

平成 22 年度修士論文

プロテアーゼを欠損した枯草菌における組換え
融合タンパク質の発現

Expression of recombinant fusion proteins in
protease-deficient *Bacillus subtilis*

高知工科大学大学院 工学研究科

基盤工学専攻 物質・環境システム工学コース

1135012 安岡佳江

1. 要旨 : Abstract

本研究室では、スギ花粉症の主要な抗原タンパク質である Cry j1、Cry j2 の T 細胞エピトープを用いるスギ花粉症ワクチンの開発を行っており、枯草菌中で T 細胞エピトープを発現させる実験を行っている。しかし、枯草菌は強いプロテアーゼ活性を持っているため目的タンパク質の安定した発現が難しい。そこで、9 つのプロテアーゼを欠損させた枯草菌株を用いタンパク質の発現量の増大と安定化を試みた。

スギ花粉症の主要アレルゲンタンパク質 Cry j1、Cry j2 の T 細胞エピトープと、これを安定化させ、その発現を確認するためのコレラ毒素 B サブユニット(CTB)との融合タンパク質遺伝子(*ctb-cry j1-cry j2*)を設計した。プロモーターには複数のプロモーターの複合体である *mwp* を用いた。次に、作製した融合遺伝子を大腸菌と枯草菌のシャトルベクターである pHY300PLK へ挿入し、作製した組換えプラスミドを大腸菌で発現させプラスミドの確認を行った。この組換えプラスミドをエレクトロポレーション法により枯草菌(168 *trpC2*)およびプロテアーゼ欠損枯草菌(KA8XA)へ導入し、融合タンパク質を発現させた。CTB に対する抗体を用いたウエスタンブロットティング法及び SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後のクーマシーブルー色素によるタンパク質の染色により融合タンパク質の発現を確認し、プロテアーゼの影響を比較した。