

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

Mitofusin I 蛋白質在轉殖小鼠肺臟中過度表現與癌化之研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2320-B-039-040

執行期間：94 年 8 月 1 日至 95 年 7 月 31 日

計畫主持人：何恆堅

共同主持人：許南榮、葉坤土

計畫參與人員：劉玉晴、廖欣儀

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：精簡報告

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中國醫藥大學醫學研究所

中 華 民 國 95 年 11 月 20 日

前言

我們以九位肺癌病人同時進行 differential display，發現編號 A76A 之 cDNA 片段(347-bp length)在癌組織中的表現，明顯高於同一個病人的非癌組織，A76A 定序後用 BLAST 比對，證實與編譯(encoded) mitofusin I 之 cDNA 相同。

研究目的

研究這個基因在肺癌組織中的表現，不禁要問：mitofusin I 異常表現是否與細胞癌化有關?因此，本研究計畫欲探討 Mitofusin I 蛋白質在轉殖小鼠肺臟中過度表現與癌化之關係。

文獻探討

1997 年，Fuller 等人在 Cell 期刊發表第一篇關於 mitofusin I 之論文(1)，開啟 mitofusin I 之研究。他們發現 isoform 1 位於 mitochondrial membrane，扮演 mediator of mitochondrial fusion 之角色，而在酵母菌與人類也具有相同功能(2, 3)，它也與 mitochondrial morphology 之控制有關(4)；此外，mitofusin 對胚胎發育是重要必須的，mitofusin 缺陷(mitofusin-deficient)之小鼠(knockout mice)死於 midgestation 階段(5)。然而，我們用 Flow cytometry 所獲得之結果，明確顯示 isoform 1 位於細胞膜。另一方面，用免疫螢光染色也獲得相同的結果。

References.

1. Hales, K. G., and Fuller, M. T. (1997) Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* 90, 121-129.
2. Hermann, G. J., Thatcher, J. W., Mills, J. P., Hales, K. G., Fuller, M. T., Nunnari, J., and Shaw, J. M. (1998) Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J. Cell Biol.* 143, 359-373.
3. Legros, F., Lombes, A., Frachon, P., and Rojo, M. (2002) Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol. Biol. Cell* 13, 4343-4354.
4. Santel, A., and Fuller, M. T. (2001) Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J. Cell Sci.* 114, 867-874.
5. Chen, H., Detmer, S. A., Ewald, A. J., Griffin, E. E., Fraser, S. E., and Chan, D. C. (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* 160, 189-200.

研究方法

轉殖小鼠製備

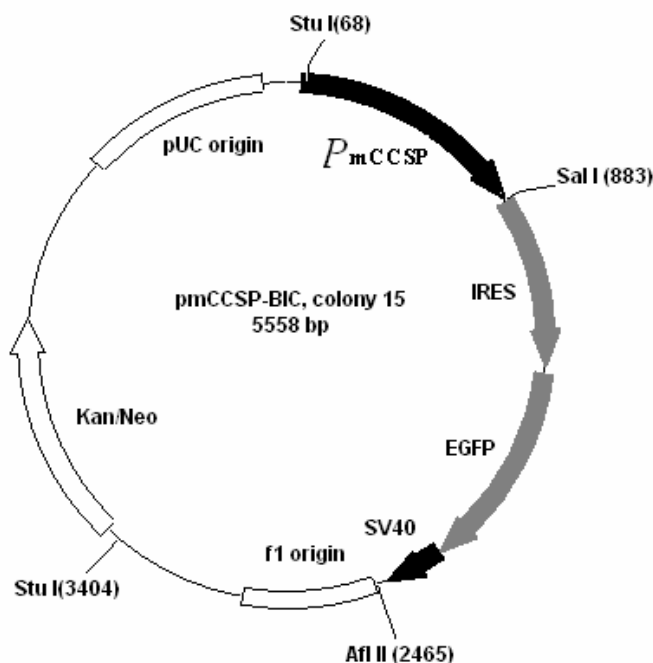
(1) **Promoter 之選擇**：要讓 transgene 在轉殖小鼠的肺臟專一性表現，目前所用的 promoter 主要有兩種，分別是 CCSP (Clara cell secretory protein) 與 SP-C (surfactant protein C)。人類的 SP-C promoter 約 3.7 kb，Ray 等人所發表的研究報告指出：0.8-kb murine CCSP promoter 只有在肺臟有活性，而在其它器官則無(1, 2)，因此本實驗選擇 0.8-kb mCCSP promoter 來進行。

References.

