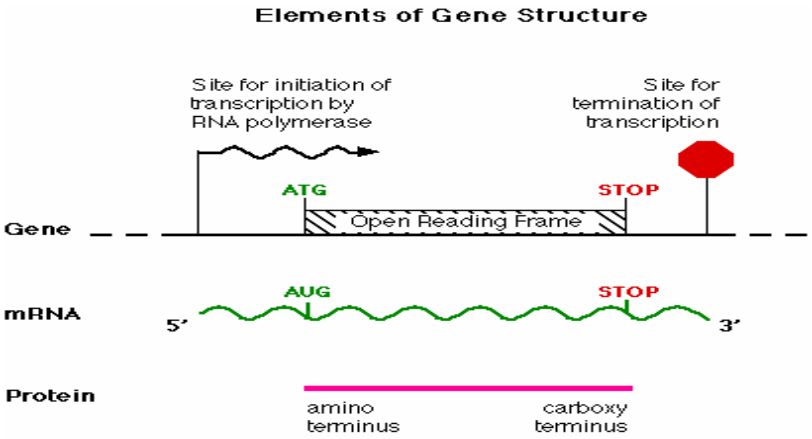
# บทที่ 4
# กระบวนการลอกรหัส
# (Transcription)

## คำนำ

กระบวนการลอกรหัส (transcription) คือกระบวนการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ (RNA synthesis) หรือเป็นการแสดงออกของยีน (คือส่วนหนึ่งของดีเอ็นเอที่ทำหน้าเก็บรหัสของโปรตีน 1 ชนิด) ที่มีการส่งข้อมูลพันธุกรรมจากดีเอ็นเอไปสู่อาร์เอ็นเอ ซึ่งเกิดในนิวเคลียสของสิ่งมีชีวิตในยูคารีโอต โดยอาศัยการทำงานของ DNA depended (directed) RNA polymerase หรือเรียกว่า RNA polymerase ที่ใช้สายใดสายหนึ่งของดีเอ็นเป็นแม่แบบ (DNA template หรือ antisense strand) เพื่อเป็นแม่แบบในการลอกรหัสหรือสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ ซึ่ง antisense strand ของแต่ละยีนไม่จำเป็นต้องอยู่บนดีเอ็นเอสายเดียวกัน กล่าวคือสายใดสายหนึ่งของดีเอ็นเออาจเป็นทั้ง antisense strand ของยีนหนึ่ง แต่เป็น sense strand ของอีกยีนหนึ่งก็ได้

ในกระบวนการลอกรหัสของยีนบนสายดีเอ็นเอ พบว่ายีนต้องมีองค์ประกอบที่สำคัญ 3 ตำแหน่ง คือ (1) ตำแหน่งของโปรโมเตอร์ (promoter) (2) ตำแหน่งของดีเอ็นเอที่กำหนดรหัสพันธุกรรมในการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ (RNA coding sequence) และ (3) ตำแหน่งของจุดสิ้นสุดการลอกรหัส (termination) นอกจาก 3 ตำแหน่งดังกล่าวแล้วยังมีลำดับเบสที่อยู่บริเวณด้านหน้าของตำแหน่งเบสที่ตัวแรกที่ใช้ในการสังเคราะห์ของอาร์เอ็นเอ (transcription initiation site หรือตำแหน่ง +1) ที่เรียกว่า upstream of gene หรือ upstream region และลำดับเบสที่อยู่บริเวณด้านหลังของตำแหน่งเบสที่ตัวแรก (+1) เรียกว่า downstream of gene หรือ downstream region **(รูปที่ 4.1)**




**รูปที่ 4.1** ตำแหน่งต่างๆ ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการลอกรหัสของยีนโครงสร้าง

(ที่มา : http://www.hort.purdue.edu/hort/courses/HORT250/pict.gif%20images/l4%20gene%20structure%20pict.gif, 2547)

## ขั้นตอนของกระบวนการลอกรหัส

สามารถแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอน คือ (1) กระบวนการเริ่มต้น (initiation) (2) กระบวนการขยายออก (elongation) และ (3) กระบวนการสิ้นสุด (termination) ซึ่งในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการลอกรหัสในโปรคารีโอต (prokaryote) และยูคารีโอต (eukaryote) นั้นอาจมีความแตกต่างกันบ้างในรายละเอียด ดังนี้

## กระบวนการลอกรหัสในโปรคารีโอต (Transcription in prokaryote)

กระบวนการลอกรหัสในโปรคารีโอตมีขั้นตอนที่สำคัญ 3 ขั้นตอน ดังนี้

**I. กระบวนการเริ่มต้น (Initiation)**

กระบวนการเริ่มต้นการลอกรหัสหรือการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ จะเกิดที่บริเวณตำแหน่งโปรโมเตอร์ของสายดีเอ็นเอแม่แบบ ซึ่งมีลำดับเบสที่จำเพาะที่ตำแหน่งที่เป็นตำแหน่งจดจำการเข้าเกาะของ RNA polymerase เพื่อทำให้เกิดกระบวนการเริ่มต้นการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ โดยมีปัจจัยที่จำเป็นในกระบวนการลอกรหัส คือ (1) RNA polymerase (2) promoter และ (3) antisense strand หรือ DNA template ดังมีรายละเอียด ดังนี้

**1. RNA polymerase**

เป็นโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 480 กิโลดาลตัน และมีจำนวนประมาณ 3,000-6,000 โมเลกุลต่อเซลล์ ซึ่ง RNA polymerase มีคุณสมบัติเป็น holoenzyme หรือ complete enzyme คือ เป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยหลายๆ ซับยูนิต แต่บางครั้งถึงจะมีไม่ครบทุกซับยูนิตก็สามารถทำงานได้ถ้ามีซับยูนิตที่สำคัญรวมกับเป็น core enzyme เช่น RNA polymerase ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอในบางยีนมี 5 ซับยูนิต หรืออาจมีมากกว่า 5 ซับยูนิตในบางยีน (**รูปที่ 4.2)** ดังนี้

1) $\beta'$ และ $\beta$ เป็นซับยูนิตที่มีขนาดใหญ่ (large subunit) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 156 และ 151 กิโลดาลตัน ตามลำดับ โดย $\beta$ subunit มีบทบาทในกระบวนการ elongation โดยมีการสร้างพันธะฟอสฟอไดเอสเทอร์ระหว่างนิวคลีโอไทด์ 2 ตัวที่อยู่ติดกัน (internucleotide linkage) ในสายอาร์เอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมา โดยมี $\beta'$ และ $\beta$ ซับยูนิต อย่างละ 1 โมเลกุลเข้ารวมเป็นองค์ประกอบของ RNA polymerase

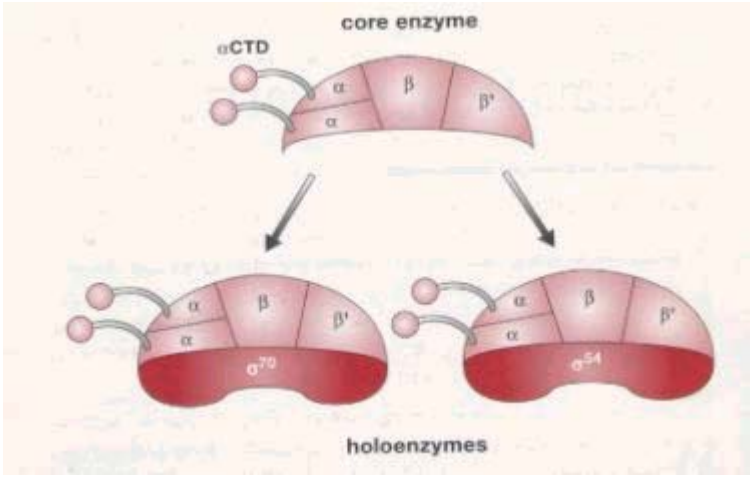
2) $\alpha$ เป็นซับยูนิตขนาดเล็ก (small subunit) มีโมเลกุลขนาดประมาณ 37 กิโลดาลตัน มีจำนวน 2 โมเลกุล เข้ารวมเป็นองค์ประกอบของ RNA polymerase

