

(43) 国際公開日
2006年2月9日 (09.02.2006)

PCT

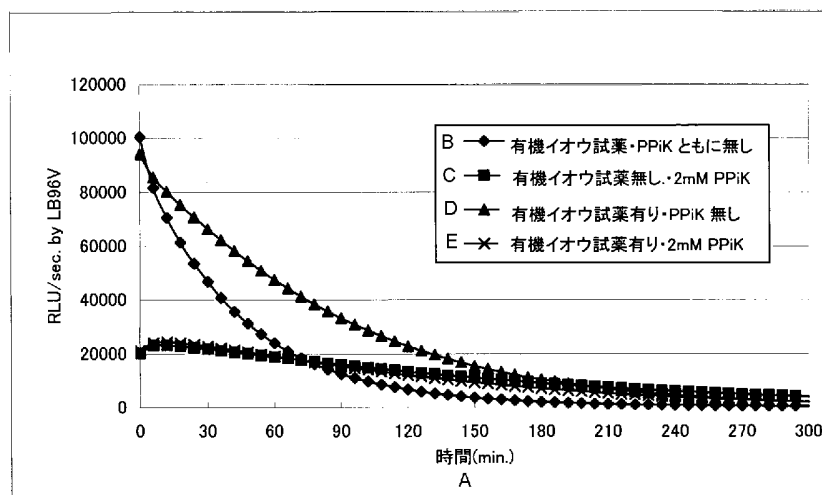
(10) 国際公開番号
WO 2006/013837 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12Q 1/66, G01N 21/78
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/014075
- (22) 国際出願日: 2005年8月2日 (02.08.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2004-229197 2004年8月5日 (05.08.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 東洋ビーネット株式会社 (TOYO B-NET CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1040031 東京都中央区京橋二丁目3番13号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 龍福 正行 (RYU-FUKU, Masayuki) [JP/JP]; 〒1040031 東京都中央区京橋二丁目3番13号 東洋ビーネット株式会社内 Tokyo (JP). 野村 亮介 (NOMURA, Ryosuke) [JP/JP]; 〒1040031 東京都中央区京橋二丁目3番13号 東洋ビーネット株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 間山 世津子, 外 (MAYAMA, Setsuko et al.); 〒2210835 神奈川県横浜市神奈川区鶴屋町3丁目30番の1 農機館4階 Kanagawa (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,

/ 続葉有 /

(54) Title: LUCIFERASE LUMINESCENCE METHOD AND LUMINESCENT REAGENT

(54) 発明の名称: ルシフェラーゼ発光方法および発光試薬



A... TIME (min)
B... NO ORGANOSULFUR REAGENT + NO PPIK
C... NO ORGANOSULFUR REAGENT + 2mM PPIK
D... ORGANOSULFUR REAGENT + NO PPIK
E... ORGANOSULFUR REAGENT + 2mM PPIK

(57) Abstract: It is intended to provide a stabilized luminescence system by extending the half-life of a luminescence reaction with the use of beetle luciferin/luciferase. A luciferin/luciferase luminescence method characterized by comprising reacting luciferin with beetle luciferase in the presence of pyrophosphoric acid and/or a pyrophosphoric acid salt to thereby cause luminescence with a luminescent half-time of 5 minutes or longer; a method of using the same, a luminescent reagent and a luminescent reagent kit.

/ 続葉有 /



SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 甲虫ルシフェリン／ルシフェラーゼを利用した発光反応の半減期を延長させ、安定化した発光系を提供する。ピロリン酸および／またはピロリン酸塩の存在下で、ルシフェリンと甲虫ルシフェラーゼを反応させ、発光半減期が5分以上である発光を生ぜしめることを特徴とする、ルシフェリン／ルシフェラーゼの発光方法。その利用法、発光試薬および発光試薬キットも提供される。

明 細 書

ルシフェラーゼ発光方法および発光試薬

技術分野

- [0001] 本発明は、甲虫ルシフェラーゼの発光反応を安定化させる方法、その利用法、および発光試薬に関する。本発明の発光試薬は、ルシフェラーゼ酵素をレポーターおよびシグナルとしたあらゆるルシフェラーゼアッセイ法、ならびにATPアッセイ法、さらにはルシフェリンアッセイ法に適用できる。

背景技術

- [0002] 従来、in vitro で甲虫ルシフェリン／ルシフェラーゼによる発光反応を行わせる際、その発光パターンはフラッシュ状に観察されるため、試薬注入の特別な機構を持つ装置を用いなければ発光反応を正確に測定することができなかった。
- [0003] これを改善すべく、ルシフェラーゼの検出方法(ルシフェラーゼアッセイ法)として補酵素A (Coenzyme A: CoA) 及びジチオスレイトール (DTT) などのチオール試薬類を用いる方法により発光の半減期をおよそ5分間と延長し、かつ発光量を増大させ得る手法が発明された(特許文献1参照)。この方法により、ルシフェラーゼによる発光量の正確な測定が試薬の自動注入装置を持たないルミノメーターや液体シンチレーションカウンターによっても可能となり、培養細胞の中でレポーターとして発現されたルシフェラーゼを高感度で測定するレポーターアッセイ法に広く用いられるようになった。
- [0004] しかし、薬剤の開発に向けた多検体のサンプルに対するHigh-throughput スクリーニング(HTS)にレポーターアッセイを適用する場合、発光半減期が5分間では試薬を随時添加してその度ごとに測定をしなければならないため、更なる発光半減期の延長が求められていた。それに対応して、ルシフェリン／ルシフェラーゼ反応系にAMPを共存させる方法(特許文献2参照)や炭酸ガスを溶存させる方法(特許文献3参照)が発明され、発光半減期を8時間まで延長させる系が報告されている。しかしながら、これらの何れの方法においても、反応溶液中に高価なCoAならびに5mM以上の高濃度のDTTなどチオール試薬を共存させる必要があった。これらチオール試薬類は構

造上SH基を持つため、特に高濃度の水溶液中では劣化し易く、溶存酸素などにより酸化もしくは劣化したチオール試薬類は、ルシフェリン／ルシフェラーゼ反応の効率を著しく阻害することが知られている。

[0005] これらCoAならびにDTTなどのチオール試薬を用いずに発光反応を改善する例として、ピロリン酸塩を反応系に加えることによる発光強度の増加が確認(文献4, 5、特許文献6参照)されてはいるが、発光反応の安定化に対する効果は見られなかった。また、甲虫ルシフェリン／ルシフェラーゼ発光反応の主要な用途として認知されている、試料中のATP量を発光反応により測定するATPアッセイ法における発光反応に対しては、ピロリン酸塩を反応系に加えても発光半減期の延長に対する効果は認められなかった。

[0006] 塩濃度を高めて発光反応を阻害することにより発光半減期を延長させる発明は為されてはいる(特許文献7参照)が、ルシフェラーゼアッセイ法ならびにATPアッセイ法、さらにはルシフェリンアッセイ法の何れに対しても適用可能な発光半減期を延長させる方法は見いだされていない。

[0007] 特許文献1:特許第3171595号公報

特許文献2:US5,866,348

特許文献3:US6,060,261

非特許文献4:J.Biol.Chem. 233, 1528-1537 (1958)

非特許文献5:Arch. Biochem.Biophys. 46, 399-416 (1953)

特許文献6:特開平8-47399号公報

特許文献7:US6,503,723

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、ルシフェリン／ルシフェラーゼの発光反応の半減期を延長させ、安定化した発光系を供給することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、ルシフェリン／ルシフェラーゼの発光反応にピロリン酸あるいはピロリン酸塩を介在させることにより、発光半減期を延長させ、発光反応を安定化させるこ

とに成功し、本発明を完成させるに至った。

[0010] 本発明の要旨は以下の通りである。

[0011] (1) ピロリン酸および／またはピロリン酸塩の存在下で、ルシフェリンと甲虫ルシフェラーゼを反応させ、発光半減期が5分以上である発光を生ぜしめることを特徴とする、ルシフェリン／ルシフェラーゼの発光方法。

[0012] (2) ピロリン酸および／またはピロリン酸塩が0.01mM～10mMの濃度で存在する、(1)記載のルシフェリン／ルシフェラーゼの発光方法。

[0013] (3) さらに、アデノシン三リン酸およびマグネシウムイオンが存在する、(1)記載のルシフェリン／ルシフェラーゼの発光方法。

[0014] (4) さらに、有機イオウ試薬が存在する、(1)～(3)のいずれかに記載のルシフェリン／ルシフェラーゼの発光方法。

[0015] (5) 有機イオウ試薬が10mM以下の濃度で存在する、(4)記載のルシフェリン／ルシフェラーゼの発光方法。

[0016] (6) (1)記載の方法を利用して、試料中の甲虫ルシフェラーゼ量を測定する方法。

[0017] (7) (1)記載の方法を利用して、試料中のATP量を測定する方法。

[0018] (8) (1)記載の方法を利用して、試料中のルシフェリン量を測定する方法。

[0019] (9) (1)記載の方法で発光を生ぜしめるための発光試薬であって、ピロリン酸および／またはピロリン酸塩を含む前記発光試薬。

[0020] (10) 試料中の甲虫ルシフェラーゼ量を測定するためのルシフェラーゼアッセイ試薬として用いられる、(9)記載の発光試薬。

[0021] (11) 試料中のATP量を測定するためのATPアッセイ試薬として用いられる、(9)記載の発光試薬。

[0022] (12) 試料中のルシフェリン量を測定するためのルシフェリンアッセイ試薬として用いられる、(9)記載の発光試薬。

[0023] (13) (9)記載の発光試薬を含む発光試薬キット。

[0024] 本発明者らは、発光甲虫によるin vitroルシフェリン／ルシフェラーゼ発光反応のキネティクスや発光強度に影響を与えるピロリン酸の効果を明らかにし、ピロリン酸が産業用途に適した発光反応系の制御に向けて有望な因子となる可能性を確認した。

