

影響酪蛋白基因表現之因素

朱 有 田

真核生物基因表現受 DNA 序列，調節因子及調節因子彼此間作用而影響 (Zahradka et al., 1990)。序列本身之影響可利用點突變後於體內 (in vivo) 或體外 (in vitro) 進行表現分析。在調節因子方面，雖然目前有些能夠結合在調節序列之因子已被純化出來，但其調節機制則尚未清楚 (Manitis et al., 1987)。DNA 序列與調節因子間交互作用亦會影響細胞分化，組織專一性 (Bandziulis et al., 1987; Choi and Engel, 1986; Frankel and Kim, 1991; Maniatis et al., 1987; Ross et al., 1990; Umek et al., 1991)。如脂肪細胞分化可能由於 CCAAT box 與 CCAAT/ 促進結合蛋白 (enhancer-binding protein) 間交互作用之結果 (Samuelsson et al., 1991; Umek et al., 1991)。

酪蛋白基因表現之研究，在基因序列方面，目前著重於有許多控制基因表現序列之 5' 端，有關 3' 端序列方面之研究則較少。在調節因子方面，著重於胜肽類及固醇類生乳激素對基因表現之影響。基因序列及調節因子在分子階層上交互作用則尚待進一步之探討。

影響酪蛋白基因於小鼠乳腺上皮細胞與基因轉殖小鼠之表現之因素很多，主要包括下列四點：

一、胜肽與固醇類內分泌素：

乳蛋白 mRNA 或蛋白質於乳腺細胞中蓄積，需要有不同之生乳激素予以誘發產生 (Guyette et al., 1979)。同時於培養基中添加泌乳素，氫皮質酮及胰島素等三種內分泌素於懸浮式膠原膠體培養之 COMMA-D 乳腺上皮細胞株，細胞中 β -酪蛋白基因轉錄速率增加 2.5~3 倍，而 β -酪蛋白 mRNA 蓄積量則增加 37 倍。單獨添加胰島素，轉錄速率無明顯增加。同時添加泌乳

National Chung Hsing University

素及氫皮質酮，細胞中 β -酪蛋白基因轉錄增加 2.5 ~ 3 倍，總mRNA 蓄積量增加73 倍 (Eisenstein and Rosen,1988)。以鼠之 β -酪蛋白起動子 (-2300/+487) 架接外源 CAT 基因於 HC11 乳腺上皮細胞株中探討起動子表現能力。僅添加胰島素則無法增強 CAT的活性，而僅添加泌乳素或類固醇 (dexamethanson) 導致 CAT 活性增強 4 倍。胰島素能增強泌乳素之誘發，但無法增強類固醇之誘發。(Doppler et al.,1989)。

生乳素增加乳蛋白基因之轉錄作用，但 mRNA之蓄積量遠高於轉錄速率。可能原因為泌乳素能增加酪蛋白mRNA之半衰期約17~25倍，而轉錄速率可增加 2 ~ 4 倍，如此加乘作用而導致酪蛋白 mRNA 大量蓄積 (Guyette et al.,1979)。並非所有泌乳激素皆有增乳蛋白基因之表現，在 Terada et al.(1988) 的報告中顯示,助孕素則會抑制乳蛋白基因之表現。

二、細胞培養基質：

將乳腺細胞直接培養於塑膠 (plastic) 培養皿表面，其細胞功能會急遽下降。於膠原膠體 (collagen gel) 培養之 COMMA-D 乳腺上皮細胞株，細胞中 β -酪蛋白基因轉錄速率較以塑膠皿培養者高 2.5倍。以接觸式 (attached) 膠原膠體培養下，細胞中 β -酪蛋白 mRNA蓄積量提高20 倍。懸浮式 (floating) 培養之 β -酪蛋白 mRNA 蓄積量則提高37倍 (Eisenstein and Rosen,1988)。細胞中 β -酪蛋白分泌能力亦由10% 提昇50% (Lee et al.,1985)。但並非所有基因於此方式培養下皆能增加表現能力。乳清酸性蛋白 (WAP)於膠原膠體培養下能提高轉錄能力，但 β -酪蛋白 mRNA 之蓄積不變。組蛋白 (histone)及肌動蛋白 (actine) 基因於膠原膠體培養下轉錄速率下降約30%~50%及60%~80%。這種現象可能原因為膠原膠體培養基對不同mRNA 之穩定性影響不同所致。膠原膠體可促進 β -酪蛋白之穩定性，但不能促進乳清酸性蛋白 mRNA之穩定性 (Eisenstein and Rosen,1988)。

