

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015 年 4 月 2 日(02.04.2015)



(10) 国際公開番号

WO 2015/045536 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/JP2014/067058
- (22) 国際出願日: 2014 年 6 月 26 日(26.06.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-197906 2013 年 9 月 25 日(25.09.2013) JP
- (71) 出願人: NECソリューションイノベータ株式会社(NEC SOLUTION INNOVATORS, LTD.) [JP/JP]; 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目 1 8 番 7 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 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). 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). 白鳥行大(SHIRATORI Ikuo); 〒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). 古市 真木雄(FURUICHI Makio); 〒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).

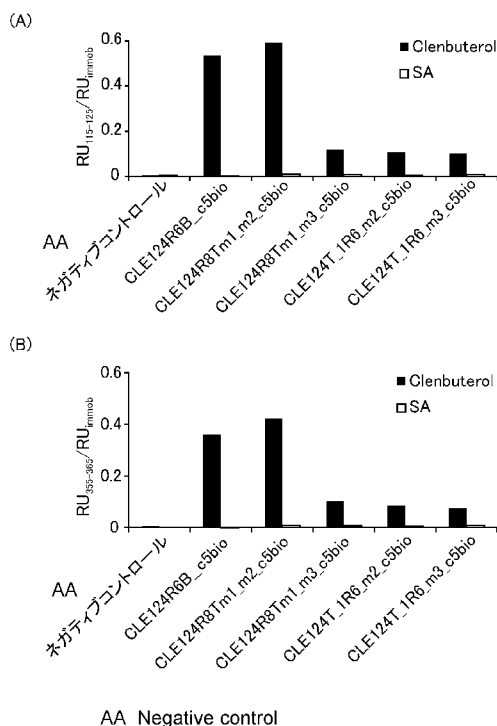
(74) 代理人: 辻丸 光一郎, 外(TSUJIMARU Koichiro et al.); 〒6008813 京都府京都市下京区中堂寺南町 1 3 4 京都リサーチパーク 1 号館 3 0 1 号室 Kyoto (JP).

(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, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,

[続葉有]

(54) Title: NUCLEIC ACID MOLECULE WHICH BINDS TO CLENBUTEROL, AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: クレンプテロールに結合する核酸分子およびその用途



(57) Abstract: Provided is a nucleic acid molecule which can be used to detect clenbuterol. This nucleic acid molecule which binds to clenbuterol includes at least one polynucleotide selected from the group consisting of: (a) a polynucleotide comprising at least any one of the base sequences represented by SEQ ID NOs: 1-5; (b) a polynucleotide which binds to clenbuterol, and which comprises a base sequence at least 80% identical to the base sequence of (a); and (c) a polynucleotide which binds to clenbuterol, and which comprises a base sequence complementary to a polynucleotide that hybridizes, under stringent conditions, with a polynucleotide comprising the base sequence of (a). The at least one polynucleotide includes at least one modified base.

(57) 要約: クレンプテロールの検出に利用可能な核酸分子を提供する。下記 (a) ~ (c) 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み、前記ポリヌクレオチドが、少なくとも一つの修飾塩基を含む核酸分子を、クレンプテロールに結合する核酸分子とする。(a) 配列番号 1 ~ 5 の塩基配列の少なくともいずれか 1 つの塩基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、80%以上の同一性を有する塩基配列からなり、クレンプテロールに結合するポリヌクレオチド (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ェ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、クレンプテロールに結合するポリヌクレオチド

WO 2015/045536 A1



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.

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).

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (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,

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：

クレンプテロール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、クレンプテロール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] クレンプテロールは、 β 2 アドレナリン受容体に対する作動薬であり、平滑筋の弛緩作用があることから、動物の呼吸器疾患の治療薬および子宮筋弛緩薬として承認されている。他方、クレンプテロールは、家畜に投与することで肉量を増やせることから、家畜の飼育において、違法に使用されることがある。この場合、投与されたクレンプテロールは、前記家畜の肉や内臓等に蓄積されるため、前記家畜の肉や内臓等を摂取したヒトが、クレンプテロールによる中毒症状を起こすことが報告されている。

[0003] クレンプテロールの検出には、液体クロマトグラフ質量分析機を用いた方法が知られているが（非特許文献 1）、例えば、家畜から採取したサンプルについて前処理を行う必要があるため、手間がかかるという問題がある。また、抗体を用いてクレンプテロールを検出する方法も考えられるが、クレンプテロールは低分子化合物であるため、抗体の取得が困難という問題がある。また、抗体が取得できても、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（特許文献 1）。

[0004] このような問題から、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、これまでにクレンプテロールに対する核酸分子は報告されていないことから、クレンプテロールの検出に利用可能な核酸分子の提供が求められている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開2013/065314号

非特許文献

[0006] 非特許文献1：C. Crescenzi, S. Bayoudh, P. A. G. Cormack, T. Klein, and K. Ensing, 「Determination of Clenbuterol in Bovine Liver by Combining Matrix Solid-Phase Dispersion and Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography/Electrospray Ion Trap Multiple-Stage Mass Spectrometry」、Anal. Chem.、2001、73、2171-2177頁

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] そこで、本発明の目的は、クレンプテロールの検出に利用可能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

[0008] 前記課題を解決するために、本発明の核酸分子は、下記（a）～（c）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み、前記ポリヌクレオチドが、少なくとも1個の修飾塩基を含むことを特徴とする。

（a）配列番号1～5の塩基配列の少なくともいずれか1つの塩基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、80%以上の同一性を有する塩基配列からなり、クレンプテロールに結合するポリヌクレオチド

（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エ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、クレンプテロールに結合するポリヌクレオチド

