



УДК 579.852.11:579.222:577.152.321:579.252

ГЕН α -АМИЛАЗЫ — МОДЕЛЬ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ СЕКРЕТОРНЫХ ВЕКТОРОВ

А. В. Сорокин, Ю. В. Йомантас, А. С. Аваков, В. Г. Богуш, Г. З. Гайда,
А. Я. Стронгин, Ю. И. Козлов, А. И. Степанов, В. Г. Дебабов

Введение. Многие виды бактерий являются промышленными продуцентами секреторных белков. В настоящее время описано клонирование нескольких генов, кодирующих секреторные белки бактерий [1—3]. Анализ нуклеотидных последовательностей этих генов показал, что все белки синтезируются в виде предшественников, на NH₂-конце которых находится сигнальный пептид, удаляемый в ходе секреции.

Использование регуляторных областей генов, кодирующих секреторные белки, открывает возможности для создания так называемых секреторных векторов, то есть таких векторов, которые обеспечивают бы не только синтез белков — продуктов чужеродных генов — но и их транспорт через клеточную мембрану. Хорошей моделью для конструирования таких векторов является ген α -амилазы, так как некоторые виды бактерий производят этот фермент в очень больших количествах. Активность гена α -амилазы подвержена сложной регуляции, описан ряд мутаций, влияющих на выражение этого гена.

В настоящей работе описана экспрессия гена α -амилазы *B. amyloliquefaciens* A50 в составе рекомбинантных плазмид в клетках *E. coli* и *B. subtilis* и конструирование секреторных векторов на основе этого гена.

Материалы и методы. В работе использовали штаммы *E. coli* C600, *B. subtilis* геСЕ4 amy^- и *B. subtilis* amy^- prg^- ser2 (коллекция лаборатории). Бактерии выращивали в бульоне Хоттингера или в L-бульоне с добавлением соответствующих антибиотиков. Бацитрацин использовали в концентрации 100 мкг/мл. Генетическую трансформацию и выделение плазмид проводили, как описано в работе [4]. Эндонуклеазы рестрикции получены от Б. А. Ребеншица (ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов Главмикробиопрома при СМ СССР) или фирмы «Serva» (ФРГ). Полинуклеотидкиназа получена от Е. Д. Свердлова (Ин-т биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР), полинуклеотидлигаза и нуклеаза Ba131 — от А. Янулайтиса (ВНИИ прикладной энзимологии, Вильнюс). Фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* выделен Н. В. Якубовичем (ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов Главмикробиопрома при СМ СССР). Нуклеотидную последовательность ДНК определяли методом Максама—Гилберта [5] или методом Сэнгера [6]. Периплазматическую фракцию белков *E. coli* выделяли по методу, описанному Неп и Хеппель [7]. Активную α -амилазу тестировали по отщеплению красителя от амилопектиназура («Calbiochem», США). Лейкоцитарный интерферон α -2 человека тестировали с помощью моноклональных антител фирмы «Celltech» (Англия). Активность интерферона выражали в международных единицах (МЕ). Удельная активность чистого интерферона — $2-4 \cdot 10^8$ МЕ/мг.

Плазмида, содержащая ген интерферона, получена от Е. Д. Свердлова. Плазмиды, содержащие укороченный репликон рМХЗО, получены от Л. С. Арутюновой (ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов Главмикробиопрома при СМ СССР).

Результаты и обсуждение. Экспрессия гена α -амилазы в клетках *E. coli*. Ранее мы описали клонирование гена α -амилазы *B. amyloliquefaciens* [4]. В этой работе были исследованы две плазмиды рАА2 и рАА15, которые отличались размером встроенного в них фрагмента (рис. 1). Обе плазмиды обеспечивали синтез активной α -амилазы в клетках *E. coli* и *B. subtilis*, однако выход фермента в клетках, содержащих плазмиду рАА2 был примерно в 10 раз выше, чем для рАА15. Эти плазмиды сильно отличались также по своей стабильности.

