

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：25403
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2013～2015
課題番号：25330344
研究課題名(和文)病態計測に用いるアミノ酸分析用マイクロチップの開発

研究課題名(英文)Development of microchip for amino acids analyses

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、血中のアミノ酸濃度を計測することで、アミノ酸の濃度パターンにより健康チェックを行うという画期的な手法を提案するものである。本研究期間内においては3～5種類程度の複数のアミノ酸濃度が計測可能な条件を確立することまでを目標とした。そして将来的には20種類のアミノ酸を同時計測可能なチップを開発することで、1枚のチップで複数の病気の同時診断が可能になると考えられる。

20種類のアミノ酸を識別する酵素として、アミノアシルtRNA合成酵素(aaRS)を用い、その酵素反応により生成する化合物を吸光法で計測することにより応答の評価を行い、目的のアミノ酸濃度を選択的に計測するための条件を確立した。

研究成果の概要(英文)：The analysis of free amino acids in plasma is useful for estimating disease status in clinical diagnoses. Large instruments, such as those used for high-performance liquid chromatography, are generally used to analyze amino acids in biological fluids; however, the conventional analytical tools are burdensome in terms of cost, time, and space requirements. Therefore, the development of simple and rapid analytical tools for measuring amino acid concentrations is desirable for the clinical diagnostics.

In this study, the specific interaction between aminoacyl-tRNA synthetase (aaRS) and its corresponding amino acid was used to measure amino acid concentrations. Pyrophosphate released by the amino acid-aaRS binding reaction was detected by the Trinder's reagent spectrophotometric method.

For the specific detection of glycine, glycyl-tRNA synthetase was used as the recognition element and the method provided selective quantitation of 50 μM glycine.

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 バイオセンシング 酵素 病態計測 小型装置

1. 研究開始当初の背景

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。これまでに**メタボリックシンドロームや肝臓病 [1]、糖尿病、癌 [2]などの病態で血中のアミノ酸濃度バランスが健全な状態とは異なってくる**ことが知られている。例えば肝臓病の診断においては、5種類のアミノ酸濃度を次式に代入し、(バリン+ロイシン+イソロイシン)(チロシン+フェニルアラニン)、その数値から病態の診断が可能であることが報告されている [1]。しかしながら、現状ではアミノ酸は大型の分析計でしか測ることができず、クロマトグラフィー用の大量の溶媒が必要であり、その廃液処理も必要であることから、家庭での健康管理に用いる方法としては適していない。

本研究は 20 種類のアミノ酸濃度を計測可能なアミノ酸分析用チップの開発、および「その場」において特殊な技術を必要とせず、迅速かつ簡便、安価に行うことが出来る方法の開発を目的として研究を行う。本研究が実現することで、医療や個別化健康管理において簡便・安価にアミノ酸の計測が可能なシステムとなり、疾患の早期発見や病態の管理に有用となりえ、患者のみならず健全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。

本申請研究はアミノグラムによって健康チェック、病態チェックを行うという画期的な手法を提案するものである。生体内に存在するアミノ酸をターゲットとした「アミノ酸分析用マイクロチップ」を開発し、複数のアミノ酸濃度のパターンによって病態、健康状態の診断を行うことを目標としている。これにより、**現在は糖尿病や肝臓病、各種癌など複数の病態についてそれぞれ異なる計測法で診断を行っていたものを、将来的には本研究で開発されたアミノ酸分析チップを用いることで1枚のチップで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することが可能になると考えられ、数千万人規模での疾患の早期発見や病態の管理に有用となり、患者のみならず健全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。

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5~1500 nmol mL⁻¹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。なお、簡便か

つ安価に測定できるようになれば医療分野だけではなく食品などの分析への応用も拡がるのが期待できるので、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。

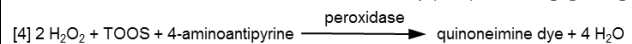
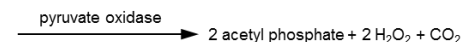
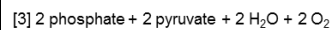
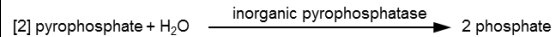
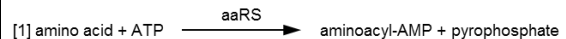
2. 研究の目的

本研究は 20 種類のアミノ酸濃度を計測可能なアミノ酸分析用チップの開発、および「その場」において特殊な技術を必要とせず、迅速かつ簡便、安価に行うことが出来る方法の開発を目的として研究を行う。目標とする計測可能なアミノ酸の濃度域は、血液中に存在する濃度である5~1500 nmol mL⁻¹とし、各アミノ酸が選択的に計測可能な条件の確立を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、20種類のアミノ酸を識別するための酵素として、アミノアシル tRNA 合成酵素(aaRS)を用いることを提案した。aaRSは、生体内においてたんぱく質やペプチドの生成に関わっている酵素である。そのため20種類のアミノ酸に対して必ず20種類存在し、分子特異性が高いと考えられる。

