

(19) 日本国特許庁 (JP)

再 公 表 特 許 (A1)

(11) 国際公開番号

W02017/057672

発行日 平成30年7月26日 (2018. 7. 26)

(43) 国際公開日 平成29年4月6日 (2017. 4. 6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/66 (2006.01)	C 1 2 Q 1/66	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/532 (2006.01)	G O 1 N 33/532	B

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁)

出願番号	特願2017-543612 (P2017-543612)	(71) 出願人	000120456
(21) 国際出願番号	PCT/JP2016/079006		栄研化学株式会社
(22) 国際出願日	平成28年9月30日 (2016. 9. 30)		東京都台東区台東4丁目19番9号
(31) 優先権主張番号	特願2015-192367 (P2015-192367)	(74) 代理人	110000796
(32) 優先日	平成27年9月30日 (2015. 9. 30)		特許業務法人三枝国際特許事務所
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	山岡 利彦
(31) 優先権主張番号	特願2016-77437 (P2016-77437)		栃木県下都賀郡野木町野木143 栄研化
(32) 優先日	平成28年4月7日 (2016. 4. 7)		学株式会社 野木事業所内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	Fターム (参考)	4B063 QQ22 QR02 QS02 QS36 QX02

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ルシフェリンの安定化方法及び生物発光の測定方法

(57) 【要約】

本発明の解決すべき課題は、ルシフェリン溶液の安定性を高める組成を提供することである。本発明は、ルシフェリン溶液にボロン酸誘導体又はその塩を共存させることを特徴とする、ルシフェリン溶液の安定化方法、ならびにルシフェリンを基質としてルシフェラーゼの生物発光反応を行うときに、ピロリン酸塩およびボロン酸誘導体又はその塩を共存させることを特徴とする、生物発光強度の減衰・低下の抑制方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ルシフェラーゼの基質であるルシフェリン溶液にボロン酸誘導体又はその塩を共存させることを特徴とする、ルシフェリン溶液の安定化方法。

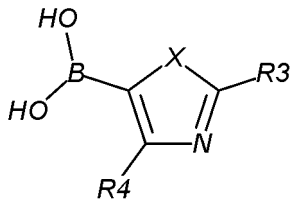
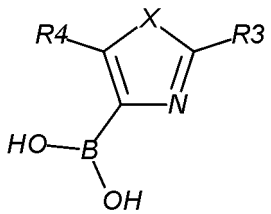
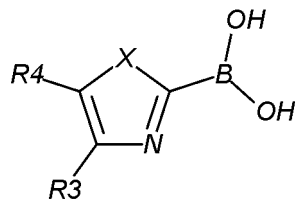
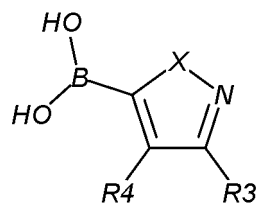
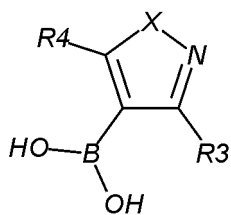
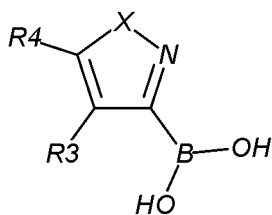
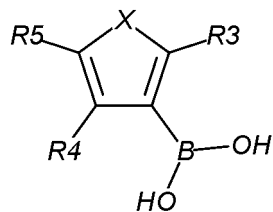
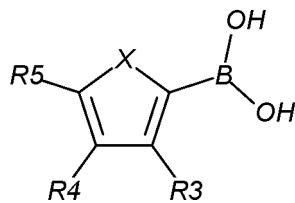
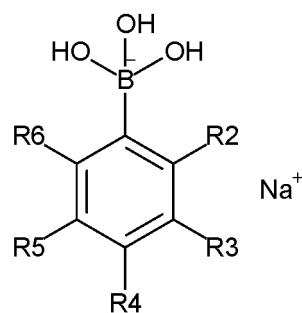
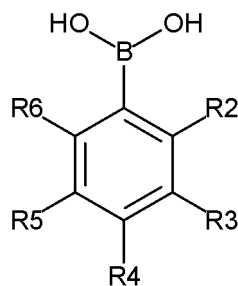
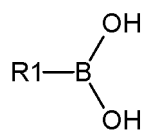
【請求項 2】

標識酵素としてルシフェラーゼを用い、ルシフェリンを基質として生物発光反応を測定する免疫学的測定方法において、ボロン酸誘導体又はその塩を共存させてルシフェリン溶液を安定化させる免疫学的測定方法。

【請求項 3】

前記ボロン酸誘導体又はその塩がほう酸、四ほう酸ナトリウム、および下記式で表されるボロン酸誘導体又はその塩からなる群より選ばれる少なくとも一種を含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【化 1】



〔式中、R 1 は、置換基としてボロニル基、ハロゲン基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、ニトロ基、アミノ基、スルホ基及びチオール基からなる群より選択される少なくと

も一種を有してもよく、二重結合または三重結合を含んでよいC 1～C 10のアルキル基を示す。XはN－R 7（窒素（N）にR 7が結合）、酸素（O）及び硫黄（S）のいずれかひとつを示す。R 2、R 3、R 4、R 5、R 6、及びR 7は、同一又は異なって、H（水素）、ボロニル基、ハロゲン基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、ニトロ基、アミノ基、スルホ基、チオール基、（tert－ブトキシカルボニル）アミノ基、または置換基としてボロニル基、ハロゲン基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、ニトロ基、アミノ基、スルホ基及びチオール基からなる群より選択される少なくとも一種を有してもよく、二重結合もしくは三重結合を含んでよいC 1～C 10のアルキル基を示す。]

【請求項 4】

ルシフェリンを基質としてルシフェラーゼの生物発光反応を行うときに、ピロリン酸塩およびボロン酸誘導体又はその塩を共存させることを特徴とする、生物発光強度の減衰・低下の抑制方法。

10

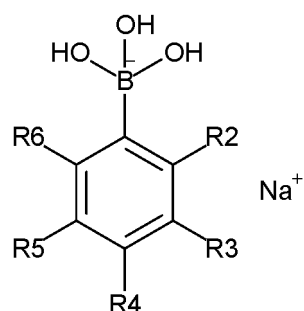
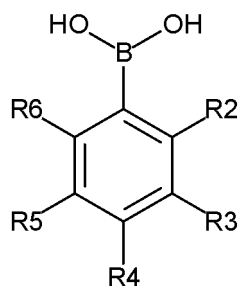
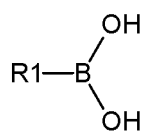
【請求項 5】

標識物としてルシフェラーゼを用い、ルシフェリンを基質として生物発光反応を測定する免疫学的測定方法において、ピロリン酸塩およびボロン酸誘導体又はその塩を共存させて生物発光強度の減衰・低下を抑制させる免疫学的測定方法。

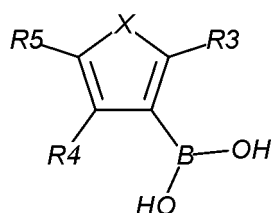
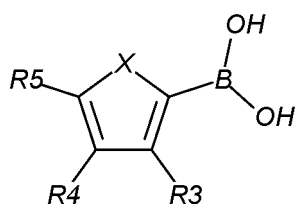
【請求項 6】

前記ボロン酸誘導体又はその塩が下記式で表されるボロン酸誘導体又はその塩からなる群より選ばれる少なくとも一種を含む、請求項 4 又は 5 に記載の方法。

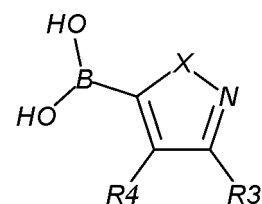
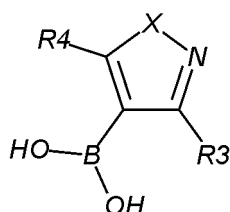
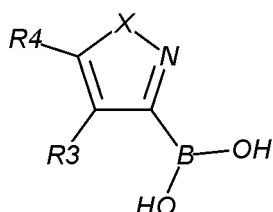
【化 2】



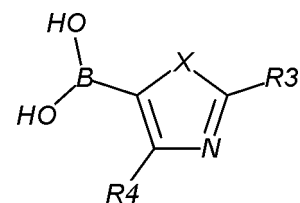
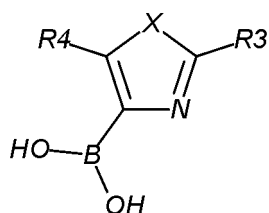
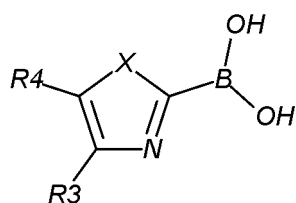
10



20



30



40

〔式中、R 1は、置換基としてボロニル基、ハロゲン基、ヒドロキシ基、カルボキシ基、ニトロ基、アミノ基、スルホ基及びチオール基からなる群より選択される少なくとも一種を有してもよく、二重結合または三重結合を含んでよいC 1～C 10のアルキル基を示す。XはN-R 7（窒素（N）にR 7が結合）、酸素（O）及び硫黄（S）のいずれかひとつを示す。R 2、R 3、R 4、R 5、R 6、及びR 7は、同一又は異なって、H（水素）、ボロニル基、ハロゲン基、ヒドロキシ基、カルボキシ基、ニトロ基、アミノ基、スルホ基、チオール基、（tert-ブトキシカルボニル）アミノ基、または置換基としてボロニル基、ハロゲン基、ヒドロキシ基、カルボキシ基、ニトロ基、アミノ基、スルホ基及びチオール基からなる群より選択される少なくとも一種を有してもよく、二重結合もしくは三重結合を含んでよいC 1～C 10のアルキル基を示す+。〕

【請求項 7】

前記ルシフェリンがホタルルシフェリンである、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

50

前記ルシフェラーゼがホタルルシフェラーゼであり、前記ルシフェリンがホタルルシフェリンである、請求項 2、3、5 及び 6 のいずれか 1 項に記載の免疫学的測定方法。

【請求項 9】

請求項 2、3 及び 5～8 のいずれか一項に記載の免疫学的測定方法に用いる免疫学的測定試薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ルシフェリンの安定化方法及びルシフェラーゼとルシフェリンによる生物発光に関する。

【背景技術】

【0002】

酵素免疫測定法による高感度測定系として、ルシフェラーゼとその発光基質であるルシフェリン反応による生物発光酵素免疫測定法が用いられている。ルシフェラーゼとルシフェリンの発光反応の利用法としては、例えば、ルシフェラーゼを標識物質とした微量物質の測定が挙げられる。特に生体内に存在するホルモン等の物質を免疫学的に測定する生物発光酵素免疫測定法では、高感度であることに加えて測定範囲も広いことから、従来の酵素免疫測定法やラジオイムノアッセイに代わるものとして注目されている。

【0003】

このルシフェラーゼと酵素基質となるルシフェリンは、由来となる生物種によって異なり、同一の発光生物由来の組合せのみに発光が認められ、その発光強度が強いことから、高感度の測定が要求されるイムノアッセイに利用されている。

【0004】

しかし、ルシフェリンを溶液の状態で保存すると、基質としての機能が低下し、測定系の発光強度が低下する。

【0005】

そこで、アデノシンモノフォスフェート、アデノシンジフォスフェート、フェニルフォスフェート等のリン酸供与体をルシフェリン溶液に共存させることにより、ルシフェリン溶液中のルシフェリンを安定化させる方法が提案されている（特許文献 1）。

【0006】

また、ルシフェリン溶液の pH をやや酸性に保持することにより、ルシフェリン溶液中のルシフェリンを安定化させる方法が提案されている（特許文献 2）。

【0007】

さらに、ルシフェリン溶液中の、ホタルルシフェリンをシクロデキストリンに包接させて、ルシフェリン溶液中のホタルルシフェリンを安定化させる方法が提案されている（特許文献 3）。

【0008】

一方、ウミホタルルシフェリンでは、ギ酸、プロピオン酸、リンゴ酸、酒石酸等の酸性溶質を含み、pH を酸性に保持することによる、溶液中のウミホタルルシフェリンを安定化させる方法が提案されている（特許文献 4）。

【0009】

しかしながら、いずれの処方でも、ルシフェリン溶液の状態でも長期間保存することにより、ルシフェリンの基質としての機能が低下し、十分な安定性は得られていない。

【0010】

そこで、ルシフェリン溶液の状態でも長期間保存しても、ルシフェリンの基質としての機能を低下させないルシフェリン溶液の組成の確立が期待されている。

【0011】

また、ルシフェラーゼによる生物発光反応は、時間とともにその発光強度が減衰するため、発光反応の初期に高い発光強度が得られていても、発光強度を測定する時点でその発光強度が減衰し、ルシフェラーゼの生物発光反応を指標とした測定の高感度化の妨げとな

10

20

30

40

50

っている。

【0012】

そこで、拮抗的阻害剤であるD-ルシフェリン類似体およびピロリン酸を共存させることにより発光強度を維持することが認められたが、拮抗的阻害剤により発光強度自体が弱く、感度は低下する（特許文献5）。

【0013】

また、トリポリリン酸、メタリン酸、ヘキサメタリン酸、ピロリン酸等のポリリン酸化合物またはその塩およびジチオスレイトール、ジチオエリトルトール、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、グルタチオン等のスルフヒドリル化合物の共存下で生物発光反応を行うと、発光強度の減衰を抑制し、長時間にわたって高い発光強度を維持することが提案されている（特許文献6）。

10

【0014】

さらに、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ると、発光半減期が5分以上の発光を生じることが示されている（特許文献7）。

【0015】

しかしながら、これらの組成を添加しても、生物発光反応による発光強度は徐々に減衰している。また、試薬の調製後から測定までの時間が長いと、生物発光反応の初期の発光強度自体も低下する。

