(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2006 年3 月30 日 (30.03.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/033400 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) *C12Q 1/32* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/017501

(22) 国際出願日: 2005 年9 月22 日 (22.09.2005)

(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2004-275817 2004 年9 月22 日 (22.09.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): ダイキン工業株式会社 (DAIKIN INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒5308323 大阪府大阪市北区中崎西２丁目４番１２号 梅田センタービル Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 末 信一朗 (SUE, Shinichiro) [JP/JP]; 〒9188005 福井県福井市みのり三丁目１４番２８号 Fukui (JP). 片山 秀夫 (KATAYAMA, Hideo) [JP/JP]; 〒5258526 滋賀県草津市岡本町字大谷１０００番地の２ ダイキン工業株式会社滋賀製作所内 Shiga (JP).

(74) 代理人: 恩田 博宣 (ONDA, Hironori); 〒5008731 岐阜県岐阜市大宮町２丁目１２番地の１ Gifu (JP).

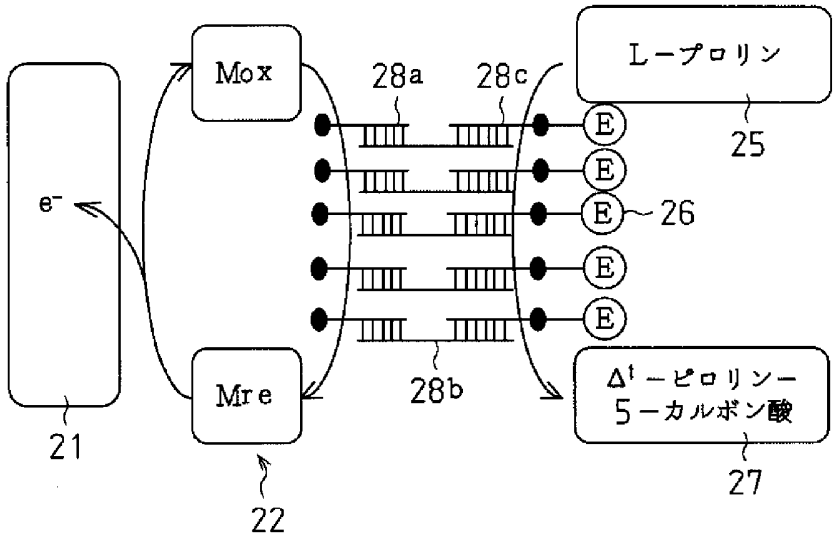
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI,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

(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, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,

[続葉有]

(54) Title: DNA DETECTION METHOD AND REPORTER PROBE

(54) 発明の名称: ＤＮＡ検出方法及びレポータプローブ



25 L-PROLINE

27 Δ^1-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE

(57) Abstract: An electrode where a capture probe (28a) is connected to the surface of a carbon electrode (21), a reporter probe (28c) labeled with an L-proline dehydrogenation enzyme (26), and an L-proline (25) serving as a substrate reactive with the L-proline dehydrogenation enzyme (26) are used. A target DNA (28b) is connected to the capture probe (28a) and the reporter probe (28c). By measuring the current value of the limiting oxidation current flowing through the carbon electrode (21) because of the reaction between the L-proline dehydrogenation enzyme (26) with which the reporter probe (28c) is labeled and the L-proline (25), the target DNA (28b) is detected.

[続葉有]

WO 2006/033400 A1

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, 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

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。

(57) 要約: カーボン電極２１の表面にキャプチャープローブ２８ａが結合してなる電極と、Ｌ－プロリン脱水素酵素２６により標識されたレポータプローブ２８ｃと、このＬ－プロリン脱水素酵素２６と反応する基質であるＬ－プロリン２５とを用いる。そして、キャプチャープローブ２８ａと、レポータプローブ２８ｃとにターゲットＤＮＡ２８ｂを結合させる。そして、レポータプローブ２８ｃに標識されたＬ－プロリン脱水素酵素２６とＬ－プロリン２５による反応によりカーボン電極２１に流れる限界酸化電流の電流値を測定することによりターゲットＤＮＡ２８ｂを検出する。

明 細 書

DNA検出方法及びレポータプローブ

技術分野

[0001] 本発明は、導電体表面にキャプチャープローブが結合してなる電極と、酵素が標識されたレポータプローブとを用いて、ターゲットDNAを結合させ、電流値を測定することによりターゲットDNAを検出するDNA検出方法及びレポータプローブに関する。

背景技術

[0002] 従来から、バッチ式のシステムにおいて、二種類の酸化還元酵素と補酵素とを組み合わせて、基質(例えば、生体内物質等)を高感度に定量する方法及び酵素活性を測定する方法が確立されている(例えば、非特許文献1参照。)。

[0003] この方法を用いてサンドイッチハイブリダイゼーションによりDNAの検出を行う場合は、レポータプローブに酵素を標識し、酵素反応に基づく電子の授受を測定する。この方法によれば、ハイブリダイゼーションをさせるためにターゲットDNAを一本鎖に変性させる必要があるが、ハイブリダイゼーションの効率を上げるためには、90℃以上の高温が必要となる。

[0004] 一方、超好熱菌であるサーモコッカス・プロファンダス(Thermococcus profundus)DSM9503に由来するL-プロリン脱水素酵素が精製され、このL-プロリン脱水素酵素の活性が示されている(例えば、非特許文献2参照。)。

非特許文献1:生化学実験講座、第5巻、酵素研究法(東京化学同人)p121-129

非特許文献2:ハルヒコ サクラバ(Haruhiko Sakuraba)、ヨシノリ タカマツ(Yoshinori Takamatsu)、タケノリ サトムラ(Takenori Satomura)、リュウシ カワカミ(Ryushi Kawakami)、トシヒサ オオシマ(Toshihisa Ohshima)著,「アプライド・アンド・エンヴァイラメンタル・マイクロバイオロジー(Applied and Environmental Microbiology)」,(米国),2001年,第67巻,p.1470-1475

発明の開示

[0005] 上記の方法を用いてDNAの検出を行う場合、従来から使用されている耐熱酵素は

90℃近くの高温では失活してしまうため、酵素により標識されたレポータプローブは、70℃程度まで反応液の温度を下げてから投入する必要があった。つまり、ハイブリッドダイゼーションの効率にかかわらず、酵素により標識されたレポータプローブは、酵素が失活しない温度までサンプル液の温度が下がってから投入しなければならなかった。

[0006] 本発明は、上記課題を解決するためになされたものであり、その目的は、より高感度かつ効率的にDNAを検出するためのDNA検出方法及びレポータプローブを提供することにある。

[0007] 本発明は、上記課題を解決するためになされたものであり、その目的は、より高感度かつ効率的にDNAを検出するためのDNA検出方法及びレポータプローブを提供することにある。

[0008] 本発明のDNA検出方法は、キャプチャープローブと、耐熱酵素により標識されたレポータプローブと、前記耐熱酵素と反応する基質とを用いて、前記キャプチャープローブと、前記レポータプローブとにターゲットDNAを結合させ、前記レポータプローブに標識された前記耐熱酵素と前記基質による反応により電気化学的に前記ターゲットDNAを検出する。これによれば、耐熱酵素により標識されたレポータプローブを、この耐熱酵素が活性を保つ温度である高温の反応液に投入することができる。従って、より高い温度でレポータプローブを反応液に投入できるため、ハイブリダイゼーションの効率が上がり、より高感度かつ効率的にターゲットDNAの検出を行うことができる。

