

배양 유선세포에서 내생성 호르몬에 의한 유선특이 유전자 프로모터의 활성 조절

윤영승¹ · 정선미¹ · 이성호² · 김재만^{1†}

¹국립목포대학교 생물학과, ²상명대학교 생물학과

Regulation of the Mammary Tissue-Specific Promoter Activity by Endogenous Hormones in Cultured Mammary Cells

Youngseung Yoon¹, Sun-Mi Jeong¹, Sung-Ho Lee² and Jaeman Kim^{1†}

¹Department of Biology, Mokpo National University, Muan-gun, Chonnam 534-729, Korea

²Department of Biology, SangMyung University, Seoul 110-743, Korea

요약: 유선에서 젖의 생산은 뇌하수체 호르몬인 성장 호르몬과 프롤락틴을 포함한 여러 가지 호르몬의 조절을 받는다. 최근의 연구에 따르면 이 호르몬들 중에서 성장호르몬과 프롤락틴은 유선에서도 그 유전자 전사체가 발견된다. 본 연구에서는 유선에서 발현되는 성장호르몬이 유선 특이 발현 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사하고자 유선 특이 발현 유전자인 베타-락토글로불린(β -lactoglobulin :BLG)의 프로모터를 모델 시스템으로 하여 소와 사람의 성장 호르몬이 유선의 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 성장 호르몬은 단독으로 처리하였을 때 베타-락토글로불린 유전자 프로모터 활성을 억제하였다. 그러나 젖 분비 호르몬들인 인슐린, 프롤락틴, 글루코코르티코이드와 함께 처리하였을 때는 농도 의존적으로 BLG 프로모터 활성을 상승시키는 효과를 보였다. 성장 호르몬을 유선 세포내에서 발현시켰을 때는 적정 농도에서 세포 증식과 유선 프로모터 활성을 크게 증진시켰다. 반면 소의 성장 호르몬 유전자 프로모터는 유선 세포에서 뚜렷한 활성을 나타내지 않았다. 이상의 결과는 유선에서 발현되는 뇌하수체 호르몬들은 조절 누수에 의한 유전자 발현이 아니라 생리적 기능을 가지고 있음을 의미한다. 또 인위적으로 성장호르몬의 발현을 조절하여 적절한 양이 발현되도록 하면 젖의 생산을 증진시킬 수 있다는 가능성도 암시한다.

ABSTRACT: Lactogenesis in mammary gland is under the control of various lactogenic hormones including hypophysial growth hormone and prolactin. Recent studies reported that such pituitary lactogenic hormones are also expressed in mammary cells as well as in pituitary. For the purpose to analyze the role of these non-pituitary hormones in mammary cells, β -lactoglobulin (BLG) gene promoter was selected as a model system. The growth hormone suppressed BLG promoter activity when it was applied alone on cultured mammary HC11 cells. Along with lactogenic hormones such as insulin, prolactin and glucocorticoid, however, it significantly enhanced expression of BLG promoter activity in a dosage- dependent manner. Exogenous expression of the growth hormone gene in cultured mammary cells also strongly promoted cell proliferation and BLG promoter activity. Bovine growth hormone promoter, on the contrary, did not revealed any notable activity. Above results suggest that endogenous expression of the pituitary hormone genes in mammary cells is not a regulation leakage but a physiological control. Moreover, artificial overproduction of the growth hormone in mammary gland may help increase milk production.

Key words: β -Lactoglobulin promoter, Mammary gland, Growth hormone.

서론

유선은 그 발생, 발달, 분화 및 젖 생산과정에서 복잡한 호

This work was supported by the Korea Research Foundation Grant (GKRF-98-019-D00128).

†교신저자: 전남 무안군 청계면 도림리 61, 국립목포대학교 생물학과 (우) 534-729 (전) 061-450-2348 (팩) 061-454-0267 e-mail: jkim@chungkye.mokpo.ac.kr

르몬 조절을 받는다 (McCarty & McCarty, 1975). 이 과정에는 각종 성 호르몬을 포함하는 스테로이드 호르몬, 성장 호르몬과 프롤락틴을 포함하는 펩타이드 호르몬들이 관여되어 있다. 이 호르몬들 중 젖 분비에서 유선 특이 프로모터의 조절에 가장 밀접한 관계가 있는 호르몬이 성장 호르몬과 프롤락틴이다. 이 두 호르몬은 보통 뇌하수체에서 합성, 분비되어 유선 세포막의 수용체에 결합함으로써 그 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다. 막 수용체에 호르몬이 결합하면 non-re-

ceptor tyrosine kinase (JAK2)가 활성화되고 이 효소에 의해서 세포내 여러 단백질들의 tyrosine이 인산화되는 것으로 보고되었다 (Rillema & Rowady, 1996; Ferrag et al., 1996; Sidis & Horseman, 1994). 이 과정에서 전사 신호 전달 및 활성화 인자 (STAT factors)인 Stats 1, 3, 5 등이 활성화되고 (Le Stunff et al., 1996; Tourkine et al., 1995) *c-fos* mRNA가 증가하였다 (Rillema & Rowady, 1996). 그 결과 카제인, 베타 락토글로불린 등의 유선 특이 프로모터들이 활성화되고 젖 합성이 촉진된다. 프롤락틴과 성장 호르몬은 젖 단백질 합성을 촉진할 뿐만 아니라 분비 세포의 apoptosis를 억제함으로써 젖 분비를 유지하는 기능을 가지고 있다 (Travers et al., 1996). 이유후에 젖 생산과 분비량 감소는 이 호르몬들의 감소와 밀접한 관련이 있다.

