

去氧核糖核酸酶之結構與功能

鄭宇哲¹、陳威戎²、廖大修³

¹財團法人國泰綜合醫院臨床醫學研究中心蛋白質體研究室，台北，台灣

²國立宜蘭大學生物科技研究所，宜蘭，台灣

³國立台灣大學醫學院生物化學暨分子生物學研究所，台北，台灣

摘要

去氧核糖核酸酶 (deoxyribonuclease; DNase) 是一種核酸內切酶 (endonuclease)，可水解 (hydrolysis) 磷酸雙酯鍵 (phosphodiester bond)。已發現的DNase概略分為四種，即第一型去氧核糖核酸酶 (deoxyribonuclease I; DNase I)、第二型去氧核糖核酸酶 (deoxyribonuclease II; DNase II)、凋亡蛋白酶活化之去氧核糖核酸酶 (caspase-activated deoxyribonuclease; CAD) 和似第二型去氧核糖核酸酶 (DNase II-Like DNase; DLAD)。其中催化機轉 (catalysis mechanism) 被研究較為透徹的是DNase I 及DNase II，兩者之差別在於DNase I 需要二價金屬離子，如錳離子 (Mn^{2+})、鎂離子 (Mg^{2+})、鈣離子 (Ca^{2+}) 等活化其酵素 (enzyme) 活性，且其最適作用pH值為中性或微鹼性。DNase II 不需要二價金屬離子活化其酵素活性，其最適作用pH值為酸性。在酵素作用產物方面，DNase I 會將DNA水解成2-4 bp，5'端 (5' terminal) 帶有磷酸根 (phosphate) 的寡核苷酸 (oligonucleotide)，DNase II 的產物則是2-4 bp，帶有3'端 (3' terminal) 磷酸根的寡核苷酸。不同的DNase在生理上有不同的功能。此外，在細胞凋亡 (apoptosis) 過程中，不同的DNase也會在不同的細胞內參與將細胞DNA降解為階梯狀。DNase I 的生理功能主要是在消化道內水解食物中的DNA供人體利用。DNase II 儲存於細胞的溶酶體 (lysosome)，主要的生理功能是水解入侵細胞的外來DNA。DLAD則是在眼球參與水解水晶體細胞DNA以維持水晶體的透光性。CAD主要的生理功能是在細胞凋亡時參與水解凋亡細胞的DNA。由此可見，DNase在維持生命健康上扮演重要的角色。(生醫 2008;1(2):199-206)

關鍵字：去氧核糖核酸酶 (deoxyribonuclease; DNase)、細胞凋亡 (apoptosis)、催化機轉 (catalysis mechanism)

前言

去氧核糖核酸酶 (deoxyribonuclease; DNase) 是一種核酸內切酶 (endonuclease)，自然界中絕

大部份的生命體都含有DNase。其主要功能原先被認為是消化食物中的DNA，這是因為早期DNase多在動物的消化道中被發現的緣故。然而隨著生物科技的進步，又有不同的DNase在不同的細胞

通訊作者：鄭宇哲博士

電話：886-2-26907965 ext 2615

傳真：886-2-26907963

地址：221台北縣汐止市建成路160巷32號

電子郵件：yccheng@cgh.org.tw

2007年12月6日來稿；2008年4月11日修改；2008年4月21日同意刊登

胞器 (organelle) 中被發現並參與不同的生理反應。除了被研究最透徹的第一型去氧核糖核酸酶 (deoxyribonuclease I; DNase I) 外, 又發現存在於細胞溶酶體 (lysosome) 的第二型去氧核糖核酸酶 (deoxyribonuclease II; DNase II), 在細胞凋亡 (apoptosis) 過程中, 負責水解 (hydrolysis) 凋亡細胞DNA的凋亡蛋白酶活化之去氧核糖核酸酶 (caspase-activated DNase; CAD), 以及於眼球細胞水晶體成熟過程中, 參與將水晶體細胞DNA水解之似第二型去氧核糖核酸酶 (DNase II-like DNase; DLAD) 等。以下就這四種DNase, 分別詳述其結構與功能方面的研究進展。

DNase I

DNase I 主要分布於動物的分泌性腺體 (secretory gland) 中, 如胰臟、唾腺 (salivary gland) 等¹。原本認為DNase I 是一種消化性酵素 (enzyme), 主要功能為分解消化道內食物裡的DNA, 但近年來, 陸續在人類的血清、尿液、雞的胚胎、老鼠的心臟、腎臟、淋巴結 (lymph node) 及小麥胚芽中發現DNase I 的存在, 而DNase I 的其他功能亦相繼被研究出來, 例如參與DNA複製 (replication)、基因重組 (genetic recombination)²、DNA修補 (repair)³。此外, DNase I 也可能參與細胞凋亡^{4,5}。在醫療應用方面, 人類的DNase I 基因已經被選殖 (cloning) 出來, 進而製造大量的重組人類DNase I (rhDNase I)。在臨床應用上, DNase I 可用來治療纖維性囊腫 (cystic fibrosis)⁶及紅斑性狼瘡 (systemic lupus erythematosus)⁷。

二價金屬離子對DNase I 的活性與結構有絕對的影響, 二價金屬離子活化DNase I 水解DNA的能力為: $(Ca^{2+} + Mg^{2+}) = Mn^{2+} > Mg \gg Ca^{2+}$ ⁸。另外, 在水解DNA時, 除了需要鈣離子 (Ca^{2+}) 外, 還需要錳離子 (Mn^{2+}) 或鎂離子 (Mg^{2+}) 做為DNA與酵素之間的橋樑。在只有 Mg^{2+} 存在時, DNase I 一次只能水解DNA的單股 (single

