明　細　書

発明の名称 ：

インフルエンザウイルス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、インフルエンザウイルス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] 近年、季節性インフルエンザウイルスおよび新型インフルエンザウイルスの感染が拡大しており、その検出が重要視されている。

[0003] インフルエンザウイルスの検出には、例えば、遺伝子増幅を利用する方法や、抗体を用いる方法が採用されている。前者の方法は、サンプル中の核酸について、ＰＣＲ等により、インフルエンザウイルスに特有の塩基配列を増幅させ、増幅の有無によって、インフルエンザウイルスへの感染を判断する方法である。しかしながら、遺伝子増幅を行うには、例えば、人体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。また、類似する配列等が増幅されることによる擬陽性の問題もある。

[0004] また、抗体に関しては、例えば、その調製作業が煩雑でありコストもかかる。また、抗体は、目的の抗原以外に対する非特異的結合の点から、検出精度の問題がある。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（非特許文献１、２）。しかしながら、これまでに報告されているインフルエンザウイルスに対する核酸分子は、その結合能が不十分であることから、新たな核酸分子の提供が求められている。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Ｊｅｏｎら、Ｊ．　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ．　２００４　２７９（４６）、４８４１０－４８４１９

非特許文献2：Ｃｈｅｎｇら、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ． ２００８ ３６６（３）、６７０－６７４

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、インフルエンザウイルスの検出等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

[0007] 本発明の核酸分子は、下記（ａ）～（ｄ）からなる群から選択された少なくとも一つのポリヌクレオチドを含むことを特徴とするインフルエンザウイルスに結合する核酸分子である。

（ａ）配列番号１～３０のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド

（ｂ）前記（ａ）のいずれかの塩基配列において、１もしくは数個の塩基が欠失、置換、挿入および／または付加された塩基配列からなり、インフルエンザウイルスに結合するポリヌクレオチド

（ｃ）前記（ａ）のいずれかの塩基配列に対して、８０％以上の同一性を有する塩基配列からなり、インフルエンザウイルスに結合するポリヌクレオチド

（ｄ）前記（ａ）のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジ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、インフルエンザウイルスに結合するポリヌクレオチド

[0008] 本発明の結合剤は、前記本発明の核酸分子を含むことを特徴とする、インフルエンザウイルスに対する結合剤である。

発明の効果

[0009] 本発明の核酸分子は、インフルエンザウイルスに結合可能である。このため、本発明の核酸分子によれば、例えば、インフルエンザウイルスを検出できる。したがって、本発明の核酸分子は、例えば、臨床分野、畜産分野等に

おけるインフルエンザウイルスの検出に極めて有用なツールとなる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図１は、本発明におけるポリヌクレオチドの推定二次構造を示す模式図である。

[図2]図２は、本発明におけるポリヌクレオチドの推定二次構造を示す模式図である。

[図3]図３は、本発明におけるポリヌクレオチドの推定二次構造を示す模式図である。

[図4]図４は、本発明の実施例Ａ１において、標的タンパク質に対する核酸分子の結合能を示すグラフである。

[図5]図５は、本発明の実施例Ａ１において、抗体に対する核酸分子の結合能を示すグラフである。

[図6]図６は、本発明の実施例Ａ４において、標的タンパク質に対する核酸分子の結合能を示すグラフである。

[図7]図７は、本発明の実施例Ａ４において、抗体に対する核酸分子の結合能を示すグラフである。

[図8]図８は、本発明の実施例Ａ６において、核酸分子とＨＡと抗体との結合能を示すグラフである。

[図9]図９は、本発明の実施例Ｂ１において、標的タンパク質に対する核酸分子の結合能を示すグラフである。

[図10]図１０は、本発明の実施例Ｂ２において、標的タンパク質に対する核酸分子の結合能を示すグラフである。

[図11]図１１は、本発明の実施例Ｂ３において、標的タンパク質に対する核酸分子の結合能を示すグラフである。

[図12]図１２は、本発明の実施例Ｂ４において、標的タンパク質に対する核酸分子の結合能を示すグラフである。

[図13]図１３は、本発明の実施例Ｂ５において、標的タンパク質に対する核酸分子の結合能を示すグラフである。

[図14]図１４は、本発明の実施例Ｂ５において、標的タンパク質に対する核酸分子の結合能を示すグラフである。

[図15]図１５は、本発明の実施例Ｂ６において、標的タンパク質に対する核酸分子の結合能を示すグラフである。

[図16]図１６は、本発明の実施例Ｂ７において、標的タンパク質に対する核酸分子の結合能を示すグラフである。

[図17]図１７は、本発明の実施例Ｃ１において、標的タンパク質に対する核酸分子の結合能を示すグラフである。

[図18]図１８は、本発明の実施例Ｃ２において、標的タンパク質に対する核酸分子の結合能を示すグラフである。

[図19]図１９は、本発明におけるポリヌクレオチドの推定二次構造を示す模式図である。

[図20]図２０は、本発明におけるポリヌクレオチドの推定二次構造を示す模式図である。

[図21]図２１は、本発明におけるポリヌクレオチドの推定二次構造を示す模式図である。

[図22]図２２は、本発明におけるポリヌクレオチドの推定二次構造を示す模式図である。

[図23]図２３は、本発明におけるポリヌクレオチドの推定二次構造を示す模式図である。

[図24]図２４は、本発明におけるポリヌクレオチドの推定二次構造を示す模式図である。

[図25]図２５は、本発明の実施例Ｄ１において、インフルエンザウイルスに対する核酸分子の結合能を示すグラフである。

[図26]図２６は、本発明の実施例Ｄ１において、インフルエンザウイルスに対する核酸分子の結合能を示すグラフである。

[図27]図２７は、本発明の実施例Ｄ２において、インフルエンザウイルスに対する核酸分子の結合能を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明の核酸分子は、前述のように、下記（ａ）～（ｄ）からなる群から選択された少なくとも一つのポリヌクレオチドを含むことを特徴とするインフルエンザウイルスに結合する核酸分子である。

（ａ）配列番号１～３０のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド

（ｂ）前記（ａ）のいずれかの塩基配列において、１もしくは数個の塩基が欠失、置換、挿入および／または付加された塩基配列からなり、インフルエンザウイルスに結合するポリヌクレオチド

（ｃ）前記（ａ）のいずれかの塩基配列に対して、８０％以上の同一性を有する塩基配列からなり、インフルエンザウイルスに結合するポリヌクレオチド

（ｄ）前記（ａ）のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジ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、インフルエンザウイルスに結合するポリヌクレオチド

[0012] 本発明において、「インフルエンザウイルスに結合する」とは、例えば、インフルエンザウイルスに対する結合能を有している、または、インフルエンザウイルス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インフルエンザウイルスとの結合は、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、ＰｒｏｔｅＯＮ（商品名、ＢｉｏＲａｄ）が使用できる。

[0013] 本発明において、対象となるインフルエンザウイルスの種類は、何ら制限されない。インフルエンザウイルスは、例えば、Ａ型インフルエンザウイルス、Ｂ型インフルエンザウイルス、Ｃ型インフルエンザウイルス等があげられる。Ａ型インフルエンザウイルスは、ヘマグルチニン（ＨＡ）の１６種類（Ｈ１～Ｈ１６）と、ノイラミニダーゼ（ＮＡ）の９種類（Ｎ１～Ｎ９）の組合せにより、１４４種類の亜型が存在し、特に制限されない。中でも、例

えば、Ｈ５Ｎ１、Ｈ１Ｎ１、Ｈ３Ｎ２があげられる。具体例として、Ｈ５Ｎ１は、例えば、A/Anhui/1/2005およびA/goose_Guiyang/337/2006、A/Japanese white eye/Hong Kong/1038/2006等があげられ、Ｈ１Ｎ１は、例えば、A/California/04/2009、A/Brisbane/59/2007、A/Georgia/20/2006等があげられ、Ｈ３Ｎ２は、例えば、A/Aichi/2/1968、A/Wisconsin/67/2005、A/Brisbane/59/2007、A/Moscow/10/1999等があげられる。Ｂ型インフルエンザウイルスは、１種類のＨＡと１種類のＮＡとの組合せである。前記Ｂ型インフルエンザとしては、例えば、B/Florida/4/2006、B/Malaysia/2506/2004等があげられる。

[0014] また、本発明の核酸分子は、例えば、インフルエンザウイルス由来のヘマグルチニン（ＨＡ）に結合可能であり、具体的には、例えば、前記ＨＡ、前記ＨＡのサブユニットであるＨＡ１、ＨＡ１とＨ２との複合体に結合可能である。本発明において、「インフルエンザウイルス由来ＨＡに結合する」とは、例えば、前記ＨＡに対する結合能を有している、または、前記ＨＡ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ＨＡとの結合は、前述と同様の解析により決定できる。前記ＨＡの由来となるインフルエンザウイルスは、特に制限されず、前述のインフルエンザウイルスがあげられる。本発明において、以下、「インフルエンザウイルスに結合」は、例えば、「インフルエンザウイルス由来ＨＡに結合」に読み替え可能である。

[0015] 本発明の核酸分子において、前記（ａ）～（ｄ）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、例えば、後述するように、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であり、例えば、さらに、非ヌクレオチド残基を含んでもよい。本発明の核酸は、例えば、以下、ＤＮＡアプタマーともいう。

[0016] 本発明の核酸分子は、例えば、前記（ａ）～（ｄ）のいずれかのポリヌクレオチドからなる分子でもよいし、前記ポリヌクレオチドを含む分子でもよ

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

[0017] 前記（ａ）のポリヌクレオチドは、前記配列番号１～３０のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチドである。

