

製品コード HB300
HB310

研究用

Takara

***Brevibacillus* Expression System**
BIC System (製品コード HB300)
pBIC DNA Set (製品コード HB310)

説明書

I. はじめに

Brevibacillus (プレビバチルス) 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^{1,2)}。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。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
- 遺伝子操作、培養生産など、取り扱いがとても簡単
- 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
- 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分子内にS-S結合を介した構造を有しており、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
Enzymes			
α -アミラーゼ	<i>B. licheniformis</i>	3.7	
Sphingomyelinase	<i>B. cereus</i>	3.0	
キシラーゼ	<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	4)
抗原			
表層抗原	<i>E. rhusiopathiae</i>	0.9	
表層抗原	<i>T. pallidum</i>	0.8	
抗体			
VHH (抗 NDOM)	ラマ	3.0	
scFv (抗 fluorescein)	マウス	0.2	
Fab (抗 erbB)	マウス	0.4	
サイトカイン			
EGF	ヒト	7.0	
NGF	マウス	0.2	
IFN- γ	ニワトリ	0.5	6)
TNF- α	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、簡単にクローニングを行うことができます。本システムで採用している BIC 法 (*Brevibacillus In vivo Cloning* 法) は、PCR 断片をベクター DNA と混合し、形質転換するだけで、発現プラスミドが構築できる非常に簡便な手法です。

培養生産も簡単です。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-8. 培地組成参照) を用います。分泌発現の場合、プラスミドを導入した発現用宿主を培地に植菌し、振とう培養するだけで、培養上清に目的タンパク質を蓄積します。あとは、遠心分離により菌体を除去することで、清澄なタンパク質溶液を得られ、後の精製工程が有利に行えます。

II. 製品の内容

Brevibacillus Expression System — BIC System — (製品コード HB300)

[Component]

● pBIC DNA Set (製品コード HB310)

直鎖状発現ベクター DNA

pBIC1 DNA 5 μ g (100 ng/ μ l)

pBIC2 DNA 5 μ g (100 ng/ μ l)

pBIC3 DNA 5 μ g (100 ng/ μ l)

pBIC4 DNA 5 μ g (100 ng/ μ l)

コントロール (インサート DNA)

BLA 1 μ g (80 ng/ μ l)

● コンピテントセル

Brevibacillus Competent Cells (製品コード HB116)

• *Brevibacillus* Competent Cells 100 μ l \times 10

• MT medium 1 ml \times 10

• Solution A 1 ml \times 1

• Solution B 1 ml \times 2

III. 保存

● pBIC DNA Set

pBIC1 ~ pBIC4 DNA - 20°C

BLA - 20°C

● コンピテントセル

Brevibacillus Competent Cells - 80°C

その他のコンポーネント - 80°C

IV. BIC System の概略

IV-1. BIC 法の特徴

BIC 法 (*Brevibacillus in vivo Cloning* 法) での発現プラスミド構築は、直鎖状ベクターと PCR で増幅したインサートを混合後、宿主菌に形質転換するだけで目的発現プラスミドが構築されるという極めて簡便な方法です。従来法で必要とされた制限酵素処理やライゲーションの工程を含まないので時間、手間、費用が大幅に節約できます。従来法ではサイズの大きな遺伝子を組み込む際には制限酵素サイトの選択が難しくなる場合がありましたが、そのような心配もありません。また、複数のターゲット遺伝子による多数の発現株の取得にも威力を発揮します。

IV-2. BIC 法の原理

目的タンパク質をコードする遺伝子の両端に、直鎖状の発現ベクターの両末端と相同な 15 塩基対の配列を付加した DNA をベクターと混合してコンピテントセルに導入すると、菌体内で相同配列同士で組換え反応が起こり、発現プラスミドが自発的に形成されます。

なお、組換え反応は、直鎖状ベクターの末端付近の位置でも起こりますので、同一ベクターを用いて、分泌シグナルより上流の位置または His・Tag 配列より上流の位置と相同な 15 塩基対の配列を付加した DNA とベクターを混合することにより、分泌シグナルを除いた菌体内発現用プラスミドまたは His・Tag 配列を除いた直接分泌発現用プラスミドの構築も可能です。

