

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B1)

(11) 特許番号

特許第5305208号
(P5305208)

(45) 発行日 平成25年10月2日(2013.10.2)

(24) 登録日 平成25年7月5日(2013.7.5)

(51) Int.Cl. F 1
C 1 2 Q 1/48 (2006.01) C 1 2 Q 1/48 Z N A Z

請求項の数 9 (全 24 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2012-69625 (P2012-69625) (22) 出願日 平成24年3月26日 (2012.3.26) 審査請求日 平成24年10月22日 (2012.10.22)</p> <p>早期審査対象出願</p>	<p>(73) 特許権者 000236920 富山県 富山県富山市新総曲輪1番7号</p> <p>(73) 特許権者 000000066 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目15番1号</p> <p>(74) 代理人 110000109 特許業務法人特許事務所サイクス</p> <p>(72) 発明者 浅野 泰久 富山県射水市黒河5180 富山県立大学 内</p> <p>(72) 発明者 亀谷 将史 富山県射水市黒河5180 富山県立大学 内</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
--	--

(54) 【発明の名称】 アミノアシルtRNA合成酵素を用いたアミノ酸の定量方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

アミノ酸、およびアデノシン三リン酸(ATP)に、そのアミノ酸に対応するアミノアシルtRNA合成酵素(AARS)を、(アミノアシルAMP)-AARS複合体分解試薬存在下で作用させ、反応生成物を得る工程(A)；および

工程(A)の生成物のいずれかを定量する工程(B)を含み、得られた生成物量に基づいてアミノ酸量を決定する、アミノ酸を定量する方法であって、このとき(アミノアシルAMP)-AARS複合体分解試薬が、アミノアシルAMPのカルボキシル基の炭素に求核反応することにより、(アミノアシルAMP)-AARS複合体の分解を引き起こすものである、方法。

【請求項2】

複合体分解試薬が、アミン類である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

複合体分解試薬が、ヒドロキシルアミン、ヒドラジンまたはメチルアミンである、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

工程(B)における生成物の定量が、吸光度を測定することにより行われる、請求項1~3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

工程(B)において定量される生成物が、ピロリン酸であり、ピロリン酸の定量が、ピロ

リン酸に、ピロリン酸ピルビン酸ジキナーゼ (PPDK) を作用させる工程を経るものである、請求項1~4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

tRNA非存在下で行われる、請求項1~5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

試料中のアミノ酸を定量するために実施され、試料が血液由来である、請求項1~6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

一の試料中の2種類以上のアミノ酸を定量するための請求項1~7のいずれか1項に記載の方法であって、

定量対象アミノ酸の各々に対応したAARSを準備し、
AARS以外の他の必要成分を含んだ反応試薬を準備し、
反応試薬と試料とを混合し、
混合物を、少なくとも対象アミノ酸の種類の数に分割し、そして
各分割物に異なるAARSを添加する

工程を含む、方法。

【請求項9】

AARSが好熱性生物由来であり、工程(A)を、50℃以上で行う、請求項1~8のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体、食品等由来の試料において、アミノ酸を測定する方法に関する。より詳細には、アミノ酸をアミノアシルtRNA合成酵素 (AARS) と(アミノアシルAMP)-AARS複合体分解試薬存在下で反応させ、その生成物を定量することにより、試料中のアミノ酸の含有量を測定する方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

血中をはじめとする生体試料中のアミノ酸濃度の定量は様々な疾病検出のマーカーとなり、その定量法の開発は医療的見地から強く望まれている。アミノ酸濃度の酵素的定量法は、その迅速さ・簡便さなど機器分析より優れた特長を有し、実際の医療現場で各種疾病検出を行うのに適した手法とされる。

【0003】

アミノアシルtRNA合成酵素 (AARS) は、特定の1種類のアミノ酸とATPとtRNAを基質とし、アミノアシルtRNAとAMPとピロリン酸を生成する酵素である。タンパク質構成アミノ酸それぞれに対応したAARSが存在する。以下、各アミノ酸に対応するAARSについて、アミノ酸名と「RS」をつなげて表記する。例えば、アラニンに対応するAARSは「AlaRS」、システインに対応するAARSは「CysRS」と表記する。

【0004】

AARSはアミノ酸に対してきわめて高い基質特性を示すことが知られている。この酵素による反応は、以下の2段階反応からなる。

【0005】

【数1】

(反応式1) アミノ酸+ATP+AARS \rightleftharpoons (アミノアシルAMP)-AARS複合体+ピロリン酸

(反応式2) (アミノアシルAMP)-AARS複合体+tRNA \rightleftharpoons アミノアシルtRNA+AMP+AARS

(反応全体) アミノ酸+ATP+tRNA \rightleftharpoons アミノアシルtRNA+AMP+ピロリン酸

【0006】

なお、上記反応式のように「(アミノアシルAMP)-AARS複合体」が形成されること、また

10

20

30

40

50

この複合体は強固であり、tRNA非存在下ではAARSが複合体としてトラップされたままになることなどは、非特許文献1などで知られている。また非特許文献1には、上記複合体にヒドロキシルアミンを添加すると、複合体が分解してアミノ酸ヒドロキサム酸とAMPが生成することも記載されている。

【0007】

非特許文献2では、微量のtRNAを添加し、試料中アミノ酸のうち一部を上記反応式1および2で反応させるアミノ酸定量法が報告されている。

【0008】

特許文献1および特許文献2では、tRNAは添加せず、試料中アミノ酸のうち一部を上記反応式1に類似した反応のみで反応させるアミノ酸定量法が報告されている。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】2011-50357, アミノ酸の分析方法およびバイオセンサ

【特許文献2】2006-166709, アミノ酸分析用バイオセンシング装置およびアミノ酸分析用バイオセンサおよびアミノ酸分析用アミノアシルtRNAシンセターゼ

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Baldwin, A. N. & Berg, P. (1966). Transfer ribonucleic acid-induced hydrolysis of valyladenylate bound to isoleucyl ribonucleic acid synthetase. J Biol Chem 241, 839-845.

20

【非特許文献2】Forbes, C. D., Myung, J., Szewczak, A. A. & Landro, J. A. (2007). A high-throughput competitive scintillation proximity aminoacyl-tRNA synthetase charging assay to measure amino acid concentration. Anal Biochem 363, 246-254.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

AARSはアミノ酸に対してきわめて高い基質特性を示すことが知られており、アミノ酸定量用酵素として有望な酵素である。

【0012】

30

非特許文献2の定量法は、試料とATPとtRNAと放射性ラベルした測定対象アミノ酸を混合した後、AARSと作用させ、生成したアミノアシルtRNAをビーズに吸着させ、その放射線量を測定することで測定対象アミノ酸を定量する手法である。非特許文献2の定量法では、生成物中に取り込まれたラベル済アミノ酸の存在比を算出するため、放射性同位体の使用は不可避である。そのためこの定量法は、放射性同位体の取り扱いが可能な環境でしか用いることができない。またこの定量法では、ビーズによる吸着・分離など、煩雑な工程も必要となってしまう。さらにこの定量法では、反応液にtRNAを最大0.5 mg/mlという高濃度で添加している。しかし、これを測定対象アミノ酸に対応したtRNAのモル濃度に換算すると、 $30 (\mu\text{g}) \div 60 (\mu\text{l}) \div 30,000 (\text{g/mol}) \div 20 = 0.8 \mu\text{M}$ となる (tRNAの分子量を30,000とし、各アミノ酸に対応する20種のtRNAが等量ずつ含まれていると仮定した場合)。得られる反応生成物のモル濃度は上記濃度以下となるが、放射性同位体を用いずにこのような微量な化合物を定量するのは難しい。よって非特許文献2のようにtRNAを添加する手法では、ごく微量の反応生成物を検出せざるを得ないため、放射性同位体の使用は不可避だといえる。

40

【0013】

特許文献1 および特許文献2 の定量法は、アミノ酸とATPとAARSのみを反応させ (以降、「tRNA非添加条件」とする)、生成物を検出する手法である。本定量法ではtRNAが存在しないため、上記反応式2は進行しえないと考えられる。

【0014】

特許文献1 および特許文献2においては、反応式1のような(アミノアシルAMP)-AARS複合

50

体の存在は論じられておらず、AARSは以下の反応式1'を触媒するものとして述べられている。反応式1'のように反応が進み、かつ平衡は完全に右に傾いていると仮定した場合、アミノ酸と同等なモル数のピロリン酸が生成し、ピロリン酸定量によりアミノ酸定量が可能と考えられる。しかしいずれの特許文献でも、反応式1ではなく反応式1'が進むという主張の根拠は示されていない。

【0015】

【数2】

(反応式1') アミノ酸+ATP⇌アミノアシルAMP+ピロリン酸

【0016】

10

本発明者らは、特許文献1および特許文献2と同様に、tRNA非添加条件で測定を行った。しかし、少なくとも発明者らが用いた検出法では、有意なピロリン酸生成を検出することができなかった(実施例5、ヒドロキシルアミン非添加サンプル参照)。有意なピロリン酸生成が見られなかった原因としては、実際に起きている反応は上記反応式1'ではなく、上記反応式1であることが考えられる。反応式1では、アミノ酸が1分子反応すると共に、AARSが複合体形成のために1分子消費される。そのため、少なくとも試料中アミノ酸以上のモル濃度のAARSを系に添加しない限り、試料中アミノ酸量と同等量のピロリン酸を生成させることは原理上不可能である。

