

인체 tau 유전자의 cDNA 클로닝 및 *Escherichia coli*에서의 발현

정상호* · 前田忠計¹ · 柳川弘志¹

목원대학교 미생물학과, ¹日本 三菱化成生命科學研究所

정상적인 세포에서 tau 단백질은 신경세포의 축색돌기에 있는 미세소관(microtubule)과 결합하고 있지만, Alzheimer병 세포의 경우 그 단백질은 몇몇 신경세포의 체세포 수지상조직(somatodendrite) 부위에 고착되어서 이중나선 섬유(paired helical filament; PHF)의 주성분을 이루게 된다. 따라서 뇌에 PHF가 축적되는 특성 파악과 그들을 야기시키는 요인분석의 일환으로 다량의 순수한 tau 단백질을 확보하기 위하여 본 연구에서는 인체 tau 유전자의 cDNA를 클로닝하고 *Escherichia coli*에서의 발현을 유도하였다.

KEY WORDS □ human tau cDNA, cloning, expression, *Escherichia coli*

미세소관(microtubule)에 결합하여 있는 tau 단백질은 신경계에서 미세소관의 형성과 그 안정성을 촉진해준다(2,23). Tau 단백질은 여러가지 동종형태(isoform)로 존재하는데 그 이유는 하나의 유전자가 선택적인 RNA splicing 방법을 취하기 때문이며, 성장시기나 세포유형에 따라 서로 다른 형태의 단백질이 발현된다(5, 6, 11, 15, 16). 정상적인 세포에서 tau 단백질은 신경세포의 축색돌기에 있는 미세소관과 결합하고 있지만, Alzheimer병 세포의 경우 그 단백질은 몇몇 신경세포의 체세포 수지상조직(somatodendrite) 부위에 고착되어서 이중나선 섬유(paired helical filament; PHF)의 주성분을 이루게 된다(8, 13, 25). 클로닝된 유전자 분석에 의한 tau 단백질의 1차구조를 보면 31개 또는 32개의 아미노산 잔기로 구성된 부위가 이 단백질 분자의 C-말단 중간에 3번 또는 4번씩 반복되어 있고 어떤 것은 부가적으로 N-말단 부위에 29개 또는 58개의 아미노산 잔기가 삽입되어 있어서 사람의 경우 전부 6가지의 형태가 존재한다(4, 5, 6). Tau 단백질 중에서 가장 짧은 것은 352개의 아미노산 잔기로 구성된 것으로 3번 반복부위를 갖고 있으며, 반면에 가장 긴 것은 441개의 아미노산 잔기로 구성된 것으로 4번 반복부위 및 58개의 아미노산 삽입부위를 갖고 있다. RNase protection 분석에 따르면 태어나 성인의 뇌에서는 3번 반복 형태의 것이 모두 발견되는 반면, N-말단 아미노산 삽입체나 4번 반복 형태의 것은 성인에서만 발견되었다(4, 5, 6). 유전자 클로닝이나 단백질의 아미노산 서열 결정으로 확인된 바에 의하면 아미노산 반복부위는 PHF의 단백질가수분해효소에 저항성을 갖는 자리(protease resistant)에 위치해 있다(14). 또한 정상적인 tau와 PHF tau와의 주된 생화학적 차이점을 보면 첫째로 PHF tau는 정상 tau에 비해 상당히 불용성이고 둘째로 PHF tau는 인산화에 따라 AT8과 같은

항체와 반응하므로 비정상적으로 인산화된 상태일 것으로 추정되며, 셋째로 PHF tau는 SDS gel상에서의 전기영동시 정상 tau보다 이동성이 더 늦기 때문에 분자량이 보다 크다고 추정되므로 인산화와의 관련이 있을 것으로 추측된다(1, 9, 17).

