

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24750068

研究課題名(和文) ミクロスケール電気泳動に基づく高性能ブロットング分析デバイスの開発

研究課題名(英文) Development of high-performance blotting device based on microscale electrophoresis

研究代表者

末吉 健志 (SUEYOSHI, Kenji)

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70552660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：市販のキャピラリー電気泳動分析装置や作製した電気泳動分析用マイクロチップを用いて、アルギン酸ヒドロゲルをベースとした新規ブロットング分析法の開発を行った。その結果、微小空間内に形成されたアルギン酸ヒドロゲルは分子ふるい効果を有すること、アルギン酸ヒドロゲルの調製条件が分子ふるい効果に影響を与えることを見出した。

また、アビジン内包ヒドロゲル充填キャピラリーを調製し、これを用いたビオチンラベル化試料のアフィニティ電気泳動分析法を開発した。その結果、ラベル化試料のみがヒドロゲルに選択的に捕捉され濃縮されること、また、濃縮された試料の溶離が可能であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：A novel protein analysis using alginate hydrogels was developed. The alginate hydrogels were easily prepared and immobilized in capillaries and microchannels. It was confirmed that the prepared hydrogel was used as molecular sieving matrix. When the DNAs were introduced into the capillary filled with the alginate hydrogel, some DNAs were separated during the migration in the formed hydrogel, the others were trapped. The sieving effect was controllable by varying concentration of alginate and calcium ions. It was also confirmed that the alginate hydrogels was applicable to affinity capillary electrophoresis. In the experiments, the alginate hydrogel containing avidin specifically captured biotinylated molecules, resulting in the selective separation and preconcentration of the target molecules. Consequently, it is clarified that the alginate hydrogel is versatile material to realize blotting device based on microscale electrophoresis.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・電気泳動分析

キーワード：キャピラリー電気泳動 マイクロチップ電気泳動 ブロットング分析 タンパク質分析 ゲル電気泳動 アフィニティ電気泳動

1. 研究開始当初の背景

近年、生命科学分野において DNA や RNA、タンパク質などの複雑な生体試料の分析のために、種々のプロット法 (Southern blotting, northern blotting, western blotting) が開発されてきた。これらの手法は平板ゲル電気泳動によって試料のサイズ分離を行った後に、分離された試料を膜へ転写し、特定の塩基対構造のみにハイブリダイゼーションする試薬、または 3 次元構造にアフィニティを示す試薬で処理することで、複雑な混合試料の中から特定の試料のみを検出可能な優れた分析手法である。そのため、特に遺伝子異常診断や腫瘍マーカーとしての変異タンパク質の検出等に必要不可欠な技術として、世界中で広く使用されている。しかしながら、煩雑な実験操作、半日以上の分析時間、自動化が困難、高コストなどのデメリットも多く、それらの問題点の改善が生命科学研究の発展を加速するために切望されている。

このような社会状況において、ごく最近、申請者らがこれまで研究を進めてきたマイクロスケール電気泳動 (キャピラリー電気泳動, CE; マイクロチップ電気泳動, MCE) に注目が集まっている。CE/MCE は、短い分析時間、高い分離能、自動化が可能、必要な試薬量・試料量が少なく低コストなどのメリットを有しており、マイクロスケール電気泳動に基づく改良プロット法の開発がいくつかの研究グループによって進められている。実際に、新規プロット法による分析時間の大幅な短縮について数点の報告が既になされているものの、MCE に基づく手法では複雑なマイクロチップ作製手順が、CE に基づく手法では膜への転写までしか自動化できない点から、それぞれプロット法の代替技術とはなっていないのが現状である。

一方、申請者らは、海藻類由来の天然多糖類高分子であるアルギン酸ナトリウムが二価の金属イオンとの混合により速やかにヒドロゲルを形成する特徴を有する点に着目し、微小空間内においてアルギン酸およびカルシウムイオンを電気泳動により混合することで、アルギン酸ヒドロゲル充填キャピラリー/マイクロチップを調製可能であること、アルギン酸ヒドロゲルが分子ふるい効果を示すこと、活性が維持されたままタンパク質をヒドロゲル内に固定可能であることをそれぞれ見出した。また、アルギン酸ヒドロゲルはその組成や分子量、カルシウムイオンとの混合条件などによって、多彩な三次元網目状構造を形成することも知られている。そこで、本研究では、二次元 MCE に基づくプロット法のコンセプトを基に、構造が異なるアルギン酸ヒドロゲルが連続的に充填されたキャピラリーを用いた、CE に基づく新規プロット法分析を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、海藻由来のバイオマスである

