

一般財団法人日本産業科学研究所
令和6年度研究助成 報告書

広島市立大学 大学院情報科学研究科 医用情報科学専攻
准教授・釘宮 章光

Email : kugimiya@hiroshima-cu.ac.jp

研究課題：農林水産・食品分野に貢献するアミノ酸計測用バイオセンサーの開発

<背景>

農産物、海産物、畜産物などの食品原料や、各種食品メーカーの製品開発・品質管理において、食料品や食品加工品中のアミノ酸濃度を計測することは鮮度、味、栄養などの重要な指標となる。また製品中のアミノ酸濃度を計測して「食品のおいしさ」などを数値化することで農産物などの生産者や食品メーカーの安定生産に繋がり、さらには消費者の食品への安心・安全を守るための重要な指標となる。本研究が実用化されたときのイメージを図1に示す。農場などの現場において食料品の鮮度や味などを簡単に評価可能であることを示している。

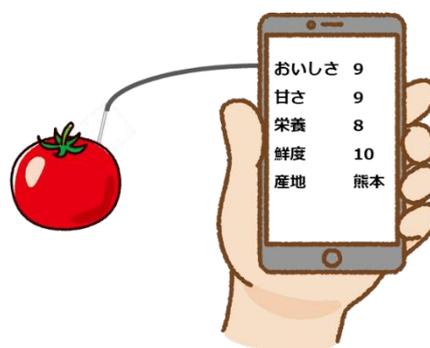


図1 本研究の完成のイメージ

畜産分野においても飼料中のアミノ酸をバランス良く配合することで家畜の栄養状態を改善でき、成長促進にもつながる。また家畜の血液中のアミノ酸を測定することで、例えば牛の栄養状態や未経産牛の受胎・不受胎判別などができると報告されており、家畜の健康診断にも役立てることができる。このような検体の分析を食品会社の工場内や牧場など「その場」において行うことは、農林水産・食品産業全般において非常に有効であり、必要とされている技術である。

<目的>

本研究の最終目標はアミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) を 20 種類のアミノ酸の識別分子に用いるアミノ酸センシング用デバイスを開発することであるが、本申請研究においては aaRS 酵素反応の反応場として紙を分離・反応媒体に用いて簡単に目的のアミノ酸を計測可能な「アミノ酸計測用ペーパーマイクロ流路デバイス (μ PAD)」を開発し、数種類のアミノ酸濃度が同時に計測可能なことを示すことを目的とする。

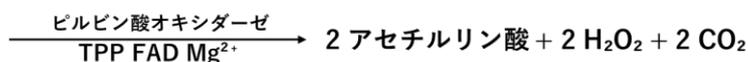
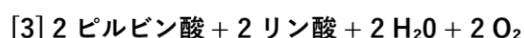
本申請研究期間においては、

- ・5種類以上のアミノ酸濃度が同時計測できる μ PADの開発

- ・食品や、家畜の血液中に存在するアミノ酸の濃度である 5~200 μM のアミノ酸が選択的に計測可能
 - ・天然調味料などの食品サンプルを用いて夾雑物質の存在下によるセンサーの応答を評価
- の各項目について検討を行った。

<研究内容と結果>

下に本研究で用いる酵素反応・呈色反応の式を示す。



ATP：アデノシン三リン酸、TPP：トリフェニルホスフィン、
FAD：フラビンアデニンヌクレオチド二ナトリウム、
TOOS：*N*-エチル-*N'*-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン

aaRS と基質のアミノ酸との反応により生成したピロリン酸を、呈色剤のトリンダー試薬を用いて反応させ、アミノ酸濃度に応じた呈色を USB カメラで撮影して応答の評価を行うというものである。

- ・5種類以上のアミノ酸濃度が同時計測できる μPAD の開発

図2に作製した5種類のアミノ酸を同時分析可能な μPAD のイラストを示す。つまり、赤で記した5か所のスポットにそれぞれのaaRSを塗布しておき、中央にサンプル溶液を滴下して毛細管現象により検出部位での呈色反応による色の濃淡を計測する、というものである。このように、1枚の μPAD 上で酵素反応と呈色反応をさせることができ、複数のアミノ酸が