현재 대부분의 Alzheimer병에 대한 연구는 뇌에 PHF가 축적되는 특성 파악과 그들을 야기시키는 요인 분석에 그 목적을 두고 있다. 정상적인 tau와 PHF tau간의 차이점 및 그 유발요인을 규명하기 위해서는 tau 단백질구조의 상세한 분석이 요망된다. Tau 단백질과 관련된 대부분의 실험에서 보면 뇌의 미세소관 조제물로부터 이 단백질들을 추출하였기 때문에 여러가지 형태의 tau 혼합물이 사용되므로 인산화 상태를 정확히 파악하기 어렵다. 따라서 최근에는 재조합 tau 단백질을 이용하는 노력이 시도되고 있다(1, 7, 24). 그리하여 서로 다른 형태의 tau 단백질의 구조는 어떠한지, tau 단백질은 서로 어떻게 결합하는지, 그리고 PHF가 형성되는데 반복부위가 특정한 역할을 하는지 등의 의문점을 해결하는데 노력이 모아지고 있다. 본 연구에서는 다량의 순수한 tau 단백질을 확보하는 것이 선결문제라 생각되어 인체의 tau 단백질 유전자 cDNA를 재조합 방법에 따라 클로닝하고 *Escherichia coli*에서의 발현을 유도하였다.

재료 및 방법

박테리아 균주, 플라스미드 및 파아지

유전자 클로닝 및 발현에 필요한 플라스미드 pUC 18의 증식에는 *E. coli* JM109 균주를, pAR3040의 증식에는 균주 BL21(DE3)(21)를 각각 사용하였다. 그리고 필요한 인체 뇌의 cDNA library(λ ZAPII)는 일본 후쿠오카 대학교의 三角佳生으로부터 분양 받

았으며 파아지 ZAPII는 *E. coli* LE392에서 증식하였다.

플라스미드와 파아지 DNA의 분리 및 조작

플라스미드 DNA는 Plasmid Quick™ Column 및 Strataclean™ resin(Stratagene)을 이용하여 분리하였고 파아지 DNA는 plate lysate 방법(19)에 따라 분리하였으며, DNA의 제한효소 처리나 연결 과정 등은 공급자(GIBCO BRL)가 제시한 자료에 따라 행하였다. 또한 원하는 DNA 단편들은 agarose gel 전기영동 후 GENE CLEAN II kit(BIO 101 Inc.)를 이용하여 회수하였다.

박테리아의 형질전환

플라스미드 DNA를 *E. coli* 내로 도입할 때는 공급자(Takara)가 제시한 수용세포(competent cell)와 그 방법에 따라 행하였다.

Polymerase chain reaction (PCR)

분리한 파아지 λZAPII DNA는 제한효소 *EcoRI* 으로 절단한 후 PCR을 하기 위한 주형으로 사용하였으며, PCR 반응은 공급자(New England BioLabs)가 제시한 자료와 ASTEC PC-700(Programmable Temperature Cycler)을 사용하여 행하였다.

DNA 염기서열 결정

DNA의 염기서열은 dideoxy chain termination 방법(20)에 따라 Sequenase Version 2.0(United States Biochemical)을 사용하여 행하였다.

SDS-Polyacrylamide Gel 전기영동

발현된 유전자 산물을 확인하기 위하여 10% SDS-polyacrylamide gel을 사용하였으며 필요한 모든 재료 및 방법은 Sambrook 등(19)에 따랐다.

N-말단 아미노산 서열

발현된 단백질이 인체 tau 단백질임을 확인하기 위하여 SDS-polyacrylamide gel상에 전개된 단백질을 Eckerskorn 등(3)의 방법에 따라 siliconized-glass fiber membrane에 electroblotting하였다. Coomassie blue로 membrane을 염색한 후 재조합 인체 tau 단백질에 해당하는 밴드를 질취하여 중류수로 세척

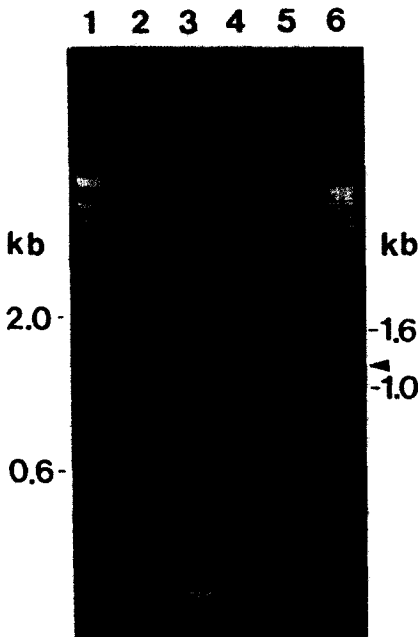


Fig. 1. Amplification of human tau gene cDNA by PCR.

