

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5731016号
(P5731016)

(45) 発行日 平成27年6月10日(2015.6.10)

(24) 登録日 平成27年4月17日(2015.4.17)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C 1 2 N	15/115 (2010.01)	C 1 2 N	15/00 H
C 1 2 M	1/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/00 A
C 1 2 Q	1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68 Z
G O 1 N	37/00 (2006.01)	G O 1 N	37/00 1 0 2

請求項の数 32 (全 98 頁)

(21) 出願番号	特願2013-552441 (P2013-552441)	(73) 特許権者	311002447 キリン株式会社 東京都中野区中野四丁目10番2号
(86) (22) 出願日	平成25年4月25日(2013.4.25)	(74) 代理人	100107342 弁理士 横田 修孝
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/062289	(72) 発明者	富田 康之 東京都中野区中野四丁目10番2号 キリン株式会社内
(87) 国際公開番号	W02013/161964	(72) 発明者	森田 悠治 東京都中野区中野四丁目10番2号 キリン株式会社内
(87) 国際公開日	平成25年10月31日(2013.10.31)	(72) 発明者	藤原 大介 東京都中野区中野四丁目10番2号 キリン株式会社内
審査請求日	平成26年1月22日(2014.1.22)		
(31) 優先権主張番号	特願2012-103864 (P2012-103864)		
(32) 優先日	平成24年4月27日(2012.4.27)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2012-196462 (P2012-196462)		
(32) 優先日	平成24年9月6日(2012.9.6)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
早期審査対象出願			
前置審査			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リガンドを高感度に検出する核酸分子並びに該核酸分子のスクリーニング方法および該核酸分子の感度の最適化方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

DNAアプタマー領域、アプタマーマスク領域、ジャンクション領域1、ジャンクション領域2、エフェクター領域および末端領域を含んでなり、かつ、各領域がDNA構築物の5'側からジャンクション領域1、アプタマーマスク領域、DNAアプタマー領域、ジャンクション領域2の順番で連結してなる、ループ構造を形成するDNA構築物であり、

DNAアプタマー領域がパツリン結合性アプタマーであり、該パツリン結合性アプタマーが配列番号：24、配列番号：25または配列番号：26の塩基配列またはその塩基配列と90%以上の配列同一性を示し、かつ、パツリン結合性である塩基配列を有するものであり、

リガンド非存在下でアプタマーマスク領域との塩基間で水素結合を形成するDNAアプタマー領域が、DNAアプタマー領域の3'末端の4塩基であり、

アプタマーマスク領域が、5'側からT-(X)n-T-Tであり、かつ、前記DNAアプタマー領域の3'末端の4塩基が、5'側からA-A-Z-Gであり(但し、nは、1または2であり、かつ、nが2である場合は、2個のXは同じ塩基でも異なる塩基でもよく、(X)nとZとは、インターナルループかバルジループを形成し、nが1である場合は、XとZは、XとZとの間でインターナルループを形成する塩基の組み合わせから選択される)、

エフェクター領域がDNAザイムであり、

エフェクター領域の少なくとも一部が、DNAアプタマー領域のリガンド非存在下では

2～5塩基長の末端領域とハイブリダイズして不活性化されており、該エフェクター領域がDNAアプタマー領域へのリガンド結合依存的に活性化する、DNA構築物

(ここで、

- ・DNAアプタマー領域の3'末端の4塩基が、リガンド非存在下で、DNAアプタマー領域の5'側に隣接する4～5塩基長のアプタマーマスク領域とハイブリダイズして、該ハイブリダイズ領域の塩基間で合計4～11個の水素結合を形成し、

- ・DNAアプタマー領域の3'側に隣接する1～5塩基長のジャンクション領域2が、リガンド非存在下で、アプタマーマスク領域の5'側に隣接するジャンクション領域1とハイブリダイズして、該ハイブリダイズ領域の塩基間で合計3個以上の水素結合を形成し、かつ、

- ・エフェクター領域がジャンクション領域1の5'側に隣接し、末端領域がジャンクション領域2の3'側に隣接するか、あるいは、エフェクター領域がジャンクション領域2の3'側に隣接し、末端領域がジャンクション領域1の5'側に隣接する。)

【請求項2】

DNAアプタマー領域、アプタマーマスク領域、ジャンクション領域1、ジャンクション領域2、エフェクター領域および末端領域を含んでなり、かつ、各領域がDNA構築物の5'側からジャンクション領域2、DNAアプタマー領域、アプタマーマスク領域、ジャンクション領域1の順番で連結してなる、ループ構造を形成するDNA構築物であり、

DNAアプタマー領域がパツリン結合性アプタマーであり、該パツリン結合性アプタマーが配列番号：24、配列番号：25または配列番号：26の塩基配列またはその塩基配列と90%以上の配列同一性を示し、かつ、パツリン結合性である塩基配列を有するものであり、

リガンド非存在下でアプタマーマスク領域との塩基間で水素結合を形成するDNAアプタマー領域が、DNAアプタマー領域の5'末端の4塩基であり、

アプタマーマスク領域が、5'側からT-T-(X)_n-Tであり、かつ、前記DNAアプタマー領域の5'末端の4塩基が、5'側からG-Z-A-Aである(但し、nは、1または2であり、かつ、nが2である場合は、2個のXは同じ塩基でも異なる塩基でもよく、(X)_nとZとは、インターナルループかバルジループを形成し、nが1である場合は、XとZは、XとZとの間でインターナルループを形成する塩基の組み合わせから選択される)、

エフェクター領域がDNAザイムであり、

エフェクター領域の少なくとも一部が、DNAアプタマー領域のリガンド非存在下では2～5塩基長の末端領域とハイブリダイズして不活性化されており、該エフェクター領域がDNAアプタマー領域へのリガンド結合依存的に活性化する、DNA構築物

(ここで、

- ・DNAアプタマー領域の5'末端の4塩基が、リガンド非存在下で、DNAアプタマー領域の3'側に隣接する4～5塩基長のアプタマーマスク領域とハイブリダイズして、該ハイブリダイズ領域の塩基間で合計4～11個の水素結合を形成し、

- ・DNAアプタマー領域の5'側に隣接する1～5塩基長のジャンクション領域2が、リガンド非存在下で、アプタマーマスク領域の3'側に隣接するジャンクション領域1とハイブリダイズして、該ハイブリダイズ領域の塩基間で合計3個以上の水素結合を形成し、かつ、

- ・エフェクター領域がジャンクション領域1の3'側に隣接し、末端領域がジャンクション領域2の5'側に隣接するか、あるいは、エフェクター領域がジャンクション領域2の5'側に隣接し、末端領域がジャンクション領域1の3'側に隣接する。)

【請求項3】

アプタマーマスク領域が、ハイブリダイズするDNAアプタマー領域との塩基間で、少なくとも1個のバルジループまたはインターナルループを形成する、請求項1または2に記載のDNA構築物。

【請求項4】

10

20

30

40

50

ジャンクション領域 1 が、ジャンクション領域 2 との塩基間で、少なくとも 1 個のバルジループまたはインターナルループを形成する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の DNA 構築物。

【請求項 5】

ジャンクション領域 1 およびジャンクション領域 2 が、それぞれ 3 塩基長である、請求項 4 に記載の DNA 構築物。

【請求項 6】

アプタマーマスク領域が、リガンド非存在下で、前記 DNA アプタマー領域の 3' 側末端または前記 DNA アプタマー領域の 5' 側末端との間で、2 個の塩基対および T - G のミスマッチ塩基対を形成するか、または、3 個若しくは 4 個の塩基対を形成する、請求項 1 に記載の DNA 構築物。

10

【請求項 7】

アプタマーマスク領域が 4 塩基長である DNA 分子であって、

リガンド非存在下でアプタマーマスク領域にミスマッチ塩基対を有する場合には、ミスマッチ塩基対を形成する塩基は、アプタマーマスク領域のミスマッチ塩基対による分子全体の二次構造の dG の増加量 (ddG) が、+ 0 . 1 k c a l / m o l 以上である塩基の組み合わせから選択され、および/または、

リガンド非存在下でジャンクション領域にミスマッチを有する場合には、ミスマッチ塩基対を形成する塩基は、ジャンクション領域のミスマッチによる分子全体の二次構造の dG の増加量が、+ 1 . 0 k c a l / m o l 以下である塩基の組み合わせから選択される、請求項 6 に記載の DNA 構築物。

20

【請求項 8】

アプタマー領域にリガンドが結合すると、アプタマーマスク領域の一部の塩基が、ジャンクション領域 2 とハイブリダイズして、4 個以上の水素結合を形成する、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の DNA 構築物。

【請求項 9】

アプタマーマスク領域の一部の塩基とジャンクション領域 2 との間で形成される 4 個以上の水素結合が、2 個の塩基対、2 個の塩基対および T - G のミスマッチ塩基対、または、3 個の塩基対により形成される、請求項 8 に記載の DNA 構築物。

【請求項 10】

エフェクター領域が、DNA アプタマー領域のリガンド依存的に活性化するシグナル発生領域である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の DNA 構築物 (ここで、シグナル発生領域の酵素活性を測定することにより、リガンドを検出し、あるいは定量することができる)。

30

【請求項 11】

エフェクター領域が DNA アプタマー領域へのリガンド結合依存的に活性化して、リガンド非存在下の 2 倍以上の活性を発揮できる、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の DNA 構築物。

【請求項 12】

DNA ザイムが、配列番号 16 の塩基配列を有する酸化還元型 DNA ザイムである、請求項 1 に記載の DNA 構築物。

40

【請求項 13】

塩基配列が、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23、配列番号：40または配列番号：41の塩基配列である、DNA 構築物。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の DNA 構築物を用いてリガンドを検出する方法であって、該 DNA 構築物とリガンドとの結合を、還元型 A B T S の酸化によって生じる吸光度の変化として検出する方法。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の DNA 構築物が電極表面に担持されてなる、セ

50

ンサー素子。

【請求項 16】

DNA構築物がリンカーを介して電極表面に担持されてなる、請求項15に記載のセンサー素子。

【請求項 17】

請求項15または16に記載のセンサー素子を備えてなる、マイクロアレイ。

【請求項 18】

DNAザイムの基質存在下での電気シグナルを測定することを含んでなる、請求項15若しくは16に記載のセンサー素子、または、請求項17に記載のマイクロアレイを用いたリガンドの検出方法（但し、DNA構築物のエフェクター領域は酸化還元型DNAザイムである）。 10

【請求項 19】

リガンドを検出するDNA分子をスクリーニングする方法であって、下記工程：

(A) (i a) または (i b) を満たし、かつ、(i i) を満たすことを指標としてDNA分子候補群を得ることと：

(i a) DNAアプタマー領域、アプタマーマスク領域、ジャンクション領域1、ジャンクション領域2、エフェクター領域および末端領域を含んでなり（但し、エフェクター領域は酸化還元型DNAザイムである）、かつ、各領域がDNA構築物の5'側からジャンクション領域1、アプタマーマスク領域、DNAアプタマー領域、ジャンクション領域2の順番で連結してなる、ループ構造を形成するDNA構築物であり、 20

エフェクター領域の少なくとも一部が、DNAアプタマー領域のリガンド非存在下では2～5塩基長の末端領域とハイブリダイズして不活性化されており、該エフェクター領域がDNAアプタマー領域へのリガンド結合依存的に活性化する、DNA分子

（ここで、

・DNAアプタマー領域の3'末端の4～7塩基が、リガンド非存在下で、DNAアプタマー領域の5'側に隣接する3～5塩基長のアプタマーマスク領域とハイブリダイズして、該ハイブリダイズ領域の塩基間で合計4～11個の水素結合を形成し、

・DNAアプタマー領域の3'側に隣接する1～5塩基長のジャンクション領域2が、リガンド非存在下で、アプタマーマスク領域の5'側に隣接するジャンクション領域1とハイブリダイズして、該ハイブリダイズ領域の塩基間で合計3個以上の水素結合を形成し、 30

かつ、
・エフェクター領域がジャンクション領域1の5'側に隣接し、末端領域がジャンクション領域2の3'側に隣接するか、あるいは、エフェクター領域がジャンクション領域2の3'側に隣接し、末端領域がジャンクション領域1の5'側に隣接する。）；または、

(i b) DNAアプタマー領域、アプタマーマスク領域、ジャンクション領域1、ジャンクション領域2、エフェクター領域および末端領域を含んでなり（但し、エフェクター領域は酸化還元型DNAザイムである）、かつ、各領域がDNA構築物の5'側からジャンクション領域2、DNAアプタマー領域、アプタマーマスク領域、ジャンクション領域1の順番で連結してなる、ループ構造を形成するDNA構築物であり、

エフェクター領域の少なくとも一部が、DNAアプタマー領域のリガンド非存在下では2～5塩基長の末端領域とハイブリダイズして不活性化されており、該エフェクター領域がDNAアプタマー領域へのリガンド結合依存的に活性化する、DNA分子 40

（ここで、

・DNAアプタマー領域の5'末端の4～7塩基が、リガンド非存在下で、DNAアプタマー領域の3'側に隣接する3～5塩基長のアプタマーマスク領域とハイブリダイズして、該ハイブリダイズ領域の塩基間で合計4～11個の水素結合を形成し、

・DNAアプタマー領域の5'側に隣接する1～5塩基長のジャンクション領域2が、リガンド非存在下で、アプタマーマスク領域の3'側に隣接するジャンクション領域1とハイブリダイズして、該ハイブリダイズ領域の塩基間で合計3個以上の水素結合を形成し、 50

・エフェクター領域がジャンクション領域1の3'側に隣接し、末端領域がジャンクション領域2の5'側に隣接するか、あるいは、エフェクター領域がジャンクション領域2の5'側に隣接し、末端領域がジャンクション領域1の3'側に隣接する。)；

(i i) DNA アプタマー領域がアプタマーマスク領域の3'側に隣接するDNA分子の場合には、アプタマーマスク領域が、5'側からT - (X) n - T - Tであり、かつ、前記DNAアプタマー領域の3'末端の4塩基が、5'側からA - A - Z - Gであり、DNAアプタマー領域がアプタマーマスク領域の5'側に隣接するDNA分子の場合には、アプタマーマスク領域が、5'側からT - T - (X) n - Tであり、かつ、前記DNAアプタマー領域の5'末端の4塩基が、5'側からG - Z - A - Aである(但し、nは、1または2であり、かつ、nが2である場合は、2個のXは同じ塩基でも異なる塩基でもよく、(X) nとZとは、インターナルループかパルジループを形成し、nが1である場合は、XとZは、XとZとの間でインターナルループを形成する塩基の組み合わせから選択される)；

(B) 設計または改変した塩基配列を有するDNA分子を電極表面に担持してなるセンサー素子を備えたマイクロアレイを作製すること、

(C) 得られたマイクロアレイを用いて電気化学的にエフェクター領域からの酸化還元電流を測定すること、および、

(D) リガンドの検出感度を指標としてDNA分子を選択することを含んでなる、スクリーニング方法。

【請求項20】

請求項19で定義された工程(A)、(B)、(C)および(D)を含んでなるスクリーニングを実施した後に、

下記工程：

(A ') その直前のスクリーニングにより得られたDNA分子をさらに改変してリガンドを検出するDNA分子候補群を得ること、

(B) 設計または改変した塩基配列を有するDNA分子を電極表面に担持してなるセンサー素子を備えたマイクロアレイを作製すること、

(C) 得られたマイクロアレイを用いて電気化学的にエフェクター領域からの酸化還元電流を測定すること、および、

(D) リガンドの検出感度を指標としてDNA分子を選択すること

を含んでなる少なくとも1回のスクリーニングをさらに実施する、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

前記(A)の工程において、DNA分子候補群が、下記(iii)をさらに満たす、請求項19または20に記載のスクリーニング方法：

(i i i) アプタマー領域にリガンドが結合すると、アプタマーマスク領域の一部の塩基が、ジャンクション領域2とハイブリダイズして、4個以上の水素結合を形成する。

【請求項22】

DNA分子によるリガンドの検出感度を最適化することに用いられる、請求項19～21のいずれか一項に記載のスクリーニング方法。

【請求項23】

DNA分子のアプタマー領域、モジュール領域、エフェクター領域、およびそれ以外の領域から選択される少なくとも1つの領域を選択してその塩基配列を設計または改変する、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

リガンドが、パツリンである、請求項19～23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】

請求項19または21の工程(A)において得られるDNA分子候補群が電極表面に担持されてなる、センサー素子。

【請求項26】

10

20

30

40

50

DNA分子候補群がリンカーを介して電極表面に担持されてなる、請求項25に記載のセンサー素子。

【請求項27】

請求項25または26に記載のセンサー素子を備えてなる、マイクロアレイ。

【請求項28】

DNAザイムの基質存在下での電気シグナルを測定することを含んでなる、請求項25若しくは26に記載のセンサー素子、または、請求項27に記載のマイクロアレイを用いた、DNA分子のスクリーニング方法（但し、DNA構築物のエフェクター領域は酸化還元型DNAザイムである）。

【請求項29】

配列番号：24、配列番号：25、または配列番号：26の塩基配列を有する、DNA分子。

【請求項30】

請求項29に記載のDNA分子または請求項1～13のいずれか一項に記載のDNA構築物を用いてパツリンを検出する方法。

【請求項31】

請求項29に記載のDNA分子または請求項1～13のいずれか一項に記載のDNA構築物にパツリンを結合させることを含んでなる、試料中のパツリンを除去する方法。

【請求項32】

請求項29に記載のDNA分子または請求項1～13のいずれか一項に記載のDNA構築物を固定化したカラム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、リガンドを検出する核酸分子に関する。本発明はまた、そのような核酸分子のスクリーニング方法および核酸分子の感度の最適化方法にも関する。

【背景技術】

【0002】

標的分子に対して特異的に結合する活性を有する分子として、抗体やアプタマーが知られている。抗体は簡便な方法により抗原特異的な抗体を得ることができる点で優れ、広く抗原の検出などに用いられている。一方、アプタマーは、設計は困難であるが、合成は比較的容易であり、完全に人工的な方法により得ることができる。アプタマーは、毒性を有する抗原や低抗原分子（例えば、低分子化合物）に対して結合する分子など抗体では作製困難な分子に対して特異性を有する分子を得ることができる点や、安価に製造し得る点、乾燥状態等で安定的に保存が可能である点などで、抗体に対して優位性を示す。

【0003】

アプタマーと標的分子との結合の検出は、特に標的分子の標識が困難な場合には、一般的には、アプタマーの構造変化を検出することにより達成される。例えば、アプタマーの構造変化を検出する方法としては、構造変化により引き起こされるアプタマーの自己切断を検出する方法が知られる。例えば、自己切断型RNAアプタマーでは、アプタマーが標的分子と結合すると自己切断活性が活性化されて分子が開裂し、この開裂したRNAアプタマーの断片を検出することにより、アプタマーと標的分子との結合をモニターすることができる。このようにアプタマーでは、標的分子の検出は、標的分子への結合依存的なシグナルの発生（前述の場合は、自己切断活性によるRNA断片の生成）をモニターすることにより行われている。

【0004】

DNAとRNAとを比較すると、RNAはより構造的に柔軟であることが知られ、生体内で発見された酵素活性を有する核酸はすべてがRNAである。一方でDNAは、構造的な柔軟性には欠けるものの化学的安定性に優れ、遺伝情報の保存などを担っている。そのため、アプタマーのほとんどは、柔軟な立体構造を形成する能力を有し、多彩な機能を発

10

20

30

40

50

揮するRNA分子である。しかし、最近になってDNA分子を用いたアプタマーも報告されている（非特許文献1）。非特許文献1は、ヘアピンループ構造のDNAアプタマーを開示しており、リガンドとしてAMPが結合すると、分子全体の二次構造が変化し、該分子が有する酸化還元酵素活性が発現する。当該酵素活性を測定することでリガンドの検出が可能であるが、検出感度はそれほど高くない。

【0005】

高感度のアプタマーの取得は、通常は、分子進化法によりランダムに配列を改変して得られたアプタマー候補群から、感度を指標としてアプタマーをスクリーニングすることにより行われ（特許文献1、2および3）、一般的に、高感度化のためのアプタマーの設計は容易ではなく、設計のための指針やDNAアプタマーが高感度を発揮するための条件等はほとんど知られていない。

10

【0006】

ところで、パツリン（patulin）は、ペニシリウム属（アオカビ類）Penicillium expansum、アスペルギルス属（コウジカビ類）によって作られるマイコトキシンの一種であり、腐敗したリンゴから検出されることで知られる。パツリンの毒性は、細胞膜に対する膜透過性を阻害することに起因する臓器出血性のほか、遺伝毒性を持つことが示され、また、動物実験では発癌性の可能性が示唆されている。そのため、リンゴ製品のパツリンの量は製品の品質の基準として用いられている。パツリンの検出や選択的な除去の方法は重要度が高く、パツリンに特異的に結合する物質が得られれば、果汁等のリンゴ製品の品質を簡便に検査すること、および製品からパツリンを効果的に除去することが可能になると期待される。

20

【0007】

アプタマーは、SELEX法（Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment）を用いて作製することができる（特許文献4）。SELEX法では、 10^{14} 個程度の配列多様性を有するRNA、またはDNAのプールから、標的物質に特異的に結合する核酸分子を取得する。SELEX法で使用される核酸プールの核酸分子は、一般的に20～40残基程度のランダム配列をプライマー配列で挟み込んだ構造をしている。SELEX法では、この核酸プールを標的物質と接触させて、標的物質に結合した核酸のみを回収する。回収した核酸がRNAの場合はRT-PCRで増幅するが、DNAの場合はそのままこれをPCRの鋳型として用いて増幅する。増幅して得たDNAから必要に応じてRNAを転写し、あるいはDNAをそのまま使用してさらに標的物質に特異的に結合する核酸分子を取得する。SELEX法では、通常、この作業を10回程度繰り返すことにより、標的物質と特異的に結合するアプタマーを取得する。

30

【0008】

一般的なSELEX法では、アプタマーの標的物質は担体に固定化されており、標的物質への親和性を利用して標的物質への親和性を示す核酸を回収する。一方、Breakerらは標的物質を担体に固定化することなくSELEX法を行う手法を提案した（非特許文献2）。Breakerらの方法は、具体的には、自己切断型リボザイムとランダム配列を連結させ、標的物質の存在下でのみ自己切断活性が発揮されるものを選別することにより、ランダム配列の中から標的物質と結合するRNAを取得する方法である。

40

【0009】

さらに、マイクロアレイを用いてアプタマーをスクリーニングする手法も開発されている（非特許文献3）。マイクロアレイによるスクリーニングは、一度に大量の分子のスクリーニングが可能である点で極めて有益な手法であるが、主にターゲット分子がタンパク質のように蛍光標識可能な分子に限られていた。例えば、蛍光標識が難しい分子や、標識することで物性が大きく変化してしまう低分子に対しては、この手法を適用することは困難であった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

50

【特許文献1】特表2003-512059号公報

【特許文献2】国際公開第2012/86772号

【特許文献3】国際公開第2013/5723号

【特許文献4】国際公開第1991/19813号

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Teller C., Shimron S., Willner I., Aptamer-DNAzyme hairpins for amplified biosensing. Anal. Chem. (2009) 81:9114-9119

【非特許文献2】Nature structural biology 6, 1062-1071, 1999

【非特許文献3】Nucleic Acids Research, Vol. 37, No. 12 e87, 2009

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明は、リガンド（例えば、パツリン）を高感度に検出できる核酸分子を提供することを目的とする。本発明はまた、リガンド（例えば、パツリン）を高感度に検出できる核酸分子のスクリーニング方法、および、リガンド（例えば、パツリン）を高感度に検出できる核酸分子の最適化に用いられる核酸分子のスクリーニング方法を提供することを目的とする。本発明はさらに、リガンド（例えば、パツリン）を含む試料中からリガンドを効果的に除去する方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

20

【0013】

本発明者らは、DNAアプタマー領域とDNAザイム領域を有するループ構造を形成するDNA分子において、DNAアプタマー領域とDNAザイム領域との間に配列を介在させた場合、リガンドに対する感度が高いDNA分子では、その配列が特定の規則を有することを見出した。本発明者らはまた、リガンドを高感度に検出するヘアピンループ構造のDNA分子は、電気化学的検出法によるマイクロアレイを用いることで、大量のDNA分子を迅速かつ簡便にスクリーニングできることを見出した。本発明者らはまた、低分子化合物であるパツリンをリガンドとして高感度に検出するDNA分子およびRNA分子を見出した。本発明はこのような知見に基づいてなされた発明である。

【0014】

30

すなわち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

(1) DNAアプタマー領域、アプタマーマスク領域、ジャンクション領域1、ジャンクション領域2、エフェクター領域および末端領域を含んでなり、かつ、各領域がDNA構築物の5'側からジャンクション領域1、アプタマーマスク領域、DNAアプタマー領域、ジャンクション領域2の順番で連結してなる、ループ構造を形成するDNA構築物であり、

エフェクター領域の少なくとも一部が、DNAアプタマー領域のリガンド非存在下では末端領域とハイブリダイズして不活性化されており、該エフェクター領域がDNAアプタマー領域へのリガンド結合依存的に活性化する、DNA構築物またはそれと同等の塩基配列を有する核酸構築物

40

(ここで、

・DNAアプタマー領域の3'末端の4~7塩基が、リガンド非存在下で、DNAアプタマー領域の5'側に隣接する3~5塩基長のアプタマーマスク領域とハイブリダイズして、該ハイブリダイズ領域の塩基間で合計4~11個の水素結合を形成し、

・DNAアプタマー領域の3'側に隣接する1~5塩基長のジャンクション領域2が、リガンド非存在下で、アプタマーマスク領域の5'側に隣接するジャンクション領域1とハイブリダイズして、該ハイブリダイズ領域の塩基間で合計3個以上の水素結合を形成し、かつ、

・エフェクター領域がジャンクション領域1の5'側に隣接し、末端領域がジャンクション領域2の3'側に隣接するか、あるいは、エフェクター領域がジャンクション領域2の

50

3'側に隣接し、末端領域がジャンクション領域1の5'側に隣接する。)。

(2) DNA アプタマー領域、アプタマーマスク領域、ジャンクション領域1、ジャンクション領域2、エフェクター領域および末端領域を含んでなり、かつ、各領域がDNA構築物の5'側からジャンクション領域2、DNAアプタマー領域、アプタマーマスク領域、ジャンクション領域1の順番で連結してなる、ループ構造を形成するDNA構築物であり、

エフェクター領域の少なくとも一部が、DNAアプタマー領域のリガンド非存在下では末端領域とハイブリダイズして不活性化されており、該エフェクター領域がDNAアプタマー領域へのリガンド結合依存的に活性化する、DNA構築物またはそれと同等の塩基配列を有する核酸構築物

10

(ここで、

- ・DNAアプタマー領域の5'末端の4~7塩基が、リガンド非存在下で、DNAアプタマー領域の3'側に隣接する3~5塩基長のアプタマーマスク領域とハイブリダイズして、該ハイブリダイズ領域の塩基間で合計4~11個の水素結合を形成し、

- ・DNAアプタマー領域の5'側に隣接する1~5塩基長のジャンクション領域2が、リガンド非存在下で、アプタマーマスク領域の3'側に隣接するジャンクション領域1とハイブリダイズして、該ハイブリダイズ領域の塩基間で合計3個以上の水素結合を形成し、かつ、

- ・エフェクター領域がジャンクション領域1の3'側に隣接し、末端領域がジャンクション領域2の5'側に隣接するか、あるいは、エフェクター領域がジャンクション領域2の5'側に隣接し、末端領域がジャンクション領域1の3'側に隣接する。)。

20

(3) アプタマーマスク領域が、ハイブリダイズするDNAアプタマー領域との塩基間で、少なくとも1個のバルジループまたはインターナルループを形成する、上記(1)または(2)に記載のDNA構築物または核酸構築物。

【0015】

(4) ジャンクション領域1が、ジャンクション領域2との塩基間で、少なくとも1個のバルジループまたはインターナルループを形成する、上記(1)~(3)のいずれかに記載のDNA構築物または核酸構築物。

(5) ジャンクション領域1およびジャンクション領域2が、それぞれ3塩基長である、上記(4)に記載のDNA構築物または核酸構築物。

30

(6) アプタマーマスク領域が、4または5塩基長である、上記(1)~(5)のいずれかに記載のDNA構築物または核酸構築物。

(7) アプタマーマスク領域が、リガンド非存在下で、前記DNAアプタマー領域の3'側末端または前記DNAアプタマー領域の5'側末端との間で、2個の塩基対およびT-Gのミスマッチ塩基対を形成するか、または、3個若しくは4個の塩基対を形成する、上記(6)に記載のDNA構築物または核酸構築物。

【0016】

(8) リガンド非存在下でアプタマーマスク領域との塩基間で水素結合を形成するDNAアプタマー領域が、DNAアプタマー領域の3'末端またはDNAアプタマー領域の5'末端の4塩基である、上記(1)~(7)のいずれかに記載のDNA構築物または核酸構築物。

40

(9) DNAアプタマー領域がアプタマーマスク領域の3'側に隣接するDNA分子の場合には、アプタマーマスク領域が、5'側からT-(X)_n-T-Tであり、かつ、前記DNAアプタマー領域の3'末端の4塩基が、5'側からA-A-Z-Gであり、DNAアプタマー領域がアプタマーマスク領域の5'側に隣接するDNA分子の場合には、アプタマーマスク領域が、5'側からT-T-(X)_n-Tであり、かつ、前記DNAアプタマー領域の3'末端の4塩基が、5'側からG-Z-A-Aである(但し、nは、1または2であり、かつ、nが2である場合は、2個のXは同じ塩基でも異なる塩基でもよく、(X)_nとZとは、インターナルループかバルジループを形成し、nが1である場合は、XとZは、XとZとの間でインターナルループを形成する塩基の組み合わせから選択され

50

る)、上記(8)に記載のDNA構築物または核酸構築物。

(10) アプタマーマスク領域が4塩基長であるDNA分子であって、

リガンド非存在下でアプタマーマスク領域にミスマッチ塩基対を有する場合には、ミスマッチ塩基対を形成する塩基は、アプタマーマスク領域のミスマッチ塩基対による分子全体の二次構造のdGの増加量(d d G)が、+0.1 kcal/mol以上である塩基の組み合わせから選択され、および/または、

リガンド非存在下でジャンクション領域にミスマッチを有する場合には、ミスマッチ塩基対を形成する塩基は、ジャンクション領域のミスマッチによる分子全体の二次構造のdGの増加量が、+1.0 kcal/mol以下である塩基の組み合わせから選択される、

上記(6)~(9)のいずれかに記載のDNA構築物または核酸構築物。

(11) アプタマー領域にリガンドが結合すると、アプタマーマスク領域の一部の塩基が、ジャンクション領域2とハイブリダイズして、4個以上の水素結合を形成する、上記(1)~(10)のいずれかに記載のDNA構築物または核酸構築物。

【0017】

(12) アプタマーマスク領域の一部の塩基とジャンクション領域2との間で形成される4個以上の水素結合が、2個の塩基対、2個の塩基対およびT-Gのミスマッチ塩基対、または、3個の塩基対により形成される、上記(11)に記載のDNA構築物または核酸構築物。

(13) DNA分子がリガンド非存在下で二次構造を形成するときの自由エネルギー変化(dG)が、-12~-5(kcal/mol)である、上記(1)~(12)のいずれかに記載のDNA構築物または核酸構築物。

(14) DNAアプタマー領域が、パツリンアプタマーである、上記(1)~(13)のいずれかに記載のDNA構築物または核酸構築物。

(15) パツリンアプタマーが、配列番号:24、配列番号:25、または配列番号:26の塩基配列と80%以上の配列同一性を有する、上記(14)に記載のDNA構築物または核酸構築物。

(16) パツリンアプタマーが、配列番号:24、配列番号:25、または配列番号:26の塩基配列(この塩基配列の末端の1~5塩基が欠失していてもよい)を有する、上記(14)に記載のDNA構築物または核酸構築物。

【0018】

(17) エフェクター領域が、DNAアプタマー領域のリガンド依存的に活性化するシグナル発生領域である、上記(1)~(16)のいずれかに記載のDNA構築物または核酸構築物(ここで、シグナル発生領域の酵素活性を測定することにより、リガンドを検出し、あるいは定量することができる)。

(18) エフェクター領域がDNAアプタマー領域へのリガンド結合依存的に活性化して、リガンド非存在下の2倍以上の活性を発揮できる、上記(1)~(17)のいずれかに記載のDNA構築物または核酸構築物。

(19) エフェクター領域が、DNAザイムである、上記(17)または(18)に記載のDNA構築物または核酸構築物。

(20) DNAザイムが、配列番号16の塩基配列を有する酸化還元型DNAザイムである、上記(19)に記載のDNA構築物または核酸構築物。

(21) 塩基配列が、配列番号:21、配列番号:22、配列番号:23、配列番号:40または配列番号:41の塩基配列である、上記(20)に記載のDNA構築物または核酸構築物。

(22) 上記(19)~(21)のいずれかに記載のDNA構築物または核酸構築物を用いてリガンドを検出する方法であって、該DNA構築物または核酸構築物とリガンドとの結合を、還元型ABTSの酸化によって生じる吸光度の変化として検出する方法。

(23) 上記(1)~(21)のいずれかに記載のDNA構築物または核酸構築物が電極表面に担持されてなる、センサー素子。

(24) DNA構築物または核酸構築物がリンカーを介して電極表面に担持されてなる、

10

20

30

40

50

上記(23)に記載のセンサー素子。

(25) 上記(23)または(24)に記載のセンサー素子を備えてなる、マイクロアレイ。

(26) DNAザイムの基質存在下での電気シグナルを測定することを含んでなる、上記(23)若しくは(24)に記載のセンサー素子、または、上記(25)に記載のマイクロアレイを用いたリガンドの検出方法。

(27) リガンドを検出するDNA分子またはそれと同等の塩基配列を有する核酸分子をスクリーニングする方法であって、下記工程：

(A) DNAアプタマー領域と、リガンド結合依存的に活性化するエフェクター領域と、アプタマーマスク領域とジャンクション領域1およびジャンクション領域2とから形成され、DNAアプタマー領域とエフェクター領域に介在するモジュール領域とを含んでなり、かつ、リガンド非存在下でループ構造を形成するDNA分子の塩基配列を設計または改変して、リガンドを検出するDNA分子候補群またはそれと同等の塩基配列を有する核酸分子を得ること、

(B) 設計または改変した塩基配列を有するDNA分子または核酸分子を電極表面に担持してなるセンサー素子を備えたマイクロアレイを作製すること、

(C) 得られたマイクロアレイを用いて電気化学的にエフェクター領域からの酸化還元電流を測定すること、および、

(D) リガンドの検出感度を指標としてDNA分子または核酸分子を選択することを含んでなる、スクリーニング方法。

(28) DNA分子または核酸分子によるリガンドの検出感度を最適化することに用いられる、上記(27)に記載のスクリーニング方法。

(29) DNA分子のDNAアプタマー領域、モジュール領域、エフェクター領域、およびそれ以外の領域から選択される少なくとも1つの領域を選択してその塩基配列を設計または改変する、上記(28)に記載の方法。

(30) 上記(1)～(21)のいずれかに記載のDNA構築物となることを指標としてDNA分子候補群の塩基配列を得る、上記(27)～(29)のいずれかに記載の方法。

(31) リガンドが、パツリンである、上記(27)～(30)のいずれかに記載の方法。

(32) 上記(27)～(31)のいずれかで定義された工程(A)、(B)、(C)および(D)を含んでなるスクリーニングを実施した後に、

下記工程：

(A') その直前のスクリーニングにより得られたDNA分子をさらに改変してリガンドを検出するDNA分子候補群またはそれと同等の塩基配列を有する核酸分子を得ること、

(B) 設計または改変した塩基配列を有するDNA分子または核酸分子を電極表面に担持してなるセンサー素子を備えたマイクロアレイを作製すること、

(C) 得られたマイクロアレイを用いて電気化学的にエフェクター領域からの酸化還元電流を測定すること、および、

(D) リガンドの検出感度を指標としてDNA分子または核酸分子を選択すること

を含んでなる少なくとも1回のスクリーニングをさらに実施する、上記(27)～(31)のいずれかに記載の方法。

【0019】

(33) パツリン結合特異性を示す、DNA分子またはそれと同等の塩基配列を有する核酸分子。

(34) 配列番号：24、配列番号：25、または配列番号：26の塩基配列と80%以上の配列同一性を有する、上記(33)に記載のDNA分子または核酸分子。

(35) 配列番号：24、配列番号：25、または配列番号：26の塩基配列(この塩基配列の末端の1～5塩基が欠失していてもよい)を有する、上記(33)に記載のDNA分子または核酸分子。

(36) DNAアプタマー領域として上記(33)～(35)のいずれかに記載のDNA

10

20

30

40

50

分子からなるパツリンアプタマー領域と、該アプタマー領域へのパツリンの結合により活性化するエフェクター領域とを含んでなる、DNA構築物またはそれと同等の塩基配列を有する核酸構築物。

(37) パツリン結合特異性を示す、RNA分子またはそれと同等の塩基配列を有する核酸分子。

(38) 塩基配列が、配列番号：33、配列番号：34または配列番号：35の塩基配列と80%以上の配列同一性を有する、上記(37)に記載のRNA分子または核酸分子。

(39) 配列番号：33、配列番号：34または配列番号：35の塩基配列(この塩基配列の5'末端の1~5塩基が欠失していてもよい)を有する、上記(38)に記載のRNA分子または核酸分子。

(40) パツリンRNAアプタマー領域と自己切断型リボザイムとを含んでなるRNA構築物であって、パツリンRNAアプタマー領域の塩基配列が、上記(37)~(39)のいずれかに記載のRNA分子の塩基配列である、RNA構築物またはそれと同等の塩基配列を有する核酸構築物。

(41) 塩基配列が、配列番号：30、配列番号：31若しくは配列番号：32の塩基配列である、上記(40)に記載のRNA構築物または核酸構築物。

(42) 上記(37)~(39)のいずれかに記載のRNA分子、または、上記(40)若しくは(41)に記載のRNA構築物をコードするDNA分子。

【0020】

(43) 上記(33)~(35)のいずれかに記載のDNA分子若しくは核酸分子、上記(37)~(39)のいずれかに記載のRNA分子若しくは核酸分子、上記(1)~(21)のいずれかに記載のDNA構築物若しくは核酸構築物、または上記(40)若しくは(41)に記載のRNA構築物若しくは核酸構築物を用いてパツリンを検出する方法。

(43) 上記(33)~(35)のいずれかに記載のDNA分子若しくは核酸分子、上記(37)~(39)のいずれかに記載のRNA分子若しくは核酸分子、上記(1)~(21)のいずれかに記載のDNA構築物若しくは核酸構築物、または上記(40)若しくは(41)に記載のRNA構築物若しくは核酸構築物にパツリンを結合させることを含んでなる、試料中のパツリンを除去する方法。

(45) 上記(33)~(35)のいずれかに記載のDNA分子若しくは核酸分子、上記(37)~(39)のいずれかに記載のRNA分子若しくは核酸分子、上記(1)~(21)のいずれかに記載のDNA構築物若しくは核酸構築物、または上記(40)若しくは(41)に記載のRNA構築物若しくは核酸構築物を固定化したカラム。

【0021】

本発明のDNA構築物は、電気化学的に簡便かつ迅速にリガンド(例えば、パツリン)を高感度で検出できる点で有利である。本発明のスクリーニング方法は、簡便に高感度のDNA構築物をスクリーニングできる点で有利である。また、本発明のスクリーニング方法は、高感度を示すDNA構築物の最適化に有用である。本発明の核酸分子および本発明の核酸構築物は、リガンド(例えば、パツリン)に特異的に結合する点で有利である。本発明の核酸分子および本発明の核酸構築物はまた、リガンド(例えば、パツリン)の検出または除去に用いることができる点で有利である。特に本発明のDNA構築物は、電気化学的に簡便かつ迅速にリガンド(例えば、パツリン)を検出できる点でさらに有利である。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】図1は、本発明のDNA構築物がリガンド非存在下で形成する二次構造の一例の模式図である。図1で示されるDNA構築物は、エフェクター領域として酸化還元DNAザイムの配列を有し、DNAアプタマー領域を有するDNA構築物であり、DNA構築物は一本鎖DNAであるが、水溶液中ではヘアピンループ構造の二次構造を形成している(すなわち、ヘアピンループ構造のDNA構築物である)。図1Aは、本発明のDNA構築物(a)の一例を示し、図1Bは、本発明のDNA構築物(c)の一例を示し、図1Cは、

10

20

30

40

50

本発明のDNA構築物(d)の一例を示し、図1Dは、本発明のDNA構築物(b)の一例を示す。なお、図中には、塩基に番号が振られているが、ジャンクション領域の長さが3塩基長で、かつアプタマーマスク領域の長さが4塩基長の場合の各塩基の位置を示す番号である。また、図1A~Dでは末端領域は便宜的に3塩基長で示している。図1E~Hは、末端領域が4塩基長である場合のDNA構築物であり、それぞれ図1A~Dに対応する。図1E~Hでは、DNA構築物の末端領域にリンカーとしてdTが14塩基長付加されている。

【図2】図2は、本発明のDNA構築物がリガンド非存在下で形成する二次構造の一例の模式図である。図2で示されるDNA構築物は、エフェクター領域として酸化還元DNAザイムの配列を有し、パツリンアプタマー領域を有するDNA構築物であり、DNA構築物は一本鎖DNAであるが、水溶液中ではヘアピンループ構造の二次構造を形成している(すなわち、ヘアピンループ構造のDNA構築物である)。図2Aは、本発明のDNA構築物(a)の一例を示し、図2Bは、本発明のDNA構築物(c)の一例を示し、図2Cは、本発明のDNA構築物(d)の一例を示し、図2Dは、本発明のDNA構築物(b)の一例を示す。なお、図中には、塩基に番号が振られているが、ジャンクション領域の長さが3塩基長で、かつアプタマーマスク領域の長さが4塩基長の場合の各塩基の位置を示す番号である。また、図2A~Dでは末端領域は便宜的に3塩基長で示している。図2E~Hは、末端領域が4塩基長である場合のDNA構築物であり、それぞれ図2A~Dに対応する。図2E~Hでは、DNA構築物の末端領域にリンカーとしてdTが14塩基長付加されている。

