

histone acetyltransferase (HAT) 的酵素，這種酵素可以把組織蛋白加上乙醯基團。之後科學家又找到了能將乙醯基團去除的一種酵素，稱為histone deacetylase (HDAC)，而這類酵素可以抑制基因的活動。就人類而言，HDAC主要分為三類：第一類去乙醯化酵素（class I HDAC）最早是在細胞核發現的，包括HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC8以及HDAC11，第二類的組蛋白去乙醯化酵素（class II HDAC）與酵母的HDA1相關，包括HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC9以及HDAC10，相較於第一類HDAC，結構較為緊密。第三類組蛋白去乙醯化酵素（class III HDAC），包含SIRT1、SIRT2、SIRT3、SIRT4、SIRT5、SIRT6以及SIRT7，這一類組蛋白去乙醯化酵素與酵母中的SIR2（silent information regulator 2）是同源物。Histone acetyltransferase (HAT) 和 Histone deacetylase (HDAC) 這兩類酵素決定著組織蛋白的乙醯化程度。最近的研究指出，在許多的癌症組織中發現了HAT與HDAC基因的參與和突變，這說明HAT與HDAC與癌症有高度的相關。癌症細胞能夠從組織蛋白中移走乙醯基，致使DNA一直纏繞在一起進而抑制了基因的活化作用。利用組蛋白去乙醯化（HDAC）抑制劑阻斷HDAC移走乙醯基的功能，能夠使這種造成癌症的錯誤逆轉並使DNA展開製造出所需的基因產物，進而抑制腫瘤細胞生長、促進細胞凋亡（1,2,4,11）。抑制HDAC活性能夠達到治療癌症的目的，因此我們選擇HDAC蛋白家族做為標的。

DOCKING是一種有效的電腦輔助藥物分子設計方法，在一些研究中已有許多成功開發新藥的報導，這新穎的藥物開發方法，可以使發現先導化合物（LEAD COMPOUND）的時間縮短許多。一般而言，在進行分子DOCKING之前，會先搜尋標的蛋白的活性位置，再將此活性位置挖空，然後才對資料庫進行篩選，試圖從資料庫找出可能適合填入空洞的有效的化合物。這是一個合理且成功的研究方法。然而，在搜尋出的活性位置之外的地方，也可能會存在有功能的活性位置(Fig.1)。有時這樣的錯誤，卻會因此遺漏相當重要的有效化合物(Fig.3)。這有兩種可能，第一是電腦軟體還未開發建置的活性位置，第二就是某些活性位置比較特殊或者不明顯，以致電腦搜尋不到。要彌補這樣的遺漏，可以對整個完整蛋白結構做完整的接合搜尋，然而這意味著要耗費相當大量的時間。因此在這篇論文裡，為了使找出HDAC蛋白的先導化合物更完整，不遺漏有價值的接合分子。我們先搜集不同物種的HDAC家族蛋白進行演化功能分析以獲得演化功能分歧的位置。這些位置是在蛋白結構的主要活性位置之外，較可能有其他活性的地方，再對這些位置進行DOCKING。我們希望能利用這種方法

