

Neurospora crassa メタロチオネイン遺伝子の構築と大腸菌中での発現

杉本 学¹⁾・江崎 信芳²⁾・田中英彦³⁾・左右田 健次²⁾

(¹⁾現・岡山大学資源生物科学研究所*, (²⁾京都大学化学研究所**, (³⁾現・岡山大学農学部***)

Construction and Expression of Metallothionein Gene of *Neurospora crassa*

Manabu SUGIMOTO¹⁾, Nobuyoshi ESAKI²⁾, Hidehiko TANAKA³⁾ and Kenji SODA²⁾

¹⁾Research Institute for Bioresources, Okayama University

²⁾Institute for Chemical Research, Kyoto University

³⁾Faculty of Agriculture, Okayama University

We have attempted to synthesize the *Neurospora crassa* copper metallothionein (MT) gene, clone it in the β -galactosidase gene, and express the MT- β -galactosidase fused gene in *Escherichia coli* cells. The fused protein in which the amino and carboxy termini of MT are linked to the β -galactosidase through methionine residues was purified by a single step, the immunoaffinity chromatography with an anti- β -galactosidase antibody. The MT was prepared by cyanogen bromide cleavage of the fused protein followed by a reverse-phase HPLC separation. The spectral features of the MT and its copper complex were similar to those of the corresponding native MTs.

メタロチオネイン (MT) は、システイン含量の多い低分子量タンパク質であり、Cu, Zn, Cdなどの重金属と結合する¹⁻⁴⁾。その生理学的意義は、細胞内における必須微量元素の吸収、運搬、貯留あるいは重金属の解毒に関与しているとされている。最近、放射線照射やシスプラチンなどの制ガン剤により引き起こる副作用が、MTの金属に対する親和力と、金属-チオレートクラスター形成によるチオール基の反応性により軽減されることが期待されている⁵⁾。

本研究では、現在知られているMTの中で最小の分子量(約2,200)を持つ*Neurospora crassa*の銅-MT⁶⁾の遺伝子を合成して*Escherichia coli*にクローニングし、MTと β -ガラクトシダーゼ(β -gal)の融合タンパク質の生産を試みた。

*所在地：倉敷市中央2-20-1(〒710)

**所在地：宇治市五ヶ庄(〒610)

***所在地：岡山市津島中1-1-1(〒700)

実験方法

1) 融合遺伝子の構築

MT 構造遺伝子は、*E. coli* のコドン使用頻度を考慮して各々のアミノ酸の最適コドンを選択した。MT 構造遺伝子の両端にはメチオニンに対するコドン ATG を、また、5'-, 3'-末端側には制限酵素 *EcoR* I, *Hind* III の切断部の配列を導入した。この遺伝子は、14-20塩基長のオリゴヌクレオチド10種類を DNA 合成機で合成し、これらを接着、結合することにより構築した。合成 MT 遺伝子を pUC18ベクターの *EcoR* I, *Hind* III 部位に挿入し、*lacZ'* 遺伝子と読み取り枠があった融合遺伝子 pFMT70 を作製した⁷⁾ (Fig. 1)。