[0009] このDNA検出方法において、前記キャプチャープローブを導電体表面に結合させて電極を構成し、前記キャプチャープローブと、前記レポータプローブとにターゲットDNAを結合させ、前記レポータプローブに標識された前記耐熱酵素と前記基質による反応により前記電極に流れる電流値を測定することにより前記ターゲットDNAを検出することができる。これによれば、前記キャプチャープローブを導電体表面に結合させて構成した電極と耐熱酵素により標識されたレポータプローブとを用いて、電極に流れる電流値を測定することにより、より高感度かつ効率的にターゲットDNAの検出を行うことができる。

[0010] このDNA検出方法において、前記耐熱酵素を、超好熱菌に由来する酵素とすることができる。これによれば、超好熱菌に由来する耐熱酵素により標識されたレポータプローブを、この超好熱菌に由来する耐熱酵素が活性を保つ温度である高温の反応液に投入することができる。従って、ハイブリダイゼーションの効率が上がり、より高感度かつ効率的にターゲットDNAの検出を行うことができる。

[0011] このDNA検出方法において、前記超好熱菌に由来する酵素は、Lープロリン脱水素酵素とすることができる。これによれば、超好熱菌に由来するLープロリン脱水素酵素により標識されたレポータプローブを、このLープロリン脱水素酵素が活性を保つ温度である高温の反応液に投入することができる。従って、ハイブリダイゼーションの効率が上がり、より高感度かつ効率的にターゲットDNAの検出を行うことができる。

[0012] このDNA検出方法において、前記Lープロリン脱水素酵素は、サーモコッカス・プロファンダス(Thermococcus profundus)、サーモコッカス・ペプトノフィラス(Thermococcus peptonophilus)、ピロコッカス・フリオサス(Pyrococcus furiosus)、及び、ピロコッカス・ホリコシOT－3(Pyrococcus horikoshi OT-3)からなる群から選ばれる生物に由来するとすることができる。これによれば、これらの各生物に由来するLープロリン脱水素酵素により標識されたレポータプローブを、このLープロリン脱水素酵素が活性を保つ温度で反応液に投入することができる。このため、ターゲットDNAを1本鎖DNAに変性させてから、高温の状態で、ターゲットDNAにレポータプローブを反応させることができる。従って、ハイブリダイゼーションの効率が上がり、より高感度かつ効率的にターゲットDNAの検出を行うことができる。

[0013] このDNA検出方法において、ターゲットDNAの変性のための熱処理時に、前記耐熱酵素により標識されたレポータプローブを、前記ターゲットDNAが含まれる溶液中に投入することができる。これによれば、電極に固定されたキャプチャープローブと耐熱酵素により標識されたレポータプローブとをハイブリダイゼーションのためのターゲットDNAの変性時にターゲットDNAと共存させることができる。これにより、ハイブリダイゼーションの効率が上がり、より高感度かつ効率的にターゲットDNAの検出を行うことができる。また、より簡易な操作で処理を行うことができる。

[0014] 本発明のレポータプローブは、キャプチャープローブに結合するターゲットDNAに

、さらに結合するレポータプローブであって、耐熱酵素により標識されており、前記耐熱酵素と基質による反応により電気化学的に前記ターゲットDNAを検出するために用いられる。これによれば、耐熱酵素により標識されたレポータプローブを、この耐熱酵素が活性を保つ温度である高温の反応液に投入することができる。従って、より高い温度でレポータプローブを反応液に投入できるため、ハイブリダイゼーションの効率が上がり、より高感度かつ効率的にターゲットDNAの検出を行うことができる。

[0015] このレポータプローブにおいて、前記レポータプローブは、導電体表面にキャプチャープローブが結合してなる電極の前記キャプチャープローブに結合するターゲットDNAに、さらに結合し、前記耐熱酵素と基質による反応により前記電極に流れる電流値を測定することにより前記ターゲットDNAを検出するために用いることができる。これによれば、前記キャプチャープローブを導電体表面に結合させて構成した電極と耐熱酵素により標識されたレポータプローブとを用いて、電極に流れる電流値を測定することにより、より高感度かつ効率的にターゲットDNAの検出を行うことができる。

[0016] このレポータプローブにおいて、前記耐熱酵素を、超好熱菌に由来する酵素とすることができる。これによれば、超好熱菌に由来する耐熱酵素により標識されたレポータプローブを、この超好熱菌に由来する耐熱酵素が活性を保つ温度である高温の反応液に投入することができる。従って、ハイブリダイゼーションの効率が上がり、より高感度かつ効率的にターゲットDNAの検出を行うことができる。

[0017] このレポータプローブにおいて、前記超好熱菌に由来する酵素は、Lープロリン脱水素酵素とすることができる。これによれば、超好熱菌に由来するLープロリン脱水素酵素により標識されたレポータプローブを、このLープロリン脱水素酵素が活性を保つ温度である高温の反応液に投入することができる。従って、ハイブリダイゼーションの効率が上がり、より高感度かつ効率的にターゲットDNAの検出を行うことができる。

[0018] このレポータプローブにおいて、前記Lープロリン脱水素酵素は、サーモコッカス・プロファンダス(Thermococcus profundus)、サーモコッカス・ペプトノフィラス(Thermococcus peptonophilus)、ピロコッカス・フリオサス(Pyrococcus furiosus)、及び、ピロコッカ

ス・ホリコシOT－3(Pyrococcus horikoshi OT-3)からなる群から選ばれる生物に由来するとすることができる。これによれば、これらの各生物に由来するL－プロリン脱水素酵素により標識されたレポータプローブを、このL－プロリン脱水素酵素が活性を保つ温度で反応液に投入することができる。このため、ターゲットDNAを1本鎖DNAに変性させてから、高温の状態で、ターゲットDNAにレポータプローブを反応させることができる。従って、ハイブリダイゼーションの効率が上がり、より高感度かつ効率的にターゲットDNAの検出を行うことができる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]本発明の一実施形態を示す概略模式図。

[図2]本発明の一実施形態で用いられるバイオセンサを示す概略模式図。

[図3]本発明の一実施形態を示す概略模式図。

発明を実施するための最良の形態

[0020] 本発明のDNA検出方法では、本発明のレポータプローブである、耐熱酵素で標識されたレポータプローブを用いて、ターゲットDNAの検出を行う。ここでは、まず、レポータプローブに標識された耐熱酵素について説明し、次に、本発明のDNA検出方法の一実施形態で用いられる電極について説明した後、本発明のDNA検出方法の一実施形態について説明する。

[0021] (レポータプローブに標識された耐熱酵素)

本発明のレポータプローブ、及び、本発明のDNA検出方法で用いられるレポータプローブは、耐熱酵素により標識されている。耐熱酵素は、人工合成による酵素又は天然の酵素のいずれでもよい。天然の耐熱酵素としては、超好熱菌から得られる酵素が挙げられる。

[0022] なお、超好熱菌とは、好熱菌のうち特に高い温度(通常85℃～90℃以上)で生育できる菌をいう。このような超好熱菌からは、高温(90℃近く)でも活性を保つ酵素を得ることができる。すなわち、このような超好熱菌から、ターゲットDNAの変性温度で完全には失活しない酵素を得ることができる。このような酵素として、例えば、超好熱菌に由来するL－プロリン脱水素酵素が挙げられる。なお、本発明における耐熱酵素及び超好熱菌に由来する酵素は、これに限定されるものではない。