scission)。若是 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 同時存在, 或是只有 Mn^{2+} 存在的情況下, 除了水解單股的DNA, DNase I 亦可水解雙股的DNA (double scission)⁹。牛胰臟DNase I 有兩個 Ca^{2+} 結合位置, 而 Ca^{2+} 存在與否, 會使其圓二色分光光譜儀 (circular dichroism spectrometer) 的分析結果有很大的變化¹⁰, 顯示 Ca^{2+} 與DNase I 結合後會造成其二級結構 (secondary structure) 的改變, 此改變使DNase I 更易與受質 (substrate) DNA的次溝 (minor groove) 結合¹¹。 Ca^{2+} 與DNase I 結合使其分子構形改變, 除了在酵素動力學 (enzyme kinetics) 上具有加成效應 (synergistic effect) 外, 尚有其它功能, 如: (a) 保護DNase I 上的氨基酸 (amino acid) C173與C209之間的雙硫鍵 (disulfide bond) 不被 β -巯基乙醇 (β -mercaptoethanol) 還原 (reduction)。(b) 保護DNase I, 使其不易被蛋白酶 (protease) 水解, 或是不受化學藥劑作用而抑制其活性¹²。(c) 使還原態 (reduced form) 的DNase I 進行正確的雙硫鍵配對, 進而再折疊 (refold) 成具有活性的分子¹³。

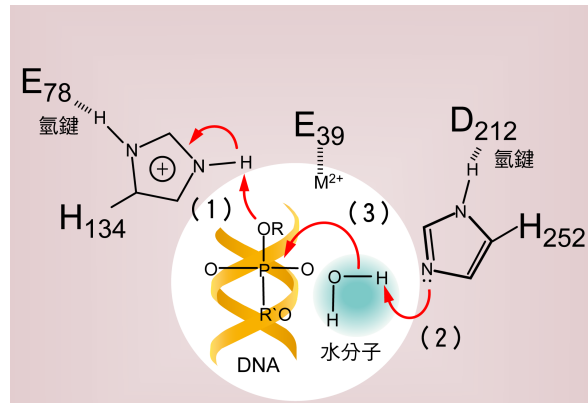
根據Price提出的蛋白質化學修飾反應¹⁴, 在銅離子 (Cu^{2+}) 存在的情況下, 牛胰臟DNase I 可在pH 7.2時被碘乙酸 (iodoacetate) 烷基化 (alkylation), 而完全失去水解DNA的能力。此化學反應是專一地對DNase I 上的氨基酸H134進行修飾, 使之成為3-carboxymethyl-histidine, 此結果顯示, H134 可能是DNase I 活性中心 (active center) 的氨基酸之一。Weston等人根據DNase I 的三級結構 (3-D structure), 提出可能的DNase I 活化位置結構圖及水解機制 (圖一)¹⁵。他們認為氨基酸E78、H134、D168、D218和H252的位置較接近受質DNA的磷酸根 (phosphate)。在催化 (catalysis) DNA水解時, 這些氨基酸扮演的角色可藉由定位突變法 (site-directed mutagenesis) 來闡明¹⁶, 其中, H134和H252分別與E78和D212形成氫鍵 (hydrogen bond)。H134扮演提供氫離子 (H^+) 的角色, 應為催化酸 (general acid), 將N上面的 H^+ 傳給

DNA 3'端 (3' terminal) 之-O⁻。H252則是扮演接受H⁺的角色，應為催化鹼 (general base)，可接受水分子 (H₂O) 的H⁺，形成氫氧離子 (OH⁻) 攻擊磷酸雙酯鍵 (phosphodiester bond)，使其斷裂。二價金屬離子則被E39固定在磷酸雙酯鍵的適當位置，以穩定整個水解過程 (圖一)。另外，氨基酸Y76及R41是與DNA結合之殘基 (residue)，因此這兩個氨基酸突變後會使整個DNase I 構型 (conformation) 改變，不能與DNA的次溝結合，因而無法水解DNA¹⁷。

DNase II

DNase II 的最適反應pH值約為4.5-5.5，作用時不需金屬離子活化。在pH值高於4.5的情況下，Mg²⁺會抑制DNase II 的活性¹⁸，而乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA) 則有助於其活性之增加。當pH值高過5.0時，HPO₄²⁻會對DNase II 產生輕微的抑制，而SO₄²⁻則會對其產生非常強烈的抑制作用。DNase II 水解DNA的機制有兩種：一是只作用於單股DNA上，二是同時作用在雙股DNA上。但不論是哪一種機制，DNase II 都是將DNA分子的磷酸雙脂鍵水解，產生3' 端為磷酸根殘基的產物。

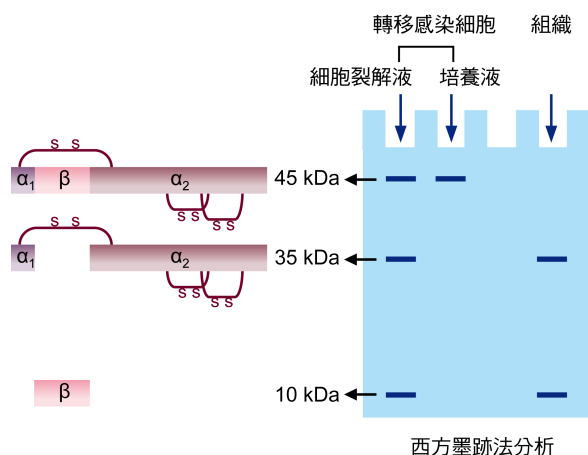
DNase II 是目前最廣泛被研究的酸性DNase，於1966年時首度由Bernardi等人純化獲得，並以沉降 (sedimentation) 及擴散 (diffusion) 係數估算其分子量約為38千道爾頓 (kilodalton; kDa)¹⁹。1985年，Liao純化出DNase II，並以膠體電泳法 (SDS-PAGE) 分析後發現，DNase II 是由二個分子量分別為35 kDa及10 kDa的蛋白質次單元 (subunit) 所構成，並將這兩個次單元稱為α次單元與β次單元²⁰。在Wang等人以β-硫氫乙醇還原豬脾臟DNase II 的雙硫鍵之後，發現α次單元會進一步解離成α₁及α₂兩個次單元²¹ (圖二)。Wang等人於1998年發表DNase II 的互補DNA (complementary DNA; cDNA) 序列，全長1292 bp，內含一個可轉譯 (translate) 出364個氨基酸



