

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015 年 10 月 8 日(08.10.2015)



(10) 国際公開番号

WO 2015/151349 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/115 (2010.01) G01N 33/53 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/083351
- (22) 国際出願日: 2014 年 12 月 17 日(17.12.2014)
- (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 2014-073741 2014 年 3 月 31 日(31.03.2014) 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: 横山 朋子(YOKOYAMA Tomoko); 〒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). 白鳥 行大(SHIRATORI Ikuro); 〒

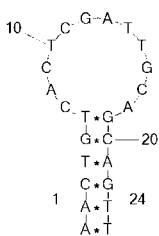
1368627 東京都江東区新木場一丁目 1 8 番 7 号 NECソリューションイノベータ株式会社内 Tokyo (JP). 堀井 克紀(HORII Katsunori); 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目 1 8 番 7 号 NECソリューションイノベータ株式会社内 Tokyo (JP). 皆川 宏貴(MINAGAWA Hirotaka); 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目 1 8 番 7 号 NECソリューションイノベータ株式会社内 Tokyo (JP). 秋富 穰(AKITOMI Jou); 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目 1 8 番 7 号 NECソリューションイノベータ株式会社内 Tokyo (JP). 金子 直人(KANEKO Naoto); 〒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). 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). 和賀 巖(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).

[続葉有]

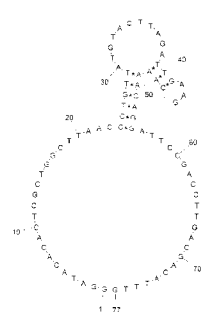
(54) Title: SOBA-ALLERGEN-BINDING NUCLEIC ACID MOLECULE AND USE THEREFOR

(54) 発明の名称: そばアレルゲンに結合する核酸分子およびその用途

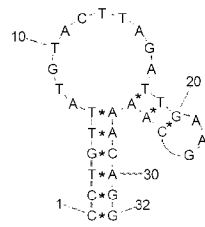
FAGE2191R8m1s24
配列番号 2 AA



FAGE2191R8m2
配列番号 3 BB



FAGE2191R8m2s32
配列番号 4 CC



AA FAGE2191R8m1s24, SEQ ID NO: 2
BB FAGE2191R8m2, SEQ ID NO: 3
CC FAGE2191R8m2s32, SEQ ID NO: 4

(57) Abstract: Provided is a novel nucleic acid molecule that can be used to detect a soba allergen. A soba-allergen-binding nucleic acid according to the present invention is characterized by being a nucleic acid molecule that has a dissociation constant with regard to a soba allergen of 60 nM or less. For example, the nucleic acid ideally includes a polynucleotide that comprises a base sequence that is any of SEQ ID NO: 1-10.

(57) 要約: そばアレルゲンの検出に利用可能な新たな核酸分子を提供する。本発明のそばアレルゲン結合核酸は、そばアレルゲンに対する解離定数が、60 nM以下の核酸分子であることを特徴とし、例えば、配列番号1-10のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むことが好ましい。



(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, 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), ユーロアジア (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： そばアレルギーに結合する核酸分子およびその用途
技術分野

[0001] 本発明は、そばアレルギーに結合する核酸分子およびその用途に関する。

背景技術

[0002] そばは、日常的に頻繁に摂取される食品であるが、近年、そばアレルギーの患者が増加しており、問題視されている。パンおよび麺の加工食品等は、そばを使用するものが多く存在するため、加工食品やその製造ライン等においては、原料としてそばが混入しているか否かを分析することは、極めて重要である。

[0003] アレルギーのアレルゲンは、一般的に、タンパク質やその分解物（ペプチド）であり、これらを抗原とする抗体を使用した分析方法が、主流である。そばに関しては、例えば、そばタンパク質である F a g e 2 がアレルゲンとして知られており、その遺伝子がクローニングされ（非特許文献4）、患者 I g E を使ったエピトープ解析等が行われている（非特許文献5）。しかしながら、いまだ、F a g e 2 に特異的な分析方法は、報告されていない。報告されている方法としては、例えば、P C R を用いた方法（非特許文献1、非特許文献2）、抗体を使用する方法（非特許文献3）等である。

[0004] しかし、抗体は、タンパク質であり、安定性に問題があるため、低コストで簡易な検査法に抗体を用いることが難しい。このため、近年、抗体に代えて、抗原と特異的に結合する核酸分子が注目されている。しかしながら、これまでにそばアレルギーに対する核酸分子は報告されていない。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1： ‘PCR Method for Detecting Trace Amounts of Buckwheat (Fagopyrum spp.) in Food’ , Takashi HIRAO, Shinsuke IMAI , Hiroshi SAWADA, Nobuo SHIOMI, Satoshi HACHIMURA, Hisanori K

AT0, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 69 (4), pp724-731, 2005

非特許文献2: 'Specific Detection of Buckwheat Residues in Processed Foods by Polymerase Chain Reaction', Hirohito YAMAKAWA, Hiroshi AKIYAMA, Yumi ENDO, Kiyoko MIYATAKE, Shinobu SAKAI, Kazunari KONDO, Masatake TOYODA, Atsuo URISU, Reiko TESHIMA, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 72 (8), pp2228-2231, 2008

非特許文献3: 'Japan Food Allergen Labeling Regulation-History and Evaluation', Hiroshi Akiyama, Takanori Imai, Motohiro Ebisawa, Advances in Food and Nutrition Research, 62, pp139-171, 2011

非特許文献4: 'Molecular cloning and expression of a major allergenic protein Fag e 2 from buckwheat', Hiroyuki YOSHIOKA, Natsuko YASUEDA and Taiji ADACHI, Fagopyrum, 21: 35-38 (2004)

非特許文献5: 'Identification of a New IgE-Binding Epitope of Peanut Oleosin That Cross-React with Buckwheat', Shoko KOBAYASHI, Shinta KATSUYAMA, Tamae WAGATSUMA, Shinji OKADA and Soichi TANABE, Biosci. Biotechnol. Biochem, 76 (6), 1182-1188 (2012)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] そこで、本発明の目的は、そばアレルギーの検出に利用可能な新たな核酸分子を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明のそばアレルギー結合核酸分子は、そばアレルギーに対する解離定数が、 6.0×10^{-6} M以下の核酸分子であることを特徴とする。

[0008] 本発明のそばアレルギー分析用センサは、前記本発明のそばアレルギー結合核酸分子を含むことを特徴とする。

[0009] 本発明のそばアレルギーの分析方法は、試料と前記本発明のそばアレルギー結合核酸分子とを接触させ、前記試料中のそばアレルギーと前記核酸分子とを結合させることにより、前記試料中のそばアレルギーを検出する工程を含むことを特徴とする。

発明の効果

[0010] 本発明のそばアレルギー結合核酸分子は、そばアレルギーに対して前述のような解離定数で結合することができる。このため、本発明のそばアレルギー結合核酸分子によれば、例えば、試料中のそばアレルギーとの結合の有無によって、優れた精度で、そばアレルギーを検出できる。したがって、本発明のそばアレルギー結合核酸分子は、例えば、食品製造、食品管理、食品の流通等の分野におけるそばアレルギーの検出に、極めて有用なツールといえる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、本発明のそばアレルギー結合核酸分子の推定二次構造の一例を示す概略図である。

[図2]図2は、本発明のそばアレルギー結合核酸分子の推定二次構造の一例を示す概略図である。

[図3]図3は、本発明のそばアレルギー結合核酸分子の推定二次構造の一例を示す概略図である。

[図4]図4は、本発明の実施例1において、アプタマーとそばアレルギーとの結合能を示すグラフである。

[図5]図5は、本発明の実施例1において、アプタマーとそばアレルギーとの結合能を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明の核酸分子は、例えば、前記そばアレルギーが、F a g e 2 またはそのサブユニットである。

[0013] 本発明の核酸分子は、例えば、前記そばアレルゲンが、未変性アレルゲンまたは加熱変性アレルゲンである。

[0014] 本発明の核酸分子は、例えば、下記（a）～（d）からなる群から選択された少なくとも一つのポリヌクレオチドを含む。

（a）配列番号 1－10 のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド

（b）前記（a）のいずれかの塩基配列において、1 もしくは数個の塩基が欠失、置換、挿入および／または付加された塩基配列からなり、前記そばアレルゲンに結合するポリヌクレオチド

（c）前記（a）のいずれかの塩基配列に対して、80%以上の同一性を有する塩基配列からなり、前記そばアレルゲンに結合するポリヌクレオチド

（d）前記（a）のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドに、相補的な塩基配列からなり、そばアレルゲンに結合するポリヌクレオチド

