

研究用

---

**Takara**

***B. subtilis* Secretory  
Protein Expression System**

---

説明書

*Bacillus subtilis* を宿主とする組換えタンパク質の生産は、可溶化発現および分泌発現に優れています。特に S-S 結合などの複雑な構造をもつタンパク質に有効です。さらに大腸菌を宿主とした発現系とは異なり、エンドトキシンが産生タンパク質中に混入しません。このような利点がある一方で、異種タンパク質の分泌効率はシグナルペプチドのタイプに大きく影響されることが T. Eggert らのグループによって報告されています<sup>1)</sup>。タカラバイオでは、*B. subtilis* による効率の良い分泌発現系の構築・スクリーニングを行うためのシステムを開発しました。本システムでは、*B. subtilis* 由来の 173 種類の分泌シグナルペプチドの中から、目的タンパク質の分泌発現に適したシグナルペプチドをスクリーニングすることが可能です。また、*B. subtilis* のプラスミドはコピー数が非常に少ないため、*B. subtilis* 中でのプラスミド構築が困難であるという問題がありますが、本システムの pBE-S DNA は *E. coli* と *B. subtilis* のシャトルベクターであり、大腸菌で発現プラスミドを構築することができます。

本システムには、*B. subtilis* の分泌シグナルペプチド DNA ライブラリーである SP DNA mixture、*B. subtilis* -*E. coli* シャトルベクター pBE-S DNA およびタンパク質発現用宿主 *B. subtilis* RIK1285 株が含まれています。SP DNA mixture は、173 種類の *B. subtilis* 由来分泌シグナルペプチドをコードする DNA 断片 (In-Fusion<sup>®</sup> クローニング用) の混合物です。pBE-S DNA には、*B. subtilis* において機能する pUB110 由来の複製 ori (pUB ori) とカナマイシン耐性遺伝子 (Kan<sup>r</sup>)、*E. coli* において機能する pUC 由来の複製 ori (ColE1 ori) とアンピシリン耐性遺伝子 (Amp<sup>r</sup>) が含まれています。さらに、*B. subtilis* 由来のサブチリシンのプロモーター (*aprE* promoter) と分泌シグナルペプチド (*aprE* SP) を含み、その下流にマルチクローニングサイト (MCS) ならびに His タグ配列が配置されています。MCS に目的遺伝子を挿入した pBE-S DNA を制限酵素 *Mlu* I と *Eco*52 I で切断して線状化した後、In-Fusion クローニングシステムで *aprE* SP の代わりに SP DNA mixture 中の 173 種類の分泌シグナルペプチド DNA のライブラリーを導入することにより (図 1 参照)、目的タンパク質に適した高分泌発現系のスクリーニングが可能です。なお、MCS は大腸菌ワールドショック発現系 pCold<sup>™</sup> ベクター (製品コード 3360 ~ 3365、3371) と同じ配列のため、容易に目的遺伝子の乗せ換えを行うことができます。本キットに添付の宿主 *B. subtilis* RIK1285 株は、2 種類のプロテアーゼ産生能を欠損しており<sup>2)</sup>、目的タンパク質の分泌発現に適しています。

