

(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
2018年5月31日(31.05.2018)



(10) 国際公開番号

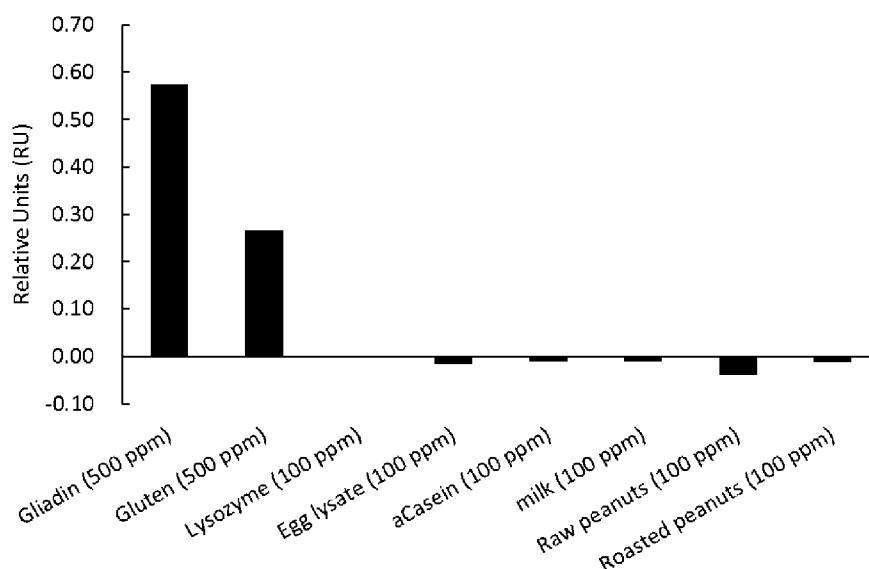
WO 2018/097220 A1

- (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/JP2017/042147
- (22) 国際出願日: 2017年11月24日(24.11.2017)
- (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 2016-227865 2016年11月24日(24.11.2016) 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18番7号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 白鳥 行大 (SHIRATORI Ikuo); 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目18番7号 NECソリューションイノベータ株式会社内 Tokyo (JP). 稲熊 あすみ(INAGUMA

Asumi); 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目18番7号 NECソリューションイノベータ株式会社内 Tokyo (JP). 清水 晃尚(SHIMIZU Akihisa); 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目18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18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18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18番7号 NECソリューションイノベータ株式会社内 Tokyo (JP). 藤田 智子(FUJITA Tomoko); 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目18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

(54) Title: NUCLEIC ACID MOLECULE AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 核酸分子およびその用途



(57) **Abstract:** Provided is a novel nucleic acid molecule capable of binding to gluten and/or gliadin. A nucleic acid molecule capable of binding to gluten and/or gliadin is a nucleic acid molecule comprising a polynucleotide (a) or (b): (a) a polynucleotide which comprises a nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 1, 8 or 10 or a partial sequence of the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 1, 8 or 10; and (b) a polynucleotide which comprises a nucleotide sequence having an identity of 90% or higher with the nucleotide sequence for the polynucleotide (a) and can bind to gluten and/or gliadin.



区新木場一丁目１８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１８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１３４ 京都リサーチパーク１号館３０１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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, 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))

(57) 要約: グルテンおよびグリアジンの少なくとも一方に結合する新たな核酸分子を提供する。下記(a)または(b)のいずれかのポリヌクレオチドを含む核酸分子を、グルテンおよびグリアジンの少なくとも一方に結合する核酸分子とする。(a) 配列番号1、8、もしくは10の塩基配列または配列番号1、8、もしくは10の塩基配列の部分配列からなるポリヌクレオチド (b) 前記(a)の塩基配列に対して、90%以上の同一性を有する塩基配列からなり、グルテンおよびグリアジンの少なくとも一方に結合するポリヌクレオチド

明 細 書

発明の名称：核酸分子およびその用途

技術分野

[0001] 本発明は、グルテンおよびグリアジンの少なくとも一方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] 小麦は、日常的に頻繁に摂取される食品であるが、近年、小麦アレルギーの患者が増加しており、問題視されている。加工食品等は、小麦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、原料として小麦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。小麦をはじめとする穀物に関しても、例えば、グルテン、および、グルテンを構成するタンパク質の1つであるグリアジンがアレルゲンとして知られている。グルテンに対する分析方法として、ELISA法を用いた方法が報告されている（非特許文献1、非特許文献2）。

[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。また、電気泳動やニトロセルロース膜へのブロッティング等が必要であり、操作が煩雑である。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。

先行技術文献

特許文献

[0005] 非特許文献1：食衛誌 Vol. 45, No.3, pp128-134 (2004)

非特許文献2：FEBS Letters Vol. 439 pp46-50 (1998)

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、グルテンおよびグリアジンの少なくとも一方に結合する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] 本発明の核酸分子は、下記（a）または（b）のいずれかのポリヌクレオチドを含むことを特徴とする、グルテンおよびグリアジンの少なくとも一方に結合する核酸分子である。

（a）配列番号 1、8、もしくは 10 の塩基配列または配列番号 1、8、もしくは 10 の塩基配列の部分配列からなるポリヌクレオチド

（b）前記（a）の塩基配列に対して、90%以上の同一性を有する塩基配列からなり、グルテンおよびグリアジンの少なくとも一方に結合するポリヌクレオチド

[0008] 本発明のグルテンまたはグリアジンの検出試薬は、前記本発明の核酸分子を含むことを特徴とする。

[0009] 本発明のグルテンまたはグリアジンの検出方法は、前記本発明の核酸分子、または前記本発明の検出試薬と、試料とを接触させ、前記試料中のグルテンまたはグリアジンと、前記核酸分子または前記検出試薬との複合体を形成させる工程、および、
前記複合体を検出する工程を含むことを特徴とする。

発明の効果

[0010] 本発明の核酸分子は、グルテンまたはグリアジンに結合可能である。このため、本発明の核酸分子によれば、試料中のアレルゲンとの結合の有無によって、グルテンやグリアジンを検出できる。したがって、本発明の核酸分子は、例えば、食品製造、食品管理、食品の流通等の分野において、例えば、小麦等の穀物に由来するアレルゲンの検出に、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、本発明の実施例1における、アプタマー1の推定二次構造である。

[図2]図2は、本発明の実施例1における、グリアジンおよびグルテンに対するアプタマー1の結合性を示すグラフである。

[図3]図3は、本発明の実施例1における、グルテンに対するアプタマー1の結合性を示すグラフである。

[図4]図4は、本発明の実施例1における、グリアジンに対するアプタマー1の結合性を示すグラフである。

[図5]図5は、本発明の実施例2における、アプタマー2～7の推定二次構造である。

[図6]図6は、本発明の実施例2における、グリアジンに対する各アプタマーの結合性を示すグラフである。

[図7]図7は、本発明の実施例3における、発光量の測定結果を示すグラフである。

[図8]図8は、本発明の実施例4における、アプタマー8～11の推定二次構造である。

[図9]図9は、本発明の実施例4における、グリアジンに対するアプタマー8および9の結合性を示すグラフである。

[図10]図10は、本発明の実施例4における、グリアジンに対するアプタマー10および11の結合性を示すグラフである。

[図11]図11は、本発明の実施例5における、加熱グリアジンに対するアプタマー8および9の結合性を示すグラフである。

[図12]図12は、本発明の実施例5における、加熱グリアジンに対するアプタマー10および11の結合性を示すグラフである。

[図13]図13は、本発明の実施例6における、グルテンおよび加熱グルテンに対するアプタマー8～11の結合性を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0012] (1) 核酸分子

本発明の核酸分子は、前述のように、下記(a)または(b)のいずれかのポリヌクレオチドを含むことを特徴とする、グルテンおよびグリアジンの

少なくとも一方に結合する核酸分子である。

(a) 配列番号 1、8、もしくは 10 の塩基配列または配列番号 1、8、もしくは 10 の塩基配列の部分配列からなるポリヌクレオチド

(b) 前記 (a) の塩基配列に対して、90%以上の同一性を有する塩基配列からなり、グルテンおよびグリアジンの少なくとも一方に結合するポリヌクレオチド

[0013] 本発明において、グルテンの由来は、特に制限されず、例えば、小麦、ライ麦、大麦、えん麦等の穀物があげられる。本発明の核酸について、例えば、結合能を確認するためのグルテンとして、市販のグルテンが使用でき、具体例として、小麦由来のグルテン (073-00575、和光純薬社製) が例示できる。グルテンは、例えば、加熱等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、加熱等による変性が生じた変性アレルゲンでもよい。

[0014] 本発明において、グリアジンの由来は、特に制限されず、例えば、前述したグルテンの由来と同様である。本発明の核酸について、例えば、結合能を確認するためのグリアジンとして、例えば、GenBank アクセッション番号 A27319 に開示されたアミノ酸配列からなる、小麦由来のグリアジンタンパク質が例示できる。グリアジンは、例えば、加熱等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、加熱等による変性が生じた変性アレルゲンでもよい。

[0015] 本発明の核酸分子は、前述のように、グルテンまたはグリアジンに結合可能である。本発明において、「グルテンに結合する」とは、例えば、グルテンに対する結合性を有している、または、グルテンに対する結合活性を有しているともいい、「グリアジンに結合する」とは、例えば、グリアジンに対する結合性を有している、または、グリアジンに対する結合活性を有しているともいう。本発明の核酸分子とグルテンまたはグリアジンとの結合は、例えば、表面プラズモン共鳴分子相互作用 (SPR; Surface Plasmon resonance) 解析等により決定できる。前記解析は、例えば、BIAcore 3000 (商品名、GE Healthcare U

K L t d.) が使用できる。本発明の核酸分子は、グルテンまたはグリアジンに結合することから、例えば、グルテンまたはグリアジンの検出に使用できる。

[0016] 本発明の核酸分子は、グリアジンに対する結合力を示す解離定数が、例えば、 581 nmol/L 以下、 132 nmol/L 以下、 102 nmol/L 以下、 23 nmol/L 以下、 20 nmol/L 以下である。

[0017] 本発明の核酸分子は、DNA分子、またはDNAアプタマーともいう。本発明の核酸分子は、例えば、前記(a)または(b)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。

[0018] 前記(a)のポリヌクレオチドは、例えば、前記配列番号1、8、または10の塩基配列を含むポリヌクレオチドでもよいし、前記配列番号1、8、または10の塩基配列からなるポリヌクレオチドでもよく、また、前記配列番号1、8、または10の塩基配列の部分配列を含むポリヌクレオチドでもよいし、前記部分配列からなるポリヌクレオチドでもよい。前記配列番号1、8、および10のポリヌクレオチドを以下に示す。

[0019] G l u 3 9 2 B R 8 m 4 (配列番号1)

GGTATGGAGGCAAGTCCCAATTCGTGCAGAGAAACGTGTCGTATTTATTAATCGTTTCAGCCAGACAG
GGTTTATG

G l i 9 5 _ 3 9 5 T R 8 m 1 (配列番号8)

GGAAACGCCGCCTAGATCATTTCGCTCCTCCCTGGTGGGGATTGGCGAAAAATTGACATCCTCAAGTTC
TGCGAAATG

G l i _ 3 9 5 B R 8 m 2 (配列番号10)

GGAAACGCCGCCTAGATCATTTCGAAACGTTTGTTACCTCACCTATTATCTATTGACATCCTCAAGTTC
TGCGAAATG

[0020] 前記配列番号1の部分配列は、特に制限されないが、例えば、配列番号2～7の塩基配列があげられる。

[0021] G l u 3 9 2 B R 8 m 4 _ s 5 9 A (配列番号2)

GGTATGGAGGCAAGTCCCAATTCGTGCAGAGAAACGTGTCGTATTTATTAATCGTTTC

G l u 3 9 2 B R 8 m 4 _ _ s 5 1 (配列番号 3)

GGCAAGTCCCAATTCGTGCAGAGAAACGTGTCTGTATTTATTAATCGTTTC

G l u 3 9 2 B R 8 m 4 _ _ s 3 8 (配列番号 4)

TCGTGCAGAGAAACGTGTCTGTATTTATTAATCGTTTC

G l u 3 9 2 B R 8 m 4 _ _ s 6 7 (配列番号 5)

GGTATGGAGGCAAGTCCCAATTCGTGCAGAGAAACGTGTCTGTATTTATTAATCGTTTCAGCCAGAC

G l u 3 9 2 B R 8 m 4 _ _ s 5 9 B (配列番号 6)

GGCAAGTCCCAATTCGTGCAGAGAAACGTGTCTGTATTTATTAATCGTTTCAGCCAGAC

G l u 3 9 2 B R 8 m 4 _ _ s 4 6 (配列番号 7)

TCGTGCAGAGAAACGTGTCTGTATTTATTAATCGTTTCAGCCAGAC

[0022] 前記配列番号 8 の部分配列は、特に制限されないが、例えば、配列番号 9 の塩基配列があげられる。

G l i 9 5 _ _ 3 9 5 T R 8 m 1 s 5 0 (配列番号 9)

CGCCTAGATCATTTGCGTCCTCCCTGGTGGGGATTGGCGAAAAATTGACAT

[0023] 前記配列番号 10 の部分配列は、特に制限されないが、例えば、配列番号 11 の塩基配列があげられる。

G l i _ _ 3 9 5 B R 8 m 2 s 5 1 (配列番号 11)

GGAAACGCCGCTAGATCATTTGAAACGTTGTACCTCACCTATTATCTA

[0024] 前記 (b) において、「同一性」は、特に制限されず、例えば、前記 (b) のポリヌクレオチドが、グルテンおよびグリアジンの少なくとも一方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、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、96%以上、97%以上、特に好ましくは98%以上、最も好ましくは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)。

[0025] 本発明の核酸分子における前記ポリヌクレオチドは、例えば、下記 (c) のポリヌクレオチドでもよい。この場合、本発明の核酸分子は、例えば、前

記(c)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。

(c) 前記(a)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ент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、グルテンおよびグリアジンの少なくとも一方に結合するポリヌクレオチド

[0026] 前記(c)において、「ハイブリダイズするポリヌクレオチド」は、特に制限されず、例えば、前記(a)の塩基配列に対して、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。

[0027] 前記(c)において、「ストリンジентな条件」は、例えば、低ストリンジентな条件、中ストリンジентな条件、高ストリンジентな条件のいずれでもよい。「低ストリンジент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ент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ент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。ストリンジエンシーの程度は、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ент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。

[0028] 本発明の核酸分子における前記ポリヌクレオチドは、例えば、下記 (d) のポリヌクレオチドでもよい。この場合、本発明の核酸分子は、例えば、前記 (d) 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。

