

21T-am05S

マイクロデバイスを用いた単一酵素活性検出による病態診断法の開発

○坂本 眞伍¹, 小松 徹^{1,2}, 渡邊 力也^{2,3}, 張 翼³, 野地 博行³, 浦野 泰照^{1,4,5} (¹東大院薬,
²JST PRESTO, ³東大院工, ⁴東大院医, ⁵AMED CREST)

【目的】

血中の酵素活性は、特定の疾患と関連して異常値を示すものが数多く知られており、これらの活性を高感度に測定することは病態の診断に有用である。近年、超高感度な酵素活性測定技術として、マルチウェルチャンバー型のマイクロデバイスが開発された。この技術では、蛍光プローブと酵素との反応の場として微小なウェルを利用することで、酵素1分子によって生じる蛍光性化合物であっても、十分に検出可能なシグナルを得ることができ、サンプル中の酵素を1分子単位で検出することが可能であるため、従来の測定系からの大幅な高感度化が期待できる。しかし、各ウェルに封入される酵素は確率論的に決定されるため、類似の活性をもつ酵素 (e. g. アイソザイム) に関しては、ウェル中の酵素を同定することが困難であった。よって本研究では、酵素の活性パターンに基づいたウェル中の酵素の同定・検出を可能とする新規の酵素活性評価法の開発を行った。

【方法・結果】

具体的には、ウェル中の酵素を、異なる基質認識部位と異なる波長域の蛍光をもつ複数のプローブと反応させることで、各プローブに対する反応性の組み合わせのパターンの差異からウェル中の酵素を同定するという手法を考案した。今回我々は、別々の疾患に関連する複数のアイソザイムをもつ alkaline phosphatase (ALP) をターゲットにプローブ開発を行い、これを用いて溶液中に存在する異なる種類の ALP アイソザイムを1分子ごとに判別し、検出することに成功した。さらにヒト血液サンプル中に存在する基質選択性の異なる phosphatase を1分子レベルで検出することに成功した。