

(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 4 月 2 日(02.04.2015)



(10) 国際公開番号

WO 2015/045593 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/34 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/069390
- (22) 国際出願日: 2014 年 7 月 23 日(23.07.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-205051 2013 年 9 月 30 日(30.09.2013) JP
- (71) 出願人: NECソリューションイノベータ株式会社(NEC SOLUTION INNOVATORS, LTD.) [JP/JP];
〒1368627 東京都江東区新木場一丁目 1 8 番 7 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 吉田 嘉仁(YOSHIDA Yoshihito); 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目 1 8 番 7 号
NECソリューションイノベータ株式会社内 Tokyo (JP). 堀井 克紀(HORII Katsunori); 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目 1 8 番 7 号
NECソリューションイノベータ株式会社内

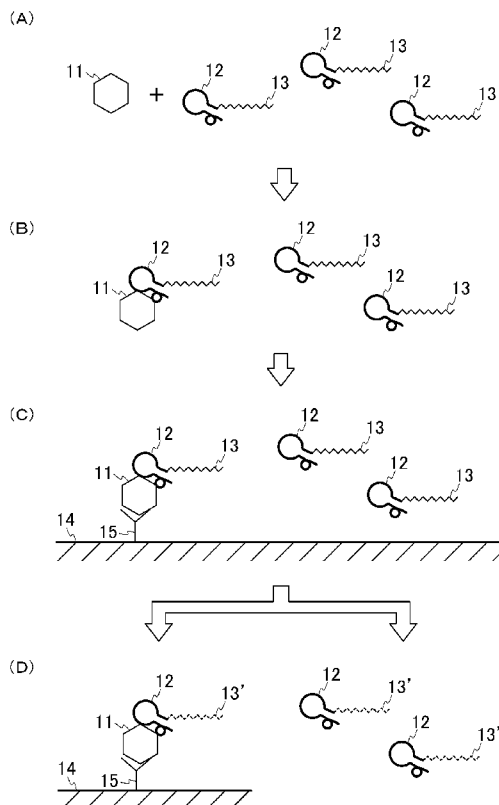
Tokyo (JP). 和賀 蔵(WAGA Iwao); 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目 1 8 番 7 号 NECソリューションイノベータ株式会社内 Tokyo (JP).

- (74) 代理人: 辻丸 光一郎, 外(TSUJIMARU Koichiro et al.); 〒6008813 京都府京都市下京区中堂寺南町 1 3 4 京都リサーチパーク 1 号館 3 0 1 号室 Kyoto (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, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ

[続葉有]

(54) Title: METHOD AND KIT FOR ANALYZING TARGET

(54) 発明の名称: ターゲットの分析方法および分析キット



(57) Abstract: Provided are: a novel method for analyzing a target easily using a binding nucleic acid molecule; and an analysis kit for use in the method. The analysis method according to the present invention comprises: a complex formation step of bringing a binding nucleic acid molecule capable of binding to a target into contact with a sample to form a complex of the binding nucleic acid molecule and the target contained in the sample; a nuclease treatment step of liberating a nucleic acid monomer from a fraction of the complex and/or a fraction that does not contain the complex by the treatment with a nuclease; an enzymatic treatment step of reacting the liberated nucleic acid monomer with an enzyme for which the substrate is a nucleic acid monomer; a detection step of detecting the enzymatic reaction; and an analysis step of analyzing the target that forms the complex from the results of the detection of the enzymatic reaction.

(57) 要約: 結合核酸分子を使用して、容易にターゲットの分析を行える新たな方法およびそれに用いる分析キットを提供する。本発明の分析方法は、ターゲットに結合する結合核酸分子と試料とを接触させ、前記結合核酸分子と前記試料中のターゲットとの複合体を形成する複合体形成工程、前記複合体の画分および前記複合体以外の画分の少なくとも一方から、ヌクレアーゼ処理により核酸モノマーを遊離させるヌクレアーゼ処理工程、前記遊離した核酸モノマーを、核酸モノマーを基質とする酵素と反応させる酵素処理工程、前記酵素反応を検出する検出工程、および、前記酵素反応の検出結果から、前記複合体を形成したターゲットを分析する分析工程を含む。



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： ターゲットの分析方法および分析キット

技術分野

[0001] 本発明は、ターゲットの分析方法および分析キットに関する。

背景技術

[0002] ターゲットの検出において、近年、ターゲットに特異的に結合する抗体に代えて、ターゲットに特異的に結合する結合核酸分子（いわゆるアプタマー）を備えるセンサの利用が試みられている。前記センサとしては、例えば、前記結合核酸分子へのターゲットの結合を判断するために、前記結合核酸分子と、酸化還元反応の触媒能を示すDNA（以下、DNAzymeという）とを連結したセンサが報告されている（非特許文献1）。このセンサは、ターゲット非存在下では、前記結合核酸分子とDNAzymeとが自己会合して、DNAzymeの触媒能を阻害され（OFF）、ターゲット存在下では、ターゲットと前記アプタマーとの接触により、前記自己会合が解除され、DNAzymeの触媒能が生起される（ON）。このため、ターゲットが存在すれば、触媒能が生起されたDNAzymeにより、酸化還元反応が生じるため、前記反応を測定することで、間接的にターゲットを分析できる。

[0003] しかしながら、前記センサは、前記センサにおけるDNAzymeの触媒能を、ターゲットの存在下およびターゲットの非存在下で、ON-OFFに制御する必要がある。また、前記センサを用いた分析において、分析感度をさらに向上させるには、例えば、より強い触媒能を示すDNAzymeを使用する必要がある。

[0004] また、前記結合核酸分子（アプタマー）を使用するELAA（Enzyme-linked Aptamer Assay）は、たとえばビオチンで標識した前記結合核酸分子を使用し、ストレプトアビジンを融合した西洋わさびペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼ等の酵素を、前記ビオチン標識化核酸分子に結合させ、各酵素の基質を検出することで、前記結合核酸分子へのターゲットの結合

を分析する方法である。しかしながら、前記結合核酸分子への標識化が必須であり、また、分析感度をさらに向上させるには、例えば、様々な条件設定改良が必要となる。

[0005] このように、前記センサを使用する場合、さらに優れた形態とするには、様々な改良が必要となる。

[0006] このため、前記結合核酸分子を用いて、容易にターゲットを検出でき、また、分析感度の向上も容易に実現できる方法の提供が求められている。

先行技術文献

非特許文献

[0007] 非特許文献1: Carsten Tellerら、*Anal. Chem.* 2009, 81, 9114-9119

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] そこで、本発明は、結合核酸分子を使用して、容易にターゲットの分析を行える新たな方法およびそれに用いる分析キット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

[0009] 本発明のターゲットの分析方法は、ターゲットに結合する結合核酸分子と試料とを接触させ、前記結合核酸分子と前記試料中のターゲットとの複合体を形成する複合体形成工程、前記複合体の画分および前記複合体以外の画分の少なくとも一方から、ヌクレアーゼ処理により核酸モノマーを遊離させるヌクレアーゼ処理工程、前記遊離した核酸モノマーを、核酸モノマーを基質とする酵素と反応させる酵素処理工程、前記酵素反応を検出する検出工程、および、前記酵素反応の検出結果から、前記複合体を形成したターゲットを分析する分析工程を含むことを特徴とする。

[0010] 本発明の分析キットは、ターゲットに結合する結合核酸分子、ヌクレアーゼ、および、核酸モノマーを基質とする酵素を含み、前記本発明のターゲッ

トの分析方法に使用することを特徴とする。

発明の効果

[0011] 本発明の分析方法によれば、前記ターゲットと前記結合核酸分子との複合体を形成させ、前記複合体の画分または前記複合体以外の画分からの核酸モノマーを遊離させ、遊離した核酸モノマーを基質とする酵素反応を行うことで、容易に、ターゲットを検出できる。この方法によれば、例えば、前述のようにアプタマーにDNAzymeを連結させる必要がなく、このため、DNAzymeの触媒能を、ターゲットの存否によってON-OFF制御することも不要である。また、本発明の分析キットによれば、前記本発明の分析方法を容易に実施できる。本発明は、アプタマーを使用するターゲットの検出方法であるため、例えば、臨床医療、食品、環境等の様々な分野における研究および検査に、極めて有用な技術といえる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、本発明の分析方法の一例を示す概略図である。

[図2]図2は、本発明の分析方法のその他の例を示す概略図である。

[図3]図3は、本発明の分析方法のその他の例を示す概略図である。

[図4]図4は、本発明の分析方法のその他の例を示す概略図である。

[図5]図5は、実施例1における発光量を示すグラフである。

[図6]図6は、実施例2における発光量を示すグラフである。

[図7]図7は、実施例3における発光量を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明の分析方法は、前述のように、ターゲットに結合する結合核酸分子と試料とを接触させ、前記結合核酸分子と前記試料中のターゲットとの複合体を形成する複合体形成工程、前記複合体の画分および前記複合体以外の画分の少なくとも一方から、ヌクレアーゼ処理により核酸モノマーを遊離させるヌクレアーゼ処理工程、前記遊離した核酸モノマーを、核酸モノマーを基質とする酵素と反応させる酵素処理工程、前記酵素反応を検出する検出工程、および、前記酵素反応の検出結果から、前記複合体を形成したターゲット

を分析する分析工程を含むことを特徴とする。

[0014] 本発明の分析方法は、例えば、前記複合体形成工程の後、さらに、前記複合体形成の反応系から、前記複合体の画分と、前記複合体以外の画分とを分離する分離工程を有する。

[0015] 本発明の分析方法は、例えば、前記分離工程において、前記複合体形成の反応系と、固定化した結合物質とを接触させ、前記結合物質に前記複合体を結合させることで、前記複合体の画分と、前記複合体以外の画分とを分離し、前記結合物質が、前記ターゲットに結合する結合物質である。

[0016] 本発明の分析方法は、例えば、前記分離工程において、前記結合物質に前記複合体を結合させた後、前記固定化した結合物質を洗浄し、未反応の前記結合核酸分子を除去する。

[0017] 本発明の分析方法は、例えば、前記ヌクレアーゼ処理工程において、前記複合体画分をヌクレアーゼ処理し、前記複合体から前記核酸モノマーを遊離させる。

[0018] 本発明の分析方法は、例えば、前記ヌクレアーゼ処理工程において、前記複合体以外の画分をヌクレアーゼ処理し、未反応の前記結合核酸分子から前記核酸モノマーを遊離させる。

[0019] 本発明の分析方法は、例えば、前記結合核酸分子が、ポリヌクレオチドが付加された結合核酸分子であり、前記ポリヌクレオチドが、前記酵素が基質とする核酸モノマーを含むポリヌクレオチドである。