能夠不遺失有價值的活性接合分子且不耗費太多時間。

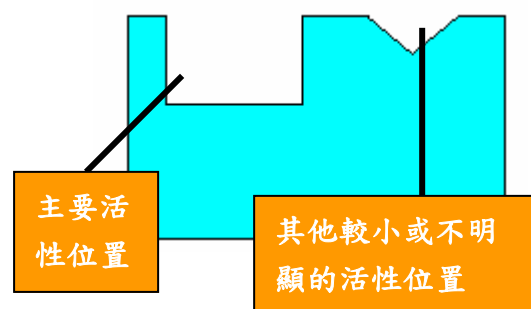


Fig.1.主要活性位置之外，亦可能存在較小或不明顯的活性位置，這些位置有時扮演相當重要的角色。

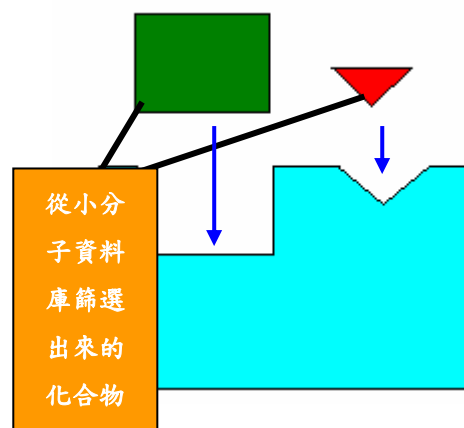


Fig.2.對小分子資料庫進行篩選，找出適合的分子化合物與配基結合

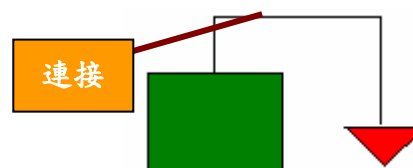


Fig.3.有時候要將化合物連接才能產生藥效。主要活性位置旁邊的小分子可以做為啟動藥物活性的關鍵。

二、方法、結果與圖表

2.1 HDAC蛋白序列的蒐集

我們從SWISS-PORT資料庫找出不同物種的HDAC家族的蛋白序列，共有28個蛋白。人類的

HDAC 蛋白有 HDAC1~11，老鼠的 HDAC 蛋白有 HDAC 1、2、3、5、6、7、8、9、11，雞的 HDAC 蛋白有 HDAC1、2、3、4，另外，還有果蠅及海膽的 HDAC 1，大鼠的 HDAC7，狐猿的 HDAC11。

2.2 多重序列比對(Multiple alignment)

從 SWISS-PORT 找出每個 target 的序列，使用 Clustal X 去進行多重序列比對。

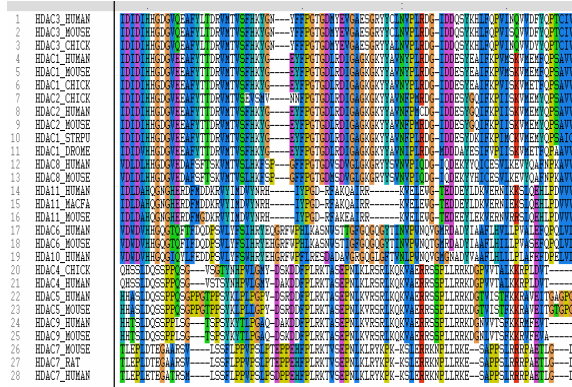


Fig.4. Phylogeny and functional divergence in HDAC. (b) Sites predicted to be critical for functional divergence between HDAC Class I and HDAC Class II.

2.3 演化樹(Phylogenetic tree)分析

多重序列比對做好之後，再使用比對結果以鄰近法 (Neighbor-joining) 畫出演化樹，從演化的過程可以得知各家族成員間的演化順序。由 HDAC 演化關係可以看出確實符合已知的 HDAC 分類情形。

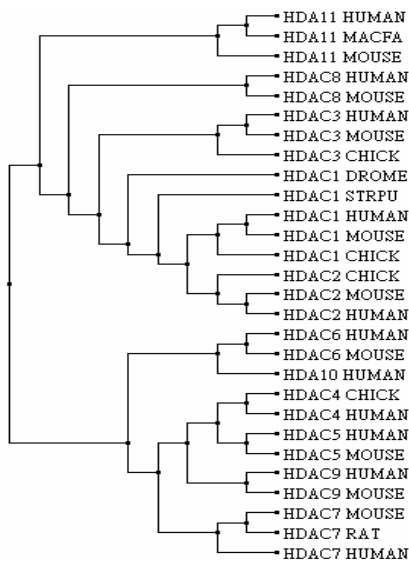


Fig.5. Phylogenetic tree of HDAC (a) Neighbor - joining tree of HDAC.

