

(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
2017年11月2日(02.11.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/188426 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/115 (2010.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/016884
- (22) 国際出願日: 2017年4月28日(28.04.2017)
- (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 2016-091390 2016年4月28日(28.04.2016) JP
特願 2017-087665 2017年4月26日(26.04.2017) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人東京農工大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND TECHNOLOGY) [JP/

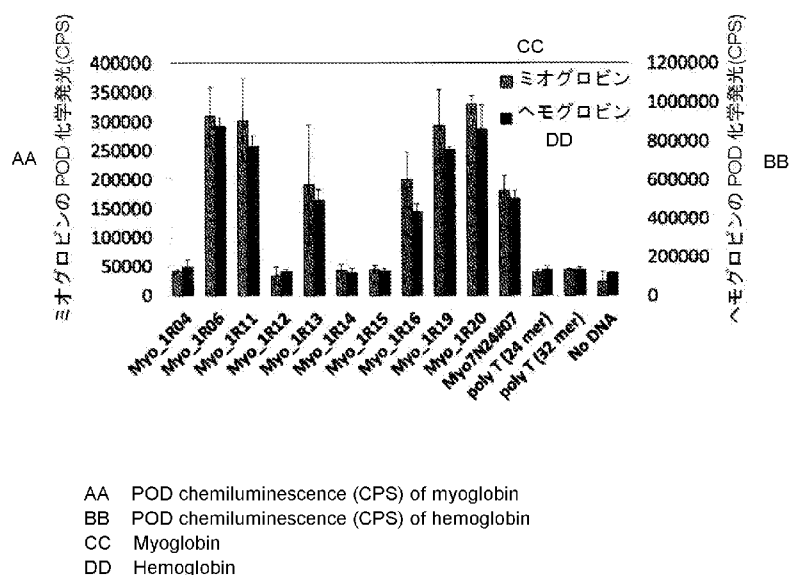
JP]; 〒1838538 東京都府中市晴見町3-8-1 Tokyo (JP). 株式会社デンソー(DENSO CORPORATION) [JP/JP]; 〒4488661 愛知県刈谷市昭和町1丁目1番地 Aichi (JP).

- (72) 発明者: 池袋 一典 (IKEBUKURO, Kazunori); 〒1838538 東京都府中市晴見町3-8-1 国立大学法人東京農工大学内 Tokyo (JP). 山岸 恭子 (YAMAGISHI, Yasuko); 〒1838538 東京都府中市晴見町3-8-1 国立大学法人東京農工大学内 Tokyo (JP). 金指 真菜(KANAZASHI, Mana); 〒4488661 愛知県刈谷市昭和町1丁目1番地 株式会社デンソー内 Aichi (JP). 久野 斉(KUNO, Hitoshi); 〒4488661 愛知県刈谷市昭和町1丁目1番地 株式会社デンソー内 Aichi (JP).

(54) Title: APTAMER ENHANCING PEROXIDASE ACTIVITY

(54) 発明の名称: ペルオキシダーゼ活性増大アプタマー

[図4]



(57) Abstract: Disclosed are a novel aptamer capable of enhancing the peroxidase activity of a heme protein and a method for quantifying a heme protein using the aptamer. The aptamer, which comprises a polynucleotide having a base sequence represented by formula [I]: $ggg(n)_1-2ggg(n)_1-8ggg(n)_1-2ggg$ [I] or a polynucleotide containing said polynucleotide, enhances the peroxidase activity of a heme protein. The method for quantifying a heme protein in a test sample comprises measuring, in the presence of this aptamer, the peroxidase activity in a heme



(74) 代理人: 特許業務法人 谷川国際特許事務所 (TANIGAWA AND PARTNERS, PATENT FIRM); 〒1020072 東京都千代田区飯田橋一丁目 7 番 10 号 山京別館 801 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, 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, 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))

protein-containing test sample collected from a living organism.

(57) 要約: 要約 ヘムタンパク質のペルオキシダーゼ活性を増大することができる新規なアプタマー及びそれを用いたヘムタンパク質の定量方法が開示されている。アプタマーは、その塩基配列が式[I]: $ggg(n)_{1-2}ggg(n)_{1-8}ggg(n)_{1-2}ggg$ [I] で示されるポリヌクレオチド又はポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドから成り、ヘムタンパク質のペルオキシダーゼ活性を増大させるものである。また、被検試料中のヘムタンパク質の定量方法は、生体から採取された、ヘムタンパク質を含む被検試料中のペルオキシダーゼ活性を、このアプタマーの存在下で測定することを含む。

明 細 書

発明の名称：ペルオキシダーゼ活性増大アプタマー

技術分野

[0001] 本発明は、ヘムタンパク質のペルオキシダーゼ活性を増大させるアプタマーに関する。

背景技術

[0002] ミオグロビンは、筋組織内での酸素運搬の役割を担うタンパク質である。急性心筋梗塞発症後、破壊された心筋から流出するミオグロビンは、急性心筋梗塞発症後ごく早期のマーカーとして利用されている。また、ヘモグロビンは、赤血球中に含まれ、肺から吸入した酸素を各組織に運搬する役割を担うタンパク質である。血中ヘモグロビンは低値で貧血や白血病、尿中ヘモグロビンは高値で大腸がんのマーカーとなると考えられている。このため、ミオグロビンやヘモグロビンのようなヘムタンパク質の定量が行われている。

[0003] ヘムタンパク質に補欠分子族として含まれるヘムは、ペルオキシダーゼ活性を有することが知られており、ヘムタンパク質の定量方法の1つとして、そのペルオキシダーゼ活性を測定する方法が知られている。ペルオキシダーゼは、酵素免疫測定(ELISA)における標識等として多用されており、その活性の測定方法は、種々のものが知られている。ペルオキシダーゼ活性の測定感度を向上させるために、主に基質が反応した際の発色を増感もしくは安定化する方法が種々開発されてきた。こうした手法では、ほとんどの場合で基質溶液と、増感剤または安定化溶液の2種類以上の試薬をアッセイのたびに混合する必要となり、操作が煩雑である上、試薬の保存にも留意する必要がある。また、そもそもペルオキシダーゼによる反応が起こっていない、あるいは反応生成物がごく微量である場合の検出は困難である。