【図3】図3は、マイクロアレイの電極表面に担持させた酸化還元DNAザイムの活性が、電気化学的に検出することができることを示す図である。

【図4】図4は、電極表面上で本発明のDNA構築物を合成して電極表面に担持させた場合の、本発明のDNA構築物の状態を示す模式図である。図中、Lはリガンドを示す。

【図5】図5は、実施例A2以降の実施例で用いた酸化還元型DNAザイムによる酸化還元反応の概略を示す図である。本発明のDNA構築物に含まれる酸化還元型DNAザイム部分は、図5左のような立体構造を形成し、ヘミンを伴って H_2O_2 を還元する。その際、ABTSを添加すると、DNAザイムの働きによりABTSが還元型から酸化型に変換され、414nmにおいて吸光が生じる(図5右)。

【図6】図6は、電気化学的な検出方法の再現性の高さを示す図である。電気化学的な検出方法による測定シグナルの比(AMP濃度5mM/AMP濃度0mM)がグラフにプロットされている。図6は、横軸を1回目の実験とし、縦軸を2回目の実験とした。図中の黒色の点は、スクリーニングに供したDNA群が示したシグナル比を示し、図中の灰色の点は、報告されている配列番号20のDNAアプタマー構築物が示したシグナル比を示す。

【図7】図7は、DNA構築物の各領域の長さやDNA構築物内に形成されるループの数、DNA構築物が二次構造を形成する際の自由エネルギー(dG)が、DNA構築物のセンサーとしての感度に及ぼす影響を調べた図である。

【図8】図8は、一次スクリーニングにより感度が高いとされた6つのDNA構築物(TMP-1~6)に関して、ABTSの吸光測定によって追試を行った結果である。グラフ中の実線は、それぞれのDNA構築物の吸光度($\epsilon_{max} = 414nm$)を示し、図8A、EおよびF中の点線は、報告されている配列番号20を有するDNA構築物で観察された吸光度を示す。

【図9】図9は、TMP1~6のそれぞれのDNA構築物が、リガンド非存在下で形成するステム部分におけるアプタマーマスク領域およびジャンクション領域の二次構造を示す図である。各図に記載されたdGは、DNA構築物全体が二次構造を形成する際の自由エネルギー(dG)を示す。

【図10】図10は、二次スクリーニングでTMP-5よりも高いシグナル比を示した55例のうち、アプタマーマスク領域が5'側から $T(X)_nTT$ (nは、1または2)であったDNA構築物7例の吸光測定の結果を示す図である。各グラフの右隣には、アプタ

10

20

30

40

50

マーマスク領域およびジャンクション領域の二次構造が示され、 dG は、DNA構築物全体が二次構造を形成する際の自由エネルギー (dG) を示す。

【図11】図11は、二次スクリーニングでTMP-5よりも高いシグナル比を示した55例のうちに残りの48例の中で、良好なリガンド依存的なDNAザイム活性を示した6例の吸光測定の結果を示す図である。

【図12】図12は、次スクリーニングでTMP-5よりも高いシグナル比を示した55例のうちに残りの48例の中で、活性を示さなかった24例の吸光測定の結果を示す図である。

【図13】図13は、ミスマッチ塩基対の種類が、DNA構築物のリガンド依存的なDNAザイム活性に及ぼす影響を示す図である。図13では、グラフの縦軸は、ミスマッチによる dG への影響 (ddG) を示す。図13では、吸光測定の結果、リガンドに対する感度の高かったもの (高感度配列) と低かったもの (低感度配列) とで ddG の値が比較されている。図13AおよびBは、アプタマーマスク領域が4塩基長である場合の結果であり、図13CおよびDは、アプタマーマスク領域が5塩基長である場合の結果である。図13AおよびCは、アプタマーマスク領域におけるミスマッチ塩基対による ddG を示し、図13BおよびDは、ジャンクション領域におけるミスマッチ塩基対による ddG を示す。

【図14】図14は、TMP-5を改変して得られた配列 (TMP5-1~5およびTG1) の吸光測定の結果とリガンド結合後の二次構造との関連を示す図である。図14A~Eは、高感度を示した配列の吸光測定の結果を示す。図14FおよびGは、高感度を示さなかったDNA構築物に関する図である。図14A~Gの矢印は、リガンド結合後の二次構造内でどの箇所がどの箇所と塩基対を形成するかを示している。図14FおよびG中のバルジグループおよびインターナルループの用語は、リガンド結合後の二次構造においてそれぞれバルジグループおよびインターナルループが形成されることを示す。図14Hは、リガンド結合後のDNAアプタマー領域が形成する立体構造を示す図である。図14Hでは、リガンド結合後には、アプタマーマスク領域とジャンクション領域2とがハイブリダイズし得ることが示されている。

【図15】図15Aは、DNAアプタマー領域として、配列番号18のアルギニンアプタマーを用いた場合のDNA分子の図である。図15Aの矢印は、リガンド結合後の二次構造内でどの箇所がどの箇所と塩基対を形成するかを示している。図15Bは、対照として用いたDNA分子のアプタマーマスク領域およびジャンクション領域のリガンド非存在下での二次構造を示す図である。図15Cは、TMP-5^{Arg} (実線) と対照 (点線) それぞれの分子のアルギニンに対するABTSの酸化活性を測定した結果を示す図である。

【図16】図16は、TMP-5分子のDNAアプタマー領域を改変して作製したパツリンアプタマーの一例 (図16A: 配列番号23の塩基配列を有するDNA構築物)、並びに、電気化学的検出マイクロアレイを用いてスクリーニングを行った分子のうち、電気シグナル比が2倍以上となった分子に関する電気シグナル比を示す (図16BおよびC) 図である。

【図17】図17は、電気シグナル比が2倍以上となった配列として図16Bに示された配列のうち、パツリン濃度5mMでの電気シグナル比の平均が4以上となった6配列 (候補群1-1~1-6)、および、電気シグナル比が2倍以上となった配列として図14Cに示された配列のうち、パツリン濃度100 μ Mでの電気シグナル比の平均が3以上、または、パツリン濃度5mMでの電気シグナル比の平均が2以上となった12配列 (候補群2-1~2-12) についての、比色試験結果を示す図である。

【図18】図18は、候補群2-7についての、比色試験結果が低温で改善されることを示す図である。

【図19】図19は、候補群1-5および1-6並びに候補群2-7のパツリンアプタマー領域の二次構造の推定結果を示す図である。

【図20】図20は、候補群2-7がパツリンに対して結合特異性を有することを示す図である。

10

20

30

40

50

【図 2 1】図 2 1 は、パツリン RNA アプタマーのスクリーニングに用いた自己切断型リボザイムの二次構造 (図 2 1 A) およびスクリーニングにより得られた 3 種類のパツリン RNA アプタマー領域の二次構造の推計結果 (図 2 1 B) を示す図である。図 2 1 A の N₃₅ は、N (それぞれの N は、A、U、G または C のいずれかから独立して選択される) が 3 5 塩基並んだ配列であることを意味する。

【図 2 2】図 2 2 は、自己切断型リボザイムにおける自己切断の検出結果を示す図である。図 2 2 A は、スクリーニングにより得られた配列番号 3 0 の RNA 構築物および自己切断によるその断片の 8 M 尿素を用いた変性 PAGE による電気泳動結果を示し、図 2 2 B は、スクリーニングにより得られた 3 種類の RNA 構築物の自己切断活性 (相対値) を示す。すなわち、図 2 2 B では、パツリン非存在下で切断された RNA 分子の量を 1 として、パツリン存在下での RNA 分子の切断量が相対的に示されている。

10

【図 2 3】図 2 3 は、配列番号 3 0 の塩基配列を有する RNA 構築物のパツリンの検出結果を示す図である。図 2 3 では、パツリン非存在下で切断された RNA 分子の量を 1 として、パツリン存在下での RNA 分子の切断量が相対的に示されている。

【図 2 4】図 2 4 は、配列番号 3 0 の塩基配列を有する RNA 構築物がパツリンに対して結合特異性を有することを示す図である。

【図 2 5】図 2 5 は、配列番号 3 1 および 3 2 の塩基配列を有する RNA 構築物の、パツリンアプタマー部分の 5' 末端または 3' 末端の 4 塩基を欠失させた場合の自己切断活性の変化を示す図である。切断活性の相対強度 (縦軸) は、パツリン添加後の自己切断活性とパツリン添加前の自己切断活性の比を示す。

20

【図 2 6】図 2 6 は、パツリンアプタマー領域を有する候補群 2 - 7 (SC - 7) の DNA 構築物の改変体 (SC - 7 - C C C A) によるパツリンの検出結果を示す図である。

【図 2 7】図 2 7 は、TMP - 5 (配列番号 2) の 3' 末端に A を付加した TMP - 5 - C C C A における AMP の検出の結果を示す図である。

【図 2 8】図 2 8 は、SC - 7 - C C C A を用いてりんごジュース中のパツリンを検出した結果を示す図である。

【図 2 9】図 2 9 は、SC - 7 - C C C A - TMP - 7 によるパツリンの検出の結果 (図 2 9 左) と TMP - 7 領域の二次構造 (図 2 9 右) を示す図である。

【発明の具体的な説明】

【0023】

30

本明細書において、「核酸」とは、DNA および RNA などの天然の核酸、並びに 7 - (2 - チエニル) イミダゾ [4, 5 - b] ピリジン (Ds)、2 - ニトロ - 4 - プロピニルピロール (Px)、ペプチド核酸 (PNA) およびロックド核酸 (LNA) などの人工核酸などの核酸模倣物を意味する。また、本明細書において、「核酸分子」とは、DNA および RNA などの核酸、並びに 7 - (2 - チエニル) イミダゾ [4, 5 - b] ピリジン (Ds)、2 - ニトロ - 4 - プロピニルピロール (Px)、ペプチド核酸 (PNA) およびロックド核酸 (LNA) などの核酸模倣物からなる群から選択されるいずれか 1 つからなる分子、または前記核酸および核酸模倣物のハイブリッドからなる分子を意味する。ここで、PNA とは、DNA や RNA の主鎖を構成する糖の代わりに N - (2 - アミノエチル) グリシンがアミド結合で結合した骨格を有する核酸をいい、LNA とは、主鎖を構成するリボ核酸の 2' 位の酸素原子と 4' 位の炭素原子がメチレンを介して架橋した環状構造を有する核酸をいう。これらの PNA や LNA からなる核酸分子は、核酸の主鎖骨格が異なるのみであり、塩基部分は、DNA や RNA と同等の塩基を有するものとしてでき、DNA または RNA と同等の塩基を有する PNA や LNA にすることにより、塩基対形成に係る塩基部分の性質を保持させたまま核酸分子としての安定性を向上させることができる。DNA と同等の塩基を有する RNA、PNA または LNA とは、DNA が有する塩基が A、T、G または C である場合には、RNA の場合にはそれぞれ、塩基として A、U、G または C を有する RNA であることを意味し、PNA および LNA の場合にはそれぞれ、塩基として A、T (または U)、G または C を有する PNA および LNA であることを意味する。また、RNA と同等の塩基を有する DNA、PNA または LNA とは、R

40

50

NAが有する塩基がA、U、GまたはCである場合には、DNAの場合にはそれぞれ、塩基としてA、T、GまたはCを有するDNAであることを意味し、PNAおよびLNAの場合にはそれぞれ、塩基としてA、T（またはU）、GまたはCを有するPNAおよびLNAであることを意味する。核酸分子または核酸構築物中の塩基は、修飾されていてもされていなくてもよい。修飾塩基としては、例えば、2-アミノプリンおよびフルオレセインなどの蛍光分子などの分子標識による修飾塩基などが知られており、当業者であれば、核酸分子や核酸構築物に適宜様々な修飾を施すことができる。

【0024】

本明細書において、「DNA分子と同等の塩基配列を有する核酸分子」は、好ましくは、後述するパツリンに結合特異性を示すDNA分子の一部、例えば、配列の50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、10%以下、5%以下、若しくは3%以下の塩基、または1若しくは2塩基が、該一部と同等の塩基配列を有するDNA以外の核酸からなり、かつ、本発明のDNA分子と同等の機能を有するハイブリッド型の核酸分子である。また、本明細書において、「RNA分子と同等の塩基配列を有する核酸分子」は、好ましくは、後述するパツリンに結合特異性を示すRNA分子の一部、例えば、配列の50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、10%以下、5%以下、若しくは3%以下の塩基、または1若しくは2塩基が、該一部と同等の塩基配列を有するRNA以外の核酸からなり、かつ、本発明のRNA分子と同等の機能を有するハイブリッド型の核酸分子である。従って、本明細書において、「DNA分子と同等の塩基配列を有する核酸分子」は、上記のように本発明のDNA分子と同等の塩基配列を有し、かつDNAとDNA以外の核酸（例えば、RNA、PNAまたはLNA）とからなる。また、「RNA分子と同等の塩基配列を有する核酸分子」は、上記のように本発明のRNA分子と同等の塩基配列を有し、かつRNAとRNA以外の核酸（例えば、DNA、PNAまたはLNA）とからなる。なお、「DNA分子と同等の塩基配列を有する核酸分子」が該DNA分子と同等の機能を有するか否かは、例えば、後述する表面プラズモン共鳴による分子間結合の検出により評価することができる。また、「RNA分子と同等の塩基配列を有する核酸分子」が該RNA分子と同等の機能を有するか否かは、例えば、後述する表面プラズモン共鳴による分子間結合の検出により評価することができる。

【0025】

また、本明細書において、「DNA構築物と同等の塩基配列を有する核酸構築物」は、後述するDNA構築物の一部、例えば、配列の50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、10%以下、5%以下、若しくは3%以下の塩基、または1若しくは2塩基が、該一部と同等の塩基配列を有するDNA以外の核酸からなるハイブリッド型の核酸構築物である。また、本明細書において、「RNA構築物と同等の塩基配列を有する核酸構築物」は、後述するRNA構築物の一部、例えば、配列の50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、10%以下、5%以下、若しくは3%以下の塩基、または1若しくは2塩基が、該一部と同等の塩基配列を有するRNA以外の核酸からなるハイブリッド型の核酸構築物である。従って、本明細書において、「DNA構築物と同等の塩基配列を有する核酸構築物」は、上記のように本発明のDNA構築物と同等の塩基配列を有し、DNAとDNA以外の核酸とからなり、かつ、本発明のDNA構築物と同等の機能を有する。また、「RNA構築物と同等の塩基配列を有する核酸構築物」は、上記のように、本発明のRNA構築物と同等の塩基配列を有し、RNAとRNA以外の核酸とからなり、かつ、本発明のRNA構築物と同等の機能を有する。特に、後述する本発明のDNA構築物のエフェクター領域がリガンド依存的に他の核酸分子とハイブリダイズする場合には、エフェクター領域のDNAをPNAまたはLNAに置き換えることにより、エフェクター領域が他の核酸分子とハイブリダイズする際の特異性を向上させることができる。また、後述する本発明のセンサー素子に担持するDNA分子のリンカー部分をPNAまたはLNAにより置き換えることができ、それにより、核酸分子の化学的安定性を向上させることができる。なお、「DNA構築物と同等の塩基配列を有する核酸構築物」が該DNA構築物と同等の機能を有するか否かは後述するリガンド依存的なエフェクター領域の活性化を指標にし

10

20

30

40

50

て評価することができ、例えば、実施例 A 3 に記載された電気化学的検出法や A B T S を用いた比色試験の手順に従って評価することができる。また、「RNA 構築物と同等の塩基配列を有する核酸構築物」が該 RNA 構築物と同等の機能を有するか否かは、例えば、リガンド依存的な自己切断活性を指標として評価することができ、例えば、実施例 C 1 に記載された手順に従って評価することができる。

【 0 0 2 6 】

上記「DNA 分子と同等の塩基配列を有する核酸分子」、「RNA 分子と同等の塩基配列を有する核酸分子」、「DNA 構築物と同等の塩基配列を有する核酸構築物」および「RNA 構築物と同等の塩基配列を有する核酸構築物」には、これらの核酸分子および核酸構築物の機能が維持されることを条件に、1 ~ 10 塩基、好ましくは、1、2 または 3 塩基の人工核酸（例えば、Ds および Px）が挿入または付加されていてもよい。また、上記「DNA 分子と同等の塩基配列を有する核酸分子」、「RNA 分子と同等の塩基配列を有する核酸分子」、「DNA 構築物と同等の塩基配列を有する核酸構築物」および「RNA 構築物と同等の塩基配列を有する核酸構築物」では、これらの核酸分子および核酸構築物の機能が維持されることを条件に、Ds および Px のような、互いと人工塩基対を形成する化合物を核酸分子中に導入することもでき、また、核酸分子または核酸構築物中の塩基対を上記 Ds - Px の人工塩基対で代替することもできる。

【 0 0 2 7 】

本明細書において、「結合性」とは、リガンドに結合する性質を有することを意味し、「結合特異性を示す」とは、リガンドに特異的に結合する性質を有することを意味する。従って、例えば、「パツリン結合性」とは、パツリンに結合する性質を有することを意味し、「パツリン結合特異性」とは、パツリンに特異的に結合する性質を有することを意味する。

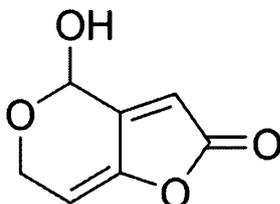
【 0 0 2 8 】

本明細書では、「リガンド」としては、以下に限られないが、例えば、アデノシン一リン酸（AMP）、パツリンおよびアルギニンなどが挙げられ、好ましくはパツリンである。

【 0 0 2 9 】

パツリンは、下記式：

【化 1】



により表される化学構造を有する化合物である。パツリンは、ペニシリウム属やアスペルギルス属などのカビから分泌されるカビ毒（マイコトキシン）の一種であり、一般的に腐敗したリンゴ、ブドウ、桃などから検出されることで知られている。

【 0 0 3 0 】

本明細書では、「アプタマー」とは、リガンドに結合特異性を示す核酸分子または核酸分子の一部を意味し、リガンドに結合特異性を示す DNA（または RNA）を「DNA アプタマー」（または「RNA アプタマー」ということがある。特にリガンドがパツリンである場合には、「アプタマー」を、「パツリンアプタマー」、特にアプタマーが DNA（または RNA）である場合には、「パツリン DNA アプタマー」（または「パツリン RNA アプタマー」ということがある。

【 0 0 3 1 】

塩基配列の同一性の数値は、周知のアルゴリズムに従って算出することができ、例えば、BLAST (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/blast-j.html>) を使用してデフォル

10

20

30

40

50

トのパラメータを用いて算出することができる。

【0032】

本明細書において「ハイブリダイズする」とは、あるポリヌクレオチドが標的となるポリヌクレオチドと相補的なそれぞれの塩基同士の水素結合により二本鎖を形成することをいう。ハイブリダイゼーションは、ストリンジেন্টな条件下で実施することができる。ここで「ストリンジেন্টな条件」は、プライマー配列とその相補鎖との二重鎖の T_m （ ）および必要な塩濃度などに依存して決定でき、プローブとなる配列を選択した後にそれに応じたストリンジেন্টな条件を設定することは当業者に周知の技術である（例えば、J. Sambrook, E. F. Frisch, T. Maniatis; Molecular Cloning 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory(1989)等参照）。ストリンジেন্টな条件としては、例えば、ハイブリダイゼーションに通常用いられる適切な緩衝液中で、ヌクレオチド配列によって決定される T_m よりわずかに低い温度（例えば、 T_m よりも0～約5 低い温度）においてハイブリダイゼーション反応を実施することが挙げられる。ストリンジেন্টな条件としてはまた、例えば、ハイブリダイゼーション反応後の洗浄を高濃度低塩濃度溶液で実施することが挙げられる。ストリンジেন্টな条件の例としては、 $6 \times SSC / 0.05\%$ ピロリン酸ナトリウム溶液中での洗浄条件が挙げられる。

10

【0033】

以下、図1および2により本発明のDNA構築物について説明する。

【0034】

本発明のDNA構築物は、パツリンアプタマー領域とエフェクター領域とを含んでなる、ループ構造を形成するDNA構築物であり、具体的には、

20

- (i) エフェクター領域、
- (ii) ジャンクション領域1、
- (iii) アプタマーマスク領域、
- (iv) DNAアプタマー領域、
- (v) ジャンクション領域2および
- (vi) 末端領域

から構成されるDNA構築物（以下、本発明のDNA構築物という）とすることができる。このようなDNA構築物は、エフェクター領域を介して、リガンドを検出に用いることができる。従って、本発明では、リガンドの検出に用いるDNA構築物、すなわち、DNAセンサー分子が提供される。

30

【0035】

以下、図1および2により本発明のDNA構築物についてさらに詳細に説明する。

【0036】

本発明のDNA構築物では、エフェクター領域は、DNAアプタマー領域のリガンド非存在下では、DNA分子内の末端領域によりマスクングされて不活性化されているが、DNAアプタマー領域にそのリガンドが結合すると、マスクングがはずれて活性化する。すなわち、本発明のDNA分子は、リガンドを検出し、リガンドとの結合依存的にエフェクター領域が活性化するDNA構築物である。エフェクター領域が活性化すると、例えば、酵素活性が活性化され、あるいは、他の核酸分子とハイブリダイズ可能となって、リガンドの検出やリガンド依存的な細胞機能制御が可能となる。すなわち、本発明のDNA構築物は、リガンドの検出やリガンド依存的な細胞機能制御を意図したDNA構築物である。本発明のDNA構築物は、DNAから構成されるため、化学的安定性がRNAやタンパク質よりも高く、また、合成、取扱いおよび保存が容易である。本発明のDNA構築物は、DNAアプタマー領域による少なくとも1つのループ構造を形成するDNA構築物であり、好ましくは、1つのループ構造を形成するDNA構築物、すなわち、ヘアピンループ構造のDNA構築物である。

40

【0037】

本発明のDNA構築物は、(i)～(vi)が、好ましくは、5'末端から、上記の順番で連結してなるDNA構築物（以下、「DNA構築物(a)」という。図1A、1E、2Aおよ

50

び 2 E 参照。) が好ましいが、不活性化されたエフェクター領域がリガンド結合依存的に活性化する限りはこれに限定されるものではない。

例えば、本発明の DNA 構築物は、5' 末端から、下記の順番：

- (vi) 末端領域、
- (v) ジャンクション領域 2、
- (iv) DNA アプタマー領域、
- (iii) アプタマーマスク領域、
- (ii) ジャンクション領域 1、および
- (i) エフェクター領域

で連結してなる DNA 構築物 (以下、「DNA 構築物 (b)」という。図 1 D、1 H、2 D および 2 H 参照。) であってもよい。 10

また、本発明の DNA 構築物は上記の DNA 構築物 (a) および (b) において、(i) と (vi) とが入れ替わった DNA 構築物、すなわち、5' 末端から、

- (vi) 末端領域、
- (ii) ジャンクション領域 1、
- (iii) アプタマーマスク領域、
- (iv) DNA アプタマー領域、
- (v) ジャンクション領域 2、および
- (i) エフェクター領域

の順に連結してなる DNA 構築物 (以下、「DNA 構築物 (c)」という。図 1 B、1 F、2 B および 2 F 参照。) または、5' 末端から、 20

- (i) エフェクター領域、
- (v) ジャンクション領域 2、
- (iv) DNA アプタマー領域、
- (iii) アプタマーマスク領域、
- (ii) ジャンクション領域 1、および
- (vi) 末端領域

の順に連結してなる DNA 構築物 (以下、「DNA 構築物 (d)」という。図 1 C、1 G、2 C および 2 G 参照。) であってもよい。本発明の DNA 構築物は、上記 DNA 構築物 (a)、(b)、(c) および (d) のいずれかの DNA 構築物であってもよく、好ましくは、DNA 構築物 (a) または DNA 構築物 (b) であり、最も好ましくは、DNA 構築物 (a) である。 30

【0038】

すなわち、本発明の DNA 構築物は、DNA アプタマー領域、アプタマーマスク領域、ジャンクション領域 1、ジャンクション領域 2、エフェクター領域および末端領域を含んでなる、ループ構造を形成する DNA 構築物であって、

DNA アプタマーの 3' 末端の 4 ~ 7 塩基が、リガンド非存在下で、DNA アプタマーの 5' 側に隣接する 3 ~ 5 塩基長のアプタマーマスク領域とハイブリダイズして (すなわち、DNA 構築物 (a) または (c) に対応)、ハイブリダイズ領域の塩基間で合計 4 ~ 11 個の水素結合を形成するか、または、DNA アプタマーの 5' 末端の 4 ~ 7 塩基が、リガンド非存在下で、DNA アプタマーの 3' 側に隣接する 3 ~ 5 塩基長のアプタマーマスク領域とハイブリダイズして (すなわち、DNA 構築物 (b) または (d) に対応)、ハイブリダイズ領域の塩基間で合計 4 ~ 11 個の水素結合を形成し、 40

DNA アプタマーの 3' 側に隣接する 2 ~ 5 塩基長のジャンクション領域 2 が、リガンド非存在下で、アプタマーマスク領域の 5' 側に隣接するジャンクション領域 1 とハイブリダイズして、ハイブリダイズ領域の塩基間で合計 3 個以上の水素結合を形成 (DNA アプタマーの 5' 末端の 4 ~ 7 塩基が、リガンド非存在下で、DNA アプタマーの 3' 側に隣接する 3 ~ 5 塩基長のアプタマーマスク領域とハイブリダイズする場合には、DNA アプタマーの 5' 側に隣接する 2 ~ 5 塩基長のジャンクション領域 2 が、リガンド非存在下で、アプタマーマスク領域の 3' 側に隣接するジャンクション領域 1 とハイブリダイズし 50

て、ハイブリダイズ領域の塩基間で合計3個以上の水素結合を形成)し、

エフェクター領域が、ジャンクション領域1の5'側に隣接し、末端領域がジャンクション領域2の3'側に隣接するか、あるいは、ジャンクション領域2の3'側に隣接し、末端領域がジャンクション領域1の5'側に隣接し(DNAアプタマーの5'末端の4~7塩基が、リガンド非存在下で、DNAアプタマーの3'側に隣接する3~5塩基長のアプタマーマスク領域とハイブリダイズする場合には、エフェクター領域が、ジャンクション領域1の3'側に隣接し、末端領域がジャンクション領域2の5'側に隣接するか、あるいは、エフェクター領域がジャンクション領域2の5'側に隣接し、末端領域がジャンクション領域1の3'側に隣接する。)、かつ、エフェクター領域の少なくとも一部がリガンド非存在下では末端領域とハイブリダイズして不活性化されており、該エフェクター領域がDNAアプタマー領域へのリガンド結合依存的に活性化する、

10

DNA構築物とすることができる。

【0039】

本明細書では、「エフェクター領域」とは、それ自体が酵素活性を有するシグナル発生領域であるか、または、他の核酸分子とハイブリダイズ可能な配列である。本発明のエフェクター領域は、DNAアプタマー領域がリガンドと結合していないときには、DNA構築物の末端領域でマスクングされて不活性化されているが、リガンドと結合すると遊離状態となって(以下、「エフェクター領域の活性化」という)、シグナル発生領域が有する酵素活性を活性化させるか、他の核酸分子とハイブリダイズ可能となる。本発明では、エフェクター領域の活性化をモニターすることにより、リガンドを検出し、あるいは定量

20

することができる。

【0040】

本発明の一つの態様では、エフェクター領域がシグナル発生領域である。この態様では、DNA構築物のシグナル発生領域の酵素活性を測定することにより、リガンドを検出し、あるいは定量することができる。

【0041】

本明細書では、「シグナル発生領域」とは、それ自体が酵素活性を有するDNAからなる領域である。シグナル発生領域としては、DNAザイムを用いることができ、好ましくは、酸化還元型DNAザイム、より好ましくは、配列番号16の配列を有する酸化還元型DNAザイムを用いることができる。酸化還元型DNAザイムの活性は、電気化学的に検出することが可能である。配列番号16の配列を有する酸化還元型DNAザイムを用いる際には、特に限定されないが、好ましくは、基質として2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)(ABTS)を添加することができる。ABTSを基質として用いる利点は、容易にDNAザイムの活性を測定することができる点であり、すなわち、ABTSを基質として用いると、酸化還元型DNAザイムにより生成される酸化型ABTSの吸光度($\lambda_{max} = 414\text{nm}$)を測定することにより簡便にDNAザイムの活性を測定することができる。電気化学的な測定の際には、必須ではないが、ABTSを基質として添加することにより酸化還元反応が促進して電気化学的な検出感度の向上が期待できる上に、比色試験(吸光測定)結果と一貫した結果が得られ易い点で有利である。本発明では、シグナル発生領域の酵素活性を測定することにより、DNA構築物へのリガンドの結合を検出し、あるいは、リガンドを定量することができる。リガンドの定量は、検量線を用いた方法など当業者に周知の方法を用いて行うことができる。

30

40

【0042】

本発明の一つの態様では、エフェクター領域が他の核酸分子とハイブリダイズする本発明のDNA構築物が提供される。この態様では、DNA構築物への該他の核酸分子のハイブリダイゼーション量を測定することにより、リガンドを検出し、あるいは定量することができる、あるいは、生体内の核酸分子とハイブリダイズすることにより、該生体内の核酸分子の機能を調節することができる。

【0043】

本発明のエフェクター領域がハイブリダイズする他の核酸分子は、酵素若しくは標識を

50

結合させた核酸分子、または生体内の核酸分子とすることができる。従って、本発明のエフェクター領域は、これらの核酸分子にハイブリダイズ可能な配列、好ましくは、これらの核酸分子と相補的な配列を有するDNAとすることができる。

【0044】

本発明のエフェクター領域がハイブリダイズする他の核酸分子に結合させることができる酵素や標識としては、特に限定されないが、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)若しくはアルカリフォスファターゼ(AP)などの酵素、または、蛍光若しくはRIなどの標識を挙げることができる。本発明のDNA構築物のエフェクター領域の活性化は、HRP若しくはAPなどの酵素活性または蛍光若しくはラジオアイソトープ(RI)などの標識を測定することにより、ハイブリダイゼーションする核酸分子の量としてモニタリングことができ、これにより、DNA構築物へのリガンドの結合を検出し、あるいは、リガンドを定量することができる。また、本発明のエフェクター領域がハイブリダイズする他の核酸分子には、金ナノ粒子を結合させてもよい。金ナノ粒子は、凝集すると吸光スペクトルが変化する。例えば、本発明のDNA構築物にも金粒子を結合させ、両者がハイブリダイズして金粒子間の距離が短くなると、分子の吸光スペクトルが低波長側になる性質を利用すれば、本発明のDNA構築物とエフェクター領域がハイブリダイズする他の核酸分子との相互作用が確認できる。金ナノ粒子はチオールを介して本発明のDNA構築物に結合させることができる。

【0045】

本発明のエフェクター領域がハイブリダイズする生体内の核酸分子としては、特に限定されないが、mRNAやゲノムDNAが挙げられる。本発明の一つの態様では、本発明のDNA構築物のエフェクター領域は、特定のmRNA分子にハイブリダイズ可能な配列からなるDNAであり、エフェクター領域の活性化に伴い、該mRNAにハイブリダイズし、該mRNAからのタンパク質の翻訳を阻害する。そのような特定のmRNAとしては、例えば、癌細胞で過剰に発現しているマトリックスメタプロテアーゼ(MMP)などのmRNA分子が挙げられ、そのいくつかは公知である(Liotta L.A., Tryggvason K., Garbisa S., Hart I., Foltz C.M., Shafie S., *Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen.* (1980) *Nature*, 284:67-68)。本発明の他の態様では、本発明のDNA構築物のエフェクター領域は、ゲノムのテロメア領域にハイブリダイズ可能な配列からなるDNAであることができ、この場合、エフェクター領域の活性化に伴い、テロメア領域と一緒にGグアドロデュプレックス構造を形成することにより、テロメラーゼによるテロメアの伸長を阻害する。Deng M., Zhang D., Zhou Y., Zhou X., *Highly effective colorimetric and visual detection of nucleic acids using an asymmetrically split peroxidase DNAzyme.* (2008) *J. Am. Chem. Soc.*, 130 (39):13095-102には、異なるDNA分子間で、Gクアドロデュプレックス構造を形成することが記載されている。あるいは、本発明のDNA構築物のエフェクター領域は、ゲノムのテロメア領域にハイブリダイズ可能な配列からなるDNAであることができ、この場合、エフェクター領域の活性化に伴い、Gクアドロデュプレックス構造を安定化することによりテロメラーゼによるテロメアの伸長を阻害する。Gクアドロデュプレックス構造の安定化と癌治療との関係が、例えば、Balasubramanian S., Hurley L.H., Neidle S., *Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy?* (2011) *Nat. Rev. Drug. Discov.* 10 (4):261-75に記載されている。エフェクター領域が活性化した際にのみ他の核酸分子とハイブリダイゼーションが生ずるようなDNA配列を選択する方法やそのハイブリダイゼーションの条件(塩強度、界面活性剤の濃度、温度など)を調整する方法は、当業者に周知である。

【0046】

本発明のDNA構築物は、DNAアプタマー領域にリガンドが結合するとエフェクター領域をリガンド依存的に活性化させて、リガンド非存在下と比較して、好ましくは2倍以上、より好ましくは3倍以上、さらに好ましくは4倍以上の活性を発揮できる。ここで、

エフェクター領域の活性とは、エフェクター領域がシグナル発生領域である場合には、シグナル発生領域の酵素活性であり、エフェクター領域が他の核酸分子とハイブリダイズするDNAである場合には、ハイブリダイゼーションする核酸分子の量である。例えば、本発明のDNA構築物は、リガンド濃度0 mMの際のエフェクター領域の活性と比較して、リガンド濃度5 mMの際のエフェクター領域の活性は、好ましくは2倍以上であり、より好ましくは3倍以上、さらに好ましくは4倍以上、さらにより好ましくは5倍以上である。また、活性化の程度は、例えば、シグナル発生領域が、酸化還元型DNAザイムである場合には、本発明のセンサー素子またはマイクロアレイを用いて、酸化還元型DNAザイムにより生じる酸化還元電流を測定し、測定値をリガンド存在下と非存在下とで比較すればよい。具体的には、例えば、エフェクター領域として酸化還元型DNAザイムを有する本発明のDNA構築物を担持した本発明のセンサー素子またはマイクロアレイを用いて、その酸化還元型DNAザイムにより生じる酸化還元電流を測定し、測定値をリガンド存在下と非存在下とで比較し、リガンド濃度5 mMの電気シグナルが0 mMの電気シグナルの好ましくは2倍以上であり、より好ましくは3倍以上、さらに好ましくは4倍以上、さらにより好ましくは5倍以上である。ハイブリダイゼーションする核酸分子の量は、酵素活性、蛍光またはRIを用いて当業者に周知の方法により測定することができる。

10

【0047】

本発明のDNA構築物の活性は、好ましくは、所望のリガンド濃度領域において上昇する。すなわち、本発明のDNA構築物は、所望のリガンド濃度領域において、その濃度領域の最高濃度のリガンドを添加した際に、最低濃度と比較して、エフェクター領域が、好ましくは2倍以上、より好ましくは3倍以上、さらに好ましくは4倍以上、さらにより好ましくは5倍以上の活性を発揮できる。すなわち、所望のリガンド濃度領域における最高濃度のリガンドを添加した際に、エフェクター領域による酵素活性またはハイブリダイゼーション量が、最低濃度と比較して、好ましくは2倍以上、より好ましくは3倍以上、さらに好ましくは4倍以上、さらにより好ましくは5倍以上となる。例えば、エフェクター領域として酸化還元型DNAザイムを有する本発明のDNA構築物を担持した本発明のセンサー素子またはマイクロアレイを用いて、その酸化還元型DNAザイムにより生じる酸化還元電流を測定し、測定値をリガンド存在下と非存在下とで比較し、その濃度領域の最高濃度のリガンドを添加した際に、電気シグナルが最低濃度と比較して、好ましくは2倍以上であり、より好ましくは3倍以上、さらに好ましくは4倍以上、さらにより好ましくは5倍以上である。

20

30

【0048】

本明細書では、「DNAアプタマー領域」とは、リガンドと結合する能力を有し、リガンドと結合することにより、その二次構造に変化を引き起こすDNA(DNAアプタマー)から構成される領域である。このようなDNAアプタマー領域として用いられるDNAとしては、パツリンアプタマー、AMPアプタマーおよびアルギニンアプタマーなどが挙げられる。AMPアプタマーは、好ましくは、配列番号17の配列を有するAMPアプタマーである。AMPアプタマーの場合は、アデノシンやアデノシン三リン酸(ATP)もリガンドとなり得る。また、アルギニンアプタマーは、好ましくは、配列番号18のアルギニンアプタマーである。

40

【0049】

また、DNAアプタマー領域として用いられるパツリンアプタマーは、例えば、配列番号：24、配列番号：25、または配列番号：26の塩基配列を有するDNA分子、あるいは、これらの塩基配列と相同な配列を有するDNA分子とすることができる。この場合、本発明のDNA分子は、25ヌクレオチド長~35ヌクレオチド長とすることができ、好ましくは30ヌクレオチド長とすることができる。

【0050】

例えば、配列番号：24、配列番号：25、または配列番号：26の塩基配列と相同な配列を有するDNA分子としては、配列番号：24、配列番号：25、若しくは配列番号：26の塩基配列と80%以上、85%以上、90%以上、若しくは95%以上の配列同

50

一性を示す塩基配列を有するDNA分子、または、配列番号：24、配列番号：25、若しくは配列番号：26の塩基配列の相補配列を有するDNA分子にハイブリダイズするDNA分子（このDNA分子は少なくとも25塩基、少なくとも26塩基、少なくとも27塩基、少なくとも28塩基、少なくとも29塩基または少なくとも30塩基からなり、全長は30塩基、31塩基、32塩基または35塩基とすることができる。）が挙げられる。配列番号：24、配列番号：25、または配列番号：26の塩基配列と相同な配列を有するDNA分子としてはまた、好ましくは配列番号：24、配列番号：25、または配列番号：26の塩基配列を有するDNA分子に対して、1塩基～5塩基、より好ましくは1塩基～4塩基、さらに好ましくは1塩基～3塩基、さらにより好ましくは1塩基の置換、挿入または欠失がなされた塩基配列を有するDNA分子とすることができる。本発明のDNA分子は、配列番号：24、配列番号：25、または配列番号：26の塩基配列を有するDNA分子に対して、特に限定されないが、1塩基～5塩基、好ましくは1塩基～4塩基、より好ましくは1塩基～3塩基、さらに好ましくは1塩基の欠失がなされた塩基配列を有するDNA分子とすることができる。塩基の欠失は、例えば、配列の末端（5'末端または3'末端）において行われ得る。

10

【0051】

本発明のDNA構築物は、DNAアプタマー領域の二次構造の変化を通じて、リガンド非存在下で少なくともその一部の構築物が、マスキングされているエフェクター領域を活性化させる。DNAアプタマー領域は、直列的に連結する少なくとも1以上のDNAアプタマーから構成され、好ましくは、2～3個のDNAアプタマーから構成され、最も好ましくは1つのDNAアプタマーから構成される。DNAアプタマー領域が、複数のDNAアプタマーから構成される場合には、各DNAアプタマーが互いに直接連結していてもよいし、各DNAアプタマーの間にリンカー配列（特に限定されないが、例えば、1～10塩基長程度）を介して連結していてもよい。また、個々のDNAアプタマーから構成されるDNAアプタマー領域は、リガンド非存在下で1以上のループ構造を形成するDNAアプタマー領域であり、好ましくは、1～3個のループ構造を形成するDNAアプタマー領域であり、より好ましくは、1個のループ構造を形成するDNAアプタマー領域である。具体例により説明すると、特に限定されないが、例えば、DNAアプタマー領域が1つのDNAアプタマーから構成される場合であって、1つのDNAアプタマーが、リガンド非存在下で2つ以上のループ構造を形成する場合（すなわち、クローバー様構造のDNAアプタマー領域を形成する場合）には、本発明のDNA構築物は、リガンド非存在下で2つ以上のループ構造を形成するDNA構築物となり得、1つのみループ構造を形成する場合（すなわち、ループ構造のDNAアプタマー領域を形成する場合）には、リガンド非存在下でヘアピンループ構造を形成するDNA構築物（すなわち、ヘアピンループ構造のDNA構築物）となる。また、別の例では、DNAアプタマー領域が2つ以上のDNAアプタマーから構成される場合には、本発明のDNA構築物は、リガンド非存在下で2つ以上のループ構造を形成するDNA構築物となり得る。従って、本発明のDNA構築物は、リガンド非存在下で少なくとも1つのループ構造を形成するDNA構築物である。

20

30

【0052】

ある好ましい態様では、本発明のDNA構築物は、ループ構造を1つのみ形成するDNAアプタマー領域、アプタマーマスク領域、ジャンクション領域1、ジャンクション領域2、エフェクター領域および末端領域を含んでなる、リガンド非存在下で1つのループ構造を形成するDNA構築物であり、すなわち、ある好ましい態様では、本発明のDNA構築物は、ループ構造のDNAアプタマー領域、アプタマーマスク領域、ジャンクション領域1、ジャンクション領域2、エフェクター領域および末端領域を含んでなる、ヘアピンループ構造のDNA構築物である。

40

【0053】

本明細書では、「アプタマーマスク領域」とは、リガンド非存在時にDNAアプタマー領域の一部をマスキングしている領域である。DNAアプタマー領域にリガンドが結合すると、このマスキングは解消され、エフェクター領域を活性化させる。アプタマーマスク

