

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 97111679.2

C12N 9/50

C12N 15/57

C12N 1/21

C12P 21/06

//(C12N9/50, C12R1 : 84,

1 : 78, 1 : 72)

[45] 授权公告日 2005 年 8 月 31 日

[11] 授权公告号 CN 1216988C

[22] 申请日 1997.3.4 [21] 申请号 97111679.2

[30] 优先权

[32] 1996. 3. 4 [33] JP [31] 73217/1996

[32] 1996. 12. 16 [33] JP [31] 352580/1996

[71] 专利权人 第一三得利制药株式会社

地址 日本大阪府

[72] 发明人 孙田浩二 增田丰文 铃木雄司

藪田雅之

审查员 王朋飞

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 段承恩

权利要求书 1 页 说明书 61 页 附图 27 页

[54] 发明名称 分泌型 Kex 衍生物的制造方法

[57] 摘要

以含有 DNA 的表达载体使甲醇利用性酵母进行转化, 培养所得到的转化体, 从该培养物中提取而得到 Kex2 蛋白酶衍生物, 以及编码该衍生物的基因系和使用该基因系的 Kex2 蛋白酶衍生物的制造方法, 所述的 DNA 编码在 Kex2 蛋白酶的氨基酸序列中, 以 1 位的 Met 作为 N 末端、以 618 - 698 位的任何氨基酸作为 C 末端的氨基酸序列或其修饰物的氨基酸序列。进而是使用上述 Kex2 蛋白酶衍生物切出目的肽的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、具有 Kex2 蛋白酶的酶活性的蛋白质的制造方法，上述蛋白质具有以序列号 1 的氨基酸序号 1 的 Met 作为 N 末端、以氨基酸序号 630 - 682 之间的任一氨基酸作为 C 末端的缩短的氨基酸序列或者具有对该缩短的氨基酸序列在氨基酸序号 630 至 C 末端区域通过一个或数个氨基酸的取代、缺失和/或插入而进行修饰的氨基酸序列，所述制造方法包括：培养以含有编码所述蛋白质的 DNA 的酵母表达载体转化的酵母细胞，从该培养物中提取所述蛋白质。

2、权利要求 1 所述的方法，其中所述酵母是甲醇利用性酵母。

3、权利要求 2 所述的方法，其中，上述的甲醇利用性酵母是毕赤氏酵母属、汉逊氏酵母属或假丝酵母属的酵母。

4、权利要求 3 所述的方法，其中，上述甲醇利用性酵母是巴斯德毕赤氏酵母、多形汉逊氏酵母或者博伊丁氏假丝酵母。

5、具有 Kex2 蛋白酶的酶活性的蛋白质的制造方法，上述蛋白质具有以序列号 1 的氨基酸序号 1 的 Met 作为 N 末端、以氨基酸序号 630 - 682 之间的任一氨基酸作为 C 末端的缩短的氨基酸序列，所述制造方法包括：培养以含有编码所述蛋白质的 DNA 的酵母表达载体转化的酵母细胞，从该培养物中提取所述蛋白质。

6、权利要求 5 所述的方法，其中所述酵母是甲醇利用性酵母。

7、权利要求 6 所述的方法，其中，上述的甲醇利用性酵母是毕赤氏酵母属、汉逊氏酵母属或假丝酵母属的酵母。

8、权利要求 7 所述的方法，其中，上述甲醇利用性酵母是巴斯德毕赤氏酵母、多形汉逊氏酵母或者博伊丁氏假丝酵母。

9、权利要求 8 所述的方法，其中，所述蛋白质具有以序列号 1 的氨基酸序号 1 的 Met 作为 N 末端、以氨基酸序号 630 - 682 之间的任一氨基酸作为 C 末端的缩短的氨基酸序列，所述氨基酸序列在氨基酸序列号 630 至 C 末端区域通过一个或数个氨基酸的取代，缺失和/或插入而进行修饰。

分泌型Kex 2衍生物的制造方法

本发明是关于具有Kex 2蛋白酶活性、在培养液中大量地分泌的Kex 2衍生物及其制造方法。进而是关于上述分泌型Kex 2衍生物的利用方法。

正在尝试利用许多嵌合蛋白质表达法生产生理活性肽的方法，作为目的肽的游离法，正在使用化学的或酶的切断法。作为化学的方法，有利用亚硝酸的天冬氨酸残基开裂、利用CNBr的甲硫氨酸残基开裂（Itakura et al., Science 198, 1059, 1977）。然而，该方法不能避免目的肽的修饰，也有精制成本的问题。

在酶的方法中，使用将赖氨酸的C末端侧的肽键特异地切断的赖氨酰肽链内切酶（无色杆菌蛋白酶-I），及使用将谷氨酸的C末端侧的肽键特异地切断的葡萄球菌蛋白酶V8（特公开6-87788）。然而，上述的化学的方法和内蛋白酶为了识别一个氨基酸残基，为了有效地从嵌合蛋白质切出目的肽，前提是在目的肽中不包含这些氨基酸残基，限定能生产的肽。为此，要求识别数个氨基酸残基的通用性高的切断方法。

前激素转化酶是在生物体内从其前体生成肽激素的酶，即使在体外作为用于从蛋白质切出肽激素的酶，也期待保持所希望的性质。Kex 2蛋白酶是以来自啤酒糖酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）的激素转化酶，异常地切断Lys-Arg、Arg-Arg、Pro-Arg序列的C末端侧的肽键的钙依存性丝氨酸蛋白酶。Kex 2蛋白酶是由在N末端侧保持信息序列、在C末端侧保持疏水性氨基酸连续的膜贯通领域的814个氨基酸残基组成的蛋白质，在细胞内局部存在于转移高尔基体。

再者，在序列表·序列号1中示出编码Kex 2蛋白酶的碱基序列及对应的氨基酸序列。缺失以啤酒糖酵母作为宿主的C末端区域的Kex 2衍生物的基因表达及其解析的结果表明，具有从序列号1的氨基酸序列1

至 614 的氨基酸序列的 Kex2 衍生物保持 Kex2 蛋白酶活性，在培养液中分泌出 (Fuller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 86, 1434-1438, 1989; 特开平 1-199578)。在本说明书中，根据从序列号 1 的氨基酸序列 1 开始的氨基酸数表示为 Kex2 蛋白酶衍生物。即具有从序列号 1 的氨基酸序列 1 至 614 的氨基酸序列的 Kex2 衍生物标记为 Kex2-614。

迄今，在已研讨过分分泌生产的 Kex2 衍生物中存在 SS-Kex2 和 Kex2 Δ P。

SS-Kex2 是在 Kex2-614 中附加氨基酸残基的肽的 Kex2 衍生物，研讨了以啤酒糖酵母作为宿主的生产 (Brnner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 922-926, 1992)。在宿主中用蛋白酶缺失株 (pep24) 进行表达 (4 mg/L 培养液)，从培养上清液以精制效率 20% 进行精制，精制过的 SS-Kex2，因为经 Asn 型糖链分解酶 Bndoh 处理后分子量降低，所以暗示带有 Asn 型糖链。进而也研究了使用合成底物的酶活性的 pH 依存性的底物特异性。

Kex2 Δ P 在本发明书中是表示为 Kex2 的 Kex2 衍生物，以昆虫细胞 sf9 作为宿主研究生产条件，已知道活性的 90% 在培养上清液中分泌，并且分泌的 Kex2 Δ p 的分子量是 70 kDa，比在细胞内的分子量 120 kDa 要小 (Gerain et al., Eur. J. Biochem, 204, 121-126, 1992)。进而，在表达 Kex2 的培养上清液中也看到分子量 70 kDa 的蛋白质，并且，如果用丙氨酸残基取代 Kex2 Δ p 的 385 号的丝氨酸残基 (Kex2 蛋白酶活性的催化部分)，在培养上清液中看到的 Kex2 Δ p 的分子量与细胞内的分子量是相同的 120 kDa，因此 70 kDa 的蛋白质被认为是在培养液中 C 末端部分缺失了 Kex2 Δ p (120 kDa) 的自分解物。进而还尝试将从分解物的分子量和 Kex2 蛋白酶的底物特异性预想的切断部位 Lys-Arg 序列 (序列号 1，氨基酸序列号 503-504 号) 转变成 Lys-Leu 序列的衍生物 Kex2 Δ 504 的表达。可是，在此场合在培养液中也看到 70 kDa 的蛋白质，Kex2 Δ p 在自分解时不一定切断从合成底物预想的 Lys-Arg

g 序列, 并且, 成为 K e x 2 蛋白酶的识别部位的这种序列在别处不存在, 因此 K e x 2 Δ 5 0 4 识别与从合成底物预想的序列完全不同的序列, 暗示切断自己的可能性。

如上所述, 关于 K e x 2 衍生物虽然进行了使用合成底物的底物特异性的研究, 但还不清楚使用蛋白质场合的底物特异性。另外, 也没有有关各种 K e x 2 衍生物的分泌产量的见解, 也不清楚能否稳定地分泌生产除 K e x 2 - 6 1 4 以外的 K e x 2 衍生物。

因此, 本发明人以提供大量地供给具有 K e x 2 蛋白酶活性的酶的方法为课题, 而完成了本发明。本发明从实验上表明即使在工业规模该酶从嵌合蛋白质也可切出目的肽, 是个有用的酶。

具体地说, 在利用工业规模下的嵌合蛋白质表达法制造有用肽中, 为了能够利用具有 K e x 2 蛋白酶活性的酶, 必须解决以下三个课题。

首先, 第一个课题是提高 K e x 2 衍生物的产量。迄今在已有的报导中, 作为具有 K e x 2 蛋白酶活性的酶, 产量最多的是 s s - K e x 2, 其产量是每 1 升培养液约 4 m g。然而, 这样的产量, 作为在工业规模下为了从嵌合蛋白质切出目的肽所使用的酶产量是少的。另外, 像 K e x 2 Δ p 这样的分泌型 K e x 2 衍生物, 暗示在培养液中自分解的可能性, 而且, 不能预想其切断部位, 因此, 如果设计出这样的衍生物。不知道能否提高产量。

因此, 不自分解的 K e x 2 衍生物的选择及构筑该 K e x 2 衍生物的高表达系统是必要的。再者, 在本说明书中, 所谓自分解意指伴随 K e x 2 蛋白酶活性的降低的自己自身分解, 不意味着伴随 K e x 2 蛋白酶的 L y s - A r g (序列号 1, 氨基酸序列号 1 0 8 - 1 0 9) 的自切断的成熟化 (Brenner & Fuller, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 89, 922-926, 1992)。

其次在第二个课题中, 提高不混入其他蛋白酶的高纯度 K e x 2 衍生物的精制方法的建立。迄今已报导的 K e x 2 衍生物的活性, 仅使用合成底物, 因为没有以蛋白质作为底物的评价, 所以不清楚是否混入其他的蛋白酶。特别在工业规模下切出嵌合蛋白质中, 难以精密地控制反应条件,

其他的蛋白酶的混入显著，有目的肽的回收率降低的可能性，有必要高纯度地精制具有Kex2蛋白酶活性的酶。

最后作为第三个课题，提高利用具有Kex2蛋白酶活性的酶进行嵌合蛋白质的切断条件设定。本专业人员清楚地知道蛋白质的高级结构对在反应条件下的酶稳定性、或底物识别的影响。而在前述的报导中，关于这些问题几乎没有进行研究。尤其嵌合蛋白质表达法，大多是嵌合蛋白质形成不溶性包涵体，因此为了使其可溶化，使用尿素等变性剂。然而，一般说来，如果酶具有哪种结构在尿素存在下才能保持酶性，还不清楚。因此，不知道Kex2蛋白酶和分泌型Kex2衍生物是否能够作为从蛋白质切出作为目的肽的酶而使用。

另外，关于其他的激素原转化酶也没有成功地进行大量生产，也不清楚这些酶能否作为用于在试管内从嵌合蛋白质切出目的肽的酶而使用。因而，以Kex2蛋白酶为首的激素原转化酶为了用作从嵌合蛋白质游离出目的肽的酶，必须建立有效的表达方法和精制方法，进而设定在试管内以蛋白质作为底物时的切断条件。

本发明人研究了上述课题的解决方法，结果发现，从N末端1位具有618-698的氨基酸序列的Kex2衍生物，在培养液中不自分解、分泌产量显著增加，并且如果在宿主中使用甲醇利用性的酵母，能进一步增加产量，从而能够大量供给Kex2衍生物。另外，已证实，通过阴离子交换色谱法、疏水色谱法的二步骤，从培养上清浓缩液将分泌型Kex2衍生物精制至在SDS-PAGE上单一带，在精制的Kex2衍生物中，在从嵌合蛋白质切出目的肽的条件下看不到分解目的肽，使回收率降低的其他蛋白酶活性。

在从嵌合蛋白质切出目的肽的条件下，发现随尿素浓度变化，分泌型Kex2衍生物的底物特异性发生变化，在目的肽内部即使在二个位置包含Kex2蛋白酶的识别序列，也显示以75%的效率从嵌合蛋白质中切出目的肽。另外，在中等规模，使用精制的Kex2-660能够从嵌合蛋白质βGal-117S4HPH34切出hPTH(1-34)，即表示分泌型Kex2衍生物的产量、纯度、从嵌合蛋白质切出目的肽的

效率也能适应于工业规模的生产，从而完成了本发明。

为了解决上述课题，本发明提供用含有编码在序列号1中表示的Kex2蛋白酶的氨基酸序列中，以氨基酸序号1的Met作为N末端，相对于以氨基酸序号618-698间的任何氨基酸作为C末端的天然氨基酸序列、或者用含有编码对该天然氨基酸序列，以包含将通过一个或数个氨基酸的取代、缺失或附加进行修饰的氨基酸序列的DNA的表达载体转化宿主细胞，然后培养所得到的转化体，从该培养物中进行提取得到的具有Kex2蛋白酶活性的蛋白质。再者，包含上述的蛋白质，在本说明书中有时称作“具有Kex2蛋白酶活性的酶”、“Kex2蛋白酶衍生物”、“分泌型Kex2衍生物”。

本发明还提供编码上述蛋白质的基因，尤其是DNA，包含该DNA的载体，特别是表达载体，及以该载体使宿主进行转化而得到的转化体，特别好的是动物细胞或酵母。

本发明又是上述蛋白质的制造方法，提供以培养利用上述表达载体进行转化的宿主，从该培养物中提取蛋白质为特征的方法。该蛋白质最好从培养上清液中使用阴离子色谱法和疏水性色谱法进行。

本发明还提供使用上述蛋白质从嵌合蛋白质切出目的肽的方法。嵌合蛋白质是在目的肽中附加保护肽的蛋白质，目的肽与保护肽的接合部位如果是上述蛋白质识别的氨基酸序列，就能利用上述蛋白质切出目的肽。另外，目的肽与保护肽的接合部位，即使在不是上述蛋白质识别的氨基酸序列的场合，通过在目的肽与保护肽之间插入上述蛋白质的识别部位，使用上述蛋白质也能切出目的肽。

对附图的简要说明

图1是表示在合成hProPTH(1-84)基因制作中使用的合成低聚物的序列图。

图2是表示合成hProPTH(1-84)基因的制作方法图。

图3是表示质粒pG210S(S/X)的制作方法图。Pla表示大肠杆菌的乳糖操纵子的启动子，Ttrp表示大肠杆菌TrpE的减弱终止区。

图4是表示表达嵌合蛋白质 β Gal-1395 (FM) PPH84的质粒pGP#19的制作方法图。

图5是表示质粒pPTH(1-34) pro α 的制作方法图。

图6是表示表达嵌合蛋白质CATPH34的质粒ptacCATPTH(1-34)的制作方法图。ptac表示trp启动子的-35领域与plac的-10领域的合成启动子。

图7是表示以大肠杆菌表达的嵌合蛋白质CATPH34精制前后的试料的SDS-PAGE照片,是表示电泳图的代用照片。

图8是表示表达嵌合蛋白质 β Gal-139SPPH34的质粒pGP#19PPH34的制作方法图。

图9是表示表达嵌合蛋白质 β Gal-117S4HPPH34的质粒pG117S4HPPH34的制作方法的前半部分的图。

图10是表示表达嵌合蛋白质 β Gal-117S4HPPH34的质粒pG117S4HPPH34的制作方法的后半部分的图。

图11是表示为了制作KEX2基因的构成和分泌型Kex2衍生物的基因而合成的引物序列及各自的退火部位的图。

图12是表示表达分泌型Kex2衍生物的质粒PYE-660的制作方法图。PKEX2表示啤酒糖酵母的KEX2基因的启动子。

图13是表示表达Kex2-614的质粒pYE-614的制作方法图。

图14是使用合成底物比较分泌型Kex2衍生物的OD660附近的Kex2活性的图。以K16-57C|pYE-614|的活性作为1表示各分泌型Kex2衍生物生产株的培养液的相对活性。

图15是将每200 μ l的分泌型Kex2衍生物的培养上清液的生产量进行比较的图,是代替表示电泳图的图面照片。

图16是在底物中使用合成底物Boc-Leu-Arg-Arg-MC Λ 研究在各种尿素浓度下的Kex2-660活性的图。以在不存在尿素下的Kex2-660的活性作为100%,表示在各尿素浓度下的相对活性。

图 1 7 是表示自各尿素浓度 (1.5 - 3.0 mol) 中的 β Gal - 1 3 9 S (FM) PPH 8 4 的 β Gal (1 - 1 4)、hPTH (1 - 8 4)、hPTH (1 - 4 4) 和 [hPTH (1 - 8 4) + hPTH (1 - 4 4)] 的回收率的比较图。

图 1 8 是表示自各尿素浓度 (3.0 - 4.0 mol) 中的 β Gal - 1 3 9 S (FM) PPH 8 4 的 β Gal (1 - 1 4)、hPTH (1 - 8 4)、hPTH (1 - 4 4) 和 [hPTH (1 - 8 4) + hPTH (1 - 4 4)] 的回收率的比较图。

图 1 9 是表示嵌合蛋白质 β Gal - 1 3 9 S (FM) PPH 8 4 的 Kex 2 - 6 6 0 处理前和处理后的 HPLC 图表及已鉴别的肽片段和 β Gal - 1 3 9 S (FM) PPH 8 4 的关系的模拟图。图表中的峰号码与图中的片段号码一致。再者, 片段 1、2、3 和 4 根据氨基酸序列决定进行鉴别。7 是从洗脱时间的推断, 5 是从 β Gal (1 - 1 4) 和 hPTH (1 - 8 4) 的相关的推断。另外, 关于 6, 在图中作为 6 表示有洗脱可能性的片段。

图 2 0 是表示自 Kex 2 - 6 6 0 的各酶浓度中的 β Gal - 1 3 9 S (FM) PPH 8 4 的 hPTH (1 - 8 4)、hPTH (1 - 4 4) 和 hPTH (4 5 - 8 4) 的回收率的比较图。■、○、●和▲分别表示 β Gal - 1 3 9 S (FM) PPH 8 4、hPTH (1 - 8 4)、hPTH (1 - 4 4) 和 hPTH (4 5 - 8 4) 的回收率。回收率的计算像以下那样确定。关于 hPTH (1 - 8 4) 和 β Gal - 1 3 9 S (FM) PPH 8 4, 从与浓度已知的标准品的峰面积求出, 另外关于 hPTH (1 - 4 4) 和 hPTH (4 5 - 8 4), 以各自的氨基酸残基数补正浓度已知的 hPTH (1 - 8 4) 的峰面积来求出。

图 2 1 是表示嵌合蛋白质 CATPH 3 4 的 Kex 2 - 6 6 0 处理前和处理后的 HPLC 曲线的图。

图 2 2 是表示表达 Kex 2 - 6 6 0 的质粒 pCU 6 6 0 的制作方法图。

图 2 3 是表示向 TK 6 2/pCU 6 6 0 = 1 0 株的各培养时间中的 K

e x 2 - 6 6 0 培养上清液分泌状况的 SDS - P A G E , 是代替表示电泳图的图面照片。

图 2 4 是表示质粒 p G 2 1 0 S h C T [G] 的制作方法图。

图 2 5 是根据使用合成底物的 K e x 2 活性进行比较各分泌型 K e x 2 衍生物的培养液 O D 6 6 0 附近的产量图。以 K 1 6 - 5 7 C [p Y E 2 2 - 6 1 4] 的产量作为 1 , 表示各分泌型 K e x 2 衍生物的产量。

图 2 6 是表示进行比较每 2 0 0 μ l 分泌型 K e x 2 衍生物的培养上清液的产量的 SDS - P A G E 图。泳道 1 和 1 2 表示分子量标记, 泳道 2 - 1 1 分别表示将 K 1 6 - 5 7 C [p Y E 2 2 m]、K 1 6 - 5 7 C [p Y E 2 2 - 6 1 4]、K 1 6 - 5 7 C [p Y E 2 2 - 6 3 0]、K 1 6 - 5 7 C [p Y E 2 2 - 6 4 0]、K 1 6 - 5 7 C [p Y E 2 2 - 6 5 0]、K 1 6 - 5 7 C [p Y E 2 2 - 6 6 0]、K 1 6 - 5 7 C [p Y E 2 2 - 6 7 9]、K 1 6 - 5 7 C [p Y E 2 2 - 6 8 2]、K 1 6 - 5 7 [p Y E 2 2 - 6 8 8]、或 K 1 6 - 5 7 C [p Y E 2 2 - 6 9 9] 的培养上清液的浓缩液展开。泳道 1 的左侧数字表示分子量标记的大小 (K D a) , 是表示电泳结果的图面代用照片。

图 2 7 是表示以多形毕赤氏酵母作为宿主时的 K e x 2 - 6 0 0 表达质粒 p H I L - 6 6 0 的制作方法图。

本发明的蛋白质如下面所述那样, 蛋白质的长度, 特别是因 C 末端的位置不同生产分泌效率显著不同。本发明是提供具有带来高生产分泌效率长度的蛋白质, 是具有从序列号 1 中的氨基酸序列的 1 位的 M e t 至 6 1 8 - 6 9 8 位的任一氨基酸的氨基酸序列的 K e x 2 蛋白酶衍生物。本发明的 K e x 2 蛋白酶衍生物的 C 末端较好是序列号 1 的氨基酸序列的 6 3 0 位 - 6 8 8 位的任一种氨基酸, 更好是 6 3 0 位 - 6 8 2 位的任一种氨基酸, 最好是 6 3 0 位 - 6 7 9 位的任一种氨基酸。在本发明中, 有时将由序列号 1 的上述的氨基酸序列的一部分组成的上述各种氨基酸序列称作天然的氨基酸序列。

但是, 本专业人员清楚知道, 在关于酶蛋白质的氨基酸序列中的活性的领域以外的领域, 即使用其他氨基酸取代整个氨基酸、氨基酸的缺失或

进行氨基酸附加，也保持该酶的活性。因此，本发明除具有上述的天然氨基酸序列的Kex2蛋白酶衍生物以外，也包括对上述的天然氨基酸序列具有通过1个或数个氨基酸的取代、缺失或附加进行修饰的氨基酸序列、并且具有Kex2蛋白酶活性的蛋白质。

本发明还提供编码上述各种多肽的基因，特别是DNA。像这样的DNA可以用合适的限制性内切酶将具有编码例如序列号1所示的碱基序列或者相同氨基酸序列的其他碱基序列的全长DNA，或者含有作为目的DNA的DNA切断，根据要求连接低聚核苷酸，或者在上述DNA的适当部位导入翻译终止密码等常规方法进行制作。另外，具有上述修饰的氨基酸序列的DNA，使用例如具有在序列号1中记载的碱基序列的天然的全长DNA或基片段作为模板，以含有所希望的变异的引物低聚核苷酸作为变异原引物使用，可使用定点突变法（site-directed mutagenesis）、聚合酶链式反应法（PCR）等常规方法进行制作。

