

爲了回答此一問題，我們進行了一個分子流行病學研究，以探討女性荷爾蒙代謝基因在乳癌生成所扮演的角色。重要的荷爾蒙代謝基因，包括參與荷爾蒙生成所需的CYP17、荷爾蒙作用活化的CYP1A1，及荷爾蒙去活化的COMT。結果發現(1)三個代謝基因當中，扮演去活化功能的COMT最爲重要，(odds ratio=4.08)；(2)若對代謝機轉整體考慮的話，易感受基因型的組合（包括CYP17及CYP1A1的高反應型及COMT的慢反應型）所造成的高致癌性，會隨著高危險性基因的數目愈多，癌症危險性也愈高，並且在女性荷爾蒙暴露較多的婦女更爲明顯，顯示荷爾蒙代謝過程對乳癌生成的重要性；(3)因爲COMT是負責荷爾蒙致癌代謝物的去活化，COMT致癌角色的定位，更支持女性荷爾蒙直接導致基因突變而致癌的可能，因荷爾蒙致突變性以氧化性傷害爲主，這其中便包含基因的斷裂與缺損，這也許是能部份解釋基因斷裂造成基因體缺損對乳癌發生格外的重要。



沈志陽

學經歷：

國立台灣大學公共衛生系學士(1983)

國立台灣大學公共衛生

生所碩士(1987)

Univ. North Carolina, USA 流行病學博士(1992)

中央研究院生物醫學科學研究所博士後研究(1992-1994)

中央研究院生物醫學科學研究所助研究員(1994-2000)

中央研究院生物醫學研究所副研究員 (2000-迄今)

中國醫藥學院環境醫學研究所副教授 (1992-迄今)

國立台灣大學流行病學研究所副教授 (1995-迄今)

## 人類免疫缺乏病毒鞘膜蛋白 gp41之功能研究

陳士隆

本院生物醫學科學研究所副研究員

HIV-1之致病機制是由其所帶之病毒蛋白？蛋白間及與細胞蛋白間之複雜交互作用以造成人體免疫系統被破壞而引起，其病毒表面 envelope (Env) protein是由extracellular蛋白gp120和transmembrane蛋白gp41以非共價鍵組合而成，是引起感染性、細胞病變及細胞感染趨性(cell tropism)之主要病毒蛋白。

gp41之N-端有一高度保留(conserved)的區域，稱爲“Zipper motif region”，在此區域內每隔七個胺基酸就有一個leucine或isoleucine，且親水性和疏水性胺基酸則分佈於 $\alpha$ -helical wheel之兩面。我們最早的研究利用變異的方法以proline取代這些保留之leucine或isoleucine，結果發現這些變異病毒不具感染性且變異蛋白喪失了與CD4<sup>+</sup>細胞形成syncytia之能力，顯示此區域在病毒生長過程中扮演重要之角色。

因HIV-1之Env是以oligomer的狀態存在，且這些zipper motif Env mutant仍具有oligomerization之能力，故我們探討當zipper motif mutant Env和wild-type (wt) Env同時表達時是否會使wt Env之功能喪失。由transient coexpression實驗我們得知zipper motif變異蛋白可抑制wt病毒之感染和wt Env蛋白所

引起之膜融合，並會抑制由wt Env所引起病毒進入細胞(virus entry)之能力。我們接著建立HeLa-CD4-*env* clone 其染色體上帶有以 HIV-1 long-terminal-repeat (LTR)控制之 zipper motif mutant *env* gene，發現以HIV-1之transcriptional transactivator Tat引發 zipper motif mutant在HeLa-CD4 clone中表達會減少T cell (T)-tropic病毒株之傳佈(transmission)。我們接著以CD4<sup>+</sup>之PM1人類T細胞（同時表達CXCR4與CCR5之HIV-1共受體）建立含有 silent copy之 mutant *env* 基因建構，並發現表達 zipper motif 變異蛋白會減少或干擾T-tropic 及 macrophage (M)-tropic 病毒株之生長及複製，這些結果顯示了此區域可作為一對抗 HIV-1 基因療法之標的。

gp41之細胞質內區域(cytoplasmic domain)含有三個雙性(amphipathic)之 $\alpha$ -helical 構造，分別位於胺基酸828至856、770至795，與786至812。因針對此三個 $\alpha$ -helix所合成之胜肽具與membrane作用之能力，且會如其他lentivirus lytic peptide (LLP)般造成membrane之破壞，故此三個 $\alpha$ -helix分別稱為LLP-1、LLP-2與LLP-3。LLP motif在primate immunodeficiency virus中雖是保留構造，然對此區域所引起之病毒進入細胞及對LLP序列在細胞膜滲透及細胞病變之分子機制仍所知有限。

