

PelB Signal Sequence로 유도된 재조합 인간 상피세포 증식인자 분비 발현 벡터의 제조

박세철 · 남정현 · 김정근 · 권태종¹ · 고인영 · 유광현*
(주)유한양행 중앙연구소 생물제품연구실, ¹건국대학교 미생물공학과

A Set of High Expression Plasmids for Recombinant Human Epidermal Growth Factor Secreted by *pelB* Signal Sequence in *E. coli*. Se-Cheol Park, Jung-Hyun Nam, Jeong-Keun Kim, Tae-Jong Kwon¹, In-Young Ko and Kwang-Hyun You*. Laboratory of Biotechnology, Yuhan Research Center, Yuhan Corporation, Kunpo-si 435-030, Korea. ¹Department of Microbial Engineering, Kon Kuk University, Seoul 133-701, Korea - We have designed nucleotide sequences of hEGF structural gene to eliminate the N-terminal methionine residue incorporated during the translation initiation step, and constructed recombinant human epidermal growth factor (rhEGF) secretion plasmids pYHB101, and pYHB2 in which *pelB* signal sequence-hEGF gene was expressed under the control of the T7, and *tac* promoter, respectively. We also constructed pYHB1 vector which contains rhEGF gene controlled by T7 promoter. The transformant with pYHB101 showed relatively slow growth pattern compared to the transformant with pYHB1. However, we observed that the transformant with pYHB101 secreted rhEGF of 13 mg/l significantly after 5 hr induction with 1 mM IPTG and that the T7 promoter was more effective than *tac* promoter when connected to *pelB* signal sequence. The amount of rhEGF was 14 mg/l under the sub-optimized condition.

Human epidermal growth factor(hEGF)는 53개의 아미노산으로 구성된 6,000 dalton의 polypeptide로서 3개의 disulfide bond를 가지고 있으며, tyrosine kinase transmembrane receptor에 결합하여 tyrosine kinase를 활성화 시켜 세포의 증식을 촉진시키는 기능을 한다(1, 5). 이와 같이 표피세포 증식을 촉진하는 성질을 이용하여 상처 및 화상의 치료, 안과수술후 처치, 피부이식, 무혈청배지 등에 사용하여 좋은 결과를 얻고 있다. 그러나 이러한 hEGF를 인체의 노에서 추출하기에는 원료의 수급, 복잡한 정제방법 등의 다양한 문제가 수반되어 대량생산에 많은 어려움이 따른다. 따라서 이러한 점을 극복하기 위하여 cloning된 hEGF 유전자를 적당한 발현 vector에 삽입하여 *E. coli*(7-9, 13), *Bacillus*(3), Yeast(15) 등에 형질 전환시킴으로서 대량배양 및 정제가 가능하게 하였다.

현재까지 *E. coli*를 host로 사용할 때 λP_L , *lac*, *trp*, *tac* promoter 등의 유도 가능하고 강력한 promoter를 이용해 왔다(5, 12, 14). 그러나 이러한 재조합 단백질이 대장균에서 과다발현 될 때 inclusion body로 알려진 불용성결합체를 형성하는 경우가 있다. Inclusion body의 형성시 균체의 회수 및 분리가 용이하고 protease에 의하여 분해되지 않는다는 장점이 있는 반면에 적절한 solubilization과 renaturation 과정을 거쳐 정확한 protein folding이 이루어지도록 활성화 시키는 과정이 필요하다는 문제점이 있다(7). 이러한 점을 해

결하기 위하여 *phoA*, *ompA*, *pelB* 등의 다양한 signal sequence를 이용하여 mature protein을 적절하게 periplasm으로 분비시키려는 연구(8, 9, 13, 16)가 많이 이루어졌으며, 그 뿐만 아니라 molecular chaperone인 GroEL 및 GroES 그리고 DnaK 등을 이용하여 단백질의 정확한 folding을 유도하는 방법(10)이 최근 응용되고 있다.

따라서 본 연구에서는 hEGF 유전자의 일부를 합성하여 *pelB* signal sequence가 삽입된 plasmid를 제조함으로써 rhEGF가 signal sequence에 이어 바로 발현되도록 하였다. 그리고 합성된 rhEGF 유전자를 *E. coli*에서 발현시키기 위하여 T7과 *tac* promoter를 사용하였다. 아울러 제조된 plasmids를 포함하고 있는 균주들로부터 발현되는 rhEGF를 조사하였으며, 분비 발현을 유도하였다.

재료 및 방법

균주 및 plasmid

본 실험에 사용된 균주 및 plasmid는 Table 1에서와 같다. hEGF 유전자의 cloning을 위한 숙주세포로서 *E. coli* Novablue와 BL21(DE3) 그리고 BL21(DE3, pLysS)은 Novagen 사로부터 구입하여 사용하였으며, 발현 vector로서 T7 promoter를 가지고 있는 pET22b와 *tac* promoter를 가지고 있는 pFLAG-ATS를 사용하였다.

배지 및 시약

각 균주들의 배양을 위하여 Luria-bertani(LB) 배지

*Corresponding author.

Key words: Human epidermal growth factor, *pelB* signal sequence, secretion

Table 1. Bacterial Strains and plasmids

Strains and plasmids	Relevant genotypes or phenotypes	Reference and source
Strains		
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B-m_B-)</i> <i>gal dcm</i> (DE3)	Novogene Co.
" BL21(DE3), pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B-m_B-)</i> <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS(cam ^R)	"
" Novablue	<i>endA1 hsdR17(r_{k12}-m_{k12}+)</i> <i>thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> ⁻ [F ⁻ <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>ZΔM15::Tn10(tet^R)</i>]	"
" JM105	<i>supE endA sbcB15 hsdR4 rpsL thiΔ(lac-proAB)</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
" XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac</i> ⁻ [F ⁻ <i>proA</i> ⁻ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>ZΔM15::Tn10(tet^R)</i>]	Stratagene Co.
Plasmids		
pUC18-EGF	Plasmid containing hEGF gene, Ap ^r	British Biotech Co.
pET22b	Expression vector containing T7 promoter, Ap ^r , <i>pelB</i> signal sequence	Novogene Co.
pFLAG-ATS	Expression vector containing <i>tac</i> promoter, Ap ^r	Eastman Co.
pYHB1	Recombinant plasmid expressing hEGF gene by T7 promoter, Ap ^r	This study
pYHB101	Recombinant plasmid containing <i>pelB</i> signal sequence expressing hEGF gene by T7 promoter, Ap ^r	"
pYHB2	Recombinant plasmid expressing hEGF gene by <i>tac</i> promoter, Ap ^r	"

(Bacto tryptone, 10 g/l ; Bacto yeast extract, 5 g/l ; NaCl, 5 g/l, pH 7.0)을 사용하였고, 고체 배지의 경우는 한천을 1.5%로 첨가하여 사용하였다.

