

专论与综述

金属硫蛋白的研究进展及应用前景

张博润 蔡向荣* 怀文辉 何秀萍

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

关键词: 金属硫蛋白, 物化特性, 基因克隆和表达, 应用

中图分类号: Q5.51 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(1999)-05-0355-03

金属硫蛋白(Metallothionein, 简称 MT)是一类广泛存在于生物体内的低分子量、富含 Cys、能被金属诱导的金属结合蛋白。自从 1957 年 Margoshes 等人^[1]在马肾脏中首次发现 MT 以来,人们对不同来源的 MT 进行了较系统的研究。鉴于 MT 具有广泛的应用前景,现将有关 MT 的研究进展作简要综述。

1 MT 的分类和命名

1.1 MT 的分类 根据 MT 的结构差异,一般将其分成 3 类^[2]:

第 1 类: MT 的氨基酸序列中的半胱氨酸位置与最先从马肾中分离的 MT 的氨基酸序列中的半胱氨酸位置紧密相关的多肽。所有哺乳动物的 MT 都属于这一类。其它来源的 MT,只要其基本结构与哺乳动物的 MT 相似亦归这一类。

第 2 类: MT 氨基酸序列结构中的半胱氨酸位置与马肾 MT 关系较远,与哺乳动物 MT 没有或很少有相似的进化关系。如酿酒酵母和某些高等植物的 MT 属于这一类。

第 3 类: 非典型的 MT, 是一类由非转译合成的金属硫醇盐多肽, 由 γ -谷氨酰半胱氨酰基单元组成。这类 MT 主要来源于真核微生物, 常称之为类 MT。依据它们之间的差异, 又可分为 4 种类 MT: 第 1 种: 含大量的酸性氨基酸残基, 天冬氨酸含量大于 14%, 谷氨酸含量大于 18%, 这类 MT 仅被 Cu、Ag 诱导。第 2 种: 它们由同样的肽基亚单位构成, 基本结构为 γ -谷氨酰肽或称 $(\gamma\text{-EC})_n\text{G}$ 或 $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ 。第 3 种: 这种类 MT 不含芳香族氨基酸, 分子量为 9~9.5kD。第 4 种: 这种类 MT 的分子量为 7kD, 具有重复 Cys-Xaa-Cys 多肽序列的二分子。

1.2 MT 的命名法^[2] 根据与 MT 结合的金属的不同, 对只含一种金属, 例如 Cd 或 Cu 等, 可分别定名为镉金属硫蛋白或铜金属硫蛋白等; 还可根据结合金属的摩尔含量写成 $\text{Cd}_7\text{-MT}$, $\text{Zn}_7\text{-MT}$ 等 (表示每分子结合 7 个分子 Cd 或 Zn)。对于含一种以上金属, 如同时含 Cd 和 Zn 时, 可写成 $\text{Cd}_x\text{Zn}_y\text{-MT}$ 。对其分子结构上的差别, 可用罗马数字和小写字母标出, 例如人 MT-II, MT-I_b, MT-II_a 等。

2 MT 的分离纯化及检测方法

2.1 MT 的分离纯化^[3] 分离纯化 MT 的常用方法是凝胶过滤和离子交换技术相结合的层析法, 微量分离可以采用 HPLC 法, 但是凝胶过滤法不能将 MT 的不同“亚型”分开。Klaassen 等建立的阴离子交换的 HPLC-AAS 法可将 MT 的亚型分开, Klauserdeng 建立的反相 HPLC 法可分离不同来源的 MT。此外, 也有采用 DEAE-Sepharose fast flow 方法分离 MT 的。这些分离纯化方法有其明显的优点, 但也有不足之处, 如何建立简便分离纯化 MT 的方法仍是一个热门课题。

2.2 MT 的检测方法^[4] 尽管对 MT 的研究已有 30 余年的历史, 但至今仍缺乏一种简便、灵敏的测定方法。现有的检测方法都是建立在 MT 的理化特性以及免疫学特性基础上。可分为以下几类: (1) 测定结合金属以计算 MT 的含量, 如镉血红蛋白饱和法和银血红蛋白饱和法。(2) 测定 SH 基以计算 MT 的含量, 主要有微分脉冲极谱法和循环伏安法。(3) 测定蛋白含量: 包括免疫

* 安徽农大代培硕士研究生, 现在青岛三生生物有限公司工作

收稿日期: 1998-08-17, 修回日期: 1998-10-28

学方法,如RIA,ELISA等;又如色谱分析法,如HPLC和HPLC-AAS。从方法学上讲,测定组织器官中的MT的含量,首推HPLC-AAS和血红蛋白饱和法,测定血液的MT含量,选用RIA和ELISA法为佳。

