

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5500985号  
(P5500985)

(45) 発行日 平成26年5月21日(2014.5.21)

(24) 登録日 平成26年3月20日(2014.3.20)

(51) Int.Cl.

F 1

<b>C 1 2 Q</b> 1/32 (2006.01)	C 1 2 Q	1/32	
<b>C 1 2 Q</b> 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
<b>G O 1 N</b> 33/58 (2006.01)	G O 1 N	33/58	Z
<b>G O 1 N</b> 33/53 (2006.01)	G O 1 N	33/53	D
<b>G O 1 N</b> 21/78 (2006.01)	G O 1 N	33/53	M

請求項の数 15 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-506355 (P2009-506355)  
 (86) (22) 出願日 平成20年3月26日(2008.3.26)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2008/055664  
 (87) 国際公開番号 W02008/117816  
 (87) 国際公開日 平成20年10月2日(2008.10.2)  
 審査請求日 平成23年1月20日(2011.1.20)  
 (31) 優先権主張番号 特願2007-85550 (P2007-85550)  
 (32) 優先日 平成19年3月28日(2007.3.28)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 507100649  
 伊藤 悦朗  
 北海道札幌市中央区南十九条西十四丁目1  
 -15-102  
 (74) 代理人 110000109  
 特許業務法人特許事務所サイクス  
 (72) 発明者 伊藤 悦朗  
 香川県さぬき市志度1079-204  
 審査官 高山 敏充

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質および核酸の超高感度測定法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗体酵素複合体を用いる酵素測定方法であって、  
 抗体酵素複合体の酵素による反応生成物は、アンドロステロン骨格を有する化合物(但し、前記アンドロステロン骨格は、3 位にヒドロキシ基、17位にカルボニル基を有する)であり、前記アンドロステロン骨格を有する化合物の定量は、NADHおよび/またはNADPH、チオNADおよび/またはチオNADP、並びに3 -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(3 -HSD)を用いて、酵素サイクリング反応によりチオNADHおよび/またはチオNADPHを生成させ、生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHの量を測定するか、または生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHによる色の変化を計測することで行う、前記方法

10

【請求項2】

抗体酵素複合体は、標的タンパク質抗原に特異的な抗体とこの抗体に標識した酵素とからなり、前記標的タンパク質の測定に用いられる請求項1に記載の方法。

【請求項3】

酵素標識核酸プローブを用いる核酸プローブ測定方法であって、  
 酵素標識核酸プローブの酵素による反応生成物は、アンドロステロン骨格を有する化合物(但し、前記アンドロステロン骨格は、3 位にヒドロキシ基、17位にカルボニル基を有する)であり、前記アンドロステロン骨格を有する化合物の定量は、NADHおよび/またはNADPH、チオNADおよび/またはチオNADP、並びに3 -ヒドロキシステロイドデヒドロ

20

ゲナーゼ(3 -HSD)を用いて、酵素サイクリング反応によりチオNADHおよび/またはチオNADPHを生成させ、生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHの量を測定するか、または生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHによる色の変化を計測することで行う、前記方法。

【請求項4】

酵素標識核酸プローブは、標的核酸に特異的に結合する核酸プローブとこの核酸プローブに標識した酵素とからなり、前記標的核酸の測定に用いられる請求項3に記載の方法。

【請求項5】

生成したチオNADHおよび/またはチオNADPH量の測定は、チオNADHおよび/またはチオNADPHの吸収波長における吸光度を測定することで行う請求項1～4のいずれかに記載の方法。

10

【請求項6】

生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHによる色の変化の計測は、目視により行う請求項1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項7】

抗体酵素複合体または酵素標識核酸プローブの酵素(標識酵素)は、アルカリフォスファターゼである請求項1～6のいずれかに記載の方法。

【請求項8】

抗体酵素複合体または酵素標識核酸プローブの酵素(標識酵素)の基質はアンドロステロン3-リン酸であり、アンドロステロン骨格を有する化合物はアンドロステロンである請求項7に記載の方法。

20

【請求項9】

抗体酵素複合体または酵素標識核酸プローブの酵素(標識酵素)と基質との反応を行って、反応生成物であるアンドロステロン骨格を有する化合物を得ること、及びチオNADHおよび/またはチオNADPHの生成を逐次に行う請求項1～8のいずれかに記載の方法。

【請求項10】

抗体酵素複合体または酵素標識核酸プローブの酵素(標識酵素)と基質との反応を行って、反応生成物であるアンドロステロン骨格を有する化合物を得ること、及びチオNADHおよび/またはチオNADPHの生成を並列に行う請求項1～8のいずれかに記載の方法。

【請求項11】

以下の試薬を含む酵素免疫測定用キット。  
標的タンパク質抗原に特異的な抗体を標識し、アンドロステロン骨格を有する化合物(但し、前記アンドロステロン骨格は、3位にヒドロキシ基、17位にカルボニル基を有する)のリン酸エステル化された3-ヒドロキシ基を3-ヒドロキシ基に転換できる酵素、

30

上記酵素の基質である3-ヒドロキシ基がリン酸エステル化されたアンドロステロン骨格を有する化合物、

3-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(3 -HSD)、

NADHおよび/またはNADPH、

チオNADおよび/またはチオNADP

40

【請求項12】

以下の試薬を含む核酸プローブ測定用キット。

標的核酸に特異的に結合する核酸プローブを標識し、アンドロステロン骨格を有する化合物(但し、前記アンドロステロン骨格は、3位にヒドロキシ基、17位にカルボニル基を有する)のリン酸エステル化された3-ヒドロキシ基を3-ヒドロキシ基に転換できる酵素、

上記酵素の基質である3-ヒドロキシ基がリン酸エステル化されたアンドロステロン骨格を有する化合物、

3-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(3 -HSD)

NADHおよび/またはNADPH、

50

チオNADおよび/またはチオNADP

【請求項 1 3】

抗体酵素複合体または酵素標識核酸プローブの酵素（標識酵素）は、アルカリフォスファターゼである請求項 1 1 または 1 2 に記載のキット。

【請求項 1 4】

3 - ヒドロキシ基がリン酸エステル化されたアンドロステロン骨格を有する化合物はアンドロステロン 3 - リン酸であり、アンドロステロン骨格を有する化合物はアンドロステロンである請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれかに記載のキット。

【請求項 1 5】

請求項 1 ~ 1 0 のいずれかに記載の方法に用いるためのキットである請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれかに記載のキット。

10

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0 0 0 1】

本出願は、2 0 0 7 年 3 月 2 8 日出願の日本特願 2 0 0 7 - 8 5 5 5 0 号の優先権を主張し、それらの全記載は、ここに特に開示として援用される。

【技術分野】

【0 0 0 2】

本発明は、酵素免疫測定法および核酸プローブ測定法を利用するタンパク質と核酸の高感度測定法に関する。特に本発明は、抗体または核酸プローブに標識する酵素の活性測定にチオNADサイクリング法を応用し、普及型の比色マイクロプレートリーダーや目視でも、標的タンパク質および核酸の超高感度測定を可能にする方法に関する。

20

【背景技術】

【0 0 0 3】

タンパク質や核酸の高感度測定法としてラジオイムノアッセイ（RIA）法が技術的に確立されているが、検出装置の感度を上げる以外に、現状では $10^{-16}$  mole 程度以上の高感度化は技術的に不可能である。しかも、RIA法では測定の場合がアイソトープ実験施設に限定されるだけでなく、短寿命の核種を使用すれば試薬の使用期限が極端に短くなる上に、測定感度も急激に低下する。さらに、放射能測定法に特有の放射性廃棄物の問題も抱えている。特に長寿命の核種を使用する場合の廃棄の問題は大きい。したがって、近年、タンパク質や核酸の高感度測定法の開発研究は「非放射性」をキーワードとして展開されてきた。それゆえ、RIA法に関する研究開発や技術的改良はほとんど行われていない現状である。

30

【0 0 0 4】

RIA法に代わる高感度測定法として、タンパク質の測定には酵素免疫測定法（ELISA法）[図 1] が、核酸の測定にはPCR法がある。酵素免疫測定法は開発当初の比色法（ $10^{-13}$  mole）から蛍光法、発光法へと高感度化（ $10^{-15}$  mole）が進められ、専用測定装置の開発・改良も進んでいる。しかし、測定操作が簡便になっただけで感度的には限界に達している。（非特許文献1）

【0 0 0 5】

また、核酸の高感度測定法としてのPCR法では、ターゲット特異的なシグナル検出の問題、増幅効率の問題、PCR産物がプラトーに達する条件等を考え合わせると、核酸の定量は厳密には難しい。

40

【非特許文献 1】「超高感度酵素免疫測定法」（学会出版センター・1993年）

【0 0 0 6】

そこで本発明の目的は、検出方法が最も簡便な比色法を用い、感度を幾何級数的に高めた測定法を提供することである。具体的には感度を $10^{-18}$  moles 以上に高めた測定法を提供することである。

【0 0 0 7】

タンパク質または核酸を、酵素免疫測定法を用いて、より高感度に測定するには、酵素

50

免疫測定法の標識酵素によって生成するシグナル物質を増幅することが考えられる。また、シグナル物質を増幅する方法として、いくつかの酵素サイクリング法が知られている。そこで、本発明者らは、酵素免疫測定法を用いたタンパク質または核酸の比色測定による高感度測定法を提供すべく種々検討した。その結果、酵素免疫測定法を、酵素免疫測定法で用いる標識酵素の生成物を基質とする酵素サイクリング法を組み合わせ、シグナル物質としてチオNAD(P)Hを幾何級数的に増幅することで、比色法によって、高感度にタンパク質または核酸の定量や目視による検出が可能であることを見いだして、本発明を完成させた。

【発明の開示】

【0008】

10

上記課題を解決するための本発明の第1の態様は、抗体酵素複合体を用いる酵素測定方法であって、  
抗体酵素複合体の酵素による反応生成物の定量は、NADHおよび/またはNADPH、チオNADおよび/またはチオNADP、並びにデヒドロゲナーゼ(DH)を用いて、酵素サイクリング反応によりチオNADHおよび/またはチオNADPHを生成させ、生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHの量を測定するか、または生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHによる色の变化を計測することで行う、前記方法である。

上記方法においては、抗体酵素複合体は、標的タンパク質抗原に特異的な抗体とこの抗体で標識した酵素とからなり、前記標的タンパク質の測定に用いられることができる。

【0009】

20

上記課題を解決するための本発明の第2の態様は、酵素標識核酸プローブを用いる核酸プローブ測定方法であって、  
酵素標識核酸プローブの酵素による反応生成物の定量は、NADHおよび/またはNADPH、チオNADおよび/またはチオNADP、並びにデヒドロゲナーゼ(DH)を用いて、酵素サイクリング反応によりチオNADHおよび/またはチオNADPHを生成させ、生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHの量を測定するか、または生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHによる色の变化を計測することで行う、前記方法である。

上記方法においては、酵素標識核酸プローブは、標的核酸に特異的に結合する核酸プローブとこの核酸プローブで標識した酵素とからなり、前記標的核酸の測定に用いられることができる。

30

【0010】

上記第1の態様および第2の態様においては、以下の態様がさらに好ましい。(1)生成したチオNADHおよび/またはチオNADPH量の測定は、チオNADHおよび/またはチオNADPHの吸収波長における吸光度を測定することで行う、

(2)生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHによる色の变化の計測は、目視により行う、

(3)抗体酵素複合体または酵素標識核酸プローブの酵素(標識酵素)は、EC番号2.-で表される転移酵素群、EC番号3.-で表される加水分解酵素群、EC番号4.-で表される除去付加酵素群およびEC番号5.-で表される異性化酵素群から成る群から選ばれる少なくとも1種の酵素である。

40

【0011】

上記課題を解決するための本発明の第3の態様は、以下の試薬を含む酵素免疫測定用キットである。

標的タンパク質抗原に特異的な抗体を標識した酵素

上記酵素の基質

デヒドロゲナーゼ(DH)

NADHおよび/またはNADPH、

チオNADおよび/またはチオNADP

【0012】

上記課題を解決するための本発明の第4の態様は、以下の試薬を含む核酸プローブ測

50

定用キットである。

標的核酸に特異的に結合する核酸プローブで標識した酵素

上記酵素の基質

デヒドロゲナーゼ(DH)

NADHおよび/またはNADPH、

チオNADおよび/またはチオNADP

【0013】

上記キットにおいて、抗体酵素複合体または酵素標識核酸プローブの酵素(標識酵素)は、EC番号 2.-で表される転移酵素群、EC番号 3.-で表される加水分解酵素群、EC番号4.-で表される除去付加酵素群およびEC番号5.-で表される異性化酵素群から成る群から選ばれる少なくとも1種の酵素であることができる。

10

【0014】

本発明によれば、測定感度を $10^{-18}$ moles 以上に高めた酵素免疫測定法を提供することができ、標的タンパク質や標的核酸の高感度測定が可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

〔酵素サイクリング法〕

本発明は、抗体酵素複合体を用いる酵素測定方法であって、

抗体酵素複合体の酵素による反応生成物の定量は、NADHおよび/またはNADPH、チオNADおよび/またはチオNADP、並びにデヒドロゲナーゼ(DH)を用いて、酵素サイクリング反応によりチオNADHおよび/またはチオNADPHを生成させ、生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHの量を測定するか、または生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHによる色の変化を計測することで行う、前記方法に関する。