3) $\delta$ เป็นซับยูนิตมีโมเลกุลหลายขนาด คือ 28, 32, 38, 54 และ 70 กิโลดาลตัน ซึ่งมีคุณสมบัติ ดังนี้ **(ตารางที่ 4.1)**

**ตารางที่ 4.1** Sigma factors ชนิดต่างๆ ใน *E. coli*

| Sigma factors | Promotes recognized | Promoter consensus | |
|---|---|---|---|
| | | **-35 region** | **-10 region** |
| $\delta^{70}$ | most genes | TTGACA | TATAAT |
| $\delta^{32}$ | genes for motility and chemotixs | TCTCNCCCTTGAA | not known |
| $\delta^{28}$ | genes for motility and chemotixs | CTAAA | not known |
| $\delta^{38}$ | genes for stationary phase | not known | not known |
| $\delta^{54}$ | gene for nitrogen metabolism and other functions | -24 region CTGGNA | -12 region TTGCA |

RNA polymerase ประกอบด้วยโมเลกุลของ $\delta + \beta' + \beta + 2\,\alpha$ subunit รวมเป็น 5 ซับยูนิต เข้ามาสร้างเป็น complex ที่เรียกว่า core enzyme แต่เมื่อมี $\delta$ subunit เข้ามารวมด้วยจะกลายเป็น holoenzyme หรือ RNA polymerase **(รูปที่ 4.2)**



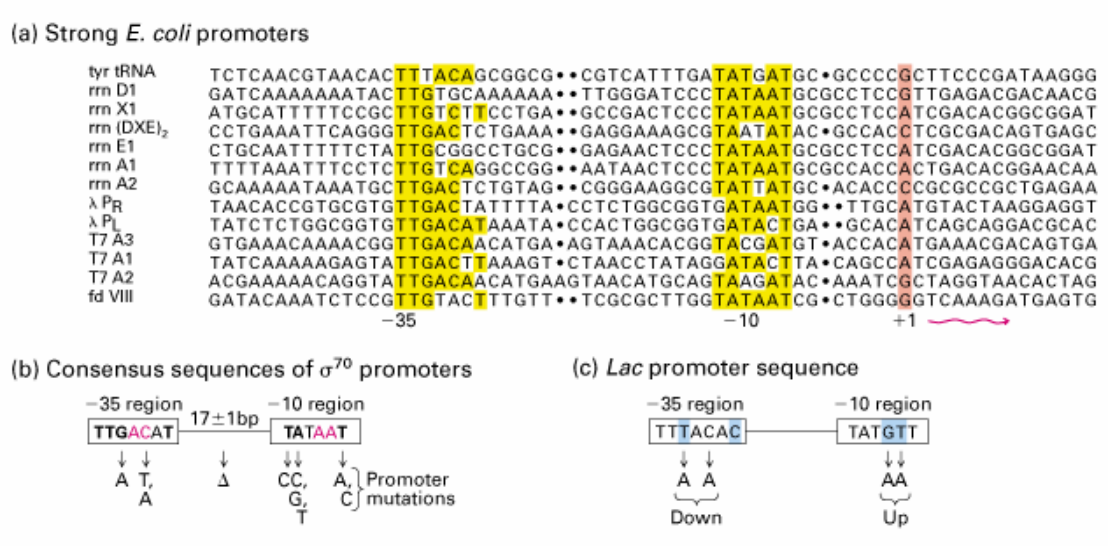

**รูปที่ 4.2** โครงสร้างของเอนไซม์ RNA polymerase

(ที่มา : http://bioweb.wku.edu/courses/biol566/Images/L1Fig1_1.jpg, 2547)

**2. Promoter**

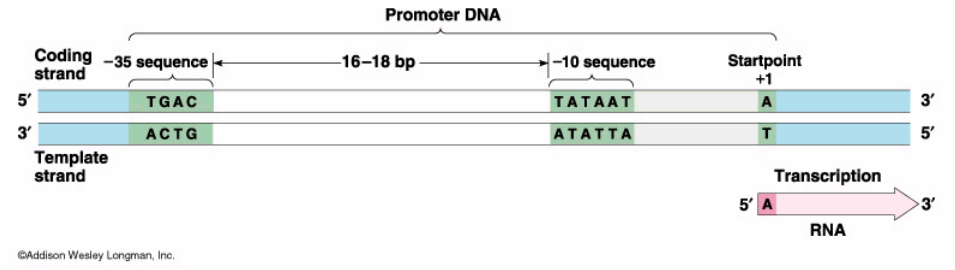
เป็นตำแน่งที่ประกอบด้วยลำดับเบสจำเพาะและอนุรักษ์ (conserved sequence) ตั้งแต่ 20-200 เบส ที่ตำแหน่ง upstream บนสายดีเอ็นเอแม่แบบ โดย promoter จะส่งเสริมให้มีการเริ่มต้นการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ promoter sequence ของโปรคารีโอตของแต่ละยีนโครงสร้างจะมีลำดับที่

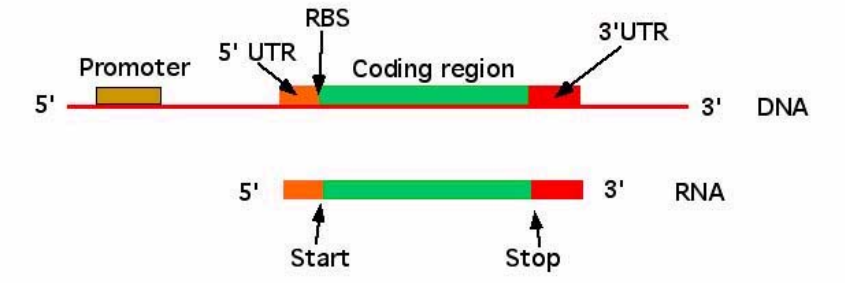
คล้ายกัน (**รูปที่ 4.3**) ซึ่งลำดับเบสภายใน promoter sequence ประกอบด้วยตำแหน่งที่สำคัญ คือ (1) ตำแหน่ง –35 sequence (2) ตำแหน่ง –10 sequence และ (3) ตำแหน่ง +1 **(รูปที่ 4.4)**




**รูปที่ 4.3** ลำดับเบสที่มีความจำเพาะของตำแหน่งโปรโมเตอร์ ในยีนต่างๆ ของ *E. coli*

(ที่มา : Benjamin, 2000)




**รูปที่ 4.4** ตำแหน่งที่สำคัญของ promoter ของโปรคารีโอต

(ที่มา : Davidson และ Sittman, 1993)

**2.1 ตำแหน่งเริ่มต้น** (initiation site หรือ start point) คือลำดับเบสตำแหน่งที่ –35 ที่บริเวณ upstream ประกอบด้วยเบสประมาณ 9-18 เบส ที่คาดว่าเป็นตำแหน่งเริ่มต้นโดยเป็นตำแหน่งจดจำการเข้าเกาะของ δ subunit **(รูปที่ 4.5)** จากนั้นชักนำให้ core enzyme เข้ามาเกาะรวมเป็น complete enzyme (holoenzyme หรือ RNA polymerase) ซึ่งครอบคุมโมเลกุลของดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่ง –45 ถึง +5

**2.2 Pribnow box** คือลำดับเบสตำแหน่งที่ –10 ที่มีลำดับเบสจำเพาะ 6 เบส อยู่ที่บริเวณ upstream ซึ่งประกอบด้วยเบสประมาณ 6 เบส คือ

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **5′** | **T** | **A** | **T** | **A** | **A** | **T** | **G** | **3′** |
| **3′** | **A** | **T** | **A** | **T** | **T** | **A** | **C** | **5′** |
| | -12 | -11 | -10 | -9 | -8 | -7 | -6 | |

โดยลำดับเบสที่ตำแหน่ง -10 ดังกล่าวพบว่ามีลำดับเหมือนกันในสิ่งมีชีวิตหลายๆ ชนิด แต่อาจมี 1 หรือ 2 เบส เท่านั้นที่แตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตที่ต่างกัน ดังนั้นจึงเรียกลำดับเบสนี้ว่า consensus sequence ซึ่งในโปรคารีโอต เรียกว่า prinow box ส่วนในยูคารีโอต เรียกว่า hogness box