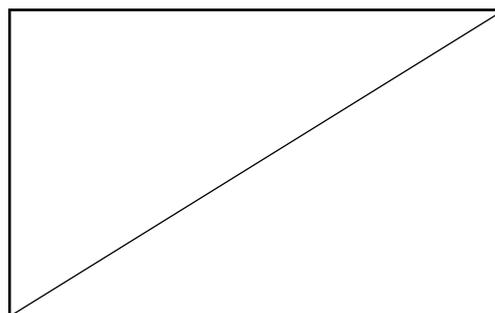


図2 5種類のアミノ酸が同時計測可能な μPAD

同時検出可能である。また、紙を用いることから、パソコンのプログラムに従いカッティングプロッター（保有装置）で切り出すことで容易に作製することができる。定量性の評価については、呈色反応による発色の色の濃淡を USB カメラで撮影して解析することで評価を行った。その結果を図3に示す。

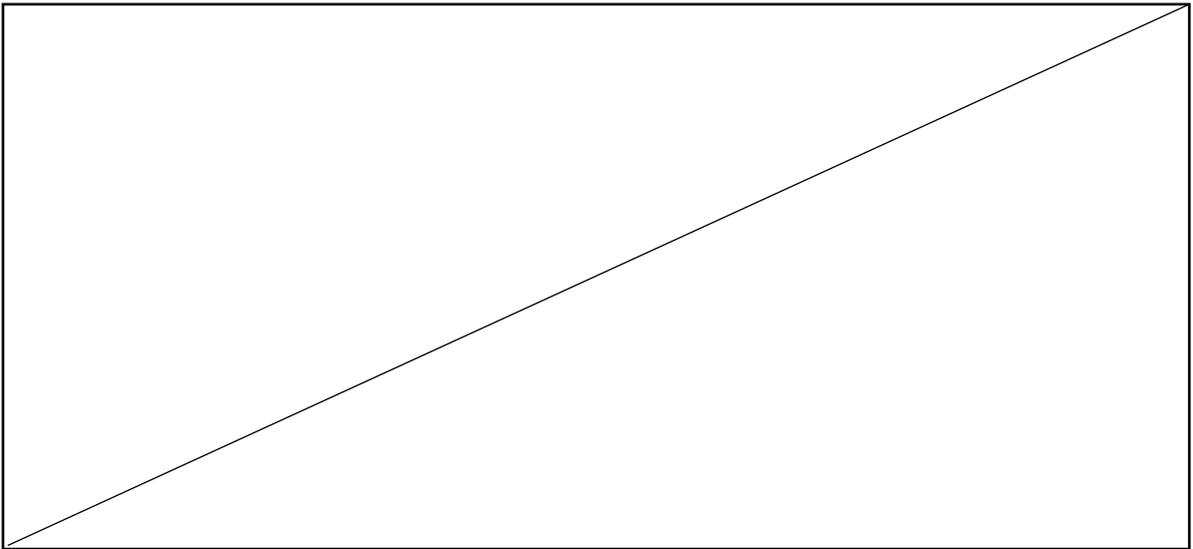
図3 5種類のアミノ酸計測用 μ PADの定量性の評価

図3左上は0, 50, 100 μ Mのバリン (Val) を中央のサンプルスポットに滴下したときのバリン、ロイシン (Leu)、イソロイシン (Ile)、フェニルアラニン (Phe)、チロシン (Tyr) 反応部の呈色の変化を示す。すると、Val 呈色部のみが濃度に応じて色が濃くなっているのがわかる。それをUSBカメラで撮影して色の濃淡を解析したところ、0~100 μ Mの間で直線性が得られ、 R^2 値も0.996以上と良好であった。ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシンについても同様に評価をおこない、0~100 μ Mの間で直線性が得られた。