50

領域の長さは、3～5塩基長であり、好ましくは4または5塩基長であり、より好ましくは4塩基長である。

【0054】

本明細書では、「ジャンクション領域」とは、エフェクター領域とDNAアプタマー領域とを連結している領域である。本明細書では、アプタマーマスク領域と連結している領域をジャンクション領域1といい、DNAアプタマー領域と連結している領域をジャンクション領域2という。ジャンクション領域1とジャンクション領域2とは、リガンド非存在下では互いにハイブリダイズしているが、リガンドがDNA構築物に結合すると互いから解離する。ジャンクション領域1とジャンクション領域2は、1～5塩基長であり、好ましくは2～5塩基長であり、より好ましくは3～5塩基長であり、さらに好ましくは3塩基長である。また、ジャンクション領域1およびジャンクション領域2の長さは、好ましくは、同じ長さである。従って、好ましくは、ジャンクション領域1およびジャンクション領域2の長さは等しく、かつ、1～5塩基長であり、好ましくは2～5塩基長であり、より好ましくは3～5塩基長であり、さらに好ましくは3塩基長である。

10

【0055】

本明細書では、「末端領域」とは、DNA構築物の5'または3'末端に存在し、DNAアプタマー領域のリガンド非存在下では、エフェクター領域の少なくとも一部とハイブリダイズして該エフェクター領域を不活性化している領域である。本発明のDNA構築物の末端領域は、リガンドがDNA構築物に結合すると、エフェクター領域から解離して、エフェクター領域を活性化させることから、エフェクターマスク領域ということもできる。末端領域はエフェクター領域の少なくとも一部とハイブリダイズしてエフェクター領域を不活性化状態にできる限り特に限定されないが、好ましくは、2～5塩基長であり、より好ましくは、3塩基長または4塩基長であり、好ましくは、エフェクター領域内のマスクングされる配列と相補的な配列を有する。

20

【0056】

本明細書では、リガンド非存在下において、アプタマーマスク領域とジャンクション領域1およびジャンクション領域2とから形成され、さらに、DNAアプタマー領域とエフェクター領域とを連結する領域を「モジュール領域」という。モジュール領域は、それ自体が酵素活性や化合物への結合活性を有することを求められるものではないが、リガンドが結合することによるDNAアプタマー領域の二次構造の変化を、エフェクター領域に伝える役割を果たす。

30

【0057】

本明細書では、DNA分子の二次構造およびDNA分子が二次構造を形成する際の自由エネルギー (dG) はすべて、DNAの二次構造予測プログラム (米国ニューヨーク州立大学オールバニ校により無償で提供される UNAFold Version 3.8 (<http://mfold.rna.albany.edu>)) を用いて、構造形成温度 (folding temperature) : 37、 Na^+ 濃度 : 1 M および Mg^{2+} 濃度 : 0 M の予測条件で予想される二次構造および自由エネルギー (dG) として記載している。UNAFold Version 3.8 では、DNAの二次構造の予測は、分子内にステム構造やループ構造などの二次構造が形成される際の自由エネルギーが最小値をとる二次構造 (最適構造) を該DNAの二次構造として予測する。従って、UNAFold Version 3.8 では、DNAの二次構造と共に、その二次構造を形成する際の自由エネルギー (dG) が予想される。予測される二次構造中で、二重鎖核酸中において塩基対を形成する相手の塩基がないものおよび mismatches 塩基対は、それぞれバルジループおよびインターナルループとされる (ただし、UNAFold Version 3.8 では、T-G間の mismatches 塩基対は、塩基対を形成していると評価され、インターナルループを形成するとは評価されない)。そこで、本明細書では、T-G間の mismatches 塩基対は、インターナルループを形成するものではないとして記載し、T-G間の mismatches 塩基対が形成する水素結合数は2個としてカウントするが、通常の塩基対とは区別して記載する。DNA分子内の mismatches 塩基対による分子全体の二次構造の dG の増加量 (ddG) は、UNAFold Version

40

50

n 3.8では、最近隣法 (nearest neighbor free energy) により評価され、塩基対またはミスマッチ塩基対の隣の塩基対の種類を考慮して計算される (SantaLucia, J. Jr., A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1998) 95:1460-1465およびSantaLucia, J. Jr., Hicks, D. The thermodynamics of DNA structural motifs. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2004) 33:415-440)。なお、本発明で推定される二次構造は、好ましくは、DNAの二次構造予測により得られる最適構造 (dGが最小値である構造) であるが、準最適構造 (dGが最小ではないが、最小値に近い値を取る構造) として予想されたものを含んでいてもよい。

【0058】

本明細書では、「塩基対」とは、A-T間の塩基対およびG-C間の塩基対を意味し、「ミスマッチ塩基対」とは、上記以外の組み合わせの塩基対を意味する。本明細書では、DNA分子のある領域と別の領域とが領域間で複数の「塩基対」を形成することを「ハイブリダイズする」と表現する。

【0059】

以下、本発明のDNA構築物における、アプタマーマスク領域並びにジャンクション領域1およびジャンクション領域2の関係を説明する。

【0060】

本明細書では、アプタマーマスク領域並びにジャンクション領域1およびジャンクション領域2の關係に関しては、DNA構築物(a)を例として詳細に説明する。DNA構築物(b)、(c)および(d)については、下記説明の「3'」および「5'」の用語は、上記の連結の順番に照らし合わせて、それぞれ適宜「5'」および「3'」と読み替えることができる。

【0061】

本発明のDNA構築物(a)は、リガンド非存在下では、アプタマーマスク領域とDNAアプタマー領域の3'末端の4~7塩基とがハイブリダイズし、ジャンクション領域1とジャンクション領域2とがハイブリダイズしている。本発明のDNA構築物はまた、リガンド非存在下では、エフェクター領域の少なくとも一部がDNA構築物の3'末端領域に位置する末端領域とハイブリダイズしてマスクングされており、結果としてエフェクター領域が不活性化されている。

【0062】

本発明のDNA構築物(a)は、リガンド非存在下では、DNAアプタマー領域の3'末端の4~7塩基とアプタマーマスク領域とのハイブリダイゼーションおよび/またはジャンクション配列1と2とのハイブリダイゼーションは、好ましくは、完全なハイブリダイゼーションを形成せず(ハイブリダイゼーションした領域において、少なくとも1個の塩基は、塩基対を形成しない)、より好ましくは、少なくとも1個のインターナルループまたはバルジループを形成する。ここで、インターナルループは、特に限定されないが、2個または3個の塩基により形成されるインターナルループであることが好ましい。従って、本発明では、アプタマーマスク領域が、ハイブリダイズするDNAアプタマー領域との塩基間で、少なくとも1個のバルジループまたはインターナルループを形成する、DNA構築物が提供される。本発明ではまた、ジャンクション領域1が、ジャンクション領域2との塩基間で、少なくとも1個のバルジループまたはインターナルループを形成する、DNA構築物が提供される。本発明ではさらに、アプタマーマスク領域が、ハイブリダイズするDNAアプタマー領域との塩基間で、少なくとも1個のバルジループまたはインターナルループを形成し、かつ、ジャンクション領域1が、ジャンクション領域2との塩基間で、少なくとも1個のバルジループまたはインターナルループを形成する、DNA構築物が提供される。

【0063】

本発明では、本発明のDNA構築物(a)は、リガンド非存在下では、DNAアプタマー領域の3'末端の4~7塩基とアプタマーマスク領域との塩基間で、好ましくは、合計

10

20

30

40

50

4 ~ 11個の水素結合を形成し、より好ましくは、合計4 ~ 10個の水素結合を形成し、最も好ましくは、6 ~ 9個の水素結合を形成する。すなわち、本発明のDNA構築物(a)のアプタマーマスク領域は、リガンド非存在下では、前記DNAアプタマーの3'側末端部との間で、2個の塩基対および1個のT-Gのミスマッチ塩基対を形成するか、または、3個若しくは4個の塩基対を形成する。

【0064】

従って、本発明のDNA構築物(a)は、リガンド非存在下では、DNAアプタマー領域の3'末端の4 ~ 7塩基とアプタマーマスク領域との間で、好ましくは、少なくとも1個のインターナルループまたはバルジループを形成し、これらの塩基間では、好ましくは、合計4 ~ 11個の水素結合を形成し、より好ましくは、合計4 ~ 10個の水素結合を形成し、最も好ましくは、6 ~ 9個の水素結合を形成する。より具体的には、本発明のDNA構築物(a)は、好ましくは、リガンド非存在下では、DNAアプタマー領域の3'末端の4 ~ 7塩基とアプタマーマスク領域との間で、4個の塩基対および1個のインターナルループ若しくはバルジループを形成するか、3個の塩基対、1個のT-Gのミスマッチ塩基対および1個のインターナルループ若しくはバルジループを形成するか、3個の塩基対および1個のインターナルループを形成するか、または、2個の塩基対、1個のT-Gのミスマッチ塩基対および1個のインターナルループを形成する。リガンド非存在下でDNAアプタマー領域の3'末端の4塩基とアプタマーマスク領域との間で形成する、上記の2個の塩基対、1個のT-Gのミスマッチ塩基対および1個のインターナルループは、好ましくは、2個のA-Tの塩基対、1個のT-Gのミスマッチ塩基対および1個のインターナルループから構成され、より好ましくは、DNAアプタマー領域に近い側から順に、2個のA-Tの塩基対、1個のインターナルループおよび1個のT-Gのミスマッチ塩基対が連なって構成される。

【0065】

本発明の一つの態様では、本発明のDNA構築物(a)では、リガンド非存在下でアプタマーマスク領域との塩基間で水素結合を形成するDNAアプタマー領域は、好ましくはDNAアプタマー領域の3'末端の4塩基である。

【0066】

ある特定の態様では、本発明のDNA構築物(a)は、アプタマーマスク領域が5'側から、T-(X)_n-T-Tであり、かつ、前記DNAアプタマー領域の3'末端の4塩基が、5'側からA-A-Z-Gである(但し、nは、1または2であり、nが2である場合は、2つのXは同じ塩基でも異なる塩基でもよく、XおよびZは、(X)_nとZとがインターナルループかバルジループを形成する塩基の組合せから選択され、nが1である場合は、XとZは、XとZとの間でインターナルループを形成する塩基の組み合わせから選択される)。参考までに、例えば、本発明のDNA(b)では、DNAアプタマー領域がアプタマーマスク領域の5'側に隣接するDNA構築物の場合には、アプタマーマスク領域が、5'側からT-T-(X)_n-Tであり、かつ、前記DNAアプタマー領域の3'末端の4塩基が、5'側からG-Z-A-Aである。この態様では、DNAアプタマー領域は、好ましくは、AMPアプタマー領域であり、より好ましくは、配列番号17の塩基配列を有するAMPアプタマーである。

【0067】

ある特定の態様では、本発明のDNA構築物(a)は、アプタマーマスク領域が5'側から、T-C-G-Tであり、かつ、前記DNAアプタマー領域の3'末端の4塩基が、5'側からA-A-G-Gである。この態様では、DNAアプタマー領域は、好ましくはパツリンアプタマー領域であり、より好ましくは、配列番号24 ~ 26の塩基配列を有するパツリンアプタマー領域であり、さらに好ましくは、配列番号26の塩基配列を有するパツリンアプタマー領域である。

【0068】

本発明のDNA構築物(a)は、ジャンクション領域の長さが1 ~ 5塩基長であり、好ましくは2 ~ 5塩基長であり、より好ましくは、3 ~ 5塩基長であり、さらに好ましくは

10

20

30

40

50

3塩基長である。リガンド非存在下では、本発明のDNA構築物のジャンクション領域1とジャンクション領域2との塩基間では、3個以上の水素結合が形成される。ジャンクション領域1とジャンクション領域2との塩基間では、特に限定されないが、G-Cの塩基対数は、好ましくは0または1個であり、好ましくは0個であり、より好ましくは、すべての塩基対が、A-Tの塩基対またはT-Gのミスマッチ塩基対のどちらかから構成される。また、ジャンクション領域1とジャンクション領域2との塩基間では、好ましくは、1個のインターナルループが存在してもよい。ある態様では、本発明のDNA構築物(a)のジャンクション領域は、ジャンクション領域1が5'側からA-G-C(または、T-A-G)であり、ジャンクション領域2が5'側からG-A-T(ジャンクション領域1が5'側からT-A-Gの場合は、5'側からC-G-A)である。この態様では、DNAアプタマー領域は、好ましくは、AMPアプタマー領域であり、より好ましくは、配列番号17の塩基配列を有するAMPアプタマーである。

10

【0069】

ある特定の態様では、DNA構築物(a)のジャンクション領域1は、5'側からC-T-G(またはG-A-T)であり、かつ、ジャンクション領域2は、5'側からT-A-G(またはG-T-C)である。この態様では、DNAアプタマー領域は、好ましくはパツリンアプタマー領域であり、より好ましくは、配列番号24~26の塩基配列を有するパツリンアプタマー領域であり、さらに好ましくは、配列番号26の塩基配列を有するパツリンアプタマー領域である。

【0070】

20

ある特定の態様では、DNA構築物(a)の末端領域の塩基配列は、5'からC-C-C-AまたはC-C-Cである。この態様では、エフェクター領域の塩基配列は、その5'末端においてそれぞれ5'からT-G-G-GまたはG-G-Gであることが好ましく、配列番号16の塩基配列を有する酸化還元型DNAザイムの塩基配列であることがより好ましい。DNA構築物(a)の末端領域の塩基配列が5'からC-C-C-Aである場合、アプタマーマスク領域は、好ましくは、5'からT-A-T-Tであり、かつ、DNAアプタマー領域の3'末端の4塩基は、5'からA-A-G-Gである。この態様では、特に限定されないが、DNAアプタマー領域は、好ましくはAMPアプタマー領域またはパツリンアプタマー領域である。

【0071】

30

本発明のDNA構築物は、リガンド非存在下では、安定化しすぎるとリガンド結合時に構造変化を起こすことができず、結果としてエフェクター領域をリガンドの有無に関わらず常時不活性化してしまう可能性があり、また、不安定化しすぎるとリガンド非結合時であってもエフェクター領域と末端領域とのハイブリダイゼーションが形成されにくくなり、結果としてエフェクター領域がリガンドの有無に関わらず常時活性化してしまう可能性がある。このため、本発明のDNA構築物が、リガンド非存在下では不活性状態で、リガンド結合依存的に活性化するようにするためには、本発明のDNA構築物が二次構造を形成する際の自由エネルギー(dG)が一定範囲となるようにすることが好ましい。具体的には、本発明のDNA構築物(リガンド非存在下)は、本発明のDNA構築物が二次構造を形成する際の自由エネルギー(dG)(kcal/mol)をUNAFold Version 3.8を用いて予測条件1で予測した場合に、その下限値は、好ましくは、-14kcal/mol、より好ましくは、-12kcal/mol、さらに好ましくは、-10kcal/mol、最も好ましくは、-9kcal/molであり、かつ、その上限値は、好ましくは、-5kcal/mol、より好ましくは、-6kcal/mol、最も好ましくは、-6.5kcal/molである。従って、本発明のDNA構築物のdGは、特に限定されないが、例えば、-12~-5kcal/molとすることができ、好ましくは、-10~-5kcal/molとすることができ、より好ましくは、-9~-5kcal/molとすることができ、さらに好ましくは、-9~-6kcal/molとすることができ、最も好ましくは、-9~-6.5kcal/molとすることができる。このように、本発明のDNA構築物を設計する際には、予想されるdGが上記の範

40

50

囲に含まれることを目安として設計することができる。

【0072】

本発明のDNA構築物(a)は、DNAアプタマー領域へのリガンド結合依存的に、二次構造の変換を起こす。その際、本発明のDNA構築物(a)は、リガンド結合後は、好ましくは、アプタマーマスク領域とジャンクション領域2とはハイブリダイズする。リガンド結合後、アプタマーマスク領域とジャンクション領域2とがハイブリダイズするDNA構築物は、エフェクター領域の遊離状態(すなわち、活性化状態)を維持しやすいと考えられ、アプタマーマスク領域とジャンクション領域2とがハイブリダイズしない場合と比べて、DNA構築物の高感度化を達成する上で有利であると考えられる。アプタマーマスク領域とジャンクション領域2とは、特に限定されないが、ハイブリダイゼーション領域において、4個以上の水素結合を形成することが好ましく、2個の連続した塩基対を形成することがより好ましく、3個の連続した塩基対を形成することが最も好ましい。

10

【0073】

本発明のDNA構築物(a)は、アプタマーマスク領域が4塩基長の場合であって、リガンド非存在下でアプタマーマスク領域にミスマッチ塩基対を有する場合には、ミスマッチ塩基対を形成する塩基は、アプタマーマスク領域のミスマッチ塩基対による分子全体の二次構造のdGの増加量(ddG)が、特に限定されるものではないが、好ましくは、+0.1 kcal/mol以上、より好ましくは、+0.5 kcal/mol以上、さらに好ましくは+1.0 kcal/mol以上、最も好ましくは、+2.0 kcal/mol以上である塩基の組み合わせから選択される。本発明のDNA構築物(a)は、アプタマーマスク領域が4塩基長の場合であって、リガンド非存在下でジャンクション領域にミスマッチを有する場合には、ミスマッチ塩基対を形成する塩基は、ジャンクション領域のミスマッチによる分子全体の二次構造のdGの増加量が、特に限定されるものではないが、好ましくは、+1.0 kcal/mol以下、より好ましくは、+0.5 kcal/mol以下、さらに好ましくは、+0.3 kcal/mol以下、最も好ましくは、+0.1 kcal/mol以下である塩基の組み合わせから選択される。また、本発明のDNA構築物は、アプタマーマスク領域が4塩基長であって、アプタマーマスク領域およびジャンクション領域のそれぞれにミスマッチを有する場合には、特に限定されるものではないが、ミスマッチ塩基対を形成する塩基はそれぞれ、アプタマーマスク領域におけるミスマッチによる分子全体の二次構造のdGの増加量が、好ましくは、+0.1 kcal/mol以上、より好ましくは、+0.5 kcal/mol以上、さらに好ましくは+1.0 kcal/mol以上、最も好ましくは、+2.0 kcal/mol以上である塩基の組み合わせから選択され、および/または、ジャンクション領域におけるミスマッチによる分子全体の二次構造のdGの増加量が、好ましくは、+1.0 kcal/mol以下、より好ましくは、+0.5 kcal/mol以下、さらに好ましくは、+0.3 kcal/mol以下、最も好ましくは、+0.1 kcal/mol以下である塩基の組み合わせから選択される。従って、本発明のDNA構築物を設計する際には、予想されるddGが上記の範囲に含まれることを目安としてDNAを設計することができる。ミスマッチ塩基対の組み合わせとddGとの関係は、SantaLucia, J. Jr., Hicks, D. The thermodynamic of DNA structural motifs. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2004) 33:415-440に記載されており、この記載は、所望のddGを満たす塩基(または塩基の組み合わせ)を選択する際の指針とすることができる。

20

30

40

【0074】

ある特定の態様では、本発明のDNA構築物の塩基配列は、アプタマーマスク領域、ジャンクション領域1およびジャンクション領域2、並びにDNAアプタマー領域の3'末端の4塩基の塩基配列のいずれか1個、2個、3個、またはすべてが、下記表1に示す組み合わせのいずれか一つから選択される塩基配列である。ある特定の態様では、本発明のDNA構築物の塩基配列は、アプタマーマスク領域、ジャンクション領域1およびジャンクション領域2、並びにDNAアプタマー領域の3'末端の4塩基の塩基配列のすべてが

50

、下記表 1 に示す組み合わせのいずれか一つから選択される。

【表 1】

表 1：モジュール領域の各領域における塩基配列の組み合わせ

組 合 せ 番 号	対応する DNA 分 子	アプタマー マスク領域	DNA アプタマー領 域の 3' 末端の 4 塩 基	ジャンクシ ョン領域 1	ジャンクシ ョン領域 2
1	TMP-1	TATT	AAGG	AAA	TTT
2	TMP-5	TATT	AAGG	AGC	GAT
3	TMP-6	TGTT	AAGG	ATA	TAT
4	図 10A	TGGTT	AAGG	CAT	ATG
5	図 10B	TCATT	AAGG	AAC	GTT
6	図 11A	CTTAT	AAGG	TCT	AGA
7	図 11B	CTAT	AAGG	GAC	GTT
8	図 11C	CCGT	AAGG	AGT	AAT
9	図 11D	CGTTT	AAGG	AGC	GAT
10	図 11E	CTCTT	AAGG	TAT	ACA
11	図 11F	CCTAT	AAGG	CAT	AGG
12	TMP5-1	TTAT	AGAG	AGC	GAT
13	TMP-5-2	TCAT	AGGG	AGC	GAT
14	TMP-5-5	TATC	GAGG	AGC	GAT
15	TMP5-TG1	TATT	AGGA	AGC	GAT
16	SC-7-CCCA-TMP-7	TCGT	AAGG	CTG	TAG

※塩基配列は、左端の塩基が 5' 側となり、右端の塩基が 3' 側となるように記載されている。

【0075】

ある特定の態様では、本発明の DNA アプタマー領域が AMP アプタマー領域である DNA 構築物の塩基配列は、配列番号 1 ~ 15 のいずれか 1 つの塩基配列である。ある特定の態様では、本発明の DNA アプタマー領域が パツリンアプタマー領域である DNA 構築物の塩基配列は、配列番号 21 ~ 23、40 および 41 のいずれか 1 つの塩基配列である。ある特定の態様では、本発明の DNA アプタマー領域が アルギニンアプタマー領域である DNA 構築物の塩基配列は、配列番号 19 の塩基配列である。

【0076】

本発明の DNA 構築物は、例えば、配列番号：1 ~ 15、19、21 ~ 23、40 および 41 の塩基配列のいずれか一つの塩基配列を有する DNA 構築物の DNA アプタマー領域を改変し、それぞれのリガンドへの結合性を指標として得ることができる。改変（塩基の置換、挿入および欠失）は、本発明の DNA 構築物の条件を満たすように行うことができる。RNA アプタマー領域が パツリンアプタマー領域である本発明の RNA 構築物は、例えば、配列番号：30 ~ 32、38 および 39 の塩基配列を有する RNA 構築物のパツリンアプタマー領域を改変し、パツリン結合依存的な自己切断活性を指標として得ることができる。改変（塩基の置換、挿入および欠失）は、本発明の RNA 構築物の条件を満たすように行うことができる。核酸分子の改変の手法は当業者に周知である。

【0077】

また、DNA 構築物が、本発明の DNA 構築物の条件を満たすことは、リガンドに対して高感度または特異性を示す DNA 構築物を設計する際の指標となる。本発明の DNA 構

10

20

30

40

50

築物の条件を満たすように、本発明のDNA構築物を設計することができる。従って、本発明によれば、リガンドを検出するDNA構築物を設計する方法が提供される。また、本発明のDNA構築物は、本発明のマイクロアレイ上に設計して得られたDNA構築物をセンサー素子として固定化することにより、リガンドの結合性を指標として得てもよい。

【0078】

本発明では、本発明のDNA構築物のエフェクター領域の活性化を、本発明のDNA構築物を担持させた電極表面を有するセンサー素子を用いて電気化学的に検出することができる。また、本発明のDNA構築物を担持させた電極表面を有するセンサー素子を備えたマイクロアレイを用いると、下記に説明するように、膨大な種類のDNA構築物をスクリーニングして、リガンドに対する感度の高いDNA構築物を一挙に取得することができる。従って、本発明では、本発明のDNA構築物が電極表面に担持されてなるセンサー素子、および、本発明のセンサー素子を備えたマイクロアレイが提供される。電極表面に担持させる本発明のDNA構築物は、エフェクター領域は、好ましくは、シグナル発生領域であり、より好ましくは、DNAザイムであり、さらに好ましくは、酸化還元型DNAザイムであり、最も好ましくは、配列番号16の酸化還元型DNAザイムである。

10

【0079】

本発明のDNA構築物を電極表面に担持する際には、DNA構築物と電極との間にリンカーを介在させることができる。従って、本発明によれば、DNA構築物がリンカーを介して電極表面に担持されてなるセンサー素子およびセンサー素子を備えたマイクロアレイが提供される。本発明では、リンカーは、特に限定されないが、DNAとすることができ、その配列は、好ましくは、DNA構築物内の他の領域とハイブリダイゼーションしない配列とすることができる。DNA構築物内の他の領域とハイブリダイゼーションしない配列は、当業者であれば容易に選択することができる。リンカーは、例えば、ポリTとすることができ、長さは、例えば、1～20塩基長とすることができる。従って、本発明では、リンカーの配列は、好ましくは、1～20塩基長のポリT、より好ましくは15塩基長のポリTとすることができる。本発明によれば、DNA構築物と電極との間にリンカーを介在させることで、DNA構築物に対する電極の立体障害等の影響を低減し、リガンドの検出感度を向上させることができる。本発明では、リンカーは、DNA構築物の5'末端または3'末端に付加することができ、好ましくは、DNA構築物の末端領域（すなわち、エフェクター領域が存在する末端とは別の末端）に付加することができる。

20

30

【0080】

本発明では、センサー素子の電極表面上へのDNA構築物の担持は、公知の様々な方法により行うことができ、例えば、好ましくは、センサー素子の電極上にDNA構築物をスポットティングすることにより、より好ましくは、センサー素子の電極表面上でDNA構築物を合成することにより行うことができる。センサー素子の電極表面上でDNA構築物を合成すると、合成されたDNAは一定の配向で電極表面上に担持させることができるので、リガンドの検出感度の観点で好ましい。従って、本発明では、センサー素子上でDNA構築物を合成することにより、DNA構築物を電極表面に担持させたセンサー素子が提供される。本発明では、本発明のセンサー素子を備えたマイクロアレイを用いることにより、1つのマイクロアレイの電極表面上に複数の、好ましくは1,000種類以上の、より好ましくは5,000種類以上の、さらに好ましくは10,000種類以上のDNA構築物を合成することができ、これら膨大な種類のDNA構築物を一挙にスクリーニングすることができる。センサー素子の電極表面上でのDNA構築物の合成は、アレイ製造の方法として公知の様々な方法を用いて行うことができ、例えば、特開第2006-291359号公報に開示された方法などを用いて行うことができる。本発明では、マイクロアレイとして、特に限定されないが、例えば、Custom Array社製ElectraSense（商標）マイクロアレイを用いることができる。

40

【0081】

本発明では、本発明のセンサー素子またはセンサー素子を備えたマイクロアレイを用いて、DNAザイムの基質存在下で、電気シグナルを測定することにより、リガンドを検出

50

することができる。本発明のリガンドの検出方法では、DNAザイムにより生じる電流をセンサー素子の電極上で読み取ることにより、リガンドを検出することができる。DNAザイムは、特に限定されないが、好ましくは酸化還元型DNAザイムであり、より好ましくは配列番号16の酸化還元型DNAザイムである。本発明では、酸化還元型DNAザイムが活性化して発生させる酸化還元電流をセンサー素子の電極上で読み取ることにより、リガンドを検出することができる。

【0082】

本発明のリガンドの検出方法ではまた、エフェクター領域として、リガンド存在下でのみ他の核酸分子とハイブリダイズ可能な配列、すなわち、リガンド存在下でのみHRPなどの酸化還元酵素をコンジュゲートした核酸分子とハイブリダイズ可能な配列を有するDNA構築物を用いることもできる。このようなDNA構築物を用いる場合には、DNA構築物をセンサー素子に固定し、HRPなどの酸化還元酵素をコンジュゲートした核酸分子とハイブリダイズ可能な条件で接触させ、その後、酸化還元酵素により生じる酸化還元電流を検出することにより、リガンドの検出を行うことができる。

【0083】

本発明ではまた、本発明のDNA構築物の塩基配列をさらに改変して得られるDNA構築物候補群から、本発明の方法を用いてリガンドの検出感度を指標としてDNA構築物をスクリーニングする方法が提供される。

【0084】

本発明のスクリーニング方法は、リガンドを検出するDNA分子またはそれと同等の塩基配列を有する核酸分子をスクリーニングする方法であって、以下の工程：

(A) DNAアプタマー領域と、モジュール領域と、DNAアプタマー領域へのリガンドの結合依存的に活性化するエフェクター領域とを含んでなり、かつ、リガンド非存在下でループ構造を形成するDNA分子の塩基配列を設計または改変して、リガンドを検出するDNA分子候補群またはそれと同等の塩基配列を有する核酸分子を得ること、

(B) 得られた塩基配列を有するDNA分子または核酸分子を電極表面に担持してなるセンサー素子を備えたマイクロアレイを作製すること、

(C) 得られたマイクロアレイを用いて電気化学的にエフェクター領域からの酸化還元電流を測定すること、および、

(D) リガンドの検出感度を指標としてDNA分子または核酸分子を選択することを含んでなる方法である。以下、上記工程(A)～(D)を工程毎に説明する。

【0085】

工程(A)について

本発明では、スクリーニングは、DNAアプタマー領域と、モジュール領域と、エフェクター領域を含んでなり、かつ、リガンド非存在下でループ構造を形成するDNA分子の塩基配列群を得ることから始まる。本発明のスクリーニング方法では、DNA分子の塩基配列の設計は、特に限定されないが、例えば、本発明のDNA構築物であることを指標として行うことができる。または、本発明のDNA構築物であることを指標としない場合には、DNA分子の塩基配列の設計は、DNA分子が、リガンド非存在下でエフェクター領域がマスキングされる二次構造のdGが最小値を示し、かつ、リガンド結合依存的にエフェクター領域のマスキングが解消された二次構造のdGが最小値を示すようになることを指標として行ってもよい。本発明のスクリーニング方法では、改変されるDNA分子は、DNAアプタマー領域にリガンドが結合すると、エフェクター領域が活性化して、エフェクター領域が、酸化還元酵素をコンジュゲートした他の核酸分子とハイブリダイズ可能となるか、シグナル発生領域である場合には、その酸化還元酵素活性を活性化させるDNA分子である。本発明のスクリーニング方法では、改変されるDNA分子としては、例えば、DNAアプタマーとDNAザイムとが、例えば、ヘアピンループ構造を形成するように連結したものをを用いることができ、特に限定されないが、例えば、本発明のDNA構築物を用いることができ、リガンドがAMPである場合は、好ましくは配列番号：1～15のいずれか一つ、リガンドがアルギニンである場合は、好ましくは配列番号：19、リガ

ドがパツリンである場合には、好ましくは配列番号 2 1 ~ 2 3、4 0 および 4 1 のいずれか一つの塩基配列を有する DNA 分子を用いることができる。また、工程 (A ') では、工程 (A) の手順と同様に、本発明のスクリーニング方法により既に得られている DNA 分子をさらに改変してリガンドを検出する DNA 分子候補群またはそれと同等の塩基配列を有する核酸分子を得てもよい。本発明では、スクリーニングする DNA 分子のエフェクター領域は、好ましくは、シグナル発生領域とすることができ、より好ましくは、DNA ザイムとすることができ、さらに好ましくは、酸化還元型 DNA ザイムとすることができ、さらにより好ましくは、配列番号 1 6 の配列を有する酸化還元型 DNA ザイムとすることができ、そして、得られた DNA 分子の塩基配列と同等の塩基配列を有する核酸として、得られた DNA 分子の一部 (例えば、エフェクター領域、ジャンクション領域 1、アプタマーマスク領域、DNA アプタマー領域、ジャンクション領域 2 および末端領域からなる群から選択される少なくとも 1 つの一部を DNA 以外の核酸 (例えば、PNA、LNA または RNA) に置き換えることにより、核酸分子を得ることができる。本発明のある態様では、工程 (A) は、ループ構造の DNA アプタマー領域と、モジュール領域と、DNA アプタマー領域へのリガンドの結合依存的に活性化するエフェクター領域とを含んでなるヘアピンループ構造の DNA 分子の塩基配列を設計または改変して、リガンドを検出する DNA 分子候補群またはそれと同等の塩基配列を有する核酸分子を得ることである。

10

【 0 0 8 6 】

DNA 分子の塩基配列の改変は、DNA アプタマー領域、モジュール領域、エフェクター領域、およびそれ以外の領域 (例えば、末端領域) から選択される 1 以上の領域に対して行うことができ、好ましくは、いずれかの 1 領域を選択して行うことができる。DNA 分子の塩基配列の改変は、塩基の挿入、欠失および置換から選択される 1 以上により行うことができる。また、DNA 分子の塩基配列の改変は、スクリーニングを簡便にする観点で、エフェクター領域を、活性の測定容易なもの、例えば、酸化還元型 DNA ザイムに置き換える改変を行うことができる。このようにすることで、本来、本発明のスクリーニング方法ではスクリーニングが困難なエフェクター領域を有する DNA 分子であっても、スクリーニングが可能となる。改変は、特に方法は問わず、当業者に周知の方法を用いて適宜行うことができるが、好ましくは、コンピュータ上で行うことができる。

20

【 0 0 8 7 】

例えば、本発明では、好ましくは、UNAFold Version 3.8 などの DNA 分子の二次構造予測プログラムを用いて、リガンド非存在下で最適構造 (または準最適構造) が所望の二次構造 (例えば、ヘアピンループ構造) を形成すると推定されるものだけをスクリーニングに供することができる。例えば、DNA 分子として本発明の DNA 構築物 (a) を用いた場合には、例えば、リガンド非存在下で図 1 A または図 2 A のようなヘアピンループ構造を形成すると推定される DNA 分子だけをスクリーニングに供することができる。コンピュータ上で塩基配列の改変を行う場合には、特に限定されないが、例えば、改変された塩基配列を有する DNA 分子の dG が本発明の DNA 構築物の条件を満たすことなど、本発明の DNA 構築物の条件を満たすことを指標として改変することができる。このように、本発明では、高い感度を示し得る分子を選択的にスクリーニングに供することが可能であり、ランダムに変異を導入してそのすべてをスクリーニングする手法と比較して、スクリーニングの効率が低い。

30

40

【 0 0 8 8 】

工程 (B) について

本発明では、上述のように、DNA 分子を電極表面上に担持してなるセンサー素子を作製することができる。本発明のスクリーニング方法では、好ましくは、本発明のセンサー素子を備えたマイクロアレイが用いられる。

【 0 0 8 9 】

工程 (C) について

本発明では、酸化還元電流の測定は、マイクロアレイ用の電気化学的検出器、および電気化学検出用のマイクロアレイを用いて、製造者のマニュアルに記載の通り測定すること

50

ができる。マイクロアレイ用の電気化学的検出器としては、特に限定されないが、例えば、Custom Array社製ElectraSense(商標)検出器を用いることができ、電気化学検出用のマイクロアレイとしては、特に限定されないが、例えば、Custom Array社製ElectraSense(商標)マイクロアレイを用いて行うことができる。

【0090】

工程(D)について

本発明では、測定された電流値の大きさは、DNA分子または核酸分子のリガンドの検出感度を反映する。例えば、リガンド非存在下と存在下とで測定される電流値の差(または比)が大きいほど、DNA分子または核酸分子はリガンドに対する検出感度が高いことを意味する。従って、本発明では、例えば、測定された電流値に基づいてリガンド検出感度が高いDNA分子または核酸分子を選択することができる。DNA分子または核酸分子をスクリーニングする際には、例えば、リガンド検出感度が分子全体の平均よりも高いものを選択してもよいし、リガンド検出感度が最も高いDNA分子または核酸分子いくつかを選択してもよい。

【0091】

また、工程(A)で得られた候補配列群では、DNA分子毎または核酸分子毎に高い定量性を発揮できるリガンド濃度領域が異なると考えられる。すなわち、あるDNA分子または核酸分子は、低濃度領域で高い定量性を発揮するが、他のDNA分子は高濃度領域で高い定量性を発揮するというように、分子によって得意とする濃度領域が異なる。そのため、所望の濃度領域において高い定量性を発揮するDNA分子または核酸分子を得ることを目的として、当該所望の濃度領域でのリガンドの検出感度に基づいてスクリーニングを行うことができる。従って、本発明では、所望の濃度領域におけるリガンドの検出感度を指標としてDNA分子または核酸分子をスクリーニングすることができる。例えば、0 mM ~ 5 mMの間の濃度領域で高感度を発揮するDNA分子または核酸分子を得る場合には、その濃度領域でのリガンドの検出感度を指標としてDNA分子または核酸分子のスクリーニングを行うことができる。また、5 mM ~ 10 mMの間の濃度領域で高い検出感度を発揮するDNA分子または核酸分子を得る場合には、その濃度領域でのリガンドの検出感度を指標としてDNA分子または核酸分子のスクリーニングを行うことができる。

【0092】

本発明のスクリーニング方法では、工程(D)を行った後に、さらに、エフェクター領域を他のエフェクター領域に置き換えてもよい。例えば、酸化還元活性を有しないエフェクター領域を有するDNA分子または核酸分子であっても、例えば、エフェクター領域を酸化還元型DNAザイムに置き換えて、リガンドの検出感度を指標として高感度なDNA分子または核酸分子を選択し、得られたDNA分子または核酸分子の酸化還元型DNAザイム部分を、酸化還元活性を有しない元々のエフェクターに置き換えることにより、高感度にリガンドを検出するDNA分子または核酸分子を得ることができる。同様に、本発明のスクリーニング方法では、工程(D)を行った後に、さらに、DNAアプタマー領域を他のDNAアプタマー領域に置き換えてもよい。このようにすることで、たとえ、スクリーニングが困難なDNA分子または核酸分子であっても本発明のスクリーニングを適用することができる。

【0093】

本発明では、リガンドの検出感度を指標としてスクリーニングしたDNA分子または核酸分子の配列をさらに改変して、さらなるスクリーニングに供することにより、DNA分子または核酸分子によるリガンドの検出感度を最適化することができる。従って、本発明では、DNAアプタマー領域とエフェクター領域を含んでなるループ構造を形成するDNA分子または核酸分子の塩基配列を最適化する方法が提供される。この目的で、DNA分子または核酸分子の改変は、DNAアプタマー領域、モジュール領域、エフェクター領域、およびそれ以外の領域(例えば、末端領域)から選択される少なくとも1つの領域に対して行ってDNA分子全体または核酸分子全体を最適化してもよいし、いずれかの1領域

10

20

30

40

50

を選択して設計または改変して、その1領域を集中的に最適化してもよい。また、1領域を集中的に最適化した後に、他の領域を最適化してもよい。このように、スクリーニングのサイクルを回して特定のリガンドに対して高い感度を有するDNA分子または核酸分子を製造し、取得することができる。

【0094】

本発明では、DNA分子若しくは核酸分子の全体または一部を最適化した後に、DNA分子または核酸分子の一部（例えば、一つの領域）を置き換えてもよい。すなわち、DNA分子若しくは核酸分子の全体または一部を最適化した後に、エフェクター領域を他の所望のエフェクター領域またはエフェクター領域としての機能が期待されるDNAに置き換えてもよい。このようにすることで、スクリーニングや最適化が困難なエフェクター領域を有するDNA分子または核酸分子であっても、少なくともエフェクター領域以外の部分の最適化は可能となる。エフェクター領域と同様に、DNA分子若しくは核酸分子の全体または一部を最適化した後に、DNAアプタマー領域を他のDNAアプタマー領域とに置き換えてもよい。

10

【0095】

本発明のスクリーニング方法は、
(E)リガンド以外の化合物、例えば、リガンドがパツリンであれば、パツリン以外の化合物、例えば、テオフィリン、ベンゾフランおよび(S)-パツリンメチルエーテルなどのパツリンの類似化合物に対して、結合性を示さない、あるいは、パツリンに対するよりも弱い結合性を示すDNA分子または核酸分子を選択することをさらに含んでなってもよい。結合性の評価は、上記のようにABTSを用いた比色試験や電気化学的手法により行うことができる。リガンド以外の化合物、例えば、パツリン以外の化合物、または、リガンドの類似化合物、例えば、パツリンの類似化合物は、DNA分子または核酸分子にどのような結合特異性を持たせたいかにより当業者が自由に設定することができる。具体的には、ある化合物に結合性を示さないDNA分子または核酸分子を得たい場合には、該化合物との結合性によってDNA分子または核酸分子を選択することができる。

20

【0096】

本発明の一つの態様では、本発明のリガンドの検出感度の最適化は、SELEX法(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)などの人工分子進化の工程、具体的には、エラープローン(error prone)なDNAポリメラーゼ等を用いた変異導入の工程は含まない。本発明では、DNA分子は、マイクロアレイの電極上で設計した配列通りに正確に合成されているので、高感度を示したDNA分子の配列は、設計した配列として既に把握済みである。従って、酵素等を用いて変異を導入するまでもなく、マイクロアレイにおいて高い検出感度を示した各スポット上のDNA分子の配列情報に基づいて塩基配列をさらに改変して、DNA分子の塩基配列を最適化することが可能である。

30

【0097】

本発明では、スクリーニングして得られたDNA分子または核酸分子や最適化して得られたDNA分子または核酸分子を比較することで、リガンドの検出感度を向上させるためにDNA分子または核酸分子が満たすべき条件やDNAの塩基配列の設計の指針を得ることができる。

40

【0098】

本発明では、スクリーニングして得られたDNA分子の一部をDNA以外の同等の核酸（例えば、RNA、PNA若しくはLNA）で置き換えてリガンドを検出する核酸分子の候補群を得てもよく、この場合、候補群の各核酸分子を電極表面に担持してなるセンサー素子を備えたマイクロアレイを作製し、得られたマイクロアレイを用いて電気化学的にエフェクター領域（特に、酸化還元DNAザイムにより構成される）からの酸化還元電流を測定し、リガンドの検出感度を指標として核酸分子を選択して、リガンドを高感度に検出する核酸分子をスクリーニングしてもよい。

【0099】

次に、本発明により提供される核酸分子について説明する。

50

【 0 1 0 0 】

本発明により提供される核酸分子は、パツリン結合性の核酸分子である。本発明の核酸分子は、分子内水素結合により水溶液中で高次構造を形成し、パツリンと結合すると考えられる。従って、本発明の核酸分子は、水溶液中で高次構造を形成し得る核酸分子である。

【 0 1 0 1 】

本発明の核酸分子は、パツリンに対して特異的に結合する。すなわち、本発明の核酸分子は、パツリンに対して結合性を示すが、構造の類似した他の化合物（例えば、ベンゾフラン、(S)-パツリンメチルエーテルおよびテオフィリンなど）には結合性を示さないか、パツリンに対するよりも弱い結合性を示す。パツリンに対して結合特異性を示す本発明の核酸分子は、測定試料中のパツリンの検出や試料中からのパツリン分子の除去に有利に用いられ得る。また、本発明のDNA分子、本発明のRNA分子、および本発明の核酸構築物も同様に、測定試料中のパツリンの検出や試料中からのパツリン分子の除去に有利に用いられ得る。

