

(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  
2021年3月25日(25.03.2021)



(10) 国際公開番号

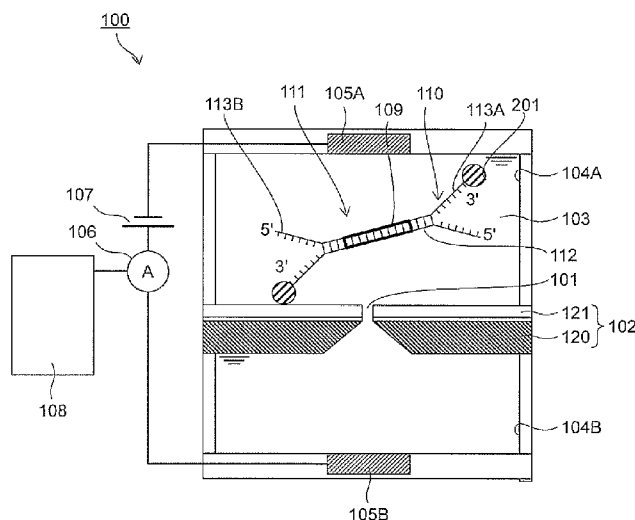
WO 2021/053744 A1

- (51) 国際特許分類:  
*C12N 15/11* (2006.01)    *C12Q 1/6869* (2018.01)  
*C12M 1/00* (2006.01)    *C12Q 1/6876* (2018.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2019/036511
- (22) 国際出願日: 2019年9月18日(18.09.2019)
- (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: 株式会社日立ハイテク  
**(HITACHI HIGH-TECH CORPORATION)** [JP/JP]; 〒1056409 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 藤岡 満(FUJIOKA Michiru); 〒1058717 東京都港区西新橋一丁目24番14号 株式会社日立ハイテクノロジーズ内 Tokyo (JP). 後藤 佑介(GOTO Yusuke); 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 株式会社日立製作所内 Tokyo (JP). 赤堀 玲奈(AKAHORI Rena); 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 株式会社日立製作所内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人平木国際特許事務所  
**(HIRAKI & ASSOCIATES)**; 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目5-1 愛宕グリーンヒルズMORITOWER32階 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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,

(54) **Title:** ADAPTER MOLECULE, BIOMOLECULE-ADAPTER MOLECULE COMPLEX IN WHICH SAID ADAPTER MOLECULE AND BIOMOLECULE ARE BOUND, BIOMOLECULE ANALYSIS APPARATUS, AND BIOMOLECULE ANALYSIS METHOD

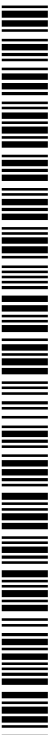
(54) 発明の名称: アダプター分子、当該アダプター分子と生体分子とが結合した生体分子-アダプター分子複合体、生体分子分析装置及び生体分子分析方法

図 1



(57) **Abstract:** The present invention is for analyzing double strand DNA, which is the target of analysis, without denaturing the same. This adapter molecule to be bound to the double strand DNA, which is the target of analysis, is provided with: a double strand nucleic acid domain having complementary base sequences; a pair of single strand nucleic acid domains each having a base sequence non-complementary to the other; and a block molecule provided to one of the single strand nucleic acid domains.

(57) 要約: 解析対象の二本鎖DNAの変性処理を行うことなく分析する。解析対象の二本鎖DNAに結合させるアダプター分子は、互いに相補的な塩基配列からなる二本鎖核酸領域と、互いに非相補的な塩基配列からなる一对の一本鎖核酸領域と、一方の一本鎖核酸領域に配設されたブロック分子とを備える。



WO 2021/053744 A1

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, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

## 明 細 書

発明の名称：

アダプター分子、当該アダプター分子と生体分子とが結合した生体分子－アダプター分子複合体、生体分子分析装置及び生体分子分析方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、核酸等の生体分子の分析に使用されるアダプター分子、当該アダプター分子を結合した生体分子、生体分子分析装置及び生体分子分析方法に関する。

### 背景技術

[0002] タンパク質や核酸分子などの生体分子は、それぞれアミノ酸やヌクレオチドといったモノマーが連結した構造を有する。これら生体分子のタンパク質については、エドマン法を自動化した装置（ペプチドシーケンサ又はプロテインシーケンサと称される）を用いてモノマー配列が決定される。核酸分子のモノマー配列（塩基配列）を決定する装置としては、サンガー法やマキサム・ギルバート法を適用した第1世代シーケンサ、パイロシーケンサ法や、ブリッジPCR法と1塩基合成（*sequence-by-synthesis*、SBS）技術を組み合わせた方法を用いた第2世代シーケンサが知られている。

[0003] また、これらの各種シーケンサとは異なり、伸長反応や蛍光ラベルを行うことなく、生体分子のモノマー配列を電氣的に直接計測する方法が次世代シーケンサの分野で注目されている。具体的には、上述したモノマー配列構造を有する生体分子を、ナノスケールの穴に通過させ、そのときに発生する電気信号を検出し、電気信号の変化に基づいてモノマー配列を決定する方法である。現在、より具体的には、核酸分子についてナノポアDNAシーケンシング方式の研究開発が活発に進められ、実用化されている。

[0004] このナノポアDNAシーケンシング方式では、薄膜に形成された細孔（以下「ナノポア」という。）をDNA鎖が通過することで生じる封鎖電流を計

測することにより、塩基配列を計測する。すなわち、DNA鎖に含まれる個々の塩基種の違いにより封鎖電流が変化するので、封鎖電流量を計測することで塩基種を順次同定することができる。この方式では、上述した各種シーケンサと異なり、DNA鎖を鋳型とした酵素による増幅反応や蛍光体等の標識物を付加する必要もない。このため、ナノポアDNAシーケンシング方式は、従来の各種シーケンサと比較して高スループットで、低ランニングコストであり、且つ長塩基のDNA解読が可能となる。

[0005] このナノポアDNAシーケンシング方式は、一般的に、電解質溶液が満たされている第1及び第2の液槽と、その第1及び第2の液槽を仕切り、ナノポアを有する薄膜と、第1及び第2の液槽に設けられる第1及び第2の電極とを備えた生体分子分析用デバイスにより実現される。生体分子分析用デバイスは、アレイデバイスとして構成することもできる。アレイデバイスは、薄膜によって仕切られる液室の組を複数個備えるデバイスをいう。例えば、第1の液槽を共通槽とし、第2の液槽を複数個の個別槽とすることができる。この場合、共通槽と個別槽の各々に電極を配置する。

[0006] この構成において、第1の液槽と第2の液槽の間に電圧が印加され、且つナノポアにはナノポア径に応じたイオン電流が流れる。また、ナノポアには、印加した電圧に応じた電位勾配が形成される。生体分子を第1の液槽に導入すると、拡散現象及びこの発生した電位勾配に応じて、生体分子がナノポアを介し第2の液槽へ送られる。イオン電流の大きさは一次近似としてナノポアの断面積に比例する。DNAがナノポアを通過すると、DNAがナノポアを封鎖し、有効断面積が減少するため、イオン電流が減少する。この電流を封鎖電流と呼ぶ。封鎖電流の大きさを元に、DNAの1本鎖と2本鎖との差異や、塩基の種類を判別する。

[0007] また、その他にも、ナノポアの内側面等にプローブ電極対を対向して設け、電極間に電圧をかけることにより、ナノポアを通過する際のDNAとプローブ電極間のトンネル電流を測定し、トンネル電流の大きさから塩基の種類を判別する方式も知られている。

- [0008] ナノポアDNAシーケンシング方式の課題の1つとして、ナノポアを通過するDNAの搬送制御が挙げられる。DNA鎖に含まれる個々の塩基種の違いを封鎖電流量で計測するには、計測時の電流ノイズ及びDNA分子の揺らぎの時定数から、DNAのナノポア通過速度を1塩基辺り100 $\mu$ s以上にする必要があると考えられている。しかし、DNAのナノポア通過速度は通常1塩基あたり1 $\mu$ s以下と速く、各塩基由来の封鎖電流を十分に計測することが困難である。
- [0009] 搬送制御法の一つとして、DNAポリメラーゼが相補鎖合成反応をする際や、ヘリカーゼが二本鎖DNAを解く際に鋳型となる一本鎖DNAを送り制御する力を利用する方法がある（例えば、非特許文献1参照）。DNAポリメラーゼは、鋳型となるDNAに結合して、鋳型DNAに相補結合したプライマーの端部から相補鎖合成反応を行う。第1の液槽において、DNAポリメラーゼがナノポア近傍で相補鎖合成反応を行うことで、ナノポアを介して鋳型DNAを第2の液槽に搬送する。このDNAポリメラーゼやヘリカーゼを分子モータと呼ぶ。
- [0010] また、特許文献1に記載されるように、ナノポアを介して第1の液槽と第2の液槽の間を、解析対象の一本鎖DNAを往復運動させることで計測精度を向上させることができる。すなわち、解析対象の一本鎖DNAを第1の液槽と第2の液槽の間で往復運動させて、複数回計測することで単回測定において生じたエラーを補正することができる。このとき、特許文献1に記載されるように、解析対象の一本鎖DNAにおける一方端部に第一ストップ分子（ナノポア径より大）を結合することで、当該一本鎖DNAの他方端部からナノポアを介して第2の液槽に一本鎖DNAを移動させ、第2の液槽内で一本鎖DNAの他方端部に対して第二ストップ分子（ナノポア径より大）を結合させる。これにより、一本鎖DNAの一方端部が第1の液槽内に留まり、他方端部が第2の液槽内に留まることができ、往復運動に際して一本鎖DNAがナノポアから抜け落ちることが防止できる。

### 先行技術文献

## 非特許文献

- [0011] 非特許文献1：Gerald M Cherf et al.、Nat. Biotechnol. 30, No. 4, p. 349-353、2012

## 特許文献

- [0012] 特許文献1：特許第5372570号

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0013] ところで、特許文献1に開示されたナノポアDNAシーケンシング方式では、解析対象の二本鎖DNAを一本鎖DNAに変性した状態でナノポアを通過させる。すなわち、従来、ナノポアDNAシーケンシング方式では、解析対象の二本鎖DNAを一本鎖DNAに変性する処理が必要となる。そのため、ナノポアDNAシーケンシング方式では、当該処理に時間やコストを要するため煩雑であるといった問題があった。

- [0014] また、非特許文献1等を開示された方式においても、解析対象の核酸は一本鎖DNAであり、二本鎖DNAを解析対象とする場合には変性処理が必要である点で特許文献1に開示されたナノポアDNAシーケンシング方式と同様な問題があった。

- [0015] そこで、本発明は、上述した実情に鑑み、解析対象の二本鎖DNAを変性処理といった煩雑さを回避できるアダプター分子、当該アダプター分子と生体分子とが結合した生体分子-アダプター分子複合体、生体分子分析装置及び生体分子分析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

- [0016] 上述した目的を達成するため、本発明者らが鋭意検討した結果、ナノポアを通過しうる一本鎖領域を有するアダプター分子を設計し、当該アダプター分子を解析対象の生体分子に連結することで、当該二本鎖DNAの変性処理が不要となることを見出し、本発明を完成するに至った。

- [0017] 本発明は以下を包含する。

- [0018] (1) 解析対象の生体分子に対して直接的又は間接的に結合する一方端部を有し、互いに相補的な塩基配列からなる二本鎖核酸領域と、  
当該二本鎖核酸領域における上記一方端部と異なる他方端部と連結し、互いに非相補的な塩基配列からなる一对の一本鎖核酸領域と、  
上記一对の一本鎖核酸領域のうち、一方の一本鎖核酸領域に配設された、上記生体分子の解析装置におけるナノポアの径より大径のブロック分子とを備えるアダプター分子。
- [0019] (2) 上記ブロック分子は、上記一对の一本鎖核酸領域のうち端部が3'末端である一本鎖核酸領域に配設されたことを特徴とする(1)記載のアダプター分子。
- [0020] (3) 上記ブロック分子は、上記一本鎖核酸領域に結合可能な分子又は上記一本鎖核酸領域内における相補領域で形成されるヘアピン構造であることを特徴とする(1)記載のアダプター分子。
- [0021] (4) 上記一对の一本鎖核酸領域のうち、端部が3'末端である一本鎖核酸領域は、分子モータが結合しうる分子モータ結合部を備えることを特徴とする(1)記載のアダプター分子。
- [0022] (5) 上記分子モータ結合部を備える一本鎖核酸領域は、当該分子モータ結合部より3'末端側にプライマーがハイブリダイズしうるプライマー結合部を備えることを特徴とする(4)記載のアダプター分子。
- [0023] (6) 上記分子モータ結合部と上記プライマー結合部との間に、上記分子モータが結合できないスペーサを有することを特徴とする(5)記載のアダプター分子。
- [0024] (7) 上記一对の一本鎖核酸領域のうち、端部が5'末端である一本鎖核酸領域は、5'末端から少なくとも2番目までの塩基がチミンからなることを特徴とする(1)記載のアダプター分子。
- [0025] (8) 上記二本鎖核酸領域は、標識配列を有することを特徴とする(1)記載のアダプター分子。
- [0026] (9) 解析対象の生体分子と、当該生体分子の両末端に対して直接的又は

間接的に結合した上記（１）～（８）いずれかに記載されたアダプター分子とを含む生体－アダプター分子複合体。

[0027] （１０）上記解析対象の生体分子は、二本鎖核酸であることを特徴とする（９）記載の生体－アダプター分子複合体。

[0028] （１１） ナノポアを有する薄膜と、  
上記薄膜を介して対向した第１の液槽及び第２の液槽と  
上記第１の液槽に（９）又は（１０）記載の生体－アダプター分子複合体を含む電解質溶液が充填されるとともに、上記第２の液槽に電解質溶液が充填された状態で第１の液槽と第２の液槽の間に電圧を印加する電圧源と、  
上記第１の液槽と上記第２の液槽との間に所望の電位勾配を形成するよう上記電圧源を制御する制御装置とを備える生体分析装置。

