

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：25403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05237

研究課題名(和文) 網羅的に病態の診断が可能なアミノ酸計測用小型装置の開発

研究課題名(英文) Development of a device for amino acid analysis via an encompassing analysis of multiple disease states

研究代表者

釘宮 章光 (KUGIMIYA, Akimitsu)

広島市立大学・情報科学研究科・准教授

研究者番号：50285433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究では、3～5種類程度の複数のアミノ酸濃度が同時に計測可能な、紙を分離・反応媒体に用いる「ペーパーマイクロ流路デバイス」を開発し、さらに、血液中に存在する濃度である5～1500  $\mu\text{M}$ の20種類の各アミノ酸が選択的に計測可能であることを示すことを目標にして研究を進めた。分岐アミノ酸であるバリン、ロイシン、イソロイシンにそれぞれ特異性を示すアミノアシルtRNA合成酵素(aaRS)のValRS、LeuRS、IleRSを用いてペーパーマイクロ流路デバイスを作製し、応答の評価を行った。その結果、数 $\mu\text{M}$ ～80  $\mu\text{M}$ の濃度域の各アミノ酸がそれぞれ選択的に定量可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では生体の栄養状態などを評価するのに有用なアミノ酸であるバリン、ロイシン、イソロイシンをそれぞれ計測可能な、紙で評価を行うペーパーデバイスの開発に成功した。計測可能な各アミノ酸の濃度範囲について、血液中のアミノ酸濃度の範囲を満たすこともできた。血液中の各アミノ酸濃度を個別に計測することによって、がんや肝臓病、糖尿病などの各種病態の診断が可能であることが知られており、本研究で得られた方法を他のアミノ酸にも適用することで、将来的には様々な病態が家庭において簡易に計測できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Free amino acid contents in blood serum serve as an indicator of a disease state, such as cancers, hepatic diseases, and diabetes; hence, they are considered useful in clinical diagnostics. A one-step analysis method was developed for amino acids, valine, leucine, and isoleucine, using a microfluidic paper-based analytical device fabricated from chromatography filtration paper and laminate films. Aminoacyl-tRNA synthetase was used to detect each amino acid. The obtained laminated paper-based analytical device (LPAD) contained four enzymatic reaction areas. Colorimetric detection was performed based on the molybdenum blue reaction.

The method provided a selective quantification at the ranges of several micromolar to 100  $\mu\text{M}$  for valine, leucine, and isoleucine, respectively. LPAD fabrication was considerably simple, and the subsequent detection process was easy and required a short period of time (within 15 min).

研究分野：生物機能工学

キーワード：アミノ酸 アミノアシルtRNA合成酵素 アミノグラム 生体計測 バイオセンサー ペーパーマイクロ流路デバイス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームや肝臓病、糖尿病、がんなどの各種病態において、血液中のアミノ酸濃度バランスが健康な状態とは異なってくるということが知られている。図1は健康人の相対的な血中アミノ酸濃度を0.5とした時の胃がん患者のステージIにおける各アミノ酸の濃度バランスを示したものである (Y. Miyagi, et al, *PLoS ONE*, 6, 1-12 (2011))。臨床医療や予防医療の分野において、検体の分析を「その場」において行うことは、疾患の早期発見や疾病の病態管理に非常に有効であり、また必要とされている技術である。とくに、個人個人の健康を管理するために家庭で健康状態が検査できるツールは予防医学的に重要であることが認識されている。

現在、アミノ酸の濃度は高速液体クロマトグラフ装置のような大型の分析計を用いて計測されており、クロマトグラフィー用の大量の溶媒が必要であり、その廃液処理や計測技術者の専門性も必要とされている。

申請者は20種類の各アミノ酸識別能を有する酵素であるアミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) を用いるアミノ酸分析法について提案している (業績参照)。マイクロプレート内で aaRS による酵素反応および呈色反応を行わせ、数十分程度の分析時間で各アミノ酸濃度が選択的に計測可能であることを示してきた。

