

(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  
2015年10月8日(08.10.2015)



(10) 国際公開番号  
WO 2015/151801 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12Q 1/34 (2006.01) C12Q 1/48 (2006.01)  
C12Q 1/26 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/057870
- (22) 国際出願日: 2015年3月17日(17.03.2015)
- (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 2014-077076 2014年4月3日(03.04.2014) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人滋賀医科大学(SHIGA UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCE) [JP/JP]; 〒5202192 滋賀県大津市瀬田月輪町 Shiga (JP).
- (72) 発明者: 森田 真也(MORITA, Shin-ya); 〒5202192 滋賀県大津市瀬田月輪町 国立大学法人滋賀医科大学内 Shiga (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所(SAEGUSA & PARTNERS); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka (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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, 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, ST, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第21条(3))



WO 2015/151801 A1

(54) Title: METHOD AND KIT FOR QUANTIFYING CARDIOLIPIN

(54) 発明の名称: カルジオリピンの定量方法及び定量用キット

(57) Abstract: Disclosed is a method for quantifying cardiolipin in a sample, which comprises the following steps: (1) allowing phospholipase D, glycerolkinase, glycerol-3-phosphate oxidase and peroxidase to act on the sample; and (2) measuring the fluorescence intensity, absorbance or amount of luminescence of a compound produced in step (1) and then quantifying cardiolipin from a calibration curve that has been determined in advance. Also disclosed is a kit for quantifying cardiolipin, which comprises phospholipase D, glycerolkinase, glycerol-3-phosphate oxidase and peroxidase.

(57) 要約: 開示されているのは、以下の工程を有する試料中のカルジオリピンの定量方法: (1)試料にホスホリパーゼD、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ及びペルオキシダーゼを作用させる工程、並びに(2)工程(1)で生成する化合物の蛍光強度、吸光度又は発光量を測定し、予め求めた検量線からカルジオリピンを定量する工程、並びにホスホリパーゼD、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ及びペルオキシダーゼを含むカルジオリピンの定量用キットである。

## 明 細 書

発明の名称：カルジオリピンの定量方法及び定量用キット

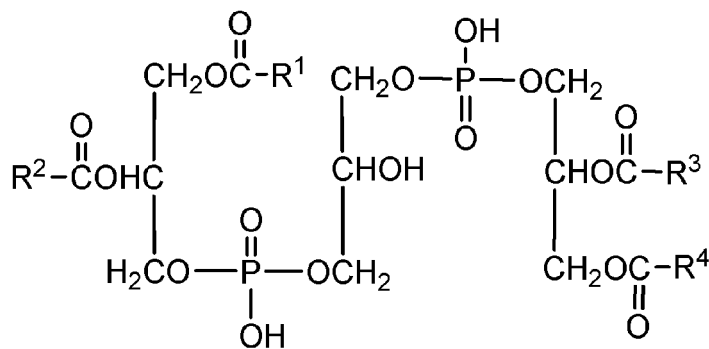
### 技術分野

[0001] 本発明は、カルジオリピンの定量方法、及びカルジオリピンの定量用キットに関する。

### 背景技術

[0002] カルジオリン(cardiolipin) (以下、CLと称することもある)は、リン脂質の一種であって、動物、植物、細菌界に広く分布し、動、植物では全リン脂質の1~15%、細菌によっては全リン脂質の50%を占める場合もある。また、カルジオリンは、以下の構造を有している。

[0003] [化1]



R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>は各々鎖式炭化水素基を表す

[0004] CLは、哺乳類細胞において主にミトコンドリアに存在しているリン脂質である。このため、CLは、電子伝達系を含むミトコンドリアに存在する様々な酵素活性を調節し、アポトーシスにも関与している。特に、心筋細胞には多量のCLが含まれる。

[0005] 従来、CLの定量は、薄層クロマトグラフィー／リン定量法により行われてきた。しかしながら、これらの定量法は、検出感度及び定量精度が低く、時間及び手間を必要とした。また、CLに対する質量分析法は確立していない。

[0006] このように、CLは生体において重要で欠かすことのできない成分であるにもかかわらず、その分析法は現在においても極めて乏しい。

[0007] 本発明者は、これまでに一連のリン脂質(ホスファチジルコリン、ホスファ

チジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリン、及びスフィンゴミエリン)に対する酵素蛍光定量法を開発している(特許文献1、2等)。

[0008] 特許文献1では、ホスホリパーゼD、L-アミノ酸オキシダーゼ及びペルオキシダーゼを試料に作用させて、生成する化合物の蛍光強度を測定することによるホスファチジルセリンの酵素定量法が報告されている。

[0009] また、特許文献2では、スフィンゴミエリナーゼ、アルカリホスファターゼ、コリンオキシダーゼ及びペルオキシダーゼを試料に作用させて、生成する化合物の蛍光強度を測定することによるスフィンゴミエリンの酵素定量法が報告されている。

[0010] しかしながら、CLについての酵素蛍光定量法については開発されていないため、CLが抜け落ちることにより、リン脂質全体のプロファイルが分からないことが問題となっている。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0011] 特許文献1：国際公開第2012/070617号

特許文献2：特開2013-255436号公報

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0012] このように、従来、CLの定量は、薄層クロマトグラフィー／リン定量法により行われている。しかしながら、これらの方法には、検出感度及び定量精度が低いこと、時間及び手間がかかることなどの欠点がある。

[0013] 本発明は、CLを高感度で簡便に定量できるカルジオリピンの定量方法、及びカルジオリピンの定量用キットを提供することを目的とする。

#### 課題を解決するための手段

[0014] 本発明者は、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、図1に示す一連の酵素反応を用いることによって、上記目的を達成することができるとい