[0025] 既に産業用途で広く活用されているホタルルシフェラーゼによる発光反応では、ピロリン酸の使用により発光強度ならびに発光半減期を制御できることを明らかにした。また、ピロリン酸を適切な濃度で使用するにより、ルシフェラーゼアッセイ法のみならず、ATPアッセイ法においても、実用化に広く用いられてきたCoAやDTTなどのチオール試薬を用いることなく、発光強度が一定で、数時間レベルの発光半減期を持つ、High-through put スクリーニング (HTS) 法で展開が可能な発光反応系の構築が可能となることを確認した。これは、初期発光反応を制御し、かつルシフェラーゼ酵素のターンオーバーを促進させるピロリン酸の2種類の作用によって、長時間にわたって発光反応を持続できる発光反応系が構築できたものと考えられる。しかしながら、本仮説の詳細な検証ならびに明確な作用メカニズムは未だ明らかとされていない。また、従来、CoAが存在する発光反応系では、DTTなどの有機イオウ試薬の存在が必要とされたが、ピロリン酸によって可能となった数時間レベルの発光半減期を持つ発光反応系において、有機イオウ試薬(実施例では、ジエチルジチオカルバミン酸ソーダを使用)が反応に及ぼす顕著な効果は確認されなかった。ピロリン酸を用いた発光反応系での有機イオウ試薬の役割についてもさらに詳細な検討が待たれる。

[0026] 本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願2004-229197号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

発明の効果

[0027] 本発明により、迅速性と高感度を特徴としていた従来のルシフェラーゼの発光測定法に代わり、持続性と安定性に優れた発光反応が可能となる。

[0028] 例えば、本発明により、ルシフェリン／ルシフェラーゼの発光反応の発光半減期を5分から6時間まで自在に制御することができる。

[0029] ルシフェリン／ルシフェラーゼの発光反応系にピロリン酸および／またはピロリン酸塩を添加することにより、発光半減期を2倍以上に延長することができる。

図面の簡単な説明

[0030] [図1]ルシフェラーゼ発光試薬における種々のピロリン酸カリウム濃度での、ルシフェリン／ルシフェラーゼ発光反応の発光強度の時間経過を示す。

[図2]ルシフェラーゼ発光試薬におけるピロリン酸カリウムの存在・不存在下でのルシ

フェリン／ルシフェラーゼ発光反応の発光強度の時間経過を示す。

[図3]ルシフェラーゼ発光試薬におけるピロリン酸カリウムおよびジエチルジチオカルバミン酸ソーダの存在・不存在下でのルシフェリン／ルシフェラーゼ発光反応の発光強度の時間経過を示す。

[図4]ATP発光試薬におけるピロリン酸カリウムおよびジエチルジチオカルバミン酸ソーダの存在・不存在下でのルシフェリン／ルシフェラーゼ発光反応の発光強度の時間経過を示す。

[図5]ルシフェラーゼ発光試薬におけるピロリン酸、ピロリン酸カリウムまたはピロリン酸ナトリウムの存在下・不在下でのルシフェリン／ルシフェラーゼ発光反応の発光強度の時間経過を示す。

[図6]ATP発光試薬におけるピロリン酸、ピロリン酸カリウムまたはピロリン酸ナトリウムの存在下・不在下でのルシフェリン／ルシフェラーゼ発光反応の発光強度の時間経過を示す。

発明を実施するための最良の形態

- [0031] 本発明で使用されるルシフェラーゼは、甲虫由来のホタル・ルシフェリン、即ち多複素式有機酸D-(一)-2-(6'ヒドロキシ-2'-ベンゾチアゾリル)- Δ 2-チアゾリン-4-カルボン酸(以降は特に記載のない限り「ルシフェリン」と表記する)を発光基質とし、これを酸化触媒して光子を発する酵素で、ホタル科を始め、コメツキ科、ホタルモドキ科、イリオモテボタル科など甲虫由来で発光反応に与る酵素全てを含む。この中には組換えDNA技術や変異技術などにより、酵素タンパク自体の安定性や発光特性などが人為的に改変された酵素も含まれる。
- [0032] ルシフェリン／ルシフェラーゼの発光反応系におけるルシフェラーゼの濃度は、ルシフェラーゼアッセイ法の場合、100 femto g/mL $\sim$ 100 μ g/mLが適当であり、好ましくは1pg/mL $\sim$ 10 μ g/mLである。またATPアッセイ法やルシフェリンアッセイ法の場合、0.1 μ g/mL $\sim$ 100 μ g/mLが適当であり、好ましくは1 μ g/mL $\sim$ 20 μ g/mLである。
- [0033] 本発明で使用するルシフェリンは、上記の甲虫ルシフェリンであり、甲虫より直接抽出および精製されたものや、化学合成されたものを含む。さらには甲虫ルシフェリンの誘導体で、ある酵素の消化を受けた後に発光活性を持つ発光基質も含まれる。こ

のような甲虫ルシフェリンの誘導体としては、4-メチル-D-ルシフェリン、D-ルシフェニル-L-メチオニン、6-O-ガラクトピラノシル-ルシフェリン、DEVD-ルシフェリン、ルシフェリン-6'メチルエステル、ルシフェリン6'-クロロエチルエステル、6'-デオキシルルシフェリン、ルシフェリン6'ベンジルエステルなどを挙げることができる。ルシフェリンおよびその誘導体は塩の形態であってもよい。塩としては、カリウム塩、ナトリウム塩などを挙げることができる。

- [0034] ルシフェリン／ルシフェラーゼの発光反応系におけるルシフェリンの濃度は、0.001 mM～100 mMが適当であり、好ましくは0.01 mM～10 mMである。
- [0035] 本発明で使用するピロリン酸および／またはピロリン酸塩は、水溶性のものが好ましく、溶液のピロリン酸を初め、ピロリン酸ナトリウム、ピロリン酸カリウム、ピロリン酸アンモニウム、ピロリン酸水素ナトリウムなどを用いることができる。
- [0036] ピロリン酸および／またはピロリン酸塩の使用濃度は、0.0001 mMから100 mMが適当であり、好ましくは0.001 mMから10 mMである。
- [0037] 本発明のルシフェリン／ルシフェラーゼの発光反応においては、さらに、有機イオウ試薬、アデノシン三リン酸、マグネシウムイオンを添加してもよい。また、緩衝成分を添加してもよい。
- [0038] 本発明で用いる有機イオウ試薬は、一般的には還元剤としてルシフェラーゼ酵素を保護する作用があると考えられている。有機イオウ試薬としては、ジチオカルバミン酸塩類、キサントゲン酸塩類、チオリン酸塩、チアゾール類、さらにはチオール試薬などを挙げることができる。
- [0039] ジチオカルバミン酸塩類としては、ペンタメチレンジチオカルバミン酸ピペリジン、メチルペンタメチルジチオカルバミン酸ピペコリン、ジメチルジチオカルバミン酸亜鉛、ジエチルジチオカルバミン酸亜鉛、ジブチルジチオカルバミン酸亜鉛、エチルフェニルジチオカルバミン酸亜鉛、ジメチルジチオカルバミン酸ソーダ、ジエチルジチオカルバミン酸ソーダ、ジブチルジチオカルバミン酸ソーダ、ジメチルジチオカルバミン酸カリ、ジメチルジチオカルバミン酸銅、ジメチルジチオカルバミン酸鉄、エチルフェニルジチオカルバミン酸鉛、ジエチルジチオカルバミン酸セレン、ジエチルジチオカルバミン酸テルル、ジエチルジチオカルバミン酸アンモニウムなどを挙げることができるが、金