[0009] 本発明のクレンプテロール検出試薬は、前記本発明の核酸分子を含むことを特徴とする。

[0010] 本発明のクレンプテロール検出キットは、前記本発明の核酸分子を含むこ

とを特徴とする。

[0011] 本発明のクレンプテロール検出方法は、前記本発明の核酸分子とサンプルとを接触させ、前記サンプル中のクレンプテロールと前記核酸分子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

[0012] 本発明の核酸分子は、クレンプテロールに結合可能である。このため、本発明の核酸分子によれば、例えば、クレンプテロールとの結合の有無によって、クレンプテロールを検出できる。したがって、本発明の核酸分子は、例えば、食品管理、公衆衛生等の分野におけるクレンプテロールの検出に、極めて有用なツールといえる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図1は、本発明の実施例1において、アプタマーとクレンプテロールとの結合能を示すグラフである。

[図2]図2は、本発明の実施例2において、アプタマーとクレンプテロール、サルブタモール、ラクトパミンおよびメタミドホスとの結合能を示すグラフである。

[図3]図3は、本発明の実施例3において、クレンプテロールによる阻害率を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0014] 本発明の核酸分子は、例えば、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、前記修飾塩基であり、前記修飾塩基が、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。

[0015] 本発明の核酸分子は、例えば、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、前記修飾塩基であり、前記修飾塩基が、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。

[0016] 本発明の核酸分子は、例えば、前記ポリヌクレオチドにおいて、全チミンが、前記修飾塩基であり、前記修飾塩基が、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。

[0017] 本発明の核酸分子は、例えば、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、前記修飾塩基であり、前記修飾塩基が、修飾シトシンである。

[0018] 本発明の核酸分子は、例えば、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、前記修飾塩基であり、前記修飾塩基が、修飾シトシンである。

[0019] 本発明の核酸分子は、例えば、前記ポリヌクレオチドにおいて、全シトシンが、前記修飾塩基であり、前記修飾塩基が、修飾シトシンである。

[0020] 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。

[0021] <核酸分子>

本発明の核酸分子は、前述のように、下記(a)～(c)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み、前記ポリヌクレオチドが、少なくとも1個の修飾塩基を含むことを特徴とするクレンブテロールに結合する核酸分子である。

(a) 配列番号1～5の塩基配列の少なくともいずれか1つの塩基配列からなるポリヌクレオチド

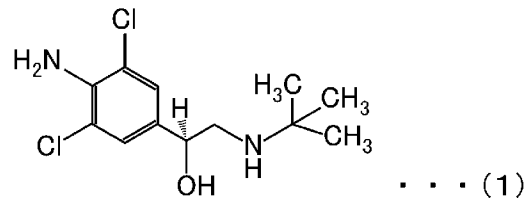
(b) 前記(a)の塩基配列に対して、80%以上の同一性を有する塩基配列からなり、クレンブテロールに結合するポリヌクレオチド

(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ェ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、クレンブテロールに結合するポリヌクレオチド

[0022] 本発明において、「クレンブテロールに結合する」とは、例えば、前記クレンブテロールに対する結合能を有している、または、前記クレンブテロール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前記クレンブテロールとの結合は、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、Protein (商品名 BioRad社)が使用できる。

[0023] クレンブテロールは、下記式（１）で表わされる。前記クレンブテロールは、例えば、異性体、塩、水和物、溶媒和物等の誘導体でもよい。以下、前記クレンブテロールに関する記載は、前記誘導体に援用できる。

[化1]



[0024] 本発明の核酸分子において、前記（a）～（c）の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。本発明の核酸分子は、例えば、以下、DNAアプタマーともいう。

[0025] 本発明の核酸分子は、例えば、前記（a）～（c）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）～（c）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。

[0026] 前記（a）のポリヌクレオチドは、前記配列番号1～5の塩基配列の少なくともいずれか1つの塩基配列からなるポリヌクレオチドである。

[0027] 配列番号1

5' -GGTAAGTAGCCCTCCCTGAAATGACAGAAAGTGTGGATTTTATTTGGATCATACACTAGCACG
GCAATCTGGTTTAAG-3'

配列番号2

5' -GGTAAGTAGCCCTCCCTGAAATGTGACAGCACATCATTTGAGTTGGCATGTCTCACTAGCACG
GCAATCTGGTTTAAG-3'

配列番号 3

5' -GGTAAGTAGCCCTCCCTGAAATGTATGCCGGTCAAAGCATATTTCCATATTTGCACTAGCACG
GCAATCTGGTTTAAG-3'

配列番号 4

5' -GGTAAGTAGCCCTCCCTGAAATGGGACGCACTCTATTCTAATATCCAGCACTAGCACGGCAAT
CTGGTTTAAG-3'

配列番号 5

5' -GGTAAGTAGCCCTCCCTGAAATGGCAGGTAGCAACTCTATTCTAATATACAGACACTAGCACG
GCAATCTGGTTTAAG-3'

[0028] 配列番号 4 および 5 において、例えば、下記配列番号 6 の塩基配列が、保存領域である。

[0029] 配列番号 6

5' -ctctatttctaatat-3'

[0030] 前記 (b) において、「同一性」は、例えば、前記 (b) のポリヌクレオチドが、クレンプテロール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）。

[0031] 前記 (c) 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 Man

ual 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。

[0032] 前記(c)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。「中ストリンジें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、42℃の条件である。「高ストリンジें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、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。「ストリンジेंट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。

[0033] 本発明の核酸分子は、例えば、下記(d)のポリヌクレオチドを含み、前記ポリヌクレオチドが、少なくとも1個の修飾塩基を含む、クレンブテロールに結合する核酸分子でもよい。

(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、クレンブテロールに結合するポリヌクレオチド

[0034] 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、クレンブテロール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個または2個である。前記（d）のポリヌクレオチドの構成単位は、例えば、前述した他のポリヌクレオチドと同じである。