本研究での酵素反応式を下記に示す。



アミノ酸が ATP の存在下で aaRS と反応し [1]、生成したピロリン酸を無機ピロフォスファターゼ [2]、ピルベートオキシダーゼで反応させた後 [3]、呈色試薬のトリンダー試薬で反応させて 556 nm の吸光度を測定することによりアミノ酸濃度検出するというものである [4]。

(1) グリシル tRNA 合成酵素を用いるグリシンの選択的計測のための条件検討

100 μg mL⁻¹ グリシル tRNA 合成酵素 (GlyRS)、2 mM ATP に 0~100 μM の各アミノ酸溶液を添加した 200 mM Tris-HCl バッファーを 96 well マイクロプレート中に 50 μL 分注し、80 °C で 30 分間反応させた。そのマイクロプレートを、マイクロプレートリーダー (Synergy 4, BioTek 社) を用い、マイクロプレートリーダー付属の 2 本のオートインジェクターにより、5 mM ピルビン酸ナトリウム、2 mM 4-アミノアンチピリン、2 mM TOOS トリンダー試薬、5 mM MgCl₂、10 mM KCl を含む反応液と、2.5 unit mL⁻¹ 無

機ピロフォスファターゼ、5.0 unit mL⁻¹ ピルベートオキシダーゼ、5 mM MgCl₂、10 mM KClを含む反応液をそれぞれ 10 μL、40 μL ずつインジェクトし、600 秒後の 556 nm の吸光度を同機で計測し、応答の評価を行った。

(2) 反応条件の検討

上記の反応条件をもとに、aaRS 酵素反応における反応温度や亜鉛イオンなどの金属イオンの添加効果、反応バッファーの pH などについて詳細に検討を行い、最適な反応条件について求めた。また、トリプトファン結合性 aaRS の TrpRS、チロシン結合性 aaRS の TyrRS、スレオニン結合性 aaRS の ThrRS についても同様に評価を行った。

(3) フロー型アミノ酸センシングシステムの開発

アスパラギン結合性酵素の aaRS (AsnRS) をヒスタグ結合性マイクロビーズ (Ni-アガロースゲル) と相互作用させて、マイクロビーズに AsnRS を固定化させた。そのビーズを内容積が 300 μL の小型カラムに充填し、それをマイクロシリンジと接続してフロー型アミノ酸センシングシステムとしての応答の評価を行った。その模式図を図 1 に示す。

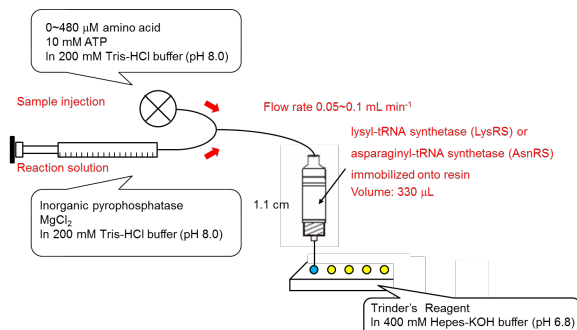


図 1 フロー型アミノ酸センシングシステムの模式図

4. 研究成果

(1) GlyRS の選択性の評価

まず、GlyRS の、基質アミノ酸であるグリシンに対する特異性を評価するため、50 μM の 20 種類のアミノ酸混合溶液を GlyRS と相互作用させた時の各アミノ酸の濃度変化をアミノ酸分析計 (日立製作所 L-8900) により計測を行った。図 2 に GlyRS と相互作用させた前後のクロマトグラムを示す。

その結果、GlyRS と相互作用させることによって、グリシンのピークのみが減少していることが確認された。よって、GlyRS は 20 種類のアミノ酸が混合している場合でも、グリシンのみに特異的に結合することが示された。

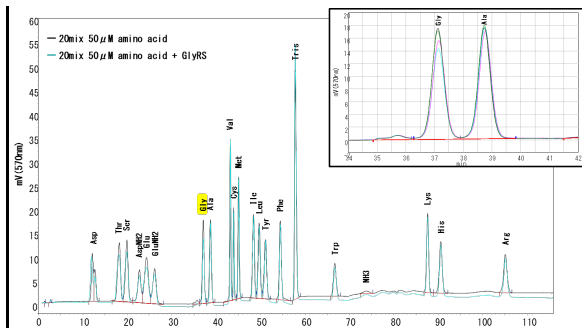


図 2 GlyRS と 20 種類のアミノ酸との相互作用前後のクロマトグラム

(黒) 相互作用前、(青) 相互作用後

(2) GlyRS の反応条件の検討

GlyRS を用いる反応において、これまで反応バッファーの pH を中性域の pH 7 ~ 8 の領域に設定して評価を行ったところ、pH 8.0 において高感度に目的のアミノ酸が計測可能であることを示してきたが、さらに pH 9.0 までを評価範囲として反応を行った。その結果、よりアルカリ領域の pH 9.0 に設定することでより高感度な計測が可能であることを示した (図 3)。ただし、pH 9 以上では、吸光度が減少するという傾向がみられたため、今後の評価は pH 8.0 または 9.0 で行うこととした。