Prinow box ที่ตำแหน่ง –10 พบว่า เบส T ที่ตำแหน่งที่ 6 (นับจาก 5′⟶3′ มีชื่อเรียกว่า conserved T ซึ่งหมายความว่า ถ้านำเอาลำดับเบสของโปรโมเตอร์จากยีนต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ มาเรียงเปรียบเทียบกันจะพบว่ามีตำแหน่ง conserved T เหมือนกัน (**รูปที่ 4.3**)

นอกจากนี้ยังคาดว่าตำแหน่ง prinow box มีบทบาทในการกำหนดทิศทางการลอกรหัสของ RNA polymerase ให้ดำเนินไปในทิศ 5′⟶ 3′ โดยบริเวณของ prinow box ของดีเอ็นเอเกลียวคู่ จะถูกเปิดออกเพื่อสร้างเป็น open promoter complex ซึ่งภายใน complex นี้จะเกิด local unwinding (melting) ของดีเอ็นเอเกลียวคู่เปิดออกได้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว โดยมีตำแหน่งตั้งแต่ –12 ถึง +2 ซึ่ง complex ดังกล่าวมีความมั่นคงแข็งแรงมาก และมี A-T rich ทำให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่เสียสภาพให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้ง่าย

**2.3 ตำแหน่ง +1** (mRNA start หรือ transcription start) เป็นตำแหน่งเริ่มต้นกระบวนการลอกรหัส พบว่าที่ตำแหน่ง +1 บนสายดีเอ็นเอแม่แบบ (antisense strand หรือ DNA template ที่มีทิศทางเป็น 3′⟶5′) เป็นเบสตัวแรก (+1) ที่ถูกลอกรหัสออกมาเป็นอาร์เอ็นเอ โดยทั่วไปเบสตัวแรกจะเป็นเบสที่อยู่ในกลุ่มของพิวรีน (purine) คือ A หรือ G บนสาย sense strand DNA; 5′⟶3′) แต่ส่วนใหญ่แล้วมักจะเป็น A ดังนั้นเบสตัวแรกที่จะถูกลอกรหัส คือ thymine (ที่อยู่บน antisense strand)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 5′ | …… | A | …… | 3′ | **sense strand** |
| 3′ | …… | **T** | …… | 5′ | **antisense strand** |

**รูปที่ 4.5** ตำแหน่งสำคัญของโปรโมเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการเข้าจับของ RNA polymerase

**3. antisense strand หรือ DNA template**

คือ ดีเอ็นเอสายเดี่ยว (ssDNA) หรือสายโพลีนิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) ที่ทำหน้าที่เป็นแม่แบบสำหรับกระบวนการการลอกรหัส โดยให้ RNA polymerase เข้าเกาะแล้วเริ่มต้นการลอกรหัสในทิศทาง $5' \rightarrow 3'$ ดังนั้น ssDNA template คือสายดีเอ็นเอที่มีทิศทาง $3' \rightarrow 5'$ ซึ่งสายใดสายหนึ่งของ DNA อาจเป็นทั้ง antisense strand ของยีนหนึ่ง แต่เป็น sense strand ของอีกยีนหนึ่งก็ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับตำแหน่ง promoter gene ซึ่งเป็นตัวกำหนดทิศทางการลอกรหัส

**สรุปขั้นตอนเริ่มต้นในกระบวนการลอกรหัส (Initiation of transcription)**

**1. $\sigma$ subunit** เข้าจับกับ promoter ที่ตำแหน่ง –35 sequence และครอบคุมถึง –10 sequence

**2. จากนั้น core enzyme** ($\beta$' + $\beta$ + 2 $\alpha$) เข้ามารวมกับ $\delta$ subunit กลายเป็น complete enzyme (หรือ holoenzyme หรือ RNA polymerase) ซึ่งครอบคุมเบสตำแหน่ง –45 ถึง +15 (รวมตำแหน่ง –35 sequence, –10 sequence และ +1 ของโปรโมเตอร์) **(รูปที่ 4.6)**

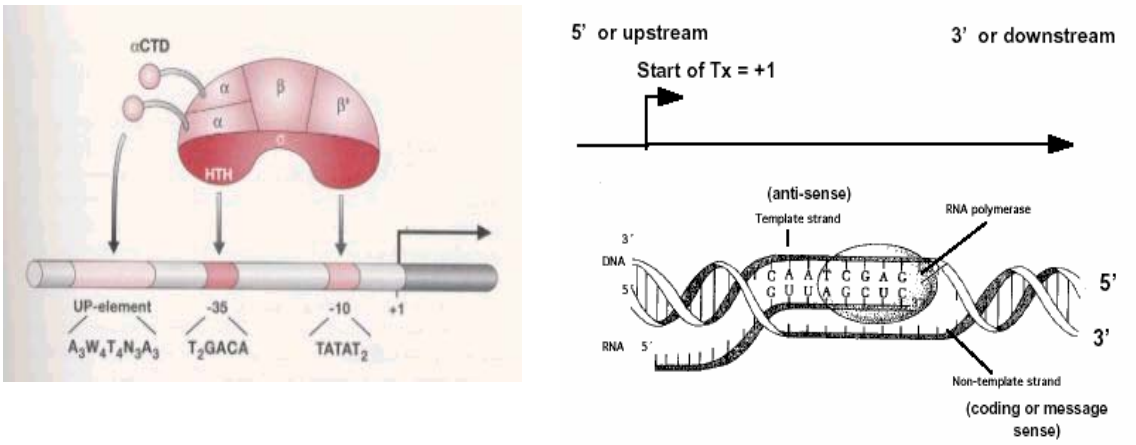
**3. เกิด open-promoter complex** ที่มั่นคงแข็งแรงมาก ซึ่งทำให้ เกิด local unwinding ขึ้นที่ตำแหน่ง prinow box (A-T rich) ถึงตำแหน่ง transcription start (+1)

**4. RNA polymerase** เริ่มกระบวนการลอกรหัส (RNA synthesis) โดย RNA polymerase มี ตำแหน่งเกาะของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide binding site) อยู่ 2 ตำแหน่ง คือ

**1) initiation site** ทำหน้าที่เข้าเกาะพิวรีนไทรฟอสเฟต (purine triphosphate) ได้แก่ ATP หรือ GTP (โดยทั่วไปเป็น ATP) ดังนั้น DNA template ตัวแรกที่ถูกลอกรหัส (สาย antisense strand) คือ ไทมีนไทรฟอสเฟต (thymine triphosphate; TTP) โดย RNA polymerase นำ ATP ซึ่งเป็นเบสคู่สมกับ TTP เข้ามาเกาะกันด้วยพันธะไฮโดรเจน

**2) elongation site** เป็นตำแหน่งที่ RNA polymerase นำ NTP ตัวใหม่ (ที่มี complementary base กับ DNA template) เข้ามาเกาะแล้วสร้างพันธะไฮโดรเจนขึ้น ขณะเดียวกันก็เกิดการเชื่อมต่อระหว่างนิวคลีโอไทด์ตัวที่หนึ่งกับตัวที่สองที่อยู่ติดกันด้วยพันธะฟอสฟอไดเอสเทอร์ จากนั้นเบสตัวแรกจึงถูกปล่อยออกจากสายของ DNA template ทำให้ตำแหน่ง initiation site ว่างหรือไม่มีนิวคลีโอไทด์เกาะอยู่ แต่ที่ตำแหน่ง elongation site มีนิวคลีโอไทด์เกาะอยู่ 2 ตัว (dinucleotide)

**5. RNA polymerase จะเคลื่อนตัว**ไปตามความยาวของสาย DNA ทางด้าน downstream ทำให้ตำแหน่ง elongation site ว่าง เนื่องจาก dinucleotide เลื่อนไปอยู่ที่ตำแหน่ง initiation site จากนั้น RNA polymerase จะนำ NTP ตัวใหม่เข้ามาเชื่อมต่อที่ปลาย $3'$OH ของอาร์เอ็นเอ ทำให้ได้สายอาร์เอ็นเอที่มีขนาดยาวขึ้น




