

## 2024年度 新産業創出研究会「研究成果報告書」

### 「酵素法を用いる全 20 種類のアミノ酸分析法の開発と実用性評価」

〔広島市立大学情報科学研究科・准教授〕 〔釘宮 章光〕

〔池田食研株式会社・マネージャー〕 〔青木 秀之〕

〔池田食研株式会社・係長〕 〔森 朋子〕

#### 1. はじめに

食品の製品開発や品質管理のプロセスにおいて、20 種類の各アミノ酸濃度を計測することは食品の栄養、鮮度、味などの評価に有用であることが知られている。また、肝臓病、糖尿病、各種がんなどの病態において、血液中のアミノ酸濃度の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おり、医療分野においても血液中のアミノ酸濃度計測の有用性が高まっている。実際に「アミノインデックスがんリスクスクリーニング」が人間ドックのオプションとしてすでに実用化されており、胃がんや肺がんなど 8 種類のがんのリスクが診断できる。

我々は食品や医療分野で利用可能な、バイオセンサーの原理を利用したアミノ酸計測用小型装置の開発を行っている。申請者が「2019 年度 新産業創出研究会」に採択された際は、ろ紙とラミネートフィルムを加工して作製したアミノ酸をターゲットとしたペーパーマイクロ流路デバイス ( $\mu$ PAD) の開発を行い、4 種類のアミノ酸（ヒスチジン、リジン、グリシン、トリプトファン）の同時分析が可能な  $\mu$ PAD を開発して論文発表も行った。これらアミノ酸の識別には、生体内においてタンパク質の生合成に関わる酵素であるアミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) を用いることを提案している。この酵素は 20 種類のアミノ酸に対して 20 種類存在する酵素である。

今年度の本研究会では、

- ・ 全 20 種類のアミノ酸を、aaRS を用いる酵素法で分析が可能なことを示す。
- ・ 肝臓病の診断を例として、5 種類のアミノ酸（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）が計測可能なペーパーデバイスを開発する。
- ・ 実サンプル（食品）の計測が可能なことを示す。

の 3 つを目標として研究を行った。

#### 2. 概要

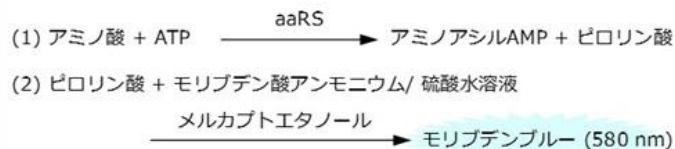
20 種のアミノアシル tRNA 合成酵素のうち、これまでに我々は 17 種類のアミノ酸に対する aaRS について、基質のアミノ酸に対して選択的に計測が可能なことを示してきた。一方 aaRS の活性に tRNA が必要なグルタミン、グルタミン酸、アルギニンの 3 種の aaRS については検討していなかったため、まずこれら 3 種の aaRS について応答の評価を行い、それぞれ目的のアミノ酸が選択的に定量可能なことを示した。そしてこれにより、全 20 種類のアミノ酸について、aaRS を用いる酵素法により選択的に定量可能なことを示した。

またグルタミン酸については、グルタミン酸計測用のペーパーデバイスの開発を行い 15 分程度の短い時間でグルタミン酸が選択的に定量可能なことを示した。

肝臓病の診断を例として、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 5 種類のアミノ酸が計測可能なペーパーデバイスを開発して応答の評価を行い、それぞれのアミノ酸が選択的に同時計測可能であることを示した。

### 3. 研究成果および今後の課題

本研究で用いた反応式を以下に示す。aaRS と、それに対応する基質のアミノ酸がアデノシン三リン酸 (ATP) の存在下で反応し、アミノアシル AMP とピロリン酸が生成し、そのピロリン酸に発色試薬のモリブデン酸アンモニウムの硫酸溶液と反応させて発色した青色の濃淡を計測して、アミノ酸濃度を求めるというものである。



#### 1. 酵素法によるグルタミン、グルタミン酸、アルギニンの計測

20 種類の aaRS のうち、グルタミン、グルタミン酸、アルギニンの aaRS は酵素の活性に tRNA が必要ことが知られている。この 3 種の aaRS について反応性の評価を行い、これによって全 20 種類の aaRS について目的のアミノ酸が計測可能なことを示す目的で検討を行った。

