

知識天地

是弱雞還是洛基？

譚婉玉研究員、林庭安研究助理（生物醫學科學研究所）

摘要

我們的心脈跳動坐臥行走無一不靠肌肉的正常運作，為因應不同器官組織的需求，肌肉又分成骨骼肌、平滑肌及心肌三大類，不同種類的肌細胞各有其不同的特性及功能，但我們並不十分清楚它們是如何在發育過程中由一種肌原母細胞 (myoblast) 特化而來，因此肌細胞的分化一直是極為值得研究的課題。另外，如果我們能瞭解如何在成體中正確誘導肌肉幹細胞分化成為新的肌肉細胞，便可修補因外傷或因遺傳性疾病而受損的肌肉組織，因此深入瞭解細胞的分化及再生對於肌肉萎縮症等肌肉退化疾病之治療將有相當的助益。以下便是關於 RBM4 的細述，在這篇文章中，我們將簡述一個 mRNA 結合蛋白分子是如何經由轉錄後之基因表達調控而參與在肌細胞的分化。

肌細胞分化的基因表達調控

骨骼肌來自胚胎中胚層的間葉細胞 (mesenchymal cells)，間葉細胞經分化成為肌母細胞後，再相互融合形成管形之多核肌小管 (myotubes)，最後再成熟成為骨骼肌纖維 (myofiber)，並在其細胞質內充滿纖維蛋白，以便進行收縮的功能。在肌細胞分化過程中，基因的表達受到轉錄 (即 RNA 的合成) 和轉錄後 RNA 後續加工兩種層次的嚴密調控。如同其它各類特化的細胞，肌細胞內亦有許多 RNA 結合蛋白參與在轉錄後的調控，可是它們如何參與在複雜的調控過程以及在生物體內所執行的生理功能仍是一個大謎團。

一個和肌細胞分化有關的 RNA 結合蛋白

我們近年來在一系列的研究中發現一個稱為 RBM4 的多功能 RNA 結合蛋白，此蛋白參與在肌細胞 mRNA 先驅分子的選擇性剪接 (alternative splicing) 及轉譯 (蛋白質合成) 的調控。在肌原母細胞中，RBM4 藉由操控選擇性剪接來促進肌細胞專有的 mRNA 同型體 (isoform) 之產生。另外，在肌肉細胞開始分化時，RBM4 會從細胞核移轉至細胞質中進行蛋白質合成的調控。我們因此希望能深入瞭解如此一個多才多藝的 RNA 結合蛋白是如何發揮它的功能。

RBM4 的 ABC

哺乳類動物 RBM4 的同源基因在果蠅中稱做「雲雀」(Lark)，它參與在果蠅胚胎發育之晝夜節律 (circadian rhythm) 調控。而人類的 RBM4 則普遍表現在所有器官組織中，但其中以大腦、心臟及骨骼肌的表現量較高。因此我們最初的研究目的是希望瞭解 RBM4 是否在這些組織中執行特定的後轉錄調控功能。

RBM4 蛋白的結構包含二個 RNA 序列識別區 (RNA recognition motif) 及一個較缺乏物種保留性的功能執行區 (effector domain)。我們的研究證實前者可使 RBM4 結合到特定的 RNA 序列上，而後者可使 RBM4 持續的在細胞核與細胞質間穿梭並使它具有調控選擇性剪接及調控轉譯的能力。

RBM4 主要分布在細胞核中，並且在細胞核質間持續的移動，細胞外界環境的改變可能影響它的移動以及在細胞內微細區域內之分佈。當細胞處於非生理常態的狀況下或進行分化時，RBM4 會經由 MKK/p38 激酶所引發的訊息傳遞途徑而被磷酸化。磷酸化後的 RBM4 會轉移到細胞質中，並進而累積在細胞因遭受不良環境而出現的壓力顆粒 (stress granules) 或含有微小 RNA (microRNA) 的細胞質顆粒中，RBM4 在這些顆粒中的出現亦可能和其參與轉譯調控有關。

RBM4 對剪接調控的影響

我們早年的研究顯示 RBM4 可調控 mRNA 剪接位的選擇，因而影響 mRNA 同源分子的產生，為了進一步瞭解它對基因表達的調控作用及其生理意義，我們經由實驗有系統的尋找被 RBM4 所調控的 mRNAs，我們因