[0020] 本発明の分析方法は、例えば、前記結合核酸分子が、担体に担持された結合核酸分子である。

[0021] 本発明の分析方法は、例えば、前記担体が、さらに、ポリヌクレオチドが付加された担体であり、前記ポリヌクレオチドが、前記酵素が基質とする核酸モノマーを含むポリヌクレオチドである。

[0022] 本発明の分析方法は、例えば、前記ヌクレアーゼ処理工程において、前記複合体形成工程の反応系を、ヌクレアーゼ処理し、未反応の前記結合核酸分子から前記核酸モノマーを遊離させる。

[0023] 本発明の分析方法は、例えば、前記結合核酸分子が、相補配列を含む一本鎖核酸分子とのハイブリッド形成体であり、前記複合体形成工程において、前記ハイブリッド形成体と前記試料とを接触させ、前記ハイブリッド形成体における前記結合核酸分子と前記ターゲットとの複合体を形成し、且つ、前記ハイブリッド形成体から前記一本鎖核酸分子を遊離させ、前記ヌクレアーゼ処理工程において、前記複合体形成工程の反応系をヌクレアーゼ処理し、遊離した前記一本鎖核酸分子から前記核酸モノマーを遊離させる。

[0024] 本発明の分析方法は、例えば、前記結合核酸分子が、担体に担持され、且つ、相補配列を含む一本鎖核酸分子とのハイブリッド形成体であり、前記複合体形成工程において、前記ハイブリッド形成体と前記試料とを接触させ、前記ハイブリッド形成体における前記結合核酸分子と前記ターゲットとの複合体を形成し、且つ、前記ハイブリッド形成体から前記一本鎖核酸分子を遊離させ、前記ヌクレアーゼ処理工程において、前記複合体形成工程の反応系をヌクレアーゼ処理し、遊離した前記一本鎖核酸分子から前記核酸モノマーを遊離させる。

[0025] 本発明の分析方法は、例えば、前記複合体形成工程後、さらに、前記複合体形成工程の反応系から、遊離された前記一本鎖核酸分子を分離する分離工程を有し、前記ヌクレアーゼ処理工程において、分離した前記一本鎖核酸分子をヌクレアーゼ処理し、前記一本鎖核酸分子から前記核酸モノマーを遊離させる。

[0026] 本発明の分析方法は、例えば、前記ヌクレアーゼが、一本鎖の核酸分子を基質とするヌクレアーゼである。

[0027] 本発明の分析方法は、例えば、前記ヌクレアーゼが、エキソヌクレアーゼである。

[0028] 本発明の分析方法は、例えば、前記酵素の基質である核酸モノマーが、アデノシンヌクレオチドであり、前記アデノシンヌクレオチドが、例えば、リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドの少なくとも一方である。

[0029] 本発明の分析方法は、例えば、前記酵素が、ルシフェラーゼ活性を有する

タンパク質であり、具体例は、ルシフェラーゼである。

[0030] 本発明の分析方法は、例えば、前記酵素処理工程において、試薬の存在下、前記酵素反応を行い、前記試薬が、前記核酸モノマーを基質とする酵素反応によりシグナルを生じる試薬、または、前記核酸モノマーを基質とする酵素反応によりシグナルを消失する試薬である。

[0031] 本発明の分析方法は、例えば、前記検出工程において、前記酵素反応により生じるシグナル、または、前記酵素反応により消失するシグナルを検出する。

[0032] 本発明の分析方法は、例えば、前記シグナルが、光学的シグナルおよび電氣的シグナルの少なくとも一方である。

[0033] 本発明の分析方法は、例えば、前記担体が、ビーズまたはプレートである。

[0034] 本発明の分析キットは、例えば、ターゲットに結合する結合核酸分子、ヌクレアーゼ、および、核酸モノマーを基質とする酵素を含み、前記本発明のターゲットの分析 방법에使用することを特徴とする。

[0035] 本発明の分析キットは、例えば、前記結合核酸分子が、ポリヌクレオチドが付加された結合核酸分子であり、前記ポリヌクレオチドが、前記酵素が基質とする核酸モノマーを含むポリヌクレオチドである。

[0036] 本発明の分析キットは、例えば、前記結合核酸分子が、担体に担持された結合核酸分子である。

[0037] 本発明の分析キットは、例えば、前記担体が、さらに、ポリヌクレオチドが付加された担体であり、前記ポリヌクレオチドが、前記酵素が基質とする核酸モノマーを含むポリヌクレオチドである。

[0038] 本発明の分析キットは、例えば、前記結合核酸分子が、相補配列を含む一本鎖核酸分子とのハイブリット形成体であり、前記ターゲットとの接触により、前記ハイブリット形成体における前記結合核酸分子と前記ターゲットとが複合体を形成し、且つ、前記一本鎖核酸分子を遊離する。

[0039] 本発明の分析キットは、例えば、前記ヌクレアーゼが、一本鎖の核酸分子

を基質とするヌクレアーゼである。

[0040] 本発明の分析キットは、例えば、前記結合核酸分子が、担体に担持され、且つ、相補配列を含む一本鎖核酸分子とのハイブリット形成体であり、前記ターゲットとの接触により、前記ハイブリット形成体における前記結合核酸分子と前記ターゲットとが複合体を形成し、且つ、前記一本鎖核酸分子を遊離する。

[0041] 本発明の分析キットは、例えば、前記ヌクレアーゼが、エキソヌクレアーゼである。

[0042] 本発明の分析キットは、例えば、前記酵素の基質である核酸モノマーが、アデノシンヌクレオチドであり、前記アデノシンヌクレオチドが、例えば、リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドの少なくとも一方である。

[0043] 本発明の分析キットは、例えば、前記酵素が、ルシフェラーゼ活性を有するタンパク質であり、具体例として、ルシフェラーゼである。

[0044] 本発明の分析キットは、例えば、さらに、試薬を含み、前記試薬が、前記モノマーを基質とする酵素反応によりシグナルを生じる試薬、または、前記モノマーを基質とする酵素反応によりシグナルを消失する試薬である。

[0045] 本発明の分析キットは、例えば、前記シグナルが、光学的シグナルおよび電氣的シグナルの少なくとも一方である。

[0046] 本発明の分析キットは、例えば、前記担体が、ビーズまたはプレートである。

[0047] <ターゲットの分析方法>

本発明のターゲットの分析方法は、前述のように、ターゲットに結合する結合核酸分子と試料とを接触させ、前記結合核酸分子と前記試料中のターゲットとの複合体を形成する複合体形成工程、前記複合体の画分および前記複合体以外の画分の少なくとも一方から、ヌクレアーゼ処理により核酸モノマーを遊離させるヌクレアーゼ処理工程、前記遊離した核酸モノマーを、核酸モノマーを基質とする酵素と反応させる酵素処理工程、前記酵素反応を検出

する検出工程、および、前記酵素反応の検出結果から、前記複合体を形成したターゲットを分析する分析工程を含むことを特徴とする。本発明において、「分析」は、例えば、定量分析、半定量分析、定性分析を含む概念である。

[0048] 前記複合体形成工程において、前記結合核酸分子は、特に制限されず、ターゲットに結合する核酸分子であればよい。前記結合核酸分子は、例えば、アプタマーともいう。

[0049] 前記ターゲットは、特に制限されず、任意のターゲットが選択できる。そして、前記任意のターゲットに応じて、前記ターゲットに結合する結合核酸分子を使用すればよい。前記ターゲットは、例えば、微生物、ウイルス、低分子化合物、食物アレルギー、農薬、カビ毒等が例示できる。

[0050] 前記結合核酸分子は、例えば、一本鎖でもよいし二本鎖でもよく、好ましくは一本鎖である。前記結合核酸分子の長さは、特に制限されず、下限は、例えば、18塩基長、20塩基長、24塩基長であり、上限は、例えば、120塩基長、60塩基長、26塩基長である。

[0051] 前記複合体形成工程において、前記試料は、特に制限されない。前記試料は、例えば、ターゲットを含む試料、ターゲットを含有するか否かが不明な試料のいずれでもよい。前記試料は、例えば、液体試料が好ましい。

[0052] 前記ヌクレアーゼ処理工程は、例えば、前記複合体の画分のみにヌクレアーゼ処理を行ってもよいし、前記複合体以外の画分のみにヌクレアーゼ処理を行ってもよいし、前記複合体形成工程における反応系（すなわち、前記複合体の画分と前記複合体以外の画分との混合系）にヌクレアーゼ処理を行ってもよい。

[0053] 前記複合体の画分のみ、または、前記複合体以外の画分のみ、にヌクレアーゼ処理を行う場合、本発明は、前記複合体形成工程の後、前記ヌクレアーゼ処理工程の前に、前記複合体形成の反応系から、前記複合体の画分と前記複合体以外の画分とを分離する分離工程を含むことが好ましい。

[0054] 前記複合体の画分と前記複合体以外の画分とを分離する方法は、特に制限

されず、例えば、担体と複合体とを結合させ、前記担体の回収により、前記複合体の画分を回収し、前記複合体の画分と前記複合体以外の画分とを分離することができる。前記担体と前記複合体との結合は、例えば、直接的な結合でもよいし、間接的な結合でもよい。前者は、例えば、予め前記結合核酸分子を担持させた前記担体を使用できる。この場合、前記担体に担持された前記結合核酸分子と前記ターゲットとが複合体を形成することにより、前記担体に、前記複合体を直接的に結合できる。また、後者は、例えば、前記ターゲットに結合する結合物質を担持させた前記担体を使用できる。この場合、前記ターゲットと前記結合核酸分子とが複合体を形成し、前記担体に担持された前記結合物質に、前記複合体における前記結合核酸分子が結合することにより、前記担体に、前記結合物質を介して、前記複合体を間接的に結合できる。

[0055] 前記担体は、特に制限されず、例えば、ビーズ、プレート等の容器等があげられる。前記結合物質は、特に制限されず、例えば、前記結合核酸分子に対する結合核酸分子、抗体等があげられる。

[0056] 前記担体を使用する場合、前記複合体の画分とそれ以外の画分との分離方法は、特に制限されず、例えば、固液分離があげられる。前記担体が前記容器の場合、前記容器内から、液体画分を採取することで、前記容器内の残存各分を、前記複合体の画分、採取した液体画分を、前記複合体以外の画分とすることができる。また、前記担体が前記ビーズの場合、前記反応系を固体画分と液体画分とに分離することで、前者を、前記複合体の画分、後者を、前記複合体以外の画分とすることができる。前記固体画分と前記液体画分との分離は、例えば、ろ過による分離、遠心分離、静置による分離等があげられる。