グルタミン結合性 aaRS (GlnRS) とその tRNA<sup>Gln</sup> を 1:0、1:0.5、1:1 の比で HEPES バッファー (pH 8.0) 中で ATP 等の試薬の存在下で反応させたところ、GlnRS と tRNA<sup>Gln</sup> を 1:1 の比で混合した時に高い活性を示し、計測可能なグルタミンの濃度範囲は 1~10 μM であった。また、選択性の評価を行ったところ GlnRS は 10 μM グルタミンと 10 μM グルタミンを含む 20 種アミノ酸混合液には吸光度にして 0.74 程度の高い応答を示したのに対し、他の 19 種アミノ酸には 0.18 程度の低い応答しか示さなかった。よって、GlnRS を用いることでグルタミンが選択的に定量可能なことを示した。

同様に、グルタミン酸結合性 aaRS の GluRS については 1~100 μM のグルタミン酸が、アルギニン結合性 aaRS の ArgRS については 1~80 μM のアルギニンが選択的に定量可能なことを示した。

この結果、aaRS を用いることで全 20 種類の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。定量可能な濃度範囲を表 1 に示す。

表 1 可能にしたアミノ酸の濃度計測範囲

| アミノ酸 | 濃度範囲 [μM] | アミノ酸 | 濃度範囲 [μM] |
|------|-----------|------|-----------|
| Gly  | 2.5–100   | Lys  | 5–100     |
| Ala  | 15–100    | Arg  | 1–80      |
| Val  | 10–100    | His  | 2.5–100   |
| Leu  | 2.5–20    | Asp  | 2.5–100   |
| Ile  | 2.5–100   | Glu  | 1–100     |
| Pro  | 2.5–15    | Asn  | 2.5–50    |
| Phe  | 2.5–20    | Gln  | 1–10      |
| Met  | 5–50      | Ser  | 2.5–20    |
| Trp  | 1–100     | Thr  | 1–100     |
| Cys  | 5–100     | Tyr  | 1–50      |

#### 2. グルタミン酸計測用ペーパーマイクロ流路デバイスの開発

グルタミン酸結合性酵素の GluRS を用い、tRNA<sup>Glu</sup> や ATP、呈色試薬のモリブデンブルーを用いてペーパーデバイスを作製し、応答の評価を行った。反応に必要な時間は 15 分程度であり、酵素反応による呈色を USB カメラで撮影することで応答の評価を行った。その結果、10~150 μM のグルタミン酸が選択的に定量可能なことを示した。計測は、サンプル溶液を滴下するだけで、簡単に計測可能であった。

### 3. 5 種類のアミノ酸計測用ペーパーデバイスの開発

肝臓病の診断を例として、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 5 種類のアミノ酸濃度が計測可能なペーパーデバイスの開発についても行った。5 本の流路を有するペーパーデバイスを作製し、各反応部の呈色による色の変化を計測したところ、各基質のアミノ酸に対して高い応答を示し、数 $\mu\text{M}$ ~150  $\mu\text{M}$  の濃度域で選択的に定量可能なことを示した。

### 4. 実サンプル(食品)の計測

実サンプル(食品)の計測については、今回は検討することができなかった。

池田食研株式会社では、以下の検討を行った。

#### 実サンプルの評価

池田食研株式会社では、aaRS 酵素を用いたアミノ酸定量法 (aaRS 法) が、食品中の夾雑物の影響を受けず、アミノ酸測定可能かを評価するため、tRNA が必要な aaRS 酵素 (GluRS) による、各種食品サンプル中の L-グルタミン酸の測定及び、aaRS 酵素 (ValRS、LeuRS、IleRS、PheRS、TyrRS) による、醤油中の 5 種アミノ酸 (L-バリン (L-Val)、L-ロイシン (L-Leu)、L-イソロイシン (L-Ile)、L-フェニルアラニン (L-Phe)、L-チロシン (L-Tyr)) の測定を行った。

#### 【実験結果】

池田食研株式会社では、aaRS 酵素 (GluRS) を用いたアミノ酸定量法 (aaRS 法) と HPLC 法について、各種食品サンプル中の L-グルタミン酸の測定値の比較試験を行った。各測定法での各食品中の L-グルタミン酸含量の比較結果を図 1 に示す。その結果、aaRS 法の測定値と HPLC 法の測定値は同程度の値であった。また、5 種類の aaRS 酵素 (ValRS、LeuRS、IleRS、PheRS、TyrRS) を用いたアミノ酸定量法 (aaRS 法) と HPLC 法について、醤油中の 5 種類のアミノ酸測定値 (L-Val、L-Leu、L-Ile、L-Phe、L-Tyr) の比較試験を行った。各測定法での醤油中の各アミノ酸含量の比較結果を図 2 に示す。その結果、aaRS 法の測定値と HPLC 法の測定値は同程度の値であった。