20

【0016】

上記抗体酵素複合体は、標的タンパク質抗原に特異的な抗体とこの抗体で標識した酵素とからなり、前記標的タンパク質の測定に用いられる。

【0017】

さらに本発明は、酵素標識核酸プローブを用いる核酸プローブ測定方法であって、

酵素標識核酸プローブの酵素による反応生成物の定量は、NADHおよび/またはNADPH、チオNADおよび/またはチオNADP、並びにデヒドロゲナーゼ(DH)を用いて、酵素サイクリング反応によりチオNADHおよび/またはチオNADPHを生成させ、生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHの量を測定するか、または生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHによる色の変化を計測することで行う、前記方法に関する。

30

【0018】

上記酵素標識核酸プローブは、標的核酸に特異的に結合する核酸プローブとこの核酸プローブで標識した酵素とからなり、前記標的核酸の測定に用いられる。

【0019】

上記本発明の方法で用いられている抗体酵素複合体または酵素標識核酸プローブの酵素(標識酵素)は、EC番号 2.-で表される転移酵素群、EC番号 3.-で表される加水分解酵素群、EC番号4.-で表される除去付加酵素群およびEC番号5.-で表される異性化酵素群から成る群から選ばれる少なくとも1種の酵素であることができる。

40

【0020】

EC番号 2.-で表される転移酵素群としては、例えば、以下のEC番号に分類されるものをいずれも使用できる。

## EC.2.- (転移酵素)

- 3.1 EC.2.1.- (一炭素原子の基を移すもの)
  - 3.1.1 EC.2.1.1.- (メチル基を移すもの)
  - 3.1.2 EC.2.1.2.- (HOCH<sub>2</sub>-ヒドロキシメチル基またはHCO-ホルミル基を移すもの)
  - 3.1.3 EC.2.1.3.- (カルボキシル基またはH<sub>2</sub>NCO-カルバモイル基を移すもの)
  - 3.1.4 EC.2.1.4.- (H<sub>2</sub>NCNH-アミジノ基を移すもの)
- 3.2 EC.2.2.- (アルデヒドまたはケトンを移すもの)
  - 3.2.1 EC.2.2.1.- (アルデヒドまたはケトンを移すもの)
- 3.3 EC.2.3.- (アシル基を移すもの)
  - 3.3.1 EC.2.3.1.- (アミノアシル基以外のアシル基を移すもの)
  - 3.3.2 EC.2.3.2.- (アミノアシル基を移すもの)
  - 3.3.3 EC.2.3.3.- (アシル基転移の際、アルキル基への変換を伴うもの)
- 3.4 EC.2.4.- (グリコシル基を移すもの)
  - 3.4.1 EC.2.4.1.- (六炭糖残基を移すもの)
  - 3.4.2 EC.2.4.2.- (五炭糖残基を移すもの)
  - 3.4.3 EC.2.4.99.- (その他のグリコシル基を移すもの)
- 3.5 EC.2.5.- (メチル基以外のアルキル基またはアリル基を移すもの)
- 3.6 EC.2.6.- (含窒素の基を移すもの)
  - 3.6.1 EC.2.6.1.- (H<sub>2</sub>N-アミノ基を移すもの)
  - 3.6.2 EC.2.6.2.- (-CNHNH<sub>2</sub>アミジノ基を移すもの)
  - 3.6.3 EC.2.6.3.- (-N(OH)オキシム基を移すもの)
  - 3.6.4 EC.2.6.99.- (その他の含窒素の基を移すもの)
- 3.7 EC.2.7.- (リンを含む基を移すもの)
  - 3.7.1 EC.2.7.1.- (キナーゼ(アルコールにつなげるもの))
  - 3.7.2 EC.2.7.2.- (カルボキシル基に移すもの)
  - 3.7.3 EC.2.7.3.- (含窒素基に移すもの)
  - 3.7.4 EC.2.7.4.- (リン酸基に移すもの)
  - 3.7.5 EC.2.7.5.- (分子内での移動を触媒するもの)
  - 3.7.6 EC.2.7.6.- (二リン酸基を移すもの)
  - 3.7.7 EC.2.7.7.- (核酸を移すもの)
  - 3.7.8 EC.2.7.8.- (その他の、リン酸基を含む基を移すもの)
  - 3.7.9 EC.2.7.9.- (複数の分子を受容体とするもの)
  - 3.7.10 EC 2.7.10.- (タンパク質-チロシンキナーゼ)
  - 3.7.11 EC 2.7.11.- (タンパク質-セリン/スレオニンキナーゼ)
  - 3.7.12 EC 2.7.12.- (双特異性キナーゼ; Ser/ThrないしはTyr残基に作用)
  - 3.7.13 EC 2.7.13.- (タンパク質-ヒステジンキナーゼ)
  - 3.7.14 EC 2.7.99.- (その他のキナーゼ)
- 3.8 EC.2.8.- (硫黄を含む基を移すもの)
  - 3.8.1 EC 2.8.1.- (スルフトランスキナーゼ類)
  - 3.8.2 EC 2.8.2.- (スルホトランスキナーゼ類)
  - 3.8.3 EC 2.8.3.- (CoA転移酵素)
  - 3.8.4 EC 2.8.4.- (アルキルチオ基転移酵素)
- 3.9 EC.2.9.- (セレンを含む基を移すもの)
  - 3.9.1 EC 2.9.1.- (セレノトランスフェラーゼ)

EC番号 2.- で表される転移酵素群に含まれる酵素の例としては、例えば、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)等を挙げることができる。

EC番号 3.-で表される加水分解酵素群としては、例えば、以下のEC番号に分類されるものをいずれも使用できる。

#### EC.3.- (加水分解酵素)

##### ■ 4.1 EC.3.1.- (エステル加水分解酵素)

- 4.1.1 EC.3.1.1.- (カルボン酸エステル加水分解酵素)
- 4.1.2 EC.3.1.2.- (3価のアルコールのエステル加水分解酵素)
- 4.1.3 EC 3.1.3.- (1価のリン酸エステル加水分解酵素)
- 4.1.4 EC 3.1.4.- (リン酸ジエステル加水分解酵素)
- 4.1.5 EC 3.1.5.- (三リン酸モノエステル加水分解酵素)
- 4.1.6 EC 3.1.6.- (硫酸エステル加水分解酵素) 10
- 4.1.7 EC 3.1.7.- (ニリン酸モノエステル加水分解酵素)
- 4.1.8 EC 3.1.8.- (リン酸トリエステル加水分解酵素)
- 4.1.9 EC 3.1.11.- (5'-リン酸モノエステル産生エンドデオキシリボヌクレアーゼ)
- 4.1.10 EC 3.1.13.- (5'-リン酸モノエステル産生エキソリボヌクレアーゼ)
- 4.1.11 EC 3.1.14.- (3'-リン酸モノエステル産生エキソリボヌクレアーゼ)
- 4.1.12 EC 3.1.15.- (リボ核酸またはデオキシリボ核酸に作用する、5'-リン酸モノエステル産生エキソヌクレアーゼ)
- 4.1.13 EC 3.1.16.- (リボ核酸またはデオキシリボ核酸に作用する、3'-リン酸モノエステル産生エキソヌクレアーゼ) 20
- 4.1.14 EC 3.1.21.- (5'-リン酸モノエステル産生エンドデオキシリボヌクレアーゼ)
- 4.1.15 EC 3.1.22.- (3'-リン酸モノエステル産生エンドデオキシリボヌクレアーゼ)
- 4.1.16 EC 3.1.23.- (欠番)
- 4.1.17 EC 3.1.23.- (欠番)
- 4.1.18 EC 3.1.25.- (サイト特異性を有する代換え塩基特異性エンドデオキシリボヌクレアーゼ)
- 4.1.19 EC 3.1.26.- (5'-リン酸モノエステル産生エンドリボヌクレアーゼ)
- 4.1.20 EC 3.1.27.- (3'-リン酸モノエステル産生エンドリボヌクレアーゼ) 30
- 4.1.21 EC 3.1.30.- (リボ核酸またはデオキシリボ核酸に作用する、5'-リン酸

- モノエステル産生エンドリボヌクレアーゼ)
- 4.1.22 EC 3.1.31.- (リボ核酸またはデオキシリボ核酸に作用する、3'-リン酸モノエステル産生エンドリボヌクレアーゼ)
  - 4.2 EC.3.2.- (糖加水分解酵素)
    - 4.2.1 EC.3.2.1.- (配糖体結合加水分解酵素または糖加水分解酵素)
    - 4.2.2 EC 3.2.2.- (N-グリコシル化合物加水分解酵素)
    - 4.2.3 EC 3.2.3.- (S-グリコシル化合物加水分解酵素)
  - 4.3 EC.3.3.- (エーテル・チオエーテル加水分解酵素)
    - 4.3.1 EC 3.3.1.- (チオエーテル・トリアルキルスルホニウム加水分解酵素)
    - 4.3.2 EC 3.3.2.- エーテル加水分解酵素) 10
  - 4.4 EC 3.4.- (ペプチド結合加水分解酵素)
    - 4.4.1 EC 3.4.1.- ( $\alpha$ -アミノアシルペプチド加水分解酵素) (廃止)
    - 4.4.2 EC 3.4.2.- (ペプチド性アミノ酸加水分解酵素) (廃止)
    - 4.4.3 EC 3.4.3.- (ジペプチド加水分解酵素) (廃止)
    - 4.4.4 EC 3.4.4.- (ペプチド性ペプチド加水分解酵素) (廃止)
    - 4.4.5 EC 3.4.11.- (アミノペプチターゼ)
    - 4.4.6 EC 3.4.12.- (ペプチド性アミノ酸加水分解酵素ないしはアシルアミノ酸加水分解酵素)
    - 4.4.7 EC 3.4.13.- (ジペプチターゼ)
    - 4.4.8 EC 3.4.14.- (ジペプチジルペプチターゼ・トリペプチジルペプチターゼ) 20
    - 4.4.9 EC 3.4.15.- (ペプチジルジペプチターゼ)
    - 4.4.10 EC 3.4.16.- (セリン性カルボキシペプチターゼ)
    - 4.4.11 EC 3.4.17.- (金属プロテアーゼ)
    - 4.4.12 EC 3.4.18.- (システイン性カルボキシペプチターゼ)
    - 4.4.13 EC 3.4.19.- (オメガペプチターゼ)
    - 4.4.14 EC 3.4.21.- (セリンエンドペプチターゼ)
    - 4.4.15 EC 3.4.22.- (システインプロテアーゼ)
    - 4.4.16 EC 3.4.23.- (アスパラギン酸プロテアーゼ)
    - 4.4.17 EC.3.4.24.- (その他のペプチターゼ)
    - 4.4.18 EC 3.4.25.- (スレオニンエンドペプチターゼ)
    - 4.4.19 EC 3.4.99.- (触媒機構不明のエンドペプチターゼ) 30
  - 4.5 EC 3.5.- (ペプチド以外のCN結合加水分解酵素)
    - 4.5.1 EC 3.5.1.- (鎖状アミドに作用)
    - 4.5.2 EC 3.5.2.- (環状アミドに作用)
    - 4.5.3 EC 3.5.3.- (鎖状アミジンに作用)
    - 4.5.4 EC 3.5.4.- (環状アミジンに作用)
    - 4.5.5 EC 3.5.5.- (ニトリルに作用)
    - 4.5.6 EC 3.5.99.- (その他の化合物に作用)
  - 4.6 EC 3.6.- (酸無水物に作用)
    - 4.6.1 EC 3.6.1.- (リン含有酸無水物に作用)
    - 4.6.2 EC 3.6.2.- (スルホニル含有酸無水物に作用) 40
    - 4.6.3 EC 3.6.3.- (酸無水物に作用・物質の膜輸送を触媒する)
    - 4.6.4 EC 3.6.4.- (酸無水物に作用・細胞または細胞小器官の運動に関与)
    - 4.6.5 EC 3.6.5.- (GTPに作用・細胞または細胞小器官の運動に関与)
  - 4.7 EC 3.7.- (炭素-炭素結合に作用)
    - 4.7.1 EC 3.7.1.- (ケトン類に作用)
  - 4.8 EC 3.8.- (ハロゲン結合に作用)
    - 4.8.1 EC 3.8.1.- (C-ハロゲン化合物に作用)

- 4.8.2 EC 3.8.2.- (P-ハロゲン化合物に作用)
- 4.9 EC 3.9.- (リン-窒素結合に作用)
- 4.10 EC 3.10.- (硫黄-窒素結合に作用)
- 4.11 EC 3.11.- (炭素-リン結合に作用)
- 4.12 EC 3.12.- (硫黄-硫黄結合に作用)
- 4.13 EC 3.13.- (炭素-硫黄結合に作用)

EC番号 3.- で表される転移酵素群に含まれる酵素の例としては、例えば、アルカリホスファターゼ (ALP)、イヌリナーゼ (INL)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -Gal)、 $\beta$ -グルコシダーゼ ( $\beta$ -Glu)、リボプロテインリパーゼ (LPL) 等を挙げることができる。

