國立交通大學

資訊科學與工程研究所

碩 士 論 文

利 用 圖 形 表 示 的 基 因 規 劃 法
找 尋 核 醣 核 酸 的 共 同 結 構 元

Prediction of RNA common structural motifs by
Genetic Programming with graphical expressions

研 究 生：許登貴
指導教授：胡毓志 博士

中 華 民 國 九 十 五 年 六 月

利用圖形表示的基因規劃法找尋核醣核酸的共同結構元

Prediction of RNA common structural motifs by Genetic Programming with graphical expressions

研 究 生：許登貴　　Student：Deng-Guei Shiu

指導教授：胡毓志　　Advisor：Yuh-Jyh Hu

國 立 交 通 大 學

資 訊 科 學 與 工 程 研 究 所

碩 士 論 文

A Thesis

Submitted to Institute of Computer Science and Engineering

College of Computer Science

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master

in

Computer Science

June 2006

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十五年六月

利用圖形表示的基因規劃法
找尋核醣核酸的共同結構元

研究生：許登貴　　指導教授：胡毓志博士

國 立 交 通 大 學 資 訊 科 學 與 工 程 研 究 所

摘要

隨著人們對 RNA 功能的知識增加，最近對 RNA 的研究較以往吸引了更多的注意。如同生物體中的其它大分子一樣，RNA 的功能取決於它們的結構。由於直接從三級立體結構出發的技術在效用與效率上仍受限制，因此有各式各樣的計算機方法被提出。在這篇論文裡，我們將目標放在 RNA 的二級結構預測。基於需要被預測的 RNA 結構的數量不同，計算的方法可被分類爲單一序列結構預測以及多重序列結構預測。一般而言，單一序列結構預測被用來尋找一條序列可能的整個二級結構，而多重序列結構預測則是被用來尋找同一 RNA 家族序列的共同區域性二級結構。目前大部分多重序列結構預測的方法皆侷限於找到相對較短的共同結構元素，它們無法找出較長的共同結構，而這些共同結構很可能在生物學上扮演重要的角色。我們提出了一個多重策略的方法，結合了單一序列結構預測以及多重序列結構預測的方法。藉由使用單一序列結構預測系統的預測結果轉換成我們定義的 RNA 二級結構的圖形化模型，我們可以提升多重序列結構預測的能力。爲了驗證我們系統的效用與效率，我們從 Rfam 下載數個真實世界裡的 RNA 家族來做測試，實驗顯示本方法能有不錯的表現。

Prediction of RNA common structural motifs by Genetic Programming with graphical expressions

Student：Deng-Guei Shiu　　Advisor：Dr. Yuh-Jyh Hu

Institute of Computer Science and Engineering
College of Computer Science
National Chiao Tung University
Hsinchu, Taiwan, Republic of China

Abstract

As the increase of knowledge of RNA functions, the research on RNA has recently attracted more attentions than ever. Like other biopolymers, the functions of RNA are dependent upon their structures. Since the effectiveness and efficiency of ab initio 3D structure determination Technologies are still limited, various computational approaches have been proposed. In this thesis, we are focused on RNA secondary structure prediction. Based on the number of RNA for which to predict the structures, computational methods can be classified as single-sequence prediction and multiple-sequence prediction. In general, single-sequence prediction is aimed to find the probable global secondary structures, and on the other hand, multiple-sequence prediction is aimed to identify the common local secondary structures in a given RNA family. Most of the current approaches to multiple-sequence prediction are limited to finding relatively short common structure elements. As a consequence, they fail to identify those longer common structures that may play important biological roles. We propose a multi-strategy method that combines the advantages of both single-sequence and multiple-sequence prediction. By using the prediction results of single-sequence predictors as the basis to form the graphical models of RNA secondary structures, we can improve the performance in multiple-sequence prediction. To demonstrate the efficiency and effectiveness, we tested our new approach on several real-world RNA families downloaded from Rfam. The experiments showed some promising results.

致謝

能夠順利完成這篇論文，首先必須感謝我的指導教授：胡毓志老師，在這兩年來的指導與督促，讓我能在短時間內進入生物資訊這領域，並且學到做研究的方法與態度，這對將來工作或是在爲人處事上都有極大的幫助。

感謝生物資訊實驗室的所有成員，讓我在這兩年內度過難忘的時光。感謝世彥、音璇、勁伍、昀君和秉蔚各位學長姊的提攜與解惑，貫中和豐茂的互相督促與勉勵，繼養學弟的協助與幫忙，以及博班學長子緯、巽昌和鈞木的加油與打氣，還有實驗室豐富的資源與熱鬧的氣氛，這些都是讓我能順利畢業的大功臣。

另外，還要感謝同時在爲碩士論文拚命的姿伶、偉民、志鵬、立泓等人，可以與我互吐苦水、互相激勵。還有感謝眾多親朋好友的鼓勵，讓我擁有繼續努力下去的動力。

最感激的還是家人的支持與關心，幾句簡單的問候便是減輕心理壓力的最佳良藥。

順利畢業了，謝謝身邊的各位，以及感謝交大土地公的保佑。

目錄

第一章、前言

1.1 研究動機

核醣核酸(RNA)在生命體中扮演很重要的角色，其中最爲人知的信使核醣核酸(mRNA)傳遞核醣核酸的資訊到核糖體，合成所需要的蛋白質。其他常見的還有轉錄核醣核酸(tRNA)、核糖體核醣核酸(rRNA)、微核醣核酸(microRNA)等。這些 RNA 會褶疊成特定的形狀來輔助生命機制，如催化化學反應及調控基因表現等等。

從已知的生物知識可知，褶疊形狀相似的核醣核酸很有可能也會有相似的功能。因此，若能由已知的核醣核酸序列來預測其褶疊而成的二級結構，進而猜測其功能，將能更迅速的瞭解生命運作的機制。

然而，在生物實驗室裡進行實驗來決定一個核醣核酸的結構是很費時的，單用人工的方式實驗非常沒有效率。因此，我們希望利用已知序列上的資訊，加入能量預測二級結構的資訊，藉由電腦的輔助以提供一個快速的方法，希望能預測出核醣核酸的結構，更進一步的從一個家族的核醣核酸序列中，預測出他們的共同結構元(motif)，因爲這些共同的結構在生物演化上可能是有意義的，他們可能控制著一種重要的生物機能，所以在經過長時間的演化之後，這些結構仍然保留至今。

研究核醣核酸二級結構預測(RNA secondary structure prediction)的方法有很多，例如使用動態程式規劃(dynamic programming)的方法尋找化學上能量最爲穩定的結構；或是以排比(alignment)的方式，利用一條已知二級結構核醣核酸序列上的資訊，去預測另外一條結構未知的相關核醣核酸序列；以及用基因演算法(genetic algorithm)的方式尋找二級結構和摺疊路徑(folding pathway)等。以上的方法都是只針對單一條核醣核酸序列提供唯一的最佳二級結構預測結果，或是包含多個次佳解的結果。

近年來，對於核醣核酸二級結構的研究主題多在預測同一核醣核酸家族的共同結構元，目前常見的方法有三大類[Paul PG et al., 2004]：

(1)先對所有核醣核酸序列做多重排比(multiple sequence alignment)，再將排比好的序列利用單一核醣核酸序列的二級結構預測系統進行摺疊(folding)，最後所得的摺疊結構即爲該家族的預測共同結構元。

(2)以 Sankoff algorithm 爲基礎，使用動態程式規劃同時考慮序列排比與摺疊的資訊來預測同一家族序列的共同結構元。

(3)利用單一核醣核酸序列的二級結構預測系統，對此家族的每一條核醣核酸序列各自進行單一序列的摺疊，再對所有產生的結構進行結構排比(structure alignment)。

本研究與上述的第三類方法有點相似，在前半段使用單一核醣核酸序列的二級結構預測系統作爲前處理器，來預測單一核醣核酸序列的完整二級結構。然而在後半段，也是最主要的核心部分，我們並非只是對其產生的結構進行排比，而是將其預測的結構轉換成圖形表示語言，再利用基因規劃法(genetic programming)預測出此家族序列的共同結構元。

1.2 研究假設

關於核醣核酸二級結構的預測，本研究設定了兩個合理的基本假設：

假設一：同一家族的核醣核酸序列有共同的二級結構。

一群核醣核酸序列之所以會被視爲同一家族，就是因爲他們有類似的功能。由化學的角度來看，當結構有些許改變就很有可能影響分子結合的能力，因而影響其功能，所以我們認爲，一群功能相同的核醣核酸序列行使功能之區域，其二級結構必定極爲相似。

本研究假設一群被歸類爲同一家族的相關核醣核酸序列中，從在某些共同的結構，而這些共同的結構則是決定此家族核醣核酸所行使的功能。

假設二：行使功能的共同結構元不容易出現在隨機產生的序列中。

本研究要尋找的共同結構應該具有演化上的意義，在演化的過程中，核醣核酸的序列及結構可能會經過多次的突變，但是其重要結構仍被保留下來，表示這些結構在演化的過程中必定扮演很重要的假設。

因此我們假設這樣的結構應該不是偶然形成，也就是說在我們隨機產生的核醣核酸結構中不應該會經常出現。

1.3 研究目的

在過去的研究中，預測核醣核酸二級結構的共同結構元用到許多不同的方法，包含動態程式規劃、隱藏式馬可夫模型(Hidden Markov Model)、序列排比、圖論方法以及演化式計算等等。每一個研究所切入的角度都不太一樣，對於不同的家族的共同結構元預測能力也不太相同，但目前的系統大多只能預測出長度較短的共同結構元。

而在本研究中，我們同樣使用基因規劃法，試圖找出同一家族的共同結構元，加入能量的資訊縮小搜尋空間以節省搜尋時間，而資料結構的表示法則以圖形(graph)的概念表示，希望可以藉此找出較長或者是更複雜的共同結構元。

1.4 論文架構

本篇論文包含六個章節：

第一章爲前言，介紹本研究的動機、背景、此研究所使用的方法及其基本假設，以及主要的研究目的。

第二章爲文獻探討，將介紹核醣核酸的背景知識，以及此研究過去的發展。

第三章爲研究方法，是本篇論文的核心，詳細介紹本研究設計的方法流程與細節。

第四章爲實驗結果，整理所有實驗的內容與實驗的結果。

第五章爲結論與討論，分析本實驗的優缺點。

第六章參考文獻，則列出本研究參考的相關文獻。

第二章、文獻探討

2.1 核醣核酸簡介

長期以來，人們對於核醣核酸(ribonucleic acid, RNA)的瞭解不多，僅知道 RNA 在合成蛋白質的過程中扮演著“遺傳信使”的角色：將去氧核醣核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)所攜帶的訊息帶到核醣體，作爲轉譯(translation)蛋白質使用。最近幾年隨著對 RNA 的研究發現愈來愈多，RNA 在生物學上的地位也愈來愈爲重要。

2.1.1 核醣核酸的重要性

除了早期所知的信使核醣核酸(messenger RNA, mRNA)外，有其他重要功能的核醣核酸也陸續被發現，如許多未編碼的核醣核酸(non-coding RNAs, ncRNAs)，其中有些甚至可以促進生化反應，控制細胞內蛋白質(酶)的合成，這類的核醣核酸包括轉錄核醣核酸(transfer RNA, tRNA)和核醣體核醣核酸(ribosomal RNA, rRNA)等。

還有能夠調控基因表現的核醣核酸，如微核醣核酸(microRNAs)。微核醣核酸是一群非常短，長度約二十多個鹼基的核醣核酸，最明顯的特徵就是所有微核醣核酸的先質(precursor)都具有一個類似髮夾的構造，而這些構造在基因體裡是非常穩定的。微核醣核酸在後轉錄時期(post-transcription)參與調控，其影響包含控制細胞凋亡、組織生長、肥胖代謝，以及決定某些基因的表現時間。

在科學(Science)雜誌所刊載的 2002 年研究表明，一些長度較短的核醣核酸，即所謂的小分子核醣核酸(Small RNA)，能夠對細胞和基因的很多行爲進行控制，比如打開和關閉多種基因，刪除一些不需要的 DNA 片段等。它們在細胞分裂過程中更是發揮了至關重要的控制作用，可指導染色體中的物質形成正確的結構，防止 DNA 片段位移出錯。若 DNA 功能的產生錯亂，可能是引發癌症的一個重要原因。

2.1.2 核醣核酸結構基本單位元

我們已知核醣核酸的功能與其結構息息相關，結構的多樣性讓核醣核酸具備多重的生物功能。因此，在核醣核酸的相關研究上，我們對於核醣核酸的結構所產生的興趣，遠大於對於序列的分析。談結構之前，還是必須先對序列組成有基本的了解。

核醣核酸由四種含氮鹼基組成，分別是腺嘌呤(Adenine) 、胞嘧啶(Cytosine)、鳥糞嘌呤(Guanine)、尿嘧啶(Uracil)，習慣上常分別以 A、C、G、U 來代表這四種含氮鹼基。

核醣核酸常以單股存在於生物體中，透過分子間的作用力，會自己摺疊成特定的結構，產生摺疊的作用力主要來自於 C≡G 三個氫鍵的鏈結以及 A＝U 兩個氫鍵的鏈結，此兩組鏈結的個別配對稱之爲標準鹼基對(canonical base pair)。此外還有一個搖擺鹼基對(wobble base pair)G－U，爲一個氫鍵的鏈結，此結構較不穩定，需要週圍的鹼基對輔助。由 A、G、C、U 各自配對所產生的摺疊形成了 RNA 的基本結構，稱之爲 RNA 的二級結構。

2.1.3 核醣核酸二級結構

核醣核酸基本的二級結構如下：

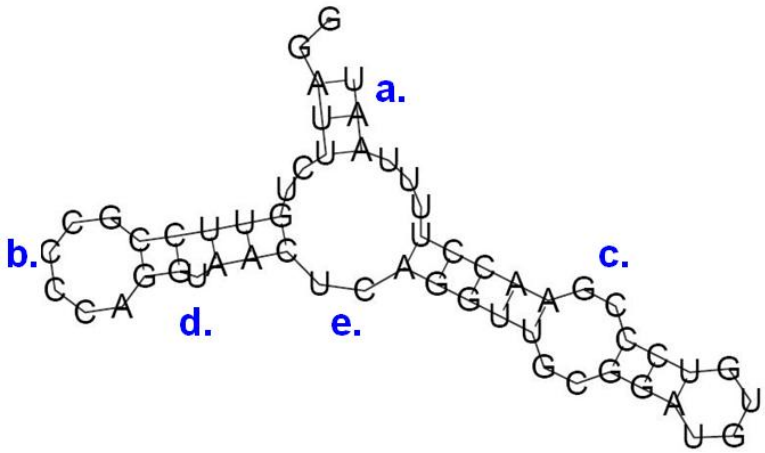


圖 1. 核醣核酸基本二級結構圖示範例

a. 莖幹結構(stem)

