

# 2015 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 070003

參展科別 微生物學

作品名稱 探討線蟲異質核糖核酸結合蛋白 hnRNP  
Q/R 同源分子 HRP-2 是否影響微小核糖核  
酸 *let-7* 調控目標基因之功能

得獎獎項 大會獎：四等獎

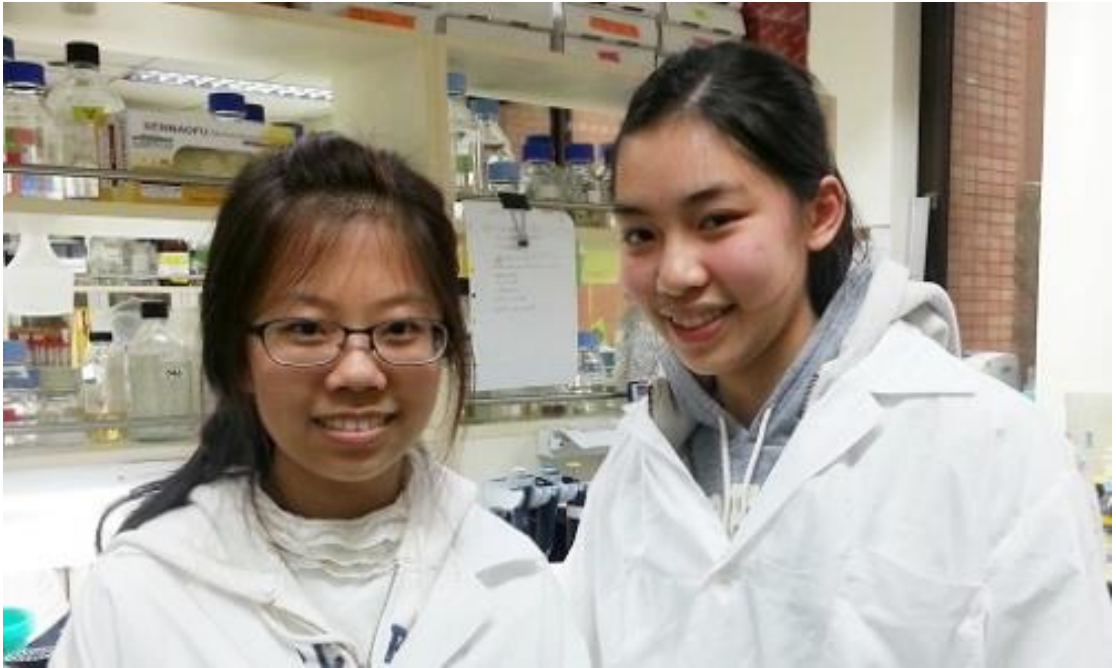
就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 詹世鵬、孫譽真

作者姓名 陳芝寧、李知俞

關鍵字 線蟲、hrp-2、微小核糖核酸

## 作者簡介



我們是陳芝寧和李知俞，目前就讀北一女中數理資優班。芝寧有幸成為中研院主辦的高中生生命科學人才培育計畫的學員，學到了各種生物領域的相關知識；知俞得到國語演說比賽第二名，在每次練習的過程中不但訓練了表達能力，亦培養了穩健的台風與自信。我們因為讚嘆於周邊生物的精巧設計，愛上顯微鏡底下那個令人驚豔的微小世界，而決定投入在生物專題研究中。高一那年有幸進入詹世鵬老師的實驗室學習，從基礎實驗做起，到獨自完成一連串的實驗，雖然有時候免不了失敗，但我們會針對每個環節檢討、修正錯誤、學習。這次有幸參與這樣的科學盛會，讓我們有機會透過交流繼續努力。

## 摘要

微小核糖核酸是一種由約 22 個核苷酸所組成的 RNA 分子，可與目標訊息核糖核酸 3 端不轉錄區域(3' UTR)配對引發基因沉默而負向調控基因表現。在線蟲中，*let-7* 微小核糖核酸調控目標基因 *lin-41*，進而控制發育事件如生殖孔的形成及體側皮下組織接縫細胞(lateral hypodermal seam cells)的分裂與分化。*let-7(n2853)* 溫度敏感低效能突變導致在非容許溫度(non-permissive)下所生長成蟲的生殖孔爆裂，也會導致接縫細胞最終分化(terminal differentiation)的延遲，而使得接縫細胞在成蟲時重複分裂(reiterated proliferation)。我們先前已經發現，利用核糖核酸干擾技術(RNA interference, RNAi)方式去降低異質核糖核酸結合蛋白基因 *hrp-2* 的表現可以抑制 *let-7(n2853)* 突變種生殖孔爆裂的性狀。而在本篇研究中，我們發現降低 *hrp-2* 表現也可以抑制 *let-7(n2853)* 突變種接縫細胞在成蟲時期重複分裂的性狀。此外，此抑制效果可經由去除掉微小核糖核酸沉默複合體的核心重要功能蛋白 ALG-1 而消除。另一方面，我們發現降低 *hrp-2* 表現也可以抑制 *let-7* 的旁系同源微小核糖核酸 miR-84 目標基因 *let-60* 功能性增加突變(gain-of-function mutation)所導致的多重生殖孔性狀。這些證據顯示降低 *hrp-2* 表現可能增強了 *let-7* 及 *miR-84* 分別對於目標基因 *lin-41* 與 *let-60* 的調控。先前研究已顯示 HRP-2 蛋白可結合到訊息核糖核酸介入子(intron)並調控其另類剪接(alternative splicing)，我們的研究結果則顯示 HRP-2 可能也參與在訊息核糖核酸受微小核糖核酸所調控的機制之中。

## Abstract

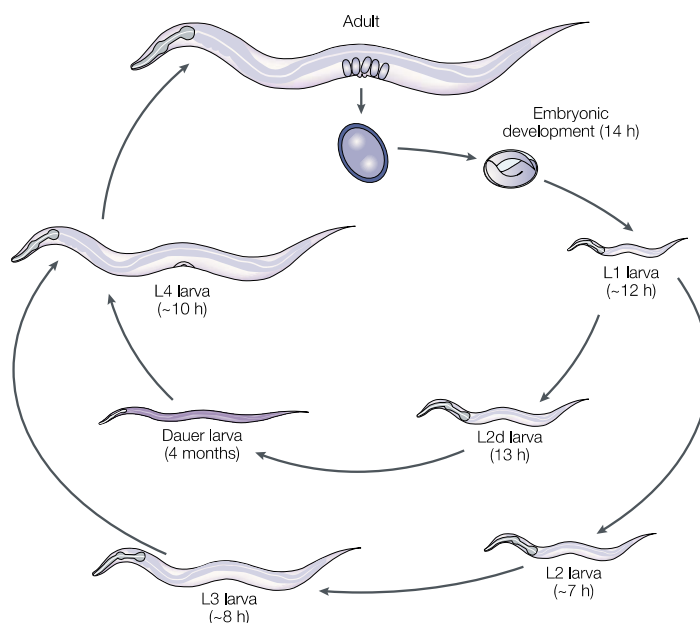
MicroRNAs (miRNAs) are ~22 nucleotides small non-coding RNAs that binds to the 3' untranslated region (3' UTR) of messenger RNAs (mRNAs) and triggers silencing of target genes. In *C. elegans*, the *let-7* miRNA regulates expression of *lin-41* that controls developmental events such as vulva formation and terminal differentiation of the lateral hypodermal seam cells. The hypomorphic temperature-sensitive *let-7(n2853)* allele causes bursting of vulva and reiterated proliferation of seam cells in adult animals grown at the non-permissive temperature. Previously, we have found that knockdown of heterogeneous ribonucleoprotein (hnRNP) gene *hrp-2* by RNAi suppressed the *let-7(n2853)* bursting vulva phenotype. In this study, we demonstrated that reduction in *hrp-2* expression also suppressed abnormal division of seam cells in adult *let-7(n2853)* animals. Moreover, removal of ALG-1, the core protein of miRNA-induced silencing complex, abolished the suppressive effect of *hrp-2* knockdown. On the other hand, we found that *hrp-2* knockdown suppressed the multiple vulva (Muv) phenotype caused by gain-of-function mutations in *let-60*, which is regulated by the *let-7* miRNA paralog miR-84. These multiple lines of evidence link *hrp-2* reduction to enhanced silencing of *lin-41* and *let-60* by *let-7* and miR-84, respectively. It has been previously shown that the HRP-2 protein binds to mRNA introns and modulates alternative splicing. Here, we propose a novel role of HRP-2 in gene regulation mediated by miRNAs.

# 壹、前言

## 一、研究動機與目的

微小核醣核酸 (MicroRNA, 以下統稱 miRNA) 是一種能調控蛋白質生合成的重要因子 (Bartel, 2009)。miRNA 為一由 20-22 個鹼基所組成的 RNA 片段，在 miRNA 生成後，Argonaute protein (ALG-1) 會與之結合，形成活化的微小核醣核酸沉默複合體 (miRNA-induced silencing complex, miRISC)，並與訊息核醣核酸 (messenger RNA, mRNA) 的 3' 端不轉錄區域 (3' - untranslated region, 3' UTR) 形成完全或不完全配對，而引發轉譯作用的抑制或訊息核醣核酸的降解，使基因表現量降低 (Huntzinger and Izaurralde, 2011)。當 miRNA 調控失常時，常導致基因表現異常，進而引發癌症發生。例如在肺癌、乳癌或是肝癌等癌症的病患中，都被發現微小核醣核酸 *let-7* 的表現量較低。(Adams, 2014)

