

(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2015-62423
(P2015-62423A)

(43) 公開日 平成27年4月9日(2015.4.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/115 (2010.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A H
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	F
G O 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	Z

審査請求 有 請求項の数 13 O L (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-230067 (P2014-230067)	(71) 出願人	000232092 NECソリューションイノベータ株式会社 東京都江東区新木場一丁目18番7号
(22) 出願日	平成26年11月12日 (2014.11.12)	(74) 代理人	100115255 弁理士 辻丸 光一郎
(62) 分割の表示	特願2011-527547 (P2011-527547) の分割	(74) 代理人	100129137 弁理士 中山 ゆみ
原出願日	平成21年8月21日 (2009.8.21)	(74) 代理人	100154081 弁理士 伊佐治 創
		(72) 発明者	竹中 洋美 東京都江東区新木場一丁目18番7号 N ECソリューションイノベータ株式会社内
		(72) 発明者	吉田 嘉仁 東京都江東区新木場一丁目18番7号 N ECソリューションイノベータ株式会社内 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 げっ歯類由来 I g G 抗体に結合性を有する核酸分子、結合剤、検出試薬および検出キット

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 抗体よりも簡便に調製可能で、且つ抗体と比べて同等以上の結合性を有する、げっ歯類由来の I g G 抗体に結合性を有する核酸分子、この核酸分子を用いた結合剤、検出試薬および検出キットを提供する。

【解決手段】 げっ歯類由来の I g G 抗体に結合性を有し、解離定数が 1 μ M 以下である核酸分子。また、該核酸分子を含む、げっ歯類由来 I g G 抗体に対する結合剤。また、該結合剤を含む、げっ歯類由来 I g G 抗体の検出試薬。また、該検出試薬を含む、げっ歯類由来 I g G 抗体の検出キット。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

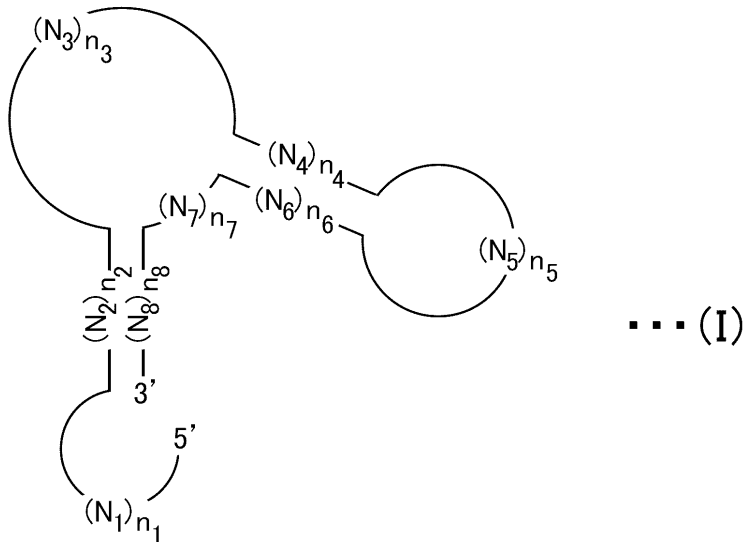
【請求項 1】

げっ歯類由来 I g G 抗体に対し特異的結合性を有し、解離定数が $1 \mu\text{M}$ 以下であることを特徴とする核酸分子。

【請求項 2】

一本鎖の核酸分子であり、かつ下記一般式 (I) で表されることを特徴とする請求項 1 記載の核酸分子。

【化 1】



10

20

前記式 (I) において、前記 N_1 、 N_2 、 N_3 、 N_4 、 N_5 、 N_6 、 N_7 および N_8 は、ヌクレオチド残基を示し、各 n_1 、 n_2 、 n_3 、 n_4 、 n_5 、 n_6 、 n_7 および n_8 は、それぞれ前記ヌクレオチド残基 N_1 、 N_2 、 N_3 、 N_4 、 N_5 、 N_6 、 N_7 および N_8 の数を示し、

前記 N_1 、 N_3 、 N_5 および N_7 は、それぞれループ構造形成可能であり、前記 N_2 および N_8 は、相互に水素結合してステム構造形成可能であり、前記 N_4 および N_6 は、相互に水素結合してステム構造形成可能である。

30

【請求項 3】

前記式 (I) において、

前記一本鎖核酸全体のヌクレオチド残基の数は、7 ~ 150 残基の範囲であり、

前記 N_1 のヌクレオチド残基数 n_1 は、0 ~ 40 残基の範囲であり、

前記 N_2 のヌクレオチド残基数 n_2 は、1 ~ 40 残基の範囲であり、

前記 N_3 のヌクレオチド残基数 n_3 は、1 ~ 50 残基の範囲であり、

前記 N_4 のヌクレオチド残基数 n_4 は、1 ~ 40 残基の範囲であり、

前記 N_5 のヌクレオチド残基数 n_5 は、1 ~ 50 残基の範囲であり、

前記 N_6 のヌクレオチド残基数 n_6 は、1 ~ 40 残基の範囲であり、

前記 N_7 のヌクレオチド残基数 n_7 は、1 ~ 50 残基の範囲であり、

前記 N_8 のヌクレオチド残基数 n_8 は、1 ~ 40 残基の範囲である、

40

ことを特徴とする請求項 2 記載の核酸分子。

【請求項 4】

前記式 (I) において、前記ヌクレオチド残基の一部がメチル化ヌクレオチド残基であることを特徴とする請求項 2 または 3 記載の核酸分子。

【請求項 5】

RNA 分子であることを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 6】

前記式 (I) において、前記ヌクレオチド残基の一部が LNA および DNA の少なくとも一方であることを特徴とする請求項 5 記載の核酸分子。

50

【請求項 7】

前記式 (I) において、5' 末端にラベル化合物が結合していることを特徴とする請求項 2 から 6 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 8】

前記ラベル化合物が、ビオチンであることを特徴とする請求項 7 記載の核酸分子。

【請求項 9】

下記に示す配列からなる群から選択された少なくとも一つの配列からなることを特徴とする請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の核酸分子。

配列番号 1

dAdAdAdAdA-CGCUGAAGAGAAGACGGAAGGAGACGAAGCG-dT

10

配列番号 2

dAdAdAdAdA-GCUGAAGAGAAGACGGAAGGAGACGAAGC-dT

配列番号 3

dAdAdAdAdA-dGdCGCUGAAGAGAAGACGGAAGGAGACGAAGCdGdC

配列番号 4

dAdAdAdAdA-dGdCdGdCUGAAGAGAAGACGGAAGGAGACGAAdGdCdGdC

配列番号 5

dAdAdAdAdA-GCGCmUGAAGAGAAGACGGAAGGAGACGAAGCGC

配列番号 6

dAdAdAdAdA-dGdCdGdCmUGAAGAGAAGACGGAAGGAGACGAAdGdCdGdC

20

配列番号 7

dAdAdAdAdA-CmUGAAGAGAAGACGGAAGGAGACGAAGCG-dT

【請求項 10】

前記げっ歯類由来 I g G が、マウス由来 I g G である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。

【請求項 11】

前記マウス由来 I g G 抗体が、サブタイプ 1 の I g G 抗体、サブタイプ 2 a の I g G 抗体およびサブタイプ 3 の I g G 抗体のうち少なくとも一つであることを特徴とする請求項 10 記載の核酸分子。

【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げっ歯類由来 I g G 抗体に対する結合剤。

30

【請求項 13】

請求項 12 記載の結合剤を含むことを特徴とするげっ歯類 I g G 由来抗体の検出試薬。

【請求項 14】

請求項 13 記載の検出試薬を含むことを特徴とするげっ歯類由来 I g G 抗体の検出キット。

【請求項 15】

試料中の検出対象物を抗原とし、前記検出対象物と抗体とを反応させて免疫沈降させる免疫沈降工程と、

40

前記免疫沈降物を変性させて前記試料の他の成分から分離する分離工程と、

前記分離工程で分離した免疫沈降物の前記抗原に抗体を反応させる第 1 反応工程と、

前記抗体反応工程の抗体に対し特異的に結合する結合剤を反応させる第 2 反応工程とを有し、

前記第 2 反応工程の前記結合剤として、請求項 12 記載の結合剤を用いることを特徴とする検出方法。

【請求項 16】

前記分離工程が、SDS-PAGE であり、前記第 1 反応工程および前記第 2 反応工程がウエスタンブロット法であることを特徴とする請求項 15 記載の検出方法。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、げっ歯類由来 I g G 抗体に結合性を有する核酸分子、結合剤、検出試薬および検出キットに関する。

【背景技術】

【0002】

抗原抗体反応は、特異性の高い反応であるため、特定のタンパク質等の検出等に応用されている。例えば、E L I S A 法は、酵素で標識化した抗体を、試料中の特定の抗原（タンパク質等）と反応させて複合体を形成し、さらにビーズ等に固定化した抗体で前記複合体を捕捉し、前記酵素に発色性基質を作用させることで、抗原（タンパク質等）を検出する方法である。さらに、抗体は、その特異性を利用して医薬としても使用されている（例えば、特許文献 1 参照）。

10

【0003】

検出試薬用として、マウスおよびラット等のげっ歯類由来抗体が使用されている。げっ歯類由来抗体を用いた検出キットでは、げっ歯類由来抗体に特異的に結合する抗体が使用されている。しかし、抗体の製造は困難であり、かつ抗体の取り扱いが煩雑であるという問題がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

20

【特許文献 1】特開 2 0 0 9 - 4 6 4 9 4 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、製造および取り扱いが容易であり、かつ抗体と同等以上の結合性を有するげっ歯類由来 I g G 抗体に結合性を有する核酸分子を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明の核酸分子は、げっ歯類由来 I g G 抗体に対し特異的結合性を有し、解離定数が、 $1 \mu\text{M}$ 以下であることを特徴とする。なお、濃度の単位 M とは、 $1 \text{mol} / \text{dm}^3$ または $1 \text{mol} / \text{L}$ に等しい。