본 연구에 사용한 T4 DNA ligase와 제한효소, Calf-intestine alkaline phosphatase, RNase 등은 Promega사에서 구입하여 사용하였다. 제한효소절단, ligation, 형질전환, 전기영동 등의 기술은 Sambrook 등(11)의 방법을 사용하였으며, 반응조건은 제조사의 사용지침을 따랐다. 완충용액에 사용한 시약과 항생제, IPTG 등은 Sigma사에서 구입하였으며, 재조합 인체 EGF는 Boehringer Mannheim사에서 구입하여 사용하였다. Agarose gel로부터 DNA의 분리 및 정제는 Bio101사의 GeneClean II kit와 Promega사의 Wizard Minipreps DNA purification system을 사용하였다.

DNA의 추출 및 형질전환

재조합 plasmid의 분리는 ampicillin 50 µg/ml이 함유된 LB 배지에서 배양한 후 Sambrook 등의 alkaline lysis 방법에 따라 추출하였으며, *E. coli*의 형질전환은 Sambrook 등(11)의 방법에 따랐다. 형질전환 집락의 선발방법은 ampicillin 50 µg/ml이 포함된 LB agar 배지에서 하룻밤 동안 배양하여 집락 형성을 확인하였다.

Oligonucleotides의 합성

본 실험에 사용된 oligonucleotides의 합성 및 정제는 한국생공사에서 실시하였으며, 이들의 염기서열은

Fig. 1에서와 같다. *Bgl*I과 *Msc*I 말단을 갖도록 고안된 34 mer와 31 mer인 단일 가닥의 oligonucleotides를 동일 부피로 혼합한 후에 90°C에서 5분간 가열하여 변성시켰다. 그리고 서서히 상온까지 식히면서 annealing 하였다.

rhEGF의 확인

재조합 균주들로부터 rhEGF의 발현을 확인하기 위하여 ampicillin 50 µg/ml이 포함된 LB 배지에 균체를 접종하였다. 그리고 A₆₀₀이 0.7~1에 도달할 때, IPTG (isopropyl-β-thiogalactopyranoside)를 최종농도가 1 mM이 되도록 가하여 일정시간 진탕배양하였다. 배양액을 10,000×g에서 15분간 원심분리하여 균체를 회수하고 상등액은 균체외로 분리된 rhEGF로 전처리없이 분석에 활용하였다. 회수된 균체는 TE buffer(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)로 현탁한 다음 초음파 분쇄기(model 300, Fisher사)로 60초간 파쇄하였다. 그런 다음 파쇄된 균체를 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 상등액과 침전물을 분리하여 상등액은 periplasm region이 포함된 soluble 분획으로 침전물은 불용성의 inclusion body로서 세포내 위치확인에 사용하였다. SDS PAGE를 위하여 각 시료를 30 µl씩 취하여 2× sample buffer(0.125 M Tris-HCl(pH 6.2) ; 4% SDS ; 20% glycerol ; 10% 2-mercaptoethanol)에 현탁한 후, 15%의 SDS polyacrylamide gel에서 30 mA로 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 후에 gel은 Coomassie blue 염색법에