う知見を得た。図1に示すカルジオリピンの定量方法について以下説明する。

- (i) ホスホリパーゼDによりCLを加水分解することで、グリセロール及びホスファチジン酸を生成させる。
- (ii) グリセロールキナーゼによりグリセロールをリン酸化し、グリセロール-3-リン酸を生成させる。
- (iii) グリセロール-3-リン酸オキシダーゼによりグリセロール-3-リン酸を酸化し、 $H_2O_2$ を生成させる。
- (iv) 10-アセチル-3,7-ジヒドロキシフェノキサジン(Amplex(商標) Red)及び $H_2O_2$ をペルオキシダーゼにより反応させることでレゾルフィンを生成させる。レゾルフィンから生じる蛍光強度を測定することにより、CL量を測定することができる。

[0015] このように、ホスホリパーゼDがCLを分解してグリセロールを遊離させることができることは知られていなかった。

[0016] 本発明は、これら知見に基づき、更に検討を重ねて完成されたものであり、次のカルジオリピンの定量方法、及びカルジオリピンの定量用キットを提供するものである。

[0017] (I) カルジオリピンの定量方法

(I-1) 以下の工程を有する試料中のカルジオリピンの定量方法：

- (1) 試料にホスホリパーゼD、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ及びペルオキシダーゼを作用させる工程、並びに
- (2) 工程(1)で生成する化合物の蛍光強度、吸光度又は発光量を測定し、予め求めた検量線からカルジオリピンを定量する工程。

(I-2) 前記工程(1)において、(a)ホスホリパーゼDを作用させる段階、並びに(b)グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ及びペルオキシダーゼを作用させる段階、の二段階に分けて酵素を作用させる、(I-1)に記載の方法。

(I-3) 前記ホスホリパーゼDが、ストレプトマイセス属に属する微生物由来の

ものである、(I-1)又は(I-2)に記載の方法。

(I-4) 前記ホスホリパーゼDが、ストレプトマイセス・クロモフスカスに属する微生物由来のものである、(I-1)~(I-3)のいずれか一項に記載の方法。

[0018] (II) カルジオリピンの定量用キット

(II-1) ホスホリパーゼD、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ及びペルオキシダーゼを含むカルジオリピンの定量用キット。

(II-2) 前記ホスホリパーゼDが、ストレプトマイセス属に属する微生物由来のものである、(II-1)に記載のキット。

(II-3) 前記ホスホリパーゼDが、ストレプトマイセス・クロモフスカスに属する微生物由来のものである、(II-1)又は(II-2)に記載のキット。

### 発明の効果

[0019] 本発明のカルジオリピンの定量方法及び定量用キットは、高感度、且つ高精度なカルジオリピンの定量が可能である。

[0020] また、本発明の検出限界は10 pmolであり、従来のCLの定量方法と比べて、極めて高感度であり、高精度の定量を行うことが可能である。

[0021] さらに、本発明における必要な操作は、ピペットによる試料及び反応液のマイクロプレートへの分注が主で、極めて簡便であり、そのため、ハイスループット定量が可能になる。

### 図面の簡単な説明

[0022] [図1]本発明のCLの定量方法における反応を示す図である。

[図2]試験例1のCL測定における標準曲線を示すグラフである。各点は3回の測定の平均±S.D.を表す。線は、線形回帰分析によって得た。相関係数は、 $r=0.9996$  (A)と $r=0.9998$  (B)であった。

[図3]試験例1のCL測定におけるウシ心臓由来CL、及び4つのオレオイル鎖を持つCL (TOCL)(ともに100  $\mu$ M)に反応した蛍光変化を示すグラフであり、ウシ心臓由来CLによる蛍光変化を100%として表している。各バーは3回の測定の平均±S.D.を表す。多重比較は、ANOVAに従いBonferroni検定を使用して行った

。ウシ心臓由来CLとTOCLとの間で統計学的に有意な相違はなかった。

### 発明を実施するための形態

[0023] 以下、本発明のカルジオリピンの定量方法、及びカルジオリピンの定量用キットについて詳細に説明する。

#### [0024] カルジオリピンの定量方法

本発明の試料中のカルジオリピンの定量方法は、以下の工程を有することを特徴とする。

(1)試料にホスホリパーゼD、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ及びペルオキシダーゼを作用させる工程、並びに

(2)工程(1)で生成する化合物の蛍光強度、吸光度又は発光量を測定し、予め求めた検量線からカルジオリピンを定量する工程。

[0025] 以下、各工程について説明する。

#### [0026] <工程(1)>

工程(1)では、試料にホスホリパーゼD、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ及びペルオキシダーゼを作用させる。

[0027] 試料にホスホリパーゼDを作用させることにより、CL及びH<sub>2</sub>Oからグリセロール及びホスファチジン酸が生成する。次に、当該生成物にグリセロールキナーゼを作用させることにより、グリセロール及びATP（アデノシン5'-三リン酸）からグリセロール-3-リン酸及びADP（アデノシン5'-二リン酸）が生成する。次に、当該生成物にグリセロール-3-リン酸オキシダーゼを作用させることにより、グリセロール-3-リン酸とO<sub>2</sub>からH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>とジヒドロキシアセトンリン酸が生成する。

