

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19144

研究課題名（和文）デザインブル・ハイブリッドデジタル電気泳動の創成

研究課題名（英文）Development of a Designable and Hybrid Digital 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）・准教授

研究者番号：70552660

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、デザインブル・ハイブリッドデジタル電気泳動の創成を目的として、新規電気泳動デバイスの開発を行った。様々な分離機能を持つ機能性ハイドロゲルが充填されたキャピラリー内管と、内管外径と同程度の内径を有するキャピラリー外管を組み合わせ、機能性ヒドロゲル充填凹凸型カートリッジを作製した。これを任意に組み合わせた電気泳動デバイスを作製し、多様なタンパク質を含む混合試料に対して、等電点や分子量、免疫反応などに基づく分離・分取を電気泳動のみの単純な操作で実現した。さらに、各種機能性ゲルに捕捉分取された試料をカートリッジ毎に回収後、それぞれの試料に対する二次元分離・分取も可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの生体試料中タンパク質分析では、複数の機器を用いて異なる原理で複雑な前処理を行う必要があった。一方、本法では、異なる分離機能を有するカートリッジを任意に接続するだけの簡単なデバイスを用いて、単純な電気泳動のみで目的タンパク質群の分取を実現できる可能性を見出した。今後、血清等の複雑系試料から対象となる標的分子群のみを分離・分取するハイブリッド前処理法として、生体試料分析の効率化に寄与するものと見込まれる。また、作製したデバイスは大量生産も可能であるため、特に微量生体試料の新規前処理法として広く貢献できるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Convex-concave cartridges partially filled with a functionalized hydrogel were newly developed to realize designable and hybrid digital electrophoresis. The cartridges were fabricated by the combination of an inner capillary containing a various type of functionalized hydrogel, and an outer one of which inner diameter was comparable to the outer diameter of the inner capillary. Digital electrophoresis devices were easily designed by connecting the cartridges with different functions, which provided the designable and hybrid separation of proteins due to their chemical or physical characteristics. Additionally, the two-dimensional separation using the cartridge devices was successfully demonstrated by detaching and reconnecting the cartridges after the first-dimensional separation.

研究分野：マイクロナノ分析化学

キーワード：ハイブリッドデジタル電気泳動 デザインブル電気泳動デバイス 機能性ゲル充填カートリッジ ミクロスケール電気泳動 オンライン試料濃縮

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍などの病理診断では、生体試料中の複数のマーカー類を測定する必要がある。また、生体試料のように複雑な混合物中に含まれる複数標的分子の同時分析には、高分離能分析法もしくは高選択的分析法が必要となることに加えて、簡便な実験操作、迅速、高感度、低コストであることが望ましい。その実現のため、申請者は機能性ゲルを用いるデジタル電気泳動の提唱・開発を行ってきた。これまでの研究で、キャピラリー内に形成された積層ゲルを用いた分離・濃縮法である 1 次元デジタル電気泳動と、ガラス平板間に形成された 2 次元積層ゲルを用いて異種分離機能に基づく連続的な分離・濃縮を行う 2 次元デジタル電気泳動が実証された。これらの結果から、積層ゲルのさらなる多次元化・多層化によって高感度、高分離能かつ高選択的な分析法となりうることも示唆されたが、積層ゲルの多層化に要する煩雑な調製手順が障害となり、その実現はきわめて困難であった。

そこで、多層化・多次元化による高感度化・高分離能分析を実現するためのアイデアとして、予め調製した機能性ゲル充填キャピラリーカートリッジの接続によって簡便に作製可能で、より多様な分離原理に基づくハイブリッドデジタル電気泳動デバイスを着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、あらゆる標的成分析に適用可能なフレキシビリティを有する新規分析デバイスを創成すること、そして、その複数並列処理(マルチアレイ化)によって、1 測定で複数の標的分子を同時に測定可能な分析デバイスを開発し、診断に要する時間を飛躍的に短縮(1 時間以内)することである。

3. 研究の方法

(1) キャピラリーカートリッジの開発

デジタル電気泳動において、多様な分離機能が組み合わされたハイブリッド分離分析を実現するためには、多様な機能を有するカートリッジを開発し、それらを任意のデザインで多数接続可能なデバイスを作製する必要がある。