本发明的表达载体含有在所使用的宿主中能发挥功能的启动子等的表达控制领域。例如，在以酵母作为宿主而使用的场合，可以使用甘油醛三磷酸脱氢酶的启动子、甘油磷酸激酶的启动子、酸性磷酸脂酶的启动子、乙醇氧化酶的启动子、甲酸脱氢酶的启动子、甲醇氧化酶的启动子等。

本发明的宿主例如可举出糖酵母属（*Saccharomyces*）、毕赤氏酵母属（*Pichia*）、汉逊氏酵母属（*Hansenula*）、假丝酵母属（*Candida*）等，优选的是啤酒糖酵母（*Saccharomyces Cerevisiae*）、多形毕赤氏酵母（*Pichiapastoris*）、多形汉逊氏酵母（*Hansenula polymorpha*）、博伊丁氏假丝酵母（*Candida boidinii*）等。特别优选的是甲醇利用性的酵母，尤其是假丝酵母属或毕赤氏酵母属的酵母，例如博伊丁氏假氏酵母和巴斯德毕赤氏酵母。

也就是说，本发明人为了能够利用具有Kex2蛋白酶活性的酶作为以工业规模用于从嵌合蛋白质切出肽的酶，认为必须解决以下的课题：1）产量高且能大量地供给，2）纯度高、不混入切断目的肽的其他蛋白酶，3）能设定以蛋白质作为底物的切断条件。进行了如下的研究。

首先，研究了提高具有是最初课题的Kex2蛋白酶活性的酶产量的条件。为了在工业规模下大量精制具有Kex2蛋白酶活性的酶，产量多不用说，其精制简单是重要的，为此，认为使Kex2衍生物向其他蛋白质分泌少的培养液中分泌是有利的。在分泌型Kex2衍生物中，如上所述有关于ssKex2的报道，但其产量是4mg/L，为在工业规模下使用的少。因此，制作编码各种分泌型Kex2衍生物的基因，以啤酒糖酵母作为宿主进行表达，调查了分泌产量。

在本发明中使用的Kex2衍生物是Kex2-614、Kex2-630、Kex2-640、Kex2-656、Kex2-660、Kex2-679、Kex2-682、Kex2-688和Kex2-699。在Kex2衍生物的基因表达中，使用啤酒糖酵母的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAP)基因的启动子。在30℃将导入含有这些表达单位的质粒的啤酒糖酵母培养一夜，以合成底物Boc-Leu-Arg-Arg-MCA作为底物测定培养液中的Kex2蛋白酶活性。其结果表明，在导入Kex2-614、Kex2-630、Kex2-640、Kex2-650、Kex2-660、Kex2-679、Kex2-682和Kex2-688基因的表达单位的酵母培养上清液中检测到Kex2蛋白酶的活性，而在导入Kex2-699基因的表达单位的酵母培养上清液中未检测到活性。由此可知，为了在培养上清液中分泌Kex2衍生物，最好使用具有从N末端1位至m位的氨基酸残基(m=614-688)的衍生物的基因

再有，OD660附近的分泌产量，根据实施例1，与迄今报导的Kex2-614相比，Kex2-660和Kex2-679显著增加。另外，将使用级分分子量大小为10000的超滤膜将培养上清液浓缩20倍的试样放在SDS-PAGE上进行解析的结果，与Kex2-614相比，Kex2-660和Kex2-679没有Kex2活性，分泌量也增加。另外，它们的分子量对应氨基酸残基数变大，即，在这次的培养液中，像以昆虫细胞sf9作为宿主的Kex2 Δ p那样，未蓄积自分解物。

而且还表明, 根据实施例9, K e x 2 - 6 3 0、K e x 2 - 6 4 0、K e x 2 - 6 5 0、K e x 2 - 6 6 0和K e x 2 - 6 7 9的培养液OD 6 6 0附近的K e x 2活性比迄今报导的K e x 2 - 6 1 4高10倍以上, 并且, K e x 2 - 6 8 2、K e x 2 - 6 8 8的K e x 2活性分别是K e x 2 - 6 1 4的6倍和3.4倍, 未能检测到K e x 2 - 6 9 9的K e x 2活性。

即, 培养液的K e x 2活性在要表达的K e x 2衍生物的C末端的氨基酸残基是从K e x 2的6 3 0至6 7 9号的氨基酸残基时变高, 但在此以上, C末端领域越变长, 活性越变低。

另外, 从S D S - P A G E解析可知, 上述的结果也证实K e x 2的分泌量增加。进而, 也表明, K e x 2衍生物的氨基酸残基越增加, 其分子量也越增加, 像以昆虫细胞s f 9作为宿主的K e x 2 Δ p的生产场合那样, 不蓄积自分解物。

这次制作的分泌型K e x 2衍生物在培养上清液中不进行自分散而能蓄积, 因此将表达系从啤酒糖酵母系变换成以单位培养液的产量高的甲醇利用性酵母, 例如博伊丁氏假丝酵母作为宿主的表达系, 研究K e x 2 - 6 6 0的生产, 其结果, 能将产量提高至每1升培养液 3 4 0 m g。该量是从嵌合蛋白质能使约 2 0 0 g的生理活性肽h P T H (1 - 3 4)游离出的量, 根据本发明, 能够提供以工业规模量为了从嵌合蛋白质切出有用肽的所必要量的酶。另外还表明, 作为甲醇利用性酵母, 最好的是假丝酵母属 (*Candida*)。

下面, 说明是第二问题的分泌型K e x 2衍生物的纯度。

首先, 从培养上清液精制分泌产量不多的K e x 2 - 6 6 0。在0.2 m m o l 钙存在下, 用超过滤 (分子量3 0 0 0 0) 过滤培养上清液, 浓缩在啤酒糖酵母细胞外分泌的K e x 2 - 6 6 0, 然后用阴离子交换色谱法和疏水性色谱法精制至单一光谱 (回收率5 7%)。该回收率在迄今已有的报导中最高, 用此方法能够大量地供给高纯度的K e x 2衍生物。

另外, 为了调查以K e x 2衍生物的蛋白质作为底物时的底物特异性、混入其他蛋白酶的可能性, 使精制的过量K e x 2 - 6 6 0作用于嵌

合蛋白质 β Gal-139S (FM) PPH84, 研究此时产生的肽结构, 再者, β Gal-139S (FM) PPH84 是在从大肠杆菌 β -半乳糖苷酶的N末端至139氨基酸残基的多肽之间, 通过来自Phe-Met序列和人副甲状腺激素的前序列(Lys-Ser-Val-Lys-Lys-Arg), 将hPTH(1-84)结合在第76号和122号的半胱氨酸残基取代成丝氨酸残基的 β Gal-139S上的嵌合蛋白质。在序列号2中示出 β Gal-139S的氨基酸序列, 在序列号3中示出hPTH(1-84)的氨基酸序列。

其结果表明, 所产生的肽的N末端序列是来自从Kex2蛋白酶的底物特异性预想的肽片段, 在精制的Kex2-660中, 在从嵌合蛋白质切出目的肽时, 没有像成为问题那样的其他蛋白酶的混入。

使用精制的Kex2-660研究关于第三个课题, 即以蛋白质作为底物的切断条件。

首先, 研究使用目的肽从嵌合蛋白质游离出时, 通用的尿素的影响。在0-4.0 mol 尿素存在下使Kex2-660作用于合成底物Boc-Len-Arg-Arg-MCA, 结果表明, 1.0 mol、2.0 mol、4.0 mol 与不存在尿素的场合相比, 活性分别降低到70%、40%和10%。一般说来, 在不溶性包涵体溶解到尿素溶液中后, 作为使蛋白酶作用的条件, 使用2.0-4.0 mol 的尿素溶液。因此, 如果研究嵌合蛋白质的溶解条件, 考虑Kex2-660可作为用于从嵌合蛋白质中切出目的肽的酶而使用。

其次调查使Kex2-660作用于嵌合蛋白质 β Gal-139S (FM) PPH84时的1.5-3.0 mol 尿素的影响。用Kex2蛋白酶进行预想切断的序列存在于4个部位: Arg-Arg (序列2, 氨基酸序列号13-14, 以下记为切断部位A)、Lys-Arg (原序列部分, 以下记为切断部位B)、Pro-Arg (序列号3, 氨基酸序列号43-44、51-52, 以下分别记为切断部位C和切断部位D)。并且, 各个部位的C末端侧是由蛋白酶切断的。

调查了以Kex2蛋白酶处理产生的肽片段的结构和量, 结果表明,

在 1.5 - 2.5 mol 范围内，尿素浓度高者，Kex 2 - 660 的切断效率高，但尿素浓度 2.5 mol 和 3.0 mol 在切断效率上没有差别。进而关于尿素对底物特异性的影响，随尿素浓度上升，切断部位 B 的切断效率变得良好，但切断部位 C 的切断效率在 2.5 mol 尿素浓度达到峰值，其结果表明，尿素浓度高者，从嵌合蛋白质中的 hPTH (1 - 84) 的回收率良好。另外，未观察到切断部位的切断。在 3.0 - 4.0 mol 的尿素浓度也观察到同样的倾向。这些见识从使用合成底物的场合不能预料到，被本发明第一次阐明。

还研究了使用 Kex 2 - 660 从 β Gal - 139S (FM) PPH 84 中切出 hPTH (1 - 84) 的条件。以从嵌合蛋白质中切出 hPTH (1 - 84) 的条件，使各种量比的 Kex 2 - 660 (每 1 mg 嵌合蛋白质的 Kex 2 - 660 定为 25 KU、50 KU、100 KU、150 KU 和 200 KU) 作用，调查所产生的肽片段的结构和回收率。在使用 50 KU/ml 的 Kex 2 - 660 时，以约 75% 的效率切出 hPTH (1 - 84)。另外，此时约 10% 的 β Gal - 139S (FM) PPH 84 残留下来。

β Gal - 139S (FM) PPH 84 随 Kex 2 - 660 的量增加而减少，在 200 KU/ml 时几乎完全消失。然而，与此同时 hPTH (1 - 44) 和 hPTH (45 - 84) 的比例也增加，hPTH (1 - 84) 的回收率不增加 (图 20)。另一方面，即使 Kex 2 - 660 的量增加，在 hPTH (1 - 44) 增加部分以下，hPTH (1 - 84) 量也不减少，在以下述的实施例 2 进行精制的 Kex 2 - 660 中，在从嵌合蛋白质中切出 hPTH (1 - 84) 的条件下，证实没有混入 Kex 2 蛋白酶和底物特异性不同的其他蛋白酶。

另外，也查明，选择反应条件，在目的肽中即使在保持 Kex 2 蛋白酶的切断部位的场合，也能从嵌合蛋白质中效率良好 (切出效率 75%) 地切出目的肽。再者，该切出效率比使用因子 Xa 场合的 hPTH (1 - 84) 的切出效率 50% (Gardella et al., J. Biol. Chem. 265, 26, 15854-15859, 1990) 高。

Gardella 等暗示, 因子 X a 的识别部位 I l e - G l u - G l y - A r g 序列尽管不存在于 h P T H (1 - 8 4), 但在酶量增加或反应时间延长的场合, h P T H (1 - 8 4) 的回收率下降, 因此混入的蛋白酶或者因子 X a 本身分解 h P T H (1 - 8 4) 的可能性。在 h P T H (1 - 8 4) 中, K e x 2 蛋白酶的切断序列虽然存在于 2 个部位, 但以高回收率得到 h P T H (1 - 8 4) 的事实暗示, 按照本发明使产量增加, 精制的 K e x 2 衍生物作为用于从嵌合蛋白质中切出目的肽的酶是有用的。

还知道精制过的 K e x 2 - 6 6 0, 在不存在尿素下能够从可溶性嵌合蛋白质 C A T P H 3 4 中在尿素存在下能够从不溶性嵌合蛋白质 β G a l - 1 1 7 S 4 H P P H 3 4 中切出 h P T H (1 - 3 4), 在以保护肽和切断部位领域不同的嵌合蛋白质作为底物的场合也能起作用、广泛地应用于工业。另外, 即使在尿素不存在下也未能检测出混入蛋白酶。

即, 在产量增加、精制到单一光谱的分泌型 K e x 2 衍生物中, 在使目的肽从嵌合蛋白质中游离出的条件下不管有无尿素的存在, 不混入使目的肽分解、回收率下降的其他蛋白酶, 并且, 该 K e x 2 衍生物即使在目的肽中存在 K e x 2 蛋白酶的识别部位的情况下, 如果选择条件也能效率良好地回收目的肽, 而且每 1 升培养液的表达量是使约 2 0 0 g 目的肽能游离的量, 以本发明得到的分泌型 K e x 2 衍生物能供给用于在工业规模从嵌合蛋白质中切出目的肽所必需的量。

实施例

根据以下的参考例和实施例等更详细地说明本发明, 但本发明并不受它们的限制。首先叙述作为为本发明材料而使用的质粒、大肠杆菌和酵母以及在各实施例中共同的基本实验操作, 再依次地描述参考例和实施例。

质粒

质粒 p G 9 7 S 4 D h C T [G] 是利用大肠杆菌乳糖操纵子的启动子能够表达在从 β - 半乳糖苷酶的 N 末端至第 9 7 号的氨基酸组成的肽 (第 7 6 号的半胱氨酸残基被丝氨酸残基取代, 第 4 0、4 1 和 7 5 号的谷氨酸残基被天冬氨酸残基取代: 称作 β G a l - 9 7 S 4 D) 上通过谷氨酸残基结合 h C T [G] (在人降血钙素的第 3 2 号氨基酸的 C 末端上附加甘氨酸

酸残基的肽)的嵌合蛋白质的质粒。

如果编码目的肽的DNA与阅读框架相吻合、以EcoRI-SalI DNA片段导入,就能表达和 β Gal-97S4D有关的嵌合蛋白质。含有该质粒的大肠杆菌W3110菌株命名为大肠杆菌SBM323,以保藏号:微工研条寄第3503号(FERM BP-3503)、于1991年8月8日保藏在工业技术院微生物工业技术研究所。

质粒ptacCAT是利用合成启动子tac能够表达氯霉素乙酰转移酶基因的质粒。含有该质粒的大肠杆菌JM109菌株命名为大肠杆菌SBM336,以保藏号FERM BP-5436、于1996年3月1日保藏在工业技术院生命工学工业技术研究所。pG97S4DhCT[G]和ptacCAT作为可溶性hPTH(1-34)嵌合蛋白质表达载体ptacCATPTH(1-34)制作的材料而使用(参考例2及图5、图6)。

质粒pG210ShCT[G]是将编码pG97S4DhCT[G]的 β Gal-97S4D的基因取代成编码 β Gal-210S(在由从 β -半乳糖苷酶的N末端至第210号氨基酸组成的肽中第76、122和154号的半胱氨酸残基被丝氨酸残基取代)的基因的质粒。

含有编码以限制性内切酶PvuII和EcoRI消化pGH α 210(Ser)rop⁻得到的 β Gal-210S的基因的DNA片段与含有以限制性内切酶PvuII和EcoRI消化pG97S4DhCT[G]得到的载体部分的DNA片段连接能够得到(图24)。关于pGH α 210(Ser)rop⁻的制作方法在特公平6-87788中已公布。pG210ShCT[G]作为合成人副甲状腺激素前体(hProPTH(1-84))基因的克隆和质粒pG#190的制作材料而使用(参考例1和图5)。

质粒pCRII从インビトロジエン公司购入,将PCR产物用于直接进行克隆。

质粒pYE-22m是利用甘油醛-3-磷酸脱氢酶(CAP)基因的启动子和终止区,在其间保持多克隆部位(MCS: EcoRI \rightarrow Sal

l I) 的表达载体, 启动子位于E o c R I侧, 在选择标记中保持T R P 1 基因, 在复制开始点保持2 μ m D N A 的一部分 (Inverted Repeats)。具有质粒 p Y E - 2 2 m 的大肠杆菌 J M 1 0 9 菌株命名为大肠杆菌 S B M 3 3 5, 以 F E R M B P - 5 4 3 5, 于 1 9 9 6 年 3 月 1 日保藏在工业技术院生命工学工业技术研究所 (图 1 2)。

质粒 p Y E - K E X 2 (5.0) b (Mizuno et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 156, 246-254, 1988) 用作利用 P C R 法制作 K e x 2 衍生物的基因的模板 (图 1 2)。质粒 p Y E - K E X 2 (R I - P v u II) (特开平 1 - 1 9 9 5 7 8) 用作制作在 K e x 2 - 6 1 4 的 C 末端附加由 1 4 氨基酸 (序列号 4) 组成的肽的蛋白质的表达载体 p Y E - 6 1 4 (图 1 3)。

质粒 p N O T e II 是利用醇氧化酶基因的启动子和终止区, 在其间保持限制性内切酶 N o t I 部位的表达载体, 在选择标记中保持 U R A 3 基因 (特开平 5 - 3 4 4 8 9 5)。

大肠杆菌和酵母

感受态大肠杆菌 J M 1 0 9 菌株由东洋纺 (株) 购入, 用于质粒的制备和嵌合蛋白质表达。大肠杆菌 J M 1 0 菌株和 M 2 5 菌株 (Sugimura et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 153, 753-759, 1988) 分别用于嵌合蛋白质 C A T P H 3 4 和 β G a l - 1 1 7 S 4 H P P H 3 4 的生产。在用于 K e x 2 蛋白酶分泌表达的宿主中, 使用啤酒糖酵母 (Saccharomyces Cerevisiae) K 1 6 - 5 7 C 菌株 (M A T α L e u 2 t r p 1 u r a 3 K e x 2 - 8: Mizuno et al., Biochem. Biophys. Res. Commun, 156, 246-254 (1 9 8 8)) 和博伊丁氏假丝酵母 (Candida boidinii) T K 6 2。

T K 6 2 菌株是从博伊丁氏假丝酵母 S 2 Λ O U - 1 菌株取得的 U R A 3 进行变异产生的尿嘧啶要求的菌株 (Sakai, Y., et al., J. Bacteriol., 173, 7458-7463, 1991)。博伊丁氏假丝酵母 S 2 Λ O U - 1 菌株命名为博伊丁氏假丝酵母 S A M 1 9 5 8, 以保藏号: 微工研条第 3 7 6 6 号 (F E R M B P - 3 7 6 6)、于 1 9 9 2 年 2 月 2 5 日保藏于工

业技术院微生物工业技术研究所。

培养基

在大肠杆菌培养基中，使用LB培养基（0.5%（w/v）酵母提取物、1%（w/v）胰化胨、0.5%（w/v）NaCl）、SB培养基（1.2%（w/v）酵母提取物、2.4%（w/v）胰化胨、0.5（v/v）甘油）、SB2培养基（2%（w/v）酵母提取物、1%（w/v）胰化胨、0.5%（v/v）甘油、1.2%（w/v） K_2HPO_4 、0.3%（w/v） KH_2PO_4 ）、及NU培养基（0.3（w/v）酵母提取物、1.5%（w/v）葡萄糖、0.3%（w/v） KH_2PO_4 、0.3（w/v） K_2HPO_4 、0.27%（w/v） Na_2HPO_4 、0.1%（w/v） $(NH_4)_2SO_4$ 、0.2g/L NH_4Cl 、0.2%（w/v） $MgSO_4$ 、40mg/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、40mg/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、10mg/L $MnSO_4 \cdot nH_2O$ 、10mg/L $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 、4mg/L $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 、2mg/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、2mg/L $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 、1mg/L $CuCl_2 \cdot 7H_2O$ 、0.5mg/L H_3BO_3 ）。

在啤酒糖酵母的培养中使用YCDP培养基（1%（w/v）酵母提取物、2%（w/v）酪蛋白氨基酸、2%（w/v）葡萄糖、100mmol磷酸钾（pH6.0））。

在博伊丁氏假丝酵母的培养中使用BMGY培养基（1%（w/v）酵母提取物、2%（w/v）胨、1%（v/v）甘油、1.34%（v/v）YNB w/o $\Lambda\Lambda$ ：无氨基酸的酵母氮碱、0.4mg/L生物素、100mmol磷酸钾（pH6.0））、BMMY培养基（1%（w/v）酵母提取物、2%（w/v）胨、0.5（v/v）甲醇、1.34%（v/v）YNB w/o $\Lambda\Lambda$ 、0.4mg/L生物素、100mmol磷酸钾（pH6.0））、YPD培养基（1%（w/v）酵母提取物、2%（w/v）胨、2%（w/v）葡萄糖）、YPGM培养基（1%（w/v）酵母提取物、2%（w/v）胨、3%（v/v）甘油、1%（v/v）甲醇、1.3%（v/v）YN

B w/o AA、50 mmol 磷酸钾 (pH 6.0))。

基本的实验操作

在参考例如实施例 中未具体地示出时，实验操作遵循以下的方法。

以使用磷酸胺酸法的全自动合成机 (アプライドバイオシステムズモデル 380A) 合成 DNA 引物。用双脱氧法决定 DNA 碱基序列。

用限制性内切酶进行的切断，使用购入前指定的 3 - 10 倍量的酶进行 1 小时反应。质粒结构的解析，使用 0.5 - 10 μ g DNA、在 20 μ l 的反应液中进行，在 DNA 的制备中，使用 3 - 10 μ g DNA、在 50 - 100 μ l 的反应液中进行。反应温度、反应缓冲剂等条件遵循购入前的指定。

琼脂糖凝胶电泳试样，在反应液中添加 1/5 容量的色素液 (含 0.25% (w/v) 溴酚蓝的 15% (w/v) Fico11 水溶液) 进行制备。在琼脂糖凝胶电泳用缓冲剂中使用 TAE 缓冲剂 (10 mmol Tris、20 mmol 乙酸、2 mmol EDTA)。在质粒的结构解析中使用 Mupid-2 (エスモバイオ (株式会社))，进行 100 伏 1 小时的电泳，为了制备 DNA 片段使用水平胶 (20 cm \times 15 cm \times 0.7 cm) 进行 150 伏、4 小时或 35 伏、14 小时的电泳。用溴化 3, 8 - 二氨基 - 5 - 乙基 - 6 - 苯基菲啶翁 (0.5 μ g/ml) 将胶进行 20 分钟染色后，照射紫外线，检测 DNA 光谱。琼脂糖凝胶的浓度，参照要级分的 DNA 片段的大小，使用 1.0、1.5、2.0% (w/v)。

在装满 0.1 X TAE 缓冲剂的透析管内放入琼脂糖凝胶、施加电压，使琼脂糖凝胶中的 DNA 洗脱，或者使用 SUPREC-01 (宝酒造 (株式会社)) 从胶中提取琼脂糖凝胶中的 DNA。DNA 溶液经苯酚处理后，进行乙醇沉淀。

连接反应是在 30 μ l 含有 0.05 - 1 μ g DNA 片段的反应液 (67 mmol Tris/HCl (pH 7.5)、5 mmol MgCl₂、5 mmol DDT、1 mmol ATP) 中添加 10 单位的 T4 连接酶，在 16 $^{\circ}$ C 进行 12 - 18 小时反应，或者使用 TAKARA 连接试剂盒 (宝酒造 (株式会社)) 进行。

大肠杆菌的转化法以氯化钙法进行 (JM109 菌株使用购入的感受态细胞), 根据耐药剂性 (氯苄西林或四环素) 选择转化菌株。酵母 K16-57C 菌株的转化按照乙酸锂法 (METHODS IN YEAST GENETICS; A Laboratory Course Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press) 进行, 根据色氨酸营养要求的互补性选择转化菌株。TK62 的转化法按照阪井等报导的方法 (Sakai et al., J Bacteriol. 173, 7458-7463, 1991) 进行。