[0023] 超好熱菌に由来するL－プロリン脱水素酵素としては、例えば、サーモコッカス・プロファンダス(Thermococcus profundus)、サーモコッカス・ペプトノフィラス(Thermococcus peptonophilus)、ピロコッカス・フリオサス(Pyrococcus furiosus)、及び、ピロコッカス・ホリコシOT－3(Pyrococcus horikoshi OT-3)に由来するL－プロリン脱水素酵素が挙げられる。このうち、サーモコッカス・プロファンダス(Th ermococcus profundus)に由来するL－プロリン脱水素酵素が特に好ましい。

[0024] なお、超好熱菌に由来するL－プロリン脱水素酵素として、サーモコッカス・プロファンダス(Thermococcus profundus)DSM9503、サーモコッカス・ペプトノフィラス(Thermococcus peptonophilus)、DSM10343、ピロコッカス・フリオサス(Pyrococcus furiosus)DSM3638、及びピロコッカス・ホリコシ(Pyrococcus horikoshi)OT－3に由来するL－プロリン脱水素酵素が抽出されている。このうち、サーモコッカス・プロファンダス(Thermococcus profundus)DSM9503に由来するL－プロリン脱水素酵素について、精製され、各条件下における活性が調べられている。このサーモコッカス・プロファンダス(Thermococcus profundus)DSM9503に由来するL－プロリン脱水素酵素の活性には、温度については80℃が好適であり、90℃においても高い活性が示されることが報告されている(非特許文献2参照。)。

[0025] (電気化学的方法によるDNAの検出)

本発明のDNA検出方法では、キャプチャープローブと、耐熱酵素により標識されたレポータプローブと、耐熱酵素と反応する基質とを用いる。そして、キャプチャープローブとレポータプローブとにターゲットDNAを結合させ、レポータプローブに標識された耐熱酵素と基質による反応により電気化学的にターゲットDNAを検出する。

[0026] 以下、電気化学的方法によりDNA検出を行う場合として、キャプチャープローブを導電体表面に結合させて電極を構成し、この電極に流れる電流値を測定することによりターゲットDNAを検出する場合について詳述する。

[0027] (電極)

本実施形態で用いられる電極は、レポータプローブに標識されたL－プロリン脱水素酵素の活性を測定するために用いることができるものである。

[0028] 導電体としては、通常、電極として用いられるものであればどのような材料でも使用

することができる。例えば、グラファイト、カーボン、カーボンファブリック等;アルミニウム、銅、金、白金、銀等の金属又は合金、SnO_2、In_2O_3、WO_3、TiO_2等、導電性酸化物等種々の材料の単層又は2種以上の積層構造が挙げられる。電極の膜厚、大きさ及び形状等は特に限定されるものではなく、使用するメディエータ、酵素等の種類、得ようとするバイオセンサの性能等によって適宜調整することができる。例えば、厚み0．1～5mm程度、1～10000mm^2程度の面積の矩形形状であることが適当である。

[0029] 導電体には、メディエータが積層されていてもよい。なお、メディエータは、導電体に積層されず、溶液中に存在していてもよい。

メディエータとしては、電極とL－プロリン脱水素酵素との間で電子を授受し得る電子移動媒体として機能するもので、L－プロリン脱水素酵素の反応に悪影響を与えないものであれば、どのようなものでも使用することができる。例えば、フェロセン、フェリシアン化アルカリ金属（フェリシアン化カリウム、フェリシアン化リチウム、フェリシアン化ナトリウム等）又はこれらのアルキル置換体（メチル置換体、エチル置換体、プロピル置換体等）、フェナジンメトサルフェート、p－ベンゾキノン、2，6－ジクロロフェノールインドフェノール、メチレンブルー、β－ナフトキノン－4－スルホン酸カリウム、フェナジンエトサルフェート、ビタミンK、ビオローゲン等の酸化還元性の有機又は無機化合物の1種あるいは2種以上の組み合わせが挙げられる。なかでも、水や水溶性有機溶媒（低級アルコール等）に溶解し、取り扱いが容易であるもの、電子移動媒体としての機能が安定しているものが好ましく、例えば、フェロセン、フェリシアン化カリウム等が好適に用いられる。

[0030] なお、L－プロリン脱水素酵素による反応における電子受容体としては、例えば、フラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）、フェレドキシン等を用いることができる。

導電体上に積層されるメディエータの膜厚は、特に限定されるものではなく、導電体の大きさ、用いるメディエータの種類、後述する酵素層の酵素の種類及び量、測定対象である酵素の種類等によって適宜調整することができる。例えば、0．1μm～1000μm程度が挙げられる。なお、メディエータを導電体上に積層する方法は、メディエータの種類によって、適当なものを適宜選択することができる。例えば、メディエータをその機能を阻害しない溶媒、例えば、水又は水溶性有機溶媒等に溶解させ、

塗布、乾燥する方法、メディエータを適当な担体、例えば、樹脂、タンパク等の高分子化合物等に混合及び分散させ、担体を薄膜状に形成する方法、交互積層法(現代化学、1997年1月、p20～25参照)等、当該分野で公知の薄膜形成法のすべてを利用することができる。なかでも、後述する交互積層法が好ましい。

[0031] なお、酵素層が、さらに、導電体上に積層されたメディエータの上に積層されてもよいし、メディエータ及び酵素の種類等によっては、酵素層をメディエータとともに導電体上に配置してもよい。酵素層の膜厚は、特に限定されるものではなく、導電体の大きさ、用いるメディエータの種類、測定対象である酵素の種類等によって適宜調整することができる。例えば、0.1μm～1000μm程度が挙げられる。なお、酵素層を積層する方法としては、メディエータとともに、あるいはメディエータの上に、メディエータを積層するのと同様の方法が挙げられる。

[0032] このDNA検出方法で用いられる電極では、上述したメディエータ、酵素層が、高分子担体とともに層状で積層されていてもよい。ここで用いることができる高分子担体としては、電荷を有すること、ポリマーであること及び水溶性であることのいずれか1種、好ましくは全ての性質を満足するものが適当である。電荷は正及び負のいずれでもよい。高分子担体は、例えば、各種タンパク質(例えば、酵素、抗体、レセプタータンパク等)、ポリペプチド(例えば、ポリリシン、ポリアスパラギン酸、ポリグルタミン酸等)、水溶性合成高分子化合物(例えば、ポリエチレンイミン、ポリアクリル酸、カルボキシメチルセルロース、ポリスチレンスルホン酸、ポリジメチルジアリルアンモニウムクロライド等)、天然高分子(アルギン酸及びその塩類、トラガントガム等)が挙げられる。

[0033] メディエータ等を高分子担体とともに積層する方法としては、特に限定されるものではなく、メディエータ等を高分子担体に分散、あるいは高分子担体とともに適当溶媒(水、緩衝液、水溶性有機溶媒等)に溶解又は分散し、塗布、乾燥する方法でもよいし、交互積層法を利用してもよい。

