

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013 年 8 月 8 日(08.08.2013)



(10) 国際公開番号

WO 2013/115248 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/32 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/052039
- (22) 国際出願日: 2013 年 1 月 30 日(30.01.2013)
- (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 2012-019441 2012 年 2 月 1 日(01.02.2012) JP
- (71) 出願人: 学校法人日本大学(NIHON UNIVERSITY)
[JP/JP]; 〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目
8 番 2 4 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 神野 英毅(KOHNO, Hideki); 〒1028275 東
京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法
人日本大学内 Tokyo (JP). 吉宗 一晃
(YOSHIMUNE, Kazuaki); 〒1028275 東京都千代田
区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人日本大学
内 Tokyo (JP). 小森谷 友絵(KOMORIYA, Tomoe);
〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2
4 号 学校法人日本大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所(THE
PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT
- OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町
1 丁目 3 番 8 号 沢の鶴人形町ビル Tokyo (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, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,
PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, 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, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ
ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ
(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,
GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,
NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, 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 (条約第 21 条(3))

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING HOMOCYSTEINE USING HOMOSERINE DEHYDROGENASE

(54) 発明の名称: ホモセリン脱水素酵素を用いたホモシステインの定量法

(57) Abstract: A method that enables homocysteine to be accurately measured by a simple operation is provided. This method for measuring the homocysteine concentration in a sample is characterized by allowing Archaea-derived homoserine dehydrogenase to act on homoserine in the sample containing homocysteine so as to measure homoserine dehydrogenase activity.

(57) 要約: 簡便な操作で正確なホモシステインを測定できる方法の提供。ホモシステイン含有試料中において、ホモセリンにアーキア由来ホモセリン脱水素酵素を作用させてホモセリン脱水素酵素活性を測定することを特徴とする、当該試料中のホモシステイン濃度の測定方法。



WO 2013/115248 A1

明 細 書

発明の名称：

ホモセリン脱水素酵素を用いたホモシステインの定量法

技術分野

[0001] 本発明は、血液等の試料中のホモシステインの測定方法に関する。

背景技術

[0002] ホモシステインは、メチオニンの代謝中間物であり、健常の血漿中の濃度は低く、 $3 \sim 15 \mu\text{M}$ である。しかし、ホモシステインの血中濃度が高くなると、心血管疾患の危険因子になることが知られている。例えば冠動脈疾患患者や脳血管疾患患者では血液中ホモシステイン濃度が高値になることが知られており、さらに糖尿病、高血圧、高脂血症、腎不全、妊娠時の合併症、アルツハイマー病等でも血中ホモシステイン濃度が高くなるという報告もある。その作用は、血中ホモシステイン濃度の上昇によってホモシステインが酸化した際に生じる過酸化水素やスーパーオキシドラジカル等の酸化ストレスによって内皮細胞障害を起こし、動脈硬化等が促進されるといわれている。

[0003] 従来のホモシステインの定量方法には検体中のホモシステインをSH基と反応する蛍光標識試薬で標識し、高速液体クロマトグラフィーにより分離して定量するプレラベルHPLC法、検体を高速液体クロマトグラフィーで分離し、後にSH基と反応する蛍光標識試薬で標識して定量するポストラベルHPLC法、ホモシステインと特異的に作用する酵素を用い、酵素反応生成物を抗体法により定量する酵素免疫法、ホモシステインに特異的に作用する酵素を用い、酵素反応生成物を酵素法により定量する方法など、幾つかの定量方法が存在する（特許文献1～4）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特許第3869601号公報

特許文献2：特許第4 2 3 3 1 6 0号公報

特許文献3：特許第4 8 0 7 9 2 0号公報

特許文献4：米国特許出願公開2 0 0 4 / 0 0 9 6 9 2 9号公報

非特許文献

- [0005] 非特許文献1：日本大学生産工学部第4 4 回学術講演概要（2 0 1 1 - 1 2 - 3）5 - 5 8

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] しかしながら、従来のホモシステインの測定法のうち、H P L Cを用いる方法は操作が煩雑であるという問題があり、酵素法については2 種以上の酵素や酵素と抗体の組み合わせを使用するため操作が煩雑になる、試薬が高価になる等の問題があった。