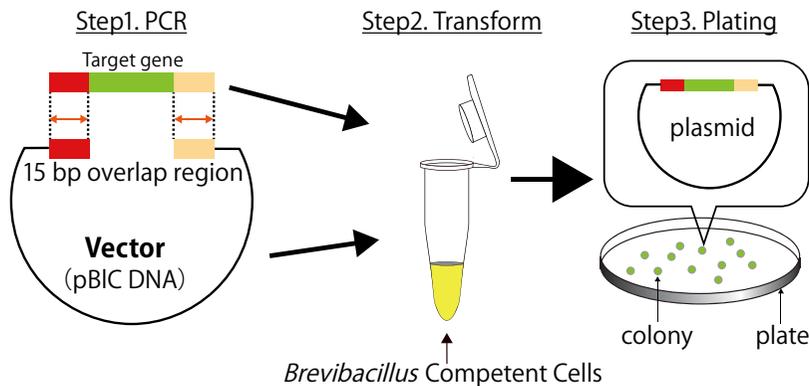


図 1. BIC 法の原理

IV-3. 発現ベクター

<発現様式>

ブレヴィバチルスを用いて目的タンパク質を発現させる場合、タンパク質の性質に応じて、分泌発現と菌体内発現を選択する必要があります。目的タンパク質が分泌性である場合には特に本システムは有効で、分泌発現を選択することをお勧めします。この場合、目的遺伝子は分泌シグナル配列の下流に連結させることになります。一方、一般的に細胞内にあって細胞内で機能するタンパク質を効率的に生産させる場合は菌体内発現を選択します。大腸菌で不溶化してしまうタンパク質でもブレヴィバチルスを用いることで可溶性高生産に成功した例があります。以上の概略を模式図に示しました(図2)。

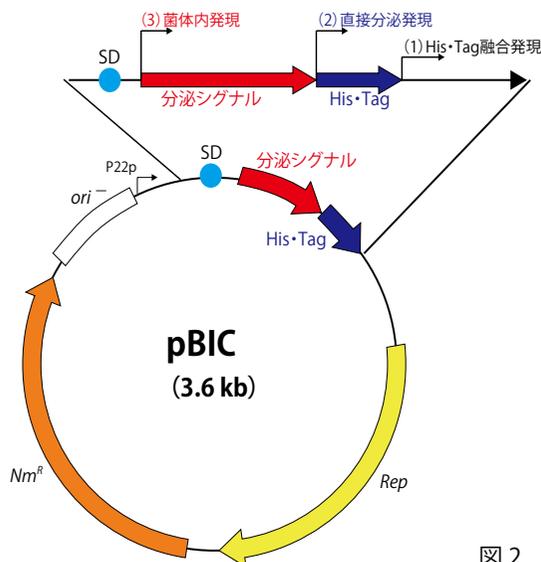


図2. pBIC DNA のマップ

pBIC DNA を用いて、以下の3通りの発現用プラスミドが構築できます。

(1) 分泌発現 (His・Tag 融合発現)

N 末端に AD+6×His+DDDDK (Enterokinase の認識配列) を付けた形で分泌させます (Ni-chelate カラムによる目的タンパク質の精製が可能*1)。遺伝子を導入する際は、Enterokinase 認識配列上の配列を用いた相同組換え・遺伝子導入を行います。

(2) 分泌発現 (直接分泌発現)