20

【0016】

そこで、試薬の調製後も発光強度の低下が生じず、ルシフェラーゼの生物発光反応における発光強度の減衰が抑制される発光試薬の新たな組成の開発が期待されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0017】

【特許文献1】特開2000-166550号公報

【特許文献2】特開2000-253899号公報

【特許文献3】特開2000-319280号公報

【特許文献4】特開平08-154699号公報

30

【特許文献5】特開昭55-13893号公報

【特許文献6】特開平8-47399号公報

【特許文献7】国際公開W02006/013837

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0018】

本発明は、ルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを安定化させることを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0019】

40

本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、ルシフェラーゼの生物発光反応を利用した測定を行うときに用いる、基質であるルシフェリン溶液にボロン酸誘導体又はその塩を組み合わせるにより安定化できることを見出した。また、本発明者は、試薬の組成を見出し、本発明を完成させるに至った。本発明者は、上記新規知見に基づき、ルシフェラーゼの生物発光反応を利用した測定の際の試薬組成等、試行錯誤を重ねた末、本発明を完成させた。

【0020】

すなわち、本発明は、以下の構成からなる。

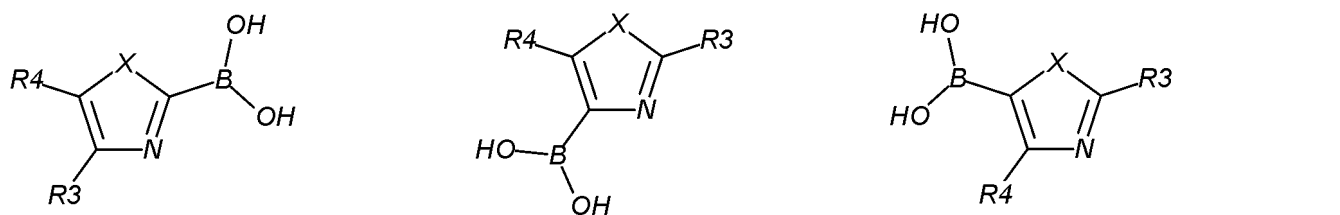
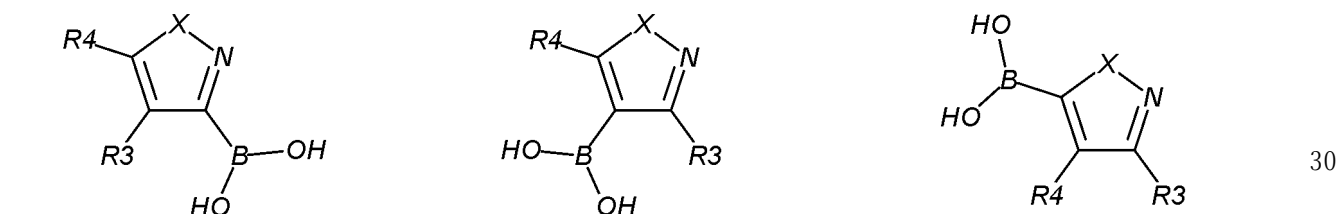
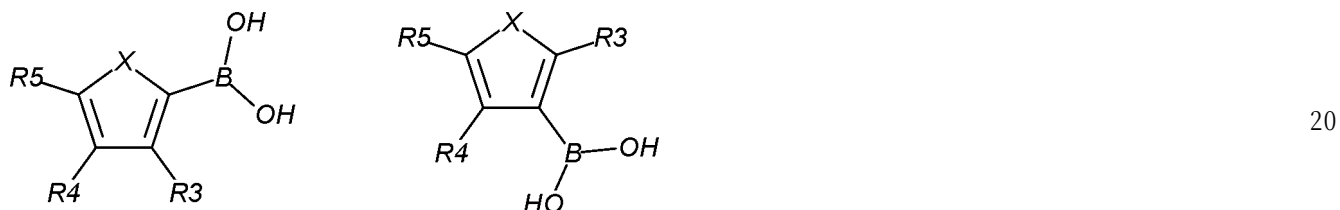
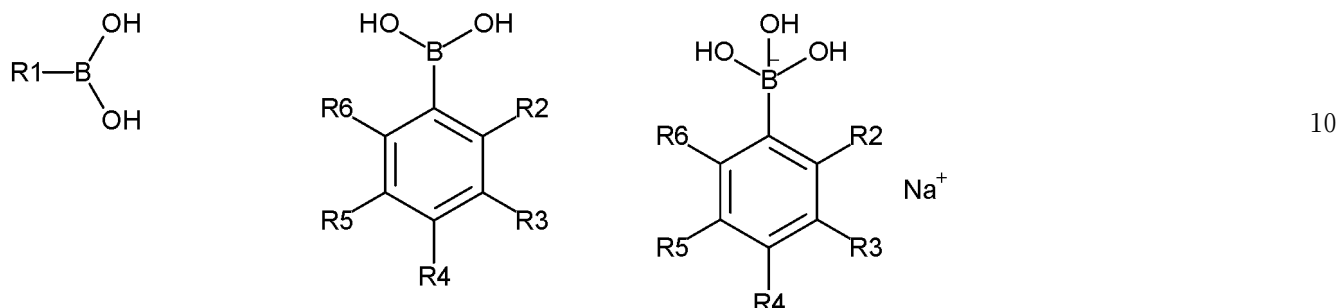
(1A) ルシフェラーゼの基質であるルシフェリン溶液にボロン酸誘導体又はその塩を共存させることを特徴とする、ルシフェリン溶液の安定化方法。

50

(2A) 前記ボロン酸誘導体又はその塩がほう酸、四ほう酸ナトリウム、および下記式で表されるボロン酸誘導体又はその塩からなる群より選ばれる少なくとも一種を含む、(1A)に記載のルシフェリン溶液の安定化方法。

【0021】

【化1】



【0022】

式中、R1は、置換基としてボロニル基、ハロゲン基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、ニトロ基、アミノ基、スルホ基及びチオール基からなる群より選択される少なくとも一種を有してもよく、二重結合または三重結合を含んでよいC1～C10のアルキル基を示す。XはN-R7（窒素（N）にR7が結合）、酸素（O）及び硫黄（S）のいずれかひとつを示す。R2、R3、R4、R5、R6、及びR7は、同一又は異なって、H（水素）、ボロニル基、ハロゲン基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、ニトロ基、アミノ基、スルホ基、チオール基、（tert-ブトキシカルボニル）アミノ基、または置換基としてボロニル基、ハロゲン基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、ニトロ基、アミノ基、スル

ホ基及びチオール基からなる群より選択される少なくとも一種を有してもよく、二重結合もしくは三重結合を含んでもよいC1～C10のアルキル基を示す。

(3A) 前記ルシフェリンがホタルルシフェリンである、(1A) または (2A) に記載のルシフェリン溶液の安定化方法。

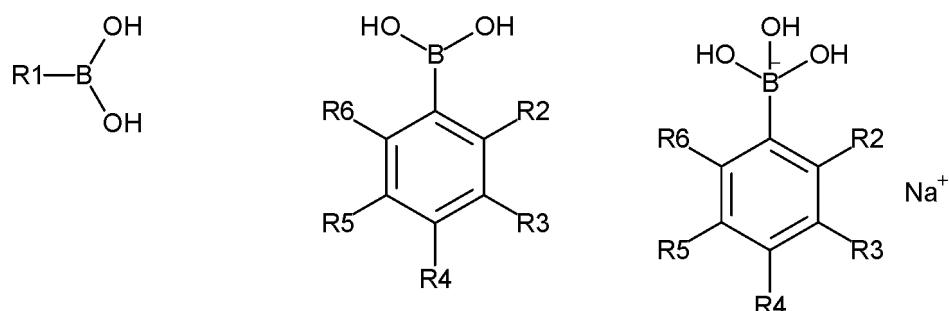
(4A) 標識酵素としてルシフェラーゼを用い、ルシフェリンを基質として生物発光反応を測定する免疫学的測定方法において、ボロン酸誘導体又はその塩を共存させてルシフェリン溶液を安定化させる免疫学的測定方法。

(5A) 前記ボロン酸誘導体又はその塩がほう酸、四ほう酸ナトリウム、および下記式で表されるボロン酸誘導体又はその塩からなる群より選ばれる少なくとも一種を含む、(4A) に記載の免疫学的測定方法。

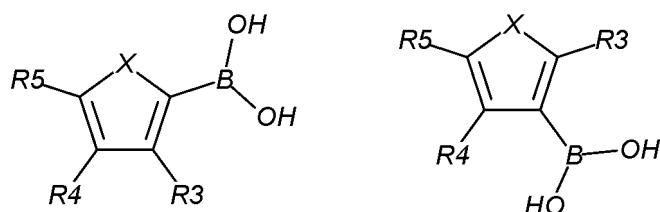
10

【0023】

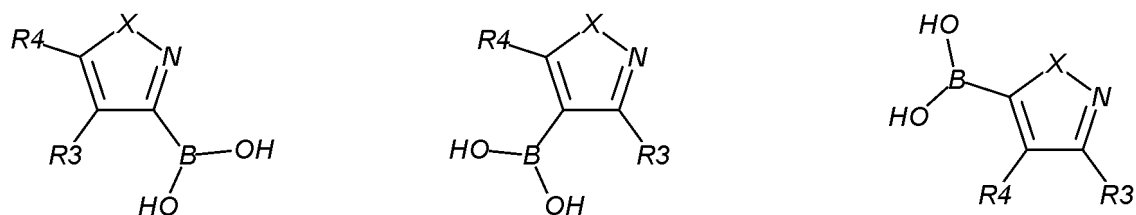
【化2】



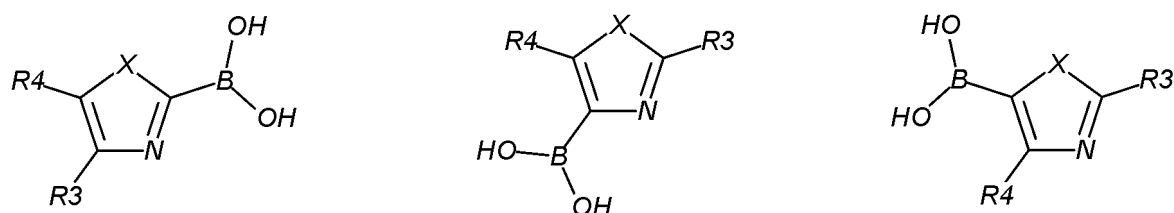
20



30



40



【0024】

50

式中、R 1 は、置換基としてボロニル基、ハロゲン基、ヒドロキシ基、カルボキシ基、ニトロ基、アミノ基、スルホ基及びチオール基からなる群より選択される少なくとも一種を有してもよく、二重結合または三重結合を含んでよいC 1 ～C 1 0 のアルキル基を示す。XはN-R 7（窒素（N）にR 7 が結合）、酸素（O）及び硫黄（S）のいずれかひとつを示す。R 2、R 3、R 4、R 5、R 6、及びR 7は、同一又は異なって、H（水素）、ボロニル基、ハロゲン基、ヒドロキシ基、カルボキシ基、ニトロ基、アミノ基、スルホ基、チオール基、（tert-ブトキシカルボニル）アミノ基、または置換基としてボロニル基、ハロゲン基、ヒドロキシ基、カルボキシ基、ニトロ基、アミノ基、スルホ基及びチオール基からなる群より選択される少なくとも一種を有してもよく、二重結合もしくは三重結合を含んでよいC 1 ～C 1 0 のアルキル基を示す。

10

（6 A）前記ルシフェラーゼがホタルルシフェラーゼであり、前記ルシフェリンがホタルルシフェリンである、（4 A）または（5 A）に記載の免疫学的測定方法。

（7 A）（4 A）～（6 A）のいずれかに記載の免疫学的測定方法に用いる免疫学的測定試薬。

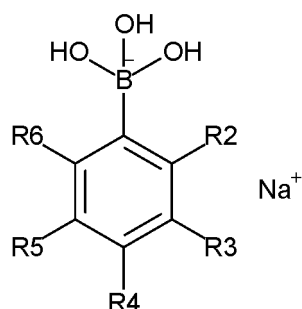
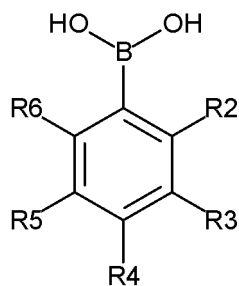
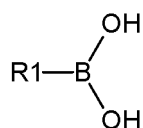
（1 B）ルシフェリンを基質としてルシフェラーゼの生物発光反応を行うときに、ピロリン酸塩およびボロン酸誘導体又はその塩を共存させることを特徴とする、生物発光強度の減衰・低下の抑制方法。

（2 B）前記ボロン酸誘導体又はその塩が下記式で表されるボロン酸誘導体又はその塩からなる群より選ばれる少なくとも一種を含む、（1 B）に記載の生物発光強度の減衰・低下の抑制方法。

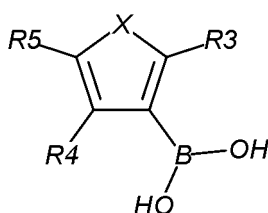
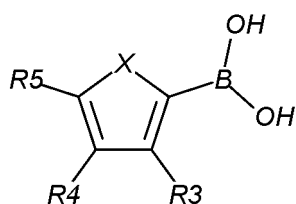
20

【0025】

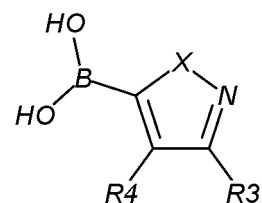
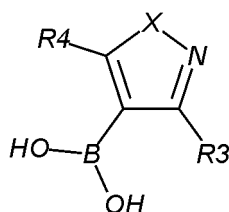
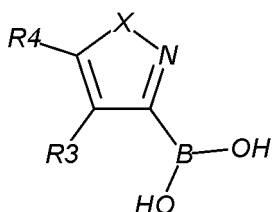
【化 3】