[0018] ＲＨＡＯＯ２３（配列番号１）

GGTTAGCCCGTCCCGAGATAACCTTGGGGTCTTTGGGTGGGGTTGGTGTGGTCTTAACACACGGCGGCTGTAG

ＲＨＡＯＯ３０（配列番号２）

GGTTAGCCCGTCCCGAGATAACGGTCTCGGCTCGGTTCTTTCGGAAATGTTGCTTAACACACGGCGGCTGTAG

ＲＨＡＯＯ１３（配列番号３）

GGTTAGCCCGTCCCGAGATAACGGGTTTCGACTTGATCGGACTTAAGCACCGCTTAACACACGGCGGCTGTAG

ＲＨＡＯＯＯ９（配列番号４）

GGTTAGCCCGTCCCGAGATAACGGGTGGTTGGGGGGGCCTTTTCTGGTTTTGTCTTAACACACGGCGGCTGTAG

ＲＨＡＯＯ５８（配列番号５）

GGTTAGCCCGTCCCGAGATAACTCTCGGCTTGGTTCGTCTGCGAAATGTTACTTAACACACGGCGGCTGTAG

ＲＨＡＯＯ９９（配列番号６）

CCTGCACCCAGTGTCCCACACGTGTATGGGTTTTTTATGGTTAGGTAGGGGCGGCTTGACGGAGAGGAGGACGG

ＲＨＡＯ１１０（配列番号７）

CCTGCACCCAGTGTCCCCGGCGTTTGGTTGGCGTGAACCATTTTTAAGTTCTGCGTGTGACGGAGAGGAGGACGG

ＲＨＡＯＯ９８（配列番号８）

CCTGCACCCAGTGTCCCGTCGTTGGTGTTTTTTTGGCTTTTAGGGTAGGTGTGGCTTGACGGAGAGG
AGGACGG

ＲＨＡＯ１４４（配列番号９）

CCTGCACCCAGTGTCCCTCGCTTCTTTTTTTGGGTTGGGGTGGGCGGGTTCCTGTCGGACGGAGAGG
AGGACGG

ＲＨＡＯ１３３（配列番号１０）

CCTGCACCCAGTGTCCCCCTCTGTGTCGGGCGGGCCGTTCAGGGTTTTGGGTGGGGGTGACGGAGAG
GAGGACGG

ＲＨＡＯＯ２０（配列番号１１）

GGTTAGCCCGTCCCGAGATAACCTGTGTTGGGGGTGGGAGGGTTTTTGGGGTCTTAACACACGGCGG
CTGTAG

ＲＨＡＯＯＯ２（配列番号１２）

GGTTAGCCCGTCCCGAGATAACTCGGGGTGTTTGATGGTTTGGTCTGGTTGGCTTAACACACGGCGG
CTGTAG

ＲＨＡＯＯＯ２＿ｓ１６（配列番号１３）

GGTTTGGTCTGGTTGG

ＲＨＡＯＯＯ２＿ｓ２０（配列番号１４）

GTGGTTTGGTCTGGTTGGAC

ＲＨＡＯＯＯ２＿ｓ２６（配列番号１５）

CGTTTGGTTTGGTCTGGTTGGCAACG

ＲＨＡＯＯＯ２＿ｓ２８（配列番号１６）

CGTTATGGTTTGGTCTGGTTGGCTAACG

ＲＨＡＯＯＯ２＿ｓ３３（配列番号１７）

GTGTTTGATGGTTTGGTCTGGTTGGCTTAACAC

ＲＨＡＯＯＯ６（配列番号１８）

GGTTAGCCCGTCCCGAGATAACTCGGTGTGTTGGGTTTGGGTTGGGTTGGGTCTTAACACACGGCGG
CTGTAG

ＲＨＡ０００６＿ｓ１９（配列番号１９）

GGGTTTGGGTTGGGTTGGG

ＲＨＡ１６３４（配列番号２０）

ATATATATGCCCACCCTCTCGCTGTACGGTTGATGCGCGTTTCTTTCTCTTTATATTGCTGGGTGCCGC
CTCCAAGGTCAAAAAAAA

ＲＨＡ１６３４＿ｓ６０（配列番号２１）

GGGCACCCTCTCGCTGTACGGTTGATGCACGTTTCTTTCTCTTTATATTGCTGGGTGCCC

ＲＨＡ１６３５（配列番号２２）

ATATATATGCCCACCCTCTCGCTGGCGGCTCTGTTCTGTTCTCGTCTCCTTGATTTCTGTGGGCAGCCG
CCTCCAAGGTCAAAAAAAA

ＲＨＡ１６３５＿ｓ６２（配列番号２３）

GGGGCCCACCCTCTCGCTGGCGGCTCTGTTCTGTTCTCGTCTCCTTGATTTCTGTGGGCCCC

ＲＨＡ０３８５（配列番号２４）

ATATATATCCTGCACCCAGTGTCCCGTGTGCAATTCAGTTGGGGTTATTTTGGGAGGGCGGGGGTTG
ACGGAGAGGAGGACGGAAAAAAAA

ＲＨＡ０３８５＿ｓ２８（配列番号２５）

TTGGGGTTATTTTGGGAGGGCGGGGGTT

ＲＨＡ０４７１（配列番号２６）

CTGCACCCAGTGTCCCTTTCCTCGTTGGGGGTGGTGGTGGGTTTCGGTTCATGGGTGGGACGGAGAG
GAGGACGG

ＲＨＡ０４７１＿ｓ５１（配列番号２７）

TCCTCGTTGGGGGTGGTGGTGGGTTTCGGTTCATGGGTGGGACGGAGAGGA

ＲＨＡ０１１１（配列番号２８）

CCTGCACCCAGTGTCCCGTGCTCCGGGGGTTGGGCGTGGTGGGTCTGTCGGGTTTCGGACGGAGAGG
AGGACGG

ＲＨＡ０１２７（配列番号２９）

CCTGCACCCAGTGTCCCTGGGTCGGCTAATTTGGCATTTGGGGTGGTTTGGGGGGGGGACGGAGAGG
AGGACGG

ＲＨＡ０１２４（配列番号３０）

CCTGCACCCAGTGTCCCTGTGTGCTGGTGTGGGGTGGTTTGGGGGGGGGACGGAGAGGAGGACGG

[0019] 前記（ｂ）において、「１もしくは数個」は、例えば、前記（ｂ）のポリヌクレオチドが、前記インフルエンザウイルスまたはＨＡ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、１～６０個、好ましくは１～３０個、より好ましくは１～１５個、さらに好ましくは１～５個、特に好ましくは１または２個である。

[0020] 前記（ｃ）において、「同一性」は、例えば、前記（ｃ）のポリヌクレオチドが、前記インフルエンザウイルスまたはＨＡ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％以上であり、好ましくは９０％以上であり、より好ましくは９５％以上、９６％以上、９７％以上さらに好ましくは９８％以上、特に好ましくは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）。

[0021] 前記（ｄ）において、「ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド」は、例えば、前記（ａ）のポリヌクレオチドに対して、完全または部分的に相補的なポリヌクレオチドである。前記ハイブリダイズは、例えば、各種ハイブリダイゼーションアッセイにより検出できる。前記ハイブリダイゼーションアッセイは、特に制限されず、例えば、ザンブルーク（Ｓａｍｂｒｏｏｋ）ら編「モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリーマニュアル第２版（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ： Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ ２ｎｄ Ｅｄ．）」〔（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ （１９８９）〕等に記載されている方法を採用することもできる。

[0022] 前記（ｄ）において、「ストリンジェントな条件」は、例えば、低ストリンジェントな条件、中ストリンジェントな条件、高ストリンジェントな条件のいずれでもよい。「低ストリンジェントな条件」は、例えば、５×ＳＳＣ

、５×デンハルト溶液、０．５％ＳＤＳ、５０％ホルムアミド、３２℃の条件である。「中ストリンジェントな条件」は、例えば、５×ＳＳＣ、５×デンハルト溶液、０．５％ＳＤＳ、５０％ホルムアミド、４２℃の条件である。「高ストリンジェントな条件」は、例えば、５×ＳＳＣ、５×デンハルト溶液、０．５％ＳＤＳ、５０％ホルムアミド、５０℃の条件である。ストリンジェンシーの程度は、当業者であれば、例えば、温度、塩濃度、プローブの濃度および長さ、イオン強度、時間等の条件を適宜選択することで、設定可能である。「ストリンジェントな条件」は、例えば、前述したザンブルーク（Ｓａｍｂｒｏｏｋ）ら編「モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリーマニュアル第２版（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：　Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ　２ｎｄ　Ｅｄ．）」〔（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ　（１９８９）〕等に記載の条件を採用することもできる。

[0023] 前記（ｂ）～（ｄ）のポリヌクレオチドは、特に制限されない。前記（ａ）のポリヌクレオチドが、配列番号１２（ＲＨＡ０００２）の塩基配列の場合、前記（ｂ）～（ｄ）のポリヌクレオチドとして、例えば、配列番号１３～１７の塩基配列からなるポリヌクレオチドが例示できる。前記（ａ）のポリヌクレオチドが、配列番号１７（ＲＨＡ０００２＿ｓ３３）の塩基配列の場合、前記（ｂ）～（ｄ）のポリヌクレオチドとして、例えば、配列番号１３～１６の塩基配列からなるポリヌクレオチドが例示できる。

ＲＨＡ０００２＿ｓ１６（配列番号１３）

GGTTTGGTCTGGTTGG

ＲＨＡ０００２＿ｓ２０（配列番号１４）

GTGGTTTGGTCTGGTTGGAC

ＲＨＡ０００２＿ｓ２６（配列番号１５）

CGTTTGGTTTGGTCTGGTTGGCAACG

ＲＨＡ０００２＿ｓ２８（配列番号１６）

CGTTATGGTTTGGTCTGGTTGGCTAACG

ＲＨＡ０００２＿ｓ３３（配列番号１７）

GTGTTTGATGGTTTGGTCTGGTTGGCTTAACAC

[0024] 本発明の核酸分子は、例えば、前記（ａ）～（ｄ）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以上であり、好ましくは２～２０であり、より好ましくは２～１０であり、より好ましくは、２または３である。

[0025] 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塩基長であり、好ましくは１～２０塩基長であり、より好ましくは３～１２塩基長であり、さらに好ましくは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。

[0026] 前記（ａ）～（ｄ）のポリヌクレオチドの配列を２つ含む一本鎖ポリヌクレオチドとして、例えば、リンカーを介して、配列番号１９（ＲＨＡ０００６＿ｓ１９）または配列番号１７（ＲＨＡ０００２＿ｓ３３）の塩基配列が

２つ連結されているポリヌクレオチドがあげられる。前記一本鎖ポリヌクレオチドの配列の例を、配列番号３１および配列番号４５に示す。下記配列において、下線部が、配列番号１９または配列番号３３の配列に該当し、その間の配列-(N)n-がリンカーに該当する。Ｎは、ヌクレオチド残基を示す。前記ヌクレオチド残基Ｎ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およびリボヌクレオチド残基があげられ、好ましくはデオキシリボヌクレオチド残基である。前記ヌクレオチド残基における塩基は、特に制限されず、例えば、Ａ、Ｇ、Ｃ、Ｔおよび／またはＵがあげられる。下記配列において、ｎは、前記ヌクレオチド残基の塩基数を示し、整数である。ｎは、好ましくは正の整数であり、例えば、１～２００塩基であり、好ましくは５－２０塩基である。

ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ（配列番号３１）

GGGTTTGGGTTGGGTTGGG-(N)n-GGGTTTGGGTTGGGTTGGG

ＲＨＡ０００２＿ｓ３３＿ｄ（配列番号４５）

GTGTTTGATGGTTTGGTCTGGTTGGCTTAACAC-(N)n-GTGTTTGATGGTTTGGTCTGGTTGGCTTAACAC

[0027] 前記配列番号３１は、具体例として、例えば、ｎ＝５、ｎ＝９およびｎ＝２０である以下の配列が例示できる。

ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ９（配列番号３２）

GGGTTTGGGTTGGGTTGGGTTTTTTTTTGGGTTTGGGTTGGGTTGGG

ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ５（配列番号３３）

GGGTTTGGGTTGGGTTGGGTTTTTGGGTTTGGGTTGGGTTGGG

ＲＨＡ０００６_ｓ１９_ｄ９_ＡＴ（配列番号４６）

GGGTTTGGGTTGGGTTGGGATATATATAGGGTTTGGGTTGGGTTGGG

ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ＿Ｒ２０（配列番号４７）

GGGTTTGGGTTGGGTTGGGGATTGGAATTAAGGCGTGTGGGGTTTGGGTTGGGTTGGG

[0028] 配列番号４５は、具体例として、例えば、ｎ＝９およびｎ＝５の以下の配列が例示できる。

ＲＨＡ０００２＿ｓ３３＿ｄ９（配列番号４８）

GTGTTTGATGGTTTGGTCTGGTTGGCTTAACACTTTTTTTTTGTGTTTGATGGTTTGGTCTGGTTGGCTTAACAC

ＲＨＡ０００２＿ｓ３３＿ｄ５（配列番号４９）

GTGTTTGATGGTTTGGTCTGGTTGGCTTAACACTTTTTGTGTTTGATGGTTTGGTCTGGTTGGCTTAACAC

[0029] 前記（ａ）～（ｄ）のポリヌクレオチドの配列を３つ含む一本鎖ポリヌクレオチドとして、例えば、リンカーを介して、配列番号１９（ＲＨＡ０００６＿ｓ１９）の塩基配列が３つ連結されているポリヌクレオチドがあげられる。前記一本鎖ポリヌクレオチドの配列の例を、配列番号５０に示す。下記配列において、下線部が、配列番号１９の配列に該当し、その間の配列-(N)n-がリンカーに該当する。Ｎおよびｎは、前述と同様である。下記配列において、２つのリンカーは、例えば、それぞれ同じ配列でもよいし、異なる配列でもよい。

ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｔ（配列番号５０）

GGGTTTGGGTTGGGTTGGG-(N)n-GGGTTTGGGTTGGGTTGGG-(N)n-GGGTTTGGGTTGGGTTGGG

[0030] 前記配列番号５０は、具体例として、例えば、ｎ＝９の以下の配列が例示できる。

ＲＨＡ０００６_ｓ１９_ｔ９（配列番号５１）

GGGTTTGGGTTGGGTTGGGTTTTTTTTTGGGTTTGGGTTGGGTTGGGTTTTTTTTTGGGTTTGGGTTGGGTTGGG

[0031] 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。

[0032] 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。

[0033] 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。

[0034] 前記ポリヌクレオチドの推定二次構造を、図１～３および図１９～２４に例示する。なお、本発明は、これには制限されない。図１は、ＲＨＡ０００２（配列番号１２）、ＲＨＡ０００２＿ｓ１６（配列番号１３）、ＲＨＡ０００２＿ｓ２０（配列番号１４）、ＲＨＡ０００２＿ｓ２６（配列番号１５）、ＲＨＡ０００２＿ｓ２８（配列番号１６）、ＲＨＡ０００２＿ｓ３３（配列番号１７）の推定二次構造を示す。図２は、ＲＨＡ０００６（配列番号１８）、ＲＨＡ０００６＿ｓ１９（配列番号１９）、リンカーが９塩基のポリｄＴであるＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ９（配列番号３２）の推定二次構造を示す。図３は、ＲＨＡ００２０（配列番号１１）、ＲＨＡ０１１１（配列番号２８）、ＲＨＡ０１２７（配列番号２９）、ＲＨＡ０１２４（配列番号３０）の推定二次構造を示す。

