

氏 名	任 健超 (REN JIANCHAO)		
授与した学位	博 士		
専攻分野の名称	理 学		
学位授与番号	博甲第	7 2 6 9	号
学位授与の日付	2 0 2 5 年 3 月 2 5 日		
学位授与の要件	自然科学研究科 地球生命物質科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	Development of Enzyme Activity Assays Based on Spectrometric Methods and Paper-Based Analytical Devices (分光法とペーパー分析デバイスに基づく酵素活性測定法の開発)		
論文審査委員	教授 金田 隆	教授 大久保 貴広	准教授 武安 伸幸
学位論文内容の要旨			
<p>This study addresses the development and improvement of enzyme activity assays, emphasizing both sensitivity and practical applicability. Enzymes play important roles not only in biological systems but also in industrial and food production. Therefore, the assays for enzymatic activities are required to study the function of the enzymes and to control industrial and food qualities. While commercial kits and instruments are available for enzyme activity assays, these methods often face challenges, such as high cost, low sensitivity, and/or difficulty for on-site use. To overcome these issues, this work focuses on developing more sensitive, fluorescence-based assays for peroxidases and laccase as well as portable, on-site methods for proteases.</p> <p>Chapter 1 outlines the characteristics and applications of various enzymes, the importance of measuring their activity, and the factors that influence the enzyme assay, such as pH and temperature. In addition, the analytical strategies for peroxidases and proteases were summarized.</p> <p>Chapter 2 presents an assay for horseradish peroxidase (HRP) using N-benzoyl leucomethylene blue (BLMB) as the substrate. The study found that BLMB was an excellent substrate for assessing the activity of HRP, as it produced a colored and fluorescent methylene blue, detectable by spectrophotometry and capillary electrophoresis-laser-induced fluorometry (CE-LIF). Two analytical methods using absorption spectrophotometry and CE-LIF were developed and evaluated for their analytical performances that demonstrated the potential applicability for the accurate and sensitive assay of HRP.</p> <p>Chapter 3 describes a fluorescence-based method for laccase activity using a mediator of 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonic acid) (ABTS) and a substrate of BLMB. The comparison of the fluorometric method with conventional absorption spectrophotometry showed high sensitivity and accuracy in the fluorometric assay of laccase. The fluorometric method was applicable to the laccase assay in mushroom extracts with accurate analytical results.</p> <p>Chapter 4 proposes a microfluidic paper-based analytical device (μPAD) for determining protease activity through a time-based readout. The μPAD consists of a gelatine film as a substrate for proteases and measures the concentration of proteases using the time to be required for decomposing the gelatine film. The device is simple, low-cost, instrument-free, and successfully measured the activity of bromelain in pineapple juices.</p> <p>Chapter 5 develops a time-measurable detector for μPAD. The detector integrates ten channels, which simultaneously measure the time required to flow a solution a constant distance in the channels of the PAD. The detector successfully measured the activity of protease and viscosity of saliva. Namely, the results indicated the applicability of the detector to the enzyme assay of protease and showed the clear relationship between viscosity and flow time.</p> <p>Chapter 6 concludes the findings of this study.</p>			

論文審査結果の要旨

本論文では、新しい基質を利用して、酵素活性測定法の高性能化を実現している。酵素は生体内で重要な役割を果たすとともに、産業においても広く利用されている。したがって、酵素の活性を高感度、高精度に測定できる方法を開発することは重要な課題である。研究では、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ(HRP)、ラッカーゼ、プロテアーゼの新しい活性測定法を開発している。

HRP の活性測定において、N-ベンゾイルロイコメチレンブルー(BLMB)が優れた基質であることを発見した。BLMB は HRP 存在下で過酸化水素と反応し、蛍光性のメチレンブルーを生成する。この反応により生成したメチレンブルーを吸光光度法、並びにレーザー励起蛍光検出／キャピラリー電気泳動法により測定し、HRP 活性の測定に適用できることを明らかにした。

ラッカーゼの活性測定では、一般に 2,2'-アゾベンゾビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸(ABTS)が基質として用いられる。しかしながら、反応生成物である ABTS ラジカルは不安定である問題点があった。そこで、生成した ABTS ラジカルをさらに BLMB と反応させて、安定なメチレンブルーを生成させることで、蛍光光度法によりラッカーゼの活性を測定する方法を開発した。

一般的なプロテアーゼの活性測定法には、基質として蛍光標識タンパク質を用いる方法がある。この方法は、複数の蛍光色素で標識されたタンパク質が自己消光により非蛍光性となり、プロテアーゼがこれを消化することで蛍光性のペプチドを生成することに基づく。しかし、この基質は高価であり汎用性が低い。そこでゼラチン膜を用いた新しいプロテアーゼ活性測定用ペーパー分析デバイスを考案した。試料導入部と検出部の間にゼラチン膜を挿入し、プロテアーゼを含む溶液を試料導入部に添加すると、プロテアーゼがゼラチンを消化し、溶液が検出部に到達する。ゼラチン膜の消化時間はプロテアーゼ濃度に依存するため、溶液が検出部に到達する時間を測定することで、プロテアーゼ活性を測定できる。この方法の原理を実証するとともに、これを食品中のプロテアーゼ活性測定に応用し、良好な結果を得た。

さらに時間測定に基づくペーパー分析デバイス用検出器を開発し、プロテアーゼ活性測定の高性能化を実現した。10 個の電気伝導度センサーをワンボードマイコンにより制御し、ペーパー分析デバイスの流路に溶液が流れる時間を計測できる小型ハイスループット検出器を開発した。この検出器により、時間測定の自動化と 10 個のデバイスでの同時測定を実現した。

本論文で得られたこれらの成果は、酵素活性測定法の発展において重要な知見を与えるとともに、今後の応用が期待されるため、社会的な貢献も大きい。論文発表を総合的に評価した結果、本論文は博士後期課程学位論文に値するものと認定する。