

研究用

---

# TaKaRa

## *Brevibacillus* Expression System II

---

説明書

---

# 目次

I.	はじめに .....	3
II.	製品の内容 .....	4
III.	保存 .....	4
IV.	<i>Brevibacillus</i> 発現システムの概略 .....	4
	IV-1. 発現ベクターの選択 (1) pNCMO2 (2) pNY326	
	IV-2. 発現ベクターへのクローニング	
	IV-3. <i>Brevibacillus</i> の形質転換	
	IV-4. タンパク質生産の確認とスケールアップ	
V.	使用方法	
	V-1. <i>Brevibacillus</i> 菌株について .....	10
	V-1-1. 遺伝子型	
	V-1-2. コントロール DNA	
	V-1-3. <i>Brevibacillus</i> 組換え体の保存	
	V-2. <i>E. coli</i> 宿主 .....	10
	V-3. pNCMO2 を用いた発現ベクターの構築 .....	11
	V-3-1. pNCMO2 へのクローニング	
	V-3-2. pNCMO2/ <i>E. coli</i> 組換え体の解析	
	V-3-3. シーケンス	
	V-4. pNY326 を用いた発現ベクターの構築 .....	12
	V-4-1. pNY326 へのクローニング	
	V-4-2. <i>Brevibacillus</i> のトランスフォーメーション	
	V-4-3. <i>Brevibacillus</i> 組換え体の解析	
	V-5. <i>Brevibacillus</i> の形質転換 .....	13
	V-5-1. 準備	
	V-5-2. NTP 法による形質転換	
	V-6. <i>Brevibacillus</i> 組換え体を用いた目的タンパク質の発現 .....	14
	V-6-1. 概略	
	V-6-2. 培地	
	V-6-3. 培養生産 (分泌生産)	
	V-7. SDS-PAGE 分析 .....	14
	V-7-1. サンプルの調製	
	V-7-2. コントロール	
	V-7-3. タンパク質発現の解析	
	V-8. タンパク質生産の至適化 .....	15
	V-8-1. 生産量が低い場合	
	V-8-2. 生産が認められない場合	
	V-9. 目的タンパク質の精製 .....	16
	V-10. 培地組成 .....	16
VI.	関連製品 .....	17
VII.	参考文献 .....	17
VIII.	注意 .....	18

## I. はじめに

*Brevibacillus* (ブレビバチルス、*Bacillus brevis*) 発現システムは高効率分泌発現を特長とするタンパク質生産能に優れたシステムです。本菌はグラム陽性の細菌で、タンパク質を大量に分泌生産する特長を有しています<sup>1)</sup>。この特長を生かし、これまでに多数の異種タンパク質生産に成功してきました。本システムには以下に示すような特長があり、特に分泌タンパク質の生産において能力を発揮しています。

- ・大量のタンパク質を菌体外に分泌生産する
- ・プロテアーゼ活性をほとんど示さない
- ・活性型のタンパク質を生産する
- ・培養、滅菌が容易
- ・遺伝子操作が簡単
- ・安全な宿主

本システムによるタンパク質生産実績の一部を表1に示しました。酵素、抗原、サイトカインなどの高発現を達成しており、これらには全て活性があることを確認しています。また、バクテリア、古細菌、真核生物由来のタンパク質生産実績もあり、遺伝子の由来にかかわらず、高い実績を有しています。特に、真核生物由来の分泌タンパク質は通常 S-S 結合を介した構造を有しており、他の原核生物の発現系では一般に生産が難しいとされています。本宿主においては、分泌生産という特徴から S-S 結合を有するタンパク質でも効率的に生産できることが確認されています。

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	起源	発現量 (g/L)	文献
<b>Enzymes</b>			
$\alpha$ -アミラーゼ	<i>B. licheniformis</i>	3.7	
Sphingomyelinase	<i>B. cereus</i>	3.0	
キシラナーゼ	<i>B. halodurans</i>	0.2	
CGTase	<i>B. macerans</i>	5.0	
キトサナーゼ	<i>B. circulans</i>	1.4	
超耐熱性プロテアーゼ	<i>A. pernix</i>	0.1	
超耐熱性ヌクレアーゼ	<i>P. horikoshii</i>	0.7	
PDI	ヒト	1.0	3)
<b>抗原</b>			
表層抗原	<i>E. rhusiopathiae</i>	0.9	
表層抗原	<i>T. pallidum</i>	0.8	
<b>抗体</b>			
VHH (抗 NDOM)	ラマ	3.0	
scFv (抗 fluorescein)	マウス	0.2	
Fab (抗 erbB)	マウス	0.4	
<b>サイトカイン</b>			
EGF	ヒト	7.0	
NGF	マウス	0.2	
IFN- $\gamma$	ニワトリ	0.5	5)
TNF- $\alpha$	ウシ	0.4	
GM-CSF	ウシ	0.2	
GH	ヒラメ	0.2	

---

本宿主は形質転換効率が高いため、遺伝子操作を簡単に行うことができます。大腸菌とのシャトルベクターを用いて、発現ベクターを大腸菌内で構築する方法や、ライゲーション DNA を直接、発現宿主に導入することも可能です。

目的タンパク質の培養生産には性質の異なる 2 種類の培地 (V-10. 培地組成参照) を用います。試験管やフラスコを用いて振とう培養を行い、培養上清を遠心分離によって回収することにより、簡単に目的タンパク質を得ることができます。菌体の破碎工程などが必要ないため、遠心による除菌操作により清澄な上清画分から目的タンパク質が得られ、後の精製工程に有利です。

## II. 製品の内容

*Brevibacillus* Expression System II (製品コード HB200)

[ Components ]

