〔原 著〕

大腸菌におけるペプシノゲン蛋白産生

一瀬雅夫*・三木一正*・遠藤康夫*・市原慶和**・岡 博*
降旗千恵***・丹治雅夫**・景山 節****・高橋健治**

SUMMARY

Several plasmids have been constructed which direct the synthesis of rat pepsinogen or prepepsinogen in *Escherichia coli*. When plasmids with the *E. coli* lac promoter was introduced into *E. coli*, a protein identified as pepsinogen or prepepsinogen by immunoreactivity and SDS-PAGE was synthesized in the form of fused protein with β -galactosidase. They constituted up to 2.5% of the total cellular protein and formed insoluble aggregate in *E. coli*. They were solubilized by urea extraction, but no pepsin activity was detected in these proteins. In these proteins, both intra and intermolecular activation from pepsinogen to pepsin was impaired. This impairment of the activation step was probably due to the structural change of the N-terminal regions of these proteins rather than the degeneration by urea extraction.

Key words: pepsin-pepsinogen, gene recombination, *Escherichia coli*

緒 言

カルボキシルプロテアーゼ（アスパラギン酸プロテアーゼ）の代表的酵素であるペプシンは、塩酸、ムチンと共に胃液の三大構成成分の一つを成し、その不活性前駆体であるペプシノゲンは胃内腔に分泌されると酸性 pH 下で自己触媒的に活性型ペプシンに変換される。ペプシン・ペプシノゲンは、酵素学的な興味以外にも、消化生理学的意義や、潰瘍発生に関連して攻撃因子としての病態生理学的意義等、消化器病学の上で

興味ある問題を多く含む酵素系である。近年の遺伝子組み換え技術の進歩は、従来の手法では不可能であった、多くの遺伝子の構造解析を可能とし、ヒト・ペプシノゲンの一次構造も DNA レベルで決定された¹⁾。一方、クローニングした動物遺伝子を大腸菌における遺伝情報の発現シグナル（プロモーター、リボソーム付着信号等）に接続し、大腸菌に導入、発現させて遺伝子産物を蓄積させる試みが活発に行なわれるようになっており、これまでに、ホルモン、酵素、インターフェロン、癌遺伝子蛋白等、種々の動物遺伝子蛋白お

Expression of cloned pepsinogen gene in *Escherichia coli*.

Masao Ichinose*, Kazumasa Miki*, Yasuo Endo*, Yoshikazu Ichihara**, Hiroshi Oka*, Chie Furihata**, Masao Tanji***, Takashi Kageyama**** and Kenji Takahashi****

*東京大学第一内科；First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo,

**同，理学部生物化学；Department of Biophysics and Biochemistry, Faculty of Science, University of Tokyo,

***同，医科研癌生物；Department of Molecular Oncology, Institute of Medical Science, University of Tokyo.

****京都大学霊長類研究所生物化学；Department of Biochemistry, Primate Research Institute, Kyoto University.

Correspondence address: Masao Ichinose, First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.

(受付 1987年7月22日, 受理 1987年9月20日)

よびウイルス蛋白の大腸菌での産生が試みられている²⁻⁹⁾。この種の試みは、外来遺伝子の発現を指標として遺伝子制御の上で問題となる一般事項および遺伝子産物の細胞内蓄積、細胞外移送等の条件の検討や、特定部位指向突然変異導入法 (Site-directed mutagenesis) を用いて人工変異蛋白を調整し、遺伝子産物の構造と機能相関性の比較解析等、単に蛋白産物の大量生産の目的以外にも、有効な実験系となっている。われわれもクローニングしたラットのペプシノゲン遺伝子¹⁰⁾を発現ベクターに接続し、大腸菌に導入、ペプシノゲンあるいは、プレペプシノゲン蛋白を大腸菌に発現させる試みを行なったので報告する。