【0017】

本発明者らの実施例5において、反応液中のAARS濃度は約9 μM程度であり、アミノ酸濃度に比べて顕著に低い。また特許文献1および特許文献2、非特許文献2においても、測定対象アミノ酸以上のモル濃度のAARSを系に添加したという記述はない。特許文献2の段落[0024]では、0~100 μMアミノ酸を定量する際のAARS濃度は10 μMであり、アミノ酸濃度以上のAARSは添加していないと言える。よって特許文献1および特許文献2の手法において、仮に反応式1が最大限進行したと仮定しても、試料中アミノ酸のうちごく一部しか反応に用いられ得ず、生成物もまた少量であると考えるのが妥当である。これを否定するようなデータは上記特許文献中に示されていない。

20

【0018】

試料中アミノ酸に対してごく少量の生成物しか生じない場合、特許文献1で用いられている蛍光法やセンサ電極などによる高感度検出系が不可欠となり、吸光度法など広く用いられている検出系では検出不可能となる。また高感度検出系を用いた場合でも、感度の低下や測定値のばらつき、バックグラウンド値の上昇など様々な問題点の原因となる。

30

【0019】

以上のように、AARSを用いた公知のアミノ酸定量法は、放射性同位体を用いた煩雑な工程を必要とすること、また試料中アミノ酸のうちごく一部しか反応しえないことなどの問題点を有しており、広く使用されるには至っていなかった。

【課題を解決するための手段】

【0020】

本発明者らは、tRNA非添加条件下のAARS反応液において有意なピロリン酸生成が見られない一方で、(アミノアシルAMP)-AARS複合体を分解する試薬を添加することで、試料中アミノ酸と同等量のピロリン酸が生成することを見出した。そこで、反応液中のほぼ全量のアミノ酸を上記反応式1と複合体分解反応で反応させることを特徴とする高感度かつ誤差の少ないアミノ酸定量が可能であることを見出し、本発明を完成させた。

40

【0021】

本発明は、以下を提供する。

[1] アミノ酸、およびアデノシン三リン酸(ATP)に、そのアミノ酸に対応するアミノアシルtRNA合成酵素(AARS)を、(アミノアシルAMP)-AARS複合体分解試薬存在下で作用させ、反応生成物を得る工程(A);および

工程(A)の生成物のいずれかを定量する工程(B)

を含み、得られた生成物量に基づいてアミノ酸量を決定する、アミノ酸を定量する方法。

50

[2] tRNA非存在下で行われる、[1]に記載の方法。

[3] 複合体分解試薬が、アミン類またはカルバニオンである、[1] または[2]に記載の方法。

[4] 複合体分解試薬が、ヒドロキシルアミン、ヒドラジンまたはメチルアミンである、[3]に記載の方法。

[5] 工程(B)における生成物の定量が、吸光度を測定することにより行われる、[1]~[4]のいずれかーに記載の方法

[6] 工程(B)において定量される生成物が、ピロリン酸であり、ピロリン酸の定量が、ピロリン酸に、ピロリン酸ピルビン酸ジキナーゼ(PPDK)を作用させる工程を経るものである、[1]~[5]のいずれかーに記載の方法。

[7] 試料中のアミノ酸を定量するために実施され、試料が血液由来である、[1]~[6]のいずれかーに記載の方法。

[8] 一の試料中の2種類以上のアミノ酸を定量するための[1]~[7]のいずれかーに記載の方法であって、

定量対象アミノ酸の各々に対応したAARSを準備し、
AARS以外の他の必要成分を含んだ反応試薬を準備し、
反応試薬と試料とを混合し、
混合物を、少なくとも対象アミノ酸の種類の数に分割し、そして
各分割物に異なるAARSを添加する

工程を含む、方法。

[9] AARSが好熱性生物由来であり、工程(A)を、50 以上で行う、請求項1~8のいずれか1項に記載の方法。

【発明の効果】

【0022】

本発明は、非特許文献2に記載の定量法と比較して以下のように優れた点を有する。

・放射性同位体およびその検出機器を用いないため、一般的な設備・環境で利用可能である

・酵素反応後のピーズによる吸着・分離などの煩雑な工程が必要なく、反応液と試料を混合後はそのまま測定可能である

・非特許文献2に記載の定量法では、ピーズによる吸着以降の工程を除いても2時間を要するのに対し、本発明は10分程度で測定可能である

【0023】

本発明は、特許文献1および特許文献2に記載の定量法と比較して以下のように優れた点を有する。

・試料中アミノ酸と同等量の生成物が得られるため、高感度・高精度な定量が可能である

・蛍光試薬やセンサ電極を用いなくとも、通常の吸光度測定で検出が可能である

・特許文献1の段落0075では40分、特許文献2の段落0024では55分を測定に要するのに対し、本発明は10分程度で測定可能である。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】各濃度(0, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 mM)のヒドロキシルアミン添加時のTyr定量反応液の経時的吸光度変化。図中の数字(25, 50, 100, 150)は各反応液のTyr濃度(μM)を示す。測定開始からの時間経過を横軸、Tyr非添加サンプルとの吸光度差を縦軸に示す。各反応液を1サンプルずつ作製・測定した結果である。

【図2】測定開始20分後の測定値から作製したTyr検量線。図中の数字(0, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000)は、各検量線のヒドロキシルアミン濃度(mM)を示す。ヒドロキシルアミン200, 400, 600, 800, 1000 mMサンプルには、一次近似直線を付した。

【図3】Tyr濃度と吸光度差の相関係数の経時的変化。図中の数字(0, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000)はヒドロキシルアミン濃度(mM)を示す。

【図4】Thermotoga由来CysRSを使用したCys検量線

10

20

30

40

50

【図5】Thermotoga由来LysRSを使用したLys検量線

【図6】Thermotoga由来SerRSを使用したSer検量線

【図7】Thermotoga由来TyrRSを使用したTyr検量線

【図8】Thermus由来TyrRSを使用したTyr検量線

【図9】モリブデンブルー法によるHis検量線

【図10】モリブデンブルー法によるPro検量線

【図11】モリブデンブルー法によるTrp検量線

【図12】Thermus由来IleRSを使用し、70 で反応させたIle検量線

【図13】Thermus由来MetRSを使用し、70 で反応させたMet検量線

【図14】Thermus由来TyrRSを使用し、70 で反応させたTyr検量線

【図15】複合体分解試薬としてヒドラジンを使用したTyr検量線

【図16】複合体分解試薬としてメチルアミンを使用したTyr検量線

【発明を実施するための形態】

【0025】

本発明のアミノ酸定量法は、アミノ酸、およびアデノシン三リン酸（ATP）に、そのアミノ酸に対応するアミノアシルtRNA合成酵素（AARS）を、（アミノアシルAMP）-AARS複合体分解試薬存在下で作用させ、反応生成物を得る工程（A）；および工程（A）の生成物のいずれかを定量する工程（B）を含み、得られた生成物量に基づいてアミノ酸量を決定する、アミノ酸を定量する方法である。

【0026】

本発明により、定量することができるアミノ酸は、対応するAARSが存在するものである。AARSが入手可能であれば、いずれのアミノ酸であっても本発明で定量することができる。例えば、タンパク質を構成する20種類のアミノ酸、すなわち、L-アラニン、L-システイン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-フェニルアラニン、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-リジン、L-ロイシン、L-メチオニン、L-アスパラギン、L-プロリン、L-グルタミン、L-アルギニン、L-セリン、L-スレオニン、L-バリン、L-トリプトファン、L-チロシンは、本発明により定量できるアミノ酸である。本発明においては、アミノ酸に関し、「L-」を省略して記載することがあるが、当業者であれば、AARSとの関係を参照し、そのアミノ酸がL体に限られるか否かを適宜判断することができる。また、本発明においては、通常の表記法に従って、アミノ酸を3文字で表記することがある。

【0027】

〔工程A〕

本発明の工程（A）では、アミノ酸、およびアデノシン三リン酸（ATP）に、そのアミノ酸に対応するアミノアシルtRNA合成酵素（AARS）を、（アミノアシルAMP）-AARS複合体分解試薬存在下で作用させ、反応生成物を得る。

【0028】

本発明においては、測定対象となるアミノ酸に対応したAARSを用いる。必要なAARSは、市販されていればそれを用いることができ、また当業者であれば、入手可能な適切な資源を利用して、遺伝子実験技術等を用いて適宜調製することができる。AARSの遺伝子実験技術による調製は、タンパク質の調製に関する当業者によく知られた一般的な手法を適用することができる、また本明細書の実施例に記載した手順、条件を参考に、調製することができる。

【0029】

なお、AARSのうち大腸菌由来GlnRS、GluRS、ArgRSに関しては、tRNAと結合し、活性化されないと上記反応式1が進行しない場合があることが知られている。これらのAARSを用いる際には、工程（A）において、tRNAを添加すればよい。なおtRNAは、測定対象アミノ酸と同等に高いモル濃度にする必要はなく、AARSと同等に低いモル濃度添加すれば十分である。tRNAの調製のための方法は、当業者にはよく知られている（例えば、『基礎生化学実験法第4巻 核酸・遺伝子実験』日本生化学会編に記載の方法、等）。