(d) 前記 (a) 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、グルテンおよびグリアジンの少なくとも一方に結合するポリヌクレオチド

[0029] 前記 (d) において、「1もしくは数個」は、例えば、前記 (d) のポリヌクレオチドが、グルテンおよびグリアジンの少なくとも一方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) の塩基配列において、例えば、1～10個、好ましくは1～7個、より好ましくは1～5個、さらに好ましくは1～3個、特に好ましくは1または2個である。

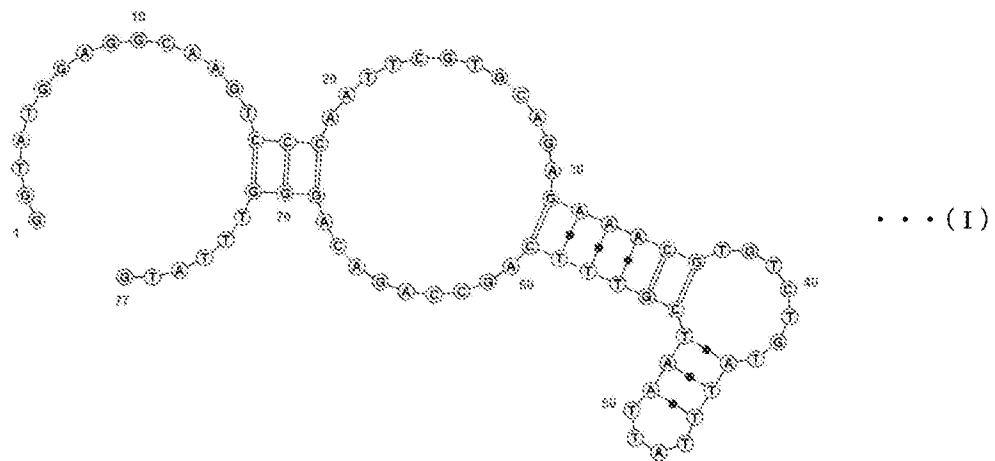
[0030] 本発明の核酸分子における前記ポリヌクレオチドは、例えば、下記 (e) のポリヌクレオチドでもよい。この場合、本発明の核酸分子は、例えば、前記 (e) のポリヌクレオチドからなる分子でもよいし、前記ポリヌクレオチドを含む分子でもよい。

(e) 前記 (a) 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、それぞれ、配列番号2～7のいずれかの塩基配列、配列番号9の塩基配列、または配列番号11の塩基配列を含む、グルテンおよびグリアジンの少なくとも一方に結合するポリヌクレオチド

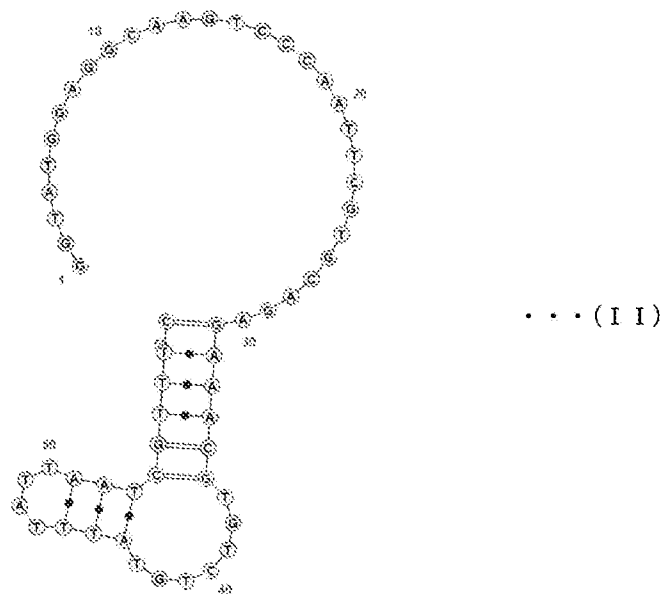
[0031] 本発明の核酸分子における前記ポリヌクレオチドは、例えば、下記 (f) のポリヌクレオチドでもよい。この場合、本発明の核酸分子は、例えば、前記 (f) のポリヌクレオチドからなる分子でもよいし、前記ポリヌクレオチドを含む分子でもよい。

(f) 配列番号 1 ～ 11 からなる群から選択された少なくとも一つ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、それぞれ、式 (I) ～ (XI) で表される二次構造を形成可能である、グルテンおよびグリアジンの少なくとも一方に結合するポリヌクレオチド

[化1]



[化2]

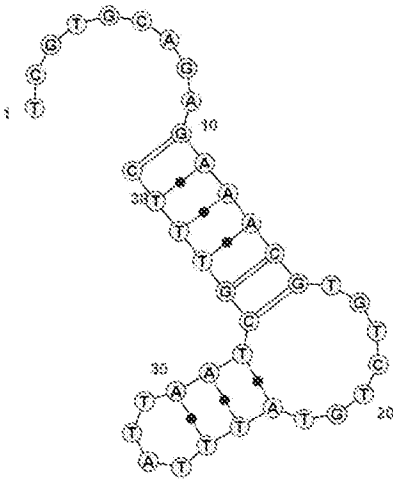


[化3]



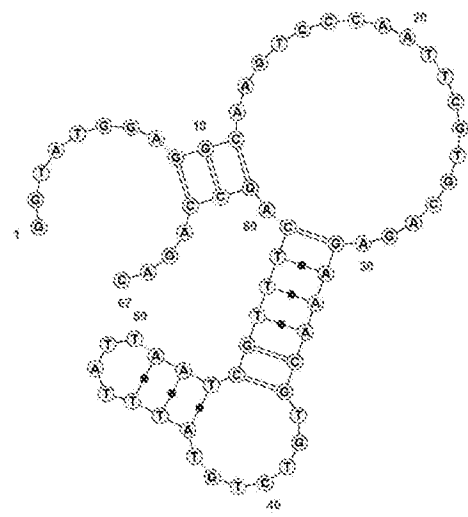
... (I I I)

[化4]



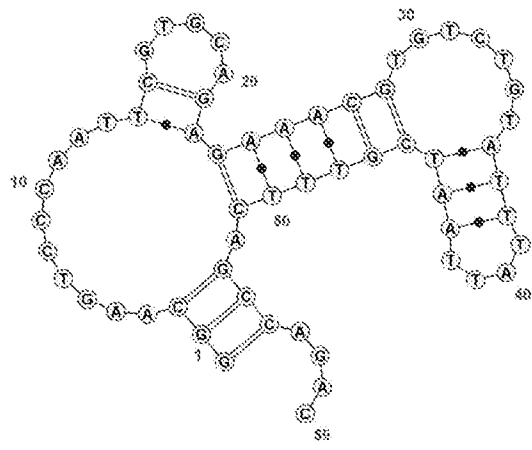
... (I V)

[化5]



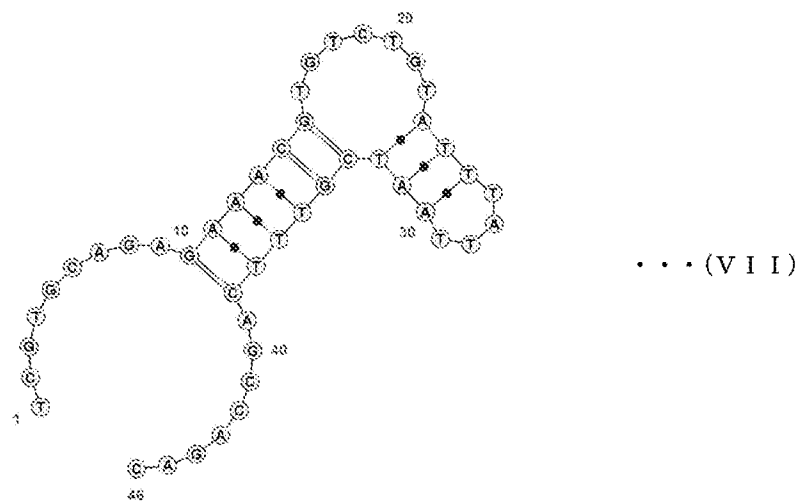
... (V)

[化6]

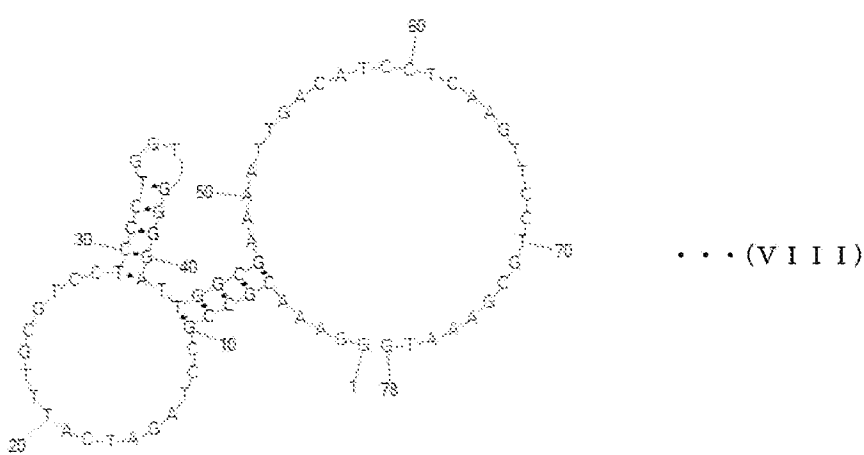


... (V I)

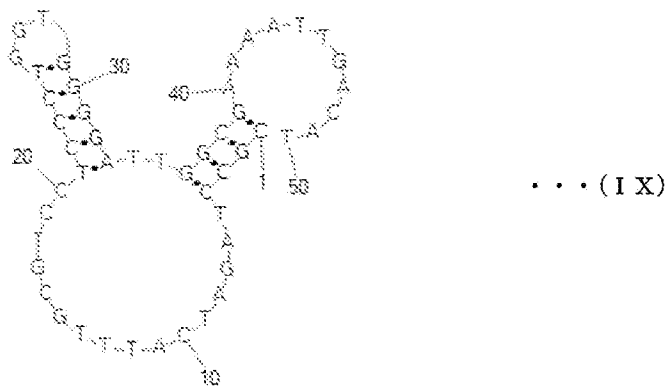
[化7]



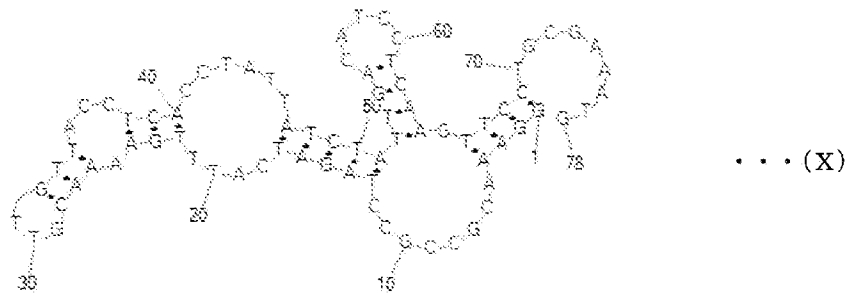
[化8]



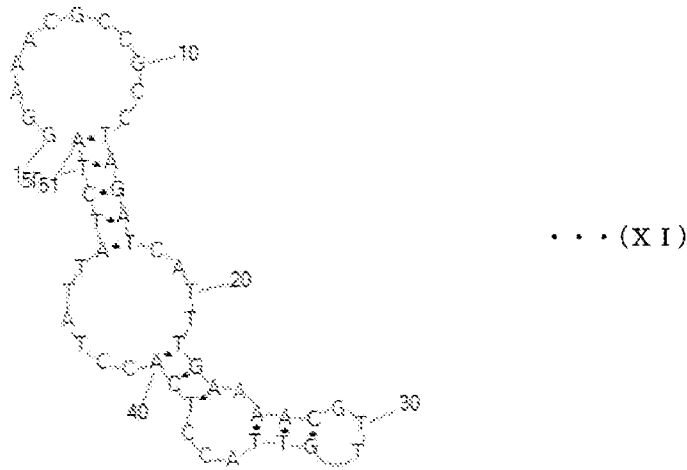
[化9]



[化10]



[化11]



[0032] 前記（f）において、「二次構造を形成可能」とは、例えば、前記（f）のポリヌクレオチドが、前記式におけるステム構造およびループ構造を形成可能であることをいう（以下、同様）。ステム構造およびループ構造については、後述する。

[0033] 本発明の核酸分子における前記ポリヌクレオチドは、例えば、下記（g）のポリヌクレオチドでもよい。この場合、本発明の核酸分子は、例えば、前記（g）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。

（g）配列番号1、8、および10からなる群から選択された少なくとも一つ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、それぞれ、式（I1）～（V11）のいずれか、式（IX）、および式（XI）で表される二次構造を形成可能である、グルテンおよびグリアジンの少なくとも一方に結合するポリヌクレオチド

[0034] 本発明の核酸分子は、例えば、前記（a）～（g）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、異なってもよいが、好ましくは同じである。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以上であり、好ましくは2～12であり、より好ましくは2～6であり、さらに好ましくは2である。

[0035] 前記リンカーは、例えば、ポリヌクレオチドがあげられ、その構成単位は、例えば、ヌクレオチド残基があげられる。前記ヌクレオチド残基は、例えば、リボヌクレオチド残基、デオキシリボヌクレオチド残基があげられる。

前記リンカーの長さは、特に制限されず、例えば、1～24塩基長であり、好ましくは12～24塩基長であり、より好ましくは16～24塩基長であり、さらに好ましくは20～24塩基長である。

[0036] 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。

[0037] 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)～(g)のいずれかのポリヌクレオチドであり、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)～(g)のいずれかのポリヌクレオチドに相補的な塩基配列からなる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)～(g)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。

[0038] 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。

[0039] 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。前記核酸分子の長さは、特に制限されず、その下限は、例えば、15塩基長であり、好ましくは75塩基長または80塩基長であり、その上限は、例えば、

1000塩基長であり、好ましくは200塩基長、100塩基長または90塩基長である。

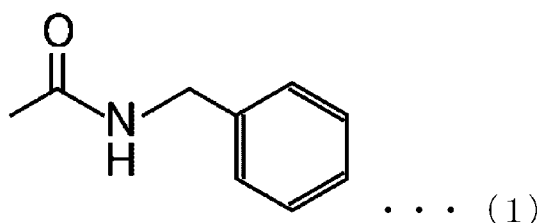
[0040] 前記ヌクレオチド残基は、例えば、デオキシリボヌクレオチド残基およびリボヌクレオチド残基があげられる。本発明の核酸分子は、例えば、デオキシリボヌクレオチド残基のみから構成されるDNA、1もしくは数個のリボヌクレオチド残基を含むDNA等があげられる。後者の場合、「1もしくは数個」は、特に制限されず、例えば、前記ポリヌクレオチドにおいて、例えば、1～3個である。本発明において、塩基数および配列数等の個数の数値範囲は、例えば、その範囲に属する正の整数を全て開示するものである。つまり、例えば、「1～3塩基」との記載は、「1、2、3塩基」の全ての開示を意味する（以下、同様）。