そこで本申請研究においては実用化へ向けて、紙を分離・反応媒体に用いる「複数のアミノ酸濃度を同時分析可能なペーパーマイクロ流路デバイス」を開発することを目指した。本課題が完成することで、反応時間や反応液量を数秒程度、数  $\mu\text{L}$  のオーダーに縮小することが可能であり、計測の迅速性を高めることができると考えた。

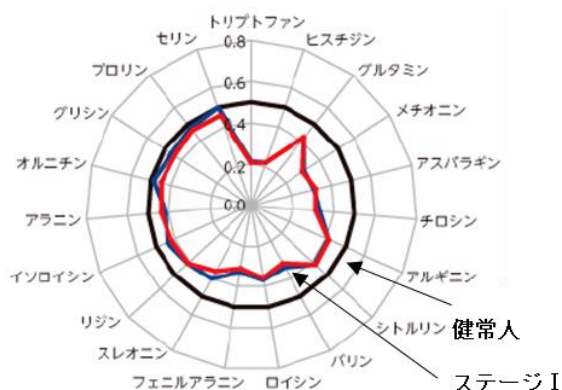
アミノ酸は生体内において比較的高濃度に存在する生体分子であり、検出に必要な各アミノ酸の定量範囲は  $5\sim 1500\ \mu\text{M}$  である。よって一般に他の化合物をターゲットとして検出する手法と比べて必ずしも高感度化を必要としないため、低コスト化、汎用化も可能であると考えられる。簡便かつ安価に測定できるようになれば市場としては病院などの医療機関、家庭などに加えて食品工場なども対象になると考えられる。

## 2. 研究の目的

申請者は、20種類のアミノ酸濃度を迅速かつ簡便、安価に計測可能なアミノ酸分析用の小型装置を開発し、家庭やベッドサイドにおいての健康診断へ応用することを最終目標として研究を行っている。本申請研究においては紙を分離・反応媒体に用いるアミノ酸分析用「ペーパーマイクロ流路デバイス」を開発し、さらに3~5種類程度の複数のアミノ酸濃度が同時に計測可能であることを示すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

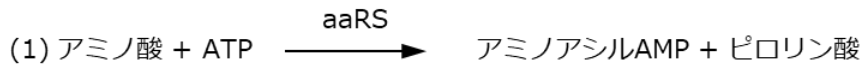
aaRS とアミノ酸との反応および吸光度検出に至る反応式を以下に示す。(1) アデノシン三リン酸 (ATP) の存在下で aaRS とアミノ酸との特異的結合により生成したピロリン酸を、一般にリン酸の検出法に使われるリン・モリブデン法により(2)の反応から吸光度の変化を検出するというものである。



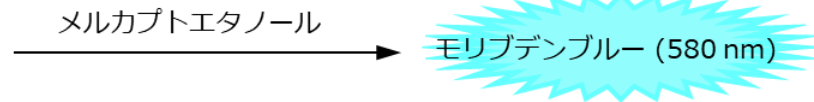
出典: Miyagi Y, et al: *PLoS One* 2011;6(9): e24143(2011)改変

図1 味の素株式会社 アミノインデックス®  
(最終閲覧日: 令和元年10月6日)

<https://www.ajinomoto.co.jp/products/aminoindex/>  
胃がん患者のアミノインデックス。健康人の血中の各アミノ酸の相対値を0.5とした時、ステージ I からアミノ酸のバランスが変化する。



(2) ピロリン酸 + モリブデン酸アンモニウム/ 硫酸水溶液



#### (1) 酵素法を用いた呈色反応性の評価

フィルター付きマイクロチューブ内に 0~200  $\mu\text{M}$  バリン、13.6 mg/mL の大腸菌由来のバリン tRNA 合成酵素 (ValRS)、10 mM ATP、10 mM 塩化マグネシウム ( $\text{MgCl}_2$ ) を 100 mM HEPES (pH 8.0) 緩衝液に溶解し、40°C で 30 分間反応させた。冷却遠心後、マイクロプレート内に酵素反応液、1 M メルカプトエタノール、2.5% モリブデン酸アンモニウム硫酸溶液を 10:1:4 の比率で混合した。マイクロプレートリーダーの測定波長を 580 nm に設定し、吸光度を測定することで結合能の評価を行った。

