

624

糖鎖結合能を持つDNAアプタマーの作成 (近畿大・工・化学環境) ○鈴木克之、林 裕司

【目的】 糖鎖を特異的に認識・結合する分子は、例えば癌の早期診断や治療に応用できると考えられる。従来からこのような分子として抗体やレクチンが用いられているが、特異性や価格などに問題が残っている。最近、様々な目的分子に特異的に結合する一本鎖核酸（核酸アプタマーと言う）が見出され、これらを効率よく検索・作成する方法として、試験管内進化法（SELEX法）が考案されている。そこで本研究では、SELEX法により、糖鎖を特異的に認識・結合するDNAアプタマーの作成を試みた。

【方法及び結果】 55塩基長のランダム配列の両端にそれぞれ22塩基長の一定配列を持たせた一本鎖DNAを化学的に合成し、熱変性後、糖鎖（Maltose, Lactose, Amylose）を固定化したカラムにかけて結合するDNAを回収した。これらDNAを鋳型とし、一定配列に対するプライマーを用いて非対称PCRを行い、得られた一本鎖DNAを再びカラムにかけるという操作を繰り返した。約15サイクル後、ある程度高い結合能を持つDNAアプタマー集団が得られたと考えられたので、PCRにより二本鎖DNAに変換し、クローニングおよび塩基配列の決定を行った。これまでに得られたアプタマーは選択に用いた糖鎖の種類によらず、共通の塩基配列を持っていたことから、これら糖鎖に共通する構造、あるいは担体に用いたShepharoseを認識するものと考えられた。現在、得られたアプタマーが認識する構造を明らかにするとともに、糖鎖特異的アプタマーの取得に向け選択条件の改良を試みている。

Selection of a DNA Aptamer That Binds Saccharide.

○Katsuyuki Suzuki, Hiroshi Hayashi (Dept. Chem. & Environ. Technol., Kinki Univ.)

【Key words】 aptamer, saccharide, SELEX

625

ストレプトマイシン依存性変異株を用いる *Corynebacterium glutamicum* の 遺伝子ライブラリーの作製

(協和発酵東京研、*東北大院農・応用生命) 影山基子、池田正人、○勝亦瞭一*

【目的】 *C. glutamicum* の分子育種に必要な遺伝子は、プラスミドベクターを用いるセルフクローニングで取得されているが、再結合したベクターを排除できない煩わしさを伴う。その解消を目的に、ストレプトマイシン(Sm)不活性遺伝子をもつベクターと Sm 依存性変異株を用いる新規ゲノムライブラリー作製法を開発したので報告する。

【方法と結果】 野生株から Sm 依存性変異株を誘導した。本株のカナマイシン(Km)耐性ベクターの形質転換体は Sm・Km 選択下で高頻度で得られるが、Km に加え Sm アデニリル化遺伝子をもつベクターでは細胞内で Sm が不活化されるため形質転換体は全く得られなかった。このことを利用すれば、本 Sm 耐性マーカー内に染色体断片を挿入するポジティブ選択系によるゲノムライブラリーの作製が可能と考えられる。そこで、Sm・Km 耐性マーカーを有し、Sm 耐性遺伝子内に唯一の *EcoRI* 部位をもつベクターを構築した。その部位に野生株染色体の *EcoRI* 消化断片を連結した ligation mixture で Sm 依存性変異株を形質転換し、Sm・Km 含有平板上に出現した 3×10^4 個の形質転換体をかき集め、プラスミドを単離した。この混成プラスミドで7種の代謝または輸送変異株を形質転換したところ、全てについて野生型相補遺伝子が得られたことから、混成プラスミドは有効なゲノムライブラリーとなることが検証された。

Construction of the gene library of *Corynebacterium glutamicum* by means of streptomycin-dependent strains

Motoko Kageyama, Masato Ikeda, ○Ryoichi Katsumata*

(Kyowa Hakko Co., Ltd., *Div. Life Sci., Grad.Sch., Tohoku Univ.)

【Key words】 glutamic acid bacteria, streptomycin-dependent strain, gene library