[0041] 前記ポリヌクレオチドは、例えば、少なくとも1個の修飾塩基を含む。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えることができる。

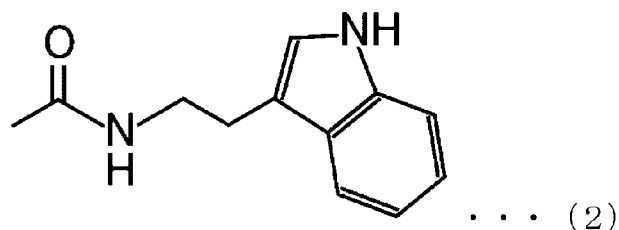
[0042] 前記修飾塩基の修飾基は、特に制限されず、例えば、メチル基、フルオロ基、アミノ基、チオ基、下記式（1）のベンジルアミノカルボニル基（benzy

laminocarbonyl)、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。

[化12]



[化13]



[0043] 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。

[0044] 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。

[0045] 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。

[0046] 前記修飾シトシンの具体例としては、例えば、5'-メチルシトシン等があげられる。

[0047] 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。

- [0048] 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 (B n d U)、5' -トリプタミノカルボニルウラシル (T r p d U) 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。
- [0049] 前記ポリヌクレオチドは、特に制限されず、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。
- [0050] 前記修飾塩基の個数は、特に制限されない。前記ポリヌクレオチドにおいて、前記修飾塩基の個数は、例えば、1個以上である。前記修飾塩基は、前記ポリヌクレオチドにおいて、例えば、1~80個、好ましくは1~70個、より好ましくは1~50個、さらに好ましくは1~40個、特に好ましくは1~30個、最も好ましくは1~20個であり、また、全ての塩基が、前記修飾塩基でもよい。前記修飾塩基の個数は、例えば、いずれか1種類の前記修飾塩基の個数であってもよいし、2種類以上の前記修飾塩基の個数の合計であってもよい。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塩基も、特に制限されず、例えば、1~80個、1~50個、1~20個であり、好ましくは、前述の範囲と同様である。
- [0051] 前記ポリヌクレオチドにおいて、前記修飾塩基の割合は、特に制限されない。前記修飾塩基の割合は、前記ポリヌクレオチドの全塩基数のうち、例えば、 $1/100$ 以上、好ましくは $1/40$ 以上、より好ましくは $1/20$ 以上、さらに好ましくは $1/10$ 以上、特に好ましくは $1/4$ 以上、最も好ましくは $1/3$ 以上である。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塩基の割合も、特に制限されず、前述の範囲と同様である。ここで、前記全塩基数は、例えば、前記ポリヌクレオチドにおける天然塩基の個数と前記修飾塩基の個数の合計である。前記修飾塩基の割合を分数で示すが、これを満たす全塩基数と修飾塩基数とは、それぞれ正の整数である。
- [0052] 前記ポリヌクレオチドにおける前記修飾塩基が、前記修飾チミンの場合、

前記修飾チミンの個数は、特に制限されない。前記ポリヌクレオチドにおいて、例えば、天然チミンは、前記修飾チミンに置換できる。前記ポリヌクレオチドにおいて、前記修飾チミンの個数は、例えば、1個以上である。前記修飾チミンは、前記ポリヌクレオチドにおいて、例えば、1～80個、好ましくは1～70個、より好ましくは1～50個、さらに好ましくは1～40個、特に好ましくは1～30個、最も好ましくは1～21個であり、また、全てのチミンが、前記修飾チミンでもよい。

[0053] 前記ポリヌクレオチドにおいて、前記修飾チミンの割合は、特に制限されない。前記修飾チミンの割合は、前記天然チミンの個数と前記修飾チミンの個数との合計のうち、例えば、 $1/100$ 以上、好ましくは $1/40$ 以上、より好ましくは $1/20$ 以上、さらに好ましくは $1/10$ 以上、特に好ましくは $1/4$ 以上、最も好ましくは $1/3$ 以上である。

[0054] 前記ポリヌクレオチドにおける前記修飾塩基が、前記修飾ウラシルの場合、前記修飾ウラシルの個数は、特に制限されない。前記ポリヌクレオチドにおいて、例えば、天然チミンは、前記修飾ウラシルに置換できる。前記ポリヌクレオチドにおいて、前記修飾ウラシルの個数は、例えば、1個以上である。前記修飾ウラシルは、前記ポリヌクレオチドにおいて、例えば、1～80個、好ましくは1～70個、より好ましくは1～50個、さらに好ましくは1～40個、特に好ましくは1～30個、最も好ましくは1～21個であり、また、全てのウラシルが、前記修飾ウラシルでもよい。

[0055] 前記ポリヌクレオチドにおいて、前記修飾ウラシルの割合は、特に制限されない。前記修飾ウラシルの割合は、前記天然チミンの個数と前記修飾ウラシルの個数との合計のうち、例えば、 $1/100$ 以上、好ましくは $1/40$ 以上、より好ましくは $1/20$ 以上、さらに好ましくは $1/10$ 以上、特に好ましくは $1/4$ 以上、最も好ましくは $1/3$ 以上である。

[0056] 前記修飾チミンと前記修飾ウラシルの個数の例示は、例えば、両者をあわせた個数であってもよい。

[0057] 前記ポリヌクレオチドにおいて、例えば、前記各塩基配列における下線部

で示されるチミンが、前記修飾チミンおよび前記修飾ウラシルの少なくとも一方でもよい。具体的には、例えば、配列番号 1～7、10 および 11 のいずれかの塩基配列における下線部で示されるチミンが、5'-ベンジルアミノカルボニルウラシル (B n d U) でもよい。また、例えば、配列番号 8 および 9 のいずれかの塩基配列における下線部で示されるチミンが、5'-トリプタミノカルボニルウラシル (T r p d U) でもよい。前記ポリヌクレオチドにおいて、前記各塩基配列における下線部で示されるチミン以外のチミンは、例えば、天然塩基である。ただし、これには限定されず、前記各塩基配列における下線部で示されるチミン以外のチミンは、前記修飾塩基でもよい。

[0058] 前記ポリヌクレオチドにおける前記修飾塩基が、前記修飾シトシンの場合、前記修飾シトシンの個数は、特に制限されない。前記ポリヌクレオチドにおいて、例えば、天然シトシンは、前記修飾シトシンに置換できる。前記ポリヌクレオチドにおいて、前記修飾シトシンの個数は、例えば、1 個以上である。前記修飾シトシンは、前記ポリヌクレオチドにおいて、例えば、1～80 個、好ましくは 1～70 個、より好ましくは 1～50 個、さらに好ましくは 1～40 個、特に好ましくは 1～30 個、最も好ましくは 1～21 個であり、であり、また、全てのシトシンが、前記修飾シトシンでもよい。

[0059] 前記ポリヌクレオチドにおいて、前記修飾シトシンの割合は、特に制限されない。前記修飾シトシンの割合は、前記天然シトシンの個数と前記修飾シトシンの個数との合計のうち、例えば、1/100 以上、好ましくは 1/40 以上、より好ましくは 1/20 以上、さらに好ましくは 1/10 以上、特に好ましくは 1/4 以上、最も好ましくは 1/3 以上である。

[0060] 前記ポリヌクレオチドにおいて、例えば、前記各塩基配列における下線部で示されるシトシンが、前記修飾シトシンでもよい。具体的には、例えば、配列番号 1～11 のいずれかの塩基配列における下線部で示されるシトシンが、5'-メチルシトシンでもよい。前記ポリヌクレオチドにおいて、前記各塩基配列における下線部で示されるシトシン以外のシトシンは、例えば、

天然塩基である。ただし、これには限定されず、前記各塩基配列における下線部で示されるシトシン以外のシトシンは、前記修飾塩基でもよい。

[0061] 前記修飾塩基が、前記修飾アデニンまたは前記修飾グアニンの場合、前記修飾シトシンの個数および割合の説明において、「シトシン」および「修飾シトシン」を、それぞれ「アデニン」および「修飾アデニン」または「グアニン」および「修飾グアニン」に読み替えて援用できる。前記ポリヌクレオチドにおいて、例えば、天然アデニンは、前記修飾アデニンに置換でき、例えば、天然グアニンは、前記修飾グアニンに置換できる。

[0062] 本発明の核酸分子は、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。

[0063] 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。

[0064] 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。

[0065] 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、1～80個、好ましくは1～70個、より好ま

しくは1～50個、さらに好ましくは1～40個、特に好ましくは1～30個、最も好ましくは1～21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、1～80個、1～50個、1～20個であり、好ましくは、前述の範囲と同様である。

[0066] 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、1～80個、好ましくは1～70個、より好ましくは1～50個、さらに好ましくは1～40個、特に好ましくは1～30個、最も好ましくは1～21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。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人工核酸モノマー残基も、特に制限されず、例えば、1～80個、1～50個、1～20個であり、好ましくは、前述の範囲と同様である。

[0067] 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。

[0068] 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塩基長であり、好ましくは1～50塩基長であり、より好ま

しくは1～25塩基長、さらに好ましくは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。

[0069] 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できる。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、本発明の核酸分子は、例えば、前記担体に、例えば、前記付加配列を介して固定化する。前記担体は、例えば、ビーズ、プレート、フィルター、カラム、基板、容器等があげられる。

[0070] 本発明の核酸分子は、例えば、さらに標識物質を有してもよく、具体的には、前記核酸分子に前記標識物質が結合してもよい。前記標識物質が結合した前記核酸分子は、例えば、本発明の核酸センサということもできる。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させてもよい。前記標識物質による標識化は、例えば、結合でもよいし、化学修飾でもよい。前記標識物質は、特に制限されず、例えば、酵素、蛍光物質、色素、同位体、薬物、毒素および抗生物質等があげられる。前記酵素は、例えば、ルシフェラーゼ、NanoLucルシフェラーゼ等があげられる。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、JOE、MAX、HEX、TYE等の蛍光団があげられ、前記色素は、例えば、Alexa488、Alexa647等のAlexa色素等があげられる。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、ポリヌクレオチドのリンカー等である。

[0071] 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、遺伝子工学的手法等の公知の方法等により合成できる。

[0072] 本発明の核酸分子は、前述のように、グルテンに結合性を示す。このため、本発明の核酸分子の用途は、グルテン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、グルテンに対する抗体に代えて、種々の方法に使用できる。

[0073] 本発明の核酸分子によれば、グルテンを検出できる。グルテンの検出方法は、特に制限されず、グルテンと前記核酸分子との結合を検出することによって行える。

[0074] また、本発明の核酸分子は、前述のように、グリアジンに結合性を示す。このため、本発明の核酸分子は、例えば、グリアジンへの結合性を利用する用途にも使用できる。本発明の核酸分子は、例えば、グリアジンに対する抗体に代えて、種々の方法に使用できる。

[0075] 本発明の核酸分子によれば、例えば、グリアジンを検出できる。グリアジンの検出方法は、特に制限されず、グリアジンと前記核酸分子との結合を検出することによって行える。

[0076] (2) 検出試薬およびキット

本発明の検出試薬は、前述のように、グルテンまたはグリアジンの検出試薬であって、前記本発明の核酸分子を含むことを特徴とする。本発明の検出試薬は、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。本発明の検出試薬を使用すれば、前述のように、例えば、グルテンまたはグリアジンの検出等を行うことができる。本発明の検出試薬は、例えば、グルテンへの結合剤またはグリアジンへの結合剤ともいえる。

[0077] 本発明の検出試薬は、例えば、さらに、標識物質を有し、前記標識物質が、前記核酸分子に結合されてもよい。前記標識物質は、例えば、前記本発明の核酸分子における説明を援用できる。また、本発明の検出試薬は、例えば

、担体を有し、前記担体に前記核酸分子が固定化されてもよい。前記担体は、例えば、前記本発明の核酸分子における説明を援用できる。

[0078] 本発明の検出キットは、前記本発明の核酸分子または前記本発明の検出試薬を含む。本発明の検出キットは、例えば、さらに、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、前記試料を調製するための緩衝液、使用説明書等があげられる。また、後述する本発明の検出方法に示す、前記核酸分子に標識物質であるルシフェラーゼを結合させた核酸センサと、アレルゲン標識化担体とを用いる方法の場合、本発明の検出キットは、例えば、前記核酸センサと、アレルゲン標識化担体（グルテン標識化担体またはグリアジン標識化担体）を含むキットとすることができる。

[0079] 本発明の検出試薬および検出キットは、例えば、前記本発明の核酸分子の説明を援用でき、また、その使用方法についても、前記本発明の核酸分子および後述する前記本発明の検出方法を援用できる。

[0080] （３）検出方法

本発明のグルテンまたはグリアジンの検出方法は、前述のように、前記本発明の核酸分子、または前記本発明の検出試薬と、試料とを接触させ、前記試料中のグルテンまたはグリアジンと、前記核酸分子または前記検出試薬との複合体を形成させる工程、および、前記複合体を検出する工程を含むことを特徴とする。本発明の検出方法は、前記本発明の核酸分子または前記検出試薬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。以下、本発明の核酸分子の使用を例にあげて説明するが、本発明の核酸分子は、本発明の検出試薬と読み替え可能である。

[0081] 本発明によれば、前記本発明の核酸分子が、グルテンまたはグリアジンに特異的に結合することから、例えば、グルテンまたはグリアジンと、前記核酸分子または前記検出試薬との結合を検出することによって、試料中のグルテンまたはグリアジンを特異的に検出可能である。具体的には、例えば、試料中のグルテンまたはグリアジンの量を分析可能であることから、定性分析または定量分析も可能といえる。

- [0082] 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。
- [0083] 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。
- [0084] 本発明の検出方法について、本発明の核酸分子として、標識物質で標識化された本発明の核酸センサを使用し、グルテンを検出する方法を例にあげて説明する。なお、グリアジンはグルテンの構成成分であることから、グルテンの検出は、グリアジンの検出として、読み替え可能である。なお、本発明は、これらの例示には制限されない。
- [0085] 前記検出工程は、例えば、さらに、前記複合体の検出結果に基づいて、前記試料中のグルテンの有無または量を分析する工程を含む。
- [0086] 前記複合体形成工程において、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。
- [0087] 前記複合体形成工程において、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℃であり、好ましくは18～25℃であり、接触時間は、例えば、10～120分であり、好ましくは30～60分である。
- [0088] 前記複合体形成工程において、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（固相担体）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。前者の場合、前記担体は、特に制限されず、例えば、プレート、フィルター、カラム

