

Title	Campbell様インテグレーションDNA断片のPolymerase Chain Reaction (PCR) 法によるin vitro構築
Author(s)	佐藤, 裕; 柴山, 和子; 石原, 和幸; 東, 俊文
Journal	歯科学報, 112(2): 157-157
URL	http://hdl.handle.net/10130/2754
Right	

口 演

No.1 : Dentipain の成熟機構の解析

宮井友理¹⁾, 国分栄仁²⁾, 青木雅憲¹⁾, 石原和幸²⁾, 佐藤 亨¹⁾ (東歯大・クラウンブリッジ補綴)¹⁾
(東歯大・微生物)²⁾

目的: *Treponema denticola* は、慢性歯周炎の病巣より高頻度に分離され、その発症と進行に重要な役割を果たしている。我々は、*T. denticola* の genome 解析により、*Streptococcus pyogenes* のプロテアーゼ (IdeS) と類似性の高いタンパク (IdeT, Dentipain) を明らかにした。IdeS は特異的に IgG を分解するプロテアーゼであるが、IdeT は IdeS 類似領域の上流にイムノグロブリン様ドメインを持つ。

そこで、本研究では、Dentipain を *T. denticola* から精製し、その成熟メカニズムと *T. denticola* の病原性に果たす役割を明らかにすることを目的とした。**方法:** *T. denticola* ATCC35405 を EX-TYGV 培地にて3日間嫌気条件下にて培養し、菌体と培養上清を得た。この上清に硫酸アンモニウムによる塩析を行った。得られた分画を、陽イオン交換カラム (Hi-load SP) により分画後、ゲル濾過カラム (SW3000 XL) を使用しさらに分画した。得られたサンプルは、SDS-PAGE 及び抗 IdeT 抗体を用いた Western-

blot 法により解析した。

成績および考察: IdeT のプロテアーゼドメインは *T. denticola* の培養上清中に認められた。これに対しイムノグロブリン様ドメインは上清への遊離は認められなかった。Westernblot 法による解析では、プロテアーゼドメインは上清から約65kDa と50kDa の2本のバンドとして検出された。これらのタンパクは、硫酸アンモニウムによる塩析では、濃度50%~60%で沈殿した。また、陽イオン交換カラムに吸着し、およそ0.25mol NaCl 濃度により溶出した。ゲル濾過による分画では、2種のタンパクは分子量50,000~100,000の範囲に認められた。

以上の結果より、IdeT のプロテアーゼドメインは、菌体から遊離されると考えられる。今後はさらに、N末端アミノ酸配列を決定し、本プロテアーゼが成熟し遊離されるメカニズムについて解析する予定である。

No.2 : Campbell 様インテグレーション DNA 断片の Polymerase Chain Reaction (PCR) 法による *in vitro* 構築

佐藤 裕¹⁾, 柴山和子²⁾, 石原和幸²⁾, 東 俊文¹⁾ (東歯大・生化)¹⁾ (東歯大・微生物)²⁾

目的: レンサ球菌等の宿主染色体 DNA に変異導入する際用いられる DNA は2通りあり、1つは環状 DNA でもう1つは線状 DNA である。前者では1箇所、後者はマーカー遺伝子の両側2箇所ですべて宿主染色体 DNA と組換えをおこし変異が導入される。両 DNA 断片の構築は一般的に大腸菌プラスミド上に目的 DNA 断片をクローニングして、それを大腸菌内で増幅・分離後、レンサ球菌等に形質転換して、変異株を得るのが一般的であった。しかし、近年 PCR 法の応用技術が発展し、後者の線状 DNA 断片は Splicing by overlap extension (SOE) 法により、複数の DNA 断片を線状に結合することが *in vitro* で出来るようになり、時間を要した大腸菌クローニングが省略できるようになった。一方前者の環状 DNA 断片の効率的な *in vitro* 構築方法はまだ確立されていない。今回その試みを行ったので報告する。

方法: 宿主は *S. mutans* Z1 株を用いた。供した DNA 断片は本菌のグリコーゲンホスホリラーゼ遺伝子 *glgP* 断片、このプロモーター断片およびマーカー遺伝子としてエリスロマイシン耐性遺伝子である。これらの結合された環状 DNA 断片の構築に2

つの方法を試みた。なお上記3つの断片は SOE 法により結合した (PGE 断片とする)。これに用いた PCR プライマーの5'に付加してあった制限酵素 (*Bam*HI) 認識サイトを、増幅後 *Bam*HI で切断しリガーゼ反応を行い環状化した。方法Aはこの環状 PGE 断片を鋳型として、相補プライマーを用いて PCR 反応を行った。方法Bは、同断片を鋳型として、2箇所を設定された inverse PCR プライマーセットを用いてそれぞれ増幅を行い、精製後2つの増幅産物を混合し変性アニール操作を行った。いずれの方法でもニックの入った環状 DNA が生成するのでこれをリガーゼで結合して形質転換に供した。

成績および考察: 方法Aでは26.6, 方法Bでは106.7 cfu/μg DNA の形質転換体を得られた。両方法とも目的の DNA 断片が100%出来る訳ではないので形質転換効率が低いであろうことは推定された。前者は方法上は PCR サイクルを行っているが、実際にはアシンメトリー PCR であり、サイクル数倍にしか DNA は増幅されないため増幅効率そのものが低いのは欠点である。後者は今後変性アニール操作等に何らかの工夫の余地があると考えられた。