

2P-202 Stenotrophomonas maltophiliaの走化性センサーの同定

○荷方 稔之, 小野寺 唯, 荒谷 一典, 柿井 一男
(宇都宮大院・工・物質環境化学)
nikata@cc.utsunomiya-u.ac.jp

【緒言】多くの細菌は鞭毛を回転させることで直進運動と方向転換を繰り返し、化学物質の濃度勾配を感知して集積、忌避といった走化性と呼ばれる行動的応答を行う。グラム陰性桿菌の *Stenotrophomonas maltophilia* JCM1975 は、ピスフェノール A や *p*-ニトロトルエンなどの幅広い芳香族化合物に走性を示す興味深い細菌である。本細菌が有する化学物質の物質認識能力を詳細に調査することにより、モニタリングやバイオレメディエーション等への応用が期待される。本発表では *S. maltophilia* JCM1975 における走化性センサー様遺伝子の1つである *mcp5* を破壊した遺伝子破壊株を作成し、本センサータンパク質が感知する化学物質について検討を行った。

【実験方法】走化性の測定は、試験物質の寒天溶液を吸引したキャピラリーを細菌懸濁液に挿入し、開口付近に集積する細菌数を経時的に計数して行った。遺伝子破壊株はゲンタマイシン耐性遺伝子を *mcp5* 内に挿入して欠損変異プラスミドを作成し相同組換えにより取得した。

【結果と考察】*S. maltophilia* JCM1975 は、*m*-クロロフェノール、*p*-クロロフェノールに対して走性応答を示すが、*mcp5* を破壊した変異株は、両化学物質に対してほとんど応答を示さなかった。このことから走化性センサー MCP5 はクロロフェノールの感知に関与していることが示唆された。しかしながらその応答は完全には消失していなかったことから、クロロフェノールを感知する他の走性センサーも存在すると考えられた。現在 MCP5 のフェノール等に対する感知の関与について検討を行っている。

Identification of methyl-accepting chemotaxis protein of *Stenotrophomonas maltophilia*

○Toshiyuki Nikata, Yui Onodera, Kazunori Araya, Kazuo Kakii
(Dept. Mater. Environ. Chem., Grad. Sch. Eng., Utsunomiya Univ.)

Key words chemotaxis, *Stenotrophomonas maltophilia*, sensor

2P-204 ルシフェラーゼを用いたインフルエンザ検査法の開発

○城 浩吉, 石田 文典, 廣田 隆一, 池田 文, 黒田 章夫
(広島大院・先端物質)
akuroda@hiroshima-u.ac.jp

【目的】現在、インフルエンザウイルスの検出方法は数種類存在するが、いずれの方法も検出時間または検出感度に問題が残っている。インフルエンザ治療薬であるタミフルは発症後 48 時間以内に服用しなければ大きな効果は得られない。従って高感度かつ検出時間の短い検出方法の開発が必要となっている。高感度で知られるルシフェラーゼによる発光反応をインフルエンザウイルス検出に応用すれば迅速かつ高感度な検出が実現できるのではないかと考え、新たな検出方法の開発を試みた。また、近年タミフル耐性インフルエンザウイルスの出現が確認されている。診断の場で検出したインフルエンザウイルスがタミフル耐性を持つか検査できれば治療に大きく貢献できる。検出したウイルスのタミフル感受性試験の検討も行った。

【方法及び結果】インフルエンザウイルスはシアル酸類を糖タンパク質から切り出すノイラミニダーゼを持つ。ノイラミニダーゼの基質として、シアル酸化したルシフェリン派生体を用いた。ノイラミニダーゼが存在すると、ルシフェリンを遊離させ、ルシフェラーゼによって発光することから、高感度にインフルエンザウイルスが検出された。また、タミフルはインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ阻害剤であることから、タミフル存在下では発光反応が低下することが予想できた。バクテリアのノイラミニダーゼとインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼで発光反応を比較した結果、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼのみ阻害することが観察できた。このことから、本技術はタミフル感受性試験にも応用可能であることが分かった。

Influenza virus detection using firefly luciferase and a luciferine derivative substrate.