方 法

1) 発現ベクターの作製

大腸菌内で組み換えペプシノゲン遺伝子を発現させるベクターとして、プロモーター活性の調節が可能 (switch-on が可能) な λ -ファージの PL プロモーターおよび大腸菌のラクトース・オペロンのプロモーター (lac プロモーター) を持つプラスミドである、pPL- λ および PUC-12 を選んだ (Fig. 1)。前者は、レプレッサーの温度感受性変異株 (cI 857 など) に導入し、培養温度を上昇させる事で、また、後者は培養液中にラクトース・オペロンの非代謝性誘導物質 (isopropyl- β , D-thiogalactoside; IPTG 等) を添加する事で、それぞれのレプレッサーを不活性化出来、プロモーターの下流に組み込んだ異種遺伝子の発現を誘導させる事が出来るプラスミドである。pPL- λ では、PL プロモーターと共に λ -ファージの N 遺伝子を含む断片が組み込まれており、N 遺伝子中の制限酵素 Hpa I 認識部位に遺伝子断片を挿入する事で、PL プロモーターの調節下 N 遺伝子蛋白とのハイブリッド蛋白の形で産生させる事が出来る。また PUC-12 では組み込まれた β -ガラクトシダーゼ遺伝子中に、制限酵素認識部位の連なった DNA 鎖が組み込まれており、ここに遺伝子断片を挿入する事で、 β -ガラクトシダーゼとのハイブリッド蛋白が、lac プロモーターの調節下に産生される。これらの発現ベクターに挿入する DNA fragment として、ラットペプシノゲン c-DNA (pRPC-1)¹⁰⁾ より制限酵素 Pvu II および Xba I を用いて切り出した約 1.2kb の fragment PX; 5'末端15塩基およびプレペプシノゲンをコードする領域を含む fragment) と、制限酵素 Ava II の部分消化および XbaI により切り出した

Fig. 1. Expression vectors.

約1.1kb の fragment (AX; ペプシノゲンをコードする領域から 5'側12塩基を除いた領域を含む fragment) を用いた (Fig. 2)。これらの PX, AX の両 fragment を DNA polymerase I の Klenow fragment で処理した後、制限酵素 Hpa I で切断し、アルカリフォスファターゼ処理をした pPL- λ に T₄リガーゼでつないだ (pPL-AX, pPL-PX)。また PUC-12 は、制限酵素 Sma I と Xba I で切断後、アルカリフォスファターゼ処理し、PX および AX の両 fragment と T₄リガーゼにてつないだ (PUC-AX, PUC-PX)。このようにして作製された組み換えプラスミドにより発現される蛋白は、N 遺伝子蛋白あるいは β -ガラクトシダーゼとペプシノゲンないしはプレペプシノゲンとが、前述のようにハイブリッド蛋白の形をとって産生され

Fig. 2. Restriction digestion map of rat prepsinogen c-DNA.

Fig. 3. Predicted structures of proteins expressed by recombinant plasmids with lac promoter.

と考えられた。Fig. 3 に、PUC-PX および PUC-AX より産生される蛋白の構造を示す。また、PUC-PX を制限酵素 EcoRI と AvaII で切断し、Mung-bean nuclease および T₄リガーゼ処理にて、 β -ガラクトシダーゼ部分を短くした PUC-AX' を得たが、このプラスミドにより産生される蛋白の構造も同時に示す。これらの組み換えプラスミドを、塩化カルシウム処理¹¹⁾を用いて、pPL-AX, pPL-PX は、大腸菌 N 4890 株へ、また PUC-AX, PUC-PX は、大腸菌 JM 103 株へ導入して、アンピシリン耐性による選択を加える事で、プラスミド保持菌を種々の条件下で培養し、その産生蛋白を検討に用いた。

細菌蛋白の分画は、Neu らの方法¹²⁾あるいは Burgess らの方法¹³⁾を用いて行なった。蛋白の分析は Laemmli の方法による SDS 電気泳動¹⁴⁾および免疫ブロッティングを用いた。ラットペプシノゲンの精製、抗体の作製、そしてペプシノゲン活性の測定は既報¹⁵⁻¹⁷⁾の如く行なった。また、ラット肝臓のマикроゾーム分画は、通常の方法¹⁸⁾に準じてこれを得た。

結 果

Fig. 4 に、lac プロモーターを使用した、プラスミド保持菌蛋白の SDS 電気泳動を示す。ペプシノゲン蛋白の分子量に一致する部分に大腸菌蛋白のバンドがある為、ゲルパターンからは蛋白の産生は、はっきりしない。しかし同じゲルの免疫ブロッティングの結果は、PUC-AX および PUC-PX でペプシノゲンと免疫学的に交叉性のある分子量 4 万前後の蛋白の産生がある事を示し、これらの蛋白の産生は、IPTG の培地への添加により 2 倍前後増加する事から、lac プロモーターに支配されていると考えられ、発現ベクターに組み込まれたラットペプシノゲン遺伝子の産生蛋白と考えられた。一方、pPL-AX および pPL-PX では抗ペプシノゲン抗体と反応する蛋白の産生は認められなかった。精製したラットペプシノゲンをコントロールにした結果から、PUC-AX および PUC-PX で産生されるこれらの蛋白は、全菌体蛋白の 2.5~0.5% 前後を占めていると考えられた。PUC-PX の蛋白スポットは、マーカー

Fig. 4. Proteins synthesized by *E. coli* containing plasmids PUC-AX or PUC-PX.