[0035] 図１９は、ＲＨＡ００２３（配列番号１）、ＲＨＡ００３０（配列番号２）、ＲＨＡ００１３（配列番号３）、ＲＨＡ０００９（配列番号４）、図２

０は、ＲＨＡ００５８（配列番号５）、ＲＨＡ００９９（配列番号６）、ＲＨＡ０１１０（配列番号７）、ＲＨＡ００９８（配列番号８）、図２１は、ＲＨＡ０１４４（配列番号９）、ＲＨＡ０１３３（配列番号１０）、ＲＨＡ０００２＿ｓ３３＿ｄ９（配列番号４８）、ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ９＿ＡＴ（配列番号４６）、図２２は、ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ＿Ｒ２０（配列番号４７）、ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｔ９（配列番号５１）、ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ５（配列番号３３）、ＲＨＡ１６３４（配列番号２０）、図２３は、ＲＨＡ１６３４＿ｓ６０（配列番号２１）、ＲＨＡ１６３５（配列番号２２）、ＲＨＡ１６３５＿ｓ６２（配列番号２３）、ＲＨＡ０３８５（配列番号２４）、図２４は、ＲＨＡ０３８５＿ｓ２８（配列番号２５）、ＲＨＡ０４７１（配列番号２６）、ＲＨＡ０４７１＿ｓ５１（配列番号２７）の推定二次構造を、それぞれ示す。

[0036] 本発明の核酸分子の構成単位は、例えば、ヌクレオチド残基である。前記ヌクレオチド残基は、例えば、デオキシリボヌクレオチド残基およびリボヌクレオチド残基があげられる。本発明の核酸分子は、例えば、デオキシリボヌクレオチド残基のみから構成されるＤＮＡ、１もしくは数個のリボヌクレオチド残基を含むＤＮＡ等があげられる。後者の場合、「１もしくは数個」は、特に制限されず、例えば、前記ポリヌクレオチドにおいて、例えば、１～９１個、好ましくは１～３０個、より好ましくは１～１５個、さらに好ましくは１～７個、特に好ましくは１～３個、最も好ましくは１または２個である。

[0037] 本発明の核酸分子は、例えば、１もしくは数個の修飾化ヌクレオチド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、好ましくは１～３０個、より好ましくは１～１５個、さらに好ましくは１～７個、特に好ましくは１～３個、最も好ましくは１または２個である。

[0038] 前記修飾化ヌクレオチド残基は、例えば、修飾化デオキシリボヌクレオチド残基および修飾化リボヌクレオチド残基があげられる。前記修飾化ヌクレ

オチド残基は、例えば、前記ヌクレオチド残基における糖残基が修飾されたものがあげられる。前記糖残基は、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。前記ヌクレオチド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’位および／または４’位があげられる。前記修飾は、例えば、メチル化、フルオロ化、アミノ化、チオ化等があげられる。前記修飾化ヌクレオチド残基は、例えば、塩基としてピリミジン塩基（ピリミジン核）を有するヌクレオチド残基が修飾されたもの、または、塩基としてプリン塩基（プリン核）を有するヌクレオチド残基が修飾されたものがあげられ、好ましくは前者である。以下、ピリミジン塩基を有するヌクレオチド残基をピリミジンヌクレオチド残基といい、修飾されたピリミジンヌクレオチド残基を修飾化ピリミジンヌクレオチド残基といい、プリン塩基を有するヌクレオチド残基をプリンヌクレオチド残基といい、修飾されたプリンヌクレオチド残基を修飾化プリンヌクレオチド残基という。前記ピリミジンヌクレオチド残基は、例えば、ウラシルを有するウラシルヌクレオチド残基、シトシンを有するシトシンヌクレオチド残基、チミンを有するチミンヌクレオチド残基等があげられる。前記修飾化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。前記修飾化ヌクレオチド残基の具体例は、例えば、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。

[0039] 前記ヌクレオチド残基における塩基は、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）の天然塩基（非人工塩基）でもよいし、非天然塩基（人工塩基）でもよい。前記人工塩基は、例えば、修飾塩基および改変塩基等があげられ、前記天然塩基（ａ、

ｃ、ｇ、ｔまたはｕ）と同様の機能を有することが好ましい。前記同様の機能を有する人工塩基は、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。前記修飾塩基は、例えば、メチル化塩基、フルオロ化塩基、アミノ化塩基、チオ化塩基等があげられる。前記修飾塩基の具体例としては、例えば、２’－メチルウラシル、２’－メチルシトシン、２’－フルオロウラシル、２’－フルオロシトシン、２’－アミノウラシル、２’－アミノシトシン、２－チオウラシル、２－チオシトシン等があげられる。本発明において、例えば、ａ、ｇ、ｃ、ｔおよびｕで表わされる塩基は、前記天然塩基の他に、前記天然塩基のそれぞれと同様の機能を有する前記人工塩基の意味も含む。

[0040] 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、好ましくは１～３０個、より好ましくは１～１５個、さらに好ましくは１～７個、特に好ましくは１～３個、最も好ましくは１または２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　Ａｃｉｄ）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。

[0041] 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。

[0042] 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、好ましくはポリｄＴ、ポリｄＡである。

[0043] 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。前記固定化の方法は、特に制限されず、例えば、担体と前記核酸分子または前記付加配列のいずれか一方に、ストレプトアビジンまたはアビジンを結合させ、他方に、ビオチンを結合させ、前者と後者との結合を利用して固定化することができる。前記担体は、特に制限されず、例えば、プレート、シート、フィルム、フィルター、チューブ、ビーズ等の基材があげられる。

[0044] 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。

[0045] 本発明の核酸分子は、インフルエンザウイルスまたは前記ＨＡとの解離定数が、例えば、３０ｎｍｏｌ／Ｌ以下であり、好ましくは１０ｎｍｏｌ／Ｌ

以下であり、より好ましくは１ｎｍｏｌ／Ｌ以下であり、さらに好ましくは０．１ｎｍｏｌ／Ｌ以下であり、特に好ましくは０．０１ｎｍｏｌ／Ｌ以下である。

[0046] 本発明の核酸分子は、前述のように、インフルエンザウイルスまたはインフルエンザウイルス由来ＨＡに結合性を示す。このため、本発明の核酸分子の用途は、インフルエンザウイルスおよび前記ＨＡ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、インフルエンザウイルスおよび前記ＨＡに対する抗体に代えて、種々の方法に使用できる。

[0047] 本発明の核酸分子によれば、例えば、前記核酸分子とインフルエンザウイルスとの結合を検出することで、インフルエンザウイルスについて、定性または定量等の分析を行うことができる。すなわち、本発明のインフルエンザウイルスの分析方法は、前記本発明の核酸分子と試料とを接触させ、前記核酸分子とインフルエンザウイルスとの結合を検出する工程を含むことを特徴とし、具体的には、前記検出工程において、例えば、前記核酸分子とインフルエンザウイルスとの結合の有無を検出することで、前記試料中のインフルエンザウイルスの有無を分析でき、または、前記核酸分子と前記試料中のインフルエンザウイルスとの結合量を測定することで、前記試料中のインフルエンザウイルスの量を分析できる。この方法の場合、例えば、前記本発明の核酸分子は、インフルエンザウイルスと結合するため、ウイルスを破壊する等の前処理を試料に施すことなく、前記試料中のインフルエンザウイルスを分析できる。

[0048] また、本発明の核酸分子によれば、例えば、前記核酸分子とインフルエンザウイルス由来ＨＡとの結合を検出することで、前記ＨＡについて、または、間接的にインフルエンザウイルスについて、定性または定量等の分析を行うことができる。すなわち、本発明のインフルエンザウイルス由来のＨＡの分析方法は、前記本発明の核酸分子と試料とを接触させ、前記核酸分子と前記ＨＡとの結合を検出する工程を含むことを特徴とし、具体的には、前記検

出工程において、例えば、前記核酸分子と前記ＨＡとの結合の有無を検出することで、前記試料中の前記ＨＡの有無を分析でき、または、前記核酸分子と前記試料中の前記ＨＡとの結合量を測定することで、前記試料中の前記ＨＡの量を分析できる。さらに、このＨＡの検出方法を利用して、インフルエンザウイルスの検出を行うこともできる。本発明のインフルエンザウイルスの検出方法は、例えば、前記ＨＡの分析方法を含み、前記核酸分子と前記ＨＡとの結合を検出することにより、前記試料中のインフルエンザウイルスを分析する方法である。具体的には、前記検出工程において、前記核酸分子と前記ＨＡとの結合の有無を検出することで、前記試料中のインフルエンザウイルスの有無を分析でき、または、前記核酸分子と前記試料中のＨＡとの結合量を測定することで、前記試料中のインフルエンザウイルスの量を分析できる。前記ＨＡの量とインフルエンザウイルスの量とは、通常、相対関係にあるため、例えば、予め、インフルエンザウイルスの量と前記ＨＡの量との相対関係を求めておき、これに基づき、前記ＨＡの量からインフルエンザウイルスの量を分析できる。前記相対関係は、例えば、検量線等で示すことができる。この方法の場合、例えば、前記試料にウイルスを破壊する前処理を施してから、前記試料と前記核酸分子とを接触させてもよいし、前記前処理を施すことなく、前記試料と前記核酸分子とを接触させてもよい。

[0049] 本発明の核酸分子は、前述のように、インフルエンザウイルスに結合可能であることから、例えば、前記インフルエンザウイルスの検出や前記ＨＡの検出の他に、両者の結合を利用する用途に広く利用できる。具体例としては、例えば、前記核酸分子を有する、フィルター、マスク、ふき取り剤、うがい剤、トローチ等の製品があげられる。前記フィルターは、例えば、空気用フィルターおよび液体用フィルター等があげられ、前記核酸分子がインフルエンザウイルスと結合することによって、例えば、空気中や液体中からのインフルエンザウイルスの除去、拡散の防止が可能となる。前記マスクは、例えば、前記核酸分子がインフルエンザウイルスと結合することにより、インフルエンザウイルスの体内への侵入を阻害し、感染を防止できる。前記ふき

取り剤は、例えば、前記核酸分子がインフルエンザウイルスに結合するため、ふきとり処理の対象からインフルエンザウイルスを除去できる。また、前記うがい剤は、例えば、前記核酸分子がインフルエンザウイルスに結合するため、口内や咽頭に付着したインフルエンザウイルスを除去できる。

[0050] ＜結合剤＞

本発明の結合剤は、前述のように、前記本発明の核酸分子を含むことを特徴とするインフルエンザウイルスに対する結合剤である。本発明の結合剤は、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。本発明の結合剤を使用すれば、前述のように、例えば、インフルエンザウイルスの検出等を行うことができる。また、本発明の結合剤は、前述のように、例えば、インフルエンザウイルス由来ＨＡに対する結合剤ということもでき、例えば、前記ＨＡの検出により、インフルエンザウイルスの検出を行うことができる。

実施例

[0051] 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。

[0052] ［実施例Ａ１］

インフルエンザウイルスに結合可能なアプタマーを作製し、各アプタマーについて、インフルエンザウイルス由来ＨＡに対する結合能を確認した。

[0053] （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。

ＲＨＡ０００２（配列番号１２）

GGTTAGCCCGTCCCGAGATAACTCGGGGTGTTTGATGGTTTGGTCTGGTTGGCTTAACACACGGCGGCTGTAG

ＲＨＡ０００６（配列番号１８）

GGTTAGCCCGTCCCGAGATAACTCGGTGTGTTGGGTTTGGGTTGGGTTGGGTCTTAACACACGGCGGCTGTAG

ＲＨＡ０１１１（配列番号２８）

CCTGCACCCAGTGTCCCGTGCTCCGGGGGTTGGGCGTGGTGGGTCTGTCGGGTTTCGGACGGAGAGGAGGACGG

ＲＨＡ０１２７（配列番号２９）

CCTGCACCCAGTGTCCCTGGGTCGGCTAATTTGGCATTTGGGGTGGTTTGGGGGGGGGACGGAGAGGAGGACGG

[0054] ３０塩基長のランダム配列（Ｎ）$_{30}$を含む配列番号３４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、比較例Ｎ３０とした。４０塩基長のランダム配列（Ｎ）$_{40}$を含む配列番号３５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、比較例Ｎ４０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。

Ｎ３０（配列番号３４）

GGTTAGCCCGTCCCGAGATAAC-$(N)_{30}$-CTTAACACACGGCGGCTGTAG

Ｎ４０（配列番号３５）

ACCCAGTGTCCC-$(N)_{40}$-GACGGAGAGGAGGACGG

[0055] 非特許文献２（ＢＢＲＣ）に記載されている下記配列のポリヌクレオチドを合成し、比較例のアプタマーＡ１０とした。

アプタマーＡ１０（配列番号５２）

GAATTCAGTCGGACAGCGGGGTTCCCATGCGGATGTTATAAAGCAGTCGCTTATAAGGGATGGACGAATATCGTCTCCC

[0056] 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。

[0057]（２）標的タンパク質

標的タンパク質として、以下のタンパク質を使用した。A/Anhui/1/2005由来ＨＡ１とA/goose_Guiyang/337/2006由来ＨＡ１とは、アミノ酸４３７残基

のうち２４アミノ酸残基が異なる配列である（５．４９％）。配列番号３６と３７とにおいて、異なるアミノ酸に下線を付した。A/Anhui/1/2005由来ＨＡの配列番号３８において、A/goose_Guiyang/337/2006由来ＨＡと異なるアミノ酸に下線を付した。

