

转移核糖核酸的三维结构

李家瑶

(中国科学院生物物理研究所)

核酸类物质的晶体结构的研究,迄今只有酵母苯丙氨酸转移核糖核酸(tRNA^{Phe})获得了原子水平的结果。这是利用X射线衍射晶体结构分析技术完成的。1968年,5—6个实验室宣称拿到了可供X射线衍射用的单晶。实际上,那种晶体有序程度很差,衍射分辨率很低,只能达到 $10\text{--}20\text{ \AA}$ 水平。用这样的晶体不可能“看”到分子的细微结构。1970年左右,麻省理工学院的Rich小组找到了一种叫做精胺的带正电荷的小分子,可以稳定酵母 tRNA^{Phe} 形成高度有序的晶体,衍射分辨本领几乎可以达到 $2\text{ \AA}$ 。1972年得到了它的 $4\text{ \AA}$ 分辨率的电子密度图,从图中可以跟踪 tRNA^{Phe} 多聚核苷酸链的骨架,也可以辨认沿分子骨架的磷酸根,磷酸根就象三维空间中一串缠绕的小珠。但还不能分辨多核苷酸链中的硷基。1974年中,美国MIT小组A. Rich等人 and 英国剑桥MRC小组A. Klug等人分别地解释了两种晶型的 $3\text{ \AA}$ 分辨率的电子密度图。尽管分子在晶体点阵中的包卷不同,两个三维结构的比较表明,它们实际上是一样的。说明 tRNA^{Phe} 的分子结构随晶体包卷力的不同变化不大,同时也可以得出结论:人们已经把握了正确的 tRNA^{Phe} 三维结构,首次直接“看到”了一个核酸的分子,虽然这是一个“静止”的结构,但通过核磁共振等方法对 tRNA 溶液构象的研究表明,晶体结构和溶液构象相关性很好,说明晶体中的 tRNA 分子可能是具有生物活力的。但晶体结构的信息比用其他任何手段取得的信息都要完整得多,从而打下了在三维水平上研究核酸的结构与功能关系的基础,也启发了人们对核酸的三维结构的更深入的认识。目前,已经对这一结构进

行了高分辨率的修正,获得了原子在空间中分布的更精确的坐标。最近,又有几个实验室分别测定了酵母 tRNA^{Asp} 、 tRNA^{Gly} 以及真核生物的起始 tRNA 等分子的中等分辨率的晶体结构,对这些 tRNA 类物质的结构研究发现,虽然结构之间大体相似,但局部构象仍有重大差别,这对 tRNA 结构与功能的研究又进一步提供了许多有价值的信息。

核酸的三维结构研究落后于蛋白质的研究有很多原因。脱氧核糖核酸(DNA)和大部分RNA皆为分子量很大的纤维多聚核苷酸链。从它们的物化性质可以推测,它们难于形成周期性很好的三维点阵。最近,苏联科学家在尝试DNA片段的结晶,已获得与一些染料络合的含大量腺嘌呤-胸腺嘧啶硷基对的DNA片段微晶。RNA的研究一般又晚于DNA,这和它在分离提纯中所遇到的特殊困难是分不开的。因此,虽然早在1953年通过X光衍射和模型法就获得了DNA双螺旋的二级结构,而且对DNA和RNA的溶液构象研究也积累了大量的资料,但晶体结构研究却长期没有突破。 tRNA 是一类小的球状多聚核苷酸链,约占RNA类的15%,大约有75—90个核苷酸长度,因种类不同而异。现在知道,用于分析结构的正交晶系的晶体含水量高达75%,所以结晶比较困难,但最终为那些有耐心的科学家们所突破,使 tRNA 的晶体结构研究在核酸类物质中后来居上。

一、 tRNA 的基本功能

为了便于了解 tRNA 的三维构象,首先回顾一下 tRNA 在生物合成蛋白质中的主要作用。

一个生命系统的遗传指令包含在活细胞中的 DNA 分子中,构成 DNA 分子线性链的核苷酸顺序规定了成千上万个蛋白质的结构。一个 DNA 分子象一条磁带,在它的结构中所包含的遗传信息若没有一个译码装置是不能表达的。这种译码装置,指的就是首先使 DNA 的核苷酸顺序转录成信使 RNA (mRNA) 的互补顺序。然后,mRNA 再决定把氨基酸按一定结构顺序装配成一个特定的蛋白质。

另一种类型的 RNA 即 tRNA 在翻译过程中起了核心的作用。它们如同一个载体,把细胞内部的自由状态的氨基酸带到蛋白质的装配链上去。这需要在酶和其他一些物质的参与下