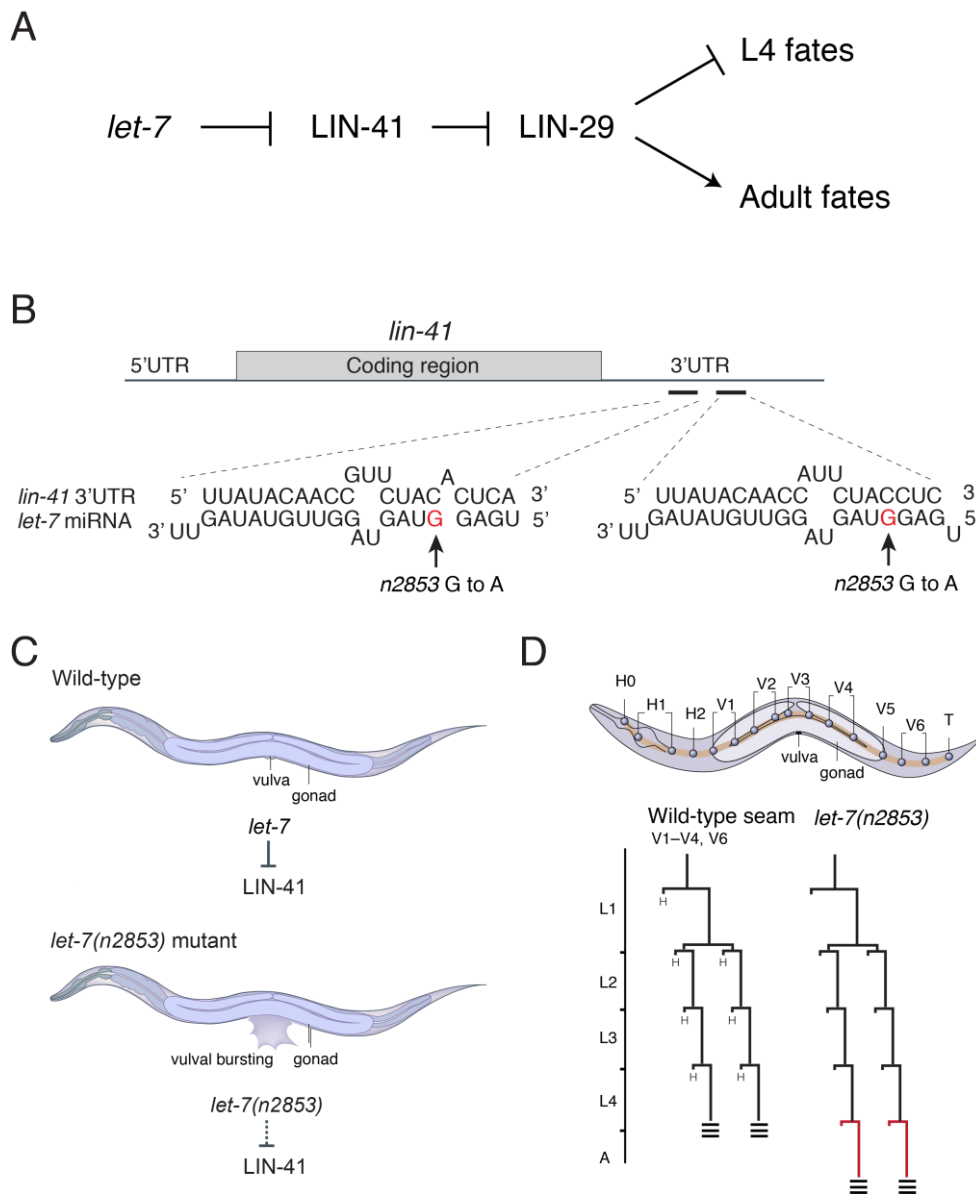
微小核醣核酸最初是在秀麗隱桿線蟲 (*Caenorhabditis elegans*) 中所發現的，它在分類上屬於動物界、線蟲動物門、胞管腎綱、小桿目、小桿科、隱桿線蟲屬。線蟲有雄性和雌雄同體兩種性別，以微生物為食 (如大腸桿菌 *Escherichia coli*)。線蟲生命週期約 2 天，卵在孵化後分為四個幼蟲期 (L1-L4) (如圖一)，而若在 L1 或 L2 遇生長逆境，將進入永久性幼蟲期 (dauer)。在此階段的幼蟲將會停止生長，並至多維持四個月生命。若逆境消失，將進入 L4 的階段繼續生長。線蟲生活史中每個發育的階段都受到微小核醣核酸調控，而且微小核醣核酸突變的性狀容易觀察，又因其生長週期短、易大量培養以及基因已全部定序完成，所以非常適合作為研究微小核醣核酸調控機制的模式生物。



圖一、線蟲的生活史。圖片來自 Jorgensen and Mango, 2002。

在線蟲自 L4 轉化到年輕成蟲的過程中，*let-7* 微小核糖核酸調控目標基因 *lin-41*，而間接活化下游基因 *lin-29* 表現，進而調控生殖孔發育及體側皮下組織接縫細胞(lateral hypodermal seam cells)的最終分化(terminal differentiation)，使這些細胞由幼蟲期細胞命運(cell fate)轉變成成蟲期細胞命運 (圖二 A) (Reinhart et al., 2000)。在 *let-7(n2853)* 溫度敏感低效能(hypomorphic temperature-sensitive)突變種品系線蟲中，其 *let-7* 微小核糖核酸帶有一個 G-to-A 點突變，而且表現量較低，因此對於目標基因 *lin-41* 的調節能力較弱(圖二 B)。如果生長在非容許溫度(non-permissive temperature)下，成蟲生殖孔無法正常發育而發生爆裂的性狀(bursting vulva phenotype) (圖二 C)，此突變也會使得接縫細胞在成蟲時期繼續分裂而不進行最終分化(圖二 D) (Reinhart et al., 2000)。我們實驗室先前研究顯示利用核糖核酸干擾(RNA interference, RNAi)使基因沉默的方式去降低異質核糖核酸結合蛋白(heterogeneous ribonucleoprotein, hnRNP)基因 *hrp-2* 的表現可以抑制 *let-7(n2853)* 突變種生殖孔爆裂的性狀，顯示降低 *hrp-2* 表現或許可以增強 *let-7* 的功能。由於 hnRNP Q/R 可以影響哺乳類動物中 mRNA 的剪接，然而 hnRNP 可否影響 miRNA 的功能仍是未知的，所以想藉本篇研究，進一步探討 hnRNP 對微小核糖核酸的調控。(Chen, 2008)我們利用 RNA 干擾使基因沉默的方式降低 *hrp-2* 表現，並觀察 *let-7(n2853)* 突變種線蟲在成蟲階段接縫細胞繼續分裂而不分化的性狀是否也受到抑制。

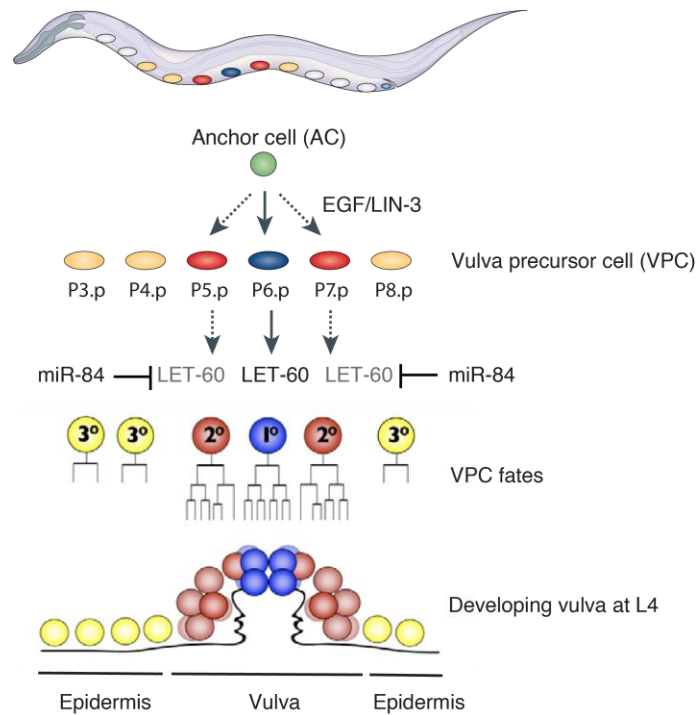
ALG-1 蛋白是組成微小核糖核酸沉默複合體的重要蛋白，前人研究已發現利用核糖核酸干擾技術去降低 *alg-1* 基因表現量時能降低 *let-7* 微小核糖核酸的功能，而引發類似 *let-7(n2853)* 突變種的性狀(Grishock et al., 2001)。如果前述降低 *hrp-2* 基因表現而抑制 *let-7(n2853)* 接縫細胞不正常分裂的性狀的效果是經過增強 *let-7* 的功能，我們推測，同時降低 *alg-1* 基因表現量應該可以阻斷這樣的抑制效果。我們希望可以透過這樣的實驗設計，來確認 HRP-2 的確跟 *let-7* 功能執行有所相關。



圖二、*let-7* 調控下游基因的作用路徑。A | *let-7* 在 L4 轉變成成蟲時期時表現量上升以抑制 *lin-41*，間接導致 *lin-29* 表現量上升。B | *let-7* 可鹼基配對到 *lin-41* 3' UTR 上兩個結合位而抑制其表現。在 *let-7(n2853)* 突變種中，一個 G-to-A 點突變降低其對於結合位的鹼基配對。C | *let-7* 促成生殖孔的正常發育，*let-7(n2853)* 突變種會出現生殖孔爆裂性狀。D | 接縫細胞在每個幼蟲期都進行分裂，其中一個子細胞分化成皮下組織細胞 Hyp7，另一個子細胞維持如幹細胞(stem cell)般可繼續分裂分化的特性。接縫細胞在進入成蟲期進行最終分化而不再分裂，此過程受到 *let-7* 的調控。在 *let-7(n2853)* 突變種中，接縫細胞無法正確最後分化，而在進入成蟲期時多分裂一次，造成總數增加的現象。圖片修改自 Pasquinelli, 2012 與 Rougvie, 2001。

除此之外，我們有興趣探討 *hrp-2* 是否會影響其他微小核糖核酸的功能。文獻顯示，*let-7* 的旁系同源(paralog)微小核糖核酸 miR-84 調控其目標基因 *let-60* 而決定生殖孔前驅細胞

(vulva precursor cell, VPC)之分裂與分化(如圖三)(Han et al., 1990; Johnson et al., 2005)。 *let-60(gf)* 功能性增加突變(gain-of-function mutation)引發多數生殖孔前驅細胞發育成假性生殖孔，而造成多重生殖孔的性狀，此一性狀已被報導可被過度表現 miR-84 所抑制(Johnson et al., 2005)。我們猜測降低 *hrp-2* 表現也可能增強 miR-84 的功能，因此我們將觀察 *hrp-2(RNAi)* 是否可抑制 *let-60(gf)* 的多重生殖孔性狀，進而討論其 *hrp-2* 在此路徑中扮演的角色。



**圖三、 miR-84 對 *let-60* 的作用路徑圖。** miR-84 藉由抑制 *let-60* 決定生殖孔前驅細胞(Vulva precursor cell) 之分裂與分化。由 Anchor cell (AC) 來的訊息分子 Epidermal growth factor EGF/LIN-3，調控生殖孔前驅細胞中 *let-60* 表現量。在 P6.p 細胞中，*let-60* 被引發較高的表現，進而決定其細胞分化命運為 1° VPC fate，而周圍的 P5.p 與 P7.p 則受到較少的 EGF/LIN-3 誘導表現 *let-60*，並且其細胞可表現 miR-84 可進一步壓抑 *let-60* 表現，決定該細胞進行 2° VPC fate。進行 1° VPC fate 與 2° VPC fate 的細胞分裂分化後發育成生殖孔。距離 AC 更遠的 VPC (P3.p, P4.p 與 P8.p) 則進行 3° VPC fate，並且發育為表皮(epidermis)。而在 *let-60(gf)* 功能性增加突變種中，*let-60* 活性上升較不易被 miR-84 所壓抑，從 P3.p 到 P8.p 都有可能進行 1° VPC fate 或 2° VPC fate，而引發多重生殖孔性狀。



## 貳、研究方法

### 一、藥品與培養基配製

#### (一)、NGM agar

成分	比例
NaCl	3 g
Agar	17 g
Peptone	2.5 g
dH <sub>2</sub> O	975 mL
cholesterol (5 mg/mL in EtOH)	1 mL
1M CaCl <sub>2</sub>	1 mL
1M MgSO <sub>4</sub>	1 mL
1M KPi, pH=6.0	25 mL
Total volume	1 L

#### (二)、Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)

前面同 NGM，完成滅菌後加入：

成分	比例
Amp 100 mg/mL	1 mL
IPTG	0.238 g (預溶於 10 mL H <sub>2</sub> O)