이와 같이 유선은 외래 호르몬에 의해서 그 기능이 조절되고 있을 뿐만 아니라 그 자체에서도 호르몬을 합성하는 것으로 보인다. 이와 같은 가능성은 여러 가지 유방암 세포주에서 호르몬 전사체의 존재가 밝혀지면서 제기되었으며 (Shaw-Bruha et al., 1997; van Garderen, 1997) 외래 호르몬의 작용을 방해한 상태에서 내부 발현 호르몬의 작용을 증명함으로써 뒷받침 되었다 (Liu et al., 1997). 유선에서 발현되는 성장 호르몬과 프롤락틴은 autocrine/paracrine 기작에 의해서 그 기능을 나타낼 것으로 추론하고 있다 (Liu et al., 1997). 뇌하수체 호르몬의 뇌하수체 조직의 발현은 태반, 정소, 난소 등 여러 조직에서 관찰되고 있는데 (Kanzaki & Morris, 1998; Untergasser et al., 1996) 이들 조직에서 호르몬의 기능은 정확히 규명되어 있지 않다.

우리는 성장 호르몬과 프롤락틴에 의해서 전사 활동이 조절되는 유선 특이 발현 유전자인 Beta-lactoglobulin (BLG) 유전자의 프로모터(Kim et al., 1995)를 이용하여 유선에서 발현되는 이들 호르몬이 유선 특이 발현 유전자 발현에 어떤 영향을 미치는지를 조사하였다. BLG는 우유의 단백질 성분들 중 약 5%를 차지하는 주요 유 단백질이며 카제인을 제외한 유청 단백질 중에서는 가장 많은 양을 차지하는 단백질이다 (Gordon & Kalan, 1974). 이 BLG는 반추동물 및 개, 돼지, 말 등의 가축과 돌고래 등의 해양 포유동물의 젖에서는 발현되지만 사람 및 설치류의 젖에서는 나타나지 않는 단백질로 그 기능은 레티놀산 (retinoic acid) 등의 운반에 관련되어 있을 것으로 추정되나 정확히 밝혀져 있지 않다 (Ali & Clark, 1988). BLG 유전자는 유선에서 임신중이나 수유 기간 중에만 발달 단계 및 조직 특이적으로 발현된다 (Gaye et al., 1986). 이 유전자의 전사 (transcription)는 glucocorticoid (Gaye et al., 1986)와 prolactin (Lesueur et al., 1990; Lesueur et al.,

1991)에 의해 조절을 받는 것으로 알려져 있다. Watson 등 (1991)은 형질전환 생쥐의 실험을 통해서 BLG 유전자 프로모터의 유선조직 특이적 활성화에 필요한 최소한의 염기 서열부위가 -406에서 -140까지인 것을 확인하였다. 그리고 이 부위의 염기서열을 gel-shift assay로 분석한 결과 이 프로모터 부위에서 최소한 5군데의 결합부위에 작용하는 두 종류의 nuclear factor I (NF I)을 확인하였으며 유선 세포에서만 발견되는 유단백질 결합인자 (MPBF)가 5군데 결합부위에 결합하는 것을 확인하였다. 이 유단백질 결합인자는 프롤락틴의 작용을 매개하며 인터페론 γ -활성화 부위 (GAS)에 결합하며 STAT factor가 이 과정에 관여하는 것으로 보고되었다 (Burdon et al., 1994a; Burdon et al., 1994b). 염소의 BLG 유전자에서는 (Kim et al., 1995) 조절 부위 염기 서열 중에서 유선 특이적 활성화 작용을 매개하는 부위 (Kim et al., 1997b; Kim & Kim, 1995)와 비유선 조직에서 발현 억제에 관여하는 부위가 결정되었다 (Kim et al., 1997a; Kim & Yu, 1995).

본 연구에서 우리는 유선에서 그 전사체가 발견된 성장 호르몬 유전자가 유선에서 발현되는지 여부와, 발현된다면 이 호르몬의 작용이 유선 특이 유전자의 발현과 어떤 관계가 있는지를 조사하였다. 먼저 실험에 적절한 길이의 베타-락토글로불린 유전자 프로모터를 가진 벡터를 결정하고, 이 벡터로 형질 전환된 유선 세포주로부터 분석에 적합한 클론을 선발한 다음, 이 클론을 이용하여 호르몬 처리효과 및 호르몬 유전자 발현이 유선 특이 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 아울러 성장 호르몬 프로모터 조절 부위를 조작함으로써 유선에서 호르몬 유전자 발현이 어떻게 조절되는지를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 유전자 발현 벡터의 제조

1) 유선세포 특이 발현벡터의 제조

염소의 베타-락토글로불린 (Beta-Lactoglobulin: BLG) 유전자의 프로모터를 chloramphenicol acetyltransferase (CAT)와 융합하여 pBLG cat 발현 벡터를 만들고 이것을 프로모터의 5' -끝쪽에서 순차적으로 결실시켜 p1692cat, p740cat, p470cat, p205cat, p110cat, pcat 벡터를 만들었다. 또 BLG 프로모터의 -744에서 -697 염기에 해당하는 부위를 올리고머로 합성하여 이것을 p205cat의 프로모터 앞에 각각 1개 또는 세 개를 삽입하여 발현 벡터인 p(Oli)₁205cat과 p(Oli)₃205cat를 만들었다. 합성 올리고머의 염기서열은 5'-GATCTAGGCAGCT-

CGCTGTAGCCTGAGCGTTGGAGGGAAGTGTCTGGGAGAG-3 인데 여기에서 밑줄친 부위를 5'-GATCTAGGCAGCTC-GAAGAGAGATGAGCGTGTGGAGGGAAGAGAGAGAGGA-GAG-3'와 같이 염기를 치환하여 돌연변이 올리고머를 만들고 이것을 p205cat에 연결하여 시켜 p(mOli)3205cat 벡터를 만들었다.

