

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6016792号  
(P6016792)

(45) 発行日 平成28年10月26日 (2016.10.26)

(24) 登録日 平成28年10月7日 (2016.10.7)

(51) Int. Cl.		F I	
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/68</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 Z N A A
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A
<b>G O 1 N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 M
<b>G O 1 N</b>	<b>33/483</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 33/483 E
<b>G O 1 N</b>	<b>27/00</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 27/00 D

請求項の数 4 (全 37 頁)

(21) 出願番号	特願2013-519840 (P2013-519840)	(73) 特許権者	504238378
(86) (22) 出願日	平成23年7月14日 (2011.7.14)		ザ キュレイターズ オブ ザ ユニバー シティ オブ ミズーリ
(65) 公表番号	特表2013-540423 (P2013-540423A)		アメリカ合衆国 6 5 2 1 1 ミズーリ州 コロンビア ユニバーシティホール3 1 6
(43) 公表日	平成25年11月7日 (2013.11.7)	(74) 代理人	100114890
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/044082		弁理士 アインゼル・フェリックス＝ライ ンハルト
(87) 国際公開番号	W02012/009578	(74) 代理人	100182545
(87) 国際公開日	平成24年1月19日 (2012.1.19)		弁理士 神谷 雪恵
審査請求日	平成26年7月14日 (2014.7.14)	(72) 発明者	リー・チュン グー
(31) 優先権主張番号	61/399,578		アメリカ合衆国 ミズーリ コロンビア ラレード トレイル 4 9 1 2
(32) 優先日	平成22年7月14日 (2010.7.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
前置審査			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ナノポア促進型の核酸の単分子検出

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

サンプル中のターゲットの m i R N A またはその断片をデュアルチャンバーナノポアシステムで選択的に捕捉及び検出する方法であって、

a) ターゲットの m i R N A またはその断片を含むと疑われる 体液または組織由来のサンプル と、前記ターゲットの m i R N A またはその断片に対して相補的な配列を有する中心ドメイン及び該中心ドメインの3 末端又は5 末端の少なくとも一方に 共有結合された2 ~ 3 0 アミノ酸残基の長さの正に荷電されたポリペプチド末端伸長部を含むプローブ とを混合して、ターゲットの m i R N A / プローブ複合体 または m i R N A 断片 / プローブ複合体 を含有するサンプル混合物を作成する工程と、

b) 前記サンプル混合物に、デュアルチャンバーナノポアシステムの第1のコンパートメントにおいて、ターゲットの m i R N A / プローブ複合体 または m i R N A 断片 / プローブ複合体 を、第1のコンパートメントに対するナノポアのトランス側開口部中で トラップ するのに十分な電圧をかける工程であって、その際、前記ナノポアは、そのトランス側開口部で、K 1 3 1 D または K 1 3 1 E アミノ酸置換を含む 溶血素の変異体 である工程と

c) 前記のナノポアシステムにおいて経時的に電流パターンを分析する工程であって、その際、前記サンプル中での前記ターゲットの m i R N A またはその断片の存在は、前記のサンプル単独又は前記プローブ単独で生ずるバックグラウンドの電流ブロックとは異なる 振幅及び / 又は異なる時間の電流ブロック を含む、少なくとも1つの特徴的な電流ブロッ

クによって示される工程を含む、前記方法。

【請求項 2】

ポリペプチド末端伸長部が 8 ~ 15 アミノ酸残基の長さである、請求項 1 に記載の方法

【請求項 3】

前記の正に荷電されたポリペプチドが、前記プローブが前記ターゲットの miRNA またはその断片にハイブリダイズした際に正味の正の電荷を提供する、少なくとも 2 つの正に荷電されたアミノ酸残基を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

プローブ分子の中心ドメインは、miRNA 分子またはその断片に対して相補的な少なくとも 10 ヌクレオチド又はヌクレオベース残基を含む、請求項 1 から 3 までのいずれか 1 項に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、米国特許仮出願第 61 / 399 , 578 ( 出願日 2010 年 7 月 14 日 ) の利益を主張する。この出願の全内容は、参照をもって本願に開示されたものとする。

【0002】

助成の表明

本発明は、アメリカ国立衛生研究所により与えられた認可番号 GM079613 で政府支援のもと完成されたものである。政府は本発明に一定の権利を有する。

20

【0003】

発明の分野

本発明は、超高感度で低ノイズのナノポアを基礎とする単分子技術を用いた、単分子検出の方法 / 装置に関し、より具体的には一本鎖の核酸、例えばマイクロ RNA の定量的な検出のための方法 / システムに関する。

【0004】

配列表の言明

サイズ 12303 バイト ( オペレーティングシステム MS-Windows で測定 ) を有する 2011 年 7 月 14 日に作成されたファイル名 "52553\_96854\_ST25.txt" のファイルに収容された配列表は、電子的送信によって本願とともに提出している。この配列表の全内容は、参照をもって本願に開示されたものとする。

30

【0005】

発明の背景

マイクロ RNA

マイクロ RNA ( miRNA ) は、転写後のレベルで遺伝子発現を調節する短鎖 ( 約 18 ~ 24 ヌクレオチド ) のノンコーディング RNA のクラスである<sup>(2)</sup>。それらのターゲット配列とのホモロジーの度合いに応じて、miRNA の結合は、ターゲット mRNA の翻訳抑制か、その開裂かのいずれかを誘発する<sup>(2)</sup>。強力な遺伝子レギュレーターとして、miRNA は、発生、細胞分化、そして細胞周期、アポトーシス及びシグナル伝達経路の調節において重要な役割を担っている<sup>(2), (3)</sup>。miRNA の異常発現は、あらゆる種類の腫瘍においても見出されており<sup>(4), (5)</sup>、異なる癌の種類は、別個の miRNA 発現プロファイルを有する<sup>(6)</sup>。数個のヌクレオチドの違いを含む幾つかの miRNA ファミリーを含む特定の miRNA は、原発腫瘍から血流へと絶えず放出されており、それは驚くべきほど安定な形態で存在する<sup>(7)</sup>。最近の研究では、循環している miRNA はエキソソームベシクル内部に封入されており、受容細胞に移転可能であり、かつそこで機能的であることが実証されている<sup>(8), (9)</sup>。このように、腫瘍特異的な循環している miRNA の検出は、癌細胞の早期診断、進行度分類及びモニタリングのための強力なツールを提供する<sup>(10)</sup>。

40

50

## 【0006】

## miRNA検出

miRNA検出のために、逆転写リアルタイムPCR (RT-qPCR) を含む技術と、マイクロアレイを含む技術の幾つかの技術が開発されてきている<sup>(11)-(13)</sup>。それぞれの技術は、それ特有の利点を有するが、酵素による増幅が必要とされること、半定量的な結果であることが制限に含まれる<sup>(14)</sup>。特に、短鎖のmiRNA配列は、プライマー又はプローブの選択的な設計を困難なものにし、こうしてクロスハイブリダイゼーションと低い選択性がもたらされる。これは、特に、miRNAがmiRNAファミリーにおいて数個の又は単独のヌクレオチドの違いを含む場合に言える。比色法、生物発光、酵素ターンオーバー数及び電気化学を基礎とする新たに浮上した技術が提案されており、ナノ粒子と分子ビーコンは、高感度及び高選択性を有するmiRNA検出に応用されている(レビュー<sup>(14)</sup>)。しかし、固有の融通性は改善の必要がある。最近では、単分子蛍光とロック核酸(lock-nucleic acid)(LNA)<sup>(15)</sup>プローブとの統合が、組織サンプルにおけるmiRNAプロファイリングのための高感度な方法を提供したが<sup>(16)</sup>、この方法は高価な機器を必要とする。

10

## 【0007】

## ナノポア式単分子検出

ナノメートルスケールのポア構造において、イオン電流は、イオン経路を占める単一のターゲット分子の存在、位置及び構造に非常に敏感になる<sup>(17)</sup>。この敏感さは、単分子を"可視化"することと、ポアのコンダクタンスの特徴的变化からそれらのキネティクスを解明することと、単分子シグネチャイベント(signature event)の発生からターゲットを定量化することを可能にする。ナノポアは、広範な生物工学的用途のために、受容体型(receptive)の単分子デテクタとして開発された(レビュー<sup>(17)-(19)</sup>)。ナノポアは、また、次世代のDNA配列決定技術の一つとも目されている<sup>(20),(21)</sup>。例えば、2nmのナノポアである溶血素の膜貫通型のタンパク質ポアは、DNA配列決定のためによく特徴付けられている一本鎖のオリゴヌクレオチドの迅速な移行(translocation)を可能にする<sup>(22)-(27)</sup>。しかしながら、分子移行を基礎とする検知方式は、miRNA検出には適していない。それというのも、全ての成熟したmiRNAの配列は短鎖(18~24ヌクレオチド)であり、該ナノポアを通り抜けるときに、それらの異なるmiRNAによる電流シグナルは区別できないからである。

20

30

## 【0008】

従って、向上した感度、スピーディーなプロセス、そして費用効果を有したナノスケールのポア構造を基礎とする新規のmiRNA検出法を提供する必要がある。

## 【0009】

## 発明の要旨

本発明の一態様において、一本鎖のオリゴヌクレオチド、例えばmiRNAの検出及び識別のためのナノポアを基礎とする新規かつ改善された検知システムが記載されている。ターゲットの一本鎖のオリゴヌクレオチドを検出するための本発明によるシステムは、1) ナノポアと、2) アンジッピング(unzipping)を誘発するのに十分な電圧を提供する電源と、3) ターゲットのオリゴヌクレオチドに相補的な中心ドメインを有するプローブであって、前記ターゲットのオリゴヌクレオチドと前記プローブとのハイブリッドのアンジッピングにより一定の同定可能な電流シグナル変化が誘発されるプローブと、4) 前記電流シグナル変化を検出するための手段とを含む。本発明によるプローブは、更に、その3'末端もしくは5'末端(又はその両方)に少なくとも1つのシグナルタグを含む。前記のシグナルタグは、電圧により駆動される、ナノポアを通じたアンジッピングによる移行を支援するのに十分な長さを有する任意の荷電した一本鎖分子であってよい。例えば、前記のシグナルタグは、ポリ(dC)<sub>n</sub>、ポリ(dA)<sub>n</sub>及びポリ(dT)<sub>n</sub>などのオリゴヌクレオチド又は荷電したポリペプチドであってよい。

40

## 【0010】

本発明のもう一つの態様において、一本鎖のオリゴヌクレオチドの検出及び識別のため

50

のナノポア技術を基礎とする新規かつ改善された方法が記載されている。本発明による方法は、ナノポア中での、ターゲットのオリゴヌクレオチドとそのプローブとのハイブリッドのアンジッピングによって引き起こされる電流変化を検出する。本発明による方法は、1) ターゲットのオリゴヌクレオチドと、前記ターゲット配列とマッチするその中心ドメインとその3'末端及び5'末端の少なくとも一方にタグ付けされた荷電された一本鎖分子とを有する予め設計されたプローブとを混合することで、サンプル混合物を得る工程と、2) 前記混合物を、ナノポアシステムのcis側チャンパー中にロードし、そしてtrans側チャンパーから電圧を加える工程と、3) 予め決められた時間帯にわたって電流出力を記録する工程とを含んでいる。

**【0011】**

本発明の更なるもう一つの態様において、患者の血液サンプルにおける癌関連のmiRNAを検出及びモニタリングするための新規かつ改善された方法が記載されている。本発明による方法は、1) 患者の血液サンプルから抽出された全血漿RNAと、ターゲットイングするmiRNAに対して相補的な配列を含むmiRNAプローブであってその3'末端、5'末端又はその両方にシグナルタグを含むプローブとを混合する工程と、2) 前記混合物を、予め選択された電圧を有するナノポアチャンパー中に添加する工程と、3) 単独のmiRNA分子認識のための電氣的マーカーとしてはたらく出力電流トレースにおいてシグネチャイベントをモニタリング及び分析する工程とを含んでいる。

**【0012】**

一定の実施形態においては、一本鎖のオリゴヌクレオチド、例えばmiRNAのナノポアを用いた検出のためのプローブ分子であって、1) ターゲットのオリゴヌクレオチドに対して相補的な配列を有する中心ドメインと、2) 前記中心ドメインの3'末端又は5'末端の少なくとも一方にタグ付けされた末端伸長部を含むプローブ分子が提供される。一定の実施形態においては、前記の末端伸長部は、荷電された鎖状分子である。一定の実施形態においては、前記の末端伸長部は、荷電されたポリペプチドである。一定の実施形態においては、前記の末端伸長部は、荷電されたポリマーである。

**【0013】**

一定の実施形態においては、本発明は、デュアルコンパートメント式(dual-compartment)のナノポアシステムで一本鎖のオリゴヌクレオチドを検出する方法を提供するが、前記システムは、中心領域に開口部を有する仕切によって区分けされたcis側コンパートメントとtrans側コンパートメントと、両方のコンパートメントを満たす記録溶液と、前記の仕切の開口部で形成された脂質二重膜と、前記のcis側チャンパーとtrans側チャンパーとをまたぐ前記脂質二重膜を通じて差し込んだナノポアと、前記のcis側コンパートメントもしくはtrans側コンパートメントからそれぞれ突き出している一対の電極を介して前記システムに印加された電圧と、電流変化をモニタリングする電流デテクタとを含み、前記方法は、1) ターゲットのオリゴヌクレオチドと、前記ターゲット配列とマッチするその中心ドメインとその3'末端及び5'末端の少なくとも一方にタグ付けされた荷電された一本鎖分子とを有する予め設計されたプローブとを混合することで、サンプル混合物を得る工程と、2) 前記混合物を、cis側コンパートメント中にロードする工程と、3) 前記システムに予め決められた電圧を与える工程と、4) 予め決められた時間帯にわたって電流出力を記録する工程とを含んでいる。前記方法の一定の実施形態においては、前記の記録工程は、更に、ターゲットのオリゴヌクレオチドとプローブとのハイブリッドがナノポア内でアンジッピングすることによって引き起こされる電流変化を分析する工程を含んでよい。

**【0014】**

当該発明は、また、プローブと、ナノポアと、前記プローブ及びナノポアを含むキットと、関連の使用法とを含んでおり、それらは、以下の明細書の部分、これと一緒に提供される図面及び特許請求の部分に記載されている。

**【図面の簡単な説明】****【0015】**

【図1】図1は、本発明の一実施形態による、一つの例示的なナノポア検知システムの概略図である。

【図2】図2は、脂質二重膜を通じて差し込んだ一つの例示的なナノポアの拡大概略図である。

【図3】図3は、一つの例示的な電流トレースと、シグネチャイベントの拡大された電氣的マークと、アンジッピングイベントと移行イベントの概略図を含んでいる。

【図4】図4(A)~(D)は、本発明によるプローブである $P_{155}$ によるmiR-155の一つの例示的な検出を図解している。

【図5】図5(a)及び(b)は、ナノポアセンサを用いたmiRNAの定量化で使用した発明を図説している。

10

【図6】図6(a)及び(b)は、miRNAと類似の配列との識別で使用した発明を図説している。

【図7】図7(a)~(f)は、肺癌患者の血漿におけるmiR-155の検出で使用した発明を図説している。

【図8】図8A~Gは、ナノポアにおける、特定のプローブを有する単一miRNA分子の捕捉を示している。

【図9】図9A~Bは、プローブ配列の最適化による検出感度の向上を示している。

【図10】図10A~Dは、1もしくは2つの異なるヌクレオチドを含むlet-7 miRNAの識別を示している。

【図11】図11A~Hは、肺癌患者の血漿におけるmiR-155の検出を示している。

20

【図12】図12A~Dは、ブロック時間のヒストグラムを示している。

【図13】図13は、mir-155・ $P_{155}$ のシグネチャイベントの電圧に依存する頻度を示している。

【図14】図14は、他の合成miRNA成分の存在下での、 $P_{155}$ (100nM)を用いて検出されたmiR-155シグネチャイベントの頻度を示している。

【図15】図15は、Let-7a・ $P_a$ のハイブリッド及びLet-7b・ $P_a$ のハイブリッドによって形成されるシグネチャイベント数の時間ヒストグラムを示している。