[0028] ホスホリパーゼD (EC 3.1.4.4)は、グリセロリン脂質のホスホジエステル結合の塩基側を加水分解するリン脂質加水分解酵素である。本発明で使用するホスホリパーゼDは、カルジオリピンを加水分解して、グリセロールとホスファチジン酸を生成させることができるものであれば、微生物、動物及び植物いずれの由来のホスホリパーゼDでも使用できるが、微生物由来のホスホリパーゼDが好ましく、ストレプトマイセス属由来のホスホリパーゼDがより好

ましく、ストレプトミセス・クロモフスカス(*Streptomyces chromofuscus*)由来のものが特に好ましい。

[0029] 本発明で使用するグリセロールキナーゼ (EC 2.7.1.30)は、グリセロールをリン酸化し、グリセロール-3-リン酸を生成させることができるものであれば、微生物、動物及び植物由来のグリセロールキナーゼを広く使用できる。これらの中でも、微生物由来のグリセロールキナーゼが好ましく、セルロモナス・エスピー(*Cellulomonas sp.*)由来のグリセロールキナーゼが特に好ましい。

[0030] 本発明で使用するグリセロール-3-リン酸オキシダーゼ(EC 1.1.3.21)は、グリセロール-3-リン酸を酸化し、過酸化水素を生成させることができるものであれば、微生物、動物及び植物由来のグリセロール-3-リン酸オキシダーゼを広く使用できる。これらの中でも、微生物由来のグリセロール-3-リン酸オキシダーゼが好ましく、ペディオコッカス・エスピー(*Pediococcus sp.*)由来のグリセロール-3-リン酸オキシダーゼが特に好ましい。

[0031] 本発明で使用するペルオキシダーゼ(EC 1.11.1.7)は、微生物、動物及び植物由来のペルオキシダーゼを広く使用できる。これらの中でも、植物由来のペルオキシダーゼが好ましく、西洋ワサビ(*horseradish*)由来のペルオキシダーゼが特に好ましい。

[0032] 本発明のCLの定量方法では、試料に上記4種類の酵素を作用させる場合は、4種の酵素を一緒に添加して一度に反応させてもよいし又は逐次的に添加して反応させてもよい。しかしながら、(a) ホスホリパーゼD、並びに(b) グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ及びペルオキシダーゼ、の二段階に分けて酵素を作用させることが好ましい。このように、4種類の酵素を段階的に反応させることにより精度を高めることができる。

[0033] 試料にホスホリパーゼDを作用させる条件としては使用する酵素の特性に応じて適宜設定することができるが、pHは通常6~9、温度は通常15~40℃である。試料にホスホリパーゼDを作用させる時間は、分析する試料の特性に応じて適宜設定することができるが、通常1分以上である。

- [0034] 試料にグリセロールキナーゼを作用させる条件としては使用する酵素の特性に応じて適宜設定することができるが、pHは通常6~9、温度は通常15~40℃である。試料にグリセロールキナーゼを作用させる時間は、分析する試料の特性に応じて適宜設定することができるが、通常1分以上である。
- [0035] 試料にグリセロール-3-リン酸オキシダーゼを作用させる条件としては使用する酵素の特性に応じて適宜設定することができるが、pHは通常6~9、温度は通常15~40℃である。試料にグリセロール-3-リン酸オキシダーゼを作用させる時間は、分析する試料の特性に応じて適宜設定することができるが、通常1分以上である。
- [0036] 試料にペルオキシダーゼを作用させる条件としては使用する酵素の特性に応じて適宜設定することができるが、pHは通常6~9、温度は通常15~40℃である。試料にペルオキシダーゼを作用させる時間は、分析する試料の特性に応じて適宜設定することができるが、通常1分以上である。
- [0037] 4種類の酵素の作用温度及びpHが共通する場合は全ての酵素の反応を同時に行うことができ、作用温度及びpHが酵素により異なる場合は逐次段階的に必要とされる温度及びpHに設定し反応を行うことができる。
- [0038] 本発明のCLの定量方法において、試料に4種類の酵素を作用させる反応液中の4種類の酵素の量は、含まれるCL量等を考慮して分析に適切な酵素量に適宜調整することができる。これら4種類の酵素は、反応時間内にほぼ完全に反応を終えることで高い精度が得られるため、十分な量の酵素を用いることが望ましい。
- [0039] 本発明において、試料にホスホリパーゼD、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ及びペルオキシダーゼを作用させるための反応液には、ペルオキシダーゼの存在下で $H_2O_2$ と反応することで蛍光強度、吸光度又は発光量が増加する化合物が含まれる。なお、4種の酵素を逐次的に反応させる場合は、当該化合物は、少なくともペルオキシダーゼを反応させる際の反応液に含まれていればよい。そのような化合物としては、例えば、10-アセチル-3,7-ジヒドロキシフェノキサジン(Amplex Red)が挙げられる。反応



液中の10-アセチル-3,7-ジヒドロキシフェノキサジンの濃度は適宜調整することができるが、通常10~500  $\mu\text{M}$ である。

[0040] 試料にホスホリパーゼD、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ及びペルオキシダーゼを作用させるための反応液には、試料と酵素の他に、緩衝液、金属塩、ATP等が含まれていてもよい。緩衝液としては、例えばトリス-塩酸緩衝液、リン酸カリウム緩衝液、グリシン-塩酸緩衝液、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液等が挙げられる。金属塩としては、例えば、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩等が挙げられる。なお、グリセロールキナーゼを作用させる反応液には、ATPとマグネシウム塩が含まれていることが望ましい。

