

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年8月6日 (06.08.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/096429 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/66 (2006.01) G01N 21/76 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/051364
- (22) 国際出願日: 2009年1月28日 (28.01.2009)
- (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2008-017863 2008年1月29日 (29.01.2008) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人徳島大学 (THE UNIVERSITY OF TOKUSHIMA) [JP/JP]; 〒7708501 徳島県徳島市新蔵町2丁目24番地 Tokushima (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 木戸博 (KIDO,

Hiroshi) [JP/JP]; 〒7708503 徳島県徳島市蔵本町3丁目18番地の15 国立大学法人徳島大学 疾患酵素学研究センター内 Tokushima (JP). 千田 淳司 (CHIDA, Junji) [JP/JP]; 〒7708503 徳島県徳島市蔵本町3丁目18番地の15 国立大学法人徳島大学 疾患酵素学研究センター内 Tokushima (JP). 武井 恒知 (TAKEI, Tsunetomo) [JP/JP]; 〒7708503 徳島県徳島市蔵本町3丁目18番地の15 国立大学法人徳島大学 疾患酵素学研究センター内 Tokushima (JP).

(74) 代理人: 庄司 隆, 外(SHOJI, Takashi et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋3-4-1 秋場ビル6階 Tokyo (JP).

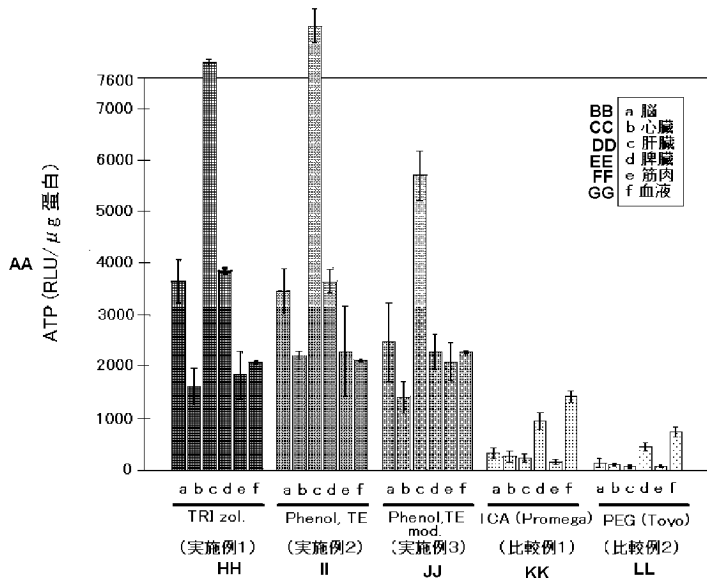
(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR EXTRACTION OF NUCLEOTIDE

(54) 発明の名称: ヌクレオチドの抽出方法

[図6]



AA - ATP (RLU/μg PROTEIN)
 BB - a BRAIN
 CC - b HEART
 DD - c LIVER
 EE - d SPLEEN
 FF - e MUSCLE
 GG - f BLOOD
 HH - TRIzol. (EXAMPLE 1)
 II - Phenol, TE (EXAMPLE 2)
 JJ - Phenol, TE mod. (Example 3)
 KK - TCA (Promega) (COMPARATIVE EXAMPLE 1)
 LL - PEG (Toyo) (COMPARATIVE EXAMPLE 2)

(57) Abstract: Disclosed is a method for extracting a nucleotide in a sample in a simple manner and with high efficiency. Also disclosed is a nucleotide extraction reagent. Further disclosed is a reagent kit for measuring a nucleotide, which comprises the nucleotide extraction reagent. A nucleotide (e.g., ATP, GTP and/or UTP) in a sample can be extracted from the sample with a high degree of efficiency by using a solution containing a phenolic compound. An extraction reagent comprising a phenolic compound can be used in the measurement of ATP or the like. It becomes also possible to provide a reagent kit for measuring ATP, which comprises the extraction reagent.

(57) 要約: 本発明は、簡便に効率よく試料中のヌクレオチドを抽出する方法を提供することを課題とし、さらにはヌクレオチド抽出用試薬、並びにヌクレオチド抽出用試薬を含むヌクレオチド測定用試薬キットを提供することを課題とする。試料中のヌクレオチド、例えばATP、GTP及び/又はUTPは、フェノール化合物を含む溶液を用いることで、試料から効率よく抽出することができる。これにより、例えばATP測定においてフェノール化合物を含む抽出用試薬を用いる

ことができ、該抽出用試薬を含むATP測定用試薬キットを提供することができる。

WO 2009/096429 A1



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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW,

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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(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,

添付公開書類:
— 国際調査報告書

明 細 書

ヌクレオチドの抽出方法

技術分野

[0001] 本発明は、試料中に含有されるヌクレオチドの抽出方法に関し、具体的にはアデノシン三リン酸(ATP)、グアノシン三リン酸(GTP)及び／又はウリジン三リン酸(UTP)等のヌクレオチドの抽出方法に関する。さらには、本発明はヌクレオチド抽出用試薬及びヌクレオチド測定用試薬キットに関する。

[0002] 本出願は、参照によりここに援用されるところの日本出願特願2008-017863号優先権を請求する。

背景技術

[0003] ATPは、すべての生物の細胞内に含まれるヌクレオチドである。試料中に含まれるATPの測定は、各種工業分野において広く行なわれている。特に、食品衛生、バイオ、臨床検査、医学等の現場では、試料中の微生物の有無の判定、該微生物の細胞数の計数等を目的として、細胞内ATPの測定が行なわれている。細胞内ATPを測定する場合、細胞を含む試料に界面活性剤等を添加して細胞内ATPを抽出した後、抽出されたATPを測定する方法が多用されている。

[0004] 近年、ヒトで起こる様々な疾患が、組織のエネルギー産生の低下によって起こることが明らかにされている。組織のエネルギー産生の低下とは、具体的には、組織を構成する個々の細胞のATPレベルの減少を示しており、先天的なミトコンドリア遺伝子の変異によって起こる場合と、後天的な遺伝子変異やウイルス感染等によって起こる場合がある。先天性の疾患としてはミトコンドリア脳筋症(CPEO: chronic progressive external ophthalmoplegia, MELAS: mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes, MERRF: myoclonus epilepsy associated with ragged red fibers)等が知られており、後天性の疾患としては脳梗塞、脳の神経変性疾患(Alzheimer's 病、Parkinson's 病、Huntington's 病、ウイルス性の脳症)等が報告されている。また、これらの疾患では、痙攣、てんかん、精神運動発達遅延、筋力低下、肝機能障害、感音性難聴等の全身での臨床症状が認められることが特徴である。

