

## 21p12 新規等温遺伝子定量手法 Alternately binding probe competitive helicase-dependent amplification (ABC-HDA) 法の開発

○古田 篤史<sup>1,2</sup>, 宮田 亮<sup>2</sup>, 岸田 直裕<sup>3</sup>, 秋葉 道宏<sup>3</sup>, 谷 英典<sup>1,2,4</sup>, 常田 聡<sup>1</sup>, 関口 勇地<sup>2</sup>, 野田 尚宏<sup>2,1</sup>  
(<sup>1</sup>早大院・先進理工・生命医, <sup>2</sup>産総研・生物機能, <sup>3</sup>国保医科院・水道工, <sup>4</sup>現: 東大RI総セ)

【背景・目的】遺伝子定量手法としてReal-time PCR法が一般的に利用されている。しかしReal-time PCR法は外部標準法なため、サンプル中にPCR阻害物質が存在した場合、定量値を過小評価する恐れがある。またPCRの1サイクル毎に蛍光を測定するため、サーマルサイクラーを内蔵した高価な蛍光検出装置が必要である。そこで我々は内部標準法でかつ等温反応後に蛍光を測定することで定量が可能な新規等温遺伝子定量手法 ABC-HDA法を開発した。【実験方法・結果】土壌・水圏等に存在する環境微生物由来の遺伝子をモデルターゲットとして検討を行った。標的配列を模倣した100 bp程度の合成オリゴDNAをモデル標的配列とし、AB-Probeおよび既知濃度の競合配列を加えてABC-HDA法を行い検量線を作成した。環境サンプルから抽出した各種遺伝子についてABC-HDA法を行い、作成した検量線から標的遺伝子のコピー数を測定した結果、環境サンプルにおける遺伝子定量を実現した。よって、標的配列を簡便・安価・正確に定量する新規等温遺伝子定量手法の開発に成功した。

## Alternately binding probe competitive helicase-dependent amplification (ABC-HDA) for quantification of specific nucleic acid sequences

○Atsushi FURUTA<sup>1,2</sup>, Ryo MIYATA<sup>2</sup>, Naohiro KISHIDA<sup>3</sup>, Michihiro AKIBA<sup>3</sup>, Hidenori TANI<sup>1,2,4</sup>, Satoshi TSUNEDA<sup>1</sup>, Yuji SEKIGUCHI<sup>2</sup>, Naohiro NODA<sup>2,1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Med. Bio sci., Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., <sup>2</sup>IBRF, AIST, <sup>3</sup>Dept. of Water Supply Eng., Natl. Inst. Public Health, <sup>4</sup>Current affiliation: RI center, Univ. Tokyo)

**Key words** helicase-dependent amplification, fluorescence quenching, fluorescence resonance energy transfer, real-time PCR

## 21p14 光導波路デバイスとアームング酵母を組み合わせた有機リン蛍光センシングシステム

○土屋 圭司<sup>1</sup>, 牧島 央和<sup>1</sup>, 黒田 浩一<sup>2</sup>, Mulchandani Ashok<sup>3</sup>, 植田 充美<sup>2</sup>, 榎波 康文<sup>4</sup>, 末 信一郎<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>福井大院・工・生応化, <sup>2</sup>京大院・農・応用生命, <sup>3</sup>Univ. California, Riverside., <sup>4</sup>広島大・ナノデバイス研)

【目的】光導波路は、屈折率の異なる材料を埋め込むことで光を分岐でき、チップ上での光集積も可能なため、蛍光検出デバイスとして注目されている。演者等は、有機リン蛍光センシングシステムの構築を目指して有機リン加水分解酵素(OPH)と蛍光タンパク質(EGFP)を酵母細胞表面へ共発現させ、有機リン存在下で酵母細胞表面上のEGFPの消光を確認した。今回は、OPH、EGFP共発現酵母をドープしたゾルゲル光導波路を用いて有機リン検出システムの構築を行った。【方法及び結果】OPH、EGFP共発現酵母をゾルゲル溶液と混合しスライドガラスにドープ後、UV照射にてガラス状に硬化させた。ゾルゲルガラス内のEGFPの蛍光観察結果から、EGFPは30日以上安定であることがわかった。さらに、パラオキシソソン滴下により、ゾルゲルガラス内のOPHのパラオキシソソン分解に伴いEGFPの蛍光強度が減少することを観察した。現在、光導波路をデバイスとしてパラオキシソソンに対する蛍光強度の定量的な検出法について検討を行っている。

## Combination of optical waveguide device and arming yeast for organophosphorus compounds fluorescence sensing system

○Keiji Tsuchiya<sup>1</sup>, Hirokazu Makishima<sup>1</sup>, Kouichi Kuroda<sup>2</sup>, Ashok Mulchandani<sup>3</sup>, Mitsuyoshi Ueda<sup>2</sup>, Yasufumi Enami<sup>1</sup>, Shin-ichiro Suye<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Univ. Fukui, <sup>2</sup>Div. Appl. Life. Sci., Kyoto Univ., <sup>3</sup>Univ. California, Riverside., <sup>4</sup>Res. Inst. Nanodevice Bio Sys., Hiroshima Univ.)