2.4 功能分歧率(Function divergence)分析

依據過去文獻對 HDACs 分類的研究及演化樹親緣遠近關係，我們對已畫好的演化樹去做分群，將 HDAC1、2、3、8、11 歸類為 Class1，4、5、6、7、9、10 歸為 Class2，在運用 DIVERGE 分析各群組間的功能分歧率(function divergence)，並找到可能的功能域。功能分歧率 Function divergence (θ) = $P(S_1|X)$ ， S_1 為有產生功能分歧的位置之分群，這意思是序列上因演化造成與其祖先序列產生不同的位置為 F_1 -sites，如果 F_1 至少出現在一個分群中，這就是 S_1 -status。相對的 S_0 則是沒有產生功能分歧的位置的情形，至於 X 便是發生改變的胺基酸殘基位置。當 θ 越大越有可能產生新的功能。

Table 1 表示基因成對比對功能分歧率(θ)的最大似估計值(Maximum likelihood)，在這篇論文中，多重序列比對的結果是以最大似估計(Maximum likelihood)求得。我們可以以此做出拓撲樹及樹支長度，這個樹能夠得到最可能得到的多重序列比對結果。當 θ 大於 0，就表示這位置可能產生功能分歧了。

2.5 演化功能分歧位置

在之前的研究證實的 HDAC 兩大分類，確實功能分歧度相當高，大部分為 8~9 之間，而其中在 108、120、131、203、206、236、239、240、264、273、320、327、338、342、343、356、357、373、375 等 19 個位置又高達 0.95 以上。

2.6 HDAC 蛋白的演化功能分歧位置

演化分析完成之後，我們得到 HDAC 家族的演化功能分歧位置。再從 PDB 資料庫找到人類的 HDAC8 蛋白的結構(Fig.7)。我們利用 PyMOL 觀察結構。而分析得到的演化功能分歧位置相對應於序列位置上，則分別落在人類 HDAC8 蛋白序列的 53-181 之間的區域。我們可以將這功能分歧區域分離出來，並針對這個區域進行活性位置的分析(Fig.8)。

Table 1

The pairwise coefficient of functional divergence

Class1/Class2	ThetaML
Class1/Class2	0.874053

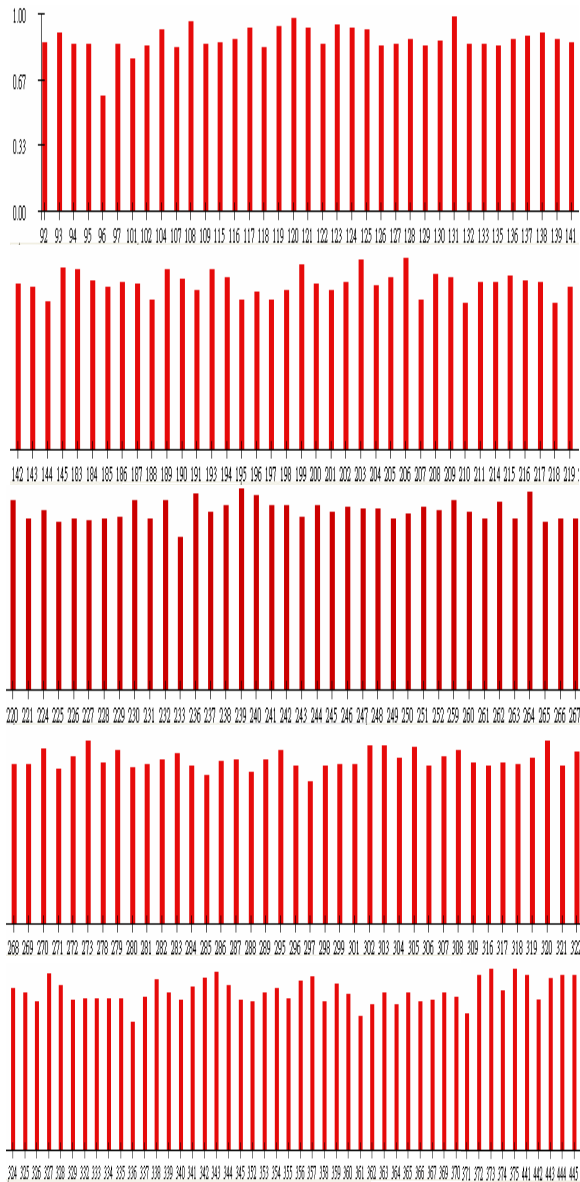


Fig.6. Phylogenetic tree of HDAC .(b) Site-specific profiles for pairwise comparison of three HDAC isoforms. $P_i(S|X)$ is the posterior probability for a site being functional-divergence related.

