79　網羅的な病気の診断に用いるアミノ酸計測装置の開発	釘宮　章光

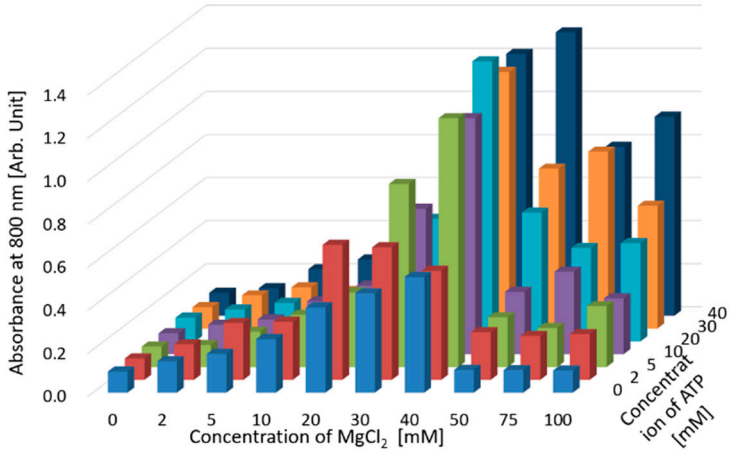
【目的】メタボリックシンドロームや肝臓病、糖尿病、がんなどの各種病態において血液中のアミノ酸濃度バランスが健常な状態とは異なってくるということが知られている。臨床医療や予防医療の分野において、検体の分析を「その場」において行うことは、疾患の早期発見や疾病の病態管理に非常に有効であり、また必要とされている技術である。とくに、個人個人の健康を管理するために家庭で健康状態が検査できるツールは予防医学的に重要である。

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℃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



79. 網羅的な病気の診断に用いるアミノ酸計測装置の開発

釘宮　章光

広島市立大学 大学院情報科学研究科 医用情報科学専攻 バイオ情報学研究室

Key words：アミノ酸，アミノアシル tRNA 合成酵素，医療機器，バイオセンサー，ペーパーマイクロ流路デバイス

緒　言

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［1〜2］。例えば胃がん患者のステージⅠの状態においてはトリプトファンやヒスチジンの濃度は顕著に減少し、グリシンやプロリンの濃度はあまり変化しない、という報告がされている。また肝臓病の診断においては 5 種類のアミノ酸について、（バリン＋ロイシン＋イソロイシン）／（フェニルアラニン＋チロシン）の式に各アミノ酸の濃度を代入して得られた数値が 3 以上なら健常、3 以下でその数値が低くなるにつれて、急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変と病態が重篤になるという研究報告もある。このアミノ酸濃度のバランスの変化はがんの種類や前述の病態の種類によってそれぞれ異なっている。このように複数のアミノ酸濃度のバランスから病態の診断を行うアミノインデックス®という方法が知られている［3］。

アミノ酸の分析法および装置の研究については、HPLC の原理による専用の分析装置が販売されており世界でも大きなシェアを有しているが、大型の装置であることと、価格も 800〜2,000 万円と非常に高価である。また 1 回あたりの計測費用も 5,000 円〜15,000 円程度を要する。また、酵素であるロイシンデヒドロゲナーゼを用いた分岐鎖アミノ酸（バリン、ロイシン、イソロイシン）を計測するキットも販売されているが、これは、これら 3 種のアミノ酸のトータル量を計測するためのキットであり、各 3 種のアミノ酸濃度を計測することはできない［4］。また、フェニルアラニンデヒドロゲナーゼやリジンオキシダーゼなどの酵素を用いたバイオセンサーの原理による研究論文も発表されているが、これらデヒドロゲナーゼやオキシダーゼの酵素は数種類のアミノ酸にしか対応して存在していない。

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。

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［5〜7］。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（μPAD）」を開発して 4 種類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て研究を行った。aaRS は生体内においてタンパク質やペプチドの生合成に関わっている酵素であり［8］、20 種類のアミノ酸に対してそれぞれ 20 種類存在し、すべて同じ反応機構で酵素反応が進行するため検出ステップが格段に簡易化されることが期待できる。