[0057] 本発明が前記分離工程を含み、前記複合体の画分についてヌクレアーゼ処理を行う場合、本発明は、例えば、さらに、前記分離工程と前記ヌクレアーゼ処理工程との間に、前記複合体の画分を洗浄する工程を含んでもよい。前記複合体の画分を洗浄することによって、例えば、複合体の形成に関与して

いない未反応の前記結合核酸分子の混入を抑制し、さらに精度に優れる分析が可能になる。

[0058] 前記ヌクレアーゼ処理工程において、前記ヌクレアーゼは、特に制限されず、ポリヌクレオチドから核酸モノマーを遊離する酵素であればよい。前記ヌクレアーゼは、例えば、前記ポリヌクレオチドの末端から核酸モノマーを遊離するエキソヌクレアーゼが好ましく、前記ポリヌクレオチドの3'末端からの遊離でもよいし、前記ポリヌクレオチドの5'末端からの遊離でもよい。前記エキソヌクレアーゼとしては、例えば、蛇毒ヌクレアーゼ、脾臓ホスホジエステラーゼ、RNase H、BAL 31、Exonuclease I、Exonuclease III、Exonuclease VII、λエキソヌクレアーゼ等があげられる。前記ヌクレアーゼは、例えば、RNAに作用するリボヌクレアーゼ、DNAに作用するデオキシリボヌクレアーゼ、両方に作用するヌクレアーゼのいずれでもよい。

[0059] 前記ヌクレアーゼによって切り出される核酸モノマーは、特に制限されず、例えば、ヌクレオチド残基である。前記ヌクレオチド残基における糖残基は、例えば、リボース残基でも、デオキシリボース残基でもよく、前者の場合、前記ヌクレオチド残基は、リボヌクレオチド残基であり、後者の場合、前記ヌクレオチド残基は、デオキシリボヌクレオチド残基である。前記ヌクレオチド残基における塩基は、特に制限されず、例えば、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル等があげられる。また、前記ヌクレオチド残基におけるリン酸基は、特に制限されず、例えば、一リン酸でも、二リン酸があげられる。前記核酸モノマーの具体例としては、例えば、AMP、デオキシAMP (dAMP) 等があげられる。

[0060] 前記酵素処理工程において、前記酵素は、特に制限されず、前記核酸モノマーを基質とする反応を触媒するタンパク質であればよい。前記酵素は、特に制限されず、例えば、ルシフェラーゼ活性を有するタンパク質等があげられ、好ましくはルシフェラーゼである。

[0061] 前記酵素は、例えば、前記ヌクレアーゼ処理工程で切り出される核酸モノ

マーの種類に応じて、適宜設定できる。

[0062] 前記酵素処理工程は、例えば、試薬の存在下で、前記酵素反応を行ってもよい。前記試薬は、例えば、前記核酸モノマーを基質とする酵素反応によりシグナルを生じる試薬でもよいし、前記核酸モノマーを基質とする酵素反応によりシグナルを消失する試薬でもよい。前記シグナルは、例えば、光学的シグナルでもよいし、電気的シグナルでもよい。

[0063] 前記ヌクレアーゼ処理工程と前記酵素処理工程との順序は、特に制限されず、前記ヌクレアーゼ処理工程の後に前記酵素処理工程を行ってもよいし、前記両工程を同時に行ってもよい。

[0064] また、本発明の分析方法は、例えば、さらに、前記ヌクレアーゼ処理工程で切り出された前記核酸モノマーについて、リン酸基が三リン酸であるヌクレオチドへの変換処理工程を含むことが好ましい。具体的には、前記ヌクレアーゼ処理工程で、一リン酸または二リン酸のヌクレオチドが前記核酸モノマーとして切り出された場合、例えば、前記変換処理工程において、前記核酸モノマーを、三リン酸のヌクレオチドに変換する。前記変換処理工程を含むことによって、さらに感度を向上できる。

[0065] 前記変換処理工程において、前記三リン酸のヌクレオチドへの変換は、例えば、一リン酸または二リン酸のヌクレオチドを三リン酸のヌクレオチドに変換する変換酵素が使用できる。前記変換酵素は、特に制限されず、例えば、ピルビン酸リン酸ジキナーゼ等があげられる。

[0066] 前記変換処理工程において、前記核酸モノマーを三リン酸のヌクレオチドに変換した場合、前記酵素処理工程においては、前記三リン酸のヌクレオチドを基質とする酵素を使用することが好ましい。前記三リン酸のヌクレオチドを基質とする酵素としては、例えば、ルシフェラーゼ等が使用できる。

[0067] 前記ヌクレアーゼ処理工程と前記変換処理工程と前記酵素処理工程との順序は、特に制限されず、この順序で行ってもよいし、前記ヌクレアーゼ処理工程と前記変換処理工程を同時に行ってもよいし、前記変換処理工程と前記酵素処理工程を同時に行ってもよいし、前記3工程を同時に行ってもよい。

[0068] 前記検出工程において、前記酵素の酵素反応の検出は、特に制限されない。前記検出は、例えば、前記酵素反応による前記基質の減少を、直接的または間接的に検出することで行うことができる。後者は、例えば、前記酵素反応により生じるシグナルの検出であり、具体例として、例えば、前記酵素反応により前記試薬から生じたシグナルでもよい。前記シグナルは、例えば、光学的シグナルでもよいし、電氣的シグナルでもよい。

[0069] 前記光学的シグナルは、例えば、発光、蛍光、発色等のシグナルがあげられる。前記光学シグナルは、例えば、発光、蛍光、発色等を目視観察で検出してもよいし、発光強度、蛍光強度、吸光度、反射率等をシグナルとして、光学的手法で検出することもできる。

[0070] 前記電氣的シグナルは、例えば、電流等があげられる。前記電氣的シグナルは、例えば、電氣的手法により検出できる。

[0071] 前記分析工程は、前記検出工程における前記酵素反応の検出結果から、前記複合体画分に含まれる前記ターゲットを分析する工程である。前記酵素反応の検出結果は、例えば、前記複合体の画分に対する酵素反応の結果でもよいし、前記複合体以外の画分に対する酵素反応の結果でもよいし、前記複合体形成工程における反応系（すなわち、前記複合体の画分と前記複合体以外の画分との混合系）に対する酵素反応の結果でもよい。

[0072] 本発明の分析方法の具体例として、以下に、前記複合体の画分と前記複合体以外の画分との分離を行う実施形態 1 と、前記 2 つの画分の分離を行わない実施形態 2 と、前記結合核酸分子と、前記結合核酸分子に対する相補配列を含む一本鎖核酸分子とのハイブリット形成体を使用する実施形態 3 をあげて説明する。なお、本発明は、これらの実施形態には制限されない。また、各実施形態は、特に示さない限り、他の実施形態にも援用できる。

[0073] (1) 実施形態 1

本発明の実施形態 1 は、前述のように、前記複合体形成工程後、前記複合体形成工程の反応系から、前記複合体の画分と前記複合体以外の画分とを分離する形態であり、例えば、以下の実施形態 1 A、1 B および 1 C が例示で

きる。

[0074] まず、本発明の実施形態 1 A は、前記複合体の画分についてヌクレアーゼ処理を施す形態であり、具体的には、ターゲットに結合する結合核酸分子と試料とを接触させ、前記結合核酸分子と前記試料中のターゲットとの複合体を形成する複合体形成工程、前記複合体形成の反応系から、前記複合体の画分と、前記複合体以外の画分とを分離する分離工程、前記複合体の画分から、ヌクレアーゼ処理により核酸モノマーを遊離させるヌクレアーゼ処理工程、前記遊離した核酸モノマーを、核酸モノマーを基質とする酵素と反応させる酵素処理工程、前記酵素反応を検出する検出工程、および、前記酵素反応の検出結果から、前記複合体を形成したターゲットを分析する分析工程を含むことを特徴とする。

[0075] 本実施形態 1 A では、前記複合体の画分と前記複合体以外の画分とを分離していることから、前記ヌクレアーゼ処理工程において、前記複合体における前記結合核酸分子から核酸モノマーが遊離され、酵素処理工程において、前記遊離した前記核酸モノマーを基質として酵素反応が行われる。このため、前記検出工程における前記酵素反応の検出結果は、前記複合体の検出結果となり、間接的に、前記複合体に含まれるターゲットの検出結果となる。

[0076] 本実施形態 1 A においては、前記結合核酸分子として、ポリヌクレオチド（以下、付加ポリヌクレオチドともいう）が付加された結合核酸分子を使用することが好ましい。前記ポリヌクレオチドが付加された結合核酸分子を使用することにより、例えば、前記複合体における前記結合核酸分子から遊離される核酸モノマーの数を増加できる。前記遊離した核酸モノマーは、前記酵素処理工程における基質となるため、遊離される前記核酸モノマーの数の増加に伴って、検出感度をさらに向上できる。

[0077] 前記結合核酸分子に付加されたポリヌクレオチドは、特に制限されない。前記付加ポリヌクレオチドの長さは、下限が、例えば、0 塩基、10 塩基、20 塩基であり、上限が、例えば、1000 塩基、200 塩基、20 塩基である。

[0078] 前記付加ポリヌクレオチドを構成する核酸モノマーの種類は、特に制限されず、例えば、前記酵素処理工程で使用する酵素の基質特異性に応じて、適宜決定できる。前記付加ポリヌクレオチドにおいて、前記核酸モノマーは、それぞれ、例えば、ホスホジエステル結合により連結されている。前記核酸モノマーは、例えば、ヌクレオチド残基である。前記ヌクレオチド残基における糖残基は、例えば、リボース残基でも、デオキシリボース残基でもよく、前者の場合、前記ヌクレオチド残基は、リボヌクレオチド残基であり、後者の場合、前記ヌクレオチド残基は、デオキシリボヌクレオチド残基である。前記ヌクレオチド残基における塩基は、特に制限されず、例えば、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル等があげられる。また、前記ヌクレオチド残基におけるリン酸基は、特に制限されず、例えば、一リン酸でも、二リン酸でも、三リン酸でもよい。前記核酸モノマーの具体例としては、例えば、AMP、デオキシAMP（dAMP）等があげられる。前記付加ポリヌクレオチドを構成するヌクレオチド残基は、例えば、1種類でもよいし、2種類以上であってもよい。前記付加ポリヌクレオチドは、中でも、AMPおよびデオキシAMP（dAMP）の少なくとも一方から構成されていることが好ましく、より好ましくは、いずれか一種類のヌクレオチド残基から構成されている。