30

【0007】

本発明のげっ歯類由来 I g G 抗体に対する結合剤は、本発明の核酸分子を含むことを特徴とする。

【0008】

本発明のげっ歯類由来 I g G 抗体の検出試薬は、本発明のげっ歯類由来 I g G 抗体に対する結合剤を含むことを特徴とする。

【0009】

本発明のげっ歯類由来 I g G 抗体の検出キットは、本発明のげっ歯類由来 I g G 抗体の検出試薬を含むことを特徴とする。

40

【発明の効果】

【0010】

本発明の核酸分子は、げっ歯類由来の I g G 抗体と高い特異性で結合可能である。また、本発明の核酸分子は、抗体に比べ、製造および取り扱いが容易である。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図 1】図 1 は、各種アプタマーの予測 2 次構造を示す模式図である。

【図 2】図 2 は、各種アプタマーの予測 2 次構造を示す模式図である。

【図 3】図 3 は、各種アプタマーの予測 2 次構造を示す模式図である。

【図 4】図 4 は、ノースウエスタンプロット法の結果を示す写真である。

50

【図5】図5は、BIACOREによる解析結果を示すグラフである。
 【図6】図6は、BIACOREによる解析結果を示すグラフである。
 【図7】図7は、BIACOREによる解析結果を示すグラフである。
 【図8】図8は、BIACOREによる解析結果を示すグラフである。
 【図9】図9は、BIACOREによる解析結果を示すグラフである。
 【図10】図10は、BIACOREによる解析結果を示すグラフである。
 【図11】図11は、アプタマーの安定性の解析結果を示す電気泳動写真である。
 【図12】図12は、アプタマーの安定性の解析結果を示すグラフである。
 【図13】図13は、アプタマーとマウス由来IgG抗体との結合の特異性の解析結果を示す電気泳動写真である。

10

【発明を実施するための形態】

【0012】

(本発明の核酸分子)

前記本発明の核酸分子は、前述の通り、げっ歯類由来IgG抗体に対し特異的結合性を有し、解離定数が、 $1\mu\text{M}$ 以下であることを特徴とする。前記解離定数は、好ましくは 200nM 以下、より好ましくは 100nM 以下、さらに好ましくは、 10nM 以下である。本発明において、げっ歯類とは、哺乳綱ネズミ目(げっ歯目)のことをいう。げっ歯類としては、例えば、マウス、ラット等があげられる。本発明の核酸分子は、マウス由来IgGに前記解離定数で特異的に結合する核酸分子が好ましい。同様に、本発明の核酸分子は、ラット由来IgGに前記解離定数で特異的に結合する核酸分子が好ましい。

20

【0013】

前記本発明の核酸分子は、例えば、一本鎖であってもよいし、二本鎖であってもよい。前記一本鎖としては、例えば、一本鎖RNAおよび一本鎖DNAがあげられ、前記二本鎖核酸としては、例えば、二本鎖RNAおよび二本鎖DNAがあげられる。本発明の核酸分子が、前記二本鎖の場合、例えば、使用に先立って、変性等により一本鎖にしてもよい。

【0014】

前記本発明の核酸分子は、例えば、RNA分子でもよいし、DNA分子でもよいが、RNA分子であることが好ましい。また、前記本発明の核酸分子は、例えば、前述のように、DNAでもRNAでもよいが、前記核酸分子を構成するヌクレオチド残基としては、DNAの構成単位であるデオキシリボヌクレオチドと、RNAの構成単位であるリボヌクレオチドとの両方を含んでもよい。また、前記本発明の核酸分子には、ssDNA、ssRNA、dsDNA、dsRNA等、鎖の本数や、核酸が修飾されているか否か等に制約はない。

30

【0015】

前記本発明の核酸分子は、前記ヌクレオチドにおける塩基が、例えば、アデニン(a)、シトシン(c)、グアニン(g)、チミン(t)およびウラシル(u)という天然塩基(非人工塩基)でもよいし、前記天然塩基(a、c、g、tまたはu)と同様の機能を有する、修飾塩基および改変塩基等の人工塩基であってもよい。前記同様の機能を有する人工塩基とは、例えば、グアニン(g)に代えて、シトシン(c)に結合可能な人工塩基、シトシン(c)に代えて、グアニン(g)に結合可能な人工塩基、アデニン(a)に代えて、チミン(t)またはウラシル(u)に結合可能な人工塩基、チミン(t)に代えて、アデニン(a)に結合可能な人工塩基、ウラシル(u)に代えて、アデニン(a)に結合可能な人工塩基等があげられる。前記修飾塩基としては、例えば、メチル化塩基、2'-フルオロウラシル、2'-アミノウラシル、2'-O-メチルウラシル、2'-チオウラシル等があげられる。また、前記本発明の核酸分子は、例えば、PNA等のペプチド核酸、LNA(Locked Nucleic Acid)、ENA(2'-O, 4'-C-Ethylenebridged Nucleic Acids)等を含んでもよい。

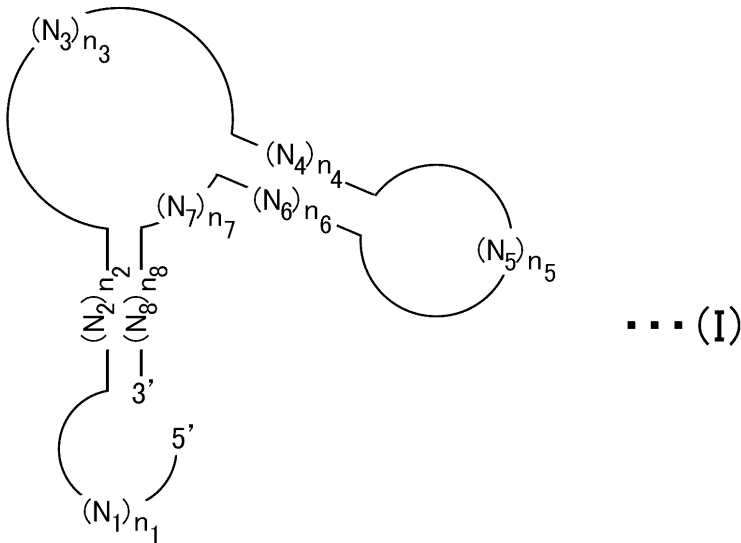
40

【0016】

前記本発明の核酸分子は、例えば、一本鎖の核酸分子であり、かつ下記一般式(I)で表されていてもよい。

50

【化 1】



10

前記式 (I) において、前記 N_1 、 N_2 、 N_3 、 N_4 、 N_5 、 N_6 、 N_7 および N_8 は、ヌクレオチド残基を示し、前記 n_1 、 n_2 、 n_3 、 n_4 、 n_5 、 n_6 、 n_7 および n_8 は、それぞれ前記ヌクレオチド残基 N_1 、 N_2 、 N_3 、 N_4 、 N_5 、 N_6 、 N_7 および N_8 の数を示し、前記 N_1 、 N_3 、 N_5 および N_7 は、それぞれループ構造形成可能であり、前記 N_2 および N_8 は、相互に水素結合してステム構造形成可能であり、前記 N_4 および N_6 は、相互に水素結合してステム構造形成可能である。

20

【 0 0 1 7 】

本発明において、「ループ構造形成可能」とは、例えば、実際にループ構造を形成すること、およびループ構造が形成されていなくても、条件によってはループ構造形成可能なことも含む。また、「ループ構造形成可能」であることは、例えば、実験的に確認した場合、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。同様に、本発明において、「ステム構造形成可能」とは、例えば、実際にステム構造を形成すること、およびステム構造が形成されていなくても、条件によってはステム構造形成可能なことも含む。また、「ステム構造形成可能」であることは、例えば、実験的に確認した場合、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。

30

【 0 0 1 8 】

前記式 (I) において、前記一本鎖核酸全体のヌクレオチド残基の数は、特に制限されないが、例えば、7 ~ 150 残基の範囲であり、好ましくは、10 ~ 100 残基の範囲であり、より好ましくは、15 ~ 60 残基の範囲である。

前記 N_1 のヌクレオチド残基数 n_1 は、特に制限されないが、例えば、0 ~ 40 残基の範囲であり、好ましくは、1 ~ 25 残基の範囲であり、より好ましくは、4 ~ 10 残基の範囲である。

前記 N_2 のヌクレオチド残基数 n_2 は、特に制限されないが、例えば、1 ~ 40 残基の範囲であり、好ましくは、2 ~ 20 残基の範囲であり、より好ましくは、2 ~ 8 残基の範囲である。

40

前記 N_3 のヌクレオチド残基数 n_3 は、特に制限されないが、例えば、1 ~ 50 残基の範囲であり、好ましくは、1 ~ 30 残基の範囲であり、より好ましくは、1 ~ 15 残基の範囲である。

前記 N_4 のヌクレオチド残基数 n_4 は、特に制限されないが、例えば、1 ~ 40 残基の範囲であり、好ましくは、1 ~ 20 残基の範囲であり、より好ましくは、1 ~ 10 残基の範囲である。

前記 N_5 のヌクレオチド残基数 n_5 は、特に制限されないが、例えば、1 ~ 50 残基の範囲であり、好ましくは、1 ~ 30 残基の範囲であり、より好ましくは、1 ~ 15 残基の範囲である。

50

前記 N_6 のヌクレオチド残基数 n_6 は、特に制限されないが、例えば、1 ~ 40 残基の範囲であり、好ましくは、1 ~ 20 残基の範囲であり、より好ましくは、1 ~ 10 残基の範囲である。

前記 N_7 のヌクレオチド残基数 n_7 は、特に制限されないが、例えば、1 ~ 50 残基の範囲であり、好ましくは、1 ~ 30 残基の範囲であり、より好ましくは、1 ~ 10 残基の範囲である。

前記 N_8 のヌクレオチド残基数 n_8 は、特に制限されないが、例えば、1 ~ 40 残基の範囲であり、好ましくは、2 ~ 20 残基の範囲であり、より好ましくは、2 ~ 8 残基の範囲である。

