

知識天地

核醣核酸干擾：從意外發現到功能基因體學的應用

鄭金松研究副技師（分子生物研究所／國家型干擾性核醣核酸核心實驗室負責人）

許多科學上重大的突破來自於意外的發現；例如，佛萊明（Alexander Fleming, 1928）觀察到真菌的侵入能減弱菌斑的形成，而這項意外的發現，讓佛萊明找到世上第一個抗生素。核醣核酸干擾（RNAi interference；RNAi）是一種轉錄後基因沉默化（post-transcriptional gene silencing, PTGS）的現象，可模擬基因功能喪失的效果。此現象也是科學研究上意外的發現，這中間含括數起饒富趣味和令人驚奇的事件。從 RNAi 的發現到在哺乳類動物上的應用，是一段迷人的過程，而其中顯現出意外發現需要有能解開謎題的天賦，也證實了機會偏愛降臨到有決心與毅力的人身上。

喬治森（Jorgensen）的團隊（Napoli et al., 1990）在 1990 年，原欲藉由引入 CHS（chalcone 合成酶）基因於矮牽牛花花瓣上，以使花色改造成深紫色；然而出乎意料地，他們發現在有轉殖 CHS 基因的植物中，約 42% 的牽牛花開出全白或紫白相雜的花朵，而實驗控制組的植物並未產生這樣的變化。有趣的是，染色體組 DNA 的研究顯示，紫色的程度和由內生或外源引入 CHS 基因的穩定態訊息 RNA（message RNA；mRNA）量有關，亦即在白花中，內生和外源引入的 CHS 基因表現皆被抑制。當時，造成同源基因共同被抑制的機制尚不清楚，然而在改變花色的植物中，可很明顯觀察到 mRNA 含量的減少，因而有了一個用來闡述這現象的術語——轉錄後基因沉默化。羅曼諾（Ramano）等人也在 1992 年提出「壓制」現象，他們發現在粉色麵包黴菌（*Neurospora crassa*）裡，藉由轉殖同源序列 DNA 可暫時抑制基因的表現，這和 CHS 轉殖植物的研究結果雷同。此後數年，無人再重視這項發現，大家只視這些為怪異或例外的現象。

約同一時期，反義股 RNA（antisense RNA）技術在線蟲（*Caenorhabditis elegans*）系統中被發展來研究基因的功能，經由這項技術，反義股 RNA 能造成線蟲中的基因被有效且專一地抑制。有一組科學家（Guo et al., 1995）利用注射 *par-1* 反義股 RNA 至野生型線蟲的生殖腺，首度證明生殖細胞的發育和建造胚胎的極性需要 PAR-1。然而，用試管合成的正股 RNA（sense RNA）處理生殖腺產生更有效的效果；這現象迷惑了線蟲陣營的科學家數年之久。至 1998 年，於數種多細胞的有機生物，例如植物、真菌、線蟲等，皆發現了 PTGS 的現象。於此年科學家提出，PTGS 是藉由胞內流程，利用雙股 RNA 引發的基因沉默，這項重大的科學成就因而獲頒諾貝爾獎，也再次證明，諾貝爾獎總是眷顧有恆心與有好奇心並能針對問題窮追不捨的人。

在 1998 年，Fire 和 Mello（Fire et al., 1998）首先嘗試去釐清 PTGS 這個令人疑惑的問題。他們質疑（1）為何正股和反義股 RNA 各自可足以使基因失活或干擾基因功能；（2）為何干擾的效果可代代相傳，甚至，當引入正股和反義股 RNA 至線蟲的胚胎時，RNA 可迅速地被降解。他們大膽假設，用來進行干擾試驗的噬菌體 RNA 聚合酶的 RNA 產物或次產物，可能參雜具有雙股特性的 RNA 分子。為了評估雙股 RNA 在 PTGS 中扮演的潛在角色，他們用 *unc-22* 基因作為研究此可能性的基因模式。他們的發現如下（摘錄自《自然》期刊 391: 806-811, 1998）：“在特定生物系統中，經由實驗引入 RNA 到細胞內，可以干擾內生性基因的功能，像這樣的效果，已被提出是源自於一簡單的反義股 RNA 機制，而此機制是和外加 RNA 與內生訊息 RNA 間的雜交（hybridization）有關。此技術已成功應用於研究線蟲基因的調控。於此研究中，我們研究干擾性 RNA 結構所需要的條件與傳送的方法；出人意料地，我們發現雙股 RNA 比用任一單股 RNA 產生更有效的干擾效果；在注射到成熟動物後，純化的單股 RNA 至多產生一些效果，而雙股 RNA 則具有較大潛力引發專一性的抑制。在注射的動物和他們的後代，這樣的干擾現象是相當顯著的；只需注射小量的雙股 RNA 即可影響細胞，這和化學劑量的概念相違，因而暗示在干擾過程中可能會涉及催化或放大效應。”

Fire 和 Mello 的傑出研究說明了，PTGS 是由雙股 RNA 所引發，因此他們創造了「核醣核酸干擾現象」（RNA interference, RNAi）術語來描述這個嶄新的細胞現象。此外，他們猜測在細胞內有一放大的步驟使得核醣核酸干擾具持久性。以 RNA 為模板的 RNA 聚合酶（RdRP）是一種可以利用小片段 RNA（siRNA）反義股當引子去製造更多雙股 RNA 的酵素。後來的確在植物、真菌與線蟲內（Catalanotto et al., 2000; Dalmay et al., 2000; Mourrain et al., 2000; Sijen et al., 2001）中，發現 RdRP 可放大核醣核酸干擾現象而造成干擾現象的持續性。在植物中，此放大反應使得由 RNAi 所調控的基因抑制現象可經由細胞間雙股 RNA 的傳遞來擴散，以全面對抗病毒感染。其後，科學家發現雙股 RNA 抑制基因表現具有序列專一性，而此是由一短片段 RNA 分子所調控，如今知曉此分子為“短干擾性 RNA”（short interfering RNA；siRNA）。在植物中此種分子的長度約為 25 個核苷酸（Hamilton et al., 1999）；在動物約為 21 至 23 個核苷酸（Hammond et al., 2000）；這些造成基因沉默的 siRNA 序列與一部份訊息 RNA 相對應。