[0041] 本発明における試料としては、CLの定量が求められているものであれば特に限定されず、例えば、培養細胞、培養液、ヒト又は動物の組織及び血液を含む体液、植物の組織及び植物体液、菌類、真菌類、細菌及び細菌の培養液、医薬、食品、サプリメント等が挙げられる。試料は希釈液により希釈されていてもよく、そのような希釈液としては緩衝液が挙げられる。緩衝液としては、例えば前述するものが挙げられる。試料は酵素反応の前に前処理されていてもよく、そのような処理としては加熱処理等が挙げられる。

[0042] <工程(2)>

工程(2)では、工程(1)で生成する化合物の蛍光強度、吸光度又は発光量を測定し、予め求めた検量線からカルジオリピンを定量する。

[0043] 一連の反応の結果、1分子のCLから1分子の $\text{H}_2\text{O}_2$ が生成するため、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 量を測定することでCLを定量することが可能となる。

[0044] 工程(2)における測定方法としては、具体的には、ペルオキシダーゼによって $\text{H}_2\text{O}_2$ と反応して新たな吸収波長を得る化合物(例えば、N,N'-ビス(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)トリジン等)を用いて吸光度測定を行う方法、ペルオキシダーゼによって $\text{H}_2\text{O}_2$ と反応して複数の化合物が酸化縮合し新たな吸収波長を得る化合物(例えば、フェノールと4-アミノアンチピリンとの酸化縮合等)を用いて吸光度測定を行う方法、ペルオキシダーゼによって $\text{H}_2\text{O}_2$ と反応して新

たに蛍光を生じる化合物(例えば、10-アセチル-3,7-ジヒドロキシフェノキサジン等)を用いて蛍光強度を測定する方法、及びペルオキシダーゼによって $H_2O_2$ と反応して新たに発光を生じる化合物(例えば、ルミノール等)を用いて発光量を測定する方法が挙げられる。

[0045] 上記の中でも好ましいのは、ペルオキシダーゼによって $H_2O_2$ と反応して新たに蛍光を生じる化合物を用いて蛍光強度を測定する方法であり、特に好ましいのは $H_2O_2$ に10-アセチル-3,7-ジヒドロキシフェノキサジン(Amplex Red)とペルオキシダーゼを作用させることにより生成するレゾルフィンの蛍光強度を測定する方法である。レゾルフィン、は、蛍光性化合物であり、最大励起波長は571 nm、最大蛍光波長は585 nmである。それに対して、10-アセチル-3,7-ジヒドロキシフェノキサジンは、非蛍光性化合物であり、波長571 nm付近の光を照射しても蛍光は生じない。一連の反応の結果、1分子のCLから1分子のレゾルフィンが生成するため、レゾルフィン量を測定することでCLを定量することが可能である。レゾルフィン量の測定は、例えば蛍光マイクロプレートリーダーを使用し、励起波長544 nm、蛍光波長590 nmを選択して蛍光強度を測定することにより行うことができる。

[0046] 本発明において、微生物、動物又は植物由来の酵素とは、微生物、動物又は植物が産生する酵素、及び該酵素のアミノ酸配列において、1又は2個以上のアミノ酸を置換、付加、欠失、挿入させることで得られ、且つ本来有する酵素活性を有している改変体を広く包含する。

[0047] 上記「1個若しくは2個以上」の範囲は特に限定されないが、例えば1~50個、好ましくは1~25個、より好ましくは1~12個、更に好ましくは1~9個、特に好ましくは1~5個を意味する。特定のアミノ酸配列において、1個若しくは2個以上のアミノ酸を置換、欠失、又は付加させる技術は公知である。

[0048] 上記の各酵素は市販品として入手可能であるか、又は公知の遺伝子配列の情報を利用して遺伝子を取得し形質転換体を作製することにより生産することができる。生産した酵素の精製は、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトカラムクロマトグ

ラフィー、硫酸アンモニウム塩折法等により行うことができる。

[0049] 本発明のCLの定量方法の一例として次の方法が挙げられる。まずCLの濃度が既知の溶液を適宜希釈した標準試料について本発明の方法により蛍光強度を測定し、CL濃度に対する蛍光強度の検量線を作成する。そして、CLの含量が未知の試料を用いて本発明により蛍光強度を測定し、上記検量線からCL量を求めることができる。

[0050] 本発明のカルジオリピンの定量方法は、高感度、且つ高精度なカルジオリピンの定量が可能である。

[0051] カルジオリピンの定量用キット

本発明のカルジオリピンの定量用キットは、ホスホリパーゼD、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ及びペルオキシダーゼを含むことを特徴とする。

[0052] 本発明のCLの定量用キットを用いて前記CLの定量方法を実施することで、高感度、且つ高精度なカルジオリピンの定量が可能である。

[0053] 本発明のCLの定量用キットを使用する方法は、前述するCLの定量方法を適用できる。

[0054] ホスホリパーゼD、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ及びペルオキシダーゼは前述したものと同様である。

[0055] 本発明のCLの定量用キットは、ホスホリパーゼD、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ及びペルオキシダーゼを酵素液として含んでもよいし、また乾燥粉末の形態で含んでもよい。本発明のCLの定量用キットは、 $H_2O_2$ の存在下でペルオキシダーゼを作用させることで蛍光強度、吸光度又は発光量を測定可能な化合物を生成する化合物を含んでもよい。本発明のCLの定量用キットはまた、更に緩衝剤、金属塩、ATP等を含んでもよく、マグネシウム塩とATPとを少なくとも含んでいることが望ましい。緩衝剤及び金属塩としては前述するものが挙げられる。緩衝剤及び金属塩は水溶液又は粉末の形態でキットに含まれていることが好ましい。

