

# 大肠杆菌系统中外源蛋白分泌的研究

陈永青 刘 坚

(复旦大学生物系,上海)

## 提 要

要使基因工程产物达到工业化生产的规模,不仅要解决基因的高表达,还需要解决产物的分泌问题。

大肠杆菌系统中外源蛋白分泌的主要障碍是外膜,从遗传和生化两方面研究入手,通过定点突变、基因融合、构建分泌型载体等方法将可能阐明分泌的机制并找到有效的应用途径。

基因工程技术,除了解决外源基因的克隆和表达以外,还有一个外源蛋白的分泌问题需要解决。这是关系到能不能有效地投入工业化生产的问题。

## 一、生物工程研究中的新课题

基因工程技术的发展,为用微生物合成和生产外源蛋白展示出广阔的前景。商业生产已开始瞄准医药、食品、化工等重要的生物工程产品市场。用基因工程手段生产的蛋白,每年将创造出几十亿美元的财富。

重组 DNA 技术的深入研究表明,许多真核生物的蛋白可以由细菌产生(表1)。

表1 用基因工程手段由大肠杆菌产生的有经济价值的某些外源蛋白<sup>[1]</sup>

蛋 白	占细胞总蛋白的百分率(%)
人白细胞介素-2 (human interleukin-2)	10
人的生长激素 (human growth hormone)	16—27
人 $\gamma$ -干扰素 (human $\gamma$ -interferon)	16
小牛前凝乳酶 (calf prochymosin)	5
牛生长激素 (bovine growth hormone)	30

表达的高低固然是一个重要的问题,而能

[3] Romano, EL. et al.: *Immunolabelling For Electron Microscopy*, Acad. Press, New York, 1984, 3—15.

[4] Handley, DA. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1983, **174**, 1.

[5] Van Bergen, H. et al.: *Histochemistry*, 1986, **85**, 81.

[6] Frens, G.: *Nature Phys. Sci.*, 1973, **241**, 20.

[7] Hodges, GM. et al.: *Immunolabelling For Electron Microscopy*, Acad. Press, New York, 1984, 190—233.

[8] Slot, JW. et al.: *Ultramicroscopy*, 1985, **15**, 383.

[9] Stathis, EC. et al.: *Chem. Ind (London)*, 1958, **27**, 860.

[10] Tschopp, J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, **79**, 7474.

[11] Baschong, W. et al.: *Histochemistry*, 1985, **83**, 409.

[12] Baigent, CL. et al.: *Experientia*, 1980, **36**, 472.

[13] Slot, JW. et al.: *Immunolabelling For Electron Microscopy*, Acad. Press, New York, 1984, 129—142.

[14] Wang, BL. et al.: *Histochemistry*, 1985, **83**, 109.

[15] Baschong, W. et al.: *Histochem. J.*, 1986, **17**, 1147.

[16] Paatero, GIL. et al.: *Cell Mol. Biol.*, 1987, **33**, 13.

[17] Handley, DA. et al.: *Eur. J. Cell Biol.*, 1987, **43**, 163.

[18] Birrell, GB. et al.: *J. Histochem. Cytochem.*, 1986, **34**, 339.

[19] Singer, SJ. et al.: *J. Electron Microsc.*, 1987, **36**, 63.

[20] 夏诗茂等:《中国医学科学院学报》,1987,9(1), 50.

[本文于1987年10月12日收到]

不能使表达的基因产物——外源蛋白 (foreign proteins) 从细胞中分泌出来则是另一个不可忽视的问题。如果外源蛋白有大量的合成, 而不能分泌到细胞外的培养基中去, 将会带来以下的一些问题<sup>[1]</sup>: (1) 引起多肽的沉淀与凝聚; (2) 外源蛋白会被细胞内的一些酶降解; (3) 给宿主细胞带来毒性; (4) 较难纯化有活性的蛋白, 给工业化生产造成困难。因此, 要使基因工程产物有效地形成工业化生产的规模, 所面临的一个新课题是怎样选择一个理想的宿主系统。