The 100 μl reaction mixture contained 1 μM of each primer, 200 μM of each dNTP, DNA template, 10 μl of 10×PCR buffer, and DNA polymerase. The PCR was carried out by template denaturation at 94°C for 4 min followed by 30 cycles of 57°C, 1 min, 73°C, 2 min, 94°C, 1 min, followed by a final cycle of 57°C, 1 min, and 73°C, 10 min. After reaction 10 μl samples were analyzed by 0.8% agarose gel electrophoresis. Lanes 1, λ *HindIII*; lane 2, control DNA template (λZAPII), 200 ng and polymerase, 1 unit; lane 3, DNA template, 200 ng and polymerase, 1 unit; lane 4, DNA template, 400 ng and polymerase, 1 unit; lane 5, DNA template, 400 ng and polymerase, 2 units; and lane 6, 1 kb DNA ladder(BRL).

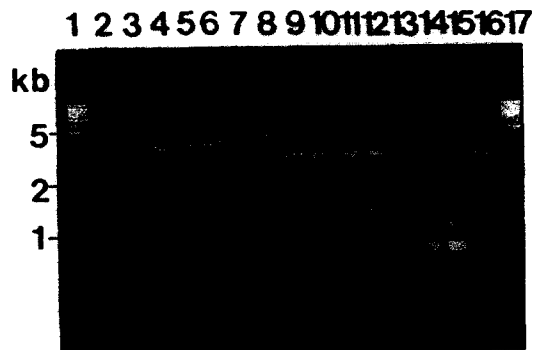


Fig. 2. Agarose gel electrophoretic analysis of pSC7 DNA.

A positive plasmid DNA was obtained and analyzed by several restriction enzymes. Lanes 1, 1 kb DNA ladder(BRL); 2, uncut DNA; 3, DNA digested with *XhoI*; 4, DNA digested with *PstI*; 5, DNA digested with *SmaI*; 6, DNA digested with *HindIII*; 7, DNA digested with *XhoII*; 8, DNA digested with *EcoRI*; 9, DNA digested with *BamHI* + *Sall*; 10, DNA digested with *BamHI* + *EcoRI*; 11, DNA digested with *SphI* + *EcoRI*; 12, DNA digested with *Sall*; 13, DNA digested with *BclI* + *Sall*; 14, DNA digested with *XhoII* + *Sall*; 15, DNA digested with *XhoII* + *EcoRI*; 16, DNA digested with *PstI* + *EcoRI*; and 17, 123 bp DNA ladder(BRL).

TGTGACTATGAGTAACTTGAACGAG

1 ATG OCT GAG GCG GCG CAG GAG TTC GAA GTG ATG GAA GAT CAC OCT GCG GCG TAC GCG TTS GCG GAC AGG AAA GAT
 164 Ala Gln Pro Arg Gln Gln Pro Gln Val Met Gln Asp His Ala Gly Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp

76 CAG GGG GCG TAC ACC GAT CAC CAA GAG GGT GAC AGG GAG OCT GCG AAA OCT GAA GAA GCA GCG ATC
 26 Gln Gly Gly Tyr Thr Met His Gln Asp Gln Gln Gly Ala Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Ala Gln Ala Gly Ile

151 GGA GAC ACC GCG ACC GTS GAA GAC GAA GGT GGT GGT CAG GTG ACC GAA OCT GTC ATG GTC AAT AAA ACC AAA GAC
 51 Gly Asp Thr Pro Ser Leu Gln Asp Gln Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp

226 GGG ACT GGA AGC GAT GAC AAA AAA GCG AAG GGG OCT GAT GAT AAA ACC AAG ATC GCG ACA CCG GCG GGA GCA GCG
 76 Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala

301 CCT GCA GCG CAG AAG GCG CAG GCG ACC ACC ACC AGG ATT GCA GCA AAA ACC CCG GCG OCT GCA AAG ACA GCA GCG
 101 Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Ala Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro

376 AGC TGT GGT GAA OCT GCA AAA TCA GGG GAT CCG ACC GCG TAC ACC ACC CCG GCG TCG CCA GCG ACT CCG GCG ACC
 126 Ser Ser Gly Gln Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Thr