[0029] （１２） ナノポアを有する薄膜を介して対向した第１の液槽と第２の液槽のうち、第１の液槽内に上記（９）又は（１０）記載の生体－アダプター分子複合体を含む電解質溶液が充填され、第２の液槽内に電解質溶液が充填された状態で、第１の液槽と第２の液槽の間に電圧を印加して、第１の液槽側を負又はグラウンド電位とし第２の液槽を正電位とする電位勾配を形成する工程と、

上記第２の液槽から上記第１の液槽に向かって上記生体－アダプター分子複合体が上記ナノポアを通過する際に生ずる信号を測定する工程とを備え、

上記電位勾配を形成する工程では、生体－アダプター分子複合体における一本鎖核酸領域が上記ナノポアを介して上記第２の液槽内に導入され、電位勾配により上記生体－アダプター分子複合体が上記第１の液槽から上記第２の液槽に向かって移動することを特徴とする、生体分子の分析方法。

[0030] （１３）上記生体－アダプター分子複合体は、端部が３′末端である一本鎖核酸領域に上記ブロック分子が配設されており、端部が５′末端である一本鎖核酸領域が上記ナノポアを介して上記第２の液槽内に導入され、電位勾配により上記生体－アダプター分子複合体が上記第１の液槽から上記第２の液槽に向かって移動し、端部が３′末端である一本鎖核酸領域に配設された

ブロック分子とナノポアとが接触することで、上記第1の液槽から上記第2の液槽に向かう上記生体-アダプター分子複合体の移動が停止することを特徴とする(12)記載の生体分子の分析方法。

[0031] (14) 上記生体-アダプター分子複合体は、端部が3'末端である一本鎖核酸領域に分子モータ結合部を有し、

上記第1の液槽に充填された電解質溶液は、上記分子モータ結合部に結合しうる分子モータを含み、

当該分子モータが上記分子モータ結合部と結合し、当該分子モータにより上記生体-アダプター分子複合体を上記第2の液槽から上記第1の液槽に向かって移動させることを特徴とする(12)記載の生体分子の分析方法。

[0032] (15) 上記生体-アダプター分子複合体は、端部が3'末端である一本鎖核酸領域に分子モータ結合部と、当該分子モータ結合部より3'末端側にプライマー結合部とを有し、

上記第1の液槽に充填された電解質溶液は、上記分子モータ結合部に結合しうる分子モータと、上記プライマー結合部にハイブリダイズしうるプライマーとを含み、

上記分子モータは、プライマー結合部にハイブリダイズしたプライマーから相補鎖を合成することで、上記生体-アダプター分子複合体を上記第2の液槽から上記第1の液槽に向かって移動させることを特徴とする(12)記載の生体分子の分析方法。

[0033] (16) 上記生体-アダプター分子複合体は、端部が3'末端である一本鎖核酸領域に分子モータ結合部と、当該分子モータ結合部より3'末端側にプライマー結合部と、当該分子モータ結合部と当該プライマー結合部との間に上記分子モータが結合できないスペーサとを有し、

上記第1の液槽に充填された電解質溶液は、上記分子モータ結合部に結合しうる分子モータと、上記プライマー結合部にハイブリダイズしうるプライマーとを含み、

上記分子モータが上記ナノポアに接触した状態で、上記分子モータがプラ

イマー結合部にハイブリダイズしたプライマーから相補鎖を合成することで、上記生体－アダプター分子複合体を上記第2の液槽から上記第1の液槽に向かって移動させることを特徴とする(12)記載の生体分子の分析方法。

[0034] (17) 上記信号を測定する工程では、上記アダプター分子における特定の領域からの信号を測定した段階で第1の液槽と第2の液槽の間に印加した電圧を反転し、第1の液槽側を正電位とし第2の液槽を負又はグランド電位とする電位勾配を形成することを特徴とする(12)記載の生体分子の分析方法。

[0035] (18) 上記第2の液槽に充填された電解質溶液は、上記生体－アダプター分子複合体における一本鎖核酸領域の5'末端側に結合可能な分子を含み、  
上記ナノポアを介して上記第2の液槽内に導入した一本鎖核酸領域の5'末端に上記分子が結合することを特徴とする(12)記載の生体分子の分析方法。

[0036] (19) 上記第1の液槽と上記第2の液槽の間に印加する電圧を制御することで、上記生体－アダプター分子複合体を上記第1の液槽と上記第2の液槽との間で往復移動させ、上記信号を測定する工程を繰り返し行うことを特徴とする(12)記載の生体分子の分析方法。

### 発明の効果

[0037] 本発明に係るアダプター分子は、解析対象の生体分子に直接的又は間接的に結合した状態で、互いに非相補的な塩基配列からなる一对の一本鎖核酸領域を端部に有している。この一本鎖核酸領域がナノポア内に導入することで、解析対象の生体分子をナノポアに容易に誘導することができる。また、解析対象の生体分子が二本鎖の核酸である場合には、この一本鎖核酸領域からナノポアを通過することで、二本鎖の核酸を一本鎖の核酸に容易に引き剥がす(Unzip)ことができる。

[0038] 本発明に係る生体－アダプター分子複合体は、上記アダプター分子が解析対象の生体分子に直接的又は間接的に結合したものであり、互いに非相補的

な塩基配列からなる一对の一本鎖核酸領域を端部に有している。この一本鎖核酸領域がナノポア内に導入することができる。また、解析対象の生体分子が二本鎖の核酸である場合には、この一本鎖核酸領域からナノポアを通過することで、二本鎖の核酸を一本鎖の核酸に容易に引き剥がす（Unzip）ことができる。

[0039] 本発明に係る生体分子の分析方法は、第1の液槽と第2の液槽の間の電位勾配により上記生体-アダプター分子複合体を一本鎖核酸領域がナノポア内に導入することができ、上記生体-アダプター分子複合体を上記第1の液槽から上記第2の液槽に向かって移動させることができる。解析対象の生体分子が二本鎖の核酸である場合には、この一本鎖核酸領域からナノポアを通過することで、二本鎖の核酸を一本鎖の核酸に容易に引き剥がす（Unzip）ことができる。

### 図面の簡単な説明

- [0040] [図1]本発明を適用した生体分子分析装置を概略的に示す構成図である。
- [図2]第1の実施形態に係るアダプター分子を模式的に示す構成図である。
- [図3]第1の実施形態に係るアダプター分子を用いて生体分子を分析する工程を模式的に示す構成図である。
- [図4]図3に示す工程の続きであって、第1の実施形態に係るアダプター分子を用いて生体分子を分析する工程を模式的に示す構成図である。
- [図5]図4に示す工程の続きであって、第1の実施形態に係るアダプター分子を用いて生体分子を分析する工程を模式的に示す構成図である。
- [図6A]図5に示す工程の続きであって、第1の実施形態に係るアダプター分子を用いて生体分子を分析する工程を模式的に示す構成図である。
- [図6B]図5に示す工程の続きであって、第1の実施形態に係るアダプター分子を用いて生体分子を分析する工程を模式的に示す構成図である。
- [図7]第2の実施形態に係るアダプター分子を模式的に示す構成図である。
- [図8A]第2の実施形態に係るアダプター分子を用いて生体分子を分析する工程を模式的に示す構成図である。

[図8B]図8Aに示す工程の続きであって、第2の実施形態に係るアダプター分子を用いて生体分子を分析する工程を模式的に示す構成図である。

[図9A]第2の実施形態に係るアダプター分子を用いて生体分子を分析する工程における要部を模式的に示す構成図である。

[図9B]図9Aに示す工程の続きであって、第2の実施形態に係るアダプター分子を用いて生体分子を分析する工程における要部を模式的に示す構成図である。

[図9C]図9Bに示す工程の続きであって、第2の実施形態に係るアダプター分子を用いて生体分子を分析する工程における要部を模式的に示す構成図である。

[図9D]図9Cに示す工程の続きであって、第2の実施形態に係るアダプター分子を用いて生体分子を分析する工程における要部を模式的に示す構成図である。

[図9E]図9Dに示す工程の続きであって、第2の実施形態に係るアダプター分子を用いて生体分子を分析する工程における要部を模式的に示す構成図である。

[図9F]図9Eに示す工程の続きであって、第2の実施形態に係るアダプター分子を用いて生体分子を分析する工程における要部を模式的に示す構成図である。

[図9G]図9Fに示す工程の続きであって、第2の実施形態に係るアダプター分子を用いて生体分子を分析する工程における要部を模式的に示す構成図である。

[図10]本実施例で行った各種反応の反応液組成及び反応条件を示す図である。

[図11]本実施例で設計したアダプター分子の塩基配列及びその二次構造を模式的に示す図である。

[図12]本実施例で測定した封鎖電流値を規格化した結果を示す特性図である。

## 発明を実施するための形態

[0041] 以下、本発明に係るアダプター分子、生体－アダプター分子複合体、生体分子の分析方法を、図面を参照して詳細に説明する。ただし、これら図面は、本発明の原理に則った具体的な実施形態を示すものであって、それらは本発明の理解のためのものであり、決して本発明を限定的に解釈するために用いられるものではない。

[0042] [第1の実施形態]

図1に、アダプター分子と解析対象の生体分子とが直接的又は間接的に連結されてなる生体－アダプター分子複合体を分析する生体分子分析装置の一構成例を示す。図1に示した生体分子分析装置は、封鎖電流方式にてイオン電流を測定する生体分子分析用デバイスであり、ナノポア101が形成された基板102と、基板102を挟んで基板102と接するように配置され、その内部に電解質溶液103が満たされた一对の液槽104（第1の液槽104A及び第2の液槽104B）と、第1の液槽104A及び第2の液槽104Bの各々に接する一对の電極105（第1の電極105A及び第2の電極105B）とを備える。測定時には、一对の電極105の間に電圧源107から所定の電圧が印加され、一对の電極105の間に電流が流れる。電極105の間に流れる電流の大きさは、電流計106により計測され、その計測値はコンピュータ108により分析される。

[0043] 電解質溶液103には、例えばKCl、NaCl、LiCl、CsClが用いられる。電解質溶液103は、第1の液槽104A及び第2の液槽104Bにおいて同じ組成であっても良いし、異なる組成であっても良い。なお、第1の液槽104Aには、詳細を後述する生体－アダプター分子複合体等を含む電解質溶液103が充填されている。第2の液槽104B中の電解質溶液103には、生体分子の自己相補鎖形成抑制のために4M以上のUreaや、DMSO、DMF、NaOHを混在することも可能である。また、生体分子の安定化のため、緩衝剤を混在させることも可能である。緩衝剤としては、TrisやEDTAやPBSなどが用いられる。第1の電極105A

及び第2の電極105Bは、例えばAg、AgCl、Ptといった導電性を有する材料から作製することができる。

[0044] 第1の液槽104A内に充填された電解質溶液103は、解析対象の生体分子109（二本鎖DNA等）及びアダプター分子110を含む生体-アダプター分子複合体111が含まれる。アダプター分子110は、図2に示すように、生体分子109に直接的に結合する二本鎖核酸領域112と、二本鎖核酸領域112における生体分子109と結合した端部と異なる端部と連結し、互いに非相補的な塩基配列からなる一对の一本鎖核酸領域113A及び113Bと、一本鎖核酸領域113A及び113Bのうちいずれか一方の末端に配されたブロック分子201とを備える。なお、一本鎖核酸領域113Aは3'末端を有し、一本鎖核酸領域113Bは5'末端を有する。図2に示した例では、ブロック分子201は、3'末端を有する一本鎖核酸領域113Aの端部に配置されている。ブロック分子201は、一本鎖核酸領域113Aの端部ではなく、5'末端を有する一本鎖核酸領域113Bの端部に配置されていてもよい。

[0045] なお、第1の液槽104A内に充填された電解質溶液103に生体分子109、アダプター分子110及びDNAリガーゼを添加し、第1の液槽104A内に充填された電解質溶液103内で生体-アダプター分子複合体111を形成してもよい。

[0046] また、図示しないが、アダプター分子110と生体分子109とは間接的に連結しても良い。間接的に連結するとは、所定の塩基長の核酸断片を介してアダプター分子110と生体分子109とを連結すること、生体分子109の種類に応じて導入される官能基を介してアダプター分子110と生体分子109とを連結することを含む意味である。

[0047] さらに、アダプター分子110は、二本鎖核酸領域112における生体分子109と連結する端部が3'突出末端（例えば、dT突出末端）とすることが好ましい。当該端部を3'dA突出末端とすることで、アダプター分子110と生体分子109とを連結する際にアダプター分子110のダイマー

形成を防止することができる。

[0048] さらにまた、アダプター分子110において、二本鎖核酸領域112の長さ及び塩基配列は、特に限定されず、任意の長さ及び任意の塩基配列とすることができる。例えば、二本鎖核酸領域112の長さとしては、5～100塩基長とすることができ、10～80塩基長とすることができ、15～60塩基長とすることができ、20～40塩基長とすることができる。

[0049] さらにまた、アダプター分子110において、一本鎖核酸領域113A及び113Bの長さ及び塩基配列は、特に限定されず、任意の長さ及び任意の塩基配列とすることができる。なお、一本鎖核酸領域113A及び113Bは、互いに同じ長さであっても良いし、異なる長さであっても良い。一本鎖核酸領域113A及び113Bは、互いに共通する塩基配列を有していても良いし、互いに非相補的であれば全く異なる塩基配列を有していても良い。非相補的であるとは、一本鎖核酸領域113A及び113Bの塩基配列全体において相補的な配列の割合が30%以下、好ましくは20%以下、より好ましくは10%以下、更に好ましくは5%以下、最も好ましくは3%以下であることを意味する。