[0004] 一方、ペルオキシダーゼ活性自体を増大させることにより、ペルオキシダーゼの検出感度を向上させる方法も知られている。例えば、ベタイン型代謝産物アナログを数十mM ～ 数百mM添加することで西洋ワサビ由来のペルオキ

シダーゼ（HRP）を活性化できることが報告されている（日本生物工学会大会講演要旨集，66，76，2014-08-05. <http://ci.nii.ac.jp/naid/110009906315>（参照 2016-02-05））。さらに、グアニン四重鎖（G4）構造をとるアプタマーが、ヘミンのペルオキシダーゼ活性を増大させることが報告されている（非特許文献1）。すなわち、非特許文献1には、G4とヘミン（塩化物イオンが1個配位したポルフィリンの3価鉄錯体）が複合体を形成すると、ヘミン単体の場合と比べてペルオキシダーゼ様活性が250倍に向上することが報告されている。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Chemistry and Biology, 1998, 5, 505-517

発明の概要

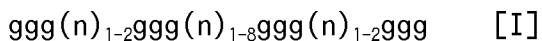
発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明の目的は、ヘムタンパク質のペルオキシダーゼ活性を増大することができる新規なアプタマー及びそれを用いたヘムタンパク質の定量方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0007] 本願発明者らは、鋭意研究の結果、特定の構造を持つアプタマーが、ミオグロビンやヘモグロビンのようなヘムタンパク質のペルオキシダーゼ活性を増大させる作用を有することを見出し、本発明を完成した。

[0008] すなわち、本発明は、塩基配列が式[I]：



で示されるポリヌクレオチド又はポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドから成り、ヘムタンパク質のペルオキシダーゼ活性を増大させるアプタマーを提供する。また、本発明は、配列番号21で示される塩基配列から成るアプタマーを提供する。さらに、本発明は、生体から採取された、ヘムタンパク質を含む被検試料中のペルオキシダーゼ活性を、上記本発明のアプタマー

の存在下で測定することを含む、被検試料中のヘムタンパク質の定量方法を提供する。さらに、本発明は、上記本発明のアプタマーの、ペルオキシダーゼ活性の測定のための使用を提供する。

発明の効果

[0009] 本発明の方法により、ヘムタンパク質のペルオキシダーゼ活性を増大させることが可能な新規なアプタマーが提供された。下記実施例において具体的に記載されるように、本発明のアプタマーの存在下では、ミオグロビンやヘモグロビンのようなヘムタンパク質のペルオキシダーゼ活性が最大で十数倍にも増大される。このため、本発明のアプタマーの存在下でヘムタンパク質のペルオキシダーゼ活性を定量することにより、測定感度が大幅に向上する。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]パラレル型とアンチパラレル型のG 4 アプタマーの構造を模式的に示す図である。

[図2]下記実施例で作製した本発明の実施例のアプタマーの円偏光二色性スペクトルを示す図である。

[図3]下記比較例のDNA配列の円偏光二色性スペクトルを示す図である。

[図4]下記実施例のアプタマー及び比較例のDNA配列の存在下又は非存在下においてミオグロビン及びヘモグロビンのペルオキシダーゼを測定した際の化学発光シグナルの強度を示す図である。

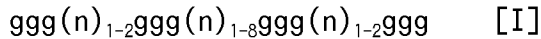
[図5]下記実施例のアプタマー及び比較例のDNA配列の終濃度が1nM、10nM及び100nMである場合のミオグロビンのペルオキシダーゼ活性を測定した際の化学発光シグナルの強度を示す図である。

[図6]下記実施例において測定した、リン酸バッファー中でのアプタマーによる化学発光強度の増幅を示す図である。

[図7]下記実施例において測定した、酢酸バッファー又はリン酸バッファー中でのアプタマーによるペルオキシダーゼ活性増幅計数を示す図である。

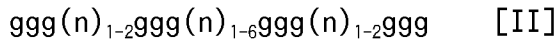
発明を実施するための形態

[0011] 上記の通り、本発明のアプタマーは、塩基配列が式[I]：

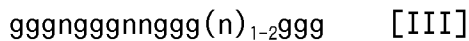


で示される。ここで、nは、a、c、g又はt（RNAの場合にはu）である。

[0012] 式[I]で示される塩基配列のうち、[II]：



で示されるものが好ましく、さらには、式[III]：



で示されるものが好ましい。

[0013] 前記式[I]で示される塩基配列の好ましい具体例としては、下記実施例で作製され、効果が具体的に確認された、配列番号1～7のいずれかに示される塩基配列を挙げることができる。これらの中でも、配列番号1～4のいずれかに示される塩基配列が好ましく、さらには、配列番号1又は2で示される塩基配列が好ましい。また、前記式[I]で示される塩基配列の好ましい具体例としては、下記実施例で作製され、効果が具体的に確認された、配列番号15～20、22及び23のいずれかに示される塩基配列も好ましい。

[0014] 本発明のアプタマーは、式[I]で示される塩基配列又は配列番号21に示される塩基配列から成るものであってもよいが、その5'末端及び3'末端の少なくともいずれか一方に、1個又は複数個のヌクレオチドが付加されたものであってもよい。アプタマーが標的物質と特異的に結合する理由は、アプタマーが特定の構造（立体構造又は平面構造）を呈することによるものであると考えられている。したがって、式[I]で示される塩基配列の一端又は両端に、特定の構造を呈さない塩基配列が付加されていてもペルオキシダーゼ活性の増大作用は維持される。DNAが何らかの構造を呈するか否かは、コンピューターソフトによる解析（例えば、<http://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/analyze.php>で公開されているRAMAPO COLLEGEのMapper（Nucleic Acids Research 2006 July; 34 (Web Server issue):W676-W682）により知ることができるので、特定の構造を呈さない塩基配列は、当業者によって容易に設定可能である。例えば、ポリt配列は、特定の構造を呈さないDNA配列として広