属塩はこれに限定されることは無く目的に応じて周期律表に記載の金属塩であれば使用可能である。

- [0040] キサントゲン酸塩類としては、キサントゲン酸カリウム、ブチルキサントゲン酸亜鉛、イソプロピルキサントゲン酸ソーダなどを挙げることができるが、これに限定されることはなく、周期律表に記載の金属と塩が形成可能であれば使用可能である。
- [0041] チオリン酸塩としては、ピペリジニービスー(o, o-ジステアリルジチオフォスフェート)などを挙げることができる。
- [0042] チアゾール類としては2-メルカプトベンゾチアゾール、2-メルカプトベンゾチアゾール亜鉛塩、2-メルカプトベンゾチアゾールナトリウム塩、2-メルカプトベンゾチアゾールシクロヘキシルアミン塩、2-メルカプトベンゾチアゾール銅塩などを挙げることができるが、これに限定されることは無く、周期律表に記載の金属と塩あるいは錯体を形成可能なら使用可能である。
- [0043] 本発明においては、CoAやDTTなどのチオール試薬類を用いない反応系でも、ピロリン酸及び／又はその塩の添加により、フラッシュ発光を抑えたグロー発光反応へ改良することが可能であるが、DTT、ジチオエリトルール、 β メルカプトエタノール、2-メルカプトプロパノール、3-メルカプトプロパノール、2, 3-ジチオプロパノール、グルタチオン、CoAなどのチオール試薬類を使用してもよい。これらのチオール試薬類を添加する場合には、CoAの濃度は、500 μ M以下、好ましくは、300 μ M以下にすることができる。また、DTTの濃度は、50 mM以下、好ましくは、10 mM以下にすることができる。
- [0044] 有機イオウ試薬は単独で使用することもできるが、混合して使用することも可能である。
- [0045] 有機イオウ試薬の使用濃度は、0 mM～50 mMが適当であり、好ましくは0.01 mM～10 mMであるが、2 mM以下の濃度で使用する事が可能である。場合によっては、有機イオウ試薬を添加しなくてもよい。
- [0046] アデノシン三リン酸は、ルシフェラーゼとの反応により、ルシフェリンからルシフェリル-AMP(アデニレート)を生成し、発光反応に寄与する。アデノシン三リン酸は塩の形態であってもよい。塩としては、2ナトリウム塩、2カリウム塩、マグネシウム塩などを挙

げることができる。

- [0047] アデノシン三リン酸の使用濃度は、0.01pM～50 mMが適当であり、好ましくは0.01 mM～10 mMである。
- [0048] マグネシウムイオンは、発光反応の補因子として考えられている。マグネシウムイオンを含む化合物としては、塩化マグネシウム、炭酸水酸化マグネシウム、硫酸マグネシウム、酢酸マグネシウム、リン酸水素マグネシウムなどを挙げることができる。
- [0049] マグネシウムイオンの使用濃度は、0.001 mM～100 mMが適当であり、好ましくは0.1 mM～50 mMである。
- [0050] 緩衝成分は、pHの安定化、発光反応の最適化の効果を奏する。緩衝成分としては、トリスー硫酸、Tricineなどを挙げることができる。緩衝成分の種類は、発光反応を利用する各種アッセイの種類に応じて決めるとよい。
- [0051] 緩衝成分の使用濃度は、1 mM～500 mMが適当であり、好ましくは5 mM～100 mMである。
- [0052] 発光反応の制御に寄与するのは、上記成分がメインであるが、その他、培養細胞の溶解に必要な界面活性剤やグリセリンなど、発光反応の利用法に応じてさまざまな組成を添加することができる。
- [0053] ルシフェリン／ルシフェラーゼの発光反応は、20℃～25℃の温度で、pH5.0～8.5の条件下で行うとよい。
- [0054] 本発明のルシフェリン／ルシフェラーゼ発光反応において、発光半減期を5分以上、10分以上、30分以上、1時間以上または2時間以上(例えば6時間)に制御することができる。
- [0055] また、本発明のルシフェリン／ルシフェラーゼ発光反応において、ピロリン酸及び／又はピロリン酸塩を添加しない場合と比較して、発光半減期を2倍以上、4倍以上、12倍以上、24倍以上または48倍以上(例えば144倍)に制御することができる。
- [0056] 本発明の方法によるルシフェリン／ルシフェラーゼの発光反応は、甲虫ルシフェラーゼ量の測定(ルシフェラーゼアッセイ法)、ATP量の測定(ATPアッセイ法)、ルシフェリン量の測定(ルシフェリンアッセイ法)などに利用することができる。
- [0057] ルシフェラーゼアッセイ法は、レポーター遺伝子にルシフェラーゼ遺伝子を用いて

その発光活性を測定することにより、遺伝子の転写活性を調べる方法である。例えば、解析対象のプロモーター下流にルシフェラーゼ遺伝子を結合させたベクターを培養細胞にトランスフェクションし、培養を行う。細胞の増殖過程で、プロモーターの転写活性が強ければ細胞内に多くのルシフェラーゼ酵素が産生され、また、活性が弱ければルシフェラーゼ酵素の産生量が低下する。本発明の方法によるルシフェリン／ルシフェラーゼの発光反応により、ルシフェラーゼ酵素の量を高感度かつ簡便に定量することができる。ルシフェラーゼアッセイ法は、遺伝子発現の解析（プロモーター、エンハンサーの転写活性解析）、細胞中のmRNAの作用機序の解析、レセプターなど遺伝子調節機能を持つ蛋白質の構造と作用機序の解明、トランスジェニック植物における器官特異的な発現様式の解析などに利用することができる。

[0058] ATPアッセイ法は、ATP量を測定する方法である。ATPとはAdenosine triphosphate（アデノシン三リン酸）の略称で、分子量507.2の高エネルギー物質であり、生物の種々の代謝活動に関与している。生物は食物から吸収した物質を用い、代謝経路を介してATP等の化合物を合成し、エネルギーを一時ATPという形で体内に貯蔵し、必要に応じてATPを分解し、エネルギーを得る。このATPを迅速、高感度に測定するために、ルシフェリン／ルシフェラーゼ反応を利用することができる。ルシフェリン／ルシフェラーゼ反応はATP量に依存する反応である。ルシフェリンとATPが反応し、アデニル酸ルシフェリンとなり、このアデニル酸ルシフェリンと酸素がルシフェラーゼ酵素の存在下で酸化的脱炭酸反応により分解され、この反応の過程において得られるエネルギーの一部が発光という反応として現れる。この発光を定量することでATPの定量を行う。

[0059] [化1]

甲虫ルシフェラーゼ発光反応

ルシフェラーゼ酵素



[0060] 本発明の方法によるルシフェリン／ルシフェラーゼの発光反応により、ATPの定量を高感度かつ簡便に行うことができる。このATPアッセイ法は、ATPaseなどの酵素活性の測定、生きている微生物の定量、生きている細胞の定量などに利用することがで

きる。

- [0061] ルシフェリンアッセイ法は、ルシフェラーゼが触媒することによって発光反応を生じる発光基質ルシフェリン量を測定する方法である。甲虫由来のホタル・ルシフェリンは発光甲虫の発光器官にしか存在しない分子量280.3の化合物であり、その基本構造の周囲に位置する置換基に修飾を施した化合物は発光活性を持たないことが広く知られている。そこで、ルシフェリンの置換基にガラクトースを結合させた6-O-ガラクトピラノシルルシフェリンは、ルシフェラーゼ酵素や充分量のATPが存在しても発光反応は生じない。しかし、 β -ガラクトシダーゼによる酵素反応が行われ6-O-ガラクトピラノシルが遊離することにより発光活性を持つD-ルシフェリンが生じる。このD-ルシフェリン量をルシフェリン／ルシフェラーゼの発光反応による発光量を測定すれば、D-ルシフェリン量の生成量すなわち β -ガラクトシダーゼの酵素活性が測定できる。本アッセイ法はルシフェリン／ルシフェラーゼの発光反応を用いていることから、従来法の呈色反応に比べ高感度による酵素活性の測定が可能となる。この方法の適用例としては、ルシフェリン6'-クロロエチルエステル、6'-デオキシルシフェリン、ルシフェリン6'-ベンジルエステル、からD-ルシフェリンを生成・定量するキナーゼ活性の測定、またDEVD-ルシフェリンによるカスパーゼ活性の測定法などがある。
- [0062] 本明細書において、「発光半減期」とは、発光量が最大発光量の1/2になるのに要する時間をいう。発光半減期は、経時発光量を測定することにより、求めることができる。ルシフェリン／ルシフェラーゼの発光反応の発光量は、公知の方法により測定することができる。例えば、市販のルミノメーターにより発光強度を測定する。
- [0063] 発光量の測定は、所望の期間にわたり、所望の時間間隔で行えばよい。例えば、ルシフェラーゼアッセイ法においては、発光反応の開始2秒後から、1～20秒間の積算発光の測定、または薬剤の開発に向けた多検体のサンプルに対するHigh-throughput スクリーニング (HTS) では、発光反応開始から8時間までの0.1秒から10秒間あたりのそれぞれの検体からの発光量が測定される。
- [0064] ATPアッセイ法においては、発光反応の開始2秒後から、1～20秒間の積算発光の測定、または薬剤の開発に向けた多検体のサンプルに対するHigh-throughput スクリーニング (HTS) では、発光反応開始から5時間までの0.1秒から10秒間あたりのそれ

それぞれの検体からの発光量が測定される。

[0065] ルシフェリンアッセイ法においては、発光反応の開始2秒後から、1～20秒間の積算発光の測定、または薬剤の開発に向けた多検体のサンプルに対するHigh-throughputスクリーニング(HTS)では、発光反応開始から5時間までの0.1秒から10秒間あたりのそれぞれの検体からの発光量が測定される。

