

平成 17 年度卒業論文

無細胞タンパク質合成系を用いた

コレラ毒素様蛍光タンパク質複合体作製の試み

Attempt of the construction of cholera toxin-like fluorescent protein complex by the use of  
cell-free protein synthesis system

高知工科大学

物質・環境システム工学科

1060018 奥田祐子

指導教員 榎本恵一

## 《要約 ( Abstract )》

コレラ毒素 (CT)は毒性のあるAサブユニット(CTA) と細胞表面の受容体(糖脂質ガングリオシド  $G_{M1}$ )に結合するためのBサブユニット(CTB)から成るタンパク質毒素である。CTAは、毒性のある  $A_1$  部分と、AサブユニットのC末端部分を占め、CTB5量体との会合に必要な  $A_2$  部分から成っている。また、CTBは5量体を形成してガングリオシド  $G_{M1}$  に結合し、エンドサイトーシスで毒素を細胞内に送る。同時にCTBには抗原に対する特異免疫応答を高めるアジュバント活性があり、免疫増強物質として利用が期待されている。そこでCTAの代わりに別のタンパク質をCTB5量体と会合させることができれば細胞内へのタンパク質輸送体や強力な抗原タンパク質として利用ができると考えられる。

本研究では毒性のある  $A_1$  の代わりに緑色蛍光タンパク質(GFP)がCTBに会合したタンパク質を作製することを試みた。GFPをCTB5量体に会合させるため、GFPのC末端に  $A_2$  を付加したタンパク質遺伝子を設計した。しかし本来、CTAとCTB5量体の会合はタンパク質の折りたたみに伴って起こるため、GFP、CTB両方をどのようにして同時に発現させるかが課題となった。そこで、本研究ではその対策として、細胞を破砕した抽出液中でDNAやmRNAからタンパク質を合成するin vitro系である無細胞タンパク質合成系を用いてタンパク質合成を行った。結果、大腸菌及びコムギ胚芽の系を用いた実験において、CTBとGFPは大腸菌の無細胞系での発現に成功した。しかし、GFPのC末端に  $A_2$  を付加したGFP- $A_2$ は、大腸菌、コムギ胚芽の系共に発現を試みたがGFP単体で発現する時よりも小さい分子量のタンパク質しか得られなかった。この原因について考察した。