## 実施例

[0056] 以下、本発明を更に詳しく説明するため実施例を挙げる。しかし、本発明はこれら実施例等になんら限定されるものではない。

[0057] 材料

ストレプトマイセス・クロモフスカス由来のホスホリパーゼDは、旭化成株式会社から購入した。セルロモナス・エスピー由来のグリセロールキナーゼ及びペディオコッカス・エスピー由来のグリセロール-3-リン酸オキシダーゼは、東洋紡株式会社から購入した。西洋ワサビ根由来のペルオキシダーゼは、オリエンタル酵母工業株式会社から購入した。Amplex Red試薬は、Invitrogen社から購入した。ウシ心臓由来CL、及びTOCLは、Avanti Polar Lipids社から購入した。その他の化学薬品は特級のものを使用した。

[0058] CLの酵素測定

測定は、4反応試液システムを使用して行った。反応試液L1は、5 U/ml ホスホリパーゼD、1.5 mM  $\text{CaCl}_2$ 、50 mM NaCl、及び50 mM Tris-HCl (pH 7.4)を含有する。反応試液L2は、5 U/ml グリセロールキナーゼ、4.5 mM ATP、5 U/ml グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ、5 U/ml ペルオキシダーゼ、300  $\mu\text{M}$  Amplex Red、0.2容量% Triton X-100、1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、50 mM NaCl、及び50 mM Tris-HCl (pH 7.4)を含有する。Amplex Red Stop試薬は、Invitrogen社から購入した。CL標準溶液は、1容量% Triton X-100水溶液にウシ心臓由来CLを溶解した。

[0059] サンプル(10  $\mu\text{l}$ )又はCL標準溶液を反応試液L1 (40  $\mu\text{l}$ )に添加し、37°Cで30分間インキュベートした。インキュベート後、反応試液L2 (50  $\mu\text{l}$ )を添加した。室温で30分間インキュベート後、Amplex Red Stop試薬(20  $\mu\text{l}$ )を添加した。蛍光強度を蛍光マイクロプレートリーダー(Infinite M200, Tecan社)を使用して測定し、励起波長及び蛍光波長は、それぞれ544 nmと590 nmに設定した。

[0060] 細胞中のCL含量の測定

HEK293細胞は、10%熱不活性化FBSを含むDMEMを用いて、加湿インキュベーター(5%  $\text{CO}_2$ )内37°Cで培養した。100 mmディッシュに細胞を播種し、37°Cで数

日間インキュベートした。インキュベート後、細胞を氷上で冷却し、冷却したPBSで洗浄し、掻き取り、細胞を超音波処理により破碎した。細胞の脂質を Bligh and Dyerの方法(Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol 37, 911-917.)によって抽出し、使用直前に調製した1容量% Triton X-100に溶解した。細胞からの脂質抽出物中のCLは、本発明の酵素定量法によって測定した。

[0061] <結果>

試験例 1 : CL測定

上記のCLの酵素定量法により、CL標準溶液を用いて検量線を作成した。結果を図2に示す。

[0062] CL測定のための検量線は、0~150  $\mu\text{M}$ の間で直線となった( $r=0.9996$  : 図2 A、 $R=0.9998$  : 図2 B)。検出限界は1  $\mu\text{M}$  (反応溶液中に10 pmol)であった。

[0063] 二種類のCLについて同濃度(100  $\mu\text{M}$ )で上記のCLの酵素定量法により蛍光強度を調べた。ウシ心臓由来CLで生じた蛍光強度を100%として表した結果を、図3に示す。ウシ心臓由来CLと4つのオレオイル鎖を有するTOCLとを比較したところ、同濃度で蛍光強度に差はなかった。

[0064] 試験例 2 : 培養細胞中のCLの測定

CL測定の正確性を確認するために、既知量のCLを細胞脂質抽出物に加えて回収試験を行った(表1)。その結果、添加したCLは、各添加量において、ほぼ100%回収できた。この結果から、添加したCLの定量は、他の細胞抽出物の阻害を受けておらず、本発明の定量方法は正確であることが分かった。

[0065]

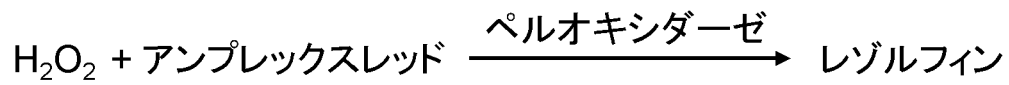
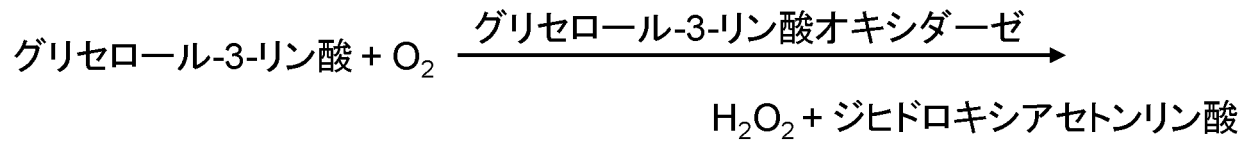
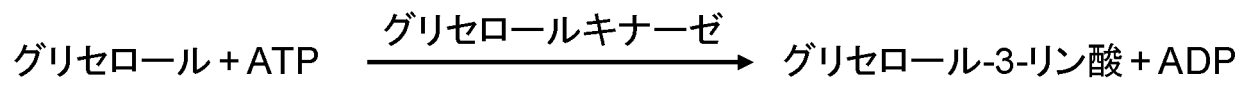
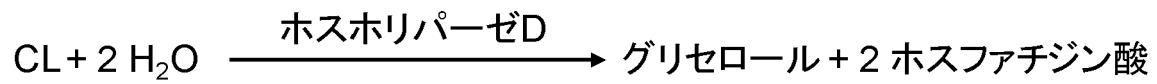
[表1]