- [0005] このような事実から、生体内の様々な組織のATPレベルを正確に測定する技術は、1)組織におけるミトコンドリアの病理学の研究、2)遺伝子疾患の診断・予防という観点から、臨床医学的にも重要である。もし、この技術が確立されれば、各組織のエネルギー状態、代謝機能の状態、生理学的ストレスの状態を調べることが可能となる。このような細胞内ATPレベルの減少・枯渇によって発症する多様な疾患の研究は、その大半が培養細胞を用いた人工的環境下での研究であり、細胞のミトコンドリアの膜電位を指標とした蛍光プローブ(MitoTracker^(R)、JC-1^(R):Invitrogen社)等を用いた間接的半定量法による細胞外からのATPレベルのモニターか、細胞を破壊して含まれるATPを測定しているのが現状である。
- [0006] ATPの測定法としては、例えば生物発光反応、具体的にはルシフェリンールシフェラーゼ発光反応を利用して測定するキット(ENLITEN^(R) ATP Assay System:プロメガ社)がすでに開発されており、市販されている。特に、食品衛生、バイオ、臨床検査、医学等の現場では、試料中の微生物の有無の判定、該微生物の細胞数の計数等を目的として、細胞内ATPレベルの測定が行なわれている。試料中のATPレベルを測定する場合、試料からATPを抽出してATPを定量的に測定することが必要である。
- [0007] 試料からATPを抽出する方法として、1)過塩素酸をベースにした抽出法(PCA抽出法)(非特許文献1)、2)蒸留水中で加熱する方法(Boiling抽出法)(非特許文献2)が報告されている。その後、ATP抽出効率の高い方法として、プロテインキナーゼKで処理をする改良法(Proteinase K抽出法)が報告された(非特許文献3)。また、培養細胞からATPを抽出する方法として、トリクロロ酢酸をベースにした抽出法(TCA抽出法)が報告されている(非特許文献4, 5)。さらに、最近では、動物組織のATPレベルを測定するためのキット(『組織の』ATP測定キットTM:東洋ビーネット社)が市販されており、PEG含有抽出用溶液がATP抽出用試薬として添付されている。
- [0008] このように様々な改良方法を考案しなければならないように、従来の方法は操作が煩雑であったり、試料中のタンパク質変性凝集塊中にATPが混入して抽出効率が下がる、用いるタンパク質変性剤の影響によるATP測定の阻害、等の問題があった。例えば、ATPの測定法がルシフェリンールシフェラーゼ発光反応を利用する方法である場合、上記タンパク質変性剤としてTCAを用いると、測定系が酸性となって発光

反応が阻害されるという問題、試料中のタンパク質濃度が高い場合に、変性タンパク質に覆われたATPが抽出されない問題、等がある。そのため、従来の測定方法では、培養細胞等比較的タンパク質濃度の低い条件ではほぼ正確にATPレベルを測定することは可能であるが、タンパク質濃度の高い生体組織中のATPを測定する場合、ATPの抽出効率が急激に低下してATPレベルを正確に測定しているとはいえない。

[0009] さらに、生物の細胞内には、ATP以外にもGTP、UTP、CTPや各種デオキシヌクレオチド等多種のヌクレオチドが存在している。これらのヌクレオチドも、生体を維持するために必要であるが、効果的な抽出方法や測定方法が十分に解明されているとはいえない。各種ヌクレオチドが効果的に抽出され、各ヌクレオチド特異的な測定方法が開発されれば、生物中における各ヌクレオチドの存在や機能について更に解明されることになり医療、食品、各種工業分野において有用と考えられるが、これらのヌクレオチドの抽出効率もいまだ十分とはいえない。

[0010] 非特許文献1:New York Academic Press, 151 (1972)

非特許文献2:New York Academic Press, 559-572 (1963)

非特許文献3:J Biochem Biophys Methods, 63: 69-77 (2005)

非特許文献4:Microbiol Rev, 44: 739-796 (1980)

非特許文献5:Methods Enzymol, 133: 14-22 (1989)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明は、簡便に効率よく試料中のヌクレオチドを抽出する方法を提供することを課題とし、具体的にATP、GTP及び／又はUTP等のヌクレオチドの抽出方法を提供することを課題とする。さらにはヌクレオチド測定のために使用するヌクレオチド抽出用試薬及びヌクレオチド測定用試薬キットを提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、フェノール化合物を含む溶液を用いることで、タンパク質変性凝集塊へのATP混入による抽出効率の低下を生じることなく、試料から効率よくヌクレオチドを抽出できることを見出し、本

発明を完成した。

[0013] すなわち本発明は、以下よりなる。

1. 試料中に含有されるヌクレオチドの測定のために、フェノール化合物を含む溶液で試料を処理することを特徴とする試料中のヌクレオチド抽出方法。
2. フェノール化合物を含む溶液が、さらにクロロホルムを含有する溶液である前項1に記載の試料中のヌクレオチド抽出方法。
3. ヌクレオチドが、アデノシン三リン酸(ATP)、グアノシン三リン酸(GTP)及び／又はウリジン三リン酸(UTP)である前項1又は2に記載の抽出方法。
4. フェノール化合物と、さらにタンパク質変性剤を含む溶液で試料を処理することを特徴とする前項1～3のいずれか1に記載の抽出方法。
5. フェノール化合物がフェノールである前項1～4のいずれか1に記載の抽出方法。
6. フェノール化合物を含む溶液が、pH4～10である前項1～5のいずれか1に記載の抽出方法。
7. 以下の工程を含む試料中に含有されるヌクレオチドの測定方法：
 - 1) 前項1～6のいずれか1に記載の抽出方法で、測定対象物であるヌクレオチドを抽出する工程；
 - 2) 抽出したヌクレオチドを、ヌクレオチド測定用試薬を用いて定量する工程。
8. ヌクレオチドがATPであり、ヌクレオチド測定用試薬がルシフェラーゼを含むATP測定用試薬であり、ルシフェラーゼの発光度を測定することにより定量する前項7に記載の測定方法。
9. フェノール化合物を含む溶液であることを特徴とする、試料からヌクレオチドを抽出するためのヌクレオチド抽出用試薬。
10. さらにクロロホルムを含有することを特徴とする前項9に記載のヌクレオチド抽出用試薬。
11. ヌクレオチドがATPである前項9又は10に記載のヌクレオチド抽出用試薬。
12. 前項9～11のいずれか1に記載のヌクレオチド抽出用試薬とヌクレオチド測定用試薬を含むヌクレオチド測定用試薬キット。
13. ヌクレオチドがATPであり、ヌクレオチド抽出用試薬と、ルシフェラーゼを含むA

TP測定用試薬を含む前項12に記載の試薬キット。

発明の効果

- [0014] 本発明のヌクレオチド抽出方法によれば、生体等の試料から効果的にヌクレオチド、具体的にはATP、GTP及び／又はUTPを抽出することができる。従来では、培養細胞や血液等、タンパク質濃度の低い試料についてはATP等所望のヌクレオチドを抽出し、測定することが可能であったが、生体組織等タンパク質濃度の高い試料では、正確な測定結果が得られているとはいえない状況であった。本発明の抽出方法によれば、従来困難であった試料中のヌクレオチドを効果的に抽出することができる。また、本発明の抽出方法により、ATP等のヌクレオチドを抽出したのち、ATP特異的に反応するルシフェラーゼを含むATP測定試薬を用いて測定することにより、ATPを定量的に、より正確に測定することができる。