来完成。它是遗传密码的核酸语言以及工作细胞的氨基酸语言之间的媒介物。由于它具有这种功能,因此 tRNA 一直是分子生物学中的一个重要研究对象。

mRNA 的核苷酸顺序翻译成蛋白质的氨基酸顺序有两个主要的阶段。第一阶段,一个氨基酸分子与一个专一的 tRNA 分子接触并结合在一起,这一反应是在一个叫做氨酰-tRNA 合成酶的催化下进行的。第二阶段是把这个氨基酸连到正在合成的多肽链上。这是在细胞微粒体中的核糖体内完成的。这一过程的基本情况如图 1 所示。

多肽链合成的相当快,在细菌里每秒可以

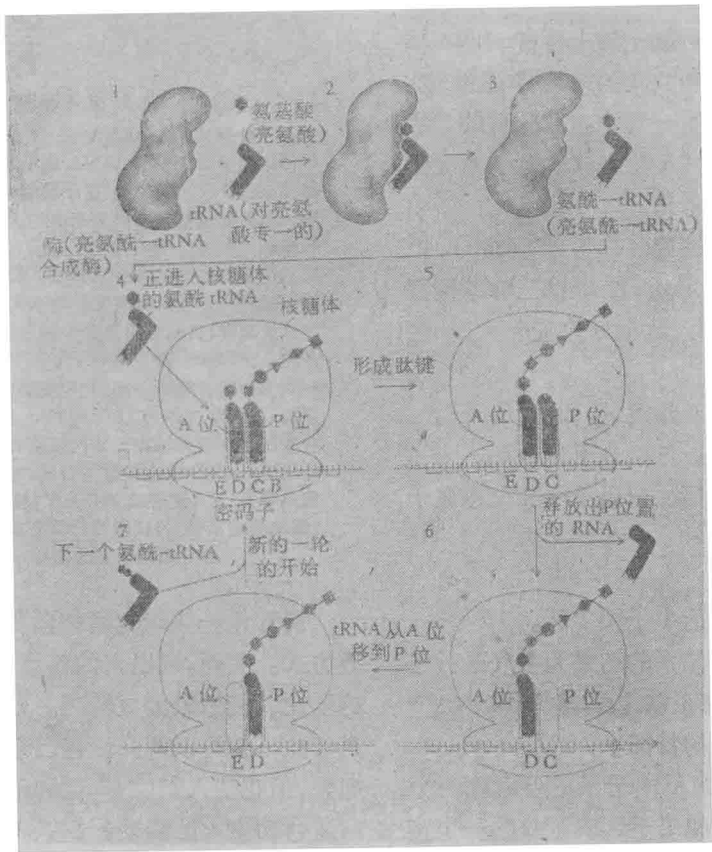


图 1 tRNA 的功能

tRNA 在合成蛋白质分子方面的功能是把氨基酸连成一条链,这条链反映了 mRNA 所表达的模板的核苷酸顺序,首先,由一个叫做氨酰-tRNA 合成酶的大蛋白把专一的 tRNA 分子与它的相应的氨基酸连接起来,这种连接是共价键(1-3),带有氨基酸的 tRNA 与核糖体接触并结合在它的 A 位置上,在核糖体上氨基酸连成蛋白质的多肽链,这种相互作用要求一个氨基酸所特有的 mRNA 链上的三个密码子碱基和 tRNA 的三个反密码子碱基之间有特殊的氢键结合(4)。然后,相邻的 P 位置上的 tRNA 分子把生长的多肽链转到 A 位置上的这个 tRNA 上去(5),“空”了的 tRNA 从 P 位置上释放掉,并且核糖体沿 mRNA 移动一个密码子距离,接着,携带了多肽链的 tRNA 从 A 位移到 P 位去(6,7),最后,新一轮再开始

使多肽链加长 20 多个氨基酸。在动物细胞里每秒大约加长一个。例如,血红蛋白分子由 4 条多肽链组成,每条链大约有 140 个氨基酸。一条那样长的链的合成,在细菌细胞里只需要 7 秒钟,在动物细胞里要 2—3 分钟。虽然合成速度那么快,但极少发生错误。