[0015] 本発明の核酸分子は、例えば、前記ポリヌクレオチドが、DNAである。

[0016] 本発明の分析用センサは、例えば、さらに、Gカルテット構造を形成する核酸分子を含む。

[0017] 本発明の分析用センサは、例えば、前記Gカルテット構造を形成する核酸分子が、DNAzymeまたはRNAzymeである。

[0018] 本発明の分析用センサは、例えば、さらに、ポルフィリンを含む。

[0019] 本発明の分析方法は、例えば、前記試料が、食品、食品原料および食品添加物からなる群から選択された少なくとも一つである。

[0020] （1）そばアレルゲン結合核酸分子

本発明のそばアレルゲン結合核酸分子は、前述のように、そばアレルゲンに対する解離定数が、60 nM以下の核酸分子であることを特徴とする。

[0021] 本発明の核酸分子は、例えば、そばの主要アレルゲンである、Fag e 2、そのサブユニット、またはそのドメインに結合する。

[0022] 前記そばアレルゲンは、例えば、加熱による変性が生じていない未変性アレルゲンでもよいし、加熱による変性が生じた変性アレルゲンでもよい。本

発明の核酸分子は、例えば、いずれのアレルゲンに対しても結合可能である。

[0023] 本発明の核酸分子は、前記そばアレルゲンに対する解離定数が、例えば、 60 nM 以下、 10 nM 以下、 3 nM 以下である。本発明の核酸分子は、前記そばアレルゲンの検出限界濃度が、例えば、 6.25 nM 、 12.5 nM 、 25 nM である。

[0024] 本発明の核酸分子は、前記F a g e 2に対する解離定数が、例えば、 60 nM 以下、 10 nM 以下、 3 nM 以下である。本発明の核酸分子は、前記F a g e 2の検出限界濃度が、例えば、 6.25 nM 、 12.5 nM 、 25 nM である。

[0025] 本発明の核酸分子と前記そばアレルゲンとの結合は、例えば、表面プラズモン共鳴分子相互作用（S P R ; Surface Plasmon resonance）解析等により決定できる。前記解析は、例えば、P r o t e O N（商品名 BioRad社）が使用できる。

[0026] 本発明のそばアレルゲン結合核酸分子について、具体例を以下に示す。本発明の核酸分子は、例えば、下記（a）～（d）からなる群から選択された少なくとも一つのポリヌクレオチドを含む核酸分子である。

（a）配列番号1－10のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド

（b）前記（a）のいずれかの塩基配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換、挿入および／または付加された塩基配列からなり、前記そばアレルゲンに結合するポリヌクレオチド

（c）前記（a）のいずれかの塩基配列に対して、80%以上の同一性を有する塩基配列からなり、前記そばアレルゲンに結合するポリヌクレオチド

（d）前記（a）のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドに、相補的な塩基配列からなり、そばアレルゲンに結合するポリヌクレオチド

[0027] 本発明の核酸分子において、前記ポリヌクレオチドの構成単位は、例えば、ヌクレオチド残基であり、デオキシリボヌクレオチド残基およびリボヌク

レオチド残基があげられる。前記ポリヌクレオチドは、後述するように、例えば、デオキシリボヌクレオチド残基からなるDNA、デオキシリボヌクレオチド残基およびリボヌクレオチド残基を含むDNAであり、さらに、非ヌクレオチド残基を含んでもよい。本発明のそばアレルゲン結合核酸分子は、例えば、以下、DNAアプタマーともいう。

[0028] 本発明の核酸分子は、例えば、前記(a)～(d)のいずれかのポリヌクレオチドからなる分子でもよいし、前記ポリヌクレオチドを含む分子でもよい。後者の場合、本発明の核酸分子は、例えば、後述するように、前記(a)～(d)のいずれかのポリヌクレオチドを2つ以上含んでもよい。前記2つ以上のポリヌクレオチドは、同じ配列でもよいし、異なる配列でもよい。また、後者の場合、本発明の核酸分子は、例えば、さらに、リンカーおよび／または付加配列等を有してもよい。

[0029] 前記(a)のポリヌクレオチドは、下記表1に示す配列番号1-10のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチドである。

[0030]

[表1]

FAGE2191R8m1 (配列番号 1)
GGATACACACTCGCTGGCTTA <u>AACTGTC</u> ACTCGATTGCAGCAGTTTAGCGCTAAGGATTCCGACCTTGACGACATTG
FAGE2191R8m1s24 (配列番号 2)
AACTGTCACTCGATTGCAGCAGTT
FAGE2191R8m2 (配列番号 3)
GGATACACACTCGCTGGCTTAAC <u>CCTGTTATG</u> TACTTAGATTGAAGCAAAACAGGATTCCGACCTTGACGACATTG
FAGE2191R8m2s32 (配列番号 4)
CCTGTTATGTACTTAGATTGAAGCAAAACAGG
FAGE2215NNHR8m1 (配列番号 5)
GGATTGCCACCCCTCGATAAGTATCAAAAATGTCCTTATTGAAGCCTTTTTGA <u>ACTCTGGCTGCGACACTTAAC</u>
FAGE2215NNHR8m1s30 (配列番号 6)
TCAAAAATGTCCTTATTGAAGCCTTTTTGA
FAGE2215NNHR8m2 (配列番号 7)
GGATTGCCACCCCTCGATAAGTAAACTGTCCTTATTGAAGCCGTTTTACAGAACTCTGGCTGCGACACTTAAC
FAGE2215NNHR8m2s30 (配列番号 8)
GTAAAACTGTCCTTATTGAAGCCGTTTTAC
FAGE2215NNHR8m3 (配列番号 9)
GGATTGCCACCCCTCGATAAGATTGACCTTATTGAAGCTAATCTTATATTGA <u>ACTCTGGCTGCGACACTTAAC</u>
FAGE2215NNHR8m3s33 (配列番号 10)
ATAAGATTGACCTTATTGAAGCTAATCTTAT

[0031] 配列番号 2 は、配列番号 1 の小型化配列であり、配列番号 4 は、配列番号 3 の小型化配列であり、配列番号 6 は、配列番号 5 の小型化配列であり、配列番号 8 は、配列番号 7 の小型化配列であり、配列番号 10 は、配列番号 9 の小型化配列である。配列番号 1 の下線部は、配列番号 2 の領域を示し、配列番号 3 の下線部は、配列番号 4 の領域を示し、配列番号 5 の下線部は、配列番号 6 の領域を示し、配列番号 7 の下線部は、配列番号 8 の領域を示し、配列番号 9 の下線部は、配列番号 10 の領域を示す。また、前記FAGE2191R8m1s24 (配列番号 2)、前記FAGE2191R8m2 (配列番号 3)、前記FAGE2191R8m2s32 (配列番号 4)、前記FAGE2215NNHR8m1 (配列番号 5)、前記FAGE2215NNHR8m1s30 (配列番号 6)、前記FAGE2215NNHR8m2 (配列番号 7) および前記FAGE2215NNHR8m2s30 (配列番号 8)、前記FAGE2215NNHR8m3 (配列番号 9) および前記FAGE2215NNHR8m3s33 (配列番号 10) の推定二次構造を図 1 - 3 に示す

が、これには限定されない。

[0032] 前記 (b) において、「1 もしくは数個」は、例えば、前記 (b) のポリヌクレオチドが、そばアレルゲンに結合する範囲であればよい。前記「1 もしくは数個」は、前記 (a) のいずれかの塩基配列において、例えば、1 ~ 10 個、1 ~ 7 個、1 ~ 5 個、1 ~ 3 個、1 または 2 個である。本発明において、塩基数および配列数等の個数の数値範囲は、例えば、その範囲に属する正の整数を全て開示するものである。つまり、例えば、「1 ~ 5 塩基」との記載は、「1、2、3、4、5 塩基」の全ての開示を意味する（以下、同様）。

[0033] 前記 (c) において、「同一性」は、例えば、前記 (c) のポリヌクレオチドが、そばアレルゲンに結合する範囲であればよい。前記同一性は、例えば、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上である。前記同一性は、例えば、BLAST、FASTA等の解析ソフトウェアを用いて、デフォルトのパラメータにより算出できる（以下、同様）。

[0034] 前記 (d) において、「ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド」は、例えば、前記 (a) のポリヌクレオチドに対して、完全または部分的に相補的なポリヌクレオチドである。前記ハイブリダイズは、例えば、各種ハイブリダイゼーションアッセイにより検出できる。前記ハイブリダイゼーションアッセイは、特に制限されず、例えば、ザンブルーク (Sambrook) ら編「モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリーマニュアル第2版 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Ed.)」[(Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))]等に記載されている方法を採用することもできる。

[0035] 前記 (d) において、「ストリンジेंटな条件」は、例えば、低ストリンジेंटな条件、中ストリンジेंटな条件、高ストリンジेंटな条件のいずれでもよい。「低ストリンジेंटな条件」は、例えば、5×SSC

、5×デンハルト溶液、0.5% SDS、50%ホルムアミド、32℃の条件である。「中ストリンジェントな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% SDS、50%ホルムアミド、42℃の条件である。「高ストリンジェントな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% SDS、50%ホルムアミド、50℃の条件である。ストリンジェンシーの程度は、当業者であれば、例えば、温度、塩濃度、プローブの濃度および長さ、イオン強度、時間等の条件を適宜選択することで、設定可能である。「ストリンジェントな条件」は、例えば、前述したザンブルーク (Sambrook) ら編「モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリーマニュアル第2版 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Ed.)」[(Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]等に記載の条件を採用することもできる。