、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。

[0089] 前記検出工程は、前述のように、前記試料中のグルテン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、前記試料中のグルテンの有無を分析（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、前記試料中のグルテンの量を分析（定量）できる。

[0090] グルテンと前記核酸分子との結合の検出方法は、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等があげられる。

[0091] そして、グルテンと前記核酸分子との結合が検出できなかった場合は、前記試料中にグルテンは存在しないと判断でき、前記結合が検出された場合は、前記試料中にグルテンが存在すると判断できる。また、予め、グルテンの濃度と結合量との相関関係を求めておき、前記相関関係に基づいて、前記結合量から、前記試料中のグルテンの濃度を分析することもできる。

[0092] グルテンと前記核酸分子との結合の検出について、一例として、前記核酸分子に標識物質であるルシフェラーゼを結合させた核酸センサと、グルテン標識化担体とを用いる方法を、以下に示す。

[0093] まず、前記核酸センサと前記試料とを混合する。これにより、前記試料中にグルテンが存在する場合、前記核酸センサにおける前記核酸分子は、ターゲットであるグルテンと結合する。他方、前記試料中にグルテンが存在しない場合、前記核酸センサにおける核酸分子は、ターゲットと未結合の状態となる。

[0094] つぎに、前記混合物を、グルテン標識化担体に接触させた後、前記グルテン標識化担体を除去する。前記担体は、例えば、ビーズがあげられる。前記混合物において、前記核酸センサがグルテンと結合している場合、前記核酸センサにおける前記核酸分子は、前記グルテン標識化担体におけるグルテン

とは結合できない。このため、前記グルテン標識化担体を除去した画分に対して、ルシフェラーゼの基質を添加して発光反応を行った場合、前記核酸センサにおけるルシフェラーゼの触媒反応によって、発光が生じる。他方、前記混合物において、前記核酸センサがグルテンと結合していない場合、前記核酸センサにおける前記核酸分子は、前記グルテン標識化担体におけるグルテンと結合する。このため、前記グルテン標識化担体の除去により、前記核酸センサも、前記グルテン標識化担体に結合した状態で除去されることになる。このため、前記グルテン標識化担体を除去した画分に対して、ルシフェラーゼの基質を添加して発光反応を行った場合、前記核酸センサが存在していないことから、ルシフェラーゼの触媒反応による発光は生じない。このため、発光の有無によって、試料中のグルテンの有無を分析（定性分析）することができる。また、試料中のグルテンの量と、前記グルテン標識化担体を除去した後の前記画分に残存する前記核酸センサの量とは、相関関係を有するため、発光の強弱によって、試料中のグルテンの量も分析（定量分析）することができる。

[0095] 本発明によれば、前述のように、グルテンまたはグリアジンを検出できる。また、本発明によれば、グルテンまたはグリアジンの検出により、例えば、間接的に、小麦の有無を検出することも可能である。

実施例

[0096] 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、それらのプロトコルに基づいて使用した。

[0097] [実施例 1]

本発明のアプタマーについて、グルテンおよびグリアジンに対する結合性を、SPR解析により確認した。

[0098] (1) アプタマー

下記ポリヌクレオチドのアプタマー 1 を、実施例のアプタマーとして合成した。下記配列番号 1 のポリヌクレオチドにおいて、下線部で示される「T

」は、天然チミン（T）に代えて、チミンの5位が置換された5'-ベンジルアミノカルボニルウラシル（BndU）を有するデオキシリボヌクレオチド残基とし、下線部で示される「C」は、天然シトシン（C）に代えて、シトシンの5位が置換された5'-メチルシトシンを有するデオキシリボヌクレオチド残基とした。

[0099] アプタマー1：G l u 3 9 2 B R 8 m 4（配列番号1）

GGTATGGAGGCAAGTCCCAATTCGTGCAGAGAAACGTGCTGTATTTATTAATCGTTTCAGCCAGACAG
GGTTTATG

[0100] アプタマー1の推定二次構造を、図1に示す。ただし、これには限定されない。

[0101] 前記アプタマーは、その3'末端に、20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付加アプタマーは、95℃、5分の条件で熱変性させたものを使用した。

[0102] （2）試料

小麦由来のグルテン（073-00575、和光純薬社製）を、SB1Tバッファーに懸濁し、一晚溶解させた後、遠心（12,000rpm、15分、室温）し分離した。前記分離した上清を、未変性グルテンを含む抽出液として得た。これをグルテン試料とした。また、小麦由来のグリアジン（cat# 101778、MP Biomedicals社製）を使用し、同様にして、未変性グリアジンを含む抽出液を調製した。前記SB1Tバッファーの組成は、40mmol/L HEPES、125mmol/L NaCl、5mmol/L KCl、1mmol/L MgCl₂および0.01% Tween（登録商標）20とし、pHは、7.5とした。

[0103] 以下の結合性試験において、前記アプタマーの交差反応の確認のため、以下に示す材料から、それぞれの試料を調製した。αカゼイン試料の調製は、前記グルテン試料の調製と同様にして行った。牛乳、卵、およびピーナッツ

は、フードプロセッサで破碎後、S B 1 Tバッファーに懸濁し、一晚溶解させた後、遠心（3 0 0 0 g、2 0 分、室温）し分離し、前記分離した上清を、0. 8 m mのフィルターでろ過し、得られた抽出液を、試料として使用した。

鶏卵の卵白由来リゾチーム（120-02674、和光純薬社製）

鶏卵の全卵

牛乳由来 α カゼイン（C6780-19、SIGMA社製）

牛乳（足柄乳業株式会社製）

生ピーナッツ（インドカレーの店アールティー社製）

ローストピーナッツ（KFVフルーツ社製）

[0104] （3）S P Rによる結合性の解析

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

[0105] まず、前記ProteON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 ProteOn NLC Sensor Chip、BioRad社）を、前記ProteON 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（D D W）を用いて、 $1 \mu\text{mol/L}$ のビオチン化ポリd Tをインジェクションし、シグナル強度（R U : R e s o n a n c e U n i t）が約9 0 0 R Uになるまで結合させた。前記ビオチン化ポリd Tは、2 0塩基長のデオキシチミジンの5'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、S B 1 Tバッファーを用いて、 $1 \mu\text{mol/L}$ の前記ポリd A付加アダプターを、流速 $25 \mu\text{L/min}$ で8 0秒間インジェクションし、シグナル強度が約8 0 0 R Uになるまで結合させた。続いて、所定濃度（5 0 0 p p mまたは1 0 0 p p m）の前記試料を、それぞれ、前記バッファーを用いて、流速 $25 \mu\text{L/min}$ で2 4 0秒間インジェクションし、引き続き、同じ条件で、前記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後、シグナル強度を測定し、前記試料のインジェクション開始を0秒として、2 9 5～3 1 5秒におけるシグナル強度（R U）

の平均値 ($RU_{295-315}$) を求めた。そして、前記ビオチン化ポリ d T に前記ポリ d A 付加アプタマーを結合させた時における RU 値 (RU_{immob}) と $RU_{295-315}$ との比 ($RU_{295-315} / RU_{immob}$) を算出した。

[0106] これらの結果を図 2 に示す。図 2 は、グリアジンおよびグルテンに対するアプタマー 1 の結合性を示すグラフであり、横軸は、各試料を示し、縦軸は、シグナル強度 (RU) を示す。横軸において、左から順に、グリアジン試料、グルテン試料、リゾチーム試料、卵試料、 α カゼイン試料、牛乳試料、生ピーナッツ試料、およびローストピーナッツ試料を示す。各試料における濃度 (ppm) は、グリアジン試料、グルテン試料、リゾチーム試料、および α カゼイン試料については、各タンパク質の濃度を示し、卵試料、牛乳試料、生ピーナッツ試料、およびローストピーナッツ試料については、各試料に含まれる全タンパク質の濃度を示す。図 2 に示すように、アプタマー 1 は、グリアジンおよびグルテンに対して、結合性を示した。一方、アプタマー 1 は、リゾチーム試料、卵試料、 α カゼイン試料、牛乳試料、生ピーナッツ試料、およびローストピーナッツ試料に対しては、いずれも、シグナル強度が 0.00 以下であり、結合性を示さなかった。

[0107] つぎに、前記グルテン試料を使用し、前記試料におけるグルテンの濃度を、3.7、11、33、100、および 300 ppm とした以外は同様にして、結合性の解析を行った。

[0108] この結果を図 3 に示す。図 3 は、グルテンに対するアプタマー 1 の結合性を示すグラフであり、横軸は、グルテンの濃度 (ppm) を示し、縦軸は、シグナル強度 (RU) を示す。図 3 に示すように、アプタマー 1 は、グルテンの濃度が増加するにつれて、シグナル強度が増加した。この結果から、本発明のアプタマーを用い、シグナル強度を測定することで、試料中のグルテン濃度を定量分析できることがわかった。

[0109] つぎに、前記グリアジン試料を使用し、前記試料におけるグリアジンの濃度を、0.25、0.5、1、2、および 4 $\mu\text{mol/L}$ とした以外は同様にして、結合性の解析を行い、前記試料のインジェクション開始後の所定時

間におけるシグナル強度を求めた。

[0110] この結果を図4に示す。図4は、グリアジンに対するアプタマー1の結合性を示すグラフであり、横軸は、前記試料のインジェクション開始後の経過時間（秒）を示し、縦軸は、シグナル強度（RU）を示す。図4に示すように、アプタマー1は、グリアジンの濃度が増加するにつれて、シグナル強度が増加した。

[0111] さらに、前記図4のSPR解析の結果から、動態パラメータを算出した。この結果、アプタマー1は、グリアジンに対する解離定数（KD）が、 $5.81 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ であり、優れた結合性であることがわかった。

[0112] [実施例2]

本発明の小型化アプタマーについて、グリアジンに対する結合性を、SPR解析により確認した。

[0113] 下記ポリヌクレオチドのアプタマー2～7を、実施例の小型化アプタマーとして合成した。アプタマー2～7は、前記実施例1のアプタマー1（配列番号1）を小型化したアプタマーである。下記ポリヌクレオチドにおいて、下線部で示される「T」は、天然チミン（T）に代えて、チミンの5位が置換された5'-ベンジルアミノカルボニルウラシル（BndU）を有するデオキシリボヌクレオチド残基とし、下線部で示される「C」は、天然シトシン（C）に代えて、シトシンの5位が置換された5'-メチルシトシンを有するデオキシリボヌクレオチド残基とした。

[0114] アプタマー2：G l u 3 9 2 B R 8 m 4 __ s 5 9 A（配列番号2）

GGTATGGAGGCAAGTCCCAATTCGTGCAGAGAAACGTGCTGTATTTATTAATCGTTTC

アプタマー3：G l u 3 9 2 B R 8 m 4 __ s 5 1（配列番号3）

GGCAAGTCCCAATTCGTGCAGAGAAACGTGCTGTATTTATTAATCGTTTC

アプタマー4：G l u 3 9 2 B R 8 m 4 __ s 3 8（配列番号4）

TCGTGCAGAGAAACGTGCTGTATTTATTAATCGTTTC

アプタマー5：G l u 3 9 2 B R 8 m 4 __ s 6 7（配列番号5）

GGTATGGAGGCAAGTCCCAATTCGTGCAGAGAAACGTGCTGTATTTATTAATCGTTTCAGCCAGAC

アプタマー 6 : G l u 3 9 2 B R 8 m 4 _ _ s 5 9 B (配列番号 6)

GGCAAGTCCCAATTCGTGCAGAGAAACGTGTCTGTATTTATTAATCGTTTCAGCCAGAC

アプタマー 7 : G l u 3 9 2 B R 8 m 4 _ _ s 4 6 (配列番号 7)

TCGTGCAGAGAAACGTGTCTGTATTTATTAATCGTTTCAGCCAGAC

[0115] アプタマー 2～7 の推定二次構造を、図 5 に示す。ただし、これには限定されない。

[0116] アプタマーとして、前記実施例 1 の前記アプタマー 1 と、前記小型化アプタマー 2～7 を使用し、試料として、前記実施例 1 で調製したグリアジン試料 ($4 \mu\text{mol/L}$)、リゾチーム試料 (25nmol/L または 100nmol/L)、および α カゼイン試料 (100nmol/L または 400nmol/L) を使用した以外は、実施例 1 と同様にして、SPR による結合性の解析を行った。

[0117] この結果を図 6 に示す。図 6 は、グリアジン ($4 \mu\text{mol/L}$)、リゾチーム (25nmol/L または 100nmol/L)、および α カゼイン (100nmol/L または 400nmol/L) に対する各アプタマーの結合性を示すグラフであり、横軸は、各試料を示し、縦軸は、シグナル強度 (RU) を示す。各グラフは、左から順に、小型化アプタマー 2、小型化アプタマー 3、小型化アプタマー 4、小型化アプタマー 5、小型化アプタマー 6、小型化アプタマー 7、およびアプタマー 1 を示す。

[0118] 図 6 に示すように、アプタマー 1 を小型化した小型化アプタマー 2～7 は、いずれも、アプタマー 1 と比較して、グリアジンに対して、より高い結合性を示した。また、アプタマー 1～7 は、リゾチームおよび α カゼインに対しては、いずれも、シグナル強度が 0.00 以下であり、結合性を示さなかった。これらの結果から、小型化アプタマー 2～7 は、グリアジンに対して優れた特異性で結合することがわかった。

[0119] [実施例 3]

本発明のアプタマーに標識物質ルシフェラーゼを結合させた核酸センサを作製し、前記核酸センサのグリアジンおよびグルテンに対する結合性を確認

した。前記結合性の確認は、ターゲットであるグリアジンまたはグルテンが固相化されたターゲット固相化ビーズと、前記核酸センサとを用いて行った。

[0120] 前述のように、反応液において、前記核酸センサが前記ターゲットと結合している場合、前記核酸センサにおける前記核酸分子は、前記ターゲット固相化ビーズに固相化されたグリアジンまたはグルテンとは結合できない。このため、前記ターゲット固相化ビーズを除去した画分に対して発光反応を行った場合、前記核酸センサにおけるルシフェラーゼの触媒反応によって、発光が生じる。他方、前記反応液において、前記核酸センサが前記ターゲットと結合していない場合、前記核酸センサにおける前記核酸分子は、前記ターゲット固相化ビーズに固相化されたグリアジンまたはグルテンと結合する。このため、前記ターゲット固相化ビーズの除去により、前記核酸センサも、前記ターゲット固相化ビーズに結合した状態で除去されることになる。このため、前記ターゲット固相化ビーズを除去した画分に対して、ルシフェラーゼの基質を添加して発光反応を行った場合、前記核酸センサが存在していないことから、ルシフェラーゼの触媒反応による発光は生じない。このため、前記核酸センサと前記ターゲット固相化ビーズとを用いて、ルシフェラーゼによる発光を検出することで、グリアジンまたはグルテンを検出することができる。