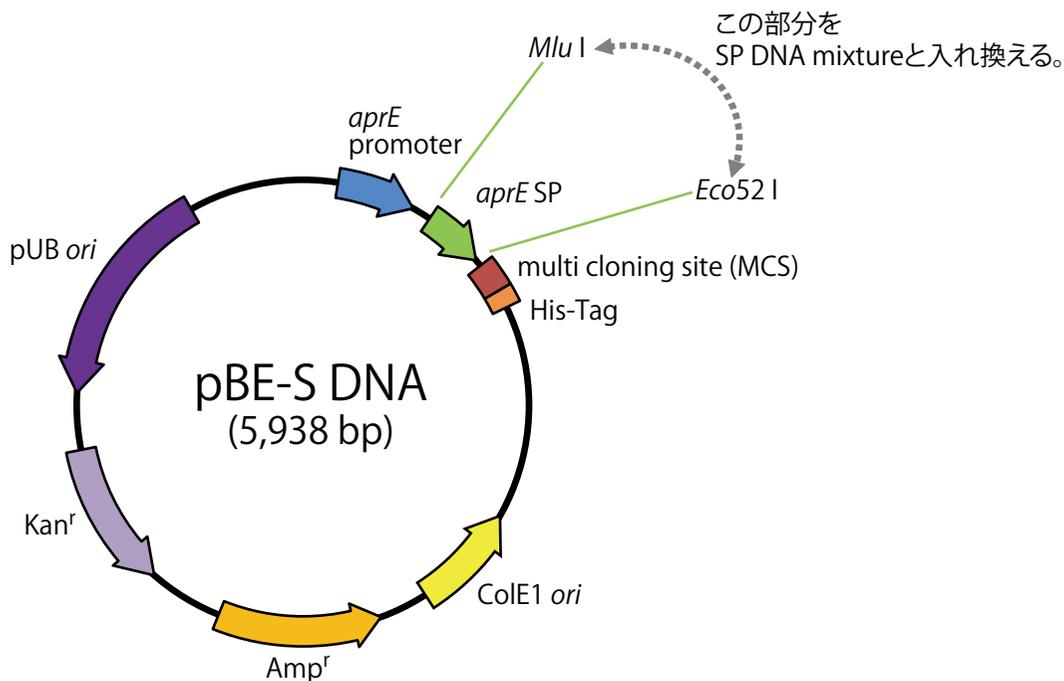


図 1. pBE-S DNA の概略図

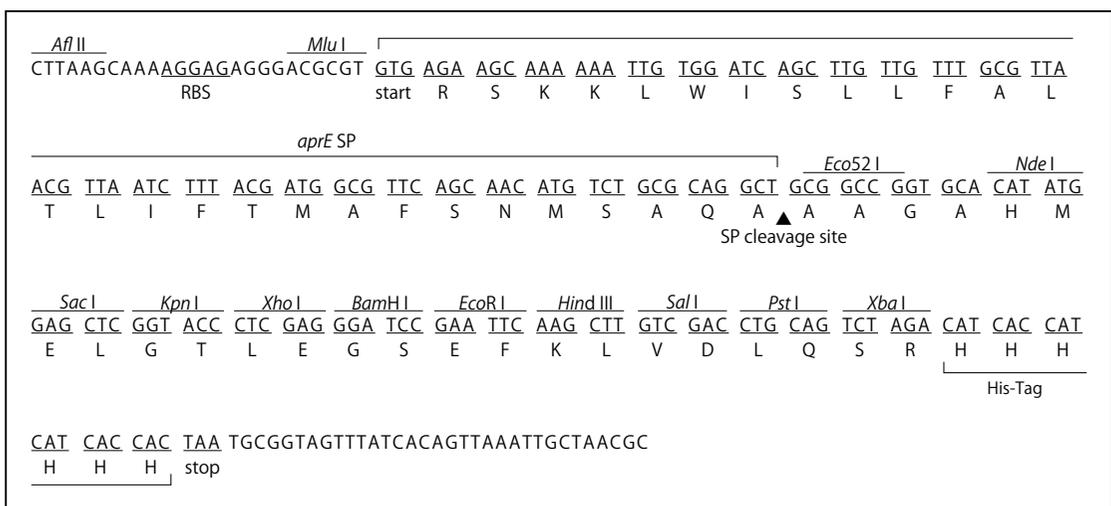


図 2. pBE-S DNA のマルチクローニングサイト周辺の塩基配列

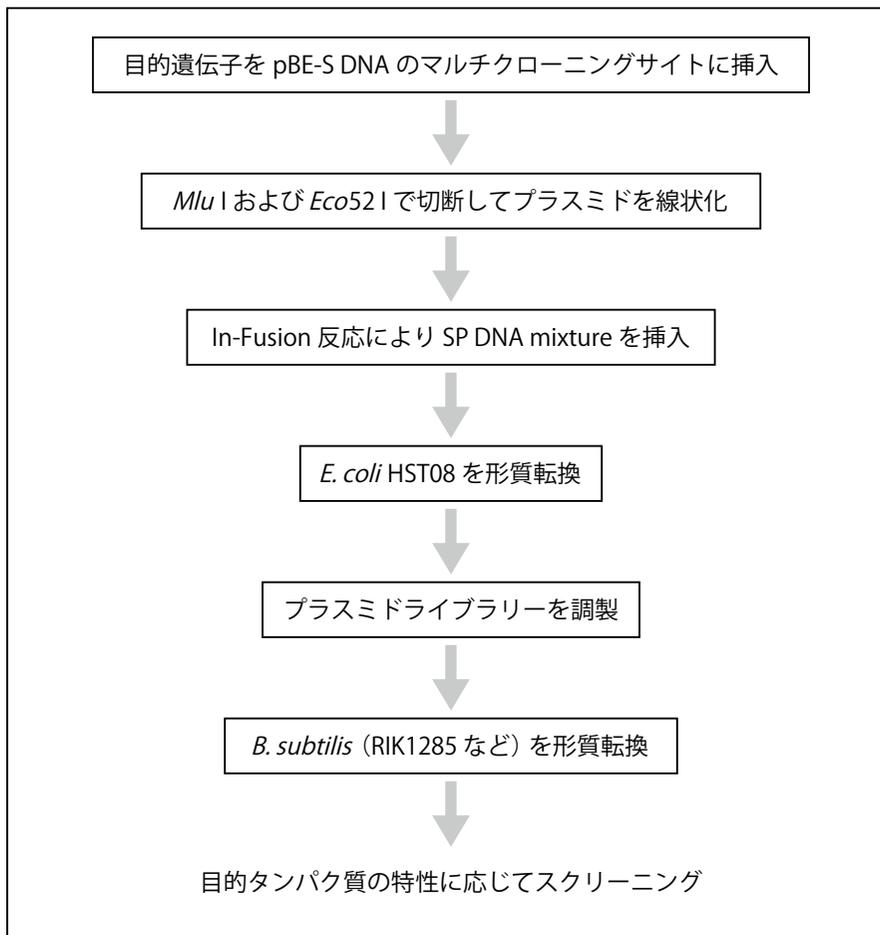


図 3. *B. subtilis* Secretory Protein Expression System 実験操作例フロー

---

## I. 内容\*1

SP DNA mixture (0.032 pmol/ $\mu$ l) *2	45 $\mu$ l
pBE-S DNA (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l) *3	20 $\mu$ g
<i>B. subtilis</i> RIK1285 *4 (glycerol stock)	100 $\mu$ l $\times$ 2

- \* 1 : ライブラリー作製 10 回分
- \* 2 : In-Fusion クローニング用の 173 種類の *B. subtilis* の分泌シグナルペプチド DNA ライブラリー 10 回分  
分泌シグナルペプチドの配列は、タカラバイオウェブカタログの *B. subtilis* Secretory Protein Expression System の製品ページからご覧いただけます。
- \* 3 : 形状 ; TE buffer (pH8.0)
- \* 4 : Marburg 168 derivative : *trpC2, lys1, aprE*  $\Delta$ 3, *nprR2, nprE18*