[0036] 本発明の核酸分子は、例えば、前記(a)～(d)のいずれかのポリヌクレオチドの配列を1つ含んでもよいし、前記ポリヌクレオチドの配列を複数含んでもよい。後者の場合、複数のポリヌクレオチドの配列が連結して、一本鎖のポリヌクレオチドを形成していることが好ましい。前記複数のポリヌクレオチドの配列は、例えば、それぞれが直接的に連結してもよいし、リンカーを介して、それぞれが間接的に連結してもよい。前記ポリヌクレオチドの配列は、それぞれの末端において、直接的または間接的に連結していることが好ましい。前記複数のポリヌクレオチドの配列は、例えば、同じでもよいし、異なってもよい。前記複数のポリヌクレオチドの配列は、例えば、同じであることが好ましい。前記ポリヌクレオチドの配列を複数含む場合、前記配列の数は、特に制限されず、例えば、2以上、2～20、2～10、2または3である。

[0037] 前記リンカーは、特に制限されない。前記リンカーの長さは、特に制限されず、例えば、1～200塩基長、1～20塩基長、3～12塩基長、5～9塩基長である。前記リンカーの構成単位は、例えば、ヌクレオチド残基で

あり、デオキシリボヌクレオチド残基およびリボヌクレオチド残基等があげられる。前記リンカーは、特に制限されず、例えば、デオキシリボヌクレオチド残基からなるDNA、リボヌクレオチド残基を含むDNA等のポリヌクレオチドがあげられる。前記リンカーの具体例として、例えば、ポリデオキシチミン（ポリdT）、ポリデオキシアデニン（ポリdA）、AとTの繰り返し配列であるポリdAdT等があげられ、好ましくはポリdT、ポリdAdTである。

[0038] 本発明の核酸分子において、前記ポリヌクレオチドは、一本鎖ポリヌクレオチドであることが好ましい。前記一本鎖ポリヌクレオチドは、例えば、自己アニーリングによりステム構造およびループ構造を形成可能であることが好ましい。前記ポリヌクレオチドは、例えば、ステムループ構造、インターナルループ構造および／またはバルジ構造等を形成可能であることが好ましい。

[0039] 本発明の核酸分子は、例えば、二本鎖でもよい。二本鎖の場合、例えば、一方の一本鎖ポリヌクレオチドは、前記（a）～（d）のいずれかのポリヌクレオチドを含み、他方の一本鎖ポリヌクレオチドは、制限されない。前記他方の一本鎖ポリヌクレオチドは、例えば、前記（a）～（d）のいずれかのポリヌクレオチドに相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドがあげられる。本発明の核酸分子が二本鎖の場合、例えば、使用に先立って、変性等により、一本鎖ポリヌクレオチドに解離させることが好ましい。また、解離した前記（a）～（d）のいずれかの一本鎖ポリヌクレオチドは、例えば、前述のように、ステム構造およびループ構造を形成していることが好ましい。

[0040] 本発明において、「ステム構造およびループ構造を形成可能」とは、例えば、実際にステム構造およびループ構造を形成すること、ならびに、ステム構造およびループ構造が形成されていなくても、条件によってステム構造およびループ構造を形成可能なことも含む。「ステム構造およびループ構造を形成可能」とは、例えば、実験的に確認した場合、および、コンピュータ等のシミュレーションで予測した場合の双方を含む。

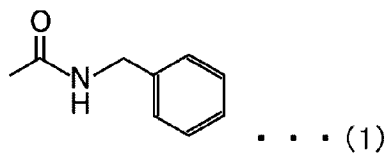
[0041] 本発明の核酸分子の構成単位は、例えば、ヌクレオチド残基である。前記ヌクレオチド残基は、例えば、デオキシリボヌクレオチド残基およびリボヌクレオチド残基があげられる。本発明の核酸分子は、例えば、デオキシリボヌクレオチド残基のみから構成されるDNA、1もしくは数個のリボヌクレオチド残基を含むDNA等があげられる。後者の場合、「1もしくは数個」は、特に制限されず、例えば、前記ポリヌクレオチドにおいて、例えば、1～91個、1～30個、1～15個、1～7個、1～3個、1または2個である。

[0042] 前記ポリヌクレオチドは、修飾塩基を含んでもよい。前記修飾塩基は、特に制限されず、例えば、天然塩基（非人工塩基）が修飾された塩基があげられ、前記天然塩基と同様の機能を有することが好ましい。前記天然塩基は、特に制限されず、例えば、プリン骨格を有するプリン塩基、ピリミジン骨格を有するピリミジン塩基等があげられる。前記プリン塩基は、特に制限されず、例えば、アデニン（a）、グアニン（g）があげられる。前記ピリミジン塩基は、特に制限されず、例えば、シトシン（c）、チミン（t）、ウラシル（u）等があげられる。前記塩基の修飾部位は、特に制限されない。前記塩基がプリン塩基の場合、前記プリン塩基の修飾部位は、例えば、前記プリン骨格の7位および8位があげられる。前記塩基がピリミジン塩基の場合、前記ピリミジン塩基の修飾部位は、例えば、前記ピリミジン骨格の5位および6位があげられる。前記ピリミジン骨格において、4位の炭素に「=O」が結合し、5位の炭素に「-CH₃」または「-H」以外の基が結合している場合、修飾ウラシルまたは修飾チミンということができる。

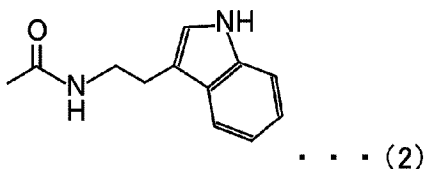
[0043] 前記修飾塩基の修飾基は、特に制限されず、例えば、メチル基、フルオロ基、アミノ基、チオ基、下記式（1）のベンジルアミノカルボニル基（benzylaminocarbonyl）、下記式（2）のトリプタミノカルボニル基（tryptaminocarbonyl）およびイソブチルアミノカルボニル基（isobutylaminocarbonyl）等があげられる。

[0044]

[化1]



[化2]



[0045] 前記修飾塩基は、特に制限されず、例えば、アデニンが修飾された修飾アデニン、チミンが修飾された修飾チミン、グアニンが修飾された修飾グアニン、シトシンが修飾された修飾シトシンおよびウラシルが修飾された修飾ウラシル等があげられ、前記修飾チミン、前記修飾ウラシルおよび前記修飾シトシンが好ましい。

[0046] 前記修飾アデニンの具体例としては、例えば、7'-デアザアデニン等があげられる。

[0047] 前記修飾グアニンの具体例としては、例えば、7'-デアザグアニン等があげられる。

[0048] 前記修飾シトシンの具体例としては、例えば、5'-メチルシトシン（5-Me-dC）等があげられる。

[0049] 前記修飾チミンの具体例としては、例えば、5'-ベンジルアミノカルボニルチミン、5'-トリプタミノカルボニルチミン、5'-イソブチルアミノカルボニルチミン等があげられる。

[0050] 前記修飾ウラシルの具体例としては、例えば、5'-ベンジルアミノカルボニルウラシル（BndU）、5'-トリプタミノカルボニルウラシル（TrpdU）および5'-イソブチルアミノカルボニルウラシル等があげられる。例示した前記修飾ウラシルは、チミンの修飾塩基ということもできる。

- [0051] 前記ポリヌクレオチドは、例えば、いずれか1種類の前記修飾塩基のみを含んでもよいし、2種類以上の前記修飾塩基を含んでもよい。
- [0052] 本発明の核酸分子は、例えば、修飾ヌクレオチドを含んでもよい、前記修飾ヌクレオチドは、前述の前記修飾塩基を有するヌクレオチドでもよいし、糖残基が修飾された修飾糖を有するヌクレオチドでもよいし、前記修飾塩基および前記修飾糖を有するヌクレオチドでもよい。
- [0053] 前記糖残基は、特に制限されず、例えば、デオキシリボース残基またはリボース残基があげられる。前記糖残基における修飾部位は、特に制限されず、例えば、前記糖残基の2'位または4'位があげられ、いずれか一方でも両方が修飾されてもよい。前記修飾糖の修飾基は、例えば、メチル基、フルオロ基、アミノ基、チオ基等があげられる。
- [0054] 前記修飾ヌクレオチド残基において、塩基がピリミジン塩基の場合、例えば、前記糖残基の2'位および／または4'位が修飾されていることが好ましい。前記修飾ヌクレオチド残基の具体例は、例えば、デオキシリボース残基またはリボース残基の2'位が修飾された、2'-メチル化-ウラシルヌクレオチド残基、2'-メチル化-シトシンヌクレオチド残基、2'-フルオロ化-ウラシルヌクレオチド残基、2'-フルオロ化-シトシンヌクレオチド残基、2'-アミノ化-ウラシルヌクレオチド残基、2'-アミノ化-シトシンヌクレオチド残基、2'-チオ化-ウラシルヌクレオチド残基、2'-チオ化-シトシンヌクレオチド残基等があげられる。
- [0055] 前記修飾ヌクレオチドの個数は、特に制限されず、例えば、前記ポリヌクレオチドにおいて、例えば、1~100個、1~90個、1~80個、1~70個である。また、前記ポリヌクレオチドを含む前記核酸分子の全長における前記修飾ヌクレオチドも、特に制限されず、例えば、1~91個または1~78個であり、好ましくは、前述の範囲と同様である。
- [0056] 本発明の核酸分子は、例えば、1もしくは数個の人工核酸モノマー残基を含んでもよい。前記「1もしくは数個」は、特に制限されず、例えば、前記ポリヌクレオチドにおいて、例えば、1~100個、1~50個、1~30

