

29【P1】Ⅲ-209

Agaricus blazei polyphenoloxidase 遺伝子のクローニング

○赤沼 明子^{1,2}, 大島 泰郎², 元井 益郎³, 大野 尚仁^{1,2}(¹東京薬大薬,²東京薬大生命,³東栄新薬)

【目的】 *A. blazei* の polyphenoloxidase (PPO) を用いて酵素合成した高分子 polyphenol が免疫賦活作用を示すことをすでに報告した。また、PPO の精製法についても報告をしている。そこで今回は、*A. blazei* の cDNA ライブラリーを使って PPO 遺伝子をクローニングし、配列情報を得たので報告する。

【方法】 *A. blazei* 近縁種である *A. bisporus* などの PPO 類縁酵素遺伝子より degenerate primer を設計し、*A. blazei* 子実体から抽出した total RNA より RT-PCR を行った。Primer 設計時に予想された大きさを示すバンドをゲル抽出し、精製された PCR 産物について TA クローニングを行い、DNA シークエンシングを行った。そこで得られた配列を元に primer を設計し、*A. blazei* 子実体から作成した cDNA ライブラリーを元に、cDNA 全配列を決定した。

【結果と考察】 RT-PCR により得られた配列を BLAST により検索したところ、*A. bisporus* PPO とおおよそ 83%の相同性があることがわかった。そこで、得られた部分配列を元に設計された primer とベクター上の cDNA 断片挿入部位近辺の配列をもつ primer を使用して cDNA ライブラリーから PCR を行い、TA クローニングの後シークエンシングを行ったところ、開始コドンを含む断片と poly A 配列を含む断片を得た。また、同じ primer を用いて genome DNA より PCR を行い、得られた断片について同様にシークエンシングを行い、cDNA より得られた配列と比較したところ、intron と思われる配列が見つかった。