[0066] 本発明は、本発明の方法で発光を生ぜしめるための発光試薬であって、ピロリン酸および／またはピロリン酸塩を含む前記発光試薬も提供する。本発明の発光試薬は、試料中の甲虫ルシフェラーゼ量を測定するためのルシフェラーゼアッセイ法、試料中のATP量を測定するためのATPアッセイ法、試料中のルシフェリン量を測定するためのルシフェリンアッセイ法などに使用することができる。本発明の発光試薬は、ピロリン酸および／またはピロリン酸塩の他、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、アデノシン三リン酸、有機イオウ試薬、マグネシウムイオン、緩衝成分、その他の成分(例えば、培養細胞の溶解に必要な界面活性剤、グリセリンなど)を含んでもよい。本発明の発光試薬に含まれるこれらの成分は上記の通りである。本発明の発光試薬は、各成分を溶解した水溶液状態であってもよいし、凍結乾燥した状態であってもよい。水溶液状態の発光試薬は凍結品として供給し、解凍後十分に室温に戻した後に使用するとよい。また、発光試薬を凍結乾燥する場合には、試薬成分の内、溶液中では比較的不安定な成分(ルシフェリン、ルシフェラーゼ、アデノシン三リン酸など)のみを凍結乾燥し(これを試薬Aとする)、ピロリン酸および／またはピロリン酸塩の他、有機イオウ試薬、マグネシウムイオン、緩衝成分、その他の成分(例えば、培養細胞の溶解に必要な界面活性剤、グリセリンなど)それぞれを使用時の溶液と同じ濃度となるように水に溶解した水溶液(これを試薬Bとする)とに分けて、凍結乾燥品(試薬A)を冷凍保存、また水溶液(試薬B)を冷蔵または冷凍保存するとよい。この場合、試薬Bを十分に室温に戻した後、試薬Aに加えて溶解し、溶液状態にしてから、使用するとよい。

[0067] 本発明の発光試薬における組成の例を以下の表にまとめる。

[0068] [表1]

表1. ルシフェラーゼアッセイ法に用いられる発光試薬（ルシフェラーゼアッセイ試薬）の組成

	好ましい範囲	適当な範囲
ピロリン酸、ピロリン酸塩	0.001 mM～ 10 mM	0.0001 mM～ 100 mM
ルシフェリン	0.01 mM～10 mM	0.001 mM～ 100 mM
アデノシン三リン酸	0.01 mM～ 1 mM	0.001 mM～ 10 mM
有機イオウ試薬	0.1 mM～10 mM	0.01 mM～ 50 mM
マグネシウムイオン	0.1 mM～50 mM	0.01 mM～100 mM
緩衝成分	5 mM～100 mM	1 mM～500 mM

溶媒：水(Milli-Q 水)

pH 5.0～8.5

- [0069] 以上の組成を持つ発光試薬をキット化する場合は、上記組成の溶液を凍結させた1液系の凍結品として供給するとよい。これは-70℃以下で保存し、解凍後十分に室温に戻した後に使用する。また上記成分の内、溶液中では比較的不安定な成分であるルシフェリン、アデノシン三リン酸などを凍結乾燥した試薬Aと、使用直前にその他の成分から成る試薬Bを加え溶解させて使用する2液系の試薬キットとしても供給できる。この場合、凍結乾燥品の試薬Aは-20℃で、また試薬Bは冷蔵(4℃)または冷凍(-20℃)で保存される。

[0070] [表2]

表2. ATP アッセイ法に用いられる発光試薬（ATP アッセイ試薬）の組成

	好ましい範囲	適当な範囲
ピロリン酸、ピロリン酸塩	0.001 mM～10 mM	0.0001 mM～100mM
ルシフェリン	0.01 mM～10 mM	0.001 mM～100 mM
ルシフェラーゼ	1 μ g/mL～20 μ g/mL	0.1 μ g/mL～100 μ g/mL
有機イオウ試薬	0.1 mM～10 mM	0.01 mM～50 mM
マグネシウムイオン	0.1 mM～50 mM	0.01 mM～100 mM
緩衝成分	5 mM～100 mM	1 mM～500 mM

溶媒：水(Milli-Q 水)

pH 5.0～8.5

- [0071] 以上の組成を持つ発光試薬をキット化する場合は、上記組成の溶液を凍結させた1液系の凍結品として供給するとよい。これは-70℃以下で保存し、解凍後十分に室温に戻した後に使用する。また上記成分の内、溶液中では比較的不安定な成分であるルシフェリン、ルシフェラーゼなどを凍結乾燥した試薬Aと、使用直前にその他の成分から成る試薬Bを加え溶解させて使用する2液系の試薬キットとしても供給できる

。この場合、凍結乾燥品の試薬Aは-20℃で、また試薬Bは冷蔵(4℃) または冷凍(-20℃)で保存される。

[0072] [表3]

表3. ルシフェリンアッセイ法に用いられる発光試薬(ルシフェリンアッセイ試薬)の組成

	好ましい範囲	適当な範囲
ピロリン酸、ピロリン酸塩	0.001 mM~10 mM	0.0001 mM~100 mM
ルシフェラーゼ	1 μ g/mL~ 20 μ g/mL	0.1 μ g/mL~100 μ g/mL
アデノシン三リン酸	0.01 mM~1 mM	0.001 mM~10 mM
有機イオウ試薬	0.1 mM~10 mM	0.01 mM~50 mM
マグネシウムイオン	0.1 mM~50 mM	0.01 mM~100 mM
緩衝成分	5 mM~100 mM	1 mM~500 mM

溶媒: 水(Milli-Q 水)

pH 5.0~8.5

[0073] 以上の組成を持つ発光試薬をキット化する場合は、上記組成の溶液を凍結させた1液系の凍結品として供給するとよい。これは-70℃以下で保存し、解凍後十分に室温に戻した後に使用する。また上記成分の内、溶液中では比較的不安定な成分であるルシフェラーゼ、アデノシン三リン酸などを凍結乾燥した試薬Aと、使用直前にその他の成分から成る試薬Bを加え溶解させて使用する2液系の試薬キットとしても供給できる。この場合、凍結乾燥品の試薬Aは-20℃で、また試薬Bは冷蔵(4℃) または冷凍(-20℃)で保存される。

[0074] 本発明は、本発明の発光試薬を含む発光試薬キットも提供する。本発明のキットは、本発明の発光試薬の他、取扱説明書、大まかな使用法を示した操作法のフローチャートなどを含むとよい。

[0075] 取扱説明書には、発光反応の概要や測定原理、製品の特徴、保存条件、試薬の調製法ならびに操作法、関連製品、トラブルシューティングなどが記載されているとよい。本発明のキットは、さらに、用途に応じて、標準品となるルシフェラーゼ酵素(ルシフェラーゼアッセイ法に用いる場合)、標準品となるATP溶液(ATPアッセイ法に用いる場合)、標準品となるルシフェリン(ルシフェリンアッセイ法に用いる場合)などを含んでもよい。

[0076] 以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、これらの実施例は本発明の範

囲を限定するものではない。

実施例 1

[0077] 「ピッカジーン発光キット(東洋インキ製造株式会社製:製品番号PGL100)」に添付されている取り扱い説明書に記載されている組成に従い、20mMトリシン、1.07mM(MgCO_3) $\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、2.67mM硫酸マグネシウム、0.1mM EDTA、470 μM ルシフェリン、530 μM アデノシン3リン酸(ATP)、pH7.8なる「ルシフェラーゼ発光試薬」を調製した。なお同処方に記載のチオール試薬である270 μM CoAならびに33.3mM DTTは添加していない。次にこの「ルシフェラーゼ発光試薬」にピロリン酸カリウム(和光純薬工業株式会社製)ならびに有機イオウ試薬であるジエチルジチオカルバミン酸ソーダ(川口工業株式会社)を終濃度がそれぞれ50 μM 、2mMとなるように加えた「ルシフェラーゼ発光試薬(+改良)」を用意した。

[0078] 「ピッカジーン発光キット(東洋インキ製造株式会社製:製品番号PGL100)」に含まれている「ルシフェラーゼ・スタンダード酵素(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)」を「ピッカジーン培養細胞溶解剤LUC:製品番号PGC50(東洋インキ製造株式会社製)」で希釈して調製した100n g/mLのルシフェラーゼ酵素溶液を、ルミノメーター(Berthold社製 LB9506)用のキューベットに10 μL 採った。まず調製した上記の「ルシフェラーゼ発光試薬」100 μL を添加し、即座にルミノメーターにセットして試薬添加直後から25秒間経過ごとの経時発光量(RLU/秒)を200秒後まで測定した。続いて「ルシフェラーゼ発光試薬(+改良)」についても同様の発光量を測定しそれぞれの測定値を得た(表4)。

[0079] [表4]

経過時間	0 秒後	25 秒後	50 秒後	75 秒後	100 秒後	125 秒後	150 秒後	175 秒後	200 秒後
ルシフェラーゼ発光試薬	5,753,825	4,315,869	4,002,698	3,656,885	3,264,859	3,023,895	2,852,214	2,423,389	2,022,784
	100%	75.0%	69.6%	63.6%	56.7%	52.6%	49.6%	42.1%	35.2%
ルシフェラーゼ発光試薬(+改良)	2,836,521	2,774,685	2,774,523	2,774,358	2,774,285	2,774,235	2,774,145	2,774,017	2,773,856
	100%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%

[0080] CoAとDTTのチオール試薬を使用しない「ルシフェラーゼ発光試薬」による発光反応では、試薬添加直後から急速に発光が減衰するフラッシュ発光が観察され、半減期は約2分半であったが、ピロリン酸カリウムと有機イオウ試薬を適用した「ルシフェラーゼ発光試薬(+改良)」による発光反応では、試薬添加直後の僅かな減衰の後に20