- 発現ベクター
  - pNY326 DNA 10  $\mu$ g (200 ng/ $\mu$ l)
  - pNCMO2 DNA 10  $\mu$ g (200 ng/ $\mu$ l) (製品コード HB112)
- コントロールベクター
  - pNY326-BLA DNA 1  $\mu$ g
- コンピテントセル
  - Brevibacillus* Competent Cells (製品コード HB116)
    - *Brevibacillus* Competent Cells 100  $\mu$ l  $\times$  10
    - MT medium 1 ml  $\times$  10
    - Solution A 1 ml  $\times$  1
    - Solution B 1 ml  $\times$  2

## III. 保存

発現ベクター	pNY326 DNA、pNCMO2 DNA	− 20°C
コントロールベクター	pNY326-BLA DNA	− 20°C
コンピテントセル	<i>Brevibacillus</i> Competent Cells	− 80°C
MT medium、Solution A、Solution B		− 80°C

## IV. *Brevibacillus* 発現システムの概略

本製品を使って、目的タンパク質を分泌生産させるまでの実験の流れを以下に示します。

### IV-1. 発現ベクターの選択

#### (1) pNCMO2

pNCMO2 は *Brevibacillus* と大腸菌のシャトルベクターです。そのため、大腸菌内で発現プラスミドを構築後、*Brevibacillus* に導入し、発現試験に進むことができます。pNCMO2 の発現プロモーターには宿主菌の細胞壁タンパク質由来の P2 プロモーターを用いています。P2 プロモーターは大腸菌内では働かないため、目的遺伝子のクローニングに有利です。しかし、*Brevibacillus* においては非常に強いプロモーターとして働きます。従って、*Brevibacillus* での効率的なタンパク質生産を行うことができます。

注： P2 プロモーターの強力なプロモーター活性が、形質転換体の生育を妨げてしまう場合があります。そのような場合は、pNY326 ベクターの使用をご検討ください。

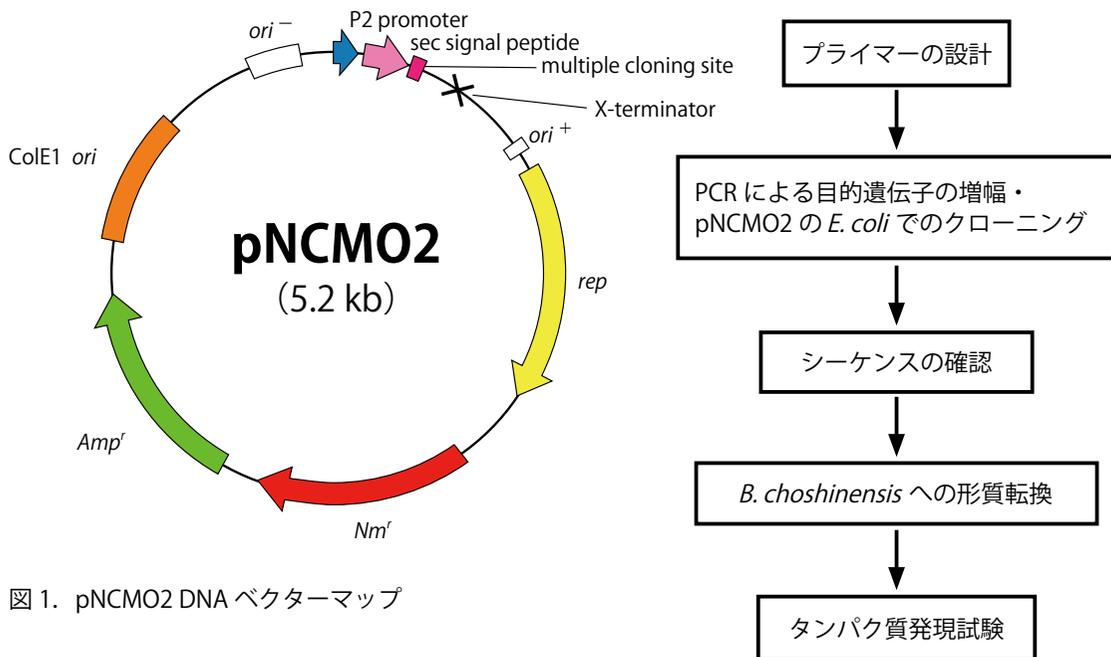


図 1. pNCMO2 DNA ベクターマップ

< pNCMO2 のベクター情報 >

プロモーター	細胞壁タンパク質遺伝子の 5' 配列の一部を使用。大腸菌ではほとんど活性がない。 <i>Brevibacillus</i> 内では強力に発現する。
分泌シグナル	汎用性を高める為、改変型の分泌シグナルを使用
マルチクローニングサイト	11 個の制限酵素切断部位
ターミネーター	マルチクローニングサイトの下流に 46 bp からなるターミネーター構造が導入されている。
<i>Rep</i>	プラスミド複製に関わるタンパク質 (pUB110 由来)
<i>Ori</i>	プラスミド複製開始点 (pUB110 由来)
<i>Nm<sup>r</sup></i>	ネオマイシン耐性遺伝子 選択マーカー ( <i>Brevibacillus</i> )
<i>ColE1 Ori</i>	pUC の複製開始点
<i>Amp<sup>r</sup></i>	アンピシリン耐性遺伝子 選択マーカー (大腸菌)

< pNCMO2 のプロモーター領域からマルチクローニングサイト周辺の塩基配列 >

AAGGCGCCGCAACTTTTGATTCGCTCAGGCGTTTAATAGGATGTAATTGTGAGCGGATAA 120  
P2-35 P2-10 lac operator

CAATTATTCTGCATGGCTTTCCTGCGAAAGGAGGTGACACGCGCTTGCAGGATTCGGGCT 180  
SD 1 Forward Sequencing Primer