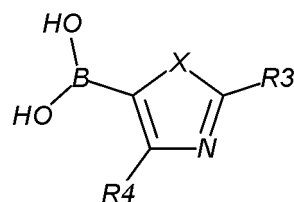
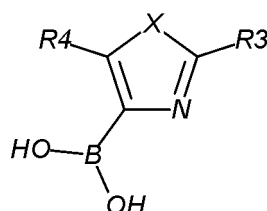
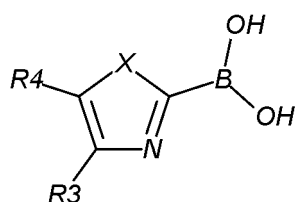
10



20



30



【0026】

式中、R1は、置換基としてボロニル基、ハロゲン基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、ニトロ基、アミノ基、スルホ基及びチオール基からなる群より選択される少なくとも一種を有してもよく、二重結合または三重結合を含んでもよいC1～C10のアルキル基を示す。XはN-R7（窒素（N）にR7が結合）、酸素（O）及び硫黄（S）のいずれかひとつを示す。R2、R3、R4、R5、R6、及びR7は、同一又は異なって、H（水素）、ボロニル基、ハロゲン基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、ニトロ基、アミノ基、スルホ基、チオール基、（tert-ブトキシカルボニル）アミノ基、または置換基としてボロニル基、ハロゲン基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、ニトロ基、アミノ基、スルホ基及びチオール基からなる群より選択される少なくとも一種を有してもよく、二重結合もしくは三重結合を含んでもよいC1～C10のアルキル基を示す。

40

（3B）前記ルシフェリンがホタルルシフェリンである、（1B）または（2B）に記載の生物発光強度の減衰・低下の抑制方法。

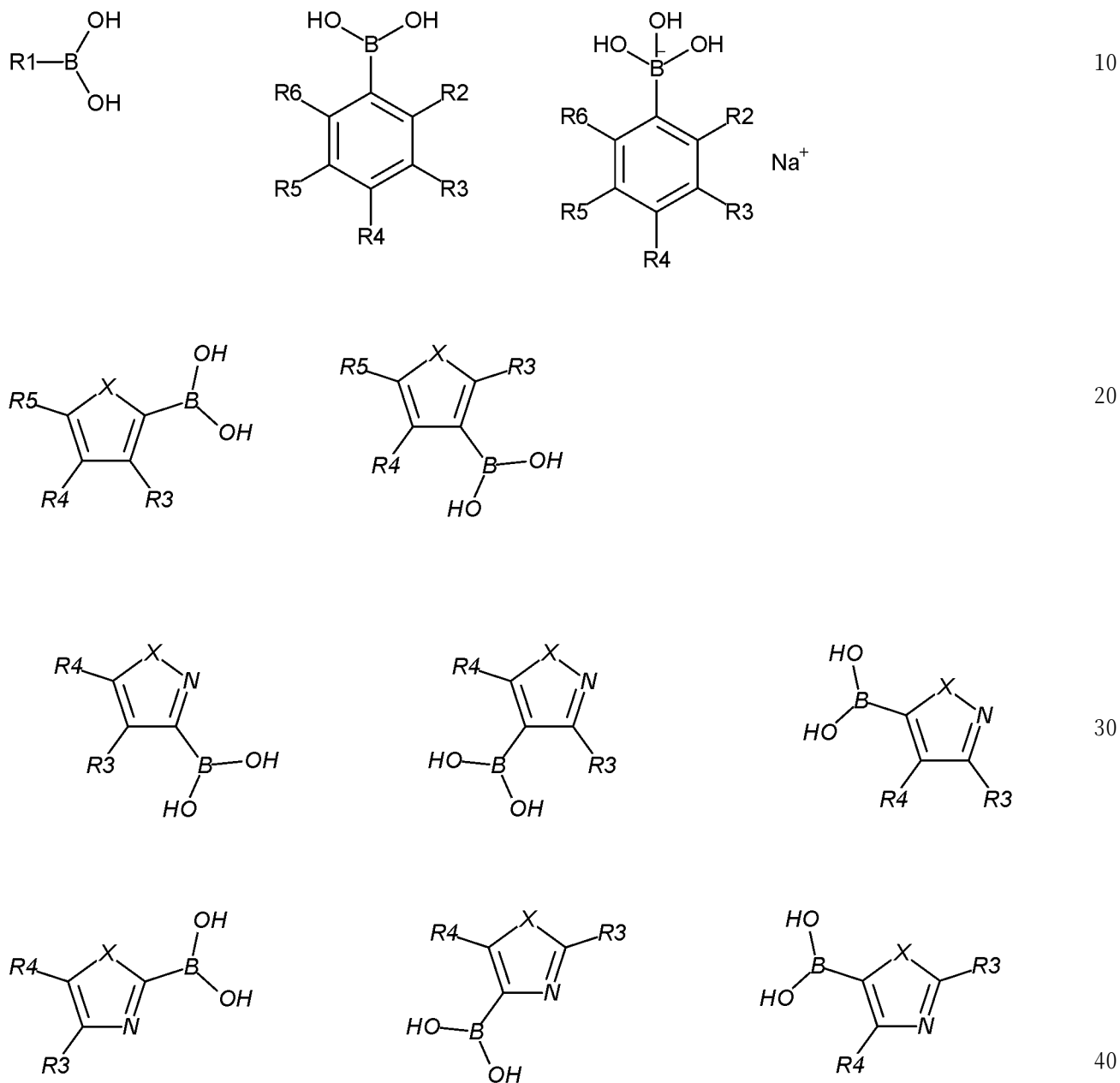
50

(４Ｂ) 標識物としてルシフェラーゼを用い、ルシフェリンを基質として生物発光反応を測定する免疫学的測定方法において、ピロリン酸塩およびボロン酸誘導体又はその塩を共存させて生物発光強度の減衰・低下を抑制させる免疫学的測定方法。

(５Ｂ) 前記ボロン酸誘導体又はその塩が下記式で表されるボロン酸誘導体又はその塩からなる群より選ばれる少なくとも一種を含む、(４Ｂ)に記載の免疫学的測定方法。

【００２７】

【化４】



【００２８】

式中、Ｒ１は、置換基としてボロニル基、ハロゲン基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、ニトロ基、アミノ基、スルホ基及びチオール基からなる群より選択される少なくとも一種を有してもよく、二重結合または三重結合を含んでよいＣ１～Ｃ１０のアルキル基を示す。ＸはＮ－Ｒ７（窒素（Ｎ）にＲ７が結合）、酸素（Ｏ）及び硫黄（Ｓ）のいずれかひとつを示す。Ｒ２、Ｒ３、Ｒ４、Ｒ５、Ｒ６、及びＲ７は、同一又は異なって、Ｈ（水素）、ボロニル基、ハロゲン基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、ニトロ基、アミノ基、スルホ基、チオール基、（tert-ブトキシカルボニル）アミノ基、または置換基としてボロニル基、ハロゲン基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、ニトロ基、アミノ基、スル

ホ基及びチオール基からなる群より選択される少なくとも一種を有してもよく、二重結合もしくは三重結合を含んでよいC1～C10のアルキル基を示す。

(6B) 前記ルシフェリンがホタルルシフェリンである(4B)または(5B)に記載の免疫学的測定方法。

(7B) 前記ルシフェラーゼがホタルルシフェラーゼであり、前記ルシフェリンがホタルルシフェリンである、(4B)から(6B)に記載の免疫学的測定方法。

(8B) (4B)～(7B)のいずれかに記載の免疫学的測定方法に用いる免疫学的測定試薬。

【発明の効果】

【0029】

本発明は、上記方法によれば、ルシフェラーゼの基質であるルシフェリン溶液の安定化が得られることとなり、ルシフェラーゼの酵素反応に基づく測定系が、長期間にわたって安定な高感度の測定をすることが出来る。また、本発明の好ましい実施形態においては、ルシフェリンを基質としてルシフェラーゼの生物発光反応の際に、ボロン酸誘導体又はその塩にさらにピロリン酸塩を組み合わせることにより、生物発光強度の減衰・低下を抑制することができる。

【0030】

そして、この測定により得られる結果についても、信頼性が高いものとなることが期待される。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】フェニルボロン酸を含まないホタルルシフェリン溶液(対照)を-30℃で一週間保存後のHPLC分析結果

【図2】フェニルボロン酸を含まないホタルルシフェリン溶液(対照)を37℃で一週間保存後のHPLC分析結果

【図3】20mmol/Lのフェニルボロン酸を含むホタルルシフェリン溶液を37℃で一週間保存後のHPLC分析結果

【図4】ピロリン酸塩および/またはブチルボロン酸を添加したときの発光強度の変化

【図5】R1および/またはR2にプロピルボロン酸を添加したときの発光強度の変化

【図6】発光反応中にプロピルボロン酸を添加したときの発光強度の変化

【図7】種々の濃度のプロピルボロン酸を添加したときの発光強度の変化

【図8】エチルボロン酸の有無による発光強度の変化

【図9】シクロペンチルボロン酸の有無による発光強度の変化

【図10】フェニルボロン酸の有無による発光強度の変化

【図11】2-クロロフェニルボロン酸の有無による発光強度の変化

【図12】3-アミノフェニルボロン酸の有無による発光強度の変化

【図13】4-ヒドロキシフェニルボロン酸の有無による発光強度の変化

【図14】4-カルボキシフェニルボロン酸の有無による発光強度の変化

【図15】1, 4-フェニレンジボロン酸の有無による発光強度の変化

【図16】3-フリルボロン酸の有無による発光強度の変化

【図17】(トリヒドロキシ)フェニルボロン酸の有無による発光強度の変化

【図18】3-チオフエンボロン酸の有無による発光強度の変化

【図19】2, 5-チオフエンジイルビスボロン酸の有無による発光強度の変化

【図20】トリヒドロキシフェニルボロン酸ナトリウムの有無による発光強度の変化

【発明を実施するための形態】

【0032】

以下、本発明の好適な実施形態について説明する。

本発明において、C1～C10のアルキル基とは、二重結合又は三重結合を(好ましくは1個又は2個、より好ましくは1個)有してもよく、炭素数が1～10であり、直鎖状、分枝鎖状又は環状の炭化水素基を示す。かかる二重結合又は三重結合を有してもよく、炭

10

20

30

40

50

素数が1～10であり、直鎖状、分枝鎖状又は環状の炭化水素基としては、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、t-ブチル基、n-ペンチル基、n-ヘキシル基、n-ヘプチル基、n-オクチル基、n-ノニル基、n-デシル基、ビニル基、1-プロペニル基、2-プロペニル基、2-メチル-2-プロペニル基、イソプロペニル基、1-ブテニル基、2-ブテニル基、3-ブテニル基、2-ペンテニル基、3-ペンテニル基、4-ペンテニル基、5-ヘキセニル基、エチニル基、プロパー-2-イン-1-イル基、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘプチル基等が挙げられる。

【0033】

本発明において、二重結合を有してもよいC1～C10のアルキル基とは、二重結合を（好ましくは1個又は2個、より好ましくは1個）有してもよく、炭素数が1～10であり、直鎖状、分枝鎖状又は環状の炭化水素基を示す。かかる二重結合を有してもよく、炭素数が1～10であり、直鎖状、分枝鎖状又は環状の炭化水素基としては、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、t-ブチル基、n-ペンチル基、n-ヘキシル基、n-ヘプチル基、n-オクチル基、n-ノニル基、n-デシル基、ビニル基、1-プロペニル基、2-プロペニル基、2-メチル-2-プロペニル基、イソプロペニル基、1-ブテニル基、2-ブテニル基、3-ブテニル基、2-ペンテニル基、3-ペンテニル基、4-ペンテニル基、5-ヘキセニル基、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘプチル基等が挙げられる。

【0034】

ハロゲンとしては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等が挙げられる。

【0035】

本発明において、ルシフェリンとしては、ホタルルシフェリン、バクテリアルシフェリン、渦鞭毛藻類ルシフェリン等種々のものを用いることができるが、ホタルルシフェリンが好ましい。

【0036】

ボロン酸誘導体の塩としては、特に限定されないが、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、アンモニウム等が挙げられ、ナトリウム塩等が好ましい。

【0037】

本発明において、「置換基としてボロニル基、ハロゲン基、ヒドロキシ基、カルボキシ基、ニトロ基、アミノ基、スルホ基及びチオール基からなる群より選択される少なくとも一種を有してもよく、二重結合または三重結合を含んでよいC1～C10のアルキル基」とは、例えば、前述したC1～C10のアルキル基、ならびに置換基としてボロニル基、前述したハロゲン基、ヒドロキシ基、カルボキシ基、ニトロ基、アミノ基、スルホ基及びチオール基からなる群より選択される少なくとも一種を有するC1～C10のアルキル基が挙げられる。本発明において、C1～C10のアルキル基が置換基を有する場合、その個数は特に限定されないが、例えば、1～2個、好ましくは1個が挙げられる。

【0038】

ルシフェリン溶液の安定化方法

第一の実施形態において、本発明は、ルシフェラーゼの基質であるルシフェリン溶液にボロン酸誘導体又はその塩を共存させることを特徴とする、ルシフェリン溶液の安定化方法を提供する。

【0039】

当該実施形態において本発明は、ルシフェラーゼの酵素活性を基質であるルシフェリンを用いて測定するとき、調製したルシフェリン溶液を保存するとルシフェリンの機能が低下する現象を、ルシフェリン溶液にボロン酸誘導体又はその塩を共存させることにより抑制することに特徴がある。

【0040】

本実施形態において本発明に用いられるボロン酸誘導体としては、ほう酸、四ほう酸ナ

10

20

30

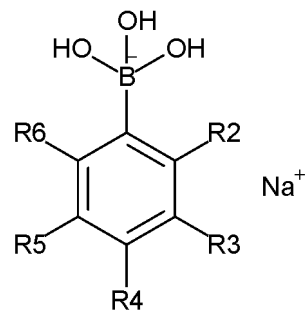
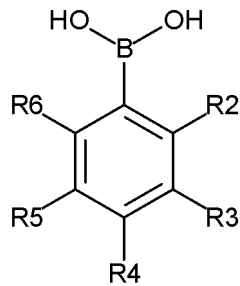
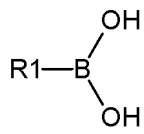
40