分泌シグナルの下流に直接目的遺伝子を導入します。遺伝子を導入する際は、分泌シグナル切断部位から上流 15 bp を用いた相同組換え・遺伝子導入を行います。

(3) 菌体内発現

翻訳開始点 ATG の下流に遺伝子を導入します。ATG から上流 15 bp を用いた相同組換え・遺伝子導入を行います。

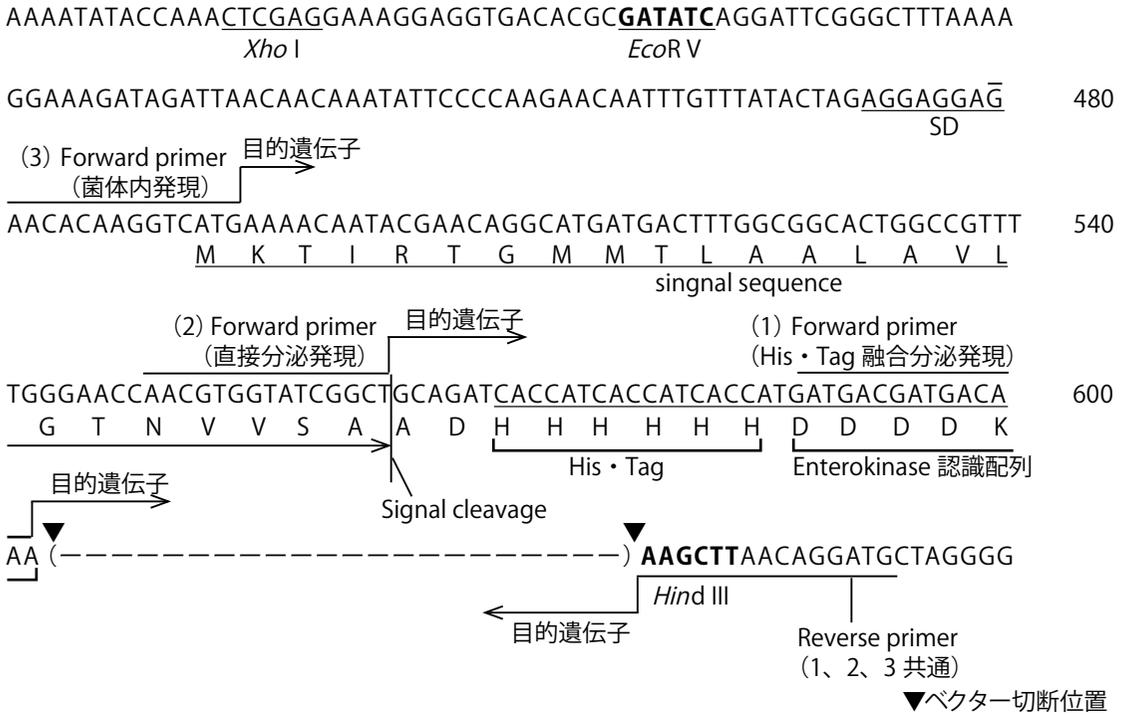
* 1 : 2SY 培地で培養したサンプルを直接 Ni-chelate カラムにアプライすると Ni が担体から脱落する場合がありますのでご注意ください。この場合はサンプルを透析後、カラムにアプライすると問題なく精製できます。なお、Ni Sepharose Fast Flow (GE ヘルスケア) を用いた場合は、サンプルの透析なしでも精製が可能です。

