

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

人類 *CYP11A1* 基因在腎上腺受 cAMP 調節的特異性表現機制
ADRENAL-SPECIFIC MECHANISM OF cAMP REGULATION
ON HUMAN *CYP11A1* GENE EXPRESSION

計畫類別： 個別計畫 整合型計畫
計畫編號：NSC 89-2313-B-002-075
執行期限：88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人：郭應誠
協同主持人：鍾邦柱

執行單位：國立台灣大學獸醫學系

中華民國八十九年九月二十三日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

人類 *CYP11A1* 基因在腎上腺受 cAMP 調節的特異性表現機制

ADRENAL-SPECIFIC MECHANISM OF cAMP REGULATION ON HUMAN *CYP11A1* GENE EXPRESSION

計畫編號：NSC 89-2313-B-002-075

執行期限：88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人：郭應誠 國立台灣大學獸醫學系

協同主持人：鍾邦柱 中央研究院分子生物研究所

計畫參與人員：邱顯傑、陳秋妹 國立台灣大學獸醫學系

一、中文摘要

類固醇內分泌素分為鹽皮素、糖皮素及性類固醇三大類，分別控制體內礦物質、糖分和性功能之平衡，這些生理作用是維持生命與延續種族所必需。大體上，來自腦垂體的刺激素如 ACTH、LH、FSH 等調節類固醇之合成，且在其標的細胞內都是經由相同的第二信使 cAMP 來傳遞他們的調節訊息。*CYP11A1* 基因所產生的酵素是最重要的類固醇合成酵素，多年來我們持續在各種類型的細胞中研究 cAMP 調節該基因的表現，發現在不同的細胞類型中有不同的特性，而且我們也發現其上游的 cAMP 反應序列很可能是此一特異性作用的關鍵因素。因此，我們計畫進一步分析此 cAMP 反應序列的組成與各元素之功能角色，完成以下既定的目標：

- 一、 確認與序列中各元素交互作用的轉錄因子。
- 二、 評估 cAMP 對這些轉錄因子表現之影響。
- 三、 評估 cAMP 對這些轉錄因子結合活性之影響。
- 四、 確認各元素與轉錄因子交互作用之關鍵序列。
- 五、 評估各元素之轉錄功能。

關鍵詞：類固醇生成作用、cAMP、轉錄因子、啟動子活性

二、計畫緣由與目的

類固醇生成酵素 P450_{scc} 為 *CYP11A1* 基因的表現，它催化類固醇生成作用的第一個步驟，普遍存在於所有的類固醇生成組織中，為生成類固醇的關鍵酵素。生理上，類固醇組織分泌類固醇是接受腦垂腺分泌的刺激素如 ACTH、LH 及 FSH 的調節。這些刺激素經由細胞內 cAMP 的訊息途徑調節類固醇細胞內的類固醇生成酵素的表現以傳達調節類固醇生成的指令。因此，了解 P450_{scc} 如何

接受 cAMP 訊息的調節而表現，為掌握類固醇生成的首要契機。

我們對 P450_{scc} 表現的研究已進行多年，所獲得的研究成果逐年發表於國際知名的科學期刊，為相關領域重要的文獻參考。最近我們發現 P450_{scc} 基因的啟動子上有一段上游的 cAMP 反應序列可能控制 P450_{scc} 在不同類固醇組不同表現的重要元素。因此，本年度的計畫目的，便是要仔細解析此一序列，以探索它的功能、重要組成、以及對 cAMP 訊息的反應等，而完成五點目標：

- 一、確認與序列中各元素交互作用的轉錄因子。
- 二、評估 cAMP 對這些轉錄因子表現之影響。
- 三、評估 cAMP 對這些轉錄因子結合活性之影響。
- 四、確認各元素與轉錄因子交互作用之關鍵序列。
- 五、評估各元素之轉錄功能。

三、結果與討論

本計畫已確認在 CYP11A1 基因啟動子的上游 cAMP 反應序列中含有二個 TRE/CRE 似的元素及一個 SF1 的元素，而 cAMP 的刺激能有效地增加這些元素與它們的轉錄因子間的結合活性，但是 cAMP 似乎不能增強這些轉錄因子的表現，暗示元素與轉錄因子間的交互作用是因轉錄因子接受轉譯後修飾而增強。我們也辨認了這些元素的關鍵序列，經突變該部分序列將喪失與轉錄因子間的交互作用。而這些元素個別存在並不具備轉錄功能，必須聯合作用才能有效地反應 cAMP 訊息的刺激。

四、計畫成果自評

本計畫執行已完成了所有的預期五點目標，所獲得的研究成果一部份已發表於今年九月十五日出刊的 Life Sciences 科學期刊上，而另一部份也於今年九月五日投稿至 Biochimica Et Biophysica Acta 科學期刊上，此二期刊都名列 SCI 排行榜，且 impact factor 都在 2.0 以上，顯然，本計畫研究成果深具學術價值，後續的研究值得被繼續支持。

五、參考文獻：

1. Hu, M.-C., **L.-C. Guo**, J.-H. Lin, and B.-c. Chung, 1991. Regulated expression of cytochrome P-450_{scc} (cholesterol-side-chain cleavage enzyme) in cultured cell lines detected by antibody against bacterially expressed human protein. *Biochem. J.* 274: 813-817.
2. Chang, C.-Y., C. Huang, **L.-C. Guo**, H.-M. Tsai, D.-A. Wu, and B.-c. Chung, 1992. Transcription of the human ferredoxin gene through a single promoter which contains the 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate-responsive sequence and Sp1-binding site. *Mol. Endocrinol.* 6: 1362-1370.