CLの添加量 ( $\mu\text{M}$ )	測定量 ( $\mu\text{M}$ )	期待量 ( $\mu\text{M}$ )	回収率 (%)
0	36.43		
12.5	48.86	48.93	99.85
25.0	61.25	61.43	99.70
50.0	87.74	86.43	101.52
75.0	110.02	111.43	98.74
100.0	138.06	136.43	101.19

## 請求の範囲

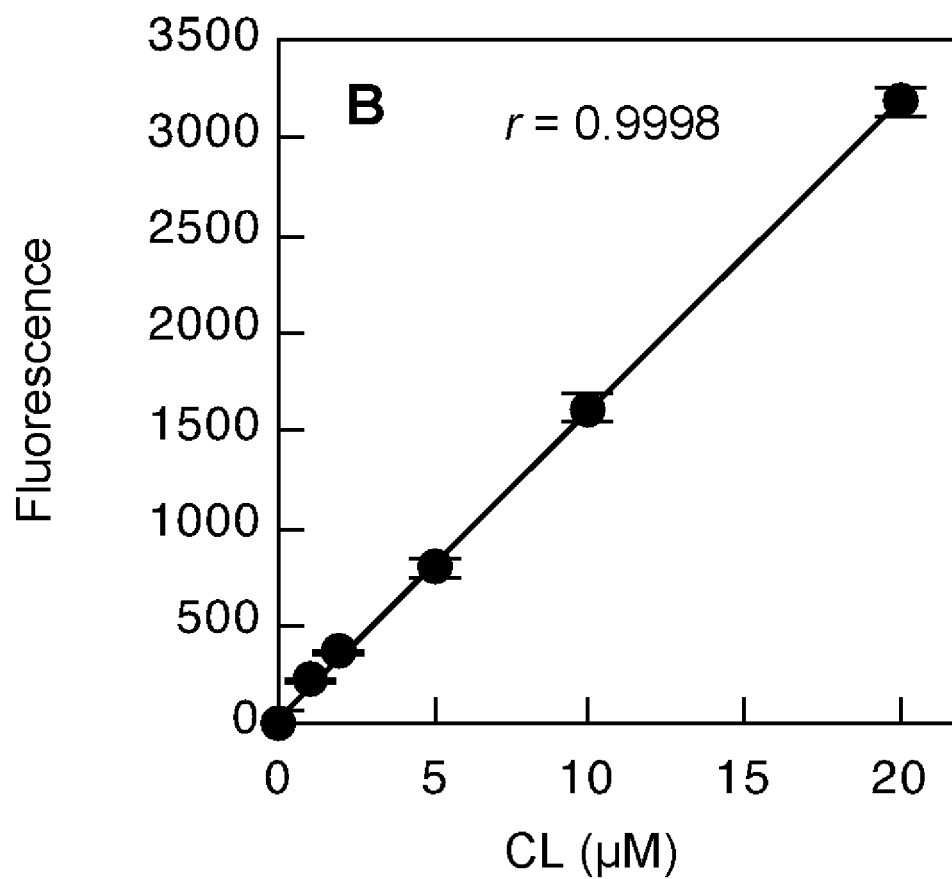
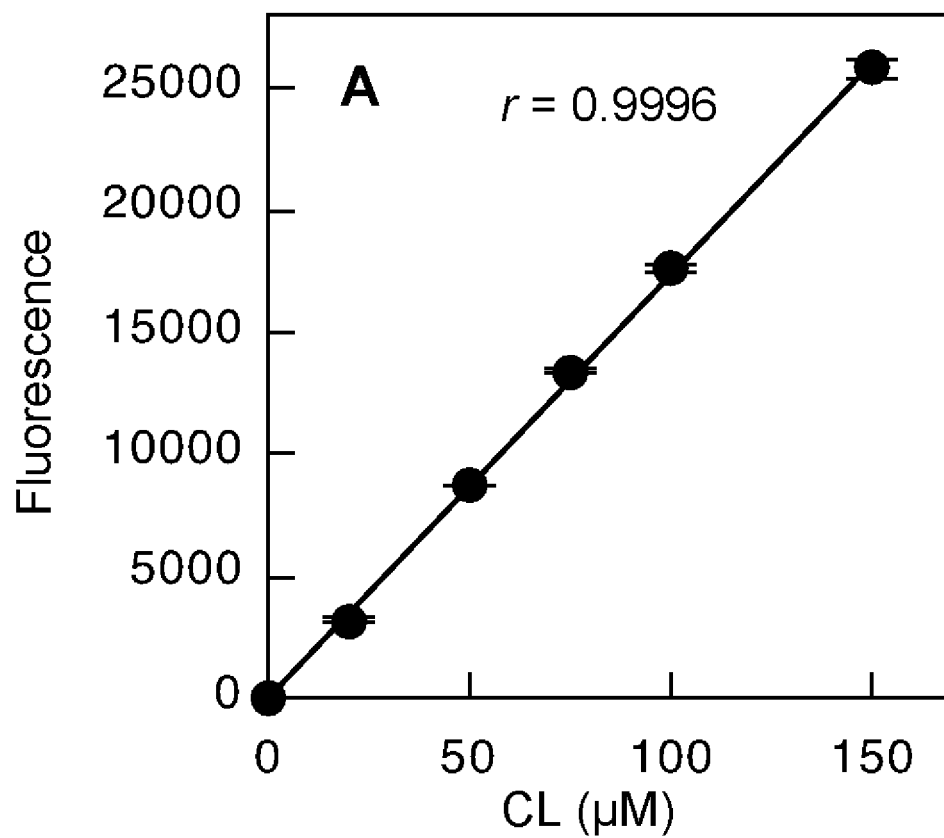
- [請求項1] 以下の工程を有する試料中のカルジオリピンの定量方法：
- (1)試料にホスホリパーゼD、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ及びペルオキシダーゼを作用させる工程、並びに
- (2)工程(1)で生成する化合物の蛍光強度、吸光度又は発光量を測定し、予め求めた検量線からカルジオリピンを定量する工程。
- [請求項2] 前記工程(1)において、(a)ホスホリパーゼDを作用させる段階、並びに(b)グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ及びペルオキシダーゼを作用させる段階、の二段階に分けて酵素を作用させる、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記ホスホリパーゼDが、ストレプトマイセス属に属する微生物由来のものである、請求項1に記載の方法。
- [請求項4] 前記ホスホリパーゼDが、ストレプトマイセス・クロモフスカスに属する微生物由来のものである、請求項1に記載の方法。
- [請求項5] ホスホリパーゼD、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ及びペルオキシダーゼを含むカルジオリピンの定量用キット。
- [請求項6] 前記ホスホリパーゼDが、ストレプトマイセス属に属する微生物由来のものである、請求項5に記載のキット。
- [請求項7] 前記ホスホリパーゼDが、ストレプトマイセス・クロモフスカスに属する微生物由来のものである、請求項5に記載のキット。