<分泌シグナル>

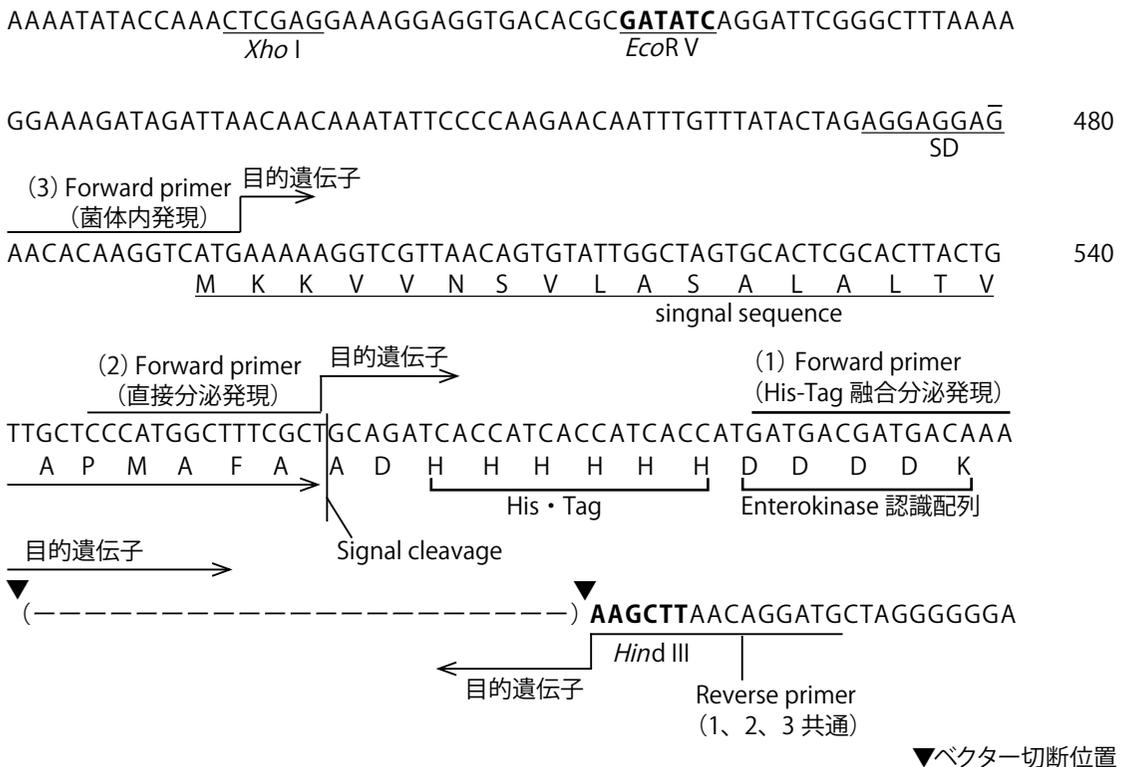
分泌シグナルはタンパク質の分泌効率に大きな影響を及ぼす要素です。どんなタンパク質でも最大効率で分泌させられる万能な分泌シグナルは見出されていませんので、目的タンパク質と相性の良い分泌シグナルを選ぶ必要があります。本システムでは、*B. choshinensis* において極めて高い分泌性を有するタンパク質に由来する4種類の分泌シグナル配列を組み込んだ発現ベクター pBIC1 ~ pBIC4 を用意しました。目的タンパク質遺伝子をこれらのベクターに組み込んで生産性を比較することにより、最適な分泌発現プラスミドをスクリーニングすることが可能です。

