

# まとめてイッキに分析！ ～生体分子の同時一斉解析技術～

和歌山大学 システム工学部

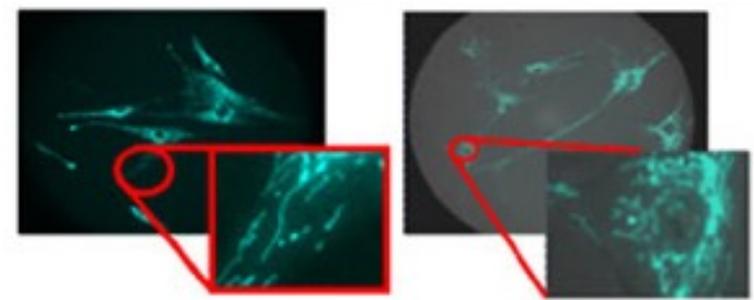
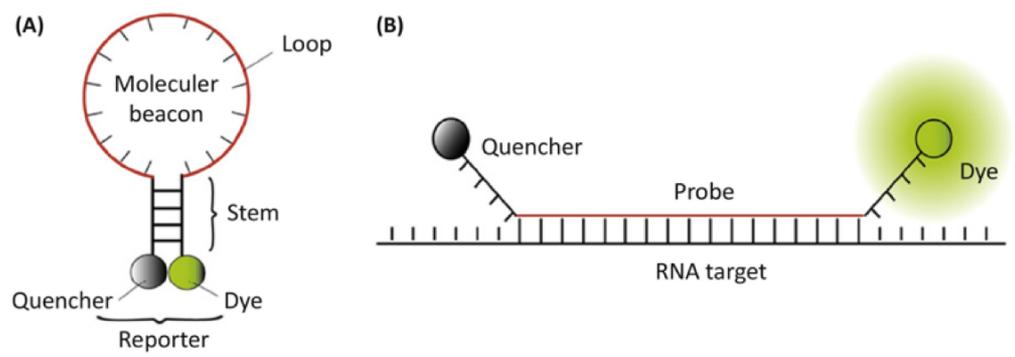
坂本 隆

# 細胞の中

- 多種多様な生体分子が共存  
例) タンパク質：5～10万種類
- 各生体分子の存在量は微量  
例) タンパク質：0.5～1 ng

# 分子プローブを用いた生体分子検出

## 細胞内のmRNAを検出した例



蛍光性の分子プローブを用いることで  
細胞内の生体分子の直接検出が可能

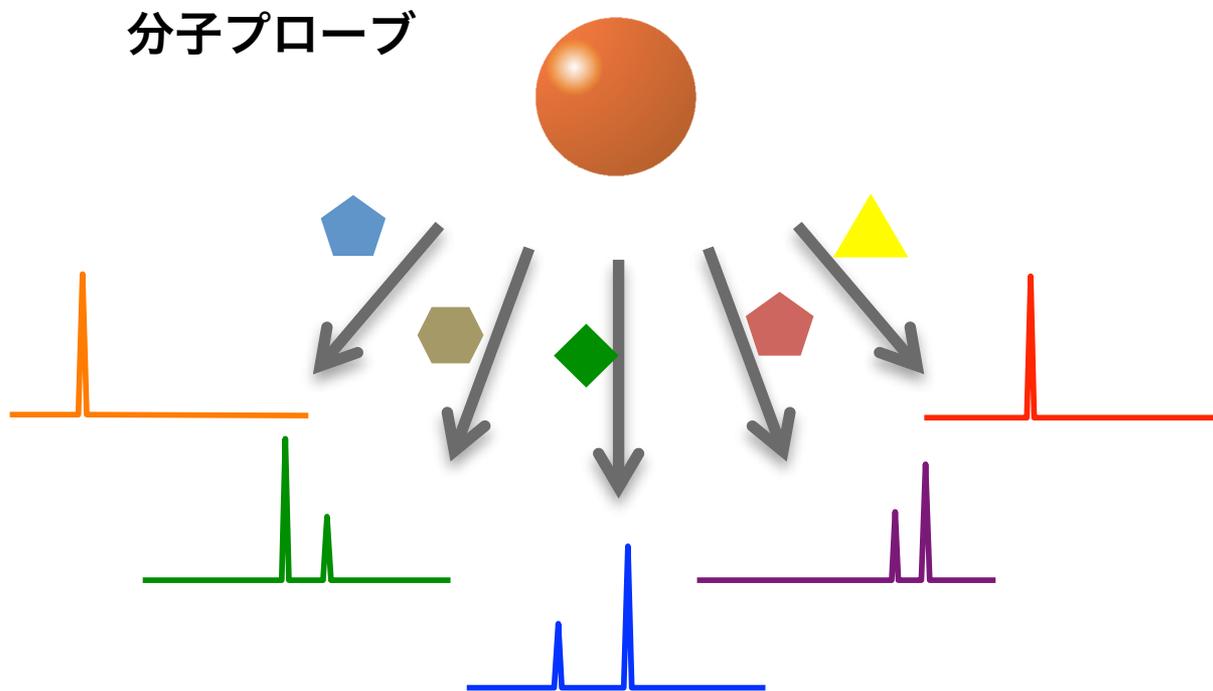
# 分子プローブを用いた生体分子検出

- 蛍光を使うことで高感度な検出が可能  
(1分子観察が可能)
- リアルタイム検出が可能で系時変化を追うことができる (タイムラプス観察)
- 様々な生体分子を検出できる分子プローブが報告されている
- 標的ごとに分子プローブが必要
- 多数の標的の同時検出には不向き

1つの分子プローブで  
多数の標的生体分子を検出したい！

# 研究の目的

- 複数の標的生体分子を同時一斉に検出できる新手法を開発する



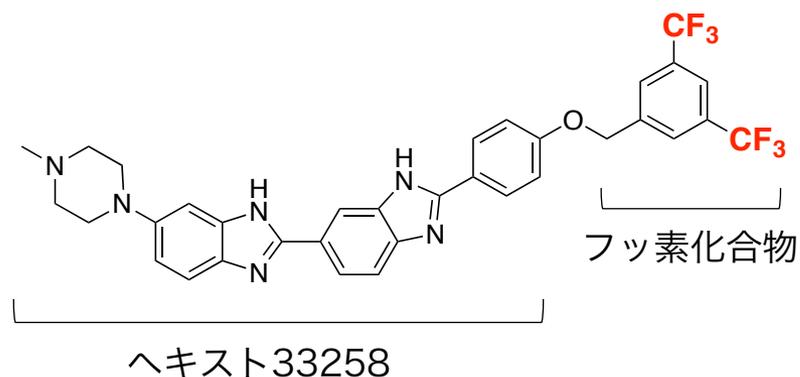
# なぜ $^{19}\text{F}$ NMR ?