[0035] 前記（b）、（c）および（d）のポリヌクレオチドは、例えば、前記保存領域を有することが好ましい。

[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、具体的には、例えば、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、73塩基長または78塩基長であり、その上限は、例えば、91塩基長、73塩基長または78塩基長である。

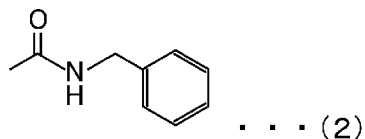
[0042] 前記ヌクレオチド残基は、例えば、デオキシリボヌクレオチド残基およびリボヌクレオチド残基があげられる。本発明の核酸分子は、例えば、デオキシリボヌクレオチド残基のみから構成されるDNA、1もしくは数個のリボヌクレオチド残基を含むDNA等があげられる。後者の場合、「1もしくは

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、1～9 1個、1～7 8個または1～7 3個、1～3 0個、1～1 5個、1～7個、1～3個、1～2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）。

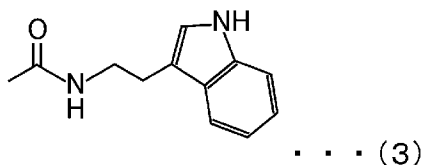
[0043] 前記ポリヌクレオチドは、少なくとも1個の修飾塩基を含む。前記修飾塩基は、特に制限されず、例えば、天然塩基（非人工塩基）が修飾された塩基があげられ、前記天然塩基と同様の機能を有することが好ましい。前記天然塩基は、特に制限されず、例えば、プリン骨格を有するプリン塩基、ピリミジン骨格を有するピリミジン塩基等があげられる。前記プリン塩基は、特に制限されず、例えば、アデニン（a）、グアニン（g）があげられる。前記ピリミジン塩基は、特に制限されず、例えば、シトシン（c）、チミン（t）、ウラシル（u）等があげられる。前記塩基の修飾部位は、特に制限されない。前記塩基がプリン塩基の場合、前記プリン塩基の修飾部位は、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。

[0044] 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（2）のベンジルアミノカルボニル基（benzylaminocarbonyl）、下記式（3）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2]



[化3]



[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。

[0051] 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。

い。

[0052] 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、1個以上であればよく、その上限は、特に制限されない。前記修飾塩基は、前記ポリヌクレオチドにおいて、例えば、1～91個、1～78個または1～73個、1～70個、1～40個、1～30個、1～20個、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、1～91個、1～78個または1～73個であり、具体的には、例えば、前述の範囲と同様である。

[0053] 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、 $1/40$ 以上、 $1/20$ 以上、 $1/10$ 以上、 $1/4$ 以上、 $1/3$ 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。

[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、1個以上であればよく、その上限は、特に制限されない。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、1～40個、5～35個、8～30個、10～25個、13～22個、17個であり、また、全てのチミンが、前記修飾チミンでもよい。

[0055] 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、 $1/40$ 以上、 $1/20$ 以上、 $1/10$ 以上、 $1/4$ 以上、 $1/3$ 以上である。

[0056] 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、1個以上であればよく、その上限は、特に制限されない。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、1～40個、5～35個、8～30個、10～25個、13～22個、17個であり、また、全てのチミンが、前記修飾ウラシルでもよい。

[0057] 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、 $1/40$ 以上、 $1/20$ 以上、 $1/10$ 以上、 $1/4$ 以上、 $1/3$ 以上である。

[0058] 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。

[0059] 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、1個以上であればよく、その上限は、特に制限されない。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、1～40個、5～30個、5～20個、8～19個、8～13個、12個であり、また、全てのシトシンが、前記修飾シトシンでもよい。

[0060] 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、 $1/40$ 以上、1

／20以上、1／10以上、1／4以上、1／3以上である。

[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、1～91個、1～78個または1～73個、1～80個、1～60個、1～50個、1～40個、1～30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、1～78個または1～73個、具体的には、例えば、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、1～91個、1～78個または1～73個、好ましくは1～80個、より好ましくは1～60個、さらに好ましくは1～50個、特に好ましくは1～40個、最も好ましくは1～30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、1～91個、1～78個または1～73個、具体的には、例えば、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。

[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、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。

[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。

[0070] 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。

[0071] 本発明の核酸分子は、前述のように、前記クレンブテロールに結合性を示す。このため、本発明の核酸分子の用途は、前記クレンブテロール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、前記クレンブテロールに対する抗体に代えて、種々の方法に使用できる。

[0072] 本発明の核酸分子によれば、例えば、前記クレンブテロールを検出できる。前記クレンブテロールの検出方法は、特に制限されず、前記クレンブテロール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。

[0073] <検出方法>

本発明のクレンブテロール検出方法は、前記本発明の核酸分子とサンプルとを接触させ、前記サンプル中のクレンブテロールと前記核酸分子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。

[0074] 本発明によれば、前記本発明の核酸分子が、クレンブテロールに特異的に結合することから、例えば、クレンブテロールと前記核酸分子との結合を検

出することによって、サンプル中のクレンプテロールを特異的に検出可能である。具体的には、例えば、サンプル中のクレンプテロール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。

[0075] 本発明において、前記サンプルは、特に制限されない。前記サンプルは、例えば、生体由来、飲食品由来、環境由来等のサンプルがあげられる。前記生体は、特に制限されず、例えば、ヒト、ウシ、ブタ、ヒツジ、マウス、ラット、ウサギ、ウマ等の非ヒト哺乳類、鳥類、魚類等の動物の生体があげられる。前記生体由来のサンプルは、例えば、排泄物、体液、皮膚、肉、粘膜、体毛等があげられる。前記飲食品由来のサンプルは、例えば、飲料、食品、食品原料等があげられる。前記環境由来のサンプルは、例えば、生物、水、土壌、大気等があげられる。前記水サンプルは、例えば、地下水、河川水、海水、生活排水等があげられる。また、前記環境由来のサンプルは、例えば、食品加工場、調理場等における付着物があげられる。

