

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015年10月1日(01.10.2015)



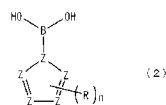
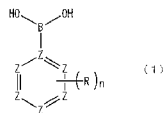
(10) 国際公開番号
WO 2015/145702 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 27/414 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/059029
- (22) 国際出願日: 2014年3月27日(27.03.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人: 国立大学法人東京医科歯科大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番45号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 宮原 裕二(MIYAHARA, Yuji); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 松元 亮(MATSUMOTO, Akira); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 三條 舞(SANJOH, Mai); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 中島 淳, 外(NAKAJIMA, Jun et al.); 〒1600022 東京都新宿区新宿4丁目3番17号 H K 新宿ビル7階 太陽国際特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,

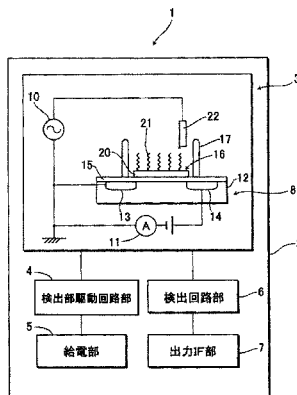
[続葉有]

(54) Title: DIPHOSPHATE COMPOUND DETECTOR AND DIPHOSPHATE COMPOUND DETECTION METHOD

(54) 発明の名称: ニリン酸化合物検出器、及びニリン酸化合物検出方法



[図1]



- 4 Detection unit drive circuit unit
5 Power supply unit
6 Detection circuit unit
7 Output IF unit

(57) Abstract: A diphosphate compound detector having: a detection unit wherein compounds indicated by general formula (1) or general formula (2) are solidified; and an electric circuit. In general formula (1) and general formula (2), each Z independently indicates a carbon atom or a nitrogen atom. However, at least one nitrogen atom is included in the ring structure. Each R independently indicates a hydrogen atom or a monovalent substituent. n indicates an integer between 0 and 5.

(57) 要約: 一般式(1)又は一般式(2)で表される化合物が固定化される検出部と、電気回路と、を有するニリン酸化合物検出器。一般式(1)及び一般式(2)中、Zは、それぞれ独立に炭素原子又は窒素原子を表す。ただし、環構造中に窒素原子が1つ以上含まれる。Rは、それぞれ独立に水素原子又は一価の置換基を表す。nは、0～5の整数を表す。



MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラ
シア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッ
パ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

ニリン酸化合物検出器、及びニリン酸化合物検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、ニリン酸化合物検出器、及びニリン酸化合物検出方法に関する。

背景技術

[0002] 現代化学、2004年7月号、vol. 400, p. 66-69, 2004年に記載されているように、DNAの塩基配列決定にはゲル電気泳動と蛍光検出を用いた方法が広く用いられている。この方法は、配列決定を行うDNA断片のコピーを沢山作製し、DNAの5'末端を始点として種々の長さの蛍光標識断片を作製する。また、これらDNA断片の3'末端の塩基種に応じて波長の異なる蛍光標識を付加しておく。ゲル電気泳動により長さの違いを1塩基の差で識別し、それぞれの断片群が発する発光を検出する。発光波長色から測定中のDNA断片群のDNA末端塩基種を知る。DNAは短い断片群から順次蛍光検出部を通過するので、蛍光色を計測することで短いDNAから順に末端塩基種を知ることができる。これにより、配列決定を行う。このような蛍光式DNAシーケンサは幅広く普及しており、また、ヒトゲノム解析にも大いに活躍した。

[0003] 一方、Electrophoresis, vol. 22, p. 3497-3504, 2001年に記載されているように、DNAの解析方法として、段階的なDNA相補鎖合成を用いるパイロシーケンシングがある。この方法ではターゲットとするDNA鎖にプライマーをハイブリダイズさせ、4種の相補鎖合成核酸基質（dATP、dCTP、dGTP、dTTP）を1種類ずつ順番に反応液に加えて相補鎖合成反応を行う。相補鎖合成反応が起るとDNA相補鎖が伸長し、副産物としてニリン酸（ピロリン酸：pp_i）が生成する。ピロリン酸は共存する酵素の働きでATPに変換され、ルシフ

ェリンとルシフェラーゼの共存下で反応して発光を生じる。この光を検出することで加えた相補鎖合成基質がDNA鎖に取り込まれたことがわかり、相補鎖の配列情報、従ってターゲットとなったDNA鎖の配列情報がわかる。

[0004] Nature, vol. 475, p. 348-352, 2011年には、バイオセンサーを用いて、DNAを検出する、又はDNA塩基配列決定する技術が報告されている。この方法では、イオンを検知するイオン感応型電解効果トランジスタ（ISFET）を用い、電界効果トランジスタ（FET：Field-Effect Transistor）のゲート電極上又はその近傍にDNAプローブを固定し、ターゲットDNAをハイブリダイズさせた時の電極の電位変化を検出したり、DNA相補鎖合成の結果生成するピロリン酸から生じる H^+ を、pHセンサーを用いて検出したりしている。

[0005] 特開2006-187251号公報では、ニリン酸化合物、特にピロリン酸は生物学的にも重要な物質であり、発光を用いてピロリン酸を検出する方法が報告されており、白濁を目途にピロリン酸を検出する方法、特開2010-200656号公報では、ピルビン酸リン酸ジキナーゼとピルビン酸デヒドロゲナーゼの2つの酵素反応を組み合わせることにより、ピロリン酸を特異的に検出・定量する簡便且つ高感度な方法などが報告されている。しかし、これらはいずれもピロリン酸を直接検出するものではなく、検出プロセスが複雑である。

[0006] 従来のピロリン酸検出法としては、パイロシーケンス法等において利用されている方法が一般的である。即ち、DNAポリメラーゼのDNA合成反応などに伴って生じるピロリン酸をATPスルフィラーゼの働きにより一旦ATPに変換し、その後ルシフェラーゼがATPを使って発光する。この現象を利用し、発光強度を計測することにより、間接的にピロリン酸の放出を定量的に計測する方法である。この方法では、3種の酵素を同じ反応槽に混在させるため各酵素の平衡定数に見合った各基質濃度の範囲内でのみ定量性が担保されている。すなわち、初期のピロリン酸放出量に応じた各酵素濃度が適切に調整されている必要があり、従ってピロリン酸検出可能な濃度の範囲

が限定的である。

[0007] 一方、特開2009-186350号公報及び特開2001-133407号公報では、ピロリン酸を含むリン酸イオン又は陰イオンが、ボロン酸基を有する化合物と反応することから、該ボロン酸基を有する化合物を蛍光標識して被検物と反応させ、生じる蛍光に基づいてピロリン酸などのリン酸イオン又は陰イオンを検出・測定する方法が報告されている。

[0008] また、Analyst, vol. 137, p. 1351-1362, 2012年には、ピロリン酸を電氣的に検出する方法として、ピロリン酸を捕らえるプローブに亜鉛ジピロリルアミン二核錯体を用い、プローブが固定化された支持体の電氣的变化を検出する方法が報告されている。

[0009] さらに、特開2013-116081号公報では、DNAポリメラーゼやDNAリガーゼにより放出されるピロリン酸を直接検出する方法として、フェニルボロン酸誘導体、メチルボロン酸誘導体、又はプロペニルボロン酸誘導体が固定化された導電性支持体と、被検物を接触させ、導電性支持体の電氣的变化を測定し、ピロリン酸を電氣的に検出する方法が提案されている。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] Analyst, vol. 137, p. 1351-1362, 2012年に記載されたピロリン酸を電氣的に検出する方法は、ピロリン酸の検出感度に優れるが、亜鉛ジピロリルアミン二核錯体とピロリン酸とが一度結合すると、分離することが困難である。そのため、繰り返し検出を行うと検出能が低下する傾向があり、繰り返し使用する用途には不向きであった。

[0011] 特開2013-116081号公報に記載されたピロリン酸を電氣的に検出する方法は、ボロン酸基を含む化合物として、フェニルボロン酸を用いるものである。一般的に、フェニルボロン酸の酸性度は低く ($pK_a = 9.0$)、生理環境下での使用が困難とされてきた。そのため、生理環境下においても使用可能な糖応答システムの開発が求められている。

[0012] 本発明は上記に鑑みなされたものであり、検出感度に優れ、繰り返し検出

可能なニリン酸化合物検出器及びニリン酸化合物検出方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

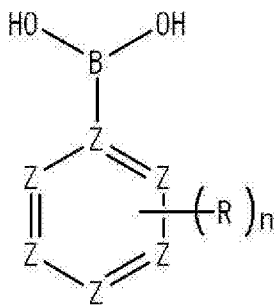
[0013] 本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討を行った結果、ボロン酸基を有する特定の含窒素複素環化合物におけるボロン酸基と、ピロリン酸とが、特異的に結合し、しかも生理環境下での使用に適しているという知見を得た。

さらに、前記ボロン酸基は、ピロリン酸（ニリン酸）単体のみならず、構造内にニリン酸基を有する化合物におけるニリン酸基とも特異的に結合するという知見を得た。

本発明は上記知見に基づいてなされたものであり、具体的には以下を包含する。

[0014] < 1 > 下記一般式（１）又は下記一般式（２）で表される化合物が固定化される検出部と、電気回路と、を有するニリン酸化合物検出器。

[0015] [化1]

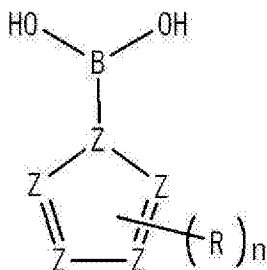


一般式（１）

[0016] 一般式（１）中、Zは、それぞれ独立に炭素原子又は窒素原子を表す。ただし、環構造中に窒素原子が１つ以上含まれる。Rは、それぞれ独立に水素原子又は一価の置換基を表す。nは、０～５の整数を表す。