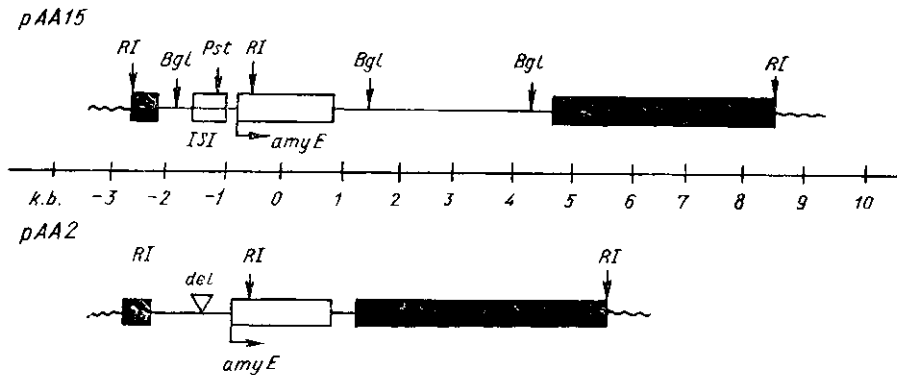


Рис. 1. Рестрикционная карта фрагментов ДНК хромосомы *B. amyloliquefaciens*, клонированных в плазмиде рАА15 и рАА2. Структурный ген α -амилазы показан белым прямоугольником; черный прямоугольник — ДНК рВР322; волнистая линия — ДНК рМХ30; RI — EcoRI, Bgl — BglII, Pst — PstI; del — предполагаемое положение делеции в плазмиде рАА2, приводящей к инактивации гена.

Fig. 1. Restriction map of *B. amyloliquefaciens* A50 DNA fragments, cloned in plasmids рАА15 and рАА2. α -amylase structural gene, pBR322 DNA and pMX30 DNA are shown by white box, black box and wavy line, respectively. Bgl — BglII, Pst — PstI; del — the proposed location of the deletion in рАА2, which causes inactivation of the gene.

Плазмиды рАА15 стабильно наследовались в течение нескольких десятков генераций, в то время как в популяции клеток, несущих плазмиду рАА2, постоянно появлялись бактерии, не способные к синтезу α -

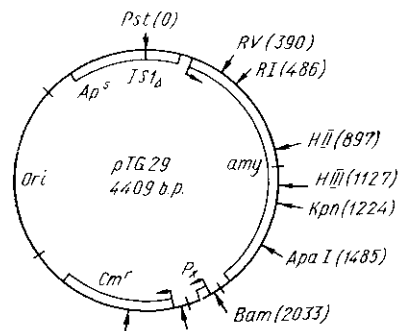


Рис. 2. Рестрикционная карта плазмиды рТГ29. Pst — PstI, RV — EcoRV, RI — EcoRI, HII — HindII, HIII — HindIII, Kpn — KpnI, Bam — BamHI; IS1 Δ — делетированный IS1-элемент.

Fig. 2. Restriction map of рТГ29 plasmid. Pst — PstI, RV — EcoRV, RI — EcoRI, HII — HindII, HIII — HindIII, Kpn — KpnI, Bam — BamHI; IS1 Δ — deleted IS1-element.

амилазы. Анализ плазмидных ДНК, выделенных из бактерий нескольких независимых клонов, показал, что во всех случаях в популяции клеток присутствуют две плазмиды, одна из которых не отличается от рАА2, а другая является ее делеционным вариантом. Все картированные делеции локализируются в области гена α -амилазы.

Векторная плазмиды рМХ39, которую использовали для клонирования гена α -амилазы, имеет большую молекулярную массу (20000 пар нуклеотидов) и присутствует в клетках в небольшом числе копий, что сильно затрудняет анализ клонированных на ней фрагментов ДНК. Поэтому для дальнейших исследований мы клонировали PstI — BamHI-фрагмент плазмиды рАА15 на векторной молекуле рМЛ2.1 [8]. В результате была получена плазмиды рТГ29 (рис. 2). Клетки *E.*

coli, содержащие плазмиду рТG29, устойчивы к хлорамфениколу и синтезируют активную α -амилазу. Интересно отметить, что ген устойчивости к хлорамфениколу (CAT) на плазмиде рТG29 не содержит собственного промотора и транскрибируется, по-видимому, с промотора, расположенного на клонированном фрагменте.