A) SDS-PAGE. B) Immuno-blotting with anti-rat pepsinogen antibody. Lanes 1 and 10, rat pepsinogen : Lanes 2, 3, 11 and 12, *E. coli* JM 103 containing plasmid PUC-PX (2 and 11 grown in the presence of IPTG) : Lanes 4, 5, 13 and 14, JM 103 containing plasmid PUC-AX (4 and 13 with IPTG) : Lanes 6, 7, 15 and 16, JM 103 containing plasmid PUC-12 (6 and 15 with IPTG) : Lanes 8 and 17, JM 103 : Lane 9, marker proteins (lysozyme 14.4K, soy bean trypsin inhibitor 21.5 K, carbonic anhydrase 31 K, ovalbumin 45 K, BSA 66.2 K, phospholylase B 92.5 K).

ーペプシノゲンおよびPUC-AXの蛋白スポットに比し、分子量が多少大きく、プレペプシノゲンをコードする fragment を挿入されている事に一致すると考えられた。Fig. 5 に示すごとくこれらの蛋白は可溶分画に存在せず細胞内にて不溶性の aggregate を形成して存在しており、6~9M 尿素抽出で可溶化回収された。これらの分画についてペプシン活性を Anson 法¹⁷⁾、および螢光法¹⁶⁾にて測定したが、ペプシン活性は認められなかった。ペプシン活性の認められない理由を検討する為に、これらのサンプルを pH2.0 とし、14℃にて8時間インキュベーションした後、免疫ブロットティングにより検討した所、これらのサンプルでは活性型ペプシンの出現が認められず、ペプシノゲンからペプシンへの変換ステップが障害され、intramolecularly に活性化が起こらないと考えられた (Fig. 5)。精製ラットペプシノゲンを PUC-AX および PUC-PX の尿素抽出分画に添加し、これらの蛋白が intermolecularly に活性化されるかを同様に検討したが、添加したラットペプシノゲン以外の活性の誘導は

認められなかった。また、PUC-PX の産生するプレペプシノゲンと β -ガラクトシダーゼのハイブリッド蛋白が、プレプロテインをプロセッシングするシグナルペプチダーゼの基質となり得るかを検討する為、ラットの肝臓より精製したマイクロゾーム分画と PUC-PX の尿素抽出分画を共にインキュベーションし、ブロットティングにて検討を行なったが、ペプシノゲン分子およびペプシン活性の出現は共に認められなかった。

考 察

ラットペプシノゲン遺伝子を大腸菌に導入して、発現させる事を試みたが、一般に、大腸菌等の宿主細胞に導入したクローン化した遺伝子の発現が効果的に行なわれる為には、転写と翻訳の両反応をはじめとした種々の調節因子がうまく機能するとともに、蛋白産物が細胞内で化学的に安定である事が必要である。しかし、これらの点に関する知識の集積は不十分であり、目的とする蛋白を大腸菌などに充分産生させ得た例はあまり多くない。発現ベクターとして、被誘導性の lac

Fig. 5. *E. coli* JM103 containing plasmids PUC-AX and PUC-PX were disrupted by lysozyme/sodium deoxycholate and separated into supernatant and cell pellet.

A) SDS-PAGE B) Immunoblotting of the same gel with anti-rat pepsinogen antibody.

Lanes 1, 3, 5, 7, 11, 13, 15 and 17, JM103 containing PUC-AX (1, 5, 11 and 15, pellet ; 3, 7, 13 and 17, supernatant).

Lanes 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16 and 18, JM103 containing PUC-PX (2, 6, 12 and 16, pellet ; 4, 8, 14 and 18, supernatant).

Lanes 9, 10, 19 and 20, rat pepsinogen. Samples applied in lanes 5-8, 10, 15-18 and 20 were incubated for 8 hs at pH 2.0 and 14°C.

プロモーター，及び PL プロモーターを持つものを選んだが，これは，ペプシノゲン遺伝子の蛋白産物が大腸菌に有害である場合には，導入した遺伝子の発現を抑制した条件で細胞数がある程度増加するまで培養を行ない，その後，遺伝子発現を誘導する事が好都合と考えられるからである．動物遺伝子が大腸菌で発現させる実験において，基本的には二通りの方法が考えられる．即ち，本来の蛋白質を直接産生させる方法と大腸菌蛋白とのハイブリッド蛋白を産生させる方法である．われわれはペプシノゲン蛋白を大腸菌の β -ガラクトシダーゼあるいは λ -ファージの N 遺伝子蛋白とのハイブリッド蛋白として生産させる方法を選んだが，この方法が前者に比して比較的容易であるばかりか，m-RNA から蛋白への翻訳開始に大きな影響を与えるリボソーム付着信号部位や，翻訳開始コドン部位の構造変化を最小限にとどめ産生された動物蛋白の大腸菌の内部での安定性を高め，菌体内での遺伝子産物の蓄積の目的から見てすぐれていると考えられるからである．われわれの作製した発現ベクターから転写される蛋白では，ペプシン活性が認められなかった．この事については，尿素抽出の過程で生ずる変性の可能性が，当然考えられる事であるが，ペプシノゲンを尿素で処理をしてもかなりの活性が認められるが，本実験