2) 성장 호르몬 발현 벡터 제조

소의 성장 호르몬의 게놈 유전자를 포함하는 pSVCAW2 (from R. Woychik) 발현벡터로부터 4.3kb 소 성장 호르몬 유전자를 분리한 다음 이것을 조절부위 조각 (2.2kb, EcoRI-BamHI)과 구조 유전자 조각 (2.1kb, BamHI-EcoRI)으로 구분하였다.

이중 조절부위 조각을 chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 보고 유전자를 가진 pcat 벡터의 multicloning site (MCS)에 삽입하여 pbGH2.1cat 벡터를 만들었다. pcat 벡터에는 미리 neo 유전자를 삽입하여 형질전환 세포를 선별할 때 표식으로 활용할 수 있게 하였다. 이 재조합 유전자의 조절부위를 5' 쪽에서 순차적으로 결실시켜 5'-deletion mutant vector series를 만들었다. 성장 호르몬을 생산하는 발현 벡터는 발현량이 조절 가능한 pRetro-On (Clontech) 벡터의 MCS에 소와 사람의 성장호르몬 구조 유전자를 삽입하여 만들었다. 사람의 성장호르몬 구조유전자는 pGH (생명공학연구소, 이경광 박사 실험실로부터 얻음) 벡터에서 2.1kb, BamHI-EcoRI 조각을 분리하여 사용하였다.

2. 세포배양

1) HC11 유선세포의 배양

생쥐의 유선 상피세포인 HC11 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)과 10 ng/ml의 상피 세포 성장 인자 (epidermal growth factor; EGF)가 포함된 RPMI 1640 (GIBCO) 성장 배양액에서 배양하였다. 배양액은 매 48 시간마다 새로이 교환하였다. neo 유전자로 형질 전환된 세포주는 200 µg/ml의 G418 (GIBCO)을 포함한 성장 배양액에서 선택배양하였다. 형질 전환 세포주에서 CAT 유전자를 발현시킬 때에는 세포를 G418을 포함한 성장 배양액에서 바닥에 가득 차도록 기른 뒤 G418과 2% FBS를 포함한 RPMI 1640 배양액에서 4일간 배양하며 호르몬을 처리할 때는 배양액에서 세포가 배양 접시에 가득 차게 기른 뒤 소의 인슐린 (5 µg/ml), 양의 프롤락틴(5 µg/ml) 및 글루코코르티코이드의 유사체인 텍사메타손 (0.1 µM; Doppler et al., 1989)이 포함된 배양액에서 96 시

간 동안 배양하였다. CAT 효소의 양은 동량의 총 단백질에 포함된 CAT 효소를 CAT ELISA Kit (Boehringer-Mannheim)을 사용하여 측정함으로써 결정하였다.

2) 단일 클론의 분리

형질 전환된 세포군을 트립신으로 처리하여 낱알의 세포로 분리되도록 한 다음 배양액에 희석하여 96well 배양용기에 이식하였다. 이때 세포밀도를 한 well당 0~2개의 콜로니가 형성되도록 조절하였다. 현미경상에서 콜로니를 뚜렷이 구분할 수 있게 되면 한 개의 콜로니만 형성된 well을 선별하여 6 well 배양용기에 이식하였다.

3. 배양 유선세포에서 GH 프로모터 활성의 조사

1) 소 성장 호르몬 프로모터의 염기서열 결정

소의 성장 호르몬의 게놈 유전자로 부터 조절부위 조각 (2.2kb, EcoRI-BamHI)을 분리하여 pBluescriptSK(+) (Stratagene)의 다중클로닝부위 (MCS)에 삽입하였다. 삽입된 조각을 다시 BstXI으로 반복하여 EcoRI-BstXI, BstXI-BamHI 조각을 가지는 벡터를 만들고 이것을 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 조절부위 염기서열을 순차적으로 결실시킨 발현벡터 시리즈를 이용하여 결정된 염기서열을 검증하였다. 염기서열의 조절인자 예상 결합부위는 Web signal scan service (BioPortal)를 사용하여 검색하였다.

2) 발현 벡터를 이용한 HC11 유선세포의 형질전환

HC11 세포를 안정적으로 형질전환 시키기 위하여 발현 벡터를 CaPO₄ transfection 방법으로 세포내에 도입하였다. 20 µg 발현 벡터를 2×HBS 및 2 M 칼슘과 혼합하여 미세한 침전이 형성되도록 한 다음 이것을 세포 배양액에 추가하여 밤새 배양하였다. 18시간이 경과한 다음 배양액을 제거하고 15% 글리세롤이 포함된 PBS로 3분간 쇼크 처리하였다. 그 후 성장 배양액에서 48시간 동안 배양하고 200 µg/ml의 G418 (GIBCO)을 포함한 성장 배양액에서 10~15일 동안 유지하여 내성 콜로니들을 선택하였다. 이렇게 얻은 약 100~200개의 콜로니들을 모아서 형질 전환 세포주들을 만들었다.

3) CAT 분석; Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) Assay

세포를 PBS로 한 차례 씻고 세포를 배양접시에서 긁어내 모은 다음, 500 µl의 0.25 M Tris-HCl (pH 7.5)에 분산시켜서

-70°C와 37°C에서 3~5회 동결-해동을 반복하여 효소를 추출한다. 세포 추출액을 65°C에서 10분간 열처리한 다음 원심 분리하여 그 상층액을 단백질 정량 (Ausubell et al., 1987b)이나 CAT 효소의 정량에 사용한다. CAT 효소의 양은 동량의 총단백질에 포함된 CAT 효소를 CAT ELISA Kit (Boeringer-Mannheim)을 사용하여 측정함으로써 결정하였다. CAT 발현량이 매우 적을 때는 thin layer chromatography (TLC)법으로 (Gorman et al., 1982) CAT 활성을 정량하였다.