圖一、第一型去氧核醣核酸酶 (deoxyribonuclease I; DNase I) 之催化機轉 (catalysis mechanism)。

DNase I 催化水解DNA的過程中，氨基H134和H252分別與E78和D212形成氫鍵 (hydrogen bond)。(1) H134扮演提供氫離子 (H⁺) 的角色，為催化酸 (general acid)，將N上面的H⁺傳給DNA 3'端 (3' terminal) 之-O⁻；(2) H252扮演接受H⁺的角色，為催化鹼 (general base)，可以接受水分子 (H₂O) 的H⁺；(3) 失去H⁺的水分子形成的氫氧離子 (OH⁻) 攻擊磷酸雙酯鍵 (phosphodiester bond)，使得磷酸雙酯鍵斷裂。二價金屬離子被E39固定於磷酸雙酯鍵的適當位置，用來穩定整個水解過程。(彩圖請見本刊網頁)

的開放讀架 (open reading frame)，在經過轉譯 (translation) 及修飾作用 (modification) 後，可得到成熟的DNase II。其中，α₁ (2.6 kDa) 含有23個氨基酸，β (8.4 kDa) 含有54個氨基酸，α₂ (34 kDa) 則含有242個氨基酸。除了α₁與α₂是以α₁ C3和α₂ C52形成的鏈間 (interchain) 雙硫鍵連接之外，其餘的Cys殘基均以鏈內 (intrachain) 雙硫鍵配對的方式存在。醣類組成分析的結果顯示，DNase II 序列上的6個可能之N-醣基化位置 (N-glycosylation sites) 均被醣基化 (glycosylation)。仔細比較DNase II 的cDNA序列和純化所得之DNase II 氨基酸序列可以發現，在成熟的DNase II 中缺少某些肽鏈 (peptide)，分別是由轉譯起始點Met算起共19



圖二、第二型去氧核糖核酸酶 (deoxyribonuclease II; DNase II) 示意圖及其在膠體電泳 (SDS-PAGE) 上所呈現的分子量 (molecular weight)。

DNase II 是由二個分子量分別為 35 千道爾頓 (kilodalton; kDa) 及 10 kDa 的蛋白質次單元 (subunit) α 與 β 構成。其中, α 次單元又包含 α_1 及 α_2 兩個次單元。除了 α_1 與 α_2 是以 α_1 C3 和 α_2 C52 形成的鏈間雙硫鍵 (interchain disulfide bond) 連接外, 其餘的 Cys 殘基均以鏈內雙硫鍵 (intrachain disulfide bond) 配對的方式存在。(彩圖請見本刊網頁)

其他名詞解釋: 轉移感染細胞, transfected cell; 細胞裂解液, cell lysate; 培養液, medium; 西方墨跡法分析, western blot analysis。

個氨基酸長度的訊息胜肽鏈 (signal peptide)、 α_1 和 β 次單元間 7 個氨基酸長度的連接胜肽鏈 (connecting peptides)、 β 與 α_2 間 6 個氨基酸長度的連接胜肽鏈, 以及 13 個氨基酸組成的 C 端 (C terminal) 末胜肽鏈。

據推測, 訊息胜肽鏈的移除可能是發生在轉譯進行的同時, 而 α_1 、 β 次單元間與 β 、 α_2 次單元間的連接胜肽鏈, 以及 C 末端胜肽鏈可能是藉由轉譯後的加工作用 (post-translational processing) 移除。利用真核細胞 (eukaryotic cell) 表現系統表現重組的 DNase II 發現, 被表現的重組蛋白質會分泌至培養液 (medium) 中²²。收集細胞培

養液中的 DNase II 純化後, 由 N 端 (N terminal) 定序並估算分子量可以發現, 由細胞表現所得之具活性的 DNase II 分子量為 45 kDa, 是由單鏈構成, 且其訊息胜肽鏈 (由前 19 個氨基酸組成) 也已被移除, 然而其他的連接胜肽鏈卻未被移除²³。

利用定點突變法可證明 DNase II 上的氨基酸 H297 之重要性。將 H297 以白氨酸 (leucine; Leu, L) 置換後, DNase II 會喪失催化水解 DNA 的能力。另外, 還發現另一個氨基酸 H115 也在 DNase II 的活性區域內²²。由於 DNase II 的立體結構目前仍然未知, 但從其他水解核酸酶的催化機制來看, 組氨酸 (histidine; His, H) 大多扮演重要的角色, 例如假性狂犬病毒 (pseudorabies virus) DNases 中的 H371 若突變為丙氨酸 (alanine; Ala, A), 會使其喪失水解 DNA 的能力²⁴。核糖核酸酶 A (ribonuclease A; RNase A) 中的 H12 及 H119 也都位於活性中心, 並參與催化水解核酸^{25,26}。在 DNase I 方面, H134 與 H252 分別擔任催化酸及催化鹼的角色, 並在二價離子存在的情況下水解 DNA。因此, 利用定位點突變的方式將重要的組氨酸突變為其他氨基酸, 即能驗明該組氨酸的生理功能為何。將 DNase II 中的 H115 及 H297 突變為白氨酸及丙氨酸後, 發現突變型 (mutant) DNase II 的 DNA 結合能力與野生型 (wild type) 並無不同, 顯示此二組氨酸的突變株之所以喪失活性, 並非由於突變株的酵素結構改變所致, 而是因為此二組氨酸直接參與 DNase II 催化水解 DNA 的緣故²²。另外, 以化學救援法實驗 (chemical rescue method) 亦證實 H115 及 H297 直接參與 DNase II 的催化反應。H115 在 DNase II 催化水解 DNA 時為催化酸, 而 H297 為催化鹼。另一個 DNase II 上的組氨酸 H132 則被認為與蛋白質的正確折疊 (folding) 有關²²。

DNase II 可能的催化機制已被提出 (圖 3 a)。在催化過程中, 上述之 H297 為催化鹼, 其咪唑環 (imidazole ring) 上的孤電子對 (long pair) 先攻擊 DNA 上的磷酸根, 而 H115 上的咪唑