【図16】図16A~Bは、イベント時間に基づく、完全マッチ(陽性)イベント及びミスマッチ(陰性)イベントの分離についてのシミュレーションを示している。

30

【図17】図17は、mir-155及び $P_{155}$ の移行頻度を示している。

【図18】図18A~Fは、miRNA/プローブの複合体の図、ペプチド-PNAプローブのP7bの移行についてのイベント、+180mVでの溶液において、遊離したmiRNA let-7b(プローブなし)では遮断イベントが観察できないこと、let-7b/P7bの複合体のトラップについてのシグネチャイベント、Let-7bとは異なる2つのヌクレオチドを有するLet-7cが、プローブのP7bのPNAに結合できず、従って図A1cに示されるようにシグネチャイベントを生じないこと、Let-7b(完全マッチ、重なりのない2つの離れたクラスター)及びLet-7c(2つのミスマッチ、完全に重なった2つのクラスター)に結合するP7bについての時間-振幅の特性の比較を示している。

40

【図19】図19A~Cは、短鎖の3'末端にヘアピンを有するHP-C30を使用した場合に、新しい種類の3レベルの電流パターンが観察されたこと、短鎖の3'末端にストレプトアビジンが結合されたSA-C30を使用した場合にも、新しいマルチレベルの電流パターンが観察されたこと、2つのDNAを結合する短鎖のオリゴヌクレオチドを使用した場合に、その複合体がナノポア中で2工程で逐次アンジッピングされうることを示している。

【0016】

図面の説明

図1は、本発明の一実施形態による、一つの例示的なナノポア検知システムの概略図である。

50

## 【0017】

図2は、脂質二重膜を通じて差し込んだ一つの例示的なナノポアの拡大概略図である。

## 【0018】

図3は、一つの例示的な電流トレースと、シグネチャイベントの拡大された電氣的マークと、アンジッピングイベントと移行イベントの概略図を含んでいる。

## 【0019】

図4(A)~(D)は、本発明によるプローブである $P_{155}$ によるmiR-155の一つの例示的な検出を図解している： 図4(A)は、異なるタイプのブロックを示す電流トレースである。それらのブロックプロフィールと相応の分子プロセスは、パネルB、C及びDに示されている； 図4(b)/(b)は、遊離したmiR-155もしくは $P_{155}$ 分子がポアを通じて移行することによって発生される一つの例示的なスパイク様の短いブロックである； 図4(c)/(c)は、miR-155・ $P_{155}$ ハイブリッドのアンジッピングと、ナノ空隙内でのmiR-155の閉じ込めと、miR-155の移行とによって一連に生成される複数のコンダクタンスレベルを有する拡大された長いブロックである； 図4(d)/(d)は、アンジッピングせずにcis側入口から出るトラップされたmiR-155・ $P_{155}$ ハイブリッドによって生成される単独のコンダクタンスレベルを有する一つの例示的な長いブロックである。

## 【0020】

図5(a)及び(b)は、ナノポアセンサを用いたmiRNAの定量化で使用した発明を図説している。(a)・100nMの $P_{155}$ の存在下での種々の濃度のmiR-155での電流トレース。ポアと相互作用するmiR-155・ $P_{155}$ に関するシグネチャイベントを、赤色の矢印で印している。(b)・miR-155濃度[miR-155]とシグネチャイベントの頻度( $f_{sig}$ )との間の相関。有意性( $p < 0.01$ )は、任意の2種類のmiR-155濃度での検出の間で妥当である。 $f_{sig}$ -[miR-155]曲線は、式1を使用して当てはめている。

## 【0021】

図6(a)及び(b)は、miRNAと類似の配列との識別で使用した発明を図説している。(a)・プローブ $P_a$ (+120mV)を使用したlet-7a及びlet-7bの検出のための電流トレース。(b)・let-7a・ $P_a$ 、let-7b・ $P_a$ 、let-7a・ $P_b$ 及びlet-7b・ $P_b$ のためのシグネチャイベントの時間( $t_{sig}$ )。

## 【0022】

図7(a)~(f)は、肺癌患者の血漿におけるmiR-155の検出で使用した発明を図説している。(a)~(d)・シグネチャイベントは、健全なボランティア(a)及び肺癌患者(b)からの全血漿RNAについての電流トレースにおいて、100nMの $P_{155}$ プローブの存在下で見出されたが、 $P_{155}$ (c)及び(d)の不在下では観察されなかった。それらのトレースは、1MのKCl中で+100mVで記録された。(e)・6人の健全な個体(N1~N6)及び肺癌を保有する6人の患者(P1~P6)からのmiR-155シグネチャイベントの頻度( $f_{sig}$ )。各サンプルを、独立したナノポアを用いてn回(n=4)測定した。データは、平均±SDとして示した。患者の状態は以下の通りである。(P1)転移性肺扁平上皮癌；(P2)再発小細胞癌；(P3)早期段階の小細胞癌、化学療法と放射線の後の状況；(P4)早期段階の小細胞癌、化学療法の後の状況；(P5)末期段階の非小細胞癌、切除と化学療法の後の状況；(P6)末期の腺癌、化学療法の後の状況。(f)・ナノポアセンサとqRT-PCRで測定された、健全なグループ(左)及び肺癌患者グループ(右)における相対miR-155レベル。平均と一緒にSDを示した。

## 【0023】

図8A~Gは、ナノポアにおける、特定のプローブを有する単一miRNA分子の捕捉を示している。(A)・miRNA・プローブのハイブリッドの分子図；(B)・cis側溶液中の100nMのmiR-155/ $P_{155}$ の存在下での逐次発生したナノポア電流ブロック。記録溶液は、10mMのTris(pH8.0)で緩衝された1MのKClを含

10

20

30

40

50

有していた。それらのトレースは、+100 mVで記録した。同定された電流パターンと相応する分子メカニズムとを、パネルc、f及びgに示した。枠に入れたブロックは、パネルc及びdに示したマルチレベル電流パターンを示した；(c) . ポア内にトラップされ、アンジッピングされ、引き続き、アンジッピングされた $P_{155}$ と $miR-155$ の該ポアを通じた連続的な移行が行われる、 $miR-155 \cdot P_{155}$ ハイブリッドによって発生された、+100 mVでのマルチレベルの長いブロック；(d) . +150 mV及び+180 mVでの特徴的なマルチレベルの長いブロック；(e) . cis側溶液中に存在する種々の濃度の $miR-155$ 及び $P_{155}$ で約6時間の電気記録の後のcis側溶液とtrans側溶液におけるqRT-PCRで検出した $miR-155$ レベル(補足情報中の文)；(f) . アンジッピングせずにcis側入口からポアを出たトラップされた $mir-155 \cdot P_{155}$ ハイブリッドによって発生されたシングルレベル電流パターン；(g) . ハイブリダイズしていない $miR-155$ 又は $P_{155}$ のcis側溶液からの移行によって発生されたスパイク状の短いブロック。

10

## 【0024】

図9A~Bは、プローブ配列の最適化による検出感度の向上を示している。(A) . (左) +100 mVで1MのKClにおいてモニタリングした、プローブ $P_{5'-C30}$ (上部)、 $P_{3'-C30}$ (中央)及び $P_{155}$ (下部)とハイブリダイズした $miR-155$ についてのシグネチャイベントの頻度を示す電流トレース、(右)種々のプローブを用いた $miR-155$ 検出についてのシグネチャイベントの発生頻度定数(第5表)。有意性( $p < 0.005$ )は、任意の2種類のプローブを用いた結果の間で妥当である。(B) . (左) 10~100 nMの範囲のターゲット濃度についての[ $miR-155$ ] -  $f_{155}$ 相間、(右) 0.1~100 pMといったよりかなり低いターゲット濃度について、0.5M/3M(cis/trans)のKCl非対称溶液において測定された[ $miR-155$ ] -  $f_{155}$ 相間。有意性( $p < 0.01$ )は、任意の2種類の $miR-155$ 濃度での検出の間で妥当であった。

20

## 【0025】

図10A~Dは、1もしくは2つの異なるヌクレオチドを含む $let-7$  miRNAの識別を示している。 $let-7a$ 、 $let-7b$ 及び $let-7c$ の配列は、第3表に示した。(a) . +120 mVでのプローブ $P_a$ 又は $P_b$ を使用した $let-7a$ 及び $let-7b$ の検出。(左)電流トレースと、(右)シグネチャイベント時間( $t_{sig}$ )の比較；(b) . +100 mVでのプローブ $P_a$ 又は $P_c$ を使用した $let-7a$ 及び $let-7c$ の検出。(左)電流トレースと、(右)シグネチャイベント時間( $t_{sig}$ )の比較；データは、第6表に示した。(c) . ミスマッチを有さない(陽性)及びミスマッチを有する(陰性)miRNA・プローブのハイブリッドについてのイベントの区別のための受信者操作特性(ROC)。(中抜き四角) :  $let-7a \cdot P_a / let-7b \cdot P_a$ 、(中抜き丸) :  $let-7b \cdot P_b / let-7a \cdot P_b$ 、(中塗り四角) :  $let-7a \cdot P_a / let-7c \cdot P_a$ 及び(中塗り丸) :  $let-7c \cdot P_c / let-7a \cdot P_c$ ；(d) . ROC曲線下の面積(AUC)と、完全マッチイベント及びミスマッチイベントの間の時間比との間の相関。(中塗り丸) : パネルcにおけるROC曲線から測定されたAUC(第7表)、(中抜き丸) : シミュレートされたデータセットを基礎としてROC分析から計算されたAUC(図16及び第8表)。それらのイベントは、指数分布した時間で発生した。完全マッチイベント(陽性)とミスマッチイベント(陰性)の時間比は、それぞれ1、2、3、4、5及び10であった。

30

40

## 【0026】

図11A~Hは、肺癌患者の血漿における $miR-155$ の検出を示している。(a)~(d) . シグネチャイベントは、健全なボランティア(a)及び肺癌患者(b)からの全血漿RNAについての電流トレースにおいて、100 nMの $P_{155}$ プローブの存在下で見出されたが、 $P_{155}$ ((c)及び(d))の不在下ではシグネチャイベントは観察されなかった。それらのトレースは、1MのKCl中で+100 mVで記録した。(e) . スパイクインされた(spiked-in)合成 $miR-39$ の存在下での、6人の健全な個体(番

50

号1～番号6)及び肺癌を保有する6人の患者(番号7～番号12)からのmiR-155シグネチャイベントの頻度( $f_{155}$ )。( $f$ )・( $e$ )で使用した全てのサンプルからの $P_{39}$ (第3表中の配列を参照)により検出されたmiR-39シグネチャイベントの頻度。各サンプルを、独立したナノポアを用いて $n$ 回( $n=4$ )測定した。データは、平均 $\pm$ SDとして示した。患者の状態は以下の通りであった。(番号7)転移性肺扁平上皮癌;(番号8)再発小細胞癌;(番号9)早期段階の小細胞癌、化学療法と放射線の後の状況;(番号10)早期段階の小細胞癌、化学療法の後の状況;(番号11)末期段階の非小細胞癌、切除と化学療法の後の状況;(番号12)末期の腺癌、化学療法の後の状況。(g)・パネルe及びfから計算された $f_{155}/f_{39}$ 。(h)・ナノポアセンサとqRT-PCRで測定された、健全なグループ及び肺癌グループにおける相対miR-155レベルの箱ひげ図。箱は、25パーセントイルと75パーセントイルとの間の間隔を印している。箱の内側黒い線は、中央値を示している。ひげは、5パーセントイルと95パーセントイルとの間の間隔を示している。中塗りの丸は、5パーセントイルと95パーセントイルの外側のデータ点を示している。データは、第9表に示した。

10

## 【0027】

図12A～Dは、ブロック時間のヒストグラムを示している。(a)・mir-155・ $P_{155}$ のハイブリッドによって発生したシグネチャブロック。(b)・シグネチャブロックにおける短いレベル3状態。(c)及び(d)・miR-155(c)及び $P_{155}$ (d)単独の移行による短いブロック。データは、1MのKCl中で+100mVで記録した電流トレースから得た。

20

## 【0028】

図13は、mir-155・ $P_{155}$ のシグネチャイベントの電圧に依存する頻度を示している。データは、1MのKClにおいて、100nMの $P_{155}$ の存在下で10nM(中抜き三角)の及び25nM(中抜き四角)のmir-155を用いて記録された、そして5pMの $P_{155}$ の存在下で10pMのmir-155を用いて(中抜き丸)記録された電流トレースから得られた。

## 【0029】

図14は、他の合成miRNA成分の存在下での、 $P_{155}$ (100nM)を用いて検出されたmiR-155シグネチャイベントの頻度を示している。3つの棒は、miR-155単独(50nM)を、Let-7a(50nM)の存在下でのmiR-155を、そしてLet-7a(50nM)とLet-7b(50nM)の両方の存在下でのmiR-155を表している。データは、1MのKCl中で+100mVで記録した電流トレースから得た。

30

## 【0030】

図15は、Let-7a・ $P_a$ のハイブリッド及びLet-7b・ $P_a$ のハイブリッドによって形成されるシグネチャイベント数の時間ヒストグラムを示している。データは、1MのKCl中で+120mVで記録した電流トレースから得た。(a)・Let-7a・ $P_a$ 。(b)・Let-7b・ $P_a$ 。全てのRNA及びDNAの成分の濃度は、100nMであった。

## 【0031】

40

図16A～Bは、イベント時間に基づく、完全マッチ(陽性)イベント及びミスマッチ(陰性)イベントの分離についてのシミュレーションを示している。(a)・様々な時間の比率でのROC曲線。該分析に参与する2つの種類のイベントが400存在した;(b)・2つの種類のイベントの様々なイベント数の比率でのROC曲線。時間の比率 $p/N$ は3である。

## 【0032】

図17は、mir-155及び $P_{155}$ の移行頻度を示している。データは、1MのKCl中で+100mVで記録した電流トレースから得た。2つのオリゴの濃度は、100nMであった。

## 【0033】

50

図18A~Fは、以下を示す：図18Aは、miRNA/プローブの複合体の図を示している。図18Bは、ペプチド-PNAプローブのP7bの移行についてのイベントを示している。特徴的なイベントは3msにわたって継続し、そして電流は、+180mVで10pAにまで下がる。図18Cは、+180mVでの溶液において、遊離したmiRNA Let-7b (プローブなし)では遮断イベントが観察できないことを示している。図18Dは、Let-7b/P7bの複合体のトラップについてのシグネチャイベントを示している。図18Eは、Let-7bとは異なる2つのヌクレオチドを有するLet-7cが、プローブのP7bのPNAに結合できず、従って図18Dに示されるようにシグネチャイベントを生じないことを示している。殆ど全ての観察されたイベントは、プローブそれ自身によるものである。図18Fは、Let-7b (完全マッチ、重なりのない2つの離れたクラスター)及びLet-7c (2つのミスマッチ、完全に重なった2つのクラスター)に結合するP7bについての時間-振幅の特性を比較している。

10

## 【0034】

図19A~Cは、以下を示す：図19Aでは、短鎖の3'末端にヘアピンを有するHP-C30を使用した場合に、新しい種類の3レベルの電流パターンが観察された。図19Bでは、短鎖の3'末端にストレプトアビジンが結合されたSA-C30を使用した場合にも、新しいマルチレベルの電流パターンが観察された。図19Cは、2つのDNAを結合する短鎖のオリゴヌクレオチドを使用した場合に、その複合体がナノポア中で2工程で逐次アンジッピングされうることを示している。2回のアンジッピングは、2つのレベル2の状態によって明らかに表すことができる。

20

## 【0035】

## 発明の詳細な説明

本発明は、エラー強さのあるナノポア検知システムであって、感度の高い、選択的な、かつ直接的な、miRNAなどの一本鎖オリゴヌクレオチドの検出、識別及び定量化を可能にする前記システムを提供する。さらに、本発明の検知技術は、また、miRNAファミリーのメンバーにおける単独のヌクレオチド差を見分けるのに使用することもできる。更に、本発明による技術は、患者の血液サンプルにおける癌マーカーの非侵襲性でかつ費用対効果の高い早期診断及び連続的なモニタリングのための可能性を含んでいる。