【 0 1 0 2 】

本発明のRNA分子は、例えば、配列番号：33、配列番号：34または配列番号35の塩基配列を有するRNA分子、あるいは、これらの塩基配列と相同な配列を有するRNA分子とすることができる。この場合、本発明のRNA分子は、30ヌクレオチド長～40ヌクレオチド長とすることができ、好ましくは30ヌクレオチド長～35ヌクレオチド長とすることができ、より好ましくは35ヌクレオチド長とすることができる。

【 0 1 0 3 】

例えば、配列番号：33、配列番号：34または配列番号：35の塩基配列と相同な配列を有するRNA分子としては、配列番号：33、配列番号：34若しくは配列番号35と80%以上、85%以上、90%以上、若しくは95%以上の配列同一性を示す塩基配列を有するRNA分子、または、配列番号：33、配列番号：34若しくは配列番号35の塩基配列の相補配列を有するRNA分子にハイブリダイズするRNA分子（このRNA分子は少なくとも30塩基、少なくとも31塩基、少なくとも32塩基、少なくとも33塩基、少なくとも34塩基または少なくとも35塩基からなり、全長は35塩基、36塩基、37塩基または40塩基とすることができる。）が挙げられる。配列番号：33、配列番号：34または配列番号35の塩基配列と相同な配列を有するRNA分子としてはまた、好ましくは配列番号：33、配列番号：34または配列番号：35の塩基配列を有するRNA分子に対して、1塩基～5塩基、より好ましくは1塩基～4塩基、さらに好ましくは1塩基～3塩基、さらにより好ましくは1塩基の置換、挿入または欠失がなされた塩基配列を有するRNA分子とすることができる。特に、下記実施例によれば、配列番号：34または35の塩基配列を有するRNA分子は、5'末端の4塩基を欠失しても、パツリンへの結合性は保たれた。従って、本発明のRNA分子は、配列番号：33、配列番号：34または配列番号35の塩基配列を有するRNA分子に対して、特に限定されないが、1塩基～5塩基、好ましくは1塩基～4塩基、より好ましくは1塩基～3塩基、さらに好ましくは1塩基の欠失がなされた塩基配列を有するRNA分子とすることができる。本発明のRNA分子でなされ得る塩基の置換、挿入または欠失は、好ましくは、配列番号：33、配列番号：34または配列番号：35の塩基配列の5'末端、特に5'末端の4塩基の部分で行われる。

【 0 1 0 4 】

パツリンとの結合の検出を容易にするために、本発明のRNA分子は、パツリンを検出する領域に連結されていてもよい。例えば、本発明のRNA分子は、自己切断型リボザイムと組み合わせて、パツリン検出用のRNA構築物とすることができる。この場合、自己切断活性が自己切断型リボザイムのパツリンとの結合を示す。本発明のRNA構築物は、本発明のRNA分子を自己切断型リボザイムの分子内に含んでなることができ、例えば、自己切断型リボザイム（配列：5'-GGGCGACCCUGAUGAGCGA AACGGUGAAGCCGUAGGUUGCCC-3'；図21Aまたは表10を参照）の1

10

20

30

40

50

6番目のGと17番目のCとの間に本発明のRNA分子が挿入されてなる分子とすることができる。

【0105】

本発明のRNA構築物は、パツリンとの結合依存的に自己切断を起こす。従って、本発明のRNA構築物は、パツリンに結合すると自己切断を引き起こすRNA構築物である。RNA構築物へのパツリンの結合は、RNA構築物の自己切断活性の変化(例えば、上昇)によりモニターすることができる。RNA構築物の切断活性は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)によりRNA分子の分子量の変化として検出することができる。PAGEでは、好ましくは、8M尿素を含むポリアクリルアミドゲルを用いた変性PAGEにより検出することができる。本明細書では、このようなRNA構築物中のパツリン結合性を示す領域をパツリンアプタマー領域またはパツリンRNAアプタマー領域ということがある。

10

【0106】

本発明では、本発明のRNA分子またはRNA構築物をコードするDNA分子が提供される。

【0107】

自己切断型リボザイムとしては、特に限定されないが、例えば、リガンド依存的な自己切断活性を示すハンマーヘッド型リボザイム(Makoto Koizumi et al., Nature Structural Biology (1999) 6: 1062-1071)が挙げられる(図21A参照)。また、本発明のRNA構築物としては、例えば、本発明の自己切断型リボザイムは、配列番号30~32の塩基配列を有するハンマーヘッド型リボザイムとすることができる。

20

【0108】

本発明のDNA分子は、例えば、配列番号:24、配列番号:25、または配列番号:26の塩基配列を有するDNA分子、あるいは、これらの塩基配列と相同な配列を有するDNA分子とすることができる。この場合、本発明のDNA分子は、25ヌクレオチド長~35ヌクレオチド長とすることができ、好ましくは30ヌクレオチド長とすることができる。

【0109】

例えば、配列番号:24、配列番号:25、または配列番号:26の塩基配列と相同な配列を有するDNA分子としては、配列番号:24、配列番号:25、若しくは配列番号:26の塩基配列と80%以上、85%以上、90%以上、若しくは95%以上の配列同一性を示す塩基配列を有するDNA分子、または、配列番号:24、配列番号:25、若しくは配列番号:26の塩基配列の相補配列を有するDNA分子にハイブリダイズするDNA分子(このDNA分子は少なくとも25塩基、少なくとも26塩基、少なくとも27塩基、少なくとも28塩基、少なくとも29塩基または少なくとも30塩基からなり、全長は30塩基、31塩基、32塩基または35塩基とすることができる。)が挙げられる。配列番号:24、配列番号:25、または配列番号:26の塩基配列と相同な配列を有するDNA分子としてはまた、好ましくは配列番号:24、配列番号:25、または配列番号:26の塩基配列を有するDNA分子に対して、1塩基~5塩基、より好ましくは1塩基~4塩基、さらに好ましくは1塩基~3塩基、さらにより好ましくは1塩基の置換、挿入または欠失がなされた塩基配列を有するDNA分子とすることができる。本発明のDNA分子は、配列番号:24、配列番号:25、または配列番号:26の塩基配列を有するDNA分子に対して、特に限定されないが、1塩基~5塩基、好ましくは1塩基~4塩基、より好ましくは1塩基~3塩基、さらに好ましくは1塩基の欠失がなされた塩基配列を有するDNA分子とすることができる。塩基の欠失は、例えば、配列の末端(5'末端または3'末端)において行われ得る。

30

40

【0110】

本発明の核酸分子とリガンド(例えば、パツリン)との結合は、例えば、表面プラズモン共鳴法(SPR)を用いて容易に検出することができる。表面プラズモン共鳴法を用いた分子間結合の検出法は、当業者に周知である。

50

【0111】

本発明では、DNA分子とリガンド、例えば、AMPやパツリンとの結合の検出等を容易にするために、例えば、DNA分子は、リガンドの検出のための領域等（例えば、下記のエフェクター領域）に連結され、DNA構築物の一部に組み込まれて用いられ得る。すなわち、本発明では、DNAアプタマー領域（例えば、AMPアプタマー領域およびパツリンアプタマー領域）と、該アプタマー領域へのリガンドの結合により活性化するエフェクター領域とを含んでなるDNA構築物が提供される。ある態様では、本発明のDNA構築物は、例えば、以下の構成のDNA構築物にパツリンアプタマー領域として組み込まれて用いられ得る。

【0112】

次に、本発明のDNA分子、RNA分子、核酸分子または核酸構築物を用いて、試料中のリガンド（例えば、パツリン）を除去する方法を説明する。

【0113】

本発明の核酸分子はリガンドに結合するので、本発明のDNA分子、RNA分子、核酸分子または核酸構築物は、試料中からリガンドを除去することにも用いられ得る。従って、本発明では、本発明のDNA分子、RNA分子、核酸分子または核酸構築物を用いて試料中からリガンドを除去する方法が提供される。すなわち、本発明では、本発明のDNA分子、RNA分子、核酸分子または核酸構築物にリガンドを結合させることを含んでなる、試料中のリガンドを除去する方法が提供される。

【0114】

本発明ではまた、試料中からのリガンドの除去は、本発明のDNA分子、RNA分子、核酸分子または核酸構築物を固定化したカラムを用いて行うことができる。カラムへの核酸分子の固定化は当業者に周知の方法を用いて行うことができる。

【0115】

より具体的には、本発明のリガンドの除去方法は、

(a) リガンドに結合性を示す、好ましくは、結合特異性を示すDNA分子、RNA分子、核酸分子または核酸構築物を得ること、

(b) 得られたDNA分子、RNA分子、核酸分子または核酸構築物をカラムの樹脂に固定化して、リガンド吸着カラムを作製すること、および、

(c) 得られたリガンド吸着カラムに試料を接触させて、リガンドをカラムに吸着させること

を含んでなる方法とすることができる。

【0116】

本発明によればさらに、本発明のDNA分子、RNA分子、核酸分子または核酸構築物が固定化されたりリガンド吸着カラム（例えば、パツリン吸着カラム）が提供される。

【実施例】

【0117】

実施例A1：化合物検出のためのDNAアプタマーの設計

本実施例では、化合物の検出に用いることができる高感度なDNA分子の設計を行った。DNA分子として、アデノシン-リン酸（AMP）アプタマーと酸化還元型DNAザイムを含んでなるヘアピンループ構造を有する配列番号20の配列を有するDNA分子を元にして、配列を改変して高感度なDNA分子を設計した。

【0118】

DNA分子の設計（改変）は以下のように行った。まず、以降の実施例A1 - A6ではいずれも、DNA分子のアプタマーマスク配列およびジャンクション領域の配列のみを改変した。設計の際には、アプタマーマスク配列が3または4塩基長（M = 3または4）であること、アプタマーマスク配列とハイブリダイズするDNAアプタマー領域が5' - AAGG - 3' であること、および、ジャンクション領域が1 ~ 5塩基長（J = 1 ~ 5）であるとの条件を設定した上で、DNAの二次構造予測プログラム（米国ニューヨーク州立大学オールバニ校により無償で提供されるUNAFold Version 3.8 (ht

10

20

30

40

50

tp://mfold.rna.albany.edu))を用いて、構造形成温度 (folding temperature) : 37、 Na^+ 濃度 : 1 M および Mg^{2+} 濃度 : 0 M の予測条件で予測した際に、AMP 非存在下で、ヘアピンループ構造の二次構造を形成すると予測されること (例えば、図 1 E に示される二次構造を形成すると予測されること) を指針として DNA 分子を設計した。ソフトウェアパッケージは 32 ビットの Linux (商標) 用のプログラムを用いた。なお、二次構造予測は、コマンド「UNAFold.pl --NA=DNA input fasta formatted file (入力ファイル名)」を用いて実行した (予測の際には、アプタマーマスク領域およびジャンクション領域において、1 個以上のインターナルループまたはバルジループが含まれていてもよいこととした)。具体的には、指針として、DNA アプタマーの 3' 末端の 4 塩基が、リガンド非存在下で、DNA アプタマーの 5' 側に隣接する 3 または 4 塩基 (アプタマーマスク領域) とハイブリダイズする構造を形成すると予測される DNA 分子を網羅的に設計した。得られた配列をカウントしたところ、上記条件を満たす DNA 配列の数と M および J との関係は表 2 の通りであった。

【0119】

【表 2】

表 2

	J=1	J=2	J=3	J=4	J=5
M=3	3	14	112	96	96
M=4	55	220	2452	1802	2932

【0120】

この際、アプタマーマスク配列やジャンクション領域は、完全な塩基対を形成してハイブリダイズする必要はなく、ハイブリダイズした領域中にインターナルループやバルジループが含まれていてもよいこととした。以下の実施例 A1 ~ A6 では、すべて、アプタマーマスク領域、アプタマーマスク領域でマスクされる DNA アプタマー領域の一部、ジャンクション領域 1 およびジャンクション領域 2 のみにおいてのみ、配列の変更を行い、それ以外の領域は、配列番号 20 の配列を有する DNA センサーと同一の配列とした。

【0121】

実施例 A2 : スクリーニング系の構築

本実施例では、DNA 分子を大量にかつ簡便にスクリーニングできる系の構築を試みた。

【0122】

スクリーニング系は、DNA ザイムの活性化を電気化学的に検出する系を用いて行った。電気化学的な検出には、電気化学検出マイクロアレイ (Custom Array 社製、ElectraSense 12k マイクロアレイ、製品番号 : 1000081) および検出器 (Custom Array 社製、ElectraSense 検出器、製品番号 : 610036) を用いることを検討した。

【0123】

まず、マイクロアレイのチップ上に、酸化還元 DNA ザイム (配列番号 16 ; GGGT AGGGCGGGTTGGG) と、対照として活性を持たない DNA (AATACGACTCACTATAGGAAGAGATGG) を合成して、DNA ザイム活性が検出できるかを検討した。これらの DNA の 3' 末端をアレイに固定するため、DNA の 3' 末端に 51 塩基のポリ T 配列を付加してアレイに固定した。5 mM の ABTS と 5 mM の H_2O_2 を用いた。反応バッファーは、25 mM HEPES (pH 7.4)、20 mM KCl、200 mM NaCl、1% DMSO とした。ヘミンは、最終濃度 2.4 μM で添加し、2,2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (ABTS) は、最終濃度 5 mM で添加した。シグナルは、25 の温度条件下で、最終濃度 5 mM の H_2O_2 添加 1 分後に測定した。すると、図 3 に示されるように、電気化学的な検出方法を用いて、DNA ザイムの活性を検出することができた。

10

20

30

40

50

【0124】

上記の電気化学検出マイクロアレイは、半導体電極のシグナル制御により Phosphoramidite 法を用いて、チップ上で最大 12,000 種類の DNA を合成することができる。従って、電気化学検出マイクロアレイを用いれば、1回で最大 12,000 種類の DNA 分子のスクリーニングができることが示唆された。

【0125】

実施例 A3：一次スクリーニング

配列と検出感度のおおざっぱな関連性を見るために、第1段階目のスクリーニングでは、設計された配列の内の一部について、スクリーニングを行った。

【0126】

まず、実施例 A1 により得られた候補配列数が膨大であったため、スクリーニングのために実施例 A1 で設計した DNA 分子を、二次構造推定により計算される DNA 分子全体の自由エネルギー (dG) ($kcal/mol$) (すなわち、フォールディング前と二次構造形成後の自由エネルギーの差) に基づいて選別し、スクリーニングに供した。具体的には、同一の dG を示す DNA 配列については、ランダムにその一つのみを選択してスクリーニングに供することとして、 dG に基づいて選別を行った。スクリーニングに供した DNA 配列の数と M および J との関係は、表3の通りであった。

【0127】

【表3】

表3

	J=1	J=2	J=3	J=4	J=5
M=3	2	7	54	62	96
M=4	39	132	698	718	912

【0128】

次に、選別した塩基配列を有する DNA 分子をこのマイクロアレイ上に合成した。合成の際には、上述のように DNA 分子の 3' 末端にリンカーとして 15 塩基のポリ T 配列を付加した (図4)。この DNA 分子は、DNA アプタマー領域に AMP が結合すると初めて、配列番号 16 の塩基配列を有する DNA ザイムが遊離状態になりヘミンと錯体を形成して、ABTS を酸化し、 H_2O_2 を還元することができる (図5)。

【0129】

実施例 A2 とバッファー条件、基質濃度および温度条件等の測定条件は変えずに、AMP 濃度のみを 0 mM または 5 mM 添加し、それぞれ 30 分室温でインキュベートしてから、各分子の DNA ザイム活性の AMP 濃度依存性を確認した。AMP を 5 mM 添加した条件の測定は 2 回繰り返し行い、添加していない条件は 1 回行った。DNA 分子のエフェクター領域の活性化の程度は、AMP を 5 mM 添加したときの 2 回の平均値を、添加しないときの値で割ることにより、測定シグナルのシグナル比として評価した。

【0130】

測定シグナルの比は、図6に示される通り、2回の繰り返し実験で高い再現性を示した。まずこのことから、電気化学的測定は、再現性が高い測定方法であることが分かった。さらに、DNA 分子の塩基配列とシグナル比との関連を調べるために、アプタマーマスク配列およびジャンクション領域のそれぞれに対して、その長さ、インターナルループ数およびバルジループ数と、シグナル比との関連を調べ、グラフ化した (図7)。すると、図7Aに示されるように、アプタマーマスク領域の長さは、4 塩基長であることが好ましく、インターナルループ数およびバルジループ数はそれぞれ、1 および 0 であることが好ましいことが明らかとなった (図7B および C)。また、図7Dに示されるように、ジャンクション領域の長さは、3 塩基長が最も好ましいことが明らかとなった。ジャンクション領域におけるインターナルループ数は、0 も 1 もほとんど違いは見られなかった (図7E)。

【0131】

二次構造形成によるDNA分子全体の自由エネルギー (dG) (すなわち、フォールディング前と二次構造形成後の自由エネルギーの差) を $UNAfold$ を用いて計算し、得られたシグナル比との関係をグラフ化した (図7F)。すると、 dG の値が小さいほど、シグナル比が小さくなる傾向が見られた。また、 dG が、 $-14 \sim -4 \text{ kcal/mol}$ で高いシグナル比を示すものが見られ、 $-8 \sim -6 \text{ kcal/mol}$ の場合に特に高いシグナル比を示すものが見られた。この結果から、DNA分子の dG が、ある一定の範囲の値であることが、DNA分子が高感度にリガンドを検出する上で重要であることが示唆された。

【0132】

さらに、上記で行ったスクリーニングにより最も高いシグナル比を示したDNA分子 (すなわち、AMPを最も高感度に検出できるDNA分子) 6種類について、別法による活性の再検証を行うと共に、その配列を調べた。具体的には、ABTSはDNAザイムによって酸化されると414nmに吸光を示すようになるため、吸光測定法により吸光度の変化を調べることににより、酸化型ABTSの量が定量でき、これにより、DNAザイムの活性化の度合いを評価することができる。そこで、測定バッファー (25mM HEPES (pH 7.1)、10mM NaCl) に、6種類のDNA分子それぞれを12.5 μM となるように添加し、ヘミンを0.5 μM 、ABTSは5mMとなるように添加した。さらに、AMPを0mM、0.05mM、0.5mM、2.5mMまたは5.0mMとなるように添加した。吸光は、最終濃度5mMの H_2O_2 を加えて反応を開始してから5分後に測定した。測定は3回繰り返し行った。414nmにおけるABTSの吸光度変化 $A_{414\text{nm}}$ は、 $A_{414\text{nm}} = [\text{AMP添加時の平均吸光度}] - [\text{AMP無添加時の平均吸光度}] - [\text{AMPを添加しDNA無添加としたときの平均吸光度}]$ により算出した。

【0133】

結果は図8に示される通りであった。すなわち、6種類のDNA分子 (それぞれTMP-1~6と呼ぶ) のうち、TMP-1、5および6は、吸光測定によってもAMP濃度依存的にDNAザイムの活性が上昇した。一方で、TMP-2~4は、スクリーニングでは高いシグナル比を示したものの、吸光測定によってもAMP濃度依存的なDNAザイムの活性の上昇は見られなかった。

【0134】

TMP-1~6で予測されるアプタマーマスク領域とジャンクション領域の二次構造およびDNA配列は図9の通りであった。すなわち、AMP濃度依存的なDNAザイムの活性上昇を示したTMP-1、5および6は、いずれも、AMP非存在下で、アプタマーマスク領域で2個のT-Aの塩基対と、1個のインターナルループ、および1個のT-Gのミスマッチ塩基対を形成すると予測されるものであった。さらに、アプタマーマスク領域の長さはいずれも4塩基長であり、ジャンクション領域の長さはいずれも3塩基長であった。また、二次構造推定により計算される、塩基対非形成時と塩基対形成時との自由エネルギー (dG) は、TMP-1、5および6のいずれも -10 kcal/mol 以上であった。また、TMP-1、5および6のいずれのDNA分子のアプタマーマスク領域およびジャンクション領域も、AMP非存在下では、(全長にわたりすべての塩基が塩基対を形成するような) 完全なハイブリダイゼーションを形成せず、インターナルループやバルジループを含んでいた。また、AMP濃度依存的なDNAザイムの活性上昇を示したTMP-1および6は、AMP非存在下で、ジャンクション領域の配列がすべてA-Tの塩基対を形成した。

【0135】

特に、TMP-3では、TMP-1、5および6と同一のアプタマーマスク配列を有するにも関わらず、AMP濃度依存的なDNAザイムの活性の上昇を示さなかった。TMP-3の dG は、 -10.07 kcal/mol であり、また、ジャンクション領域でG-Cの塩基対を2個形成し、二次構造が安定化しすぎてしまった (すなわち、 dG が小さくなりすぎた) ためにAMPの結合の際に構造変化を起こすことができなかったと考えられ

る。すなわち、この結果から、 dG が一定値以上であることが好ましいこと、および、ジャンクション領域ではG-Cの塩基対は0個か1個であることが好ましいことが示唆された。

【0136】

AMP濃度依存的なDNAザイムの活性の上昇を示さなかったTMP-2~4では、二次構造推定により計算される自由エネルギー(dG)がいずれも -10 kcal/mol より小さく、AMP非存在下における二次構造が高度に安定化していることが分かった。すなわち、DNAザイムが活性を示すためには、AMPアプタマーへのAMPの結合に伴って、アプタマーマスク領域およびジャンクション領域の塩基対が解消される必要があり、これらの領域はハイブリダイゼーションにより安定化しすぎていてはならないことが示唆された。また、AMP濃度依存的なDNAザイムの活性上昇を示さなかったTMP-2および4では、AMP非存在下で、アプタマーマスク領域のすべての塩基が塩基対を形成し、TMP-2では、さらに、AMP非存在下で、ジャンクション領域のすべての塩基が塩基対を形成し、アプタマーマスク領域およびジャンクション領域の全長にわたってすべての塩基が塩基対を形成した。このことから、アプタマーマスク領域またはジャンクション領域のいずれかでは、AMP非存在下で、少なくとも1個のインターナルループまたはバルジループが形成されることが好ましいと考えられる。

【0137】

このように、AMPアプタマー領域とDNAザイム領域とをつなぐアプタマーマスク領域およびジャンクション領域が、一定の長さを有し、かつ、上記のような一定の規則を有している場合には、DNA分子がAMP濃度依存的なDNAザイムの活性の上昇を示す高感度なセンサーとして機能することが示唆された。また、二次構造推定により計算される自由エネルギー(dG)は、大きすぎると構造が不安定となり、DNAのセンサーとして機能を発揮するための基本的な二次構造(例えば、式(I)の構造)が取りにくくなり、また、小さすぎると構造が安定化しすぎており、AMPが分子に結合した際に、二次構造の構造変化を起こしにくくなることが予想され、DNA分子の dG は、 $-10 \sim -6.5\text{ kcal/mol}$ であることが好ましいことが示唆された。

【0138】

なお、配列番号20の配列を有する既知のDNAセンサーと、本実施例で取られたTMP-5とのAMPセンサーとしての感度を吸光測定により比較したところ、図8A、EおよびFに示されるように、吸光度変化は、既知のDNAセンサーでは約0.1であるのに対して、TMP-5では0.3と吸光度変化が大きく、センサーとしての感度に優れることがわかった。また、ダイナミックレンジは、既知のDNAセンサーでは1オーダー程度(約 $0.05\text{ mM} \sim 0.5\text{ mM}$)であるのに対して、TMP-5では3オーダー程度(約 $0.005\text{ mM} \sim 5\text{ mM}$)であり、幅広い濃度域でセンサーとして用い得る広いダイナミックレンジを有していた。このように、TMP-5は、センサーとしての感度およびダイナミックレンジの両方で、配列番号20の配列を有する既知のDNAセンサーを凌駕した。TMP-5同様に、TMP-1および6についても、高い感度と広いダイナミックレンジを有していた。なお、配列番号20の配列を有する既知のDNAセンサーでは、AMP非存在下における二次構造形成時の自由エネルギー dG は、 -12.79 kcal/mol と計算された。

【0139】

また、これらの結果から、実施例A2において構築したスクリーニング系は、リガンドに対して高感度に反応して活性化する本発明のDNA分子のスクリーニングに有用であることも明らかとなった。

【0140】

実施例A4：二次スクリーニング

二次スクリーニングでは、一次スクリーニングから得られたDNAセンサーが高感度となる条件を満たす配列を網羅的にスクリーニングした。

【0141】

10

20

30

40

50

一次スクリーニングの結果によれば、AMPを高感度で検出できるDNA分子は、(i) アプタマーマスク領域の長さが4塩基長であり、(ii) ジャンクション領域の長さが3塩基長であり、かつ(iii) ジャンクション領域でのG-Cの塩基対は多くても1個であるとの条件を満たしていた。また、(iv) アプタマーマスク領域とジャンクション領域が二次構造を形成するときのdGは -10 kcal/mol 以上と計算された。

【0142】

従って、この上記(i)~(iv)条件をすべて満たし、かつ、UNAFoldを用いてDNAの二次構造を予測した場合に、(v) AMP非存在下で、ヘアピンループ構造の二次構造が唯一推定されるDNA配列を有するDNA分子のすべてを二次スクリーニングの対象とした(二次スクリーニングではこれに加えて、アプタマーマスク領域の長さが5塩基長のものも含めた)。予測の際には、アプタマーマスク領域およびジャンクション領域において、1個以上のインターナルループまたはバルジループが含まれていてもよいこととした。得られたDNA配列の数とMおよびJとの関係は、表4の通りであった。

10

【0143】

【表4】

表4

	J=3
M=4	3072
M=5	6552

20

【0144】

得られた配列の3'末端に15塩基のポリT配列を付加した配列を付加して、実施例A2と同様にアレイ上でDNA分子を合成した。実施例A2と同様にシグナルを測定し、AMPの5mM添加時と非添加時とでシグナルを測定し、シグナル比を計算した。

【0145】

その結果、実施例A3で得られたTMP-5よりも、大きなシグナル比を示すDNA分子が55例見つかった。これら55例のDNA分子それぞれを、実施例A3と同様に吸光測定により再検証した。

【0146】

55例のうち7例は、AMP濃度依存的なDNAザイムの活性上昇が見られたTMP-1、5および6と同様に、アプタマーマスク領域で、2個のT-Aの塩基対と、1個のインターナルループ、および1個のT-Gのミスマッチ塩基対を形成すると予測されるものであった(図10)。この7例のうち、dGが -6.5 kcal/mol 未満と計算された2例(図10AおよびB)は、吸光測定によっても、AMP濃度依存的なDNAザイムの活性上昇が確認され、dGが -6.5 kcal/mol 以上であると計算された5例は、AMP濃度依存的なDNAザイムの活性上昇は確認できなかった(図10C~G)。

30

【0147】

TMP-5よりも大きなシグナル比を示す上記以外のDNA分子48例を吸光測定すると、そのうちの6例で、AMP濃度依存的なDNAザイムの活性上昇が確認された(図11)。これらの6例においては、いずれのDNA分子のdGも、 -6.0 kcal/mol 以下であり、dGが -6.5 kcal/mol 以下と計算された4例は、特に高感度なAMP濃度依存的なDNAザイムの活性上昇を示した(図11A、C、DおよびF)。この6例においては、アプタマーマスク領域で、2個の塩基対および1個のT-Gミスマッチペアを形成するもの(図11AおよびB)、3個の塩基対を形成するもの(図11CおよびD)、並びに4個の塩基対を形成するもの(図11EおよびF)が見られた。いずれの場合も、アプタマーマスク領域ではインターナルループまたはバルジループのいずれかを有していた。

40

【0148】

上記55例中、AMP濃度依存的なDNAザイムの活性上昇を示す上記の6例と同じアプタマーマスク配列を有するものでも、AMP濃度依存的なDNAザイムの活性上昇が見

50

られなかったものも存在した(図12)。具体的には、2個の塩基対、1個のインターナルループおよび1個のT-G mismatchesペアを形成するものに関しては5例(図12A~E)、3個の塩基対を形成するものに関しては12例(図12F~Q)、4個の塩基対を形成するものに関しては7例(図12R~X)が見出された。

【0149】

なお、リガンド依存的なエフェクター領域の活性化を引き起こすDNA分子において、アプタマーマスク領域とハイブリダイズするDNAアプタマー領域の3'末端は、多くのケースで4塩基長であったが、アプタマーマスク領域が5塩基長のときには、最大で7塩基のDNA分子が見出された(データ示さず)。

【0150】

実施例A5：アプタマーマスク領域とジャンクション領域における mismatches 塩基対の種類

本実施例では、一次スクリーニング(実施例A3)および二次スクリーニング(実施例A4)の結果得られた高感度なDNA分子と低感度なDNA分子とを比較して、 mismatches 塩基対の種類がDNA分子の感度に及ぼす影響を評価した。

【0151】

mismatches 塩基対の存在は、DNAの二次構造の安定性に影響することが知られている(SantaLucia, J. Jr. and Hick, D. (2004) Annu. Rev. Biophys. Biom.). また、 mismatches 塩基対によるDNAの二次構造の安定性への影響は、隣接する塩基対の種類によって変わる。そこで、吸光測定により高感度とされる配列と低感度とされる配列とで、 mismatches 塩基対によるDNA分子のdGに対する影響を調べた。dGに対する mismatches 塩基対の影響(d d G)の評価は、SantaLucia, J. Jr. and Hick, D. (2004) Annu. Rev. Biophys. Biom.に開示された方法を用いてUNAFold Version 3.8を用いて行った。調べたDNA分子は、DNA分子全体が二次構造を形成する際のdGが、 $-9 \sim -6 \text{ kcal/mol}$ のものに限定した。

【0152】

その結果、図13に示されるように、アプタマーマスク領域が4塩基長である場合には、アプタマーマスク領域における mismatches 塩基対によるdGへの影響は、大きいほど好ましいことが分かった。t検定を行ったところ、吸光測定により高感度であることが確認された5例とそれ以外の10例では、統計的に有意な差が見られた(図13A; $p < 0.05$)。アプタマーマスク領域が4塩基長である場合にはまた、ジャンクション領域における mismatches 塩基対によるdGへの影響は小さいほど良いことが分かった(図13B; $p < 0.05$)。

【0153】

このように、インターナルループを形成する mismatches 塩基対の種類によって、DNA分子の感度が変動することが示唆された。

【0154】

一方、アプタマーマスク領域が5塩基長である場合には、 mismatches 塩基対によるdGへの影響とDNA分子の検出感度とには統計的に有意な差は見られなかった。

【0155】

実施例A6：DNA分子のセンサーとしての最適化

本実施例では、実施例A3にて得られ高感度なAMP濃度依存的なDNAザイムの活性上昇を示したTMP-5について、アプタマーマスク領域およびジャンクション領域にのみにおいて配列の改変を行ってDNA分子のセンサーの最適化を試みた。

【0156】

まず、作成したTMP5-1~5およびTG1について、AMP濃度依存的なDNAザイムの活性上昇を吸光測定により確認した(図14)。すると、TMP5-1、2、5およびTG1(図14B~E)については、AMP濃度依存的なDNAザイムの活性上昇が確認されたが、TMP5-3および4(図14FおよびG)については、AMP濃度依存的なDNAザイムの活性上昇はほとんど示さなかった(TMP-5については、図14A

10

20

30

40

50

を参照)。

【0157】

配列番号12の配列を有するDNAセンサー(TMP5-1)は、AMPが結合すると、DNAアプタマー領域において、図14Hのような立体構造を形成すると考えられる。アプターマスク領域とジャンクション領域1とは、AMPと結合すると、4塩基3'側の塩基と塩基対を形成し(図14H)、この状態で安定化することにより、DNAザイムの活性状態が保たれると考えられる。そこで、作成したTMP5-1~5およびTG1について、AMP結合時に形成される塩基対を調べた。

【0158】

AMP結合時のアプターマスク領域とジャンクション領域2とのハイブリダイゼーションについて検討したところ、AMP濃度依存的なDNAザイムの活性上昇を示したTMP5-1、2、5およびTG1は、アプターマスク領域とジャンクション領域2との間で2個以上の連続した塩基対を形成することが明らかとなった(図14A~Eの矢印)。また、AMP濃度依存的なDNAザイムの活性上昇はほとんど示さなかったTMP5-3および4では、バルジループまたはインターナルループを挟んで2個の塩基対を形成していた(図14FおよびG)。また、TMP5-1や5-TG1などのように、dGが-6.5 kcal/mol以上の場合であっても(TMP5-1はdGが-6.0 kcal/mol以上)、AMP結合時に、アプターマスク領域とジャンクション領域2との間で2個以上の連続した塩基対を形成する場合には、AMP濃度依存的なDNAザイムの活性上昇を示した(図14BおよびE)。

【0159】

このことから、AMP結合後の構造を安定化させる要因を有することは、AMP濃度依存的なDNAザイムの活性上昇を示す上で重要であることが示唆された。また、AMP非存在下での二次構造が多少不安定であったとしても(例えば、dGが、-6.5~-5.0 kcal/molであっても)、AMP結合後の構造を安定化させる要因を有することによって、AMP濃度依存的なDNAザイムの活性上昇が示されることがあることも明らかとなった。また、AMP結合後の構造を安定化させる具体的な要因として、AMP結合時に、アプターマスク領域とジャンクション領域2との間で2個以上の連続した塩基対を形成することが重要であることが明らかとなった。

【0160】

実施例A7：アルギニンアプタマーの検出のためのDNA分子

本実施例では、AMPアプタマー以外への適用可能性を検証するため、DNAアプタマー領域をアルギニンアプタマーに置き換えて同様の実験を行った。

【0161】

まず、ジャンクション領域の長さを3塩基長とし、配列はTMP-5のジャンクション領域と同一とした。次に、アプターマスク領域は、アルギニンアプタマーの3'末端の4塩基との間で3個の塩基対と一つのインターナルループを作るように設計した(配列番号19の塩基配列を有するTMP-5^{Arg})。UNAFoldによれば、設計したDNA分子は、図15Aに示される二次構造を形成すると推定された。また、アルギニン結合後の構造は、図15Aの矢印で示されるように、アプターマスク領域とジャンクション領域2との間で2個の連続した塩基対を形成すると推定された。コントロールDNA分子としては、図15AのDNA分子のうち、アプターマスク領域は、アルギニンアプタマーの3'末端の4塩基との間で完全な塩基対を4個形成し、ジャンクション領域の長さは2塩基長としたDNA分子を用いた(図15B)。測定条件は、AMPをアルギニンに置き換える以外は、実施例A3と同様に行った。

【0162】

すると、図15Cに示されるように、TMP-5^{Arg}は、アルギニン濃度10mMの場合に、コントロールと比較して、2倍以上の吸光変化を示した。このように、AMPアプタマーで行われた実施例A1~5の結果は、アルギニンアプタマーを用いた場合でも普遍的に成立することが明らかとなった。

【0163】

実施例B1：パツリンDNAアプタマーの設計

本実施例では、パツリン結合性DNAアプタマー分子の取得を試みた。

【0164】

実施例A3において得られたTMP-5分子を用い、DNAアプタマー領域のみを改変して、パツリン結合性DNAアプタマー分子の取得を試みた。

【0165】

まず、パツリンアプタマー領域の設計を行った。本実施例で用いた、電気化学検出マイクロアレイ（CustomArray社製、ElectraSense12kマイクロアレイ、製品番号：1000081）の制約上、スクリーニングに供することができるサンプルが12,000サンプルに限られたため、パツリンアプタマーの設計は、以下の制約条件を設けて行った。すなわち、（条件1）パツリンアプタマー領域部分が、30塩基長であること、（条件2）パツリン非存在下で1つのみループを形成すること、（条件3）ループが3～7塩基長のヌクレオチドから形成されること、および（条件4）ステム部分で形成する塩基対の数が6～9個であることの制約条件を設けてDNA分子を設計した。二次構造予測により、アプタマーマスク領域がアプタマーの3'末端とハイブリダイズし、かつジャンクション領域1がジャンクション領域2とハイブリダイズする構造が予測される配列を絞り込んだところ、候補分子数が、約12,000種類になった。アレイ上に合成した候補分子の配列数の内訳は表5の通りであった。

【0166】

【表5】

表5：スクリーニング対象分子の二次構造中の塩基対数およびループ中の塩基数

塩基対数 (塩基対)	ループの塩基数 (塩基)					合計
	3	4	5	6	7	
6	1	6	3	1	0	11
7	35	39	143	46	24	287
8	269	502	582	368	382	2103
9	1527	2861	3476	1735	0	9599
合計	1832	3408	4204	2150	406	12000

【0167】

実施例B2：パツリンDNAアプタマーの取得

本実施例では、パツリン結合性DNAアプタマー分子の取得を試みた。

【0168】

スクリーニングは、DNAザイムの活性化を電気化学的に検出する系を用いて行った。電気化学的な検出には、電気化学検出マイクロアレイ（CustomArray社製、ElectraSense12kマイクロアレイ、製品番号：1000081）および検出器（CustomArray社製、ElectraSense検出器、製品番号：610036）を用いた。

【0169】

設計した12,000種類のDNA分子を、1スポット1種類の要領でこのマイクロアレイ上に合成した。合成の際には、上述のようにDNA分子の3'末端にリンカーとして15塩基のポリT配列を付加した（例えば、図4を参照）。反応バッファーは、25mM HEPES (pH7.4)、20mM KCl、200mM NaCl、1% DMSOとした。反応バッファーに5mMと100μMのパツリンを添加してから室温で30分間インキュベートした。ヘミンは、最終濃度2.4μMで添加し、2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (ABTS) は、最終濃度5mMで添

加した。シグナルは、25℃の温度条件下で、最終濃度5 mMのH₂O₂添加1分後に測定した。各スポットの電気シグナルをパツリン存在下および非存在下で測定し、電気シグナル比（パツリン存在下/パツリン非存在下）を算出した。

【0170】

図16には、AMPアプタマー領域の代わりに実施例B1で設計したパツリンアプタマー領域を含んでなるTMP-5分子の二次構造の代表例が示され（図16A）、また、2つのプローブ両方で2倍以上のシグナルの倍数変化を示した14配列（パツリン5 mM、図16B）および32配列（パツリン100 μM、図16C）の電気シグナル比がプロットされている。電気シグナル比が2倍以上となった配列として図16Bに示された配列のうち、パツリン濃度5 mMでの倍数変化の2回の実験での平均が4倍以上となった6配列（候補群1（First-Candidate）-1~1-6）、および、電気シグナル比が2倍以上となった配列として図14Cに示された配列のうち、パツリン濃度100 μMでの倍数変化の2回の実験での平均が3倍以上、または、パツリン濃度5 mMでの電気シグナル比の平均が2以上となった12配列（候補群2（Second-Candidate）-1~2-12）について、ABTSを用いた比色試験により再現性の検討を行った。

【0171】

結果は図17に示される通りであった。すなわち、候補群1-1~1-6のDNA分子のうち2つ（候補群1-5および1-6）、および、候補群2-1~2-12のDNA分子のうち1つ（候補群2-7）が、比色試験によってもパツリン濃度依存的なDNAザイムの活性上昇が確認された。また、測定には高い再現性が見られた。最も感度が高いと思われた候補群2-7については、パツリンを0 mM、0.01 mM、0.025 mM、0.05 mM、0.1 mMまたは0.5 mMとなるように添加し、低濃度側で検出感度の検討を行った（図18）。また、4で同様の検討を行ったところ、測定誤差が小さくなり、パツリンをさらに高感度に検出できることが分かった（図18）。その結果、候補群2-7は10 μMの濃度のパツリンの検出が可能であることが分かった。また、候補群1-5および1-6についても検討したところ、これらの分子は数百μMオーダーのパツリンの検出が可能であった（データ省略）。それぞれのDNA分子のパツリンアプタマー領域の二次構造の推定結果を図19に示した。以下、候補群2-7は、SC-7とも呼ぶことがある。

【0172】

また、これらの分子の塩基配列は表6の通りであった。

【0173】

【表6】

表6：パツリンに対して高感度を示した3種類のDNA構築物の塩基配列

配列名	DNA分子全長の塩基配列	配列番号
First-Candidate 5	5'-GGGTAGGGCGGGTTGGGAGCTATTCCTGCGAATCAGTG CGACATCCGCCGAAGGGATCCC-3'	21
First-Candidate 6	5'-GGGTAGGGCGGGTTGGGAGCTATTCCTTAGCGTACCAC TTCAGGCATCGGAAGGGATCCC-3'	22
Second-Candidate 7	5'-GGGTAGGGCGGGTTGGGAGCTATTCCTGCGGGCGCTGT TCGCCTAGTCGGAAGGGATCCC-3'	23

※塩基配列中の下線部は、DNA構築物中のパツリンアプタマー領域を示す。

【0174】

また、これらの分子のパツリンアプタマー領域部分の塩基配列は表7の通りであった。

【0175】

【表 7】

表 7：パツリンに対して高感度を示した 3 種類の DNA 構築物のパツリンアプタマー領域部分の塩基配列

配列名	各配列のパツリンアプタマー領域部分の塩基配列	配列番号
First-Candidate 5 のパツリンアプタマー領域	5' - CCTGCGAATCAGTGCACATCCGCCGAAGG - 3'	2 4
First-Candidate 6 のパツリンアプタマー領域	5' - CCTTAGCGTACCACTTCAGGCATCGGAAGG - 3'	2 5
Second-Candidate 7 のパツリンアプタマー領域	5' - CCTGCGGGCGCTGTTTCGCCTAGTCGGAAGG - 3'	2 6

10

【 0 1 7 6 】

次に、高感度を示した DNA アプタマーの結合特異性を確認するため、配列番号：2 3 の塩基配列を有するパツリン DNA アプタマーを用いて、パツリンと構造の近いベンゾフランおよび (S) - パツリンメチルエーテル (図 2 0) を用いて結合特異性を確認した。すると、得られたパツリン DNA アプタマーは、ベンゾフランおよび (S) - パツリンメチルエーテルには結合せず、パツリンに対して結合特異性を示すことが明らかとなった (図 2 0)。