[0058] ＢＳＡ

ウシ血清アルブミン

日本ジーン社

Ｈｉｓ－ＭＩＦ

ヒスチジンタグを付加したＭＩＦ（マクロファージ遊走阻止因子）

ATGen Co., Ltd. Gyeonggi-do社

$HA1_{Anhui}$

A/Anhui/1/2005由来ＨＡ１

Sino Biological Inc.社 （＃１１０４８－Ｖ０８Ｈ２）

配列番号３６

MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILE

KTHNGKLCDLDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKAN

PANDLCYPGNFNDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSDHEASSGVSSA

CPYQGTPSFFRNVVWLIKKNNTYPTIKRSYNNTNQEDLLILWGIHHSNDA

AEQIKLYQNPITYISVGTSTLNQRLVPKIATRSKVNGQSGRMDFFWTILK

PNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSAIVKSEVEYGNCNTKCQTPIGA

INSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSNKLVLATGLRNSP

$HA1_{Guiyang}$

A/goose_Guiyang/337/2006由来ＨＡ１

Sino Biological Inc.社 （＃１１６９０－Ｖ０８Ｈ１）

配列番号３７

MEKIVLLLAIISLVKSDQICIGYHANNSTVQVDTIMEKNVTVTHAQDILE

KTHNGKLCSLDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKAS

PANDLCYPGDFNDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWPNHEASLGVSSA

CPYQGESSFFRNVVWLIKKNSSYPTIKRSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDA

AEQIKLYQNPNTYISVGTSTLNQRLVPTIATRSKVNGQSGRMEFFWTILK

PNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKCQTPMIGA

INSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSNRLVLATGLRNTL

HA_{Anhui}

A/Anhui/1/2005由来ＨＡ

Sino Biological Inc.社 （＃１１０４８－Ｖ０８Ｈ１）

配列番号３８

MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILE

KTHNGKLCDLDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKAN

PANDLCYPGNFNDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSDHEASSGVSSA

CPYQGTPSFFRNVVWLIKKNNTYPTIKRSYNNTNQEDLLILWGIHHSNDA

AEQIKLYQNPITYISVGTSTLNQRLVPKIATRSKVNGQSGRMDFFWTILK

PNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSAIVKSEVEYGNCNTKCQTPIGA

INSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSNKLVLATGLRNSP

RGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQGSGYAADKESTQKAIDGVT

NKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELL

VLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECM

ESVRNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQ

[0059] （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。

[0060] 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、５０００ｎｍｏｌ／Ｌのリガンドをインジェクションし、シグナル強度（ＲＵ：Ｒｅｓｏｎａｎｃｅ Ｕｎｉｔ）が約１０００ＲＵになるまで結合させた。前記リガンドは、２４塩基長のデオキシチミジ

ンの５’末端をビオチン化した、ビオチン化ポリｄＴを使用した。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、４００ｎｍｏｌ／Ｌの前記ポリｄＡ付加アプタマーを、流速２５μＬ／ｍｉｎで８０秒間インジェクションし、シグナル強度が約７００ＲＵになるまで結合させた。続いて、５００ｎｍｏｌ／Ｌの前記標的タンパク質を、ＳＰＲバッファーを用いて、流速５０μＬ／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。前記標的タンパク質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。

[0061] 前記セレクションバッファーの組成は、５０ｍｍｏｌ／Ｌ Ｔｒｉｓ、０．１ｍｏｌ／Ｌ ＮａＣｌ、０．０１％ Ｔｗｅｅｎ（登録商標）、５ｍｍｏｌ／Ｌ K^+、１ｍｍｏｌ／Ｌ Mg^{2+}とし、ｐＨは、７．４とした。前記ＳＰＲバッファーの組成は、５０ｍｍｏｌ／Ｌ Ｔｒｉｓ、０．１ｍｏｌ／Ｌ ＮａＣｌ、０．０１％ Ｔｗｅｅｎ（登録商標）、１０ｍｍｏｌ／Ｌ K^+とし、ｐＨは、７．４とした。

[0062] これらの結果を図４に示す。図４は、各標的タンパク質に対する各アプタマーの結合能を示すグラフである。図４のグラフにおいて、縦軸は、前記Prote ON（登録商標）XRP36で測定したシグナル強度（ＲＵ）の相対値である。前記相対値は、洗浄開始時（標的タンパク質のインジェクション終了時）のシグナル強度を、標的タンパク質のインジェクション開始前（ポリｄＡ付加アプタマーのインジェクション終了時）のシグナル強度で割った値として算出した。図４において、「0-pool」は、前記Ｎ３０の結果を示す。

[0063] 図４に示すように、比較例のアプタマーは、いずれも$HA1_{anhui}$、$HA1_{guiyang}$、HA_{anhui}に対する結合能を示さなかった。これに対して、実施例のアプタマーは、いずれもＢＳＡおよびＨｉｓ－ＭＩＦに結合することなく、$HA1_{anhui}$、$HA1_{guiyang}$、HA_{anhui}に結合能を示した。

[0064] （４）交差反応

つぎに、前記アプタマーについて、抗体との交差反応を確認した。前記標

的タンパク質として、ＨＡ１$_{Anhui}$および下記抗体を使用した以外は、前記（３）と同様にしてＳＰＲを行った。

[0065] Rabbit IgG

ウサギ イムノグロブリン

Beckman Coulter, Inc.社 （＃７３１６４２）

Mouse IgG

マウス イムノグロブリン

Beckman Coulter, Inc.社 （＃７３１６２０）

Rat IgG

ラット イムノグロブリン

Beckman Coulter, Inc.社 （＃７３１６２８）

Goat IgG

ヤギ イムノグロブリン

Beckman Coulter, Inc.社 （＃７３１６３５）

Chicken IgG

トリ イムノグロブリン

Immunology Consultants Laboratory(ICL), Inc.社 （＃ＣＧＨＬ－１０Ａ）

[0066] これらの結果を図５に示す。図５は、各抗体に対する各アプタマーの結合能を示すグラフである。図５のグラフにおいて、縦軸は、図４と同様にシグナル強度（ＲＵ）の相対値を示す。相対値は、前記（３）と同様にして求めた。図５において、「0-pool」は、前記Ｎ３０の結果を示す。

[0067] 図５に示すように、実施例のアプタマーは、いずれの抗体に対しても結合能を示すことなく、ＨＡ１$_{anhui}$に強い結合能を示した。このため、例えば、本発明のアプタマーを使用してインフルエンザウイルスまたはＨＡを検出する際、抗体との併用が可能であることがわかった。

[0068] ［実施例Ａ２］

ＲＨＡ０００２（配列番号１２）の小型化アプタマーについて、ＨＡに対

する結合能を確認した。

[0069] （１）アプタマー

ＲＨＡ０００２（配列番号１２）、および以下に示すその小型化アプタマーを合成した。

ＲＨＡ０００２（配列番号１２）

GGTTAGCCCGTCCCGAGATAACTCGGGGTGTTTGATGGTTTGGTCTGGTTGGCTTAACACACGGCGGCTGTAG

ＲＨＡ０００２＿ｓ３３（配列番号１７）

GTGTTTGATGGTTTGGTCTGGTTGGCTTAACAC

[0070] （２）ＳＰＲによる結合能の解析

前記アプタマーを使用した以外は、前記実施例Ａ１と同様にして標的タンパク質に対する結合能を解析した。これらの結果を下記表１に示す。表１において、相対値は、前記実施例Ａ１（３）と同様にして求めた。

[0071] [表1]

アプタマー	相対値		
	ＨＡ１anhui	ＨＡ１guiyang	ＨＡanhui
ＲＨＡ０００２	0.5039	0.4935	0.2936
ＲＨＡ０００２＿ｓ３３	0.9958	0.9477	0.9847
Ｎ３０	0.0286	0.0091	0.0045

[0072] 前記表１に示すように、小型化したアプタマーは、それぞれ標的タンパク質に結合能を示し、中でもＲＨＡ０００２＿ｓ３３（配列番号１７）は、小型化により結合能が向上した。

[0073] [実施例Ａ３]

ＲＨＡ０００６（配列番号１８）、その小型化アプタマー、その小型化配列を２つ有するアプタマーについて、ＨＡに対する結合能を確認した。

[0074] （１）アプタマー

ＲＨＡ０００６（配列番号１８）

GGTTAGCCCGTCCCGAGATAACTCGGTGTGTTGGGTTTGGGTTGGGTTGGGTCTTAACACACGGCGG

CTGTAG

ＲＨＡ０００６＿ｓ１９（配列番号１９）

GGGTTTGGGTTGGGTTGGG

ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ９（配列番号３２）

GGGTTTGGGTTGGGTTGGGTTTTTTTTTTGGGTTTGGGTTGGGTTGGG

[0075] （２）ＳＰＲによる結合能の解析

前記アプタマーを使用した以外は、前記実施例Ａ１と同様にして標的タンパク質に対する結合能を解析した。これらの結果を下記表２に示す。表２において、相対値は、前記実施例Ａ１（３）と同様にして求めた。

[0076] [表2]

アプタマー	相対値		
	ＨＡ１anhui	ＨＡ１guiyang	ＨＡanhui
ＲＨＡ０００６	0.2970	0.2432	0.1122
ＲＨＡ０００６＿ｓ１９	0.4240	0.2297	0.1662
ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ	0.9374	0.9096	0.7082
Ｎ３０	0.0286	0.0091	0.0045

[0077] 前記表２に示すように、小型化アプタマーおよび小型化配列を２つ有するアプタマーは、それぞれ標的タンパク質に結合能を示した。中でも小型化配列を２つ有するアプタマーＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ９（配列番号３２）は、結合能がさらに向上した。

[0078] [実施例Ａ４]

各アプタマーについて、ＨＡに対する結合能を確認した。

[0079] （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。

ＲＨＡ０００２（配列番号１２）

GGTTAGCCCGTCCCGAGATAACTCGGGGTGTTTGATGGTTTGGTCTGGTTGGCTTAACACACGGCGG

CTGTAG

ＲＨＡ０００２＿ｓ３３（配列番号１７）

GTGTTTGATGGTTTGGTCTGGTTGGCTTAACAC

ＲＨＡ０００６（配列番号１８）

GGTTAGCCCGTCCCGAGATAACTCGGTGTGTTGGGTTTGGGTTGGGTTGGGTCTTAACACACGGCGG
CTGTAG

ＲＨＡ０００６＿ｓ１９（配列番号１９）

GGGTTTGGGTTGGGTTGGG

ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ９（配列番号３２）

GGGTTTGGGTTGGGTTGGGTTTTTTTTTGGGTTTGGGTTGGGTTGGG

[0080] 比較例のアプタマーとして、前記実施例Ａ１における比較例のアプタマーＡ１０と、非特許文献２（ＢＢＲＣ）に記載されている下記配列のアプタマーＡ０５を使用した。

比較例　Ａ０５（配列番号５３）

GAATTCAGTCGGACAGCGGGGGGGAATTCTAGCAGTACACCTCGAGAATTATAGCCAGGATGGACGAAT
ATCGTCTCCC

[0081] （２）ＳＰＲによる結合能の解析

前記アプタマーを使用した以外は、前記実施例Ａ１と同様にして標的タンパク質に対する結合能を解析した。これらの結果を図６に示す。図６は、各標的タンパク質に対する各アプタマーの結合能を示すグラフである。図６のグラフにおいて、縦軸は、前記ProteON（登録商標）XRP36で測定したシグナル強度（ＲＵ）の相対値である。相対値は、前記実施例Ａ１（３）と同様にして求めた。図６において、「0-pool」は、前記Ｎ３０の結果を示す。

[0082] 図６に示すように、実施例のアプタマーは、いずれもＢＳＡおよびＨｉｓ－ＭＩＦに結合することなく、$HA1_{Anhui}$、$HA1_{Guiyang}$およびHA_{Anhui}に結合能を示した。中でも、ＲＨＡ０００２＿ｓ３３（配列番号１７）およびＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ９（配列番号３２）が高い結合能を示した。

[0083] （３）交差反応

前記アプタマーについて、前記実施例Ａ１と同様にして、交差反応を確認した。これらの結果を図７に示す。図７は、各抗体に対する各アプタマーの

結合能を示すグラフである。図７のグラフにおいて、縦軸は、図６と同様にシグナル強度（ＲＵ）の相対値を示す。

[0084] 図７に示すように、実施例のアプタマーは、いずれの抗体に対しても結合能を示すことなく、$HA1_{Anhui}$に強い結合能を示した。このため、例えば、本発明のアプタマーを使用してＨＡを検出する際、抗体との併用が可能であることがわかった。

[0085] ［実施例Ａ５］

ＲＨＡ０００２＿ｓ３３（配列番号１７）およびＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ９（配列番号３２）のアプタマーについて、ＨＡに対する解離定数を確認した。

