

鑑定其各種經過不同修改的酵素活性。利用此一方法，我們過去三年中，不但定出在丁型肌醇磷脂酶負責認識及切割肌醇磷脂之氨基酸功能基因。更有趣的是我們意外地發現在丁型肌醇磷脂酶上，除了肌醇磷脂酶水解中心外，另有一個功能區域負責和肌醇磷脂結合，但不負責水解肌醇磷脂。當此一功能區和肌醇磷脂結合後，直接之效果是肌醇磷脂酶由細胞質中轉移至胞膜之內層表面，進而提昇其對胞膜上之肌醇磷脂之水解效率。由於這個功能區之結構和血小板胞膜表面之重要蛋白pleckstrin之N-及C-端結構類似，故稱之為Pleckstrin Homology（簡稱為PH）功能區。目前在許多其他和胞膜有關之訊息傳導蛋白分子上也發現有和PH功能區相似之結構，由於此功能區和胞膜蛋白或胞膜上之磷脂有很強之親和力，故在生理上認為在當胞膜訊息生化反應時，PH功能區和胞膜徵募訊息蛋白分子到胞膜上之機制有關。

當神經細胞或內分泌細胞在靜止狀態時，其胞內之許多訊息傳導之蛋白分子均在細胞質中。細胞受到第一訊息（神經激素或內分泌激素）刺激時，很多訊息傳導蛋白必須自細胞質湧向細胞膜去執行其在整個生化過程中之任務。雖然，我們發現丁型肌醇磷脂酶上之PH功能區會促使此酵素由細胞質湧向細胞膜，但是仍然遺留許多尚待解決之問題，例如是何種胞內訊號，使PH功能區活化而轉向胞膜之結合等等，故這方面之研究正是方興未艾。



金克寧

學經歷：

國立台灣大學復健系

學士(1975)

國立清華大學分子生

物學碩士(1977)

美國杜克大學生物化學博士(1988)

美國霍華休斯醫學研究所博士後研究(1988-91)

本院生物醫學科學研究所助研究員（1991-迄今）

從探討細菌RNA分解到研究哺乳類細胞生長休止基因

林淑端

分子生物研究所副研究員

前言

在本院年輕人員研究著作獎得獎成果發表會中，我就本研究室研究成果得獎的三篇論文定了講題「從探討細菌RNA分解到研究哺乳類細胞生長休止基因」提出演講。藉此，一方面介紹本研究室的兩個主要研究主題，即RNA分解機制及哺乳類細胞生長休止基因之探討；另一方面則對國科會及本院對這二個研究主題，無論是在研究環境或研究經費及人力上的支持，表示感謝！另外，對日以繼夜一起打拼的研究伙伴們，更由衷地感謝，若是沒有大家執著、不懼怕挑戰地來共同參與，將不會有今天的研究成果！

從發現「RNaseE切割RNAI」乃是調控「質體DNA複製」的重要因子談起

RNA的功能多采多姿，其中相當有趣者之一乃屬在1980初期對antisense RNA，即RNAI，負調控ColE1質體DNA複製的研究發現。當RNAI與負責DNA複製的引子，RNAII互動，形成雙鏈狀RNAI/RNAII時，RNAII引子即失去其調控質體複製的功能。所以可預知RNAI的穩定程度，即RNAI分解或降解速度(decay)的快慢將會影響DNA複製。當時學界雖然對細胞內RNA切割酵素(RNase)在成熟核糖體RNA (ribosome RNA或rRNA) 的生化角色，已有深入地研究，然而對細胞內一般mRNA的降解機制，幾乎毫無所知。