TTAAAAAGAAAGATAGATTAACAACAAATATTCCCCAAGAACAATTTGTTTATACTAGAG 240  
SD 2

GAGGAGAACACAAGGTCATGAAAAAAAAAGAAGGGTCGTTAACAGTGTATTGCTTCTGCTAC 300  
M K K R R V V N S V L L L L

TGCTAGCTAGTGCACCTCGCACTTACTGTTGCTCCCATGGCTTTCGCTGCAGGATCCGCTCG 360  
L L A S A L A L T V A P M A F A ▲ Signal cleavage

クローニングサイト  
Xba I Xho I EcoRI Kpn I Sma I BstBI Cla I Hind III  
ACTCTAGACTCGAGGAATTCGGTACCCCGGGTTCGAAATCGATAAGCTTCGGCATTATAG 420

TGCGGAGGCTTTTTTCGCATGCAGGTAGGGAACAATTACATTGTCTTTGATTGTAAAATG 480  
Reverse Sequencing Primer

P2プロモーターは細胞壁タンパク質合成の主要なプロモーターです。このプロモーターの直ぐ上流には lac オペレーター配列を導入し、大腸菌内でのプロモーター活性を制御しています。SD 配列\*は 2ヶ所存在し (SD1、SD2)、同じフレームで翻訳されます。

\* SD 配列：リボソーム結合サイト

(2) pNY326

pNY326は *Brevibacillus* 内で複製するプラスミドで、大きさが 3.4 kb と比較的小さく、pNCMO2 よりもプロモーター活性は弱めであるため、宿主内で非常に安定に保たれ、発現産物が宿主に対してストレスとなる場合には効果的です。このベクターを用いることにより、良好な生育を示し、生産量が向上する場合があります。植え継ぎ等による生産量の変動が少ないため、ラージスケールでの培養に適しています。 *Brevibacillus* 専用ベクターである為、宿主菌を用いて直接クローニングをする必要があります。

高い形質転換効率が要求される為、高効率が得られるコンピテントセル (*Brevibacillus* Competent Cells) ( $10^5$  transformants/ $\mu$ g DNA) の利用をお勧めします。

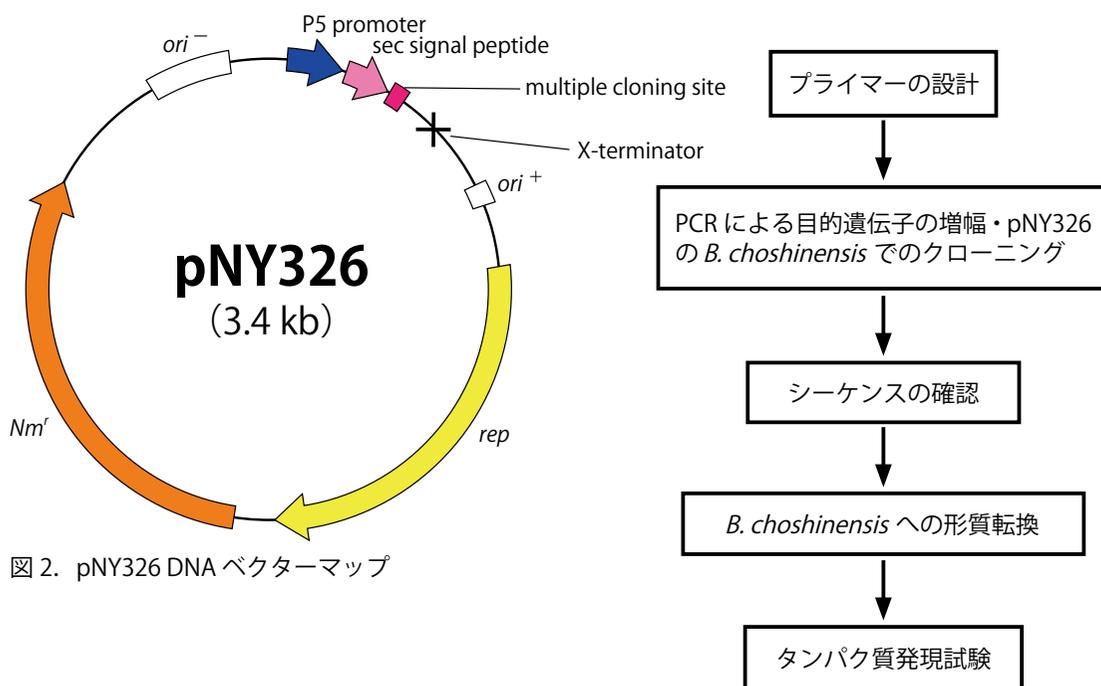


図 2. pNY326 DNA ベクターマップ

< pNY326 のベクター情報 >

プロモーター	細胞壁タンパク質遺伝子の 5' 配列の一部を使用。 <i>Brevibacillus</i> 内で発現する。
分泌シグナル	汎用性を高める為、改変型の分泌シグナルを使用
マルチクローニングサイト	11 個の制限酵素切断部位
ターミネーター	マルチクローニングサイトの下流に 26 bp からなるターミネーター構造が導入されている。
Rep	プラスミド複製に関わるタンパク質 (pUB110 由来)
Ori	プラスミド複製開始点 (pUB110 由来)
Nm <sup>I</sup>	ネオマイシン耐性遺伝子 選択マーカー ( <i>Brevibacillus</i> )

< pNY326 のプロモーター領域からマルチクロニングサイト周辺の塩基配列 >

CAGGGGAATATACTAGAGATTTTAAACACAAAAAGCGAGGCTTTCCTGCGAAAGGAGGTG 60  
P5-35 P5-10 SD1

ACACGCGCTTGCAGGATTCGGGCTTTAAAAAGAAAGATAGATTAACAACAAATATTCCCC 120  
Forward Sequencing Primer

