

# 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

(日本分析化学会推薦)

代表研究者 大阪府立大学 末吉 健志 Osaka Prefecture University Kenji Sueyoshi

In conventional microfluidic bioassays, short optical pathlength and extremely small quantities of analytes sometimes can significantly reduce detectability. Various sample preconcentration techniques have been reported for improving the detectability of bioassays. In the present study, we developed a novel preconcentration technique, ‘double sweeping’, utilizing cationic and anionic micelles simultaneously. Microscopic observations demonstrated that double sweeping enabled a sample solution, which initially filled a capillary, to be focused into an extremely narrow band. Initially, the sample molecules are swept from cathode to anode, or anode to cathode, based on conventional sweeping with an anionic or cationic micellar solution, respectively. Then, the fronts of the swept bands collide each other in the capillary, and halt at the interface between the bands. The sample molecules in the micellar solutions continue to move toward the interface because of the electrophoretic migration of the micelles, which results in further focusing, and suppression of the band broadening due to molecular diffusion. We demonstrated that higher preconcentration efficiency was achieved using double sweeping, than using conventional sweeping. In addition, double sweeping was successfully incorporated into a multiple enzyme activity assay using an arrayed reagent-release capillary, resulting in simple, rapid, simultaneous, and highly sensitive assays of caspase-3, alkaline phosphatase, and trypsin.

### 研究目的

酵素は生体内における様々な化学反応に関与していることが知られており、その働きの解明は生命の営みを解き明かす上で非常に重要である。一般に生命科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、操作自体は勘弁である反面、複数のウェルへの試料・試薬導入が煩雑、必要試料量・試薬量が多いなどの点から、希少な生体試料分析への適用が困難となる場合がある。そこで近年、ミクロスケール酵素活性アッセイに関する様々な研究が進められ、試薬量・試料量の削減や分析の短時間化が実現されてきた。当研究室でも、ガラス製毛細管 (キャピラリー) 内表面に分析試薬が物理吸着固定された「試薬放出キャピラリー (reagent-release capillary, RRC)」を開発し、微量試料の酵素

活性アッセイに適用してきた [1]。この分析法では、毛細管力の利用によって 1  $\mu$ L 以下の試料溶液が自動的に RRC 内に導入されるため、極微量試料を簡便に分析可能である。その後、RRC 内における酵素反応生成物について蛍光顕微鏡を用いて観察・解析するだけで、極微量の試料溶液中酵素の活性アッセイが達成される。これまで、RRC の開発によって簡便、短時間、少試料量・試薬量な酵素活性アッセイが実現されたものの、100  $\mu$ m と非常に短い光路長に起因する低い濃度感度が大きな課題であった。その改善のため、RRC を用いた酵素活性アッセイとミクロスケール電気泳動に基づくオンライン試料濃縮法との結合を着想した。その中でも、界面活性剤ミセルを用いた疎水性物質の高効率濃縮法であるスウィーピングに着目し、これを応用した新手法として、二種類

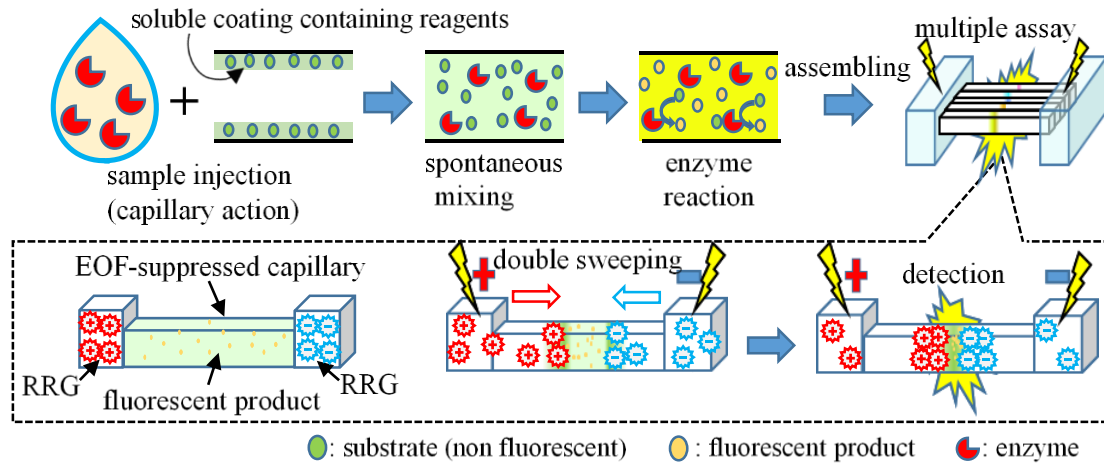


Figure 1. Schematic illustration of combination of enzyme activity assay using an RRC with double sweeping.

