



核酸修復的諾貝爾之路

醫學檢驗暨生物技術學系（楓城新聞與評論總編輯）方偉宏副教授

2015 年諾貝爾化學獎頒給三位研究核酸修復的大師，其中杜克大學研究核酸配對錯誤修復的 Paul Modrich，正是我博士論文的指導教授，恩師榮獲大獎，身為弟子也倍感殊榮，由於我當年研究主題是人類細胞核酸配對錯誤修復，而且目前仍在核酸修復的領域進行研究，因此勉力為文介紹核酸修復，以彰顯恩師的成就。

中文媒體所有的音譯：保羅·默德里奇（Paul Modrich）默德里奇這個四音節的音譯讓我聽起來有些不習慣，Modrich 這個姓氏在美國的確不常見，而我在他的實驗室聽到稱呼，如用中文音譯則更像三個音節的摩哲曲。他在實驗室中，希望自己指導的學生及同事稱他 Paul，較生疏的人則稱呼他 Dr. Modrich。為了避免中譯的拗口及混淆，本文直接以英文稱呼。

生物體的遺傳物質核酸(DNA)，經常面臨著各種外源性的傷害或是內源性的錯誤，需要進行核酸修復才能恢復正常以維持遺傳的恒定性。生物體中的核酸修復活性可以分成幾個大類，有些專門修復外源性的放射線或化學反應所造成的傷害，而本篇文章所討論的核酸配對錯誤修復(DNA Mismatch Repair)，則是專門因應內源性的錯誤所演化出來的系統。

正常的雙股核酸遵循華生—克里克提出的模型，腺嘌呤配胸腺嘧啶(A:T)，鳥糞嘌呤配胞嘧啶(G:C)，在核酸複製的過程中，核酸聚合酶的失誤會造成 G-T，或是 G-A 鹼基配對錯誤的情形（約合成十萬到百萬個單元可能會出現一個錯誤）。另外在基因重組的過程中，形成雜雙股核酸是一個重要的中間步驟，其引介兩條雙股核酸進行核酸鏈的交換，這時如果交換中的核酸不全然相同，則鹼基配對錯誤就可能形成於雜雙股中。這些核酸代謝過程所發生的錯誤都需要被正確的修復，才能維持遺傳的恒常性。

在大腸菌中具有甲基指引核酸配對錯誤修復系（Methyl-directed mismatch

repair)，這個系統是一項核酸複製後的除錯修復機制，其修復過程牽涉到修復蛋白 MutS 識別錯配的位置，再加上 MutL 蛋白共同活化內切酶 MutH，這些蛋白的共同作用下可以在尚未甲基化的新生核酸(GATC)序列上，產生一個與配對錯誤相關的股裂(nick)，接下來由外切核酸酶將含有錯誤配對的核酸水解，最後再由複製用核酸聚合酶合成正確的核酸以完成修復的工作。

有許多研究顯示在原核及真核生物中核酸配對錯誤修復系統在功能上的相似性，例如範圍寬廣的受質識別能力：細菌可修復 C-C 以外的七種鹼基配對錯誤及 1 到 4 個的核酸插入或刪除，而人類系統可以修復所有的配對錯誤及小段插入刪除，在修復反應方面也有相似處。分子遺傳學上也證明了可以在各種不同的生物中找到核酸配對錯誤修復蛋白的類似物，包括原核生物的大腸菌及鏈球菌，在真核生物的酵母菌，昆蟲細胞，兩生類，乃至於哺乳動物及人類細胞中。這表示負責核酸配對錯誤修復的基因在演化上很保守，MutS 同質體(MSH1 to 6)幾乎在被研究過的物種中都可以找到，證明這種蛋白質在演化上十分的保守。

出生於美國新墨西哥州的 Paul Modrich 有強烈的牛仔氣息，在史丹佛取得博士學位，在哈佛做博士後研究，之後受聘於杜克大學。早年研究過許多與 DNA 相關的酵素，包括 DNA ligase, DNA polymerase, DNA methylase 及限制酵素 EcoRI 等。

