

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2007年12月21日 (21.12.2007)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2007/145298 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 25/16 (2006.01)	G01N 21/45 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)	G01N 21/75 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)	G01N 33/53 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)	G01N 33/566 (2006.01)
G01N 21/05 (2006.01)	

CORPORATION TOKYO UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND TECHNOLOGY [JP/JP]; 〒1838538 東京都府中市晴見町3-8-1 Tokyo (JP). 株式会社神戸製鋼所 (KABUSHIKI KAISHA KOBE SEIKO SHO) [JP/JP]; 〒6518585 兵庫県神戸市中央区脇浜町2丁目10番26号 Hyogo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2007/062053

(22) 国際出願日: 2007年6月14日 (14.06.2007)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2006-167898 2006年6月16日 (16.06.2006) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人東京農工大学 (NATIONAL UNIVERSITY

(72) 発明者; および

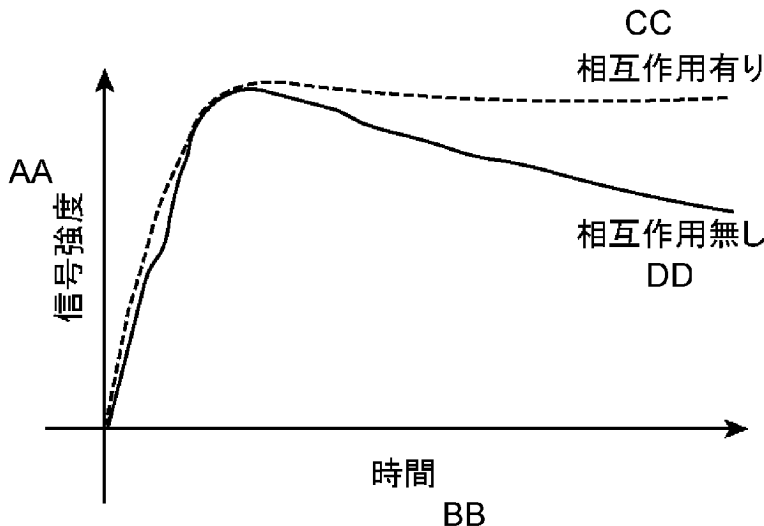
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 池袋 一典 (IKEBUKURO, Kazunori). 片山 亮 (KATAYAMA, Ryo). 高橋 英二 (TAKAHASHI, Eiji). 高松 弘行 (TAKAMATSU, Hiroyuki).

(74) 代理人: 小谷 悦司, 外 (KOTANI, Etsuji et al.); 〒5300005 大阪府大阪市北区中之島2丁目2番2号ニチメンビル2階 Osaka (JP).

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF, AND APPARATUS FOR, DETECTING OF ANY INTERACTION BETWEEN NUCLEIC ACID AND PROTEIN

(54) 発明の名称: 核酸と蛋白質の相互作用の検出方法及び装置



AA - SIGNAL INTENSITY  
 BB - TIME  
 CC - INTERACTION EXISTING  
 DD - NO INTERACTION

(57) Abstract: Any interaction between nucleic acid and protein is easily detected with high sensitivity without the need of sample labeling with a fluorescent molecule or sample anchorage onto a metal thin-film. Accordingly, whether or not there is any occurrence of interaction between nucleic acid and protein in sample (S) is detected in an optical manner. In particular, the sample (S) is irradiated with excitation rays (Le) and with measuring rays (L2) for measuring of any photothermal effect produced in the sample (S) by the irradiation with the excitation rays (Le). On the basis of any phase change of the measuring rays (L2), there is produced a measurement signal for the photothermal effect in the sample (S) by the excitation rays (Le). From any change over time of the measurement signal, whether or not there is any occurrence of interaction between nucleic acid and protein is judged.

(57) 要約: この発明は、蛍光分子による試料の標識や金属薄膜上への試料の固着を要することなく、核酸と蛋白質の相互作用を

容易にかつ高感度で検出することを目的とする。そのた

[続葉有]

WO 2007/145298 A1



(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

---

めに、試料S中での核酸と蛋白質との相互作用の発生の有無が光学的に検出される。具体的には、試料Sに対する励起光L<sub>e</sub>の照射と、この励起光L<sub>e</sub>の照射が試料S内に生じさせる光熱効果を測定するための測定光L<sub>2</sub>の照射とが行われる。この測定光L<sub>2</sub>の位相変化に基づき、励起光L<sub>e</sub>による試料Sの光熱効果の測定信号が作成される。この測定信号の時間変化から核酸と蛋白質相互作用の発生の有無の判断が判断される。

## 明 細 書

### 核酸と蛋白質の相互作用の検出方法及び装置

#### 技術分野

[0001] 本発明は、例えば癌マーカー蛋白の検出や転写因子探索等を目的として、試料中における核酸とそのリガンド蛋白質との相互作用の有無を検出するための技術に関する。

#### 背景技術

[0002] 従来、前記のような核酸と蛋白質との相互作用を検出するための方法として、下記特許文献1に記載されるようないわゆる蛍光法が知られている。この方法は、核酸と蛋白質の双方を互いに異なる蛍光色素で標識することと、これらの蛍光色素が互いに作用して蛍光を変化させることの有無を測定することにより前記核酸と蛋白質の相互作用を検出することを含む。

[0003] 前記の蛍光法は、前記蛍光分子によって核酸及び蛋白質を特異的に染色するために数段階の前処理工程を要する。従って、実際の測定工程に至るまでに多大な手間が必要とされる。さらに、蛍光分子が活性部位に与える影響が懸念される。

[0004] なお、前記蛍光分子等による標識が不要な分子間相互作用検出方法として、SPR（表面局在プラズモン共鳴）センサを用いる方法が考えられる。この方法は、基板上に形成された金属薄膜上に試料を固相で結合することと、この試料に所定のレーザー光を入射したときの前記試料の吸着度合いをSPRセンサによって検出することを含む。

[0005] しかしながら、この方法を前記核酸－蛋白質相互作用の検出に利用することは実用上困難である。この方法では、前記金属薄膜の膜厚についてナノメートルオーダーでの制御が求められるとともに、その薄膜表面にアナライトと呼ばれる目的分子捕獲用の分子（例えば抗原に対する抗体）を吸着させる必要があり、このような事情から、再現性の高い基板を作成することはきわめて困難であるからである。特に、機能性分子についての計測は、基板表面付近に活性部位を置く必要があるので、当該活性部位が前記基板の影響を受ける可能性は否定できない。

特許文献1:特開2004-16132号公報

## 発明の開示

[0006] 本発明の目的は、蛍光分子による試料の標識や金属薄膜上への試料の固着を要することなく、核酸と蛋白質の相互作用を容易にかつ高感度で検出する方法及び装置を提供することである。そのために、本発明者は、前記核酸及び蛋白質を含む試料の光熱効果、すなわち、当該試料に所定の励起光を入射した時にこの励起光を前記試料が吸収して発熱する効果に着目し、この光熱効果と、試料中での核酸と蛋白質との相互作用の有無との間に著しい相関関係があることを見出した。具体的に、前記光熱効果は一般に時間が経過するに従って減少するのであるが、核酸と蛋白質との相互作用が生じている試料では少なくとも光熱効果の立上り直後において前記光熱効果の時間減少がほとんどないことが確認された。これは、前記核酸の断片の構造がリガンド蛋白質との相互作用によって安定化することによるものであると推察される。