環則脫失一個 H^+ ，此脫失的 H^+ 會與DNA磷酸根的OR基結合，造成DNA斷裂，斷裂後的DNA一半形成ROH脫離，另一半則仍與H297相連。前述脫去 H^+ 的H115會攻擊一個鄰近的水分子，而水分子上的氧則攻擊仍與H297相連之磷酸根。H115在獲得水分子上的 H^+ 後，回復為催化前的狀態，而與H297相連之磷酸根則藉由電子（electron）轉移，將電子轉回H297上的咪唑環，藉此脫離H297，同時H297也回復為催化前的狀態，至此即完成整個催化反應。此一催化機轉也解釋以碘醋酸（iodoacetic acid; IAA）處理DNase II 時，碘醋酸如何與H297結合。當碘醋酸進入催化中心時，其羧基（carboxyl）會先被某一帶正電（positive charge）的氨基酸殘基穩定，而H297（擔任催化鹼）的咪唑環上之孤電子對會攻擊碘-碳鍵（iodine-carbon bond），進而使碘醋酸接上H297殘基（圖三 b）。

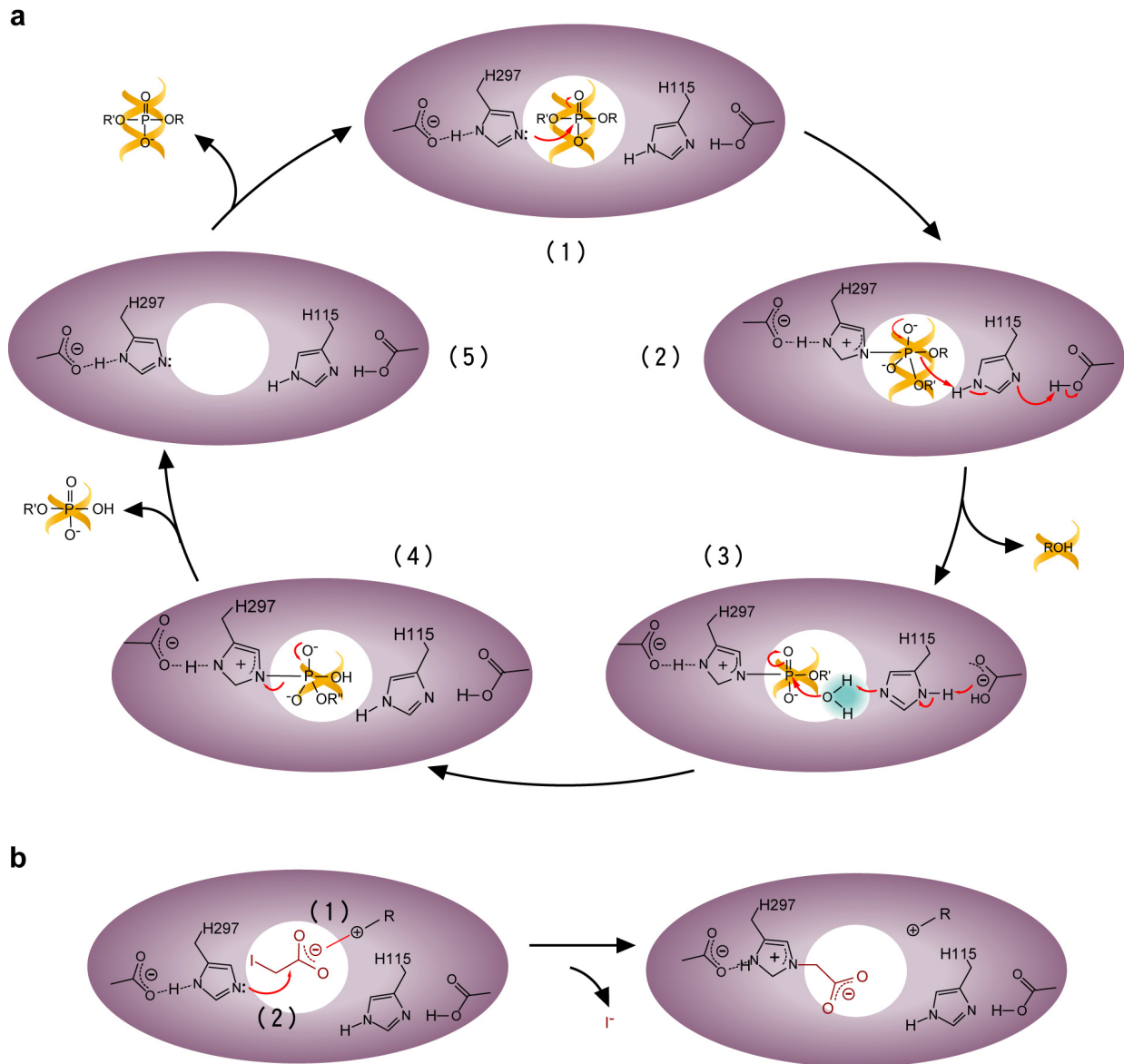
在與DNase II 抑制劑相關的研究方面，由於N-溴代丁二醯亞胺（N-bromosuccinimide; SucNBr）、碘醋酸和過氧化氫（ H_2O_2 ）都會對DNase II 造成強烈的抑制作用，但碘乙胺（iodoacetamide）卻僅會造成輕微的抑制作用，因此早在1969年，就已經有Trp、His及Met殘基位於活性中心的推測²⁷。1985年，Liao以[2-14C]-ICH₂COOH對DNase II 進行化學修飾發現，某一特定的His殘基被羧甲基化（carboxymethylation）後會導致DNase II 失去活性，因此確定該組氨酸是位於活性中心的重要氨基酸²⁰。而以氨基酸定序（amino acid sequencing）方法分析包含此His之肽鏈所得之氨基酸序列為Ala-Thr-Glu-Asp-His-Ser-Lys-Trp，即為DNase II 蛋白質序列上的第293個至第300個氨基酸²¹，因而確定H297位於活性中心。