[0034] メディエータ及び酵素層を積層する交互積層法(ここでは、各層を順次積層する方法)は、例えば、以下のように行うことができる。

まず、導電体表面を活性化することにより、正又は負に帯電させる。次いで、メディエータを構成する分子、あるいはメディエータを分散／メディエータと結合した高分

子担体を負又は正に帯電させ、これを導電体表面に接触させることにより、正と負との電荷の間の相互作用を通してメディエータを導電体表面に積層する。なお、このような1回の正負の相互作用によって、必要なメディエータ量を確保することができれば、上述のような積層は1層のみでよいが、さらに多量のメディエータを導電体表面に積層したい場合は、上述の相互作用を複数回行うことによって、メディエータ層を複数層、例えば、2～20層程度積層してもよい。この場合、積層されたメディエータ上に、これと反対の電荷を有する担体(例えば、上述した高分子担体)又はメディエータ等を積層し、再度、メディエータを構成する分子等を、この高分子担体等の上に積層するという一連の操作を繰り返すことによって、多数層のメディエータの積層を実現することができる。

[0035] また、このDNA測定装置の電極では、測定対象となる酵素の活性を測定するために、(1)活性の測定対象となる酵素が積層されていてもよいし、(2)電極に接触するように、この電極とは別個に測定対象となる酵素が配置されていてもよい。(1)の場合には、メディエータ等と同様の積層法を利用して積層することができ、同様に、交互積層法によって形成することが好ましい。なお、(1)の場合には、測定対象となる酵素が導電体上に積層されていることにより、例えば、酵素が基質とともに溶液によって供給されるのに比較して、測定対象の酵素の反応に起因して発生する電流値が十分に高い出力として得ることができ、より測定感度が良好となり、測定誤差を低減することが可能になるという利点がある。(2)の場合には、例えば、測定対象となる酵素を、好ましくは基質の存在下において、溶液状、懸濁又は分散された液状で、電極に接触させてもよい。なお、(2)の場合には、測定対象となる酵素が含有された液状であってもよい。

[0036] 本実施形態で用いる電極には、さらに、DNA断片を固定させておく。このDNA断片は、DNAの相補性を利用して、検出及び／又は定量目的のDNA(以下「ターゲットDNA」と記す)と対合させるためのキャプチャープローブである。

[0037] ターゲットDNAは、DNAの相補性を利用して、このキャプチャープローブと対合させられる検出及び／又は定量目的のDNA断片である。本発明のDNA検出方法では、キャプチャープローブとレポータプローブとにそれぞれ相補性を有する特定のD

NA断片の検出を行うが、検出対象のDNA断片が、ターゲットDNAに相当する。なお、採取されたDNAは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により増幅されて用いられる。

[0038] レポータプローブは、DNAの相補性を利用してターゲットDNAと対合する。このレポータプローブには、ターゲットDNAの検出及び／又は定量するために酵素が標識されている。本発明において、この酵素は、Lープロリン脱水素酵素である。

[0039] そして、このキャプチャープローブとターゲットDNAとレポータプローブとを反応させることにより、キャプチャープローブ、ターゲットDNA、レポータプローブがこの順に電極に結合させられる。つまり、電極上で、いわゆるターゲットDNAのハイブリダイゼーションを行わせる。そして、ターゲットDNA及びレポータプローブが結合された電極を用いて、メディエータを介する間接的な電子授受を、例えば、電流値として測定することによって、ターゲットDNAの検出及び／又は定量を行うことができる。

[0040] 電極上にキャプチャープローブを固定する方法としては、当該分野で公知の方法の全て及びそれらに準じた方法を利用することができる。例えば、電極上にストレプトアビジンを積層し、キャプチャープローブの5'末端をビオチン修飾し、アビジンービオチンの相互作用により固定する方法又はこれに準じた方法が挙げられる。

[0041] なお、DNA断片（キャプチャープローブ、レポータプローブ）を用いる方法、つまりDNAプローブ法、DNAハイブリダイゼーション自体は当該分野で公知の方法の全て及びそれらに準じた方法を利用することができる。この際に利用するDNA断片は、市販されているいずれを用いてもよい。例えば、サルモネラのプローブ（Rahn K., S. A. De Grandis, R. C. Clarke, S. A. McEwen, J. E. Galan, C. Ginocchio, R. Curtiss and C.L. Gyles, Mol. Cell. Probes, 6, 271-279 (1992)参照）、タカラバイオケミカルス、赤痢菌および腸管侵入性大腸菌（EIEC）invE遺伝子検出用Primer Set INV-1& 2、赤痢菌および腸管侵入性大腸菌（EIEC）ipaH遺伝子検出用Primer Set IPA-1& 2、コレラ毒素遺伝子検出用Primer Set VCT-1 & 2（いずれも（株）島津製作所製）等が挙げられる。

[0042] 上記のようにして作成された電極は、通常、対電極と、これらの電極及び対電極とを収容し、液体、好ましくは測定対象の酵素の基質を含有する溶液を収容することができる反応器内に配置され、さらにこの反応器内に、両電極がほぼ完全に浸漬する程

度に溶液で充填されたバイオセンサにおいて、利用されることが適当である。このようなバイオセンサにおいては、サイクリックボルタンメトリの結果をもとにして、例えば両電極に所定の電位差を有する定電位を与え、測定対象の酵素の反応に起因して発生する電流値を測定して(例えば、限界酸化電流値として測定する)、測定対象の酵素の活性を判定することができる。電流値の検出は、例えば、ポテンショスタット、電流計等の電流検出部によって行うことができる。本実施形態においては、このようなバイオセンサを用いて電流値を測定することによりDNAの検出を行う。

[0043] 本実施形態におけるDNA検出方法では、レポータプローブが耐熱酵素により標識され、この耐熱酵素の基質を含有する溶液を反応器内に収容する。そして、上記のように作成された電極と、対電極と、参照電極とを、この基質を含有する溶液に浸漬させ、この電極と対電極とに所定の電位差を有する定電位を与え、耐熱酵素と基質による反応に起因して発生する電流値を測定する。

[0044] <本実施形態におけるDNA検出方法>

以下に、本実施形態におけるDNA検出方法を、図面に基づいて具体的に説明する。なお、ここでは耐熱酵素が超好熱菌に由来するL-プロリン脱水素酵素である場合について説明するが、上述のとおり、本発明における耐熱酵素は、これに限られるものではない。

[0045] (作用電極)

図1に示すように、作用電極は、カーボン電極21上にメディエータ22を介してターゲットDNA28bと相補的にハイブリダイズするキャプチャープローブ28aを固定化している。なお、メディエータ22は、カーボン電極21に固定化されていなくてもよく、溶液中に存在していてもよい。

[0046] そして、キャプチャープローブ28a、ターゲットDNA28b、L-プロリン脱水素酵素26により標識されたレポータプローブ28cを結合させることにより、L-プロリン脱水素酵素26により標識されたレポータプローブ28cを結合した作用電極を得ることができる。ここで、DNAサンプル液中に検出対象のDNAが存在する場合、このDNAを変性させた1本鎖DNAが、1本鎖のターゲットDNA28bに相当する。ターゲットDNA28bの検出を行うためには、DNAサンプル液中に、ターゲットDNA28bの検出のため

に十分なだけ、採取されたDNAが存在する必要がある。このため、まず、ターゲットDNA28bの検出のために十分な量のDNAを得るために、DNAサンプル液を用いてPCR(Polymerase Chain Reaction)を行うことにより、サンプル液中のDNAを増幅させる。

[0047] そして、このDNAサンプル液を、例えば、96℃で30秒間、熱処理することにより、2本鎖DNAを1本鎖DNAに変性させる。そして、作用電極をサンプル液に挿入するとともに、L－プロリン脱水素酵素26により標識されたレポータプローブ28cを投入する。なお、L－プロリン脱水素酵素26により標識されたレポータプローブ28cは、凍結乾燥させた状態のものを用いてもよいし、液状試薬を用いてもよい。