く知られており、式[I]で表されるアプタマーの一端又は両端にポリt配列が付加されたものも、ヘムタンパク質のペルオキシダーゼを増大する作用を有し、本発明の範囲に含まれる。もっとも、下記実施例で具体的に示されるように、式[I]で示される塩基配列の5'末端及び3'末端にヌクレオチドが付加されていなくても優れた効果を発揮し、また、アプタマーの長さが長くなると合成のコストも手間もかかるので、式[I]の一端又は両端にそれぞれ0個～10個、好ましくは0個～6個、さらに好ましくは0個～3個のヌクレオチドが付加されたアプタマーが好ましい（なお、「0個のヌクレオチドが付加された」は、ヌクレオチドが付加されていないことを意味する）。

[0015] 図1に示されるように、G4アプタマーには、平行型G4とアンチ平行型G4があることが知られているが、本発明のアプタマーは、下記実施例に具体的に記載するように、円偏光二色性（circular dichroism; CD）スペクトル測定の結果、平行型G4であることが確認されている。なお、G4アプタマーでは、グアニンが平面に4つ並ぶことで形成されるG-カルテットが平行に並んでおり、標的物質は、このG-カルテット嵌入される形で結合することが知られている。

[0016] 本発明のアプタマーは、DNAでもRNAでもよいが、化学的に安定なDNAが好ましい。また、本発明のアプタマーは、市販のDNA合成装置等を用いた化学合成により容易に調製することができる。

[0017] ヘムタンパク質と、本発明のアプタマーが共存すると、ヘムタンパク質のペルオキシダーゼ活性が増大する。ヘムタンパク質の例としては、ミオグロビン、ヘモグロビン、メトミオグロビン、カタラーゼ、シトクロムP450などが挙げられる。これらのうち、ミオグロビン及びヘモグロビンが好ましい。

[0018] 本発明のアプタマーの共存下で、ヘムタンパク質のペルオキシダーゼ活性を測定すると、ペルオキシダーゼ活性が増大されているので、ヘムタンパク質の測定感度が向上し、検出下限が下がる。したがって、本発明はまた、生体から採取された、ヘムタンパク質を含む被検試料中のペルオキシダーゼ活性を、上記本発明のアプタマーの存在下で測定することを含む、被検試料中

のヘムタンパク質の定量方法をも提供する。ここで、被検試料としては、血清、血漿、全血等の血液試料や尿等の体液、並びにその希釈物を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。被検試料に添加されるアプタマーの量は、想定されるヘムタンパク質の量等に応じて適宜設定することができ、想定されるヘムタンパク質中のヘムのモル数以上のモル数であることが好ましく、通常、終濃度が0.5nM～200nM程度、好ましくは1nM～100nM程度の範囲となるように添加される。

[0019] ペルオキシダーゼは、酵素免疫測定の際の標識等として汎用されているため、活性の測定方法自体は周知であり、種々の試薬や装置が市販されているので、市販の試薬や装置を用いた周知の方法により容易に測定することができる。例えば、ペルオキシダーゼの基質であって、ペルオキシダーゼ活性により分解されて化学発光する基質が市販されているので、このような基質を被検試料に加え、生じる化学発光を測定することによりペルオキシダーゼ活性を測定することができる（下記実施例参照）。

[0020] ペルオキシダーゼ活性の測定は、バッファの存在下で行うことが好ましく、特に、リン酸バッファ又は酢酸バッファの存在下で行うことが好ましい。例えば、血液や尿等の体液を、バッファ（緩衝液）で希釈したものを被検試料として好ましく用いることができ、バッファの中でもリン酸バッファ又は酢酸バッファを用いると、他のバッファを用いた場合と比較して、ペルオキシダーゼ活性が特に大幅に増大される（下記実施例8、19、20参照）ので好ましい。ここでリン酸バッファとは、 K_2HPO_4 と KH_2PO_4 を含むバッファであり、酢酸バッファとは、酢酸と、酢酸カリウム又は酢酸ナトリウムとを含むバッファである。これらのバッファのpHは4～7が好ましく、特に4～6.5が好ましい。

[0021] 以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

[0022] 実施例1～7、比較例1～6

1. アプタマーの合成

下記表 1 に示す塩基配列から成る DNA アプタマーを、市販の DNA 合成装置により化学合成した。なお、アプタマーはいずれも 5' 末端ビオチン修飾の配列を使用し、TBS バッファー (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, pH 7.4) 中にて 95℃ で 10 分間熱処理し、25℃ まで徐冷することでフォールディングしてから実験に用いた。

[0023] [表1]

例	アプタマー名	配列	長さ (mer)	配列 番号
比較例 1	Myo_1R04	gggatagggcacttacagaatgggtgcaaagtggg	35	8
実施例 1	Myo_1R06	gggtgggaagggttggg	17	2
実施例 2	Myo_1R11	gggtgggtttcttgggaggg	20	3
比較例 2	Myo_1R12	gggctagggtttcttgggttggg	24	9
実施例 3	Myo_1R13	gggtgggagggaggg	15	6
比較例 3	Myo_1R14	gggatagggcttcttgggttggg	23	10
比較例 4	Myo_1R15	gggcagggtttcttgggtgtaaagtggg	28	11
実施例 4	Myo_1R16	gggaagggttgggaggg	17	5
実施例 5	Myo_1R19	gggccgggagggaggg	16	4
実施例 6	Myo_1R20	gggtgggttgggaggg	16	1
実施例 7	Myo7N24#07	gggtgggttttcttgggttgggc	24	7
比較例 5	poly T(24 mer)	tttttttttttttttttttttt	24	12
比較例 6	poly T(32 mer)	tttttttttttttttttttttttttttt	32	13

(「mer」は塩基数)

[0024] 2. 円偏光二色性 (circular dichroism; CD) スペクトル測定によるアプタマーの構造評価

TBS バッファーで終濃度 2 μ M となるように調製したアプタマー (Myo_1R04, 06, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 20, Myo7N24#07. 配列は表1参照) について、石英セル (光路長 1 cm) を用い、J-720型円二色性分散計 (JASCO) にて波長 220~320 nm における CD スペクトル測定を行った。