[0017]

[化2]



一般式 (2)

[0018] 一般式 (2) 中、Z は、それぞれ独立に炭素原子又は窒素原子を表す。ただし、環構造中に窒素原子が 1 つ以上含まれる。R は、それぞれ独立に水素原子又は一価の置換基を表す。n は、0～5 の整数を表す。

[0019] <2> 前記一般式 (1) で表される化合物が、ピリジルボロン酸誘導体である<1>に記載のニリン酸化合物検出器。

<3> 前記検出部に接続された電界効果トランジスタ (FET) を、前記電気回路内に有する<1>又は<2>に記載のニリン酸化合物検出器。

[0020] <4> <1>～<3>のいずれか 1 つに記載されたニリン酸化合物検出器を用い、前記検出部のボロン酸基と被検物とを接触させる接触工程と、前記検出部の電気的変化を測定する測定工程と、前記電気的変化に基づいてニリン酸化合物を検出する検出工程と、を含む、ニリン酸化合物検出方法。

[0021] <5> 前記接触工程を、pH 4.0～pH 6.0 の溶液中で行う<4>に記載のニリン酸化合物検出方法。

発明の効果

[0022] 本発明によれば、検出感度に優れ、繰り返し検出可能なニリン酸化合物検出器及びニリン酸化合物検出方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0023] [図1] 検出器の構成例を示す図である。

[図2] 3-ピリジルボロン酸とピロリン酸との混合液の ^{11}B -NMR スペクトルである。

[図3] 3-ピリジルボロン酸とピロリン酸との混合液の ^{31}P -NMR スペクトルである。

ルである。

[図4]フェニルボロン酸とピロリン酸との混合液の ^{11}B -NMRスペクトルである。

[図5]4-ピリジルボロン酸とピロリン酸との混合液の ^{31}P -NMRスペクトルである。

[図6]5-ピリミジンボロン酸とピロリン酸との混合液の ^{31}P -NMRスペクトルである。

[図7]3-カルボキシ-3-ピリジルボロン酸とピロリン酸との混合液の ^{31}P -NMRスペクトルである。

[図8]3-ピリジルボロン酸とゲムシタビン-5-ニリン酸との混合液の ^{11}B -NMRスペクトルである。

[図9]実施例で用いたピロリン酸検出装置で測定された、ピロリン酸添加時の電位変化を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0024] 以下、本発明を実施するための形態について詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではなく、その趣旨の範囲内で種々変形して実施することができる。

本明細書において「～」を用いて表される数値範囲は、「～」の前後に記載される数値を下限値及び上限値として含む範囲を意味する。

本発明における「ニリン酸化合物」とは、ピロリン酸（ニリン酸）単体を含め、構造内にニリン酸基を有する化合物を意味する。

[0025] <ニリン酸化合物検出器>

本発明のニリン酸化合物検出器は、後述する一般式（1）又は一般式（2）で表される化合物が固定化された検出部と電気回路とを有する。

[0026] 特開2013-116081号公報には、ボロン酸を含む化合物が固定化された導電性支持体を備えることを特徴とするピロリン酸を電氣的に検出するためのデバイスが開示されている。特開2013-116081号公報に記載されたデバイスにおけるボロン酸を含む化合物は、フェニルボロン酸の

誘導体、メチルボロン酸の誘導体、及びプロペニルボロン酸の誘導体が好ましいとされている。これらのボロン酸を含む化合物は、 pK_a が高いため、生理環境下におけるピロリン酸の検出は困難であった。

[0027] それに対し、本発明のニリン酸化合物検出器は、検出部に含窒素複素環化合物である一般式（１）又は一般式（２）で表される化合物を用いるため、生理環境下で使用可能であり、例えば、DNA配列決定、細胞状態の解析、及び酵素反応の解析等に応用が可能である。

また、本発明の検出器は、ピロリン酸単体のみならず、ニリン酸化合物についても好適に検出することができる。

ニリン酸化合物として、例えば、ピロリン酸、ゲムシタビンニリン酸、アシクロビルニリン酸、シクロサルヌクレオチド、ニリン酸化ジドブジン、ニリン酸化ジダノシン、ニリン酸化ザルシタビン、ニリン酸化スタブジン、ニリン酸化ラミブジンなどが挙げられる。

[0028] 以下、本発明のニリン酸化合物検出器の構成部分について説明する。

[0029] <<検出部>>

本発明のニリン酸化合物検出器は、下記一般式（１）又は下記一般式（２）で表される化合物の少なくとも１種が固定化される検出部を有する。

本発明のニリン酸化合物検出器における検出部は、一般式（１）又は一般式（２）で表される化合物が、支持体に固定化されている構成であることが好ましい。

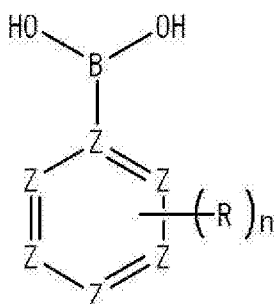
また検出部は、更に信号変換器を含んでもよい。

[0030] 本発明における一般式（１）又は一般式（２）で表される化合物と、ニリン酸化合物は特異的に反応し結合するため、本発明の検出器において、ニリン酸化合物を感度良く検出することができる。

また、一般式（１）又は一般式（２）で表される化合物とニリン酸化合物は可逆的に共有結合を形成するため、本発明のニリン酸化合物検出器は、繰り返し検出が可能である。

[0031]

[化3]



一般式 (1)

[0032] 一般式 (1) 中、Z は、それぞれ独立に炭素原子又は窒素原子を表す。ただし、環構造中に窒素原子が 1 つ以上含まれる。

一般式 (1) 中、Z は、1 つ～3 つが窒素原子であることが好ましく、1 つ～2 つが窒素原子であることがより好ましく、1 つが窒素原子であることが更に好ましい。なお、一般式 (1) 中、ボロン酸基 ($-B(OH)_2$) は、窒素原子に結合してもよく、炭素原子に結合してもよいが、炭素原子に結合することが好ましい。

[0033] 一般式 (1) 中、R は、それぞれ独立に水素原子又は一価の置換基を表す。

一般式 (1) 中、R が、一価の置換基であり、かつ複数の場合は、支持体と反応性を示す基を末端に有する置換基を少なくとも 1 つ含むことが好ましい。

支持体と反応性を示す基との具体例としては、チオール基、アミノ基、スクシンイミド基、マレイミド基、ヒドロキシ基、カルボキシ基、アジド基、アルキン基などが挙げられる。

一般式 (1) 中、R が、複数であり、かつ隣接する場合、隣接する置換基が互いに結合して、環構造を形成してもよい。

置換基が互いに結合して形成される環構造は、3 員環～8 員環が好ましく、5 員環～6 員環がより好ましい。また、置換基が互いに結合して形成される環構造は、芳香族環であっても、複素環であってもよい。

[0034] 一般式 (1) 中、R で表される一価の置換基として、炭素数 1 ～炭素数 2

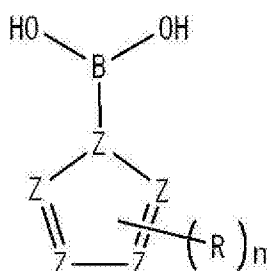
0のアルキル基、炭素数1～炭素数20のアルカンチオール基、ハロゲン原子、カルボキシ基、ヒドロキシ基、アミノ基、ニトロ基、メトキシ基、エトキシ基、モルホリノ基、シアノ基などが挙げられる。これらの中でも、金基板へ導入するための分子配列構造の観点から、アルカンチオール基が好ましい。

[0035] 一般式(1)中、 n は、0～5の整数を表し、1～4が好ましく、1～3がより好ましく、1～2が更に好ましい。

[0036] 本発明における一般式(1)で表される化合物は、一般式(1)中、 Z のうち1つ～3つが窒素原子であり、 R が水素原子、アルキル基、ハロゲン原子、カルボキシ基、アミノ基、ヒドロキシ基、フルオロ基、メトキシ基、エトキシ基、ニトロ基、モルホリノ基であり、 n が1～4であることが好ましく、一般式(1)中、 Z のうち1つ～2つが窒素原子であり、 R が水素原子、アルキル基、ハロゲン原子、カルボキシ基、アミノ基、ヒドロキシ基、フルオロ基、メトキシ基、エトキシ基、ニトロ基、モルホリノ基であり、 n が1～2であることがより好ましく、一般式(1)中、 Z のうち1つが窒素原子であり、 R が水素原子、アルキル基、ハロゲン原子、カルボキシ基、アミノ基、ヒドロキシ基、フルオロ基、メトキシ基、エトキシ基、ニトロ基、モルホリノ基であり、 n が1～2であることがさらに好ましい。

[0037] 本発明における一般式(1)で表される化合物の具体例として、ピリジルボロン酸、フルオロピリジルボロン酸、ピリミジニルボロン酸、キノリンボロン酸などが挙げられる。これらの中でも、ピリジルボロン酸、ピリミジニルボロン酸、キノリンボロン酸が好ましく、ピリジルボロン酸がより好ましい。

[0038] [化4]



一般式(2)

[0039] 一般式(2)中、Zは、それぞれ独立に炭素原子又は窒素原子を表す。ただし、環構造中に窒素原子が1つ以上含まれる。

一般式(2)中、Zは、1つ～3つが窒素原子であることが好ましく、1つ～2つが窒素原子であることがより好ましく、1つが窒素原子であることが更に好ましい。なお、一般式(2)中、ボロン酸基は、窒素原子に置換してもよく、炭素原子に置換してもよいが、炭素原子に置換することが好ましい。