[0007] 本発明は、前記の相関関係に基づいて試料中での核酸と蛋白質の相互作用の有無を検出するものである。具体的に、本発明に係る検出方法は、前記試料に対して励起光を照射するステップと、前記励起光の照射により前記試料内に生ずる光熱効果を測定するステップと、前記光熱効果の時間変化に基づいて核酸と蛋白質の相互作用の発生の有無を判断するステップとを含む。また、本発明に係る検出装置は、前記試料を収容する試料収容部と、前記試料収容部に収容された試料に対して励起光を照射する励起光照射系と、前記励起光の照射により前記試料内に生ずる光熱効果の測定信号を生成する測定装置とを含み、前記測定装置は、前記測定信号の時間変化に関するデータを作成し、その作成したデータに基づいて前記相互作用の有無を判断する信号処理装置を含む。

[0008] 以上の検出方法及び検出装置は、試料に励起光を照射して当該試料における光熱効果を測定するだけで、当該光熱効果の時間変化に基づいて前記試料における核酸-蛋白質相互作用の有無を容易にかつ高感度で検出することを可能にする。

## 図面の簡単な説明

[0009] [図1]本発明の第1の実施の形態に係る核酸と蛋白質との相互作用の検出装置の全

体構成図である。

[図2]前記検出装置における試料収容部の一部断面正面図である。

[図3]前記試料収容部の要部を示す一部断面斜視図である。

[図4](a)は前記試料収容部に用いられるマイクロアレイの平面図、(b)はその要部断面図である。

[図5]前記検出装置が生成する測定信号の強度の時間変化を示すグラフである。

[図6](a)は本発明の第2の実施の形態で用いられるマイクロリアクタの平面図、(b)は(a)の6B-6B線断面図である。

[図7](a)は本発明の第2の実施の形態において得られる各測定位置A~Cでの測定信号の時間変化を示すグラフ、(b)はその測定信号を重ね合わせた信号の時間変化を示すグラフである。

[図8]前記第1の実施の形態に係る装置の実施により得られる測定信号を示すグラフである。

### 発明を実施するための最良の形態

[0010] 本発明の第1の実施の形態を、図1~図5を参照しながら説明する。

[0011] 図1は、この実施の形態に係る検出装置の全体構成を示したものである。図示の検出装置は、励起光照射系(以下、単に「励起系」と称する。)10と、測定系(測定装置)20と、試料収容部40とを備える。そして、この試料収容部40に後述の試料が収容される。

[0012] 前記励起系10は、前記試料収容部40の所定位置に収容される試料に励起光を照射するためのものであり、励起光源12と、分光機構14と、変調機構16と、ダイクロイックミラー17と、集光レンズ18とを備える。

[0013] 前記励起光源12としては、例えば白色光を出力するキセノンランプや紫外光を出力する水銀ランプが好適である。この励起光源12から発せられる光は、前記分光機構14で分光され、前記変調機構16で周期的に変調される。これにより、測定に好適な励起光 $L_e$ となる。

[0014] 前記ダイクロイックミラー17は、前記測定系20と前記試料収容部40との間に位置し、後述のように前記測定系20から送られてくる測定光はそのまま透過させる一方、前

記励起光源12から送られてくる励起光Leを90° 反射させて前記測定光と同軸で前記試料収容部40側に導く。前記集光レンズ18は、前記ダイクロイックミラー17で反射した後の励起光Leを特定領域内に集光して前記試料収容部40に収容された試料に照射する。この励起光を前記試料が吸収して発熱することにより、その温度変化分だけ当該試料の屈折率が変化する。

- [0015] 前記測定系20は、前記試料の屈折率を測定するための測定光L2を当該試料に照射し、かつ、その測定光の位相変化によって前記屈折率を測定するためのものである。この実施の形態にかかる測定系20は、測定光源22、必要な光学系、光検出器36及び信号処理装置38を備える。前記光学系は、複数の偏光ビームスプリッタ24, 28, 30、複数の音響光学変調器25A, 25B、複数のミラー26A, 26B, 34、複数の1/4波長板23, 32, 33、及び偏光板35を含む。
- [0016] 前記測定光源22は、例えば出力1mWのHe-Neレーザ発生器からなる。前記光学系のλ/2波長板23は、前記測定光源22から照射される光の偏光面を調節する。前記偏光ビームスプリッタ24は、前記偏光面が調節された後の光を互いに直交する2つの偏光、すなわち、参照光L1と測定光L2とに分光する。
- [0017] 前記参照光L1は、前記音響光学変調器25Aに入力され、この音響光学変調器25Aが前記参照光L1の光周波数のシフト(周波数変換)を行う。この参照光L1は前記ミラー26Aで反射されて偏光ビームスプリッタ28に入力される。一方、前記測定光L2は、前記音響光学変調器25Bに入力され、この音響光学変調器25Bが前記測定光L2の光周波数のシフト(周波数変換)を行う。この測定光L2はミラー26Bで反射されて前記偏光ビームスプリッタ28に入力され、この偏光ビームスプリッタ28で前記参照光L1と合成される。
- [0018] 前記参照光L1は、前記偏向ビームスプリッタ30をそのまま透過してミラー34で180° 反射されることにより前記偏光ビームスプリッタ30に戻る。この偏光ビームスプリッタ30と前記ミラー34との間に前記1/4波長板33が介在するために、前記参照光L1は、前記1/4波長板33を往復で通過し、これによって当該参照光L1の偏光面が90° 回転する。従って、前記偏光ビームスプリッタ30に戻った参照光L1は前記試料収容部40と反対の側に90° 反射され、これにより、前記偏光板35を通じて前記光

検出器36に入力される。

[0019] 一方、前記測定光L2は、前記偏光ビームスプリッタ30で前記試料収容部40側に90° 反射され、前記1/4波長板32、前記励起系10のダイクロイックミラー17、及び前記集光レンズ18を通じて試料収容部40へ導かれる。この測定光L2は、後述のように試料に入射され、さらに180° 反射して、前記1/4波長板32を通じて前記偏光ビームスプリッタ30に戻る。その際、この測定光L2が前記1/4波長板32を往復透過することにより当該測定光L2の偏光面が90° 回転する。従って、この測定光L2は前記偏光ビームスプリッタ30をそのまま透過して前記参照光L1と合流し、前記偏光板35および前記光検出器36へ向かう。前記偏光板35は、前記参照光L1と前記測定光L2とを互いに干渉させ、その干渉光の光強度を前記光検出器36が電気信号(測定信号)に変換する。

[0020] 前記信号処理装置38は、前記測定信号を特定のサンプリング周期においてサンプリングし、その測定信号に基づいて前記測定光L2(測定光)の位相変化を演算する。さらに、この信号処理装置38は、前記位相変化の時間的変化に関するデータを作成し、かつ、後述のように、当該データに基づいて前記試料S内における相互作用の有無を自動的に判断する。

[0021] ここで、前記干渉光強度S1は、次の(1)式で表される。

$$[0022] \quad S1 = C1 + C2 \cdot \cos(2\pi \cdot fb \cdot t + \phi) \cdots (1)$$

同式において、C1、C2は前記偏光ビームスプリッタ等の光学系や試料Sの透過率により定まる定数、 $\phi$ は前記参照光L1と前記測定光L2の光路長差による位相差、fbは前記参照光L1と前記測定光L2の周波数差である。この(1)式は、前記干渉光強度S1の変化(前記励起光を照射しない或いはその光強度が小さいときの干渉光の強度と当該励起光の光強度が大きいときの干渉光の強度との差)から、前記位相差 $\phi$ の変化が求まることを示している。前記信号処理装置38は、(1)式に基づいて前記位相差 $\phi$ の変化を算出する。

[0023] 前記励起光Leの強度が例えばチョッパの回転により周波数fで周期的に変調されていると、試料Sの屈折率も前記周波数fで変化し、測定光L2の光路長も前記周波数fで変化し(参照光L1の光路長は一定)、前記位相差 $\phi$ も周波数fで変化する。従