[0025] 3. アプタマー存在下におけるペルオキシダーゼ活性測定

(1) 配列依存性: 96穴プレートに終濃度 100 nM のミオグロビンまたはヘモグロビン 50 μ L、終濃度 100 nM のアプタマー (Myo1R06, 11, 13, 16, 19, 20, Myo7N24#07. 配列は表1参照) 50 μ L を添加し、室温にて 1 時間振とうした。その後ペルオキシダーゼ基質 (BM Chemiluminescence ELISA Substrate (POD),

Roche) 100 μ Lを添加し、10分後にプレートリーダーを用いて化学発光強度を測定した。なお、DNAなし (No DNA) の場合、またはpoly T (24 merまたは32 mer) を用いた場合についても同様の操作を行った。

[0026] (2) アプタマー濃度依存性：96穴プレートに終濃度100 nMのミオグロビン50 μ L、終濃度1, 10, 100 nMのアプタマー (Myo1R06, 11, 13, 16, 19, 20, Myo7N24#07. 配列は表1参照) 50 μ Lを添加し、室温にて1時間振とうした。その後、(1)と同様の操作によりペルオキシダーゼ活性を測定した。なお、Myo_1R04, 12, 14, 15を用いた場合、またはDNAなしの場合についても同様の操作を行った。

[0027] 4. 結果

(1) CDスペクトル測定によるアプタマーの構造評価

G4はグアニンが平面に4つ並ぶことで形成されるG-カルテットが平行に並ぶことで形成される。一般に、G-カルテットの形成に寄与するグアニンの並び方により、パラレル型とアンチパラレル型の二種類に大別されることが知られている。CDスペクトル測定において、260nmにおける正のピークと240nmにおける負のピークが観察されればパラレル型G4、290nmにおける正のピークと260nmにおける負のピークが観察されればアンチパラレル型G4が形成されていると考えられる (図1)。今回構造を評価した配列の中では、本発明の実施例になるMyo_1R06, 11, 13, 16, 19, 20, Myo7N24#07において260nmにおける正のピークと240nmにおける負のピークが観察された (図2)。従って、これらの配列はパラレル型G4を形成していると考えられる。一方、比較例になるMyo_1R04, 12, 14, 15では顕著なピークが観察されなかった (図3)。

[0028] (2) アプタマー存在下におけるペルオキシダーゼ活性測定

(i) ミオグロビン及びヘモグロビンのペルオキシダーゼ活性による化学発光シグナルが特に高かったのは、本発明の実施例になるMyo_1R06, 11, 13, 16, 19, 20及びMyo7N24#07を用いた場合であった (図4)。(1)より、高いペルオキシダーゼ活性が確認されるのはパラレル型のG4を形成し得る配列であった。また、DNAなしの場合のペルオキシダーゼ活性に対して各アプタマー存在下

でのペルオキシダーゼ活性の比を化学発光シグナルによって算出すると、ミオグロビンでは最大でその活性が13.7倍、ヘモグロビンでは7.5倍にも増感されていることが示された（表2、表3）。

[0029] [表2]

ミオグロビンのペルオキシダーゼ活性増幅係数
(DNA無添加の場合に対する比)

例	アプタマー名	ペルオキシダーゼ活性増幅係数
実施例 6	Myo_1R20	13.7
実施例 1	Myo_1R06	12.9
実施例 2	Myo_1R11	12.6
実施例 5	Myo_1R19	12.2
実施例 4	Myo_1R16	8.4
実施例 3	Myo_1R13	7.9
実施例 7	Myo7N24#07	7.6

[0030] [表3]

ヘモグロビンのペルオキシダーゼ活性増幅係数
(DNA無添加の場合に対する比)

例	アプタマー名	ペルオキシダーゼ活性増幅係数
実施例 1	Myo_1R06	7.5
実施例 6	Myo_1R20	7.4
実施例 2	Myo_1R11	6.6
実施例 5	Myo_1R19	6.5
実施例 7	Myo7N24#07	4.3
実施例 3	Myo_1R13	4.2
実施例 4	Myo_1R16	3.7

[0031] (ii)本発明の実施例になるMyo_1R06, 11, 13, 16, 19, 20及びMyo7N24#07を用いた場合、アプタマー濃度依存的にミオグロビンのペルオキシダーゼ活性が向上した（図5）。一方、比較例のDNA配列を用いた場合、ペルオキシダーゼ活性は、DNA配列を添加しない場合とほとんど同じであった。

[0032] 実施例 8、9、比較例 7 リン酸バッファー中での測定

TBSバッファーをリン酸バッファー（組成：10mM K₂HP0₄, KH₂PO₄, pH6.5）に変更したことを除き、実施例 5（Myo_1R19）及び実施例 6（Myo_1R20）と同じ操作を行った（終濃度100nMのミオグロビンのペルオキシダーゼ活性を測定（実施例 8 及び 9））。また、31T（polyT(31mer)）についてもリン酸バッフ

ァー中で同様に測定を行った（比較例 7）。結果を下記表 4 及び図 6 に示す。

[0033] [表4]

例	アプタマー名	ペルオキシダーゼ活性増幅係数
実施例 8	Myo_1R19	62.9
実施例 9	Myo_1R20	95.2
比較例 7	T31 (polyT(31mer) (配列番号 1 4)	0.9

[0034] 表 4 及び図 6 に示されるように、測定をリン酸バッファー中で行うことにより、TBSバッファー中で行う場合と比べて、ペルオキシダーゼ活性が約 5 倍～約 8 倍に増幅された。

[0035] 実施例 1 0 ～ 1 8

下記表 5 に示す塩基配列から成る DNA アプタマーを、実施例 1 ～ 7 と同様にして化学合成し、ミオグロビンのペルオキシダーゼ活性の増幅計数を測定した。結果を表 5 に示す。

[0036] [表5]