核醣核酸序列中，連續鹼基配對所形成的一個長狀形狀，稱之爲莖幹結構。

b. 髮夾環狀結構(hairpin loop)

當一個連續的非配對區域不是出現在序列的終端，而且僅與一個莖幹相鄰的話，該區域就是一個髮夾環狀結構。而此環狀結構與相鄰的莖幹則合稱一個髮夾結構。

c. 內部環狀結構(internal loop)

一個連續的非配對區域恰與兩個莖幹相連，而且兩側都有未配對鹼基，則該區域即爲內部環狀結構。內部環狀結構又可分爲對稱性(symmetrical)與非對稱性(asymmetrical)，當兩側未配對鹼基個數相同時，則稱爲對稱性內部環狀結構，反之則稱爲非對稱性內部環狀結構。

d. 突起結構(bulge)

在莖幹中僅一邊有未配對的鹼基，而另一邊都是連續的鹼基對，則稱這些未配對的區域爲突起結構。

e. 多分支環狀結構(multi-branched loop)

類似內部環狀結構，但當該環狀結構與三個以上的莖幹接觸時，則稱爲多分支環狀結構。

f. 擬結結構(pseudo-knot)

擬結結構是一種比較特別的結構，形成的主因是莖幹交錯配對。當莖幹間的鹼基會與莖幹外的鹼基形成配對時，該結構就稱之爲擬結結構。

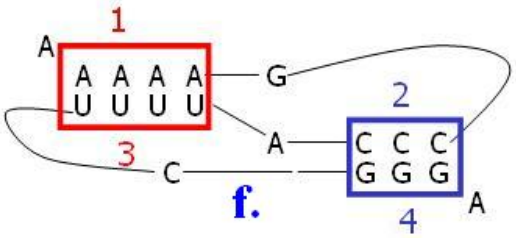


圖 2. 擬節結構範例

2.2 預測核醣核酸結構的相關方法

研究核醣核酸的目的是希望能夠了解核醣核酸在生物體裡所擁有的功能，而讓這些核醣核酸有其功能的原因不在於它的一級結構(序列)，而是它所折疊而成的二級結構。目前生物學家認爲，分子的結構是影響核醣核酸功能的關鍵，例如常見的轉移核醣核酸，其結構都是很穩定的苜蓿葉(cloverleaf)結構：包含四個莖幹而形狀類似四瓣的苜蓿葉。另外，擁有相同生化功能的同一家族成員，也常會擁有相似的二級結構片段。

因此，若能利用計算機的輔助，能夠迅速的發現同一家族成員中的共同結構元，這對生物學是很有幫助的。這不僅能協助生物學家快速找出該家族行使其功能的結構片段，亦能利用已知的共同結構，檢驗未知功能的序列，來推論出其功能，進而找到所屬家族。

過去研究核醣核酸二級結構預測的方法很多，本節簡述過去幾個比較具代表性的方法：

2.2.1 單一核醣核酸序列二級結構預測

給定一條核醣核酸序列，我們希望預測出它摺疊而成的二級結構，最常見的方法則是使用熱力學(thermodynamics)的知識來推論此序列可能折疊而成的形狀，以下爲幾個代表的系統：

2.2.1.1 Mfold [Zuker M, 2003]

Mfold 是一套單一核醣核酸序列的二級結構預測系統，實作 Zuker 與 Stiegler 所提供的演算法，利用動態程式規劃法(Dynamic Programming)計算出核醣核酸序列擁有最小自由能量(minimal free energy, MFE)的摺疊結構，以預測最爲穩定的結構。當序列的長度爲 n 時，系統所需的時間複雜度爲 $O(n^3)$，所需要的空間複雜度爲 $O(n^2)$。此系統可以依照自由能量的大小，由小到大輸出數個可能的二級結構供使用者參考。

然而核醣核酸在摺疊的過程中可能受到某些因素或是受到其他分子的影響，使得理論上最穩定的結構無法形成，單純依靠最小能量來斷定結構形狀仍會有很大的不足。另外，Mfold 無法摺疊成擬結結構，這也是其缺點之一。但在許多相關的研究上，Mfold 仍被廣泛應用，其確實提供了相當程度的資訊。

2.2.1.2 RNAfold [Hofacker et al., 1994]

RNAfold 是維也納 RNA 研究團隊(Vienna RNA package)所實作的單一核醣核酸序列的二級結構預測系統，其運作原理與 Mfold 一樣皆是建立在 Zuker 與 Stiegler 所提供的演算法上，以動態程式規劃法找出能量最小而最爲穩定的二級結構。

RNAfold 與 Mfold 的運作原理相同，差別只在於實作的方式不同，兩者所預測出來的核醣核酸二級結構結果差異性很小，從兩者的比較研究顯示，這兩個不同的單一核醣核酸序列二級結構預測系統，從準確性上看來沒有重大的差別存在。

2.2.1.3 Sfold [Ding Y et al., 2003]

Sfold 實作了另一種以能量爲基礎的單一序列折疊演算法，給定一條核醣核酸序列，利用統計的方法取出其二級結構的樣本，接著依據給予的熱力學參數產生核醣核酸二級結構的相稱分割函數(equilibrium partition functions)，根據分割函數使用條件機率對所有可能的結構進行遞迴取樣，而後產生二級結構的統計上典型樣本，最後使用分群(clustering)的技術獲得可能的結構。可根據最小自由能取出前幾名可能的結構以供使用者參考。

根據先前的研究分析，從精確度上看來，Sfold 的結果與 Mfold 和 RNAfold 產生的結果非常相似，但 Sfold 相較於其他兩者而言，它的結果的變異性(variance)有稍微高出了一些。

2.2.2 根據多重序列排比結果進行摺疊來預測核醣核酸共同結構元

預測核醣核酸共同結構元的一類逼近方法，先同時對所有核醣核酸序列進行多重排比，再將排比結果的序列摺疊成二級結構。而進行多重排比的方法，最常見的爲 ClustalW，其不僅擁有長久的歷史，且其結果也優於許多其他類似的工具。而摺疊的方法則是各有明顯的差異。

2.2.2.1 RNAalifold [Hofacker et al., 2002]

RNAfold 是維也納 RNA 研究團隊(Vienna RNA package)所開發的系統之一，可預測出多條已排比好序列的一致結構，其原理爲 Zuker-Stiegler 演算法的延伸，摺疊結構時同時考慮最小自由能(MFE)和共變(covariation)關係。當資料有 N 條序列，而最長序列長度爲 n 時，本系統的時間複雜度爲 $O(N \cdot n^2+n^3)$，空間複雜度爲 $O(n^2)$。

2.2.2.2 Pfold [Knudsen B et al., 2004]

Pfold 使用隨機前後無關文法(stochastic context free grammar, SCFG)，產生核醣核酸結構的先前機率分配(prior probability distribution)，針對輸入的已排比核醣核酸序列和系統發生的樹狀結構(phylogenetic tree)，計算出此結構的後端機率(posterior probabilities)，而後進行行(column)的排比或行的配對。最後在 SCFG model 中找到最大可能發生樹(maximum-likelihood tree)，產生最有可能的核醣核酸二級結構。

2.2.2.3 ILM [Ruan J et al., 2004]

ILM(iterated loop matching)使用熱力學和相互資訊(mutual information)的結合產生一個二級結構，接著產生所有可能的莖幹，根據熱力學和相互資訊的結合分數對莖幹進行排序。選擇分數最高的莖幹，更新分數，然後將與被選上的莖幹有衝突的莖幹移除，之後再選擇分數第二高的莖幹，接著一直重複此動作直到沒有其他莖幹剩下，最後的所有莖幹則決定了結構。

2.2.3 同時考慮序列排比與摺疊的資訊來預測核醣核酸的共同結構元

Sankoff algorithm 是一種合併了做序列排比與做結構摺疊的動態程式規劃方法，它可以被用來獲得排比結果和一致性的共同結構。而最原始的 Sankoff algorithm 實作雖然可以同時做結構摺疊與序列排比，但其負擔卻是相當的大，當資料有 N 條序列而最長序列長度爲 n 時，其運作所需的時間複雜度爲 $O(n^{3N})$，空間複雜度爲 $O(n^{2N})$。因此，爲了減少系統運作的負擔，則有了一些新的實作方法，針對原始的 Sankoff algorithm 加了一些限制，而能在預測核醣核酸的共同結構元時仍有不錯的表現。

2.2.3.1 Foldalign [Gorodkin J et al., 1997]

Foldalign 可被視爲一個區域性排比(local alignment)與鹼基配對數最大化(maximum number of base-pairs)演算法的混合體，它使用了與 CLUSTAL 和 CONSENSUS 相似的啓發式方法(heuristics)，由兩條序列的排比與鹼基配對的關係建立了分數矩陣(scoring matrix)，使用由 Sankoff algorithm 延伸的動態程式規劃法求出兩條最佳配對排比結果(pairwise alignment)。而系統將所有序列兩兩成對個別求出其排比結果，從中取出分數最高的排比結果，再個別與其他序列進行排比，從中再取出最好的配對排比結果，此時的配對排比結果即爲三條序列的最佳配對排比結果。之後再依此方法持續循環下去，最後所得即爲所有序列的最佳配對排比結果。

Foldalign 將 Sankoff algorithm 延伸實作，但限制了尋找的共同結構元最大長度，而且禁止了多分支環狀結構(multi-loops)的產生，因此可以降低系統運作的負擔。當資料有 N 條序列而最長序列長度爲 n 時，其運作所需的時間複雜度爲 $O(n^4N)$。

Foldalign 被專門設計來預測短區域的調控共同結構元，例如 IREs(iron response element)中的髮夾結構(hairpin structures)，因此在找尋全域性(global)的結構與多分支環狀結構上的表現不佳。

2.2.3.2 Dynalign [Mathews D et al., 2002]

Dynalign 結合了自由能最小化(free energy minimization)與比較序列分析(comparative sequence analysis)，依此找出兩條序列低自由能的共同結構。系統先對兩條序列進行排比，再分別對兩條序列進行摺疊，而摺疊的結構其鹼基可以產生配對的條件爲：必須兩條序列在排比結果的同個位置上皆能產生標準鹼基對，亦即使兩條序列可以摺疊成相同的結構。

Dynalign 的目的將整個系統的總自由能做最小化，總自由能的求法爲：

$$\Delta G^{\circ}_{\text{total}} = \Delta G^{\circ}_{\text{sequence 1}} + \Delta G^{\circ}_{\text{sequence 2}} + (\Delta G^{\circ}_{\text{gap}})\,(\text{number of gaps})$$

ΔG°_{total} 表示整個系統的總自由能，$\Delta G^{\circ}_{sequence\ 1}$ 與 $\Delta G^{\circ}_{sequence\ 2}$ 分別爲序列 1 與序列 2 的構造自由能(conformational free energy)，ΔG°_{gap} 爲兩條序列排比產生的缺口(gap)造成的處罰值(penalty)，此值根據經驗設置。

Dynalign 使用全能量模型(full energy model)，進行 Sankoff algorithm 的動態程式規劃法對系統的總自由能做最小化，但在進行演算時則限制了兩條序列在進行排比時的最大距離，即當序列 1 的第 i 個鹼基要與序列 2 第 j 個鹼基排比在一起，則 i 與 j 的差值必須小於由使用者設定的 M 值。使用這樣的限制可以使系統的時間複雜度降爲 $O(n^3M^3)$，而空間複雜度則爲 $O(n^2M^2)$，其中 n 爲較短序列的序列長度。

Dynalign 只能同時找兩條序列的共同結構元，儘管可以擴展至多條序列，但會造成系統的嚴重負擔，例如當序列數爲三條時，系統的時間複雜度會增至 $O(n^3M^6)$，而空間複雜度則增爲 $O(n^2M^4)$。

由實驗的測試結果顯示，Dynalign 在較短的且較多樣性的 tRNA 預測上有比較好的表現。

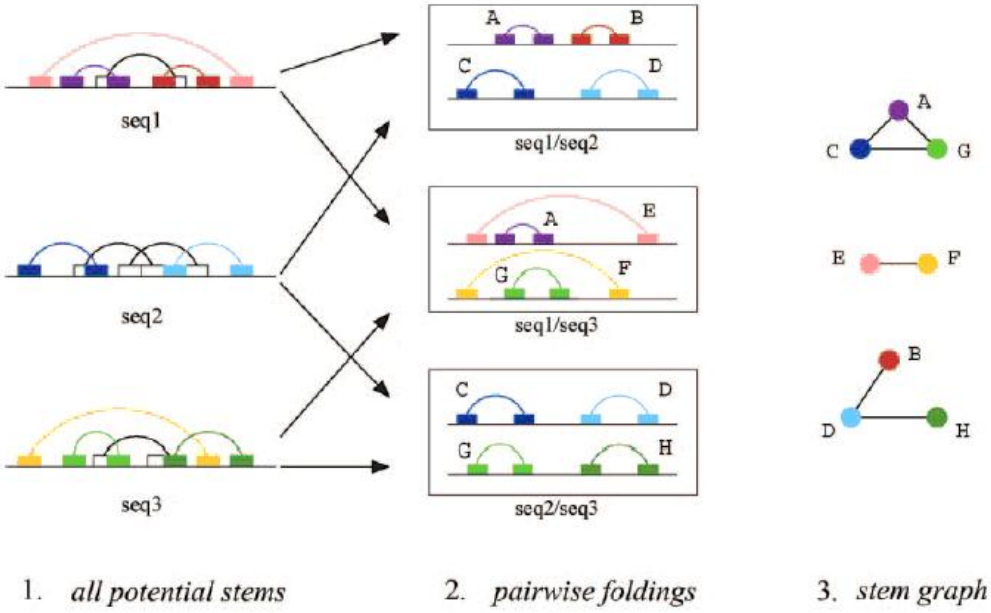


圖 3. Carnac 演算法三步驟範例圖

2.2.3.3 Carnac [Perriquet O et al., 2003]

Carnac 同時考慮區域相似性(local similarity)、莖幹能量(stem energy)和共變關係(covariation)，產生序列的共同摺疊二級結構。此系統採用啓發式的演算法，概略圖如圖 3.，演算法步驟如下(設有 N 條序列)：

Step1: 對所有的序列分別找出每條序列所有可能的莖幹，再使用熱力學的知識，利用動態程式規劃法計算出每條莖幹的自由能，留下能量低於預設門檻值的所有莖幹。

Step2: 將所有的序列兩兩成對，分別建立所有可能的 N*(N-1)/2 個序列對成對摺疊(pairwise foldings)。方法爲先找出兩條序列鹼基高度相似的區域，考慮區域相似性與共變關係找出成對的莖幹(pairwise stems)，然後根據所選到的所有莖幹，考慮能量最小化使用類似 Sankoff algorithm 的動態程式規劃法找出最佳的共同摺疊。而此動態程式規劃法與 Sankoff algorithm 的差異點在於 Carnac 將序列的莖幹視爲基本單位元去運作，而不是像一般皆以含氮鹼基視爲基本單位元。因此找兩條序列的共同結構元的時間複雜度只需要 $O(n^2)$，所需要的空間複雜度亦爲 $O(n^2)$。

