

蛋白質乙醯化： 一首由基因體學及蛋白質體學 譜成的交響曲

文・圖／林育誼

人類基因組的解碼開啟了後基因體時代，並提供了許多訊息促使我們更加了解基因遺傳與疾病之關聯。然而許多伴隨老化而來的慢性疾病像是高血壓、糖尿病等代謝症候群，甚至癌症及神經退化疾病，環境及後天因素的貢獻度可高達60-70%。環境因素例如飲食及抽菸、喝酒、熬夜、精神壓力等各種生活習慣及狀態如何導致疾病的分子機制目前仍不甚明瞭，但一個可能的機轉為透過蛋白質受環境因素調節而產生的轉譯後修飾，進而改變或切換該蛋白質的功能。

乙醯化是一種關鍵性的蛋白質轉譯後修飾

生物體將基因之DNA序列經由轉錄作用合成RNA，再由RNA轉譯形成蛋白質。蛋白質合成後經過進一步修飾而改變其物理或化學性質，進而影響其活性、其他生物分子結合及交互作用、細胞內位置以及蛋白質穩定度等屬性。此「轉譯後修飾」可以快速切換蛋白質的各項特性以因應環境需求，細胞不需經過基因表現之調節及轉錄、轉譯等冗長過程，即可啟動或終止某條訊息路徑，因而大幅增加了細胞生存的彈性。目前已知的蛋白質轉譯後修飾包括兩大類：一、以共價鍵結的方式加上具有生化活性的功能基，乙醯化反應（acetylation）屬於這一類；二、經由特定胜肽裂解酶的作用，在蛋白質的特定肽鏈鍵結產生裂解反應。這些轉譯後修飾使蛋白質在結構及功能上產生極大的多樣性，遠超過其本身胺基酸序列可能帶來的變化；同時這些修飾作用彼此也存在複雜的競合，由此對受質蛋白遂行精巧的功能調節。

以共價鍵結加上功能基的轉譯後修飾原則是動態及可逆的，並且經由專門負責的酵素來催化其反應的進行。其中，乙醯化可以發生在蛋白質的N端的甘胺酸（glycine, G）的胺基上，或是蛋白質內部任意位置的賴氨酸（lysine, K）的支鏈上。賴氨酸支鏈的乙醯化反應由兩種互相拮抗的酵素所催化：賴胺酸乙醯基轉移酶（lysine acetyl transferase, KAT），以及賴胺酸去乙醯酶（lysine deacetylase, KDAC）。乙醯化的受質最常見的是組蛋白、轉錄因子、細胞核運輸因子以及細胞骨幹之重要組成微管蛋白。做為表觀基因調控的重要機制，轉錄因子可藉由特殊的bromodomain結構來辨識被乙醯化的組蛋白，進而影響染色質的結構和相關基因的表現。組蛋白是一群被DNA纏繞、富含鹼性基的正電荷蛋白質，與DNA共同形成核小體（nucleosome）。組蛋白的乙醯化會中和賴氨酸支鏈上的正電荷，使之與帶有負電荷的DNA纏繞放鬆，進而促進轉錄因子進入基因之啟動子區域來活化轉錄過程的進行。乙醯化也會減少受質蛋白被泛素化（ubiquitylation）的程度而保護受質蛋白不被蛋白體酶降解，進而提升

其穩定度。

乙醯化與細胞內能量狀態也有密切的關係，因其酵素催化反應中共同受質之乙醯輔酶A（acetyl coA）本身就是碳水化合物或脂肪代謝的核心中間產物（圖1）。近來大規模蛋白質譜分析研究發現許多代謝酶能夠進行乙醯化，意謂著細胞可能利用蛋白質的動態乙醯化來因應代謝狀態的變化。然而我們對於這些代謝酶受質乙醯化/去乙醯化的功能以及負責此修飾的