【0030】

10

20

30

40

50

tRNAを用いる場合、定量しようとする対象アミノ酸に対応したtRNA以外の異種のtRNA、mRNA、rRNAの混入は特に悪影響を与えないと考えられるので、全RNA抽出液を用いることが、上記3種いずれのAARSを用いる場合においても、有用であろう。

【0031】

本発明で「AARS」というときは、特に記載した場合を除き、特定の種より生産されるものに限られない。定量しようとする対象アミノ酸に特異的または選択的に作用することができ、(アミノアシルAMP)-AARS複合体を形成しうるものであればよい。AARSに関し、「対応するアミノ酸」というときは、そのAARSが特異的または選択的に作用するアミノ酸を指す。

【0032】

本発明に用いるAARSは、自然界に存在する天然型であってもよく、遺伝子改変を行った改変型であってもよい。また、本発明に用いるAARSは、AARSをコードする遺伝子を大腸菌や他の生物を宿主として発現させて得られた、組み換え酵素であってもよい。

【0033】

本発明に用いることのできるAARSの調製方法は、特に制限されず、化学合成により合成したタンパク質でもよいし、遺伝子組換え技術により作製した組換えタンパク質でもよい。組換えタンパク質を作製する場合には、当該タンパク質をコードする遺伝子をDNAとして取得し、適当な発現系に導入することにより、上記AARSを産生することができる。典型的なAARSの調整方法は、適切な生物種より抽出したゲノムDNAから該当する遺伝子をPCRにて増幅し、pETまたはpUCなどのプラスミドに組み込んだベクターを構築したのち、それによりBL21、JM109などの宿主菌株を形質転換し、培養することである。これら以外の他の公知の方法も、適宜用いることができる。

【0034】

本発明には、(アミノアシルAMP)-AARS複合体分解試薬を用いる。本発明ではこの試薬のことを単に「複合体分解試薬」ということもある。

【0035】

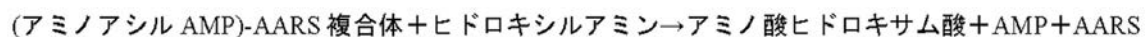
本発明で「(アミノアシルAMP)-AARS複合体分解試薬」または「複合体分解試薬」というときは、特に記載した場合を除き、(アミノアシルAMP)-AARS複合体を分解してAARSを遊離型に再生することができるものをいう。複合体分解試薬の例は、アミン類またはカルバニオンであり、より特定された例は、ヒドロキシルアミン、ヒドラジンまたはメチルアミンである。

【0036】

本発明に用いられる複合体分解試薬の好適な例の一つは、ヒドロキシルアミン(NH_2OH)である。ヒドロキシルアミンは、本発明において下記の反応を進行させる。

【0037】

【数3】



【0038】

上記反応においてヒドロキシルアミンは、アミノアシルAMPのカルボキシル基の炭素に求核反応することにより、(アミノアシルAMP)-AARS複合体の分解を引き起こす。

【0039】

本発明においては、ヒドロキシルアミンと同様の反応を起こすことができ、かつ(アミノアシルAMP)-AARS複合体の基質ポケットまでアクセスできる求核試薬であれば、複合体分解試薬として好適に用いることができる。このような例として、ヒドラジン(H_2NNH_2)およびメチルアミン(CH_3NH_2)が挙げられる。

【0040】

工程(A)では、他にアデノシン三リン酸(ATP)を用いる。

【0041】

工程(A)での反応生成物は、例えば、ピロリン酸であり、上述のようにヒドロキシル

10

20

30

40

50

アミンを用いる場合は、アミノ酸ヒドロキサム酸である。

【0042】

〔工程B〕

本発明の工程(B)では、工程(A)の生成物のいずれかを定量する。

工程(A)の生成物として、ピロリン酸を定量する場合、ピロリン酸を定量するための種々の方法が本発明のために適用できる。ピロリン酸測定のための好ましい態様の1つは、工程(A)と同じ系中で実施できる方法である。

【0043】

工程(A)と同じ系中で実施できるピロリン酸測定方法の例としては、ピルビン酸ジキナーゼ(PPDK)を用い、ピロリン酸からピルビン酸を生成し、(1)ピルビン酸を乳酸脱水素酵素(LDH)と反応させる手法が挙げられる(実施例3参照)。または、(2)ピルビン酸をピルビン酸酸化酵素およびペルオキシダーゼと反応させる手法が挙げられる。これらのピロリン酸の定量方法は、無機リン酸やATPの共存に影響を受けず、またAARSの基質であるATPをAMPから再生することができるという特長を有する。なお、PPDK、LDH、ピルビン酸酸化酵素、ペルオキシダーゼは、それぞれ以下に示す反応を触媒する。

【0044】

【数4】

PPDK: $\text{ピロリン酸} + \text{ホスホエノールピルビン酸} + \text{AMP} \rightarrow \text{ピルビン酸} + \text{ATP} + \text{無機リン酸}$

LDH: $\text{ピルビン酸} + \text{NADH} \rightarrow \text{乳酸} + \text{NAD}^+$

ピルビン酸酸化酵素: $\text{ピルビン酸} + \text{リン酸} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{アセチルリン酸} + \text{二酸化炭素} + \text{H}_2\text{O}_2$

ペルオキシダーゼ: $2\text{H}_2\text{O}_2 + 4\text{-アミノアンチピリン} + \text{フェノール} \rightarrow \text{キノンイミン色素} + 4\text{H}_2\text{O}$

【0045】

上記以外のピロリン酸定量法としては、ピロリン酸をピロフォスファターゼと反応させて無機リン酸に変換し、無機リン酸を各種手法で定量する方法が挙げられる。無機リン酸定量法としては、例えば、モリブデンブルー法が挙げられる(実施例4参照)。これは、リン酸を酸性条件下でモリブデン酸アンモニウムと還元剤と反応させることにより生成する色素を分光光度的に定量する手法である。なお、ピロフォスファターゼは以下に示す反応を触媒する。

【0046】

【数5】

ピロフォスファターゼ: $\text{ピロリン酸} \rightarrow 2 \times \text{無機リン酸}$

【0047】

なお、上記以外のピロリン酸定量法としては、ATPスルフリラーゼなどの酵素によってピロリン酸からATPを生成させ、ルシフェラーゼなどを用いてATPを定量する手法が知られている。しかしこのピロリン酸定量法では、AARSの基質として添加してあるATPにより、ピロリン酸が過剰に見積もられてしまうことがあり、またルシフェラーゼなどによってATPが枯渇しAARSの反応が進行しなくなることがある。よって上記方法のようにATP生成に基づくピロリン酸定量法については、本発明のAARSとの共役系に用いる場合は、特別な配慮が必要であろう。なお、ATPスルフリラーゼは以下に示す反応を触媒する。

【0048】

【数6】

ATPスルフリラーゼ: $\text{ピロリン酸} + \text{APS} \rightarrow \text{ATP} + \text{硫酸}$

【0049】

工程(B)で測定可能な工程(A)の反応液生成物としては、(アミノアシルAMP)-AARS複合体の分解産物が挙げられる。例えば、複合体分解試薬としてヒドロキシルアミンを使用した場合には、分解産物としてアミノ酸ヒドロキサム酸とAMPが生じるが、これらのいずれ

10

20

30

40

50

かを測定してもよい。AMPの定量は、例えば、HPLCを用いることによる。ヒドロキサム酸の定量は、例えば、酸性条件下で塩化鉄と反応させ、540 nmの吸光度を測定することで、分光光度的に実施できる。

【0050】

〔反応条件〕

工程(A)において使用するAARSの量は、本発明のピロリン酸の定量が実施できれば特に限定されず、試料に含まれるピロリン酸の存在量、使用する装置、PPDKの純度や種類に応じて適宜決定することができる。使用するAARSの量は、反応を数十分以内に終了させたい場合は、下限は、0.05 mU/ml以上であることが好ましく、0.1 U/ml以上であることがより好ましく、0.5 mU/ml以上であることがさらに好ましい。反応をより速やかに進行させたい場合は、より多くの量をもちいてもよい。またいずれの場合であっても上限は経済性等の観点から定めてもよく、10 U/ml以下とすることができ、5 U/ml以下であってもよく、1 U/ml以下であってもよい。なお、本発明に関し、反応系における成分の濃度を示すときは、特に記載した場合を除き、その濃度値は、反応系における終濃度としての値である。

10

【0051】

本発明においては、複合体分解試薬の使用により、AARSが再生される。したがって、AARSの量は、AARSが酵素として機能可能な量であればよく、定量しようとする対象アミノ酸の量未満であってもよい。本発明者らの検討によると、2 μ MのTyrRS存在下で200 μ M Tyrの定量が可能であった。このことから、 μ Mオーダー以下のAARS、またはアミノ酸に対し1%以下のモル濃度の比較的少ない量のAARSでも、本発明は実施可能である。

20

【0052】

工程(A)においては、複合体分解試薬が使用される。複合体分解試薬としてヒドロキシルアミンを用いる場合(なお、本発明で複合体分解試薬としてヒドラジンを用いるときは、特に記載した場合を除き、ヒドラジンを塩として用いる場合も含む。他の複合体分解試薬を用いる場合も同じ。)、その量は、反応を数十分以内に終了させたい場合は、下限は、5m M以上であることが好ましく、50 m M以上であることがより好ましく、400 m M以上であることがさらに好ましい。反応時間を要してもよければ、より少ない量で実施することができる。またいずれの場合であっても上限量は、取扱い上の安全性、経済性等の観点から定めてもよく、8000 m M以下とすることができ、4000 m M以下とすることができ、2000 m M以下とすることができる。