## II. 保存

− 80°C

SP DNA mixture および pBE-S DNA は、− 20°C でも保存可能です。

## III. 本製品以外に必要な試薬 (主なもの)

In-Fusion HD Cloning Kit シリーズ

(製品コード 639633 ~ 639635/639642 ~ 639644/639648 ~ 639650)

*E. coli* HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128)

*Mlu* I (製品コード 1071A) \*1

*Eco*52 I (*Xma* III) (製品コード 1039A) \*1

その他の制限酵素 \*2

NucleoSpin Plasmid (製品コード 740588.10/.50/.250) など、市販のプラスミド精製キット  
*B. subtilis* 形質転換用試薬 (VI-1-1. 試薬の準備 参照)

- \* 1 : 目的遺伝子を挿入した pBE-S DNA (SP DNA mixture 挿入用) の線状化に使用します。
- \* 2 : pBE-S DNA への目的遺伝子のクローニングに使用します。

## IV. 使用上の注意

- 本キットは、In-Fusion HD Cloning Kit と組み合わせて使用してください。さらに、高効率で形質転換体を得るため、*E. coli* HST08 Premium Competent Cells を使用することをおすすめします。
- SP DNA mixture は PCR 増幅した DNA fragment を混合し、調製しています。従って、頻度は低いですがプライマーダイマーなど PCR 増幅副産物がクローニングされる場合があります。