以上の GluRS を用いた各食品中の L-グルタミン酸含量の測定結果及び、5 種類の aaRS 酵素 (ValRS、LeuRS、IleRS、PheRS、TyrRS) を用いた醤油中の各アミノ酸含量の測定結果から、aaRS 法は、食品中の夾雑物の影響を受けることなく、アミノ酸定量ができる可能性が示唆された。

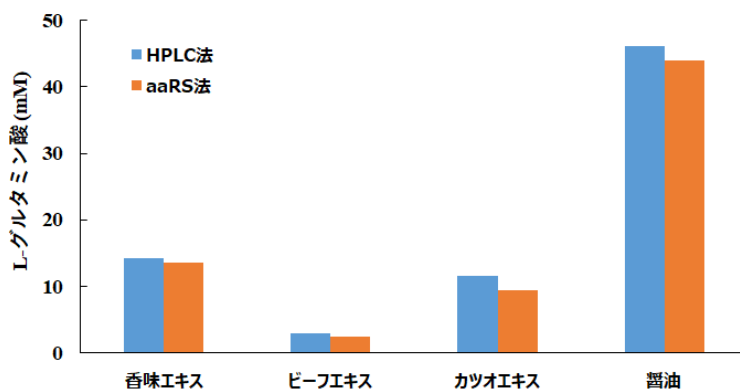


図 1 各食品中の L-グルタミン酸含量の aaRS 法と HPLC 法の比較結果

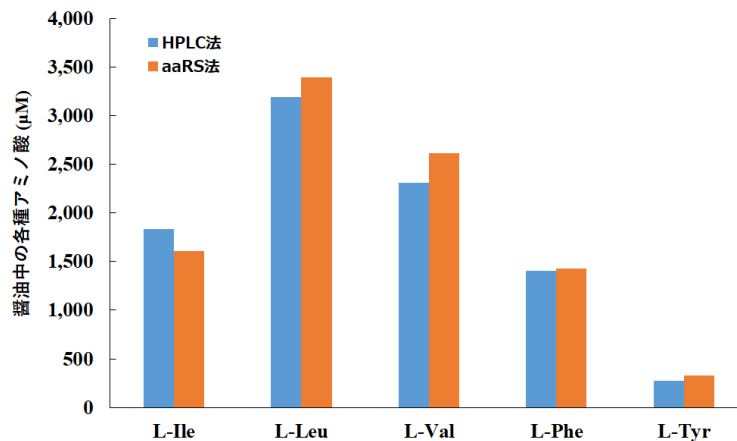


図2 醤油中の各アミノ酸含量の aaRS 法と HPLC 法の比較結果

#### 4. おわりに

本研究では、20 種類の aaRS のうち、これまで検討を行っていなかった酵素反応に tRNA が必要なグルタミン、グルタミン酸、アルギニンについて応答の評価を行い、これら 3 種のアミノ酸が選択的に定量可能なことを示し、これにより全 20 種のアミノ酸が aaRS を用いる酵素法により分析可能であることを示した。またグルタミン酸については、グルタミン酸計測用のペーパーデバイスの開発を行い 15 分程度の短い時間で、かつ簡易にグルタミン酸が選択的に定量可能なことを示した。

肝臓病の診断を例として、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 5 種類のアミノ酸が計測可能なペーパーデバイスを開発して応答の評価を行い、それぞれのアミノ酸が選択的に同時計測可能であることを示した。

#### 5. 本研究の今後の計画

本研究会の研究によって、20 種類の全アミノ酸が aaRS を用いる酵素法によって分析可能であることを示したため、今後は食品サンプル、あるいは血液や尿などの実サンプルを用いた試験を行い、夾雑物質の影響の評価を行う。また 20 種類のアミノ酸を同時計測可能なペーパーデバイスの開発を行う。

#### 6. その他

(1) 出願特許(タイトル・出願番号・発明者・特許権者など)

未定

(2) 投稿論文(タイトル・学会名等)

投稿予定

(3) 本研究会の参加企業・団体名

池田食研株式会社

以 上