Step3: 此步驟將 Carnac 擴展至可以同時找多條序列的共同結構元。在經過 step 2 之後，每條序列皆得到 N-1 個預測結構，爲了得到最有可靠度(reliable)的莖幹，於是建立了一套新的資料結構，稱之爲莖幹圖(stem graph)。在莖幹圖中的所有點(vertices)的集合表示所有序列預測出來的所有莖幹的集合，觀察序列 1 中的任一莖幹 A 與序列 2 中的任一莖幹 C，若配對(A,C)出現在 step 2 產生的成對摺疊中，則在莖幹圖中的點 A 與點 C 建立一致邊(identity edge)。觀察完每條莖幹，建立完整的莖幹圖，再對莖幹圖中的每個連通單元(connected component)進行排序，排序的依據則考慮各個莖幹圖的幾個拓撲特徵(topological features)：(i)莖幹圖中節點的數目，(ii)每條序列的莖幹數目，(iii)所有邊的總數，以及(iv)各個一致邊的數目。最理想的情形是連通單元可以構成一個頂點數爲 N 的完全圖(complete graph)，而每個頂點皆來自於不同的序列。最後則根據排序好的最佳連通單元完成其二級結構。

Carnac 在鹼基對的預測測試中發現其結果有很高的選擇性(selectivity)，然而它的敏感性(sensitivity)一般而言卻偏低，儘管可以藉由限制最小自由能的摺疊來提高其敏感性，但如此一來則相對的會因此降低其選擇性，而相關性(correlation)則有非常些微的提高。

2.2.4 對核醣核酸摺疊結構進行排比來預測核醣核酸共同結構元

當已知序列有可信賴的二級結構時，我們可以考慮藉由結構提供的資訊進行多重結構排比，由此預測核醣核酸的共同結構元。而每一條序列的二級結構，可以使用 2.2.1 節裡介紹的單一核醣核酸序列二級結構預測工具來取得，其中的 Mfold 與 RNAfold 皆常被各相關研究引進使用。

2.2.4.1 RNAforester [Höchsmann M et al., 2003]

RNAforester 建立樹狀排比模型(tree alignment model)，依此推論核醣核酸二級結構的多重排比，只考慮核醣核酸分子的二級結構而不需要知道其序列的相似性。系統使用其他單一核醣核酸序列二級結構預測工具將序列轉爲二級結構，再將預測的二級結構轉換成樹狀結構(tree)或森林結構(forest)的輪廓圖(profile)，之後

將 ClustalW 多重序列排比的演算法延伸爲多重結構排比，以此演算法對所有序列轉換成的輪廓圖進行多重結構排比，由排比結果可得預測的核醣核酸共同結構元。

當實驗的資料序列有 N 條，其平均的長度爲 n，設 d 值爲輪廓圖中的樹狀結構節點的最大分支度(degree)，則此系統運作的時間複雜度爲 $O(n^2d^2N^2)$，空間複雜度爲 $O(Nn+N^2+n^2d)$。

2.2.4.2 MARNA [Siebert S et al., 2003]

MARNA 同時考慮核醣核酸一級序列與二級結構產生 RNA 的多重排比，它建立了權重排比邊(weighted alignment edges)的集合，而這些邊的權重則反映了序列的和結構的共通性(conservation)，其計算方法須考慮到序列與結構兩部分，而結構部份則參考由單一核醣核酸序列二級結構預測工具產生的預測結構。之後將這些邊的集合輸入 T-coffee 系統，產生多重排比的結果，最後可從此結果擷取出一致性的序列與一致性的結構。

當實驗的資料序列有 N 條，假設每條序列長度皆接近爲 n，設 E 值爲每條序列所產生的預測結構個數(此值通常極小)，則此系統運作的時間複雜度爲 $O(E^2N^2n^4)+O(N^3n^2)$。

2.2.5 其他相關工具

以下介紹與本論文設計之系統較爲相關的工具：

2.2.5.1 RNAshapes [Steffen P et al., 2006]

RNAshapes 是一套使用抽象形狀(abstract shapes)表示法的軟體套件，其中包含了三項核醣核酸的分析工具：形狀代表物分析(analysis of shape representatives)、形狀機率計算(calculation of shape probabilities)、以及找尋一致性形狀(consensus shapes)。另外，RNAshape 亦包含了一些實用的特色：如使用正確的懸蕩能量(dangling energies)找出摺疊次佳候選解、輸出二級結構圖形、找尋形狀的配對、以及提供了圖形化的使用者介面。

RNAshapes 的主要核心是它的抽象形狀表示法，即使用 RNAcast[Reeder J and Giegerich R, 2005]工具將二級結構轉爲抽象形狀(shapes)，轉換方法則是將目前常用來表示二級結構的點－括號(dot-bracket)表示法根據 RNAcast 定義的語言轉換成形狀的抽象表示法。如以下爲點－括號表示法：

```
AUCGGCGCACAGGACAUCCUAGGUACAAGGCCGCCCGUU
..(((.((..(((....))).(((.....)))))))))..
..(((.....(((....))).(((.....)))..)))..
```

根據其語言定義，將連續對稱的圓括號(“(”and “)”)以方括號(“[”and “]”)表示，而連續的未配對區域則以底線(“_”)表示，以下則爲其轉換結果：

```
_[_[_[_]_[_]]]_
  _[_[_]_[_]_]_
```

此爲最低層級的 type 1 抽象形狀表示法。爲了提高其抽象的層級，於是將未配對區域拿掉，而連續巢狀(nested)的方括號則合併，以上兩例皆可轉換成 type 5 的抽象形狀表示法，如下：

```
[[][]]
```

RNAshapes 則利用此種抽象形狀的表示法應用到 RNA 的相關研究中。以下列舉與本研究相關的兩項：

形狀摺疊(shape folding)

對單一核醣核酸序列，考慮其自由能摺疊出能量最小的結構，並且可以輸出次佳的數個候選，以能量低的結構爲排序優先。而 RNAshapes 的特點則是在輸出候選時限制每種形狀(shape)的組成只能出現一次，而其輸出則是以該形狀能量最小的結構爲代表。

一致性形狀(Consensus shapes)

RNAshape 所提供的找尋一致性形狀的功能則爲 RNAcast 原本有的功能。對於同一家族的核醣核酸序列，RNAcast 對其中每條序列分別進行摺疊，列出接近最小能量的各種抽象形狀，存於一個抽象形狀空間(abstract shape space)，再從所有序列產生的抽象形狀空間中找出交集，取出其共同的抽象形狀，則爲此家族的共同一致性形狀。

2.3 核醣核酸資料庫

由於核醣核酸的相關研究蓬勃發展，已知的核醣核酸序列及結構資料量快速地成長，於是有許多相關的生物資料庫收集了分散在各個文獻的資料，以各自設計的方法系統化地將核醣核酸的資料分門別類整理，公開提供給所有相關的研究人員使用。目前核醣核酸相關的資料庫有許多，以下則簡單介紹幾個常用的資料庫。

2.3.1 Rfam [Griffiths-Jones et al., 2003]

(http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/)

Rfam(RNA families database of alignments and CMs)資料庫儲存了多數家族的核醣核酸資料，包含家族成員各自的鹼基資料、家族的多重序列排比結果、以及家族二級結構的共同結構元等，是一個廣泛被使用的資料庫。其中每個家族的排比結果分爲兩組資料，”SEED”集合裡的排比結果是以手動的方式完成，參與排比的序列有高度的相似性；而另一組”FULL”集合裡的排比結果則是以共變模型(covariance model, CM)的方法[Eddy SR and Dubrin R, 1994]所產生。

2.3.2 The RNase P Database [Brown, 1999]

(http://www.mbio.ncsu.edu/RNAseP/home.html)

資料庫收集了 **Ribonuclease P** 家族序列的資訊，含有家族序列排比資訊、各

序列摺疊的二級結構、以及部分序列的 3D 摺疊立體結構。其中的序列與二級結構則以生物有機體做爲分類，每條序列皆有連結可連至 NCBI(National Center for Biotechnology Information)網頁查詢較完整的資訊，而二級結構則有 4 種檔案格式可供使用。

2.3.3 tRNA Compilation 2000 [Sprinzl et al., 1996]

(http://www.staff.uni-bayreuth.de/~btc914/search/)

資料庫收集了大量的轉錄核醣核酸序列，亦包含了明確的結構資訊。資料庫中提供了查詢的功能，可在 11 個界(kingdom)中選擇適當的分類，再從界之下的有機體(organism)分立中做選擇，最後再查詢是攜帶哪一種胺基酸的轉錄核醣核酸，這比較適合有生物背景的使用者使用。

2.3.4 RAG [Gan HH et al., 2004; Fera D et al., 2004]

(http://monod.biomath.nyu.edu/rna/rna.php)

RAG(RNA-As-Graphs web resource)是一個存放 RNA 二級結構的資料庫，利用圖學理論(Graph Theory)的結果，提供了一個量化的方法可以對 RNA 二級結構的拓撲(topology)進行分類，相較於其他 RNA 的資料庫，RAG 容易用於比較相異二級結構的相似與相異處。

RAG 提供了兩種二級結構拓撲的表示法：RNA tree graphs 及 RNA dual graphs，此兩種表示法可以列舉出所有可能的 RNA 二級結構元。

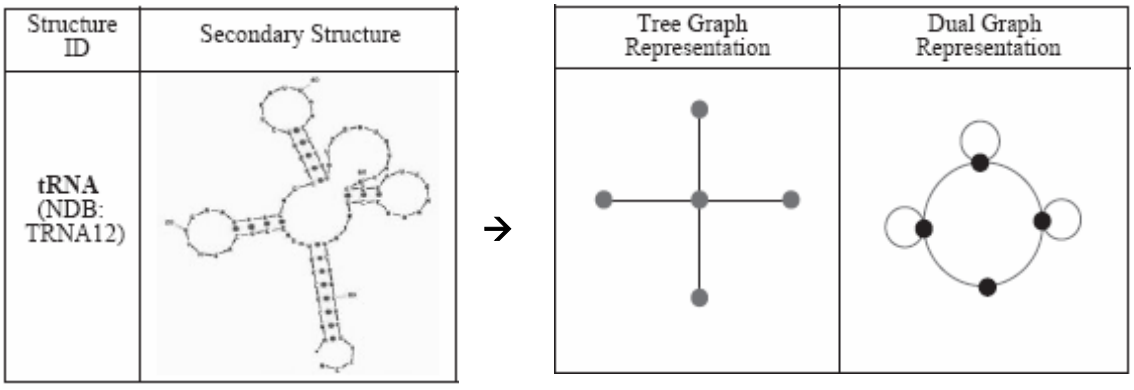


圖 4. RNA tree graph 與 RNA dual graph 示意圖

RNA tree graphs：

將突起結構與所有環狀結構都視爲一個點(vertex)，而莖幹結構則視爲一個邊(edge)，如此便能將一個 RNA 二級結構表示成一個 RNA tree graph。但此表示法無法表示擬結結構。

RNA dual graphs：

將莖幹結構視爲一個點，而突起結構或環狀結構的單股(single strand)則視爲一個邊，如此便能將一個 RNA 二級結構表示成一個 RNA dual graph。此表示法可以表示所有可能的 RNA 二級結構，包含了擬結結構。而 RAG 的接續下來的研究[Kim N et al., 2004]也都著墨在 RNA dual graphs 的特性。

RAG 提供了圖學中圖形拓撲的表示法，然而擁有同一種拓撲的相異 RNA，其二級結構還是很有可能會有很大的不同，因爲缺少了每個點跟邊的長度資訊，即使在每個點跟邊都只有些微差異的情況下，累積起來的差異依舊不小，這對尋找 RNA 二級結構的共同結構元影響頗大。這是目前 RAG 的圖形拓撲表示法較爲不足的地方。

2.3.5 RNABase [Murty et al., 2003]

(http://www.rnabase.org/)

RNABase(The RNA Structure Database)資料庫整合了 Protein Data Bank(PDB)與 Nucleic Acid Data Base(NDB)兩者的核醣核酸資料，再依功能與結構的不同來做分類。此資料庫的主要特色是能提供核醣核酸的 3D(three-dimensional)結構圖，另外還能執行結構的分析與檢測。

2.3.6 SCOR [Klosterman et al., 2002; Tamura et al., 2004]

(http://scor.lbl.gov/)

SCOR(Structural Classification or RNA)提供了核醣核酸共同結構元的階級分類，分別以生物功能、二級結構元和三級立體結構爲依據，提供了三種不同的分類方法。而生物功能類別則分別以分子功能、結構元功能與結構模型向下細分；二級結構元類別則分類成髮夾結構和內部環狀結構，而各類別底下再依據結構的形狀做更小的細分；三級立體結構類別則以各種形狀不同的相互作用作爲細分的依據。

2.3.7 其他常見資料庫

PseudoBase [Batenburg et al., 2000] (http://wwwbio.leidenuniv.nl/~Batenburg/PKB.html)收集了擬節結構的核醣核酸相關資料，包含了序列、結構與生物功能三類資訊。

5S ribosomal RNA database [Szymanski, 2002] (http://rose.man.poznan.pl/5SData/)專門爲 5S 的核醣體核醣核酸所建置，提供了這些序列的排比資訊與二級結構。另外也提供了與這些核醣核酸結合蛋白質資訊。

miRBase(http://microrna.sanger.ac.uk/)收集了微核醣核酸序列，可依物種分類瀏覽，此資料庫亦包含了各微核醣核酸的先質(precursor)，也有提供搜尋介面，使用者可根據序列片段、編號或名稱進行搜尋。

第三章、研究方法

3.1 系統設計目的與概念

當核醣核酸折疊成二級結構時，其莖幹的兩股在序列上的位置可能相距很近，也可能相距很遠。若共同結構元的莖幹其兩股在序列上相距太長，在先前的相關研究則很不容易找到。如下圖 5 所示，這是 RNaseP 家族的結構示意圖假設它的共同結構元是方框所爲起來的莖幹(P5, P7)，由於該莖幹後面還有很長的一段序列，並且折疊成數個莖幹結構(P8, P9, P10, P12)，以先前定義的結構描述語言無法單獨表示 P5, P7 所形成的莖幹。因此我們設計了一套新的結構描述語言，以圖論中的圖形(Graph)來表示，則將使莖幹兩股在序列上的距離所造成的影響大大減少。