[0048] ここで、レポータプローブ28cに標識されたL－プロリン脱水素酵素26の活性を保つためには、反応液の温度がL－プロリン脱水素酵素26の耐熱温度より低いことが必要である。超好熱菌に由来するL－プロリン脱水素酵素26の耐熱温度より反応液の温度が低ければ、さらに冷却することなく、L－プロリン脱水素酵素26で標識されたレポータプローブ28cを反応液に投入できる。

[0049] ここで、DNAサンプル液中にターゲットDNA28bが存在する場合、図1に示すように、キャプチャープローブ28a、1本鎖のターゲットDNA28b及びレポータプローブ28cがアニールさせられる。ここで、検出対象のDNAが得られている場合には、この検出対象のDNAが、1本鎖のターゲットDNA28bに相当する。従って、サンプル液中に検出対象のDNAが含まれている場合に、キャプチャープローブ28a、ターゲットDNA28b、レポータプローブ28cがこの順にカーボン電極21に結合させられる。

[0050] (バイオセンサ)

このDNA検出方法では、上記の作用電極と、参照電極及び対電極とを用いて、DNAの検出を行う。すなわち、作用電極と参照電極と対電極とを備えたバイオセンサを用いる。このバイオセンサの概略図を図2に示す。

[0051] 図2に示すように、バイオセンサ18は、反応器15内に、リード11aに接続された作用電極11と、同じくリード14aに接続された対電極14と、リード12aに接続された参照電極12とを収容する。そして、反応器15内に、電解液13として、レポータプローブに標識されたL－プロリン脱水素酵素の基質であるL－プロリンを含有した緩衝液(例

えば、トリス緩衝液)を収容する。そして、この緩衝液に、作用電極、参照電極及び対電極を浸漬させる。なお、作用電極11と対電極14との間にセパレータ16を装備する。また、リード11aには、作用電極11において発生した電流値を測定するための電流検出部として電流計17が接続されている。

[0052] このようなバイオセンサ18の作用電極11に、参照電極12を基準として、例えば＋500mVの電位を印加することにより、電解液13中の基質(Lープロリン)と酵素(Lープロリン脱水素酵素)等が反応し、メディエータを介して電子の授受が行われる。これにより作用電極に流れる電流を限界酸化電流として、電流計によって測定することができる。従って、この電解液13中のLープロリン、レポータプローブに標識されたLープロリン脱水素酵素及びメディエータ等による電子の授受により、作用電極11に流れる電流を限界酸化電流として、電流計17によって測定することができる。

[0053] (電流値の測定によるターゲットDNAの検出)

次に、上記の様に構成された電極(作用電極11)を備えたバイオセンサ18を用いて電流値の測定を行うことによるターゲットDNAの検出について説明する。

[0054] ここで、サンプル液中に検出対象のDNAが含まれていた場合には、作用電極11上には、キャプチャープローブ28a、ターゲットDNA28b、レポータプローブ28cが、この順で結合されている。なお、レポータプローブ28cは、Lープロリン脱水素酵素26により標識されている。

[0055] 電流値の測定は、バイオセンサ18の作用電極11に、参照電極12を基準として＋500mVの電位を印加し、作用電極11に流れる電流を測定することにより行う。

ここで、バイオセンサ18の作用電極11に電位を印加すると、反応液中のLープロリン25とLープロリン脱水素酵素26が反応し、メディエータ22を介して電子の授受が行われる。具体的には、図1に示すように、Lープロリン脱水素酵素26が、基質であるLープロリン25と反応してΔ^1ーピロリンー5ーカルボン酸27を生成する際に、メディエータ22が水素を受け取ることで還元型に変換される。この還元型のメディエータ22が、水素を移動させて、これによって生じた電子の授受をカーボン電極21に伝達させる。

[0056] この作用電極11と、対電極14と、参照電極12とを用いて、作用電極11のカーボン

電極21に流れる電流（限界酸化電流）の電流値を測定する。作用電極11に、参照電極12を基準として、例えば、＋500mVの電位を印加することにより、反応液中の、Ｌ－プロリン25と、Ｌ－プロリン脱水素酵素26とが反応し、メディエータ22を介して電子の授受が行われ、作用電極11に流れる電流を、限界酸化電流として、電流計17によって測定することができる。

[0057] なお、電解質溶液のみを用い、Ｌ－プロリン脱水素酵素26による酵素反応が起こらない場合であっても、ベースとなる電流が発生するが、酵素反応が起こった場合の酸化還元反応の電子の移動を、このベース電流に比較してより大きな値として測定することができる。

[0058] このように、Ｌ－プロリン脱水素酵素26による酵素反応に基づく酵素－電極間の電子伝達をモニタする、つまり、一連の電子移動を電流として捕らえることにより、ターゲットDNAの有無又は濃度を検知することができる。従って、ターゲットDNAを捕捉するキャプチャープローブ及びキャプチャーしたターゲットDNAにさらに結合し、信号を得るためのレポータプローブを用いるサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイによりDNAの検出を行うことが可能となる。

[0059] 以上、本実施形態によれば、以下に示す効果を得ることができる。

・ 上記実施形態では、キャプチャープローブと、耐熱酵素により標識されたレポータプローブと、耐熱酵素と反応する基質とを用いて、キャプチャープローブとレポータプローブとにターゲットDNAを結合させ、レポータプローブに標識された耐熱酵素と基質による反応により電気化学的に前記ターゲットDNAを検出する。これにより、耐熱酵素により標識されたレポータプローブを、この耐熱酵素が活性を保つ温度である高温の反応液に投入することができる。従って、より高い温度でレポータプローブを反応液に投入できるため、ハイブリダイゼーションの効率が上がり、より高感度かつ効率的にターゲットDNAの検出を行うことができる。

[0060] ・ 上記実施形態では、キャプチャープローブを導電体表面に結合させて電極を構成し、キャプチャープローブとレポータプローブとにターゲットDNAを結合させ、レポータプローブに標識された耐熱酵素と基質による反応により電極に流れる電流値を測定することによりターゲットDNAを検出する。これにより、キャプチャープローブを

導電体表面に結合させて構成した電極と耐熱酵素により標識されたレポータプローブとを用いて、電極に流れる電流値を測定することにより、より高感度かつ効率的にターゲットDNAの検出を行うことができる。

[0061] ・ 上記実施形態では、超好熱菌に由来する酵素により標識されたレポータプローブを用いる。超好熱菌からは、ターゲットDNAの変性温度で完全には失活しない酵素を得ることができるため、これによれば、ターゲットDNAの変性温度で、レポータプローブを反応液に投入することが可能となる。このため、ハイブリダイゼーションの効率が上がり、より高感度かつ効率的にターゲットDNAの検出を行うことができる。

[0062] ・ 上記実施形態では、カーボン電極21の表面にキャプチャープローブ28aが結合してなる電極と、超好熱菌に由来するL－プロリン脱水素酵素26により標識されたレポータプローブ28cと、このL－プロリン脱水素酵素26と反応する基質であるL－プロリン25とを用いる。そして、キャプチャープローブ28aと、レポータプローブ28cとにターゲットDNA28bを結合させ、レポータプローブ28cに標識されたL－プロリン脱水素酵素26とL－プロリン25による反応に基づいてカーボン電極21に流れる限界酸化電流の電流値を測定することによりターゲットDNA28bを検出する。これによれば、超好熱菌に由来するL－プロリン脱水素酵素26により標識されたレポータプローブ28cを、このL－プロリン脱水素酵素26が活性を保つ温度である高温で反応液に投入することが可能となる。従って、ハイブリダイゼーションの効率が上がり、より高感度かつ効率的にターゲットDNAの検出を行うことができる。