2.7 主要活性位置與演化功能分歧區域

一般在進行DOCKING，會先找出活性的位置，我們找出人類HDAC8的活性位置及模擬的Ligand(Fig.9)。白色的區域是演化分析得到的區域(Fig.10, 11)。我們在主要活性位置及白色的功能分歧區域進行DOCKING，這樣的方法可以減少遺失有價值小分子的機會，並且不會耗費太多時間。

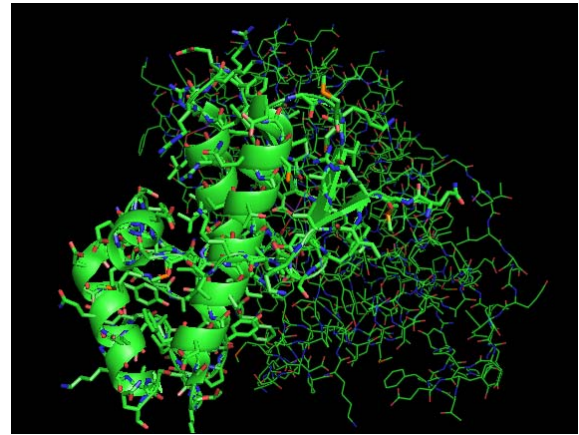


Fig.7.HDAC8_human 完整蛋白結構，放大的部份即為演化功能分歧位置。

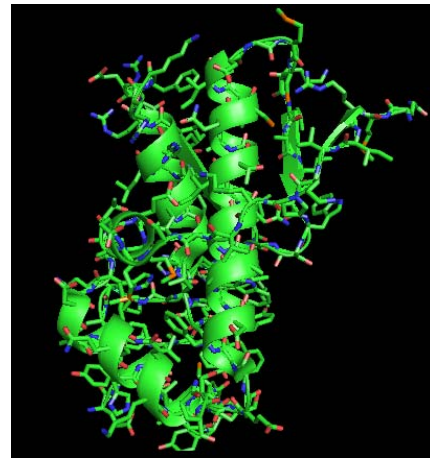


Fig.8.HDAC8_human 演化功能位置對應於蛋白序列的區域。

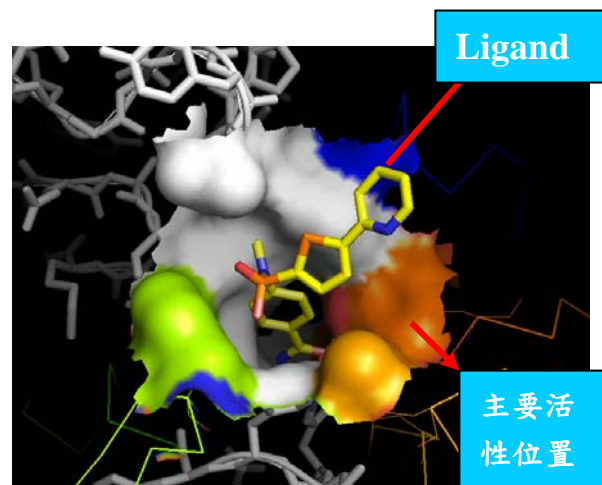


Fig.9.HDAC8_human 主要活性位置及其Ligand。

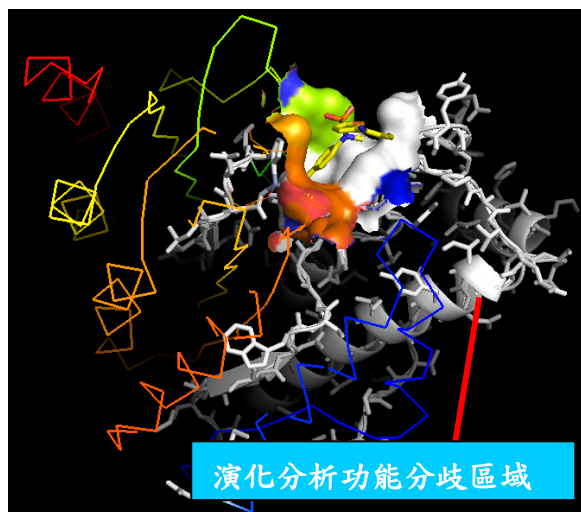


Fig.10.HDAC8_human 不同觀察角度的結構。白色的部份是演化分析得到的功能分歧區域。

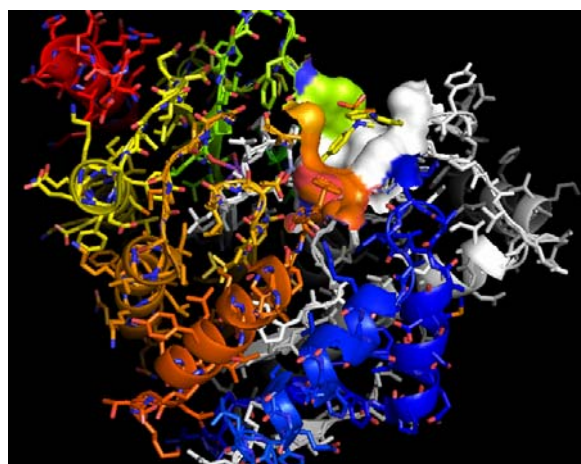


Fig.11.HDAC8_human 全部結構的分布情形。

三、結論

經由演化關係透過 θ 值及其相應位置的分析，我們發現 HDAC 這個蛋白家族的成員間，在漫長的演化過程中，因為這些位置的序列突變可能產生新的功能，相信經由生物實驗對這些位置的研究，可以有新的發現，而這些發現將可能是存在有重要意義的。

在研究中，我們分析演化所得到的功能分歧位置對應於人類 HDAC8 蛋白序列，位置分別落在 53-181 之間。因為結構必須完整，搜尋的活性位置才有意義。因此，我們選擇 53-181 這個區域，做為演化分析功能分歧的區塊。

我們透過演化樹分析的方法得到的結果。可以幫助我們在做藥物虛擬篩選時，除了主要活性位置外的選擇。這將使我們得到的結果更完整。我們將不需要對全蛋白結構做分析而耗費大量時間，便能得到少數不易獲得的藥物小分子(Fig.12)。這個方法將使虛擬篩選的結果更好，而不耗費大量時間。