個、1～10個である。前記人工核酸モノマー残基は、例えば、PNA（ペプチド核酸）、LNA（Locked Nucleic Acid）、ENA（2'-O, 4'-C-Ethylenebridged Nucleic Acids）等があげられる。前記モノマー残基における核酸は、例えば、前述と同様である。

[0057] 本発明の核酸分子は、例えば、ヌクレアーゼ耐性であることが好ましい。本発明の核酸分子は、ヌクレアーゼ耐性のため、例えば、前記修飾化ヌクレオチド残基および／または前記人工核酸モノマー残基を有することが好ましい。本発明の核酸分子は、ヌクレアーゼ耐性のため、例えば、5'末端または3'末端に、数10kDaのPEG（ポリエチレングリコール）またはデオキシチミジン等が結合してもよい。

[0058] 本発明の核酸分子は、例えば、さらに付加配列を有してもよい。前記付加配列は、例えば、前記核酸分子の5'末端および3'末端の少なくとも一方に結合していることが好ましく、より好ましくは3'末端である。前記付加配列は、特に制限されない。前記付加配列の長さは、特に制限されず、例えば、1～200塩基長、1～50塩基長、1～25塩基長、18～24塩基長である。前記付加配列の構成単位は、例えば、ヌクレオチド残基であり、デオキシリボヌクレオチド残基およびリボヌクレオチド残基等があげられる。前記付加配列は、特に制限されず、例えば、デオキシリボヌクレオチド残基からなるDNA、リボヌクレオチド残基を含むDNA等のポリヌクレオチドがあげられる。前記付加配列の具体例として、例えば、ポリdT、ポリdA等があげられる。

[0059] 本発明の核酸分子は、例えば、担体に固定化して使用できる。前記本発明の核酸分子は、例えば、5'末端および3'末端のいずれかを固定化することが好ましく、より好ましくは3'末端である。本発明の核酸分子を固定化する場合、例えば、前記核酸分子は、前記担体に、直接的に固定化してもよいし、間接的に固定化してもよい。後者の場合、例えば、前記付加配列を介して固定化することが好ましい。

[0060] 本発明の核酸分子の製造方法は、特に制限されず、例えば、化学合成を利用した核酸合成方法等、遺伝子工学的手法、公知の方法により合成できる。本発明の核酸分子は、例えば、いわゆるS E L E X法によっても得ることができる。この場合、ターゲットは、そばアレルギーであるF a g e 2が好ましい。

[0061] 本発明の核酸分子は、前述のように、前記そばアレルギーに結合性を示す。このため、本発明の核酸分子の用途は、前記そばアレルギーへの結合性を利用する用途であれば、特に制限されない。本発明の核酸分子は、例えば、前記そばアレルギーに対する抗体に代えて、種々の方法に使用できる。

[0062] (2) そばアレルギー分析用センサ

本発明のそばアレルギー分析用センサは、前述のように、本発明のそばアレルギー結合核酸分子を含むことを特徴とする。本発明のセンサは、前記本発明のそばアレルギー結合核酸分子を含んでいればよく、その他の構成は、何ら制限されない。

[0063] 本発明のセンサは、例えば、前記そばアレルギー結合核酸分子に前記そばアレルギーが結合した状態で、活性型となり、前記そばアレルギー結合核酸分子に前記そばアレルギーが未結合の状態で、不活性型となる、前記結合を検出する結合検出用核酸分子を、さらに含んでもよい。本発明のセンサは、前記結合検出用核酸分子を含む場合、前記結合検出用核酸分子が活性型であるか不活性型であるかによって、前記そばアレルギー結合核酸分子への前記そばアレルギーの結合の有無を確認でき、それによって、前記そばアレルギーの有無を分析することができる。

[0064] 前記結合検出用核酸分子としては、例えば、Gカルテット構造を形成する核酸分子があげられる。前記Gカルテット構造を形成する核酸分子は、例えば、Gカルテット構造を形成した状態が、活性型であり、Gカルテット構造を非形成の状態が、不活性型である。

[0065] 前記Gカルテット構造を形成する核酸分子は、例えば、D N A z y m eまたはR N A z y m e等があげられ、好ましくはD N A z y m eである。

[0066] Gカルテッド構造を形成した活性型DNAzymeは、例えば、酸化還元反応を触媒するペルオキシダーゼ様の活性を示す。このため、本発明のセンサがDNAzymeを有する場合、前記DNAzymeの触媒活性を検出することによって、前記そばアレルギー結合核酸分子への前記そばアレルギーの結合の有無または結合量を分析することができる。

[0067] この場合、本発明のセンサは、例えば、ポルフィリンを共存させることが好ましい。前記ポルフィリンは、特に制限されず、例えば、無置換体のポルフィリン、その誘導体があげられる。前記誘導体は、例えば、置換体のポルフィリンおよび金属元素と錯体を形成した金属ポルフィリン等があげられる。前記置換体のポルフィリンは、例えば、N-メチルメソポルフィリン等があげられる。前記金属ポルフィリンは、例えば、三価鉄錯体であるヘミン等があげられる。前記ポルフィリンは、例えば、前記金属ポルフィリンが好ましく、より好ましくはヘミンである。

[0068] また、Gカルテッド構造を形成した活性型のDNAzymeは、例えば、ポルフィリンと複合体を形成することで、蛍光を生じる。このため、本発明のセンサがDNAzymeを有する場合、前記ポルフィリンを共存させ、前記DNAzymeと前記ポルフィリンとの複合体形成による蛍光を検出することによって、前記そばアレルギー結合核酸分子への前記そばアレルギーの結合の有無または結合量を分析することができる。

[0069] 前記ポルフィリンは、特に制限されず、例えば、N-メチルメソポルフィリン(NMM)、Zn-DIGP、ZnPP9およびTMPyP等が好ましい。

[0070] 本発明のセンサは、例えば、さらに標識物質を有してもよい。前記標識物質は、例えば、前記核酸分子の5'末端および3'末端の少なくとも一方に結合していることが好ましく、より好ましくは5'末端である。前記標識物質は、特に制限されず、例えば、蛍光物質、色素、同位体、酵素等があげられる。前記蛍光物質は、例えば、ピレン、TAMRA、フルオレセイン、Cy3色素、Cy5色素、FAM色素、ローダミン色素、テキサスレッド色素

、J O E、M A X、H E X、T Y E等の蛍光団があげられ、前記色素は、例えば、A l e x a 4 8 8、A l e x a 6 4 7等のA l e x a色素等があげられる。

[0071] 前記標識物質は、例えば、前記核酸分子に直接的に連結してもよいし、リンカーを介して、間接的に連結してもよい。前記リンカーは、特に制限されず、例えば、前述の例示を援用できる。

[0072] (3) 分析方法

本発明の分析方法は、前述のように、そばアレルゲンの分析方法であって、試料と前記本発明のそばアレルゲン結合核酸分子とを接触させ、前記試料中のそばアレルゲンと前記核酸分子とを結合させることにより、前記試料中のそばアレルゲンを検出する工程を含むことを特徴とする。本発明の分析方法は、前記本発明の核酸分子を使用することが特徴であって、その他の工程および条件等は、特に制限されない。また、本発明の分析方法は、前記本発明の核酸分子として、前記本発明のそばアレルゲン分析用センサを使用してもよい。

[0073] 本発明によれば、前記本発明の核酸分子が、そばアレルゲンに特異的に結合することから、例えば、そばアレルゲンと前記核酸分子との結合を検出することによって、試料中のそばアレルゲンを特異的に検出可能である。具体的には、例えば、試料中のそばアレルゲンの有無またはそばアレルゲンの量を分析可能であることから、定性または定量も可能といえる。

[0074] 本発明において、前記試料は、特に制限されない。前記試料は、例えば、食品、食品原料、食品添加物等があげられる。また、前記試料は、例えば、食品加工場または調理場等における付着物、洗浄後の洗浄液等があげられる。

[0075] 前記試料は、例えば、液体試料でもよいし、固体試料でもよい。前記試料は、例えば、前記核酸分子と接触させ易く、取扱いが簡便であることから、液体試料が好ましい。前記固体試料の場合、例えば、溶媒を用いて、混合液、抽出液、溶解液等を調製し、これを使用してもよい。前記溶媒は、特に制

限されず、例えば、水、生理食塩水、緩衝液等があげられる。

[0076] 前記検出工程は、例えば、前記試料と前記核酸分子とを接触させて、前記試料中のそばアレルギーと前記核酸分子とを結合させる接触工程と、前記そばアレルギーと前記核酸分子との結合を検出する結合検出工程とを含む。また、前記検出工程は、例えば、さらに、前記結合検出工程の結果に基づいて、前記試料中のそばアレルギーの有無または量を分析する工程を含む。

[0077] 前記接触工程において、前記試料と前記核酸分子との接触方法は、特に制限されない。前記試料と前記核酸分子との接触は、例えば、液体中で行われることが好ましい。前記液体は、特に制限されず、例えば、水、生理食塩水、緩衝液等があげられる。