二、tRNA^{Phe} 的三维结构特征

Holley 是首批提供 tRNA 结构信息的人之一。1965 年,他和他的同事在 Cornell 大学测定了酵母丙氨酸 tRNA 的核苷酸顺序,发现如果这条链自身折回,会存在硷基对的互补区,形成氢键就象 DNA 的双螺旋。根据为人们熟知的最大限度硷基配对原则建立了三叶草型 RNA 二级结构模型。至今所测定的上百种 tRNA 核苷酸顺序全都遵从这一共同的结构特征原则,表现出这类结构的高度一致性。三叶草的二级结构特征在 tRNA^{Phe} 4 Å 分辨率的电子密度图上就可以直接清楚地看到。

如果把成键的双螺旋区称为干 (stems), 把不成键的区域称为环 (loops), 根据三叶草模型可以把 tRNA 的结构大致划分为五个区, 如图 2 所示。

1. 接受氨基酸的双螺旋区, 即“受体干”。
2. 双氢尿嘧啶区。包括 D 干和 D 环。
3. 反密码区。包括反密码子干和反密码子环。
4. 可变环。
5. T-ψ-C 区, 包括 T 干和 T 环。

我们这里以正交晶系的结果为主 (最近已取得 2.7 Å 分辨率的修正结果) 着重介绍 tRNA^{Phe} 分子的基本的三维结构特征。

结构概貌 tRNA^{Phe} 分子的外形象一个英文字 “L”。受体干和 T 干形成了 L 的一个连续的双螺旋臂, D 干和反密码子干形成了 L 的另一个长的双螺旋臂, 每臂长大约 60 Å, 直径约 20 Å, 两个臂端的距离约 80 Å, 两臂粗略呈直角, T 环和 D 环在 L 形的拐角处。其多核苷酸骨架结构如图 3 所示, 每条干都是一个反平行的右手双螺旋。图 4 是它的全充满模型。

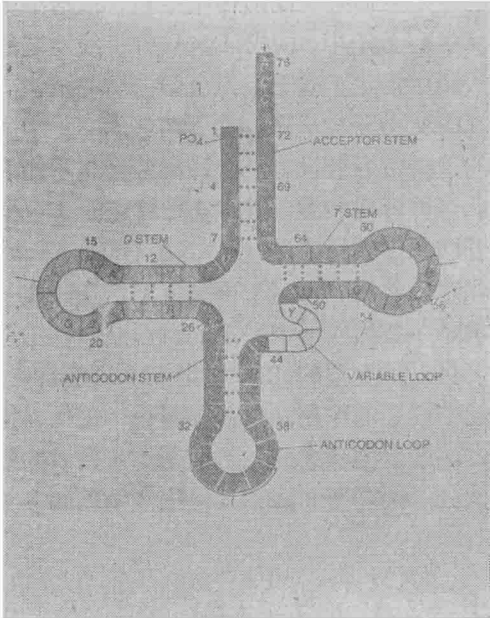


图 2 三叶草图

三叶草模型是 tRNA 分子的二维折叠图, 它是 1965 年从酵母丙氨酸 tRNA 的结构单元核苷酸顺序推出来的。自那以后, 这个模型已被用来装配从植物、动物、细菌细胞中分离出来的大约近 100 种 tRNA 的核苷酸顺序。图上指示了在所有 tRNA 顺序中同样的位置所找到的核苷酸硷基。梯子状的干是由多核苷酸链的不同部分的互补硷基构成的。它们成对并形成氢键, 这是链的自身折回形成的。除标明 α 和 β 的 D 环的两部分 (α, β 部分在不同的 tRNA 中一到三个核苷酸不等) 以及可变环 (通常是 4—5 个核苷酸, 但可能有多到 21 个) 外, 各种干和环中的核苷酸数目一般都相同。A 代表腺嘌呤核苷, G (鸟嘌呤核苷), C (胞嘧啶核苷), U (尿嘧啶核苷), R (腺苷或鸟苷), Y (胞苷或尿苷), T (胸腺嘧啶核苷), ψ (假尿嘧啶核苷), H (修饰的腺苷或鸟苷), 阿拉伯数码为核苷酸序号

前几年一些研究者曾预测 tRNA 分子的折叠方式。然而, 超出人的料想, 自然界实际存在的要比人们想象的更精巧。L 形的折叠方式就是如此, 它可以解释一些已经积累起来的化学现象, 但也使人们惊奇, 这种不常见的形状是如何适合功能上的需要?