3 MT的物理化学特性

3.1 MT的一般理化特性^[5] 研究表明,不同来源的MT的分子量一般为6.5kD。从不同哺乳动物的组织中提取的MT的分子大小和形状基本是一致的。从粗糙脉孢菌中分离出的MT,其分子量比哺乳动物的MT低得多,但基本结构十分相似。能使各种MT中的50%金属离子发生解离的pH为:Zn-MT, pH3.5~4.5;Cd-MT, pH2.5~3.5;Cu-MT, pH低于1。MT的存在形式和稳定性与它结合的金属种类及环境的pH密切相关,MT的光吸收特征除与它的氨基酸组成有关外,也与它所结合的金属种类相关。各种MT具有其特征吸收峰: Cd-MT为250nm, Zn-MT为220nm以及Cu-MT为270nm。脱掉了金属的硫蛋白在190nm处有一明显的肽键吸收峰。

3.2 MT的结构特性^[6] 对MT序列分析发现,MT在生物进化上是很保守的,尤其是哺乳动物的MT均含61个氨基酸残基,其中有38个氨基酸残基相同,不含芳香族氨基酸和组氨酸,氨基末端皆为N-乙酰甲硫氨酸,羧基末端皆为丙氨酸,更为惊奇的是所有这些MT都有20个半胱氨酸。第1类MT含有很高的半胱氨酸和丝氨酸,不含芳香族氨基酸,具有很高的同源性。如哺乳动物的MT,半胱氨酸含量占总氨基酸残基的33%,丝氨酸含量占总氨基酸残基的14%,并且都含有同源序列Pro-Asn(Asp)-Cys-Ser(Thr)-Cys。第2类MT的结构与第1类MT相似,但不同源或很少同源,Cys和Ser含量较第1类MT低,有的还含有酪氨酸、组氨酸和苯丙氨酸等。第2类MT也分别含有同源序列Pro-Asn-Cys-Ser-Cys和Asn-Cys-Thr-Cys。第3类MT一般只含Cys、Glu和Gly,这类MT的硫含量较高(>13%),其结构通式为 $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gly}[(\gamma\text{-EC})_n\text{G}]$, $n=2\sim11$ 或 $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-}\beta\text{-Ala}[(\gamma\text{-EC})_n\text{-}\beta\text{-Ala}]$, $n=2\sim6$ 。

3.3 MT的空间结构及金属结合位点 通过圆二色性和晶体结构研究表明,MT分子中不含 α -螺旋和 β -折叠片,而存在一种十分坚固的构象,因此它具有很强的抗热性和抗蛋白酶消化的能力。MT的三级结构以两个结构域为特征,即分子前半部(氨基端头30个氨基酸残

基)为 β 结构域;分子后半部(羧基端的30个或少于30个氨基酸残基)为 α 结构域,彼此都单独呈球状,由第30位和第31位的氨基酸残基连接两部分而使整个MT分子呈哑铃状。

4 MT的分子生物学研究

4.1 MT基因结构^[6,7] 哺乳动物MT基因一般由3个外显子和两个内含子组成,3个外显子分别对应于MT序列中的1-9,10-31和32-61位氨基酸残基。前一个外显子编码MT蛋白 β 结构域,后两个外显子编码MT蛋白的 α 结构域。一般来说,不同亚型的MT基因位于同一染色体,人类有4个MT基因簇,主要位于染色体16。比较几种哺乳动物MT基因发现,其密码区是相当保守的。

植物MT基因的结构研究报道不多。微生物MT基因研究较为详细的有酿酒酵母、光滑球拟酵母和粗糙脉孢菌。酵母菌Cu-MT的结构基因位于染色体VIII远离着丝粒42分摩(基因交换单位)位置的CUP1基因座中,它编码53个氨基酸残基组成的肽链。

4.2 MT基因放大^[6,7] 研究证明中国仓鼠卵细胞对Cd的抗性增强是由于其染色体上的MT-1和MT-2基因放大的结果。酿酒酵母对Cu或Cd的抗性水平和细胞内Cu-MT或Cd-MT的水平及CUP1基因座的拷贝数是成比例的。光滑球拟酵母Cu的抗性水平也是如此,哺乳动物细胞MT基因放大的最大水平可达60倍,酵母菌中CUP1基因座串联重复单位可达15~60拷贝。关于酵母菌MT基因放大机理还不太清楚,Pavlikis等人认为主要是由于减数分裂过程基因转换造成的,而Fogel等则认为这是由于CUP1基因座在染色单体DNA上重复跳跃,在配对链上形成一个或多个未配对的单链环,若单链环被复制、修复,CUP1基因座被放大。

4.3 MT基因的调控^[6~8] 采用诱变、缺失、插入及序列分析等手段研究MT基因的调控机理,可望确定MT基因中的各种调节成分。已知小鼠MT-I,MT-II和人的MT-II_A基因的启动子中有4段保守的序列,其中之一是TATAAA序列,另一组序列与重金属的调节有关。人和鼠的MT基因的金属调节成分在结构上相似,都具有5'TCGCCCGCTC.....3'序列。金属对MT基因转录的调控是通过MT本身,还是另一种金属结合蛋白,尚有待进一步肯定。除金属外,人和动物MT基因的调控