[0063] ・ 上記実施形態では、超好熱菌に由来する酵素により標識されたレポータプローブを用いる。超好熱菌からは、ターゲットDNAの変性温度で完全には失活しない酵素を得ることができるため、これによれば、ターゲットDNAの変性温度で、レポータプローブを反応液に投入することが可能となる。このため、ハイブリダイゼーションの効率が上がり、より高感度かつ効率的にターゲットDNAの検出を行うことができる。

[0064] ・ 上記実施形態では、カーボン電極21の表面にキャプチャープローブ28aが結合してなる電極と、超好熱菌に由来するL－プロリン脱水素酵素26により標識されたレポータプローブ28cと、このL－プロリン脱水素酵素26と反応する基質であるL－プロリン25とを用いる。そして、キャプチャープローブ28aと、レポータプローブ28cとに

ターゲットDNA28bを結合させ、レポータプローブ28cに標識されたL－プロリン脱水素酵素26とL－プロリン25による反応に基づいてカーボン電極21に流れる限界酸化電流の電流値を測定することによりターゲットDNA28bを検出する。これによれば、超好熱菌に由来するL－プロリン脱水素酵素26により標識されたレポータプローブ28cを、このL－プロリン脱水素酵素26が活性を保つ温度である高温で反応液に投入することが可能となる。従って、ハイブリダイゼーションの効率が上がり、より高感度かつ効率的にターゲットDNAの検出を行うことができる。

[0065] ・ 上記実施形態では、超好熱菌に由来するL－プロリン脱水素酵素26により標識されたレポータプローブ28cを用いる。これによれば、超好熱菌に由来するL－プロリン脱水素酵素26により標識されたレポータプローブ28cを、このL－プロリン脱水素酵素26が活性を保つ温度である高温の反応液に投入することができる。このため、ターゲットDNAを1本鎖のターゲットDNA28bに変性させてから、L－プロリン脱水素酵素26が活性を保つ温度である高温で、ターゲットDNA28bにレポータプローブ28cを反応させることが可能となる。従って、ハイブリダイゼーションの効率が上がり、より高感度かつ効率的にターゲットDNAの検出を行うことができる。

[0066] ・ 上記実施形態では、サーモコッカス・プロファンダス(Thermococcus profundus)、サーモコッカス・ペプトノフィラス(Thermococcus peptonophilus)、ピロコッカス・フリオサス(Pyrococcus furiosus)、及び、ピロコッカス・ホリコシOT－3(Pyrococcus horikoshi OT-3)からなる群から選ばれる生物に由来するL－プロリン脱水素酵素を用いることができる。このため、これらの各生物に由来するL－プロリン脱水素酵素により標識されたレポータプローブを、このL－プロリン脱水素酵素が活性を保つ温度で反応液に投入することが可能となる。このため、ターゲットDNAを1本鎖DNAに変性させてから、高温の状態で、ターゲットDNAにレポータプローブを反応させることが可能となる。従って、ハイブリダイゼーションの効率が上がり、より高感度かつ効率的にターゲットDNAの検出を行うことができる。

[0067] ・ 上記実施形態では、ハイブリダイゼーションのためのターゲットDNAの変性時に、電極に固定されたキャプチャープローブとL－プロリン脱水素酵素により標識されたレポータプローブを、ターゲットDNAが含まれる溶液中に投入する。このため、電極

に固定されたキャプチャープローブとL－プロリン脱水素酵素により標識されたレポータプローブとをハイブリダイゼーションのためのターゲットDNAの変性時にターゲットDNAと共存させることができる。これにより、ハイブリダイゼーションの効率が上がり、より高感度かつ効率的にターゲットDNAの検出を行うことができる。また、より簡易な操作で処理を行うことができる。

[0068] なお、上記実施形態は、以下の態様に変更してもよい。

○ 上記実施形態では、キャプチャープローブを導電体表面に結合させて電極を構成し、この電極に流れる電流値を測定することによりターゲットDNAを検出したが、電気化学的方法によるDNA検出の方法は、これに限定されるものではない。例えば、pH感応膜上にキャプチャープローブを固定しておき、酵素反応によるpH変化を電圧の変化により検出し、これによりターゲットDNAを検出してもよい。以下、この場合の実施形態について説明する。

[0069] 図3は、本発明の一実施形態のDNA検出方法で用いられる電界効果トランジスタ構造を示す。この電界効果トランジスタ構造は、p型のシリコン基板31、pH感応膜32、対極34、ソース電極35、ドレイン電極36、n^+型層37を備えている。pH感応膜32は、pH応答を示し、例えば、Si_3N_4（シリコン窒化膜）等を用いることができる。そして、pH感応膜32及び対極34を電解液に浸漬させる。

[0070] （pH感応膜）

本実施形態では、図3の下部の拡大図に示すように、pH感応膜32上にキャプチャープローブ48aを固定化させている。このキャプチャープローブ48aは、ターゲットDNA48bと相補的にハイブリダイズする。そして、図3に示すように、キャプチャープローブ48a、ターゲットDNA48b、耐熱酵素46により標識されたレポータプローブ48cを結合させることにより、耐熱酵素46をpH感応膜32の近傍に保持することができる。

[0071] なお、ここでは電圧の測定によりpHの変化を検出することによりDNAの検出を行うため、耐熱酵素46と基質45との反応はpHの変化を伴う必要がある。そこで、本実施形態においては、耐熱酵素46として、例えば、グルコースオキシダーゼのように、基質45との反応においてpHを変化させる酵素を用いる。

[0072] DNAサンプル液中に検出対象のDNAが存在する場合、このDNAを変性させた1

本鎖DNAが、1本鎖のターゲットDNA48bに相当する。ターゲットDNA48bの検出を行うためには、DNAサンプル液中に、ターゲットDNA48bの検出のために十分なだけ、採取されたDNAが存在する必要がある。このため、まず、ターゲットDNA48bの検出のために十分な量のDNAを得るために、DNAサンプル液を用いてPCRを行うことにより、サンプル液中のDNAを増幅させる。

[0073] そして、このDNAサンプル液を、例えば、96℃で30秒間、熱処理することにより、2本鎖DNAを1本鎖DNAに変性させる。そして、このサンプル液にpH感応膜32を浸漬させるとともに、耐熱酵素46により標識されたレポータプローブ48cを投入する。ここで、レポータプローブ48cに標識された耐熱酵素46の活性を保つためには、反応液の温度が耐熱酵素46の耐熱温度より低いことが必要である。耐熱酵素46の耐熱温度より反応液の温度が低ければ、これをさらに冷却することなく、耐熱酵素46により標識されたレポータプローブ48cを反応液に投入できる。

[0074] ターゲットDNA48bが存在する場合、図3に示すように、キャプチャープローブ48a、1本鎖のターゲットDNA48b及びレポータプローブ48cがアニールさせられる。ここで、検出対象のDNAが得られている場合には、この検出対象のDNAが、1本鎖のターゲットDNA48bに相当する。従って、サンプル液中に検出対象のDNAが含まれている場合に、キャプチャープローブ48a、ターゲットDNA48b、レポータプローブ48cがこの順にpH感応膜32に結合する。