不論是原核或真核細胞降解mRNA都是由RNase執行。以大腸桿菌(*E. coli*)系統，研究RNA降解機制比較容易。因為大腸桿菌的遺傳基因只有一套，比較容易分離溫度敏感(temperature-sensitive)突變種，而且它的細胞週期很短。自七十年代起，利用遺傳與生化研究方法從大腸桿菌系統鑑定了約20種RNases。這些RNases分為兩類：RNA內切酵素與3'-端往5'-端切割活性的RNA外切酵素(簡稱3'-端外切酵素)；到目前為止在大腸桿菌系統5'-端RNA外切酵素則尚未發現。這些RNases細胞對轉移RNA(tRNA)與核糖體RNA的成熟過程具有不同切割活性與功能。例如RNaseIII專切雙鏈區(double-stranded region)，RNaseE則切RNA單鏈區(single-stranded region)；前者與23S及16SrRNA形成有關，後者與5SrRNA形成有關。又如大腸桿菌RNaseP則負責5'-端tRNA成熟處理(5'end-processing)，不過RNaseP活性是由它的RNA次分子(RNA

subunit)來執行。到目前為止，20種RNases中只有RNaseE與RNaseP是大腸桿菌必要的內切酵素。換句話說，缺少其中一種活性，細胞就無法存活；但除去RNaseIII或其他任一種RNase活性則不影響細胞生長。

RNaseE溫度敏感突變種是利用遺傳突變研究法，由D. Apirion研究室於1978年鑑定出來的。當時他們的研究發現RNaseE乃是切割5S rRNA之先驅分子即9S rRNA的內切酵素。後來，於1985年，Apirion研究室又發現RNaseE可以切割負調控子RNAI，當時本人正在H. Bremer的研究室修習博士論文，論文主題是研究ColE1質體複製與大腸桿菌細胞生長的關係。當時覺得RNAI是研究降解很好的模式，因為RNAI很小只有108nt，它的二級結構與功能都已知，且RNAI不做轉譯，故其穩定度不受核糖體的干擾，研究系統比較單純。但首先並需能證明RNaseE切割RNAI的確可調控RNAI的穩定度，即調控RNAI降解速率。不巧，Apirion在那一年離開美國，我一時要不到RNaseE突變菌種，加上當時實驗非常緊，就沒有進一步與Apirion聯絡。1987畢業之後隨即到史丹福大學跟隨對RNA降解研究頗有貢獻的S. N. Cohen修習博士後研究。Cohen研究室也用大腸桿菌系統，不過選用*bla*與*ompA*兩個基因為研究對象，利用*bla/ompA*具有等長mRNA不一樣半衰期的特性，研究RNA序列與構造如何影響RNA降解的機轉。三年博士後研究轉眼即逝，本人因為花費大部時間參與Cohen研究室另一研究小組從事哺乳類細胞株系統研發基因捕抓(gene-trap)的工作，而RNAI降解的研究反而停留在初步階段。

回國之後，在分生所優良研究設備下，利用從美國大腸桿菌遺傳菌種中心(Genetic

Stock Center)取得的RNaseE溫度敏感突變種，與利用點突變法(site-directed mutagenesis)改變RNAI 5'-端RNaseE切割序列產生的RNAI突變種(variants)，繼續與Cohen合作研究RNaseE活性與RNAI降解的關係。實驗結果發現當突變菌種被移到43°C失去RNaseE活性時，RNAI降解立刻停止，RNAI半衰期由原來的一分鐘延長為十分鐘以上。我們發現當RNAI半衰期增長時，ColE1質體DNA複製立即停止。這些結果證明RNaseE切割RNAI是控制RNAI降解的首要步驟，而RNAI半衰期是調控ColE1質體複製的重要因子。此乃在生物學上首次實驗證明RNA降解是調控DNA複製的重要因素。

RNAI降解調控ColE1質體複製的機轉

因為RNAI穩定度可以調控ColE1質體複製的發現，引發了其它有趣的問題：經RNaseE切割之後的pRNAI-5（圖一）是如何繼續降解的？它的降解是經由RNaseE或經由大腸桿菌的其它RNases執行？若是經由其它

RNases執行，會是哪些RNases？影響ColE1質體複製的其它基因突變是否也影響RNAI的穩定度？因此我們針對已知大腸桿菌RNase突變種去分析活體內RNAI降解速率的變化。我們選用的大腸桿菌攜帶的突變基因包括*pcnB-*，*pnp-*，或*rnc-*。這些基因產物的功能已知與RNA切割有關(*pnp-*，*rnc-*)或與ColE1質體複製有關(*pcnB-*)。*pnp*的基因產物是PNPase，它是一個RNA 3'-端的外切酵素（圖二）；*rnc*的基因產物是RNaseIII，它是專切RNA雙鏈區的內切酵素；而*pcnB*的基因產物則是PAP (poly A polymerase)，具有在RNA 3'-端加A的活性。又為了要進一步瞭解RNaseE切割後的pRNAI-5降解是否與這些基因有關？我們利用遺傳研究法將這些已知的突變基因轉入*rne-*溫度敏感突變種產生雙基因突變種，*rne-/pcnB-*，與*rne-/pnp-*，然後也分析其活體內RNAI降解的情形。

