

2P-237 A simple flow-focusing device for high-throughput applications in emulsions

○Marsel Murzabaev¹, Kojima Takaaki¹, Isao Kobayashi², Hideo Nakano¹
 (¹Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ., ²Food Eng. Div., Natl Food Res. Inst.)
 hnakano@agr.nagoya-u.ac.jp

Recently, many studies requiring high-throughput screening of large libraries are done using water-in-oil emulsion droplets. Microfluidics allows producing uniform emulsion which is beneficial for quantitative assays. We have developed a simple, inexpensive flow-focusing device consisting of two syringes driven by syringe pumps, standard fittings and tubes and a specially fabricated nozzle. This nozzle is made of a large glass capillary for oil phase, smaller glass capillary for water phase and a thin steel needle for emulsification connected to the exit capillary. Cell-free transcription reaction was performed in emulsion produced by this device. Light mineral oil containing Sun Soft No. 818SK 4% (wt/vol.) and Span 80 1% (wt/vol) was used as the oil phase. Emulsion droplets with diameter around 75 μm were produced. An active ribozyme was successfully synthesized by T7 RNA-polymerase from DNA attached to paramagnetic beads in the emulsion droplets. The difference in signal strength between active and inactive promoter variants was much higher (22 times) when transcribed in emulsion from flow-focusing device than that obtained in vortex-emulsified reaction (6 times).

A simple flow-focusing device for high-throughput applications in emulsions

○Marsel Murzabaev¹, Kojima Takaaki¹, Isao Kobayashi², Hideo Nakano¹
 (¹Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ., ²Food Eng. Div., Natl Food Res. Inst.)

Key words *in vitro* coupled transcription/translation, high-throughput screening, microfluidic device, flow-focusing

2P-239 細胞内機能性ペプチド探索のための CPP 結合ペプチドライブラリーの作製

○松本 凌¹, 大河内 美奈^{1,2}, 本多 裕之¹
 (¹名大院・工・生物機能, ²東工大院・理工・化工)
 honda@nubio.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】

本研究でこれまで探索してきたペプチドは、細胞外タンパク質や受容体に結合して作用する「細胞外」で機能するペプチドであった。近年、タンパク質やポリペプチド、核酸といった親水性生体分子を細胞内に送達するためのツールとして、細胞透過性ペプチド(CPP)が注目されている。そこで本研究では、このCPPとペプチドアレイを組み合わせて、今まで固相合成ペプチドアレイでは困難だった「細胞内機能性ペプチド」が探索できる新規スクリーニング系の開発を目的とした。

【方法】

セルロースメンブレン上に、まず紫外線で切断可能なフォトリソカーを結合させ、そのアレイ上に、CPPとしてオクタアルギニン(R8)を合成した。紫外線照射によって切断したR8が、細胞内に導入されるかどうかを、HeLa細胞を用いて調べた。その後、細胞内機能性ペプチド探索のため31種類のトリペプチドをR8に付加し、HeLa細胞への導入効率を評価した。

【結果と考察】

合成したトリペプチドの性質によってHeLa細胞への取り込みが変化した。トリペプチドの疎水度と電荷で整理したところ、負電荷アミノ酸が多く親水的なペプチドは取り込みにくいことがわかった。この結果から、導入に適さない配列を予め除外して探索用ペプチドライブラリーを作成することで、細胞内機能性ペプチドが効率よく探索可能となることが示唆された。

Development of CPP binding peptide library for screening of intracellular functional peptides

○Ryo Matsumoto¹, mina Okochi^{1,2}, Hiroyuki Honda¹
 (¹Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., ²Dept. Chem. Eng., Grad. Sch. Sci. Eng., Tokyo Tech)

Key words cell-penetrating peptide, peptide array, screening

2P-238 miRNA 阻害剤 LidNA ～ miRNA 結合部位の両端の二本鎖が重要である

○立花 亮, 伊田 寛之, 田辺 利住
 (阪市大院・工・化生系)
 tatibana@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

