

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

非小細胞肺癌組織中異常表現的KIAA0751 蛋白質是否涉及 癌化過程之研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93－2320－B－039－052

執行期間：93 年 8 月 1 日至 94 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：詹琇雯

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 12 月 16 日

前言

我們以九個非小細胞肺癌病人為研究對象進行 differential display，從複製(amplified)出來的 cDNA 片段(fragments)當中，挑選了某些 cDNA 片段做鑑定(identification)，這些 cDNA 片段在非癌組織與肺癌組織中的表現，有非常明顯的差異。其中一種 cDNA 片段定序後用 BLAST 比對相似性(homology)，結果發現這段長度 224 bp 的 cDNA 片段，除了兩端的 primer 序列外，其餘的 195 bp 序列與編譯(encoded)人類 KIAA0751 protein 的 cDNA 有 100%之相似性。

研究目的

探討 KIAA0751 protein 在轉殖小鼠(transgenic mice)的肺臟過度表現，是否會誘發肺癌產生。

文獻探討

利用 BLAST 進行序列比對，結果發現 KIAA0751 protein 與 rat Rim2 protein 有 83%的相似性，與 mouse Rim2 protein 也有 75%的相似性；Rim 代表 **Rab3 interacting molecule**，第一篇關於 rat Rim2 protein 的研究報告是由 Südhof 等人發表於 2000 年 **J. Biol. Chem.** 期刊 (1)，在這篇報告中指出：一、Rim2 protein 可以與 Rab3A 和 Rab3C 結合，參與 neurotransmitter release，此點與 rat Rim1 protein 類似(2)；二、KIAA0751 protein 就是 human homolog of rat Rim2 protein。日本學者 Seino 等人也發表研究報告指出 Rim2 protein 與 cAMP-GEFII 結合，參與胰臟β細胞分泌 insulin (3, 4)；他們還進一步研究發現 Rim2 protein 可以和 Piccolo 結合成 heterodimer (5)。根據這些結果，我們可以推測 Rim2 protein 在不同組織中，藉著與不同的 interacting protein(s)結合，參與某些特定物質的分泌。

References.

1. Wang, Y, Sugita, S, and Südhof, T. C. The RIM/NIM family of neuronal C2 domain proteins. Interactions with Rab3 and a new class of Src homology 3 domain proteins. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 20033-20044.
2. Wang, Y., Okamoto, M., Schmitz, F., Hofmann, K., and Südhof, T. C. Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic vesicle fusion. (1997) *Nature* 388, 593-598.
3. Ozaki, N., Shibasaki, T., Kashima, Y., Miki, T., Takahashi, K., Ueno, H., Sunaga, Y., Yano, H., Matsuura, Y., Iwanaga, T., Takai, Y., and Seino, S. cAMPGEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. (2000) *Nat. Cell Biol.* 2, 805-811.
4. Kashima, Y., Miki, T., Shibasaki, T., Ozaki, N., Miyazaki, M., Yano, H., and Seino, S. Critical role of cAMP-GEFII · Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 46046-46053.
5. Fujimoto, K., Shibasaki, T., Yokoi, N., Kashima, Y., Matsumoto, M., Sasaki, T., Tajima, N., Iwanaga, T., and Seino, S. Piccolo, a Ca²⁺ sensor in pancreatic β cells. Involvement of cAMPGEFII-Rim2-Piccolo complex in cAMP-dependent exocytosis. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 50497-50502.

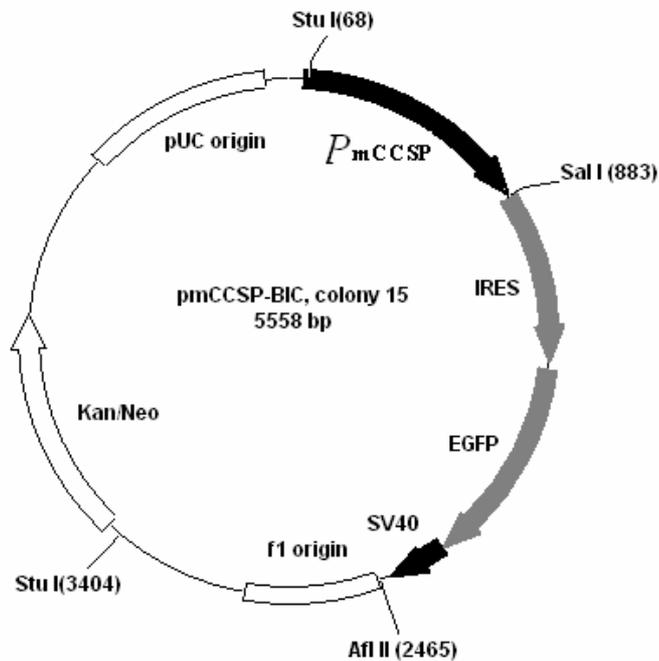
研究方法：轉殖小鼠製備

(1) **Promoter 之選擇**：要讓 transgene 在轉殖小鼠的肺臟專一性表現，目前較常用的 promoter 為 murine CCSP (Clara cell secretory protein)。Ray 等人所發表的研究報告指出 0.8-kb mCCSP 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)。