Kex2 活性测定按照水野等的方法进行 (Mizuno et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 156, 246-254, 1988)。即, 在含有 2 mmol CaCl₂、0.2% (w/v) 蛇麻醇 (ルブロール)、100 μmol Boc-Leu-Arg-Arg-MCA ((株式会社) 肽研究所) 的 200 mmol Tris/HCl (pH 7.0) 溶液 100 μl 中添加以 100 mmol Tris/HCl (pH 7.0) 稀释的 Kex2 100 μl, 在 37℃ 放置 30 分钟, 添加 25 mmol EGTA 50 μl 使反应停止。用 PANDEx FCA 系统 (バクスタートラベノール (株式会社) 10-015-1 型; (激发波长 = 365 nm、基底波长 = 450 nm)) 测定游离出的荧光物质 (AMC) 的荧光强度。将以上述条件、在 1 分钟使 1 pmol 的 AMC 游离的 Kex2 量定义为 1 U。

SDS-聚丙烯酰胺电泳 (SDS-PAGE) 按照 Laemmli 的方法进行 (Laemmli et al., Natur 227, 680-685, 1970)。即, 在试剂中添加 1/4 容量的 4 × SDS 试样缓冲剂 (375 mmol Tris/HCl (pH 6.8)、30% (v/v) 甘油、7% (w/v) SDS、15% (v/v) 2-巯基乙醇、0.1% (w/v) 溴酚蓝), 在 95℃ 加热 5 分钟。将 10 μl 供给 SDS-聚丙烯酰胺胶 (55 mm × 85 mm × 1 mm 或テフエ公司), 进行 20 mA、80 分钟的电泳。电泳后用染色液 (10% (v/v) 乙酸、40% (v/v) 甲醇、0.25% (w/v) 考马斯亮蓝-R2) 将胶染色。

其他, 除特别表示以外, 基本的基因操作按照 Molecular Cloning

(Maniatis 等著, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982) 中记载的方法进行。

参考例 1 嵌合蛋白质 β Gal-139S (FM) PPH84 的制备

1) hProPTH (1-84) 基因的制作 (图 1 和图 2)

hProPTH (1-84) 基因, 如图 1 所示, 分成 U1-U7 (序列号 5-11) 和 L1-L7 (序列号 12-18) 的 14 个片段进行合成。

hProPTH (1-84) 基因像以下那样将各片段连接而制成 (图 2)。首先, 在含有 16 单位的 T4 多核苷酸激酶和 0.5 nmol (1M Bq 以上) 的 [γ - 32 P]dATP 的磷酸反应液 15 μ l (50 mmol Tris/HCl (pH 7.6)、10 mmol MgCl₂、5 mmol DTT) 中、在 37°C 使 DNA 片段 U1 (序列号 5) 和 L7 (序列号 18) (各约 1 μ g) 反应 15 分钟。向其中添加含有 5 mmol ATP 的磷酸反应液 5 μ l, 再在 37°C 反应 45 分钟。U2 (序列号 6) 和 L6 (序列号 17)、U3 (序列号 7) 和 L5 (序列号 16)、U4 (序列号 8) 和 L4 (序列号 15)、U5 (序列号 9) 和 L3 (序列号 14)、U6 (序列号 10) 和 L2 (序列号 13) 及 U7 (序列号 11) 和 L1 (序列号 12) 也同样进行。

将上述的 7 个反应液集中在一起, 进行乙醇沉淀, 回收 DNA。将其溶解于 80 μ l 的 100 mmol Tris/HCl (pH 7.6)、6.5 mmol MgCl₂、300 mmol NaCl 中。将其中的 40 μ l 在 95°C 放置 5 分钟后, 经 30 分钟温度降至 43°C。冰冷却后添加 40 μ l 的连接 B 液 (宝酒造 (株式会社)), 在 26°C 放置 15 分钟。

将该试样供给 5% 聚丙烯酰胺电泳。电泳后, 用自动射线照像术检测已连接的 DNA 片段。从胶中提取出对应约 280 bp 的 DNA 片段后, 按照通用方法进行精制。

2) β Gal-139S (FM) PPH84 表达质粒 pGP# 19 的制作 (图 3 和图 4)

在含有合成 $nPrOPTH(1-84)$ 基因的约 280 bp 的 DNA 片段中, 在 5' 末端存在限制性内切酶 $EcoRI$ 部位, 在 3' 末端存在限制性内切酶 SaI 部位。将该 $EcoRI/SaI$ DNA 片段插入 $pG210ShCT[G]$ 的 $EcoRI/SaI$ 部位进行 $hPrOPTH(1-84)$ 基因的克隆。

用限制性内切酶 $EcoRI$ 和 SaI 切断 $pG210ShCT[G]$ 后, 制备成含有载体部分的约 3.5 kb DNA 片段。将其与由以 1) 得到的约 280 bp 组成的 $hPrOPTH(1-84)$ 基因的 DNA 片段连接, 得到质粒 $pG210ShPrOPTH$ (图 3)。使用 $pG210ShPrOPH$ 使大肠杆菌 JM109 菌株进行转化, 得到 JM109[$pG210ShPrOPTH$]。

进而, 在 $pG210ShPrOPTH$ 的限制性内切酶 $XhoI/EcoRI$ 部位导入接头 KM091 (序列号 19) 和 KM092 (序列号 20), 制成质粒 $pG210S(S/X)$ (图 3)。该接头在两端保持限制性内切酶 $XhoI$ 和 $EcoRI$ 部位, 在其间保持 $SacI$ 部位。

$pG210S(S/X)$, 用限制性内切酶 $SacI$ 和 $XhoI$ 消化后, 使用 $Kilobase$ (测序) 用 $Deletion$ 试剂盒 (宝酒造 (株式会社)), 使编码 $\beta Gal-210S$ 的 DNA 领域随时间变化且异常地进行缺失。用 $klenow$ 片段进行末端修复后, 进行自身连接, 得到将通过 $Phe-Met$ 连接 $\beta Gal-139S$ 和 $hPrOPTH(1-84)$ 的嵌合蛋白质 $\beta Gal-139S(FM)PH84$ 编码的质粒 $pGD\#19$ (图 4)。将导入 $pGP\#19$ 的大肠杆菌 JM109 菌株称作 JM109[$pGP\#19$]。

将 JM109[$pGP\#19$] 接种到含有 200 ml SB 培养基的 1 升容积的三角烧瓶中, 在 37°C 振动培养 16 小时。将前培养液全量接种到含有 10 $\mu g/ml$ 四环素的 3 升的 NU 培养基上, 使用 5 升容积的发酵桶 (ミツワ 理化工业 (株式会社), KMJ-5B-4U-FP 型), 在 37°C 进行通气搅拌培养。通气量达到 3 L/min, 变化搅拌速度, 使溶解量控制在 2.0 ppm 以上。

pH值用9% (v/v) 氨水和1 mol磷酸控制在pH 7。在培养开始后第3、9和14小时，每1升培养液添加10 ml甘油供给碳源，在培养开始后第9.5小时，每1升培养液添加10 ml 5倍浓度的SB培养基来供给氮源。在培养开始时按300 μ l/L添加消泡剂（デイスフオ-ムCC-222，（株）日本油脂），以后根据需要添加。

培养18小时后的OD₆₆₀是55，每1 ml培养液能产生约0.5 mg的嵌合蛋白质 β Gal-139S (FM) PPH84。嵌合蛋白质作为不溶性包涵体而生产，像以下那样进行精制。将1.5 L培养液在4 $^{\circ}$ C、以6000 r/min离心10分钟（日立制作所（株式会社），20PR-52D）回收菌体。将菌体悬浮于320 ml的100 mmol Tris/HCl (pH 7.0) 中，用法式压力机进行破碎（10000 psi，2次）。

菌体破碎液在4 $^{\circ}$ C、以4000 r/min离心15分钟（日立制作所（株式会社），05PR-22：50 ml容积的塑料管（住友ベークライト（株式会社））。将沉淀物悬浮在含有0.5% (w/v) Triton X-100的30 ml的20 mmol Tris/HCl (pH 7.0) 中后，在4 $^{\circ}$ C、以3000 r/min离心15分钟，回收沉淀。将该操作重复4次，形成精制的嵌合蛋白质。

粗精制嵌合蛋白质的纯度是约70%（根据SDS-PAGE进行估计），蛋白质质量是约670 mg（以牛血清白蛋白作为基准，以布拉德福德（ブラッドフォード）法定量）。

粗精制嵌合蛋白质供给使用YMC填充柱（2 cm \times 25 cm，（株式会社）小村化学研究所）的高速液体色谱（HPLC，ミリポア（株式会社）Waters 600E），进行精制。嵌合蛋白质用乙腈的直线浓度梯度（A：0.1% (v/v) 三氟乙酸（TFA）；B：0.1% (v/v) TFA/80% (v/v) 乙腈；%B = 30% \rightarrow 60%，60分，流速10 ml/min）进行洗脱。各级分供给SDS-PAGE，集中纯度95%以上的级分，进行冷冻干燥。

冷冻干燥的嵌合蛋白质再次溶解于0.1% (v/v) TFA中，供给H

P L C，再进行精制（条件，除使梯度达到% B = 4 0 % → 6 0 % / 6 0 分以外，其他相同）。经分析用H P L C的分析，以2 1 0 n m的吸光度作为指标，集中纯度9 9 %以上的级分，进行冷冻干燥作为标准品。从氨基酸分析推断标准品的蛋白质质量。

参考例2 可溶性嵌合蛋白质C A T P H 3 4的制备

1) C A T P H 3 4表达质粒p t a c C A T P T H (1 - 3 4) 的制作 (图5和6)

在p G 9 7 S 4 D h C T [G]的限制性内切酶E c o R I - X h o I部位插入R 4接头 (R 4 U: 序列号2 1及R 4 L: 序列号2 2)，制成p G 9 7 S 4 D h C T [G] R 4。在所得的p G 9 7 S 4 D h C T [G] R 4的限制性内切酶X h o I - K p n I部位插入用P C R制备的P T H (1 - 3 4) 基因和以下所示的p r o α接头 (p r o α U: 序列号2 3、p r o α L: 序列号2 4)，制成p P T H (1 - 3 4) p r o α。P T H (1 - 3 4) 基因，以p G P # 1 9作为模板，借助使用引物P 1 (序列号2 5)和P 2 (序列号2 6)的P C R进行制备 (图5)。

接着，为了在C A T基因 (氨基转移酶)的3'末端导入限制性内切酶X h o I部位，合成引物C A T 1和C A T 3 (序列号2 7和2 8)。通过使用引物C A T 1和C A T 3、模板D N A使用p t a c C A T的P C R，得到在3'末端导入限制性内切酶X h o I部位的C A T基因。用限制性内切酶N c o I和X h o I将其消化后，连接来自p t a c C A T的S a l I - N c o I D N A片段 (3.6 k b p)和来自p P T H (1 - 3 4) p r o α的X h o I - S a l I D N A片段 (0.1 5 k b p)，制成p t a c C A T P T H (1 - 3 4)。

2) 嵌合蛋白质C A T P H 3 4的制备 (参照图7)

在L B培养基上在3 7 ℃培养具有p t a c C A T P T H (1 - 3 4)的J M 1 0 1菌株。在培养液的O D 6 6 0值达到0.6时，添加I P T G (异丙基β - 硫代半乳糖苷)，最终使浓度达到2 m m o l，再继续培养3小时，使嵌合蛋白质C A T P H 3 4产生。培养终了后，利用离心分离 (8 0 0 0 r / m i n，2 0分钟)回收菌体，添加溶液Λ (5 0 m m o

1 Tris/HCl (pH 8.0)、2 mmol EDTA、0.1 mmol 2-巯基乙醇、0.1 mmol PMSF), 使悬浮液的OD 660值达到7.0。

接着将该菌体悬浮液进行超声波处理, 将菌体破碎后, 用离心分离(12000 r/min, 10分钟)分离可溶性级分, 加到以溶液A平衡了的氯霉素己酸酯(Sigma C-8899)柱(3 ml)上。用含1 mol的NaCl的溶液A将柱洗净后, 用含10 mol氯霉素和1 mol NaCl的溶液A使嵌合蛋白质洗脱。图7是对精制前后的试料进行SDS-PAGE的结果。再有, 泳道1表示分子量标记, 泳道2表示菌体破碎后的可溶性级分, 泳道3表示精制后的嵌合蛋白质CATPH(1-34)。泳道1左侧的数字表示分子量标记的大小(KDa)。

嵌合蛋白质由可溶性级分生产, 借助使用氯霉素己酸酯的亲合性色谱法易于进行精制。

参考例3 不溶性嵌合蛋白质 β Gal-117S4HPH34的制备

1) β Gal-117S4HPH34表达质粒pG117S4HPH34的制作(图8-10)

以pGP#19为模板, 以S01(序列号29)和S02(序列号30)作为引物, 用PCR法将hPTH(1-84)的第35号密码GTT转变成翻译停止密码TAA的DNA片段扩增后, 按照常规方法分离精限制性内切酶AatII-SalI DNA片段, 与pGP#19的对应部分进行交换, 制成pGP#19PPH34(图8)。

接着, 以pG210S(S/X)为模板, 以S03(序列号31)和S05(序列号32)作为引物, 通过PCR法扩增后, 用T4连接酶连接用限制性内切酶SalI和SmaI消化的DNA片段、pGP#19PPH34为模板以S07(序列号33)和S02(序列号30)作为引物按照PCR法扩增后用限制性内切酶SalI和SmaI消化的DNA片段和含有pGP#19PPH34的复制起点的限制性内切酶PvuI-SalI DNA片段, 制成pG117SPPH34(图

9-10)。

在pG117SPPH34的限制性内切酶Sma I部位插入编码(His)₄-Pro-Gly的接头S08(序列号34)和S09(序列号35),制成pG117S4HPPH34(图10)。在制备质粒后,决定DNA碱基序列,确认接头的方向性。

2) 嵌合蛋白质βGal-117S4HPPH34的生产

为了大量地得到嵌合蛋白质βGal-117S4HPPH34,在37℃在20L SB2培养基中培养导入该嵌合蛋白质的表达载体的大肠杆菌M25[pG117S4HPPH34]菌株。在菌体浓度OD₆₆₀=1.0时添加IPTG,使最终浓度达到1mmol,继续培养至菌体浓度OD₆₆₀=1.2。在消泡剂中使用去泡剂(デイスフォ-ム)CC-222((株式会社)日本油脂)。收集菌落后,悬浮在TE(10mmol Tris/HCl, 1mmol EDTA, pH8.0)中,用高压匀浆器(Manton-Gaulin)进行菌体破碎,离心分离,用TE和去离子水进行悬浮洗净,得到约100g包涵体。

实施例1 以啤酒糖酵母作为宿主的分泌型Kex2衍生物的表达

为了大量精制具有Kex2蛋白酶活性的酶,产量高不用说,其精制简单也是重要的,为此,认为向其它蛋白质分泌少的培养液中分泌是有益的。作为分泌型Kex2衍生物有关于ssKex2的报导,但其产量是4mg/L,在工业规模下使用的少。因此,首先制作各种分泌型Kex2衍生物,以啤酒糖酵母作为宿主进行表达,调查分泌产量,从其中得到分泌产量高的Kex2衍生物。

1) 分泌型Kex2衍生物表达质粒的制作(图11、12和13)

用PCR法制成分泌型KEX2基因。引物的序列如图11(b)所示。KM085(序列号36)在5'末端具有限制性内切酶EcoRI部位(下部线),KM088(序列号37)、KM089(序列号38)、KM090(序列号39)和KM093(序列号40)在5'末端分别具有限制性内切酶SalI部位(下部线)。

另外,这些引物对应于如图11(a)所示的KEX2基因领域,K

M085含有编码KEX2基因的开始甲硫氨酸的碱基序列，KM088、KM089、KM090和KM093分别具有从N末端在第660号、第679号、第688号和第699之后附加翻译停止密码TAA序列的反意义链的碱基序列。

用限制性内切酶EcoRI切断，将处于直链上的质粒pYE-KEX2(5.0)b作为模板，使用引物KM085和KM088，进行PCR反应。用限制性内切酶EcoRI和SalI切断反应精制物，得到EcoRI-SalI DNA片段。该DNA片段具有编码Kex2-660的碱基序列(KEX2-660)，在其上游具有限制性内切酶EcoRI部位，在其下游具有限制性内切酶SalI部位。

接着，用限制性内切酶EcoRI和SalI切断质粒pYE-22m后，精制含有载体部分的约8.3kb的DNA片段。将其分别与含有编码先前得到的Kex2-660的基因的EcoRI-SalI DNA片段连接，得到质粒pYE-660(图12)。

同样，用KM089、KM090或KM093代替引物KM088，回收分别含有编码Kex2-679、Kex2-688和Kex2-699的碱基序列(KEX2-679、KEX2-688、KEX2-699)的EcoRI-SalI DNA，通过与质粒pYE-22m的EcoRI-SalI片段连接，能够得到质粒pYE-679、pYE-688或pYE-699。

含有pYE-KEX2(RI-PvuII)的KEX2基因一部分的BglII-SalI DNA片段与含有pYE-660的KEX2-660基因一部分的BglII-SalI DNA片段进行取代，制成质粒pYE-614(图13)。

2) 转化和分泌型Kex2衍生物的表达(参照图14和15)

将质粒(pYE-22m、pYE-614、pYE-660、pYE-679、pYE-688和pYE-699)分别导入K16-57C菌株，得到K16-57C[pYE-22m]、K16-57C[pYE-614]、K16-57C[pYE-660]、K16-57c[pYE-

679]、K16-57c[pYE-688]和K16-57C[pYE-699]菌株。

通过培养上清液的Kex2活性测定和浓缩液的SDS-PAGE调查Kex2衍生物向培养液的分泌量。

在4ml YCDP培养基中接种菌落后，在32℃振荡培养一夜。在4ml YCDP培养基中接种100μl培养液后，在32℃振荡培养一夜。在4℃、以12000r/min、5分钟将培养液1ml进行离心，得到培养上清液。用100mmol Tris/HCl (pH7.0)将培养上清液稀释成2-64倍后，测定Kex2活性。结果示于图14中。K16-57C[pYE-660]、K16-57C[pYE-679]和K16-57C[pYE-688]的OD660附近的Kex2活性，与K16-57C[pYE-614]相比，分别是2.5倍、1.5倍和1.2倍。在K16-57C[pYE-22m]和K16-57C[pYE-699]的培养上清液中未检测到Kex2活性。

SDS-PAGE用的试样，使用ウルトラフリー-C3GC (ミリオア (株式会社)，级分分子量：10000)将培养上清液浓缩20倍进行制备，每泳道使用相当200μl培养上清液。结果示于图15中。泳道1和7表示分子量标记，泳道2表示K16-57C[pYE-22m]，泳道3表示K16-57C[pYE-614]，泳道4表示K16-57C[pYE-660]，泳道5表示K16-57C[pYE-679]，泳道6表示K16-57C[pYE-688]。泳道左侧的数字表示分子量标记的大小(KDa)。

Kex2-660和Kex2-679活性相同，但比Kex2-614分泌量增加。另外，它们的分子量对应氨基酸残基数变大，即，在这些培养液中，像以昆虫细胞St9作为宿主的Kex2△P那样，不蓄积自分解物。

已知Kex2-660和Kex2-679的分泌产量是迄今已报导的Kex2-614的分泌产量的10倍以上，是非常多的。另外，在培养上清液中也看不到明显的自分解，因此通过研究生产方法能够期待进一

步提高产量。

实施例2 Kex2-660的精制

扩大规模培养K16-57C[pYE-660]菌株, 试验从培养上清液精制Kex2-660。

在32℃、在3升YCDP培养基上将K16-57C[pYE-660]培养一夜。用超过滤组件(UF-LMII系统, UF2CS-3000ps, 东ソ-(株式会社)), 浓缩2.3L培养上清液, 并和缓冲液(20mmol Bis-Tris/HCl (pH6.0)、50mmol NaCl、0.2mmol CaCl₂)进行交换(最终容量: 275ml)。

将其中的210ml吸附在预先用相同缓冲液平衡化的Q-琼脂糖凝胶XK16(ファルマシア(株式会社))柱上。用75ml的相同缓冲液洗净后, 用相同的缓冲液利用50-350mmol的NaCl浓度的直线浓度梯度进行洗脱(120ml)。流速以3ml/min进行。在150-250mmol的NaCl浓度的洗脱级分24ml中回收Kex2活性。向该洗脱液中添加6.6g硫酸铵后, 用HCl调整至pH6.0, 用20mmol Bis-Tris/HCl (pH6.0)、0.2mmol CaCl₂填充到30ml。

将其中15ml吸附在以预先含有2mol硫酸铵的20mmol Bis-Tris/HCl (pH6.0)、0.2mmol CaCl₂平衡化的Phenylsuperose HR5/5(ファルマシア(株式会社))柱上。用2.5ml相同的缓冲液洗净后, 用20mmol Bis-Tris/HCl (pH6.0)、0.2mmol CaCl₂, 进行利用2-0mol硫酸铵的直线浓度梯度洗脱(15ml)。流速以0.5ml/min进行。在0.8-0.6mol硫酸铵浓度的洗脱级分2.25ml中回收Kex2活性。在表1中示出各过程中的Kex2-660的回收率。累计各过程的回收率求出回收率。

表 1 Kex2-660的精制

过程	活性 ($\times 10^4$ U/ml)	回收率(%)	
		*1	*2
培养上清液	9.3		100
0.22 μ m 过滤	9.2	99	99
超过滤	50	99	97
Q-琼脂糖凝胶	250	63	61
Phenyl Superose	1,740	93	57

*1: 各过程的回收率; *2: 来自培养上清液试料的回收率

实施例3 尿素对Kex2-660的Kex2蛋白酶活性的影响

嵌合蛋白质表达法大多是嵌合蛋白质形成不溶性包涵体, 为了将其溶化而使用尿素等变性剂。迄今, 没有关于尿素对Kex2蛋白酶和分泌型Kex2衍生物的活性影响的报导。因此, 以合成底物Boc-Leu-Arg-Arg-MCA和嵌合蛋白质 β Gal-139S(FM)PPH84作为底物, 调查了尿素对Kex2-660的蛋白酶活性的影响。

1) 尿素对以合成底物作为底物时的Kex2-660的Kex2蛋白酶活性的影响

使用实施例2精制的Kex2-660(调整到最终浓度80-1200 U/ml), 使用合成底物Boc-Leu-Arg-Arg-MCA调查最终尿素浓度0、1、2、4 mol下的活性。反应条件, 除尿素以外遵循上述的Kex2活性测定法。以尿素不存在下的活性作为100%时, 尿素浓度为1、2、4 mol下的活性分别是70%、40%、10%(图16)。不溶性包涵体溶解在尿素溶液中后, 在使蛋白酶起作用的场合, 一般以2-4 mol的尿素浓度进行。因此, 研究嵌合蛋白质的溶解条件等, Kex2-660可以用作从嵌合蛋白质中切出目的肽的酶。

2) 尿素对以蛋白质作为底物时的Kex2-660 Kex2蛋白酶活性的影响

使用参考例1制备的 β Gal-139S(FM)PPH84和实施例2精制的Kex2-660, 调查尿素对Kex2-660蛋白酶活性

的影响。首先，就尿素浓度 1.5 - 3.0 mol，在以下的条件下、在 37 °C 反应 30 分钟。向反应液中添加 4 倍容量的 5 N 乙酸后，将 50 μl 反应液供给使用 YMC-ODS-A302 柱 (d 4.6 mm × 150 mm, (株式会社) 山村化学研究所) 的高速液相色谱 (HPLC: 岛津制作所 (株式会社) LC6A)，以直线浓度梯度 (A: 0.1% (v/v) 三氟乙酸 (TFA)，B: 0.094% (v/v) TFA/80% (v/v) 乙腈，%B = 30% → 60%/30 分，流速 1 ml/min) 进行洗脱。