RNAi 被廣泛認為是遠古自然的細胞防禦機制，在植物或昆蟲，可用此來對抗由病原菌產生的雙股 RNA 中間產物或次產物。然而，在哺乳類系統，長度超過 30 個鹼基的雙股 RNA 會直接作用於細胞內的 RNA 結合蛋白，擊發訊息傳導，啟動第一型干擾素反應及活化非專一性的核糖核酸酶 (RNase)。接著，第一型干擾素誘發數個干擾素激化基因的表現，在細胞中引起非專一性、廣泛性的基因沉默，進而造成哺乳類細胞的凋亡；在哺乳類細胞，干擾素反應使得以長雙股 RNA 抑制基因表現的應用受阻。涂須爾 (Tuschl) 的研究團隊借助前人的研究成果，發現直接用化學合成有著 3 端突出的 21 個核苷酸雙股 siRNA，在多種哺乳類細胞株內能特別抑制內生性和外源性基因表現 (Elbashir et al., 2001)。因此，含 21 個核苷酸的雙股 siRNA 成為解析哺乳動物基因功能的新利器。利用細胞的 RNAi 機制去降低基因產物大大加速了基因功能的了解。RNAi 在生物過程中的重要性和廣泛的應用性，始得「科學」(Science) 期刊宣稱“RNAi 是 2002 年的重大突破”。

後續生化學的研究結果顯示，RNAi 是利用一個錯綜複雜的蛋白質群組去引發標的訊息 RNA 降解，以導致基因功能的喪失。詳細的歷史和 RNAi 的機制可以參閱近期《當代頂尖微生物免疫》(Curr Top Microbiol Immunol 2008, volume 320:1-201) 期刊的回顧文章。

雖然帶有 3 端突出的 21 個核苷酸，可用序列專一性來調節 RNAi 於培養的哺乳類細胞，但合成的 siRNA 試劑庫價格高昂且須藉由轉染傳送到細胞，已知並非所有細胞都有著好的轉染效率，且在活體更為困難；此外，由於缺乏放大 RNAi 的步驟，siRNA 在哺乳類僅能產生短暫的效果；這些限制了合成 siRNA 的應用性。

於此時，RNAi 領域正蓬勃發展。在研究 RNAi 分子機制的過程中，科學家發現，在細胞質中，siRNA 和 miRNA 是藉由一個類似 RNase III 的核酸酶—Dicer 所處理 (processing) 而形成。Dicer 會將雙股 RNA 前驅物變成 21 至 23 個核苷酸的 siRNA 或 miRNA；亦即，這兩種微小 RNA 於細胞質中共用相同的 RNA 處理器。生化和遺傳研究顯示，沉默或突變 Dicer，會導致一種大小約 70 個核苷酸具短夾型構造的 RNA (short hairpin RNA; shRNA) 堆積於哺乳類和低等的真核細胞中，暗示此 shRNA 為 miRNA 的前驅物。科學家基於此些發現而發展利用 RNA 聚合酶 III 的驅動子表現 shRNA，於細胞內再利用 Dicer 將 shRNA 剪接成 siRNA。由於 RNA 聚合酶 III 轉錄的起始位置已被清楚鑑定，且知當聚合酶遇到連續 4-5 個胸腺嘧啶核苷酸 (T)，轉錄會停止並終結於第二個尿嘧啶核苷酸 (U) (在 DNA 為 T)；因此，此 shRNA 結構具明確的 5' 端和 3' 端。

在 RNAi 技術成熟之前，哺乳類系統中並沒有一套可進行全基因方位的遺傳篩選工具。由於生技公司或學界致力於 RNAi 的應用研究，迄今市面上已有全基因方位的 siRNA 或 shRNA 試劑庫。這些 RNAi 試劑可於哺乳動物系統中進行專一性地抑制單一基因表現；因此，此全基因方位的 RNAi 試劑庫可應用於功能基因體學研究及新藥開發。

參考文獻：

1. Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R. (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2:279-289.
2. Romano, N. and Macino, G. (1992) Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.* 6:3343-3353.
3. Guo, S. and Kemphues, K.J. (1995) par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81:611-620.
4. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
5. Mourrain P, B?clin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Jouette D, Lacombe AM, Nikic S, Picault N, R?mou? K, Sanial M, Vo TA, Vaucheret H. (2000) Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101:533-42.
6. Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, Angell S, Baulcombe DC. (2000) An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101:543-53.
7. Catalanotto C, Azzalin G, Macino G, Cogoni C. (2000) Gene silencing in worms and fungi. *Nature* 404:245.
8. Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish S, Timmons L, Plasterk RH, Fire A. (2001) On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107:465-76.
9. Hamilton, A.J. and Baulcombe, D.C. (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286:950-952.
10. Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G.J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404:293-296.
11. Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-498.

※各期知識天地文章請逕於本院網頁：<http://www.sinica.edu.tw/>「常用連結」之「週報〈知識天地〉」項下瀏覽。※