[0079] 前記付加ポリヌクレオチドは、例えば、前記結合核酸分子の3'末端に付加されてもよいし、前記結合核酸分子の5'末端に付加されてもよい。前記結合核酸分子における付加の位置は、例えば、前記ヌクレアーゼの特性に応じて適宜決定できる。前記ヌクレアーゼが、例えば、5'末端から3'末端の方向に、前記核酸モノマーを遊離していく場合、前記付加ポリヌクレオチドは、前記結合核酸分子の5'末端に付加されていることが好ましく、前記ヌクレアーゼが、例えば、3'末端から5'末端の方向に、前記核酸モノマーを遊離していく場合、前記付加ポリヌクレオチドは、前記結合核酸分子の3'末端に付加されていることが好ましい。

[0080] 本実施形態1Aについて、図1を参照して、前記付加ポリヌクレオチドを

付加した結合核酸分子を使用する例を説明する。図 1 は、本発明の実施形態 1 A の概略を示す模式図であり、(A) - (D) は、各工程を示す。なお、図 1 は、模式図であって、例えば、ターゲット、前記結合核酸分子および前記付加ポリヌクレオチドの大きさ等の条件は、これには制限されない。

[0081] まず、前記複合体形成工程において、図 1 (A) に示すように、ターゲット 1 1 を含む試料と、付加ポリヌクレオチド 1 3 が付加された結合核酸分子 1 2 とを接触させる。これによって、図 1 (B) に示すように、前記複合体形成工程の反応液において、前記試料中のターゲット 1 1 と、付加ポリヌクレオチド 1 3 が付加された結合核酸分子 1 2 とが、複合体を形成する。この際、前記複合体形成に関与しなかった未反応の結合核酸分子 1 2 も、前記反応液に共存する。

[0082] そして、前記分離工程において、図 1 (C) に示すように、前記反応液を、担体 1 4 に固定化した結合物質 1 5 と接触させる。結合物質 1 5 は、ターゲット 1 1 に結合する物質である。このため、図 1 (C) に示すように、前記反応液に含まれる前記複合体が、ターゲット 1 1 と結合物質 1 5 との結合を介して、担体 1 4 に結合する。この際、前記未反応の結合核酸分子 1 2 は、担体 1 4 に結合することなく、前記反応液中で遊離状態となる。

[0083] つぎに、前記反応液について、前記複合体が結合した担体 1 4 と、それ以外の画分とを分離する。具体的には、例えば、担体 1 4 から液体画分を除去する。そして、担体 1 4 にヌクレアーゼを添加し、ヌクレアーゼ処理を行う。これによって、図 1 (D) の左図に示すように、担体 1 4 に結合した前記複合体における付加ポリヌクレオチド 1 3 が分解され、核酸モノマー 1 3' が切り出される。

[0084] そして、付加ポリヌクレオチド 1 3 から切り出された核酸モノマー 1 3' を、核酸モノマーを基質とする酵素で処理し、その酵素反応を検出する。これによって、前記試料中のターゲットを分析できる。

[0085] つぎに、本発明の実施形態 1 B は、前記複合体以外の画分についてヌクレアーゼ処理を施す形態であり、具体的に、ターゲットに結合する結合核酸分

子と試料とを接触させ、前記結合核酸分子と前記試料中のターゲットとの複合体を形成する複合体形成工程、前記複合体形成の反応系から、前記複合体の画分と、前記複合体以外の画分とを分離する分離工程、前記複合体以外の画分から、ヌクレアーゼ処理により核酸モノマーを遊離させるヌクレアーゼ処理工程、前記遊離した核酸モノマーを、核酸モノマーを基質とする酵素と反応させる酵素処理工程、前記酵素反応を検出する検出工程、および、前記酵素反応の検出結果から、前記複合体を形成したターゲットを分析する分析工程を含むことを特徴とする。

[0086] 本実施形態 1 B は、前記結合核酸分子への前記付加ポリヌクレオチドの付加が任意であり、前記複合体以外の画分についてヌクレアーゼ処理を行い、それにより遊離した核酸モノマーについて酵素処理を行い、前記酵素反応を検出する以外は、前記実施形態 1 A と同様にして行うことができ、前記実施形態 1 A の記載を援用できる。

[0087] 本実施形態 1 B の場合、前記複合体以外の画分には、前記複合体形成に関与しなかった未反応の前記結合核酸分子が含まれる。したがって、この未反応の前記結合核酸分子をヌクレアーゼ処理し、それにより遊離した核酸モノマーを検出することで、未反応の前記結合核酸分子を分析できる。未反応の前記結合核酸分子を分析できれば、その結果から、前記複合体形成に関与した前記結合核酸分子も分析できるため、結果的に、前記複合体を形成したターゲットを分析できる。

[0088] 本実施形態 1 B は、前記結合核酸分子として、前記付加ポリヌクレオチドが付加された結合核酸分子を使用することが好ましい。前記ポリヌクレオチドが付加されていることにより、例えば、前記複合体における前記結合核酸分子から遊離される核酸モノマーの数を増加できる。前記遊離した核酸モノマーは、前記酵素処理工程における基質となるため、遊離される前記核酸モノマーの数の増加に伴って、検出感度をさらに向上できる。前記付加ポリヌクレオチドの条件は、特に制限されず、前記実施形態 1 A の例示を援用できる。

- [0089] 本実施形態 1 B は、前記実施形態 1 A と同様に、図 1 を参照できる。前記実施形態 1 A と同様に、前記複合体の画分と前記複合体以外の画分を分離する。そして、前記複合体以外の画分に対してヌクレアーゼ処理を行うことによって、図 1 (D) の右図に示すように、未反応の核酸分子 1 2 に付加された付加ポリヌクレオチド 1 3 から、核酸モノマー 1 3' が切り出される。そして、この核酸モノマー 1 3' を、前記実施形態 1 A と同様に、酵素処理し、その酵素反応を検出する。これによって、間接的に、前記試料中のターゲットを分析できる。
- [0090] 前記実施形態 1 A および 1 B について、図 1 では、付加ポリヌクレオチド 1 3 が付加された結合核酸分子 1 2 を示したが、前記実施形態 1 B は、これには制限されず、例えば、付加ポリヌクレオチド 1 3 が付加されていない結合核酸分子 1 2 であってもよい。
- [0091] つぎに、本発明の実施形態 1 C は、前記結合核酸分子として、担体に担持された結合核酸分子を使用する形態であり、それ以外は、例えば、前記実施形態 1 A および 1 B と同様である。
- [0092] 本実施形態 1 C において、前記担体に担持される結合核酸分子の個数は、特に制限されず、1 分子でもよいし、2 分子以上の複数分子であってもよい。ヌクレアーゼ処理によって遊離される核酸モノマー量を増加できることから、前記担体には、複数分子の前記結合核酸分子が担持されていることが好ましい。
- [0093] 前記担体は、例えば、結合核酸分子のみを担持してもよいし、ヌクレアーゼ処理によって遊離される核酸モノマー量を増加できることから、さらに、ポリヌクレオチドを担持してもよい。前記ポリヌクレオチドは、特に制限されず、例えば、前記実施形態 1 A に示すポリヌクレオチドが例示できる。
- [0094] 前記担体は、特に制限されず、前述のような担体が例示でき、中でも、ビーズが好ましい。
- [0095] 本実施形態 1 C について、図 2 を参照して、前記担体に担持された結合核酸分子を使用する例を説明する。図 2 は、本発明の実施形態 1 C の概略を示

す模式図であり、（Ａ）－（Ｄ）は、各工程を示す。なお、図２は、模式図であって、例えば、ターゲット、前記結合核酸分子および前記付加ポリヌクレオチドの大きさ等の条件は、これには制限されない。

[0096] 本実施形態１Ｃでは、前記複合体形成工程において、図２（Ａ）に示すように、ターゲット１１を含む試料と、担体２０とを接触させる。担体２０は、複数の結合核酸分子１２および複数のポリヌクレオチド１３を担持している。これによって、図２（Ｂ）に示すように、前記複合体形成工程の反応液において、前記試料中のターゲット１１と、担体２０が担持する結合核酸分子１２とが、複合体を形成する。この際、前記複合体形成に関与しなかった未反応の結合核酸分子１２も、前記反応液に共存する。その後は、前記実施形態１Ａおよび１Ｂと同様である。

[0097] 図２に示すように、担体２０は、複数の結合核酸分子１２および複数のポリヌクレオチド１３を担持していることから、例えば、前記実施形態１Ａにおける前記複合体の画分のヌクレアーゼ処理によっても、前記実施形態１Ｂにおける前記複合体以外の画分のヌクレアーゼ処理によっても、多くの核酸モノマーを遊離できる。このため、より感度の高い分析が可能になる。

[0098] （２）実施形態２

本発明の実施形態２は、前述のように、前記複合体形成工程後、前記複合体の画分と前記複合体以外の画分とを分離することなく、前記複合体形成工程の反応系についてヌクレアーゼ処理を施す形態である。

[0099] すなわち、本実施形態２は、ターゲットに結合する結合核酸分子と試料とを接触させ、前記結合核酸分子と前記試料中のターゲットとの複合体を形成する複合体形成工程、前記複合体形成の反応系から、ヌクレアーゼ処理により核酸モノマーを遊離させるヌクレアーゼ処理工程、前記遊離した核酸モノマーを、核酸モノマーを基質とする酵素と反応させる酵素処理工程、前記酵素反応を検出する検出工程、および、前記酵素反応の検出結果から、前記複合体を形成したターゲットを分析する分析工程を含むことを特徴とする。

[0100] 本実施形態２においては、前記複合体と、前記複合体形成に関与していな

い未反応の前記結合核酸分子とが共存する反応系について、前記ヌクレアーゼ処理を行う。しかしながら、前記結合核酸分子と前記ターゲットとが複合体を形成すると、前記複合体における前記結合核酸分子は、物理的障害が原因となり、前記ヌクレアーゼによって分解され難くなる。このため、前記反応系のヌクレアーゼ処理において、前記ヌクレアーゼによって、前記ターゲットに結合した前記結合核酸分子からは核酸モノマーが遊離せず、前記複合体形成に関与していない未反応の前記結合核酸分子のみから核酸モノマーが遊離する。したがって、本実施形態2では、前記複合体の画分と、前記複合体以外の画分との分離が不要である。また、未反応の前記結合核酸分子のみから核酸モノマーを遊離させ、前記遊離した核酸モノマーを検出することで、未反応の前記結合核酸分子を分析できる。未反応の前記結合核酸分子を分析できれば、その結果から、前記複合体形成に関与した前記結合核酸分子も分析できるため、結果的に、前記複合体を形成したターゲットを分析できる。

[0101] 本実施形態においては、前記付加ポリヌクレオチドが付加されていない前記結合核酸分子を使用することが好ましい。前記付加ポリヌクレオチドが付加された結合核酸分子を使用する場合、前記付加ポリヌクレオチドの長さは、特に制限されないが、上限が、例えば、5塩基、3塩基、1塩基である。