0秒間にわたってほぼ一定値を持続するグロー発光が確認され、半減期は5分以上となった。

- [0081] さらに、上記の「ルシフェラーゼ発光試薬」において、ジエチルジチオカルバミン酸ソーダを終濃度が2 mMとなるように、またピロリン酸カリウム(PPiK)を終濃度がそれぞれ10 μ M、25 μ M、50 μ M、75 μ M、100 μ Mとなるように加え、上記の操作を繰り返した。結果を図1に示す。
- [0082] ピロリン酸カリウムの添加濃度が低い10 μ Mでは初期発光量が高いものの発光は速やかに減衰したが、発光の半減期は5分以上となった。これに対してピロリン酸カリウムの添加濃度が高くなるに従い初期発光量はそれに応じて減少はするが、発光量の安定化への効果は高くなる傾向が認められ、ピロリン酸カリウムを100 μ M添加させた場合には、発光半減期は10分以上に延長された。これにより初期発光量と発光の安定化は、ピロリン酸カリウムの濃度によって制御することができることが確認された。これは、甲虫ルシフェリン/ルシフェラーゼ発光反応において、初期発光反応を制御し、かつルシフェラーゼ酵素のターンオーバーを促進させる、ピロリン酸が持つ2種類の作用による効果と考えられる。

実施例 2

- [0083] 「ピッカジーン発光キット(東洋インキ製造株式会社製:製品番号PGL100)」に添付されている取り扱い説明書に記載されている組成に従い、20mMトリシン、1.07mM(MgCO_3) $\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、2.67mM硫酸マグネシウム、0.1mM EDTA、33.3mM DTT、470 μ Mルシフェリン、270 μ M CoA、530 μ Mアデノシン3リン酸(ATP)、pH7.8なる「ルシフェラーゼ発光試薬」を調製した。一方、同処方に記載のチオール試薬である270 μ M CoAならびに33.3mM DTTは添加していない代わりにピロリン酸カリウム(和光純薬工業株式会社製)ならびに有機イオウ試薬であるジエチルジチオカルバミン酸ソーダをそれぞれ終濃度が1.5mM、2mMとなるように加えた「ルシフェラーゼ発光試薬(+改良)」を調製した。さらにそれぞれについて、ルシフェラーゼ酵素の安定化を促進させるため終濃度10%のグリセロールならびに1mM DTTを共存させた。
- [0084] 「ピッカジーン発光キット(東洋インキ製造株式会社製:製品番号PGL100)」に含まれている「ルシフェラーゼ・スタンダード酵素(10 μ g/mL)」を「ピッカジーン培養細胞溶

解剤LUC:製品番号PGC50(東洋インキ製造株式会社製)」で希釈して調製した100n g/mLのルシフェラーゼ酵素溶液を、マイクロタイタープレートのウェル内に10 μ Lづつ分注した。続いて調製した上記発光試薬をそれぞれの酵素溶液に100 μ L加え、速やかにルミノメーター(Berthold製 LB96V Plus)内に移し、装置内で測定を開始してから5時間の経時発光量の変動を測定した(表5および6、図2)。なおルシフェリン／ルシフェラーゼ発光反応は温度によって大きく影響を受ける為、全ての操作ならびにルミノメーターによる測定は23℃に設定された恒温室にて行った。

[0085] [表5]

経過時間	0時間	0.5時間	1時間	2時間	3時間	4時間	5時間
「ルシフェラーゼ発光試薬」	124,053.7	91,562	62,581	32,564	12,564	6,754	432
	100%	73.8%	50.4%	26.2%	10.1%	5.4%	0.3%
「ルシフェラーゼ発光試薬(+改良)」	29,876	33,256	32,487	27,742	23,568	20,224	18,544
	100%	111.3%	108.7%	92.9%	78.9%	67.7%	62.1%

[0086] [表6]

	Max RLU	Max Time(min.)	Red.Ratio(RLU/min.)	Half life(min.)	Max RLU%
ピロリン酸なし	124053.7	0	1016.7	61.0	100.0
1.5mM PPiK	34120.3	18	51.9	328.7	27.5

[0087] 「ルシフェラーゼ発光試薬」による発光反応は、測定開始より高い発光量を示したが、除々に減衰し、測定開始後60分間で発光量は50.4%にまで低下したことから発光半減期は61分間であった。これに対して「ルシフェラーゼ発光試薬(+改良)」による発光反応では、開始してから10分後に発光量(RLU/秒)は一定値を取って安定化しながら、徐々に減衰した。その後5時間を経過した時点でも最大発光量の62.1%の発光量を維持しており、発光半減期は5.5時間であった。

[0088] さらに、上記の「ルシフェラーゼ発光試薬」において、(1)ジエチルジチオカルバミン酸ソーダもピロリン酸カリウムも添加しないもの、(2)ピロリン酸カリウム(終濃度2 mM)を添加したもの、(3)ジエチルジチオカルバミン酸ソーダ(終濃度2 mM)を添加したもの、(4)ジエチルジチオカルバミン酸ソーダ(終濃度2 mM)とピロリン酸カリウム(終濃度2 mM)を添加したものを用意し、上記の操作を繰り返した。結果を表7および図3に示す。なおこの実験系では、ルシフェラーゼ酵素の安定化のために10%のグリセロールは共存させたが、有機イオウ試薬の効果を厳密に比較するためにDTTは一切加えていない。

[0089] [表7]

	Max RLU	Max Time(min.)	Half life(min.)	Max RLU%
有機イオウ試薬・PPiK ともに無し	100436.8	0	28.1	100.0
有機イオウ試薬無し・2mM PPiK	23210.5	12	187.1	23.1
有機イオウ試薬有り・PPiK 無し	94160.3	0	50.9	93.8
有機イオウ試薬有り・2mM PPiK	24373.3	12	169.9	24.3

[0090] 2mMピロリン酸カリウムの添加により、初期発光の増加ならびにその急速な減衰が抑えられ、発光半減期の延長に顕著な効果があることが認められた。すなわちピロリン酸カリウムを添加しない場合、有機イオウ試薬を含まない系で発光半減期が28分間、有機イオウ試薬を含んだ場合にも50分間程度であるのに対し、ピロリン酸カリウムを加えた場合、有機イオウ試薬がない場合で187分間、有機イオウ試薬存在下では169分間と発光半減期の大幅な延長ならびに発光反応の安定化が確認され、この安定化への効果はピロリン酸カリウム添加により顕著となることが確認された。

[0091] CoAなどのチオール試薬存在下におけるルシフェラーゼアッセイ法の発光反応を数十秒間単位で計測する際には、その発光反応における発光強度の増加と発光キネティクスの安定化においてジエチルジチオカルバミン酸ソーダ等の有機イオウ試薬は顕著な効果を示した。しかしながら、CoAなどのチオール試薬が存在せず、かつ発光持続時間を数時間レベルまで延長させた反応系では、有機イオウ試薬は発光の減衰を抑制させ発光強度を維持する若干の効果を示したが、発光安定化に寄与する効果はピロリン酸の方が遥かに大きいことが確認された。これは、ピロリン酸自身が甲虫ルシフェリン/ルシフェラーゼ発光反応の制御により直接的に作用するのに対し、有機イオウ試薬はその補助的な役割を担っていることに拠ると推察される。

実施例 3

[0092] 「ATP測定試薬キット(東洋インキ製造株式会社製:製品番号 LL100-1)」に含まれるATP発光試薬10mL(1 mM DTT含有)を調製し、分け取った5mLに対してピロリン酸カリウム(PPiK)(和光純薬工業株式会社製)を終濃度1mMとなるよう加えた。続いて同キットに含まれるATP標準試薬(ATP濃度= 1×10^{-12} M)をマイクロタイタープレートのウェル内に100 μ L分注した。速やかにルミノメーター(Berthold製 LB96V Plus)内に

移し、装置内で測定を開始してから5時間の経時発光量の変動を測定した(表8)。なおルシフェリン／ルシフェラーゼ発光反応は温度によって大きく影響を受ける為、全ての操作ならびにルミノメーターによる測定は23℃に設定された恒温室にて行った。ピロリン酸カリウムを添加していないATP発光試薬についても上記の操作を行った。

[0093] [表8]

経過時間	0 時間	0.5 時間	1 時間	2 時間	3 時間	4 時間	5 時間	6 時間
ATP 発光試薬	887,689 100%	226,334 25.5%	113,876 12.8%	52,146 5.9%	11,235 1.3%	5,223 0.6%	1,125 0.1%	201 0.0%
ATP 発光試薬 (1mM PPiK)	189,865 100%	176,532 93.0%	165,325 87.1%	152,365 80.2%	135,886 71.6%	123,542 65.1%	95,521 50.3%	83,625 44.0%

[0094] ピロリン酸カリウムを添加していないATP発光試薬による発光反応は、測定開始より高い発光量を示したが、急速に減衰し、測定開始後15分間で発光量は45%にまで低下したことから発光半減期は11分間であった。これに対してピロリン酸カリウムを終濃度1mM加えた発光試薬による発光反応では、開始してから5分後に発光量(RLU/秒)は一定値を取って安定化し、その後徐々に減衰する。その後5時間を経過した時点でも最大発光量の50.3%の発光量を維持しており、発光半減期はおおよそ5時間であった。