って、前記位相差 $\phi$ の変化を前記周波数 $f$ の成分(前記励起信号の強度変調周期と同周期成分)について測定(算出)すれば、周波数 $f$ の成分を有しないノイズの影響を除去しつつ試料 $S$ の屈折率変化のみを測定することが可能である。このような測定は、前記位相差 $\phi$ の測定の $S/N$ 比を向上させる。

- [0024] また、前記励起光源12にレーザダイオードやLEDなどが用いられる場合、その励起光源12の電源を電気回路でコントロールすることにより前記変調を行うことも可能である。
- [0025] 前記試料収容部40は、図2に示すように、基台41と、試料収容器であるマイクロアレイ42と、移送手段であるマニピュレータ44とを備え、前記基台41上には、自動分注装置46、ヒータ47、及びミラー48が設置される。
- [0026] 前記マイクロアレイ42は、前記自動分注装置46から分注される試料を収容するためのものであり、図2～図4に示すような平坦な基板により構成される。このマイクロアレイ42の上面部には、縦横に並ぶ複数(図4(a)に示す例では $5 \times 5 = 25$ 個)の試料収容凹部42aが形成され、各試料収容凹部42a内に図4(b)に示すような試料 $S$ が分注される。本発明では試料収容器の具体的な材質を問わないが、この実施の形態に係るマイクロアレイ42は、前記励起光 $L_1$ 及び測定光 $L_2$ を透過させる材質を有する必要がある。その材質としては、例えば合成石英、石英、PDMSが好適である。
- [0027] 前記マニピュレータ44は、前記マイクロアレイ42の外形に対応する形状の窓44aを有し、この窓44a内に前記マイクロアレイ42が嵌まり込んだ状態で同アレイ42を保持する。換言すれば、このマイクロアレイ42を上下に開放した状態で同アレイ42を四方外側から保持する。
- [0028] 前記自動分注装置46は、前記基台41上に立設され、前記試料 $S$ を適量(すなわち前記各試料収容凹部42aを満たす量)だけ滴下する。
- [0029] 前記ミラー48は、前記自動分注装置46から水平方向に離れた位置で前記基台41上に設置され、前記測定系20から下向きに導入される測定光 $L_2$ を上向きに $180^\circ$ 反射させる。
- [0030] 前記ヒータ47は、本発明に係る温度調節機構を構成するもので、前記ミラー48のすぐ上に配設され、このヒータ47上に移送されるマイクロアレイ42を所定温度まで加



熱する。この加熱温度は、前記試料Sにおける核酸と蛋白質との相互作用を促進させる温度(反応温度)に設定される。このヒータ47には、前記励起光Le及び前記測定光L2が照射される位置に切欠部47aが形成され、この切欠部47aは前記ミラー48を上方に開放する。本発明に係る温度調節機構は、前記ヒータ47に限らない。逆に試料の温度を低下させる冷却器も当該温度調節機構に含まれ得る。

- [0031] 前記マニピュレータ44は、前記自動分注装置46による分注位置、前記ヒータ47上の加熱位置、及び前記ミラー48上の励起光Le及び測定光L2の照射位置の順に前記マイクロアレイ42を搬送する。
- [0032] 次に、この検出装置の作用を説明する。
- [0033] 前記試料収容部40では、マイクロアレイ42を保持するマニピュレータ44が同アレイ42を分注位置に移送する。詳しくは、前記マイクロアレイ42の各試料収容凹部42aを順に前記自動分注装置46の直下の分注位置に移動させるように同アレイ42を走査する。前記分注位置で、前記自動分注装置46から各試料収容凹部42a内に試料Sが分注される。
- [0034] 全ての試料収容凹部42aへの試料Sの分注が完了した後、前記マニピュレータ44は前記マイクロアレイ42を前記ヒータ47上の加熱位置へ移送する。この加熱位置は、前記マイクロアレイ42が前記ヒータ47に直接接触する位置であってもよいし、当該ヒータ47から若干離間する位置であってもよい。前記マニピュレータ44は、前記加熱位置に前記マイクロアレイ42を所定時間保持し、これにより各試料収容凹部42a内の試料Sにおける反応(核酸と蛋白質との相互作用)を促進させる。
- [0035] その後、前記マニピュレータ44は、前記マイクロアレイ42を図4(b)に示すような前記励起光Le及び前記測定光L2の照射位置(前記ヒータ47の切欠部47aに対応する位置であって前記ミラー48の直上位置)へ移送する。そして、前記マイクロアレイ42の各試料収容凹部42a内の試料Sに対して順に前記励起光Le及び前記測定光L2が照射されるように、前記マイクロアレイ42を走査する。
- [0036] この照射位置では、前記励起系10から前記試料収容部40に導かれる励起光Leが前記試料Sに入射され、この試料Sを透過する。このとき、試料Sが前記励起光Leを吸収して発熱する(光熱効果)。一方、前記測定系20から試料収容部40に導入さ

れる測定光L2は、前記励起光Leと同軸で前記各試料収容凹部42aに入射され、その凹部42a内の試料Sを透過する。さらに、この測定光L2はミラー48で上向きに反射して前記試料Sをさらに透過する。このとき、前記光熱効果による発熱の量に応じて前記試料Sでの屈折率が変わり、該屈折率に応じて前記位相差 $\phi$ が変わるので、当該発熱の量に応じて前記測定系20に戻る測定光L2とこの測定系20における前記参照光L1との干渉光強度が変わる。この干渉光強度に対応する測定信号が前記測定系20の光検出器36により生成され、信号処理装置38に入力される。

[0037] この信号処理装置38は、前記測定信号を所定のサンプリング周期で取り込み、この測定信号の時間変化を示すデータ、例えば図5に示すように経過時間と信号強度との関係を示すグラフを作成する。前記試料S中で核酸と蛋白質との相互作用が生じていない場合は、時間経過とともに前記信号強度が低下していくのに対し、前記相互作用が生じている場合時間経過にかかわらず信号強度がほぼ一定値を維持する。このような特性を利用するため、前記信号処理装置38は、前記信号強度の時間減衰率を求め、その時間減衰率が一定以下の場合に前記相互作用が存在していると判断する。

[0038] 前記時間減衰率は、前記グラフに基づいて測定者により判定されることも可能であるが、この実施の形態では前記信号処理装置38が自動的に前記時間減衰率を演算して前記相互作用の有無を判定する。例えば、前記信号処理装置38がサンプリング周期毎に取り込んだ信号強度に基づいて当該信号強度の時間変化を表す直線近似式を演算し、その直線の傾きが一定以下の場合に前記相互作用が生じていると判断することが可能である。また、前記直線近似式からの各サンプリング信号のばらつきが過度に大きい場合に測定不良との判断がされてもよい。

[0039] 以上示した方法及び装置では、前記試料Sにおける核酸及び蛋白質の標識や、金属薄膜への前記試料Sの固着を行うことなく、当該試料Sにおける核酸-蛋白質相互作用の有無を検出することが可能である。

[0040] 次に、第2の実施の形態を図6及び図7を参照しながら説明する。なお、装置全体の構成は前記図1に示したものと同等であるので、ここでは省略される。

[0041] この第2の実施の形態では、前記第1の実施の形態のように試料収容器であるマイ

クロアレイ42そのものを移送する手段に代え、図6に示されるように試料を特定方向に流すための流路60をもったマイクロアクタ50が使用される。すなわち、このマイクロアクタ50は、試料収容器としての役割と、試料を移送方向に案内する手段としての役割を兼ねる。