ロイシンについて、27.8 mg/mL の大腸菌由来のロイシル tRNA 合成酵素 (LeuRS) を用いて ValRS の時と同様の実験を行った。

#### (2) ペーパーマイクロ流路デバイスを用いる応答の評価

図 2 に示す例では 4 種類のアミノ酸の同時分析が可能である。つまり、E1~E4 にそれぞれのアミノ酸結合性酵素(aaRS)を塗布しておき、D には発色試薬を塗布してペーパーマイクロ流路デバイス ( $\mu\text{PAD}$ ) とし、中央にサンプル溶液を滴下して毛細管現象により、E での酵素反応を経て検出部位 D での呈色反応による色の濃淡を計測する、というものである。紙を用いることから、パソコンのプログラムに従いカッティングプロッター (保有装置) で切り出すことで容易に作製することができる。そのため将来的には 20 本の流路を設計することで、20 種類のアミノ酸濃度が同時計測可能なデバイスの構築についても可能であると考えられる。

ろ紙上において(1)と同様に酵素法を用いて呈色反応を検討した。ろ紙は ADVANTEC 社 No. 1 を使用した。図 2 のようにろ紙をカットし、また同じ形状にラミネートフィルムをカットし、無加工のラミネートフィルムとでラミネートすることでペーパーデバイスを作製した。E<sub>1</sub>~<sub>4</sub> 部 (酵素反応部) に各 4 種類のアミノ酸結合性酵素(aaRS)を、D 部 (アミノ酸検出部) に発色試薬である 2.5% モリブデン酸アンモニウム硫酸溶液を滴下し、冷蔵庫で水平に 30 分静置することで  $\mu\text{PAD}$  とした。

それを 40°C に加熱したヒーター上に試料滴下部と Ex 部がすべて収まるように水平に設置した。設置から 2 分後にターゲットであるアミノ酸、ATP、 $\text{MgCl}_2$ 、メルカプトエタノールを 100 mM HEPES (pH 8.0) 緩衝液に溶解した試料を滴下し、各 D 部の呈色反応を計測した。