展開核酸修復研究的機緣來自他發現 Dam methylase 會在 DNA 上的 GATC 序列的 A 加一個甲基，被甲基化的 DNA 可以改變對限制酵素的敏感度，讓限制酵素切除有害的噬菌體核酸，而不會傷害到細菌本身的核酸，可說是細菌用來識別敵我的防衛機制。而當時哈佛大學的分子生物學家 Matthew Meselson 則認為，這種核酸複製後過一段時間才會被甲基化的位置，或許是用來修復核酸複製錯誤時，用來區分正確的舊模版與錯誤的新複製片段的信號。於是兩人合作用噬菌體進行細菌轉染的研究，結論出核酸配對誤修復是一種自然的過程，用來修復複製時的錯誤，而且是用是否甲基化來決定需要修復的核酸股。

在分子生物學當道的年代，Paul 一向自稱是一位古典的生化學家，最為重視且自豪的是將所研究的蛋白質純化到幾乎無雜質。而生化學家致力研究的是特定生命現象的原理，終極目標就是在試管中重現特定的生命現象，以核酸修復為例遵循著的古典的研究程序包括下列五部曲：

1．設計具特定錯誤的核酸受質，將目標物種細胞製成粗萃取液，與核酸錯誤受質在試管中進行修復反應的功能性測試。

2．利用粗萃取液及核酸錯誤受質進行反應機制的分析。

3．利用功能性測試為工具，自粗萃取液中將參與反應的蛋白質成分分離純化。

4．將純化的成分仿照生物體中的比例，在試管中重組修復的反應。

5．利用純化的蛋白質及核酸受質做更為精細的反應機制研究。

一旦 Paul Modrich 進入了核酸修復的領域，確確實實的執行了上述的研究程序。他運用在核酸酵素學研究的優勢，進行系統性的分析，首先他利用限制酵素對核酸切位序列的特異性，設計配對錯誤的受質，只要受質中的限制酵素識別序列出現一個像 G-T 的配對錯誤就無法被限制酵素水解，如果這個受質經過了核酸修復反應將識別序列復原成 G:C，就可以讓限制酵素水解，而水解後的產物用簡單的洋菜凝膠電泳就可以定量修復活性。1983 年他在 PNAS 發表第一篇大腸桿菌試管中核酸配對錯誤修復論文就是上述使用細菌粗萃取液測定的第一部曲。

這種在試管中進行的功能性測定，讓他可以有效的進行系統性的研究，隨後幾年進行了配對錯誤核酸受質的改善，包括將配對錯誤種類從最初的 G-T，增加到 A-A，A-C，A-G，G-G，C-C，C-T，T-T 等 8 種所有可能的配對錯誤，以增進對修復反應特異性的了解。指引修復的甲基化位置，從原始載具中的 4 個修減成 1 個，以便明確了解修復反應起點位置及修復的區段，以上為第二部曲。同時併行的第三部曲則是利用功能測定這個工具，加上缺乏配對錯誤修復的菌株純化出 MutS，MutH，及 MutL 主要的修復蛋白;到了 1989 年所有的修復蛋白成份都到位了，理想的配對錯誤核酸受質也備好了，呈現中的第四部曲就是在 Science 所發表史詩級鉅作的研究專文(Research Article)，將純化的十種成分仿照生物體中的比例，在試管中重組修復的反應，以及詳細的反應細節。

當這篇文章發表出來的時候，杜克大學校園間就盛傳 Paul 開始接到諾貝爾獎委員會的信函，邀請他推薦候選人。研究圈內的朋友及競爭對手都認為，他已將細菌的核酸配對錯誤修復系統打包完成，再投入這個領域的研究者將難以匹敵。果然，在接下來的十餘年有關細菌核酸配對錯誤修復反應機制細節的研究

