

製品コード HB131/HB132

研究用

Takara

Brevibacillus 発現システム
菌体内発現ベクター

pNI DNA (製品コード HB131)

pNI-His DNA (製品コード HB132)

説明書

目次

I.	はじめに.....	3
II.	内容.....	3
III.	保存.....	3
IV.	<i>Brevibacillus</i> 発現システムの概略	
	IV-1. 発現ベクターの選択.....	3
	(1) pNI DNA (2) pNI-His DNA	
	IV-2. 発現ベクターへのクローニング.....	6
	IV-3. <i>Brevibacillus</i> の形質転換.....	6
	IV-4. タンパク質生産の確認とスケールアップ.....	6
V.	使用方法	
	V-1. <i>Brevibacillus</i> 菌株について.....	6
	V-1-1. 遺伝子型	
	V-1-2. <i>Brevibacillus</i> 組換え体の保存	
	V-2. <i>E. coli</i> 宿主.....	7
	V-3. pNI DNA および pNI-His DNA を用いた発現プラスミドの構築.....	7
	V-3-1. pNI DNA および pNI-His DNA へのクローニング	
	V-3-2. <i>E. coli</i> 組換え体の解析	
	V-3-3. シーケンス	
	V-3-4. プラスミドの精製	
	V-4. <i>Brevibacillus</i> の形質転換.....	8
	V-4-1. 準備	
	V-4-2. NTP 法による形質転換	
	V-5. <i>Brevibacillus</i> 組換え体を用いた目的タンパク質の発現.....	9
	V-5-1. 概略	
	V-5-2. 培地	
	V-5-3. 培養生産	
	V-6. SDS-PAGE 分析.....	10
	V-6-1. サンプルの調製	
	V-6-2. コントロール	
	V-6-3. タンパク質発現の解析	
	V-7. 目的タンパク質の精製.....	11
	V-8. 培地組成.....	11
VI.	実験例.....	12
VII.	参考文献.....	14
VIII.	関連製品.....	14
IX.	注意.....	15

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での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、特にタンパク質を大量に分泌生産する特長を有しています¹⁾。この特長を生かし、これまでに多数の異種タンパク質分泌生産に成功してきました。

しかし、最近の研究により、分泌生産だけではなく菌体内生産においても本菌は優れた性質を示すことが分りました。大腸菌では不溶化して沈殿するタンパク質も、本菌で生産させると可溶性の状態でも回収することも可能です。pNI DNA、pNI-His DNA はブレビバチルス内で強力に働く P2 プロモーターを用いた菌体内発現ベクターです。本来細胞内に作られ機能するタンパク質で、大腸菌では生産物が不溶化してしまい、*in vitro* リフォールディングも困難である場合にも、pNI DNA、pNI-His DNA が有効です。本システムの特長は以下の通りです。

- ・可溶性の状態でも異種タンパク質を効率良く菌体内に生産する
- ・培養、減遺伝子操作が簡単
- ・安全な宿主

本システムの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。発現ベクターの構築は、大腸菌とのシャトルベクターを用いて、大腸菌内で行います。また、N 末に His タグが付加されるタイプのベクター (pNI-His DNA) も用意しました。His タグ融合タンパク質精製カラムで簡単に目的タンパク質を精製でき、精製後付加された His タグは精製物を Enterokinase で処理することにより除去することも可能です。

II. 内容

pNI DNA (製品コード HB131)	10 µg (0.2 µg/µl)
pNI-His DNA (製品コード HB132)	10 µg (0.2 µg/µl)

【各ベクターの形状】 10 mM Tris-HCl, pH8.0
1 mM EDTA

III. 保存

− 20°C

※適切に保存し、受取り後 2 年を目途にご使用ください。

IV. *Brevibacillus* 発現システム菌体内発現ベクターの概略

本製品を用いて、目的タンパク質を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) pNI DNA

pNI DNA は、分泌発現用ベクターである pNCM02 DNA (製品コード HB112) から分泌シグナル部分を除去して菌体内に生産物が蓄積するように作られた菌体内発現用ベクターです。それ以外の基本的な構造は pNCM02 DNA と共通です。*Brevibacillus* と大腸菌のシャトルベクターで、大腸菌内で発現プラスミドを構築後、*Brevibacillus* に導入、発現試験に進むことができます。

pNI DNA 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。一方、*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に適しています。