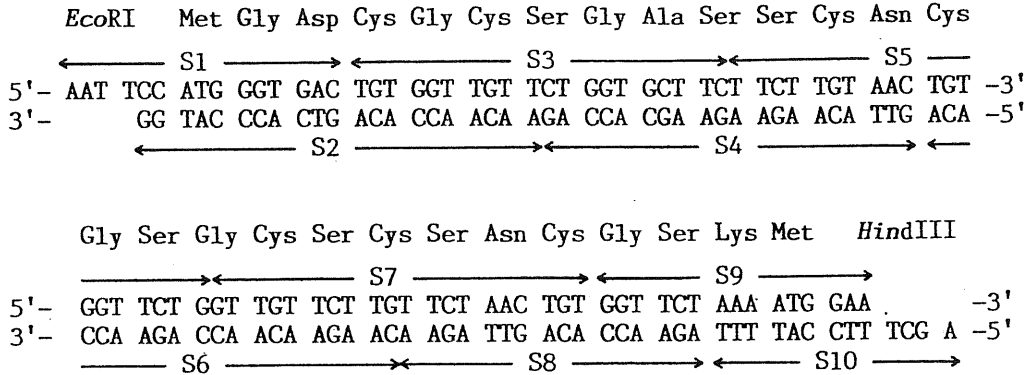


Fig. 1. Nucleotide and amino acid sequences of the synthetic *N. crassa* MT gene. Individual oligonucleotides(S1-S10)are shown by arrow.

2) 融合タンパク質の精製

E. coli JM109を pFMT70で形質転換して得たクローン株の菌体抽出液を抗β-gal抗体アフィニティークロマトグラフィー (ProtoSorbTM immunoaffinity adsorbent, Promega Biotec) に供し、融合タンパク質を精製した。

3) MTの単離

融合タンパク質をプロモシアン処理した⁸⁾。得られたMTペプチドは逆相高速液体クロマトグラフィーを用いて単離した。

4) アポMT, 銅結合MTの調製

HPLCで単離したMTは、嫌気条件下水素化ホウ素ナトリウムで還元し、塩酸でpHを1とした(アポMT)。アポMTを硫酸銅存在下、トリスでpHを8に調整した後、ゲル濾過で銅結合MTを得た⁷⁾。

結果と考察

融合タンパク質は、抗β-gal抗体カラムを用いて精製した。SDS電気泳動分析の結果、分子量約116,000の融合タンパク質を1段階で約90%の純度に精製することができた (Fig. 2)。また、融合タンパク質は、クローン株培養液150mlから1.6mg得ることができた。