至於DNase II 在細胞內的位置方面，由於以0.33 M (mole) sucrose進行梯度離心分離（gradient centrifugation）時，DNase II 會與組織蛋白酶（cathepsin D）及酸性磷酸酶（acid

phosphatase）這兩個溶酶體標記（marker）酵素一起沉降²⁸，故DNase II 被認為是存在於溶酶體中的酵素。溶酶體中的DNase II 會利用細胞的胞飲特性（endocytosis）對細胞之轉移感染（transfection）過程造成阻礙，進而降低轉移感染的效率²⁹。由於DNase II 存在於溶酶體中，因此其功能被認為是分解外來的DNA，如細菌或病毒的DNA。此外，某種溶酶體中的酸性DNase會參與降解巨噬細胞（macrophage）攝入的已凋亡胸腺（thymocyte）細胞之DNA³⁰，所以DNase II 可能也會參與細胞凋亡，將凋亡細胞內的DNA切除。另外，由DNase II 基因剔除（gene knockout）老鼠發現，這些基因剔除鼠皆在出生前即死亡，且其肝臟內有大量未成熟的紅血球堆積，這些未成熟的紅血球之細胞核都還存在，核內有大量的DNA堆積³¹，代表DNase II 參與紅血球的成熟過程，並水解未成熟紅血球核中的DNA。

其他DNase

近年來被發現的CAD與細胞凋亡有密切關係。細胞凋亡是細胞因應外來傷害刺激、控制細胞恆定（homeostasis）的正常生理反應。細胞凋亡過程中最明顯的特徵為染色質濃縮（nuclear condensation）及基因體DNA降解（genomic DNA degradation）。基因體DNA降解後的產物是大小約為180 bp的DNA階梯（ladder）³²。此DNA階梯是在組織蛋白質（histone）未被蛋白質裂解（proteolysis）的情況下由DNA內切酶作用所形成。在細胞凋亡時，CAD負責分解細胞核內的DNA。平常在細胞質中時，CAD會與其抑制物（inhibitor of CAD; ICAD）結合，而在細胞凋亡初期，活化之凋亡蛋白酶-3（caspase-3）會切除該抑制物並釋出CAD³³。由於CAD帶有核訊息信號（nuclear localization signal; NLS），因此在與抑制物脫離後，可進入細胞核執行DNA片段化（DNA fragmentation）的工作³⁴。CAD的最適作用pH為7.5，作用產物為5'端（5' terminal）為磷酸的寡核苷酸。



圖三、可能之第二型去氧核糖核酸酶 (deoxyribonuclease II; DNase II) 催化 (catalysis) 水解DNA機轉及可能之碘醋酸 (iodoacetic acid) 結合H297殘基機轉。

(a) 可能的DNase II 催化水解DNA機轉為 (1) H297擔任催化鹼的角色，其咪唑環 (imidazole ring) 上的孤電子對 (long pair) 先攻擊DNA上的磷酸根 (phosphate)；(2) H115擔任催化酸的角色，其上的咪唑環脫失一個氫離子 (H⁺)，此脫失的H⁺與DNA磷酸根上的OR基結合，造成DNA斷裂，一半形成ROH脫離，另一半仍與H297相連；(3) 脫去H⁺的H115攻擊鄰近的水分子，而水分子上的氧則攻擊仍與H297相連的磷酸根；(4) H115獲得水分子上的H⁺後回復為催化前的狀態；(5) 與H297相連之磷酸根藉由電子 (electron) 轉移將電子轉回H297上的咪唑環，藉此脫離，H297也回復為催化前的狀態，至此，完成整個催化反應。(b) 可能之碘醋酸結合H297機轉為 (1) 碘醋酸 (iodoacetic acid; IAA) 進入催化中心時，其羧基 (carboxyl) 被某一帶正電 (positive charge) 的氨基酸殘基穩定；(2) H297的咪唑環上之孤電子對攻擊碘-碳鍵 (iodine-carbon bond)，進而使碘醋酸接在H297殘基上。(彩圖請見本刊網頁)

另一種酸性DNase也被發現存在於人類或老鼠的纖維母細胞 (fibroblast) 中，稱為DLAD，它在眼睛水晶體的分化過程中扮演重要的角色。一旦DLAD的基因缺失，將導致DNA在水晶體累積，造成白內障³⁵。在巨噬細胞吞噬周邊死亡細胞後，也會由DLAD分解被噬入之死亡細胞殘存的DNA³⁶。

結語

DNase可催化水解DNA，不同的DNase分別在不同的組織細胞負責不同的生理功能。DNase I 主要的生理功能是在消化道中水解食物的DNA供人體利用。DNase II 儲存於細胞的溶酶體，主要生理的功能為水解入侵細胞的外來DNA。DLAD則在眼球參與水解水晶體細胞DNA，以維持水晶體的透光性。CAD主要的生理功能是在細胞凋亡時參與水解凋亡細胞的DNA。

若以結構的角度仔細研究這些DNase，會發現一些極細微但可能非常重要的因子，例如，僅是單一氨基酸的突變已足以影響整個酵素的功能，DNase I 中的H252即為很好的例子，它發生突變時會使整個酵素喪失功能。再如DNase II 中的H132，它發生突變時會使酵素不能正常構型，也無法被輸送到溶酶體中儲存。由此可知，從蛋白質構成的角度，吾人能更貼近問題的核心，進而找出解決問題的方法。

細胞中有許多不同的訊息路徑 (signal pathway) 會引起細胞凋亡，而細胞凋亡後，會有許多不同的DNase執行水解凋亡細胞之DNA的工作。且正如前述，不同的DNase在不同的細胞扮演不同的生理功能，正說明生命的複雜與奧妙，而且還有許多未知的調控分子及機轉等待我們去發現。