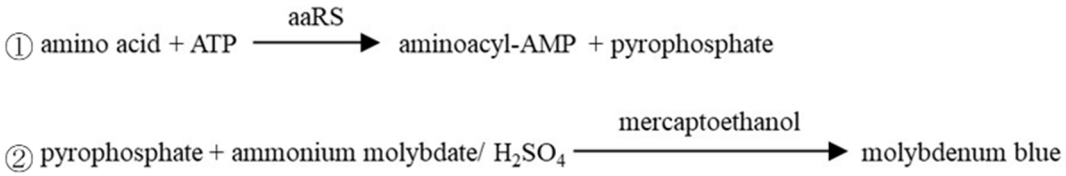
本申請研究においては、aaRS の酵素反応が最適に活性化される条件について詳細に条件検討を行い、40 mM アデノシン三リン酸（ATP）、50 mM 塩化マグネシウム（$MgCl_2$）を添加した時に高い応答性を示し、1〜150 μM のヒスチジンが選択的に定量可能であることを示した。

また、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 を作製し、応答の評価を行い、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）であることを示した。

方　法

1. aaRS 酵素反応と呈色反応の原理

本研究でアミノ酸の識別材料として用いた aaRS による酵素反応と、それに続く呈色反応の反応式を下に示す。①式に示すように ATP の存在下で基質アミノ酸と結合し、アミノアシル AMP とピロリン酸を生成する。そして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・モリブデン法である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。なおリン・モリブンデン法によりピロリン酸の定量が可能であることも確認している。この①式の酵素反応は 20 種類の aaRS において全て同じ反応機構で進行するというのもポイントである。



2. aaRS 酵素反応条件の検討

200 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0)に 100 μM または 0 μM ヒスチジン、45.9 μM ヒスチジン結合性 aaRS (HisRS)、0～40 mM ATP、0～100 mM $MgCl_2$ を溶解し（70 通りの組み合わせ)、反応溶液のトータルを 100 μL とした。この反応溶液をアルミブロック内で 80℃で 30 分間反応させ、5 分間氷冷させた。ろ過フィルター付マイクロプレートにこの反応溶液と 1 M メルカプトエタノール（10 μL)、2.5%モリブデン酸アンモニウム／2.5 M 硫酸水溶液（40 μL）を滴下し、2 枚のマイクロプレートを重ね合わせて遠心分離機を用いて 1,000 g、4℃で 8 分間遠心させた。遠心中、分子量の大きい酵素はフィルターにトラップされてフィルター付マイクロプレートに残り、分子量の小さいアミノ酸やピロリン酸、ATP などがフィルターを通過し、ピロリン酸がマイクロプレート内のモリブデン酸と反応することによる青色の呈色反応を、マイクロプレートリーダーを用いて 800 nm における吸光度を計測して結合能の評価を行った。

また、上で得られた最適な ATP および $MgCl_2$ 濃度において、ヒスチジンの濃度を 0～200 μM と変化させて定量性の評価を行った。選択性の評価は同様に 100 μM の 20 種類の各アミノ酸について反応させることで評価を行った。

3. 複数のアミノ酸同時計測用ペーパーマイクロ流路デバイスの作製と応答の評価

Graphic Studio（iMark ソフトウエア社）を用いて流路を設計し、ろ紙（Advantec 社 No. 1）およびラミネートフィルムをカッティングプロッタ (CE-6000) にて切り出し (図 1a)、ラミネートすることで μPAD を作製した (図 1b)。