我們稍早的研究發現一個缺少整個cytoplasmic domain之Env mutant，稱TC mutant，會與wt Env形成一異聚合物而使整個complex失去了wt Env所引發之virus entry之能力。因TC mutant仍會與CD4結合造成CD4<sup>+</sup>細胞形成syncytia，故我們在TC mutant之CD4-binding site內作了一個由tryptophan改

成serine之變異，此427.TC double mutant喪失了與CD4<sup>+</sup>細胞形成syncytia之能力。接著我們發現帶有TC或427.TC mutant *env* gene之HeLa-CD4細胞株在受到T-tropic病毒株感染時會減少病毒之傳佈，此外我們也發現CD4<sup>+</sup> T細胞如CEM-SS和PM1若帶有427.TC之double mutant *env* gene可減緩T-tropic and M-tropic病毒之生長和複製，而帶有TC mutant *env* gene之CD4<sup>+</sup> T細胞則無法有效地減緩病毒之複製。

由這些dominant interference之實驗結果我們推測gp41之cytoplasmic domain可能是以 oligomeric狀態存在。我們利用E. coli malE gene（其encode monomeric之maltose-binding protein）之表達系統配合sucrose gradient、chemical cross-linking、gel filtration及細胞表達等實驗發現gp41 cytoplasmic domain之C端三分之二部份具有自身組合成一high-ordered構造之能力，且LLP-1和LLP-2在cytoplasmic domain所引起之聚合(multimerization)上扮演重要之角色。這些發現對LLP序列在破壞細胞膜及pore formation上提供了一「結構需求」之解釋。

最近我們利用cell fractionation，in vivo membrane flotation及confocal microscopy等方法發現gp41 cytoplasmic domain之C端三分之二部份能與cellular membrane結合，且藉由區分ER及Golgi等subcellular organelle marker之colocalization及subcellular fractionation等實驗進一步得知三個LLP motif分別具有把cytoplasmic reporter protein如 $\alpha$ -galactosidase及green fluorescence protein target至ER之能力。這些實驗結果顯示HIV-1 Env之cytoplasmic domain與細胞膜結合在病

毒生長過程中可能扮演極重要之角色。

為進一步了解gp41 cytoplasmic domain 在病毒組裝、膜融合後之過程及對細胞所引起病變之分子機制，目前我們的研究重點在：(1)探討cytoplasmic domain聚合之生理意義；(2)了解cytoplasmic domain與細胞膜結合在病毒複製過程中之重要性；(3)探討cytoplasmic domain與Gag結合之本質及了解此種結合在病毒組裝過程中所扮演角色之分子基礎。由這些研究所得之結果亦有助於以cytoplasmic domain為標的之抗愛滋病毒方法之設計及開發。



陳士隆

學經歷：

國立台灣大學農業化學系學士(1975)

國立台灣大學農業化學研究所碩士(1977)

美國普渡大學生物化學系博士(1983)

美國哈佛大學醫學院微生物暨分子遺傳系博士後研究

(1983-1987)

美國哈佛大學醫學院小兒醫學系講師(1987-1990)

美國哈佛大學醫學院小兒醫學系助教授 (1990-1992)

中央研究院生物醫學科學研究所副研究員 (1995-迄今)

## Focal Adhesion Kinase的表現促進肝細胞生長因子所引起的細胞移動及腫瘤化

陳鴻震

中興大學生命科學院動物學系教授

細胞與細胞外基質蛋白(extracellular matrix protein)間的作用，又稱之為細胞附著(cell adhesion)，參與著許多重要的生理或病理過程，例如胚胎形成、組織修復、凝血作用、免疫反應、及腫瘤轉移等。細胞能夠附著於細胞外基質蛋白，主要是經由細胞表面接受體integrin的作用。近年來的研究發現，integrin與細胞外基質蛋白間的作用，不僅可以促進細胞骨架的形成，以提供細胞機械性的附著與支撐，也可以傳遞生化性的訊號，進一步調節許多重要的細胞功能，例如細胞的增殖、存活、與移動。Focal adhesion kinase (FAK)一種存在於細胞質內的protein tyrosine kinase，被認為在integrin的訊息傳遞中，居於中央樞紐的地位。當細胞藉由integrin附著於細胞外基質蛋白時，FAK本身的酪氨酸磷酸化及活性能很快地被激活，進而吸引其他細胞內訊息傳遞分子與之作用，例如Src、PI 3-kinase、Grb2、Cas等。此外，FAK也被發現可以和某些細胞骨架蛋白發生作用，例如paxillin及talin。就細胞層次而言，目前FAK已被證明可以促進細胞對細胞外基質蛋白的遷移及抑制細胞凋亡(apoptosis)。在臨床上，某些腫瘤的惡化似乎也伴隨著FAK的表現增加，然而，FAK的表現增加是否真的是造成腫瘤形成或惡化的原因之一，則仍不清楚。

肝細胞生長因子(hepatocyte growth