図面の簡単な説明

- [0015] [図1]標準核酸混合液(ATP、UTP、GTP、CTP)のHPLCによるヌクレオチドの分離パターンを示す図である。(実験例1)
- [図2]肝組織をフェノールTE飽和溶液を含む抽出用溶液で処理した抽出液中のヌクレオチドのHPLC分析結果を示す図である。(実施例2、実験例1)
- [図3]肝組織をTCA含有抽出用溶液で処理した抽出液中のヌクレオチドのHPLC分析結果を示す図である。(比較例1、実験例1)
- [図4]肝組織をPGE含有抽出用溶液で処理した抽出液中のヌクレオチドのHPLC分析結果を示す図である。(比較例2、実験例1)
- [図5]各組織中からの抽出液中のATP、UTP及びGTPのHPLC分析結果を示す図である。(実験例2)
- [図6]各組織中からの抽出液について、ルシフェラーゼ試薬を用いたATPの測定結果を示す図である。(実験例3)
- [図7]血液抽出物でのATP測定値を示す図である(正常マウス、ヘテロ型欠損マウス、JVSマウス)(実験例4)
- [図8]肝抽出物でのATP測定値を示す図である(正常マウス、ヘテロ型欠損マウス、JVSマウス)(実験例4)

[図9]心臓抽出物でのATP測定値を示す図である(正常マウス、ヘテロ型欠損マウス、JVSマウス)(実験例4)

[図10]脾臓抽出物でのATP測定値を示す図である(正常マウス、ヘテロ型欠損マウス、JVSマウス)(実験例4)

[図11]抽出後に含まれるATP以外の核酸(GTP, AMP)のルシフェラーゼ発光反応への影響を確認した図である。(実験例5)

[図12]健常人の末梢血試料に含まれるATP量を確認した図である。(実験例6)

[図13]各種疾患の末梢血試料に含まれるATP量を確認した図である。(実験例7)

[図14]脳症及び回復期(健常者)の末梢血試料に含まれるATP量を確認した図である。(実験例8)

発明を実施するための形態

- [0016] 本発明のヌクレオチド抽出方法におけるヌクレオチドとは、DNAやRNA等のポリヌクレオチドとは区別される核酸であり、具体的にはATP、GTP及び／又はUTP等のヌクレオチドをいう。以下、本発明のヌクレオチド、即ちポリヌクレオチドでないヌクレオチドについて、単に核酸という場合もある。
- [0017] 本発明において、試料とは上記ヌクレオチドを含有可能性のある試料であれば良く、生体由来の試料であってもよいし、生体外に存在する試料であってもよい。また、生体は、ヒト及びヒトをのぞく脊椎動物であっても良い。試料として、例えば生体組織、尿、糞便、血液、喀痰、膿汁、細胞、細胞の培養液、飲食物・医薬品・化粧品等の各工業製品・その半製品・その原料、海水、河川水、工業用水、下水、土壌等を挙げることができる。また、細菌汚染検査、清浄度検査、拭き取り検査等の各種検査における検体も、本発明における試料とすることができる。さらには、上記試料を適当な溶媒(例えば、蒸留水、生理的食塩水、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液等)に懸濁した溶液を試料としてもよい。試料が固形分を含む場合には、該試料を上記溶媒に懸濁するか、ミキサー等でホモジナイズすれば溶液状のものと同様に扱うことができる。
- [0018] 本発明のヌクレオチド抽出方法に使用されるフェノール化合物は、フェノール基を有する化合物であって、試料中のヌクレオチドを抽出しうる化合物であれば良く、特

に限定されない。特に好適にはフェノールである。フェノール化合物を含む溶液には、クロロホルムを含んでも良い。また、フェノール化合物を含む溶液には、タンパク質変性剤を含んでも良い。ここにおいて、タンパク質変性剤とは、自体公知のものが挙げられ、特に従来のATP抽出方法に使用可能であったタンパク質変性剤が好適である。そのようなタンパク質変性剤としては、グアニジンイソチアネート、過塩素酸、TCA、プロテインキナーゼK等が挙げられる。しかしながら、試料中に、ATP分解酵素以外のタンパク質が多く含まれる場合には、タンパク質変性剤を加えることでタンパク質が変性して凝集する場合がある。このような場合には測定対象物であるATP等の核酸が変性により凝集したタンパク質中に埋没して抽出が困難になってしまう場合もあり、正確な測定ができるとはいえない。また、従来のATP抽出方法である加熱処理方法も、本発明のヌクレオチド抽出方法に組み合わせて処理することができるが、タンパク質が多く含まれる試料の場合には、同様に加熱により変性したタンパク質中に核酸が取り込まれる場合もある。従って、タンパク質変性剤や加熱処理を組み合わせないでフェノール化合物を含む溶液で処理することが最も効率的にヌクレオチドを抽出することができるものと考えられる。

[0019] 本発明のフェノール化合物を含む溶液のpHは特に限定されないが、最も感度良く測定を行うためには、ルシフェラーゼ測定試薬等、核酸測定試薬において最も効率的に反応するpHに合わせることを適当と考えられる。本発明のフェノール化合物を含む溶液を用いて試料を処理した場合には、例えばpH 4～10等のようなpHの溶液で処理しても、従来の抽出方法に比べて効果的にヌクレオチドが抽出される。例えばルシフェラーゼ試薬を用いてATPを測定する場合には、ルシフェラーゼの特質によりpH 7～9付近で効果的な測定を行うことができるため、本発明のフェノール化合物を含む溶液は、これらのpHとすることができ、より好適にはpH 8付近とすることができる。上記のヌクレオチド抽出方法に使用されるフェノール化合物を含む溶液は、試料からのヌクレオチド抽出用試薬として利用することができる。

[0020] 本発明のヌクレオチド抽出用試薬におけるフェノール化合物の溶媒は、特に限定されないが、例えばTE(10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA)を用いることができる。さらに、必要に応じて安定化剤を加えても良い。

- [0021] 本発明のヌクレオチド抽出方法によると、試料に各種ヌクレオチドが存在する場合は、ATPのみならず、GTPやUTP等も効果的に抽出される。本発明のヌクレオチドの測定は、測定目的対象物に応じて適宜測定方法を選択することができ、自体公知の方法、または今後開発されるあらゆる測定方法を含めることができる。今後開発される方法については、例えばATP、GTP又はUTP等の測定用試薬であって、目的に応じて、各々の核酸特異的に測定可能な試薬を用いて測定することが好ましい。
- [0022] 自体公知の方法として、例えばATPの測定についてはルシフェリン-ルシフェラーゼ発光反応を利用する方法、ATP変換反応を利用する方法等を適用することができる。ルシフェリン-ルシフェラーゼ発光反応を利用するATPの測定方法としては、ルシフェリンおよびルシフェラーゼを含む発光試薬と、標的ATPとを、金属イオン(マグネシウムイオン等)の存在下で接触させ、生成した光の発光量を測定する方法が挙げられる。例えば、市販のATP測定用キットとして、ENLITEN^(R) ATP Assay System: プロメガ社、「細胞の」ATP測定キットTM: 東洋ビーネット社、「組織の」ATP測定キットTM: 東洋ビーネット社、ルシフェール250プラスTM: キッコーマン、等を用いることができる。これらのATP測定用試薬を用いて測定すると、本発明のヌクレオチド抽出方法によりヌクレオチドを抽出して得た試料について、例えばGTPやUTP等のATPを除くヌクレオチドが含まれていても、ATP特異的に測定することができる。
- [0023] 今後開発されるヌクレオチド測定方法、例えば新たなATP測定方法、その他GTPやUTP特異的な新規測定方法が開発される場合にも本発明のヌクレオチド抽出方法を適用することができる。
- [0024] 本発明は、フェノール化合物を含む溶液からなる、試料からヌクレオチドを抽出するためのヌクレオチド抽出用試薬にも及ぶ。ヌクレオチド抽出用試薬には、フェノール化合物のほか、さらにクロロホルムを含有していても良い。また、本発明は、ヌクレオチド抽出用試薬及びヌクレオチド測定用試薬を含むヌクレオチド測定用試薬キットにも及ぶ。具体的には、フェノール化合物を含むヌクレオチド抽出用試薬と、ルシフェラーゼを含むATP測定用試薬を含むヌクレオチド測定用試薬キットにも及ぶ。