[0040] 一般式(2)中、Rは、前記一般式(1)中のRと同義である。

[0041] 一般式(2)中、nは、0～4の整数を表し、1～3が好ましく、1～2がより好ましく、1が更に好ましい。

[0042] 本発明における一般式(2)で表される化合物は、一般式(2)中、Zのうち1つ～3つが窒素原子であり、Rが水素原子、アルキル基、ハロゲン原子、カルボキシ基、アミノ基、ヒドロキシ基、メトキシ基、エトキシ基、ニトロ基、モルホリノ基、ベンジル基であり、nが1～4であることが好ましく、

一般式(2)中、Zのうち1つ～2つが窒素原子であり、Rが水素原子、アルキル基、ハロゲン原子、カルボキシ基、アミノ基、ヒドロキシ基、メトキシ基、エトキシ基、ニトロ基、モルホリノ基、ベンジル基であり、nが1～2であることがより好ましく、

一般式(2)中、Zのうち1つが窒素原子であり、Rが水素原子、アルキル基、ハロゲン原子、カルボキシ基、アミノ基、ヒドロキシ基、メトキシ基、エトキシ基、ニトロ基、モルホリノ基、ベンジル基であり、nが1～2であることがさらに好ましい。

[0043] 本発明における一般式(2)で表される化合物の具体例として、ピラゾールボロン酸、ピロールボロン酸、インドールボロン酸、インダゾールボロン酸などが挙げられる。

[0044] (支持体)

本発明における一般式（１）又は一般式（２）で表される化合物は、式中 R で表される置換の少なくとも１つと支持体とが結合し、固定化することができる。

本発明における支持体は、当技術分野で一般的に用いられるものから選択して用いることができる。中でも、電気的方法で被検物を検出できる点から、導電性支持体を用いることが好ましい。

[0045] 導電性支持体の具体例としては、貴金属（金、銀、白金、パラジウム、ロジウム、イリジウム、ルテニウム等）、銅、アルミニウム、タングステン、モリブデン、クロム、チタン、ニッケル等の金属；ステンレス、ハステロイ、インコネル、モネル、ジュラルミン等の合金；半導体素子等の電極（トランジスタ、FET など）；シリコン；ガラス、石英ガラス、熔融石英、合成石英、アルミナ、サファイア、セラミクス、フォスファイト及び感光性ガラス等のガラス材料；ポリエステル、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ナイロン、アクリル、ポリカーボネート、ポリエチレンテレフタレート（PET）、ポリウレタン、フェノール樹脂、メラミン樹脂、エポキシ樹脂及びポリ塩化ビニル等のプラスチック；アガロース、デキストラン、セルロース、ポリビニルアルコール、ニトロセルロースが挙げられる。

[0046] また、非導電性支持体を導電性材料で被覆したものも導電性支持体として用いることができる。導電性支持体の形状も、特に限定はなく、平面により形成されるもの（例えばタイタープレート、多孔質及び細孔アレー、マイクロ流路など）、平板、フィルム、チューブ及び粒子（磁性粒子等）が挙げられる。導電性支持体は、後述する電気的変化の測定を簡便かつ効率的に行うための電極であってもよい。

[0047] これらの中でもニリン酸化合物を高感度かつ定量的に測定する観点から、多孔性薄膜、または細孔アレー形状などが好ましく、細孔アレー形状がより好ましい。

[0048] （支持体への固定化方法）

一般式（１）又は一般式（２）で表される化合物を支持体に固定する方法

は、特に限定されるものではない。例えば、共有結合、イオン結合、物理吸着によって一般式（１）又は一般式（２）で表される化合物を支持体に固定することができる。

具体例として、一般式（１）又は一般式（２）で表される化合物を混和させた溶液（例えばエタノールなどの有機溶媒中）を支持体上に塗布し、乾燥させることにより支持体の表面に一般式（１）又は一般式（２）で表される化合物を固定する方法が挙げられる。

また、一般式（１）又は一般式（２）で表される化合物が置換基を有する場合には、支持体の性質や固定化させる化合物の性質に合わせ、適宜、化学反応又は酵素反応などにより固定する方法が挙げられる。さらに、一般式（１）又は一般式（２）で表される化合物は、スペーサー配列、例えば１個～１０個の炭素原子を含む炭化水素基を介して、支持体に固定させる方法も挙げられる。

[0049] 一般式（１）又は一般式（２）で表される化合物を、共有結合によって支持体に固定する場合は、例えば、一般式（１）又は一般式（２）で表される化合物における置換基Ｒの末端と、支持体に導入された反応性の官能基と、を反応させることにより実施できる。

また、一般式（１）又は一般式（２）で表される化合物が支持体（例えば貴金属）と共有結合可能な置換基Ｒの末端を有する場合には、その置換基Ｒの末端を利用して、一般式（１）又は一般式（２）で表される化合物を金や白金等の貴金属支持体に共有結合を介して固定することができる。この方法によれば、金や白金等は原子レベルで配列制御ができる。すなわち金属結晶として成長させた格子面は１原子レベルの凹凸も無い平板状加工が可能である。前記格子面に一般式（１）又は一般式（２）で表される化合物の単分子層を構築することにより、ピロリン酸を検出するための平板状支持体を得ることができる。すなわち、この一般式（１）又は一般式（２）で表される化合物の単分子層を持つ金属材でできた支持体上に分子の配向が制御された上で、高さが制御された検出部を提供することができる。

また、この一般式（１）又は一般式（２）で表される化合物の単分子層を持つ金属材でできた支持体上に、ボロン酸基と結合可能なペプチドタグを介して任意のタンパク質分子を結合させることで、金属平面上にその分子の配向が制御された上で、かつ数オングストロームの誤差で固定された分子の高さが制御されたデバイスを提供することができる。

例えば、支持体の表面上に分子を同一配向で保持されている単分子膜として固定化することができる。

[0050] また例えば、一般式（１）で表される化合物の置換基 R の末端としてアミノ基を使用し、支持体に活性エステル基、エポキシ基、アルデヒド基、カルボジイミド基、イソチオシアネート基又はイソシアネート基を導入することにより共有結合を形成できる。

また、置換基 R の末端としてチオール基を使用し、支持体に活性エステル基、マレイミド基又はジスルフィド基を導入してもよい。活性エステル基としては、例えば、p-ニトロフェニル基、N-ヒドロキシスクシンイミド基、コハク酸イミド基、フタル酸イミド基、5-ノルボルネン-2、3-ジカルボキシイミド基等が挙げられる。

官能基を支持体に導入する方法の一つとしては、所望の官能基を有するシランカップリング剤（γ-アミノプロピルトリエトキシシランなど）によって支持体表面を処理する方法が挙げられる。別の方法としては、プラズマ処理が挙げられる。

[0051] 上述のようにして、一般式（１）又は一般式（２）で表される化合物を支持体に固定することができる。

[0052] 本発明の好ましい実施形態は、支持体に金電極を用い、3-ピリジルボロン酸にアルカンチオールを導入し、金電極上にアルカンチオール誘導体の自己組織化単分子膜（Self-Assembled Monolayer; SAM）を生成し、ピロリン酸検出用電極とする。

[0053] 本発明では別の方法として、一般式（１）又は一般式（２）で表される化合物が、置換基 R として架橋性の官能基（例えば、水酸基など）を有する場

合、架橋分子を用いて架橋することにより、一般式（１）又は一般式（２）で表される化合物自体で支持体（固定化基材）を形成する方法が挙げられる。架橋分子としては、多価アルコール、例えばポリビニルアルコールや、多糖類、例えばデキストランなどが挙げられる。

[0054] 形成することができる支持体（固定化基材）としては、固体、高分子膜、高分子半透膜、フィルム、固相ゲル及び液相ゲルなどが挙げられる。したがって、本発明は、一般式（１）又は一般式（２）で表される化合物を、半透膜などのフィルム状物質や、様々な含水率を有するゲル状物質中に安定的に共有結合により固定化した検出部とすることもできる。また、これらの支持体は、微小な、例えばマイクロメートル又はナノメートルのサイズとすることが可能である。

[0055] さらに、このように固定された一般式（１）又は一般式（２）で表される化合物のボロン酸基を利用して、他にも様々な分子（タンパク質など）を支持体に固定することが可能である。

一般式（１）又は一般式（２）で表される化合物や他のタンパク質分子を電極等の貴金属支持体上に配向制御した状態で結合させることができるため、固定化した化合物又は分子（例えばタンパク質、とりわけ酵素）の活性部位を貴金属支持体表面から約１００オングストローム以内におさめて固定することも可能となる。これにより、数十から百数十オングストロームと推定されている電界効果トランジスタ（ＦＥＴ）のデバイ長内に化学反応又は酵素反応（種々の電荷移動反応を含むことが多い）を惹起させることが可能となる。そのため、ピロリン酸の検出反応又は任意の酵素反応を、ＦＥＴにより検出する系の構築が可能となる。例えば、単金属結晶からなる完全に平板な支持体上に配向及び高さを揃えて一般式（１）又は一般式（２）で表される化合物を固定した検出部は、ＦＥＴなどのセンサーチップに好適である。

[0056] ここで、電界効果トランジスタ（ＦＥＴ）とは、電氣的検出を利用したセンサーに汎用されている技術である。原理としては、ソース電極からドレイン電極へ流れる電流を、第三の電極であるゲート電極で制御し、そのゲート