[0086] 前記ビオチン化ポリＴの濃度を１００ｎｍｏｌ／Ｌとし、$HA1_{Anhui}$、$HA1_{Guiyang}$およびHA_{Anhui}を、それぞれ所定濃度（１５．６、３１．３、６２．５、１２５、２５０ｎｍｏｌ／Ｌ）とした以外は、前記実施例Ａ１と同様にして、ＳＰＲを行った。そして、その結果から、解離定数を算出した。これらの結果を下記表３に示す。

[0087] [表3]

RHA0002_s33

	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)	Rmax (RU)
$HA1_{Anhui}$	3.07E+04	5.30E-04	1.72E-08	4.75E+02
$HA1_{Guiyang}$	5.77E+04	1.31E-03	2.26E-08	2.35E+02
HA_{Anhui}	1.93E+04	5.16E-04	2.67E-08	1.04E+03

RHA0006_s19_d9

	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)	Rmax (RU)
$HA1_{Anhui}$	3.62E+04	5.54E-04	1.53E-08	3.70E+02
$HA1_{Guiyang}$	5.17E+04	1.07E-03	2.08E-08	3.61E+02
HA_{Anhui}	1.98E+04	4.90E-04	2.47E-08	9.81E+02

[0088] 前記表３に示すように、ＲＨＡ０００２＿ｓ３３（配列番号１７）およびＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ９（配列番号３２）の解離定数は、いずれの標的タンパク質に対しても極めて低く、非常に優れた結合能を示した。

[0089] ［実施例Ａ６］

本発明のアプタマー、ＨＡ１またはＨＡ、および抗体を、この順序で結合させ、ＳＰＲにより結合能の解析を行った。

[0090] 前記アプタマーは、ＲＨＡ０００２＿ｓ３３（配列番号１７）およびＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ９（配列番号３２）を使用した。ＨＡ１は、$HA1_{Anhui}$を使用し、ＨＡは、HA_{Anhui}を使用した。抗体は、コントロール抗体であるＣｏｎｔｒｏｌ　Ａｂ（ウサギ　イムノグロブリン、Beckman Coulter, Inc.社、＃７３１６４２）、およびＡｎｔｉ　ＨＡ　Ａｂ（ウサギ抗ＨＡ抗体、Sino Biological Inc.社、＃１１０４８－ＲＰ０２）を使用した。

[0091] そして、以下のような条件に設定した以外は、前記実施例Ａ１（３）と同様にしてＳＰＲを行った。はじめにセンサーチップのフローセルに、超純水（ＤＤＷ）を用いて、５０００ｎｍｏｌ／Ｌのリガンドをインジェクションし、シグナル強度（ＲＵ：Ｒｅｓｏｎａｎｃｅ　Ｕｎｉｔ）が約１０００ＲＵになるまで結合させた。前記リガンドは、２４塩基長のデオキシチミジンの5’末端をビオチン化したビオチン化ポリｄＴを使用した。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、　４００ｎｍｏｌ／Ｌの前記ポリｄＡ付加アプタマーを流速２５μＬ／ｍｉｎで８０秒間インジェクションし、シグナル強度が約７００ＲＵになるまで結合させた。続いて、５００ｎｍｏｌ／Ｌの前記標的タンパク質を、ＳＰＲバッファーを用いて、流速２５μＬ／ｍｉｎで８０秒間インジェクションし、引き続き、１μｍｏｌ／Ｌの検出抗体を流速５０μＬ／ｍｉｎで１２０秒間インジェクションし、最後に、ＳＰＲバッファーを流して洗浄を行った。

[0092] これらの結果を図８に示す。図８は、アプタマーと標的タンパク質と抗体との結合能を示すグラフである。図８のグラフにおいて、縦軸は、前記ProteON（登録商標）XRP36で測定したシグナル強度（ＲＵ）の相対値である。相対値は、前記実施例Ａ１（３）と同様にして求めた。

[0093] 図８に示すように、いずれのアプタマーを使用した場合も、アプタマーとＨＡまたはＨＡ１とコントロール抗体との結合が生じることなく、アプタマ

ーとＨＡまたはＨＡ１と抗ＨＡ抗体との結合が確認された。この結果から、本発明のアプタマーが抗体と併用可能であることがわかった。

[0094] ［実施例Ｂ１］

アプタマーについて、ＳＰＲによりＨＡに対する結合能を確認した。

[0095] （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。

ＲＨＡ０００２＿ｓ３３（配列番号１７）

GTGTTTGATGGTTTGGTCTGGTTGGCTTAACAC

ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ５（配列番号３３）

GGGTTTGGGTTGGGTTGGGTTTTTGGGTTTGGGTTGGGTTGGG

ＲＨＡ１６３４＿ｓ６０（配列番号２１）

GGGCACCCTCTCGCTGTACGGTTGATGCACGTTTCTTTCTCTTTATATTGCTGGGTGCCC

ＲＨＡ１６３５＿ｓ６２（配列番号２３）

GGGGCCCACCCTCTCGCTGGCGGCTCTGTTCTGTTCTCGTCTCCTTGATTTCTGTGGGCCCC

ＲＨＡ０３８５＿ｓ２８（配列番号２５）

TTGGGGTTATTTTGGGAGGGCGGGGGTT

ＲＨＡ０４７１＿ｓ５１（配列番号２７）

TCCTCGTTGGGGGTGGTGGTGGGTTTCGGTTCATGGGTGGGACGGAGAGGA

[0096] ＨＡに結合性を示さないコントロールの核酸分子、ＨＡに結合性を示すことが報告されている非特許文献１のアプタマーＡ２２および非特許文献２の前記Ａ０５を合成した。

コントロール（配列番号３９）

CGGCGTTTGGTTGGCGTGAACCATTTTTAAGTT

比較例　Ａ２２（配列番号４０）

AATTAACCCTCACTAAAGGGCTGAGTCTCAAAACCGCAATACACTGGTTGTATGGTCGAATAAGTTA
A

比較例　Ａ０５（配列番号５３）

GAATTCAGTCGGACAGCGGGGGGGAATTCTAGCAGTACACCTCGAGAATTATAGCCAGGATGGACGA

ATATCGTCTCCC

[0097] 前記アプタマーは、その３’末端に、２４塩基長のデオキシアデニン（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。

[0098] （２）標的タンパク質

標的タンパク質として、前記実施例Ａ１におけるA/Anhui/1/2005由来ＨＡ１（$HA1_{Anhui}$：配列番号３６）、以下に示す、A/California/04/2009由来ＨＡ１、A/Brisbane/59/2007由来ＨＡ１、A/Aichi/2/1968由来ＨＡ１を使用した。

$HA1_{California}$

A/California/04/2009由来ＨＡ１

Sino Biological Inc. 社＃１０５５－Ｖ０８Ｈ４

配列番号４１

MKAILVVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLL

EDKHNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETP

SSDNGTCYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVT

AACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPS

TSADQQSLYQNADTYVFVGSSRYSKKFKPEIAIRPKVRDQEGRMNYYWTL

VEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQTPK

GAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQSR

$HA1_{Brisbane}$

A/Brisbane/59/2007由来ＨＡ１

Sino Biological Inc.社 ＃１１０５２－Ｖ０８Ｈ１

配列番号４２

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLL

ENSHNGKLCLLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVEKP

NPENGTCYPGHFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHTVTGVSA

SCSHNGESSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSKSYANNKEKEVLVLWGVHHPPN

IGDQKALYHTENAYVSVVSSHYSRKFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLL

EPGDTIIFEANGNLIAPRYAFALSRGFGSGIINSNAPMDKCDAKCQTPQG

AINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRSAKLRMVTGLRNIPSIQSR

ＨＡ１$_{Aichi}$

A/Aichi/2/1968由来ＨＡ１

Sino Biological Inc. 社＃１１７０７－Ｖ０８Ｈ１

配列番号４３

MKTIIALSYIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQI

EVTNATELVQSSSTGKICNNPHRILDGIDCTLIDALLGDPHCDVFQNETW

DLFVERSKAFSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFITEGFTWTGVTQNG

GSNACKRGPGSGFFSRLNWLTKSGSTYPVLNVTMPNNDNFDKLYIWGIHH

PSTNQEQTSLYVQASGRVTVSTRRSQQTIIPNIGSRPWVRGLSSRISIYW

TIVKPGDVLVINSNGNLIAPRGYFKMRTGKSSIMRSDAPIDTCISECITP

NGSIPNDKPFQNVNKITYGACPKYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTR

[0099] （３）ＳＰＲによる結合能の解析

前記アプタマーおよび前記標的タンパク質を使用した以外は、前記実施例Ａ１（３）と同様にして行った。これらの結果を図９に示す。図９は、各標的タンパク質に対する各アプタマーの結合能を示すグラフである。図９のグラフにおいて、縦軸は、前記ＰroteON（登録商標）ＸRP36で測定したシグナル強度（ＲＵ）の相対値である。相対値は、前記実施例Ａ１（３）と同様にして求めた。

[0100] 図９に示すように、実施例のいずれのアプタマーも、各種ＨＡ１に対して、比較例のアプタマーよりも優れた結合能を示した。

[0101] ［実施例Ｂ２］

アプタマーを用いて、ＥＬＡＡ（Ｅｎｚｙｍｅ－ｌｉｎｋｅｄ Ａｐｔａｍｅｒ Ａｓｓａｙ）により、固定化したＨＡの検出を行った。

[0102] （１）アプタマー

前記実施例Ｂ１で合成したＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ５（配列番号３３

）、ＲＨＡ１６３４＿ｓ６０（配列番号２１）、ＲＨＡ１６３５＿ｓ６２（配列番号２３）、ＲＨＡ０３８５＿２８（配列番号２５）、ＲＨＡ０４７１＿ｓ５１（配列番号２７）を使用した。また、前記実施例Ｂ１と同じ、コントロールの核酸分子および比較例のアプタマーを使用した。これらのアプタマーの３’末端を、それぞれビオチン化し、ビオチン化アプタマー（検出用アプタマー）として、後述するＥＬＡＡに使用した。

[0103] （２）標的タンパク質

標的タンパク質として、実施例Ａ１および実施例Ｂ１のA/Anhui/1/2005由来ＨＡ（ＨＡ／Ｈ５Ｎ１）およびA/California/04/2009由来ＨＡ（ＨＡ／Ｈ１Ｎ１）を使用した。

[0104] （３）ＥＬＡＡ（直接法）

ウェルにターゲットを固定化し、前記固定化ターゲットに前記検出用アプタマーを接触させ、前記固定化ターゲットに結合した前記検出用アプタマーを検出することによって、固定化したターゲットの検出を行った。この方法を、以下、ＥＬＡＡの直接法という。

[0105] まず、９６穴プレート（商品名Ｉｍｍｕｎｏ　９６　Ｍｉｃｒｏｗｅｌｌ　Ｐｌａｔｅｓ　ＭａｘｉＳｏｒｐ：Ｎｕｎｃ社）に、炭酸バッファー（ｐＨ９．６）で希釈した１０μｇ／ｍＬの前記ＨＡを、ウェルあたり１００μＬ添加し、４℃で一晩吸着させた。前記ウェルを２００μＬの洗浄バッファー（５０ｍｍｏｌ／Ｌ　Ｔｒｉｓ、１００ｍｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ、５ｍｍｏｌ／Ｌ　ＫＣｌ、１ｍｍｏｌ／Ｌ　$MgCl_2$、０．０１％　Ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０，ｐＨ７．４）で洗浄後、ブロッキングバッファー（Ｐｒｏｔｅｉｎ－Ｆｒｅｅ（ＴＢＳ）　ｂｌｏｃｋｉｎｇ　ｂｕｆｆｅｒ，＃３７５７０、ＰＩＥＲＣＥ社）を２００μＬ加え、室温で１時間インキュベートした。インキュベート後、前記ウェルを２００μＬの前記洗浄バッファーで３回洗浄し、前記ＨＡを固定化したプレートを作製した。

[0106] そして、反応溶液（５０ｍｍｏｌ／Ｌ　Ｔｒｉｓ、１００ｍｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ、５ｍｍｏｌ／Ｌ　ＫＣｌ、１ｍｍｏｌ／Ｌ　$MgCl_2$、０．０１

％　Ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０、０．０５％　ＢＳＡ、ｐＨ７．４）で、前記ビオチン化アプタマーを１μｍｏｌ／Ｌに希釈した後、前記ウェルに、ウェルあたり１００μＬ添加し、室温で１時間インキュベートした。続いて、前記ウェルを前記洗浄液で洗浄した後、１０００倍希釈したストレプトアビジンーセイヨウワサビペルオキシダーゼ（ＳＡ－ＨＲＰ：ＧＥ社、＃ＲＰＮ１２３１＿２ＭＬ）を１００μＬ添加し、室温で３０分間反応させた。さらに、前記ウェルを前記洗浄液で洗浄した後、ＴＭＢ－Ｅ基質（Ｍｏｓｓ　Ｉｎｃ．製）１００μＬを添加し、室温で２０分間反応（発色）させた。その後、前記ウェルに１００μＬの０．５ｍｏｌ／Ｌ　硫酸を加え、反応を停止した後、プレートリーダーで波長４５０ｎｍの吸光度（参照波長は６２０ｎｍ）を測定した。

