

氏名(本籍)	HOANG Van Vinh (ベトナム)
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	甲第264号
学位授与年月日	平成26年9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項
研究科・専攻名	工学研究科・基盤工学専攻
学位論文題目	コレラ毒素 B サブユニットと融合したニホンスギ花粉主要アレルゲン T 細胞エピトープ組換え体の細菌類における発現 Expression of recombinant T-cell epitopes of major Japanese cedar pollen allergens fused with cholera toxin B subunit in bacterial strains

論文審査	(主査) 高知工科大学 教授 榎本 恵一	高知工科大学 准教授 有賀 修
	高知工科大学 准教授 堀澤 栄	元鳥取大学 教授 佐藤 建三
	米沢栄養大学 教授 佐塚 正樹	

審査結果の要旨

1. 論文の評価

スギ花粉症は、ある調査によれば日本の人口の27%が罹患しているアレルギー疾患である。それにもかかわらず、主に対症療法による治療が行われており、根本的な治療法の適用はまだ試験的な試みに留まっている。根本的治療法の1つとして、免疫細胞であるT細胞が認識する抗原ペプチドの投与により免疫寛容と脱感作を誘導することが考えられている。しかし、T細胞による抗原ペプチドの認識が個人によって異なる主要組織適合性遺伝子複合体(MHC)の型に依存するため、それぞれの患者に有効な抗原ペプチドの種類は異なっている。そのため多数の患者に有効な抗原ペプチドを生産することはまだ完成に至っていない。また、実用化を展望するとき、抗原ペプチドを簡便な方法で安価に大量に生産する手法の開発が重要となる。

申請者は、上述の現状に鑑み、主要スギ花粉抗原タンパク質であるCry j 1及びCry j 2のアミノ酸配列の中から、種々のMHCタイプをもつ患者のT細胞によって認識される抗原決定基(エピトープ)となるペプチドを選択し、それらを繋ぎ合わせた人工ペプチドの遺伝子を設計した。さらにこの人工ペプチド遺伝子を、免疫増強作用をもつコレラ毒素Bサブユニット遺伝子と結合した融合タンパク質の遺伝子を設計し、これを作製した。Cry j 1からは4つのエピトープペプチドを選択し、これらを結合した遺伝子である *cry j 1 epi* をステップワイズPCR法により作製した。同様にCry j 2の6つのエピトープを繋ぎ合わせた遺伝子 *cry j 2 epi* を作製した。さらにこれら2つの人工遺伝子をコレラ毒素Bサブユニット遺伝子 *ctb* とオーバーラップエクステンションPCR法により連結し、融合タンパク質遺伝子 *ctb-cry j 1 epi-cry j 2 epi* を作製した。

次にこの遺伝子を大腸菌における発現ベクターであるpET28aに組み込み、この組換えベクターを大腸菌に導入し、遺伝子を発現させた。その結果、発現誘導後4時間で培養液1Lあたり約120mgの高収量で融合タンパク質が得られた。また、発現された融合タンパク質はその両端につけたHisタグへの親和

性を利用したアフィニティークロマトグラフィーで容易に精製できた。さらに発現タンパク質の分子量測定及びN末端のコレラ毒素BサブユニットとC末端につけたFlagタグに対するウエスタンブロッティングにより、このタンパク質が目的の融合タンパク質であることを確認した。

融合タンパク質の大量生産を目的として、大腸菌での発現に成功した融合タンパク質遺伝子を、発現タンパク質を培養液中に分泌することができる細菌 *Brevibacillus choshinensis* にベクターとともに導入した。分泌効率を増すため、N末端に分泌タンパク質であるアミラーゼ遺伝子を結合した。しかし、培養液中に分泌されるタンパク質は主にアミラーゼのみであった。その原因を究明したところ、アミラーゼと上述の融合タンパク質の結合部付近がプロテアーゼの攻撃を受けて切断され、融合タンパク質部分は菌体内でさらに切断を受けることが示唆された。このことから発現宿主の選択が重要であることが示された。

本研究は、抗原タンパク質の生産についての進歩に寄与するものである。このことより、本研究は博士学位論文に値するものとする。

2. 審査の経過と結果

- (1) 平成26年7月 9日 博士後期課程委員会で学位論文の受理を決定し、5名がその審査委員として指名された。
- (2) 平成26年8月22日 公開論文審査発表会及び最終試験を実施した。
- (3) 平成26年9月 3日 博士後期課程委員会で学位授与を可とし、教育研究審議会で承認された。