- [0042] このマイクロアクタ50は、下側基板52と、その上に重ねられる上側基板54とを備える。これらの基板52, 54は、前記マイクロアレイ42と同様に前記励起光Le及び前記測定光L2を透過する材料により形成される。
- [0043] 前記流路60は、前記下側基板52の上面部に形成された溝により構成される。この下側基板52の上に前記上側基板54が載せられて接合される。これにより前記流路60が封止される。
- [0044] この流路60は、その上流側から順に、核酸供給部61N及び蛋白質供給部61Pと、各供給部61N, 61Pの下流側の供給流路62N, 62Pと、これらの供給流路62N, 62Pが合流する合流流路64と、合流して混合された核酸と蛋白質とを反応させるための反応部65と、前記励起光Le及び前記測定光L2が基板厚み方向に照射される光照射部66と、試料排出部68とを有する。
- [0045] 前記核酸供給部61N及び蛋白質供給部61Pには、試料を構成する核酸、蛋白質がそれぞれ供給される。これら供給部61N, 61Pに対応して前記上側基板54に同基板54を厚み方向に貫通する供給孔57が形成されている。同様に、前記試料排出部68に対応して前記上側基板54に排出孔58が形成されている。前記供給孔57には、それぞれ、試料移送手段としての核酸供給用シリンジ及び蛋白質供給用シリンジが接続される。これらのシリンジは、前記供給孔57を通じて前記核酸供給部61N及び蛋白質供給部61Pにそれぞれ核酸及び蛋白質を供給する。
- [0046] 前記上側基板54には、前記反応部65の上方に位置するようにヒータ56が組み込まれている。このヒータ56は、前記核酸と蛋白質とが混合された試料をその反応温度まで加熱する。また、この加熱時間すなわち反応時間を十分に確保するために(例えば10分)、前記反応部65が蛇行してその流路長を稼いでいる。
- [0047] 前記光照射部66は、直線状をなし、その長手方向(すなわち試料の流れ方向)に並ぶ複数の位置(図例では3つの位置A, B, C)に前記励起光Le及び前記測定光L

2の照射位置が設定されている。そして、これらの照射位置に対して順に前記励起光Le及び前記測定光L2が照射されるように、当該光Le, L2の照射位置またはマイクロアクタ50が動かされる。

[0048] 前記下側基板52の底面には、前記測定光L2を180° 反射させるための反射膜(例えば誘電多層膜)がコーティングされている。この反射膜は、前記測定光L2の反射によって当該測定光L2に前記試料S内を往復させる。

[0049] なお、前記流路60の寸法は適宜設定可能であるが、一般には幅200 μ m程度、深さ100 μ m程度が好適である。試料は比較的ゆっくりとした速度で送液されることが好ましく、その速度は例えば0.5mm/sec程度が好適である。

[0050] このマイクロアクタ50では、前記核酸及び蛋白質の供給、混合、反応、及びその光熱効果の測定が全て行われる。従って、コンパクトな構成で核酸-蛋白質相互作用の検出を効率よく行うことが可能である。

[0051] この第2の実施の形態での信号処理は例えば次のようにして行われる。

[0052] 前記試料中で核酸と蛋白質との相互作用が生じていない場合、前記励起光Leの照射による光熱効果は時間経過とともに減衰していくため、測定開始位置である位置Aからその下流側の位置Bさらには位置Cに向かうに従って検出信号の強度は低下していく。しかしながら、前記試料中に前記相互作用が生じた部分が存在している場合、その部分については光熱効果の減衰がほとんどないため、当該部分が位置B及び位置Cを通過した時に信号強度が一時的に高くなる。すなわち、その信号強度の時間変化は例えば図7(a)のようになる。ただし、各位置A~Cでの検出信号には時間的なずれがあるので、そのずれ分を補正して各位置A~Cでの検出信号を同図(b)に示すように重ね合わせると、前記相互作用が生じた部分(同図D)においてのみ信号強度が著しく高くなる。従って、この局所的に信号強度が高い部分で相互作用が生じていることを把握することが可能である。

[0053] 前記信号処理装置38は、前記図7(b)に示されるような重ね合わせデータの出力に加え、その重ね合わせデータでのピーク値の大小から相互作用の有無を自動的に判定する。なお、この第2の実施の形態においても、前記第1の実施の形態と同様に励起光Le及び測定光L2の照射位置が単一の位置にのみ設定され、その時間変

化が監視されてもよい。あるいは、前記光照射部66での試料の流れ速度と同等の速度で前記励起光Le及び測定光L2の照射位置が追従してもよい。

- [0054] 本発明において、前記励起光による試料の光熱効果を測定する方法は前記のような光干渉法に限られない。例えば、熱レンズ法のように、溶媒の屈折率の変化に伴う測定光の強度変化を測定する方法も利用可能である。

### 実施例

- [0055] 前記図1～図4に示す装置により核酸-蛋白質相互作用の検出が行われる。図4(a)(b)に示されるマイクロアレイ42には合成石英製のものが用いられ、その各試料収容凹部42aの形状は0.5mm×0.5mm×1.0mmの直方体である(ただし、この形状は例えば直径0.5mmの円柱でもよい。)。前記各試料収容凹部42aに、蛋白質トロンビンとこのトロンビンに特異的に反応する核酸であるアプタマー(DNAまたはRNAからなる機能性高分子)の混合溶液からなる試料が分注される。その比率は、トロンビンの最終濃度が70nM、アプタマーの最終濃度が175nMとなる比率である。
- [0056] 分注後、前記試料がヒータ47により37°Cまで加熱され、そのまま15分間保持される。その後、当該試料が励起光Le及び測定光L2の照射位置にセットされ、当該試料内での光熱効果が測定される。励起光Leの光源12には高圧水銀ランプが用いられ、その波長250nm付近の発光極大域がバンドパスフィルタで取り出されてオプティカルチョッパーで80Hz程度に変調される。この励起光Leは直径5mmの領域に集光されて前記試料に照射される。さらに、この励起光Leと同軸で測定光L2が試料に照射され、この測定光L2と参照光L1との干渉光の強度が測定される。この測定信号が信号処理装置38において電圧値として表示され、さらにデータロガーにより連続的に記録される。
- [0057] この測定の結果を図8に示す。同図破線71に示されるように、試料がアプタマーのみの場合は、前記測定信号の強度が立上ってから徐々に低下していく。また、同図一点鎖線72に示されるように、試料がトロンビンのみの場合は信号強度の立上りすらない。これに対し、試料がアプタマーとトロンビンの混合溶液である場合は、同図実線70に示されるように、信号強度が立ち上がってからその低下がほとんど見られない。これらの結果は、前記測定信号の立上り後の低下速度を比較することにより、アプ

タマーとトロンビンとの相互作用の存在を判定することが可能であることを意味する。具体的には、アプタマーと混合されるトロンビンの存在を40nM程度まで検出できることが確認されている。

- [0058] 以上のように、本発明は、試料中での核酸と蛋白質との相互作用の発生の有無を検出するための方法及び装置を提供する。前記方法は、前記試料に対して励起光を照射するステップと、前記励起光の照射により前記試料内に生ずる光熱効果を測定するステップと、前記光熱効果の時間変化に基づいて核酸と蛋白質相互作用の発生の有無を判断するステップとを含む。また、前記装置は、前記試料を収容する試料収容部と、前記試料収容部に収容された試料に対して励起光を照射する励起光照射系と、前記励起光の照射により前記試料内に生ずる光熱効果の測定信号を生成する測定装置とを含み、この測定装置は、前記測定信号の時間変化に関するデータを作成し、その作成したデータに基づいて前記相互作用の有無を判断する信号処理装置を含む。
- [0059] 前記方法及び装置では、前記試料に励起光が照射されたときの光熱効果の測定と、その測定した光熱効果の時間変化の監視とが、前記試料中での核酸と蛋白質の相互作用の発生の有無を的確に判断することを可能にする。これにより、試料中の核酸及び蛋白質の標識や金属薄膜への試料の固着を要することなく、前記相互作用の有無を容易にかつ高感度で検出することが可能となる。さらに、前記検出装置では、前記信号処理装置が前記相互作用の有無の判断に有用なデータを作成してそのデータに基づいて相互作用の有無を自動的に判断する。
- [0060] 前記検出方法は、例えば、DNAまたはRNAからなる機能性高分子（いわゆるアプタマー）と、そのリガンド蛋白質との相互作用の有無を検出するのに好適である。
- [0061] 前記検出方法において前記光熱効果を測定するステップとしては、前記試料に前記励起光とは別の測定光を透過させてこの透過した測定光の位相変化を測定する操作を含むものが、好適である。同様に、前記検出装置における測定装置は、前記試料に前記励起光とは別の測定光を透過させてこの透過した測定光の位相変化を測定するものが、好適である。前記試料が光熱効果により発熱すると、当該試料での光の屈折率が変化するので、この試料に測定光を透過させてその位相変化を測定

