

# 分泌タンパク質の大量生産に最適! ブレバチルス発現システム

## Brevibacillus Expression System

製品コード HB100 1 Set ¥120,000

タカラバイオではヒゲタ醤油株式会社で開発されたブレバチルス発現システムの販売を開始いたします。本システムで用いる *Brevibacillus choshinensis* はグラム陽性細菌で、タンパク質を大量に分泌発現します<sup>1)</sup>。この特長を活かし、宿主株、発現ベクターをタンパク質生産に最適化した本システムは、特に分泌タンパク質の生産において能力を発揮し、これまでに多数の活性型タンパク質の生産に成功しています。

### 本製品の概要と特長

(1) プロテアーゼ活性をほとんど示さない宿主株を使用  
本システムで宿主として用いる *B. choshinensis* は、プロテアーゼ活性をほとんど示さない株を基に、さらに、微弱な活性を示す2種のプロテアーゼ遺伝子を破壊し、タンパク質の生産性をより向上させています。培養上清中に生産された目的タンパク質は分解を受けることなく培養液中に蓄積させることができます。

(2) 活性型のタンパク質を生産可能

真核生物由来の分泌タンパク質はS-S結合を介し構造を維持するケースが多く、原核生物の発現系では活性型タンパク質としての生産が難しいといわれていますが、本ブレバチルス発現システムでは、活性型で分泌発現させることができます。これまでに、分泌タンパク質であるサイトカイン類を効率良く生産することに成功しており、これらすべてが活性を示すことも確認されています。

(3) 取り扱いが容易

宿主株は一般的な培養基材を用いることで、容易に培養することができます。また、孢子形成遺伝子の破壊により孢子形成が抑制されており、スケールアップ培養の殺菌時にも非常に有利です。

以上の特長を活かし、酵素、抗原、サイトカインなどの高発現を達成しており、表1には、これまでの成功例の一部を示しました。バクテリア、アーキア(古細菌)由来のタンパク質のほか、真核生物由来のタンパク質の生産実績もあり、由来を問わず高い実績を有しています。

### 内容

<i>Brevibacillus choshinensis</i> Electro-Cells	100 µl × 10
pNY326 DNA	10 µg
pNCMO2 DNA	10 µg
pNCMO2-BLA DNA(ポジティブコントロール)	1 µg

\*各コンポーネントは別売りもご用意しております。

(1) コンピテントセルについて

プラスミドDNAの宿主への導入を効率良く行うため、エレクトロポレーション用コンピテントセルの形態で供給されます。1 µg DNAあたり、10<sup>5</sup>程度の形質転換体を得られます。Tris-PEG法によって遺伝子を導入することはできますが、形質転換頻度がきわめて低いため(約10<sup>1</sup>/µg DNA)、クローニングには適しません。

表1 *B. choshinensis* 宿主-ベクター系による異種タンパク質の発現例

タンパク質	由来	発現ベクター	発現量(g/L)	遺伝子鎖長(kbp)	分子量(kDa)	
酵素	Sphingomyelinase	<i>Bacillus cereus</i>	その他	3.0	0.9	34.3
	キシラーナーゼ	<i>Bacillus halodurans</i>	pNY326	0.2	0.8	25.5
	CGTase	<i>Bacillus macerans</i>	その他	1.5 <sup>2)</sup>	2.1	74.0
	キトサナーゼ	<i>Bacillus circulans</i>	その他	1.4	0.8	29.0
	超耐熱性プロテアーゼ	<i>Aeropyrum pernix</i>	pNCMO2	0.1	1.2	41.0
	超耐熱性ヌクレアーゼ	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	pNCMO2	0.7	0.4	17.2
	PDI	ヒト	pNY326	1.0 <sup>3)</sup>	1.4	54.1
抗原	表層抗原	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	pNY326	0.9	1.2	46.5
	表層抗原	<i>Treponema pallidum</i>	その他	0.8	1.2	45.8
サイトカイン	IL-2	ヒト	その他	0.6 <sup>4)</sup>	0.4	15.4
	NGF	マウス	その他	0.2	0.4	13.2
	IFN-γ	ニワトリ	pNCMO2	0.5 <sup>5)</sup>	0.4	16.7
	TNF-	ウシ	その他	0.4	0.5	17.5
	GM-CSF	ウシ	その他	0.2	0.4	14.3
	GH	ヒラメ	その他	0.2	0.5	19.6

(2) pNCMO2 DNA ベクターについて

*B. choshinensis* - *E. coli* のシャトルベクターで、大腸菌を用いて発現ベクターの構築を行うことができます。*B. choshinensis* の細胞壁タンパク質に由来する強力なプロモーターおよび分泌シグナルを採用しています。