**รูปที่ 4.6** ขั้นตอนเริ่มต้นในกระบวนการลอกรหัส

(ที่มา : http://bioweb.wku.edu/courses/biol566/Images/L1Fig1_5.jpg และ

: http://163.238.8.180/~davis/Bio_327/lectures/Transcription/Tx1.gif, 2547)

**II. ขั้นตอนการขยายยาวของสายอาร์เอ็นเอ (Elongation of RNA chain)**

คือกระบวนการสังเคราะห์สายอาร์เอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ ร่วมกับการทำงานของ RNA polymerase ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. จากการเคลื่อนตัวของ RNA polymerase ดังกล่าวทำให้ elongation site ของ RNA polymerase ว่าง จึงมีการนำไรโบนิวคลีโอไทด์ไทรฟอสเฟตตัวใหม่ที่มีเบสคู่สมกับสายดีเอ็นเอแม่แบบเข้ามาเชื่อต่อกับปลาย 3′OH ของสายอาร์เอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมา

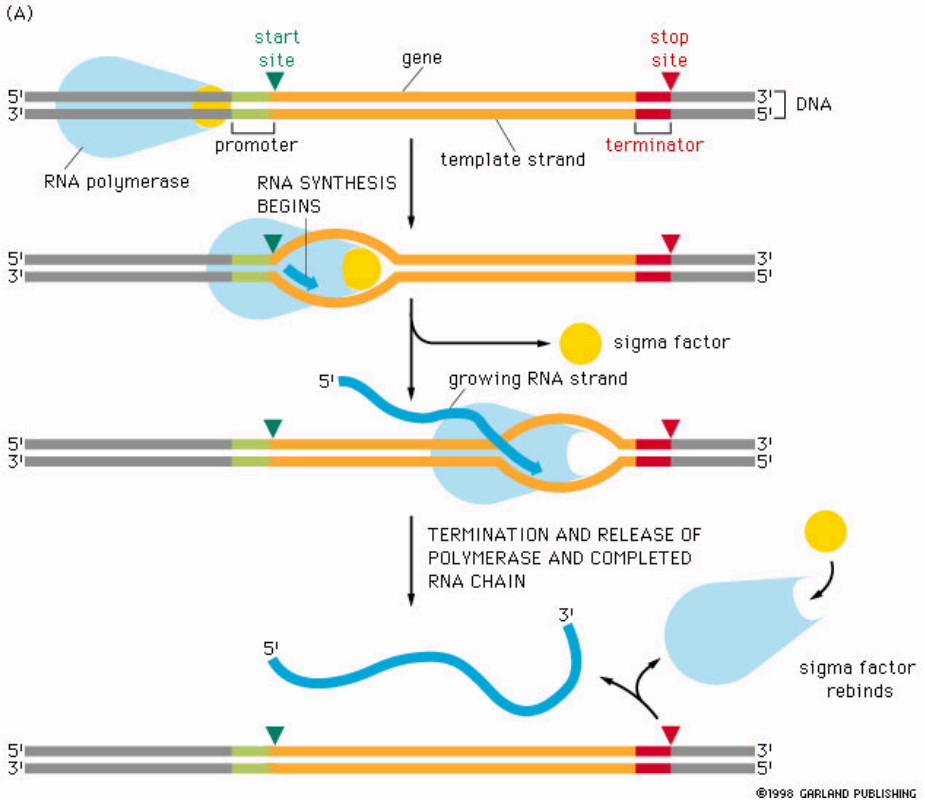
2.เกิดการเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของไรโบนิวคลีโอไทด์เก่ากับไรโบนิวคลีโอไทด์ใหม่ด้วยพันธะฟอสฟอไดเอสเทอร์ ทำให้ได้สายอาร์เอ็นเอยาวขึ้นประมาณ 8-12 ไรโบนิวคลีโอไทด์

3. จากนั้น sigma factor จึงแยกตัวออกจาก RNA polymerase เหลือเพียง core enzyme ที่ยังทำหน้าที่สังเคราะห์อาร์เอ็นเอต่อไป ซึ่งตอนนี้ดีเอ็นเอเกลียวคู่จะมีจุดเปิดออกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวเพียง 2-3 เบสเท่านั้น

4. เมื่อ core enzyme ทำหน้าที่นำไรโบนิวคลีโอไทด์มาตัวใหม่เข้ามาเชื่อมต่อกับอาร์เอ็นเอเรียบร้อยแล้ว core enzyme ก็จะเคลื่อนที่ผ่านบริเวณดังกล่าว open double helix ก็จะปิดเป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่เหมือนเดิม พร้อมกันนั้นสายอาร์เอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นก็จะถูกปล่อยให้หลุดจาก template strand DNA แต่ยังมีประมาณ 2-3 เบสที่ยังเกาะอยู่กับ DNA template ในระหว่างกระบวนการ elongation **(รูปที่ 4.7)**

มีบางรายงานกล่าวว่า open-promoter complex (transcription bubble) ครอบคลุมเบสจำนวน 17 เบส และภายใน open-promoter complex ดังกล่าวพบสายผสมของอาร์เอ็นเอกับดีเอ็นเอ (hybrid RNA-DNA) ยาวประมาณ 17 เบสด้วย

ปฏิกิริยาการขยายยาวของการะบวนการลอกรหัสเกิดในอัตราที่ไม่คงที่ เฉลี่ยประมาณ 30-50 เบสต่อวินาที โดยเฉพาะบริเวณตำแหน่งสิ้นสุดการลอกรหัส (termination) ที่มีลำดับเบสเป็น G-C rich (ประมาณ 8 เบส) พบว่า อัตราการลอกรหัสลดลงอย่างมากหรือหยุดลง (pause) โดยมีการทดลองที่ยืนยัน คือจากการศึกษายีนมิวเตชัน (gene mutation) ที่เกิด transition (คือการที่เบสตัวหนึ่งถูกแทนที่ด้วยเบสอีกตัวหนึ่งที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน) เช่น G≡C เกิด transition เปลี่ยนไปเป็น A=T ทำให้ไม่มีกระบวนการสิ้นสุดการลอกรหัสขึ้น (อาจเนื่องจากมีความคงตัวของพันธะไฮโดรเจนต่ำลง)




**รูปที่ 4.7** การเชื่อมต่อระหว่างไรโบนิวคลีโอไทด์ไทรฟอสเฟต 2 โมเลกุลที่อยู่ติดกันของสายอาร์เอ็นเอ ด้วยพันธะฟอสฟอไดเอสเทอร์

(ที่มา : http://www.csu.edu.au/faculty/health/biomed/subjects/molbol/images/7_9.jpg, 2547)

**III. กระบวนการสิ้นสุดการลอกรหัส (Termination of transcription)**

กระบวนการสิ้นสุดการลอกรหัสจะเกิดบริเวณตำแหน่งที่อยู่ถัดจากยีนโครงสร้าง ซึ่งมีลำดับเบสจำเพาะที่ทำหน้าที่เป็นสัญญาณแสดงถึงการสิ้นสุดการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ และมีการ

ปลดปล่อยโมเลกุลของ RNA polymerase ออกจากสายดีเอ็นเอแม่แบบ กระบวนการสิ้นสุดการลอกรหัสในโปรคารีโอตมี 2 แบบ คือ

**1. การควบคุมแบบ Termination base sequence หรือ Rho independent termination**

การสิ้นสุดการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอโดยอาศัยลำดับเบสจำเพาะที่อยู่บนดีเอ็นเอแม่แบบที่เรียกว่า termination base sequence มีประมาณ 16-20 เบส ซึ่งมีทำหน้าที่เป็นสัญญาณ (signal) เตือนให้ RNA polymerase หลุดออกจากสายดีเอ็นเอแม่แบบ termination base sequence มีส่วนที่สำคัญอยู่ 3 ตำแหน่ง **(รูปที่ 4.8)** คือ