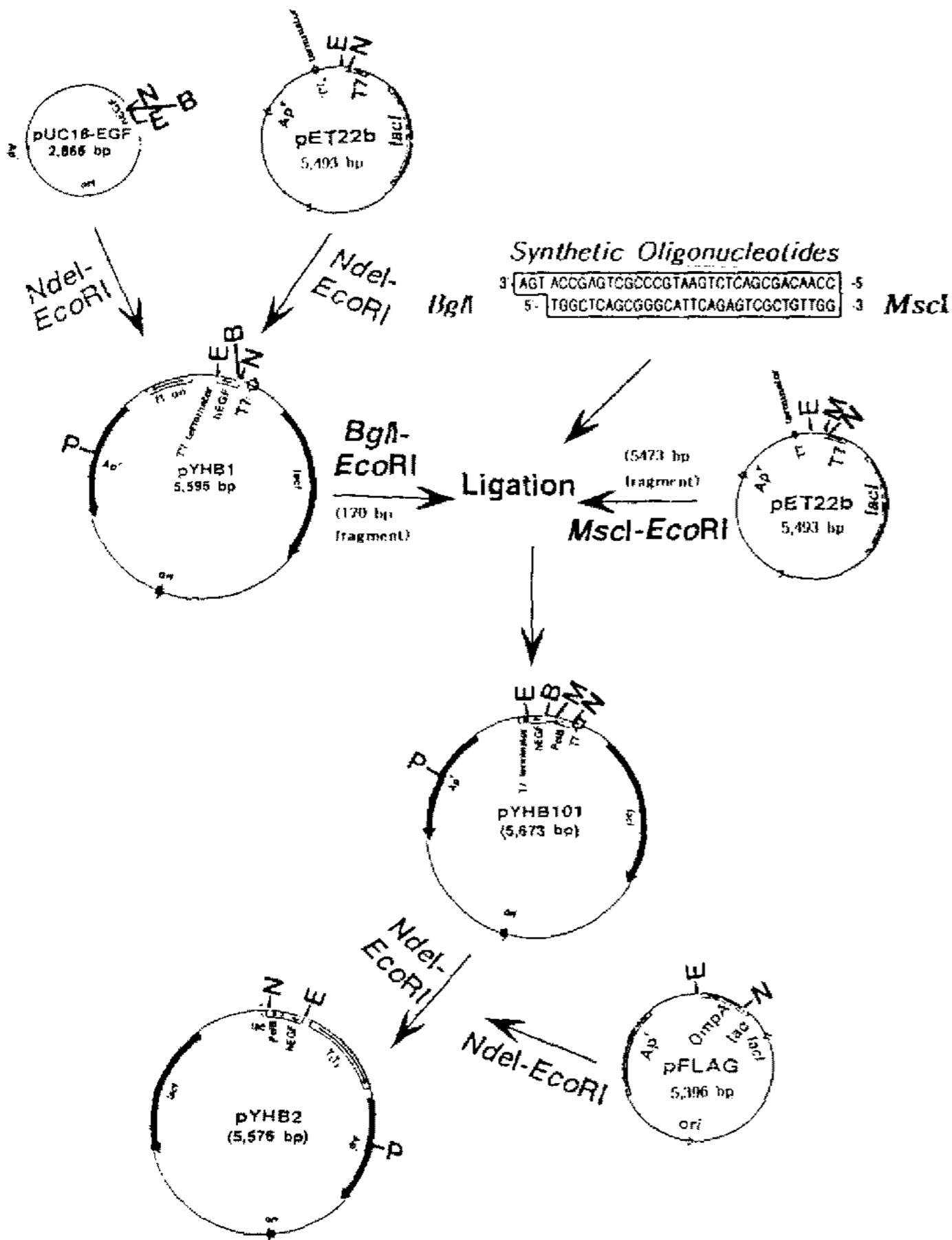


Fig. 1. Construction scheme for the rhEGF expression plasmids pYHB1, pYHB101, and pYHB2.
Abbreviations: N, *NdeI*; E, *EcoRI*; B, *BglI*, M, *MscI*.

의해 염색하고 Scanning densitometer(Image quant, Molecular Dynamics 사)를 이용하여 발현된 rhEGF를 정량하였다.

Radioimmuno assay

rhEGF 표준물질과 시료를 assay buffer(10 mM sodium phosphate(pH 7.2), 0.9% NaCl, 0.1% bovine serum albumin)로 적당히 희석하여 100 μl의 표준용액을 각각 제조하고 여기에 I¹²⁵-EGF 용액(200 cpm/μl)을 100 μl씩 가한 다음 rhEGF에 대한 IgG 용액을 1 : 1,000으로 희석하여 200 μl씩 가하였다. 그리고 37°C에서 2시간 반응시킨 후 Amersham donkey anti-rabbit reagent(Amersham 사)를 500 μl 첨가하여 20분간 반응시켰다. 그런 다음 Magnetic separator를 이용하여 donkey anti-rabbit reagent와 결합된 부분만을 회수하고 γ-counter(Berthold LB 951G, Beckman 사)에 의해 재조합 균주들로부터 발현된 rhEGF를 정량하였다.

결과 및 고찰

rhEGF 발현 plasmids

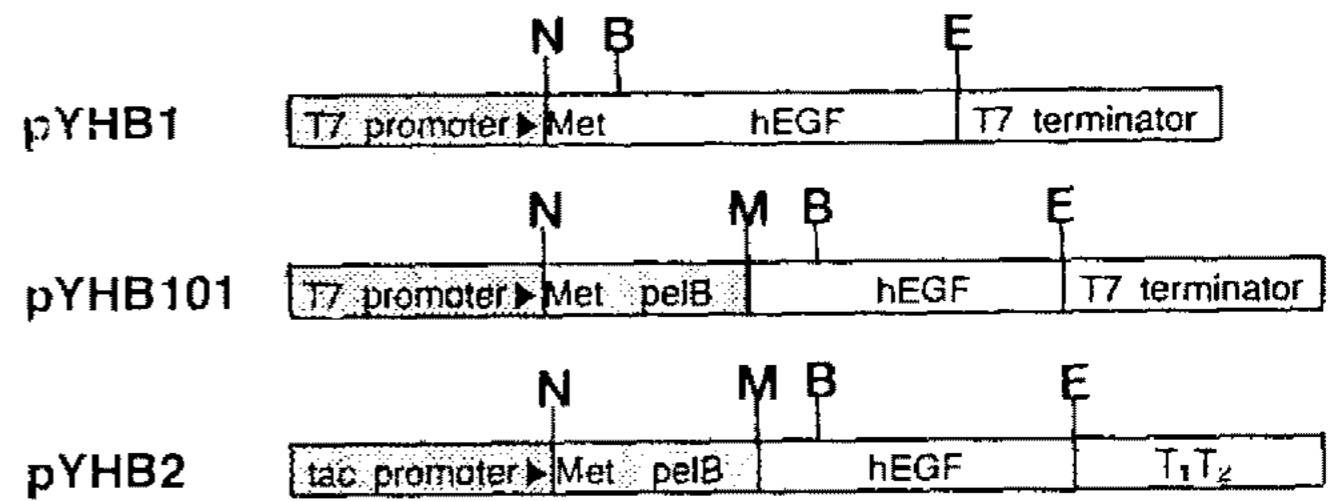


Fig. 2. Structure of rhEGF expression vector, pYHB1, pYHB101, and pYHB2.
Abbreviations: B, *BglI*; M, *MscI*; N, *NdeI*; E, *EcoRI*; *pelB*, *pelB* signal sequence