(3) pNY326 DNA ベクターについて

*B. choshinensis* 内で安定に保持される比較的サイズの小さいプラスミドベクターです。発現ベクターの構築は *B. choshinensis* を用いて行います。

pNCMO2 に比べ弱いプロモーターを採用しており、宿主に対してストレスとなるタンパク質を生産させるときに有効です。安定性が高いので、大量培養用の発現ベクターに適しています。

目的タンパク質の発現方法

発現用に設計したプライマーを用い、目的遺伝子を PCR によって増幅する。

発現用ベクターへのサブクローニング

(pNCMO2 は大腸菌、pNY326 は *B. choshinensis* Electro-Cells を使用)

シーケンスを確認

*B. choshinensis* に導入

ネオマイシンを含む培地でセレクション

コロニーを生産用培地に植菌し(試験管またはフラスコ) 48 ~ 64 時間、30 で振とう培養

培養上清をサンプリングし、SDS-PAGE で目的タンパク質の分泌生産を確認

実施例

pNCMO2 および pNY326 をそれぞれ用いた場合の実施例を以下に示します。

実施例 1 : pNCMO2 を用いて生産した

*Bacillus licheniformis* 由来アミラーゼ

ポジティブコントロールとして添付している pNCMO2-BLA DNA を用いて、分泌生産を実施しました。TMNm 培地\*を用いて、30、64 時間培養後、培養上清について、SDS-PAGE 分析を行いました。その結果、図 2 に示したように約 100 mg/L の生産が認められました。ポジティブコントロールとして、この生産量を目安とすることができます。

\* TMNm 培地 : 1% グルコース、1% ポリペプトン、0.5% 肉エキス、0.2% 酵母エキス、0.001% 硫酸鉄、0.001% 硫酸マンガン、0.0001% 硫酸亜鉛、50 μg/ml ネオマイシン

