

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-259496

(P2008-259496A)

(43) 公開日 平成20年10月30日(2008.10.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/53 N	
	G O 1 N 33/543 5 O 1 P	
審査請求 有 請求項の数 13 O L 外国語出願 (全 11 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-66508 (P2008-66508)	(71) 出願人	504173275
(22) 出願日	平成20年3月14日 (2008.3.14)		コレア インスティテュート オブ サイ
(31) 優先権主張番号	10-2007-0025105		エンス アンド テクノロジー
(32) 優先日	平成19年3月14日 (2007.3.14)		大韓民国 1 3 6 - 7 9 1 ソウル ソン
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		ブクーク ハウォルゴクードン 3 9 - 1
		(74) 代理人	100077931
			弁理士 前田 弘
		(74) 代理人	100110939
			弁理士 竹内 宏
		(74) 代理人	100110940
			弁理士 嶋田 高久
		(74) 代理人	100113262
			弁理士 竹内 祐二
		(74) 代理人	100115059
			弁理士 今江 克実
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 DNAアプタマーを用いて標的タンパク質を検出する方法及びキット

(57) 【要約】

【課題】単一増幅ストラテジを用いてサンプル中の標的タンパク質を検出する方法及びキットを提供する。

【解決手段】フルオロフォア及びクエンチャを含む一重鎖RNA（「F-RNA-Q」）に相補的に結合する一重鎖DNA（G-DNA）の付随放出を利用した、アプタマー型の標的タンパク質分子識別のための単一増幅ストラテジが確立される。フルオロフォア及びクエンチャが取り付けられたRNAは、その後、RNase Hによって分解されて蛍光シグナルを発生し、損傷されなかったG-DNAはリサイクルされて、蛍光増幅が達成される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプル中の標的タンパク質を検出する方法であって、

(1) (a) 標的結合に必要な配列及び前記標的結合配列の 5' 末端から延びた配列を含む DNA アプタマー (5' - E x _ a p t a m e r) と (b) 前記 DNA アプタマーの前記 5' 末端延長領域を含む部分に対して相補関係にある一重鎖 DNA (G u a r d - D N A 又は G - D N A) とからなる DNA 二重鎖を生成する工程と、

(2) 前記標的タンパク質を含むサンプルを前記工程 (1) の前記 DNA 二重鎖と混合する工程と、

(3) 前記工程 (2) で得られた混合物を、R N a s e H 及び前記 G - D N A に対して相補関係にある一重鎖 RNA (F - R N A - Q) と混合する工程であって、フルオロフォア (fluorophore) 及びクエンチャがそれぞれ前記一重鎖 RNA の 5' 末端及び 3' 末端を標識している、混合工程と、

(4) 前記工程 (3) で得られた混合物の蛍光強度を測定する工程とを包含することを特徴とする方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法において、

前記一重鎖 RNA の長さは、前記一重鎖 DNA の長さ以下であることを特徴とする方法。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の方法において、

前記フルオロフォアは、フルオレセイン、テトラメチルローダミン、C y 5、C y 3 及びテキサスレッドからなる群より選択されることを特徴とする方法。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の方法において、

前記クエンチャは、ダブシル (dabsyl)、ダブサイル (dabcyl) 及びブラッククエンチャからなる群より選択されることを特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の方法において、

前記クエンチャは、共鳴蛍光エネルギー移動 (F R E T) 機構において蛍光アクセプタとして作用するフルオロフォアであることを特徴とする方法。

【請求項 6】

請求項 1 に記載の方法において、

前記標的タンパク質は、抗体、リガンド、天然化合物、合成ペプチド、新規な薬物の候補化合物、又はタンパク質であることを特徴とする方法。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の方法において、

前記蛍光強度は、蛍光測定器によって測定されることを特徴とする方法。

【請求項 8】

サンプル中の標的タンパク質を検出するキットであって、

(1) (a) DNA アプタマーと (b) 前記 DNA アプタマーの 5' 末端延長領域を含む部分に対して相補関係にある一重鎖 DNA (G u a r d - D N A 又は G - D N A) とからなる DNA 二重鎖と、