実施例

- [0025] 本発明の理解を助けるために、以下に実施例を示して具体的に本発明を説明する

が、本発明は本実施例に限定されるものでないことはいうまでもない。

[0026] (実施例1)トリゾル(Trizol^(R))試薬を用いたヌクレオチド抽出方法

3週齢のマウス(C57BL/6J)の各組織(心臓、肝臓、脾臓、筋肉、血液)を摘出し、各組織0.05~0.4 gに、本実施例のヌクレオチド抽出用溶液3.0 mLを加え、ホモジナイズした。

本実施例のヌクレオチド抽出用溶液として、フェノール、グアニジンイソチオシアネートを含む市販のRNA抽出用試薬であるTrizol^(R)試薬(pH 5.0:Invitrogen社)2.8 mLにクロロホルム200 μ Lを加えたものを用いた。

上記ホモジナイズを4°Cで12,000 rpm×10分間遠心処理し、上清200 μ Lを保存用チューブに入れ、-80°Cにて保存した。

[0027] (実施例2)フェノールTE飽和溶液を用いたヌクレオチド抽出方法

本実施例のヌクレオチド抽出用溶液として、市販のフェノールTE飽和溶液(TE (10 mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA:WAKO社)2.8 mLにクロロホルム200 μ Lを加えたものを用いた他は、実施例1と同様の処理を行った。本抽出用溶液は、安定化剤として0.1% (w/v)の8-ヒドロキシキノリンを含み、pH8.0に調整されたものである。

[0028] (実施例3)フェノールTE飽和溶液(mod.)を用いたヌクレオチド抽出方法

本実施例のヌクレオチド抽出用溶液として、フェノール、グアニジンイソチオシアネートを含むフェノールTE飽和溶液(TE (10 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA)2.8 mLにクロロホルム200 μ Lを加えたものを用いた他は、実施例1と同様の処理を行った。本抽出用溶液は、pH 8.0に調整されたものである。

[0029] (比較例1)TCAを用いたヌクレオチド抽出方法

本比較例のヌクレオチド抽出用溶液として、市販のATP測定用試薬(ENLITEN^(R) r Luciferase/Luciferin Reagent:プロメガ社)が推奨しているATP抽出用試薬(TCA含有)を用いた。

実施例1と同様に3週齢のマウス(C57BL/6J)の各組織(心臓、肝臓、脾臓、筋肉、血液)を摘出した。その後各組織0.05~0.4 gあたりに0.25 M スクローズ溶液(10 mM HEPES-NaOH、pH 7.4)を3.0 mL加え、ホモジナイズした。上清500 μ Lをチューブに入れ、更に10%TCAを含む抽出用溶液500 μ Lをチューブに加えた。上記抽出

用溶液を含む試料液を4°Cで12,000 rpm×10分間遠心処理し、上清400 μLを新たなチューブに分注した。1.0 M Tris-Acetate (pH 7.75)を200 μL加えて攪拌した後、−80°Cにて保存した。

[0030] (比較例2) ポリエチレングリコール(PEG)を用いたヌクレオチド抽出方法

本比較例のヌクレオチド抽出用溶液として、市販のATP測定用試薬(『組織の』ATP測定キットTM: 東洋ビーネット社)に添付のATP抽出用試薬(PEG含有)を用いた。

比較例1と同様に3週齢のマウス(C57BL/6J)の各組織(心臓、肝臓、脾臓、筋肉、血液)を摘出し、各組織0.05~0.4 gあたりに0.25 M スクロース溶液(10 mM HEPES-NaOH、pH 7.4)を3.0 mL加え、ホモジナイズした。ホモジェネートを4°Cで12,000 rpm×10分間遠心処理し、上清100 μLを新たなチューブに分注した。本比較例のPEG含有ATP抽出用溶液100 μLを加えて攪拌した後、室温にて30分放置した後、−80°Cにて保存した。

[0031] (実施例4) 改良型ATP測定用試薬(rLuciferase/Luciferin Reagent mod.)

改良型ATP測定用試薬の組成を以下に示す。

D-ルシフェリンカリウム (D-Luciferin Potassium Salt) 0.8 mg

ホタル由来遺伝子組換えルシフェラーゼ(Luciferase Recombinant) 1 mg/mL(緩衝液)

緩衝液組成

20 mM トリシン(Tricine: $(\text{HOCH}_2)_3\text{C}-\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$)

1.05 mM Mg-Carbonate Hydroxide Pentahydrate

2.7 mM 硫酸マグネシウム(Magnesium Sulfate)

33.3 mM ジチオスレイトール(Dithiothreitol)

[0032] (実験例1) HPLCによる抽出産物の解析

実施例2、比較例1及び2の、各ヌクレオチド抽出方法で得られた肝組織の抽出液中のヌクレオチド(ATP、UTP、GTP、CTP、ITP)の抽出について調べた。

各抽出物の分析は、東ソー株式会社のHPLC分析情報(Data code: G00707)に準じて行った。本分析は溶離液としてアセトニトリル/75 mM カリウム2水素リン酸水溶液(70:30, v/v)、HPLCカラムとしてTSK-gel^(R) Amide-80(5 μm, I.D. 4.6×250 mm)(東

ソー株式会社)およびHPLC装置として日立高速液体クロマトグラフィー LaChrom™ ELUTEシリーズ:日立ハイテクノロジーズ社を使用して実施した。抽出液は希釈せず0.025 mLをカラムに供し、カラム温度30°C、1.0 mL/minの流速、260 nmの波長でモニターした。なお、標準核酸物質としてATP、UTP、GTP、CTP(シグマ社)を使用した。

[0033] 上記の分析結果を、図1～4に示した。図1は、標準核酸物質の抽出パターンであり、図2は実施例2のフェノールTE飽和溶液(pH8.0)を用いたヌクレオチド抽出方法により得られた抽出物の抽出パターンであり、図3は同様に比較例1のTCAを用いたヌクレオチド抽出方法によるものであり、図4は比較例2のPEGを用いたヌクレオチド抽出方法によるものである。これらの結果より、実施例2の抽出方法により得られた抽出物中には、比較例1、2の抽出方法により得られた抽出物に比べ、ATP、GTP及びUTPがより多く抽出されることが確認された。

[0034] (実験例2)各組織中のヌクレオチド量について

実施例2、比較例1及び2の、各ヌクレオチド抽出方法で得られた脳、心臓、肝臓、筋肉の各組織の抽出液中のヌクレオチド(ATP、UTP、GTP)の抽出について、HPLCにより調べた。HPLCの測定条件は、実験例1と同様に行った。

[0035] 上記の分析の結果、実施例2の方法で抽出した場合には、比較例1及び2の方法で抽出した場合に比べて、各ヌクレオチドについて高い抽出効果が認められた(図5)。