由上述的两个臂构成一个假二次对称轴。在三维结构上还可以见到一个“洞”, 是由 T 干 T 环和 D 干 D 环围绕形成的 (见图 5)。

二级结构 虽然粗略的看四条双螺旋干的配置有如三叶草模型所示, 硷基对也大部是 Watson-Crick 型。但修正后发现, 全部四条双

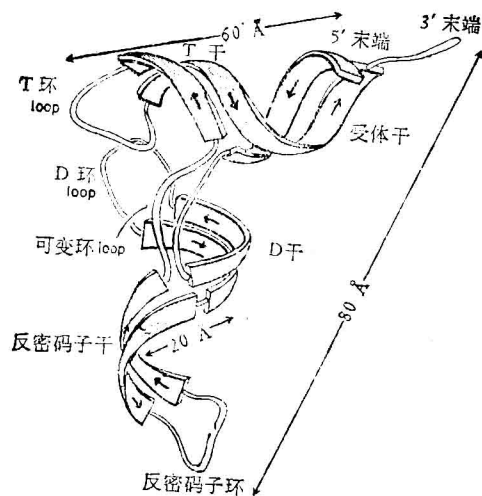


图3 tRNA^{Phe} 多核苷链走向简图
管状代表单股区,带状表示双螺旋干,箭头指明骨架由5'末端到3'末端的方向

螺旋的螺旋性都表现出重大的无规性, 硷基对相对于螺旋轴倾斜, 核苷酸绕螺旋轴的旋转角度及每个残基的提升量与标准值相比都有较大差别。而且, 四条螺旋之间的无规程度也不完全一样。正交晶系的结果更近于 A-RNA 的构象, 但除反密码子干外, 每圈的残基数通常都少于 A-RNA, 核苷酸绕螺旋轴的旋转角度也较大, 硷基对顺螺旋轴的位移也较短。其中 D 干的差异最大, 这可能是由于 D 干与分子的其余部分的广泛的三维相互作用所造成的。选磷原

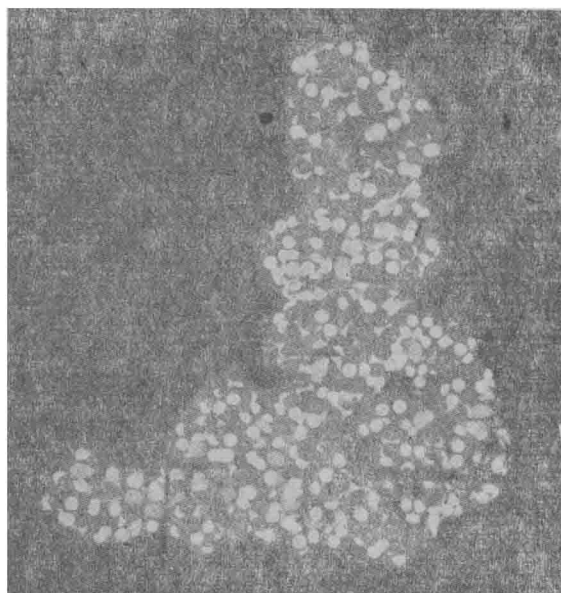


图4 酵母 tRNA^{Phe} 空间充满模型
水平臂的末端是受体干, 垂直臂的末端是反密码子环

子做为螺旋参数计算的最小二乘修正的结果示于表 1。这种螺旋的无规则性可能反映了在多种 RNA 纤维中所观察到的不同的螺旋参数。

虽然 tRNA^{Phe} 分子中绝大部分的硷基对都是 Watson-Crick 型, 但仍有一个例外, 就是受体干中的 G₁ 和 U₆ 是鸟嘌呤-尿嘧啶硷基对, 而不是通常的鸟嘌呤-胞嘧啶或腺嘌呤-尿嘧啶, 在晶体结构中发现它们至少形成一对氢键, 构成“Wobble”对。这正是 Crick 曾经预言过