[0050] 一本鎖核酸領域113A及び113Bの長さとしては、例えば、10～200塩基長とすることができ、20～150塩基長とすることができ、30～100塩基長とすることができ、50～80塩基長とすることができる。一例としては、特に、5'末端を有する一本鎖核酸領域113Bは、5'末端から少なくとも2番目までの塩基配列、好ましくは5番目までの塩基配列、より好ましくは7番目までの塩基配列がチミンからなる配列であることが好ましい。また、5'末端を有する一本鎖核酸領域113Bは、90%以上がチミンからなる塩基配列、好ましくは100%チミンからなる塩基配列とすることができる。5'末端を有する一本鎖核酸領域113Bの端部における2番目までの塩基配列、好ましくは5番目までの塩基配列、より好ましくは7番目までの塩基配列をチミンとするか、5'末端を有する一本鎖核酸領域113Bにおけるチミンの割合をこの範囲とすることで、高次構造の形成

を防止できナノポア101に導入しやすい形状を維持することができる。

[0051] ここで、ブロック分子201とは、第1の液槽104Aに存在する一本鎖にUnzipされた生体-アダプター分子複合体202がナノポア101を介して第2の液槽104Bに抜け落ちるのを防止する機能を有する構成を意味する。したがって、ブロック分子201としては、一本鎖核酸領域113Aに結合する分子であっても良いし、一本鎖核酸領域113Bの末端近傍で形成される高次構造としてもよい。ブロック分子201として使用可能な分子としては、例えば、アビジン、ストレプトアビジンやDigoxigenin (DIG) に対する抗DIG抗体とビーズとの複合体等を使用することができる。また、ブロック分子201として使用可能な高次構造としては、一本鎖核酸領域113Aの3'末端部に形成される分子内ヘアピン構造や三重鎖DNA構造を挙げることができる。

[0052] また、ブロック分子201は、ナノポア101の大きさ（直径）よりも十分大きいものとするのが好ましい。例えば、ナノポア101の径に対するブロック分子201の大きさとしては、生体分子109の進行を止めることができる大きさであればよいが、例えば1.2~50倍程度とすることが望ましい。より詳細には、生体分子109として一本鎖DNAを測定する場合、その直径が大凡1.5nmであるため、ナノポア101の直径として1.5nm~2.5nm程度とすれば、ストレプトアビジン（径は大凡5nm）をブロック分子201として使用することができる。なお、ストレプトアビジンを一本鎖核酸領域113Aの末端に結合させる際には、当該末端にビオチンを結合させておく。末端のビオチン化は市販のキットを使用することができる。また、ストレプトアビジンとしては、特に限定されないが、例えば、ビオチンとの結合部位を1箇所となるように変異を導入した変異型ストレプトアビジンでもよい。

[0053] 一方、基板102は、基材120と、基材120の一主面に形成された薄膜121とから構成されている。ナノポア101は、薄膜121に形成されている。また、基板203は、図示しないが、絶縁層を有してもよい。基材

120は、電氣的絶縁体の材料、例えば無機材料及び有機材料（高分子材料を含む）から形成することができる。基材120を構成する電氣的絶縁体材料の例としては、シリコン（ケイ素）、ケイ素化合物、ガラス、石英、ポリジメチルシロキサン（PDMS）、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）、ポリスチレン、ポリプロピレン等が挙げられる。ケイ素化合物としては、窒化ケイ素、酸化ケイ素、炭化ケイ素等、酸窒化ケイ素が挙げられる。特に、基材120は、これらの任意の材料から作製することができるが、例えばケイ素又はケイ素化合物であってよい。

[0054] 基板102のサイズ及び厚さは、ナノポア101を設けることができるものであれば特に限定されるものではない。基板102は、当技術分野で公知の方法により作製することが可能で、あるいは市販品として入手することも可能である。例えば、基板102は、フォトリソグラフィ又は電子線リソグラフィ、及びエッチング、レーザブレーション、射出成形、鋳造、分子線エピタキシー、化学蒸着（CVD）、誘電破壊、電子線若しくは収束イオンビーム等の技術を用いて作製することができる。なお、基板102は、表面への標的外の分子の吸着を避けるために、コーティングしてもよい。

[0055] 基板102は、少なくとも1つのナノポア101を有する。ナノポア101は、具体的には薄膜121に設けられるが、場合により、薄膜121及び基材120に設けてもよい。ここで、「ナノポア」及び「ポア」とは、ナノメートル（nm）サイズ（すなわち、1nm以上、1 $\mu$ m未満の直径を有する貫通孔であり、基板102を貫通して第1の液槽104Aと第2の液槽104Bとを連通する孔である。

[0056] 基板102は、ナノポア101を設けるための薄膜121を有することが好ましい。すなわち、ナノサイズの孔を形成するのに適した材料及び厚さの薄膜121を基板120上に形成することによって、ナノポア101を簡便かつ効率的に基板102に設けることができる。ナノポア101形成の容易性から、薄膜121の材料は、例えば酸化ケイ素（SiO<sub>2</sub>）、窒化ケイ素（SiN）、酸窒化ケイ素（SiON）、金属酸化物、金属ケイ酸塩等が好ま

しい。また、薄膜121（及び場合によっては基板102全体）は、実質的に透明であってもよい。ここで「実質的に透明」とは、外部光をおよそ50%以上、好ましくは80%以上透過できることを意味する。また薄膜は、単層であっても複層であってもよい。

[0057] 薄膜121の厚みは、1nm~200nm、好ましくは1nm~50nm、より好ましくは1nm~20nmである。薄膜121は、当技術分野で公知の技術により、例えば減圧化学気相成長（LPCVD）により、基材120上に形成することができる。

[0058] なお、薄膜121上には、絶縁層を設けることも好ましい。絶縁層の厚みは好ましくは5nm~50nmである。絶縁層には任意の絶縁体材料を使用できるが、例えばケイ素又はケイ素化合物（窒化ケイ素、酸化ケイ素等）を使用することが好ましい。

[0059] ナノポア101のサイズは、分析対象の生体高分子の種類によって適切なサイズを選択することができる。ナノポアは、均一な直径を有していてもよいが、部位により異なる直径を有してもよい。基板102の薄膜121に設けるナノポアは、最小直径部、すなわちナノポア101の有する最も小さい直径が、直径100nm以下、例えば1nm~100nm、好ましくは1nm~50nm、例えば1nm~10nmであり、具体的には1nm以上5nm以下、3nm以上5nm以下等であることが好ましい。なお、ナノポア101は、基材120に形成された1 $\mu$ m以上の直径を有するポアと連結していてもよい。

[0060] また、解析対象の生体分子が一本鎖の核酸（DNA）である場合には、一本鎖DNAの直径が大凡1.5nmであることから、ナノポア101の直径としては1.5nm~10nm程度であることが好ましく、1.5nm~2.5nm程度であることがより好ましい。解析対象の生体分子が二本鎖の核酸（DNA）である場合には、二本鎖DNAの直径が大凡2.6nmであることから、ナノポア101の直径としては3nm~10nm程度であることが好ましく、3nm~5nm程度であることがより好ましい。さらに、ナノ

ポア101の直径は、解析対象の生体高分子（例えばタンパク質、ポリペプチド、糖鎖等）の外径寸法に応じて、適宜設定することができる。

[0061] ナノポア101の深さ（長さ）は、薄膜121又は基板102全体の厚さを調整することにより調整することができる。ナノポア101の深さは、解析対象の生体分子を構成するモノマー単位の長さと同程度であることが好ましい。例えば、解析対象の生体分子として核酸を選択する場合には、ナノポア101の深さは、塩基1個以下の大きさ、例えば約0.3nm以下とすることが好ましい。ナノポア101の形状は、基本的には円形であるが、楕円形や多角形とすることも可能である。

[0062] さらに、ナノポア101は、基板102に少なくとも1つ設けることができ、複数のナノポア101を設ける場合に、規則的に配列してもよいしランダムに配置しても良い。ナノポア101は、当技術分野で公知の方法により、例えば透過型電子顕微鏡（TEM）の電子ビームを照射することにより、ナノリソグラフィ技術又はイオンビームリソグラフィ技術等を使用することにより形成することができる。

[0063] なお、図1に例示した装置は、一对の液槽104Aと104Bとの間に1つのナノポア101を有しているが、これはあくまでも一例であり、一对の液槽104Aと104Bとの間に複数のナノポア101を有する構成とすることもできる。また、他の例としては、基板102に複数個のナノポア101を形成し、複数個のナノポア101の各々の領域を隔壁で分離して構成されるアレイデバイスとすることも可能である。当該アレイデバイスにおいては、第1の液槽104Aを共通槽とし、第2の液槽104Bを複数個の個別槽とすることができる。この場合、共通槽と個別槽のそれぞれに電極を配置することができる。

[0064] 一方、第1の電極105A及び第2の電極105Bとしては、特に限定されず、例えば白金、パラジウム、ロジウム、ルテニウム等の白金族、金、銀、銅、アルミニウム、ニッケル等；グラファイト、例えばグラフェン（単層又は複層のいずれでもよい）、タングステン、タンタル等から作製すること

ができる。

[0065] 以上のように構成された生体分子分析装置では、第1の液槽104A内に生体-アダプター分子複合体111を含む電解質溶液103が充填された状態で、第1の電極105A及び第2の電極105Bの間に電圧を印加して、第1の液槽104A側を負電位又はグランド電位とし第2の液槽104Bを正電位とする電位勾配を形成すると、図3に示すように、ブロック分子201を有しない一本鎖核酸領域113Bがナノポア101を介して（通って）第2の液槽104Bの方向に移動する。そして、図4に示すように、第1の液槽104Aと第2の液槽104Bとの間の電位勾配により、生体-アダプター分子複合体111はナノポア101を介して（通って）第2の液槽104Bへ移動する。この図3の状態から図4の状態へと推移する際、生体-アダプター分子複合体111における二本鎖の核酸（アダプター分子110における二本鎖核酸領域112と生体分子109）が引き剥がされる（Unzipped）。

[0066] なお、第1の液槽104A及び第2の液槽104Bの間に形成する電圧勾配とは、負に帯電した核酸分子を移動させるため、いずれか一方を正電位とすれば良く、他方は負電位又はグランド電位とすれば良い。以下の説明において、第1の液槽104A及び第2の液槽104Bのいずれか一方を正電位とし、他方を負電位とすると記載する場合、負電位とする側はグランド電位としても良いことは勿論である。

[0067] また、図3～4に示すように、ブロック分子201を有しない一本鎖核酸領域113Bがナノポア101を介して第2の液槽104Bの方向に移動した状態で、第2の液槽104内には、ブロック分子203を有する電解質溶液103を充填することで、図5に示すように、当該ブロック分子203が一本鎖核酸領域113Bの末端に結合する。これにより、一本鎖となった生体-アダプター分子複合体111の両末端にブロック分子201及び203を配設することができる。

[0068] 本実施形態において、ブロック分子201及び203は、同じ物質として

も良いし、異なる物質としてもよい。また、ブロック分子201を一本鎖核酸領域113A端部近傍の高次構造とし、ブロック分子203を一本鎖核酸領域113Aの端部に結合する物質としてもよい。

[0069] ブロック分子201及び203に異なる物質を使用した例としては、一本鎖核酸領域113Aの端部に結合するブロック分子201をストレプトアビジンとし、一本鎖核酸領域113Bの端部に結合ブロック分子203をDIG-抗DIG抗体結合を介したビーズとすることができる。この場合、一本鎖核酸領域113Bに予めDigoxigenin (DIG)を標識しておく。そして、図4に示したように、末端がDIG標識された一本鎖核酸領域113Bを第1の液槽104Aから第2の溶槽104Bへ泳動させる。DIG自身の大きさは、ナノポア101の直径1nmよりも十分小さいため、一本鎖核酸領域113Bの末端よりナノポア101に導入される。ストレプトアビジンからなるブロック分子201によって一本鎖となった生体-アダプター分子複合体202の移動が停止した状態で、第2の溶槽104Bに直径が1nmよりも大きなビーズが標識された抗DIG抗体を導入し、一本鎖核酸領域113Bの末端に標識されたDIGと結合させる。これにより、ストレプトアビジンからなるブロック分子201と、DIG-抗DIG抗体結合を介したビーズからなるブロック分子203とをそれぞれ、一本鎖となった生体-アダプター分子複合体111に結合させられる。なお、ブロック分子201及び203としては、ビオチン・ストレプトアジビン及びDIG・抗DIG結合ビーズ以外にも、末端をチオール化して金粒子を結合させる方法や、末端をアミノ基修飾してカルボキシル基修飾のビーズと脱水反応により結合させる方法等を用いてもよい。また、ブロック分子201及び203としては、末端を含む近傍領域に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせ、その後、形成された二本鎖核酸領域を光架橋或いはエチジウムブロマイドアミドモノアジドやソラレン誘導体を等の架橋剤を使用して強固に結合させたものでもよい。

[0070] なお、上述した例では、一本鎖核酸領域113Aの端部にブロック分子2

01を結合させ、その後、一本鎖核酸領域113Bの端部にブロック分子203を結合させる方法を説明したが、この順序は逆でもよい。すなわち、一本鎖核酸領域113Bの端部にブロック分子203を結合させた後、一本鎖核酸領域113Aの端部にブロック分子201を結合させてもよい。

[0071] 図3の状態から図4の状態へと推移する際、アダプター分子110を使用することによって、二本鎖の核酸である生体分子109に対して煩雑な変性処理（例えば熱処理）を行うことなく、ナノポア101を通過しうる一本鎖の核酸とすることができる。すなわち、アダプター分子110を使用することによって二本鎖の核酸を容易に引き剥がすことができる。