10

【 0 0 2 2 】

EC番号4.- で表される除去付加酵素群としては、例えば、以下の E C 番号に分類されるものをいずれも使用できる。

EC.4.- (付加脱離酵素(リアーゼ))

- 5.1 EC.4.1.- (C-Cリアーゼ)
  - 5.1.1 EC.4.1.1.- (カルボキシル基の付加脱離)
  - 5.1.2 EC.4.1.2.- (アルデヒド基の付加脱離)
  - 5.1.3 EC.4.1.3.- (オキソ酸の付加脱離)
  - 5.1.4 EC.4.1.99.- (その他の炭素-炭素リアーゼ類)
- 5.2 EC.4.2.- (炭素-酸素リアーゼ類)
  - 5.2.1 EC.4.2.1.- (デヒドラターゼ類)
  - 5.2.2 EC.4.2.2.- (多糖に作用する)
  - 5.2.3 EC.4.2.3.- (リン酸基の付加脱離)
  - 5.2.4 EC.4.2.99.- (その他の炭素-酸素リアーゼ)
- 5.3 EC.4.3.- (C-Nリアーゼ)
  - 5.3.1 EC.4.3.1.- (アンモニアの付加脱離)
  - 5.3.2 EC.4.3.2.- (アミジンの付加脱離)
  - 5.3.3 EC.4.3.3.- (アミンリアーゼ類)
  - 5.3.4 EC.4.3.99.- (他の炭素-窒素リアーゼ類)
- 5.4 EC.4.4.- (C-Sリアーゼ類)
- 5.5 EC.4.5.- (C-ハロゲン化物リアーゼ類)
- 5.6 EC.4.6.- (P-Oリアーゼ類)
- 5.7 EC.4.99.- (その他のリアーゼ)

20

30

EC番号 4.- で表される転移酵素群に含まれる酵素の例としては、例えば、フマラーゼ (FUM)、ホスホエノールピルベートカルボキシラーゼ (PEPC)、オキサロアセテートデカルボキシラーゼ (OAC)、マレートシンテターゼ (MLS) 等を挙げることができる。

【 0 0 2 3 】

EC番号5.- で表される異性化酵素群としては、例えば、以下の E C 番号に分類されるものをいずれも使用できる。

## EC.5.-(異性化酵素)

- 6.1 EC.5.1.-(ラセマーゼ・エピメラーゼ(光学異性の転換))
  - 6.1.1 EC.5.1.1 (アミノ酸類に作用)
  - 6.1.2 EC.5.1.2.-(ヒドロキシ酸類に作用)
  - 6.1.3 EC.5.1.3.-(炭水化物およびその類縁体に作用)
  - 6.1.4 EC.5.1.99.-(その他化合物に作用)
- 6.2 EC.5.2.-(シストランス異性化酵素)
- 6.3 EC.5.3.-(分子内で酸化還元酵素として働くもの)
  - 6.3.1 EC.5.3.1.-(アルドース - ケトースの相互変換)
  - 6.3.2 EC5.3.2.-(ケト基-エノール基の相互変換)
  - 6.3.3 EC5.3.3.-(C=C結合の転位)
  - 6.3.4 EC.5.3.4.-(S-S結合の転位)
  - 6.3.5 EC.5.3.99.-(分子内酸化還元酵素)
- 6.4 EC.5.4.-(分子内転位酵素;ムターゼ)]
  - 6.4.1 EC.5.4.1.-(アシル基を移すもの)
  - 6.4.2 EC.5.4.2.-(リン酸基転位酵素;ホスホムターゼ)
  - 6.4.3 EC.5.4.3.-(アミノ基を移すもの)
  - 6.4.4 EC.5.4.4.-(水酸基を移すもの)
  - 6.4.5 EC.5.4.99.-(その他の基を移すもの)
- 6.5 EC.5.5.-(分子内リアーゼ)
- 6.6 EC.5.99.-(その他の異性化酵素)

10

20

EC番号 5.-で表される転移酵素群に含まれる酵素の例としては、例えば、トリオースホスフェ - トイソメラーゼ(TIM)、ラクテートラセマーゼ(LRM)、3-ケトステロイド 4- 5イソメラーゼ等を挙げることができる。

## 【 0 0 2 4 】

本発明の超高感度測定法は、通常の酵素免疫測定法や核酸プローブ法と同様に実施することができる。例えば、被検体に特異的に結合する抗体や核酸プローブを表面に固着させた固相担体、例えば、マイクロプレートやプラスチックチューブ、磁気ビーズ等、通常の測定に用いられている固相担体を用いることができる。

30

## 【 0 0 2 5 】

抗体および核酸プローブ - 酵素複合体は、常法により調製できる。

## 【 0 0 2 6 】

抗体酵素複合体を構成する抗体は、本発明の酵素免疫測定方法により測定されるべき被検体に特異的に結合する抗体から適宜選択することができる。例えば、本発明の酵素免疫測定方法は、タンパク質の分析に用いられるが、その場合、抗体酵素複合体の抗体は、被検体であるタンパク質に特異的に結合する抗体である。また、この場合、被検体であるタンパク質に特異的に結合する抗体を表面に固着させた基板を用いる。また、抗体酵素複合体を構成する抗体および基板に固着させる抗体は、抗体の断片であっても良い。本発明の酵素免疫測定方法における、被検体は、タンパク質に限定されず、通常の酵素免疫測定方法が測定対象とするタンパク質以外のすべての物質であることができる。

40

## 【 0 0 2 7 】

核酸プローブ酵素複合体も同様に測定対象となる核酸に相補的なプローブを適宜選択することができる。

## 【 0 0 2 8 】

本発明の方法において、抗体酵素複合体の酵素または酵素標識核酸プローブの酵素による反応生成物の定量は、NADHおよび/またはNADPH、チオNADおよび/またはチオNADP、並びにデヒドロゲナーゼ(DH)を用いて、酵素サイクリング反応によりチオNADHおよび/またはチオNADPHを生成させ、生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHの量を測定するか、または生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHによる色の変化を計測することで行う

50

## 【0029】

本発明の方法において、各成分の濃度は以下の範囲にすることができる。

(1) 抗体酵素複合体または酵素標識核酸プローブの濃度範囲

0.01  $\mu\text{g/ml}$  ~ 1  $\text{mg/ml}$

(2) 標識酵素の基質の濃度範囲

1  $\mu\text{M}$  ~ 500  $\text{mM}$

(3) NADHおよび/またはNADPHの濃度範囲

0.01  $\text{mM}$  ~ 50  $\text{mM}$

(4) チオNADおよび/またはチオNADPの濃度範囲

0.01  $\text{mM}$  ~ 100  $\text{mM}$

(5) デヒドロゲナーゼ(DH) の濃度範囲

0.01  $\text{u/ml}$  ~ 5000  $\text{u/ml}$

10

## 【0030】

反応条件は、標識酵素およびデヒドロゲナーゼ(DH)の最適温度範囲を考慮して適宜決定できる。例えば、反応温度は、操作が簡便であることから、室温で実施することが好ましい。但し、標識酵素およびデヒドロゲナーゼ(DH)の最適温度範囲を考慮して室温より高い温度または低い温度で実施することもできる。

## 【0031】

反応時間は、生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHの量の測定、または生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHによる色の変化の計測が可能な程度まで、チオNADHおよび/またはチオNADPHが蓄積するに十分な時間とすることができる。但し、測定または計測に必要なチオNADHおよび/またはチオNADPHの蓄積量は、測定または計測条件により変化するので、条件に応じて適宜決定できる。

20

## 【0032】

抗体酵素複合体の酵素または酵素標識核酸プローブの酵素による反応生成物は、標識酵素および標識酵素の基質として用いる物質により異なるが、例えばアルカリホスファターゼ(ALP)の場合は酵素サイクリング反応に使用する脱水素酵素の基質となりうる化合物のモノリン酸エステルであることができる。標識酵素と基質の組み合わせの例は後述する。

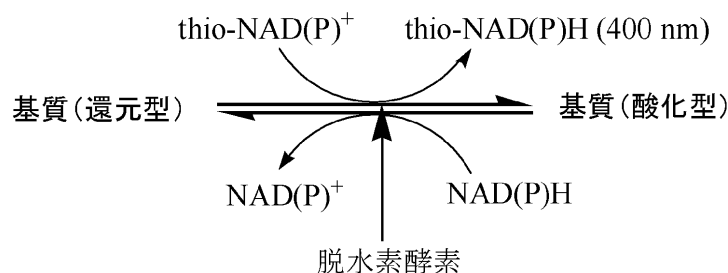
## 【0033】

酵素サイクリング系の中でチオNAD(P)を利用するサイクリング系は比較的最近になって登場したユニークなサイクリング系である。この系ではNAD(P)/NAD(P)Hを補酵素として利用する脱水素酵素(Dehydrogenase; DH)を用い、NAD(P)/NAD(P)HとそのアナログであるチオNAD(P)/チオNAD(P)Hが共存する条件下でサイクリングを行い、脱水素酵素の基質をチオNAD(P)H(極大吸収波長: 400 nm、モル吸光係数=11,900)として増幅定量する。チオNAD(P)サイクリング法の測定原理は以下の通りである。

30

## 【0034】

## 【化1】



40

## 【0035】

NADHの極大吸収が340 nm(モル吸光係数=6,200)であるのに対し、チオNAD(P)Hは可視域に吸収を示すため(極大吸収波長: 400 nm、モル吸光係数=11,900)、普及型の吸光度計や比色測定用マイクロプレートリーダーを用いて測定できることをその長所としてい

50

る。

【0036】

チオNAD(P)を利用するサイクリング系は、普及型の吸光光度計や比色測定用マイクロプレートリーダーを用いて測定できるという長所を利用して、NADHの吸収増加に基づく脱水素酵素活性測定やその基質の定量法などの従来法のいくつかがチオNADを用いる方法に改良されている。しかしながら、このサイクリング系を酵素免疫測定法等の検出系として高感度化に利用した報告は未だない。

本発明では、標識酵素とサイクリング系を組み合わせることにより、初めて増幅反応を幾何級数的な反応とすることが可能となり、十分な高感度化を行うことが可能となった。

【0037】

本発明の測定法では、酵素免疫測定法の例で示したとおり、酵素複合体とそれに組み合わせた基質で産生された生成物を次の酵素サイクリング反応の基質として用い、酵素サイクリング反応により生成したチオNAD(P)Hの吸収を比色定量するものである。この反応では1種の脱水素酵素で酵素サイクリングを行うため、酵素サイクリング反応の基質としては、還元型基質でも酸化型基質でもよい。

【0038】

上記酵素複合体として用いる標識酵素とその基質およびそれに続くサイクリング反応に用いる脱水素酵素は以下のような性質を持っていることが望ましい。

- (1) 標識酵素のターンオーバー数が大きい
- (2) 市販および汎用されている標識酵素が使用できる
- (3) 酵素サイクリングのターンオーバー数が大きい
- (4) 酵素サイクリング反応に使用する脱水素酵素に標識酵素のコンタミや標識酵素と同様の活性がない
- (5) 標識酵素の基質が市販の化合物であるか、または容易に合成ができ、かつ安定性が高い

【0039】

デヒドロゲナーゼ(DH)としては、以下のデヒドロゲナーゼ(DH)を挙げることができる。

- EC.1.1.1.1 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/1.html>) アルコールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.2 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/2.html>) アルコールデヒドロゲナーゼ(NADP)

10

20

30

- EC.1.1.1.3 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/3.html>) ホモセリンデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.4 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/4.html>) (R,R-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ)
- EC.1.1.1.5 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/5.html>) アセトインデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.6 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/6.html>) グリセロールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.7 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/7.html>) プロパンジオールリン酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.8 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/8.html>) グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ 10
- EC.1.1.1.9 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/9.html>) D-キシロースレダクターゼ
- EC.1.1.1.10 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/10.html>) L-キシロースデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.11 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/11.html>) D-アラビニトール4-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.12 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/12.html>) L-アラビニトール4-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.13 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/13.html>) L-アラビニトール2-デヒドロゲナーゼ 20
- EC.1.1.1.14 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/14.html>) L-イジトール2-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.15 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/15.html>) D-イジトール2-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.16 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/16.html>) ガラクチトール2-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.17 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/17.html>) マンニトール-1-リン酸5-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.18 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/18.html>) Myo-イノシトール2-デヒドロゲナーゼ 30
- EC.1.1.1.19 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/19.html>) グルクロ酸レダクターゼ
- EC.1.1.1.20 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/20.html>) グルクロラクトンレダクターゼ
- EC.1.1.1.21 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/21.html>) アルデヒドレダクターゼ
- EC.1.1.1.22 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/22.html>) UDP-グルコース6-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.23 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/23.html>) ヒスチノールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.24 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/24.html>) キナ酸5-デヒドロゲナーゼ 40
- EC.1.1.1.25 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/25.html>) シキミ酸5-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.26 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/26.html>) グリコール酸レダクターゼ
- EC.1.1.1.27 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/27.html>) L-乳酸デヒ