電極表面で分子間相互作用を起こさせるとゲート電極の電荷が変化するため、電流的応答が変化する。

[0057] FETはセンサーチップ上に電荷移動が生じる反応が起こった場合、高感度な検出ができるが、検出できる距離が支持体表面から数ナノメートルとされている。そのため、上述のように配向が制御され、かつ高さが高精度で揃えられた一般式(1)又は一般式(2)で表される化合物を固定した支持体(例えば金属結晶基盤)の場合、検出限界内で有効に電荷移動反応を検出することが可能である。

[0058] ピロリン酸の検出の際、一般式(1)又は一般式(2)で表される化合物が固定された支持体を溶液中に配置されることが好ましい。使用する溶液は、特に限定されるものではなく、被検物(ピロリン酸を生じる反応)の種類、支持体の種類などに応じて適宜選択することができる。例えば、水、生理食塩水、リン酸緩衝液(PBS)、Tris緩衝液、酢酸緩衝液、炭酸緩衝液、ホウ酸緩衝液などの水性緩衝液が挙げられる。

[0059] これらの溶液の中でも、一般式(1)又は一般式(2)で表される化合物とピロリン酸との反応性の観点から、前記溶液は、pH8.0以下であることが好ましく、pH3.0～pH7.0であることがより好ましく、pH4.0～pH6.0であることが更に好ましい。

[0060] また、本発明の検出部の他の実施態様として、一般式(1)又は一般式(2)で表される化合物を固定化した支持体を固相基板(例えば、ガラスなど)に接合する態様が挙げられる。この固相基板の一端面から支持体に臨界角以上の角度でレーザー光を入射することにより、支持体表面に固定化された化合物との境界面に表面プラズモンを発生させることができ、表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance: SPR)を利用して、ピロリン酸の検出が可能である。固相基板は、例えば、図1のゲート絶縁膜15に代えて配置した態様とすることができる。

[0061] また、本発明の検出部の他の実施態様として、一般式(1)又は一般式(2)で表される化合物を固定化した支持体を水晶振動子に接合し、水晶振動

子マイクロバランス (Quartz Crystal Microbalance : QCM) センサーとする態様が挙げられる。QCMセンサーは、共振周波数変化から、水晶振動子を介して、支持体表面に固定化された化合物に吸着又は結合した微量物質の質量測定することができ、これによりピロリン酸の検出が可能である。

[0062] (信号変換器)

本発明のニリン酸化合物検出器における検出部は、信号変換器を含んでもよい。信号変換器は、化学反応に伴う、表面プラズモン変化、質量変化、化学ポテンシャル、熱、及び光学的な変化などの信号を電気信号に変換することができる。

これにより、一般式(1)又は一般式(2)で表される化合物とニリン酸化合物が結合するときに生じる表面プラズモン変化、質量変化、化学ポテンシャル、熱、及び光学的な変化などの信号が電気信号に変換され、検出部から電気的变化として出力される。

その結果、本発明のニリン酸化合物検出器において、熱変化、光学的変化などによるニリン酸化合物の検出が可能となる。

[0063] <<電気回路>>

本発明のニリン酸化合物検出器は、電気回路を有する。

電気回路は、前記検出部に接続され、検出部における電気的变化(前記信号変換器により変換された電気信号の変化を含む)を、電圧変化測定器等によって測定することができる。電圧変化測定器は、微小な電圧変化を測定可能な測定器、又は微小な電圧変化に惹起される電極内電子移動(微小電流)を検知可能な測定器であればいかなる回路構成を有する測定器でもよい。

[0064] 本発明の検出器の構成例について、図1を用いて説明する。

本発明のニリン酸化合物検出器1は、検出部3と、この検出部3に信号を与えて駆動させる検出部駆動回路部4と、各回路部に電源を供給する給電部5と、検出部3からの出力を処理して検出信号を出力する検出回路部6と、検出信号を外部に出力するための出力インターフェース(出力IF)部7とが

、プリント実装基板 2 上に一体的に形成され、集積化された構成を有する。

検出部 3 は、検出媒体となる電界効果トランジスタ(以下、F E Tとも呼ぶ) 8 を備えており、プリント実装基板 2 上に実装された検出部駆動回路部 4 の制御信号を基に、電源 1 0 から給電される電力により駆動し得る。實際上、この検出部 3 は、F E T 8 から出力される電流計 1 1 でサンプリングし、その検出結果を検出回路部 6 に送出し得る。これにより、ニリン酸化合物検出器 1 では、F E T 8 からの検出結果を検出回路部 6 で処理し所定の検出信号として出力 I F 部 7 から取り出し得るようになされている。

ここで F E T 8 は、半導体基板 1 2 の表面に形成されたソース 1 3 及びドレイン 1 4 と、これら半導体基板 1 2、ソース 1 3 及びドレイン 1 4 上に形成されたゲート絶縁膜 1 5 の表面に一般式 (1) 又は一般式 (2) で表される化合物を固定化した支持体 (検出デバイス) 1 6 が設けられた構成を有する。實際上、ゲート絶縁膜 1 5 の上には、検出デバイス 1 6 を測定セル壁 1 7 が取り囲んだ検出領域が形成されており、当該測定セル壁 1 7 によって区画された検出領域内に、ピロリン酸等のニリン酸化合物溶液を留め得るようになされている。

かかる構成に加えて検出デバイス 1 6 は、例えば金蒸着薄膜からなる支持体 2 0 の一面を一般式 (1) 又は一般式 (2) で表される化合物 2 1 で被覆した構成を有し、支持体 2 0 がゲート絶縁膜 1 5 に形成され、一般式 (1) 又は一般式 (2) で表される化合物 2 1 が検出表面として検出領域内に露出し得るように構成されている。このとき支持体 2 0 は、ゲートとして機能する。

このような F E T 8 は、例えば参照電極 2 2 を用いて、支持体 2 0 に対して電圧が印加され、かつこの状態でニリン酸化合物溶液が検出領域に流入されて当該参照電極 2 2 と検出表面とがニリン酸化合物溶液中に入れられることで、ソース 1 3 及びドレイン 1 4 間に電流が流れる。

因みに、この実施形態では、検出部 3 を含めて全ての構成を単一のプリント実装基板 2 上に集積化することが可能であり、非常に小型で、かつ簡便な

構成によりピロリン酸を検出することができる。また、F E T 8は、検出表面上に備えた分子固有電荷をトランジスタ特性変化と同期させて検出する非侵襲・非標識計測法であり、リアルタイム計測も可能となる。さらにこのF E T 8は、レーザー等の光学系機器が不要となる分だけコスト低減や小型化を図ることもでき、また半導体加工技術による高密度・超並列化が容易に行え、ハイスループットシステム化において求められる主要要件を潜在的に網羅する。

[0065] <ニリン酸化合物検出方法>

本発明のニリン酸化合物検出方法は、既述のニリン酸化合物検出器を用い、ニリン酸化合物検出器の検出部と被検物を接触させる工程と、前記検出部の電気的変化を測定する測定工程と、前記電気的変化に基づいてニリン酸化合物を検出する工程を有する。

[0066] 本発明のニリン酸化合物検出方法は、既述のニリン酸化合物検出器を用いるため、検出感度に優れる。

以下に、本発明のニリン酸化合物検出方法の各工程について詳細に説明する。

[0067] <<接触工程>>

本発明のニリン酸化合物検出方法は、少なくとも一般式（１）又は一般式（２）で表される化合物が固定化された検出部のボロン酸基と被検物とを接触させる接触工程を有する。

[0068] 本発明において「被検物」とは、ニリン酸化合物を検出しようとする対象であり、例えばピロリン酸を生じる反応物、化学反応又は酵素反応の反応液などが含まれる。また「接触」は、被検物が検出部における支持体と近接するような操作を意味する。例えば被検物（液体）を検出部における支持体に添加すること、被検物（液体）を検出部における支持体が配置された溶液中に添加し混和すること、検出部における支持体上で化学反応又は酵素反応を行うこと、などを包含する。

[0069] 前記接触工程は、一般式（１）又は一般式（２）で表される化合物とニリ

ン酸化合物との反応性の観点から、溶液中で行われることが好ましい。

また、溶液は、pH 8.0以下であることが好ましく、pH 3.0～pH 7.0であることがより好ましく、pH 4.0～pH 6.0であることが更に好ましい。

[0070] 《測定工程》

本発明のニリン酸化合物検出方法は、検出部の電気的変化を測定する測定工程を含む。

本発明において「電気的変化」とは、当技術分野で公知であり、検出部における電位の変化を指し、電圧・電流の変化として測定することができる。電気的変化は、検出部に接続した電気回路を介して電圧変化測定器等によって測定することができる。電圧変化測定器は、微小な電圧変化を測定可能な測定器、又は微小な電圧変化に惹起される電極内電子移動（微小電流）を検知可能な測定器であればいかなる回路構成を有する測定器でもよい。

例えば、微小な電圧変化を測定するためにトランジスタ、好ましくは電界効果トランジスタ（FET）、又は同等の微小電流測定系を回路内に有する測定器を用いることができる。好ましい実施形態においては、検出部として電極を採用し、一般式（1）又は一般式（2）で表される化合物を固定した電極をFETのゲート電極とし、その電気的変化を経時的に観察できる装置構成を用いる。変化を測定するため、被検物との接触前の電圧又は微小電流や、被検物を接触させない対照の電圧又は微小電流を測定して、接触後の電圧又は微小電流と比較することにより電気的変化を測定してもよい。

[0071] また、本発明における電気的変化には、信号変換器により他の信号から電気信号に変換されたものも含まれる。すなわち、信号変換器を用いることにより、本発明の測定工程において一般式（1）又は一般式（2）で表される化合物とニリン酸化合物が結合するときに生じる表面プラズモン変化、質量変化、化学ポテンシャル、熱、及び光学的な変化についても測定が可能である。