[0036] (実験例3)各組織のATP抽出について

実施例1～3、及び比較例1、2の各抽出方法を行った希釈試料10 μ Lを、ENLITE N^(R) rLuciferase/Luciferin Reagent:プロメガ社90 μ Lで、1/10倍に希釈し、ATPの測定を行った。タンパク質量は、BCA™タンパク定量アッセイキット(BCA™ Protein Assay Kit, PIERCE社)により測定した。

[0037] その結果、タンパク質あたりのATP量は、比較例1及び2の方法で抽出した場合に比べて、実施例1～3の方法で抽出した場合のほうが、高い結果が得られ、効果的にATP量を測定できたことが示唆された(図6)。

[0038] (実験例4)遺伝性カルニチン欠乏JVSマウスのATP量の測定

本発明のヌクレオチド抽出方法により抽出した場合のATP測定値について、動物組織でのATPの低下を、全身性カルニチン欠損症、即ちミトコンドリアの脂肪酸代謝障害の疾患モデルとして確立しているJVS(juvenile visceral steatosis) マウスを用いて調べた。JVSマウスは、sodium-dependent carnitine cotransporter (OCTN2)遺伝子のミスセンス変異を伴ったマウスで、先天性長鎖脂肪酸代謝障害を示す (Lu K, Nishimori H, Nakamura Y, Shima K, Kuwajima M. Biochem Biophys Res Commun 252: 290-594, 1998)。このマウスに、インフルエンザウイルス(Influenza A/PR/8/38株)を感染させた場合の、血液、肝臓、心臓及び脾臓でのATPレベルを測定し、多臓器不全の程度を判定した。

[0039] 7日齢の野生型マウス(C57BL/6J)、OCTN2遺伝子のヘテロ型欠損マウスとホモ型欠損マウス(JVSマウス)に、インフルエンザウイルスを感染させ、3日放置した。10日齢の野生型及びJVSマウスについて、インフルエンザウイルス感染なしのマウスと3日間感染させた各マウスについて、実施例1と同様に各組織を摘出し、実施例2の方法に従いヌクレオチド抽出を行い、ATPの定量を行った。ATPの定量は、実験例3の方法に従った。

[0040] 各組織におけるATPレベルを、図7～10に示した。各図において、+/+は野生型マウスを、+/-はヘテロ型欠損マウスを、-/-はJVSマウスを示す。各組織について、インフルエンザに感染したマウスでは、非感染マウスに比べて野生型、ヘテロ型欠損、JVSマウスのいずれでもATP量は低下傾向にあるが、中でもJVSマウスの場合ではATP量が著名に低値を示した事実から、多臓器不全を来していることが確認された。

[0041] (実験例5)ルシフェラーゼを用いたATP測定試薬のATP特異性の確認

以上の実験例の結果より、本発明のヌクレオチド抽出法により動物の組織から効率良くヌクレオチドを抽出することが可能であることが明らかとなった。しかし、実験例1及び2に示したように、動物の組織にはATPの他にも様々なヌクレオチドが存在する。本実験例では、各抽出液に含まれるATP以外のヌクレオチドがルシフェラーゼ発光反応に影響するか否かを検討した。ATP各希釈溶液に各濃度のGTP又はAMPを混合した溶液を調製し、これらの溶液について実験例3の方法に従い、ルシフェラーゼ発光反応を行った。

- [0042] その結果、ルシフェラーゼ発光反応によるATP測定には、組織中に存在すると考えられるGTP、AMP量、さらにそのATP濃度の $10^6 \sim 10^9$ 倍のGTP、AMP濃度存在下においても影響のないことが確認された(図11)。
- [0043] (実験例6) ヒトの血液試料のATPの測定
健常者(被験者)の末梢血を試料とし、実施例1～3に示すヌクレオチド抽出方法により抽出したATP測定値と、比較例1及び2の、各ヌクレオチド抽出方法で測定したATP測定値を比較した。被験者(3名)の末梢血試料は、インフォームド・コンセントを書面で行い、徳島大学倫理審査委員会の承認を得て、採血を行ったものを用いた。ATPの定量は、実験例3に従った。
- [0044] 上記の測定の結果、実施例1～3の方法で抽出した場合には、比較例1及び2の各抽出法を用いて抽出した場合に比べて、ATPの高い抽出効果が認められた(図12参照)。
- [0045] (実験例7) ヒト患者の血液試料のATPの測定
各種疾患で入院したヒト患者(被験者)の末梢血を試料とし、実施例2の方法で抽出した場合のATP測定値について、健常者の末梢血を試料に比べてATPレベルが低下しているかどうかについて調べた。被験者の末梢血試料は、インフォームド・コンセントを書面で行い、徳島大学の倫理審査委員会の承認を得て、採血を行ったものを用いた。被験者は、脳症患者6名、ミトコンドリア脳筋症の患者5名、そして、脳症の回復期の患者3名であった。
- [0046] 上記の測定の結果、脳症(急性期)の患者、ミトコンドリア脳筋症の患者においては、末梢血のATPレベルは低値(1 mM以下)を示したが、脳症の回復期の患者では、末梢血中のATPレベルが1.2 mM以上であり、ATPレベルが回復していることが確認された(図13参照)。
- [0047] (実験例8) 各組織のATP抽出量の測定について
脳症で入院したヒト患者(脳症の回復期の患者(健常者)5名、脳症(急性期)の患者4名)の末梢血を試料とし、実施例2の方法で抽出した。既存の市販品及び実施例4の改良型ATP測定用試薬を用いたATP測定方法の比較試験を行った。
実施例2の方法で抽出した希釈試料(1/10,000倍希釈)10 μ Lを、市販のATP試薬

(ENLITEN^(R) rLuciferase/Luciferin Reagent:プロメガ社)90 μ Lで、1/10倍に希釈し、ルミノメーター(TD-20/2:TURNER DESIGN社)でルシフェラーゼの発光量を測定した。同時に、ATP標準溶液(10^{-7} M)を1/10倍~1/10,000,000倍まで段階的に希釈した溶液を調製し、ATP濃度とルシフェラーゼの発光量との相関関係を表す標準曲線を作成した。この標準曲線をもとに、ルシフェラーゼの発光量から試料中に存在するATP濃度を算出した。

[0048] 同様に実施例2の方法で抽出した希釈試料10 μ Lを、実施例4の改良型ATP測定用試薬90 μ Lで希釈した。他は、上記市販の試薬を用いた方法と同様の方法で試料中に存在するATP濃度を算出した。

[0049] 上記の比較試験の結果、市販のATP試薬又は実施例4の改良型ATP試薬で測定した場合には、ほぼ同様の結果が得られることが確認された(図14参照)。

[0050] 以上の結果から、本発明のフェノール化合物を含む溶液を用いたヌクレオチドの抽出法によると、動物組織中のヌクレオチドを効率良く抽出可能なことが確認され、さらに本発明のATPの測定方法に使用したルシフェラーゼ発光を指標とする試薬では、ルシフェラーゼ発光は抽出した核酸のATPのみに反応することが再確認された。さらに、改良型ATP測定用試薬(rLuciferase/Luciferin Reagent mod.)を用いることで、従来の方法と比較して、より安価に測定試料中のATP量の測定を実現可能なことが明らかになった。