Выход активной α -амилазы в клетках *E. coli*, несущих плазмиду рТG29, составляет примерно 40000 молекул на клетку в логарифмической фазе роста, при этом около 80 % активности фермента обна-

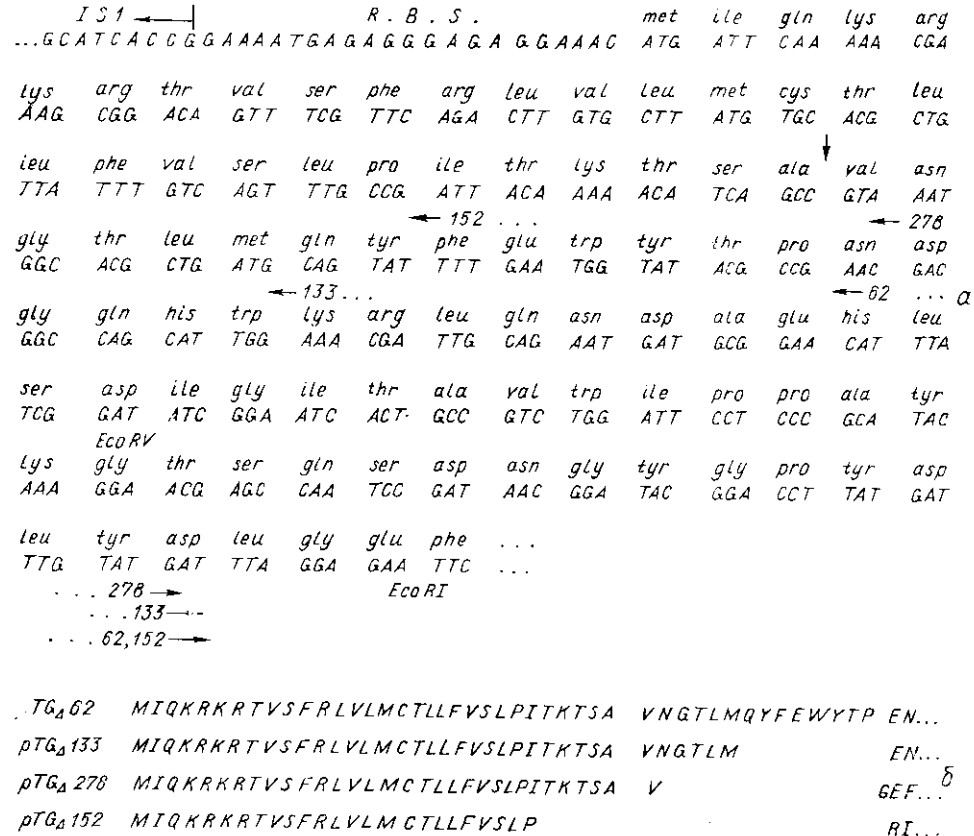


Рис. 4. а) Нуклеотидная последовательность лидерной части гена α -амилазы, клонированного в плазмиде рАА15; IS1—начало последовательности IS1-элемента; R. B. S.—сайт связывания с рибосомой гена α -амилазы. б) Аминокислотные последовательности, кодируемые лидерными областями плазмид, которые могут быть использованы в качестве секреторных векторов.

Fig. 4. Nucleotide sequence of the leader part, α -amylase gene cloned in plasmid рАА15 (а): IS1—the start of IS1-element sequence; RBS—ribosome binding site of α -amylase gene; amino acid sequences coded by plasmid leader sequences which might be used as the secretion vectors (б).

рживается в периплазматическом пространстве. Выделенная из *E. coli* α -амилаза не отличается по молекулярной массе (рис. 3, см. вклейку) и другим характеристикам от фермента из *B. amyloliquefaciens*. Эти данные показывают, что система секреции *E. coli* узнает сигналы, закодированные в структуре α -амилазы, и обеспечивает процессинг и секрецию этого белка в периплазму.