[0072] また、生体分子分析装置は、図4に示したように、一本鎖となった生体－アダプター分子複合体111を、ナノポア101を介して第1の液槽104Aから第2の液槽104Bへ移動させるが、電圧勾配を逆にすることで、一本鎖となった生体－アダプター分子複合体111を、ナノポア101を介して第2の液槽104Bから第1の液槽104Aへ移動させることができる。すなわち、図6Aに示したように、第1の液槽104Aを負電位とし、第2の液槽104Bを正電位として形成された電圧勾配によって図中矢印[A]で示す方向に一本鎖となった生体－アダプター分子複合体111を移動させることができる。逆に、図6Bに示したように、第2の液槽104Bを負電位とし、第1の液槽104Aを正電位として形成された電圧勾配によって図中矢印[B]で示す方向に一本鎖となった生体－アダプター分子複合体111を移動させることができる。このように、生体分子分析装置は、一本鎖となった生体－アダプター分子複合体111を第1の液槽104Aと第2の液槽104Bとの間で往復運動させることができる。

[0073] また、図1の生体分子分析装置は、測定部106にて一对の電極105A及び105Bの間に流れるイオン電流（封鎖信号）を測定し、コンピュータ108が測定されたイオン電流（封鎖信号）の値に基づいて生体－アダプター分子複合体111の配列情報を取得することができる。なお、図1には示していないが、ナノポア101内に電極を設けることでトンネル電流を取得

してトンネル電流に基づいて配列情報を取得すること、又はトランジスタ特性変化を検出することでも生体分子109の配列情報を得ることが可能である。

[0074] ここで、より詳細に塩基配列情報の決定方法を説明する。塩基にはA T G Cの4種類があるが、これらの塩基がナノポア101を通過するとその種類ごとに固有のイオン電流（封鎖電流）の値が観測される。そこで、予め、既知の配列を用いてナノポア101通過時のイオン電流を計測しておき、当該既知の配列に対応した電流値をコンピュータ108におけるメモリに記憶させておく。そして、解析対象の生体－アダプター分子複合体111を構成する塩基が順次、ナノポア101を通過する際に測定された電流値を、メモリに格納した既知の配列に対応した電流値と比較することで、解析対象の生体－アダプター分子複合体111を構成する塩基の種類を順次決定することができる。

[0075] また、生体分子109の塩基配列決定方法としては、生体分子109に蛍光体を標識し、ナノポア101近傍で励起させ、その発光蛍光を検出しても良い。さらに、参考文献1（NANO LETTERS（2005），Vol. 5，pp. 421－424）に記載されている、ハイブリダイゼーションベースでの生体分子109の塩基配列を決定する方法を適用することもできる。

[0076] 上述した塩基配列情報の決定方法によって、図3及び図4に示したように、一本鎖となった生体－アダプター分子複合体111を、ナノポア101を介して第1の液槽104Aから第2の液槽104Bへ移動させる際に生体分子109の塩基配列情報を取得することができる。また、図6A及び6Bに示したように、一本鎖となった生体－アダプター分子複合体111を、ナノポア101を介して第1の液槽104Aと第2の液槽104Bとの間を往復運動する際に生体分子109の塩基配列情報を取得することができる。このとき、図6A及び6Bに模式的に示したが、ブロック分子201及び203によって、一本鎖となった生体－アダプター分子複合体111全体がナノポ

ア101を通過することを防止することができる。

[0077] なお、一本鎖となった生体−アダプター分子複合体111を往復運動させる際、図6Aの矢印[A]方向に移動するときのみ生体分子109の塩基配列情報を取得しても良いし、図6Bの矢印[B]方向に移動するときのみ生体分子109の塩基配列情報を取得しても良いし、図6Aの矢印[A]方向及び図6Bの矢印[B]方向の両方で生体分子109の塩基配列情報を取得しても良い。図6Aの矢印[A]方向に移動するときは、生体分子109の5'末端から3'末端に向かって塩基配列情報を決定し、図6Bの矢印[B]方向に移動するときは、生体分子109の3'末端から5'末端に向かって塩基配列情報を決定することとなる。いずれの場合でも、生体分子109について複数セットの塩基配列情報を取得することができ、塩基配列情報の正確性を向上させることができる。言い換えると、一本鎖となった生体−アダプター分子複合体111を往復運動させることで、生体分子109の塩基配列を複数回読み取ることができ、読み取り精度を向上させることができる。

[0078] また、上述した往復運動における印加電圧の切替えは、例えば、一定時間で自動的に切り替える方法を挙げることができる。この場合、コンピュータ108に電圧切替えのタイミングをプログラムしておき、当該プログラムに従って電圧源107を制御することで、当該タイミングで印加電圧を切替え、上述したような往復運動を行うことができる。

[0079] 或いは、上述した往復運動に際して読み取った塩基配列情報を用いて印加電圧の切替えを行うこともできる。例えば、アダプター分子110に特徴的な配列や、塩基（AGCT）とは異なる封鎖電流を生じさせる領域を組み入れ、この特徴的な配列や当該領域の信号を読み取った段階で電圧を切り替える方法が挙げられる。塩基とは異なる封鎖電流を生じさせる領域とは、例えば、ペプチド核酸や人工核酸等の疑似核酸を含む領域を挙げることができる。上記特徴的な配列や、塩基とは異なる封鎖電流を生じさせる領域の信号を読み取ることで、生体分子109について塩基配列の読取りが終わり、ナノ

ポア101に生体-アダプター分子複合体111の端部が近接していることを認識できる。よって、このタイミングで印加電圧を切替えることで、生体-アダプター分子複合体111がナノポア101から脱落する前に、生体-アダプター分子複合体111を反対方向に移動させることができる。さらに、本実施形態においては、上述した往復運動における印加電圧の切替えを、ブロック分子201及び203を検知することで切り替える方法を採用することができる。すなわち、ブロック分子201或いは203がナノポア101に近接すると封鎖電流の減少が計測できるため、封鎖電流の減少を検知した段階で印加電圧を切り替えるタイミングとすることができる。

[0080] 以上のように、アダプター分子110を使用することで二本鎖核酸を一本鎖核酸に変性する処理が必要ない。すなわち、解析対象の生体分子109が二本鎖核酸である場合であっても、第1の液槽104Aと第2の液槽104Bとの間に形成した電圧勾配によって、塩基配列の決定が可能な一本鎖核酸とすることができる。そして、そのあとは、上述したように定法に従って配列決定解析を行うことができる。

[0081] なお、上述の例では、生体分子109として二本鎖核酸（DNAやRNA）を例示したが、生体分子109としてはタンパク質（ペプチド鎖）や糖鎖であっても同様の原理によって分析対象とすることができる。

[0082] [第2の実施形態]

本実施の形態では、図1等に示したアダプター分子110とは異なる構成のアダプター分子300について説明する。なお、図7に例示的に示すアダプター分子300において、図1等に示したアダプター分子110と同じ構成については同じ符号を付すことで、本項においては詳細な説明を割愛する。

[0083] 図7に示すアダプター分子300は、生体分子109に結合する二本鎖核酸領域112と、二本鎖核酸領域112における生体分子109と結合する端部と異なる端部と連結し、互いに非相補的な塩基配列からなる一对の一本鎖核酸領域301A及び301Bと、一本鎖核酸領域301A及び301B

のうちいずれか一方の末端に配されたブロック分子201とを備える。なお、一本鎖核酸領域301Aは3'末端を有し、一本鎖核酸領域301Bは5'末端を有する。図7に示した例では、ブロック分子201は、3'末端を有する一本鎖核酸領域301Aの端部に配置されている。ブロック分子201は、一本鎖核酸領域113Aの端部ではなく、5'末端を有する一本鎖核酸領域301Bの端部に配置されていてもよい。

[0084] 図7に示すアダプター分子300における一本鎖核酸領域301Aは、分子モータが結合しうる分子モータ結合部302を有している。ここで分子モータとは、アダプター分子300及び生体分子109上を移動することができるタンパク質分子を意味する。このような機能を有する分子モータとしては、特に限定されないが、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、リボソーム及びヘリカーゼを挙げることができる。特に、本実施の形態では、分子モータとして、一本鎖DNAを鋳型として相補鎖を5'末端から3'末端方向に合成するDNAポリメラーゼを使用することが好ましい。分子モータ結合部302は、特定の塩基配列に限定されず任意の塩基配列とすることができ、一本鎖核酸として存在する。

[0085] また、図7に示すアダプター分子300における一本鎖核酸領域301Aは、分子モータ結合部302の3'末端側にプライマーがハイブリダイズしうるプライマー結合部303を有している。プライマー結合部303は、使用するプライマーの塩基配列と相補的な配列を有していればよく、具体的な塩基配列に限定されない。ここで、プライマーとは、特に限定されないが、例えば10～40塩基長、好ましくは15～35塩基長、より好ましくは18～25塩基長の一本鎖ヌクレオチドとすることができる。したがって、プライマー結合部303は、10～40塩基長、好ましくは15～35塩基長、より好ましくは18～25塩基長の領域であってプライマーの塩基配列に対して相補的な塩基配列からなる領域とすることができる。

[0086] さらに、図7に示すアダプター分子300における一本鎖核酸領域301Aは、分子モータ結合部302とプライマー結合部303との間にスペーサ

304を有している。ここでスペーサ304とは、分子モータが結合できない領域、すなわちAGCTからなる塩基を含まない領域を意味する。スペーサ304としては、特に限定されないが、塩基を含まない、直鎖状連結体とすることができる。特にスペーサ304の長さは、少なくとも2塩基に相当する長さ、すなわち約 $0.6 \times 2 \text{ nm}$ 以上とすることが好ましい。換言すると、スペーサ304により、分子モータ結合部302とプライマー結合部303との間を2塩基以上（約 $0.6 \times 2 \text{ nm}$ 以上）離間させることができる。スペーサ304を構成する材料としては、Integrated DNA Technologies社が提供するC3 Spacer、PC spacer、Spacer 9、Spacer 18及びdSpacer等のDNA鎖中に配置できる材料を挙げることができる。その他にも、スペーサ304としては直鎖状炭素鎖、直鎖状アミノ酸、直鎖脂肪酸及び直鎖状糖鎖等を使用することができる。

[0087] さらにまた、図7に示すアダプター分子300は、二本鎖核酸領域112における所定の領域を標識配列（図示せず）とすることができる。標識配列とは、バーコード配列やインデックス配列とも呼称され、アダプター分子300に固有の塩基配列を意味する。例えば、標識配列のみが相違する複数のアダプター分子300を用意しておくことで、標識配列に基づいて使用したアダプター分子300の種類を特定することができる。

[0088] 以上のように構成されたアダプター分子300を用いた生体分子109の分析方法を、図8A及びB並びに図9A～G)を用いて説明する。

[0089] 先ず、生体分子109の両端部にそれぞれアダプター分子300を結合した生体-アダプター分子複合体305を準備する。第1の液槽104A内に、当該生体-アダプター分子複合体305、分子モータ306、プライマー307及びブロッキング核酸308を含む電解質溶液を充填する。これにより、図8Aに示すように、アダプター分子300における分子モータ結合部302に分子モータ306が結合し、プライマー結合部303にプライマー307がハイブリダイズし、一本鎖核酸領域103Bの所定の位置にブロッ

キング核酸308がハイブリダイズする。なお、ブロッキング核酸308は、一本鎖核酸領域103Bの所定の領域に対して相補的な配列からなる一本鎖ヌクレオチドである。ブロッキング核酸308がハイブリダイズする領域は、一本鎖核酸領域103Bにおける5'末端領域（例えば、5'末端を含む2～10塩基、好ましくは5～10塩基）を除く領域とすることができる。ブロッキング核酸308が当該領域にハイブリダイズすることで、分子モータ306が一本鎖核酸領域301Bに結合することを防止できる。そのため、分子モータ306の分子モータ結合部302への結合効率が向上する。つまり、少ない量の分子モータ306でも、効率よく分子モータ結合部302と結合させることが可能である。ただし、分子モータ306が一本鎖核酸領域301Bに結合したとしても、生体分子109の分析結果に影響しない。よって、ブロッキング核酸308は使用しなくてもよい。

[0090] 次に、第1の電極105A及び第2の電極105Bの間に電圧を印加して、第1の液槽104A側を負電位（又はグランド電位。以下同様。）とし第2の液槽104Bを正電位とする電位勾配を形成する。これにより、一本鎖核酸領域113Bがナノポア101方向に移動し、ブロッキング核酸308がハイブリダイズしていない5'末端領域がナノポア101内に導入される。そして、図8Bに示すように、第1の液槽104Aと第2の液槽104Bとの間の電位勾配により、生体-アダプター分子複合体305はナノポア101を介して（通って）第2の液槽104Bへ移動する。このとき、生体-アダプター分子複合体305における二本鎖の核酸（アダプター分子300における二本鎖核酸領域112と生体分子109、ブロッキング核酸308と一本鎖核酸領域301B）が引き剥がされる（Unzipped）。

[0091] このように、アダプター分子300を使用した場合でも、二本鎖の核酸である生体分子109に対して煩雑な変性処理（例えば熱処理）を行うことなく、ナノポア101を通過しうる一本鎖の核酸とすることができる。すなわち、アダプター分子300を使用した場合でも二本鎖の核酸を容易に引き剥がすことができる。なお、図8A及びBに示した状態では、プライマー30

7と分子モータ306とがスペーサ304の長さ離間しているため、プライマー307の3'末端を起点とした、分子モータ306による相補鎖合成反応は開始されない。なお、図示しないが、第1の実施形態と同様にして、第2の液槽104B内で、生体-アダプター分子複合体305における一本鎖核酸領域103Bにブロック分子201を結合することができる。