AAGAACAATTTGTTTATACTAGAGGAGGAGAACACAAGGTCATGAAAAAAGAAGGGTCTG 240  
fm SD2 M K K R R V  
sec signal peptide

TTAACAGTGTATTGCTTCTGCTACTGCTAGCTAGTGCACCTCGCACTTACTGTTGCTCCCA 300  
V N S V L L L L L A S A L A L T V A P

クローニングサイト  
PstI BamHI SalI XbaI XhoI EcoRI KpnI SmaI BstBI  
TGGCTTTCGCTGCAGGATCCGTCGACTCTAGACTCGAGGAATTCGGTACCCCGGGTTCGA 360  
M A F A ▲ Signal cleavage

ClaI HindIII  
AATCGATAAGCTTAACAGGATGCGGGGAGCCCGCTCCGTCGCCCCCTGCGGGGGGCT 420

TCCGTATGCGGCAGGCATCCCCTCGCATGCAGGTAGGGAACAATTACATTGCTTTTGATT 480  
Reverse Sequencing Primer

P5 プロモーターは *Brevibacillus* において比較的弱いプロモーター活性を示します。  
SD 配列\*は 2ヶ所存在し (SD1、SD2)、同じフレームで翻訳されます。

\* SD 配列：リボソーム結合サイト

## IV-2. 発現ベクターへのクローニング

発現ベクターには細胞壁タンパク質由来の分泌シグナルを採用しています。分泌シグナルの切断部位の下流に目的遺伝子を挿入するように設計します。シグナルペプチド上および、その下流のマルチクローニングサイト上の2種類の制限酵素部位を用いることによって、インサートを目的の方向にクローニングできます。

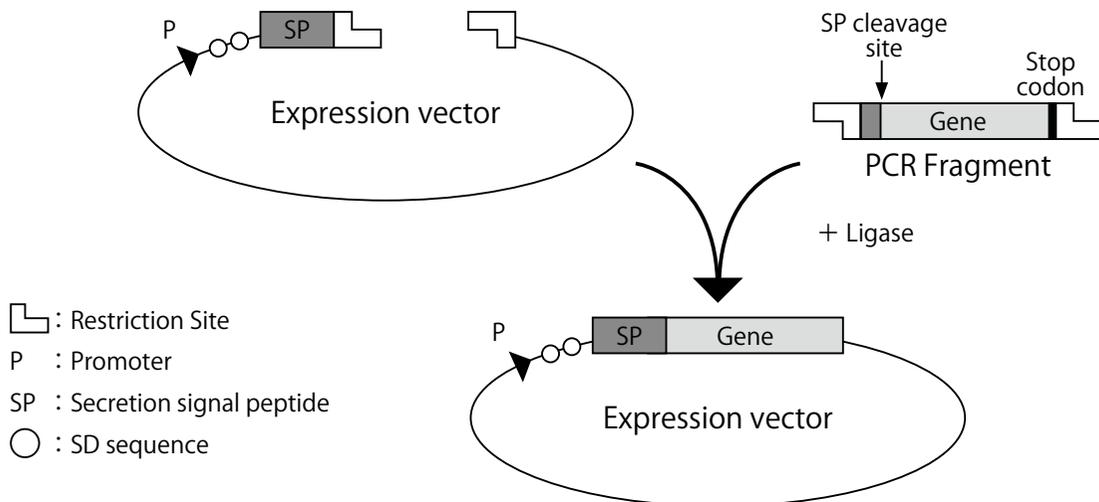


図3. *B. choshinensis* 発現ベクターの構築

## IV-3. *Brevibacillus* の形質転換

*Brevibacillus* の形質転換は NTP 法 (New Tris-PEG 法) によって行います。セレクションはネオマイシン耐性によって行います。シャトルベクターを用いて大腸菌でサブクローニングする場合は、アンピシリン耐性によってセレクションできます。

## IV-4. タンパク質生産の確認とスケールアップ

ネガティブコントロールとポジティブコントロール (pNY326-BLA : *Bacillus licheniformis* 由来  $\alpha$ -アミラーゼ) を用い、目的タンパク質の発現を確認します。目的タンパク質発現プラスミドを導入した形質転換体をピックアップし、指定の液体培地で振とう培養することにより、48 ~ 64 時間で目的のタンパク質が得られます。培養上清を SDS-PAGE 等で解析することにより、発現の有無が確認できます。生産量上げるためには、スケールアップを行ってください。*Brevibacillus* のラージスケールでの培養は比較的容易です。

---

## V. 使用方法

### V-1. *Brevibacillus* 菌株について

*B. choshinensis* は GILSP 自動化リストに掲載されている安全性の高い宿主です。遺伝子操作も簡単で、基本的な遺伝子工学的手法を用いることができます。

#### V-1-1. 遺伝子型

*B. choshinensis* SP3 は孢子形成関連遺伝子が破壊されており、滅菌が簡単に行えます。また、わずかに活性を示していた菌体内プロテアーゼ遺伝子 (*imp*)、菌体外プロテアーゼ遺伝子 (*emp*) が破壊されており、生産された目的タンパク質の分解を最小限に抑えています。

#### V-1-2. コントロール DNA

pNY326-BLA：分泌発現のポジティブコントロールです。約 55 kDa のタンパク質 (*Bacillus licheniformis* 由来  $\alpha$ -アミラーゼ) で、0.1 g/L 以上の生産が確認できます。

#### V-1-3. *Brevibacillus* 組換え体の保存

短期間の保存 (1 週間程度)

1. シングルコロニーをピックアップし、MTNm プレート (V-10. 培地組成参照) に塗抹する。
2. 30°C、一晩培養。
3. プレートをシールし、室温 (20°C 前後) にて保存。

【注意】冷蔵保存は厳禁。

長期間の保存 (1 ヶ月以上)