の界面活性剤ミセルを同時に用いる「デュアルスウィーピング」を提案した。本研究では、その試料濃縮機構を解明し、その特徴から「ダブルスウィーピング」と新たに命名した。また、開発したダブルスウィーピングを酵素活性アッセイデバイスへ応用し、その高感度化を図った。さらに、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一斉分析の実現 (Figure 1) を目的として、その検討を行った。

## 研究経過

まず、より簡便な操作で測定可能な酵素活性アッセイデバイスの実現を目指して、(1) 試薬放出ヒドロゲル (reagent-release hydrogel, RRG) を用いた電氣的試薬導入について検証した。続いて、RRC を用いた酵素活性アッセイの高感度化を目的として、(2) ダブルスウィーピングにおける試料濃縮機構の解明と濃縮効率の評価を行った。また、最終的には (3) アレイ化 RRC と RRG、そしてダブルスウィーピングを組み合わせた超高感度マルチ酵素活性アッセイの実現に向けて検討を行った。

### (1) 試薬放出ヒドロゲルを用いた電氣的試薬導入

一般的なキャピラリー電気泳動分析では、キャピラリー両端に緩衝液が満たされた溶液リザーバーを接続する。その際、わずかな液面高さの差異によってキャピラリー内に溶液が流入し、分析結果や再現性に影響を与えることが知られている。この問題点を解消し、簡便なアッセイを実現するため、溶液リザーバーが「試薬放出ヒドロゲル (RRG)」に置換された電気泳動操作を新たに着想した。本研究では、

ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド (カチオン性界面活性剤) および硫酸ドデシルナトリウム (アニオン性界面活性剤) の両方を異なる比率で混合・ヒドロゲル化させた、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 (カチオン性およびアニオン性 RRG) を調製した。RRG を用いたミセルの電氣的注入について評価するため、ローダミン B 溶液が充填されたキャピラリーの陽極側および陰極側にカチオン性およびアニオン性 RRG をそれぞれ接続後、各 RRG を介して電圧を印加して、ミセルがキャピラリー内に導入される様子を観察した。

### (2) ダブルスウィーピングの濃縮機構の解明と濃縮効率の評価

ダブ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であるスウィーピングを基盤技術として開発した新規試料濃縮法である。測定対象となる試料分子が含まれるキャピラリー末端の陽極側からカチオン性ミセルを、陰極側からアニオン性ミセルを、それぞれ同時に電気泳動によって導入する。このとき、ミセル内の疎水性空間に取り込まれた試料分子は、各ミセルと同程度の泳動速度で共に移動することとなる。その結果、各ミセルによってかき集められるようにして濃縮されながら、キャピラリー中央部に向かって移動する。各ミセルゾーンがキャピラリー中央部に到達し、異なる電荷を有するミセル同士が衝突すると、電氣的に中性なミセルが形成され、その電気泳動が停止する。その際、ミセルに取り込まれていた試料分子も衝突界面近傍において泳動停止し、細いバンド状に濃縮される。その結果、キャピラリー内試料分子の高効率な

