

综述与专论

核糖体 RNA 的生物功能、自我剪接与自我复制

刘 望 夷

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

提 要

核糖体 RNA 在肽链合成的起始、延伸和终止等整个过程中都有重要的功能。RNA N-糖苷酶是一类核糖体失活蛋白; 它只水解 rRNA 特定位置上的一个腺苷酸的糖苷键, 释放一个腺嘌呤碱基, 使核糖体失活。天花粉蛋白是一种核糖体失活蛋白。目前已知最小的 ribozyme 是人工合成的 13 寡聚核糖核苷酸。利用四膜虫 ribozyme 转磷酸酯的逆反应合成了一个 42 寡聚核糖核苷酸。这说明 RNA 可以催化 RNA 的合成。

关键词 核糖体 RNA 的生物功能, RNA N-糖苷酶, ribozyme, RNA 自我复制

前 言

核糖体是细胞合成蛋白质的唯一场所。原核生物、真核生物及其细胞器——叶绿体和线粒体中都有核糖体。核糖体包括大小两个亚基, 由 RNA 和蛋白质组成。三十多年来, 科学家们对核糖体 RNA 和蛋白质的结构与功能以及它们之间的相互关系进行了广泛的研究。一种原核生物(大肠杆菌)核糖体的三种 RNA (5S, 16S 和 23S) 和五十多种蛋白质的一级结构全部搞清楚了。核糖体是目前唯一的一种其化学结构全部阐明了的细胞器。近年来, 也测定出了其它原核生物和真核生物核糖体的许多 RNA 和蛋白质的一级结构。Noller 等提出了一个为科学界普遍接受的 16S rRNA 二级结构模型。嗜热杆菌核糖体结晶的成功为研究核糖体的高级结构创造了必要的条件。在研究核糖体蛋白质和 RNA 化学结构和生物功能的同时, 人们对它们的基因结构与表达方式也开始了研究^[1]。可以说, rRNA 基因是研究的最

早的一种真核生物基因。

蛋白质生物合成的大多数步骤, 包括肽链合成的起始、延伸和终止都是在核糖体上进行的。整个合成过程涉及二百多种生物大分子的协同作用。它比遗传物质的复制与转录要复杂得多^[2]。在蛋白质生物合成中, 最重要的是肽键的形成。这一化学反应就是在核糖体上进行的。核糖体的任何个别组分或局部组分都不能催化肽键的形成, 而必须是完整的核糖体, 因此, 人们认为核糖体本身就是一个包括多种蛋白质和 rRNA 的复杂酶系。在这个酶系中究竟是蛋白质还是 rRNA 表现催化功能, 对于这个问题, 人们的看法在发生着明显的变化, 在一切生物催化剂都是酶(蛋白质)的观念占统治地位的年代里, 多数人认为核糖体蛋白质可能发挥催化作用, 而 rRNA 只不过起着“骨架”作用。与此同时, 少数科学家(如 Santer, Crick 和 Woese)却提出了 rRNA 在蛋白质生物合成中可能发挥着重要的生物功能的看法。这是一种崭新的观念。

七十年代末期,人们发现了一种剪切 tRNA 前体的酶 (RNase P) 由蛋白质和 RNA 两部分组成^[3]。在适当条件下,如较高浓度的镁离子存在下,单独的 RNA 组分就可以催化 tRNA 前体的成熟,而单独的蛋白质组分就没有这种作用。八十年代初期,Cech 实验室发现四膜虫大核 26 S rRNA 前体中含有的一个内含子 (IVS) 可以自我剪接除去,仅仅需要镁离子和鸟苷而没有蛋白质(酶)的参与^[4]。以上这两个发现开始转变人们的传统观念,越来越多的人开始转向认为 rRNA 可能是催化蛋白质生物合成的主要物质,而核糖体蛋白质只不过起着稳定和改变 rRNA 构型的辅助作用。本文扼要介绍在蛋白质合成过程中 rRNA 的功能及其自我剪接与复制方面的一些最新进展。

在蛋白质合成过程中 rRNA 的功能^[5]