[0072] 《検出工程》

本発明のニリン酸化合物検出方法は、検出部の電気的变化に基づいてニリン酸化合物を検出する検出工程を含む。

電気的变化が測定された場合には、被検物中のニリン酸化合物の存在が検出される。電気的变化は、ニリン酸化合物の存在量に応じてその変化の程度も変わるため、電気的变化の程度を測定することにより、ニリン酸化合物を定量することも可能である。

[0073] 本発明の一態様においては、被検物としてDNAポリメラーゼの反応物を用いる。すなわち、検出対象となるピロリン酸は、ターゲットDNA又はRNAを鋳型としたDNAポリメラーゼによるDNA相補鎖合成により放出されるピロリン酸である。

DNAポリメラーゼは、ターゲットDNA又はRNAに適合するデオキシリボ核酸（ヌクレオチド三リン酸：dATP、dCTP、dGTP又はdTTP）が基質として取り込まれた際にピロリン酸を放出する。そのため、未知配列のターゲットDNAを鋳型として用いて、4種のデオキシリボ核酸（基質）を順次添加し、ピロリン酸を検出することにより、配列に適合した基質の取り込みの有無を判定し、最終的にはターゲットDNAの塩基配列を決定することが可能となる。またDNAの段階的な相補鎖合成をモニターすることにより、ターゲットDNAの塩基配列の全体又は一部を決定することができる。

さらに、ターゲットDNA又はRNAを鋳型としたDNAポリメラーゼによるDNA相補鎖合成により放出されるピロリン酸を検出することにより、配列に適合した基質の取り込みの有無を判定し、ターゲットDNA又はRNAの塩基配列の全体又は一部を決定する。これにより最終的にはターゲットDNA又はRNAを検出又は定量することができる。

[0074] 本発明のニリン酸化合物検出方法の別の態様として、一般式（1）又は一般式（2）で表される化合物に、色素化合物を組み合わせ、ニリン酸化合物を光学的に検出する方法が挙げられる。

この方法では、一般式（1）又は一般式（2）で表される化合物とニリン

酸化化合物との反応に伴う色素化合物の紫外線吸収特性、可視光吸収特性、赤外線吸収特性、蛍光スペクトル、及び円偏光二色吸光度の変化などを検出し、ニリン酸化化合物を検出することができる。

実施例

[0075] 以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はその主旨を越えない限り、以下の実施例に限定されるものではない。なお、特に断りがない限り、「%」及び「部」は質量基準である。

[0076] (参考例1)

3-ピリジルボロン酸 (3-PyBA) 及びピロリン酸 (PPi) をそれぞれ 20 mM になるよう純水に溶解させ、3-PyBA/PPi 混合液を調製した。1 M 塩酸又は 1 M 水酸化ナトリウムを用い、前記混合液の pH を種々の値に調整した。

各 pH の混合液の ^{11}B -NMR スペクトルを、 ^{11}B -NMR 装置 (JEOL 社製、AL300) を用いて、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, $\delta = 0 \text{ ppm}$) を外部標準として測定を行った。測定結果は図 2 に示す。

また、各 pH の混合液の ^{31}P -NMR スペクトルを、 ^{31}P -NMR 装置 (Burker 社製、ADVANCE III 400) を用いて、リン酸トリフェニル ($\text{PO}_4(\text{C}_6\text{H}_5)_3$, $\delta = -17.8 \text{ ppm}$) を外部標準として測定を行った。測定結果は図 3 に示す。

[0077] (参考例2)

参考例1における 3-PyBA をフェニルボロン酸 (PBA) に変えた以外は、参考例1と同様にして、各 pH の混合液の ^{11}B -NMR スペクトルを測定した。測定結果は図 4 に示す。

[0078] 図 2 に示すように参考例1では、いずれの pH の混合液においても、0 ppm 付近に 3-PyBA と PPi が結合して生成した化合物に起因するピークが観測される。

一方、図 4 に示すように参考例2では、0 ppm 付近にピークが現れず、

いずれの pH の混合液においても、PBA と PPI が結合していないことがわかる。

[0079] (参考例 3)

参考例 1 における 3-PyBA を 4-ピリジルボロン酸 (4-PyBA) に変えた以外は、参考例 1 と同様にして、各 pH の混合液の ^{31}P -NMR スペクトルを測定した。測定結果は図 5 に示す。

[0080] (参考例 4)

参考例 1 における 3-PyBA を 5-ピリミジンボロン酸に変えた以外は、参考例 1 と同様にして、各 pH の混合液の ^{31}P -NMR スペクトルを測定した。測定結果は図 6 に示す。

[0081] (参考例 5)

参考例 1 における 3-PyBA を 3-カルボキシ-3-ピリジルボロン酸に変えた以外は、参考例 1 と同様にして、各 pH の混合液の ^{31}P -NMR スペクトルを測定した。測定結果は図 7 に示す。

[0082] (参考例 6)

参考例 1 におけるピロリン酸をゲムシタビン-5-ニリン酸に変え、混合液として 3-ピリジルボロン酸 (3-PyBA) が 10 mM、ゲムシタビン-5-ニリン酸が 4 mM になるよう純水に溶解させ 3-PyBA/ゲムシタビン-5-ニリン酸混合液を調整した。混合液の pH は 5 に調整した。得られた混合液の ^{11}B -NMR スペクトルを参考例 1 と同様にして測定した。測定結果は図 8 に示す。

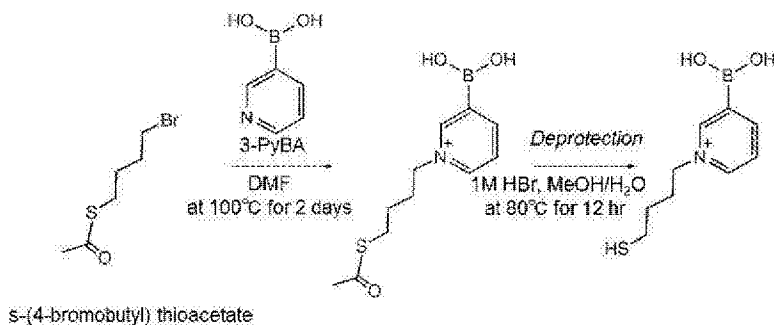
[0083] 図 3 及び図 5～図 8 に示すように、参考例 1 及び参考例 3～参考例 6 では、いずれの pH 混合液においても、 ^{31}P -NMR スペクトルにおいては -12 ppm 付近にピークが観測され、 ^{11}B -NMR スペクトルにおいては 0 ppm 付近にピークが観測される。これらのピークは、ボロン酸基とニリン酸化合物の結合に由来するピークであり、参考例 1 及び参考例 3～参考例 6 のいずれの化合物においても、ニリン酸化合物との結合が確認された。

[0084] (実施例 1)

＜検出部の作製＞

3-ピリジルボロン酸（3-PyBA）を金基板表面へ固定化するため、3-PyBAに対してチオール基の導入を行った。導入方法は、下記スキームに示すように3-PyBAのピリジン窒素に対してチオ酢酸S-ブロモブチルを反応させ、チオ酢酸の脱保護により行った。

[0085] [化5]



[0086] 得られたアルカンチオール誘導体を濃度0.5 mMとなるようにメタノールに溶解させアルカンチオール誘導体のメタノール溶液を得た。金スパッタ薄膜基板をこの溶液に半日間浸漬し、金基板上に3-PyBAを導入した自己組織化膜（3-PyBA-SAM）を形成させた。

一方、半導体基板の表面に、ソース及びドレインを形成し、さらにその上にゲート絶縁膜を形成した。ゲート絶縁膜の表面に3-PyBA-SAMを形成させた金基板を積層し、3-PyBAを固定化させた検出部を得た。

[0087] ＜検出器の作製＞

上記で得られた3-PyBAを固定させた検出部と、この検出部に信号を与えて駆動させる検出器駆動回路部と、各回路部に電源を供給する給電部と、検出部からの出力を処理して検出信号を出力する検出回路部と、検出信号を外部に出力するための出力インターフェース（I/F）部とを、プリント実装基板上に形成した。なお、検出器駆動回路部、給電部、検出回路部、及び出力インターフェース部を総称して電気回路とも呼ぶ。

[0088] 上記で得られた検出器の3-PyBAを固定化させた検出部を、50 mM酢酸緩衝液（pH=5）に浸漬させ、純水に溶解させたピロリン酸（PPi

）を緩衝溶液に加え、緩衝溶液中で、前記検出部とピロリン酸を接触させた。なお、純水に溶解させたピロリン酸は、緩衝溶液に加えた後のピロリン酸の濃度が0.2 mM、0.38 mM、0.57 mM、0.74 mM、及び0.91 mMとなるように、5回に分け、10 μ l ずつ添加した。

ピロリン酸を添加した時の検出部の電位変化を測定し、ピロリン酸を検出した。

[0089] (比較例1)

実施例1におけるピロリン酸を一リン酸に変更した以外は、同様にして、一リン酸を添加した時の検出部の電位変化を測定した。

[0090] 実施例1及び比較例1の測定結果を図9に示す。

図9において、横軸は電位測定を開始してからの経過時間を表し、縦軸は電位変化を表す。ピロリン酸（ニリン酸；PPi）及び一リン酸（Pi）はグラフ中に矢印で示したタイミングで添加した。

[0091] 図9に示されるように、ピロリン酸の添加に応答して電位変化が検出器部の電位変化が観測される。一方、一リン酸を添加した場合、電位変化は観測されない。すなわち、3-PyBAを固定化させた検出部を有する検出器において、ピロリン酸が検出可能であることがわかる。