## 【0036】

miRNAなどのターゲットの一本鎖のオリゴヌクレオチドを検出するための本発明によるナノポア検知システムは、1)一本鎖のオリゴヌクレオチドの迅速な移行を可能にするナノポアと、2)二本鎖のオリゴヌクレオチドのアンジッピングを誘発する駆動力として予め決められた電圧を提供する電源と、3)ターゲットのオリゴヌクレオチドと混合されて前記ナノポア中にロードされるプローブ分子と、その際、ターゲットのオリゴヌクレオチドとプローブとのハイブリッドが前記ポア中でアンジッピングすると、一定の同定可能な電流シグナル変化が生じ、4)前記電流変化を検出するための手段とを含む。

30

## 【0037】

図1に関して、それは、一つの例示的なナノポア検知システムの概略図である。図1に示されるように、検知チャンバ1は、cis側コンパートメント2とtrans側コンパートメント3とを含み、それらは仕切4によって隔たれている。両方のコンパートメントは、予め選択された、1MのKClなどの記録溶液で満たされている。仕切4は、その中央領域に開口部5を有し、その上に脂質二重膜が形成され、かつナノポア6が、該脂質二重膜を通じて差し込まれている。電源7は、前記の2つのコンパートメント中の一对の電極を通してロードされる電圧を与え、ピコアンペア増幅器などの電流デテクタ8が電流変化のモニタリングのために接続されている。試験において、ターゲットのオリゴヌクレオチド9とその相補的なプローブ10の混合物サンプルは、cis側コンパートメント2中にロードされる。

40

## 【0038】

図2に関して、それは、ナノポア6の拡大した概略図である。図2に示されるように、ナノポア6は、円錐形又は漏斗形であり、それは2つの開口部、つまり広い端部にcis側

50

開口部 11 と、下の狭い端部に trans 側開口部 12 とを有する。検出の間に、対になったオリゴヌクレオチド 9 / 10 は、ナノ空隙 13 中に捕捉される。次いで電圧は、狭窄部 14 でオリゴヌクレオチド 9 / 10 のアンジッピングを促し、その際、プローブ 10 は、まず - パレル 15 を通り抜け、trans 側開口部 12 から出て、その後ターゲットのオリゴヌクレオチド 9 が通り抜ける。

#### 【0039】

前記のナノポアは、広い開口部と狭い開口部とを有する円錐形もしくは任意の非対称形の任意のイオンチャネルであってよく、前記イオンチャネルは、平坦な脂質二重膜中に差し込まれており、より広い空隙に続いて狭いチャネルを有し、それにより、アンジッピングによる移行イベントを促進できる。前記のナノポアは、任意の存在するタンパク質イオンチャネル、例えば以下の例で採用された 溶血素膜貫通型タンパク質又はシリコンなどの無生物材料を用いてナノテクノロジーの様式で作成された様々な合成ポアであってよい。

10

#### 【0040】

本発明によるプローブは、マルチドメインの一本鎖分子であって、ターゲットのオリゴヌクレオチドと完全に相補的な中心ドメインと、その 3' 末端もしくは 5' 末端に少なくとも 1 つの末端伸長部、すなわちシグナルタグとを含み、その際、シグナルタグは両末端にあることが好ましい。本発明は、3' でタグ付けされたプローブは、5' でタグ付けされたプローブよりも好ましいことを示唆している。捕捉率に依存するプローブ指向性は、おそらく、ssDNA の塩基がその鎖の 5' 末端に向けて総じて傾いており<sup>(38)</sup>、この非対称の塩基の配向により、5' 末端よりも容易に 3' 末端から DNA が動くことによるものである。

20

#### 【0041】

前記の末端伸長部（シグナルタグ）は、電圧により駆動される、ナノポアを通じたアンジッピングによる移行を支援するのに十分な長さを有する任意の荷電した一本鎖分子であってよい。前記のシグナルタグは、ポリ(dC)<sub>n</sub>、ポリ(dA)<sub>n</sub>及び/又はポリ(dT)<sub>n</sub>などのオリゴヌクレオチドであってよい荷電したポリマー鎖又は荷電したポリペプチドであってよい。例えば、溶血素膜貫通型タンパク質ポアがナノポアとして使用される場合に、ポリ(dC)タグがポリ(dA)タグもしくはポリ(dT)タグよりも好ましく、さらに、ポリ(dC)<sub>30</sub>は、シグネチャイベント（以下に議論される）の発生において、ポリ(dC)<sub>8</sub>などのより短いタグを用いたものよりもさらに効率的である。捕捉率は、高電圧での検出、内腔中に設計された荷電プロファイルを有する工学ポアの使用<sup>(33)</sup>、及びポアの両側の間での非対称の塩濃度での検出<sup>(39)</sup>を含む他の効果的なアプローチと組み合わせるとさらに高めることができる。

30

#### 【0042】

本発明は、また、オリゴヌクレオチドがナノポアを通じてアンジッピングし移行することによって引き起こされる電流変化をモニタリングすることによって一本鎖のオリゴヌクレオチドを検出及び識別する方法を提供する。図 1 に図解される、デュアルコンパートメント式のナノポアシステムを用いた一本鎖のオリゴヌクレオチドの本発明による検出方法は、1) ターゲットのオリゴヌクレオチドと、前記ターゲット配列とマッチするその中心ドメインとその 3' 末端及び 5' 末端の少なくとも一方にタグ付けされた荷電された一本鎖分子とを有する予め設計されたプローブとを混合することで、サンプル混合物を得る工程と、2) 前記混合物を、cis 側コンパートメント中にロードする工程と、3) 該システムに予め決められた電圧を与える工程と、4) 予め決められた時間帯にわたって電流出力を記録する工程とを含んでいる。ターゲットのオリゴヌクレオチドとその相補的なプローブとのハイブリッドがナノポアを通じてアンジッピングし、移行することによって引き起こされる電流変化は、ユニークなシグネチャイベントであり、それは、ターゲットのオリゴヌクレオチドの検出及び識別に使用される。図 3 に関して、それは、一つの例示的な検出の間に記録された一つの例示的な電流トレースと、シグネチャイベントの拡大された電気的マークと、アンジッピング - 移行イベントの概略図を含んでいる。

40

50

## 【 0 0 4 3 】

更なる説明

定義

本願で使用される場合に、用語"ROC曲線"は、受信者操作特性曲線を指す。ROC曲線は、選択性と感度との間の関連性の分析に使用した。ROC曲線は、プロットを上方領域とより下方の領域とに分離する。

## 【 0 0 4 4 】

本願で使用される場合に、用語"AUC"は、ROC曲線下の面積を指す。AUCは、0.5 ~ 1.0の間の範囲であってよい。AUC値がより高いと、分離結果がより良好である。

10

## 【 0 0 4 5 】

本願で使用される場合に、用語"OCP"は、至適カットオフポイントを指す。一定の実施形態においては、OCPは、ROC曲線から計算することができる。一定の実施形態においては、OCPは、Youden指数の最大値でのカットオフ時間である。

## 【 0 0 4 6 】

本願で使用される場合に、"Youden指数"という文言は、{感度 + 選択性 - 1}として定義される。Youden指数は、ROC曲線から計算され、0と1との間の範囲であってよい。長期分布と短期分布の完全な分離に導くカットオフ時間は、Youden指数 = 1となり、一方で、完全な重複は、Youden指数 = 0となる。一定の実施形態においては、Youden指数の最大値を生じるカットオフ時間の値、すなわち"至適"カットオフポイント(OCP)(Greiner et al., 2000 Preventive Veterinary Medicine 45, 23-41)は、最も正確な分離をもたらす。

20

## 【 0 0 4 7 】

プローブ、ナノポア、そのプローブとナノポアを含むキット、及び関連の使用方法的説明

一つの広範な態様においては、当該発明は、プローブとターゲットとの相互作用から生ずるこれらのイベントを他のイベントと識別する"シグネチャ"電流遮断イベントを提供する、プローブ、ナノポア、該プローブ及びナノポアを含むキット並びに関連の使用方法的に関する。この文脈においては、前記他のイベントは、"バックグラウンド"イベントと呼称する。バックグラウンドイベントには、制限されないが、プローブとターゲットではない核酸との相互作用、プローブとナノポア検出システム中に存在する他の成分、ナノポア検出システム中に存在する遊離の核酸などとの相互作用が含まれる。かかるシグネチャイベントのかかる特徴には、制限されないが、i)バックグラウンド電流ブロックとは異なる時間の電流ブロック、ii)バックグラウンド電流ブロックとは異なる数の別個の電流遮断レベル、iii)バックグラウンド電流ブロックとは異なる発生順序の電流遮断レベル、iv)バックグラウンド電流ブロックとは異なる、遮断レベルでの電流振幅、v)バックグラウンド電流ブロックとは異なる各遮断レベルの電流振幅、の少なくとも1つ又は(i)、(ii)、(iii)、(iv)もしくは(v)の任意の組み合わせが含まれる。一定の実施形態においては、シグネチャ遮断イベントは、バックグラウンド遮断イベントと、各遮断イベントの特徴的なバックグラウンドノイズにおける違いの点で識別できる。一定の実施形態においては、シグネチャイベントにおける別個の時間、数又は振幅は、バックグラウンドイベントにおいて観察されるものよりも大きい。一定の実施形態においては、シグネチャイベントにおける別個の時間、数又は振幅は、バックグラウンドイベントにおいて観察されるものよりも小さい。一定の実施形態においては、シグネチャイベントにおける別個の時間、数、順序又は振幅は、バックグラウンドイベントのそれらとは、統計学的に識別できる。一定の実施形態においては、前記のシグネチャイベントは、溶血素(HL)又はその工学変異体によって形成されたタンパク質ナノポアを平坦な脂質二重膜系中に含むナノポアシステムにおいて提供される。一定の実施形態においては、前記のシグネチャイベントは、脂質二重膜中に包埋された単独のタンパク質ナノポアを有する脂質二重膜のヒドロゲルで封入されて形成されたバイオチップ又はマイクロ液滴二重膜系

30

40

50

において提供されうる。バイオチップ及びマイクロ液滴二重膜系は、説明されてきている (Shim and Gu; Stochastic Sensing on a Modular Chip Containing a Single-Ion Channel Anal. Chem. 2007, 79, 2207-2213; Bayley, H. et al. Droplet interface bilayers. Mol. Biosyst. 4, 1191-1208 (2008))。

【0048】

一定の実施形態においては、シグネチャイベントは、合成のナノポアにおいて提供されうる。合成のナノポアには、制限されないが、窒化ケイ素又はグラフェンを含むナノポアが含まれる。

【0049】

本願で提供されるプローブ分子は、その5 末端及び/又は3 末端の一方又は両方に末端伸長部を含む。理論にとらわれることを求めるものではないが、これらの末端伸長部は、有用な機能を提供すると考えられており、前記機能には、制限されないが、高い比率でのナノポア中へのプローブ/ターゲットの複合体のトラップ(すなわち、単位記録時間あたりの、単位ターゲット濃度あたりの、シグネチャイベントの数)が含まれる。トラッピング率は、直接的に感度を決める。同じターゲットの濃度と同じ記録時間においては、トラッピング率が高ければ検知結果はより正確となる。理論にとらわれることを求めるものではないが、また、これらの末端伸長部は、有用な機能を提供すると考えられており、前記機能には、制限されないが、プローブ/ターゲットの複合体の電圧により駆動される解離の誘導が含まれる。この解離機能は、混合物中でプローブとターゲットとの相互作用を他の成分から区別するのに使用でき、それにより選択性又は特異性が保証されるシグネチャイベントを生成する。

【0050】

プローブの末端伸長部は、任意の長さの荷電されたポリマーを含んでよい。一定の実施形態においては、前記ポリマーは、負に荷電した一本鎖の核酸であってよい。かかる核酸の末端伸長部の利点には、制限されないが、極めて低い合成費用及びpH、塩濃度及び温度により制御可能な荷電が含まれる。かかる核酸伸長部は、ホモポリマー、ヘテロポリマー、コポリマー又はそれらの組み合わせを含む。一定の実施形態においては、かかる核酸の末端伸長部の長さは、約1もしくは2ヌクレオチドから約50ヌクレオチドまでの範囲であってよい。なおも他の実施形態においては、前記の核酸伸長部は、約5ヌクレオチドから約40ヌクレオチドまでの長さの範囲であってよく、約15ヌクレオチドから約35ヌクレオチドまでの長さの範囲であってよく、又は約20ヌクレオチドから約35ヌクレオチドまでの長さの範囲であってよい。本願により提供される一つの例示的な末端伸長部は、ホモポリマーであるポリ(dC)<sub>30</sub>である。しかしながら、制限されないが、CTCTCTCT...又はCATCATCAT...などのジヌクレオチドもしくはトリヌクレオチドのヘテロポリマーを含むヘテロポリマー配列も使用できる。一定の実施形態においては、非塩基(abase)を含むコポリマー又はポリエチレングリコール(PEG)を末端伸長部において使用することができる。末端伸長部におけるこれらのコポリマー又はそれらのドメインは、該プローブの末端伸長部に新たな機能を付与しうる。非塩基は、塩基を有さないヌクレオチドであるが、リン酸によって提供される負電荷を有する。非塩基の大きさは通常の新ヌクレオチドより狭いので、隣の新ヌクレオチドによって形成されるものとは異なるシグネチャイベントシグナルが生成することがある。PEGは荷電されていない。理論にとらわれることを求めるものではないが、核酸配列中のPEGドメインがポア中にトラップされるときに、それは駆動力を減じ、こうしてプローブ/ターゲットの複合体の解離を厳密に調節すると考えられている。

【0051】

プローブの末端伸長部は、また、ポリペプチドを含んでよい。アミノ酸の選択がより豊富であると、ポリペプチドの末端伸長部の配列及び官能性を、オリゴヌクレオチドの末端伸長部よりも多くの計画を可能にする。例えば、ポリペプチドの末端伸長部は、より高い識別が可能なプローブ/ターゲットのシグネチャイベントを生成するために、最適な位置に荷電アミノ酸の挿入を可能にする。理論にとらわれることを求めるものではないが、プ

10

20

30

40

50

ローブ/ターゲットの複合体は、好適な電圧下で正に荷電したポリペプチド末端伸長部を含むプローブを用いて選択的にトラップされうるが、一方で、混合物中の全ての他の負に荷電した非ターゲットのオリゴヌクレオチドは、ポア中に入ることから阻まれ、こうして超選択的な検出がもたらされると考えられている。一定の実施形態においては、ポリペプチド末端伸長部は、正電荷を有してよい2つ、3つ、4つ又はそれより多くのアミノ酸残基（すなわち、リシン及び/又はアルギニン及び/又はヒスチジン）を含んでよい。一定の実施形態においては、前記プローブがターゲットのオリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたときに正味の正電荷を提供するために、十分な数の正に荷電された残基がポリペプチド末端伸長部に含まれる。一定の実施形態においては、プローブがリシン、アルギニンもしくはヒスチジンなどの残基によって授けられた正電荷を有する末端伸長部を含むとき、関連のナノポアを基礎とする検出法の性能は、酸性条件下（すなわちpH値が7未満であるとき）に、又は残基がプロトン化される条件下で増強されうる。このように、かかるプローブは、約1～約6.9のpH値で、1～約6.0のpH値で、約1～約5.5のpH値で、約3～約5.5のpH値で、かつ同様のpH値で使用される。一定の実施形態においては、かかるポリペプチドの末端伸長部の長さは、約1もしくは2残基から約30残基までの範囲であってよい。なおも他の実施形態においては、前記のポリペプチド伸長部は、約5残基から約20残基までの長さの範囲であってよく、約8残基から約20残基までの長さの範囲であってよく、又は約8残基から約15残基までの長さの範囲であってよい。一つの例示的な実施形態においては、正に荷電したアルギニン残基及びリシン残基を含むHIV-TATポリペプチドは、末端伸長部として使用されうる。一定の実施形態においては、ターゲットのオリゴヌクレオチドに相補的なプローブの中心ドメインは、正電荷を有するアミノ酸を含む末端伸長部に共有結合されたペプチド核酸を含んでよい。一定の実施形態においては、ペプチド核酸を含む中心ドメインは、前記プローブがターゲットのオリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたときに正味の正電荷を提供するために、正電荷を有するアミノ酸を含む末端伸長部と連結して使用される。一定の実施形態においては、制限されないが、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、チロキシンなどを含む芳香族側鎖を有するアミノ酸を含むポリペプチド末端伸長部は、ポリペプチド末端伸長部中に組み込まれてよい。理論にとらわれることを求めるものではないが、かかる芳香族アミノ酸は、芳香族スタッキングを通じてポアと相互作用でき、ナノポアを基礎とする検出方法で得られたシグネチャの有用な変化を提供すると考えられている。