[0076] 前記サンプルは、例えば、液体サンプルでもよいし、固体サンプルでもよい。前記固体サンプルの場合、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、液体と混合して、液体サンプルとして使用することが好ましい。前記液体は、特に制限されず、例えば、水、生理食塩水、緩衝液、培地等があげられる。

[0077] 前記検出工程は、例えば、前記サンプルと前記核酸分子とを接触させて、前記サンプル中のクレンプテロールと前記核酸分子とを結合させる接触工程と、前記クレンプテロール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、前記サンプル中のクレンプテロールの有無または量を分析する工程を含む。

[0078] 前記接触工程において、前記サンプルと前記核酸分子との接触方法は、特に制限されない。前記サンプル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。

[0079] 前記接触工程において、前記サンプル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。

[0080] 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、前記サンプルと接触させる。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。

[0081] 前記結合検出工程は、前述のように、前記サンプル中のクレブテロール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、前記サンプル中のクレブテロールの有無を分析（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、前記サンプル中のクレブテロールの量を分析（定量）できる。

[0082] 前記クレブテロール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。

[0083] そして、前記クレブテロールと前記核酸分子との結合が検出できなかった場合は、前記サンプル中にクレブテロールは存在しないと判断でき、前記結合が検出された場合は、前記サンプル中にクレブテロールが存在すると判断できる。また、予め、クレブテロールの濃度と、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、前記サンプル中のクレブテロールの濃度を分析することもできる。

[0084] <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、クレブテロール検出試薬であって

、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けばよく、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、前記クレンブテロールの検出等を行うことができる。

[0085] 本発明の検出キットは、前述のように、クレンブテロール検出キットであって、前記本発明の核酸分子を含むことを特徴とする。本発明の検出キットは、前記本発明の核酸分子を含んでいけばよく、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、前記クレンブテロールの検出等を容易に行うことができる。

[0086] 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、緩衝液、使用説明書等があげられる。

[0087] 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前記本発明の検出方法を援用できる。

[0088] <検出デバイス>

本発明の検出デバイスは、クレンブテロールの検出デバイスであって、前記本発明の核酸分子を含むことを特徴とする。本発明の検出デバイスは、前記本発明の核酸分子を含んでいけばよく、その他の構成は何ら制限されない。本発明の検出デバイスを使用すれば、前述のように、例えば、前記クレンブテロールの検出等を行うことができる。

[0089] 本発明の検出デバイスは、例えば、さらに担体を有し、前記担体に前記核酸分子が配置されている。前記核酸分子は、前記担体に固定化されていることが好ましい。前記担体の種類および前記核酸分子の固定化は、例えば、前述の通りである。本発明の検出デバイスの使用方法は、特に制限されず、前記本発明の核酸分子および前記本発明の検出方法を援用できる。

実施例

[0090] 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。

[0091] [実施例 1]

各アプタマーについて、クレンブテロールに対する結合能を間接的に確認した。

[0092] (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。下記ポリヌクレオチドの合成において、アプタマー 1-5 の下線を付した領域は、天然シトシン (C) に代えて、シトシンの 5 位がメチル化された 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を使用し、また、アプタマー 1 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 (B n d U) を有するデオキシリボヌクレオチド残基を、さらに、アプタマー 2-5 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 (T r p d U) を有するデオキシリボヌクレオチド残基を使用し、合成した。

アプタマー 1 : CLE124R6B_c5bio (配列番号 1)

5' -GGTAAGTAGCCCTCCCTGAAATGACAGAAAGTGTGGATTTTATTTGGATCATACACTAGCAGGCAATCTGGTTTAAG-3'

アプタマー 2 : CLE124R8Tm1_m2_c5bio (配列番号 2)

5' -GGTAAGTAGCCCTCCCTGAAATGTGACAGCACATCATTTGAGTTGGCATGTCTCACTAGCAGGCAATCTGGTTTAAG-3'

アプタマー 3 : CLE124R8Tm1_m3_c5bio (配列番号 3)

5' -GGTAAGTAGCCCTCCCTGAAATGTATGCCGGTCAAAGCATATTTCCATATTTGCACTAGCAGGCAATCTGGTTTAAG-3'

アプタマー 4 : CLE124T_1R6_m2_c5bio (配列番号 4)

5' -GGTAAGTAGCCCTCCCTGAAATGGGACGCACTCTATTCTAATATCCAGCACTAGCACGGCAATCTGGTTTAAG-3'

アプタマー 5 : CLE124T_1R6_m3_c5bio (配列番号 5)

5' -GGTAAGTAGCCCTCCCTGAAATGGCAGGTAGCAACTCTATTCTAATATACAGACACTAGCACG
GCAATCTGGTTTAAG-3'

- [0093] また、40塩基長のランダム配列 (N)₄₀を含む配列番号7で表わされるオリゴヌクレオチドからなるDNAを複数含むDNAライブラリーを、ネガティブコントロールとした。下記配列において、「N」は、デオキシリボヌクレオチド残基であり、その核酸は、アデニン、グアニン、シトシンおよび/またはチミンとした。

ネガティブコントロール (配列番号7)

CCTGCACCCAGTGTCCC-(N)₄₀-GACGGAGAGGAGGACGG

- [0094] 前記アプタマーは、その3'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。

- [0095] (2) クレンブテロール試料

クレンブテロールのアミノ基をビオチン化し、ビオチン化クレンブテロールを作製した。40mmol/LのHEPES緩衝液中で、2μmol/Lの前記ビオチン化クレンブテロールと500nmol/Lのストレプトアビジン (SA、シグマ社製) とを混合し、ビオチン化クレンブテロールのビオチンとSAとを結合させたものを試料とした。この試料を以下のSPRに使用した。