[0095] さらに、上記のATP発光試薬に、(1)ジエチルジチオカルバミン酸ソーダもピロリン酸カリウムも添加しないもの、(2)ピロリン酸カリウム(終濃度1 mM)を添加したもの、(3)ジエチルジチオカルバミン酸ソーダ(終濃度2 mM)を添加したもの、(4)ジエチルジチオカルバミン酸ソーダ(終濃度2 mM)とピロリン酸カリウム(終濃度1 mM)を添加したものを用意し、上記の操作を繰り返した。結果を表9および図4に示す。

[0096] [表9]

	Max RLU	Max Time(min.)	Red.Ratio(RLU/min.)	Half life(min.)	Max RLU%
有機イオウ試薬・PPiK共になし	67976.75	0	632.9	53.7	100.0
有機イオウ試薬なし・1mM PPiK	20005.5	10	50.6	207.8	29.4
有機イオウ試薬あり・PPiKなし	62036.75	0	616.1	50.3	91.3
有機イオウ試薬あり・1mM PPiK	16828.5	15	40.7	221.5	24.8

[0097] 1mMピロリン酸カリウムの添加により、初期発光の増加ならびにその急速な減衰が抑えられ、発光半減期の延長に顕著な効果があることが認められた。またこの際に併せて有機イオウ試薬としてジエチルジチオカルバミン酸ソーダを添加したが、効果と

しては若干の発光量の低下に作用しているが、発光反応の安定化に対する効果は認められなかった。

- [0098] これまでATPアッセイ法における発光反応系では、その発光半減期の延長や発光キネティクスの安定化に対して、ルシフェラーゼアッセイ法の発光反応系で効果を示したチオール試薬、炭酸ガス、AMPなどの何れの制御因子を用いても効果は認められなかった。これに対し、ピロリン酸を反応系に加えることにより、初期発光反応を抑制するとともに発光半減期を顕著に延長できる効果を確認した。ATPアッセイ法における発光反応系においても、初期発光反応の抑制、及びルシフェラーゼ酵素のターンオーバー向上による発光反応の継続促進にピロリン酸が効果を及ぼした結果、発光反応の安定化が為されたものと考えられる。

実施例 4

- [0099] 「ピッカジーン発光キット(東洋インキ製造株式会社製:製品番号PGL100)」に添付されている取り扱い説明書に記載されている組成に従い、20mMトリシン、1.07mM($\text{MgCO}_3 \cdot \text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)、2.67mM硫酸マグネシウム、0.1mM EDTA、470 μM ルシフェリン、530 μM アデノシン3リン酸(ATP)、pH7.8なる「ルシフェラーゼ発光試薬」を調製した。なお同処方に記載のチオール試薬である270 μM CoAならびに33.3mM DTTは添加していない。次にこの「ルシフェラーゼ発光試薬」にピロリン酸ナトリウム(和光純薬工業株式会社製)ならびに有機イオウ試薬であるジエチルジチオカルバミン酸ソーダを終濃度がともに2mMとなるように加えた「ルシフェラーゼ発光試薬(+改良)」を用意した。さらにそれぞれについて、ルシフェラーゼ酵素の安定化を促進させるため終濃度10%のグリセロールを共存させた。
- [0100] 「ピッカジーン発光キット(東洋インキ製造株式会社製:製品番号PGL100)」に含まれている「ルシフェラーゼ・スタンダード酵素(10 $\mu\text{g/mL}$)」を「ピッカジーン培養細胞溶解剤LUC:製品番号PGC50(東洋インキ製造株式会社製)」で希釈して調製した100n g/mL のルシフェラーゼ酵素溶液を、ルミノメーター(Berthold社製 LB9506)用のキューベットに10 μL 採った。まず調製した上記の「ルシフェラーゼ発光試薬」100 μL を添加し、即座にルミノメーターにセットして試薬添加直後から25秒間経過ごとの経時発光量(RLU/秒)を200秒後まで測定した。続いて「ルシフェラーゼ発光試薬(+改良)」に

についても同様の発光量を測定しそれぞれの測定値を得た。さらに、上記の「ルシフェラーゼ発光試薬(+改良)」のピロリン酸ナトリウムの代わりにピロリン酸カリウム(和光純薬工業株式会社製)またはピロリン酸(和光純薬工業株式会社製)を終濃度がそれぞれ2mMとなるように加えた「ルシフェラーゼ発光試薬(+改良)」を用意して、上記の操作を繰り返した。結果を表10および図5に示す。

[0101] [表10]

	Max RLU	Max Time(min.)	Half life(min.)	Max RLU%
no PPi	122651.0	0	45.8	100.0
PPiK	31448.0	12	122.4	25.6
PPiNa	30290.8	12	126.0	24.7
PPi	67904.5	6	111.1	55.4

[0102] 「ルシフェラーゼ発光試薬」による発光反応は、測定開始より高い発光量を示したが、その後速やかに減衰を続け、測定開始後60分間で発光量は47%にまで低下し、発光半減期は約46分間であった。これに対してピロリン酸ならびにピロリン酸塩を加えた「ルシフェラーゼ発光試薬(+改良)」による発光反応では、開始してから6から12分後に発光量(RLU/秒)は最大値を取って安定化しながら徐々に減衰した。ピロリン酸を加えた反応系では加えないものに比べ最大発光量は55.4%であったが、発光半減期は111分間に延長された。またピロリン酸塩を加えた発光反応系では、最大発光反応はそれぞれ24から26%に抑えられたが、2時間以上の発光半減期と安定した発光反応が得られた。

[0103] ピロリン酸(PPi)に比べて、2mMと同濃度のPPiKやPPiNaのピロリン酸塩はより強く発光を抑制する効果が認められたが、これは水溶液中にピロリン酸イオンの解離の効率の違いによるものと考えられる。反応液中でピロリン酸イオンを遊離する化合物であれば、その作用の強弱は解離定数で異なるにしても、ルシフェラーゼアッセイ法において発光反応を制御する効果を持つものと考察される。

実施例 5

[0104] 「ATP測定試薬キット(東洋インキ製造株式会社製:製品番号 LL100-1)」の中のATP発光試薬10mL(1 mM DTT含有)を調製し、分け取った5mLに対してピロリン酸(和

光純薬工業株式会社製)を終濃度1mMとなるよう加えた。続いて同キットに含まれるATP標準試薬(ATP濃度= 1×10^{-12} M)をマイクロタイタープレートのウェル内に100 μ L分注した。速やかにルミノメーター(Berthold製 LB96V Plus)内に移し、装置内で測定を開始してから5時間の経時発光量の変動を測定した。なおルシフェリン／ルシフェラーゼ発光反応は温度によって大きく影響を受ける為、全ての操作ならびにルミノメーターによる測定は23°Cに設定された恒温室にて行った。ピロリン酸を添加していないATP発光試薬についても上記の操作を行った。さらに、ピロリン酸の代わりにピロリン酸カリウムまたはピロリン酸ナトリウムを終濃度1mMとなるよう加えたATP発光試薬も用意して、上記の操作を行った。結果を表11および図6に示す。

[0105] [表11]

	Max RLU	Max Time(min.)	Half life(min.)	Max RLU%
no PPi	63116.8	5	42.3	100.0
PPiK	16800.3	15	243.5	26.6
PPiNa	15275.5	25	262.7	24.2
PPi	30874.3	5	136.5	48.9

[0106] ピロリン酸を添加していないATP発光試薬による発光反応は、測定開始より5分間後に最も高い発光量を示したが、急速に減衰し、測定開始後30分間には発光量は6.6%にまで低下したことから発光半減期は約42分間であった。これに対してピロリン酸を終濃度1mM加えた発光試薬による発光反応では、初期発光量こそ「ATP発光試薬」の50%弱と抑えられているが、発光反応開始後5分間で発光量(RLU/秒)は最大値を取り、その後一定の割合で徐々に減衰し、その発光半減期は136.5分間に延長された。さらにピロリン酸塩を添加した反応系では、それぞれ24から26%に最大発光量は抑えられたが、カリウム塩では243.5分間、ナトリウム塩では262.7分間の発光半減期も顕著な延長が確認された。

[0107] ピロリン酸(PPi)に比べて、1mMと同濃度のPPiKやPPiNaのピロリン酸塩はより強く発光を抑制する効果が認められたが、これは水溶液中にピロリン酸イオンの解離の効率の違いによるものと考えられる。反応液中でピロリン酸イオンを遊離する化合物であれば、その作用の強弱は解離定数で異なるにしても、ATPアッセイ法において発

