、５５℃、３時間インキュベートした。アミコン（３Ｋ）により脱塩し、反応をクエンチした。反応効率はゲル電気泳動により分析した。その結果を図９に示す。この図の（ａ）は反応溶液中の各成分の濃度を、（ｂ）は電気泳動の結果を、（ｃ）は収率を示している。

（２）結果

濃度が上がるにつれて、反応効率が向上しており、最もよいもの（２０ｍＭ）で８４％の収率を得た。

[0048] ９．実験例９（実施例９）：最後に入れる試薬の検討

「６．実験例６（実施例６）：水存在下での検討」の条件の下で、最後に加える試薬の違いによる反応効率を検討した。それぞれｌａｎｅ１：５’－ＰＯ　ＲＮＡ、ｌａｎｅ２：活性化キャップ化合物、ｌａｎｅ３：$CaCl_2$を最後に加えている。

（１）実験項

（ｌａｎｅ１）活性化キャップ化合物、$CaCl_2$、（ｌａｎｅ２）ＲＮＡ、$CaCl_2$、（ｌａｎｅ３）ＲＮＡ、活性化キャップ化合物をそれぞれ必要

量混合した。この溶液を遠心エバポレーターにより乾固させた。１－メチルイミダゾール、　ａｎｈ．　ＤＭＳＯ、（ｌａｎｅ１）ＲＮＡ、（ｌａｎｅ２）活性化キャップ化合物、（ｌａｎｅ３）$CaCl_2$をそれぞれ必要量加え、５５℃、３時間インキュベートした。アミコン（３Ｋ）により脱塩し、反応をクエンチした。反応効率はゲル電気泳動により分析した。その結果を図１０に示す。この図の（ａ）は反応溶液中の各成分の濃度を、（ｂ）は電気泳動の結果を、（ｃ）は収率を示している。

（２）結果

どの試薬を最後に加えても反応効率には大きな影響はなかった。

[0049] １０．実験例１０（実施例１０）：反応時間の検討

反応開始から１．０、２．０、３．０、４．０、５．０、６．０、２０時間ごとに反応液をサンプリングし、反応時間による収率の変化を調べた。反応条件は、５５℃でインキュベートした。１－メチルイミダゾール（＋）の場合では、反応時間が１時間でほとんど反応が進行していたため、更に短い時間間隔（１０、２０、３０、４０、５０、６０、９０、１２０分）で反応液をサンプリングし、反応効率の差を調べた。

（１）実験項

ＲＮＡ、$CaCl_2$をそれぞれ必要量混合した。この溶液を遠心エバポレーターにより乾固させた。１－メチルイミダゾール（＋のみ）、ａｎｈ．ＤＭＳＯ、活性化キャップ化合物をそれぞれ必要量加え、５５℃でインキュベートした。アミコン（３Ｋ）により脱塩し、反応をクエンチした。反応効率はゲル電気泳動により分析した。その結果を図１１に示す。この図の（ａ）は反応溶液中の各成分の濃度を、（ｂ）は電気泳動の結果を、（ｃ）は収率を示している。

（２）結果

反応は、２～３時間でおおよそ完了しており、ｏｖｅｒ　ｎｉｇｈｔで反応させることで僅かに収率が向上した。１－メチルイミダゾール（－）の場合では、反応速度に大きな差が生まれた。

[0050] １１．実験例１１（実施例１１）：水溶液中での反応検討

「３．実験例３（実施例３）：１－メチルイミダゾールの添加、反応時間検討

」の検討で、活性化剤の添加を必要とせず高収率を得た$CaCl_2$、$MgCl_2$について、水溶液中での反応を検討した。溶媒として、ＭＱ及び１０ｍＭＨＥＰＥＳ　Ｂｕｆｆｅｒ（ｐＨ＝７．４）を用いた。反応条件は５５℃、ｏｖｅｒｎｉｇｈｔでインキュベートした。

（１）実験項

終濃度が図１２（ａ）の表のようになるように、ＲＮＡ、活性化キャップ化合物、MCl_2、ｓｏｌｖｅｎｔを混合した。５５℃、ｏｖｅｒｎｉｇｈｔでインキュベートした。アミコン（３Ｋ）により脱塩し、反応をクエンチした。反応効率はゲル電気泳動により分析した。その結果を図１２に示す。この図の（ａ）は反応溶液中の各成分の濃度を、（ｂ）は電気泳動の結果を、（ｃ）は収率を示している。

（２）結果

溶媒としてＭＱを用いた場合には、高効率で反応が進行することが確認された。ただ、バンド強度が低くなっていることから、ＲＮＡの加水分解も同様に進行した可能性がある。

[0051] １２．実験例１２（実施例１２）：塩濃度の検討（Ｍｇ）

ＭＱ溶媒中で$MgCl_2$濃度の影響を検討した。濃度は５、１０、２０、３０ｍＭの４点で検討した。反応条件は、５５℃、ｏｖｅｒｎｉｇｈｔでインキュベートした。

（１）実験項

終濃度が図１３（ａ）の表のようになるように、ＲＮＡ、活性化キャップ化合物、$CaCl_2$、ＭＱを必要量混合した。５５℃、ｏｖｅｒｎｉｇｈｔでインキュベートした。アミコン（３Ｋ）により脱塩し、反応をクエンチした。反応効率はゲル電気泳動により分析した。その結果を図１３に示す。この図の（ａ）は反応溶液中の各成分の濃度を、（ｂ）は電気泳動の結果を、（