- [0096] (3) SPRによる結合能の解析

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

- [0097] 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 (DDW) を用いて、5μmol/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、 $1\mu\text{mol/L}$ の前記ポリdA付加アダプターを、流速 $25\mu\text{L/min}$ 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。続いて、前記試料を、SPRバッファーを用いて、流速 $50\mu\text{L/min}$ 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。前記希釈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。

[0098] 前記SPRバッファーの組成は、 40mmol/L HEPES、 125mmol/L NaCl、 5mmol/L KCl、 1mmol/L MgCl_2 および0.05% Tween（登録商標）20とし、pHは、7.5とした。

[0099] そして、前記試料のインジェクション開始を0秒として、115秒～125秒におけるRUの平均値（ $\text{RU}_{115-225}$ ）と、355～365秒におけるRUの平均値（ $\text{RU}_{355-365}$ ）とを求めた。また、前記ビオチン化ポリdTに前記ポリdA付加アダプターを結合させた時におけるRU値（ RU_{immob} ）と $\text{RU}_{115-225}$ との比（ $\text{RU}_{115-225}/\text{RU}_{\text{immob}}$ ）または RU_{immob} と $\text{RU}_{355-365}$ との比（ $\text{RU}_{355-365}/\text{RU}_{\text{immob}}$ ）を求めた。コントロールは、前記試料に代え、 500nmol/L の前記SAをインジェクションした以外は、同様にして、 $\text{RU}_{115-225}/\text{RU}_{\text{immob}}$ および $\text{RU}_{355-365}/\text{RU}_{\text{immob}}$ を求めた。また、 $\text{RU}_{115-225}/\text{RU}_{\text{immob}}$ および $\text{RU}_{355-365}/\text{RU}_{\text{immob}}$ から、レスポンスカーブフィッティングにより解離定数（KD）を求めた。

[0100] $\text{RU}_{115-225}/\text{RU}_{\text{immob}}$ および $\text{RU}_{355-365}/\text{RU}_{\text{immob}}$ の結果を図1（A）および（B）に示し、解離定数の結果を表1に示す。図1（A）は、 $\text{RU}_{115-225}/\text{RU}_{\text{immob}}$ を示すグラフであり、横軸は、アダプターの種類を示し、縦軸は、 $\text{RU}_{115-225}/\text{RU}_{\text{immob}}$ を示す。図1（B）は、 $\text{RU}_{355-365}/\text{RU}_{\text{immob}}$ を示すグラフであり、横軸は、アダプターの種類を示し、

縦軸は、 $RU_{355-365} / RU_{immob}$ を示す。

[0101] 図1 (A) に示すように、実施例のいずれのアプタマーも、コントロール (SA) に対しては結合能を示さないのに対し、クレンブテロールに対して高い $RU_{115-225} / RU_{immob}$ を示し、クレンブテロールへの優れた結合能が確認された。また、図1 (B) に示すように、いずれのアプタマーも図1 (A) の結果と比較して著しい低下はみられず、洗浄後も結合が維持されることがわかった。これに対して、ネガティブコントロールは、クレンブテロールに結合しなかった。また、表1に示すように、実施例のアプタマーとビオチン化クレンブテロール-S A複合体との解離定数は、 $18.6-378 \text{ nmol/L}$ の範囲であった。これらの結果から、実施例のアプタマーは、優れた結合能でクレンブテロールに結合できることがわかった。

[0102] [表1]

アプタマー	K D (nmol/L)
GLE124R6B_c5bio	48.7
GLE124R8Tm1_m2_c5bio	18.6
GLE124R8Tm1_m3_c5bio	55.5
GLE124T_1R6_m2_c5bio	221
GLE124T_1R6_m3_c5bio	378

[0103] [実施例2]

各アプタマーについて、クレンブテロールに対する特異性を間接的に確認した。

[0104] クレンブテロール、サルブタモール、ラクトパミンおよびメタミドホスのアミノ基をそれぞれビオチン化し、ビオチン化クレンブテロール、ビオチン化サルブタモール、ビオチン化ラクトパミンおよびビオチン化メタミドホスを作製した。前記ビオチン化クレンブテロール、前記ビオチン化サルブタモール、前記ビオチン化ラクトパミンまたは前記ビオチン化メタミドホスと前記SAとを結合させたものを試料として使用し、SPRバッファを $25 \mu\text{L/min}$ でインジェクションし、 $250 \sim 260$ 秒におけるRUの平均値 ($RU_{250-260}$) を求めた以外は、前記実施例1と同様にして、各サンプル

における $RU_{250-260} / RU_{immob}$ を求めた。

[0105] この結果を図2に示す。図2は、 $RU_{250-260} / RU_{immob}$ 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、 $RU_{250-260} / RU_{immob}$ を示す。

[0106] 図2に示すように、実施例のいずれのアプタマーも、サルブタモール、ラクトパミンおよびメタミドホスに対して、ネガティブコントロールより低い $RU_{250-260} / RU_{immob}$ を示し、これらに結合しないことがわかった。これに対して、実施例のいずれのアプタマーも、クレンブテロールに対して優れた結合能を示した。これらの結果から、実施例のアプタマーは、優れた結合能でかつ特異的にクレンブテロールに結合できることがわかった。

[0107] [実施例3]

前記ビオチン化クレンブテロールと前記SAとの複合体に、未修飾のクレンブテロール単体を添加した場合、アプタマーが、前記クレンブテロール単体に結合するならば、アプタマーと前記複合体との結合は、競合により阻害される。そこで、各アプタマーについて、前記クレンブテロール単体に対する結合能を競合法により確認した。