申請者はこれまでに、分離用カートリッジとして「分子ふるいカートリッジ」、「等電点分離カートリッジ」、「免疫捕捉カートリッジ」を、また検出用カートリッジとして「酵素活性検出カートリッジ」を、それぞれ開発してきた。また、未接続状態の各カートリッジを用いたデジタル電気泳動の基礎評価において、試料の分子量や等電点の違いに基づく分離・濃縮が確認された。本研究では、複雑な混合物である生体試料中からさらに多様な機能に基づいて目的成分を分離・濃縮・検出するため、第一段階として種々の機能性ゲル充填カートリッジを開発する

(2) デザイナブル・ハイブリッドデバイスの開発

申請者はこれまでに、「分子ふるい分離」と「等電点分離」を組み合わせた基礎的なハイブリッドデバイスを試作し、本アイデアに基づく異種分離機能のハイブリッド化が可能であることを示唆してきた。しかしながら、試作デバイスでは従来の二次元電気泳動と比較して分離能が低く、さらなる多機能化・多層化による分離能向上が必要である。そこで、本デバイスはカートリッジ交換のみでフレキシブルに分析をデザイン可能(デザイナブル)である点を生かし、多様な分離機能がハイブリッドされたデバイスをデザインし、その分離性能について評価・検証を行う。

(3) マルチアレイ化・多次元化ハイブリッドデジタル電気泳動デバイスの開発とその応用

ここまでの研究で得られた知見を基に、実際の診断に対応可能な多成分同時解析デバイスを構築する。本研究で開発するデバイスは、基本的には 1 本の管状構造であるため、並列化(マルチアレイ化)が容易である。異なるハイブリッドデバイスをマルチアレイ化・多次元化して用いれば、複雑な生体試料中から診断に必要な複数成分を同時検出可能となることが期待される。本研究では、ここまでの研究で実現されたハイブリッドデジタル電気泳動デバイスを基に、モデル生体試料からの多成分一斉解析を実証する。

4. 研究成果

(1) キャピラリーカートリッジの開発

アクリルアミドモノマー濃度の調整と機能性分子の添加によって、分子ふるい効果や pH 緩衝能・各種アフィニティを有する各種機能性ヒドロゲルが調製可能である。これらの機能性ヒドロゲルが充填されたキャピラリーをそれぞれ作製し、機能性ヒドロゲル充填カートリッジとした。異種分離原理ハイブリッドデジタル電気泳動を実現するため、異種分離機能を有するカートリッジをアクリルアミドモノマー溶液で満たされたホルダ内に順次挿入し、光重合を利用して接続した (Fig. 1 左)。また、着脱が容易なカートリッジ・ホルダー一体型デバイス(凹凸型デバイス)を作製し、カートリッジ接続・デジタル電気泳動分級・接続解除による分画を 1 次元とする多次元デジタル電気泳動分画を考案した (Fig. 1 右)。蛍光標識タンパク質類を用いたデバイス評価によって、各カートリッジに充填された機能性ヒドロゲルの有する分離機能に基づくデジタル分離が可能となることが実証された。

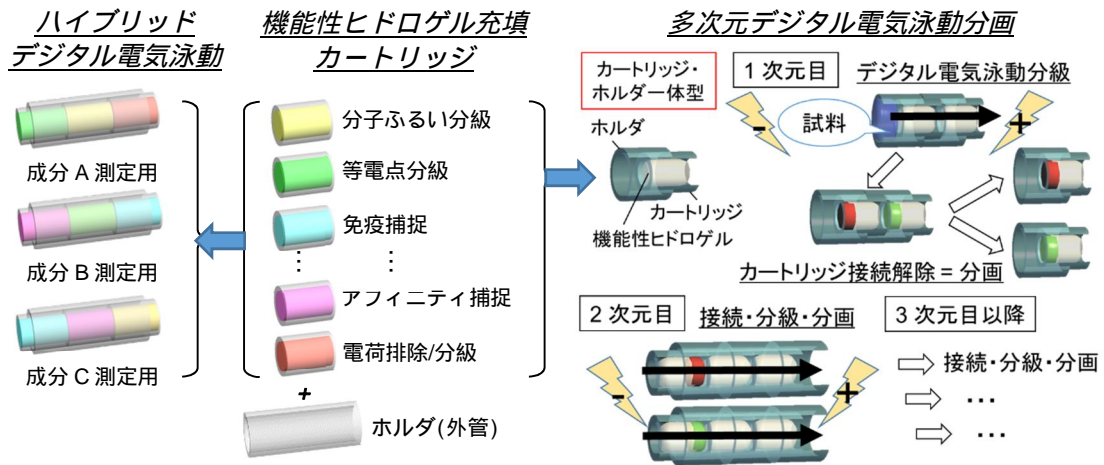


Figure 1. Concept of digital electrophoresis devices fabricated by cartridge connection.