ｃ）は収率を、（ｄ）は収率のグラフを示している。

（２）結果

ＭｇＣｌ$_2$濃度は反応効率に大きな影響は与えなかった。

[0052] １３．実験例１３（実施例１３）：塩濃度の検討（Ｃａ）

ＭＱ溶媒中でＣａＣｌ$_2$濃度の影響を検討した。濃度は５、１０、２０、３０、４５、６０、９０ｍＭの７点で検討した。反応条件は、５５℃、ｏｖｅｒｎｉｇｈｔでインキュベートした。

（１）実験項

終濃度が図１４（ａ）の表のようになるように、ＲＮＡ、活性化キャップ化合物、ＣａＣｌ$_2$、ＭＱを必要量混合した。５５℃、ｏｖｅｒｎｉｇｈｔでインキュベートした。アミコン（３Ｋ）により脱塩し、反応をクエンチした。反応効率はゲル電気泳動により分析した。その結果を図１４に示す。この図の（ａ）は反応溶液中の各成分の濃度を、（ｂ）は電気泳動の結果を、（ｃ）は収率を、（ｄ）は収率のグラフを示している。

（２）結果

ＣａＣｌ$_2$濃度は反応効率に大きく影響した。塩濃度が高くなると収率は高くなり、３０ｍＭで最大となった。過剰な塩濃度は加水分解を促進し、反応効率の低下につながった。

[0053] １４．実験例１４（実施例１４）：反応時間の検討

ＭＱ溶媒条件下で反応時間の検討を行った。反応開始から１．０、２．０、３．０、１５、４０、７０時間ごとに反応液をサンプリングし、反応時間による収率の変化を検討した。反応条件は、５５℃でインキュベートした。

（１）実験項

終濃度が図１５（ａ）の表のようになるように、ＲＮＡ、活性化キャップ化合物、ＣａＣｌ$_2$、ＭＱを必要量混合した。５５℃でインキュベートした。アミコン（３Ｋ）により脱塩し、反応をクエンチした。反応効率はゲル電気泳動により分析した。その結果を図１５に示す。この図の（ａ）は反応溶液中の各成分の濃度を、（ｂ）は電気泳動の結果を、（ｃ）は収率のグラフを

示している。

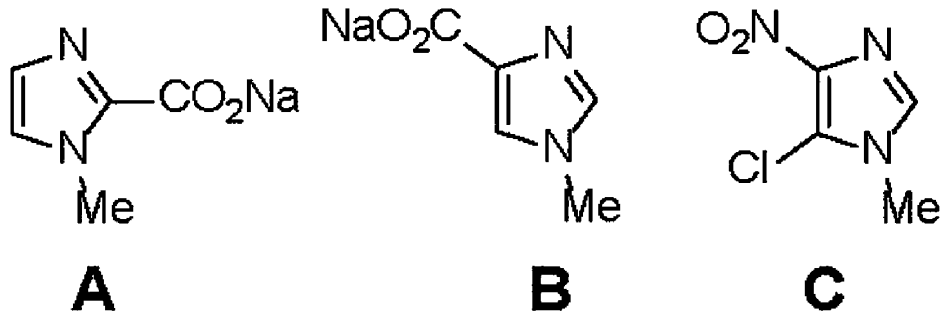
（２）結果

時間経過とともに反応効率は向上したが、加水分解も大幅に促進されＲＮＡ量の減少につながっている。

[0054] １５．実験例１５（実施例１４）：添加剤（ヘテロ芳香族化合物）のスクリーニング

添加剤であるヘテロ芳香族化合物について、種々のイミダゾール誘導体を使用してＣＡＰ化反応を行った。評価したイミダゾール誘導体は、以下のとおりである。

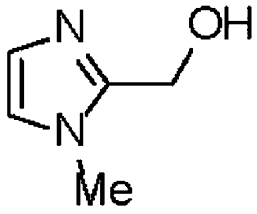
[化4]



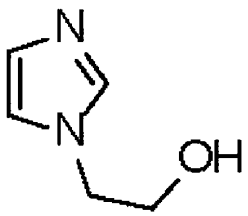
A

B

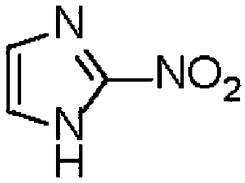
C



D



E



F

[0055] （１）実験項

実験の概要は図１７（ａ）に示すとおりである。

［イオン交換］

２０％（ｖ／ｗ）テトラエチルアンモニウムクロリド溶液を通し平衡化及

びＭＱで洗浄した陽イオン交換樹脂カラム（Ｄｏｗｅｘ　５０Ｗｘ８）に、イソプロパノール沈殿で得られたＲＮＡの溶液をロードし、ＭＱで溶出した。Ａ２６０吸光度を持つフラクションを回収し、テトラエチルアンモニウムクロリドに塩交換したＲＮＡ溶液を得た。