引用文獻

1. Paudel HK, Liao TH. Comparison of the three primary structures of deoxyribonuclease isolated from bovine, ovine, and porcine pancreas. Derivation of the amino acid sequence of ovine DNase and revision of the previously published amino acid sequence of bovine DNase. *J Biol Chem* 1986;261:16012-16017.
2. Davis RW, Thomas M, Cameron J, St John TP, Scherer S, Padgett RA. Rapid DNA isolations for enzymatic and hybridization analysis. *Methods Enzymol* 1980;65:404-411.
3. Cal S, Tan KL, McGregor A, Connolly BA. Conversion of bovine pancreatic DNase I to a repair endonuclease with a high selectivity for abasic sites. *EMBO J* 1998;17:7128-7138.
4. Polzar B, Zanotti S, Stephan H, Rauch F, Peitsch MC, Irmeler M, Tschopp J, Mannherz HG. Distribution of deoxyribonuclease I in rat tissues and its correlation to cellular turnover and apoptosis (programmed cell death). *Eur J Cell Biol* 1994;64:200-210.
5. Falcone RA Jr, Stern LE, Kemp CJ, Shin CE, Erwin CR, Warner BW. Apoptosis and the pattern of DNase I expression following massive small bowel resection. *J Surg Res* 1999;84:218-222.
6. Durward A, Forte V, Shemie SD. Resolution of mucus plugging and atelectasis after intratracheal rhDNase therapy in a mechanically ventilated child with refractory status asthmaticus. *Crit Care Med* 2000;28:560-562.
7. Prince WS, Baker DL, Dodge AH, Ahmed AE, Chestnut RW, Sinicropi DV. Pharmacodynamics of recombinant human DNase I in serum. *Clin Exp Immunol* 1998;113:289-296.
8. Wiberg JS. On the mechanism of metal activation of deoxyribonuclease I. *Arch Biochem Biophys* 1958;73:337-358.
9. Liu YF, Liao TH. Mechanism for inhibition of deoxyribonuclease activity by antisera. *J Protein Chem* 1997;16:75-82.
10. Tullis R, Price PA. The effect of calcium and magnesium on the ultraviolet spectrum of bovine pancreatic deoxyribonuclease A. *J Biol Chem* 1974;249:5033-5037.
11. Suck D. Crystallization and preliminary crystallographic data of bovine pancreatic deoxyribonuclease I. *J Mol Biol* 1982;162:511-513.
12. Price PA, Stein WH, Moore S. Effect of divalent cations on the reduction and re-formation of the disulfide bonds of deoxyribonuclease. *J Biol Chem* 1969;244:929-932.
13. Price PA, Liu TY, Stein WH, Moore S. Properties of chromatographically purified bovine pancreatic deoxyribonuclease. *J Biol Chem* 1969;244:917-923.
14. Price PA, Moore S, Stein WH. Alkylation of a histidine

- residue at the active site of bovine pancreatic deoxyribonuclease. *J Biol Chem* 1969;244:924-928.
15. Weston SA, Lahm A, Suck D. X-ray structure of the DNase I-d(GGTATACC)₂ complex at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol* 1992;226:1237-1256.
 16. Chen WJ, Lai PJ, Lai YS, Huang PT, Lin CC, Liao TH. Probing the catalytic mechanism of bovine pancreatic deoxyribonuclease I by chemical rescue. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;352:689-696.
 17. Doherty AJ, Worrall AF, Connolly BA. Mutagenesis of the DNA binding residues in bovine pancreatic DNase I: an investigation into the mechanism of sequence discrimination by a sequence selective nuclease. *Nucleic Acids Res* 1991;19:6129-6132.
 18. Shack J. The influence of sodium and magnesium ions on the action of deoxyribonuclease II. *J Biol Chem* 1959;234:3003-3006.
 19. Bernardi G, Griffe M, Appella E. Isolation and characterization of spleen acid deoxyribonuclease. *Nature* 1963;198:186-187.
 20. Liao TH. The Subunit Structure and Active Site Sequence of Porcine Spleen Deoxyribonuclease. *J Biol Chem* 1985;260:10708-10713.
 21. Wang CC, Lu SC, Chen HL, Liao TH. Porcine spleen deoxyribonuclease II. Covalent structure, cDNA sequence, molecular cloning, and gene expression. *J Biol Chem* 1998;273:17192-17198.
 22. Cheng YC, Hsueh CC, Lu SC, Liao TH. Identification of three crucial histidine residues (His115, His132 and His297) in porcine deoxyribonuclease II. *Biochem J* 2006;398:177-185.
 23. Wang WY, Liaw SH, Liao TH. Cloning and characterization of a novel nuclease from shrimp hepatopancreas, and prediction of its active site. *Biochem J* 2000;346:799-804.
 24. Ho TY, Wu SL, Hsiang CH, Chang TJ, Hsiang CY. Identification of a DNA-binding domain and an active-site residue of pseudorabies virus DNase. *Biochem J* 2000;346:441-445.
 25. Campbell RL, Petsko GA. Ribonuclease structure and catalysis: crystal structure of sulfate-free native ribonuclease A at 1.5-Å resolution. *Biochemistry* 1987;26:8579-8584.
 26. Borah B, Chen CW, Egan W, Miller M, Wlodawer A, Cohen JS. Nuclear magnetic resonance and neutron diffraction studies of the complex of ribonuclease A with uridine vanadate, a transition-state analogue. *Biochemistry* 1985;24:2058-2067.
 27. Melzer MS. Influence of carcinogens and group-specific compounds on DNase II. *Can J Biochem* 1969;47:987-989.
 28. Liao TH, Liao WC, Chang HC, Lu KS. Deoxyribonuclease II purified from the isolated lysosomes of porcine spleen and from porcine liver homogenates. Comparison with deoxyribonuclease II purified from porcine spleen homogenates. *Biochim Biophys Acta* 1989;1007:15-22.
 29. Howell DP, Krieser RJ, Eastman A, Barry MA. Deoxyribonuclease II is a lysosomal barrier to transfection. *Mol Ther* 2003;8:957-963.
 30. McIlroy D, Tanaka M, Sakahira H, Fukuyama H, Suzuki M, Yamamura K, Ohsawa Y, Uchiyama Y, Nagata S. An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. *Genes Dev* 2000;14:549-558.
 31. Krieser RJ, MacLea KS, Longnecker DS, Fields JL, Fiering S, Eastman A. Deoxyribonuclease II α is required during the phagocytic phase of apoptosis and its loss causes perinatal lethality. *Cell Death Differ* 2002;9:956-962.
 32. Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 1984;142:67-77.
 33. Wolf BB, Schuler M, Echeverri F, Green DR. Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *J Biol Chem* 1999;274:30651-30656.
 34. Lechardeur D, Drzymala L, Sharma M, Zylka D, Kinach R, Pacia J, Hicks C, Usmani N, Rommens JM, Lukacs GL. Determinants of the nuclear localization of the heterodimeric DNA fragmentation factor (ICAD/CAD). *J Cell Biol* 2000;150:321-334.
 35. Nishimoto S, Kawane K, Watanabe-Fukunaga R, Fukuyama H, Ohsawa Y, Uchiyama Y, Hashida N, Ohguro N, Tano Y, Morimoto T, Fukuda Y, Nagata S. Nuclear cataract caused by a lack of DNA degradation in the mouse eye lens. *Nature* 2003;424:1071-1074.
 36. Odaka C, Mizuochi T. Role of macrophage lysosomal enzymes in the degradation of nucleosomes of apoptotic cells. *J Immunol* 1999;163:5346-5352.