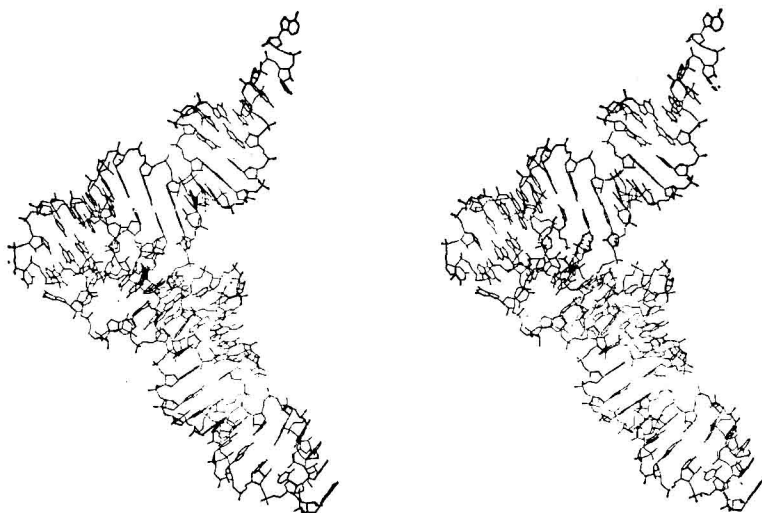


图5 酵母 tRNA^{Phe} 分子上那个“洞”的立体图对

表 1 螺旋干的螺旋参数

干	每圈残基数	核苷酸绕螺旋轴 旋转角(度)	每硷基对顺螺旋 轴的位移量(Å)	平均倾斜角*(度)	平均扭角**(度)
受体干	10.65	33.806	2.467	15.8	10.82
D干	10.78	33.385	2.450	19.6	5.79
T干	10.59	34.004	2.544	16.5	9.65
反密码子干	11.21	32.101	2.671	12.3	4.75
A-RNA	11	32.73	2.8	12.8	2.2

* 硷基平面法线方向和螺旋轴之间的夹角

** 硷基对两平面之间夹角

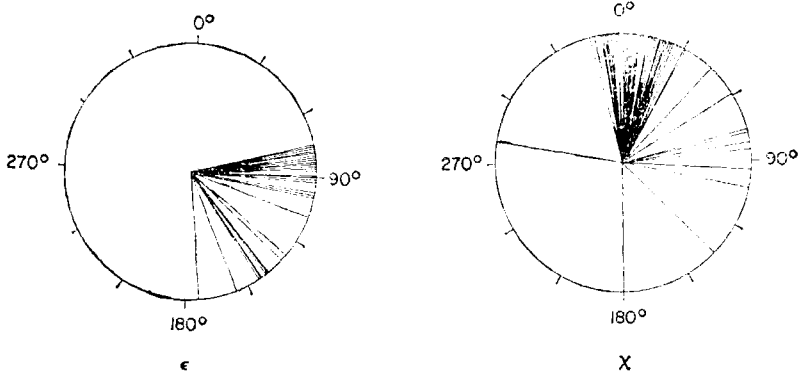


图 6 构象角 ϵ 、 X 的分布

ϵ 是 $C3'-C4'$ 键旋转角, 绝大多数在 90° 左右, 相应于 $C3'$ -endo 糖, 也有相应于 $C2'$ -endo 糖的构象角, 分布在 150° 左右。X 是呋喃平面和硷基平面间的旋转角, 绝大多数分布在 10° 左右, 相应于 “anti” 构象, 分布在 90° 左右的相当于 “高 anti” 构象, 其余的还有几个分别分布在 180° 左右和 270° 左右相当于 “Syn” 和 “高 Syn” 构象

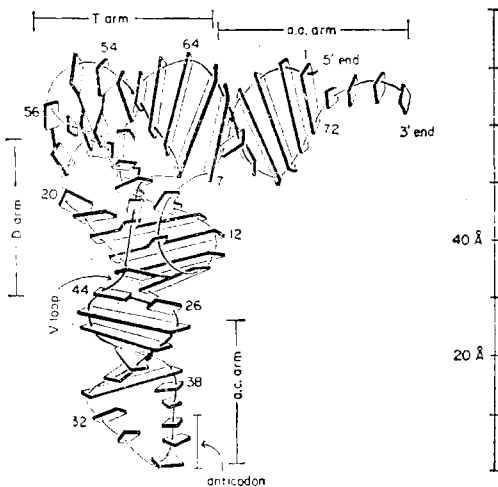


图 7 $tRNA^{Phe}$ 分子中硷基的取向

多核苷链骨架用细线表示, 短的象木板样子的片表示未成对硷基, 长木板表示硷基对, 用粗线连起来的两片, 表示构成三级硷基对。图中可以看出结构中大范围的硷基堆积

的。这种硷基对严重地干扰了螺旋的规则性。这种扰动可能对 $tRNA$ 的识别过程起作用。

此外, 正如核苷酸的 X 射线衍射研究所表明的, 在 $tRNA^{Phe}$ 结构中, 绝大部分核糖仍采取了 $3'$ -endo 构型, 硷基和核糖间的糖苷键也基本上是 anti 型。与这两种构象有关的构象角分布如图 6 所示。