【序論】ssDNAはmiRNAに対する結合力がRNAに比べて弱く、miRNAの阻害剤にならないことが知られていた。しかし、我々はmiRNA結合部位(MBD)の両端にdsDNAを付加することによって、約2000倍に親和性を向上させ、世界初のDNAからなるmiRNA阻害剤を開発し、LidNAと命名した。今回はこの親和性向上の原因を検討した。

【方法と結果】ピアコア3000を用いて、センサーチップ上にLidNAタイプのプローブを設計し、各種ssDNAをインジェクションし、結合速度定数および解離速度定数を算出した。LidNAはssDNAより500倍程度、結合速度定数が高いことがわかっていて、MBDと結合するDNAと二本鎖領域の間に1または3塩基の隙間があっても両定数は変化しなかった。このことから、これまで報告のあったベーススタッキング効果が結合力向上に寄与しているのではないことがわかった。次に、64塩基長DNAのほぼ中央に蛍光ラベルした塩基を導入し、その塩基付近に二本鎖を形成させ、蛍光偏光を測定した。蛍光偏光は分子の運動に依存することがわかっていて、この二本鎖部分が蛍光ラベルした塩基に近いほど蛍光偏光が大幅に増大した。その増大量は分子量の増大から考えてもかなり大きな量であった。すなわち、二本鎖形成によりMBD塩基の自由運動が抑制され、結合速度が大きくなったと考えられた。これがLidNAがmiRNA阻害剤として機能することに重要であると結論した。本研究は文部科学省の大学発新産業創出拠点プロジェクト(START)の支援を受けて行われたものである。

文 献: Ida, et al. 2014 JBB in press. Tachibana, et al. 2012. FEBS Lett. 586: 1529-1532.

Binding affinity of ssDNA is improved by attachment of dsDNA regions

○Akira Tachibana, Hiroyuki Ida, Toshizumi Tanabe
 (Dept. Appl. Chem. Bioeng., Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)

Key words LidNA, microRNA inhibitor, RNA interference, surface plasmon resonance

2P-240 エピトープペプチドを用いたミルクアレルギー抑制効果

○山内 望¹, 荻原 沙緒理¹, 大河内 美奈^{1,2}, 本多 裕之¹
 (¹名大院・工・生物機能, ²東工大院・理工・化工)
 honda@nubio.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】近年、患者数が増加傾向であることから食物アレルギーが注目されている。食物アレルギーの治療法として経口免疫療法が挙げられるが、この治療法ではアレルギー患者が抗原物質を徐々に摂取するため、治療中にアレルギー反応を誘発し危険を伴う。そこで本研究では、ミルクペプチドアレイを用いることでIgEエпитーブペプチドの探索を行い、事前にエピトープペプチドを摂取することでIgEの抗原認識部位をブロックし、抗原摂取を行ってもアレルギー症状を抑制可能か評価することを目的とした。

【方法】カゼインをアラムゲルと共に腹腔内投与によって免疫したアレルギーマウスを作製した。免疫後、採血することでアレルギーマウス血清中のIgEを取得し、ミルクペプチドアレイでIgEエピトープの取得を行った。また、アレルギーマウスにカゼインのみを投与もしくはエピトープペプチドとカゼインを投与し直腸温の経時変化を追うことでアレルギー症状の評価を行った。

【結果と考察】高IgE価のアレルギーマウスの作製に成功し、ミルクペプチドに高結合のIgEを取得し、エピトープペプチドを取得することができた。また、アレルギーマウスにカゼインのみ投与した場合では直腸温が低下したことに対し、エピトープペプチドとカゼインを投与した場合では直腸温の低下は観察されず、アレルギー症状が抑制可能であることが示唆された。

Suppression effect used epitope peptides for milk allergy

○Nozomi Yamauchi¹, Saori Ogihara¹, Mina Okochi^{1,2}, Hiroyuki Honda¹
 (¹Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., ²Dept. Chem. Eng., Grad. Sch. Sci. Eng., Tokyo Tech)

Key words allergy, IgE, epitope peptide