

3P-197 簡便かつ迅速な組換えタンパク質生産を目指した BmNPV バクミドの改良

○杉岡 沙紀¹, 加藤 竜也^{1,2}, 朴 龍洙^{1,2}
^(¹静大院・農・応生化,²静大グリーン科技研)
 xxx.shortage@ezweb.ne.jp

【背景・目的】バキュロウイルス遺伝子発現システムは大量発現が可能な点から多くの組換えタンパク質発現に用いられている。近年更なるタンパク質の発現高速化が注目されているが、複雑なクローニングの過程や発現した組換えタンパク質の複雑な精製過程を克服する必要がある。そこで本研究では BmNPV バクミドに改良を加え、さらに簡便かつ迅速に組換えタンパク質生産を行うことを目的とした。

【方法・結果】直鎖状 BmNPV バクミドを構築し、目的遺伝子を直接 BmNPV バクミドにクローニングして、組換え BmNPV バクミドを構築した。本来もたない制限酵素サイトである Bsu36I と致死遺伝子である Barnase 遺伝子を組込んだ BmNPV バクミド (BmNPV/Bsu36I-Barn) を構築した。構築した BmNPV バクミドをカイコ幼虫に導入した所、Barnase の発現が確認された。また、Barnase 遺伝子が存在することで組換え BmNPV 増幅が抑えられた。BmNPV/Bsu36I-Barn バクミドを Bsu36I によって 24 時間処理することで、ほぼすべてのバクミドが直鎖化することが確認できた。その後直鎖化した BmNPV バクミドへ Bsu36I で処理した GFPuv 遺伝子をライゲーションによってクローニングし、組換え BmNPV バクミド (BmNPV/GFPuv-Barn) を Bm5 細胞に導入した。Bm5 細胞内で GFPuv の発現が確認できた。これは組換え BmNPV が増幅していることを示唆し、さらにカイコ、さなぎ及び幼虫においても発現を確認している。

Modification of BmNPV bacmid for easy and rapid expression of recombinant proteins using silkworms

○Saki Sugioka¹, Tatsuya Kato^{1,2}, Enoch Y. Park^{1,2}
^(¹Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Agric., Shizuoka Univ., ²Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words BmNPV, bacmid, gene expression, baculovirus

3P-199 大腸菌では発現困難なプロテアーゼとセルラーゼの *Brevibacillus* 発現システムによる高生産

○大西 廣優¹, 水上 誠¹, 花方 寛¹, 徳永 正雄², 黒木 良太³,
 安達 基泰³, 石川 一彦⁴, 宮内 明¹
<sup>(¹ヒゲタ醤油研,²鹿児島大・農,³原子力機構・量子ビーム,
⁴産総研・バイオマスリファイナリー研セ)</sup>
 ohnishi@higeta.co.jp

Brevibacillus 発現システムは、優れた蛋白質生産能力を持つ *B. choshinensis* を宿主として開発された蛋白質発現システムである。本発現系は、分泌型の蛋白質に対して特に相性が良く、10 g/L を超える分泌生産に成功した事例がある。また、幅広い生物種の蛋白質で高い生産性を示し、真核生物由来の s-s 結合を有する分泌蛋白質でも活性型で効率的に生産した実績を多数有している。このような実績から、本発現系は量と質の両面において高い能力を持つ発現系であることが知られている。今回は、大腸菌では発現が困難であったプロテアーゼとセルラーゼを *Brevibacillus* 発現システムにおいて効率的に分泌生産させることに成功した結果を報告する。

試験には、高度耐塩性菌である *Oceanobacillus iheyensis* 由来プロテアーゼと超好熱菌由来耐熱性セルラーゼの 2 種類の蛋白質を用いた。両遺伝子は、異なる分泌シグナル配列を持つ 4 種類の発現ベクターにクローニングし、試験管スケールにて発現試験を実施した。その結果、プロテアーゼ、セルラーゼともに高い生産性を示す発現株を得ることができた。さらなる生産性の向上を目指し、ジャーファメンターを用いた流加培養を実施した結果、プロテアーゼ、セルラーゼともに約 3 g/L という非常に高い生産量を達成することに成功した。

Efficient production of recombinant protease and cellulase by *Brevibacillus* expression system while difficult by *E. coli*

○Hiromasa Onishi¹, Makoto Mizukami¹, Hiroshi Hanagata¹, Masao Tokunaga², Ryota Kuroki³, Motoyasu Adachi³, Kazuhiko Ishikawa⁴, Akira Miyauchi¹
^(¹R & D Dept., Higeta Shoyu, ²Fac. Agric., Kagoshima Univ., ³Quantum Beam Sci. Center, JAEA, ⁴BRRC, AIST)