(2) pNI-His DNA

pNI-His DNA は TALON® Resin などの His タグ融合タンパク質精製樹脂により生産物を簡単に精製できるように、目的タンパク質の N 末に His タグ配列 (6 × His 配列) およびタグ除去のための Enterokinase 認識配列が付加されるように作られた菌体内発現用ベクターです。それ以外は pNI DNA と共通です。

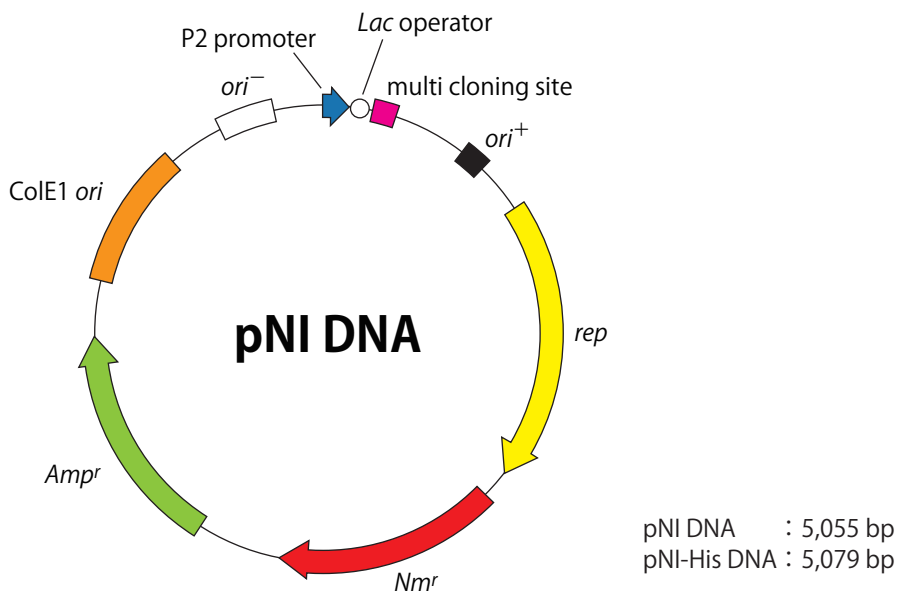


図 1. pNI DNA のベクターマップ

< pNI DNA および pNI-His DNA のベクター情報 >

プロモーター (P2 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。
His タグ + Enterokinase 認識配列	pNI-His DNA のみ
マルチクローニングサイト	12 個の制限酵素切断部位 (pNI DNA) 10 個の制限酵素切断部位 (pNI-His DNA)
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>Nmr</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^r</i>	アンピシリン耐性遺伝子選択マーカー (大腸菌)

< pNI DNA のクローニングサイト図 >

AAGGCGCCGCAACTTTTGATTTCGCTCAGGCGTTTAATAGGATGTAATTGTGAGCGGATAA 120
P2-35 P2-10 lac operator

CAATTATTCTGCATGGCTTTCCTGCGAAAGGAGGTGACACGCGCCATGGCTTTCGCTGCA 180
SD1 Start codon

Cloning site
BamHI SalI XbaI XhoI EcoRI KpnI SmaI BstBI ClaI Hind III
GGATCCGTCGACTCTAGACTCGAGGAATTCGGTACCCGGGTTCGAAATCGATAAGCTTC 240

GGCATTATAG

< pNI-His DNA のクローニングサイト図 >

AAGGCGCCGCAACTTTTGATTTCGCTCAGGCGTTTAATAGGATGTAATTGTGAGCGGATAA 120
P2-35 P2-10 lac operator

CAATTATTCTGCATGGCTTTCCTGCGAAAGGAGGTGACACGCGCCATGGCTCACCATCAC 180
SD1 M A H H H
His-Tag

Cloning site
BamHI SalI XbaI XhoI EcoRI KpnI
CATCACCATGATGACGATGACAAAGGATCCGTCGACTCTAGACTCGAGGAATTCGGTACC 240
H H H D D D D K