## ドロゲナーゼ

- EC.1.1.1.28 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/28.html>) D-乳酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.29 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/29.html>) グリセル酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.30 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/30.html>) 3-ヒドロキシブチル酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.31 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/31.html>) 3-ヒドロキシイソブチル酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.32 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/32.html>) メバロン酸レダクターゼ 10
- EC.1.1.1.33 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/33.html>) メバロン酸レダクターゼ(NADPH)
- EC.1.1.1.34 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/34.html>) ヒドロキシメチルグルタリルCoAレダクターゼ
- EC.1.1.1.35 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/35.html>) 3-ヒドロキシアシルCoAデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.36 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/36.html>) アセトアシルCoAレダクターゼ
- EC.1.1.1.37 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/37.html>) リンゴ酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.38 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/38.html>) リンゴ酸デヒドロゲナーゼ 20
- EC.1.1.1.39 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/39.html>) リンゴ酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.40 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/40.html>) リンゴ酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.41 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/41.html>) イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(NAD)
- EC.1.1.1.42 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/42.html>) イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(NADP)
- EC.1.1.1.43 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/43.html>) 6-ホスホグルコン酸2-デヒドロゲナーゼ 30
- EC.1.1.1.44 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/44.html>) ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.45 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/45.html>) L-グルオン酸3-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.46 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/46.html>) L-アラビノース1-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.47 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/47.html>) グルコース1-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.48 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/48.html>) D-ガラクトース1-デヒドロゲナーゼ 40
- EC.1.1.1.49 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/49.html>) グルコース6-リン酸1-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.50 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/50.html>) 3- $\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.51 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/51.html>) 3(or17)- $\beta$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ

- EC.1.1.1.52 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/52.html>) 3- $\alpha$ -ヒドロキシコール酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.53 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/53.html>) 3- $\alpha$ (or20 $\beta$ )-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.54 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/54.html>) アリルアルコールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.55 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/55.html>) ラクトアルデヒドレダクターゼ
- EC.1.1.1.56 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/56.html>) リビトール2-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.57 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/57.html>) フルクツロン酸デヒドロゲナーゼ 10
- EC.1.1.1.58 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/58.html>) タガツロン酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.59 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/59.html>) 3-ヒドロキシプロピオン酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.60 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/60.html>) 2-ヒドロキシ-3-オキソプロピオン酸レダクターゼ
- EC.1.1.1.61 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/61.html>) 4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.62 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/62.html>) エストラジオール17- $\beta$ -デヒドロゲナーゼ 20
- EC.1.1.1.63 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/63.html>) テストステロン17- $\beta$ -デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.64 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/64.html>) テストステロン17- $\beta$ -デヒドロゲナーゼ(NADP)
- EC.1.1.1.65 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/65.html>) ピリドキシン4-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.66 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/66.html>)  $\omega$ -ヒドロキシデカン酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.67 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/67.html>) マンニトール2-デヒドロゲナーゼ 30
- EC.1.1.1.68 欠番 →EC.1.7.99.5
- EC.1.1.1.69 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/69.html>) グルコン酸5-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.70 欠番 →EC.1.2.1.3
- EC.1.1.1.71 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/71.html>) アルコールデヒドロゲナーゼ(NAD(P))
- EC.1.1.1.72 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/72.html>) グリセノールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.73 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/73.html>) オクタノールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.74 欠番 削除
- EC.1.1.1.75 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/75.html>) (R)-アミノプロパノールデヒドロゲナーゼ 40
- EC.1.1.1.76 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/76.html>) (S,S)-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.77 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/77.html>) ラクトアルアルデヒドレダクターゼ

- EC.1.1.1.78 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/78.html>) D-ラクタルアルデヒドデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.79 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/79.html>) グリオキシル酸レダクターゼ
- EC.1.1.1.80 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/80.html>) イソプロパノールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.81 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/81.html>) ヒドロキシピルビン酸レダクターゼ
- EC.1.1.1.82 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/82.html>) リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(NADP)
- EC.1.1.1.83 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/83.html>) D-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ 10
- EC.1.1.1.84 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/84.html>) ジメチルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.85 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/85.html>) 3-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.86 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/86.html>) ケトール酸レダクトイソメラーゼ
- EC.1.1.1.87 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/87.html>) 3-カルボキシ-2-ヒドロキシアジピン酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.88 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/88.html>) ヒドロキシメチルグルタルルCoAレダクターゼ 20
- EC.1.1.1.89 欠番 →EC.1.1.1.86
- EC.1.1.1.90 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/90.html>) アリルアルコールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.91 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/91.html>) アリルアルコールデヒドロゲナーゼ(NADP)
- EC.1.1.1.92 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/92.html>) オキサログリコール酸レダクターゼ
- EC.1.1.1.93 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/93.html>) タルトロン酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.94 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/94.html>) グリセロール3-リン酸デヒドロゲナーゼ 30
- EC.1.1.1.95 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/95.html>) ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.96 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/96.html>) ジョードフェニルピルビン酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.97 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/97.html>) 3-ヒドロキシベンジルアルコールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.98 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/98.html>) (R)-2-ヒドロキシ脂肪酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.99 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/99.html>) (S)-2-ヒドロキシ脂肪酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.100 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/100.html>) 3-オキソアシル(アシル輸送たんぱく質)レダクターゼ 40
- EC.1.1.1.101 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/101.html>) アシルグリセロンリン酸レダクターゼ
- EC.1.1.1.102 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/102.html>) 3-デヒドロスフィンガニンレダクターゼ

- EC.1.1.1.103 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/103.html>) L-スレオニン3-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.104 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/104.html>) 4-オキソプロリンレダクターゼ
- EC.1.1.1.105 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/105.html>) レチノールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.106 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/106.html>) パントテン酸4-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.107 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/107.html>) ピリドキサル4-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.108 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/108.html>) カルチニン3-デヒドロゲナーゼ 10
- EC.1.1.1.109 欠番 →EC.1.3.1.28
- EC.1.1.1.110 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/110.html>) インドール3-乳酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.111 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/111.html>) 3-(イミダゾール5-イル)乳酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.112 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/112.html>) インダノールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.113 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/113.html>) L-キシロース1-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.114 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/114.html>) アピオース1-レダクターゼ 20
- EC.1.1.1.115 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/115.html>) リボース1-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.116 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/116.html>) D-アラビノース1-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.117 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/117.html>) D-アラビノース1-デヒドロゲナーゼ(NAD(P))
- EC.1.1.1.118 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/118.html>) グルコース1-デヒドロゲナーゼ(NAD)
- EC.1.1.1.119 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/119.html>) グルコース1-デヒドロゲナーゼ(NADP) 30
- EC.1.1.1.120 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/120.html>) ガラクトース1-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.121 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/121.html>) アルドース1-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.122 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/122.html>) D-スレオアルドース1-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.123 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/123.html>) ソルボース5-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.124 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/124.html>) フルクトース5-デヒドロゲナーゼ 40
- EC.1.1.1.125 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/125.html>) 2-デオキシ-D-グルコン酸3-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.126 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/126.html>) 2-デヒドロ-D-グルコン酸5-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.127 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/127.html>) 2-デヒドロ-D-グルコン酸6-デヒドロゲナーゼ

- EC.1.1.1.128 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/128.html>) L-イドン酸2-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.129 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/129.html>) L-スレオン酸3-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.130 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/130.html>) 3-デヒドロ-L-グルン酸2-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.131 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/131.html>) マンヌロン酸レダクターゼ
- EC.1.1.1.132 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/132.html>) GDP-マンノース6-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.133 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/133.html>) dTDP-4-デヒドロラムノースレダクターゼ 10
- EC.1.1.1.134 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/134.html>) dTDP-6-デオキシ-L-タロース4-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.135 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/135.html>) GDP-6-デオキシ-D-タロース4-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.136 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/136.html>) UDP-N-アセチルグルコサミン6-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.137 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/137.html>) リビトール-5-リン酸2-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.138 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/138.html>) マンニトール2-デヒドロゲナーゼ 20
- EC.1.1.1.139 欠番 →EC.1.1.1.21
- EC.1.1.1.140 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/140.html>) ソルビトール-6-リン酸2-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.141 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/141.html>) 15-ヒドロキシプロスタグランジンデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.142 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/142.html>) D-ピニトールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.143 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/143.html>) セクオイトールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.144 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/144.html>) ペリリルアルコールデヒドロゲナーゼ 30
- EC.1.1.1.145 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/145.html>) 3-β-ヒドロキシ-δ(5)-ステロイドデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.146 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/146.html>) 11-β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.147 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/147.html>) 16-α-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.148 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/148.html>) エストラジオール-17-α-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.149 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/149.html>) 20-α-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.150 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/150.html>) 21-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(NAD) 40
- EC.1.1.1.151 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/151.html>) 21-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(NADP)
- EC.1.1.1.152 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/152.html>) 3-α-ヒドロキシ-5-β-アンドロスタン-17-オン3-α-デヒドロゲナーゼ

- EC.1.1.1.153 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/153.html>) セピアブ  
テリンレダクターゼ
- EC.1.1.1.154 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/154.html>) ウレイド  
グリコール酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.155 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/155.html>) ホモイソ  
クエン酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.156 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/156.html>) グリセロ  
ール2-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.157 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/157.html>) 3-ヒドロキ  
シブチリルCoAレダクターゼ
- EC.1.1.1.158 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/158.html>) UDP-N-10  
アセチルムラミン酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.159 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/159.html>) 7- $\alpha$ -ヒドロ  
キシステロイドデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.160 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/160.html>) ジヒドロブ  
ノノールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.161 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/161.html>) コレスタ  
ンテトラオール26-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.162 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/162.html>) エリスル  
ロースレダクターゼ
- EC.1.1.1.163 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/163.html>) シクロペ  
ンタノールデヒドロゲナーゼ 20
- EC.1.1.1.164 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/164.html>) ヘキサデ  
カノールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.165 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/165.html>) 2-アルキ  
ン-1-オールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.166 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/166.html>) 炭酸ヒド  
ロキシシクロヘキサンデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.167 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/167.html>) ヒドロキ  
シマロン酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.168 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/168.html>) 2-デヒドロ  
パントラクトンレダクターゼ
- EC.1.1.1.169 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/169.html>) 2-デヒドロ 30  
パント酸2-レダクターゼ
- EC.1.1.1.170 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/170.html>) ステロ  
ール-4- $\alpha$ -炭酸3-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.171 欠番 →EC.1.5.1.20
- EC.1.1.1.172 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/172.html>) 2-オキノ  
アジピン酸レダクターゼ
- EC.1.1.1.173 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/173.html>) L-ラムノ  
ース1-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.174 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/174.html>) シクロヘ  
キサン-1,2-ジオールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.175 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/175.html>) D-キシロ 40  
ース1-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.176 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/176.html>) 12- $\alpha$ -ヒド  
ロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.177 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/177.html>) グリセロ  
ール3-リン酸1-デヒドロゲナーゼ(NADP)

- EC.1.1.1.178 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/178.html>) 3-ヒドロキシ2-メチルブチリルCoAレダクターゼ
- EC.1.1.1.179 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/179.html>) D-キシロース1-デヒドロゲナーゼ(NADP)
- EC.1.1.1.180 欠番 →EC.1.1.1.131
- EC.1.1.1.181 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/181.html>) コレスト-5-エン-3-β-7-α-ジオール3-βデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.182 欠番 →EC.1.1.1.198,EC.1.1.1.227,EC.1.1.1.228
- EC.1.1.1.183 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/183.html>) ゲラニオールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.184 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/184.html>) カルボニルレダクターゼ 10
- EC.1.1.1.185 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/185.html>) L-グリコールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.186 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/186.html>) dTDP-ガラクトース6-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.187 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/187.html>) GDP-4-デヒドロ-D-ラムノースレダクターゼ
- EC.1.1.1.188 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/188.html>) プロスタグランジン-Fシンターゼ
- EC.1.1.1.189 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/189.html>) プロスタグランジン-E2-9-レダクターゼ 20
- EC.1.1.1.190 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/190.html>) インドール3-アセトアルデヒドレダクターゼ(NADH)
- EC.1.1.1.191 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/191.html>) インドール3-アセトアルデヒドレダクターゼ(NADPH)
- EC.1.1.1.192 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/192.html>) 長鎖アルコールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.193 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/193.html>) 5-アミノ-6-(5-ホスホリボシルアミノ)ウラシルレダクターゼ
- EC.1.1.1.194 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/194.html>) コニフェリルアルコールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.195 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/195.html>) シナミルアルコールデヒドロゲナーゼ 30
- EC.1.1.1.196 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/196.html>) 15-ヒドロキシプロスタグランジンDデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.197 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/197.html>) 15-ヒドロキシプロスタグランジンデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.198 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/198.html>) (+)-ボルネオールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.199 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/199.html>) (S)-ウソン酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.200 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/200.html>) アルドース-6-リン酸レダクターゼ 40
- EC.1.1.1.201 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/201.html>) 7-β-ヒドロキシステロイドレダクターゼ
- EC.1.1.1.202 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/202.html>) 1,3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.203 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/203.html>) ウロン酸

- デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.204 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/204.html>) キサンチンデヒドロゲナーゼ
  - EC.1.1.1.205 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/205.html>) IMPデヒドロゲナーゼ
  - EC.1.1.1.206 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/206.html>) トロピンデヒドロゲナーゼ
  - EC.1.1.1.207 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/207.html>) (-)-メントールデヒドロゲナーゼ
  - EC.1.1.1.208 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/208.html>) (+)-ネオメントールデヒドロゲナーゼ 10
  - EC.1.1.1.209 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/209.html>) 3(or17)- $\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
  - EC.1.1.1.210 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/210.html>) 3- $\beta$ (or20- $\alpha$ )-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
  - EC.1.1.1.211 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/211.html>) 長鎖-3-ヒドロキシアシルCoAデヒドロゲナーゼ
  - EC.1.1.1.212 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/212.html>) 3-オキソアシル-(アシル輸送たんぱく質)-レダクターゼ
  - EC.1.1.1.213 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/213.html>) 3- $\alpha$ ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ 20
  - EC.1.1.1.214 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/214.html>) 2-デヒドロパントラクトンレダクターゼ
  - EC.1.1.1.215 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/215.html>) グルコン酸2-デヒドロゲナーゼ
  - EC.1.1.1.216 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/216.html>) ファルネゾールデヒドロゲナーゼ
  - EC.1.1.1.217 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/217.html>) ベンジル-2-メチル-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ
  - EC.1.1.1.218 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/218.html>) モルヒネ6-デヒドロゲナーゼ
  - EC.1.1.1.219 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/219.html>) ジヒドロカンプフェロール4-レダクターゼ 30
  - EC.1.1.1.220 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/220.html>) 6-ピルボイル3-ヒドロキシプテリン2'-レダクターゼ
  - EC.1.1.1.221 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/221.html>) ポミフォリオールレダクターゼ
  - EC.1.1.1.222 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/222.html>) (R)-4-ヒドロキシフェニル乳酸デヒドロゲナーゼ
  - EC.1.1.1.223 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/223.html>) イソピペリテノールデヒドロゲナーゼ
  - EC.1.1.1.224 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/224.html>) マンノース6リン酸レダクターゼ 40
  - EC.1.1.1.225 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/225.html>) クロルデコンレダクターゼ
  - EC.1.1.1.226 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/226.html>) 4-ヒドロキシシクロヘキサンカルボン酸デヒドロゲナーゼ
  - EC.1.1.1.227 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/227.html>) (-)-ボルネオールデヒドロゲナーゼ

- EC.1.1.1.228 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/228.html>) (+)-サビノールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.229 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/229.html>) ジエチル2-メチル3-オキシコハク酸レダクターゼ
- EC.1.1.1.230 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/230.html>) 3- $\alpha$ -ヒドロキシグリシルレチン酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.231 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/231.html>) 15-ヒドロキシ2プロスタグランジンIデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.232 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/232.html>) 15-ヒドロキシイコサテトラエン酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.233 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/233.html>) N-アシルマンノースアミンI-デヒドロゲナーゼ 10
- EC.1.1.1.234 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/234.html>) フラボノン4-レダクターゼ
- EC.1.1.1.235 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/235.html>) 8-オキシコホルミチンレダクターゼ
- EC.1.1.1.236 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/236.html>) トロピノンレダクターゼ
- EC.1.1.1.237 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/237.html>) ヒドロキシフェニルピルビン酸レダクターゼ
- EC.1.1.1.238 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/238.html>) 12- $\beta$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ 20
- EC.1.1.1.239 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/239.html>) 3- $\alpha$ -(17-ベータ)-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ (NAD)
- EC.1.1.1.240 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/240.html>) N-アシルヘキソースアミンI-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.241 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/241.html>) 6-endo-ヒドロキシシネオールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.242 欠番 →EC.1.3.1.69
- EC.1.1.1.243 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/243.html>) カルベオールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.244 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/244.html>) メタノールデヒドロゲナーゼ 30
- EC.1.1.1.245 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/245.html>) シクロヘキサノールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.246 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/246.html>) プテロカルピンデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.247 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/247.html>) コデイノンレダクターゼ (NADPH)
- EC.1.1.1.248 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/248.html>) サルタリジンレダクターゼ (NADPH)
- EC.1.1.1.249 欠番 →EC.2.5.1.46
- EC.1.1.1.250 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/250.html>) D-アラビニトール2-デヒドロゲナーゼ 40
- EC.1.1.1.251 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/251.html>) ガラクチトール1リン酸5-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.252 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/252.html>) テトラヒドロキシナフタレンレダクターゼ
- EC.1.1.1.253 欠番 →EC.1.5.1.33

- EC.1.1.1.254 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/254.html>) (S)-カルチニン3-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.255 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/255.html>) マンニトールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.256 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/256.html>) フルオレン9-オールデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.257 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/257.html>) 4-(ヒドロキシメチル)ベンゼンスルホン酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.258 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/258.html>) 6-ヒドロキシヘキサン酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.259 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/259.html>) 3-ヒドロキシピメロイルCoAデヒドロゲナーゼ 10
- EC.1.1.1.260 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/260.html>) スルカトンレダクターゼ
- EC.1.1.1.261 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/261.html>) グリセロール1リン酸デヒドロゲナーゼ (NAD(P))
- EC.1.1.1.262 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/262.html>) 4-ヒドロキシスレオニン4リン酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.263 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/263.html>) 1,5-アンヒドロD-フルクトースレダクターゼ
- EC.1.1.1.264 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/264.html>) L-イドン酸5-デヒドロゲナーゼ 20
- EC.1.1.1.265 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/265.html>) 3-メチルブタナールレダクターゼ
- EC.1.1.1.266 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/266.html>) dTDP-4-デヒドロ6-デオキシグルコン酸レダクターゼ
- EC.1.1.1.267 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/267.html>) 1-デオキシD-キシロース5リン酸レダクトイソメラーゼ
- EC.1.1.1.268 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/268.html>) 2-(R)-ヒドロキシプロピルCoMデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.269 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/269.html>) 2-(S)-ヒドロキシプロピルCoMデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.270 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/270.html>) 3-ケトステロイドレダクターゼ 30
- EC.1.1.1.271 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/271.html>) GDP-L-フコースシンターゼ
- EC.1.1.1.272 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/272.html>) (R)-2-ヒドロキシ酸デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.273 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/273.html>) ベロシミンデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.274 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/274.html>) 2,5-ジヒドログルコン酸レダクターゼ
- EC.1.1.1.275 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/275.html>) (+)-トランスカルベオールデヒドロゲナーゼ 40
- EC.1.1.1.276 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/276.html>) セリン3-デヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.277 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/277.html>) 3-β-ヒドロキシ5-β-ステロイドデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.278 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/278.html>) 3-β-ヒドロ

キシ5- $\alpha$ -ステロイドデヒドロゲナーゼ

- EC.1.1.1.279 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/279.html>) (R)-3-ヒドロキシ酸エステルデヒドロゲナーゼ
- EC.1.1.1.280 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/280.html>) (S)-3-ヒドロキシ酸エステルデヒドロゲナーゼ
- EC 1.1.1.282 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/282.html>) キナ酸-シキミサンデヒドロゲナーゼ
- EC 1.1.1.283 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/283.html>) メチルグリオキサールリダクターゼ(NADPH-dependent)
- EC 1.1.1.284 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/284.html>) S-ヒドロキシメチルグルタチオンデヒドロゲナーゼ
- EC 1.1.1.285 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/285.html>) 3"-デアミノ-3"-ニコチン酸レダクターゼ
- EC 1.1.1.286 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/286.html>) イソクエン酸-ホモイソクエン酸デヒドロゲナーゼ
- EC 1.1.1.287 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/287.html>) D-アラビニトールデヒドロゲナーゼ(NADP+)
- EC 1.1.1.288 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/288.html>) キサンチンデヒドロゲナーゼ
- EC 1.1.1.289 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/289.html>) ソルボースレダクターゼ
- EC 1.1.1.290 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/290.html>) 4-ホスホエリスロ酸デヒドロゲナーゼ
- EC 1.1.1.291 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/291.html>) 2-ヒドロキシメチルグルタル酸デヒドロゲナーゼ

10

20

デヒドロゲナーゼ(DH)としては、より具体的には、例えば、マレートデヒドロゲナーゼ、ラクテートデヒドロゲナーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ、ガラクトースデヒドロゲナーゼ、3 - ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、ガラクトースデヒドロゲナーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ、テストステロン - 17 - デヒドロゲナーゼ、グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ等を挙げることができる。

【 0 0 4 0 】

本発明に使用可能な代表的な標識酵素、基質及び酵素サイクリング用の脱水素酵素の組み合わせの一例として以下のものがあげられるが、もちろんこの組み合わせに限られるわけではない。

30

【 0 0 4 1 】

【表 1】

標識酵素	基質	デヒドロゲナーゼ
フマラーゼ	フマル酸	マレートデヒドロゲナーゼ
フォスホエノールピルベートカルボキシラーゼ	フォスホエノールピルベート	マレートデヒドロゲナーゼ
アスパラギンアミノトランスフェラーゼ	L-アスパラギン,2-オキソグルタル酸	マレートデヒドロゲナーゼ
アラニンアミノトランスフェラーゼ	L-アラニン,2-オキソグルタル酸	ラクテートデヒドロゲナーゼ
$\alpha$ -グルコシダーゼ	$\alpha$ -フェニルグルコシド	グルコースデヒドロゲナーゼ
$\beta$ -グルコシダーゼ	$\beta$ -フェニルグルコシド	グルコースデヒドロゲナーゼ
$\beta$ -ガラクトシダーゼ	フェニルエチルガラクトシド	ガラクトースデヒドロゲナーゼ
アルカリホスファターゼ	グルコース6-リン酸	グルコースデヒドロゲナーゼ
アルカリホスファターゼ	アンドロステロン3-リン酸	3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
$\beta$ -ガラクトシダーゼ	ラクトース	ガラクトースデヒドロゲナーゼ グルコースデヒドロゲナーゼ
$\alpha$ -グルコシダーゼ	マルトース	グルコースデヒドロゲナーゼ
$\beta$ -グルコシダーゼ	セロビオース	グルコースデヒドロゲナーゼ
オキサロアセテートデカルボキシラーゼ	オキサロ酢酸	ラクテートデヒドロゲナーゼ
3-ケトステロイドイソメラーゼ	$\Delta^4$ -アンドロステン-3,17-ジオン	テストステロン-17 $\beta$ -デヒドロゲナーゼ
トリオースフォスフェートイソメラーゼ	グリセルアルデヒド-3-リン酸	グリセロール-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ

10

20

## 【0042】

例えば、上記記載の組み合わせの中でサイクリング酵素として3-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼを用いる場合、使用可能な基質の候補としては、アンドロステロン、11-ヒドロキシアンドロステロン、11-オキソアンドロステロン、11-ヒドロキシアンドロステロン、エチオコラノロン、テトラヒドロコルチゾール、プレグナンジオール、リトコール酸、デオキシコレート、ケノデオキシコール酸及びコール酸が挙げられる。

30

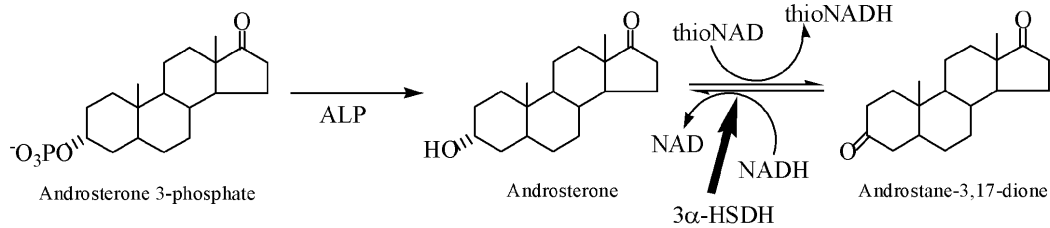
## 【0043】

サイクリング用の基質としては、酵素の反応速度が速く(基質に対する活性が高い)、低濃度でも反応する( $K_m$ 値が小さい)ものが好ましい。また、脱水素酵素として好ましい性質は、補酵素としてチオNAD(P)を用いた場合の反応速度である。多くの脱水素酵素では、補酵素としてチオNADを用いた場合の反応速度がNADを用いた場合の数%以内であるのに対し、3-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼによるアンドロステロンの脱水素反応では、チオNADでの反応速度がNADでの反応速度の約59%もあり、本発明のサイクリング酵素として、好ましい性質を有している。しかも組み合わせる標識酵素として、汎用されているアルカリホスファターゼ(ALP)を用いることが可能であり、アルカリホスファターゼの基質となるアンドロステロン3-リン酸の合成が容易であることも好ましい組み合わせである。

40

## 【0044】

## 【化2】



## 【0045】

抗体酵素複合体の酵素としてトリオースフォスフェイトイソメラーゼ(TIM)を用いる酵素免疫測定方法を例にして、以下に説明する。 10

トリオースフォスフェイトイソメラーゼ(TIM)は、ターンオーバー数の高い標識酵素であり、このTIMを用いる酵素免疫測定方法では、TIMの生成物として、ジヒドロキシアセトン-3-フォスフェイトが生成する。そして、TIMの反応生成物を基質とするデヒドロゲナーゼである、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)を酵素サイクリング反応に使用する。

## 【0046】

チオNADサイクリングは適切な脱水素酵素反応を選択すれば1分当たり数百サイクルという効率で脱水素酵素基質を増幅定量することができる。したがって、このような基質を反応生成物として与える酵素の活性はチオNADサイクリングによって超高感度に測定できる 20