以上のヌクレオチド残基数 n_1 、 n_2 、 n_3 、 n_4 、 n_5 、 n_6 、 n_7 および n_8 は、特に制限されないが、以下の等式および不等式を満たすことが好ましい。

$$n_2 = n_8, n_4 = n_6, (n_3 + n_7) > n_5$$

【0019】

前記式 (I) で表わされる核酸分子は、DNA 分子でもよいし、RNA 分子でもよいが、RNA 分子であることが好ましい。本発明の核酸分子が RNA 分子である場合、RNA 分解酵素耐性であることが好ましい。RNA 分解酵素耐性にする手法は、特に制限されず、例えば、本発明の RNA 核酸分子のヌクレオチド残基の一部をメチル化等で修飾する方法、前記ヌクレオチド残基の一部または全部を DNA 化もしくは LNA 化する方法等があげられる。

【0020】

前記式 (I) において、前記ヌクレオチド残基の一部（一本鎖核酸全体のヌクレオチド残基のうち一部のヌクレオチド残基）が、修飾化ヌクレオチド残基であることが好ましい。前記修飾化ヌクレオチド残基としては、例えば、メチル化ヌクレオチド残基であることが好ましい。前記ヌクレオチド残基における修飾部位は、例えば、リボース部位が好ましい。前記塩基がピリミジン塩基の場合、例えば、2' 位、4' 位が修飾されていることが好ましく、プリン塩基の場合、例えば、2' 位、4' 位が修飾されていることが好ましい。また、5' 末端や 3' 末端に、数 10 kDa の PEG（ポリエチレングリコール）またはデオキシチミジンを結合させる方法等もあげられる。

【0021】

前記式 (I) において、前記一本鎖核酸全体のヌクレオチド残基の数は、特に制限されないが、例えば、7 ~ 150 残基の範囲であり、好ましくは、10 ~ 100 残基の範囲であり、より好ましくは、15 ~ 60 残基の範囲である。

【0022】

前記式 (I) において、前記修飾化ヌクレオチド残基の部位は、特に制限されないが、ステム構造形成可能な領域の末端であり、且つ、ループ構造形成可能な領域の末端であることが好ましい。具体例としては、前記式 (I) において、例えば、 N_2 の 5' 末端 (N_1 の 3' 末端)、 N_2 の 3' 末端 (N_3 の 5' 末端)、 N_3 の 3' 末端 (N_4 の 5' 末端)、 N_4 の 3' 末端 (N_5 の 5' 末端)、 N_5 の 3' 末端 (N_6 の 5' 末端)、 N_6 の 3' 末端 (N_7 の 5' 末端)、 N_7 の 3' 末端 (N_8 の 5' 末端) 等があげられ、中でも、 N_3 の 3' 末端 (N_4 の 5' 末端)、 N_5 の 3' 末端 (N_6 の 5' 末端)、 N_2 の 3' 末端 (N_3 の 5' 末端) 等が好ましい。

【0023】

前記式 (I) において、前記ヌクレオチド残基の一部が、例えば、LNA および DNA の少なくとも一方であることが好ましい。中でも、前記式 (I) で表わされる核酸分子が、前述のように RNA 分子の場合、前記ヌクレオチド残基の一部または全部が、例えば、LNA および DNA の少なくとも一方であることが好ましく、また、前記 RNA 分子は、LNA および DNA の両方を含んでもよい。

前記式 (I) において、LNA ヌクレオチドモノマーの数は、特に制限されないが、例えば、1 ~ 150 残基の範囲であり、好ましくは、1 ~ 100 残基の範囲であり、より好ましくは、1 ~ 10 残基の範囲である。

10

20

30

40

50

また、前記式(I)に含まれる L N A の長さは、特に制限されないが、例えば、1 ~ 10 残基の範囲であり、好ましくは2 残基である。前記式(I)において、D N A を構成するデオキシリボヌクレオチドモノマーの数は、特に制限されないが、例えば、1 ~ 150 残基の範囲であり、好ましくは、1 ~ 100 残基の範囲であり、より好ましくは、1 ~ 30 残基の範囲である。また、前記(I)に含まれる D N A の長さは、特に制限されないが、例えば、1 ~ 30 残基の範囲であり、好ましくは、3 ~ 10 残基の範囲であり、より好ましくは、4 残基の範囲である。

【 0 0 2 4 】

また、前記式(I)で表わされる核酸分子が R N A 分子であって、D N A を含む場合、前記式(I)において、ステム構造形成可能な部位に、前記 D N A を含むことが好ましい。具体的には、前記式(I)において、N₂ および N₇ の全部または一部に、D N A を含むことが好ましい。また、前記式(I)で表わされる核酸分子が R N A 分子であって、L N A を含む場合も、同様に、前記式(I)において、ステム構造形成可能な部位に、前記 L N A を含むことが好ましい。具体的には、前記式(I)において、N₂ および N₇ の全部または一部に、L N A を含むことが好ましい。

10

【 0 0 2 5 】

前記式(I)において、例えば、5' 末端および3' 末端の少なくとも一方にラベル化合物が結合していることが好ましく、5' 末端に前記ラベル化合物が結合していることがより好ましい。

【 0 0 2 6 】

前記ラベル化合物は、特に制限されないが、例えば、ビオチン、アビジン、蛍光団、酵素、放射性同位元素、チオール基やアミノ基などの官能基、メチレンブルーなどの電子受容体や N A D P H などの電子供与体、有機化合物や無機化合物、ルテニウムなどの電気化学発光物質等があげられ、ビオチンであることが好ましい。前記蛍光団は、特に制限されないが、例えば、フルオレセインとその誘導體、ローダミンとその誘導體、ダンシルクロリドとその誘導體、ウンベリフェロン等があげられる。前記酵素は、特に制限されないが、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコースオキシダーゼ、乳酸脱水素酵素、アミラーゼ等があげられる。放射性同位元素は、特に制限されないが、例えば、ヨウ素(¹³¹I、¹²⁵I、¹²³I、¹²¹I)、リン(³²P)、イオウ(³⁵S)、金属類(例えば ⁶⁸Ga、⁶⁷Ga、⁶⁸Ge、⁵⁴Mn、⁹⁹Mo、⁹⁹Tc、¹³³Xe 等)、トリチウム等があげられる。その他のラベルは、特に制限されないが、例えば、N A D H -、F M N H₂ -、アクリジニウムエステル、ルミノール等の発光物質、ルシフェラーゼ、ルシフェリン等の生物発光物質、G F P 等の生体蛍光蛋白質等があげられる。

20

30

【 0 0 2 7 】

前記本発明の核酸分子は、例えば、下記に示す配列からなる群から選択された少なくとも一つの配列からなることが好ましい。下記式において、d A、d G、d C および d T 等の「d N」は、デオキシリボヌクレオチド残基を示し、G および C 等の「N」は、L N A ヌクレオチド残基を示し、m C および m U 等の「m N」は、メチル化リボヌクレオチド残基を示す。

40

配列番号 1

dAdAdAdAdA-CGCUGAAGAGAAGACGGAAGGAGACGAAGCG-dT

配列番号 2

dAdAdAdAdA-GCUGAAGAGAAGACGGAAGGAGACGAAGC-dT

配列番号 3

dAdAdAdAdA-dGdCGCUGAAGAGAAGACGGAAGGAGACGAAGCdGdC

配列番号 4

dAdAdAdAdA-dGdCdGdCUGAAGAGAAGACGGAAGGAGACGAAdGdCdGdC

配列番号 5

dAdAdAdAdA-GCGmUGAAGAGAAGACGGAAGGAGACGAAGCGC

50

配列番号 6

dAdAdAdAdA-dGdCdGdCmUGAAGAGAAGACGGAAGGAGACGAAAdGdCdGdC

配列番号 7

dAdAdAdAdA-CGCmUGAAGAGAAGACGGAAGGAGACGAAAGCG-dT

【0028】

前記本発明の核酸分子において、例えば、前記マウスIgG抗体が、サブタイプ1のIgG抗体、サブタイプ2aのIgG抗体およびサブタイプ3のIgG抗体のうち少なくとも一つであることが好ましい。

【0029】

本発明において、マウス由来のIgG抗体のサブタイプとしては、特に制約はなく、例えば、サブタイプ1、サブタイプ2aおよびサブタイプ3並びにこれらを任意に有する異なるサブタイプを有するIgG抗体を混合したものが挙げられる。

10

【0030】

本発明の核酸分子は、いわゆるRNAプール等の核酸分子と、標的物質としてマウス等のげっ歯類由来のIgG抗体とを用いて、核酸分子と標的物質とが特異的に結合して形成される核酸分子/標的物質複合体から、この複合体の形成に関与した核酸分子のみを選択する方法で製造することが可能である。このような方法としては、例えば、SELEX法(Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment)と称される方法や、アガロースゲルやポリアクリルアミドゲル等の担体を用いて核酸分子/標的物質複合体を得た後にこの複合体の形成

20

【0031】

(SELEX法に準じた本発明の核酸分子の製造方法)

本発明の核酸分子は、SELEX法に従って、またこの方法に準じた方法で、RNAプールと標的物質とを反応させて得られるRNAプール-標的物質複合体を回収した後、この複合体から、この複合体の形成に関与したRNAプールのみを回収して、製造することが可能である。

【0032】

RNAプールとは、A、G、CおよびUからなる群から選択された塩基、並びに、この塩基の置換体を20~120個程度連結した領域(この領域を、以下、「ランダム領域」と称する。)を有する遺伝子配列を総称する遺伝子の混合物をいう。従って、RNAプールは、 $4^{20} \sim 4^{120}$ ($10^{12} \sim 10^{72}$)種類の複数の遺伝子が含まれ、 $4^{30} \sim 4^{60}$ ($10^{18} \sim 10^{36}$)種類の遺伝子が含まれることが好ましい。塩基の置換体としては、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素等のハロゲンや、メチル、エチルおよびプロピル等のアルキル基等、適当に置換された塩基が挙げられる。