[0092] そして、第1の液槽104Aと第2の液槽104Bの間の電位勾配により、図9Aに示すように、一本鎖となった生体-アダプター分子複合体305がナノポア101を通過し、その後、分子モータ306がナノポア101に到達する。ここで分子モータ306の寸法 $D_m$ はナノポア101の直径 $D_n$ よりも大きいため ( $D_m > D_n$ )、分子モータ306がナノポア101の入口(第1の液槽104A側)に到達すると、ナノポア101を通過して出口側(第2の液槽104B側)に進むことはできず、ナノポア101の入口に止まる。一方、一本鎖となった生体-アダプター分子複合体305は負電荷を帯びているため、さらに下流方向に進み、スペーサ304を中心に形状変化を起こす。すると、分子モータ306は、プライマー307の3'末端と接触し、結合する(図9B)。これにより、分子モータ306は、プライマー307の3'末端を起点として、5'末端から3'末端の方向に相補鎖合成反応を開始する。なお、図9A~Hにおいて白抜き矢印は負極から正極に向かう電位勾配を意味している。

[0093] そして、図9Cに示すように、分子モータ306による相補鎖合成反応が進行すると、一本鎖となった生体-アダプター分子複合体305が電位勾配によって第2の液槽104B側に移動する力よりも、一本鎖となった生体-アダプター分子複合体305が分子モータ306によって引き上げられる力が強いため、一本鎖となった生体-アダプター分子複合体305は電位勾配に逆らって第1の液槽104A方向(図9C中矢印Mの方向)に搬送される。このとき、ナノポア101を通過する生体-アダプター分子複合体305の塩基配列情報を取得することができる。

[0094] そして、図9Dに示すように、生体-アダプター分子複合体305の一本

鎖核酸領域103Bに結合したブロック分子203がナノポア101に到達すると、分子モータ306による搬送動作及びシーケンシングが停止する。分子モータ306による搬送動作及びシーケンシングが停止した段階で、第2の液槽104B内をより強い正電位とする。その結果、図9Eに示すように、生体-アダプター分子複合体305が電位勾配によって第2の液槽104B側に移動する(図9E中矢印Mの方向)。このとき、分子モータ306によって合成された生体-アダプター分子複合体305の相補鎖307が生体-アダプター分子複合体305から引き剥がされる(Unzipped)とともに、分子モータ306が生体-アダプター分子複合体305から乖離する。

[0095] なお、第2の液槽104B内をより強い正電位とするタイミングは、一定時間で自動的に切り替える方法や、読み取った塩基配列情報を用いて切り替える方法とすることもできる。あるいは、ブロック分子203がナノポア101に近接すると封鎖電流の減少が計測できるため、封鎖電流の減少を検知した段階で第2の液槽104B内をより強い正電位としてもよい。これらいずれの方法でも、一本鎖核酸領域103Bにブロック分子203を結合させることで、一本鎖となった生体-アダプター分子複合体305全体がナノポア101を通過することを防止することができる。

[0096] そして、次に、図9Fに示すように、第1の電極105A及び第2の電極105Bに印加する電圧を反転し、第1の液槽104Aを正電位とし第2の液槽104Bを負電位とする電位勾配を形成する。これにより、一本鎖となった生体-アダプター分子複合体305を、ナノポア101を介して第2の液槽104Bから第1の液槽104A方向へ移動させることができる。

[0097] その後、図9Gに示すように、第1の液槽104Aに充填された電解質溶液103に分子モータ306及びプライマー307を添加し、プライマー結合部303にプライマー307をハイブリダイズさせ、分子モータ結合部302に分子モータ306を結合させる。その後、第1の電極105A及び第2の電極105Bに印加する電圧を再び反転し、第1の液槽104Aを負電

位とし第2の液槽104Bを正電位とする電位勾配を形成する。これにより、プライマー307がハイブリダイズし、分子モータ306が結合した生体アダプター分子複合体305を、第2の液槽104B方向へ移動させる。そして、図9Bに示したように、スペーサ304を中心とした形状変化が生じ、分子モータ306にプライマー307の3'末端と接触する状態を形成する。すなわち、図9A~Gを繰り返すことによって、分子モータ306による搬送動作毎にシーケンシングすることができる。

[0098] なお、参考文献(Nat Nanotechnol, 2010, November; 5(11): 798-806)によれば、分子モータ306を用いた計測(ナノポア101の直径1.4nm)では、少なくとも80mV以上の電圧をかけながら計測することが示唆されている。この場合、参考文献(Nature physics, 5, 347-351, 2009.)によれば、大凡24pNの力がかかること示唆されている。したがって、本実施形態において、ブロック分子201及び203は、80mVの電圧で測定する場合には24pN以上の結合力で一本鎖核酸領域103A及び103Bに結合することが好ましい。

## 実施例

[0099] 以下、実施例を用いて本発明を更に詳細に説明するが、本発明の技術範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

### 〔実施例1〕

本実施例で使用した試薬類を表1に示した。本実施例では、スペーサ304として脱塩基配列部(iSpC3)を有するアダプター分子300を作製した。また、本実施例では、分子モータ306として高塩耐性DNAポリメラーゼであるBST3.0 polymeraseを使用した。さらに、1塩基単位信号を明瞭化することが確認されている、特殊塩基(AMP, GMP, UMP-PNP)とdTTPをBST3.0 polymerase反応の基質として使用した。

[0100]

[表1]

試薬類	製品コード	製造元
CaCl <sub>2</sub>	038-19735	Wako Pure Chemical Industries
KCl	160-22115	Wako Pure Chemical Industries
MgCl <sub>2</sub>	136-03995	Wako Pure Chemical Industries
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	N.A.	Kanto Chemical Co.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	N.A.	Kanto Chemical Co.
KOH	32344-00	Kanto Chemical Co.
1M Tris-HCl Buffer (pH7.5)	15567-027	Invitrogen
BST 3.0 DNA polymerase	M0374M	New England Biolabs
10x Isothermal Buffer II	B0374S	New England Biolabs
dNTP Mix (dATP,dGTP,dTTP,dCTP)	N0447L	New England Biolabs
AMP-PNP	A2647-5MG	Sigma-Aldrich
GMP-PNP	G0635-5MG	Sigma-Aldrich
UMP-PNP	NU-415S	Jena Bioscience
Blunt/TA Ligase Master Mix	M0367S	New England Biolabs
NEBNext Ultra II End Repair/dA-Tailing Module	E7546L	New England Biolabs

[0101] 本実施例では、図8及び9に示したスキームで、二本鎖DNA（生体分子109）の塩基配列を解析するためのシーケンサ用ライブラリを作製した。本実施例では、図7に示したアダプター分子300を設計した。本実施例で設計したアダプター分子300は、図8に示したように、解析対象の二本鎖DNAの両末端に結合する対称構造のホモ型アダプターである。設計したアダプター分子300は、ライゲーション反応によって解析対象の二本鎖DNAに結合し、シンメトリーなY型構造を両末端に有する生体-アダプター分子複合体305となる。本実施例では、生体-アダプター分子複合体305を作製した後、シーケンス用のプライマー307をプライマー結合部303にハイブリダイズさせる。次に、生体-アダプター分子複合体305をポリメラーゼとともに第1の液槽104Aに投入すると、電気泳動によってライブラリで1箇所だけ一本鎖状態となっている一本鎖核酸領域301Bがナノポア101へと引き込まれていく。ナノポア101を通過することで二本鎖DNAが解離（unzip）していく。分子モーター結合部302に結合したDNAポリメラーゼ（分子モーター306）がナノポア101に到達すると、スペーサ304を挟んで離間していたプライマー307の端部とDNAポリ

メラゼとが接触し、5'末端から3'末端の方向に相補鎖合成反応を開始する。

[0102] 本実施例では、λファージ由来の所定の領域を解析対象の二本鎖DNA（生体分子109）とした（配列番号1）。配列番号1に示す塩基配列からなる二本鎖DNAは、λファージのゲノムを鋳型として、配列番号1における1～21番目の塩基配列からなるフォワードプライマーと、配列番号1における394～415番目の塩基配列の逆鎖配列からなるリバースプライマーとを用いたPCRにより取得することができる。

[0103] また、本実施例では、アダプター分子300として、HomoAdaptor-template（配列番号2）とHomoAdaptor-primer（配列番号3）とを合成し、相補領域同士でハイブリダイゼーションすることで作製した。なお、配列番号2における5'末端から1～30番目は二本鎖核酸領域112を構成する一方の鎖であり、61～64番目のNNNNはスペーサ304に相当し、65～91番目はプライマー結合部303に相当している。さらに、配列番号3における5'末端から62～92番目は二本鎖核酸領域112を構成する他方の鎖である。さらにまた、本実施例では、プライマー結合部303にハイブリダイズするプライマー307としてSequencingPrimer（配列番号4）を設計した。

[0104] なお、このアダプター分子300におけるHomoAdaptor-templateの5'末端リン酸部とHomoAdaptor-primerの3'末端に突出したdT部が、dA付加されたPCR産物とハイブリダイズし、ライゲーションに必要なリン酸化が施されていることで結合される（T/Aライゲーション）。この際、アダプター分子300における突出塩基の存在により、アダプタダイマは生成されないように設計されている。

[0105] また、具体的には下記の工程でライブラリを作製した（図10及び11参照）。

(1) HomoAdaptor-template及びHomoAdaptor-primerをIsothermal Buffer11内にて80

℃で10分（解離）→30℃で30分（ハイブリ）でハイブリダイゼーションし、アダプター分子300を作製した。

(2) PCR増幅したDNAサンプルをNEBNext Ultra II End Repair/dA-Tailing Moduleを用いて20℃で30分（酵素反応）→65℃で30分（酵素失活）により末端修復及びdA付加処理を行い、AMPure XPにより精製した。

(3) (1) で用意したアダプタと(2) で用意したdA付加後のDNAサンプルを混合し、Blunt/TA Ligase Master Mixを用いて、室温（25℃）で30分、T/Aライゲーションを行い、氷上で静置後、AMPure XPにより精製した（アダプタ：サンプルのモル比は3：1に調整）。

(4) (3) でライゲーションされたサンプルに対して、Sequencing PrimerをIsothermal Buffer II内にて30℃で30分ハイブリダイゼーションし、最終ライブラリを作成した。

[0106] なお、上記(1)～(4)で使用した反応液の組成等を図10に示した。

図11には、本実施例で設計したアダプター分子の塩基配列及びその二次構造を模式的に示している。

[0107] 得られたライブラリは、電気泳動装置（Agilent technologies社、Tape station 4200）にて電気泳動を行い、バンド解析を行った。本実施例では、測定した封鎖電流値を規格化し（図12）、予想される封鎖電流値と相関を取ったところ相関係数 $R^2 = 0.807$ であった。この結果から、本実施例で作製したアダプター分子300を使用することで、二本鎖DNAを一本鎖DNAに熱変性するといった工程を含まない上述したプロトコルによってシーケンスが可能であることが示された。

## 請求の範囲

- [請求項1] 解析対象の生体分子に対して直接的又は間接的に結合する一方端部を有し、互いに相補的な塩基配列からなる二本鎖核酸領域と、  
当該二本鎖核酸領域における上記一方端部と異なる他方端部と連結し、互いに非相補的な塩基配列からなる一对の一本鎖核酸領域と、  
上記一对の一本鎖核酸領域のうち、一方の一本鎖核酸領域に配設された、上記生体分子の解析装置におけるナノポアの径より大径のブロック分子とを備えるアダプター分子。
- [請求項2] 上記ブロック分子は、上記一对の一本鎖核酸領域のうち端部が3'末端である一本鎖核酸領域に配設されたことを特徴とする請求項1記載のアダプター分子。
- [請求項3] 上記ブロック分子は、上記一本鎖核酸領域に結合可能な分子又は上記一本鎖核酸領域内における相補領域で形成されるヘアピン構造であることを特徴とする請求項1記載のアダプター分子。
- [請求項4] 上記一对の一本鎖核酸領域のうち、端部が3'末端である一本鎖核酸領域は、分子モータが結合しうる分子モータ結合部を備えることを特徴とする請求項1記載のアダプター分子。
- [請求項5] 上記分子モータ結合部を備える一本鎖核酸領域は、当該分子モータ結合部より3'末端側にプライマーがハイブリダイズしうるプライマー結合部を備えることを特徴とする請求項4記載のアダプター分子。
- [請求項6] 上記分子モータ結合部と上記プライマー結合部との間に、上記分子モータが結合できないスペーサを有することを特徴とする請求項5記載のアダプター分子。
- [請求項7] 上記一对の一本鎖核酸領域のうち、端部が5'末端である一本鎖核酸領域は、5'末端から少なくとも2番目までの塩基がチミンからなることを特徴とする請求項1記載のアダプター分子。
- [請求項8] 上記二本鎖核酸領域は、標識配列を有することを特徴とする請求項1記載のアダプター分子。

- [請求項9] 解析対象の生体分子と、当該生体分子の両末端に対して直接的又は間接的に結合した請求項1～8いずれか一項記載のアダプター分子とを含む生体－アダプター分子複合体。
- [請求項10] 上記解析対象の生体分子は、二本鎖核酸であることを特徴とする請求項9記載の生体－アダプター分子複合体。
- [請求項11] ナノポアを有する薄膜と、  
上記薄膜を介して対向した第1の液槽及び第2の液槽と  
上記第1の液槽に請求項9又は10記載の生体－アダプター分子複合体を含む電解質溶液が充填されるとともに、上記第2の液槽に電解質溶液が充填された状態で第1の液槽と第2の液槽の間に電圧を印加する電圧源と、  
上記第1の液槽と上記第2の液槽との間に所望の電位勾配を形成するように上記電圧源を制御する制御装置とを備える生体分析装置。
- [請求項12] ナノポアを有する薄膜を介して対向した第1の液槽と第2の液槽のうち、第1の液槽内に請求項9又は10記載の生体－アダプター分子複合体を含む電解質溶液が充填され、第2の液槽内に電解質溶液が充填された状態で、第1の液槽と第2の液槽の間に電圧を印加して、第1の液槽側を負又はグラウンド電位とし第2の液槽を正電位とする電位勾配を形成する工程と、  
上記第2の液槽から上記第1の液槽に向かって上記生体－アダプター分子複合体が上記ナノポアを通過する際に生ずる信号を測定する工程とを備え、  
上記電位勾配を形成する工程では、生体－アダプター分子複合体における一本鎖核酸領域が上記ナノポアを介して上記第2の液槽内に導入され、電位勾配により上記生体－アダプター分子複合体が上記第1の液槽から上記第2の液槽に向かって移動することを特徴とする、生体分子の分析方法。
- [請求項13] 上記生体－アダプター分子複合体は、端部が3'末端である一本鎖

