

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7216968号
(P7216968)

(45)発行日 令和5年2月2日(2023.2.2)

(24)登録日 令和5年1月25日(2023.1.25)

(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 M	1/34 (2006.01)	C 1 2 M	1/34	Z
C 1 2 N	9/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/34	E
		C 1 2 N	9/00	

請求項の数 7 (全21頁)

(21)出願番号	特願2019-544537(P2019-544537)	(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30年9月11日(2018.9.11)	(73)特許権者	507157045 公立大学法人福井県立大学 福井県吉田郡永平寺町松岡兼定島4 - 1 - 1
(86)国際出願番号	PCT/JP2018/033590	(74)代理人	100216286 弁理士 篠崎 史典
(87)国際公開番号	WO2019/065211	(72)発明者	中柄 朋子 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	平成31年4月4日(2019.4.4)	(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3年9月1日(2021.9.1)		
(31)優先権主張番号	特願2017-186527(P2017-186527)		
(32)優先日	平成29年9月27日(2017.9.27)		
(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)二価陽イオンの存在下、試料中のアミノ酸(AA)、該AAに対応する非リボソーム型ペプチド合成酵素(NRPS)、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NRPSから成る複合体(アミノアシルAMP-NRPS複合体)を形成させる反応(反応1)を含む工程；

(工程I-2)反応1及び/又は反応3で形成されたアミノアシルAMP-NRPS複合体にアミノ酸再生試薬が作用して、該複合体からNRPS及びAAが遊離する反応(反応2)を含む工程；

(工程I-3)反応2で遊離されたAA及び/又はNRPSを反応1において再利用することによってアミノアシルAMP-NRPS複合体反応を形成させる反応(反応3)を含む工程；及び、

(工程I-4)工程I-2及び工程I-3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)、

を含み、前記NRPSは少なくともAドメインを含む、試料中のアミノ酸定量方法。

【請求項2】

NRPSがAドメインから構成されるもの、並びに/又は、Aドメイン及びTドメインから構成されるものである、請求項1に記載のアミノ酸定量方法。

【請求項 3】

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

【請求項 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、請求項 1 ～ 3 の何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 ～ 4 の何れか一項に記載のアミノ酸定量方法。

【請求項 6】

工程（I）で生じた反応産生物のモル数が試料中の N R P S 及びノ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 ～ 5 のいずれか一項に記載のアミノ酸定量方法。

【請求項 7】

請求項 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、A T P、ヌクレオチド及び該アミノ酸に対応する N R P S を含む、アミノ酸定量用キット。

【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】**

アミノ酸は、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いる。アミノ酸の機能性に関し多くの研究がなされ、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。

【0003】

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。

【0004】

別のアミノ酸定量技術として、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問題点があった。

【0005】

アミノアシル t R N A 合成酵素（A A R S）は、生体内のタンパク質合成に係る酵素であり、20 種類のアミノ酸に対し特異的な 20 種類の A A R S が存在する。その為、標的とするアミノ酸に対する選択性が極めて高い酵素であるとされ、A A R S が関与する反応（A A R S 反応）を利用したアミノ酸定量技術がこれまで開発されてきた。例えば、A A R S を用いたアミノ酸の分析方法が特許文献 2 に記載されている。該方法では、A A R S が触媒として機能して A T P、アミノ酸が 1 分子ずつ反応することでアミノアシル A M P とピロリン酸が産生され、産生するピロリン酸を指標とすることによりアミノ酸を分析する。しかしながら、該方法では 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 A M P を産生するため、試料中のアミノ酸と同量かそれ以下のピロリン酸しか産生されない（非特許文献 2、3、4）。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 6 】

更に、AARS反応に基づくアミノ酸の定量方法が上記の特許文献3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、この方法では、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3に記載の方法は、該複合体分解試薬が複合体の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3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、アミノ酸は再利用することが出来ず、その結果、試料中の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3の段落番号0023）。

10

【 0 0 0 7 】

このように、AARSが関与する該方法は、ピロリン酸産生量が少ないため、高感度分析を行う問題点があった。さらにAARSは、20種類のアミノ酸に対する特異的な20種類のAARSが存在するが、オルニチンなどの20種類のアミノ酸以外に反応するAARSは存在しない課題もある。

【 0 0 0 8 】

非リボソーム型ペプチド合成酵素（NRPS）は、複合ペプチド合成に関与する酵素であり、抗生物質などの合成に利用されている。NRPSは、タンパク質性アミノ酸（タンパク質を構成する20種のL型のアミノ酸）に作用すると共に、異性体であるD型のアミノ酸、さらにはメチル化、アシル化、グリコシル化などの修飾アミノ酸及びオルニチン等の非タンパク質性アミノ酸（タンパク質の構成単位ではないアミノ酸）にも作用し、更に、選択性（特異性）が極めて高い酵素であるとされている。NRPSは、アデニレーション・ドメイン（Aドメイン）、チオレーション・ドメイン（Tドメイン）、コンデンセーション・ドメイン（Cドメイン）の3つのドメインから構成される。NRPS反応は、図1に示す通りで、Aドメインでは、NRPSにアデノシン三リン酸（ATP）、アミノ酸（AA）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）とピロリン酸（P_i）が産生される。次いでTドメインでは、アミノアシルAMPとTドメインのアミノアシル4'ホスホパンテテイン基（4'PP）が反応し、アミノアシル-Tドメイン複合体を形成する。続いてCドメインでは、アミノアシル-Tドメイン複合体に結合しているアミノ酸同士を結合させるペプチド縮合反応を起こさせることで、ペプチドが産生する。NRPSは、このような反応を繰り返すことでアミノ酸が3～15量体の直線状或いは環状に連なったペプチドを合成する（非特許文献5、非特許文献6）。

20

30

【 0 0 0 9 】

NRPSに関する公知文献（特許文献4、5、非特許文献5、6）に記載された技術は、A、T及びCドメインから成るNRPSによるペプチド合成に関するものであって、Aドメイン、又は、Aドメイン及びTドメインから成るNRPSによる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。また、NRPSの公知文献（非特許文献7）では、バイオポリマー合成のために使用するNRPSの活性測定法の記載があるが、1分子のNRPSに対し1分子のアミノ酸とATPが反応し、アミノアシルAMP-Aドメイン複合体を形成するため、試料中のNRPS濃度までしか反応しないことから、アミノアシルAMP-NRPS複合体分解試薬としてヒドロキシルアミン（アミン類の求核剤）を添加することで、NRPSを再び反応可能な状態とし、NRPSの活性確認をしている。しかしながら、本方法は、該複合体分解試薬が複合体のアミノ酸と反応して化合物が産生されるため、アミノ酸は再利用することが出来ず、その結果、試料中のアミノ酸と同等量の産生物であるピロリン酸しか生成されない。これら公知文献には、NRPS反応を活用したアミノ酸の定量、及び、アミノ酸の定量にAドメイン、又は、Aドメイン及びTドメインから成るNRPSを用いることについては何ら言及されておらず、更に、アミノ酸とNRPSとの反応におけるアミノ酸及びNRPSの再利用に関しても一切触れら