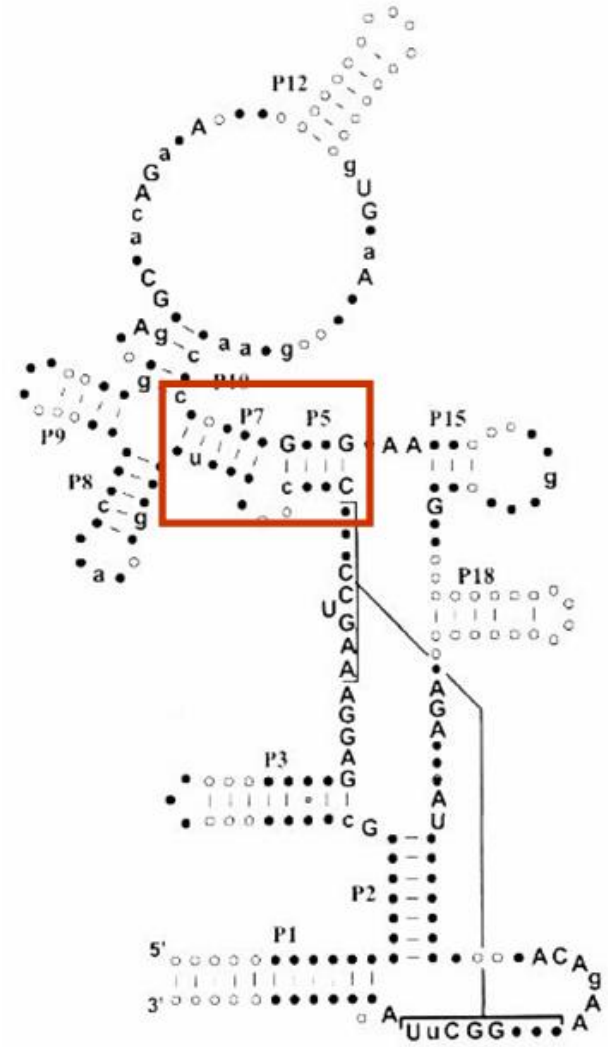


圖 5. RNaseP 家族的結構示意圖

本系統的目標在預測核醣核酸家族的共同結構元，當核醣核酸轉換成圖形，找出共同結構元的目標則轉換爲類似圖論中找出共同子圖的問題，此問題的難度爲 NP-Complete，會有相當大量的搜尋空間，將會需要大量的搜尋時間，因此我們採用演化式計算(evolutionary computing)中的基因規劃法(genetic programming)來減少系統的搜尋時間。

在演化式計算中，有個良好的演化起點可以加快搜尋時間，並且可以使得搜尋結果容易趨向最佳解，因此我們採用現有的單一核醣核酸序列二級結構預測工具做爲前處理器，這些預測工具考慮了最小自由能，個別產生每條序列可能的結構，我們再從這些結構中擷取子圖，以做爲演化中初代的個體(individual)。

3.2 核醣核酸結構描述語言

本研究針對核醣核酸的二級結構設計一套圖形表示的描述語言，語言的定義如下：

1. 以 RNA dual graph 的概念表示核醣核酸的二級結構，以二維陣列儲存 RNA dual graph 的資訊，其中包含了結構拓樸及結構長度的資訊。
2. 結構拓樸中的莖幹辨別是根據前置器的設定而得到，不一定只是 C≡G、A＝U、G－U 三種鹼基配對。
3. 一個莖幹中可包含特定長度以下的內部環狀結構或突起結構，長度大小可由使用者自由設定，系統預設值爲 1。
4. 莖幹結構與每個環狀結構分別給一個長度範圍，表示該結構元所涵蓋的結構大小。
5. 內部環狀結構或突起結構的長度不包含在莖幹長度中。
6. 環狀長度的結構可能爲零，供區別相鄰的兩個莖幹。

透過上述定義，任何的二級結構能輕易的轉換爲描述語言，以下舉例說明，下頁圖 6 爲 DF4600(tRNA)執行 Mfold 後所輸出的第一個候選結構：

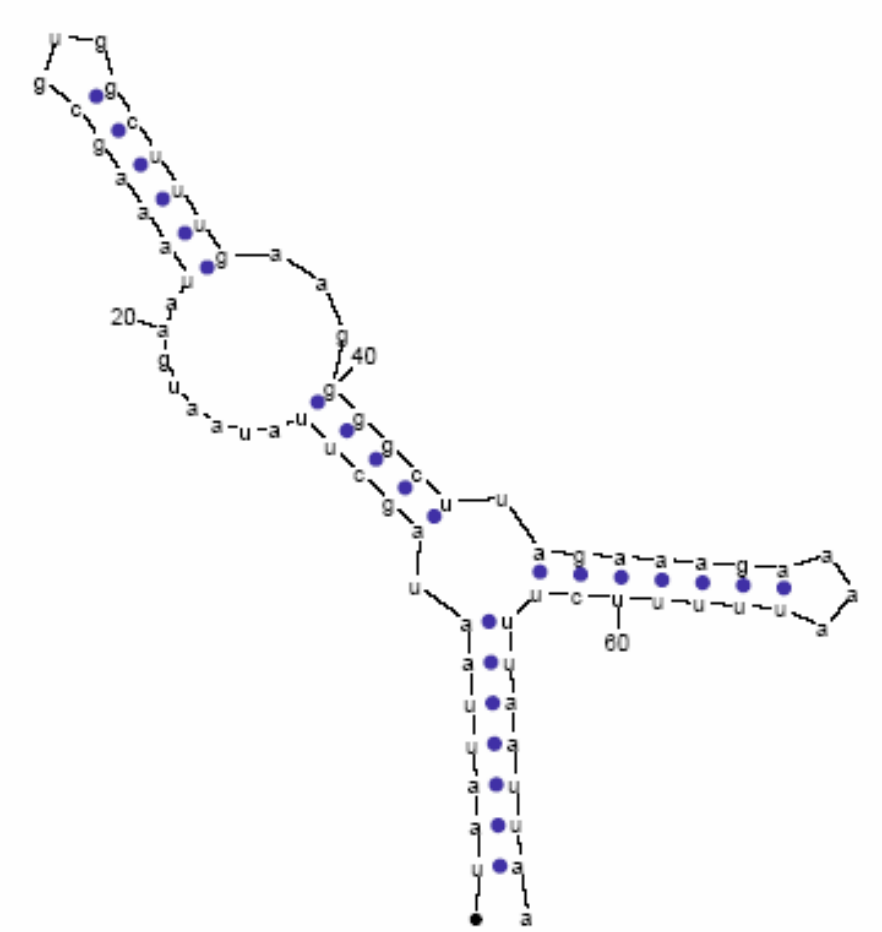


圖 6. DF4600(tRNA)由 Mfold 產生之第一候選結構

我們將此結構圖轉爲 RNA dual graph 的概念圖，所得的概念圖如下頁之圖 7。轉換的方法則先分別將每個莖幹結構皆視爲一個圖形(graph)的點(vertex)，而上圖中有四個莖幹，則可以轉換成四個點。上圖中的•爲 RNA 的 5’端，我們從 5’端出發往 3’端走，根據先後遇到的莖幹分別命名爲莖幹 1、莖幹 2、莖幹 3 與莖幹 4，而其建立的對應點則爲點 1、點 2、點 3 以及點 4。由於莖幹 1 到莖幹 2 之間有環狀結構，故建立一條由點 1 往點 2 的邊(edge)；莖幹 2 到莖幹 3 之間有環狀結構，故建立一條由點 2 往點 3 的邊；而從莖幹 3 走髮夾環狀結構回到莖幹 3 本身，故在點 3 建立一條自身邊(self-edge)回到點 3 自己。莖幹 3 走環狀結構到莖幹 2，然後走環狀結構到莖幹 4，再走髮夾環狀結構回到莖幹 4 本身，於是我們建立從點 3 到點 2 的邊、點 2 到點 4 的邊以及從點 4 走回到點 4 的自身邊。而從莖幹 4 到莖幹 1，雖然其中沒有環狀結構，但爲了區別莖幹 4 與莖幹 1，我們建立了一條從點 4 到點 1 邊，雖然其長度爲零，但仍視爲存在此邊。

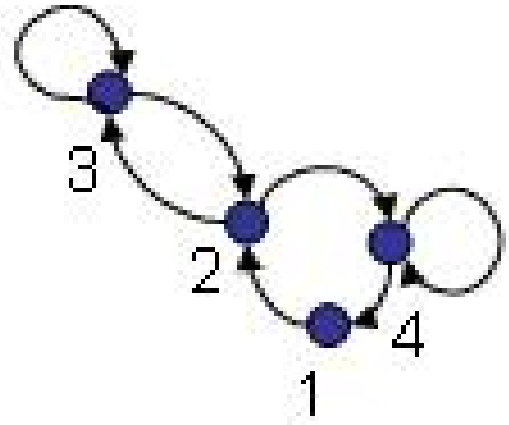


圖 7. 由圖 6 轉換之 RNA dual graph

根據此概念圖，我們欲建立一個資料結構來表示此圖，在圖學上，習慣以鄰接串列(adjacency-list)表示有向圖(directed graph)，如下圖 8 所示，最左邊的陣列依照索引(index)分別表示點 1、點 2、點 3 與點 4，而陣列中每個點右邊的鏈結，其內容表示該點可連結到的點，而內容爲 0 則表示此點亦爲 3’ 端終點。在此圖表示點 1 可以連結到點 2，而點 1 亦爲終點；點 2 根據由 5’ 端到 3’ 端的走法，第一次走到點 2 時接下來則連結到點 3，而第 2 次走到點 2 時則連結到點 4；點 3 的第一個連結則是回到點 3 自己，第二個連結則是到點 2；點 4 的第一個連結則是回到點 4 自己，第二個連結則是到點 1。如此便可由此鄰接串列清楚的表達其 RNA dual graph 的概念圖。

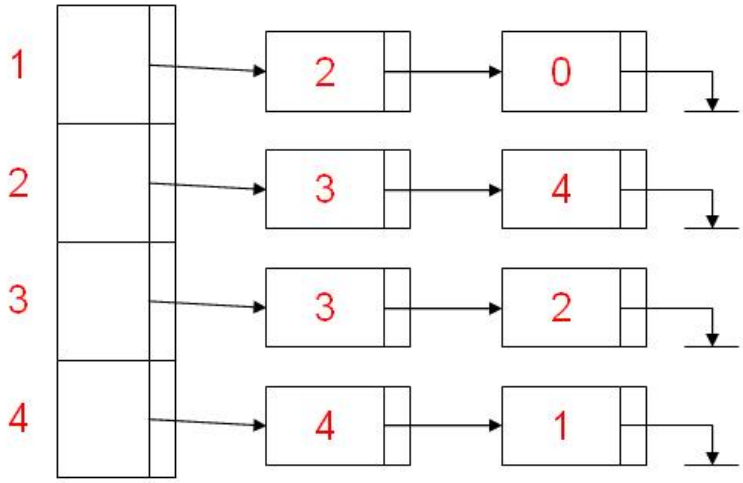


圖 8. 以鄰接串列表示圖 7

然而 RNA dual graph 的缺點便是缺少了點跟邊的長度資訊，我們將此鄰接串列擴充，根據前面的二級結構圖，把點跟邊的長度資訊納進資料結構中，所得新的鄰接串列如下圖 9。

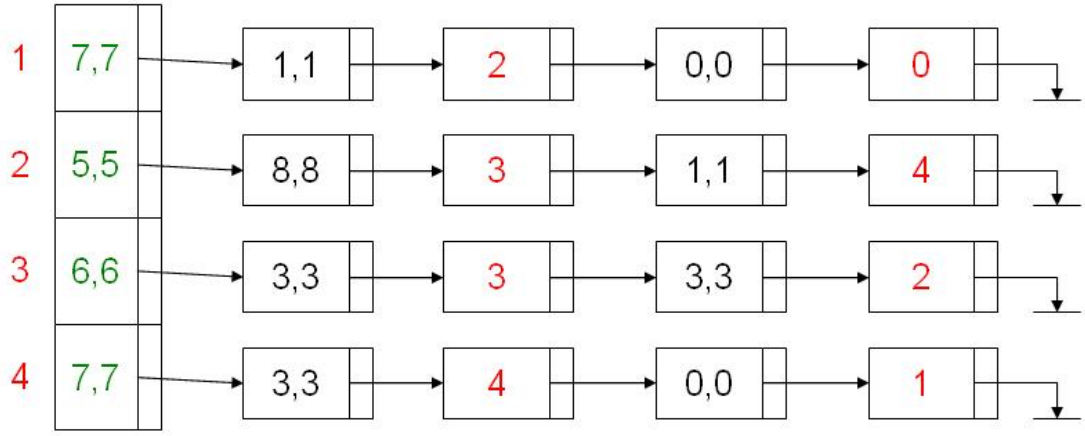


圖 9. 將圖 8 的表示法擴充之鄰接串列表示法

最左邊的陣列內容表示該點(即莖幹)的長度，而其中會有兩個值則指的是長度範圍，[X,Y]表示其長度最小爲 X，長度最大爲 Y，在此的鄰接串列表示的是一個確切的結構，因此 X 與 Y 值會相同。由於我們的資料結構是爲了找出共同結構元所設計，而共同結構元意指會出現在序列上的相似結構，所以我們將長度擴展爲長度區間來表示長度範圍，如下頁圖 10 中表示，例如點 1 的長度範圍變爲 [6, 8]，以較有彈性的資料結構來進行基因規劃法。

而陣列的第一個鏈結(link)內容表示到下一個點的邊(即環狀結構)的長度範圍，陣列的第二個鏈結內容則表示第一個可連結的點。第三個鏈結內容表示到達第二個連結點的邊的長度範圍，第四個鏈結內容則表示第二個連接點。在上圖中，取陣列中索引爲 2 的點舉例說明：陣列中的值爲 5，表示點 2(即莖幹 2)的長度爲 5；第一個鏈結內容爲 8，第二個鏈結內容爲 3，表示點 2 可以經過長度爲 8 的邊到達點 3；第三個鏈結內容爲 1，第四個鏈結內容爲 4，表示點 2 可以經過長度爲 1 的邊到達點 4。

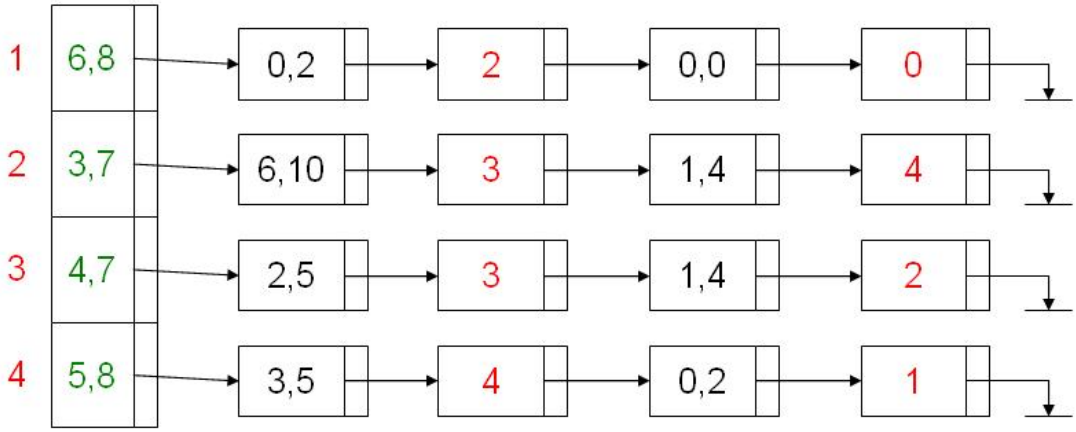


圖 10. 將圖 9 表示法中各點與邊隨機擴展長度後之表示法

由於在實作時需要不斷的取出資料結構中的值來使用，在演化過程中亦會不斷的改變資料結構中的內容，而鄰接串列中的鏈結串列在資料存取時較爲不便，需花費很多時間，也需要額外的空間來做鏈結。因此我們想到利用陣列有隨機存取(random access)的優點，以陣列(array)模擬鄰接串列實作。