- 信号がシャープ
  - ☞ 信号を分離しやすい
- 生体分子や生体環境中には $^{19}\text{F}$ がほとんどない
  - ☞ 低バックグラウンド
- NMR検出感度が $^1\text{H}$ の83%
  - ☞ 比較的高感度
- 有機化学的に操作可能
  - ☞ プローブをデザイン・合成しやすい
- 同位体が存在しない

# 本日で紹介する技術

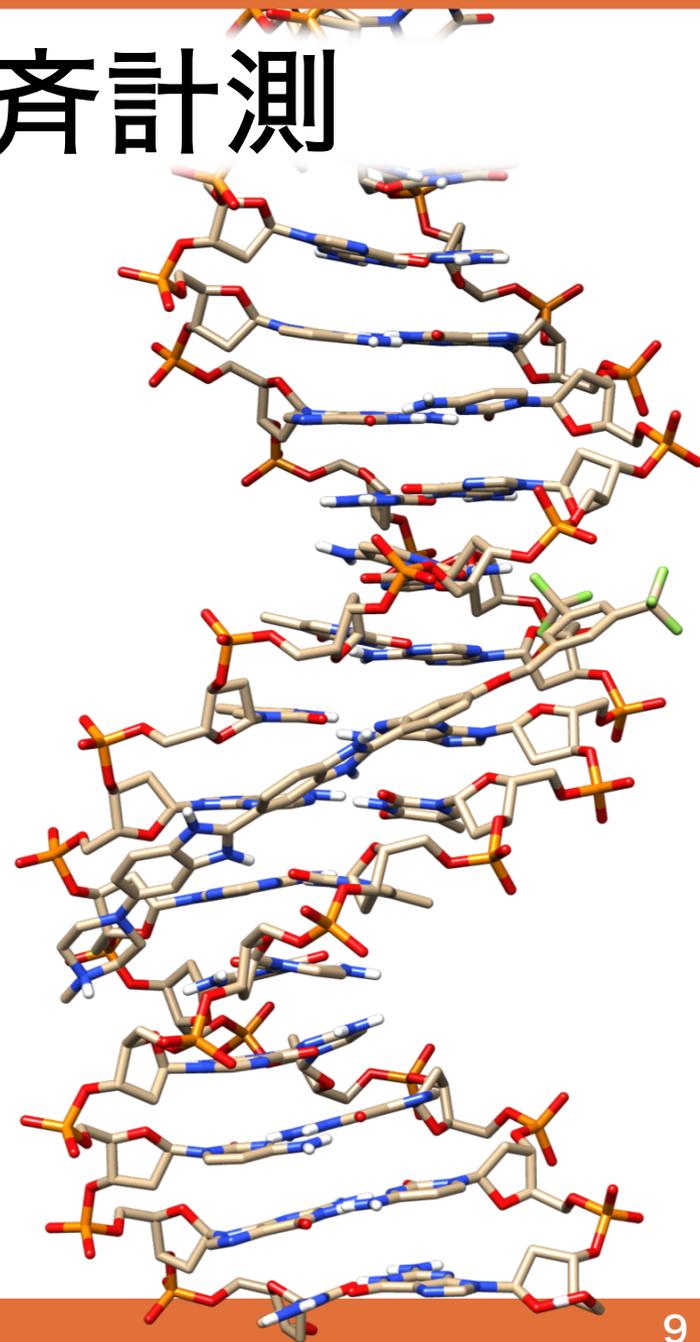
- ① 異なる配列を持つ核酸を同時・一斉に検出できる分子プローブ
- ② 複数のアミノ酸を同時・一斉に検出できる新しいアミノ酸分析法