Для BglII-фрагмента плазмиды рАА15, содержащего ген α -амилазы, была определена нуклеотидная последовательность. Фрагмент этой последовательности представлен на рис. 4 (полная последовательность будет опубликована позднее). Как видно из этого рисунка, в плазмиде рАА15 произошло встраивание IS1-элемента в область, расположенную между промотором и SD-последовательностью гена α -амилазы. Этот результат позволяет объяснить различия в уровне синтеза α -амилазы, наблюдаемые для клеток с плазмидами рАА2 и

рАА15. По-видимому, накопление α -амилазы в *E. coli* токсично для клеток. Поэтому при культивировании бактерии, утратившие способность синтезировать фермент, получают селективные преимущества. Потеря плазмиды предотвращалась добавлением в среду антибиотика, вследствие чего происходил отбор бактерий со структурными перестройками плазмидной ДНК. В случае плазмиды рАА15 произошло встраивание IS1-элемента, которое привело к снижению синтеза α -амилазы и стабилизации плазмидных клеток. Для клеток, несущих плазмиду рАА2, в которую такого встраивания не произошло, наблюдается непрерывное расщепление популяции. Интеграцию IS1-элемента в ген α -амилазы *B. coagulans* наблюдали также Корнелис и др. [9]. Интересно отметить, что встраивание IS1-элемента между промотором и участком инициации трансляции гена α -амилазы не блокирует полностью экспрессию гена. Более того, удаление промотора α -амилазы (плазмида рТG29) также не останавливает транскрипцию. Известно, что в состав IS1-элемента входят терминаторы транскрипции и за счет этого встраивание IS1 обычно приводит к инактивации генов и оперонов [10]. Анализ нуклеотидной последовательности плазмиды рТG29 не выявил перед геном α -амилазы структуры, соответствующей обычным промоторам *E. coli*. Таким образом, остается неясным, с какого промотора осуществляется транскрипция гена α -амилазы на плаزمиде рТG29 и рАА15.

За последовательностью гена α -амилазы обнаружена шпилечная структура, характерная для бактериальных терминаторов транскрипции. Далее находится последовательность, гомологичная вегетативным промоторам бацилл. Удаление этой области из плазмиды рТG29 приводит к утрате клетками, содержащими плазмиду, устойчивости к хлорамфениколу. Следовательно, этот промотор функционален в клетках *E. coli*.

Экспрессия гена α -амилазы в клетках *B. subtilis*. Для изучения экспрессии гена α -амилазы в клетках *B. subtilis* была сконструирована плазмида рКВ8 (рис. 5), которая содержит PstI — BamHI-фрагмент плазмиды рТG29, клонированный на делеционном варианте вектора рМХ30. Клетки *B. subtilis* 168 amy^- , получившие такую плазмиду, продуцируют активную α -амилазу, однако в очень малых количествах. Напомним, что плазмида

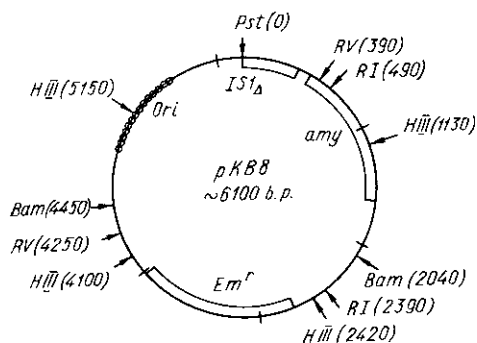


Рис. 5. Рестрикционная карта плазмиды рКВ8: Ori — укороченный ориджин репликации рМХ30; обозначения рестриктаз, как на рис. 2.

Fig. 5. Restriction map of рКВ8 plasmid: ori — the shortened origin of replication of рМХ30; abbreviations of restriction enzymes are identical to that in Fig. 2.

рКВ8 не содержит промотора α -амилазы. Эта плазмида может быть использована для клонирования бациллярных промоторов, причем относительную силу промоторов можно оценивать *in vivo* по размеру зон гидролиза крахмала или амилопектиназура на индикаторных чашках.