[図1]

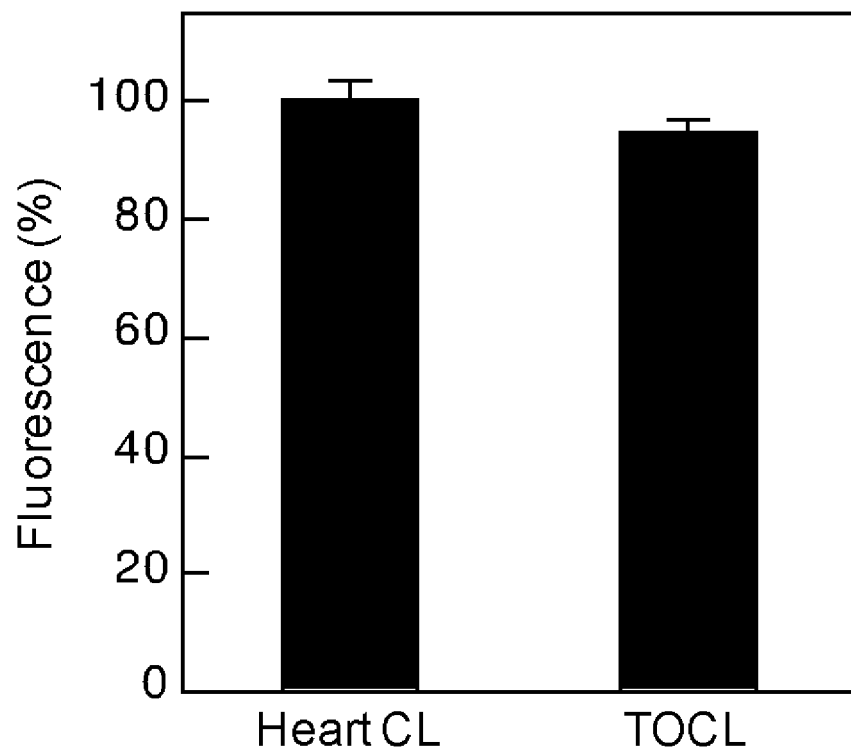




[圖2]