的第五部曲，大多出自於 Modrich 的實驗室或是與他合作的實驗室，包括了利用極精密電子顯微鏡觀察配對錯誤修復中間產物的模樣，以推測修復蛋白作用機制，以及利用 X 光結構分析了解修復蛋白如何結合識別配對錯誤的核酸。

近代對生命現象好奇所啟發的研究，常常從最簡單的單細胞生物如大腸桿菌或酵母菌開始，推到最終端仍是希望對於人類生命現象奧秘的有深入的了解。核酸配對錯誤修復系統的研究也不例外。1990 年在 PNAS 發表了第一篇以人類細胞粗萃取液進行配對錯誤修復的文章，1991 年我成為 Paul 博士生，以細胞萃取液進行反應機制的研究，發現人類修復與細菌修復的相似性，另外也發現兩株人類細胞株缺乏核酸修復的能力，其中一個細胞株是用化學致突變的變種，啟發了使核酸損傷的化療藥物作用機制的新理論。

另一個細胞株則是來自遺傳性大腸癌(HNPCC)的腫瘤細胞，配對錯誤修復缺乏造成這種細胞的突變率增加，突變的累積則是致癌的重要原因。當我們做出這個成果時，大家都了解這個成果的重要性，整個實驗室的成員都十分興奮，[諾貝爾獎，諾貝爾獎]的耳語已在流傳。這件研究計畫的開始至文章在 Cell 發表的過程堪稱傳奇，1993 年中在 Science 及 Cancer Research 分別刊出文章顯示某些大腸癌細胞株突變極高，有微衛星核酸不穩定的特性，Paul 直覺認為與我們的核酸修復有關，找我和兩位博士後研究員討論設計模擬微衛星核酸複製錯誤的模型，做出新的核酸重覆序列插入/刪除受質，同時與約翰霍普金斯大學的腫瘤學大師 Bert Vogelstein 合作，從他的實驗室取得大腸癌細胞株，我們用了三個多月的時間合成新受質，製備細胞萃取液，進行修復活性測定及機制分析，證明了遺傳性大腸癌因為核酸配對錯誤的缺乏，產生了遺傳不穩定性，進而推演出核配修復可以避免突變的發生，進而降低癌症的發生這個重要的結論。當我們將所有圖、表，實驗步驟及結果的草稿交給 Paul，他花了十多天的時間將論文寫好，這時 Vogelstein 獲知競爭對手已有相似的成果投稿中，於是運用其影響力，在論文寄至 Cell 的主編隨即就交給審稿人，只一天時間就完成審稿並接受刊登，趕在 1993 年最後一期刊出。

去年 Paul 應中研院謝道時院士邀請來台演講，分生所鄭淑珍所長為我們舉辦一個 Modrich lab reunion，師生暢談過往我提起上述舊事，Paul 臉色靦腆語帶保留的說，事情不應該這樣做。在他認為無論再怎麼傑出的論文，仍然需要經過正常的審查程序與正常的出版程序。無論如何 1993 年在 Cell 發表的論文至今已被科學界引用 7 百多次，是 Paul 著作中被引用最多的原著論文，比起諾貝爾