20

【 0 1 7 7 】

実施例 C 1：パツリン RNA アプタマー分子の取得

本実施例では、パツリンに結合する RNA アプタマー分子の取得を試みた。

【 0 1 7 8 】

検出対象となるパツリンは、和光純薬社製のパツリンを用いた。パツリン RNA アプタマー分子は、約 6×10^{14} の多様性を有する 35 ヌクレオチドのランダム RNA のプールからパツリンへの結合を指標として RNA 分子をスクリーニングする手法を採用した。パツリンとの結合を検出するために、RNA 分子は自己切断型リボザイムに組み込んで合成し (図 2 1 A 参照)、パツリン結合依存的に生じる自己切断を検出することにより、パツリン RNA アプタマーをスクリーニングすることとした。また、スクリーニングの際には、改良 SELEX 法 (Makoto Koizumi et al., Nature Structural Biology (1999) 6: 1062-1071) を用いて、高いパツリン結合性を有する RNA アプタマーの取得を試みることにした。

30

【 0 1 7 9 】

約 6×10^{14} の多様性を有する 35 ヌクレオチドのランダム RNA を自己切断型リボザイムの領域に組み込んだ RNA 構築物 (図 2 1 A 参照) は、化学合成によって得られた鋳型 DNA (配列番号：2 7) を、フォワードプライマー (配列番号：2 8) およびリバースプライマー (配列番号：2 9) を用いて PCR を行った。

【 0 1 8 0 】

PCR は、DNA ポリメラーゼである Taq DNA Polymerase (フナコシ社製、製品番号：E 0 0 0 0 7) を用いて表 8 の組成で、9 4 3 0 秒、6 1 3 0 秒のサイクルを 4 回繰り返すことにより行った。

40

【 0 1 8 1 】

【表 8】

表 8 : PCR の反応溶液組成

成分	量
cDNA プール	25 μ g
フォワードプライマー	10 μ M
リバースプライマー	10 μ M
dNTP	各 200 μ M
Taq DNA ポリメラーゼ	200 μ L
10×反応バッファー (DNA ポリメラーゼ付属)	1 mL
ミリQ水	6.3 mL
合計	10 mL

10

【0182】

PCR に用いた鋳型 DNA およびプライマーは表 9 の通りとした。

【0183】

【表 9】

表 9 : PCR で用いた鋳型 DNA の一般的な配列およびプライマーの配列

20

配列名	塩基配列	配列番号
鋳型 DNA	5' -GGGCAACCTACGGCTTTTCACCGTTTCG (N ₃₅) CTCATCAGGGTCGCC -3'	27
フォワード プライマー	5' -TAATACGACTCACTATAGGGCGACCCTGATGAG-3'	28
リバース プライマー	5' -GGGCAACCTACGGCTTTTCACCGTTTCG-3'	29

【0184】

30

得られた PCR 産物 100 μ g を T7 RNA ポリメラーゼ (タカラバイオ社製) を用いて転写して RNA 分子を合成した。

【0185】

パツリン依存的な RNA の自己切断は以下のように検出した。すなわち、1 μ M の RNA プールを 50 mM Tris-HCl pH 7.5 に溶解し、アプタマーに正しい立体構造をフォールディングさせるために、95 °C で 2 分間加熱した後、室温で 30 分 ~ 2 時間冷却した。

【0186】

パツリン非存在下でも自己切断が生じてしまう分子を除去するため (ネガティブセレクション) に、まず、パツリン非存在下で、20 mM の MgCl₂ を添加してから室温で 30 分 ~ 12 時間 RNA をインキュベートした。10% 変性 PAGE (8 M 尿素含有ポリアクリルアミドゲル電気泳動) 分離によって、パツリン非存在下においても自己切断されてしまうパツリン非結合 RNA を除去した。自己切断を起こさなかった RNA は、自己切断を起こした RNA からバンドとして明確に分離し、ゲルを切り出して溶出することにより容易に回収することができた。続いて、回収した RNA を 1 μ M の濃度になるように 50 mM Tris-HCl pH 7.5 に溶解した。その後、アプタマーに正しい立体構造をフォールディングさせるために、再度 95 °C で 2 分間加熱した後、室温で 30 分 ~ 2 時間冷却した。その後、パツリンおよび 20 mM の Mg²⁺ を含有する溶液を添加し、室温で 5 分 ~ 30 分インキュベートすることにより、パツリン依存的な RNA 分子の自己切断を誘導した。インキュベート後、再び変性 PAGE によりパツリンと結合して自己切断を

40

50

起こしたRNA分子を回収した。

【0187】

回収されたパツリンRNAアプタマーのプールに含まれるRNAに対して、Super script III (インビトロジェン社製)を用いて逆転写を行ってcDNAプールを得た。得られたcDNAプールに対して、T7プロモーター配列を含む配列番号：28のフォワードプライマーと、自己切断により欠損した配列を含む配列番号：29のリバースプライマーとを用いて、PCRを行い、T7プロモーター配列および自己切断前の配列を含むDNAプールを取得した。その後、PCR産物をT7RNAポリメラーゼ(タカラバイオ社製)を用いて転写して次のラウンドに用いるRNAプールを得た。

【0188】

上記、フォールディング、ネガティブセレクション、ポジティブセレクション、変性PAGE、RT-PCR、およびRNA分子への転写のサイクル(改変SELEX法)のサイクルを11ラウンド行い、パツリンRNAアプタマーをコードするDNA分子を得た。得られたDNA分子は、TOPO TA Cloning Kit For Sequencing (インビトロジェン社製)を用いてクローン化し、塩基配列を決定した。

【0189】

このようにして得られたDNA分子から、パツリンRNAアプタマーおよびRNA構築物の配列を推定したところ、配列番号：33のパツリンRNAアプタマーを含む配列番号：30のRNA構築物、および配列番号：34のパツリンRNAアプタマーを含む配列番号：31のRNA構築物を得た。また、別プールの鋳型を用いて上記と同様の方法で改変SELEX法のサイクルを9ラウンド行った結果、配列番号：35のパツリンRNAアプタマーを含む配列番号：32のRNA構築物を得た。

【0190】

得られたRNA構築物の配列は表10の通りであった。

【0191】

【表10】

表10：パツリンRNAアプタマーと自己切断型リボザイムを含むRNA構築物の塩基配列

自己切断型リボザイムの全長の塩基配列	配列番号
5'-GGGCGACCCU GAUGAGAAAG AUCUACAGCA AAAACCAUAG UAGUAAAGAA GCGAAACGGU GAAAGCCGUA GGUUGCCC-3'	30
5'-GGGCGACCCU GAUGAGAGUA UAAAAUAUCA AUGAAAUAAA CAAGCCAUUA UCGAAACGGU GAAAGCCGUA GGUUGCCC-3'	31
5'-GGGCGACCCU GAUGAGGGGG CACGCGUACG GCUAGCCAAG UCAAACGAUU CCGAAACGGU GAAAGCCGUA GGUUGCCC-3'	32

※塩基配列中の下線部は、RNA構築物中のパツリンRNAアプタマー部分を示す。

【0192】

また、得られたRNA構築物中のパツリンRNAアプタマー部分の塩基配列は表11の通りであった。

【0193】

10

20

30

40

【表 1 1】

表 1 1：自己切断型リボザイム中のパツリンRNAアプタマー部分の塩基配列

パツリンRNAアプタマー部分の塩基配列	配列番号
5'-AAAGAUCUAC AGCAAAAACC AUAGUAGUAA AGAAG-3'	3 3
5'-AGUAUAAAAU AUCAAUGAAA UAAACAAGCC AUUAU-3'	3 4
5'-GGGGCACGCG UACGGCUAGC CAAGUCAAAC GAUUC-3'	3 5

【 0 1 9 4 】

また、配列番号 3 0 ~ 3 2 のパツリンRNAアプタマー部分の二次構造をMfoldプログラム (<http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/dna-form1.cgi>) を用いて分析したところ、図 2 1 に示される二次構造が予測された。

【 0 1 9 5 】

実施例 C 2：得られたパツリンRNAアプタマーを含むRNA構築物の検出感度の測定

本実施例では、実施例 C 1 で得られたRNA構築物についてパツリン検出感度を確認した。

【 0 1 9 6 】

配列番号 3 0 ~ 3 2 のRNA構築物の塩基配列の相補鎖の塩基配列を有するDNA (塩基配列中のUはDNAではTに対応する) を鋳型にして、配列番号：2 8 のフォワードプライマーと配列番号：2 9 のリバースプライマーを用いて実施例 C 1 と同様の方法により、PCRを行った。その結果生じたDNA断片をMinElute PCR Purification Kit (商品名、キアゲン) を用いて精製した。得られたDNAを鋳型としてT7 RNA Polymerase (商品名、タカラバイオ) を用い、In Vitro転写によりRNAを合成し、変性PAGEにより精製して、RNA構築物を得た。

【 0 1 9 7 】

各RNA構築物 (1 μM) を95 °Cで2分間加熱した後、室温で30分~2時間冷却し、次いで、0 mM (コントロール) または1 mMのパツリンと共に50 mM Tris (pH 7.5) および20 mM MgCl₂ を含むバッファー中にて25 °Cで8分間インキュベートして、各RNA構築物とパツリンとを結合させ、RNA構築物の自己切断を誘導した。得られた反応産物を、変性10% PAGEによって分離し、ゲル中のRNAをLas-4000 (FUJIFILM) を使用して視覚化した。各バンドの強度は、Multi Gauge Ver 3.0ソフトウェア (FUJIFILM) を使用して各レーンにロードしたRNA量で標準化して決定した。パツリン非存在下でもMg²⁺イオン存在下では自己切断が見られる場合があるが、パツリン存在下では、自己切断を起こしたRNA分子が有意に増加した (図 2 2 A および B)。

【 0 1 9 8 】

次に得られた配列番号 3 0 を有するRNA構築物についてパツリン検出感度を確認した。このRNA構築物は、100 μMの濃度のパツリンを検出することができ、100 μM ~ 5 mMの濃度範囲でパツリンに対する用量依存的な自己切断活性の増加を示した (図 2 3)。

【 0 1 9 9 】

さらに、得られたRNA構築物のパツリンに対する結合特異性を確認するため、配列番号：3 0 の塩基配列を有するRNA構築物を用いて、パツリンと構造の近いテオフィリン (和光純薬社製) を用いて結合特異性を確認した。具体的には、パツリンの代わりに1 mMテオフィリンを添加した反応溶液を用いて、自己切断が生じるか否かを確認した。当該RNA構築物は、パツリンにより自己切断が生じたが、テオフィリンによっては自己切断が生じず、パツリンに対して特異性を示すことが明らかとなった (図 2 4)。

【 0 2 0 0 】

10

20

30

40

50

このように、本実施例では、パツリンに結合特異性を有する3種類のパツリンRNAアプタマー分子、およびパツリンRNAアプタマーと自己切断型リボザイムとを含むRNA構築物を得ることができた。

【0201】

実施例C3：パツリンRNAアプタマー領域における塩基の欠失

本実施例では、実施例C1で得られたRNA構築物の5'末端または3'末端を欠失させたときの自己切断活性を調べた。

【0202】

配列番号：34および配列番号：35の塩基配列を有する2種類のパツリンRNAアプタマーの5'末端または3'末端をそれぞれ4塩基ずつ欠失させ、欠失させたパツリンRNAアプタマーを実施例C1と同様の方法で自己切断型リボザイムに組み込んでRNA構築物を調製した。

【0203】

得られた2種類のRNA構築物それぞれを、20mMのMg²⁺を含有する溶液（組成：50mM Tris (pH7.5)、20mM MgCl₂）中でパツリンと混合し、自己切断の有無をゲル電気泳動により確認した。

【0204】

結果は、図25に示す通りであった。確認した2種類のRNA構築物のいずれも、パツリンRNAアプタマー部分の3'末端を欠失させた場合には活性が見られなくなったが、パツリンRNAアプタマー部分の5'末端を欠失させた場合には自己切断活性が見られた。従って、確認した2種類のRNA構築物では、パツリンRNAアプタマー部分の5'末端の塩基配列はパツリンを検出する上では必須ではなく、欠失させることが可能であることが示された。配列番号：34および配列番号：35の塩基配列を有する2種類のパツリンRNAアプタマーの5'末端を4塩基欠失させたパツリンRNAアプタマーの塩基配列はそれぞれ、配列番号：36および配列番号：37であり、これらを組み込んで得られたRNA構築物の塩基配列はそれぞれ、配列番号：38および配列番号：39である。すなわち、得られたRNA構築物の配列は表12の通りであった。

【0205】

【表12】

表12：パツリンRNAアプタマーと自己切断型リボザイムを含むRNA構築物の塩基配列

全長の塩基配列	配列番号
5'-GGGCGACCCU GAUGAG <u>UAAA</u> AUAUCAUGA AAUAAACAAG CCA <u>UUAUCGA</u> AACGGUGAAA GCCGUAGGUU GCCC-3'	38
5'-GGGCGACCCU GAUGAG <u>CACG</u> CGUACGGCUA GCCAAGUCA ACGAU <u>UCCGA</u> AACGGUGAAA GCCGUAGGUU GCCC-3'	39

※塩基配列中の下線部は、RNA構築物中のパツリンRNAアプタマー部分を示す。

【0206】

このようにして、パツリンに結合性を示すパツリンRNAアプタマーおよびパツリンDNAアプタマーを取得することに成功した。また、これらのRNAおよびDNAはそれぞれ、自己切断型リボザイムや酸化還元型DNAザイムを用いた核酸構築物に組み込むことにより、パツリンとの結合を容易に検出することが確認できた。また、これらのパツリンRNAアプタマーおよびパツリンDNAアプタマーは、パツリンへの結合特異性も示した。従って、パツリンRNAアプタマーおよびパツリンDNAアプタマーは、サンプル中のパツリンのみを特異的に検出する系を構築する際に有用であることが示唆された。

【0207】

実施例 D 1 : パツリンアプタマー領域を含む本発明の DNA 構築物である候補群 2 - 7 の高感度化

本実施例では、リガンド検出の高感度化を目的として、実施例 B 2 で得られた候補群 2 - 7 の DNA 構築物について、末端領域およびモジュール領域（すなわち、アプタマーマスク領域、ジャンクション領域 1、ジャンクション領域 2 およびパツリンアプタマー領域の 3' 末端の 4 塩基）の塩基配列の最適化を試みた。

【0208】

具体的には、まず、実施例 B 2 で得られた候補群 2 - 7 (SC - 7) の DNA 構築物の末端領域の 3 塩基を 5' - CCC - 3' から 5' - CCCA - 3' に変更した。

【0209】

パツリンの検出は、吸光光度に基づき、実施例 B 2 に記載した通りに行った。

【0210】

その結果、末端領域の 3 塩基を 5' - CCCA - 3' に改変した DNA 構築物では、濃度依存的な吸光度の変化が顕著となった（図 26）。以下、上記改変した DNA 構築物を SC - 7 - CCCA（配列番号：40）とよぶ。また、TMP - 5 の末端領域の 3 塩基を 5' - CCC - 3' から 5' - CCCA - 3' に改変した TMP - 5 - CCCA を用いた場合でも濃度依存的な吸光度の変化が顕著となった（図 27）。

【0211】

実施例 D 2 : りんご製品中のパツリンの検出

本実施例では、実施例 D 1 で得られた SC - 7 - CCCA を用いてりんごジュースサンプル中のパツリンの検出が可能であることを確認した。

【0212】

りんご製品のパツリンの量は製品の品質の基準として用いられている。厚生労働省は 2003 年 11 月、りんご果汁にパツリンの規格基準 50 ppb 以下（324 nM 以下）を設定した（WHO の規格基準と同一）（<http://www.nihs.go.jp/dmb/paturin.html>）。そこで、SC - 7 - CCCA を用いて、実際りんごジュースサンプルに 300 nM の濃度（すなわち、上記規格基準以下）になるようにパツリンを溶解し検出することを試みた。

【0213】

パツリン無添加のサンプルと比較して視覚的な判断を行うには 0.1 程度の吸光度差が必要である。パツリンを最終濃度 300 nM となるように添加した場合、0.1 の吸光度差を得るためには、リンゴジュースを 100 倍濃縮して 30 μM 程度になるように調整する必要があると考えられた（例えば、図 26 参照）。そこで、りんごジュースサンプル（パツリン濃度 300 nM）に含まれるパツリンは、POLYINTELL 社の AFFINIMIP（商標）パツリン（リンゴジュース）として販売されるパツリン精製用のカラムを利用し、製造者マニュアルに従って精製した。

【0214】

溶出した液は、エバポレーターにより減圧濃縮し、乾固させた。乾燥させたサンプルは反応バッファー（25 mM HEPES（pH 7.4）、20 mM KCl、200 mM NaCl、1% DMSO）により溶解した。得られた溶解液中のパツリンの最終的な濃度は 20 μM であった（高速液体クロマトグラフにより測定）。

【0215】

得られた溶解液を用いて、実施例 B 2 に記載するようにパツリンの検出を行った。その結果、無添加サンプルと比較して、パツリンを添加したサンプルでは、0.1 程度の吸光度差を示し、結果として、りんごジュース中の規格基準 50 ppb 以下の濃度のパツリンを視覚的に検出することができた（図 28、t 検定で $p = 0.032$ ）。

【0216】

実施例 D 3 : SC - 7 - CCCA のモジュール領域の最適化

次に末端領域の配列を 5' - CCCA - 3' とした SC - 7 - CCCA のモジュール領域部分の最適化を試みた。

【0217】

10

20

30

40

50

SC-7-CCCAのモジュール領域部分は以下の条件を満たすように設計した：

- 条件1：アプターマスク領域の塩基長が4または5であり、
 条件2：ジャンクション領域1および2の塩基長が3であり、
 条件3：UNAFold Version 3.8の二次構造推定により計算されるDNA構築物のdGが、 $-12 \sim -6$ (kcal/mol)であり、かつ、
 条件4：アプターマスク領域とパツリンアプタマー領域の3'末端とで1つのインターナルループを形成する。

【0218】

その結果、アプターマスク領域の塩基長が4である配列が2,737配列設計されたので、実施例B2に記載されたように電気化学検出マイクロアレイに1配列につき5スポットのDNAを合成した。但し、本実施例では、DNAの3'末端に1塩基長のデオキシチミン(dT)付加した。

10

【0219】

また、アプターマスク領域の塩基長が5である配列が8,535配列取得されたので、下記のルールに基づいて3,753配列に絞り込み、実施例A2に記載されたように電気化学検出マイクロアレイに1配列につき3スポットのDNAを合成した。本実施例では、DNAの3'末端に1塩基長のデオキシチミン(dT)付加した。3,753配列への絞り込みは、UNAFold Version 3.8の二次構造推定により計算されるDNA構築物のdGを指標として1(kcal/mol)毎にDNA構築物を分類してそれぞれグループを作り、各グループから、(各グループに分類された配列数)×約3,753個/8,535個の配列をランダムに選び出した。例えば、dGが $-8 \sim -7$ (kcal/mol)のDNA構築物の群を1つのグループとし、dGが $-7 \sim -6$ (kcal/mol)のDNA構築物の群を別の1つのグループとして分類した。

20

【0220】

次に、実施例B2に記載した通りにパツリンの検出を行った。その後、パツリンの検出に適したDNA構築物を以下の基準で選抜した：

- 基準1：パツリン濃度10 μ Mと1 μ Mとの電気シグナル比が2以上であり、かつ、
 基準2：パツリン濃度1 μ Mと0 μ Mとの電気シグナル比が1以上である。

【0221】

すると、基準1および2により11個の候補配列が得られた。

30

【0222】

次に、この11の候補配列を有するDNA構築物を吸光測定法を用いて以下の基準でさらに選抜した：

基準3：パツリン濃度が0 μ Mであるときの吸光度の標準偏差をDNA構築物それぞれについて算出し、吸光度が以上上昇するパツリン濃度がSC-7-CCCAより低いこと。

【0223】

すると、基準3により1個のDNA構築物(配列番号：41)が得られた。得られたDNA構築物をSC-7-CCCA-TMP-7と命名し、そのモジュール領域をTMP-7と命名する。このDNA構築物は、基準3におけるパツリン濃度が5 μ Mであり、SC-7-CCCAの10 μ Mよりも低かった(図29)。また、パツリンの検量線の傾きは、このDNA構築物では、0.0026であったのに対して、SC-7は0.0005であり、SC-7-CCCAは0.0037であった。

40

【0224】

得られたSC-7-CCCAとSC-7-CCCA-TMP-7の塩基配列を表13に示す。

【表 1 3】

表 1 3 : SC-7 を改変して得られた DNA 構築物の塩基配列

配列名	各配列のパツリンアプタマー領域部分の塩基配列	配列番号
SC-7-CCCA	5' -GGGTAGGGCGGGTTGGGAGCTATTCCTGCGGGCG CTGTTTCGCCTAGTCGGAAGGGATCCCA-3'	4 0
SC-7-CCCA-TMP-7	5' -GGGTAGGGCGGGTTGGGCTGTCGTCCTGCGGGCG CTGTTTCGCCTAGTCGGAAGGTAGCCCA-3'	4 1

※塩基配列中の下線部は、DNA 構築物中のパツリンアプタマー領域を示す。

10

【 0 2 2 5】

このように、本発明者らは、配列番号 2 0 の DNA 構築物を出発材料として、実施例 A 3 にて、モジュール領域以外を固定してモジュール領域だけを改変し、AMP を高感度に検出できる配列番号 1 ~ 1 5 の塩基配列を有する DNA 構築物を得た。そして、実施例 B 2 にて、得られた TMP - 5 をモジュール配列として有する DNA 構築物の DNA アプタマー部分のみを改変し、パツリンを検出できる配列番号 2 1 ~ 2 3 の塩基配列を有する DNA 構築物を得た。さらに、実施例 D 1 にて、配列番号 2 3 の塩基配列を有する DNA 構築物（候補群 2 - 7 ; SC - 7）の末端領域を改変して、配列番号 4 0 の塩基配列を有する DNA 構築物（SC - 7 - CCCA）を得、また、モジュール領域を改変して、配列番号 4 1 の塩基配列を有する DNA 構築物（SC - 7 - CCCA - TMP - 7）を得た。

20

【 0 2 2 6】

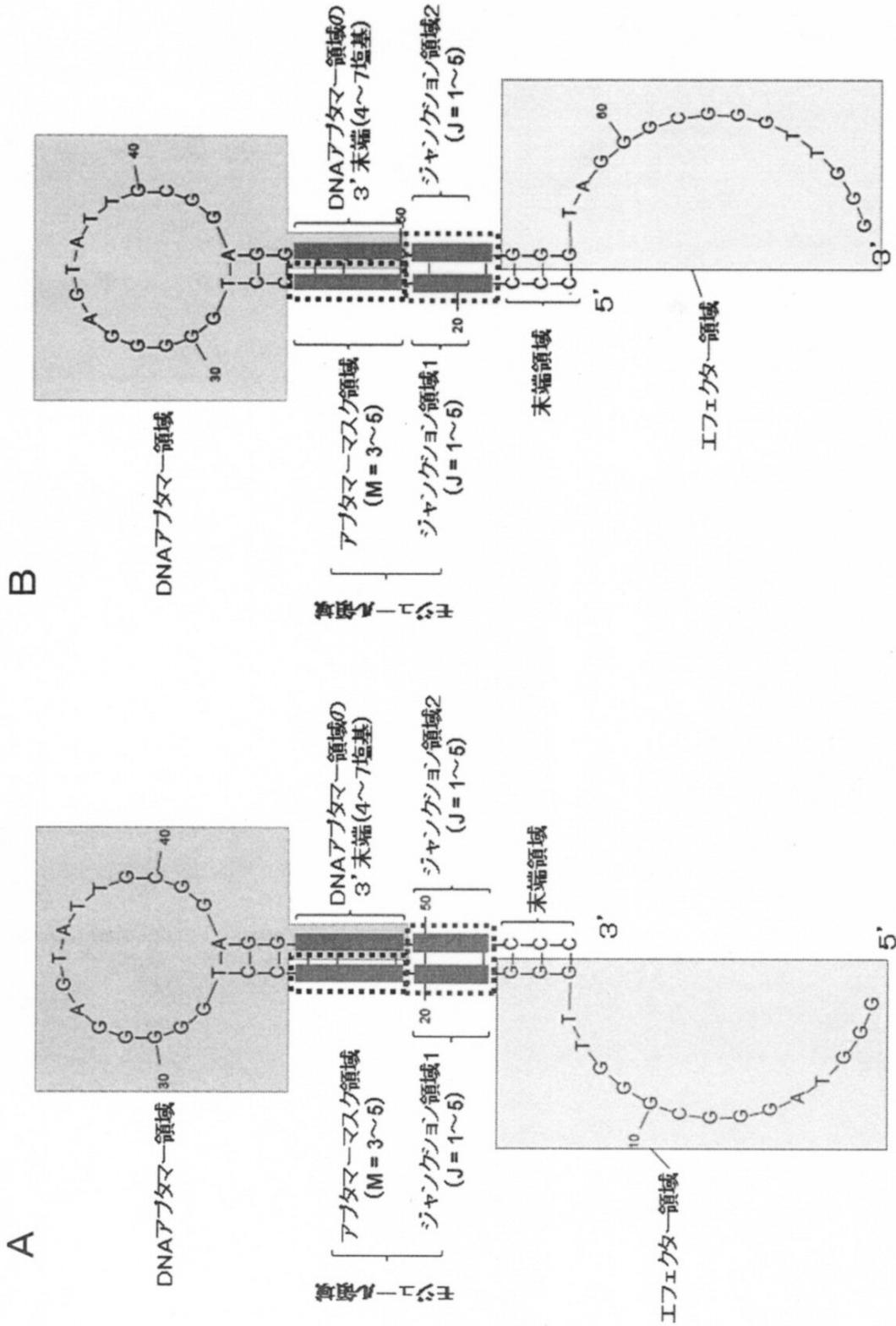
このようにして、本発明者らは、DNA 構築物の全体または一部を最適化した後に、DNA 構築物中の少なくとも 1 つの領域に対して改変を加えて DNA 構築物をさらに最適化することができた。具体的には、実施例 A 3 および D 1 において、モジュール領域を改変して DNA 構築物のそれぞれ AMP およびパツリンの検出感度を改善させ。また、実施例 D 1 において、末端領域を改変して DNA 構築物をさらに最適化することができた。

【 0 2 2 7】

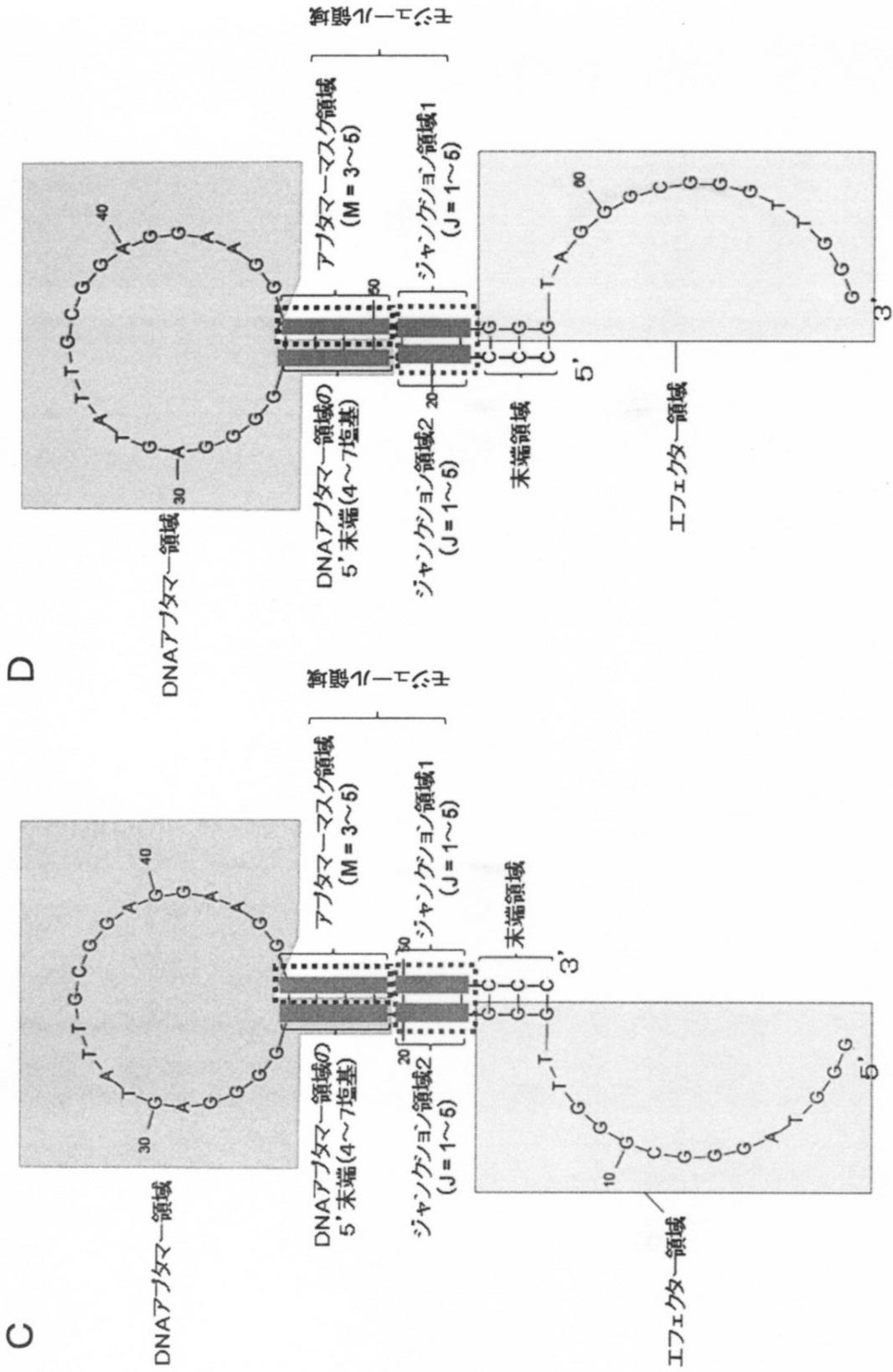
また、本発明者らは、実施例 B 2 において、DNA 構築物の一部の領域、すなわち、AMP アプタマー領域をパツリンアプタマー領域に置き換えても DNA 構築物の最適化が可能であることも示した。