(2) デザイナブル・ハイブリッドデバイスの開発

モデル試料として各種蛍光標識タンパク質を用いてデジタル電気泳動を行い、それぞれのコンセプトについて検証した。ハイブリッドデジタル電気泳動デバイスにおいて、それぞれ分子ふるい効果と pH 緩衝能を有する異種カートリッジを接続して電圧印加した結果、分子量、等電点の差異に基づいた 1 デバイスでのハイブリッド分離が達成された。また、アフィニティ分離、分子ふるい分離を組み合わせたデバイスにおいても、それぞれのカートリッジに対応した分子のみが捕捉され、分離・検出できることが証明された。以上の結果から、作製したカートリッジ組合せ型デバイスを用いたハイブリッド分離が実現可能であることが明らかとなった (Fig. 2)。

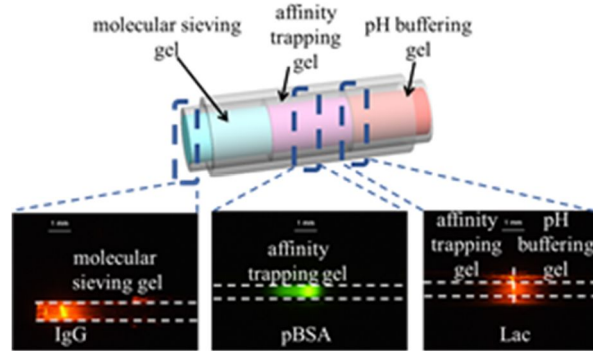


Figure 2. Typical result in hybrid digital electrophoresis devices.

多次元デジタル電気泳動分画デバイスでは、一次元目のデジタル等電点電気泳動に基づくタンパク質の分級・分画に成功した。さらに、二次元目のデジタル分子ふるい分級デバイスへ等電点分画後のカートリッジを接続して電圧印加した結果、画分に含まれていたタンパク質試料がそれぞれの分子量に従って分級される様子が観察された (Fig. 3)。以上の結果から、開発したカートリッジ接続型デバイスは多様なデジタル電気泳動分析を自由かつ容易にデザイン可能なフレキシビリティを有するデバイスであることが示された。

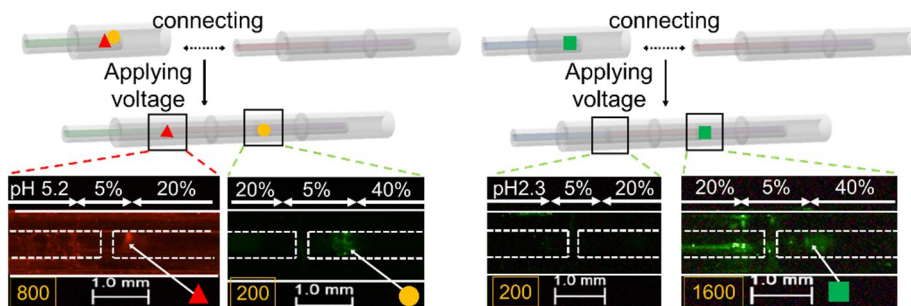


Fig. 3. Protein separation based on molecular weight

(3) マルチアレイ化・多次元化ハイブリッドデジタル電気泳動デバイスの開発とその応用

開発した機能性ヒドロゲル凹凸型カートリッジ組合せ型デバイスを用いて、多次元電気泳動に基づく試料分画を試みた。人血清由来アルブミン (HSA)、卵白由来オボアルブミン (OVA)、免疫グロブリン G (IgG) をそれぞれ蛍光標識してモデル試料とし、その基礎性能評価を行った。その結果、分子ふるい効果を利用する一次元目デバイスにおいて、分子量の大きな IgG とそれ以外のアルブミン類を、二つのカートリッジに分級することに成功した。続いて、分画されたアルブミン類を二次元目のアフィニティカートリッジに導入したところ、コンカナバリン A を用い

