

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利申请公开说明书

C12P 21/00
C12N 15/70 C12N 1/21
// C12P21/00, C12R1:19

[21] 申请号 96108052.3

[43]公开日 1997年4月30日

[11] 公开号 CN 1148626A

[22]申请日 96.3.29

[30]优先权

[32]95.3.29 [33]JP[31]71033/95

[71]申请人 三井东压化学株式会社

地址 日本东京都

[72]发明人 本城胜 内藤直和 内田博司

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 姜建成

权利要求书 3 页 说明书 31 页 附图页数 11 页

[54]发明名称 分泌产生蛋白质的方法

[57]摘要

在从大肠杆菌周质中产生重组蛋白质的方法中,通过人工共表达谷胱甘肽还原酶和靶重组蛋白质,可以提高靶重组蛋白质的产率。

(BJ)第 1456 号

权 利 要 求 书

1. 一种分泌产生重组蛋白质的方法,所述的包括分泌产生将重组蛋白质分泌到宿主大肠杆菌的周质中,所述方法包括在相同的宿主大肠杆菌中人工同时表达谷胱甘肽还原酶和靶重组蛋白质这一步骤。

2. 按照权利要求1的分泌产生方法,其中的人工表达的谷胱甘肽还原酶源于大肠杆菌。

3. 按照权利要求1或2的分泌产生方法,其中的谷胱甘肽还原酶基因和编码靶重组蛋白质的基因位于同一复制子中。

4. 按照权利要求1或2的分泌产生方法,其中的谷胱甘肽还原酶基因和编码靶重组蛋白质的基因分别位于不同的复制子中。

5. 一种分泌产生分子量约为20,000的人生长激素的方法,所述的分泌产生包括将分子量约为20,000的人生长激素分泌到宿主大肠杆菌的周质中,该方法包括在同一宿主大肠杆菌中人工同时表达谷胱甘肽还原酶和分子量约为20,000的人生长激素。

6. 按照权利要求5的分泌产生方法,其中的人工表达的谷胱甘肽还原酶源于大肠杆菌。

7. 按照权利要求5或6的分泌产生方法,其中的谷胱甘肽还原酶基因和编码分子量约为20,000的人生长激素的基因位于同一复制子中。

8. 按照权利要求5或6的分泌产生方法,其中的谷胱甘肽还原酶基因和编码分子量约为20,000的人生长激素的基因分别位于不同

的复制子中。

9. 按照权利要求5或6的分泌产生方法,其中的有关分子量约为20,000的人生长激素的分泌的信号肽是SEQ ID NO:1所描述的氨基酸序列。

10. 一种在其中靶重组蛋白质能被分泌到周质中的重组大肠杆菌,该重组大肠杆菌能人工同时表达谷胱甘肽和靶重组蛋白质。

11. 按照权利要求10的重组大肠杆菌,其中的被人工表达的谷胱甘肽还原酶源于大肠杆菌。

12. 按照权利要求10或11的重组大肠杆菌,其中的谷胱甘肽还原酶基因与编码靶重组蛋白质的基因位于同一复制子中。

13. 按照权利要求10或11的重组大肠杆菌,其中的谷胱甘肽还原酶基因与编码靶重组蛋白质的基因分别位于不同的复制子中。

14. 一种在其中分子量约为20,000的人生长激素能被分泌到周质中的重组大肠杆菌,该重组大肠杆菌能人工同时表达谷胱甘肽还原酶和分子量约为20,000的人生长激素。

15. 按照权利要求14的重组大肠杆菌,其中的人工表达的谷胱甘肽还原酶得自大肠杆菌。

16. 按照权利要求14或15的重组大肠杆菌,其中的谷胱甘肽还原酶基因和编码分子量约为20,000的人生长激素的基因位于同一复制子中。

17. 按照权利要求14或15的重组大肠杆菌,其中的谷胱甘肽还原酶基因和编码分子量约为20,000的人生长激素的基因分别位于不同的复制子中。

18. 按照权利要求14或15的重组大肠杆菌，其中的有关分子量约为20,000的人生长激素的分泌的分泌信号肽是SEQ ID NO:1中描述的氨基酸序列。

19. 按照权利要求18的重组大肠杆菌，其中的重组大肠杆菌是FERM BP-5020。

说明书

分泌产生蛋白质的方法

本发明涉及到一种产生蛋白质的方法,更具体地说,本发明涉及到一种用大肠杆菌转化菌株分泌产生蛋白质的方法,所述大肠杆菌能在其周质中有效地分泌和积累所述蛋白质。

近年来,重组DNA技术已能用微生物为宿主产生有用的蛋白质。这一技术主要的例子包括胞内产生方法和分泌产生方法。

已知胞内产生方法是一种以高产率在胞质中产生和积累所需蛋白质的方法。然而,在胞质中产生和积累的蛋白质是非天然型的,其中蛋氨酸添加到天然型氨基酸序列的N-末端,并且,大量产生的重组蛋白质通常变为称作包含体的不溶形式,以致在提取操作后易于形成与真正的结构不同的不正确的高级结构。因此,在胞内产生方法中,需要一个将具有高级结构的蛋白质转化成其真正结构的重折叠步骤,这意味着在制造过程中必须加上这一复杂的步骤。

另一方面,在以上提到的分泌产生方法中,所需重组蛋白质以一种融合蛋白质形式(一种前体,其中一种分泌信号肽加到N-末端上)被表达。因为这一分泌信号肽在透过细胞膜的转移期间被酶促缺失,所以,可以分泌出真正的蛋白质。结果是分泌出天然型蛋白质。在分泌产生方法的情况下,产生的蛋白质可以具有真正的一级和高级结构。因此,这一方法比胞内产生方法更好。然而,在分泌

产生方法中,额外地需要一个透过细胞膜的转移步骤和一个前体加工步骤,这样,其产率通常是低的。特别是,已知在用无核生物产生和必泌源于哺乳动物的蛋白质时,其产率较用其产生和分泌源于原核生物的蛋白质的产率低得多。因此,人们期望有一种更好的分泌产生方法。

现在,已报道了与微生物蛋白质分泌有关的各种因子,并已进行了使用这些报道的因子改进分泌产率的几种研究。其中之一是分泌信号肽的研究。已知分泌信号肽在分泌步骤的早期阶段起重要作用[J. Biol. Chem., Vol. 263. p. 8164-8169 (1990)]。就从宿主微生物分泌蛋白质来说,在胞质中合成的融合蛋白质必需被转移透过细胞膜并被正确地加工已形成真正的结构。USP 4,680,260已公开了一种用于分泌一种碱性磷酸酶或一种肠毒素分泌信号肽可作为分泌分子量约为22,000的人生长激素(此后将人生长激素称为"hGH",将具有所述分子量的人生长激素称为"22K hGH")的优选的分泌信号肽。此外,该专利同时报道,使用得自原核生物的分泌信号肽试验了几种真核生物蛋白质的分泌,但在一些实施例中,不合成任何蛋白质,在另一些实施例中,即使蛋白质在胞质中表达,它也不能分泌。这一事实表明,对每一种待分泌的蛋白质来说,需要选择一种合适的分泌信号肽。迄今还没有发现一种能用于每一种蛋白质分泌的全能分泌信号肽。而且,关于分泌信号肽的序列,最近已阐明在N-端正电荷区的正电荷和中心疏水区的疏水性是重要的[J. Biol. Chem., Vol. 267. p. 4882-4888 (1992)]。已知一些基于这一认识的成功例子。例如,Udaka等已报道,在使用短芽孢杆菌为宿主的分泌产生中,将两个碱性氨基酸(Arg)和三个

疏水氨基酸 Leu 加入到短芽孢杆菌 MWP (中间壁蛋白质) 分泌信号肽的碱性疏水区引起hGH 的有效表达。在这种情况下, 累积的hGH达到 200mg/L (专利申请WO 94/9474)。然而,对于这种分泌信号肽的修饰,不存在任何一般性的指导原则, 仍需一个接一个地反复试验来发现优选的序列。此外, 该分泌信号肽对将前体融合蛋白质转运到胞质膜起作用, 但它不直接涉及下一个步骤, 在该步骤中,前体蛋白质被转运穿过胞质膜以从胞质转移到周质或培养基中。因此, 分泌信号肽的修饰对改进前体蛋白质向膜的转移(定位)是有效的,但是, 它对待分泌蛋白质从胞质通过胞质膜到达周质或培养基的接下来的步骤几乎是无效的, 即,在膜通过步骤是速度控制步骤的情况下, 改进分泌信号肽的效能是有限的。总的来说,为改进分泌效力起见而进行的分泌信号肽的修饰对前体蛋白质向胞质膜的转移是重要的, 这一点是公知的。然而,在接下来的膜通过步骤中存在麻烦的情况下, 这种修饰没有任何改进的效果。

这样, 在蛋白质的分泌产生中, 低的分泌效力的原因在于分泌蛋白质(待从胞质转移到周质或培养基中)通过胞质膜的步骤中的情况下,也需要一种改进的技术,而不是修饰分泌信号肽。现在,已报道涉及大肠杆菌蛋白质分泌的几种蛋白质因子 (SecA、SecB、SecD、SecE、secF、SecY、SecG等), 并已在体外测试了各个因子对分泌的作用。然而,几乎没有有关其体内应用的报道。仅有的一个例子是,最近报道了通过增强大肠杆菌SecY/E基因的表达可以改进白细胞介素6(IL-6)的分泌产生 [Bio/Technology, Vol. 12, p. 178-180 (1994)]。使用涉及分泌的蛋白质因子的研究迄

今还没有投入实际应用。为了有效地产生和分泌不同类型的蛋白质(特别是得自哺乳动物的蛋白质),可以考虑待研究的各种课题,但具体地就较少分泌蛋白质来说,不存在任何改善其分泌产率的普通技术,因此,仍然需要许多试验,且对这些试验的结果会是成功的无任何保证。

本发明发明人试验了哺乳动物蛋白质在大肠杆菌中的分泌。在这种情况下, 22K hGH 能相对较好地分泌, 但就分子量约为 20,000 的人生长激素(此后称为"20K hGH")来说,其分泌产率却非常低。由此, 为了改进 20K hGH 的分泌产率,采用上述公知方法(分泌信号肽氨基酸序列的修饰和蛋白质分泌基因的表达)进行了各种研究。然而,在任何研究中,未能发现有效的分泌产生方法。

本发明的目的是提供一种有效的分泌产生方法,所述的分泌产生包括将一种重组蛋白质(特别是得自哺乳动物的蛋白质)分泌到微生物周质中,所述蛋白质用现有技术的方法在微生物中难以产生和分泌。

为了发现非常新的分泌促进因子(它背离了上述公知的观念)这一目的,本发明发明人进行了广泛的研究,结果发现谷胱甘肽还原酶(此后简称为"GR")可以在大肠杆菌中与靶重组蛋白质同时表达,即共表达,从而分泌到周质中的蛋白质的量可以显著改善。基于这一新的认识,相应地完成了本发明。

(1)本发明的第一方面针对一种分泌产生重组蛋白质的方法,所述的分泌产生包括将重组蛋白质分泌到宿主大肠杆菌周质中,所述方法包括在相同的宿主大肠杆菌中人工同时表达谷胱甘肽还原