#### 【0052】

理論にとらわれることを求めるものではないが、十分な数の正に荷電したアミノ酸がポリペプチド末端伸長部に存在して、該末端伸長部を含むプローブがターゲットのオリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたときにターゲットのオリゴヌクレオチド/プローブの複合体の正味の電荷がまだ正であるならば、前記のターゲットのオリゴヌクレオチド/プローブの複合体全体は、強力な双極子分子を形成するものと考えられている。プローブの双極子の正に荷電したペプチドドメインが両者とも正の電圧（cis側接地）によって押されて、trans側開口部にある負の環状部によって引き寄せられて、ポア中へのオリゴヌクレオチド/プローブの複合体のトラップが導かれると考えられている。正の電圧では、任意の他の遊離した核酸成分は、遊離したハイブリダイズされていない核酸によって運ばれる負電荷のためポアに入ることが妨げられる。これは遊離した核酸成分によりシグナルを大きく下げため、観察される電流遮断イベントの大部分は、オリゴヌクレオチド/プローブの複合体のトラップによるか、プローブの移行によるものかのいずれかである。

#### 【0053】

一定の実施形態においては、正味の正電荷を有するオリゴヌクレオチド/プローブの複合体は、ポアのtrans側開口部に負に荷電した環状部を有するナノポアに向かいうる。この文脈においては、ポアのtrans側開口部は、分子が出てくるポアの開口部であり、一方で、ポアのcis側開口部は、そこから分子が入る開口部である。これらの実施形態においては、ポアのtrans側開口部の負に荷電した環状部は、ポアのtrans側開口部で負に荷電した環状部を有するように適宜合成及び/又は誘導体化した任意のタイプのナノポアを使用

することによって得ることができると解されるべきである。ポアのtrans側開口部に負に荷電した環状部を有するかかるナノポアには、制限されないが、タンパク質ナノポア及び合成ナノポアが含まれる。ポアのtrans側開口部に負に荷電した環状部を有するタンパク質のナノポアには、制限されないが、溶血素タンパク質の工学変異体が含まれる。一定の実施形態においては、前記の工学された溶血素の変異体は、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) の溶血素であって、K 1 3 1 D、K 1 3 1 E又はK 1 3 1 Hのアミノ酸置換を含むものを含んでよい。例示的かつ制限されないスタフィロコッカス・アウレウスの溶血素の野生型配列は、本願で提供され(配列番号20、核酸コーディング領域;配列番号21、タンパク質コーディング領域)、他でも入手できる(National Center for Bioinformatics又はGenBankのアクセッション番号M90536及びAAA 26598)。例示的かつ制限されないスタフィロコッカス・アウレウスの溶血素の変異体であってK 1 3 1 D置換を含むものは、配列番号22として提供される。一定の実施形態においては、工学された溶血素の変異体は、ポアのtrans側開口部に負に荷電された環状部を提供する部分で誘導体化された適宜誘導体化された変異体を含んでよい。ポアのtrans側開口部に負に荷電された環状部を有するタンパク質ナノポアを提供するように置換又は誘導体化できる一つの例示的な野生型のスタフィロコッカス・アウレウスの溶血素タンパク質は、これとともに配列番号21として提供されている。しかしながら、ポアの形成が可能な他の溶血素の変異体は、ポアのtrans側開口部に負に荷電された環状部を有するタンパク質ナノポアを提供するように置換又は誘導体化されていてよい。ポアのtrans側開口部に負に荷電された環状部を有する合成ナノポアも提供されている。一定の実施形態においては、ポアのtrans側開口部に負に荷電された環状部を有するかかる合成のナノポアには、制限されないが、ポアのtrans側開口部に負に荷電された環状部を提供する部分で適宜誘導体化された窒化ケイ素又はグラフェンのナノポアが含まれる。

#### 【0054】

本願に提供されるプローブの中心ドメインは、ターゲット分子の捕捉のために使用される。一定の実施形態においては、前記の中心ドメインは、ターゲット配列と完全に相補性であるか又は部分的に相補性であってよい。一定の実施形態においては、中心ドメインは、天然ヌクレオチド(A、T、G、C(DNA)又はa、u、g、c(RNA))及び/又は人工ヌクレオチド、例えば制限されないが、イノシン、キサントシン、7-メチルグアノシン、ジヒドロウリジン及び5-メチルシチジンなどのヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを含んでよい。一定の実施形態においては、中心ドメインは、ロケット核酸(LNA)又はペプチド核酸(PNA)を含んでよい。ロケット核酸は、RNA誘導体であって、リボース環が2 酸素と4 炭素との間にメチレン結合を含む誘導体を含む。ペプチド核酸(PNA)は、ヌクレオベース側鎖を有するペプチド骨格を含む。一定の実施形態においては、LNA又はPNAの中心ドメインは、天然ヌクレオベース(アデニン、グアニン、チミン、シトシン又はウラシル)及び/又は人工ヌクレオベース、例えば制限されないがヒポキサンチン、キサントシン、7-メチルグアニン、5,6-ジヒドロウラシル及び5-メチルシトシンを含んでよい。一定の実施形態においては、オリゴヌクレオチド、LNA又はPNAのコポリマーを含むプローブの中心ドメインが提供される。一定の実施形態においては、プローブの中心ドメインは、ターゲット核酸に対して相補的な、少なくとも約4、6、8、10、12、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25個のヌクレオチド又はヌクレオベース残基を有する。一定の実施形態においては、プローブの中心領域は、ターゲット核酸に対して相補的な、少なくとも約4、6、8、10、12、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25個のヌクレオチド又はヌクレオベース残基ないし約30、35、40又は50個のヌクレオチド又はヌクレオベース残基のいずれかを有する。一定の実施形態においては、配列内に挿入される合成ヌクレオチド又はヌクレオベースは、ターゲットとのハイブリダイゼーションエネルギーを正確に適合でき、こうして単独のヌクレオチドの多形、メチル化又はmiRNAとそのターゲットのメッセンジャーRNAとの間の相互作用などのターゲットの特徴が識別されうる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 5 】

様々なターゲットの核酸又はオリゴヌクレオチドであって、プローブ、ナノポア、該プローブとナノポアを含むキット及び関連のプローブの使用方法によって、非ターゲットの核酸から検出及び識別できるものが本願に提供されている。一定の実施形態においては、前記のターゲットは、細胞、体液、組織、細菌又はウイルスからの核酸又はその断片であってよい。一定の実施形態においては、前記のターゲットは、PCR産物又は合成オリゴヌクレオチドであってよい。一定の実施形態においては、ターゲットは、ゲノムDNA、mRNA、未熟もしくは成熟のmiRNA、人工miRNA、非コーティングDNAもしくはRNA、核酸バイオマーカ又は合成アプタマーを含んでよい。一定の実施形態においては、miRNAターゲットは、血漿及びホルマリン固定された組織及びパラフィン包埋された組織などの任意の組織由来の生体流体からのRNA抽出を起源としうる。一定の実施形態においては、ターゲット核酸は、ターゲットタンパク質と結合される、核酸結合タンパク質、抗体又はアプタマーのいずれかと複合体形成された核酸断片を含んでよい。一定の実施形態においては、ターゲット核酸は、制限されないが薬剤を含む低分子量化合物と複合体形成された核酸断片を含んでよい。一定の実施形態においては、ターゲットは、突然変異を有する、単一のヌクレオチド多形を有する、又はメチル化及びリン酸化などの化学的修飾を有する配列を含んでよい。

10

## 【 0 0 5 6 】

## 実施例

例 1 . 肺癌のバイオマーカである mi R - 1 5 5 の検出

20

本発明は、さらに、肺癌のバイオマーカである mi R - 1 5 5 の検出のための一つの例示的なナノポア検知システムを提供する。前記ナノポア検知システムは、溶血素膜貫通型タンパク質ポアと、mi R - 1 5 5 のために予め設計されたプローブとを含む。プローブは、DNA多重ブロックコポリマーであって、ターゲットの mi R - 1 5 5 に対して相補的なその中心ドメインと、3'末端、5'末端又は両末端にシグナルタグとして機能する少なくとも一つのポリ(dC)<sub>30</sub>伸長部とを有する前記コポリマーである。第1表に列記されるのは、mi R - 1 5 5 の配列と、トリブロックコポリマーを有する例示的なプローブの配列であり、P<sub>155</sub>が好ましい。

## 【 0 0 5 7 】

第 1 表 . mi RNA 及びそれらのプローブの配列

30

## 【 表 1 】

miRNA	プローブ	配列
<i>mir-155</i>		5'-UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGG-3' (配列番号1)
	P <sub>nt</sub>	5'-CCCCTATCACGATTAGCATTA-3' (配列番号2)
	P <sub>5'-C30</sub>	5'-C <sub>30</sub> -CCCCTATCACGATTAGCATTA-3' (配列番号3)
	P <sub>3'-C30</sub>	5'-CCCCTATCACGATTAGCATTA-C <sub>30</sub> -3' (配列番号4)
	P <sub>155</sub>	5'-C <sub>30</sub> -CCCCTATCACGATTAGCATTA-C <sub>30</sub> -3' (配列番号5)

## 【 0 0 5 8 】

40

一つの例示的な検知プロセスの間に、mi R - 1 5 5 / P<sub>155</sub>の混合物は、ポアのcis側に添加され、一連の短期継続型の及び長期継続型の電流ブロックを有する電流トレースは、+100mVで1MのKCl中でモニタリングして、図4aに示されるように記録できる。スパイク状の短いブロックは、図4aにおいてbとして表示され図4bにも示されているが、そのブロックは、220 ± 21 μsの時間を有し相対コンダクタンス  $g/g_0 = 0.16$  でポアコンダクタンスをほぼ完全に減じ、その際、g及びg<sub>0</sub>は、ブロックのコンダクタンス及び非占有のナノポアのコンダクタンスである。時間とコンダクタンスの両方は、mi R - 1 5 5 と P<sub>155</sub> 単独によるブロックのそれと類似しており、こうして混合物中の短いブロックは、図4bに図説されるポアを通じた一本鎖の遊離したmi R - 1 5 5 もしくは P<sub>155</sub> の迅速な通過に関連している。

50

## 【0059】

短いブロックに対して、図4aでc及びdとして表示される、記録における長いブロックは、 $250 \pm 58 \text{ ms}$ にわたって持続する。図4aにcとして表示される長いブロックの1つのタイプは、3つの順次のコンダクタンスレベル、レベル1 レベル2 レベル3 (図4cに示される)を特徴付けている。このタイプのブロックは、miR-155かP<sub>155</sub>が単独で存在する場合には観察されず、それは、miR-155/P<sub>155</sub>のハイブリッド(miR-155・P<sub>155</sub>)に由来することを示している。レベル1は、コンダクタンスをほぼ完全に $g/g_0 = 0.15$ にまで減じる。このコンダクタンスレベルは、miR-155・P<sub>155</sub>がポア中により広い開口部(cis側)からトラップされ、その際、P<sub>155</sub>の3シグナルタグか5シグナルタグのいずれかが最も狭い - バレルを占拠している配置と一致している(図4cのレベル1)。前記の - バレル中のシグナルタグは、電圧により駆動されるmiR-155・P<sub>155</sub>のアンジッピングを誘導しうる。アンジッピング時間又はレベル1の時間は、ポア中でのDNAアンジッピングについて先に報告された時間規模に匹敵する。例えば50塩基対のdsDNAの+140mVでのアンジッピングのためには約435ms、そして10塩基対のヘアピンDNAの+90mVでのアンジッピングのためには約40ms。そのアンジッピング過程は、さらに、レベル1からレベル2への離散的な遷移によって実証された。レベル2は、 $410 \pm 20 \mu\text{s}$ 続き、そのコンダクタンスは $g/g_0 = 0.42$ へと大きく増加する(図1cのレベル2)。この部分的なブロックは、 - バレル中を占めているオリゴヌクレオチドとして解釈できない。恐らく、miR-155・P<sub>155</sub>のアンジッピングに引き続きP<sub>155</sub>の移行があった後に、mir-155は、一時的にポアのナノ間隙中に閉じ込められうる。ナノ間隙中に留まる一本鎖のオリゴヌクレオチドはかかる部分的なブロックを生じうることが実証されている<sup>(33)</sup>、<sup>(34)</sup>。そのナノ間隙中にあるmiR-155分子は最終的に - バレルを横切って、レベル3を生じる。これは、コンダクタンスを $g/g_0 = 0.08$ にまで完全に減じる(図4c)。レベル3の時間は $270 \pm 30 \mu\text{s}$ であって、mir-155単独による短いブロックについての $220 \mu\text{s}$ と近く、+120mVでの75塩基のRNAの移行についての約 $400 \mu\text{s}$ の時間スケール<sup>(35)</sup>及び+120mVでの210塩基のRNAについての $800 \mu\text{s}$ の時間スケール<sup>(36)</sup>と一致している。レベル3の時間は、電圧が上がると短くなり、さらに、このコンダクタンスレベルに関しては、一本鎖のオリゴヌクレオチドの移行を支援している。

## 【0060】

多重コンダクタンスの長いブロックに加えて、 $g/g_0 = 0.15$ での単独のコンダクタンスレベルを有する長いブロック(図4aにdとして表示され、図4dに示されている)も観察されている。このタイプの長いブロックは、捉えられたmiR-155・P<sub>155</sub>がアンジッピングすることなくポアをcis側入口から出るときに生じうる。

## 【0061】

本発明は、特徴的な長いブロックが、ターゲットのmiRNAの単一分子を同定するためのシグネチャイベントとして役立つことを教示している。シグネチャイベントの頻度( $f_{sig}$ )から、ターゲットのmiRNAは、式1を使用して定量化できる(補足材料における方法、以下の例2に提供される)

## 【数1】

$$f_{sig} = k_{on} \frac{([miR]_0 + [P]_0 + K_d) - \sqrt{([miR]_0 + [P]_0 + K_d)^2 - 4[miR]_0[P]_0}}{2} \quad (1)$$

## 【0062】

式1においては、 $[miR]_0$ 及び $[P]_0$ は、miRNAとプローブの初期濃度であり、 $k_{on}$ は、シグネチャイベントの発生率であり、かつ $K_d$ は、溶液中でのmiR・Pについての解離定数である。 $[miR]_0 \ll [P]_0$ である場合に、 $f_{sig} \approx k_{on} [miR]_0$ である。電流トレースは、まさに、miR-155濃度が高まるほど、miR-155・

$P_{155}$ のシグネチャイベントの頻度が高まることを示している(図5a)。 $f_{sig} - [miR - 155]$ データは、式1を使用して、 $K_d = 30 \text{ nM}$ 及び $k_{on} = 3.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ で当てはめることができる(図5b)。文献<sup>(8)</sup>によれば、循環しているmiRNAの平均濃度は、対照グループの $68.1 \text{ ng/mL}$ (約 $10 \text{ nM}$ )に対して、肺癌グループについては $158.6 \text{ ng/mL}$ (約 $25 \text{ nM}$ )であった。従って、 $10 \text{ nM}$ と $25 \text{ nM}$ のmiR-155での $f_{sig}$ 値を比較した(図5b)。分析により、2つのレベルのmiRNA濃度が分けられうることを示され( $p < 0.005$ )、それは、本発明による方法が、肺癌患者においてmiRNAレベルを区別して検出する見込みを有することを示唆している。

【0063】

10

本発明は、また、類似のmiRNA配列であるlet-7a及びlet-7bとを高度に識別するために、本発明によるナノポア検知システムを使用する一つの例示的な方法を提供する。let-7a及びlet-7bは、Let-7腫瘍抑制性miRNAファミリー<sup>(4)・(6)</sup>のメンバーであり、かつ2つのLet-7メンバーは、位置17及び19で異なるヌクレオチドを有するに過ぎず、それらはlet-7aではアデニンであり、かつlet-7bではグアニンである。本発明によるプローブ $P_a$ 及び $P_b$ は、第2表中に列記される配列をそれぞれ有するlet-7aとlet-7bのために設計されている。