[0102] (3) 実施形態3

本発明の実施形態3は、前述のように、前記結合核酸分子と、前記結合核酸分子に対する相補配列を含む一本鎖核酸分子とのハイブリット形成体を使用する形態であり、例えば、以下の実施形態3Aおよび3Bが例示できる。

[0103] まず、本発明の実施形態3Aは、前述のように、前記結合核酸分子が、相補配列を含む前記一本鎖核酸分子とのハイブリット形成体である形態であり、具体的には、前記ハイブリット形成体と試料とを接触させ、前記ハイブリット形成体における前記結合核酸分子と前記試料中のターゲットとの複合体を形成し、且つ、前記ハイブリット形成体から前記一本鎖核酸分子を遊離させる複合体形成工程、前記複合体形成の反応系から、ヌクレアーゼ処理によ

り核酸モノマーを遊離させるヌクレアーゼ処理工程、前記遊離した核酸モノマーを、核酸モノマーを基質とする酵素と反応させる酵素処理工程、前記酵素反応を検出する検出工程、および、前記酵素反応の検出結果から、前記複合体を形成したターゲットを分析する分析工程を含むことを特徴とする。

[0104] 本実施形態3 Aでは、前記ヌクレアーゼ処理工程において、一本鎖の核酸を基質とするヌクレアーゼを使用することで、前記複合体からは核酸モノマーを遊離させることなく、前記ハイブリッド形成体より遊離した前記一本鎖核酸分子のみから、前記核酸モノマーを遊離することができる。そして、前記遊離した前記一本鎖核酸分子をヌクレアーゼ処理し、それにより遊離した核酸モノマーを検出することで、前記ハイブリット形成体から遊離した前記一本鎖核酸分子を分析できる。遊離した前記一本鎖核酸分子を分析できれば、その結果から、前記複合体形成に関与した前記結合核酸分子も分析できるため、結果的に、前記複合体を形成したターゲットを分析できる。

[0105] 前記一本鎖核酸分子は、前記結合核酸分子に対する相補配列を有しており、前記結合核酸分子にハイブリダイズできればよい。前記一本鎖核酸分子の長さは、特に制限されず、前記結合核酸分子に応じて適宜設定できる。前記結合核酸分子の長さとの前記一本鎖核酸分子の長さの比は、特に制限されず制限されず、前記一本鎖核酸分子は、前記結合核酸分子に対して、例えば、1分の1～1000分の1である。前記一本鎖核酸分子は、前記結合核酸分子のいずれの領域に結合してもよい。

[0106] 本実施形態3で使用するヌクレアーゼは、前述のように、一本鎖の核酸を基質とするヌクレアーゼであればよい。

[0107] 本実施形態3 Aについて、図3を参照して、前記結合核酸分子と前記一本鎖核酸分子とのハイブリット形成体を使用する例を説明する。図3は、本発明の実施形態3の概略を示す模式図である。なお、図3は、模式図であって、例えば、ターゲット、前記結合核酸分子および前記一本鎖核酸分子の大きさ等の条件は、これには制限されない。

[0108] 本実施形態3 Aでは、前記複合体形成工程において、図3 (A) に示すよ

うに、ターゲット 11 を含む試料を、結合核酸分子 12 と一本鎖核酸分子 30 とのハイブリッド形成体と接触させる。これによって、図 3 (B) に示すように、前記複合体形成工程の反応液において、前記ハイブリッド形成体における結合核酸分子 12 は、前記試料中のターゲット 11 と結合し、前記ハイブリッド形成体における一本鎖核酸分子 30 は、遊離する。そして、前記複合体と遊離した一本鎖核酸 30 とを含む前記反応液を、一本鎖核酸を基質とするヌクレアーゼで処理することによって、図 3 (C) に示すように、前記複合体からは核酸モノマーが遊離せず、一本鎖核酸分子 30 のみから核酸モノマー 30' が切り出される。そして、一本鎖核酸分子 30 から遊離した核酸モノマー 30' について、酵素処理し、酵素反応を検出する。これによって、遊離した一本鎖核酸分子 30 を検出でき、間接的に、前記試料中のターゲットを分析できる。

[0109] つぎに、本実施形態 3 B は、前記ハイブリッド形成体が、担体に担持された形態である。本実施形態 3 B は、前記担体に担持された前記ハイブリッド形成体を使用し、前記複合体形成工程後に、前記担体を含む固体画分と液体画分とを分離し、前記液体画分について、前記ヌクレオチド処理および酵素処理を行う以外は、前記実施形態 3 A と同様である。

[0110] 本実施形態 3 B においては、前記固体画分、すなわち、前記担体を含む画分には、担持した結合核酸分子がターゲットと結合して複合体を形成した担体と、担持した結合核酸分子がターゲットと結合していない未反応の担体とが含まれ、他方、液体画分には、遊離した前記一本鎖核酸分子が含まれる。このため、前記液体画分をヌクレアーゼ処理し、核酸モノマーを遊離させ、これを酵素処理して、酵素反応を検出することで、前記ハイブリッド形成体から遊離した前記一本鎖核酸分子を分析できる。遊離した前記一本鎖核酸分子を分析できれば、その結果から、前記複合体形成に関与した結合核酸分子も分析できるため、結果的に、前記複合体を形成したターゲットを分析できる。

[0111] 本実施形態 3 B について、図 4 を参照して、前記結合核酸分子と前記一本

鎖核酸分子とのハイブリッド形成体を担持した担体を使用する例を説明する。図4は、本発明の実施形態3Bの概略を示す模式図である。なお、図4は、模式図であって、例えば、ターゲット、前記結合核酸分子および前記一本鎖核酸分子の大きさ等の条件は、これには制限されない。

[0112] 本実施形態3Bでは、前記複合体形成工程において、図4（A）に示すように、ターゲット11を含む試料を、結合核酸分子12と一本鎖核酸分子30とのハイブリッド形成体を担持する担体20と接触させる。これによって、図4（B）に示すように、前記複合体形成工程の反応液において、前記ハイブリッド形成体における結合核酸分子12は、前記試料中のターゲット11と結合し、前記ハイブリッド形成体における一本鎖核酸分子30は、遊離する。つぎに、前記反応液を、担体20を含む固体画分と、遊離した一本鎖核酸分子30を含む液体画分に分離する。そして、遊離した一本鎖核酸分子30をヌクレアーゼで処理することによって、図4（D）に示すように、一本鎖核酸分子30から核酸モノマー30'が切り出される。そして、一本鎖核酸分子30から遊離した核酸モノマー30'について、酵素処理し、酵素反応を検出する。これによって、遊離した一本鎖核酸分子30を検出でき、間接的に、前記試料中のターゲットを分析できる。

[0113] <ターゲットの分析キット>

本発明のターゲットの分析キットは、ターゲットに結合する結合核酸分子、ヌクレアーゼ、および、核酸モノマーを基質とする酵素を含み、前記本発明のターゲットの分析方法に使用することを特徴とする。本発明の分析キットによれば、前記本発明の分析方法を容易に行うことができる。なお、本発明の分析キットは、前記本発明の分析方法の記載を援用できる。

実施例

[0114] つぎに、本発明の実施例について説明する。ただし、本発明は、下記実施例により制限されない。市販の試薬は、特に示さない限り、それらのプロトコールに基づいて使用した。

[0115] [実施例1]

。これに対し、前記希釈試料では、いずれの核酸分子を用いた場合においても、強い発光が測定された。これらの結果から、ヌクレアーゼ処理によって核酸分子から核酸モノマーを遊離させ、遊離した核酸モノマーを基質とする酵素と反応させることで、発光を測定できることがわかった。

[0122] [実施例 2]

ヌクレアーゼとルシフェラーゼとを共存させることによって、核酸分子からの核酸モノマーの遊離と前記遊離した核酸モノマーの検出とを同時に行った。

[0123] N30-079と前記DNAエンドヌクレアーゼとを、前記DNAエンドヌクレアーゼを1Unitとした以外は、前記表1と同様の割合で混合し、試料とした。つぎに、前記試料を前記AMP検査キットに添加し、20分間静置した。そして、前記測定装置を用いて、15秒毎に、前記試料の相対的発光量を測定した。

[0124] これらの結果を図6に示す。図6は、相対的発光量を示すグラフである。図6において、横軸は、反応時間を示し、縦軸は、相対的発光量を示す。なお、前記反応時間は、前記試料を前記AMP検査キットに添加した時を基準としている。図6に示すように、いずれの時間においても、強い発光が測定された。これらの結果から、ヌクレアーゼ処理工程と酵素処理工程とを同時に行っても、核酸分子を検出できることがわかった。

[0125] [実施例 3]

インフルエンザウイルスのヘマグルチニン(HA)に結合する結合核酸分子(アプタマー)とHAとの複合体を形成し、ヌクレアーゼ処理によって前記複合体から核酸モノマーを遊離させ、前記遊離した核酸モノマーをルシフェラーゼで検出した。

[0126] インフルエンザウイルスのHAに結合するアプタマー(RHA0006)として、下記配列番号2の塩基配列からなるDNAを使用した。前記アプタマーは、その3'末端に、24塩基長のポリdAを付加した。つぎに、前記アプタマーを、100nmol/LとなるようにTBS緩衝液に混合した。

前記TBS緩衝液の組成は、50mmol/L Tris-HCl、100mmol/L NaCl、5mmol/L KCl、1mmol/L MgCl₂、0.05% Tween（登録商標）20、pH7.4とした。そして、前記アプタマー液を95度で5分間熱処理し、さらに、5分間氷上で静置した。

[0127] RHA0006（配列番号2）

5' -GGGTTTGGGTTGGGTTGGGTTTTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAA-3'

[0128] 次に、HAとして、インフルエンザウイルス（H5N1）由来HAを使用した。前記HAを、TBS緩衝液で、所定濃度（0、10¹、10²、10³、10⁴または10⁵pmol/L）となるように希釈し、希釈試料とした。

[0129] 96穴プレート（商品名 Nunc-Immuno（登録商標） plate, Maxisorp（登録商標）、Nunc社）に、前記希釈試料を、ウェルあたり100μL添加し、4℃で16時間吸着させた。前記ウェルを200μLの前記TBS緩衝液で3回洗浄後、Protein Free（TBS） Blocking Buffer（Pierce社製）を200μL加え、室温で1時間インキュベートした。インキュベート後、前記静置後のアプタマー液を100μL加え、室温で30分間インキュベートした。そして、前記ウェルを200μLの前記TBS緩衝液で3回洗浄した。

[0130] 次に、BAL31 Nucleaseをウェルあたり20μL（3Units/well）添加し、室温で20分間インキュベートした。前記インキュベート後、前記ウェルの溶液をAMP検査キットに添加し、前記実施例1と同様に、相対的発光量を測定した（N=3）。