30

【0033】

RNAプールは、ランダム領域を有する限り、その他の構造に制約はないが、本発明の核酸分子をSELEX法に準じて製造する場合、ランダム領域の5'末端および/又は3'末端には、後述のPCR等で利用するプライマー領域や、DNA依存性RNAポリメラーゼの認識領域を有することが好ましい。例えば、ランダム領域は、5'末端側からT7プロモーター等のDNA依存性RNAポリメラーゼの認識領域(以下、この領域を「RNAポリメラーゼ認識領域」と称する。)と、DNA依存性DNAポリメラーゼのプライマー領域(以下、この領域を「5'末端側プライマー領域」と称する。)とを連結し、この5'末端側プライマー領域の3'末端にランダム領域を連結し、さらにこのランダム領域の3'末端側にDNA依存性DNAポリメラーゼのプライマー領域(以下、この領域を、「3'末端側プライマー領域」と称する。)を連結した構造を有してもよい。また、RNAプールは、これらの領域の他に、標的物質への結合を補助する公知の領域を有してもよい。さらに、RNAプールは、ランダム領域の一部が各RNAプールにおいて同じ配列を有するものであってもよい。

40

【0034】

50

ランダム領域は、RNAプールのランダム領域のUをTに置き換えた初期プールを鋳型として、PCR法に基づいて、遺伝子増幅した後、得た遺伝子産物と、T7ポリメラーゼ等のDNA依存性RNAポリメラーゼとを反応させて、調製されてもよい。また、初期プールに相補的な遺伝子を合成し、RNAポリメラーゼ認識領域と、5'末端側プライマー領域に相補的な配列とからなるプライマーを、初期プールにおいてこのプライマーと相補的な遺伝子にアニーリングさせて、PCR法に基づいて、調製されてもよい。

【0035】

次に、このようにして合成したRNAプールと、標的物質であるげっ歯類由来のIgG抗体とを水素結合等の分子間力を介して結合させる。この結合方法としては、RNAプールと標的物質とを、標的物質の結合等の機能が保たれる緩衝液中で一定時間インキュベートする方法が挙げられる。このようにして、緩衝液中でRNAプール-標的物質複合体が形成される。

10

【0036】

次に、このように形成されたRNAプール-標的物質複合体を回収する。緩衝液中には、この複合体の他、複合体の形成に関与しなかったRNAプールや標的物質が含まれるが、この複合体の回収方法としては、標的物質に結合性を有する核酸分子を回収することを目的として、緩衝液中に存在する複合体の形成に関与しなかったRNAプールを除去する方法により行えばよい。この方法としては、標的物質およびRNAプールの特定の成分への吸着性の違いを利用する方法や、複合体とRNAプールとの分子量の違いを利用する方法が挙げられる。

20

【0037】

標的物質およびRNAプールの特定の成分への吸着性の違いを利用した方法としては、例えば、ニトロセルロース等の標的物質に吸着性を有する膜を用いて、上述のRNAプール-標的物質複合体を有する緩衝液を濾過し、この膜上にRNAプール-標的物質複合体を吸着させ、その後、膜上に残存したRNAプール-標的物質複合体から、複合体の形成に関与したRNAプールを、例えばこの複合体におけるRNAプールと標的物質との結合を解除した後にRNAプールを回収する方法が挙げられる。

【0038】

また、RNAプール-標的物質複合体とRNAプールとの分子量の違いを利用した方法としては、アガロースゲル等、RNAプールを通過させ得るがRNAプール-標的物質複合体を通過させ得ない程度のポアを有する担体を利用して、RNAプール-標的物質複合体とRNAプールとを電気的に分離し、この複合体から、複合体の形成に関与したRNAプールを回収する方法が挙げられる。

30

【0039】

次に、このようにして得たRNAプール-標的物質複合体から回収した複合体の形成に関与したRNAプールを用いて、遺伝子増幅を行う。この遺伝子増幅の方法としては、RNAプールに含まれる5'末端側プライマー領域、3'末端側プライマー領域、RNAポリメラーゼ認識領域を利用する方法が挙げられる。例えば、複合体の形成に関与したRNAプールの3'末端側プライマー領域に相補的な遺伝子断片をプライマーとして用いて、トリ骨髄芽球症ウイルス由来リバーストランスクリプターゼ(AMV Reverse Transcriptase)等のRNA依存性DNAポリメラーゼを用いた逆転写反応に従ってcDNAを調製した後、このcDNAに含まれる5'末端側プライマー領域および3'末端側プライマー領域を利用して、DNA依存性DNAポリメラーゼを用いたPCR反応を行い、得た遺伝子産物に含まれるRNAポリメラーゼ認識領域を利用し、DNA依存性RNAポリメラーゼを用いて、*in vitro*転写反応を行って、RNAプールの遺伝子増幅を行ってもよい。

40

【0040】

このように遺伝子増幅された複合体の形成に関与したRNAプールと、標的物質とを用いて、上述のRNAプール-標的物質複合体を形成する方法以下の各方法を繰り返し行い、最終的に、標的物質としてのマウスおよびラット等由来のIgG抗体に特異的に結合す

50

る核酸分子、つまり、げっ歯類 (rodent) 由来の I g G 抗体に結合性を有する核酸分子を得ることができる。

【 0 0 4 1 】

(本発明における二次構造予測)

本発明の核酸分子は、上記の通りに得ることが出来るが、その塩基配列に基づいた二次構造予測の手法を用いた結果を参照して、得た核酸分子の一部を改変されたものであってもよい。この二次構造予測としては、核酸分子の二次構造の候補を探索し、この探索された二次構造候補のうち、エネルギー的に安定な二次構造を予測する方法であれば、特に制約はない。例えば、核酸分子の塩基配列を、ワトソン・クリック型等の塩基対を構成するステム領域と、このステム領域以外の塩基で構成されるループ構造等の一本鎖領域とに分割して得た二次構造候補のエネルギー関数を最小化することに基づく二次構造予測であってもよい。

10

【 0 0 4 2 】

この二次構造候補のエネルギー関数を最小化することに基づく二次構造予測について、説明する。まず、対象となる核酸分子の塩基配列のうち、ワトソン・クリック型等の塩基対を構成する塩基の候補と、この塩基対候補以外の一本鎖領域の候補とを探索する。探索された塩基対候補および一本鎖領域候補の全組合せのうち、塩基対候補を構成する塩基と一本鎖領域候補を構成する塩基とが重複する等、理論的に取り得ない組合せを除いて、二次構造候補を同定する。同定された二次構造候補のうち、二次構造候補のエネルギー関数を算出し、算出されたエネルギー関数が最小となる二次構造を探索する。この際、この二次構造候補のエネルギー関数の算出方法としては、二次構造候補を構成する個々のステム領域および一本鎖領域の自由エネルギーに基づいて、この二次構造候補における自由エネルギーを、二次構造候補のエネルギー関数とする方法であってもよい。このようにして、同定された二次構造候補のうち、エネルギー関数の最も小さい二次構造を、対象となる核酸分子の塩基配列の二次構造とする。

20

【 0 0 4 3 】

本発明の核酸分子は、このようにして得た二次構造の結果を参照して、二次構造のうちの特徴ある部位を構成する塩基の置換若しくは欠失によって、又は二次構造のうちの特徴ある部分への塩基の挿入等によって、改変されてもよい。例えば、上記の通り調製した核酸分子を親分子として、二次構造のステム領域および / 又は一本鎖領域を構成する塩基の一部を置換してもよい。また、二次構造のステム領域および / 又は一本鎖領域を構成する塩基の一部を欠失させてもよい。また、二次構造のステム領域および / 又は一本鎖領域に、単数又は複数の塩基を挿入して、ステム長さおよび / 又は一本鎖領域の長さを短縮 / 延長してもよい。

30

【 0 0 4 4 】

本発明の核酸分子は、この二次構造予測を用いて得た核酸分子の二次構造において、ステム長さ 3 以上のステム領域を、この核酸分子の末端に有することが好ましい。また、本発明の核酸分子において、ステム長さ 3 以上のステム領域の一本鎖領域側の末端の塩基に隣接する塩基が、アデニン以外の塩基であることが好ましい。また、本発明の核酸分子において、ステム長さ 3 以上のステム領域は、グアニン残基およびシトシン残基のみから構成されていることが好ましい。これらにより、げっ歯類 (rodent) 由来の I g G 抗体への結合性がさらに向上する。

40

【 0 0 4 5 】

(本発明の核酸分子の用途等)

本発明の核酸分子は、上記の通り、マウス等のげっ歯類由来の I g G 抗体に結合性を有することを特徴とするものである。従って、本発明の核酸分子の用途としては、マウス等のげっ歯類由来の I g G 抗体への結合性を利用する用途であれば特に制約はなく、S D S - P A G E (S D S ポリアクリルアミド電気泳動法) 法に準じて行われる泳動対象物の検出用として、E L I S A 法 (酵素免疫測定法 ; E n z y m e - L i n k e d I m m u n o S o r b e n t A s s a y) の測定の対象物若しくはこの対象物を含む複合体の検出

50

用として、ノースウエスタン法に準じて行われる泳動対象物の検出用として、又はマウス等のげっ歯類由来の I g G 抗体若しくはこの抗体を利用した精製用として用いられてもよい。

【0046】

例えば、本発明の核酸分子を SDS - PAGE 法に用いる場合には、泳動されたタンパク質を検出するために用いられてもよく、泳動されたタンパク質を検出するのに用いられたマウス等のげっ歯類由来の I g G 抗体を検出するのに用いられてもよい。

【0047】

また、本発明の核酸分子を ELISA 法に用いる場合には、測定の対象となるマウス等のげっ歯類由来 I g G を検出するのに用いられてもよく、また、測定の対象を検出するために用いられたマウス等のげっ歯類由来の I g G 抗体を検出するのに用いられてもよい。

10

【0048】

また、本発明の核酸分子をノースウエスタン法に用いる場合には、電気泳動の対象となるマウス等のげっ歯類由来の I g G 抗体を検出するのに用いられてもよく、また、泳動の対象となるタンパク質の検出に用いられるマウス等のげっ歯類由来の I g G 抗体を検出するのに用いられてもよい。

【0049】

また、本発明の核酸分子をマウス等のげっ歯類由来の I g G の精製に用いる場合、精製の対象となるマウス等のげっ歯類由来の I g G 抗体を精製するのに適当な形態で利用すればよく、例えば、本発明の核酸分子を、アガロースや合成樹脂からなるビーズに結合して、使用してもよい。このようにビーズに結合する形態としては、精製に用いる担体（例えば、アガロースや、合成樹脂からなるビーズ）に結合性を有するように、ビオチン化等、種々の改変が挙げられる。従って、本発明の核酸分子は、ビオチン化等の種々の改変を受けたものであってもよい。

