

プロテアーゼ反応を用いる高感度・小型・簡便な電気化学センサ

山梨大学大学院 総合研究部 工学域基礎教育センター 井上 久美

【略歴】

1995年3月 京都大学 農学部 農芸化学科 卒業
1995年11月 宮城県味噌醤油工業協同組合 研究員
2005年2月 東北大学大学院 環境科学研究科 研究支援者
2010年4月 東北大学 マイクロシステム融合研究開発センター 研究支援者
2010年8月 東北大学大学院 環境科学研究科 博士課程後期三年課程 修了
2013年4月 東北大学 マイクロシステム融合研究開発センター 助教
2014年4月 東北大学大学院 環境科学研究科 講師
2018年4月 同 准教授
2020年2月 センスタップ株式会社 取締役（兼業・現在に至る）
2020年8月 山梨大学大学院 総合研究部 工学域基礎教育センター 准教授（現在に至る）

はじめに

プロテアーゼは摂取したタンパク質の消化以外にも、細胞シグナル伝達など、多くの生物学的機能に関与している。これまでにバイオセンサ素子として利用されている酵素の多くは酸化還元酵素であり、酵素反応によって生じる電子移動を光学的、電気化学的あるいはその他の方法で検出し、目的とする分子の定量を行う。プロテアーゼの場合はペプチド結合が切断されることによって生じる変化を検出することで、センシングを行うことができる。それに加えて、カスケード反応による増幅を利用することにより、高感度センシングに利用することもできる（図1）。本研究では、このようなプロテアーゼの性質と、電気化学センサの小型で簡便な性質とを利用して、新しい高感度センサの開発を行った。

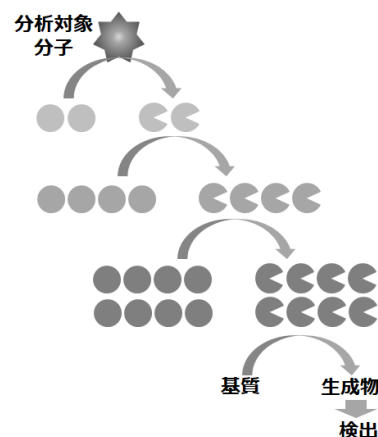


図1. プロテアーゼカスケード反応によるシグナル増幅

エンドトキシンセンサ

エンドトキシンはグラム陰性菌由来の発熱性物質で、かつ、加熱や薬剤による不活性化が困難なため、透析液をはじめとする血液に触れる薬剤では厳重な管理を必要とし、現場で高感度にエンドトキシンを簡易に検出できる手法が強く求められている。そこで、電気化学センサで簡易かつ高感度にエンドトキシンを検出するための研究を行った。従来法で利用されているリムルス試薬のプロテアーゼカスケード反応が高感度検出に重要であることが分かった¹。さらに、電気化学的な増幅法である「レドックスサイクリング」を組み合わせることで、高感度化し²、透析現場で必要とされる1 EU/L（EUはエンドトキシン活性の単位）を45分以内で検出できる感度を達成した³。現在、医療機器製造販売企業による実用化を進めている。

アポトーシスセンサ

アポトーシスは細胞のプログラム死であり、胚から多細胞生命体を形成する重要な過程のひとつである。アポトーシスのマーカーはカスパーゼ3と呼ばれるプロテアーゼであり、従来、細胞のアポトーシス検出のためには、ライセートに含まれるカスパーゼ3活性を発色などの光学的手法で検出する必要があった。カスパーゼ3の基質として Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroaniline⁴ および Asp-Glu-Val-Asp-*p*-methoxyaniline⁵ を利用する電気化学アポトーシス検出法を確立した。電気化学検出法では生きています