# 核酸の同時・一斉計測

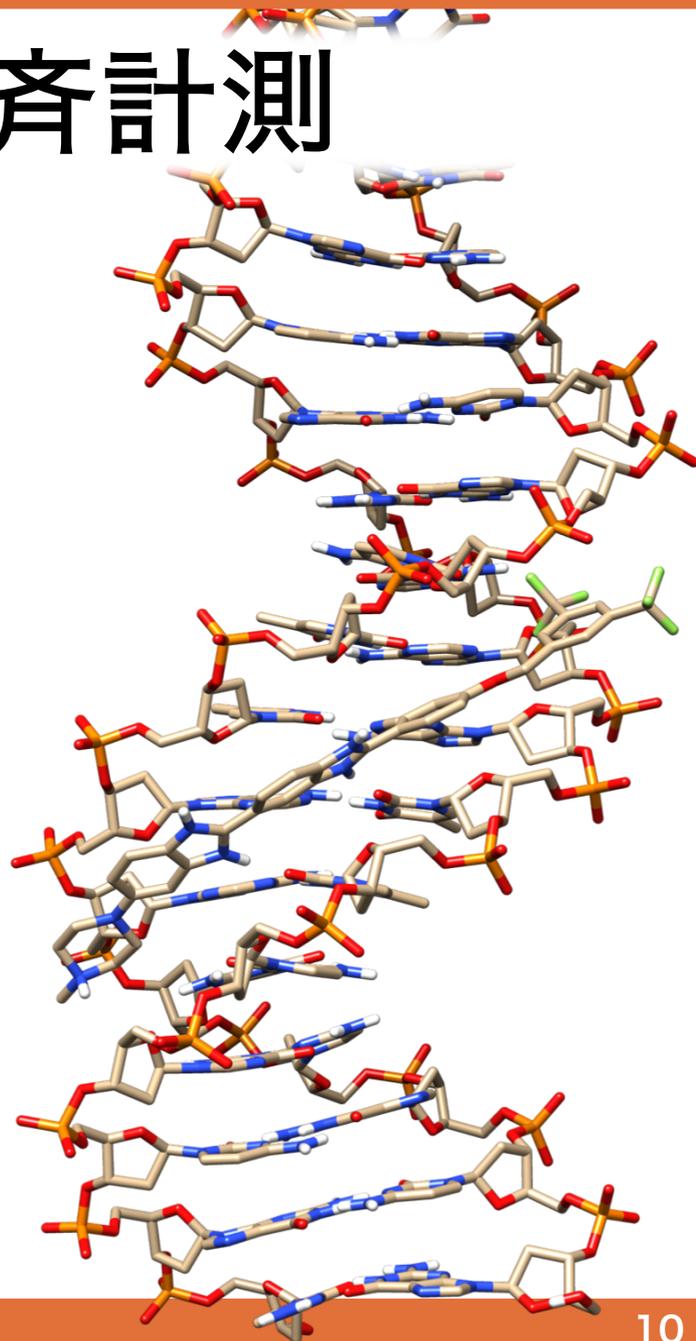
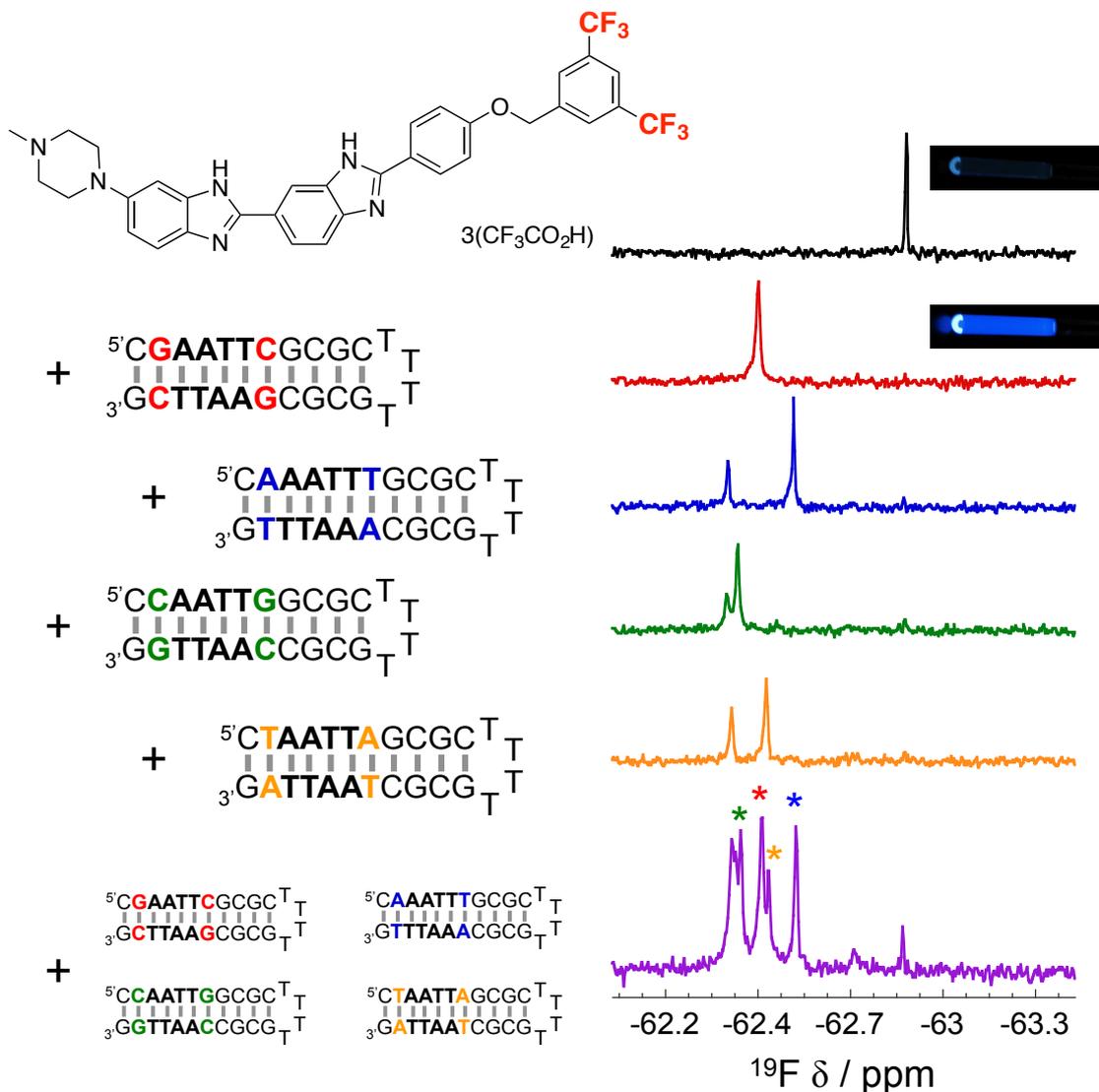