目前, 科学家致力于这方面研究的有三个系统: 大肠杆菌系统; 酵母系统和芽孢杆菌系统。酵母是适应工业化生产的好材料, 作为外源蛋白分泌的宿主是有潜力的。但它的不足之处是外源基因的表达水平相对较低, 且分泌到细胞外的蛋白很容易达到饱和。芽孢杆菌有着天然的分泌特性, 分泌的蛋白可以达到每升几克的要求, 但是, 这个系统最大的缺点是在它的培养液中存在着高水平的蛋白酶, 在这个系统中的质粒和所克隆的 DNA 片段往往是不稳定的。而对大肠杆菌来说, 遗传背景清楚, 许多外源基因均可表达。但是, 作为外源蛋白的生产者, 它还缺少一个真正的分泌系统。近代遗传学和生物化学的进展, 为这个系统的研究提供了许多线索和方法, 有关大肠杆菌系统的外源蛋白分泌问题的评论也有报道<sup>[2,3]</sup>。

## 二、蛋白分泌的概念和模式

### 1. 分泌的概念

目前, 有关“分泌”的概念不是很统一, 在这里, 我们提出我们自己的定义。

细菌细胞蛋白质的合成是在细胞质中, 其中许多合成的蛋白质将分布定域到细胞质以外的细胞质膜 (cytoplasmic membrane)、周质空间 (periplasm)、外膜 (outer membrane) 以及细胞外的环境中, 这些蛋白统称为输出蛋白 (exported proteins); 定域到周质空间及其以外的蛋白称分泌蛋白 (secreted proteins); 特异性地仅仅指定域到细胞外环境中的蛋白称外泌蛋白 (excreted proteins)。这样的定义与相应的英文术语也较吻合。

### 2. 分泌的模式

蛋白分泌的过程是一个极其复杂的生化反应过程, 近年来, 遗传学和生物化学两方面的研究有了很大的进展。但是, 对于分泌的分子机制还没有一个完整的认识。至今, 已有四种模式 (model) 或假说 (hypothesis) 从不同的角度阐述蛋白分泌的过程。

(1) 信号肽假说 (signal peptide hypothesis)

这个假说认为: 多肽链的转移 (translocation) 和蛋白质的合成是紧密偶联的 (图 1)。

这个分泌过程大致可分成以下几个步骤:

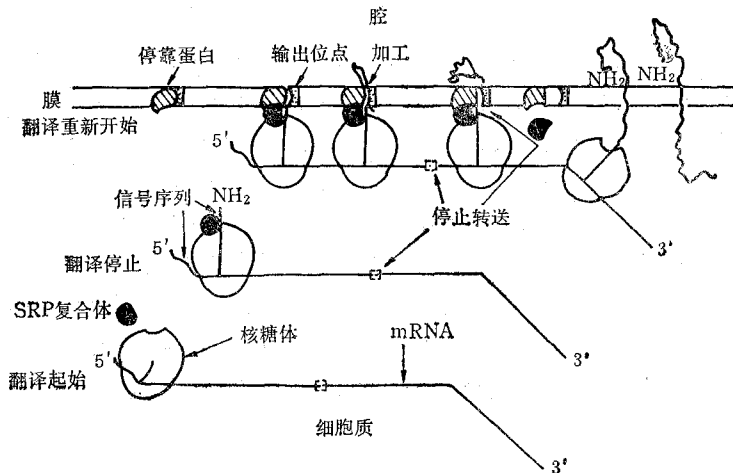


图 1 信号肽假说模式图<sup>[4]</sup>

①核糖体组装,从 mRNA 的 5' 端开始翻译。  
②核糖体上露出的 N 末端信号序列 (signal sequence) 被信号识别颗粒 (signal recognition particle, SRP) 复合体识别, SRP 与核糖体和初生链作用,翻译停止。  
③当核糖体移至输出部位并与膜上 SRP 受体作用后,蛋白合成恢复, SRP 则被释放回细胞质中<sup>[9]</sup>。在翻译继续进行的同时,新生肽链就垂直地越过脂质双分子层。信号序列最后由位于膜外侧的蛋白酶水解掉。图中还表示了除信号序列外的第二种信号——停止转送信号 (stop transfer)<sup>[6]</sup>。出现这个信号时,核糖体便从膜上解离下来,释放 SRP,余下的 mRNA 在胞质中完成羧基末端的翻译。结果,肽链的 N 端朝向腔内而 C 端则朝向胞质。

根据对已知的原核生物中信号序列氨基酸顺序的分析,发现信号序列有三个保守性特点:  
①N 末端有 1—3 个带正电的氨基酸残基。  
②N 端后有一延伸 14—20 个中性的疏水氨基酸的部分,通常称作疏水中心 (hydrophobic core)。  
③在信号肽切除部位附近的氨基酸有如下特点: A-X-B。B 紧接着切除位点 (processing site), 可以是 Ala、Gly、Ser。A 可以是上述氨基酸也可以是 Leu、Val、Ile。