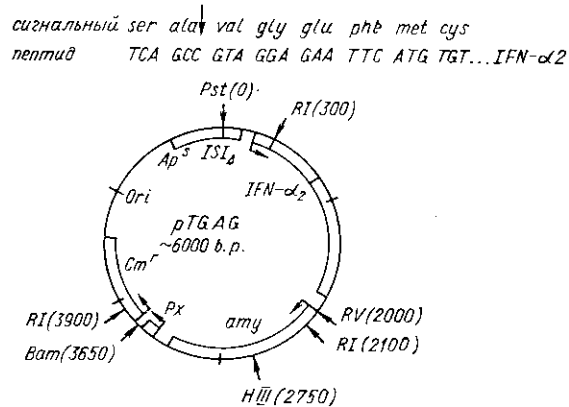
Мы использовали плазмиду рКВ8 для клонирования промотора α -амилазы. В результате была получена плазмида рРТ5 (рис. 6, см. вклейку), которая обеспечивала высокий уровень синтеза α -амилазы (около 400 мг/л культуры за 24 ч ферментации). Практически весь фермент (более 99 %) был обнаружен в культуральной жидкости. Синтезируемая α -амилаза по молекулярной массе, иммунологическим свойствам и удельной активности не отличалась от фермента из исходного штамма *B. amyloliquefaciens* А50. Для фермента, синтезируемого *B. subtilis*, была определена N-концевая аминокислотная после-

довательность, которая полностью совпала с последовательностью зрелого фермента из штамма А50.

Конструирование секреторных векторов. Для получения секреторного вектора мы вводили удобный для клонирования участок расщепления рестриктазы в непосредственной близости от фрагмента ДНК, кодирующего сигнальный пептид. С этой целью ДНК плазмиды рТG29 (рис. 2) расщепляли рестриктазой *EcoRV* и затем обрабатывали экзонуклеазой *Bal31*. Условия реакции подбирались таким образом, чтобы отщепилось примерно 200 пар нуклеотидов. Для трансформации использовали кольцевые молекулы, полученные с помощью ДНК-лигазы. Отбирали *amy*-трансформанты, из которых вы-

Рис. 7. Рестрикционная карта плазмиды рТGА6. Обозначения рестриктаз, как на рис. 2. Сверху показано место стыковки α -амилазы с интерфероном α -2. Цистеиновый кодон соответствует первой аминокислоте зрелого интерферона.

Fig. 7. Restriction map of рТGА6 plasmid. In the upper part the fusion of α -amylase and interferon α 2 is shown. Cys-codon codes the first amino acid of the mature interferon. The abbreviation of restriction enzymes are identical to that in Fig. 2.



деляли плазмидную ДНК, и после рестрикционного анализа определяли нуклеотидные последовательности в области *EcoRI*-сайта. Из 200 проанализированных плазмид было отобрано четыре, которые можно использовать в качестве секреторных векторов (рис. 4, б). Одна из плазмид — рТG Δ 278 — была выбрана нами для использования в качестве секреторного вектора при клонировании гена лейкоцитарного интерферона человека α -2.

Последовательность ДНК, кодирующую структурную часть гена лейкоцитарного интерферона, встраивали в *EcoRI*-сайт плазмиды рТG Δ 278 (рис. 7). Полученные рекомбинантные молекулы вводили в клетки *E. coli* С600 и исследовали экспрессию гена интерферона. Оказалось, что в логарифмической фазе роста в клетках накапливается $1 \div 2 \cdot 10^7$ МЕ интерферона, что соответствует примерно 10^3 молекул на клетку. Примерно 50% синтезированного интерферона тестируется в периплазматической фракции, остальная активность обнаруживается в цитоплазме. Препараты интерферона, выделенные из периплазмы и цитоплазмы, чистили на моноклональных антителах и анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (рис. 8, см. вклейку). Оказалось, что интерферон из периплазмы имеет молекулярную массу 19000. Эта молекулярная масса складывается из молекулярной массы зрелого интерферона (18000) и молекулярной массы пяти аминокислот, которые появляются в результате процессинга сигнального пептида, если предположить, что этот процессинг происходит в том же месте, что и у α -амилазы (рис. 4).

Следует отметить, что в цитоплазматической фракции обнаружена вторая форма иммунологически активного интерферона с молекулярной массой 17000. Эта форма, по-видимому, является продуктом деградации интерферона, так как образование пептидов с такой же подвижностью наблюдается и при обработке интерферона некоторыми протеиназами.