40

50

れていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【文献】特開2013-146264号公報

特開2011-50357号公報

特許5305208号明細書

WO2006/001382

特許5367272号明細書

【非特許文献】

【0011】

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

“広島市立大学情報科学研究科創造科学専攻 釘宮章光” [online]、広島市立大ホームページ、[2016/01/13検索]、インターネット (URL:http://rsw.office.hiroshima-cu.ac.jp/Profiles/2/000129/profile.html)

Analytical Biochem., 443, 22-26, 2013

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

“社団法人日本化学会 NEWS LETTER”、(日本)、2015年、Vol.29、p.3-6

“化学と生物”、(日本)、2006年、Vol.44、p.85-92

Analytical Sciences January, 30, 17-24, 2014

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

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、測定対象のタンパク質性アミノ酸(タンパク質を構成する20種のL型のアミノ酸)、また、D型アミノ酸、修飾アミノ酸及びオルニチン等の非タンパク質性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を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0013】

NRPSを用いて試料中のアミノ酸量を定量する方法に於いて、従来のA、T及びCドメインから成るNRPS反応では、NRPSに対しアミノ酸とATPが反応し、ペプチドを産生するため、試料中のアミノ酸を再利用できないと共に、アミノ酸と同量かそれ以下のピロリン酸しか産生されない、と考えられる。また、A及びTドメインから成るNRPS反応では、1分子のNRPSに対し1分子のアミノ酸とATPが反応するが、アミノアシル-Tドメイン複合体を形成するため、試料中のアミノ酸を再利用できないと共に、試料中のNRPSと同量かそれ以下のピロリン酸しか産生されない、と考えられる。さらにAドメインから成るNRPS反応では、1分子のNRPSに対し1分子のアミノ酸とATPが反応するが、アミノアシルAMP-Aドメイン複合体を形成するため、試料中のNRPSと同量かそれ以下のピロリン酸しか産生されない、と考えられる。そこで発明者らは、種々の検討を行った結果、図2に示すように、一度形成させたアミノアシルAMP-NRPS複合体からNRPS及びアミノ酸(AA)を遊離させ、それらを再度、アミノアシルAMP-NRPS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、試料中に含まれるNRPS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。

【0014】

本発明は、以下の[1]~[6]の態様に関する。

[1]以下の各工程を含む工程(I)：

(工程I-1)二価陽イオンの存在下、試料中のアミノ酸(AA)、該AAに対応する非リボソーム型ペプチド合成酵素(NRPS)、及び、アデノシン三リン酸(ATP)を反

10

20

30

40

50

応させて、アミノアシルアデニル酸（アミノアシルAMP）とNRPSから成る複合体（アミノアシルAMP-NRPS複合体）を形成させる反応（反応1）を含む工程；

（工程I-2）反応1及び/又は反応3で形成されたアミノアシルAMP-NRPS複合体にアミノ酸再生試薬が作用して、該複合体からNRPS及びAAが遊離する反応（反応2）を含む工程；

（工程I-3）反応2で遊離されたAA及び/又はNRPSを反応1において再利用することによってアミノアシルAMP-NRPS複合体反応を形成させる反応（反応3）を含む工程；及び、

（工程I-4）工程I-2及び工程I-3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）、

を含み、前記NRPSは少なくともAドメインを含む、試料中のアミノ酸定量方法。

[2] NRPSがAドメインから構成されるもの、並びに/又は、Aドメイン及びTドメインから構成されるものである、[1]に記載のアミノ酸定量方法。

[3] 工程（I）で用いるアミノ酸再生試薬が、ヌクレオチド及び/又はアルカリ性化合物であることを特徴とする、[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、[1]～[3]の何れか一項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、[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試料中のNRPS及び/又はアミノ酸のモル数より多いことを特徴とする、[1]～[5]のいずれか一項に記載のアミノ酸定量方法。

[7] [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、ヌクレオチド及び該アミノ酸に対応するNRPSを含む、アミノ酸定量用キット。

【発明の効果】

【0015】

本発明に係るアミノ酸定量方法に於いては、タンパク質性アミノ酸（タンパク質を構成する20種のL型のアミノ酸）が特異的に測定できると共に、異性体であるD型のアミノ酸、さらにはメチル化、アシル化、グリコシル化などの修飾アミノ酸及びオルニチン等の非タンパク質性アミノ酸も特異的に測定できる。また、形成されたアミノアシルAMP-NRPS複合体からNRPS及びアミノ酸を遊離させ、それらをアミノアシルAMP-NRPS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、試料中に含まれるNRPS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となる。更に、同じ測定手段を用いる場合には、より低濃度範囲のアミノ酸の定量が可能である。

【0016】

更に、本発明によって、NRPSを用いた、測定対象のタンパク質性アミノ酸、また、D型アミノ酸、修飾アミノ酸及びオルニチン等の非タンパク質性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できる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】 NRPS反応を示す図である。

【図2】 本発明の反応工程を示す図である。

【図3】 各種NRPS反応により生じるピロリン酸産生量を示す図である。

【図4】 各種ATP及び酵素濃度によるピロリン酸産生量を示す図である。

【図5】 二価陽イオンの種類によるピロリン酸産生量を示す図である。

10

20

30

40

50

【図6】各種二価陽イオン濃度によるピロリン酸産生量を示す図である。

【図7】各pHにおけるピロリン酸産生量を示す図である。

【図8】各温度におけ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7）のNRPS反応におけるピロリン酸産生量を示す図である。