【0064】

第2表. let-7a及びlet-7b並びにそれらのプローブの配列

【表2】

20

miRNA	プローブ	配列
Let-7a		5'-UGAGGUAGUAGGUUGU <u>AU</u> AGUU-3' (配列番号6)
	$P_a$	5'-C <sub>30</sub> -AACTATAACAACCTACTACCTCA-C <sub>30</sub> -3' (配列番号7)
Let-7b		5'-UGAGGUAGUAGGUUGU <u>GUG</u> GUU-3' (配列番号8)
	$P_b$	5'-C <sub>30</sub> -AACCACACAACCTACTACCTCA-C <sub>30</sub> -3' (配列番号9)

【0065】

図6a及び図6bに示されるように、 $P_a$ を使用して各miRNAを検出する場合に、let-7a・ $P_a$ (ミスマッチなし)についてのシグネチャイベントの時間( $t_{sig}$ )は、 $155 \pm 28 \text{ ms}$ であり、一方で、let-7b・ $P_a$ (2ヌクレオチドのミスマッチを有する)についての $t_{sig}$ は、 $48 \pm 11 \text{ ms}$ にまで大きく短縮される( $p < 0.005$ )。同様に、 $P_b$ を使用して両方のmiRNAを検出する場合に、let-7b・ $P_b$ (ミスマッチなし)についての $t_{sig}$ は、 $165 \pm 47 \text{ ms}$ であり、図6bに示されるように、let-7a・ $P_b$ (2ヌクレオチドのミスマッチを有する)についての $24 \pm 2 \text{ ms}$ ( $p < 0.005$ )よりもかなり長い。時間における有意差は、ミスマッチが、miRNAとプローブとの間のハイブリダイゼーション相互作用を大きく弱めることと解釈できる。同じ電界中に置かれた場合に、ミスマッチを含むハイブリッドは、完全にマッチしたハイブリッドよりもアンジッピングのためにより低いエネルギーしか必要としない。このように、本発明によるナノポア検知システムは、アンジッピング時間に基づき単独のミスマッチを識別可能であり、こうして、類似の配列及びSNPsを有するmiRNAを検出する見込みを裏付けている。

30

40

【0066】

本発明は、さらに、肺癌患者における血漿miR-155を、本発明によるナノポア検知システムで検出する一つの例示的な方法を提供する。その例示的な方法の間に、末梢血サンプルを、6人の肺癌患者と6人の健全なボランティアから地域のIRB承認をもって入手した。miRNAを含む全血漿RNAを、各血漿サンプル $350 \mu\text{l}$ からmiRVana PARISキット(Ambion)を用いて最終希釈容量 $100 \mu\text{l}$ で抽出し、それらを次いでナノポアとRT-PCRアッセイ<sup>(44)</sup>のために2つのアリコート( $50 \mu\text{l}$ )に分けた。一方のアリコートを、 $P_{155}$ と予備混合し、ナノポアチャンパ中の $2 \text{ ml}$ の記録溶

50

液に直接添加した。ナノポア電流は、血漿サンプルの存在下でさえも低レベルのノイズを保ち、そして別個の短いブロック及び長いブロック（赤い矢印で印した）は、対照グループ（図7a）及び肺癌グループ（図7b）の両方で同定できる。多重コンダクタンスと単独のコンダクタンスの両方を含む特徴的な長いブロックは、図1aにおける合成miR-155 RNAについてのものと同じコンダクタンスプロフィール及びそれと類似の特性を特徴としている。P<sub>155</sub>の不在下で、かかるタイプの長いブロックは観察できない（図7c及びd）が、短いブロックは、遊離したmiRNAなどの一本鎖のオリゴヌクレオチドの移行に関して見出された（図7c及びd）。総合して、前記の特徴的な長いブロックは、miR-155・P<sub>155</sub>のハイブリッドによるものとすることができ、単独のmiRNA分子検出のためのシグネチャイベントとして役立つ。

10

#### 【0067】

肺癌患者グループにおける全てのサンプルについてのmiR-155シグネチャイベントの頻度 $f_{sig}$ は、 $1.15 \sim 1.51 \text{分}^{-1}$ の間で変動し、その平均は、 $1.40 \pm 0.16 \text{分}^{-1}$ である（図7e）。このレベルは、 $0.32 \sim 0.70 \text{分}^{-1}$ の範囲で、 $0.48 \pm 0.14 \text{分}^{-1}$ を平均とする対照グループ（図7e）における $f_{sig}$ よりもかなり高かった。全てのサンプルは標準的な手順（補足材料における方法）に従って調製したので、2つのグループにおける相対miRNAレベルを比較するのは妥当であるべきである。健全な血漿における平均 $f_{sig}$ を1とした場合に、肺癌の血漿におけるmiR-155の倍数を2つの方法で比較した。図7fは、肺癌患者における相対miR-155レベルが、ナノポアセンサを用いて2.79であった（ $p < 0.001$ ）ことを示している。比較によ

20

#### 【0068】

##### 例2．補足情報

##### 試料．

miRNA及びDNAプローブを含むオリゴヌクレオチドは、Integrated DNA Technologies (Coralville, IA) によって合成され、電気泳動精製された。試験前に、miRNAとDNAプローブの混合物を、90℃で5分にわたり加熱し、次いで徐々に室温へと冷却し、そして4℃で貯蔵した。RNアーゼ不含の水を使用してRNA溶液を調製した。

30

#### 【0069】

##### ナノポア検出の設定と手法．

この節は、以前から十分に文書になっている（Shim, J.W., Tan, Q., & Gu, L.Q. Single-molecule detection of folding and unfolding of a single G-quadruplex aptamer in a nanopore nanocavity. *Nucleic Acids Res.* 37, 972-982 (2009)）。簡単に言うと、記録装置は、テフロンフィルムで仕切られた2つのチャンバ（cis側及びtrans側）から構成されていた。1, 2 - ジフィタノイル - sn - グリセロホスファチジルコリン（Avanti Polar Lipids）の平坦な脂質二重膜は、仕切りの中心にある100～150nmの穴にわたって形成された。cis側チャンバとtrans側チャンバの両方を、10mMのTrisで緩衝されかつpH8.0に滴定された対称的な1Mの塩溶液（KCl）で満たした。全ての溶液は、使用前に濾過している。単独の溶血素タンパク質を、前記二重膜中にcis側から挿入することで、膜内に分子ポアを形成させた。miRNAとDNAプローブと臨床的なRNAサンプルを含む全てのオリゴヌクレオチドを、またcis側溶液へと添加した。ポア電流を記録するために、cis側溶液を接地し、そして電圧をtrans側溶液から与えた。この慣行において、正電圧は、負に荷電したDNAをポアを通じてcis側からtrans側へと移行させることを駆動できる。単一チャンネル電流を、Axopatch 200A増幅器（Molecular Devic

40

50

e Inc. Sunnyvale, CA) を用いて記録し、内蔵の 4 極ローパス・ベッセルフィルタを用いて 5 kHz でフィルタリングし、Clampex 9.0ソフトウェア (Molecular Device Inc.) を用いて Digidata 1332 A/Dコンバータ (Molecular Device Inc.) を通じて 20 kHz のサンプリング速度で収集した。それらのデータは、Clampfit 9.0ソフトウェア (Molecular Device Inc.)、Excelソフトウェア (Microsoft) 及びSigmaPlotソフトウェア (SPSS) を使用して解析した。

#### 【0070】

遊離した miRNA 又はプローブのポアを通じた移行によって、非常に短い電流ブロック (約  $10^1 \sim 10^2 \mu s$ ) が生じた。幾つかの短いブロックは、部分的に減じられたポアコンダクタンスを示しており、それは、5 kHz での記録のフィルタリングによるものであるか、又はトラップされたオリゴヌクレオチドが cis 側溶液に戻ることにによって形成されるかのいずれかが考えられる (Maglia, G., Restrepo, M.R., Mikhailova, E., & Bayley, H. Enhanced translocation of single DNA molecules through alpha-hemolysin nanopores by manipulation of internal charge. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 19720-19725 (2008))。この実験では、これらの部分的なブロックを含む全ての短いブロックを、ヒストグラムの作成のために収集した。移行イベント (約  $10^1 \sim 10^2 \mu s$ ) はシグネチャイベント (約  $10^1 \sim 10^3 ms$ ) とは十分に識別されるので、本願では、短いイベントと長いイベントとの分離のための境界として簡便に 1 ms を使用した。それらのデータは、少なくとも 3 つの別個の実験 ( $n > 3$ ) に基づく、平均  $\pm$  SD として示した。t 検定において、 $p < 0.05$  を、2 つのグループ間での有意差と見なした。電気生理学実験は、 $22 \pm 2$  で行った。

#### 【0071】

血漿からの全 RNA 抽出と qRT-PCR による miRNA 定量化。

末梢血サンプルを、IRB 承認をもってミズーリ大学 Ellis Fischel がんセンターで取得した。EDTA 保存剤を有する全血を室温で 1600 g で 10 分間にわたり遠心分離し、血漿を新しいチューブへと移した。miRNA を含有する全 RNA を、350  $\mu l$  の血漿から、miRvana PARIS キット (Ambion, Austin, TX, USA) を使用して製造元のプロトコールに従って抽出した。最終希釈容量は、100  $\mu l$  であった。

#### 【0072】

サイバークリーン (SYBR green) をベースとする定量化 RT-PCR アッセイを、miRNA 定量化のために使用した。簡潔には、miRNA を含む全 RNA サンプル 10  $\mu l$  を、ポリ (A) ポリメラーゼ (Ambion) によってポリアデニル化し、そして SuperScript III リバーストランスクリプターゼ (Invitrogen) を使用して製造元の指示に従い、ポリ (T) アダプタープライマー (5' -GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT N-3' ; 配列番号 10) を用いて cDNA へと逆転写した。リアルタイム PCR を、iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を使用して miR-155 特異的 フォワードプライマー (5' -TTAATGCTAATCGTGATAGGGGT-3' ; 配列番号 11) と、リバースプライマーとしてのポリ (T) アダプターと相補的な配列 (5' -GCGAGCACAGAATTAATACGAC-3' ; 配列番号 12) を用いて iQ5 Real-time PCR system (Bio-Rad, USA) において実施した。その PCR は、以下のとおり実施した：95 °C での 3 分間の初期変性後に、95 °C で 15 秒を 40 サイクルと、引き続き 60 °C で 1 分間を行った。miR-155 の相対レベルを、 $2^{-C_t}$  法を使用して計算し、その際、健全な血漿のレベルを 1 と正規化した。データは、3 つの独立した試験の平均  $\pm$  SD として表し、その差は、スチューデントの t 検定を使用することによって、 $p < 0.05$  で統計的有意であると見なされた。

#### 【0073】

ナノポア及び qRT-PCR のデータの、対照としてスパイクインされた C. elegans (C. elegans) の miRNA である miR-39 を用いた正規化。

ここで、ヒトのサンプルでのナノポアセンサーによる miRNA 検出能力の説得力のある実証をするために、対照として、スパイクインされた合成 miRNA を導入した。検出におけるスパイクインされた RNA オリゴヌクレオチドは、ヒトゲノムに存在しない mi

10

20

30

40

50

RNAであるC.エレガンスのmiR-39の配列と一致している。3.5 μLの1 nMの合成miR-39溶液を、各350 μLの血漿サンプルへと、2×変性溶液(miRVana PARISキット)を血漿に添加した後に導入し、こうして血漿中のmiR-39濃度は10 pMであった。変性溶液は、RNAが分解を受けることを内因性の血漿RNAアーゼの阻害により妨げる。各サンプルについて、miR-155とスパイクインされたmiR-39の両方を、ナノポアセンサとサイバークリーンをベースとするqRT-PCRを使用して測定した。ナノポアデータと正規化の結果を、第9表に示した。ナノポア検出において、miR-155とmiR-39についてのプローブは、P<sub>155</sub>とP<sub>39</sub>であった。ここでまず、miR-155・P<sub>155</sub>とmiR-39・P<sub>39</sub>のそれぞれのハイブリッドのシグネチャイベントの頻度f<sub>155</sub>及びf<sub>39</sub>を測定した。f<sub>39</sub>のばらつきは、RNA抽出後のサンプルの間でのmiR-39濃度の差を反映した。従って、2つの頻度の比f<sub>155</sub>/f<sub>39</sub>は、原則的にこのばらつきを排除すべきである。ここで最後に、6つの健全なサンプルの平均f<sub>155</sub>/f<sub>39</sub>(A<sub>normal</sub>)を標準として使用し、各サンプルの相対miR-155レベルを、f<sub>155</sub>/f<sub>39</sub>をA<sub>normal</sub>に正規化すること、すなわちf<sub>155</sub>/f<sub>39</sub>/A<sub>normal</sub>によって計算した。

10

【0074】

miRNA濃度とシグネチャイベントの頻度との間の相関。

演繹法において、"miR"はmiRNAを表し、"P"はプローブを表し、K<sub>d</sub>は、miR・Pについての平衡解離定数を表し、k<sub>on</sub>は、miR・Pのシグネチャイベントの発生率定数を表し、そしてf<sub>sig</sub>は、シグネチャイベントの頻度を表す。miRNAとプローブの混合物において、反応物であるmiR及びPと、生成物であるmiR・Pとの平衡が確認できる。

20

【0075】

【数2】



【0076】

K<sub>d</sub>は、

【数3】

30

$$K_d = \frac{([miR]_0 - [miR \cdot P])([P]_0 - [miR \cdot P])}{[miR \cdot P]} \quad (S1)$$

によって決定され、その式中、[miR]<sub>0</sub>及び[P]<sub>0</sub>は、miRNAとプローブの全濃度であり、かつ[miR・P]は、miR・Pの濃度である。こうして、[miR・P]と[miR]<sub>0</sub>の関係は、

【数4】

$$[miR \cdot P] = \frac{([miR]_0 + [P]_0 + K_d) - \sqrt{([miR]_0 + [P]_0 + K_d)^2 - 4[miR]_0[P]_0}}{2} \quad (S2)$$

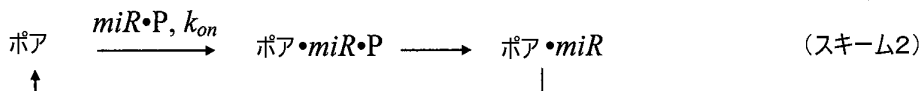
40

である。

【0077】

ナノポア中でのmiR・Pのトラッピングとアンジッピングに関するキネティクスは、

【数5】



である。

50

【 0 0 7 8 】

$f_{sig}$  は、 $[miR \cdot P]$  と線形に関連しているので、

【 数 6 】

$$f_{sig} = k_{on} [miR \cdot P] \quad (S3)$$

であり、式 S 2 と式 S 3 とから

【 数 7 】

$$f_{sig} = k_{on} \frac{([miR]_0 + [P]_0 + K_d) + \sqrt{([miR]_0 + [P]_0 + K_d)^2 - 4[miR]_0[P]_0}}{2} \quad (S4)$$

10

である。

【 0 0 7 9 】

式 S 4 は、 $f_{sig}$  が、ターゲットの miRNA の全濃度である  $[miR]_0$  と正比例にならないことを示している。しかしながら、 $[miR]_0$  が  $[P]_0$  よりもかなり小さい場合に、それはここでの miRNA 検出における場合であるが、式 S 4 は、

【 数 8 】

$$f_{sig} \approx k_{on} [miR]_0 \quad (S5)$$

として単純化できる。

20

【 0 0 8 0 】

この条件では、 $f_{sig}$  は、 $[miR]_0$  と比例している。式 S 4 は、最終的に  $f_{sig}$  が飽和状態になるとも示唆している。これは、 $f_{sig}$  の大きさが  $miR \cdot P$  の捕捉頻度であることと、 $miR \cdot P$  の最大濃度 ( $[miR \cdot P]$ ) は、プローブの濃度 ( $[P]_0$ ) よりも高くありえないことからである。

【 0 0 8 1 】

trans側溶液中の miR - 155 の RT - PCR を用いた同定。

モデルに示されるように (図 8)、miRNA・プローブの複合体がポア中でアンジッピングされると、別個のプローブと miRNA とは、 $\pi$ -バレルを通じて trans側溶液へと順次移行しうる。このモデルを検証するために、ここで RT - PCR を使用して、trans側溶液中のアンジッピングされた miRNA を検出した。しかしながら、PCR 法は、trans側の miRNA が、アンジッピングされた miRNA からであるか又は cis側溶液から trans側溶液へと単に移行した遊離した miRNA (ハイブリダイズしていない) からであるかを区別できない。従ってここで、cis側溶液中の miRNA よりもさらに高い濃度のプローブが添加され、こうして、殆どの miRNA 分子は前記プローブと結合され、遊離した miRNA は殆ど残らず、それにより遊離した miRNA が、PCR の結果と干渉しうる trans側溶液へと移行することが排除される。ここでのターゲットは、miR - 155 であり、そしてプローブは、 $P_{155}$  であった。ターゲット/プローブの濃度は、 $0.1 / 1000$ 、 $1 / 1000$  及び  $10 / 1000$  (nM) であった。多くのポアに関する 6 時間にわたる二重膜記録の後に、cis側溶液と trans側溶液の両方  $2 \mu L$  を、ポリアデニル化、逆転写及び RT - PCR にかけて、上記の方法に示されるようにして miR - 155 の濃度を検出した。その間に、合成された miR - 155 の希釈列を行い、校正のための標準曲線を作成した。cis側の miR - 155 と trans側の miR - 155 を、個別に測定した。miR - 155 /  $P_{155}$  の濃度が  $10 / 1000$  (nM) である場合に、trans側の RNA サンプルについての融解曲線のピークは、合成された miR - 155 と同じであった。miR - 155 の標準曲線に従って、trans側溶液中の miR - 155 の濃度は、 $14$ 、 $34$  及び  $63$  aM ( $10^{-18}$  M) であり、これにより、微量の miR - 155 が、ポアの trans側に運ばれたことが示された。

30

40

【 0 0 8 2 】

注釈 S 1 .