#### (三)、LB broth

成分	比例
Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g
溶至 H <sub>2</sub> O 中	加至 1 L
Total volume	1 L

#### (四)、M9 buffer

成分	比例
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
NaCl	5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 g
溶至 H <sub>2</sub> O 中	加至 1 L
Total volume	1 L

#### (五)、1.5% agarose

成分	比例
H <sub>2</sub> O	50 mL
Agarose	0.75 g
Total volume	50 mL

#### 二、Feeding RNAi

將表現空 RNAi 載體 pL4440 或 *hrp-2* RNAi 載體的 *E. coli* HT115 菌液 6 mL，以 6000g 離心 2 分鐘，取上清液加入 200  $\lambda$  MX1 (DNA 純化試劑組，Viogene 公司，以下同)後 vortex 將其打散，再加入 250  $\lambda$  MX2，翻轉 10 次後靜置 5 分鐘。接著，加入 350  $\lambda$  MX3 接著翻轉 10 次使酸鹼中和產生蛋白質沉澱，以 10000g 離心 10 分鐘後將上清液倒入 DNA 純化試劑組的管柱中，再以 7000g 離心 1 分鐘，後加入 500  $\lambda$  WN 後，將下層丟棄。在上層加入 700  $\lambda$  WS，以 7000g 離心 1 分鐘，倒掉下層液之後再以 10000g 離心 3 分鐘，加入 50  $\lambda$  Elution buffer 靜置 5 分鐘，10000g 離心 2 分鐘，沖提 column 後即得質體。將 HT115 勝任細胞至於冰上退冰，每個小離心管加入 1  $\lambda$  任質體置於冰上 20 分鐘。以 42 °C 進行熱休克作用 90 秒，置於冰上 5 分鐘後，加入 900  $\lambda$  LB broth，放入 37 °C 培養箱搖 1 小時。取 200  $\lambda$  取塗抹於 Amp<sup>+</sup> 盤上，再放入培養箱過夜培養。

#### 三、觀察 *hrp-2* (RNAi) 影響下 *let-7(n2853)* 溫度敏感突變種的接縫細胞數目：

*let-7(n2853)* 溫度敏感突變種的線蟲適合生長在 15 °C 的環境下，而在 20 °C 的非容許溫度生長環境下則會表現出其突變的性狀，例如接縫細胞在成蟲其無法進行最後分化而繼續分裂，造成其數目比野生種線蟲中的接縫細胞較多的現象。我們希望利用接縫細胞數量的變化探討 *hrp-2* 對此性狀的影響，進而推測是否是因為其 *hrp-2* 基因表現量之下降，影響到 *let-7* 抑制 *lin-41* 的作用，而造成 *lin-29* 含量改變，導致其性狀表現不同的發生。

而另一方面，為了能更清楚了解 *hrp-2* 的作用機制，我們希望觀察線蟲在降低 *alg-1* 基因表現量，導致其無法自行合成微小核糖核酸沉默複合體核心蛋白 ALG-1 的情況下，*hrp-2* 是否因此而無法有效抑制接縫細胞在成蟲階段時，繼續分裂而不進行最後分化的性狀，來探討 *hrp-2* 的作用是否與微小核糖核酸沉默複合體功能有關。

以下為我們的實驗流程與安排：



表一、

在蟲體觀察部分，我們利用在顯微鏡下觀察特定會表現在接縫細胞的的 GFP 螢光蛋白 (SCM::gfp) 來對接縫細胞做計數。而進行蟲體觀察的同時，我們也會進行西方墨點法(Western blots)之實驗，以確認是否有成功降低 *hrp-2* 之基因表現量。

#### 四、觀察 *hrp-2* (RNAi) 影響下 *let-60(gf)* 突變種線蟲的假性生殖孔數量：

MT2124 品系線蟲帶有 *let-60(n1046)* gain-of-function 突變，其突變會導致多數生殖孔前驅細胞發育成假性升值孔。SD551 品系線蟲帶有 *let-60(ga89)* 溫度敏感性 gain-of-function 突變，於 25 °C 的環境中方引發多重生殖孔性狀。

我們希望利用突變種線蟲多重生殖孔的性狀是否受到 *hrp-2*(RNAi) 影響，來探討是否因為 *hrp-2* 基因表現量之下降，影響到 *miR-84* 抑制 *let-60* 的作用，而對其生殖孔發育的路徑產生改變，導致其性狀表現不同的發生。

以下為我們的實驗流程安排：



表二、

除了上述的觀察過程外，我們亦將一部份的蟲進行西方墨點法實驗，以確認是否有達到使 *hrp-2* 基因表現量下降的結果。

## 五、西方墨點法實驗：

### (一)、SDS-PAGE 膠體配置：

上層	
37.5:1 30%Acrylamide-Bis	3.3 ml
1.5 M Tris-HCl PH 8.8	2.5 ml
10% SDS	0.1 ml
10% APS	0.1 ml
TEMED	0.02 ml
ddH <sub>2</sub> O	4 ml
下層	
37.5:1 30%Acrylamide-Bis	0.5 ml
1.0M Tris-HCl PH 6.8	0.38 ml
10% SDS	0.03 ml
10% APS	0.03 ml
TEMED	0.003 ml
ddH <sub>2</sub> O	2.1 ml

### (二)、樣品配置及電泳：

線蟲樣品加 ddH<sub>2</sub>O 使總體積至 20  $\mu$ l，再加入 6  $\mu$ l 6X SDS sample loading dye，加熱至 95 度 5 分鐘，接下來以離心機快速離心數秒，使滯留於管蓋上的液體沉降下來，將樣品及蛋白質標記分別注入膠體中，以電壓 50 V 跑膠約 2 ~ 3 小時。電泳緩衝液使用 SDS PAGE running buffer (25 mM Tris、0.192 M glycine、0.1% SDS)

### (三)、轉印及抗體雜合：

將 PVDF 轉印膜浸泡在甲醇中進行活化。等蛋白質電泳結束之後，依序將海綿、濾紙、凝膠、轉印膜、濾紙、海綿夾入轉印匣中。將轉印匣插入濕式電轉印儀中 (膠朝負極、轉印膜朝正極)，用 400 伏特的電壓在 4  $^{\circ}$ C 下進行轉印 1 小時。將轉印膜取出，以 TBST 配置 5% 脫脂牛奶並將轉印膜浸泡在其中 1 個小時，之後再加入一級抗體 (抗 HRP-2 抗體為兔子血清，

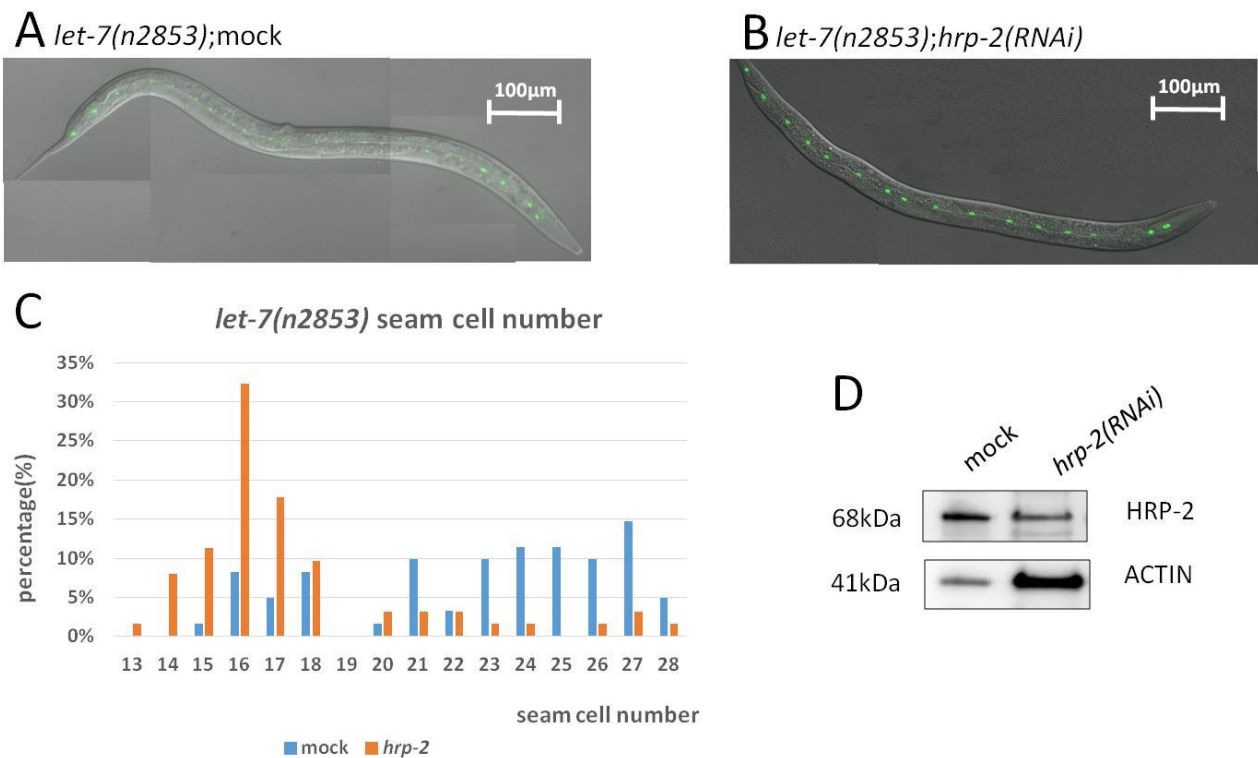
稀釋 1000 倍。抗 Actin 抗體為老鼠單株抗體，稀釋一千倍)，放在 4 °C overnight。隔天取出轉印膜，並用 TBST 清洗，每次 10 分鐘，洗 3~4 次。加入 5%牛奶，1 個小時之後加入標有 HRP 的二級抗體放在 4 °C overnight 或室溫 2 到 4 小時。接下用 TBST 清洗，每次 10 分鐘，洗 3~4 次。以 ECL prime (GE)進行呈色 5 分鐘，即可至利用 UVP (BioSpectrum 500)進行曝光顯影。