[0131] これらの結果を図7に示す。図7は、相対的発光量を示すグラフである。図7において、横軸は、前記希釈試料におけるHAの濃度を示し、縦軸は、相対的発光量を示す。図7に示すように、0pmol/Lの希釈試料では、発光が測定されないのに対し、前記希釈試料では、いずれのHA濃度においても、発光が測定された。これらの結果から、結合核酸分子とターゲットと

の複合体の画分から、ヌクレアーゼ処理によって核酸分子から核酸モノマーを遊離させ、遊離した核酸モノマーを基質とする酵素と反応させることで、発光を測定できることがわかった。

[0132] 以上、実施形態を参照して本願発明を説明したが、本願発明は、上記実施形態に限定されるものではない。本願発明の構成や詳細には、本願発明のスコープ内で当業者が理解しうる様々な変更をすることができる。

[0133] この出願は、2013年9月30日に提出された日本出願特願2013-205051を基礎とする優先権を主張し、その開示のすべてをここに取り込む。

産業上の利用可能性

[0134] 本発明によれば、前記ターゲットと前記結合核酸分子との複合体を形成させ、前記複合体の画分または前記複合体以外の画分からの核酸モノマーを遊離させ、遊離した核酸モノマーを基質とする酵素反応を行うことで、容易に、ターゲットを検出できる。この方法によれば、例えば、前述のようにアプタマーにDNAzymeを連結させる必要がなく、このため、DNAzymeの触媒能を、ターゲットの存否によってON-OFF制御することも不要である。また、本発明の分析キットによれば、前記本発明の分析方法を容易に実施できる。本発明は、アプタマーを使用するターゲットの検出方法であるため、例えば、臨床医療、食品、環境等の様々な分野における研究および検査に、極めて有用な技術といえる。

請求の範囲

- [請求項1] ターゲットに結合する結合核酸分子と試料とを接触させ、前記結合核酸分子と前記試料中のターゲットとの複合体を形成する複合体形成工程、
前記複合体の画分および前記複合体以外の画分の少なくとも一方から、ヌクレアーゼ処理により核酸モノマーを遊離させるヌクレアーゼ処理工程、
前記遊離した核酸モノマーを、核酸モノマーを基質とする酵素と反応させる酵素処理工程、
前記酵素反応を検出する検出工程、および、
前記酵素反応の検出結果から、前記複合体を形成したターゲットを分析する分析工程を含むことを特徴とするターゲットの分析方法。
- [請求項2] 前記複合体形成工程の後、
さらに、前記複合体形成の反応系から、前記複合体の画分と、前記複合体以外の画分とを分離する分離工程を有する、請求項1記載の分析方法。
- [請求項3] 前記分離工程において、前記複合体形成の反応系と、固定化した結合物質とを接触させ、前記結合物質に前記複合体を結合させることで、
前記複合体の画分と、前記複合体以外の画分とを分離し、
前記結合物質が、前記ターゲットに結合する結合物質である、請求項2記載の分析方法。
- [請求項4] 前記分離工程において、前記結合物質に前記複合体を結合させた後、
前記固定化した結合物質を洗浄し、未反応の前記結合核酸分子を除去する、請求項3記載の分析方法。
- [請求項5] 前記ヌクレアーゼ処理工程において、前記複合体画分をヌクレアーゼ処理し、前記複合体から前記核酸モノマーを遊離させる、請求項2記載の分析方法。
- [請求項6] 前記ヌクレアーゼ処理工程において、前記複合体以外の画分をヌクレ

アーゼ処理し、未反応の前記結合核酸分子から前記核酸モノマーを遊離させる、請求項 2 記載の分析方法。

[請求項 7] 前記結合核酸分子が、ポリヌクレオチドが付加された結合核酸分子であり、

前記ポリヌクレオチドが、前記酵素が基質とする核酸モノマーを含むポリヌクレオチドである、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の分析方法。

[請求項 8] 前記結合核酸分子が、担体に担持された結合核酸分子である、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の分析方法。

[請求項 9] 前記担体が、さらに、ポリヌクレオチドが付加された担体であり、前記ポリヌクレオチドが、前記酵素が基質とする核酸モノマーを含むポリヌクレオチドである、請求項 8 記載の分析方法。

[請求項 10] 前記ヌクレアーゼ処理工程において、前記複合体形成工程の反応系を、ヌクレアーゼ処理し、未反応の前記結合核酸分子から前記核酸モノマーを遊離させる、請求項 1 記載の分析方法。

[請求項 11] 前記結合核酸分子が、相補配列を含む一本鎖核酸分子とのハイブリッド形成体であり、

前記複合体形成工程において、前記ハイブリッド形成体と前記試料とを接触させ、前記ハイブリッド形成体における前記結合核酸分子と前記ターゲットとの複合体を形成し、且つ、前記ハイブリッド形成体から前記一本鎖核酸分子を遊離させ、

前記ヌクレアーゼ処理工程において、前記複合体形成工程の反応系をヌクレアーゼ処理し、遊離した前記一本鎖核酸分子から前記核酸モノマーを遊離させる、請求項 1 記載の分析方法。

[請求項 12] 前記結合核酸分子が、担体に担持され、且つ、相補配列を含む一本鎖核酸分子とのハイブリッド形成体であり、

前記複合体形成工程において、前記ハイブリッド形成体と前記試料とを接触させ、前記ハイブリッド形成体における前記結合核酸分子と前

記ターゲットとの複合体を形成し、且つ、前記ハイブリッド形成体から前記一本鎖核酸分子を遊離させ、

前記ヌクレアーゼ処理工程において、前記複合体形成工程の反応系をヌクレアーゼ処理し、遊離した前記一本鎖核酸分子から前記核酸モノマーを遊離させる、請求項 1 記載の分析方法。

[請求項13] 前記複合体形成工程後、さらに、前記複合体形成工程の反応系から、遊離された前記一本鎖核酸分子を分離する分離工程を有し、
前記ヌクレアーゼ処理工程において、分離した前記一本鎖核酸分子をヌクレアーゼ処理し、前記一本鎖核酸分子から前記核酸モノマーを遊離させる、請求項 1 2 記載の分析方法。

[請求項14] 前記ヌクレアーゼが、一本鎖の核酸分子を基質とするヌクレアーゼである、請求項 1 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の分析方法。

[請求項15] 前記ヌクレアーゼが、エキソヌクレアーゼである、請求項 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の分析方法。

[請求項16] 前記酵素の基質である核酸モノマーが、アデノシンヌクレオチドである、請求項 1 から 1 5 のいずれか一項に記載の分析方法。

[請求項17] 前記アデノシンヌクレオチドが、リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドの少なくとも一方である、請求項 1 6 記載の分析方法。

[請求項18] 前記酵素が、ルシフェラーゼ活性を有するタンパク質である、請求項 1 から 1 7 のいずれか一項に記載の分析方法。

[請求項19] 前記酵素が、ルシフェラーゼである、請求項 1 から 1 8 のいずれか一項に記載の分析方法。

[請求項20] 前記酵素処理工程において、試薬の存在下、前記酵素反応を行い、前記試薬が、前記核酸モノマーを基質とする酵素反応によりシグナルを生じる試薬、または、前記核酸モノマーを基質とする酵素反応によりシグナルを消失する試薬である、請求項 1 から 1 9 のいずれか一項に記載の分析方法。

- [請求項21] 前記検出工程において、前記酵素反応により生じるシグナル、または、前記酵素反応により消失するシグナルを検出する、請求項1から20のいずれか一項に記載の分析方法。
- [請求項22] 前記シグナルが、光学的シグナルおよび電氣的シグナルの少なくとも一方である、請求項20または21記載の分析方法。
- [請求項23] 前記担体が、ビーズまたはプレートである、請求項8、9および12のいずれか一項に記載の分析方法。
- [請求項24] ターゲットに結合する結合核酸分子、ヌクレアーゼ、および、核酸モノマーを基質とする酵素を含み、請求項1から23のいずれか一項に記載のターゲットの分析方法に使用することを特徴とする分析キット。
- [請求項25] 前記結合核酸分子が、ポリヌクレオチドが付加された結合核酸分子であり、前記ポリヌクレオチドが、前記酵素が基質とする核酸モノマーを含むポリヌクレオチドである、請求項24記載の分析キット。
- [請求項26] 前記結合核酸分子が、担体に担持された結合核酸分子である、請求項24または25記載の分析キット。
- [請求項27] 前記担体が、さらに、ポリヌクレオチドが付加された担体であり、前記ポリヌクレオチドが、前記酵素が基質とする核酸モノマーを含むポリヌクレオチドである、請求項26記載の分析キット。
- [請求項28] 前記結合核酸分子が、相補配列を含む一本鎖核酸分子とのハイブリット形成体であり、
前記ターゲットとの接触により、前記ハイブリット形成体における前記結合核酸分子と前記ターゲットとが複合体を形成し、且つ、前記一本鎖核酸分子を遊離する、請求項24記載の分析キット。
- [請求項29] 前記ヌクレアーゼが、一本鎖の核酸分子を基質とするヌクレアーゼである、請求項28記載の分析キット。
- [請求項30] 前記結合核酸分子が、担体に担持され、且つ、相補配列を含む一本鎖核酸分子とのハイブリット形成体であり、

前記ターゲットとの接触により、前記ハイブリット形成体における前記結合核酸分子と前記ターゲットとが複合体を形成し、且つ、前記一本鎖核酸分子を遊離する、請求項 24 記載の分析キット。

[請求項31] 前記ヌクレアーゼが、エキソヌクレアーゼである、請求項 24 から 30 のいずれか一項に記載の分析キット。

[請求項32] 前記酵素の基質である核酸モノマーが、アデノシンヌクレオチドである、請求項 24 から 31 のいずれか一項に記載の分析キット。

[請求項33] 前記アデノシンヌクレオチドが、リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドの少なくとも一方である、請求項 32 記載の分析キット。

[請求項34] 前記酵素が、ルシフェラーゼ活性を有するタンパク質である、請求項 24 から 33 のいずれか一項に記載の分析キット。

[請求項35] 前記酵素が、ルシフェラーゼである、請求項 24 から 34 のいずれか一項に記載の分析キット。

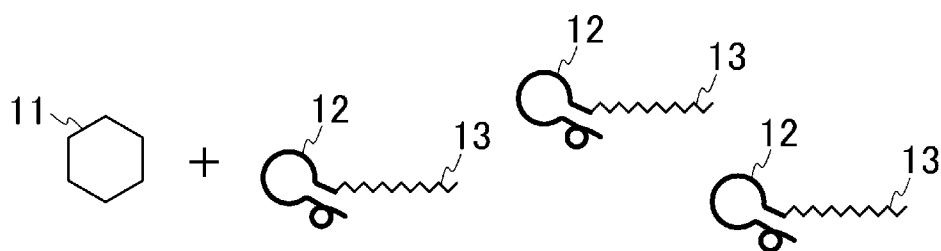
[請求項36] さらに、試薬を含み、
前記試薬が、前記モノマーを基質とする酵素反応によりシグナルを生じる試薬、または、前記モノマーを基質とする酵素反応によりシグナルを消失する試薬である、請求項 24 から 35 のいずれか一項に記載の分析キット。