産業上の利用可能性

[0051] 以上詳述したように、本発明のヌクレオチドの抽出方法により、効果的にATP、GTP又はUTPを抽出可能なことが確認された。従って、効果的にこれらのヌクレオチドの測定を行うことができる。そのため、本発明のヌクレオチド抽出方法に使用する抽出用溶液を、ヌクレオチド抽出用試薬とすることができ、ATP、GTP又はUTPの測定用試薬キットに含めることができる。特に、現実に市販されているATP測定用試薬を用いて測定する場合にも、本発明の抽出方法は有効に利用できることから、既存のATP測定用試薬に添付するATP抽出用試薬としても用いることができ、このような抽出用試薬を含むATP測定用試薬キットとして提供することができる。

[0052] 本発明のヌクレオチドの抽出方法は、各種工業分野、特に、バイオ・臨床検査・医

学等の現場における標的ATPの測定法として好適に使用できる。なかでも、患者の末梢血のATPレベルを測定する技術は、患者の容態をモニタリングする一つの指標として、医療機関に波及する可能性がある。

請求の範囲

- [1] 試料中に含有されるヌクレオチドの測定のために、フェノール化合物を含む溶液で試料を処理することを特徴とする試料中のヌクレオチド抽出方法。
- [2] フェノール化合物を含む溶液が、さらにクロロホルムを含有する溶液である請求項1に記載の試料中のヌクレオチド抽出方法。
- [3] ヌクレオチドが、アデノシン三リン酸(ATP)、グアノシン三リン酸(GTP)及び/又はウリジン三リン酸(UTP)である請求項1又は2に記載の抽出方法。
- [4] フェノール化合物と、さらにタンパク質変性剤を含む溶液で試料を処理することを特徴とする請求項1～3のいずれか1に記載の抽出方法。
- [5] フェノール化合物がフェノールである請求項1～4のいずれか1に記載の抽出方法。
- [6] フェノール化合物を含む溶液が、pH4～10である請求項1～5のいずれか1に記載の抽出方法。
- [7] 以下の工程を含む試料中に含有されるヌクレオチドの測定方法：
1) 請求項1～6のいずれか1に記載の抽出方法で、測定対象物であるヌクレオチドを抽出する工程；
2) 抽出したヌクレオチドを、ヌクレオチド測定用試薬を用いて定量する工程。
- [8] ヌクレオチドがATPであり、ヌクレオチド測定用試薬がルシフェラーゼを含むATP測定用試薬であり、ルシフェラーゼの発光度を測定することにより定量する請求項7に記載の測定方法。
- [9] フェノール化合物を含む溶液であることを特徴とする、試料からヌクレオチドを抽出するためのヌクレオチド抽出用試薬。
- [10] さらにクロロホルムを含有することを特徴とする請求項9に記載のヌクレオチド抽出用試薬。
- [11] ヌクレオチドがATPである請求項9又は10に記載のヌクレオチド抽出用試薬。
- [12] 請求項9～11のいずれか1に記載のヌクレオチド抽出用試薬とヌクレオチド測定用試薬を含むヌクレオチド測定用試薬キット。
- [13] ヌクレオチドがATPであり、ヌクレオチド抽出用試薬と、ルシフェラーゼを含むATP測定用試薬を含む請求項12に記載の試薬キット。

[図1]

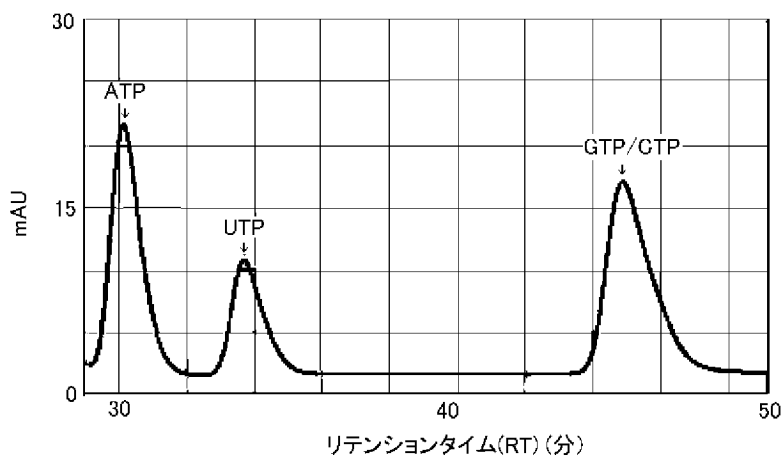


図1 核酸標準混合液による核酸の分離パターン

[図2]

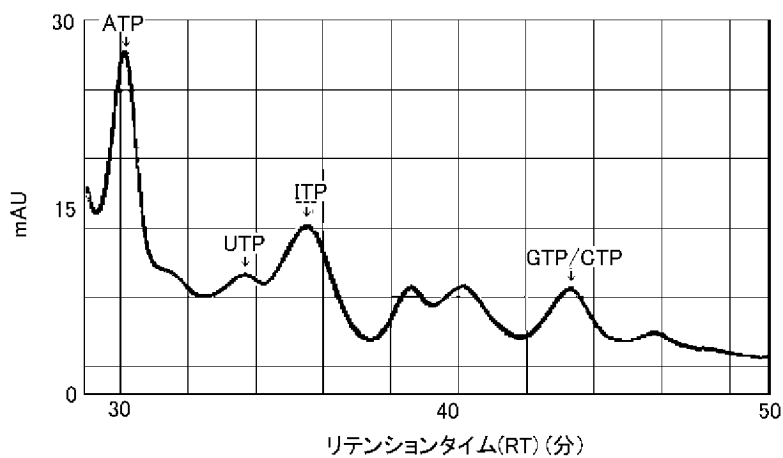


図2 肝組織のPhenol-TE抽出中の核酸の量のHPLC分析

[図3]