1. Ray, M. K., Magdaleno, S., Finegold, M. J., and DeMayo, F. J. (1995) Cis-acting elements involved in the regulation of mouse Clara-cell specific 10kDa protein gene. *J. Biol. Chem.* 270, 2689–2694.
2. Ray, M. K., Chen, C. Y., Schwartz, R. J., and DeMayo, F. J. (1996) Transcriptional regulation of a mouse Clara cell-specific protein (mCC10) gene by the NKx transcription factor family members thyroid transcription factor 1 and cardiac muscle-specific homeobox protein (CSX). *Mol. Cell. Biol.* 16, 2056–2604.

(2) **Vector**：本實驗室已將 mCCSP promoter 構築在 vector pmCCSP-BIC 上，Map 如圖一所示 (IRES：Internal Ribosome Entry Site)。

(3) **Transgene**：構築 transgene 所用的兩個 primers 分別位於 mitofusin I 的 Residues 1-7 與 Residues 735-741，以 Lung cancer cell line A549 的 cDNA 來進行 PCR；再將 PCR 產物接入 Sal I site (位於 mCCSP promoter 與 IRES 之間，圖一)，如此所形成的重組質體(recombinant plasmid)，稱為 pmCCSP-TG741-BIC；最後用限制酵素 Stu I 與 Afl II 將 transgene 切下來，用電泳展開後回收。



圖一

(4) **轉殖小鼠產製與鑑定**：回收的 transgene 將委託台灣動物科技研究所(ATIT)進行顯微注射(microinjection)，預計三個月後可開始進行轉殖小鼠鑑定。先剪取三週齡的小鼠

尾部抽取 genomic DNA，進行 PCR 反應，sense primer 位於 mCCSP promoter 內，antisense primer 位於 mitofusin I 基因內，PCR 產物長度約 500 bp，所獲得之轉殖小鼠為 F0 generation。

- (5) **F1 generation**：每一隻轉殖小鼠 (F0 generation) 個別與非轉殖小鼠 (wild-type non-transgenic mouse) 交配繁殖，如此將會產生幾組不同的 founder lines (F1 generation)；在小鼠三週齡時作鑑定，方法與上述(4)相同，去除非轉殖小鼠。

