

# 枯草菌分泌シグナルペプチドの網羅的スクリーニングによる高効率分泌発現系の構築

## *B. subtilis* Secretory Protein Expression System

製品コード 3380 10回 ¥100,000

- 好適な分泌シグナルペプチドを173種類の中からスクリーニング可能
- In-Fusionクローニングで効率良くライブラリーを作製
- 取り扱いが簡単な*E. coli*と*B. subtilis*のシャトルベクターを採用

枯草菌(*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、宿主として用いる枯草菌は、大腸菌とは異なりエンドトキシンを産生しません。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スクリーニング/構築を行うためのシステムを開発しました。本システムを使用することで、*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し、効率の良い分泌発現系を構築することが可能です。

### ■ 内容

SP DNA mixture (0.032 pmol/μl)	45 μl
pBE-S DNA	20 μg
<i>B. subtilis</i> RIK1285* (glycerol stock)	100 μl × 2

\* Marburg 168 derivative: *trpC2*, *lys1*, *aprE*Δ3, *nprR2*, *nprE18*

### ■ 概要と特長

本システムは、*B. subtilis*の分泌シグナルペプチドの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株で構成されています。

SP DNA mixtureには、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クローニング用)が含まれています。

pBE-S DNAは、*B. subtilis*で機能するpUB110由来の複製oriとカナマイシン耐性遺伝子、*E. coli*で機能するpUC由来の複製oriとアンピシリン耐性遺伝子を搭載しています。本ベクターは*B. subtilis*由来のズ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)配列を利用しており、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。この分泌シグナルペプチド配列部分を、In-Fusion反応で173

種類の分泌シグナルペプチドのDNAライブラリーと置換することにより(図1)、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を行います。なお、MCSはpColdベクターと同じ配列のため、容易に目的遺伝子の乗せ換えを行うこともできます。

宿主として用いる*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>、異種タンパク質の分泌発現に適しています。

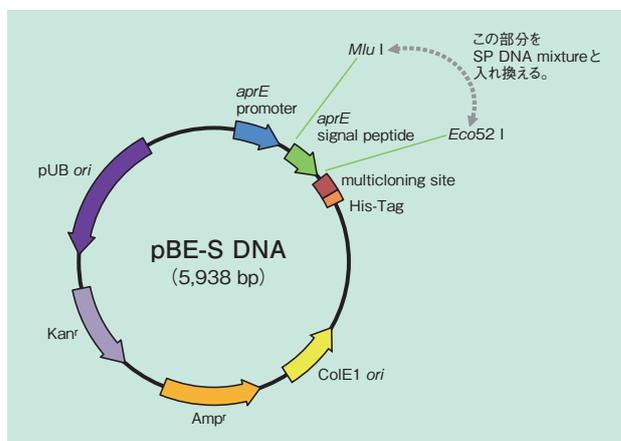


図1 pBE-S DNAの概略図

### ■ 好適な分泌シグナルペプチドのスクリーニング方法

目的遺伝子をpBE-S DNAのMCSに翻訳フレームを合わせて挿入し、発現用プラスミドを作製



発現用プラスミドを制限酵素Mlu IおよびEco52 Iで切断して線状化し、SP DNA mixtureとともにIn-Fusion反応を行い、分泌シグナルペプチドDNAを挿入



*E. coli* HST08 Premium Competent Cellsを形質転換(アンピシリンで選択)



形質転換体からプラスミドライブラリーを調製



*B. subtilis* (RIK1285など)を形質転換(カナマイシンで選択)



発現スクリーニングを行い、目的タンパク質の分泌発現に好適なクローンを選択

## ■ 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 に挿入して発現プラスミドを構築した。この発現プラスミドを制限酵素 *Mlu* I と *Eco*52 I で完全消化し、In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit を用いて SP DNA mixture を挿入した。形質転換には *E. coli* HST08 Premium Competent Cells を使用した。アンピシリンで選択した形質転換体 (約 2,500 コロニー) を集め、プラスミドを精製した。得られたプラスミドライブラリーを用いて *B. subtilis* RIK1285 を形質転換し、カナマイシンを含む LB プレートで形質転換体を選択した。得られたコロニーのうち 470 個について、カナマイシンを含む LB 培地で 37℃ で 24 時間培養し、培養上清の  $\beta$ -glycosidase 活性を測定した。