1. シングルコロニーをピックアップし、2SYNm 培地 (V-10. 培地組成参照) に植菌し、一晩振とう培養する。
2. 等量の LB 培地 (40% グリセロール含む) を添加し、凍結保存用バイアルに分注する。
3. -80°C で凍結保存する。
4. 使用する場合は 1 本を融解し、そのまま液体培地に植菌する。  
植菌の目安：培地液量に対して 0.1 ~ 1% の範囲

【注意】凍結融解は最小限とする。

### V-2. *E. coli* 宿主

pNCM02 には、大腸菌内でのプロモーター活性を弱める為、*lac* オペレーターを導入してあります。そのため、F 因子 (*lacI<sup>q</sup>*) が組み込まれている JM109 のような宿主を用いる必要があります。参考に JM109 の遺伝子型を以下に示しました。

JM109 : *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* ( $r_K - m_K +$ ), *e14 -* (*mcrA -*), *supE44*, *relA1*,  $\Delta$  (*lac-proAB*) /F' [*traD36*, *proAB +*, *lacI<sup>q</sup>*, *lacZ*  $\Delta$  M15]

### V-3. pNCM02 を用いた発現ベクターの構築

< pNCM02 を用いて発現ベクターを構築する際の手順と注意点 >

プラスミド構築に用いる大腸菌宿主には JM109 のような *lacI<sup>q</sup>* を持ち、かつ *recA<sup>-</sup>* の株をお勧めします。

インサートは分泌シグナルの下流にフレームを合わせてクローニングします。

クローニングする目的遺伝子の最後に stop codon を導入します。

バクテリア由来の分泌タンパク質の発現を行う場合は、オリジナルの分泌シグナルを用いた方が良い結果が得られる場合もあります。この場合は pNY326 ベクターを用いる必要があります。

#### V-3-1. pNCM02 へのクローニング

< PCR による遺伝子の増幅 >

分泌シグナルの下流に目的遺伝子を挿入できるように、プライマーを設計します。発現ベクターにあわせて 2 種類の制限酵素サイトを PCR 産物の両端に導入し、方向性を持たせ、PCR によって目的遺伝子を増幅させます。PCR 条件はそれぞれの遺伝子や PCR 酵素にあわせて設定してください。PCR には高い正確性をもつ High-Fidelity PCR 酵素 (PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase (製品コード R045A) など) をお勧めします。

< ライゲーションによる発現ベクターの構築 >

インサートおよびベクター 0.5 ~ 1.0  $\mu\text{g}$  を 2 種類の制限酵素で処理します。それぞれをアガロースゲル電気泳動し、目的断片を回収・精製します。

精製 DNA それぞれ 100 ng 用い、ライゲーション試薬 (DNA Ligation Kit < Mighty Mix > (製品コード 6023) など) を用いて反応させます。反応液の一部を、大腸菌のトランスフォーメーションに用います。

< In-Fusion<sup>®</sup> クローニングシステムを用いたクローニング >

Clontech 社の In-Fusion HD PCR Cloning Kit を用いると、適切な制限酵素サイトが存在しない場合でも、簡単・迅速にディレクショナルクローニングが行えるので便利です。In-Fusion クローニングシステムのプロトコールに従って実施してください。

< 大腸菌の形質転換 >

形質転換効率の高いクローニング用の宿主大腸菌を用います。

*E. coli* JM109 Competent Cells (製品コード 9052)、*E. coli* JM109 Electro-Cells (製品コード 9022) などをご使用ください。

#### V-3-2. pNCM02 / *E. coli* 組換え体の解析

形質転換後の混合液 100 ~ 200  $\mu\text{l}$  を 50 ~ 100  $\mu\text{g/ml}$  のアンピシリンを含む LB プレートに播きます。15 ~ 18 時間、37°C で培養します。

アンピシリン耐性のコロニーを 10 ~ 20 個選び、2 ml の LB 培地 (50 ~ 100  $\mu\text{g/ml}$  のアンピシリンを含む) に植菌します。

37°C で 15 ~ 18 時間培養後、菌体を集めます。市販のキットを用いてプラスミドを抽出します。通常、1.5 ~ 3  $\mu\text{g}$  の DNA が回収できます。

適当量の DNA を用い、制限酵素による切断を行います。通常はクローニングに用いた制限酵素を用いて消化し、アガロースゲル電気泳動によって、インサートの有無を確認します。

インサートが含まれていることを確認したら、シーケンスを行います。目的の遺伝子が挿入されているか、PCR によりエラーが挿入されていないかを調べる必要があります。

#### V-3-3. シーケンス

シーケンスの確認には以下の Forward および Reverse プライマー配列が利用できます。(プライマー配列は pNCM02、pNY326 共通です。)

Forward Sequencing Primer : 5'-CGCTTGCAGGATTCGG-3'

Reverse Sequencing Primer : 5'-CAATGTAATTGTTCCCTACTGTC-3'

---

## V-4. pNY326 を用いた発現ベクターの構築

< pNY326 を用いて発現ベクターを構築する際の手順と注意点 >

プラスミド構築には *Brevibacillus* Competent Cells を用います。形質転換頻度の高いコンピテントセルを使用する必要があります。

インサートは分泌シグナルの下流にフレームを合わせてクローニングします。

クローニングする目的遺伝子の最後に stop codon を導入します。

バクテリア由来の分泌タンパク質の発現を行う場合は、*Brevibacillus* 由来分泌シグナルの他にオリジナルの分泌シグナルも試してみることをお勧めいたします。この場合は *Bsp*HI サイト上のスタートコドンから in-frame でクローニングします。

pNCMO2 で発現できない場合や製造用宿主として高い安定性が要求される場合などは pNY326 が有効です。

### V-4-1. pNY326 へのクローニング

< PCR による遺伝子の増幅 >

分泌シグナルの下流に目的遺伝子を導入できるように、プライマーを設計します。

発現ベクターにあわせて 2 種類の制限酵素サイトを PCR 産物の両端に導入し、方向性を持たせ、PCR によって目的遺伝子を増幅させます。PCR 条件はそれぞれの遺伝子や PCR 酵素にあわせて設定してください。PCR には高い正確性をもつ High-Fidelity PCR 酵素 (PrimeSTAR Max DNA Polymerase (製品コード R045A) など) をお勧めします。