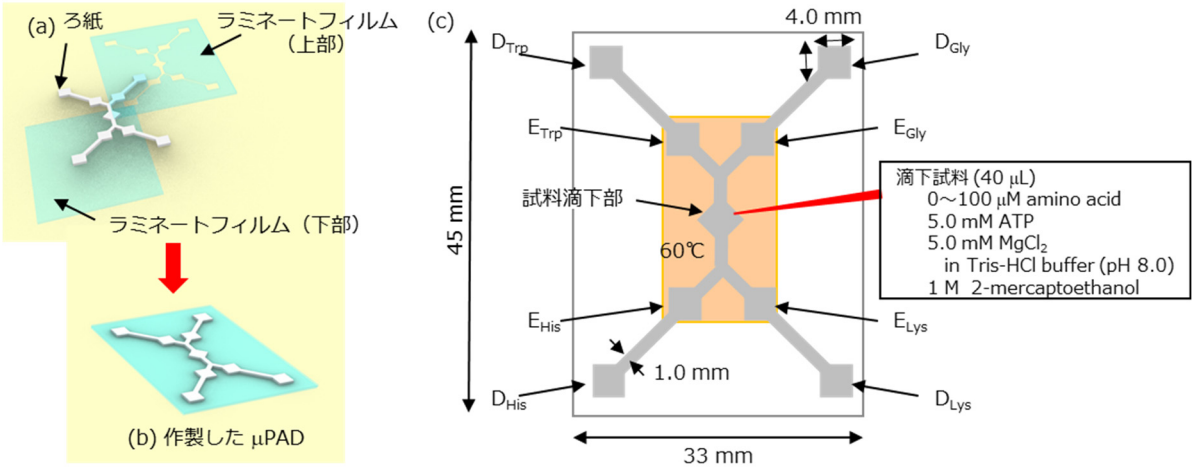


図 1. 4 種類のアミノ酸検出用ペーパーマイクロ流路デバイス（μPAD）の作製

さらに図 1c に示すように、4 か所の酵素反応部（Ex）にそれぞれ 222 μg/mL HisRS、LysRS 160 μg/mL、GlyRS 100 μg/mL、TrpRS 220 μg/mL を 25 mM Tris-HCl バッファー（pH 8.0）に溶解し、1 μL ずつ滴下した。アミノ酸検出部（Dx）には発色試薬の 5% モリブデン酸アンモニウムを 0.5 μL ずつ滴下して μPAD とした。今回作製した μPAD ではトリプトファン（Trp）、グリシン（Gly）、ヒスチジン（His）、リジン（Lys）の 4 種類のアミノ酸の同時分析が可能である。例えば、図 3c 左下において E_{His} にはヒスチジン結合性酵素の HisRS が塗布されており、その検出部の D_{His} では基質であるヒスチジンを含有するサンプルを滴下すると酵素反応と呈色反応により青色に呈色する。非基質アミノ酸を滴下すると酵素反応が起こらないため検出部 Dx での呈色反応は起こらない、という原理である。

60℃に設定したアルミプレート上でアミノ酸溶液（0～100 μM の濃度の各トリプトファン、グリシン、ヒスチジン、リジン、および 5.0 mM ATP、5.0 mM $MgCl_2$ を 25 mM Tris-HCl バッファー（pH 8.0）に溶解した溶液）40 μL をサンプル滴下部に滴下した。滴下 3 分後の μPAD を ImageJ を用いてアミノ酸検出部の青色の濃淡を計測することで応答の評価を行った。

結果および考察

1. 酵素反応に用いる ATP と $MgCl_2$ の添加量の検討

酵素反応に及ぼす ATP と $MgCl_2$ の添加量について検討を行った結果、図 2 に示す通り、ヒスチジン濃度が（a）100 μM と（b）0 μM で比べると 40 mM ATP、50 mM $MgCl_2$ を添加したときに吸光度の値、および 100 μM と 0 μM ヒスチジンのときの差が最も大きく、鋭敏に計測できることを示した。よってこれ以降の評価は、40 mM ATP、50 mM $MgCl_2$ を 200 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 8.0）に溶解した条件で行うこととした。

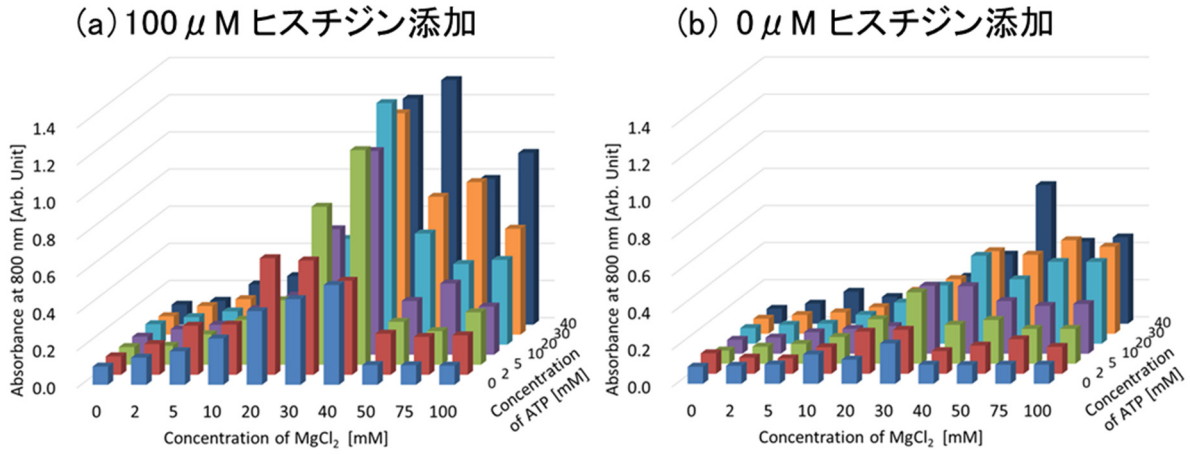


図 2. HisRS 反応における ATP と $MgCl_2$ の添加量の検討
200 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 8.0）に 100 μM または 0 μM ヒスチジン、45.9 μM HisRS、0～40 mM ATP と 0～100 mM $MgCl_2$ は 70 通りの組み合わせ溶解し、酵素反応後の呈色反応による吸光度（800 nm）を計測。繰り返し回数 4 回、エラーバーは標準偏差を示す。