[0078] 前記接触工程において、前記試料と前記核酸分子との接触条件は、特に制限されない。接触温度は、例えば、4～37℃、18～25℃であり、接触時間は、例えば、10～120分、30～60分である。

[0079] 前記接触工程において、前記核酸分子は、例えば、担体に固定化された固定化核酸分子でもよいし、未固定の遊離した核酸分子でもよい。後者の場合、例えば、容器内で、前記試料と接触させる。前記核酸分子は、例えば、取扱性に優れることから、前記固定化核酸分子が好ましい。前記担体は、特に制限されず、例えば、基板、ビーズ、容器等があげられ、前記容器は、例えば、マイクロプレート、チューブ等があげられる。前記核酸分子の固定化は、例えば、前述の通りである。

[0080] 前記結合検出工程は、前述のように、前記試料中のそばアレルギーと前記核酸分子との結合を検出する工程である。前記両者の結合の有無を検出することによって、例えば、前記試料中のそばアレルギーの有無を分析（定性）でき、また、前記両者の結合の程度（結合量）を検出することによって、例えば、前記試料中のそばアレルギーの量を分析（定量）できる。

[0081] そして、前記そばアレルギーと前記核酸分子との結合が検出できなかった場合は、前記試料中にそばアレルギーは存在しないと判断でき、前記結合が検出された場合は、前記試料中にそばアレルギーが存在すると判断できる。

[0082] 前記そばアレルギーと前記核酸分子との結合の分析方法は、特に制限されない。前記方法は、例えば、物質間の結合を検出する従来公知の方法が採用でき、具体例として、前述のSPR、蛍光偏光法等があげられる。また、前記結合は、例えば、前記そばアレルギーと前記核酸分子との複合体の検出でもよい。

[0083] 前記蛍光偏光法による前記そばアレルギーと前記核酸分子との結合の検出は、例えば、以下のようにして行うことができる。

[0084] 前記蛍光偏光法は、一般に、偏光励起光を前記標識物質に照射した際、前記標識物質から発せられる蛍光が、前記標識物質で標識された分子の分子量に応じて異なった偏光度を示すという特性に基づく測定方法である。本発明においては、例えば、前記標識物質で標識化した前記核酸分子（標識化核酸分子）を使用することで、前記蛍光偏光法により前記そばアレルギーと前記核酸分子との結合を検出することができる。具体的には、前記標識化核酸分子は、そばアレルギーと未結合の状態と、そばアレルギーと結合した状態とを比較した場合、前者は、相対的に分子量が小さいため、相対的に偏光度が低く、一方、後者は、相対的に分子量が大きいため、相対的に偏光度が高い。このため、例えば、試料と接触させる前の前記標識化核酸分子の偏光度と、前記試料と接触させた後の前記標識化核酸分子の前記偏光度とを比較することで、そばアレルギーと前記標識化核酸分子との結合を検出できる。また、そばアレルギーと未結合の前記標識化核酸分子およびそばアレルギーと結合した前記標識化核酸分子の少なくとも一方の偏光度を評価基準として、前記試料と接触させた後の前記標識化核酸分子の偏光度を評価することでも、そばアレルギーと前記標識化核酸分子との結合を検出できる。

[0085] 前記蛍光偏光法によれば、例えば、前記本発明の核酸分子を、前記標識物質で標識化するのみで、センサとして容易に使用できる。また、前記標識物質は、その種類によって検出波長が異なるため、例えば、試料の種類に応じて前記標識物質を選択することで、前記試料由来の蛍光の影響を低減することもできる。

- [0086] 前記標識化核酸分子は、例えば、前記本発明の核酸分子が前記標識物質で標識化されていればよく、その標識方法は、特に制限されない。
- [0087] 前記標識化核酸分子としては、例えば、前記本発明の核酸分子に前記標識物質が連結した形態があげられる。この形態は、例えば、前述の記載が援用でき、前記本発明の核酸分子に、前記標識物質が直接的に連結してもよいし、前述のようにリンカー等を介して前記標識物質が間接的に連結してもよい。前記リンカーの長さは、特に制限されず、例えば、0～10塩基長、0～7塩基長、0～5塩基長である。前記標識物質は、例えば、前記本発明の核酸分子のいずれの部位に連結されてもよく、具体例としては、5'末端および3'末端があげられ、両末端に連結してもよいし、いずれか一方の末端に連結してもよく、好ましくは、5'末端である。
- [0088] 前記標識化核酸分子としては、この他に、例えば、前記本発明の核酸分子と、これに相補的であって且つ標識物質が連結した相補鎖（以下、「標識化相補鎖」ともいう）とを含み、前記核酸分子と前記標識化相補鎖とがハイブリダイズしたハイブリッド分子があげられる。
- [0089] 前記相補鎖は、例えば、前記本発明の核酸分子の一部に相補的な配列を有していればよく、前記相補的な配列のみから構成されてもよいし、前記相補的な配列を含んでもよい。前記相補鎖は、前記本発明の核酸分子のどの領域に対して相補的でもよく、好ましくは、5'末端領域または3'末端領域に相補的である。また、例えば、前記本発明の核酸分子が、その5'末端または3'末端にリンカーを有し、前記相補的な配列は、前記リンカーに相補的であることが好ましい。前記リンカーの長さは、特に制限されず、例えば、10～30塩基長、15～25塩基長、18～24塩基長である。前記相補鎖の長さは、特に制限されず、例えば、10～30塩基長、15～25塩基長、18～24塩基長である。
- [0090] 前記標識化相補鎖において、前記標識物質は、例えば、前記相補鎖のいずれの部位に連結されてもよく、具体例としては、5'末端および3'末端があげられ、両末端に連結してもよいし、いずれか一方の末端に連結してもよ

い。前記標識化相補鎖が、前記本発明の核酸分子の3'末端領域に相補的な場合、前記標識物質は、前記相補鎖の5'末端に連結することが好ましく、前記標識化相補鎖が、前記本発明の核酸分子の5'末端領域に相補的な場合、前記標識物質は、前記相補鎖の3'末端に連結することが好ましい。

[0091] 前記標識物質は、特に制限されず、前述した例示を援用でき、中でも前記蛍光物質および前記色素が好ましい。

[0092] 前記蛍光偏光法を採用する場合、本発明の分析方法は、例えば、前記試料と前記標識化核酸分子とを接触させ、前記試料中のそばアレルゲンと前記標識化核酸分子とを結合させる接触工程と、前記標識化核酸分子に偏光励起光を照射して、前記標識化核酸分子の偏光度を測定する測定工程と、前記測定工程における測定結果と評価基準とを比較し、そばアレルゲンと前記標識化核酸分子との結合を検出する工程を検出する検出工程を含むことが好ましい。

[0093] 前記測定工程において、前記偏光励起光の波長および前記偏光度の検出波長は、特に制限されず、例えば、前記標識物質の種類に応じて適宜設定できる。具体例として、前記標識物質がAlexa647の場合、前記偏光励起光の波長は、例えば、620～680nmであり、偏光度の検出波長は、例えば、660～800nmである。前記偏光励起光の照射時間は、特に制限されず、例えば、1ナノ～5ナノ秒があげられる。

[0094] 前記検出工程において、前記評価基準は、例えば、予め決定してもよいし、測定ごとに決定してもよい。前記評価基準としては、例えば、そばアレルゲン未結合の基準、そばアレルゲン結合の基準が設定できる。前者の基準は、例えば、そばアレルゲンが結合していない前記標識化核酸分子のみの偏光度であり、後者の基準は、例えば、そばアレルゲンが結合した前記標識化核酸分子の偏光度である。

[0095] 前者の基準を用いる場合は、例えば、前記測定工程における測定値が、前記基準よりも高ければ、そばアレルゲンが存在すると判断でき、また、前記基準よりも相対的に高ければ、相対的に多くのそばアレルゲンが存在すると

判断できる。他方、前記測定工程における測定値が、前記基準と同程度または低ければ、そばアレルギーが存在しないと判断できる。前者の基準は、例えば、前記接触工程前の前記標識化核酸分子の偏光度でもよい。

[0096] また、後者の基準を用いる場合は、例えば、前記測定工程における測定値が、前記基準よりも低ければ、そばアレルギーが存在しないと判断できる。他方、前記測定工程における測定値が、前記基準と同程度または高ければ、そばアレルギーが存在すると判断でき、また、前記基準よりも相対的に高ければ、相対的に多くのそばアレルギーが存在すると判断できる。

[0097] また、前記基準は、そばアレルギーの量と偏光度との相関関係であってもよい。例えば、複数の既知濃度のそばアレルギーと所定量の前記標識化核酸分子とを接触させ、各濃度のそばアレルギーに結合した前記標識化核酸分子の偏光度を測定することにより、前記相関関係を示す相関式が得られる。そして、この相関式と、前記測定工程における測定値とから、前記試料におけるそばアレルギーの量を判断することができる。

[0098] また、本発明の核酸分子として、前記本発明のそばアレルギー分析用センサを使用する場合、例えば、酸化還元反応の検出または蛍光発生の検出によって、前記そばアレルギーの検出を行うことができる。