[0121] 前記核酸センサは、蛍光物質 NanoLuc（商標）ルシフェラーゼ（Promega社製）を使用し、その使用説明書にしたがって、前記実施例1のアプタマー1（G l u 3 9 2 B R 8 m 4）の5'末端を標識化することにより、調製した。

[0122] 試料として、前記実施例1の前記グリアジン試料または前記グルテン試料を使用した。

[0123] 前記ターゲット固相化ビーズは、ターゲットとして前記グリアジン試料または前記グルテン試料を使用し、NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow Lab Packs（GE Healthcare社製）を使用し、その使用説明書にしたがっ

て調製した。

[0124] そして、前記核酸センサおよび前記ターゲット固相化ビーズを用い、前記核酸センサのグリアジンおよびグルテンに対する結合性を、以下に示すようにして確認した。まず、96ウェルのU底プレートに、フィルタープレート（millipore社製、cat#MSGVN2250）をセットし、前記U底プレートの各ウェルに、50 μ L／ウェルとなるように前記ターゲット固相化ビーズを加えた。前記各ウェルに、90 μ Lの前記グリアジン試料または前記グルテン試料（終濃度 0、0.4、1.235、3.7、11.1、33.3、100 ppm）と、10 μ Lの前記核酸センサ（ 2.5×10^6 希釈）とを加え、1200 rpm、5分、室温の条件で混合し、前記グリアジン試料または前記グルテン試料、前記ターゲット固相化ビーズ、および前記核酸センサを反応させた。その後、前記U底プレートを、3000 g、2分、室温の条件で遠心分離し、前記ターゲット固相化ビーズを遠心除去した。前記遠心分離によって、前記フィルタープレートを通過した反応液を、前記各ウェルから回収し、発光量の測定に供した。前記発光量の測定には、Infinite M1000 Pro（TECAN社）を、その使用説明書にしたがって使用した。前記発光量の測定において、基質として、NanoGlo（商標、Promega社製、cat#N2012）を使用した。また、交差反応の確認のため、前記グリアジン試料および前記グルテン試料に代えて、前述した卵、牛乳、および生ピーナッツを使用して、同様の測定を行った。

[0125] 発光量の測定結果を図7に示す。図7は、グリアジン、グルテン、卵、牛乳、および生ピーナッツを試料とした場合における、発光量の測定結果を示すグラフである。図7において、横軸は、各試料の濃度を示し、縦軸は、発光量（RLU）を示す。図7に示すように、グリアジン試料およびグルテン試料の場合、ルシフェラーゼの触媒反応による発光がみられた、前記グリアジン試料および前記グルテン試料のタンパク質濃度の増加に伴い、発光量が増加した。一方、前記卵試料、前記牛乳試料、および前記生ピーナッツ試料の場合は、いずれも、発光量は変化しなかった。

[0126] さらに、前記図7の測定結果から、 3σ 法により、前記核酸センサのグリアジンおよびグルテンに対する検出限界を算出した ($n=3$)。この結果、前記核酸センサのグリアジンおよびグルテンに対する検出限界 (LOD) は、それぞれ、 1.2 ppm であった。このことから、前記核酸センサは、微量のグリアジンおよびグルテンを検出可能であることがわかった。

[0127] [実施例4]

本発明のアプタマーについて、グリアジンに対する結合性を、SPR解析により確認した。

[0128] 下記ポリヌクレオチドのアプタマー8および9を、実施例1と同様にして、合成した。アプタマー9は、アプタマー8の小型化配列である。下記配列番号8および9のポリヌクレオチドにおいて、下線部で示される「T」は、天然チミン (T) に代えて、チミンの5位が置換された5'-トリプタミノカルボニルウラシル (Trp d U) を有するデオキシリボヌクレオチド残基とし、下線部で示される「C」は、天然シトシン (C) に代えて、シトシンの5位が置換された5'-メチルシトシンを有するデオキシリボヌクレオチド残基とした。

[0129] アプタマー8 : G l i 9 5 _ 3 9 5 T R 8 m 1 (配列番号8)

GGAAACGCCGCCTAGATCATTTGCGTCCTCCCTGGTGGGGATTGGCGAAAAATTGACATCCTCAAGTTC
IGCGAAATG

アプタマー9 : G l i 9 5 _ 3 9 5 T R 8 m 1 s 5 0 (配列番号9)

CGCCTAGATCATTTGCGTCCTCCCTGGTGGGGATTGGCGAAAAATTGACAT

[0130] アプタマー8および9の推定二次構造を、図8 (A) に示す。ただし、これには限定されない。

[0131] アプタマー8および9を使用し、試料として、前記グリアジン試料を使用し、前記試料におけるグリアジンの濃度を、 50 、 100 、 200 、および 400 nmol/L とした以外は実施例1と同様にして、結合性の解析を行い、前記試料のインジェクション開始後の所定時間におけるシグナル強度を求めた。

[0132] この結果を図9に示す。図9（A）および（B）は、それぞれ、グリアジンに対するアプタマー8および9の結合性を示すグラフであり、横軸は、前記試料のインジェクション開始後の経過時間（秒）を示し、縦軸は、シグナル強度（RU）を示す。図9（A）および（B）に示すように、アプタマー8およびその小型化配列であるアプタマー9は、グリアジンの濃度が増加するにつれて、シグナル強度が増加した。

[0133] さらに、前記図9のSPR解析の結果から、動態パラメータを算出した。この結果、アプタマー8および9は、グリアジンに対する解離定数（KD）が、それぞれ、 $19.4 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 、および $22.7 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ であり、優れた結合性であることがわかった。

[0134] つぎに、下記ポリヌクレオチドのアプタマー10および11を、実施例1と同様にして、合成した。アプタマー11は、アプタマー10の小型化配列である。下記配列番号10および11のポリヌクレオチドにおいて、下線部で示される「T」は、天然チミン（T）に代えて、チミンの5位が置換された5'-ベンジルアミノカルボニルウラシル（BndU）を有するデオキシリボヌクレオチド残基とし、下線部で示される「C」は、天然シトシン（C）に代えて、シトシンの5位が置換された5'-メチルシトシンを有するデオキシリボヌクレオチド残基とした。

[0135] アプタマー10：G l i _ 3 9 5 B R 8 m 2（配列番号10）

GGAAACGCCGCCTAGATCATTGAAAACGTTGTTACCTCACCTATTATCTATTGACATCCTCAAGTTC
TGCGAAATG

アプタマー11：G l i _ 3 9 5 B R 8 m 2 s 5 1（配列番号11）

GGAAACGCCGCCTAGATCATTGAAAACGTTGTTACCTCACCTATTATCTA

[0136] アプタマー10および11の推定二次構造を、図8（B）に示す。ただし、これには限定されない。

[0137] アプタマー10および11を使用し、試料として、前記グリアジン試料を使用し、前記試料におけるグリアジンの濃度を、100、200、400、および800 nmol/Lとした以外は同様にして、結合性の解析を行い、

前記試料のインジェクション開始後の所定時間におけるシグナル強度を求めた。

[0138] この結果を図10に示す。図10(A)および(B)は、それぞれ、グリアジンに対するアプタマー10および11の結合性を示すグラフであり、横軸は、前記試料のインジェクション開始後の経過時間(秒)を示し、縦軸は、シグナル強度(RU)を示す。図10(A)および(B)に示すように、アプタマー10およびその小型化配列であるアプタマー11は、グリアジンの濃度が増加するにつれて、シグナル強度が増加した。

[0139] さらに、前記図10のSPR解析の結果から、動態パラメータを算出した。この結果、アプタマー10および11は、グリアジンに対する解離定数(KD)が、それぞれ、 $132 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 、および $102 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ であり、優れた結合性であることがわかった。

[0140] [実施例5]

本発明のアプタマーについて、加熱したグリアジンに対する結合性を、SPR解析により確認した。

[0141] 試料として、加熱グリアジン試料を使用した以外は実施例4と同様にして、結合性の解析を行い、前記試料のインジェクション開始後の所定時間におけるシグナル強度を求めた。前記加熱グリアジン試料は、前記グリアジン試料を、95℃、10分の条件で加熱処理し、 $12000 \times g$ で10分遠心した後、上清を回収することにより調製した。

[0142] この結果を図11および12に示す。図11(A)および(B)は、加熱グリアジンに対するアプタマー8および9の結合性を示すグラフであり、横軸は、前記試料のインジェクション開始後の経過時間(秒)を示し、縦軸は、シグナル強度(RU)を示す。図11(A)および(B)に示すように、アプタマー8およびその小型化配列であるアプタマー9は、加熱グリアジンの濃度が増加するにつれて、シグナル強度が増加した。

[0143] 図12(A)および(B)は、加熱グリアジンに対するアプタマー10および11の結合性を示すグラフであり、横軸は、前記試料のインジェクショ

ン開始後の経過時間（秒）を示し、縦軸は、シグナル強度（RU）を示す。図12（A）および（B）に示すように、アプタマー10およびその小型化配列であるアプタマー11は、加熱グリアジンの濃度が増加するにつれて、シグナル強度が増加した。

[0144] さらに、前記図11および12のSPR解析の結果から、動態パラメータを算出した。この結果、アプタマー8～11は、加熱グリアジンに対する解離定数（KD）が、それぞれ、 $19.7 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $21.7 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $134 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、および $99.5 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ であり、優れた結合性であることがわかった。

[0145] [実施例6]

本発明のアプタマーについて、グルテンおよび加熱グルテンに対する結合性を、SPR解析により確認した。

[0146] アプタマーとして、アプタマー8～11を使用し、試料として、100 ppmの前記グルテン試料、および加熱グルテン試料を使用した以外は実施例1と同様にして、結合性の解析を行った。前記加熱グルテン試料は、前記グルテン試料を、95℃、10分の条件で加熱処理し、 $12000 \times g$ で10分遠心した後、上清を回収することにより調製した。また、前記アプタマーの交差反応の確認のため、前記卵試料、前記牛乳試料、および前記生ピーナッツ試料を使用した以外は同様にして、結合性の解析を行った。

[0147] この結果を図13に示す。図13は、グルテンおよび加熱グルテンに対するアプタマー8～11の結合性を示すグラフであり、横軸は、アプタマーの種類を示し、縦軸は、シグナル強度（RU）を示す。横軸において、左から順に、アプタマー8、アプタマー10、アプタマー9、およびアプタマー11を示す。各グラフは、左から順に、グルテン試料、加熱グルテン試料、卵試料、牛乳試料、および生ピーナッツ試料を示す。図13に示すように、アプタマー8～11は、グルテンおよび加熱グルテンに対して、結合性を示した。一方、アプタマー8～11は、卵試料、牛乳試料、および生ピーナッツ試料に対しては、シグナル強度が0.05以下であり、結合性を示さなかつ

た。

[0148] 以上の結果から、本発明のアプタマーは、グルテンおよび加熱グルテンに特異的に結合し、それを測定により検出できること、および、本発明のアプタマーによれば、発光の強弱によって、試料中のグルテンおよび加熱グルテンの量を分析できることがわかった。

[0149] 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。

[0150] この出願は、2016年11月24に出願された日本出願特願2016-227865を基礎とする優先権を主張し、その開示の全てをここに取り込む。

産業上の利用可能性

[0151] 本発明の核酸分子は、グルテンまたはグリアジンに結合可能である。このため、本発明の核酸分子によれば、試料中のアレルゲンとの結合の有無によって、グルテンやグリアジンを検出できる。このため、本発明の核酸分子は、例えば、食品製造、食品管理、食品の流通等の分野において、例えば、小麦等の穀物に由来するアレルゲンの検出に、極めて有用なツールといえる。

請求の範囲

[請求項1] 下記（a）または（b）のいずれかのポリヌクレオチドを含むことを特徴とする、グルテンおよびグリアジンの少なくとも一方に結合する核酸分子。

（a）配列番号 1、8、もしくは 10 の塩基配列または配列番号 1、8、もしくは 10 の塩基配列の部分配列からなるポリヌクレオチド

（b）前記（a）の塩基配列に対して、90%以上の同一性を有する塩基配列からなり、グルテンおよびグリアジンの少なくとも一方に結合するポリヌクレオチド

G l u 3 9 2 B R 8 m 4 （配列番号 1）

GGTATGGAGGCAAGTCCCAATTCGIGCAGAGAAACGTGTCTGTATTTATTAATCGTTTCAGC
CAGACAGGGTTTATG

G l i 9 5 _ 3 9 5 T R 8 m 1 （配列番号 8）

GGAAACGCCGCCTAGATCATTGCGTCCTCCCTGGTGGGGATTGGCGAAAATTGACATCCTC
AAGTTCCTGCGAAATG

G l i _ 3 9 5 B R 8 m 2 （配列番号 10）

GGAAACGCCGCCTAGATCATTGAAAACGTGTGTACCTCACCTATTATCTATTGACATCCTC
AAGTTCCTGCGAAATG

[請求項2] 前記配列番号 1、8、または 10 の塩基配列の部分配列が、それぞれ、配列番号 2～7 からなる群から選択された少なくとも一つの塩基配列、配列番号 9 の塩基配列、または配列番号 11 の塩基配列である、請求項 1 記載の核酸分子。

G l u 3 9 2 B R 8 m 4 _ s 5 9 A （配列番号 2）

GGTATGGAGGCAAGTCCCAATTCGIGCAGAGAAACGTGTCTGTATTTATTAATCGTTTC

G l u 3 9 2 B R 8 m 4 _ s 5 1 （配列番号 3）

GGCAAGTCCCAATTCGIGCAGAGAAACGTGTCTGTATTTATTAATCGTTTC

G l u 3 9 2 B R 8 m 4 _ s 3 8 （配列番号 4）

TCGTGCAGAGAAACGTGTCTGTATTTATTAATCGTTTC

G l u 3 9 2 B R 8 m 4 _ _ s 6 7 (配列番号 5)

GGTATGGAGGCAAGTCCCAATTCGTGCAGAGAAACGTGCTGTATTTATTAATCGTTTCAGC
CAGAC

G l u 3 9 2 B R 8 m 4 _ _ s 5 9 B (配列番号 6)

GGCAAGTCCCAATTCGTGCAGAGAAACGTGCTGTATTTATTAATCGTTTCAGCCAGAC

G l u 3 9 2 B R 8 m 4 _ _ s 4 6 (配列番号 7)