30

【0053】

複合体分解試薬としてヒドラジンまたはメチルアミンを用いる場合、本発明者らの検討によると、それぞれ反応系における終濃度が400 mM、20 mMであれば、アミノ酸が定量できることが確認されている。したがって、これらの複合体分解試薬を用いる場合は、その有効性が確認された濃度の1/100倍以上、より特定すると1/10倍以上の濃度で、好適に実施することができるであろう。なおいずれの場合であっても、上限量は、取扱い上の安全性、経済性等の観点から定めてもよく、8000 m M以下とすることができ、4000 m M以下とすることができ、2000 m M以下とすることができる。

40

【0054】

なお、複合体分解試薬として比較的反応性が高いものを選択する場合は、反応系へは、反応直前に混合した方が、悪影響が出ないと考えられる。当業者であれば、このような点にも配慮して、工程(A)を計画することが容易であろう。本発明者らの検討によると、ヒドロキシルアミンを用いた場合、ヒドロキシルアミンを他の成分と混合し、約10分経過した程度では、問題になるような影響は見られなかった。

【0055】

工程(A)において使用するATPの量は、当業者であれば、他の成分濃度や反応条件を勘案して、適宜設計することができる。通常、工程(A)においては、測定しようとするアミノ酸の濃度以上の濃度のATPを要するから、ATPの濃度は少なくとも、本発明で測定可能なアミノ酸濃度の下限值である5 μ M以上である。

50

【0056】

一方で、工程(A)とピロリン酸ピルビン酸ジキナーゼ(PPDK)を用いる工程(B1)とを同じ系内で実施する場合、理論的にはそれより低濃度のATPでも問題ないと考えられる。この観点からは、ATPの濃度の下限は、0.002mM以上であることが好ましく、0.02mM以上であることがより好ましく、0.2mM以上であることがさらに好ましい。

【0057】

ATPの濃度の上限は、いずれの場合であっても200mM以下とすることができ、20mM以下であることが好ましく、2mM以下であることがより好ましい。

【0058】

工程(B)を、工程(A)と同じ系中でのピロリン酸測定のための工程として実施し、かつ、ピロリン酸ピルビン酸ジキナーゼ(PPDK)によりピロリン酸からピルビン酸を生成させ、ピルビン酸を乳酸脱水素酵素(LDH)と反応させる場合(「工程(B1)」とする。)使用するPPDKの量は、本発明のピロリン酸の定量が実施できれば特に限定されず、試料に含まれるピロリン酸の存在量、使用する装置、PPDKの純度や種類に応じて適宜決定することができる。使用するPPDKの量は、下限は、0.001U/ml以上であることが好ましく、0.005U/ml以上であることがより好ましく、0.01U/ml以上であることがさらに好ましい。またいずれの場合であっても上限は、10U/ml以下であることが好ましく、5U/ml以下であることがより好ましく、1U/ml以下であることがさらに好ましい。

10

【0059】

工程(B1)は、PEP等の高エネルギーリン酸化合物の存在下で実施される。存在するPEPの量は、下限は0.01mM以上であることが好ましく、0.025mM以上であることがより好ましく、0.05mM以上であることがさらに好ましい。またいずれの場合であっても上限は、20mM以下であることが好ましく、10mM以下であることがより好ましく、5mM以下であることがさらに好ましい。

20

【0060】

工程(B1)は、AMPの存在下で実施される。存在するAMPの量は、下限は、0.01mM以上であることが好ましく、0.025mM以上であることがより好ましく、0.05mM以上であることがさらに好ましい。またいずれの場合であっても上限は、20mM以下であることが好ましく、10mM以下であることがより好ましく、5mM以下であることがさらに好ましい。

30

【0061】

工程(B1)は、金属イオンの存在下で実施されることが好ましい。金属イオンは、マグネシウムイオン、コバルトイオン、またはマンガンイオンのうちいずれかであることができるが、マグネシウムイオンであることが好ましい。使用する金属イオンの量は、例えば、マグネシウムイオンの場合、下限は、AMPの濃度に対して0.1当量以上であることが好ましく、0.2当量以上であることがさらに好ましく、0.4当量以上であることがさらに好ましい。またいずれの場合であっても上限は、10当量以下であることが好ましく、5当量以下であることがより好ましく、2.5当量以下であることがさらに好ましい。最も好ましい濃度はリン酸供与体の0.5~2当量、例えば1当量である。

【0062】

工程(B1)での乳酸脱水素酵素の量は、ピロリン酸の定量が実施できれば特に限定されず、試料に含まれるピロリン酸の存在量、使用する装置、酵素の純度や種類に応じて適宜決定することができる。使用する酵素の量は、下限は、0.002U/ml以上であることが好ましく、0.005U/ml以上であることが好ましく、0.01U/ml以上であることがさらに好ましい。またいずれの場合であっても上限は、4U/ml以下であることが好ましく、2U/ml以下であることがより好ましく、1U/ml以下であることがさらに好ましい。

40

【0063】

工程(B1)はまた、NADHの存在下で実施される。NADH濃度は、低過ぎるとは吸光度の検出が困難であり、また高過ぎるとは減少量測定値の正確性が低下する等、影響が比較的大きい。存在するNADHの量は、下限は、0.01mM以上であることが好ましく、0.02mM以上であ

50

ることがより好ましく、0.05mM以上であることがさらに好ましい。いずれの場合であっても上限は、4mM以下であることが好ましく、2mM以下であることがより好ましく、1mM以下であることがさらに好ましい。

【0064】

工程(B1)では、340nmの吸光度を測定することで、反応進行に伴うNADH減少量を計測し、ピルビン酸生成量が算出される。

【0065】

工程(B)を、ピロリン酸測定のための工程として実施し、かつピロリン酸をピロフォスファターゼと反応させて無機リン酸に変換し、無機リン酸を各種手法で定量する場合(「工程(B2)」とする。)、使用するピロフォスファターゼの量は、ピロリン酸の定量が実施できれば特に限定されず、試料に含まれるピロリン酸の存在量、使用する装置、ピロフォスファターゼの純度や種類に応じて適宜決定することができる。使用するピロフォスファターゼの量は、下限は、0.151U/ml以上であることが好ましく、1.5U/ml以上であることがより好ましく、15U/ml以上であることがさらに好ましい。またいずれの場合であっても上限は、6000U/ml以下であることが好ましく、600U/ml以下であることがより好ましく、60U/ml以下であることがさらに好ましい。発色試薬としては、水と濃硫酸を混合後、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ を溶解した液と、水と濃硫酸を混合後、 FeSO_4 を溶解した液を用いることができる(モリブデンブルー法)。発色試薬の例は、本明細書の実施例の項を参考にすることができる。

【0066】

工程(A)および工程(B)のための反応温度は、使用する酵素の最適温度等を考慮して適宜設定することができる。本明細書の実施例で示したような酵素を用いる場合、各工程は、室温~37℃で好適に行うことができる。工程(A)およびPPDKを用いてピロリン酸を測定する工程(B)は、同じ系内で同時に進行させる場合も、反応温度は、使用する酵素の最適温度等を考慮して適宜決定されるが、室温~37℃、例えば30℃で好適に行うことができる。

【0067】

工程(A)および工程(B)のための反応時間は、被検試料に含まれるアミノ酸量や使用するAARSの量にも拠るが、反応は速やかに進行するものであり、40分以内、例えば約20分以内とすることができる。

【0068】

本発明の好ましい態様の一つにおいては、工程(A)のAARSとして、好熱性生物由来のものを用いる。好熱性生物の例は、Thermus属に属する生物である。このような態様においては、反応を比較的高温で実施することができ、高温で行うことにより、酵素使用量が少なく済むという利点があると考えられる。このような態様における反応温度は、当業者であれば用いるAARSに応じて適宜設計しうるが、例えば50℃以上であり、60℃以上であることが好ましく、65℃以上であることがさらに好ましい。そして、AARSの使用量は、上で述べた量の1/2以下、より特定すると1/5以下、さらに特定すると1/9以下程度でありうる。

【0069】

工程(A)を比較的高温で実施する場合、好適に組み合わせることができる工程(B)の例は、上で工程(B2)として示したモリブデンブルー法である。

【0070】

〔本発明の用途等〕

本発明により、5 μM ~200 μM のアミノ酸の定量が可能である。

本発明の方法は、試料中のアミノ酸を定量するために用いることができる。試料は、測定対象アミノ酸を含む可能性のある試料であれば、如何なるものでもよく、例えば、生体由来物、例えば、血液、血清、血漿、尿、汗に対して適用することができる。また食品、化粧品、医薬品等を対象に適用することもできる。

【0071】

試料には2種類以上のアミノ酸が含まれていてもよく、本発明によれば、それぞれのアミノ酸を定量することができる。一つの試料中の2種類以上のアミノ酸を定量する場合、好ましい態様においては、本発明は、定量対象アミノ酸の各々に対応したAARSを準備し、AARS以外の他の必要成分を含んだ反応試薬を準備し、反応試薬と試料とを混合し、混合物を、少なくとも対象アミノ酸の種類の数に分割し、そして各分割物に異なるAARSを添加する