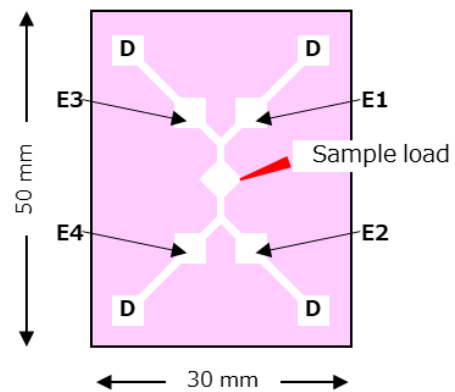


図2 4種類のアミノ酸濃度が同時計測可能なペーパーデバイスの例

E1~E4にそれぞれのアミノ酸結合性酵素(aaRS)を塗布しておき、Dには発色試薬を塗布してペーパーデバイスとする。

中央にサンプル溶液を滴下して毛細管現象により、Eでの酵素反応を経て検出部位Dでの呈色反応による色の濃淡を計測する。

## 4. 研究成果

### (1) ValRS、LeuRS の定量性の評価

基質アミノ酸濃度を 0~200  $\mu\text{M}$  とし、ValRS と LeuRS の各酵素の定量性の評価を行った。その結果を図 3 に示す。

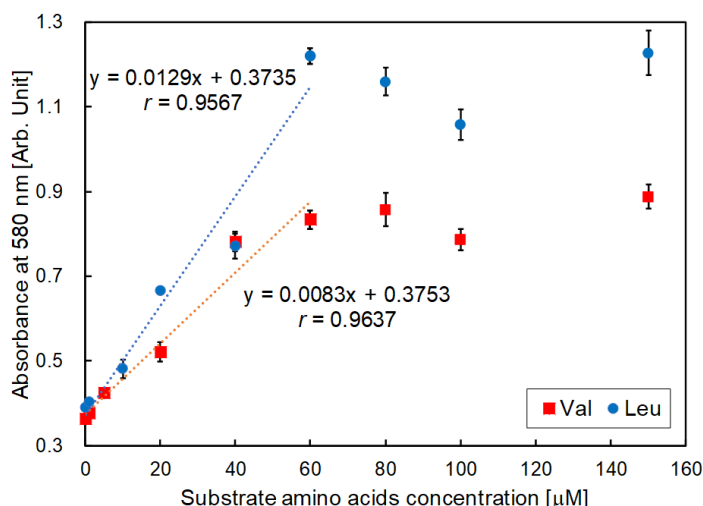


図3 ValRS、LeuRS の定量性の評価 (n = 4)

図3より、ValRSはバリンについて、LeuRSはロイシンについてそれぞれ1~60 μMの濃度範囲で定量的に計測可能であることが示され、その相関係数は0.95以上と良好であった。

## (2) ValRS、LeuRSの選択性の評価

アミノ酸濃度を50 μMとし、基質アミノ酸、アミノ酸20種混合液(AA20)、基質アミノ酸を除いたアミノ酸19種混合液(AA19)、そしてネガティブコントロールとしてBCAAを比較することでValRS、LeuRSの基質アミノ酸に対する選択性を評価した。測定結果を図4に示す。

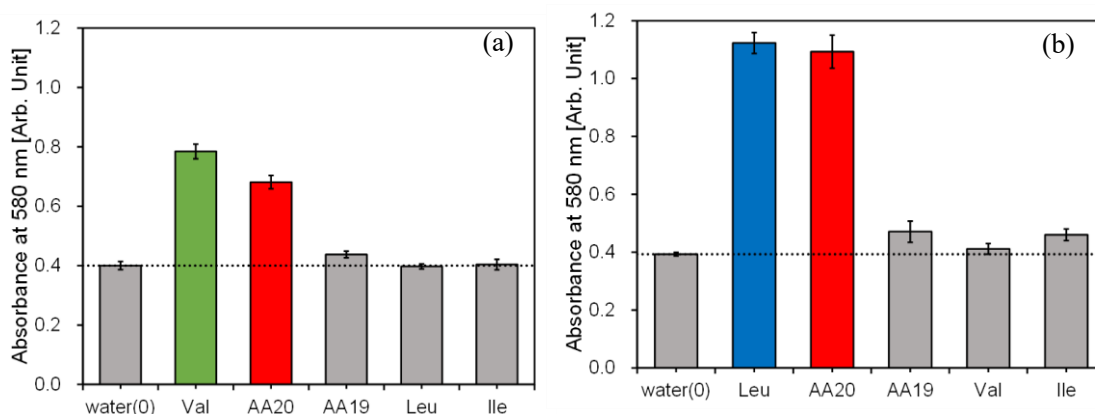


図4 (a) ValRS および(b) LeuRSの選択性の評価 (n = 4)

ValRSについて、ネガティブコントロールとしてロイシンとイソロイシンを選択した。ValRSはバリンに対してアミノ酸20種混合液と同程度の高い値を示した。また、バリンを除いたアミノ酸19種混合液とロイシンとイソロイシンは水(0)と同等の低い値を示した。この結果から、ValRSはバリン以外のアミノ酸の阻害を受けることなくバリンに対して選択性を示した。