［ｃａｐ化反応］

エッペンドルフチューブに、イオン交換したＲＮＡ溶液（と$CaCl_2$溶液）を添加し、凍結乾燥機で水の除去を行った。m^7Ｇｐｐ－Ｉｍ（活性化キャップ化合物）と、イミダゾール誘導体のＤＭＳＯ溶液及び濃度調整のためのＤＭＳＯを添加した。最終濃度は、ＲＮＡ　１０μＭ、$CaCl_2$　１０ｍＭ、m^7Ｇｐｐ－Ｉｍ　１０ｍＭ、イミダゾール誘導体　５０ｍＭとした。

反応溶液を５５度で３時間インキュベートし、反応溶液の一部を２ｘｌｏａｄｉｎｇ　ｂｕｆｆｅｒ（８０％ホルムアミド、１０ｍＭ　ＥＤＴＡ　ｉｎ　ＭＱ）と混和し、ゲル電気泳動で解析した（１０％　ａｃｒｙｌａｍｉｄｅ、７．５Ｍ　ｕｒｅａ）。電気泳動の結果を図１７（ｃ）に示す。

（２）結果

この結果から、２－ニトロイミダゾール（化合物Ｆ）が、$CaCl_2$有り（＋）で収率が最も高かった（収率＝９８％）。したがって、添加剤としては、２－ニトロイミダゾールが最適であることがわかった。

[0056] １６．実験例１６（実施例１５）：添加剤濃度、温度、反応時間のスクリーニング

添加剤として２－ニトロイミダゾールを使用し、種々の濃度、反応温度、反応時間でＣＡＰ化反応を行った。反応条件は図１８（ｂ）に示したとおりである。

（１）実験項

実験の概要は図１８（ａ）に示すとおりである。

［ｃａｐ化反応］

エッペンドルフチューブに、イオン交換したＲＮＡ溶液と$CaCl_2$溶液を添加し、凍結乾燥機で水の除去を行った。ｍ７Ｇｐｐ－Ｉｍと、イミダゾー

ル誘導体のＤＭＳＯ溶液及び濃度調整のためのＤＭＳＯを添加した。

最終濃度は、ＲＮＡ　１０μＭ、$CaCl_2$　１０ｍＭ、m^7Ｇｐｐ－Ｉｍ　１０ｍＭ、イミダゾール誘導体　０～５０ｍＭとした。

反応溶液を各温度（３７　ｏｒ　５５　℃）で３－２３時間インキュベートし、反応溶液の一部を２ｘｌｏａｄｉｎｇ　ｂｕｆｆｅｒと混和し、ゲル電気泳動で解析した（１０％　ａｃｒｙｌａｍｉｄｅ、７．５Ｍ　ｕｒｅａ）。電気泳動の結果を図１８（ｃ）に示す。

（２）結果

この結果から、ｌａｎｅ５の条件（濃度１０ｍＭ、反応温度３７℃、反応時間９時間）が最適であることがわかった。

[0057] １７．実験例１７（実施例１６）：ＲＮＡのカウンター塩の効果の評価

ＲＮＡのカウンター塩について、種々の塩を使用してＣＡＰ化反応を行った。評価した塩は、図１９（ｂ）にＫ４４０’Ａ等として示している。

（１）実験項

実験の概要は図１９（ａ）に示すとおりである。カウンター塩として、テトラエチルアンモニウム塩（NEt_4Cl）、酢酸ナトリウム塩（ＮａＯＡｃ）を使用した。

［ｃａｐ化反応］

エッペンドルフチューブに、ＲＮＡ溶液と$CaCl_2$溶液を添加し、凍結乾燥機で水の除去を行った。m^7Ｇｐｐ－Ｉｍと、イミダゾール誘導体のＤＭＳＯ溶液及び濃度調整のためのＤＭＳＯを添加した。

最終濃度は、ＲＮＡ　１０μＭ、$CaCl_2$　１０ｍＭ、m^7Ｇｐｐ－Ｉｍ　１０ｍＭ、２－ニトロイミダゾール　１０ｍＭとした。

反応溶液を３７℃で９時間インキュベートし、反応溶液の一部を２ｘｌｏａｄｉｎｇ　ｂｕｆｆｅｒと混和し、ゲル電気泳動で解析した（１０％　ａｃｒｙｌａｍｉｄｅ、７．５Ｍ　ｕｒｅａ）。電気泳動の結果を図１９（ｃ）に示す。

（２）結果

この結果から、テトラエチルアンモニウム塩、酢酸ナトリウム塩のどちらでも反応性は変わらないことがわかった。