1. rRNA 与 mRNA 的相互作用

在肽链合成的起始、延伸和终止阶段, rRNA 与 mRNA 通过碱基配对发生相互作用,仅举例如下。

(1) 肽链合成的起始 在肽链合成起始时, rRNA 与 mRNA 相互作用的一个典型例子就是 mRNA 中起始密码子 5' 端方向的富含嘌呤核苷酸区 (Shine-Dalgarn, SD 区) 与 16 S rRNA 近 3' 端富含嘧啶核苷酸区 (反 SD 区) 的碱基配对形成互补双链区。现在已积累了许多生化和遗传学方面的资料支持这种作用方式。例如,用互补的寡聚核苷酸与 16 S rRNA 近 3' 端的反 SD 区形成双链后或在 mRNA 的 SD 区发生变异都可以阻止肽链合成的起始。16 S rRNA 近 3' 端的反 SD 区如发生变异,即 1538 位 C 变成 U, 对蛋白质合成则有明显的影响。

(2) 肽链合成的延伸 肽链的延伸伴随着 mRNA 在核糖体上的密码子移位 (frameshifting, 移码)。在这个过程中, rRNA 与 mRNA 也发生相互作用。例如,大肠杆菌释放因子 2 (RF2) 的 mRNA 中 15 个核苷酸 (5'-AGG-GGG-UAU-CUU-UGA-3') 是移码所必需的序

列。其中的 AGG-GGG 最为重要,若有一个碱基变异 (AGG-GGG 变为 AGC-GGG) 就可以大大降低移码效率。为了证明这是由于破坏了 mRNA 与 16 S rRNA 之间的碱基配对,把 16 S rRNA 的第 1538 位 C 变为 G,又恢复了 mRNA 与 16 S rRNA 之间的互补碱基对, mRNA 的移码效率同样又可以恢复到原来的水平。

(3) 肽链合成的终止 一般情况下,细胞内没有阅读终止密码子的 tRNA。在 16 S rRNA 中删去 C₁₀₅₄ 后诱导细胞内产生的一种校正 tRNA 可以阅读 trp A 和噬菌体 T₄ 的 mRNA 中的 UGA 终止密码子,但仍不能阅读 UAG 和 UAA 两种终止密码子。这种专一地校正 UGA 终止密码子的现象是由于 mRNA 中 UGA 与 16 S rRNA 中互补序列之间碱基不能配对所引起的。

2. rRNA 在核糖体亚基结合中的作用

关于核糖体的两个亚基是如何结合在一起的问题,目前了解得还非常少。Herr 等认为,大肠杆菌核糖体两个亚基的结合主要是通过 16 S rRNA 和 23 S rRNA 之间的碱基配对来实现。许多生化和遗传学实验支持这种观点。例如,16 S rRNA 中一个含 790 个核苷酸的环位于 30 S 亚基与 50 S 亚基相接触的平面上。与 790 环互补的寡聚核苷酸可以显著地阻止 30 S 亚基与 50 S 亚基的结合。

3. rRNA 在核糖体解码部位中的作用

在核糖体上 mRNA 与 tRNA 必须按适当方式排列以保证密码子与反密码子在解码部位上形成正确的碱基对,进而催化 tRNA 的另一端形成肽键。要确定 rRNA 在解码部位上的功能比较困难,因为解码部位相当复杂,其中包括 A 部位和 P 部位以及 16 S rRNA 的某些保守序列。

Moazed 和 Noller 报告,用化学专一试剂与 rRNA 反应的“足迹法”(用 tRNA 保护以后)鉴定了 16 S rRNA 中有三个区域因与 tRNA 相互作用而被保护起来。这三个区域是 A 部位、P 部位以及 tRNA 与 50 S 亚基的重叠部

位,在这三个区域中核苷酸序列都是保守的,由此构成了 rRNA 中保守的功能部位。

4. 肽基转移酶的活性部位

tRNA 阅读 mRNA 是在核糖体 30 S 亚基上进行的,而合成肽键的化学反应则发生在 tRNA 分子的另一端,即在核糖体 50 S 亚基上。肽键的形成是核糖体最重要的生物功能。多年来科学家们对这一问题开展了多方面的研究。早期的工作主要集中在探索核糖体蛋白质与肽基转移酶之间的关系上,企图搞清楚哪一种或哪几种核糖体蛋白质有肽基转移酶的活力。这方面的努力迄今没有得到成功的结果。自从认识到 RNA 具有酶的催化活性并且肽基转移酶催化的转肽过程与 RNA 催化的转磷酸酯过程非常相似以后,人们理所当然地把注意力转移到探索 rRNA 催化肽键形成的可能性上来。现在最重要的是要首先鉴定核糖体上肽基转移酶的真实部位,以便进一步弄清楚这个部位的化学结构和形成肽键的机制。