【図10】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】

【0018】

本発明方法の反応1及び反応3では、アミノ酸、該アミノ酸に対応するNRPS、及びATPを反応させて、アミノアシルAMP-NRPS複合体を形成させる。本発明方法に使用するNRPSは、各アミノ酸に対し特異的に作用する当業者に公知の任意のNRPSを用いることができる。例えば、オルニチン(Orn)であれば、オルニチンに特異的に作用するNRPS、リジン(Lys)であれば、リジンに特異的に作用するNRPSなどが挙げられる。また、本発明に使用するNRPSは、例えば、Streptomyces属、Corynebacterium属、Pseudomonas属、Aspergillus属、Saccharopolyspora属、及びLecanicillium属などの微生物由来など、各種生物由来のNRPSであれば、いずれのNRPS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NRPSが好ましい。NRPSは、Aドメイン、Tドメイン及びCドメインから構成されるが、好ましくは、Aドメインのみから構成されるもの、並びに/又は、AドメインとTドメインから構成されるものが良い。また、組換え型NRPSでも良く、合成したNRPS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、可溶性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。NRPSの公知のアミノ酸配列を利用でき、Aドメインから構成される組換え型のNRPSは、60%、70%、80%、90%又は95%以上の同一性を有する配列を有し、また、AドメインとTドメインから構成される組換え型のNRPSは、60%、70%、80%、90%又は95%以上の同一性を有する配列を有し、NRPS活性を有する蛋白質を使用しても良い。

【0019】

本発明に使用するNRPSの調製方法としては、当業者に公知の任意の方法・手段、例えば、NRPS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、破碎した破砕物を遠心分離、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NRPS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、NRPS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-NRPS複合体中からNRPS及びアミノ酸を遊離させて、それらをアミノアシルAMP-NRPS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、試料中に含まれるNRPS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、NRPSの調製方法は何ら限定されるものではない。

【0020】

本発明の測定対象となるアミノ酸は、L-リジン、L-ロイシン及びL-イソロイシンなどのL型の20種類のタンパク質性アミノ酸、L型アミノ酸の異性体であるD-リジン、D-ロイシン及びD-イソロイシンなどのD型のアミノ酸、オルニチン、 ϵ -リジン及び ϵ -メチル-L-セリンなど非タンパク質性アミノ酸でも良い。

【0021】

また、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、血液中のアミノ酸濃度は、イソロイシンは、41~85nmol/mL、ロイシンは、81~154nmol/mL、バリンは、158~288nmol/mL、リジンは、119~257nmol/mL、オルニチンは、43~96nmol/mLなどである。生鮮食品中の遊離アミノ酸含量は、例えば、ニンニクでは、リジンは、5mg/100g、

10

20

30

40

50

アルギニンは、136 mg / 100 g などである。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、リジンは、213 mg / 100 g、アラニンは、348 mg / 100 g、ロイシンは、450 mg / 100 g などである。コーヒー生豆ロブスタ種の完熟では、アスパラギン酸は、76 mg / 100 g、ロイシンは、6 mg / 100 g、バリンは、10 mg / 100 g などである。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。

【0022】

本発明に使用する試料中のアミノ酸には、L体及びD体が混在してもよい。そのような場合には、例えば、本発明方法における前処理として、L体又はD体のアミノ酸の何れか一方を除去するのが好ましい。L体又はD体の何れか一方を除去する方法として、カラムクロマトグラフィー又は適当な酵素によるL体又はD体のアミノ酸の何れか一方を除去する等、当業者に公知の任意の方法が挙げられる。尚、生体試料には、L体及びD体が混在するが、哺乳類体内中の殆どのD体アミノ酸は、L体アミノ酸の0.1~1.0%程度、果物では、D体アミノ酸は、L体アミノ酸の3.0%以下であり、生体試料中のD体アミノ酸含量は、L体アミノ酸の定量に影響を与えるほど含有していない。

10

【0023】

当該反応に使用される反応液中のNRPS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。NRPS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、NRPS濃度は低濃度で良い。例えば、Streptomyces属、Saccharopolyspora属及びCorynebacterium属などの放線菌由来のNRPSの濃度は、0.1 µM以上、より好ましくは0.5 µM以上、さらに好ましくは1.0 µM以上、特に好ましくは5.0 µM以上、最も好ましくは10.0 µM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、NRPSを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NRPSを添加する必要はない、という利点を有する。従って、NRPS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出来る。

20

【0024】

本発明方法の反応1又は反応3ではNRPSと共にATP、二価陽イオンを用いる。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、NRPS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、0.01 mM以上、より好ましくは0.1 mM以上、さらに好ましくは1.0 mM以上、特に好ましくは10.0 mM以上、最も好ましくは40.0 mM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出来る。また、本発明に使用する二価陽イオンは、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。二価陽イオンは、NRPSにより要求性が異なるため、使用するNRPSに適した二価陽イオンを適宜使用すれば良い。当該反応に使用される反応液中の二価陽イオンの濃度は、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、NRPSにおけるATP：二価陽イオンの比率は、少なくとも1：10、より好ましくは少なくとも1：7、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1：3、最も好ましくは少なくとも1：1とすることができる。

30

40

【0025】

続いて、本発明方法の反応2では、反応1及び/又は反応3で形成させたアミノアシルAMP-NRPS複合体に対してアミノ酸再生試薬が作用し、該複合体からNRPS及びアミノ酸が遊離する。当該反応のアミノ酸再生試薬としては、ATP、アデノシン三リン酸(ADP)、アデノシン二リン酸(AMP)、グアノシン三リン酸(GTP)、デオキシアデノシン三リン酸(dATP)などから任意に選択される一種又はそれらの組み合わせ

50

からなるヌクレオチドや、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を発生するアルカリ性化合物を使用できる。反応2に於いては、アミノアシルAMP-NRPS複合体からのNRPS及びアミノ酸の遊離と共に、使用するアミノ酸再生試薬に応じて、AMP、Ap4A等が生成される。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、NRPS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が、AMP、Ap4A等の生成に於いて消費されるので、ヌクレオチドは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、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10.0mM以上、最も好ましくは40.0mM以上とすることができる。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、Streptomyces属、Saccharopolyspora属及びCorynebacterium属などの放線菌由来のNRPS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以上とする。尚、反応pHは、当業者に公知の任意の当業者に公知の任意の緩衝剤である、HEPESバッファー、CHESバッファー、TRISバッファー、MOPSバッファーなどを使用して調整することが出来る。従って、本発明方法では、NRPSを再び反応可能な状態とさせるために、特許文献3に記載されているようなアミン類等のアミノアシルAMP-NRPS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-NRPS複合体の形成に再び利用することができる。

10

20

【0026】

本発明方法の反応3では、反応2で遊離したアミノ酸及び/又はNRPSを反応1において再び使用することによってアミノアシルAMP-NRPS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1又は3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-NRPS複合体形成及び該複合体からのNRPS及びアミノ酸の遊離に再利用すること、及び/又は、反応2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2におけるヌクレオチドとして再利用することもできる。