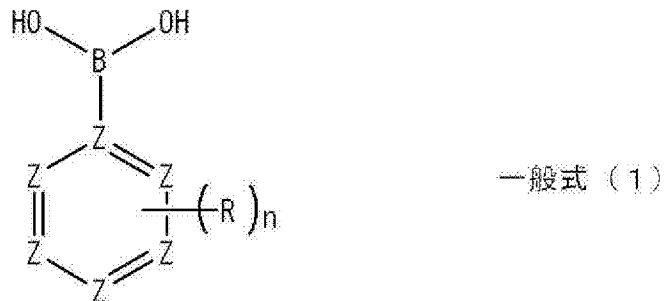
産業上の利用可能性

[0092] 本発明によると、検出感度に優れ、繰り返し検出可能なニリン酸化合物検出器及びニリン酸化合物検出方法を提供することが可能となった。

請求の範囲

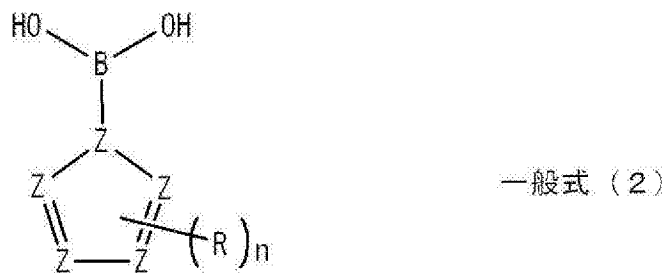
[請求項1] 下記一般式（１）又は下記一般式（２）で表される化合物が固定化される検出部と、電気回路と、を有するニリン酸化合物検出器。

[化1]



一般式（１）中、Zは、それぞれ独立に炭素原子又は窒素原子を表す。ただし、環構造中に窒素原子が１つ以上含まれる。Rは、それぞれ独立に水素原子又は一価の置換基を表す。nは、０～５の整数を表す。

[化2]

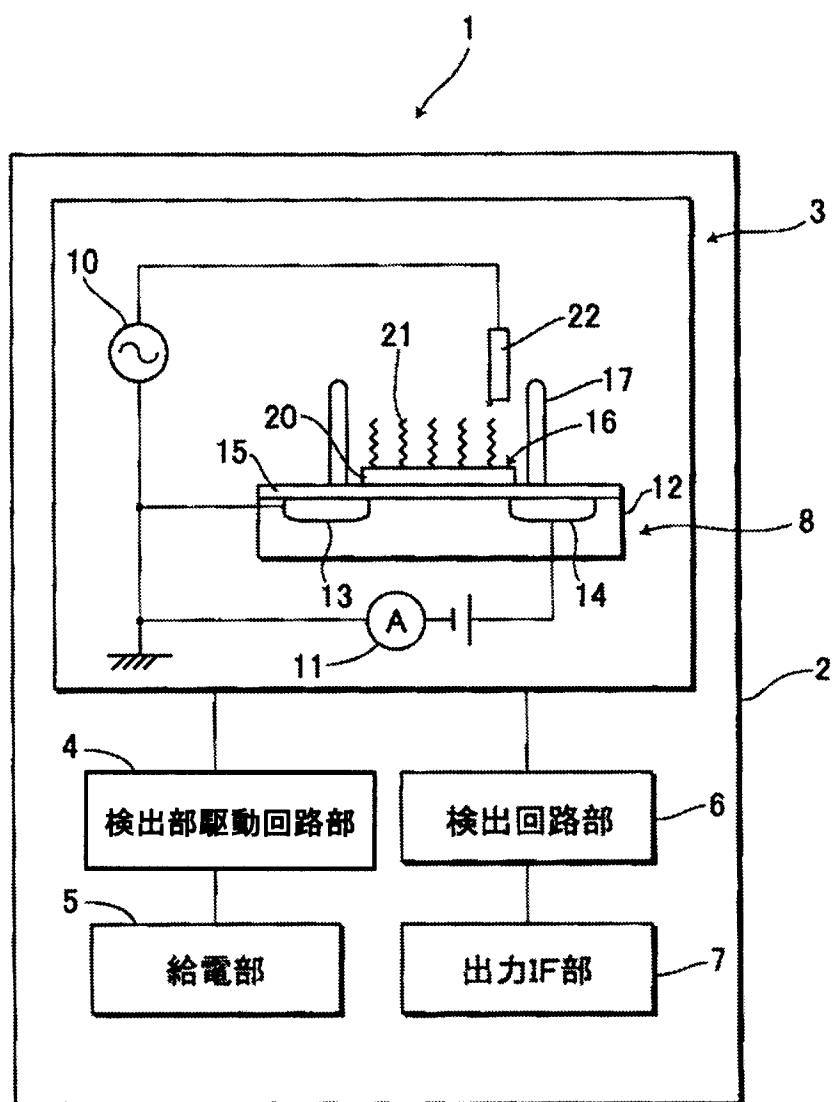


一般式（２）中、Zは、それぞれ独立に炭素原子又は窒素原子を表す。ただし、環構造中に窒素原子が１つ以上含まれる。Rは、それぞれ独立に水素原子又は一価の置換基を表す。nは、０～５の整数を表す。

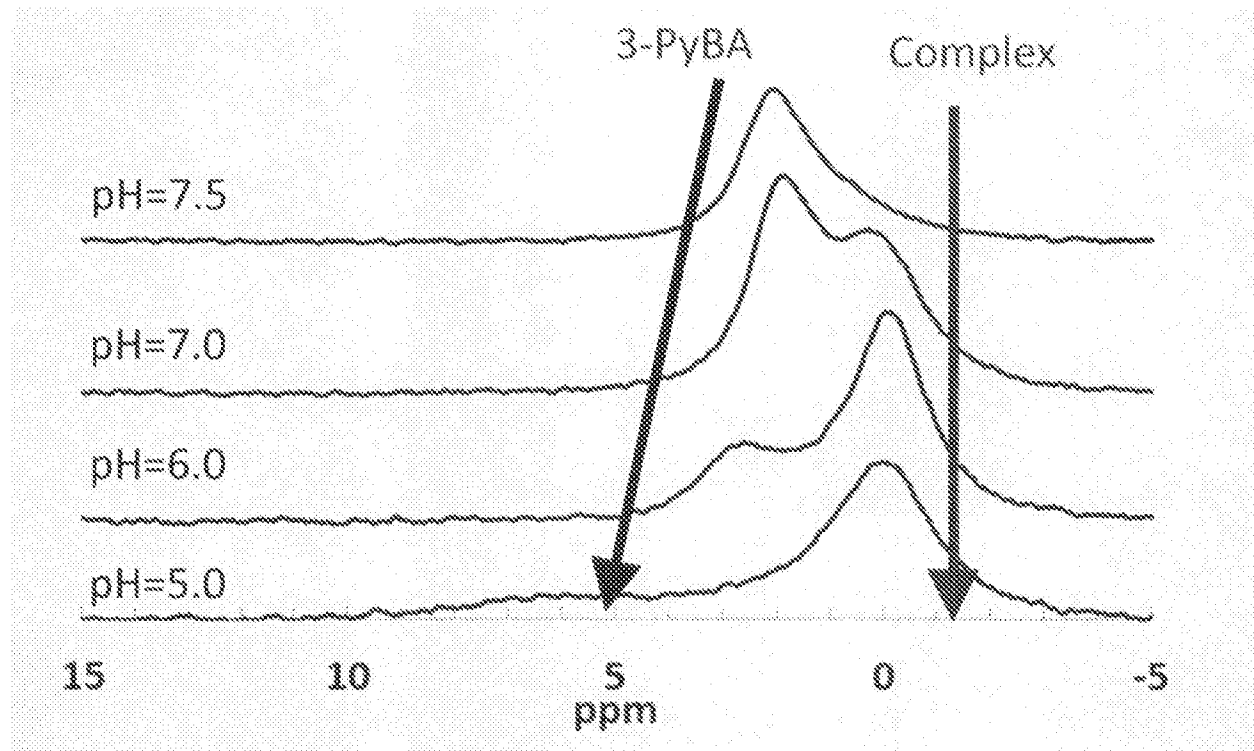
[請求項2] 前記一般式（１）で表される化合物が、ピリジルボロン酸誘導体である請求項１に記載のニリン酸化合物検出器。

- [請求項3] 前記検出部に接続された電界効果トランジスタ（F E T）を、前記電気回路内に有する請求項 1 又は請求項 2 に記載のニリン酸化合物検出器。
- [請求項4] 請求項 1 ～請求項 3 のいずれか 1 項に記載されたニリン酸化合物検出器を用い、
前記検出部のボロン酸基と被検物とを接触させる接触工程と、
前記検出部の電気的変化を測定する測定工程と、
前記電気的変化に基づいてニリン酸化合物を検出する検出工程と、
を含む、ニリン酸化合物検出方法。
- [請求項5] 前記接触工程を、p H 4. 0 ～ p H 6. 0 の溶液中で行う請求項 4 に記載のニリン酸化合物検出方法。