50

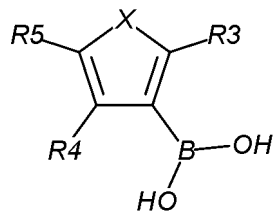
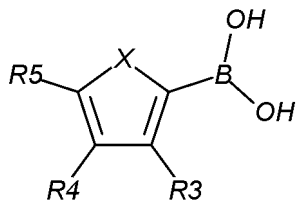
トリウム、および下記式で表されるボロン酸誘導体又はその塩を選択することができる。これらは一種類で使用するも良く、また数種類を混合して使用するも良い。

【0041】

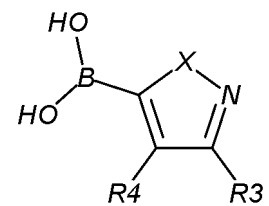
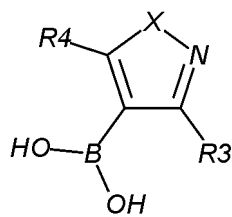
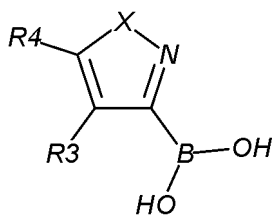
【化5】



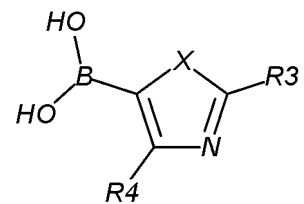
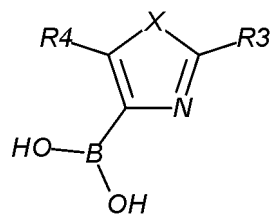
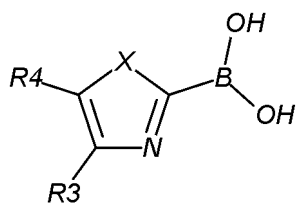
10



20



30



【0042】

40

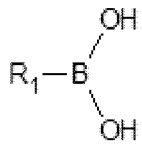
上記式中、R1は、置換基としてボロニル基、ハロゲン基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、ニトロ基、アミノ基、スルホ基及びチオール基からなる群より選択される少なくとも一種を有してもよく、二重結合または三重結合を含んでよいC1～C10のアルキル基を示す。XはN-R7（窒素（N）にR7が結合）、酸素（O）及び硫黄（S）のいずれかひとつを示す。R2、R3、R4、R5、R6、及びR7は、同一又は異なって、H（水素）、ボロニル基、ハロゲン基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、ニトロ基、アミノ基、スルホ基、チオール基、（tert-ブトキシカルボニル）アミノ基、または置換基としてボロニル基、ハロゲン基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、ニトロ基、アミノ基、スルホ基及びチオール基からなる群より選択される少なくとも一種を有してもよく、二重結合もしくは三重結合を含んでよいC1～C10のアルキル基を示す。

50

本発明において、ボロン酸誘導体又はその塩として

【0043】

【化6】



【0044】

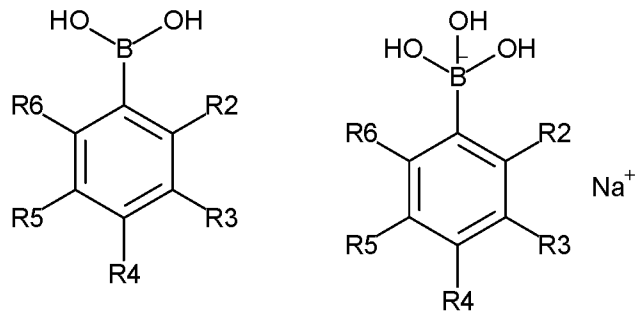
を用いる場合、R1は、アルキル基が好ましい。

10

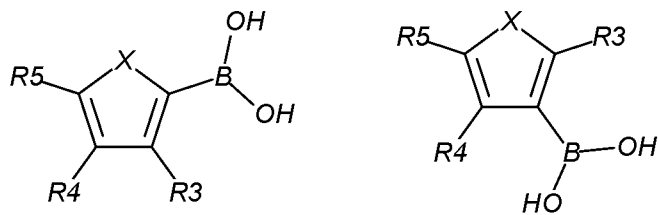
本発明において、ボロン酸誘導体又はその塩として

【0045】

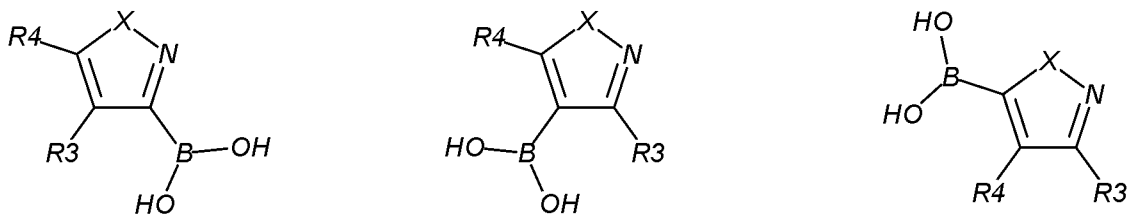
【化7】



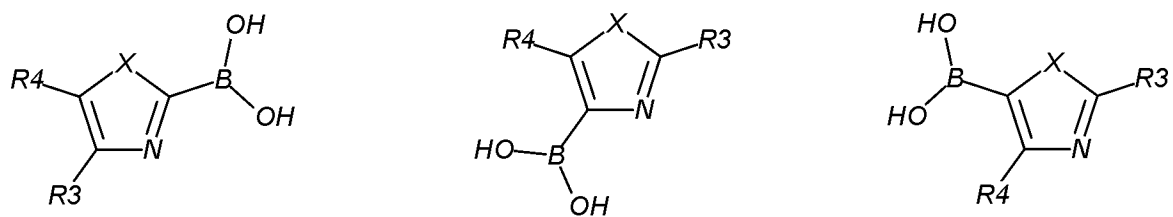
20



30



40



【0046】

を用いる場合、Xは、S又はOが好ましく、R2、R3、R4、R5、およびR6は、同

50

一又は異なって、H、ボロニル基、ハロゲン基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、メチル基、または(tert-ブトキシカルボニル)アミノ基を示すことが好ましい。

【0047】

ボロン酸誘導体又はその塩としては、ほう酸、四ほう酸ナトリウム、エチルボロン酸、プロピルボロン酸、ブチルボロン酸、ヘキシルボロン酸、1,4-フェニレンジボロン酸、トリヒドロキシフェニルボロン酸ナトリウム、3-チオフエンボロン酸、3-フリルボロン酸、2,5-チオフエンジイルビスボロン酸、フェニルボロン酸、4-フルオロフェニルボロン酸、4-クロロフェニルボロン酸、4-ブロモフェニルボロン酸、4-ヒドロキシフェニルボロン酸、4-カルボキシフェニルボロン酸、4-メチルフェニルボロン酸、3-(tert-ブトキシカルボニル)アミノフェニルボロン酸等が挙げられる。これらのボロン酸誘導体又はその塩は一種単独で、又は二種以上を組み合わせ用いることができる。

10

【0048】

本実施形態において、ルシフェリン溶液におけるルシフェリン濃度は限定されないが、例えば、0.01~10mmol/Lが好ましく、0.1~2.5mmol/Lがより好ましい。

【0049】

また、ルシフェリン溶液におけるボロン酸誘導体又はその塩の濃度は、0.1~100mmol/Lが好ましく、0.5~10mmol/Lがより好ましい。

【0050】

本発明においてルシフェリン溶液は、任意選択で、公知の安定化剤、発光増強剤等を添加することもできる。安定化剤としてはシクロデキストリン等を用いることができる。また発光増強剤としてはコエンザイムA、ピロリン酸、ジチオスレイトール、AMP等が挙げられる。

20

【0051】

本実施形態において、ルシフェリン溶液は、安定剤としてシクロデキストリンをさらに含んでいてもよい。シクロデキストリンとしては、例えば、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリン、これらの誘導体等が挙げられる。より具体的には、例えば、メチルー α -シクロデキストリン、メチルー β -シクロデキストリン、メチルー γ -シクロデキストリン、ヒドロキシエチルー α -シクロデキストリン、ヒドロキシエチルー β -シクロデキストリン、ヒドロキシエチルー γ -シクロデキストリン、ヒドロキシプロピルー α -シクロデキストリン、ヒドロキシプロピルー β -シクロデキストリン、ヒドロキシプロピルー γ -シクロデキストリン等が含まれる。これらのシクロデキストリンは一種単独で、又は二種以上を組み合わせ用いることができる。

30

【0052】

シクロデキストリンを用いる場合、その配合量は特に限定されないが、ルシフェリン1モルに対し、シクロデキストリン1~100モルが好ましく、1~20モルがより好ましい。

【0053】

本発明において、ルシフェリン溶液は、上記成分を水又は緩衝液に溶解することにより調製することができる。緩衝液としては、生化学用に一般的に用いられるものであれば特に限定はなく、例えば、りん酸緩衝液、りん酸クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、トリシン緩衝液、トリス緩衝液、Good's緩衝液等が挙げられる。

40

【0054】

ルシフェリン溶液のpHは特に限定されないが、例えば、pH5.0~7.2、好ましくはpH5.5~6.8等の範囲で適宜設定することができる。

【0055】

本発明によれば、かかる構成をとることにより、ルシフェラーゼの基質であるルシフェリン溶液を安定して保存することが可能となる。従って、ルシフェラーゼの酵素反応に基づく測定系が、長期間にわたって安定な高感度の測定をすることが出来る。

50

【0056】

免疫学的測定方法1

本発明はまた、標識酵素としてルシフェラーゼを用い、ルシフェリンを基質として生物発光反応を測定する免疫学的測定方法において、ボロン酸誘導体又はその塩を共存させてルシフェリン溶液を安定化させる免疫学的測定方法を提供する。本実施形態においては、免疫学的測定方法に用いるルシフェリンとして、ルシフェリン及びボロン酸誘導体又はその塩を含む溶液を用いることを特徴とする。当該実施形態においては、免疫学的測定方法に用いるルシフェリン溶液にボロン酸誘導体又はその塩を共存させることに起因して、当該測定前のルシフェリン溶液の保存安定性が改善されており、そのため長期間にわたって安定な高感度の測定をすることが出来る。当該実施形態における、ルシフェリンの種類、ルシフェリン溶液、緩衝液、安定剤の組成等は上記「ルシフェリン溶液の安定化方法」と同様である。

10

【0057】

また、本発明において、ルシフェラーゼとしては、ルシフェリンを基質として生物発光反応をするものであれば特に限定されない。典型的には、本発明において、ルシフェラーゼには、本発明の属する技術分野において用いられているものを広く使用することができ、野生型ルシフェラーゼだけでなく、遺伝子改変したもの、標識化したもの等の種々の誘導体も含まれる。また、本発明において、「ルシフェラーゼを用いる」とは、ルシフェラーゼタンパク質を用いる場合だけでなく、ルシフェラーゼ遺伝子を用いる（例えば、目的遺伝子の存在下でルシフェラーゼが発現するようプロモータの制御下にルシフェラーゼ遺伝子が配置されたベクターを用いる等）方法も包含する。本発明においてルシフェラーゼとしては種々生物由来のものを用いることができるが、ホタル由来のホタルルシフェラーゼ等が好ましい。

20

【0058】

生物発光強度の減衰・低下の抑制方法

また、一実施形態において、本発明は、ピロリン酸塩およびボロン酸誘導体又はその塩の共存下でルシフェリンを基質としてルシフェラーゼの生物発光反応を行う工程を含む、生物発光強度の減衰・低下の抑制方法を提供する。言い換えると、本発明は、ルシフェリンを基質としてルシフェラーゼの生物発光反応を行うときに、ピロリン酸塩およびボロン酸誘導体又はその塩を共存させることを特徴とする、生物発光強度の減衰・低下の抑制方法を提供する。

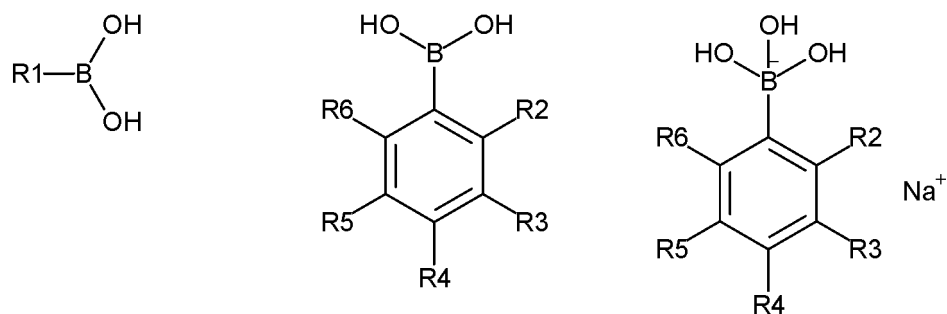
30

【0059】

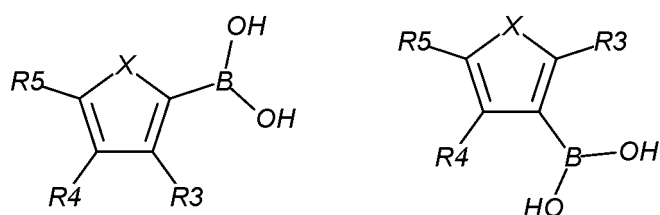
免疫学的測定方法及び生物発光強度の減衰・低下の抑制方法の実施形態において、本発明に用いられるボロン酸誘導体又はその塩としては、例えば、下記式で表されるボロン酸誘導体又はその塩を選択することができる。これらは一種類で使用するでも良く、また数種類を混合して使用するでも良い。

