大腸菌 *phoA* 遺伝子を用いた有用蛋白の分泌生産†

(昭和 63 年度農芸化学奨励賞受賞)

依 田 幸 司

(東京大学農学部)

遺伝子操作技術により種々の有用蛋白を微生物で生産させることが可能になって以来、その生産量を増大させるべくさまざまな工夫がなされてきた。遺伝子増量効果を得るためには、多コピー数プラスミド、高コピー変異(run-away) プラスミド、誘導時の溶原フェージなどをベクターにすることが適している。また mRNA 量を増やすためには、強力なプロモーターの下流に遺伝子を配し、3' 領域を分解を受けにくいターミネーターに置き換え、さらに RNA 分解酵素の活性の低い宿主菌を使用することで効果が認められている。翻訳の効率を高めるためには、SD 配列と開始コドン間の距離の最適化など 5' 末端の構造が工夫され、また蛋白分解活性の低い宿主の利用が試みられ、高発現させたい遺伝子の違いによってそのいずれかで生産量の向上が果たされている。

さらにこの生産と精製の効率をあげるために目的の蛋白質をその生産の場である細胞質から外へ出す分泌生産に期待が持たれて久しい⁽¹⁾。期待される効果とは、①産物の蓄積により細胞の機能が阻害されることが防げる、②細胞質に存在するプロテアーゼによる分解が防げる、③後の精製の効率向上が期待される、などであるが、さらに④分泌の過程でシグナル配列が切断されることを利用すれば開始コドンにコードされるメチオニン以外の本来その蛋白のN末端にあったのと同じアミノ酸をN末端にすることが可能である。

多くの分泌蛋白や膜蛋白の解析から明らかにされたように膜通過を開始するためには、その蛋白のN末端にシグナル配列と呼ばれる配列を持たせることが必須であるので、シグナル配列をN末端に付け足すように工夫されたベクターが分泌ベクターと呼ばれている。Talmadge

と Gilbert が pBR 322 の *bla* 遺伝子を加工してそのシグナル配列にラットの preproinsulin を連結して分泌発現させた一連の実験は⁽²⁻⁵⁾、この方法に大きな期待を持たせたといえよう。すなわち、産物がペリプラズムに移行すること⁽³⁾、分泌に際して融合遺伝子産物のシグナル配列も大腸菌のシグナルペプチダーゼで正確に切除されること⁽⁴⁾、細胞質内への生産に比べ産物の安定性が 10 倍以上向上すること⁽⁵⁾が示された。この報告を皮切りに、さまざまな分泌蛋白や膜蛋白のシグナル配列を連結して発現させる分泌ベクターが開発されている。筆者らも彼らの報告と前後して大腸菌のアルカリ性ホスファターゼに着目してこの遺伝子のクローニングによる解析を始めており⁽⁶⁾、それを利用した分泌ベクターの開発を行った。

I. 大腸菌 *phoA* 遺伝子

大腸菌のアルカリ性ホスファターゼは、培地中のリン酸濃度を制限することにより高効率でペリプラズムに誘導生産される分泌酵素である⁽⁷⁻¹⁰⁾。染色体地図上 8.7 min にある構造遺伝子 *phoA* は、およそ 0.5 mM 以上のリン酸を含む培地中では完全に発現が抑制されており、ほとんどアルカリ性ホスファターゼの活性を検出することはできない。リン酸濃度をそれ以下に下げると本酵素は新生蛋白の約 6% という高い効率で発現が誘導される⁽⁹⁾。この制御はリン酸制限で誘導される他の一群の蛋白とともに、*phoB*、*phoR*、*phoM* という制御遺伝子により行われている。この制御の詳細な機構については、1960 年代より精力的な研究が進められているが、いまだに明らかになっていない部分が多い⁽¹¹⁾。誘導時に高度な発現ができしかも厳密な制御がなしうる *phoA* のプロモーター領域は、そのことだけを取り出してみても異種蛋白の生産にとって都合がよい。

アルカリ性ホスファターゼは、分子量約 47 K のサブ

† Secretion of Useful Proteins by the *phoA* Gene of *Escherichia coli*.