圖一

(3) **Transgene**：在肺癌組織中，KIAA0751 protein 的 cDNA 有不同 isoforms，有些 isoforms 的 exon 3 因 splicing 去除，使得 exon 2 與 exon 4 連結在一起，此種類型的 isoform 普遍存在於肺癌組織與肺癌細胞株中，所編譯的蛋白產物長度很短，因為進行 translation 時將遭遇 in-frame termination codon (在 exon 4 內部)，這種短型的 isoform 也是本實驗所欲構築的

transgene，所用的兩個 primers 分別位於 exon 2 與 exon 4 內；先將 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-A7C(S)-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。

- (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 transgene 內，PCR 產物長度約 600 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) **Transgene 回收**：以 pmCCSP-A7C(S)-BIC (colony 4)來回收 transgene，如圖二所示(Left lane, DNA ladder; right lane, transgene)。



圖二

- (2) **小鼠產製**：如下表所示，基因顯微注射後，計有 130 隻小鼠出生。

表 1、A7C (S) 基因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 | 11 | 11 | 1 | 4 | 4 | 0 | a |
| II | 50 | 49 | 2 | 22 | 12 | 0 | a |
| III | 7 | 7 | 1 | 0 | 0 | 0 | |
| IV | 94 | 84 | 3 | 28 | 26 | 1 | |
| V | 197 | 176 | 6 | 54 | 54 | 3 | |
| VI | 122 | 113 | 4 | 22 | 17 | 0 | |

| | | | | | | |
|-------|-----|-----|----|-----|----|---|
| Total | 481 | 440 | 17 | 130 | 97 | 4 |
|-------|-----|-----|----|-----|----|---|

(3) **轉殖小鼠鑑定**：以存活的 97 隻小鼠為分析樣本，PCR 分析結果顯示，獲得基因轉殖小鼠 4 隻（編號 7-8、11-6、13-7、13-12），結果如圖三所示。

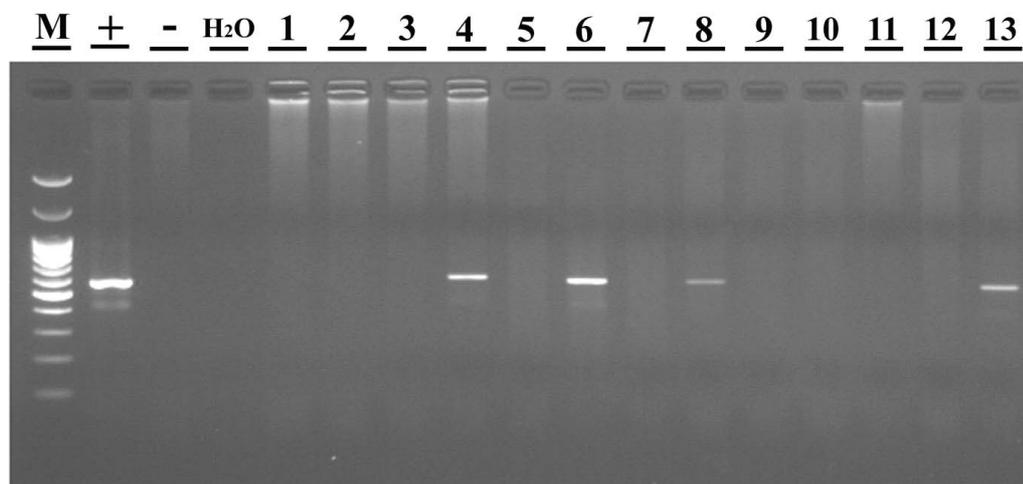
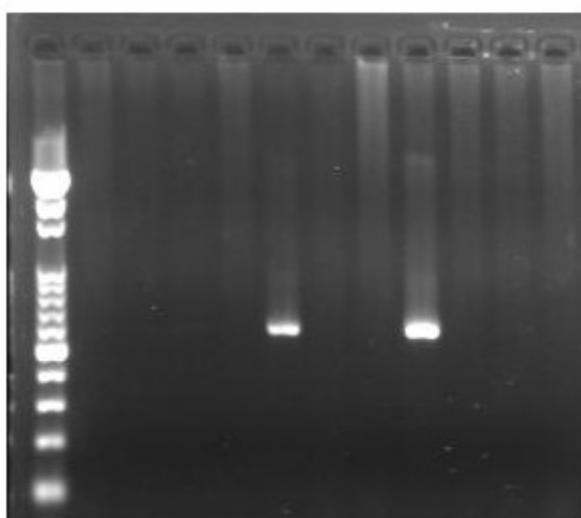