氯霉素、碳霉素等抗菌素是肽基转移酶的专一抑制剂。已经知道,23 S rRNA 中区域 V 的中心环上有一个碱基发生变异就可以产生对上述这两种抗菌素的抗药性。另外,光化学交链法也证明 23 S rRNA 的区域 V 与肽基转移酶有密切关系。至于究竟 23 S rRNA 中哪些核苷酸序列代表 A 部位和 P 部位,Moazed 和 Noller 最近提供了一些强有力的证据。他们证明 23 S rRNA 中区域 V 的中心环上许多保守的核苷酸序列分别代表了 A 部位、P 部位和 E 部位。

5. rRNA 与移位的关系

移位,即在延伸因子-G(EF-G)促进下,肽基 tRNA 由 A 部位移至 P 部位,同时 mRNA 在核糖体上移动一个密码子的距离。研究 rRNA 与移位的关系的工作目前还在刚刚开始阶段。“足迹法”证明,EF-G 保护 23 S rRNA 上的第 2655,2660 和 2661 位核苷酸;延伸因子-Tu(EF-Tu)与 EF-G 有重叠保护作用,即也可以保护 2655 和 2661 位核苷酸。在肽链延伸过程中,tRNA·EF-Tu:GTP 复合物就是

结合在核糖体的这些部位(即 A 部位)上的。用同样方法证明,23 S rRNA 中第 1067 和第 1069 位核苷酸对移位也有重要的功能。

核糖体失活蛋白——RNA N-糖苷酶

植物毒蛋白对真核细胞蛋白质生物合成的抑制作用主要是使核糖体失活。所以,这类毒蛋白又称核糖体失活蛋白(Ribosome-Inactivating-protein, RIP)。目前,已从五十多种高等植物的根、茎皮、叶或种子中分离到约六十多种 RIP^[6],甚至组织培养的植物细胞中也有 RIP。这类毒蛋白,有的只有一条多肽链,分子量在 3 万左右;有的是中间通过二硫键连接的两条多肽链,分子量为 6 万左右。RIP 的作用机制有两种类型:(1) RNA 水解酶型。属于这种类型的目前只有一种,即从真菌中分离到的 α -sarcin,它专一水解真核细胞核糖体 28S rRNA 的第 4325 和 4326 位核苷酸之间的磷酸二酯键^[7]。(2) RNA N-糖苷酶型^[8,9]。这种作用方式是近两年来才搞清楚的。它专一水解真核细胞核糖体 28S rRNA 的第 4324 位腺苷酸的糖苷键,释放一个腺嘌呤碱基。被水解后的核糖体丧失活力,属于 RNA N-糖苷酶水解方式的 RIP,现在已经分离到近二十种^[6],其中研究得最多的是蓖麻毒蛋白(ricin)和天花粉蛋白。

Ricin 由 A、B 两条多肽链通过二硫键组成。用巯基乙醇或二巯苏糖醇(DTT)可以把 A、B 链折开。A 链具有 RNA N-糖苷酶活力,B 链只有协助 A 链透过细胞膜的功能。Endo 和 Tsurugi 最近报告^[10],很低浓度(1×10^{-10} mol/L)的 ricin A 链即能水解大鼠核糖体内的 28S rRNA 第 4324 位腺苷酸的糖苷键,但不能作用于自由的 28S rRNA。浓度提高 1000 倍(1×10^{-7} mol/L),自由的 28S rRNA 也可以被水解,其速度尽管很慢,但专一性仍然不变。这个事实说明,ricin A 链对核糖体内的或自由的 28S rRNA 都有相似的亲和力。对于原核生物来说,ricin A 链不能水解大肠杆菌核糖体内的 23 S rRNA,但却能水解自由的 23 S rRNA 中第 2660 位腺苷酸的糖苷键。这个位

置相应于大鼠 28 S rRNA 中的第 4324 位腺苷酸。这说明在大肠杆菌核糖体内蛋白质保护了这个位置上的腺苷酸而不能被 ricin A 链水解。此外, ricin A 链还可以水解大肠杆菌自由的 16 S rRNA 中的第 1014 位腺苷酸的糖苷键。上述的 28 S rRNA 中第 4324 (或 16 S rRNA 的第 1014 或 23 S rRNA 的第 2660) 位附近的序列为 GAGA。由此看来, ricin A 链似乎能识别 rRNA 中 GAGA 的序列。