pBIC1 ~ pBIC4 の分泌シグナル付近の塩基配列を次ページ図3に示しました。

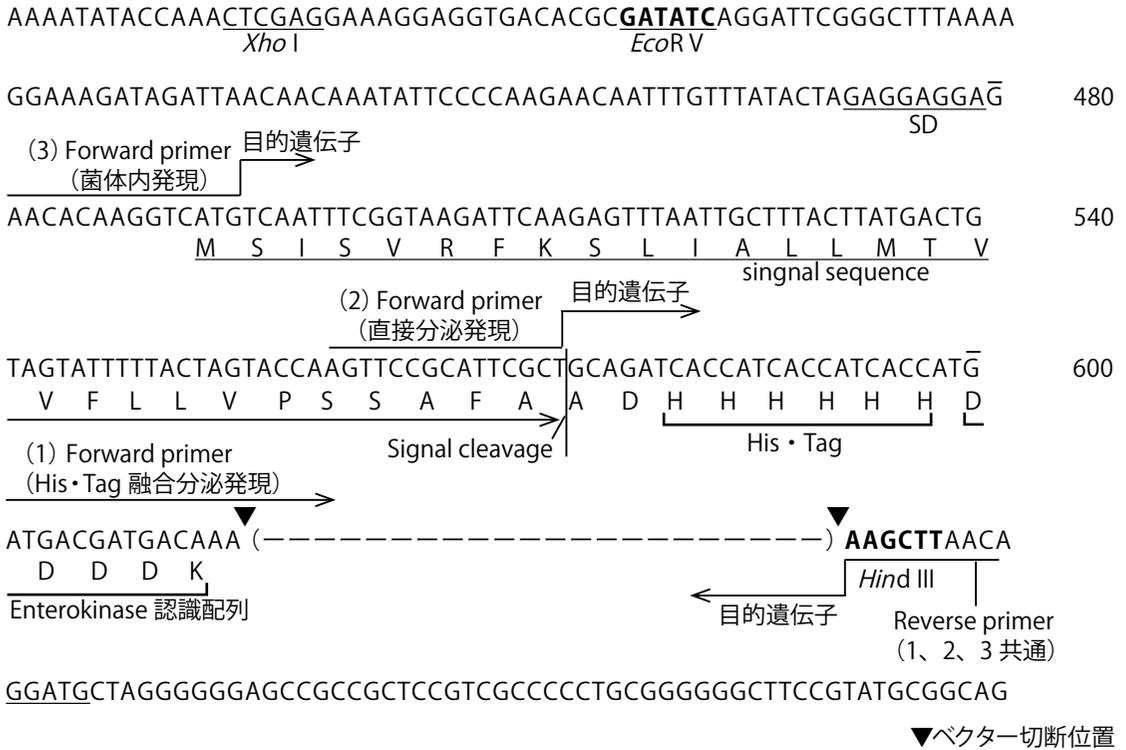
pBIC1 DNA



pBIC 2 DNA



pBIC3 DNA



pBIC4 DNA

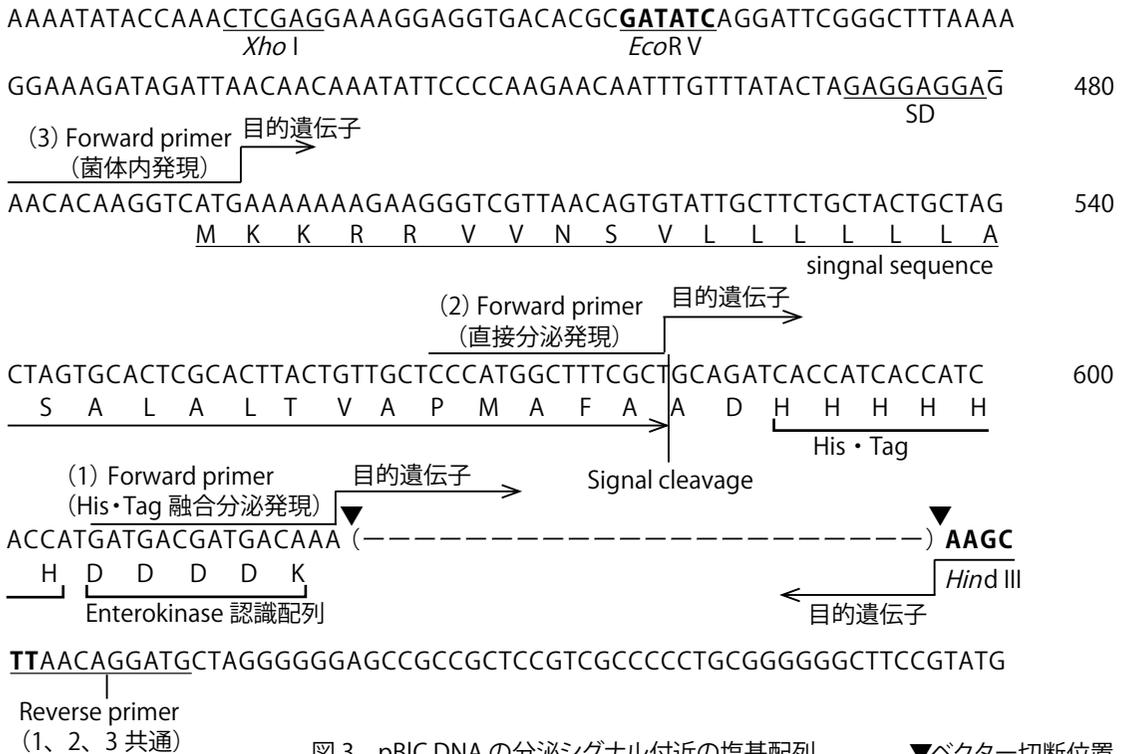


図 3. pBIC DNA の分泌シグナル付近の塩基配列

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

BLA：分泌発現 (His・Tag 融合発現) のポジティブコントロールとして用いるインサート DNA で、鎖長は 1,480 bp です。
2SY 培地を用いた場合に約 55 kDa のタンパク質 (*Bacillus licheniformis* 由来 α アミラーゼ) で 50 mg/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 プレートに塗抹する。
2. 30°C、一晚培養。
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-8. 培地組成参照) に植菌し、一晚振とう培養する。
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. pBIC DNA を用いた発現ベクターの構築

V-2-1. pBIC DNA の概略

pBIC1 ~ 4 のベクターマップの詳細は IV-3 の図 3 を参照。

< pBIC のベクター情報 >

プロモーター	<i>B. choshinensis</i> 由来 P22 タンパク質遺伝子の 5' 配列の一部を使用。 <i>Brevibacillus</i> 内で強力に発現する。
分泌シグナル	pBIC1: <i>B. choshinensis</i> 由来 BbrPI タンパク質の分泌シグナル pBIC2: <i>B. brevis</i> 由来細胞壁タンパク質の分泌シグナル pBIC3: <i>B. choshinensis</i> 由来 P22 タンパク質の分泌シグナル pBIC4: pBIC2 の改変型分泌シグナル