[請求項37] 前記シグナルが、光学的シグナルおよび電氣的シグナルの少なくとも一方である、請求項 36 記載の分析キット。

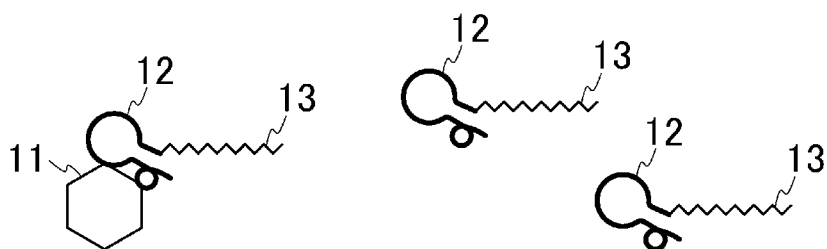
[請求項38] 前記担体が、ビーズまたはプレートである、請求項 26、27 および 30 のいずれか一項に記載の分析キット。

[図1]

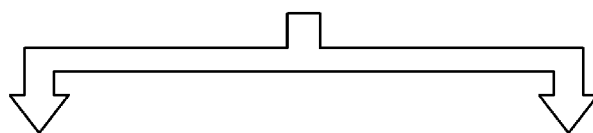
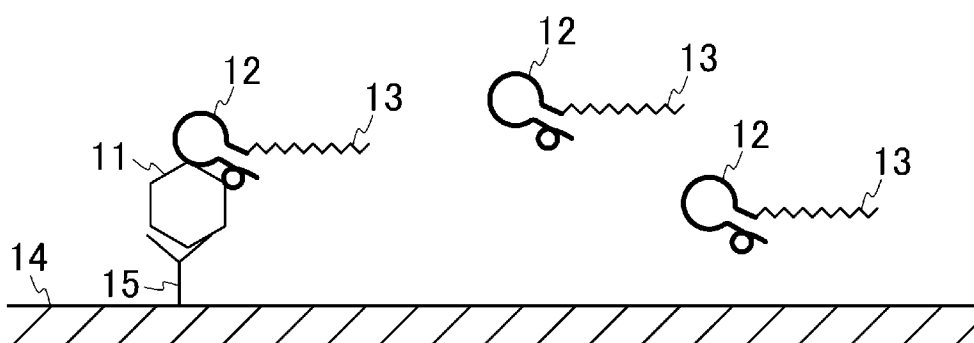
(A)



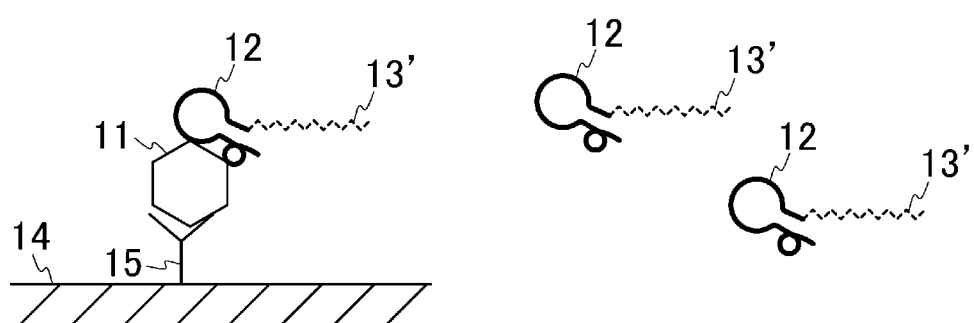
(B)



(C)

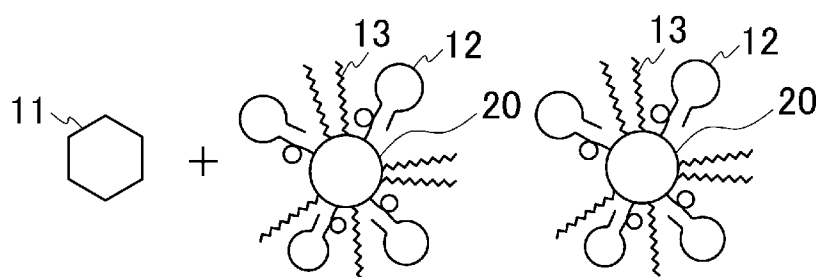


(D)

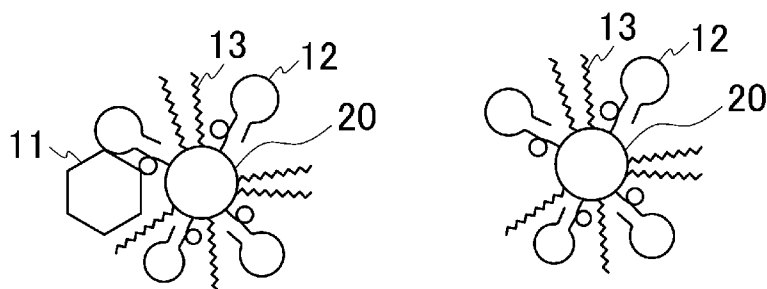


[図2]

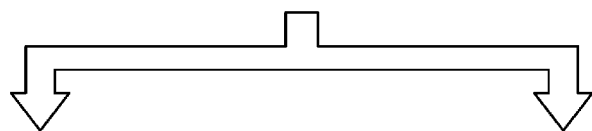
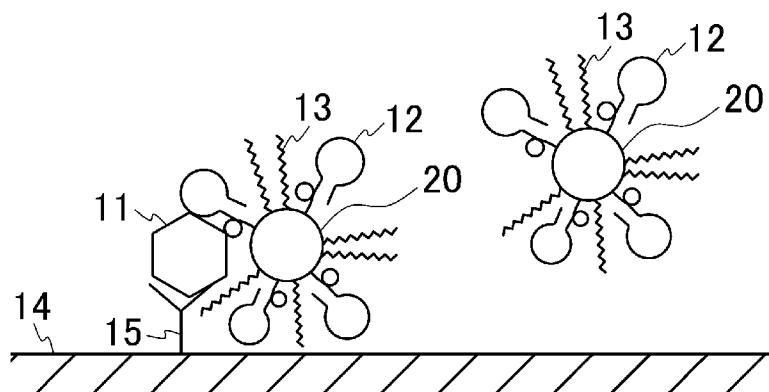
(A)



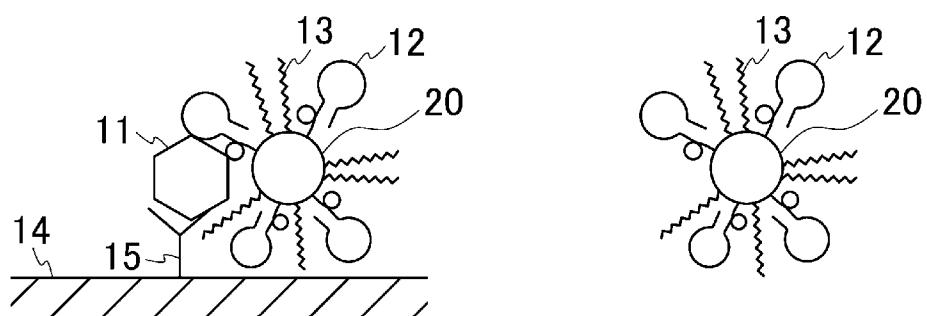
(B)



(C)

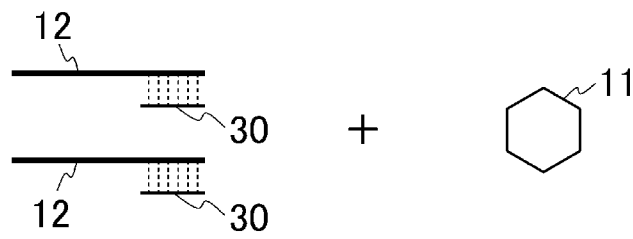


(D)

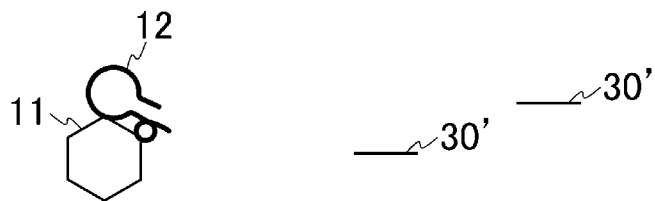


[図3]

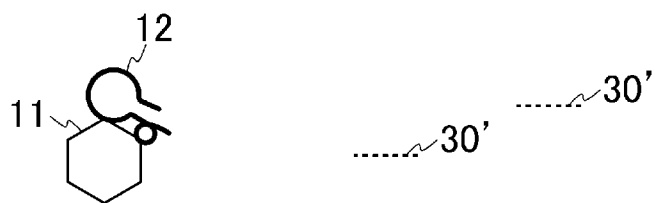
(A)



(B)

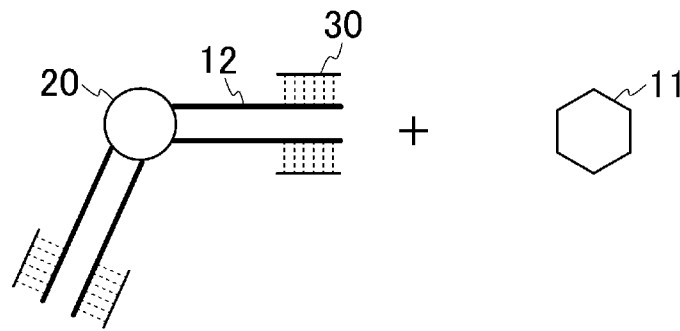


(C)