30

【0027】

例えば、反応2で作用するヌクレオチドとしてATPを選択し、更に、上記のような反応を利用してATPの再産生をしない場合には、本明細書の実施例に示されるように、工程(I)の反応系全体で、上記に示したATP及びヌクレオチドの夫々の濃度を合計した、より高濃度のATPを添加することが好ましい。

【0028】

以上の結果、前述のアミノ酸再生試薬(ATPなどのヌクレオチド及び/又はアルカリ性化合物)及び該アミノ酸に対応するNRPS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生物の各々について、試料中に含まれているNRPS及び/又は、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。

40

【0029】

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生物が、試料中のアミノ酸のモル数以下の量であっても、該反応産生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生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)に於ける該反応産生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、

50

特に限定されない。また、本発明方法の（工程 I - 4）に於ける、反応 2（工程 I - 2）及び反応 3（工程 I - 3）の繰り返しの回数についても、工程（II）に於ける該反応産生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、特に制限はない。

【0030】

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、*Streptomyces* 属、*Saccharopolyspora* 属及び *Corynebacterium* 属等の放線菌由来の NRP S の場合、好ましくは 4 ~ 50、より好ましくは 10 ~ 40、最も好ましくは 20 ~ 35 とすることが適している。また、当該反応時間も試料中のアミノ酸と NRP S 反応が生じるような任意の時間で良いが、好ましくは 5 ~ 120 分程度、より好ましくは 10 ~ 90 分程度、さらに好ましくは、15 ~ 60 分程度であることが望ましい。

10

【0031】

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、NRP S 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、NRP S 又はアミノ酸を最後に添加し反応させても良い。

【0032】

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 NRP S との反応を、例えば、実施例に記載されているように、トリクロロ酢酸を反応系に添加する等の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。

20

【0033】

本発明の工程（I）で生じたピロリン酸量の測定には、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産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、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。また、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。さらに、当該反応で産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。本発明の工程（I）で生じたピロリン酸、水素イオンなどは、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、NRP S 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-NRP S 複合体中から NRP S 及びアミノ酸を遊離させて、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、試料中に含まれる NRP S 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、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。

30

40

【0034】

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

50

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。

【実施例】

【0035】

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】

【0036】

(酵素の調製)

放線菌 (*Saccharopolyspora* 属又は *Corynebacterium* 属) 由来のNRPS配列 (Pls-se-Aドメイン、Pls-cg-Aドメイン又はPls-cg-ATドメイン) をもつプラスミドで大腸菌JM109を形質転換し、発現株として用いた。各発現株についてアンピシリンを終濃度200 µg/mLを含むLB培地により37度で培養後、OD660 = 0.6-0.8に達したところで、培養液を氷水で冷却し、終濃度0.1 mMとなるようにIPTGを添加した。培養液を18度で終夜培養後、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Hisタグカラム (商品名: TALON superflow、GE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、L-オルニチンに特異的に作用するAドメインから成るNRPSのPls-se-A、L-リジン及びD-リジンに特異的に作用するAドメインから成るNRPSのPls-cg-A、L-リジン及びD-リジンに特異的に作用するAドメイン及びTドメイン (以下、ATドメイン) から成るNRPSのPls-cg-ATを得た。

【実施例2】

【0037】

(各種NRPS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))

200 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、40 mM ATP、40 mM MnCl₂、50 µM L-オルニチン、5.0 µM Pls-se-A (放線菌由来) を含む反応溶液を150 µL調製し、30、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) 1を調製した。

【実施例3】

【0038】

200 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、40 mM ATP、40 mM MnCl₂、50 µM L-リジン又はD-リジン、5.0 µM Pls-cg-A (放線菌由来) を含む反応溶液を150 µL調製し、30、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) 2、3を調製した。

【実施例4】

【0039】

200 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、40 mM ATP、40 mM MnCl₂、50 µM L-リジン又はD-リジン、5.0 µM Pls-cg-AT (放線菌由来) を含む反応溶液を150 µL調製し、30、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) 4、5を調製した。

【実施例5】

【0040】

(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))

調製した実施品1~5の反応溶液150 µLに1 Mメルカプトエタノール15 µL、発

10

20

30

40

50

色液（2.5%モリブデン酸アンモニウム/5N硫酸）60μL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3に示す通り、Aドメイン及びATドメインから成るNRPS共に、NRPSの分子数以上、さらに各基質アミノ酸が酵素反応に使用された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。従って、本発明の方法によれば、試料中に含まれるNRPS及びアミノ酸分子数より多くのモル数のピロリン酸が産生されることが示された。

【実施例6】

【0041】

（各種ATP濃度及び酵素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)、25mM ATP、25mM MnCl₂、50μM L-オルニチン、5.0μM Pls-se-A（放線菌由来）を含む反応溶液、又は200mM HEPES-KOH (pH8.0)、40mM ATP、40mM MnCl₂、50μM L-オルニチン、5.0μM Pls-se-AT（放線菌由来）を含む反応溶液を150μL調製し、30、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30μL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）6、7を調製した。

10

【実施例7】

【0042】

200mM HEPES-KOH (pH8.0)、40mM ATP、40mM MnCl₂、50μM L-リジン、1.0μM Pls-cg-A（放線菌由来）を含む反応溶液を150μL調製し、30、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30μL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）8を調製した。

20

【実施例8】

【0043】

200mM HEPES-KOH (pH8.0)、10mM ATP、10mM MnCl₂、50μM L-リジン、5.0μM Pls-cg-A（放線菌由来）を含む反応溶液、又は200mM HEPES-KOH (pH8.0)、25mM ATP、25mM MnCl₂、50μM L-リジン、5.0μM Pls-cg-A（放線菌由来）を含む反応溶液、又は200mM HEPES-KOH (pH8.0)、40mM ATP、40mM MnCl₂、50μM L-リジン、5.0μM Pls-cg-A（放線菌由来）を含む反応溶液を150μL調製し、30、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30μL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）9、10、11を調製した。

30

【実施例9】

【0044】

（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6、7、8で調製した実施品6～11のピロリン酸を実施例5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に示す通り、各種NRPSにおいてATP又は酵素濃度の増加と共にピロリン酸の増加が認められた。また、添加したアミノ酸が全て酵素反応に使用された場合に産生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。

40

【実施例10】

【0045】

（二価陽イオンの種類の違い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)、40mM ATP、40mM MnCl₂、50μM L-オルニチン、5.0μM Pls-se-A（放線菌由来）を含む反応溶液、又は200mM HEPES-KOH (pH8.0)、40mM ATP、40mM