此發現甲型肌原球蛋白 (α -tropomyosin) 的 mRNA 可能是 RBM4 的作用目標之一。後來證實 RBM4 確實會藉由結合到 mRNA 內含子 (introns) 上的特定序列以增進某些和肌細胞功能有關的 exons 之選擇，並且 RBM4 能夠拮抗另一剪接抑制分子 PTB 對這些 exon 選取的負面作用。這些初步結果都顯示著 RBM4 可能參與骨骼肌細胞中選擇性剪接的調控。

為了再進一步驗證我們的假設，我們又由生物資料庫中搜尋 RBM4 在肌細胞中的可能作用目標，結果顯示 RBM4 和 PTB 可能會作用在相同的 mRNA 標的物上，並都藉由 exon 周圍的辨識序列以調控肌細胞特定的選擇性剪接，更有趣的是我們發現 RBM4 藉由調控 PTB mRNA 先驅分子的選擇性剪接而導致其 mRNA 降解，使得 PTB 的表達量會在肌細胞的分化過程中會逐漸下降。另外，我們也證實 RBM4 會調控其它與肌細胞分化及功能有關的 exon 選擇，被調控的基因包括與肌細胞形成有關的重要轉錄因子、多種細胞骨架蛋白以及和肌細胞生理功能有關的表面分子如胰島素接受器和尼魚丁 (ryanodine) 接受器。值得注意的是由於 PTB 在這些 mRNA 的 exon 選擇上是扮演抑制的角色，因此 RBM4 藉由降低 PTB 的表達量和拮抗其功能的双重調控而達到使得 RBM4 在促進骨骼肌特定 mRNA 同型分子的表現時更為重要，我們後來亦證實 RBM4 的確會促使體外培養的肌細胞進行分化。

儘管過去的研究讓我們對於 mRNA 剪接調控的分子機制已有初步的瞭解，但近年來大量的生物資訊及 RNA 的定序顯示細胞產生數量驚人的 mRNA 同型體及非編碼 RNA (non-coding RNA)，因此我們需要更全面性及有系統的研究才能瞭解 RNA 在基因表達調控中的真實面貌。

由於我們目前的研究結果明顯指出 RBM4 在骨骼肌及心肌特有的 mRNA 選擇性剪接調控上扮演了重要角色。我們亦將進一步瞭解 RBM4 的全面作用機制以及與它有協同或拮抗作用的分子間如何互動以準確的控制肌細胞分化過程中 mRNA 的表達。

RBM4 對轉譯調控的影響

我們先前的研究發現當細胞處於不利於生長的環境下，有部份的 RBM4 會離開細胞核而至細胞質中，此時它能結合到 mRNA 5' 端非轉譯區的特定序列上，和轉譯起始因子 eIF4A/eIF4G 共同參與在一種使核糖體不需經由掃描非轉譯區而啟動蛋白合成的反應機制。由於，早有研究指出 p38 激酶訊號傳遞對肌肉細胞的分化相當重要，而此激酶亦引發 RBM4 細胞核質間的轉移，因此我們推測肌細胞分化的訊號可促使 RBM4 參與在數種不同的轉譯調控。因為有許多與肌細胞功能有關的蛋白分子如纖維母細胞生長因子 (FGF-1) 及第二型類胰島素生長因子 (IGF-II) 是經由此另類轉譯機制合成的，因此我們將進一步瞭解 RBM4 是否會控制這些蛋白分子的表達。

另外，我們和另一實驗室同時發現 RBM4 會和微小核糖核蛋白體粒 (miRNPs) 中的一個功能性分子 Ago2 有交互作用。我們更進一步證實了 RBM4 於正在分化的小鼠肌母細胞中的確會移轉到細胞質並和 Ago2 共存於細胞質顆粒 (cytoplasmic granules) 內以抑制轉譯作用。從別人的研究中我們已知微小 RNA 在肌細胞分化的過程中扮演極重要的角色，而我們發現 RBM4 會選擇性的和這些微小 RNA 共同結合到它們的目標 mRNA 上，並藉此促進 Ago2 對轉譯的抑制作用，這個結果顯然更具有生理意義。目前我們正更進一步的研究 RBM4 在肌肉發育的過程中協同微小 RNA 對轉譯調控的抑制機制和其生物意義。