## ヘキスト33258

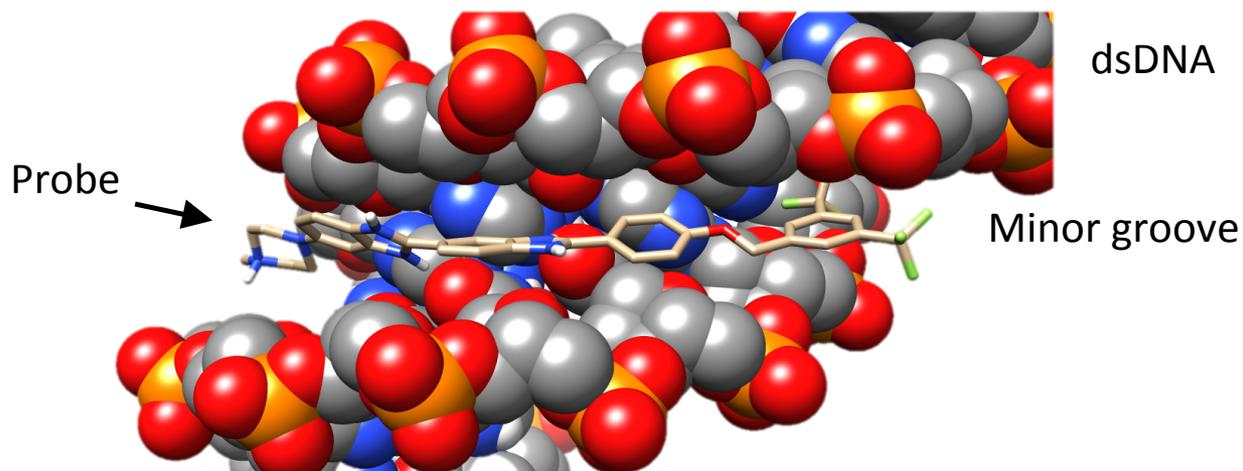
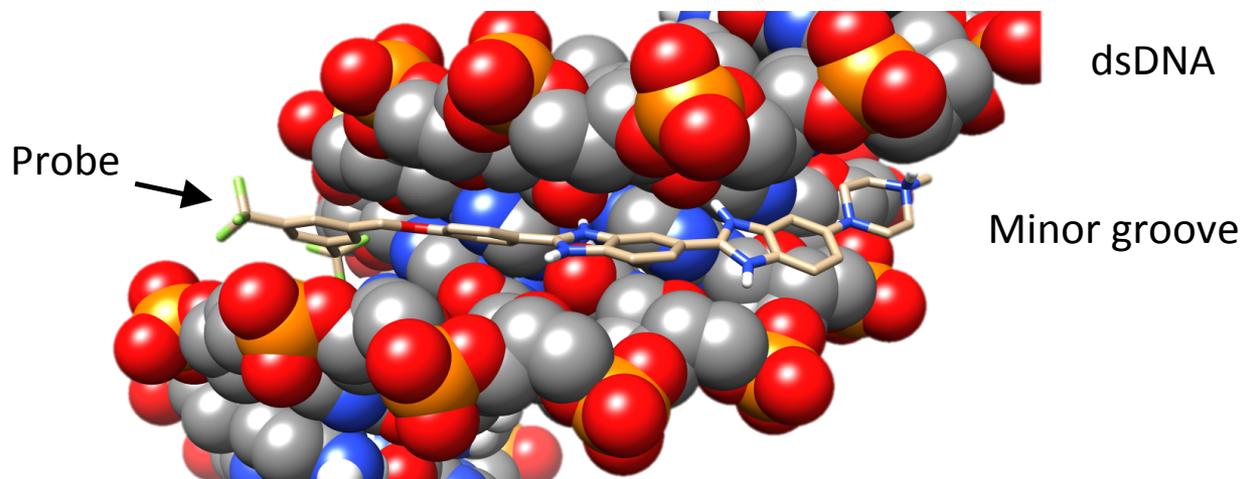
- 二重鎖DNAのAATT領域に結合
- DNAに結合すると蛍光強度が増加



# 核酸の同時・一斉計測

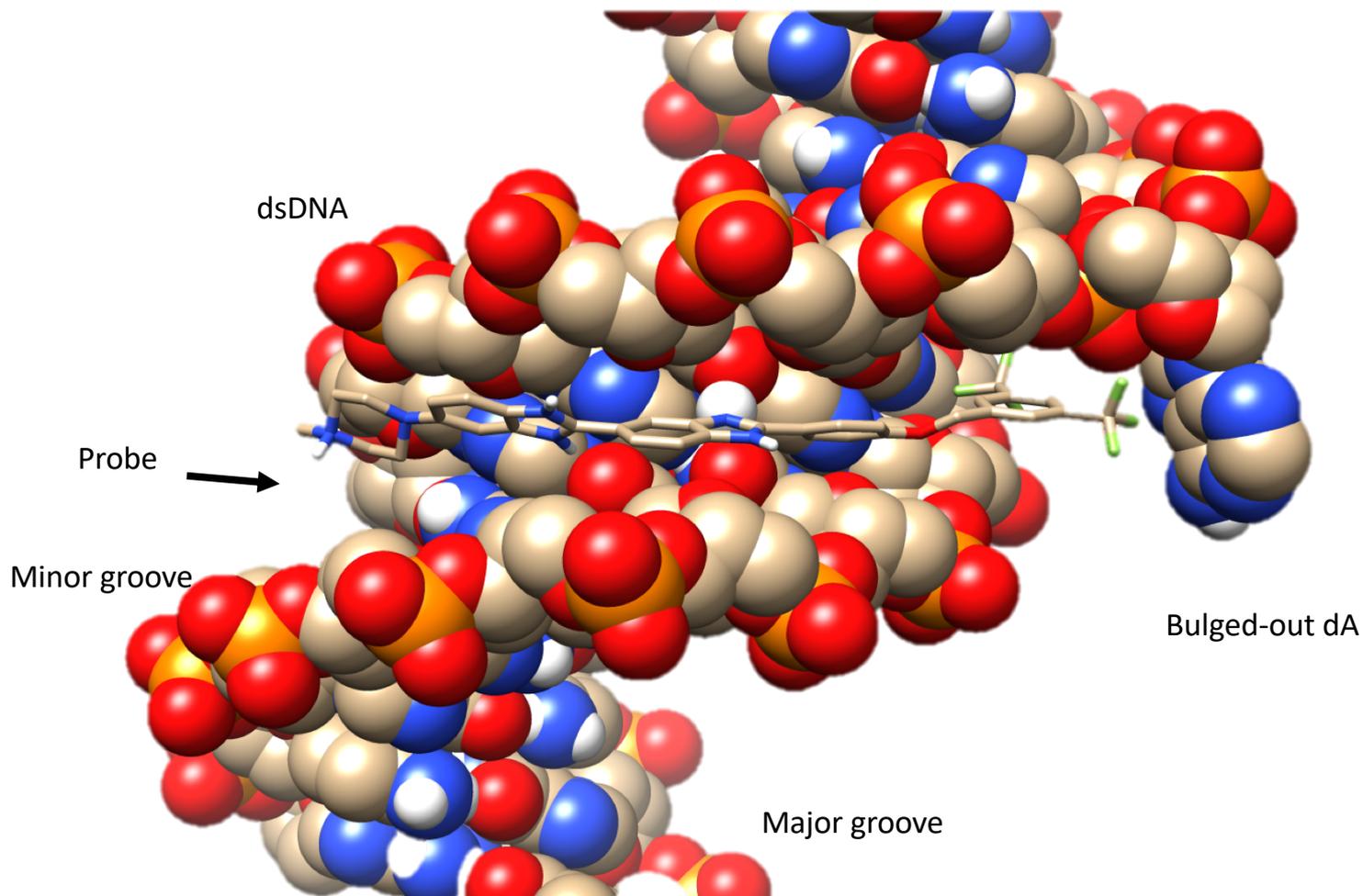


# なぜピークが割れるのか？



プローブはどちらの向きでも結合可能

# バルジを入れると配向がそろおう



$^{19}\text{F}$  NMRでバルジ塩基を判別できる？



# 本件に関する文献等

## 学術論文

Takashi Sakamoto, Daisaku Hasegawa, Kenzo Fujimoto

Fluorine-modified bisbenzimidazole derivative as a molecular probe for bimodal and simultaneous detection of DNAs by  $^{19}\text{F}$  NMR and fluorescence