例	アプタマー名	配列	長さ (mer)	配列 番号	ペルオキシダーゼ 活性増幅係数
実施例10	mPOD_2-01	gggcgggttgggctggg	17	15	32.6
実施例11	mPOD_3-03	aggggtgggaaggagg	17	16	29.3
実施例12	mPOD_1-03	gggccgggtgggttggg	17	17	26.6
実施例13	mPOD_2-02	gggtgggagggtggg	16	18	26.3
実施例14	mPOD_1-02	gggccgggagggtggg	16	19	26.2
実施例15	mPOD_3-19	gggtgggctgggttggg	17	20	26.1
実施例16	mPOD_1-01	gggtgggcgggtgtagagtggg	22	21	26.0
実施例17	mPOD_3-18	gggcgggttgggtagg	17	22	25.9
実施例18	mPOD_2-05	gggagggttgggttggg	17	23	25.5

[0037] 実施例 1 9、2 0、比較例 8

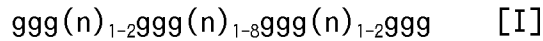
上記実施例 7 のアプタマー Myo7N24#07（実施例 1 9）、上記実施例 1 0 のアプタマー mPOD_2-01（実施例 2 0）及び polyT（24mer、配列番号 2 4）（比較例 8）について、酢酸バッファー（10mM CH₃COOK/CH₃COOH、pH3.5～5.5）又はリン酸バッファー（10mM K₂HPO₄/KH₂PO₄、pH5.5.0～8.0）中で、上記と同様に

してミオグロビンのペルオキシダーゼ活性の増幅計数を測定した。結果を図7に示す。

[0038] 図7に示すように、本発明のアプタマーでは、酢酸バッファー又はリン酸バッファー中で高いペルオキシダーゼ活性増幅が観測された。また、pH7以下の酸性側で増幅計数が高く、すなわちプロトン濃度が高くなった際に特にそのペルオキシダーゼ活性の増強効果が高くなることがわかった。プロトン濃度が高い時にはプロトンの授受がペルオキシダーゼ反応の律速になると考えられるが、アプタマーの存在によりプロトンの授受に関与する官能基がヘム近傍に配置され、ペルオキシダーゼ活性が向上したと考察している。このことから、G4形成アプタマーがプロトンの授受に寄与していることが示唆された。

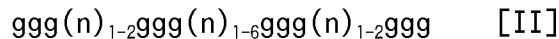
請求の範囲

【請求項1】 塩基配列が式[I]：



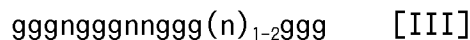
で示されるポリヌクレオチド又は該ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドから成り、ヘムタンパク質のペルオキシダーゼ活性を増大させるアプタマー。

【請求項2】 前記式[I]が式[II]：



で示される請求項1記載のアプタマー。

【請求項3】 前記式[II]が式[III]：



で示される請求項1記載のアプタマー。

【請求項4】 前記式[I]で示される塩基配列が、配列番号1～7のいずれかに示される塩基配列である請求項1記載のアプタマー。

【請求項5】 前記式[I]で示される塩基配列が、配列番号1～4のいずれかに示される塩基配列である請求項1記載のアプタマー。

【請求項6】 前記式[I]で示される塩基配列が、配列番号1又は2で示される塩基配列である請求項1記載のアプタマー。

【請求項7】 式[I]の一端又は両端にそれぞれ0個～10個のヌクレオチドが付加された請求項1記載のアプタマー。

【請求項8】 前記式[I]で示される塩基配列が、配列番号15～20、22及び23のいずれかに示される塩基配列である請求項1記載のアプタマー。

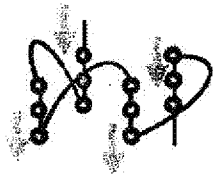
【請求項9】 配列番号21で示される塩基配列から成るポリヌクレオチド又は該ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドから成り、ヘムタンパク質のペルオキシダーゼ活性を増大させるアプタマー。

【請求項10】 配列番号21で示される塩基配列から成るポリヌクレオチドから成る請求項9記載のアプタマー。

- [請求項11] 生体から採取された、ヘムタンパク質を含む被検試料中のペルオキシダーゼ活性を、請求項1～7のいずれか1項に記載のアプタマーの存在下で測定することを含む、被検試料中のヘムタンパク質の定量方法。
- [請求項12] 前記ヘムタンパク質が、ミオグロビン又はヘモグロビンである請求項11記載の方法。
- [請求項13] 生体から採取された、ヘムタンパク質を含む被検試料中のペルオキシダーゼ活性を、請求項8～10のいずれか1項に記載のアプタマーの存在下で測定することを含む、被検試料中のヘムタンパク質の定量方法。
- [請求項14] 前記ヘムタンパク質が、ミオグロビン又はヘモグロビンである請求項13記載の方法。
- [請求項15] ペルオキシダーゼ活性の測定を、リン酸バッファー又は酢酸バッファーの存在下で行う請求項10～14のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項16] 請求項1～10のいずれか1項に記載のアプタマーの、ペルオキシダーゼ活性の測定のための使用。

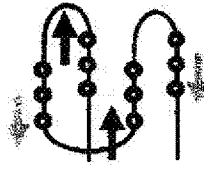
[図1]