**1) Inverted repeat base sequence หรือ palindrome sequence หรือ dyad sequence**

เป็นตำแหน่งลำดับเบสจำเพาะที่อยู่บนดีเอ็นเอแม่แบบที่เรียกว่า termination base sequence เมื่อ RNA polymerase ลอกรหัสผ่านจุดนี้จะเกิดการจับคู่กันของเบสที่อยู่ภายในอาร์เอ็นเอเดียวกันที่บริเวณปลาย 3′OH (intrastrand base pairing) เกิดเป็นโครงสร้างคล้ายปิ่นปักผม (hairpin loop หรือ stem and loop configulation)

**2) มีลำดับเบสที่เป็น G-C rich บริเวณส่วนของปลาย loop หรืออาจอยู่ภายใน stem**

G-C rich ทำให้ stem and loop ของอาร์เอ็นเอมั่นคงแข็งแรง ดังนั้นเมื่อ RNA polymerase เคลื่อนที่ผ่าน stem and loop ของอาร์เอ็นเอ ขณะเดียว RNA polymerase ที่บนบริเวณตำแหน่ง terminator ของสายดีเอ็นเอก็มีการเคลื่อนตัวช้าลงหรือหยุดเคลื่อนตัวชั่วคราว เนื่องจากต้องใช้พลังงานมากในการทำลายพันธะไฮโดรเจนของ G≡C ซึ่งเหตุการณ์ดังกล่าวอาจทำหน้าที่เป็นสัญญาณ (signal) เตือนให้ RNA polymerase หลุดออกจากสายดีเอ็นเอแม่แบบ (เปรียบเสมือนว่า stem and loop ที่เกิดขึ้นบนสายอาร์เอ็นเอนั้นไปกระตุกหรือกระชากให้ RNA polymerase หลุดออกจากสายดีเอ็นเอแม่แบบ)

**3) Oligouracil (poly U) ที่ปลาย 3′ของสายอาร์เอ็นเอ**

บริเวณปลาย 3′OH terminus ของอาร์เอ็นเอมี oligouracil (poly U) ประมาณ 5-10 เบส (บางครั้งอาจไม่มีส่วนนี้ก็ได้)

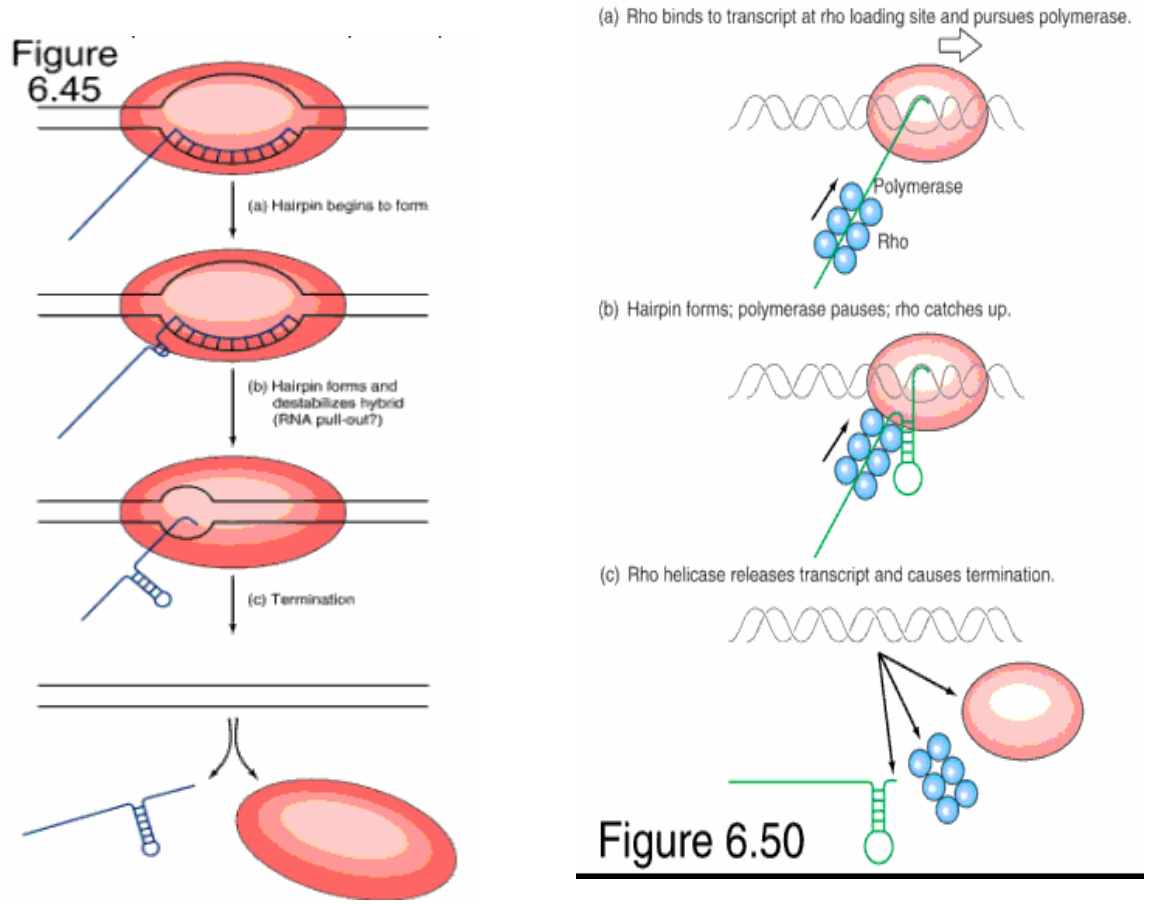
**2. การควบคุมแบบ Terminal protein (rho-protein; ρ)**

การสิ้นสุดการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ โดยอาศัย terminal protein (rho-protein; ρ) เมื่อ RNA polymerase ลอกรหัสมาถึงบริเวณ DNA specific base sequence จะมี ρ ซึ่งเป็น oligomeric protein ขนาดประมาณ 276,000 ดาลตัน เข้ามาจับกับเส้นอาร์เอ็นเออย่างแข็งแรงโดยอาศัยพลังงานจากการทำงานของ ATPase สำหรับกิจกรรมของ ρ ยังเข้าใจน้อยมาก แต่คาดว่าเกี่ยวข้องกับกลไกหลายอย่าง เช่น

1) เพื่อให้ RNA polymerase หยุดการทำงาน หรือหลุดออกจากดีเอ็นเอแม่แบบ ซึ่งกิจกรรมของ ρ อาจถูกยับยั้งโดยตัวยับยั้ง (inhibitor) ที่เรียกว่า antiterminator

2) ρ เข้าเกาะกับสายอาร์เอ็นเอที่ปลาย $5'PO_4$ แล้วเคลื่อนตัวไปตามความยาวของสายอาร์เอ็นเอที่กำลังยาวขึ้นเรื่อยๆ (growthing strand) และขณะที่ RNA polymerase หยุดหรือชะลอการเคลื่อนที่เนื่องจากสายอาร์เอ็นเอเกิด stem and loop ส่งผลทำให้ ρ เข้าเกาะหรือชนกับ RNA polymerase จากนั้น core enzyme หลุดจากสายดีเอ็นเอแม่แบบ (**รูปที่ 4.8**)

สรุป Rho-protein (ρ) มี 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งแรกเข้าเกาะกับ ATP แล้วเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสได้พลังงานออกมา ส่วนตำแหน่งที่สองเข้าเกาะกับสายอาร์เอ็นเอ เพื่อกระตุกให้สายอาร์เอ็นเอแยกตัวจาก RNA-DNA hybrid ทำให้อาร์เอ็นเอหลุดเป็นอิสระจากดีเอ็นเอ




**รูปที่ 4.8** การสิ้นสุดการลอกรหัสของการทำงานของ Rho-protein (ρ) และ ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอแม่แบบ และลำดับเบสบนสายอาร์เอ็นเอ (ที่มา : Benjamin, 2000)

## กระบวนการลอกรหัสในยูคารีโอต (Transcription in eukaryote)

กระบวนการลอกรหัสในยูคารีโอตคล้ายคลึงกับในโปรคารีโอต แต่มีความแตกต่างกันบ้าง คือในขั้นตอนเริ่มต้นการลอกรหัสของยูคารีโอตมีความซับซ้อนกว่าโปรคารีโอต และในขั้นตอนการสิ้นสุดกระบวนการลอกรหัสของยูคารีโอตไม่เกี่ยวข้องกับโครงสร้าง stem and loop โดยมีรายละเอียดในแต่ละขั้นตอนดังนี้