Key words *Brevibacillus*, secretory production, protease, cellulase

3P-198 Investigating chemical chaperones effects on soluble expression of recombinant flagellin

○Shirin Tarahomjoo¹, Bahador Bakhtiarvand², Soheila Yaghmaei², Mehrad Mirsaedi¹
^(¹Biotechnol. Dept., Razi Vaccine & Serum Res. Inst., ²Chem. petroleum Eng. Dept., Sharif Univ. Technol.)
 starahomjoo@gmail.com

Bacterial flagellins are potent adjuvants, which can boost vaccine responses against infection diseases. Recombinant production of flagellin of *Salmonella enteritidis* is advantageous due to removing the pathogenic bacterium from the production process and improving the process safety. *Escherichia coli* is a popular host for expression of recombinant proteins. However, its major obstacle is formation of inclusion bodies, which are functionally inactive proteins. Using chemical chaperones can be considered as an appropriate solution to circumvent this problem. Therefore, the objective of this research is to evaluate effects of chemical chaperones including arginine and sorbitol on soluble expression of *S. enteritidis* flagellin. For this purpose, the flagellin gene of *S. enteritidis* SGSC2475 was cloned in *E. coli* BL21 (DE3) using pET28a vector. Results of SDS-PAGE showed that 46% of the expressed flagellin was in the soluble form. Utilizing arginine at concentrations of 0.1-0.25M and sorbitol at concentrations of 0.4-0.6M in the cultivation medium increased the flagellin solubility remarkably to 91-94% and 80-84% respectively. These results indicated that chemical chaperones can effectively increase the solubility of the recombinant flagellin.

Investigating chemical chaperones effects on soluble expression of recombinant flagellin

○Shirin Tarahomjoo¹, Bahador Bakhtiarvand², Soheila Yaghmaei², Mehrad Mirsaedi¹
^(¹Biotechnol. Dept., Razi Vaccine & Serum Res. Inst., ²Chem. petroleum Eng. Dept., Sharif Univ. Technol.)

Key words flagellins, recombinant proteins, chemical chaperones, solubility

3P-200 *Brevibacillus* 発現システムのフラグメント抗体生産への応用

○花方 寛¹, 植野 陽平¹, 大西 廣優¹, 水上 誠¹, 徳永 正雄²,
 伊東 祐二³, 萩原 義久⁴, 荒川 力⁵, 宮内 明¹
<sup>(¹ヒゲタ醤油研,²鹿児島大・農,³鹿児島大院・理工,⁴産総研,
⁵Alliance Protein Lab.)</sup>
 h-hanagata@higeta.co.jp

抗体は標的分子 (抗原) への高い特異性から様々な分野で応用されており、特に抗体医薬品は急速な市場拡大を遂げている。特に抗体の変換領域を用いた低分子化抗体 (フラグメント抗体) の開発が盛んに行われている。フラグメント抗体は分子内に s-s 結合を有し、大腸菌による菌体内生産には不向きであると考えられる。一方、分泌発現を特徴とする *Brevibacillus* は s-s 結合を有する真核生物由来の分泌タンパク質においても数多くの生産実績があり、フラグメント抗体の生産への高い適合性が期待される。今回は scFv、L 鎖と H 鎖を共発現させることによる Fab 抗体 (抗 erbB) および単ドメイン VHH 抗体 (抗 NDOM) の *Brevibacillus* による生産試験を行った。分泌シグナルの異なる 4 種類の発現ベクターを用い、最適なプラスミドを選抜した。Fab の発現においては L 鎖と H 鎖の遺伝子が一つのプラスミド上にタンデムに並ぶ構造のプラスミドを構築した。その結果、最適な分泌シグナルを選抜することで 100ml スケールの培養では、scFv、Fab、VHH ともに 100 mg/L 以上の高生産を達成した。また、いずれの生産物も抗体活性を有することが確認された。さらなる高生産を目指した 3L ジャーファメンターによる培養の結果、Fab では 400mg/L、VHH では約 3 g/L という高い生産性を達成した。

Practical Application of *Brevibacillus* Expression System for Antibody Fragments Production

○Hiroshi Hanagata¹, Yohei Ueno¹, Hiromasa Onishi¹, Makoto Mizukami¹, Masao Tokunaga², Yuji Ito³, Yoshihisa Hagihara⁴, Tsutomu Arakawa⁵, Akira Miyauchi¹
^(¹R & D Dept., Higeta Shoyu, ²Fac. Agric. Kagoshima Univ., ³Grad. Sch. Sci. Eng., Kagoshima Univ., ⁴AIST, ⁵Alliance Protein Lab.)

Key words *Brevibacillus*, antibody fragment, Fab, VHH