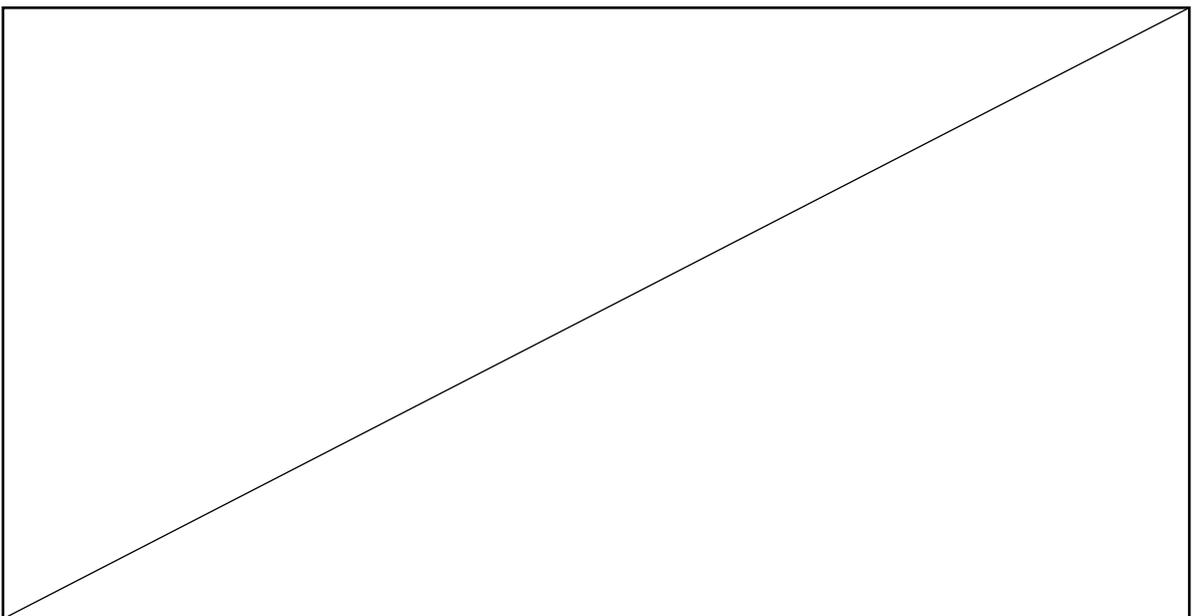
図4 5種類のアミノ酸計測用 μ PADの選択性の評価

図4に選択性の評価の結果を示す。その結果、それぞれ基質のアミノ酸については高い応答を示した一方、基質のアミノ酸でないものには低い応答しか示さなかった。このことから、aaRSをアミノ酸の識別分子に用いることで、各アミノ酸の分析が可能であることを示した。基質ではないアミノ酸の分析結果は若干ばらつきがみられるが、今後より詳細に検討を行う。

高濃度域の評価については、サンプルを希釈することで容易に計測できるため、「食品や、家畜の血液中に存在するアミノ酸の濃度である5~200 μM のアミノ酸が選択的に計測可能」の項目も達成できた。

- ・天然調味料などの食品サンプルを用いて夾雑物質の存在下によるセンサーの応答を評価

本研究期間内では実サンプルを用いる評価までは至らなかった。今後はスープやジュースなどの食品サンプルを用いてセンサーの応答について評価を行い、新規に開発したセンサーの応答について既存のアミノ酸分析装置（保有装置）などで得られた結果との整合性などについて評価を行う。

<まとめ>

本申請において、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5種類のアミノ酸濃度が同時計測できる μPAD の開発し、食品や、家畜の血液中に存在するアミノ酸の濃度である数 μM ~100 μM のアミノ酸が選択的に計測可能であることを示した。高濃度域についてはサンプルをバッファーなどの溶媒で薄めることで容易に対応可能である。今後はさらに詳細に計測可能な濃度域の検討や再現性の評価を行い、また実サンプルを用いる評価も行う予定である。

また、アミノ酸分析について農業・食品分野のほか、医療分野でのニーズ調査や、装置化を進める際の仕様設定および分析精度や定量限界などの評価を行う。今後もさらに農業・水産業・畜産関連の連携先企業を探索し、さらに計測機器の開発経験のある企業をも探索して産業化に向けて展開する予定である。