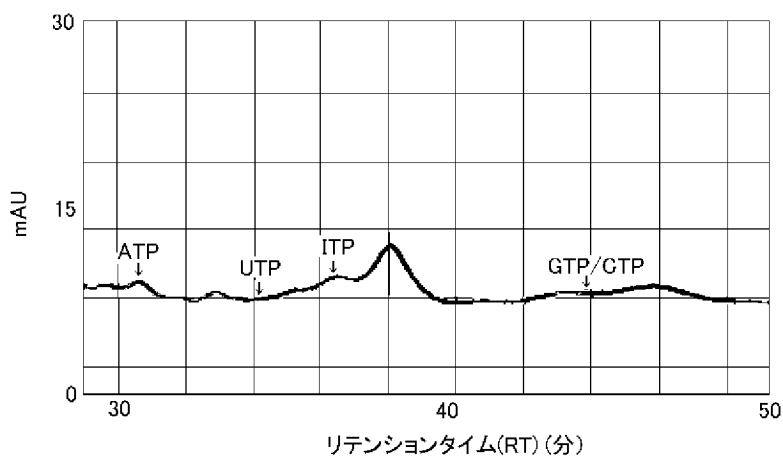


図3 肝組織のTCA抽出中の核酸の量のHPLC分析

〔図4〕

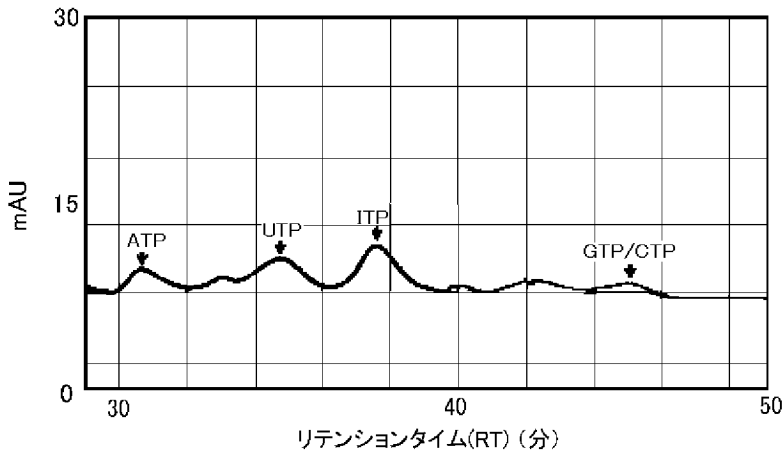
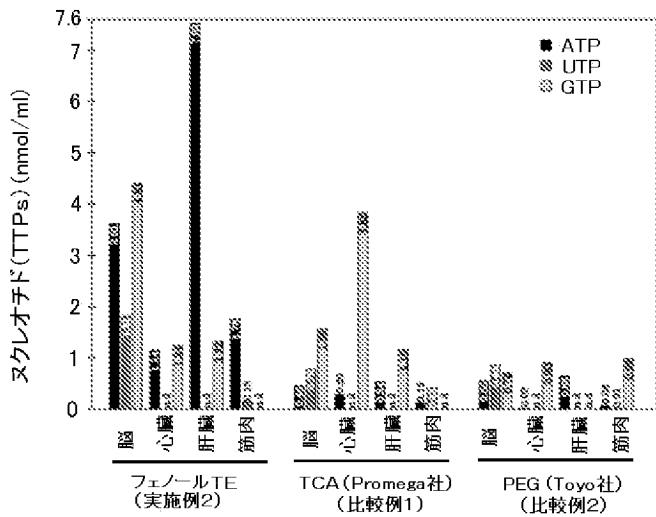
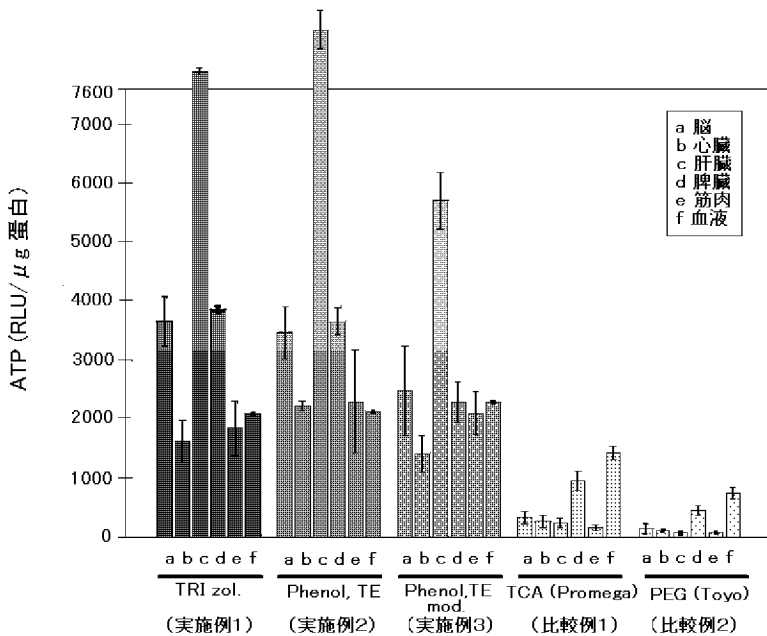


図4 肝組織のPEG抽出中の核酸の量のHPLC分析

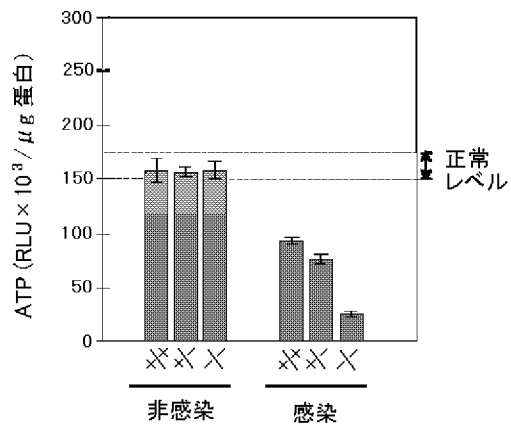
〔図5〕



〔図6〕

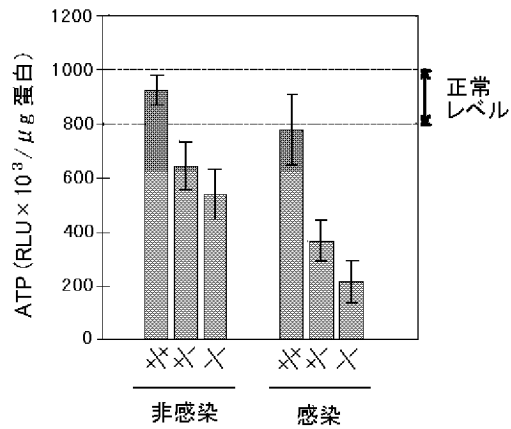


[図7]



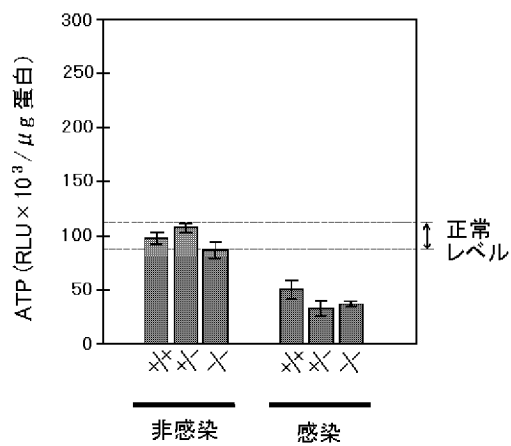
各10日齢マウスの血液のATPレベル

[図8]



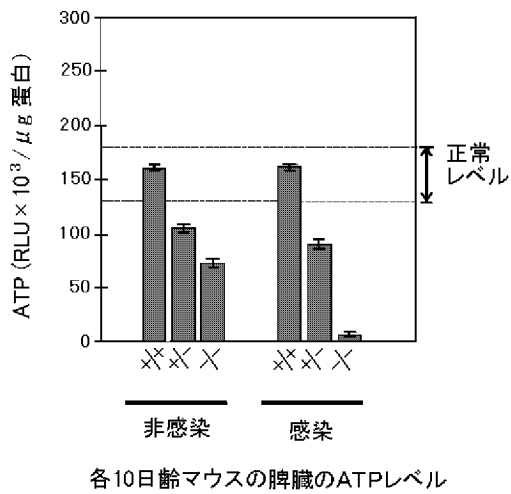
各10日齢マウスの肝臓のATPレベル

[図9]