實驗結果讓我們非常驚喜：驚的是發現在RNAI的3'-端具有外加的十幾個A（圖二）；喜的是發現這外加的十幾個A居然是促進pRNAI-5降解的主要原因。換句話說，當*pcnB*基因突變而失去在RNAI 3'-端加A的功能時，RNaseE切割後的中間產物pRNAI-5會累積下來。而累積的中間產物pRNAI-5之半衰期也超過十分鐘。這些結果證明在原核RNA的3'-端可有外加A的處理且其功能與加速RNA降解有關。而穩定性很高、未加A之pRNAI-5的累積乃是造成DNA複製停止，質體套數降低之主因（圖二）。

RNAI降解機轉模式的建立（此次得獎研究著作之一）

最近利用引子延伸法在*pcnB-*大腸桿菌進

圖一 RNaseE切割RNAI是驅動RNAI降解的第一步驟

圖二 RNAI降解機轉及其降解速率與調控質體DNA複製的關係

一步探討RNAI或5'-端不具有RNaseE切割序列之RNAI突變種的降解時，我們偵測到另一個七十nt左右的RNA降解中間產物（圖二）。進一步分析發現此RNA降解中間產物正是RNAI的3'-端，因為不具有A所以累積下來。這些結果暗示了在大腸桿菌中RNaseE切割RNAI後之中間產物pRNAI-5的降解是從它的3'-端開始。

不過，當我們利用純化的RNaseE及RNAI進行試管內生化切割的研究時，我們發現純化的RNaseE酵素在第一刀切割RNAI產生pRNAI-5之後可以分別在第34-35nt間及72-76nt間作切割反應（圖一）。更有趣的發現是RNaseE不僅執行RNA切割反應，具有鬆開RNA複雜結構的功能；而且發現RNaseE蛋白對不同長短的RNA受質有不同的親合力。這些研究發現可建議一個RNA的降解模式：RNAI 5'-端單股區經RNaseE切割產生pRNAI-5後，切割酵素同時幫忙鬆開pRNAI-5複雜的RNA結構，讓34-35 nt間及72-76 nt間的切割點漸續解開，形成單股成爲RNaseE切割的受質。此陸續切割產生較短的RNA，可能透過3'-端加A的反應，最後在再經3'-端外切酵素加以完全水解或分解。

E. coli RNA分解體的發現（獲獎代表作之二）

細胞中，既然至少由兩種以上的切割酵素合作完成RNA的分解：即先由RNA內切酵素在RNA上做定點切割後，再經由3'-端往5'-端的RNA外切酵素完成RNA的分解。那麼，RNA分解內切與外切酵素之間，及RNA分解酵素與其RNA受質之間是如何互動？在活體內，一個RNA分子又如何可以在幾十秒中就完全被分解呢？直到1994年，Krisch和Higgins兩組研究群利用免疫沈澱及生化方法研究RNaseE時，發現RNaseE可與3'-端外切酵素PNPase形成免疫沈澱。此研究結果暗示在*E. coli*內RNaseE可能與PNPase結合形成結合體。接下來，是如何從活體細胞中快速的分離純化RNaseE/PNPase結合體？於是我們利用DNA重組技術將N-端標的蛋白(N-terminal tag)與RNaseE作成融合蛋白，並在細胞內表現。細胞中若有任何RNaseE的結合蛋白，便會與此融合蛋白形成結合體，以標的蛋白的單株抗體應可將RNaseE結合體分離出來。實驗結果，果然分離出RNaseE/PNPase結合體。意外的是此結合體經過電泳分析及胺基酸定