ターミネーター	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>	プラスミドの自己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^R</i>	ネオマイシン耐性遺伝子 (選択マーカー)

V-2-2. pBIC へのクローニング

< PCR による遺伝子の増幅 >

以下の (1) ~ (3) のいずれかの目的に合わせ、プライマーを設計します。
プライマーの 5' 末端 15 塩基は必ずベクターと相同な以下の配列になるように設計し、その 3' 側に目的遺伝子を増幅する配列 (18 ~ 20 塩基) を付加してください。

- (1) 分泌発現 (His・Tag 融合発現) の場合
forward : 5'-GATGACGATGACAAA- 目的遺伝子の 5' 側配列
reverse : 5'-CATCCTGTTAAGCTT- 目的遺伝子の 3' 側配列

- (2) 直接分泌発現の場合
 - pBIC1 をベクターとする場合のプライマー設計
forward : 5'-AACGTGGTATCGGCT- 目的遺伝子の 5' 側配列
reverse : 5'-CATCCTGTTAAGCTT- 目的遺伝子の 3' 側配列
 - pBIC2 をベクターとする場合
forward : 5'-CCCATGGCTTTCGCT- 目的遺伝子の 5' 側配列
reverse : 5'-CATCCTGTTAAGCTT- 目的遺伝子の 3' 側配列 (1 と共通)
 - pBIC3 をベクターとする場合
forward : 5'-AGTTCGCGATTTCGCT- 目的遺伝子の 5' 側配列
reverse : 5'-CATCCTGTTAAGCTT- 目的遺伝子の 3' 側配列 (1 と共通)
 - pBIC4 をベクターとする場合
forward : 5'-CCCATGGCTTTCGCT- 目的遺伝子の 5' 側配列 (2 と共通)
reverse : 5'-CATCCTGTTAAGCTT- 目的遺伝子の 3' 側配列 (1 と共通)

- (3) 菌体内に発現させる場合 (ベクターは pBIC1~pBIC4 どれでも使用可)
forward : 5'-GAACACAAGGTCATG- 目的遺伝子の 5' 側配列 (開始コドンを除く)
reverse : 5'-CATCCTGTTAAGCTT- 目的遺伝子の 3' 側配列 (1 と共通)