*E. coli*에서 효과적인 발현 vector인 pET22b와 pFLAG-ATS에서 rhEGF 유전자를 발현 및 분비시키기 위하여 Fig.1에서와 같이 hEGF 유전자를 포함하고 있는 pUC18-EGF(2,866 bp)로부터 180 bp *NdeI-EcoRI* 절편의 hEGF 유전자를 분리하였다. 그리고 T7 promoter를 가지고 있는 pET22b를 동일한 제한효소로 절단하고 앞서 분리된 hEGF 유전자를 삽입하여 promoter 다음에 전사개시 codon인 methionine이 오도록 pYHB1 (5,595 bp)를 제조하였다. 그런 다음 rhEGF가 inclusion body로서 세포내에 축적되는 것을 줄이고 periplasm이나 배지안으로 분비시키기 위하여 pectate lyase의 분비에 관여하는 *pelB* signal sequence(16)를 사용하였다. Fig. 1에서와 같이 *BglI-EcoRI*으로 절단한 pYHB1으로부터 170 bp의 hEGF 유전자 일부를 분리하고 *BglI-MscI* 부위를 갖도록 합성된 linker(34 bp)와 *MscI-EcoRI*으로 자른 pET22b와 ligation을 수행하였다. 그 결과 Fig. 1에서와 같이 제조된 pYHB101(5,673 bp)은 합성된 linker를 사용하여 *pelB* signal sequence에 이어 곧바로 hEGF 유전자를 연결하였으므로 전사개시(translation initiation) 단계에서 삽입되는 N말단의 methionine이 제거되어 천연형의 hEGF와 동일하게 발현되도록 고안되었다. 한편, T7 promoter의 발현체계의 비교연구로서 *tac* promoter에 의한 rhEGF의 발현을 조사하기 위하여 pYHB101에서 *pelB* signal sequence와 hEGF 유전자가 포함된 210 bp의 절편을 분리하고 pFLAG-ATS의 *tac* promoter 뒤에 삽입하여 pYHB2를 제조하였다. Fig. 2에서는 재조합 plasmids들이 가지고 있는 발현 체계의 모식도를 나타내고 있다.

rhEGF의 발현 및 세포내 위치

T7 promoter에 의하여 발현되며 signal sequence를 삽입하지 않은 pYHB1을 *E. coli* BL21(DE3)와 BL21(DE3, pLysS)에 형질 전환하여 제조한 균주에서 rhEGF의 발현을 조사하였을 때, Fig. 3에서와 같이 두 균주에서 모두 A₆₀₀이 5 이상이 되었으며 pLysS에서 발현되는 T7 lysozyme에 의한 lysis 효과가 적은 것으로 관찰되었는데 이는 Neubauer 등에 의한 pLysS를 포

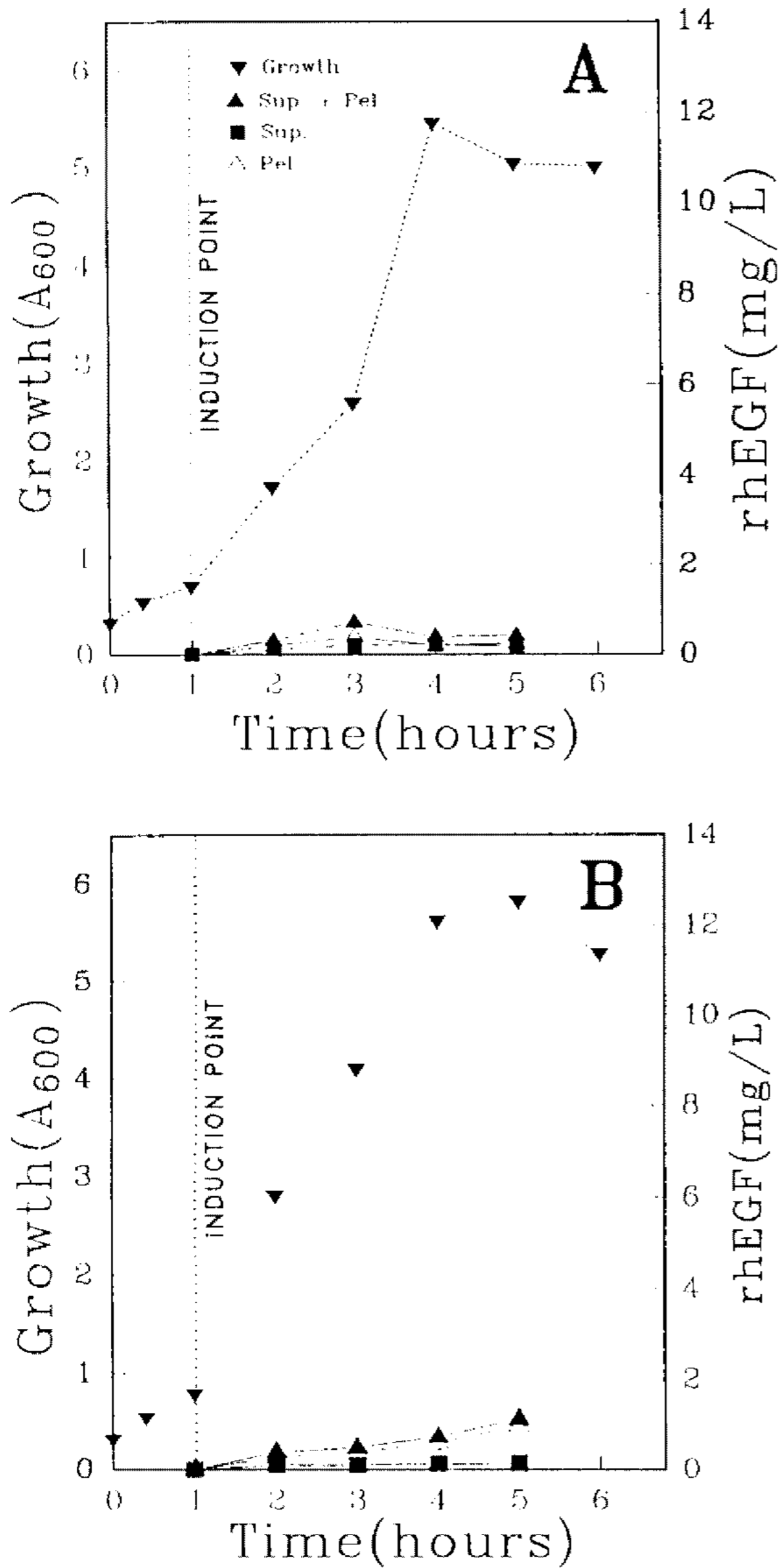


Fig. 3. Cellular localization of rhEGF produced by *E. coli* BL21(DE3) (A) and (DE3, pLysS) (B) carrying pYHB1. Activities of rhEGF were assayed by Radioimmunoassay (RIA) in both the culture medium and the soluble (supernatant) fraction of the sonicated cells after induction with 1 mM IPTG at 37°C, at the times indicated. The activities in the remaining fraction is considered as the cytoplasmic activity (pellets), and the activities in supernatant, pellets, and medium fraction were combined, and considered as the total activity.