20

【0050】

(本発明の核酸分子の応用例)

本発明の核酸分子の応用例としては、得た核酸分子を含有する試薬、この試薬を有するキット等、マウス等のげっ歯類由来の I g G 抗体への結合性を利用したものが挙げられる。例えば、上記の本発明の核酸分子を含有する試薬を用いて、マウス等のげっ歯類由来の I g G 抗体への結合を検出する検出キットとしてもよい。このようなキットの測定対象物としては、溶液、懸濁液のような液体系であってもよく、培養細胞や組織切片等、固形物であってもよい。

30

【0051】

また、本発明の検出キットにおいて、本発明の核酸分子以外の試薬としては、標的物質と核酸分子との結合を検出するために必要な物質を適宜選択すればよく、これは、検出キットに用いる核酸分子によって適宜選択すればよい。

【0052】

例えば、本発明の検出キットは、SDS - PAGE 法 (SDS ポリアクリルアミド電気泳動法) に準じて行うものであってもよく、この場合、検出キットに含まれる試薬としては、電気泳動の対象となるタンパク質の検出に用いるマウス等のげっ歯類由来 I g G に結合性を有する核酸分子であってもよく、また電気泳動の対象となるマウス等のげっ歯類由来 I g G に結合性を有する核酸分子であってもよい。

40

【0053】

また、本発明の検出キットは、ELISA 法に準じて行うものであってもよく、この場合、検出キットに含まれる試薬としては、測定の対象となるマウス等のげっ歯類由来 I g G に結合性を有する核酸分子が挙げられる。

【0054】

また、本発明の検出キットは、ノースウエスタン法に準じて行われるものであってもよく、この場合、検出キットに含まれる試薬としては、泳動の対象となるタンパク質の検出に用いられるマウス等のげっ歯類由来 I g G に結合性を有する核酸分子であってもよく、

50

また電気泳動の対象となるマウス等のげっ歯類由来 I g G に結合性を有する核酸分子であってもよい。

【0055】

つぎに、本発明の検出方法は、
 試料中の検出対象物を抗原とし、前記検出対象物と抗体とを反応させて免疫沈降させる免疫沈降工程と、
 前記免疫沈降物を変性させて前記試料の他の成分から分離する分離工程と、
 前記分離工程で分離した免疫沈降物の前記抗原に抗体を反応させる第1反応工程と、
 前記抗体反応工程の抗体に対し特異的に結合する結合剤を反応させる第2反応工程とを有し、
 前記第2反応工程の前記結合剤として、前記本発明の結合剤を用いることを特徴とする。

10

【0056】

本発明の核酸分子（特に、RNA分子）は、マウス等のげっ歯類由来 I g G に特異的に結合し、変性したマウス等のげっ歯類由来 I g G には特異性が低い。したがって、本発明の核酸分子（特に、RNA分子）を用いれば、例えば、SDS-PAGEの後、マウス I g G を用いたウエスタンブロット法で検出する場合、SDSで変性した抗体に結合すること少ないため、ノイズを押さえてクリアに検出対象物を検出可能である。したがって、本発明の検出方法において、前記分離工程が、SDS-PAGEであり、前記第1反応工程および前記第2反応工程がウエスタンブロット法であることが好ましい。

【0057】

次に、本発明の実施例について説明する。ただし、本発明は下記の実施例により制限されない。

20

【実施例】

【0058】

以下の実施例で使用した、マウス I g G 抗体に対するアプタマー（以下、「マウス I g G アプタマー」ともいう）のクローンを、下記表1に示す。下記表の「Modification」は、各配列の修飾を示す。具体的に、「5'-biotin」は、5'末端にビオチンが結合していること、「dA 5mer」は、5merのポリデオキシヌクレオチド残基、「stem LNA-2bp」および「stem LNA-4bp」は、ステム構造形成可能な領域に2bpまたは4bpのLNAを有すること、「stem DNA-2bp」および「stem DNA-4bp」は、ステム構造形成可能な領域に2bpまたは4bpのDNAを有すること、「+dT」は、3'末端にデオキシチミン残基を有すること、「methylation 21C」、「methylation 31C」および「methylation 10U」は、それぞれ、21番目のC、31番目のC、または10番目のUが、メチル化されていることを示す。また、下記表の「Sequence」において、「dN」は、デオキシリボヌクレオチドを示し、「下線N」は、LNAヌクレオチドモノマーを示し、「mN」は、塩基の2'位のメチル化（2'-O-methyl）を示す。また、これらのアプタマーについて、予想される二次構造を、図1～3にそれぞれ示す。

30

【0059】

40

【表 1】

Clone Name	配列番号	Modification	Sequence
MIG-m040	5	5'-biotin dA 5mer methylation 10U	biotin-dAdAdAdAdA- GCGCmUGAAGAGAAGACGGAAGGAGACGAAGCGC
MIG-m034	1	5'-biotin dA 5mer stem LNA-2bp +dT	biotin-dAdAdAdAdA- <u>CG</u> CUGAAGAGAAGACGGAAGGAGACGAAG <u>CG</u> -dT
MIG-m035	2	5'-biotin dA 5mer stem LNA-2bp +dT	biotin-dAdAdAdAdA- <u>GC</u> UGAAGAGAAGACGGAAGGAGACGAAG <u>GC</u> -dT
MIG-m036	3	5'-biotin dA 5mer stem DNA-2bp	biotin-dAdAdAdAdA- dGdCGCUGAAGAGAAGACGGAAGGAGACGAAGC dGdC
MIG-m037	4	5'-biotin dA 5mer stem DNA 4bp	biotin-dAdAdAdAdA- dGdCdGdCUGAAGAGAAGACGGAAGGAGACGAA dGdCdGdC
MIG-m041	6	5'-biotin dA 5mer methylation 10U stem DNA-4bp	biotin-dAdAdAdAdA- dGdCdGdCmUGAAGAGAAGACGGAAGGAGACGAA dGdCdGdC
MIG-m042	7	5'-biotin dA 5mer methylation 9U stem LNA-2bp +dT	biotin-dAdAdAdAdA- <u>CG</u> CmUGAAGAGAAGACGGAAGGAGACGAAG <u>CG</u> -dT

10

20

30

【実施例 1】

【0060】

まず、前記マウス I g G アプタマーについて、マウス由来 I g G 抗体との結合性を、ノースウエスタンプロット法により評価した。アプタマーとしては、前述の M I G - m 0 3 4、M I G - m 0 4 1 および M I G - m 0 4 2 のアプタマーを使用した。なお、M I G - m 0 4 1 は、10 番目のウラシル残基がメチル化され、且つ、ステム構造形成可能な領域に、4 b p の D N A を有するアプタマーである。また、M I G - m 0 4 2 は、M I G - m 0 3 4 において、9 番目のウラシル残基がメチル化され、且つ、ステム構造形成可能な領域に、2 b p の L N A を有するアプタマーである。

40

【0061】

ノースウエスタンプロット法は、まず、抗原として、50 n g、100 n g および 200 n g の FLAG-BAP Control Protein (SIGMA #P7582) を S D S - P A G E 後、P V D F 膜へ転写した。そして、前記 P V D F 膜の前記抗原に、一次抗体として 1 / 1000 に希釈した ANTI-FLAG M2 Monoclonal Antibody (SIGMA #F3165 Lot#086K6012) を結合させ、さらに、前記各アプタマーをそれぞれ前記一次抗体に結合させた。そして、さらに、ペルオキシダーゼ標識化ストレプトアビジン (G E ヘルスケア社製) と基質 C P S - 1

50

(SIGMA社製)を添加して、前記基質を発光させ、フィルムへの感光を行った。なお、M I G - m 0 3 4のアプタマー濃度は、20 nMとし、M I G - m 0 4 1およびM I G - m 0 4 2のアプタマー濃度は、10 nMとした。

【0062】

これらの結果を図4に示す。図4は、ノースウエスタンプロット法の結果を示す写真である。図4において、(a)は、M I G - m 0 3 4の結果、(b)は、M I G - m 0 4 1の結果、(c)は、M I G - m 0 4 2の結果をそれぞれ示し、各図において、レーンMは、ビオチン化分子量マーカー、レーン1は、200 ngのF L A G - B A P、レーン2は、100 ngのF L A G - B A P、レーン3は、50 ngのF L A G - B A Pを使用した結果である。図4に示すように、いずれのアプタマーを使用した場合も、抗原に特異的なシグナルが検出できた。中でも、M I G - m 0 4 1およびM I G - m 0 4 2は、アプタマー濃度を10 nMの低濃度としたが、十分にシグナルが確認できた。

10

[実施例2]

【0063】

前記マウスI g Gアプタマーと、各種サブタイプのマウス由来I g G抗体との結合を解析した。前記アプタマーとして、前述のM I G - m 0 3 4、M I G - m 0 4 1およびM I G - m 0 4 2のアプタマーを使用した。

【0064】

前記結合の解析は、B I A C O R E 3000 (GEヘルスケア社製)を用いて、その使用説明書にしたがって行った。また、前記B I A C O R Eで測定したシグナル強度(R U : R e s o n a n c e U n i t)から、B I A e v a l u a t i o nソフトウェアを用いて1:1 Langmuir結合モデルで解析を行って、各アプタマーとマウスI g G抗体との解離定数を求めた。前記B I A C O R Eの測定条件および手法等は、下記の文献の記載に従った。

20

(文献)

Yoshihito Yoshida*, Nobuya Sakai*, Hiromi Masuda,
Makio Furuichi, Fumiko Nishikawa, Satoshi Nishikawa,
Hiroshi Mizuno and Iwao Waga:

“Rabbit antibody detection with RNA aptamers”

Analytical Biochemistry, Vol. 375, pp. 217-222, (2008)