[0099] 前述のように、前記本発明のセンサが、前記結合検出用核酸分子としてGカルテッド構造を形成するDNAzymeを有する場合、前記そばアレルギー結合核酸分子への前記そばアレルギーの結合によって、前記DNAzymeは、Gカルテッド構造を形成し、ペルオキシダーゼ様の酸化還元反応の触媒活性を示す活性型となる。このため、前記酸化還元反応を検出することによって、前記そばアレルギー結合核酸分子への前記そばアレルギーの結合を検出できる。この場合、例えば、前記酸化還元反応の基質を併用することが好ましい。

[0100] 前記基質は、特に制限されず、例えば、3, 3', 5, 5' - Tetramethylbenzidine (TMB)、1, 2-Phenylenediamine (OPD)、2, 2' - Azinobis (3-ethyl

benzothiazoline-6-sulfonic Acid Ammonium Salt (ABTS)、3, 3'-Diaminobenzidine (DAB)、3, 3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride Hydrate (DAB4HCl)、3-Amino-9-ethylcarbazole (AEC)、4-Chloro-1-naphthol (4C1N)、2, 4, 6-Tribromo-3-hydroxybenzoic Acid、2, 4-Dichlorophenol、4-Aminoantipyrine、4-Aminoantipyrine Hydrochloride、ルミノール等があげられる。

[0101] また、前記本発明のセンサが、前記結合検出用核酸分子としてGカルテット構造を形成するDNAzymeを有する場合、前記そばアレルゲン結合核酸分子への前記そばアレルゲンの結合によって、前記DNAzymeは、Gカルテット構造を形成し、ポルフィリンとの複合体を形成することで、蛍光を発生する。このため、前記蛍光を検出することによって、前記そばアレルゲン結合核酸分子へのそばアレルゲンを検出できる。

[0102] (4) 検出キット

本発明の検出キットは、前記本発明のそばアレルゲン結合核酸分子を含むことを特徴とする。本発明の検出キットは、前記本発明の核酸分子を含んでいればよく、その他の構成は何ら制限されない。本発明の検出キットを使用すれば、前述のように、例えば、前記そばアレルゲンの検出等を行うことができる。

[0103] 本発明の検出キットは、例えば、前記本発明の核酸分子として、前記本発明のセンサを含んでもよい。また、前記本発明の検出キットは、例えば、前記本発明の核酸分子の他に、その他の構成要素を含んでもよい。前記構成要素は、例えば、前記担体、前記ポルフィリン、緩衝液、使用説明書等があげられる。

実施例

[0104] 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。

[0105] [実施例 1]

各アプタマーについて、そばアレルゲンに対する結合能および動態パラメータを確認した。

[0106] (1) アプタマー

下記ポリヌクレオチドを合成し、実施例のアプタマーとした。

[表2]

FAGE2191R8m1 (配列番号 1)
GGATACACACTCGCTGGCTTA <u>ACTGTC</u> ACTCGATTGCAGCAGTTTAGCGCTAAGGATTCCGACCTTGACGACATTTG
FAGE2191R8m1s24 (配列番号 2)
AACTGTCACTCGATTGCAGCAGTT
FAGE2191R8m2 (配列番号 3)
GGATACACACTCGCTGGCTTA <u>ACCCTGTTATG</u> TACTTAGATTGAAGCAAAACAGGATTCCGACCTTGACGACATTTG
FAGE2191R8m2s32 (配列番号 4)
CCTGTTATGTACTTAGATTGAAGCAAAACAGG
FAGE2215NNHR8m1 (配列番号 5)
GGATTGCCACCCCTCGATAAGTATCAAAAATGTCCTTATTGAAGCCTTTTTGA <u>ACTCTGGCTGCGACACTTAAC</u>
FAGE2215NNHR8m1s30 (配列番号 6)
TCAAAAATGTCCTTATTGAAGCCTTTTTGA
FAGE2215NNHR8m2 (配列番号 7)
GGATTGCCACCCCTCGATAAGTAAACTGTCCTTATTGAAGCCGTTTTACAGAACTCTGGCTGCGACACTTAAC
FAGE2215NNHR8m2s30 (配列番号 8)
GTAAAACTGTCCTTATTGAAGCCGTTTTAC
FAGE2215NNHR8m3 (配列番号 9)
GGATTGCCACCCCTCGATAAGATTGACCTTATTGAAGCTAATCTTATATTGA <u>ACTCTGGCTGCGACACTTAAC</u>
FAGE2215NNHR8m3s33 (配列番号 10)
ATAAGATTTGACCTTATTGAAGCTAATCTTAT

[0107] 前記アプタマーは、その末端に、24塩基長のポリデオキシアデニン（ポリdA）を付加し、ポリdA付加アプタマーとして、後述するSPRに使用した。前記ポリdAは、FAGE2191R8m1（配列番号1）、FAGE2191R8m2（配列番号3）、FAGE2215NNHR8m1s30（配列番号6）、FAGE2215NNHR8m2（配列番号

7)、FAGE2215NNHR8m2s30(配列番号8)、FAGE2215NNHR8m3(配列番号9)およびFAGE2215NNHR8m3s33(配列番号10)について、3'末端に付加し、FAGE2191R8m1s24(配列番号2)およびFAGE2191R8m2s32(配列番号4)について、5'末端に付加した。また、FAGE2215NNHR8m1(配列番号5)については、3'末端または5'末端に付加し、いずれの末端にポリdAを付加しても、結果は同等であることを確認済みである。

[0108] (2) 試料

F a g e 2タンパク質にヒスチジントグ(H i sタグ)付加した状態で、発現させ、これを試料として、以下の試験に使用した。前記F a g e 2をコードする遺伝子の全長塩基配列およびタンパク質の全長アミノ酸配列は、UniProtアクセッション番号Q2PS07に登録されておりとし、前記H i sタグは、10個のH i sが連続したペプチドを、前記F a g e 2のN末端に付加した。

[0109] (3) SPRによる結合能の解析

結合能の解析には、Protein XPR36(BioRad社)を、その使用説明書にしたがって使用した。

[0110] まず、前記Protein専用のセンサーチップとして、ストレプトアビジンが固定化されたチップ(商品名 Protein NLC Sensor Chip、BioRad社)を、前記Protein XPR36にセットした。前記センサーチップのフローセルに、超純水(DDW)を用いて、5 μ mol/Lのビオチン化ポリdTをインジェクションし、シグナル強度(RU: Resonance Unit)が約900RUになるまで結合させた。前記ビオチン化ポリdTは、24塩基長のデオキシチミジンの5'末端または3'末端をビオチン化して調製した。そして、前記チップの前記フローセルに、SPRバッファーを用いて、1 μ mol/Lの前記ポリdA付加アダマーを、流速25 μ L/minで80秒間インジェクションし、シグナル強度が約800RUになるまで結合させた。この結果を、アダマーのセンサーチップへの固着化量を示すシグナルとして、アダマー固着化測定値(A)という。続いて、前記試料を、SPR

バッファーを用いて、流速 $50 \mu\text{L}/\text{min}$ で 120 秒間インジェクションし、引き続き、同じ条件で、SPRバッファーを流して洗浄を行った。前記試料のインジェクションおよび前記SPRバッファーによる洗浄に並行して、シグナル強度の測定を行った。この結果を、前記アプタマーとタンパクの結合量を示すシグナルとして、タンパク質結合測定値 (B) という。前記試料の濃度は、 $50 \text{ nmol}/\text{L}$ 、 $25 \text{ nmol}/\text{L}$ 、 $12.5 \text{ nmol}/\text{L}$ 、 $6.25 \text{ nmol}/\text{L}$ および $3.125 \text{ nmol}/\text{L}$ とした。

[0111] 前記SPRバッファーの組成は、 $40 \text{ mmol}/\text{L}$ HEPES、 $125 \text{ mmol}/\text{L}$ NaCl、 $5 \text{ mmol}/\text{L}$ KCl および 0.01% Tween (登録商標) 20 とし、pH は、 7.5 とした。

[0112] これらの結果を図4および5に示す。図4および5は、前記Fag e 2 に対するアプタマーの結合能を示すグラフであり、横軸は、測定時間 (秒) を示し、縦軸は、シグナル強度 (RU) を示す。横軸において、 $0 \sim 120$ 秒が、前記試料のインジェクション時間であり、 120 秒以降が、前記SPRバッファーによる洗浄の時間である (以下、同様)。

[0113] 図4および5に示すように、いずれのアプタマーを使用した場合も、前記Fag e 2 に対して、結合性を示した。

[0114] また、前記図4および5のSPR解析の結果から、動態パラメータを算出した。これらの結果を下記表3に示す。下記表3に示すように、いずれのアプタマーを使用した場合も、Fag e 2 に対する解離定数 (KD) は、 60 nM 以下であり、非常に優れた結合性であることがわかった。

[0115]

[表3]

アプタマー	Base	KD (M)
FAGE2191R8m1	77mer	6.50E-09
FAGE2191R8m1s24	24mer	5.80E-08
FAGE2191R8m2	77mer	3.48E-08
FAGE2191R8m2s32	32mer	2.78E-08
FAGE2215NNHR8m1	74mer	2.85E-09
FAGE2215NNHR8m1s30	30mer	1.96E-08
FAGE2215NNHR8m2	74mer	1.28E-08
FAGE2215NNHR8m2s30	30mer	1.17E-08
FAGE2215NNHR8m3	74mer	2.92E-09
FAGE2215NNHR8m3s33	32mer	3.30E-06