< ライゲーションによる発現ベクターの構築 >

インサートおよびベクター 0.5 ~ 1.0  $\mu$ g を 2 種類の制限酵素で処理します。それぞれをアガロースゲル電気泳動し、目的断片を回収、精製します。

精製 DNA それぞれ 100 ng を用い、ライゲーション試薬 (DNA Ligation Kit < Mighty Mix > (製品コード 6023) など) で反応させます。反応液を *Brevibacillus* へのトランスフォーメーションに用います。

### V-4-2. *Brevibacillus* のトランスフォーメーション

形質転換頻度の高いクローニング用の宿主を用います (*Brevibacillus* Competent Cells の利用をお勧めします)。形質転換方法は V-5. *Brevibacillus* の形質転換をご参照ください。

### V-4-3. *Brevibacillus* 組換え体の解析

- (1) MTNm プレートにてセレクションしたコロニーからランダムに 10 ~ 20 個を選び、2 ml の TMNm 培地に植菌します。  
コロニーの大きさに大小が出る場合は、両方のコロニーを選択するようにしてください。  
スクリータイプのキャップを用いる場合は、キャップを緩めて使用してください。培地がしっかりと揺れるように試験管の傾きを調整してください。
- (2) 37°C で 15 ~ 18 時間培養後、菌体を集めます。市販のキットを用いて、プラスミドを抽出します。通常 1 ~ 2  $\mu$ g の DNA が回収できます。
- (3) 適量の DNA を用い、制限酵素による切断を行います。通常はクローニングに用いた制限酵素を用いて消化し、アガロースゲル電気泳動によって、インサートの有無を確認します。
- (4) インサートが含まれていることを確認したら、シーケンスを行います。目的の遺伝子が挿入されているか、PCR によりエラーが挿入されていないかを調べる必要があります。(シーケンスの際のプライマー配列は、V-3-3. シーケンスをご参照ください。)

---

## V-5. *Brevibacillus* の形質転換

### V-5-1. 準備

*Brevibacillus* Competent Cells (製品コード HB116)

(内容) *Brevibacillus* Competent Cells  
MT medium  
Solution A  
Solution B

目的遺伝子発現用プラスミド

ポジティブコントロール用プラスミド (pNY326-BLA)

ネガティブコントロール用プラスミド (pNY326 または pNCMO2)

MTNm プレート

培養用チューブ\*

滅菌済みマイクロチューブ

\*：例として、14 ml 丸底滅菌チューブ (ファルコン・ラウンドチューブ等) を推奨します。

### V-5-2. NTP 法による形質転換

- (1) Solution A、Solution B、MT 培地を融解しておく。
  - (2) *Brevibacillus* Competent Cells を 37°C 温水中で急速解凍 (30 秒程度) する。
  - (3) 微量遠心機により集菌 (12,000 rpm、30 秒～1 分) し、上清をマイクロピペットで除去する。
- 以下は、室温で操作を行ってください。—
- (4) 5  $\mu$ l 以下の量に調製した DNA 溶液\*<sup>1</sup> と 50  $\mu$ l の Solution A を混合する。
  - (5) 混合した DNA 溶液を (3) のチューブに全量加え、ボルテックスにより菌のペレットを完全に懸濁する。\*<sup>2</sup>
  - (6) そのまま 5 分間静置する。
  - (7) 150  $\mu$ l の Solution B (PEG 溶液) を加え\*<sup>3</sup>、液が均一になるまで (5～10 秒) ボルテックスにより混和する。
  - (8) 微量遠心機により集菌 (5,000 rpm、5 分) し、上清を除去する。
  - (9) 再度、軽く遠心 (5,000 rpm、30 秒程度) し、完全に上清を除去する。
  - (10) 1 ml MT 培地を加え、マイクロピペットを使って完全に懸濁する。
  - (11) 菌を懸濁した培養液を培養用チューブに移し、37°C、120 rpm で 2 時間振とうする。
  - (12) MTNm プレートに播き、37°C で一晩培養する。
  - (13) 得られたコロニーをプラスミド解析またはタンパク質発現実験に用いる。

\* 1：ライゲーション反応液を用いる場合は、反応液 5  $\mu$ l をそのまま、Solution A と混合してください。精製プラスミドを用いる場合は、10～100 ng 使用してください。

\* 2：菌の分散が不足すると形質転換効率が低下しますので十分に懸濁してください。

\* 3：Solution B (PEG 溶液) は粘性が高いため、1,000  $\mu$ l 用のマイクロピペットを使用してゆっくり吸い上げてください。

---

## V-6. *Brevibacillus* 組換え体を用いた目的タンパク質の発現

発現用宿主が完成したら、小スケールでのタンパク質発現試験を行います。ここでは一般的な発現確認手法を示します。

### V-6-1. 概略

発現用形質転換体の作製を確認したら、ポジティブコントロールおよびネガティブコントロールを用い、発現試験を実施します。それぞれのコントロールには以下の形質転換体を用います。

*B. choshinensis* SP3/pNY326-BLA 分泌発現のコントロール

*B. choshinensis* SP3/pNCMO2 or pNY326 (ベクターのみ) バックグラウンドコントロール

目的のタンパク質によっては形質転換体間で生産性が異なる恐れがあります。また、コロニーの大きさに違いが生じる場合もあります。そこで、発現試験にはランダムに(大小コロニーを含む)6～10コロニーを選んで、試験管培養を実施します。形質転換後のプレートを数日放置しますと生産能が低下する恐れがあります。そのような場合は、再度形質転換を行い、新たに形質転換体を調製してください。