4. 호르몬의 생리적 기능에 관한 조사

1) 호르몬 발현 벡터와 유선-특이 프로모터 벡터를 이용한 HC11 유선세포의 형질전환

유선 세포인 HC11 세포를 p740cat 벡터로 형질 전환하여 stable transformant를 분리하였다. 형질 전환된 클론들 각각을 조사하여 가장 발현 효율이 좋은 클로니를 분리한 다음 이 클론 세포들을 성장 호르몬 발현 벡터인 pRetro-hGH-On과 pRetro-bGH-On으로 형질전환 하였다. Retroviral vector 형질 전환 대조군 세포는 성장 호르몬 유전자가 들어 있지 않은 pRetro-On vector 만으로 형질전환하였다. 형질전환된 세포는 2 µg/ml의 푸로마이신 (Sigma)으로 선별하였다. 이 세포를 6 well 배양접시에 이식한 다음 농도를 달리한 Doxycycline (Tetracycline 유사체)로 성장호르몬의 발현을 유도하였다. 성장 호르몬의 발현 정도에 따른 유선 특이 프로모터의 활성화는 p740cat에서 발현되는 CAT의 양을 정량함으로써 결정하였다.

2) 성장 호르몬에 의한 세포 증식 효과

유선 세포인 HC11 세포를 BLG 발현벡터인 p740cat 벡터와 성장 호르몬 발현벡터인 pRetro-hGH-On 및 pRetro-bGH-On 벡터로 형질 전환된 세포군을 Doxycycline으로 처리하여 성장호르몬의 발현을 유도하였다. 성장호르몬의 발현 정도에 따른 세포 증식 효과는 Proliferation assay kit (Promega)을 이용하여 정량하였다.

연구결과 및 고찰

1. 호르몬 반응성 beta-lactoglobulin 프로모터의 결정 및 단일 클론의 분리

베타 락토글로불린 프로모터를 연차적으로 결실시킨 발현 벡터를 유선 세포에서 발현시킨 결과 -740까지의 프로모터를 가지는 p740cat 벡터가 젖 분비 호르몬에 대하여 잘 반응함을 확인하였다(Fig. 1). 이 프로모터는 비유선 세포인 HeLa

세포와 CV-1 세포에서는 작동하지 않을 뿐만 아니라 (data not shown) 유선세포인 HC11 세포에서는 상당한 기본 발현량을 나타내었다. 또 젖 분비 호르몬을 처리하였을 때 -205까지의 조절부위를 가지는 p205cat 벡터는 발현량의 변화를 보이지 않는 반면 p740cat 벡터는 호르몬에 의한 3~4배 정도 발현량이 증진되었다. -205에서 -740 염기서열을 분석한 결과 이 부위에서는 유선 특이발현과 관련될 것으로 추정되는 γ -IRE (Burdon et al., 1994a; Burdon et al., 1994b) 부위가 -740부터 -697에서 밀집되어 나타났다. 그래서 -740부터 -697까지의 염기서열을 합성하여 p205cat 벡터의 프로모터 앞에 삽입한 결과, 합성 염기서열 세벌이 삽입되었을 때 이 벡터는 p740cat 벡터와 유사한 발현 양상을 나타내었다. γ -IRE 부위를 돌연변이 시킨 올리고머는 이와 같은 경향을 전혀 나타내지 않았다. 합성된 올리고머들은 전기영동 이동성 변이 분석 (Electrophoretic Mobility Shift Assay : EMSA)에서도 발현 실험과 일치하는 결과를 나타내었다 (Data not shown). 이상의 결과는 -740까지의 조절 부위 염기서열이 베타 락토글로불린 프로모터의 유선 특이 발현을 충분히 매개할 수 있음을 의미한다. 따라서 이 p740cat 벡터를 유선 특이 발현 유전자의 발현 벡터로 결정하였다.

성장 호르몬에 의한 유선 특이 프로모터의 활성화 조절 양상을 조사하기 위하여 앞의 실험에서 선발된 p740cat 벡터로 유선 세포인 HC11 세포를 형질전환하였다. 형질 전환된 세포군으로부터 단일 클론을 분리하여 프로모터 활성을 비교한 결과, 각 클론간에 발현량이 매우 큰 차이를 나타냄을 알 수 있었다 (Fig. 2). 일부 클론은 CAT 활성이 거의 관찰되지 않

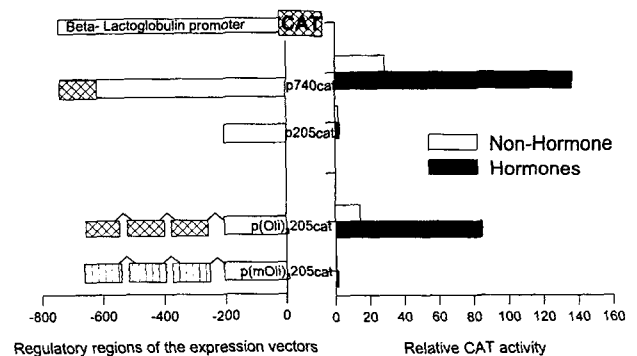


Fig. 1. Localization of the hormone responsive region on the BLG promoter. The mammary HC11 cells were stably transfected with indicated expression vectors and induced by lactogenic hormones; insulin, prolactin and dexametasone as described in materials and methods. The hatched box indicates locations of corresponding sequence for synthetic oligomer. Mutant oligomer is indicated as boxes filled with vertical lines. Data shown are representative result.