三级结构 除了形成双螺旋的硷基对以外, $tRNA^{Phe}$ 中大多数硷基都顺着分子的两臂排成两行, 堆在分子的中心核内(只有 D_{16} 、 D_{17} 、 G_{20} 、 U_{47} 和 A_{76} 五个硷基除外, 从而形成了广范围的硷基堆积相互作用(见图 7)。这种相互作用就是堆积硷基平面间 π 电子云的重叠作用。这种排布解释了 $tRNA$ 分子结构的难得的稳定性。在蛋白质里, 一般没有能和它相比

较的作用力,所以加热 tRNA 分子的溶液使它变性,在热源去除后,它的天然构象仍可以恢复,而蛋白质的热变性则是不可逆的。

关于三维结构的另一个有趣的发现是,在 tRNA^{Phe} 大多数不变的和半可变的残基的硷基之间都形成三级氢键。这也是构成三维结构的重要的稳化力之一。在两种晶型中至少发现了 8 处,其中包括 6 个硷基对,2 个硷基三联体。它们所在的位置如图 8 所示。这些硷基大部处于分子两臂的中间部位。这样的硷基对大都不是 Watson-Crick 型。由这些三级氢键的组成和它们所在的部位已经暗示出,大概所有 tRNA 分子都有一个基本相同的三级结构。与此有关的另一个发现是,因不同种类 tRNA 有可变数目的多核苷酸所在的区域通常都处于环区,硷基没有堆积起来。在晶体结构中看出,这些环从 tRNA^{Phe} 的分子表面突出出来。这也暗示了 tRNA^{Phe} 的结构骨架可能适用于其他 tRNA。例如: tRNA^{Phe} D 环的一个可变区含两个核苷酸,这段多核苷酸链离开分子凸出去了,再折回来。如果这个区域有更多的核苷酸;可以想象这个“鼓包”就大些,反之就小些,两“鼓包”的大小显然并不影响分子的折叠外貌。

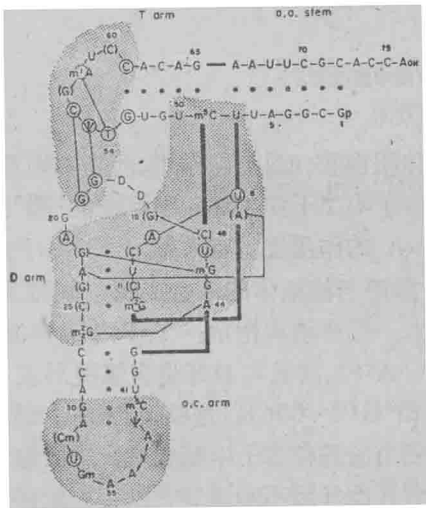


图 8 硷基之间的8个三级氢键

相互作用用实线表示。圈表示不变硷基，
括号表示半可变硷基

硷基之间的氢键相对来说容易确定，因为

形成硷基对的立体化学要求是相当严格的。然而，确定包括核糖磷酸在内的那些氢键就困难得多，氢键键长和键角范围也相当广。正交晶系的 2.7 Å 分辨率的修正结果报道：硷基和骨架之间找到了 12 对氢键（见图 9）其中有 5 个氢键包含 02' 羟基基团。还有骨架和骨架之间形成的大量氢键，其中大部分也都包含了 02' 羟基基团。这种包含核糖的糖里的羟基所发生的一系列三级相互作用也十分有趣，因为 DNA 分子里的糖没有那种羟基，所以可以认为，它对稳化 tRNA 的复杂卷曲的作用也是本质的。

一个 tRNA 的功能分子要求有镁离子和它成键。在正交晶系的结构中，确定了 4 个镁离子水合物的位置与 tRNA^{Phe} 的结构成键，其中两个在 D 环、一个在反密码子环，还有一个在残基 8 到 12 所形成的急转弯处。从它们所在的位置可以断定，其基本作用是稳定 tRNA^{Phe} 结构中的环和急转弯部分。

生物大分子晶体结构修正的一个重要内容是确定结晶水的位置。因为水和溶剂分子参与了生物大分子的结构和功能的作用。正交晶系中最后确定了大约 60 个与 tRNA^{Phe} 成键的水分子。

总之，稳定 tRNA^{Phe} 三维结构的力是错综复杂的。“L”的两臂主要通过大范围的硷基堆积和双螺旋的硷基对来稳化，两个臂在“L”的中心处相会，这种形状的结构稳定性和专一性还通过硷基和硷基间、硷基和骨架间以及骨架和骨架间的一个复杂的三级氢键网络来达到。加之，四个镁离子中的三个都在分子中心区的特殊位置处与 tRNA^{Phe} 成键，进一步稳化了环和转折，第四个镁离子处于反密码子环处，从而稳定了那个重要区域的构象。