30

【0065】

これらの結果を、図5~7に示す。図5~図7は、経時的なシグナル強度の変化を示すグラフである。図5は、サブタイプ1のマウスI g G抗体とアプタマーとの結合、図6は、サブタイプ2aのマウスI g Gとアプタマーとの結合、図7は、サブタイプ3のマウスI g Gとアプタマーとの結合を、それぞれ示し、各図ともに、上から、M I G - m 0 3 4、M I G - m 0 4 1およびM I G - m 0 4 2を使用した結果である。また、各グラフにおいて、縦軸は、前記B I A C O R Eで測定したシグナル強度(R U)を示し、横軸は、解析時間(秒)を示す。横軸において、100秒は、流速20 μ L/minで解析対象物をフローセルにインジェクション開始した時点であり、前記インジェクションを2分間(120秒間)継続し、その後、ランニングバッファーを3分間(180秒間)送液しアプタマーとI g Gの相互作用を示すセンサグラムを得た。グローバルフィッティング解析を行い、正確なK d値を求めるために、ターゲット濃度の異なる条件下でセンサグラムを得た。6つの結果はそれぞれシグナルの強い順から順にアナライトの濃度が、100 nM、50 nM、25 nM、12.5 nM、6.25 nMおよび0 nMのセンサグラムを示している。

40

【0066】

また、下記表2に、各マウスI g Gアプタマーについて、各サブタイプのマウスI g G抗体との解離定数を示す。

【0067】

【表 2】

Clone Name	配列番号	Kd (M)		
		IgG1	IgG2a	IgG3
MIG-m034	1	1E-12 以下	9.95E-10	8.80E-09
MIG-m041	6	1E-12 以下	9.59E-10	8.40E-09
MIG-m042	7	1E-12 以下	4.36E-10	5.57E-09

【0068】

前記図 5 ~ 7 および前記表 2 の結果から、いずれのアプタマーについても、各サブタイプのマウス由来 IgG との優れた結合性が示された。中でも、MIG - m 0 3 4 を修飾した MIG - m 0 4 1 および MIG - m 0 4 2 は、マウス由来 IgG に対して、より高い結合能を示し、特に IgG 1 に対しては、極めて特異的な結合を示すことが分かった。ステムの GC 対が LNA である MIG - m 0 3 4 をベースにステム領域を DNA に置換した MIG - m 0 4 1 および 9 位のウリジンをメチル化した MIG - m 0 4 2 の結合力はほぼ同等である。これらステム領域の塩基対およびその近傍にある U はマウス IgG の結合に関与しないことが考えられる。

10

[実施例 3]

【0069】

アプタマーとして、MIG - m 0 3 4、MIG - m 0 3 5、MIG - m 0 3 6、MIG - m 0 3 7 および MIG - m 0 4 0 を用いた以外は、実施例 2 と同様に実験を行った。これらの結果を、図 8 ~ 10 に示す。図 8 ~ 10 は、経時的なシグナル強度の変化を示すグラフであり、それぞれ、サブタイプ 1、サブタイプ 2 a およびサブタイプ 3 のマウス IgG を用いた結果である。また、前記 B I A C O R E の測定結果から求めた、前記各アプタマーと前記各サブタイプのマウス IgG との解離定数を下記表に示す。下記表の結果から、これらのアプタマーは 2 次抗体試薬として非常に汎用性が高く、結合性に優れていることが確認された。また実施例 1 よりステム領域の塩基対およびその近傍にある U はマウス IgG の結合に関与しないことが考えられたため、系統的な修飾塩基を持つクローンを作成し、Kd 値を求めた。どのクローンに対してもマウス抗体のサブタイプに対して結合力はほぼ変わらないため、どのサブタイプに対しても、ステム領域は結合に関与しないことが考えられ、更に各サブタイプに対するアプタマーの結合様式は同じと考えられた。

20

30

【0070】

【表 3】

Clone Name	配列番号	Kd (M)		
		IgG1	IgG2a	IgG3
MIG-m034	1	6.34E-10	1.09E-09	8.33E-09
MIG-m035	2	1E-12 以下	1.92E-09	1.39E-07
MIG-m036	3	5.48E-09	4.61E-09	1.38E-08
MIG-m037	4	1.70E-09	3.70E-09	9.85E-09
MIG-m040	5	4.11E-10	1.23E-09	3.46E-09

40

[実施例 4]

【0071】

前記アプタマーを、FBS 溶液に添加し、このサンプルを、室温 (2 0) で添加後 3 0 分、1 時間、2 時間、4 時間保持した。保持後の前記サンプルに RNase インヒビター (RNAs e c u r e ; A m b i o n 社製) を添加した 2 x U r e a サンプル溶液を等量加えて 6 0 ° C で 1 0 分間処理しヌクレアーゼの反応を止めた。前記サンプリングした RNA を、1 5 % 7 M 尿素ポリアクリルアミドゲル (1 x T B E , 1 4 0 m m x 7 0 m m x 1 m m ゲル板) に 1 レーンあたり 1 0 ~ 2 0 n g 添加し、2 0 0 V 定電圧で 8 0 ~ 9

50

0 分間電気泳動を行った後、ゲルを SYBR Gold (Invitrogen社製) で染色し UV トランスイルミネーター上で撮影した。得られた画像データのうち、アプタマー全長のバンドを ImageJ 1.37v (Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J., Ram, S.J. "Image Processing with ImageJ" Biophotonics International, 11,7,36-42,2004.) を用いてデンシトメトリー解析を行い数値化し、各アプタマーの安定性を評価した。前記サンプルにおいて、前記アプタマーの終濃度は、 $10 \mu\text{M}$ とし、前記 FBS の終濃度は、 1% とした。前記アプタマーとして、MIG - m034、MIG - m041 および MIG - m042 を使用した。

【0072】

これらの結果を、図 11 に示す。図 11 は、一定時間保持した後のアプタマーサンプルの電気泳動写真である。図 11 において、m034、m041 および m042 は、それぞれ、前記アプタマーの種類を示す。また、各レーンは、M が、RNA マーカー、1 ~ 5 は、それぞれ保持時間 0 時間、0.5 時間、1.0 時間、2.0 時間および 4.0 時間の結果を示す。前記保持時間は、FBS 溶液へのアプタマーの添加時を 0 時間とした。

10

【0073】

また、電気泳動の解析結果を定量化した結果を、図 12 に示す。図 12 は、電気泳動におけるバンドの強度の経時変化を示すグラフである。縦軸は、relative intensity (%) を示し、横軸は、保持時間 (hr) を示す。同図に示すように、 $1/100$ 希釈 FBS 中での前記アプタマーの半減期は 1 ~ 2 時間と算出された。以上の結果から、IgG との結合に関与しない部位に修飾を施すことにより、アプタマーの半減期を延長できることが分かった。

20

[実施例 5]

【0074】

まず、前記 MIG - m041 アプタマーについて、マウス由来 IgG 抗体との結合の特異性を、ノースウエスタンブロット法により評価した。実験条件は、抗原として、抗 FLAG マウス IgG ($0.5 \mu\text{g}$)、抗 FLAG マウス IgG ($0.5 \mu\text{g}$) および FLAG - BAP タンパク質 (100ng)、並びに、FLAG - BAP タンパク質 (100ng) を用い、アプタマーとして、 20nM の MIG - m041 を用いた以外は、実施例 1 と同様に行った。

[比較例 1]

30

【0075】

実施例 5 の比較例として、上記の抗原に対するウエスタンブロット法を行った。前記 MIG - m041 アプタマーに代えて、ビオチン化抗マウス IgG ヤギ抗体 (CHEMICON 社製 AP124B) を用いた以外は、実施例 5 と同様にして、プロットングを行った。

【0076】

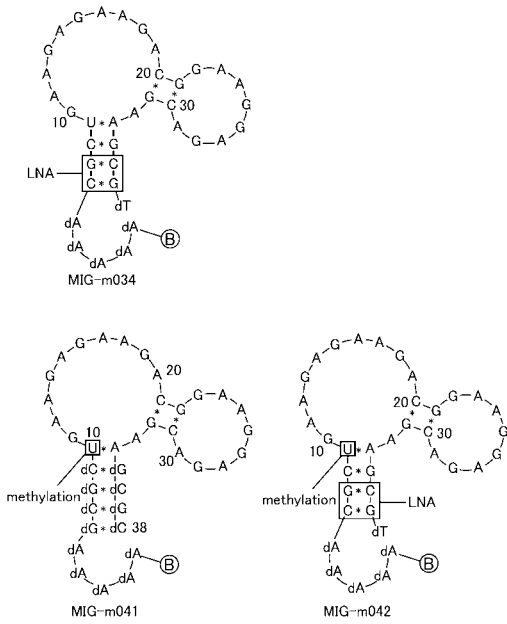
実施例 5 および比較例 1 の結果を、図 13 に示す。同図 (a) は、実施例 5 のノースウエスタンブロット法の結果を示す写真であり、同図 (b) は、比較例 1 のウエスタンブロット法の結果を示す写真である。同図 (a) および (b) において、レーン M は、ビオチン化分子量マーカー、レーン 1 は、抗 FLAG マウス IgG ($0.5 \mu\text{g}$)、レーン 2 は、抗 FLAG マウス IgG ($0.5 \mu\text{g}$) および FLAG - BAP タンパク質 (100ng)、レーン 3 は、FLAG - BAP タンパク質 (100ng) を使用した結果である。同図 (a) に示すように、前記 MIG - m041 アプタマーを使用した場合、目的タンパク質である FLAG - BAP タンパク質のシグナルのみ検出された。一方、同図 (b) に示すように、通常の二次抗体を用いたウエスタンブロット法の場合、抗 FLAG マウス IgG が変性して生じた抗体重鎖および抗体軽鎖のシグナルが検出された。この結果から、このアプタマーは、ネイティブな形態の IgG にのみ結合し、変性した IgG には結合しないことが明らかになった。また、このアプタマーを免疫沈降後のサンプルのプロットングに用いると、抗体重鎖および抗体軽鎖のバックグラウンドの無いきれいな結果が得られることが分かった。