以下圖 11 的陣列表示法即模擬實作了鄰接串列，相對的位置則代表著相同的意義。陣列中的每一列儲存著與每一個點相關的資訊，例如從第二列，我們可以知道：點(莖幹)2 的長度範圍爲[3, 7]，在經過長度範圍爲[6, 10]的邊(環狀結構)可以到達點 3，而點 2 亦可由經過長度範圍爲[1, 4]的邊到達點 4。

1	6	8	0	2	2	0	0	0
2	3	7	6	10	3	1	4	4
3	4	7	2	5	3	1	4	2
4	5	8	3	5	4	0	2	1

圖 11. 以矩陣表示法表示圖 10 中之鄰接串列

3.3 系統主架構

下圖爲本系統的主要流程圖，系統先讀入使用者輸入的序列及系統參數，根據輸入序列產生背景序列，再以預測工具對輸入序列與背景序列產生個別的二級結構，之後分析結構，將這些結構轉爲本系統所使用的描述語言。接著進行系統核心的基因規劃法，由演化的方法預測出核醣核酸的共同結構元，再由後處理對預測的結果做修正，最後輸出共同結構元。

在以下的各節將做更詳細的說明：

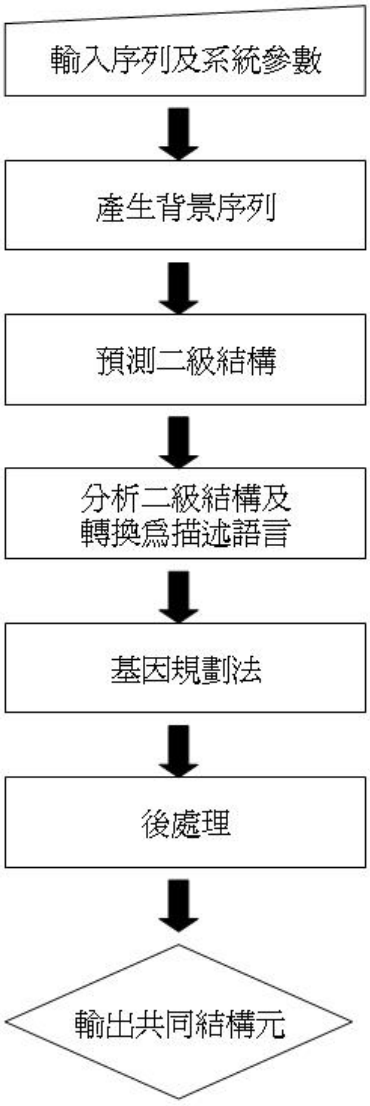


圖 12. 系統流程圖

3.3.1 輸入序列及系統參數

一開始讀入使用者輸入的核醣核酸序列以及系統參數，使用者可以使用系統預設的參數，若使用者對於輸入的核醣核酸序列的生物背景有些了解，則可以藉由自行設定參數來使實驗達到更好的效果。

使用者可以自行定義的參數包含系統能預測的莖幹數目最大上限、莖幹內允許環狀結構的大小、負面背景資料的產生倍數等，以及在執行基因規劃法時所需要的各種參數，如族群的大小(population size)、一個個體(individual)產生突變(mutation)的機率、兩個個體進行互交(crossover)的機率、個體產生重製(reproduction)的機率，還有系統進行演化的代數(generation)等。

而輸入系統的核醣核酸序列檔案以 FASTA 格式表示，檔案內容第一行以大於(>)符號開始，後面則接第一條序列名稱與註解，第二行則爲此序列的內容，以各鹼基所組成的序列表示。第三、四行以同樣表示法表示第二條序列，第五、六行以同樣表示法表示第三條序列，後面各序列皆類似。以下爲 ctRNA_pND324 家族序列的一部份：

```
> AL592102.1/21892-21975 (ctRNA_pND324)
AGACAAUGUGAUGUUCACGAUAGAAGCCGCUCCCAUCGACGACACUCGAUGUCCGUACAGAUACGGUUAUCACGCCCCCGUAGAAAACUGCUCCUUU
> X96952.1/270-186 (ctRNA_pND324)
CAGAAAUGACCUCCGUCACAUAUAGACCGACGCUCUCACACGUUCAGUGAUCAGCGAGCCGAUUUCAGAACUUGGCGUGGUAUAAAAUACGCUCCUU
> AJ493278.1/8242-8159 (ctRNA_pND324)
CACCCACAUGUAUAUAAAUACGCUCCUUUGCGUUUUGUGUAAUAAGCAUAAAGAAAAACUUUUGGUCGGGAAUUUCUUUAUGCUUUUAUUGUACCAG
> U35629.2/270-185 (ctRNA_pND324)
GUCAGCAGGACCAAUCAUGUAGGUAUAGUAAUUGCUCCUUUGUGAGUGAUUUUGGUUAAGCAUGAAGAAAUGCUCUGCAAAAAGUUUUUUCUUCAUG
> AJ132009.2/384-301 (ctRNA_pND324)
UACGCCGACCUCCGCGGUUUGUAAAUACUCCUUUGUGAGUGAUUUUAGAUAGGCAUAGAGAAAAAUCUUUAGCGAGUCAAUUUCUCUAUGCUUUUAU
> AF013595.1/382-299 (ctRNA_pND324)
GCAGAGUUUUCAUCGUUCUUCAAAGCUUUUAGGCUCCGACUCUGGCAUAUCAGCAGUUUCUAGCACUCAUACAUUGUAAAUACUCCUUUGUGAGUGA
> Z22704.1/624-539 (ctRNA_pND324)
CGGAAGGUCGUUGUCAUUGAACACGGGUUGAAUUCUUGAGUAGGAGCCCACAAUCUGAUGCCCGCAUCCUUAGUAAUACUCCUUUGUGAGUGUUUUU
> AF001314.2/271-188 (ctRNA_pND324)
UGUAGCUGUUGUUUAACGGAAUCUGUCCGGCUAGUGUUUCCUGAGUGAAGUCAAAACCACUGGCGAUGCUUGUAAAUACGCUCCUUUGCGUGUUUUA
> AJ550510.1/1776-1692 (ctRNA_pND324)
CACUCAUUAGGGGAGAGAAAACGUUUGGGCCUUUCAACAGUCUUGAGAAGCCGCUCCUUAUGAGUAAUUUUGGCUAAGCAUAGAGAAGUCAUUUCGU
```

圖 13. FASTA 格式範例

3.3.2 產生背景序列

根據本研究的假設，具有生物意義的二級結構元不會任意出現在隨機產生的序列中，因此我們採用監督學習法(supervised learning)，藉由使用負面背景資料來抑制太過普遍的結構。

負面背景資料的產生方法則依據輸入序列的資料產生，負面背景序列的長度模擬輸入序列的長度，數量則以使用者輸入的倍數參數做決定，設爲一至三倍。當背景序列倍數設爲三倍時，第一到三條背景序列的長度會取輸入序列第一條的長度，第四到六條背景序列的長度會取輸入序列第二條的長度，依此類推。

由於已知自然界中的核甘酸序列，相鄰的鹼基對之間是有相關性的，因此使用一級(first order)序列產生法產生背景序列的鹼基，亦即每一條序列的第一個鹼基是由四個鹼基個別出現的機率來決定，之後的每個鹼基則必須考慮前一個鹼基的種類，由條件機率決定出現的鹼基。

3.3.3 預測二級結構

目前現有許多可以將序列折疊成二級結構的預測工具可供使用，我們可將輸入的序列及系統產生的背景序列分別輸入這些工具來預測二級結構，再取得每條序列產生的數個候選結構。

當使用 Mfold 做爲我們的前處理器時，Mfold 輸出的檔案有數種檔案格式，而我們取其中的 ct 檔來使用，下頁圖 14 中爲 ctRNA_pND324 家族中的 AL592102.1 序列片段，經由 Mfold 預測出來的第二個預測結構的 ct 檔。

在 ct 檔中第一列分別表示序列長度、結構能量、以及序列名稱，之後的第一行表示索引(index)、第二行爲序列的鹼基、第五行則爲鹼基配對的所在位置，我們可由下頁圖中看出有(7, 19)(8, 18)(9, 17)(10, 16)四個連續的鹼基對所形成的一個莖幹。

而在本研究的實驗中，爲了方便與其他相關研究做比較，因此不限於使用 Mfold做爲前處理器，亦可能使用其他的序列折疊預測工具。

```
184   dG = -44.94   AL592102.1/21892-21975
  1 A     0     2     0     1
  2 G     1     3     0     2
  3 A     2     4     0     3
  4 C     3     5     0     4
  5 A     4     6     0     5
  6 A     5     7     0     6
  7 U     6     8    19     7
  8 G     7     9    18     8
  9 U     8    10    17     9
 10 G     9    11    16    10
 11 A    10    12     0    11
 12 U    11    13     0    12
 13 G    12    14     0    13
 14 U    13    15     0    14
 15 U    14    16     0    15
 16 C    15    17    10    16
 17 A    16    18     9    17
 18 C    17    19     8    18
 19 G    18    20     7    19
 20 A    19    21     0    20
 21 U    20    22     0    21
 22 A    21    23     0    22
 23 G    22    24   183    23
 24 A    23    25   182    24
 25 A    24    26     0    25
 26 G    25    27   180    26
 27 C    26    28   179    27
 28 C    27    29   178    28
 29 G    28    30     0    29
 30 C    29    31     0    30
 31 U    30    32     0    31
 32 C    31    33     0    32
 33 C    32    34     0    33
 34 C    33    35     0    34
 35 A    34    36   111    35
 36 U    35    37   110    36
 37 C    36    38   109    37
 38 G    37    39     0    38
 39 A    38    40     0    39
 40 C    39    41     0    40
 41 G    40    42   104    41
 42 A    41    43   103    42
 43 C    42    44   102    43
 44 A    43    45   101    44
 45 C    44    46   100    45
 46 U    45    47    99    46
 47 C    46    48    98    47
 48 G    47    49    71    48
 49 A    48    50    70    49
 50 U    49    51    69    50
 51 G    50    52    68    51
 52 U    51    53     0    52
 53 C    52    54    66    53
 54 C    53    55    65    54
 55 G    54    56    64    55
 56 U    55    57    63    56
 57 A    56    58    62    57
 58 C    57    59     0    58
 59 A    58    60     0    59
 60 G    59    61     0    60
 61 A    60    62     0    61
 62 U    61    63    57    62
 63 A    62    64    56    63
 64 C    63    65    55    64
 65 G    64    66    54    65
 66 G    65    67    53    66
 67 U    66    68     0    67
 68 U    67    69    51    68
 69 A    68    70    50    69
 70 U    69    71    49    70
 71 C    70    72    48    71
 72 A    71    73     0    72
 73 C    72    74     0    73
 74 G    73    75     0    74
 75 C    74    76     0    75
 76 C    75    77     0    76
 77 C    76    78     0    77
 78 C    77    79     0    78
 79 C    78    80     0    79
 80 G    79    81    91    80
 81 U    80    82    90    81
 82 A    81    83    89    82
 83 G    82    84    88    83
 84 A    83    85     0    84
 85 A    84    86     0    85
 86 A    85    87     0    86
 87 A    86    88     0    87
 88 C    87    89    83    88
 89 U    88    90    82    89
 90 G    89    91    81    90
 91 C    90    92    80    91
 92 U    91    93     0    92
 93 C    92    94     0    93
 94 C    93    95     0    94
 95 U    94    96     0    95
 96 U    95    97     0    96
 97 U    96    98     0    97
 98 G    97    99    47    98
 99 A    98   100    46    99
100 G    99   101    45   100
101 U   100   102    44   101
102 G   101   103    43   102
103 U   102   104    42   103
104 U   103   105    41   104
105 U   104   106     0   105
106 U   105   107     0   106
107 U   106   108     0   107
108 A   107   109     0   108
109 G   108   110    37   109
110 A   109   111    36   110
111 U   110   112    35   111
112 A   111   113     0   112
113 C   112   114     0   113
114 G   113   115   151   114
115 C   114   116   150   115
116 A   115   117   149   116
117 U   116   118   148   117
118 G   117   119   147   118
119 A   118   120   146   119
120 A   119   121   145   120
121 G   120   122   144   121
122 A   121   123   143   122
123 U   122   124     0   123
124 U   123   125     0   124
125 C   124   126     0   125
126 U   125   127     0   126
127 C   126   128   138   127
128 U   127   129   137   128
129 C   128   130     0   129
130 G   129   131     0   130
131 A   130   132     0   131
132 C   131   133     0   132
133 G   132   134     0   133
134 A   133   135     0   134
135 A   134   136     0   135
136 A   135   137     0   136
137 A   136   138   128   137
138 G   137   139   127   138
139 U   138   140     0   139
140 G   139   141     0   140
141 U   140   142     0   141
142 U   141   143     0   142
143 U   142   144   122   143
144 C   143   145   121   144
145 U   144   146   120   145
146 U   145   147   119   146
147 C   146   148   118   147
148 A   147   149   117   148
149 U   148   150   116   149
150 G   149   151   115   150
151 C   150   152   114   151
152 U   151   153     0   152
153 U   152   154     0   153
154 U   153   155   176   154
155 U   154   156   175   155
156 A   155   157   174   156
157 U   156   158   173   157
158 U   157   159   172   158
159 A   158   160   171   159
160 U   159   161   170   160
161 A   160   162   169   161
162 C   161   163   168   162
163 C   162   164     0   163
164 A   163   165     0   164
165 C   164   166     0   165
166 U   165   167     0   166
167 A   166   168     0   167
168 G   167   169   162   168
169 U   168   170   161   169
170 G   169   171   160   170
171 U   170   172   159   171
172 G   171   173   158   172
173 A   172   174   157   173
174 U   173   175   156   174
175 A   174   176   155   175
176 A   175   177   154   176
177 A   176   178     0   177
178 G   177   179    28   178
179 G   178   180    27   179
180 C   179   181    26   180
181 C   180   182     0   181
182 U   181   183    24   182
183 C   182   184    23   183
184 A   183     0     0   184
```