(2) 前記 G - D N A に対して相補関係にあり且つフルオロフォア及びクエンチャで標識された一重鎖 RNA と、

10

20

30

40

50

(3) RNaseHと
を含むことを特徴とするキット。

【請求項9】

請求項8に記載のキットにおいて、
前記一重鎖RNAの長さは、前記一重鎖DNAの長さ以下である
ことを特徴とするキット。

【請求項10】

請求項8に記載のキットにおいて、
前記フルオロフォアは、フルオレセイン、テトラメチルローダミン、Cy5、Cy3及び
テキサスレッドからなる群より選択される
ことを特徴とするキット。

10

【請求項11】

請求項8に記載のキットにおいて、
前記クエンチャは、ダブシル(dabsyl)、ダブサイル(dabcyl)及びブラッククエンチャか
らなる群より選択される
ことを特徴とするキット。

【請求項12】

請求項8に記載のキットにおいて、
前記クエンチャは、共鳴蛍光エネルギー移動(FRET)機構において蛍光アクセプタと
して作用するフルオロフォアである
ことを特徴とするキット。

20

【請求項13】

請求項8に記載のキットにおいて、
前記標的タンパク質は、抗体、リガンド、天然化合物、合成ペプチド、新規な薬物の候
補化合物、又はタンパク質である
ことを特徴とするキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、サンプル中に含まれる標的タンパク質を分析する方法及びキットに関する。

30

【背景技術】

【0002】

アプタマーとは、通常、SELEX(試験管内人工進化法)によってインビトロで選択
される核酸種である。Gold及びSzostakのグループによって導入されて以来(
Tuerk及びGoldのScience, vol. 249, pp. 505-510, (1990))、アプタマーは、小さな分子やタンパク質から細胞及び組織に至る範囲に亘
って対象とする任意の標的を仮想的に検出するために、分子識別エレメントとして用いら
れてきた。アプタマーは、感度及び特異性の点で抗体に匹敵するが、化学合成によって低
コストで容易に製造できる。アプタマーは、さらに、所望の貯蔵特性(storage propertie
s)を有し且つ生物学的な意味で免疫原性をほとんど又は全く誘発しない。アプタマーはそ
の利点のために、抗体と比較して、治療及び診断における有用性がかなり広い。近年、固
有のシグナリング特性を持たないというアプタマーの性質がきっかけとなり、生物工学用
途及び生物医学用途のために、標的結合イベント(target-binding events)を容易に測定
可能なシグナルへとトランスデュースするさまざまな方法が盛んに開発されている(Na
vani及びLiのCurr. Opin. Chem. Biol., vol. 10, pp. 272-281 (2006))。

40

【0003】

蛍光レポーターを用いる方法がアプタマー型バイオセンサの生成に特に有用であること
がわかっている。該方法は、モノクロモフォア(monochromophore)型アプローチ(Jha
veriraのJ. Am. Chem. Soc., vol. 122, pp. 2469-247

50

3 (2000))、アプタマービーコン(aptamerbeacon)工学 (Hamaguchiらの Anal. Biochem., vol. 294, pp. 126-131 (2001))、構造切替シグナリング(structure-switching signaling) (Nutiu及びLiの J. Am. Chem. Soc., vol. 125, pp. 4771-4778 (2003))、インサイチュラベリング(in situ labeling) (Merino及びWeeksの J. Am. Chem. Soc., vol. 125, pp. 12370-12371 (2003))、アロステリックキメラ(allosteric chimeras) (Wu及びCurranの Nucleic Acids Res., vol. 27, pp. 1512-1516 (1999))、染色式アプローチ (Liらの Chem. Commun., pp. 73-75 (2007))、高分子コンジュゲート型蛍光化学センサ(polymer-conjugate based fluorescent chemosensors) (Ho及びLeclercの J. Am. Chem. Soc., vol. 126, pp. 1384-1387 (2004))を含んでいる。これらの系は、通常、化学量論的な状態でシグナルを生成するが、PLA (proximity-ligation assay) 法 (Fredrikssonらの Nature Biotechnol., vol. 20, pp. 473-477 (2002)) 又はエキソヌクレアーゼ保護アッセイ(exo-nuclease-protection assay) (Wangらの Anal. Chem., vol. 76, pp. 5605-5610 (2004)) をアプタマー型検知法に組み込むことによってシグナルを増幅する試みがなされてきた。タンパク質の超高感度検出が実現されているが、前者のアッセイは、同質二量体タンパク質標的に限定され、後者のアッセイは、時間をかけて複工程手順を行うという欠点がある。ごく最近では、分子ビーコンと組み合わせたDNAポリメラーゼアッセイを用いて、アプタマーと標的である小さな分子との識別シグナルの増幅検出が行われている (Shlyahovskyらの J. Am. Chem. Soc., vol. 129, pp. 3814-3815 (2007))。正確且つ特異的な生物分析を容易にし得る単純且つ適用容易なアプタマー型の方法を開発するために、そのような技術が要求され続けている。