2. 定量性と選択性の評価

1. で得られた 40 mM ATP、50 mM $MgCl_2$ を反応溶液に添加して用いる条件において、HisRS のヒスチジンに対する定量性の評価を行ったところ、1～150 μM のヒスチジンが定量可能であることを示した。また、100 μM の 20 種類の各アミノ酸について結合性の評価を行ったところ、ヒスチジンに対して吸光度が 0.64 程度と高い反応性を示した。一方、他の 19 種類のアミノ酸は水を添加した時と同じ程度の低い吸光度しか示さなかったことから、HisRS がヒスチジンに選択的に結合したために、呈色反応による吸光度が高い値を示したと考えられる（図 3）。

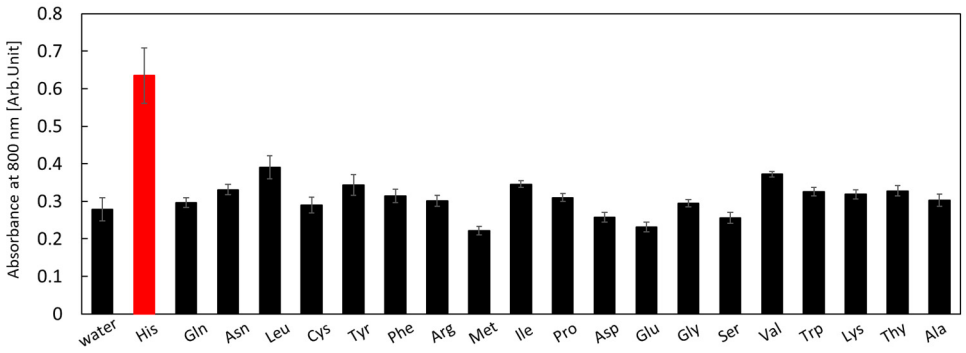


図 3. HisRS 反応における選択性の評価

各アミノ酸濃度は 100 μM とし、40 mM ATP、50 mM $MgCl_2$ を 200 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 8.0）に溶解し、酵素反応後の呈色反応による吸光度（800 nm）を計測。繰り返し回数 4 回、エラーバーは標準偏差を示す。

3. 4 種類のアミノ酸同時計測用 μPAD の作製と応答の評価

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て、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。中央に試料溶液を滴下すると毛細管現象により E_Xでの酵素反応を経て検出部位 D_Xでの呈色反応による青色の濃淡を計測する、というものである。

得られた結果を図 4 に示す。各検出部位 D_Xにおいては基質のアミノ酸に対して応答を示す一方、他のアミノ酸に対してはほとんど応答を示さなかった。つまり今回作製した μPAD を用いるとトリプトファン、グリシン、ヒスチジン、リジンの 4 種類のアミノ酸それぞれに対して選択的に数 μM～100 μM の定量範囲で計測可能であることが示された。また計測に必要な時間は 3 分程度であった。