核酸領域に上記ブロック分子が配設されており、端部が5'末端である一本鎖核酸領域が上記ナノポアを介して上記第2の液槽内に導入され、電位勾配により上記生体-アダプター分子複合体が上記第1の液槽から上記第2の液槽に向かって移動し、端部が3'末端である一本鎖核酸領域に配設されたブロック分子とナノポアとが接触することで、上記第1の液槽から上記第2の液槽に向かう上記生体-アダプター分子複合体の移動が停止することを特徴とする請求項12記載の生体分子の分析方法。

[請求項14] 上記生体-アダプター分子複合体は、端部が3'末端である一本鎖核酸領域に分子モータ結合部を有し、

上記第1の液槽に充填された電解質溶液は、上記分子モータ結合部に結合しうる分子モータを含み、

当該分子モータが上記分子モータ結合部と結合し、当該分子モータにより上記生体-アダプター分子複合体を上記第2の液槽から上記第1の液槽に向かって移動させることを特徴とする請求項12記載の生体分子の分析方法。

[請求項15] 上記生体-アダプター分子複合体は、端部が3'末端である一本鎖核酸領域に分子モータ結合部と、当該分子モータ結合部より3'末端側にプライマー結合部とを有し、

上記第1の液槽に充填された電解質溶液は、上記分子モータ結合部に結合しうる分子モータと、上記プライマー結合部にハイブリダイズしうるプライマーとを含み、

上記分子モータは、プライマー結合部にハイブリダイズしたプライマーから相補鎖を合成することで、上記生体-アダプター分子複合体を上記第2の液槽から上記第1の液槽に向かって移動させることを特徴とする請求項12記載の生体分子の分析方法。

[請求項16] 上記生体-アダプター分子複合体は、端部が3'末端である一本鎖核酸領域に分子モータ結合部と、当該分子モータ結合部より3'末端

側にプライマー結合部と、当該分子モータ結合部と当該プライマー結合部との間に上記分子モータが結合できないスペーサとを有し、

上記第1の液槽に充填された電解質溶液は、上記分子モータ結合部に結合しうる分子モータと、上記プライマー結合部にハイブリダイズしうるプライマーとを含み、

上記分子モータが上記ナノポアに接触した状態で、上記分子モータがプライマー結合部にハイブリダイズしたプライマーから相補鎖を合成することで、上記生体アダプター分子複合体を上記第2の液槽から上記第1の液槽に向かって移動させることを特徴とする請求項12記載の生体分子の分析方法。

[請求項17] 上記信号を測定する工程では、上記アダプター分子における特定の領域からの信号を測定した段階で第1の液槽と第2の液槽の間に印加した電圧を反転し、第1の液槽側を正電位とし第2の液槽を負又はグラウンド電位とする電位勾配を形成することを特徴とする請求項12記載の生体分子の分析方法。

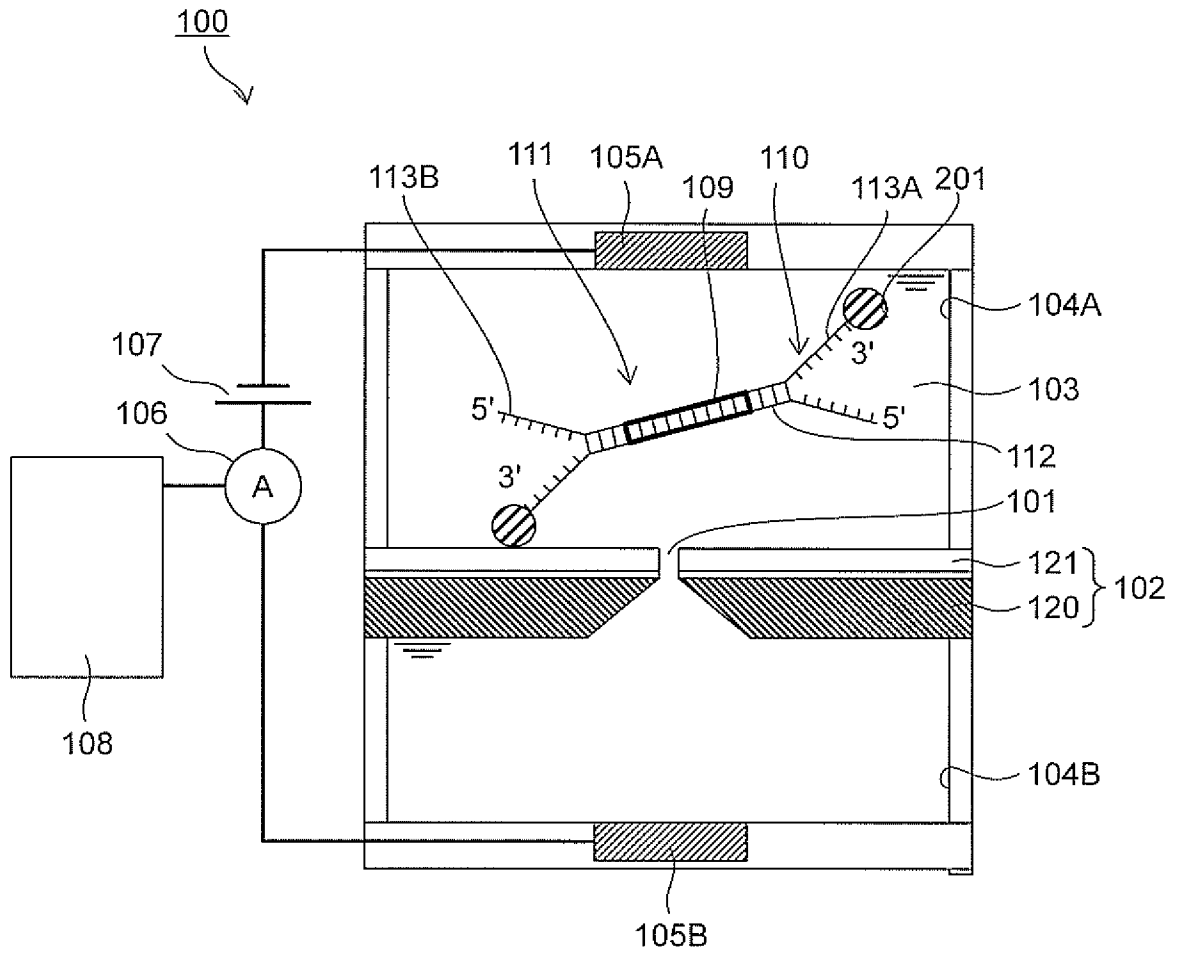
[請求項18] 上記第2の液槽に充填された電解質溶液は、上記生体アダプター分子複合体における一本鎖核酸領域の5'末端側に結合可能な分子を含み、

上記ナノポアを介して上記第2の液槽内に導入した一本鎖核酸領域の5'末端に上記分子が結合することを特徴とする請求項12記載の生体分子の分析方法。

[請求項19] 上記第1の液槽と上記第2の液槽の間に印加する電圧を制御することで、上記生体アダプター分子複合体を上記第1の液槽と上記第2の液槽との間で往復移動させ、上記信号を測定する工程を繰り返し行うことを特徴とする請求項12記載の生体分子の分析方法。

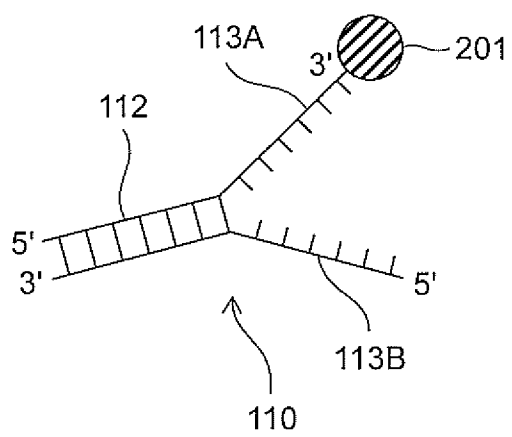
[図1]

図 1



[図2]

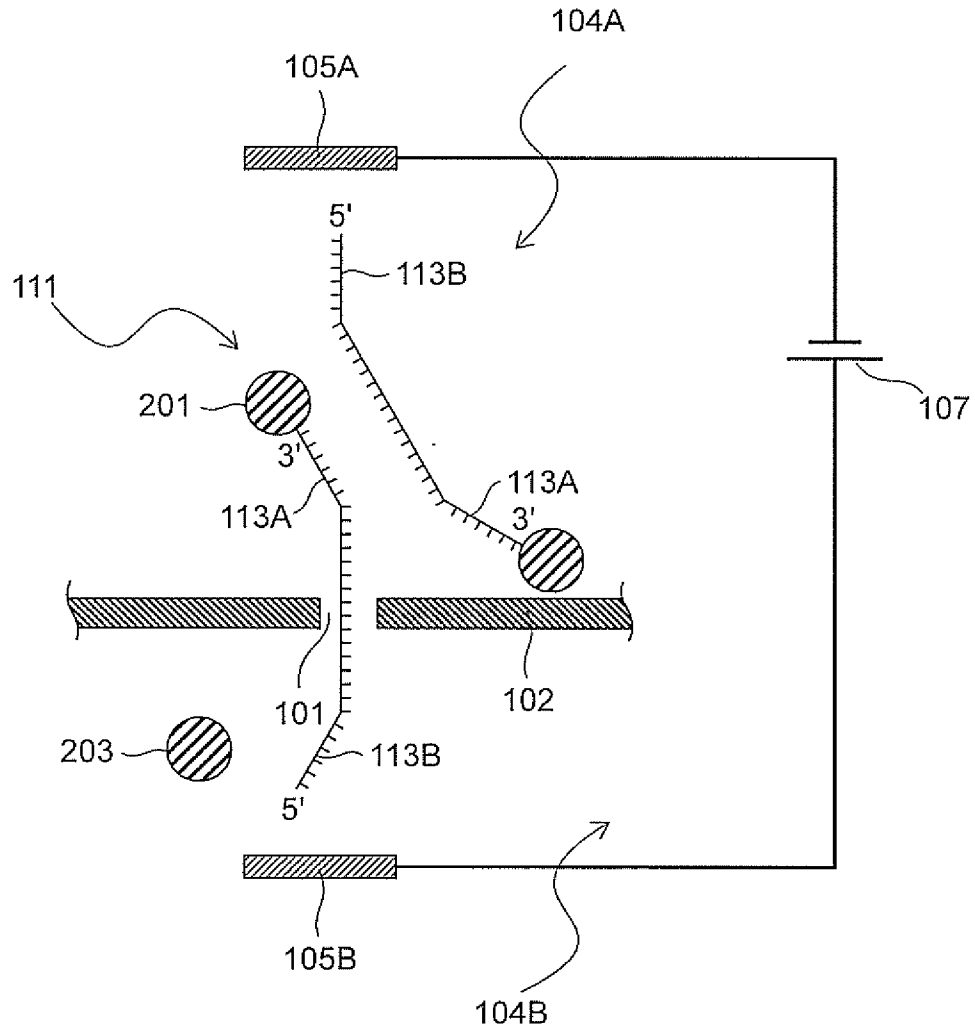
図 2





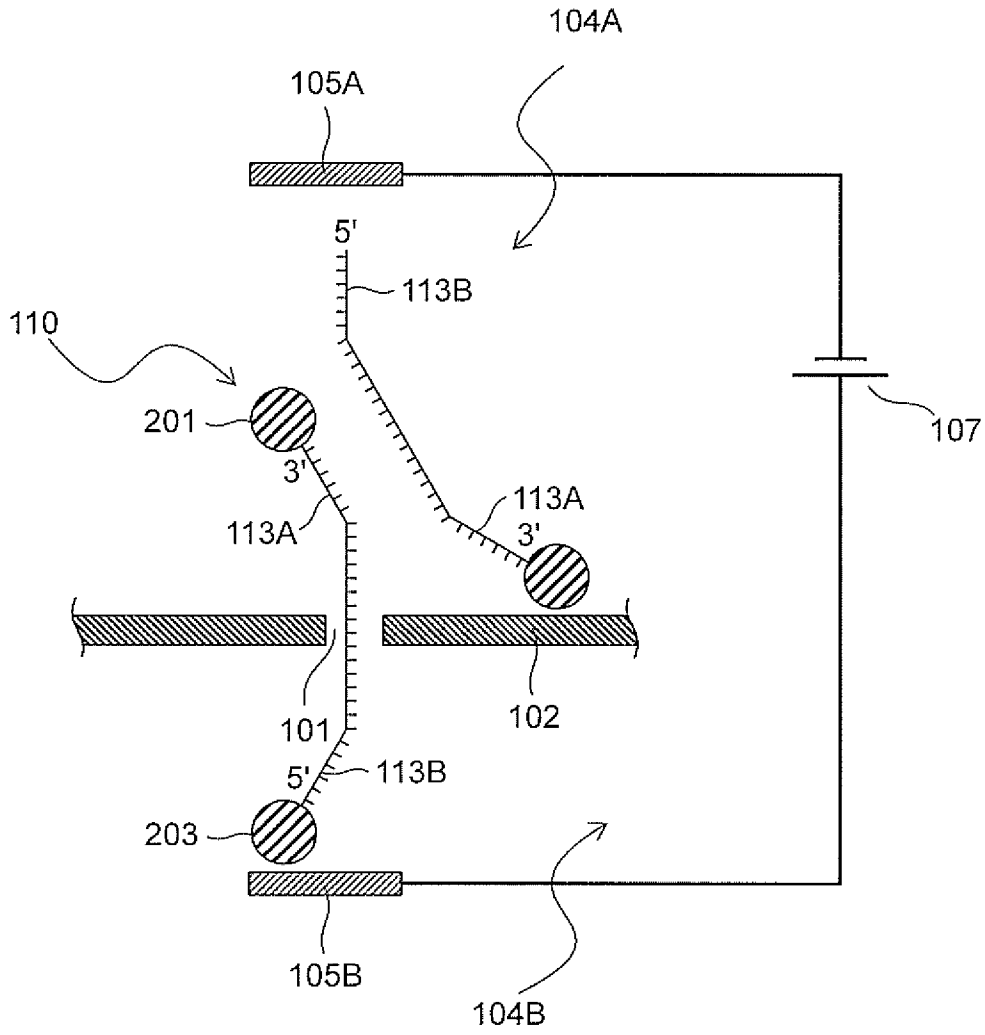
[図4]