RBM4 在肌肉分化中的潛在作用

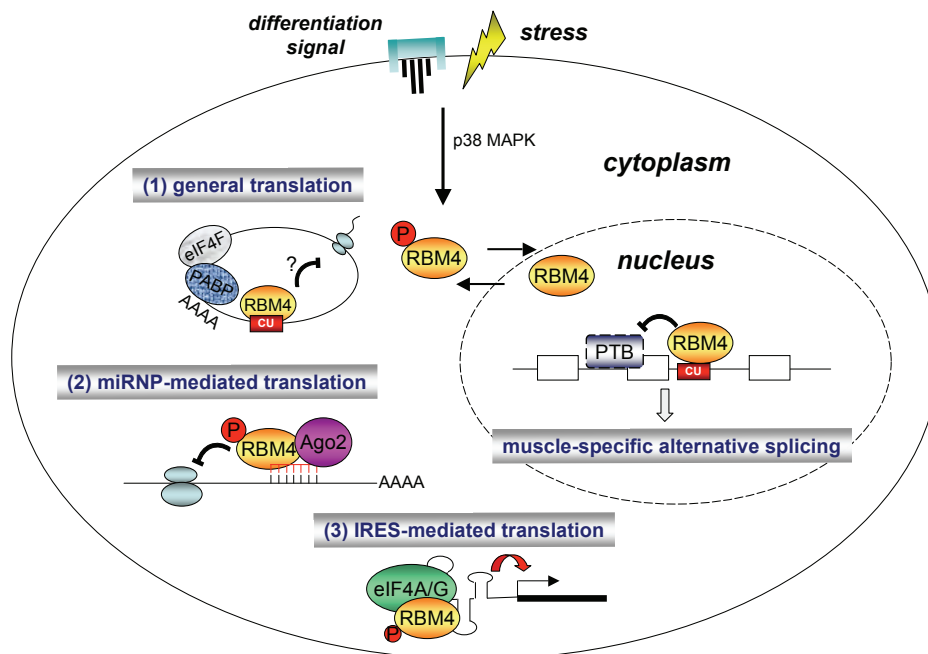
雖然我們目前的結果顯示 RBM4 參與在肌細胞選擇性剪接和轉譯的調控，但對於它在肌母細胞分化、肌小管的形成及肌肉再生方面的生理角色仍需做更深入的研究。若要瞭解 RBM4 在生物個體上的功能，最佳的

方式仍是建立 RBM4 的基因剔除小鼠，但哺乳動物有兩個 RBM4 基因，所以我們目前正和生醫所顏裕庭博士合作將其單一基因先行剔除，初步的結果顯示 RBM4 基因的缺失的確會使成鼠的肌肉細胞發生 mRNA 錯誤剪接的現象，而且使其心肌結構改變致使心室肥大。這項結果應證了我們多年來利用細胞培養所得到的實驗結果，並讓我們更有信心再深入探討 RBM4 對生物個體發育及心臟生理功能的影響。

結語

人類雖僅有 23000 個基因，但細胞內至少有 500 個以上的 RNA 結合蛋白會參與他們基因轉錄後的調控，使得一個基因經由 mRNA 的選擇性剪接增加了蛋白功能的多元性，另外，由於最近幾年微小 RNA 及非編碼 RNA 的發現，使得基因的調控更顯複雜，在此基因組定序完成後的「後基因體時代」(post-genome era)，全面性的瞭解 RNA 結合蛋白所參與的基因調控以及他們之間的相互影響 (interplay) 便成為一項相當重要的工作。

RBM4 只是眾多 RNA 結合蛋白的一個成員，我們藉由它漸漸的發現了具有組織特定性的 RNA 剪接調控機制，也初步看到了它對肌肉及心臟發育的影響，但這一切都還是只是一個「開端」而已，在實驗室裡還有其它的 RNA 結合蛋白也正透露著它們有趣的故事，我們有幸能有機會一窺 RNA 調控的多元面貌以及生命的奧秘。當然這一切都要感謝實驗室裡所有的成員，沒有他們「一步一腳印」的努力便沒有今日的成果，未來我們仍有許多的路要走，也許有一天我們能藉由調控 mRNA 的剪接以影響肌細胞的分化，使弱雞有一天能變成拳王洛基 (Rocky)。



在細胞核中，RBM4 主要參與 mRNA 選擇性剪接的調控，在肌肉細胞分化過程中 RBM4 藉由結合到 RNA 的多嘧啶序列及抑制 PTB 的活性而促進肌細胞特有的 mRNA 同型體表現。另外，在細胞分化或細胞處於不良環境時 RBM4 會被磷酸化並轉移至細胞質中參與在 mRNA 的轉譯調控，其中包括 (1) 抑制帶有多嘧啶序列的 mRNA 之一般性轉譯，(2) 協同微小 RNA 一起抑制轉譯，及 (3) 與轉譯啟始分子 eIF4a 共同促進帶有 IRES 序列的 mRNA 進行轉譯。