함한 균주와 유사한 성장곡선을 보인 결과(18)이다. 그렇지만 rhEGF의 발현량은 비교적 적어 약 1 mg/l에 불과하였으며 대부분의 rhEGF가 inclusion body로서 cytoplasm에 축적됨을 확인하였다. 이러한 결과는 Kishimoto 등(7)에 의해 보고된 것과 같이 *lpp* promoter 다음에 Met-EGF 유전자를 삽입하여 Met-EGF가 발현된 것과 동일한 결과이었다. 이와같이 rhEGF의 N 말단에 methionine이 붙어있는 경우에 대부분이 숙주 세포내 methionyl aminopeptidase에 의하여 Met이 제

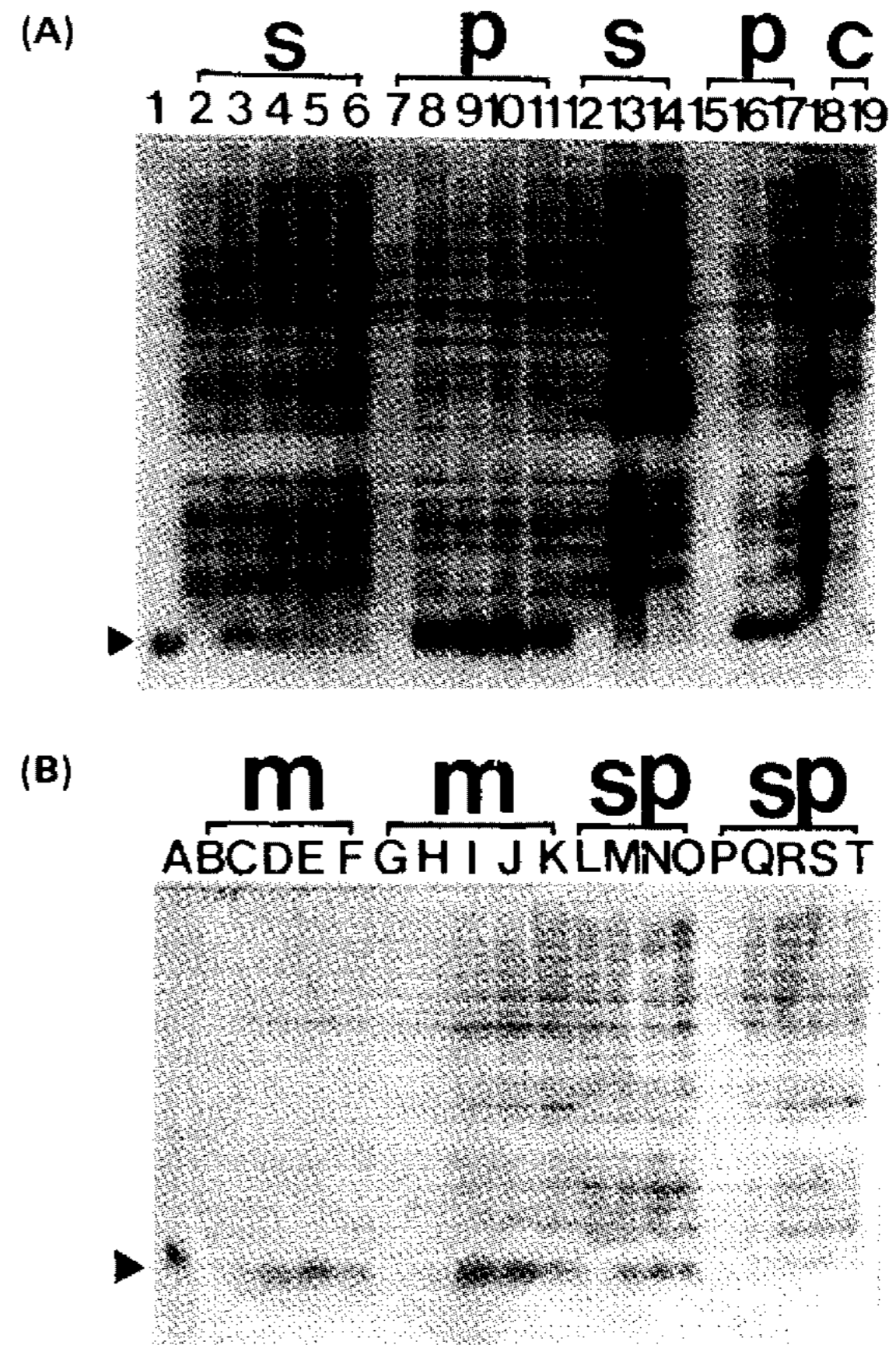


Fig. 4. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of the cellular proteins from cells carrying pYHB101. As a control, cells were also grown in the absence of IPTG at 37°C. In all cases, samples applied to the gel are equivalent to 35 µl cultures. Abbreviations: s, supernatant; p, pellets; c, control; m, medium; sp, supernatant plus pellets. (A) Lane 1, standard rhEGF (2 µg); 2~6, pYHB101 supernatant; 7~11, pYHB101 pellets; 12~14, pYHB101 pLysS supernatant; 15~17, pYHB101 pLysS pellets; 18, BL21 (DE3) control, supernatant; 19, BL21 (DE3) control pellets. (B) Lane A, standard rhEGF (2 µg); B~F, pYHB101 medium; G~K, pYHB101 pLysS medium; L~O, pYHB101 supernatant plus pellets; P~T, pYHB101 pLysS supernatant plus pellets.