至于有关 tRNA^{Phe} 的详细结构数据，诸如原子坐标、构象角参数等均已存入蛋白质数据银行中，这里不再详述。

三、三维结构与功能的关系

tRNA^{Phe} 的三维结构可以解释很多物理化学实验的结果。比如：tRNA^{Phe} 的某些核苷酸

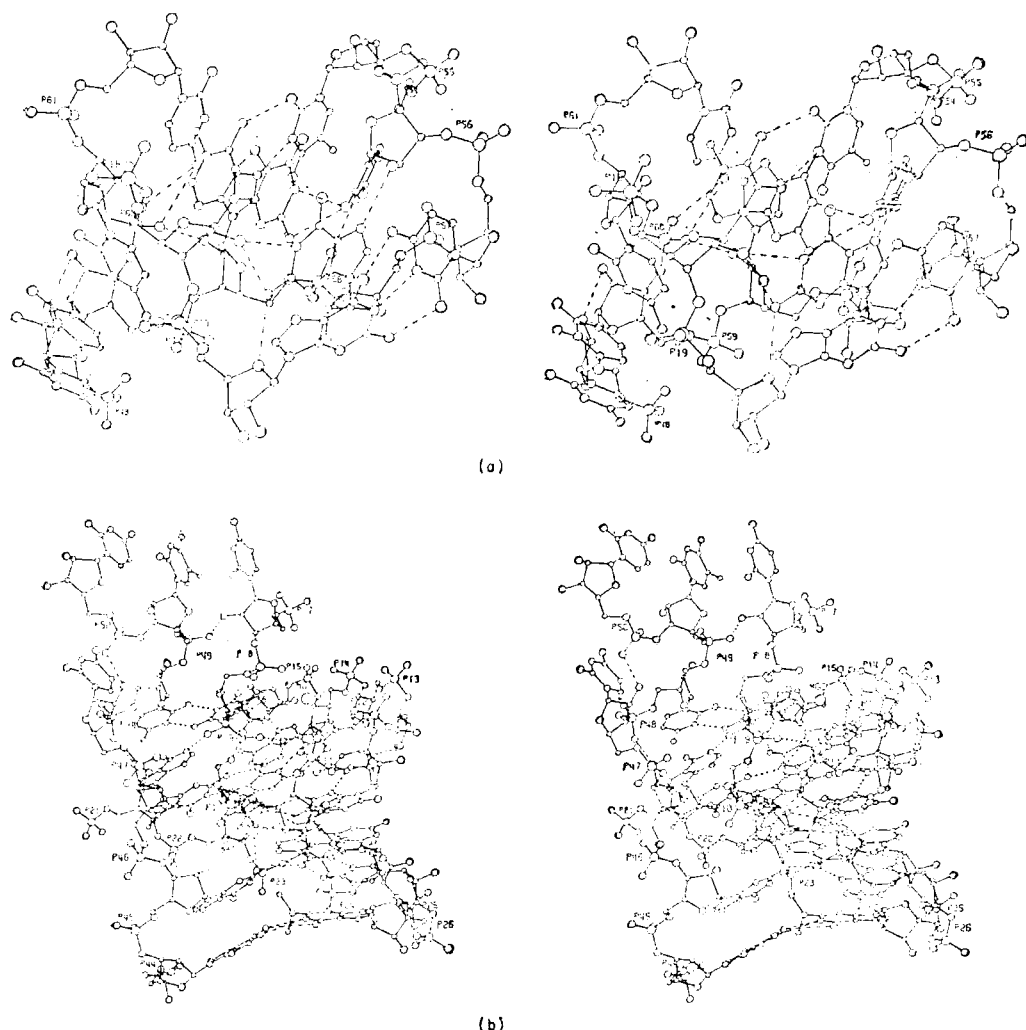


图9 表示三级氢键的立体图对 (图中虚线所示)
P60、P61、...为磷原子序号

很容易发生化学反应,而另一些就不容易。这在以前始终是个谜。现在清楚了,原来在分子凸起部分的那些核苷酸容易进行化学修饰。一般来说,化学修饰的敏感性与分子在晶态中的可接近性相关很好。因为有关结构与功能关系的研究,目前还需要做大量的实验,所以现在只能就几个方面概述如下:

tRNA^{Phe} 的分子结构精巧,作用奇妙,与氨基酸结合的部位是 3' 末端,它远离反密码子三联体,二者处于分子的两端。T- ψ -C 环处于分子的拐角处。这个环和辨识核糖体 RNA 有关。于是三个功能上非常重要的部位,就被远远地分开了。因此,它们就有可能同时与几个