## V. 使用方法

### V-1. 発現プラスミドライブラリーの作製

In-Fusion 反応については In-Fusion HD Cloning Kit の、*E. coli* HST08 Premium Competent Cells を用いた形質転換については *E. coli* HST08 Premium Competent Cells の取扱説明書をご参照ください。

- (1) pBE-S DNA の分泌シグナルペプチド下流のマルチクローニングサイトに翻訳フレームが合うように目的遺伝子を挿入し、発現プラスミドを構築する (図 1、図 2 参照)。
- (2) (1) で構築した発現プラスミドを制限酵素 *Mlu* I および *Eco*52 I で完全消化し、精製する。<sup>\*1</sup>
  - \* 1: *Mlu* I と *Eco*52 I での同時切断はお勧めできませんので、順番に反応を行ってください。アガロースゲル電気泳動で目的 DNA 断片を単離後、ゲルから DNA を回収することをお勧めします。
  - なお、目的遺伝子の配列中に *Mlu* I あるいは *Eco*52 I 切断サイトが存在する場合は、PCR 増幅により発現プラスミドを線状化してください。プライマー設計については、VIII. トラブルシューティングを参照してください。
- (3) SP DNA mixture と (2) で制限酵素消化した発現プラスミドをモル比 2 : 1 で混合し、下記のように In-Fusion 反応液を調製する。<sup>\*2,3</sup>

線状化発現プラスミド ( <i>Mlu</i> I- <i>Eco</i> 52 I cut)	100 ng	y mol
SP DNA mixture	x $\mu$ l	2 × y mol
5 × In-Fusion HD Enzyme Premix	2 $\mu$ l	
滅菌精製水	up to 10 $\mu$ l	

- \* 2: 1 kb の目的遺伝子を pBE-S DNA に挿入した場合、発現プラスミド (*Mlu* I-*Eco*52 I cut) は約 6.8 kb となり、その 100 ng は約 0.022 pmol に相当します。
  - なお、反応に使用する発現プラスミド (*Mlu* I-*Eco*52 I cut) と SP DNA mixture の容量が 7  $\mu$ l を超える場合は、5 × In-Fusion HD Enzyme Premix を倍量用いて滅菌精製水により 20  $\mu$ l に調製してください。
  - \* 3: バックグラウンドのチェックのため、SP DNA mixture を入れない反応系も同時に行ってください。
- (4) 反応液をピペティングなどで混合する。
  - (5) 50°C で 15 分間反応後、氷上で静置する。
  - (6) *E. coli* HST08 Premium Competent Cells を使用直前に、氷中で融解する。
  - (7) 融解したら、穏やかに混和して均一にし、100  $\mu$ l のコンピテントセルを 14 ml 丸底チューブ (ファルコン・ラウンドチューブ等) に移す (ボルテックスは使用しない)。
  - (8) (3) の希釈済 In-Fusion 反応液 2  $\mu$ l を (7) のチューブに添加する。
  - (9) 氷中、30 分間静置する。
  - (10) 42°C で 45 秒間インキュベートする。
  - (11) 氷中、1 ~ 2 分間静置する。
  - (12) あらかじめ 37°C に保温しておいた SOC 培地を最終 1 ml になるように加える。
  - (13) 37°C で 1 時間振とうする (160 ~ 225 rpm)。
  - (14) アンピシリン (100  $\mu$ g/ml) を含む LB プレートに適量まく。
  - (15) 37°C で一晩培養する。<sup>\*4,5</sup>
    - \* 4: ライブラリーのサイズ確認のため、コロニー数のカウントをお勧めします。良好なプラスミドライブラリーを調製するには、2,000 以上のコロニーが必要と考えられます。(pBE-S DNA を用いて同様に作製したライブラリーでは、960 コロニーから 163 種類のシグナルペプチドの挿入を確認しています) 。
    - なお、得られるコロニー数は挿入した目的遺伝子によっても変動しますが、弊社で行った検討では、全量 (1 ml) のプレートングで 1,000 個以上のコロニーが得られました。十分なコロニー数が得られない場合は、形質転換のスケールアップを行ってください。
    - \* 5: バックグラウンドが高い時は、ステップ (2) からやり直してください。