することが、前記試料の光熱効果を容易にかつ的確に把握することを可能にする。

[0062] この場合、前記測定装置は、測定用光源と、この測定用光源から発せられる測定光を前記試料収容部に収容された試料に透過させ、この透過した測定光と参照光とを干渉させる光学系と、その干渉した光の強度を検出する光検出器とを含むことが、より好ましい。この測定装置は、前記測定光と参照光とを干渉させてその干渉光の強度を検出するだけの簡単な構成で、前記試料を透過する測定光の位相変化を容易に計測することを可能にする。

[0063] 前記試料収容部は、前記試料を収容する試料収容器と、この試料収容器内の試料を前記核酸と蛋白質の反応温度に調節する温度調節機構と、その加熱された試料を前記励起光の照射位置まで移送する移送手段とを含むものが、好ましい。この試料収容部では、前記試料収容器内で前記試料中における核酸と蛋白質との反応(相互作用)が行われ、しかも、その容器内での反応後の試料に対してそのまま当該励起光を照射することが可能である。

[0064] 前記移送手段としては、前記試料収容器を、この試料収容器内に前記試料を注入するための注入位置と、その注入された試料の温度を前記温度調節機構により調節するための温度調節位置と、前記励起光の照射位置の順に移送するものが、好適である。

[0065] 前記試料収容器は、前記試料を流すための流路を有し、この流路は、その上流側から順に、前記核酸及び前記蛋白質がそれぞれ導入される導入部と、その導入された核酸と蛋白質とを合流させて混合する混合部と、その混合液の温度を前記温度調節機構により調節して前記反応を行わせるための反応部と、前記励起光が照射される励起光照射部とを有してもよい。この試料収容器は、試料収容部内で前記試料の移送を行うことを可能にする。

[0066] また、前記励起光照射部が、その試料の流れ方向に並ぶ複数の位置に前記励起光が照射されるものであれば、その各位置で光熱効果を測定することによって、当該光熱効果の時間変化を適正に検出することができる。

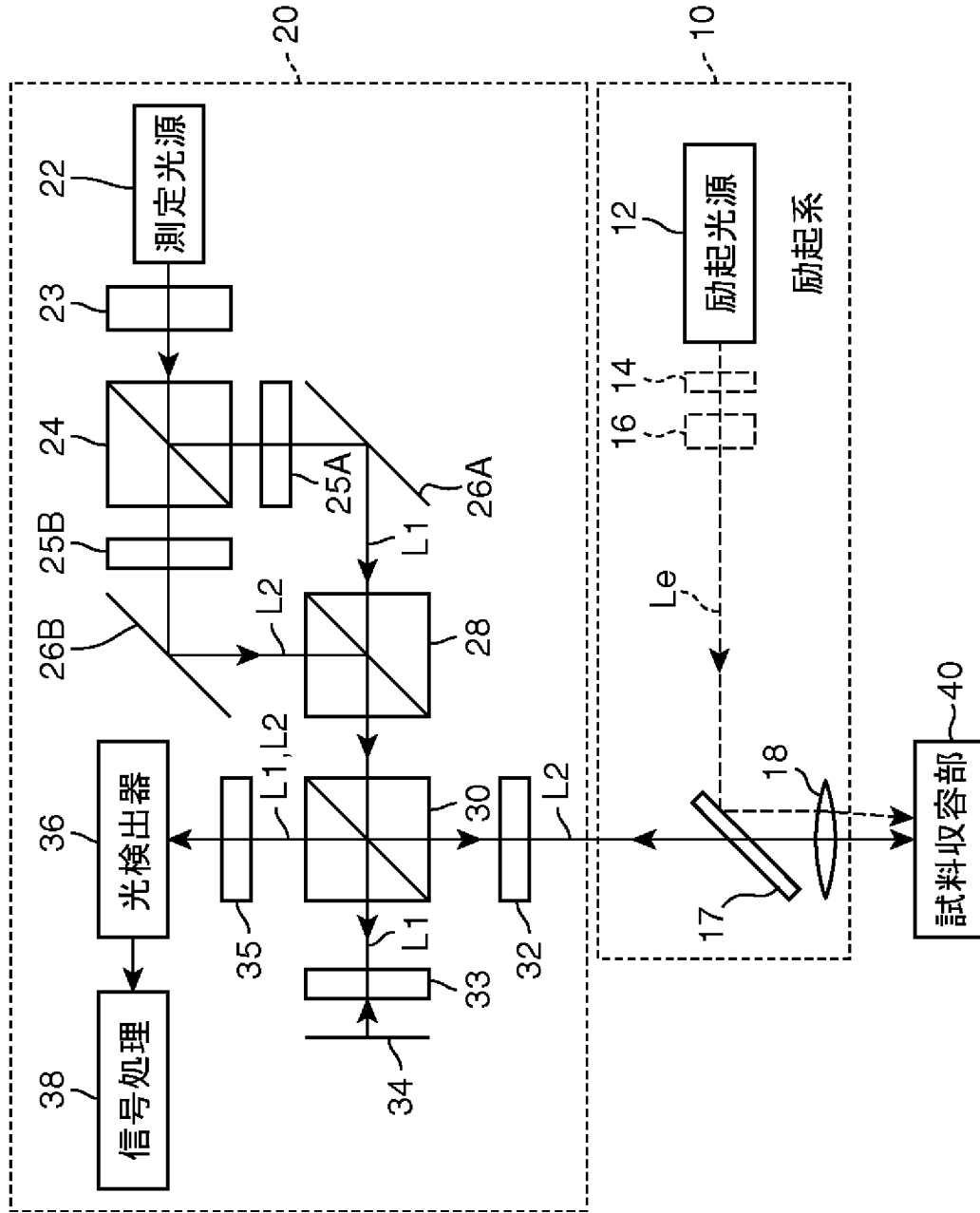
## 請求の範囲

- [1] 試料中での核酸と蛋白質との相互作用の発生の有無を検出するための方法であつて、  
前記試料に対して励起光を照射するステップと、  
前記励起光の照射により前記試料内に生ずる光熱効果を測定するステップと、  
前記光熱効果の時間変化に基づいて核酸と蛋白質相互作用の発生の有無を判断するステップとを含む。
- [2] 請求項1記載の核酸と蛋白質の相互作用の検出方法であつて、  
DNAまたはRNAからなる機能性高分子とそのリガンド蛋白質との相互作用の有無を検出する。
- [3] 請求項1または2記載の核酸と蛋白質の相互作用の検出方法において、  
前記光熱効果を測定するステップは、前記試料に前記励起光とは別の測定光を透過させてこの透過した測定光の位相変化を測定する操作を含む。
- [4] 試料中での核酸と蛋白質との相互作用の発生の有無を検出するための装置であつて、  
前記試料を収容する試料収容部と、  
前記試料収容部に収容された試料に対して励起光を照射する励起光照射系と、  
前記励起光の照射により前記試料内に生ずる光熱効果の測定信号を生成する測定装置と、を含み、  
前記測定装置は、前記測定信号の時間変化に関するデータを作成し、その作成したデータに基づいて前記相互作用の有無を判断する信号処理装置を含む。
- [5] 請求項4記載の核酸と蛋白質の相互作用の検出装置において、  
前記測定装置は、前記試料に前記励起光とは別の測定光を透過させてこの透過した測定光の位相変化を測定する。
- [6] 請求項5記載の核酸と蛋白質の相互作用の検出装置において、  
前記測定装置は、測定用光源と、この測定用光源から発せられる測定光を前記試料収容部に収容された試料に透過させ、この透過した測定光と参照光とを干渉させる光学系と、その干渉した光の強度を検出する光検出器とを含む。

