

- 2P-2114 マウス由来嗅覚受容体 mOR-EG の酵母における 機能的発現効率向上を目指した RTP との共発現系の構築
○神山 周也¹, 福谷 洋介², 内海 現太², 萬 麻衣子²,
中村 智子², 養王田 正文²
(¹東農工大・工・生命工,²東京農工大・院工・生命工)

嗅覚受容体は嗅細胞の細胞膜上に発現するGタンパク質共役受容体(GPCR)であり、GPCRの中で最大のファミリーを形成している。細胞外の匂い分子を認識する高感度のセンサーであり、匂いセンサー開発への応用が期待されている。しかし異種細胞での発現は困難であり、他のGPCRに比べて研究は遅れている。私たちは、嗅覚受容体の機能解析や、相互作用する因子の特定・機能解析と共に、匂いセンサーとしての工学的利用を目的に、出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*を用いた嗅覚受容体の高効率発現系の構築を行っている。
本研究では、異種細胞で比較的高効率に発現するオイゲノール受容体であるマウス由来嗅覚受容体mOR-EGの酵母での機能的発現を行った。酵母 α -因子フェロモン受容体をmOR-EGに入れ替え、シグナル伝達機構の下流にルシフェラーゼの遺伝子をレポーター遺伝子として組み込み、オイゲノール応答酵母を作成した。発現効率を上げるため、ラット由来I7嗅覚受容体のNおよびC末端配列で置き換えキメラ体嗅覚受容体を作成した。シグナル伝達効率を改善するために、嗅覚細胞由来Gタンパク質 α サブユニットGolfを共発現させ、また嗅覚受容体の細胞膜への効率的輸送を促すため、マウス由来Receptor transport protein(RTP)を共発現させた出芽酵母を作成した。本発表では、これらのアプローチによる、嗅覚受容体の出芽酵母での機能的発現への効果について報告する。

Effect of co-expression of RTP on functional expression of the olfactory receptor, mOR-EG, in yeast

○Shuya KAMIYAMA¹, Yosuke FUKUTANI², Arata USTUMI², Maiko YOROZU², Tomoko NAKAMURA², Masafumi YOHDA²
(¹Dept. Biotech., Tokyo Univ. Agric. Technol.,²Dept. Biotechnol., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words G-Protein Coupled Receptor,RTP,Olfactory Receptor,Bio sensor

- 2P-2116 マイクロウェルチャンバーを用いた磁性液滴搬送デバイスによる細胞解析
○大河内 美奈, 熊澤 史貴, 手島 翠, 古池 真司, 本多 裕之
(名大院・工・生物機能)

磁性粒子は、生体サンプルからの目的とする細胞や生体分子の分離、精製、濃縮を可能とする特性を有する他、反応場である液滴間の搬送子として利用でき、磁力を駆動力として用いた解析システム全体の小型・携帯化を実現する上で優れた特性を有する。我々は、磁性微粒子と磁力を利用した液滴搬送システムを考案し、液滴の合一や磁性微粒子の抽出などの操作を磁力制御により進行できることを明らかにした。本研究では、多数の細胞の遺伝子発現解析を実現するためマイクロウェルチャンバーを作製し、ミネラルオイル中での磁性液滴搬送により、細胞溶解、逆転写反応、およびPCR増幅の各反応液と順次、合一させて温度コントロールを行うことでRT-PCR反応を進行させた。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に必要な技術である。そこで、Hela total RNAを鋳型としてbeta actinのRT-PCRをデバイス上で行ったところ、10-10,000コピーにおいてRNA量と蛍光強度で相関がみられた。次に、ヒト慢性骨髄性白血病細胞であるK562と正常細胞RPMI-1788を用いて、1細胞を1液滴に挿入してRT-PCRを行った。白血病診断に用いるマーカーであるWT-1の解析を行ったところ、K562においてのみ高い発現が確認され、1細胞遺伝子発現解析が可能であることが示唆された。

Cell analysis using the micro-chamber well device with magnetic-force based manipulation

○Mina Okochi, Fumitaka Kumazawa, Midori Teshima, Shinji Koike, Hiroyuki Honda
(Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Key words magnetic-force,single-cell PCR