[0116] 以上、実施形態および実施例を参照して本願発明を説明したが、本願発明は、上記実施形態および実施例に限定されるものではない。本願発明の構成や詳細には、本願発明の範囲内で当業者が理解しうる様々な変更をできる。

[0117] この出願は、2014年3月31日に出願された日本出願特願2014-073741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

[0118] 本発明のそばアレルゲン結合核酸分子は、そばアレルゲンに対して前述のような解離定数で結合することができる。このため、本発明のそばアレルゲ

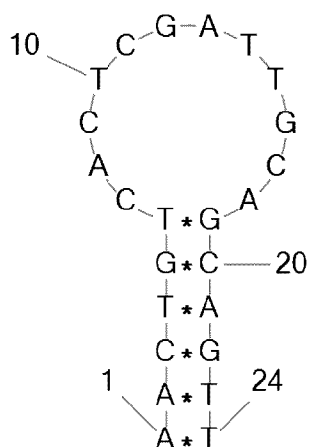
ン結合核酸分子によれば、例えば、試料中のそばアレルギーとの結合の有無によって、優れた精度で、そばアレルギーを検出できる。したがって、本発明のそばアレルギー結合核酸分子は、例えば、食品製造、食品管理、食品の流通等の分野におけるそばアレルギーの検出に、極めて有用なツールといえる。

請求の範囲

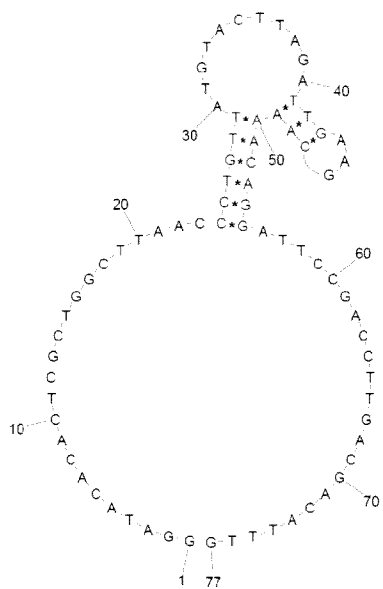
- [請求項1] そばアレルギーに対する解離定数が、 60 nM 以下の核酸分子であることを特徴とするそばアレルギー結合核酸分子。
- [請求項2] 前記そばアレルギーが、F a g e 2またはそのサブユニットである、請求項1記載のそばアレルギー結合核酸分子。
- [請求項3] 前記そばアレルギーが、未変性アレルギーまたは加熱変性アレルギーである、請求項1または2記載のそばアレルギー結合核酸分子。
- [請求項4] 下記(a)～(d)からなる群から選択された少なくとも一つのポリヌクレオチドを含む、請求項1から3のいずれか一項に記載のそばアレルギー結合核酸分子。
- (a) 配列番号1-10のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド
- (b) 前記(a)のいずれかの塩基配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換、挿入および／または付加された塩基配列からなり、前記そばアレルギーに結合するポリヌクレオチド
- (c) 前記(a)のいずれかの塩基配列に対して、80%以上の同一性を有する塩基配列からなり、前記そばアレルギーに結合するポリヌクレオチド
- (d) 前記(a)のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドに、相補的な塩基配列からなり、そばアレルギーに結合するポリヌクレオチド
- [請求項5] 前記ポリヌクレオチドが、DNAである、請求項4記載のそばアレルギー結合核酸分子。
- [請求項6] 請求項1から5のいずれか一項に記載のそばアレルギー結合核酸分子を含むことを特徴とする、そばアレルギー分析用センサ。
- [請求項7] さらに、Gカルテット構造を形成する核酸分子を含む、請求項6記載のそばアレルギー分析用センサ。

- [請求項8] 前記Gカルテット構造を形成する核酸分子が、DNAzymeまたはRNAzymeである、請求項7記載のそばアレルギー分析用センサ。
- [請求項9] さらに、ポルフィリンを含む、請求項6から8のいずれか一項に記載のそばアレルギー分析用センサ。
- [請求項10] 試料と請求項1から5のいずれか一項に記載のそばアレルギー結合核酸分子とを接触させ、前記試料中のそばアレルギーと前記核酸分子とを結合させることにより、前記試料中のそばアレルギーを検出する工程を含むことを特徴とする、そばアレルギーの分析方法。
- [請求項11] 前記試料が、食品、食品原料および食品添加物からなる群から選択された少なくとも一つである、請求項10記載のそばアレルギーの分析方法。

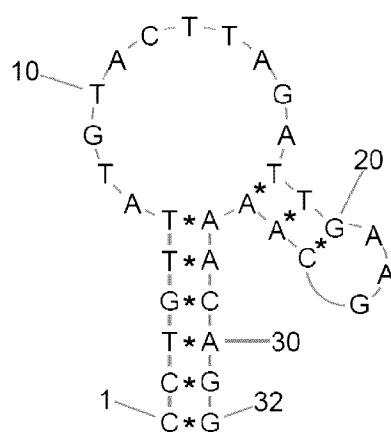
配列番号 2



配列番号 3



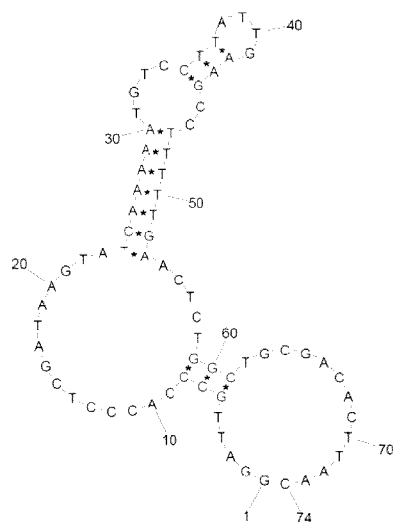
配列番号 4



[図2]

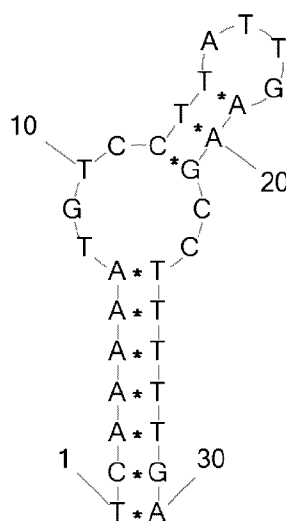
FAGE2215NNHR8m1

配列番号 5



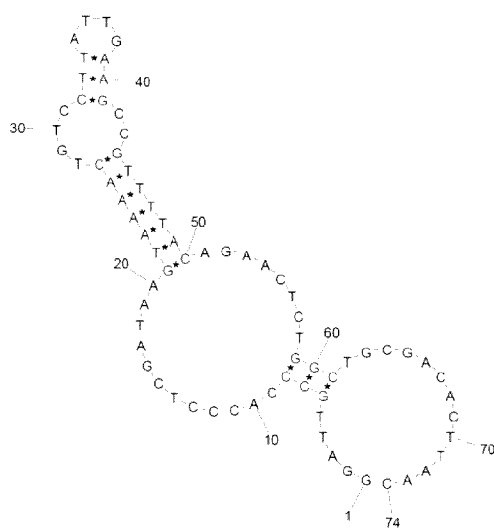
FAGE2215NNHR8m1s30

配列番号 6



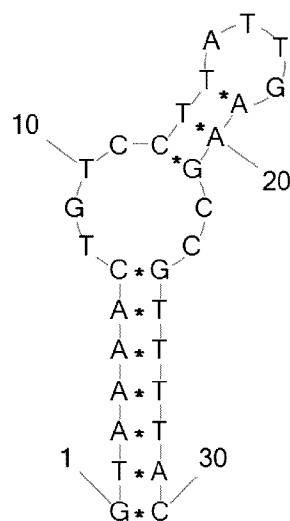
FAGE2215NNHR8m2

配列番号 7



FAGE2215NNHR8m2s30

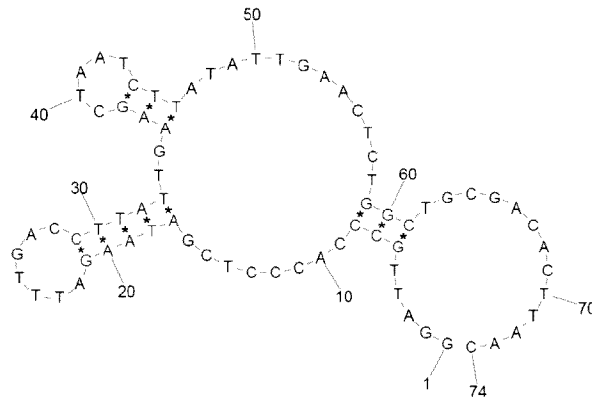
配列番号 8



[図3]