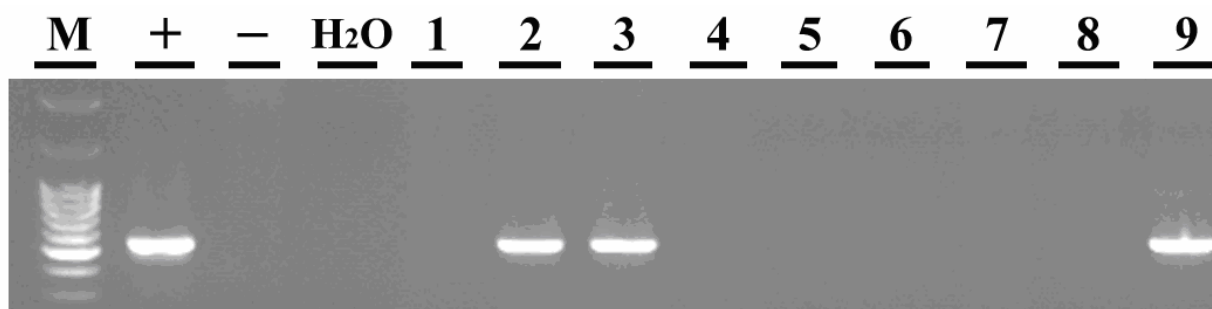
結果與討論

- (1) 小鼠產製：如下表所示，基因顯微注射後，計有 66 隻小鼠出生。

表 1、轉殖小鼠之顯微注射結果

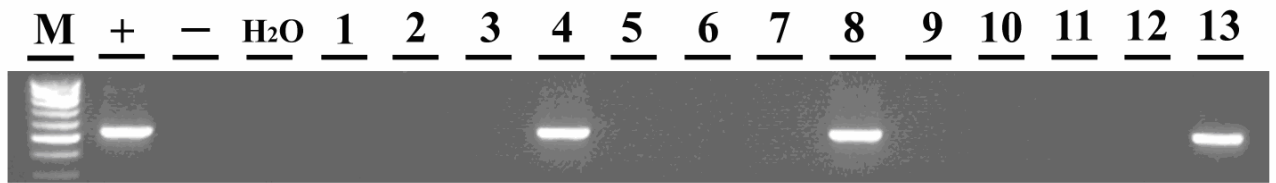
批次	注射胚數	移置胚數	ET 鼠數	出生仔鼠數	分析鼠數	Tg 鼠數	備註
I	66	63	2	14	14	2	
II	52	49	2	2	0	0	
III	92	89	3	8	6	1	
IV	163	148	5	42	40	3	
Total	373	349	12	66	60	6	

- (2) 轉殖小鼠鑑定：以存活的 60 隻小鼠為分析樣本，PCR 分析結果顯示，編號 2-2 (♀)、2-3 (♀)、7-2 (♂)、11-4 (♂)、11-8 (♀) 與 11-13 (♀) 呈現陽性反應，因此共計有轉殖小鼠 6 隻，結果如圖二與圖三所示。



(M: 100 bp marker; +: positive control; -: negative control; H₂O: blank;
1: 2-1; 2: 2-2; 3: 2-3; 4: 6-1; 5: 6-2; 6: 6-3; 7: 6-4; 8: 7-1; 9: 7-2)

圖二

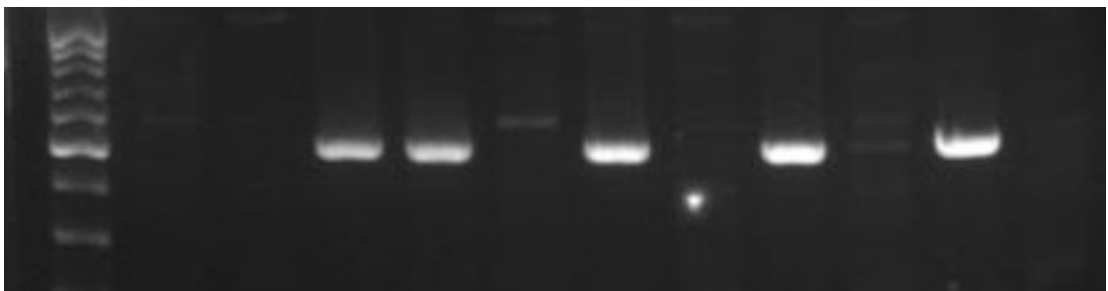


(M: 100 bp marker; +: positive control; -: negative control; H₂O : blank;
 1: 11-1; 2: 11-2; 3: 11-3; 4: 11-4; 5: 11-5; 6: 11-6; 7: 11-7; 8: 11-8; 9:11-9;
 10: 11-10; 11: 11-11; 12: 11-12; 13: 11-13)

圖三

(3) **轉殖小鼠之繁殖**：在交配繁殖前，有三隻轉殖小鼠死亡(編號：2-3、7-2、11-4)，因此剩下三隻轉殖小鼠分別與非轉殖小鼠(wild-type non-transgenic mouse)交配。

編號 2-2 (♀) 轉殖小鼠：第一胎生 11 隻小鼠，其中五隻為轉殖小鼠(F1 generation)，如圖四所示；然而，這五隻轉殖小鼠在未進一步繁殖前，全部死亡。而且編號 2-2 母鼠後來也死亡。



圖四

編號 11-8 (♀) 轉殖小鼠：第一胎生 8 隻小鼠，PCR 鑑定結果發現並無轉殖小鼠；第二胎生 7 隻小鼠，也無轉殖小鼠產生，顯然 transgene 無法傳遞至下一代。
 編號 11-13 (♀) 轉殖小鼠：第一胎生 9 隻小鼠，然而母鼠棄養導致小鼠全部死亡。而且編號 11-13 母鼠後來也死亡。

在本研究中，轉殖小鼠死亡並非飼養技術或飼養環境不當造成，很可能是這些轉殖小鼠本身就很不穩定，所以不易進行大量繁殖，導致實驗無法進行。