**I. การเริ่มต้นกระบวนการลอกรหัส**

การเริ่มต้นกระบวนการลอกรหัสในยูคารีโอต พบว่า โปรโมเตอร์มีความหลากหลาย และ RNA polymerase มีความซับซ้อนมากกว่าในโปรคารีโอต ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับกลุ่มของยีนที่พบในยูคารีโอต ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ ยีนกลุ่มที่ 1 (class I) คือยีนที่เกี่ยวข้องกับ large rRNA ได้แก่ 18S rRNA, 28S rRNA และ 5.8 S rRNA ในนิวคลีโอลัส ยีนกลุ่มที่ 2 (class II) คือ ยีนทั้งหมดที่เก็บรหัส (coding sequence) ไว้สำหรับการสังเคราะห์โปรตีน และ small nuclear RNA (snRNA) บางชนิด คือ อาร์เอ็นเอที่มีความยาวประมาณ 100-200 ไรโบนิวคลีโอไทด์ ซึ่งทำหน้าที่ในการสร้างไรโบนิวคลีโอโปรตีนขนาดเล็ก (snRNPs หรือ small nuclear ribonucleoproteins) และ ยีนกลุ่มที่ 3 (class III) เป็นกลุ่มยีนขนาดเล็กที่มียีนส่วนใหญ่เรียงอยู่เป็นกลุ่ม (cluster) และมีหลายชุด (copy) เช่น snRNA บางชนิด tRNA และ 5S rRNA เช่น ในรังไข่ของกบ พบว่ามี 5S gene มากกว่า 20,000 ชุด ดังนั้นชนิดของโปรโมเตอร์และชนิดของ RNA polymerase จึงต้องมีความจำเพาะกับยีนในกลุ่มต่างๆ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

**RNA polymerase ในยูคารีโอต มี 3 ชนิด** คือ

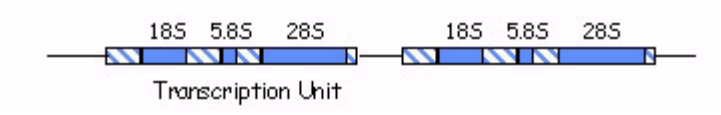
**1**. **RNA polymerase I** ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการลอกรหัสของยีนกลุ่มที่ 1 (class I) ซึ่งเป็นยีนที่มีการสังเคราะห์ขึ้นเป็นจำนวนมากในเซลล์ของยูคารีโอต ได้แก่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับ large rRNA ได้แก่ 18S rRNA, 28S rRNA และ 5.8 S rRNAในนิวคลีโอลัส โดย RNA polymerase I มีคุณสมบัติ (**ภาพที่ 12.9**) ดังนี้

1) จดจำตำแหน่งโปรโมเตอร์ คล้าย RNA polymerase II แต่ไม่มีส่วนของ TATA, GC หรือ CCAAT box

2) มี 5′ flanking regions หรือ enhancher ที่บริเวณ upstream ของโปรโมเตอร์

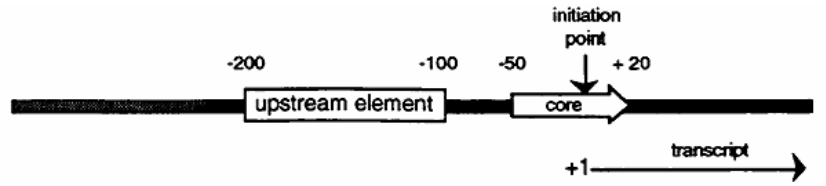
3) มี G-C rich ที่ตำแหน่งของโปรโมเตอร์ โดยมี 2 ส่วนที่สำคัญ คือ (1) core sequences ที่ตำแหน่ง –45 ถึง +20 ใกล้จุดกับเริ่มต้นการลอกรหัส และ (2) upstream control element (UCE) ที่ตำแหน่ง –156 ถึง –107

4) การทำงานของ RNA polymerase I ต้องการ transcription factors (TFs) หรือ class I factors โดยมี 2 ปัจจัย คือ (1) SL1 มีหน้าที่จดจำตำแหน่ง TATA box binding protein ; TBP ซึ่ง

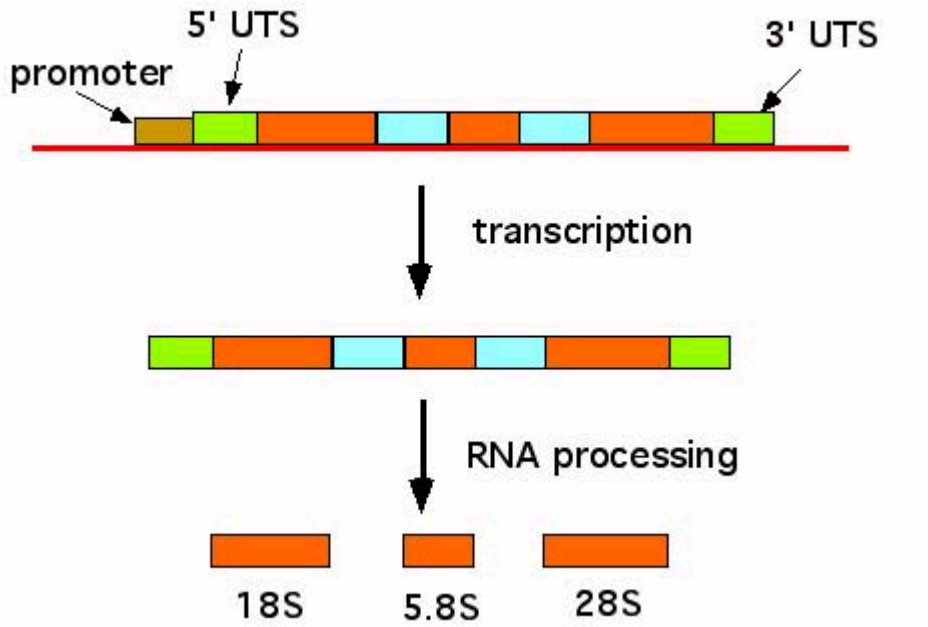



ประกอบด้วย 3 TAFs (หน้าที่คล้ายกับ TFIID ของ RNA polymerase II) และ (2) upstream binding factor (UBF) ทำหน้าที่เข้าเกาะกับ UCE

**ภาพที่ 12.9** แสดงตำแหน่งโปรโมเตอร์ของ rRNA ของมนุษย์ ที่มีความสำคัญต่อการลอกรหัส โดย RNA polymerase I




(ที่มา : ://images.google.co.th/images?q=transcription+&hl=th&lr=&ie=UTF-8&start=320&sa=N, 2547)




**2. RNA polymerase II** ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการลอกรหัสของยีนกลุ่มที่ 2 (class II) คือ ยีนทั้งหมดที่เก็บรหัส (coding sequence) ไว้สำหรับโปรตีน และ small nuclear RNA (snRNA) บางชนิด คือ อาร์เอ็นเอที่มีความยาวประมาณ 100-200 ไรโบนิวคลีโอไทด์ ซึ่งทำหน้าที่

ในการสร้างไรโบนิวคลีโอโปรตีนขนาดเล็ก (snRNPs หรือ small nuclear ribonucleoproteins โดย RNA polymerase II มีคุณสมบัติ (**ภาพที่ 12.10**) ดังนี้