50

前駆 *miRNA* (*pre-miRNA*) は、RNAアーゼ III に媒介された開裂のサインとしての 2ヌクレオチドの 3 突出部を有する約 70ヌクレオチドのステムループ型の RNA である (Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S., & Kim, V.N. *MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization*. *EMBO J* 21, 4663-4670 (2002))。血漿の全 RNA 抽出物が *pre-miRNA* を含むかどうかは未知である。しかしながら、ここで、*miR-P* についての捕捉率は、プローブ中のシグナルタグが非常に短いであれば非常に低いことが実証された (図 9、図 16 及び未公表のデータ)。従って、ここで、*pre-miRNA* は存在するものの、短い突出部によって、ナノポア中でのトラッピングが妨げられることが予想された。

## 【0083】

注釈 S 2 .

ここでまた、ナノポアと qRT-PCR (補足情報において) によって *miRNA* を分析するためにかかった時間を比較した。ここでの RT-PCR 検出は、多くても 16 のサンプルを一度で、スパイクインを用いたのと用いないので各試験について三重反復試験を含めて試験できる。PCR には約 5 ~ 6 時間がかかり、そこには、1 時間のポリ A 反応と、1 時間の逆転写と、2.5 時間の qPCR と、サンプル添加のための 1 時間が含まれる。ナノポア法は、標識不要であり、増幅が必要なく、そして短い核酸断片について選択的である。しかし、最近のナノポアの設定では、一つのサンプルを一度で検出することが可能である。ヒトの血漿サンプルからの *miR-155* についての平均記録時間は、約 100 イベントを収集して約 90 分であった。従って、高スループットのナノポア法は、進展が必要とされる。これは、合成のナノポアアレイ [Advanced Materials 18, 3149-3153 (2006)] とタンパク質ポア - 合成ポアのハイブリッドシステム [Nat. Nanotechnol. 5, 874-877 (2010)] の両方が報告されているので可能である。

## 【0084】

第 3 表 . 調査される *miRNA* 及びそれらのプローブの配列

## 【表 3】

<i>mir-155</i>	5'-UAAUGCUAAUCGUGAUAGGGG-3' (配列番号1)	
<i>P<sub>mi</sub></i>	5'-CCCCTATCACGATTAGCATTAA-3' (配列番号2)	
<i>P<sub>5-C30</sub></i>	5'-C <sub>30</sub> -CCCCTATCACGATTAGCATTAA-3' (配列番号3)	30
<i>P<sub>3-C30</sub></i>	5'-CCCCTATCACGATTAGCATTAA-C <sub>30</sub> -3' (配列番号4)	
<i>P<sub>155</sub></i>	5'-C <sub>30</sub> -CCCCTATCACGATTAGCATTAA-C <sub>30</sub> -3' (配列番号5)	
<i>Let-7a</i>	5'-UGAGGUAGUAGGUUGU <u>AU</u> GUU-3' (配列番号6)	
<i>P<sub>a</sub></i>	5'-C <sub>30</sub> -AACTATAACAACCTACTACCTCA-C <sub>30</sub> -3' (配列番号7)	
<i>Let-7b</i>	5'-UGAGGUAGUAGGUUGU <u>GUG</u> GUU-3' (配列番号8)	
<i>P<sub>b</sub></i>	5'-C <sub>30</sub> -AACCACACAACCTACTACCTCA-C <sub>30</sub> -3' (配列番号9)	
<i>Let-7c</i>	5'-UGAGGUAGUAGGUUGU <u>AUG</u> GUU-3' (配列番号13)	
<i>P<sub>c</sub></i>	5'-C <sub>30</sub> -AACCATAACAACCTACTACCTCA-C <sub>30</sub> -3' (配列番号14)	40
<i>miR-39</i>	5'-UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG-3' (配列番号15)	
<i>P<sub>39</sub></i>	5'-C <sub>30</sub> -CAAGCTGATTTACACCCGGTGA-C <sub>30</sub> -3' (配列番号16)	

## 【0085】

第 4 表 . *miR-155*・*P155* のハイブリッドによって生成されるシグネチャイベントと、*miR-155* か *P155* 単独の移行によるスパイク状の短いブロックのコンダクタンス

【表4】

	シグネチャブロック ( <i>miR-155</i> • <i>P<sub>155</sub></i> )			短いイベント
	レベル1	レベル2	レベル3	
<i>g</i> (pS)	203	585	110	227
<i>g/g<sub>0</sub></i> <sup>a</sup>	0.15	0.42	0.08	0.16

【0086】

10

<sup>a</sup>: *g<sub>0</sub>*は、占有されていない 溶血素ポアのコンダクタンス。 *g<sub>0</sub>* = 1 MのKCl (pH 8.0) 中、+100 mVで1380 pS

【0087】

第5表．様々なプローブで検出されたシグネチャイベントの頻度と発生率

【表5】

プローブ	<i>P<sub>nt</sub></i>	<i>P<sub>5'-C30</sub></i>	<i>P<sub>3'-C30</sub></i>	<i>P<sub>155</sub></i>
<i>f<sub>sig</sub></i> (分 <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	0.168±0.042 (n=5)	0.408±0.084 (n=4)	8.31±2.1 (n=5)	11.9±1.2 (n=6)
<i>k<sub>on</sub></i> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	2.8±0.6×10 <sup>4</sup>	6.8±1.3×10 <sup>4</sup>	1.4±0.3×10 <sup>6</sup>	2.0±0.2×10 <sup>6</sup>

20

【0088】

<sup>a</sup>: 100 nMの*miR-155*とプローブの存在下での+100 mVでの頻度。

<sup>b</sup>: *f<sub>sig</sub>* *k<sub>on</sub>* [*miR-155*]からの発生率定数、その際、[*miR-155*] = 100 nM。

【0089】

第6表．完全マッチの*miRNA*・プローブのハイブリッドとミスマッチを有するものについてのシグネチャイベントの時間

30

【表6】

miRNA・プローブ	<i>let-7a</i> • <i>P<sub>a</sub></i>	<i>let-7b</i> • <i>P<sub>a</sub></i>	<i>let-7b</i> • <i>P<sub>b</sub></i>	<i>let-7a</i> • <i>P<sub>b</sub></i>
<i>τ<sub>sig</sub></i> (ms)	155±28	48±11	165±47	24±2
+120 mV での	(n=7)	(n=7)	(n=6)	(n=5)
p値	<0.005		<0.005	
miRNA・プローブ	<i>let-7a</i> • <i>P<sub>a</sub></i>	<i>let-7c</i> • <i>P<sub>a</sub></i>	<i>let-7c</i> • <i>P<sub>c</sub></i>	<i>let-7a</i> • <i>P<sub>c</sub></i>
<i>τ<sub>sig</sub></i> (ms)	303±45	124±39	343±49	179±38
+100 mV での	(n=6)	(n=4)	(n=6)	(n=4)
p値	<0.005		<0.05	

40

【0090】

第7表．1つのヌクレオチド差を有する*miRNA* (*let-7a*及び*let-7c*) の分離及び2つのヌクレオチド差を有する*miRNA* (*let-7a*及び*let-7b*) の分離のためのROC曲線下の面積 (AUC)

【表 7】

	$let-7a \cdot P_a$	$let-7b \cdot P_b$		$let-7a \cdot P_a$	$let-7c \cdot P_c$
$let-7b \cdot P_a$	0.75	n.a.	$let-7c \cdot P_a$	0.73	n.a.
$let-7a \cdot P_b$	n.a.	0.83	$let-7a \cdot P_c$	n.a.	0.71

## 【0091】

<sup>a</sup> : 受信者操作特性 (ROC) 曲線は、時間の分布全体を陽性成分と陰性成分とに分離する種々の可能性のあるカットオフポイントについての、偽陽性率 (1 - 選択性) に対する真陽性率 (感度) のプロットである。miRNA 検出において、完全マッチの miRNA・プローブのハイブリッドについてのイベントを "陽性" と示し、そしてミスマッチのハイブリッドについてのイベントを "陰性" と示した。分離精度は、ROC 曲線下の面積 (AUC) によって測定した。AUC が 1 であることは、完璧な分離を表し、0.5 の面積は、分離能がないことを表す。AUC は、オンラインでワールドワイドウェブ上の無料ソフトウェアを使用して分析した (インターネットアドレス) [rad.jhmi.edu/jeng/javarad/roc/JROCFITi.html](http://rad.jhmi.edu/jeng/javarad/roc/JROCFITi.html)。

10

## 【0092】

第 8 表 . 様々な時間比とイベント数比での ROC 曲線下の面積 (AUC) 及び至適カットオフポイント (OCP)

20

【表 8】

$\tau_p/\tau_N$ (s/s) <sup>b</sup>	1/1	2/1	3/1	4/1	5/1	10/1
AUC	0.51	0.72	0.73	0.76	0.78	0.93
OCP	n.a.	1.33	1.74	1.88	1.98	2.18
$N_p/N_N$ <sup>c</sup>	200:800	200:400	200:200	200:150	200:100	200:50
AUC	0.83	0.81	0.76	0.76	0.79	0.78
OCP	1.88	1.88	1.85	1.79	1.81	1.97

30

## 【0093】

<sup>a</sup> : AUC と OCP の両方とも、図 16 A ~ B に示される ROC 曲線から計算した。OCP は、Youden 指数の最大値でのカットオフ時間である。Youden 指数は、{ 感度 + 選択性 - 1 } として定義され、ROC 曲線から計算され、0 と 1 との間の範囲である。長期分布と短期分布の完全な分離に導くカットオフ時間は、Youden 指数 = 1 となり、一方で、完全な重複は、Youden 指数 = 0 となる。Youden 指数の最大値を生じるカットオフ時間の値、すなわち "至適" カットオフポイント (OCP) (Greiner et al., 2000 Preventive Veterinary Medicine 45, 23-41) は、最も正確な分離をもたらす。

40

<sup>b</sup> :  $\tau_p / \tau_N$  : "陽性" のデータセットと "陰性" のデータセットの時間比。各データセットは、200 の指数分布した時間値を含んでいた。より長い平均時間を有するデータセットを "陽性" として示し、より短いものを "陰性" として示した。

<sup>c</sup> :  $N_p / N_N$  : "陽性" ( $N_p$ ) のデータセットにおける、"陰性" のデータセットに対するイベント数比。  $\tau_p / \tau_N$  は、このシミュレーションでは 5 であった。

## 【0094】

第 9 表 . ナノポアセンサによって検出されたヒト血漿サンプル中の miR - 155 と スパイクインされた miR - 39 のレベル

50

【表 9】

サンプル番号	$f_{155}$ (分 <sup>-1</sup> )	$f_{39}$ (分 <sup>-1</sup> )	$f_{155} / f_{39}$	相対 <i>miR</i> -155 レベル <sup>a</sup>		
1	0.67±0.04	2.29±0.34	0.292	1.22		
2	0.50±0.13	2.62±0.33	0.192	0.80		
3	0.62±0.09	2.65±0.25	0.236	0.99		
健全	4	0.61±0.12	2.35±0.29	0.258	1.08	10
	5	0.68±0.15	2.95±0.20	0.230	0.97	
	6	0.70±0.06	3.14±0.35	0.224	0.94	
		(平均) <sup>a</sup>	0.239	1		
	7	1.63±0.15	2.75±0.44	0.593	2.49	
	8	1.62±0.14	2.58±0.57	0.627	2.63	
	9	1.71±0.16	2.52±0.21	0.675	2.83	20
肺癌	10	1.74±0.18	2.76±0.38	0.633	2.65	
	11	1.69±0.16	2.57±0.25	0.658	2.76	
	12	1.39±0.11	2.74±0.12	0.507	2.12	
		(平均)	0.615	2.57		

## 【0095】

<sup>a</sup>: 相対 *miR*-155 レベルは、各サンプルの  $f_{155} / f_{39}$  を、表中で強調表示した 0.239 である、健全なサンプル 1 ~ 6 の平均の  $f_{155} / f_{39}$  に正規化することによって得られた。

## 【0096】

例 3 . マイクロ RNA のペプチド誘導型の選択的検出

原理的説明 .

ここで長期の目的は、血漿又は組織からの全 RNA 抽出物においてターゲット *miRNA* A を正確に検出するためのナノポア単一分子センサを開発することである。前記の RNA 抽出物は、多くの複雑な核酸成分を含んでおり、少なくとも *miRNA* (未熟な及び成熟の *miRNA* の両方)、*mRNA*、*tRNA*、他の RNA を含む。全ての成分は、通常は、負電荷を有する。このように、ターゲットの *miRNA* が印加電圧でポア中にトラップされうる場合に、任意の他の成分も駆動されて該ナノポアと相互作用することがあり、それによりターゲットの *miRNA* / プロブの複合体によって生じたシグネチャイベントの認識と干渉する非特異的な電流シグナルが発生する。ここで、ターゲットの *miRNA* / プロブの複合体だけをポア中にトラップできるが、どの他の核酸成分も前記ポアとの干渉から妨げられるため、従って選択性と感度の両方が大きく改善されたエラー強さのある戦略が提供される。この戦略は、*miRNA* のペプチド誘導型の選択的検出と呼ばれる。

## 【0097】

方法 .