在最近的研究裡，HDAC 與癌症轉移有密切的關係，癌症轉移(Metastasis)是惡性腫瘤最基本的生物學特徵，在轉移的惡性腫瘤組織上，最近發現 MTA 家族有高度的表現，甚至有科學家認為這類分子的缺失或水準過低會直接造成癌的侵襲性生長，metastasis-associated genes (MTA)顧名思義是與 metastasis 有高度相關分子，這個家族常能在 metastatic cell 上被發現。而 MTA1 這個蛋白的表現被認為與 HDAC 的活性有關。有科學家指出，不像 N-COR 或者是 SMRT 一樣，MTA1 既不活化 HDAC，也不跟它產生鍵結，而是正向的去調控 HDAC3 (7,8)。另外，Methyl-CpG-binding domain-containing protein(MBD) binding 了 MTA2 與 HDAC，且 MTA2 調控 HDAC 核複合體，而 MBD3 這個蛋白則調控 MTA2 與 HDAC 核複合體。因此 MTA2 與 HDAC 關係也相當緊密(10,12)。此外，MBD3 還可以調節 MTA2 與 HDAC 的核複合體，而且包括 DNA methyltransferase 1(DNMT1)以及幾個 methyl-CpG binding proteins, MeCP2, MBD2 and MBD3 在內，也都全部與 HDAC 相關(3)。MTA 家族與 HDAC 及 MBD3 都有很高度的相關，MTA1 正向調控 HDAC3，並且與 HDAC 的活性有關，而 MTA2 則受 MBD3 調控，MBD3 不但調控 MTA2 也調控 HDAC 複合體，而且還與 MTA2 及 HDAC 複合體鍵結。有此可見，HDAC 蛋白家族在癌症的治療上，有著相當大的研究價值以及開發的潛力。未來隨著結構生物學理論的逐漸完整，以及電腦輔助藥物分子設計的進步，我們希望能繼續研究設計 HDAC 蛋白家族的新穎先導化合物，並且針對與其有密切相關的 MTA 家族及 MBD 家族深入研究，開發出有效、安全的抗癌新藥。

誌謝 Acknowledgment

The authors wish to express their appreciation for the support from the National Science Council, Taiwan under the Grant NSC 94-2745-E-468-004.