酶与靶重组蛋白质。

(2)本发明的第二方面针对一种分泌产生分子量约为 20,000 的人生长激素的方法,所说的分泌产生包括将分子量约为20,000 的人生长激素分泌到宿主大肠杆菌周质中,所述方法包括在相同的宿主大肠杆菌中人工同时表达谷胱甘肽还原酶与所述人生长激素。

(3)本发明的第三方面针对一种能将重组蛋白质分泌到周质中的重组大肠杆菌,所述的重组大肠杆菌能够人工同时表达谷胱甘肽还原酶和靶重组蛋白质。

(4)本发明的第四方面针对一种能将分子量约为 20,000 的人生长激素分泌到周质中的重组大肠杆菌,所述重组大肠杆菌能够人工同时表达谷胱甘肽还原酶和分子量约为 20,000 的人生长激素。

按照本发明的方法,过去在微生物中难以产生和分泌的重组蛋白质(特别是得自哺乳动物的蛋白质)可被分泌到微生物周质中,从而能有效地产生该重组蛋白质。

而且,按照本发明的方法,20K hGH 的产率可由采用大肠杆菌为宿主的遗传重组技术改进。

本发明的方法也被认为甚至可以改进胞内产生重组蛋白质的产率。

图1是说明GR表达质粒pKKGR1制备方法的示意图。

图2是说明分泌的22K hGH 质粒pGHW300制备方法的示意图。

图3 是部分说明用于修饰源于中性蛋白酶的分泌信号肽的分泌20K hGH 质粒pGHV1制备方法的示意图。

图4 是部分说明用于修饰源于中性蛋白酶的分泌信号肽的分泌20K hGH 质粒pGHV2制备方法的示意图。

图5是部分说明具有修饰过的得自中性蛋白酶的分泌信号肽的20K hGH分泌质粒制备方法的示意图。

图6是部分说明具有药物抗性标记的20K hGH 分泌质粒制备方法的示意图。

图7是部分说明具有药物抗性标记的20K hGH 分泌质粒制备方法的示意图。

图8是部分说明具有药物抗性标记的20K hGH 分泌质粒制备方法的示意图。

图9是部分说明具有药物抗性标记的20K hGH 分泌质粒制备方法的示意图。

图10 是说明在相同的质粒中包含 GR 基因和 20K hGH 基因(具有修饰过的分泌信号肽)的分泌质粒 pGHV45GR 制备方法的示意图。

图11是说明在相同的质粒中包含GR基因和20K hGH 基因(具有修饰过的分泌信号肽) 并且能恰好用于无lacI^q基因的宿主菌株的分泌质粒pGR10制备方法的示意图。

P_{tac}.....tac启动子区

SD.....核糖体结合区

T_{rrnB}.....rrnB转录终止子区

Amp^r.....氨苄青霉素抗性基因区

pBR322 ori.....pBR322复制起点区

GR.....谷胱甘肽还原酶基因
P_{NP}.....解淀粉芽孢杆菌的中性蛋白酶基因启动子区
SS解淀粉芽孢杆菌的中性蛋白酶分泌信号肽或修饰过的
分泌信号肽的编码区
22K hGH22K hGH 基因
pUB110 ori.....pUB110的复制起点区
T_{NP}.....解淀粉芽孢杆菌的中性蛋白酶基因的转录终止子区
20K hGH20K hGH 基因
Tet^r.....四环素抗性基因区
lacZ.....β-半乳糖苷酶基因区
ColE1 ori.....ColE1 复制起点区
T_{trp}.....trpA 基因转录终止子区
lacI^q.....lacI^q基因

现在详细描述本发明。

GR是一种黄素(FAD)酶,它需要NAD(P)H为辅酶,能将氧化型谷胱甘肽还原成还原型谷胱甘肽,广泛存在于动物、植物和微生物组织中。已知GR产生可与存在于胞质中的蛋白质的二硫键反应的还原型谷胱甘肽,这样保留了其SH的还原态,或者GR具有将过氧化氢交换到水中的解毒功能。此外,已报道在其叶绿体中表达得自大肠杆菌的GR的一种植物(烟草)中,对由光引起的氧化应力的抗性增加["Plant Cell Physiol.", Vol. 34, p. 129-135 (1993)]。然而,本发明中的GR增加的表达与分泌效率有关这一认识迄今还不存在。

GR 基因和重组蛋白质基因的共表达可以由使所述两种基因存在于一个复制子中的方式或使它们分别存在于不同的复制子中的方式完成。所述复制子指DNA复制的一个自主单位。“使所述两种基因存在于一个复制子中”指所述两种基因一起存在于一个染色体或一个质粒中。“使它们分别存在于不同的复制子中”指GR 基因和重组蛋白质基因存在于染色体和一个质粒或复制子不同的两个质粒的每一组合中。

在本发明中，可以使用得自任何生物的有效GR 基因。而且也可以使用任何已知的GR 基因，例如从GR 的mRNA 获得的 cDNA 和由化学合成装配的基因。源于大肠杆菌的GR 基因可容易地获得并适于使用。在本发明中，当使用源于大肠杆菌的GR 基因时，可允许所获得的GR 基因与染色体或质粒共存，并且GR 基因可与重组蛋白质同时表达，因为得自大肠杆菌的GR 原始存在于大肠杆菌染色体中。

只要其能在大肠杆菌中表达，本发明中对分泌的重组蛋白质没有特别的限制。所述重组蛋白质的例子包括22K hGH、20K hGH 和 β -内酰胺酶，本发明对产生20K hGH 特别有效。本发明已提出了一种使用大肠杆菌分泌产生20K hGH 的方法，其中使用了得自解淀粉芽孢杆菌的中性蛋白酶基因的启动子，即一种分泌信号肽(USP 5,496,713)。按照所提出的方法，分泌产生20K hGH 可以提高到30mg/升培养基。但仍期望培养一种能获得更高产量的菌株。

20K hGH 具有一个 176 个氨基酸的序列，在构成 22KhGH 的 191个氨基酸序列中缺失了其第23到46位氨基酸(15个残基)。近年

来,尽管22K hGH 已用于医疗,但人们更多得注意到作为一种具有较低的葡萄糖耐受畸变性和较低的白血病起因的hGH的20K hGH 的生物学性质。同以,20K hGH 是一种作为新的药用hGH 被表达的蛋白质。而且,就20K hGH 的N-端14位氨基酸来说,已有两种报道,即,一种报道它为丝氨酸,另一种报道它为蛋氨酸。这就是说,在Masuda, N. et al., "Biophysica Acta", Vol. 949, p. 125(1988)中,一段cDNA碱基序列是AGT(它编码丝氨酸),在Martial, J. A. et al., "Science", Vol. 205, p. 602 (1979)中,包含为20KhGH 的从N-末端起的第14位氨基酸编码的序列的一段 mRNA 是AUG(它编码蛋氨酸)。本发明的20K hGH 指第14位氨基酸为蛋氨酸的氨基酸序列和第14位氨基酸为丝氨酸的氨基酸序列两者。此外,其1或2位氨基酸被取代、丢失、插入或缺失的氨基酸序列也包含在本发明的20K hGH 类别的范围内。

对分泌信号肽的类别没有特别的限制,源于任何分泌蛋白质的分泌信号肽均是可用的。然而,优选的分泌信号肽应考虑待分泌蛋白质的种类来选择。就分泌产生20K hGH 而言,得自解淀粉芽孢杆菌的中性蛋白酶的分泌信号肽是优选的,如USP 5,496,713 所述。为了发现一种对分泌20K hGH 比得自解淀粉芽孢杆菌的中性蛋白酶更有利的氨基酸序列这一目的,本发明发明人进行了一种实验。即,将一个碱性氨基酸(Lys)加入到分泌信号肽N-末端氨基酸序列的正电荷区,将5个疏水氨基酸(Leu)加入到分泌信号肽N-末端氨基酸序列的中心疏水区,有秩序地组装携带各种修饰分泌信号肽的20KhGH 分泌质粒。如比较实施例1所述。然后,培养用所述质粒转化的宿主大肠杆菌,结果某些修饰的分泌信号肽提高了分泌蛋白质

的产量。而如实施例4所示，如果GR基因和20K hGH 基因在大肠杆菌中同时表达时，在所有转化的大肠杆菌中观察到具有修饰分泌信号肽的20K hGH 的分泌改善效果。修饰分泌信号肽pGHV45 的序列示于序列表的SEQ ID NO:1中，利用这一序列可以获得最高的分泌水平。

GR基因与编码待分泌的靶蛋白质基因同时人工表达，因此，如果GR基因表达非常强烈，这种情况下就会影响大肠杆菌的生长和靶蛋白的分泌。这一问题可以基于已知信息通过控制GR 基因的表达来解决。例如，当使用可诱导的启动子(tac启动子、lac启动子等)表达GR基因时，可以适当地采用一种方法，如降低加入的诱导剂的浓度、不加诱导剂或使用启动子的抑制基因(如tac启动子的LacI^q)。GR 基因的过度强烈地表达可很容易地通过对由超声波处理培养细胞的溶液进行电泳分析来证实。

为了制备本发明的重组大肠杆菌，将(a)包含上述的GR 基因和与此连接的启动子的一段DNA和/或(b)包含编码重组蛋白质的基因的一段DNA和编码启动子和在上游侧向与重组蛋白基因连接的分泌信号肽序列的一段DNA掺入到一个可复制的载体中或分别掺入到不同的可复制的载体中，以产生一种质粒，然后用转化的方法将这一质粒引入到宿主大肠杆菌中。换种方法，以上DNA(a)和(b) 可以一起掺入到染色体DNA中，或者可以各自分别掺入到一种染色体DNA和一种质粒中。

就在本发明中能用作宿主的大肠杆菌菌株来说，任何菌株都是可接受的。但无致病性的且实际已经应用的大肠杆菌菌株是优选的。这种合适的可用的菌株的例子包括 JM109、 HB101 和

W3110 (ATCC27325)。这里, ATCC 编号是美国典型培养物保藏中心收藏的微生物的编号,ATCC27325 可以售卖给任何一个需要它的人。

这样,可以获得转化的大肠杆菌菌株,在该菌株中,蛋白质可以通过GR基因的表达得到有效的分泌。特别是20K hGH 的分泌作用可以得到明显改善。可以分泌和产生20K hGH 的菌株的例子是MT-10765,这一菌株以保藏号BP-5020 保藏在1-1-3, Higasi, Tsukuba City, Ibaraki Prefecture, Japan 的工业科学技术局国家生物科学和人类技术研究所。因MT-10765菌株可在30 °C的培养温度下培养,所以可以缩短培养时间,且20K hGH 的产率可高达每升培养基70mg或更高。

涉及靶蛋白质产生的改进的GR 以增加的量在宿主细胞中产生的机制不清楚。可能是GR 与有关胞质膜中质子梯度的形成的现象和在待分泌蛋白质通过胞子膜的转运步骤中需要的氧化还原电位有关。

转化的大肠杆菌菌株按已知的培养技术在包含可被同化的碳源、氮源和无机盐的培养基中培养。就培养方法来说,可优选地使用液体培养。优选的培养基是包含0.2到1.0% 甘油的加倍浓缩的LB培养基(20g/l聚蛋白胨和10g/l酵母膏)。