**Key words** Organophosphorus compounds, EGFP, Organophosphorus hydrolase, Sol-gel waveguide

## 21p13 *Photinus pyralis* ルシフェラーゼの酵母表面ディスプレイ

○新谷 英也, 三浦 夏子, 黒田 浩一, 植田 充美  
(京大院・農・応用生命)

【目的】ポストゲノム時代の現在、生命を織りなす生体分子の動態解析やイメージングを可能にするバイオツールが注目されている。ホタルなどの発光生物が有する発光酵素ルシフェラーゼも、生命現象を可視化する有力なバイオツールの一つであり、ATP定量、次世代DNAシーケンシング、レポーターアッセイあるいはタンパク質間相互作用検出といった様々な用途に用いられている。一方、機能性タンパク質を細胞表面に提示する細胞表面工学は、細胞センサーや分子改変による有用変異体作成に用いられているが、ルシフェラーゼのディスプレイ系の構築により、さらに幅広い分野への応用が考えられる。そこで、本研究では、酵母の細胞表面にルシフェラーゼの提示を試みた。

【方法および結果】北米産ホタル *Photinus pyralis* 由来のルシフェラーゼ(ppLuc)の野生型および赤色発光変異体を酵母細胞壁タンパク質 $\alpha$ -グルチニンとの融合タンパク質として発現させ、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞表面に提示させた。細胞の蛍光抗体染色により提示を確認したのち、市販のppLucによる検量線を用いて、酵母1細胞当りに提示しているppLucの分子数を決定した。今回構築した酵母では、細胞表面上でppLucの活性を確認することができたので、多数の変異体の調製と解析が期待できる。

## Construction of luciferase-displaying yeast

○Hideya SHINTANI, Natsuko MIURA, Kouichi KURODA, Mitsuyoshi UEDA  
(Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

**Key words** luciferase, molecular display, arming technology, cell surface engineering

## 21p15 磁力を用いた液滴送液システムによる1細胞遺伝子発現解析デバイスの開発

○熊澤 史貴<sup>1</sup>, 大河内 美奈<sup>1</sup>, 式田 光宏<sup>2</sup>, 本多 裕之<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>名大院・工・生物機能, <sup>2</sup>名大院・工・マイクロナノシステム, <sup>3</sup>名大予防早期医療創成センター)

【背景】我々は、磁力を用いた液滴送液システム(MAG-LOC)を開発してきた。MAG-LOCは、オイルを満たした微細流路中に磁性微粒子を含む反応溶液を液滴として配置し、この液滴を磁力で送液することで、液滴の合一、磁性微粒子の分離を行い、生化学反応を行うものである。MAG-LOCを利用してイムアッセイデバイスの構築を行った。MAG-LOCは、液滴と磁力を組み合わせることで、小型化、ハイスループット化が容易に行えるため、様々なバイオデバイスに活用できる。本研究では、1細胞遺伝子発現解析を行うため、細胞溶解、RT-PCR、蛍光検出といった多段階の反応を行うデバイスを構築した。

【結果】1細胞遺伝子発現解析は、ヘテロな集団である細胞の挙動を正確に評価するため必要な技術である。従来の1細胞遺伝子発現解析デバイスは、細胞溶解、RT-PCRのどちらかに特化したものが多かった。しかし、MAG-LOCを用いることで、液滴の合一や磁性微粒子の分離が容易に行えるため、多段階の反応を一つのデバイス上で実現できる。また、微粒子表面を負電荷ポリマーで修飾することでPCR阻害等がない磁性微粒子の構築に成功した。アルミ製のデバイスを作製し、K562を用いて $\beta$ -actin遺伝子の発現解析を行った結果、従来法と同様の結果が得られた。以上から、一連の1細胞遺伝子発現解析を行えるデバイスの構築が可能であることが示唆された。

## Single-cell analysis using a magnetic force-based lab-on-a-chip

○Fumitaka KUMAZAWA<sup>1</sup>, Mina OKOCHI<sup>1</sup>, Mitsuhiro SHIKIDA<sup>2</sup>, Hiroyuki HONDA<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., <sup>2</sup>Dept. Micro-Nano Systems Eng., Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., <sup>3</sup>NEXT Innovative Research Center for Preventive Medical Engineering)

**Key words** Droplet handling, Magnetic beads, Single-cell analysis