Koji YODA (Department of Agricultural Chemistry, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, 113 Tokyo)

ユニット2つよりなる二量体蛋白で、活性発現に亜鉛を必要とする金属酵素である⁽¹²⁾。生合成は *in vivo* の研究から膜結合型のポリゾームにより行われ、膜通過とともにシグナル配列の切断を受けてペリプラズムにおいて活性型になると考えられている^(13,14)。シグナル配列の切断のタイミングについては Randall ら⁽¹⁵⁾の研究により、アルカリ性ホスファターゼ・ポリペプチドの全長の約80% が合成された後に切断が起こることが示されている。すなわち、Blobel らの提唱したシグナル仮説の初期のモデル⁽¹⁶⁾のようにシグナル配列が合成されて直ちに膜を通過し、その切断が起こるという co-translational な機構とは異なるようである。一方、大腸菌の膜小胞を用いた *in vitro* の分泌系を用いた実験では、翻訳を完了した後に、すなわち post-translational にでも膜通過できることが示されている⁽¹⁷⁾。これらを考えあわせると、アルカリ性ホスファターゼの成熟蛋白部分あるいはそれを置き換えることになる異種蛋白質の性質が分泌効率に大きな影響を与えうることになる。シグナル配列に続く部分が単に受動的に分泌経路に入りこむのではないということである。

筆者らは構造遺伝子 *phoA* のプロモーター領域とシグナル配列を応用するために、まず *phoA* 形質導入メジャーを取得し、次いでその制限酵素断片をプラスミド上にクローン化した⁽⁶⁾ (図1)。制限酵素解析から、*Hind* III と *Xho* I で切り出される 2.7 kb の断片中に

全構造遺伝子があり、欠失体の解析やプロモーター検索ベクターへのサブクローニングにより *Hind* III 側にプロモーターがあることがわかった。さらにプロモーター近傍約 520 bp の塩基配列を決定し、アルカリ性ホスファターゼは *Hind* III から 282 bp 目の GTG を開始コドンとして 21 アミノ酸の典型的なシグナル配列を持つ前駆体として生産されることを明らかにした⁽¹⁸⁾。アルカリ性ホスファターゼの全アミノ酸配列は Bradshaw ら⁽¹⁹⁾により、また *phoA* 遺伝子の全塩基配列は後に Chang ら⁽²⁰⁾によって報告されている。

II. 多コピー *phoA* 遺伝子の発現

phoA 遺伝子をプラスミド上に多コピー持つ菌でもリン酸による制御は厳密に行われ、0.5mM 以上のリン酸を含む培地では完全に抑制されているが、リン酸欠培地への培地交換あるいはリン酸濃度を制限した培地中で増殖させて大腸菌自身の生育によりリン酸を食い切らせることで高効率で発現した。

しかし、*phoA* 遺伝子にハイブリダイズする mRNA を定量すると、*phoA* を1コピー持つ株に比べ10倍以上発現しているのに対し、アルカリ性ホスファターゼの酵素活性はたかだか2倍にしか増加しなかった。このとき全細胞蛋白を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で調べてみると、アルカリ性ホスファターゼのバンドよりわずかに遅れて泳動する蛋白が大量に誘導合成されて

図1 最初に *phoA* 遺伝子をクローン化したプラスミド pKI-2 と *phoA* 遺伝子上流の構造

シグナル配列は 21 アミノ酸よりなり、垂直矢印の Ala-Arg 間で切断される。

いることがわかった。このような細胞の超薄切片を電子顕微鏡で観察すると、細胞質内に顆粒が認められた。細胞を壊して蔗糖密度勾配遠心によりこれを分画すると膜画分より下の画分に沈降した。このようにして精製した顆粒を SDS-PAGE で調べてみると、アルカリ性ホスファターゼ単量体に比べ約 2000 分子量の大きな、ほぼ純粋な蛋白質より成っていた。その N 末端アミノ酸配列を決定したところ、まさに DNA 塩基配列から予想していたアミノ酸配列のシグナル配列が付いたアルカリ性ホスファターゼ前駆体であった。すなわち多コピー *phoA* 遺伝子の発現に対して分泌過程が制約となり細胞質内に inclusion body を形成したものと考えられる。