30

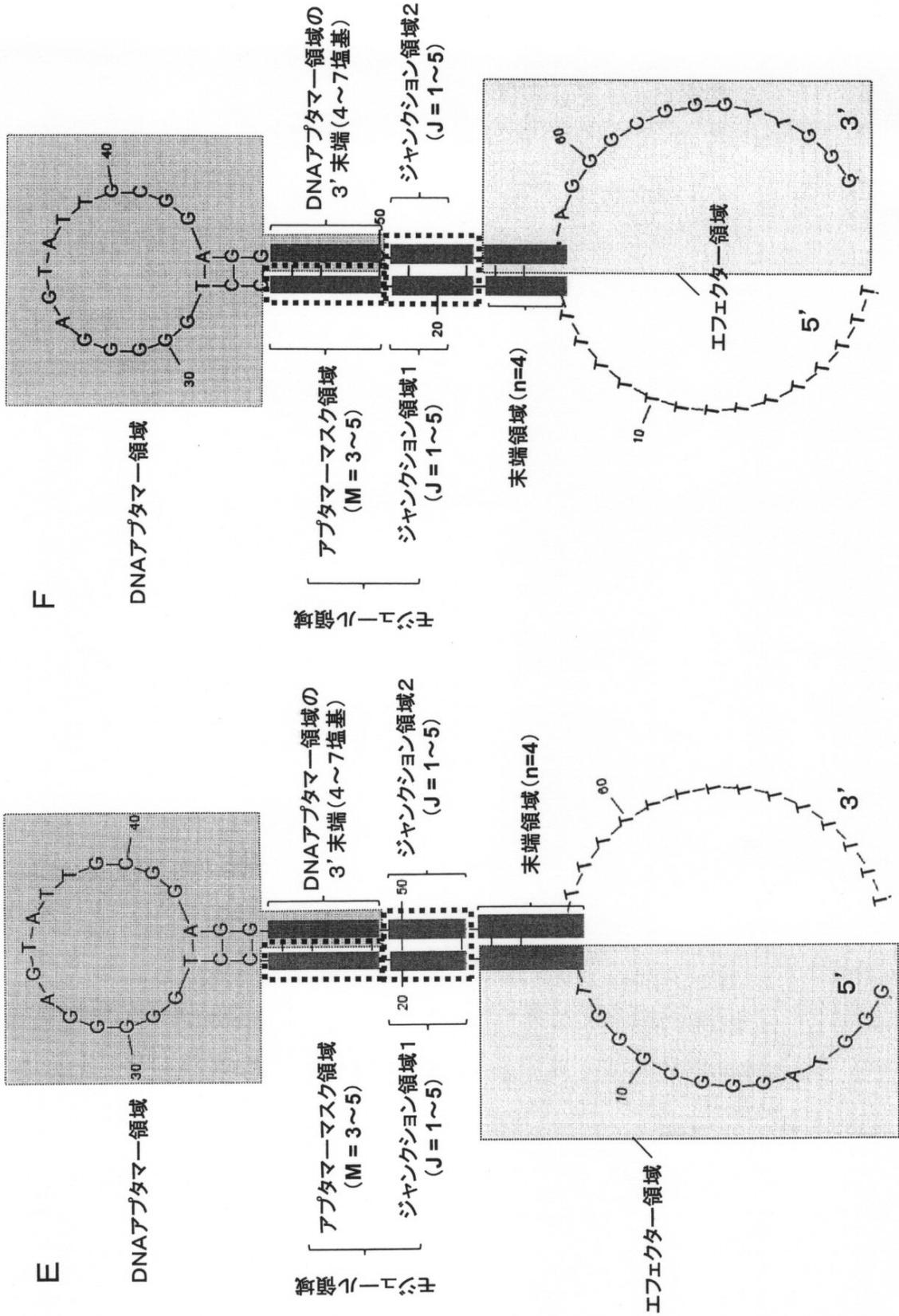
【 図 1 - 1 】



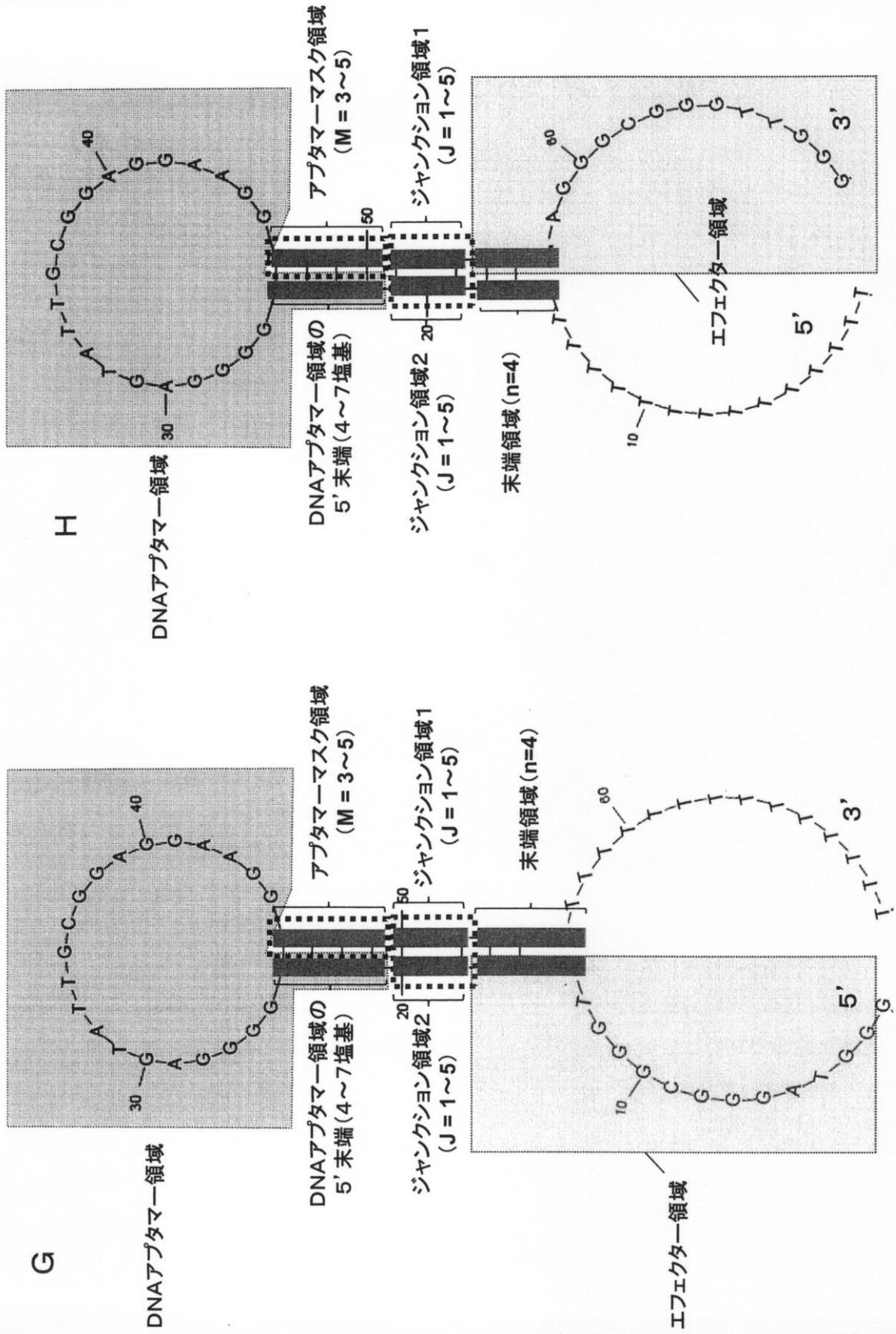
【図 1 - 2】



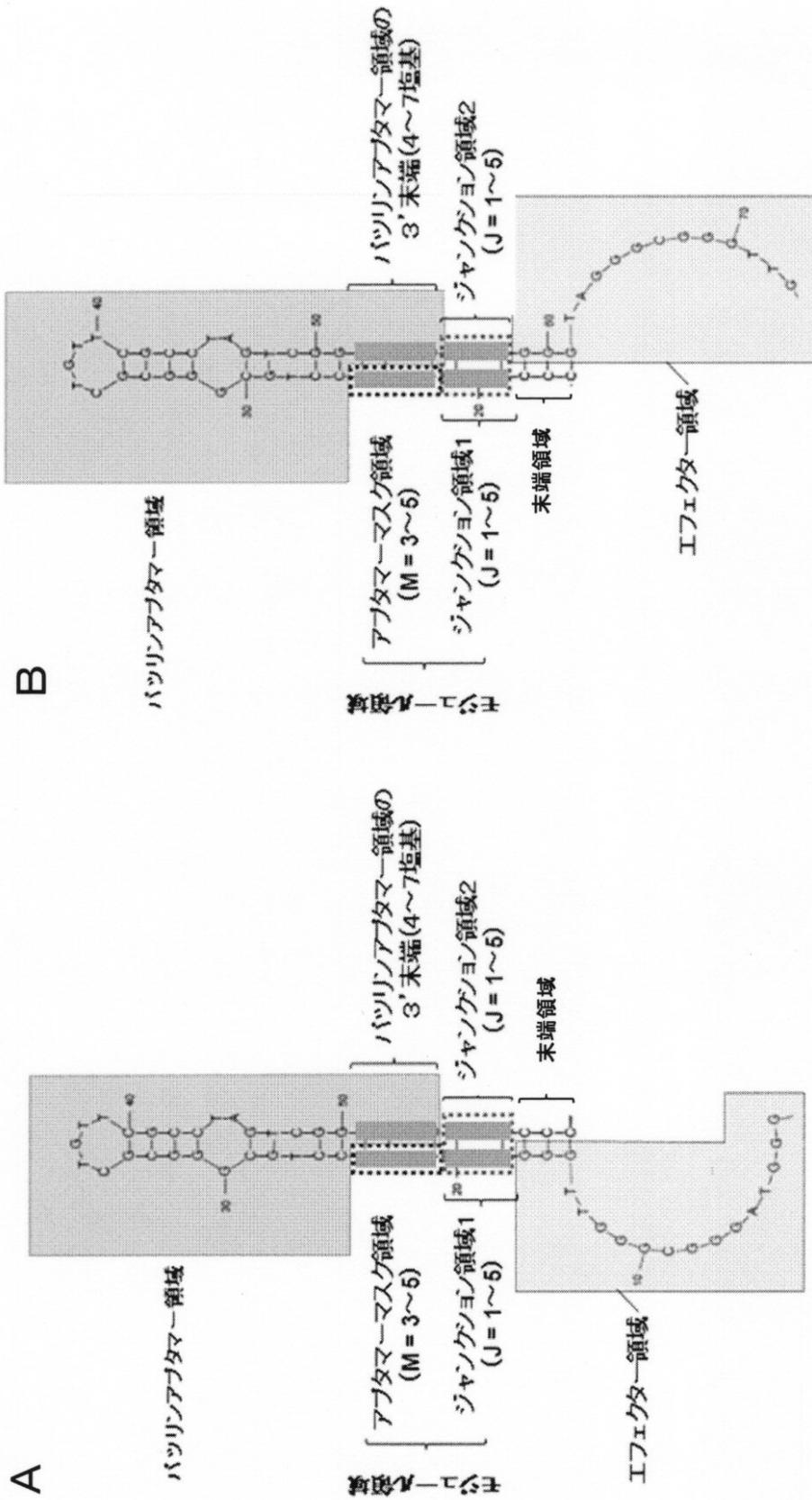
【 図 1 - 3 】



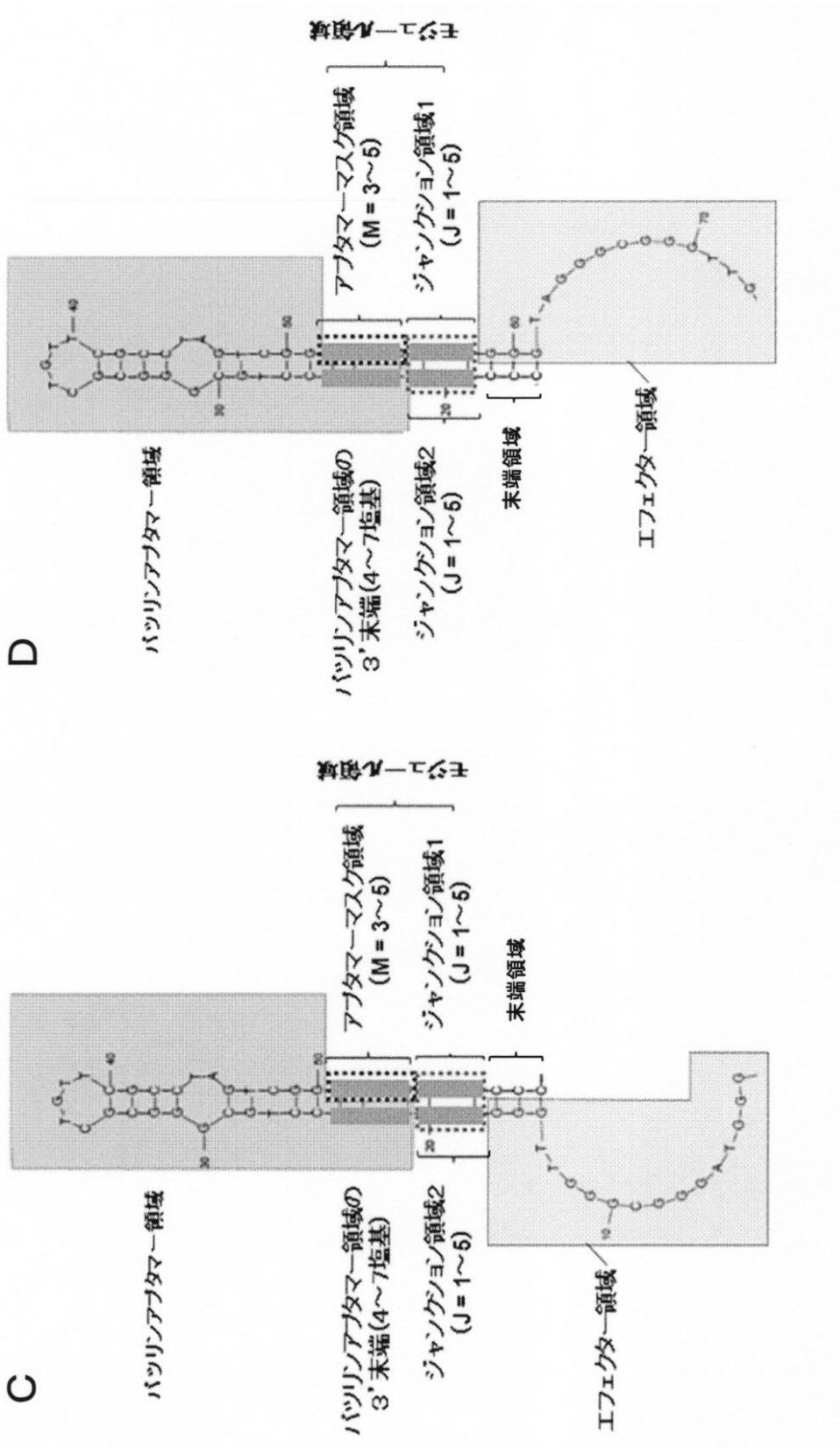
【 図 1 - 4 】



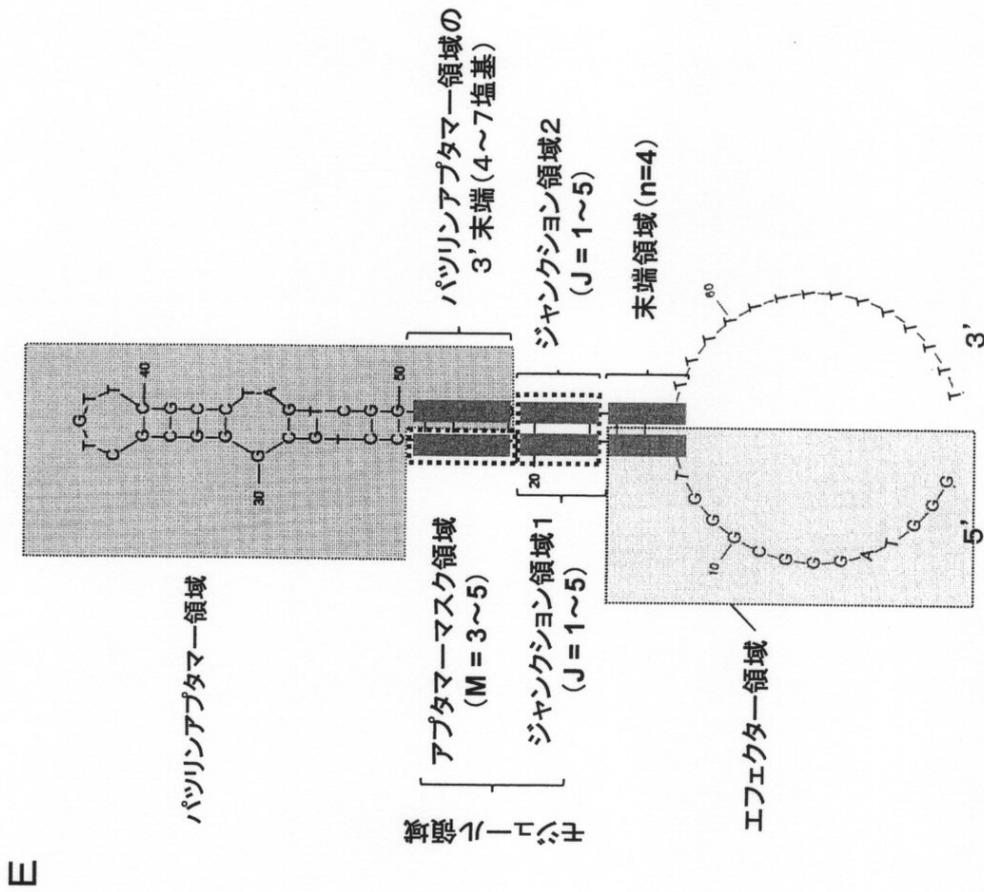
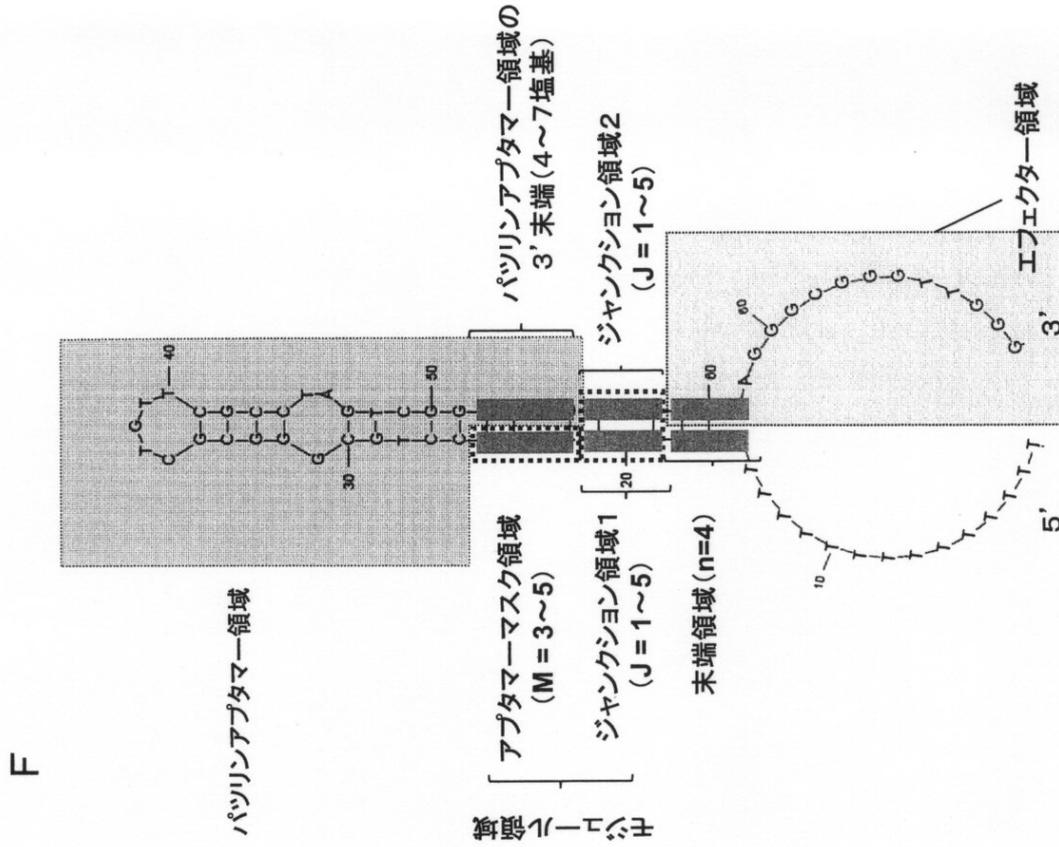
【図2-1】



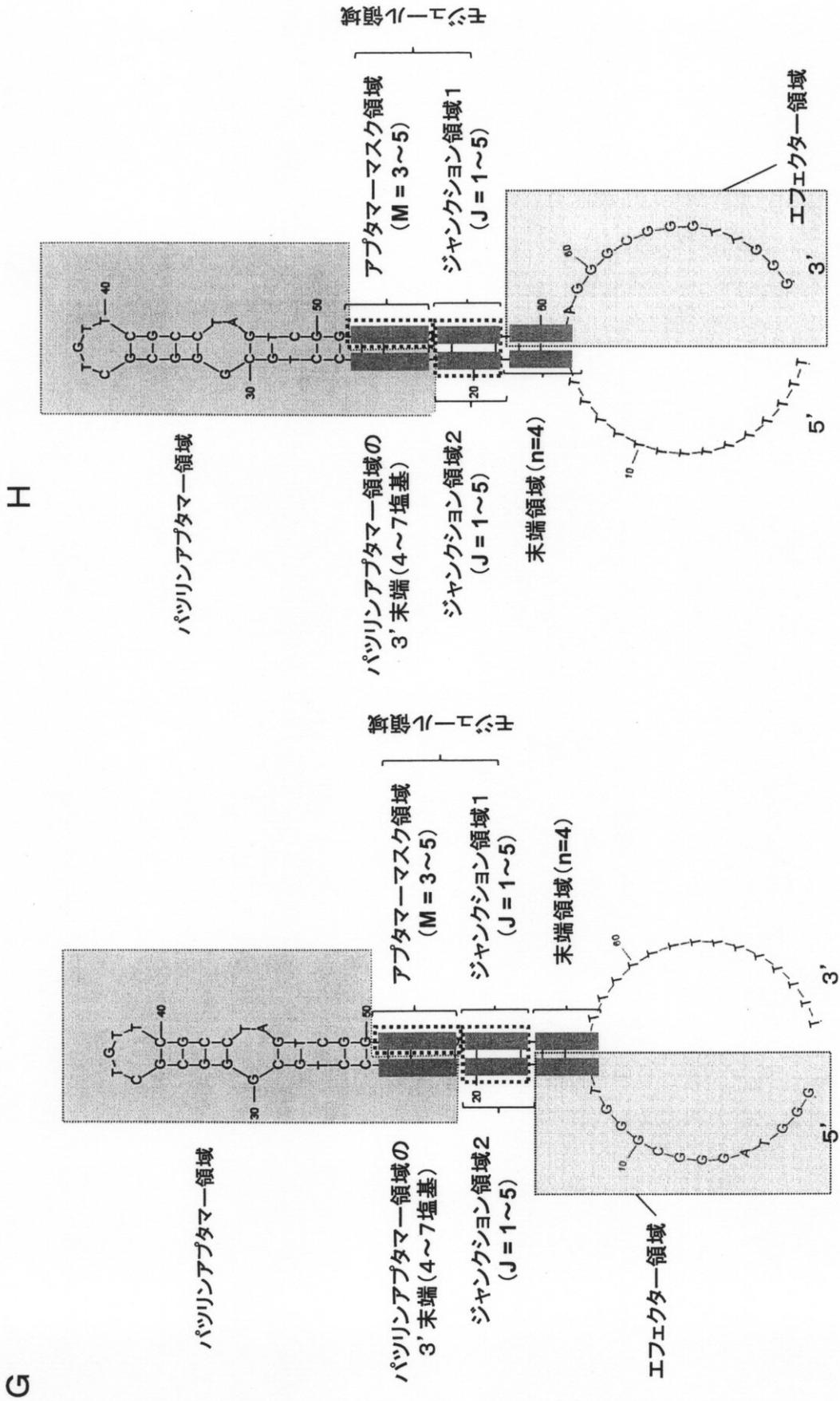
【図2-2】



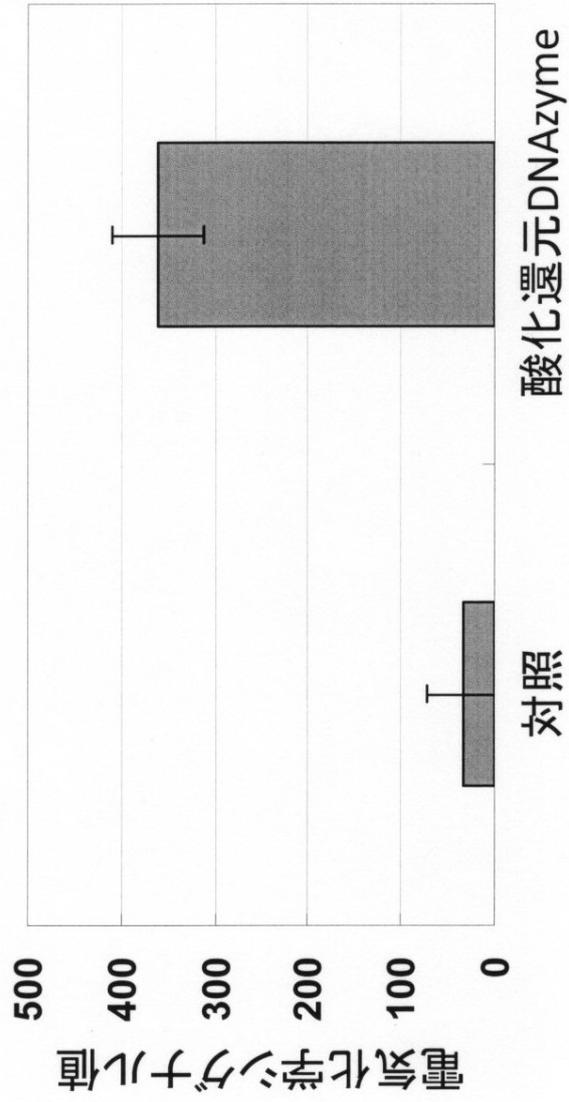
【 図 2 - 3 】



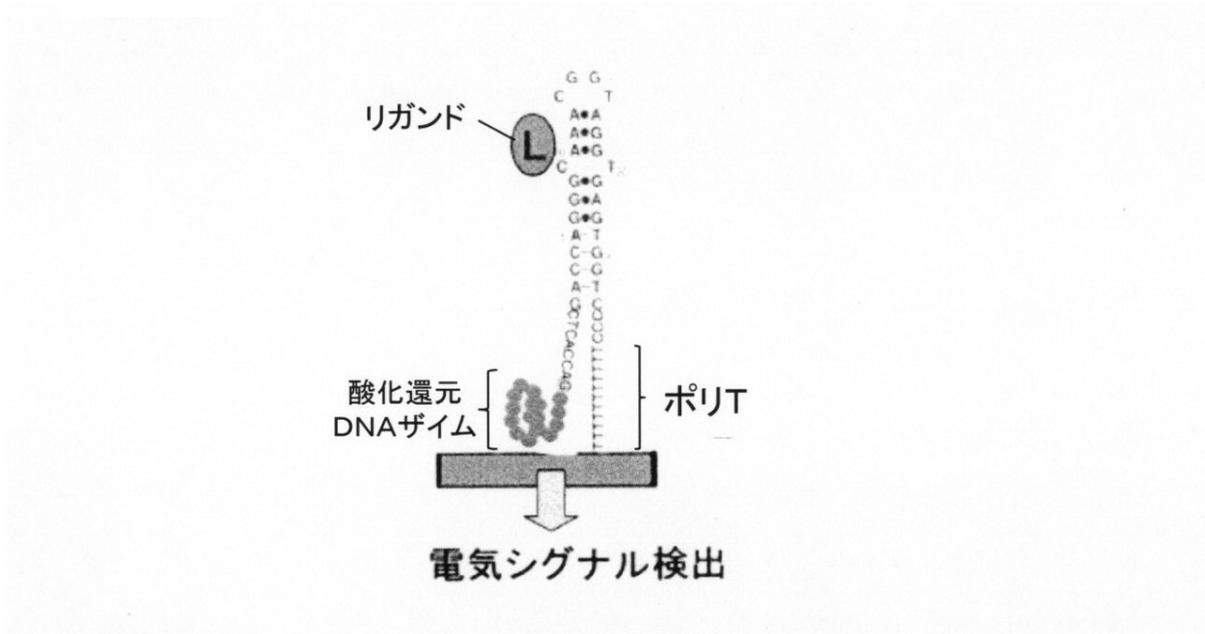
【 図 2 - 4 】



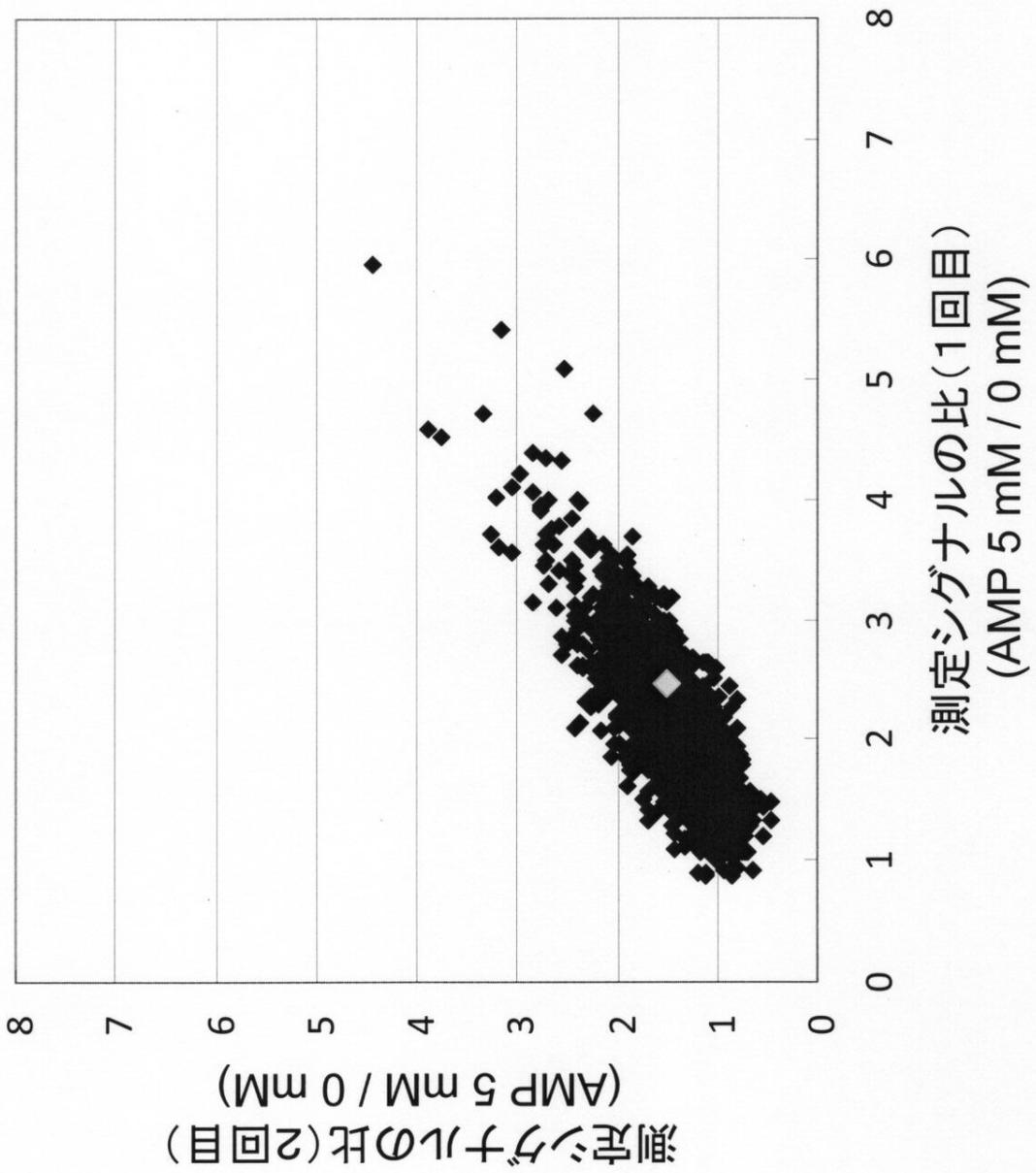
【 図 3 】



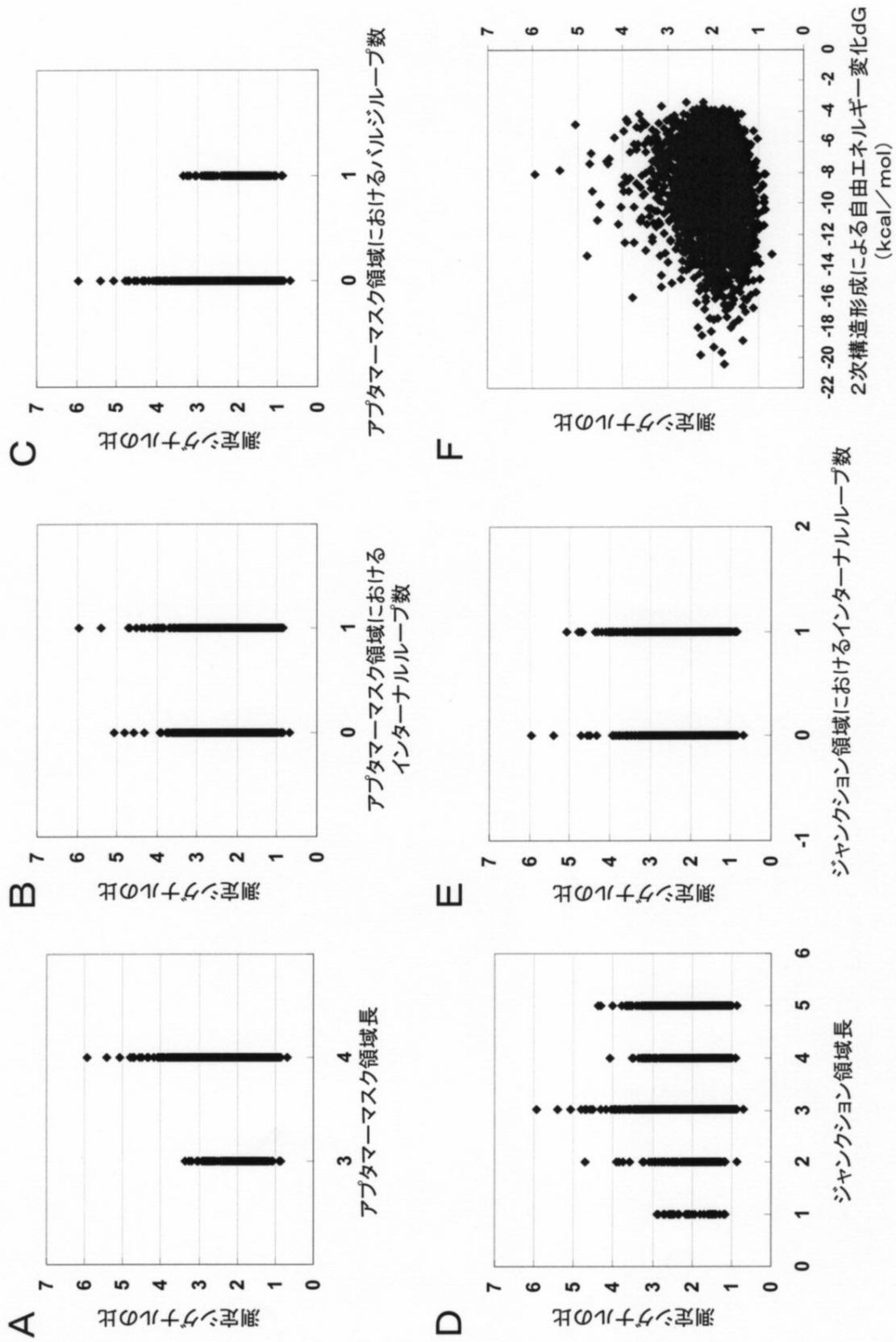
【図4】



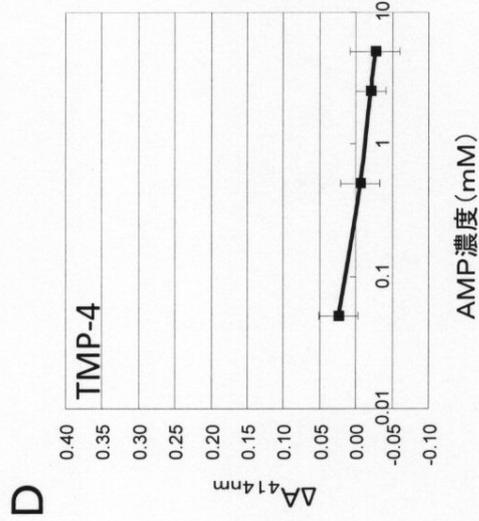
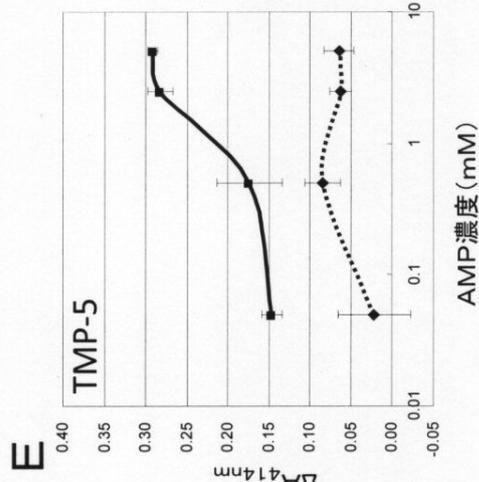
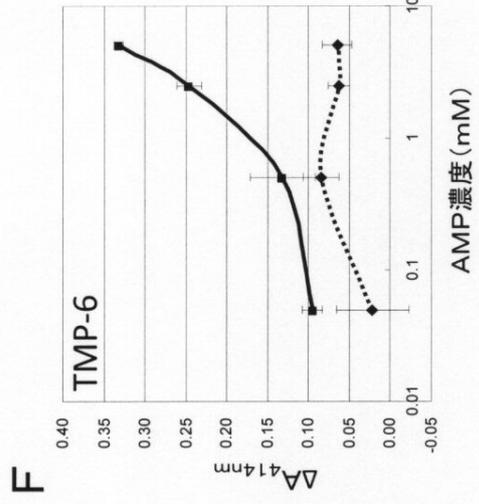
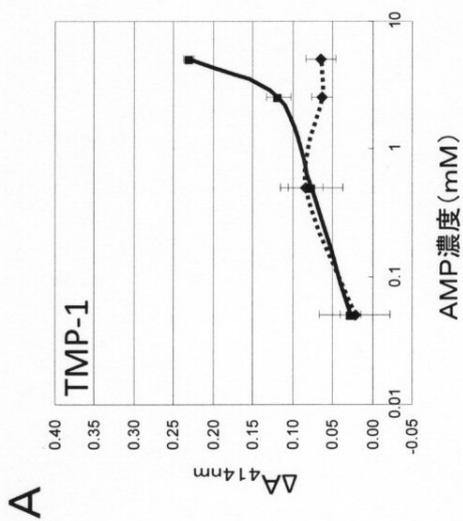
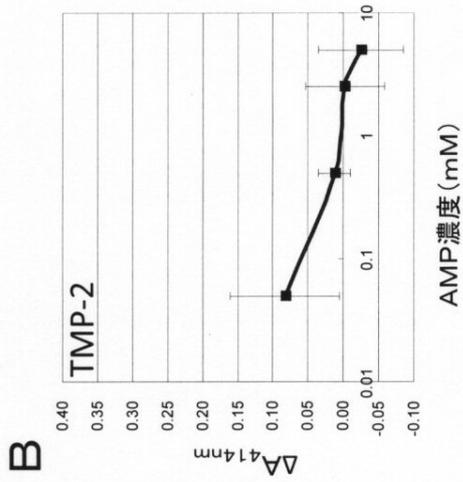
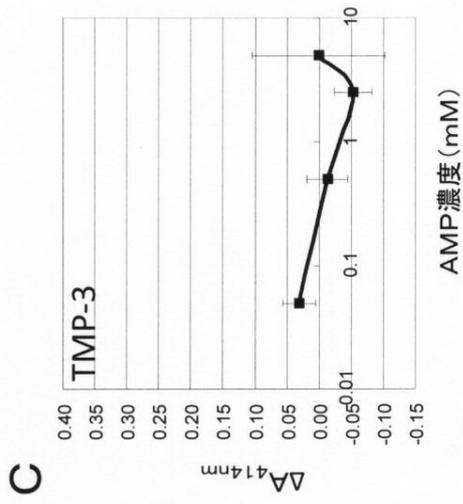
【図6】



【 図 7 】



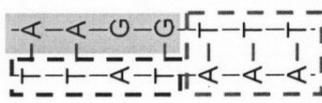
【 図 8 】



【 9 】

A

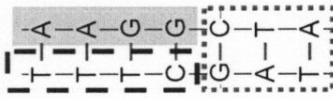
TMP-1



dG=-8.11kcal/mol

B

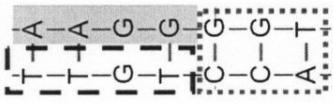
TMP-2



dG=-11.08kcal/mol

C

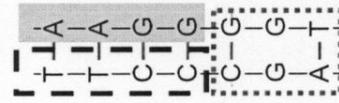
TMP-3



dG=-10.07kcal/mol

D

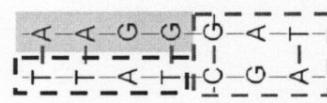
TMP-4



dG=-13.43kcal/mol

E

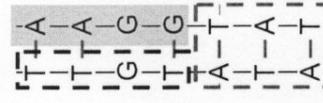
TMP-5



dG=-6.74kcal/mol

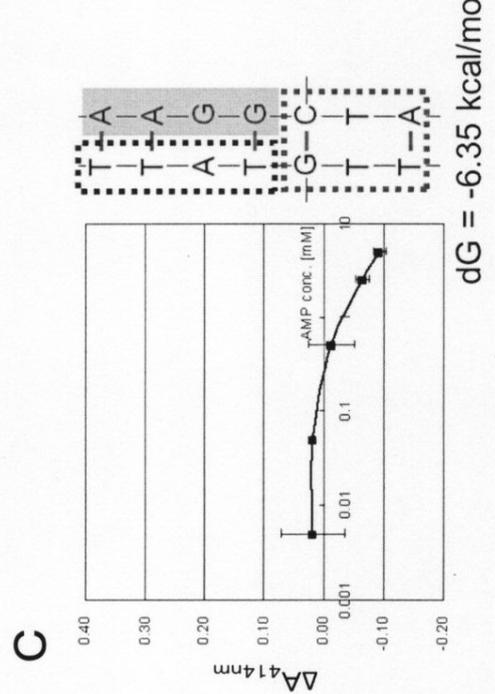
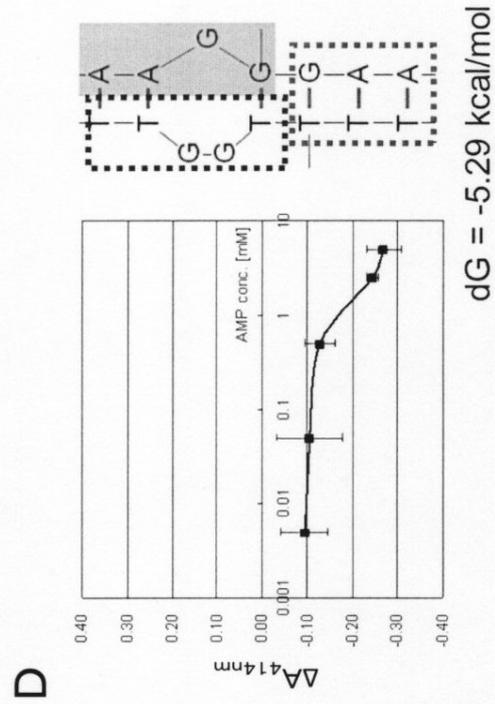
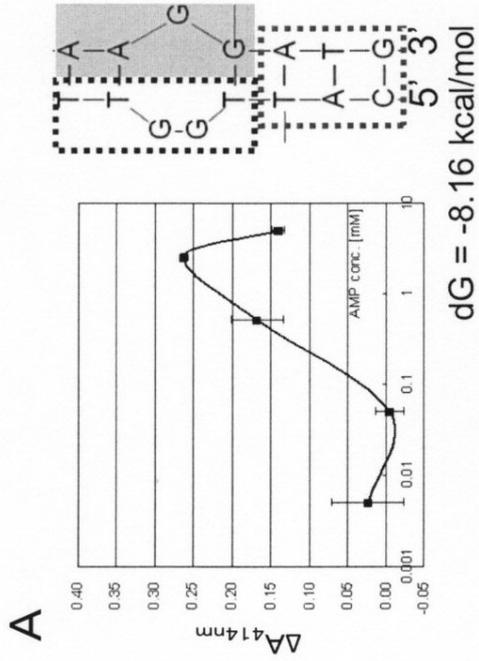
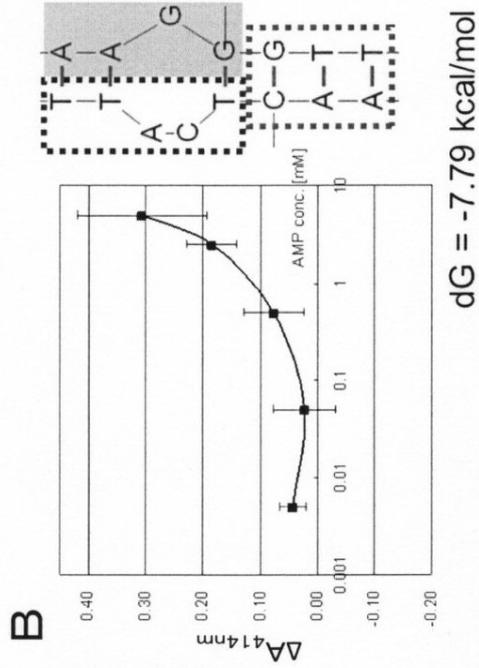
F

TMP-6

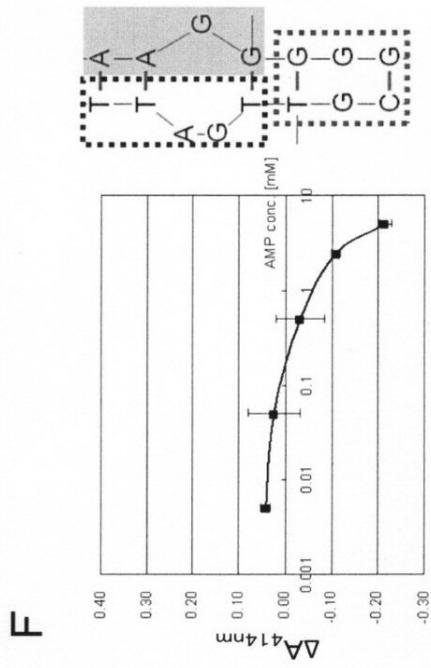


dG=-7.86kcal/mol

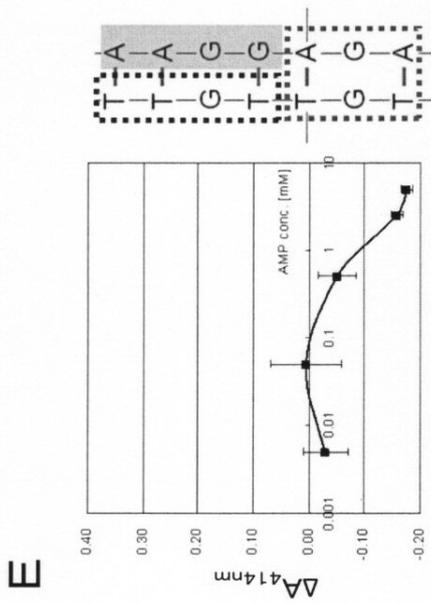
【 10 - 1 】



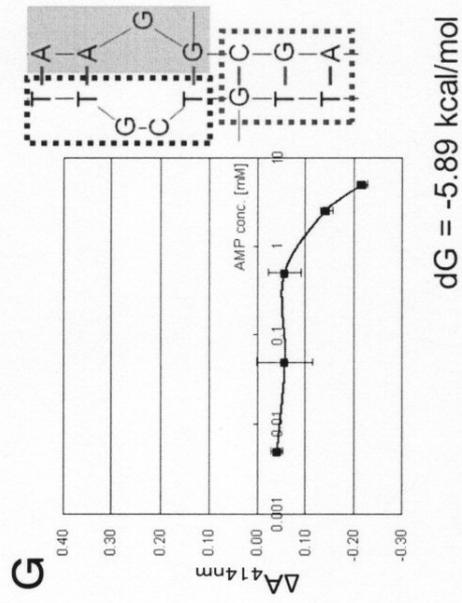
【 10 - 2 】



$dG = -5.65$ kcal/mol

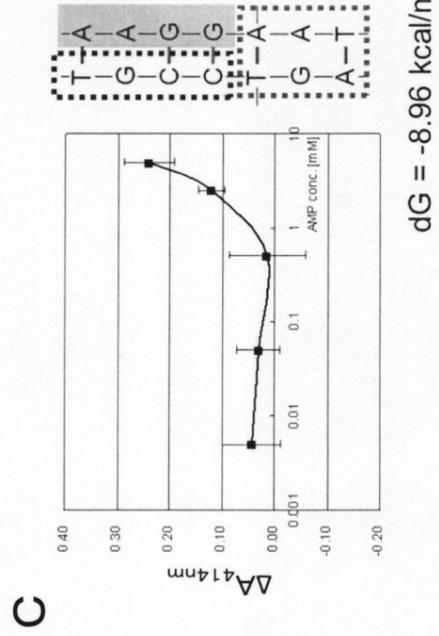
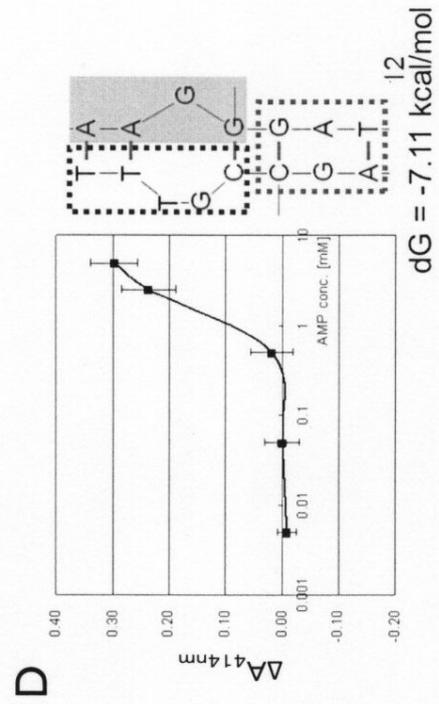
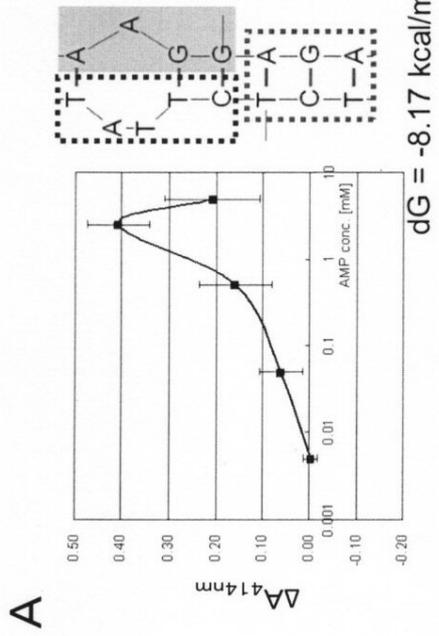
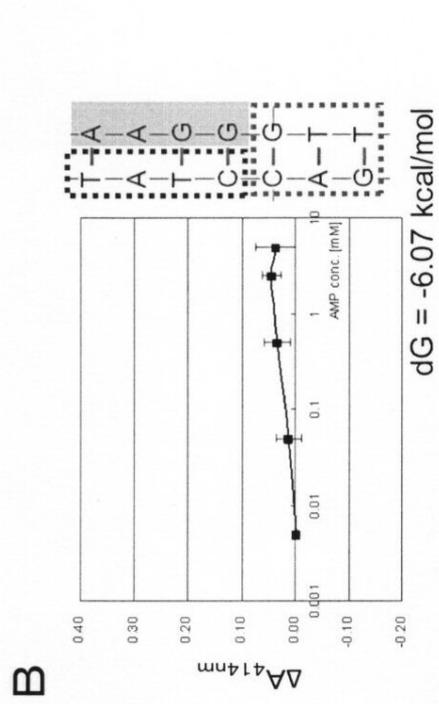