獎官方說明所引用 1989 年 Science 上那一篇精典多了一倍以上，可見其重要性及影響力之廣。

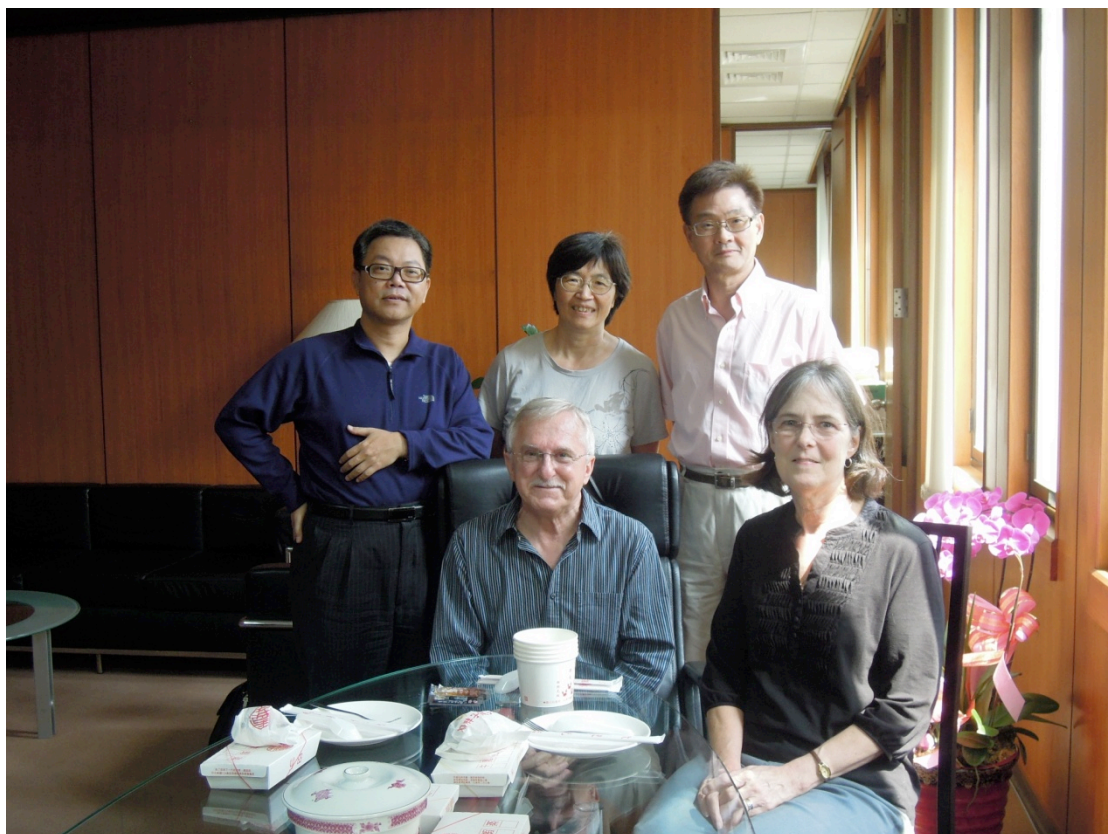
我在 1993 年底取得博士學位 1994 年離開 Modrich 實驗室返國服務，仍然與 Paul 保持聯繫，知道 Modrich 實驗室在隨後十多年間，依循著生化學研究五部曲，將修復蛋白一一純化，又在 2005 年將純化的人類修復蛋白質成分在試管中重組完整的修復反應。近年來則是用純化的人類修復蛋白質進及反應機制細節的研究，也進一步探討核酸修復在人類生理與病理上的意義，終於所有努力的成果，在今年的諾貝爾化學獎得到了最終的肯定。

Paul Modrich 的確與台灣頗有淵源，收過許多位台灣的博士後研究員及博士生，包括呂阿戀(馬里蘭大學教授)，鄭淑珍(中研院院士兼研究員)，金克寧(中研院客座研究員)，蘇新森(Agios 藥廠資深副董)，謝仁至(賓州大學)及方偉宏(台大醫技系副教授)等。他曾經來台灣演講訪問多次，最近一次在 2013 年底。

Modrich lab 在製備核酸受質及蛋白純化在技術精確度要求很高，是一個競爭對手難以模仿技術門檻。曾參與過核酸配對錯誤修復研究的台灣學生起始於 1980 年代呂阿戀擔任博士後研究大腸桿菌修復系統，建立了配對錯誤核酸受質及測定方法的原型。之後接手的是蘇新生博士，純化了 MutS 蛋白，做了許多配對錯誤的型式的受質，而本人則在 1991-1994 年做過人類修復系統的研究。



2013 年暑假筆者帶著太太和小孩回母校杜克大學拜望恩師 Dr. Modrich 合影留念。



2013 年底在中研院分生所的 Modrich lab reunion，前排 Dr. Modrich 及夫人，後排為過去的博士生方偉宏，鄭淑珍院士及金克寧博士。