胞でアポトーシスが進行している状態のまま計測することができた。

尿タンパクセンサ

尿タンパクは腎臓病の早期マーカーとして重要である。しかし、従来の検査紙法では正確な定量が難しく、またデータが電子化されていないため「デジタルヘルス」に組み入れることが難しい問題がある。そこで、トイレに設置して「かけるだけ」で試薬添加不要で尿中タンパク質が定量できるセンサの開発を行った。尿タンパクをプロテアーゼで分解し、生じるグルタミン酸を、グルタミン酸オキシダーゼを用いて酸化し、生じる過酸化水素をプルシアンブルー修飾電極で検出した。オキシダーゼを有機金属構造体 (MOF) 中に封入し、プロテアーゼとともに電極上に固定化することで、試薬添加不要のセンサとした。本手法で、センサを 30 分間漬けるだけでタンパク尿の基準である 0.3 mg/mL のアルブミンを検出できることを示した⁶。

プロテアーゼカスケード反応を利用するイムノセンサの高感度化

イムノセンサは抗原抗体反応を利用して、血中などの目的タンパクを特異的に検出できる方法で、新規感染症の抗体検査やインフルエンザ検査、妊娠検査、食品アレルギー検査など、生化学検査をはじめとする様々な検査に利用されている。しかし、がんマーカーや疾患初期のマーカータンパク質など、血中や尿中にごく微量しか含まれておらず、従来のイムノセンサでは感度が不足していて検出できないものも多くある。この問題を解決するために、エンドトキシンを抗原抗体反応のラベルに用いることで、リムルスカスケード反応のシグナル増幅効果を利用し、イムノセンサの高感度化を行った。これにより、10 pg/mL (67 fM) のイムノグロブリン G (IgG) の検出ができることを示した⁷。また、リムルス反応に加えて、ナノギャップ電極を利用する Dual 増幅では、70 fg/mL (470 aM) の IgG 検出を達成した⁸。さらに、血液凝固反応のプロテアーゼカスケード反応もリムルス反応と同様に利用できることを示し、LAL 反応と血液凝固反応を利用する二項目同時検出を達成した⁹。

今後の展望

プロテアーゼ反応は消化や異化だけでなく、細胞シグナル伝達など、多くの生物学的機能に関与している。これらの生体機能を「はかる」手法として、これまでに得た知見を応用するとともに、プロテアーゼの基質特異性やカスケード反応を活かした新たな分析法を検討する。

謝辞

本研究は東北大学大学院工学研究科珠玖仁教授、東北大学大学院環境科学研究科末永智一名誉教授、および両研究室のスタッフ、学生と実施した成果である。関係各位および共同研究企業の皆様のご協力に深く感謝申し上げます。

参考文献

1. K. Y. Inoue, S. Takahashi, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue. *Innate Immun.* **18** (2012) 343-349.
2. 樋口 拓也, 小川健一, 末永智一, 井上久美, 高野真一郎. 特開 2018-72331.
3. Kentaro Ito, Kumi Y. Inoue, Takahiro Ito-Sasaki, Miho Ikegawa, Shinichiro Takano, Kosuke Ino, Hitoshi Shiku. *Micromachines*, **14** (2023) 327.
4. K. Y. Inoue, S. Takano, S. Takahashi, Y. Ishida, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue. *Analyst*, **138** (2013) 6523-6531.
5. S. Takano, S. Shiomoto, K. Y. Inoue*, K. Ino, Hitoshi Shiku, T. Matsue. *Anal. Chem.*, **86** (2014) 4723-4728.
6. K. Ito, K. Y. Inoue, T. Miura, T. Matuse, Hitoshi Shiku. *Electrochemistry*, **89** (2021) 409-414.
7. K. Ito, K. Y. Inoue, T. Ito-Sasaki, K. Ino, H. Shiku. *ACS Appl. Nano Mater.*, **4** (2021) 12393-12400.
8. K. Ito, K. Y. Inoue, K. Ino, H. Shiku. *Anal. Chem.*, **94** (2022), 12427-12434.
9. K. Ito, K. Y. Inoue, K. Ino, H. Shiku. *Anal. Chem.*, **94** (2022), 16451-16460.