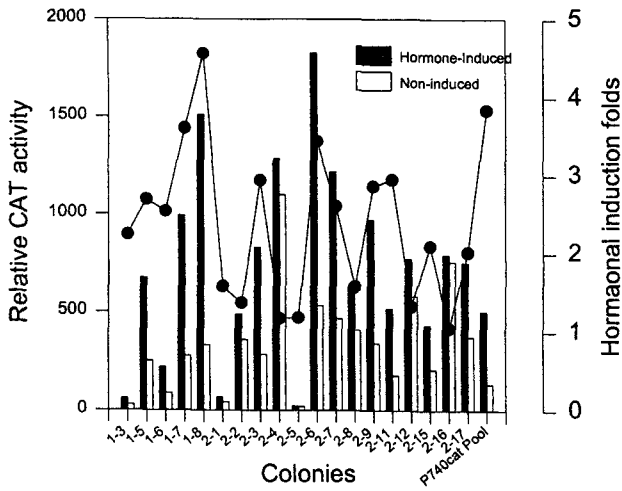


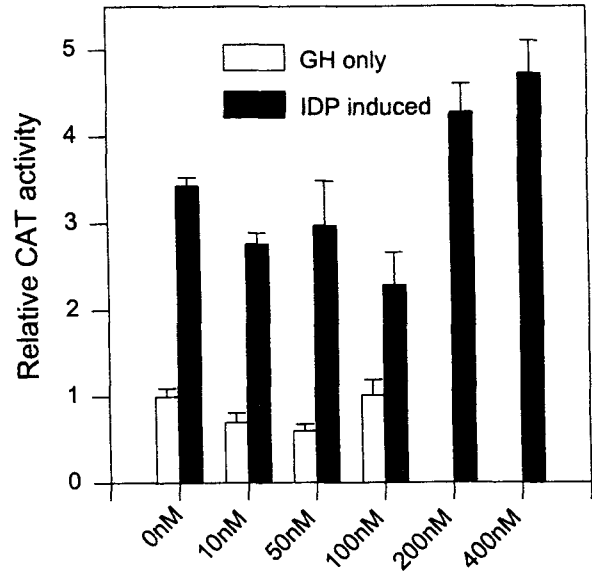
Fig. 2. Clonal variation in CAT expression. Each colonies were isolated from stable transformant pool transformed with p740cat expression vector and assayed for CAT expression. Line graph indicates hormonal induction ratios. Data shown are representative result.

왔고 일부 클론들은 젖분비 호르몬에 의한 발현 증진 현상이 거의 관찰되지 않았다. 그러나 이 클론들 중에서 1~8 클론과 2~6 클론은 CAT 발현량이 다른 클론들에 비해 현저하게 높고 젖분비 호르몬에 의한 발현 증진 효과도 뚜렷하게 나타났다. 한편 각각의 클론을 함께 모은 풀(p740cat Pool) 세포군의 발현량은 최고 발현 클론의 1/2 내지 1/3 정도의 발현량을 나타내었다. 이것은 클론 풀의 발현의 대부분이 최고 발현 클론의 유전자 발현을 반영함을 의미한다. 또 호르몬에 의해 발현이 증진되지 않는 클론들의 대부분의 기본 발현량이 고 발현 클론의 기본 발현량보다 높게 나타나는 것으로 보아 클론 풀의 기본 발현은 이들 클론의 기여가 큼을 알 수 있다. 이와 같은 결과는 호르몬에 의한 프로모터 활성화 분석에 있어서 클론 풀을 이용하는 것보다는 단일 클론을 이용하는 것이 더 정확한 결과를 얻을 수 있음을 시사한다. 각 클론의 CAT 발현 정도와 유전자 copy 수와의 상관관계를 조사하기 위하여 총 DNA중 CAT 유전자량을 비교한 결과 클론간 발현량의 차이는 유전자 copy 수와는 큰 상관관계가 없었다 (data not shown). 이상의 결과를 바탕으로 분리된 단일 클론 중에서 발현 효율이 가장 높은 1~8 클론을 성장 호르몬 효과를 검사하는 차후 실험에 사용하였다.

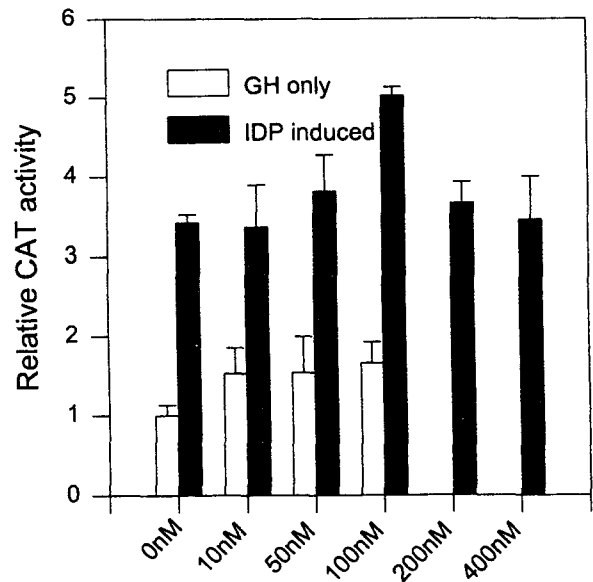
2. 성장 호르몬에 의한 Beta-lactoglobulin 프로모터 활성의 조절

성장호르몬은 배양 유선세포에서 베타-락토글로블린 프로모터를 단독적으로 활성화하지는 못하였다 (Fig. 3). 오히려

p740cat 벡터의 프로모터 활성이 성장 호르몬의 처리에 의해서 억제되었다. 이와 같은 억제 효과는 소의 성장호르몬보다 사람의 성장 호르몬 처리 시에 더욱 뚜렷이 관찰되었다. 사



a) Human Growth Hormone Treatment



b) Bovine Growth Hormone Treatment

Fig. 3. Effect of growth hormone treatment on cultured mammary cells. The HC11 monoclonal, 1~8 clone was subjected to hormonal induction by growth hormone alone (GH only) or along with lactogenic hormones (IDP induced). Human growth hormone (a) and bovine growth hormone (b) was treated in the indicated concentrations.