天花粉是一种中医草药, 临床上用于中期妊娠引产。因此, 在计划生育工作中很有用途。这种药采自一种多年生草本攀藤植物——栝楼 (*Trichosanthes kirilowii* Maxim) 的块根。我国和美国科学家分别从天花粉中抽提出了同一种蛋白质称天花粉蛋白质 (trichosanthin)。这种蛋白质与天花粉有同样的生物功能。天花粉蛋白质是一条多肽链, 分子量为 2.5 万。我国测定它的氨基酸序列与美国测定的略有不同, 但它与 ricin A 链序列的同源性很高^[11,12]。trichosanthin 可以抑制蛋白质生物合成, 但其作用的分子机制是否与 ricin A 链相同, 至今尚无人研究。

意大利科学家 Casellas 等^[13] 从栝楼种子

中分离到另一种单链毒蛋白, 他们命名为 trichokirin, 分子量为 2.7 万。trichokirin 也可以抑制蛋白质生物合成, 其作用机制与 ricin A 链相同, 即为 RNA N-糖苷酶型。从栝楼的块根和种子中抽提出的这两种蛋白质之间的关系有待进一步研究。

核糖体 RNA 上除去一个腺嘌呤碱基, 从分子量的变化上看, 核糖体的损失可以说微乎其微, 但核糖体却完全丧失了活力。这个事实也强有力地说明, rRNA 具有重要的生物功能。最近, Watanabe 和 Funatsu^[14] 认为, 核糖体丧失活力可能是由于除去一个腺嘌呤碱基引起核糖体的构型发生了变化。因为增加 EF-2 和镁离子的浓度又可以部分地恢复核糖体的生物功能。

除了植物中广泛存在 RNA N-糖苷酶以外, Endo 等^[15] 报告, 大肠杆菌中的志贺毒素 (Shiga toxin) 也水解真核细胞核糖体 28 S rRNA 的第 4324 位腺苷酸的糖苷键, 也是一种 RNA N-糖苷酶。

13 聚核糖核苷酸——最小的 Ribozyme

具有酶活性的核糖核酸或称核酶 (ribozy-

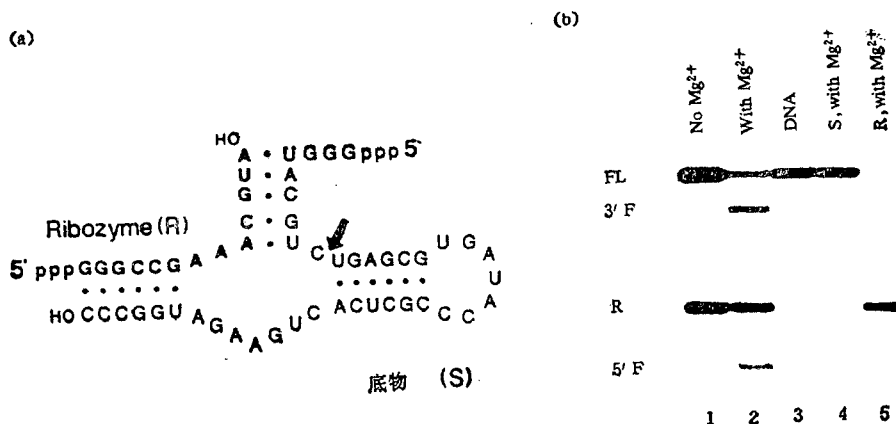


图1 vLTSV-A 正链 RNA 的 ribozyme 自我剪切

(a) 除底物的 5' 端 GGG 外, “锤头”中所有序列都与 vLTSV-A 正链 RNA 相同。ribozyme (R) 是 13 聚核糖核苷酸, 箭头表示自我剪切点。 (b) ribozyme 催化底物自我剪切后产物的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

1 ribozyme 和底物一起保温, 无 Mg^{2+} ; 2 ribozyme 和底物一起保温, 加 Mg^{2+} ; 3 13 聚脱氧核苷酸和底物一起保温, 加 Mg^{2+} ; 4 只有底物, 加 Mg^{2+} ; 5 只有 ribozyme, 加 Mg^{2+} 。