【発明の開示】

【0004】

第1の局面において、本発明は、サンプル中において他の分子の存在下でDNAアプタマーが標的タンパク質に結合する際に生成される蛍光シグナルを増幅することによって標的タンパク質を検出する方法である。該方法は、

(1) (a) 標的結合に必要な配列及び前記標的結合配列の5'末端から延びた配列を含むDNAアプタマー(5'-Ex-aptamer)と(b)前記DNAアプタマーの前記5'末端延長領域を含む部分に対して相補関係にある一重鎖DNA(Guard-DNA又はG-DNA)とからなるDNA二重鎖を生成する工程と、

(2) 前記標的タンパク質を含むサンプルを前記工程(1)の前記DNA二重鎖と混合する工程と、

(3) 前記工程(2)で得られた混合物を、RNase H及び前記G-DNAに対して相補関係にある一重鎖RNA(F-RNA-Q)と混合する工程であって、フルオロフォア(fluorophore)及びクエンチャがそれぞれ前記一重鎖RNAの5'末端及び3'末端を標識している、混合工程と、

(4) 前記工程(3)で得られた混合物の蛍光強度を測定する工程とを包含することの特徴とする。

【0005】

第2の局面において、本発明は、サンプル中の標的タンパク質を検出する方法を提供するキットである。該キットは、(1) (a) DNAアプタマーと(b)前記DNAアプタマーの5'末端延長領域を含む部分に対して相補関係にある一重鎖DNA(Guard-DNA又はG-DNA)とからなるDNA二重鎖と、(2)前記G-DNAに対して相補関係にあり且つフルオロフォア及びクエンチャで標識された一重鎖RNAと、(3) RNase Hとを含む。

【0006】

本発明の上記並びにその他の目的及び特徴は、以下の本発明の説明を、本明細書に添付の図面と関係付けて参酌することにより、より明確になる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

本発明は、サンプル中の標的タンパク質の測定に用いる蛍光強度アッセイに基づいたバイオセンサに関し、該アッセイは、

(1) (a) 標的結合に必要な配列及び前記標的結合配列の5'末端から延びた配列を含むDNAアプタマー(5'-Ex__aptamer)と(b)前記DNAアプタマーの前記5'末端延長領域を含む部分に対して相補関係にある一重鎖DNA(Guard-DNA又はG-DNA)とからなるDNA二重鎖を生成する工程と、

(2) 前記標的タンパク質を含むサンプルを前記工程(1)の前記DNA二重鎖と混合する工程と、

(3) 前記工程(2)で得られた混合物を、RNase H及び前記G-DNAに対して相補関係にある一重鎖RNA(F-RNA-Q)と混合する工程であって、フルオロフォア及びクエンチャがそれぞれ前記一重鎖RNAの5'末端及び3'末端を標識している、混合工程と、

(4) 前記工程(3)で得られた混合物の蛍光強度を測定する工程とを包含することの特徴とする。

【0008】

工程(1)のDNAアプタマーは、ある既定のアプタマー(5'-Ex__aptamer)の5'末端に延長配列を有する分子である。本実施形態のG-DNAは、DNAアプタマーの5'末端延長領域を含む部分に対して相補関係にある一重鎖DNA分子である。該既定のアプタマーは、標的タンパク質に結合するアプタマーである。DNAアプタマー及びG-DNAからなるDNA二重鎖は、DNAアプタマー及びG-DNAを含む水溶液を加熱し、その後室温でゆっくりと冷却することにより生成され得る。

【0009】

工程(2)で得られた標的タンパク質は、タンパク質であり得、例えば、抗体、リガンド、天然化合物、抽出物、合成ペプチド、新規な薬物の候補化合物、又はタンパク質であるが、これらの例に限定されない。