アルギン酸ナトリウムを微小空間内でヒドロゲル化し、分子ふるい効果を有する分離媒体およびアフィニティ分子の固定化媒体として用いることで、マイクロスケール電気泳動に基づく新規プロット法分析に関する要素技術を開発し、簡便、迅速かつ高選択的な生体試料分離分析の実現を目指した。また、要素技術開発で得られた知見を基に、DNA やタンパク質などの実試料のプロット法分析への展開、酵素・薬剤スクリーニングなどへの応用などを通じて、社会に貢献することを目的とした。

3. 研究の方法

平成 24 年度には、組成や分子量の異なるアルギン酸ナトリウムから調製されたアルギン酸ヒドロゲル充填キャピラリー/マイクロチップを用いた マイクロチップゲル電気泳動 (MCGE) および アフィニティキャピラリー電気泳動 (ACE) 分析について検討し、ヒドロゲル形成条件が分子ふるい効果とアフィニティ分子の固定化効果に与える影響をそれぞれ明らかにした。

平成 25 年度には、分離用およびアフィニティ分子固定化用ヒドロゲルの両方を同時に形成させたキャピラリーの調製、それを用いた CE に基づく新規プロット法の開発、その基礎的性能評価および実試料分析への応用について検討した。また、分離能、選択性の異なるヒドロゲルを一つの分離流路内に調製し、MCGE 分析の分離能の向上およびマルチ ACE 分析の実現に取り組んだ。

4. 研究成果

市販のキャピラリー電気泳動分析装置や作製した電気泳動分析用マイクロチップを用いて実験を行い、アルギン酸ヒドロゲルをベースとした新規プロット法分析の開発による、短時間、簡便、省試薬量な分析の実現に取り組んだ。

(1) アルギン酸ヒドロゲルは、アルギン酸および添加するカルシウムの濃度によって構造が変化することが知られている。そこで、本研究ではキャピラリー内に充填したアルギン酸ナトリウム溶液に対して、電気泳動によって種々の濃度のカルシウムイオンを加えることで、異なる構造のヒドロゲルを作製することを試みた。その結果、混合比を最適化することで種々の DNA のサイズ分離が可能となること、アルギン酸自体の構造の違いがゲル構造およびサイズ分離能に影響を与えることがそれぞれ見出された。

(2) アルギン酸ナトリウム溶液にアビジンを添加したものをキャピラリー内に充填し、その後カルシウムイオンを電気泳動によって加えることで、アビジンがゲル構造の中に閉じ込められ、キャピラリー内に固定化されることを見出した。また、キャピラリー内に固定化されたアビジンのビオチンに対する高い活性が維持されていることを確認した。

(3) アビジン内包ヒドロゲル充填キャピラリーを調製し、これを用いたバイオチンラベル化試料のアフィニティ電気泳動分析法を開発した。その結果、ラベル化試料のみがヒドロゲルに捕捉され、それ以外の試料はゲル充填部を通過することが確認された。また、イミノバイオチンの捕捉による濃縮と溶離が可能であることを見出し、生体試料に対する選択的かつ高感度な分析法として確立した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文](計12件、全て査読有り)