上記のプライマーを用いて、PCR により目的遺伝子を増幅させます。PCR 条件はそれぞれの遺伝子の鎖長や PCR 酵素に合わせて設定してください。PCR には高い正確性を持つ High-Fidelity PCR 酵素 (PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (製品コード R045A) など) をお勧めします。

< PCR 産物の精製 >

1. 増幅産物をアガロースゲルで電気泳動し、目的遺伝子の増幅以外に非特異的な増幅が見られない場合は、市販の DNA 精製カラム (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up など) を用いて PCR 反応液を精製してください。*2
2. アガロースゲル電気泳動の結果、目的遺伝子の増幅以外に非特異的な増幅が見られる場合、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up を用いて、プロトコールに従いゲル片から DNA を精製してください。

* 2 : バックグラウンドが少量であれば、精製工程を省いても大きな効率低下はありません。

<形質転換>

pBIC DNA 1 μ l (100 ng) とインサートをモル比で約 1 : 2 になるように混合し、全量 5 μ l になるように滅菌水を加えた後、*Brevibacillus* Competent Cells (製品コード HB116) を用いた形質転換を行います。^{*3} 形質転換方法は V-3. *Brevibacillus* の形質転換をご参照ください。

- * 3 : 通常、遺伝子導入効率は 80% 程度ですが、発現タンパク質が菌にストレスを与えるような性質を持つ場合には低下する傾向があります。
キットにはコントロール DNA として BLA (*B. licheniformis* 由来 α -amylase) 遺伝子が添付してあります。コントロールとしてベクター 1 μ l (100 ng) と、BLA 1 μ l (80 ng) を混合してご使用ください。BLA を用いて正しく発現プラスミドが構築された場合、2% デンブンを含む寒天プレート上でコロニーの周囲にハローが形成されることにより陽性クローンの識別が可能となります。但し、BLA の分泌発現は宿主菌にストレスを与えるため、より高発現する pBIC4 での出現コロニー数と導入効率とは共に pBIC1 ~ pBIC3 に比べて低くなります。

V-2-3. *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 6 ~ 10 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。
スクリュ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。市販のプラスミド抽出キットを用いて、プラスミドを抽出します。通常 1 ~ 2 μ 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。目的遺伝子の導入が判断できるように制限酵素を選択してください。
EcoRV と *HindIII* を用いた場合は、(1) His・Tag 融合発現で 200 ~ 220 bp、(2) 直接分泌発現で 160 ~ 180 bp、(3) 菌体内発現で 90 bp プラス目的遺伝子の断片が切り出されます。
- 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 による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。

Forward Sequencing Primer : 5'-CGCGATATCAGGATTCGG-3'

Reverse Sequencing Primer : 5'-CAATGTAATTGTTCCCTACCTGC-3'

※ 菌体内発現、分泌発現ともに上記のプライマーで配列確認が可能です。

V-3. *Brevibacillus* の形質転換

V-3-1. 準備

Brevibacillus Competent Cells (製品コード HB116)

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

MTNm プレート

培養用チューブ*4

滅菌済みマイクロチューブ

*4：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-3-2. 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、1～2 分）し、上清をマイクロピペットで完全に除去する。

—以下は、室温で操作を行ってください。—

- (4) 5 μ l に調製した DNA 溶液*5 と 50 μ 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。*6
- (6) そのまま 5 分間静置する。
- (7) 150 μ l の Solution B (PEG 溶液) を加え*7、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 1 時間振とうする。
- (12) MTNm プレートに播き、37°C で一晚培養する。
- (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。

*5：pBIC DNA（100 ng）とインサートをモル比で 1：2 になるように混合し、全量 5 μ l になるように滅菌水を加えた後、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。

*6：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。

*7：Solution B (PEG 溶液) は粘性が高いため、1,000 μ 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-4. *Brevibacillus* 組換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-4-1. 概略

発現用形質転換体の作製を確認したら、pBIC DNA に BLA をクローニングした形質転換体を用いて、ポジティブコントロール発現試験を実施します。(pBIC1 ~ 3 DNA を使用した場合は大小のコロニーが出現しますが、小コロニーを選択してください。)