40

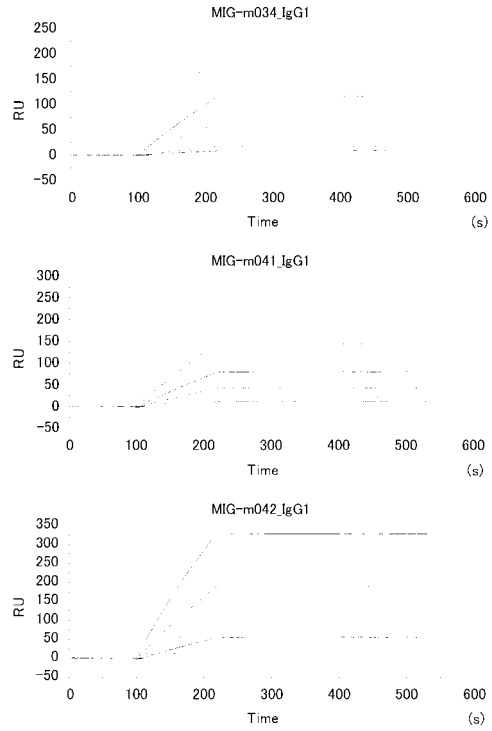
【0077】

50

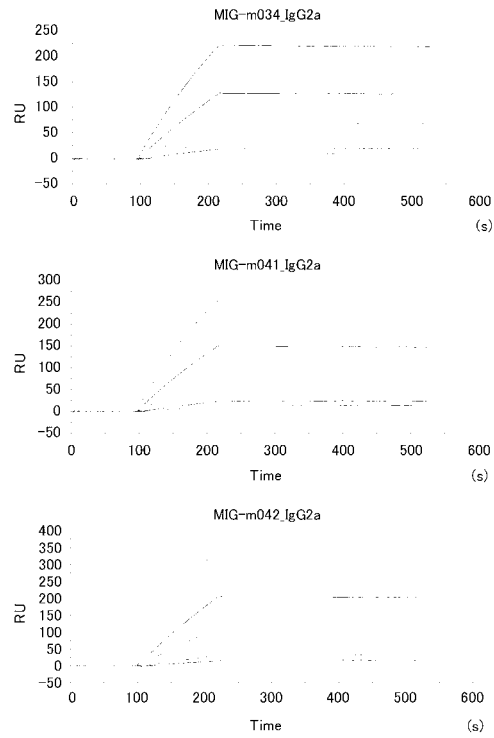
【 図 3 】



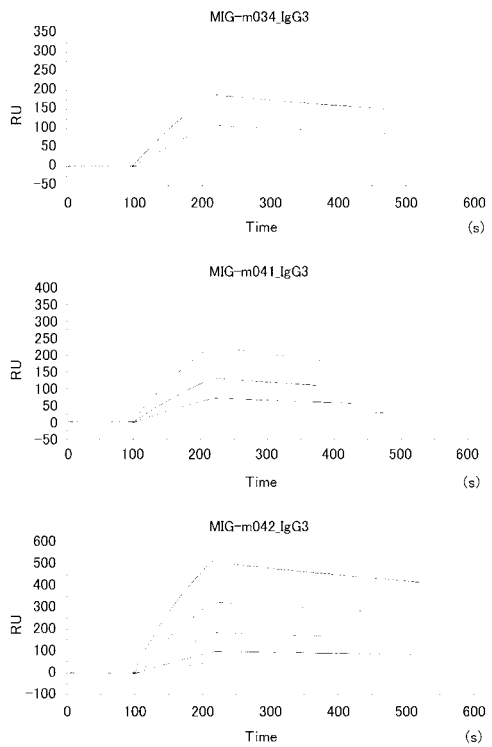
【 図 5 】



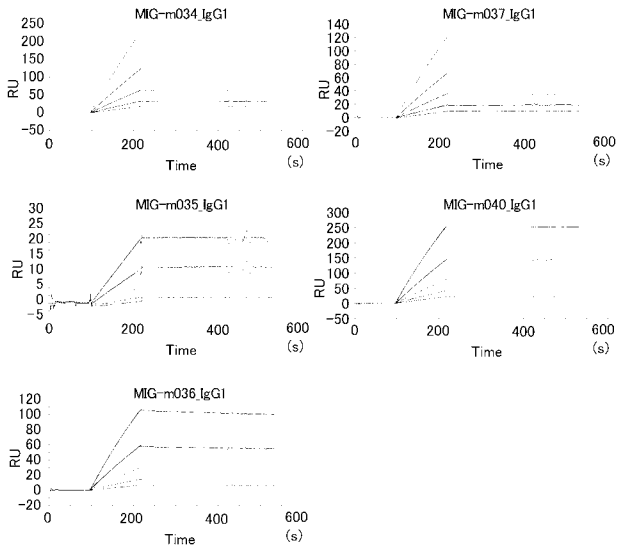
【 図 6 】



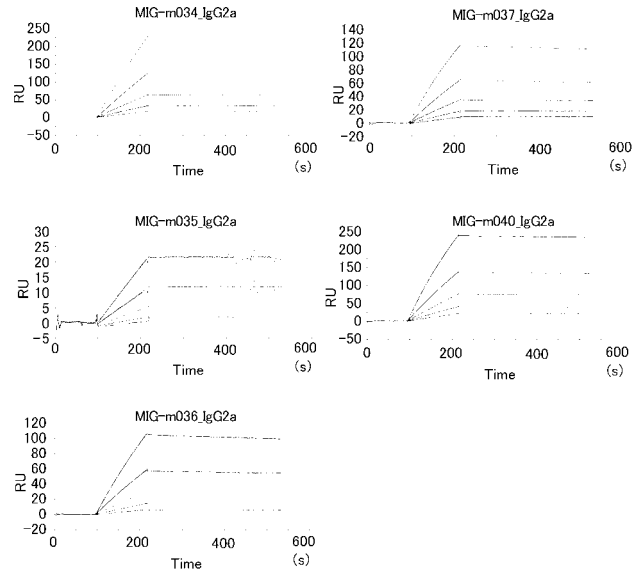
【 図 7 】



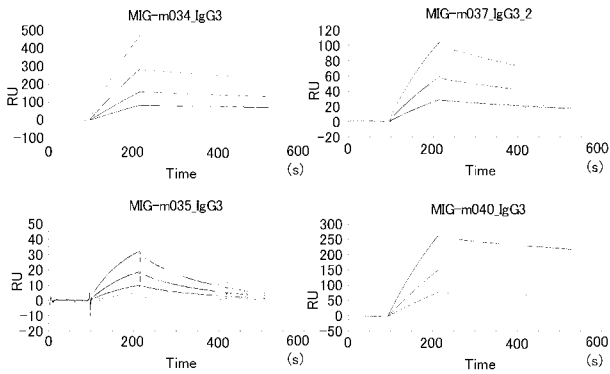
【 図 8 】



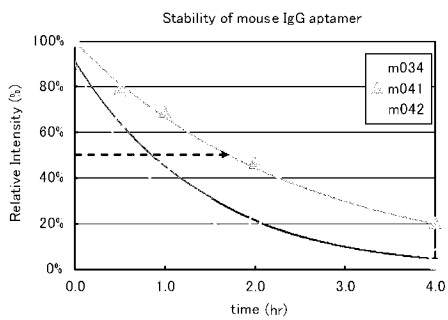
【 図 9 】



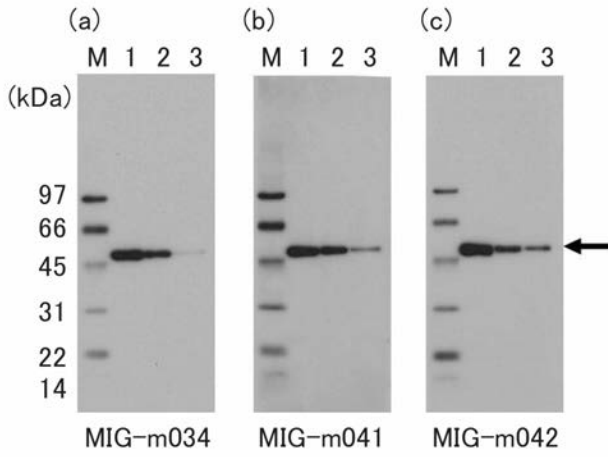
【 図 10 】



【 図 12 】



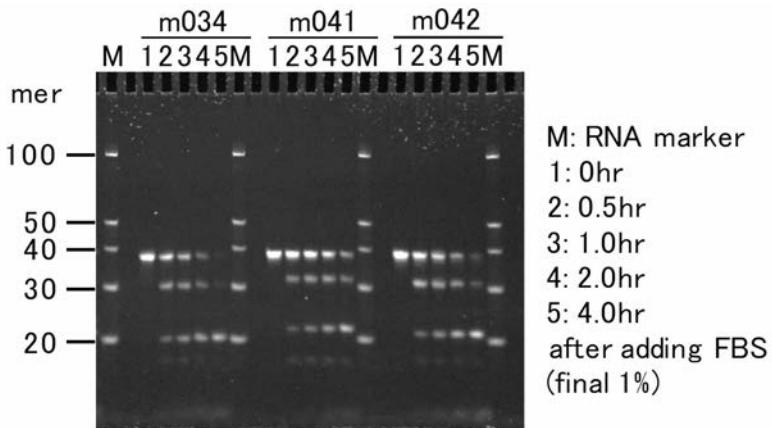
【 図 4 】



Lane M: biotinylated MW marker
Lane 1: 200 ng FLAG-BAP
Lane 2: 100 ng FLAG-BAP
Lane 3: 50 ng FLAG-BAP