经培养本发明的转化的大肠杆菌菌株,分泌的蛋白质在转化菌株的周质中积累。从转化的大肠杆菌菌株的周质中收集分泌的蛋白质可以用从周质中收集纯化蛋白质的常用方法进行。例如,渗透休克方法 [Nossal G. N., "J. Biol. Chem.", Vol. 241 (13), p. 3055-3062 (1996)] 或类似的方法。

因此,按照本发明的产生方法,所需蛋白质可以有效地分泌到转化大肠杆菌菌株的周质中,并在该周质中积累。

下面将结合实施例更详细地描述本发明,但本发明的范围丝毫不受这些实施例的限制。

在下列实施例中具有“FERM BP-”编号的菌株保藏在以上所述的“国家生物科学和人类技术研究所”。

实施例1

GR基因和hGH基因共表达对hGH分泌效率的影响

(1)大肠杆菌GR基因表达质粒pKKGR1的制备

制备这一质粒的一种方法示于图1中。制备大肠杆菌K-12菌株(ATCC 23716)的染色体DNA。使用化学合成的寡核苷酸引物SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3,以上述染色体为模板用聚合酶链反应(PCR)方法扩增GR基因[Mullis, K. B. et al., "MethodsEnzymol.", Vol. 155, p. 335-350 (1987)]。结果获得了一个包含编码大肠杆菌GR基因的序列的DNA区段。接着,用限制酶EcoRI和PstI消化这一DNA区段,以分离1352bp的DNA片段。接着用限制酶EcoRI和PstI消化从Pharmacia Co. Ltd获得的载体质粒pKK223-3,分离4.6kb的DNA片段(2),将这一DNA片段(2)与上述DNA片段(1)连接,制备表达大肠杆菌GR基因的质粒pKKGR1的。此后,按InoueH. et al. ["Gene 96", p. 23-28(1990)]的方法用以上提到的质粒转化大肠杆菌JM109菌株(从Takara Shuzo Co., Ltd. 得到),获得一个转化大肠杆菌菌株(MT-10771)。

(2)22K hGH 分泌质粒pGHW300的制备

制备这一质粒的一种方法示于图2中。用限制酶StuI 和BglIII 消化用于枯草杆菌宿主的22K hGH分泌质粒pGH526 [Nakayama A. et al., J. Biotech, Vol. 8, p. 123-134 (1988)], 分离一个包含C-末端截短的22K hGH 基因的DNA片段(3)。另一方面, 用限制酶StuI和BglIII消化从MT-10712 (FERM BP-4361) 抽提出的人 20K hGH 分泌质粒pGHW3 (USP 5,496,713) 获得一个载体片段(4)。该这一载体片段(4) 与以上提到的DNA片段(3) 连接, 获得一个22K hGH 分泌质粒pGHW300。此后, 用以上提到的质粒转化大肠杆菌HB101菌株(从Takara Shuzo Co. Ltd. 获得), 获得MT-10773。如此获得的MT-10773以FERM BP-5019的保藏号保藏。

(3) hGH基因和GR基因的共表达

上述质粒pGHW3具有编码作为从20K hGH N-末端起的第14位氨基酸的丝氨酸的DNA碱基序列。另一方面, 本发明人制备了一种携带包括为从N-末端起的14 位氨基酸的蛋氨酸编码的密码子在内的核苷酸序列的20K hGH 分泌质粒pGHW30。具体来说, 以质粒 pGHW3 为模板, 用化学合成的寡核苷酸SEQ ID NO:17和市售的M4引物进行PCR扩增, 获得约0.6kbp的DNA片段。用限制酶StuI和BglIII 消化这一扩增的DNA片段, 然后用质粒 pGHW3 相应的部分取代所形成的StuI-BglIII片段, 制备出具有为20K hGH 编码的核苷酸序列的20K hGH 分泌质粒pGHW30, 所述序列具有为作为从N-末端起的14 位氨基酸的蛋氨酸编码的密码子。此外, 用上述质粒pGHW30转化大肠杆菌W3110菌株(ATCC 27325), 获得转化大肠杆菌菌株(MT-10772)。接着, 用常用的方法从这一转化菌株抽提和纯化质粒pGHW30。此后, 按照Inoue H. et al., ["Gene96", p. 23-28 (1990)]的方法, 分

别用pGHW30与pKKGR1的组合和pGHW300和pKKGR1的组合来转化宿主大肠杆菌JM109菌株。将如此获得的每一种转化体于30°C下在含有10 μg/ml氯苄青霉素和10 μg/ml四环素的LB培养基中培养,使其形成菌落。接下来将分离的转化体在30°C的培养温度下在含有100 μg/ml氯苄青霉素和10 μg/ml四环素的双倍浓缩的LB培养基(20g/l聚蛋白胍和10g/l酵母膏)中培养24小时。因质粒 pKK223-3 和 pKKGR1具有tac启动子,所以要监测在培养具有这类质粒的转化菌株的培养开始时加入1mM IPTG 的影响。在培养之后,用渗透冲击方法[Nossal G. N., "J. Biol. Chem.", Vol. 241 (13), p. 3055-3062 (1996)]收集分泌到周质部分中的hGH。以酶免疫测定法[Kato K. et al., "J Immunol.", Vol. 116, p. 1554 (1967)]用hGH的抗体测定hGH在周质部分中的浓度。按以下方法制备周质部分溶液。这就是说,采用离心培养基的方法,以沉淀组分的状态收集培养的大肠杆菌的细胞沉淀,然后悬浮在原始培养基1/10量的等渗溶液(含有20%蔗糖和1mM EDTA的10mM tris-盐酸缓冲液(pH7.0))中。此后,使悬液静置30分钟,接着进行离心分离并收集细胞沉淀。接下来,将如此收集的细胞沉淀悬浮在4°C的冷水中,抽提存在于细胞沉淀周质中的蛋白质。将该悬液离心分离,从其中除去细胞沉淀。收集作为周质组分的所形成的上清液(提取的组分)。用酶免疫测定法测定在周质组分中的收集的hGH的浓度。根据测定值,计算每升培养基中分泌的hGH的量。结果示于表1和表2中。

表 1

由GR 基因同时表达引起的20K hGH 分泌量的提高(以mg / 升培养基)

质粒	pGHW30	pGHW30/pKK223-3		pGHW30/pKKGR1	
加入 IPTG	-	-	+	-	+
分泌的 20K hGH 的量	30	24	19	30	65

表 2

由GR 基因同时表达引起的22K hGH 分泌量的提高(以mg / 升培养基表示)

质粒	pGHW300	pHW300/pKK223-3		pGHW300/pKKGR1	
加入 IPTG	-	-	+	-	+
分泌的 22K hGH 的量	60	37	29	61	105

当GR基因与hGH基因共表达时,20k hGH 和22k hGH 两者均比在单独使用 hGH 分泌质粒时得到更大量的分泌。当使载体质粒 pKK223-3 和 hGH 分泌质粒存在于同一细胞中的情况下,分泌的20khGH 和22k hGH 两者的量都降低。而使GR表达质粒 pKKGR1 和 hGH分泌质粒存在于同一细胞中时,分泌的20k hGH 和22k hGH 两者的量均明显增加。这一事实表明,GR基因的共表达可以提高分泌

的靶产物的产量。为什么在载体质粒pKK223-3和hGH分泌质粒的共存时,分泌的hGH的量比hGH分泌质粒单个存在时的量要小的原因还不确定。但是,与hGH分泌质粒类似,pKK223-3有源于pBR322的复制起点,因此可以假定会出现复制和相容性致劣的竞争。也可以假定,pKK223-3的药物抗性标记 β -内酰胺酶是一种分泌蛋白质,该蛋白质在膜通过步骤中与hGH前体竞争。

在用GR表达质粒 pKKGR1 和 hGH 分泌质粒两种质粒转化菌株 JM109 中,需要加入GR表达的诱导剂(IPTG)。

实施例2

GR基因和 β -内酰胺酶基因的共表达对 β -内酰胺酶分泌效率的影响

在从Pharmacia Labs., Inc. 获得的载体质粒pKK223-3 上, β -内酰胺酶基因以一种药物抗性标记存在。 β -内酰胺酶在大肠杆菌胞质中表达,然后分泌到周质空间并在那里积累。将GR基因渗入到pKK223-3 中形成质粒 pKKGR1,因而该质粒仅在这一点上与pKK223-3不同,质粒pKKGR1的剩下的部分与pKK223-3 中的完全相同(包括 β -内酰胺酶的表达区在内)。因此,通过将由质粒pKKGR1表达的 β -内酰胺酶的分泌量与由质粒pKK223-3表达的 β -内酰胺酶的分泌量进行比较,可以看出GR同时表达对 β -内酰胺酶分泌效率的影响。以与上述hGH产生菌株的培养相同的方法培养用各个质粒转化的JM109菌株。收集周质部分溶液,进行SDS-PAGE,然后用考马斯亮蓝R250染色。此后,用光密度计测定 β -内酰胺酶带(32.0kDa),以检测 β -内酰胺酶相对于总的周质蛋白质的含量比率

(%)。结果示于表3中。

表 3

GR基因的共表达对 β -内酰胺酶分泌效率的影响[A660(32.0kDa)/A660(周质组分中总蛋白量)%]

质粒	pKK223-3		pKKGR1	
	-	+	-	+
加入IPTG	-	+	-	+
β -内酰胺酶	10	8	18	24

大肠杆菌的 β -内酰胺酶向周质中的分泌也能被GR基因的共表达加强得到了证实。

实施例3

使用源于大肠杆菌OmpA的分泌信号肽分泌和产生20K hGH

(1) GR基因和具有得自大肠杆菌OmpA基因的分泌信号肽编码区的20K hGH基因的共表达

按与实施例 1 相同的方式将 20K hGH 分泌质粒 pGHW40 与 GR表达质粒 pKKGR1 一起转化进大肠杆菌 JM109 菌株中, 所述质粒 pGHW40 携带有源于解淀粉芽孢杆菌的中性蛋白酶的转录启动子和源于大肠杆菌外膜蛋白 OmpA 基因的分泌信号肽。用与实施例 1 相同的方法培养如此转化的菌株, 然后抽提周质组分。接着用酶免疫测定法测定分泌的20K hGH 的量, 结果示于表 4 中。

表 4

由使用源于大肠杆菌OmpA的信号肽共表达GR 基因产生的分泌促进作用(以mg/升培养基表示)

20K hGH载体	pGHW40 (OmpA信号肽)	
pKKGR1	-	+
分泌的20K hGH的量	2	16

对20K hGH 的分泌来说,源于解淀粉芽孢杆菌的中性蛋白酶的分泌信号肽是优选的(表1),分泌的20K hGH 的量可以经共表达GR 基因明显增加。然而,即使通过使用具有源于大肠杆菌OmpA的分泌信号肽的分泌质粒转化的菌株,由于GR基因的共表达,其分泌效率能明显提高,但分泌的20K hGH 的量比使用源于中性蛋白酶的分泌信号肽时的量相对小一些。

而且,如实施例2所示,在具有 β -内酰胺酶的分泌信号肽的 β -内酰胺酶分泌中也可以观察到GR 基因的同时表达产生的分泌促进作用。就这一事实来看,GR基因同时表达的作用并不被特定种类的分泌信号肽所限制,这一点是明显的。