従って、本発明は、簡便な操作で正確にホモシステインを測定できる方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0007] そこで本発明者は、新たなホモシステインの定量法について種々検討してきたところ、ホモシステインに対する活性を有しないことが知られている超好熱アーキア由来ホモセリン脱水素酵素を、ホモセリンとホモシステインの共存系に作用させたところ、全く意外なことに、ホモシステインにより当該酵素のアロステリック効果が生じ、当該酵素のホモセリンに対する脱水素活性がホモシステイン濃度依存的に向上し、その脱水素活性を直接測定すれば、試料中のホモシステイン濃度が正確に測定できることを見出し、本発明を完成した。

- [0008] すなわち、本発明は、以下の〔1〕～〔3〕に係るものである。

〔1〕ホモシステイン含有試料中において、ホモセリンにアーキア由来ホモセリン脱水素酵素を作用させてホモセリン脱水素酵素活性を測定することを特徴とする、当該試料中のホモシステイン濃度の測定方法。

〔２〕アーキア由来ホモセリン脱水素酵素が、スルフォロバス由来のホモセリン脱水素酵素である〔１〕記載の測定方法。

〔３〕アーキア由来ホモセリン脱水素酵素が、スルフォロバス・トコダイ由来のホモセリン脱水素酵素である〔１〕又は〔２〕記載の測定方法。

発明の効果

〔０００９〕 本発明によれば、１種類の酵素を反応させるだけで試料中のホモシステイン濃度が簡便かつ正確に定量できる。また、反応系が単純なので、分光光度計を備えた自動分析装置により迅速に定量できる。

図面の簡単な説明

〔００１０〕〔図１〕ホモシステインによるホモセリン脱水素酵素の活性化作用を示す図である。

〔図２〕ホモセリン脱水素酵素の１０μＭ ＤＬ－ホモシステインによる活性化を示す図である。

〔図３〕ＤＬ－ホモシステインによる反応速度への影響（反応開始後５分後の反応速度と初速度の比に対するホモシステインの影響）を示す図である。

発明を実施するための形態

〔００１１〕 本発明の試料中のホモシステイン濃度測定方法は、ホモシステイン含有試料中において、ホモセリンにアーキア由来ホモセリン脱水素酵素を作用させ、ホモセリン脱水素酵素活性を測定するものである。

〔００１２〕 用いられるホモシステイン含有試料としては、遊離のホモシステインを含有する生体試料であればよい。血液中ではホモシステインは、遊離のホモシステインとしての存在量は少なく、そのほとんどが、ホモシスチン、ホモシステイン－システイン、ホモシステイン－タンパク質の形態で存在するので、まず還元してホモシステインを遊離させた試料を検体とするのが好ましい。この場合、測定されるのは総ホモシステイン量になる。ここで、還元処理手段としては、硫化水素、メタンチオール、２－メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、チオグリセロール、システアミン等のチオール化合物を反応させる方法等が挙げられる。この還元処理方法は公知の手段を採用できる

(1) Refsum, H. et al., Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu. Rev. ed.* (1998) Vol. 49, pp. 31-62、2) Mansoor, M. A. et al., Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with homocystinuria. *Metabolism* (1993) Vol. 42, pp. 1481-5、3) Mansoor, M. A. et al., Redox status and protein binding of homocysteine and other aminothiols in patients with early-onset peripheral vascular disease. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* (1995) Vol. 15, pp. 232-40、4) Chambers, J. C. et al., Investigation of relationship between reduced, oxidized, and protein-bound homocysteine and vascular endothelial function in healthy human subjects. *Circ. Res.* (2001) Vol. 89, pp. 187-192、5) 橋本隆男ら、「ホモシステイン代謝」、*薬学雑誌* (2007) 127 巻 10 号 1579-92.)