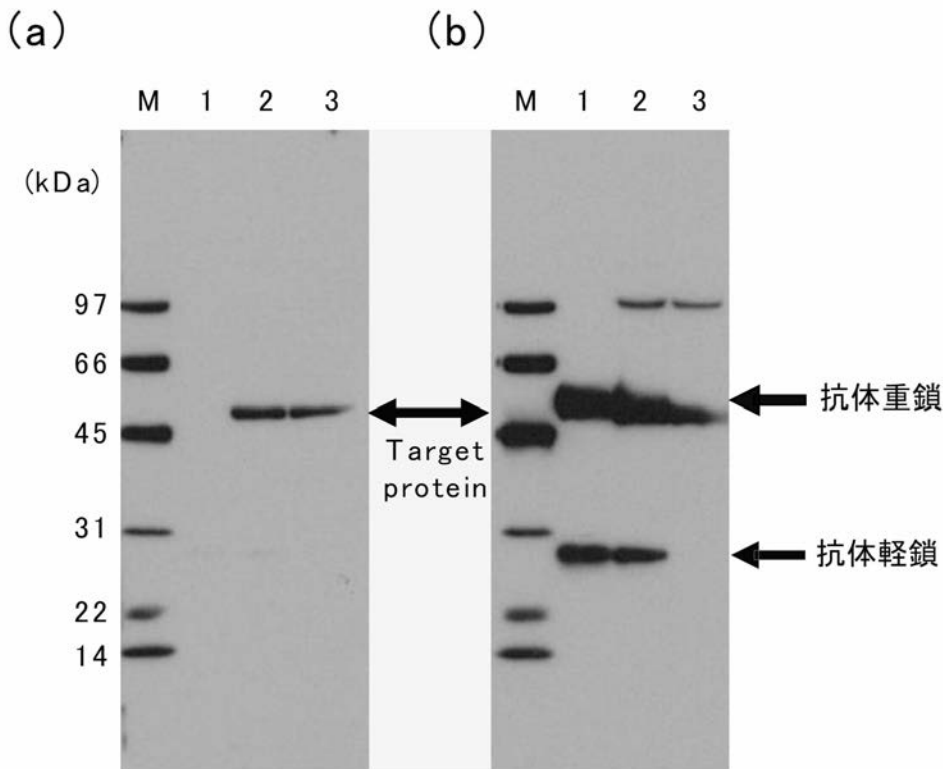
Substrate: CPS-1 (Sigma)
Expose: 30 sec

【 図 1 1 】



M: RNA marker
1: 0hr
2: 0.5hr
3: 1.0hr
4: 2.0hr
5: 4.0hr
after adding FBS
(final 1%)

【図 1 3】



【配列表】

[2015062423000001.app](#)

【手続補正書】

【提出日】平成26年11月28日(2014.11.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

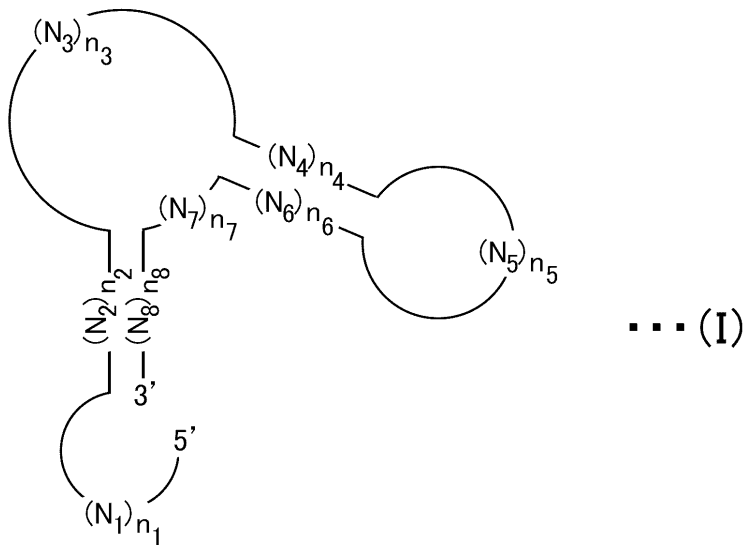
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

げっ歯類由来 IgG 抗体に対し特異的結合性を有し、解離定数が $1 \mu\text{M}$ 以下である一本鎖の核酸分子であり、下記一般式 (I) で表され、
前記核酸分子は、ステム長さ3以上のステム領域を、前記核酸分子の末端に有し、
前記ステム長さ3以上のステム領域において、5'末端側の鎖における3'末端の塩基の一本鎖領域側に隣接する塩基が、アデニン以外の塩基であり、かつ、
前記ステム長さ3以上のステム領域は、グアニン残基およびシトシン残基のみから構成されていることを特徴とする核酸分子。

【化 1】



前記式 (I) において、前記 N_1 、 N_2 、 N_3 、 N_4 、 N_5 、 N_6 、 N_7 および N_8 は、ヌクレオチド残基を示し、各 n_1 、 n_2 、 n_3 、 n_4 、 n_5 、 n_6 、 n_7 および n_8 は、それぞれ前記ヌクレオチド残基 N_1 、 N_2 、 N_3 、 N_4 、 N_5 、 N_6 、 N_7 および N_8 の数を示し、

前記 N_3 、 N_5 および N_7 は、それぞれループ構造であり、前記 N_1 は、ループ構造形成可能であり、前記 N_2 および N_8 は、相互に水素結合してステム構造を形成し、前記 N_4 および N_6 は、相互に水素結合してステム構造を形成しており、

前記式 (I) において、

前記一本鎖核酸全体のヌクレオチド残基の数は、15 ~ 150 残基の範囲であり、

前記 N_1 のヌクレオチド残基数 n_1 は、0 ~ 40 残基の範囲であり、

前記 N_2 のヌクレオチド残基数 n_2 は、3 ~ 40 残基の範囲であり、

前記 N_3 のヌクレオチド残基数 n_3 は、1 ~ 50 残基の範囲であり、

前記 N_4 のヌクレオチド残基数 n_4 は、3 ~ 40 残基の範囲であり、

前記 N_5 のヌクレオチド残基数 n_5 は、1 ~ 50 残基の範囲であり、

前記 N_6 のヌクレオチド残基数 n_6 は、3 ~ 40 残基の範囲であり、

前記 N_7 のヌクレオチド残基数 n_7 は、1 ~ 50 残基の範囲であり、

前記 N_8 のヌクレオチド残基数 n_8 は、3 ~ 40 残基の範囲である。

【請求項 2】

前記式 (I) において、前記ヌクレオチド残基の一部がメチル化ヌクレオチド残基であることを特徴とする請求項 1 記載の核酸分子。

【請求項 3】

RNA 分子であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の核酸分子。

【請求項 4】

前記式 (I) において、前記ヌクレオチド残基の一部が LNA および DNA の少なくとも一方であることを特徴とする請求項 3 記載の核酸分子。

【請求項 5】

前記式 (I) において、5' 末端にラベル化合物が結合していることを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 6】

前記ラベル化合物が、ビオチンであることを特徴とする請求項 5 記載の核酸分子。

【請求項 7】

前記げっ歯類由来 IgG が、マウス由来 IgG であることを特徴とする請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 8】

前記マウス由来 I g G 抗体が、サブタイプ 1 の I g G 抗体、サブタイプ 2 a の I g G 抗体およびサブタイプ 3 の I g G 抗体のうち少なくとも一つであることを特徴とする請求項 7 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げっ歯類由来 I g G 抗体に対する結合剤。

【請求項 10】

請求項 9 記載の結合剤を含むことを特徴とするげっ歯類 I g G 由来抗体の検出試薬。

【請求項 11】

請求項 10 記載の検出試薬を含むことを特徴とするげっ歯類由来 I g G 抗体の検出キット。

【請求項 12】

試料中の検出対象物を抗原とし、前記検出対象物と抗体とを反応させて免疫沈降させる免疫沈降工程と、

前記免疫沈降物を変性させて前記試料の他の成分から分離する分離工程と、

前記分離工程で分離した免疫沈降物の前記抗原に抗体を反応させる第 1 反応工程と、

前記抗体反応工程の抗体に対し特異的に結合する結合剤を反応させる第 2 反応工程とを有し、

前記第 2 反応工程の前記結合剤として、請求項 9 記載の結合剤を用いることを特徴とする検出方法。

【請求項 13】

前記分離工程が、S D S - P A G E であり、前記第 1 反応工程および前記第 2 反応工程がウエスタンブロット法であることを特徴とする請求項 12 記載の検出方法。

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 27/447 (2006.01)		G 0 1 N 33/53		N
		G 0 1 N 27/26		3 0 1 A

- (72)発明者 堀井 克紀
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
- (72)発明者 古市 真木雄
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
- (72)発明者 八木 博隆
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
- (72)発明者 秋富 穰
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
- (72)発明者 山口 美峰子
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
- (72)発明者 加藤 信太郎
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
- (72)発明者 西潟 憲策
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
- (72)発明者 和賀 巖
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

专利名称(译)	具有与啮齿动物来源的IgG抗体，结合剂，检测试剂和检测试剂盒结合能力的核酸分子		
公开(公告)号	JP2015062423A	公开(公告)日	2015-04-09
申请号	JP2014230067	申请日	2014-11-12
[标]申请(专利权)人(译)	日本电气方案创新株式会社		
申请(专利权)人(译)	NEC软件有限公司		
[标]发明人	竹中洋美 吉田嘉仁 堀井克紀 古市真木雄 八木博隆 秋富穰 山口美峰子 加藤信太郎 西瀧憲策 和賀巖		
发明人	竹中 洋美 吉田 嘉仁 堀井 克紀 古市 真木雄 八木 博隆 秋富 穰 山口 美峰子 加藤 信太郎 西瀧 憲策 和賀 巖		
IPC分类号	C12N15/115 C12Q1/68 C12M1/00 C12M1/34 G01N33/53 G01N27/447		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.H C12Q1/68.A C12M1/00.A C12M1/34.F C12M1/34.Z G01N33/53.N G01N27/26.301.A C12N15/00.H C12N15/00.HZN.A C12N15/115.Z G01N27/447.301.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/HA12 4B029/AA07 4B029/BB17 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/CC02 4B029/CC08 4B029/FA12 4B063/QA18 4B063/QQ22 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR02 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR58 4B063/QS03 4B063/QS32 4B063/QS36 4B063/QX01		
代理人(译)	Tsuji maru 一郎		
其他公开文献	JP6041399B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种核酸分子，其能够比抗体更容易地制备并且具有等于或高于抗体的结合能力，并且具有与啮齿动物来源的IgG抗体的结合能力，使用该核酸分子的结合剂以及检测。提供了试剂和检测试剂盒。具有与啮齿动物来源的IgG抗体的结合特性且解离常数为1 μ M以下的核酸分子。啮齿动物来源的IgG抗体的结合剂，其包含核酸分子。啮齿动物衍生的IgG抗体的检测试剂，其包含结合剂。用于检测来自啮齿动物的IgG抗体的试剂盒，其包含检测试剂。[选择图]无

載の核酸分子。

【化 1】