【0060】

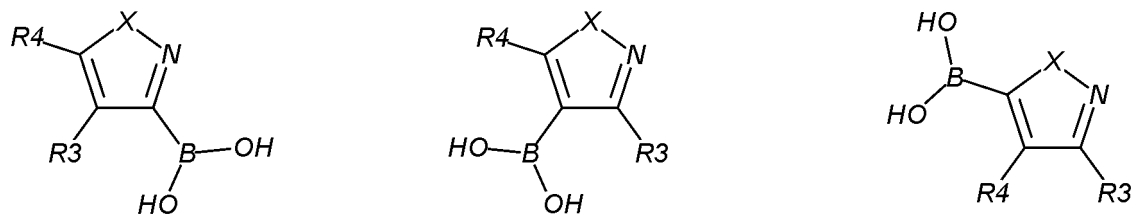
【化 8】



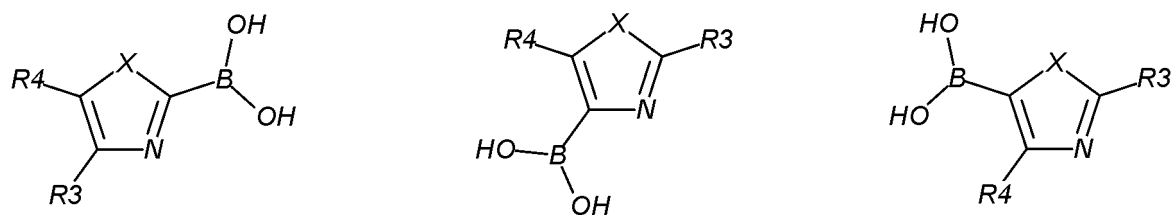
10



20



30



【0061】

式中、 $R1$ は、置換基としてボロニル基、ハロゲン基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、ニトロ基、アミノ基、スルホ基及びチオール基からなる群より選択される少なくとも一種を有してもよく、二重結合または三重結合を含んでよい $C1 \sim C10$ のアルキル基を示す。 X は $N-R7$ （窒素（ N ）に $R7$ が結合）、酸素（ O ）及び硫黄（ S ）のいずれかひとつを示す。 $R2, R3, R4, R5, R6$ 、及び $R7$ は、同一又は異なって、 H （水素）、ボロニル基、ハロゲン基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、ニトロ基、アミノ基、スルホ基、チオール基、（*tert*-ブトキシカルボニル）アミノ基、または置換基としてボロニル基、ハロゲン基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、ニトロ基、アミノ基、スルホ基及びチオール基からなる群より選択される少なくとも一種を有してもよく、二重結合もしくは三重結合を含んでよい $C1 \sim C10$ のアルキル基を示す。本発明において、ボロン酸誘導体又はその塩として $R1-B(OH)_2$ を用いる場合、 $R1$ は、アルキル基が好ましい。本発明において、上記式で表されるボロン酸誘導体又はその塩を用いる場合、 X は、 S 又は O が好ましく、 $R2, R3, R4, R5$ 、および $R6$ は、同一又は異なって、

40

50

H、ボロニル基、ハロゲン基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、メチル基、または（tert-ブトキシカルボニル）アミノ基を示すことが好ましい。

【0062】

ボロン酸誘導体又はその塩としては、エチルボロン酸、プロピルボロン酸、ブチルボロン酸、ヘキシルボロン酸、1,4-フェニレンジボロン酸、トリヒドロキシフェニルボロン酸ナトリウム、3-チオフェンボロン酸、3-フリルボロン酸、2,5-チオフェンジイルビスボロン酸、フェニルボロン酸、4-フルオロフェニルボロン酸、4-クロロフェニルボロン酸、4-ブロモフェニルボロン酸、4-ヒドロキシフェニルボロン酸、4-カルボキシフェニルボロン酸、4-メチルフェニルボロン酸、3-アミノフェニルボロン酸、3-(tert-ブトキシカルボニル)アミノフェニルボロン酸等が挙げられる。これらのボロン酸誘導体又はその塩は一種単独で、又は二種以上を組み合わせ用いることができる。

10

【0063】

本発明においては、ルシフェリンを基質としてルシフェラーゼの生物発光反応を生じさせる方法は特に限定されないが、例えば、被験サンプルに、ルシフェリン、ビオチン化ルシフェラーゼ、ビオチン化抗体、アビジンを添加してビオチン化抗体に特異的に結合する物質を定量測定する方法；被験サンプルに、ルシフェラーゼ、ルシフェリンを添加して被験サンプル中のATPの量、位置等を測定する方法；等が挙げられる。各測定方法は、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応をピロリン酸塩およびボロン酸誘導体又はその塩の共存下で生じさせる以外、自体公知の方法に基づき行うことができる。典型的には、生物発光反応を用いた免疫学的測定方法は、以下の手順により行うことができる：

20

まず、担体固定化抗体（第一抗体）溶液に被験試料を添加する。次に、バッファを分離（洗浄）する。そしてルシフェラーゼ標識抗体（第二抗体）溶液を添加する。次に、バッファを分離（洗浄）する。そして基質を混合（ルシフェリン等）し、発光を測定する。

【0064】

また、本実施形態において、反応系に添加する前のルシフェリン溶液におけるボロン酸誘導体又はその塩の濃度は、0.1~300mmol/Lが好ましく、0.5~50mmol/Lがより好ましく、0.5~10mmol/Lがさらに好ましい。また、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を生じさせている際のボロン酸誘導体又はその塩の濃度は、0.05~150mmol/Lが好ましく、0.25~25mmol/Lがより好ましく、0.25~5mmol/Lがさらに好ましい。

30

【0065】

本実施形態においてピロリン酸塩としては、例えば、ピロリン酸カリウム、ピロリン酸ナトリウム、ピロリン酸マグネシウム等が挙げられる。本実施形態において、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応の反応系中のピロリン酸塩の濃度は特に限定されないが、例えば、0.01~10mmol/Lが好ましく、0.05~0.5mmol/Lがより好ましい。

【0066】

本実施形態においてルシフェリン溶液に配合するルシフェリン、ボロン酸誘導体又はその塩以外の成分の組成、pH、ルシフェラーゼの種類等は、「ルシフェリン溶液の安定化方法」と同様である。

40

【0067】

本実施形態において、ルシフェリンを基質としたルシフェラーゼの生物発光反応の発光強度を、その測定中、長時間にわたって維持することが出来る。すなわち、生物発光反応を検出するときの測光するタイミングを発光反応のごく初期に設定しなくても十分な発光強度が得られることとなり、容易に高感度の測定が可能となる。

【0068】

さらに、本発明を用いて作製したルシフェリン基質試薬は、調製した後も基質としての効果が低下することもなく安定であることから、安定した結果が求められる測定試薬の構

50

成分に用いることが可能となる。

【0069】

すなわち、ルシフェリンを基質としたルシフェラーゼによる高感度の生物発光反応を利用した測定を行う際に、信頼性が高い測定結果が得られることが期待される。

【0070】

免疫学的測定方法2

本発明はまた、標識物としてルシフェラーゼを用い、ルシフェリンを基質として生物発光反応を測定する免疫学的測定方法において、ピロリン酸塩およびボロン酸誘導体又はその塩を共存させて生物発光強度の減衰・低下を抑制させる免疫学的測定方法を提供する。当該実施形態においては、免疫学的測定方法に用いるルシフェリン溶液にピロリン酸塩及びボロン酸誘導体又はその塩を共存させることに起因して、免疫学的測定の際の、経時的な生物発光強度の減衰・低下を抑制することができる。当該実施形態における、ボロン酸誘導体の種類、濃度、ルシフェリンの種類、ルシフェリン溶液、緩衝液、安定剤の組成等は上記「生物発光強度の減衰・低下の抑制方法」と同様である。

【0071】

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例】

【0072】

実施例1

各種ボロン酸誘導体によるホタルルシフェリンの安定化

ホタルルシフェリン溶液に種々のボロン酸誘導体を溶解し、25℃または37℃で一定期間保存後にホタルルシフェラーゼの活性を測定し、ホタルルシフェリンの安定性を評価した。

【0073】

(1) 試薬の調製

本実施例で用いたホタルルシフェラーゼ活性の至適pHは、pH8.2～8.3である。一方、基質であるホタルルシフェリンは弱酸性において安定である（特許文献2）。

【0074】

そこで、ホタルルシフェリンを含む溶液のpHを弱酸性とし、ホタルルシフェラーゼの活性を測定するときには至適pHとなるように、二種類の測定試薬（R1およびR2）を調製し、ホタルルシフェラーゼの活性測定時にR1とR2を混合し、発光強度を測定した。

【0075】

各々の試薬の組成は、R1が30mmol/L MgSO₄・7H₂O、4mmol/L ATP・2Na、および0.1mmol/L ピロリン酸カリウム含有100mmol/L Tris緩衝液（pH8.4）、R2が0.5mmol/L ホタルルシフェリンおよび5mmol/L ボロン酸誘導体含有10mmol/L ADA緩衝液（pH6.5）とした。

【0076】

ボロン酸誘導体として、ほう酸、四ほう酸ナトリウム、エチルボロン酸、プロピルボロン酸、ブチルボロン酸、ヘキシルボロン酸、1,4-フェニレンジボロン酸、トリヒドロキシフェニルボロン酸ナトリウム、3-チオフエンボロン酸、3-フリルボロン酸、2,5-チオフエンジイルビスボロン酸、フェニルボロン酸、4-フルオロフェニルボロン酸、4-クロロフェニルボロン酸、4-ブロモフェニルボロン酸、4-カルボキシフェニルボロン酸、4-メチルフェニルボロン酸、3-(tert-ブトキシカルボニル)アミノフェニルボロン酸を用いた。水に難溶性なボロン酸誘導体は、有機溶媒（水溶性で難溶性ボロン酸誘導体を溶解できるもの）を適宜用いて溶解し、添加した。

【0077】

試薬を調製した後、R1は-30℃で凍結保存し、R2は-30℃、25℃、および3

10

20

30

40

50

7℃で7日間保存し、試験に用いた。

【0078】

(2) ルシフェラーゼ活性の測定

7日間保存後、凍結させたものは水浴で融解し、全ての試薬を30℃で予備加温した。

ホタルルシフェラーゼ溶液は、 $1 \times 10^{-11} \text{ mol/L}$ となるように調製した。

【0079】

96穴マイクロプレート（サーモフィッシュサイエンティフィック社）の各ウェルに10μLのホタルルシフェラーゼ溶液をマニュアルで分注後、発光強度測定装置のCentrol B960（ベルトールド社）を用いてR1を50μLおよびR2を50μL各々吐出し、4.5秒後から5秒間の発光強度を測定した。

10

【0080】

結果を表1、2、3、および4に示す。

【0081】

表1より、R2にボロン酸誘導体を添加しない組成（対照）の発光強度は、R2を-30℃に保存したときの発光強度と比較すると、25℃保存では76%、37℃保存では45%に低下した。この発光強度の低下は、ホタルルシフェリンの分解産生物がホタルルシフェラーゼ活性を阻害したためと考えられる。

【0082】

一方、R2にほう酸を添加した場合、25℃保存では84%に、37℃保存では52%となり、発光強度の低下が抑制された。また、四ほう酸ナトリウムを添加した場合、各々25℃保存では83%に、37℃保存では55%となり、発光強度の低下が抑制された。これらより、ホウ酸および四ホウ酸ナトリウムがホタルルシフェリンの分解を抑制し、安定化したと考えられる。

20

【0083】

また、表2から4より、エチルボロン酸、プロピルボロン酸、ブチルボロン酸、ヘキシルボロン酸、1,4-フェニレンジボロン酸、トリヒドロキシフェニルボロン酸ナトリウム、3-チオフェンボロン酸、3-フリルボロン酸、2,5-チオフェンジイルビスボロン酸、フェニルボロン酸、4-フルオロフェニルボロン酸、4-クロロフェニルボロン酸、4-ブロモフェニルボロン酸、4-カルボキシフェニルボロン酸、4-メチルフェニルボロン酸、3-(tert-ブトキシカルボニル)アミノフェニルボロン酸をR2に添加した場合も、ホタルルシフェリンの分解を抑制し安定化することが明らかになった。

30

【0084】

すなわち、ホタルルシフェリンとボロン酸誘導体を共存させることにより、ホタルルシフェリンの機能の低下を抑制することができた。

【0085】

【表 1】

ほう酸、四ほう酸ナトリウムによるルシフェリンの安定化 (7日間)

		ルシフェリン濃度		
	保存温度 (7日間)	0M RLU	1X10 ⁻¹¹ M RLU	%
ボロン酸誘導体 対照	-30℃	20	35498	100%
	25℃	42	27148	76%
	37℃	22	15863	45%
ほう酸	-30℃	20	34607	100%
	25℃	23	29176	84%
	37℃	24	18038	52%
四ほう酸ナトリウム	-30℃	32	33288	100%
	25℃	29	27743	83%
	37℃	28	18443	55%

【 0 0 8 6 】

【表 2】

ボロン酸誘導体によるルシフェリンの安定化 (7日間)

ボロン酸誘導体	保存温度 (7日間)	ルシフェリン濃度		
		0M RLU	1X10 ⁻¹¹ M RLU %	
対照	-30℃	35	33983	100%
	25℃	30	25692	76%
	37℃	33	13866	41%
エチルボロン酸	-30℃	29	34983	100%
	25℃	34	28813	82%
	37℃	32	19801	57%
プロピルボロン酸	-30℃	29	34601	100%
	25℃	27	29155	84%
	37℃	27	19589	57%
ブチルボロン酸	-30℃	25	31708	100%
	25℃	24	26476	83%
	37℃	42	18594	59%
ヘキシルボロン酸	-30℃	36	17066	100%
	25℃	35	14984	88%
	37℃	29	11039	65%
1, 4-フェニレンジボロン酸	-30℃	29	24409	100%
	25℃	32	21582	88%
	37℃	31	17114	70%
トリヒドロキシフェニル ボロン酸ナトリウム	-30℃	48	28661	100%
	25℃	31	25313	88%
	37℃	31	18955	66%
3-チオフェンボロン酸	-30℃	26	32996	100%
	25℃	29	28946	88%
	37℃	38	21899	66%
3-フリルボロン酸	-30℃	33	33893	100%
	25℃	31	30931	91%
	37℃	37	21500	63%
2, 5-チオフェンジイル ビスボロン酸	-30℃	17	34210	100%
	25℃	21	31990	94%
	37℃	18	26348	77%