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-4-2. 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-4-3. 培養生産(分泌生産)

発現コントロールとして pBIC DNA に BLA をクローニングしたプラスミドを用い、*Bacillus licheniformis* 由来 α -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当かどうか確認します。同時に発現用形質転換体を培養し、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(ϕ 16 mm) にシングルコロニーを選び、植菌する。30 ~ 33°C、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(5,000 $\times g$ 、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*⁸ 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。

V-4-4. 培養生産(菌体内生産)

- (1) 3 ml の 2SYNm および TMNm 液体培地を分注した試験管(ϕ 16 mm) にシングルコロニーを選び、植菌する。30 ~ 33°C、120 rpm、48 ~ 64 時間振とう培養を行う。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(5,000 $\times g$ 、5 分間)によって上清画分を分離する。超音波破碎を行う場合は沈殿画分を等量の PBS*⁸ で懸濁する。または xTractor Buffer Kit (製品コード 635623) を用いることで簡便且つ穏やかにタンパク質を抽出することができる。
- (3) 超音波破碎または xTractor Buffer Kit による抽出後、遠心分離(12,000 $\times g$ 、10 分間)により、上清(可溶性画分)を回収し、SDS-PAGE や活性測定によって評価を行う。

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

V-5. 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-5-1. サンプルの調製

培養上清および沈殿懸濁液 40 μ l に 10 μ 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°C、5 分間加熱処理し泳動用サンプルとします。

V-5-2. 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. α -amylase (約 55 kDa) を発現させた *B. choshinensis* SP3/pBIC-BLA の培養液サンプル (分泌発現のコントロール)

V-5-3. 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-6. タンパク質発現の至適化

BIC System を用いることで成功率はこれまでの 1.5 ~ 2 倍に向上しており、約 60% の確率でタンパク質発現に成功しています。中には 1 mg/ml を超える高生産を達成しており、大部分は 100 μ g/ml 以上の生産性を示しています。

V-6-1. 生産量が低い場合

- a. 異なるタイプの培地を試してください。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。
- b. 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ください。菌体画分について、生産を確認してください。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-6-2. 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、リピート配列上に変異を導入し、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-7. 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。この後は通常の精製手法（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。

pBIC DNA には N 末端に His・Tag を導入していますので、His・Tag の下流にクローニングすることで、Ni-chelate カラムなどを用いてより簡単に精製タンパク質を得ることができます。タンパク質の性質によっては C 末端側に His・Tag を導入したほうが良い場合も有りますので、ご検討ください。

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-8. 培地組成

・ 2SY 液体培地

成分

グルコース*9	20.0 g/L
Bacto Soytone	40.0 g/L
Bacto Yeast Extract	5.0 g/L
CaCl ₂ ・2H ₂ O	0.15 g/L

NaOH で pH7.2 に調整する。

*9：グルコースと CaCl₂ 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	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 ₄ ・7H ₂ O	10 mg/L
MnSO ₄ ・4H ₂ O	10 mg/L
ZnSO ₄ ・7H ₂ O	1 mg/L

NaOH で pH7.0 に調整する。

*10：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

MgCl₂ 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℃まで放冷後、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. 参考文献

- 1) M. Mizukami, H. Hanagata, and A. Miyauchi. *Brevibacillus* expression system: host-vector system for efficient production of secretory proteins. *Curr Pharm Biotechnol.* (2010) **11**(3): 251-258.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) K. Yashiro, J. W. Lowenthal, T. E. O'Neil, S. Ebisu, and H. Takagi. High-Level Production of Recombinant Chicken Interferon- γ by *Brevibacillus choshinensis*. *Protein Expression and Purification.* (2001) **23**: 113-120.

VII. 関連製品

Brevibacillus Expression System II (製品コード HB200)
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)
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (製品コード R045A/B)
PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (製品コード R050A/B)
xTractor Buffer Kit (製品コード 635623)
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250)

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 μ m プラスミド DNA の部分配列が含まれます (製品コード HB300、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。

S

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