

【目的】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常な状態とは異なってくるということが知られている。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。

我々は、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計測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。本研究においては20種類のアミノ酸の識別に用いる酵素であるアミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) について各20種類のアミノ酸濃度を計測するのに最適な条件を確立し、さらに紙を分離・反応媒体に用いる「アミノ酸計測用ペーパーマイクロ流路デバイス」を開発して4種類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て研究を行った。

【方法】100 μM ヒスチジン、45.9 μM ヒスチジン結合性 aaRS の HisRS、アデノシン三リン酸 (ATP)、塩化マグネシウム (MgCl_2) を含む 200 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を反応溶液とし、ATP と MgCl_2 の濃度を 70 通りの組み合わせで加えて 40°C で 30 分間反応させ、反応停止後、呈色試薬のリン-モリブデン溶液を加えて 800 nm の吸光度を計測することで結合能の評価を行った。また、ろ紙とラミネートフィルムを貼り合わせて作製した基板の上に、4か所の酵素反応部および検出部を有するペーパーマイクロ流路デバイス (μPAD) を作製し、応答の評価を行った。

【結果】マイクロプレート内でアミノ酸の1種のヒスチジンについて、ヒスチジン結合性 aaRS を用いて反応性の評価を行った結果、40 mM ATP、50 mM MgCl_2 を添加した時に高い応答性を示し、1~150 μM のヒスチジンが選択的に定量可能であることを示した。また、作製した μPAD についてトリプトファン、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 の応答の評価を行ったところ、それぞれ数 μM ~100 μM の濃度範囲で目的のアミノ酸が選択的に計測可能であり、検出限界はそれぞれトリプトファン (1.1 μM)、グリシン (3.3 μM)、ヒスチジン (1.9 μM)、リジン (1.8 μM) であることが示された。

ヒスチジン結合性 aaRS 反応における ATP と MgCl_2 の添加量の検討