(16) プレート上のコロニーを LB で懸濁して集め\*6、集菌後、プラスミドを精製してプラスミドライブラリーとする。\*7

\* 6：例) 角型プレート (140 × 104 × 16 mm) の場合、5 ml の LB 培地でコロニーを回収する。その後 3 ~ 5 ml の LB で 2 回洗浄を行なう。  
回収には、市販のコナラージ棒を使用すると便利です。

\* 7：通常、2,000 コロニーから 20  $\mu\text{g}$  以上のプラスミド DNA が精製できます。  
*B. subtilis* の形質転換には 0.1 ~ 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  濃度に調整してご使用ください。

## V-2. *B. subtilis* の形質転換

V-1 で得られたプラスミドライブラリーを用いて *B. subtilis* を形質転換し\*8、カナマイシン (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を含む選択培地プレートで発現形質転換体を選択する。

\* 8： *B. subtilis* の形質転換操作例を VI-1 に記載していますので、ご参照ください。

## V-3. *B. subtilis* 組換え体の解析

V-2 で得られたコロニーをカナマイシン (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を含む選択液体培地 (例えば、5 ml 培地で 37°C、24 時間 (~ 48 時間)) で培養し、培養上清中の目的タンパク質の発現量を活性測定や SDS- ポリアクリルアミドゲル電気泳動などで確認する。\*9

\* 9：発現量の多いクローンのシグナルペプチド配列をシーケンス解析するなど *B. subtilis* からプラスミドを精製する場合は、VI-2 をご参照ください。

# VI. Appendix

## VI-1. *B. subtilis* RIK1285 を用いた形質転換操作例

### VI-1-1. 試薬の準備

[1] 下記の試薬を調製し、オートクレーブ滅菌する。

• SP I salts (1 L あたり)

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6 g
Na-Citrate · 2H <sub>2</sub> O	1 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2 g

• Casamino Acids/Yeast Extract (100 ml あたり)

Casamino Acids	2 g
Yeast Extract	10 g

• 50% Glucose

• 50 mM CaCl<sub>2</sub>

• 250 mM MgCl<sub>2</sub>

• 100 mM EGTA

{エチレンジグリコールビス (β- アミノエチルエーテル) -N,N,N',N'- 四酢酸}

NaOH で pH7.0 に調整する。

[2] [1] で調製・滅菌した試薬を下記の組成で無菌的に混合する。

• SP I medium

SP I salts	10 ml
50% glucose	100 $\mu\text{l}$
Casamino Acids/Yeast Extract	100 $\mu\text{l}$

• SP II medium

SP I medium	5 ml
50 mM CaCl <sub>2</sub>	50 $\mu\text{l}$
250 mM MgCl <sub>2</sub>	50 $\mu\text{l}$

## VI-1-2. *B. subtilis* RIK1285 コンピテントセルの調製方法

- (1) 宿主菌株のグリセロールストックから適量を LB プレートに広げて、37℃で一晩（約 16 時間）培養する。
- (2) 一晩 LB プレートで培養した宿主菌株から、1 白金耳を 2 ml の LB 培地に植菌する。一晩（約 16 時間）、28℃、150～180 rpm で前培養する。
- (3) 5 ml の SP I medium に前培養液 50  $\mu$ l を加えて 37℃、170～180 rpm で培養する。
- (4) 培養開始 1 時間後より 30 分ごとに OD<sub>660</sub> を測定し、定常期に入ったところ（図 4：矢印付近）で培養を終了する\*<sup>1</sup>。  
\* 1：通常、約 5 時間で定常期に入ります。
- (5) 4.5 ml の SP II medium に (4) の培養液 0.5 ml を加えて 37℃、90～100 rpm、90 分間培養する。
- (6) 培養液に 50  $\mu$ l の 100 mM EGTA を加えて、さらに 5～10 分間、37℃、90～100 rpm で振とうする。
- (7) 培養液を 300  $\mu$ l ずつ 14 ml 丸底チューブに分注し、すぐに形質転換を行う。\*<sup>2</sup>  
\* 2：調製したコンピテントセルは保存できません。必ず用時調製してご使用ください。