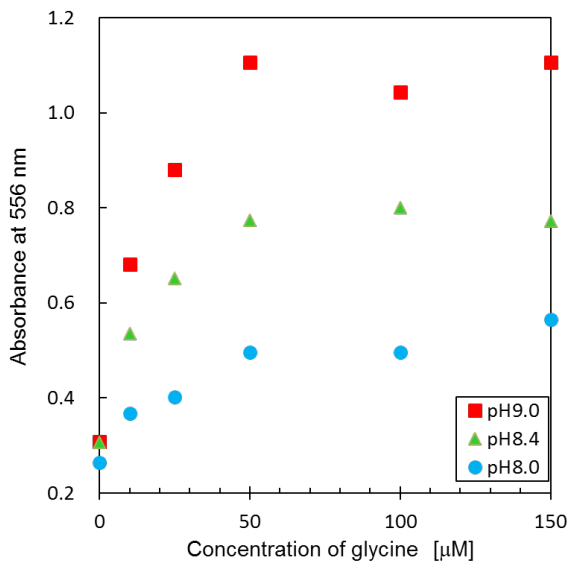


図 3 GlyRS におけるバッファーの pH の検討

(3) 選択性の評価

pH 9.0 のバッファー条件において、選択性の評価を行った。50 μL の各アミノ酸および 20 種類のアミノ酸を混合した溶液と GlyRS とを相互作用させて評価を行ったところ、基質アミノ酸であるグリシンに対して高い応答を示し、一方、他の 19 種のアミノ酸に対してはアミノ酸を添加しない場合 (none) とほぼ同じ吸光度であることからほとんど応答をしていないことがわかった (図 4)。20 種類のアミノ酸を混合した溶液とは、グリシン

ンのみの時とほぼ同じ値を示しており、これらの結果から、GlyRS はグリシンと特異的に結合することで、本センシングシステムにおいてもグリシンの選択的な計測が可能であるということが示された。

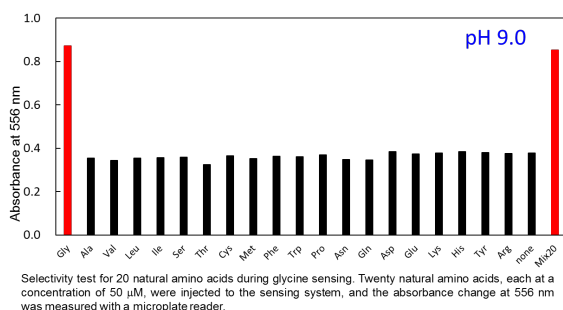


図 4 GlyRS における選択性の評価

トリプトファン結合性 aaRS の TrpRS、チロシン結合性 aaRS の TyrRS、スレオニン結合性 aaRS の ThrRS についても同様に評価を行い、それぞれ数 μM ~ 50 μM の濃度域で選択的に目的のアミノ酸が選択的に計測可能であることを示した。

(4) フロー型アミノ酸センシングシステムにおける応答の評価

アスパラギン結合性酵素の AsnRS をマイクロビーズに結合させたリアクター型カラムを有するフロー型アミノ酸センシングシステムを構築し、応答の評価を行った。

反応バッファの流速を 0.1 mL min^{-1} とし、カラムの温度を室温、あるいは 40 に設定し、また亜鉛イオンを 1.0 mM 添加した場合としない場合について評価を行った。その結果、亜鉛イオンを添加した場合に 1 ~ 400 μM のアスパラギンが計測可能であることが示された(図 5)。これは、aaRS の中には亜鉛イオンが反応を活性化させる要素となっているものもあるため、亜鉛イオンの効果により反応が活性化し、計測可能な濃度範囲が広がったと考えられる。なお、温度の要因については顕著な効果が見られなかった。