比较实施例1

使用源于解淀粉芽孢杆菌的中性蛋白酶的修饰分泌信号肽产生20K hGH

(1) 用于修饰源于中性蛋白酶的分泌信号肽的20K hGH 分泌质粒pGHV2的装配

为了将一个可有可无的氨基酸残基插入到源于解淀粉芽孢杆菌的中性蛋白酶的分泌信号肽中,向分泌信号肽序列中引入一个限制酶识别位点,并同时组成一个完整的质粒,以产生用于修饰分泌信号肽的质粒pGHV2。方法示于图3 和图4 中。在用限制酶消化pGHV2后,用克列诺酶处理使pGHV30末端变成平端,使限制酶BamHI作用在pGHV30上,从而制备约0.85kbp的DNA片段(5),该片段含有一个启动子和一个分泌信号肽编码区,两个中性蛋白酶基因和20K hGH 基因。将这一DNA 片段(5) 与载体部分(6)连接,所述载体部

分是由为了产生pGHV1(图3)用限制酶SmaI和BamHI处理市售的克隆载体pUC119获得的。接着,以所述pGHV1为模板,用化学合成的寡核苷酸SEQ ID NO:4和市售M4引物进行PCR扩增,获得约100bp 的包含中性蛋白酶基因启动子的DNA片段(7)。此外,也用化学合成的寡核苷酸SEQ ID NO:5和市售RV引物进行PCR扩增,获得约700bp 的含有中性蛋白酶分泌信号肽编码区基因和20K hGH 基因的DNA片段(8)。接着,为了用这一PCR 扩增将可有可无的氨基酸残基插入到分泌信号肽中这一目的,设计一种引物SEQ ID NO:5,以使其中可包含识别限制酶NdeI和SpeI的位点。如图4所示,分别用限制酶EcoRI和NdeI、NdeI和HindIII消化扩增的DNA片段(7)和(8),然后连接到用EcoRI和HindIII消化市售的克隆载体pUC118获得的载体部分(9)上,从而产生pGHV2(图4)。在由这一质粒编码的源于中性蛋白酶的信号肽中,由于限制酶NdeI和SpeI识别位点的插入,其从N-末端起的第8位丝氨酸(Ser)残基被苏氨酸(Thr)残基取代。

(2) 具有修饰分泌信号肽序列的20K hGH 分泌质粒的产生

为了在分泌信号肽序列中增加一个正电荷区和一个疏水区,分别插入正电荷氨基酸(Lys)和疏水氨基酸(Leu)。Mizushima 等已报道,从分泌效率考虑,有许多构成疏水区的疏水氨基酸残基(Hikita C. and Mizushima S., "J. Biol. Chem.", Vol. 267, p. 4882-4888 (1992)),因此合成了SEQ ID NO 6-10 所示的接头DNA,其中改变了被插入的亮氨酸残基的数量。用夹在pGHV2的限制酶NdeI和SpeI之间的区取代每一合成接头,产生20K hGH 分泌质粒(pGHV3、pGHV4、pGHV5、pGHV6和pGHV),所述质粒在分泌信号肽序列中具有不同的亮氨酸残基(图5显示了使用SEQ ID NO:8为代表性

例子的方法)。经使用荧光探针DNA序列试剂盒(ABI Co., Ltd. 制造)翻译在分泌信号肽序列中编码氨基酸残基的DNA 序列来证实修饰分泌信号肽序列中的氨基酸序列。在引入了额外的亮氨酸残基后,用上述pGHV2的丝氨酸(Ser)残基再次取代苏氨酸(Thr)残基,除了插入的残基外,原始序列被保持。

(3)使用具有修饰分泌信号肽的20K hGH分泌质粒产生20K hGH

用与实施例1相同的方式培养用以上获得的具有修饰分泌信号肽的每一20K hGH 质粒转化的大肠杆菌 JM109菌株,然后提取周质组分。此后,测量20K hGH的含量,再计算每升培养其中20K hGH 的产量。结果示于表5中。在表5中,符号K代表Lys残基,L代表leu 残基。各符号前面的数字分别代表插入后在正电荷区和疏水区存在的赖氨酸残基的亮氨酸残基的数目。

分泌信号肽序列的修饰对分泌的20K hGH的量的影响(以mg/升培养基表示)

质粒	pGHW30	pGHV2	pGHV3	pGHV4	pGHV5	pGHV6	pGHV7
信号肽	2K1L	2K1L	4K1L	4K3L	4K6L	4K7L	4K9L
分泌的 20K hGH 的量	28	26	25	24	35	33	30

实施例4

GR基因的共表达和分泌信号肽序列的修饰对分泌20K hGH 的影响

(1)通过分泌信号肽的修饰改变20K hGH 分泌质粒的药物抗性标记

将GR表达质粒和用修饰分泌信号肽分泌20K hGH的质粒渗入到

相同的宿主细菌中,且为了测定GR基因的同时表达对分泌20K hGH的影响,有必要将具有带修饰信号肽的20K hGH 分泌质粒的药物抗性标记从氨苄青霉素改变成四环素。对携带有修饰分泌信号肽编码区的质粒(pGHW30、pGHV2、pGHV3、pGHV4、pGHV5、pGHV6和pGHV7)进行所有相同的操作,因此仅以pGHV5 为代表例在以下进行描述。

简单地说,用pGHV5 和EcoRI - HindIII 部分(含有中性蛋白酶基因的启动子和编码由修饰信号肽与20K hGH 组成的前体的区)取代pBR322的EcoRI-HindIII部分。克隆载体pBR322是可以购买到的。

在这种情况下,为了阻止中性蛋白酶启动子的引入,将 trpA 终止子序列直接加在编码 20K hGH 的 DNA 序列的下游侧向。

具体地说,将 SEQ ID NO:11 所示的含有 trpA 终止子的合成接头插入到夹在 pGHV5 的限制酶 BamHI 和 XbaI 之间的位点,以获得 pGHV15 (图6)。接着,用限制酶 EcoRI 和 HindIII 切割 pGHV15,获得约 0.85kbp 的 DNA 片段 (10)。另一方面,

用限制酶 EcoRI 和 HindIII 切割 pBR322,以取得载体部分(11)。将所述 DNA 片段(10)与载体部分(11)连接制备 pGHV25 (图7)。然而,该质粒缺失四环素抗性基因, HindIII 上游的 -35 序列,因而它仅表现出氨苄青霉素抗性,而不表现出四环素抗性功能。为了将 -35 序列插入到四环素基因的上游侧向这一目的,化学合成 SEQ ID NO:12 所示的 DNA 接头,然后插入到夹在 pGHV25 的限制酶 XbaI 和 HindIII 之间的位点上,以制备

pGHV35 (图8)。此外, 为了消除 pGHV35 具有的氨苄青霉素抗性基因, 使约 0.8kbp 的区缺失产生 pGHV45 (图9), 所述约 0.8kbp 的区位于限制酶EcoRI 和 VspI 之间以固定启动子区的氨苄青霉素抗性基因。对具有其它修饰信号肽的 20K hGH 分泌质粒进行类似的操作, 产生pGHV42、pGHV43、pGHV44、pGHV46 和 pGHV47。

(2) 用具有修饰分泌信号肽编码区的20K hGH分泌质粒的GR 表达质粒分泌20K hGH

将同时用20K hGH分泌质粒(具有修饰分泌信号肽编码区, 该区带有获得的四环素抗性标记)和GR表达质粒pKKGR1转化的大肠杆菌 JM109菌株加入到含有IPTG(1mM)的培养基中。然而用与实施例1相同的方法培养, 然后提取周质组分。此后, 测定20K hGH的含量, 再计算每升培养基中20K hGH 的产量。结果示于表6中。在表6中, 符号K代表Lys残基、符合L代表Leu残基。这些符号前面的数字分别代表插入后在正电荷区和疏水区存在的赖氨酸残基和亮氨酸残基的数目。

表 6

在GR基因共表达下分泌信号肽序列的修饰作用(对分泌的20K hGH的量的影响)

(以mg/升培养基表示)

质粒	pGHW30	pGHV42	pGHV43	pGHV44	pGHV45	pGHV46	pGHV47
信号肽	2K1L	2K1L	4K1L	4K3L	4K6L	4K7L	4K9L
分泌的 20K hGH 的量	65	63	58	61	76	71	69

在这些具有修饰分泌信号肽的20K hGH 质粒中,pGHV45给出最大的分泌产量。

实施例5

用在同一质粒中包含20K hGH 基因(带有修饰分泌信号肽编码区)和GR基因的质粒产生20K hGH

(1)在同一质粒中包含带有分泌信号肽编码区的20K hGH 基因和GR基因的分泌质粒pGHV45GR的产生

用示于 SEQ ID NO 13 和14中的合成寡核苷酸为引物,将包含 tac 启动子、GR 基因和TrrnB 终止子的 pKKGR1 的一个区进行PCR扩增,以获得约 2.0kbp 的 DNA 片段(12)。在这种情况下,设计各引物,以使限制酶AvaI 和AccIII 的识别序列可以存在于 DNA 片段的两端。接着将包含GR基因表达区的DNA片段(12)插入到用限制酶AvaI 和AccIII 消化的pGHV45 的位点上,产生pGHV45GR(图10)。

(2)使用在同一质粒中包含20K hGH 基因(带有修饰分泌信号肽编码区)和GR基因的分泌质粒pGHV45GR产生20K hGH

用与实施例1相同的方法培养由pGHV45GR转化的各种大肠杆菌菌株,提取各周质组分。接着测定20K hGH的含量,并计算每升培养基中20K hGH的产量(mg),结果示于表7中

表 7

经使用pGHV45GR的20K hGH 的产率(以mg/升培养基表示)

宿主	JM109		W3110		RB791		HB101	
加入 IPTG	-	+	-	+	-	+	-	+
分泌的 20K hGH 的量	73	23	12	7	75	21	9	6

在以 JM109 为宿主并且向培养基中加入 IPTG 的情况下, 分泌的20K hGH 的量与使用两种不同质粒的实施例1、2 和3 的实验结果比较相反地要低。 当将超声波处理制备的全细胞提取溶液进行SDS-PAGE 分析时, 可证实 GR 非常高的产量。相反地,在不向培养基中加入 IPTG 的非诱导条件下, 获得了大量的分泌产物。用 SDS- PAGE将这些培养细胞进行类似的分析, 结果证实产生的

GR 的量比在诱导培养条件下产生的 GR 的量小。从这些结果可明显看出, 对转化的JM109(其中20K hGH 基因和 GR 基因存在于同一质粒中), 向培养基中加入IPTG 的条件是优选的。GR 基因被 tac 启动子表达, 但宿主是 JM109 的情况下, 可以认为加入 IPTG 的诱导作用导致 GR 基因的过度表达, 这引起分泌作用的降低。

在转化的W3110中,在IPTG诱导和无IPTG 诱导两种情况下都获得了小量的分泌,如表7所示。当由超声波处理制备的全细胞提取溶液用于SDS-PAGE分析时,可证实GR非常高的产量。在以HB101 为宿主的情况下也获得了类似的结果。