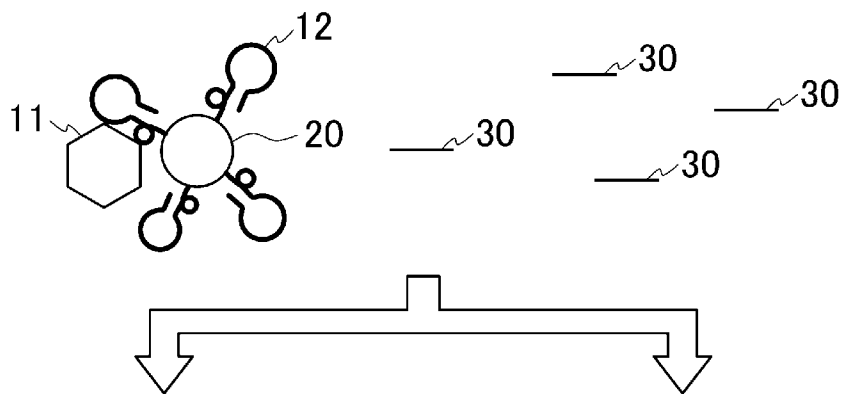


[図4]

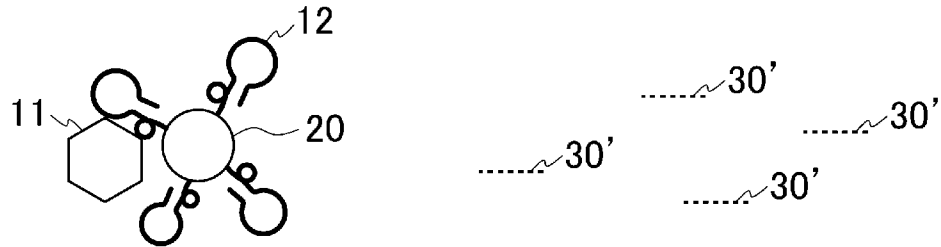
(A)



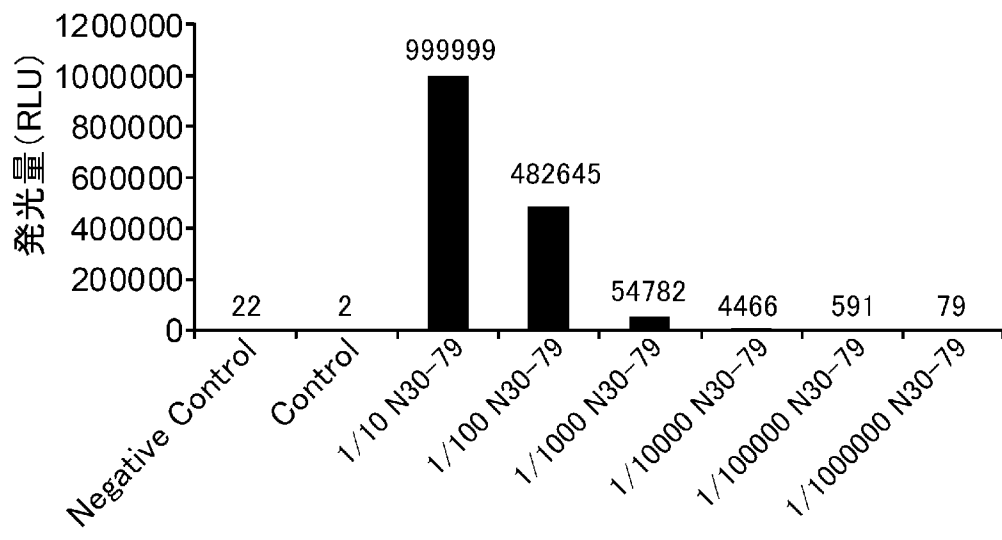
(B)



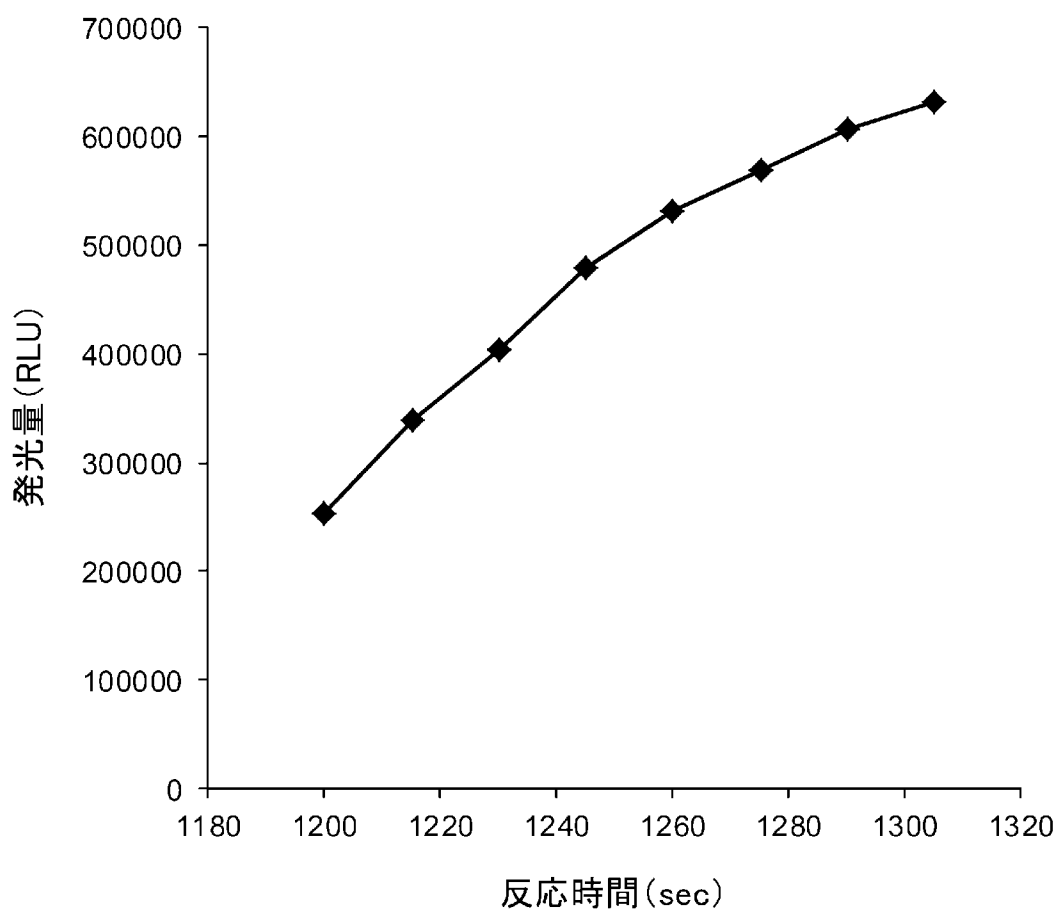
(C)



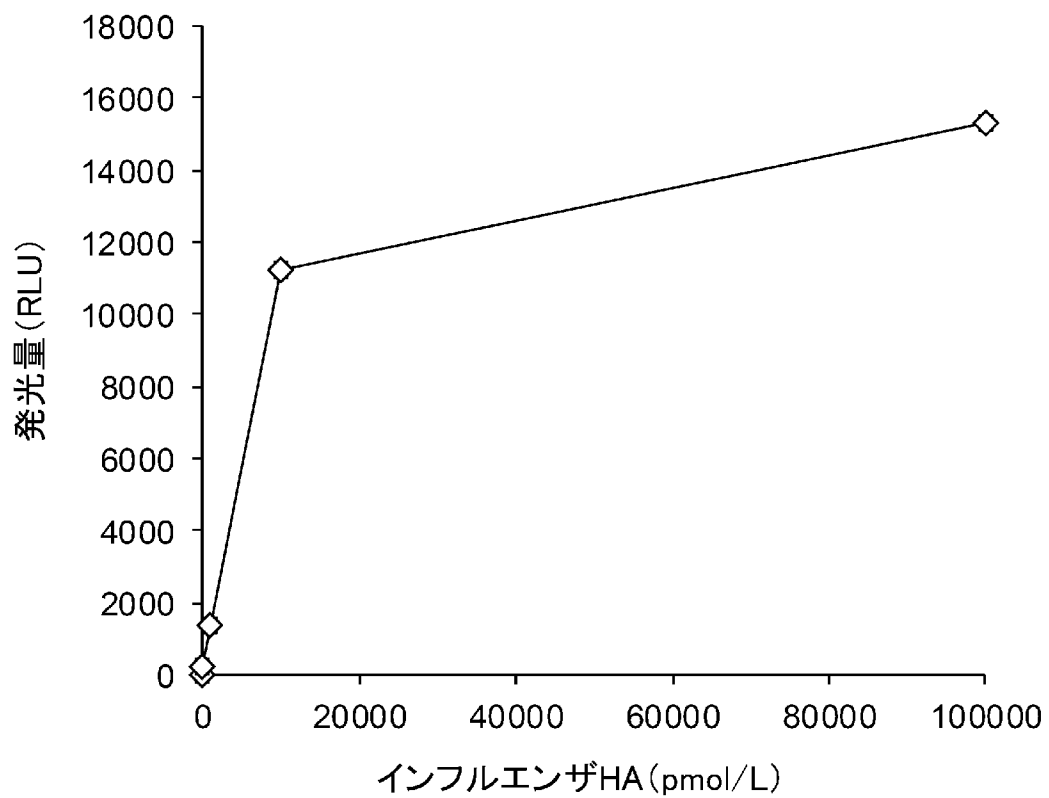
[図5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/069390

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/34(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(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)

C12Q, C12N, C12M, G01N31/, G01N33/

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)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Thomson Innovation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2008-515405 A (California Institute of Technology), 15 May 2008 (15.05.2008), claims; drawings & US 2006/0088864 A1 & US 2012/0035065 A1 & EP 1799825 A & WO 2006/042112 A2 & CN 101072874 A & AT 514776 T	1-38
A	JP 2006-508677 A (Fu, Guoliang), 16 March 2006 (16.03.2006), claims; drawings & US 2006/0240431 A1 & GB 228614 D & GB 228614 D0 & EP 1573057 A & WO 2004/053159 A2 & AU 2003285583 A	1-38

☐ 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
14 October, 2014 (14.10.14)

Date of mailing of the international search report
28 October, 2014 (28.10.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12Q1/34(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(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. C12Q, C12N, C12M, G01N31/, G01N33/

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）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII), Thomson Innovation

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
A	JP 2008-515405 A (カリフォルニア インスティテュート オブ テクノロジー) 2008.05.15, 特許請求の範囲、図面 & US 2006/0088864 A1 & US 2012/0035065 A1 & EP 1799825 A & WO 2006/042112 A2 & CN 101072874 A & AT 514776 T	1 - 38
A	JP 2006-508677 A (フー, グオリアン) 2006.03.16, 特許請求の範囲、図面 & US 2006/0240431 A1 & GB 228614 D & GB 228614 D0 & EP 1573057 A & WO 2004/053159 A2 & AU 2003285583 A	1 - 38

☐ 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

1 4 . 1 0 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

2 8 . 1 0 . 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）

山本 晋也

4 N

3 3 4 1

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8