[0107]　また、ブランクとして、ＨＡを固定化していない９６穴プレートについて、同様にＥＬＡＡを行った。

[0108]　これらの結果を、図１０に示す。図１０は、アプタマーに結合したＨＡの量を示すグラフである。図１０において、縦軸は、前記結合能を示す波長４５０ｎｍの吸光度（参照波長は６２０ｎｍ）である。

[0109]　図１０に示すように、実施例のいずれのアプタマーも、各種ＨＡに対して、比較例のアプタマーよりも優れた結合能を示した。また、ブランクについて、吸光度は検出限界未満であった。これらの結果から、実施例のアプタマーは、プレートではなく、固定化されたＨＡ１に結合性を示すことがわかった。このような方法によれば、測定された吸光度は、固定化されたＨＡに結合したアプタマーの量を示すことから、間接的に、ＨＡを定性および定量できる。また、ＨＡの定性および定量をできることから、さらに、インフルエンザウイルスの定性および定量も可能である。

[0110]［実施例Ｂ３］

アプタマーを用いて、ＥＬＡＡ（Ｅｎｚｙｍｅ－ｌｉｎｋｅｄ　Ａｐｔａｍｅｒ　Ａｓｓａｙ）により、固定化抗体により捕捉したＨＡの検出を行った。

[0111] （１）アプタマー

前記実施例Ｂ１で合成したＲＨＡ０００２＿ｓ３３（配列番号１７）、ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ５（配列番号３３）、ＲＨＡ１６３４＿ｓ６０（配列番号２１）、ＲＨＡ１６３５＿ｓ６２（配列番号２３）を使用した。また、前記実施例Ｂ１と同じ、コントロールの核酸分子を使用した。これらのアプタマーの３’末端を、それぞれビオチン化し、ビオチン化アプタマーとして、後述するＥＬＡＡに使用した。

[0112] （２）標的タンパク質

標的タンパク質として、前記実施例Ｂ１のA/Anhui/1/2005由来ＨＡ（ＨＡ１／Ｈ５Ｎ１）を使用した。

[0113] （３）抗体

ＨＡ／Ｈ５Ｎ１に結合性を示すポリクローナル抗体として、ウサギ抗ヘマグルチニン（Ｈ５Ｎ１）ｐＡｂ（Sino Biological Inc.、＃１１０４８－ＲＰ２）を使用した。

[0114] （４）ＥＬＡＡ

９６穴プレート（商品名Immuno 96 Microwell Plates MaxiSorp、Ｎｕｎｃ社）に、１ウェルあたり抗体１μｇを添加し、４℃で一晩インキュベートして、前記抗体を固定化した。ブロッキングバッファーは、商品名Protein－Free (TBS) blocking buffer（＃３７５７０、ＰＩＥＲＣＥ社）を使用し、処理条件は、室温で１時間とした。そして、前記プレートに、ウェルあたり１μｇの前記ＨＡを添加し、室温で２時間インキュベートして、前記プレート上の固定化抗体に前記ＨＡを結合させた。続いて、前記プレートに、ウェルあたり１μｍｏｌ／Ｌのビオチン化アプタマー１００μＬを添加し、室温で１時間インキュベートした後、ストレプトアビジン－ＨＲＰ（×１００００）による発色反応を行って、吸光度を測定した。なお、特に示さない限りは、前記実施例Ｂ２におけるＥＬＡＡと同様の条件で処理を行った。

[0115] また、ブランクとして、前記ＨＡを未添加とした系、前記抗体を固定化していない系についても、吸光度の測定を行った。

[0116] これらの結果を、図１１に示す。図１１は、アプタマーに結合したＨＡの量を示すグラフである。図１１において、縦軸は、前記結合能を示す波長４５０ｎｍの吸光度（参照波長は６２０ｎｍ）である。

[0117] 図１１に示すように、実施例のいずれのアプタマーも、各種ＨＡに対して、コントロールの核酸分子よりも高い吸光度を示し、特に、ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ５（配列番号３３）は、極めて高い吸光度を示した。また、ブランクについて、ＨＡ未添加の系および抗体を固定化していない系のいずれにおいても、吸光度は検出限界未満であった。これらの結果から、実施例のアプタマーは、前記抗体または前記プレートではなく、プレート上に抗体を介して結合しているＨＡに対して、結合性を示すことがわかった。このような方法（Ｓａｎｄｗｉｃｈ－ＥＬＡＡ）によれば、測定された吸光度は、アプタマーに捕捉されたＨＡに結合した抗体の量を示すことから、間接的に、ＨＡを定性および定量できる。

[0118] ［実施例Ｂ４］

固定化したアプタマーによりＨＡを捕捉し、一次抗体および二次抗体により前記ＨＡの検出を行った。

[0119] （１）アプタマー

前記実施例Ｂ１で合成したＲＨＡ０００２＿ｓ３３（配列番号１７）を使用した。また、前記実施例Ｂ１と同じ、コントロールの核酸分子を使用した。これらのアプタマーの３’末端、それぞれアミノ基（－NH_2）を導入し、アミノ化アプタマーとして使用した。

[0120] （２）標的タンパク質

標的タンパク質として、前記実施例Ｂ１のA/Anhui/1/2005由来ＨＡ（ＨＡ／Ｈ５Ｎ１）を使用した。

[0121] （３）抗体

一次抗体は、ＨＡ／Ｈ５Ｎ１に結合性を示すポリクローナル抗体として、ウサギ抗ヘマグルチニン（Ｈ５Ｎ１）ｐＡｂ（Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｃ、＃１１０４８－ＲＰ２）を使用した。二次抗体は、前記一次

抗体に結合可能なポリクローナル抗体として、ＨＲＰ標識された抗ウサギＩｇＧ抗体（α－Ｒａｂｉｔ　ＩｇＧ－ＨＲＰ、＃ＮＡ９３４－１ＭＬ，ＧＥ社）を使用した。

[0122] （４）ＥＬＡＡ

９６穴プレート（商品名ｉｍｍｏｂｉｌｉｚｅｄ　Ａｍｉｎｏ　ｐｌａｔｅ、＃４３６００６、Ｎｕｎｃ社）に、炭酸バッファー（ｐＨ９．６）で希釈した前記アミノ化アプタマーを添加し、４℃で一晩インキュベートして、前記アミノ化アプタマーを固定化した。前記ウェルに対する前記アミノ化アプタマーの濃度は、０、０．００２、０．０２、０．２、２μＭとした。１回目のブロッキングは、１ｍｏｌ／Ｌ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ７．４）を使用し、処理条件は、室温で１時間とした。２回目のブロッキングは、ブロッキングバッファーとして、商品名Ｐｒｏｔｅｉｎ－Ｆｒｅｅ（ＴＢＳ）ｂｌｏｃｋｉｎｇ　ｂｕｆｆｅｒ（＃３７５７０、ＰＩＥＲＣＥ社）を使用し、処理条件は、室温で１時間とした。そして、前記プレートに、ウェルあたり１μｇの前記ＨＡを添加し、室温で２時間インキュベートして、前記プレート上の固定化アプタマーに前記ＨＡを結合させた。続いて、前記プレートに、ウェルあたり１００ｎμＭの前記一次抗体１００μＬを添加し、室温で１時間インキュベートした後、洗浄を行い、さらに、前記二次抗体（×５０００）を添加して、室温で３０分インキュベートした。そして、ＴＭＢ－Ｅ基質を用いた発色反応により、吸光度を測定した。なお、特に示さない限りは、前記実施例Ｂ２におけるＥＬＡＡと同様の条件で処理を行った。

[0123] また、ブランクとして、前記一次抗体に代えて、コントロール抗体として、ウサギ　イムノグロブリン（Beckman　Coulter,　Inc.社、＃７３１６４２）を使用した系についても、吸光度の測定を行った。

[0124] これらの結果を、図１２に示す。図１２は、アプタマーに結合したＨＡの量を示すグラフである。図１２において、縦軸は、前記結合能を示す波長４５０ｎｍの吸光度（参照波長は６２０ｎｍ）である。

[0125] 図１２に示すように、プレートに固定化した前記ＲＨＡ０００２＿ｓ３３

（配列番号１７）の濃度に依存的に吸光度が増加した。この結果から、固定化した実施例のアプタマーによって、ＨＡを濃度依存的に捕捉できることがわかった。このような方法（Ｓａｎｄｗｉｃｈ－ＥＬＡＡ）によれば、測定された吸光度は、捕捉されたＨＡに結合した抗体の量を示すことから、間接的に、ＨＡを定性および定量できる。

[0126] ［実施例Ｂ５］

固定化した捕捉用アプタマーによりＨＡを捕捉し、検出用アプタマーにより前記ＨＡの検出を行った。

[0127] （１）アプタマー

前記実施例Ｂ１で合成したＲＨＡ０００２＿ｓ３３（配列番号１７）、ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ５（配列番号３３）、ＲＨＡ０３８５＿ｓ２８（配列番号２５）、ＲＨＡ０４７１＿ｓ５１（配列番号２７）を使用した。プレートに固定化する捕捉用アプタマーは、３’末端にアミノ基（－NH_2）を導入した。また、検出用アプタマーは、３’末端をビオチン化した。また、前記実施例Ｂ１と同じ、コントロールの核酸分子を使用した。前記捕捉用アプタマーと前記検出用アプタマーの組合せを、以下に示す。

[0128] [表4]

捕捉用アプタマー	検出用アプタマー
コントロール	ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ５
	ＲＨＡ０３８５＿ｓ２８
	ＲＨＡ０４７１＿ｓ５１
ＲＨＡ０３８５＿ｓ２８	コントロール
	ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ５
	ＲＨＡ０４７１＿ｓ５１
ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ５	コントロール
	ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ５
	ＲＨＡ０３８５＿ｓ２８
	ＲＨＡ０４７１＿ｓ５１
ＲＨＡ０００２＿ｓ３３	ＲＨＡ０３８５＿ｓ２８

[0129] （２）標的タンパク質

標的タンパク質として、前記実施例Ｂ１のA/California/04/2009由来ＨＡ（ＨＡ１／Ｈ１Ｎ１）を使用した。

[0130] （３）ＥＬＡＡ（サンドイッチ法）

ウェルに捕捉用アプタマーを固定化し、前記捕捉用アプタマーにターゲットを接触させ、さらに、前記捕捉用アプタマーに結合した前記ターゲットに対して、前記検出用アプタマーを接触させ、前記捕捉用アプタマーと前記検出用アプタマーで前記ターゲットをサンドイッチした。そして、この複合体における前記検出用アプタマーを検出することによって、ターゲットを検出した。この方法を、以下、ＥＬＡＡのサンドイッチ法という。

[0131] まず、９６穴プレート（商品名immobilized Amino plate、＃４３６００６、Ｎｕｎｃ社）に、ウェルあたり０．２μｍｏｌ／Ｌの前記捕捉用アプタマー１００μＬを添加し、室温で２時間インキュベートして、前記アミノ化アプタマーを固定化した。１回目のブロッキングは、１ｍｏｌ／Ｌ Ｔｒｉｓ（ｐＨ７．４）を使用し、処理条件は、室温で１時間とした。２回目のブロッキングは、ブロッキングバッファーとして、商品名Protein-Free (TBS) blocking buffer（＃３７５７０、ＰＩＥＲＣＥ社）を使用し、処理条件は、室温で１時間とした。そして、前記プレートに、ウェルあたり１μｇの前記ＨＡを添加し、室温で２時間インキュベートして、前記プレート上の前記捕捉用アプタマーに前記ＨＡを結合させた。続いて、前記プレートに、ウェルあたり１μｍｏｌ／Ｌの前記検出用アプタマー１００μＬを添加し、室温で１時間インキュベートした後、ストレプトアビジン－ＨＲＰ（×１０００）による発色反応を行って、吸光度を測定した。なお、特に示さない限りは、前記実施例Ｂ２におけるＥＬＡＡと同様の条件で処理を行った。

[0132] これらの結果を、図１３に示す。図１３は、捕捉用アプタマーで捕捉されたＨＡに結合した前記検出用アプタマーに結合したＨＡの量を示すグラフである。

[0133] 図１３に示すように、実施例のアプタマーを捕捉用アプタマーおよび検出用アプタマーとして使用することによって、コントロールよりも高い吸光度

を示した。特に、捕捉用アプタマーと検出用アプタマーとの組合せが、ＲＨＡ０３８５＿ｓ２８（配列番号２５）とＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ５（配列番号３３）との組合せ、ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ５（配列番号３３）とＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ５（配列番号３３）またはＲＨＡ０３８５＿ｓ２８（配列番号２５）の組合せの場合、極めて高い吸光度を示した。このような方法（Ｓａｎｄｗｉｃｈ－ＥＬＡＡ）によれば、測定された吸光度は、捕捉用アプタマーに捕捉されたＨＡに結合した検出用アプタマーの量を示すことから、間接的にＨＡを定性および定量できる。