*Chemical Communications*, **51**(42), 8749–8752 (2015)

Takashi Sakamoto, Daisaku Hasegawa, Kenzo Fujimoto

Simultaneous detection of single-nucleotide polymorphisms in a DNA bulge structure using fluorine-modified bisbenzimidazole derivative

*Analyst*, **141**(4), 1214–1217 (2016)

## 特許

坂本隆、藤本健造

「含フッ素化合物、それを用いる核酸検出方法」

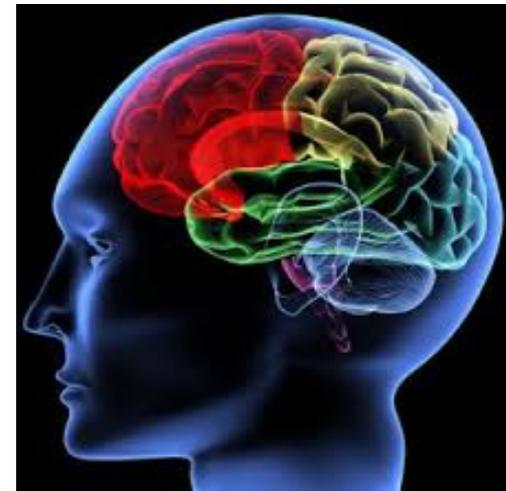
特願：2015-44611 (2015.3.6) 特開：2016-164130 (2016.9.8)

# 本日で紹介する技術

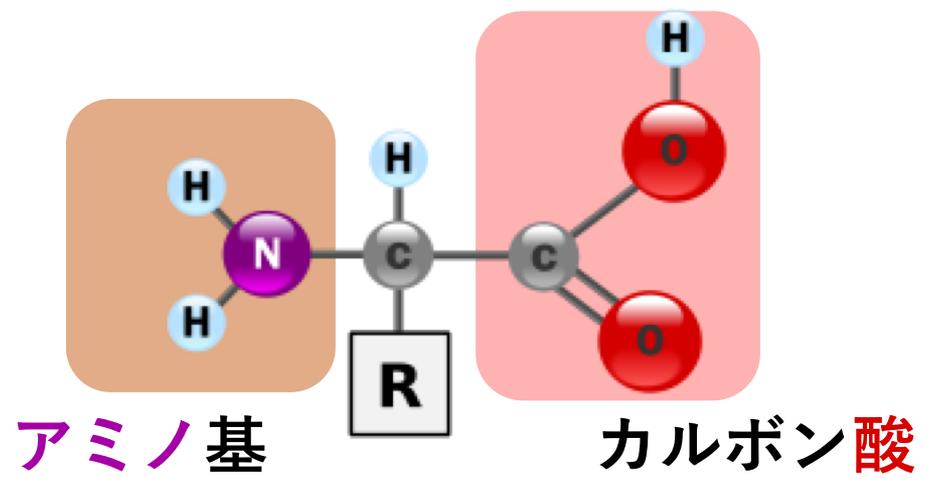
- ① 異なる配列を持つ核酸を同時・一斉に検出できる分子プローブ
- ② 複数のアミノ酸を同時・一斉に検出できる新しいアミノ酸分析法