細胞中 β -酪蛋白基因表現能力於 Matrigel (成份為 Engelbreth - Holm - Swarm, EHS, tumor抽出物) 培養基培養，有90% 細胞具高度的 β -酪蛋白生產能力，表現能力又優於膠原膠體培養之細胞。以Matrigel 培養之乳腺細胞形態可維持正常之三度立體空間結構 (Li et al.,1987; Yoshimura and Oka,1990)。

三、酪蛋白基因 5'端序列之影響：

Doppler et al.(1989) 將鼠之 β -酪蛋白 5'端(-2300/+487) 序列，而後架接於CAT報導基因 (report gene) 之前。利用鈣磷沉澱法 (calcium phosphate precipitation technique)轉形感染 (transfect)進入有或無生乳激素誘發之HC11 乳腺細胞株中，測其表現情形。具有自轉錄起始點上游 -2300/+487 架構者表現能力最佳，為基礎活性 (basal activity) 之 22 倍。其有 5'端上游 -300/+487 架構者，表現能力減至10.8倍。明顯的是 -265~-180/+487 架構者，活性減至3倍，下降速率最為顯著。而具有-170~-44/+487 序列者，CAT 活性幾乎完全消失(表1)。

-2300 架構者，經同時加入泌乳素及氫皮質素酮誘發較無任何生乳激素誘發者，CAT 活性高出32倍。具 -300bp 架構者對於泌乳素誘發尚有2.9 倍，而 -44bp 架構者皆無法以任何生乳激素誘發 CAT 活性增加。

很顯然，生乳激素之反應需要有一些特定序列與之結合，這些生乳激素結合位置可能位於 -300~-44bp之間，而其中又以-265~-285bp之間序列影響基因表現最鉅，-180~-265bp則居中。而 300至-2300bp可能為氫皮質素酮反應位置 (Doppler et al.,1989)。Yoshimura and Oka(1990b)將此基因中-381~-5300bp 序列反轉，結果發現不影響此連結基因在小鼠初級乳腺上皮細胞中之良好表現(表2)。Schmitt-Ney et al.(1991)利用 bandshift 及 site mutation 等技術證明鼠 β -酪蛋白起動子序列-80~-100bp -130~-150bp 為細胞核調節因子(MGF) 結合位置，經點突變試驗，此序列亦為泌乳激素誘發酪蛋白表現所必須。此段序列中-100~-150 bp位置亦為細胞核調節因子 A 及 B 結合位置，經點突變試驗，證實此序列對酪蛋白基因表現為負調節 (negative regulation) 作用。

至今，有關酪蛋白基因序列對其表現影響之研究報告甚少。目前亦只能根據其它基因加以比較，推測其它調節因子結合區域 (Gorodetsky et al.,1988)。至於可能導致二次結構之 5'端上游序列及 3'端序列對基因表現之影響，尚不明瞭 (Doppler et al.,1989)。

四、其它影響因子：

酪蛋白基因表現具組織專一性，因此只能在特定之細胞株中方能表現，如初級培養之乳腺上皮細胞 (Li et al.,1987; Yoshimura and Oka,

1990), HC11, COMMA-D 乳腺上皮細胞株 (Doppler et al., 1989; Eisens-tein and Rosen, 1988) 及 Cytotoxic T 淋巴球細胞 (CTL; cytotoxic T lymphocyte) (Grusby et al., 1990)。另外, 培養中之乳腺細胞亦須達匯生期細胞密度足夠下才能由生乳激素誘發酪蛋白基因表現 (Doppler et al., 1989)。酪蛋白基因轉殖小鼠研究方面, 鼠 β -酪蛋白基因於基因轉殖小鼠中表現具階段性, 組織專一性及性別差異性。懷孕及泌乳後 8 天之基因轉殖小鼠中, 外源性 β -酪蛋白 mRNA 高出未懷孕小鼠之 250 倍。鼠之 β -酪蛋白基因只有在基因轉殖小鼠之乳腺中表現, 少數在腦中表現 (Lee et al., 1989)。外源性 β -酪蛋白基因之表現和小鼠內源性 β -酪蛋白一樣, 受到乳腺發育及內泌素之調節。Andres et al. (1987) 及 Schoeneberger et al. (1988) 導入鼠 WAP-Ha-ras 及 WAP-c-myc 連接基因於轉殖小鼠中, 在懷孕哺乳後, 皆會導致其乳腺形成不正常之腫瘤。

Schmitt-Ney et al. (1991) 發現乳腺細胞核調節因子 (MGF) 能辨認鼠之 β -酪蛋白特定序列 ANTTCTGGNA, 其結合能力與酪蛋白表現呈正調節 (positive regulation), 調節因子 C 與 D 亦是正調節因子。生乳激素誘發會增強此兩調節因子與酪蛋白基因起動子特定序列結合能力。而調節因子 A 與 B 亦能辨認 β -酪蛋白基因之特定序列。但其結合能力與酪蛋白表現呈負調節 (negative regulation), 調節因子除了能與起動子結合而影響表現能力外, 是否決定組織專一性, 階段性及性別差異性, 則待更一步之探討。

Table 1、 β -酪蛋白基因與 CAT 之嵌合基因 pbs β c(-2300/+487)CAT 轉形感染 HC11 細胞並經泌乳素與類固醇誘發 CAT 之表現。

Table 1、Induction of CAT expression by prolactin and dexamethasone in HC11 cells transfected with 5' deletion of pbs β c(-2300/+487) CAT.