た糖鎖認識ゲルにおいて強く捕捉される OVA と、あまり保持されない HSA が分画される様子が観察された。また、各カートリッジに捕捉された試料はそれぞれ別個に回収可能であった。以上の結果から、作製したデバイスの多次元化やマルチアレイ化による複雑な生体試料分析の新規前処理法としての実用化が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 A. Shirai, K. Sueyoshi, T. Endo, H. Hisamoto	4. 巻 13
2. 論文標題 Graphene/polyethylene glycol hybrids for single-step immunoassay microdevice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FlatChem	6. 最初と最後の頁 34-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.flatc.2018.12.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 R. Sanuki, K. Sueyoshi, T. Endo, H. Hisamoto	4. 巻 89
2. 論文標題 Double Sweeping: Highly Effective Sample Preconcentration Using Cationic and Anionic Micelles and Its Application to a Multiple Enzyme Activity Assay	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 6505-6512
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00586	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計33件（うち招待講演 6件／うち国際学会 9件）

1. 発表者名 J. Takao, T. Endo, H. Hisamoto, K. Sueyoshi
2. 発表標題 Microfluidic Device for Direct Measurement of Initial Rate of Enzyme Reaction by Electrophoretic Filtration
3. 学会等名 23rd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS 2019)（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高尾隼空, 遠藤達郎, 久本秀明, 末吉健志
2. 発表標題 マイクロスケール電気泳動に基づく濃縮・混合・分離を利用した酵素反応初速度測定法の開発
3. 学会等名 日本分析化学会 第79回分析化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高尾隼空, 遠藤達郎, 久本秀明, 末吉健志
2. 発表標題 電気泳動フィルタリングによる酵素濃縮・生成物分離を利用した酵素反応初速度測定
3. 学会等名 第39回キャピラリー電気泳動シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高尾隼空, 遠藤達郎, 久本秀明, 末吉健志
2. 発表標題 電気泳動フィルタリングに基づく酵素反応初速度直接測定法の開発
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Sueyoshi
2. 発表標題 Development of Digital Electrophoresis Devices for Multi-dimensional Fractionation
3. 学会等名 2018 Japan-China Joint Symposium on Separation Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Nishino, T. Endo, H. Hisamoto, K. Sueyoshi
2. 発表標題 Analysis of Specific Interaction between Small Molecules and RNA Aptamers by Capillary Electrophoresis with Partial Filling Technique
3. 学会等名 2018 Japan-China Joint Symposium on Separation Sciences (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Sueyoshi, Y. Uwagawa, T. Endo, H. Hisamoto
2. 発表標題 Convex-concave Cartridge-connected Digital Electrophoresis Devices for Multi-dimensional Fractionation
3. 学会等名 25th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques (ITP 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Sueyoshi, R. Sanuki, T. Endo, H. Hisamoto
2. 発表標題 Highly Sensitive Enzyme Activity Assay Using Reagent-release Capillaries with Double Sweeping
3. 学会等名 25th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques (ITP 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Uwagawa, T. Endo, H. Hisamoto, K. Sueyoshi
2. 発表標題 A MULTI-DIMENSIONAL FRACTIONATION MICRODEVICE BASED ON DIGITAL ELECTROPHORESIS USING CONVEX-CONCAVE CARTRIDGES
3. 学会等名 The 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 末吉健志, 青木優太, 宇和川悠己, 遠藤達郎, 久本秀明
2. 発表標題 デザインナブル・デジタル電気泳動デバイスを用いる多次元電気泳動法の開発
3. 学会等名 日本分析化学会 第78回分析化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宇和川悠己, 末吉健志, 遠藤達郎, 久本秀明
2. 発表標題 デジタル電気泳動に基づく多次元電気泳動分画デバイスの開発
3. 学会等名 第25回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 末吉健志
2. 発表標題 凹凸型カートリッジ接続デバイスを用いた多次元デジタル電気泳動分画法の開発
3. 学会等名 第69回日本電気泳動学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 末吉健志
2. 発表標題 デジタル電気泳動に基づく多次元電気泳動分画法の開発