[0075] （電圧の測定によるターゲットDNAの検出）

次に、上記の様に構成された電界効果トランジスタを用いて電圧の測定を行うことによるターゲットDNAの検出について説明する。

[0076] まず、反応液を廃棄し、電解液である緩衝液にpH感応膜32及び対極34を浸漬させる。ここで、サンプル液中に検出対象のDNAが含まれていた場合には、pH感応膜32上には、キャプチャープローブ48a、ターゲットDNA48b、耐熱酵素46により標識されたレポータプローブ48cが、この順で結合されている。従って、この場合、pH感応膜32の近傍に耐熱酵素46が保持されている。

[0077] そして、レポータプローブに標識された耐熱酵素46と反応する基質45をこの電解液中に投入すると、電解液中の基質45と耐熱酵素46とが反応して反応後基質47を

生成し、pH感応膜32の近傍のpHが変化する。

[0078] 上記のように構成された電界効果トランジスタにおいて、pHの変化に応じてpH感応膜32と電解液との界面電位が変化する。この界面電位の変化を測定する。例えば、ドレイン電流とソース／ドレイン間電圧とを一定に保持し、ゲート電圧を測定する。このように、pHの変化を電圧の測定により検出することにより、ターゲットDNAの有無又は濃度を検知することができる。

請求の範囲

[1] キャプチャープローブと、耐熱酵素により標識されたレポータプローブと、前記耐熱酵素と反応する基質とを用いて、

前記キャプチャープローブと、前記レポータプローブとにターゲットDNAを結合させ、前記レポータプローブに標識された前記耐熱酵素と前記基質による反応により電気化学的に前記ターゲットDNAを検出することを特徴とするDNA検出方法。

[2] 前記キャプチャープローブを導電体表面に結合させて電極を構成し、

前記キャプチャープローブと、前記レポータプローブとにターゲットDNAを結合させ、前記レポータプローブに標識された前記耐熱酵素と前記基質による反応により前記電極に流れる電流値を測定することにより前記ターゲットDNAを検出することを特徴とする請求項1に記載のDNA検出方法。

[3] 前記耐熱酵素は、超好熱菌に由来する酵素であることを特徴とする請求項1又は2に記載のDNA検出方法。

[4] 前記超好熱菌に由来する酵素は、Lープロリン脱水素酵素であることを特徴とする請求項3のいずれか1つに記載のDNA検出方法。

[5] 前記Lープロリン脱水素酵素は、サーモコッカス・プロファンダス(Thermococcus profundus)、サーモコッカス・ペプトノフィラス(Thermococcus peptonophilus)、ピロコッカス・フリオサス(Pyrococcus furiosus)、及び、ピロコッカス・ホリコシOT－3(Pyrococcus horikoshi OT-3)からなる群から選ばれる生物に由来することを特徴とする請求項4に記載のDNA検出方法。

[6] ターゲットDNAの変性のための熱処理時に、前記耐熱酵素により標識されたレポータプローブを、前記ターゲットDNAが含まれる溶液中に投入することを特徴とする請求項1～5のいずれか1つに記載のDNA検出方法。

[7] キャプチャープローブに結合するターゲットDNAに、さらに結合するレポータプローブであって、

耐熱酵素により標識されており、

前記耐熱酵素と基質による反応により電気化学的に前記ターゲットDNAを検出するために用いられることを特徴とするレポータプローブ。

[8] 前記レポータプローブは、導電体表面にキャプチャープローブが結合してなる電極の前記キャプチャープローブに結合するターゲットDNAに、さらに結合し、

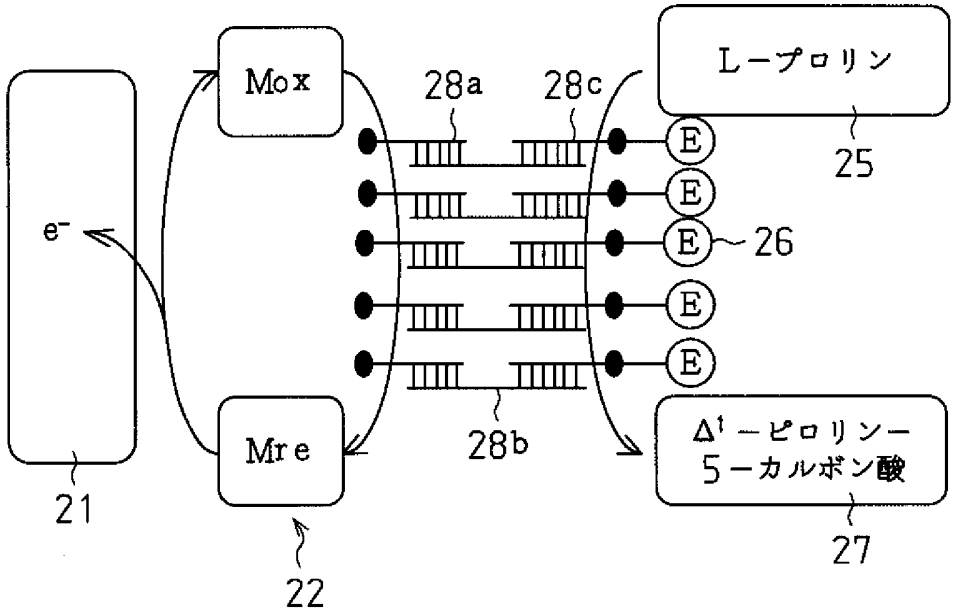
前記耐熱酵素と基質による反応により前記電極に流れる電流値を測定することにより前記ターゲットDNAを検出するために用いられることを特徴とする請求項7に記載のレポータプローブ。

[9] 前記耐熱酵素は、超好熱菌に由来する酵素であることを特徴とする請求項7又は8に記載のレポータプローブ。

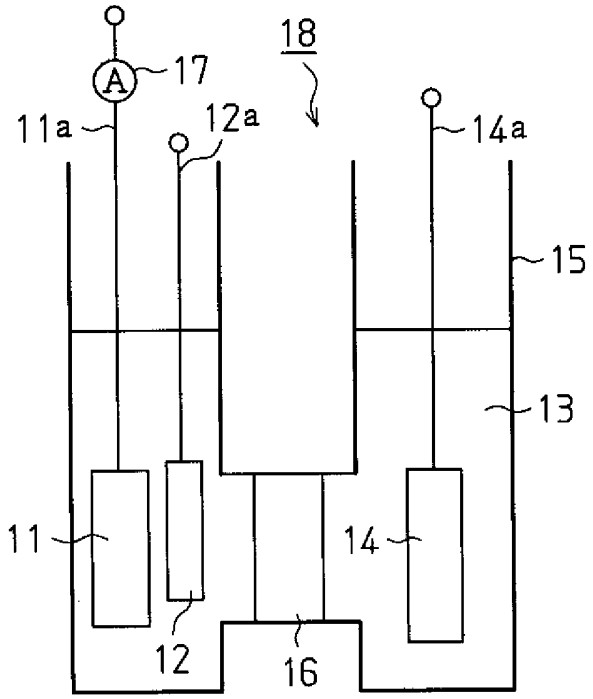
[10] 前記超好熱菌に由来する酵素は、Ｌ－プロリン脱水素酵素であることを特徴とする請求項9に記載のレポータプローブ。