[0108] 前記実施例1と同様にして、前記ビオチン化クレンブテロールと前記SAとを結合させた。前記結合後、さらに0、0.02、0.2、2または20 mmol/Lとなるように前記クレンブテロール単体を添加し、試料とした以外は、前記実施例1と同様にして、250～260秒におけるRUの平均値 ($RU_{250-260}$) を求め、 $RU_{250-260} / RU_{immob}$ を算出した。そして、0 mmol/Lの前記クレンブテロール単体を含む前記試料の $RU_{250-260} / RU_{immob}$ を100%とし、各クレンブテロール単体の濃度における $RU_{250-260} / RU_{immob}$ の減少率を求め、これを阻害率(%)とした。また、前記クレンブテロール単体の濃度および前記阻害率に基づき、各アプタマーに対するクレンブテロールの阻害率のIC50 (CLE IC50) を求めた。

[0109] 阻害率(%)の結果を図3に示し、阻害率のIC50の結果を表2に示す

。図3は、阻害率を示すグラフであり、横軸は、クレンプテロール単体の濃度を示し、縦軸は、阻害率（％）を示す。図3に示すように、実施例のいずれのアプタマーも、前記試料中の前記クレンプテロール単体の濃度の上昇に伴い阻害率が上昇した。また、表2に示すように、実施例の各アプタマーに対するクレンプテロールの阻害率のIC50は、1.3～6mmol/Lの範囲であった。これらの結果は、前記複合体に前記クレンプテロール単体を添加することで、実施例のアプタマーと前記複合体との結合が、前記クレンプテロール単体の競合により阻害されることを示している。このことから、実施例のアプタマーは、前記クレンプテロール単体に結合できることがわかった。

[0110] [表2]

アプタマー	CLE IC50 (mmol/L)
CLE124R6B_c5bio	4.8
CLE124R8Tm1_m2_c5bio	6.0
CLE124R8Tm1_m3_c5bio	1.4
CLE124T_1R6_m2_c5bio	1.3
CLE124T_1R6_m3_c5bio	3.7

[0111] 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、本願発明のスコープ内で当業者が理解しうる様々な変更をできる。

[0112] この出願は、2013年9月25日に出願された日本出願特願2013-197906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

[0113] 本発明の核酸分子は、クレンプテロールに結合可能である。このため、本発明の核酸分子によれば、例えば、クレンプテロールとの結合によって、クレンプテロールを検出できる。このため、本発明の核酸分子は、例えば、食

品管理、公衆衛生等の分野におけるクレンプテロールの検出に、極めて有用なツールとなる。

請求の範囲

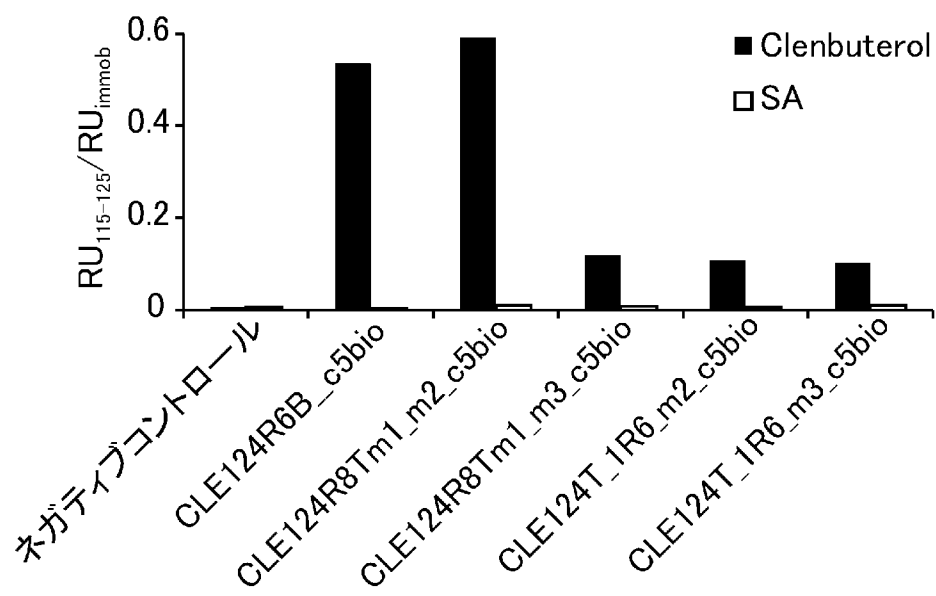
- [請求項1] 下記（a）～（c）からなる群から選択された少なくとも一つのポリヌクレオチドを含み、前記ポリヌクレオチドが、少なくとも1個の修飾塩基を含むことを特徴とする、クレンブテロールに結合する核酸分子。
- （a）配列番号1～5の塩基配列の少なくともいずれか1つの塩基配列からなるポリヌクレオチド
- （b）前記（a）の塩基配列に対して、80%以上の同一性を有する塩基配列からなり、クレンブテロールに結合するポリヌクレオチド
- （c）前記（a）の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドに相補的な塩基配列からなり、クレンブテロールに結合するポリヌクレオチド
- [請求項2] 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、前記修飾塩基であり、前記修飾塩基が、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記載の核酸分子。
- [請求項3] 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、前記修飾塩基であり、前記修飾塩基が、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、全チミンが、前記修飾塩基であり、前記修飾塩基が、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、少なくとも1個のシトシンが、前記修飾塩基であり、前記修飾塩基が、修飾シトシンである、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、シトシンの全塩基数のうち、20分の1以上が、前記修飾塩基であり、前記修飾塩基が、修飾シトシンで