パラレル型G4



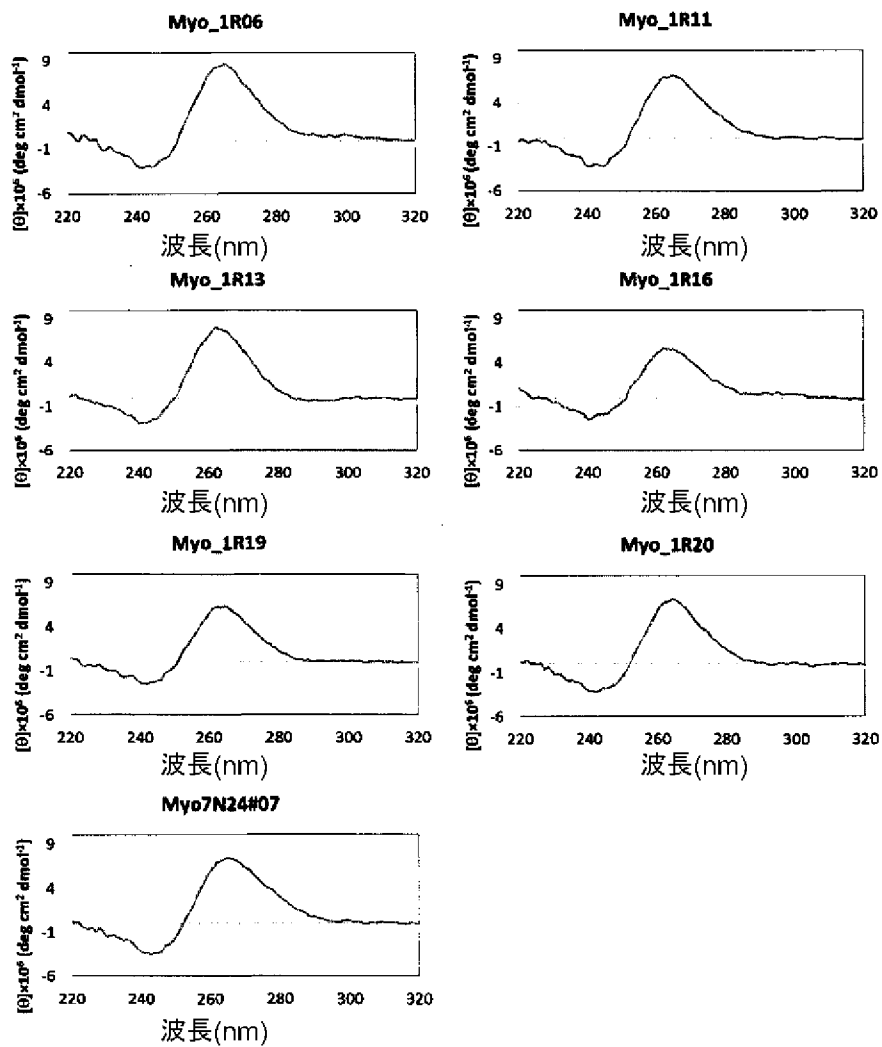
↑ 260 nm
↓ 240 nm

アンチパラレル型G4

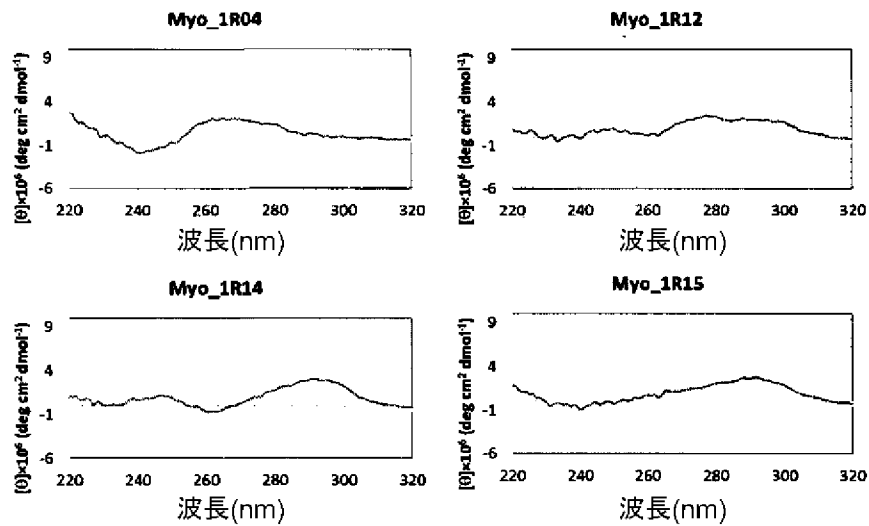


↑ 290 nm
↓ 260 nm

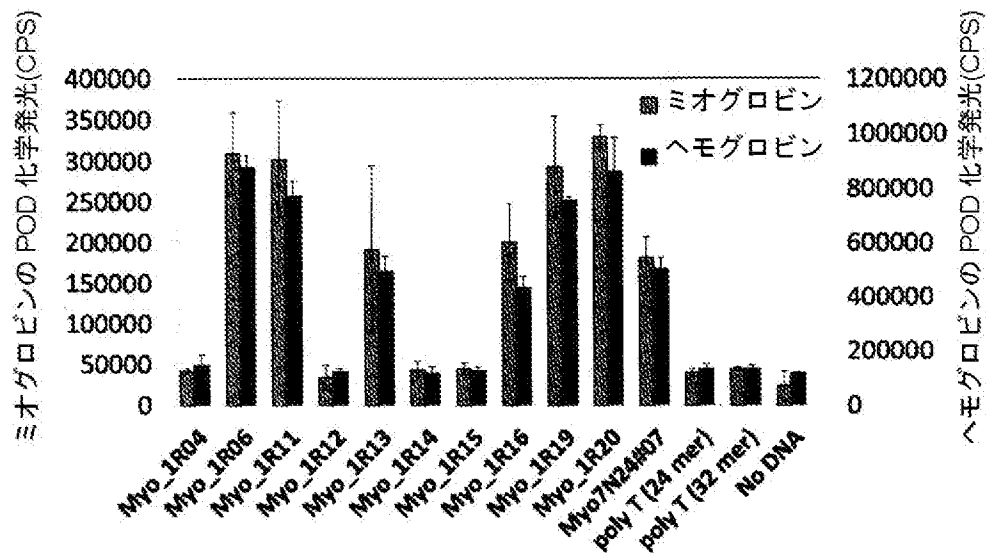
[図2]