通过对影响翻译、分泌和切除过程的信号肽突变体的研究,例如,用寡聚核苷酸引导的突变 (oligonucleotide-directed mutagenesis, 也叫定点突变)<sup>[7]</sup>,使信号序列中缺失或改变若干氨基酸,视其对整个分泌过程的影响。研究表明:信号序列对蛋白质的最终定位区域无作用,它的作用可能只是在蛋白分泌的早期起促进作用<sup>[8]</sup>。

## (2) 膜触发假说 (membrane trigger hypothesis)

膜触发假说与信号肽假说的区别在于它着重强调蛋白构象的折叠在其本身运输中所起的作用。根据这个假说,信号序列的作用是使蛋白质形成一个适合于运输的水溶性的构象。前体蛋白 (preprotein) 与膜结合后便触发了构象变化,使蛋白变成脂溶性能自身插入并穿过

脂质双分子层。

二硫键对蛋白质形成一定的构象起着很重要的作用。二硫键的形成需氧化态环境,而大肠杆菌细胞内一般是还原态的环境。但是,细胞内局部微环境的改变(如从质到膜)是否能提供一定的环境条件而形成适于运输的蛋白构象,这还有待于进一步的研究。

这一假说首先被提出用来解释噬菌体 M13 壳蛋白 (coatprotein) 的分泌。这个蛋白先以水溶性的、带有 23 个氨基酸信号肽的前壳蛋白 (precoatprotein) 存在,插入膜后信号序列被水解掉,成为一个 50 氨基酸长的成熟的跨膜壳蛋白<sup>[9]</sup>。

近来,通过用脉冲追踪标记 (pulse-chase labeling) 法在低温 (15°C) 时对大肠杆菌  $\beta$ -内酰胺酶 ( $\beta$ -lactamase) 分泌到细胞周质过程的研究发现<sup>[10]</sup>,成熟的  $\beta$ -内酰胺酶以两种形式存在:一种分泌到细胞周质中,且为抗胰酶的,另一种则结合在原生质体的膜外侧,且为胰酶敏感的。为了搞清楚这一膜结合酶是分泌过程中的中间物还是最终产物 ("dead-end" product) 这个问题,采用在较高温度 (37°C) 下培养,结果发现,酶能很快释放到周质空间,成为有催化活性的抗胰酶的成熟的内酰胺酶。这充分说明酶的释放到周质空间这一过程发生于前体的加工之后且伴随有构象的变化。

## (3) 直接转运模型 (direct transfer model)

这个模型只在真核生物中观察到。真核生物核糖体和粗糙型内质网膜上受体紧密结合后能提供足够的自由能使新生肽链穿过脂质双分子层。

## (4) 环模型 (loop model)

环模型的内容是信号肽的带正电荷的氨基末端与带负电的细胞质膜的内侧相结合。信号肽的疏水中心插入到疏水的脂质双分子层中,形成环 (loop) 或发夹式 (hairpin-like) 的结构。随着链的不断延伸,不断增大的环位于膜的朝向周质的一面。信号肽的切除将多肽链释放到周质空间,而信号肽本身则留在细胞质膜上。被脂蛋白切除的留在膜内的信号肽已被证

实<sup>[14]</sup>。这个模型也许具有普遍的意义,因为不管信号肽在蛋白质分子中的哪个部位都能在膜内造成环这一结构。事实上,利用重组 DNA 技术发现,通常在 N 末端的信号肽当被置于一蛋白质分子内部时也具有功能。

### 三、解决大肠杆菌系统中外源蛋白分泌的途径和思考

外源蛋白从大肠杆菌细胞中分泌到胞外,最主要的障碍在于外膜。革兰氏阳性菌(如芽孢杆菌等)之所以有很强的分泌蛋白的能力,也在于它没有外膜结构。而革兰氏阴性菌大肠杆菌则有一层很复杂的外膜结构(图 2)。