圖 1、A7C (S) 基因轉殖小鼠 PCR 分析結果。(1：7-5；2：7-6；3：7-7；4：7-8；5：11-5；6：11-6；7：11-7；8：13-7；9：13-8；10：13-9；11：13-10；12：13-11；13：13-12。)

圖三

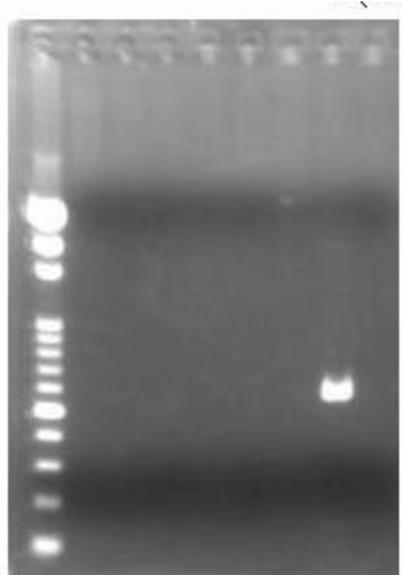
(4) **轉殖小鼠之繁殖**：在交配繁殖前，有一隻轉殖小鼠死亡(編號：13-7)，因此剩下三隻轉殖小鼠分別與非轉殖小鼠(wild-type non-transgenic mouse)交配。

編號 7-8 (♀) 轉殖小鼠：第一胎生 11 隻小鼠，其中兩隻為轉殖小鼠(F1 generation)，如圖四所示。



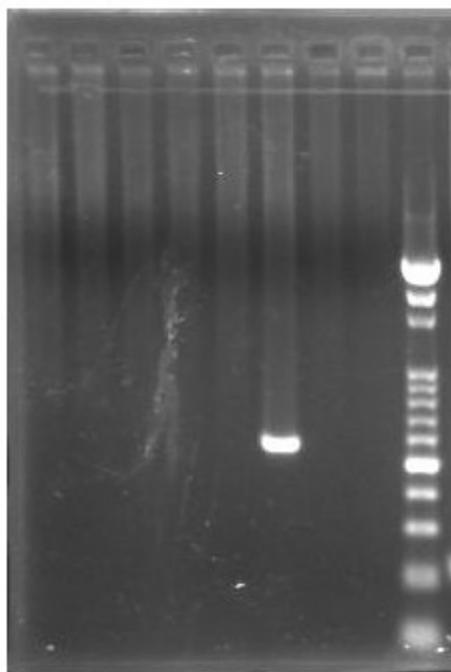
圖四

編號 11-6 (♀) 轉殖小鼠：第一胎生 8 隻小鼠，只有一隻為轉殖小鼠，如圖五所示。



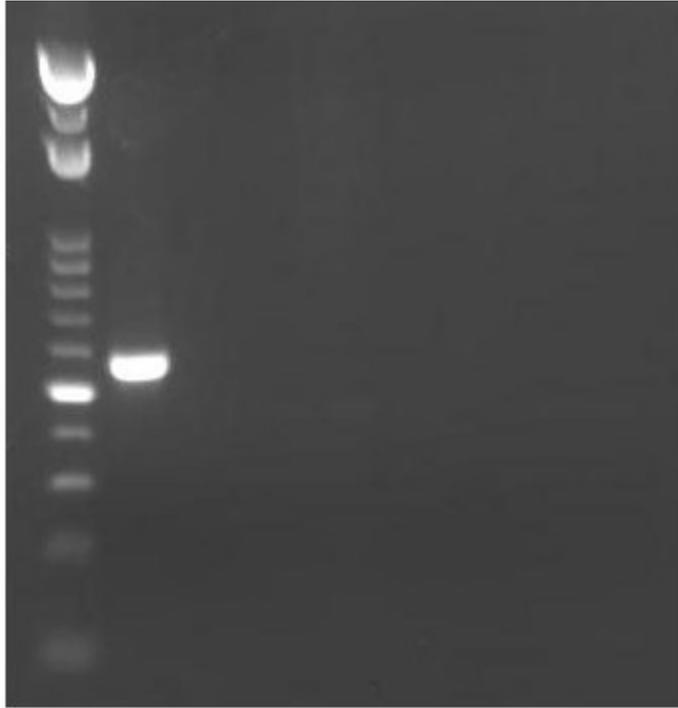
圖五

第二胎生 8 隻小鼠，仍然只有一隻為轉殖小鼠(編號 11-6-6)，如圖六所示。



圖六

編號 13-12 (♀) 轉殖小鼠：第一胎生 8 隻小鼠，只有一隻為轉殖小鼠(編號 13-12-1)，如圖七所示。



圖七

在本實驗中，所遭遇的最大困難在於所產下的 F1 generation 中，轉殖小鼠的數量太少，此點由編號 11-6 轉殖小鼠連續生兩胎即可看出。