50

MgCl₂、50 μM L-オルニチン、5.0 μM Pls-se-A (放線菌由来)を含む反応溶液、又は200 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、40 mM ATP、40 mM CaCl₂、50 μM L-オルニチン、5.0 μM Pls-se-A (放線菌由来)を含む反応溶液を150 μL調製し、30、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)12、13、14を調製した。

【実施例11】

【0046】

200 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、40 mM ATP、40 mM MnCl₂、50 μM L-リジン、5.0 μM Pls-cg-A (放線菌由来)を含む反応溶液、又は200 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、40 mM ATP、40 mM MgCl₂、50 μM L-リジン、5.0 μM Pls-cg-A (放線菌由来)を含む反応溶液、又は200 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、40 mM ATP、40 mM CaCl₂、50 μM L-リジン、5.0 μM Pls-cg-A (放線菌由来)を含む反応溶液を150 μL調製し、30、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)15、16、17を調製した。

10

【実施例12】

【0047】

(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))

20

実施例10、11で調製した実施品12~17のピロリン酸を実施例5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5に示す通り、各種二価陽イオンを用いた条件で、基質アミノ酸が酵素反応に使用された場合に産生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。また、少なくとも上記実施例で使用したNRPSに関しては、Mnが最適な二価陽イオンであることが示された。

【実施例13】

【0048】

(二価陽イオン濃度の違い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)、40 mM ATP、40 mM MgCl₂、50 μM L-オルニチン、5.0 μM Pls-se-A (放線菌由来)を含む反応溶液、又は200 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、40 mM ATP、120 mM MgCl₂、50 μM L-オルニチン、5.0 μM Pls-se-A (放線菌由来)を含む反応溶液、又は200 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、40 mM ATP、200 mM MgCl₂、50 μM L-オルニチン、5.0 μM Pls-se-A (放線菌由来)を含む反応溶液、又は200 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、40 mM ATP、400 mM MgCl₂、50 μM L-オルニチン、5.0 μM Pls-se-A (放線菌由来)を含む反応溶液を150 μL調製し、30、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)18~21を調製した。

30

【実施例14】

【0049】

(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))

40

実施例13で調製した実施品18~21のピロリン酸を実施例5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6に示す通り、二価陽イオンの濃度によって、酵素反応により産生されるピロリン酸量は異なることが示された。

【実施例15】

【0050】

(反応pHによるピロリン酸産生量)

200 mM MES (pH 6.0)、又は200 mM HEPES-KOH (pH 7.0)、又は200 mM HEPES-KOH (pH 7.5)、又は200 mM HEPES-

50

KOH (pH 8.0) と、40 mM ATP、40 mM $MnCl_2$ 、50 μM L-オルニチン、5.0 μM Pls-se-A (放線菌由来) を含む反応溶液を150 μL 調製し、30 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。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5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7に示す通り、pHがアルカリ側になるほどピロリン酸産生量が増加し、pH 8.0において、良好なピロリン酸の産生が認められた。

【実施例16】

【0051】

(反応pHによるピロリン酸産生量)

200 mM MES (pH 6.0)、又は200 mM HEPES-KOH (pH 7.0)、又は200 mM HEPES-KOH (pH 8.0) と、40 mM ATP、40 mM $MnCl_2$ 、50 μM L-リジン、2.5 μM Pls-cg-A (放線菌由来) を含む反応溶液を150 μL 調製し、30 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。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5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7に示す通り、pHがアルカリ側になるほどピロリン酸産生量が増加し、pH 8.0において、良好なピロリン酸の産生が認められた。

10

【実施例17】

【0052】

(反応温度によるピロリン酸産生量)

200 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、40 mM ATP、40 mM $MnCl_2$ 、50 μM L-オルニチン、5.0 μM Pls-se-A (放線菌由来) を含む反応溶液を150 μL 調製し、10、又は20、又は25、又は30、又は35、又は40 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。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5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8に示す通り、10~40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。

20

【0053】

(本発明と公知文献記載のNRPS反応におけるピロリン酸の産生量の比較：本発明方法の工程(I))

30

[比較例1]

非特許文献7記載の反応条件に従い、0.9 μM Pls-cg-A (放線菌由来)、50 μM L-リジン、5 mM ATP、5 mM $MgCl_2$ 、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、32 mM ヒドロキシルアミンを含む反応液300 μL を調製し、30 で60分間酵素反応を行った。酵素反応後、トリクロロ酢酸を終濃度4%となるように60 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。

【0054】

[比較例2]

非特許文献7記載の反応条件に従い、0.8 μM Pls-cg-AT (放線菌由来)、50 μM L-リジン、5 mM ATP、5 mM $MgCl_2$ 、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、32 mM ヒドロキシルアミンを含む反応液300 μL を調製し、30 で60分間酵素反応を行った。酵素反応後、トリクロロ酢酸を終濃度4%となるように60 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。

40

【実施例18】

【0055】

5.0 μM Pls-cg-A (放線菌由来)、50 μM L-リジン、40 mM ATP、40 mM $MnCl_2$ 、200 mM HEPES-KOH (pH 8.0) を含む反応液300 μL を調製し、30 で60分間酵素反応を行った。酵素反応後、トリクロロ酢酸を終濃度4%となるように60 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

50

し、実施品 22 を調製した。

【実施例 19】

【0056】

5.0 μ M Pls-cg-AT(放線菌由来)、50 μ M L-リジン、40 mM ATP、40 mM $MnCl_2$ 、200 mM HEPES-KOH (pH 8.0) を含む反応液 300 μ L を調製し、30 で 60 分間酵素反応を行った。酵素反応後、トリクロロ酢酸を終濃度 4% となるように 60 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 23 を調製した。

【実施例 20】

【0057】

(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、2 及び実施例 16、17 で得られた比較品 1、2 及び実施品 22、23 のピロリン酸を実施例 5 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 に示すように本発明の方法では、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、比較品の産生したピロリン酸は、理論値以下であった。

【実施例 21】

【0058】

(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)

200 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、40 mM ATP、40 mM $MnCl_2$ 、0、又は 30、又は 50、又は 70、又は 100 μ M L-オルニチン、5.0 μ M Pls-se-A (放線菌由来) 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 5 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 ~ 100 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-オルニチンの定量が可能であることが示された。

【実施例 22】

【0059】

200 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、40 mM ATP、40 mM $MnCl_2$ 、0、又は 30、又は 50、又は 70、又は 100 μ M L-リジン、5.0 μ M Pls-cg-A (放線菌由来) を含む反応溶液 150 μ L を調製し、30、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 5 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 ~ 100 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 ($R = 0.97$) が認められ、L-リジンの定量が可能であることが示された。

