

## 2019年度 新産業創出研究会「研究成果報告書」

### 「食品の品質管理や病気の診断に用いるアミノ酸計測用小型装置の開発」

[広島市立大学情報科学研究科・准教授] [釘宮 章光]

[広島市立大学社会連携センター・社会連携コーディネーター]

[中倉 照郎]

[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

アミノ酸の分析に関して、食品製造分野においては旨味成分であるグルタミン酸などの分析値が食品の品質向上に活用されている。また、医療分野においてはメタボリックシンドロームや肝臓病、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ことが認識されている。このことから、医療分野においてもアミノ酸分析技術が活用されつつある。

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。

本申請研究においては、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計測用ペーパーマイクロ流路デバイスを作製し、バッファー中で調製したアミノ酸のサンプルを高感度・高選択的に検出するための反応条件、およびペーパーデバイスの流路の設計について検討を行った。

#### 2. 概要

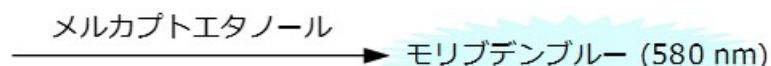
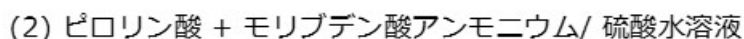
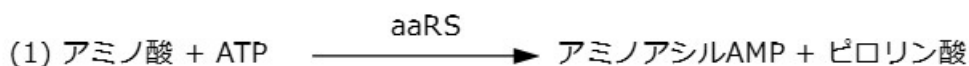
アミノアシル tRNA 合成酵素の各20種類のアミノ酸に対する基質特異性を利用したバイオセンサー型の小型のアミノ酸分析用装置を開発する。本装置が完成すると、食品分野においては食品の品質管理、医療分野では病院や家庭等において各種病態の網羅的診断が迅速・簡便・安価に行うことが可能になると考えられる。

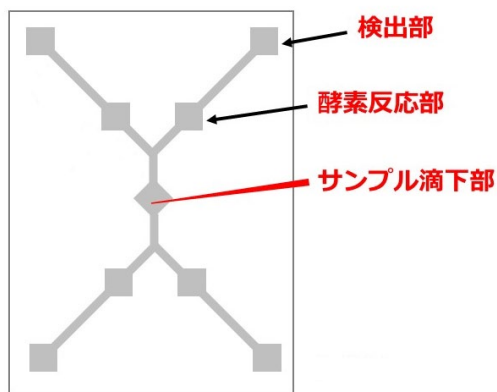
本申請研究では、ろ紙とラミネートフィルムを加工して作製したアミノ酸計測用ペーパーマイクロ流路デバイスを作製し、バッファー中で調製したアミノ酸のサンプルを高感度・高選択的に検出するための反応条件、ペーパーデバイスの流路の設計について検討を行った。検出目標とする各アミノ酸の濃度範囲は5~1500 μMとし、数種類のアミノ酸が同時分析可能なペーパーデバイスの開発を目指した。

また、池田食研株式会社では aaRS 酵素を用いて、食品及び血液サンプル中のアミノ酸が測定できるかについて検討を行った。

#### 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ATPの存在下でアミノアシル 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。





本研究では、これまで困難であった複数のアミノ酸濃度の同時計測をめざし、図 1 のようなサンプル滴下部、酵素 (aaRS) 反応部、アミノ酸検出部からなる新しいペーパーデバイスを作製した。サンプルが酵素 (aaRS) 反応部からアミノ酸検出部に移動する間に酵素反応が行われる。ペーパーデバイス上で酵素反応、呈色反応を行うことで、4 種類のアミノ酸の同時測定を目指した。