거되며, 이러한 경향은 Met 다음에 위치하는 아미노산의 종류에 의해 결정된다는 보고(4, 6)도 있다.

signal sequence를 사용하여 목적 물질을 분비 발현한 경우 균체의 성장이 증가함에 따라서 균체의 lysis가 촉진되는 것으로 알려져 있으며(14), 53개의 아미노산으로 구성된 rhEGF를 발현시키기 위하여, T7 promoter 뒤에 *pelB* signal sequence를 삽입하여 세포밖으로 rhEGF의 분비를 유도한 pYHB101을 가지고 있는 균주의 경우에도 Fig. 3의 signal sequence를 삽입하지 않은 경우와 비교하여 Fig. 4와 5에서와 같이 균체의 lysis가 증가하여 많은 rhEGF가 배지로 분비됨을 확인할 수 있었다. Fig. 5에서와 같이 *E. coli* BL21(DE3)를 host로 사용하였을 때와 비교하여 BL21(DE3, pLysS)를 이용하였을 때는 pLysS에서 발현되는 T7 lysozyme에

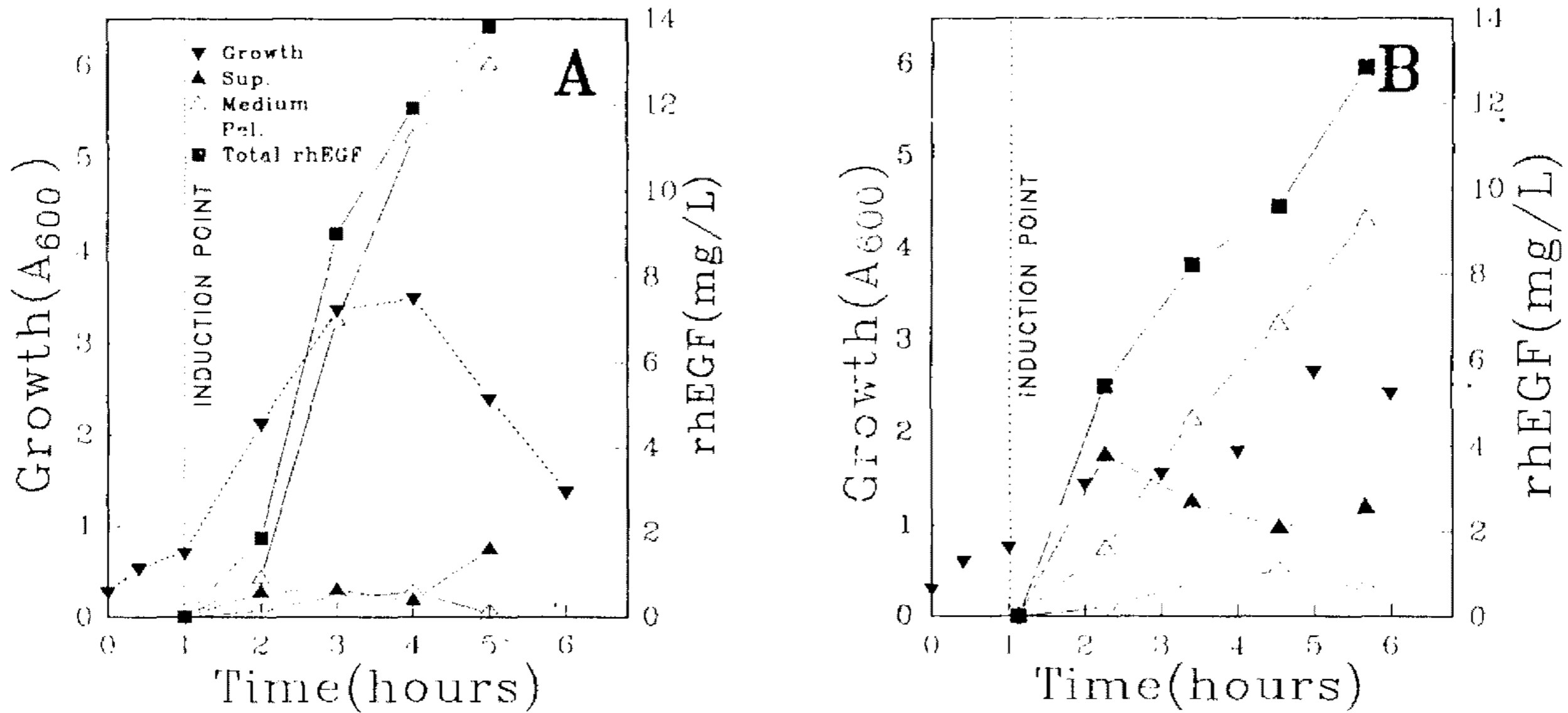


Fig. 5. Cellular localization of rhEGF produced by *E. coli* BL21 (DE3, pLysS) (A) and (DE3) (B) carrying pYHB101. Activities of rhEGF were assayed by Radioimmunoassay (RIA) in both the culture medium and the soluble (supernatant) fraction of the sonicated cells after induction with 1 mM IPTG at 37°C, at the times indicated. The activities in the remaining fraction is considered as the cytoplasmic activity (pellets), and the activities in supernatant, pellets, and medium fraction were combined, and considered as the total activity.

Table 2. Secretion of rhEGF by *E. coli* carrying pYHB1, pYHB101, and pYHB2

Plasmids	Host strains	Marker	Promoter	Signal sequence	Secreted rhEGF (mg/l)	*Secreted ratio (%)
pYHB1	BL21 (DE3)	Ap ^r	T7	No	0.1	8.3
	BL21 (DE3, pLysS)	Ap ^r Cm ^r	"	"	0.1	9.1
pYHB101	BL21 (DE3)	Ap ^r	"	<i>pelB</i>	9.6	72.1
	BL21 (DE3, pLysS)	Ap ^r Cm ^r	"	"	13	93.9
pYHB2	JM105	Ap ^r	<i>tac</i>	"	2.7	45.2
	XL1-Blue	Ap ^r Tc ^r	"	"	2.7	39.2
	Novablue	Ap ^r	"	"	2.1	46.0

*Secreted ratio (%) = Secreted rhEGF (mg/l) / Total rhEGF (mg/l) × 100

Activities of secreted rhEGF were assayed by Radioimmunoassay (RIA) in the culture medium after 4 hours of with 1 mM IPTG at 37°C.