5' border of β -casein	Induction ratio (fold) of CAT activity after hormone addition						
	Prolactin		Dexamethasone		Prolactin and dexamethasone		
-2300	4.0	0.7	2.6	0.3	22.4	3.9	
-300	2.9	0.4	1.2	0.2	10.8	1.9	
-221	1.9	0.2	0.72	0.09	2.1	0.4	
-44	0.87	0.02	0.98	0.03	0.95	0.09	

(Doppler et al., 1989)

Table 2、 β -酪蛋白基因5'端序列與腺病毒40起動子影響CAT表現活性。
 Table 2、Effect of β -casein gene sequence and simian virus 40 promoter on expression of CAT activity.

CAT constructs	CAT activity				Induction (fold)	n
	Basal		Induced			
-5300,+7	0.65	0.11	7.69	1.01	11.9	5
-381,-5300/-380,+7	1.23	0.11	15.53	2.87	12.7	3
-545,+7	2.15	0.63	17.71	2.97	8.3	3
-5300,+91	0.03	0	0.36	0.06	12.0	2
pSV2CAT	20.23	5.93	26.61	4.38	1.3	3

PMME were transfected with chimeric gene. PMME were culture on Matrigel either in the presence of insulin and EGF or in the presence of insulin, hydrocortisone and prolactin to determine basal and induced level of CAT activity, respectively. "n" indicated number of transfection experiments in which the same batch of cell preparation was used.

(Yoshimura and Oka,1990)

參考文獻:

1. Alam, J. and J.L. Cook. 1990. Reporter genes Application to the study of mammalian gene transcription. *Anal. Biolchem.* 188:245-254.
2. Ball, R.K., R.R. Friis, C.A. Schoenenberger, W. Dopfer and B. Groner. 1988. Prolactin regulation of β -casein gene expression and of a cytosolic 120-Kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. *EMBO J.* 7:2089-2095.
3. Bonsing, J. and A.G. Mackinlay. 1987. Recent studies on nucleotide sequence encoding the caseins. *J. Dairy Res.* 54:447-461.
4. Chen, C. and H. Okayama. 1987. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* 7:2745 - 2752.

5. DeWet, J.R., K.V. Wood, M. DeLuca, D.R. Helinski and S. Subramani. 1987. Firefly luciferase gene : structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 7 : 725 - 737.
6. Doppler, W., B. Groner and R.K. Ball. 1989. Prolactin and glucocorticoid hormones synergistically induce expression of transfected rat β -casein gene promoter constructs in a mammary epithelial cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 104 - 108.
7. Gould, S.J. and S. Subramani. 1988. Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Anal. Biochem.* 175: 5 - 13.
8. Gorodetsky, S.I., T.M. Tkach and T.V. Kapelinskaya. 1988. Isolation and characterization of the *Bos taurus* β -casein gene. *Gene* 60 : 87 - 96.
9. Jimenez-Flores, R., Y.C. Kang and T. Richardson. 1987. Cloning and sequence analysis of bovine β -casein cDNA. *Biochem. and Biophys. Res.* 142 : 617 - 621.
10. Lee, K.-F., F.J. DeMayo, S.H. Atice and J.M. Rosen. 1988. Tissue specific expression of the rat β -casein gene in transgenic mice. *Nucl. Acids Res.* 16: 1027 - 1041.
11. Lee, K.-F., S.H. Atice and J.M. Rosen. 1989. Differential regulation of rat β -casein chloramphenicol acetyltransferase fusion gene expression in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* 9: 560 - 565.
12. MacGregor, G.R. and C.T. Caskey. 1989. Construction of plasmids that express *E. coli* β -galactosidase in mammalian cells. *Nucl. Acids Res.* 17: 2365.
13. Schmitt-Ney, M., W. Doppler, R.K. Ball and B. Groner. 1991. β -casein gene promoter activity is regulated by the hormone-mediated relief of transcriptional repression and a mammary-gland-specific nuclear factor. *Mol. Cell. Biol.* 11 : 3745 - 3755.
14. Thepot, D., E. Devinoy, M.L. Fontaine and L.M. Houdebine. 1991. Structure of the gene encoding rabbit β -casein. *Gene* 97: 301 - 306.