このようなことでは、せっかく高発現しうる系でありながらその能力を十分に発揮できないわけなので、コピー数に対応した生産量を得られるよう宿主大腸菌の育種を検討した。細胞内に前駆体を蓄積した細胞は、コロニー形成能を徐々に失うことを認めた。したがってコロニー形成能を失わない株のなかに生産量の増大した変異株が存在すると期待される。しかし、このコロニー形成能の消失過程はやや緩慢であって、単に寒天培地にプレートしたのでは選択が困難であった。そこでコロニー形成能の消失を明瞭にするため、細胞表面に作用する薬剤に対する感受性を検討したところ、マルチコピーで *phoA* を発現させた細胞の大部分は 1% SDS で容易に溶菌することを見出した。このことを利用して 1% SDS を含む誘導培地寒天プレート上で生育することのできる耐性変異株を選出し、そのなかよりアルカリ性ホスファターゼ活性の高いものを分離した。このようにして細胞全蛋白の 35~50% にあたる成熟型アルカリ性ホスファターゼをペリプラズムに分泌して蓄積しうる株を取得するこ

図 2 アルカリ性ホスファターゼ大量生産に耐える変異宿主 SW 1033 でペリプラズム空間に大量に分泌し蓄積された PhoA-Bla 融合蛋白質
図中バーは 1 μ m.

とができた⁽²¹⁾。これらの変異株は以下に述べる PhoA-Bla など一部の融合蛋白の生産についても野生株より優れていた (図 2)。

III. 分泌発現ベクターの造成

予備的な実験では *phoA* 内の制限酵素部位ないしはランダムな欠失により *phoA* 上流領域を他の遺伝子と融合させ、*phoA* のシグナル配列が細胞質内酵素の β -ガラクトシダーゼを分泌させることはできないが、ペリプラズム酵素の β -ラクタマーゼの分泌は行えることなどを示した。このような方法では連結の仕方に制限が多くまた効率的でないので、*phoA* 遺伝子のプロモーターからシグナル配列まで (以下 Psi (*phoA*) と略す) による、一般的な分泌発現をめざしたベクターの造成を試みた。

Psi (*phoA*) を利用するため、シグナル配列切断点である Ala-Arg コドンの塩基配列中にある Hpa I 部位を切断後加工して、3 種の reading frame で連結可能な制限酵素切断配列を持つ 3 つ一組のベクターを造成し Psi ベクターと命名した^(21,22) (図 3)。

Psi ベクターを用いばリンカー DNA の利用により任意の open reading frame を持つ断片と in frame で

図 3 3通りの reading frame で Eco RI 部位を持つ Psi ベクター
シグナル配列は垂直矢印の位置で切断される。

図4 シグナル配列と目的遺伝子を自由に連結するための改良 Psi ベクター

MCS は multiple cloning site, sfp は一本鎖ファージ f1 の IG 領域を含む *Rsa* I 断片で、挿入方向により異なる側の相補鎖が一本鎖化される。シグナル配列は垂直矢印の位置で切断される。

連結できる。ただし連結部分の DNA にコードされたアミノ酸がシグナル配列の後に入りこむので、それに由来する活性や抗原性の変化が問題となりうる。このような比較的短い配列を正確にとり除くためにはやはり合成 DNA を用いた部位指定欠失変異法を利用するのが一般的であり確実でもある。そこで次に、クローニングに使用できる制限酵素数を multiple cloning site の導入で 10 種に増し、f1 ファージの複製開始領域を利用して一本鎖 DNA へ容易に変換しうる改良 Psi ベクターを造成した⁽²³⁾ (図4)。

改良 Psi ベクターでは、まず制限酵素を用いて発現させたい遺伝子を含む断片を同じ転写方向でサブクローンし、次いで野生型の fd (あるいは f1, M13) ファージの感染によりプラスミドを一本鎖環状 DNA に変換し、合成 oligonucleotide による部位指定欠失を行って Psi (*phoA*) と任意の位置で介在配列なしに連結することができる。