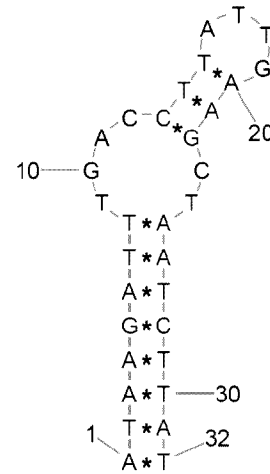
FAGE2215NNHR8m3

配列番号 9



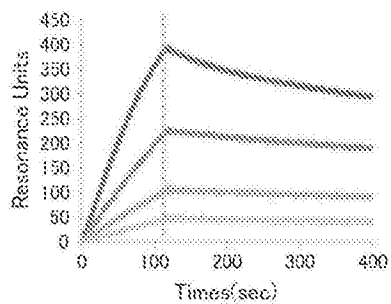
FAGE2215NNHR8m3s33

配列番号 10

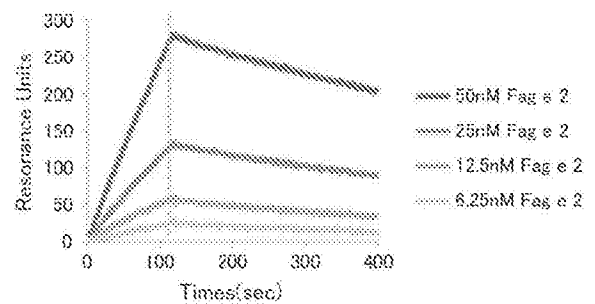


[図4]

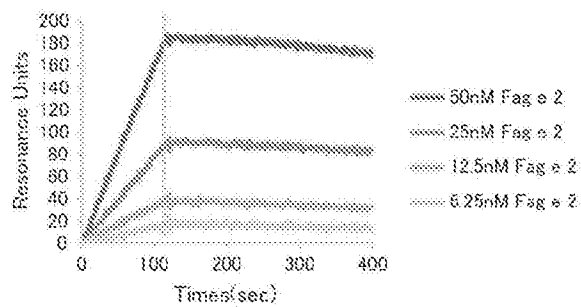
FAGE2191R8m1



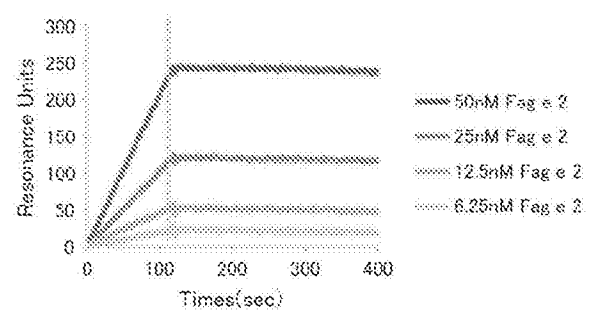
FAGE2191R8m1s24



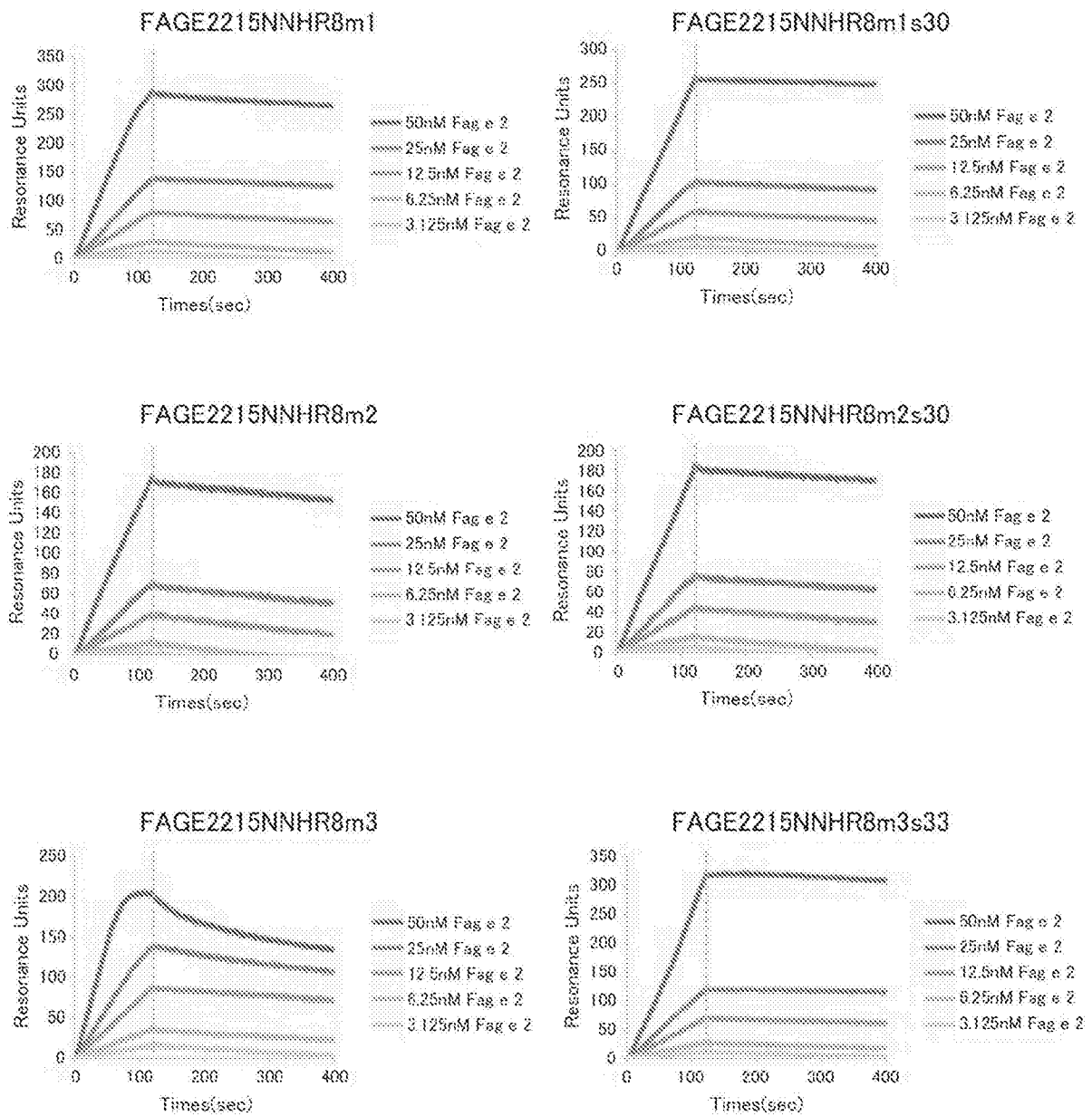
FAGE2191R8m2



FAGE2191R8m2s32



[圖5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/083351

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/115(2010.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(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, G01N33/53

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	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

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

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Hiroyuki YOSHIOKA et al., Molecular cloning and expression of a major allergenic protein Fag e 2 from buckwheat, Fagopyrum, 2004, Vol.21, pp.35-38	1-11
A	Edited by Nikkei Biotechnology/Nikkei Biobusiness, Nikkei Bio Saishin Yogo Jiten, 5th edition, Nikkei Business Publications, Inc., 2002, page 23	1-11
A	Tao Li et al., Multifunctional G-quadruplex aptamers and their application to protein detection., Chem. Eur. J., 2009, Vol.15, No.4, pp.1036-1042	6-11

☒ 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
11 March 2015 (11.03.15)

Date of mailing of the international search report
24 March 2015 (24.03.15)

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/JP2014/083351

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/141291 A1 (NEC Soft, Ltd.), 26 September 2013 (26.09.2013), entire text (Family: none)	6-11
A	Jie Jiang et al., A homogeneous hemin/G- quadruplex DNAzyme based turn-on chemiluminescence aptasensor for interferon- gamma detection via in-situ assembly of luminol functionalized gold nanoparticles, deoxyribonucleic acid, interferon-gamma and hemin., Anal. Chim. Acta., 2013, Vol.791, pp.60-64	6-11

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/115(2010.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(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. C12N15/115, C12Q1/68, G01N33/53

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 5 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 5 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 5 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/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

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	Hiroyuki YOSHIOKA et al., Molecular cloning and expression of a major allergenic protein Fag e 2 from buckwheat, Fagopyrum, 2004, Vol.21, pp.35-38	1-11
A	日経バイオテック／日経バイオビジネス編, 日経バイオ最新用語辞典, 第5版, 日経B P 社, 2002, p.23	1-11

☒ 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 1 . 0 3 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

2 4 . 0 3 . 2 0 1 5

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）

長谷川 茜

4 B

5 5 7 5

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

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	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	Tao Li et al., Multifunctional G-quadruplex aptamers and their application to protein detection., Chem. Eur. J., 2009, Vol.15, No.4, pp.1036-1042	6-11
A	WO 2013/141291 A1 (NECソフト株式会社) 2013.09.26, 全文 (ファミリーなし)	6-11
A	Jie Jiang et al., A homogeneous hemin/G-quadruplex DNzyme based turn-on chemiluminescence aptasensor for interferon-gamma detection via in-situ assembly of luminol functionalized gold nanoparticles, deoxyribonucleic acid, interferon-gamma and hemin., Anal. Chim. Acta., 2013, Vol.791, pp.60-64	6-11