Enterokinase

SmaI BstBI ClaI Hind III
CCGGGTTCGAAATCGATAAGCTTCGGCATTATAG

IV-2. 発現ベクターへのクローニング

pNI DNA の場合は *Nco*I に始まるマルチクローニングサイトに目的タンパク質の遺伝子を挿入します。*Nco*I サイトが使える場合には、マルチクローニングサイトに由来する余分なアミノ酸が目的タンパク質に付加されることはありませんが、*Nco*I サイト以外の場合には使うサイトに応じて余分なアミノ酸が N 末に付加されます。

pNI-His DNA の場合には目的タンパク質の遺伝子は *Bam*HI 以後のサイトに挿入します。

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を同時に培養し、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。培養菌体を 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。高い生産量が必要とされる場合には、スケールアップを行います。*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. *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℃、一晚培養。
3. プレートをシールし、室温 (20℃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℃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

pNI DNA および pNI-His DNA 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 (*lac*^{Iq}) 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*,
△ (*lac-proAB*) /F' [*traD36*, *proAB*⁺, *lac*^{Iq}, *lacZ* △ M15]

V-3. pNI DNA および pNI-His DNA を用いた発現プラスミドの構築

< pNI DNA および pNI-His DNA 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 *lac*^{Iq} を持ち、かつ *recA*⁻ の株をお勧めします。
pNI DNA の場合、*Nco*I に始まるマルチクローニングサイトに目的タンパク質の遺伝子を挿入するとマルチクローニングサイトに由来する余分なアミノ酸が目的タンパク質に付加されることはありません。*Nco*I サイト以外を利用する場合には使うサイトに応じて余分なアミノ酸が N 末に付加されます。
pNI-His DNA の場合、Enterokinase 認識配列の下流にフレームを合わせて目的タンパク質の遺伝子をクローニングします。
いずれの場合も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。

V-3-1. pNI DNA および pNI-His DNA へのクローニング

< PCR による遺伝子の増幅 >

目的遺伝子を適切に挿入できるように、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® 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 μg 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 をそれぞれ 100 ng 使用して、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。反応液を大腸菌のトランスフォーメーションに用います。

< In-Fusion® 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 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. *E. coli* 組換え体の解析

形質転換後の混合液 100 ~ 200 μ l を 50 ~ 100 μ 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 μ g/ml のアンピシリンを含む) 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。スクリュウ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。培地がしっかり揺れるように試験管の傾きを調整してください。

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 μ g の DNA が回収できます。

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。

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 pNI DNA、pNI-His DNA 共通です。)

Forward Sequencing Primer : 5'-TCGAAGGCGCCGCAAC - 3'

Reverse Sequencing Primer : 5'-CAATGTAATTGTTCCCTACCTGC - 3'

V-3-4. プラスミドの精製

適切なインサートの挿入を確認した大腸菌クローンを適量培養し、市販のキットを用いてプラスミドを抽出・精製します。

V-4. *Brevibacillus* の形質転換

V-4-1. 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

ネガティブコントロール用プラスミド (空のベクター)

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-4-2. 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 μ l 以下の量に調製した DNA 溶液*¹ 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。*²
- (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*³、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：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 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-5. *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-5-1. 概略

発現用形質転換体の作製を確認したら、ベクターのみのネガティブコントロールを用い、発現試験を実施します。

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-5-2. 培地

2SYF 培地を発現試験のベース培地として用います。

V-5-3. 培養生産

発現用形質転換体と共に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 2SYFNm 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) によって菌体画分を分離する。
- (3) 菌体を PBS*¹ に懸濁し、超音波破碎を行う。*² 温度が上がらないように必ず氷中で行う。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。
- (4) 破碎物を遠心 (20,000 $\times g$ 、10 分間) し、上清と沈殿に分ける。沈殿は上清と等量の PBS に懸濁する。
- (5) 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。

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

* 2 : 破碎条件については、BRANSON SONIFIER 350 型を使った場合には、50% duty、output 4 ~ 5、30 秒 \times 2 が標準です。それ以外の機種の場合には最適条件をご検討ください。

V-6. 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-6-1. 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 \times SDS-PAGE ローディングバッファを加えます。

混合後、100°C、10 分間加熱処理し泳動用サンプルとします。

V-6-2. 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)

V-6-3. 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ェ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。