序，我們發現除了已知的RNaseE與PNPase外，還有結合專門解開RNA二級結構的Helicase，調控蛋白分子構造及活性有關的DnaK，及與醣類能量代謝有關的Enolase（圖三）；而且分離出來之龐大的多蛋白複合體具有RNaseE的活性（圖四）。此外，我們發現它也結合有RNA分子。這些研究發現，首次證明細胞內存有龐大的RNaseE複合體來執行RNA分解，此RNaseE複合體因而命名為RNA分解體(RNA degradosome)。本研究結

圖三 純化的RNaseE複合體（或稱RNA分解體）含有RNAI及其它RNA分子

圖四 從野生種(w.t.)大腸菌純化之RNA分解體具有RNase E切割RNAI之活性，然而從rnets突變種純化的分解體，經43°C處理即失去活性。

果很快的被美國出版的PNAS接受，並在1996年4月30日發表。九天之後，即5月9日，英國出版的Nature也報導Krisch(法)及Higgins(英)兩研究群，利用生化分析法成功純化出*E. coli* RNaseE de-gradosome的合作研究成果。

RNA分解體的發現固然令人興奮，然而研究RNA降解的調控機制並未因此而結束。相反的，我們正一步一步的去探討許多有趣的問題：如在*E. coli*內，如何決定哪些RNA在何時該被分解？又*E. coli*內是否已含有其他不同類的RNA分解體？分解體各個成員蛋白分子在RNA分解途徑扮演什麼角色？盼望未來數年中的不斷鑽研，研究成果可以開發更多的知識，對細胞調控RNA降解機制有更完全的認識。

本研究室開發「小鼠基因捕抓技術」的源起

1953年「DNA是雙螺旋結構」的發現，不但解開遺傳物質DNA複製之謎，並且快速地促使分子生物學及其它相關學門的興起，其中包括DNA重組技術之開發及運用。四十多年來，藉著分子生物學及DNA重組技術的快速發展，人類在步入廿一世紀後短短四至五年間，將見證完成解讀人類基因體龐大的DNA序列(~ 3×10^9 bp)，約含概五十萬個基因。顯然，廿一世紀裡，科學家們將要忙著解開這些基因的生物功能。但面臨的問題是如何從 3×10^9 bp的DNA序列中，快速地鑑定具有基因表現的區域，並進一步選殖DNA序列以探討其基因功能？

因此，藉著早期利用指標基因(reporter gene)及噬菌體病毒(Mudlac)成功地從原核染色體中鑑定「轉錄活化區」的原理，及本人對DNA載體的認知，本研究室開始開發一套有效的「基因捕抓」技術。

反轉錄病毒攜帶指標基因之衍生載體並應用於鑑定基因體之轉錄活化區(獲獎代表作之三)

細胞染色體上基因啓動子(promoter)的活性決定該基因的轉錄。因此，利用基因組合的技術，學者可以將純化的染色體DNA，用酵素切成片段後，將這些片段的染色體DNA插入一個不帶有啓動子的指標基因(reporter gene)形成重組質體(recombinant plasmid)，然後利用遺傳工程的技術，將它轉入細胞中，以偵測指標基因的表現，來鑑定插入之染色體DNA之片段是否帶有啓動子的活性。然而此法，除了繁瑣的實驗步驟外，有一個基本問題：重組質體與染色體的結構、大小差異很大，而染色體的結構乃調控啓動子轉錄活性之重要因素。因此，利用重組質體偵測到之啓動子的轉錄活性，在細胞染色體上未必具有轉錄活性。

避免上述的問題，本論文利用重組之反轉錄病毒(recombinant retrovirus)，攜帶指標基因，藉感染寄主後，將指標基因直接插入細胞染色體，去偵測染色體上具有轉錄活性之啓動子。如此，藉著偵測指標基因之表現與否，直接在細胞染色體上鑑定轉錄啓動子，稱為promoter trap。一般，promoter trap反轉錄病毒衍生之載體，只保留兩端具有插入染色體功能的long terminal repeat (LTR)構造，而其複製基因已被指標基因取代，因此喪失複製之活性。但此不具複製活性之反轉錄病毒載體，經轉染至輔助細胞中，利用輔助細胞株表現的Gag、Pol、Env蛋白，便可以大量生產有感染力之反轉錄衍生之載體病毒。