10

20

30

【 0 0 8 7 】

【表 3】

ボロン酸誘導体によるルシフェリンの安定化 (7日間)

ボロン酸誘導体	保存温度 (7日間)	ルシフェリン濃度		
		0M RLU	1X10 ⁻¹¹ M RLU	%
対照	-30℃	29	35983	100%
	25℃	37	26448	74%
	37℃	25	14323	40%
フェニルボロン酸	-30℃	26	29142	100%
	25℃	21	26544	91%
	37℃	22	21842	75%
4-フルオロフェニルボロン酸	-30℃	24	25968	100%
	25℃	21	23484	90%
	37℃	25	20210	78%
4-クロロフェニルボロン酸	-30℃	22	19830	100%
	25℃	26	18329	92%
	37℃	25	15372	78%
4-ブロモフェニルボロン酸	-30℃	21	16135	100%
	25℃	22	14294	89%
	37℃	31	12725	79%
4-カルボキシフェニルボロン酸	-30℃	21	34773	100%
	25℃	22	30787	89%
	37℃	22	22818	66%
4-メチルフェニルボロン酸	-30℃	28	17925	100%
	25℃	26	16069	90%
	37℃	25	13425	75%

10

20

【0088】

【表 4】

ボロン酸誘導体によるルシフェリンの安定化 (7日間)

ボロン酸誘導体	保存温度 (7日間)	ルシフェリン濃度		
		0M RLU	1X10 ⁻¹¹ M RLU	%
対照	-30℃	22	33451	100%
	25℃	24	26899	80%
	37℃	30	18203	54%
3-(tert-ブトキシカルボニル)アミノフェニルボロン酸	-30℃	25	10467	100%
	25℃	25	10785	103%
	37℃	22	9407	90%

30

40

【0089】

また、ヘキシルボロン酸、1,4-フェニレンジボロン酸、4-フルオロフェニルボロン酸、4-クロロフェニルボロン酸、4-ブロモフェニルボロン酸、4-メチルフェニルボロン酸、3-(tert-ブトキシカルボニル)アミノフェニルボロン酸等のボロン酸誘導体を5mmol/L添加して使用すると、ホタルルシフェラーゼ活性の阻害が認められた。しかし、これらのボロン酸誘導体がホタルルシフェリンを安定化することは明らかであるので、5mmol/L以下のホタルルシフェラーゼ活性を阻害しない濃度を添加して用いることが可能である。

【0090】

50

表 2、3、および 4 の結果から、ボロン酸誘導体又はその塩の置換基の種類がホタルルシフェリンの安定化に影響し、また、ホタルルシフェラーゼ活性にも影響することが明らかになった。

【0091】

実施例 2

ボロン酸誘導体の異性体によるホタルルシフェリンの安定化

【0092】

(1) 試薬の調製

ボロン酸誘導体の異性体によるホタルルシフェリンの安定化に対する効果を検討した。

ボロン酸誘導体としてクロロフェニルボロン酸を用い、その異性体として、2-クロロフェニルボロン酸、3-クロロフェニルボロン酸、および 4-クロロフェニルボロン酸を用いた。

10

【0093】

また、ボロン酸誘導体としてフリルボロン酸を用い、その異性体として、2-フリルボロン酸および 3-フリルボロン酸を用いた。

【0094】

試薬の調製は、実施例 1 と同様に行った。なお、クロロフェニルボロン酸は、水に難溶性であるため、有機溶媒（水溶性でクロロフェニルボロン酸を溶解できるもの）を適宜用いて溶解し、添加した。

【0095】

20

(2) ルシフェラーゼ活性の測定

実施例 1 と同様に測定した結果を表 5 および 6 に示す。

−30℃での発光強度を比較すると、クロロフェニルボロン酸は 4 位、3 位、および 2 位の順で発光強度の低下が大きく、ホタルルシフェラーゼの活性を阻害した。一方、ホタルルシフェリンの安定化効果は、4 位がよい傾向が認められた。しかし、その差は著しいものではないので、より高感度な測定を行うためには、ホタルルシフェラーゼ活性の阻害が小さい 2-クロロフェニルボロン酸を用いることが適当である。

【0096】

また、フリルボロン酸では 2 位と 3 位の異性体で著しい差はないが、2-フリルボロン酸がホタルルシフェリンの安定化効果がやや高い結果であった。

30

【0097】

このように、置換基の種類だけでなく、置換基の位置もホタルルシフェリンの安定化にも影響することが明らかになった。

【0098】

【表 5】

クロロフェニルボロン酸の位置異性体の検討

ボロン酸誘導体	保存温度 (7日間)	ルシフェリン濃度		
		0M RLU	1X10 ⁻¹¹ M RLU	%
対照	-30℃	22	33451	100%
	25℃	24	26899	80%
	37℃	30	18203	54%
2-クロロフェニルボロン酸	-30℃	25	30785	100%
	25℃	29	28395	92%
	37℃	32	23022	75%
3-クロロフェニルボロン酸	-30℃	23	22439	100%
	25℃	91	20492	91%
	37℃	26	17337	77%
4-クロロフェニルボロン酸	-30℃	23	15960	100%
	25℃	25	14805	93%
	37℃	25	12906	81%

10

【0099】

【表 6】

フリルボロン酸の位置異性体の検討

ボロン酸誘導体	保存温度 (7日間)	ルシフェリン濃度		
		0M RLU	1X10 ⁻¹¹ M RLU	%
対照	-30℃	29	35983	100%
	25℃	37	26448	74%
	37℃	25	14323	40%
2-フリルボロン酸	-30℃	23	36180	100%
	25℃	29	33606	93%
	37℃	41	27327	76%
3-フリルボロン酸	-30℃	26	34951	100%
	25℃	30	32217	92%
	37℃	23	24595	70%

20

30

【0100】

実施例 3

ホタルルシフェリンの安定化におけるボロン酸誘導体の濃度の影響（その 1）

ボロン酸誘導体として、プチルボロン酸およびフェニルボロン酸を用い、ボロン酸誘導体の濃度を 0.2 mmol/L、2 mmol/L、および 20 mmol/L としてボロン酸誘導体の濃度の違いによる影響を検討した。

40

【0101】

（1）試薬の調製

各々の試薬の組成は、R1 が 30 mmol/L MgSO₄/7H₂O、4 mmol/L ATP・2Na、および 0.1 mmol/L ピロリン酸カリウム含有 100 mmol/L Tris 緩衝液（pH 8.5）、R2 が 0.5 mmol/L ホタルルシフェリンおよびボロン酸誘導体含有 10 mmol/L ADA 緩衝液（pH 6.5）とした。

【0102】

（2）ルシフェラーゼ活性の測定

実施例 1 と同様に測定した結果を表 7 に示す。

プチルボロン酸、フェニルボロン酸とも濃度に依存してホタルルシフェリンの安定化に

50

対する効果の増強が認められた。

【0103】

【表7】

ボロン酸誘導体の濃度の影響

検討物質	濃度 (mmol/L)	保存温度 (7日間)	ルシフェリン濃度		
			0M RLU	1X10 ⁻¹¹ M RLU	%
対照	0	-30℃	31	32537	100%
		25℃	34	22973	71%
		37℃	31	11555	36%
ブチルボロン酸	0.2	-30℃	46	35138	100%
		25℃	45	25663	73%
		37℃	61	15249	43%
	2	-30℃	45	32956	100%
		25℃	45	25346	77%
		37℃	39	16696	51%
	20	-30℃	44	22302	100%
		25℃	47	18947	85%
		37℃	47	13697	61%
フェニルボロン酸	0.2	-30℃	25	33292	100%
		25℃	42	20554	62%
		37℃	29	16925	51%
	2	-30℃	45	32190	100%
		25℃	48	28045	87%
		37℃	65	20828	65%
	20	-30℃	37	16683	100%
		25℃	41	15789	95%
		37℃	61	14086	84%

【0104】

なお、ボロン酸誘導体の濃度を20mmol/Lとしたときには、-30℃保存のR2での発光強度が低く、ホタルルシフェラーゼの酵素活性を抑制した。

【0105】

実施例4

ホタルルシフェリンの安定化におけるボロン酸誘導体の濃度の影響（その2）

【0106】

（1）試薬の調製

ボロン酸誘導体として、ほう酸を用い、ほう酸の濃度を1mmol/L、5mmol/L、10mmol/L、15mmol/L、20mmol/L、および25mmol/Lとし、Trisの濃度を200mmol/Lとした他は、実施例3と同様に調製した。

【0107】

（2）ルシフェラーゼ活性の測定

実施例1と同様に測定した結果を表8に示す。

ほう酸濃度に依存してホタルルシフェリンの安定化に対する効果の増強が認められた。

【0108】

【表 8】

ほう酸濃度の影響

ほう酸 (mmol/L)	保存温度 (7日間)	ルシフェリン濃度		
		0M RLU	1X10 ⁻¹¹ M RLU	%
0	-30℃	17	32456	100%
	25℃	36	25490	79%
	37℃	19	15184	47%
1	-30℃	18	32514	100%
	25℃	21	25916	80%
	37℃	17	15921	49%
5	-30℃	17	32245	100%
	25℃	19	27346	85%
	37℃	52	17365	54%
10	-30℃	19	32194	100%
	25℃	21	28194	88%
	37℃	17	18901	59%
15	-30℃	16	31807	100%
	25℃	17	28656	90%
	37℃	17	19811	62%
20	-30℃	25	31375	100%
	25℃	17	28832	92%
	37℃	36	20758	66%
25	-30℃	17	30881	100%
	25℃	18	28632	93%
	37℃	19	20598	67%

10

20

【0109】

実施例 5

30

ホタルルシフェリンの安定化におけるボロン酸誘導体の濃度の影響（その 3）

【0110】

（1）試薬の調製

ボロン酸誘導体として、プロピルボロン酸を用い、プロピルボロン酸の濃度を 0.01 mmol/L、0.05 mmol/L、0.1 mmol/L、0.5 mmol/L、1 mmol/L、2.5 mmol/L、5 mmol/L、10 mmol/L、25 mmol/L、50 mmol/L、および 100 mmol/L とし、Tris の濃度を 200 mmol/L とした他は、実施例 3 と同様に調製した。

【0111】

（2）ルシフェラーゼ活性の測定

40

実施例 1 と同様に測定した結果を表 9 に示す。

ほう酸同様、プロピルボロン酸濃度に依存してホタルルシフェリンの安定化に対する効果の増強が認められた。

【0112】

【表 9】

プロピルボロン酸の濃度の影響

プロピルボロン酸 (mmol/L)	保存温度 (7日間)	ルシフェリン濃度		
		0M RLU	1X10 ⁻¹¹ M RLU %	
対照	-30℃	17	34280	100%
	25℃	25	25255	74%
	37℃	18	14661	43%
0.01	-30℃	19	34120	100%
	25℃	21	25661	75%
	37℃	22	14823	43%
0.05	-30℃	19	35019	100%
	25℃	25	26236	75%
	37℃	20	15902	45%
0.1	-30℃	20	34620	100%
	25℃	21	26487	77%
	37℃	17	16308	47%
0.5	-30℃	21	35349	100%
	25℃	19	27565	78%
	37℃	22	17951	51%
1	-30℃	18	35948	100%
	25℃	19	27745	77%
	37℃	19	18285	51%
2.5	-30℃	18	35921	100%
	25℃	21	28423	79%
	37℃	19	19779	55%
5	-30℃	16	35168	100%
	25℃	18	28511	81%
	37℃	22	19390	55%
10	-30℃	19	34455	100%
	25℃	20	27919	81%
	37℃	22	19566	57%
25	-30℃	18	31079	100%
	25℃	18	25281	81%
	37℃	17	17717	57%
50	-30℃	19	26201	100%
	25℃	17	20916	80%
	37℃	26	14346	55%
100	-30℃	17	17928	100%
	25℃	19	14805	83%
	37℃	17	10329	58%

10

20

30

40

【0113】

実施例 6

ボロン酸誘導体とシクロデキストリン誘導体を組み合わせたときのホタルルシフェリンの安定化

ボロン酸誘導体とホタルルシフェリンの安定化に効果が認められたシクロデキストリン誘導体（特許文献 3）を組み合わせたときの効果の増大の有無を検討した。

【0114】

50

(1) 試薬の調製

ボロン酸誘導体として 2 mmol/L フェニルボロン酸、およびシクロデキストリン誘導体として 2.5 mmol/L ジメチル- β -シクロデキストリンを用いた他は、実施例 1 と同様に調製した。

【0115】

(2) ルシフェラーゼ活性の測定

実施例 1 と同様に測定した結果を表 10 に示す。

ボロン酸誘導体またはシクロデキストリン誘導体単独で使したときに比較して、ボロン酸誘導体とシクロデキストリン誘導体を組み合わせて共存させたときの方が 25°C 、 37°C とともにホタルルシフェラーゼの活性が高く、両者を組み合わせることによりホタルルシフェリンの安定化が高まることが認められた。

10

【0116】

【表 10】

ボロン酸誘導体とシクロデキストリン誘導体の組み合わせ (7日間)