IV. Psi(*phoA*) による蛋白の分泌生産

予備的検討の際には、細胞質内酵素の β -ガラクトシダーゼ (*lacZ*) とペリプラズム酵素の β -ラクタマーゼ (*bla*) にアルカリ性ホスファターゼの N 末端領域をつないだ融合蛋白を発現させたが、PhoA-LacZ 融合蛋白はすべて分泌せず、PhoA-Bla 融合蛋白はシグナル配列が

切断除去されたものがペリプラズムに分泌されてから凝集体を作った。このような実験結果から、もともと細胞質に存在している蛋白を分泌させることは困難であるが、もともと分泌している蛋白を大腸菌でも分泌させることは可能であろうという期待が持たれた。大腸菌のペプチド伸長因子 Tu 遺伝子をプロリン・コドン介して Psi (*phoA*) につなげ発現させたときには細胞質内でシグナル配列のついたままの凝集体となり、ヒト・インターフェロン α の cDNA を介在配列なしに Psi (*phoA*) につなげて発現させたときにはペリプラズムに分泌したこともこのような期待を支持した⁽²⁴⁾。

V. 比較的低分子の蛋白の分泌生産

ヒト上皮細胞増殖因子 (EGF) は、53 アミノ酸よりなるペプチドであるが、これをコードする遺伝子を合成 DNA により作製し細胞質内で発現させると産物は不安定でほとんど検出されなかった。同じ遺伝子を Psi (*phoA*) に介在配列なしに連結し、培地のリン酸制限により発現させたとところ 1 mg/l の活性ペプチドをペリプラズムから回収することができた⁽²⁵⁾。同じ *phoA* のプロモーターを用いて発現させてもシグナル配列を持たないようにした場合はほとんど検出される量生産されなかった。すなわち、細胞内生産ではおそらく分解が急速に起こるため産物が検出できないが、ペリプラズムに分泌させることでプロテアーゼとの接触がなくなり産物の安定化が起こったと考えられる。この EGF は容易に HPLC で 1 ピークに精製することができた。精製標品のアミノ酸配列は天然のものと完全に一致することからシグナル配列はアルカリ性ホスファターゼと同じくアラニンの次で切断されており、また活性から 3 つの S-S 結合を含む高次構造が天然と同じに形成されていると考えられる。EGF の分泌発現については、さらにプロモーターやシグナル配列などの交換による分泌生産量の検討がなされている⁽²⁶⁾。

VI. 比較的高分子の蛋白の分泌生産

枯草菌の α -アミラーゼ (59 K) は典型的な菌体外酵素であるが、枯草菌において分泌される酵素は塩基配列から予想されるアミノ酸配列に比べて 41 アミノ酸短い。そのすべてがシグナル配列というわけではなく、シグナル配列が切除された後に N 末端がさらに切り縮められると考えられている⁽²⁷⁾。本来のシグナル配列の切断点

と予想されていたアミノ酸の一つである 33 番目のアラニンの次のグルタミン酸コドン以後を、合成オリゴヌクレオチドを用いた部位指定欠失で直接に Psi (*phoA*) のアラニンに連結させた⁽²⁸⁾。この遺伝子を持つ大腸菌を澱粉を含むリン酸制限プレート上で生育させることにより誘導したところ、 α -アミラーゼ活性による巨大なハロの形成が認められた。細胞を分画すると、 α -アミラーゼ活性および抗 α -アミラーゼ抗体と反応する蛋白はすべてペリプラズムに局在していた。この蛋白を精製してアミノ酸配列を決定したところ、グルタミン酸を N 末端とする α -アミラーゼの配列であった。すなわち、大腸菌では第 2 のプロセッシングは起こらず、またこのプロセッシングは大腸菌での分泌および活性発現に必要なでないことが示された。