TCGTGCAGAGAAACGTGCTGTATTTATTAATCGTTTCAGCCAGAC

G l i 9 5 _ _ 3 9 5 T R 8 m 1 s 5 0 (配列番号 9)

CGCCTAGATCATTTCGTGCTCCTCCCTGGTGGGGATTGGCGAAAAATTGACAT

G l i _ _ 3 9 5 B R 8 m 2 s 5 1 (配列番号 11)

GGAAACGCCGCCTAGATCATTTCGAAACGTGTGTACCTCACCTATTATCTA

[請求項3] 前記ポリヌクレオチドにおいて、少なくとも1個のチミンが、修飾塩基であり、前記チミンの修飾塩基が、修飾チミンおよび修飾ウラシルの少なくとも一方である、請求項1または2記載の核酸分子。

[請求項4] 前記ポリヌクレオチドにおいて、チミンの全塩基数のうち、20分の1以上が、修飾塩基であり、前記チミンの修飾塩基が、修飾チミンおよび修飾ウラシルの少なくとも一方である、請求項1から3のいずれか一項に記載の核酸分子。

[請求項5] 前記ポリヌクレオチドにおいて、前記各塩基配列における下線部で示されるチミンが、修飾塩基であり、前記チミンの修飾塩基が、修飾チミンおよび修飾ウラシルの少なくとも一方である、請求項1から4のいずれか一項に記載の核酸分子。

[請求項6] 前記ポリヌクレオチドにおいて、少なくとも1個のシトシンが、修飾塩基である、請求項1から5のいずれか一項に記載の核酸分子。

[請求項7] 前記ポリヌクレオチドにおいて、シトシンの全塩基数のうち、20分の1以上が、修飾塩基である、請求項1から6のいずれか一項に記載の核酸分子。

[請求項8] 前記ポリヌクレオチドにおいて、前記各塩基配列における下線部で示

されるシトシンが、修飾塩基である、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の核酸分子。

[請求項9] 前記ポリヌクレオチドが、DNAである、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の核酸分子。

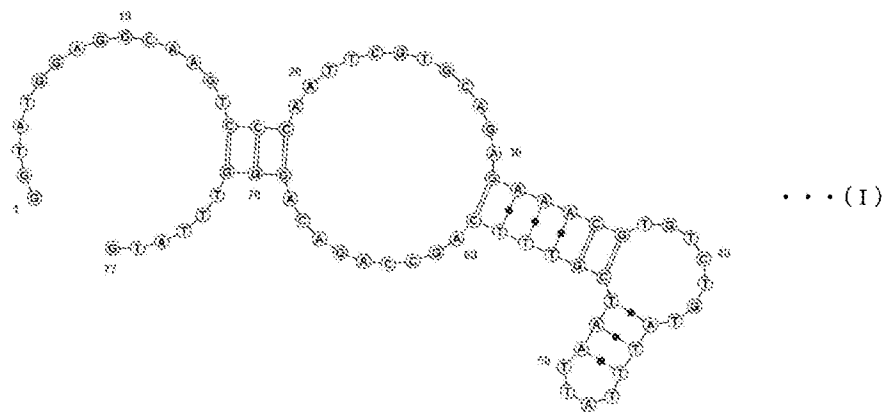
[請求項10] 下記（e）のポリヌクレオチドを含むことを特徴とする、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の核酸分子。

（e）前記（a）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、それぞれ、配列番号 2～7 のいずれかの塩基配列、配列番号 9 の塩基配列、または配列番号 11 の塩基配列を含む、グルテンおよびグリアジンの少なくとも一方に結合するポリヌクレオチド

[請求項11] 下記（f）のポリヌクレオチドを含むことを特徴とする、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の核酸分子。

（f）配列番号 1～11 からなる群から選択された少なくとも一つ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、それぞれ、式（I）～（XI）で表される二次構造を形成可能である、グルテンおよびグリアジンの少なくとも一方に結合するポリヌクレオチド

[化1]



[化2]



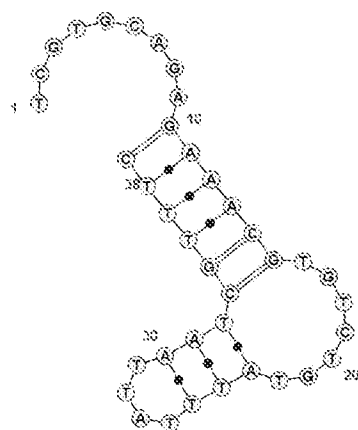
• • • (I I)

[化3]



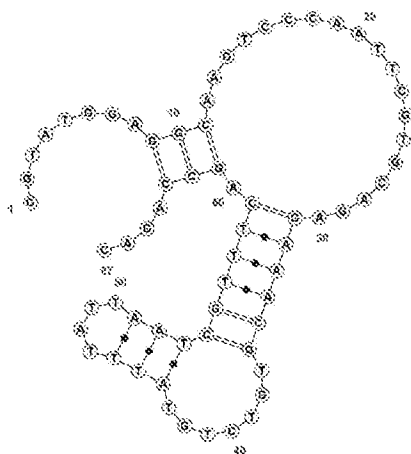
• • • (I I I)

[化4]



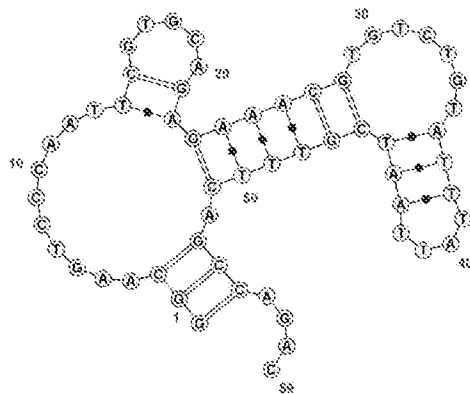
• • • (I V)

[化5]



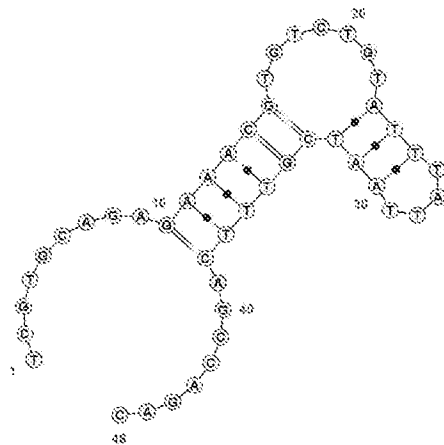
• • • (V)

[化6]



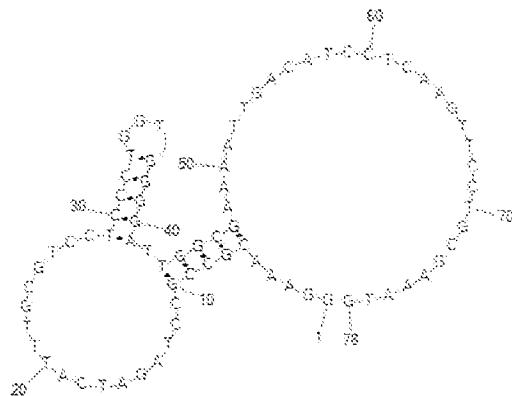
... (VI)

[化7]



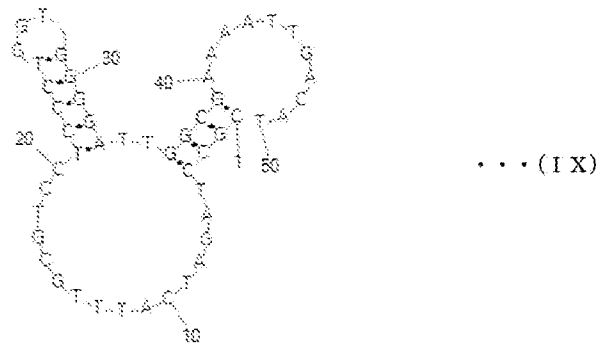
... (VII)

[化8]

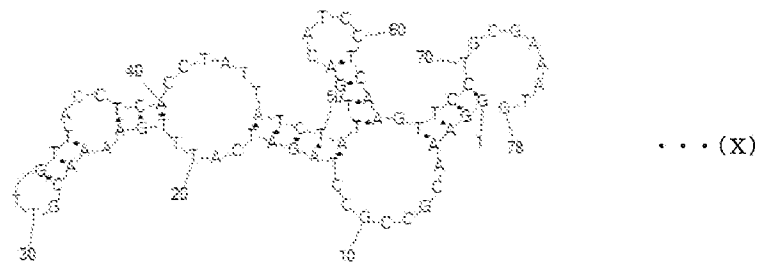


... (VIII)

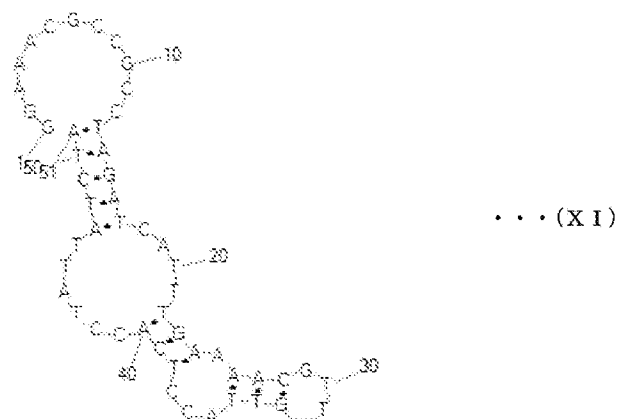
[化9]



[化10]



[化11]

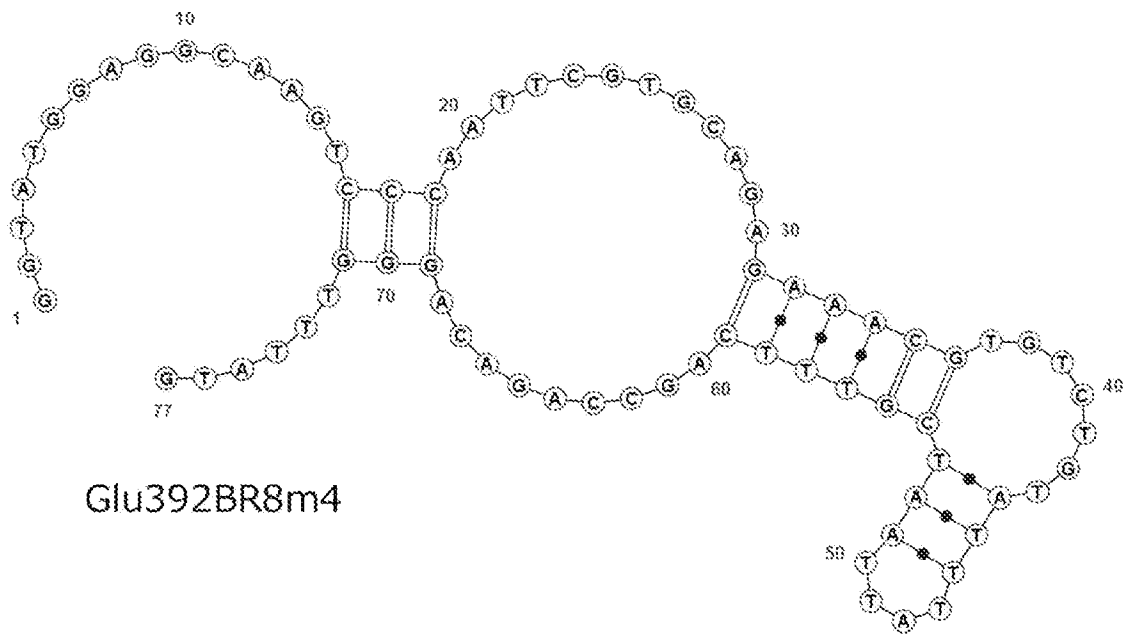


[請求項12] 請求項1から11のいずれか一項に記載の核酸分子を含むことを特徴

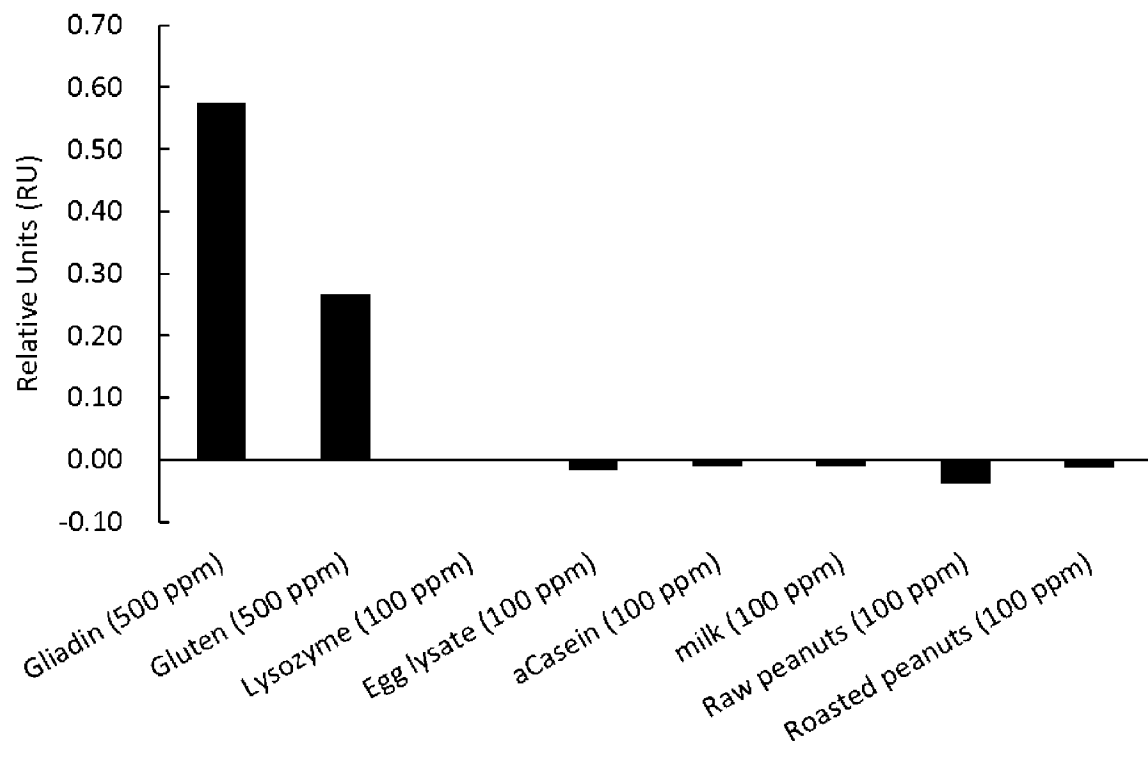
とする、グルテンまたはグリアジンの検出試薬。

- [請求項13] さらに、標識物質を有し、
前記標識物質が、前記核酸分子に結合されている、請求項 1 2 記載の
検出試薬。
- [請求項14] 前記標識物質が、酵素である、請求項 1 3 記載の検出試薬。
- [請求項15] 前記酵素が、ルシフェラーゼである、請求項 1 4 記載の検出試薬。
- [請求項16] 請求項 1 から 1 1 のいずれか一項に記載の核酸分子、または請求項 1
2 から 1 5 のいずれか一項に記載の検出試薬と、試料とを接触させ、
前記試料中のグルテンまたはグリアジンと、前記核酸分子または前記
検出試薬との複合体を形成させる工程、および、
前記複合体を検出する工程を含むことを特徴とする、グルテンまたは
グリアジンの検出方法。
- [請求項17] 前記検出が、定性分析または定量分析である、請求項 1 6 記載の検出
方法。