【0010】

工程(3)のF-RNA-Qは、5'末端にフルオロフォアが取り付けられ、3'末端にクエンチャが取り付けられたRNA配列である。好適な実施形態において、フルオロフォアは、フルオレセイン、テトラメチルローダミン、Cy 5、Cy 3及びテキサスレッドなどの従来の蛍光材料である。好適な実施形態において、クエンチャは、ダブシル(dabsyl)、ダブサイル(dabcyl)及びブラッククエンチャなどの、従来のクエンチャであり得る。クエンチャは、共鳴蛍光エネルギー移動(FRET)機構において蛍光アクセプタとして作用する別のフルオロフォアであってもよい。本発明において、関連技術の当業者に公知のさらなるフルオロフォア及び蛍光クエンチャのいずれかを用いてもよい。

【0011】

本実施形態のRNase Hは、RNA/DNA二重鎖を識別し且つ該二重鎖のRNA部分のみを分解し、一重鎖RNAを分解しない酵素である。本発明において、RNase Hを用いて、F-RNA-Q/G-DNA二重鎖のF-RNA-Qを分解する。

【0012】

本発明で用いるDNAアプタマー、G-DNA、F-RNA-Q及びRNase Hは、それぞれ市販のものであり得る。

【0013】

工程(4)において、蛍光強度は、TRIADマルチモード検出器、Wallac/Victor Fluorescence、及びパーキンエルマー社のLB50Bルミネセンス分光計(luminescence spectrometer)などの、関連技術の当業者に公知の蛍光測定器によって測定され得る。

10

20

30

40

50

【0014】

以下に、本発明によるサンプル中の標的タンパク質を検出する方法をさらに詳細に説明する。

【0015】

工程(2)において、標的タンパク質の存在下において、5' Ex__aptamerを含有する部分的に二重鎖構造の複合体は、タンパク質-5' Ex__aptamer複合体を形成する傾向にある。この結果、一重鎖のG-DNA分子が放出される。工程(3)において、本実施形態のバイオセンサシステムは、5'末端にフルオロフォア(F)が取り付けられた一重鎖DNAプローブ「F-RNA-Q」を含む。このフルオロフォアの強度は、3'末端のクエンチャ(Q)によって完全に消失される。F-RNA-Qの配列は放出されたG-DNAに対して相補関係にあるので、その後、RNA-DNA二重鎖が形成される。蛍光が消失したRNA-DNA二重鎖が、RNase Hで分解される。この結果、フルオロフォア含有RNAフラグメントがクエンチャから分離され、蛍光シグナルを生成するのに用いられる(図1)。サンプル中に標的タンパク質が存在しない場合、DNAアプタマーはG-DNAに結合したままであり、F-RNA-QとRNA-DNA二重鎖を形成することができないので、蛍光シグナルは生成されない。RNase HによってF-RNA-Qが分解された結果、損傷しなかったG-DNAが残り、この残ったG-DNAは、別のF-RNA-Q分子と共に二重鎖を再形成するのに利用可能であるので、RNA-DNA二重鎖形成の後にRNase Hによる分解が行われるというサイクルの結果、蛍光シグナル増幅のメカニズムが得られる。

【0016】

さらに、本発明は、蛍光シグナルの強度が標的タンパク質の量に比例して増加する(図2)ので、標的タンパク質の定量分析に用い得る。一方、F-RNA-QがG-DNAよりもかなり長い場合、G-DNA及びF-RNA-Qは二重鎖を形成し、その結果、標的タンパク質がサンプル中に存在しない場合であってもRNase Hの触媒作用が誘導され得、正の誤シグナルが生成される。したがって、一重鎖RNAの長さは、G-DNAの長さ以下である。G-DNAの量がDNAアプタマーの量よりも多い場合、DNAアプタマーに結合した後に残った過剰分のG-DNAがF-RNA-Qに結合し得、RNase Hが活性化されて、正の誤シグナルが生成され得る。したがって、本発明では、DNAアプタマー及びG-DNAは、好適には同じ量で使用される。