[0134] また、標的タンパク質として、前記A/California/04/2009由来ＨＡ（$HA_{California}$）に加え、A/Anhui/1/2005由来ＨＡ（HA_{Anhui}）を使用し、捕捉用アプタマーと検出用アプタマーとの組合せを、ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ５（配列番号３３）とＲＨＡ０３８５＿ｓ２８（配列番号２５）との組合せを採用した以外は、前述と同様にして、ＥＬＬＡを行った。これらの結果を、図１４に示す。図１４は、捕捉用アプタマーで捕捉されたＨＡに結合した前記検出用アプタマーに結合したＨＡの量を示すグラフである。図１４に示すように、$HA_{California}$に加え、HA_{Anhui}に対しても高い吸光度を示したことから、捕捉用アプタマーと検出用アプタマーとを使用することで、ＨＡを間接的に定性および定量できることがわかった。

[0135] ［実施例Ｂ６］

[0136] （１）アプタマー

前記実施例Ｂ１で合成したＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ５（配列番号３３）を使用した。前記アプタマーの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、さらに、前記ポリｄＡの３’末端をビオチン化した。これをビオチン化ポリｄＡ付加アプタマーとして、使用した。

[0137] （２）アンチセンスおよびポリｄＴ

前記アプタマーと相補的な配列であるアンチセンス（配列番号４４）を合成し、５’末端をアミノ化した。

アンチセンス（配列番号４４）

CCCAAACCCAACCCAACCCAAAAACCCAAACCCAACCCAACCCTTTTT

[0138] （３）標的タンパク質

標的タンパク質として、前記実施例Ｂ１のA/California/04/2009由来ＨＡ（ＨＡ／Ｈ５Ｎ１）を使用した。

[0139] （４）ＥＬＡＡ

９６穴プレート（商品名immobilized Amino plate、＃４３６００６、Ｎｕｎｃ社）に、ウェルあたりＯ．０２μｍｏｌ／Ｌの前記アミノ化アンチセンス１００μＬを添加し、室温で２時間インキュベートして、前記アミノ化アンチセンスを固定化した。１回目のブロッキングは、１ｍｏｌ／Ｌ Ｔｒｉｓ（ｐＨ７．４）を使用し、処理条件は、室温で１時間とした。２回目のブロッキングは、ブロッキングバッファーとして、商品名Protein−Free (TBS) blocking buffer（＃３７５７０、ＰＩＥＲＣＥ社）を使用し、処理条件は、室温で１時間とした。

[0140] 他方、所定濃度（０、０．０００２、０．００２、０．０２、０．２、２μｍｏｌ／Ｌ）の前記ＨＡと、２ｎｍｏｌ／Ｌのビオチン化ポリｄＡ付加アプタマーとを混合し、４℃で一晩インキュベートし、前記ＨＡと前記アプタマーとを結合させた。そして、この混合液を１ｎｍｏｌ／Ｌとなるように、前記ウェルに添加し、室温で１時間インキュベートした後、洗浄し、ストレプトアビジン（ＳＡ）−ＨＲＰ（×１０００）による発色反応を行って、吸光度を測定した。なお、特に示さない限りは、前記実施例Ｂ２におけるＥＬＡＡと同様の条件で処理を行った。

[0141] 比較例として、前記アミノ化アンチセンスに代えて、5’末端をアミノ化した２４塩基長のポリｄＴを使用した以外は、同様にして吸光度の測定を行った。

[0142] これらの結果を、図１５に示す。図１５は、固定化したアンチセンスに結合したアプタマーの量を示すグラフである。図１５において、縦軸は、前記結合能を示す波長４５０ｎｍの吸光度（参照波長は６２０ｎｍ）である。

[0143] 図１５に示すように、前記アンチセンスと前記アプタマーとを組み合わせ

た場合、ＨＡの濃度が増加するにしたがって、吸光度が相関性をもって減少した。これは以下の理由による。ＨＡが非存在の場合、前記アプタマーは、プレートに固定化された前記アンチセンスと結合できる。このため、前記アンチセンスを介して前記プレートに捕捉された前記アプタマーのビオチンと、ＳＡ－ＨＲＰが結合して、発色が生じる。しかしながら、ＨＡが存在する場合、前記アプタマーは、前記ＨＡと結合するため、前記プレートに固定化された前記アンチセンスと結合できず、前記プレートに捕捉されない。このため、ＳＡ－ＨＲＰによる発色反応が生じない。したがって、ＨＡの濃度の増加に相関的に、吸光度が減少する。なお、ポリｄＴを用いた場合、前記アプタマーに付加されたポリｄＡと結合できるため、ＨＡの増加によっても吸光度の減少は見られなかった。このような方法（Ｃｏｍｐｅｔｉｔｉｖｅ－ＥＬＡＡ）によれば、測定された吸光度は、アンチセンスに捕捉された、ＨＡと未結合のアプタマーの量を示すことから、間接的にＨＡを定性および定量できる。

[0144] ［実施例Ｂ７］

アプタマーについて、抗体との交差反応を確認した。特に示さない限り、前記実施例Ａ１（４）と同様にして行った。

[0145] 標的タンパク質は、前記A/California/04/2009由来ＨＡ１（$HA1_{California}$）に代えて、A/Anhui/1/2005由来ＨＡ１（$HA1_{Anhui}$）、ＢＳＡ、Ｈｉｓ－ＭＩＦを使用した。抗体は、前記実施例Ａ１（４）に記載した、Ｒａｂｂｉｔ　ＩｇＧ、Ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ、Ｃｈｉｃｋｅｎ　ＩｇＧ、Ｒａｔ　ＩｇＧ、Ｇｏａｔ　ＩｇＧを使用した。

[0146] これらの結果を図１６に示す。図１６は、各抗体に対する各アプタマーの結合能を示すグラフである。図１６のグラフにおいて、縦軸は、図４と同様にシグナル強度（ＲＵ）の相対値を示す。前記各アプタマーの９種類のバーは、左から、ＢＳＡ、Ｒａｂｂｉｔ　ＩｇＧ、Ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ、Ｃｈｉｃｋｅｎ　ＩｇＧ、Ｒａｔ　ＩｇＧ、Ｇｏａｔ　ＩｇＧ、Ｈｉｓ－ＭＩＦ、ＨＡ１／Ｈ１Ｎ１、ＨＡ１／Ｈ５Ｎ１の結果を示す。

[0147] 図１６に示すように、実施例のアプタマーは、いずれの抗体に対してもほとんど結合能を示すことなく、ＨＡに強い結合能を示した。このため、例えば、本発明のアプタマーを使用してインフルエンザウイルスまたはＨＡを検出する際、抗体との併用が可能であることがわかった。

[0148] ［実施例Ｃ１］

下記アプタマーについて、標的タンパク質への結合能を確認した。特に示さない限り、前記実施例Ａ１（３）と同様にして行った。

[0149] （１）アプタマー

ＲＨＡ０００２（配列番号１２）

GGTTAGCCCGTCCCGAGATAACTCGGGGTGTTTGATGGTTTGGTCTGGTTGGCTTAACACACGGCGGCTGTAG

ＲＨＡ０００２＿ｓ１６（配列番号１３）

GGTTTGGTCTGGTTGG

ＲＨＡ０００２＿ｓ２０（配列番号１４）

GTGGTTTGGTCTGGTTGGAC

ＲＨＡ０００２＿ｓ２６（配列番号１５）

CGTTTGGTTTGGTCTGGTTGGCAACG

ＲＨＡ０００２＿ｓ２８（配列番号１６）

CGTTATGGTTTGGTCTGGTTGGCTAACG

ＲＨＡ０００２＿ｓ３３（配列番号１７）

GTGTTTGATGGTTTGGTCTGGTTGGCTTAACAC

[0150] （２）標的タンパク質

標的タンパク質は、前記ＨＡ１$_{Anhui}$を使用した。

[0151] これらの結果を図１７に示す。図１７は、標的タンパク質に対する各アプタマーの結合能を示すグラフである。図１７のグラフにおいて、縦軸は、シグナル強度（ＲＵ）の相対値を示す。相対値は、前記実施例Ａ１（３）と同様にして求めた。図１７において、「0-pool」は、前記Ｎ３０の結果を示す。図１７に示すように、実施例のアプタマーは、いずれもＨＡ１$_{Anhui}$に結合

能を示した。

[0152] ［実施例Ｃ２］

下記アプタマーについて、標的タンパク質および抗体への結合能を確認した。特に示さない限り、前記実施例Ａ１（４）と同様にして行った。

[0153] （１）アプタマー

ＲＨＡ０００２＿ｓ３３（配列番号１７）

GTGTTTGATGGTTTGGTCTGGTTGGCTTAACAC

ＲＨＡ０００２＿ｓ３３＿ｄ９（配列番号４８）

GTGTTTGATGGTTTGGTCTGGTTGGCTTAACACTTTTTTTTTTGTGTTTGATGGTTTGGTCTGGTTGGCTTAACAC

ＲＨＡ０００６＿ｓ１９（配列番号１９）

GGGTTTGGGTTGGGTTGGG

ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ９（配列番号３２）

GGGTTTGGGTTGGGTTGGGTTTTTTTTTTGGGTTTGGGTTGGGTTGGG

ＲＨＡ０００６_ｓ１９_ｄ９_ＡＴ（配列番号４６）

GGGTTTGGGTTGGGTTGGGATATATATAGGGTTTGGGTTGGGTTGGG

ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ５（配列番号３３）

GGGTTTGGGTTGGGTTGGGTTTTTGGGTTTGGGTTGGGTTGGG

ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ＿Ｒ２０（配列番号４７）

GGGTTTGGGTTGGGTTGGGGATTGGAATTAAGGCGTGTGGGGTTTGGGTTGGGTTGGG

ＲＨＡ０００６_ｓ１９_ｔ９（配列番号５１）

GGGTTTGGGTTGGGTTGGGTTTTTTTTTGGGTTTGGGTTGGGTTGGGTTTTTTTTTGGGTTTGGGTTGGGTTGGG

[0154] （２）標的タンパク質

標的タンパク質は、前記ＨＡ１$_{Anhui}$および前記ＨＡ$_{Anhui}$を使用し、抗体は、前記実施例Ａ１（４）に記載したＲａｂｂｉｔ　ＩｇＧを使用した。

[0155] これらの結果を図１８に示す。図１８は、標的タンパク質および抗体に対する各アプタマーの結合能を示すグラフである。図１８のグラフにおいて、

縦軸は、シグナル強度（ＲＵ）の相対値を示す。相対値は、前記実施例Ａ１（３）と同様にして求めた。図１８において、「control」は、前記Ｎ３０の結果を示す。

[0156] 図１８に示すように、実施例のアプタマーは、いずれも、抗体に対してほとんど結合能を示さなかったのに対して、$HA1_{Anhui}$およびHA_{Anhui}に結合能を示した。また、アプタマー内のリンカーの長さを変化させた結果、リンカー長が９塩基であるＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ９（配列番号３２）よりも、リンカー長が５塩基であるＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ５（配列番号３３）の方が、より優れた結合能を示した。

[0157] ［実施例Ｄ１］

アプタマーを用いて、ＥＬＡＡにより、固定化したインフルエンザウイルスの検出を行った。

[0158] （１）ウイルス

インフルエンザウイルスは、以下のものを使用し、対照例のウイルスとして、以下の非インフルエンザウイルスを使用した。

（インフルエンザウイルス）

Ｈ１Ｎ１

A/Brisbane/10/07

A/California/04/09

A/Georgia/20/06

Ｈ３Ｎ２

A/Wisconsin/67/05

A/Brisbane/59/07

A/Moscow/10/99

Ｈ５Ｎ１

A/Japanese white eye/Hong Kong/38/06

（非インフルエンザウイルス）

Sindbis virus

[0159] （２）ウイルスストックの調製１

前記Ｈ１Ｎ１、前記Ｈ３Ｎ２および前記非インフルエンザウイルスについて、以下の方法によりウイルスストックを調製した。

[0160] ウイルスの研究用細胞として、イヌの腎臓から樹立されたＭＤＣＫ（Madin Darby Canine Kidney）セルライン（ＡＴＣＣ（登録商標） ＣＣＬ－３４（商標））を使用した。生育培地は、下記組成（終濃度）とした。前記生育培地の成分として、ウシ胎児血清（ＦＢＳ）は、商品名ＤＦＢＳ(Mediatech社)を使用し、その他の成分は、Invitrogen社の製品を使用した。培養条件は、３７℃±２℃、加湿下、５％ CO_2、一晩とした。また、培養プレートは、使用前に、培養密度が８０％であることを確認した。