【0060】

以上の結果から、本発明方法における NRPS 反応では、NRPS 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 2 ~ 5 に示されるように、L-オルニチン、L-リジン及び D-リジンの様々なアミノ酸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 NRPS 及び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 6 ~ 9 に示されるように、ATP や酵素濃度、実施例 10 ~ 17 に示されるように、二価陽イオンの種類や濃度、反応温度及び反応 pH によってもピロリン酸の産生量は変化することが分かった。また、比較例 1、2 及び実施例 18、19、20 に示されるように、従来の NRPS 反応では、産生されるピロリン酸量が、

10

20

30

40

50

アミノ酸分子数以下であったが、本発明の方法では、アミノ酸分子数以上のピロリン酸が産生されることが分かった。さらに、実施例 2 1、2 2 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 N R P S 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】

【0061】

従来の A A R S を用いたアミノ酸定量法では、タンパク質性アミノ酸（タンパク質を構成する 20 種の L 型のアミノ酸）に対する特異的な 20 種類の A A R S が存在するが、オルニチンなどの 20 種類のアミノ酸以外に反応する A A R S は存在しないため、測定対象のアミノ酸の制限があった。これに対して、N R P S は、上記 20 種類のアミノ酸に特異的に作用すると共に、異性体である D 型のアミノ酸、さらにはメチル化、アシル化、グリコシル化などの修飾アミノ酸、及びオルニチン等の非タンパク質性アミノ酸にも特異的に作用することから、様々なアミノ酸の定量を可能とする。また、本発明方法に於いて、形成されたアミノアシルAMP-NRPS複合体からNRPS及びアミノ酸を遊離し、再度それらをアミノアシルAMP-NRPS複合体の形成に繰り返し利用することによって、試料中に少ないアミノ酸しか含まれていない場合であっても、多量のピロリン酸や水素イオンを産生させることができるため、多段階酵素反応を用いた蛍光法などによる高感度分析は不必要である。従って、本発明によって、NRPSを用いてタンパク質性アミノ酸、また、D型アミノ酸、修飾アミノ酸及びオルニチン等の非タンパク質性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。

【0062】

実施例 1 で調製した各 N R P S は具体的には以下の通り取得した。

目的アミノ酸の活性化を触媒すると予想される N R P S について、推定されるアミノ酸配列を P f a m s e a r c h (<http://pfam.xfam.org/search#tabview=tab1>) にてドメイン検索を行った。その結果から、ペプチド結合形成に必要な各 N R P S ドメイン（A ドメイン、T ドメインなど）に高く保存されている領域を推定し、下記、1 と 2 において配列を決定した。

1. A ドメインに高く保存されている配列

AMP-binding domain (下線部)

AMP-binding enzyme C-terminal domain (二重線部)

2. T ドメインに高く保存されている配列

L G G x x S L x A モチーフ (4'-phosphopantetheine attachment site) (四角枠内) を中心にもつ P P-binding domain

【0063】

各 N R P S のアミノ酸配列は以下の通りである。

(1) P l s - c g - A - d o m a i n

菌株名: *Corynebacterium glutamicum* NBRC 12169

アミノ酸配列 (大腸菌発現用プラスミドにクローニングした領域):

[配列番号 1]

MALSSVPAQFLRSAQAPPKRTLWDVLESVASTYPEAAAIDDGQVLTYAELMEEVTALADSIHAQGIIRRGDRIGIRMP
GTRDLYIAILATLAAGAAVVPVDADDPEERAEMVFGGANINALFDATGFHMLRPTAGGDTRRPRLDATAWIIFTSGST
GKPKGVAVSHRSAAAFVDAEAQMFLVDHPSGPLPEDRVLAGLSVAFDASCEEMWLAWHGACLVPAAPRSLVRSMDL
GPWLIRRDISVVSTVPTLAGLWPAEALSQVRLIVGGEACSQELVERLSTPDRELVWNTYGPTEATVVACGTQLYAGQP
VGIGLPLAGWDLVVDDAGEPVGIGEVGELVIGGVGLARYLDPEKDREKYAPLKSVMWTRAYRSGDHVRLEEDGLYFV
GRVDDQVKIGRRRIELGEVDANVAALSNVRSSAVVVQTTGADQKVLVAVVSLDAAAGFDHNVATARLTETMPAALVP
RIHVMDLPLVTTSGKVDKSLPWLPGTVVEAN

10

20

30

40

50

アミノ酸配列（実際に活性測定に用いた組換え酵素）：

[配列番号 2]

MRGSHHHHHHSALSSVPAQFLRSAQAPPKRTLWDVLESVASTYPEAAAIDDGQVLTYAELMEEVTALADSIHAQGIR
 RGDRI GIRMPSGTRDLYIAILATLAAGAAYVPVDADDPEERAEMVFGEANINALFDATGFHMLRPTAGGDTRRPRLLD
 TAWIIFTSGSTGKPKGVAVSHRSAAAFVDAEAQMFLVDHPSGPLGPEDRVLAGLSVAFDASCEEMWLAWGHGACLVPA
 PRSLVRS GMDLGPWLIRRDISVVSTVPTLAGLWPAEALSQVRLIVGGEACSQELVERLSTPDREVWNTYGPTEATVV
 ACGTQLYAGQPVGIGLPLAGWDLVVVDDAGEPVGIGEVGELVIGGVGLARYLDPEKDREKYAPLKSVGWTRAYRSGDH
 VRLEEDGLYFVGRVDDQVKIGGRRIELGEVDANVAALSNVRSSAVVVQTTGADQKVLVAYVSLEDAAGFDHNVATAR
 LTETMPAALVPRIHVMDLPTTSGKVDKKSPLWPLPGTVVEAN

10

（下線部は大腸菌発現用プラスミド由来のH i s - t a g 領域の配列）

【 0 0 6 4 】

(2) P l s - c g - A T - d o m a i n

菌株名：Corynebacterium glutamicum NBRC 12169

アミノ酸配列（大腸菌発現用プラスミドにクローニングした領域）：

[配列番号 3]