工程を含む。

【0072】

本発明の方法は、多種類のアミノ酸の迅速な同時定量を可能にし得る。

【実施例】

【0073】

以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0074】

〔1. AARSの発現系構築〕

Thermotoga maritima MSB8株 (NBRC 100826) 由来CysRS, HisRS, LysRS, ProRS, SerRS, TrpRS, TyrRSを大腸菌で異種発現させるための発現系を以下のようにして構築した。NBRCから分譲された*T. maritima*由来ゲノムDNAを鋳型として用い、データベース上の各種AARS遺伝子配列(配列番号1~7)を元に設計したプライマー(配列番号8~21)を用いてPCRを行い、各遺伝子を増幅した。増幅産物をpET-28aに挿入し、各AARS発現用プラスミドとした。なおプライマー設計の際には、TyrRS遺伝子に関してはNdeIサイトとHindIIIサイトを付加してN末端にHisタグがつくようにし、それ以外の遺伝子に関してはNcoIサイトとNotIサイトを付加してC末端にHisタグがつくようにした。

【0075】

Thermus thermophilus HB8株由来IleRS, MetRS, TyrRS(配列番号22~24)の大腸菌での異種発現のためには、RIKEN BioResource Center、DNA Bankから提供された*Thermus thermophilus*遺伝子発現プラスミドセットを使用した。

【0076】

〔2. AARSの発現、精製〕

各発現用プラスミドで大腸菌BL21 (DE3)株を形質転換し、大量発現株として用いた。各発現株を37℃の振盪培養でOD₆₀₀が0.6~0.8に達するまで培養し、IPTGを終濃度0.5 mMになるように添加することで発現誘導をかけた。発現誘導後30℃で4時間振盪培養を行い、集菌した。菌体を超音波破碎し、可溶性画分に目的酵素が得られた。

【0077】

上記の破碎液上清をGEヘルスケア社製Ni Sepharoseカラムにロードし、20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 50 mM imidazole溶液で洗浄後、20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 500 mM imidazole溶液で溶出させることによって目的酵素を精製・回収した。上記の酵素液は、必要に応じて、透析や限外濾過によりimidazoleの除去やバッファの交換、濃縮を行ってから使用した。

【0078】

〔3. PPKとLDHの共役によるAARS活性測定法〕

測定対象アミノ酸を含む検体と、下記の組成のアミノ酸定量用反応液を混合した。混合液を30℃に静置して、AARS、PPDKおよびLDH反応を進行させ、340 nmの吸光度の減少量を測定した。混合液の液量は200 μlになるようにし、96穴マイクロプレートに分注後、マイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。

アミノ酸定量用反応液: 20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 10 mM MgCl₂, 10 mM NH₄Cl, 0.3 mM PEP, 0.3 mM NADH, 0.2 mM ATP, 0.2 mM AMP, 70 mU/ml PPK, 50 U/ml LDH, AARS(濃度は検体との混合後の終濃度)

【0079】

〔4. モリブデンブルー反応によるAARS活性測定法〕

10

20

30

40

50

測定対象アミノ酸を含む検体と、下記の組成のアミノ酸定量用反応液を混合した。混合液を30 に静置して、AARS反応を進行させた。上記混合液33 μ lと水66 μ l、300 U/ml酵母由来ピロフォスファターゼ溶液1 μ lを混合後、室温で20分間静置してピロフォスファターゼ反応を進行させた。その後、下記の組成の発色液A 100 μ lと発色液B 30 μ lを混合してから5分間室温で静置し、マイクロプレートリーダーで700 nmまたは900 nmの吸光度を測定した。

アミノ酸定量用反応液：20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 5 mM $MgCl_2$, 2 mM ATP, AARS (濃度は検体との混合後の終濃度)

発色液A: 水と濃硫酸を3 : 1で混合後、 $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ を0.066 g/ml溶かした溶液

発色液B: 水と濃硫酸を10000 : 7で混合後、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ を145 mg/ml溶かした溶液

10

【5. 70 でのAARS活性測定法】

測定対象アミノ酸を含む検体と、下記の組成のアミノ酸定量用反応液を混合した。混合液を70 に静置して、AARS反応を進行させた。上記混合液600 μ lと1 M 2-メルカプトエタノール溶液60 μ l、下記の発色液240 μ lを混合してから20分間室温で静置し、光路長1 cmのキュベットで580 nmの吸光度を吸光度計で測定した。

アミノ酸定量用反応液：20 mM HEPES-NaOH (pH 8.0), 5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM ATP, AARS (濃度は検体との混合後の終濃度)

発色液：水と濃硫酸を6 : 1で混合後、 $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ を0.025 g/ml溶かした溶液

【0080】

【6. ヒドロキシルアミン添加効果の検証】

20

【3】に示したAARS活性測定法を用い、反応液中に各種濃度のヒドロキシルアミンを添加した際の活性測定を行った。AARSにはThermotoga由来TyrRSを用いた。検体には、混合後の終濃度が0, 25, 50, 100, 150 μ Mとなるような標準Tyr溶液を用いた。ヒドロキシルアミンは、混合後の終濃度が0, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 mMとなるように反応液に添加した。なおこれ以降の実施例で用いたヒドロキシルアミンは、事前に塩酸を添加してpH 7.0に中和したものを指す。TyrRSは終濃度125 μ g/ml (10 mU/ml)となるように反応液に添加した。各種濃度のTyrとヒドロキシルアミンを含む検体・反応液を混合した後速やかにマイクロプレートリーダーにセットし、340 nmの吸光度のモニタリングを開始した。各ヒドロキシルアミン濃度条件のサンプルグループ内で、0 mM Tyrサンプルとの吸光度差を算出してプロットしたところ、図1に示すような経時変化が得られた。

30

【0081】

ヒドロキシルアミンを50, 100, 200, 400, 600, 800 mM添加した条件下では、Tyr濃度に依存し、AARS・PPDK・LDHの共役反応に由来すると思われる吸光度変化が観察された。この反応は、サンプル混合後5分~1時間以上続き、その後は一定の吸光度差に落ちついた。ヒドロキシルアミン400 mM以下サンプルでは、ヒドロキシルアミン濃度が高いサンプルほど吸光度差が落ちつくまでの時間が短かった。ヒドロキシルアミン400 mM以上のサンプルでは、吸光度差が落ちつくまでの時間に有意な差はいらなかった。

【0082】

一方ヒドロキシルアミン非添加条件では、TyrRS・PPDK・LDHの共役反応由来と思われる吸光度変化は見られなかった。この条件下でのサンプル間の吸光度差はわずかであり、マイクロプレートウェルの汚れや実験操作による誤差の範疇に留まる。よってTyrRS反応の進行を上記検出系で観察するためには、ヒドロキシルアミン添加が不可欠であることが示された。

40

【0083】

本実施例のヒドロキシルアミン非添加条件は、特許文献1および特許文献2で用いられている反応条件と同じ原理である。似た条件であるにも関わらず、上記特許文献ではAARS反応による有意なピロリン酸生成が検出されたのに対し、本実施例では検出不可能であった。このような結果の相違の原因は不明であるが、一つには、検出法の違いによるものである可能性も考えられる。すなわち、本実施例では吸光度法による検出を行っているのに対し、上記特許文献ではセンサ電極または蛍光法による検出を行っており、検出法の感度

50

の違いによって検出の可否が変わるのかもしれない。いずれにしても本実施例の結果から、少なくとも本実施例のような検出系を用いる場合においては、ヒドロキシルアミン非添加では検出不可能であったAARS反応によるピロリン酸生成が、ヒドロキシルアミン添加によって検出可能になることを明らかにした。

【0084】

図1で示したデータから、測定20分後の吸光度差を縦軸、Tyr濃度を横軸として、各ヒドロキシルアミン濃度毎に検量線を作成すると、図2のようになる。ヒドロキシルアミン濃度200, 400, 600, 800, 1000 mM条件で、吸光度差とTyr濃度の間の相関係数は、それぞれ0.9952, 0.9998, 0.9998, 0.9988, 0.9995となった。いずれも検量線として高い直線性を有していると言え、本反応系により精度の高いTyr定量が可能であることが示された。

10

【0085】

測定20分後以外の各タイムポイントでも同様に検量線を作成して相関係数を算出し、横軸を時間として相関係数をプロットすると、図3のようになった。いずれのヒドロキシルアミン濃度においても、時間経過と共に相関係数が上昇して安定する傾向が見られた。相関係数が安定するまでに要する時間は、400 mM以下のヒドロキシルアミンサンプルでは高濃度ほど短くなり、それ以上の濃度では有意な差が見られなかった。高濃度のヒドロキシルアミンが悪影響を及ぼさない系であれば、より高濃度のヒドロキシルアミンを添加することで速やかに反応を完了させられることが示された。

【0086】

〔7. PPKとLDHの共役によるアミノ酸検量線作成〕

20

〔3〕に示したAARS活性測定法を用い、検体として標準Cys, Lys, Ser, Tyr溶液を用いたときの検量線を作成した。上記アミノ酸の濃度は、終濃度0~200 μ Mになるように調製した。ヒドロキシルアミン濃度は、Tyr検量線サンプルで200 mM、Cys、Lys、Ser検量線サンプルで1000 mMとした。Thermotoga由来CysRS, LysRS, SerRS, TyrRS, Thermus由来TyrRSはそれぞれ終濃度0.2 (7 mU/ml), 0.1 (10 mU/ml), 0.2 (8 mU/ml), 0.4 (40 mU/ml), 0.1 mg/mlとなるように反応液に添加した。