## 【0047】

[酵素サイクリング用キット]

本発明は、反応性担体に標識化された酵素およびその基質とサイクリング反应用的酵素とその補酵素のチオNADとNADHを含む酵素サイクリング法用キットを包含する。

反応性担体とは測定対象物と結合する活性を持った抗体・核酸プローブ・レクチン等を表す。

反応性担体は測定対象物に適した物を用いればよく、標識酵素およびその基質も適した物を用いればよく特に限定はされない。

## 【0048】

より具体的には、本発明は、標識酵素及びその基質とサイクリング反应用的酵素とその補酵素のチオNADとNADHを含む酵素サイクリング法用キットを包含する。 30

## 【0049】

本発明のキットは、以下の試薬を含む酵素免疫測定用キットである。

標的タンパク質抗原に特異的な抗体を標識した酵素

上記酵素の基質

デヒドロゲナーゼ(DH)

NADHおよび/またはNADPH、

チオNADおよび/またはチオNADP

## 【0050】

さらに本発明は、以下の試薬を含む核酸プローブ測定用キットである。 40

標的核酸に特異的に結合する核酸プローブで標識した酵素

上記酵素の基質

デヒドロゲナーゼ(DH)

NADHおよび/またはNADPH、

チオNADおよび/またはチオNADP

## 【0051】

標識酵素およびデヒドロゲナーゼ(DH)については、上記本発明の方法で説明したものをそのまま利用できる。

## 【0052】

本発明のキットは、市販の酵素標識抗体等をこのキットの構成試薬と組合わせて使用することも可能である。このキットは、酵素サイクリング法を用いる酵素免疫測定方法に利用できる。

【実施例】

【0053】

以下、実施例に基づきこの発明を説明するが、斯界の技術水準においては、斯かる実施例は多種多様に改変可能である。斯かる技術水準に鑑み、この発明がこれら実施例のみに限定されるべきでないことは云うまでもない。

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。

【0054】

実施例1 標識酵素としてのFumaraseのサイクリング反応と組合わせた活性測定

反応試液

200 mM Tris緩衝液 pH 9.0  
9 mM チオNAD  
0.3 mM NADH  
300 u/ml MDH

基質液

100 mM Fumaric acid

測定試料

1, 5, 10 u/ml Fumarase

【0055】

測定方法

反応試液180  $\mu$ lをマイクロプレートに分注し、次に基質液を20  $\mu$ l,更に試料を20  $\mu$ l加えて、マイクロプレートリーダー(コロナ社製MTP-800)で405 nmのフィルターを使用して37 °Cでの吸光度変化を測定する。

図2に示される高感度な反応曲線を得た。特に時間の経過と共に反応が幾何級数的に進むことから、測定時間を長くすると感度は飛躍的に増大する。

【0056】

比較例1 標識酵素としてのFumaraseの活性測定

反応試液

200 mM Tris緩衝液 pH 9.0  
9 mM チオNAD  
300 u/ml MDH

基質液

100 mM Fumaric acid

測定試料

1, 5, 10 u/ml Fumarase

【0057】

測定方法

反応試液180  $\mu$ lをマイクロプレートに分注し、次に基質液を20  $\mu$ l,更に試料を20  $\mu$ l加えて、マイクロプレートリーダー(コロナ社製MTP-800)で405 nmのフィルターを使用して37 °Cでの吸光度変化を測定する。

図3に示される反応曲線を得た。酵素サイクリングと組合わせていないので反応が直線的にしか進行せず、感度が低いことが分かる。

【0058】

実施例2 標識酵素としてのPhosphoenolpyruvate carboxylaseのサイクリング反応と組合わせた活性測定

反応試液

100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 8.0)  
0.3 mM NADH

10

20

30

40

50

9 mM チオNAD

300 u/ml MDH

基質液

50 mM Phosphoenolpyruvate

測定試料

0.1 u/ml Phosphoenolpyruvate carboxylase

【0059】

測定方法

反応試液180  $\mu$ lをマイクロプレートに分注し、次に基質液を20  $\mu$ l,更に試料を20  $\mu$ l加えて、マイクロプレートリーダー(コロナ社製MTP-800)で405 nmのフィルターを使用して37 での吸光度変化を測定する。

10

図4に示される高感度な反応曲線を得た。特に時間の経過と共に反応が幾何級数的に進むことから、測定時間を長くすると感度は飛躍的に増大する。

【0060】

比較例2 標識酵素としてのPhosphoenolpyruvate carboxylaseの活性測定

反応試液

100 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (pH 8.0)

0.4 mM NADH

50 u/ml MDH

基質液

50 mM Phosphoenolpyruvate

20

測定試料

0.1 u/ml Phosphoenolpyruvate carboxylase

【0061】

測定方法

反応試液180  $\mu$ lをマイクロプレートに分注し、次に基質液を20  $\mu$ l,更に試料を20  $\mu$ l加えて、マイクロプレートリーダー(コロナ社製MTP-800)で340 nmのフィルターを使用して37 での吸光度変化を測定する。

図5に示される反応曲線を得た。酵素サイクリングと組合わせていないので殆ど反応が進行していないことが分かる。

30

【0062】

実施例3 標識酵素としてのAlkaline phosphataseのサイクリング反応と組み合わせた活性測定

反応試液

100 mM Tris 緩衝液 pH 9.8

1.8 mM チオNAD

0.9 mM NADH

3.8 mM  $\text{MgCl}_2$

25 単位/ml 3-Hydroxysteroid dehydrogenase

【0063】

40

基質液

5 mM Androsterone 3-phosphate

測定試料

10、2.5、0.625 単位/ml Alkaline phosphatase (ALP)

【0064】

測定方法

反応試液 800  $\mu$ lを石英セル(光路長 1 cm)に入れ、基質液200  $\mu$ lを加えて37 で5分間インキュベート後、測定試料2  $\mu$ lを添加して400 nmの吸光度変化を測定する。

図6に示される反応曲線を得た。短時間でも0.625 mU/mlが測定できている。

【0065】

50

## 比較例3 標識酵素としてのAlkaline phosphataseの活性測定

反応試液

100 mM Tris 緩衝液 pH 9.8  
 1.8 mM チオNAD  
 3.8 mM MgCl<sub>2</sub>  
 25 単位/ml 3- $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase

【0066】

基質液

5 mM Androsterone 3-phosphate

測定試料

10、2.5、0.625 単位/ml Alkaline phosphatase (ALP)

10

【0067】

測定方法

反応試液 800  $\mu$ l を石英セル (光路長 1cm) に入れ、基質液200  $\mu$ l を加えて37  $^{\circ}$ C で5分間インキュベート後、測定試料2  $\mu$ l を添加して400 nmの吸光度変化を測定する。

図7に示される反応曲線を得た。酵素サイクリングと組合わせていないので殆ど反応が進行していないことが分かる。

【0068】

## 参考例 1

ALP標識抗体の作製

抗原に特異的反応性を有するマウス由来等のモノクローナル抗体を100 mM酢酸緩衝液(pH4.2)に酸100 mMリン酸緩衝1.0 mg/mlの濃度で溶解した溶液1 mlに3 %濃度になるようにペプシンを添加し37  $^{\circ}$ C で3時間加温した後4 N-NaOHでpH7付近にpHを調整した。この混合反応液をセファデックスG-200を充填したカラムを用いてゲル濾過し、F(ab')<sub>2</sub>を得た。

20

【0069】

このF(ab')<sub>2</sub>フラクションを1 mlに濃縮した後、22 mM 2-メルカプトエタノール0.1 mlを加え37  $^{\circ}$ C で1時間加温する。この混合反応液をセファデックスG-200を充填したカラムを用いてゲル濾過し、F(ab')<sub>2</sub>を得た。アルカリホスファターゼ(ALP)100 mgを10 mM PBS(pH6.0)1 mlに溶解し、N-(6-Maleimidocaproyloxy)succinimide (EMCS)の20 mMの濃度のジメチルホルムアミド溶液0.1 mlを添加し、25  $^{\circ}$ C の温度で30分間反応させた。次いで、この反応混合液をセファデックスG-25を充填したカラムを用い、0.1 Mリン酸緩衝液(pH6.0)でゲル濾過を行ない、マレイミド化ALPと未反応EMCSとを分離した。

30

【0070】

次に、F(ab')<sub>2</sub>化モノクローナル抗体とマレイミド化ALPとを混合し、4  $^{\circ}$ C で一昼夜放置した後、セファデックスG-200を充填したカラムを用いてゲル濾過し、ALP標識モノクローナル抗体を得た。

【0071】

## 参考例 2

不溶性担体固定化モノクローナル抗体の調製

抗原に特異的反応性を有するマウス由来等のモノクローナル抗体を10 mMPBS(pH7.4)に1 mg/mlの濃度で溶解した溶液を、平底マイクロプレート(ヌンク社)の各ウェルに0.1 mlずつ加え、室温で1時間放置した後、PBSで洗浄してから、2 %ウシ血清アルブミン(BSA)水溶液を0.3 mlずつ加えて室温で2時間放置してブロッキング処理を実施してモノクローナル抗体固定化マイクロプレートを得た。

40

【0072】

## 実施例4 1ステップ法によるPumilio(プミリオ)の測定

反応試液

200 mM Glycine 緩衝液 pH 8.8  
 1.5 mM チオNAD  
 1.0 mM NADH

50

0.5 mM Androsterone 3-phosphate

20 単位/ml 3 -Hydroxysteroid dehydrogenase

【 0 0 7 3 】

測定試料

1, 10, 100, 200 ng/ml Pumilio

【 0 0 7 4 】

測定方法

参考例2の方法で調製した抗Pumilioマウスモノクローナル抗体を固定化したマイクロプレートに、精製したPumilio(標準物質)を0~200 ng/mlの範囲で含有する0.1 %BSA含有TBS溶液(pH7.5) 50  $\mu$ l加え、室温で1時間インキュベートした。次に、ウェル内の溶液を吸引除去した後、ウェル内を生理食塩水で洗浄してから、参考例1の方法で調製したALP標識抗Pumilioマウスモノクローナル抗体を約3  $\mu$ g/mlの濃度で含有する0.1 %BSA-1 mM MgCl<sub>2</sub>-0.1 mM ZnCl<sub>2</sub>含有TBS溶液(pH7.5) 50  $\mu$ lを加え、室温で1時間インキュベートした。次に、ウェル内の溶液を吸引除去した後、ウェル内を生理食塩水で洗浄してから、各ウェルに反応試液 100  $\mu$ lを加え、37  $^{\circ}$ Cで加温しながらマイクロプレートリーダー(コロナ社製MTP-800AFC)で405 nmのフィルターを使用して30分間吸光度を測定し、30分間の吸光度変化を標準物質濃度に対してプロットすることにより、図8に示される低濃度まで濃度依存性の良い検量線を得た。

10

【 0 0 7 5 】

実施例5 2ステップ法によるPumilio(プミリオ)の測定

20

反応試液A

100 mM Tris-HCl(pH 8.0)

0.2 mM Androsterone 3-phosphate

【 0 0 7 6 】

反応試液B

200 mM Glycine 緩衝液 pH 8.8

3.0 mM チオNAD

2.0 mM NADH

40 単位/ml 3 -Hydroxysteroid dehydrogenase

【 0 0 7 7 】

測定試料

0.1, 0.5, 1, 2, 5 ng/ml Pumilio

【 0 0 7 8 】

測定方法

参考例2の方法で調製した抗Pumilioマウスモノクローナル抗体を固定化したマイクロプレートに、精製したPumilio(標準物質)を0~10 ng/mlの範囲で含有する0.1 %BSA含有TBS溶液(pH7.5) 50  $\mu$ l加え、室温で1時間インキュベートした。次に、ウェル内の溶液を吸引除去した後、ウェル内を生理食塩水で洗浄してから、参考例1の方法で調製したALP標識抗Pumilioマウスモノクローナル抗体を約3  $\mu$ g/mlの濃度で含有する0.1 %BSA-1 mM MgCl<sub>2</sub>-0.1 mM ZnCl<sub>2</sub>含有TBS溶液(pH7.5) 50  $\mu$ lを加え、室温で1時間インキュベートした。次に、ウェル内の溶液を吸引除去した後、ウェル内を生理食塩水で洗浄してから、各ウェルに反応試液A 50  $\mu$ lを加え、1時間インキュベートした。次に、各ウェルに反応試液B 50  $\mu$ lを加え、37  $^{\circ}$ Cで加温しながらマイクロプレートリーダー(コロナ社製MTP-800AFC)で405 nmのフィルターを使用して30分間吸光度を測定し、30分間の吸光度変化を標準物質濃度に対してプロットすることにより、図9に示される低濃度まで濃度依存性の良い検量線を得た。