$dG = -5.96$ kcal/mol



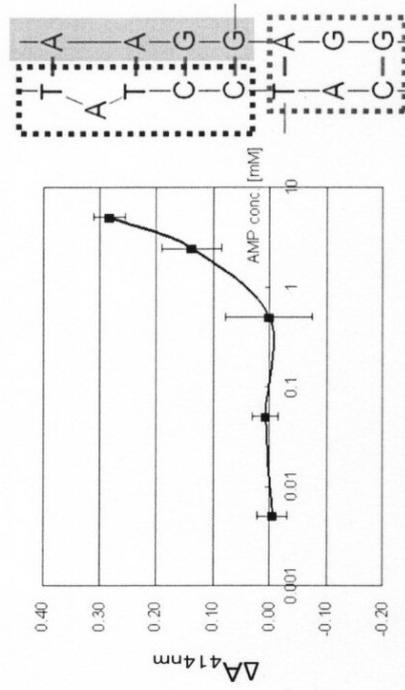
$dG = -5.89$ kcal/mol

【 1 1 - 1 】



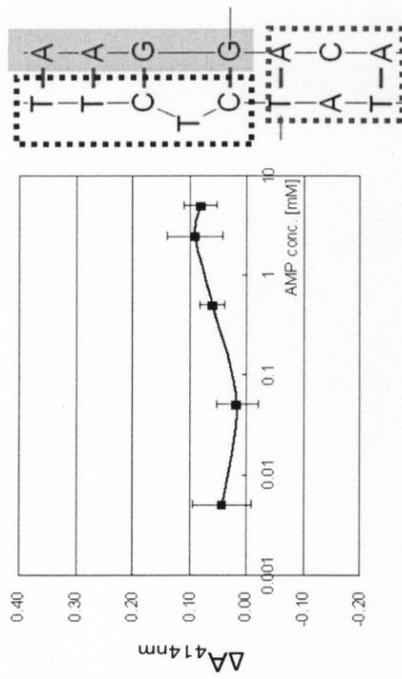
【 1 1 - 2 】

F



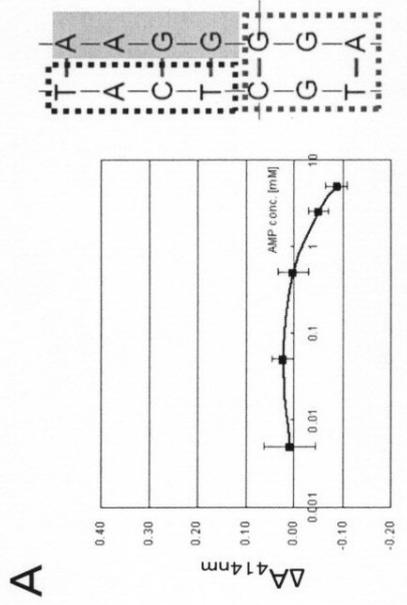
$dG = -8.54 \text{ kcal/mol}$

E

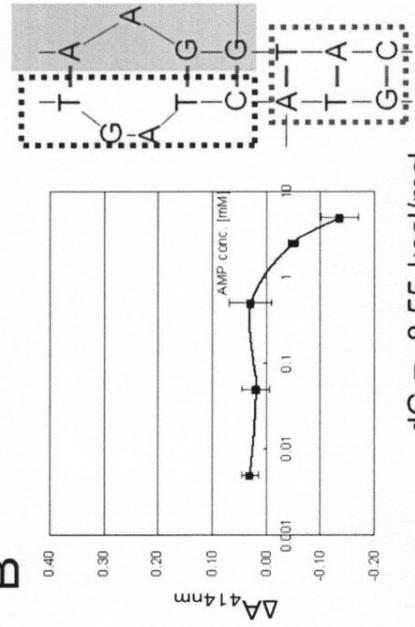


$dG = -6.10 \text{ kcal/mol}$

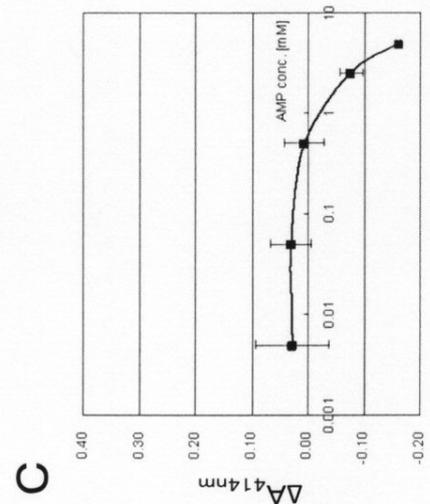
【 1 2 - 1 】



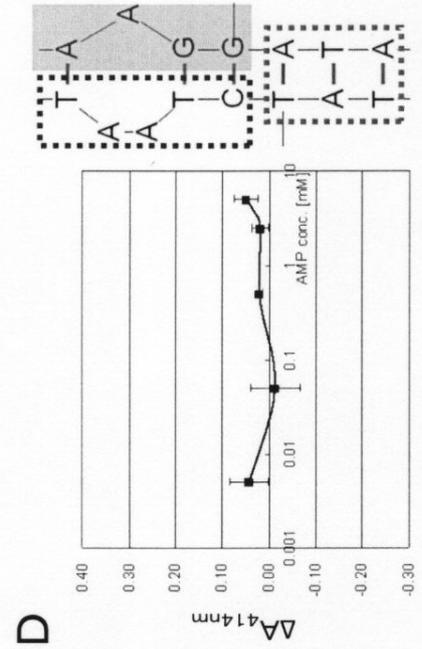
dG = -6.24 kcal/mol



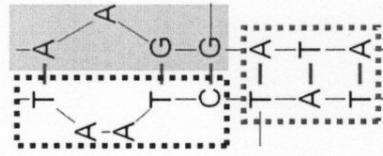
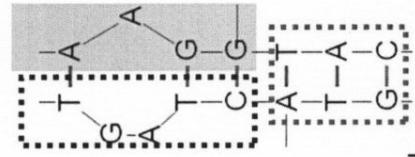
dG = -8.55 kcal/mol



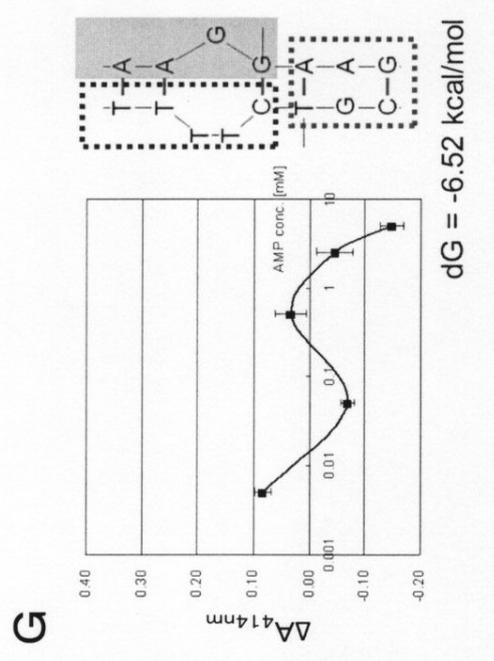
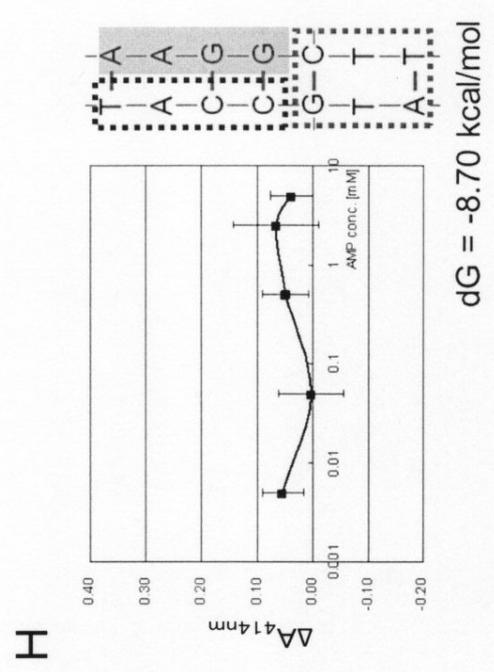
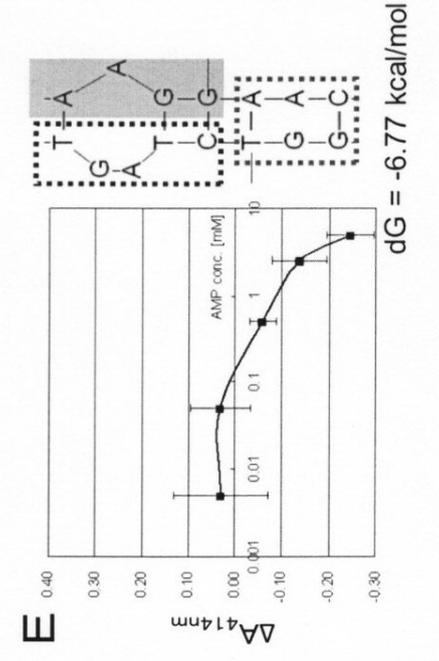
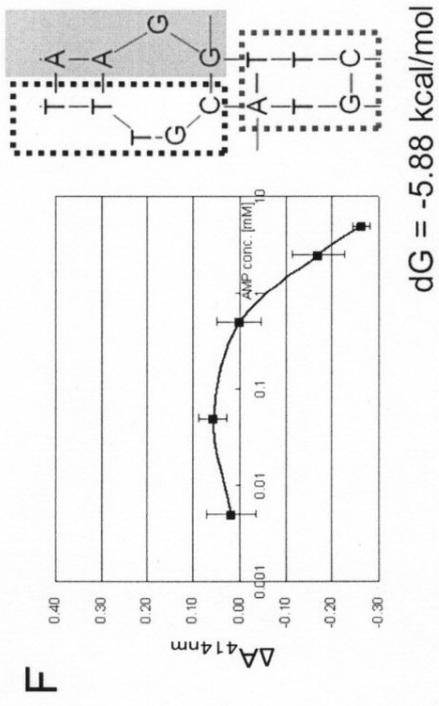
dG = -5.27 kcal/mol



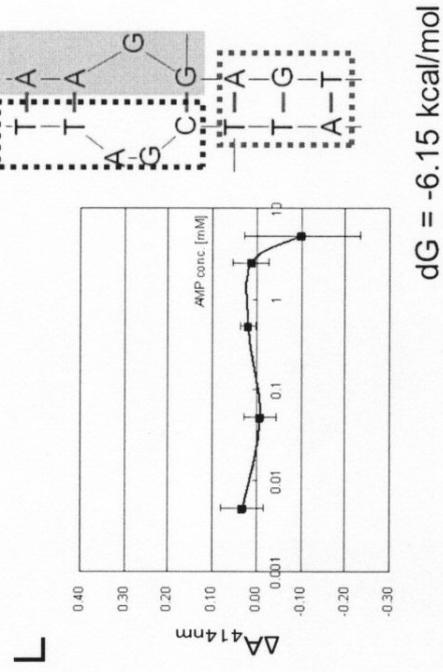
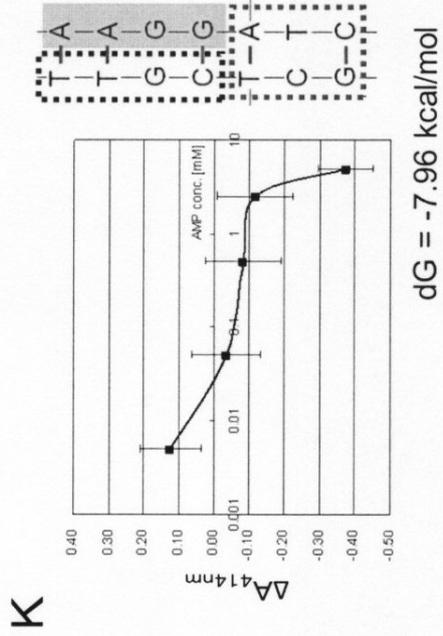
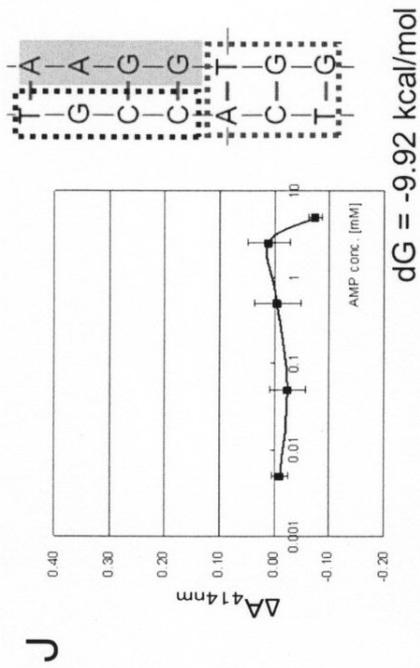
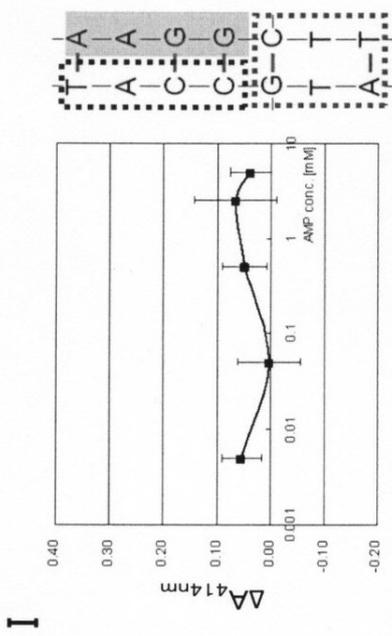
dG = -7.55 kcal/mol



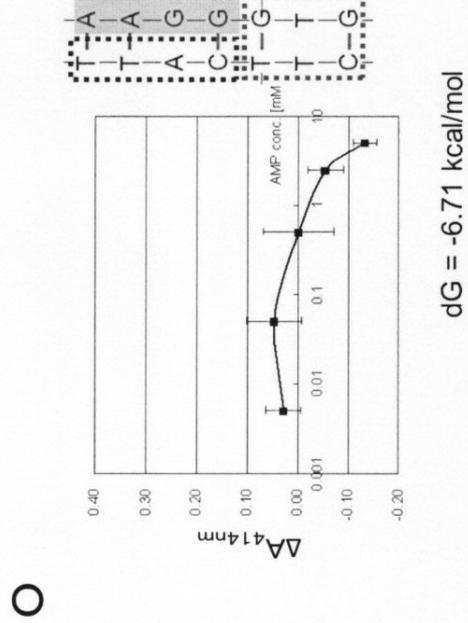
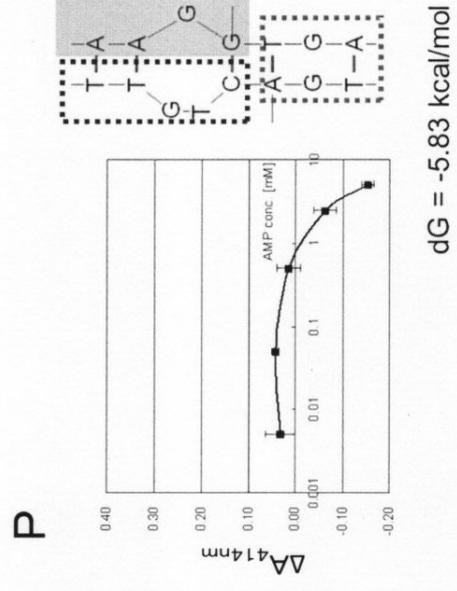
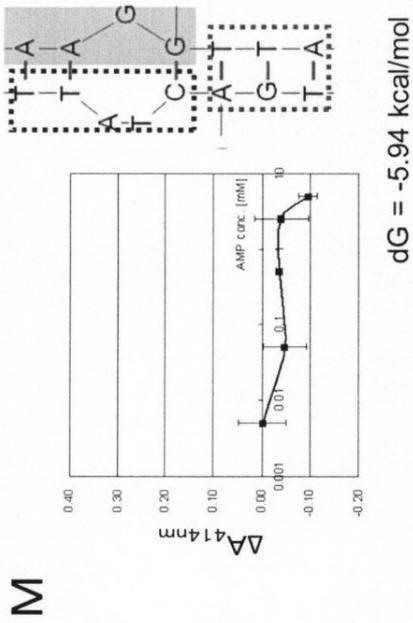
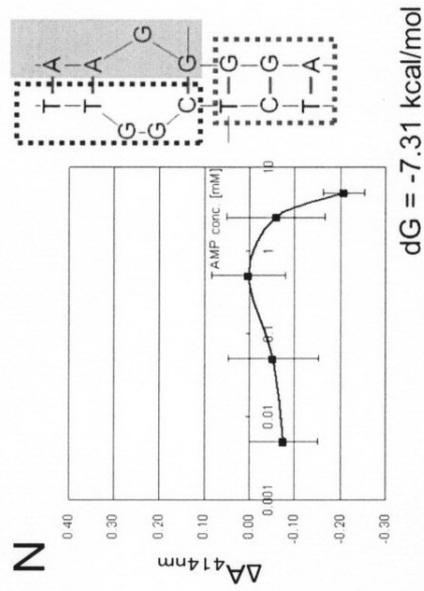
【 図 1 2 - 2 】



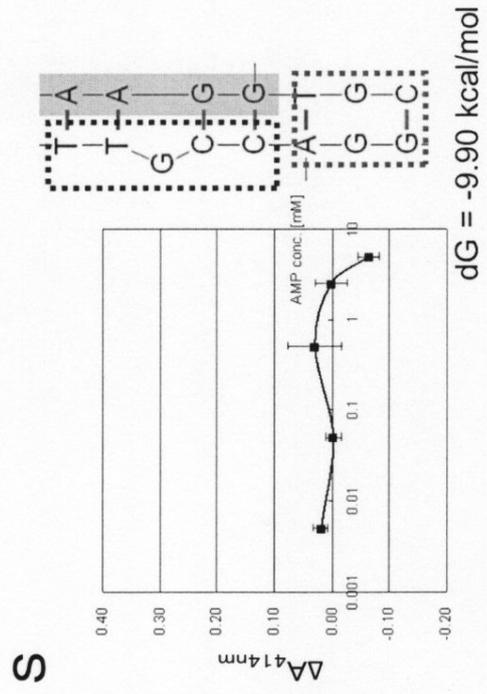
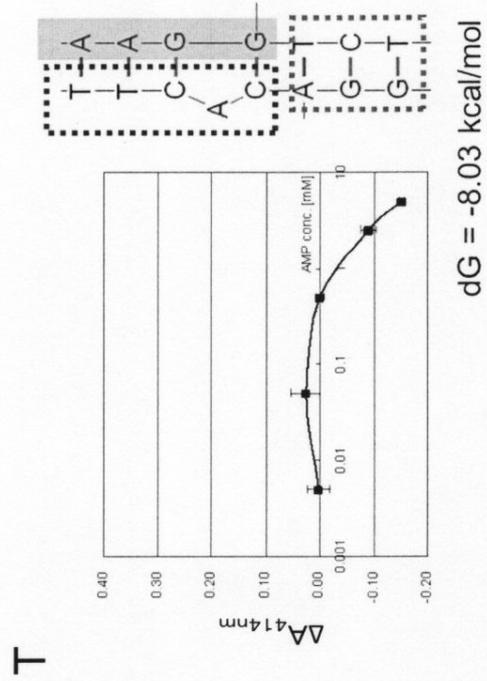
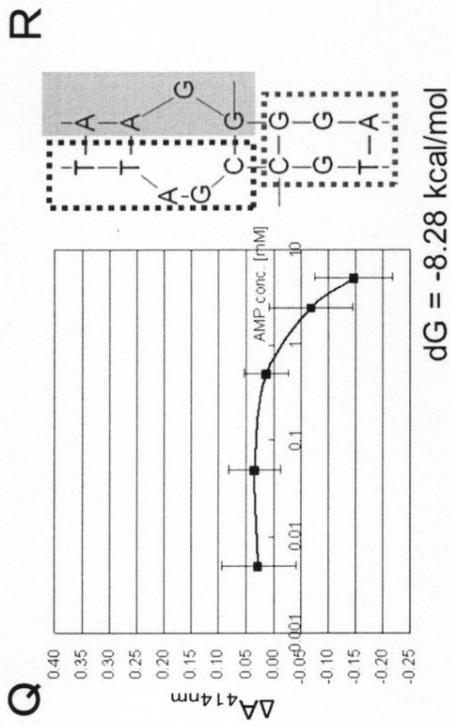
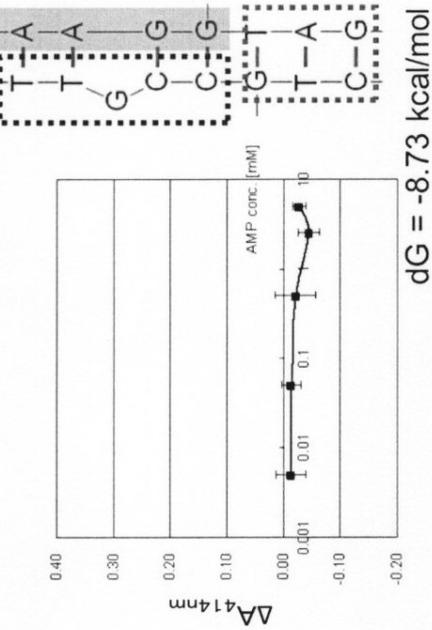
【 1 2 - 3 】



【 1 2 - 4 】



【 図 1 2 - 5 】



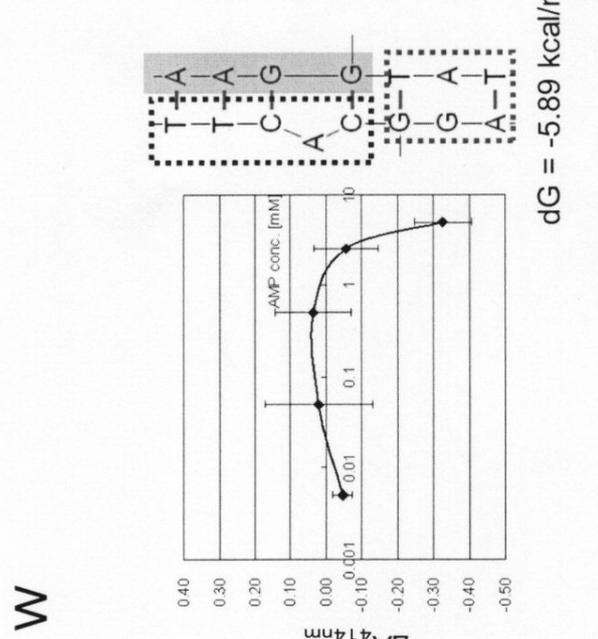
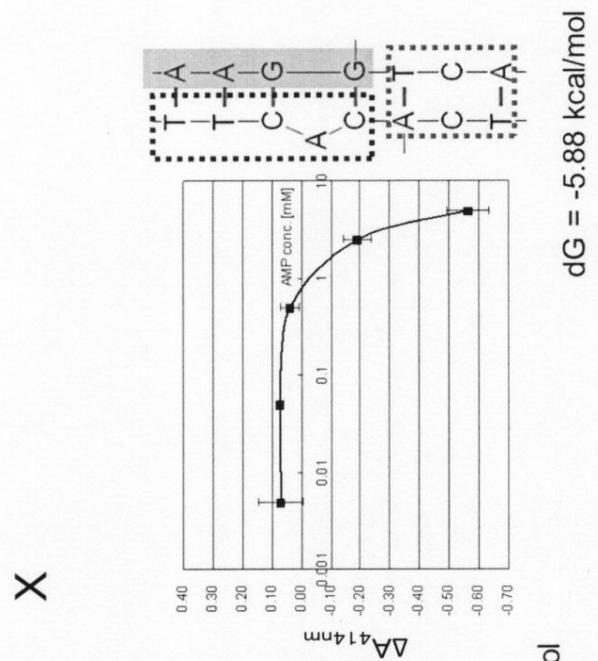
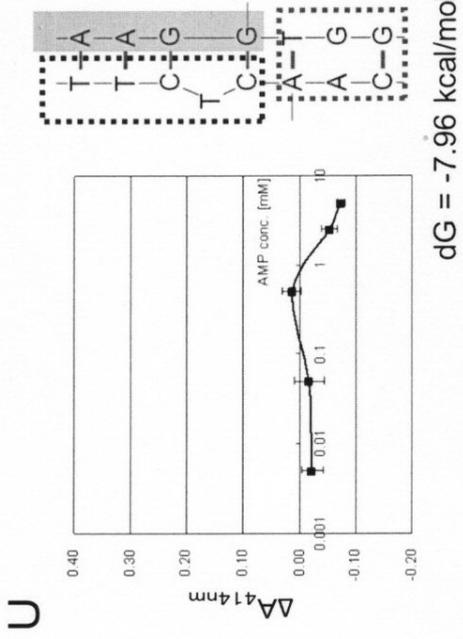
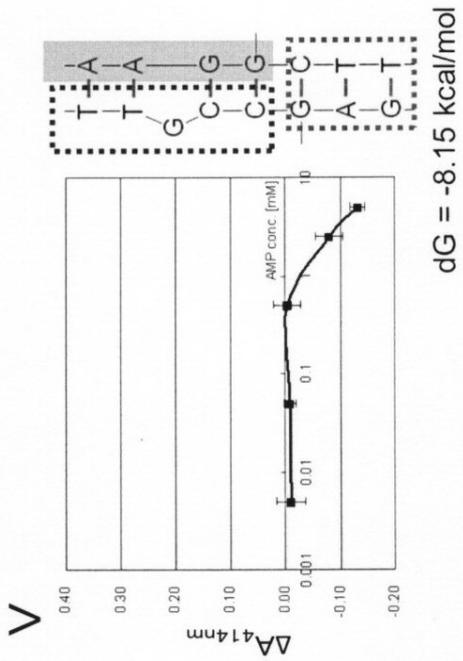
S

T

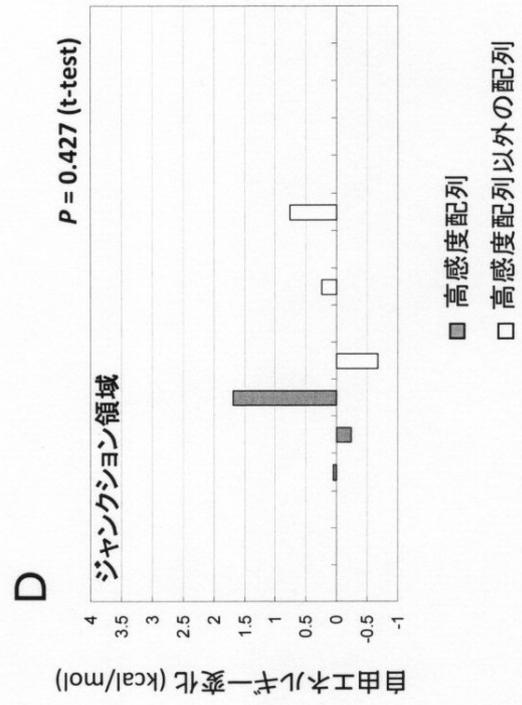
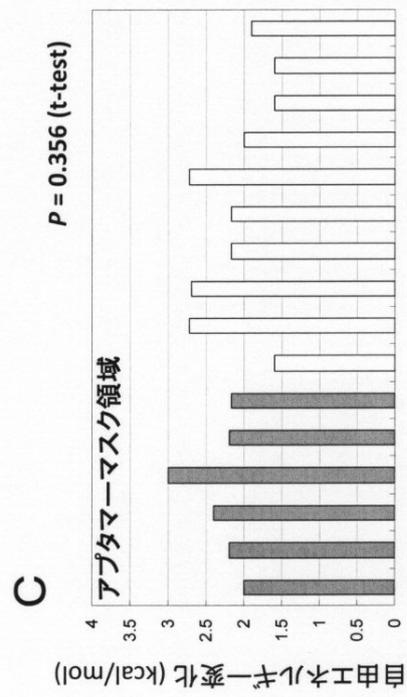
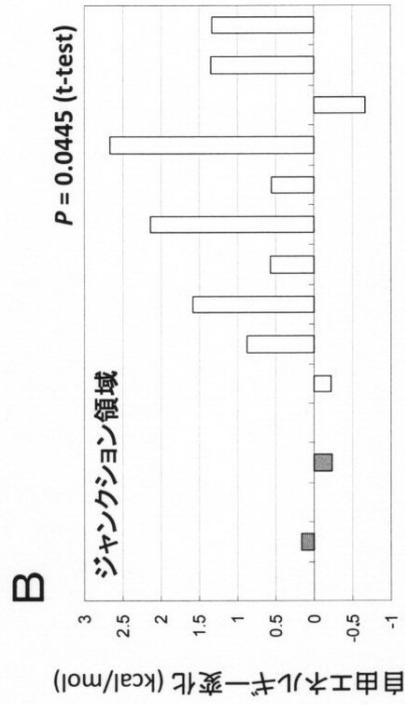
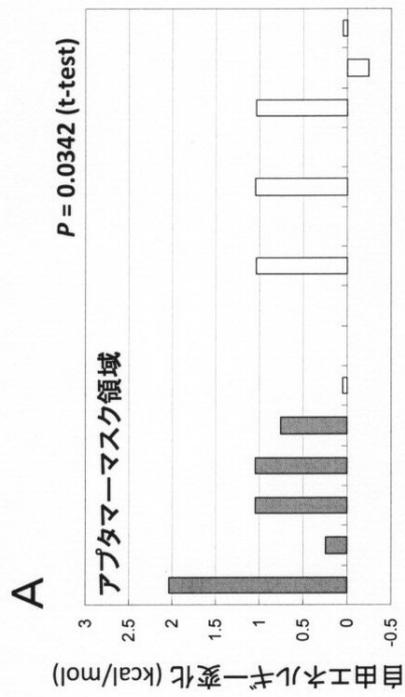
R

Q

【 図 1 2 - 6 】

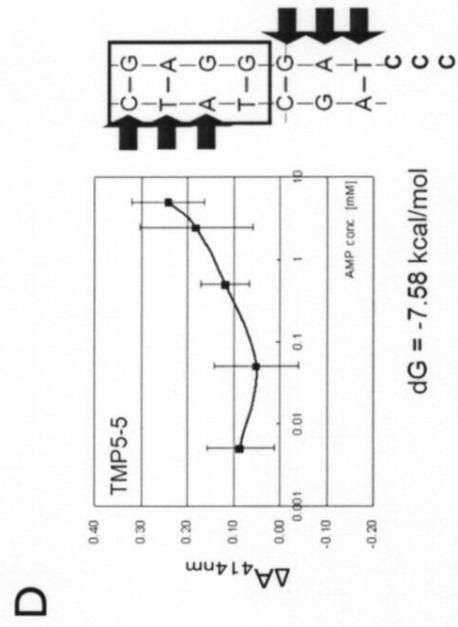
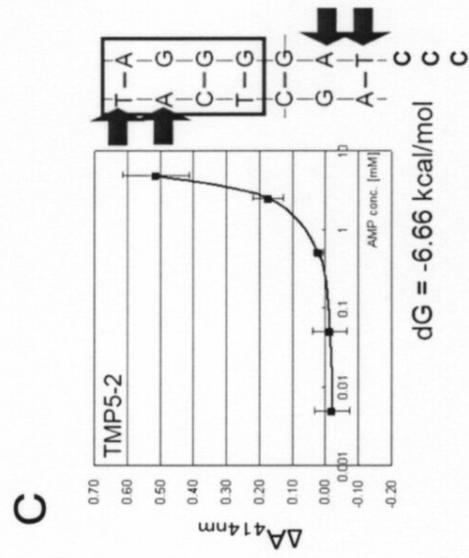
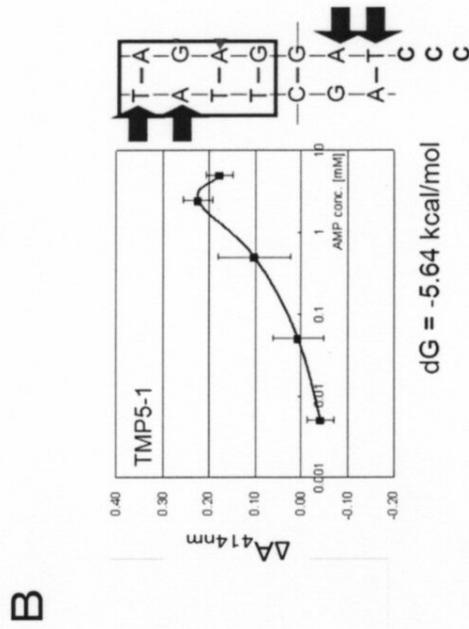
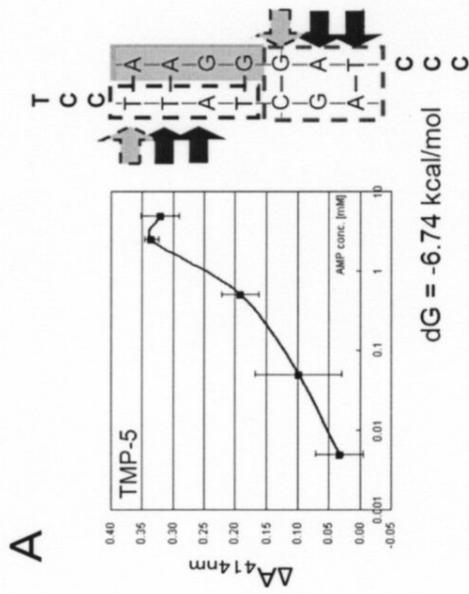


【 図 1 3 】

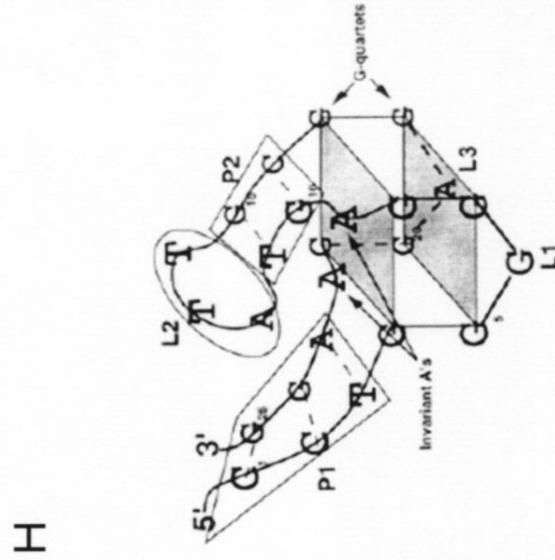
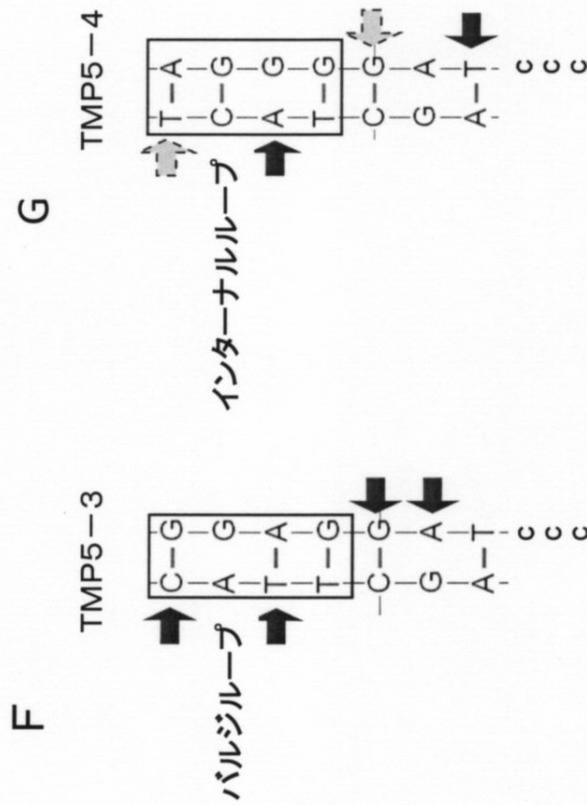
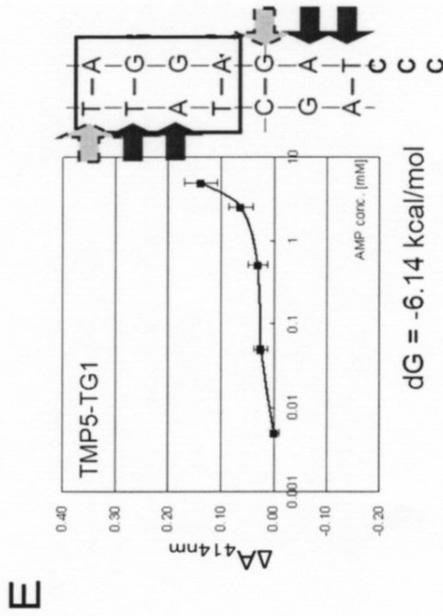


■ 高感度配列
□ 高感度配列以外の配列

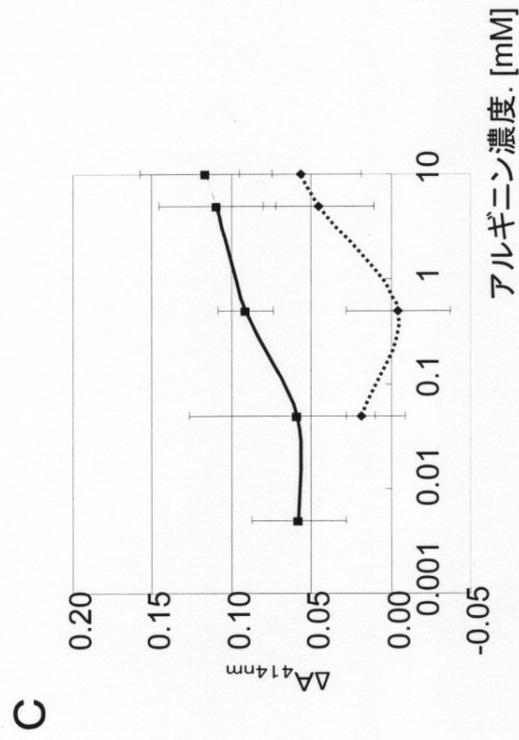
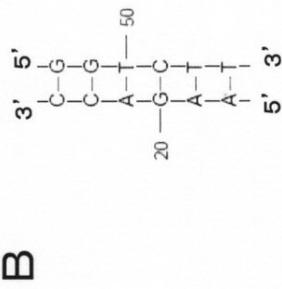
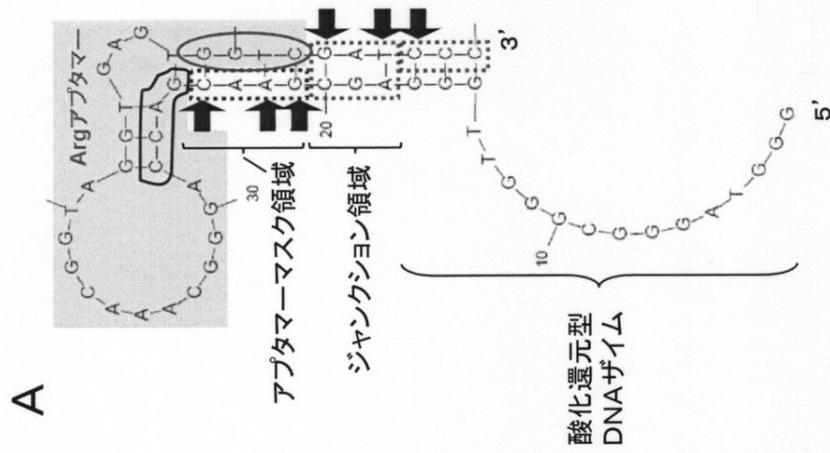
【 図 1 4 - 1 】