圖 14. ct 檔格式範例

3.3.4 分析二級結構及轉換爲描述語言

在此步驟則將前處理器產生之二級結構轉換成本系統的描述語言，讀入的檔案預設爲 ct 檔，若前處理器的輸出不是 ct 檔則必須先進行轉換。系統根據 ct 檔中的鹼基配對資訊，研判產生莖幹結構長度、環狀結構長度，以及莖幹結構與環狀結構之間的相對關係。

在 ct 檔中，我們可以看出鹼基之間的配對關係，當遇見連續有配對的鹼基，若其配對的鹼基也連續，則將這些連續的鹼基與其配對的鹼基視爲一個莖幹結構；若配對的鹼基不連續，則會產生兩個以上的莖幹。當遇見不連續的鹼基，則視爲環狀結構。

例如系統可以根據上頁圖 14 中序列 AL592102.1 的 ct 檔，得到如下的資料結構表示法：

```
1( 4, 4) --> ( 5,  5) -->  1 --> ( 3,  3) -->  2
2( 2, 2) --> ( 1,  1) -->  3 --> ( 0,  0) -->  0
3( 3, 3) --> ( 6,  6) -->  4 --> ( 1,  1) -->  2
4( 3, 3) --> ( 3,  3) -->  5 --> ( 2,  2) -->  9
5( 7, 7) --> ( 0,  0) -->  6 --> ( 4,  4) -->  4
6( 4, 4) --> ( 1,  1) -->  7 --> ( 8,  8) -->  8
7( 5, 5) --> ( 4,  4) -->  7 --> ( 1,  1) -->  6
8( 4, 4) --> ( 4,  4) -->  8 --> ( 6,  6) -->  5
9( 9, 9) --> ( 4,  4) --> 10 --> ( 2,  2) --> 11
10( 2, 2) --> ( 8,  8) --> 10 --> ( 4,  4) -->  9
11( 9, 9) --> ( 5,  5) --> 11 --> ( 1,  1) -->  3
```

圖 15. 由圖 14 所得之資料結構表示法

其對應的概念圖爲：

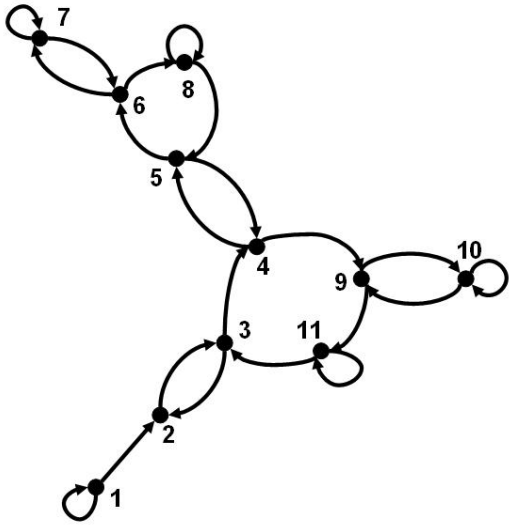


圖 16. 對應圖 15 之概念圖

而此結構的摺疊形狀如下：

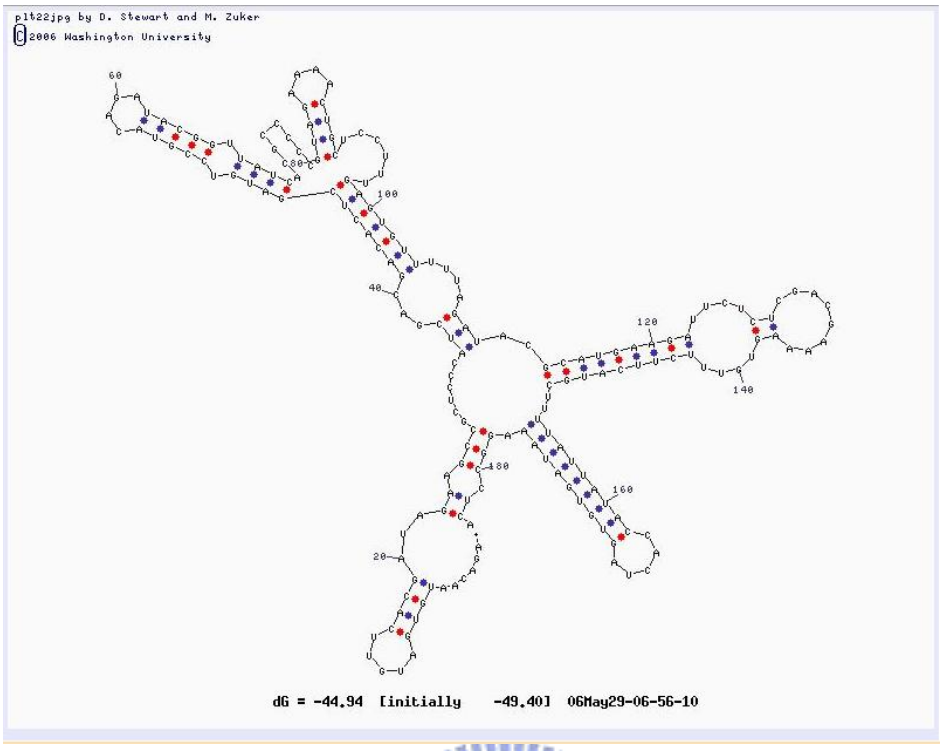


圖 17. 序列 AL592102.1(ctRNA_pND324)由 Mfold 產生之第二候選

觀察此結構，其中存在有兩莖幹間的內部環狀結構長度爲 1 的情形，另外還有莖幹長度爲 2 的情形發生。我們在系統的設計上，可以忽略以上的情形，也就是說，將內部環狀結構長度爲 1 的兩相鄰莖幹視爲一個莖幹，以及將長度小於 3 的莖幹拆開成環狀結構。如此一來，使得整個結構的莖幹數減少而降低了複雜性，亦使本系統增加了些彈性，可以找出差異性較大的共同結構元。

當略過上述的情形後，上頁圖中的概念圖可以簡化爲如下：

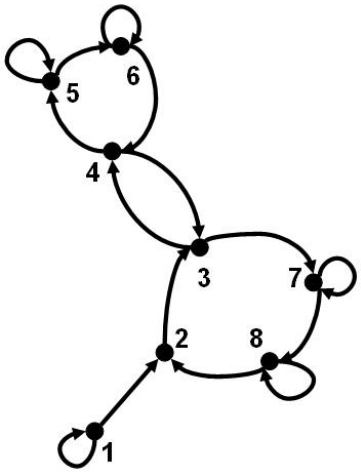


圖 18. 簡化後之概念圖

上頁圖 18 的概念圖對應的資料結構表示法則爲：

```
1( 4, 4) --> ( 5,  5) -->  1 --> ( 3,  3) -->  2
2( 5, 5) --> ( 6,  6) -->  3 --> ( 0,  0) -->  0
3( 3, 3) --> ( 3,  3) -->  4 --> ( 2,  2) -->  7
4( 7, 7) --> ( 0,  0) -->  5 --> ( 4,  4) -->  3
5( 9, 9) --> ( 4,  4) -->  5 --> ( 8,  8) -->  6
6( 4, 4) --> ( 4,  4) -->  6 --> ( 6,  6) -->  4
7( 9, 9) --> (20, 20) -->  7 --> ( 2,  2) -->  8
8( 9, 9) --> ( 5,  5) -->  8 --> ( 1,  1) -->  2
```

圖 19. 對應圖 18 之資料結構表示法

亦即將頂點數爲 11 個的圖形資料結構簡化成 8 個點。

3.4 基因規劃法

基因規劃法源自於基因演算法(genetic algorithms, GA)，爲 John Koza 在 1992 年首先提出，基本架構遵循演化式計算的精神，模擬生物演化過程中「物競天擇，適者生存」的概念，自隨機產生的初代個體中，透過突變、互交、複製等演化過程，並且經過與其他個體的互相競爭，逐漸演化留下個體適應度高的個體。經由一代一代的演化，最後留下來適應度最高的個體，即代表了此問題領域的最佳可能解。

基因規劃法分爲五個主要部份：

1. 產生初代個體 (initial population)、
2. 適應函數 (fitness function)、
3. 母代挑選機制 (selection)、
4. 演化運算子 (genetic operator)、
5. 終止條件 (termination criterion)。

系統從得到的二級結構中擷取初代個體，計算所有個體的適應分數，透過挑選機制產生母代，並經由演化運算子得到子代個體，直到個體數目達到族群數量。再如此反覆的一代一代得進行演化，直到滿足終止條件爲止。最後則輸出最佳的幾個個體。

本系統的基因規劃法流程如下：

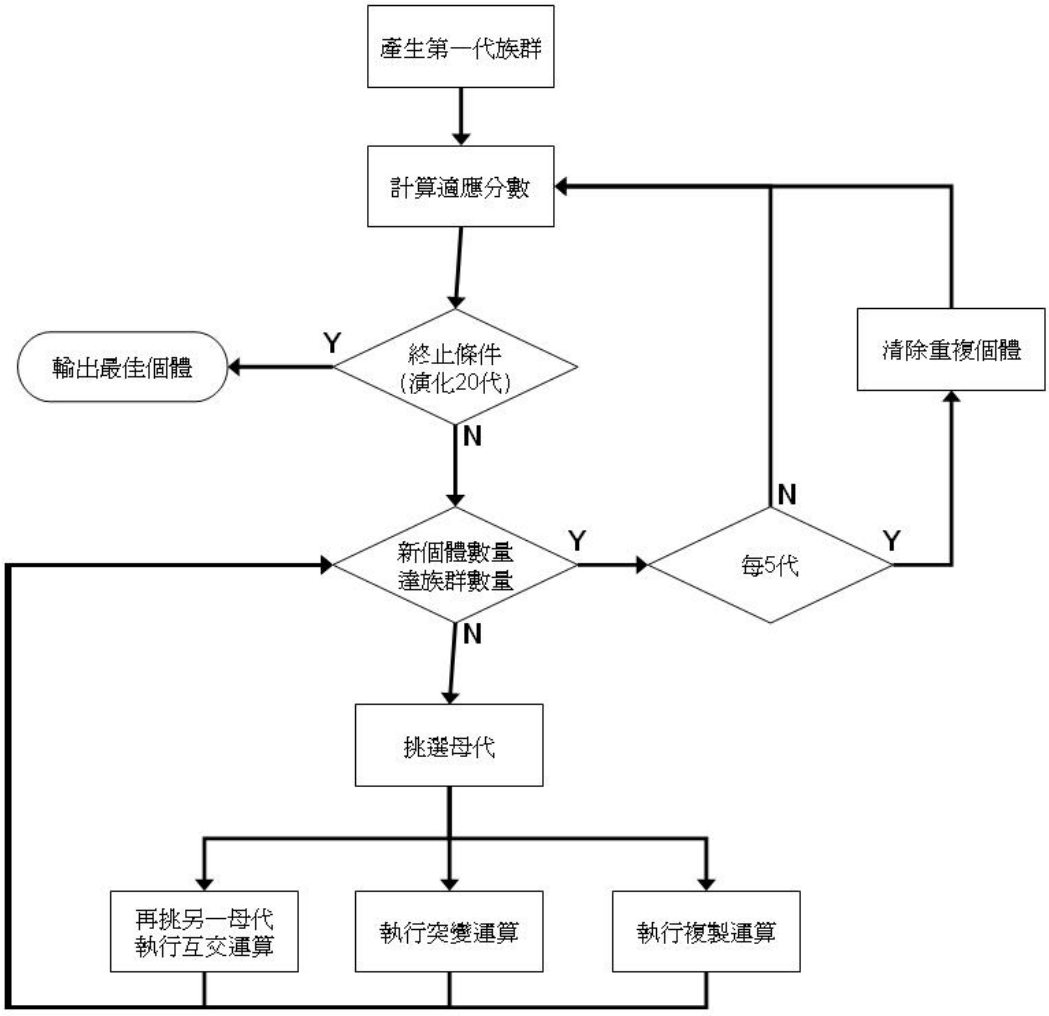


圖 20. 基因規劃法流程圖

以下各小節將詳述故部分的實作方法：

3.4.1 產生初代個體

在演化的過程中，有個良好的演化起點可以加快搜尋的效率。由於共同結構元表示會出現在各序列上的相似結構，因此我們從輸入序列的候選結構中擷取子結構來做爲第一代。而取子結構的方法，則相當於在候選結構的 RNA dual graph 概念圖中取出子圖一樣，先在圖中隨機取一個頂點，然後隨機沿著邊走向其他頂點，然後將走過的頂點與和這些點相關的邊取出來構成子圖，並將子圖調整成一個合理 RNA dual graph。最後再將子結構中的每個長度隨機往外拓展，形成一長度區間。

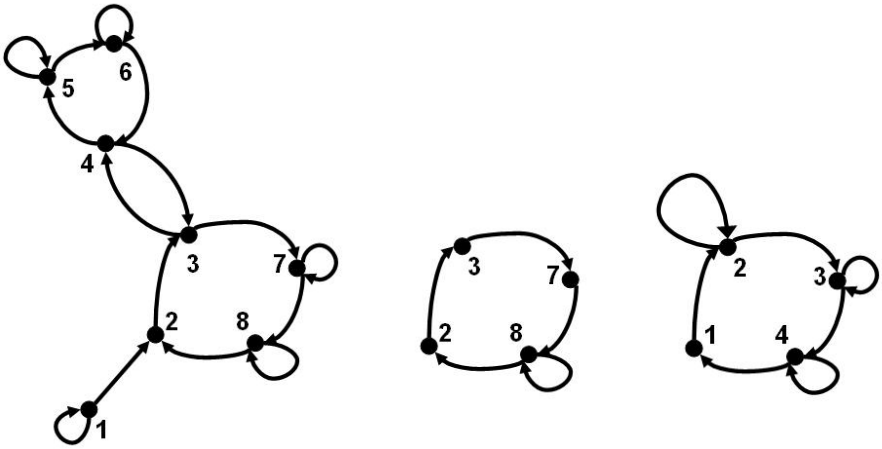


圖 21. 產生初代個體：左圖爲候選結構，中圖爲隨機取得之子結構，右圖則爲將中圖補上適當邊之後所得之合理的 RNA dual graph。

我們取前面候選結構的概念圖(如上圖 21 左圖)來做例子，假設我們隨機取到的點爲頂點 3，而從頂點 3 出發，沿著邊隨機走的路徑爲：3→7→8→8→2→3，依此路徑取得了子圖(如上圖 21 中圖)，接著補上應該有的邊，並計算其長度，再重新調整頂點編號(如上圖 21 右圖)，得到一個合理的 RNA dual graph。則此子圖的資料結構表示法如下：

```
1( 5, 5) --> ( 6,  6) -->  2 --> ( 0,  0) -->  0
2( 3, 3) --> (69, 69) -->  2 --> ( 2,  2) -->  3
3( 9, 9) --> (20, 20) -->  3 --> ( 2,  2) -->  4
4( 9, 9) --> ( 5,  5) -->  4 --> ( 1,  1) -->  1
```