40

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 7 9 】

本発明は、高感度かつ簡便な測定が要求される臨床検査分野や食品検査分野において好適に利用可能である。

50

## 【図面の簡単な説明】

【0080】

【図1】 酵素免疫測定法（ELISA法）の測定原理

【図2】 実施例1で得られたFumaraseについての活性測定結果。

【図3】 比較例1で得られたFumaraseについての活性測定結果。

【図4】 実施例2で得られたPhosphoenolpyruvate carboxylaseについての活性測定結果

。

【図5】 比較例2で得られたPhosphoenolpyruvate carboxylaseについての活性測定結果

。

【図6】 実施例3で得られたAlkaline phosphataseについての活性測定結果。

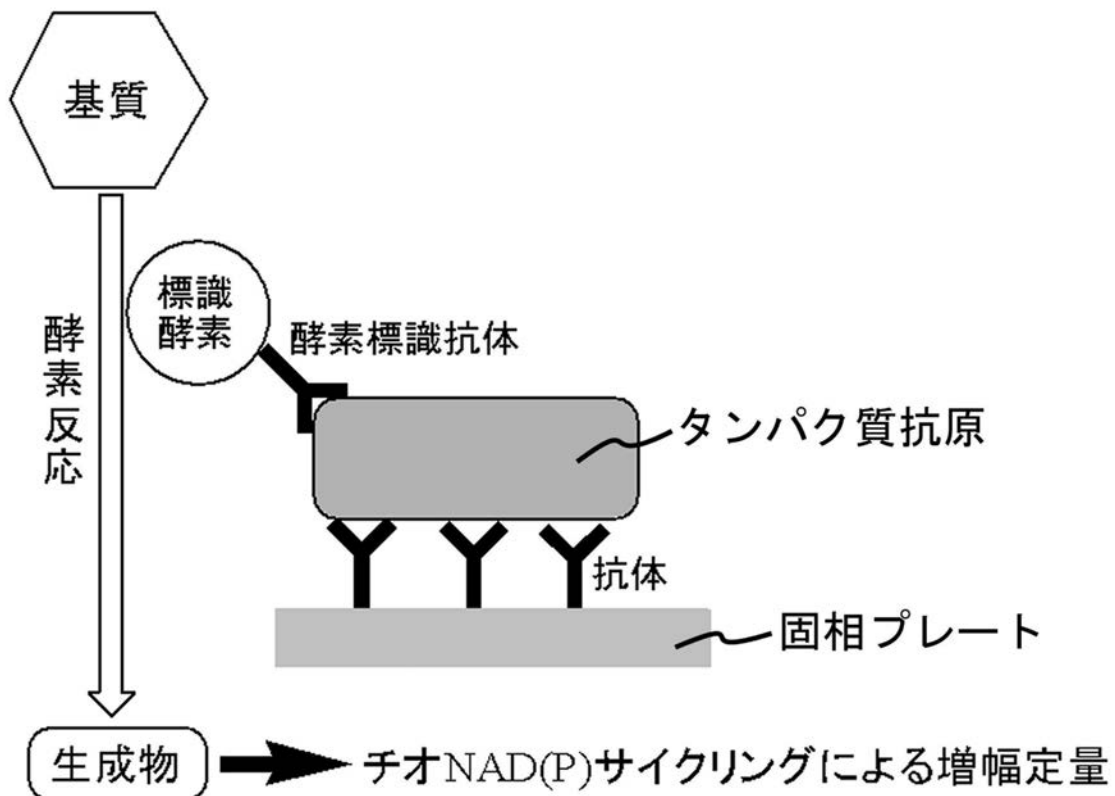
10

【図7】 比較例3で得られたAlkaline phosphataseについての活性測定結果。

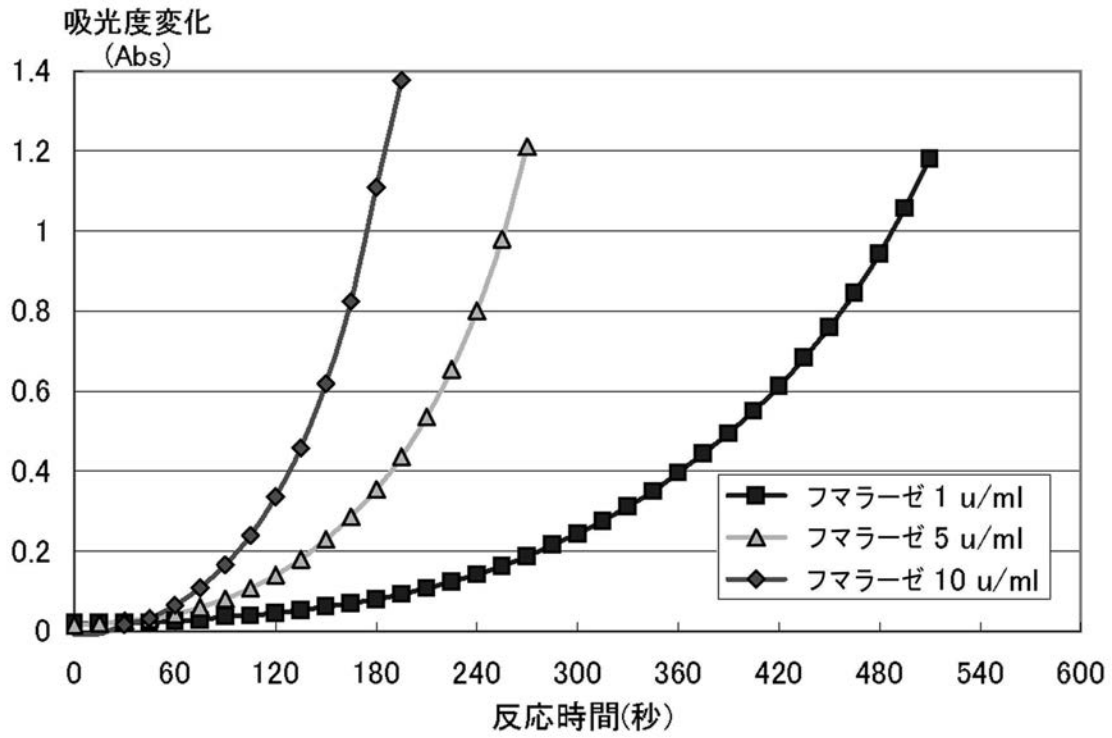
【図8】 実施例4で得られた検量線。

【図9】 実施例5で得られた検量線。

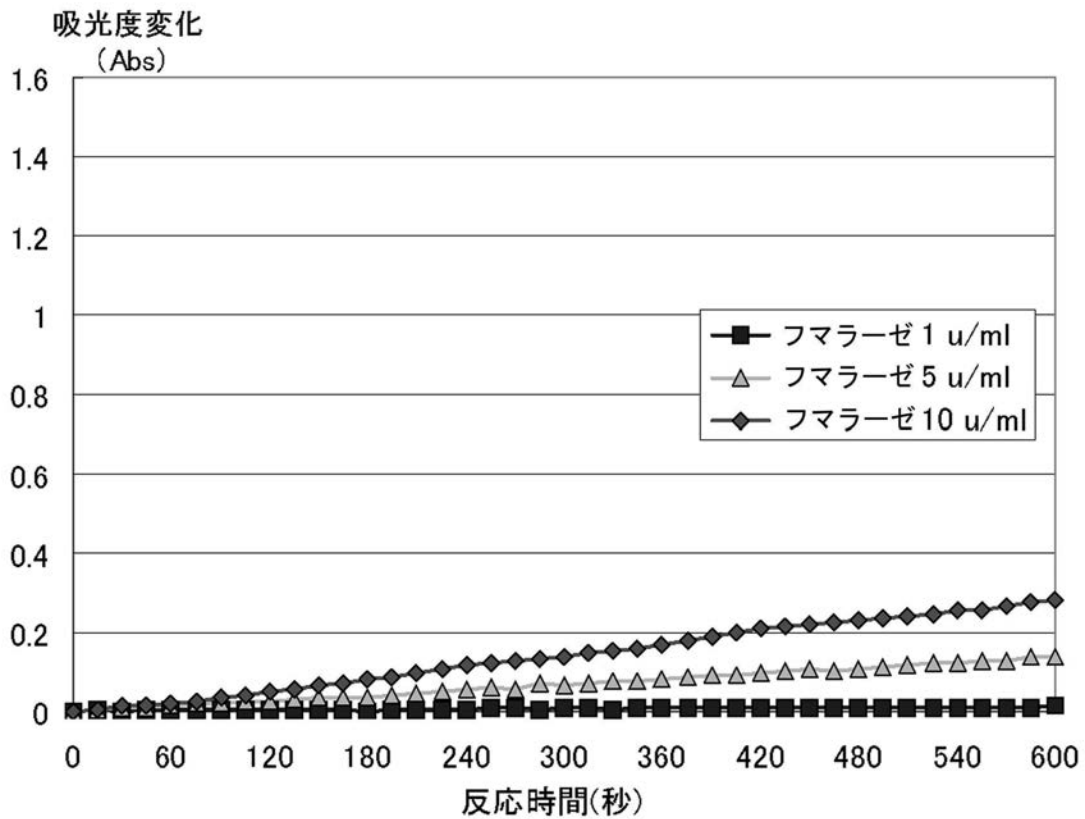
【図1】



【 図 2 】

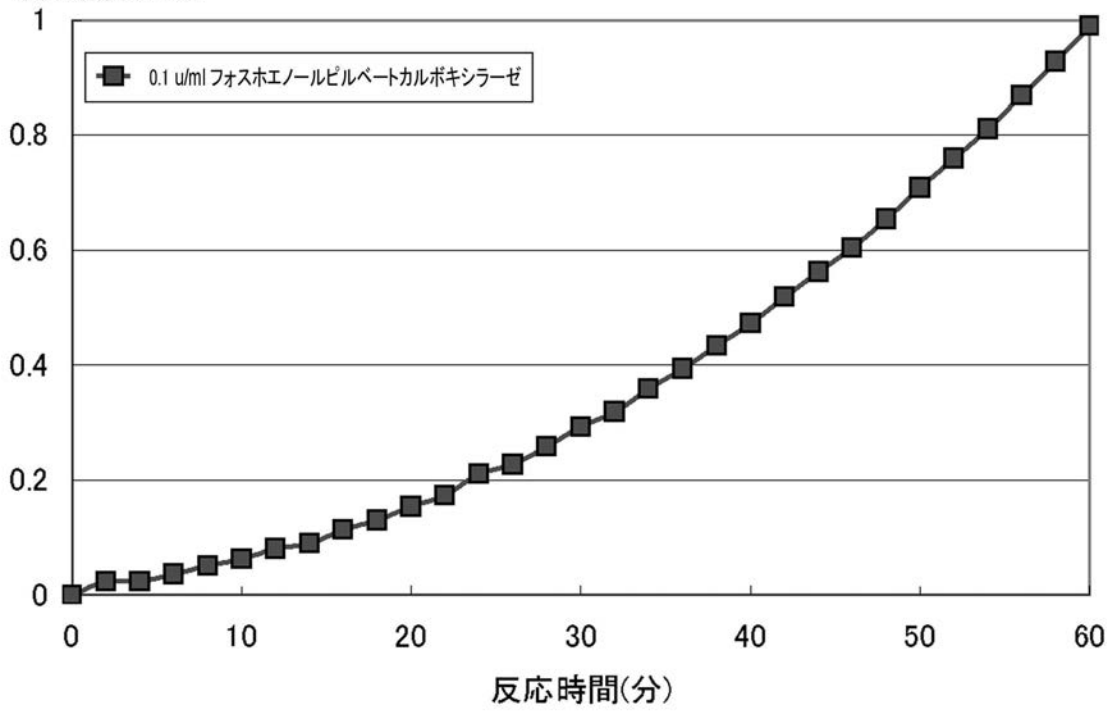


【 図 3 】



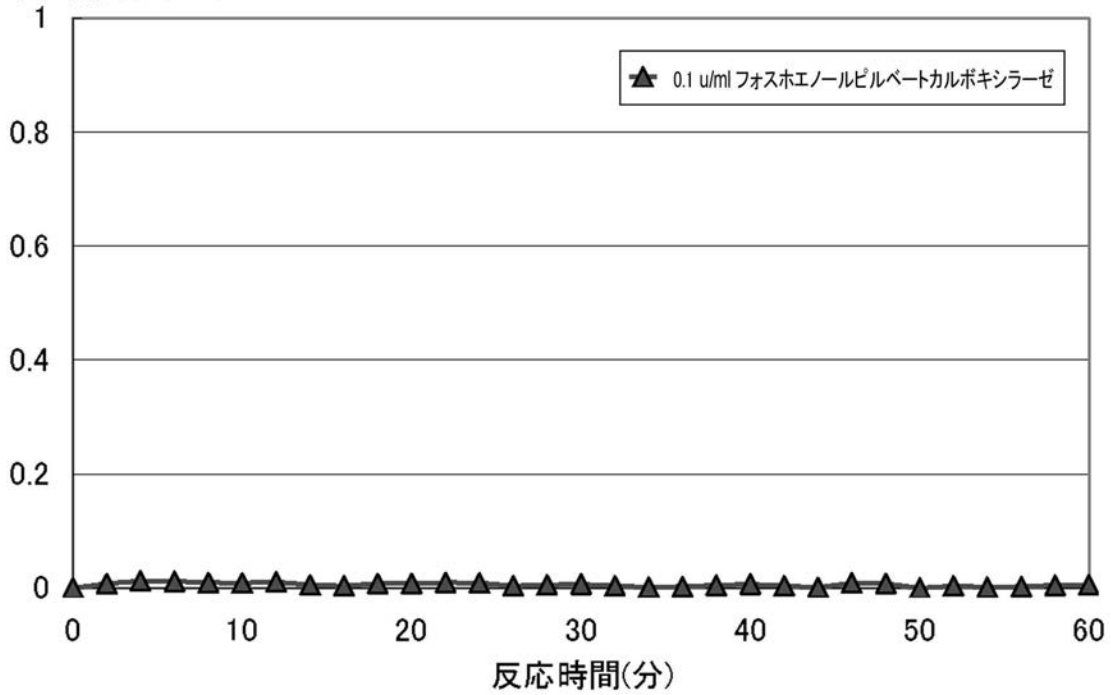
【 図 4 】

吸光度変(Abs)