VII. preS を含む複数の蛋白の融合産物の分泌生産

B 型肝炎ウイルスの preS(2) ペプチドは S 抗原に先行する ORF にコードされ、ウイルスの最表層に位置してヒト肝細胞への吸着に関与していると考えられている 55 アミノ酸よりなるペプチドである⁽²⁹⁾。これを Psi (*phoA*) に連結して発現を試みたが、免疫学的にも検出可能な量の生産は認められなかった。Psi(*phoA*)-preS(2) 間に連結に用いた制限酵素配列由来の 3 アミノ酸がリンカーとしてコードされているが、これと開始コドンのメチオニンの計 4 アミノ酸を部位指定欠失変異で取り除いてみたが、著しい効果は認められなかった。高分子化による安定化を期待して 2 つ～3 つタンデムに重複させたものも作製して生産を試みたが、良い結果は得られなかった。次善の策として、アルカリ性ホスファターゼの N 末端側約 4/5 にあたるポリペプチドの後に preS(2) がつながった構成の融合遺伝子を作り発現させることにより、preS(2) 抗原性を持つペプチドの大量生産は果たすことができた⁽²⁹⁾。このものは inclusion body を形成しており、正確な局在性は決定していない。同様にしてさらに先行する ORF にコードされる preS(1) および preS(1)+preS(2) の抗原性を持つペプチドも生産することができ、診断薬としての利用開発が可能になった。

アルカリ性ホスファターゼや β -ラクタマーゼの分泌の *in vivo* のタイミングおよび *in vitro* で post-translational に分泌することから、シグナル配列以外の成熟蛋白部分の配列が分泌に大きく関与している可能性が考

えられるようになっている。このことを考慮して、これらの遺伝子の後ろにシグナル配列を欠いた *bla* 遺伝子を連結して、Psi (*phoA*)-(preS(2))_n-*bla* 融合遺伝子を作成して発現させることを試みた。すなわち、 β -ラクタマーゼ配列が先行する preS(2) 配列の分泌を補助するのではないかと期待するとともに、 β -ラクタマーゼの酵素活性が融合蛋白の精製に役立ちうるし、また生産菌の β -ラクタム抗生物質に対する耐性を高めてゆくことにより、融合蛋白質の生産性の向上した株を育種してゆけるのではないかと考えたのである。その結果、(n=1)<(n=2)<(n=3) の順に高い生産量で融合蛋白質の生産が認められた。また、Psi (*phoA*)-preS(2) 間のリンカー・アミノ酸を除いたもののほうが生産量は大きかった。これらの蛋白は浸透圧ショック法では放出されないが、アミノ酸配列を決定してみると、シグナル配列は正しく切断除去されており、スフェロプラストをトリプシン処理すると分解してしまうことから、ペリプラズムに分泌した後に凝集体となったと考えられる。

以上に述べてきたように、本来細胞質から分泌していた蛋白の場合には筆者らの開発したベクターはプロモーターとシグナル配列をすげかえることになり、多くの場合に分泌生産が可能であろうと予想される。また EGF の例でも示されたように細胞質内で生産しようとしても大量に得られない蛋白のなかには分泌生産により高生産化されるものがあり、また N 末端アミノ酸を天然と同じにすることも可能である。また、抗原ペプチドなどで単独で分泌生産させようとしてもうまくゆかない場合には、C 末端側に分泌蛋白をさらに補助要素として付けることで分泌生産が可能になる場合がある。

いかなる蛋白をも大量に分泌生産させる系を構築することは分泌という現象の応用を考える多くの研究者の願いであるが、現状ではとにかく構成を変えながら種々の蛋白について融合遺伝子を作り試してみるのが精一杯かもしれない。しかし分泌生産を夢で終わらせないためには、単に分泌した・しないという結果だけではなく、種々の融合蛋白の挙動を詳細に検討し、分泌機構の基礎的理解を進めることが重要であろう。

本研究を行うにあたり終始御指導御鞭撻いただきました東京大学名誉教授田村學造先生、東京大学教授山崎眞狩先生に深く御礼申し上げます。本研究は東京大学農学

部農芸化学科微生物研究室において両先生の御指導のもと菊池康弘博士とともに始められ、研究室内外の多くの方々との共同実験により遂行されたものであり、御協力賜りました皆様に厚く御礼申し上げます。