去氧核糖核酸酶之結構與功能

施純明副教授（臺北醫學大學醫學系）

本篇作者由生物化學及分子生物學的觀點，以深入淺出、簡明扼要的方式，清楚闡釋四大類去氧核糖核酸酶（deoxyribonuclease; DNase）的基本生理作用、功能、結構及其與疾病之相關性。因此，本篇文章對從事生物化學及分子生物學相關研究的學者而言，可更深入地瞭解DNase，並獲取相當大的助益。

細胞中存在許多種類的核酸內切酶（endonuclease），其功用是藉由切斷DNA的磷酸二酯鍵（phosphodiester bond）使DNA水解（hydrolysis）。DNase亦屬於核酸內切酶的一群，可不具序列專一性（non sequence-specific）地水解DNA。本文作者於文章中詳細介紹四類DNase之結構功能和疾病間的密切相關性，其中以第一型去氧核糖核酸酶（deoxyribonuclease I; DNase I）及第二型去氧核糖核酸酶（deoxyribonuclease II; DNase II）較為詳盡。經由本文的介紹可知，DNase I與DNase II具有複雜的蛋白質結構及功能，且不同二價金屬離子及pH值，對DNase I與DNase II的活性及結構往往有牽一髮而動全身的影響。此外，單一氨基酸（amino acid）的改變也進一步造成構型（conformation）變化，而與致病機轉有關。早期以傳統蛋白質化學方法作為研究的工具，近幾年則結合分子生物學、生物資訊學（bioinformatics）、基因體學（genomics）及蛋白質體學（proteomics）等方法，開啟DNase於疾病治療應用上新的研究領域及視野。如作者於文中所述，DNase I可被用來治療纖維性囊腫（cystic fibrosis）及紅斑性狼瘡（systemic lupus erythematosus）。重組人類DNase I（recombinant human deoxyribonuclease I; rhDNase I）也可作為祛痰（mucolytic）藥物，在治療兒童急性氣喘（acute asthma）發作時，清除

黏液（mucous）中的DNA¹。

除了治療疾病，DNase亦可當做疾病診斷的生物性指標（biomarker）。Yasuda等²學者指出，DNase I具有基因多型性（polymorphism）及蛋白質多型性，例如胃癌（gastric carcinoma）或大腸直腸癌（colorectal carcinoma）病人之DNase I表型2（phenotype 2）有較高的表現，因此DNase I表型2可做為診斷可能罹患胃癌或大腸直腸癌風險病人的生物性指標。研究證實，DNase I表型1-2及表型2在心肌梗塞（myocardial infarction）病人亦較高，因此急性心肌梗塞（acute myocardial infarction; AMI）病人血中的DNase I活性會迅速增加，若能即時偵測血中的DNase I活性，在診斷及治療AMI病人上都可給予極大幫助。臨床上利用single radical enzyme diffusion (SRED)/CAM DNase I assay method，可於30分鐘內檢測出血中的DNase I活性，是非常便利的方法。除了AMI病人，Yasuda亦證明心絞痛（vasospastic angina pectoris; VSAP）所導致之暫時性心肌缺血（transient myocardial ischemia），也會使血清（serum）中的DNase I活性增加，因此DNase I也可作為暫時性心肌缺血的生物性指標³。

作者於文中提到，有別於DNase I，DNase II不需要二價離子的輔助，但DNase II必須在酸性pH值下才具有功能，因此又被稱為酸性（acidic）DNase。DNase II的酵素活性可被細胞環境的pH值所調控。在正常的生理狀況下，細胞質、細胞核及內質網（endoplasmic reticulum）之pH值維持在7.2，而溶酶體（lysosome）之pH值約4.6-5.0⁴，因此如作者所述，DNase位於溶酶體，並可在其內發揮作用，分解外來的DNA。1998年之前，對於DNase II的研究主要著重在探討其結構與酵素

活性，然而後續有更多研究發現，DNase II 不僅只存在於溶酶體，且不同種類之DNase II 亦可能有不同的功能⁵。一篇2003年的文獻指出，人類DNase II 主要有三種：DNase II α 、DNase II β 及L-DNase II⁶。DNase II α 之功能如作者於文中所敘，為參與紅血球之分化（differentiation）及胸腺（thymocyte）成熟的過程。而DNase II β 之功能主要是清除眼淚水晶體內的DNA，以保持水晶體的透明度。DNase II β 亦稱為似第二型去氧核糖核酸酶（DNase II-like acid endonuclease; DLAD），其所適應之pH範圍比DNase II α 更廣，於酸性及中性pH值皆可作用。然而，其在人體內的組織器官中分佈較少，僅存在於水晶體及唾腺（salivary gland）中⁵。