所有反应在 50°C 保温 6 h。FL 表示底物, 5'F 为 9 核苷酸, 3'F 为 32 核苷酸, R 表示 Ribozyme

me) 究竟需要多大才能表现活性, 最早发现的四膜虫 ribozyme 全长 414 个核苷酸, 除去 19 个核苷酸后所得的 L-19 IVS RNA 具有多种酶的催化功能, 全长 395 个核苷酸。其它具有自我剪接活力的 rRNA 和 mRNA 前体中的 IVS, 其大小都和四膜虫的 ribozyme 差不了很多^[6]。Sullivan 和 Uhlenbeck 用 T₇ RNA 聚合酶在人工合成的 DNA 模板上合成了两种寡聚核糖核苷酸片段 (19 和 24 核苷酸)。在镁离子存在下于 37℃ 保温, 19 核苷酸催化 24 核苷酸片段迅速断裂为 18 核苷酸片段 (3' 端为 2', 3' 环化磷酸) 和 6 核苷酸片段 (5' 端为羟基)。

澳大利亚 Adelaide 大学 Symons 实验室对许多植物卫星 RNA、拟病毒和类病毒 RNA 的自我剪切 (Self-cleavage) 方式进行了多年的研究并且提出了一种“锤头”状二级结构模型来解释它们的自我剪切机制。他们首先制备了紫花苜蓿短暂条纹病毒的拟病毒 (vLTSV) RNA 正链的 55 个核苷酸, 证明由它形成的“锤头”状二级结构能够进行自我剪切反应。最近他们又用 T₇ RNA 聚合酶合成了 vLTSV 的 RNA 正链序列中一个 13 聚体核糖核苷酸和一个 41 聚体核糖核苷酸^[7]。由这两个寡聚核糖核苷酸形成的“锤头”状二级结构, 在镁离子存在下, 前者 (ribozyme) 可以催化后者 (底物) 水解为 9 核苷酸片段 (3' 端为 2', 3' 环化磷酸, 5'F) 和 32 核苷酸片段 (5' 端为羟基, 3'F)。这个人工合成的 13 聚体核糖核苷酸是目前已知的最小的 ribozyme (图 1)。13 聚体脱氧核糖核苷酸则没有这种活性。

植物类病毒是一类单链、环状的小分子 RNA, 一般由 250—370 个核苷酸组成。这种 RNA 通过自身的碱基配对形成高度的二级结构。类病毒没有蛋白质外壳。自 1971 年 Diener 发现第一个类病毒到 1988 年的 18 年中间共发现了 18 个类病毒, 其中 13 个已测定了核苷酸序列^[8]。类病毒 RNA 的分子量小, 结构又简单。它既有自主复制 (autonomous replication) 的能力又有自我剪切的能力。所以, 类病毒 RNA 是研究 RNA 自我剪切和自我复制

(self-replication) 的好材料。

RNA 的自我复制——42 核糖核苷酸的合成

自我复制是生命现象的重要特征之一。发现 RNA 具有催化活性这一事实说明, RNA 兼有贮存遗传信息和表现活力两种功能。因此, 在生命起源过程中 RNA 可能是最早出现的生物大分子。果真如此的话, RNA 应具有自我复制的能力。近年来科学家们在这方面做了许多探索性的工作。已经知道, 四膜虫的 rRNA 前体在自我剪接时需要鸟苷攻击其内含子 5' 端磷酸二酯键发生转磷酸酯反应。1985 年 Sharp 提出, 利用 ribozyme 转磷酸酯反应的逆反应有合成 RNA 的可能性。1989 年这一预见变成了现实。具体方法如下。

Doudna 和 Szostak^[9] 用四膜虫 ribozyme 把几个寡聚核糖核苷酸聚合成其序列与模板 (RNA) 互补的 42 个核苷酸长的 RNA 片段 (图 2)。他们的方法大致如下: (1) 首先对 ribozyme 做适当的剪裁, 使得模板与 ribozyme 之间不能形成双链, 在反应过程中, ribozyme 自身不发生变化并且严格在模板指导下合成 RNA。(2) 模板是一种与 ribozyme 完全不同的 RNA 分子。(3) 要连接的两个寡聚核糖核苷酸 (引物和连接物) 与模板可以形成碱基对。(4) 引物 3' 端的 U 一般与模板上的 G 配对 (U-G 对即摆动碱基对), 但在亚精胺存在下, 这个位置可以是任意的 Watson-Crick 碱基对。(5) 连接物的 5' 端必须有一个不同模板上的碱基配