○Kokichi Shiro, Takenori Ishida, Ryuichi Hirota, Takeshi Ikeda, Akio Kuroda
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words influenza virus, luciferase

2P-203 出芽酵母における分割ルシフェラーゼを利用した GPCR リガンド応答検出法の応用

○福谷 洋介¹, 松波 宏明², 小澤 岳昌³, 養王田 正文¹
(¹農工大院・工・生命工, ²デューク大・メディカルセ, ³東大院・理・化学)
yohda@cc.tuat.ac.jp

出芽酵母は真核単細胞生物であり、哺乳類由来タンパク質の生産に広く用いられている。我々は出芽酵母に哺乳類 G タンパク質共役型受容体 (GPCR) を発現させ、単生物センサーとして利用することを目指している。これまで、出芽酵母での GPCR リガンドアッセイには、内在のフェロモン受容体シグナル伝達を利用したシステムを用いていた。しかし、この手法ではリガンド添加からレポーター遺伝子発現までに時間を要することが課題であった。

最近、小澤らによって分割ルシフェラーゼを用いた GPCR のリガンドアッセイシステムが構築された。このシステムは β アレスチンがリン酸化した GPCR に結合する機構を応用した方法であり、短時間で高い検出能をもつ手法である。しかし、出芽酵母には哺乳類の β アレスチンに対応するタンパク質は発現しておらず、このシステムが出芽酵母で利用可能かどうかは未確認であった。

そこで本研究では、分割ルシフェラーゼを利用した GPCR リガンドアッセイシステムが出芽酵母においても利用可能か試験した。ヒト由来ソマトスタチン受容体におけるリガンドアッセイ試験の結果、これまで用いていたシステムに比べ、リガンド応答を短時間で検出できた。このことから、出芽酵母でも β アレスチンと分割ルシフェラーゼを用いた GPCR リガンドアッセイシステムが利用可能であると考えられる。

Application of Split Luciferase for the G-Protein-Coupled Receptor in *Saccharomyces cerevisiae*

○Yosuke Fukutani¹, Hiroaki Matsunami², Masatake Ozawa³, Masafumi Yohda¹
(¹Biotechnol. Life Sci., Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., ²Dept. Mol. Genetics Microbiol., Duke Univ. Medical Ctr., ³Dept. Chem., Sch. Sci., The Univ. of Tokyo)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, G Protein Coupled Receptor, Split Luciferase

2P-205 ナノ粒子の局在表面プラズモン共鳴によるインフルエンザウイルスヘマグルチニンの検出

○高橋 直人¹, シェッドアハメッド², 董 金華², 朴 龍洙²
(¹静大・農, ²静大・創科技院)
pakkun0449@yahoo.co.jp

【目的】近い将来強毒性インフルエンザが突然変異により発生し、世界規模で多大な被害を出すことが予想され、高感度かつ迅速な検出は重要である。そこで、本研究では蛍光性半導体ナノ粒子 (QD) と金ナノ粒子 (AuNP) を用いた H1N1 型インフルエンザに対する新規検出技術の開発を試みた。

【方法】コア/シェル (CdTe/CdS) QD と金ナノ粒子をそれぞれ水溶液中のボトムアップ法と液相還元法により作製し、各粒子を限外濾過で精製した。それぞれの粒子液に抗インフルエンザウイルス H1N1 抗体を 5.1 $\mu\text{g/ml}$ となるように加え、EDC/NHS カップリングによって修飾した。抗体修飾粒子を限外濾過で精製し、QD (Ab-QD) と金ナノ粒子 (Ab-AuNP) を得た。Ab-QD と Ab-AuNP を混合した検出液に H1N1 ヘマグルチニン (HA) とコントロールとしたウシ血清アルブミン (BSA) をそれぞれ 10 pg/ml ~1 $\mu\text{g/ml}$ 加え、反応させた後に蛍光マイクロプレートリーダーを用いて励起光 380 nm で 550 nm の蛍光強度を測定した。

【結果】HA を Ab-QD と Ab-AuNP の検出液に加え、蛍光を検出したところ、100 pg/ml ~1 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で HA 濃度に依存して蛍光の増加が確認できたが、BSA では蛍光強度は変化しなかった。この結果より、QD と AuNP が HA に結合し隣接し合うことで局在表面プラズモン共鳴による蛍光増強が起きたことが確認できた。今後無毒化されたウイルスを用いて本法を検証する予定である。

Detection of influenza virus hemagglutinin using localized surface plasmon resonance of nanoparticle

○Naoto Takahashi¹, Ahmed Syed², Jinhua Dong², Yong-Soo Park²
(¹Fac. Agric., Shizuoka Univ., ²Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

Key words quantum dot, influenza, nanoparticle, localized surface plasmon resonance