【0017】

本発明の方法は均質な溶液中にて実施されるので、追加の洗浄工程を行うELISA(酵素免疫検定法)と比較して簡便である。

【0018】

本発明において、DNAアプタマーは標的タンパク質に対して高い感度を示すので(図3)、標的タンパク質がサンプル中に存在しない限りにおいて、蛍光シグナルの増幅は起らない。従来の化学量論的検出方法において、標的タンパク質の検出可能な量は、標的タンパク質のアプタマーとの結合強度に応じて変化する。対照的に、本発明のシグナル増幅処理を用いることにより、標的タンパク質の濃度が標的タンパク質-アプタマー複合体の乖離定数よりも低い場合であっても、非常に少量の標的タンパク質を検出することができる。蛍光増幅は、RNase HによるF-RNA-Qの分解サイクルによって得られるが、このことは、標的タンパク質への結合時にDNAアプタマーから放出される少量のG-DNAによってトリガされる。例えば、アプタマー-トロニン複合体の乖離定数(〜100 nM)よりもかなり小さな10 nMの濃度のトロニンは、本発明を用いることによって容易に検出され得る。本発明の方法を用いると、増幅されたシグナルの定量のためのゲル分離処理を必要とするシグナル増幅を行うPCRを用いる前述のアプタマー型検出方法と比べて、標的タンパク質の検出が非常に素早く達成される。

【0019】

本発明によって提供される、サンプル中の標的タンパク質を検出するキットは、(1)(a) DNAアプタマーと(b) 前記DNAアプタマーの5'末端延長領域を含む部分に

対して相補関係にある一重鎖DNA (Guard-DNA又はG-DNA) とからなるDNA二重鎖と、(2) 前記G-DNAに対して相補関係にあり且つフルオロフォア及びクエンチャで標識された一重鎖RNAと、(3) RNase Hとを含むことを特徴とする。

【0020】

標的タンパク質は、抗体、リガンド、天然化合物、合成ペプチド、新規な薬物の候補化合物、又はタンパク質であり得る。

【0021】

以下の実施例及び試験例は、説明のみを目的としたものであり、本発明の範囲を限定することを意図したものではない。以下の実施例は、本発明の実施形態を例示するために含まれる。以下の実施例に開示された技術は、本発明の実施において十分機能することが本発明者らによって確認された技術であり、よってその実施のための好適な様態を構成すると考え得るといことが当業者に理解される。しかし、当業者は、本明細書の開示を鑑みて、開示された特定のな実施形態にさまざまな改変を行い得、本発明の趣旨及び範囲から逸れることなく同一又は同様の結果が得られるということを理解する。

【実施例】

【0022】

(実施例1) RNase H及びαトロンビンアプタマーを用いたαトロンビンの検出シグナルの増幅

配列番号1 (SEQ ID NO: 1) のヌクレオチド配列を有するトロンビンアプタマー (50 μL, 1 μM) を配列番号2 (SEQ ID NO: 2) のヌクレオチド配列を有するG-DNA (50 μL, 1 μM) と混合し、その後、RNase H反応バッファ (10X; 50 μL, 500 mM Tris-HCl, pH 8.3, 750 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 及び100 mM ジチオスレイトール) 並びにRNase Hを含まない水 (285 μL) を加えた。その後、得られたDNA混合物を70℃で5分間加熱し、室温まで緩やかに冷却して、二重鎖を形成した。ヒトのαトロンビン (10 μL、最終濃度は0 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nMと変化させた) をプレアニーリングした二重鎖に加え、得られた混合物を25℃で30分間培養した。5'末端及び3'末端にそれぞれフルオレセイン及びダブサイル(dabcyl)で標識された配列番号3 (SEQ ID NO: 3) のヌクレオチド配列を有するRNAを含むF-RNA-Q (50 μL, 1 μM; BIONEER, Korea) を加えた後、RNase H (5 μL, 2.5単位, New England Biolabs, USA) を加えて又は加えずに得られた溶液を所定時間に亘って培養した。異なる培養時間 (0時間、5時間及び16時間) を経た後、パーキンエルマー社のLB50Bルミネセンス分光計を用いて試験溶液の蛍光強度を測定した。αトロンビンの各濃度について上記手順を3回繰り返し、その結果の平均値を計算した (図2)。

【0023】

図2に示すように、蛍光強度の増加はαトロンビンの濃度に比例していた。これにより、本発明が標的タンパク質を定量的に分析するのに有用であることが確認された。

【0024】

(実施例2) RNase H及びαトロンビンアプタマーを用いたαトロンビンの検出シグナルの増幅のための選択性

特異性評価のために、実施例1の手順を繰り返した。プレアニーリングしたDNA二重鎖にBSA、ヒトα-、β-、又はγ-トロンビン (50 μL, 1 μM) を加えた。F-RNA-Q (50 μL, 1 μM) を加えた後、RNase H (5 μL, 2.5単位, New England Biolabs, USA) を加えて又は加えずに得られた溶液を16時間培養した。その後、各溶液の蛍光強度を、実施例1に記載の方法によって判定した。各データは、3つの別個の実験の平均値を示す (図3)。