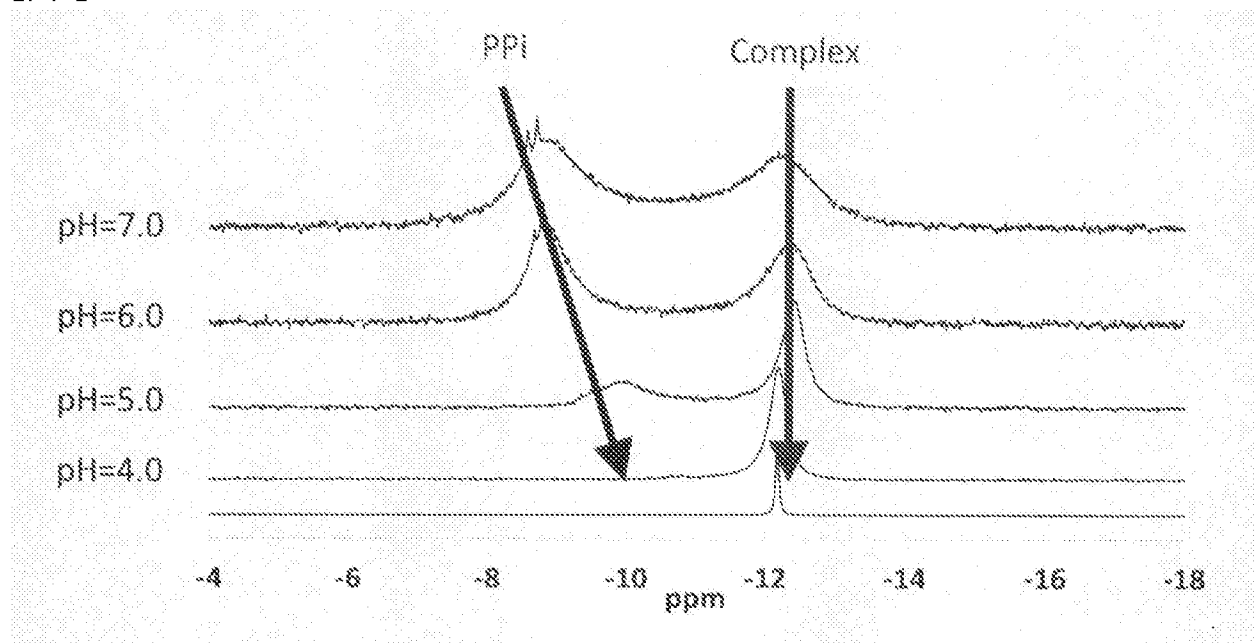
[図1]



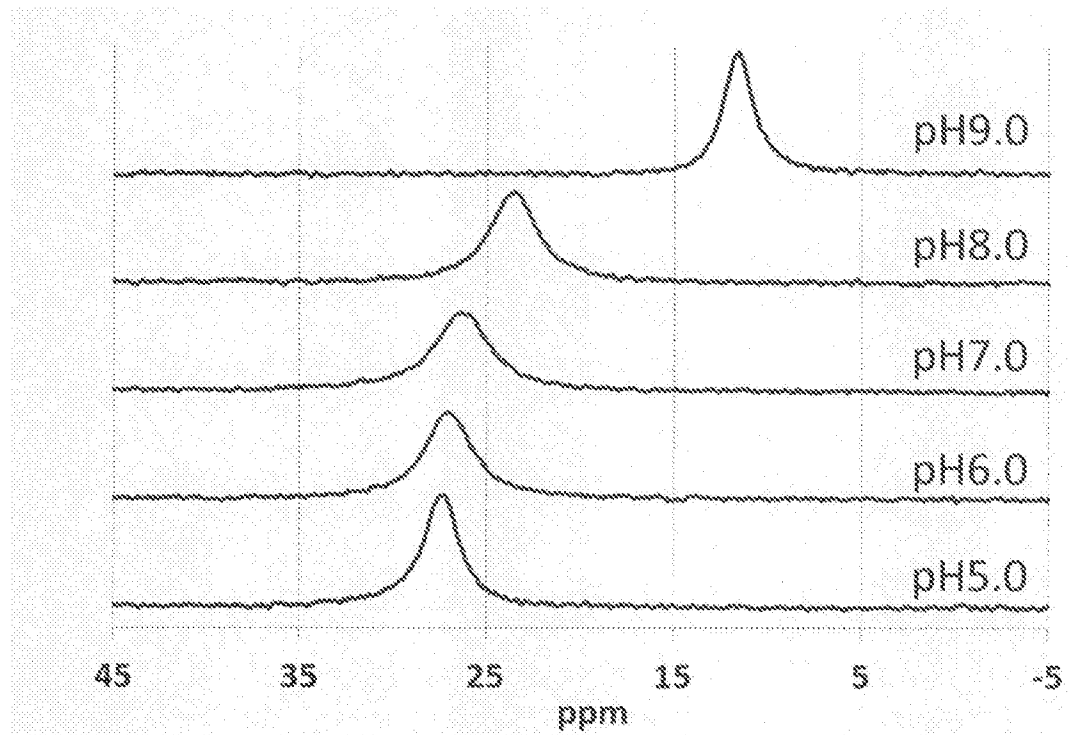
[図2]



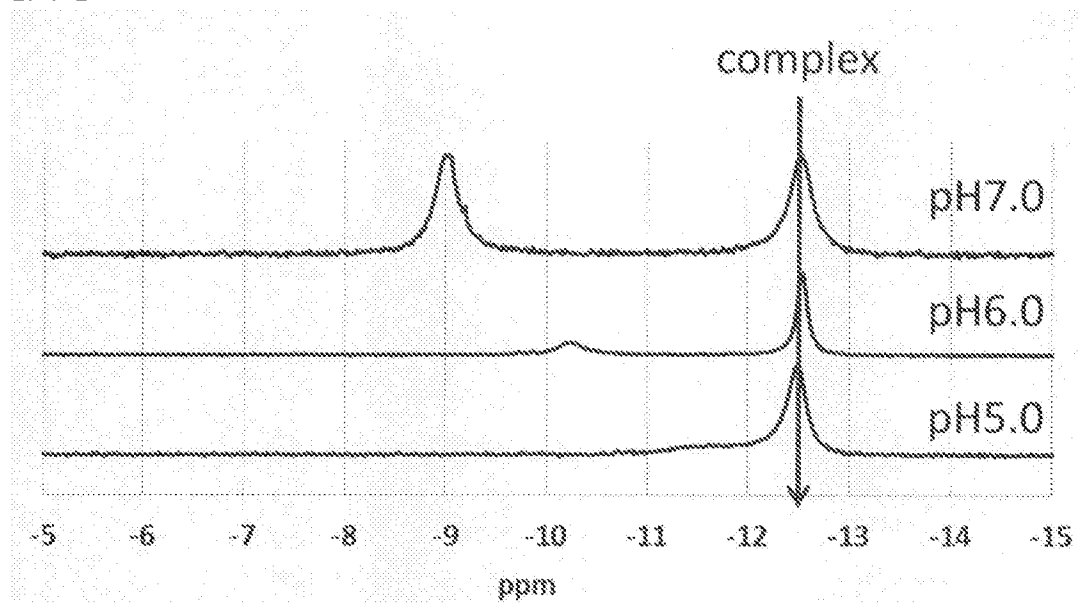
[図3]



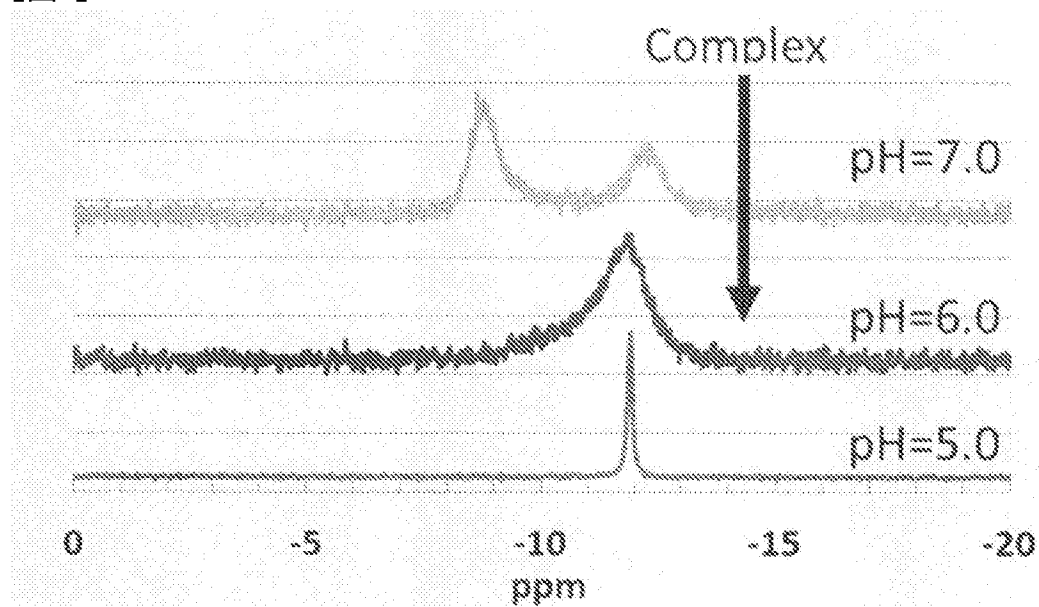
[図4]