除了作者提到的DNase II 及DLAD，Counis的實驗室於1998年從豬的脾臟中純化出另一種DNase II，稱為L-DNase II。L-DNase II是豬脾臟中所含的一種抗蛋白酶（anti-protease）—白血球彈性蛋白酶抑制物（leukocyte elastase inhibitor; LEI）經蛋白酶水解切割（proteolytic cleavage）後轉變而來，此時，其失去抗蛋白酶的能力，反而具有內切酶的功能，且同樣地在酸性pH值的環境中才具酵素活性，亦不需要二價離子的輔助。不同於DNase II α 及DNase II β 存在於溶酶體中，L-DNase II分布於細胞質中，平時以LEI的形式存在，當細胞內出現細胞凋亡誘導劑（apoptotic inducer）或細胞受損時，LEI會藉由不同蛋白酶（protease），如彈性蛋白酶（elastase）、組織蛋白酶G（cathepsin G）、蛋白酶3（proteinase 3）或AP24之催化，轉變成L-DNase II，以參與正在進行細胞凋亡（apoptosis）的凋亡細胞（apoptotic cells）之DNA分解⁵。因此，不同種類的DNase II 分佈於不同的組織及胞器，且具有不同的功能。

在生長發育的過程中，為了維持體內平衡（homeostasis），會進行計畫性細胞死亡（programmed cell death），即細胞凋亡。細胞凋

亡會使DNA分解，此步驟即藉由不同的DNase來執行。這些DNase中，常見的除了上述之L-DNase II 外，還有凋亡蛋白酶活化之去氧核糖核酸酶（caspase-activated deoxyribonuclease; CAD），作者已於文中詳細介紹其在細胞內的存在形式及活化方式。而CAD與L-DNase II 的差異在於，前者分解死亡中細胞（dying cells）的DNA，後者則是清除經吞噬作用（phagocytosis）之死亡中細胞的DNA⁷。

細胞凋亡過程中會活化的DNase不只CAD和DNase II 等，Fan等人的實驗室於2003年發現，顆粒溶解酶A活化之DNase（granzyme A-activated DNase; GAAD，或nm23-H1）亦參與細胞毒性T淋巴細胞（cytotoxic T lymphocytes; CTL）所誘導之細胞凋亡。GAAD平時與其抑制蛋白（inhibitor of GAAD; IGAAD，或SET）結合，形成複合體，存在於細胞質而不活化。當細胞接觸CTL後，CTL會釋放顆粒溶解酶（granzyme; Gzm），Gzm可直接穿透細胞膜或經由穿孔蛋白（perforin）通道進入細胞，GzmA與SET/GAAD複合體結合後會易位（translocate）至細胞核中，並將IGAAD切除，使GAAD活化而分解DNA，進而導致細胞凋亡，此過程並不需要凋亡蛋白酶（caspase）的活化^{8,9}。GzmB則是與凋亡蛋白酶-3（caspase-3）的作用相似，可將ICAD（inhibitor of CAD; ICAD）切除，使CAD活化。而GAAD與CAD水解的DNA產物不同，前者造成單股DNA的斷裂（single-stranded nicks），後者則可導致雙股DNA斷裂（double-strand breaks）^{8,9}。

另有一種特殊的DNase，稱為核酸內切酶G（endonuclease G; Endo G），存在於細胞的粒線體（mitochondrion）中。2001年，Wang等學者證實Endo G參與細胞凋亡之DNA水解作用¹⁰。在正常細胞中，Endo G存在於粒線體膜間腔（intermembrane space），以避免水解DNA。然而，當細胞接受到細胞凋亡的訊號傳遞（signal transduction）時，粒線體膜通透性

(permeability) 改變，此時Endo G可從粒線體釋放出來，與細胞凋亡誘導因子 (apoptosis-inducing factor; AIF) 一起易位至細胞核，將染色體 (chromosome) 水解成大片段的DNA¹¹。Endo G的作用環境為中性pH值，過程中需要鎂離子 (Mg²⁺) 的協助，這點與DNase I相同。此外，Endo G除了可水解單股及雙股DNA外，亦可水解RNA¹²。

不同種類之DNase可經由不同的路徑或在不同細胞、組織中活化，且功能稍有不同，但整體而言，DNases的作用是水解DNA，以調節生理狀態，顯示DNase存在之必要性與複雜性。本篇文章的作者詳細描述目前所知的主要幾種DNase，並闡述DNase構型的重要。閱讀此篇文章有利於讀者瞭解DNase的功能及重要性，並啟發DNase於臨床應用上之價值。

引用文獻

1. Puterman AS, Weinberg EG. rhDNase in acute asthma. *Pediatr Pulmonol* 1997;23:316-317.
2. Yasuda T, Kawai Y, Ueki K. Clinical application of DNase I, a genetic marker already used for forensic identification. *Legal Med* 2005;7:274-277.
3. Morikawa N, Kawai Y, Arakawa K, Kumamoto T, Miyamori I, Akao H, Kitayama M, Kajinami K, Lee JD, Takeshita H, Kominato Y, Yasuda T. Serum deoxyribonuclease I activity can be used as a novel marker of transient myocardial ischemia: results in vasospastic angina pectoris induced by provocation test. *Eur Heart J* 2007;28:2992-2997.
4. Demaurex N. pH homeostasis of cellular organelles. *News Physiol Sci* 2002;17:1-5.
5. Counis MF, Torriglia A. Acidic DNases and their interest among apoptotic endonucleases. *Biochimie* 2006;88:1851-1858.
6. Evans CJ, Aguilera RJ. DNase II: genes, enzymes and function. *Gene* 2003;322:1-5.
7. Nagata S, Nagase H, Kawane N, Fukuyama H. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ* 2003;10:108-116.
8. Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, Lieberman J. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* 2003;112:659-672.
9. Lieberman J, Fan Z. Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr Opin Immunol* 2003;15:553-559.
10. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001;412:95-99.
11. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999;397:441-446.
12. Widlak P, Garrard WT. Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J Cell Biochem* 2005;94:1078-1087.