【0025】

図3に示すように、アプタマーは、標的タンパク質、すなわちαトロンビンに、他のタンパク質と比べて非常に高い親和性で選択的に結合する。この結果は、本発明は標的タンパク質の選択的検出に有用であることを示唆している。

【図面の簡単な説明】

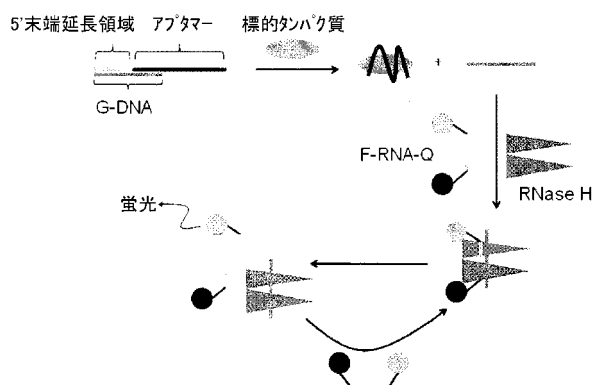
【0026】

【図1】 図1は、本発明の根拠となる原理を示す模式図である。

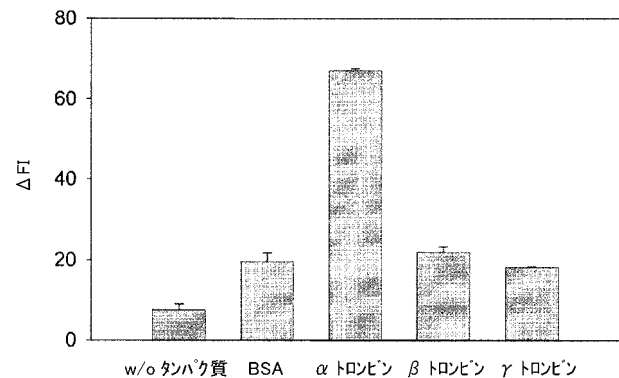
【図2】 図2は、本発明による、バッファ中の α トロニンを検出し定量するために測定された蛍光強度値を示すグラフを示す図である。なお、蛍光強度は、 α トロニンの濃度並びに／若しくはRNase H及びF-RNA-Qを用いた処理の後の培養時間を変化させて測定した。

【図3】 図3は、本発明によるトロニンの検出におけるトロニンアプタマーの特異性を示すグラフを示す図である。

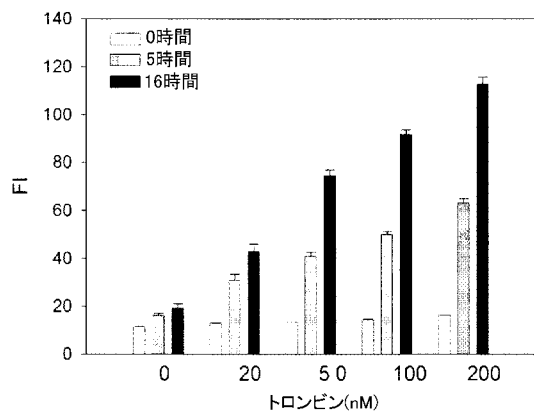
【図1】



【図3】



【図2】



【配列表】

2008259496000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/543 5 7 5

(74)代理人 100115691
弁理士 藤田 篤史

(74)代理人 100117581
弁理士 二宮 克也

(74)代理人 100117710
弁理士 原田 智雄

(74)代理人 100121728
弁理士 井関 勝守

(74)代理人 100124671
弁理士 関 啓

(74)代理人 100131060
弁理士 杉浦 靖也

(72)発明者 アン デロ
大韓民国 1 3 6 - 1 3 0 ソウル, ソンブグ, ハウォルゴットン, 3 9 - 1, K I S Tアパー
ト B - 3 0 4

(72)発明者 ヤン ウンギョン
大韓民国 1 3 7 - 9 5 0 ソウル, ソチョグ, ジャムオンドン, 5 8 - 1 6, シンバンポ 1 0
チャ アパート 3 1 7 - 8 0 8

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA09 CA11 HA12
4B063 QA18 QQ79 QR14 QR32 QR35 QR56 QS34 QX02

【外国語明細書】
2008259496000001.pdf