MALSSVPAQFLRSAQAPPKRTLWDVLESVASTYPEAAAIDDGQVLTYAELMEEVTALADSIHAQGIRRGDRIGIRMPS
 GTRDLYIAILATLAAGAAYVPVDADDPEERAEMVFGEANINALFDATGFHMLRPTAGGDTRRPRLLDTAWIIFTSGST
 GKPKGVAVSHRSAAAFVDAEAQMFLVDHPSGPLGPEDRVLAGLSVAFDASCEEMWLAWGHGACLVPAPAPRSLVRS GMDL
 GPWLIRRDISVVSTVPTLAGLWPAEALSQVRLIVGGEACSQELVERLSTPDREVWNTYGPTEATVVACGTQLYAGQP
 VGIGLPLAGWDLVVVDDAGEPVGIGEVGELVIGGVGLARYLDPEKDREKYAPLKSVGWTRAYRSGDHVRLEEDGLYFV
 GRVDDQVKIGGRRIELGEVDANVAALSNVRSSAVVVQTTGADQKVLVAYVSLEDAAGFDHNVATARLTETMPAALVP
 RIHVMDLPTTSGKVDKKSPLWPLPGTVVEANDLSATEAWIAQEWVDILGTSVSSKDADFFSLGGTSLAAATLVGRV
RAKVPTAAVRDLYDHRLEKFAERVE

20

30

アミノ酸配列（実際に活性測定に用いた組換え酵素）：

[配列番号 4]

MRGSHHHHHHSALSSVPAQFLRSAQAPPKRTLWDVLESVASTYPEAAAIDDGQVLTYAELMEEVTALADSIHAQGIR
 RGDRI GIRMPSGTRDLYIAILATLAAGAAYVPVDADDPEERAEMVFGEANINALFDATGFHMLRPTAGGDTRRPRLLD
 TAWIIFTSGSTGKPKGVAVSHRSAAAFVDAEAQMFLVDHPSGPLGPEDRVLAGLSVAFDASCEEMWLAWGHGACLVPA
 PRSLVRS GMDLGPWLIRRDISVVSTVPTLAGLWPAEALSQVRLIVGGEACSQELVERLSTPDREVWNTYGPTEATVV
 ACGTQLYAGQPVGIGLPLAGWDLVVVDDAGEPVGIGEVGELVIGGVGLARYLDPEKDREKYAPLKSVGWTRAYRSGDH
 VRLEEDGLYFVGRVDDQVKIGGRRIELGEVDANVAALSNVRSSAVVVQTTGADQKVLVAYVSLEDAAGFDHNVATAR
 LTETMPAALVPRIHVMDLPTTSGKVDKKSPLWPLPGTVVEANDLSATEAWIAQEWVDILGTSVSSKDADFFSLGGT
 SLAAATLVGRVRAKVPTAAVRDLYDHRLEKFAERVE

40

（下線部は大腸菌発現用プラスミド由来のH i s - t a g 領域の配列）

【 0 0 6 5 】

(3) P l s - s e - A - d o m a i n

菌株名：Saccharopolyspora erythraea NBRC 13426

アミノ酸配列（大腸菌発現用プラスミドにクローニングした領域）：

50

[配列番号 5]

MEPRTLDPGNGQPVRATGPSHGRLHDFFTTTCDRTPGKVALEAGDVRMTYRQLDRRANQLAHHLLTLGLGTGSRVGIL
LERSAWTYVSLGVLKAGAAFVPIDAVSPSDRVGYICGDSRLDLVITSGDLAGKVGACPVLDVLDVLTLDHTPSTR
PELPDTADPPAYVIYTSGSSGRPKGVEVSQSSICNFIDVVPAYDVRESDRVYQGMSISFDFSIEEIWPTWAVGATLV
AGPNSRRLGEELAEFLDDNGVSVLYCVPTLLATIHRELPKVRSVLVGGEACPAELVERWSTPKRRILNTYGPTEATV
TASWCELLPGRRTIGRALPTYTVVLLDEALHPVPDGDVGEICIGGPGVANGYVGLPEKTADRFVEHPLAPRGGRLYR
TGDLGRTTEDGEIEYLGRADAEVKIRGRRVDLGEIDNVLLEHPAVSGAVTALTADGMALASYLTVRGDAGDELIADLH
DRARAKLPEYMVPALVDVLDLPTMPGKVVHRARLPAPSGRRFSAG

10

アミノ酸配列（実際に活性測定に用いた組換え酵素）：

[配列番号 6]

MRGSHHHHHSACEPRTLDPGNGQPVRATGPSHGRLHDFFTTTCDRTPGKVALEAGDVRMTYRQLDRRANQLAHHLL
TLGLGTGSRVIGILLERSAWTYVSLGVLKAGAAFVPIDAVSPSDRVGYICGDSRLDLVITSGDLAGKVGACPVLDVD
LVGTTLDHTPSTRPELPDTADPPAYVIYTSGSSGRPKGVEVSQSSICNFIDVVPAYDVRESDRVYQGMSISFDFSIE
EIWPTWAVGATLVAGPNSRRLGEELAEFLDDNGVSVLYCVPTLLATIHRELPKVRSVLVGGEACPAELVERWSTPKR
RILNTYGPTEATVTASWCELLPGRRTIGRALPTYTVVLLDEALHPVPDGDVGEICIGGPGVANGYVGLPEKTADRFV
EHPLAPRGGRLYRTGDLGRTTEDGEIEYLGRADAEVKIRGRRVDLGEIDNVLLEHPAVSGAVTALTADGMALASYLTV
RGDAGDELIADLHDRARAKLPEYMVPALVDVLDLPTMPGKVVHRARLPAPSGRRFSAG

20

（下線部は大腸菌発現用プラスミド由来のHis-tag領域の配列）

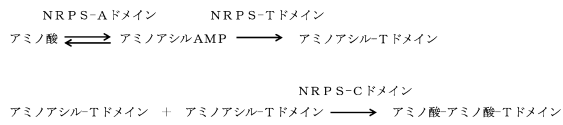
30

40

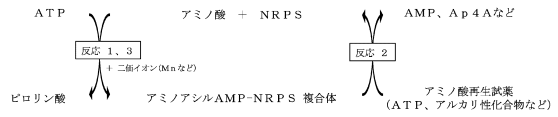
50

【図面】

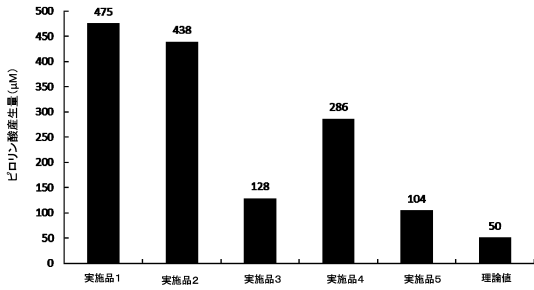
【図 1】



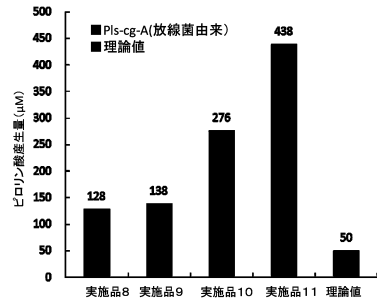
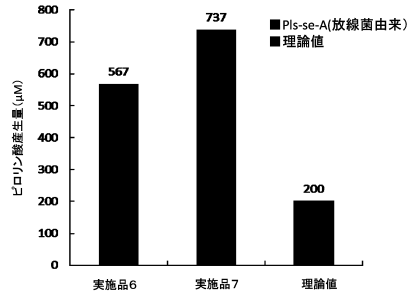
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