本研究使用的反轉錄病毒載體是從SIN (self-inactivating)病毒衍生而來，SIN衍生之

載體具有下列特性：它的3' LTR不含加強子和啓動子（以dLTR代表），因此經由輔助細胞產生的反轉錄病毒，感染細胞後經過複製，插入染色體中，便很穩定地成爲染色體的一部份；另外，因反轉錄病毒複製的結果，插在細胞染色體中之病毒載體其3'端及5'端均形成dLTR結構，所以不具任何轉錄活性。因此，利用該載體攜帶指標基因，在插入染色體後，只有其插入點之上游區具有活性的啓動子(genomic flanking promoter)，指標基因才能表現。所以，利用SIN衍生之病毒載體，可以有效率地鑑定染色體上之轉錄活化區。

抗藥性基因作為指標基因

我們利用原核生物之 aph 基因(aminoglycoside 3'phosphotransferase gene)作為指標基因。 aph 隨著反轉錄病毒衍生載體，插入哺乳類細胞染色體後，藉其插入上游之啓動子的活性才能表現。 aph 的表現可導致受感染之細胞株產生抗G418的能力。相反地，若是病毒插入區不含轉錄活性， aph 基因就無法表現，而受感染之細胞株，在G418篩選下，即無法存活。另外，如圖五，我們所用之 aph 指標基因具有原核轉錄啓動子(prokaryotic promoter)，而且，在其5'端接有質體DNA複製所需的origin，在3'端具有預先設計的單一限制酵素切割點Hind III，因此，受病毒感染後具抗G418細胞株，其染色體經純化，HindIII切割，若切割後之染色體DNA片段含有病毒載體插入之 aph 指標基因，經self-ligation、轉型後，因 aph 之蛋白產物，可導致大腸桿菌對kanamycin產生抗藥性，便可利用kanamycin直接篩選出轉形成功之大腸桿菌。如此，不必利用其它質體及複雜之實驗步驟，便可將G418篩選出來之具轉錄活化區的染色體DNA片段，快

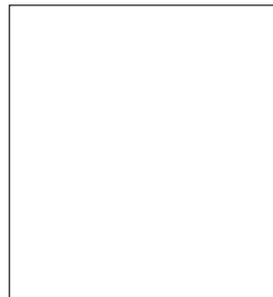
速地選殖出來（圖五），以作進一步研究。

***lacZ*做為指標基因之反轉錄衍生病毒並應用於捕抓哺乳類細胞生長休止基因(growth arrest specific or *gas* gene)**

利用上述promoter trap的原理，我們進一步構築以半乳糖水解基因*lacZ*為指標基因，及利用經改進具有高病毒效價之載體，運用螢光活化細胞篩選儀，開發「捕抓具特殊功能之基因」(gene trap)之技術，進行捕抓細胞生長休止期特別表現的*gas*基因(此部份之研究成果已發表於PNAS 93:4617-22, 1996)。為何選擇捕抓*gas*基因呢？在細胞分化、老化，或甚

至細胞死亡的過程中，透過訊息傳遞之刺激，可驅動特殊基因群之表現，而導致細胞分裂能力之喪失，進入細胞生長休止期。而哺乳類發育的過程中，不同組織之各類細胞，其休止期的長短不一，各型細胞表現之休止基因群也不完全相同。因此，細胞休止期特別表現的*gas*基因群，對決定細胞離開休止期後之命運，是否扮演特殊之角色，將是非常有趣的研究問題。盼望解開*gas*基因的生物功能，能幫助我們進一步瞭解細胞生長及分化的調控機制。

在此特別感謝本研究室蘇文琳文姐、秘書室洪藝楨小姐之熱心協助，使本稿得以及時完成。



林淑端

學經歷：

國立彰化師範大學生
物系學士(1973-77)

台中縣立大安及梧棲

國中教師(1978-82)

美國德州大學（達拉斯校區）分子遺傳與細胞生物研
究所碩士、博士(1982-87)

美國史丹福大學博士後研究員(1987-90)

本院分子生物研究所副研究員（1990-迄今）

科學真理的追尋 ——以抑癌基因p53為例

林陽生

生物醫學研究所副研究員

圖五 選殖具轉錄活性之染色體DNA之實驗步驟

起於對未知事物的好奇，想要探索其真象