람의 성장호르몬은 단독으로 처리했을 때 BLG 프로모터 활성을 2배에서 5배까지 감소시켰다. 그러나 젖 분비 호르몬과 동시에 처리하였을 때는 호르몬의 작용이 농도에 따라서 프로모터 활성을 억제하거나 증진시키는 결과를 보였다. 소의 성장호르몬은 단독으로 처리하였을 때는 BLG 프로모터에 대한 영향이 거의 없었으나 젖분비 호르몬인 인슐린, 프롤락틴 및 글루코코르티코이드와 동시에 처리하였을 때는 100 nM 을 정점으로 강력한 활성 증진 효과를 나타내었다. 이와 같은 효과는 소 성장호르몬의 농도가 더 높아지면 점차 감소하였다. 사람의 성장 호르몬은 100 nM까지는 약간의 활성 억제 경향을 보이다가 200 nM 이상에서 뚜렷한 활성 증진 효과를 나타내었다.

외부에서 처리한 성장 호르몬의 효과를 내부에서 발현된 호르몬의 작용과 비교하기 위하여 1~8클론을 성장 호르몬 발현 벡터로 형질전환한 다음 성장호르몬의 발현을 유도하였다. 성장호르몬이 유선 세포 내부에서 생산되었을 때 BLG 프로모터에 대한 활성 증진 효과가 더욱 뚜렷하게 나타났다 (Fig. 4). 세포 내에서 발현된 성장호르몬은 500 ng/ml 농도의 Doxycycline을 처리하였을 때 세포 증식을 최대로 증가시키고 Doxycycline 농도가 더 늘어나면서 세포 증식효과는 감소하였다. 그러나 BLG 프로모터에 대한 활성은 Doxycycline 농도가 2,000 ng/ml에 이를 때까지 지속적으로 증가하였다. 이 사실은 성장호르몬이 유선 세포 내에서 작용할 때, 세포 증식과 유선 프로모터 활성화에서 각각 다른 적정 농도를 가

지고 있음을 시사한다. 세포 증식과 유선 특이 프로모터 활성화에 대한 성장 호르몬의 작용 기작에 대해서는 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

3. 성장 호르몬 프로모터 염기서열의 결정

성장 호르몬의 프로모터가 유선 세포에서 활동할 수 있는지 여부를 판단하기 위하여 먼저 염기서열을 결정하였다. -2145 염기에서 +1염기까지 염기서열을 분석한 결과 소의 성장 호르몬 프로모터는 여러 가지 전사 조절인자들이 결합할 수 있는 부위를 포함하였다 (Fig. 5). 먼저 이 프로모터는 진핵세포 유전자 프로모터에서 전형적으로 나타나는 TATA box 서열을 -27 염기부위에 가지고 있었다. 또 뇌하수체에서 성장 호르몬 유전자 발현을 조절하는 것으로 알려진 Pit-1 인자의 결합부위가 -979 염기와 -118 염기 위치에서 나타났다. 이 두 가지 사실은 우리가 다루는 소 성장 호르몬 유전자 프로모터가 뇌하수체에서 정상적으로 조절되어 발현되는 유전자임을 보증해 준다. 우리는 소의 성장호르몬 프로모터가 유선에서도 활성화 될 가능성을 알기 위하여 BLG 프로모터에서 유선 특이 발현과 관련된 것으로 추정되는 γ -IRE 결합부위와 글루코코르티코이드, 프롤락틴 및 인슐린 조절부위의 존재 여부를 조사하였다. 예상과 달리 소 성장호르몬 프로모터 부위에서는 많은 수의 γ -IRE 결합예상 부위가 관찰되었다. 이 부위들은 주로 -1000에서 -2000 사이의 부위에 밀집하여 나타났으며 둘 혹은 세 개의 사이트

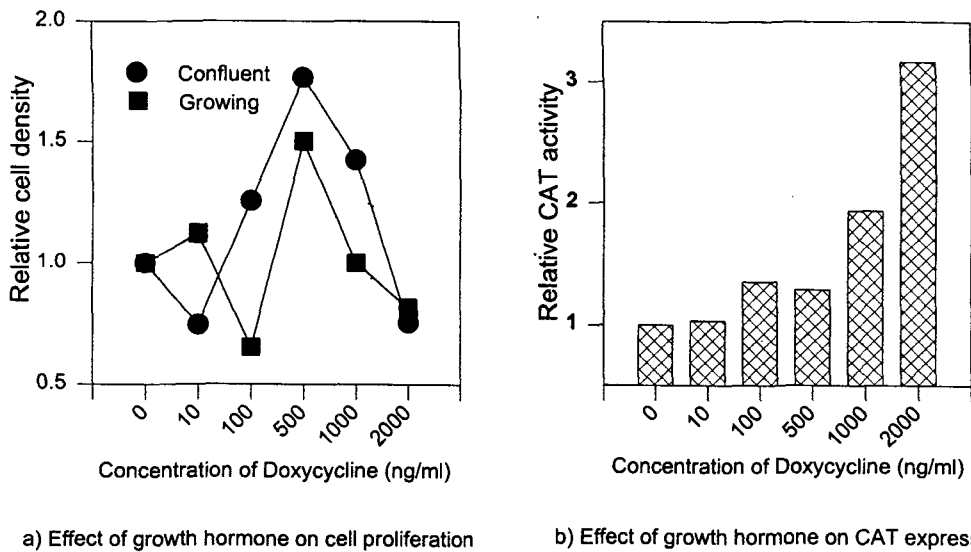


Fig. 4. Effect of growth hormone expressed ectopically in mammary cells. The HC11 1~8 clone was transformed with growth hormone expression vector, pRetro-hGH-On and induced by doxycycline in the indicated concentrations(a). Effect of growth hormone on CAT expression in mammary cells was assayed with confluent cells treated with lactogenic hormones(b). Data shown are representative result.