451 GCG TCG GCG ACC GCG TCG CTT GCA ACC GCA GCG ACC CCG GAG CCG AAG AAG GTG GCA GTS GTS GGT ACT GCA GCG
 151 Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Gln Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro

526 AAG TCG GCG TCT TCG ACC AAG ACC GCG CTS GAG ACA GCG CCG GTS GCG ATG GCA GAG CTA AAG AAT GTC AAG TCG
 176 Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Lys Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Lys Lys Ala Val Lys Ser

601 AAG ATC GCG TCG ACT GAG GAG CTS AAG CAG CAG CAG GCA GCG GCG AAG GTS CAG ATA ATT AAT AAG AAG CTS GAT
 201 Lys Ile Gly Ser Thr Gln Ala Lys Lys His Gln Pro Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Ala Lys Lys Lys Leu Asp

676 CTT ACC AAG GTC CAG TCG AAG TGT GCG TCA AAG GAT AAT ATC AAA CAG GTC CCG GGA GCG GCG ACT GTS GCA ATA
 226 Leu Ser Asp Val Gln Ser Lys Lys Cys Gly Ser Lys Asp Ala Ile Lys His Val Pro Gly Gly Ser Val Gln Ile

751 GTC TAC AAA GCA GTC GAG CTS AAG GTS ACC TCG AAG TGT GCG TCA TCA GCG ACC GTC CAG CAG CAG CAG GCA GCG
 251 Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Lys Gln Ala Ile His Lys Lys Lys Pro Gly

826 GGT GCG CAG GTS GAA GGA AAA TCT GAG AAG CTT GAG TTC AAG GAC GCA GCG ACC CAG TCG AAG ATT GGG TCG CTS GAG
 276 Gly Gly Gln Val Gln Val Lys Ser His Lys Lys Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp

901 AAT ATC ACC CAG GTC GTC GCG GGA GAA AAT AAA AAG ATT AAA ACC CAG CAG CTS GCG TTC CAG GAG ACC ACC AAA
 301 Ala Ile Thr His Val Pro Gly Gly Lys Lys Lys Lys Ile Gln Thr His Lys Lys Thr Phe Arg Gln Ala Ala Lys

976 GCG AAG ACA GAC CAG GCG GCG GAG ATC GTS TAC AAG TCG CCA GTS GCG TCT GCG ACC ACC TCT CCA GCG CAG CAG
 326 Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Gln Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Pro Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu

1051 ACC AAT GTC TCG ACC GCG ACC ATC GAC ATG GTA GAC TCG GCG CAG GTC GCG ACC GCA GCT GAC GAG GTS TCT
 351 Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Gln Val Ser

1126 GCG TCG CCG ACC AAG CAG GGT TTG TGA TCAAGGCGGCGCGCGGCGCGCAATAA
 376 Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu Ser

Fig. 3. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the PCR product, as deduced from plasmid pSC7.

The DNA sequence of the PCR product was identical with human tau clone htau24 (5) except that a single base was changed (636 G→A), but not changed the corresponding amino acid(Pro).

하고 건조시킨 다음 Applied Biosystems 477A Protein Sequencer를 이용하여 발현된 단백질의 N-말단 아미노산 서열을 확인하였다.

결과 및 고찰

PCR 방법에 의한 인체 tau 유전자 cDNA의 증폭

인체의 완전한 길이를 갖는 tau 단백질 유전자의 cDNA를 증폭하기 위하여 2가지의 primer를 합성하였다. 즉 forward primer(40-mer; 5'-TGTCG-ACTATCAGGTGAACCTTTG AACGAGGATGG-CTGAGC-3')와 reverse primer(40-mer; 5'-TTAT-TGACCGCCCCAGGGGCCTGATCACAAACC-CTGCTTG-3')로 그들은 각각 밑줄친 개시암호 ATG 및 그 인접 염기서열 그리고 상보적 염기서열인 정지암호 TCA 및 그 인접부위로 이루어져 있고, 이 염기서열은 이미 발표된 인체 tau cDNA(6)에 기초하였다. PCR 반응은 Deep Vent® DNA polymerase(New England Biolabs)를 사용하였고, 100 µl의 반응액에는 1 µM의 각 primer, 200 µM의 각 dNTP, 200 ng의 DNA 주형, 10 µl의 10×PCR buffer 그