LeuRSについて、ネガティブコントロールとしてバリンとイソロイシンを選択した。LeuRSはロイシンに対してアミノ酸20種混合液と同程度の高い値を示した。また、ロイシンを除いたアミノ酸19種混合液とバリンとイソロイシンは水(0)と同等の低い値を示した。この結果から、LeuRSはロイシン以外のアミノ酸の阻害を受けることなくロイシンに対して選択性を示した。

## (3) μPADを用いる定量性と選択性の評価

上項で得られた知見をもとに、ろ紙をアミノ酸の分離分析および検出媒体として用い、ろ紙とラミネートフィルムを用いるμPADを作製し、1枚のμPAD上で酵素反応と呈色反応をさせることで複数のアミノ酸の同時分析を可能なデバイスについて検討した。

ロイシン結合性 aaRS 酵素の LeuRS についてロイシン濃度依存的な応答の結果を図5に示す。上の写真は各濃度におけるロイシン反応部の写真。下のグラフの横軸はロイシン濃度 [μM]、縦

軸は USB カメラで計測した応答値を示す。

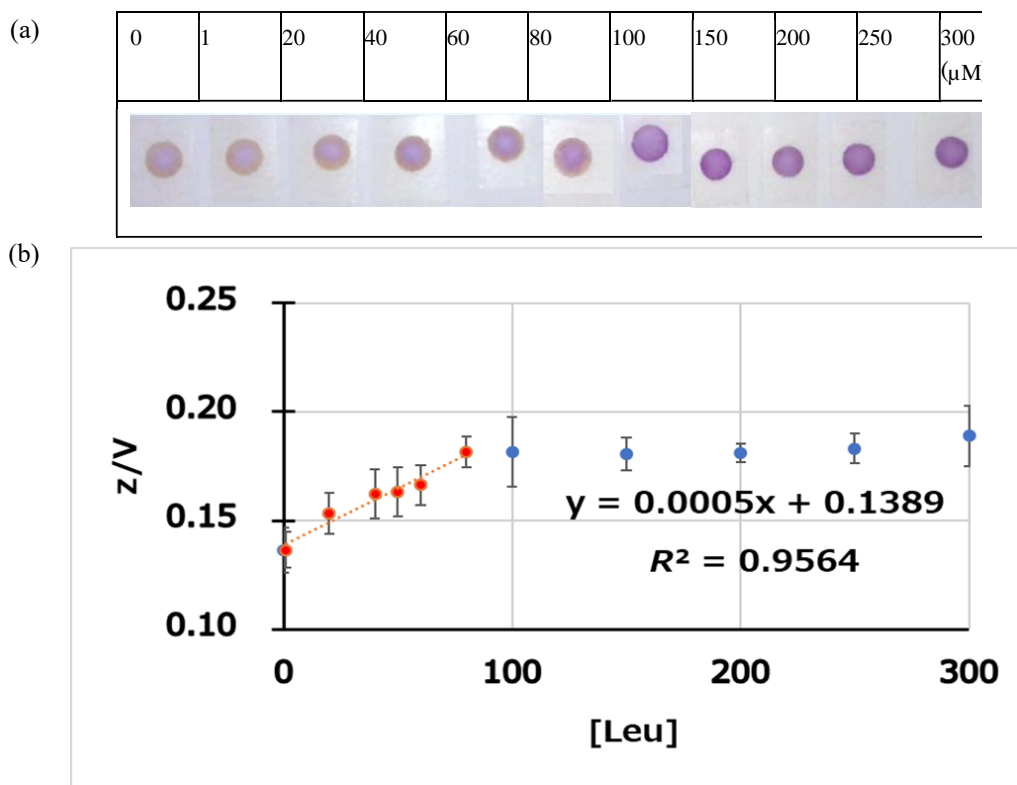


図5 ペーパーデバイスの(a) 各濃度におけるロイシン反応部の写真、(b) 検量線  
繰り返し回数4回、エラーバーは標準偏差を示す。

各検出部位 D においては基質のアミノ酸であるロイシンに対して応答を示し、1~80 μM のロイシンに対して検量線が得られた。一方、バリンやイソロイシンなど他のアミノ酸に対しては応答を示さなかったことから選択的な応答も示した。また計測に必要な時間は3分程度であった。