フェニルボロン酸	ジメチル- β -シクロデキストリン	保存温度 (7日間)	ルシフェリン濃度		
			0M RLU	$1 \times 10^{-11}\text{M}$ RLU	%
—	—	-30°C	26	31856	100%
		25°C	26	23794	75%
		37°C	40	13139	41%
—	+	-30°C	35	30676	100%
		25°C	51	27165	89%
		37°C	46	20287	66%
+	—	-30°C	49	32227	100%
		25°C	30	29641	92%
		37°C	38	22764	71%
+	+	-30°C	36	30272	100%
		25°C	29	28482	94%
		37°C	31	23981	79%

20

30

【0117】

実施例 7

HPLC によるホタルルシフェリンの分解産物の分析

【0118】

(1) 試薬の調製

フェニルボロン酸を含まないホタルルシフェリン溶液 (対照) および 20 mmol/L フェニルボロン酸を含むホタルルシフェリン溶液を調製した。なお、フェニルボロン酸の他は、実施例 1 と同様に調製した。

【0119】

フェニルボロン酸を含まないホタルルシフェリン溶液 (対照) は -30°C および 37°C で保存した。また、フェニルボロン酸を含むホタルルシフェリン溶液は 37°C で 7 日間保存した。

40

【0120】

(2) HPLC による分析

HPLC として Waters 社の UPLC、検出器は PDA を用いて、 330 nm で測定した。カラムは、CHIRALCEL OD-RH ($4.6 \times 15\text{ cm}$) (ダイセル化学工業社) を用いた。移動相はアセトニトリルと 0.1% トリフルオロ酢酸を用いて、アセトニトリルを $0 \sim 30$ 分間で 25% から 85% のグラジエント分析 (UPLC パラメータ曲線増加 8) を用いた。

【0121】

50

HPLCの分析結果を図1～図3に示す。対照のホタルルシフェリン溶液の -30°C 保存(図1)および 37°C 保存(図2)を比較すると、 37°C で保存することにより14.5分、19.4分、および21.3分にピークの上昇が認められ、これらがホタルルシフェリンの主な分解産生物と考えられた。なお、16.6分がホタルルシフェリンである。ホタルルシフェリンは 37°C 7日間後98%残存しており、2%が分解したと考えられた。

【0122】

14.5分のピークはL-ルシフェリン、19.4分のピークはデヒドロルシフェリンと考えられ、21.3分のピークは不明であった。これらのピークを分取し、ホタルルシフェラーゼ活性への影響を評価したところ、全てのピークがホタルルシフェラーゼ活性を阻害することを確認した。

【0123】

一方、フェニルボロン酸を含むホタルルシフェリン溶液(図3)では、14.5分のピークはやや上昇したが、19.4分および21.3分のピークの上昇が顕著に抑制された。

【0124】

デヒドロルシフェリンはホタルルシフェラーゼに対する親和性が非常に大きいため、ホタルルシフェラーゼを強く阻害することが知られている。フェニルボロン酸は19.4分(デヒドロルシフェリン)および21.3分の分解産生を抑制することにより、ホタルルシフェリン溶液を安定化しているものと考えられた。

【0125】

実施例8

ルシフェリン溶液にピロリン酸塩および／またはブチルボロン酸を共存させたときの発光の減衰・低下の抑制

ホタルルシフェリン溶液にピロリン酸塩および／またはブチルボロン酸を添加して、ルシフェラーゼによる発光反応を経時的に測定し、発光強度の減衰・低下の抑制効果を評価した。

【0126】

(1) 試薬の調製

本実施例のルシフェラーゼは遺伝子変異で得られたホタルルシフェラーゼを用いた。この酵素の至適pHは、pH8.2～8.3である。一方、基質であるホタルルシフェリンは弱酸性において安定である。

【0127】

そこで、ホタルルシフェリンを含む溶液のpHを弱酸性とし、ホタルルシフェラーゼの活性測定時には至適pHとなるように、二種類の測定試薬(R1およびR2)を調製し、ホタルルシフェラーゼの活性測定時にR1とR2を混合し、発光強度を測定した。

【0128】

各々の試薬の組成は、R1が 30 mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、および 4 mmol/L $\text{ATP} \cdot 2\text{Na}$ 含有 100 mmol/L Tris 緩衝液(pH8.5)、R2が 0.5 mmol/L ホタルルシフェリン含有 10 mmol/L ADA 緩衝液(pH6.5)とし(対照)、試験区にはさらに、 0.1 mmol/L ピロリン酸カリウムおよび／または 2 mmol/L ブチルボロン酸となるようにR2に添加した。

【0129】

(2) ホタルルシフェラーゼ溶液

ホタルルシフェラーゼ溶液は、 $1 \times 10^{-11}\text{ mol/L}$ となるように調製した。

【0130】

(3) ルシフェラーゼの活性測定

96穴マイクロプレート(サーモフィッシュャーサイエンティフィック社)の各ウェルに $10\text{ }\mu\text{L}$ のホタルルシフェラーゼ溶液をマニュアルで分注した。また、全ての試薬を 30°C で予備加温した。発光強度測定装置CentrolB960(ベルトールド社)を用い

10

20

30

40

50

てR1を50 μ LおよびR2を50 μ L各々吐出し、0秒後から30秒後までの発光強度を連続的に測定した。

【0131】

結果を図4に示すが、対照（ピロリン酸とブチルボロン酸を含まない場合）はフラッシュ発光であり、発光強度が速やかに低下した。これに対し、発光反応時にピロリン酸及びブチルボロン酸を共存させた場合は、ピロリン酸のみを共存させた場合に比べて、発光強度の減衰・低下が抑制された。

【0132】

実施例9

プロピルボロン酸をR1またはR2に添加したときの発光の減衰・低下の抑制

ボロン酸誘導体としてプロピルボロン酸を用い、より高い効果を得るためには、いずれの試薬にボロン酸誘導体を添加した方が良いか、検討した。

【0133】

(1) 試薬の調製

各々の試薬の組成は、R1が30 mmol/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、4 mmol/L $ATP \cdot 2Na$ 、および0.1 mmol/L ピロリン酸カリウム含有100 mmol/L $Tris$ 緩衝液（pH8.4）、R2が0.5 mmol/L ホタルルシフェリン含有10 mmol/L ADA 緩衝液（pH6.5）とし（対照）、試験区にはさらにR1またはR2に5 mmol/L プロピルボロン酸を添加した。

【0134】

(2) ルシフェラーゼの活性測定

実施例8と同様にホタルルシフェラーゼ溶液を調製し、測定を60秒後まで行った他は実施例8と同様の測定を実施した。

結果を図5に示すが、R1にプロピルボロン酸を添加したとき、R2にプロピルボロン酸を添加したとき、およびR1とR2の両方にプロピルボロン酸を添加したときのいずれも同等で、プロピルボロン酸を添加しない対照に比べて発光強度の減衰・低下が小さくなった。従って、プロピルボロン酸はR1、R2のどちらか一方の試薬に添加してもよく、またはR1、R2の両方に添加してもよいことが分かった。

【0135】

実施例10

プロピルボロン酸を反応中に添加したときの発光の減衰低下の抑制

ボロン酸誘導体としてプロピルボロン酸を用い、発光反応中にボロン酸誘導体を添加したときの発光の減衰・低下の抑制効果を検討した。

【0136】

(1) 試薬の調製

各々の試薬の組成は、R1が30 mmol/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、4 mmol/L $ATP \cdot 2Na$ 、および0.1 mmol/L ピロリン酸カリウム含有100 mmol/L $Tris$ 緩衝液（pH8.4）、R2が0.5 mmol/L ホタルルシフェリン含有10 mmol/L ADA 緩衝液（pH6.5）とし、さらにR3として7.5 mmol/L プロピルボロン酸溶液を調製した。

【0137】

(2) ルシフェラーゼの活性測定

実施例8と同様にホタルルシフェラーゼ溶液を調製した。

96穴マイクロプレートの各ウェルに10 μ Lのホタルルシフェラーゼ溶液をマニュアルで分注後、発光強度測定装置CentroLB960を用いてR1を50 μ LおよびR2を50 μ L各々吐出し、0秒後から15秒後までの発光強度を連続的に測定し、その後R3を50 μ L吐出し、さらに60秒後まで連続的に測定した。対照のR3は精製水50 μ Lとした。

【0138】

結果を図6に示すが、ルシフェラーゼの発光反応中にプロピルボロン酸を添加しても、

10

20

30

40

50

対照に比べて、発光強度の減衰・低下の抑制効果が改善された。従って、ボロン酸誘導体は構成試薬のどこに含まれてもよく、ルシフェラーゼ発光の反応時にボロン酸誘導体が存在すればよいことが分かった。

【0139】

実施例 11

ボロン酸誘導体の濃度による影響

添加するボロン酸誘導体の濃度を変えてルシフェラーゼによる発光反応を経時的に測定し、ボロン酸誘導体の濃度の違いによる発光強度の減衰・低下の抑制効果を評価した。

【0140】

(1) 試薬の調製

各々の試薬の組成は、R1が30mmol/L MgSO₄・7H₂O、および4mmol/L ATP・2Na含有100mmol/L Tris緩衝液(pH8.4)、R2が0.5mmol/L ホタルルシフェリン、0.1mmol/L ピロリン酸カリウム含有10mmol/L ADA緩衝液(pH6.5)とし、さらに、R2にプロピルボロン酸が0、0.5、1、5、10、25、50、および100mmol/Lとなるように添加した。

【0141】

(2) ルシフェラーゼの活性測定

実施例8と同様にホタルルシフェラーゼ溶液を調製し、実施例9と同様の測定を実施した。

結果を図7に示すが、プロピルボロン酸を何れの濃度で添加しても、発光強度の減衰・低下の抑制が認められた。またプロピルボロン酸濃度を50mmol/L以上添加すると発光強度は低下するが、長時間にわたり発光強度を維持することができることが分かった。

【0142】

実施例 12

種々のボロン酸誘導体の効果

ボロン酸誘導体として、エチルボロン酸、シクロペンチルボロン酸、フェニルボロン酸、2-クロロフェニルボロン酸、3-アミノフェニルボロン酸、4-ヒドロキシフェニルボロン酸、4-カルボキシフェニルボロン酸、1,4-フェニレンジボロン酸、3-フリルボロン酸、(トリヒドロキシ)フェニルボロン酸、3-チオフェンボロン酸、および2,5-チオフェンジイルビスボロン酸を用い、発光強度の減衰・低下の抑制効果を評価した。

【0143】

(1) 試薬の調製

各々の試薬の組成は、R1が30mmol/L MgSO₄・7H₂O、4mmol/L ATP・2Na、および0.1mmol/L ピロリン酸含有100mmol/L Tris緩衝液(pH8.4)、R2が0.5mmol/L ホタルルシフェリン含有10mmol/L ADA緩衝液(pH6.5)とし(対照)、試験区にはさらに、ボロン酸誘導体をR2に1~5mmol/Lとなるように添加した。

【0144】

(2) ルシフェラーゼの活性測定

実施例8と同様にホタルルシフェラーゼ溶液を調製し、実施例9と同様の測定を実施した。

結果を図8~図19に示すが、何れのボロン酸誘導体を用いても、発光強度の減衰・低下が抑制されることが分かった。

【0145】

なお、実施例12においてボロン酸誘導体として2,5-チオフェンジイルビスボロン酸を添加したときの発光開始55~60秒間の積算値を表1に示すが、発光強度の積算値が対照に比べて1.4倍であった。従って、ルシフェラーゼによる発光反応の場にボロン

酸誘導体を共存させることにより、発光強度の減衰・低下が抑制されるので、高感度に発光強度を測定することができることが分かった。

【0146】

【表11】

発光開始後55～60秒間の発光強度積算値(RLU)

	RLU	倍
対照	23890	1.0
2,5-チオフェンジイルビスボロン酸	32485	1.4

10

【0147】

発光強度の減衰・低下抑制効果の長時間での評価

ボロン酸誘導体としてトリヒドロキシフェニルボロン酸ナトリウムを10mmol/Lで使用し、ATP濃度を2mmol/Lとし、発光強度の測定時間を60分とする以外、実施例8と同様にして、蛍光強度減衰・低下に対するピロリン酸カリウム（PPi）及びボロン酸誘導体の影響を評価した。具体的には、マイクロプレートに検体を分注後、R1、R2をルミノメーターCentro LB960で添加し、添加2分後から2分間隔で60分までの発光強度を測定した。結果を図20に示す。図20に示すように、ピロリン酸とボロン酸誘導体を含まない場合（対照）はフラッシュ発光であり、発光強度は急激に減衰低下し2分以内に定常状態になった。ピロリン酸が存在すると、発光の減衰は緩やかではあるが、15～20分で減衰し、定常状態になる。ピロリン酸とボロン酸誘導体が存在すると60分後も強い発光強度を測定することができた。

20

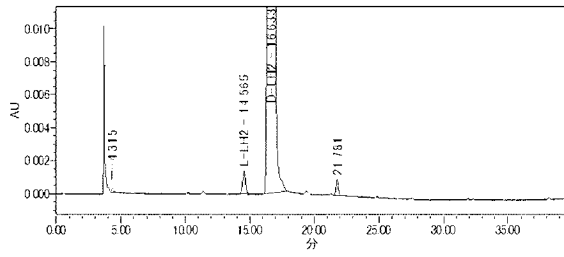
【産業上の利用可能性】

【0148】

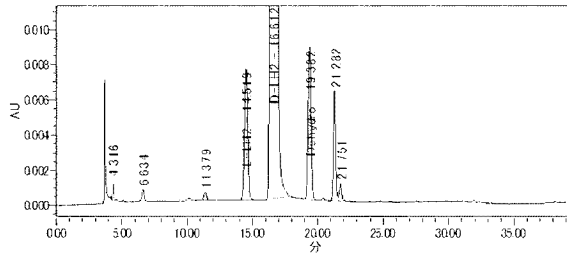
本発明は、ボロン酸誘導体又はその塩をルシフェリン溶液に共存させることにより、ルシフェリン溶液の保存安定性を高める方法である。ルシフェリン溶液は分解産生物を生じ、このためルシフェラーゼの発光強度が経時的に低下する。それゆえ、ルシフェラーゼの活性を指標とした高感度な測定系を構築するとき、発光強度が経時的に低下するため、安定した値を得ることができない。本発明により、より安定なルシフェリン溶液を提供することができるので、より長期間にわたり安定に測定することができる。また、一実施形態において、本発明は、ボロン酸誘導体又はその塩をルシフェリン溶液に共存させることにより、ピロリン酸塩による発光反応の減衰・低下の抑制効果をさらに高めることを可能とする方法である。本発明により、ルシフェラーゼの発光反応の発光強度が安定することにより、高感度で安定した測定結果を得ることが可能となる。