ある、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の核酸分子。

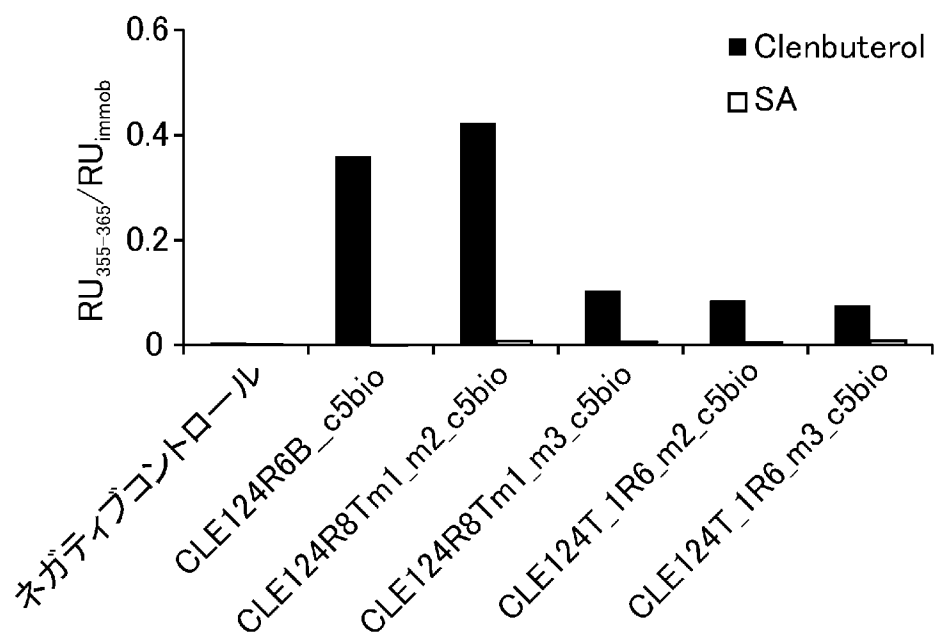
- [請求項7] 前記ポリヌクレオチドにおいて、全シトシンが、前記修飾塩基であり、前記修飾塩基が、修飾シトシンである、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の核酸分子。
- [請求項8] 前記ポリヌクレオチドが、DNAである、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の核酸分子。
- [請求項9] 請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の核酸分子を含むことを特徴とする、クレンブテロール検出試薬。
- [請求項10] 請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の核酸分子を含むことを特徴とする、クレンブテロール検出キット。
- [請求項11] 請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の核酸分子とサンプルとを接触させ、前記サンプル中のクレンブテロールと前記核酸分子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クレンブテロール検出方法。

[図1]

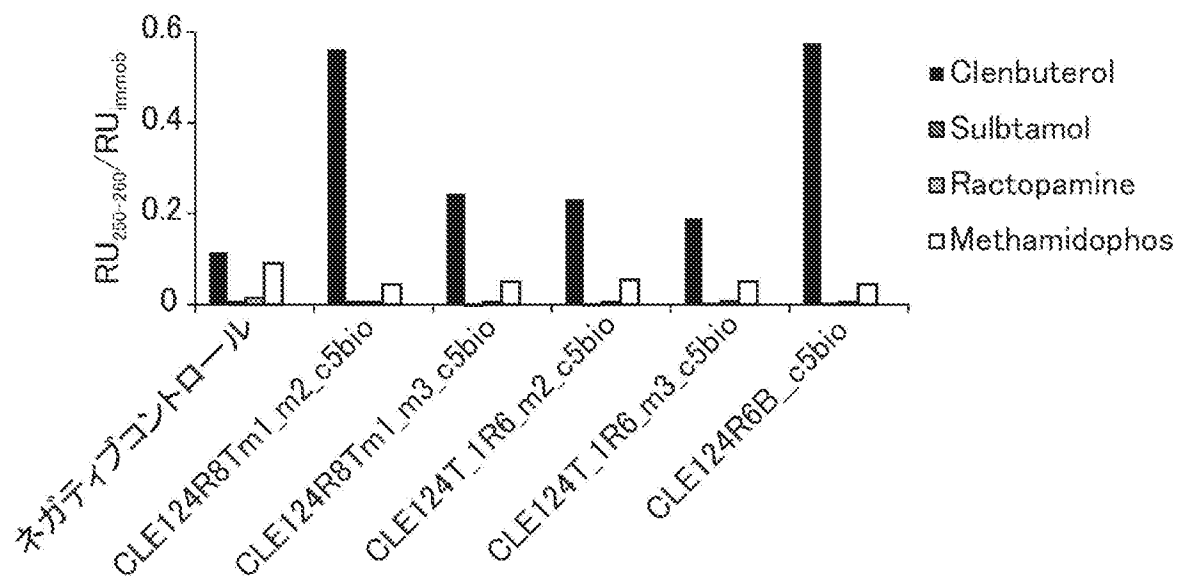
(A)