光反応を制御する効果を持つものと考察される。

- [0108] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

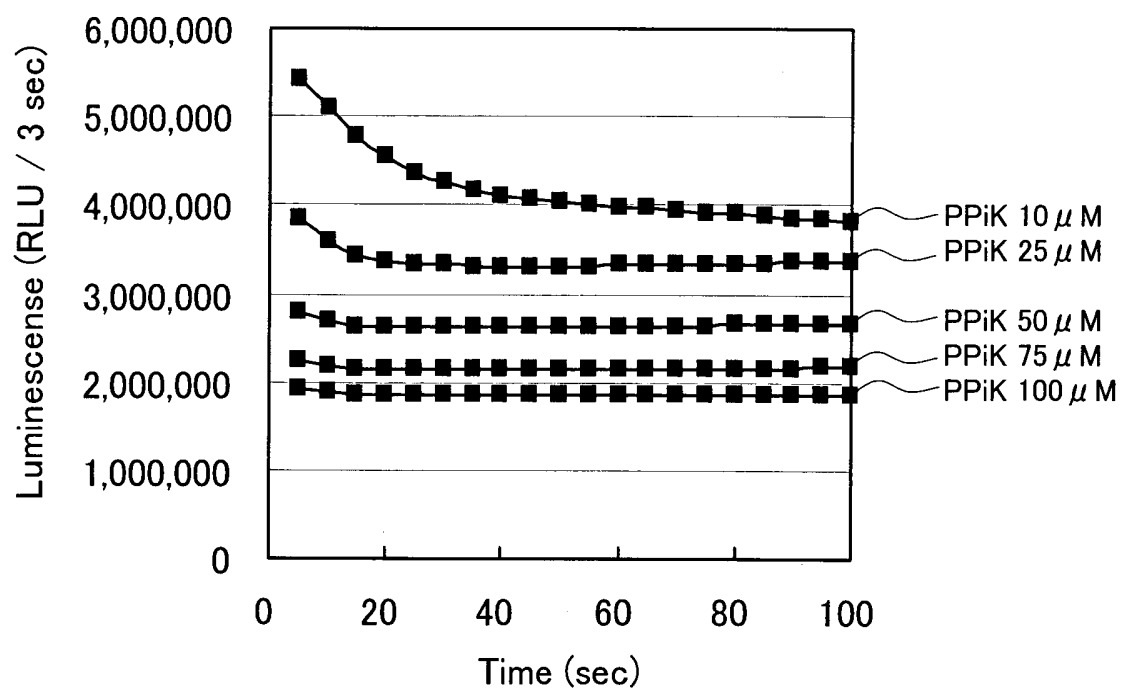
産業上の利用可能性

- [0109] 本発明のルシフェリン／ルシフェラーゼ発光方法は、ルシフェラーゼアッセイ法、ATPアッセイ法、ルシフェリンアッセイ法などに利用できる。従って、本発明のルシフェリン／ルシフェラーゼ発光方法を利用することにより、遺伝子の転写活性の測定、ATPaseなどの酵素活性の測定、生きている微生物の定量、生きている細胞の定量、カスパーゼや β ガラクトシダーゼなどの酵素活性の測定、細胞に対する薬剤の毒性試験などを正確、かつ大量の検体を取り扱うHTSにおいて簡便に行うことができる。

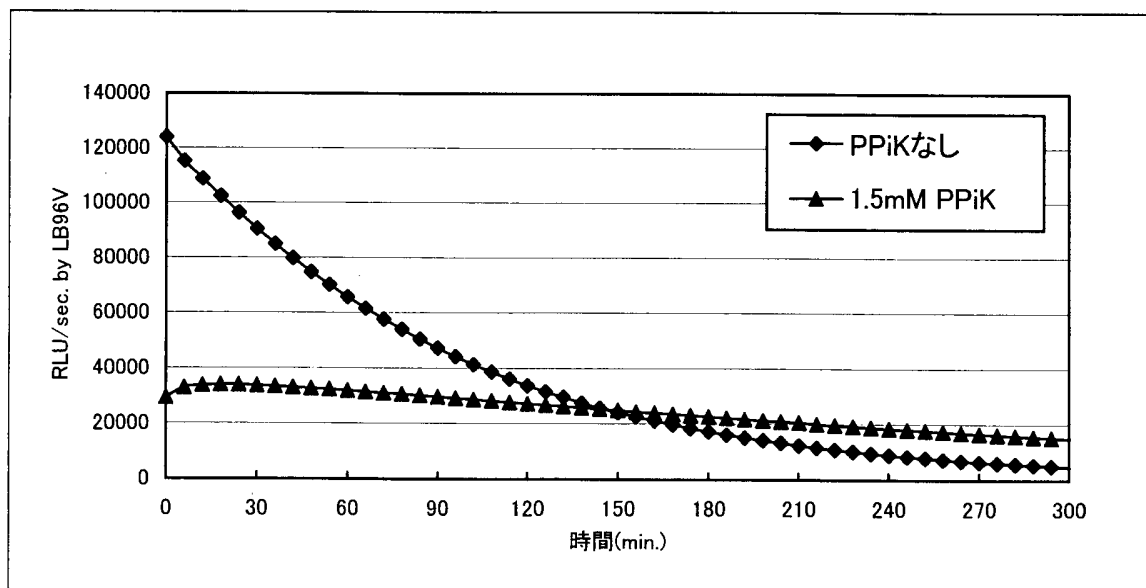
請求の範囲

- [1] ピロリン酸および／またはピロリン酸塩の存在下で、ルシフェリンと甲虫ルシフェラーゼを反応させ、発光半減期が5分以上である発光を生ぜしめることを特徴とする、ルシフェリン／ルシフェラーゼの発光方法。
- [2] ピロリン酸および／またはピロリン酸塩が0.01mM～10mMの濃度で存在する、請求項1記載のルシフェリン／ルシフェラーゼの発光方法。
- [3] さらに、アデノシン三リン酸およびマグネシウムイオンが存在する、請求項1記載のルシフェリン／ルシフェラーゼの発光方法。
- [4] さらに、有機イオウ試薬が存在する、請求項1～3のいずれかに記載のルシフェリン／ルシフェラーゼの発光方法。
- [5] 有機イオウ試薬が10mM以下の濃度で存在する、請求項4記載のルシフェリン／ルシフェラーゼの発光方法。
- [6] 請求項1記載の方法を利用して、試料中の甲虫ルシフェラーゼ量を測定する方法。
- [7] 請求項1記載の方法を利用して、試料中のATP量を測定する方法。
- [8] 請求項1記載の方法を利用して、試料中のルシフェリン量を測定する方法。
- [9] 請求項1記載の方法で発光を生ぜしめるための発光試薬であって、ピロリン酸および／またはピロリン酸塩を含む前記発光試薬。
- [10] 試料中の甲虫ルシフェラーゼ量を測定するためのルシフェラーゼアッセイ試薬として用いられる、請求項9記載の発光試薬。
- [11] 試料中のATP量を測定するためのATPアッセイ試薬として用いられる、請求項9記載の発光試薬。
- [12] 試料中のルシフェリン量を測定するためのルシフェリンアッセイ試薬として用いられる、請求項9記載の発光試薬。
- [13] 請求項9記載の発光試薬を含む発光試薬キット。

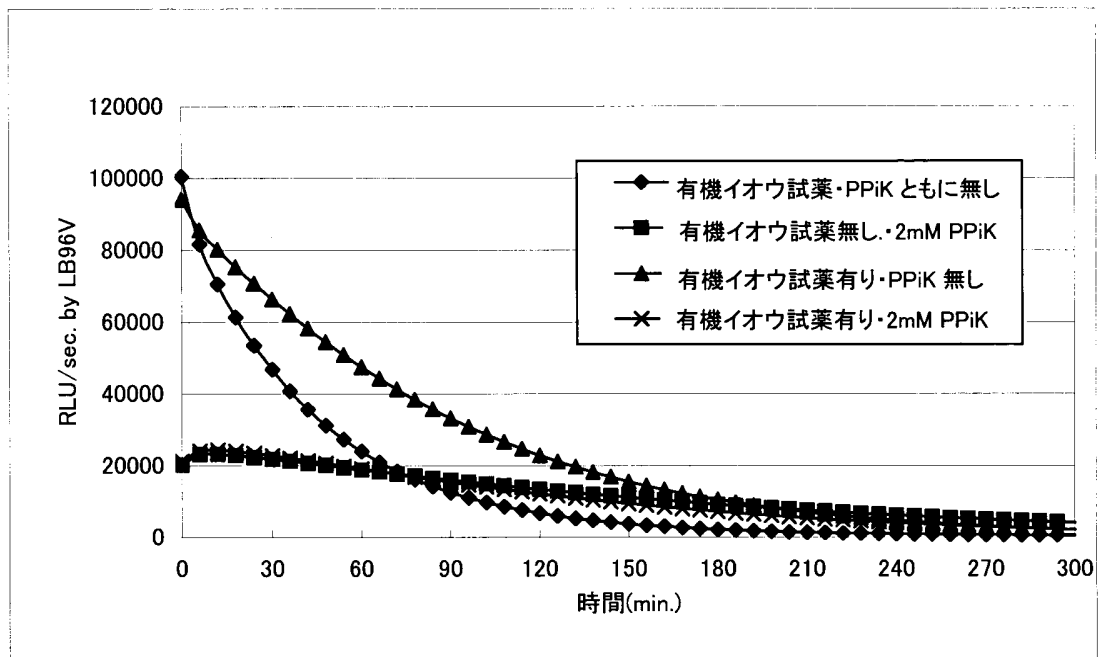
[図1]