2mg/ml	β Gal-139S(FM)PPH84
100mM	Tris/HCl(pH7.0)
1.5 - 3.0M	尿素
1mM	CaCl ₂
50kU/ml	Ke x 2 - 6 6 0

Ke x 2 - 6 6 0 处理后，取出新产生的峰，进行从 N 末端的氨基酸序列的决定和氨基酸组成分析，鉴定 β Gal (1 - 14)、hPTH (1 - 84) 和 hPTH (1 - 44)。在 β Gal - 139S (FM) PPH84 中，用 Ke x 2 蛋白酶预想切断的序列存在于 Arg - Arg (切断部位 A)、Lys - Arg (切断部位 B)、Pro - Arg (切断部位 C、切断部位 D) 四个部位。从鉴定过的肽片段能证实切断部位 A、切断部位 B、切断部位 C 的切断，但不能证实切断部位 D 的切断。

Ke x 2 - 6 6 0 处理后产生的各肽片段的回收率如以下那样进行确定。

$$\text{回收率 (\%)} = \text{FPA} \times \text{CAA} \times 100 / (\text{CPA} \times \text{FAA})$$

FPA: 进行 Ke x 2 - 6 6 0 处理后的各肽片段的峰区面积

CAA: β Gal - 139S (FM) PPH84 的氨基酸数
(231 氨基酸)

CPA: 进行 Ke x 2 - 6 6 0 处理前的 β Gal - 139S (FM) PPH84 的峰区面积

F A A: 各肽片段的氨基酸数

结果示于图 1 7 中。□、○、●和△分别表示 β G a l (1 - 1 4) 、 h P T H (1 - 8 4) 、 h P T H (1 - 4 4) 和 [h P T H (1 - 8 4) + h P T H (1 - 4 4)] 的回收率。

在尿素浓度 1.5 - 2.5 m o l 的范围, 随尿素浓度上升, 利用 K e x 2 - 6 6 0 切出的肽的回收率增加, 即, 切断部位 A、切断部位 B 和切断部位 C 的切断效率上升。

另一方面, 在 2.5 - 3.0 m o l 尿素浓度, β G a l (1 - 1 4) 、 h P T H (1 - 4 4) 的回收率降低, [h P T H (1 - 8 4) + h P T H (1 - 4 4)] 的回收率几乎不变化, 因为 h P T H (1 - 8 4) 增加, 所以切断部位 B 的切断效率不变, 但切断部位 A 和切断部位 C 的切断效率降低。即, 在用 K e x 2 - 6 6 0 进行 β G a l - 1 3 9 S (F M) P P H 8 4 的切断中, 至 2.5 m o l 浓度的尿素浓度, 高者切断效率降低, 但在 2.5 - 3.0 m o l 的尿素浓度, 不出现因其序列不同的切断效率差别。

因此, 就更高尿素浓度 3.0 - 4.0 m o l 进行以下的实验, 调查各肽片段的回收率。

2mg/ml	β Gal-139S(FM)PPH84
100mM	Tris/HCl(pH7.0)
3.0 - 4.0M	尿素
1mM	CaCl ₂
20kU/ml	K e x 2 - 6 6 0

结果示于图 1 8 中。符号和回收率的计算如前所述。

其结果是, 在尿素浓度 3.0 - 4.0 m o l 时, 所有的肽片段的回收率都无明显的差别, 但随尿素浓度上升, 看到 β G a l (1 - 1 4) 、 h P T H (1 - 4 4) 的回收率降低, h P T H (1 - 8 4) 增加的倾向。即, 随尿素浓度上升, 切断部位 B 的切断效率有某些增加, 切断部位 C 的切断

效率减少。

以上，关于在1.5 - 4.0 mol 尿素浓度下由Kex 2 - 660进行的 β Gal - 139S (FM) PPH84的切断进行归纳，在尿素浓度1.5 - 2.5 mol 范围，随尿素浓度上升，切断部位A、切断部位B和切断部位C的切断效率上升，在尿素浓度2.5 - 3.5 mol 范围，切断部位B的切断效率上升，而切断部位C的切断效率下降。这些见解从使用合成底物的场合不能预料，被本发明初次知晓。

从由嵌合蛋白质切出hPTH (1 - 84)的观点看，切断部位B的切断效率高，切断部位C的切断效率低，希望尿素浓度为3.5 - 4.0 mol。

实施例4 用Kex 2 - 660进行从 β Gal - 139S (FM) PPH84切出hPTH (1 - 84)

在实施例3中，鉴定 β Gal (1 - 14)、hPTH (1 - 84)和hPTH (1 - 44)，从这些肽的回收率，研究尿素对用Kex 2 - 660进行 β Gal - 139S (FM) PPH84切断效率的影响。但是，没能鉴定来自hPTH (45 - 84)的肽片段。因此，将进行Kex 2 - 660处理的hPTH (1 - 84)样品，在改变洗脱条件的HPLC上进行分析、解析，鉴定hPTH (45 - 84)，利用上述条件进行的洗脱，证实在未吸附的级分中洗脱出。这些结果表明，切断部位D几乎不接受切断。接着，使各种量比的Kex 2 - 660 (每1mg嵌合蛋白质使用的Kex 2 - 660分别为25KU、50KU、100KU、150KU和200KU)作用于嵌合蛋白质，30分钟后，调查各肽片段的回收率。所产生的肽片段的解析，从上述结果将梯度条件变更成%B = 0% → 80%/80分，除此以外进行与实施例3相同地操作。

1mg/ml	β Gal-139S(FM)PPH84
100mM	Tris/HCl(pH7.0)
4M	尿素
1mM	CaCl ₂

25 - 200kU/ml

K e x 2 - 6 6 0

K e x 2 - 6 0 0 未处理的和以 5 0 K U 的 K e x 2 - 6 6 0 处理的试样的记录示于图 1 9 中。峰 1、2、3、4、7 分别是 h P T H (4 5 - 8 4) (从切断部位 C 的后面的氨基酸至 h P T H (1 - 8) 4 的 C 末端)、 β G a l (1 - 1 4) (从 β G a l - 1 3 9 S 的 N 末端至切断部位 A)、h P T H (1 - 8 4)、h P T H (1 - 4 4) (从切断部位 B 的后面的氨基酸至切断部位 C) 和 β G a l - 1 3 9 S (F M) P P H 8 4 (嵌合蛋白质的全长)。

在 K e x 2 - 6 6 0 量少时, 峰 6、7 多, 在 K e x 2 - 6 6 0 量多时, 峰 6、7 少, 随峰 6、7 的减少, 峰 5 增加, 因此峰 5 是从嵌合蛋白质的切断部位 A 的后面的氨基酸至切断部位 B 的肽, 峰 6 是从 β G a l - 1 3 9 S 的 N 末端至切断部位 B 或者从切断部位 A 的后面的氨基酸至 h P T H (1 - 8 4) 的 C 末端 (峰 6 也有从 β G a l - 1 3 9 S 的 N 末端至切断部位 C 的可能性, A r g - A r g 一方因为比 P r o - A r g 容易切断, 所以该可能性低)。

另外, 在 2 5 - 2 0 0 K U / m l 的范围, 峰 1、4、5、6、7 的大小变化, 但峰 2、3 的大小几乎不变。另外, 即使在使用 2 0 0 K U / m l 的 K e x 2 - 6 6 0, 也不产生新的峰。即, 即使使用为了切出 h P T H (1 - 8 4) 所必要的 K e x 2 - 6 6 0 量 (2 5 K U / m l) 的 8 倍量 (2 0 0 K U / m l), 也检测不到 K e x 2 蛋白酶以外的蛋白酶活性, 在实施例中精制的 K e x 2 - 6 6 0 中, 证实在从嵌合蛋白质中切出 h P T H (1 - 8 4) 的条件下, 没有混入成为问题的其他蛋白酶。

来自在 2 5 - 2 0 0 K U / m l 范围中的 h P T H (1 - 8 4) 的肽片段的回收率汇集于图 2 0 中。在使用 5 0 K U / m l 的 K e x 2 - 6 6 0 的场合, 已知 h P T H (1 - 8 4) 约 7 5 % 被回收。此时, 残留约 1 0 % 的 β G a l - 1 3 9 S H (F M) P P H 8 4, 但随 K e x 2 - 6 6 0 量增加而减少, 在 2 0 0 K U / m l, 基本完全消失。可是, h P T H (1 - 4 4) 的比例也同时增加, h P T H (1 - 8 4) 的回收率不增加。K

e x 2 - 6 6 0 量迅速增加时, h P T H (1 - 8 4) 的分解物、h P T H (1 - 4 4) 和 h P T H (4 5 - 8 4) 增加缓慢, 在 2 5 - 2 0 0 K U / m l 的范围, h P T H (1 - 8 4) 的回收率是 6 5 - 7 5 %。

从以上结果可知, 即使在 K e x 2 - 6 6 0 在目的肽中保持 K e x 2 蛋白酶的切断部位的场合, 能够效率良好地 (切出效率 7 5 %) 从嵌合蛋白质切出目的肽。再者, 该切出效率比使用因子 X a 时的 h P T H (1 - 8 4) 的切出效率高 5 0 % (Gardella et al., J. Biol. Chem., 265 (26), 15854-15859, 1990)。G a r d e l l a 等暗示, 尽管在 h P T H (1 - 8 4) 没有因子 X a 的识别部位 I l e - G l u - G l y - A r g 序列, 但若增加酶量或者延长反应时间, h P T H (1 - 8 4) 的回收率就下降, 因此混入的蛋白酶或因子 X a 分解 h P T H (1 - 8 4) 的可能性。

在 h P T H (1 - 8 4) 中, 尽管 K e x 2 蛋白酶的切断序列存在于 2 个部位, 但以高回收率得到 h P T H (1 - 8 4) 的这一事实表明, 按照本发明增加产量、精制的 K e x 2 衍生物作为用于从嵌合蛋白质中切出目的肽的酶是有用的。

另外, 在使 K e x 2 - 6 6 0 量增加的场合, 也未检测到利用 K e x 2 蛋白酶部位以外的切断产生的肽片段, 以实施例 2 精制的 K e x 2 的底物特异性高, 并且, 在从嵌合蛋白质中切出目的肽的条件下未检测到其他蛋白酶活性。

实施例 6 利用 K e x 2 - 6 6 0 进行从 C A T P H 3 4 切出 h P T H (1 - 3 4)

为了从嵌合蛋白质 C A T P H 3 4 切出 h P T H (1 - 3 4) , 从参考例 2 的洗脱液取出 6 0 μ l , 向其中添加 2 3 9 μ l 去离子水、1.3 2 μ l 的 1 m o l C a C l 2 和 3 0 K U 的 K e x 2 - 6 6 0 , 在 3 7 $^{\circ}$ C 加温 1 小时。在反应后, 对出现的峰进行氨基酸分析, 结果与 h P T H (1 - 3 4) 的氨基酸组成一致 (图 2 1) 。

即, 在反应溶液中即使尿素不存在的状态, 也未检测到其他蛋白酶活性, 使用 K e x 2 - 6 6 0 从嵌合蛋白质中切出 h P T H (1 - 3 4) 。另外, 即使嵌合蛋白质的保护肽和切断部位领域不同, K e x 2 - 6 6 0

也能切出目的肽，能够工业地广泛使用。

实施例 7 从嵌合蛋白质 β Gal-117S4HPPH34 中切出 hPTH (1-34)

向 250 ml 参考例 3 制备的 β Gal-117S4HPPH34 的包涵体悬浮液 (160 g/L) 中添加 1 mol Tris/HCl (pH 8.2) 100 ml、5 mol NaCl 50 ml、去离子水 500 ml、尿素 900 g，在 30℃ 的恒温槽中进行 30 分钟搅拌溶解，用温去离子水稀释，在 30℃ 形成 5 升。

边搅拌，边向其中缓慢地添加 250 mmol CaCl_2 溶液 50 ml，再添加 Kex2-660，使达到 20 KU/ml。2 小时后，以 90% 以上的效率切出 7 g 的 hPTH (1-34)。所使用的 Kex2-660 量是嵌合蛋白质的 1/20000 (重量比) 以下，效率良好地从嵌合蛋白质切出 hPTH (1-34)。

实施例 8 以博伊丁氏假丝酵母作为宿主的分泌型 Kex2 衍生物的表达

从实施例 1 的结果已知，Kex2-660 在培养液中不发生显著的自分解。因此，如果使用更高效率的表达系，就能期待产量增加。以甲醇利用性酵母即博伊丁氏假丝酵母作为宿主，试验 Kex2-660 的生产。

1) 以博伊丁氏假丝酵母作为宿主的表达质粒的制作 (图 11 和 22)

除了在引物中使用 NKEX2 (序列号 41) 和 KM088 以外，与实施例 1 的 1) 同样地用 PCR 法制成 NKEX2-660。NKEX2 在 5' 末端具有限制性内切酶 Not I 部位的碱基序列 (下划线部)，含有 KEX2 基因的开始甲硫氨酸的上游 -107--132 碱基序列 (图 11)。在 pCR II 上克隆后，用限制性内切酶 Not I 切出 NKEX2-660 基因 (具有 KEX2 基因的 5' 非翻译领域 132 碱基对的 KEX2 基因)。在质粒 pNOTe1 I 的 Not I 部位在启动子支配下要能表达 KEX2-660 基因地插入含有 NKEX2-660 基因的 Not I DNA 片段，制成 pCU660 (图 22)。

2) 以博伊丁氏假丝酵母作为宿主的分泌型Kex2衍生物的生产(图23)

以存在于URA3基因上的限制性内切酶BamHI切断, 形成直链质粒pCU660中导入TK62, 选择出转化菌株TK62/pCU660。20株TK62[pCU660]株(#1~#20)在BMGY培养基上、于27℃进行振荡培养。2天后, 将相当前培养液10OD·ml接种到1ml的BMMY培养基上, 在27℃再进行振荡培养。30小时后, 测定培养上清液的Kex2活性。对活性高的5株进行同样的培养, 选择Kex2活性良好再现高的TK62[pCU660]#10株, 用发酵罐培养。

将甘油冷冻原种TK62[pCU660]#10株1ml接种到含有25ml的YPD培养基的300ml容量的三角烧瓶中, 在27℃进行16小时前培养。将10.5ml的前培养液(OD600=38)接种到2L的YPGM培养基上, 用5L容量的发酵罐(ミツワ理化、KMJ-5B-4U-PP型), 在27℃进行通气搅拌培养。以通气量达到4L/min、溶解氧量不低于2.5ppm以下那样变化搅拌速度进行控制。适当补充甲醇、甘油和氮源(5%(v/v)酵母提取物、10%(v/v)豚、6.7%(v/v)YNB w/o AA, 1/25容量/次)。

添加5%(v/v)氨水, 以pH不在5.5以下那样控制pH。在培养开始时按0.5ml/L添加消泡剂, 然后根据需要添加。在图23中示出各培养时间的培养上清液的SDS-PAGE的结果。培养48小时后的OD660是35, 按照该培养每1L培养上清液能生产的2800MU的Kex2-660(相当约340mg)。

该产量是在实施例7中切出200g hPTH(1-34)的可能量, 表明本发明的Kex2衍生物以工业规模能实际地应用于从嵌合蛋白质切出目的肽。

实施例9 以啤酒糖酵母作为宿主的分泌型Kex2衍生物的表达(2)

在实施例1中已显示, 缺失C末端领域的Kex2蛋白酶(Kex2

-660和Kex2-679)的产量比Kex2-614、Kex-699显著增加。在本实施例中,制成缺失更多的C末端领域的Kex2蛋白酶(Kex2-630、Kex2-640、Kex2-650和Kex2-682),调查了Kex2蛋白酶的产量与C末端领域的关系。

1) 分泌型Kex2衍生物表达质粒的制作

按照实施例1的1)方法制成分泌型Kex2基因。即,引物的序列KM100(序列号42)、KM102(序列号43)、KM103(序列号44)和KM104(序列号45)分别具有从N末端第630号、第640号、第650号和第682号氨基酸之后附加翻译停止密码TAA序列的无义链的碱基序列,在5'末端保持限制性内切酶Sal I部位。

编码分泌型Kex2衍生物基因的EcoRI-Sal I DNA片段和含有这些片段的表达载体的制作,按照实施例1的1)方法进行。将从Kex2蛋白酶的N末端至第630号、640号、650号或682号的多肽分别称作Kex2-630、Kex2-640、Kex2-650、Kex2-682,将编码它们的基因分别称作KEX2-630、KEX2-640、KEX2-650、KEX2-682。

2) 转化和分泌型Kex2衍生物的生产(参照图25和26)

向K16-57C菌株导入质粒(pYE-630、pYE-640、pYE-650、pYE-682),得到K16-57C[pYE-630]、K16-57C[pYE-640]、K16-57C[pYE-650]和K16-57C[pYE-682]菌株。接着对这些转化株、还有以实施例1的2)制备成的分泌型Kex2衍生物生产株进行培养,利用培养上清液的Kex2活性测定和培养上清液浓缩液的SDS-PAGE调查Kex2的产量(向培养液分泌的Kex2量)。

培养液首先将菌落悬浮在YCDP培养基中后,在30℃进行振动培养,制备成对数增殖期的菌。接着将该菌在使OD660的吸光度达到约0.02那样在YCDP培养基中进行继代培养,在30℃再培养约16小时。在图25中示出Kex2活性的测定结果,在图26中示出SDS-

PAGE的结果。

在培养OD 660附近的Kex2活性,K16-57C[pYE-630]、K16-57C[pYE-640]、K16-57C[pYE-650]、K16-57C[pYE-660]和K16-57C[pYE-679]是K16-57C[pYE-614]的大约1.2倍,在从KEX2-630至KEX2-679的范围内,Kex2的产量没有差别。

另外,K16-57C[pYE-682]、K16-57C[pYE-688]、的Kex2的产量分别是K16-57C[pYE-614]的6倍、3.4倍,C末端领域越长越降低(图25)。在K16-57C[pYE-22m]和K16-57C[pYE-699]的培养上清液中未检测到Kex2活性。

此外,从SDS-PAGE的结果可知,Kex2-630、Kex2-640、Kex2-650、Kex2-660、Kex2-679、Kex2-682、Kex2-688的产量,与Kex2活性一样,比Kex2-614增加。

实施例10 以多形毕赤氏酵母作为宿主的分泌型Kex2衍生物的表达

实施例8的结果表明,以博伊丁氏假丝酵母作为宿主的表达系能够大量地生产分泌型Kex2衍生物Kex2-660。使用以多形毕赤氏酵母(*Pichia pastoris*)作为宿主的表达系((*Pichia Expression Kit*),インビトロジエン公司)调查即使用其他甲醇利用性酵母也能生产Kex2-660。

1) 以多形毕赤氏酵母作为宿主的分泌型Kex2衍生物表达质粒的制作(参照图11和27)

以限制性内切酶EcoRI切断、形成直链的质粒pYE-660为模板、在引物中使用KM085(序列号36)和KM088(序列号37),进行PCR反应。反应精制物在pCRII(インビトロジエン公司)上进行克隆。用限制性内切酶EcoRI切断得到的质粒,得到在KEX2-660基因的两端具有限制性内切酶EcoRI部位的DN

A 片段。

在质粒 p H I L - D 2 (Pichia Expression Kit) 的限制性内切酶 E c o R I 部位插入含有 K E X 2 - 6 6 0 基因的 D N A 片段, 得到 K E X 2 - 6 6 0 基因通过 A O X 启动子插入能表达方向的质粒 p H I L - 6 6 0 (图 2 7) 。

2) 以多形毕赤氏酵母作为宿主的分泌型 K e x 2 衍生物的生产

用限制性内切酶 N o t I 切断质粒 p H I L - 6 6 0 得到含有 K E X 2 - 6 6 0 基因的片段, 将该片段导入多形毕赤氏酵母 G S 1 1 5 菌株 (his, AOX⁻, Pichia Expression Kit) 中, 选择出以不含组氨酸的培养基培养的转化株 G S 1 1 5 [p H L - 6 6 0]。从这些之中得到仅以甲醇作为碳源时不能培养的 G S 1 1 5 [p H I L - 6 6 0] (A O X⁻) 5 株。在 B M M Y 培养基上培养这些菌株, 得到 K e x 2 产量多的 G S 1 1 5 [p H I L - 6 6 0] # 2 3 。

调查 G S 1 1 5 [p H L - 6 6 0] # 2 3 的 K e x 2 的产量。首先, 将菌落接种到 1 0 m l 的 B M G Y 培养基上, 在 3 0 ℃ 振动培养 2 天, 将从 1 0 m l 培养液中离心分离得到的菌悬浮于 2 m l 的 B M M Y 培养基中, 在 2 5 ℃ 再振动培养 2 天, 然后测定培养上清液的 K e x 2 活性。其结果表明, 每 1 m l 培养液生产约 1 3 5 0 K U (相当约 1 6 0 μ g) 的 K e x 2 - 6 6 0 。

因此, 即使以博伊丁氏假丝酵母以外的甲醇利用性酵母即多形毕赤氏酵母作为宿主的表达系统也能大量地生产 K e x 2 - 6 6 0 。

序列**序列号: 1****序列长: 2848****序列类型: 核酸****链数: 双链****拓扑学: 直链状****序列种类: cDNA****起源****生物名称: 啤酒糖酵母****菌株名: X2180-IB****序列**

```

TGCATAATTC TGTCATAAGC CTGTTCTTTT TCCTGGCTTA AACATCCCGT TTTGTA AAAAG 60
AGAAATCTAT TCCACATATT TCATTCATTC GGCTACCATA CTAAGGATAA ACTAATCCCG 120
TTGTTTTTTG GCCTCGTCAC ATAATTATAA ACTACTAACC CATTATCAG ATG AAA GTG 178
                                                    Met Lys Val
                                                    1
AGG AAA TAT ATT ACT TTA TGC TTT TGG TGG GCC TTT TCA ACA TCC GCT 226
Arg Lys Tyr Ile Thr Leu Cys Phe Trp Trp Ala Phe Ser Thr Ser Ala
      5              10              15
CTT GTA TCA TCA CAA CAA ATT CCA TTG AAG GAC CAT ACG TCA CGA CAG 274
Leu Val Ser Ser Gln Gln Ile Pro Leu Lys Asp His Thr Ser Arg Gln
      20              25              30              35
TAT TTT GCT GTA GAA AGC AAT GAA ACA TTA TCC CGC TTG GAG GAA ATG 322
Tyr Phe Ala Val Glu Ser Asn Glu Thr Leu Ser Arg Leu Glu Glu Met
              40              45              50
CAT CCA AAT TGG AAA TAT GAA CAT GAT GTT CGA GGG CTA CCA AAC CAT 370
His Pro Asn Trp Lys Tyr Glu His Asp Val Arg Gly Leu Pro Asn His
              55              60              65