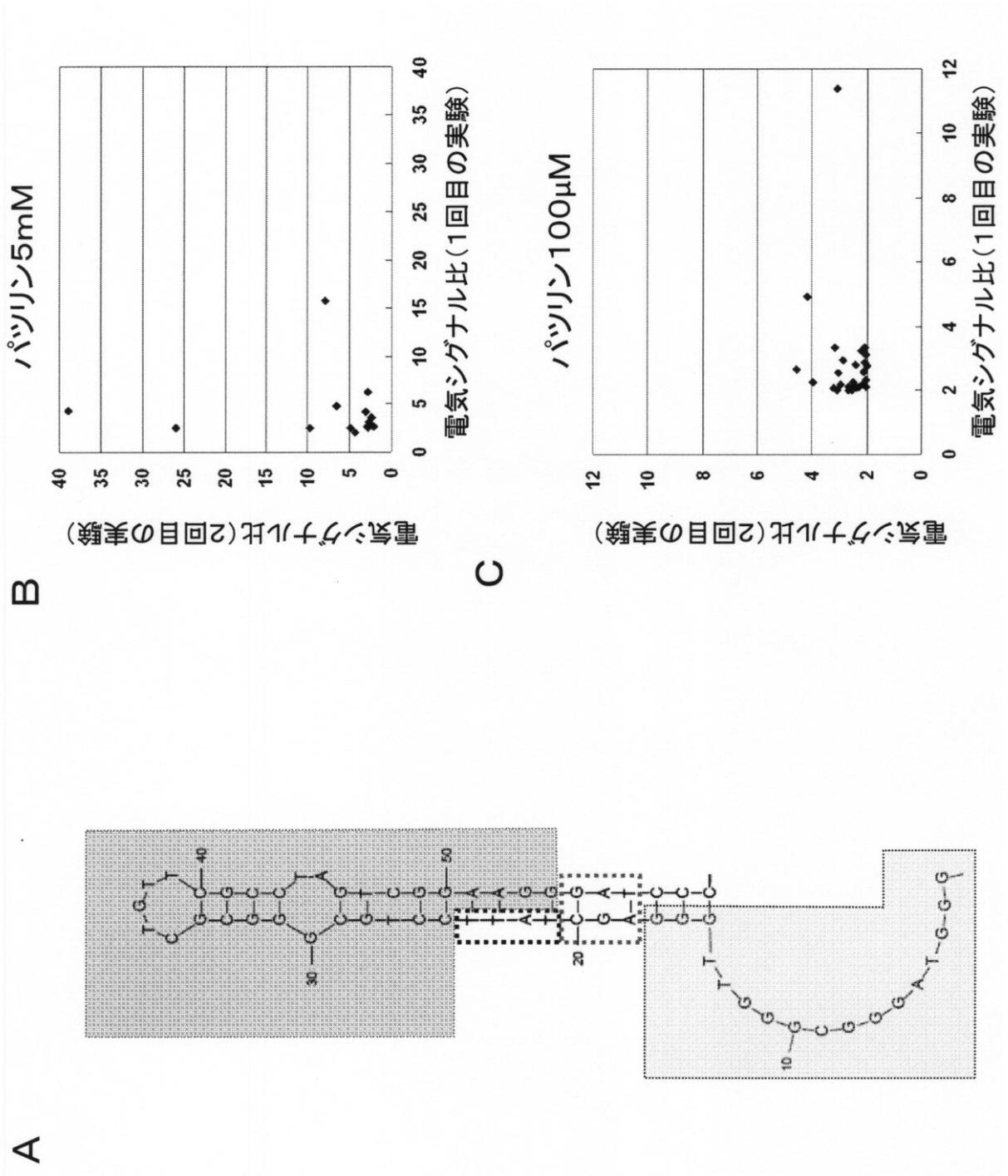
【 図 1 4 - 2 】



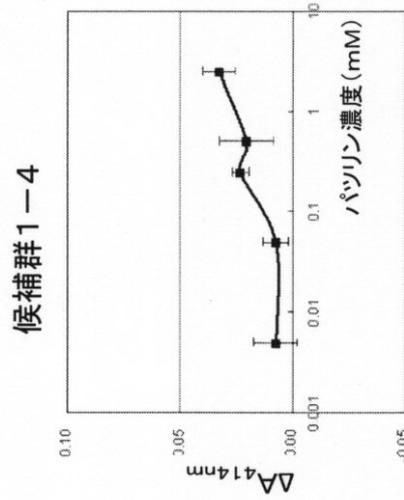
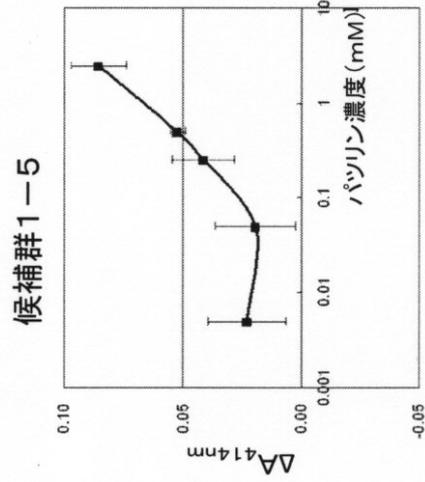
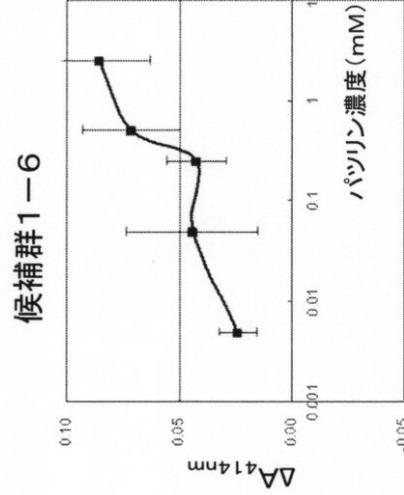
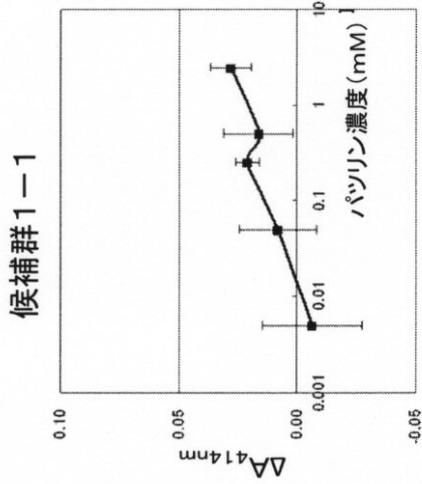
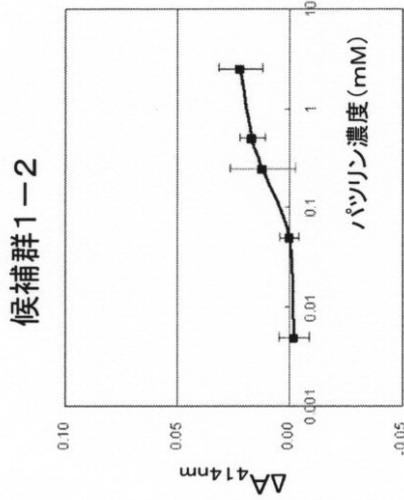
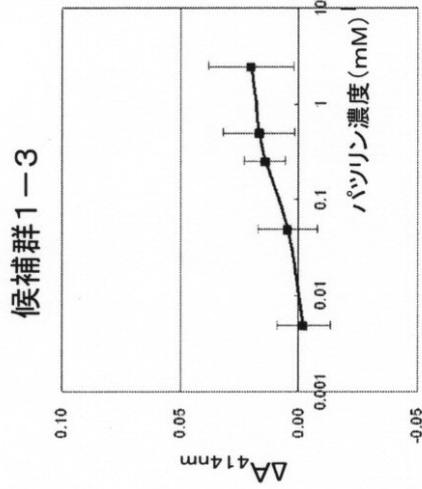
【 図 15 】



【 図 16 】

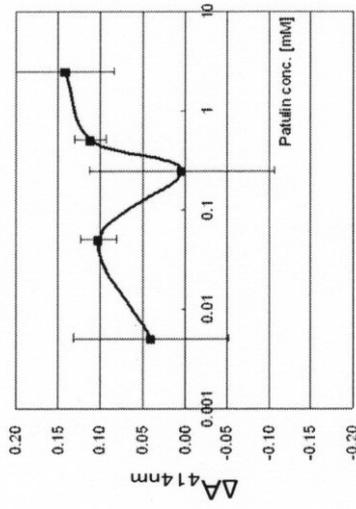


【 図 17 - 1 】



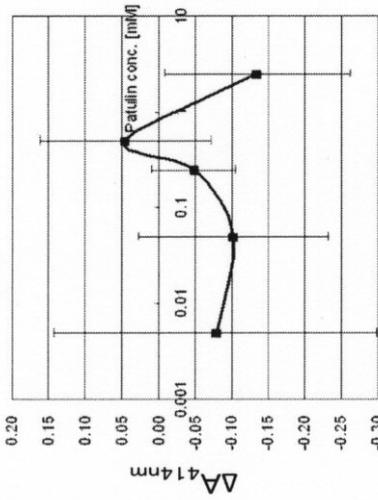
【図 17 - 2】

候補群2-3



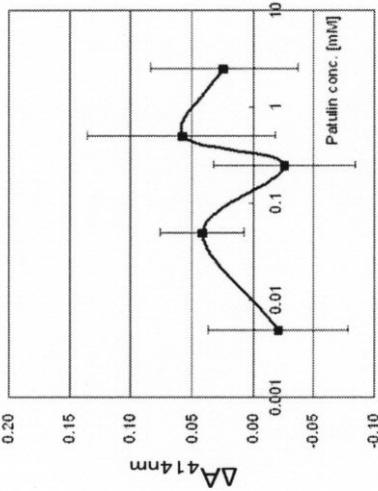
パツリン濃度 (mM)

候補群2-2



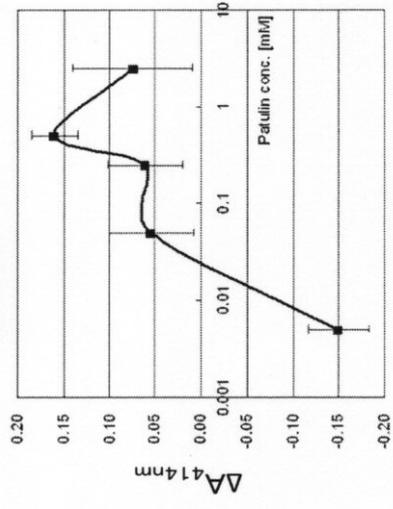
パツリン濃度 (mM)

候補群2-1



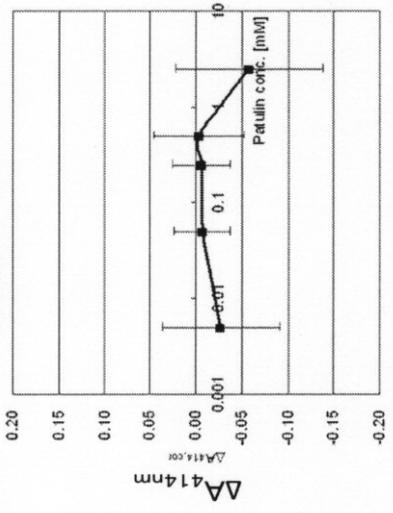
パツリン濃度 (mM)

候補群2-6



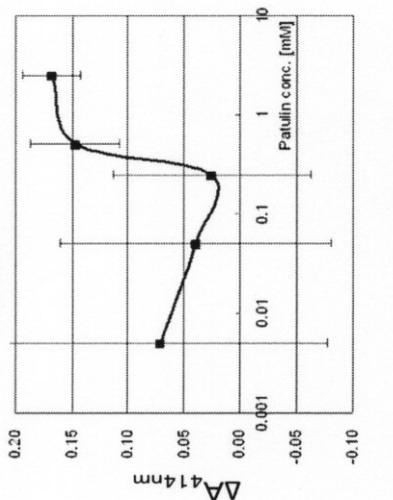
パツリン濃度 (mM)

候補群2-5



パツリン濃度 (mM)

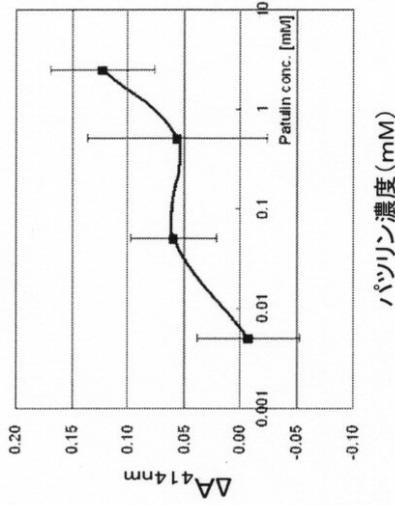
候補群2-4



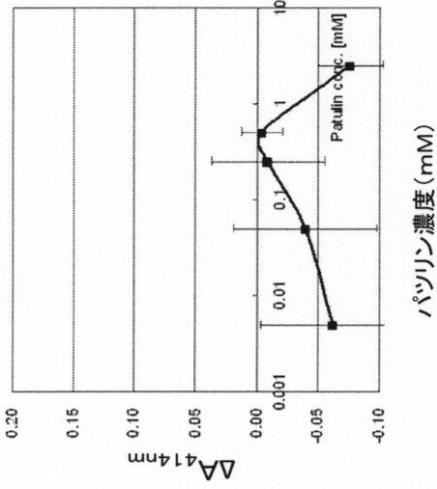
パツリン濃度 (mM)

【 図 17 - 3 】

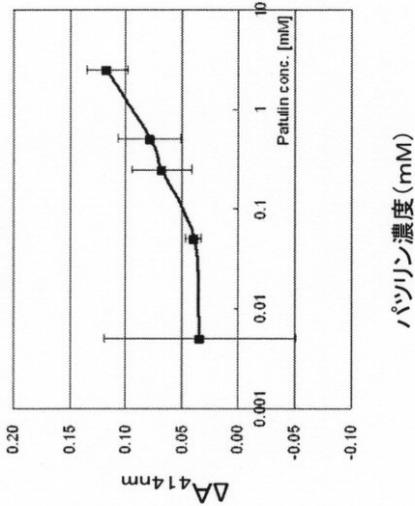
候補群2-9



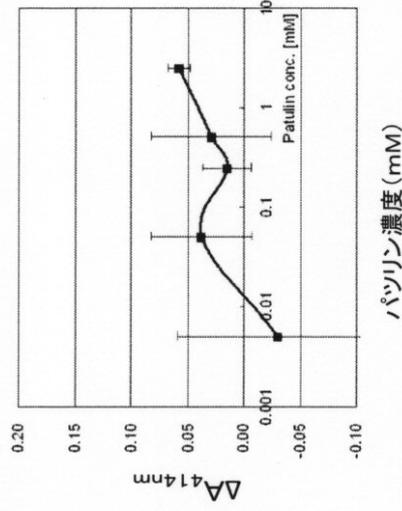
候補群2-8



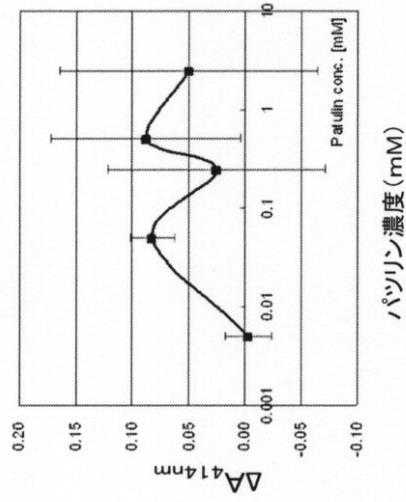
候補群2-7



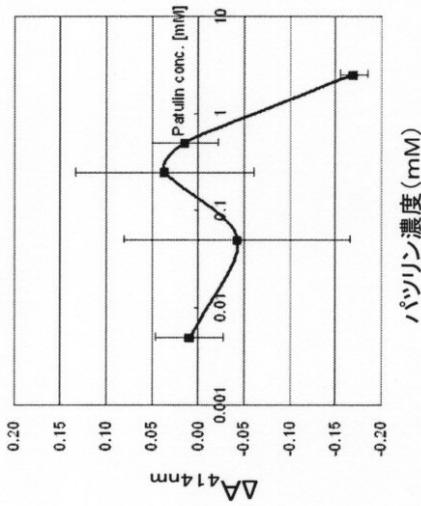
候補群2-12



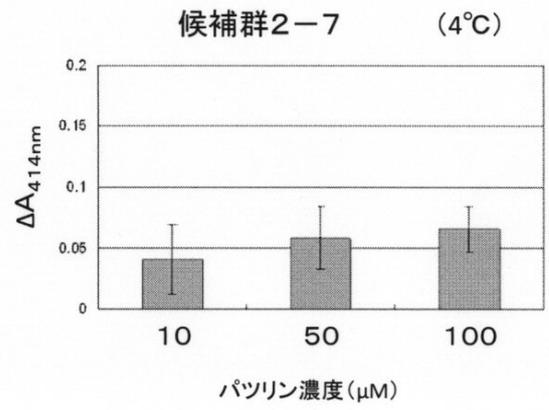
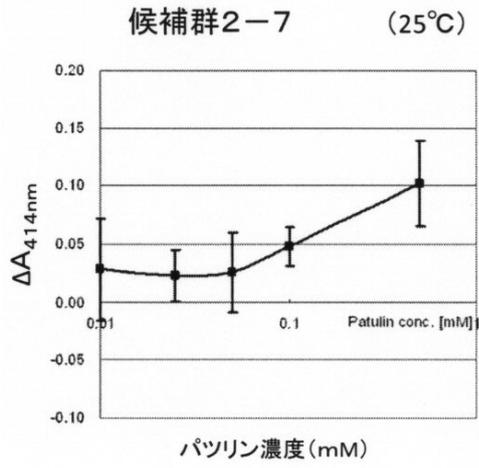
候補群2-11



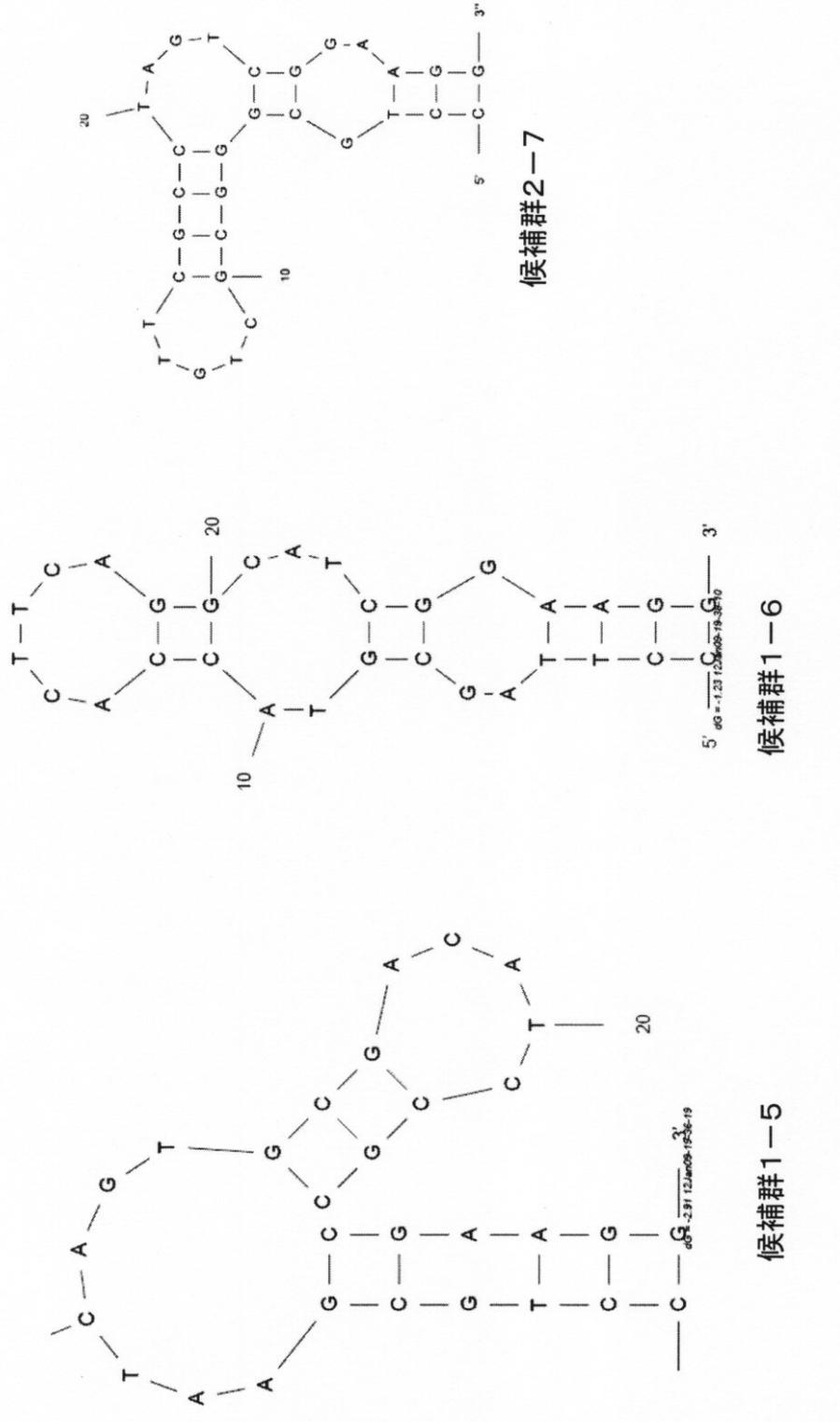
候補群2-10



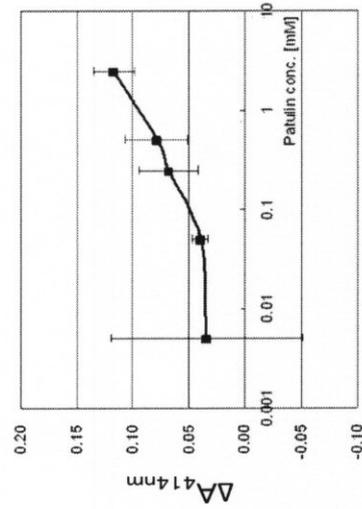
【図18】



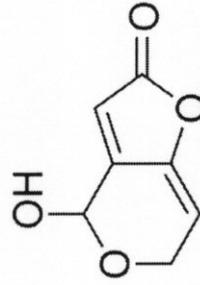
【 図 19 】



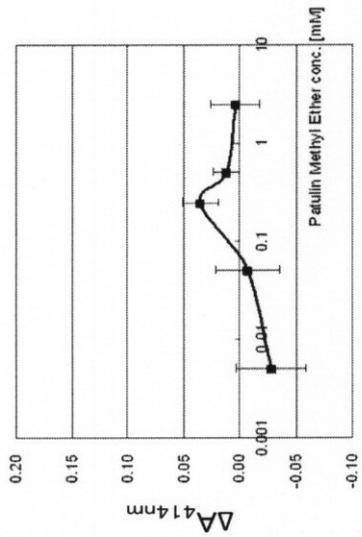
【 図 20 】



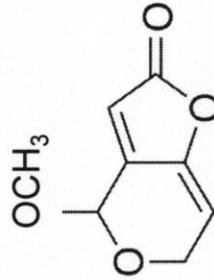
パツリン濃度 (mM)



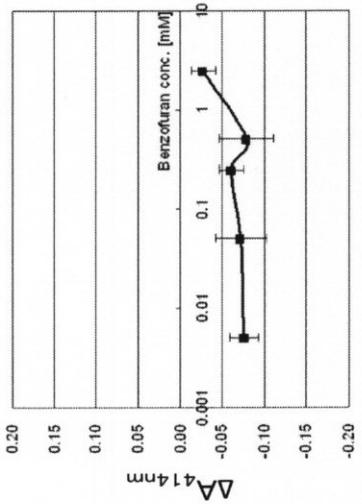
パツリン



(S)-パツリンメチルエーテル濃度 (mM)



(S)-パツリンメチルエーテル



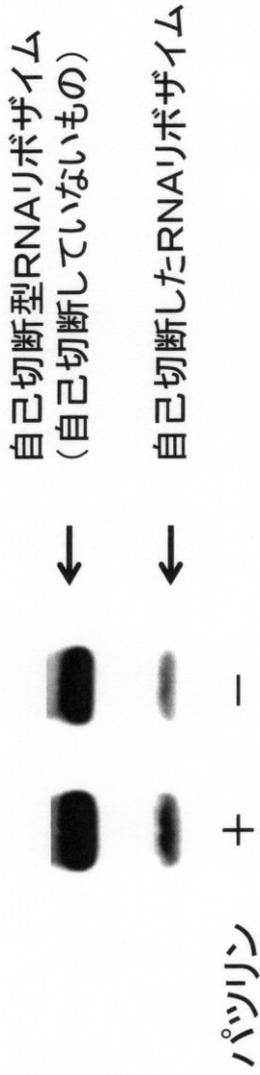
ベンゾフラン濃度 (mM)



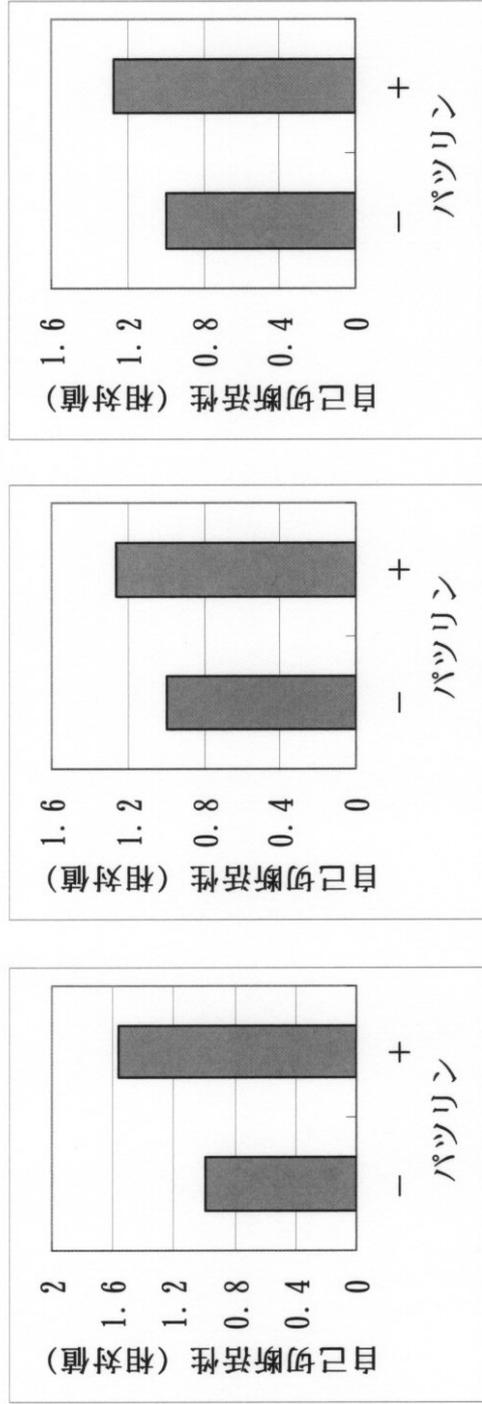
ベンゾフラン

【 図 2 2 】

A



B

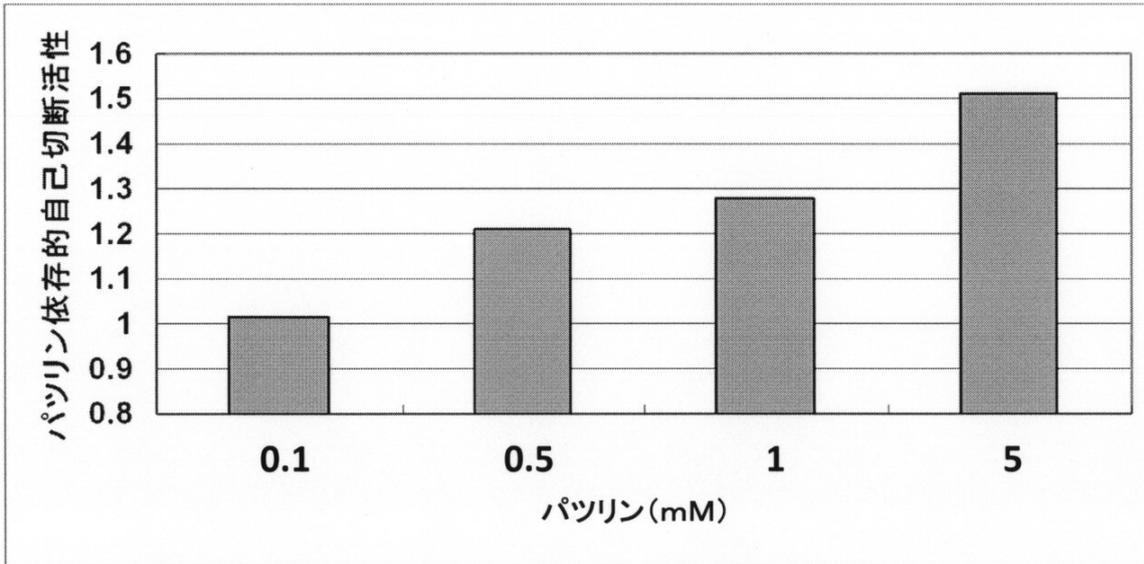


配列番号30

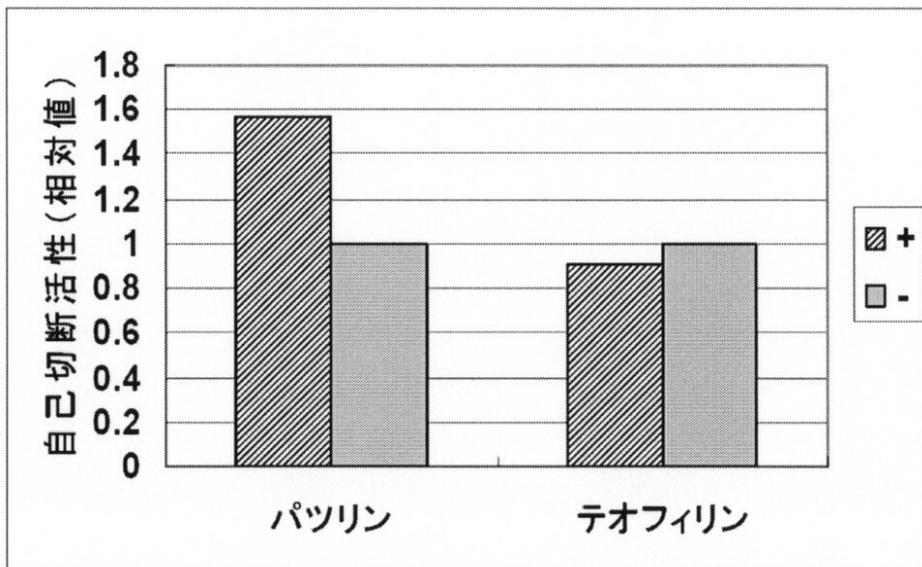
配列番号31

配列番号32

【 図 2 3 】

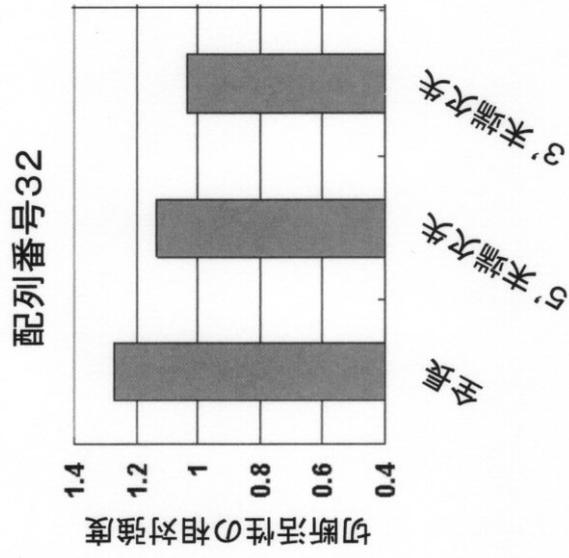


【 図 2 4 】

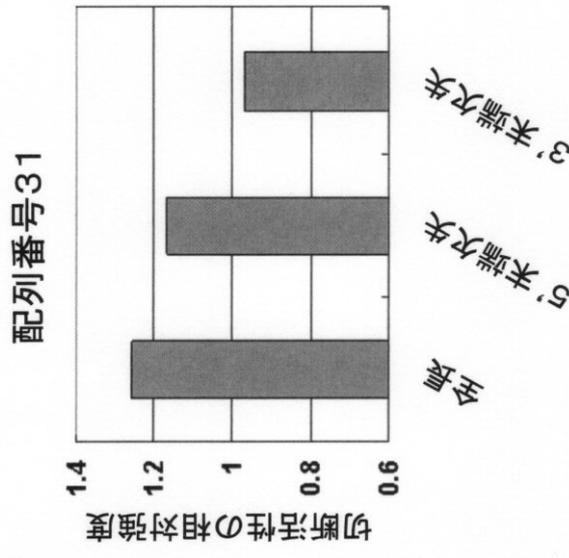


【図25】

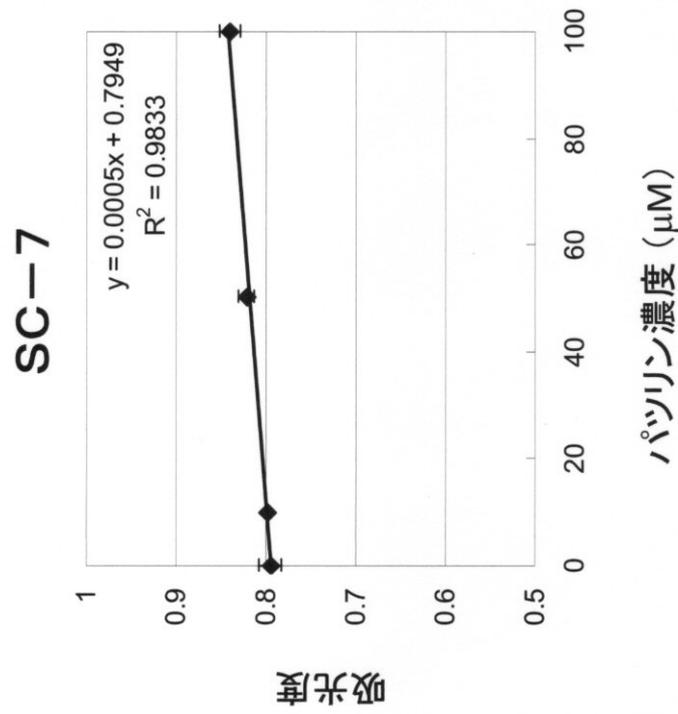
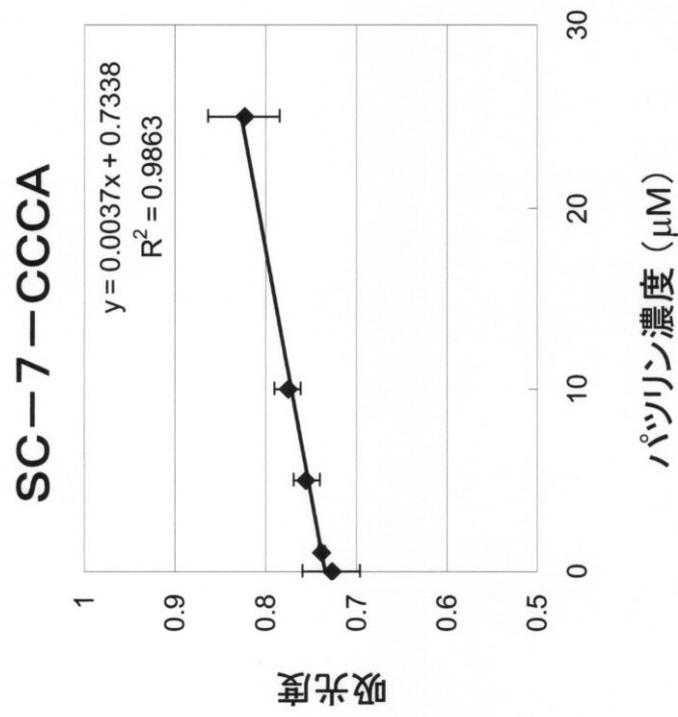
B



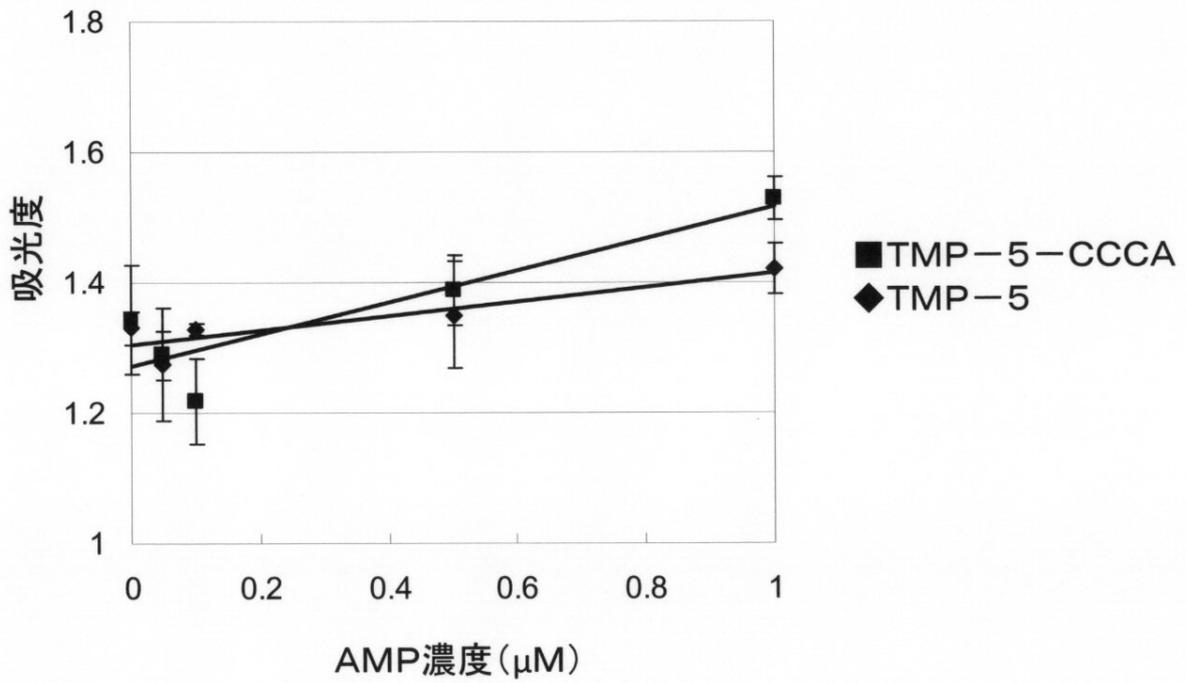
A



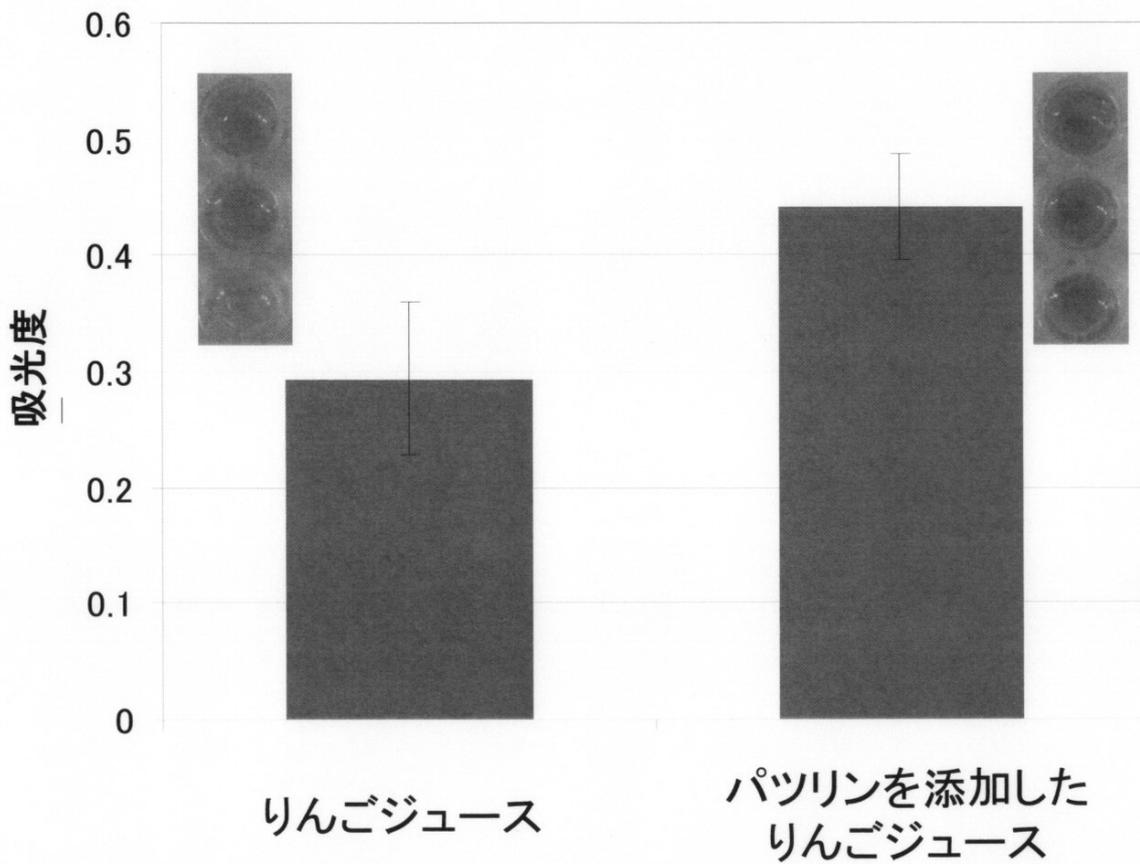
【 図 2 6 】



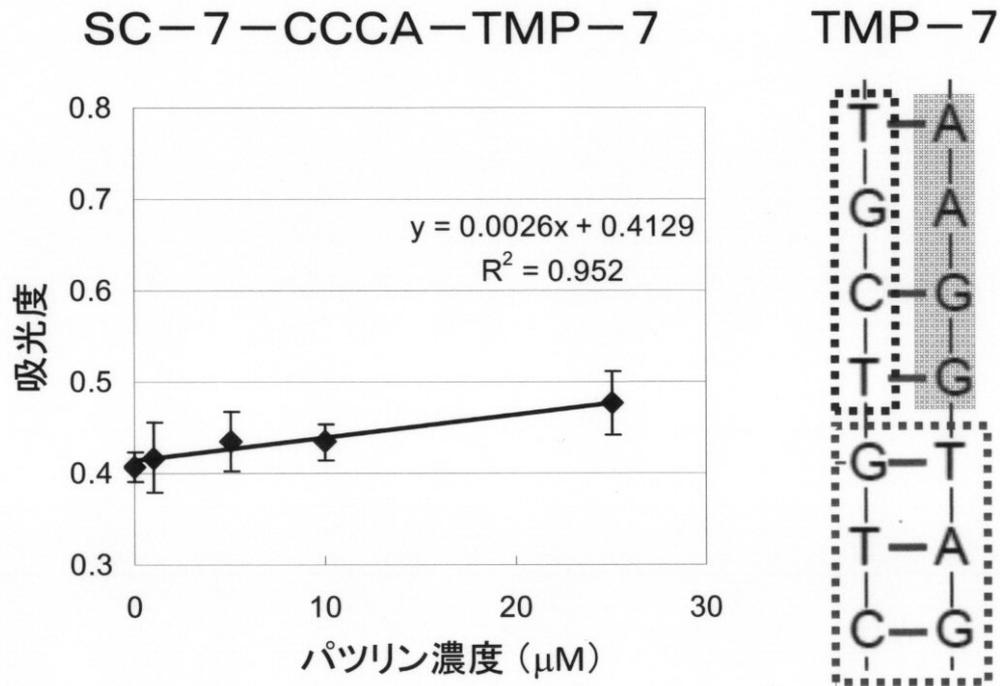
【 図 2 7 】



【 図 2 8 】



【 図 2 9 】



【 配列表 】

0005731016000001.app

フロントページの続き

審査官 北田 祐介

- (56)参考文献 特表2009-520956(JP,A)
特表2002-528109(JP,A)
特表2008-515405(JP,A)
国際公開第2012/002541(WO,A1)
特開2010-158238(JP,A)
Anal Chem., 2009年, 第81巻, 9114-9119ページ
Anal Chem., 2010年, 第82巻, 4396-4402ページ
Biosens Bioelectron., 2012年2月, 第32巻, 208-212ページ
J Nucleic Acids., 2012年10月, 2012:748913
岩谷直治記念財団研究報告書, 2004年, 第27巻, 36-38ページ

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15-90
C12M 1/00
C12Q 1/68
G01N 37/00
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS
(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq