

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7333547号
(P7333547)

(45)発行日 令和5年8月25日(2023.8.25)

(24)登録日 令和5年8月17日(2023.8.17)

(51)国際特許分類 F I
C 1 2 Q 1/25 (2006.01) C 1 2 Q 1/25 Z N A
C 1 2 N 15/52 (2006.01) C 1 2 N 15/52 Z

請求項の数 6 (全25頁)

(21)出願番号	特願2020-513235(P2020-513235)	(73)特許権者	000210067 池田食研株式会社 広島県福山市箕沖町9 5 番地 7
(86)(22)出願日	平成31年4月5日(2019.4.5)	(73)特許権者	503359821 国立研究開発法人理化学研究所 埼玉県和光市広沢2 番 1 号
(86)国際出願番号	PCT/JP2019/015061	(74)代理人	100216286 弁理士 篠崎 史典
(87)国際公開番号	WO2019/198623	(72)発明者	山田 健太 広島県福山市箕沖町9 5 番地 7 池田食 研株式会社内
(87)国際公開日	令和1年10月17日(2019.10.17)	(72)発明者	青木 秀之 広島県福山市箕沖町9 5 番地 7 池田食 研株式会社内
審査請求日	令和4年4月1日(2022.4.1)	(72)発明者	中柄 朋子
(31)優先権主張番号	特願2018-77189(P2018-77189)		
(32)優先日	平成30年4月12日(2018.4.12)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アミノ酸定量方法及びアミノ酸定量用キット

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の各工程を含む工程 (I) :

(工程 I - 1) 試料中のアミノ酸 (A A) に対応するアミノアシル t R N A 合成酵素 (A A R S) 及び転移 R N A (t R N A) を反応させて、A A R S と t R N A から成る複合体 (A A R S - t R N A 複合体) を形成させる反応 (反応 1) を含む工程 ;

(工程 I - 2) 二価陽イオンの存在下、該 A A 、該 A A に対応する A A R S - t R N A 複合体、及び、アデノシン三リン酸 (A T P) を反応させて、アミノアシルアデニル酸 (アミノアシル A M P) と A A R S - t R N A 複合体から成る複合体 (アミノアシル A M P - A A R S - t R N A 複合体) を形成させる反応 (反応 2) を含む工程 ;

(工程 I - 3) 反応 2 及び / 又は反応 4 で形成されたアミノアシル A M P - A A R S - t R N A 複合体 (該複合体から生成され得る A A R S 及びアミノアシル t R N A も含む) にアミノ酸再生試薬を作用させて、A A 、並びに、A A R S 、 A A R S - t R N A 複合体及び t R N A からなる群から選択される少なくとも一種以上の化合物を遊離させる反応 (反応 3) を含む工程 ;

(工程 I - 4) 反応 3 で遊離された A A 、並びに、A A R S 、 A A R S - t R N A 複合体及び t R N A からなる群から選択される少なくとも一種以上の化合物を反応 1 及び / 又は反応 2 において再利用することによってアミノアシル A M P - A A R S - t R N A 複合体反応を形成させる反応 (反応 4) を含む工程 ; 及び、

(工程 I - 5) 工程 I - 3 及び工程 I - 4 を繰り返す工程、並びに、工程 (I) で生じた

反応産生物の量を測定し、該反応産生物の測定量に基づきアミノ酸の量を決定することを
含む工程（ⅠⅠ）、
を含む、試料中のアミノ酸定量方法であって、
前記工程（Ⅰ）で用いるアミノ酸再生試薬が、ヌクレオチド及びアルカリ性化合物である
ことを特徴とするアミノ酸定量方法。

【請求項 2】

工程（Ⅰ）で用いる tRNA が、AARS のモル数の 0.25 倍以上であることを特徴とする、請求項 1 に記載のアミノ酸定量方法。

【請求項 3】

吸光度法により吸光度変化を測定することによって、工程（Ⅰ）で生じた反応産生物の量を測定する、請求項 1 又は 2 に記載のアミノ酸定量方法。

10

【請求項 4】

工程（Ⅰ）で生じる反応産生物として、ピロリン酸又は水素イオンの少なくとも何れか 1 つを測定する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のアミノ酸定量方法。

【請求項 5】

工程（Ⅰ）で生じた反応産生物のモル数が反応液中に含まれる tRNA 及び / 又はアミノ酸のモル数より多いことを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のアミノ酸定量方法。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のアミノ酸定量法を実施するためのアミノ酸定量用キットであって、ATP、アミノ酸再生試薬、並びに、該アミノ酸に対応する AARS 及び tRNA を含む、アミノ酸定量用キット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アミノ酸定量方法及びアミノ酸定量用キット等に関する。

【背景技術】

【0002】

L-アミノ酸（L-AA）は、生体内のタンパク質の構成成分として重要な役割を担っており、その種類は 20 種類である。L-アミノ酸の機能性に関し多くの研究がなされ、L-アミノ酸は、医薬品、加工食品、健康食品など様々な産業で使用されている。例えば、食品中の遊離の L-アミノ酸は、味、加熱後の香り、保存性、摂取後の生体調節機能等に関係しており、食品科学や栄養科学分野における重要な要素として注目されている。また、近年、疾病により血液中の L-アミノ酸濃度が変化することが見いだされ、血液中のアミノ酸濃度を測定することで、肺がん、胃がん、大腸がんなどのがん診断を可能とするバイオマーカーとしても活用されている。その為、アミノ酸定量技術は、アミノ酸を使用する製品開発、品質管理、診断などの様々な分野で必要不可欠な技術となっている。

30

【0003】

L-アミノ酸のアミノ酸定量技術として、アミノ酸を液体クロマトグラフィーで分離し、ニンヒドリンや蛍光誘導体化剤オルトフタルアルデヒドによる呈色反応で検出する方法が知られている（非特許文献 1）。しかし、該方法は、1 検体の分析時間が 2 時間程度必要なため分析時間がかかり、多数の検体を測定するには不向きであるという問題点があった。

40

【0004】

別のアミノ酸定量技術として、L-アミノ酸に作用する酵素を利用するアミノ酸の測定方法が知られている（特許文献 1）。しかし、該方法は目的基質とするアミノ酸に対する選択性が低く、目的以外のアミノ酸にも反応する、また、20 種類のアミノ酸に対応する酵素がないという問題点があった。

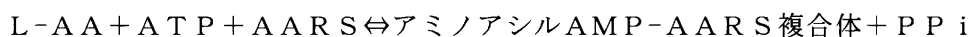
【0005】

アミノアシル tRNA 合成酵素（AARS）は、生体内のタンパク質合成に係る酵素であり、以下の反応式 1 及び 2 に従って、アミノアシル tRNA を産生する。20 種類の L-ア

50

ミノ酸 (L - A A) に対し特異的な 2 0 種類の A A R S が存在する。その為、標的とするアミノ酸及び転移 R N A (t R N A) に対する選択性が極めて高い酵素であるとされている。
【化 1】

(反応式 1)



(反応式 2)



10

【0006】

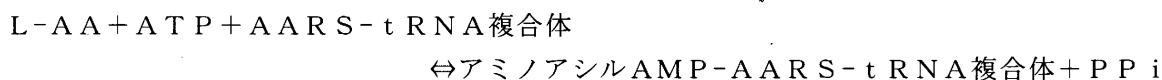
AARS の内、グルタミン酸に作用するグルタミル t R N A 合成酵素、グルタミンに作用するグルタミル t R N A 合成酵素及びアルギニンに作用するアルギニル t R N A 合成酵素の 3 種類の A A R S については、以下の反応式 3 ~ 5 に従って、t R N A と A A R S が予め会合し、活性化されなければ A A R S 反応が起こらないことが報告されている (非特許文献 2) 。

【化 2】

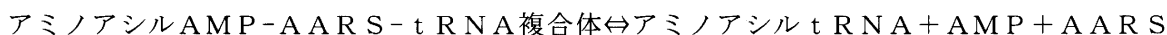
(反応式 3)



(反応式 4)



(反応式 5)



20

【0007】

当該反応では、ピロリン酸 (P P i) が産生されると共に、AARS にアデノシン三リン酸 (A T P) 、 L - アミノ酸 (L - A A) 及び t R N A が 1 分子ずつ作用することで、アミノアシルアデニル酸 (アミノアシルAMP) - A A R S - t R N A 複合体という反応中間体を形成する。該複合体に於いて、アミノアシルAMPは、通常、AARS に強く結合しているため、t R N A 又は求核剤 (アミン類) を加えて複合体を分解しない限り上記の A A R S 反応は進まないとされている (特許文献 2 、 非特許文献 3 ~ 4) 。

【0008】

このような A A R S が関与する反応 (A A R S 反応) については、非特許文献 5 や非特許文献 6 のように放射線ラベルを使用した方法で確認されており、本方法を利用した L - アミノ酸の定量技術がこれまで開発されてきた。例えば、非特許文献 7 では、反応式 1 と反応式 2 の A A R S 反応に基づき、放射線ラベルをした測定対象アミノ酸を用い、A T P 、 t R N A と A A R S を作用させ、産生したアミノアシル t R N A 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測定する方法が記載されている。しかしながら、該方法では、放射線ラベルした測定対象アミノ酸が不可欠であり、放射線ラベルをした測定対象アミノ酸が取り扱える施設や設備が必要である。また、ビーズの吸着、分離などの煩雑な操作も必要である。さらに反応式 1 と 2 の A A R S 反応に基づくため、A A R S が 1 分子のアミノ酸と A T P と反応し、1 分子のアミノアシル t R N A を産生するため、試料中の t R N A と同量かそれ以下のピロリン酸しか産生されない。従って、該方法では、微量な反応産物であるアミノアシル t R N A を検出する必要があり、放射線ラベルをした測定対象アミノ酸が必要不可欠だとされている (特許文献 2 の段落番号 0 0 1 2) 。

30

40

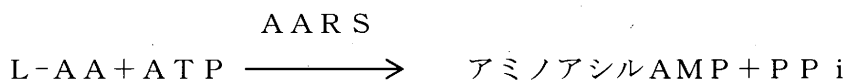
50

【0009】

また、例えば、以下の反応式6で示される反応に基づくアミノ酸の分析方法が特許文献3に記載されている。

【化3】

(反応式6)



10

【0010】

該方法に於いては、AARSがATP及びL-アミノ酸と結合する際に生じるピロリン酸を指標とすることによりL-アミノ酸を分析する(特許文献3、非特許文献8、9、10)。しかしながら、反応式6からも分かるように、当該方法は、tRNAを添加せず反応させる方法であり、tRNAとAARSが予め会合し、活性化されなければならないAARSでは、反応が起こらない方法である。

【0011】

更に、tRNAを添加せず、反応式1と2のAARS反応に基づいてL-アミノ酸を定量する方法が、特許文献2及び特許文献4に記載されている。即ち、前述の通りアミノアシルAMPは、通常、AARSに強く結合してアミノアシルAMP-AARS複合体を形成している。そこで、該方法では、アミノアシルAMP-AARS複合体分解試薬としてヒドロキシルアミンなどのアミン類(求核剤)を添加することで、AARSを再び反応可能な状態とし、その結果、少量のAARSでL-アミノ酸を定量することを特徴とする。しかしながら、特許文献2及び特許文献4に記載の該複合体分解試薬が複合体のL-アミノ酸と反応して化合物が産生される(例えば、特許文献2の段落番号0037に示されるように、該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は、「アミノ酸ヒドロキサム酸」が産生される)ため、L-アミノ酸は再利用することが出来ず、その結果、試料中のL-アミノ酸と同等量の産生物であるピロリン酸しか得られない(特許文献2の段落番号0023)。

20

30

【0012】

また、該方法はtRNAを添加せず反応させる方法であり、tRNAとAARSが予め会合し、活性化されなければならないAARSでは、反応が起こらない。因みに、特許文献2では、tRNAとAARSが予め会合し、活性化されなければならないAARSについては、tRNAを添加すれば良いとしており、添加するtRNAは、測定対象のアミノ酸と同等に高いモル濃度にする必要がなく、AARSと同等に低いモル濃度添加すれば十分であることが記載されている(特許文献2の段落番号0012)。また、反応式1と2のAARS反応に基づく該方法において、tRNAを使用する場合、アミノアシルtRNAを構成するtRNAは再利用することが出来ず、その結果、試料中のtRNA量に反応が制限されることとなり、tRNAと同等量の産生物であるピロリン酸しか得られない。以上のことから、反応式1と2のAARS反応に基づく該方法は、tRNAやL-アミノ酸の再利用をしないため、tRNA又はL-アミノ酸と同等量のピロリン酸しか得ることができない、また、AARS反応で生じたピロリン酸を多段階の酵素反応により検出しているため、煩雑であるとともに、血中の夾雑物やその他の外部要因により各酵素が影響を受けやすいことが懸念される。

40

【0013】

実際に、特許文献2には、こうして予めtRNAと会合されたAARSから形成されるアミノアシルAMP-AARS-tRNA複合体にヒドロキシルアミンなどのアミン類(求核剤)を作用させた場合に、該複合体からAA、並びに、AARS、AARS-tRNA複合体及びtRNAからなる群から選択される少なくとも一種以上の化合物が遊離されて、

50

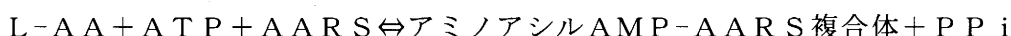
これらが再び反応可能な状態となり、その結果、L-アミノ酸が定量出来ることは何ら記載ないし示唆されていないし、また、そのような事実を示した実施例は開示されていない。

【0014】

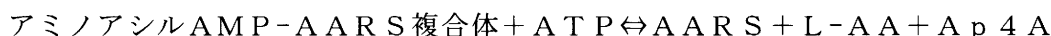
一方、別のAARS反応としては、例えば、以下の反応式7と8の反応が知られている。当該反応では、AARSにATP及びL-アミノ酸が1分子ずつ作用することで、アミノアシルAMP-AARS複合体を形成する。次いで該複合体にATP、GTP等を作用させることによって、医薬品や医薬品原料として期待されているジアデノシン四リン酸(Ap4A)等のジアデノシンポリリン酸(ApnA)及びアデノシングアノシントラリン酸(Ap4G)等が合成・製造されている(特許文献5、特許文献6、非特許文献11、非特許文献12)。

【化4】

(反応式7)



(反応式8)



【0015】

当該反応の反応式7は、ピロリン酸の存在下では逆反応が促進され、アミノアシルAMP-AARS複合体からアミノ酸、AARS及びATPが産生される。その為、当該反応を進めるためには、逆反応を生じなくさせる必要があり、上記の公知文献に記載の技術では、反応式7で産生される不必要なピロリン酸を分解するため、ピロリン酸を分解する無機ピロホスファターゼが使用されている。更に、これら公知文献に記載された技術は、あくまで、ApnA及びAp4G等の合成・製造に関するものであって、アミノ酸の定量に関する技術的課題を解決することを目的とするものではない。実際に、これら公知文献には、上記の反応式7と8のAARS反応を活用したアミノ酸の定量については何ら言及されておらず、反応式8に於いて生じるアミノ酸及びAARSの再利用に関しても一切触れられていない。

【0016】

また、反応式7と8のAARS反応に基づいた、L体及びD体のアミノ酸を定量する方法が、特許文献7に記載されている。この方法では、一度形成させたアミノアシルAMP-AARS複合体からAARS及びアミノ酸を遊離させ、それらを再度、アミノアシルAMP-AARS複合体の形成に利用することによって、最終的に、測定対象であるピロリン酸等の反応産生物を、試料中に含まれるアミノ酸より多くのモル数まで産生させることを特徴とする。しかしながら、該発明は、tRNAとAARSが予め会合し、活性化されなければならないAARSに関して何ら触れられていない。更に、特許文献7には、アミノアシルAMP-AARS-tRNA複合体から、AA、並びに、AARS、AARS-tRNA複合体及びtRNAからなる群から選択される少なくとも一種以上の化合物が遊離され、これらが再利用できる可能性については記載ないし示唆されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0017】

【文献】特開2013-146264号公報

特許5305208号明細書

特開2011-50357号公報

WO2013118894A1

特開2000-69990号公報

特許3135649号明細書

10

20

30

40

50

WO 2017170469A1

【非特許文献】

【0018】

【文献】“化学と生物”、(日本)、2015年、Vol.53、p.192-197

Structure、14、1791-1799、2006

“ヴォート 生化学(下)”、(日本)、第3版、1024-1029

J.Biol.Chem., 241、839-845、1966

J.Biol.Chem., 240、432-438、1965

Eur. J. Biochem., 70、137-145、1976

Analytical Biochem., 363、246-254、2007

10

Analytical Biochem., 443、22-26、2013

Appl. Biochem. Biotechnol., 174、2527-2536、2014

J. Chem.Chem. Eng. 6、397-400、2012

“東京医科大学雑誌”、(日本)、1993年、Vol.51、p.469-480

Agric. Biol. Chem., 53、615-623、1989

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

本発明は、上記のアミノ酸定量法に関する従来技術に於ける様々な問題点を解決し、AARSを用いて、測定対象のアミノ酸を選択的且つ簡便、高感度に定量する方法及びアミノ酸定量用キットを提供することを目的とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0020】

発明者らは、種々の検討を行った結果、AARSを用いて試料中のアミノ酸(L体及びD体)、特に、グルタミン酸、グルタミン及びアルギニンの量を定量する方法に於いて、図1に示すように、試料中のアミノ酸(AA)に対応するアミノアシルtRNA合成酵素(AARS)及び転移RNA(tRNA)を反応させて、AARSとtRNAから成る複合体(AARS-tRNA複合体)を形成させ、このAARS-tRNA複合体とアミノ酸及びATPと反応させてアミノアシルAMP-AARS-tRNA複合体を形成させ、次いで、一度形成させたアミノアシルAMP-AARS-tRNA複合体(該複合体から生成され得るAARS及びアミノアシルtRNAも含む)とアミノ酸再生試薬(ヌクレオチド又は、アルカリ性化合物)を反応させることによって、該複合体から、AA、並びに、AARS、AARS-tRNA複合体及びtRNAからなる群から選択される少なくとも一種以上の化合物を遊離させ、それらを再度、アミノアシルAMP-AARS-tRNA複合体の形成に利用することによって、最終的に、測定対象であるピロリン酸等の反応産物が、反応液中に含まれるtRNA及び/又はアミノ酸より多くのモル数まで産生され得ることを見出し、本発明を完成させた。

30

【0021】

本発明は、以下の[1]~[7]の態様に関する。

[1]以下の各工程を含む工程(I)：

40

(工程I-1)試料中のアミノ酸(AA)に対応するアミノアシルtRNA合成酵素(AARS)及び転移RNA(tRNA)を反応させて、AARSとtRNAから成る複合体(AARS-tRNA複合体)を形成させる反応(反応1)を含む工程；

(工程I-2)二価陽イオンの存在下、該AA、該AAに対応するAARS-tRNA複合体、及び、アデノシン三リン酸(ATP)を反応させて、アミノアシルアデニル酸(アミノアシルAMP)とAARS-tRNA複合体から成る複合体(アミノアシルAMP-AARS-tRNA複合体)を形成させる反応(反応2)を含む工程；

(工程I-3)反応2及び/又は反応4で形成されたアミノアシルAMP-AARS-tRNA複合体(該複合体から生成され得るAARS及びアミノアシルtRNAも含む)にアミノ酸再生試薬を作用させて、AA、並びに、AARS、AARS-tRNA複合体及びt

50

RNA からなる群から選択される少なくとも一種以上の化合物を遊離させる反応（反応 3）を含む工程；

（工程 I - 4）反応 3 で遊離された AA、並びに、AARS、AARS-tRNA 複合体及び tRNA からなる群から選択される少なくとも一種以上の化合物を反応 1 及び/又は反応 2 において再利用することによってアミノアシルAMP-AARS-tRNA 複合体反応を形成させる反応（反応 4）を含む工程；及び、

（工程 I - 5）工程 I - 3 及び工程 I - 4 を繰り返す工程、並びに、工程（I）で生じた反応産生物の量を測定し、該反応産生物の測定量に基づきアミノ酸の量を決定することを

含む工程（II）、

を含む、試料中のアミノ酸定量方法。

10

[2] 工程（I）で用いるアミノ酸再生試薬が、ヌクレオチド及びアルカリ性化合物であることを特徴とする、態様 [1] に記載のアミノ酸定量方法。

[3] 工程（I）で用いる tRNA が、AARS のモル数の 0.25 倍以上であることを特徴とする、態様 [1] に記載のアミノ酸定量方法。

[4] 吸光度法により吸光度変化を測定することによって、工程（I）で生じた反応産生物の量を測定する、態様 [1] ~ [3] に記載のアミノ酸定量方法。

[5] 工程（I）で生じる反応産生物として、ピロリン酸又は水素イオンの少なくとも何れか 1 つを測定する、態様 [1] ~ [4] の何れか一項に記載のアミノ酸定量方法。

[6] 工程（I）で生じた反応産生物のモル数が反応液中に含まれる tRNA 及び/又はアミノ酸のモル数より多いことを特徴とする、態様 [1] ~ [5] のいずれか一項に記載のアミノ酸定量方法。

20

[7] 態様 [1] ~ [6] に記載のアミノ酸定量法を実施するためのアミノ酸定量用キットであって、ATP、アミノ酸再生試薬、並びに、該アミノ酸に対応する AARS 及び tRNA を含む、アミノ酸定量用キット。

【発明の効果】

【0022】

本発明に係るアミノ酸定量方法に於いては、試料中のアミノ酸に対応する AARS 及び tRNA と反応させて、AARS と tRNA から成る複合体（AARS-tRNA 複合体）を形成させ、二価陽イオンの存在下、該 AARS-tRNA 複合体、該アミノ酸及び ATP を反応させて、アミノアシルAMP-AARS-tRNA 複合体を形成させる。次いで、一度形成させたアミノアシルAMP-AARS-tRNA 複合体（該複合体から生成され得る AARS 及びアミノアシル tRNA も含む）とアミノ酸再生試薬（ヌクレオチド又はアルカリ性化合物）を反応させて、AA、並びに、AARS、AARS-tRNA 複合体及び tRNA からなる群から選択される少なくとも一種以上の化合物を遊離させ、それらをアミノアシルAMP-AARS-tRNA 複合体の形成に繰り返し利用することによって、測定対象であるピロリン酸等の反応産生物を、反応液中に含まれる tRNA 及び/又はアミノ酸より多くのモル数まで産生させることができる。その結果、従来技術のような放射線ラベルをした測定対象アミノ酸は不必要となる。また、従来技術に比べてより簡便な手段でこれら反応産生物を測定する場合であっても、従来技術の多段階酵素反応を用いた蛍光法などによる高感度分析のアミノ酸定量法のアミノ酸定量範囲と同等の範囲での定量が可能であり、このような高感度分析は不必要となる。従って、本発明によって、グルタミン酸、グルタミン、及び、アルギニンを特異的且つ簡便、高感度に定量する方法及びその定量用キットを提供することが可能となる。

30

40

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図 1】本発明方法に含まれると考えられる反応工程を示す図である。

【図 2】tRNA を用いた各種 AARS 反応により生じるピロリン酸産生量を示す図である。

【図 3】tRNA 混合品を用いた各種 AARS 反応により生じるピロリン酸産生量を示す図である。

50

【図4】ArgRSにおけるtRNAの各種濃度によるピロリン酸産生量を示す図である。

【図5】GluRSにおけるtRNAの各種濃度によるピロリン酸産生量を示す図である。

【図6】GlnRSにおけるtRNAの各種濃度によるピロリン酸産生量を示す図である。

【図7】ArgRSにおけるtRNA混合品の各種濃度によるピロリン酸産生量を示す図である。

【図8】GlnRSにおけるtRNA混合品の各種濃度によるピロリン酸産生量を示す図である。

【図9】本発明と公知文献（非特許文献6、特許文献2）のAARS反応におけるピロリン酸産生量を示す図である。

【図10】各種ATP濃度により生じるピロリン酸産生量を示す図である。

10

【図11】各種二価イオン濃度により生じるピロリン酸産生量を示す図である。

【図12】各反応温度によるピロリン酸産生量を示す図である。

【図13】各pHによるピロリン酸産生量を示す図である。

【図14】モリブデンブルー法によるピロリン酸測定におけるアミノ酸検量線を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0024】

本発明方法の反応1では、試料中のアミノ酸(AA)に対応するAARS及び該AARSに対応する転移RNA(tRNA)を反応させて、AARSとtRNAから成るAARS-tRNA複合体を形成させる。本発明方法に使用するAARSは、グルタミン酸に特異的に作用するグルタミルtRNA合成酵素(GluRS)、グルタミンに特異的に作用するグルタミルtRNA合成酵素(GlnRS)、アルギニンに特異的に作用するアルギニルtRNA合成酵素(ArgRS)などアミノ酸に対し特異的に作用するAARSを用いる。また、本発明に使用するAARSは、ウシ、ラット、マウスなどの動物由来、Lupin Seed、Phaseolus aureusなどの植物由来、Escherichia属、Thermus属、Thermotoga属、Saccharomyces属などの微生物由来など、生物由来のAARSであれば、いずれのAARSでも良く、特に取扱及び生産性の面の観点から、微生物由来のAARSが好ましい。また、組換え型AARSでも良く、合成したAARSでも良い。可溶性酵素が好ましいが、不溶性酵素に界面活性剤を組み合わせても良く、可溶化タンパクとの融合又は膜結合部分の削除等により不溶性酵素を可溶化させた酵素でも良い。AARSの公知のアミノ酸配列を利用でき、組換え型のAARSは、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%以上の同一性を有する配列を有し、AARS活性を有するタンパク質を使用しても良い。

20

30

【0025】

本発明に使用するAARSとしては、当業者に公知の任意の方法・手段、例えば、AARSを含む対象物に加水し、粉碎機、超音波破碎機などで粉碎後、破碎した破碎物を遠心分離、濾過などで固形物を取り除いた抽出物、さらに当該抽出物をカラムクロマトグラフィーなどにより精製、単離したAARSなどを用いることができる。即ち、本発明の主な技術的特徴は、AARSを用いるアミノ酸定量方法に於いて、形成されたアミノアシルAMP-AARS-tRNA複合体中から、AA、並びに、AARS、AARS-tRNA複合体及びtRNAからなる群から選択される少なくとも一種以上の化合物を遊離させて、それらをアミノアシルAMP-AARS-tRNA複合体の形成に繰り返し利用することによって、測定対象であるピロリン酸等の反応産生物を、反応液中に含まれるtRNA及び/又はアミノ酸より多くのモル数まで産生させることであり、AARSの調製方法は何ら限定されるものではない。

40

【0026】

当該反応に使用される反応液中のAARS濃度は、試料の種類、推定される試料中のアミノ酸濃度、ATP濃度、及び、反応時間・温度等の各種反応条件に応じて、当業者が適宜決められる。工程(I)の反応2における逆反応を出来るだけ抑えるためには、試料中のアミノ酸濃度が低濃度と予想される場合は、AARS濃度を高濃度とすることが好ましく

50

、逆に試料中のアミノ酸濃度が高濃度と予想される場合は、AARS濃度は低濃度で良い。また、AARS濃度を高濃度することによって反応を短時間に完了させることが出来、逆に反応時間が長時間でも良い場合は、AARS濃度は低濃度で良い。例えば、Escherichia属、Thermus属、Thermotoga属などの微生物由来のAARSの濃度は、 $0.1\mu\text{M}$ 以上、より好ましくは $0.25\mu\text{M}$ 以上、さらに好ましくは $1.0\mu\text{M}$ 以上、特に好ましくは $3.0\mu\text{M}$ 以上、最も好ましくは $5.0\mu\text{M}$ 以上とすることができる。いずれにしても、本発明方法では、AARSが繰り返し使用されるので、予想される試料中のアミノ酸量に対して、過剰量のAARSを添加する必要はない、という利点を有する。従って、AARS濃度の上限は、経済性なども考慮して当業者が適宜設定することができる。

10

【0027】

また、本発明方法の反応1ではAARSと共にtRNAを用いる。本発明に使用するtRNAは、各アミノ酸に対し特異的に作用するAARSに対応するtRNAを用いる。例えば、グルタミン酸に特異的に作用するGluRSに対応するtRNA、グルタミンに特異的に作用するGlnRSに対応するtRNA、アルギニンに特異的に作用するArgRSに対応するtRNAが挙げられる。また、本発明に使用するtRNAは、ウシ、ラット、マウスなどの動物由来、Lupin Seed、Phaseolus aureusなどの植物由来、Escherichia属、Thermus属、Thermotoga属、Saccharomyces属などの微生物由来など、生物由来のtRNAであれば、いずれのtRNAでも良く、特に取扱及び生産性の面の観点から、微生物由来のtRNAが好ましい。また、合成したtRNAでも良い。tRNAの公知の塩基配列を利用でき、合成したtRNAは、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%以上の同一性を有する配列を有し、AARSに結合、AARS反応を引き起こすtRNAであれば良い。

20

【0028】

本発明に使用するtRNAとしては、当業者に公知の任意の方法・手段、例えば、tRNAを含む対象物を抽出用緩衝液とフェノールとの混合液に混ぜ、超音波ホモジナイザーなどで粉碎後、破砕した破砕物を遠心分離、濾過などで取得したtRNA、さらに当該tRNAをカラムクロマトグラフィーなどにより精製、単離したtRNAなどを用いることができる。即ち、本発明の主な技術的特徴は、AARSを用いるアミノ酸定量方法に於いて、形成されたアミノアシルAMP-AARS-tRNA複合体中から、AA、並びに、AARS、AARS-tRNA複合体及びtRNAからなる群から選択される少なくとも一種以上の化合物を遊離させて、それらをアミノアシルAMP-AARS-tRNA複合体の形成に繰り返し利用することによって、測定対象であるピロリン酸等の反応産物を、反応液中に含まれるtRNA及び/又はアミノ酸より多くのモル数まで産生させることであり、tRNAの調製方法は何ら限定されるものではない。更に、以下の実施例に於いて「tRNA混合物」と示されるような、各アミノ酸に対応する複数の種類のtRNAが任意の割合で混在する混合物を本発明の方法に於ける「tRNA」として使用することも可能である。

30

【0029】

当該反応に使用される反応液中のtRNAの濃度は、試料の種類、予想される試料中のアミノ酸濃度、AARS濃度、ヌクレオチド濃度、及び、反応時間・温度等の各種反応条件に応じて、当業者が適宜決められる。例えばtRNA濃度は、 $0.01\mu\text{M}$ 以上、より好ましくは $0.1\mu\text{M}$ 以上、さらに好ましくは $0.5\mu\text{M}$ 以上、特に好ましくは $1.0\mu\text{M}$ 以上、最も好ましくは $2.0\mu\text{M}$ 以上とすることができる。又、tRNA混合品の場合には、tRNA全体の濃度は、 $1\mu\text{M}$ 以上、より好ましくは $5\mu\text{M}$ 以上、さらに好ましくは $10\mu\text{M}$ 以上、特に好ましくは $50\mu\text{M}$ 以上、最も好ましくは $100\mu\text{M}$ 以上とすることができる。尚、tRNAの濃度は、平均分子量25,000により算出した。tRNA濃度の上限は、経済性なども考慮して当業者が適宜設定することができる。また、反応条件に依存するが、測定対象であるピロリン酸等の反応産物を試料中に含まれるアミノ酸より多

40

50

くのモル数まで産生させるために、tRNAのモル数がAARSのモル数の0.25倍以上、より好ましくは、0.5倍以上、更に好ましくは、1倍以上であることが望ましい。更に、反応条件に依存するが、測定対象であるピロリン酸等の反応産物を試料中に含まれるtRNAより多くのモル数まで産生させるために、tRNAのモル数がAARSのモル数の0.1倍以上、より好ましくは、0.25倍以上、更に好ましくは、0.5倍以上であることが望ましい。

【0030】

本発明方法の反応2では、二価陽イオンの存在下、試料中のアミノ酸(AA)、該AAに対応するAARS-tRNA複合体、及び、アデノシン三リン酸(ATP)を反応させて、アミノアシルAMP-AARS-tRNA複合体を形成させる。

本発明に使用する試料に特に制限はなく、例えば、血液、生鮮食品、加工食品及び飲料などがあげられる。各試料中のアミノ酸濃度は、各アミノ酸により異なる。例えば、血液中のグルタミン酸は11~44nmol/mL、グルタミンは488~733nmol/mLである。生鮮食品中の遊離アミノ酸含量は、例えば、ニンニクでは、アルギニンは136mg/100gなどである。トマトでは、グルタミンは94mg/100gである。乾燥シイタケでは、グルタミン酸は386mg/100gである。加工食品や飲料中の遊離アミノ酸含量は、例えば、醤油では、グルタミン酸は782mg/100gである。煎茶では、アルギニンは314mg/100g、グルタミン酸は258mg/100gである。これら各試料中の予想されるアミノ酸濃度によって、適宜、希釈調製し、本発明の試料として使用できる。

【0031】

本発明に使用するATPは、ナトリウム塩、リチウム塩などが使用できる。当該反応に使用される反応液中のATPの濃度は、試料の種類、予想される試料中のアミノ酸濃度、AARS濃度、ヌクレオチド濃度、及び、反応時間・温度等の各種反応条件に応じて、当業者が適宜決められるが、予想される試料中のアミノ酸濃度に対して過剰となるように添加するのが好ましい。例えば試料が血液の場合、ATP濃度は、0.01mM以上、より好ましくは0.1mM以上、さらに好ましくは1.0mM以上、特に好ましくは5.0mM以上、最も好ましくは10.0mM以上とすることができる。ATP濃度の上限は、経済性なども考慮して当業者が適宜設定することができる。

【0032】

また、本発明に使用する二価イオンは、マグネシウム、マンガン、コバルト、カルシウムなどが使用できる。二価イオンは、各AARSにより要求性が異なるため、使用するAARSに適した二価イオンを適宜使用すれば良いが、AARS共通に要求性のあるマグネシウムやマンガンの使用がより好ましい。さらには二価イオンと同様な作用をするスペルミン、スペルミジン、プトレッシンなどのポリアミンも使用できる。当該反応に使用される反応液中の二価イオンの濃度は、適宜決められるが、ATP濃度に対して同等以上に添加するのが好ましい。例えば、Escherichia属、Thermus属、Thermotoga属などの微生物由来のAARSにおけるATP：二価陽イオンの比率は、少なくとも1：1、より好ましくは少なくとも1：3、さらに好ましくは少なくとも1：5、特に好ましくは少なくとも1：7、最も好ましくは少なくとも1：10とすることができる。

【0033】

続いて、本発明方法の反応3では、反応2及び/又は反応4で形成させたアミノアシルAMP-AARS-tRNA複合体、並びに、反応条件等によって該複合体から生成され得るアミノアシルtRNA、に対しアミノ酸再生試薬を作用させ、該複合体を分解し該複合体からAA、並びに、AARS、AARS-tRNA複合体及びtRNAからなる群から選択される少なくとも一種以上の化合物を遊離させる。当該反応のアミノ酸再生試薬としては、例えば、ATP、アデノシン二リン酸(ADP)、アデノシン一リン酸(AMP)及びグアノシン三リン酸(GTP)などのヌクレオチドや、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム及び緩衝剤などの水酸化物イオン(アルカリ性水溶液)を発生するアルカリ性化合物を使用できる。また、アルカリ性化合物は、反応の場(反応系)をpH7

以上にできれば良い。例えば、Escherichia属、Thermus属及びThermotoga属のAARSの場合では、好ましくはpH7.0以上、より好ましくはpH7.5以上、さらに好ましくは、pH8.0以上であることが好ましい。尚、反応pHは、当業者に公知の任意の緩衝剤などを使用して調整することが出来る。当該反応に使用される反応液中のアミノ酸再生試薬の濃度は、試料の種類、予想される試料中のアミノ酸濃度、AARS濃度、ATP濃度、tRNA濃度及び、反応時間・温度等の各種反応条件に応じて、当業者が適宜決められるが、反応2で使用するATPと当該反応に使用するアミノ酸再生試薬の総量は試料中のアミノ酸濃度に対して過剰に添加するのが好ましい。例えば、試料が血液の場合、ヌクレオチド濃度は、0.01mM以上、より好ましくは0.1mM以上、さらに好ましくは1.0mM以上、特に好ましくは5.0mM以上、最も好ましくは10.0mM以上とすることができる。従って、本発明方法では、AARSを再び反応可能な状態とさせるために、特許文献2に記載されているようなアミン類等のアミノアシルAMP-AARS複合体分解試薬を添加する必要がなく、更に、遊離したアミノ酸が該試薬と反応することがないので、遊離したアミノ酸をアミノアシルAMP-AARS-tRNA複合体の形成に再び利用することができる。

10

【0034】

本発明方法の反応4では、反応3で遊離したAA、並びに、AARS、AARS-tRNA複合体及びtRNAからなる群から選択される少なくとも一種以上の化合物を反応1及び/又反応2において再び使用することによってアミノアシルAMP-AARS-tRNA複合体反応を形成させる。更に、本発明方法の工程(I)において、当業者に公知の任意の方法によって、反応2又は4で生じたピロリン酸及び反応系中のAMPにホスホエノールピルビン酸とピルビン酸ジキナーゼとを反応させることによって産生されるATPを、アミノアシルAMP-AARS-tRNA複合体形成及び該複合体からのAA、並びに、AARS、AARS-tRNA複合体及びtRNAからなる群から選択される少なくとも一種以上の化合物の遊離に再利用すること、及び/又は、反応3でヌクレオチドから生成されるAp4Aに対しAp4Aピロホスホヒドラーゼを作用させることによって産生されるADPを、反応3におけるヌクレオチドとして再利用することもできる。

20

【0035】

その結果、前述のATPなどのヌクレオチド及び該アミノ酸に対応するAARSの組成等の反応条件において、工程(I)に於ける反応の結果、ピロリン酸及び/又は水素イオン等の夫々の反応産物の各々について、反応液中に含まれているtRNAや測定対象のアミノ酸のモル数より多いモル数の分子が産生され得る。その結果、本発明方法では、従来技術より低濃度である1µM程度の極めて低いアミノ酸濃度から定量可能となる。従って、この点は従来技術と比較して本発明の顕著な効果といえる。

30

【0036】

しかしながら、当該反応条件下で産生されるピロリン酸等の反応産物が、反応液中のtRNAやアミノ酸のモル数以下の量であっても、該反応産物に基づきアミノ酸の定量が可能であれば、ピロリン酸等の反応産物が当該アミノ酸のモル数以上に産生される必要はない。従って、本発明の工程(I)に於いて産生されるピロリン酸や水素イオンの量は、工程(II)に於ける該反応産物の適当な測定方法によってアミノ酸の定量が可能となる限り、特に限定されない。従って、本発明方法の(工程I-5)に於ける、反応3(工程I-3)及び反応4(工程I-4)の繰り返しの回数に特に制限はない。

40

【0037】

本発明方法の工程(I)における反応温度は、各反応が生じるような任意の温度で良い。例えば、Escherichia属のAARSの場合、10~60、好ましくは、40~50、Thermus属及びThermotoga属のAARSの場合では、10~95、好ましくは、40~70が適している。また、当該反応時間も試料中のアミノ酸とAARS反応が生じるような任意の時間で良いが、好ましくは1~90分程度、より好ましくは5~70分程度、さらに好ましくは、10~60分程度であることが望ましい。

【0038】

50

本発明方法の工程（Ⅰ）に含まれる各工程で使用する試薬・酵素等の各反応成分は、AARS反応が生じる添加方法である限り、当業者に公知の任意の手段・手順等で反応系に添加することができる。例えば、各成分を反応開始前に一度に反応系に予め添加するか、又は、AARS又はアミノ酸を最後に添加し反応させても良い。

【0039】

本発明方法の工程（ⅠⅠ）では、工程（Ⅰ）で生じたピロリン酸及び水素イオン等の各反応産生物の夫々の量を測定し、該反応産生物の測定量に基づきアミノ酸の量を決定する。工程（ⅠⅠ）は、測定方法等に応じて、工程（Ⅰ）に於ける試料中のアミノ酸とAARSとの反応を当業者に公知の任意の方法・手段で停止させた後、あるいは、工程（Ⅰ）に於ける反応が進行中の任意の段階で適宜、実施することが出来る。

10

【0040】

本発明の工程（Ⅰ）で生じたピロリン酸の量の測定には、当業者に公知の任意の方法・手段、例えば、モリブデン酸とピロリン酸を反応させ発生した青色の錯体の吸光度を測定するモリブデンブルー法、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、キサンチンオキシダーゼ又はキサンチンデヒドロゲナーゼを組みわせる方法などが使用できる。また、本発明の工程（Ⅰ）で生じたピロリン酸を無機ピロホスファターゼなどで2分子のリン酸とし、そのリン酸を測定することで、より高感度の測定ができる。例えば、ルミノールと無機ピロホスファターゼ、ピルビン酸オキシダーゼ及びペルオキシダーゼを組み合わせ産生物の発光を測定する方法などのピロリン酸を測定できる酵素法などが使用できる。さらに酵素反応などで酸化還元反応を起こし、その酸化還元反応に由来する電流値を検出する多電極電位計測計により電位変化を測定する測定方法などを使用することができる。また、当該反応で発生された水素イオンの測定には、水素イオンを検出するガラス電極やイオン感応性電界効果トランジスタにより電位変化を測定する測定方法などを使用することができる。当該反応で発生されたアデノシンリン酸（AMP）の測定には、アデノシンリン酸を検出する発光を利用したAMPセンサで測定するなどを使用することができる。本発明の工程（Ⅰ）で生じたピロリン酸、水素イオン、AMPなどは、反応溶液から分離し、測定することができる。反応溶液からのピロリン酸、水素イオン、AMPなどの分離方法としては、測定に影響の無い方法であれば特に限定されないが、例えば、酸処理による除タンパク質、ペーパークロマトグラフィー分離、マイクロ流体デバイスでの分離などが挙げられる。本発明の主な技術的特徴は、AARSを用いるアミノ酸定量方法に於いて、形成されたアミノアシルAMP-AARS-tRNA複合体中からAA、並びに、AARS、AARS-tRNA複合体及びtRNAからなる群から選択される少なくとも一種以上の化合物を遊離させて、これら化合物を、再度、該複合体の形成に繰り返し利用することにより、測定対象であるピロリン酸等の反応産生物を、反応液中に含まれるtRNA及び/又はアミノ酸より多くのモル数まで発生させることであり、反応産生物の量の測定方法は何ら限定されるものではない。

20

30

【0041】

本発明は、上記の本発明方法を実施するための、試料中のアミノ酸定量に必要な前述の各成分を含む、アミノ酸定量用キットを提供する。当該キットは、安定化剤又は緩衝剤等の当業者に公知の他の任意成分を適宜含有させ、前記酵素等試薬成分の安定性を高めても良い。測定に影響の無い成分であれば特に限定されないが、例えば、牛血清アルブミン（BSA）、卵白アルブミン、糖類、糖アルコール類、カルボキシル基含有化合物、酸化防止剤、界面活性剤、又は酵素と作用性のないアミノ酸類等を例示できる。また、当該キットの一例として前述のピロリン酸や水素イオンを測定するためのキットを挙げることが出来る。

40

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、本発明の技術的範囲は以下の実施例によって限定されるものではない。

【実施例1】

【0042】

（大腸菌由来のAARSの調製）

50

大腸菌 K 1 2 株由来の変異株 (N B R C 3 9 9 2) の A A R S 配列をもつプラスミド (p E T 2 8 b) を大腸菌 B L 2 1 (D E 3) p L y s 株に遺伝子導入し、発現株として用いた。各発現株について、選択マーカーとしてカナマイシン、クロラムフェニコールを含む LB 培地で 3 7 培養し、O D 6 0 0 が約 0 . 6 に到達後、I P T G を終濃度 1 m M とするように添加し、I P T G を添加して 2 5 で一晚誘導培養を行った。培養終了後、集菌を行い、得られた菌体を超音波破碎し、無細胞抽出液を調製した。さらに遠心分離を行い、得られた上清の一部を用いて電気泳動法により目的酵素の発現を確認した。次いで残りの上清を H i s タグカラム (商品名 : T A L O N s u p e r f l o w 、 G E ヘルスケア製) により夾雑タンパクを除去することにより、A r g R S (配列番号 1) 、 G l u R S (配列番号 2) 、 G l n R S (配列番号 3) を得た。

10

【実施例 2】

【0043】

(大腸菌由来の t R N A の調製)

大腸菌 K 1 2 株由来の t R N A 遺伝子配列をコードするオリゴヌクレオチドから、I n v i t r o で t R N A を転写した。電気泳動法により、目的 t R N A の転写を確認した後、ゲルろ過カラムを用いて、未反応 N T P 、塩などを除去した。次いで、イオン交換体カラムを用いて、目的 t R N A 以外の核酸断片を除去することにより、アルギニン、グルタミン酸及びグルタミンの各アミノ酸に夫々対応する t R N A (配列番号 4 ~ 6) を調製した。

【実施例 3】

20

【0044】

(大腸菌由来の t R N A 混合品の調製)

大腸菌由来 t R N A 数十種類の混合品 (商品名 : t R N A , f r o m E . c o l i M R E 6 0 0 , 1 0 0 m g 、 R o c h e 製) を N u c l e a s e フリー水に溶解させることにより、t R N A 混合品を調製した。

【実施例 4】

【0045】

(t R N A を用いた各種 A A R S 反応により生じるピロリン酸の産生量 : 本発明方法の工程 (I))

2 0 0 m M H E P E S - K O H (p H 8 . 0) 、 1 0 m M A T P 、 1 0 0 m M M g C l ₂ 、 5 0 μ M L - グルタミン酸、 2 . 0 μ M G l u R S 、 及び 1 8 μ M t R N A を含む反応溶液を 1 5 0 μ L 調製し、 4 0 、 6 0 分間処理した。反応後、トリクロロ酢酸を終濃度 4 % となるように 3 0 μ L 添加し、反応を停止した。反応停止後、遠心分離で沈殿を除去し、実施品 1 (本発明品) を調製した。

30

【実施例 5】

【0046】

2 0 0 m M H E P E S - K O H (p H 8 . 0) 、 1 2 . 5 m M A T P 、 1 2 . 5 m M M n C l ₂ 、 5 0 μ M L - アルギニン、 2 . 5 μ M A r g R S 、 及び 1 0 μ M t R N A を含む反応溶液を 1 5 0 μ L 調製し、 5 0 、 6 0 分間処理した。反応後、トリクロロ酢酸を終濃度 4 % となるように 3 0 μ L 添加し、反応を停止した。反応停止後、遠心分離で沈殿を除去し、実施品 2 (本発明品) を調製した。

40

【実施例 6】

【0047】

2 0 0 m M H E P E S - K O H (p H 8 . 0) 、 3 m M A T P 、 3 0 m M M g C l ₂ 、 5 0 μ M L - グルタミン、 2 . 0 μ M G l n R S 、 及び 8 . 2 μ M t R N A を含む反応溶液を 1 5 0 μ L 調製し、 4 0 、 6 0 分間処理した。反応後、トリクロロ酢酸を終濃度 4 % となるように 3 0 μ L 添加し、反応を停止した。反応停止後、遠心分離で沈殿を除去し、実施品 3 (本発明品) を調製した。

【実施例 7】

【0048】

50

(モリブデンブルー法によるピロリン酸の測定：本発明方法の工程(II))

実施例4、5、6で調製した実施品1~3の反応溶液150 μ Lに1Mメルカプトエタノール15 μ L、発色液(2.5%モリブデン酸アンモニウム/5N硫酸)60 μ Lを混合し、室温で20分間静置した後、580nmの吸光度を測定した。なお、基質アミノ酸の代わりに水を添加したサンプルの吸光値を、ブランクとして各サンプルの吸光値から差し引いた値から、反応溶液中のピロリン酸量を求めた。その結果、図2に示す通り、GluRS、ArgRS及びGlnRSにおいて単に、反応液中のtRNA分子又は/及び各基質アミノ酸が一回きり酵素反応に使用された(再利用されない)場合に産生されるピロリン酸量の理論値より多くのピロリン酸が産生されていた。

【実施例8】

【0049】

(tRNA混合品を用いた各種AARS反応により生じるピロリン酸の産生量：本発明方法の工程(I))

200mM HEPES-KOH(pH8.0)、25mM ATP、250mM MgCl₂、20 μ M L-グルタミン酸、5.0 μ M GluRS、及び600 μ M tRNA混合品を含む反応溶液を150 μ L調製し、40、60分間処理した。反応後、トリクロロ酢酸を終濃度4%となるように30 μ L添加し、反応を停止した。反応停止後、遠心分離で沈殿を除去し、実施品4(本発明品)を調製した。

【実施例9】

【0050】

200mM HEPES-KOH(pH8.0)、12.5mM ATP、125mM MgCl₂、20 μ M L-アルギニン、2.5 μ M ArgRS、及び400 μ M tRNA混合品を含む反応溶液を150 μ L調製し、50、60分間処理した。反応後、トリクロロ酢酸を終濃度4%となるように30 μ L添加し、反応を停止した。反応停止後、遠心分離で沈殿を除去し、実施品5(本発明品)を調製した。

【実施例10】

【0051】

200mM HEPES-KOH(pH8.0)、3mM ATP、30mM MgCl₂、20 μ M L-グルタミン、2.0 μ M GlnRS、及び320 μ M tRNA混合品を含む反応溶液を150 μ L調製し、40、60分間処理した。反応後、トリクロロ酢酸を終濃度4%となるように30 μ L添加し、反応を停止した。反応停止後、遠心分離で沈殿を除去し、実施品6(本発明品)を調製した。

【実施例11】

【0052】

(モリブデンブルー法によるピロリン酸の測定：本発明方法の工程(II))

実施例8、9、10で調製した実施品4~6のピロリン酸を実施例7に記載のモリブデンブルー法により測定した。その結果、図3に示す通り、GluRS、ArgRS及びGlnRSにおいて単に、反応液中の各基質アミノ酸が一回きり酵素反応に使用された(再利用されない)場合に産生されるピロリン酸量の理論値より多くのピロリン酸が産生されていた。

【実施例12】

【0053】

(各種tRNA濃度によるピロリン酸の産生量：本発明方法の工程(I))

200mM HEPES-KOH(pH8.0)、12.5mM ATP、12.5mM MnCl₂、20 μ M L-アルギニン、及び2.5 μ M ArgRSを含む反応溶液に、夫々、0 μ M tRNA、0.25 μ M tRNA、0.63 μ M tRNA、1.25 μ M tRNA、1.88 μ M tRNA、2.5 μ M tRNA、又は、5.0 μ M tRNAを添加した各反応溶液を150 μ L調製し、50、60分間処理した。反応後、トリクロロ酢酸を終濃度4%となるように30 μ L添加し、反応を停止した。反応停止後、遠心分離で沈殿を除去し、実施品(本発明品)7、8、9、10、11、12、及び13を調

10

20

30

40

50

製した。

【実施例 13】

【0054】

200 mM HEPES - KOH (pH 8.0)、10 mM ATP、100 mM MgCl₂、50 μM L-グルタミン酸、及び 2.0 μM GluRS を含む反応溶液に、夫々、0 μM tRNA、6 μM tRNA、12 μM tRNA、又は、18 μM tRNA を添加した各反応溶液を 150 μL 調製し、40、60 分間処理した。反応後、トリクロロ酢酸を終濃度 4% となるように 30 μL 添加し、反応を停止した。反応停止後、遠心分離で沈殿を除去し、実施品 (本発明品) 14、15、16、及び 17 を調製した。

【実施例 14】

【0055】

200 mM HEPES - KOH (pH 8.0)、3 mM ATP、30 mM MgCl₂、50 μM L-グルタミン、及び 2.0 μM GlnRS を含む反応溶液に、夫々、0 μM tRNA、4 μM tRNA、8 μM tRNA、又は、16 μM tRNA を添加した各反応溶液を 150 μL 調製し、40、60 分間処理した。反応後、トリクロロ酢酸を終濃度 4% となるように 30 μL 添加し、反応を停止した。反応停止後、遠心分離で沈殿を除去し、実施品 (本発明品) 18、19、20、及び 21 を調製した。

【実施例 15】

【0056】

200 mM HEPES - KOH (pH 8.0)、12.5 mM ATP、125 mM MgCl₂、20 μM L-アルギニン、及び 2.5 μM ArgRS を含む反応溶液に、夫々、0 μM tRNA 混合品、100 μM tRNA 混合品、200 μM tRNA 混合品、又は、400 μM tRNA 混合品を添加した各反応溶液を 150 μL 調製し、50、60 分間処理した。反応後、トリクロロ酢酸を終濃度 4% となるように 30 μL 添加し、反応を停止した。反応停止後、遠心分離で沈殿を除去し、実施品 (本発明品) 22、23、24、及び 25 を調製した。

【実施例 16】

【0057】

200 mM HEPES - KOH (pH 8.0)、3 mM ATP、30 mM MgCl₂、20 μM L-グルタミン、及び 2.0 μM GlnRS を含む反応溶液に、夫々、0 μM tRNA 混合品、160 μM tRNA 混合品、240 μM tRNA 混合品、又は、320 μM tRNA 混合品を添加した各反応溶液を 150 μL 調製し、40、60 分間処理した。反応後、トリクロロ酢酸を終濃度 4% となるように 30 μL 添加し、反応を停止した。反応停止後、遠心分離で沈殿を除去し、実施品 (本発明品) 26、27、28、及び 29 を調製した。

【実施例 17】

【0058】

(モリブデンブルー法によるピロリン酸の測定：本発明方法の工程 (II))

実施例 12、13、14、15、16 で調製した実施品 7 ~ 29 のピロリン酸を実施例 7 に記載のモリブデンブルー法により測定した。その結果、図 4、5、6、7、8 に示す通り、ArgRS、GluRS 及び GlnRS において tRNA 濃度の増加と共にピロリン酸の増加が認められた。tRNA が無添加の場合、ArgRS、GluRS 及び GlnRS のいずれにおいてもピロリン酸の増加が認められなかったことから、これらの AARS 反応には、tRNA が必須であることが分かった。また、単に、反応液中の tRNA 又は / 及び各基質アミノ酸の全てが酵素反応に一回きり使用された (再利用されない) 場合に産生されるピロリン酸量の理論値より多くのピロリン酸が産生されていた。

【0059】

[比較例 1]

(本発明と公知文献記載の AARS 反応におけるピロリン酸の産生量の比較)

非特許文献 6 記載の反応に於いて、測定対象として放射線ラベルをしない通常のアミノ酸

10

20

30

40

50

を使用したこと以外は、該文献に記載の条件に従い、100 mM HEPES - KOH (pH 7.4)、2 mM ATP、10 mM MgCl₂、20 μM L-アルギニン、15.4 μM ArgRS、及び2 μM tRNAを含む反応溶液を150 μL調製し、37、60分間処理した。反応後、トリクロロ酢酸を終濃度4%となるように30 μL添加し、反応を停止した。反応停止後、遠心分離で沈殿を除去し、比較品1を調製した。

【0060】

[比較例2]

特許文献2記載の反応条件に従い、20 mM HEPES - KOH (pH 8.0)、0.5 mM ATP、5 mM MgCl₂、20 μM L-アルギニン、1.0 μM ArgRS、及び400 mM ヒドロキシアミンを含む反応溶液を150 μL調製し、50、60分間処理した。反応後、トリクロロ酢酸を終濃度4%となるように30 μL添加し、反応を停止した。反応停止後、遠心分離で沈殿を除去し、比較品2を調製した。

10

【実施例18】

【0061】

200 mM HEPES - KOH (pH 8.0)、12.5 mM ATP、12.5 mM MnCl₂、20 μM L-アルギニン、2.5 μM ArgRS、及び10 μM tRNAを含む反応溶液を150 μL調製し、50、60分間処理した。反応後、トリクロロ酢酸を終濃度4%となるように30 μL添加し、反応を停止した。反応停止後、遠心分離で沈殿を除去し、実施品30(本発明品)を調製した。

【実施例19】

20

【0062】

(モリブデンブルー法によるピロリン酸の測定：本発明方法の工程(II))

比較例1、比較例2及び実施例18で調製した比較品1、比較品2及び実施品30のピロリン酸を実施例7に記載のモリブデンブルー法により測定した。その結果、図9に示す通り、本発明の方法では、添加したtRNA及びアミノ酸の全てが一回きり反応に使用された(再利用されない)場合に産生されると推測されるピロリン酸量である理論値より多くのピロリン酸が産生されていた。一方、比較品1の産生したピロリン酸は、tRNAの理論値に近く、アミノ酸の理論値以下であった。また、比較品2では、ピロリン酸は、全く産生されなかった。

【実施例20】

30

【0063】

(各種ATP濃度によるピロリン酸の産生量：本発明方法の工程(I))

200 mM HEPES - KOH (pH 8.0)、1.25 mM ATP、1.25 mM MnCl₂、50 μM L-アルギニン、2.5 μM ArgRS、及び10.0 μM tRNAを含む反応溶液、200 mM HEPES - KOH (pH 8.0)、6.25 mM ATP、6.25 mM MnCl₂、50 μM L-アルギニン、2.5 μM ArgRS、及び10.0 μM tRNAを含む反応溶液、又は、200 mM HEPES - KOH (pH 8.0)、12.5 mM ATP、12.5 mM MnCl₂、50 μM L-アルギニン、2.5 μM ArgRS、及び10.0 μM tRNAを含む反応溶液を150 μL調製し、50、60分間処理した。反応後、トリクロロ酢酸を終濃度4%となるように30 μL添加し、反応を停止した。反応停止後、遠心分離で沈殿を除去し、実施品(本発明品)31、32、及び33を調製した。

40

【実施例21】

【0064】

200 mM HEPES - KOH (pH 8.0)、1.25 mM ATP、12.5 mM MgCl₂、20 μM L-グルタミン酸、5.0 μM GluRS、及び600 μM tRNA混合品を含む反応溶液、200 mM HEPES - KOH (pH 8.0)、2.5 mM ATP、25 mM MgCl₂、20 μM L-グルタミン酸、5.0 μM GluRS、及び600 μM tRNA混合品を含む反応溶液、200 mM HEPES - KOH (pH 8.0)、5 mM ATP、50 mM MgCl₂、20 μM L-グルタミン酸、5.0 μM

50

G l u R S、及び600 μM t R N A混合品を含む反応溶液、又は、200 mM H E P E S - K O H (p H 8 . 0)、10 mM A T P、100 mM M g C l 2、20 μM L - グルタミン酸、5 . 0 μM G l u R S、及び600 μM t R N A混合品を含む反応溶液を150 μL調製し、40、60分間処理した。反応後、トリクロロ酢酸を終濃度4%となるように30 μL添加し、反応を停止した。反応停止後、遠心分離で沈殿を除去し、実施品(本発明品)34、35、36、及び37を調製した。

【実施例22】

【0065】

(モリブデンブルー法によるピロリン酸の測定：本発明方法の工程(II))

実施例20、21で調製した実施品31~37のピロリン酸を実施例7に記載のモリブデンブルー法により測定した。その結果、図10に示す通り、A r g R S及びG l u R SにおいてA T P濃度の増加と共にピロリン酸の増加が認められた。また、t R N A又は/及び各基質アミノ酸の全てが一回きり酵素反応に使用された(再利用されない)場合に産生されるピロリン酸量の理論値より多くのピロリン酸が産生されていた。

10

【実施例23】

【0066】

(各種二価イオン濃度によるピロリン酸産生量：本発明方法の工程(I))

200 mM H E P E S - K O H (p H 8 . 0)、12.5 mM A T P、18.75 mM M g C l 2、20 μM L - アルギニン、2.5 μM A r g R S、及び400 μM t R N A混合品を含む反応溶液、200 mM H E P E S - K O H (p H 8 . 0)、12.5 mM A T P、31.25 mM M g C l 2、20 μM L - アルギニン、2.5 μM A r g R S、及び400 μM t R N A混合品を含む反応溶液、200 mM H E P E S - K O H (p H 8 . 0)、12.5 mM A T P、62.5 mM M g C l 2、20 μM L - アルギニン、2.5 μM A r g R S、及び400 μM t R N A混合品を含む反応溶液、又は、200 mM H E P E S - K O H (p H 8 . 0)、12.5 mM A T P、93.75 mM M g C l 2、20 μM L - アルギニン、2.5 μM A r g R S、及び400 μM t R N A混合品を含む反応溶液を150 μL調製し、50、60分間処理した。反応後、トリクロロ酢酸を終濃度4%となるように30 μL添加し、反応を停止した。反応停止後、遠心分離で沈殿を除去し、実施品(本発明品)38、39、40、及び41を調製した。

20

【実施例24】

【0067】

200 mM H E P E S - K O H (p H 8 . 0)、25 mM A T P、37.5 mM M g C l 2、20 μM L - グルタミン酸、5.0 μM G l u R S、及び600 μM t R N A混合品を含む反応溶液、200 mM H E P E S - K O H (p H 8 . 0)、25 mM A T P、125 mM M g C l 2、20 μM L - グルタミン酸、5.0 μM G l u R S、及び600 μM t R N A混合品を含む反応溶液、200 mM H E P E S - K O H (p H 8 . 0)、25 mM A T P、187.5 mM M g C l 2、20 μM L - グルタミン酸、5.0 μM G l u R S、及び600 μM t R N A混合品を含む反応溶液、又は、200 mM H E P E S - K O H (p H 8 . 0)、25 mM A T P、250 mM M g C l 2、20 μM L - グルタミン酸、5.0 μM G l u R S、及び600 μM t R N A混合品を含む反応溶液を150 μL調製し、40、60分間処理した。反応後、トリクロロ酢酸を終濃度4%となるように30 μL添加し、反応を停止した。反応停止後、遠心分離で沈殿を除去し、実施品(本発明品)42、43、44、及び45を調製した。

30

40

【実施例25】

【0068】

(モリブデンブルー法によるピロリン酸の測定：本発明方法の工程(II))

実施例23、24で調製した実施品38~45のピロリン酸を実施例7に記載のモリブデンブルー法により測定した。その結果、図11に示す通り、A r g R S及びG l u R S共に、A T P：二価イオン比率が、1：1.5~1：10において、各基質アミノ酸の全てが一回きり酵素反応に使用された(再利用されない)場合に産生されるピロリン酸量の理論

50

値より多くのピロリン酸が産生されていた。

【実施例 26】

【0069】

(各反応温度によるピロリン酸産生量：本発明方法の工程(I))

200 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、12.5 mM ATP、12.5 mM MnCl₂、20 μM L-アルギニン、2.5 μM ArgRS、及び2.5 μM tRNAを含む反応溶液を150 μL調製し、20、又は30、又は40、又は50 で60分間処理した。反応後、トリクロロ酢酸を終濃度4%となるように30 μL添加し、反応を停止した。その結果、図12に示す通り、20~50 の広い範囲において、良好なピロリン酸の産生が認められた。また、tRNA又は/各基質アミノ酸の全てが一回きり酵素反応に使用された(再利用されない)場合に産生されるピロリン酸量の理論値より多くのピロリン酸が産生されていた。

10

【実施例 27】

【0070】

200 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、25 mM ATP、250 mM MgCl₂、20 μM L-グルタミン酸、5.0 μM GluRS、及び600 μM tRNA混合品を含む反応溶液を150 μL調製し、30、又は40、又は50 で60分間処理した。反応後、トリクロロ酢酸を終濃度4%となるように30 μL添加し、反応を停止した。その結果、図12に示す通り、30~50 の広い範囲において、良好なピロリン酸の産生が認められた。また、各基質アミノ酸の全てが一回きり酵素反応に使用された(再利用されない)場合に産生されるピロリン酸量の理論値より多くのピロリン酸が産生されていた。

20

【実施例 28】

【0071】

(各pHによるピロリン酸産生量：本発明方法の工程(I))

200 mM MES-KOH (pH 6.0)、12.5 mM ATP、125 mM MgCl₂、20 μM L-アルギニン、2.5 μM ArgRS、及び400 μM tRNA混合品を含む反応溶液、200 mM HEPES-KOH (pH 7.0)、12.5 mM ATP、125 mM MgCl₂、20 μM L-アルギニン、2.5 μM ArgRS、及び400 μM tRNA混合品を含む反応溶液、200 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、12.5 mM ATP、125 mM MgCl₂、20 μM L-アルギニン、2.5 μM ArgRS、及び400 μM tRNA混合品を含む反応溶液、又は、200 mM CHES-KOH (pH 9.0)、12.5 mM ATP、125 mM MgCl₂、20 μM L-アルギニン、2.5 μM ArgRS、及び400 μM tRNA混合品を含む反応溶液を150 μL調製し、50、60分間処理した。反応後、トリクロロ酢酸を終濃度4%となるように30 μL添加し、反応を停止した。その結果、図13に示す通り、pH 7~8において、各基質アミノ酸の全てが一回きり酵素反応に使用された(再利用されない)場合に産生されるピロリン酸量の理論値より多くのピロリン酸が産生されていた。

30

【実施例 29】

【0072】

200 mM MES-KOH (pH 6.0)、25 mM ATP、250 mM MgCl₂、20 μM L-グルタミン酸、5.0 μM GluRS、及び600 μM tRNA混合品を含む反応溶液、200 mM HEPES-KOH (pH 7.0)、25 mM ATP、250 mM MgCl₂、20 μM L-グルタミン酸、5.0 μM GluRS、及び600 μM tRNA混合品を含む反応溶液、200 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、25 mM ATP、250 mM MgCl₂、20 μM L-グルタミン酸、5.0 μM GluRS、及び600 μM tRNA混合品を含む反応溶液、又は、200 mM CHES-KOH (pH 9.0)、25 mM ATP、250 mM MgCl₂、20 μM L-グルタミン酸、5.0 μM GluRS、及び600 μM tRNA混合品を含む反応溶液を150 μL調製し、40、60分間処理した。反応後、トリクロロ酢酸を終濃度4%と

40

50

なるように30 μ L 添加し、反応を停止した。その結果、図13に示す通り、pH7~9において、各基質アミノ酸の全てが一回きり酵素反応に使用された(再利用されない)場合に産生されるピロリン酸量の理論値より多くのピロリン酸が産生されていた。

【実施例30】

【0073】

(tRNAを用いたモリブデンブルー法によるピロリン酸測定におけるアルギニンの検量線)

200 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、12.5 mM ATP、12.5 mM $MgCl_2$ 、0、10、20、又は30 μ M L-アルギニン、2.5 μ M ArgRS、及び10 μ M tRNAを含む反応溶液150 μ Lを調製し、50、60分間反応させた。反応後、トリクロロ酢酸を終濃度4%となるように30 μ L 添加し、反応を停止した。反応停止後、遠心分離で沈殿を除去し、上清中のピロリン酸を実施例7に記載のモリブデンブルー法により測定した。その結果、図14に示すように、添加したアミノ酸が全て反応に使用された場合に産生されると推測されるピロリン酸量の理論値より多くのピロリン酸が産生されていた。また、0~30 μ Mのアミノ酸濃度範囲においてアミノ酸濃度とピロリン酸量に相関関係($R = 0.96$)が認められ、L-アルギニンの定量が可能であることが示された。

10

【実施例31】

【0074】

(tRNAを用いたモリブデンブルー法によるピロリン酸測定におけるグルタミンの検量線)

200 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、3 mM ATP、30 mM $MgCl_2$ 、0、5、10、20、又は30 μ M L-グルタミン、2 μ M GlnRS、及び16 μ M tRNAを含む反応溶液150 μ Lを調製し、40、60分間反応させた。反応後、トリクロロ酢酸を終濃度4%となるように30 μ L 添加し、反応を停止した。反応停止後、遠心分離で沈殿を除去し、上清中のピロリン酸を実施例7に記載のモリブデンブルー法により測定した。その結果、図14に示すように、添加したアミノ酸が全て反応に使用された場合に産生されると推測されるピロリン酸量の理論値より多くのピロリン酸が産生されていた。また、0~30 μ Mのアミノ酸濃度範囲においてアミノ酸濃度とピロリン酸量に相関関係($R = 0.99$)が認められ、L-グルタミンの定量が可能であることが示された。

20

30

【実施例32】

【0075】

(tRNA混合品を用いたモリブデンブルー法によるピロリン酸測定におけるアルギニンの検量線)

200 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、12.5 mM ATP、12.5 mM $MgCl_2$ 、0、5、10、又は20 μ M L-アルギニン、2.5 μ M ArgRS、及び400 μ M tRNA混合品を含む反応溶液150 μ Lを調製し、50、60分間反応させた。反応後、トリクロロ酢酸を終濃度4%となるように30 μ L 添加し、反応を停止した。反応停止後、遠心分離で沈殿を除去し、上清中のピロリン酸を実施例7に記載のモリブデンブルー法により測定した。その結果、図14に示すように、添加したアミノ酸が全て反応に使用された場合に産生されると推測されるピロリン酸量の理論値より多くのピロリン酸が産生されていた。また、0~20 μ Mのアミノ酸濃度範囲においてアミノ酸濃度とピロリン酸量に相関関係($R = 0.99$)が認められ、L-アルギニンの定量が可能であることが示された。

40

【実施例33】

【0076】

(tRNA混合品を用いたモリブデンブルー法によるピロリン酸測定におけるグルタミンの検量線)

200 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、25 mM ATP、250 mM $MgCl_2$

50

12、0、5、10、又は20 μM L-グルタミン酸、5.0 μM GluRS、及び600 μM tRNA混合品を含む反応溶液150 μL を調製し、40、60分間反応させた。反応後、トリクロロ酢酸を終濃度4%となるように30 μL 添加し、反応を停止した。反応停止後、遠心分離で沈殿を除去し、上清中のピロリン酸を実施例7に記載のモリブデンブルー法により測定した。その結果、図14に示すように、添加したアミノ酸が全て反応に使用された場合に産生されると推測されるピロリン酸量の理論値より多くのピロリン酸が産生されていた。また、0~20 μM のアミノ酸濃度範囲においてアミノ酸濃度とピロリン酸量に相関関係($R = 0.99$)が認められ、L-グルタミン酸の定量が可能であることが示された。

【0077】

以上の結果から、本発明方法におけるAARS反応では、AARS、tRNA及びアミノ酸を繰り返し反応に使用することで、産生されるピロリン酸を増幅できることが示された。実施例4~11に示されるように、ArgRS、GluRS及びGlnRSのいずれにおいても当該反応で産生されるピロリン酸を反応液中のtRNA及び/又はアミノ酸のモル数より多く産生させることができた。実施例12~17に示されるように、tRNA濃度によってピロリン酸の産生量は変化することが分かった。また、tRNAが無添加の場合、ArgRS、GluRS及びGlnRSのいずれにおいてもピロリン酸の増加が認められなかったことから、これらのAARS反応には、tRNAが必須であることが分かった。比較例1及び比較例2に示されるように、従来のAARS反応では、産生されるピロリン酸量が、反応液中のtRNA及び/又はアミノ酸の分子数以下であったが、本発明の方法では、反応液中のtRNA及び/又はアミノ酸の分子数以上のピロリン酸が産生されることが分かった。実施例20~25に示されるように、ATP濃度やマグネシウム濃度によって、ピロリン酸の産生量が変化することが分かった。また、実施例26~29に示されるように、酵素反応温度及びpHによって、ピロリン酸の産生量は変化し、30~50、pH7~9で好適にピロリン酸が産生することが分かった。さらに、実施例30~33に示されるように、アミノ酸濃度に依存して直線的にピロリン酸が増加する、即ちアミノ酸濃度とピロリン酸量に相関関係があることが分かり、本発明のAARS反応により産生したピロリン酸について、簡便な方法であるモリブデンブルー法による各種アミノ酸の定量が可能であることが確認された。

【産業上の利用可能性】

【0078】

従来のtRNAの会合を必要とするAARSを用いたアミノ酸定量法では、微量な反応産物を検出する必要があり、放射線ラベルをした測定対象アミノ酸や高感度分析が必要不可欠であった。これに対して、本発明に係るアミノ酸定量方法によれば、測定対象であるピロリン酸等の反応産物を、反応液中に含まれるtRNA及び/又はアミノ酸より多くのモル数まで産生させることができる。その結果、従来技術のような放射線ラベルをした測定対象アミノ酸は不必要である。また、従来技術に比べてより簡便な手段でこれら反応産物を測定する場合であっても、従来技術の多段階酵素反応を用いた蛍光法などによる高感度分析のアミノ酸定量法のアミノ酸定量範囲と同等の範囲での定量が可能であり、このような高感度分析は不必要である。従って、本発明によって、AARSを用いてアミノ酸を特異的且つ簡便、高感度に定量する方法及びアミノ酸定量用キットを提供することが可能となった。

10

20

30

40

50

【 図 5 】

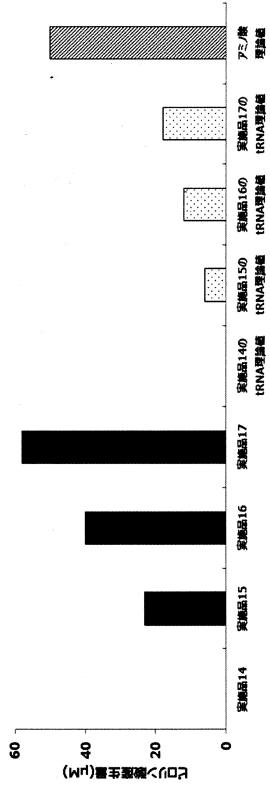


図 5

【 図 6 】

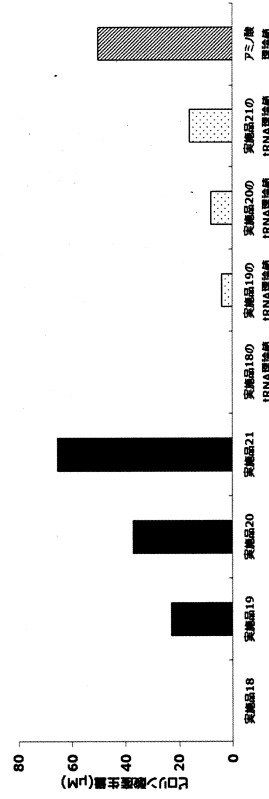


図 6

【 図 7 】

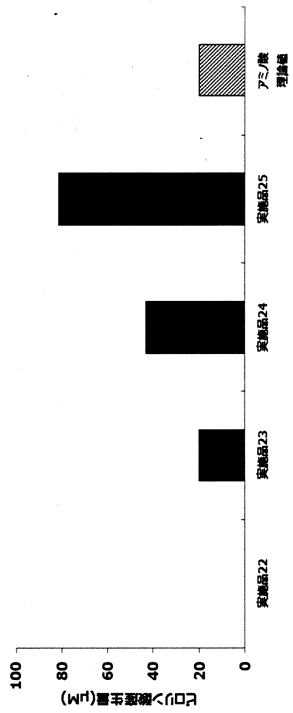


図 7

【 図 8 】

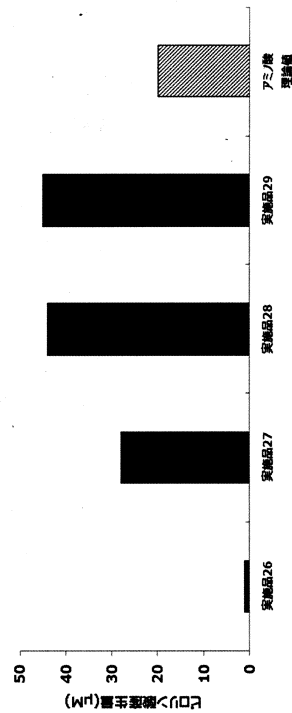


図 8

10

20

30

40

50

【 図 9 】

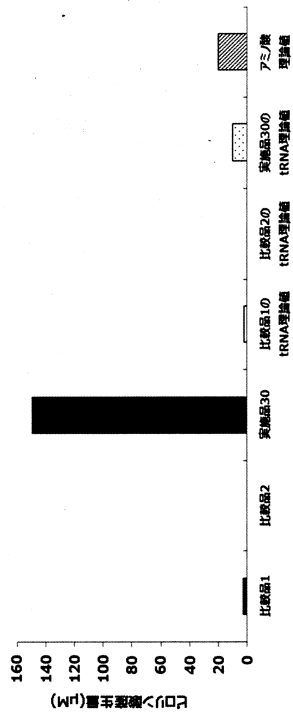


図 9

【 図 10 】

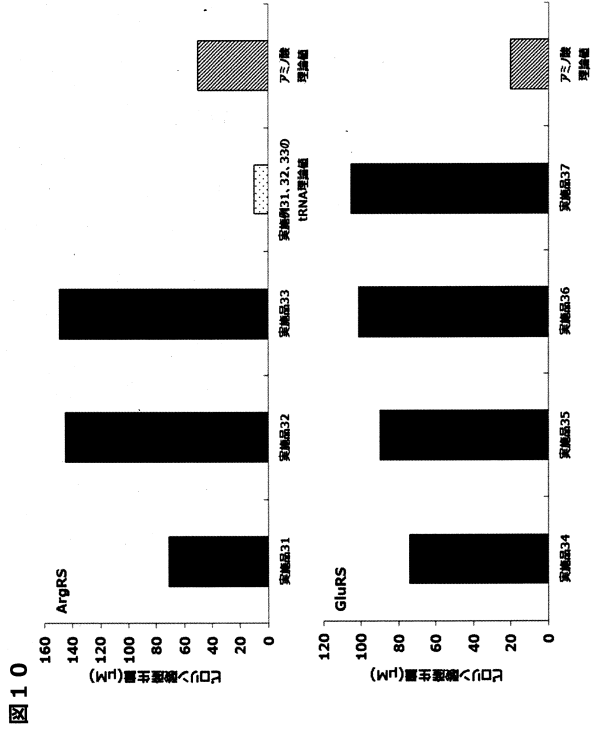


図 10

【 図 11 】

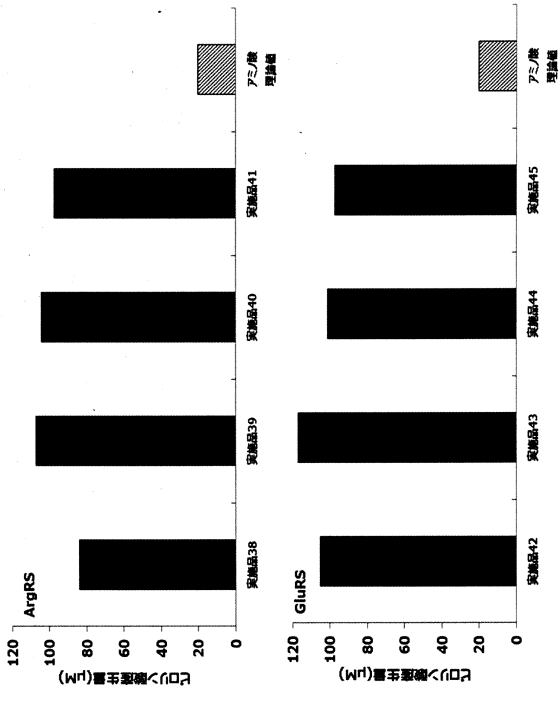


図 11

【 図 12 】

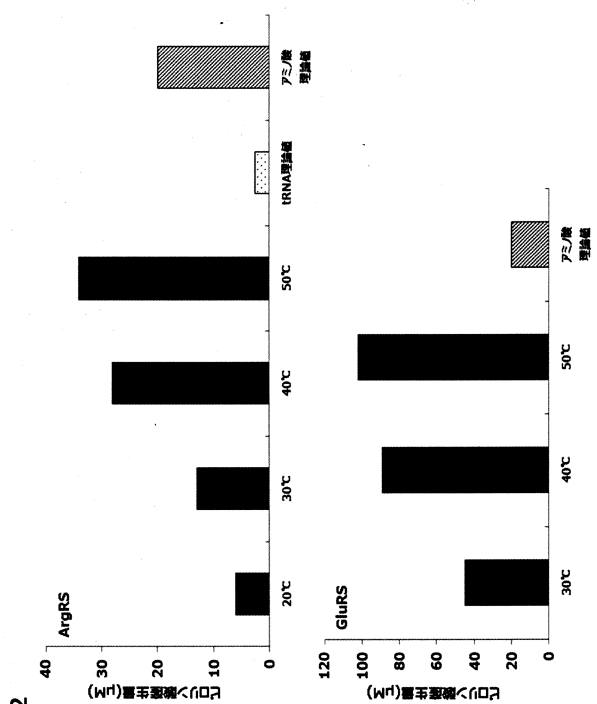


図 12

10

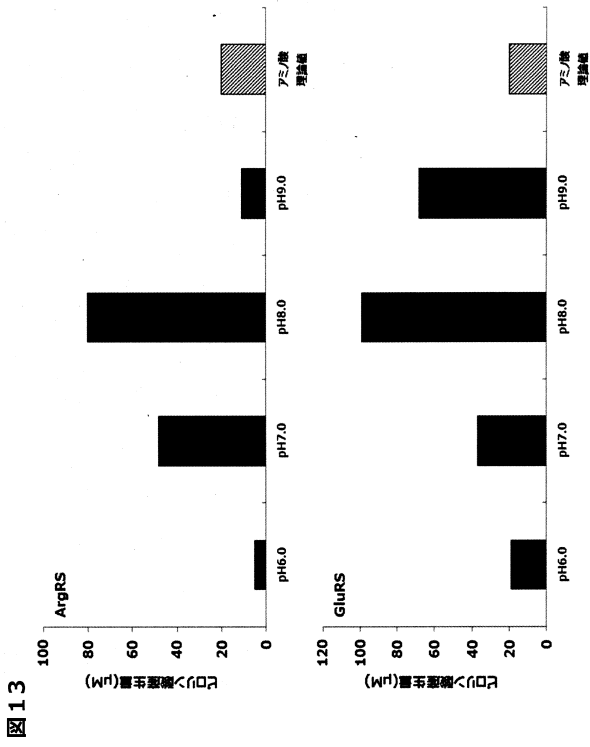
20

30

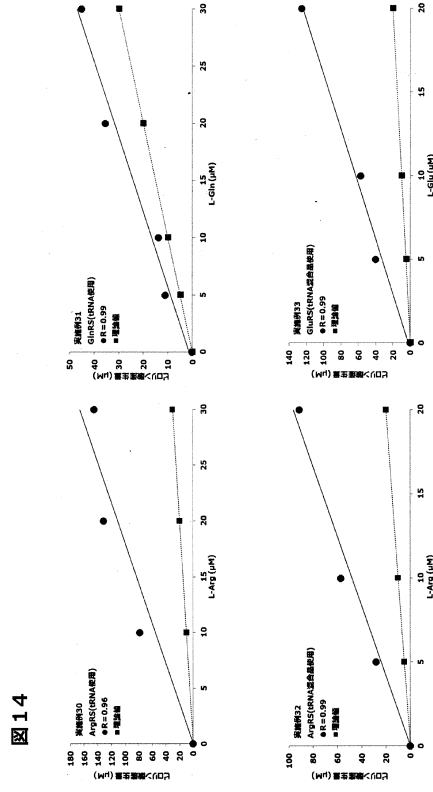
40

50

【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 配列表 】

0007333547000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- 広島県福山市箕沖町95番地7 池田食研株式会社内
(72)発明者 喜田 幹子
広島県福山市箕沖町95番地7 池田食研株式会社内
(72)発明者 佐藤 大祐
広島県福山市箕沖町95番地7 池田食研株式会社内
(72)発明者 寺田 貴帆
埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内
(72)発明者 疋田 泰士
埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内
(72)発明者 横山 茂之
埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内
審査官 北村 悠美子
(56)参考文献 国際公開第2017/170469(WO, A1)
特開2013-198448(JP, A)
国際公開第2013/118894(WO, A1)
(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12Q 1/00-3/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)