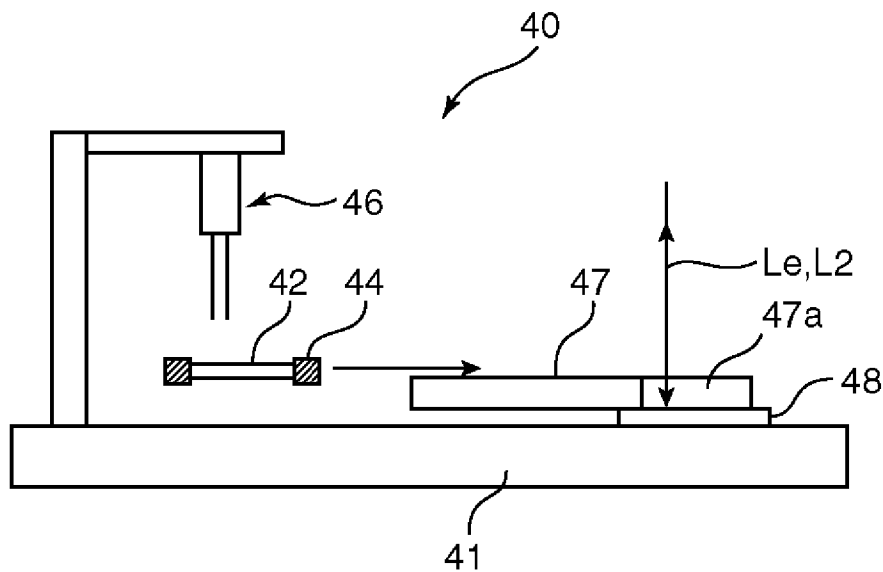


- [7] 請求項4～6のいずれかに記載の核酸と蛋白質の相互作用の検出装置において、前記試料収容部は、前記試料を収容する試料収容器と、この試料収容器内の試料を前記核酸と蛋白質の反応温度に調節する温度調節機構と、その加熱された試料を前記励起光の照射位置まで移送する移送手段とを含む。
- [8] 請求項7記載の核酸と蛋白質の相互作用の検出装置において、前記移送手段は、前記試料収容器を、この試料収容器内に前記試料を注入するための注入位置と、その注入された試料の温度を前記温度調節機構により調節するための温度調節位置と、前記試料に前記励起光を照射するための照射位置の順に移送する。
- [9] 請求項7記載の核酸と蛋白質の相互作用の検出装置において、前記試料収容器は、前記試料を流すための流路を有し、この流路は、その上流側から順に、前記核酸及び前記蛋白質がそれぞれ導入される導入部と、その導入された核酸と蛋白質とを合流させて混合する混合部と、その混合液の温度を前記温度調節機構により調節して前記反応を行わせるための反応部と、前記励起光が照射される励起光照射部とを有する。

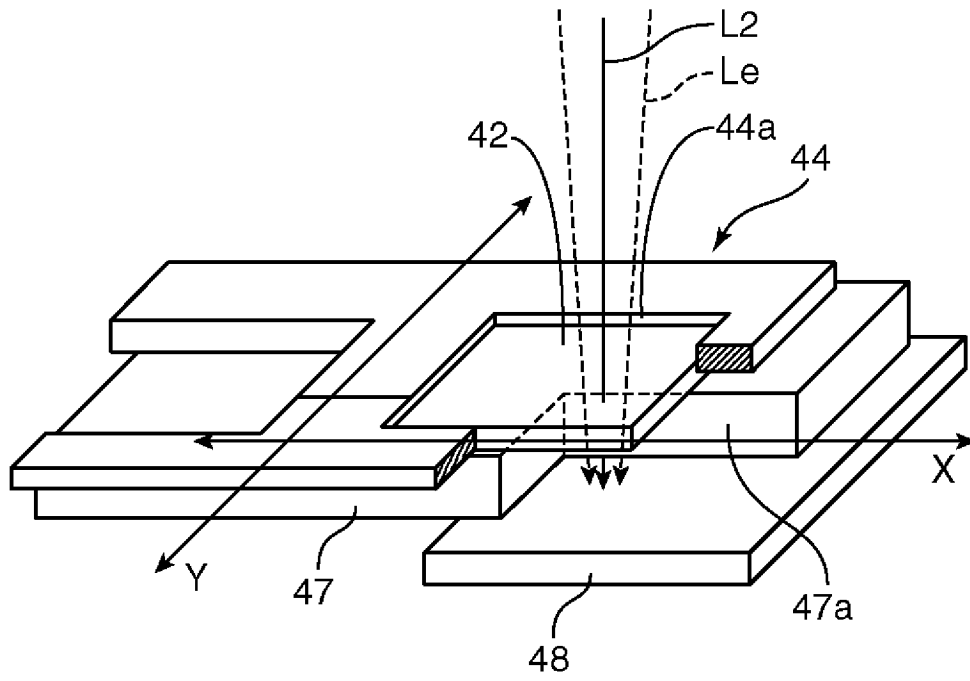
[図1]



[図2]

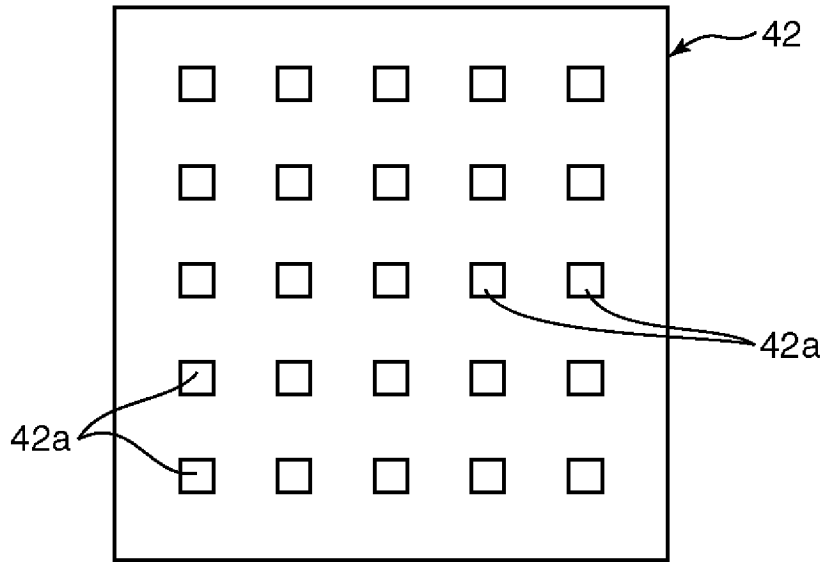


[図3]