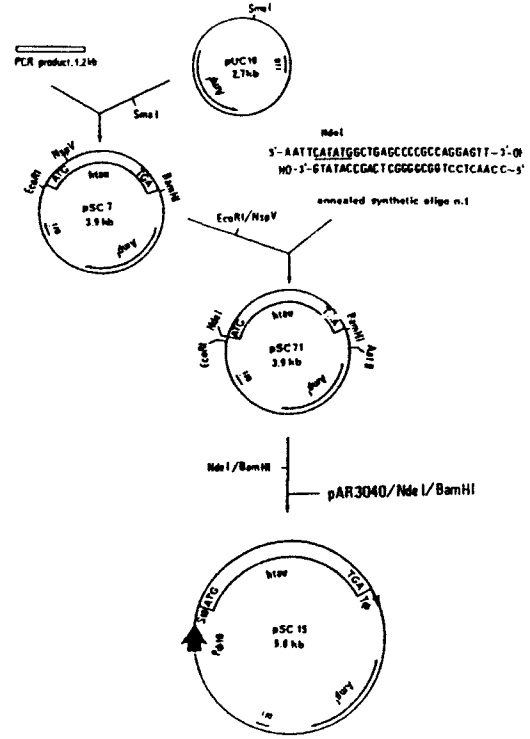


Fig. 4. Construction of pSC7, pSC71, and pSC15 to express the human tau gene in E. coli.

리고 1.0~2.0 units의 DNA polymerase가 혼합되었다. 여러 반응조건을 비교한 결과 94°C에서 4분간 주형을 변성시키고 이어서 57°C에서 1분, 73°C에서 2분 그리고 94°C에서 1분씩 30번 반복한 후 마지막으로 57°C에서 1분, 73°C에서 10분간 처리한 것이 최적임을 알 수 있었다(Fig. 1).

PCR 산물의 클로닝

PCR 산물은 polyacrylamide gel 전기영동을 거쳐 정제한 후 5' 말단을 T4 polynucleotide kinase를 이용하여 인산화하였다(19). 그리고 이미 SmaI로 절단하고 calf intestinal alkaline phosphatase로 처리한 플라스미드 벡터 pUC18과 연결한 후 E. coli JM109에 형질전환시키고 형질전환체는 ampicillin을 함유한 LB/X-gal 배지상에서 선별하였다. 그 결과 얻어진 콜로니로부터 하나의 긍정적인 DNA 제한효소 패턴을 갖는 재조합 plasmid를 얻을 수 있었으며 (Fig. 2) pSC7이라 명명하였다.

증폭하여 클론된 유전자가 실제의 인체 tau 유전자 cDNA 인지를 확실하게 하기 위하여 Sequenase kit 및 합성 oligonucleotide를 primer로 이용하여 pSC7내의 삽입된 DNA의 염기서열을 결정하였다. 그 결과 삽입된 DNA는 636번째 염기 G가 A로 바뀐 것을 제외한 나머지는 이미 알려진 인체 tau clone htau24