ここで、図 18 A に示されるように、プロブとしてペプチド - PNA (ペプチド核酸

10

20

30

40

50

) コポリマーを設計した。そのPNA配列(図18Aで"PNA"で囲われる)は、側鎖のヌクレオベースを有するペプチド骨格であって、ターゲットのmiRNA(図18A中の"miRNA(Let-7b, -7c)"で囲われる)の全配列又は部分配列と相補的な骨格を有し、こうして溶液中のターゲットのmiRNAを捕捉するための中心ドメインとして役立つ。これらの配列を以下に規定する:

プローブ

NH<sub>2</sub>-Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-AACCACACAA-COOH、ここで、プローブ全体はペプチド骨格(すなわち、プローブのAACCACACAA部分は、指摘されたAACCACACAAヌクレオベースを有するペプチド骨格を含む)を有する;配列番号17。

【0098】

プローブのPNA(中心ドメイン):

NH<sub>2</sub>-AACCACACAA-COOH、ここで、該分子は、指摘されたAACCACACAAヌクレオベースを有するペプチド骨格を含む(配列番号18)。

【0099】

HIV-TAT:

Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg(配列番号19)。

【0100】

オリゴヌクレオチドプローブと対立して、新たなプローブのリポーター(又は末端伸長部)は、一連の正に荷電したアミノ酸を有するペプチド(図18A中の"ペプチドリポーター"で囲われる)であり、そして中心ドメインは、ターゲットの核酸と相補的なヌクレオチドを含むペプチド核酸である。プローブのリポーター又は末端伸長部における正に荷電したアミノ酸が十分な数で存在する場合に、miRNA/プローブの複合体の正味の電荷は、依然として正であり、こうしてターゲットのmiRNAがプローブのPNA(ペプチド核酸)ドメインに結合する場合に、miRNA/プローブの複合体全体は、強力な双極子分子を形成する。ここで、ポアのtrans側開口部に負に荷電した残基の環状部を有するナノポアを工学した(S.アウレウス(S. aureus)の溶血素であってK131D突然変異を含むもの)。野生型のS.アウレウスの溶血素のペプチド配列(National Center for Bioinformaticsのアクセッション番号:AAA26598.1)は、以下の通りである:

ADSDINIKTGTDDIGSNTTVKTDGLVTDYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVLQLPDNEVAQISDYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSI GHTLKYVQPDFKTI LE SPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKA SKQQTNDVIERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWTRSSERYKIDWEKEEMTN(配列番号21)

【0101】

変異体のS.アウレウスK131D溶血素ペプチド配列は、以下の通りである:

ADSDINIKTGTDDIGSNTTVKTDGLVTDYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVLQLPDNEVAQISDYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGDIGGLIGANVSI GHTLKYVQPDFKTI LE SPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKA SKQQTNDVIERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWTRSSERYKIDWEKEEMTN(配列番号22)

【0102】

従って、プローブの双極子の正に荷電したペプチドドメインが両者とも正の電圧(cis側接地)によって押されて、trans側開口部にある負の環状部によって引き寄せられて、ポアのバレル中へのmiRNA/複合体のトラップが導かれる。正の電圧では、任意の他の遊離した核酸成分は、保有する負電荷のためポアに入ることが妨げられる。これは遊離したRNA成分によりシグナルを大きく下げ、最も観察されるイベントは、miRNA/プローブの複合体のトラップによるか、プローブの移行によるものかのいずれかである。ペプチドPNAプローブの使用は、ターゲットのmiRNAの選択的な検出を可能にする。

【0103】

結論.

図18Aは、miRNA/プローブの複合体の図を示している。囲われたmiRNAは

10

20

30

40

50

、ターゲットのmiRNAであるLet-7bである。囲われたプローブであるP7bは、囲われた"ペプチドリポーター"部と、囲われた"PNA"(ペプチド核酸)部を有する。PNAは、Let-7bの捕捉のためであり、囲われた"ペプチドリポーター"は、HIV-TATの配列に相当する正に荷電した、アルギニン及びリシンを原因とする+8eを有するペプチドである。図18Bは、ペプチド-PNAプローブのP7bの移行についてのイベントを示している。特徴的なイベントは3msにわたって継続し、そして電圧は、+180mVで10pAにまで下がる。図18Cは、+180mVでの溶液において、遊離したmiRNA let-7b(プローブなし)では遮断イベントが観察できないことを示している。

#### 【0104】

図18Dは、let-7b/P7bの複合体のトラッピングについてのシグネチャイベントを示している。これらのイベントは、特徴的に100msにわたって継続し、そして電流を、プローブに関するものとは完全に異なる+180mVで57pAにまで下がる。図18Eは、Let-7bからの2種の異なるヌクレオチドを有するLet-7cが、プローブのP7bのPNAに結合できず、従って図18Dに示されるようにシグネチャイベントを生じないことを示している。殆ど全ての観察されたイベントは、プローブそれ自身によるものである。

#### 【0105】

図18Fは、Let-7b(完全マッチ、重なりのない2つの離れたクラスター)及びLet-7c(2つのミスマッチ、完全に重なった2つのクラスター)に結合するP7b 20 についての時間-振幅の特性を比較している。このことは、2つの異なるヌクレオチドを有する配列の類似したmiRNAを識別するにあたりほとんど100%の精度を示している。

#### 【0106】

バイオセンシング用途のためのナノポアにおける様々な分子プロセスを理解するためのシグネチャイベントの利用も提供される。図19Aにおいて、ここで、短鎖の3 30 末端にヘアピンを有するHP-C30を使用した場合に、新しいタイプの3つのレベルの電流パターンが確認された。そのレベル1とレベル2は、HP-C30のアンジッピングと、アンジッピングされた短鎖のナノ間隙から - バレルへの移行と一致している。しかしながら、レベル1 の時間は、ヘアピンを有さないターゲットと比較して、 $15 \pm 1.9$ ms へと80倍だけ劇的に延長された。延長されたレベル1 は、 - バレルにおける通過(threading)の前にヘアピンのアンジッピングと一致している。アプタマーなどの多くのDNA又はRNA構造はヘアピンを含むので、ここでこのシステム及びシグネチャイベントは、これらの構造を調べるために、そしてそれらのタンパク質ターゲットとの結合相互作用を調べるために使用することができる。図19Bにおいて、ここでまた、短鎖の3 40 末端にストレプトアビジンと結合されたSA-C30を使用した場合に、新しい多重レベルの電流パターンが裏付けられた。再び、完全に遮断されたレベル1と部分的に遮断されたレベル2は、SA-C30のアンジッピングと、アンジッピングされた短鎖のナノ間隙から - バレルへの移行と一致している。その電流は、負電圧によって強制的に回復されるまで数分にわたってレベル1 に留まった。長期のレベル1 は、SA-C30の短鎖 40 がアンジッピング後に - バレル中に動くものの、その移行は結合された大きなストレプトアビジンによって抑えられることによって説明できる。この結果は、タンパク質検出のためにシグネチャイベントを使用する可能性を示している。図19Cにおいて、ここで、前記複合体は、2つのDNAの結合に短いオリゴヌクレオチドを使用した場合に、ナノポア中で2つのステップにおいて逐次アンジッピングされることが裏付けられた。2つのDNAのアンジッピングは、2つのレベル2状態によって明らかに表すことができる。

#### 【0107】

結論 .

ペプチド-PNAプローブは、1)ターゲットのmiRNAの選択的な検出、2)配列が類似したmiRNAの識別における大きく向上した精度を可能にする。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 0 8 】

本発明は、その特定の実施形態と関連づけて説明されているが、本発明によるデバイスには更なる変更が可能であると解される。本件特許出願は、発明のいかなる変更、使用もしくはは適合も、一般に本発明の原理に従って、そして本発明の属する技術分野内で公知の又は通常の慣行に含まれかつ本願で先に示した及び以下の特許請求の範囲における必須の特徴に当てはまりうる本願開示からの逸脱を含めて対象に含めることを意図している。

## 【 0 1 0 9 】

## 参考資料

1. Silvestri,G.A., Alberg,A.J., & Ravenel,J. The changing epidemiology of lung cancer with a focus on screening. *BMJ* **339**, (2009). 10
2. Carthew,R.W. & Sontheimer,E.J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**, 642-655 (2009).
3. Inui,M., Martello,G., & Piccolo,S. MicroRNA control of signal transduction. *Nat Rev Mol. Cell Biol* **11**, 252-263 (2010).
4. Garzon, R., Calin, G. A., and Croce, C. M. MicroRNAs in cancer. *60*, 167-179. 2009.
5. Ortholan,C., Puissegur,M.P., Ilie,M., Barbry,P., Mari,B., & Hofman,P. MicroRNAs and lung cancer: New oncogenes and tumor suppressors, new prognostic factors and potential therapeutic targets. *Curr. Med. Chem.* **16**, 1047-1061 (2009). 20
6. Calin,G.A. & Croce,C.M. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* **6**, 857-866 (2006).
7. Mitchell,P.S., Parkin,R.K., Kroh,E.M., Fritz,B.R., Wyman,S.K., Pogosova-Agadjanyan,E.L., Peterson,A., Noteboom,J., O'Briant,K.C., Allen,A., Lin,D.W., Urban,N., Drescher,C.W., Knudsen,B.S., Stirewalt,D.L., Gentleman,R., Vessella,R.L., Nelson,P.S., Martin,D.B., & Tewari,M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10513-10518 (2008).
8. Rabinowits,G., GerÅşel-Taylor,C., Day,J.M., Taylor,D.D., & Kloecker,G.H. Exosomal microRNA: A diagnostic marker for lung cancer. *Clin. Lung Cancer* **10**, 42-46 (2009). 30

## 【 0 1 1 0 】

9. Kosaka,N., Iguchi,H., Yoshioka,Y., Takeshita,F., Matsuki,Y., & Ochiya,T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* (2010).
10. Rosell,R., Wei,J., & Taron,M. Circulating MicroRNA Signatures of Tumor-Derived Exosomes for Early Diagnosis of Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin. Lung Cancer* **10**, 8-9 (2009).
11. Thomson,J.M., Parker,J., Perou,C.M., & Hammond,S.M. A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. *Nat Methods* **1**, 47-53 (2004).
12. Chen,C., Ridzon,D.A., Broomer,A.J., Zhou,Z., Lee,D.H., Nguyen,J.T., Barbisin,M., Xu,N.L., Mahuvakar,V.R., Andersen,M.R., Lao,K.Q., Livak,K.J., & Guegler,K.J. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **33**, (2005).
13. Li,W. & Ruan,K. MicroRNA detection by microarray. *Anal. Bioanal. Chem.* **394**, 1117-1124 (2009).
14. Hunt,E.A., Goulding,A.M., & Deo,S.K. Direct detection and quantification of microRNAs. *Anal. Biochem.* **387**, 1-12 (2009).
15. Kloosterman,W.P., Wienholds,E., de Bruijn,E., Kauppinen,S., & Plasterk,R.H. In situ detection of miRNAs in animal embryos using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nat Methods* **3**, 27-29 (2006).
16. Neely,L.A., Patel,S., Garver,J., Gallo,M., Hackett,M., McLaughlin,S., Nadel,M., Harris,J., Gullans,S., & Rooke,J. A single-molecule method for the quantitation of microRNA gene expression. *Nat Methods* **3**, 41-46 (2006).
17. Bayley,H. & Jayasinghe,L. Functional engineered channels and pores - (Review). *Molecular Membrane Biology* **21**, 209-220 (2004).
18. Ma,L. & Cockroft,S.L. Biological nanopores for single-molecule biophysics. *Chembiochem* **11**, 25-34 (2010).
19. Movileanu,L. Interrogating single proteins through nanopores: challenges and opportunities. *Trends Biotechnol.* **27**, 333-341 (2009).
20. Bayley,H. Sequencing single molecules of DNA. *Current Opinion in Chemical Biology* **10**, 628-637 (2006).
21. Branton,D., Deamer,D.W., Marziali,A., Bayley,H., Benner,S.A., Butler,T., Di Ventra,M., Garaj,S., Hibbs,A., Huang,X., Jovanovich,S.B., Krstic,P.S., Lindsay,S., Ling,X.S., Mastrangelo,C.H., Meller,A., Oliver,J.S., Pershin,Y.V., Ramsey,J.M., Riehn,R., Soni,G.V., Tabard-Cossa,V., Wanunu,M., Wiggin,M., & Schloss,J.A. The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nature Biotechnology* **26**, 1146-1153 (2008).
22. Kasianowicz,J.J., Brandin,E., Branton,D., & Deamer,D.W. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 13770-13773 (1996).

23. Akeson, M., Branton, D., Kasianowicz, J.J., Brandin, E., & Deamer, D.W. Microsecond time-scale discrimination among polycytidylic acid, polyadenylic acid, and polyuridylic acid as homopolymers or as segments within single RNA molecules. *Biophys. J.* **77**, 3227-3233 (1999).
24. Meller, A., Nivon, L., & Branton, D. Voltage-driven DNA translocations through a nanopore. *Phys Rev Lett* **86**, 3435-3438 (2001).
25. Deamer, D.W. & Branton, D. Characterization of nucleic acids by nanopore analysis. *Acc. Chem. Res.* **35**, 817-825 (2002).
26. Nakane, J., Akeson, M., & Marziali, A. Nanopore sensors for nucleic acid analysis. *J Phys Condens Matter* **15**, (2003). 10
27. Mitchell, N. & Howorka, S. Chemical tags facilitate the sensing of individual DNA strands with nanopores. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 5565-5568 (2008).
28. Rabinowits, G., GerÅsel-Taylor, C., Day, J.M., Taylor, D.D., & Kloecker, G.H. Exosomal microRNA: A diagnostic marker for lung cancer. *Clin. Lung Cancer* **10**, 42-46 (2009).
29. Rosell, R., Wei, J., & Taron, M. Circulating microRNA signatures of tumor-derived exosomes for early diagnosis of non-small-cell lung cancer. *Clin. Lung Cancer* **10**, 8-9 (2009). 20
30. Meller, A., Nivon, L., Brandin, E., Golovchenko, J., & Branton, D. Rapid nanopore discrimination between single polynucleotide molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 1079-1084 (2000).
31. Sauer-Budge, A.F., Nyamwanda, J.A., Lubensky, D.K., & Branton, D. Unzipping kinetics of double-stranded DNA in a nanopore. *Phys Rev Lett* **90**, (2003).
32. Mathés, J., Visram, H., Viasnoff, V., Rabin, Y., & Meller, A. Nanopore unzipping of individual DNA hairpin molecules. *Biophys. J.* **87**, 3205-3212 (2004). 30
33. Maglia, G., Restrepo, M.R., Mikhailova, E., & Bayley, H. Enhanced translocation of single DNA molecules through +|-hemolysin nanopores by manipulation of internal charge. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 19720-19725 (2008).
34. Shim, J.W., Tan, Q., & Gu, L.Q. Single-molecule detection of folding and unfolding of a single G-quadruplex aptamer in a nanopore nanocavity. *Nucleic Acids Res.* **37**, 972-982 (2009).
35. Butler, T.Z., Gundlach, J.H., & Troll, M.A. Determination of RNA orientation during translocation through a biological nanopore. *Biophys. J.* **90**, 190-199 (2006). 40
36. Kasianowicz, J.J., Brandin, E., Branton, D., & Deamer, D.W. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 13770-13773 (1996).

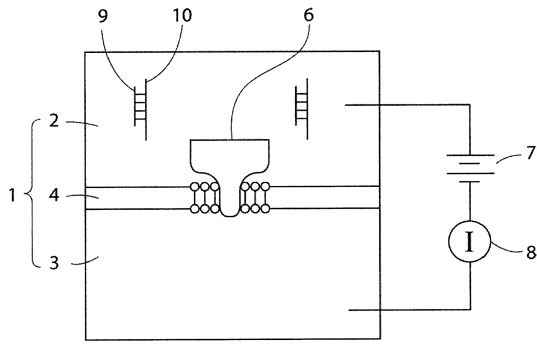
37. Mathés,J., Aksimentiev,A., Nelson,D.R., Schulten,K., & Meller,A. Orientation discrimination of single-stranded DNA inside the  $\hat{\pm}$ -hemolysin membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 12377-12382 (2005).
38. Purnell,R.F., Mehta,K.K., & Schmidt,J.J. Nucleotide identification and orientation discrimination of DNA homopolymers immobilized in a protein nanopore. *Nano Lett.* **8**, 3029-3034 (2008).
39. Wanunu,M., Morrison,W., Rabin,Y., Grosberg,A.Y., & Meller,A. Electrostatic focusing of unlabelled DNA into nanoscale pores using a salt gradient. *Nature Nanotechnology* **5**, 160-165 (2010). 10
40. Cho,W.C. Role of miRNAs in lung cancer. *Expert Rev Mol. Diagn.* **9**, 773-776 (2009).
41. Landi,M.T., Zhao,Y., Rotunno,M., Koshiol,J., Liu,H., Bergen,A.W., Rubagotti,M., Goldstein,A.M., Linnoila,I., Marincola,F.M., Tucker,M.A., Bertazzi,P.A., Pesatori,A.C., Caporaso,N.E., McShane,L.M., & Wang,E. MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer. *Clin. Cancer Res* **16**, 430-441 (2010).
42. Patnaik,S.K., Kannisto,E., Knudsen,S., & Yendamuri,S. Evaluation of microRNA expression profiles that may predict recurrence of localized stage I non-small cell lung cancer after surgical resection. *Cancer Res* **70**, 36-45 (2010). 20
43. Yanaihara,N., Caplen,N., Bowman,E., Seike,M., Kumamoto,K., Yi,M., Stephens,R.M., Okamoto,A., Yokota,J., Tanaka,T., Calin,G.A., Liu,C.G., Croce,C.M., & Harris,C.C. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* **9**, 189-198 (2006).
44. Shi,R. & Chiang,V.L. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *BioTechniques* **39**, 519-524 (2005).
45. Kim,M.J., Wanunu,M., Bell,D.C., & Meller,A. Rapid fabrication of uniformly sized nanopores and nanopore arrays for parallel DNA analysis. *Advanced Materials* **18**, 3149-3153 (2006). 30