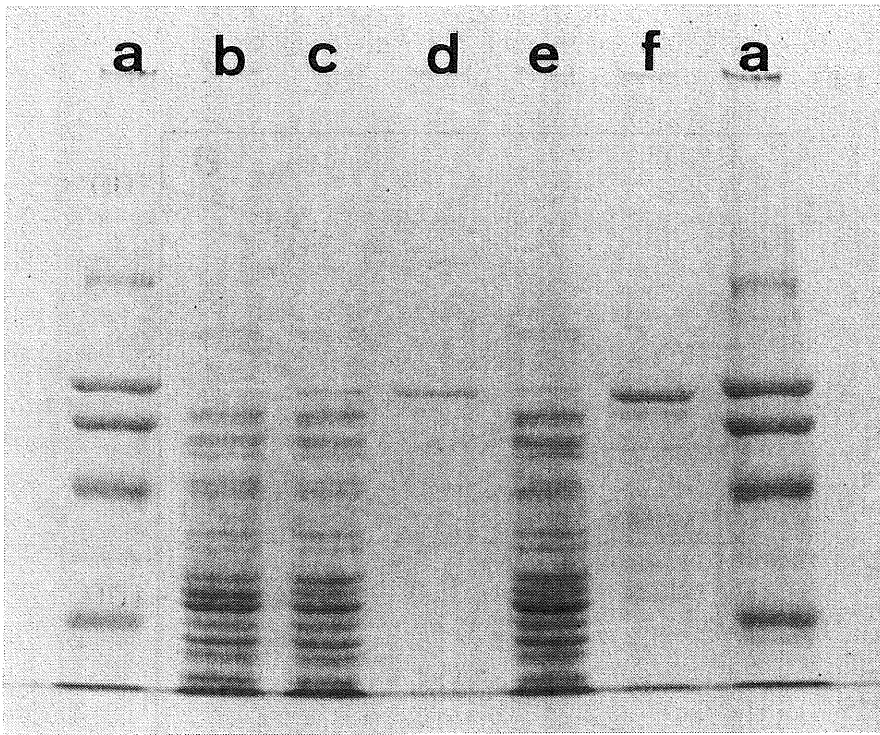


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel (7.5%) electrophoresis of the MT- β -gal fused protein. Protein was stained with Coomassie brilliant blue R-250. a, molecular weight markers (top to bottom, 205,000, 116,000, 97,400, 66,000, 45,000); b, crude extract of host *E. coli* JM109; c, crude extract of *E. coli* JM109-pUC18; d, β -gal purified from *E. coli* JM109-pUC18 by immunoaffinity chromatography; e, crude extract of *E. coli* JM109-pFMT70; f, MT- β -gal fused protein purified from *E. coli* JM109-pFMT70 by immunoaffinity chromatography.

融合タンパク質における MT 部分の N 末端側, C 末端側には共にメチオニン残基を導入している (Fig. 1)。そこで, 融合タンパク質をプロモシアンで処理し, MT を逆相高速液体クロマトグラフィーで単離した。その結果, MT は保持時間31分にピークとして溶出された (Fig. 3)。このピークを分取し, アミノ酸分析を行った結果, 単離されたペプチドは MT であることがわかった。

次に, アポ MT と銅結合 MT の吸光度スペクトルを調べた。アポ MT は260nm 以上の波長では光吸収はなかった。これは, MT が芳香族アミノ酸残基を欠いていることによる。銅結合 MT は, 260nm 付近に波長の肩を示し, 銅-チオネインクラスターを形成していることがわかった⁹⁾ (Fig. 4)。

以上の結果, MT を融合タンパク質として *E. coli* 中で発現させることにより, MT を容易に得ることが可能となった。大量生産が可能となった MT を用いて, MT-金属結合様式や生物学的機能について今後は検討を加えたいと考えている。