発現ベクターとして pNI-His DNA を用いた場合は、抗 His タグ抗体によるウェスタンブロットティングでの目的タンパク質の検出が可能です。

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。目的タンパク質が生産された場合は、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。

発現ベクターに pNI-His DNA を使った場合には TALON Metal Affinity Resin（製品コード 635501）などの His タグ融合タンパク質精製樹脂を使って簡単に目的タンパク質を精製することができます。精製後 His タグを除去したい場合には精製物を Enterokinase で処理することによって取り除くことができます。His タグ融合タンパク質精製樹脂による精製および Enterokinase 処理の条件についてはそれぞれの製品に添付された使用マニュアルをご参考ください。

V-8. 培地組成

- 2SYF 液体培地

成分

フルクトース*	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。

*：フルクトースと CaCl₂ は混合し、培地とは別に濾過滅菌をしてください。滅菌後に混合してください。

- 2SYFNm 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 2SYF 液体培地に添加してください。

- 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 ₂ · 2H ₂ O	0.15 g/L

NaOH で pH7.2 に調整する。

*：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*	10.0 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。

*：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 Broth
ネオマイシン溶液 (ストック溶液 50 mg/ml) を 50 μ g/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 broth 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 μ 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。

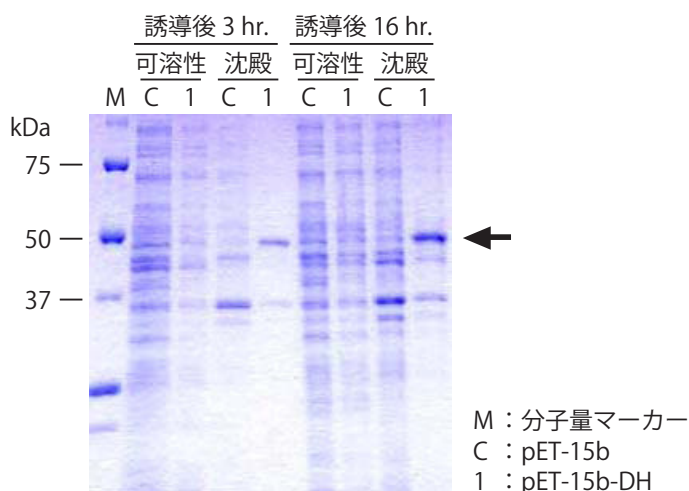
2SYF 液体培地、2SY 液体培地、TM 液体培地の下記の成分については、下記のメーカーの製品をご利用ください。

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、Code. 551-01212-5)
酵母エキス 青ラベル	(オリエンタル酵母工業)

VI. 実験例：pNI を用いた真核生物由来タンパク質の生産

pNI ベクターを用いた真核生物由来のデヒドロゲナーゼ (DH：約 50 kDa) の生産例を以下に示した。まず、大腸菌で汎用されている pET ベクターシステムを用い、定法に従って本タンパク質の発現試験を行ったところ、ほとんどが封入体化してしまった (図 2A)。次にプレバチルスを用いた分泌発現系を試したが、形質転換体は得られず致死となってしまった。そこで pNI ベクターを用いて菌体内発現 (30°C、48 時間) を試みた結果、菌体破碎可溶性画分に目的タンパク質が得られ (図 2B)、大腸菌に比べ 10 ~ 20 倍の酵素活性が得られた (図 3)。培養方法を最適化すれば、さらに 5 倍程度生産性を向上させることが可能である。

