

超高感度マルチ酵素活性アッセイの実現に向けた デュアルスウィーピング濃縮法の開発

Development of Dual Sweeping Preconcentration for Highly Sensitive Multiple Enzyme Activity Assay

大阪府立大学 末吉健志

創薬・生化学分野で汎用されているマイクロプレートを用いた酵素活性アッセイは、操作が煩雑、必要試料量・試薬量が多い、測定時間が長いなどの点から希少生体試料分析への適用が困難である。一方、当研究室で開発した、分析試薬が物理吸着固定された試薬放出キャピラリー (RRC) を用いた微量試料の酵素活性アッセイ^[1]では、簡便、短時間、少試料量・試薬量な分析が実現されたものの、低い濃度感度が課題となっていた。その改善のための新規試料濃縮法として、酵素反応生成物をキャピラリー内の同一位置へ高効率に濃縮可能な方法である「デュアルスウィーピング」を着想した。本研究では、その試料濃縮機構の解明と、アレイ化 RRC を用いたマルチ酵素活性アッセイへの適用による高感度化を遂行した^[2]。

デュアルスウィーピングは、界面活性剤ミセルの電気泳動を利用した試料濃縮法 (スウィーピング) を基盤技術として開発された新規試料濃縮法である。カチオン性・アニオン性ミセルの電気泳動によって RRC 内の蛍光分子を両ミセルで挟み込むような濃縮機構を有しており、高効率な試料濃縮および分子拡散の抑制による超高感度化が期待できる試料濃縮法である。

まず、カチオン性およびアニオン性界面活性剤を異なる比率で混合・ヒドロゲル化させ、カチオン性およびアニオン性混合ミセル含有ヒドロゲルを調製した。試料濃縮機構解明のため、モデル蛍光試料 (ローダミン B) 溶液が充填されたキャピラリーの陽極および陰極側に、調製したカチオン性およびアニオン性混合ミセル含有ヒドロゲルをそれぞれ接続した後、各ミセルをキャピラリー内に電気泳動によって導入し、デュアルスウィーピングに基づく試料濃縮過程を蛍光顕微鏡観察した。さらに、酵素反应用蛍光基質が固定化された RRC に酵素溶液を導入して酵素反応を行った後、生成物をデュアルスウィーピングによって濃縮し、酵素活性アッセイの高感度化を試みた。

蛍光画像観察の結果、蛍光試料が各混合ミセルとの相互作用に基づくスウィーピングによって濃縮されながら泳動した後、最終的にキャピラリー中心部付近で一本の細いバンド状に収束される様子が観測された。また、分子拡散によるバンド幅の増加が電圧印加時には抑制されている様子も観察された。さらに、未濃縮時との蛍光強度比較から、本実験系におけるデュアルスウィーピングの濃縮効率は約 200 倍と算出された。この値は、従来のスウィーピングに基づく試料濃縮と比較して約 3~5 倍高効率であり、本法の高い濃縮効率が示された。

カスパーゼ 3、トリプシンおよびアルカリフォスファターゼの酵素活性アッセイに RRC およびデュアルスウィーピングを適用したところ、各 RRC 内で酵素反応によって生じたそれぞれの蛍光性生成物が、どれも細いバンド状に濃縮される様子が観察された。また、酵素濃度・反応時間に応じて蛍光強度が増加する様子も確認された。さらに、3 種の酵素活性アッセイ用 RRC を並列化し、混合試料溶液のマルチアッセイを行った結果、各キャピラリーにおいて対応する酵素との反応によって生じた蛍光生成物を濃縮・検出することが可能であった。以上の結果から、本法に基づく簡便かつ高感度なマルチ酵素活性アッセイが可能であることが示された。

【参考文献】

[1] Henares, T. G.; *et al. Anal. Chem.* **2007**, *79*, 908-915.

[2] Sanuki, R.; *et al. Anal. Chem.* **2017**, *89*, 6505-6512.