知識天地

外基因體學：DNA 序列外的調控新思維

李政峰博士後、阮麗蓉助研究員（基因體研究中心）

西元 1953 年，華生（James Watson）與克力克（Francis Crick）發現帶有生命遺傳基因的 DNA 之雙股螺旋結構。此後，科學家們便對 DNA 產生莫大的興趣。自 90 年代起，爲了透視人類基因密碼，美國能源部（U.S. Department of Energy）及國家衛生研究院（National Institutes of Health）共同主導人類基因體 30 億鹼基序列定序計畫『人類基因體計畫』（Human Genome Project）。西元 2001 年，人類基因體定序圖譜初稿雙雙發表於《自然》（*Nature*）及《科學》（*Science*）期刊。

然而，隨著 DNA 解碼完成，後基因體時代（Post-genomic Era）來臨，科學家卻發現人類的基因數目遠低於原先所預估，可能只有 20,000~25,000 個[1]，約莫與黑猩猩的基因數相當。更令人驚訝的是，人類與黑猩猩基因序列之相似度居然高達百分之九十九！研究指出，相近物種間的演化差異、同物種間個體的表現變異、甚或個人本身不同種細胞生長及分化的不同，其決定關鍵並不全然掌控於 DNA 序列，而在於如何調控基因表現，即 DNA 如何轉變爲 RNA（DNA 轉錄[Transcription]）。關於調控 DNA 轉錄成 RNA 機制的研究在近年來如雨後春筍般地蓬勃發展。這些研究被歸類於『外遺傳學』（Epigenetics），意指專門研究『可以遺傳，並影響生物表現型（Phenotype）差異，卻不涉及任何基因型（Genotype）改變的因子』的一門科學。

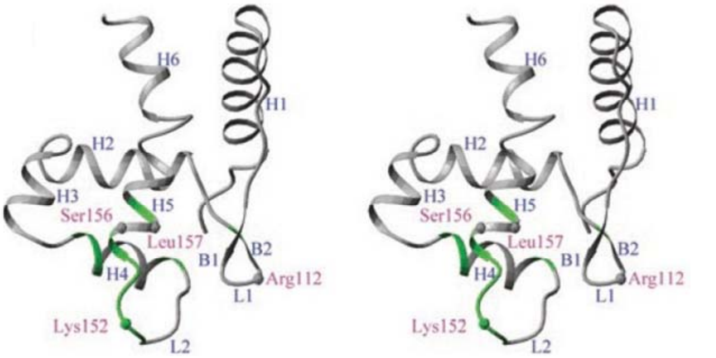
當今針對外遺傳學的研究，主要可歸爲下列三大類：第一大類爲 DNA 甲基化（DNA methylation）的研究。西元 1967 年起，研究者發現 DNA 可被外加甲基（$-CH_3$），DNA 甲基轉移酵素（DNMTs）可將甲基轉移至 cytidine / guanosine 雙核苷酸高度重複區（亦稱爲 CpG islands）中的 cytidine C5 環的位置，在高於百分之七十的人類基因啓動子（Promoter）區域附近，都可以發現 CpG islands 的蹤跡[2]。CpG islands 上的 DNA 甲基化，可以調控 DNA 轉錄，進而影響細胞分化及基因表現。

第二大類爲非編碼 RNA（Non-coding RNA）的研究。探討非編碼 RNA 是一個新興的研究領域。長久以來，非編碼 RNA 因無法像我們熟知的編碼 RNA（Coding RNA，如 messenger RNA）可以轉譯出細胞所需的蛋白質，而被科學家認爲是無用的序列。近幾年來的研究顯示，真核生物細胞中普遍存在大量非編碼 RNA，這些非編碼 RNA 包括了 microRNAs（miRNAs，~22 個核苷酸）、small RNAs（100~200 個核苷酸）、large RNAs（大於 10,000 個核苷酸以上）、以及最近才發現，大約 24~31 個核苷酸左右的 piwi-interacting RNAs（pi-RNA）[3]。這些非編碼 RNA 的作用十分廣泛，不僅可以參與基因默化（Gene silencing）、X 染色體失活（X-chromosome inactivation）、促進 mRNA 穩定、增加轉錄活性等，更透過複雜機制間接調控前段所述之 DNA 甲基化及組蛋白修飾（見後）。非編碼 RNA 的發現，贏得了 2006 年諾貝爾生理醫學獎。