## 參、研究結果

### 一、實驗觀察結果

#### (一)、*hrp-2*(RNAi)影響下 *let-7* (*n2853*) 溫度敏感突變接縫細胞數目變化：

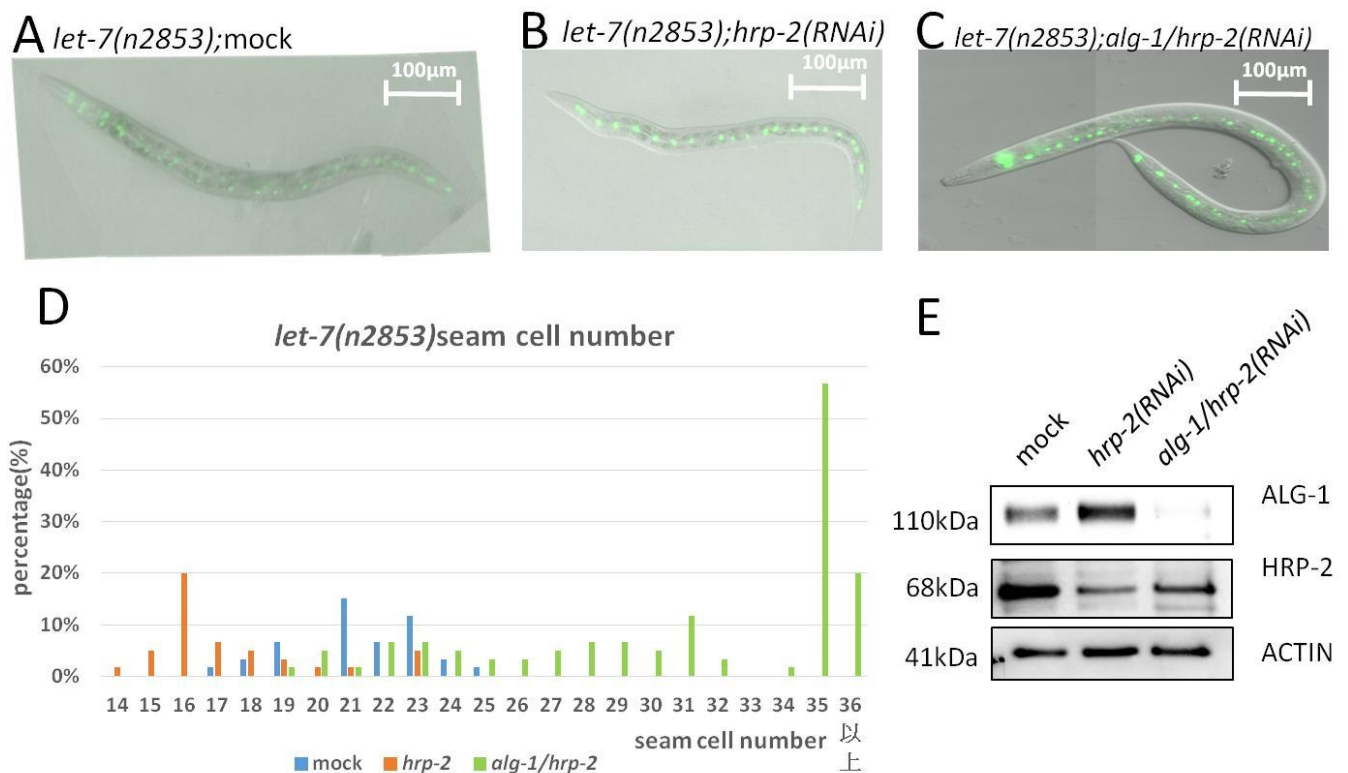
我們利用觀察特定會表現在接縫細胞的 GFP 螢光蛋白 (SCM::*gfp*)來對接縫細胞做計數，在顯微鏡下進行三次重複實驗，觀察對照組(mock)和實驗組 *hrp-2*(RNAi)所含有接縫細胞數目的變化差異。野生種線蟲接縫細胞數目大都是 16 個，在 *let-7* (*n2853*)突變種中，由於進入成蟲期時接縫細胞持續分裂，造成其數目比 16 還大 (圖四 A)。當我們使 *hrp-2* 基因表現受到抑制時，可以發現這樣的線蟲中 seam cell 數量大多落在 16~17 個，亦即恢復成野生種線蟲的接縫細胞數量 (圖四 B)。在此三次重複實驗中皆觀察到相同的趨勢 (附錄圖一至三)，將其結果加總後發現，在 *let-7* (*n2853*)突變種中接縫細胞數目大約落在 21 到 27 個，而經過 *hrp-2*(RNAi)後，多數線蟲帶有 16~17 個接縫細胞 (圖四 C)。我們利用西方墨點法測試，顯示在本實驗中，HRP-2 蛋白表現量的確因為 *hrp-2*(RNAi)而下降 (圖四 D)。我們的實驗結果顯示 *hrp-2* 可能跟 *let-7* 微小核糖核酸功能有關。



圖四、A)為 *let-7*(*n2853*) mock 控制組，其體內接縫細胞數比 16 還大。B)為 *let-7*(*n2853*) *hrp-2* (RNAi)實驗組，其 *hrp-2* 之基因表現量已被降低，而其體內的接縫細胞數為 16~17 個。C) *let-7*(*n2853*)的接縫細胞數分布趨勢。D)為 Western Blot 之結果。

在另組實驗中，我們一樣利用觀察特定會表現在接縫細胞的 GFP 螢光蛋白 (SCM::*gfp*)

來對接縫細胞做計數，在顯微鏡下進行兩次實驗。觀察對照組(mock)、實驗組一 *hrp-2(RNAi)*、實驗組二 *alg-1/hrp-2(RNAi)*所含有的接縫細胞數目。實驗組一中使用 50% 細菌表現空 RNAi 載體，50%細菌表現 *hrp-2(RNAi)* 質體。實驗組二中使用 50% 細菌表現 *alg-1(RNAi)*質體，50%細菌表現 *hrp-2(RNAi)* 質體。在 *let-7 (n2853)*突變種中，也如同上一個實驗，其接縫細胞數目比 16 還大（圖五 A）。實驗組一 *hrp-2(RNAi)* 中，線蟲接縫細胞數目依舊大多落在 16 個，即恢復成野生種線蟲的接縫細胞數量(圖五 B)。而在實驗組二 *alg-1/hrp-2(RNAi)*中，當 *hrp-2* 與 *alg-1* 基因表現量都下降時，能觀察到其接縫細胞大多都在 28 個以上(圖五 C)。在重複實驗後亦得到相同趨勢(如附圖四至五)，將其結果加總後發現，在 *let-7 (n2853)*突變種中接縫細胞數目大約落在 21 到 23 個，而經過 50% *hrp-2(RNAi)*後，多數線蟲帶有 16 個接縫細胞，另外，經 50% *hrp-2(RNAi)*、50% *alg-1(RNAi)* 後，多數線蟲帶有 28 個以上的接縫細胞(圖五 D)。我們利用西方墨點法測試，顯示在本實驗中，HRP-2 與 ALG-1 蛋白表現量的確都有因為使用對應的 RNAi 處理而下降（圖五 E）。由於 ALG-1 是微小核糖核酸沉默複合體中的核心蛋白，我們可以觀察到去除 ALG-1 後造成了比單純只有 *let-7(n2853)*突變時更嚴重的性狀，如果降低 *hrp-2* 表現所引起的突變性狀抑制效果不是經過 *let-7* 及微小核糖核酸沉默複合體的作用，可能還是可以抑制突變性狀。但是我們實驗結果顯示，只要去除 ALG-1，那 *hrp-2(RNAi)*就沒有任何抑制接縫細胞重複分裂性向的效果了，這支持前述 *hrp-2* 可能跟 *let-7* 微小核糖核酸功能有關的假說。



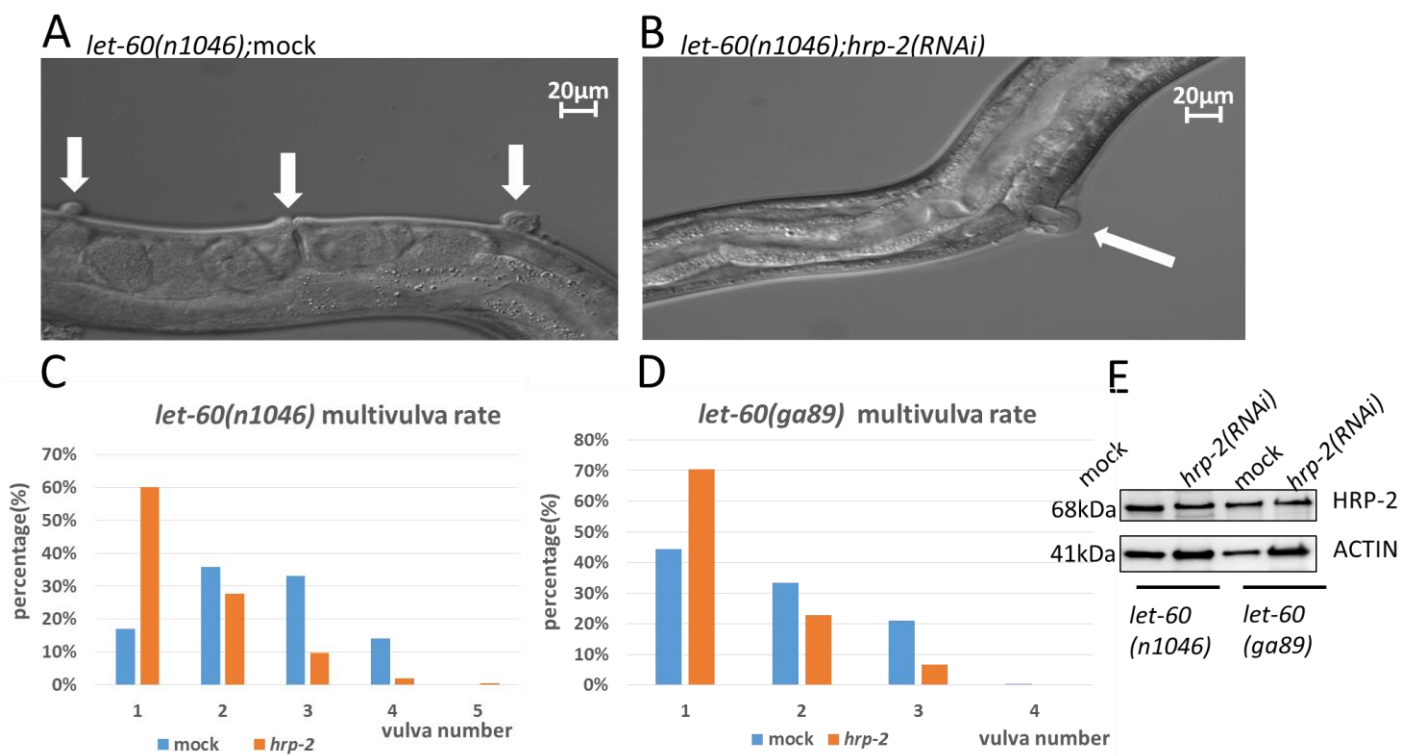
圖五、A 為 *let-7(n2853)* mock 控制組，其體內接縫細胞數比 16 還大。B 為 *let-7(n2853)* *hrp-*



2(RNAi)實驗組，其 *hrp-2* 之基因表現量已被降低，而其體內的接縫細胞數大多為 16 個。C 為 *let-7(n2853) alg-1/hrp-2(RNAi)* 實驗組，其體內的接縫細胞數大多超過 28 個。D 為 *let-7(n2853)* 的接縫細胞數分布趨勢。E 為 Western Blot 之結果。

(二)、觀察 *hrp-2(RNAi)* 對於 MT2124 以及 SD551 品系線蟲之多重生殖孔性狀的影響:

在顯微鏡下觀察帶有 *let-60(n1046)* 的突變 MT2124 和帶有 *let-60(ga89)* 突變的 SD551 線蟲的生殖孔數目，分別觀察三次，實驗結果如圖四。在線蟲幼蟲發育過程中，生殖孔前驅細胞中僅有 P6.p 表現 *let-60*，而在相鄰的 P5.p 與 P7.p 中，*let-60* 被 miR-84 所抑制，以確保只形成單一生殖孔。但在 *let-60* gain-of-function 突變種中，P5.p 與 P7.p 中的 miR-84 並未完全抑制 *let-60*，而導致了多重生殖孔的性狀發生（圖六 A），當我們利用 RNAi 去降低 *hrp-2* 表現時，可以發現多重生殖孔的性狀被抑制（圖六 B）。在三次重複實驗中皆觀察到相同的趨勢（附錄圖六至八 for *let-60(n1046)*，附錄圖九至十一 for *let-60(ga89)*），加總統計結果顯示於圖六 C（for *let-60(n1046)*）與圖六 D（for *let-60(ga89)*）。西方墨點法測試顯示 *hrp-2(RNAi)* 的確降低了 HRP-2 蛋白表現（圖六 E）。我們的實驗結果顯示 *hrp-2* 可能也跟 miR-84 功能有關。



圖六、A 為 *let-60(n1046)* mock 控制組生殖孔生長情形的觀察。B 為 *let-60(n1046) hrp-2(RNAi)* 實驗組生殖孔生長情形的觀察。C 為 *let-60(n1046)* 實驗結果統計圖。D 為 *let-60(ga89)* 實驗結果統計圖。E 前兩組為 *let-60(n1046)* western blot 的結果，後兩組為 *let-60(ga89)* western blot 的結果。



## 肆、結論與討論

我們的研究結果顯示，當 *let-7(n2853)* 溫度敏感突變種年輕成蟲之接縫細胞有 21 到 27 個，這是因為接縫細胞在進入成蟲期時，繼續分裂而不最終分化的結果。在 *hrp-2* 的基因表現量被降低的情況下，這樣的性狀就能被抑制，使接縫細胞被改善成與野生種線蟲的數量相同 (16 或 17 個)，顯示降低 *hrp-2* 表現時可能增強了 *let-7* 的功能。而進一步結果顯示，去除微小核糖核酸沉默複合體的主要成分 ALG-1 可以消除這個現象，更支持了 *hrp-2* 與 *let-7* 調控有關的假說。實驗室學長姊也發現，*let-7* 表現量在 *hrp-2* 的基因表現量被降低的情況下並不會下降，且 HRP-2 會和 ALG-1 有交互作用(unpublished data)。而因為 HRP-2 本身即為一個與 RNA 結合蛋白，已被報導可參與在 mRNA 的剪接過程 (Kabat et al., 2009)，我們推測 HRP-2 和 mRNA 的結合也影響到 RISC 而使 *let-7* 的功能受到改變，可能這樣的結合可以負向調控或拮抗微小核糖核酸抑制轉譯作用的效果，因此，當除去 HRP-2 蛋白時，可以補償在 *let-7(n2853)* 溫度敏感突變種中功能較低下的 *let-7* 微小核糖核酸功能。

而在前言提及癌症病患中有 *let-7* 低落的現象，若能更確認 hnRNP Q/R 同源分子 *hrp-2* 與 *let-7* 之間的調控關係，便可推廣至人體中其他 hnRNP Q/R 分子，觀察其是否能抑制 *let-7* 表現量低落的情形，或許在癌症治療上能有更大幫助。

我們也使用 MT2124 以及 SD551 品系線蟲進行研究探討是否 HRP-2 與另一個微小核糖核酸 miR-84 功能有關。此兩種突變種表現正常的 miR-84，但其目標基因 *let-60* 因為帶有 gain-of-function 突變而功能較強，不易被 miR-84 調控，使得大約有 70% 線蟲具有多重生殖孔的性狀，而降低 *hrp-2* 之基因表現量後，具此性狀的線蟲比例下降。我們推測，HRP-2 可能也參與在 miR-84 調控 *let-60* 的過程，移除 HRP-2 使得 *let-60* mRNA 更容易被 miR-84 調控，而增強了 miR-84 調控的效果。我們未來希望能用 *mir-84* 的 deletion 突變種做進一步地確認，亦即，利用 *mir-84* 的 deletion 與 *let-60* gain-of-function 雙重突變種進行實驗，此時如果移除 HRP-2 無法降低多重生殖孔的性狀，則表示 miR-84 在移除 HRP-2 時加強對 *let-60* 的調控是需要的。而是否 HRP-2 對於其他的微小核糖核酸也有類似的功能，或者這樣對於 RISC 的拮抗調節機制並非取決於微小核糖核酸的種類，而是取決於其目標 mRNA 上是否有適當的 HRP-2 結合位，將是本研究未來想要探討的方向。

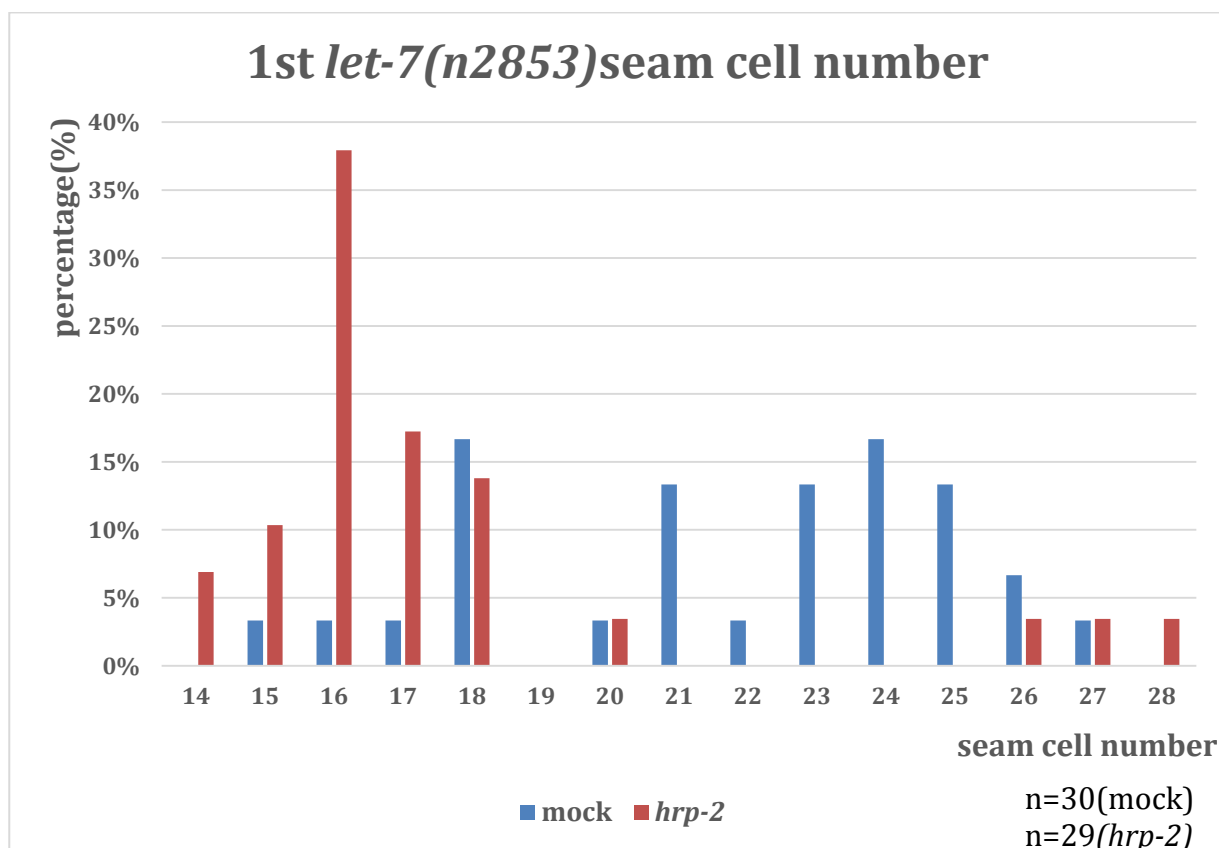
## 伍、參考文獻

- 一、Adams, Brian D., Andrea L. Kasinski, and Frank J. Slack , 2014. Aberrant regulation and function of microRNAs in cancer." *Curr Biol* **24** R762-R776.
- 二、Bartel, D.P. , 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215-233.
- 三、Chen HH, Chang JG, Lu RM, Peng TY, Tarn WY, 2008. The RNA binding protein hnRNP Q modulates the utilization of exon 7 in the survival motor neuron 2 (SMN2) gene. *Mole Cell Biol* **28**: 6929-6938.
- 四、Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A., Ruvkun, G., Mello, C.C., 2001. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* **106**, 23-34.
- 五、Hammell, C.M., Lubin, I., Boag, P.R., Blackwell, T.K., and Ambros, V. , 2009. nhl-2 Modulates microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *Cell* **136**, 926-938.
- 六、Han, M., Aroian, R.V., and Sternberg, P.W , 1990 . The *let-60* locus controls the switch between vulval and nonvulval cell fates in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **126**, 899-913.
- 七、Han, S., Y. Tang, and Ross Smith, 2010. Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives." *Biochem. J* **430** 379-392.
- 八、Huntzinger, E., and Izaurralde, E. , 2011. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* **12**, 99-110.
- 九、Johnson, S., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K., Brown, D., and Slack, F. , 2005. RAS is regulated by the *let-7* microRNA family. *Cell* **120**, 635-647.
- 十、Jorgensen, E.M., Mango, S.E., 2002. The art and design of genetic screens: *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 356-369.
- 十一、Kabat, J.L., Barberan-Soler, S., Zahler, A.M., 2009. HRP-2, the *Caenorhabditis elegans* homolog of mammalian heterogeneous nuclear ribonucleoproteins Q and R, is an alternative splicing factor that binds to UCUAUC splicing regulatory elements. *J Biol Chem* **284**, 28490-28497.
- 十二、Pasquinelli, A.E., 2012. Non-coding RNA: MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *NPG* **13**, 271-282.
- 十三、Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. , 2000. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **403**, 901-906.
- 十四、Rougvie, A.E., 2001. Control of developmental timing in animals. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 690-701.
- 十五、Vella, M.C., and Slack, F.J. , 200). *C. elegans* microRNAs. WormBook : the online review of *C. elegans* biology, 1-9.