乙醯基轉移酶/去乙醯酶近乎全然未知；加上人類細胞有18個賴胺酸去乙醯酶，其氨基酸序列與蛋白質構型相似度頗高，要區分其個別功能十分具挑戰性。

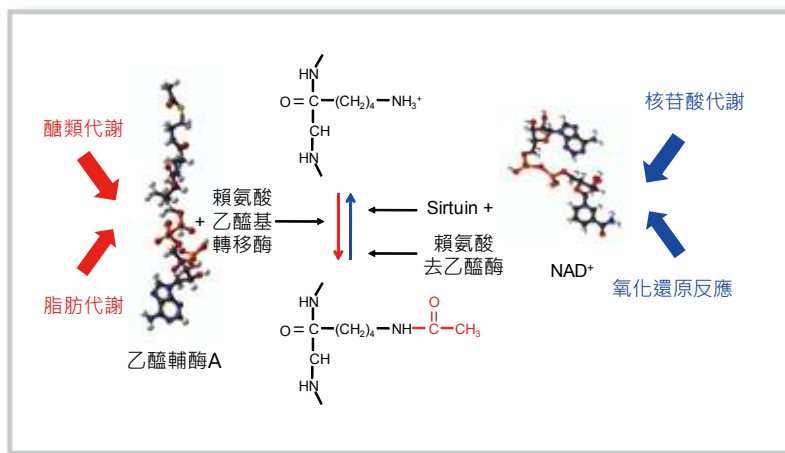


圖1：蛋白質乙醯化和細胞代謝息息相關。

全基因組核糖核酸干擾技術與基因交互作用篩檢

為了要解開代謝酶乙醯化的種種謎團，我們建構了一套以全基因組核糖核酸干擾在人類細胞株進行基因交互作用的篩檢技術來研究人類的賴胺酸去乙醯酶在細胞內的功能和作用機轉。基因交互作用意指當兩個基因同時突變時會產生個別突變不會造成的表現型，例如細胞存活的減少甚至死亡（負向基因交互作用）或是存活的增加（正向基因交互作用）。基因交互作用通常存在於具備相同功能或是組成相同蛋白複合體的基因之間；許多利用模式生物的研究已經證實基因交互作用對於解析複雜的生物系統極有助益。

首先我們先利用短髮夾核糖核酸建立個別賴胺酸去乙醯酶基因敲損（knockdown）的穩定細胞株，再把由The RNAi Consortium取得的一個含有75000個短髮夾核糖核酸的慢病毒集合一次性地感染該細胞株來同時監測個別賴胺酸去乙醯酶基因和15000個基因之間的交互作用（圖2）。之後再利用客製化的微陣列晶片來定量這些交互作用；在微陣列晶片上呈現綠色或紅色的點分別代表和賴胺酸去乙醯酶基因有負向或正向交互作用的基因。經過標準化的統計分析後，我們將所有超越判定標準的候選基因以96孔盤的實驗方式