核糖体蛋白和 RNA 起作用,而又不相互干扰。

分子中 T 干和 T 环包围形成的“洞”正好是 5S RNA 的作用位。有人做过 tRNA 与 T- ψ -C-G 顺序与核糖体的结合实验,间接发现了这一点。晶体结构指示: T 环内部形成氢键 (T54 · A58),并且与 D 环也有氢键形成 (G18 · ψ 55 和 G19 · C56)。这样, T- ψ -C 顺序上的全部三个硷基在分子中都成对,若核糖体的组分或者其他外因不能诱导它发生构象变化,大概这种结构对 tRNA 的辨识是不利的。但晶体结构又发现: G19 · C56 硷基对不只扭歪了而且还“弯”了 30° 角,不象标准 Watson-Crick 的几乎平面型的硷基对,所以,这个硷基对一定

很不稳定，极可能是这个碱基对解离使 T 环和 5S RNA 能够形成复合物。

tRNA 核苷酸顺序的一个特点是包含了许多修饰的碱基。这些碱基在 tRNA 分子合成后经过甲基化酶的加工而加上了一个或多个甲基。从 tRNA^{Phe} 的三维结构可以看出，这些修饰的碱基不是支持 tRNA^{Phe} 的三维结构所必需的，因而可以推测，它们可能是与 tRNA 相互作用的蛋白质的识别位。反密码子环中残基 32 和 34 上面还有两个修饰的核糖。已知这个环是分子的最暴露的环。这些糖的 2'-羟基甲基化大概避免了核糖核酸酶对 tRNA 的任意酶解，因为核糖核酸酶在水解时形成的中间产物需要 2'-羟基基团。

关于分子的柔性，通过对碱基、核糖和磷酸热参数的修正可以得到某种启示。这种热参数的修正对每一个核苷酸都给出了一个平均值。如图 10 所示。每个位置圆圈的半径与每个残基的平均平方位移成正比。这个图的最主要特征是反密码子臂和受体干的较强的“热振动”，暗示出这两个臂要比分子其他部分更柔软，或者说它们的干较松弛。这种分子的柔性可能在功能上是合理的，即 tRNA 参与转肽和在核糖体中转位时似乎受体干和反密码子臂都稍有运动。

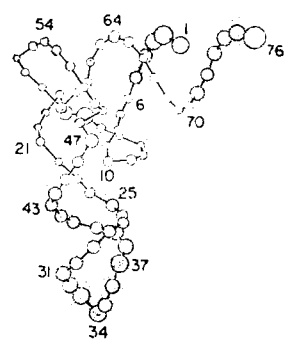


图 10 正交晶体中 tRNA^{Phe} 每个残基的平均“热运动”
(用圆圈大小来表示)

“热运动”与各向异性结晶学温度因子成比例。这个图可以提供整个分子柔性的一个印象。阿拉伯数码为核苷酸序号

弄清 tRNA^{Phe} 的三维结构仅仅是研究三维结构和功能关系的开始。更进一步需要了解氨酰-tRNA 合成酶与 tRNA 的专一相互作用，这就需要制备这种复合物的结晶。这一类的研究目前在许多实验室中正在进行，不久的将来就会得到答案。tRNA 的生物功能是极其复杂的，除参与合成蛋白质外，还参与各种非常重要的其他过程。如发现 tRNA 参与基因表达的控制，与多核苷酸链的合成有关等等。有关这个多变的分子及其在活细胞中的种种作用，还有待于人们进行深入的研究。

[本文于 1979 年 9 月 26 日收到]

蛋白质的三维结构研究

王大成

(中国科学院生物物理研究所)

蛋白质的三维结构研究是最近十几年来取得重大突破和迅速发展的一个领域，其影响所及，已深入到许多重要的有关蛋白质的生物学问题。

具有独特的三维结构是蛋白质分子的一个最显著的特征，其重要性可以用一句话来概括：没有特征的三维结构就没有复杂的蛋白质功

能。微妙的空间构象，在正常生理过程中可以发生必须的特征性变化。这是蛋白质的基本属性，是其发挥纷繁而奥妙的功能的基础。事实上，生物体内各种分子间复杂而专一的辨识过程，多样而灵活的功能表现，都以精确的结构为基础。因此，对了解许多生物学过程，对探讨蛋白质在生命活动中的重要作用，蛋白质的三维