[図3]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2015/057870

<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  <i>C12Q1/34(2006.01)i, C12Q1/26(2006.01)i, C12Q1/48(2006.01)i</i></p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>														
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  <i>C12Q1/34, C12Q1/26, C12Q1/48</i></p>														
<p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <table style="width:100%; border:none;"> <tr> <td style="width:33%;"><i>Jitsuyo Shinan Koho</i></td> <td style="width:33%;"><i>1922-1996</i></td> <td style="width:33%;"><i>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</i></td> <td style="width:33%;"><i>1996-2015</i></td> </tr> <tr> <td><i>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</i></td> <td><i>1971-2015</i></td> <td><i>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</i></td> <td><i>1994-2015</i></td> </tr> </table>			<i>Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1922-1996</i>	<i>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</i>	<i>1996-2015</i>	<i>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1971-2015</i>	<i>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1994-2015</i>				
<i>Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1922-1996</i>	<i>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</i>	<i>1996-2015</i>											
<i>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1971-2015</i>	<i>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1994-2015</i>											
<p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  <i>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), BIOSIS/MEDLINE(STN)</i></p>														
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:10%;">Category*</th> <th style="width:70%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width:20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td align="center">A</td> <td>FULLER KM., ET AL, Determination of the cardiolipin content of individual mitochondria by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection., Electrophoresis, 2002, Vol.23, No.11, p.1571-1576</td> <td align="center">1-7</td> </tr> <tr> <td align="center">A</td> <td>GARRETT TA., ET AL, Quantification of cardiolipin molecular species in Escherichia coli lipid extracts using liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry., Rapid Commun. Mass Spectrom., 2012, Vol.26, No.19, p.2267-2274</td> <td align="center">1-7</td> </tr> <tr> <td align="center">A</td> <td>LEUNG CW., ET AL, Superior fluorescent probe for detection of cardiolipin., Annal. Chem., 2014.01, Vol.86, No.2, p.1263-1268</td> <td align="center">1-7</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	FULLER KM., ET AL, Determination of the cardiolipin content of individual mitochondria by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection., Electrophoresis, 2002, Vol.23, No.11, p.1571-1576	1-7	A	GARRETT TA., ET AL, Quantification of cardiolipin molecular species in Escherichia coli lipid extracts using liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry., Rapid Commun. Mass Spectrom., 2012, Vol.26, No.19, p.2267-2274	1-7	A	LEUNG CW., ET AL, Superior fluorescent probe for detection of cardiolipin., Annal. Chem., 2014.01, Vol.86, No.2, p.1263-1268	1-7
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
A	FULLER KM., ET AL, Determination of the cardiolipin content of individual mitochondria by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection., Electrophoresis, 2002, Vol.23, No.11, p.1571-1576	1-7												
A	GARRETT TA., ET AL, Quantification of cardiolipin molecular species in Escherichia coli lipid extracts using liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry., Rapid Commun. Mass Spectrom., 2012, Vol.26, No.19, p.2267-2274	1-7												
A	LEUNG CW., ET AL, Superior fluorescent probe for detection of cardiolipin., Annal. Chem., 2014.01, Vol.86, No.2, p.1263-1268	1-7												
<p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.      <input type="checkbox"/> See patent family annex.</p>														
<table style="width:100%; border:none;"> <tr> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </td> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </td> </tr> </table>			<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>										
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>													
<p>Date of the actual completion of the international search                  08 June 2015 (08.06.15)</p>		<p>Date of mailing of the international search report                  16 June 2015 (16.06.15)</p>												
<p>Name and mailing address of the ISA/                  Japan Patent Office                  3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,                  Tokyo 100-8915, Japan</p>		<p>Authorized officer</p> <p>Telephone No.</p>												

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/057870

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2013-255436 A (Shiga University of Medical Science), 26 December 2013 (26.12.2013), claims (Family: none)	1-7
A	WO 2012/070617 A1 (Shiga University of Medical Science), 31 May 2012 (31.05.2012), claims (Family: none)	1-7
A	MORITA S., ET AL, Enzymatic measurement of phosphatidic acid in cultured cellsJ. Lipid Res., 2009, Vol.50, No.9, p.1945-1952	1-7
A	MORITA S., ET AL, Specific and sensitive enzymatic measurement of sphingomyelin in cultured cells., Chem. Phys. Lipids, 2012, Vol.165, No.5, p.571-576	1-7
A	MORITA S., ET AL, Enzymatic measurement of phosphatidylserine in cultured cells., J. Lipid Res., 2012, Vol.53, No.2, p.325-330	1-7
A	MORITA S., ET AL, Functional analysis of two isoforms of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase., Biochem. J., 2010, Vol.432, No.2, p.387-398	1-7
P,X	Shin'ya MORITA, Tomohiro TERADA, "Shinki Koso Keikoho ni yoru Mitochondria no Rin Shishitsu Teiryō Bunseki", Proceedings of Japanese Conference on the Biochemistry of Lipids, 2014.05, vol.56, pages 126 to 128, [Method]	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
 Int.Cl. C12Q1/34(2006.01)i, C12Q1/26(2006.01)i, C12Q1/48(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. C12Q1/34, C12Q1/26, C12Q1/48

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 1971-2015年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2015年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2015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)  
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), BIOSIS/MEDLINE (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 請求項の番号
A	FULLER KM., ET AL, Determination of the cardiolipin content of individual mitochondria by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection., Electrophoresis, 2002, Vol.23, No.11, p.1571-1576	1-7
A	GARRETT TA., ET AL, Quantification of cardiolipin molecular species in Escherichia coli lipid extracts using liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry., Rapid Commun. Mass Spectrom., 2012, Vol.26, No.19, p.2267-2274	1-7

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 08.06.2015	国際調査報告の発送日 16.06.2015
--------------------------	--------------------------

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) 柴原 直司	4N	3534
	電話番号 03-3581-1101 内線 3488		

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 請求項の番号
A	LEUNG CW., ET AL, Superior fluorescent probe for detection of cardiolipin., Annal. Chem., 2014.01, Vol.86, No.2, p.1263-1268	1-7
A	JP 2013-255436 A (国立大学法人滋賀医科大学) 2013.12.26, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-7
A	WO 2012/070617 A1 (国立大学法人滋賀医科大学) 2012.05.31, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-7
A	MORITA S., ET AL, Enzymatic measurement of phosphatidic acid in cultured cellsJ. Lipid Res., 2009, Vol.50, No.9, p.1945-1952	1-7
A	MORITA S., ET AL, Specific and sensitive enzymatic measurement of sphingomyelin in cultured cells., Chem. Phys. Lipids, 2012, Vol.165, No.5, p.571-576	1-7
A	MORITA S., ET AL, Enzymatic measurement of phosphatidylserine in cultured cells., J. Lipid Res., 2012, Vol.53, No.2, p.325-330	1-7
A	MORITA S., ET AL, Functional analysis of two isoforms of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase., Biochem. J., 2010, Vol.432, No.2, p.387-398	1-7
PX	森田真也/寺田智祐, 新規酵素蛍光法によるミトコンドリアのリン脂質定量分析, 日本脂質生化学研究, 2014.05, Vol.56, p.126-128, 【方法】	1-7