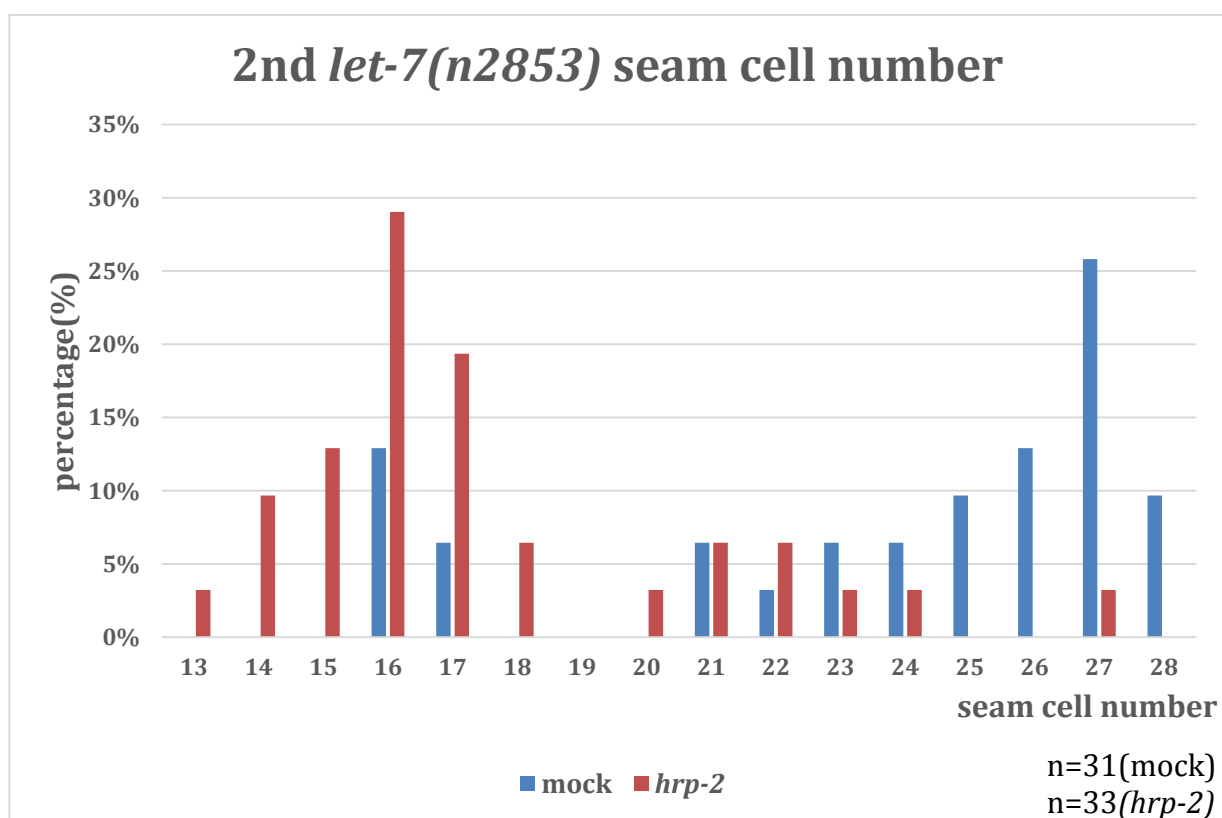
## 陸、附錄

一、觀察數據 (mock 指對照組, *hrp-2* 指進行 *hrp-2(RNAi)* 之實驗組)

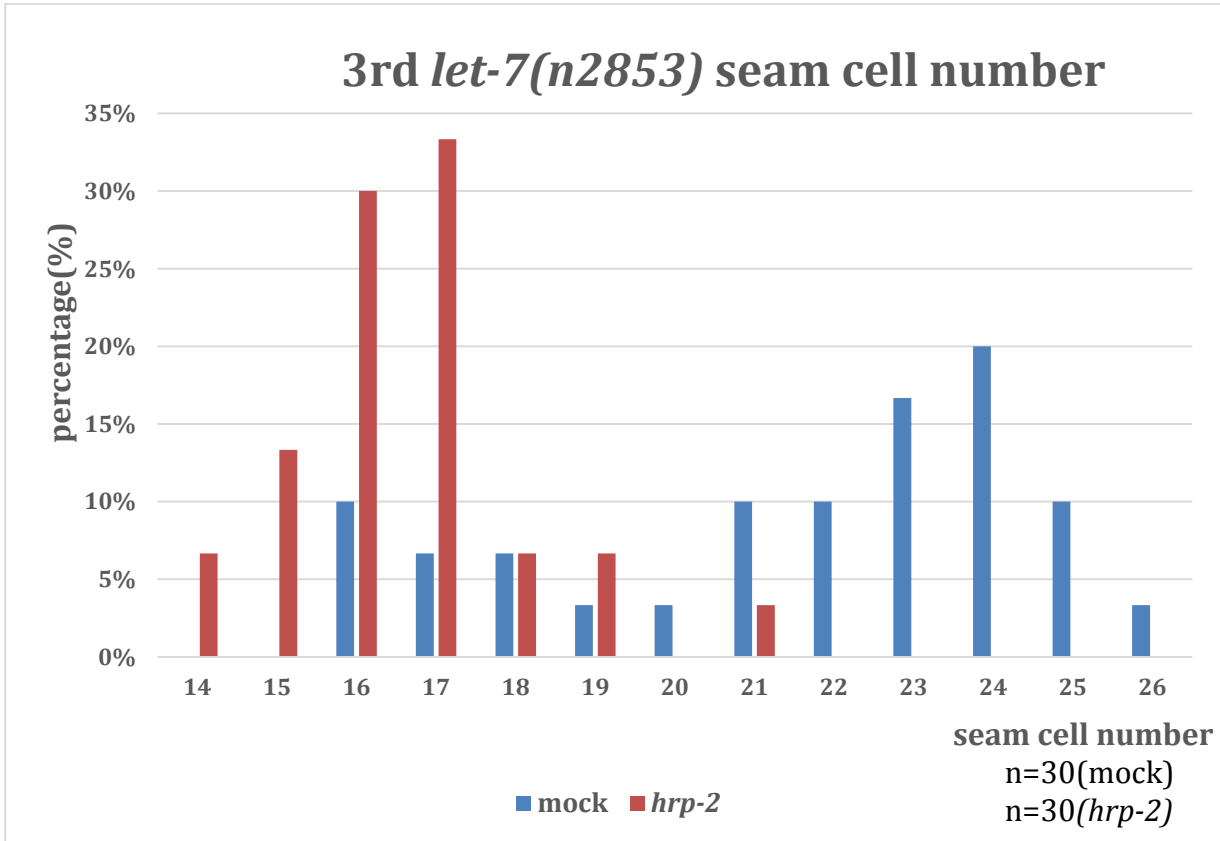
圖一、*let-7(n2853)* 溫度敏感突變種 seam cell 個數(第一次)



圖二、*let-7(n2853)* 溫度敏感突變種 seam cell 個數(第二次)

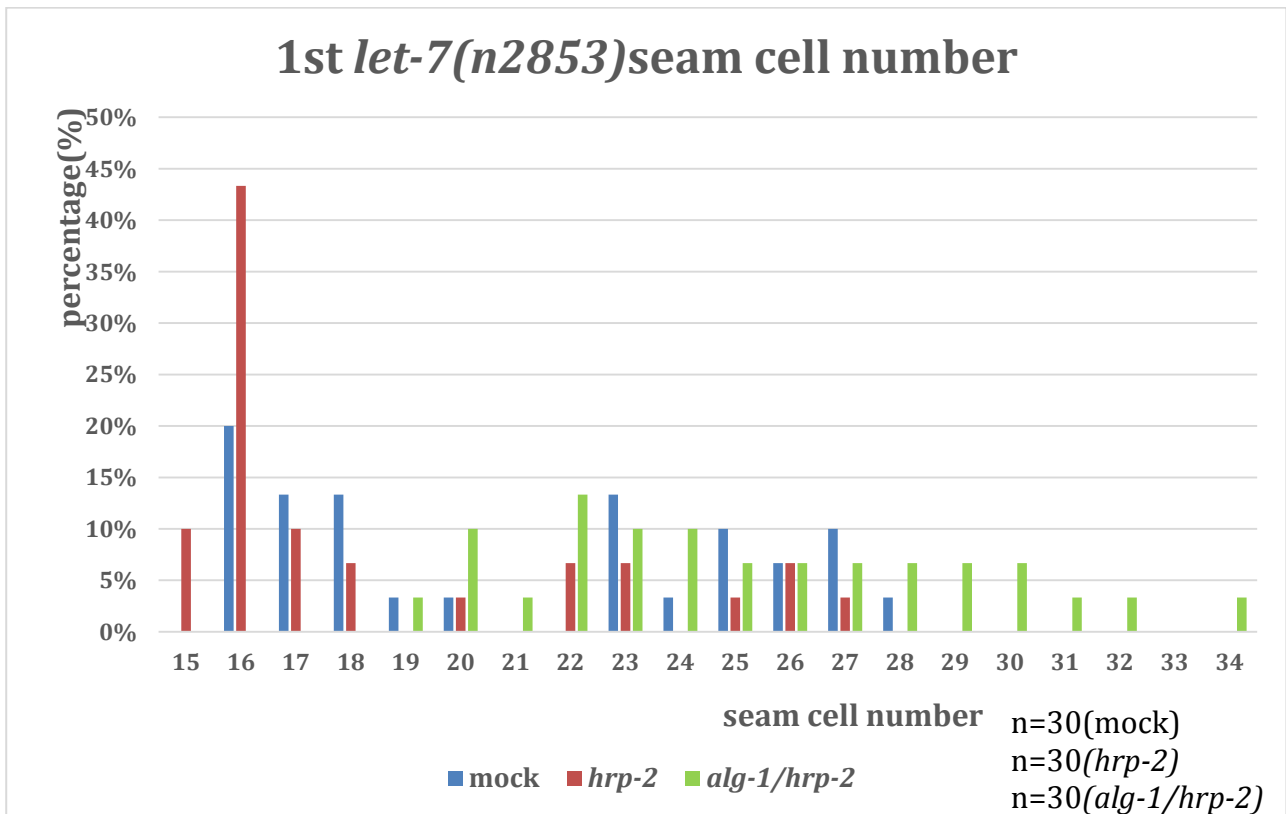


圖三、*let-7(n2853)* 溫度敏感突變種 seam cell 個數(第三次)



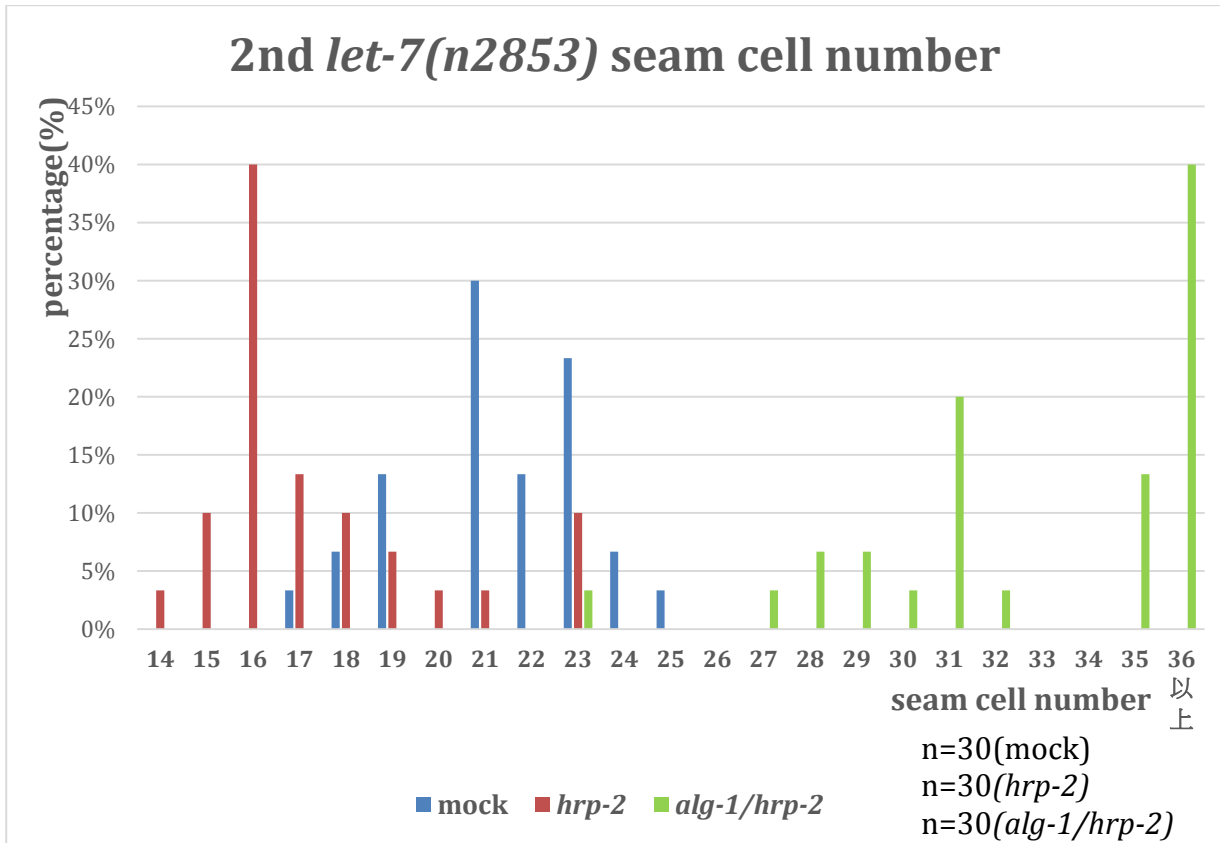
圖四、*let-7(n2853)* 溫度敏感突變種 seam cell 個數(第一次)