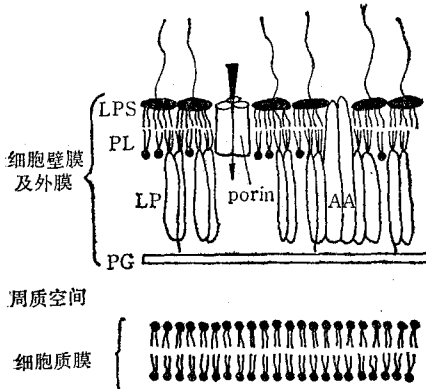


图 2 大肠杆菌细胞外层结构<sup>[12]</sup>

LPS: 脂多糖 PL: 磷脂 LP: 脂蛋白 PG: 肽聚糖 porin: 孔道蛋白 A: OmpA 外膜结构蛋白

要解决大肠杆菌系统中外源蛋白分泌的问题,需要紧密地将遗传学研究和生物化学方法结合起来,运用新的生物技术如基因融合(gene fusion)、定点突变等,深入分析研究蛋白分泌与膜的关系,以不同的途径进行探索。

#### 1. 渗漏突变株的利用

经诱变处理的渗漏突变株(*lky* mutant)可将周质空间的蛋白渗漏到胞外。渗漏的蛋白有: *E. coli* 的碱性磷酸酯酶(alkaline phosphatase), *E. coli* 的 $\beta$ -内酰胺酶,鼠原胰岛素(rat proinsulin), *Cellulomonas fimi* 粪肥纤维素酶(cellulase)<sup>[15]</sup>。在研究渗漏突变方面, Raymond Portalier 和他的同事们做了很多工作,对由 *E. coli* K12 的 *lky* 突变株释放碱性

磷酸酯酶的最佳胞外产量作了详尽的研究<sup>[13]</sup>。碱性磷酸酯酶(AP)由结构基因 *phoA* 编码,只有当细胞在磷酸限量的情况下才合成,并定位于周质空间中。在不同的突变株中,他们发现 *lky207* 突变株释放的 AP 活性最高,而当将基因 *phoS.T* (对 AP 合成有间接的负作用调控的基因)和 *lky207* 转移到 F<sup>-</sup> 多营养缺陷型菌株(PA601)后,释放的 AP 产量和活性又都有所提高,这就说明不同的基因型(genotype)对 AP 的产量和活性有影响。他们继而还研究了培养基成份, pH, 培养温度, 细胞制备, 盐浓度等条件对 AP 产量的影响, 找到了生产 AP 的最佳条件: 菌株预先在 LB8.3 斜面上于 4°C 活化 1—4 个月, 然后 37°C 培养于 LB8.3 (NaCl 浓度 4g/l), 16 小时后释放的 AP 可达细胞外蛋白总量的 34%。

#### 2. 分泌载体的构建 (construction of secretion vector)

分泌载体的构建基于这样一个事实: K. Horikoshi 等发现当从嗜碱性芽孢杆菌 170 得到的一 1.7kb 的 DNA 片段克隆到大肠杆菌的质粒载体上后, 影响了大肠杆菌外膜的完整性, 导致有 90% 的 $\beta$ -内酰胺酶释放到胞外<sup>[14]</sup>。此后, Toshiaki Kudo 等又将一种能分泌青霉素酶(penicillinase)的嗜碱性芽孢杆菌 170 的青霉素基因克隆到 *E. coli* 的 pMB9 质粒中, 发现质粒编码的青霉素酶分泌到培养液中<sup>[15]</sup>。进一步的研究证实, 外源基因激活了质粒上的 *kil* 基因, 导致外膜通透性增加, 使周质空间的青霉素酶能释放到胞外<sup>[16]</sup>。

*ompF* 是编码 *E. coli* 主要的外膜蛋白的基因, 利用基因融合技术将此基因与外源蛋白结构基因相连, 导致融合蛋白的分泌也取得了成功。当 *ompF* 的启动区、信号肽编码区和 OmpF 蛋白的 N 端基因的下游接上人的 $\beta$ -内啡肽( $\beta$ -endorphin)基因, 引入质粒, 在 *E. coli* 中, 能合成 OmpF- $\beta$ -endorphin 融合多肽并能分泌到培养液中<sup>[17]</sup>。由于 OmpF 信号肽在分泌过程中能准确地被切除, 因此认为这一过程可能符合信号肽假说。奇怪的是用同样的