1) เกี่ยวข้องกับกระบวนการลอกรหัสของยีนหลายยีน เช่น mRNA และ snRNA บางชนิด

2) ตำแหน่งจดจำของโปรโมเตอร์ของยีนต่างๆ ได้แก่

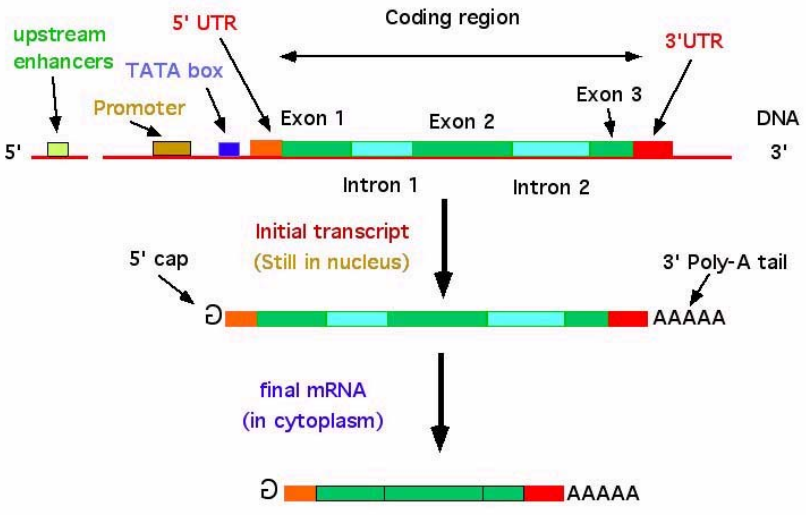
2.1) TATA box ที่ตำแหน่ง –30 เป็น A-T rich ที่มี consensus sequence คือ 5′TATAAA3′ (A's ตำแหน่งหลังอาจมี 5-7 ตัว) นอกจากนี้พบว่าในบางยีนอาจมี C's หรือ G's แทนตำแหน่ง TATA box ได้ เช่น rabbit β -globin gene เป็น CATA box

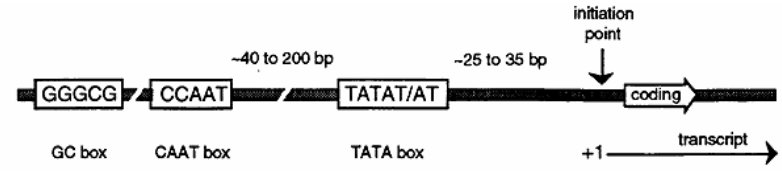
2.2) CCAAT box (cat box) ที่ตำแหน่ง –75 มี consensus sequence คือ 5′GGCCAATCT3′

2.3) โปรโมเตอร์ของสิ่งมีชีวิตบางชนิด เช่น SV40 พบว่าบริเวณ upstream element ในส่วนของ CCAAT box อาจถูกแทนที่ด้วย GC คือมีประมาณ 21 เบส ซึ่งเรียงซ้ำๆ กัน 3 ครั้ง ระหว่างตำแหน่ง –40 ถึง –103 upstream ที่อยู่ส่วนหน้าของ TATA box (**ภาพที่ 4.12**)

2.4) หลายยีนในยูคารีโอต พบว่ามี flanking regions หรือ enhancher อยู่บริเวณ upstream หรืออยู่ภายในยีน ซึ่งมีความสำคัญต่อกระบวนการลอกรหัส

2.5) การทำงานของ RNA polymerase II ต้องการ transcription factors (TFs) หรือ class II factors คือมีอย่างน้อย 6 TFs ได้แก่ TFIIA, B, C, D, E, F, and H โดย TFIID มีหลาย subunit ที่เรียกว่า TBP-association factors (TAFs; prounced "taffs") preinitation complex = 6 factors + RNA polymerase II






**ภาพที่ 4.10** โปรโมเตอร์ของยีนในยูคารีโอต ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ RNA polymerase II (ที่มา : Russell, 1996)

**3. RNA polymerase III**

ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการลอกรหัสของยีนกลุ่มที่ 3 (class III) เป็นกลุ่มยีนขนาดเล็กที่มียีนส่วนใหญ่เรียงอยู่เป็นกลุ่ม (cluster) และมีหลายชุด (copy) เช่น snRNA บางชนิด tRNA และ 5S rRNA ซึ่งในรังไข่ของกบ พบว่ามี 5S gene มากกว่า 20,000 ชุด โดย RNA polymerase III มีคุณสมบัติ ดังนี้

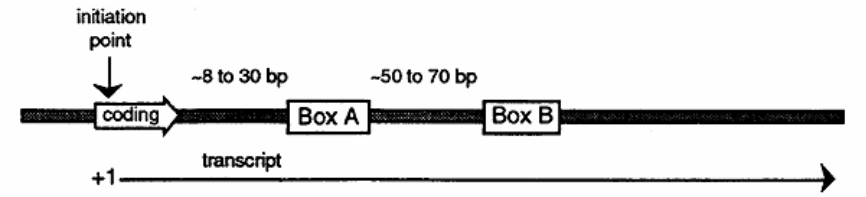
1) ทำหน้าที่ลอกรหัสยีนที่มีขนาดลำดับเบสสั้นๆ เช่น 5S rRNA และ t RNA

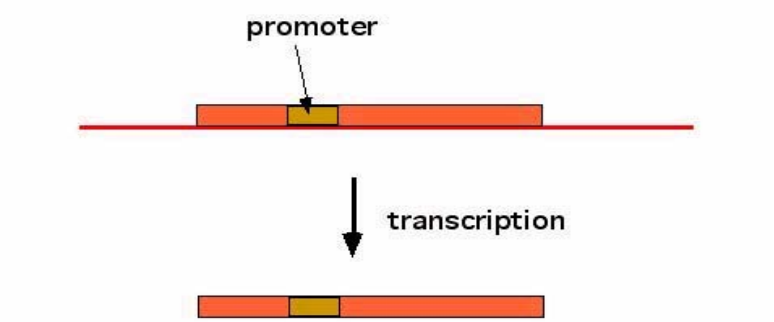
2) ตำแหน่งโปรโมเตอร์ที่อยู่ภายในยีนโครงสร้างประกอบด้วยส่วนที่สำคัญคือ

(1) internal control regions (ICRs) ซึ่งอยู่ภายในยีน เช่น 5S rRNA gene มี ICRs 3 ส่วน (ได้แก่ box A และ B เป็น major elements และมี short sequence ตรงกลางที่เรียกว่า intermediate element) อยู่ระหว่างตำแหน่งที่ +50 และ +85 ของ transcription region ส่วน t RNA gene มี ICRs 2 ส่วน **(รูปที่ 4.11)**

(2) บางครั้งพบว่ามีส่วนของ 5′ flanking region ที่มี TATA box (แต่ไม่มี ICR) เช่น 7 SL RNA gene

3) การทำงานของ RNA polymerase III ต้องการ transcription factors (TFs) หรือ class III factors โดยมี 2 factors คือ (1) TFIIIA สำหรับ 5S rRNA gene และ (2) TFIIIC สำหรับ tRNA gene โดยการทำงานของ RNA polymerase III ต้องอาศัย TFIIIB ซึ่งทำหน้าที่เป็น initiation factor



**รูปที่ 4.11** ตัวอย่างโปรโมเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ RNA polymerase III

**ตัวอย่างขั้นตอนการเริ่มต้นกระบวนการลอกรหัสของยีนในกลุ่มที่ 2 ของยูคารีโอต**

ขั้นตอนการเริ่มต้นกระบวนการลอกรหัสของยีนในกลุ่มที่ 2 โดยอาศัยการทำงานของ RNA polymerase II และ Transcription factor ต่างๆ ของยีนกลุ่มที่ 2 (TFII) มีขั้นตอน (**รูปที่ 4.12**) ดังนี้