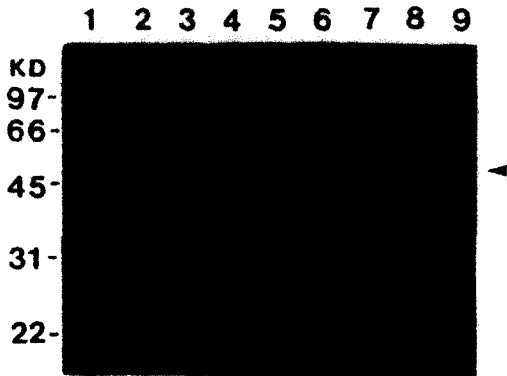


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic analysis of the recombinant human tau protein. Overnight cultures of *E. coli* cells transformed with parental(pAR3040) or recombinant(pSC15) plasmid were diluted 1:10 in a fresh medium(NZCYM) and grown for 1 hr at 37 °C. After addition of IPTG to 1mM and further culture for 1~3 hr the cells were collected by centrifugation. Expression of the recombinant human tau protein was checked by resuspending the pellet from 1 ml culture in 100 µl sample buffer, boiling for 5 min, and running on a 10% SDS-PAGE gel followed by staining with Coomassie blue. Lanes 1 and 9, standard molecular weight marker proteins (Bio-Rad); lane 2, proteins from uninduced cell/pAR3040; lane 3, proteins from 3 hr-induced cell/pAR3040; lane 4, proteins from uninduced cell/pSC15; lane 5, proteins from 1 hr-induced cell/pSC15; and lane 6, proteins from 3 hr-induced cell/ pSC 15. Lanes 7 and 8 were the supernatants after boiling of the 3 hr-induced cell lysates containing pAR3040 and pSC15, respectively.

(5)와 동일한 4번 반복 형태임을 확인하였으며 더구나 여기서 암호화되는 아미노산 서열에는 아무 변화가 없음을 알 수 있었는데(Fig. 3). 이러한 하나의 염기 변화는 아마 개체 다형화현상(individual polymorphism)에 기인된 것으로 사료된다.

발현 벡터(expression vector)의 작성 및 인체 tau 유전자의 cDNA 발현

우선 재조합 플라스미드 pSC7의 개시암호 ATG 자리에 유일한 제한효소 *NdeI* 자리를 만들기 위해서 Fig. 4에서와 같이 *EcoRI*과 *NspV* 자리를 이용하여 pSC7을 작성하였다. 즉 pSC7의 *EcoRI/NspV* 단편을 제거하고 대신 합성한 두개의 oligonucleotide 즉, 5'-AATTCATATGGCTGAGCCCCGCCAGGA GTT-3'과 또 하나의 5'-CCAACTCCTGGCGGGG CTCAGCCATATG-3'를 연합(annealing)한 후(제한 효소 *EcoRI*, *NdeI* 및 *NspV* 자리를 갖음) 그 자리에

Table 1. N-terminal amino acid sequences of the recombinant human tau protein

Applied Biosystems 477A Protein Sequencer Report

SAMPLE : C:\NG\HTAU1-3L5\SC15021
[Initiated 21 Oct 1992 8:46pm]

Sample Amount: 100 pmol

Acid #	Acid ID	R. Time (min)	C. Time (min)	Pmol (raw)	Pmol (-bkgd)	Pmol (+leg)	Pmol Ratio	Acid ID
1	A	11.29	12.30	23.89	23.87	26.89	179.82	ALA
2	E	9.18	9.23	17.49	16.13	17.58	35.74	GLU
3	P	18.62	18.63	10.80	9.55	15.06	44.77	PRO
4	R	15.88	15.92	9.43	4.39	9.85	13.72	ARG
5	Q	7.35	7.38	11.88	11.44	18.53	63.64	GLN
6	E	9.17	9.23	11.25	9.11	12.61	25.64	GLU
7	F	23.89	23.83	9.53	8.82	16.18	71.95	PHE
8	E	9.17	9.23	10.47	8.85	9.54	19.48	GLU
9	V	19.97	20.90	9.44	7.31	13.86	29.97	VAL
10	H	19.98	19.82	6.74	5.88	11.33	24.41	HEP
11	E	9.17	9.23	7.83	3.91	6.41	13.82	GLU
12	O	5.58	5.65	10.82	6.28	11.35	38.86	ASP
13	H	11.23	11.22	2.10	1.20	2.39	5.68	MIS
14	A	11.97	12.00	8.54	4.14	9.72	66.90	ALA
15	G	8.37	8.49	10.95	3.72	8.82	27.80	GLY
16	T	7.98	8.02	7.84	3.28	4.82	9.88	THR
17	Y	16.53	16.59	4.31	3.86	6.51	91.14	TYR
18	G	8.37	8.40	13.71	4.54		18.48	GLY

REPEITIVE YIELD ANALYSIS:

	Rep. Yield	Variance	
A: 1, 14	87.48 %	1.000	ALA
E: 2, 6, 8, 11	85.75 %	0.990	GLU
G: 15, 18	106.81 %	1.000	GLY
Average AA Repetitive Yield:	90.31 %		
Combined AA Repetitive Yield:	90.96 %	0.954	
Theoretical Initial Yield:	14.71 pmol (14.71 %)		

Crude protein samples were separated on SDS-containing polyacrylamide gel and electroblotted onto siliconized-glass fiber membrane. Protein bands corresponding to the recombinant human tau gene detected after staining with Coomassie blue were cut out of the membrane, washed in distilled water and dried, and their N-terminal amino acid sequences were determined by means of an Applied Biosystems 477A sequencer.