Для изучения синтеза и секреции интерферона в бациллах была сконструирована плаزمида рRT84.1 (рис. 9), в которую клонировали *Pst*I — *Bam*HI-фрагмент плазмиды рТGА6 (рис. 7), содержащей ген

интерферона. Плазмиду pRT84.1 — INF вводили в клетки *B. subtilis* 168 и исследовали накопление интерферона в культуральной жидкости. В этих экспериментах нам не удалось обнаружить интерфероновой активности. Известно, что клетки *B. subtilis* синтезируют и секретируют несколько протеиназ [11]. Действительно, добавление к раствору интерферона культуральной жидкости, полученной после ферментации *B. subtilis*, приводит к очень быстрой инактивации интерферона. Для подавления протеазной активности в культуральную среду добавляли бацитрацин. В этом случае в культуральной жидкости накапливалось до 10^7 МЕ/л интерферона. Был сконструирован также мутантный штамм *B. subtilis* со сниженной активностью металло- и сериновой

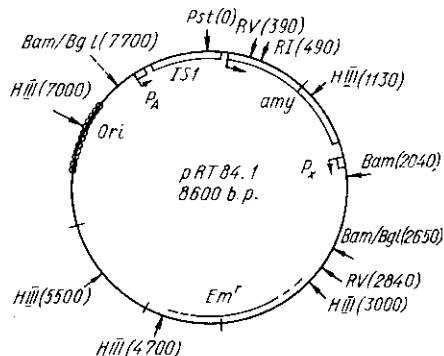


Рис. 9. Рестрикционная карта плазмиды pRT84. 1. Обозначения рестриктаз, как на рис. 2. Плазмида pRT84. 1 — INF получена клонированием PstI — BamHI-фрагмента плазмиды pTGA6 в плазмиде pRT84. 1 в клетках *B. subtilis*.

Fig. 9. Restriction map of pRT84. 1 plasmid. The abbreviations of restriction enzymes are identical to that in Fig. 2. Plasmid pRT84. 1-IFN was constructed by cloning PstI-BamHI-fragment of pTGA6 plasmid in pRT841 plasmid in *B. subtilis* cells.

протеиназ. Этот штамм также продуцировал 10^7 МЕ/л интерферона. Примерно половина синтезированного интерферона секретировалась в культуральную жидкость, остальная активность оказалась связанной с клетками и тестировалась только после обработки их додецилсульфатом натрия.

Таким образом, сконструированные нами векторы способны обеспечить синтез и секрецию интерферона в клетках *E. coli* и *B. subtilis*, однако количество и распределение интерферона и α -амилазы между клеточными фракциями сильно различается.

Идея создания секреторных векторов привлекает в настоящее время все большее внимание. Такие векторы обладают целым рядом потенциальных преимуществ по сравнению с традиционными молекулами, используемыми для экспрессии генов. Сейчас накапливается все больше данных о том, что суперпродукция очень многих белков токсична для бактериальной клетки. Следовательно, для обеспечения большего выхода таких белков необходимо обеспечить их транспорт из клетки.

Секреторные векторы могут также обеспечить и целый ряд технологических преимуществ при использовании штаммов — продуцентов белков в промышленности.

Приведенные в настоящей работе результаты и ряд литературных данных [12, 13] показывают принципиальную возможность создания секреторных векторов.

Участок инициации трансляции и лидерный пептид гена α -амилазы *B. amyloliquefaciens* обеспечивают синтез и по крайней мере частичную (50 %) секрецию интерферона человека в клетках *E. coli* и *B. subtilis*. При этом, по-видимому, происходит правильный (с точностью до 1 аминокислотного остатка) процессинг белка. Следует, однако, отметить, что выход интерферона значительно ниже, чем выход α -амилазы, ген которой был клонирован в аналогичных конструкциях. Для *E. coli* наблюдаются отличия в 40—50 раз, для *B. subtilis* — более чем в 1000 раз в случае штамма с пониженным синтезом протеиназ.

Причины, обуславливающие такую большую разницу в выходе двух белков, в настоящее время не известны. Не вызывает сомнения, что одним из основных факторов является различная чувствительность интерферона и α -амилазы к протеолизу. Действительно, синтез интер-

ферона в *B. subtilis* мы смогли обнаружить только после введения мутаций по генам протеиназ, в то время как эти мутации мало сказывались на выходе α -амилазы. Интерферон нестабилен также и в *E. coli*, так как в клетках накапливается значительное количество низкомолекулярных продуктов деградации интерферона. Время полураспада интерферона в *E. coli* составляет примерно 1 ч, что значительно ниже соответствующего времени, характерного для обычных бактериальных белков.