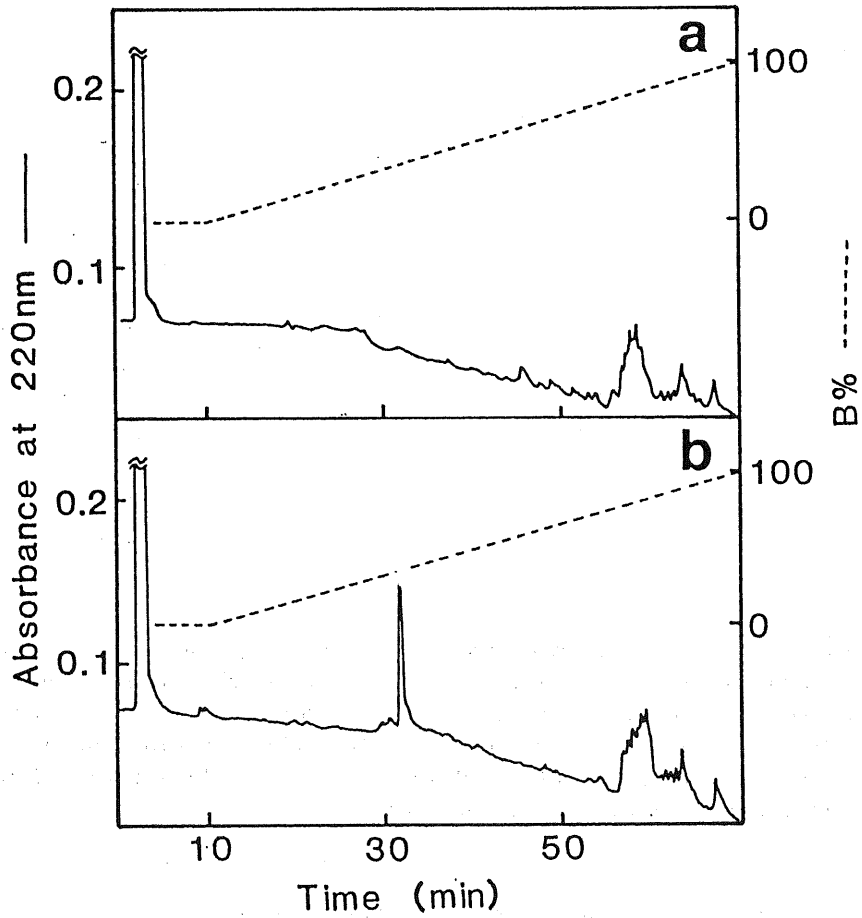


Fig. 3. Reverse-phase HPLC profiles of peptides from protein by cyanogen bromide cleavage. The peptide mixture was applied to a column equilibrated with 0.07% TFA. The column was washed with the same buffer at a flow rate of 0.8 ml/min. followed by elution with a linear gradient of between 0.07% TFA in water and 0.07% TFA in 70% acetonitrile (B%). a; *E. coli* JM109-pUC18, b; *E. coli* JM109-pFMT70.

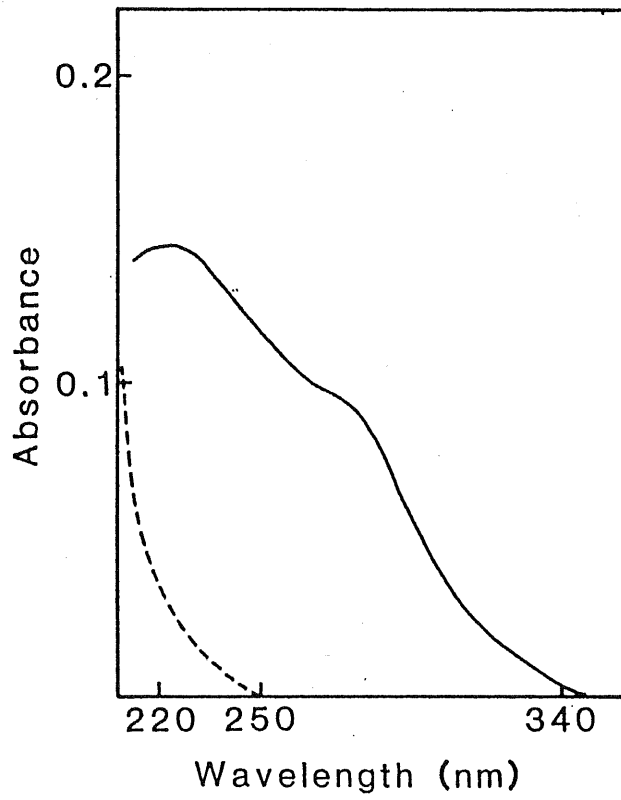


Fig. 4. Absorption spectra of the MT derivative with an extra homoserine residue at the carboxy terminus. The solid line shows the spectrum of the copper complex of the MT derivative in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6), and the dotted line shows the spectrum of the apoMT derivative in 50 mM HCl.

文 献

1. KAGI, J. H. R., Y. KOJIMA, M. M. KISSLING and K. LERCH (1980) *Ciba Found. Symp.* 72 : 223
2. NORDBERG, M. and Y. KOJIMA (1979) *Metallothionein*, ed. by Kagi, J. H. R. and M. Nordberg, bairkhauser Verlag, Basel : pp. 41-117
3. KAGI, J. H. R. and B. L. VALLEE (1960) *J. Biol. Chem.* 235 : 3640
4. PULIDO, P., J. H. R. KAGI and B. L. VALLEE (1966) *Biochemistry* 5 : 1768
5. KELLEY, S. L., A. BASU, B. A. TEICHER, M. P. HACKER, D. H. HAMER and J. S. LAZO (1988) *Science* 241 : 1813
6. LERCH, K. (1980) *Nature* 284 : 368
7. SUGIMOTO, M., T. OIKAWA, N. ESAKI, H. TANAKA and K. SODA (1988) *J. Biochem.* 104 : 924
8. GROSS, E. and B. WITKOP (1962) *J. Biol. Chem.* 237 : 1856
9. BELTRAMINI, M. and K. LERCH (1983) *Biochemistry* 22 : 2043