- 2P-2115 ヒト由来 μ -オピオイド受容体 OPRM1 とその変異体 A118G の酵母による発現と機能解析
○savangsuksa aulaphan¹, 福谷 洋介², 萬 麻衣子², 養王田 正文²
(¹東京農工大・工・生命工,²東京農工大・院工・生命工)

オピオイド受容体は、鎮痛作用に関わるモルヒネ様物質の作用発現に関与する受容体タンパク質で、7回膜貫通型のGタンパク質共役受容体(GPCR)に属し、アゴニスト、アンタゴニスト及び生理作用の違いにより μ , δ , κ のサブタイプに分類できる。中でも、 μ オピオイド受容体は、この受容体の遺伝子多型の存在が薬剤の効果に個人差が生じるという問題が示唆され、がん疼痛治療などの分野で注目されている。しかし、遺伝子多型とリガンド結合能の相関などの解明は遅れている。そこで、本研究は、出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*を用いたヒト由来 μ オピオイド受容体OPRM1の機能解析系の開発を行い、遺伝子多型と薬剤応答性の関連を解析することを目的とした。
ヒトOPRM1 cDNAをガラクトース代謝系プロモーターを有するベクターに導入し、出芽酵母に形質転換した。ガラクトースを含む培地での培養により誘導されたOPRM1の発現を逆転写PCRおよびウェスタンブロットを用いて確認した。内因性のリガンドとして知られている β -エンドルフィンを追加し、シグナル伝達経路下流で発現する蛍光タンパク質GFPとルシフェラーゼの蛍光の測定により、酵母細胞でのOPRM1機能的発現を解析した。さらに、薬物やアルコール依存に関連があると言われていたExon 1のSNP(A118G)を有する変異体を構築し、リガンド応答性の変化の有無を解析した。本発表においては、OPRM1の機能的発現の成否、またA118G変異体での変化の有無について報告する。

Expression of the human μ -Opioid receptor OPRM1 and that variant A118G in yeast

○Aulaphan SAVANGSUKSA¹, Yosuke FUKUTANI², Maiko YOROZU², Masafumi YOHDA²
(¹Dept. Biotechnol., Tokyo Univ. Agric. Technol.,²Dept. Biotechnol., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words opioid receptor,*S.cerevisiae*,SNP

- 2P-2117 濃度勾配形成マイクロデバイスを用いた単一細胞毒性評価システムの構築
○吉野 知子¹, 林 拓磨¹, 細川 正人¹, モリ テツシ¹, 中園 聡², 松永 是¹
(¹東京農工大院・生命,²電力中央研究所)

【目的】細胞を用いた毒性試験は、化学物質リスク評価への応用が示されている。特に単一細胞の解析を行うことで、より詳細な化学物質評価が可能であると考えられる。これまでに、微細孔上に細胞を高密度集積する技術“Microcavity array”を開発してきた。本研究ではこのMicrocavity arrayに濃度勾配を形成する流路を組み合わせたマイクロデバイスを開発し、単一細胞毒性評価システムの構築を目指した。
【方法及び結果】2倍希釈系列の濃度勾配を形成するマイクロ流路を作製した。本流路は、2つのInletと溶液を混合するDilution chamber、細胞アッセイ用のCulture chamberを有する。本流路をMicrocavity arrayに接着し、細胞捕捉用の微細孔を500個×6レーン配したマイクロデバイスを構築した。本デバイスの微細孔上にHeLa細胞を捕捉した後、2つのInletにKCN及び培地を送液し、捕捉した細胞に100~6.25 μ MのKCNを暴露した。その結果、KCNの暴露時間の経過に伴い、KCN濃度が高いCulture chamberほど死細胞が多く、また各時間におけるKCNの半数致死濃度を簡便に算出することが可能であった。このように本デバイスは、単一細胞レベルでの様々な毒性評価のためのツールとして有効であることが示された。

Development of a novel method for evaluation of cytotoxic chemicals using a single-cell based microfluidic concentration gradient device

○Tomoko YOSHINO¹, Takuma HAYASHI¹, Masahito HOSOKAWA¹, Tetsushi MORI¹, Satoshi NAKASONO², Tadashi MATSUNAGA¹
(¹Dept. Biotechnol., Tokyo Univ. Agric. Technol.,²Central Research Institute of Electric Power Industry)

Key words single-cell,cytotoxic,concentration gradient,microcavity array