図 1 作製したペーパーデバイス

### 【実験方法】

#### 1. ペーパーデバイスの作製と応答の評価

- ① ペーパーデバイスは、設計した流路の通りに切り取ったろ紙を同様の形状に加工したラミネートフィルムで挟み込み作製した。流路の形状は iMark ソフトウェアの Graphtec Studio を使用し作製し、カッティングプロッタ(CE6000-ASF)を用いてカットした。
- ② アミノ酸検出部にモリブデン酸アンモニウムを滴下した。
- ③ HisRS (ヒスチジン結合性 aaRS)、LysRS (リジン結合性 aaRS)、GlyRS (グリシン結合性 aaRS)、TrpRS (トリプトファン結合性 aaRS) を 25 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.0) に溶解し、酵素 (aaRS) 反応部に滴下した。
- ④ 60 °C に設定したアルミプレート上でアミノ酸反応液をサンプル滴下部に滴下した。アミノ酸反応液は前実験と同様に調製した。また、本実験ではヒスチジン、リジン、グリシン、トリプトファンについてそれぞれについて 0、1、20、40、60、80、100  $\mu\text{M}$  の 7 通りについて濃度測定を行った。
- ⑤ 反応後、ImageJ を用いてアミノ酸検出部の青色の濃度を測定し、縦軸を平均輝度 $\times$ 面積、横軸をアミノ酸濃度としてグラフを作製した。以下の実験を 1 日 3 回、3 日間行い、9 回に平均値を測定値とし、標準偏差をエラーバーとして表した。

#### 2. 実サンプルの評価

池田食研株式会社では、各種食品サンプルや血液サンプルを用いて aaRS 酵素を用いたアミノ酸定量法 (aaRS 法) と HPLC 法による比較を行った。

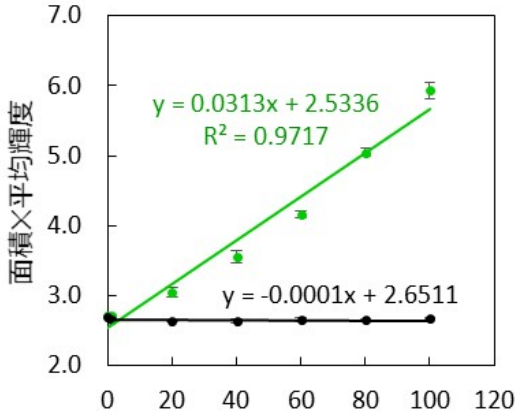
### 【実験結果】

各 aaRS 酵素反応で産生したピロリン酸を検出するアミノ酸検出部は、それぞれの基質アミノ酸であるヒスチジン、リジン、グリシン、トリプトワンの濃度に比例して青色強度も大きくなり直線性が得られた (図 2)。またそれらの相関係数 (R) の値も 0.98 以上と良好な結果が得られた。また、基質のアミノ酸でないサンプルを滴下した場合は全く反応を示さなかった。このことから作製したペーパーデバイスを用いると、ヒスチジン、リジン、グリシン、トリプトワンの 4 種類のアミノ酸を識別可能で、同時に 4 つのアミノ酸が 1~100  $\mu\text{M}$  の濃度域で計測可能であることが示された。

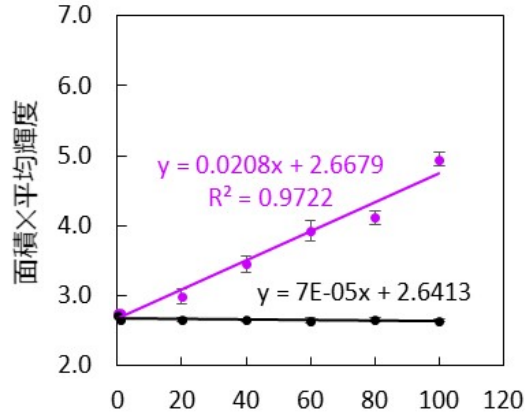
池田食研株式会社では、aaRS 酵素 (GluRS と HisRS) を用いたアミノ酸定量法 (aaRS 法) と、HPLC 法について、各種食品サンプル中のアミノ酸測定値の比較試験を行った。その結果、aaRS 法の測定値と HPLC 法の測定値は同程度の値であった。GluRS を用いた、各食品中の L-グルタミン酸含量の各測定法での比較の結果を図 3 に示す。

また、血液サンプル中の各アミノ酸濃度について aaRS 酵素 (HisRS、SerRS、TyrRS) を用いたアミノ酸定量法と、HPLC 法について比較したところ、0.99 程度の相関係数が得られ、良好な相関性が得られた。