의하여 세포벽의 peptidoglycan 층이 분해되어 세포의 lysis가 일어나 생균수가 배양 4시간 이후에 급격히 감소하였다. 이는 Fig. 3의 signal sequence를 삽입하지 않은 경우와 비교하여 signal sequence를 삽입한 경우에만 pLysS에 의한 lysis 효과가 증대된 것을 알 수 있었다. 이와 비례하여 Fig. 4(B)와 Fig. 5(B)에서와 같이 배지로의 rhEGF 분비는 *E. coli* BL21(DE3)의 경우 발현된 rhEGF 14 mg/l 중에서 9 mg/l가 배지로 분비되어 전체 분비 단백질의 68%에 달하였다. *E. coli* BL21 (DE3, pLysS)의 경우에는 Fig. 5(A)에서 보여지듯이 lysis되어 배지에서 발현된 비율이 13 mg/l 로서 전체 발현량의 대부분을 차지하였다. David 등(2)은 *tac* promoter 다음에 *phoA* signal sequence를 삽입하여 hEGF 유전자를 발현시켰으며, 이때 *E. coli* 전체 단백질의 4%가 periplasm으로 분비된다고 보고하였는데 이에 비

하여 *E. coli* BL21(DE3)의 경우 densitometry에 의한 정량결과 배지로 분비되는 단백질중에서 rhEGF가 38%를 차지할 정도의 높은 순도를 유지하여 산업적인 규모로의 정제 및 기타 공정에 유용하리라 판단된다. Fig. 4(B)에서 보여지듯이 rhEGF의 배지로의 분비발현은 *E. coli* 발현체계에서는 이례적이긴 하지만 아직까지 규명되지 않은 기작에 의하여 haemolysin 등의 발현에서 보고된 예(17)가 있다. 이와 비교하여 pLysS를 host에 삽입시켜 발현한 경우 Fig. 4에서와 같이 배지에서 lysis되는 비율이 증가하여 Table 2에서와 같이 5시간 배양에서 최대 94%에 달하였다.

tac promoter에 의하여 발현되는 pYHB2를 *E. coli* JM105, XL1-Blue 그리고 Novablue에 각각 형질전환하여 rhEGF의 발현과 발현되는 세포내 위치(cellular localization)를 확인한 결과는 Fig. 6에서와 같다. 이들

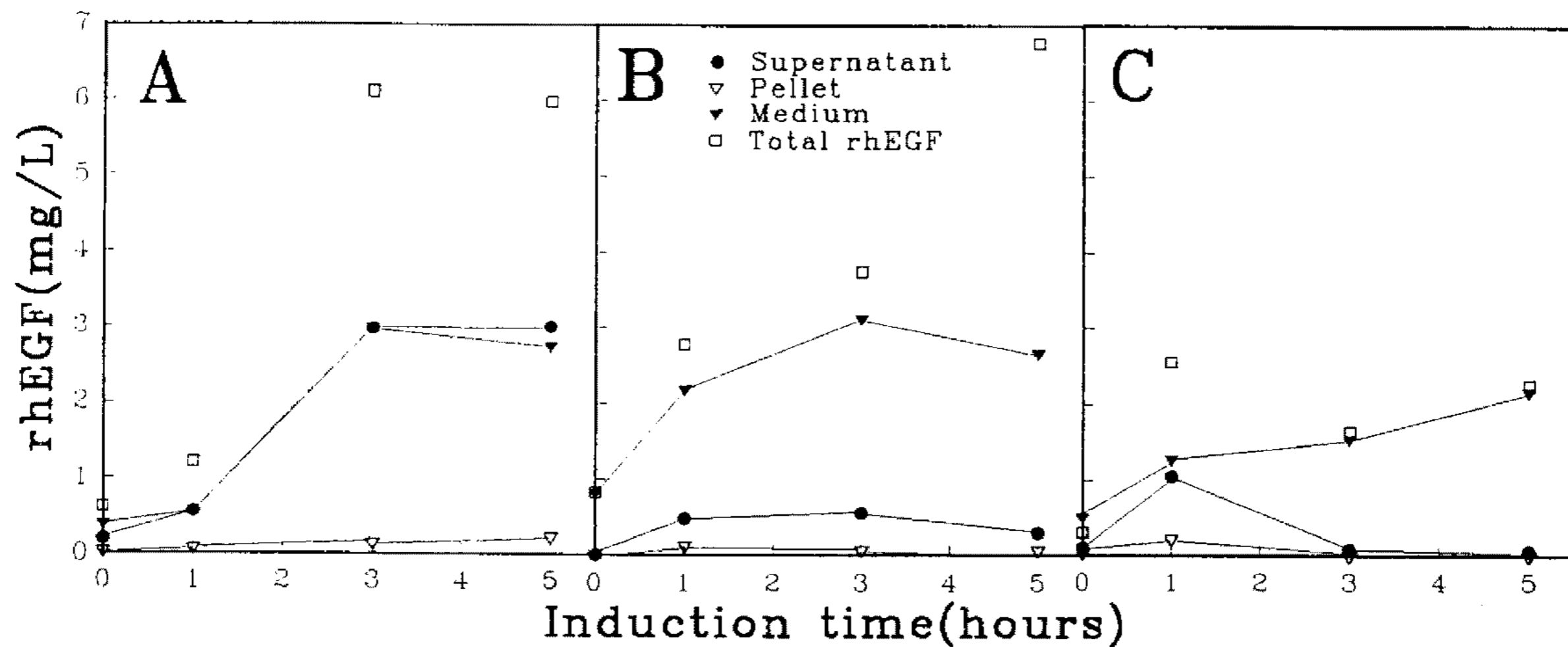


Fig. 6. Cellular localization of rhEGF produced by *E. coli* JM105 (A), XL1-Blue (B), and Novablue (C) carrying pYHB2. Activities of rhEGF were assayed by Radioimmunoassay (RIA) in both the culture medium and the soluble (supernatant) fraction of the sonicated cells after induction with 1 mM IPTG at 37°C, at the times indicated. The activities in the remaining fraction is considered as the cytoplasmic activity (pellets), and the activities in supernatant, pellets, and medium fraction were combined, and considered as the total activity.