삽입하였으며, 삽입된 그들 자리는 제한효소 처리 및 DNA 염기서열로 확인하였다. 클로닝한 인체 tau cDNA를 *E. coli*에서 발현시키기 위하여 pAR3040 벡터 시스템(18)을 사용하였다. 우선 pAR3040의 SD 염기서열 다음에 존재하는 클로닝 자리 *NdeI*과 *BamHI* 사이의 단편을 제거하고 그 자리에 pSC7의 *NdeI*과 *BamHI* 사이에 존재하는 인체 tau cDNA 단편을 삽입하여 발현 벡터 pSC15를 작성하였다(Fig. 4). 따라서 이 pSC15의 인체 tau 유전자 cDNA는 IPTG의 첨가에 의해 숙주 *E. coli* BL21(DE3) lysogen의 염색체에 존재하는 T7 유전자 1의 산물인 T7 RNA polymerase가 발현되면 선택적인 전사가 가능해진다(18, 21, 22). Fig. 5에서는 pSC15 내에 존재하는 인체 tau 단백질이 *E. coli* 내에서 IPTG의 첨가에 의해 시간별로 발현된 정도를 보여주고 있다.

대부분의 여러 단백질들은 열처리(100°C에서 5분 끓였을 때)에 의하여 변성되므로 원심분리시 침전이 되는 반면, tau 단백질은 고열에도 상당히 안정하다고

알려져 있다(10, 23). 본 실험에서도 IPTG 첨가 후 발현된 단백질이 열처리 후 선택적으로 강하게 용해성으로 존재하는 것으로 미루어 볼 때(Fig. 5) 이것은 tau 단백질임을 암시해 주며, 더구나 SDS-PAGE상에 나타나는 것은 분자량이 약 52 kDa으로서(Fig. 5) Goedert와 Jakes(7)의 보고와도 일치한다.

보다 확실히 발현된 단백질이 인체 tau 단백질을 입증하기 위하여 그들의 N-말단 부위의 아미노산 서열을 결정하였다. 그 결과 나타난 아미노산 서열은 Ala-Glu-Pro-Arg-Gln-Glu-Phe-Glu-Val-Met-Glu-Asp-His-Ala-Gly-Thr-Tyr-Gly으로서(Table 1), 처음 시작하는 개시암호 ATG에 해당하는 methionine은 *E. coli* 세포 내에서 이미 제거 되었지만 그 후로 나타나는 것은 Fig. 3에서 예상한 서열과 일치함을 알 수 있었다. 이때 처음 시작하는 아미노산 methionine이 결여된 이유는 alanine 바로 전에 나타나는 N-말단 methionine이 *E. coli*의 경우 제거된다는 일종의 후속 해독공정(post-translational processing)이라고 여겨진다(12).

따라서 본 실험에서는 우리가 원하는 인체 tau 단백질이 *E. coli* 내에서 비교적 다량으로(Fig. 5) 안정하게 발현되었기 때문에 이들을 순수하게 정제할 수 있다면 그 구조나 역할 등을 밝히는데 큰 도움이 되리라 생각한다.