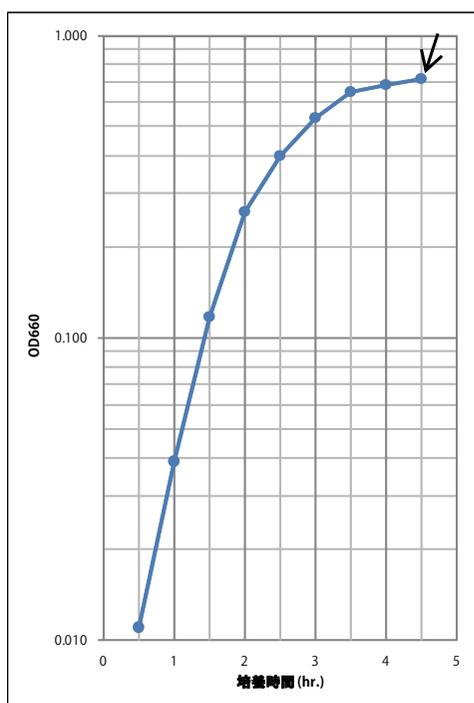


図 4. *B. subtilis* RIK1285 の増殖曲線

## VI-1-3. 形質転換方法

- (1) VI-1-2 で調製したコンピテントセル 300  $\mu$ l あたり 1  $\mu$ g の DNA 溶液を加える。
- (2) 37℃、90～100 rpm、90 分間培養する。
- (3) 培養液をカナマイシン（10  $\mu$ g/ml）を含む LB プレートにまく。37℃で一晩培養する。\*<sup>3</sup>  
\* 3：挿入されている目的遺伝子によって形質転換効率が異なります。コンピテントセル 300  $\mu$ l のプレーティングで十分なコロニー数が得られない場合は、（コンピテントセル 300  $\mu$ l あたり 1  $\mu$ g の DNA 溶液） $\times$  n 倍の容量で形質転換～プレーティングを行い、スクリーニングに十分なコロニー数を取得することをお勧めします。

---

## VI-2. *B. subtilis* からのプラスミド精製例 (NucleoSpin Plasmid 使用)

- (1) シングルコロニーをカナマイシン (10  $\mu\text{g/ml}$ ) を含む 5 ml の LB 培地に接種し、37°Cで一晩 (12 ~ 16 時間) 振とう培養する。
- (2) 培養液を 11,000  $\times g$  で 30 秒間遠心し、集菌する。
- (3) 終濃度 4 ~ 10 mg/ml になるように Lysozyme\*4 を加えた 250  $\mu\text{l}$  の Buffer A1 をペレットに加える。ボルテックスまたはピペティングでペレットを完全に懸濁し、懸濁液を 1.5 ml のマイクロチューブに移す。  
\* 4 : Lysozyme は NucleoSpin Plasmid には含まれていません。別途ご用意ください。
- (4) 37°Cで 30 分間放置する。
- (5) NucleoSpin Plasmid の取扱説明書に従い、Buffer A2 を加えるステップからプラスミドを精製する。

## VII. 実験例：超耐熱性酵素 $\beta$ -glycosidase に好適な分泌シグナルペプチドのスクリーニング

### 【方法】

*Pyrococcus furiosus* 由来  $\beta$ -glycosidase をコードする DNA を PCR で増幅し、pBE-S DNA の *Nde* I – *Xba* I サイトに挿入して発現プラスミドを構築した。その後、プロトコールに従って発現プラスミドライブラリーを作製した。このプラスミドライブラリー 1  $\mu$ g、2  $\mu$ g、4  $\mu$ g をそれぞれ「VI-1-2」に記載の方法で作製した *B. subtilis* RIK1285 コンピテントセル 300  $\mu$ l、600  $\mu$ l、1,200  $\mu$ l に添加し、「VI-1-3」に記載の方法で形質転換を行った。得られたコロニーのうち 470 個をカナマイシン (10  $\mu$ g/ml) を含む LB 培地 1 ml に植菌し、37°C で 24 時間培養後、培養上清の  $\beta$ -glycosidase 活性を合成基質を用いて測定した。さらに発現量の異なる 24 クロンのプラスミドを精製し、挿入された分泌シグナルペプチドの配列を解析した。