```

TAT GTT TTT TCA AAA GAG TTG CTA AAA TTG GGC AAA AGA TCA TCA TTA	418
Tyr Val Phe Ser Lys Glu Leu Leu Lys Leu Gly Lys Arg Ser Ser Leu	
70 75 80	
GAA GAG TTA CAG GGG GAT AAC AAC GAC CAC ATA TTA TCT GTC GAT GAT	466
Glu Glu Leu Gln Gly Asp Asn Asn Asp His Ile Leu Ser Val His Asp	
85 90 95	
TTA TTC CCG CGT AAC GAC CTA TTT AAG AGA CTA CCG GTG CCT GCT CCA	514
Leu Phe Pro Arg Asn Asp Leu Phe Lys Arg Leu Pro Val Pro Ala Pro	
100 105 110 115	
CCA ATG GAC TCA AGC TTG TTA CCG GTA AAA GAA GCT GAG GAT AAA CTC	562
Pro Met Asp Ser Ser Leu Leu Pro Val Lys Glu Ala Glu Asp Lys Leu	
120 125 130	
AGC ATA AAT GAT CCG CTT TTT GAG AGG CAG TGG CAC TTG GTC AAT CCA	610
Ser Ile Asn Asp Pro Leu Phe Glu Arg Gln Trp His Leu Val Asn Pro	
135 140 145	
AGT TTT CCT GGC AGT GAT ATA AAT GTT CTT GAT CTG TGG TAC AAT AAT	658
Ser Phe Pro Gly Ser Asp Ile Asn Val Leu Asp Leu Trp Tyr Asn Asn	
150 155 160	
ATT ACA GGC GCA GGG GTC GTG GCT GCC ATT GTT GAT GAT GGC CTT GAC	706
Ile Thr Gly Ala Gly Val Val Ala Ala Ile Val Asp Asp Gly Leu Asp	
165 170 175	
TAC GAA AAT GAA GAC TTG AAG GAT AAT TTT TGC GCT GAA GGT TGT TGG	754
Tyr Glu Asn Glu Asp Leu Lys Asp Asn Phe Cys Ala Glu Gly Ser Trp	
180 185 190 195	
GAT TTC AAC GAC AAT ACC AAT TTA CCT AAA CCA AGA TTA TCT GAT GAC	802
Asp Phe Asn Asp Asn Thr Asn Leu Pro Lys Pro Arg Leu Ser Asp Asp	
200 205 210	

TAC CAT GGT ACG AGA TGT GCA GGT GAA ATA GCT GCC AAA AAA GGT AAC	850
Tyr His Gly Thr Arg Cys Ala Gly Glu Ile Ala Ala Lys Lys Gly Asn	
215 220 225	
AAT TTT TGC GGT GTC GGG GTA GGT TAC AAC GCT AAA ATC TCA GGC ATA	898
Asn Phe Cys Gly Val Gly Val Gly Tyr Asn Ala Lys Ile Ser Gly Ile	
230 235 240	
AGA ATC TTA TCC GGT GAT ATC ACT ACG GAA GAT GAA GCT GCC TCC TTG	946
Arg Ile Leu Ser Gly Asp Ile Thr Thr Glu Asp Glu Ala Ala Ser Leu	
245 250 255	
ATT TAT GGT CTA GAC GTA AAC GAT ATA TAT TCA TGC TCA TGG GGT CCC	994
Ile Tyr Gly Leu Asp Val Asn Asp Ile Tyr Ser Cys Ser Trp Gly Pro	
260 265 270 275	
GCT GAT GAC GGA AGA CAT TTA CAA GGC CCT AGT GAC CTG GTG AAA AAG	1042
Ala Asp Asp Gly Arg His Leu Gln Gly Pro Ser Asp Leu Val Lys Lys	
280 285 290	
GCT TTA GTA AAA GGT GTT ACT GAG GGA AGA GAT TCC AAA GGA GCG ATT	1090
Ala Leu Val Lys Gly Val Thr Glu Gly Arg Asp Ser Lys Gly Ala Ile	
295 300 305	
TAC GTT TTT GCC AGT GGA AAT GGT GGA ACT CGT GGT GAT AAT TGC AAT	1138
Tyr Val Phe Ala Ser Gly Asn Gly Gly Thr Arg Gly Asp Asn Cys Asn	
310 315 320	
TAC GAC GGC TAT ACT AAT TCC ATA TAT TCT ATT ACT ATT CGG GCT ATT	1186
Tyr Asp Gly Tyr Thr Asn Ser Ile Tyr Ser Ile Thr Ile Gly Ala Ile	
325 330 335	
GAT CAC AAA GAT CTA CAT CCT CCT TAT TCC GAA GGT TGT TCC GCC GTC	1234
Asp His Lys Asp Leu His Pro Pro Tyr Ser Glu Gly Cys Ser Ala Val	
340 345 350 355	

ATG GCA GTC ACG TAT TCT TCA GGT TCA GGC GAA TAT ATT CAT TCG AGT	1282
Met Ala Val Thr Tyr Ser Ser Gly Ser Gly Glu Tyr Ile His Ser Ser	
360 365 370	
GAT ATC AAC GGC AGA TGC AGT AAT AGC CAC GGT GGA ACG TCT GCG GCT	1330
Asp Ile Asn Gly Arg Cys Ser Asn Ser His Gly Gly Thr Ser Ala Ala	
375 380 385	
GCT CCA TTA GCT GCC GGT GTT TAC ACT TTG TTA CTA GAA GCC AAC CCA	1378
Ala Pro Leu Ala Ala Gly Val Tyr Thr Leu Leu Leu Glu Ala Asn Pro	
390 395 400	
AAC CTA ACT TGG AGA GAC GTA CAG TAT TTA TCA ATC TTG TCT GCG GTA	1426
Asn Leu Thr Trp Arg Asp Val Gln Tyr Leu Ser Ile Leu Ser Ala Val	
405 410 415	
GGG TTA GAA AAG AAC GCT GAC GGA GAT TGG AGA GAT AGC GCC ATG GGG	1474
Gly Leu Glu Lys Asn Ala Asp Gly Asp Trp Arg Asp Ser Ala Met Gly	
420 425 430 435	
AAG AAA TAC TCT CAT CGC TAT GGC TTT GGT AAA ATC GAT GCC CAT AAG	1522
Lys Lys Tyr Ser His Arg Tyr Gly Phe Gly Lys Ile Asp Ala His Lys	
440 445 450	
TTA ATT GAA ATG TCC AAG ACC TGG GAG AAT GTT AAC GCA CAA ACC TGG	1570
Leu Ile Glu Met Ser Lys Thr Trp Glu Asn Val Asn Ala Gln Thr Trp	
455 460 465	
TTT TAC CTG CCA ACA TTG TAT GTT TCC CAG TCC ACA AAC TCC ACG GAA	1618
Phe Tyr Leu Pro Thr Leu Tyr Val Ser Gln Ser Thr Asn Ser Thr Glu	
470 475 480	
GAG ACA TTA GAA TCC GTC ATA ACC ATA TCA GAA AAA AGT CTT CAA GAT	1666
Glu Thr Leu Glu Ser Val Ile Thr Ile Ser Glu Lys Ser Leu Gln Asp	
485 490 495	

GCT AAC TTC AAG ACA ATT GAG CAC GTC ACG GTA ACT GTA GAT ATT GAT 1714
 Ala Asn Phe Lys Arg Ile Glu His Val Thr Val Thr Val Asp Ile Asp
 500 505 510 515
 ACA GAA ATT AGG GGA ACT ACG ACT GTC GAT TTA ATA TCA CCA GCG GCG 1762
 Thr Glu Ile Arg Gly Thr Thr Thr Val Asp Leu Ile Ser Pro Ala Gly
 520 525 530
 ATA ATT TCA AAC CTT GGC GTT GTA AGA CCA AGA GAT GTT TCA TCA GAG 1810
 Ile Ile Ser Asn Leu Gly Val Val Arg Pro Arg Asp Val Ser Ser Glu
 535 540 545
 GGA TTC AAA GAC TGG ACA TTC ATG TCT GTA GCA CAT TGG GGT GAG AAC 1858
 Gly Phe Lys Asp Trp Thr Phe Met Ser Val Ala His Trp Gly Glu Asn
 550 555 560
 GGC GTA GGT GAT TGG AAA ATC AAG GTT AAG ACA ACA GAA AAT GGA CAC 1906
 Gly Val Gly Asp Trp Lys Ile Lys Val Lys Thr Thr Glu Asn Gly His
 565 570 575
 AGG ATT GAC TTC CAC AGT TGG AGG CTG AAG CTC TTT GGG GAA TCC ATT 1954
 Arg Ile Asp Phe His Ser Trp Arg Leu Lys Leu Phe Gly Glu Ser Ile
 580 585 590 595
 GAT TCA TCT AAA ACA GAA ACT TTC GTC TTT GGA AAC GAT AAA GAG GAG 2002
 Asp Ser Ser Lys Thr Glu Thr Phe Val Phe Gly Asn Asp Lys Glu Glu
 600 605 610
 GTT GAA CCA GCT GCT ACA GAA AGT ACC GTA TCA CAA TAT TCT GCC AGT 2050
 Val Glu Pro Ala Ala Thr Glu Ser Thr Val Ser Gln Tyr Ser Ala Ser
 615 620 625
 TCA ACT TCT ATT TCC ATC AGC GCT ACT TCT ACA TCT TCT ATC TCA ATT 2098
 Ser Thr Ser Ile Ser Ile Ser Ala Thr Ser Thr Ser Ser Ile Ser Ile
 630 635 640

GGT GTG GAA ACG TCG GCC ATT CCC CAA ACG ACT ACT GCG AGT ACC GAT 2146
Gly Val Glu Thr Ser Ala Ile Pro Gln Thr Thr Thr Ala Ser Thr Asp
645 650 655
CCT GAT TCT GAT CCA AAC ACT CCT AAA AAA CTT TCC TCT CCT AGG CAA 2194
Pro Asp Ser Asp Pro Asn Thr Pro Lys Lys Leu Ser Ser Pro Arg Gln
660 665 670 675
GCC ATG CAT TAT TTT TTA ACA ATA TTT TTG ATT GGC GCC ACA TTT TTG 2242
Ala Met His Tyr Phe Leu Thr Ile Phe Leu Ile Gly Ala Thr Phe Leu
680 685 690
GTG TTA TAC TTC ATG TTT TTT ATG AAA TCA AGG AGA AGG ATC AGA AGG 2290
Val Leu Tyr Phe Met Phe Phe Met Lys Ser Arg Arg Arg Ile Arg Arg
695 700 705
TCA AGA GCG GAA ACG TAT GAA TTC GAT ATC ATT GAT ACA GAC TCT GAG 2338
Ser Arg Ala Glu Thr Tyr Glu Phe Asp Ile Ile Asp Thr Asp Ser Glu
710 715 720
TAC GAT TCT ACT TTG GAC AAT GGA ACT TCC GGA ATT ACT GAG CCC GAA 2386
Tyr Asp Ser Thr Leu Asp Asn Gly Thr Ser Gly Ile Thr Glu Pro Glu
725 730 735
GAG GTT GAG GAC TTC GAT TTT GAT TTG TCC GAT GAA GAC CAT CTT GCA 2434
Glu Val Glu Asp Phe Asp Phe Asp Leu Ser Asp Glu Asp His Leu Ala
740 745 750 755
AGT TTG TCT TCA TCA GAA AAC GGT GAT GCT GAA CAT ACA ATT GAT AGT 2482
Ser Leu Ser Ser Ser Glu Asn Gly Asp Ala Glu His Thr Ile Asp Ser
760 765 770
GTA CTA ACA AAC GAA AAT CCA TTT AGT GAC CCT ATA AAG CAA AAG TTC 2530
Val Leu Thr Asn Glu Asn Pro Phe Ser Asp Pro Ile Lys Gln Lys Phe
775 780 785

```

CCA AAT GAC GCC AAC GCA GAA TCT GCT TCC AAT AAA TTA CAA GAA TTA 2578
Pro Asn Asp Ala Asn Ala Glu Ser Ala Ser Asn Lys Leu Gln Glu Leu
      790              795              800

CAG CCT GAT GTT CCT CCA TCT TCC GGA CGA TCG 2611
Gln Pro Asp Val Pro Pro Ser Ser Gly Arg Ser
      805              810              814

TGATTCGATA TGTACAGAAA GCTTCAAATT ACAAATAGC ATTTTTTCT TATAGATTAT 2671
AATACTCTCT CATACGTATA CGTATATGTG TATATGATAT ATAAACAAAC ATTAATATCC 2731
TATTCCTTCC GTTTGAATC CCTATGATGT ACTTTCATT GTTTCACCC CGGAATAAAA 2791
TGAAACTCC GAACCGATAT ATCAAGCACA TAAAAGGGGA GGGTCCAATT AATGCAT 2848

```

序列号: 2

序列长: 139

序列类型: 氨基酸

拓扑学: 直链状

序列种类: 肽

序列

```

Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Arg Asp Trp
  1              5              10              15
Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro Pro
      20              25              30
Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp Arg Pro Ser
      35              40              45
Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe Pro
      50              55              60
Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu Glu Ser Asp Leu Pro Glu
      65              70              75              80