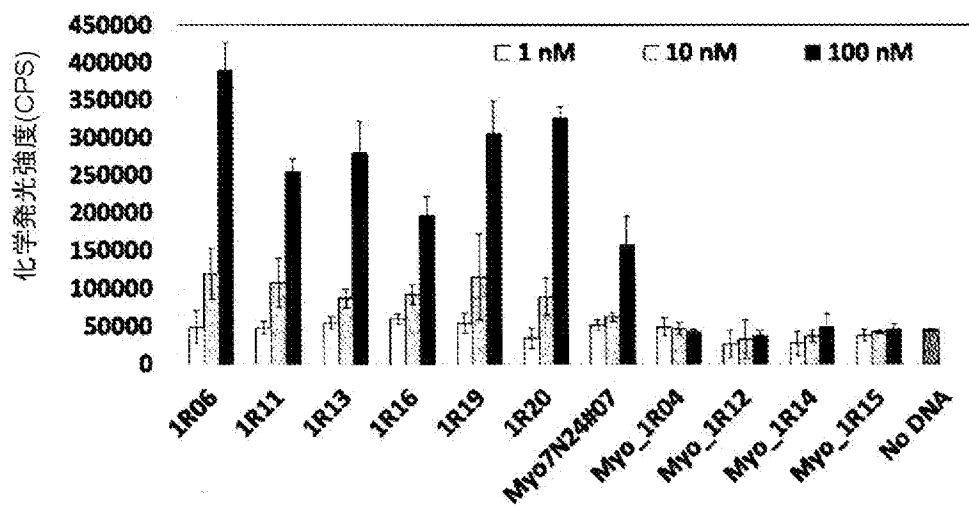
[図3]



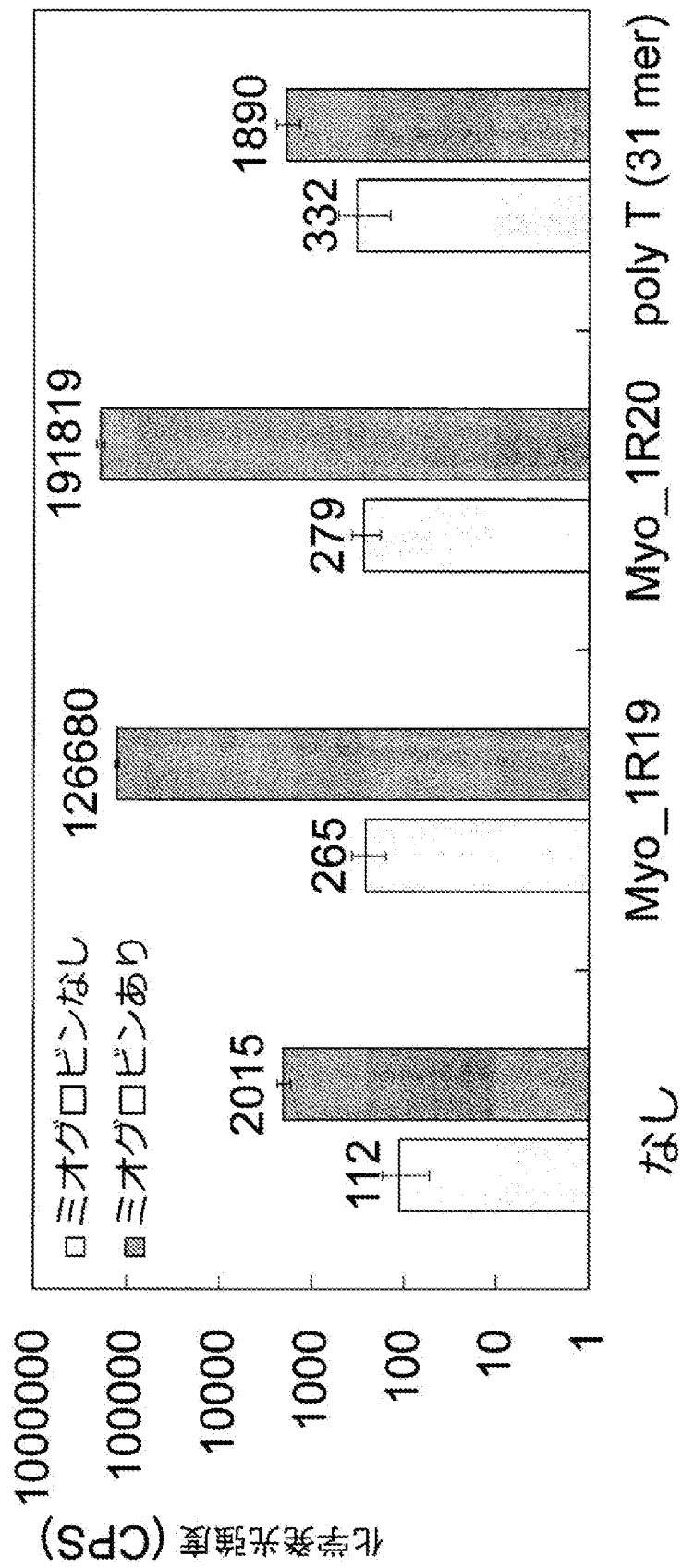
[図4]