（生育培地）

１× 最小必須培地（ＭＥＭ）

５％ ＦＢＳ

２ｍｍｏｌ／Ｌ Ｌ－グルタミン

３％ $NaHCO_3$

１× ＭＥＭ Ｖｉｔａｍｉｎｓ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ

[0161] フラスコ内で、コンフルエントな前記ＭＣＤＫ細胞（約９．６×10^6細胞／ｍＬ）に各ウイルスを感染させた。前記細胞の培養には、下記組成（終濃度）の感染培地を使用した。前記感染培地の成分は、特に示す他は、Life Technologiesの製品を使用した。そして、A/Brisbane/59/07およびA/California/04/09については、感染効率（ＭＯＩ）を０．０１ＰＦＵ／細胞とした。A/Brisbane/10/07、A/Wisconsin/67/05、A/Moscow/10/99、A/Georgia/20/06およびSinbisについては、感染効率（ＭＯＩ）を０．０５ＰＦＵ／細胞とした。ＰＦＵは、プラーク形成単位を示す。

（感染培地）

１× ＭＥＭ

３％ $NaHCO_3$

１× ＭＥＭ Ｖｉｔａｍｉｎｓ ｓｏｌｕｔｉｏｎ (Sigma社)

１×　Ｌ－グルタミン

１００Ｕ／ｍＬ　ペニシリン

１００μｇ／ｍＬ　ストレプトマイシン

５０μｇ／ｍＬ　ゲンタマイシン

[0162] 前記細胞に前記ウイルスを１時間感染させた後、前記フラスコに、２μｇ／ｍＬとなるように、改変トリプシンを添加した。前記改変トリプシンは、Ｌ－(トシルアミド-2-フェニル) エチル　クロロメチル　ケトン（ＴＰＣＫ）で処理したトリプシン（商品名TPCK　treated　trypsin、USB社)を使用した。

[0163] そして、細胞変性効果（ＣＰＥ）が約１００％となった時点で、ウイルスを含む培養上清を、遠心分離（２００×Ｇ、１０分、４℃）により回収した。前記上清の残りを、前記上清を、限外ろ過膜を用いた遠心分離によって、１００ｋＤａ以下のタンパク質の除去とウイルスの濃縮を行った。前記限外ろ過膜は、商品名Amicon Ultra centrifugal filter devices 100,000 NMWL (Millipore)を使用し、遠心分離の条件は、３０００×Ｇ、４℃、３０分とした。この操作を繰り返し行い、前記上清全てを濃縮した。この濃縮物を半精製のウイルスストックとした。前記ウイルスストックの一部を採取し、これに含まれるウイルスをＵＶ照射で不活性化し、その濃度をＢＣＡａｓｓａｙ（商品名、Pierce）を用いて決定した。前記ウイルスストックは、－６５℃以下で保存した。

[0164] （３）ウイルスストックの調製２

トリインフルエンザウイルスである前記Ｈ５Ｎ１について、以下の方法によりウイルスストックを調製した。

[0165] 弱毒化された rg A/Japanese White Eye/Hong Kong/38/06を、特定病原体がフリー（ＳＰＦ）である鶏卵に接種し、前記鶏卵を生育させてウイルス感染を行い、４８時間後に、ウイルスを含む漿尿液画分を採取した。そして、回収した前記画分を、希釈液で希釈した。前記希釈液は、１００Ｕ／ｍＬペニシリン、１００μｇ／ｍＬストレプトマイシンおよび５０μｇ／ｍＬ

ゲンタマイシンを含む１×ＰＢＳ（ｐＨ７．４）を使用した。前記（２）に示す濃縮を行うことなく、前記画分の希釈物を、ウイルスストックとした。前記ウイルスストックは、－６５℃以下で保存した。

[0166] なお、前記Ｈ５Ｎ１は、前述のように鶏卵で増殖させているため、鶏卵由来タンパク質を多く含むため、前記「（２）ウイルスストックの調製１」における、カラムによる精製工程は行わなかった。そこで、前記Ｈ５Ｎ１のウイルスストックに関しては、使用量を、ウイルス濃度ではなく、前記タンパク質濃度で示した。なお、前記Ｈ５Ｎ１は、固定化するウイルス数を、他のウイルスと同程度の条件とするために、他のウイルスのウイルス濃度（Ｖμｇ／ｗｅｌｌ）に対して、１００～１０００倍のタンパク質濃度（１００×Ｖ μｇ／ｗｅｌｌ～１０００×Ｖ μｇ／ｗｅｌｌ）となるように使用した。

[0167] （４）ＥＬＡＡ（直接法）

アプタマーとして、前記実施例Ａ３に示すＲＨＡ０００６＿ｓ１９（配列番号１９）、前記実施例Ｂ１に示すＲＨＡ１６３５＿ｓ６２（配列番号２３）、ＲＨＡ０３８５＿ｓ２８（配列番号２５）、ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ５（配列番号３３）を使用した。そして、前記標的タンパク質に代えて、前記ウイルスを固定化した以外は、前記実施例Ｂ２と同様にして、ＥＬＡＡを行った。また、コントールとして、前記実施例Ｂ１と同じコントロールの核酸分子（配列番号３９）を使用した。

[0168] （５）ウイルスに対する結合能

各アプタマーについて、各種ウイルスに対する結合能の結果を以下に示す。

[0169] （５－１）Ｈ５Ｎ１

ＲＨＡ１６３５＿ｓ６２（配列番号２３）、ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ５（配列番号３３）およびＲＨＡ０３８５＿ｓ２８（配列番号２５）について、Ｈ５Ｎ１であるA/Japanese white eye/Hong Kong/38/06への結合能を確認した。前記各アプタマーの濃度は、０．２μｍｏｌ／Ｌとした。これら

の結果を、図２５に示す。図２５は、ウイルスに結合したアプタマーの量を示すグラフである。図２５において、縦軸は、前記結合能を示す波長４５０ｎｍの吸光度（参照波長は６２０ｎｍ）であり、横軸は、固定化したウイルスの量に対応するタンパク質量（μｇ／ｗｅｌｌ）を示す。

[0170] 図２５に示すように、前記コントロールの核酸分子は、インフルエンザウイルスＨ５Ｎ１にほとんど結合性を示さなかった。これに対して、前記各アプタマーは、インフルエンザウイルスＨ５Ｎ１に優れた結合性を示した。

[0171] なお、ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ５について、Ｈ１Ｎ１（ウイルス：１μｇ／ｗｅｌｌ）に対する結合性を示す吸光度（図示せず）と、図２５に示す前記Ｈ５Ｎ１（タンパク質：１００μｇ／ｗｅｌｌ）に対する結合性を示す吸光度は、同程度であった。この結果に基づき、前述のように、以下の実験においては、Ｈ５Ｎ１以外のウイルスのウイルス濃度（Ｖ　μｇ／ｗｅｌｌ）に対して、Ｈ５Ｎ１は、１００倍のタンパク質濃度（１００×Ｖ　μｇ／ｗｅｌｌ）となるように、固定化した。

[0172] （５－２）Ｈ１Ｎ１、Ｈ３Ｎ２およびＨ５Ｎ１

ＲＨＡ１６３５＿ｓ６２（配列番号２３）およびＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ５（配列番号３３）について、インフルエンザウイルスＨ１Ｎ１、Ｈ３Ｎ２、Ｈ５Ｎ１および非インフルエンザウイルスであるSindbis virusへの結合能を確認した。前記各アプタマーの濃度は、０．２μｍｏｌ／Ｌとした。また、Ｈ５Ｎ１以外のウイルスは、固定化ウイルス量を１μｇ／ｗｅｌｌとし、Ｈ５Ｎ１は、固定化ウイルス量に代えて、これに対応するタンパク質量を１００μｇ／ｗｅｌｌとした。これらの結果を、図２６に示す。図２６は、ウイルスに結合したアプタマーの量を示すグラフである。図２６において、縦軸は、前記結合能を示す波長４５０ｎｍの吸光度（参照波長は６２０ｎｍ）である。

[0173] 図２６に示すように、前記コントロールの核酸分子は、非インフルエンザウイルスとインフルエンザウイルスのいずれにもほとんど結合性を示さなかった。これに対して、前記各アプタマーは、非インフルエンザウイルスには

結合性を示さず、インフルエンザウイルスのみに優れた結合性を示した。また、この結果から、本発明のアプタマーは、インフルエンザウイルスの検出において、直接法にも適用できることがわかった。

[0174] ［実施例Ｄ２］

固定化した捕捉用アプタマーによりインフルエンザウイルスを捕捉し、検出用アプタマーにより前記インフルエンザウイルスの検出を行った。

[0175] （１）ウイルス

前記実施例Ｄ１で調製した以下のウイルスを使用した。

（インフルエンザウイルス）

Ｈ１Ｎ１

A/California/04/09

A/Georgia/20/06

Ｈ３Ｎ２

A/Moscow/10/99

Ｈ５Ｎ１

A/Japanese white eye/Hong Kong/38/06

（非インフルエンザウイルス）

Sindbis virus

[0176] （２）ＥＬＡＡ（サンドイッチ法）

捕捉アプタマーとして、ＲＨＡ０３８５＿ｓ２８（配列番号２５）、ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ５（配列番号３３）を使用し、検出用のビオチン化アプタマーとして、ＲＨＡ０００６＿ｓ１９＿ｄ５（配列番号３３）を使用した。そして、前記標的タンパク質に代えて、前記ウイルスを使用し、前記Ｈ５Ｎ１は、タンパク質量を１μｇ／ｗｅｌｌとし、それ以外のウイルスは、ウイルス量を１μｇ／ｗｅｌｌとし、前記捕捉用アプタマーの濃度を０．１μｍｏｌ／Ｌ、前記ビオチン化アプタマーの濃度を０．１μｍｏｌ／Ｌとした以外は、前記実施例Ｂ３と同様にして、ＥＬＡＡを行った。また、ブランクとして、インフルエンザウイルスに代えて、バッファーを添加した系、

コントロールとして、前記アプタマーに代えて、前記実施例Ｂ１のコントロールの核酸分子（配列番号３９）を使用した系について、同様にＥＬＡＡを行った。

[0177] これらの結果を、図２７に示す。図２７は、アプタマーに結合したインフルエンザウイルスの量を示すグラフである。図２７において、縦軸は、前記結合能を示す波長４５０ｎｍの吸光度（参照波長は６２０ｎｍ）である。

[0178] 図２７に示すように、前記コントロールの核酸分子は、非インフルエンザウイルスとインフルエンザウイルスのいずれにもほとんど結合性を示さなかった。これに対して、前記各アプタマーは、非インフルエンザウイルスには結合性を示さず、インフルエンザウイルスのみに優れた結合性を示した。また、この結果から、本発明のアプタマーは、インフルエンザウイルスの検出において、サンドイッチ法にも適用できることがわかった。

[0179] 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。

[0180] この出願は、２０１２年６月４日に出願された日本出願特願２０１２－１２８６１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

[0181] 本発明の核酸分子によれば、インフルエンザウイルスに結合可能であるため、例えば、インフルエンザを検出できる。このため、本発明の核酸分子は、例えば、臨床分野、畜産分野等におけるインフルエンザウイルスの検出等に、極めて有用なツールとなる。

請求の範囲

[請求項1] 下記（ａ）～（ｄ）からなる群から選択された少なくとも一つのポリヌクレオチドを含むことを特徴とするインフルエンザウイルスに結合する核酸分子。

（ａ）配列番号１～３０のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド

（ｂ）前記（ａ）のいずれかの塩基配列において、１もしくは数個の塩基が欠失、置換、挿入および／または付加された塩基配列からなり、インフルエンザウイルスに結合するポリヌクレオチド

（ｃ）前記（ａ）のいずれかの塩基配列に対して、８０％以上の同一性を有する塩基配列からなり、インフルエンザウイルスに結合するポリヌクレオチド

（ｄ）前記（ａ）のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジ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、インフルエンザウイルス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を、２つ以上含む、請求項１記載の核酸分子。

[請求項3] 前記２つ以上のポリヌクレオチドが、リンカーを介して連結している、請求項２記載の核酸分子。

[請求項4] 配列番号１９の塩基配列からなるポリヌクレオチド（ＲＨＡ０００６__ｓ１９）または配列番号１７の塩基配列からなるポリヌクレオチド（ＲＨＡ０００２__ｓ３３）を、２つ含み、前記２つのポリヌクレオチドが、リンカーを介して連結している、請求項２または３記載の核酸分子。

[請求項5] リンカーを介して連結した２つのポリヌクレオチドの全体の塩基配列が、配列番号３１または配列番号４５の塩基配列である、請求項４記載の核酸分子。

[請求項6] 前記ポリヌクレオチドが、ＤＮＡ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］ 請求項１から６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、インフルエンザウイルスに結合する結合剤。