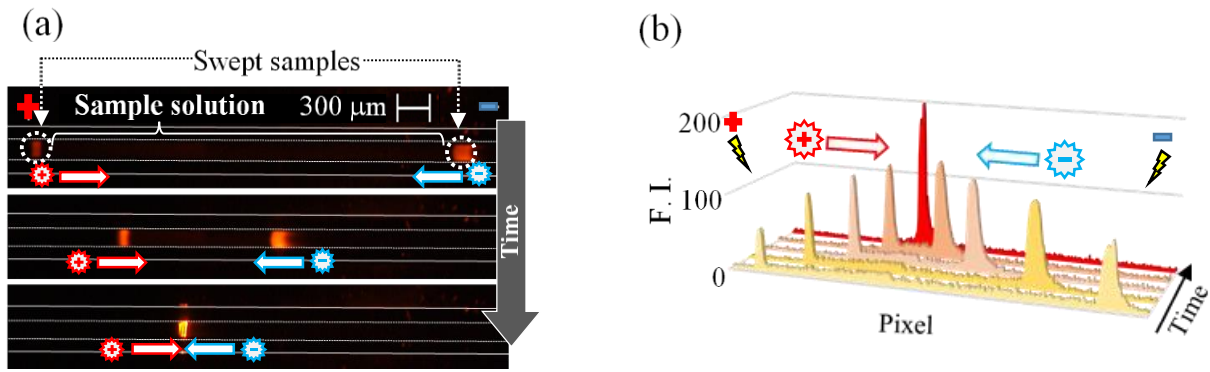


Figure 2. Fluorescence imaging of sample migration during double sweeping. (a) Images obtained using digital microscope at 13, 27, and 42 s after applying voltage. (b) Fluorescence intensity profiles extracted from fluorescent images.

試料濃縮が達成され、超高感度検出が実現される。

試料濃縮機構解明のためのモデル試料として、ローダミンB溶液をキャピラリー内に充填後、(1)と同様の手順で各ミセルを電気泳動によって導入した。電気泳動および試料濃縮の様子は蛍光顕微鏡を用いて観察した。得られた蛍光画像から、未濃縮時と濃縮時の蛍光強度を比較し、ダブルスウィーピングの濃縮効率を評価した。また、多様な蛍光基質への対応を目標として、酵素活性アッセイ用基質の蛍光部位として使用されているフルオレセイン、アミノメチルクマリン、ローダミン110について、それぞれの濃縮効率を同様に評価した。

### (3) 超高感度マルチ酵素活性アッセイの実現

酵素反応モデル試料として、カスパーゼ3用蛍光基質が固定化されたRRCを作製した。作製したRRCにカスパーゼ3溶液を毛細管力にて導入し、酵素反応を行った。その後、蛍光生成物をダブ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。さらに、トリプシンおよびアルカリフォスファターゼ用蛍光基質が固定化されたRRCをそれぞれ作製し、各酵素活性アッセイの高感度化を同様に試みた。また三種類のRRCが並列的に配置されたアレイ化RRCを用いて同様の実験を行い、超高感度マルチ酵素活性アッセイの実現を目指した。

## 考察

### (1) 試薬放出ヒドロゲルを用いた電氣的試薬導入

電圧印加直後から、ローダミンBで満たされたキャピラリー内にカチオン性およびアニオン性RRGから各ミセルが導入され、スウィーピングの原理に基づく試料濃縮バンドが形成される様子が観察

された (Figure 2a)。この結果から、煩雑かつ実験結果に悪影響を与える可能性がある溶液操作を排除するために溶液リザーバーをRRGに置換することで、RRC後のスウィーピングによる試料濃縮を簡便な手順で実現可能であることが示された。

### (2) ダブルスウィーピングの濃縮機構の解明と濃縮効率の評価

各RRGをローダミンB溶液充填キャピラリーに接続して電圧印加し、各ミセルを電気泳動導入し続けた。その結果、それぞれのミセルによって濃縮された試料バンドがキャピラリー中央付近へと移動し、最終的には50 μm程度の非常に狭いバンド状に収束されて停止する様子が観察された (Figure 2a)。また、電圧印加中は濃縮完了後のバンド幅の増加が確認されず、試料分子の濃度拡散による希釈が抑制されている様子が確認された。このとき、未濃縮時との蛍光強度比較から、本実験系におけるダブルスウィーピングの濃縮効率は約200倍と算出された (Figure 2b)。この値は、キャピラリー全長(10 mm)に充填されていた試料バンドが約1/200(50 μm)に収束されたことに対応しており、キャピラリー内の蛍光分子ほぼすべてが一点に濃縮されていることを示唆している。また、従来の界面活性剤を一種類のみしか用いないスウィーピングに基づく試料濃縮と比較しても、約3~5倍高効率な試料濃縮が達成されていた。以上の結果から、本法は従来のスウィーピングには無い試料濃縮機構を有しており、より高効率な試料濃縮が可能であることが示された。