# アミノ酸の役割

- ① タンパク質の原料になる
- ② 神経伝達物質として働く
- ③ その他さまざまな生理活性



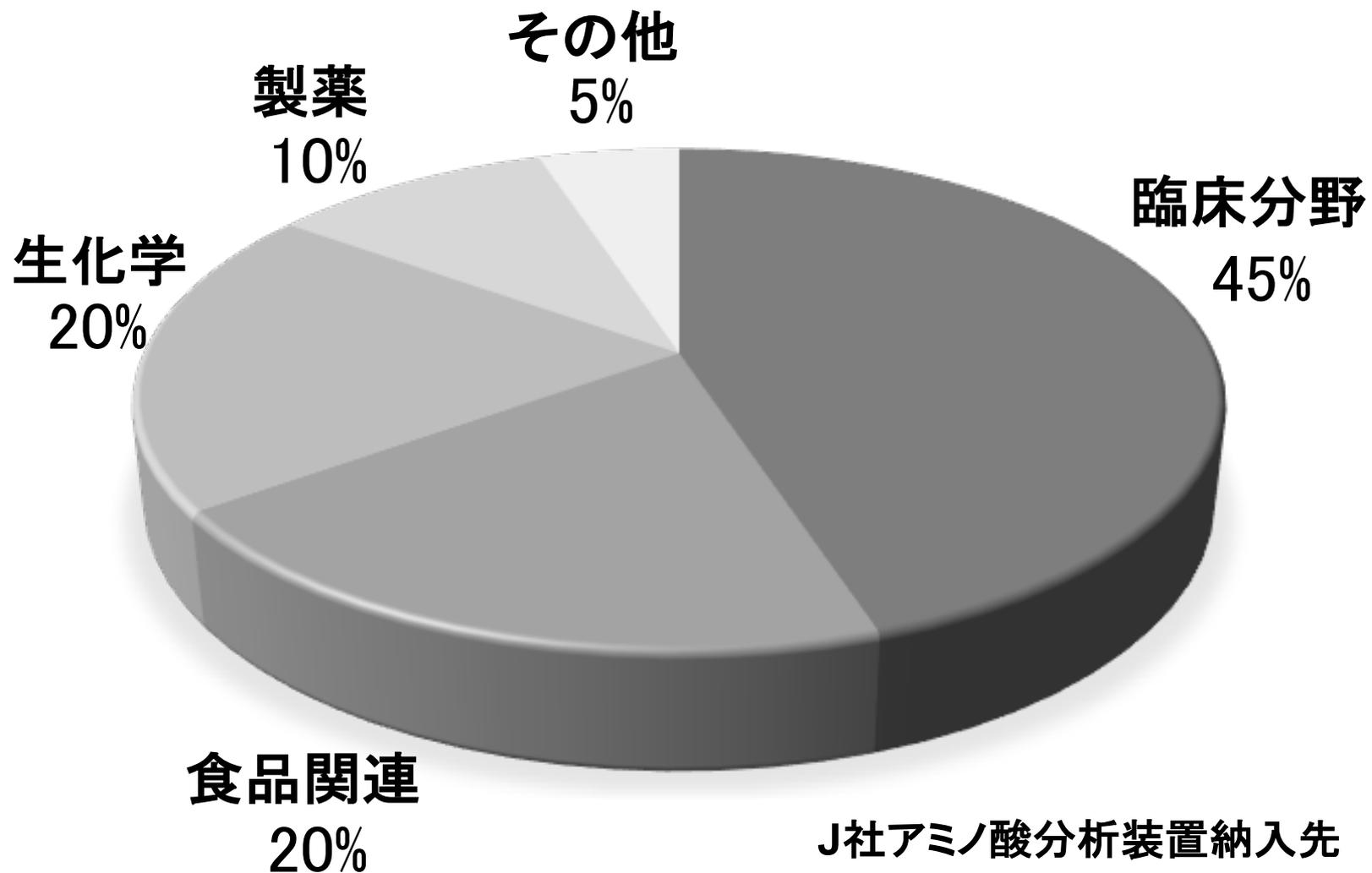
# アミノ酸の構造



<chem>[NH3+]CC(C)C(=O)[O-]</chem> Lysine Lys K	<chem>[NH3+]CC(C)CNC(=O)N</chem> Arginine Arg R	<chem>[NH3+]CC(C(=O)[O-])C(=O)[O-]</chem> Aspartic acid Asp D	<chem>[NH3+]CC(C)C(=O)[O-]</chem> Glutamic acid Glu E
<chem>[NH3+]CC(N)C(=O)[O-]</chem> Asparagine Asn N	<chem>[NH3+]CC(C)C(N)C(=O)[O-]</chem> Glutamine Gln Q	<chem>[NH3+]CC(O)C(=O)[O-]</chem> Serine Ser S	<chem>[NH3+]CC(C)C(O)C(=O)[O-]</chem> Threonine Thr T
<chem>[NH3+]CC1=CN=CNC1C(=O)[O-]</chem> Histidine His H	<chem>[NH3+]CC1=CC=CC=C1C(=O)[O-]</chem> Phenylalanine Phe F	<chem>[NH3+]CC(O)C1=CC=C(C=C1)C(=O)[O-]</chem> Tyrosine Tyr Y	<chem>[NH3+]CC1=CNC2=C1C=CC=C2C(=O)[O-]</chem> Tryptophan Trp W
<chem>[NH3+]CC(C)C(=O)[O-]</chem> Alanine Ala A	<chem>[NH3+]CC(C)C(C)C(=O)[O-]</chem> Valine Val V	<chem>[NH3+]CC(C)C(C)C(=O)[O-]</chem> Leucine Leu L	<chem>[NH3+]CC(C)C(C)C(=O)[O-]</chem> Isoleucine Ile I
<chem>[NH3+]CC(C)C(=O)[O-]</chem> Glycine Gly G	<chem>[NH3+]CC1CCNC1C(=O)[O-]</chem> Proline Pro P	<chem>[NH3+]CC(S)C(=O)[O-]</chem> Cysteine Cys C	<chem>[NH3+]CC(C)SCC(=O)[O-]</chem> Methionine Met M

**R** の化学構造が異なる多様なアミノ酸が存在する

# アミノ酸分析の応用分野



# 臨床分野におけるアミノ酸分析

## アミノインデックス<sup>®</sup>がんリスク診断

- 血中アミノ酸のバランスを調べることで様々ながんのリスクを診断
- 2015年の時点で940の医療機関で受診可能

Miyagi Y, et al., *PLoS ONE*, 2011, 6, e24143.  
<https://www.ajinomoto.co.jp/products/aminoindex.html>

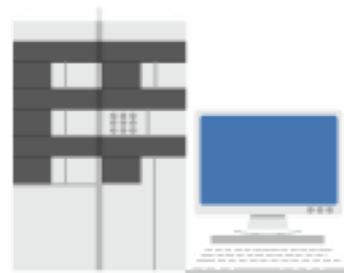
# 食品分野におけるアミノ酸分析

## 食品分析・品質管理

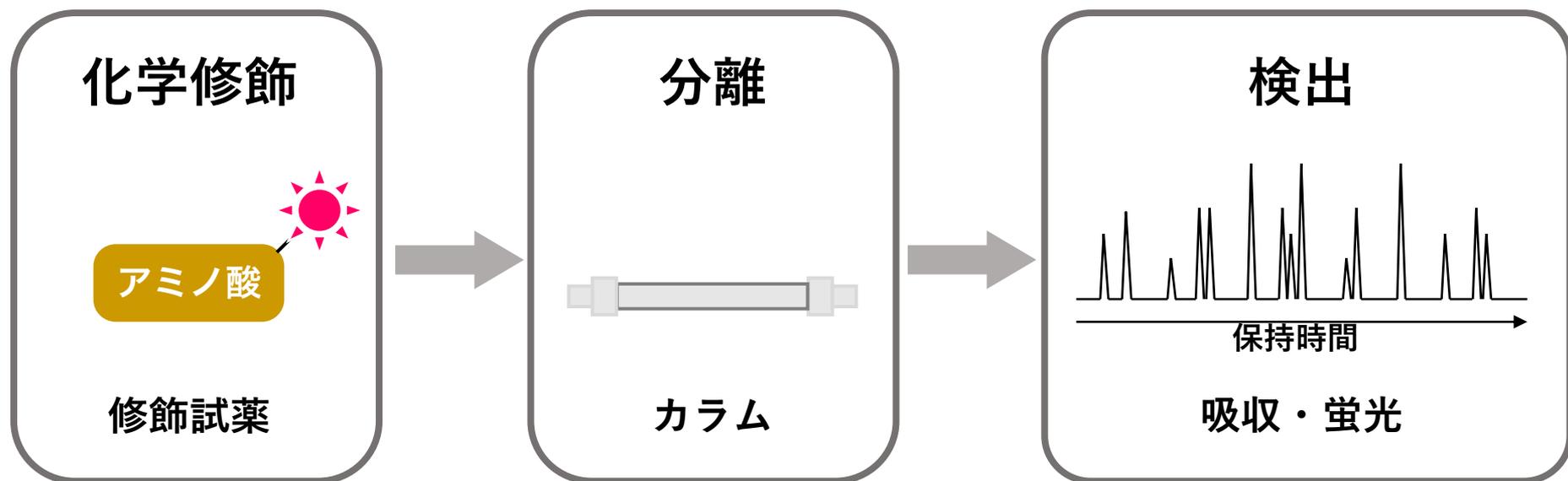
- 食品に含まれるアミノ酸を調べることで、  
味や栄養素を定量的に評価
- 健康食品などの品質管理に利用