- (1) 依田幸司, 田村學造: 蛋白質 核酸 酵素, **26**, 386 (1980).
- (2) K. Talmadge and W. Gilbert: *Gene*, **12**, 235 (1980).
- (3) K. Talmadge, S. Stahl and W. Gilbert: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **77**, 3369 (1980).
- (4) K. Talmadge, J. Kaufman and W. Gilbert: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **77**, 3988 (1980).
- (5) K. Talmadge and W. Gilbert: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **79**, 1830 (1982).
- (6) K. Yoda, Y. Kikuchi, M. Yamasaki and G. Tamura: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1213 (1980).
- (7) A. Torriani: *Biochim. Biophys. Acta*, **38**, 460 (1960).
- (8) A. Garen and C. Levinthal: *Biochim. Biophys. Acta*, **38**, 470 (1960).
- (9) M. Malamy and B. Horecker: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **5**, 104 (1961).
- (10) H. C. Neu and L. A. Heppel: *J. Biol. Chem.*, **240**, 3685 (1965).
- (11) H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura and A. Nakata: "Phosphate Metabolism and Cellular Regulation in Microorganisms," American Society for Microbiology, 1987, p. 20.
- (12) T. W. Reid and I. B. Wilson: "The Enzymes," Vol. 4, Academic Press, New York, 1971, p. 373.
- (13) W. P. Smith, P.-C. Tai, R. C. Thompson and B. D. Davis: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 2830 (1977).
- (14) S. Varenne, M. Piovant, J. M. Pages and C. Lazdunski: *Eur. J. Biochem.*, **86**, 603 (1978).
- (15) L.-G. Josefsson and L. L. Randall: *Cell*, **25**, 151 (1981).
- (16) G. Blobel and B. Dobberstein: *J. Cell Biol.*, **67**, 835 (1975).
- (17) L. Chen, D. Rhoads and P.-C. Tai: *J. Bacteriol.*, **161**, 973 (1985).
- (18) Y. Kikuchi, K. Yoda, M. Yamasaki and G. Tamura: *Nucleic. Acids Res.*, **9**, 5671 (1981).
- (19) R. A. Bradshaw, F. Cancedda, L. H. Ericsson, P. A. Neumann, S. P. Piccoli, M. J. Schlesinger, K. Shrieffer and K. A. Walsh: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **78**, 3473 (1981).
- (20) C. N. Chang, W.-J. Kuang and E. Y. Chen: *Gene*, **44**, 121 (1986).
- (21) 田村學造, 山崎真狩, 依田幸司: 「バイオテクノロジー」, 学会出版センター, 1985, p. 396.
- (22) K. Yoda, K. Tachibana, S. Watanabe, K. Yamane, M. Yamasaki and G. Tamura: "Phosphate Metabolism and Cellular Regulation in Microorganisms," American Society for Microbiology, 1987, p. 99.
- (23) K. Tachibana, K. Yoda, S. Watanabe, H. Kadokura, Y. Katayama, K. Yamane, M. Yamasaki and G. Tamura: *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 1089 (1987).
- (24) T. Miyake, T. Oka, T. Nishizawa, F. Misoaka, T. Fuwa, K. Yoda, M. Yamasaki and G. Tamura: *J. Biochem.*, **97**, 1429 (1985).
- (25) T. Oka, S. Sakamoto, K. Miyoshi, T. Fuwa, K. Yoda, M. Yamasaki, G. Tamura and T. Miyake: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**, 7212 (1985).
- (26) T. Oka, S. Sumi, T. Fuwa, K. Yoda, M. Yamasaki, G. Tamura and T. Miyake: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1099 (1987).
- (27) H. Yamazaki, K. Ohmura, A. Nakayama, Y. Takeichi, K. Otozai, M. Yamasaki, G. Tamura and K. Yamane: *J. Bacteriol.*, **156**, 327 (1983).
- (28) H. Okamoto, M. Imai, S. Usuda, E. Tanaka, K. Tachibana, S. Mishiro, A. Machida, T. Nakamura, Y. Miyakawa and M. Mayumi: *J. Immunol.*, **134**, 1212 (1985).
- (29) K. Tachibana, M. Imai, H. Okamoto, K. Yoda, H. Kadokura, Y. Katayama and M. Yamasaki: *Biotechnol. Lett.*, **8**, 677 (1986).