【0087】

Thermotoga由来AARSを用いたとき、各アミノ酸について図4~7のような検量線が得られた。いずれの検量線でも高い直線性を有することが示された。この結果から、本定量法によりTyrだけでなくCys、Lys、Serについても定量可能であることを明らかにした。なおいずれの反応液でも、ヒドロキシルアミン非添加時には有意な吸光度変化は見られなかった。

30

【0088】

上記アミノ酸の代わりにピロリン酸を加えた場合も同様に検量線が作成可能であるが、Lys, Ser, Tyr検量線の傾き(基質mMあたりの吸光度変化量)は、ピロリン酸検量線の傾きの80%以上となった。このことは、検体中のアミノ酸の80%以上が反応に用いられ、同モルのピロリン酸を生成したことを示している。なおCys検量線の傾きは他の検量線に比べてやや低くなっているが、これは検体中のシステインの一部が空気酸化によりシスチンに変わってしまい、システインの実濃度が低下していたためだと考えられる。

【0089】

40

またThermus由来TyrRSを用いたとき、図8のような検量線が得られた。Thermotoga由来TyrRSを用いたときと同様に直線性の高い検量線が得られ、Thermotoga以外の生物種由来AARSでも定量が可能であることが示された。

【0090】

〔8. モリブデンブルー法によるアミノ酸検量線作成〕

〔4〕に示したAARS活性測定法を用い、検体として標準His, Pro, Trp溶液を用いたときの検量線を作成した。上記アミノ酸の濃度は、終濃度0~80 μ Mになるように調製した。HisRS, ProRS, TrpRSはそれぞれ終濃度0.1, 0.2, 0.1 mg/mlとなるように反応液に添加した。

【0091】

50

各アミノ酸について図9~11のような検量線が得られた。検出限界に近い低濃度のアミノ酸サンプルであったため相関係数は図4~7の系に比べて劣るが、検量線として使用に耐える直線性を示した。よって、本定量法によりHis, Pro, Trpについても定量可能であること、また〔3〕に示したピロリン酸定量法以外の手法を用いても定量可能であることを明らかにした。なおいずれの反応液でも、ヒドロキシルアミン非添加時には有意な吸光度変化は見られなかった。

【0092】

〔9. 70 インキュベーションによるアミノ酸検量線作成〕

〔5〕に示したAARS活性測定法を用い、検体として標準Ile, Met, Tyr溶液を用いたときの検量線を作成した。AARSには、Thermus由来IleRS, MetRS, TyrRSを用いた。各AARSはそれぞれ終濃度0.01, 0.08, 0.08 mg/mlとなるように反応液に添加した。上記アミノ酸の濃度は、終濃度0~100 μ Mになるように調製した。また複合体分解試薬として、ヒドロキシルアミンを終濃度400 mM添加した。

10

【0093】

各アミノ酸について、図12~図14のような検量線が得られた。この結果から、本定量法によりIle, Metについても定量可能であることを明らかにした。また同時に、工程Aにおける反応温度は30 に限られず、70 などの高温にも設定可能であることを明らかにした。さらに、30 で反応を行った〔6〕と比較すると、Thermus由来TyrRSについては1オーダー低い酵素濃度で定量可能となった。好熱性生物由来AARSに関しては、70 など高温下で反応を行うことにより、酵素使用量が少なく済むという利点があると考えられる。

20

【0094】

〔10. 各AARSの基質特異性〕

Thermotoga由来CysRS, HisRS, LysRS, ProRS, SerRS, TrpRS, TyrRSについて、〔4〕に示したAARS活性測定法を用い、検体として各種アミノ酸の標準溶液のいずれかを用いたときのピロリン酸生成の有無を検証した。各AARSはそれぞれ終濃度0.3 (8 mU/ml), 0.1, 0.2 (3 mU/ml), 0.2, 0.1 (1 mU/ml), 0.1, 0.2 (20 mU/ml) mg/mlとなるように反応液に添加した。Tyrは終濃度1 mM、それ以外のアミノ酸は終濃度5 mMとなるように反応液を調製した。ヒドロキシルアミン濃度は、いずれも終濃度1000 mMとなるように添加した。またThermus由来MetRSとTyrRSについて、〔5〕に示したAARS活性測定法を用い、検体として各種アミノ酸の標準溶液のいずれかを用いたときのピロリン酸生成の有無を検証した。各アミノ酸は終濃度200 μ Mとなるように反応液を調製した。ヒドロキシルアミンは終濃度400 mMとなるように添加した。

30

【0095】

各AARSとアミノ酸の組み合わせを含む反応液での活性検出の有無を、表1に示す。+は活性が検出されたこと、-は活性が検出されなかったことを表す。各AARSは、対応する一種類のアミノ酸に対してのみ活性を示した。この結果から、これらのAARSを用いた定量系により各アミノ酸種に対し選択性の高い定量が可能であることを明らかにした。

【0096】

【表 1】

表 1 各種 AARS での定性試験

	Thermotoga 由来 AARS							Thermus 由来 AARS	
	CysRS	HisRS	LysRS	ProRS	SerRS	TrpRS	TyrRS	MetRS	TyrRS
Ala	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cys	+	—	—	—	—	—	—	—	—
Asp	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Glu	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Phe	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Gly	—	—	—	—	—	—	—	—	—
His	—	+	—	—	—	—	—	—	—
Ile	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lys	—	—	+	—	—	—	—	—	—
Leu	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Met	—	—	—	—	—	—	—	+	—
Asn	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Pro	—	—	—	+	—	—	—	—	—
Gln	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Arg	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ser	—	—	—	—	+	—	—	—	—
Thr	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Val	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Trp	—	—	—	—	—	+	—	—	—
Tyr	—	—	—	—	—	—	+	—	+

+…活性検出、—…活性非検出

【 0 0 9 7 】

〔 11. 各種複合体分解試薬の効果 〕

〔 5 〕 に示した AARS 活性測定法を用い、複合体分解試薬としてヒドラジンまたはメチルアミンを添加したときの検量線を作成した。AARS には、Thermus 由来 TyrRS を終濃度 0.01 mg/ml となるように反応液に添加した。Tyr は終濃度 0 ~ 100 μM になるように調製した。また、ヒドラジンとメチルアミンはそれぞれ終濃度 400 mM、20 mM となるように添加した。

【 0 0 9 8 】

測定 20 分後の吸光度差を縦軸、Tyr 濃度を横軸として、各複合体分解試薬毎に検量線を作成した。ヒドラジンをを用いた場合を図 15 に、メチルアミンを用いた場合を図 16 に示した。いずれも検量線として高い直線性を有していると言え、本反応系により精度の高いアミノ酸定量が可能であることが示された。

【 産業上の利用可能性 〕

【 0 0 9 9 】

アミノ酸分析は食品の品質管理や様々な疾病検出のマーカーとして用いられ、産業上広い分野で需要のある技術と言える。多種類のアミノ酸分析を行うためには、HPLC などの機器分析を用いるという選択肢しかほぼないのが現状である。しかし機器分析は高価・大規模な分析機器を要し、現場で迅速な測定を行うことは困難である。また、現場での測定ではなく依頼分析を行う場合は、サンプル分析をはじめ保管や輸送のため高額な費用を要することから、その利用はごく限られた範囲に留まっている。

【 0 1 0 0 】

上記のような機器分析法と異なり、本発明の手法は酵素的定量法であり、高価な専用分析機器を要さない。また、放射性同位体や蛍光法など高感度検出系を必要とする従来の酵素的定量法とも異なり、より幅広い環境で容易に実施可能な定量法と言える。本発明の実

10

20

30

40

50

施により、多種類のアミノ酸を迅速に測定することが可能である。例えば、AARS活性測定溶液と検体を混合後に分注し、それぞれに異なる種類のAARSを混合することで、多種類のアミノ酸の同時定量を容易に行うことができる。また本手法がマイクロプレートリーダーなどのハイスループットな測定機器で実施可能であることも、本明細書の実施例で示されている。

【配列表フリーテキスト】

【0101】

配列番号1：Thermotoga由来CysRS

配列番号2：Thermotoga由来HisRS

配列番号3：Thermotoga由来LysRS

配列番号4：Thermotoga由来ProRS

配列番号5：Thermotoga由来SerRS

配列番号6：Thermotoga由来TrpRS

配列番号7：Thermotoga由来TyrRS

配列番号8：プライマー CysRS F

配列番号9：プライマー CysRS R

配列番号10：プライマー HisRS F

配列番号11：プライマー HisRS R

配列番号12：プライマー LysRS F

配列番号13：プライマー LysRS R

配列番号14：プライマー ProRS F

配列番号15：プライマー ProRS R

配列番号16：プライマー SerRS F

配列番号17：プライマー SerRS R

配列番号18：プライマー TrpRS F

配列番号19：プライマー TrpRS R

配列番号20：プライマー TyrRS F

配列番号21：プライマー TyrRS R

配列番号22：Thermus由来IleRS

配列番号23：Thermus由来MetRS

配列番号24：Thermus由来TyrRS

【要約】

【課題】アミノ酸の簡易、迅速な定量方法を提供する。

【解決手段】アミノ酸、およびアデノシン三リン酸（ATP）に、そのアミノ酸に対応するアミノアシルtRNA合成酵素（AARS）を、（アミノアシルAMP）-AARS複合体分解試薬存在下で作用させ、反応生成物を得る工程（A）；および 工程（A）の生成物のいずれかを定量する工程（B）を含み、得られた生成物量に基づいてアミノ酸量を決定する。本発明の方法に拠れば、一の試料中の2種類以上のアミノ酸を同時に迅速に測定することができる。

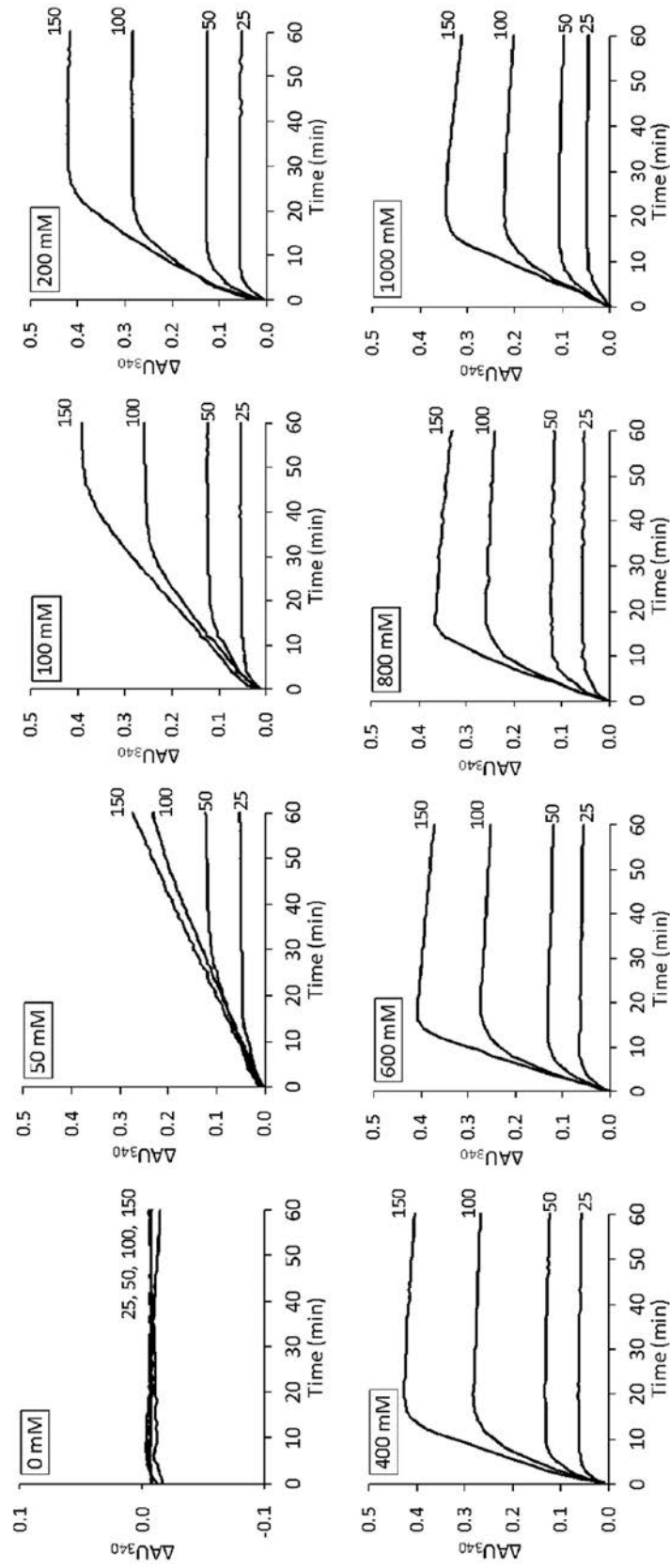
【選択図】なし

10

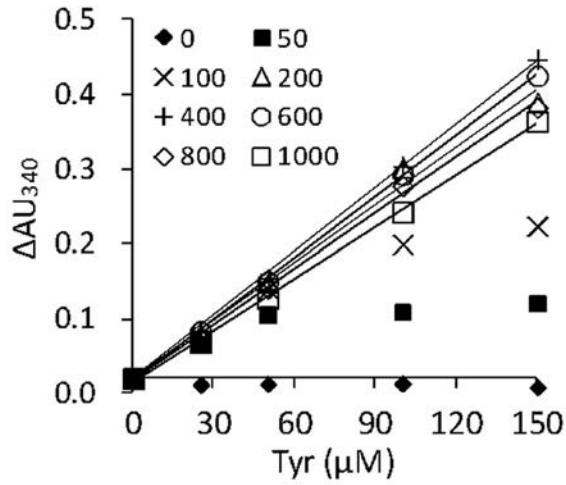
20

30

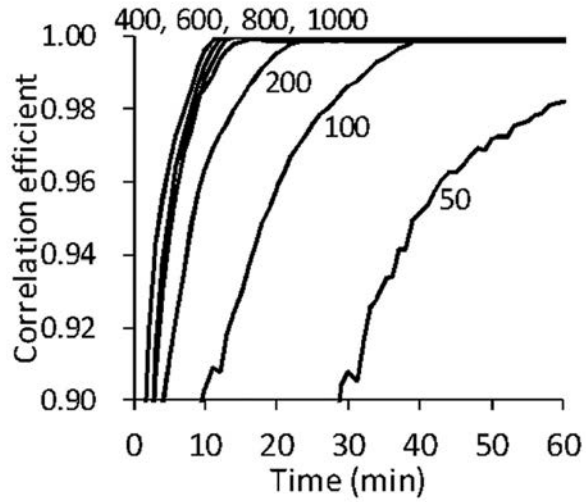
【 図 1 】



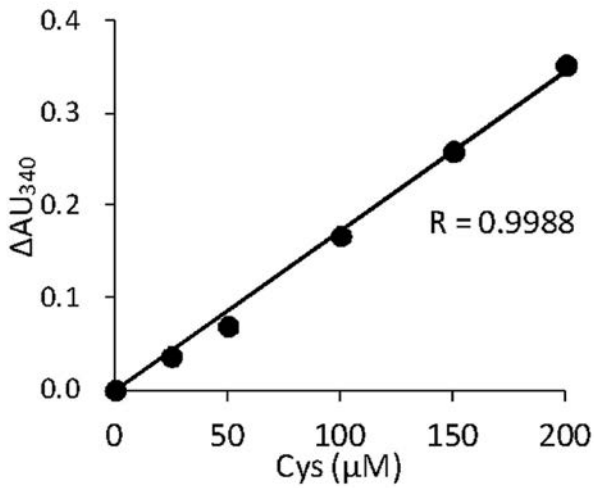
【 図 2 】



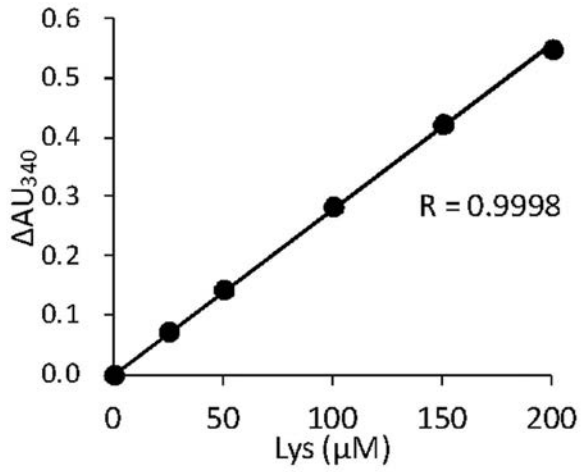
【 図 3 】



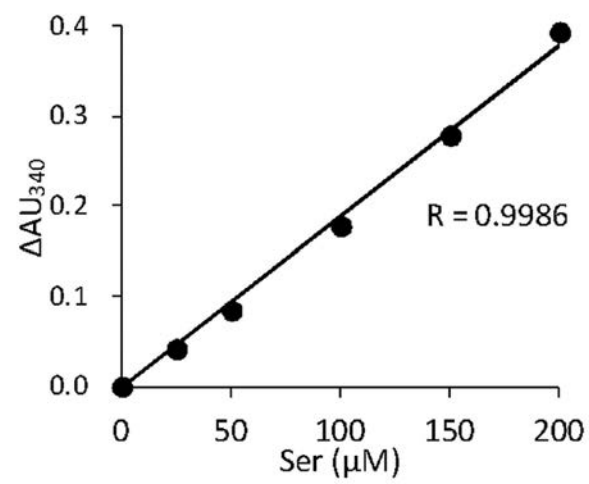
【 図 4 】



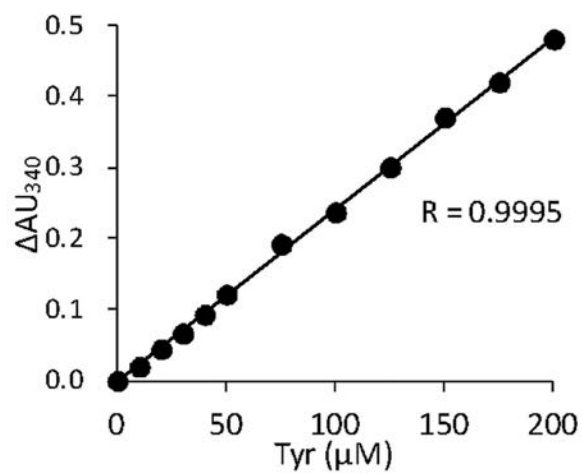
【 5 】



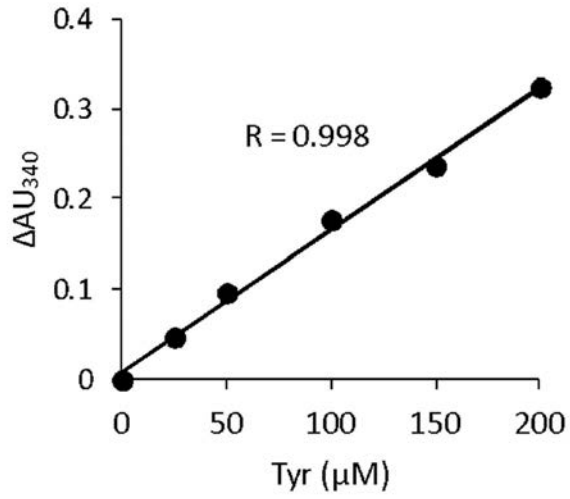
【 6 】



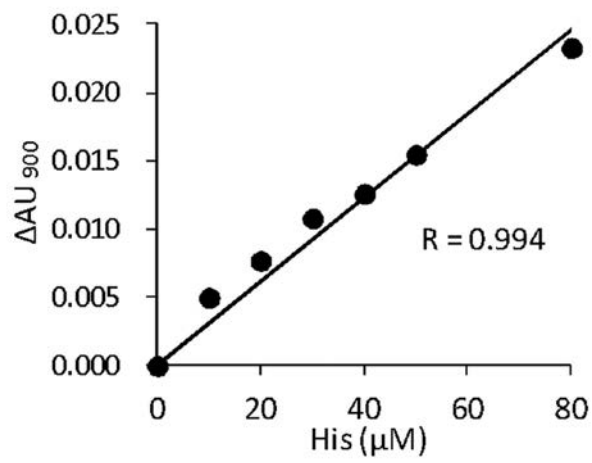
【 7 】



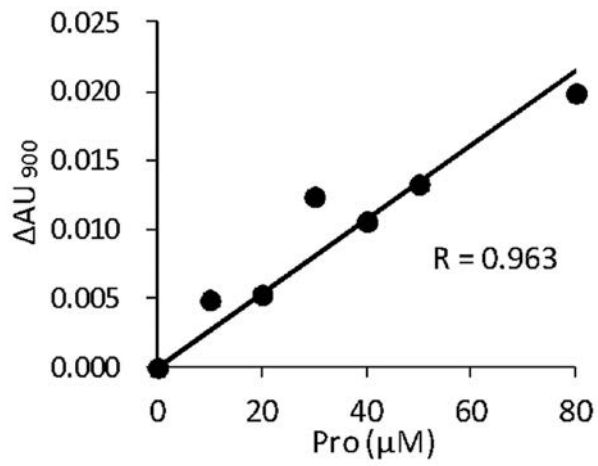
【 図 8 】



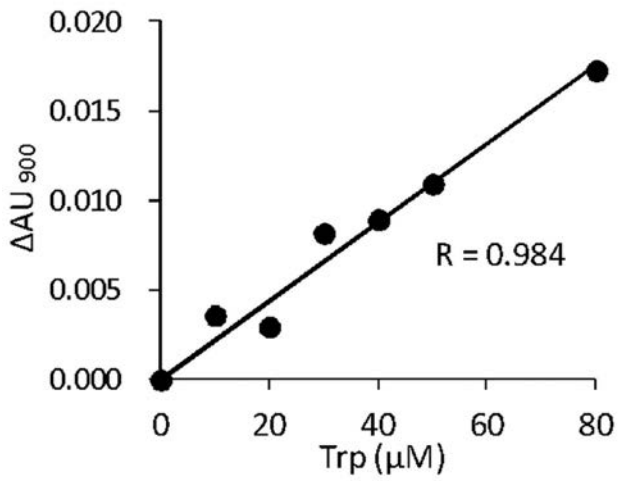
【 図 9 】



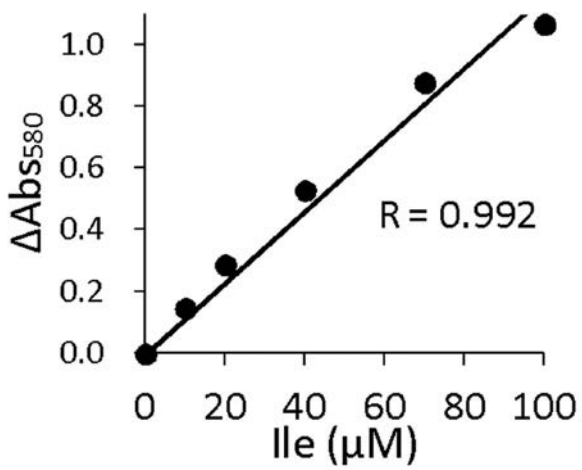
【 図 10 】