(mock 指對照組，*hrp-2* 指進行 *hrp-2(RNAi)* 之實驗組，*alg-1* 指進行 *hrp-2(RNAi)* 之實驗組)



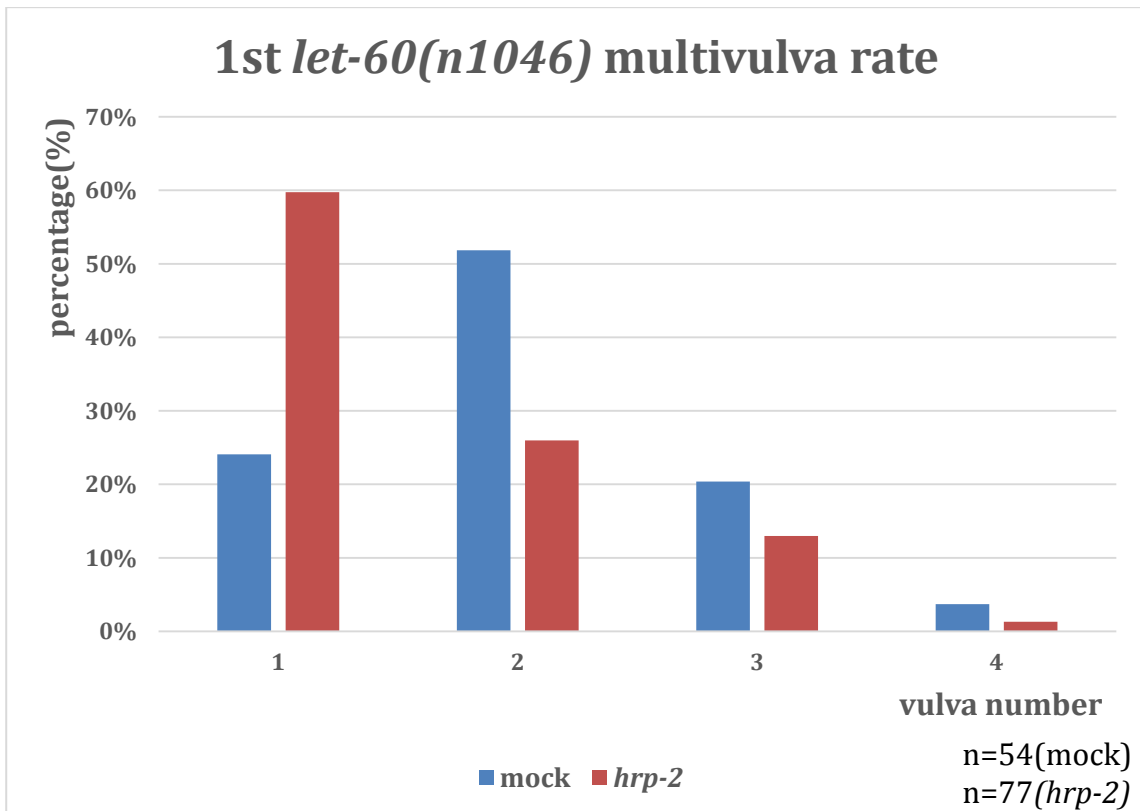
圖五、*let-7(n2853)* 溫度敏感突變種 seam cell 個數(第二次)

(mock 指對照組, *hrp-2* 指進行 *hrp-2(RNAi)* 之實驗組, *alg-1* 指進行 *hrp-2(RNAi)* 之實驗組)

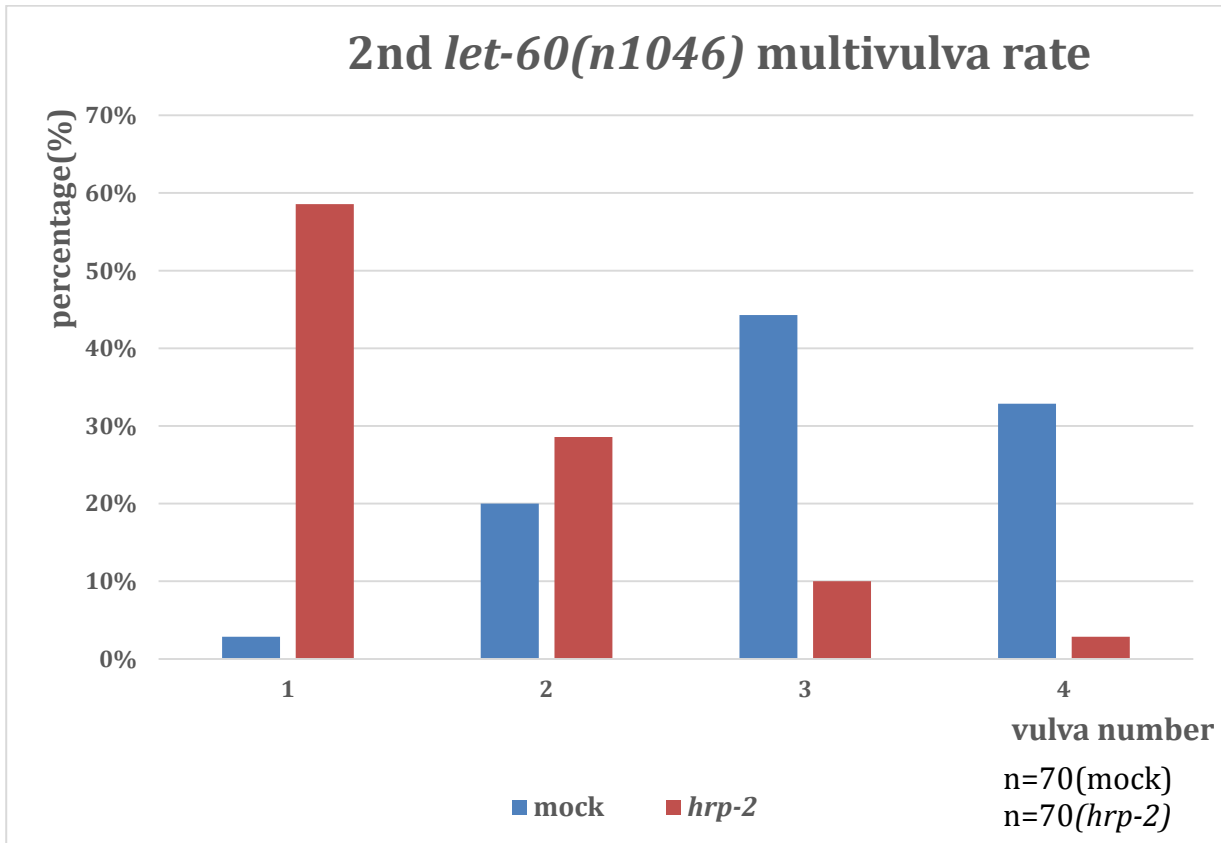


圖六、MT2124 *C.elegans* 多重生殖孔比例(第一次)

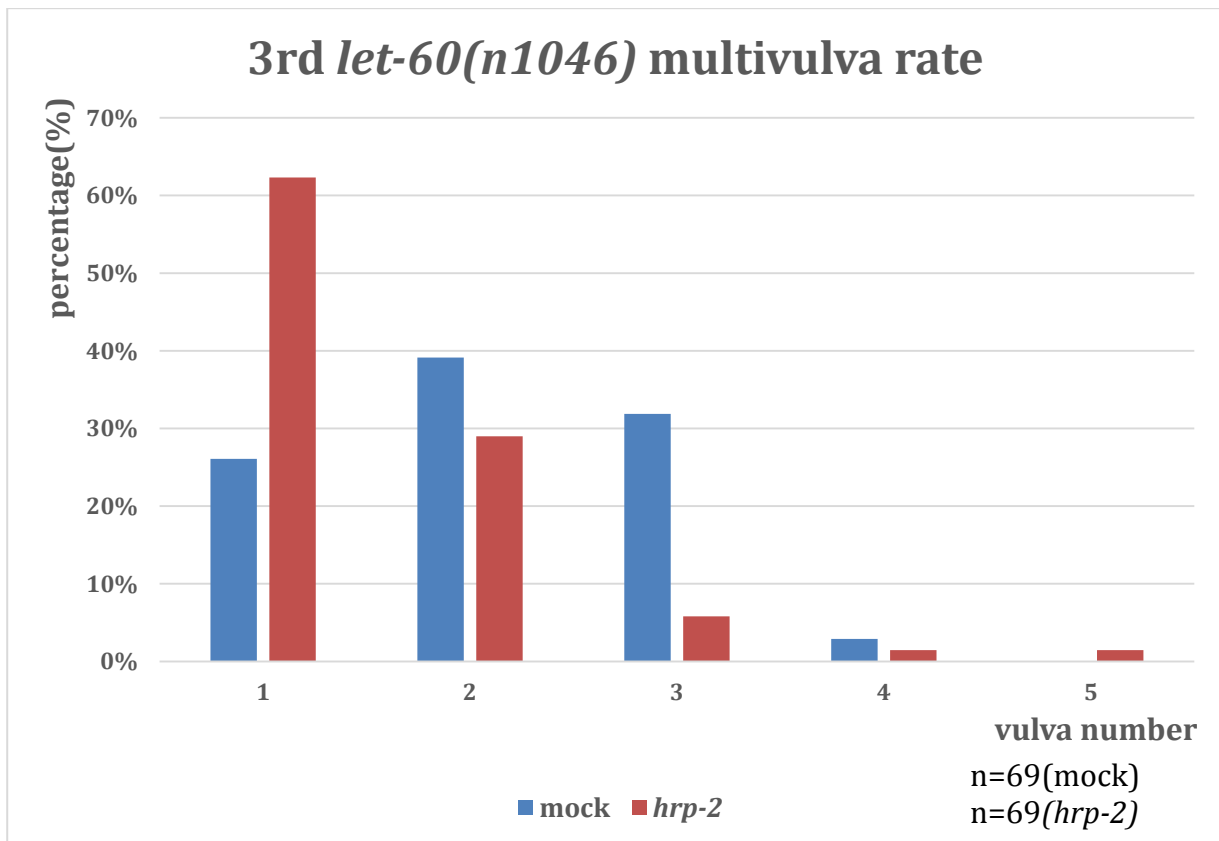
(mock 指對照組, *hrp-2* 指進行 *hrp-2(RNAi)* 之實驗組)