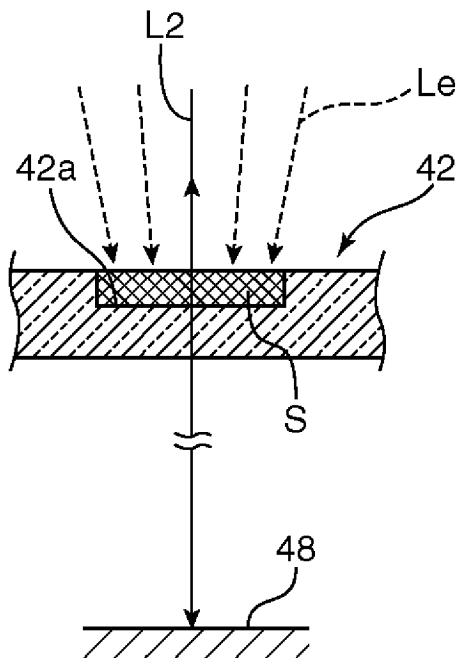


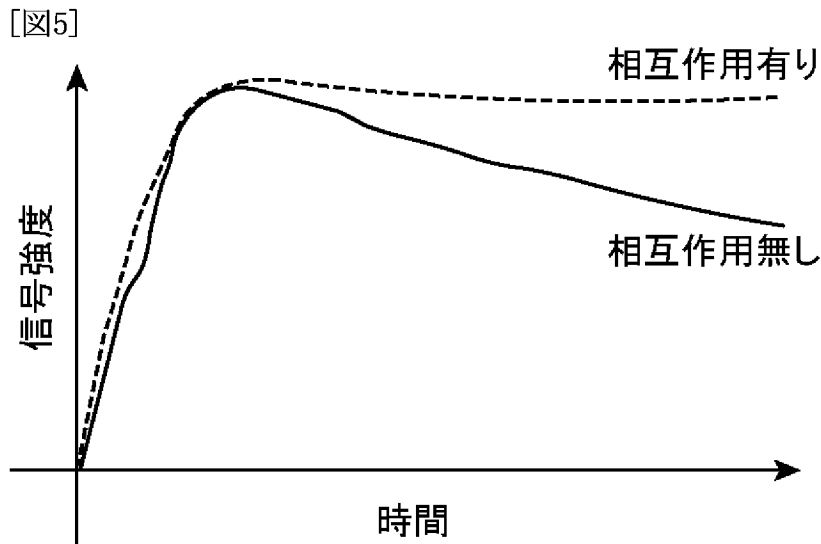
[図4]

(a)



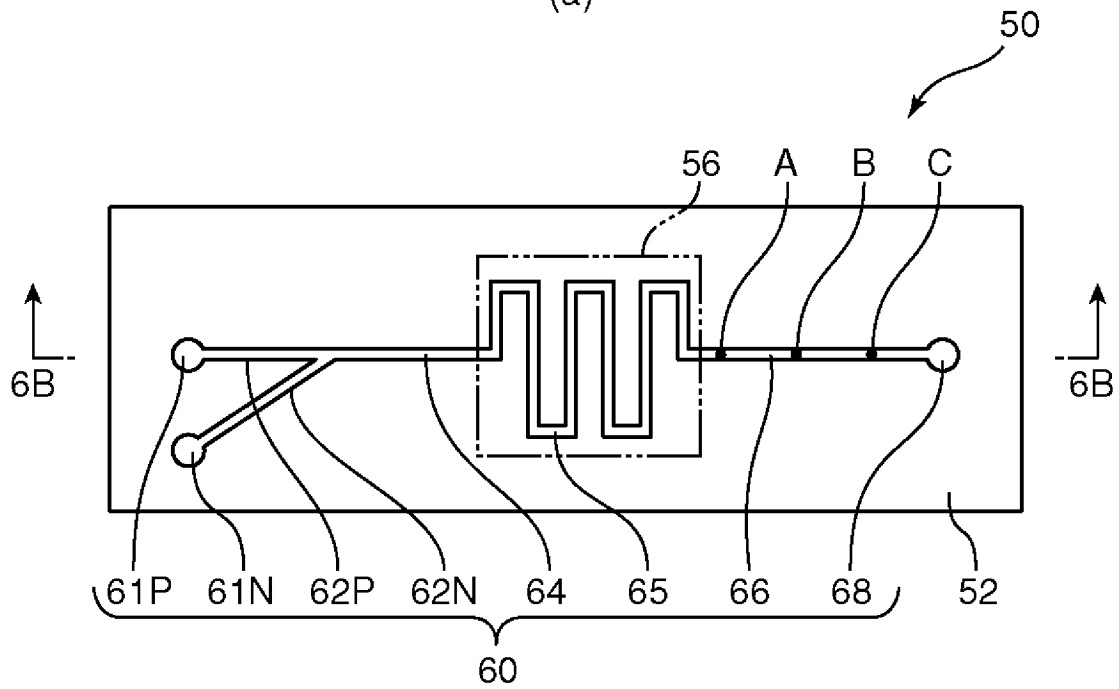
(b)



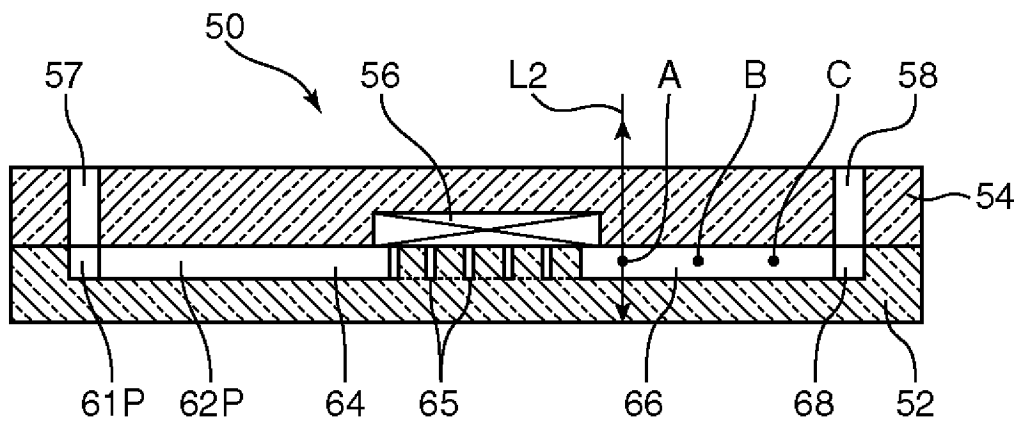


[図6]

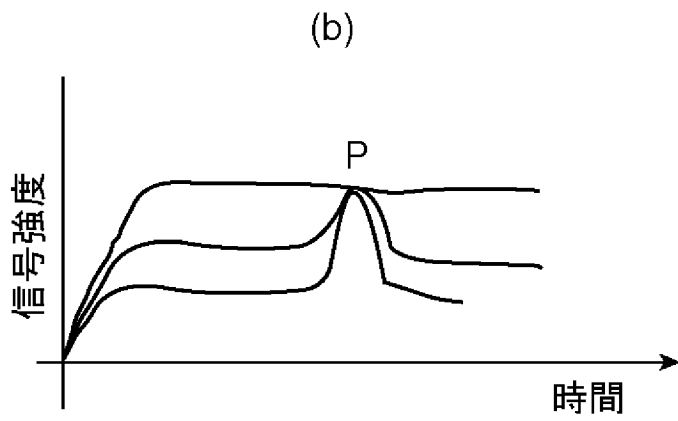
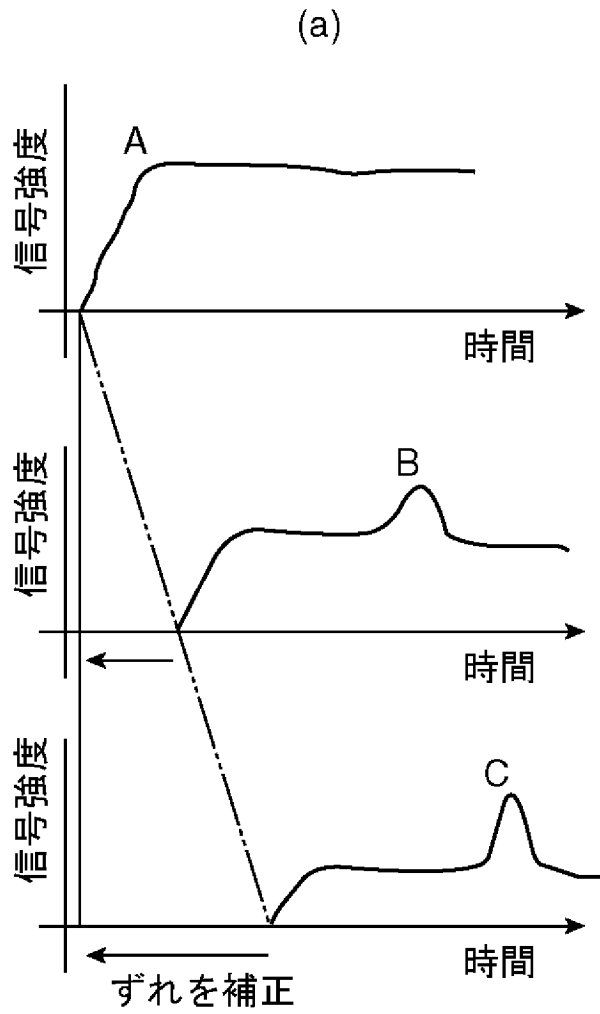
(a)