一方、骨格や疎水性、電荷などの性質が大きく異なるフルオレセイン、アミノメチルクマリン、ローダミン110についても、それぞれ同様に200倍程度

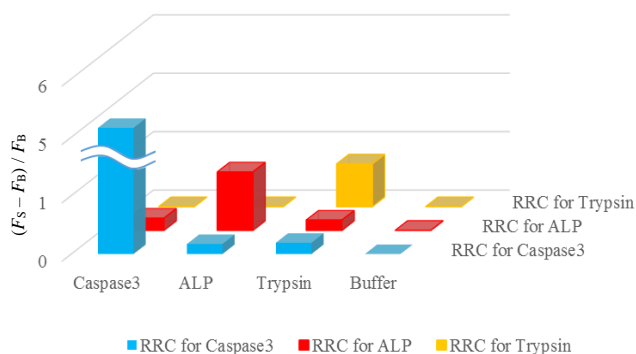


Figure 3. Multiple enzyme cross-reactivity assay using arrayed RRCs with double sweeping.  $F_S$  and  $F_B$  represent the fluorescence intensities of the assays in sample and buffer solutions, respectively.

の高効率濃縮が可能であることが確認された。このことから、本法は高い汎用性を有しており、多様な酵素活性アッセイに適用可能であることが示された。

### (3) 超高感度マルチ酵素活性アッセイの実現

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 およびダブルスウィーピングを適用した。その結果、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ことから、各 RRC とダブルスウィーピングを組み合わせた高感度酵素活性アッセイが可能であることが示された。さらに、三種の酵素活性アッセイ用 RRC が並列に設置されたアレイ化 RRC を用いて、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 (Figure 3)。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.

### 研究の発表

#### 口頭発表

1. 讃岐僚太, 安倉直希, 末吉健志, 遠藤達郎, 久本秀明, "試薬放出ヒドロゲルを用いたダブルスウィーピングに基づく高感度酵素活性アッセイ", 日本分析化学会第 64 年会 (福岡), 2015.9.9-11.
2. 末吉健志, "ミクロスケール電気泳動のバイオアッセイへの応用", 日本分析化学会近畿支部, 異分野融合による新規分離分析法の創成のための若手後援会, 口頭発表 (依頼講演) (大阪), 2015.11.7.
3. 末吉健志, "ミクロスケール電気泳動を駆使した新規バイオアッセイ法の開発", 第 26 回クロマトグラフィー科学会議, 口頭発表 (依頼講演) (福岡), 2015.11.11-13.
4. 讃岐僚太, 末吉健志, 遠藤達郎, 久本秀明, "ダブルスウィーピングに基づく高感度電気泳動酵素活性アッセイ", 第 76 回分析化学討論会, 口頭発表 (岐阜), 2016.5.28-29.
5. Kenji Sueyoshi, (Invited talk) "Rapid and sensitive bioassay based on microscale electrophoresis", 8th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM 2016), (Hon Kong University, Hong Kong), 2016.5.30-6.1.
6. Kenji Sueyoshi, (Invited talk) "Rapid and Sensitive Bioassay Using Online Sample Preconcentration Techniques in Microscale Electrophoresis", 16th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis (APCE2016), November 7-10, 2016, Malaysia.
7. 讃岐僚太, 末吉健志, 遠藤達郎, 久本秀明 "ダブルスウィーピングに基づく簡便・迅速・高感度酵素活性マルチアッセイ", 日本化学会第 97 春季年会 (東京), 2017.3.16-19.

#### 誌上発表

1. Ryota Sanuki, Kenji Sueyoshi\*, Tatsuro Endo, Hideaki Hisamoto, "DOUBLE SWEEPING USING REAGENT-RELEASE HYDROGELS FOR A HIGHLY SENSITIVE ELECTROPHORETIC BIOASSAY MICRODEVICE", The Proceedings of MicroTAS 2015 Conference, 1080-1082, 2015.