Fig. 5. Signal scan of the 5'-regulatory sequence of bovine growth hormone gene. The 2.1 kb 5'-regulatory region of bovine growth hormone gene was sequenced and analysed with binding sites scanning program. The putative binding sites indicated are as follows; GR; glucocorticoid receptor, CBP; cAMP binding protein, γ -IRE; gamma interferon responsive element, AP-1; activation protein-1, Pit-1; Pituitary factor-1, TFIID; transcription factor IID, CAP-site; capping site.

가 연속해서 존재하였다. 글루코코르티코이드 수용체 결합 예상부위는 -1854 위치와 -677 위치 두 군데에서 발견되었다. 그 외에도 다수의 CAAT box와 알려진 조절인자 결합 예상 부위들이 관찰되었다. 이러한 결합 부위들의 존재는 소의 성장 호르몬 유전자 프로모터가 유선 세포에서도 발견될 수 있음을 시사한다.

4. 유선 세포에서 성장 호르몬 프로모터의 활성화

직접적으로 성장 호르몬 프로모터가 유선에서 활동할 수 있는지를 판단하기 위하여 성장 호르몬 프로모터를 가진 발현 벡터를 유선 세포에 도입시켜 프로모터의 활성을 측정하였다 (Fig. 6). 소 성장호르몬 프로모터는 뇌하수체 유래 세포인 GH3 세포주에서는 예상대로 활성을 나타내었다. 그러나

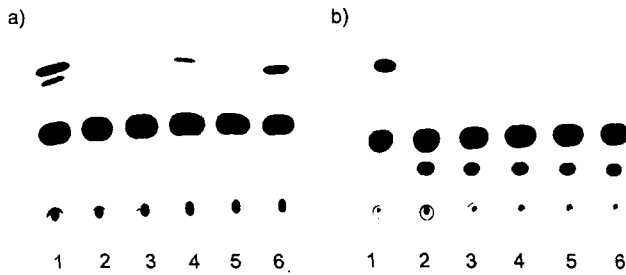


Fig. 6. Promoter activities of the bovine growth hormone gene in the pituitary and mammary cells. The GH3 cells (a), derived from pituitary and HC11 cells(b), derived from mammary gland were transfected with expression vectors indicated and analysed for expression of CAT reporter gene. pCMVcat was used as positive control vector. 1;pCMVcat, 2;pb0cat, 3;pb300cat, 4;pb700cat, 5;pb1200cat, 6;pb2150cat. The numbers in vector name indicate 5'-end of the promoter sequences.

유선세포인 HC11 세포에서는 예상과는 달리 성장 호르몬 프로모터는 유선에서 뚜렷한 활성을 보이지 않았다. 성장 호르몬 프로모터 활성이 유선 세포에서 나타나지 않는 이유는 프로모터 활성이 지나치게 낮거나 혹은 유선에서 발현되는 또 다른 프로모터가 존재할 수 있음을 의미한다.

이상의 결과를 종합해서 고찰해 보면 뇌하수체에서 작동하는 성장 호르몬 유전자 프로모터는 유선세포에 그 활성이 뚜렷이 나타나지 않는다(Fig. 6). 이 사실은 성장 호르몬의 전사체가 유선에 극히 소량으로 존재하는 이유를 설명해 준다. 유선에서 발견되는 뇌하수체 호르몬 유전자들은 대개 극소량으로 존재하며 따라서 최근에 와서야 GnRH와 그 수용체 (Palmon et al., 1994; Levi et al., 1996) 및 LH와 그 수용체가 발현되는 것이 확인되었다 (Ryu et al., 2000). 그러나 이와 같은 미미한 발현에도 불구하고 성장 호르몬이 유선에서 발현되면 유선 세포의 증식을 촉진할 뿐만 아니라 유선 특이 프로모터의 활성도 크게 증진시킬 수 있다(Fig. 4). 따라서 유선 세포에서 발견된 성장 호르몬 유전자 전사체는 이것이 단순한 조절 누수에 의한 발현이라기 보다는 미세한 양이라도 성장 호르몬이 유선 세포에서 유선 특이 유전자 발현에 영향을 미칠 수 있음을 의미한다. 또 인위적으로 성장 호르몬을 과잉 발현시킴으로써 유선 특이 유전자의 발현을 증진시킬 수 있을 것이다. 성장 호르몬은 농도에 따라서 세포 증식을 억제할 수도 있으므로 이 실험에서 사용한 것과 같은 조절 가능한 프로모터를 이용하여 유선 내에서 성장 호르몬의 발현을 조절하면 유선세포에서 유선특이 프로모터의 활성을 조절할 수 있을 것이다.

인용문헌

- Ali S, Clark J (1988) Characterization of the gene encoding ovine β -lactoglobulin; Similarity to the genes for retinoic acid binding factor. *J Mol Biol* 199: 415-426.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1987) DNA-Protein interaction, pp12.0.3-12.2.10. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley -Interscience, New York.
- Burdon TG, Demmer J, Clark AJ, Watson CJ (1994a) The mammary factor MPBF is a prolactin-induced transcriptional regulator which binds to STAT factor recognition sites. *FEBS letters* 350: 177-182.
- Burdon TG, Maitland KA, Clark AJ, Wallace R, Watson CJ (1994b) Regulation of the sheep beta-lactoglobulin gene by lactogenic hormones is mediated by a transcription factor that binds an interferon-gamma activation site-related element. *Mole Endocrinol* 8: 1528-1536.
- Doppler W, Groner B, Ball RK (1989) Prolactin and glucocorticoid hormones synergistically induce expression of transfected β -casein gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 104-110.
- Ferrag F, Chiarenza A, Goffin V, Kelly PA (1996) Convergence of signaling transduced by prolactin (PRL)/cytokine chimeric receptors on PRL-responsive gene transcription. *Mol Endocrinol* 10(4): 451-460.
- Gaye P, Hue-Delahaie D, Mercier JC, Soulier S, Vilotte JL, Furet JP (1986) Ovine β -lactoglobulin messenger RNA: nucleotide sequence and mRNA levels during functional lactation. *Biochi* 68: 1097-1107.
- Gordon WGV, Kalan EB (1974) Proteins of Milk, pp87-124. In: Webb BH, Johnson AH, Alford JA, (eds.) *Fundamentals of Dairy Chemistry*. AVI Publishing Company Inc., Westport, Connecticut.
- Gorman CM, Moffat LF, Howard BH (1982) Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2: 1044-1051.
- Kanzaki M, Morris PL (1998) Lactogenic hormone-inducible phosphorylation and gamma-activated site-binding activities of Stat5b in primary rat Leydig cells and MA-10 mouse

