

平成16年度育成試験課題

整理番号	16神-5
------	-------

育成試験の名称	遺伝子発現のリアルタイムモニタリング技術を活用した生細胞マイクロチップの開発と創薬への応用
実施機関及び担当者	横浜市立大学 大学院 総合理学研究所 教授 古久保哲朗
育成試験の目的・目標	
<p>核内転写因子の一種であるエストロゲンレセプターにより活性化される人工プロモーターの下流にポリリン酸合成酵素遺伝子を連結したものを染色体 DNA 上に組み込み、環境ホルモン様の活性を示す化学物質を容易にスクリーニングし得る出芽酵母株の作製を行う。</p> <p>上記出芽酵母の生細胞を定量的にスライドガラス（あるいはより安価な樹脂類等）上にスポットとして固定する技術の開発、ならびに各スポットに低分子化合物を極微量注入後、数回？数十回分裂した後の細胞内の遺伝子発現量を測定する技術の開発を試みる。</p>	
試験方法と内容	
試験項目	内容
モデル酵母株の作製	エストロゲンに応答して、ポリリン酸を蓄積する酵母株を作製し、実際に ^{31}P -MRI により画像化できることを確認する。
細胞チップの作製	オクタデシルアミンをスライドガラスに塗布し、そこに生細胞を疎水的相互作用により固定化し、培養する。また高撥水性フッ素樹脂インクによりマイクロウエルを形成させたスライドガラスを用いて生細胞を固定化し、培養する。
マルチウエルプレート方式に変更	96穴マルチウエルプレート中で酵母を凍結乾燥保存し、薬剤添加後のポリリン酸蓄積量をハイスルーブットに測定できるシステムの構築を行う。
予算額	2,000 千円
試験結果	
<p>GAL1 プロモーターの支配下に VMA2 を組み込んだ出芽酵母株を作製し、そこに GAL4 の DNA 結合ドメイン+エストロゲンレセプターホルモン結合ドメイン+ VP16 の転写活性化ドメインを融合したキメラ型転写因子を発現するプラスミドを導入した。得られた株は、エストロゲンに反応してポリリン酸を著量蓄積することが ^{31}P-MRI により確かめられた。</p> <p>上記記載の方法はいずれもうまくいかなかった。また現有の設備では少なくともコロニー10個程度の細胞数が必要であることが示されたため、マルチウエルプレート方式に変更することとした。</p> <p>まず で作製した酵母株に適した凍結乾燥条件を決定した。次に直径0.8mmのキャピラリーガラス管を16本同時に測定する方法を考案し、マルチウエルプレートからキャピラリーガラス管へ移送するための簡便な器具の開発を行った（特許出願準備中）。</p>	
現在の状況及び今後の展開方策	
<p>本研究では当初細胞チップの開発を視野に入れていたが、^{31}P-MRI の検出感度の問題が明らかとなったことから、一般的な NMR 機器でも測定可能なシステムの構築を目指すこととした。その結果、エストロゲンに反応してポリリン酸を蓄積する出芽酵母株の作製、この酵母株に適した凍結乾燥条件（保存条件）の決定、マルチウエルプレートでの培養及びそこから NMR 測定デバイスへのハイスルーブットな移送方法など、商品化に向けて必要と考えられる要素技術の開発に成功した。今後はマルチウエルプレートマイクロチップ化するために、ポリリン酸の高感度検出法やマイクロチップスケールでの培養技術の確立を目指し、研究を続行していく。</p>	