A. 宿主：大腸菌 BL21



B. 宿主：ブレビバチルス SP3

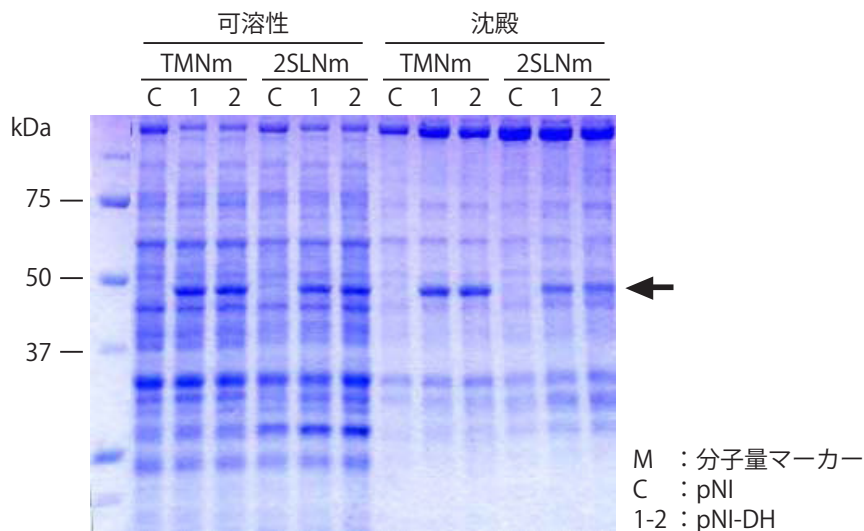


図 2. pET および pNI を用いた真核生物由来デヒドロゲナーゼ (DH) の発現比較

C. 酵素活性比較

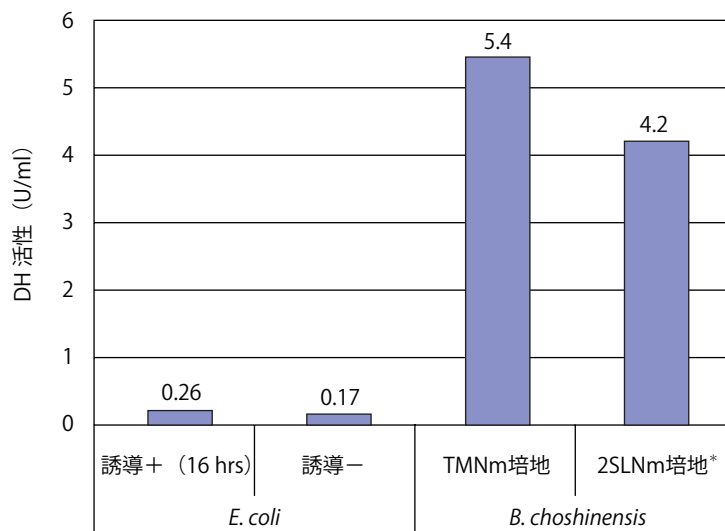


図 3. 発現 DH の酵素活性比較

* : 2SLNm 培地 2% グルコース、4% 大豆ペプトン、0.5% 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 μ g/ml ネオマイシン (pH7.2)

このように、ブレビバチルス発現システムは従来の分泌発現だけでなく、菌体内発現でもタンパク質の高生産性が認められた。

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) Y. Takimura, M. Kato, T. Ohta, H. Yamagata, and S. Udaka. Secretion of Human Interleukin-2 in Biologically Active Form by *Bacillus brevis* Directly into Culture Medium. *Biosci Biotechnol Biochem.* (1997) **61**(11): 1858-1861.
- 6) K. Yashiro, J. W. Lowenthal, T. E. O'Neil, S. Ebisu, and H. Takagi. High-Level Protein Production of Recombinant Chicken Interferon- γ by *Brevibacillus choshinensis*. *Protein Expression and Purification.* (2001) **23**: 113-120.

VIII. 関連製品

[ブレビバチルス分泌発現システム]

BIC System (製品コード HB300)
pBIC DNA Set (製品コード HB310)
Brevibacillus Expression System II (製品コード HB200)
Brevibacillus Competent Cells (製品コード HB116)
pNCMO2 DNA (製品コード HB112)
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)

[His タグ融合タンパク質精製]

HisTALON™ Superflow Cartridge Purification Kit (製品コード 635649/635681)
HisTALON™ Superflow Cartridges (製品コード 635650/635683)
HisTALON™ Buffer Set (製品コード 635651)
TALON® Metal Affinity Resin (製品コード 635501/635502/635503/635504/635652/635653)
His60 Ni Superflow Cartridge (製品コード 635675/635680/635679)
xTractor Buffer Kit (製品コード 635623)

[その他]

In-Fusion® HD Cloning Kit (製品コード 639633 など)
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)
PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (製品コード R010A/B)
PBS Tablets (製品コード T900)

IX. 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、TALON、In-Fusion は Takara Bio USA, Inc. の登録商標です。HisTALON は Takara Bio USA, Inc. 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。

※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