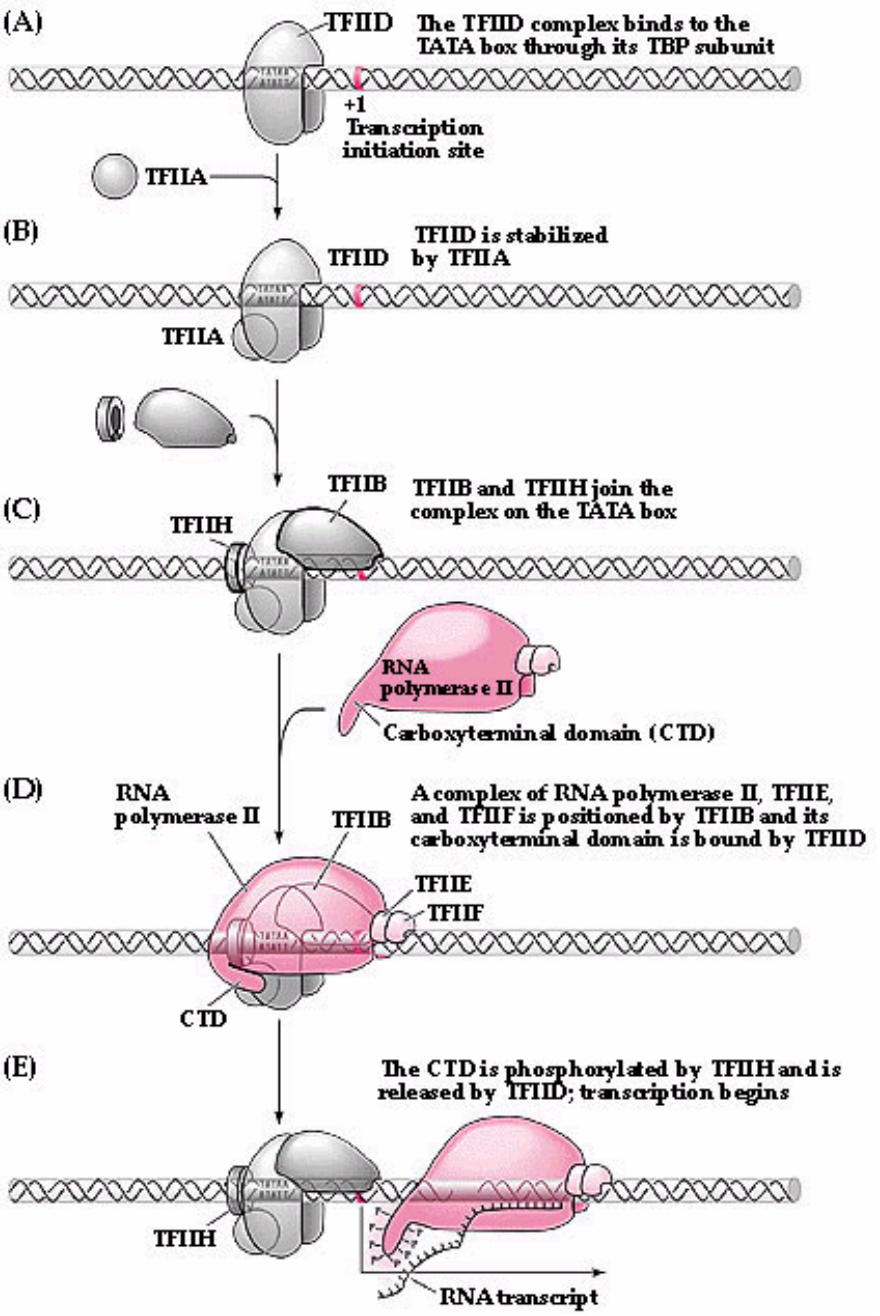
1. TFIID (หรือ TATA factor) เข้าเกาะกับโปรโมเตอร์ที่ตำแหน่ง TATA box กลายเป็น initial committed complex เป็นการทำงานอย่างอิสระไม่ขึ้นกับการทำงานของ RNA polymerase II

TFIID = the TATA box-binding protein (TBP) + TBP-associated factors (TAFs)

2. TFIIA เข้าเกาะกับ initial committed complex เพื่อให้ TFIID มีความเสถียรภาพสูงขึ้น

3. TFIIB และ TFIIH เข้าเกาะกับตำแหน่ง binding site ของ initial committed complex เพื่อให้มีความมั่นคงยิ่งขึ้น โดย TFIIB กระตุ้นให้ TFIIE และ TFIIF รวมกับ RNA polymerase II (ซึ่งบริเวณตรงปลาย carboxyterminal domail (CTD) ของ RNA polymerase II ที่เกาะอยู่กับ TFIID) แล้วเข้าจับกับ initial committed complex เกิดเป็น minimal transcription initiation complex

3. จากนั้น TFIIH เข้าเกาะ กลายเป็นโครงสร้าง transcription initiation complex ซึ่งพร้อมที่จะเริ่มต้นกระบวนการลอกรหัส โดย TFIIH ทำหน้าที่ปลอดปล่อย TFIID ให้หลุดจาก RNA polymerase II ขณะเดียวกัน TFIIH ก็ทำหน้าที่ช่วยให้ ปลาย carboxyterminal domail (CTD) ของ RNA polymerase II เกิดกระบวนการ phosphorylation เพื่อที่ RNA polymerase II จะได้ทำหน้าที่เริ่มต้นกระบวนการลอกรหัส




**รูปที่ 4.12** ขั้นตอนการเริ่มต้นกระบวนการลอกรหัสที่เกี่ยวข้องกับ transcription factor

และ promoter ของ RNA polymerase II

(ที่มา : http://images.google.co.th/images?q=eukaryotic+transcription&hl=th&lr=&ie=UTF-8&start=40&sa=N, 2547)

**II. ขั้นตอนการขยายยาวออกของสายอาร์เอ็นเอ (Elongation of RNA chain)**

กระบวนการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอในขั้นตอนการขยายยาวของสายอาร์เอ็นเอมีเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นคล้ายคลึงกับในโปรคารีโอต คือ

**1. RNA polymerase II** เริ่มกระบวนการลอกรหัสที่ตำแหน่ง +1 แล้วเคลื่อนที่ไปทาง downstream ของยีนขณะเดียวกันก็ปลดปล่อย transcription factor ออกจาก complete transcription initiation complex เหลือเพียง TFIID ที่ยังคงจับอยู่กับ TATA box เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับ RNA polymerase II โมเลกุลอื่นๆ ที่จะเข้ามา transcription ต่อในกรณีที่เซลล์ต้องการ RNA product มาก

**2. Elongation** ขณะเดียวกัน TFIIS เข้ารวมกับ RNA polymerase II เพื่อช่วยในการ elongation ต่อไป โดย RNA polymerase II จะนำนิวคลีโอไทด์ตัวใหม่เข้ามาต่อที่ปลาย 3′OH ของสายอาร์เอ็นเอ

**3. RNA polymerase II** จะเคลื่อนตัวไปทางด้าน dowstream ตามความยาวของสายดีเอ็นเอแม่แบบ เพื่อทำการสังเคราะห์ให้ได้สายอาร์เอ็นเอที่ยาวขึ้น

**III. ขั้นตอนการสิ้นสุดการลอกรหัส (Termination of transcription)**

ปัจจุบันยังเข้าใจและมีการศึกษาน้อยมาก คือ มีการศึกษาเพียงเฉพาะบางยีนเท่านั้น ซึ่งอาจพอสรุปกระบวนการสิ้นการลอกรหัส ได้ดังนี้

**1. กระบวนการสิ้นการลอกรหัสของ RNA polymerase I**

1.1 มีลำดับเบสหลายร้อยเบสที่อยู่เหนือจุดสิ้นสุดของลำดับเบสในยีน 28S rRNA

1.2 พบช่องว่าง (spacer หรือ intron) บริเวณส่วนปลายของยีน

**2. กระบวนการสิ้นการลอกรหัสของ RNA polymerase II**

2.1 ยังไม่ทราบแน่ชัด เนื่องจากปลาย 3′OH ของอาร์เอ็นเอถูกขจัดออกไปอย่างรวดเร็ว

2.2 บริเวณส่วนปลาย (tailing region) ของยีนมีลำดับเบสจำนวนมากประมาณ 1,000-2,000 เบส ซึ่งอาจหมายถึงว่าจริงๆ แล้วไม่มีจุดสิ้นสุดการกระบวนการลอกรหัส

2.3 อาจเกิด complex โดยมี termination factor เข้ามาเกี่ยวข้องทำให้ RNA polymerase II หลุด จาก DNA

**3. กระบวนการสิ้นการลอกรหัสของ RNA polymerase III**

มีส่วนที่เป็นสัญญาณ (signal) ให้สิ้นสุดการสังเคราะห์สายอาร์เอ็นเอ คือส่วนปลายสุดของของสายดีเอ็นเอที่ไม่ได้ใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (sensestrand strand) มีเบสไทมีน (T) 3 หรือมากกว่า 3 เบส และบริเวณปลาย 3′OH มีลำดับเบสที่เป็น G-C rich