可以假定由于不同宿主JM109和W3110 引起的上述不同与每一宿主染色体上的lacI^q的存在/不存在有关。这就是说, JM109 具有起到tac启动子的抑制剂作用的tacI^q基因,而W3110没有任何lacI^q基因。用以 RB791 为宿主的以下实验证实了这一假设是正确的。RB791(ATCC53622)是由将lacI^q基因整合到W3110 中制备的菌株, RB791的其它特征与W3110的相同。在使用RB791的情况下,在 IPTG 诱导的培养条件下分泌的20K hGH 的量降低,与在JM109 的情况下一样, 电泳证实了GR的高产量。另一方面,在无IPTG 诱导的情况下,可以获得大量分泌的20K hGH。电泳证实了不存在GR 的过度产生。

实施例6

无lacI^q基因的宿主菌株的使用

为了使在实施例5 中令人不满意的大肠杆菌宿主的W3110 和

HB101能够使用,进行了以下所述的研究

(1)在相同的质粒中包含20K hGH基因(带有修饰分泌信号肽编码区)和GR 基因并且即使在无lacI^q基因的宿主中也是有效的分泌质粒pGHR10的产生

为了将 lacI^q 基因整合到作为 20K hGH 基因表达区的相同的复制子中, 以化学合成的示于 SEQ ID NO 15 和 16 为引物, 将市售表达载体 pTrc99A (Pharmacia Labs., Inc.) 的 lacI^q 基因进行 PCR 扩增。在这种情况下, 设计各引物使限制酶 EcoT141 和 AvaI 识别位点可以加入到 DNA 片段 (13) 的两端。接着, 用限制酶 EcoT141 和 AvaI 消化 pGHV56GR, 以得到载体片段 (14)。将这一载体片段 (14) 与含有 lacI^q 基因的 DNA 片段 (13) 连接, 产生 pGHR10 (图 11)。所插入的 lacI^q 基因仅含有 RBS 序列 (一个核糖体键合区), 但不含有任何启动子区, 因此它可以经引入上游四环素抗性基因被转录和表达。

(2)使用在同一质粒中含有20K hGH基因(带有修饰的分泌信号肽编码区)和GR基因且其中GR 的表达由lacI^q基因控制的分泌质粒pGHR10产生20K hGH。

用与实施例 1 相同的方式培养用 pGHR10 转化的各种转化大肠杆菌菌株, 然后提取各周质组分。接着测定 20K hGH 的含量, 并计算每升培养基中 20K hGH 的产量(mg)。结果示于表8中。在所有转化的大肠杆菌菌株中,大肠杆菌W3110菌株(MT-10765)(携带pGHR10)以保藏号 FERM BP- 5020 保藏。HB101 菌株从 Takara Shuzo Co., Ltd. 获得, LE392 菌株(ATCC 33572) 从美

国典型培养物保藏中心获得。

表 8

用pGHR10产生20K/hGH(以mg/升培养基表示)

宿主	W3110		HB101		LE392	
加入 IPTG	-	+	-	+	-	+
分泌的 20K hGH 的量	76	10	74	4	68	5

通过采用pGHR10(其中20K hGH 基因表达区和GR基因存在于相同的复制子上)和使lacI^q基因(控制由启动子(tac)定向的GR 基因的表达)存在于相同的质粒中,使用不具有lacI^q基因的宿主菌株也是可能的。

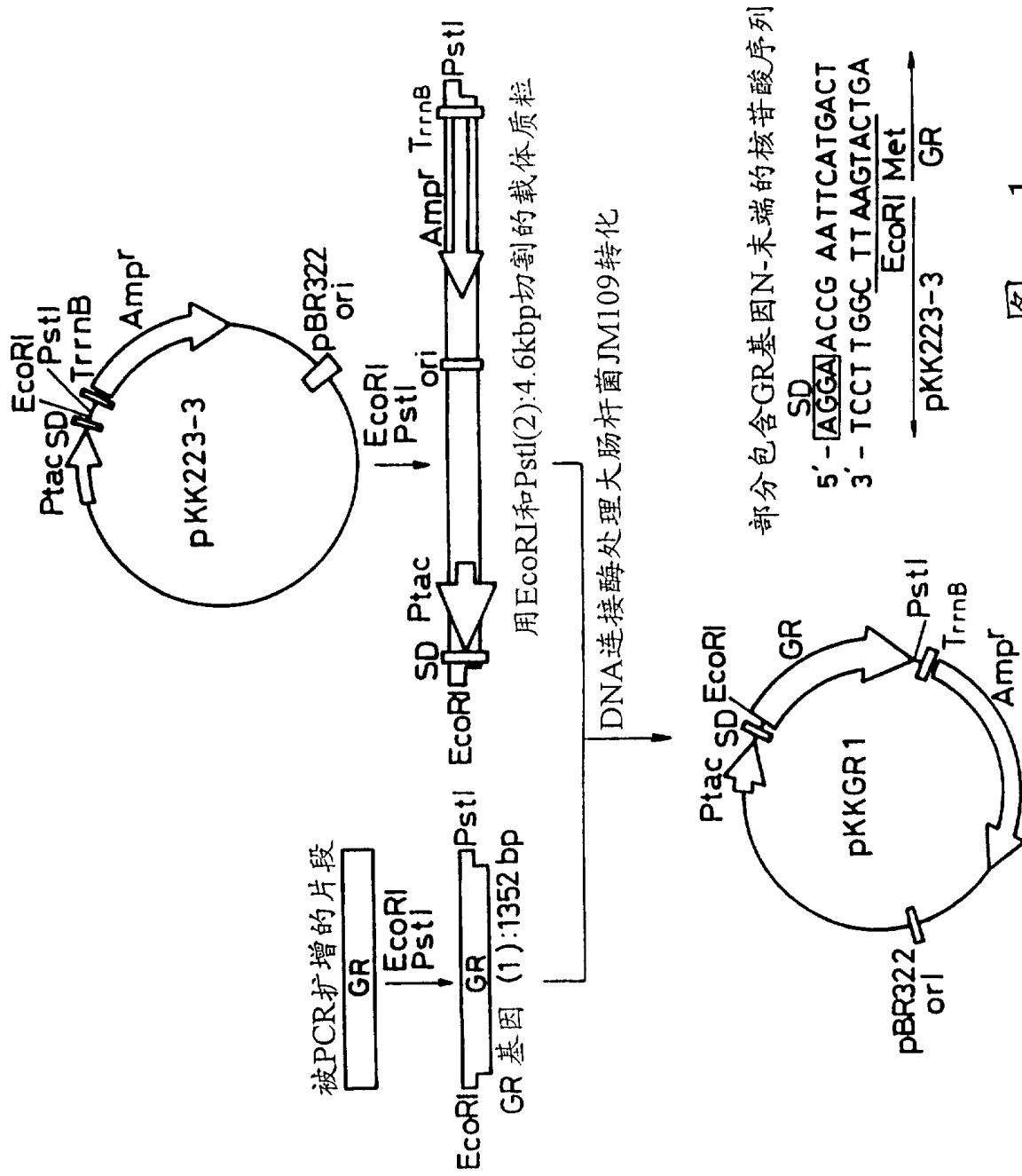
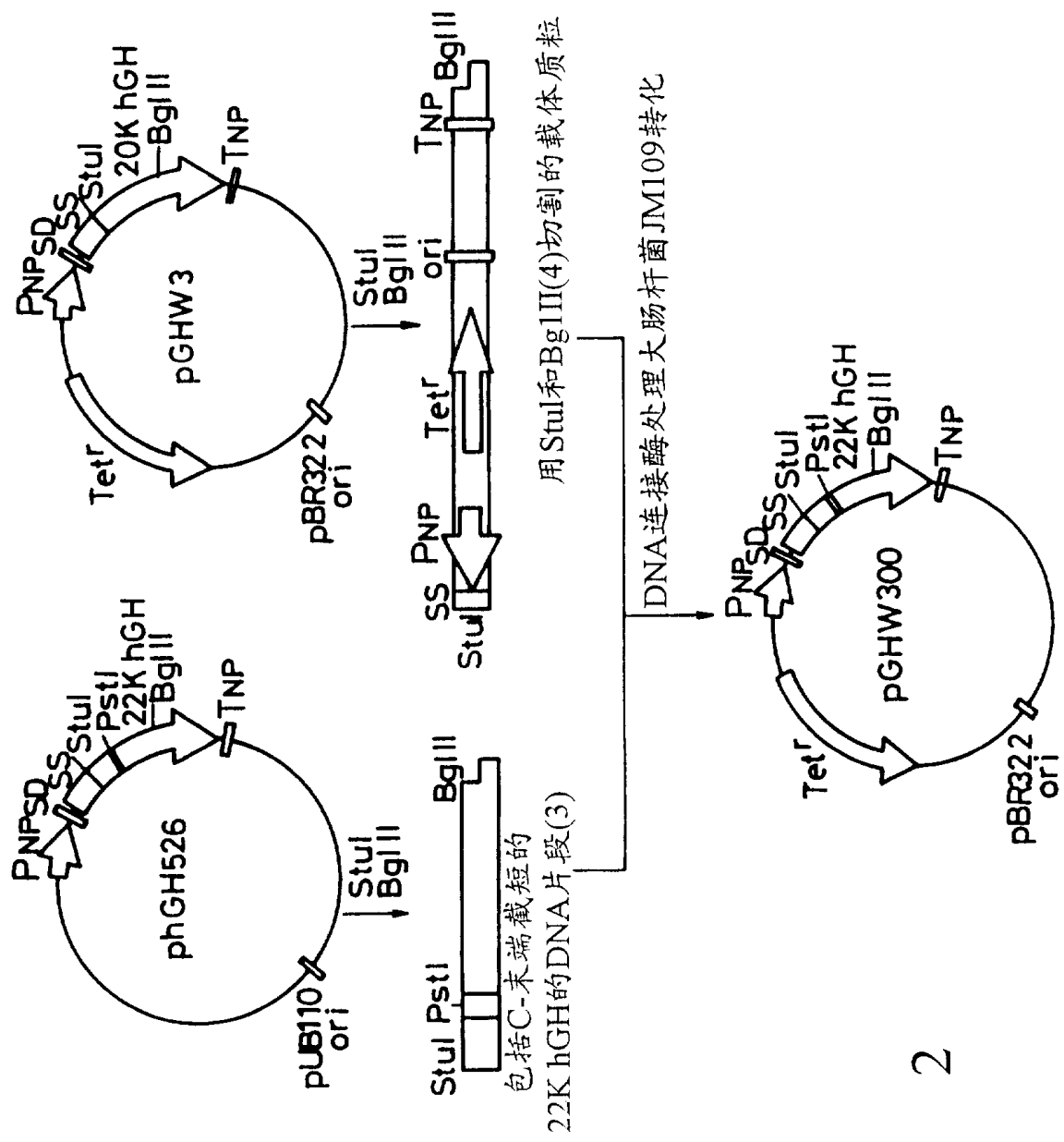