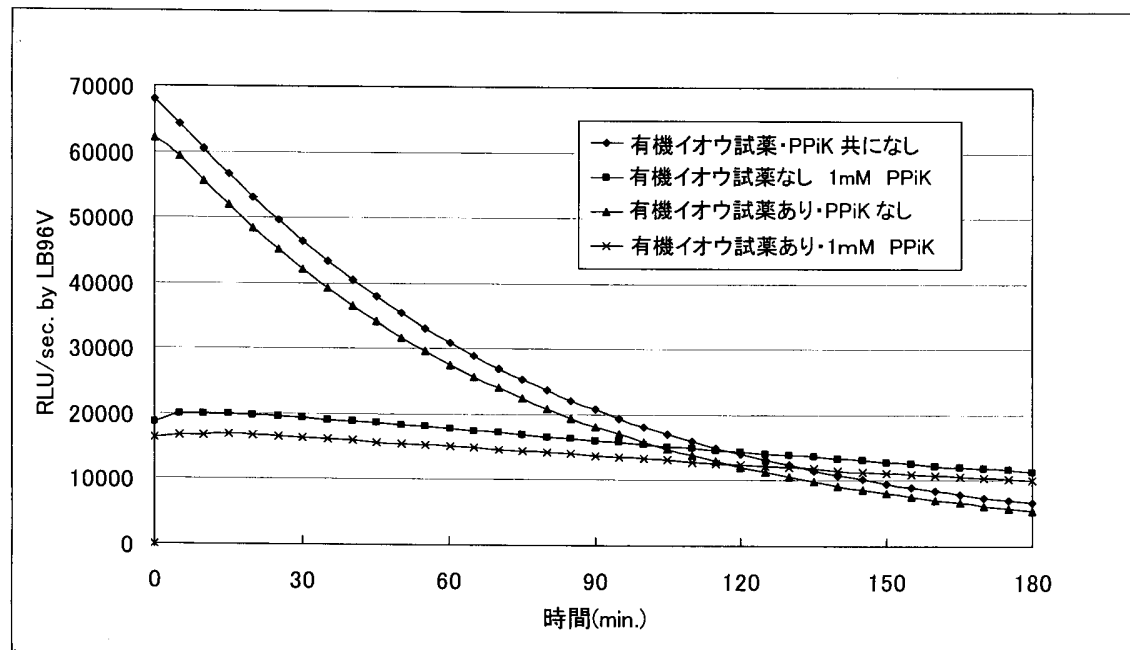
[図2]



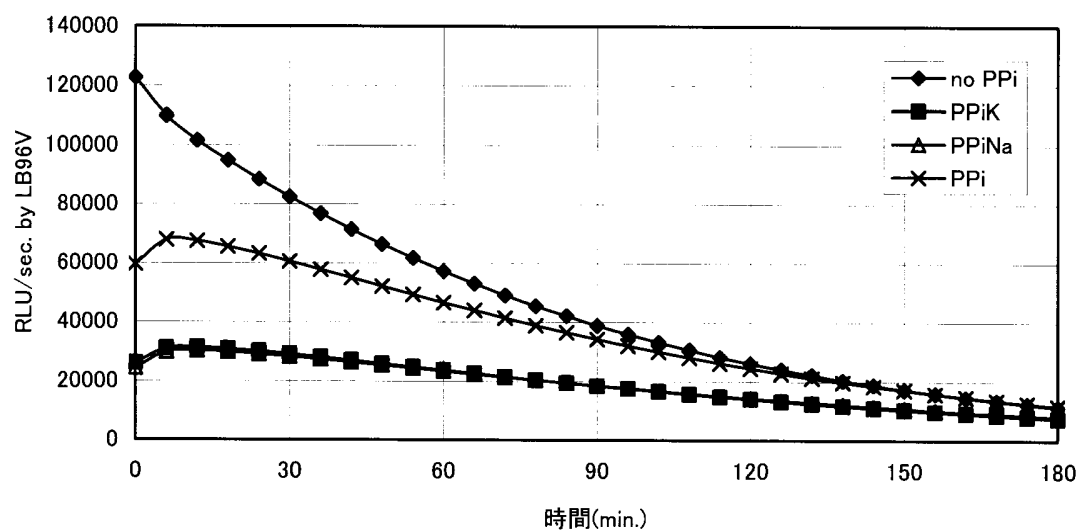
[図3]



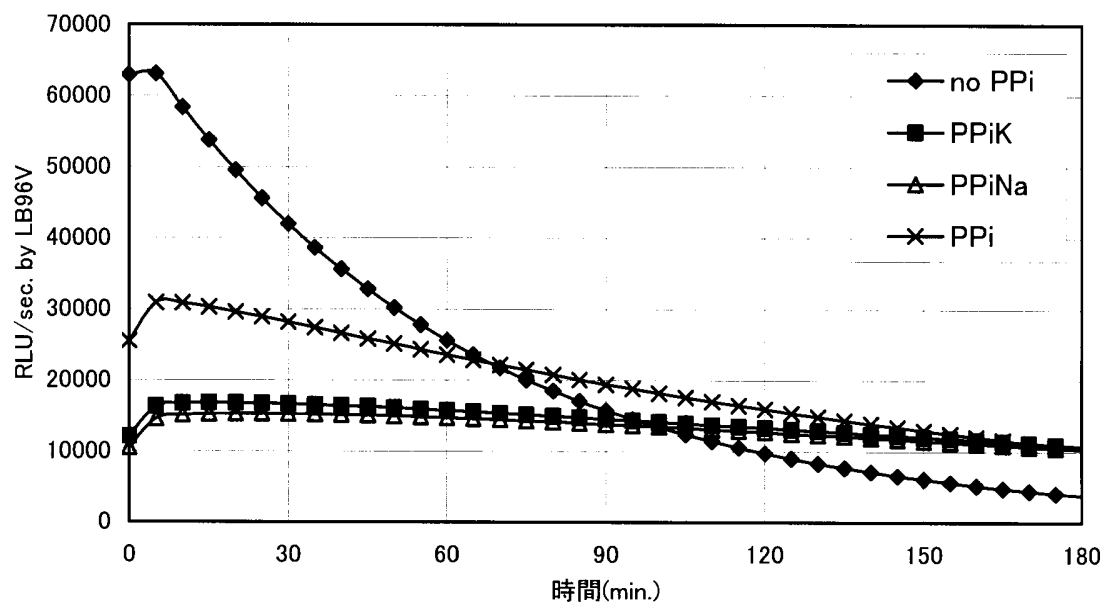
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/014075

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12Q1/66, G01N21/78

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12Q1/66, G01N21/78

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAPLUS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 8-47399 A (Eiken Chemical Co., Ltd.), 20 February, 1996 (20.02.96) (Family: none)	1-13
X	SAKAKIBARA, T. et al., An enzymatic cycling method using pyruvate orthophosphate dikinase and firefly luciferase for the simultaneous determination of ATP and AMP (RNA), Anal. Biochem., 01 March, 1999 (01.03.99), 268(1), pages 94 to 101	1-13
X	JP 2002-10800 A (Kikkoman Corp.), 15 January, 2002 (15.01.02) & WO 2001/081618 A1	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 August, 2005 (19.08.05)

Date of mailing of the international search report

06 September, 2005 (06.09.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/014075

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GANDELMAN O. et al., Cytoplasmic factors that affect the intensity and stability of bioluminescence from firefly luciferase in living mammalian cells, J.Biolumin. Chemilumin., 1994, 9(6), p.363-71	1-13
X	JP 55-13893 A (Arne T. Lundin), 31 January, 1980 (31.01.80) & US 4246340 A	1-13
X	McELROY W.D. et al., The mechanism of action of pyrophosphate in firefly luminescence, Arch. Biochem.Biophys., 1953 October, 46(2), pages 399 to 416	1-13
A	RHODES W.C. et al., The synthesis and function of luciferyl-adenylate and oxyluciferyl-adenylate, J.Biol.Chem., 1958 December, 233(6), p.1528-37	1-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12Q1/66, G01N21/78

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12Q1/66, G01N21/78

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAPLUS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 8-47399 A (栄研化学株式会社) 1996. 02. 20 (ファミリーなし)	1-13
X	SAKAKIBARA T et al., An enzymatic cycling method using pyruvate orthophosphate dikinase and firefly luciferase for the simultaneous determination of ATP and AMP (RNA), Anal Biochem, 1999 Mar 1, 268(1), p. 94-101	1-13

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 08. 2005

国際調査報告の発送日

06. 9. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伏見 邦彦

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4 N

9838

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2002-10800 A(キッコーマン株式会社) 2002.01.15 &WO 2001/081618 A1	1-13
X	GANDELMAN O et al., Cytoplasmic factors that affect the intensity and stability of bioluminescence from firefly luciferase in living mammalian cells, J Biolumin Chemilumin, 1994, 9(6), p. 363-71	1-13
X	JP 55-13893 A(アルネ・トウールヴァルド・ランデイン) 1980.01.31 &US 4246340 A	1-13
X	McELROY W D et al., The mechanism of action of pyrophosphate in firefly luminescence, Arch Biochem Biophys, 1953 Oct, 46(2), p. 399-416	1-13
A	RHODES W C et al., The synthesis and function of luciferyl-adenylate and oxyluciferyl-adenylate, J Biol Chem, 1958 Dec, 233(6), p. 1528-37	1-13