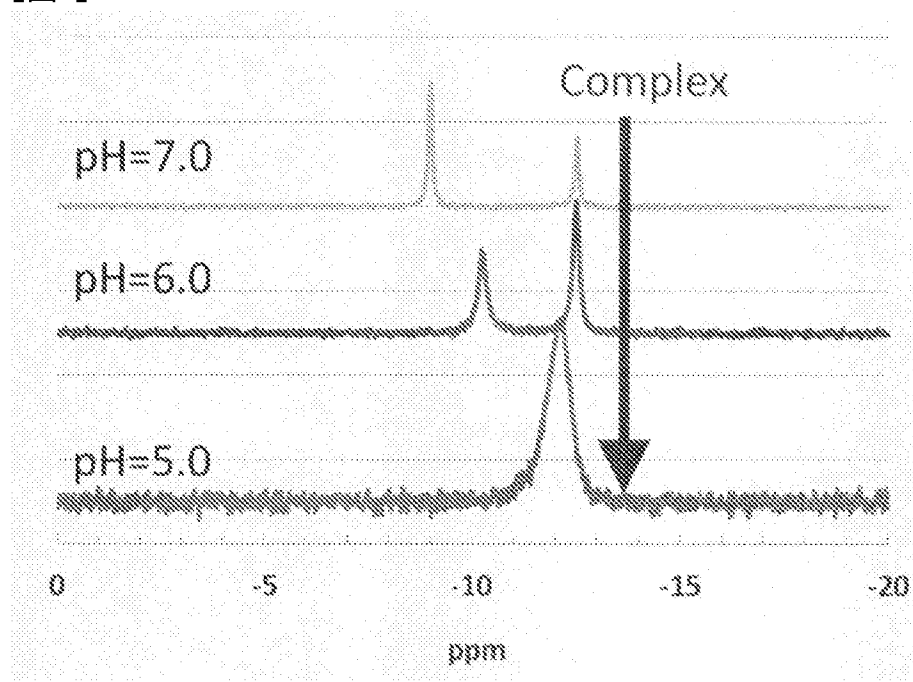
[図5]



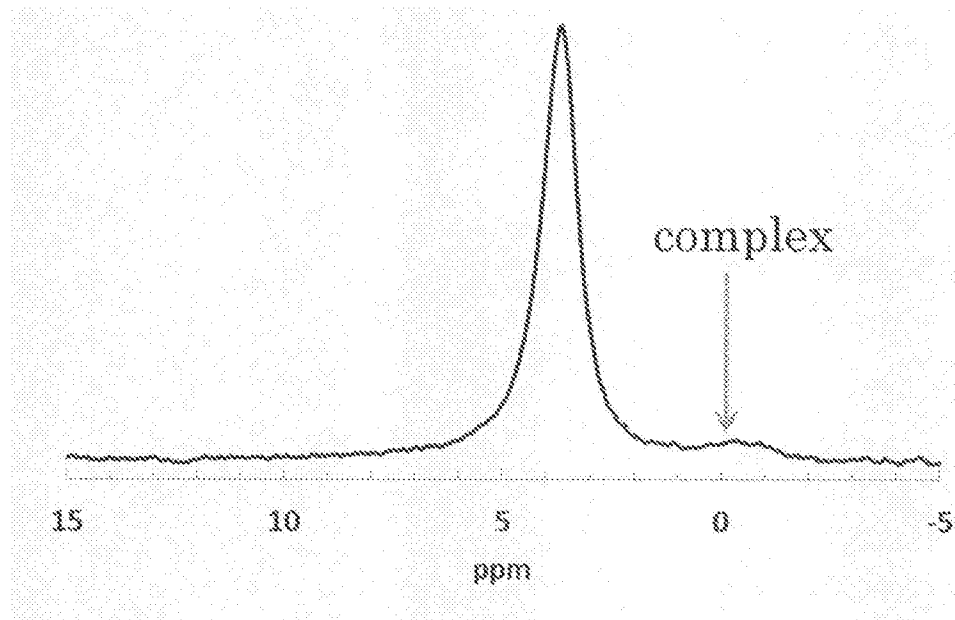
[図6]



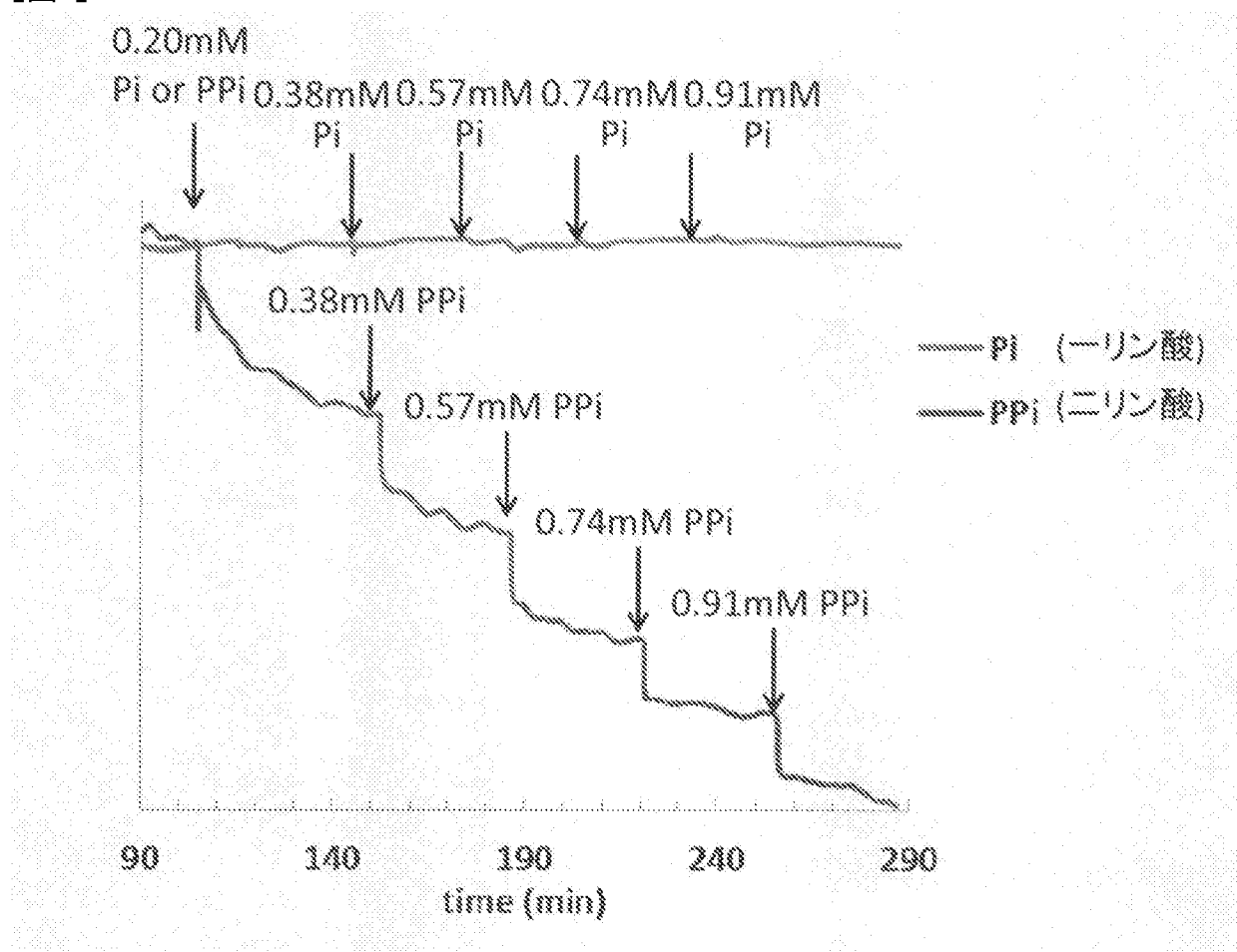
[図7]



[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/059029

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N27/414(2006.01) i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N27/26-27/49, G01N21/41, G01N5/02, C12N15/09		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2013-116081 A (Hitachi, Ltd.), 13 June 2013 (13.06.2013), claims & WO 2013/084917 A	1-5
Y	Mai SANJO et al., "Pyridylboronic Acid ni yoru Bunshi Ninshikino o Riyo shita Pyrophosphoric Acid no Sentakuteki Kenshutsu", Polymer Preprints, Japan, 28 August 2013 (28.08.2013), vol.62, no.2, page 4616	1-5
A	JP 2012-26839 A (The University of Tokyo), 09 February 2012 (09.02.2012), entire text; all drawings & US 2012/0244037 A1 & EP 2518482 A1 & WO 2012/011479 A	1-5
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 June, 2014 (12.06.14)		Date of mailing of the international search report 24 June, 2014 (24.06.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/059029

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2010-107496 A (The University of Tokyo), 13 May 2010 (13.05.2010), entire text; all drawings (Family: none)	1-5
A	JP 2009-186350 A (Saitama University), 20 August 2009 (20.08.2009), entire text; all drawings (Family: none)	1-5

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. G01N27/414 (2006.01) i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. G01N27/26-27/49, G01N21/41, G01N5/02, C12N15/09			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 日本国公開実用新案公報 1 9 7 1 - 2 0 1 4 年 日本国実用新案登録公報 1 9 9 6 - 2 0 1 4 年 日本国登録実用新案公報 1 9 9 4 - 2 0 1 4 年			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
Y	JP 2013-116081 A (株式会社日立製作所) 2013.06.13, 特許請求の 範囲 & WO 2013/084917 A	1-5	
Y	三條舞 他, ピリジルボロン酸による分子認識能を利用したピロリ ン酸の選択的検出, 高分子学会予稿集, 2013.08.28, 6 2 巻 2 号, P. 4616	1-5	
A	JP 2012-26839 A (国立大学法人東京大学) 2012.02.09, 全文、全図 & US 2012/0244037 A1 & EP 2518482 A1 & WO 2012/011479 A	1-5	
☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 1 2 . 0 6 . 2 0 1 4		国際調査報告の発送日 2 4 . 0 6 . 2 0 1 4	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (I S A / J P) 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 黒田 浩一 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2	2 J 9 2 1 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2010-107496 A (国立大学法人 東京大学) 2010.05.13, 全文、 全図 (ファミリーなし)	1-5
A	JP 2009-186350 A (国立大学法人埼玉大学) 2009.08.20, 全文、全 図 (ファミリーなし)	1-5