참 고 문 헌

1. Biernat, J., E.-M. Mandelkow, C. Schröter, B. Lichtenberg-Kraag, B. Steiner, B. Berling, H. Meyer, M. Mercken, A. Vandermeeren, M. Goedert, and E. Mandelkow, 1992. The switch of tau protein to an Alzheimer-like state includes the phosphorylation of two serine-proline motifs upstream of the microtubule binding region. *EMBO J.* 11, 1593-1597.
2. Cleveland, D.W., S.-Y. Hwo, and M.W. Kirschner, 1977. Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J. Mol. Biol.* 116, 207-225.
3. Eckerskorn, C., W. Mewes, H. Goretzki, and F. Lottspeich, 1988. A new siliconized-glass fiber as support for protein-chemical analysis of electrophoretically separated proteins. *Eur. J. Biochem.* 176, 509-519.
4. Goedert, M., C.M. Wischik, R.A. Crowther, J.E. Walker, and A. Klug, 1988. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4051-4055.
5. Goedert, M., M.G. Spillantini, M.C. Potier, J. Ulrich, and R.A. Crowther, 1989. Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J.* 8, 392-399.
6. Goedert, M., M.G. Spillantini, R. Jakes, D. Rutherford, and R.A. Crowther, 1989. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3, 519-526.
7. Goedert, M. and R. Jakes, 1990. Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J.* 9, 4225-4230.
8. Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, M. Quinlan, Y.-C. Tung, M.S. Zaidi, and H.M. Wisniewski, 1986. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 261, 6084-6089.
9. Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, Y.-C. Tung, M. Quinlan, H.M. Wisniewski, and L. Binder, 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4913-4917.
10. Hagedstedt, T., B. Lichtenberg, H. Wille, E.-M. Mandelkow, and E. Mandelkow, 1989. Tau protein becomes long and stiff upon phosphorylation: Correlation between paracrystalline structure and degree of phosphorylation. *J. Cell Biol.* 109, 1643-1651.
11. Himmler, A., 1989. Structure of the bovine tau gene: Alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1389-1396.
12. 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.
13. Ihara, Y., N. Nukina, R. Miura, and M. Ogawara, 1986. Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J. Biochem.* 99, 1807-1810.
14. Jakes, R., M. Novak, M. Davison, and C.M. Wischik, 1991. Identification of 3- and 4-repeat tau isoforms within the PHF in Alzheimer's disease. *EMBO J.* 10, 2725-2729.
15. Kanai, Y., R. Takemura, T. Oshima, H. Mori, Y. Ihara, M. Yanagisawa, T. Mosaki, and N. Hirokawa, 1989. Expression of multiple tau isoforms and microtubule bundle formation in fibroblasts transfected with a single tau cDNA. *J. Cell Biol.* 109, 1173-1184.
16. Kosik, K.S., L.D. Orecchio, S. Bakalis and R.L. Neve, 1989. Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* 2, 1389-1397.
17. Lee, V.M.-Y., B.J. Balin, L. Otvos, Jr., and J.Q. Trojanowski, 1991. A68: A major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal tau. *Science* 251, 675-678.
18. Rosenberg, A.H., N.L. Barbara, D.-S. Chui, S.-W. Lin, J.J. Dunn, and F.W. Studier, 1987. Vectors

- for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* 56, 125-135.
19. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
 20. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
 21. Studier, F.W. and B.A. Moffatt, 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130.
 22. Tabor, S and C.C. Richardson, 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1074-1078.
 23. Weingarten, M.D., A.H. Lockwood, S.-Y. Hwo, and M.W. Kirschner, 1975. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1858-1862.
 24. Wille, H., G. Drewes, J. Biernat, E.-M. Mandelkow, and E. Mandelkow, 1992. Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimers formed from microtubule-associated protein tau *in vitro*. *J. Cell Biol.* 118, 573-584.
 25. Wischik, C.W., M. Novak, H.C. Thøgersen, P.C. Edwards, M.J. Runswick, R. Jakes, J.E. Walker, C. Milstein, M. Roth, and A. Klug, 1988. Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4506-4510.
- (Received December 17, 1993)
(Accepted January 24, 1994)

ABSTRACT: Cloning and Expression of a Human tau Gene cDNA in *Escherichia coli*

Chung, Sang-Ho*, Tadakazu Maeda¹, and Hiroshi Yanagawa¹ (Department of Microbiology, Mokwon University, Taejon 301-729, Korea, and ¹Laboratory of Biopolymer Conformation Analysis, Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences, Tokyo 194, Japan)

In normal cells tau protein is associated with axonal microtubules, whereas in Alzheimer's disease it is immobilized in the somatodendritic compartment of certain nerve cells as a major component of the paired helical filament. As a part of the study to analyze the nature of the paired helical filament (PHF) deposits and some related factors in brain, we have cloned and expressed a human tau gene cDNA in *Escherichia coli* to obtain the recombinant human tau protein in abundance.