图 1



用Stul和BglII(4)切割的载体质粒

图 2

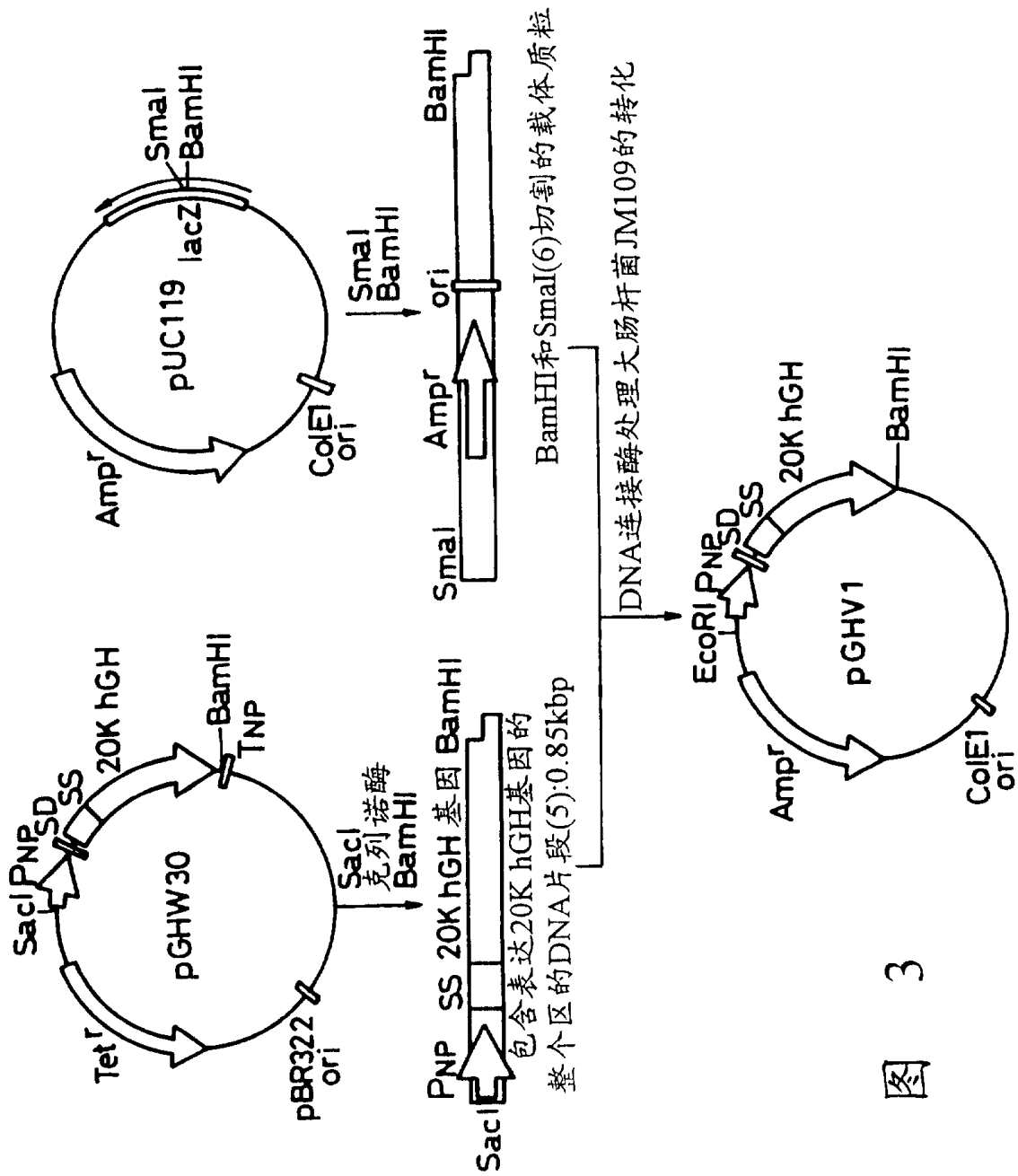


图 3

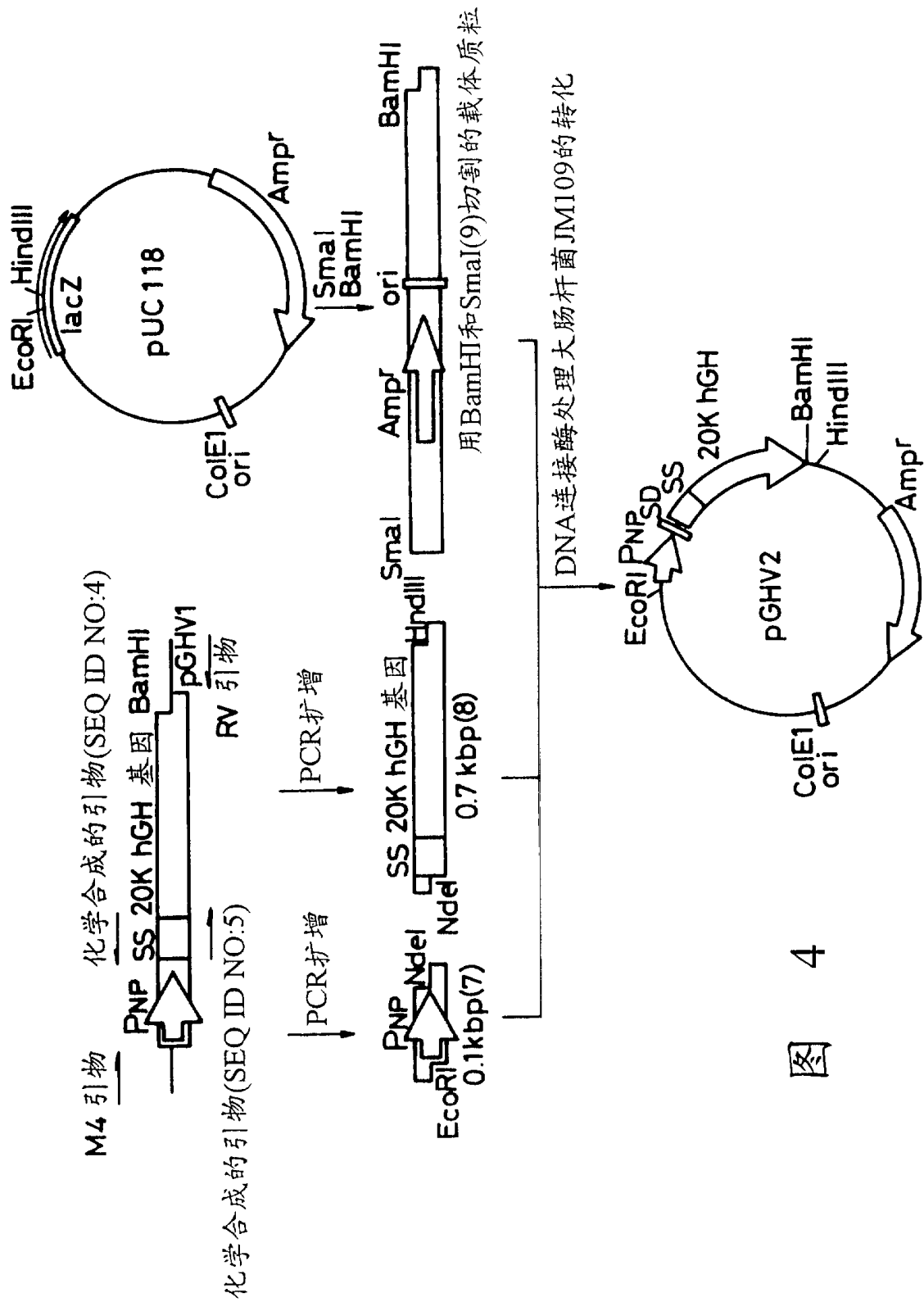


图 4

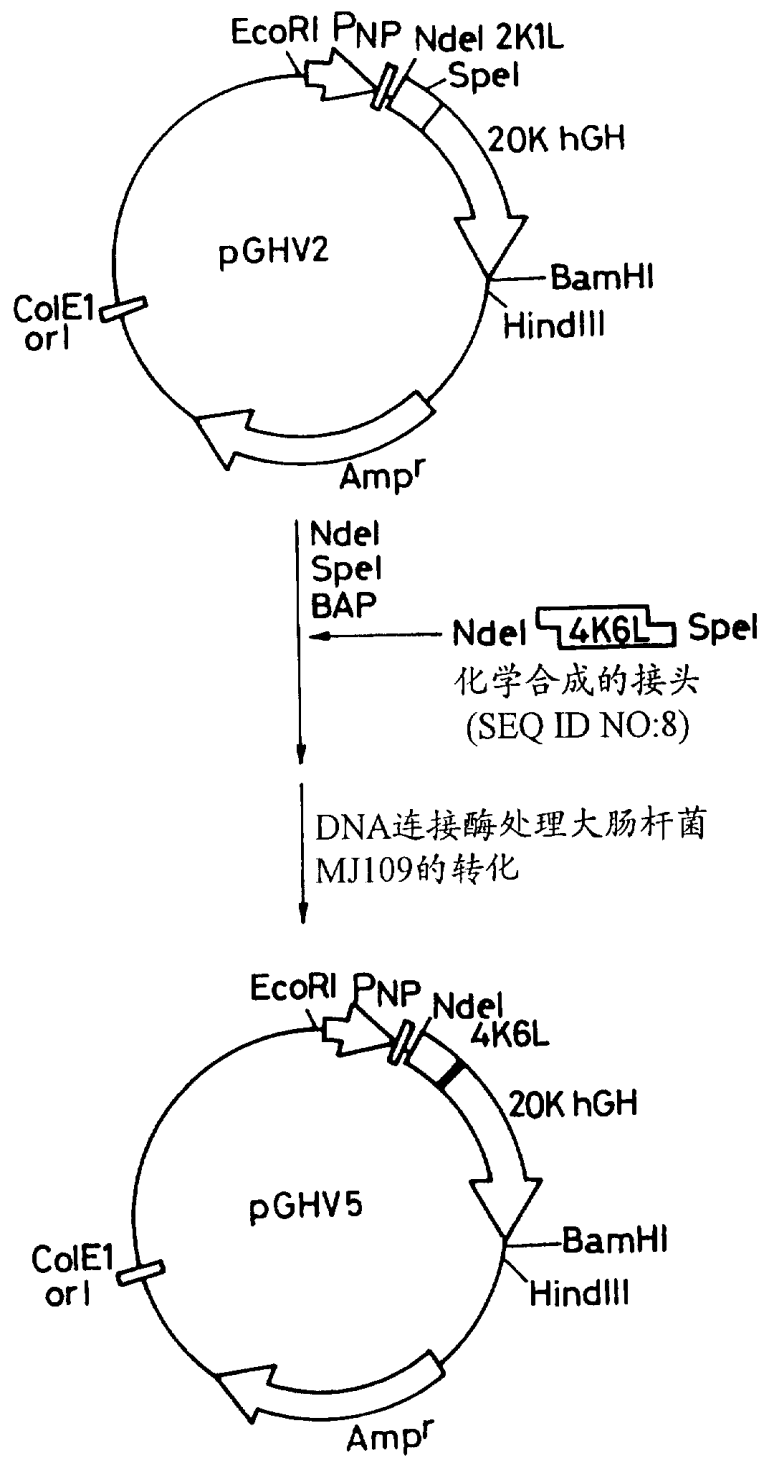