```


序列号: 4

序列长: 14

序列类型: 氨基酸

拓扑学: 直链状

序列种类: 肽

序列

Gly Gly Ser Ser Arg Val Ile leu Gln Ala Cys Leu Ile Asn

1

5

10

14

序列号: 5

序列长: 40

序列类型: 氨基酸

拓扑学: 直链状

序列种类: 合成DNA

序列

AATTCATGAA ATCTGTAAA AAGCGTCTG TTTCTGAAAT

序列号: 6

序列长: 41

序列类型: 氨基酸

拓扑学: 直链状

序列种类: 合成DNA

序列

TCAGCTGATG CATAACCTGG GCAAACACCT GAATAGCATG G

序列号: 7

序列长: 41

序列类型: 核酸

链数: 单链

拓朴学：直链状

序列种类：合成DNA

序列

AACGCGTCGA GTGGCTGCGT AAGAAACTGC AGGACGTCCA
C

序列号：8

序列长：41

序列类型：核酸

链数：单链

拓朴学：直链状

序列种类：合成DNA

序列

AACTTCGTTG CGCTGGGTGC ACCGCTGGCT CCACGTGATG C

序列号：9

序列长：39

序列类型：核酸

链数：单链

拓朴学：直链状

序列种类：合成DNA

序列

AGGATCCCAA CGTCCGCGTA AGAAAGAAGA TAACGTACT

序列号：10

序列长：40

序列类型：核酸

链数：单链

拓朴学：直链状

序列种类：合成DNA

序列

GGTTGAATCT CATGAGAAAT CCCTGGGCGA AGCTGACAAA

序列号：1 1

序列长：4 0

序列类型：核酸

链数：单链

拓扑学：直链状

序列种类：合成DNA

序列

GCCGATGTTA ACGTGCTGAC CAAAGCGAAA AGCCAGTAAG

序列号：1 2

序列长：3 3

序列类型：核酸

链数：单链

拓扑学：直链状

序列种类：合成DNA

序列

TCGACTTACT GGCTTTTCGC TTTGGTCAGC ACG

序列号：1 3

序列长：4 0

序列类型：核酸

链数：单链

拓扑学：直链状

序列种类：合成DNA

序列

TTAACATCGG CTTTGTCAGC TTCGCCAGG GATTCTCAT

序列号: 1 4

序列长: 4 0

序列类型: 核酸

链数: 单链

拓扑学: 直链状

序列种类: 合成DNA

序列

GAGATTCAAC CAGTACGTTA TCTTCTTTCT TACGCGGACG

序列号: 1 5

序列长: 4 1

序列类型: 核酸

链数: 单链

拓扑学: 直链状

序列种类: 合成DNA

序列

TTGGGATCCT GCATCACGTG GAGCCAGCGG TGCACCCAGC

G

序列号: 1 6

序列长: 4 1

序列类型: 核酸

链数: 单链

拓扑学: 直链状

序列种类: 合成DNA

序列

CAACGAAGTT GTGGACGTCC TGCAGTTTCT TACGGAGCCA

C

序列号: 17

序列长: 41

序列类型: 核酸

链数: 单链

拓扑学: 直链状

序列种类: 合成DNA

序列

TCGACTCGTT CCATGCTATT CAGGTGTTTG CCCAGGTTAT

G

序列号: 18

序列长: 46

序列类型: 核酸

链数: 单链

拓扑学: 直链状

序列种类: 合成DNA

序列

CATCAGCTGA ATTCAGAAA CAGAACGCTT TTTAACAGAT

TTCATG

序列号: 19

序列长: 24

序列类型: 核酸

链数: 单链

拓扑学: 直链状

序列种类: 合成DNA

序列

TCGAGGTCGA CGGTACCGAG CTCG

序列号： 2 0

序列长： 2 4

序列类型： 核酸

链数： 单链

拓扑学： 直链状

序列种类： 合成DNA

序列

AATTCGTGCT CGGTACCGTC GACC

序列号： 2 1

序列长： 2 4

序列类型： 核酸

链数： 单链

拓扑学： 直链状

序列种类： 合成DNA

序列

AATTCGAGCT CGGTACCGTC GACC

序列号： 2 2

序列长： 2 4

序列类型： 核酸

链数： 单链

拓扑学： 直链状

序列种类： 合成DNA

序列

TCGAGGTCGA CGGTACCGAG CTCG

序列号: 2 3

序列长: 3 6

序列类型: 核酸

链数: 单链

拓扑学: 直链状

序列种类: 合成DNA

序列

TCGAGAAAGA AGAAGGCGTA AGCTTGGAAA AACGAT

序列号: 2 4

序列长: 3 0

序列类型: 核酸

链数: 单链

拓扑学: 直链状

序列种类: 合成DNA

序列

CGTTTTCCA AGCTTACGCC TTCTTCTTTC

序列号: 2 5

序列长: 3 3

序列类型: 核酸

链数: 单链

拓扑学: 直链状

序列种类: 合成DNA

序列

GTAAAAAGC GATCGGTTTC TGAAATTCAG CTG

序列号: 2 6

序列长: 3 4

序列类型：核酸

链数：单链

拓扑学：直链状

序列种类：合成DNA

序列

GCACCGGTAC CTTAGAAGTT GTGGACGTCC TGCA

序列号：27

序列长：30

序列类型：核酸

链数：单链

拓扑学：直链状

序列种类：合成DNA

序列

GCTAAGGAAG AATTCATGGA GAAAAAATC

序列号：28

序列长：24

序列类型：核酸

链数：单链

拓扑学：直链状

序列种类：合成DNA

序列

CTGCCTTAAA ACTCGAGCGC CCCG

序列号：29

序列长：45

序列类型：核酸

链数：单链

拓朴学：直链状

序列种类：合成DNA

序列

**AAACTGCAGG ACGTCCACAA CTTCTAAGCG CTGGGTGCAC
CGCGT**

序列号：30

序列长：24

序列类型：核酸

链数：单链

拓朴学：直链状

序列种类：合成DNA

序列

CATTAAAGCT TTGCGATGAT AAGC

序列号：31

序列长：26

序列类型：核酸

链数：单链

拓朴学：直链状

序列种类：合成DNA

序列

CGCACCGATC GCCCTTCCCA ACAGTT

序列号：32

序列长：35

序列类型：核酸

链数：单链

拓朴学：直链状

序列种类：合成DNA

序列

TTTCCCGGGC CTCCGTGGGA ACAAACGGCG GATTG

序列号：33

序列长：42

序列类型：核酸

链数：单链

拓扑学：直链状

序列种类：合成DNA

序列

TTTCCCGGGA GGCCTTCTGT TAAAAGCGG TCTGTTTCTG

AA

序列号：34

序列长：18

序列类型：核酸

链数：单链

拓扑学：直链状

序列种类：合成DNA

序列

CACCATCATC ACCCTGGA

序列号：35

序列长：18

序列类型：核酸

链数：单链

拓扑学：直链状

序列种类：合成DNA

序列

TCCAGGGTGA TGATGGTG

序列号： 3 6

序列长： 3 7

序列类型： 核酸

链数： 单链

拓扑学： 直链状

序列种类： 合成DNA

序列

TAAGAATTCA TGAAAGTGAG GAAATATATT ACTTTAT

序列号： 3 7

序列长： 3 5

序列类型： 核酸

链数： 单链

拓扑学： 直链状

序列种类： 合成DNA

序列

TAAGTCGACT TAAGGATCGG TACTCGCAGT AGTCG

序列号： 3 8

序列长： 3 5

序列类型： 核酸

链数： 单链

拓扑学： 直链状

序列种类： 合成DNA

序列

TAAGTCGACT TAATAATGCA TGGCTTGCCT AGGAG

序列号: 39

序列长: 39

序列类型: 核酸

链数: 单链

拓扑学: 直链状

序列种类: 合成DNA

序列

TAAGTCGACT TAGGCGCCAA TCAAAAATAT TGTAAAAA

序列号: 40

序列长: 39

序列类型: 核酸

链数: 单链

拓扑学: 直链状

序列种类: 合成DNA

序列

TAAGTCGACT TACATAAAAA ACATGAAGTA TAACACCAA

序列号: 41

序列长: 35

序列类型: 核酸

链数: 单链

拓扑学: 直链状

序列种类: 合成DNA

序列

GCGGCCGCTT AAACATCCCG TTTTGTA AAA AGAGA

序列号: 42

序列长: 3 1

序列类型: 核酸

链数: 单链

拓扑学: 直链状

序列种类: 合成DNA

序列

GGGGTCGACT TAAGAAGTTG AACTGGCAGA A

序列号: 4 3

序列长: 3 1

序列类型: 核酸

链数: 单链

拓扑学: 直链状

序列种类: 合成DNA

序列

GGGGTCGACT TAAGAAGATG TAGAAGTAGC 6

序列号: 4 4

序列长: 3 0

序列类型: 核酸

链数: 单链

拓扑学: 直链状

序列种类: 合成DNA

序列

GGGGTCGACT TAAATGGCCG ACGTTTCCAC

序列号: 4 5

序列长: 3 3

序列类型: 核酸

链数：单链

拓扑学：直链状

序列种类：合成DNA

序列

GGGGTCGACT TATGTTAAAA AATAATGCAT GGC

图 2

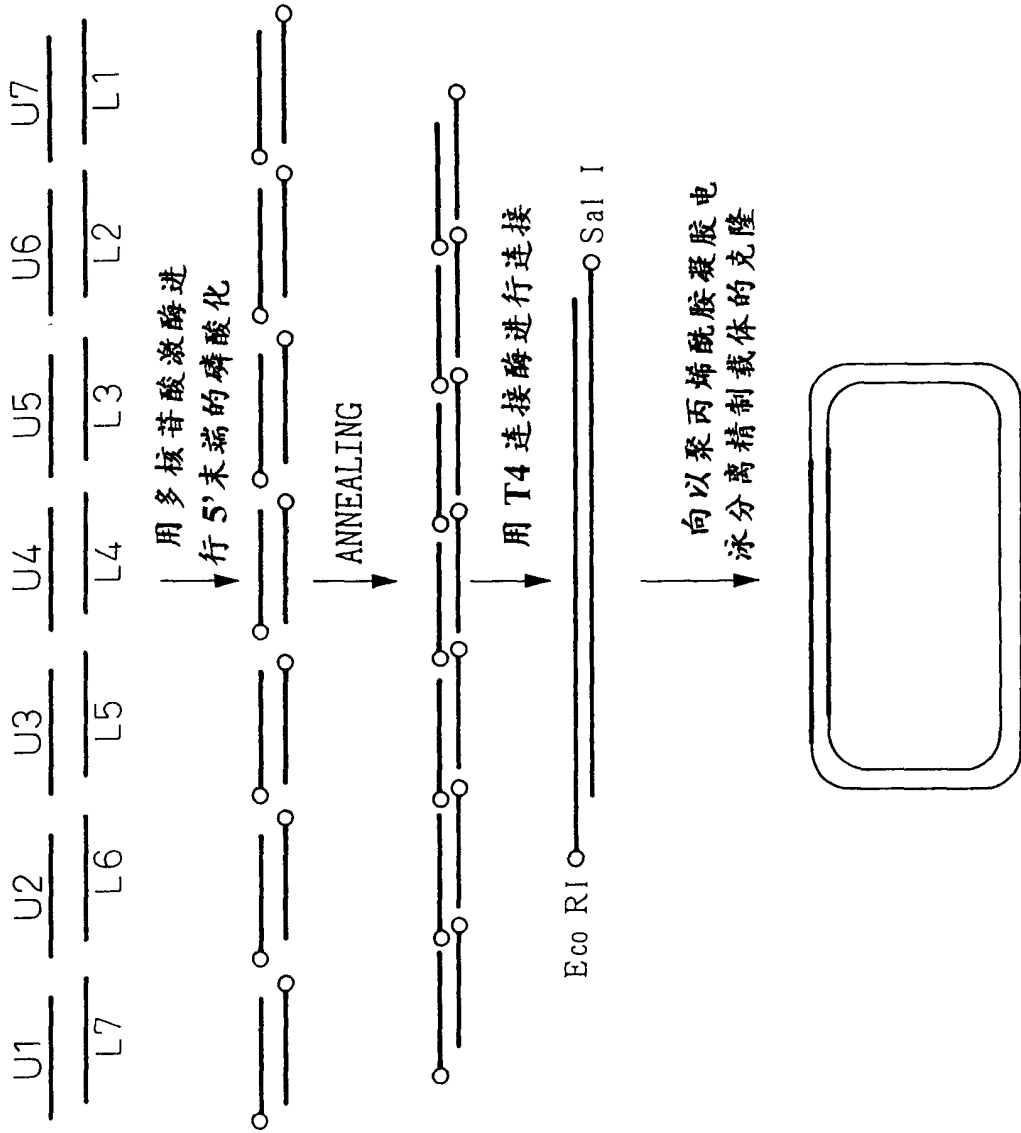


图 3

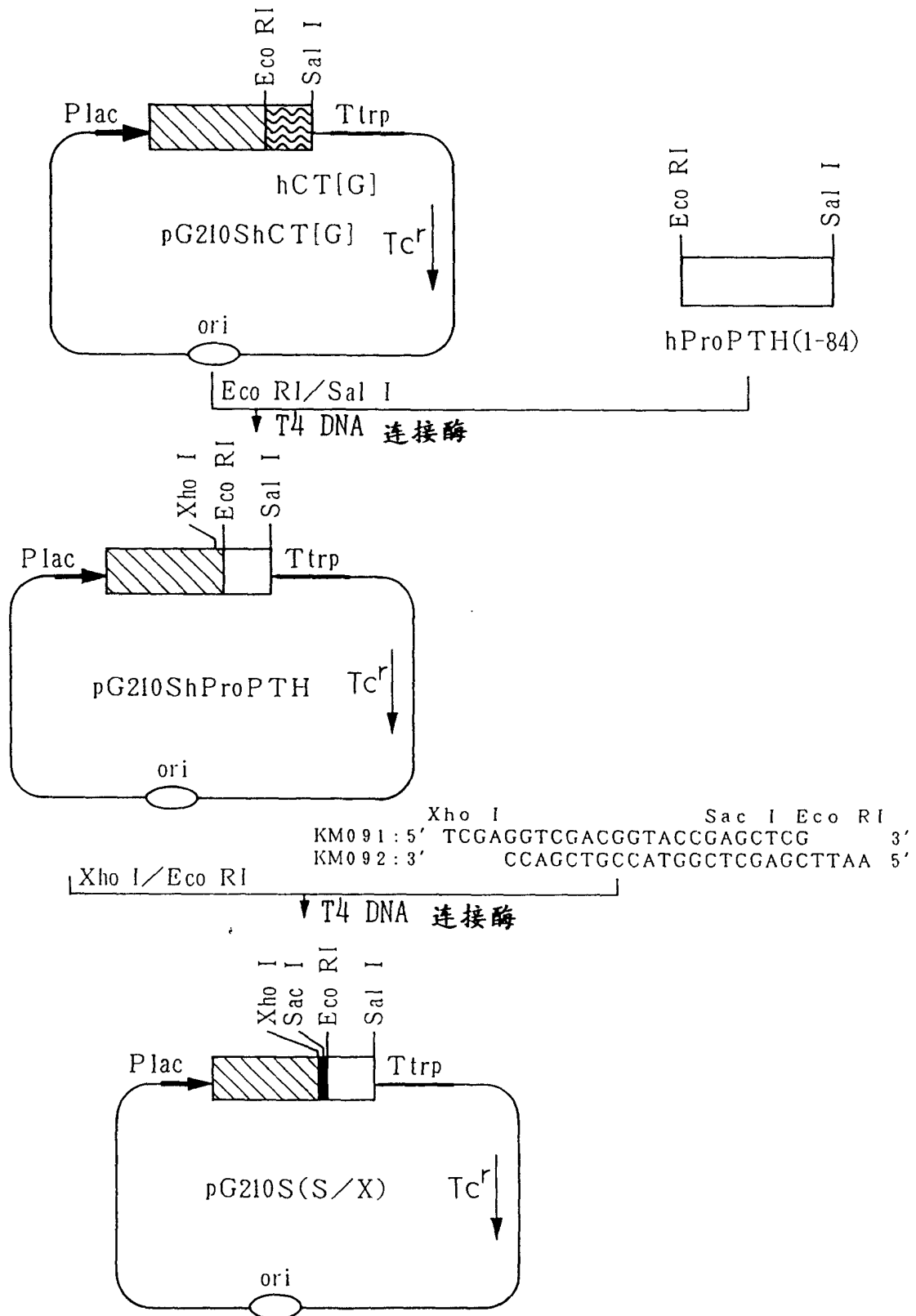
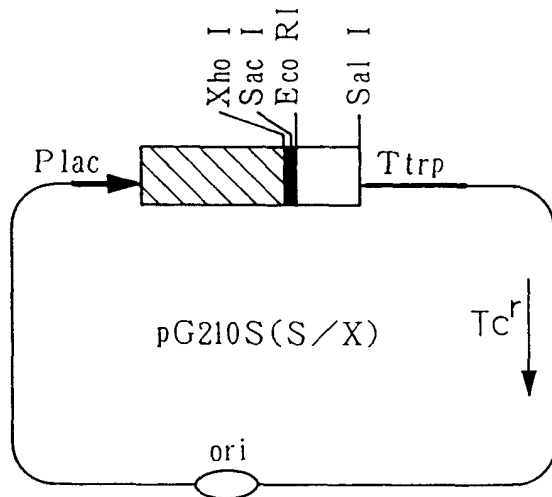


图 4



- ↓ Sac I/Xho I
- ↓ Exo III 核酸酶
- ↓ 绿豆核酸酶
- ↓ DNA 聚合酶 (KLENOW 片段)
- ↓ T4 DNA 连接酶

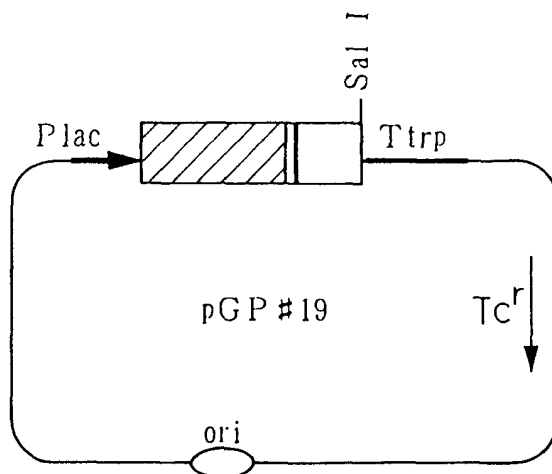


图 5

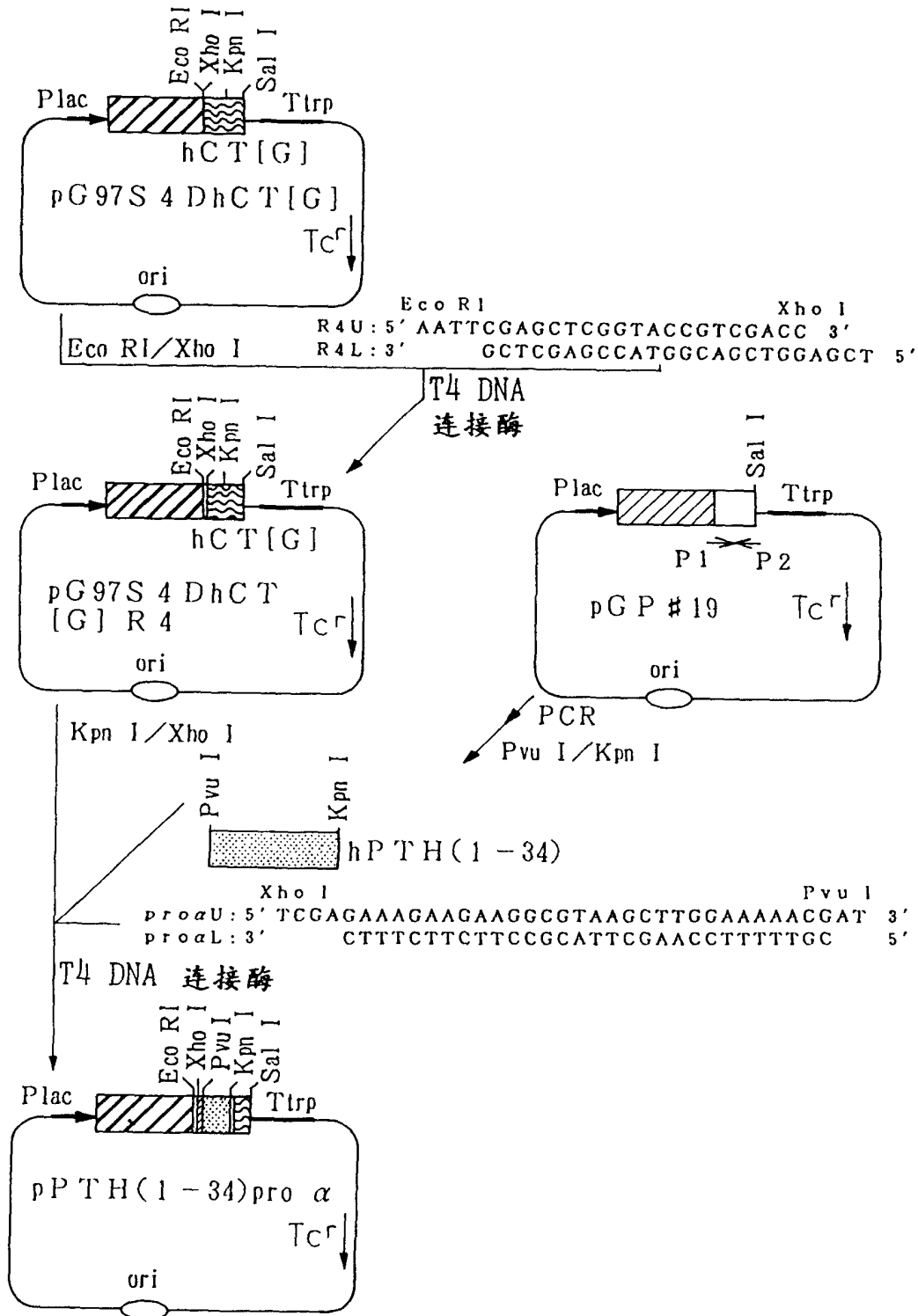


图 6

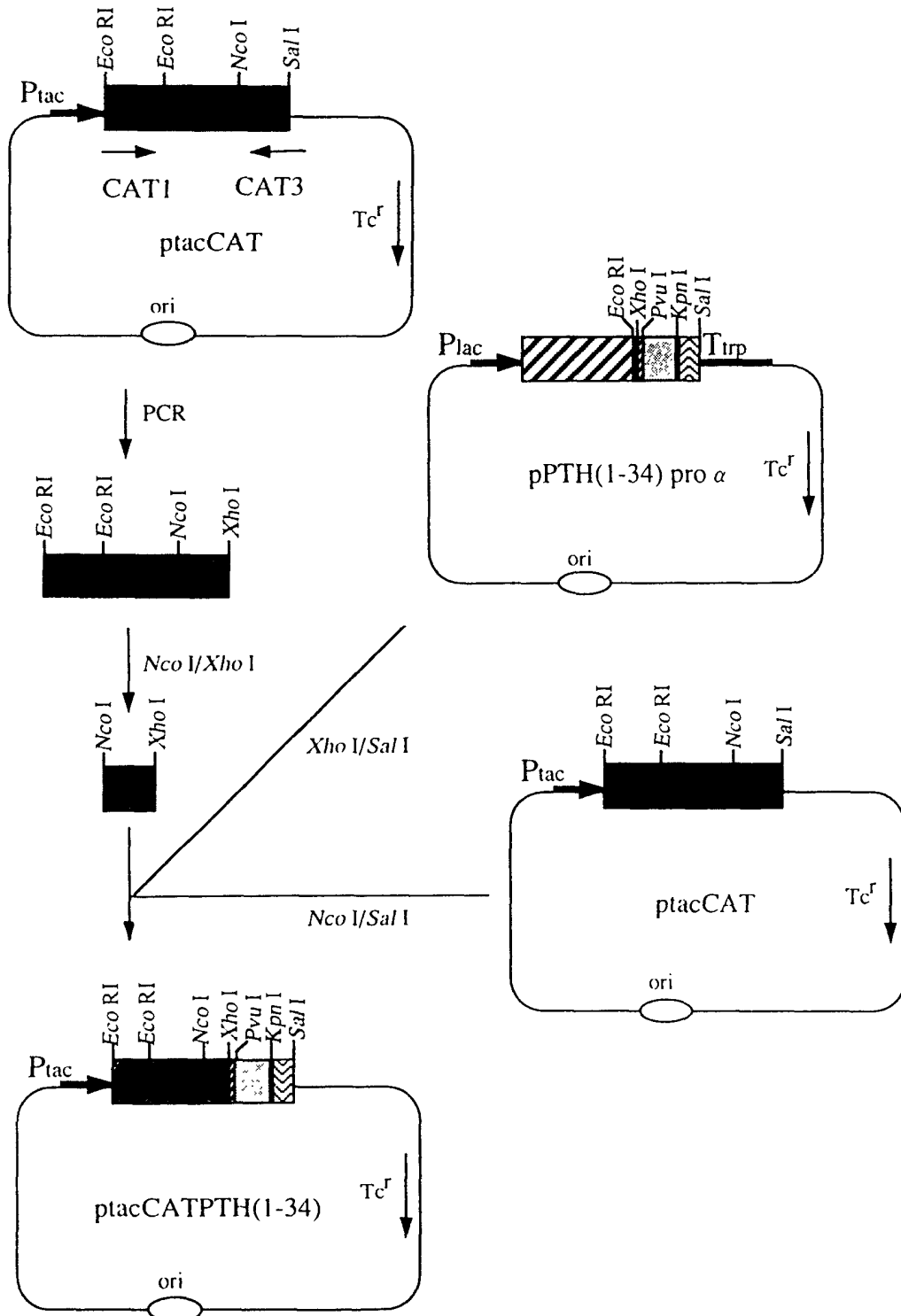
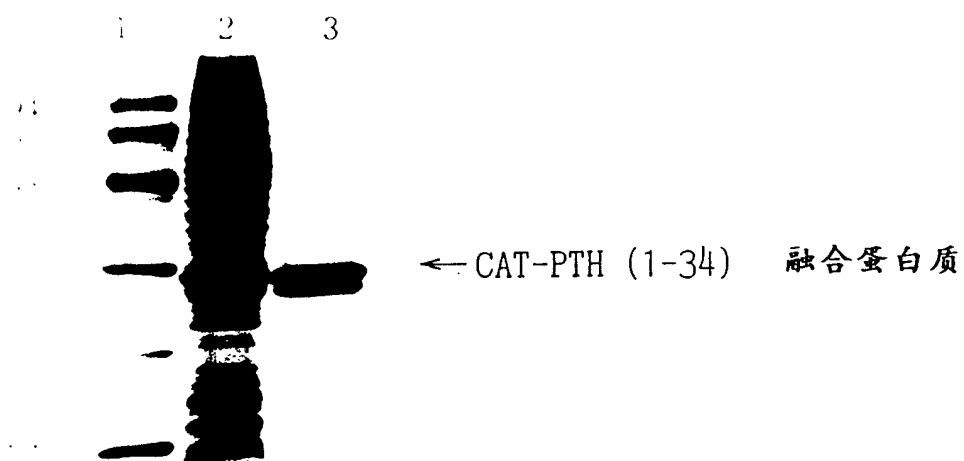


图 7



CAT-PTH (1-34) 融合蛋白质的表达和精制

1. 分子量标记
2. 菌体破碎后的可溶性级分
3. 精制后的 CAT-PTH (1-34) 融合蛋白质

图 8

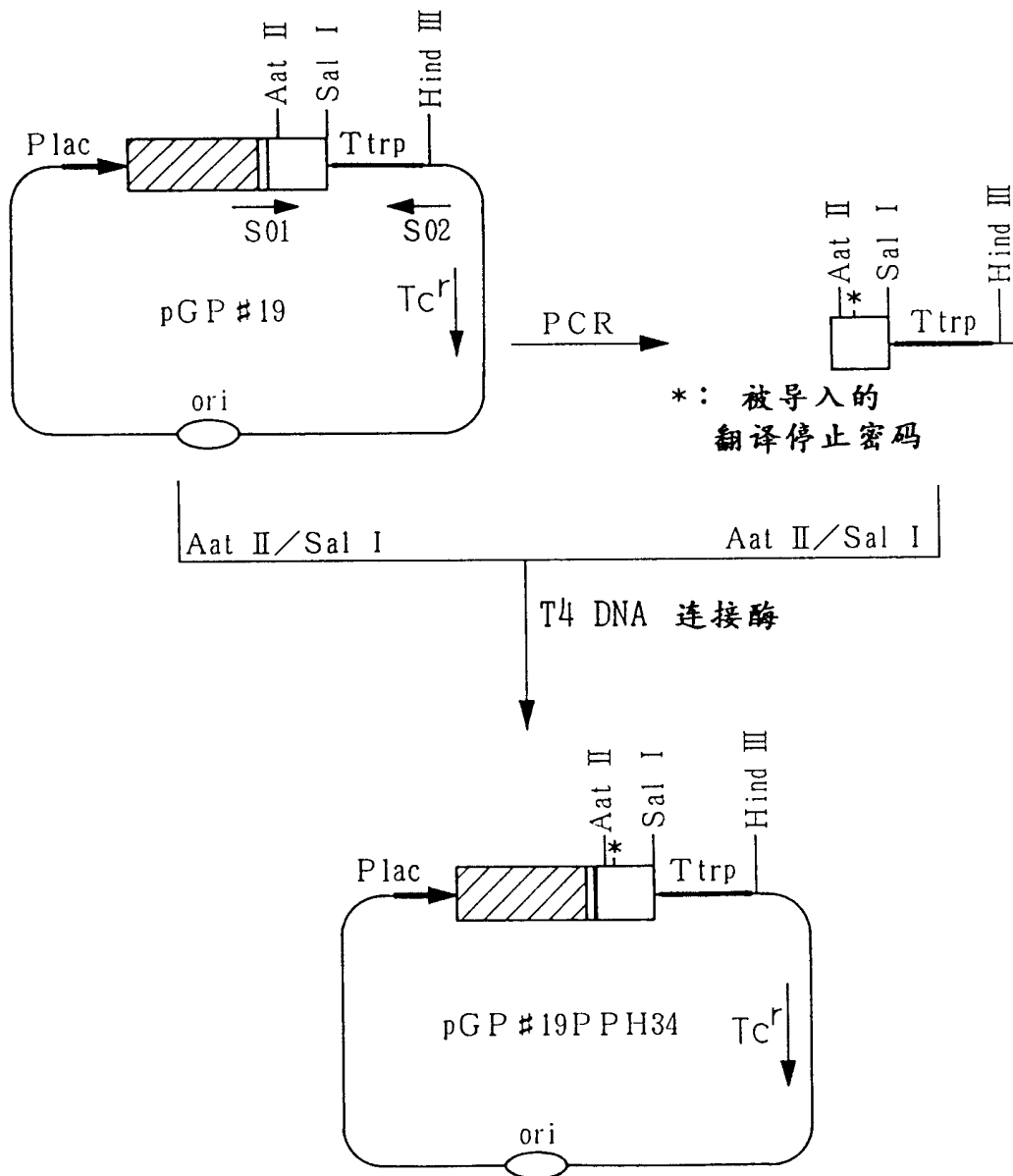
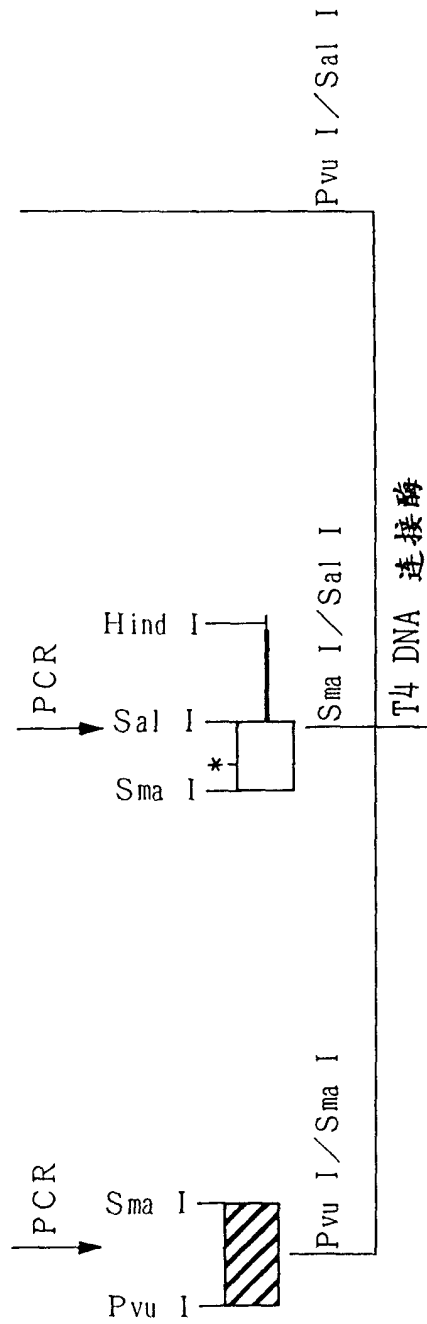
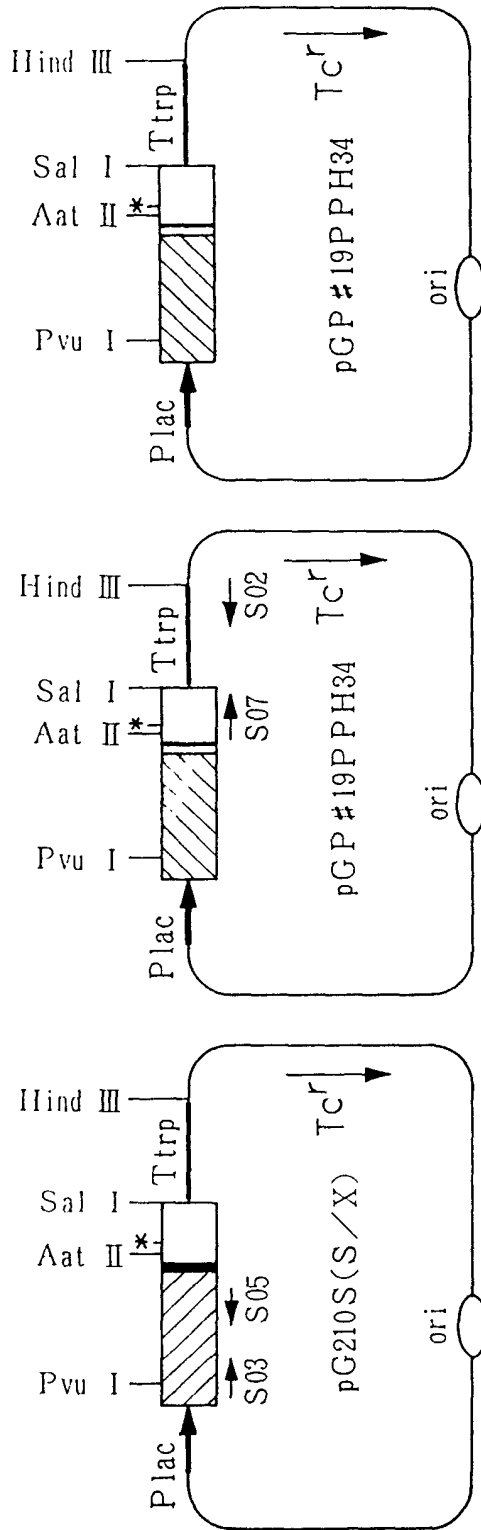