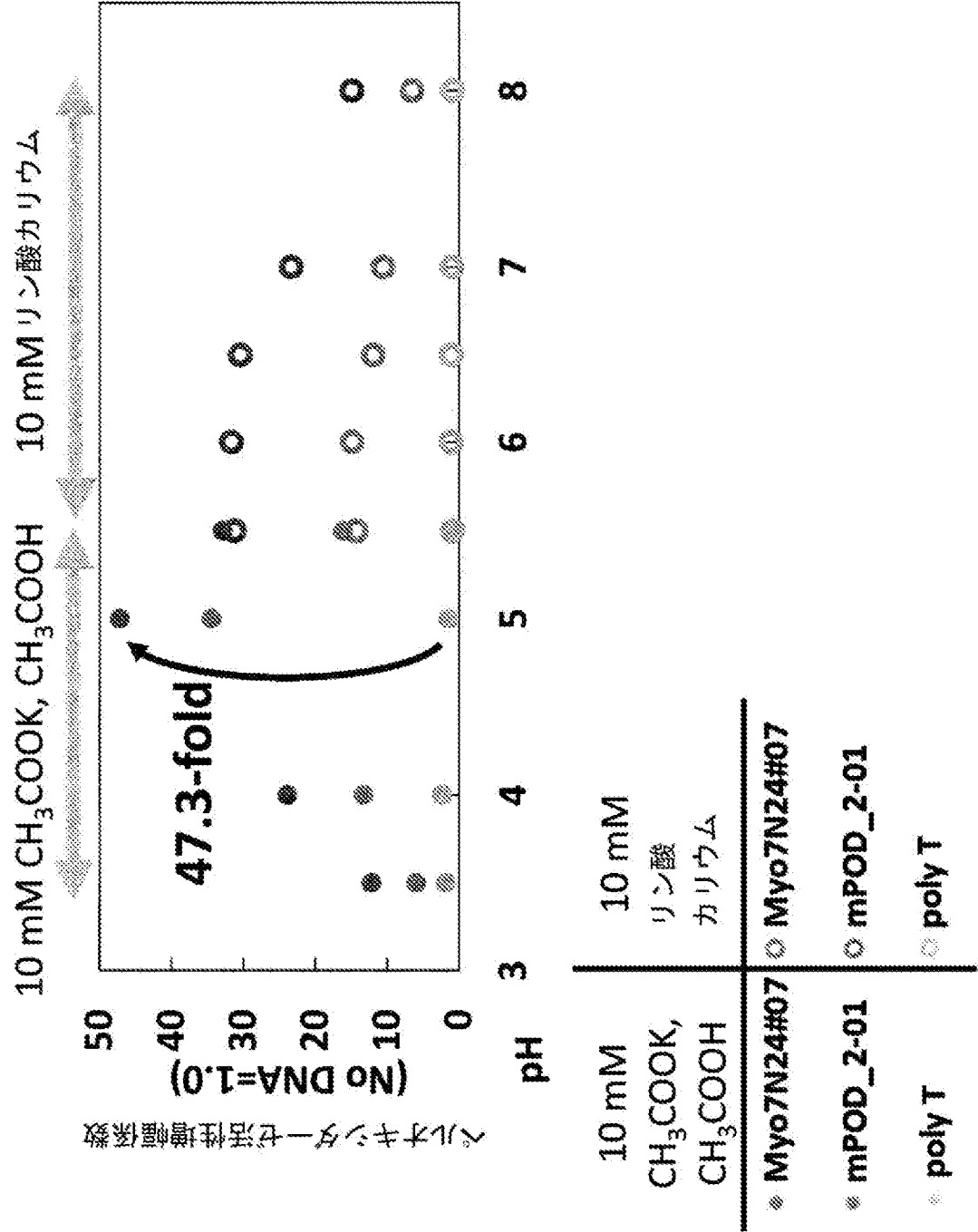
[図5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/016884

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/115(2010.01) 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)

C12N15/115, C12Q1/68

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	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), WPIDS/WPIX(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 2013/140681 A1 (NEC Soft, Ltd.), 26 September 2013 (26.09.2013), claims; SEQ ID NO:14 & US 2015/0056720 A1 claims; Seq No. 14	1-4, 7, 16/11, 12, 15
X/Y	WO 2013/141291 A1 (NEC Soft, Ltd.), 26 September 2013 (26.09.2013), claims; SEQ ID NO:14 & US 2015/0086980 A1 claims; Seq No. 14 & EP 2829604 A1	1-4, 7, 16/11, 12, 15

☒ 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 2017 (12.06.17)

Date of mailing of the international search report
20 June 2017 (20.06.17)

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/JP2017/016884

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 2013/140629 A1 (NEC Soft, Ltd.), 26 September 2013 (26.09.2013), claims; SEQ ID NO:14 & US 2015/0056720 A1 claims; Seq No. 14	1-4, 7, 16/11, 12, 15
X/Y	WO 2013/005723 A1 (NEC Soft, Ltd.), 10 January 2013 (10.01.2013), claims; tables 2, 3 & US 2014/0128589 A1 claims; tables 2, 3 & EP 2730915 A1	1-3, 7, 8, 16/ 11-15
X/Y	ZHU, Ling et al., In Vitro Selection of Highly Efficient G-Quadruplex-Based DNazymes, Anal. Chem., 2012, Vol. 84, p. 8383-8390, ISSN 1520- 6882, Figure 1-4.	1-10, 16/ 11-15
Y	JP 08-029430 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 02 February 1996 (02.02.1996), claims; examples (Family: none)	11-15
Y	JP 04-262796 A (The Green Cross Corp.), 18 September 1992 (18.09.1992), example 1 (Family: none)	11-15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/115(2010.01)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 (IPC))

Int.Cl. C12N15/115, C12Q1/68

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	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017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/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (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	WO 2013/140681 A1 (NECソフト株式会社) 2013.09.26, 特許請求の範囲、配列番号14 & US 2015/0056720 A1, Claims, Seq No. 14	1-4, 7, 16/11, 12, 15
X/Y	WO 2013/141291 A1 (NECソフト株式会社) 2013.09.26, 特許請求の範囲、配列番号14 & US 2015/0086980 A1, Claims, Seq No. 14 & EP 2829604 A1	1-4, 7, 16/11, 12, 15

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

12.06.2017

国際調査報告の発送日

20.06.2017

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)

小倉 梢

4N

4504

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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
X/Y	WO 2013/140629 A1 (NECソフト株式会社) 2013.09.26, 特許請求の範囲、配列番号 1 4 & US 2015/0056720 A1, Claims, Seq No. 14	1-4, 7, 16/11, 12, 15
X/Y	WO 2013/005723 A1 (NECソフト株式会社) 2013.01.10, 請求の範囲、表 2、3 & US 2014/0128589 A1, Claims, Table 2, 3 & EP 2730915 A1	1-3, 7, 8, 16/11-15
X/Y	ZHU, Ling et al., In Vitro Selection of Highly Efficient G-Quadruplex-Based DNazymes, Anal. Chem., 2012, Vol. 84, p. 8383-8390, ISSN 1520-6882, Figure 1-4.	1-10, 16/11-15
Y	JP 08-029430 A (協和発酵工業株式会社) 1996.02.02, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	11-15
Y	JP 04-262796 A (株式会社ミドリ十字) 1992.09.18, 実施例 1 (ファミリーなし)	11-15