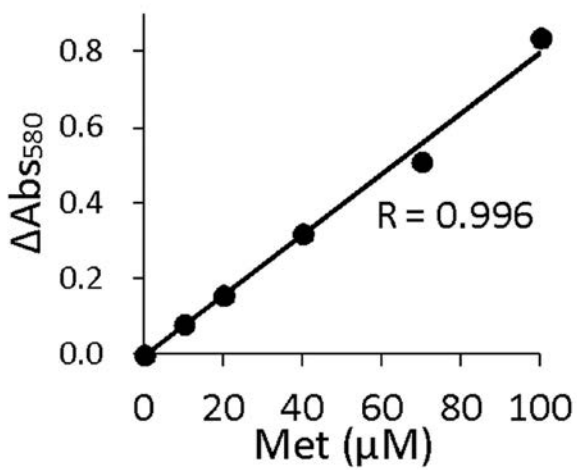
【 1 1 】



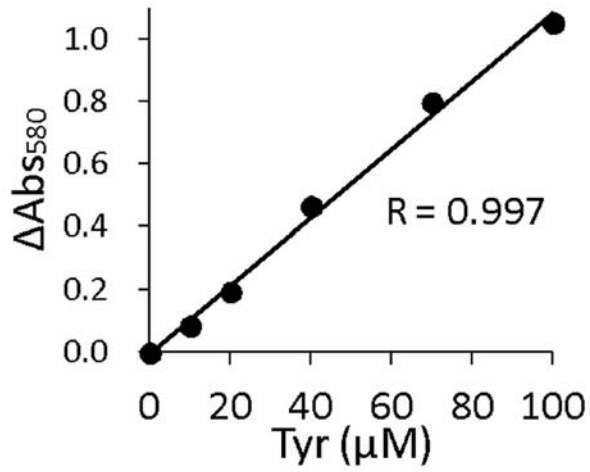
【 1 2 】



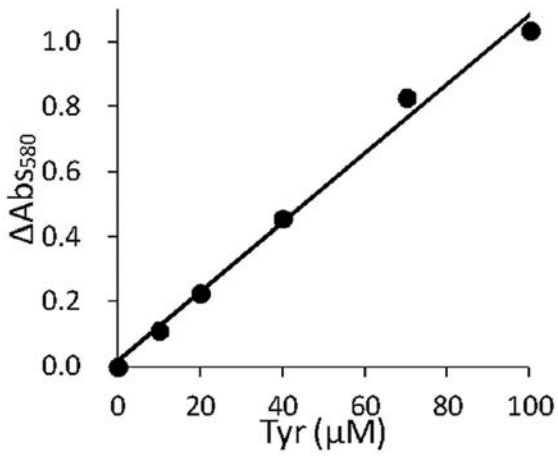
【 1 3 】



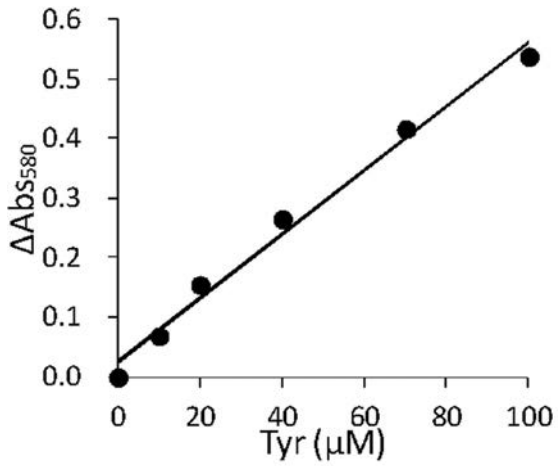
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 配列表 】

0005305208000001.app

フロントページの続き

審査官 北村 悠美子

(56)参考文献 特開2010-200656(JP,A)

日本化学会第92春季年会(2012)講演予稿集III,2012年3月9日,p.1069,1PC-128

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,1966年,Vol.241, No.4, p.839-845

日本化学会第90春季年会(2010)講演予稿集III,2010年,p.1017,3PC-170

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C12Q 1/48

CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

WPI