図 4



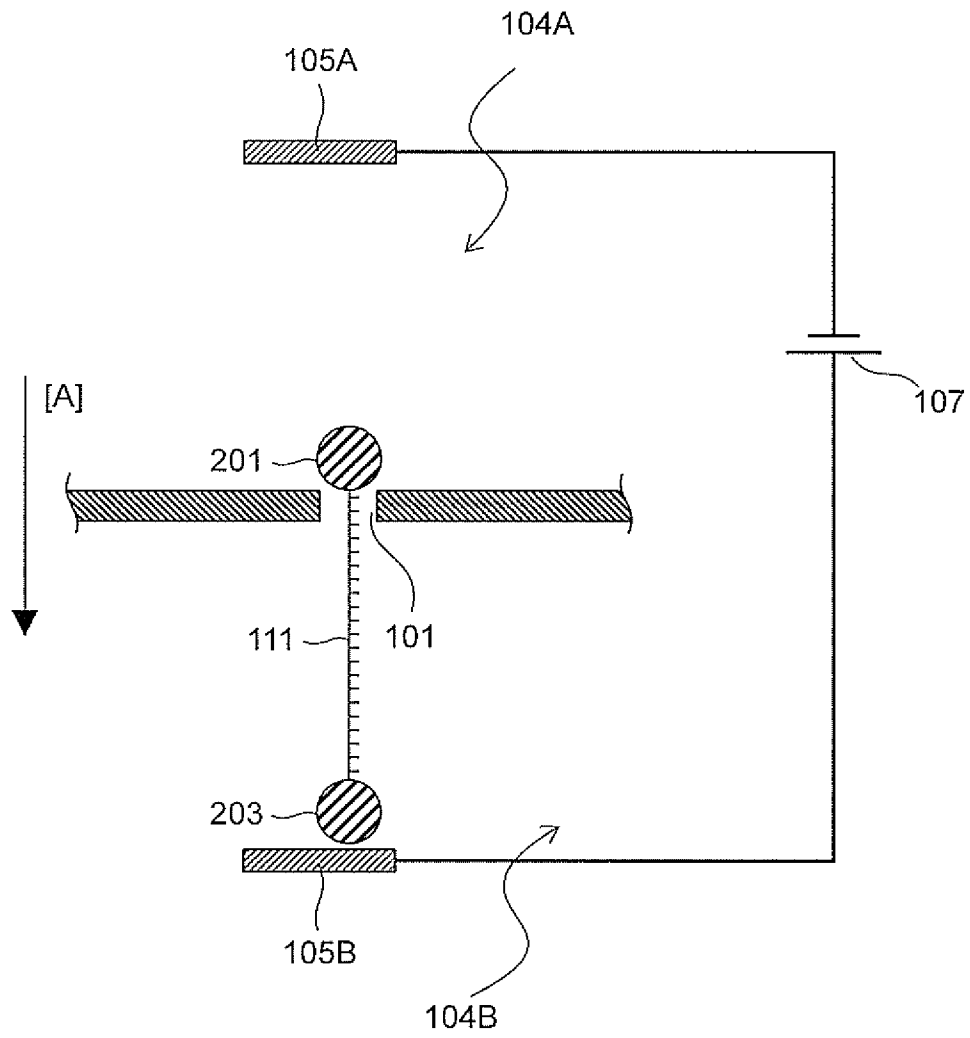
[図5]

図 5



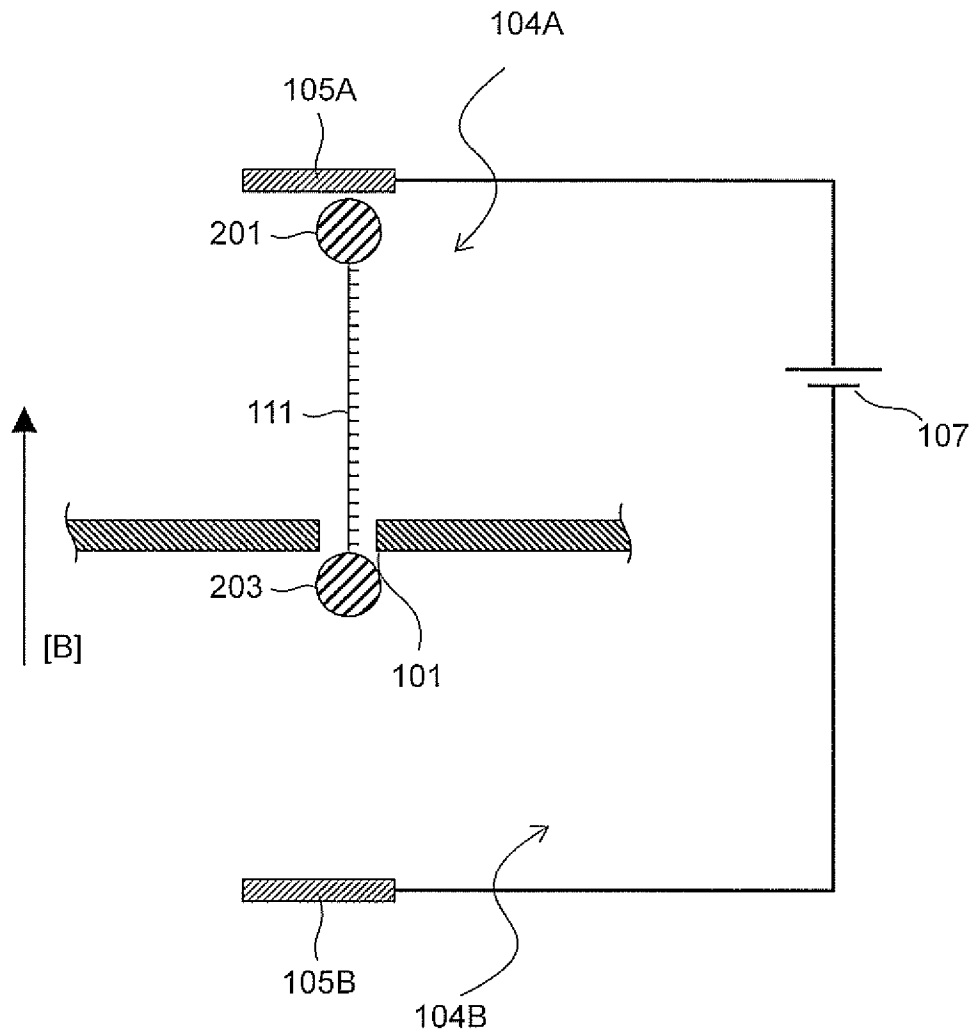
[図6A]

図 6 A



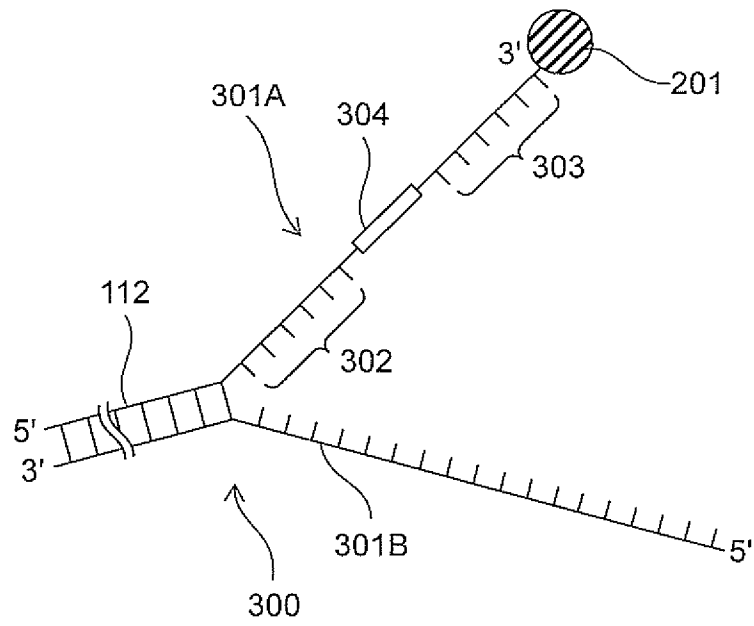
[図6B]

図 6 B



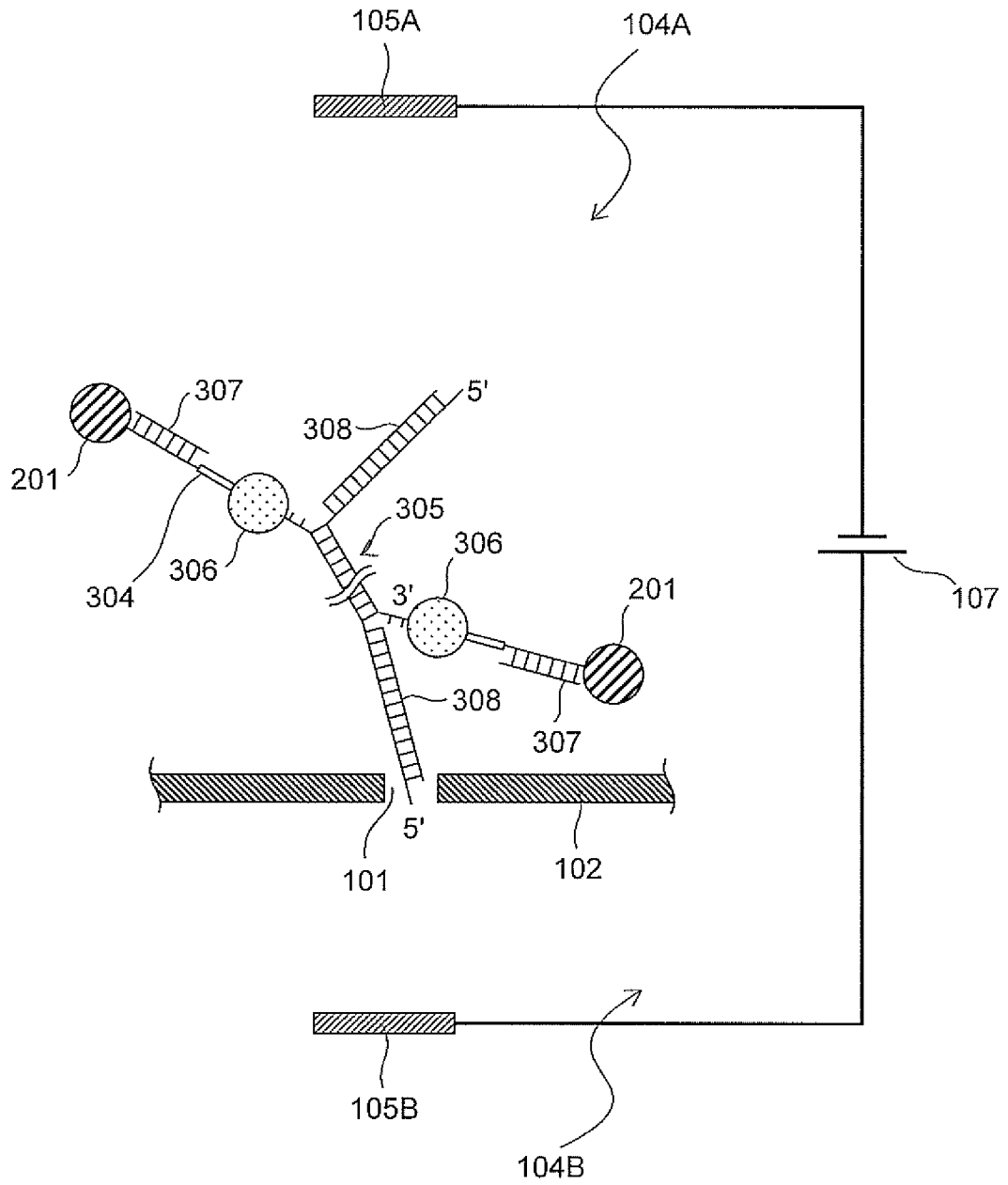
[図7]

図 7



[図8A]