1. Design of Single-Step Immunoassay Principle Based on the Combination of Enzyme-Labeled Antibody Release Coating and Hydrogel Copolymerized with Fluorescent Enzyme Substrate in a Microfluidic Capillary Device”, Hideki Wakayama, Terence Henares, Kaede Jigawa, Shun-ichi Funano, Kenji Sueyoshi, Tatsuro Endo, Hideaki Hisamoto *Lab on a Chip*, 13, 4304-4307 (2013).
2. Novel Fluorescent Probe for Highly-Sensitive Bioassay using Sequential Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-Capillary Isoelectric Focusing (ELISA-cIEF)”, Terence Henares, Yuta Uenoyama, Yuto Nogawa, Ken Ikegami, Daniel Citterio, Koji Suzuki, Shun-ichi Funano, Kenji Sueyoshi, Tatsuro Endo, Hideaki Hisamoto *Analyst*, 138, 3139-3141 (2013).
3. Capillary-based Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Highly Sensitive Detection of Thrombin-cleaved Osteopontin in Plasma”, Shun-ichi Funano, Terence Henares, Mie Kurata, Kenji Sueyoshi, Tatsuro Endo, Hideaki Hisamoto *Analytical Biochemistry*, 440, 137-141 (2013).
4. Open-tubular Electrochromatographic Chiral Separation of Amino Acids Using an Organic Nanocrystals Immobilized Capillary”, Fumihiko Kitagawa, Hiroshi Sudaki, Kenji Sueyoshi, Koji Otsuka *Analytical Sciences*, 29, 107-112 (2013).
5. Effect of a Low-conductivity Zone on Field-amplified Sample Stacking in Microchip Micellar Electrokinetic Chromatography”, Kenji Sueyoshi, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka *Analytical Sciences*, 29, 133-138 (2013).
6. Zone electrophoresis of proteins in poly-(dimethyl-siloxane) (PDMS) microchip coated with physically adsorbed amphiphilic phospholipid polymer”, Kyosuke Nii, Kenji Sueyoshi, Koji Otsuka, Madoka Takai *Microfluidics and Nanofluidics*, 14, 951-959 (2013).
7. Inner surface modification of poly-(dimethylsiloxane) microchannel with chitin for electrophoretic analysis of proteins”, Kenji Sueyoshi, Yusuke Hori, Koji Otsuka *Microfluidics and Nanofluidics*, 14, 933-941 (2013).
8. Toward 10 000-fold sensitivity improvement of oligosaccharides in capillary electrophoresis using large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump combined with field-amplified sample injection”, Takayuki Kawai, Masumi Ueda, Yudai Fukushima, Kenji Sueyoshi, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka *Electrophoresis*, 34, 2303-2310 (2013).
9. Highly sensitive oligosaccharide analysis in capillary electrophoresis using large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump”, Takayuki Kawai, Masato Watanabe, Kenji Sueyoshi, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka *Journal of Chromatography A*, 1232, 52-58 (2012).
10. Highly sensitive chiral analysis in capillary electrophoresis with large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump”, Takayuki Kawai, Hiroshi Koino, Kenji Sueyoshi, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka *Journal of Chromatography A*, 1246, 28-34 (2012).
11. Electrophoretic analysis of cations using large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump using capillaries coated with neutral and cationic polymers”, Takayuki Kawai, Jun Ito, Kenji Sueyoshi, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka *Journal of Chromatography A*, 1267, 65-73 (2012).
12. Sensitive Enantioseparation by Transient Trapping-Cyclodextrin Electrokinetic Chromatography”, Kenji Sueyoshi, Hiroshi Koino, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka *Journal of Chromatography A*, **1269**, 366-371 (2012).

[学会発表](国際学会発表: 計4件)

1. “Development of Microfluidic Blotting Devices Using Alginate Hydrogel”, Yudai Fukushima, Toyohiro Naito, Kenji Sueyoshi, Takuya Kubo, Koji Otsuka The Proceedings of the μ TAS 2013 Conference, 1200-1202 (Messe Freiburg, Freiburg, Germany; 27-31 October 2013).
2. “Development of a Microfluidic Blotting Device by Using Alginate Hydrogel”, Masahiro Ikawa, Yudai Fukushima, Kenji Sueyoshi, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka The Proceedings of the μ TAS 2012 Conference, 1741-1743 (Okinawa Convention Center, Okinawa, Japan; 28 October-01 November 2012).

3. “Development of a capillary partially filled with an affinity ligand-encapsulated hydrogel for electrophoresis. 2”, Yudai Fukushima, Kenji Sueyoshi, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka
38th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques (HPLC2012) (Anaheim, CA, USA; 16-21 June 2012).
4. “Microchip gel electrophoresis using alginate hydrogel”, Masahiro Ikawa, Kenji Sueyoshi, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka
38th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques (HPLC2012) (Anaheim, CA, USA; 16-21 June 2012).