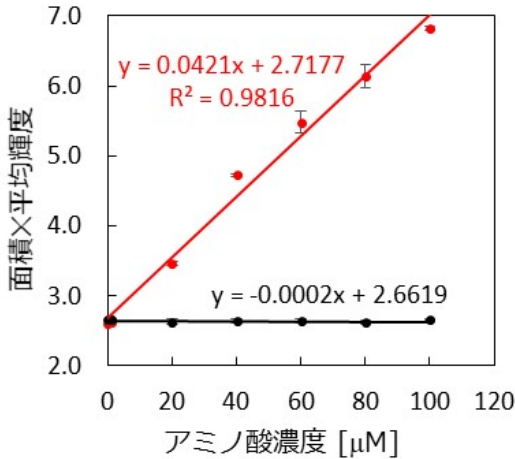
### TrpRS固定化反応部



### GlyRS固定化反応部



### HisRS固定化反応部



### LysRS固定化反応部

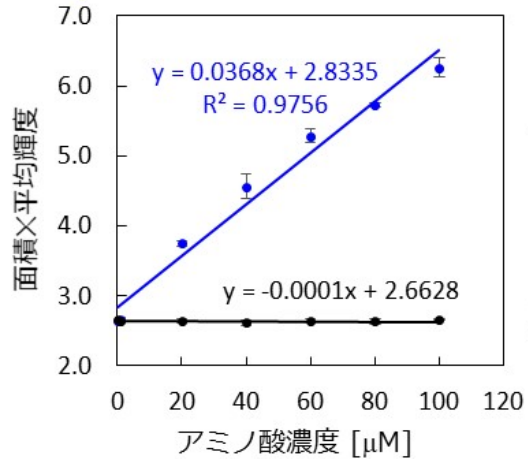


図2 4種のアミノ酸を同時検出可能なペーパーデバイスの応答の評価

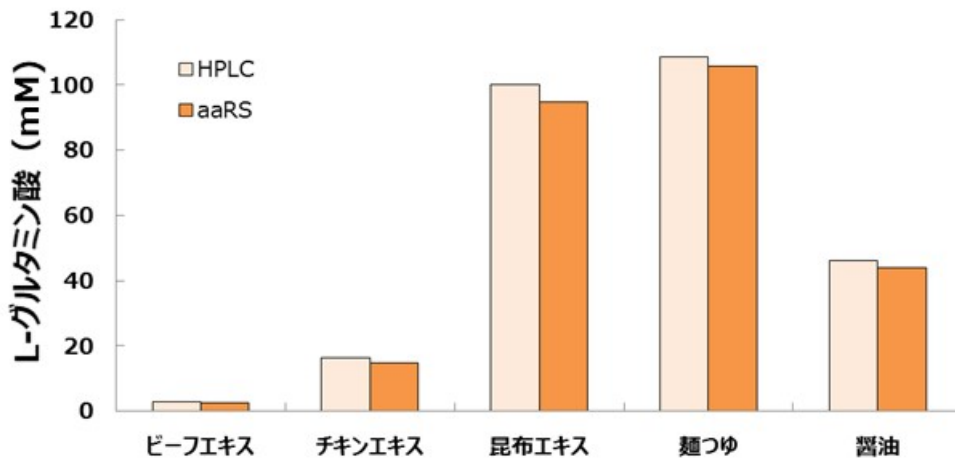


図3 GluRS を用いた各食品中の L-グルタミン酸含量の aaRS 法と HPLC 法の比較結果

#### 4. おわりに

本研究の最終目標は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小型装置を開発し、複数のアミノ酸濃度のパターンによって迅速・簡便・安価に食品の品質管理が可能な装置、さらには家庭や薬局、病院等において健康診断や病気の診断が可能な装置を開発することである。これにより、1台の分析装置で食品の品質管理や複数の疾患の同時診断が可能になると考えられる。将来的には農業・畜産分野などでの実用化可能性についても検討をすすめる。

#### 5. 本研究の今後の計画

本申請研究において、aaRS 酵素を用いたアミノ酸定量法 (aaRS 法) と HPLC 法にて食品や血液中のアミノ酸含量を測定した結果、aaRS 法により、HPLC 法と同程度に食品や血液中のアミノ酸が測定できることが示された。今後は他の aaRS 酵素についても実サンプルを用いた場合の特異性について評価を行う。

また、20 種類のアミノ酸濃度を同時計測可能なデバイスの開発、低濃度域のアミノ酸計測についての検討を行う。

#### 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



競輪の補助事業

この事業は、競輪の補助を受けて実施しました。

<https://www.jka-cycle.jp/>