- Leydig tumor cells. *Endocrinology* 139(4): 1872-1882.
- Kim J, Kim JY, Kim K, Yu MH (1995) Isolation and characterization of the caprine genomic β -lactoglobulin gene. *Mol. Cells* 5: 209-216.
- Kim J, Yu MH, Kim K (1997a) Repression Participates in Mammary Tissue-specific Activation of the Caprine β -Lactoglobulin Promoter. *Mol Cell Endo* 133: 161-168.
- Kim J, Yu MH, Kim K (1997b) Activation of the caprine β -lactoglobulin gene promoter in the cultured mammary HC11 cells. *Korean J Biol Sci* 1: 603-608.
- Kim J, Kim K (1995) Hormonal regulation of the caprine β -lactoglobulin gene promoter activity. *Korean J Zool* 38: 426-432.
- Kim J, Yu MH (1995) Localization of the negative regulatory element on the caprine β -lactoglobulin promoter. *Korean J Zool* 38: 433-441.
- Le Stunff C, Gronowski AM, Rotwein P (1996) Contrasting acute in vivo nuclear actions of growth hormone and prolactin. *Mol Cell Endocrinol* 121(2): 109-117.
- Lesueur L, Edery M, Paly J, Clark J, Kelly PA, Djiane J (1990) Prolactin stimulates milk protein promoter in CHO cells cotransfected with prolactin receptor cDNA. *Mol Cell Endocrinol* 71:R7-R12.
- Lesueur L, Edery M, Ali S, Paly, Kelly PA (1991) Comparison of long and short forms of the prolactin receptor on prolactin-induced milk protein gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 824-828.
- Levi LN, Ben-Aroya N, Tel-Or S, Palmon A, Burstein Y, Koch Y (1996) Expression of the gene for the receptor of gonadotropin-releasing hormone in the rat mammary gland. *FEBS Lett* 379: 186-190.
- Liu N, Mertani HC, Norstedt G, Tornell J, Lobie PE (1997) Mode of the autocrine/paracrine mechanism of growth hormone action. *Exp Cell Res* 237(1): 196-206.
- McCarty KS, McCarty KS Jr (1975) Early mammary gland responses to hormones. *J Dairy Sci* 1975 Jul; 58(7): 1022-32.
- Palmon A, Aroya NB, Tel-Or S, Burstein Y, Fridkin M, Koch Y (1994) The gene for the neuropeptide gonadotropin-releasing hormone is expressed in the mammary gland of lactating rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4994-4996.
- Rillema JA, Rowady DL (1996) Characteristics of the prolactin stimulation of *c-fos* mRNA levels in mouse mammary gland explants. *Proc Soc Exp Biol Med* 212(2): 142-146.
- Ryu JS, Kim J, Lee SH (2000) Expression of Luteinizing Hormone (LH) and Its Receptor Gene in Rat Mammary Gland. *Dev Reprod* 4: 231-236.
- Shaw-Bruha CM, Pirruccello SJ, Shull JD (1997) Expression of the prolactin gene in normal and neoplastic human breast tissues and human mammary cell lines: promoter usage and alternative mRNA splicing. *Breast Cancer Res Treat* 44(3): 243-253.
- Sidis Y, Horseman ND (1994) Prolactin induces rapid p95/p70 tyrosine phosphorylation, and protein binding to GAS-like sites in the *anx* *Icp35* and *c-fos* genes. *Endocrinology* 134 (4): 1979-1985.
- Silva MC, Wong DWS, Batt CA (1990) Cloning and partial nucleotide sequence of the genomic bovine β -lactoglobulin gene. *Nucl Acids Res* 18: 3051-3051.
- Tourkine N, Schindler C, Larose M, Houdebine LM (1995) Activation of STAT factors by prolactin, interferon-gamma, growth hormones, and a tyrosine phosphatase inhibitor in rabbit primary mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 270(36): 20952-20961.
- Travers MT, Barber MC, Tonner E, Quarrie L, Wilde CJ, Flint DJ (1996) The role of prolactin and growth hormone in the regulation of casein gene expression and mammary cell survival: relationships to milk synthesis and secretion. *Endocrinology* 137(5): 1530-1539.
- Untergasser G, Kranewitter W, Walser F, Madersbacher S, Dirnhofner S, Berger P (1996) [The testis as eutopic production site of human growth hormone, placental lactogen and prolactin: possible autocrine/paracrine effects on testicular function]. *Wien. Klin. Wochenschr* 108(17): 541-546.
- van Garderen E, de Wit M, Voorhout WF, Rutteman GR, Mol JA, Nederbragt H, Misdorp W (1997) Expression of growth hormone in canine mammary tissue and mammary tumors. Evidence for a potential autocrine/paracrine stimulatory loop. *Am J Pathol* 150(3): 1037-1047.
- Watson CJ, Gordon KE, Robertson M, Clark AJ (1991) Interaction of DNA-binding proteins with a milk protein gene promoter *in vitro*: Identification of a mammary gland-specific factor. *Nuc Acids Res* 9: 6603-6610.