### V-6-2. 培地

TM 培地および 2SY 培地を発現試験のベース培地として用います。培地によって生産性に違いが生じる可能性があります。生産性と生育のバランスが重要となりますので、まず、両培地を用いて生産性を確認します。

### V-6-3. 培養生産(分泌生産)

発現コントロールとして *B. choshinensis* SP3/pNY326-BLA を用い、*Bacillus licheniformis* 由来  $\alpha$ -アミラーゼ(約 55 kDa) の生産を確認することによって培養生産試験の条件が適切かどうか確認します。同時に発現用形質転換体とネガティブコントロールを培養し、これらの対比によって生産の確認を行います。

以下に発現試験プロトコールを示しました。

- (1) 3 ml の 2SYNm および TMNm 液体培地を分注した試験管 ( $\phi$  16 mm) にシングルコロニーを選び、植菌する。30～33℃、120 rpm、48～64 時間振とう培養を行う。十分に通気が行えるようにキャップを緩め、試験管の傾きを調整する。  
この際、24 時間ごとにサンプリングし、目的タンパク質の生産を確認する。
- (2) 培養終了後、遠心分離 (5000 × *g*、5 分間) によって上清画分を分離する。沈殿画分は等量の PBS\* で懸濁する。
- (3) 培養上清および沈殿画分について、SDS-PAGE (CBB 染色または Western blotting) や活性測定によって評価を行う。

\* : PBS Tablets (製品コード T900) を用いて調製すると便利です。

## V-7. SDS-PAGE 分析

目的タンパク質の分離に適した SDS-PAGE 用のゲルを用い、電気泳動を行います。

### V-7-1. サンプルの調製

培養上清および沈殿懸濁液 40  $\mu$ l に 10  $\mu$ l の 5 × SDS-PAGE ローディングバッファーを加えます。

混合後、100℃、10 分間加熱処理し泳動用サンプルとします。

---

## V-7-2. コントロール

コントロールとして以下のサンプルを用います。

- a. 分子量マーカー
- b. 目的タンパク質スタンダード
- c. インサートを含まない発現用ベクターを導入した *B. choshinensis* SP3 の培養液サンプル (バックグラウンドコントロール)
- d.  $\alpha$ -amylase (約 55 kDa) を発現させた *B. choshinensis* SP3/pNY326-BLA の培養液サンプル (分泌発現のコントロール)

## V-7-3. タンパク質発現の解析

目的タンパク質のスタンダードと培養上清を SDS-PAGE ゲル上で比較することにより生産の有無を確認することができます。生産性が低い場合、可溶性が低い場合、バックグラウンドタンパク質にマスクされてしまっている場合などは検出が難しい場合があります。このような場合は、特異的抗体を用いたウエスタンブロットティングや機能性の評価 (活性測定など)、特別な精製方法がある場合などは精製を実施し、生産性の確認を行ってください。

## V-8. タンパク質発現の至適化

これまで、タンパク質発現にトライしてきた結果によると、30～40%の確率で発現に成功しています。いくつかは 1 mg/ml を超える高発現を達成しており、大部分は 100  $\mu$ g/ml 以上の生産性を示しています。もし、これらと比較して生産性が低いか、または生産が認められない場合は以下のガイドラインをご参照ください。

### V-8-1. 生産量が低い場合

- a. BIC System (製品コード HB300) の使用をご検討ください。成功率が 20～30% 向上します。
- b. プロモーター活性を変えるために両方のベクター (pNCMO2 または pNY326) を試してみてください。pNCMO2 のように、プロモーター活性が高いほうが生産性が良い場合もあります。または、pNY326 のように弱めのプロモーター活性のベクターを用い、菌の生育が改善されることにより生産性が向上する場合もあります。
- c. 異なるタイプの培地を用いてみてください。培地の種類によって生産性に違いが生じることがあります。
- d. プラスミドのコピー数をコントロールと比較してみてください。著しくコピー数が減少している場合は、pNY326 ベクターを用いたり、培地を変更したり、抗生物質濃度を上げてみる (400  $\mu$ g/ml) などの策を試してみてください。
- e. 目的タンパク質が分泌生産に適さない場合がありますので、そのような場合は菌体内発現にトライしてみてください。菌体画分について、生産を確認してみてください。微量の生産しか得られない場合は、硫酸沈殿や限外膜による濃縮を試みてください。

### V-8-2. 生産が認められない場合

「生産量が低い場合」と同様の試験を行ってみてください。それでも改善されない場合は以下のような可能性が考えられます。

- a. mRNA の 2 次構造を確認してみてください。高エネルギーのパリンドローム構造を有する場合は翻訳に異常をきたす場合があります。このような場合は、リピート配列に変異を導入し、スタッキングを解除する必要があります。
- b. シグナル切断部位近傍の配列が不適な場合、分泌生産に影響を及ぼす場合があります。N 末端に付加配列を設けても目的タンパク質の活性に問題がない場合は、精製タグや検出タグを導入したり、PCR によってランダムな配列を導入し、高発現の配列をスクリーニングするなどのアプローチが考えられます。

## V-9. 目的タンパク質の精製

精製方法は目的タンパク質の種類によって、それぞれ異なります。目的タンパク質が分泌生産された場合は、除菌操作によって、清澄な液を得る事ができるため、後の精製に有利です。この後は通常の前製手法（イオン交換、疎水、アフィニティークロマトなど）を用いて精製してください。