では，感度の上で Anson 法の約200倍の螢光法¹⁶⁾でも全く活性が認められていない事から，むしろ産生された蛋白が β -ガラクトシダーゼとのハイブリッド蛋白である事に原因があると考えられる．すなわち，大腸菌で産生されたプレペプシノゲンは β -ガラクトシダーゼの10アミノ酸を含む15個のアミノ酸が余分についており，またペプシノゲンは，N 末端の4個のアミノ酸を除いたものに， β -ガラクトシダーゼの N 末端アミノ酸10個をつけたものである．この変化がペプシノゲン蛋白の活性化部位周辺の立体構造を変化させ，pH の変化により生ずる intramolecularly な活性化あるいは活性型ペプシンの存在下で生ずる intermolecularly な活性化の過程で，活性化ペプチドの遊離を阻害している事は充分考えられる．われわれは， β -ガラクトシダーゼの影響を考慮して PUC-AX の N 末端の β -ガラクトシダーゼのアミノ酸を5個に減らしたもの (PUC-AX') も作製して検討したが，同様に，このプラスミド保持菌蛋白の尿素抽出分画では，ペプシン分子および活性の出現を認めなかった．ブタのペプシノゲン c-DNA を同様に大腸菌に導入した実験において， β -ガラクトシダーゼの N 末端の5アミノ酸とペプシノゲンの N 末端4アミノ酸を除いた蛋白とのハイブリッド蛋白では活性が認められている

事¹⁹⁾を考慮すると、ペプシノゲンのN末端の構造はペプシノゲンの活性化部位にかなり微妙な影響を与えていると考えられる。このペプシノゲンの構造と機能の問題は、このような大腸菌などで産生される人工蛋白の系が1つの解決を与えると考えられ、このようにして得られる情報はペプシノゲンの消化性潰瘍の病態生理に果たす役割の理解を深め、治療理論の発展に寄与するとともに、ペプシノゲンアイソザイムの意義などの未解決な問題の解明にも手掛りを与えていると考えている。

ま と め

クローニングしたラットペプシノゲン c-DNA を発現ベクターに組み込み大腸菌に導入、ペプシノゲン蛋白の発現を試みた。大腸菌のラクトースプロモーターを使用した系において、 β -ガラクトシダーゼとペプシノゲンあるいはプレペプシノゲンとのハイブリッド蛋白の産生を見た。これらの蛋白は、全大腸菌蛋白の2.5~0.5%を占め、不溶性の aggregate として存在し、尿素抽出にて可溶性蛋白として回収された。しかし、これらの蛋白は酸性 pH 下、あるいはペプシンの存在下で活性が誘導されず、プレペプシノゲン→ペプシノゲン→ペプシンの各ステップの変換が障害されており、これらの蛋白では、N末端の構造変化が活性の誘導を妨げていると考えられた。

文 献

1) Sogawa K, et al: J. Biol. Chem., **258** : 5306, 1983.

2) Seeburg PH, et al: Nature, **276** : 795, 1978.
 3) Goeddel DV, et al: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76** : 106, 1979.
 4) Ratzkin B, et al: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78** : 3313, 1981.
 5) Emtage JS, et al: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80** : 3671, 1983.
 6) Gilmer TM, et al: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79** : 2152, 1982.
 7) Küpper H, et al: Nature, **289** : 555, 1981.
 8) Nagata S, et al: Nature, **284** : 316, 1980.
 9) Taniguchi T, et al: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77** : 5230, 1980.
 10) Ichihara Y, et al: Eur. J. Biochem., **161** : 7, 1987.
 11) Mandel M, et al: J. Mol. Biol., **53** : 154, 1970.
 12) Neu HC, et al: J. Biol. Chem., **240** : 3685, 1985.
 13) Burgess RR, et al: J. Biol. Chem., **244** : 6160, 1969.
 14) Laemmli UK: Nature, **227** : 680, 1970.
 15) Furihata C, et al: Eur. J. Biochem., **105** : 43, 1980.
 16) Furihata C, et al: Anal. Biochem., **84** : 479, 1978.
 17) Anson ML, et al: J. Gen. Physiol., **22** : 79, 1939.
 18) Hogeboom GH: Methods in Enzymology, vol 1, p14, edited by Colowick S. P. and Kaplan N. D. Academic Press, New York, 1955.
 19) 塚越規弘, 他: 日本農芸化学会講演要旨集 **60** : 443, 1985.