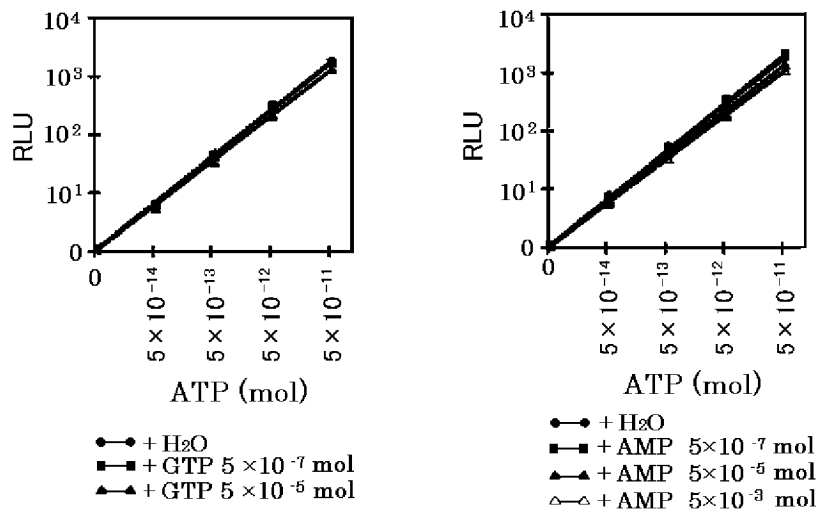


各10日齢マウスの心臓のATPレベル

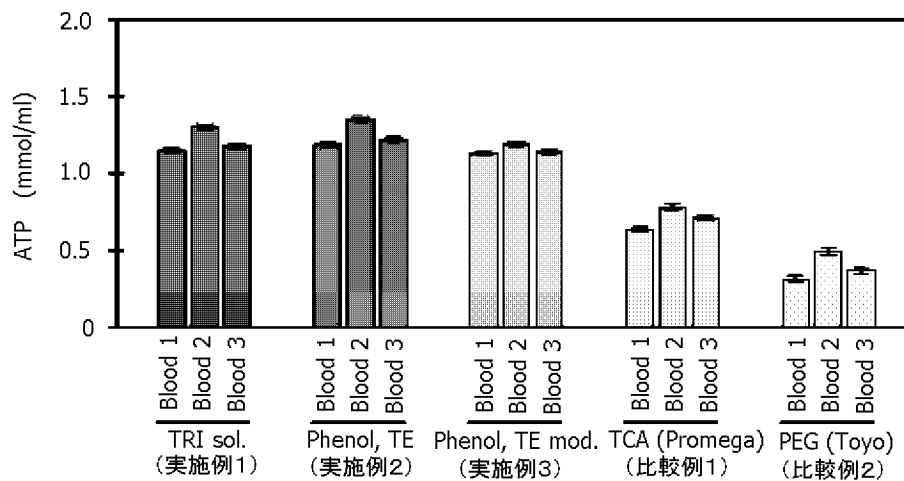
[図10]



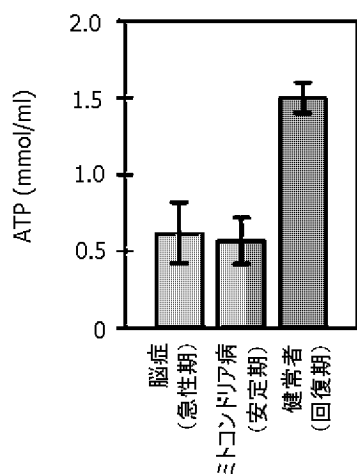
[図11]



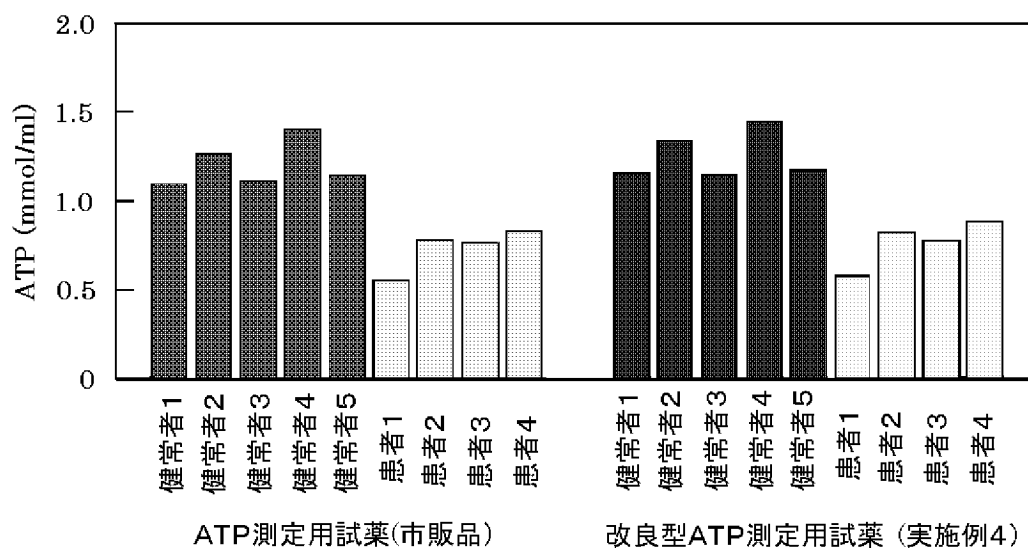
[図12]



[図13]



[図14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2009/051364

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12Q1/66(2006.01) i, C12Q1/68(2006.01) i, G01N21/76(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)
C12Q1/66, C12Q1/68, G01N21/76

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	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubMed, JSTPlus(JDreamII), Science Direct

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	NOACK, H., et al., Evaluation of a Procedure for the Simultaneous Determination of Oxidized and Reduced Pyridine Nucleotides and Adenylates in Organic Phenol Extracts from Mitochondria, ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 1992, Vol.202, p.162-165, full text, particularly, Abstract, lines 1 to 6, MATERIALS AND METHODS, Fig. 1, table 1	1-6, 9-11/7, 8, 12, 13
Y	ARRETXE, M., et al., The effect of toxic discharges on ATP content in activated sludge, Environmental Toxicology and Water Quality, 1997, Vol.12, p.23-29, full text, particularly, Abstract, lines 1 to 2, MATERIALS AND METHODS	7, 8, 12, 13

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

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 06 March, 2009 (06.03.09)	Date of mailing of the international search report 17 March, 2009 (17.03.09)
--	---

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 (IPC))
 Int.Cl. C12Q1/66(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N21/76(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 (IPC))
 Int.Cl. C12Q1/66, C12Q1/68, G01N21/76

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 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2009年
 日本国実用新案登録公報 1996-2009年
 日本国登録実用新案公報 1994-2009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)
 PubMed, JSTPlus(JDreamII), Science Direct

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 /	NOACK, H., et al., Evaluation of a Procedure for the Simultaneous Determination of Oxidized and Reduced Pyridine Nucleotides and Adenylates in Organic Phenol Extracts from Mitochondria,	1-6、 9-11 /
Y	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 1992, Vol.202, p.162-165, 全文、特に Abstract 第1-6行、MATERIALS AND METHODS、図1及び表1	7、8、 12、13
	ARRETXE, M., et al., The effect of toxic discharges on ATP content	

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	の日の後に公表された文献
「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	「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
「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	「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
「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)	「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
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 06.03.2009	国際調査報告の発送日 17.03.2009
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) 富永 みどり 電話番号 03-3581-1101 内線 3448
	4B 4152

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
Y	in activated sludge, Environmental Toxicology and Water Quality, 1997, Vol. 12, p. 23-29, 全文、特に Abstract 第 1 - 2 行及び MATERIALS AND METHODS	7、8、 12、13