また生体試料としては、血液、血漿、血清、髄液、リンパ液等が挙げられる。

[0013] 好ましいホモシステイン含有試料は、還元処理された血液、血漿又は血清である。

[0014] 本発明に用いられるホモセリン脱水素酵素は、哺乳類等の真核生物や細菌由来ではなくアーキア由来のホモセリン脱水素酵素である。細菌由来のホモセリン脱水素酵素はホモシステインで少し阻害されるという報告 (RJ Rowbury, *J. Gen. Microbiol.* (1968), vol. 54, pp. 337-342) があり、使用できない。アーキア (古細菌) 由来のホモセリン脱水素酵素であればよいが、スルフォロバス由来のホモセリン脱水素酵素が好ましく、特にスルフォロバス・トコダイ (*Sulfolobus tokodaii*) 由来のホモセリン脱水素酵素がより好ましい。スルフォロバス属の好気、好酸、好熱性の古細菌は、陸上の火山や温泉などから採取でき、スルフォロバス・トコダイ以外にも、*S. acidocaldarius*、*S. solfataricus*、*S. metallicus*、*S. shibatae*、*S. yangmingensis* 等も利用できる。

[0015] 本発明者の研究によれば、非特許文献 1 に記載のように、アーキア由来の

ホモセリン脱水素酵素は、ホモセリンに対する脱水素酵素活性（ホモセリンからアスパラギン酸-4-セミアルデヒドへの酸化反応をNAD(P)に依存して可逆的に触媒する活性）は有するが、ホモシステインに対する活性はない。従って、このアーキア由来のホモセリン脱水素酵素がホモシステインによって活性化され、ホモシステインの存在下でホモセリン脱水素酵素活性が増強されることは全く予測できなかった。

[0016] アーキアからホモセリン脱水素酵素を採取するには、例えばアーキアを公知の手段により培養した培養液から採取することができるが、非特許文献1記載のように遺伝子組換え技術により形質転換した大腸菌を培養することにより採取することもできる。

[0017] ホモシステイン含有試料中で、ホモセリンにアーキア由来ホモセリン脱水素酵素を作用させるには、例えばホモシステイン含有試料にアーキア由来ホモセリン脱水素酵素を添加してインキュベートし、次いで所定量のホモセリンを添加すればよい。アーキア由来のホモセリン脱水素酵素の添加量は、特に限定されないが、0.01~100 U/ml程度、さらに0.5~2 U/ml程度が好ましい。また、ホモセリンの添加量は、所定量であり、例えば0.01~10000 mM、さらに1~100 mMが好ましい。なお、酵素反応はpH3~11の緩衝液中、10~100℃で合計0.1分~60分インキュベートすればよい。

[0018] ホモセリン脱水素酵素活性は、ホモセリンからアスパラギン酸-4-セミアルデヒドへの酸化反応であり、NAD又はNADPに依存して進行するから、反応系中にNAD又はNADPを存在させておき、NADからNADHの生成又はNADPからNADPHの生成を分光光度計により吸光度を測定すれば、ホモセリン脱水素酵素活性、すなわちホモシステイン濃度が定量できる。

[0019] 試料中のホモシステイン濃度は、予め作成しておいたホモシステイン濃度と酵素活性（例えば吸光度）に基づく検量線から決定することができる。

実施例

[0020] 次に実施例を上げて本発明を詳細に説明する。

[0021] 実施例 1

[古細菌由来ホモセリン脱水素酵素の生産]

DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) 等のデータベースから見出した好気・好酸性超好熱古細菌スルフォロバス・トコダイのゲノム上のHSDH推定遺伝子(915bp)を増幅するプライマーを設計し、PCRにより遺伝子を増幅した。増幅した遺伝子を発現ベクターpET101に挿入し発現プラスミドpST1519を構築した。pST1519でBL21-CodonPlus(DE3)-RIL Competent Cellsを形質転換した後、50 μ l/mlアンピシリン含有LB培地でOD₆₆₀が0.6~0.8になるまで振盪培養し、0.2mM IPTGを加え、3時間37℃で培養した。培養で得られた菌体を遠心分離によって回収、1M KPB (pH7.0)、10mM MgCl₂ (pH7.0)で懸濁し、超音波破碎(出力35%, on time 2 sec, off time 2 sec, total time 60 min)を氷上で行った。更に、遠心分離後の上清を回収し、それを粗酵素液とし、酵素液をタンパク質濃度測定した。70℃に加熱した恒温槽で粗酵素を20分間加熱し、遠心分離によって上清を回収し、酵素液とした。