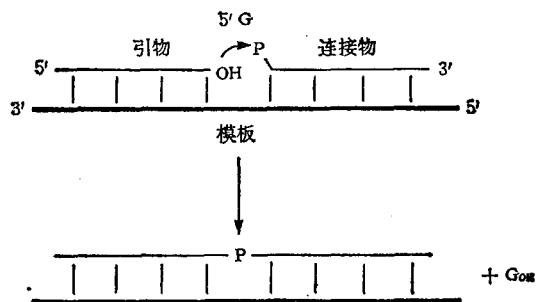


图 2 四膜虫 ribozyme 催化在模板 (RNA) 指导下合成 RNA

新发现的胰脏活性多肽

马建农 戚正武

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

提 要

胰脏中除了人们所熟悉的胰岛素、胰高血糖素、生长激素释放抑制因子和胰多肽外, 近几年又陆续发现了几个新的胰脏活性多肽。它们是甘丙肽 (galanin), 胰脏释放抑制因子 (pancreastatin), 胰岛淀粉样多肽 (islet amyloid polypeptide) 及胰岛素拮抗肽。本文着重介绍它们的结构与功能。对这些活性多肽的深入研究, 无疑在理论上或临床实践中均将有其重要的意义。

关键词 胰脏活性多肽, 多肽结构, 生理功能

一个世纪前, 两位德国生理学家 Von Mering & Minkowski 发现切除狗的胰腺会出现类似于人糖尿病的症状。由此, 胰腺的内分泌功能开始引起人们的重视。1916 年, Schafer 发现被称为兰氏岛的胰腺细胞可以分泌控制糖代谢的活性物质, 并称之为胰岛素。1922 年, Banting & Best 成功地从小牛胰腺中分离了胰岛素并用于糖尿病的治疗, 从而揭开了胰脏中生物活性多肽研究的序幕。

人们对胰岛素的分子结构、生物效应、结构与功能的关系以及作用机理的研究已积累了极其丰富的资料, 取得了巨大进展, 并且也推动了其它学科的发展。与胰岛素有关的工作已数次获得诺贝尔奖就是明证。在胰岛素之后, 又陆续从胰脏中发现了胰高血糖素、生长激素释放抑制因子和胰多肽。对它们的研究也已相当深入。近年来, 随着分离、分析和生物活性检测技术的突飞猛进, 在胰脏中又有不少新的活性多

对的鸟苷 (G)。这个 G 在连接反应中除去。

在上述条件下, ribozyme 合成 42 核糖核苷酸仅需要 5—60 min。这个实验的成功是在 RNA 自我复制方面的一项重大突破。它标志着在没有蛋白质(酶)的参与下, RNA 可以催化另一个 RNA 分子的合成。今后, ribozyme 如能在模拟原始环境下催化简单的活化核苷酸在模板上发生聚合反应, 则能更加使人相信 RNA 是生命起源中最古老的生物大分子。

参 考 文 献

- 1 刘望夷, 祁国荣. 见: 敖世洲等主编, 真核生物基因的结构与功能, 北京: 科学出版社, 1989; 46—94
- 2 祁国荣, 刘望夷. 见: 王德宝, 祁国荣主编, 核酸-结构, 功能与合成(下册), 北京: 科学出版社, 1987; 189—222
- 3 Kole R *et al.* *Cell*, 1980; 19: 881

- 4 Cech T R *et al.* *Cell*, 1981; 27: 487
- 5 Dahlberg AE. *Cell*, 1989; 57: 525
- 6 董焄, 刘望夷. 细胞生物学杂志, 1990; 12: 印刷中
- 7 Endo Y, Wool I G. *J Biol Chem*, 1982; 257: 9054
- 8 Endo Y *et al.* *J Biol Chem*, 1987; 262: 5908
- 9 Endo Y, Tsurugi K. *J Biol Chem*, 1987; 262: 8128
- 10 Endo Y, Tsurugi K. *J Biol Chem*, 1988; 263: 8735
- 11 顾梓伟等. 化学学报, 1984; 42: 943
- 12 Maraganore J M *et al.* *J Biol Chem*, 1987; 262: 11628
- 13 Casellas P *et al.* *Eur J Biochem*, 1988; 176: 581
- 14 Wantanabe K, Funatsu G. *Agr Biol Chem*, 1988; 52: 1067
- 15 Endo Y *et al.* *Eur J Biochem*, 1988; 171: 45
- 16 刘望夷, 王德宝. 生物化学与生物物理进展, 1989; 16: 2
- 17 Jeffries A C, Symons R H. *Nucleic Acids Res*, 1989; 17: 1371
- 18 刘望夷. 生命的化学, 1989; 9: 12
- 19 Doudna J A, Szostak J W. *Nature*, 1989; 339: 519

[本文于 1990 年 4 月 16 日收到]