균주에서 발현되는 rhEGF의 양은 JM105와 XL1-Blue의 경우에 약 6~7 mg/l이며, Novablue의 경우에는 2.5 mg/l로서 비교적 적어 다양한 host system에 따라서 발현양에 상이한 결과를 보였다. Takanori 등(13)은 다양한 signal sequence와 promoter를 이용하여 제조한 plasmid에서 rhEGF의 발현량을 조사하였을 때, 모든 재조합 plasmid에서 signal peptidase에 의하여 signal sequence가 잘려 periplasm으로 53개의 아미노산으로 구성된 rhEGF가 분비되었으나 항생제 marker로서 ampicillin을 사용하였을 때보다 kanamycin을 사용할 경우에 분비량이 증가하였다고 보고하였다. 본 연구를 통하여 Table 2에서와 같이 T7 promoter, *pelB* signal sequence 등을 갖는 재조합 plasmid인 pYHB101에서 rhEGF의 분비율이 가장 높았으며 이를 이용하면 산업적인 대량생산이 용이할 것으로 판단된다. 아울러 본 연구에 덧붙여서 항생제 marker, 배양조건, rhEGF 유전자의 중복발현 등의 연구를 통하여 *E. coli*에서 보다 효율적인 발현 체계를 확립할 수 있으리라 생각한다.

요 약

전사개시 단계중에 삽입되는 N말단의 methionine이 제거되고 *pelB* signal sequence를 삽입하여 인체 epidermal growth factor(hEGF)가 직접 분비발현 되도록 고안된 T7과 *tac* promoter에 의하여 각각 발현되는 pYHB101과 pYHB2를 제조하였다. 또한 T7 promoter에 의하여 발현되지만 signal sequence를 삽입하지 않은 pYHB1도 제조하여 각각 제조된 재조합 plasmid들의 발현 및 분비효율을 비교하였다. *pelB* signal sequence-hEGF 유전자를 갖도록 제조된 pYHB101을 포함하고 있는 균주가 pYHB1보다 균체 성장속도는 낮았지만

pYHB101을 1 mM IPTG로 5시간 induction 하였을 때 13 mg/l의 rhEGF가 분비발현되어 T7 promoter의 발현 체계를 갖는 경우가 *tac* promoter보다 높은 발현 효율을 보였다. 이때 pYHB101에서 발현되는 rhEGF의 발현량은 준최적 조건에서 14 mg/l이었다.

감사의 말

본 연구는 1994년도 통산산업부의 공업기반기술 개발사업의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Carpenter, G. and S. Cohen. 1975. Human epidermal growth factor and the proliferation of human fibroblast. *J. Cell. Physiol.* **88**: 227-238.
2. David, A.E., R. Matsunami, S.R. Campion, C.D. Stringer, A. Stevens, and S.K. Niyogi. 1987. Cloning of authentic human epidermal growth factor as a bacterial secretion protein and its initial structure-function analysis by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **263**: 12384-12390.
3. Hideo, Y., N. Kazuo, S. Yutaka, and K. Atsushi. 1989. Use of *Bacillus brevis* for efficient synthesis and secretion of human epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 3589-3593.
4. Hirel, P.H., J.M. Schmitter, P. Dessen, G. Fayat, and S. Blanquet. 1989. Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 8247-8251.
5. John, S., E. Cook, I. Fotheringham, S. Pheby, R. Derbyshire, M. Eaton, M. Doel, D. Lilley, J. Pardon, T. Patel, H. Lewis, and L. Bell. 1982. Chemical synthesis

- and cloning of a gene for human β -urogastrone. *Nucleic Acids Res.* **10**: 4467-4483.
6. John, W.T., T. Shrader, G. Rocap, and A. Varshavsky. 1991. The N-end rule in bacteria. *Science* **254**: 1374-1377.
 7. Kishimoto, F., H. Gomi, M. Kanaoka, T. Nakatani, A. Ito, T. Katoh, H. Agui, S. Sumida, and S. Ogino. 1986. Directed expression of urogastrone gene in *Escherichia coli*. *Gene* **45**: 311-316.
 8. Miyake, T., T. Oka, and T. Nishizawa. 1985. Secretion of Human Interferon- α induced by using secretion vectors containing a promoter and signal sequence of alkaline phosphatase gene of *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **97**: 1429-1436.
 9. Oka, T., S. Sumi, T. Fuwa, K. Yoda, M. Yamasaki, G. Tamura, and T. Miyake. 1987. Efficacies of different secretion vectors for secretion of Human Epidermal Growth Factor by *Escherichia coli*. *Agri. Biol. Chem.* **51**: 1099-1104.
 10. Blum, P., M. Velligan, N. Lin, and A. Martin. 1995. DnaK-mediated alterations in human growth hormone proteins inclusion bodies. *Bio/technology*. **10**: 301-304.
 11. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning*, 2nd ed., Cold Spring Harbor, New York.
 12. Studier, F.W., A.H. Rosenberg, J.J. Dunn, and J.W. Dubendorff. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**: 60-89.
 13. Takanori, O., S. Sakamoto, K. Miyoshi, T. Fuwa, K. Yoda, M. Yamasaki, G. Tamura, and T. Miyake. 1985. Synthesis and secretion of human epidermal growth factor by *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **82**: 7212-7216.
 14. Tedin, K., U. Altanerova, and U. Blasi. 1995. Construction of a transducible cassette encoding an inducible bacteriophage T7 RNA polymerase gene 1 in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Methods*. **21**: 173-181.
 15. Urdea, M.S., J.P. Merryweather, G.T. Mullenbach, D. Coit, U. Heberlein, P. Valenzuela, and P.J. Barr. 1983. Chemical synthesis of a gene for human epidermal growth factor urogastrone and its expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **80**: 7461-7465.
 16. Lei, S.P., H.C. Lin, S.S. Wang, J. Callaway, and G. Wilcox. 1987. Characterization of the *Erwinia carotovora pelB* gene and its product pectate lyase. *J. Bacteriology*. **169**: 4379-4383.
 17. Blight, M.A. and I.B. Holland. 1994. Heterogeneous protein secretion and the versatile *Escherichia coli* haemolysin translocator. *TiBtech*. **12**: 450-463.
 18. Neubauer, P., K. Hofman, O. Holst, B. Mattasson, and P. Kruschke. 1992. Maximizing the expression of a recombinant gene in *Escherichia coli* by manipulation of induction time using lactose as inducer. *App. Microbial. Biotech.* **36**: 739-744.

(Received 25 March 1996)