圖 22. 對應圖 21 右圖之資料結構表示法

其表示的子結構如下圖方框部份。

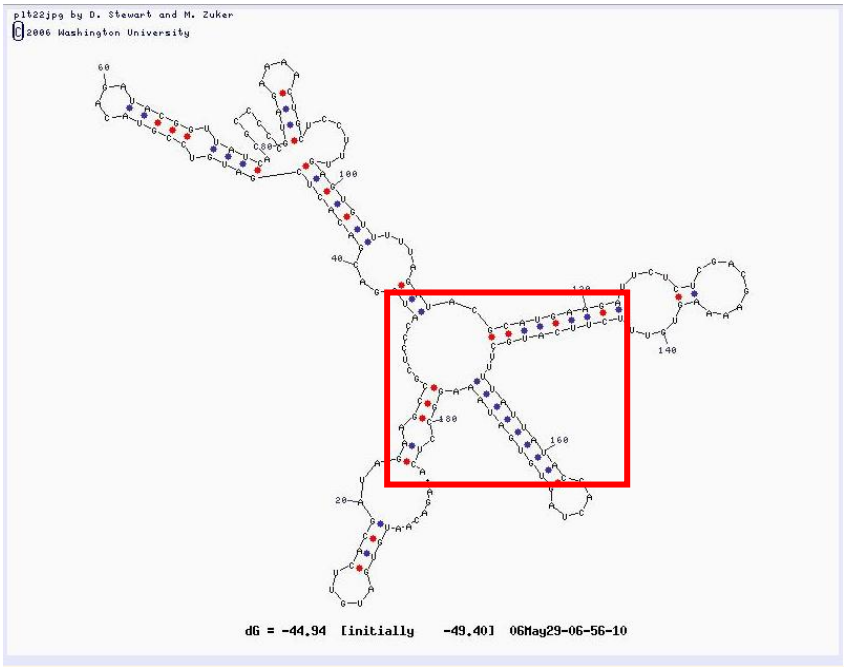


圖 23. 方框內表示取得之子結構，亦即所產生之初代個體

最後我們將此子結構中的每個長度隨機向外拓展，所得即爲演化的初代個體，如下圖 24 所示。

```
1( 4, 8) --> ( 4,  9) -->  2 --> ( 0,  0) -->  0
2( 3, 6) --> (66, 73) -->  2 --> ( 1,  5) -->  3
3( 8,10) --> (18, 22) -->  3 --> ( 0,  3) -->  4
4( 7,12) --> ( 3,  7) -->  4 --> ( 0,  4) -->  1
```

圖 24. 將圖 22 表示之結構隨機拓展長度之資料結構表示法

3.4.2 適應函數

適應函數是演化式計算中最核心的部份，不同的適應函數會影響整個族群演化的方向，因而影響到最後演化的結果。好的適應函數不僅能將族群個體發展導向正確的演化方向，亦能減少不必要的搜尋，縮小搜尋空間，提升搜尋的效率及品質。

本研究所定義的適應函數包含了兩部份：一部分是能兼顧正確率(precession)與擷取率(recall)的 F-score，另一方面則是考慮配對的鹼基對數的影響。

在相關的研究顯示，若爲了增加該實驗的正確率則會使得擷取率下降，若爲了提高擷取率則會犧牲部分正確率，因此要同時考慮兩者來設計適應函數才能確保演化過程是走向正確的方向。而 F-score 則是取正確率與擷取率的調和平均數，預期當正確率與擷取率分數都高時才會拉高整體的分數，這不會因爲只有某一個值的增加就過度拉高整體的分數。

F-score 定義如下：

$$F(I) = \frac{1}{\frac{1}{2}\left[\frac{1}{M/(M+N)} + \frac{1}{M/C}\right]} = \frac{2M}{M+N+C}$$

其中M 代表輸入序列中，包含結構元 I的個數；N 代表背景序列包含結構元 I 的個數； C 爲輸入序列的總個數。 $\frac{M}{M+N}$則表示正確率， $\frac{M}{C}$表示擷取率。

然而背景資料對於較大的共同結構元影響不大，當 F-score 相近時，我們會傾向選取結構較大且較完整的個體，亦即會傾向找鹼基配對數較多的結構。因此定義 $P(I)$表示鹼基配對數所產生的影響，也就是將結構元 I 符合序列的鹼基數除以鹼基配對最多的結構的鹼基數，如此可以使 $P(I)$正規劃在 0 到 1 之間。

本系統的 fitness function 則定義爲：

$$fitness(I) = \alpha \times F(I) + (1-\alpha) \times P(I).$$

其中 α 爲一個介於 0 到 1 之間的值，當 α 愈大時，系統會偏好被更多輸入序列包含的結構元，但可能受到雜訊的影響，只能找到共同結構元的子結構。而當 α 愈小時，則系統會偏好找到鹼基配對數較多的結構，但很有可能受到少數幾條序列的影響，找到的結構只符合少數幾條序列，而非是全體的共同結構元，當輸入序列中每條序列的長度差異性較大時，此類的影響更爲明顯。

而在本系統的測試中，當 α 設定爲 0.7 時，可以滿足絕大部份的資料。

3.4.3 母代挑選機制

產生新一代個體時，我們先保留一定比例適應分數高的個體到下一代，剩餘的個體則透過挑選機制選出母代，執行演化運算後產生新一代的個體。本系統採用的挑選機制爲競賽法(tournament)，競賽法可以保留隨機的機制，也符合適者生存的原理，是目前最普遍採用的選取方法。其挑選的方法爲：自母代群體中隨機挑選出一定數量的個體，個體之間彼此比較適應分數，其中分數最高者被挑選出來作爲母代個體，進而產生子代。

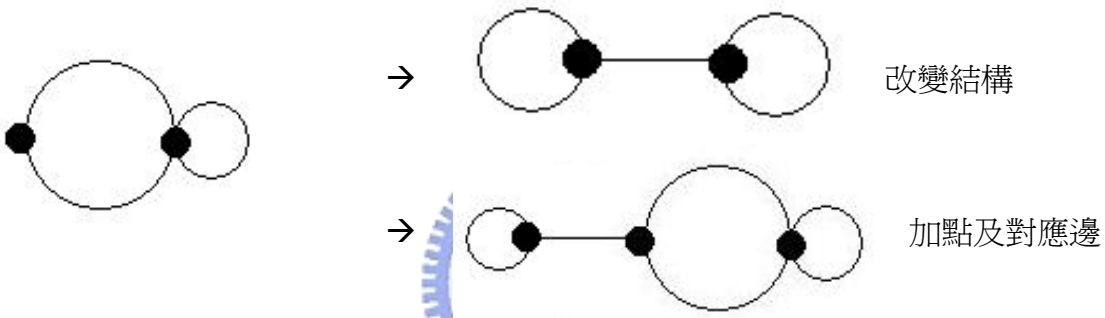
3.4.4 演化計算子

以下各小節介紹本研究所使用的各演化運算子：

3.4.4.1 突變(mutation)

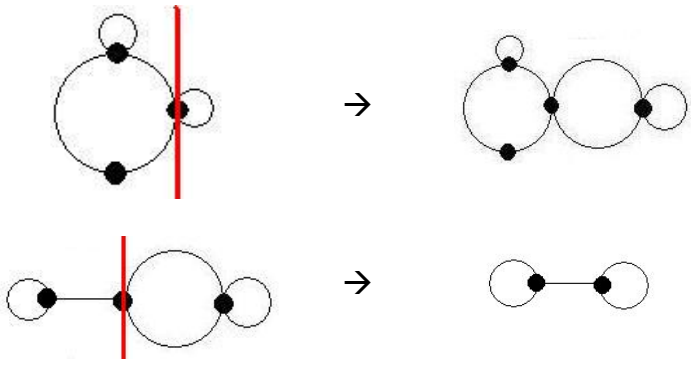
突變包含了長度突變與結構突變：長度突變是在挑選的結構中，隨機挑選其概念圖中的一個點或一個邊，然後改變其長度範圍。

而結構突變則是隨機改變挑選結構的結構形狀，或是在原本結構多加一個點其對應邊。



3.4.4.2 互交(crossover)

隨機選擇兩個結構，各選擇其中一個點，依此爲依據，交換部分子結構，其概念圖如下。



互交不僅可以改變結構拓璞，莖幹數也隨之改變，而當挑選到的莖幹恰好是共同結構元上的不同子結構時，透過互交將兩者結合起來，可以使跳脫區域最佳解的機會大增。

3.4.4.3 重製

除了保留適應分數高的個體外，我們也保留一些機會讓母代能完整保留下來，以增加族群的多樣性。

3.4.4.4 清除重複個體

當演化到一定程度後，可能會往某幾個區域最佳解逼近，而使整個族群充斥著特定的個體。而族群變異度太小，缺乏多樣性，容易使演化結果侷限在區域最佳解，因此我們每五代之後，會將過多的重複個體清除，而再以產生初代個體的方法，隨機產生新的個體，補足刪除掉的個體。

3.4.5 終止條件

通常系統在 20 代內即能收斂到不錯的結果，並且考量時間因素，我們將中止條件設定在演化 20 代。

3.4.6 後處理

我們透過基因規劃法找出找到輸入序列的共同結構元後，找出共同結構元在每條序列上的位置，然後考慮配對的莖幹能否往外或往內延伸幾個鹼基對。另外再針對沒被找出結構的序列，搜尋判斷是否可能有共同結構元的存在。最後再將完整的結果輸出給使用者。

第四章、實驗

4.1 實驗評估標準

與目前多數預測二級結構的研究一樣，我們採用 Matthews 的相關係數(Matthews correlation coefficient)來做爲評估的標準。其原始定義如下：

$$C = \frac{P_t N_t - P_f N_f}{\sqrt{(N_t + N_f)(N_t + P_f)(P_t + N_f)(P_t + P_f)}}$$

其中 P_t爲正確正預測的總鹼基對數(true positive)，即系統預測到的鹼基對也出現在正確答案中的鹼基對數；P_f爲錯誤正預測的總鹼基對數(false positive)，即系統預測到的鹼基對沒有出現在正確答案中的鹼基對數；N_t爲正確負預測的總鹼基對數(false negative)，即沒有出現在預測結果上也沒有出現在正確答案上的鹼基對數；N_f爲錯誤負預測的總鹼基對數(false negative)，即沒有出現在預測結果上卻有在正確答案上出現的鹼基對數。

化簡後的式子如下：

$$C \approx \sqrt{\frac{P_t}{P_t + N_f} \frac{P_t}{P_t + P_f}}$$

其中 $\frac{P_t}{P_t + P_f}$ 表示系統的精確率(precession)，又稱爲選擇性(selectivity)，

而 $\frac{P_t}{P_t + N_f}$ 表示系統的擷取率(recall)，又稱爲敏感性(sensitivity)。

4.2 實驗測試資料

本研究使用多種核醣核酸家族作爲實驗測試的資料，包含過去文獻常用來評估的資料，以及其他各種多樣化的資料。簡介如下：

S. cerevisiae tRNA-PHE

tRNA-PHE 爲攜帶胺基酸 PHE 的轉移核醣核酸，其共同結構元包含四個莖幹結構，形狀像是四瓣的苜蓿葉，這對於使用熱力學來進行結構摺疊的方法是一種比較困難的資料。

實驗測試的資料來自於先前的文獻[Griffiths-Jones et al.,(2003), Sundaralingham & Rao,(1975)]，其中包含兩組資料：一組爲高相似的序列，其序列相似度爲 84.4%，此組資料爲 11 條序列，序列長度皆爲 73；另一組爲中相似度的序列，其序列相似度爲 60.0%，此組資料爲 11 條序列，序列長度皆爲 75。

E. coli RNase P

RNase P 是一種普遍存在內切核醣核酸(endoribonuclease)，家族成員在序列與結構上皆有相對比較高的多變性，在測試的資料中含有 11 條莖幹，其中還包含了一個擬結結構。

實驗測試資料來自於 The RNase P Database[Brown, 1999]，其中包含兩組資料，一組爲高相似性的資料，其序列的相似度爲 81.5%，此組資料內有 9 條序列，其平均長度爲 335，其中五條序列則將原始資料在 5’ 與 3’ 兩端切去一部份以增加測試資料的困難性，另一組資料爲中相似度資料，其序列的相似度爲 67.1%，內有 11 條序列，平均長度爲 359，。

Hepatitis C virus 3'X element

HCV_X3 家族爲 C 型肝炎病毒，其共同結構元包含三條相鄰的莖幹，其中一條莖幹有長度爲 1 的突起(bulge)，第二條莖幹有長度爲 3 的突起，第三條莖幹則

分別在莖幹兩股不對稱的位置各有一個長度爲 1 的突起。實驗的測試資料從 Rfam 的 HCV_X3 家族中取出 seed 裡的 16 條序列，其平均長度爲 100。

ctRNA

ctRNA(counter-transcribed RNA)可嵌入 RepB 蛋白質的信息核醣核酸(mRNA)中，而會產生轉譯抑制的功能。本實驗測試的資料爲 Rfam 資料庫裡的 48 條 ctRNA_pND324 序列，平均長度爲 85，其共同結構元爲兩個相鄰的莖幹，其中的一個莖幹比較有變化性，在部分序列中含有突起或是內部環狀結構，而此莖幹在每條序列中的長度爲 5~10 不等。

本實驗還準備了另一組測試資料，將原本的 48 條序列根據真實資料分別向兩端延長，左右延長的長度隨機但兩端延長總和爲 100，讓此組資料更有變化性，而更難以預測。

Purine riboswitch

Purine 的共同結構元爲三分支的環狀結構，而整個家族中有數條序列的莖幹存在長度爲 1~2 的未配對鹼基，而莖幹長度在每條序列中也有些變化。我們測試資料來自於 Rfam 資料庫，取自 seed 裡的 35 條序列，並且根據真實資料向序列兩端延長，延長長度爲隨機，但限制總和爲 100，而其中兩條序列未延長，可測試系統是否會略過此兩條長度較短的序列。

Enterovirus cis-acting replication element

Entero_CRE 的共同結構元爲 1 個莖幹的髮夾結構，其中包含了一個不對稱的內部環狀結構，兩端的環狀結構長度分別爲 1 與 2。而此實驗的測試資料取自於 Rfam 的 Entero_CRE 家族中的 56 條 seed 的序列，並且根據真實資料向其兩端延長，延長長度總和爲 100~300 不等，全部序列中長度最短爲 111，最長爲 361，平均長度爲 262。

mir-160 microRNA precursor family

mir-160 的共同結構元爲一長條莖幹的髮夾結構，莖幹中包含了三個對稱

的內部環狀結構，而其髮夾環狀結構也相對的長了許多，可用來測試本系統對於兩股相距較長之莖幹的預測能力。此實驗的測試資料取自於 Rfam 的 mir-160 家族中全部(full)19 條序列，全部序列中長度最短爲 85，最長爲 136，平均長度爲 97。