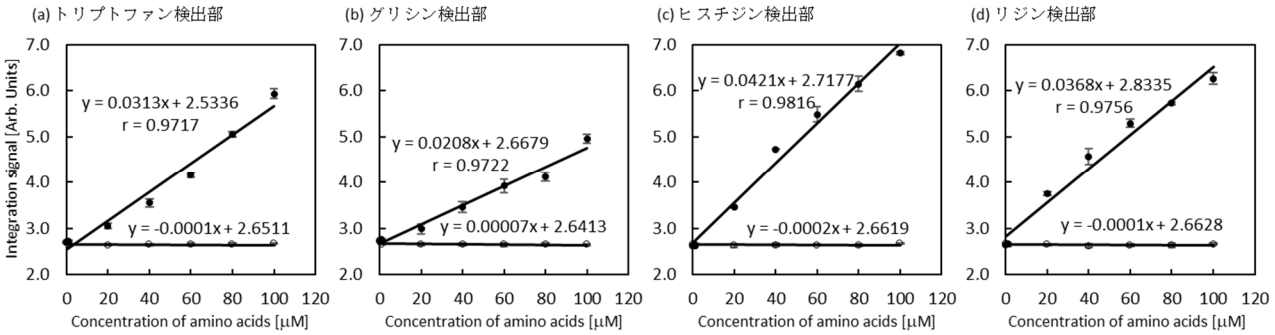


図 4. 種類のアミノ酸同時計測用 μPAD の各検出部位における検量線と選択性評価

a) トリプトファンを滴下した際の●トリプトファン（基質アミノ酸）および○他 3 種のアミノ酸の応答。

b～d) 同様に、●基質アミノ酸、○他 3 種アミノ酸の応答を示す。繰り返し回数 4 回、エラーバーは標準偏差を示す。

4. まとめ

本研究では 20 種類のアミノ酸の識別に用いる酵素の aaRS を用いて各 20 種類のアミノ酸濃度を計測するのに最適な条件を検討し、アミノ酸の 1 種のヒスチジンについてマイクロプレート内においてヒスチジン結合性 aaRS（HisRS）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。

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」（μPAD）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い、トリプトファン、グリシン、ヒスチジン、リジンの 4 種類のアミノ酸それぞれに対して選択的に数μM～100μM の定量範囲で計測可能であることを示した。

紙を分離分析媒体に用いるメリットとして、紙は安価で軽量なため保存や運搬や廃棄が容易、分析に必要なサンプルや試薬が少量、流路の設計が容易なため多項目を同時分析可能なデバイスの設計が容易、毛細管現象を利用するため外部電力が不要、などが挙げられる。このように紙を用いるμPAD は流路の形状や寸法などを容易に設計・作製できるため、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。本研究で提案するアミノ酸分析用小型装置はバイオセンサーの原理を用いているため、精密な送液ポンプなどが必要なく、装置の小型化、廉価化が可能である。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計測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。

共同研究者・謝辞

本研究を進めるにあたり、実験に尽力してくれた広島市立大学情報科学部医用情報科学科の脇本聖さん、河村星さん、髙口京太さんに感謝いたします。

文　献

1） Miyagi Y, Higashiyama M, Gochi A, Akaike M, Ishikawa T, Miura T, Saruki N, Bando E, Kimura H, Imamura F, Moriyama M, Ikeda I, Chiba A, Oshita F, Imaizumi A, Yamamoto H, Miyano H, Horimoto K, Tochikubo O, Mitsushima T, Yamakado M, Okamoto N. Plasma free amino acid profiling of five types of cancer patients and its application for early detection. PLoS One. 2011;6(9):e24143. Epub 2011 Sep 7. PMID: 21915291 DOI: 10.1371/journal.pone.0024143.

2） Noguchi Y, Zhang QW, Sugimoto T, Furuhata Y, Sakai R, Mori M, Takahashi M, Kimura T. Network analysis of plasma and tissue amino acids and the generation of an amino index for potential diagnostic use. Am J Clin Nutr. 2006 Feb;83(2):513S-519S. PMID: 16470023 DOI: 10.1093/ajcn/83.2.513S.

3） https://www.ajinomoto.co.jp/products/aminoindex/technology/

4） https://search.cosmobio.co.jp/view/p_view.asp?PrimaryKeyValue=17509084&ServerKey=Primary&selPrice=1

5） Kugimiya A, Morii M, Ohtsuki T. Amino acid sensing using aminoacyl-tRNA synthetase. Anal Biochem. 2008 Jul 1;378(1):90-2. PMID: 18410738 DOI: 10.1016/j.ab.2008.03.037.

6） Kugimiya A, Takamitsu E. Spectrophotometric detection of histidine and lysine using combined enzymatic reactions. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2013 Dec 1;33(8):4867-70. PMID: 24094198 DOI: 10.1016/j.msec.2013.08.004.

7） Kugimiya A, Wakimoto S, Kohda J, Nakano Y, Takano Y. Development of a one-step analysis method for several amino acids using a microfluidic paper-based analytical device. Sci Rep. 2022 Mar 2;12(1):3427. PMID: 35236904 DOI: 10.1038/s41598-022-07408-9.

8） Sekine S, Shichiri M, Bernier S, Chênevert R, Lapointe J, Yokoyama S. Structural bases of transfer RNA-dependent amino acid recognition and activation by glutamyl-tRNA synthetase. Structure. 2006 Dec;14(12):1791-9. PMID: 17161369 DOI: 10.1016/j.str.2006.10.005.