四、參考文獻

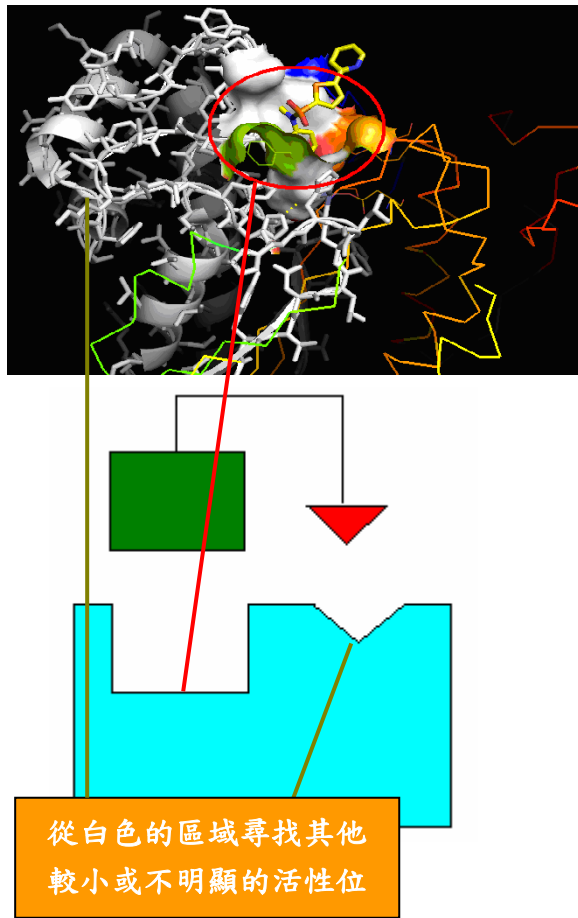


Fig.12.本研究要從白色的演化分析得到的功能分歧區域尋找除了主要活性位置之外可能的活性位置

- [1] Dangond F, Hafler D A, Tong J K, et al. Differential display cloning of a novel human histone deacetylase (HDAC3) cDNA from PHA-activated immune cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 242 (3) : 648~652.
- [2] Emiliani S, Fischle W, Van Lint C, et al. Characterization of a human RPD3 ortholog, HDAC3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95 (6) : 2795~2800.
- [3] El-Osta A, Wolffe AP. DNA methylation and histone deacetylation in the control of gene expression: basic biochemistry to human development and disease. *Gene Expr*. 2000;9(1-2):63-75.
- [4] Fenrick R, Hiebert S W. Role of histone deacetylases in acute leukemia. *J Cell Biochem*, 1998, 30-31 (Suppl) : 194~202.
- [5] Martin MD, Fischbach K, Osborne CK, Mohsin SK, Allred DC, O'Connell P. Loss of heterozygosity events impeding breast cancer metastasis contain the MTA1 gene. *Cancer Res*. 2001 May 1;61(9):3578-80.
- [6] Matthew G. Guenther, Orr Barak, and Mitchell A. Lazar. The SMRT and N-CoR Corepressors Are Activating Cofactors for Histone Deacetylase 3. *Molecular and Cellular Biology*, September 2001, p. 6091-6101
- [7] Patricia Foo, *Metastasis: The journey of mobile cancer cell*, Harvard science 2002.
- [8] Saito M, Ishikawa F. The mCpG-binding domain of human MBD3 does not bind to mCpG but interacts with NuRD/Mi2 components HDAC1 and MTA2. *J Biol Chem*. 2002 Sep 20;277(38):35434-9. Epub 2002 Jul
- [9] Yang W M, YAO Y L, Sun J M, et al. Isolation and characterization of cDNAs corresponding to an additional member of the human histone deacetylase gene family. *J Biol Chem*, 1997, 272 (44) : 28001~28007.
- [10] Zhang Y, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bird A, Reinberg D. Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev*. 1999 Aug 1;13(15):1924-35.