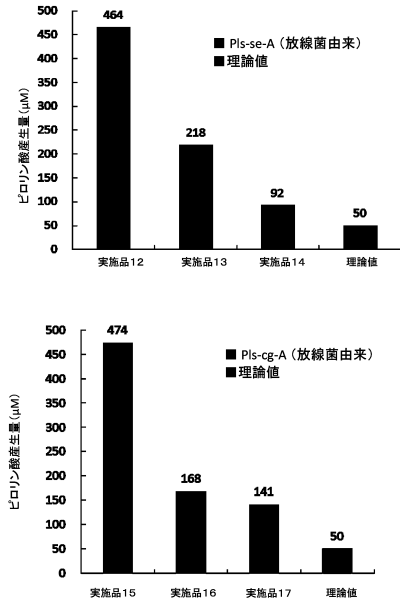
20

30

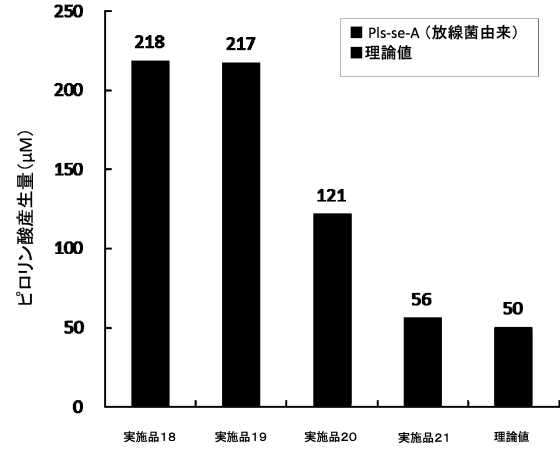
40

50

【 図 5 】



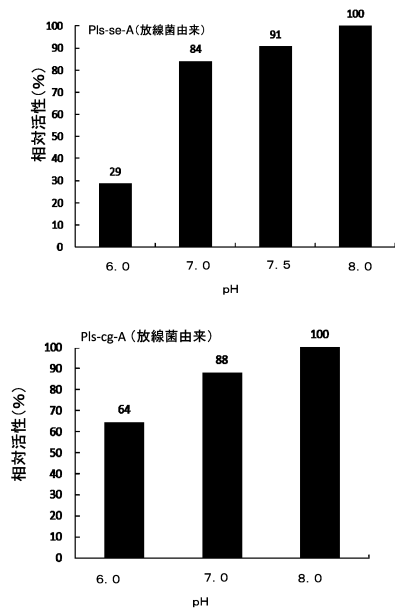
【 図 6 】



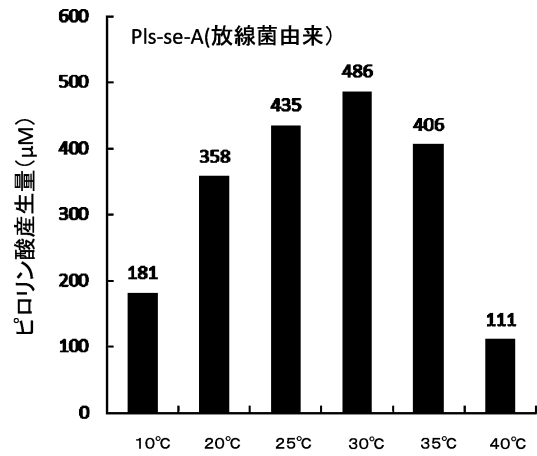
10

20

【 図 7 】



【 図 8 】

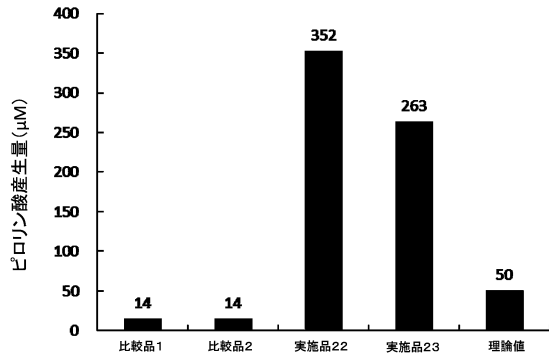


30

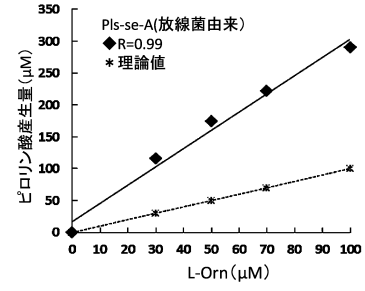
40

50

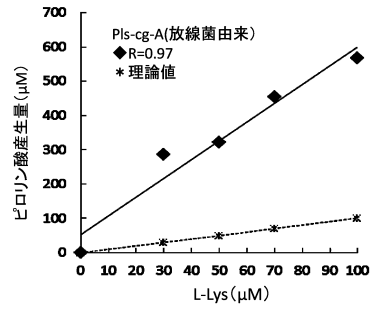
【 図 9 】



【 図 10 】



10



20

【 配列表 】

[0007216968000001.app](#)

30

40

50

フロントページの続き

- (72)発明者 喜田 幹子
広島県福山市箕沖町9 5 番地7 池田食研株式会社内
- (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
- (72)発明者 濱野 吉十
福井県吉田郡永平寺町松岡兼定島4 - 1 - 1 公立大学法人福井県立大学内
- (72)発明者 丸山 千登勢
福井県吉田郡永平寺町松岡兼定島4 - 1 - 1 公立大学法人福井県立大学内
- 審査官 斉藤 貴子
- (56)参考文献 特開2011-050357(JP, A)
特許第5305208(JP, B1)
KATANO, H., et al., Analytical methods for the detection and purification of ϵ -poly-L-lysine for studying biopolymer synthetases, and bioelectroanalysis methods for its functional evaluation, Analytical Sciences, 2014年, Vol. 30, pp. 17-24
濱野吉十, 非リボソームペプチド合成酵素, 生物工学会誌, 2008, Vol. 86, No. 4, p. 191
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12Q
C12M
C12N
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)