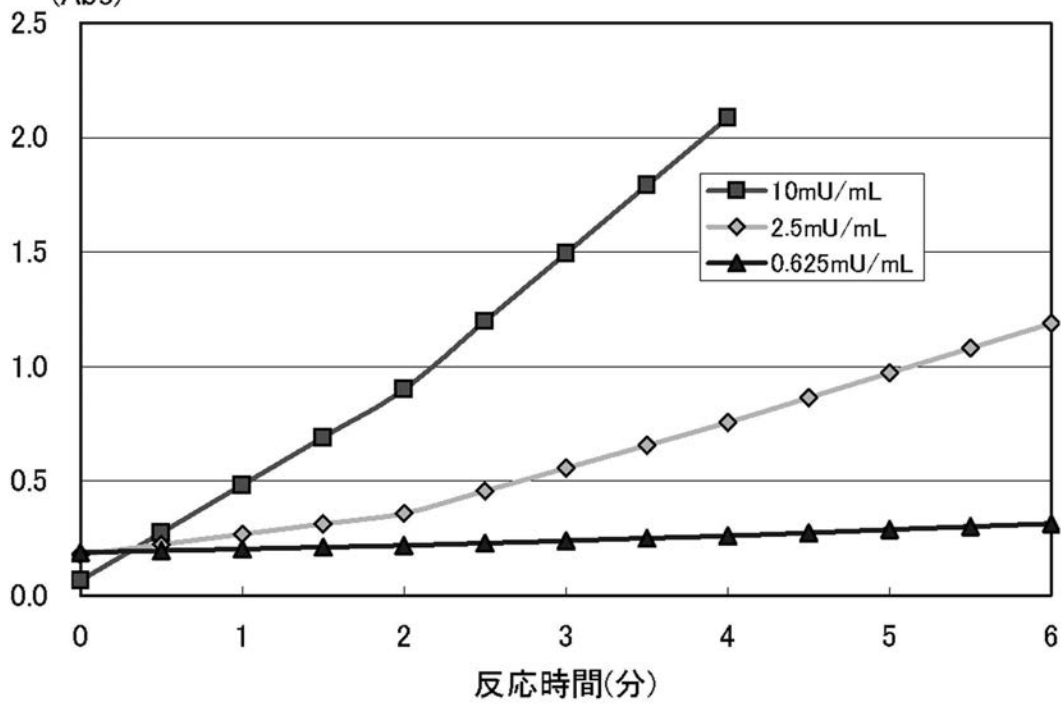


【 図 5 】

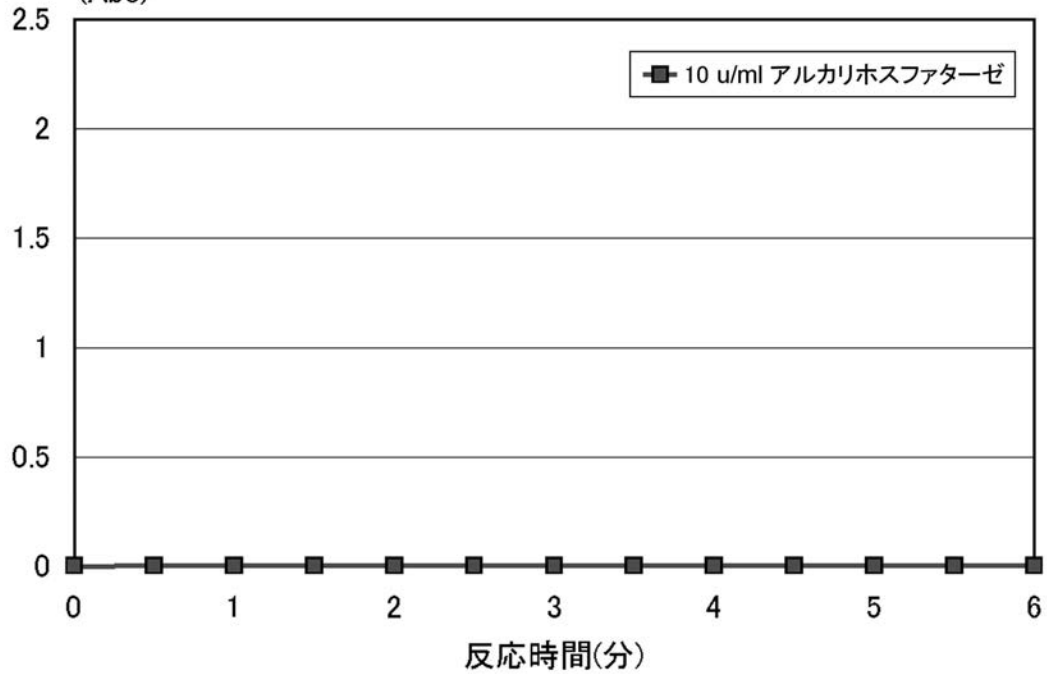
吸光度変化(Abs)



【 図 6 】

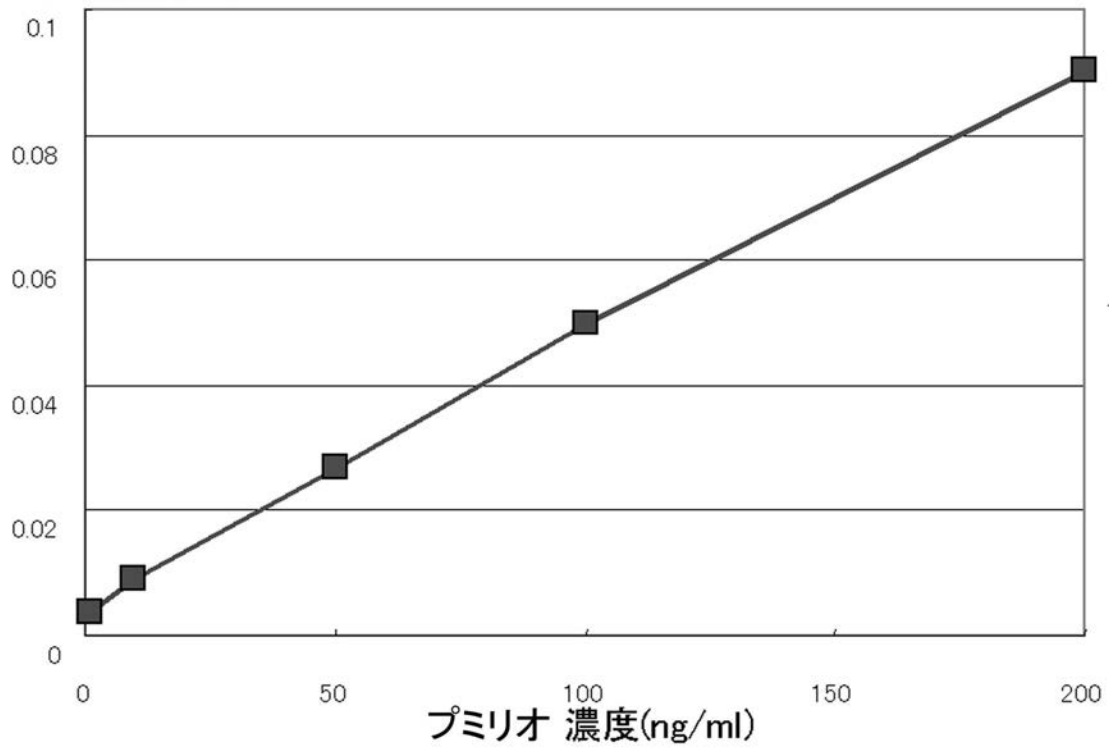
吸光度変化  
(Abs)

【 図 7 】

吸光度変化  
(Abs)

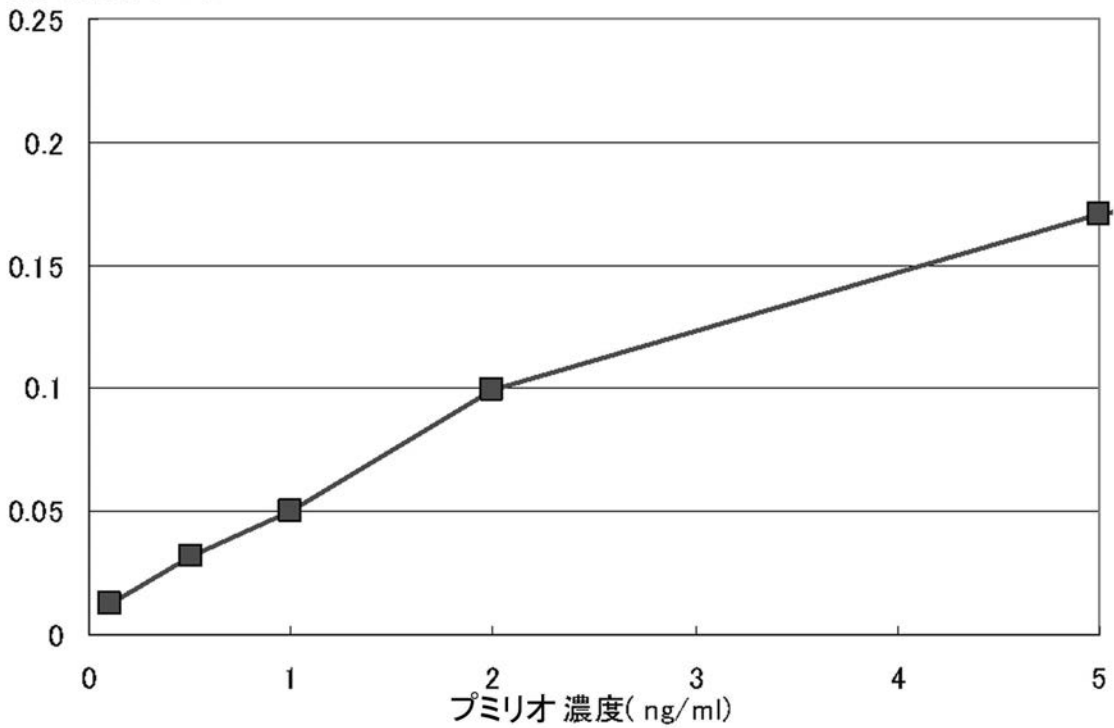
【 図 8 】

吸光度変化(Abs)



【 図 9 】

吸光度変化(Abs)



---

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	G 0 1 N 33/58	A
		G 0 1 N 21/78	Z
		C 1 2 N 15/00	A

(56)参考文献 特表2003-527866(JP,A)  
 特開平10-309200(JP,A)  
 特開平10-033196(JP,A)  
 Clin. Chem., 2002年, Vol. 48, No. 5, pp.737-41  
 Biochem. Biophys. Res. Commun., 2005年, Vol. 326, No. 1, pp.87-92  
 臨床透析, 2000年, Vol.16, No.2, p.167-73  
 バイオテクノロジージャーナル, 2006年, Vol. 6, No. 5, pp.609-612  
 Eur. J. Biochem., 1975年, Vol. 50, pp.603-609

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0  
 P u b M e d  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
 C A p l u s / M E D L I N E / W P I D S / B I O S I S ( S T N )

专利名称(译)	蛋白质和核酸的超高灵敏度测定方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP5500985B2</a>	公开(公告)日	2014-05-21
申请号	JP2009506355	申请日	2008-03-26
[标]申请(专利权)人(译)	伊藤 悦朗		
申请(专利权)人(译)	伊藤 悦朗		
当前申请(专利权)人(译)	伊藤 悦朗		
[标]发明人	伊藤悦朗		
发明人	伊藤 悦朗		
IPC分类号	C12Q1/32 C12Q1/68 G01N33/58 G01N33/53 G01N21/78 C12N15/09		
CPC分类号	C12Q1/32 C12Q1/25 G01N33/5735 G01N33/6803		
FI分类号	C12Q1/32 C12Q1/68.A G01N33/58.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/58.A G01N21/78.Z C12N15/00.A		
审查员(译)	高山俊光		
优先权	2007085550 2007-03-28 JP		
其他公开文献	JPWO2008117816A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

公开了一种超灵敏的测量方法，其可以目视地或在诸如吸收分光光度计或板读取器板读取器的通用测量设备上实现测量。具体地公开了一种高度灵敏的测量方法，其可以在视觉上或在通用测量设备上实现测量，并且其特征以指数方式放大硫代-NAD(P)H(其为信号物质)并比色法测量其中的含量。硫-NAD(P)H，是通过将硫-NAD(P)作为辅酶与标记酶和标记酶底物的酶循环方法的最佳组合而实现的。