图 5

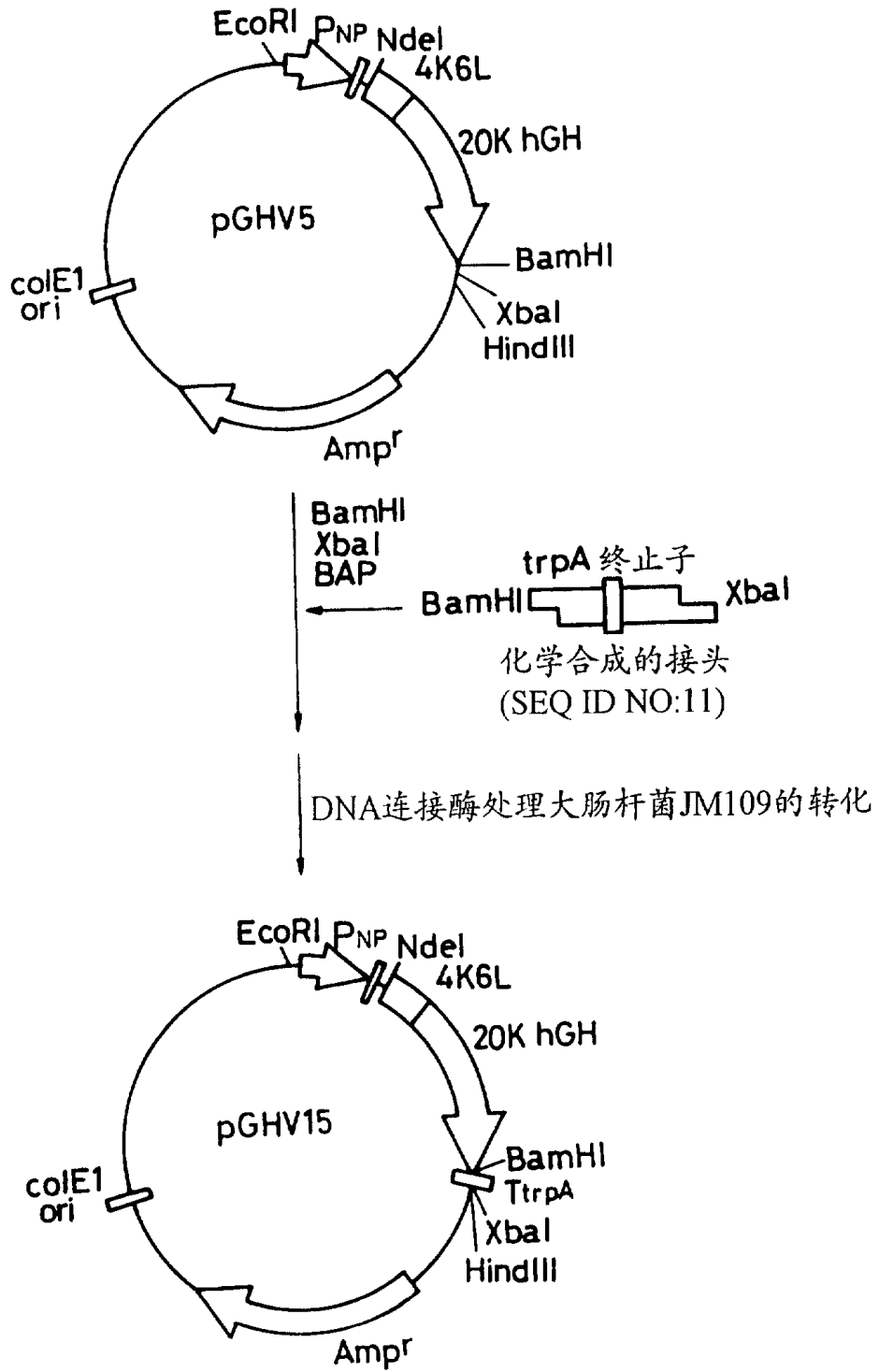


图 6

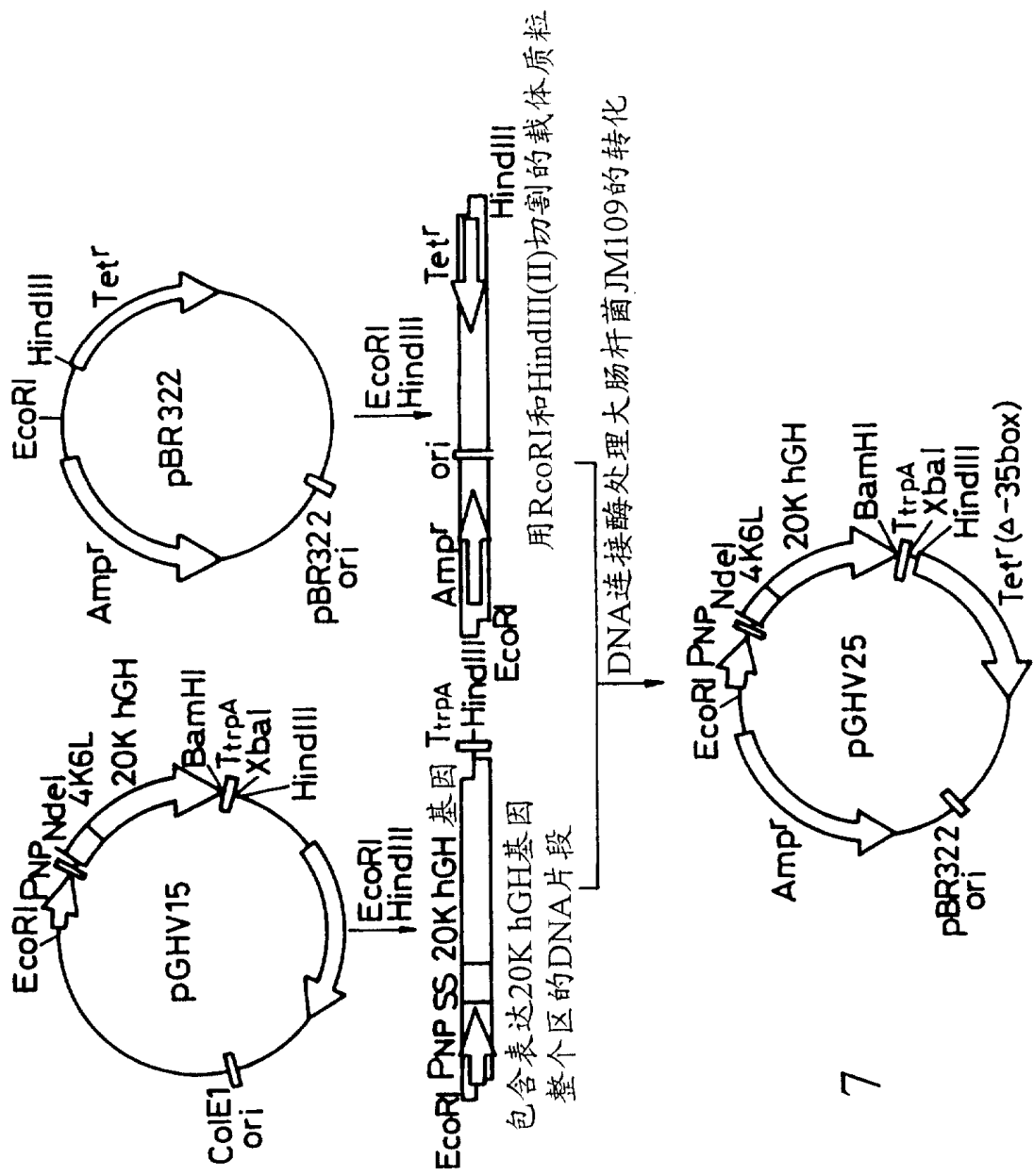


图 7

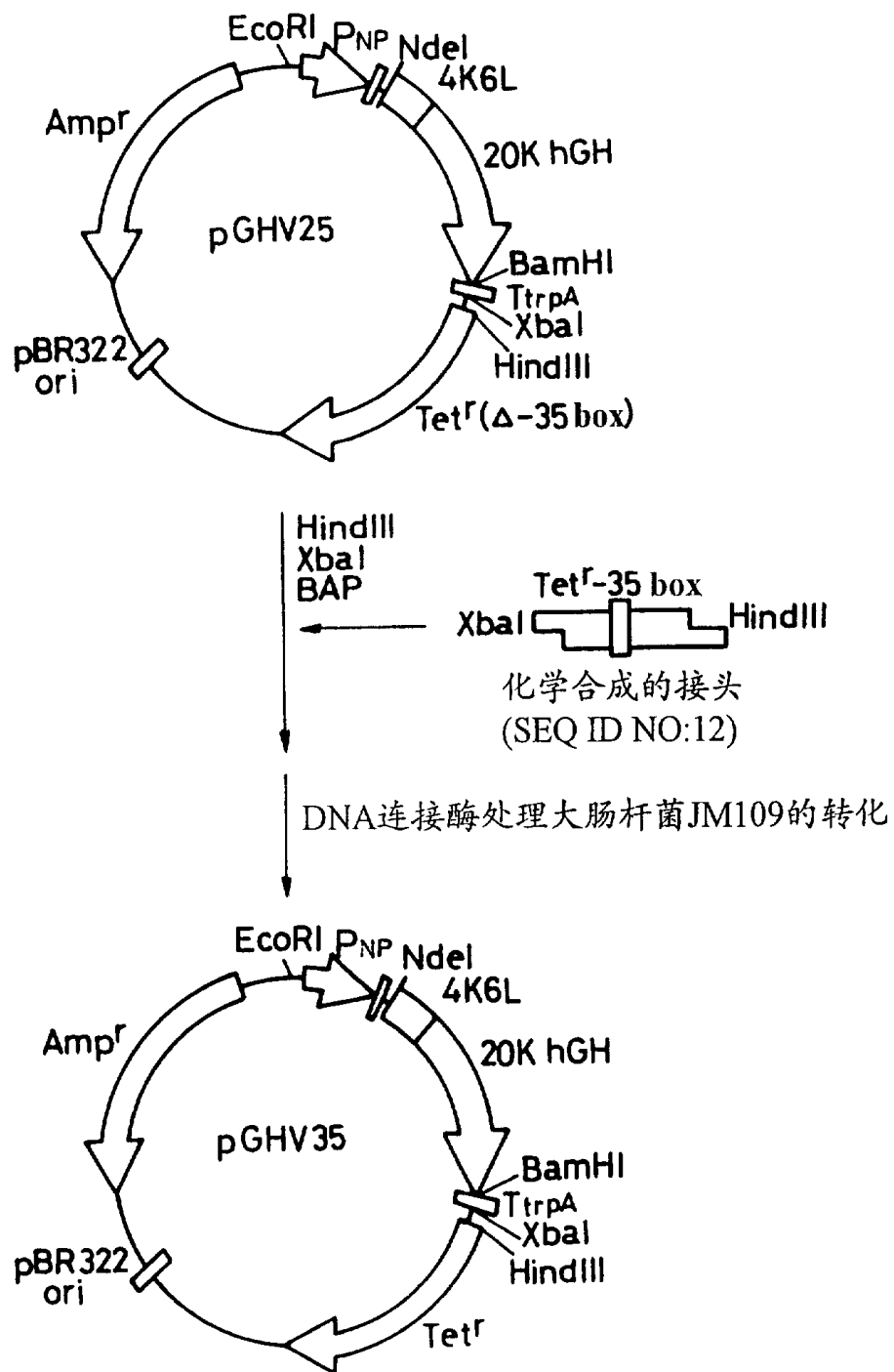


图 8