〔学会発表〕(国内学会発表: 計 11 件)

1. “アフィニティリガンド内包ヒドロゲル部分充填キャピラリーを用いる電気泳動分析(7)”, 福島雄大、末吉健志、久保拓也、北川文彦、大塚浩二
第 33 回キャピラリー電気泳動シンポジウム (日本女子大学, 東京; 2013 年 11 月 13-15 日).
2. “キャピラリー電気泳動装置を用いた ELISA による iPS 細胞関連タンパク質の定量分析”, 泉本賢太郎、加藤智子、末吉健志、遠藤達郎、久本秀明
第 33 回キャピラリー電気泳動シンポジウム (日本女子大学, 東京; 2013 年 11 月 13-15 日).
3. “アフィニティリガンド内包ヒドロゲル部分充填キャピラリーを用いる電気泳動分析(6)”, 福島雄大、末吉健志、久保拓也、北川文彦、大塚浩二
第 24 回クロマトグラフィー科学会議 (東京大学, 東京; 2013 年 11 月 11-13 日).
4. “アフィニティリガンド内包ヒドロゲル部分充填キャピラリーを用いる電気泳動分析(5)”, 福島雄大、内藤豊裕、末吉健志、久保拓也、北川文彦、大塚浩二
日本分析化学会第 62 年会 (近畿大学東大阪キャンパス, 大阪; 2013 年 9 月 10-12 日).
5. “アフィニティリガンド内包ヒドロゲル部分充填キャピラリーを用いる電気泳動分析(4)”, 福島雄大、末吉健志、久保拓也、北川文彦、大塚浩二
第 73 回分析化学討論会 (北海道大学函館キャンパス, 函館; 2013 年 5 月 18-19 日).
6. “アフィニティリガンド内包ヒドロゲル部分充填キャピラリーを用いる電気泳動分析(3)”, 福島雄大、末吉健志、久保拓也、北川文彦、大塚浩二
日本化学会第 93 春季年会 (立命館大学びわこ・くさつキャンパス, 草津, 滋賀; 2013 年 3 月 22-25 日).

7. “アフィニティリガンド内包ヒドロゲル部分充填キャピラリーを用いる電気泳動分析(2)”, 福島雄大、末吉健志、久保拓也、北川文彦、大塚浩二
第 23 回クロマトグラフィー科学会議 (長良川国際会議場, 岐阜; 2012 年 11 月 14-16 日).
8. “アルギン酸ヒドロゲルを分離媒体として用いる電気泳動分析”, 井川真宏、末吉健志、久保拓也、北川文彦、大塚浩二
第 23 回クロマトグラフィー科学会議 (長良川国際会議場, 岐阜; 2012 年 11 月 14-16 日).
9. “アフィニティリガンド内包ヒドロゲル部分充填キャピラリーを用いる電気泳動分析”, 福島雄大、末吉健志、久保拓也、北川文彦、大塚浩二
第 32 回キャピラリー電気泳動シンポジウム (産総研関西センター, 大阪; 2012 年 11 月 7-9 日).
10. “電気泳動分析用アフィニティリガンド内包ヒドロゲル部分充填キャピラリーの開発(4)”, 福島雄大、末吉健志、久保拓也、北川文彦、大塚浩二
日本分析化学会第 61 年会 (金沢大学角間キャンパス, 金沢; 2012 年 9 月 19-21 日).
11. “電気泳動分析用アフィニティリガンド内包ヒドロゲル部分充填キャピラリーの開発(3)”, 福島雄大、末吉健志、北川文彦、大塚浩二
第 19 回クロマトグラフィーシンポジウム (八王子市学園都市センター, 東京; 2012 年 5 月 23-25 日).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 1 件)
- 名称: マイクロチャンネル内の真空乾燥ポリマー修飾法
- 発明者: 大塚浩二、末吉健志、堀祐輔、北川文彦
- 権利者: 同上
- 種類: 特許
- 番号: 特願 2014-69677
- 出願年月日: 2014 年 3 月 28 日
- 国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織
- (1)研究代表者: 末吉 健志(SUEYOSHI, Kenji)
大阪府立大学・工学研究科 助教
研究者番号: 70552660