ALPHA-AMYLASE GENE AS A MODEL FOR SECRETION VECTOR CONSTRUCTION

A. V. Sorokin, Yu. V. Jomantas, A. S. Avakov, V. G. Bogush, G. Z. Gaida,
A. Ya. Strongin, Yu. I. Kozlov, A. I. Stepanov, V. G. Debabov

All-Union Research Institute of Genetics and Breeding
of Industrial Microorganism, Glavmicrobioprom at Council
of Ministers of the USSR, Moscow

Summary

Bacillus amyloliquefaciens A50 alpha-amylase gene was cloned in *E. coli* and *B. subtilis* cells. The leader part of the gene which includes the signal peptide coding sequence was used for secretion vector construction. One of the vectors obtained was applied for human leukocyte interferon expression in *E. coli* and *B. subtilis*. The secretion of interferon and alpha-amylase was shown to differ in these microorganisms. A large amount of interferon in *E. coli* is found in cytoplasm while in *B. subtilis* it is found in the membrane fraction.

1. Nucleotide sequence of the promoter and NH₂-terminal signal peptide region of the α -amylase gene from *Bacillus amynoliquefaciens* / i. Palva, R. F. Pettersen, N. Kalkinen et al.—*Gene*, 1981, 15, N 1, p. 43—51.
2. The *subtilisin E* gene of *Bacillus subtilis* is transcribed from a σ^{37} promoter in vivo / S.-L. Wong, Ch. Price, D. S. Goldfarb, R. H. Dot.—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, N 4, p. 1184—1188.
3. Brammar W. J., Muir S., McMorris A. Molecular cloning of the gene for the β -lactamase of *Bacillus licheniformis* and its expression in *Escherichia coli*.—*Mol. and Gen. Genet.*, 1980, 178, N 1, p. 217—224.
4. Синтез и секреция активной α -амилазы *Bacillus amyloliquefaciens* A50 в клетках *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* / А. В. Сорокин, Ю. В. Йомантас, В. Е. Калужский и др.—*Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология*, 1984, 6, № 6, с. 24—26.
5. Maxam A. M., Gilbert W. Sequencing end-labelled DNA with basespecific chemical cleavages.—*Meth. Enzymol.*, 1980, 65, p. 499—560.
6. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors.—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, 74, N 18, p. 5463—5467.
7. Nen H. C., Heppel L. A. The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during formation of spheroplasts.—*J. Biol. Chem.*, 1965, 240, N 9, p. 3685—3692.
8. Клонирование гена фибробластного интерферона человека в клетках *Escherichia coli* / Ю. И. Козлов, С. В. Машко, М. И. Лебедева и др.—*Молекуляр. генетика, микробиология, и вирусология*, 1983, 7, № 7, с. 19—23.
9. Cornelis P., Dignoffe C., Willemot H. Cloning and expression of a *Bacillus coagulans* amylase gene in *Escherichia coli*.—*Mol. and Gen. Genet.*, 1982, 186, N 3, p. 507—511.
10. Besemer J., Herpers M. Suppression of polarity of insertion mutation within the gal operon of *Escherichia coli*.—*Mol. and Gen. Genet.*, 1977, 151, N 2, p. 295—302.
11. Priest F. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*.—*Bacteriol. Revs.*, 1977, 41, N 3, p. 711—753.
12. Secretion of interferon by *Bacillus subtilis* / I. Palva, P. Lehtovaara, L. Hääräinen et al.—*Gene*, 1983, 22, N 2, p. 229—235.
13. A *Bacillus subtilis* secretion vector system derived from the *B. subtilis* α -amylase promoter and signal sequence region and secretion of *Escherichia coli* β -lactamase by the vector system / K. Ohmura, T. Shraza, H. Nakamura et al.—*J. Biochem.*, 1984, 95, N 1, p. 87—93.

ВНИИ генетики и селекции
промышленных микроорганизмов
Главмикробиопрома при СМ СССР, Москва

Получено 03.09.84