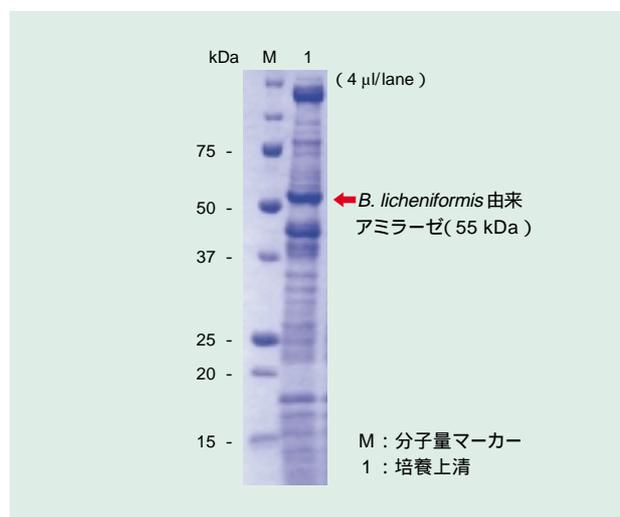


図 2 pNCMO2 を用いたアミラーゼの発現

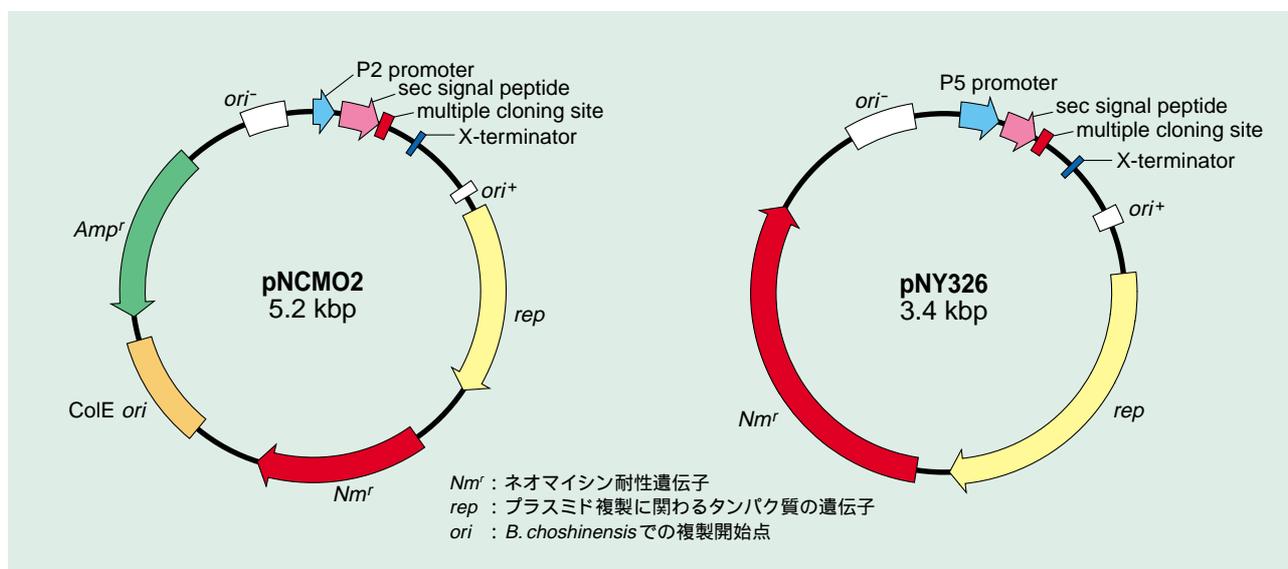


図 1 *Brevibacillus* 発現ベクター pNCMO2 および pNY326 の概略図

実施例 2 : pNY326 を用いて生産したサイトカイン  
 ウシ、ブタおよびヒト由来のサイトカインについて、本システムを用いて分泌生産を行いました。pNY326 DNA に目的遺伝子を導入し、*Brevibacillus* の形質転換を行いました。得られたコロニーからランダムに選んだ4株について、それぞれ試験管スケールでの生産を実施しました。TMNm培地を用い、30、48時間培養後、培養上清について、SDS-PAGE 分析を行いました。その結果、図3のような高生産(約200 mg/L)が得られ、コロニー間の生産量にバラツキは見られませんでした。このように、プレビバチルス発現システムにより安定かつ効率的な分泌生産が可能です。

#### 【参考文献】

- 1) Takagi, H., et al. (1989) *Agric. Biol. Chem.*, 53(3) 691-699.
- 2) Takano, T., et al. (1992) *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(5) 808-809.
- 3) Tojo, H., et al. (1994) *J. Biotechnol.*, 33(1) 55-62.
- 4) Takimura, Y., et al. (1997) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61(11) 1858-1861.
- 5) Yashiro, K., et al. (2001) *Expression and Purification*, 23, 113-120.

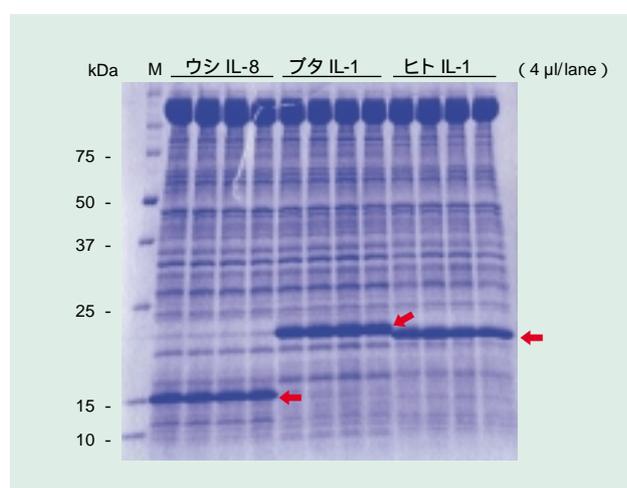


図3 pNY326 によるサイトカイン類の生産

#### 本稿でご紹介した製品

製品名	製品コード	容量	価格
プレビバチルス発現システム <i>Brevibacillus</i> Expression System	HB100	1 Set	¥120,000
コンピテントセル( エレクトロポレーション用 ) <i>Brevibacillus choshinensis</i> Electro-Cells	HB115	100 $\mu$ l $\times$ 10	¥50,000
発現ベクター			
pNY326 DNA	HB111	10 $\mu$ g	¥35,000
pNCMO2 DNA	HB112	10 $\mu$ g	¥35,000
コントロールベクター			
pNCOMO2-BLA DNA	HB113	1 $\mu$ g	¥20,000

本文中の製品に該当するライセンス確認事項は35ページをご覧ください。[6]

なお、プレビバチルス発現システムは、ご購入に際してライセンス同意書が必要です(詳しくはオンラインカタログをご覧ください)。

#### 【使用上のご注意】

*Brevibacillus* Expression System で宿主として用いる *B. choshinensis* Electro-Cells は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」の遺伝子組換え生物等に該当します。ご使用の際は、「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置を定める省令」(平成16年文部科学省・環境省令第1号)および組織内の安全委員会の指示に従ってください。