最後一大類爲組蛋白修飾作用（Histone modifications）的研究。真核生物的 DNA 緊密纏繞於組蛋白（Histone）上，直到 DNA 需要進行複製或轉錄成 RNA 時才會舒展開來。影響組蛋白與 DNA 結合能力的主要因素之一乃藉由後轉譯修飾作用（Post-translational modifications）改變組蛋白本身的化學結構。早在 1964 年科學家已發現組蛋白可以被接上乙醯基($-COCH_3$)或甲基，並影響 DNA 轉錄。1964 至 1995 三十年之間，相關研究進展不大，主要受限於無法純化出增減組蛋白修飾的蛋白酶及其相對基因，以進行分子機制探討。1996 年，美國洛克斐勒大學 David Allis 博士於四膜蟲（Tetrahymena）及酵母菌（Yeast）中成功分離出組蛋白乙醯基酶基因，發現能夠將乙醯基轉移至組蛋白的組蛋白乙醯基酶多存在於可增加 DNA 轉錄活性的轉錄輔因子複合體（Transcriptional coactivator complex）中。此重大突破使得外遺傳學相關研究往前邁進一大步。Allis 並因此於 2006 年獲選爲美國國家科學院院士。此後，許多其他種類的組蛋白修飾酶，如去乙醯基酶、磷酸酶、甲基酶等陸續被發現。一般而言，當位於基因啓動子區域的組蛋白被高度乙醯化（Hyperacetylation）， DNA 轉錄機制便可活化；相反地，當組蛋白低度乙醯化（Hypoacetylation），DNA 轉錄將受到抑制。組蛋白甲基化更爲複雜，組蛋白上不同位置的氨基酸被甲基化，可正向或負向調控 DNA 轉錄。被轉移至組蛋白的甲基相當穩定，去甲基酶又始終未被發現，長久以來，組蛋白甲基化被科學家定位爲不可逆反應。2004 年哈佛大學華裔科學家施揚打破迷思，找到第一個去甲基酶，2006 年施揚與北卡羅萊納大學及霍華修斯醫學研究所之華裔科學家張毅同時又找到含有 JmjC 特殊氨基酸序列的蛋白家族（JmjC-containing protein family）

可一次移除組蛋白上的三個甲基。

外基因體學研究至今，許多迷團一一解開，目前尚未有完整答案的中心課題（Buring issues）包括：一、癌細胞之外基因體學研究；二、幹細胞之外基因體學研究；三、RNA 於外基因體學之細部研究；四、DNA 去甲基酶是否存在；五、組蛋白修飾酶如何辨識特定基因上之組蛋白。本實驗室近年來專注於解開組蛋白修飾酶參與 DNA 轉錄作用的機制。我們與基因體研究中心特聘研究員暨中研院生化所所長蔡明道博士領導的團隊合作，發現能將三個甲基從組蛋白去除的組蛋白修飾酶 RBP2 可以藉由 RBP2 蛋白上一段稱爲 ARID 的區域辨認特殊基因序列 CCGCCC[4] 並與之結合。ARID 區域被剔除的 RBP2 完全無法將甲基從組蛋白移除，失去了組蛋白修飾酶的特殊活性。利用核磁共振技術（NMR），合作團隊解出 ARID 的立體結構（圖一），從中找出與 DNA 結合的四個重要胺基酸，並進一步證實，若此四個重要氨基酸發生突變，RBP2 即無法與 CCGCCC 序列結合而失去調控 DNA 轉錄功能。截至今日，科學家已發現上百種組蛋白修飾酶。幾乎所有組蛋白修飾酶都需要藉由 DNA 鍵結蛋白（DNA binding protein）的幫助與特定基因上之組蛋白結合；基於上述之創新研究成果，合作團隊提出了另外一種可能性。我們認爲，某些組蛋白修飾酶能夠直接辨認 DNA 序列，並與 DNA 結合，修飾其上之組蛋白，進而調控 DNA 的轉錄功能。



圖一：RBP2-ARID 區域 3D 立體結構圖，其上四個氨基酸爲與 DNA 結合之重要位置。

外遺傳調控機制正向或負向決定 DNA 是否轉錄爲 RNA，讓細胞及個體保有正常的生長、發育、或分化過程。以目前當紅的幹細胞（Stem cell）研究爲例，當維持自我更新（Self-renewal）狀態的幹細胞受到特定生理訊號決定走向分化（Differentiation）一途時，基因啓動子（Gene promoter）區域之高度甲基化，以及其上之組蛋白 H3 之第二十七個氨基酸 K27 被甲基化，將抑制一群 self-renewal/proliferation 所需要的轉錄調控因子，如 NANOG、OCT4、SOX2 等，之 DNA 轉錄爲 RNA。不正常的外遺傳調控時常導致疾病發生，癌症即爲其中一例。研究結果顯示，癌細胞普遍呈現出不同的 DNA 甲基化模式、不同的組蛋白修飾，以及過量或較低的組蛋白修飾酶及非編碼 RNA 的表現[5]。因此，瞭解外遺傳學所調控的 DNA 轉錄機制，除可進一步窺探生命的神秘奧妙之處，深究幹細胞分化的機制，更可提供未來癌症治療的新契機。

參考文獻

1. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431** (7011), 931 (2004).
2. Saxonov, S., Berg, P., and Brutlag, D. L., A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* **103** (5), 1412 (2006).
3. Lin, H., piRNAs in the germ line. *Science* **316** (5823), 397 (2007).
4. Tu, S. et al., The ARID domain of the H3K4 demethylase RBP2 binds to a DNA CCGCCC motif. *Nat Struct Mol Biol* **15** (4), 419 (2008).
5. Lopez-Serra, L. and Esteller, M., Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. *Br J Cancer* **98** (12), 1881 (2008).

※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。※