また、図6にトリプトファン、グリシン、ヒスチジン、リジンの4種類のアミノ酸を同時計測可能なμPADにリジンを滴下したときの写真を示す。リジンの検出部位の図6の左下のみが色が呈色して青色に変化しており、滴下するリジンの濃度に応じて数μM~100 μM の定量範囲で計測可能であることが示唆された。今後は複数のアミノ酸が同時計測可能なμPADの開発について検討を行う。



図6 4種類のアミノ酸濃度が同時計測可能なμPAD  
リジンを滴下した場合は左下のリジン検出部のみが呈色

#### まとめ

マイクロプレート内で反応させる評価法について、BCAAのうちバリンとロイシンについて検討を行ったところ、それぞれバリンとロイシンが1~60 μMの濃度範囲で定量的に計測可能であることが示され、優れた特異性をも示した。

そしてこの結果をもとにμPADを作製し、3分程度の計測時間で1~80 μMのロイシンが選択的に定量可能であった。今後は他のアミノ酸結合性酵素についても評価を行い、本提案の方法の有用性をさらに拡張させる予定である。

現在は糖尿病や肝臓病、各種がんなど複数の病態についてそれぞれ異なる計測法・装置で診断を行っているものを、将来的には本研究で開発されたアミノ酸分析用小型装置を用いることで1台の装置で1度に複数の疾病を診断することが可能となり患者の精神的・費用的な負担を大幅に軽減できると考えられる。また、数千万人規模での疾患の早期発見や病態の管理に有用であり、患者のみならず健常な人の食や医療に対する安心・安全を実現し向上させることが可能になると考えられる。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kugimiya Akimitsu, Wakimoto Sho, Kohda Jiro, Nakano Yasuhisa, Takano Yu	4. 巻 12
2. 論文標題 Development of a one-step analysis method for several amino acids using a microfluidic paper-based analytical device	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-07408-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 釘宮章光	4. 巻 4
2. 論文標題 網羅的に病態の診断が可能なアミノ酸計測用小型装置の開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 55-59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akimitsu Kugimiya, Akari Kawamura, Jiro Kohda, Yasuhisa Nakano, Yu Takano	4. 巻 10th, Apr.
2. 論文標題 Highly sensitive colorimetric detection of histidine using histidyl-tRNA synthetase as the bioreceptor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedical Materials and Devices	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s44174-023-00075-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河村星・釘宮章光
2. 発表標題 病気の診断に用いるアミノ酸計測用バイオセンサーの開発
3. 学会等名 第44回日本生体医工学会中国四国支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河村星・釘宮章光
2. 発表標題 複数のアミノ酸を同時分析可能なペーパーデバイスの開発
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 釘宮章光・脇本聖・香田次郎・中野靖久・鷹野優
2. 発表標題 4種類のアミノ酸を同時分析可能なペーパーデバイスの開発
3. 学会等名 日本化学会 第14回バイオ関連化学シンポジウム(オンライン)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河村星・釘宮章光
2. 発表標題 酵素法を用いるアミノ酸分析法の開発とアミノ酸分析用ペーパーデバイスへの応用
3. 学会等名 日本分析化学会 第82回分析化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅野明・釘宮章光
2. 発表標題 酵素法によるロイシン濃度の高感度計測のための反応条件の検討
3. 学会等名 日本分析化学会 第83回分析化学討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 兼定諒・釘宮章光
2. 発表標題 USBカメラによるペーパーマイクロ流路デバイスの比色検出
3. 学会等名 日本分析化学会 第83回分析化学討論会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

広島市立大学 バイオ情報学研究室 <a href="http://www.bio.info.hiroshima-cu.ac.jp/">http://www.bio.info.hiroshima-cu.ac.jp/</a>
---

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関