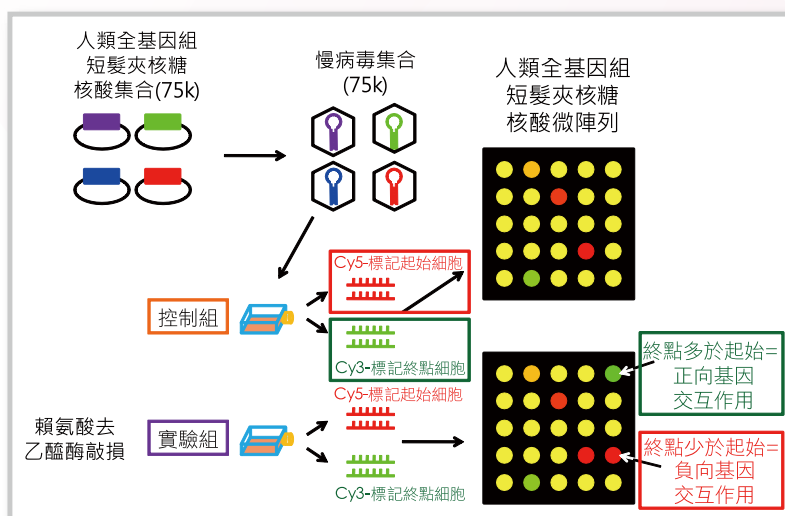


圖2：利用全基因組核糖核酸干擾篩檢人類去賴胺酸乙醯酶的基因交互作用。

確認了898個基因交互作用，其中負向與正向交互作用的比例約為2：1，此比例與已知的其他模式生物相當。我們發現不同的去乙酰酶因為有redundancy以致彼此之間常有負向基因交互作用；反之，去乙酰酶與乙酰基轉移酶彼此的拮抗作用導致其間存在正向基因交互作用，同理，去乙酰酶與人類細胞內主導乙酰輔酶A生成的基因ATP-citrate lyase之間也呈現正向基因交互作用。基因本體（gene ontology）分析顯示和去乙酰酶有交互作用的基因作用廣泛，涵蓋細胞分裂、日夜週期、能量代謝、巨分子合成及胚胎發育等調節機制，這些基因同時參與癌症、代謝症候群以及神經退化等老年相關疾病的致病機轉，顯示去乙酰酶在維持細胞正常運作的許多面向扮演不可或缺的角色。

AMPK的乙酰化與細胞代謝平衡

基因交互作用除了可以預測去乙酰酶的新穎功能之外，也隱含和去乙酰酶之間的物理性結合和催化反應，換言之，和去乙酰酶有交互作用的基因同時也可能是去乙酰酶的受質蛋白。HDAC1和HDAC2是兩個在生物化學特性上極為相似的去乙酰酶，然而基因剔除小鼠的研究結果顯示這兩個去乙酰酶具有截然不同的功能。同樣地，我們的基因交互作用篩檢結果也辨識出許多和HDAC1呈現特異性交互作用的基因，包括AMPK的許多單體（圖3）。AMPK是動物細胞內至為關鍵的能量感測蛋白複合體，會因應細胞的能量狀態來調節合成代謝（anabolism）以及分解代謝（catabolism）以維持細胞內ATP的恆定：當細胞能量匱乏時，AMPK會被上游激酶LKB1磷酸化並活化，進一步活化下游分解代謝酵素來增加ATP產出；反之當細胞能量充裕時，AMPK會被去磷酸酶去磷酸化並去活化，進一步增進下游合成代謝酵素來增加ATP消耗。種種遺傳學實驗也證實AMPK和許多物種的壽命息息相關，同時在卡路里限制壽命的機轉上扮演關鍵性角色。

我們藉由許多活體與試管的實驗證實，一如AMPK和HDAC1之間的特異性基因交互作用所暗示的，AMPK的催化單體 PRKAA1確實也是HDAC1的特定受質，同時也鑑

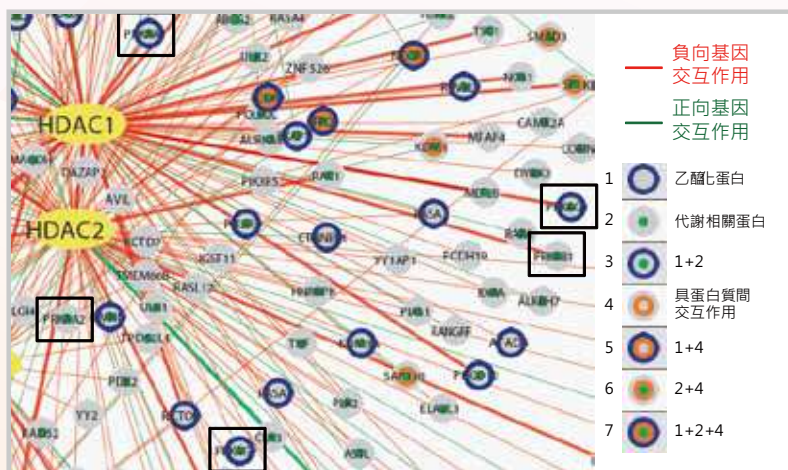


圖3：HDAC1和HDAC2的基因交互作用網路，黑色方框內為AMPK的單體。

定出PRKAA1的特定乙酰基轉移酶為p300。p300對PRKAA1的乙酰化發生在三個特定的賴氨酸支鏈上，會阻礙PRKAA1和上游激酶LKB1的結合，因而抑制PRKAA1的磷酸化與活化；反之HDAC1對PRKAA1的去乙酰化會促進PRKAA1和上游激酶LKB1的結合以及PRKAA1的磷酸化與活化。一如預期的PRKAA1的乙酰化和去乙酰化分別發生在細胞能量