[0022] 実施例 2

[活性測定]

酵素液(1U)に100mM リン酸緩衝液(pH7.0)、1mM MgCl₂、1.3mM NAD⁺、各濃度のDL-ホモシステインをセルに加え、50℃で3分間インキュベートした。終濃度が10mMとなる様にDL-ホモセリンを添加し反応を開始させ、50℃において340nmの吸光度を経時的に観測することで活性測定を行った。酵素の1Unitは、50℃で1分間に1 μ molのNADHを生じるのに必要な酵素量として定義した。図1にホモセリン脱水素酵素のホモシステインによる活性(ホモシステイン濃度と比活性の関係)化を示す。

図1から、本発明方法により、試料中のホモシステイン濃度が、ホモシス

テイン含有試料中で、ホモセリンとホモセリン脱水素酵素を作用させることにより、該試料中のホモシステイン濃度が定量できることがわかる。

[0023] 実施例 3

[低濃度ホモシステインの活性測定]

酵素液 (1 U) に 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、1 mM MgCl₂、1.3 mM NAD⁺、各濃度のDL-ホモシステインをセルに加え、50℃で3分間インキュベートした。終濃度が8 mMとなる様にDL-ホモセリンを添加し反応を開始させ、50℃において340 nmの吸光度を経時的に観測することで活性測定を行った。

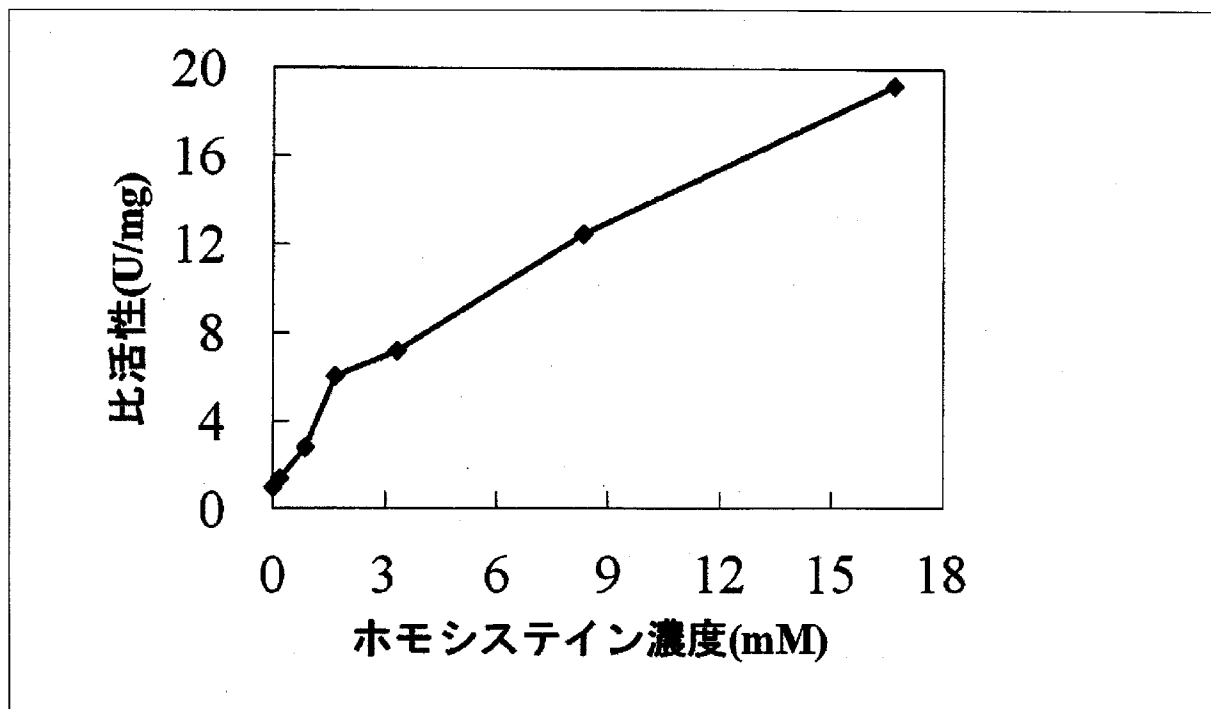
図2にホモセリン脱水素酵素の10 μM DL-ホモシステインによる活性化を示す。血中濃度とほぼ同等の10 μM ホモシステインによって経時的な吸光度変化が大きく影響を受けていることが示された。特に反応開始直後の初速度と反応5分後の速度がDL-ホモシステインによって影響を受ける。