### 【結果】

プロトコールに従って発現プラスミドライブラリーを作製したところ、2,470 個のコロニーから 28  $\mu$ g のプラスミドが得られました。これを用いた *B. subtilis* RIK1285 の形質転換効率率は以下のようにになりました。

コンピテントセル量 ( $\mu$ l)	DNA 量 ( $\mu$ g)	コロニー数	形質転換効率 (colonies/ $\mu$ g DNA)
300	1	104	$1.0 \times 10^2$
600	2	244	$1.2 \times 10^2$
1,200	4	497	$1.2 \times 10^2$

ランダムにピックアップした 470 クロンの培養上清の  $\beta$ -glycosidase 活性を測定したところ、様々な強さの活性を示すクロンが得られていることが確認できました。

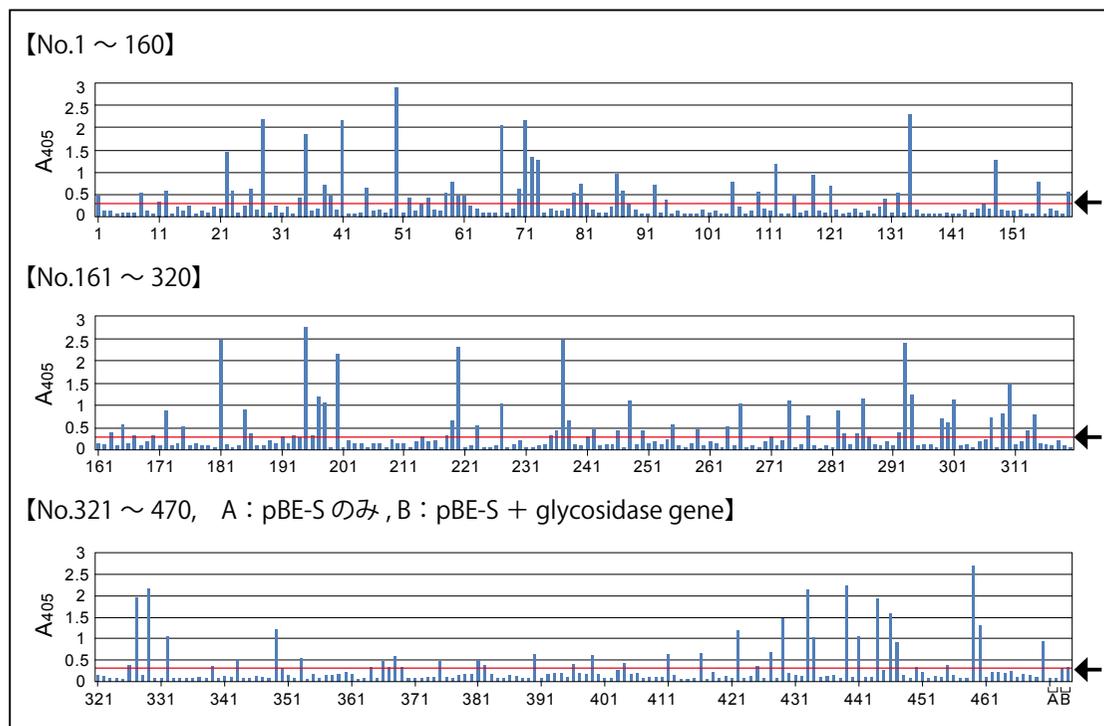


図 5. 470 クロンの  $\beta$ -glycosidase 活性測定結果  
 ← : *aprE* シグナルペプチドでの発現レベル

さらに、様々な活性のクローンのうち 24 クローンについてプラスミド DNA を調製してシーケンス解析を行いました。その結果、分泌シグナルペプチドとの組み合わせによって分泌発現量が異なる事がわかりました (表 1)。