3. **Guo, I.-C.**, C. Huang, and B.-c. Chung, 1993. Differential regulation of the CYP11A1 (P450_{sc}) and ferredoxin genes in adrenal and placental cells. *DNA Cell Biol.* 12: 849-860.
4. **Guo, I.-C.**, H.-M. Tsai, and B.-c. Chung, 1994a. Actions of two different cAMP-responsive sequences an enhancer of human CYP11A1 (P450_{sc}) gene in adrenal Y1 and placental JEG-3 cells. *J. Biol. Chem.* 269: 6362-6369.
5. **Guo, I.-C.**, L.-S. Wu, J.-S. Lin, and B.-c. Chung, 1994b. Mechanism of trophic hormone action on the regulation of steroid biosynthesis. *Cont. Med. Edu.* 4: 414-423.
6. Chen, C.-T., **I.-C. Guo**, B.-c. Chung, 1995. Regulation of cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 in mouse testis Leydig cell line I-10. *DNA Cell Biol.* 14: 803-810.
7. Yeh, J.-R., C. Huang, D.-A. Wu, **I.-C. Guo**, W.E. Rainey, and B.-c. Chung, 1995. Regulation of ferredoxin gene in steroidogenic and nonsteroidogenic cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53: 47-51.
8. Chung, B.-c., **I.-C. Guo**, and S.-J. Chou, 1997. Transcriptional regulation of the CPY11A1 and ferredoxin genes. *Steroids* 62: 37-42.
9. **Guo, I. C.** and B. c. Chung, 1999. Protein binding activity and cyclic AMP-responsiveness of a weak sp1 site in proximal promoter of human CYP11A1 gene. *J. Genet. Mol. Biol.* 10: 9-18.
10. **Guo I. C.** and B. c. Chung, 1999. Cell-type specificity of human CYP11A1 TATA box. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69: 329-334.
11. **Guo, I. C.**, 1999. Effect of cAMP on expression of cytochrome P450_{sc}. *J. Chin. Soc. Vet. Sci.* 25[Suppl]: 8-15.
12. **Guo, I.-C.**, L.-S. Wu, L.-H. Lin, and B.-c. Chung, 2000. Inhibition of estrogens and androgens on progesterone synthesis in bovine luteal cells. *Life Sci.* (accepted).
13. Chen C., and **I.-C. Guo**, 2000. Effect of cAMP on protein binding activities of three elements in upstream promoter of human CYP11A1 gene. *Life Sci.* (accepted).
14. **Guo, I.-C.**, H.-H. Chiu, H.-M. Tsai, and B.-c. Chung, 2000. Characterization of upstream cAMP responsive sequence regulating transcription of human CYP11A1 gene. *Biochem. Biophys. Acta* (submitted)

Abstract

Steroid hormones including mineralocorticoids, glucocorticoids and sex steroids control the balance of minerals, glucose and sexual characteristics, which are essential for the maintenance of life and for the continuation of a species. Physiologically tropic hormones secreted from pituitary gland regulate the biosynthesis of steroid hormones and the cAMP is the common intracellular second messenger for all tropins such as ACTH, LH and FSH. The conversion of cholesterol into pregnenolone is the first step in the synthesis of all steroid hormones, which is a rate-limiting and hormonally regulated step and catalyzed by *CYP11A1* enzyme. We have been studying the regulation of *CYP11A1* gene expression in distinct cell types and found out its cell type-specific cAMP-dependent transcription. By combination of DNA-protein interacting assay and functional transfection assay, we have identified two cAMP-responsive sequences (CRS) in the promoter region of *CYP11A1* gene. The upstream CRS (U-CRS) seems to work as a cell type-specific sequence since it is only functional in adrenocortical cells. The tissue-selective function could elucidate how the common second messenger cAMP transduces multiple-way signals from distinct tropic hormones to the same target *CYP11A1* gene. In animal body, that is important mechanism for cell to distinguish different origins of stimulating signals when they share the same second messenger. So that, in this grant proposal, we plan to further analyze the components of U-CRS and their properties to achieve the following specific aims:

1. Identify interacting proteins
2. Measure the influence of cAMP on expression of specific binding proteins
3. Measure the influence of cAMP on binding activities of specific binding proteins
4. Define the essential sequences for specific protein binding
5. Test the function of elements

Keywords: steroidogenesis, cAMP, transcription factor, promoter activity