所有測試資料整理如下表：

資料名稱	序列數量	平均長度	結構元莖幹數目
tRNA(high)	11	73	4
tRNA(med)	11	75	4
RNaseP(high)	9	335	11
RNaseP(med)	11	359	11
HCV_X3	16	100	3
ctRNA	48	85	2
ctRNA_ext.	48	185	2
Purine	35	220	3
Entero_CRE	56	262	1
mir-160	19	97	1

表 1. 測試資料整理表

4.3 實驗結果

本系統以 C 語言實作，測試環境的作業系統爲 Mandrake Linux 10.1，電腦配備爲 Pentium IV 3.2GHz 的中央處理器與 2Giga-bytes 的記憶體。

所有實驗基因規劃法的參數：族群數量爲輸入序列之 100 倍，結構突變率爲 45%，長度突變率 45%，互交率 5%，重置率 5%。結構部份不多加限制，但有濾掉長度小於 3 的莖幹以及忽略莖幹內長度爲 1 的環狀結構。

實驗所使用的前置器爲 RNAshapes 的 folding 功能，實驗結果的數據爲實驗數次所取得的平均值，每次的實驗皆以 linux 系統時間做爲隨機種子(random seed)，可確保每次實驗不會重複。

4.3.1 與 RNAshapes 比較

由於 RNAshapes 與我們的系統皆是以各序列個別摺疊的結果作爲找尋核醣核酸共同結構元的出發點，而且 RNAshapes 在部分的實驗測試上表現不錯，因此以 RNAshapes 來與我們的系統做比較。

本系統(FGGP)與 RNAshapes[本文 2.2.5.1 小節]的實驗結果比較如下表：

dataset	RNAshapes			FGGP		
	Selectivity(%)	Sensitivity(%)	MCC(%)	Selectivity(%)	Sensitivity(%)	MCC(%)
tRNA(high)	33.61	34.63	34.12	88.53	83.55	**86.00**
tRNA(med)	78.81	80.52	79.66	83.40	84.85	**84.12**
RNaseP(high)	NA	NA	NA	81.34	16.59	37.64
RNaseP(med)	NA	NA	NA	49.76	13.73	26.13
HCV_X3	52.29	20.35	51.31	97.40	79.33	**87.40**
ctRNA	70.23	90.53	79.74	79.96	87.61	83.70
ctRNA_ext.	61.07	73.31	66.91	71.57	66.67	69.07
Purine	46.12	56.19	50.91	82.58	91.02	**86.70**
Entero_CRE	NA	NA	NA	64.64	70.59	67.55
mir-160	63.21	98.67	78.97	85.27	97.56	91.21

表 2. RNAshapes 與 FGGP 的實驗結果比較表

在表 2 中，selectivity 表示在預測的結果中預測正確的比率，sensitivity 表示在正確答案中有預測出來且正確的比率，MCC 則表示 Matthews 相關係數[本文 4.1 小節]，而表中的 NA 表示 RNAshapes 無法產生結果。

在表 2 中可以看出 RNAshapes 對部分測試資料表現極差，這可以歸咎於 RNAshapes 的前處理器對這些資料的表現不佳，RNAshapes 對於其前處理性的依賴性相當大，因此結果受前處理器的影響相當大。而我們的系統 FGGP 雖然也會受到前處理器的影響，但於由於有演化的過程，因此對前處理器的依賴性不會太大。在以上的各組測試資料中，我們的系統(FGGP)所得到的結果皆比 RNAshapes 好，而在 tRNA(high)、tRNA(med)、HCV_X3 與 Purine 的四組測試資料比較中，我們系統所得結果的 selectivity、sensitivity 與 MCC 值皆明顯比 RNAshapes 的結果好上許多。

4.3.2 實驗結果分析

下面表 3 爲實驗結果整理，各欄分別爲：資料名稱、平均序列長度、資料序列數量、FGGP 找到含預測共同結構元的序列數量、選擇性、敏感性、Matthews 相關係數以及執行主程式的時間。其中的選擇性、敏感性、Matthews 相關係數則是考慮全部序列去計算，沒有濾掉系統沒找到共同結構元的序列。

Dataset	length	# seq.	# hit seq.	Selectivity(%)	Sensitivity(%)	MCC(%)	Runtime
tRNA(high)	73	11	11	88.53	83.55	86.00	7"
tRNA(med)	75	11	11	83.40	84.85	84.12	9"
RNaseP(high)	335	9	9	81.34	16.59	37.64	21"
RNaseP(med)	359	11	11	49.76	13.73	26.13	3'06"
HCV_X3	100	16	13	97.40	79.33	87.40	11"
ctRNA	85	48	46	79.96	87.61	83.70	1'56"
ctRNA_ext.	185	48	37	71.57	66.67	69.07	10'57"
Purine	220	35	35	82.58	91.02	86.70	6'08"
Entero_CRE	262	56	38	64.64	70.59	67.55	22'22"
Mir-160	97	19	19	85.27	97.56	91.21	24"

表 3. 實驗結果數據表

對 tRNA 的兩組資料，雖然前處理器摺疊成二級結構的能力沒有很好，但由於本系統有演化的過程，可以漸漸偏向找尋較大的結構，因此可以找到四瓣苜蓿葉結構的共同結構元，而且資料量不大，所以能很快的找出還不錯的答案。

本系統對 RNase P 的表現不盡理想，由於 RNase P 較長的序列，high 與 med 兩組序列的共同結構元的鹼基數分別爲 71 與 97，共同結構元涵蓋的範圍(含莖幹與環狀結構)長度超過 250，是比較複雜的結構。由於其共同結構元的莖幹有 11 個，對我們的系統而言太過複雜。而我們在 high 的這組資料中，找到 2 個莖幹的共同結構，此爲真實的共同結構元當中的子結構，因此其 selectivity 還不錯，但仍有很多結構未找出，所以整體表現不佳。

HCV_X3 爲比較單純的結構，序列數少，長度短，而且幾乎整條序列就是共同結構元，是一組比較容易的測試資料，因此實驗結果還算不錯。

而 ctRNA 結構也很單純，其共同結構元莖幹數爲 2，但其中的一條莖幹在很多序列中存在內部環狀結構，因而影響到了系統的 selectivity。而 ctRNA_ext.則爲原序列的延伸，雜訊也因此增多，因此只找到 48 條序列中的 38 條序列的共同結構。

Purine 的共同結構元爲三條莖幹，莖幹長度皆很接近，而莖幹中長度爲 1 的環狀結構有被濾掉。雖然長度有被隨機延長過，但在全部 34 條結構亦能找到的全部的共同結構元。在系統的表現上還不錯，可能的原因之一，是系統在設計上，產生個體初代時會比較偏好封閉性的結構。

Entero_CRE 的共同結構元爲 1 個莖幹的髮夾結構，其中包含了一個不對稱的內部環狀結構，而此不對稱結構在本系統裡可以過濾掉，但由於延伸了序列的長度，相較於莖幹部分則多了很多雜訊，因此影響了實驗結果。

mir-160 的共同結構元爲 1 個長條莖幹的髮夾結構，其髮夾環狀結構相對而言較長，但我們的系統表現極佳，這顯示出我們的系統可以處理兩股距離相距較長之莖幹。

在以上各組資料的實驗中，我們的系統皆能在秒或是分的時間等級內完成，而且大多能得到還不錯的成果，與目前的相關研究相較之下，顯示我們的系統是個可被接受且擁有相當潛力的系統。

第五章、結論與未來方向

5.1 結論

本系統建立了一種新的描述語言來描述核醣核酸的二級結構，利用現有的二級結構預測工具提供能量資訊，使用基因規劃法來來尋找一群具有相同功能核醣核酸的共同結構元，不需要有序列排比的資訊，直接以二級結構作爲搜尋的目標，降低系統搜尋空間。

而系統的描述語言以圖形表示，對於一條莖幹的兩股間距離很長時，本系統亦有可能找到此莖幹，但其表現能力尚不強，系統仍較爲偏好距離較近的莖幹。若要強化此功能，則容易影響到搜尋一般的莖幹，這在需要參數設定上做選擇或調整。

我們使用基因規劃法搜尋核醣核酸的共同結構元，由實驗結果可以看出基因規劃法能避開大量雜訊的干擾，而在不會花費太多時間的情況下尚能找到還不錯的結果。

5.2 未來研究方向

在進行研究的過程中，發現尚有一些研究方向可以延伸。

5.2.1 處理共同結構元莖幹數較多之家族

在我們的實驗中，對於共同結構元莖幹數較多的 RNaseP(high)資料，我們可以找出其真實共同結構元的子結構，經由簡單的測試，我們使用 FGGP 找出預測共同結構元後，先在每條序列上移除此共同結構元，然後再重複呼叫 FGGP，如此重複，可以漸漸提高 Matthews 相關係數。但是重複進行 FGGP，會漸漸增加雜訊，之後則使預測能力愈來愈差。

因此我們可以研究如何設定一個機制，判斷該重複呼叫幾次才是最好的，以及每次重複進行 FGGP 前該如何去掉多餘的雜訊，移除預測共同結構元後該如何處理，還有重複呼叫亦可以改爲遞迴式的呼叫等，這些還有很多的研究空間，。

5.2.2 對多個家族做分群

我們以兩個家族混合資料丟入 FGGP 測試，當兩個家族結構元差異性很大時，有可能將一個家族的大部份序列取出來，因而達到了分群的目的。當家族的結構元差異性不是很大時分群的效果就不是很明顯，但可以調整某些參數可以使此能力稍微加強，因此我們可以朝著分群的方向繼續研究。

第六章、參考文獻

Baterburg F.H.D. van, Gultyaev A.P., Pleij C.W.A., Ng J. and Oliehoek J. “Pseudobase: a database with RNA pseudoknots.” Nucleic. Acids Res. 2000, 28(1):201-204.

Brown JW. “The Ribonuclease P Database.” Nucleic Acids Res. 1999, 27(1):314.

Ding Y, Lawrence C “A statistical sampling algorithm for RNA secondary structure prediction.” Nucleic Acids Research 2003, 31(24):7280-7301.

Eddy,S.R. and Durbin, R “RNA sequence analysis using covariance models.” Nucleic Acids Res. 1994, 22, 2079-25088.

Fera D, Kim N, Shiffedldrim N,Zorn J, Laserson U, Gan HH, Schlick T. “RAG: RNA-As-Graphs web resources.” BMC Bioinformatics. 2004, 5(1):88.

Gan HH, Fera D, Zorn J, Shiffedldrim N, Tang M, Laserson U, Kim N, Schlick T. “RAG: RNA-As-Graphs Database – Concepts, Analysis, and Features.” Bioinformatics 2004, 20:1285-1291.

Gardner P.P. and Giegerich R “A comprehensive comparison of comparative RNA structure prediction approaches.” BMC Bioinformatics 2004, 5:140

Gorodkin J, Heyer L, Stormo G “Finding the most significant common sequence and structure motifs in a set of RNA sequences.” Nucleic Acids Research 1997, 25(18):3724-3732.

Griffiths-Jones S, Bateman A, Marshall M, Khanna A, Eddy SR “Rfam: an RNA family database.” Nucleic Acids Research 2003, 31:439-441.

Griffiths-Jones S, Moxon S, Marshall M, Khanna A, Eddy SR, Bateman A. "Rfam: annotating non-coding RNAs in complete genomes." Nucleic Acids Res. 2005, 33(Database issue):D121-4.

Höchsmann M, Töller T, Giegerich R, Kurtz S "Local similarity of RNA secondary structures." Proc of the IEEE Bioinformatics Conference 2003:159-168.

Hofacker IL, Fontana W, Bonhoeffer S, Stadler PF "Fast folding and comparison of RNA secondary structures." Monatshefte fur Chemie 1994, 125:167-188.

Hofacker I, Fekete M, Stadler P "Secondary structure prediction for aligned RNA sequences." Journal of Molecular Biology 2002, 319(5):1059-1066.

John R. Koza. "Genetic Programming On the Programming of Computers by Means of Natural Selection." MIT Press, 1992.

Kim N, Shiffedldrim N, Gan HH, Schlick T. "Candidates for Novel RNA Topologies" J.Mol.Biol. 2004, 314:1129-1144

Klosterman P.S., Tamura M., Holbrook S.R., Brenner S.E. "SCOR: a structural classification of RNA database." Nucleic Acids Res. 2002, 30:392-394.

Knudsen B, Hein J "RNA secondary structure prediction using stochastic context-free grammars and evolutionary history." Bioinformatics 1999, 15(6):446-454.

Knudsen B, Hein J "Pfold: RNA secondary structure prediction using stochastic context-free grammars." Nucleic Acids Research 2003, 31(13):3423-3428.

Mathews D, Turner D "Dynalign: An algorithm for finding the secondary structure common to two RNA sequences." Journal of Molecular Biology 2002, 317(2):191-203.

Murty V.L. and Rose G.D. "RNABase: an annotated database of RNA structures." Nucleic Acids Res. 2003, 31, 502-504.

Perriquet O, Touzet H, Dauchet M "Finding the common structure shared by two homologous RNAs." Bioinformatics 2003, 19:108-116.

Reeder J, Giegerich R. "Consensus shapes: an alternative to the Sankoff algorithm for RNA consensus structure prection." Bioinformatics 2005, 21(17):3516-3523.

Ruan J, Stormo G, Zhang W "An iterated loop matching approach to the prediction of RNA secondary structures with pseudoknots." Bioinformatics 2004, 20:58-66.

Sankoff, D. "Simultaneous solution of the RNA folding, alignment and proto sequence problems." SIAM J. Appl. Math. 1985, 45:810-25.

Siebert S, Backofen R "MARNA A server for multiple alignment of RNAs." In Proceedings of the German Conference on Bioinformatics 2003:135-140.

Sprinzl M, Steegborn C, Hubel F, Steinberg S. "Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes." Nucleic Acids Res. 1996, 24(1):68-72.

Steffen P, Voβ B, Rehmsmeier M, Reeder J, Giegerich Robert. "RNAshapes: anintegrated RNA analysis package based on abstract shapes." Bioinformatics 2006, 22(4):500-503.

Szymanski M, Barciszewska MZ, Erdmann VA, Barciszewski J. "5S Ribosomal RNA Database." Nucleic Acids Res. 2002, 30(1):176-8.

Tamura M., Hendrix D.K., Klosterman P.S., Dchimmelman N.R.B., Brenner S.E. and Holbrook S.R. "SCOR: Structural Classification of RNA, Version 2.0." 2004, 32:182-184.

Touzet H, Perriquet O "CARNAC: folding families of relatedn RNAs." Nucleic Acids Res. 2004, 32(Web Server issue):W142-145.

Van Batenburg FH, Gultyaev AP, Pleij CW, Ng J, Oliehoek J. " PseudoBase: a database with RNA pseudoknots." Nucleic Acids Res. 2000, 28(1):201-4.

Zuker M, Stiegler P "Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information." Nucleic Acids Research 1981, 9:133-148.

Zuker M. "On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule." Science. 1989, 244(4900):48-52.

Zuker M. "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction." Nucleic Acids Res. 2003, 31(13):3406-15