この初速度と5分後の反応速度の比を計算したところ、図3の様にDL-ホモシステイン濃度との相関が得られた。この検量線によって数μMのホモシステインの定量が可能である。

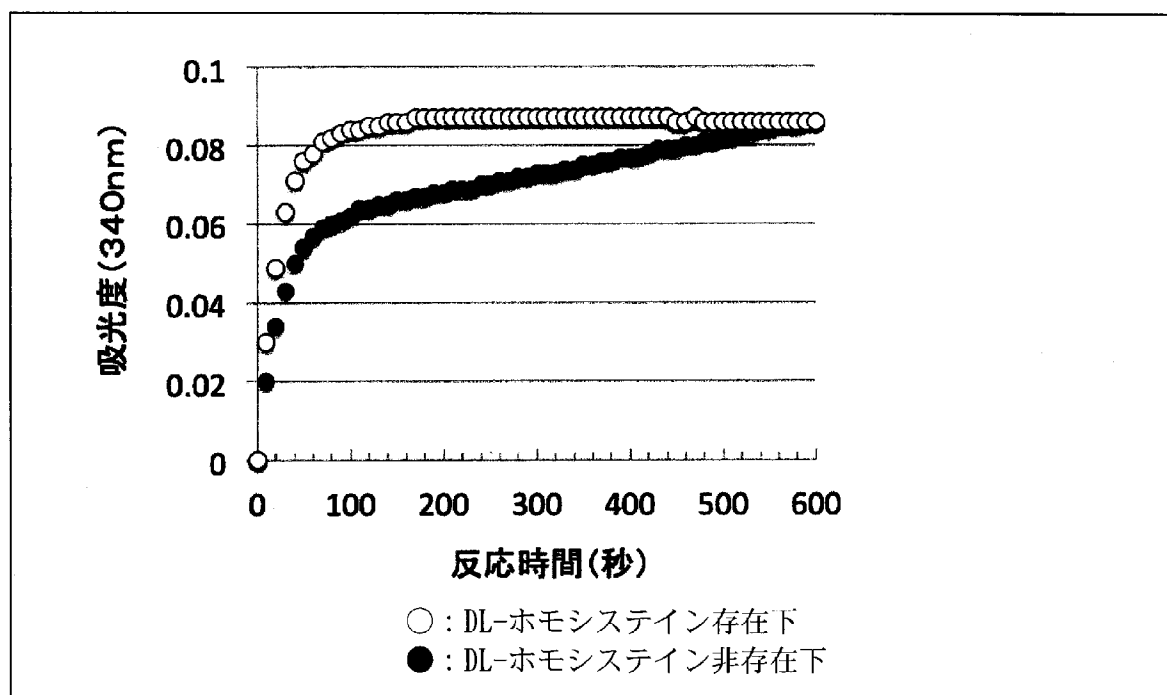
請求の範囲

- [請求項1] ホモシステイン含有試料中において、ホモセリンにアーキア由来ホモセリン脱水素酵素を作用させてホモセリン脱水素酵素活性を測定することを特徴とする、当該試料中のホモシステイン濃度の測定方法。
- [請求項2] アーキア由来ホモセリン脱水素酵素が、スルフォロバス由来のホモセリン脱水素酵素である請求項1記載の測定方法。
- [請求項3] アーキア由来ホモセリン脱水素酵素が、スルフォロバス・トコダイ由来のホモセリン脱水素酵素である請求項1又は2記載の測定方法。