还受许多其它的因素调节,如糖皮质激素、干扰素、白细胞介素-1等。对植物 MT 基因的调控机理研究甚少。微生物 MT 基因的调控研究主要以酵母菌为材料。酵母菌 MT 基因转录具有与其它真核生物共同的分子调控机制。酿酒酵母 MT 的基因位于染色体 VIII 的 CUP1 基因座中,其 UAS 位于 CUP1 基因座转录起始点上游 -105 至 -180 位置。在 UAS 中于 -108 至 -139 之间发现有 32bp(称为 UASp 因子)和 34bp(-141 至 -181 的位置,称为 UASd 因子)序列两次重复,其中 UASp 是不完全重复序列,较 UASd 缺少 Cu 诱导的三个关键性碱基(即 -140、-142 位置的 G 和 -141 位置的 C)。通过用 UAS 上的点突变和甲基化干扰的方法对 ACE1 蛋白与 UAS 上形成的 DNA 复合物进行分析,发现 UAS 上 G-128、G-140、G-142 三个位点是体内转录活性所要求的最基本的碱基。酵母菌 MT 基因转录调控除受 ACE1 蛋白反式作用因子的正控制方式外,MT 本身就是其基因表达的一个负调控因子。当酵母细胞处于大量 Cu 离子环境时,进入细胞的 Cu 离子激活 ACE1 蛋白与 UAS 结合,启动 MT 基因转录,转录后形成的 MT 就成为一个有活性的阻遏子。最近的研究结果表明酵母菌的 MT 基因还存在葡萄糖阻遏 MT 基因座转录的负调控。

4.4 MT 基因的克隆和表达^[9~13] Jeyaprakash 等证明,在酵母液体过夜培养物中加 Cd(0.01 μ mol/L)或 Cu(50 μ mol/L)能诱导染色体或质粒携带的 CUP1 基因表达。在高拷贝质粒 YEp351 中克隆 3.3kb 酵母基因组 DNA 片段能使缺失 CUP1 基因菌株 LS70-4 β Δ (CUP1 Δ)恢复铜抗性但不能恢复镉抗性。Sayer 等用 PCR 技术研究了酿酒酵母 Cu MT 基因在 *E.coli* 中的克隆和表达和重组蛋白的特性。本研究组首次进行了桑蚕 MT 基因的克隆和表达研究,共获得三个阳性转化子,转化子对 Cu 离子的抗性比受体菌 DH5 α 对 Cu 离子的抗性明显提高。Joanne L. 等将 *C. glabrata* 的 MT 基因克隆到对重金属敏感的酵母菌中,可明显提高酵母菌的抗性。

5 MT 的应用前景^[14,15]

由于 MT 具有十分重要的生理学功能,因此如何开发利用 MT 已成为当前研究的热点课题。尽管可以从各种动物器官、植物组织分离提纯 MT,但从动物器官或植物组织分离提取 MT 有其不利因素。而利用微生物,

特别是酵母菌生产 MT,以其无毒、易培养和不受时空限制而具有独特的优点,已引起科学家们更大的兴趣,利用微生物生产 MT 有两条有效途径:一是选育高产 MT 的菌株用于生产;二是利用基因工程技术构建 MT 工程菌。随着对 MT 的深入研究,MT 将在以下几方面得到重视和发展:1)可作为导向药物的载体;2)可作为生物药物进行开发利用;3)可用于金属的回收和清除环境中的重金属污染;5)利用 MT 基因的高度可诱导性,可将 MT 的启动子分别连接到目的基因前面,建立一系列外源基因的高效调控的表达系统,目前已用于乙肝表面抗原、干扰素、生长激素等基因的高效表达,并取得了可喜的结果。

参 考 文 献

- [1] Margoshes M, Vallee B L. *J Am Chem Soc*, 1957, **79**:4813~4814.
- [2] Kajima Y. *Methods Enzymol*, 1991, **205**:8~10, 419~421.
- [3] Geesey G G, Bremer P J, Smith J J *et al.* *Can J Microbiol*, 1992, **38**:785~793.
- [4] Olafson R W. *Methods Enzymol*, 1991, **205**:283~286.
- [5] Turner J S, Robinson N J. *J Industrial Microbiol*, 1995, **14**:119~125.
- [6] Mehra R K, Tarbet E B, Gray W R *et al.* *J Biol Chem*, 1990, **265**(11):6369~6375.
- [7] Zhou P, Thiele D J. *BioFactors*, 1993, **4**:105~115.
- [8] Zhou P, Thiele D J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**(14):6112~6116.
- [9] Jeyaprakash A, Welch J W, Fogel S. M G G, 1991, **225**:363~368.
- [10] Sayer Z, Brouillon P, Vonstantin C E *et al.* *Eur J Biochem*, 1993, **212**:521~528.
- [11] Jensen L T, Howard W R, Strain J J *et al.* *J Biol Chem*, 1996, **271**:18514~18519.
- [12] Pumpel T, Pernfuß B, Pigher B *et al.* *J Industrial Microbiol*, 1995, **14**:213~217.
- [13] Odawara F, Kurasaki M, Kurasaki M S *et al.* *J Biochem*, 1995, **118**:1131~1137.
- [14] Kambe H H, Sugawara K, Yoda K. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, **8**(3):373~379.
- [15] Fischer E H, Davie E W. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(7):3333~3334.