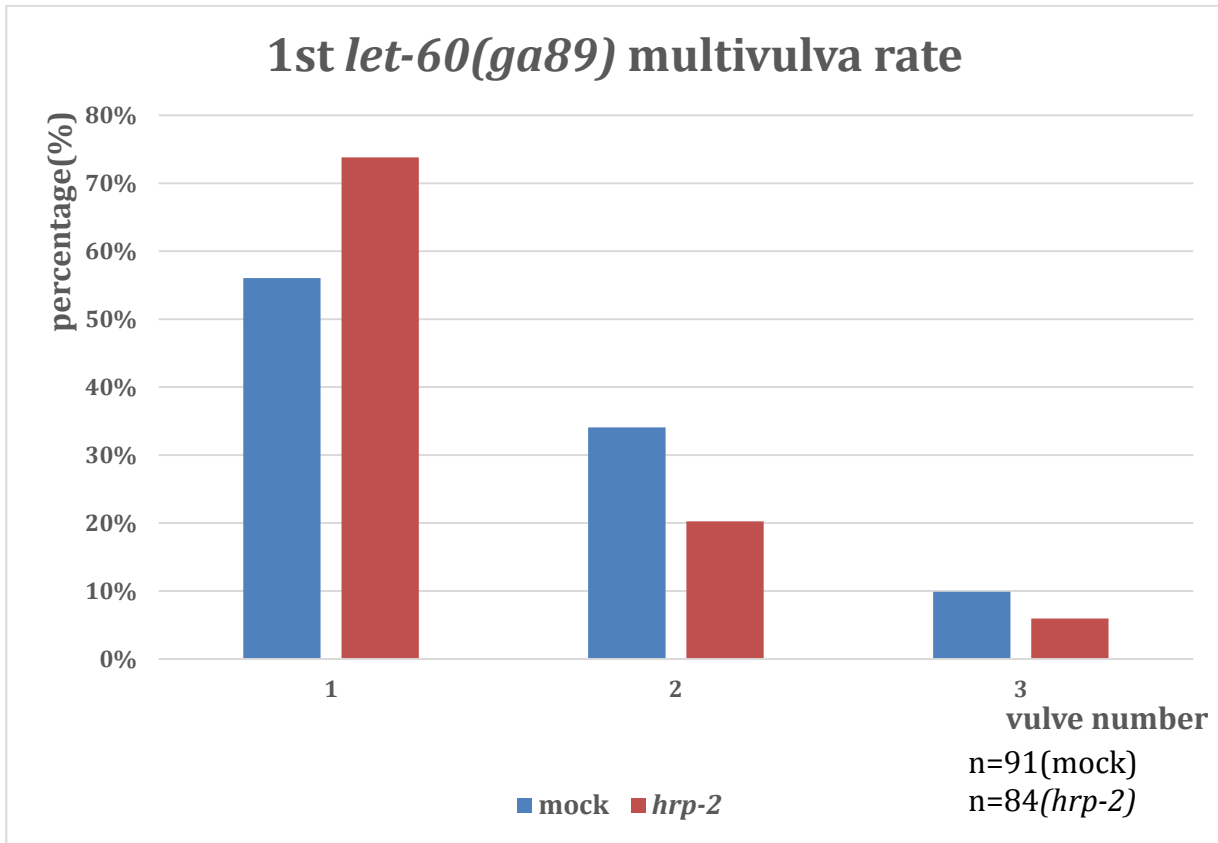
圖七、MT2124 *C.elegans* 多重生殖孔比例(第二次)



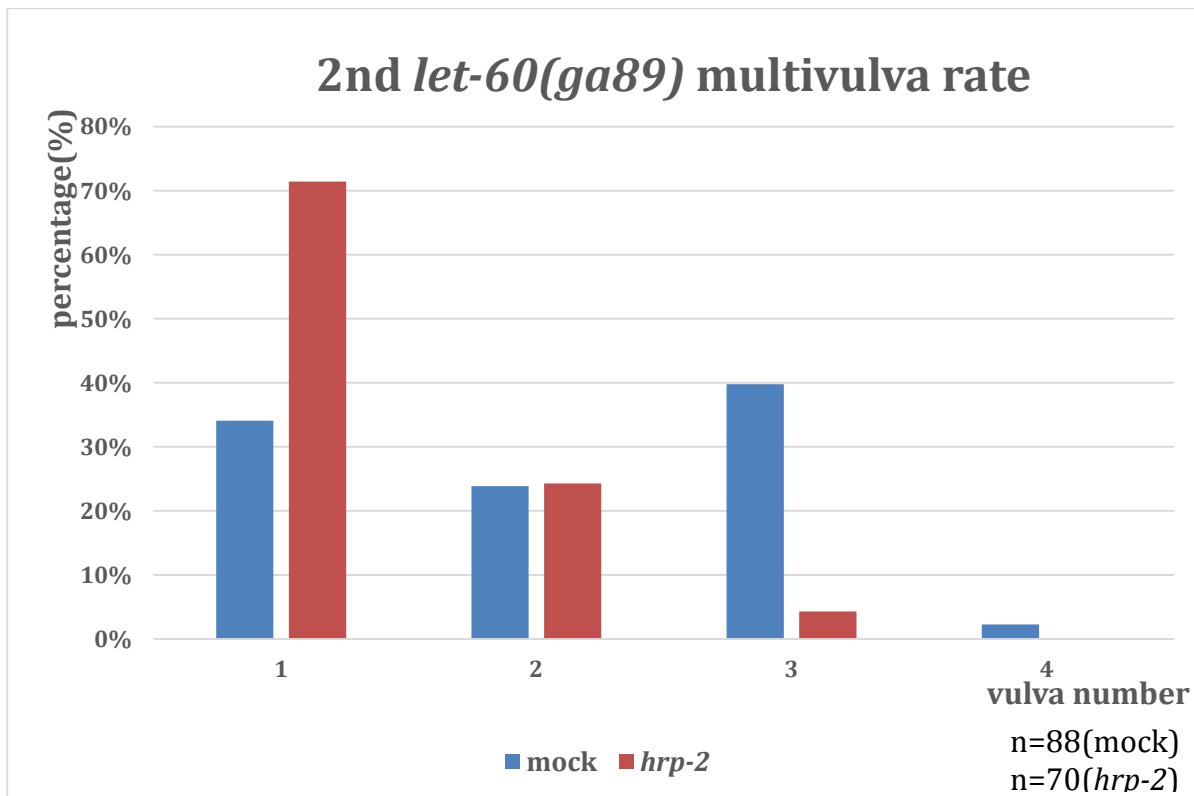
圖八、MT2124 *C.elegans* 多重生殖孔比例(第三次)



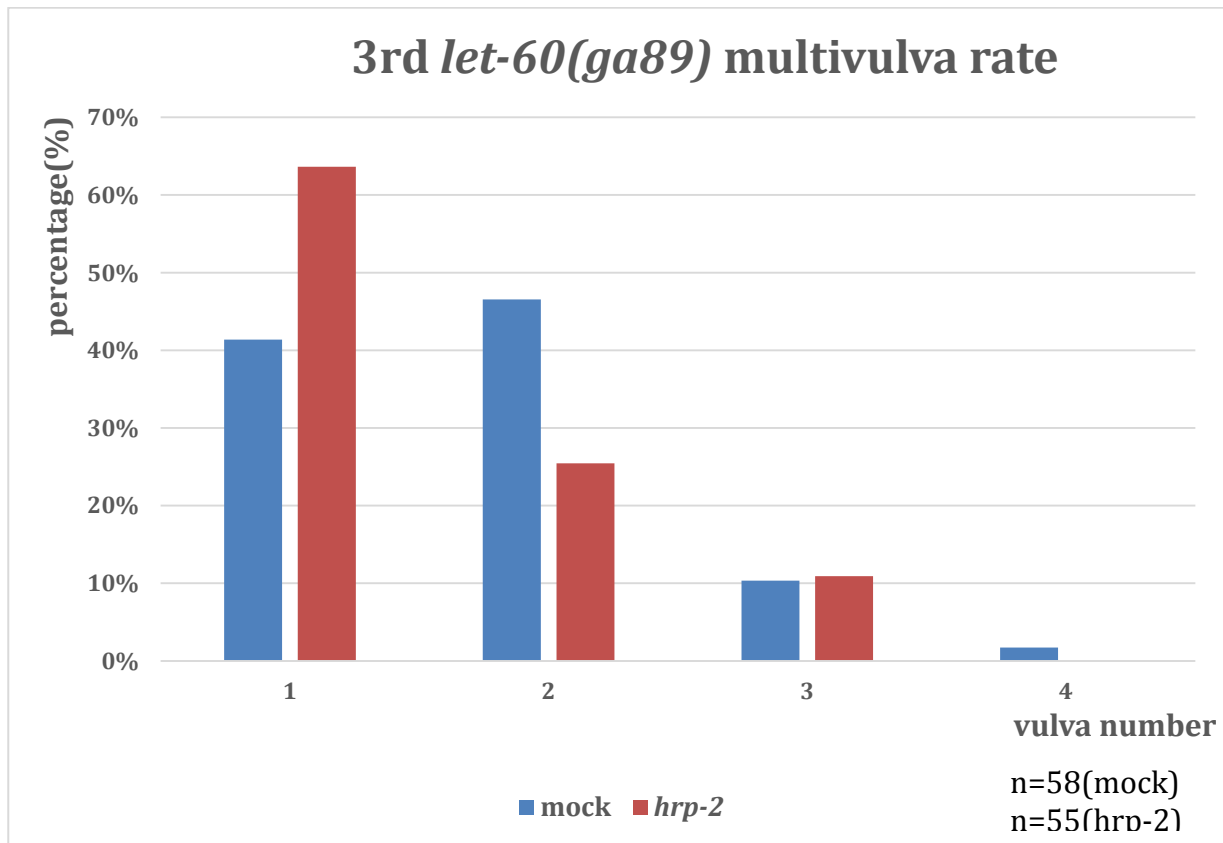
圖九、SD551 *C.elegans* 多重生殖孔比例(第一次)



圖十、SD551 *C.elegans* 多重生殖孔比例(第二次)



圖十一、SD551 *C.elegans* 多重生殖孔比例(第三次)





## 【評語】 070003

1. 本科展作品主旨在於探討 HRP-2 可能調控 let-7 目標基因的機制，也可能參與 mir-84 作用機制有關。
2. 針對 HRP-2 參與 mir-84 作用部分，後續建議需要更多的實驗證據才可支持上述論點。