## 【 符号の説明 】

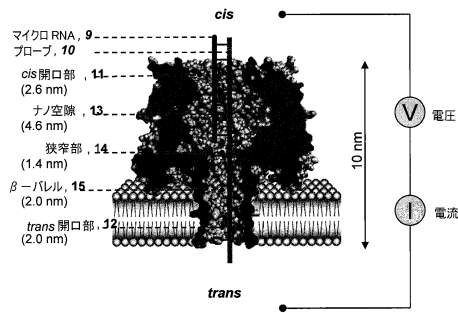
## 【 0 1 1 3 】

1 検知チャンバ、 2 cis側コンパートメント、 3 trans側コンパートメント、  
 4 仕切、 5 開口部、 6 ナノポア、 7 電源、 8 電流デテクタ、 9  
 ターゲットのオリゴヌクレオチド、 10 プローブ

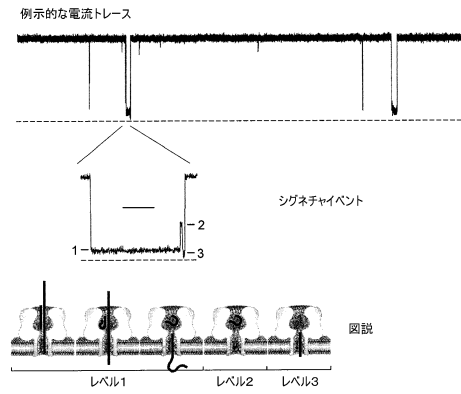
【図1】



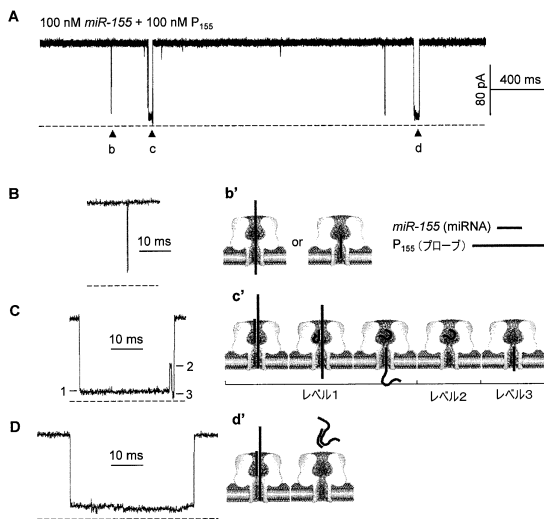
【図2】



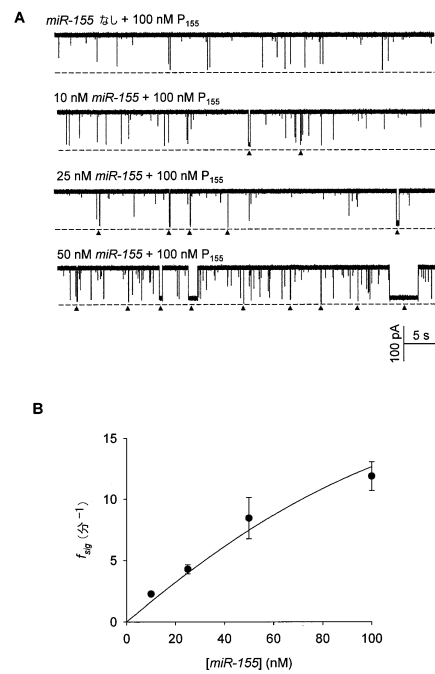
【図3】



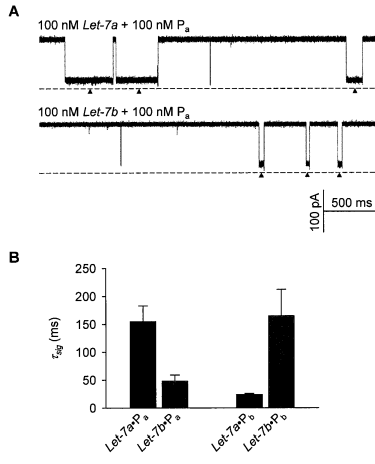
【図4】



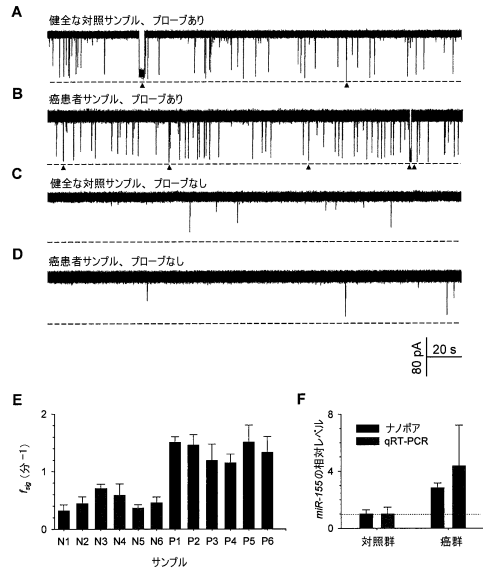
【図5】



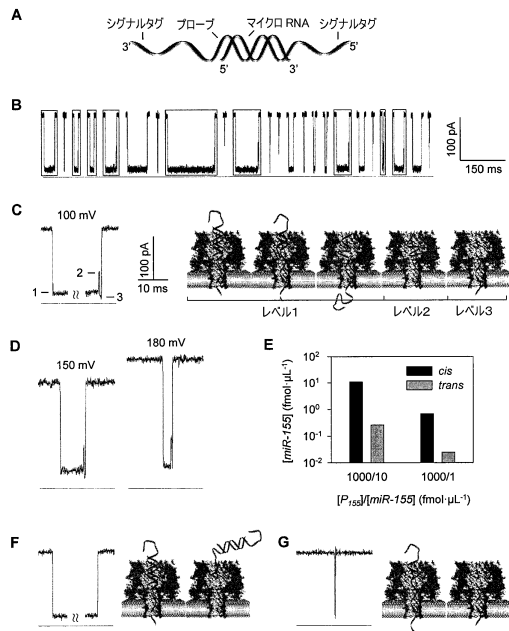
【 図 6 】



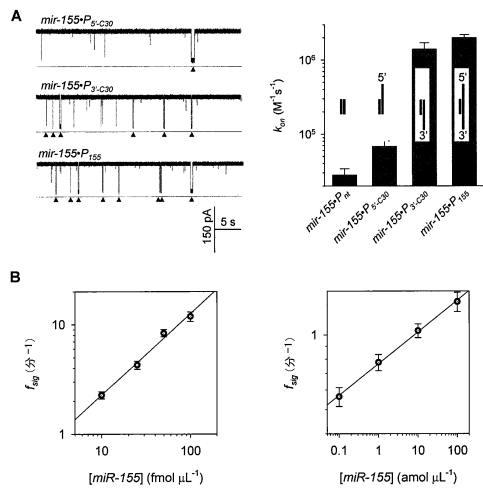
【 図 7 】



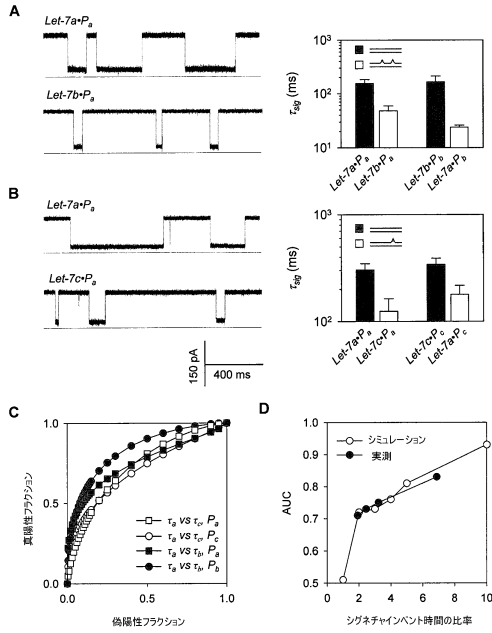
【 図 8 】



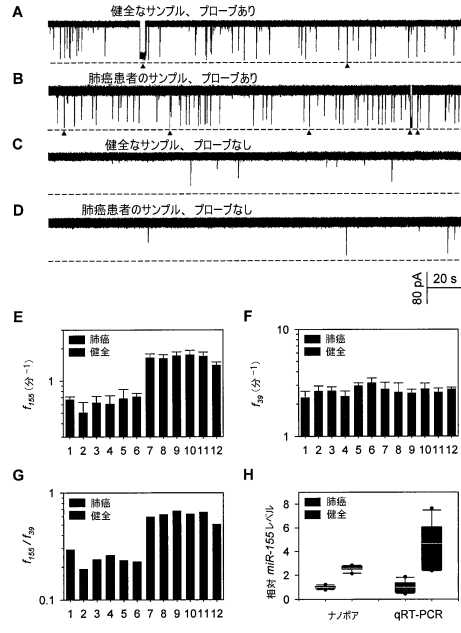
【 図 9 】



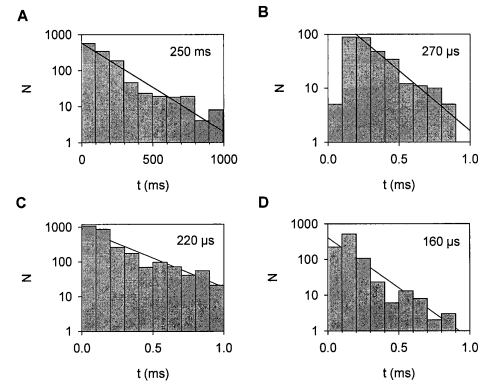
【図10】



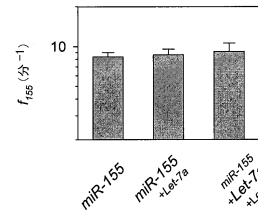
【図11】



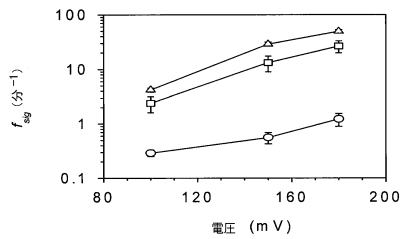
【図12】



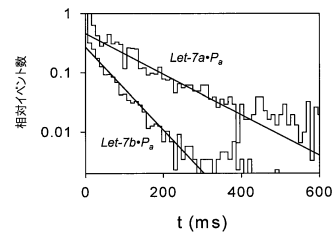
【図14】



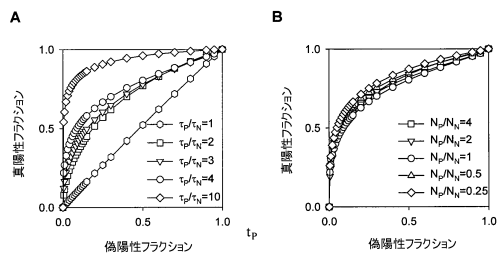
【図13】



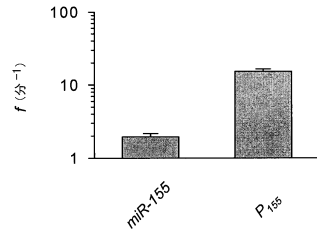
【図15】



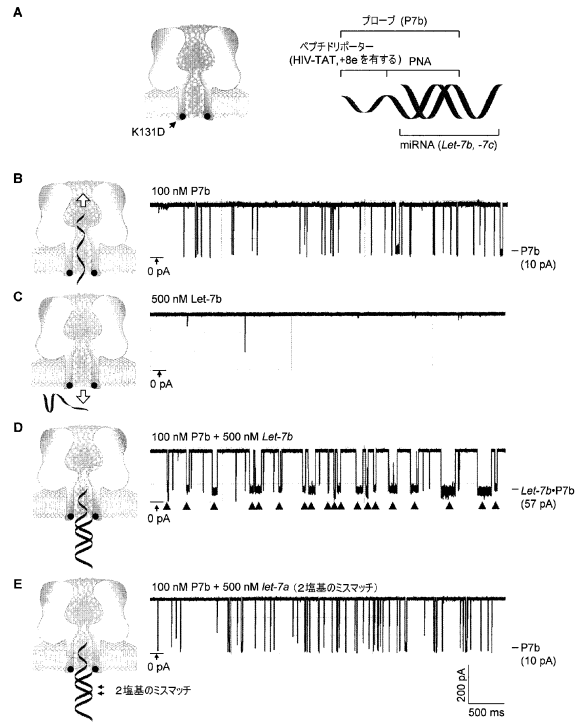
【図16】



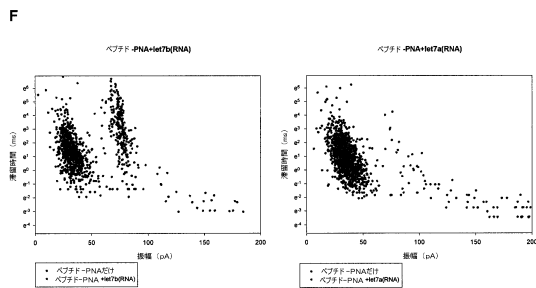
【 図 17 】



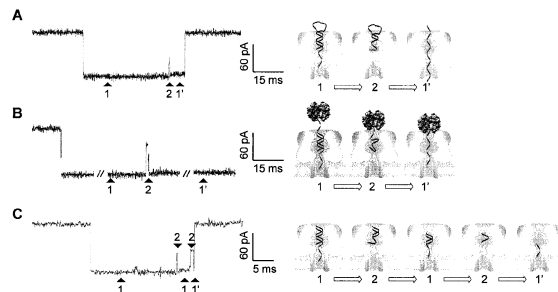
【 図 18 - 1 】



【 図 18 - 2 】



【 図 19 】



【配列表】

0006016792000001.app

## フロントページの続き

- (72)発明者 ヨン ワン  
アメリカ合衆国 ミズーリ コロンビア パリス ロード 1407 アpartment エス
- (72)発明者 カイ ティアン  
アメリカ合衆国 ミズーリ コロンビア ディエゴ コート 100 アpartment ビー

審査官 原 大樹

- (56)参考文献 国際公開第2009/092035(WO, A1)  
米国特許出願公開第2007/0190543(US, A1)  
Biophysical Journal, 2010年 1月, Vol.98, Issue3, Supplement1, p.599a-600a, 3108-Pos  
ChemBioChem, 2010年 1月, Vol.11, Issue1, p.25-34  
Biophysical Journal, 2004年, Vol.87, No.1, p.615-621  
PNAS, 1993年, Vol.90, p.5076-5080

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12Q 1/00 - 3/00

G01N 27/00 - 27/92

G01N 33/00 - 33/98

MEDLINE/BIOSIS/EMBASE/WPIDS/WPIX/CAPLUS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)

专利名称(译)	单分子检测纳米孔促进的核酸		
公开(公告)号	<a href="#">JP6016792B2</a>	公开(公告)日	2016-10-26
申请号	JP2013519840	申请日	2011-07-14
[标]申请(专利权)人(译)	密苏里大学		
申请(专利权)人(译)	密苏里大学的Kyureitazu		
当前申请(专利权)人(译)	密苏里大学的Kyureitazu		
[标]发明人	リーチュンゲー ヨンワン カイティアン		
发明人	リーチュンゲー ヨンワン カイティアン		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/483 G01N27/00		
CPC分类号	C12Q1/6825 C12Q1/6886 C12Q2600/178 G01N33/48721 C12Q2523/307 C12Q2525/161 C12Q2525/207 C12Q2565/631		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A G01N33/53.M G01N33/483.E G01N27/00.D		
审查员(译)	原 大树		
优先权	61/399578 2010-07-14 US		
其他公开文献	JP2013540423A JP2013540423A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种基于纳米孔技术的新颖且改进的方法，该方法使用包含与靶寡核苷酸互补的序列并且在其两端具有3'末端，5'末端或末端延伸的探针。从而提供寡核苷酸检测方法。具有孔的改进的纳米孔传感器允许灵敏，选择性和直接检测，鉴定和定量靶寡核苷酸，例如miRNA。根据本发明的检测方法还可以用作基于患者血液样品中的miRNA的癌症检测的非侵入性且成本有效的诊断方法。