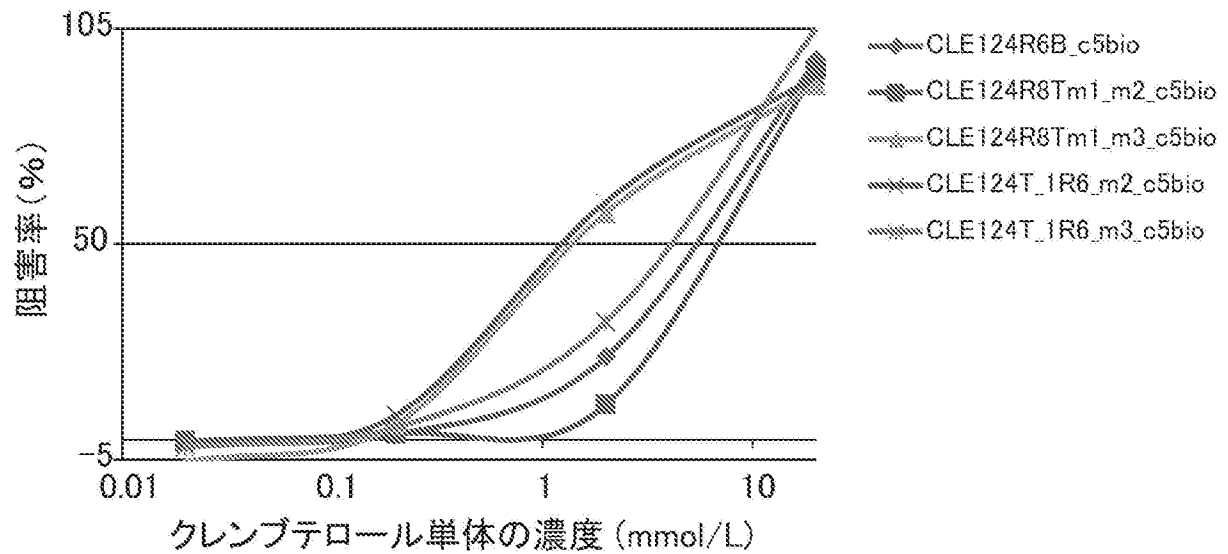
(B)



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/067058

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	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

CAPLUS/MEDLINE/WPIDS/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.
A	QIN, Z. et al., Simultaneous Screening for Five Veterinary Drug Residues by a Developed Multiplexed Luminex Assay, Anal. Lett., 2009, 42, p.255-264, particularly, page 256, Summary	1-11
A	CRESCENZI, C. et al., Determination of Clenbuterol in Bovine Liver by Combining Matrix Solid-Phase Dispersion and Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography/Electrospray Ion Trap Multiple-Stage Mass Spectrometry, Anal. Chem., 2001, 73, p.2171-2177, particularly, page 2171 to page 2173, left column, 2nd paragraph	1-11

☒ 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
09 September, 2014 (09.09.14)

Date of mailing of the international search report
22 September, 2014 (22.09.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/067058

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 2013/065314 A1 (Ushio Inc.), 10 May 2013 (10.05.2013), particularly, claim 17 (Family: none)	1-11
A	JP 2013-523177 A (Soma Logic Inc.), 17 June 2013 (17.06.2013), particularly, claim 9; paragraphs [0035], [0040], [0069], [0059] to [0062] & US 2013/0012693 A1 & WO 2011/130195 A1 & CN 102858990 A	1-11
A	Funakoshi Co., Ltd., 'Aptamer Tansaku Gosei Jutaku Service', Aptamer Sciences / Aptamer Sciences Inc. [online], 16 January 2013 (16.01. 2013), [Retrieved on 08 September 2014 (08.09. 2014)], URL < http://www.funakoshi.co.jp/contents/7139 >	1-11
A	IMAIZUMI, Y. et al., Efficacy of Base- Modification on Target Binding of Small Molecule DNA Aptamers, J. Am. Chem. Soc., 2013. 06.04, 135, p.9412-9419, particularly, Summary, page 9412, INTRODUCTION, 1st paragraph, page 9415, right column, 2nd paragraph	1-11
P,X	Tomoko MURATA et al., "Clenbuterol o Ninshiki suru DNA Aptamer no Kaihatsu", Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Program Yoshishu (Web), 20 November 2013 (20. 11.2013), 3P-0941	1-11

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 4 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 4 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 4 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII), GenBank/EMBL/DBJ/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
A	QIN, Z. et al., Simultaneous Screening for Five Veterinary Drug Residues by a Developed Multiplexed Luminex Assay, Anal. Lett., 2009, 42, p.255-264, 特に、256 頁、要旨	1 - 1 1

☒ 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

0 9 . 0 9 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

2 2 . 0 9 . 2 0 1 4

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官（権限のある職員）

吉田 知美

4 B

3 3 3 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	CRESCENZI, C. et al., Determination of Clenbuterol in Bovine Liver by Combining Matrix Solid-Phase Dispersion and Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography/Electrospray Ion Trap Multiple-Stage Mass Spectrometry, Anal. Chem., 2001, 73, p.2171-2177, 特に、2171 頁-2173 頁左欄 2 段落	1 - 1 1
A	WO 2013/065314 A1 (ウシオ電機株式会社) 2013.05.10, 特に、請求項 1 7 (ファミリーなし)	1 - 1 1
A	JP 2013-523177 A (ソマロジック, インコーポレイテッド) 2013.06.17, 特に、請求項 9、[0035]、[0040]、[0069]、[0059]-[0062] & US 2013/0012693 A1 & WO 2011/130195 A1 & CN 102858990 A	1 - 1 1
A	フナコシ株式会社, 「アプタマー探索・合成受託サービス」 アプタマー サイエンス / Aptamer Sciences Inc. [online], 2013.01.16, [Retrieved on 2014.09.08], URL < http://www.funakoshi.co.jp/contents/7139 >	1 - 1 1
A	IMAIZUMI, Y. et al., Efficacy of Base-Modification on Target Binding of Small Molecule DNA Aptamers, J. Am. Chem. Soc., 2013.06.04, 135, p.9412-9419, 特に、要旨、9412 頁 INTRODUCTION 1 段落、9415 頁右欄 2 段落	1 - 1 1
P X	村田朋子, 外 7 名, クレンブテロールを認識する DNA アプタマーの開発, 日本分子生物学会年会プログラム・要旨集(Web), 2013.11.20, 3 P - 0 9 4 1	1 - 1 1