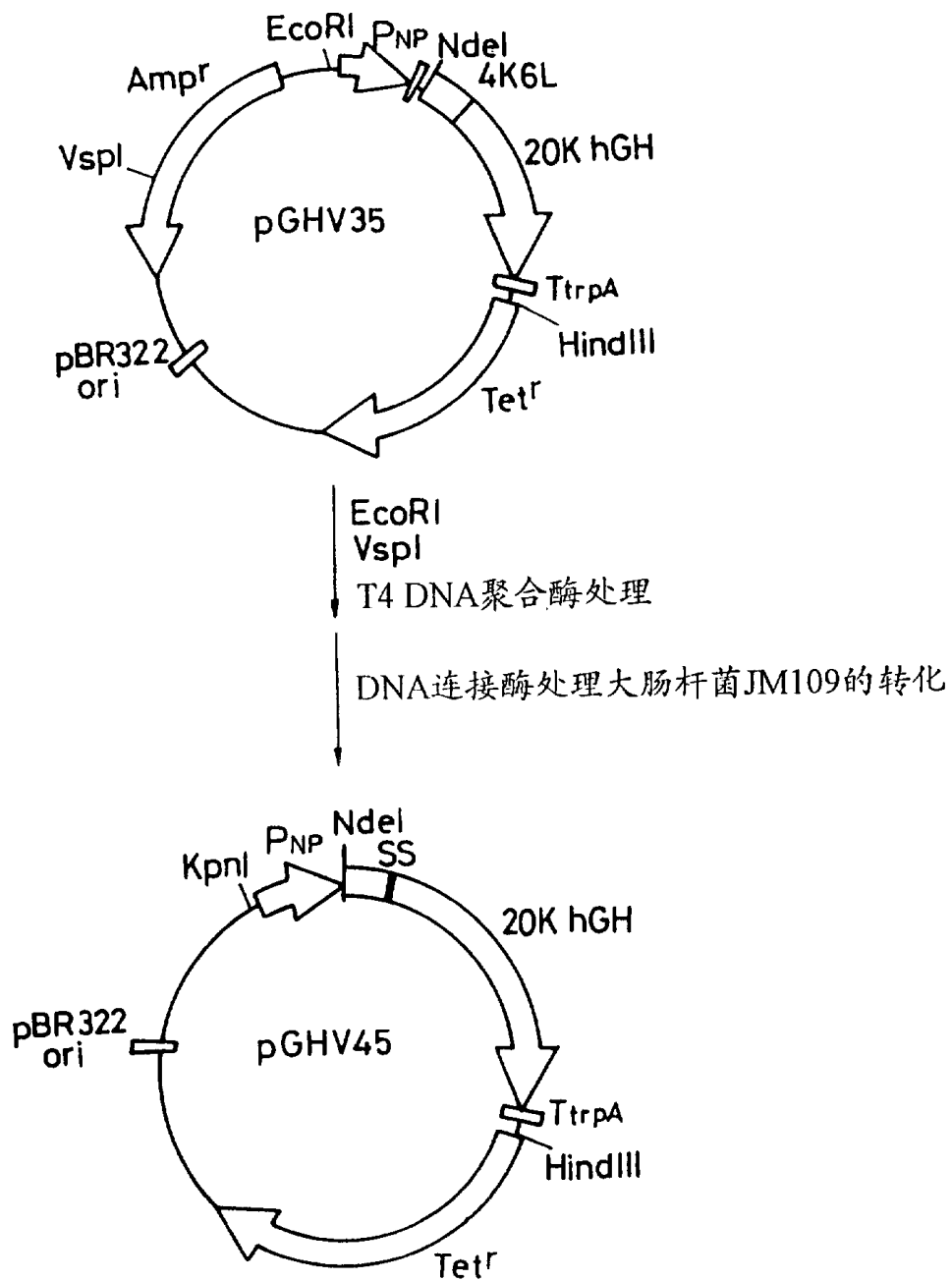


图 9

化学合成的引物(SEQ ID NO:13)

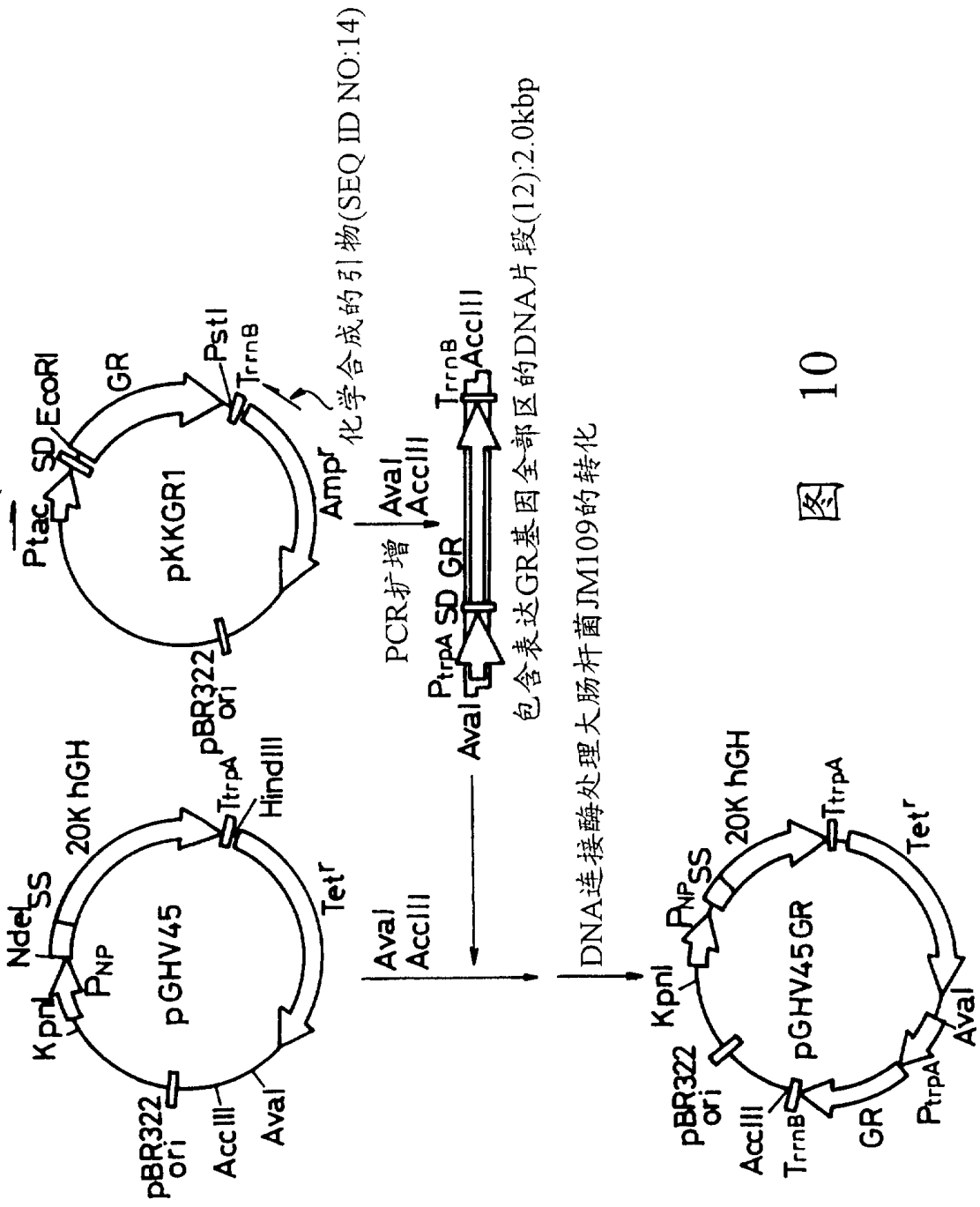


图 10

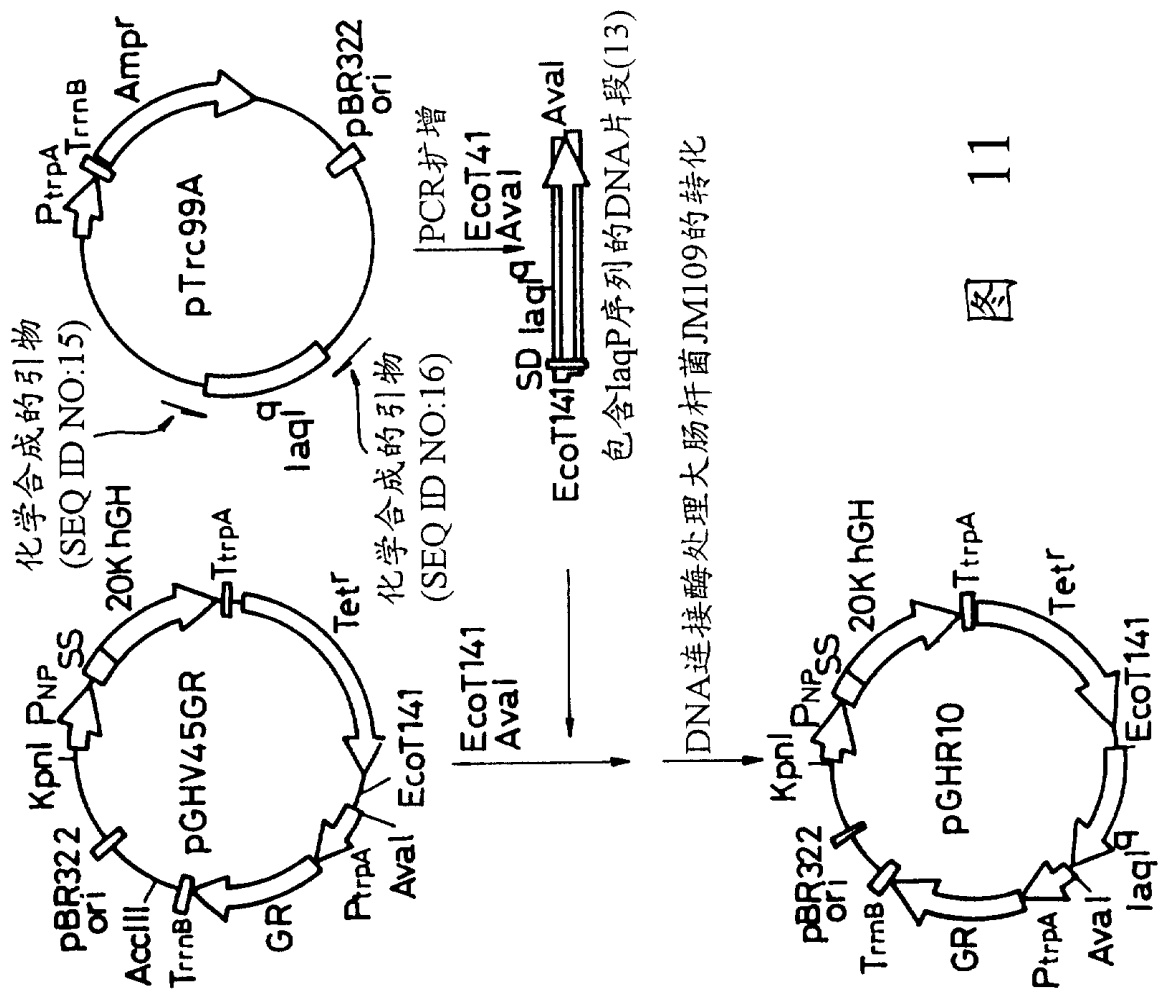


图 11