表 1. 挿入されていたシグナルペプチド DNA

	signal peptide	クローン数	Clone No.
活性 強	<i>ywsB</i>	7	28, 71, 134, 181, 200, 433, 439
	<i>citH</i>	4	41, 50, 195, 459
	<i>phoB</i>	1	444
	<i>ybdG</i>	1	329
	( <i>aspB</i> ) *	1	293
活性 中	<i>ykwD</i>	2	45, 80
	<i>ybbE</i>	1	455
	<i>ywaD</i>	1	364
	<i>abnA</i>	1	307
活性なし	<i>lipB</i>	1	3
	<i>ybbR</i>	1	461
	<i>yopL</i>	1	120
	<i>ypbG</i>	1	320
	<i>ywmD</i>	1	383

\* : *aspB* シグナルペプチドが一部欠損した形。プライマーダイマー由来と考えられる。

このように、本製品により目的タンパク質の分泌発現に好適な分泌シグナルペプチドを選択することが出来ました。これらの中から、さらに 2 次スクリーニングを行うことにより、最適なシグナルペプチドを選択することが可能です。

---

## VIII. トラブルシューティング

1. In-Fusion 反応後、*E. coli* を形質転換した時のコロニー数が少ない。
  - V-1- (2) の *Mlu* I、*Eco*52 I による完全消化を電気泳動などで確認してください。消化が不十分の場合、バックグラウンドの上昇や形質転換効率の低下が起こります。
  - 高効率コンピテントセル *E. coli* HST08 Premium Competent Cells の使用をおすすめします。
  - 挿入されている目的遺伝子によっては、In-Fusion 反応条件を検討していただき、実験プロトコルを至適化していただく必要があります。詳細は In-Fusion HD Cloning Kit の取扱説明書をご参照ください。
2. *B. subtilis* RIK1285 を形質転換した時に、コロニー数が少ない。
  - 添付の pBE-S DNA 1  $\mu$ g を用いた時の形質転換効率をご確認ください。「VI-1」に記載の方法で形質転換を行った場合、通常  $3 \sim 8 \times 10^2$  colonies/ $\mu$ g の効率を得られます。形質転換効率が低いようであれば、再度コンピテントセルの調製を行ってください。
  - 挿入されている目的遺伝子によっては、形質転換効率が低下する場合があります。形質転換の反応容量を増やして、必要なコロニー数を確保してください。
3. 目的遺伝子配列中に *Mlu* I (あるいは *Eco*52 I) サイトがあり、発現プラスミドの線状化に制限酵素を使用できない。
  - PCR 増幅を行い、線状化した発現プラスミドを用意してください。下記のような *Mlu* I および *Eco*52 I を起点とするプライマーを合成し、Inverse PCR を行います。

[プライマー設計例]

M1-E1 プライマー対で Inverse PCR を行う。

*Mlu* I 起点のプライマー：

M1：5'- CGCGT CCCTC TCCTT TTGCT TAAGT TCAGA GTAG

*Eco*52 I 起点のプライマー：

E1：5'- GGCCG GTGCA CATAT GXXXX XXXXX XXXXX XXXX

(構築した発現プラスミドに応じて X の部分を追加し、34 塩基程度の長さとする。)

## IX. 参考文献

- 1) Brockmeier U, et al. *J Mol Biol.* (2006) **362**: 393-402.
- 2) Murayama R, et al. *Biosci Biotechnol Biochem.* (2004) **68** (8): 1672-1680.

## X. 関連製品

*Mlu* I (製品コード 1071A)  
*Eco*52 I (*Xma* III) (製品コード 1039A)  
In-Fusion® HD Cloning Kit シリーズ  
(製品コード 639633 ~ 639635/639642 ~ 639644/639648 ~ 639650)  
*E. coli* HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128)  
NucleoSpin Plasmid (製品コード 740588.10/.50/.250)  
NucleoSpin Plasmid QuickPure (製品コード 740615.10/.50/.250)  
pCold™ ベクターシリーズ (製品コード 3360 ~ 3365, 3371)

## XI. 注意

- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- In-Fusion は Takara Bio USA, Inc. の登録商標です。pCold はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

**テクニカルサポートライン**

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

---

**タカラバイオ株式会社**