图 9



接图 10

图10

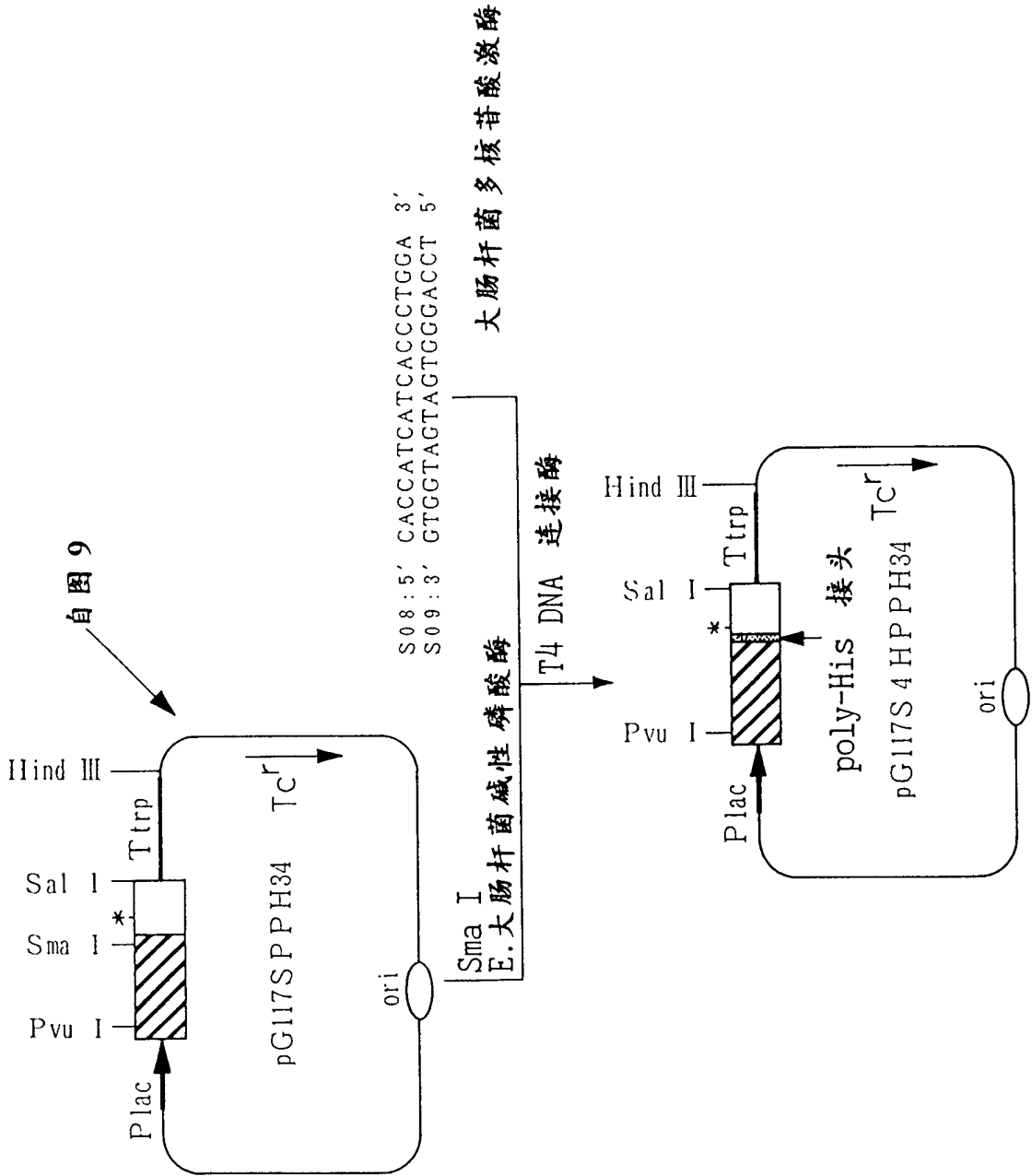


图11

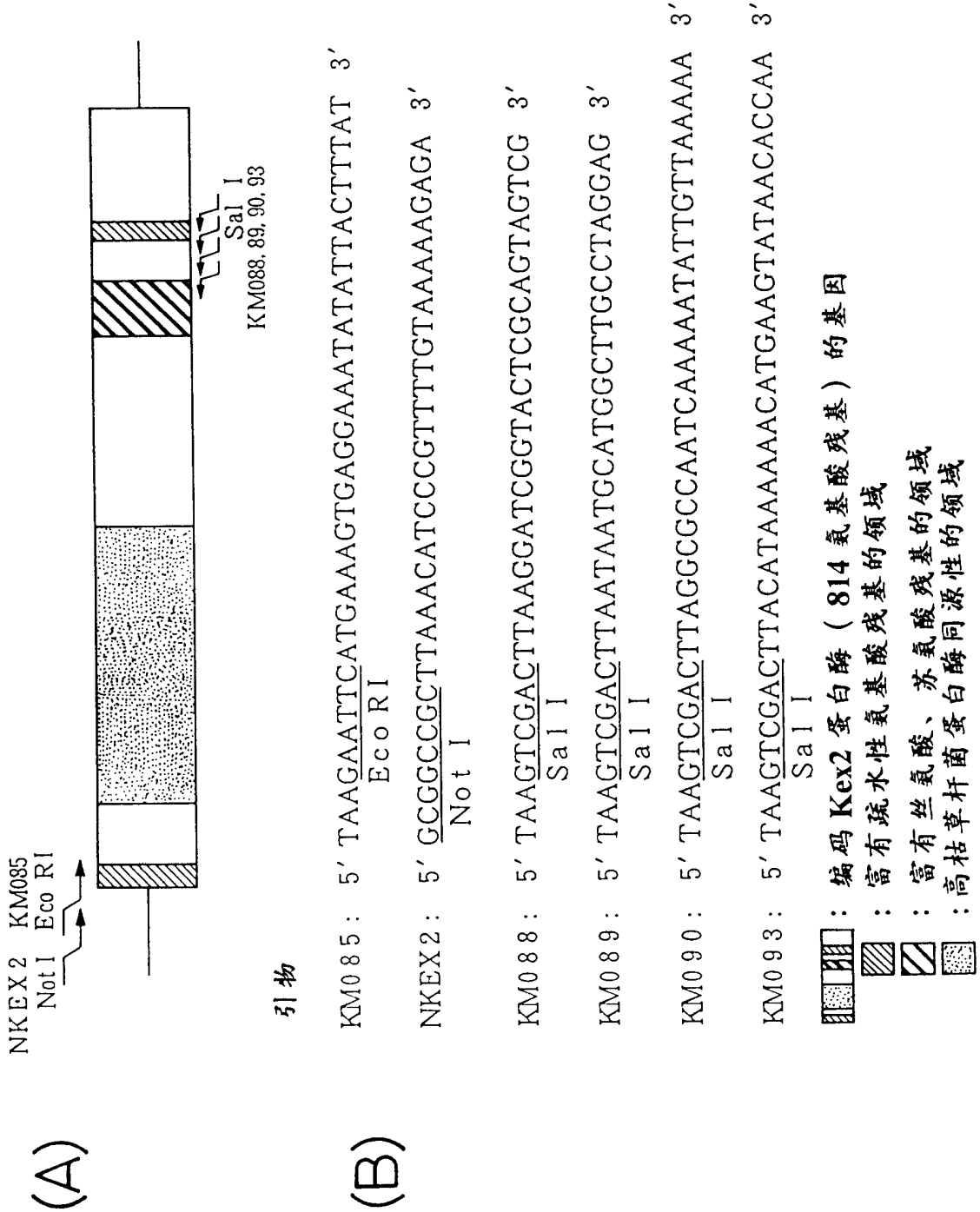


图 12

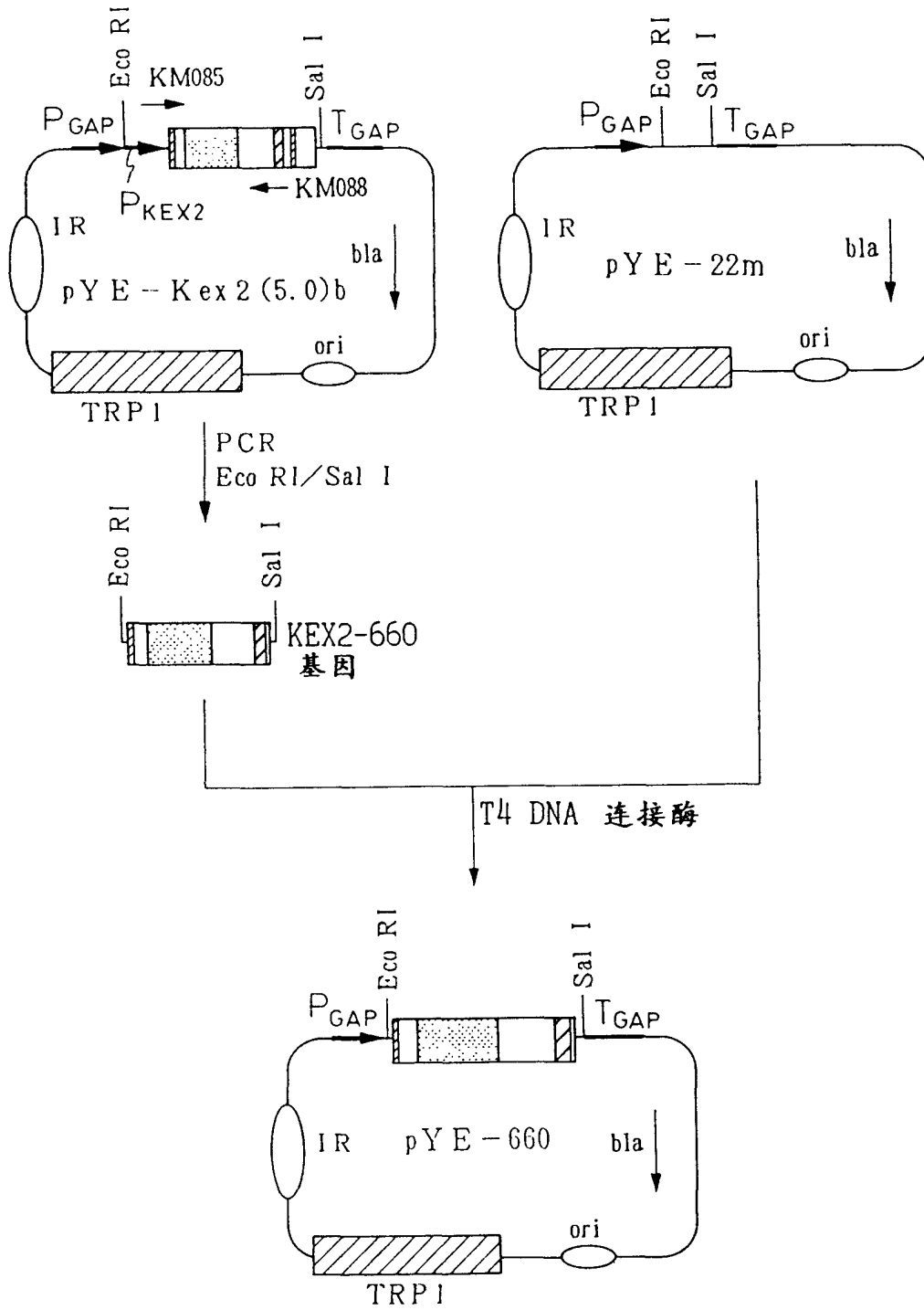


图 13

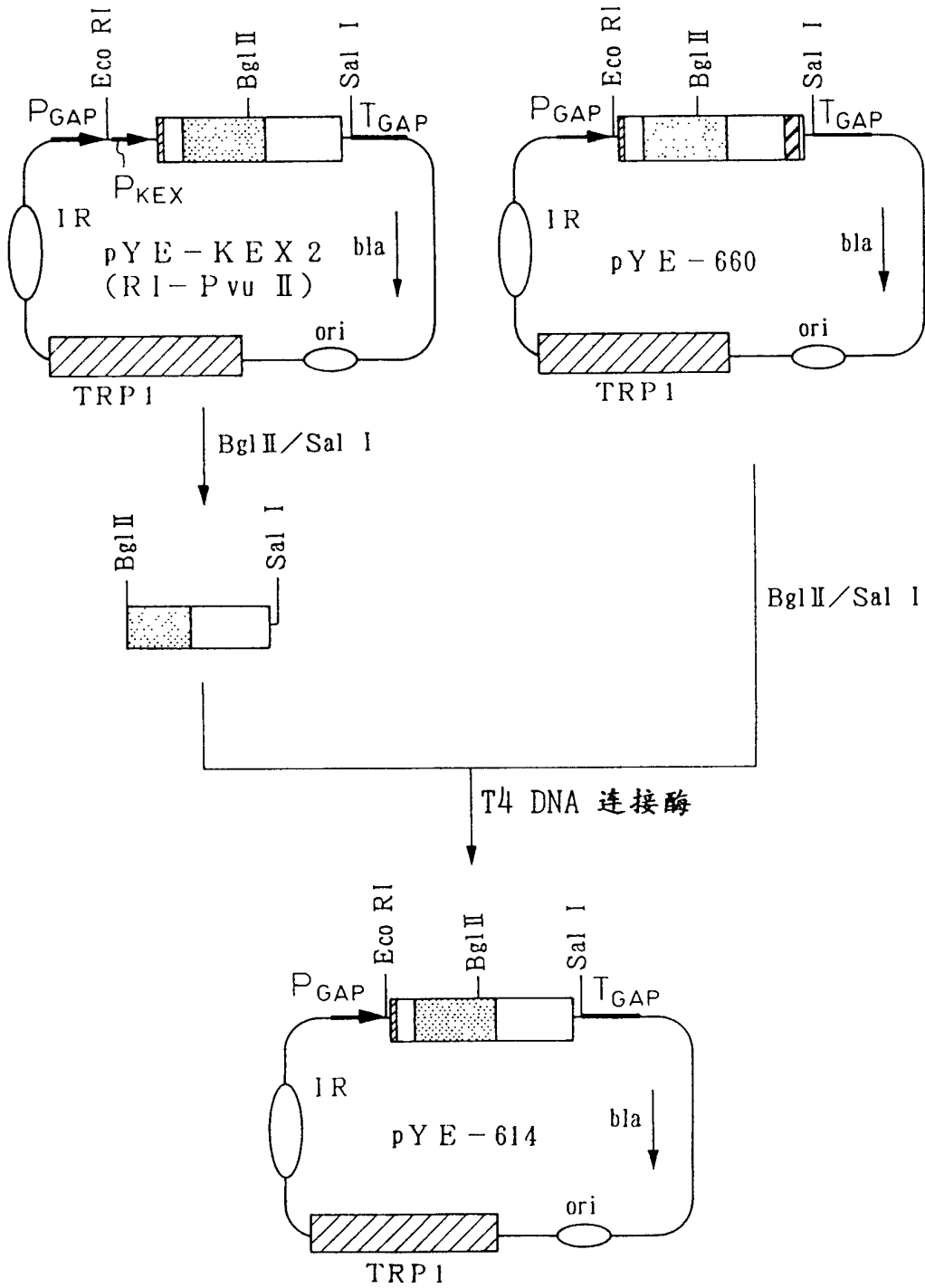


图 14

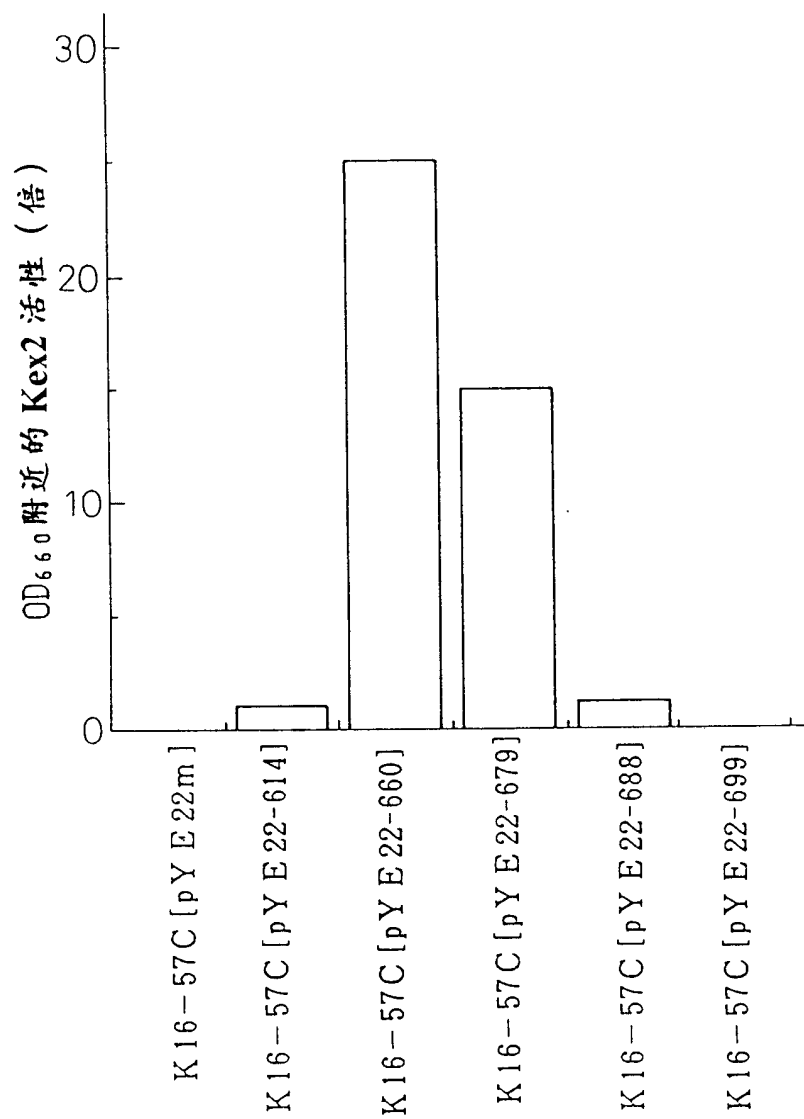


图 15

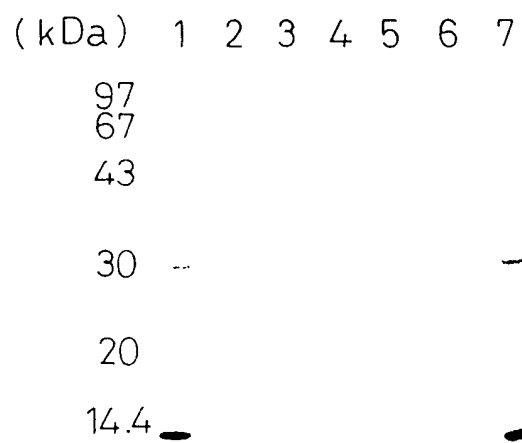


图 16

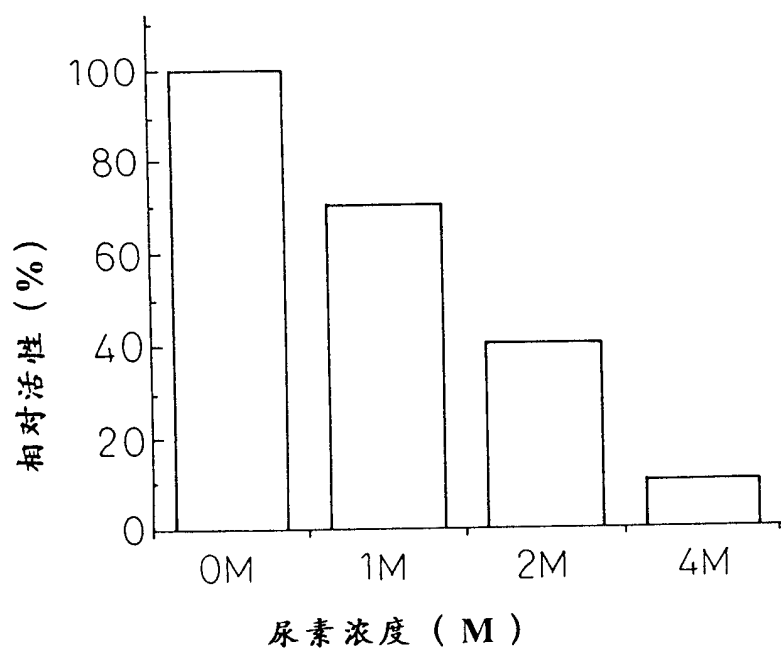


图 17

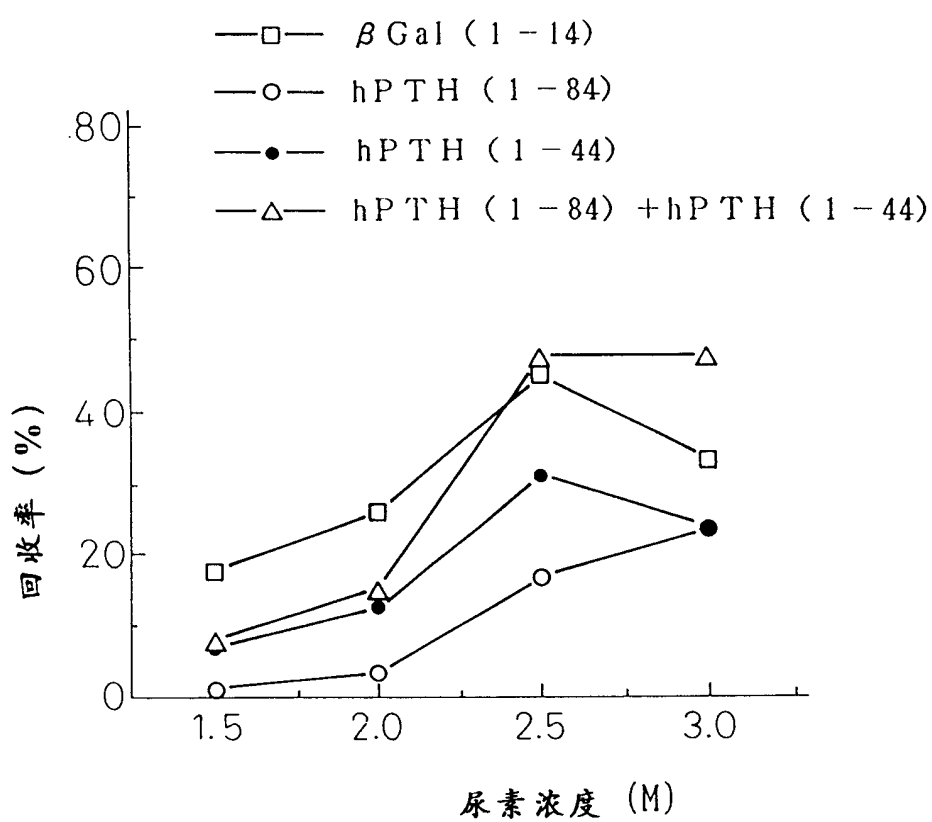


图 18

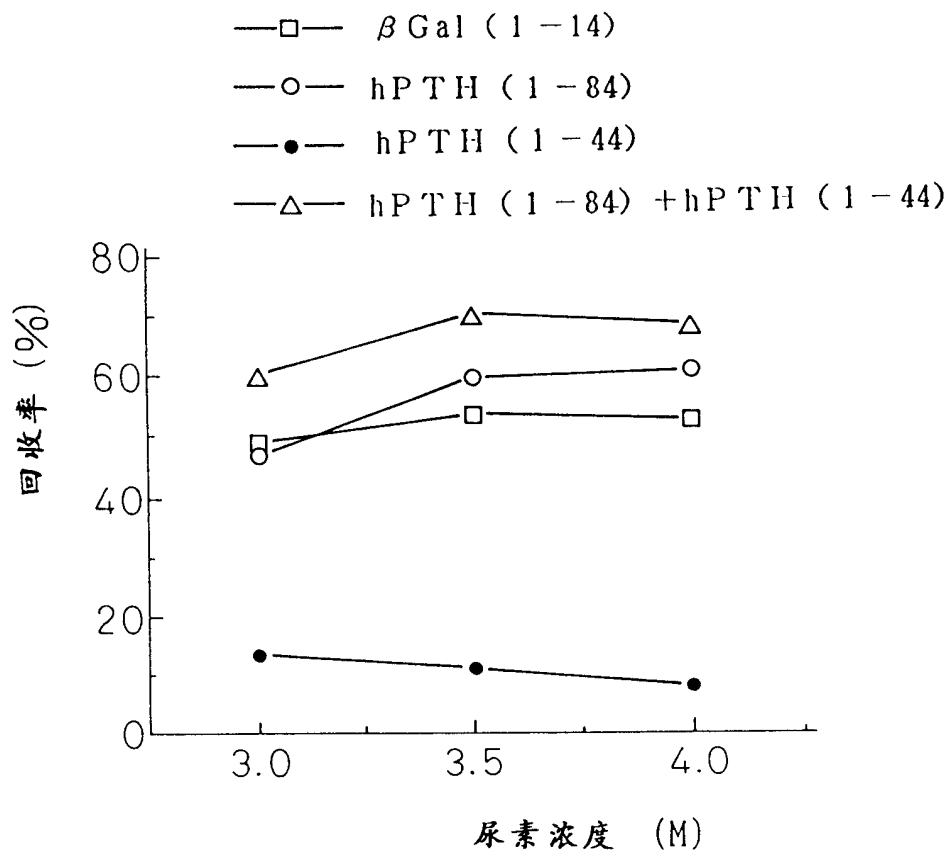


图 19

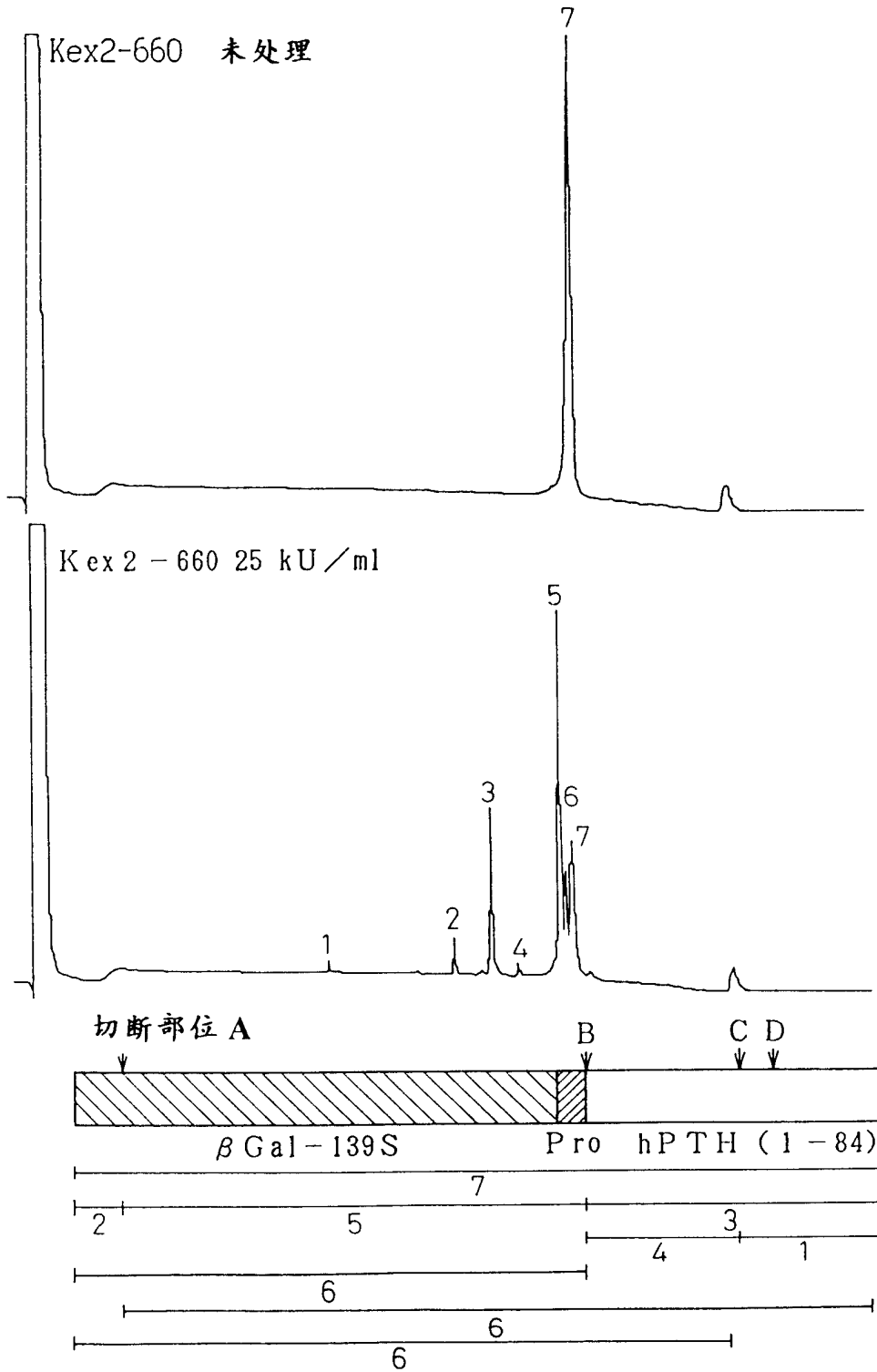


图 20