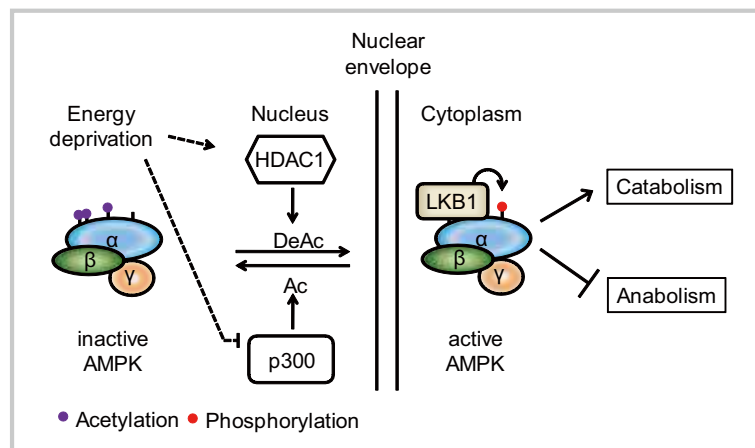
圖4：AMPK的乙醯化對其活性的調節。

充裕和匱乏的狀態（圖4），意謂著細胞同時利用ATP及乙醯輔酶A這兩種代謝中間產物來調整AMPK活性的閾值以維持能量平衡。

結語

非組蛋白，尤其是代謝酶的乙醯化/去乙醯化是一個新穎的浩瀚領域。我們利用

全基因組核糖核酸干擾這種跨越功能性基因體以及蛋白質體的嶄新技術在人類細胞株篩檢去乙醯酶的基因交互作用，因而更深入地了解人類去乙醯酶的特定功能，同時也鑑識出許多去乙醯酶的特定受質蛋白。其中HDAC1對AMPK的調控開創未來臨床上利用去乙醯酶抑制劑治療代謝症候群以及其他老化相關疾病的可能性。



延伸閱讀

- [1] Lin, Y. Y., Kiihl, S., Suhail, Y., Liu, S. Y., Chou, Y. H., Kuang, Z., Lu, J. Y., Khor, C. N., Lin, C. L., Bader, J. S., Irizarry, R., Boeke, J. D. (2012). Functional dissection of lysine deacetylases reveals that HDAC1 and p300 regulate AMPK. *Nature*. 482, 251-255.
- [2] Lu, J. Y., Lin, Y. Y., Sheu, J. C., Wu, J. T., Lee, F. J., Chen, Y., Lin, M. I., Chiang, F. T., Tai, T. Y., Berger, S. L., Zhao, Y., Tsai, K. S., Zhu, H., Chuang, L. M., Boeke, J. D. (2011). Acetylation of yeast AMPK controls intrinsic aging independently of caloric restriction. *Cell*. 146, 969-979.
- [3] Lin, Y. Y., Lu, J. Y., Zhang, J., Walter, W., Wan, J., Tao, S. C., Qian, J., Zhao, Y., Boeke, J. D., Berger, S. L., and Zhu, H. (2009). Protein acetylation microarray reveals NuA4 controls key chronologic aging target regulating gluconeogenesis. *Cell*. 136, 1073-1084.
- [4] Lin, Y. Y., Qi, Y., Lu, J. Y., Pan, X., Yuan, D. S., Zhao, Y., Bader, J. S., and Boeke, J. D. (2008). A comprehensive synthetic genetic interaction network governing yeast histone acetylation and deacetylation. *Genes Dev* 22, 2062-2074.



林育誼小檔案

1998年臺灣大學醫學士，2008年美國約翰霍普金斯醫學院哲學博士。自2009年起任教於臺灣大學醫學院生物化學暨分子生物學研究所。研究重點在於利用高通量篩檢技術整合基因體與蛋白質體訊息來剖析複雜的生物系統。