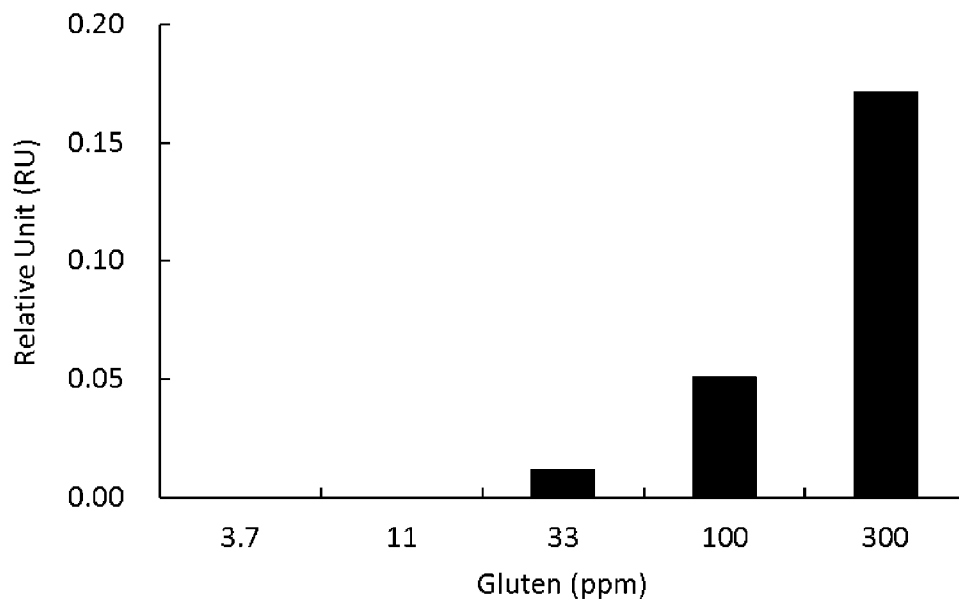
[図1]



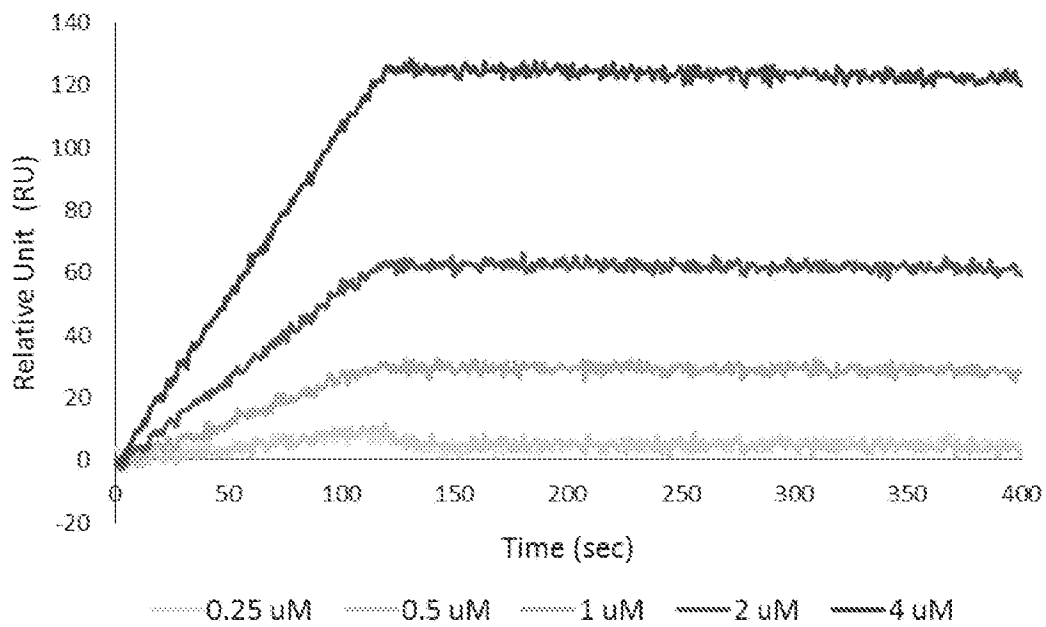
[図2]



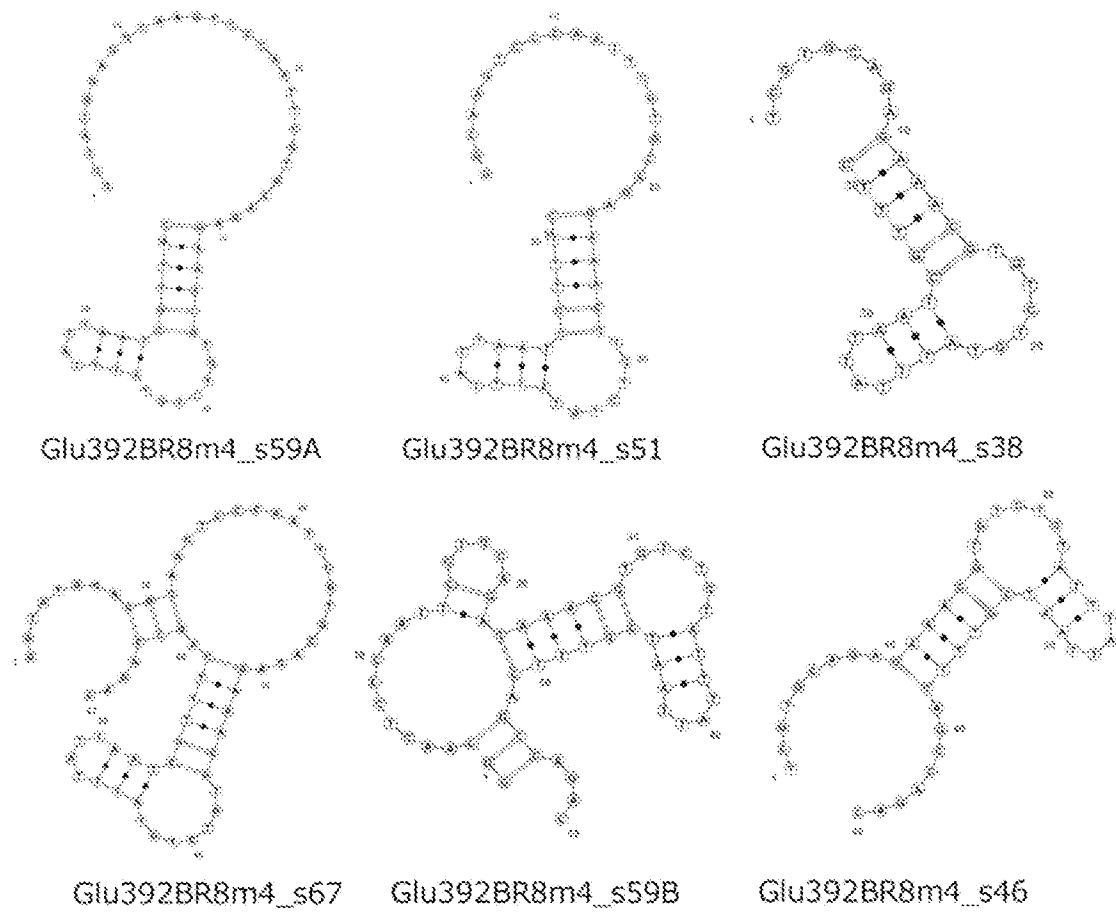
[図3]



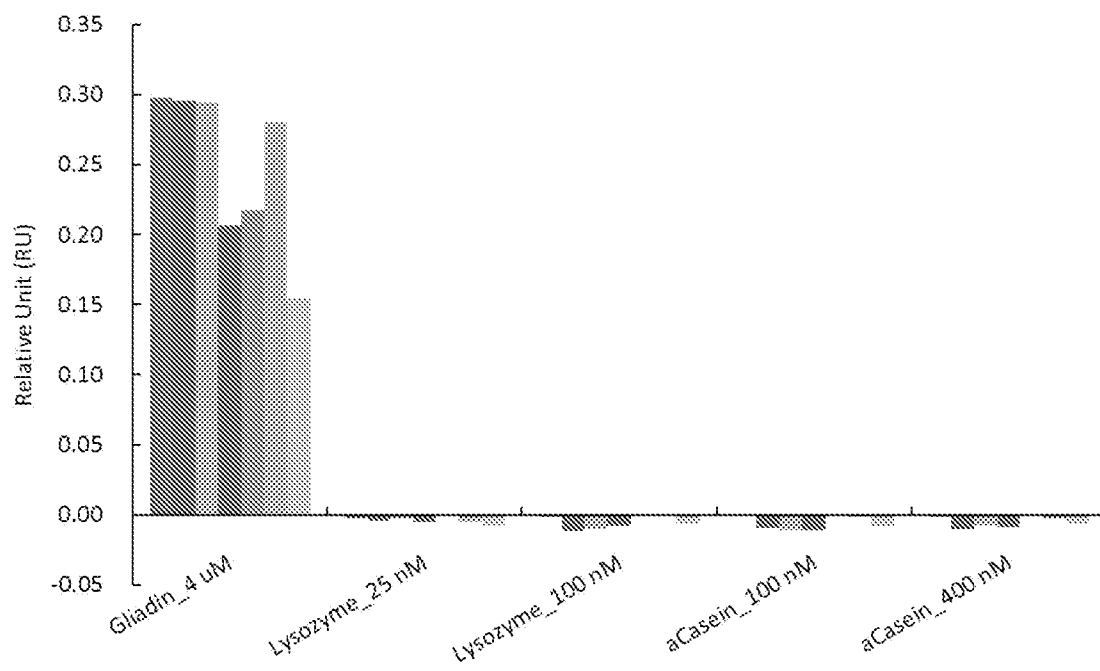
[図4]



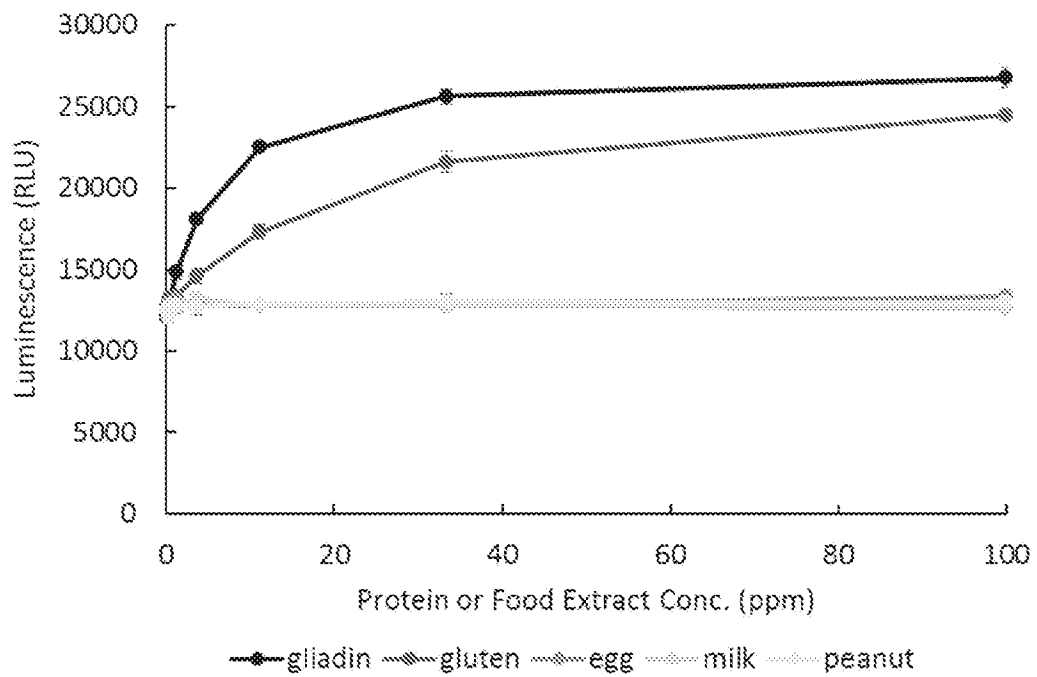
[図5]



[図6]



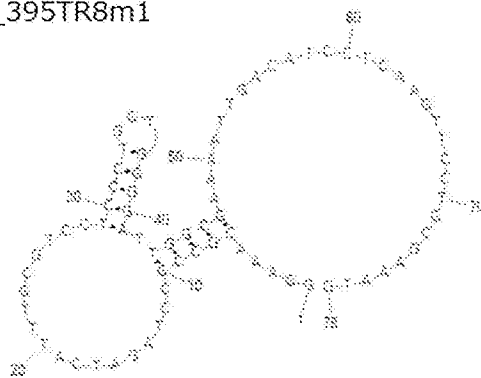
[図7]



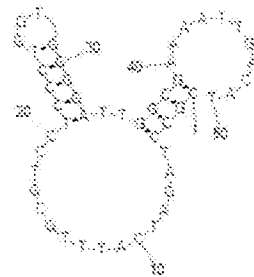
[図8]

(A)

Gli95_395TR8m1

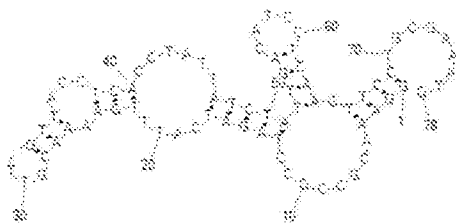


Gli95_395TR8m1s50

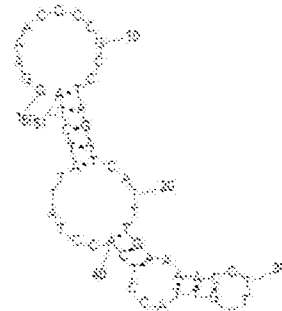


(B)