- 3 ; hP T H (1 - 84)
- 4 ; hP T H (1 - 44)
- ▲— 1 ; hP T H (45 - 84)
- 7 ; β G a l 139 S (F M) P P H 84

号码对应 图 19 的峰号码

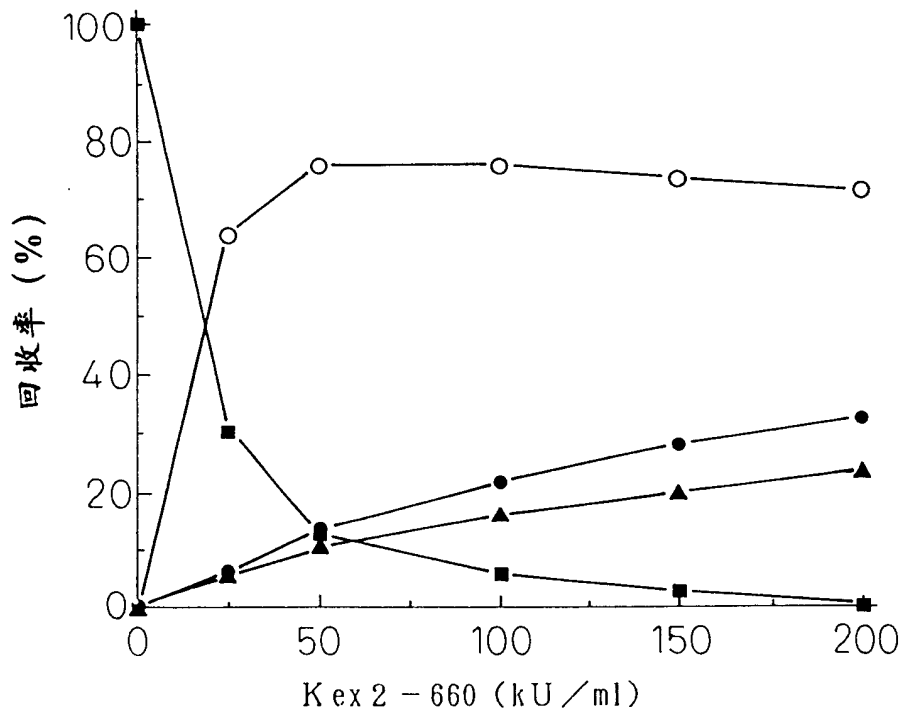


图 21

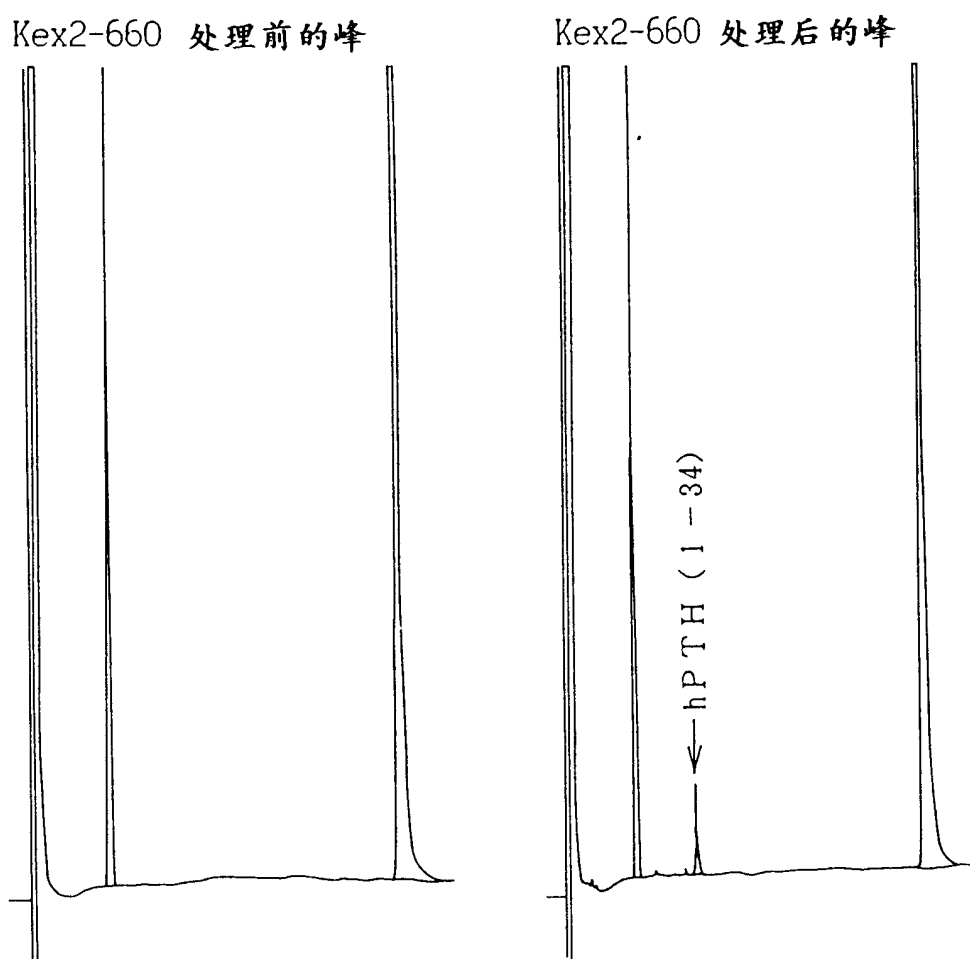


图 22

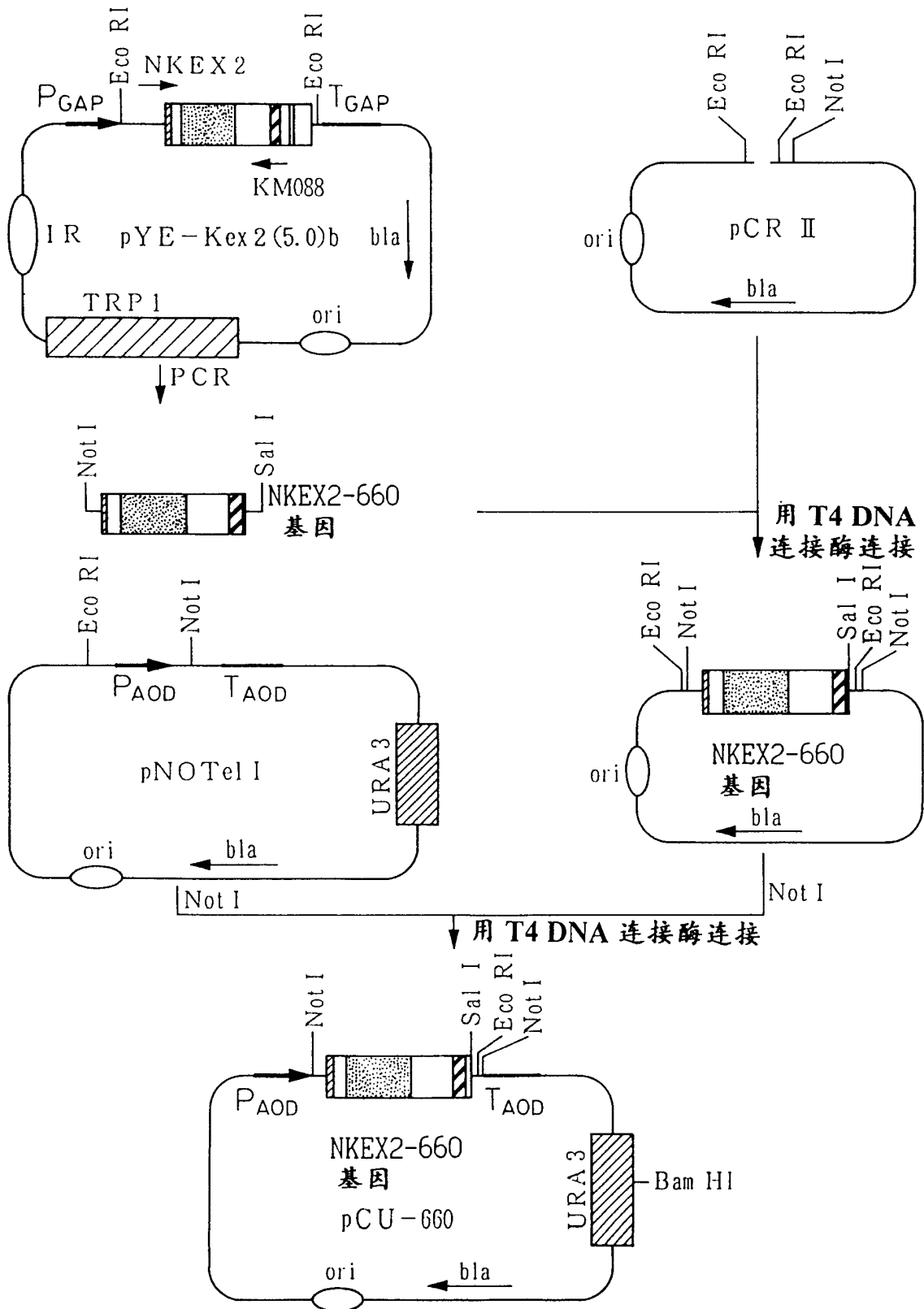


图 23

10% SDS-PAGE 5 μ l 培养上清液/泳道

培养时间 (h) 0 6 12 18 24 30 36 42 48

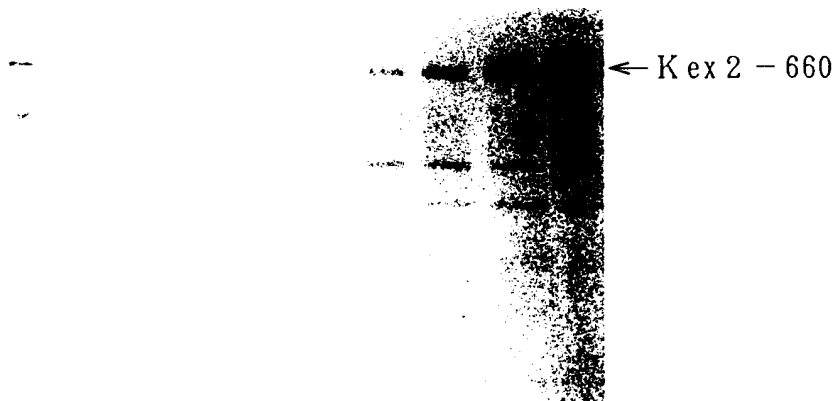


图 24

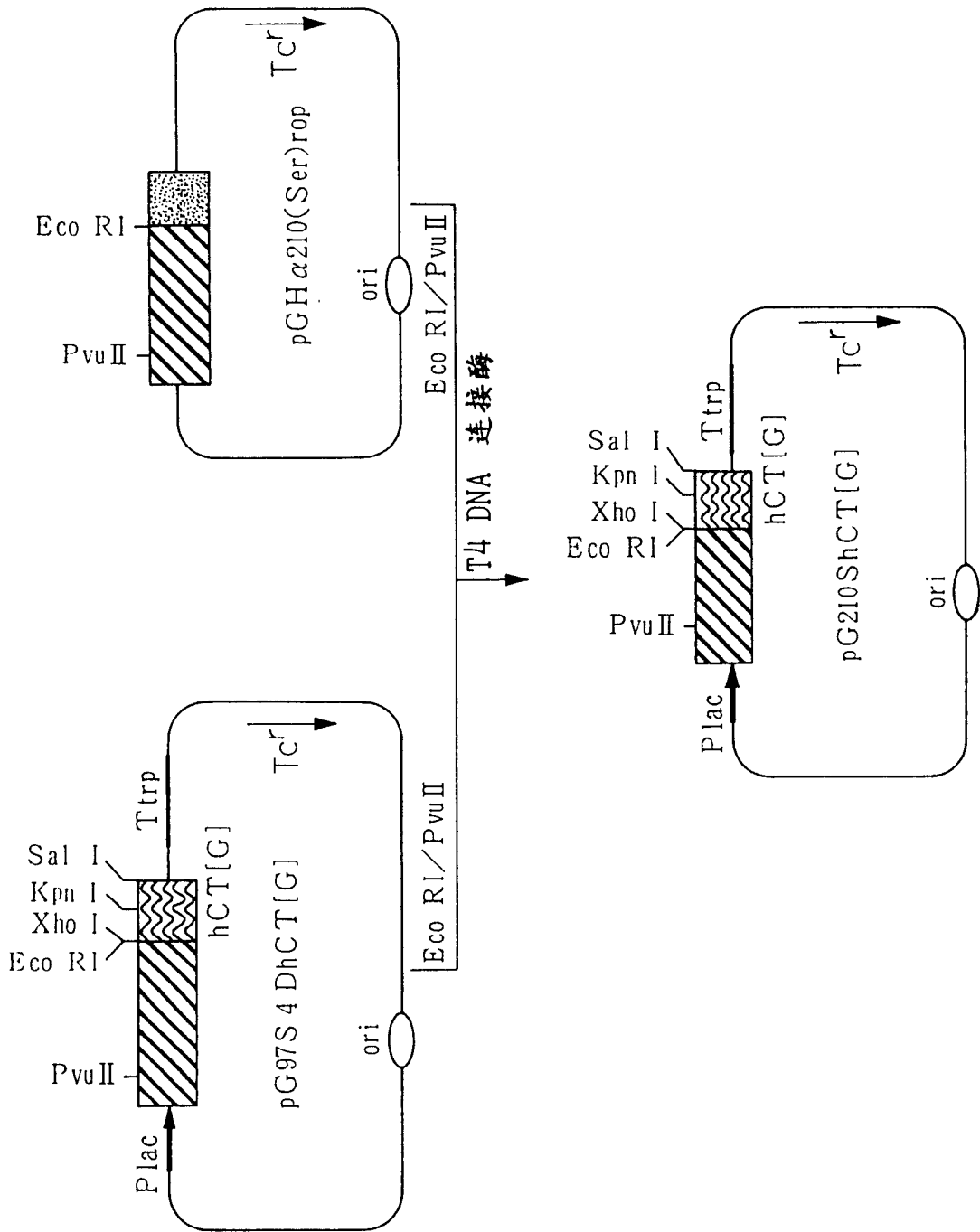


图 25

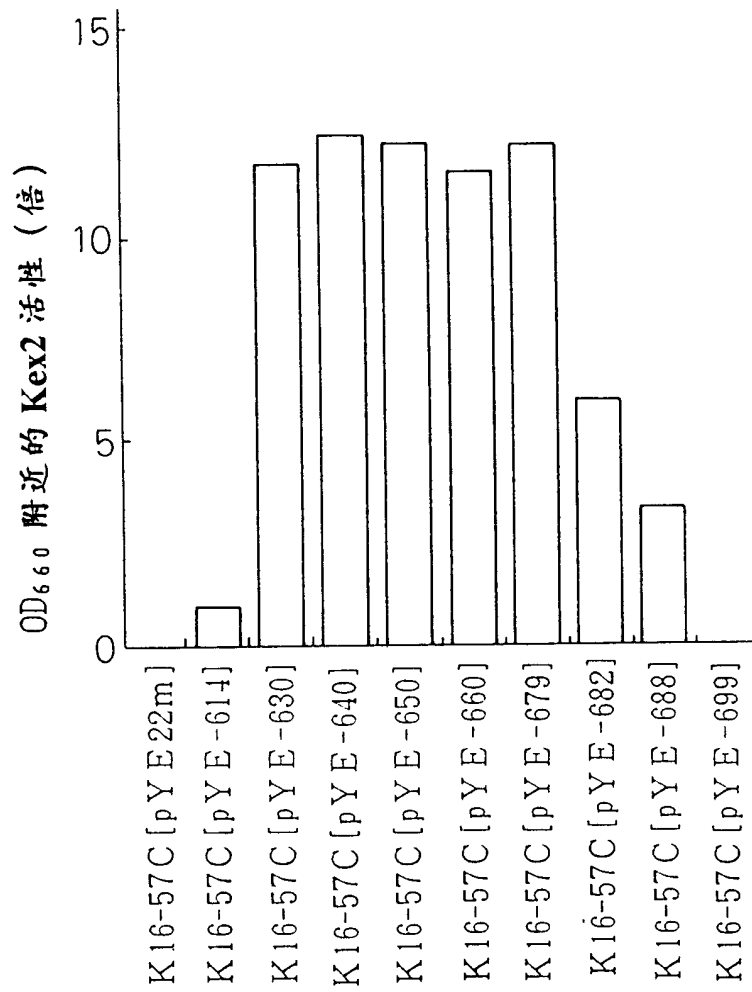


图 26

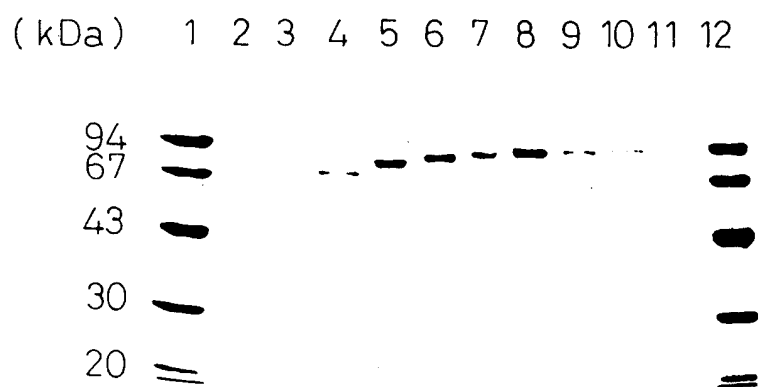


图 27