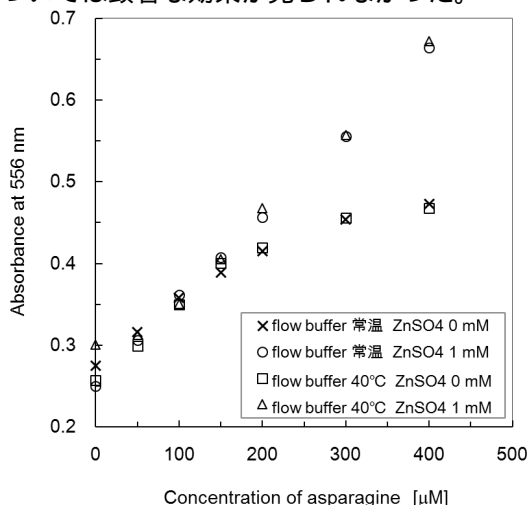


図 5 AsnRS における反応条件の検討

反応液の流速を 0.05 ~ 2.0 mL min^{-1} として評価を行ったところ、流速が 1.0 mL min^{-1} 以下の時に高い応答性を示した。流速がその値を超えると基質と酵素の接触時間が短く、酵素反応できる時間も短くなるためであると考えられたため、その後の実験は、流速 1.0 mL min^{-1} で行うこととした。

(5) 選択性の評価

フロー型アミノ酸センシングシステムに 400 μM の 20 種類の各アミノ酸をサンプルとしてインジェクトし、選択性の評価を行った。その結果、アスパラギン結合性酵素の AsnRS をマイクロビーズに固定化したことで、アスパラギンに高い選択性を示した(図 6)。

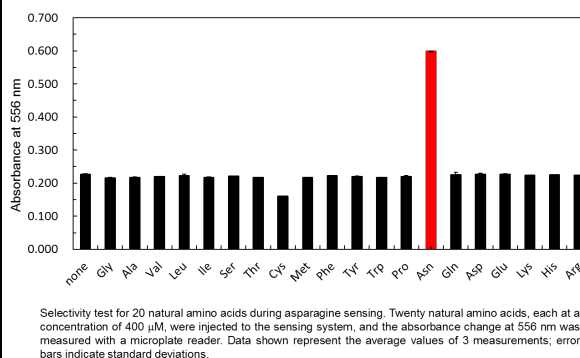


図 6 フロー型アミノ酸センシングシステムにおける選択性の評価

同様に、リジン結合性酵素の LysRS を固定化したリアクターではリジンにセリン結合性酵素の SerRS を固定化したリアクターではセリンに選択的応答を示した。

本申請研究においては、アミノアシル tRNA 合成酵素(aaRS)を 20 種類の各アミノ酸の分子識別材料に用い、グリシンやチロシン、アスパラギンなどを計測するための反応条件を検討し、グリシンは 1 ~ 50 μM 、アスパラギンは 1 ~ 400 μM の濃度範囲で選択的に計測可能であることを示した。

また aaRS をマイクロビーズに固定化したリアクター型カラムを作製し、フロー型のアミノ酸センシングシステムを構築して応答の評価を行った。その結果、半自動的に目的のアミノ酸濃度が 15 分程度で選択性良く 1 ~ 400 μM の濃度範囲で計測可能なことが示された。つまり、目標とする計測可能な濃度範囲は達成することができた。

原理的にはこのようなリアクター型カラムを並列に接続することで、複数のアミノ酸を同時に計測することが可能になると考えられるため、引き続き実用化を目指して研究を進めていく。

参考文献

- [1] Y. Noguchi, et al., *Am. J. Clin. Nutr.*, 83, 513S-519S (2006).
[2] Y. Miyagi, et al., *PLoS ONE*, 6, 1-12 (2011).
[3] 「アミノ酸の分析方法およびバイオセンサー」発明者：釘宮章光、特開 2011-50357
[4] A. Kugimiya, M. Morii, Takashi Ohtsuki, *Analytical Biochemistry*, 378, 90-92 (2008).
[5] A. Kugimiya, K. Kohara, *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 6, 397-400 (2012).

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Akimitsu Kugimiya, Hidenori Konishi, Rie Fukada, "Flow analysis of amino acids by using a newly developed aminoacyl-tRNA synthetase-immobilized, small reactor column-based assay", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 査読有, Vol. 178, 924-931 (2016).
DOI: 10.1007/s12010-015-1918-2

Akimitsu Kugimiya, Rie Fukada, "Chemiluminescence detection of serine, proline, glycine, asparagine, leucine, and histidine by using corresponding aminoacyl-tRNA synthetases as recognition elements", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 査読有, Vol. 176, 1195-1202 (2015).
DOI 10.1007/s12010-015-1639-6

〔学会発表〕(計 13 件)

〔図書〕(計 1 件)

釘宮章光, 「全アミノ酸同時計測用バイオチップへの応用」、*マイクロ流路 - ものづくりと分析技術 -*、東レリサーチセンター、363-365 (2014)。

〔その他〕

ホームページ等

http://www.bio.info.hiroshima-cu.ac.jp/index_b.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

釘宮 章光 (KUGIMIYA, Akimitsu)
広島市立大学・大学院情報科学研究科
・准教授

研究者番号：50285433