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高尾隼空, 遠藤達郎, 久本秀明, 末吉健志
2. 発表標題 マイクロスケール電気泳動に基づく微量生体試料中希薄酵素の高感度・正確な活性測定法の開発
3. 学会等名 第8回CSJ化学フェスタ2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 末吉健志, 高尾隼空, 遠藤達郎, 久本秀明
2. 発表標題 酵素反応初速度測定のためのマイクロスケール電気泳動デバイス
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第38回研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 末吉健志, 和田将英, 遠藤達郎, 久本秀明
2. 発表標題 低分子標的アプタマー選抜のためのキャピラリー分子ふるい電気泳動
3. 学会等名 第29回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宇和川悠己, 遠藤達郎, 久本秀明, 末吉健志
2. 発表標題 カートリッジ接続型デバイスによるタンパク質の二次元デジタル電気泳動分画
3. 学会等名 第38回キャピラリー電気泳動シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 末吉健志
2. 発表標題 低分子標的アプタマー選抜のためのキャピラリー分子ふるい電気泳動
3. 学会等名 第38回キャピラリー電気泳動シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高尾隼空, 遠藤達郎, 久本秀明, 末吉健志
2. 発表標題 マイクロスケール電気泳動に基づく酵素反応初速度直接測定デバイスの開発
3. 学会等名 第38回キャピラリー電気泳動シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西野智哉, 遠藤達郎, 久本秀明, 末吉健志
2. 発表標題 部分的注入キャピラリー電気泳動による低分子量化合物 - 核酸間相互作用解析
3. 学会等名 第38回キャピラリー電気泳動シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤原聡子, 遠藤達郎, 久本秀明, 末吉健志
2. 発表標題 マイクロ・ナノ流体デバイスを用いたナノ粒子分級の基礎検討
3. 学会等名 第38回キャピラリー電気泳動シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田将英, 遠藤達郎, 久本秀明, 末吉健志
2. 発表標題 キャピラリー分子ふるい電気泳動による低分子認識核酸アプタマー高効率選抜法の開発
3. 学会等名 第38回キャピラリー電気泳動シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 末吉健志, 西野智哉, 遠藤達郎, 久本秀明
2. 発表標題 キャピラリー電気泳動を用いた低分子-核酸相互作用スクリーニング
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenji Sueyoshi, Yuta Aoki, Yuki Uwagawa, Saeko Kawano, Tatsuro Endo, Hideaki Hisamoto
2. 発表標題 Digital Electrophoresis Device for A Desirable Multi-dimensional Fractionation
3. 学会等名 RSC Tokyo International Conference 2017, JASIS Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kenji Sueyoshi, Ryota Sanuki, Tatsuro Endo, Hideaki Hisamoto
2. 発表標題 RAPID, SIMPLE, SENSITIVE, AND MULTIPLE ENZYME ACTIVITY ASSAY USING A REAGENT-RELEASE CAPILLARY-ASSEMBLED MICRODEVICE WITH DOUBLE SWEEPING
3. 学会等名 The 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kenji Sueyoshi
2. 発表標題 Digital Electrophoresis for Multi-Dimensional Separation
3. 学会等名 46th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2017 Jeju) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 青木優太, 末吉健志, 遠藤達郎, 久本秀明
2. 発表標題 カートリッジ接続型デジタル電気泳動分析デバイスの開発と多次元電気泳動分析への応用
3. 学会等名 第77回分析化学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 末吉健志
2. 発表標題 マイクロスケール電気泳動を基盤技術とした簡便・迅速・高感度バイオ分析法の開発
3. 学会等名 日本分析化学会第66年会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 末吉健志, 西脇貴志, 遠藤達郎, 久本秀明
2. 発表標題 蛍光基質固定化ヒドロゲルを用いたマイクロスケール電気泳動酵素活性アッセイデバイスの開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第36回研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 末吉健志, 青木優太, 宇和川悠己, 川野紗依子, 遠藤達郎, 久本秀明
2. 発表標題 デザインナブル・デジタル電気泳動デバイスを用いた多次元電気泳動分画法の開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第36回研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 青木優太, 宇和川悠己, 川野紗依子, 末吉健志, 遠藤達郎, 久本秀明
2. 発表標題 カートリッジ接続型デジタル電気泳動デバイスの開発と応用
3. 学会等名 第37回キャピラリー電気泳動シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 青木優太, 末吉健志, 遠藤達郎, 久本秀明
2. 発表標題 ハイブリッド分離を志向したカートリッジ接続型デジタル電気泳動デバイスの開発
3. 学会等名 第37回キャピラリー電気泳動シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宇和川悠己, 青木優太, 末吉健志, 遠藤達郎, 久本秀明
2. 発表標題 多次元分画を志向したカートリッジ接続型デジタル電気泳動デバイスの開発
3. 学会等名 第37回キャピラリー電気泳動シンポジウム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪府立大学 大学院工学研究科 物質・化学系専攻 応用化学分野 分析化学研究グループHP
<http://www2.chem.osakafu-u.ac.jp/ohka/ohka1/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----