30

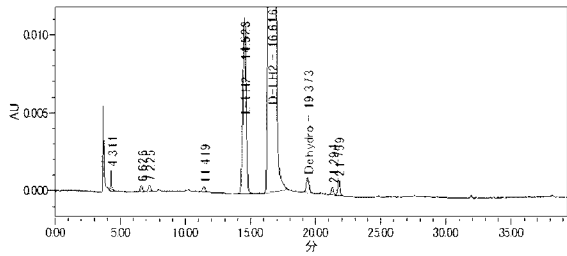
【図 1】



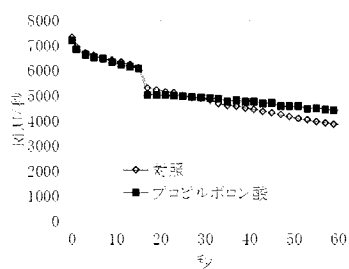
【図 2】



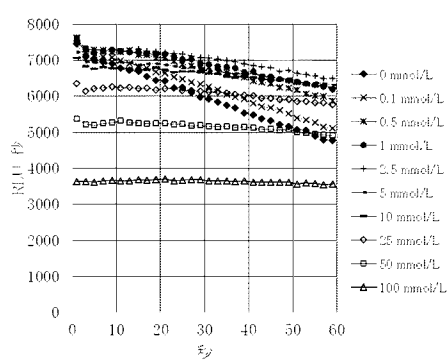
【図 3】



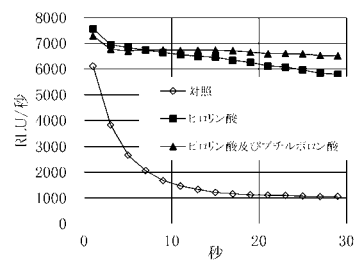
【図 6】



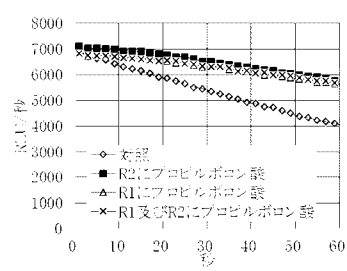
【図 7】



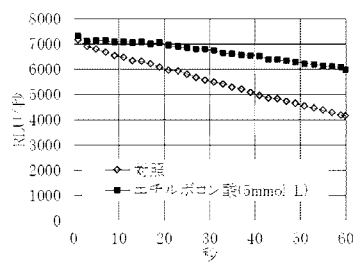
【図 4】



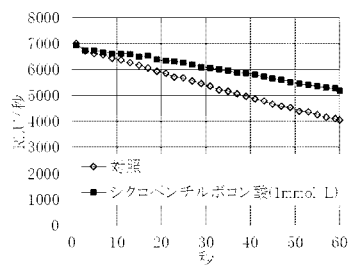
【図 5】



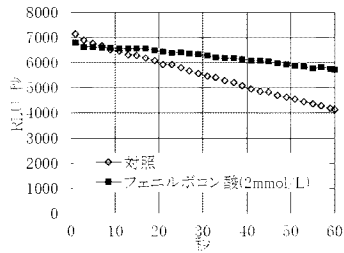
【図 8】



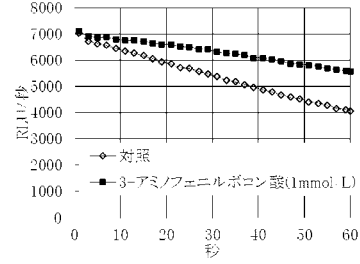
【図 9】



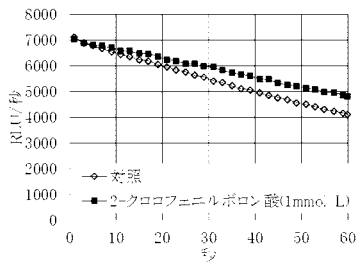
【図 10】



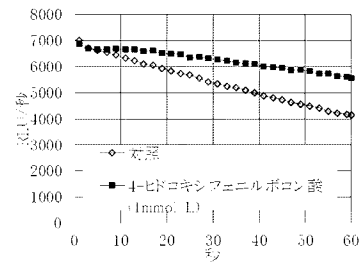
【図 12】



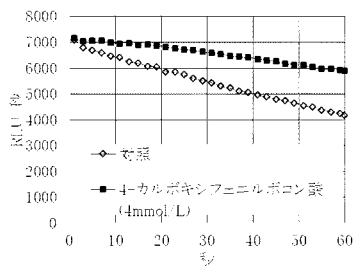
【図 11】



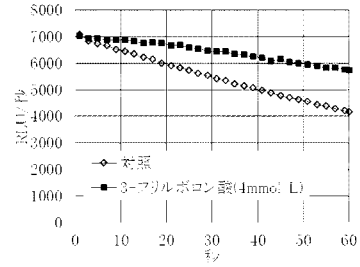
【図 13】



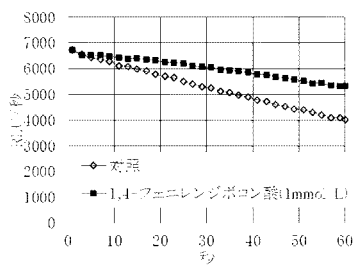
【図 14】



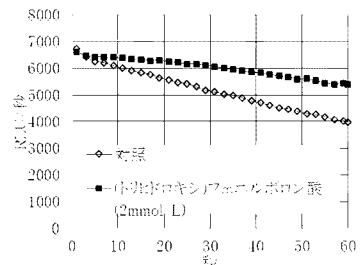
【図 16】



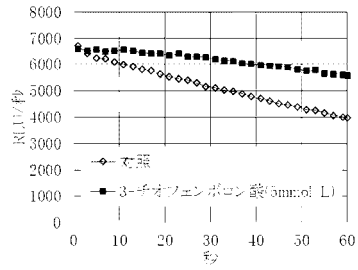
【図 15】



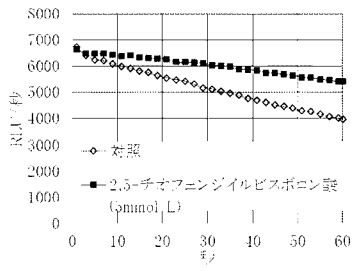
【図 17】



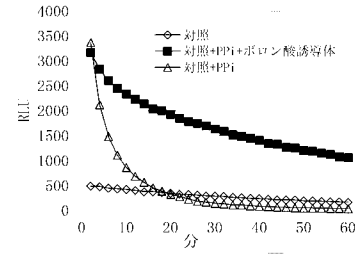
【図 18】



【図 19】



【図 20】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2016/079006
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q1/66(2006.01)i, G01N33/532(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, G01N33/532 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 1996-2016 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIX (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2000-253899 A (Eiken Chemical Co., Ltd.), 19 September 2000 (19.09.2000), claim 1; examples (Family: none)	1-9
A	JP 2000-166550 A (Eiken Chemical Co., Ltd.), 20 June 2000 (20.06.2000), claim 12; example 5 (Family: none)	1-9
A	JP 2000-319280 A (Eiken Chemical Co., Ltd.), 21 November 2000 (21.11.2000), claim 1; examples (Family: none)	1-9
☒ 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 13 December 2016 (13.12.16)		Date of mailing of the international search report 27 December 2016 (27.12.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/079006

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 2014-039486 A (Eiken Chemical Co., Ltd.), 06 March 2014 (06.03.2014), claim 1; examples (Family: none)	1-9
A	JP 8-047399 A (Eiken Chemical Co., Ltd.), 20 February 1996 (20.02.1996), claim 1; examples (Family: none)	1-9
A	JP 10-210999 A (Eiken Chemical Co., Ltd.), 11 August 1998 (11.08.1998), abstract; claim 1; paragraphs [0010] to [0011]; examples (Family: none)	1-9
A	WO 99/011766 A1 (Toyo Ink Manufacturing Co., Ltd.), 11 March 1999 (11.03.1999), page 3, lines 24 to 26 & US 6060261 A column 2, lines 45 to 49	1-9
A	JP 2008-092900 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 24 April 2008 (24.04.2008), paragraphs [0027], [0030] (Family: none)	1-9

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 7 9 0 0 6										
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, G01N33/532(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, G01N33/532												
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2016年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2016年	日本国実用新案登録公報	1996-2016年	日本国登録実用新案公報	1994-2016年	
日本国実用新案公報	1922-1996年											
日本国公開実用新案公報	1971-2016年											
日本国実用新案登録公報	1996-2016年											
日本国登録実用新案公報	1994-2016年											
国際調査で利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) Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIX (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII)												
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	JP 2000-253899 A (栄研化学株式会社) 2000.09.19, 請求項 1, 実施例 (ファミリーなし)	1-9										
A	JP 2000-166550 A (栄研化学株式会社) 2000.06.20, 請求項 12, 実施例 5 (ファミリーなし)	1-9										
☒ 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。												
<table border="0"> <tr> <td> * 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 </td> <td> 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 </td> </tr> </table>				* 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							
* 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 13.12.2016		国際調査報告の発送日 27.12.2016										
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		<table border="1"> <tr> <td>特許庁審査官 (権限のある職員)</td> <td>4B</td> <td>5804</td> </tr> <tr> <td colspan="3">市島 洋介</td> </tr> <tr> <td>電話番号 03-3581-1101</td> <td colspan="2">内線 3448</td> </tr> </table>		特許庁審査官 (権限のある職員)	4B	5804	市島 洋介			電話番号 03-3581-1101	内線 3448	
特許庁審査官 (権限のある職員)	4B	5804										
市島 洋介												
電話番号 03-3581-1101	内線 3448											

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 7 9 0 0 6
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	JP 2000-319280 A (栄研化学株式会社) 2000. 11. 21, 請求項 1, 実施例 (ファミリーなし)	1-9
A	JP 2014-039486 A (栄研化学株式会社) 2014. 03. 06, 請求項 1, 実施例 (ファミリーなし)	1-9
A	JP 8-047399 A (栄研化学株式会社) 1996. 02. 20, 請求項 1, 実施例 (ファミリーなし)	1-9
A	JP 10-210999 A (栄研化学株式会社) 1998. 08. 11, 要約, 請求項 1, 段落[0010]-[0011], 実施例 (ファミリーなし)	1-9
A	WO 99/011766 A1 (東洋インキ製造株式会社) 1999. 03. 11, 第 3 頁第 24-26 行 & US 6060261 A, 第 2 欄第 45-49 行	1-9
A	JP 2008-092900 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2008. 04. 24, 段落[0027], 段落[0030] (ファミリーなし)	1-9

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, DJ, 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, KW, 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

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	稳定荧光素的方法和测量生物发光的方法		
公开(公告)号	JPWO2017057672A1	公开(公告)日	2018-07-26
申请号	JP2017543612	申请日	2016-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	荣研化学株式会社		
申请(专利权)人(译)	荣研化学株式会社		
[标]发明人	山岡利彦		
发明人	山岡 利彦		
IPC分类号	C12Q1/66 G01N33/532		
CPC分类号	C12Q1/66 G01N33/532		
FI分类号	C12Q1/66 G01N33/532.B		
F-TERM分类号	4B063/QQ22 4B063/QR02 4B063/QS02 4B063/QS36 4B063/QX02		
优先权	2015192367 2015-09-30 JP 2016077437 2016-04-07 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明要解决的问题是提供一种增强荧光素溶液稳定性的组合物。本发明的特征在于，在以荧光素为底物进行荧光素酶的生物发光反应时，使荧光素溶液中的硼酸衍生物或其盐共存，使荧光素溶液稳定化的方法以及焦磷酸和硼酸。公开了一种抑制生物发光强度的降低/降低的方法，其特征在于允许衍生物或其盐共存。

(19) 日本国特許庁 (JP)		再 公 表 特 許 (A1)		(11) 国際公開番号 WO2017/057672	
発行日 平成30年7月26日 (2018. 7. 26)		(43) 国際公開日 平成29年4月6日 (2017. 4. 6)			
(51) Int. Cl. C 1 2 Q 1/66 (2006.01) G 0 1 N 33/532 (2006.01)		F I C 1 2 Q 1/66 G 0 1 N 33/532 B		テーマコード (参考) 4 B 0 6 3	
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁)			
出願番号 特願2017-543612 (P2017-543612)		(71) 出 願 人 000120456			
(21) 国際出願番号 PCT/JP2016/079006		栄研化学株式会社			
(22) 国際出願日 平成28年9月30日 (2016. 9. 30)		東京都台東区台東 4 丁目 1 9 番 9 号			
(31) 優先権主張番号 特願2015-192367 (P2015-192367)		(74) 代理人 110000796			
(32) 優先日 平成27年9月30日 (2015. 9. 30)		特許業務法人三枝国際特許事務所			
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)		(72) 発明者 山岡 利彦			
(31) 優先権主張番号 特願2016-77437 (P2016-77437)		栃木県下都賀郡野木町野木 1 4 3 栄研化			
(32) 優先日 平成28年4月7日 (2016. 4. 7)		学株式会社 野木事業所内			
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)		F ターム (参考) 4B063 QQ22 QR02 QS02 QS36 QX02			
				最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 ルシフェリンの安定化方法及び生物発光の測定方法					