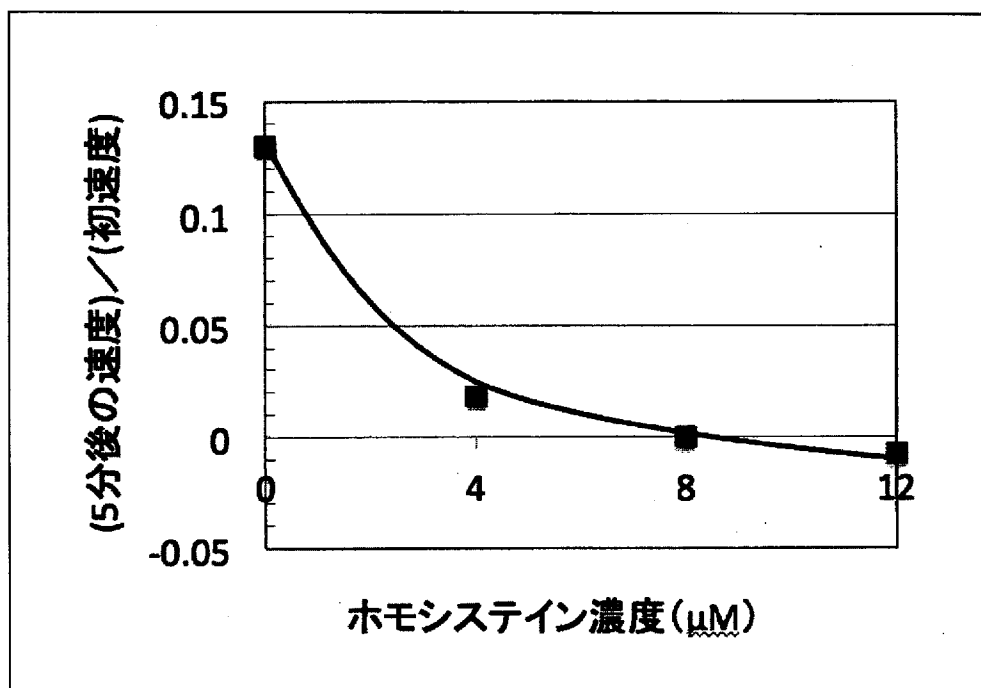
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/052039

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/32 (2006.01) i

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)

C12Q1/32

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MARON B.A. and LOSCALZO J., Homocysteine, Clin. Lab. Med., 2006.09, Vol.26, No.3, pp.591-609	1-3
A	PERACCHI A. and MOZZARELLI A., Exploring and exploiting allosteric: Models, evolution, and drug targeting, Biochim. Biophys. Acta, 2011.08, Vol.1814, No.8, pp.922-933	1-3



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

03 April, 2013 (03.04.13)

Date of mailing of the international search report

16 April, 2013 (16.04.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12Q1/32(2006.01)i

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 (I P C))

Int.Cl. C12Q1/32

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

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 3 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 年

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)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

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 請求項の番号
A	MARON B. A. and LOSCALZO J., Homocysteine, Clin. Lab. Med., 2006.09, Vol.26, No.3, pp.591-609	1-3
A	PERACCHI A. and MOZZARELLI A., Exploring and exploiting allosterism: Models, evolution, and drug targeting, Biochim. Biophys. Acta, 2011.08, Vol.1814, No.8, pp.922-933	1-3

C 欄の続きにも文献が列挙されている。

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

0 3 . 0 4 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

1 6 . 0 4 . 2 0 1 3

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

小金井 悟

4 N

3 9 6 1

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8