方法,  $\beta$ -内酰胺酶和碱性磷酸酯酶都不分泌到培养液中, 这可能是因为后两者的分子量较大的缘故。

与 *ompF* 有关的另一个做得比较漂亮的实验是由 Masao Itoh 等完成的<sup>[18]</sup>。他们在 *E. coli* 中构建了一个能控制基因表达进而控制蛋白分泌的杂种质粒称控制型表达分泌载体 (controllable expression secretion vector)。构建这一载体分两步: (1) 先构建 pIAT141 质粒 (图 3a)。在带有 *ompF* 的质粒中插入五个 *trp* 的启动基因-操纵基因 (*trp* promoter-operator, *trpPO*) 作为转录控制开关 (transcriptional control switch), 使用五个 *trpPO* 的原因是由于在组建质粒的过程中发现多拷贝的 *trpPO* 对 *OmpF* 的合成更有效。然后再插入编码色氨酸操纵子阻遏物的 *trpR* (*Trp* repressor), 在

*trpPO* 和 *trpR* 同时存在下, *ompF* 的表达能得到很好地调控。(2) 再构建 pIAT141- $\beta$ E 质粒 (图 3b)。将编码人的  $\beta$ -内啡肽的基因插入 *OmpF* 信号肽下游。这样, *trpPO* 调控的  $\beta$ -内啡肽的合成分泌载体便构成了。

当培养液中加入诱导物 indoleacrylic acid 使最终浓度为  $80\mu\text{g/ml}$ , 培养 8 小时后量最大, 培养液中  $\beta$ -endorphin 含量可达  $1.2\text{mg/L}$  左右<sup>[18]</sup>。

此外, 对葡萄球菌蛋白 A (proteinA) 的研究也取得了一些结果。proteinA 可和 IgG 结合, 结合部位为有同源顺序的五个区 E、D、A、B、C。当 B 区接在 E 区后, 并一起位于 proteinA 信号肽基因的下游, 出人意料的是基因产物 EB 能分泌到胞外且伴有 *E. coli* 形态的变化——变成丝状体。当含有 proteinA 信号肽基因, 不

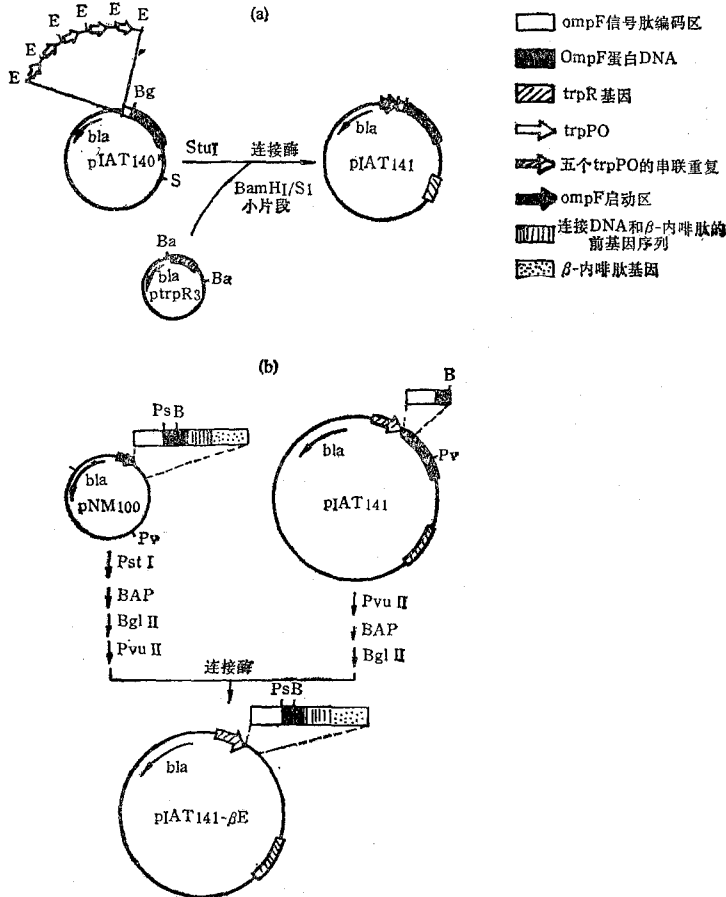


图 3 (a) 质粒 pIAT141 的构建<sup>[18]</sup> (b) 质粒 pIAT141- $\beta$ E 的构建<sup>[18]</sup>

bla: 抗氨基青霉素 (Ampicillin) 基因; BAP: 细菌碱性磷酸酯酶; 缩写字母表示的内切酶如下:  
Ba: BamHI; S, StuI; Bg, BglII E, EcoRI; Ps, PstI; B, BglII; Pv, PvuII