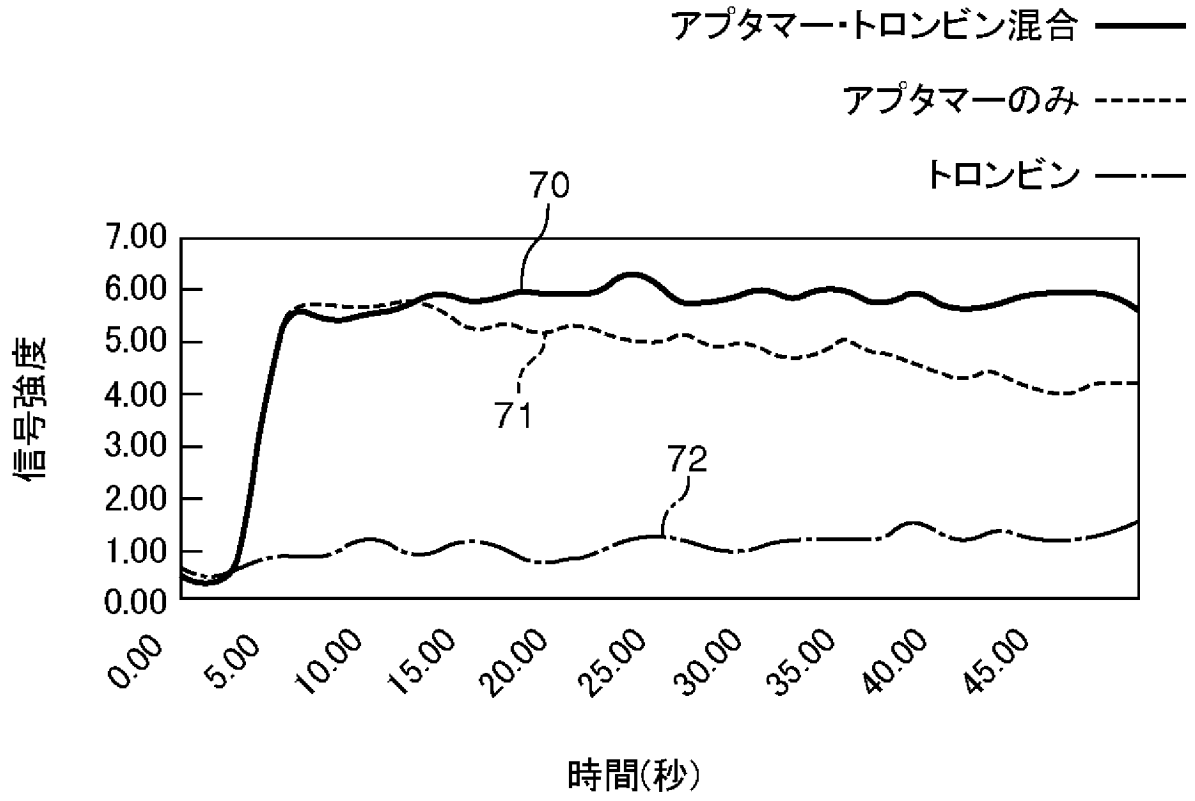
(b)



[図7]



[図8]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2007/062053

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

G01N25/16(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N21/05(2006.01)i, G01N21/45(2006.01)i, G01N21/75(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/566(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N25/16, C12M1/00, C12M1/34, C12Q1/68, G01N21/05, G01N21/45, G01N21/75, G01N33/53, G01N33/566

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2007
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2007	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2007

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

JSTPlus (JDream2)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2003-510600 A (Commissariat a L'Energie Atomique), 18 March, 2003 (18.03.03), Full text; all drawings & US 6884582 B1 & EP 1216411 A1 & WO 2001/023867 A1	1-9
A	WO 2001/06243 A1 (Asahi Kasei Corp.), 25 January, 2001 (25.01.01), Full text; all drawings & EP 1211505 A1	1-9

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
15 August, 2007 (15.08.07)

Date of mailing of the international search report  
28 August, 2007 (28.08.07)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/062053

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Ryo MAWATARI et al., "Laser Kansho Konetsu Henkanho ni yoru Kokando Shigai Kyuko Bunseki no Seitai Bunshi eno Oyo", 28th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Koen Yoshishu, 25 November, 2005 (25.11.05), page 560	1-9
A	WO 2002/090912 A1 (Kanagawa Academy of Science and Technology), 14 November, 2002 (14.11.02), Full text; all drawings (Family: none)	1-9
A	JP 2005-110529 A (Kanagawa Academy of Science and Technology), 28 April, 2005 (28.04.05), Full text; all drawings (Family: none)	1-9

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. G01N25/16(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N21/05(2006.01)i, G01N21/45(2006.01)i, G01N21/75(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/566(2006.01)i</p>			
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. G01N25/16, C12M1/00, C12M1/34, C12Q1/68, G01N21/05, G01N21/45, G01N21/75, G01N33/53, G01N33/566</p>			
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <p>日本国実用新案公報 1922-1996年                  日本国公開実用新案公報 1971-2007年                  日本国実用新案登録公報 1996-2007年                  日本国登録実用新案公報 1994-2007年</p>			
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>JSTPlus(JDream2)</p>			
<p>C. 関連すると認められる文献</p>			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
A	JP 2003-510600 A (コミツサリア タ レネルジー アトミック) 2003.03.18, 全文、全図 & US 6884582 B1 & EP 1216411 A1 & WO 2001/023867 A1	1-9	
A	WO 2001/06243 A1 (旭化成株式会社) 2001.01.25, 全文、 全図 & EP 1211505 A1	1-9	
A	馬渡 亮、他、レーザ干渉光熱変換法による高感度紫外吸光分析の 生体分子への応用, 第28回日本分子生物学会年会講演要旨集,	1-9	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>		<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&amp;」同一パテントファミリー文献</p>	
<p>国際調査を完了した日</p> <p>15.08.2007</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p>28.08.2007</p>	
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/J P)</p> <p>郵便番号100-8915</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>野田 洋平</p>	<p>2 J</p> <p>3 2 1 0</p>
		<p>電話番号 03-3581-1101 内線 3252</p>	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	2005. 11. 25, 第 5 6 0 頁	
A	WO 2002/090912 A1 (財団法人神奈川科学技術アカデミー) 2002. 11.14, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-9
A	JP 2005-110529 A (財団法人神奈川科学技術アカデミー) 2005. 04.28, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-9