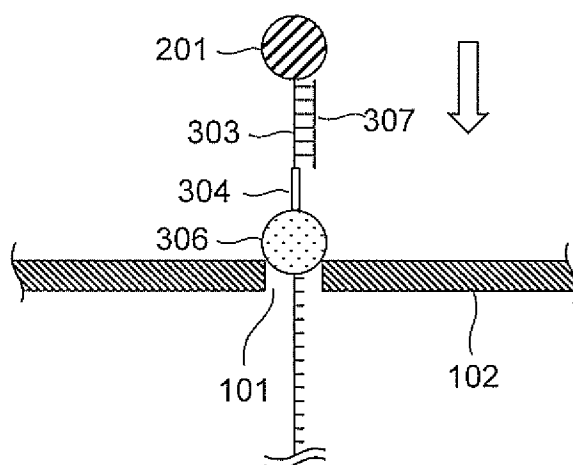
図 8 A





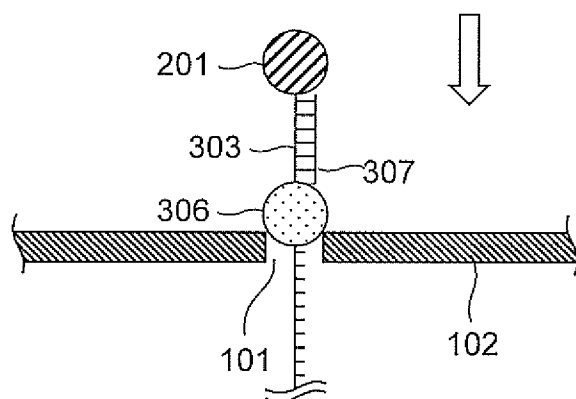
[図9A]

図 9 A



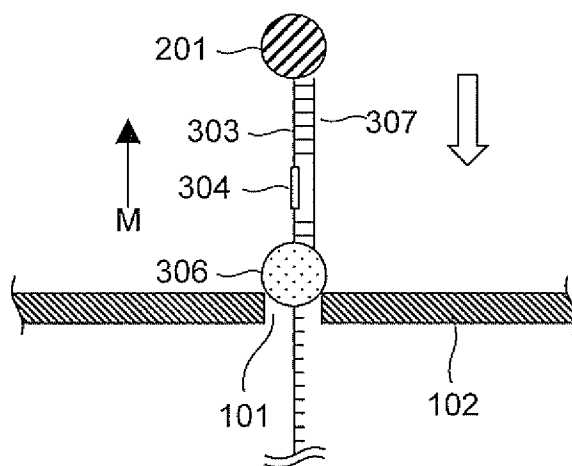
[図9B]

図 9 B



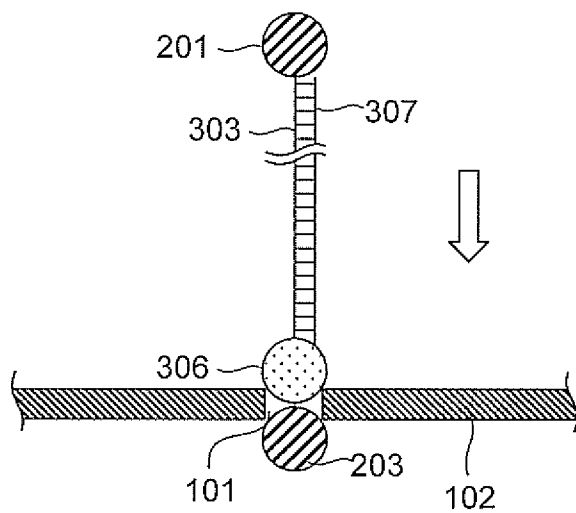
[図9C]

図9C



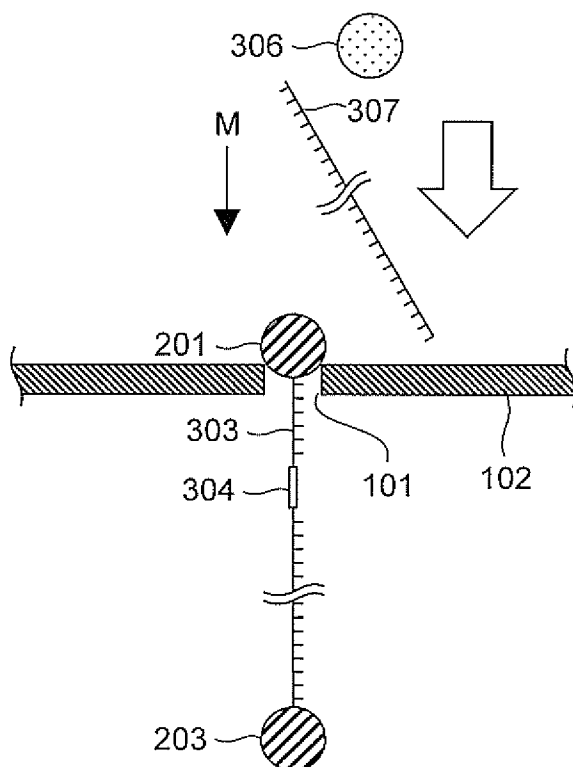
[図9D]

図 9 D



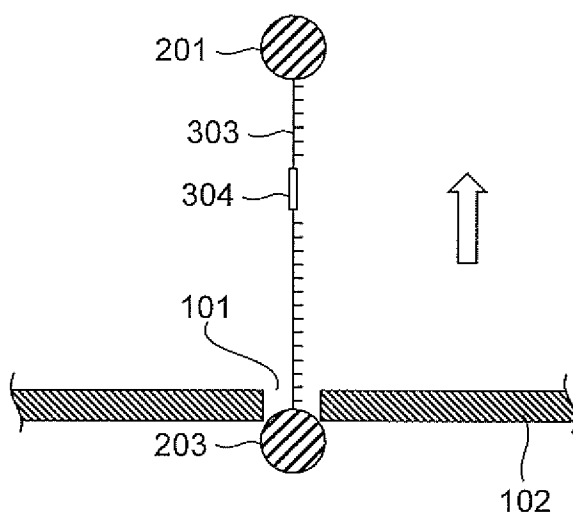
[図9E]

図 9 E



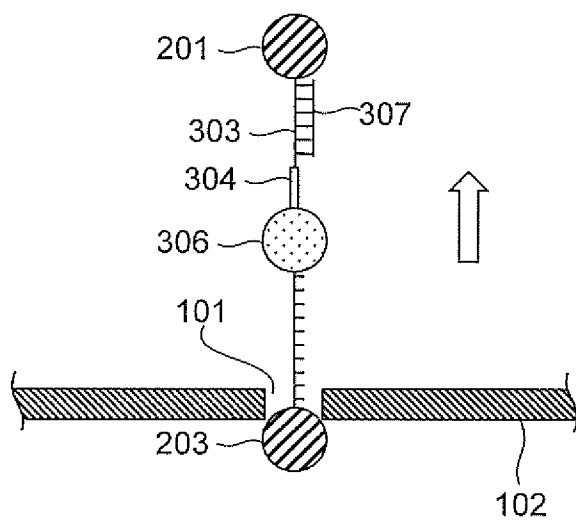
[図9F]

[図9F]



[図9G]

図 9 G



[図10]

図 10

1. Adaptor hybridization:  
80 °C 10 min → 30 °C 30 min

HomoAdaptor-template 10 uM	1 uL
HomoAdaptor-primer 10 uM	1 uL
10x Isotherml Buffer II	1 uL
D.W.	7 uL
Total	10 uL

2. End repair/dA tailing:  
20 °C 30 min → 65 °C 30 min → 4 °C  
→ AMPure purification

DNA sample 500 ng/uL	2 uL
1x TE buffer	48 uL
Ultra II End Repair buffer	7 uL
Ultra II End Repair enzyme	3 uL
Total	60 uL

3. Ligation:  
R.T. 30 min → on ice  
→ AMPure purification

(1) Hybridized adaptor 0.5 uM	20 uL
(2) dA tailed DNA samples	20 uL
Blunt/TA ligase MasterMix	40 uL
Total	80 uL

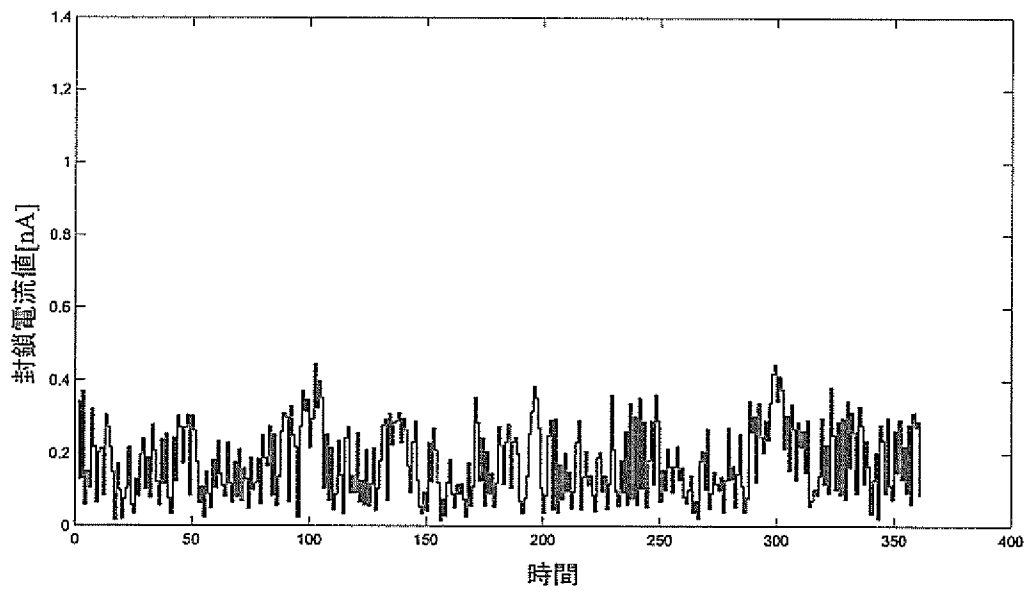
4. Primer hybridization:  
30 °C 30 min

(3) Purified Ligated DNA samples	20 uL
SequencingOligo 1 uM	2.5 uL
10x Isotherml Buffer II	2.5 uL
Total	25 uL



[図12]

図 1 2



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2019/036511

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int. Cl. C12N15/11 (2006.01) i, C12M1/00 (2006.01) i, C12Q1/6869 (2018.01) i, C12Q1/6876 (2018.01) 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)

Int. Cl. C12N15/11, C12M1/00, C12Q1/6869, C12Q1/6876

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996  
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2019  
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2019  
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2017-503517 A (OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES LIMITED) 02 February 2017, claim 1, example 7,	1-8
Y	fig. 12-14 & WO 2015/110813 A1, claim 1, example 7, fig. 12-14 & WO 2014/135838 A1 & WO 2015/055981 A2 & WO 2015/110777 A1 & WO 2015/150787 A1 & WO 2014/013262 A1 & WO 2015/022544 A1 & WO 2015/056028 A1 & WO 2015/150786 A1	8
A		9-19
Y	JP 2015-505458 A (GENIA TECHNOLOGIES, INC.) 23 February 2015, claims 24, 26-27, paragraphs [0133]-[0139], fig. 28 & WO 2013/109970 A1, claims 24, 26-27, paragraphs [0164]-[0170], fig. 28 & US 2013/0244340 A1	8
A		9-19

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 20.11.2019	Date of mailing of the international search report 03.12.2019
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer  Telephone No.
--	---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/JP2019/036511

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2010/0035260 A1 (OLASAGASTI, Felix) 11 February 2010, claim 1, all drawings & WO 2008/124107 A1, claim 1, figures & US 2011/0174625 A1 & US 2011/0005918 A1 & JP 2015-51013 A	1-19
A	JP 2010-230614 A (HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORP.) 14 October 2010, claim 1, all drawings & US 2011/0308950 A1, claim 1, figures & WO 2010/116595 A1	1-19
A	US 9017937 B1 (TURNER, Stephen) 28 April 2015, claim 1, columns 50-52, fig. 24 & WO 2010/117470 A2 & US 2010/0331194 A1	1-19

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/11(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12Q1/6869(2018.01)i, C12Q1/6876(2018.01)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 (IPC))

Int.Cl. C12N15/11, C12M1/00, C12Q1/6869, C12Q1/6876

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	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2019年
日本国実用新案登録公報	1996-2019年
日本国登録実用新案公報	1994-2019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), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

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
X Y A	JP 2017-503517 A (オックスフォード ナノポール テクノロジー ズ リミテッド) 2017.02.02, 請求項1, 実施例7, 図12-14 & WO 2015/110813 A1, Claim 1, Example 7, Figures 12-14 & WO 2014/135838 A1 & WO 2015/055981 A2 & WO 2015/110777 A1 & WO 2015/150787 A1 & WO 2014/013262 A1 & WO 2015/022544 A1 & WO 2015/056028 A1 & WO 2015/150786 A1	1-8 8 9-19

☑ 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

の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

20.11.2019

国際調査報告の発送日

03.12.2019

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号100-8915  
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)

木原 啓一郎

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

4867

C (続き) . 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 A	JP 2015-505458 A (ジニア テクノロジーズ, インコーポレイテッド) 2015.02.23, 請求項 24, 26-27, 段落 0133-0139, 図 28 & WO 2013/109970 A1, Claims 24, 26-27, Paragraphs 164-170, Figure 28 & US 2013/0244340 A1	8 9-19
A	US 2010/0035260 A1 (OLASAGASTI, Felix) 2010.02.11, 請求項 1, 全図 & WO 2008/124107 A1, Claim 1, Figures & US 2011/0174625 A1 & US 2011/0005918 A1 & JP 2015-51013 A	1-19
A	JP 2010-230614 A (株式会社日立ハイテクノロジーズ) 2010.10.14, 請求項 1, 全図 & US 2011/0308950 A1, Claim 1, Figures & WO 2010/116595 A1	1-19
A	US 9017937 B1 (TURNER, Stephen) 2015.04.28, 請求項 1, 第 50-52 欄, 図 24 & WO 2010/117470 A2 & US 2010/0331194 A1	1-19