### 【結果】

470 クロンの培養上清について、合成基質を用いてそれぞれ  $\beta$ -glycosidase 活性を測定したところ、さまざまな活性のクローンが得られていることがわかりました (図 2、図 3)。この中には、pBE-S の *aprE* シグナルペプチド (図 3；赤色ライン) より活性が高いクローンも含まれていました。

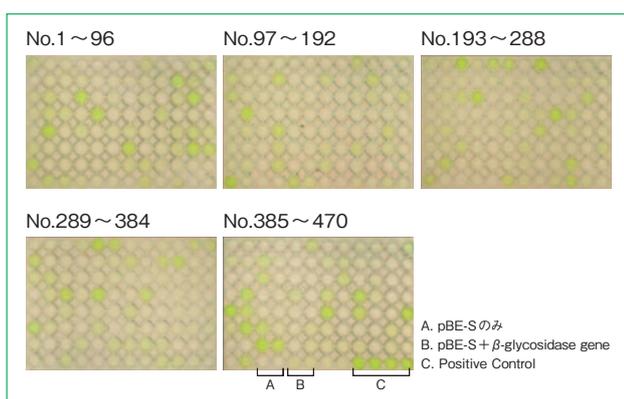


図2  $\beta$ -glycosidase の発現

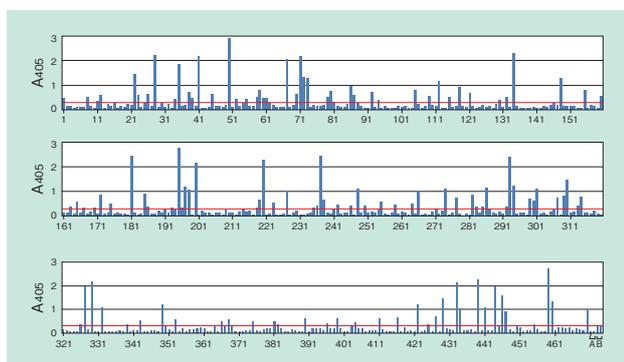


図3  $\beta$ -glycosidase 活性の測定

$\beta$ -glycosidase による合成基質の分解を、405 nm での吸光度で測定した。

A : pBE-Sのみ

B : pBE-S +  $\beta$ -glycosidase gene

さらに、さまざまな活性を示すクローンのうち 24 クローンについてプラスミド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ことがわかりました (表 1)。

表 1 挿入されていた分泌シグナルペプチド DNA

活性	シグナルペプチド	クローン数	クローン番号
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	1	293
中	<i>ykwD</i>	2	45, 80
	<i>ybbE</i>	1	455
	<i>ywaD</i>	1	364
	<i>abnA</i>	1	307
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

\* 1 : *aspB* シグナルペプチドが一部欠損した形。SP DNA mixture 作製時のプライマーダイマー由来と考えられる。

(注) 173 種類の分泌シグナルペプチドのアミノ酸配列や DNA 配列の情報は弊社ウェブカタログの本製品ページからダウンロードできます。

このように、本システムを用いて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できました。これらの中から、さらに二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。

### 【参考文献】

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

### ■ 関連製品

- *Mlu* I  
製品コード 1071A 1,000 U ¥9,500
- *Eco*52 I  
製品コード 1039A 200 U ¥10,500
- In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit  
製品コード 639619 10回 ¥21,000  
639620 50回 ¥98,000  
639621 100回 ¥168,000
- *E. coli* HST08 Premium Competent Cells  
製品コード 9128 1 Set (100  $\mu$ l  $\times$  10) ¥21,000

本文中の製品に該当するライセンス確認事項は 54 ~ 55 ページをご覧ください。

⑥ 46