ヒスチジンタグなどの精製タグを目的遺伝子に付加することで、より簡単に精製タンパク質を得る事ができます。ヒスチジンタグはN末端、C末端どちらでも生産が可能です。タンパク質の種類や活性の有無によって使い分けてください。

pNCM02 DNA の分泌シグナルの下流に His タグ配列とタグの除去のためのプロテアーゼ認識配列が挿入された pNC-HisT DNA (製品コード HB121)、pNC-HisF DNA (製品コード HB122)、pNC-HisE DNA (製品コード HB123) もご利用ください。

【注意】2SY 培地で培養したサンプルを直接 Ni-chelate カラムにアプライすると Ni が担体から脱落する場合がありますのでご注意ください。この場合はサンプルを透析後、カラムにアプライすると問題なく精製できます。なお、Ni Sepharose Fast Flow (GE ヘルスケア) を用いた場合は、サンプルの透析なしでも精製が可能です。

## V-10. 培地組成

### ・2SY 液体培地

#### 成分

グルコース*	20.0 g/L
Bacto Soytone	40.0 g/L
Bacto Yeast Extract	5.0 g/L
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.15 g/L

NaOH で pH7.2 に調整する。

\*：グルコースと CaCl<sub>2</sub> は混合し、培地とは別に滅菌をしてください。滅菌後に混合してください。

### ・2SYNm 液体培地

ネオマイシン溶液 (ストック溶液 50 mg/ml) を 50 μg/ml になるように 2SY 液体培地に添加してください。

### ・TM 液体培地

#### 成分

グルコース*	10.0 g/L
ファイトンペプトン	10.0 g/L
35%エルリッヒ カツオエキス	5.75 g/L
酵母エキス 青ラベル	2.0 g/L
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10 mg/L
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	10 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1 mg/L

NaOH で pH7.0 に調整する。

\*：グルコースと培地は別滅菌してください。滅菌後に混合してください。

### ・TMNm 液体培地

ネオマイシン溶液 (ストック溶液 50 mg/ml) を 50 μg/ml になるように TM 液体培地に添加してください。

### ・MT 液体培地

MgCl<sub>2</sub> を 20 mM になるように TM 液体培地に添加してください。

---

・ MTNm プレート

500 mlのMT 液体培地に7.5 gの寒天を懸濁し、オートクレーブで滅菌してください。  
約 50°Cまで放冷後、ネオマイシン溶液（ストック溶液 50 mg/ml）を 50  $\mu$ g/ml に  
なるように添加し、緩やかに混合後、プレートに分注します。

2SY 液体培地、TM 液体培地の下記の成分については、下記のメーカーの製品をご利用く  
ださい。

Bacto Soytone	(Becton Dickinson 社、Code. 243620)
Bacto Yeast Extract	(Becton Dickinson 社、Code. 212750)
ファイトンペプトン	(Becton Dickinson 社、Code. 211906)
35% エルリッヒ カツオエキス	(極東製薬社、Code. 551-01212-5)
酵母エキス 青ラベル	(オリエンタル酵母工業)

## VI. 関連製品

BIC System (製品コード HB300)  
pBIC DNA Set (製品コード HB310)  
pNC-HisT DNA (製品コード HB121)  
pNC-HisF DNA (製品コード HB122)  
pNC-HisE DNA (製品コード HB123)  
pNI DNA (製品コード HB131)  
pNI-His DNA (製品コード HB132)  
In-Fusion® HD Cloning Kit (製品コード 639633 ~ 639650)  
*E. coli* JM109 Competent Cells (製品コード 9052)  
*E. coli* JM109 Electro-Cells (製品コード 9022)  
DNA Ligation Kit < Mighty Mix > (製品コード 6023)  
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (製品コード R045A/B)  
PBS Tablets (製品コード T900)

## VII. 参考文献

- 1) H. Takagi, K. Kadowaki, and S. Udaka. Screening and Characterization of Protein-Hyperproducing Bacteria without Detectable Exoprotease Activity. *Agric Biol Chem.* (1989) **53**(3): 691-699.
- 2) T. Takano, A. Miyauchi, H. Takagi, K. Kadowaki, K. Yamane, and S. Kobayashi. Expression of the Cyclodextrin Glucanotransferase Gene of *Bacillus macerans* in *Bacillus brevis*. *Biosci Biotech Biochem.* (1992) **56**(5): 808-809.
- 3) H. Tojo, T. Asano, K. Kato, S. Udaka, R. Horinouchi, and A. Kakinuma. Production of Human Protein Disulfide Isomerase by *Bacillus brevis*. *J Biotechnol.* (1994) **33**(1): 55-62.
- 4) H. Yamagata, K. Nakahama, Y. Suzuki, A. Kakinuma, N. Tsukakoshi, and S. Udaka. Use of *Bacillus brevis* for efficient synthesis and secretion of human epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1989) **86**: 3589-3593.
- 5) K. Yashiro, J. W. Lowenthal, T. E. O'Neil, S. Ebisu, and H. Takagi. High-Level Production of Recombinant Chicken Interferon- $\gamma$  by *Brevibacillus choshinensis*. *Protein Expression and Purification.* (2001) **23**: 113-120.

## VIII. 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。
- ・PrimeSTAR はタカラバイオ株式会社の、In-Fusion は Takara Bio USA, Inc. の登録商標です。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。

本製品のうち、*Brevibacillus choshinensis* HPD31-SP3 には、*Saccharomyces cerevisiae* 由来 2  $\mu\text{m}$  プラスミド DNA の部分配列が含まれます (製品コード HB200、HB116)。これらは、「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」で規定する遺伝子組換え生物等に該当します。また、「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 年文科省・環境省令第 1 号) における実験分類ではクラス 1 に分類されます。ご使用の際は、上記の省令および貴組織内の安全委員会の指示に従い拡散防止措置を行ってください。

※本製品はヒゲタ醤油株式会社が開発・製造し、タカラバイオ株式会社が販売しています。

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**