# 従来のアミノ酸分析法



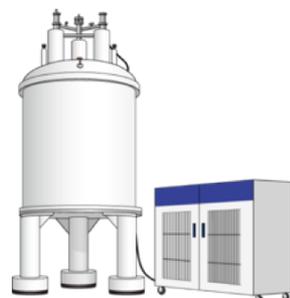
HPLC



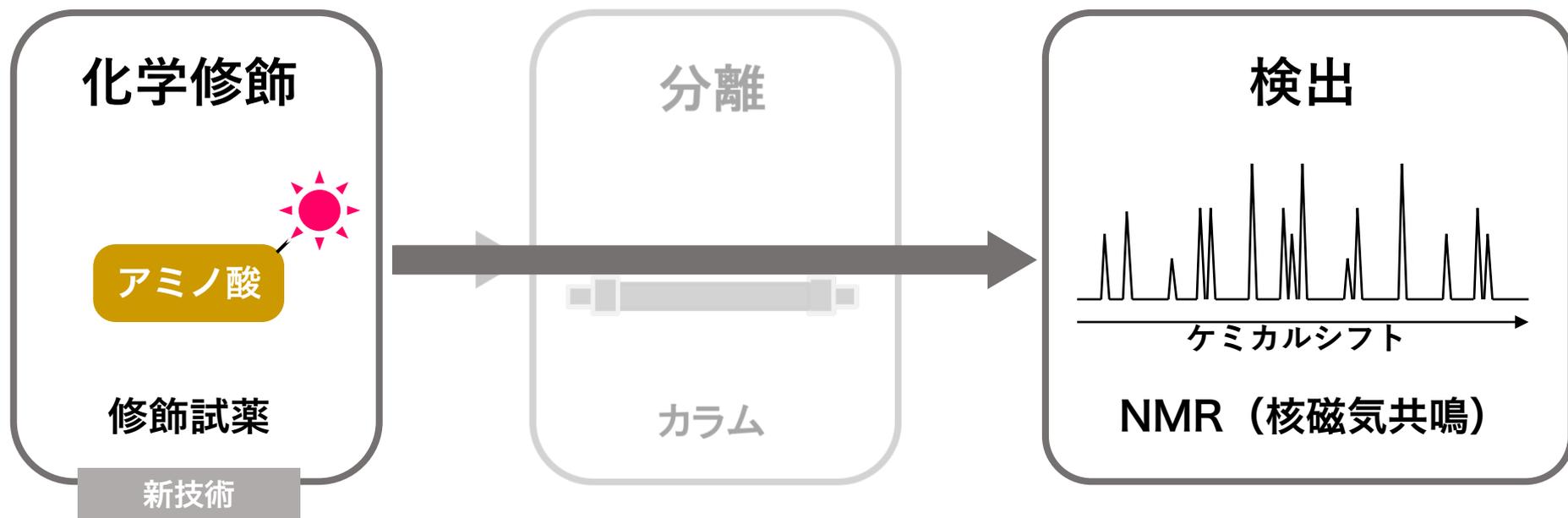
# 従来法の問題点

- 分析に時間がかかる（～60分）
- 劇物指定有機溶媒を使用（メタノール、アセトニトリルなど）
- 数多くの検体を処理するには不向き

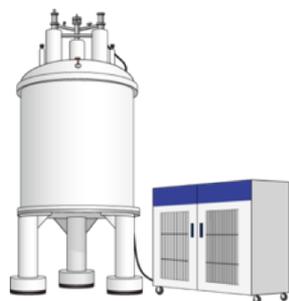
# 開発した新技術



## NMR (核磁気共鳴)



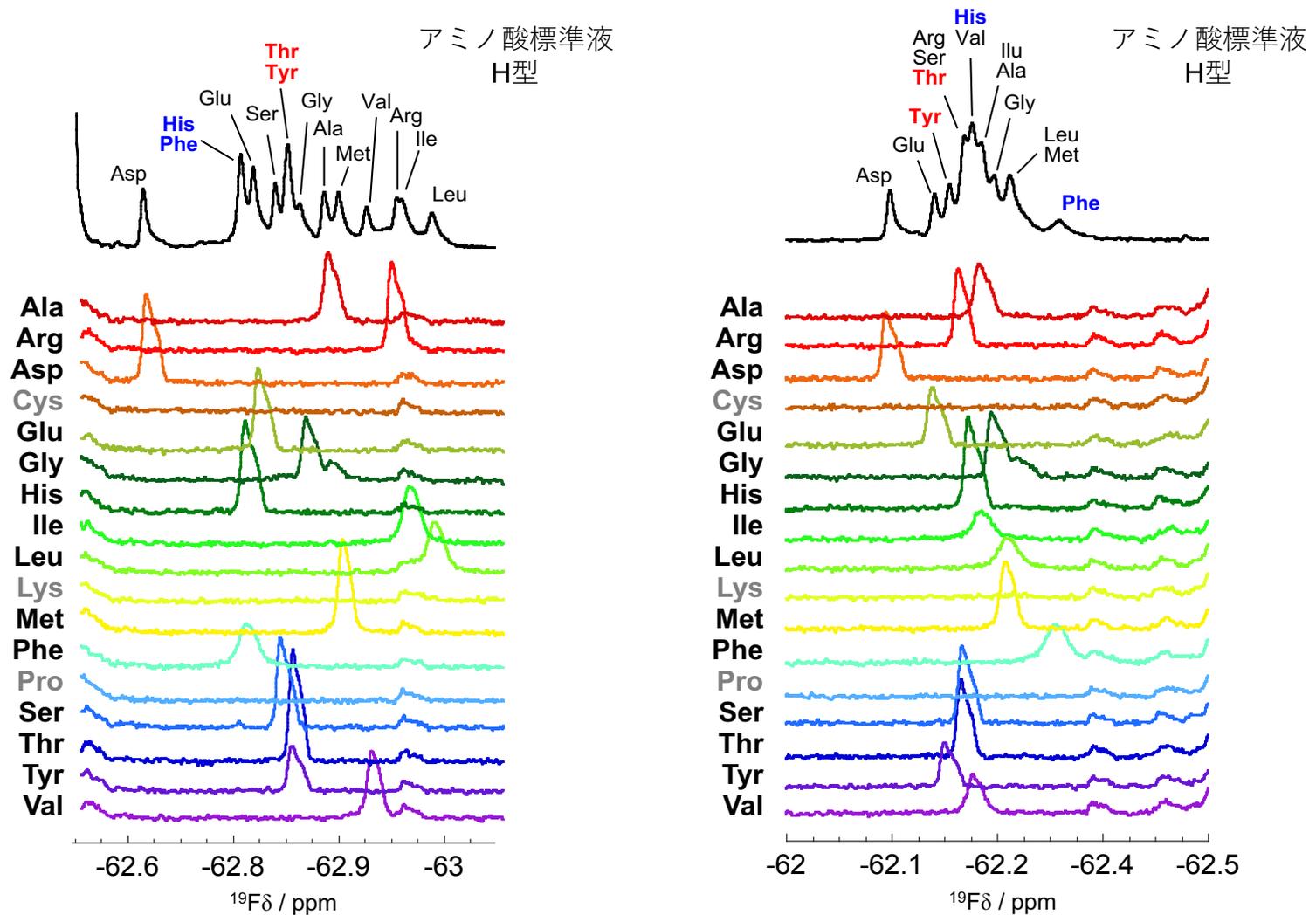
# 開発した新技術のポイント



NMR (核磁気共鳴)

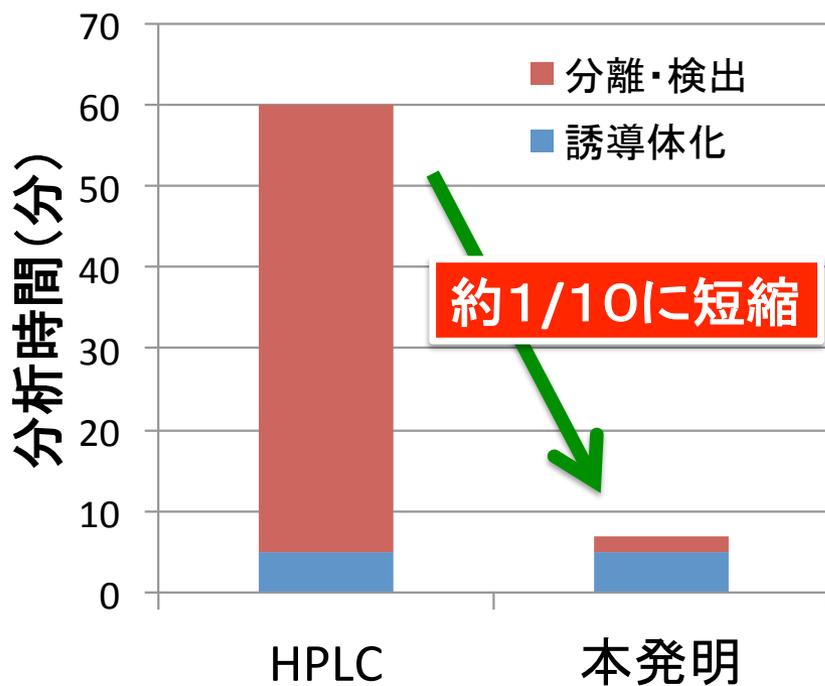
- アミノ酸をフッ素で修飾
- フッ素NMRスペクトル上で各アミノ酸を同時に分離・検出

# 実施例

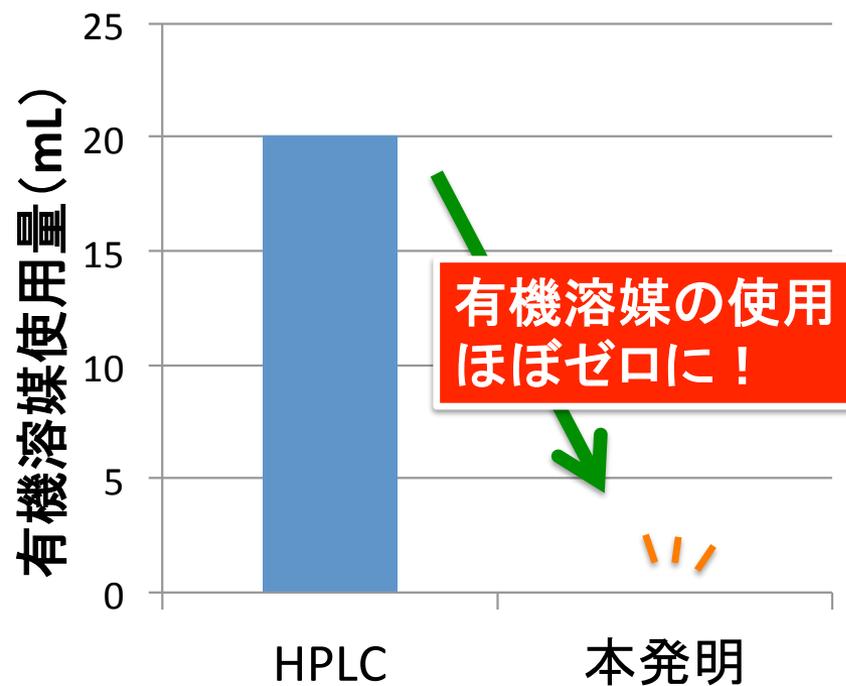


# 従来法との比較

## 分析に要する時間



## 劇物指定有機溶媒の使用



# 従来法との比較

- 分離することなくイッキに測定可能
- 従来法より10倍速く分析可能
- 劇物指定有機溶媒が不要（管理コストの低減）
- 夾雑な検体でも測定できる可能性

# 想定される用途

- 疾患診断の1次スクリーニング
- 食品や医薬品の品質管理
- 研究用試薬

# 実用化に向けた課題

- アミノ酸修飾反応条件の最適化
- 実際の検体（血液、食品など）を用いた実証
- 検体に応じたアミノ酸修飾反応条件の最適化

# 本件に関する知的財産

- 発明の名称：アミノ酸分析法
- 出願番号：特願 2016-173792
- 出願人：和歌山大学
- 発明者：坂本 隆

## お問い合わせ先

和歌山大学 産学連携イノベーションセンター

産学官連携コーディネーター 米田 則篤

TEL 073-457-7564

FAX 073-457-7550

e-mail [liaison@center.wakayama-u.ac.jp](mailto:liaison@center.wakayama-u.ac.jp)