[11] 前記Ｌ－プロリン脱水素酵素は、サーモコッカス・プロファンダス(Thermococcus profundus)、サーモコッカス・ペプトノフィラス(Thermococcus peptonophilus)、ピロコッカス・フリオサス(Pyrococcus furiosus)、及び、ピロコッカス・ホリコシＯＴ－３(Pyrococcus horikoshi OT-3)からなる群から選ばれる生物に由来することを特徴とする請求項10に記載のレポータプローブ。

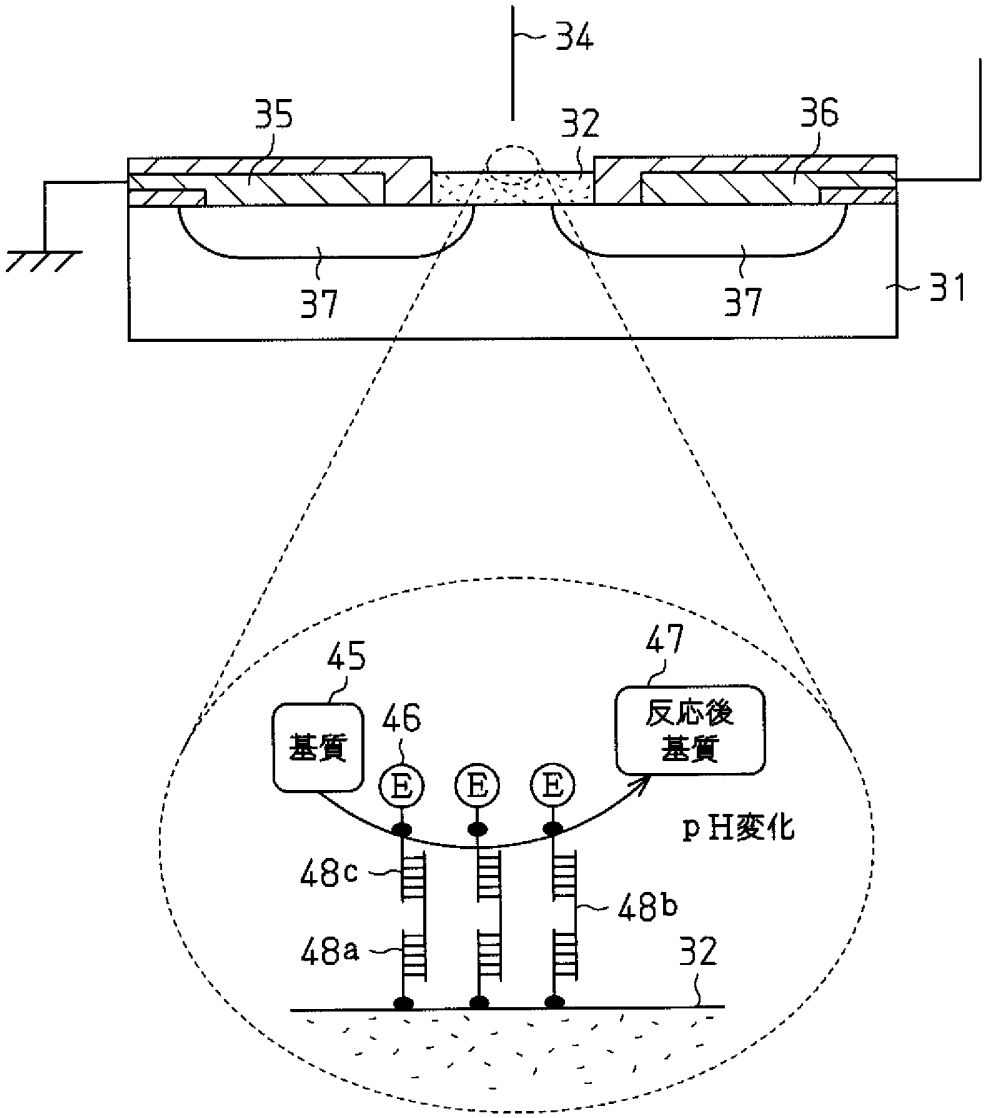
[図1]


Mox
Mre
e⁻
21
22
28a
28c
28b
E
26
L－プロリン
25
Δ¹－ピロリン－
5－カルボン酸
27

[図2]


A
17
18
11a
12a
14a
15
13
11
14
12
16

[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2005/017501

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12Q1/68(2006.01), ***C12N15/09***(2006.01), ***C12Q1/32***(2006.01), *C12R1/01*(2006.01)

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)
C12Q1/68(2006.01), ***C12N15/09***(2006.01), ***C12Q1/32***(2006.01), *C12R1/01*(2006.01)

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/CAPlus/MEDLINE/WPIDS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 99/67628 A1 (E. HELLER & CO.), 19 December, 1999 (19.12.99), Full text; particularly, Claims 7 to 10 & US 6018117 A & EP 1090286 A1 & JP 2002-518998 A	1-2,7-8 1-11
X Y	JP 61-9300 A (Fujirebio Inc.), 16 January, 1986 (16.01.86), Full text (Family: none)	7-8 1-11

☒ 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	Date of mailing of the international search report
07 December, 2005 (07.12.05)	20 December, 2005 (20.12.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2005/017501

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SAKURABA Haruhiko et al., "Purification, Characterization, and Application of a Novel Dye-Linked L-Proline Dehydrogenase from a hyperthermophilic Archaeon, Thermococcus profundus", APPLIED and ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2001, Vol.67(4), pages 1470 to 1475, full text	1-11
A	WO 00/32813 A1 (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM), 08 June, 2000 (08.06.00), Full text & EP 1135533 A1 & JP 2002-531100 A & DE 69916650 A	1-11
A	WO 92/08808 A1 (SISKA DIAGNOSTICS, INC.), 29 May, 1992 (29.05.92), Full text & EP 557456 A1 & JP 6-502766 A & US 5474895 A	1-11

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００５／０１７５０１

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　***C12Q1/68*** (2006.01)，***C12N15/09*** (2006.01)，***C12Q1/32*** (2006.01)，*C12R1/01* (2006.01)

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　***C12Q1/68*** (2006.01)，***C12N15/09*** (2006.01)，***C12Q1/32*** (2006.01)，*C12R1/01* (2006.01)

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

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）

BIOSIS/CAPlus/MEDLINE/WPIDS(STN)

Ｃ．　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
X Y	WO 99/67628 A1 (E. HELLER & CO.) 1999.12.19 & US 6018117 A & EP 1090286 A1 & JP 2002-518998 A 文献全体、特に特許請求の範囲第７項～第１０項等参照	1-2, 7-8 1-11
X Y	JP 61-9300 A (富士レビオ株式会社) 1986.01.16 (ファミリーなし) 文献全体参照	7-8 1-11

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「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
「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
「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）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「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
「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
「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
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０７．１２．２００５	２０．１２．２００５

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	４Ｎ	９４５１
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	坂崎　恵美子 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８		

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（２００５年４月）

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
Y	SAKURABA Haruhiko et al. "Purification, Characterization, and Application of a Novel Dye-Linked L-Proline Dehydrogenase from a hyperthermophilic Archaeon, Thermococcus profundus" APPLIED and ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2001, Vol.67(4), p.1470-1475 文献全体参照	1-11
A	WO 00/32813 A1 (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM) 2000.06.08 & EP 1135533 A1 & JP 2002-531100 A & DE 69916650 A 文献全体参照	1-11
A	WO 92/08808 A1 (SISKA DIAGNOSTICS, INC.) 1992.05.29 & EP 557456 A1 & JP 6-502766 A & US 5474895 A 文献全体参照	1-11