Gli_395BR8m2

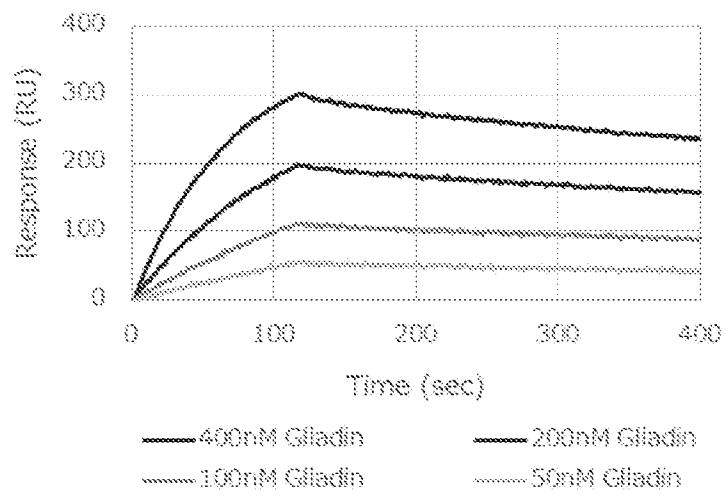


Gli_395BR8m2s51

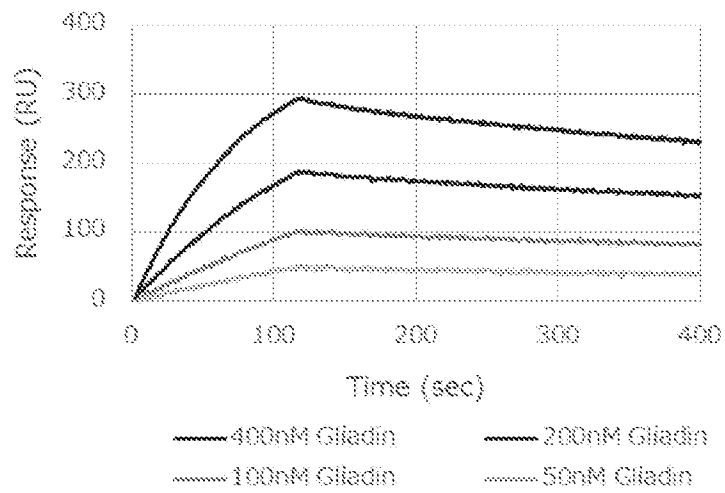


[図9]

(A)

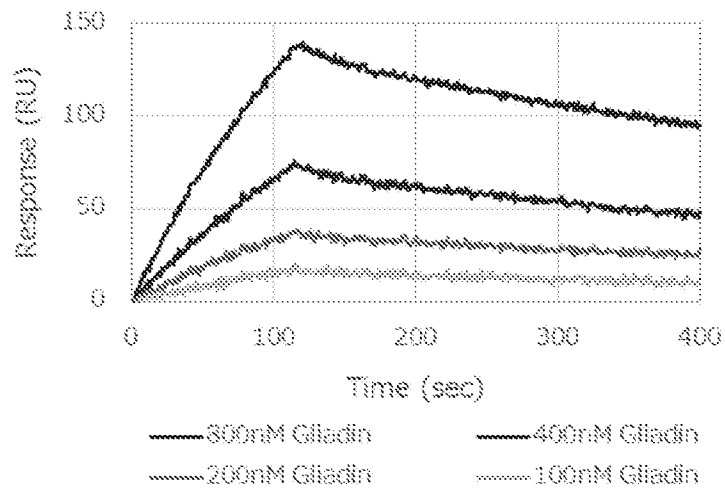


(B)

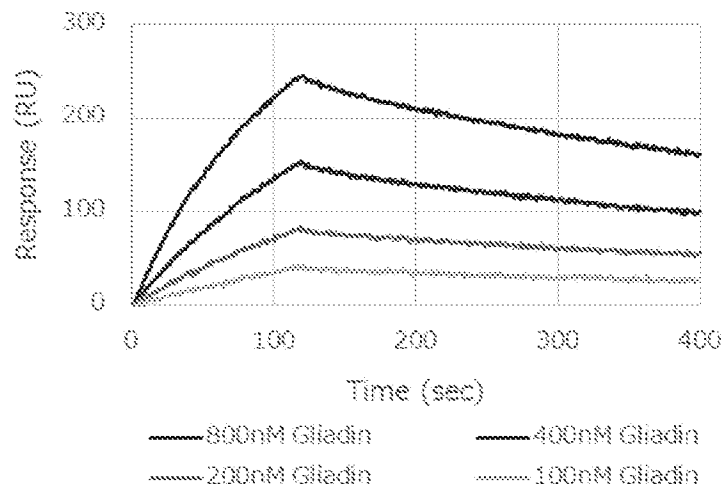


[図10]

(A)

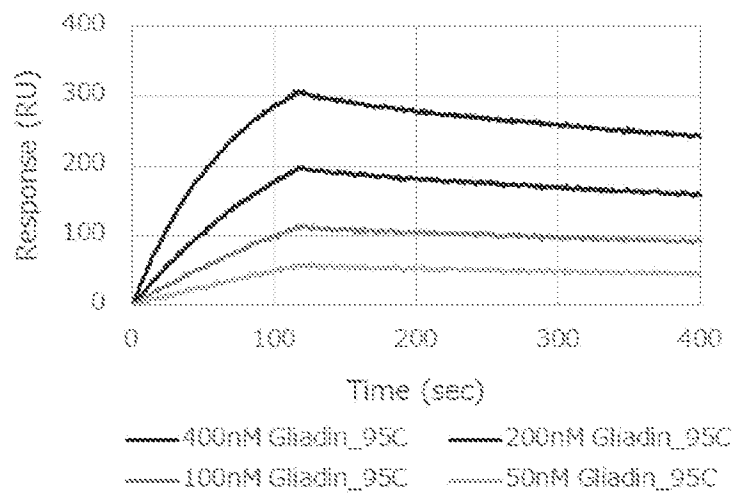


(B)

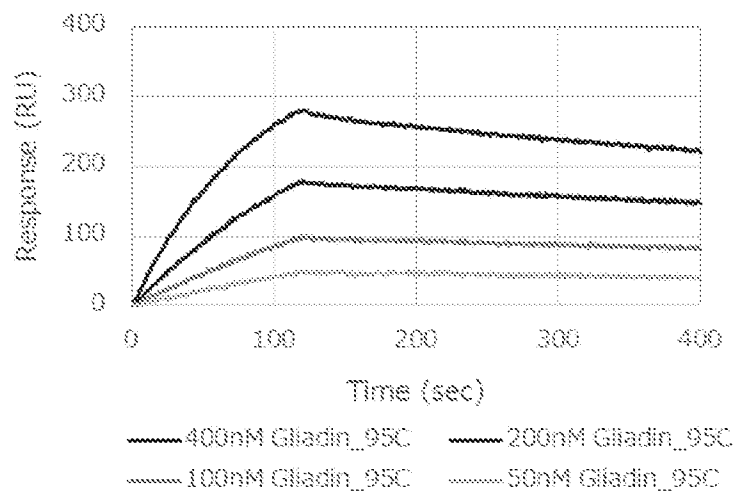


[図11]

(A)

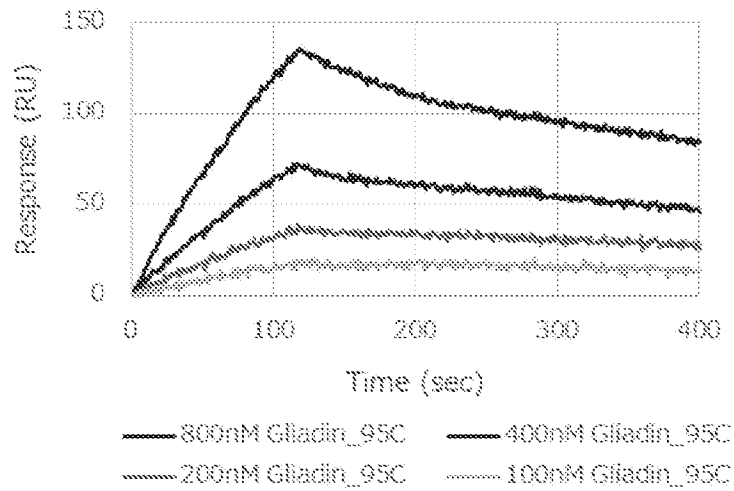


(B)

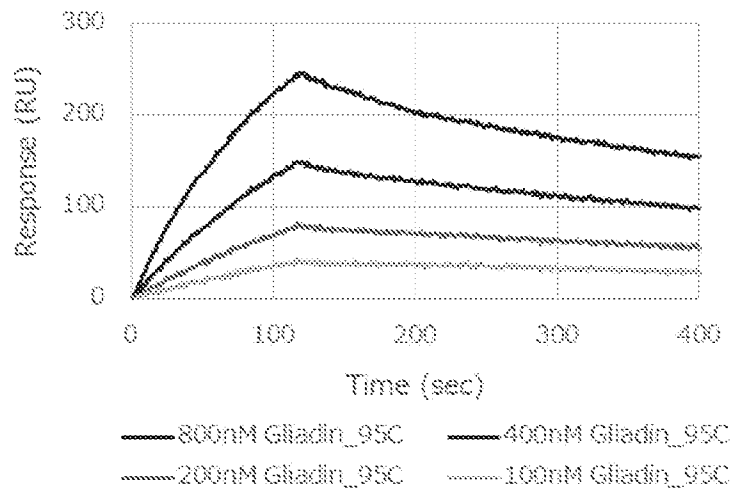


[図12]

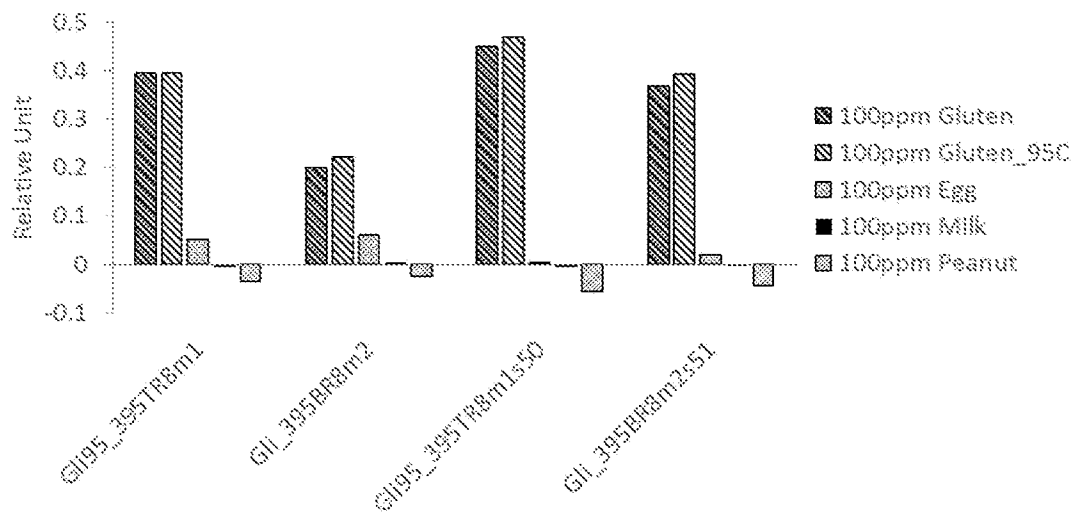
(A)



(B)



[図13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/042147

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. 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)

Int.Cl. C12N15/115, C12Q1/68

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2017
Registered utility model specifications of Japan	1996-2017
Published registered utility model applications of Japan	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/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), 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.
Y	AMAYA-GONZALEZ, S. et al., Aptamer binding to celiac disease-triggering hydrophobic proteins: a sensitive gluten detection approach, Anal. Chem., 2014, vol. 86, pp. 2733-2739, abstracts, experimental methods, fig. 1-3, tables 1-5	1-17
Y	WO 2013/178844 A1 (UNIVERSIDAD DE OVIEDO) 05 December 2013, claims, examples (Family: none)	1-17



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

26 December 2017

Date of mailing of the international search report

16 January 2018

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/JP2017/042147

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PINTO, A. et al., Label-free detection of gliadin food allergen mediated by real-time apta-PCR, Anal. Bioanal. Chem., 2014, vol. 406, pp. 515-524, abstracts, experimental approaches, fig. 1-6	1-17
Y	WO 2012/113072 A1 (NEOVENTURES BIOTECHNOLOGY INC.) 30 August 2012, claims, examples (Family: none)	1-17
Y	WO 2015/045536 A1 (NEC SOLUTION INNOVATORS, LTD.) 02 April 2015, claims, examples, paragraphs [0043]-[0065] (Family: none)	1-17
Y	WO 2015/191419 A1 (3M INNOVATIVE PROPERTIES COMPANY) 17 December 2015, page 6, lines 9-20 & US 2017/0128935 A1 & EP 3151966 A2 & CN 106662529 A	1-17
P, X	WO 2017/085767 A1 (NEC SOLUTION INNOVATORS, LTD.) 26 May 2017, claims, examples, paragraphs [0042]-[0055], [0071], [0081] (Family: none)	1-17

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/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), 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
Y	AMAYA-GONZALEZ S et al., Aptamer Binding to Celiac Disease-Triggering Hydrophobic Proteins: A Sensitive Gluten Detection Approach, Anal. Chem., 2014, Vol.86, p.2733-2739, 要約、実験方法、図1-3、表1-5	1-17
Y	WO 2013/178844 A1 (UNIVERSIDAD DE OVIEDO) 2013.12.05, 請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-17

☒ 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

26.12.2017

国際調査報告の発送日

16.01.2018

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)

北田 祐介

4 B

4868

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	PINTO A et al., Label-free detection of gliadin food allergen mediated by real-time apta-PCR, Anal. Bioanal. Chem., 2014, Vol.406, p.515-524, 要約、実験手法、図1-6	1-17
Y	WO 2012/113072 A1 (NEOVENTURES BIOTECHNOLOGY INC.) 2012.08.30, 請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-17
Y	WO 2015/045536 A1 (NECソリューションイノベータ株式会社) 2015.04.02, 請求の範囲、実施例、[0043] - [0065] (ファミリーなし)	1-17
Y	WO 2015/191419 A1 (3M INNOVATIVE PROPERTIES COMPANY) 2015.12.17, 6 ページ 9 - 20 行 & US 2017/0128935 A1 & EP 3151966 A2 & CN 106662529 A	1-17
P, X	WO 2017/085767 A1 (NECソリューションイノベータ株式会社) 2017.05.26, 請求の範囲、実施例、[0042] - [0055]、[0071]、[0081] (ファミリーなし)	1-17