带启动基因和信号序列的 *E. coli* AP 基因组成分泌载体后, AP 能有效地分泌到胞外<sup>[19]</sup>。进一步的实验还发现,若外源基因为 IGF-I (insulin-like growth factor I), 那么, mRNA 的方向性会对外源蛋白分泌的多少有影响。

### 3. 其他

改造外膜,有很多文章好做。Yoko Ikura 发现甘氨酸、甘氨酸甘氨酸对 *E. coli* 中  $\beta$ -半乳糖苷酶 ( $\beta$ -galactosidase) 的释放和生产很有效。在培养液中加入适量的甘氨酸和甘氨酸甘氨酸,24 小时培养后,整个酶的产量可提高 6—7 倍,胞外酶的产量则超过 240 倍。加 1.2% 的甘氨酸,培养液中有 93% 的酶<sup>[20]</sup>。显微镜下观察可见细胞膨大而形状变得不规则。这说明细胞表面的结构发生了变化。其他的氨基酸或抗生素的影响与甘氨酸相比是微乎其微的。推断其原因可能是甘氨酸、甘氨酸甘氨酸参与了肽聚糖的合成,使外膜结构发生改变,利于酶的释放。虽然,对这一现象的机制还有待于进一步研究,但已可用以投入商业生产了。

外源蛋白要从细胞质通过细胞质膜进入周质空间,再通过外膜进到胞外培养液中,不仅要解决在大肠杆菌还原性的细胞质环境中正确地形成分泌蛋白的构型问题,还要为克服外膜的屏障而造成能增强通透性的特异功能。

通过研究能增加周质空间中的外源蛋白的分泌量,利用渗透休克 (osmotic shock) 的方法,很易使外膜破碎,分离得到纯的和较高分泌量的外源蛋白,这是对基因工程菌改造的一个方面。如果能在不破碎细胞外膜,外源蛋白

直接通过外膜而分泌到培养液中,再利用特殊的方法(如亲和层析法)得到高分泌量的基因工程产物,这将为形成有效的工业化生产开辟广阔的前景。

随着分泌系统基础理论的不断发展和完善,生物学技术手段日新月异的发展以及两者更完美的结合,我们对外源蛋白分泌问题的解决及投入到工业化大生产中的应用充满了信心。

### 参 考 文 献

- [1] J. -M., Nicaud, et al.: *Journal of Biotechnology*, 1986, 3, 255.
- [2] Holland, B. et al.: *Biotechnology*, 1986, 4, 427.
- [3] Pugsley, A. P. et al.: *FEMS Microbiology Reviews*, 1985, 32, 3.
- [4] Thomas, J. et al.: *Microbiological Reviews*, 1983, 47, 33.
- [5] Gilmore, R. et al.: *Cell Biol.*, 1982, 95, 470.
- [6] Rogers, J. et al.: *Cell*, 1980, 20, 303.
- [7] Shortle, D. et al.: *Ann. Rev. Genet.*, 1981, 15, 265.
- [8] Lin, J. J. C. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, 75, 4891.
- [9] Wickner, W.: *TIBS*, 1983, 8, 90.
- [10] Abraham, M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 4180.
- [11] Hussain, M.: et al.: *J. Biol. Chem.*, 1982, 257, 5177.
- [12] Mitchell, W. J.: *Microbiological Sciences*, 1985, 2, 330.
- [13] Danielle, A. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1984, 19, 5.
- [14] Kudo, J. et al.: *J. Bacteriol.*, 1983, 156, 949.
- [15] Toshiaki, K. et al.: *J. Bacteriol.*, 1983, 156, 949.
- [16] Tetsuo, K. et al.: *J. Bacteriol.*, 1986, 166, 728.
- [17] Kenji, N. et al.: *EMBO J.* 1985, 4, 3589.
- [18] Masso, I. et al.: *Agric. Biol. Chem.* 1986, 50, 1295.
- [19] Lars, A. et al.: *EMBO J.*, 1985, 4, 3901.
- [20] Yoko, Ikura.: *Agric. Biol. Chem.* 1986, 50, 2747.

[本文于 1987 年 10 月 12 日收到]

### 更 正

本刊 1988 年第 15 卷第 3 期 207 页第 3 行中的“1 × SSC”应更正为“0.1 × SSC”。