

真核翻译因子与蛋白质生物合成

蒋 达 和

(武汉大学病毒学及分子生物学系, 武汉 430072)

提 要

真核 mRNA 在 80S 核糖体上翻译成蛋白质是一个复杂的过程, 需要多步反应及多种因子参与, 文章就真核蛋白质的生物合成机制简要综述翻译起始、延伸和终止因子的结构、功能和性质及其在肽链合成过程中的作用研究新进展。

关键词 真核蛋白质生物合成, 核糖体, 起始因子, 延伸因子, 终止因子

蛋白质的生物合成是生物体内基因表达的 生物大分子的参与, 包括核糖体, mRNA, 氨酰-tRNA, NTP 和翻译起始、延伸、终止因子的相

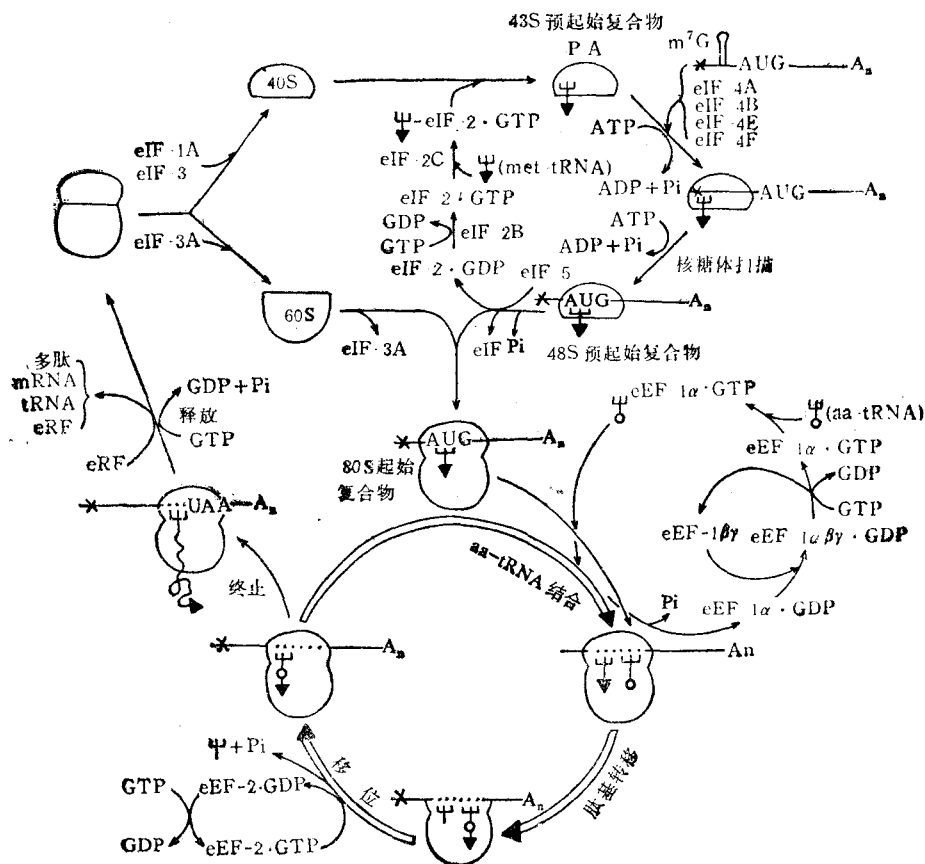


图 1 真核蛋白质生物合成的起始、延伸和终止过程示意图

互协同作用。翻译过程可分为肽链的起始、延伸和终止三个阶段, 其总反应过程见图 1。翻

收稿日期: 1991-11-07

修回日期: 1992-03-06

表 1 真核翻译的起始、延伸和终止因子^[4]

阶段	因子	分子量 kD	主要功能
起始	eIF-1	15	促进 40S 预起始复合物的形成
	eIF-1A	17.6	核糖体解离; 促进 40S 预起始复合物形成
	eIF-2	130(α 36, β 38, γ 55)	依赖于 GTP 的 Met-tRNA _i 结合 40S 核糖体亚基
	eIF-2A	65	依赖于 AUG 的 Met-tRNA _i 结合 40S 核糖体亚基
	eIF-2B	272(α 26, β 39, γ 58, δ 67, ϵ 82)	GTP:GDP 交换
	eIF-2C	94	稳定三联复合物
	eIF-3	550(35,36,40,44,47,66,115,170)	促进 40S 预起始复合物的形成
	eIF-3A	25	核糖体解离; 结合 60S 亚基
	eIF-4A	46	依赖于 RNA 的 ATPase; 解旋酶; 促进 mRNA 结合核糖体
	eIF-4B	80	解旋酶; 促进 mRNA 的结合
	eIF-4F	24	识别并结合 mRNA 的 5' 帽子结构
	eIF-4F	290(24,46,220)	帽子识别; 解旋酶
	eIF-5	150	促进 40S 与 60S 亚基缔合
	eIF-5A	16.7	促进第一个肽键的形成
延伸	eEF-1	150(α 50, β 26, γ 46, δ 28)	氨酰-tRNA 结合核糖体
	eEF-2	100	肽酰-tRNA 的移位
	eEF-3	125	ATPase; 促进氨酰-tRNA 的结合
终止	eRF	54	识别终止密码子; 促进肽酰-tRNA 切开和释放

译起始因子 (eIF), 延伸因子 (eEF)、释放因子 (eRF) 见表 1。

1 肽链的起始

起始阶段分为三步: a. 43S 预起始复合物的形成; b. 43S 复合物与 mRNA 结合, 扫描至起始密码形成 48S 预起始复合物; c. 80S 起始复合物形成。

1.1 43S 预起始复合物的形成

在起始因子-3 (eIF-3)、eIF-1A 和 eIF-3A 的存在下, 80S 核糖体解离成 40S 和 60S 两个亚基, eIF-1A 和 eIF-3 与 40S 亚基结合可防止 40S 亚基自身聚合或与 60S 亚基重新缔合, 同时促进起始 tRNA 和 mRNA 与核糖体 40S 亚基结合。如图 1 所示, 起始 Met-tRNA_i 与 40S 亚基的结合需要 eIF-2·GTP 作载体。从 48S 复合物中释放的 eIF-2·GDP 二联体不能直接结合 Met-tRNA_i, 需要在 eIF-2B (也称鸟苷酸交换因子, GEF) 的作用下, 才能与 Met-tRNA_i 结合成 eIF-2·GTP·Met-tRNA_i 三联体复合物, 而结合 40S 核糖体形成 43S 预起始复合物。蛋白质交联实验已证明, 三联体

复合物是直接 与 40S 亚基的 P 位结合。

eIF-3 是一个多亚基蛋白^[1], 由 7—10 个多肽组成, 总分子量约 600kD, 具有多种功能: 可使 80S 核糖体解离; 能紧密结合 40S 亚基; 促进起始 tRNA 与 40S 亚基结合; 也是 mRNA 结合 43S 预起始复合物所必需; 其中的 170kD 亚基在 eIF-4A, 4E 和 4F 完全缺乏时也具有结合 mRNA 5' m⁷G 帽子的活性。eIF-1A (也称 eIF-4C) 则是一个 17.6kD 多肽, 也能解离 80S 核糖体, 结合 40S 亚基, 刺激起始 tRNA 和 mRNA 与 40S 亚基的结合, 以及 40S 二聚体解离。eIF-3A (也称 eIF-6) 是一个 25kD 多肽, 能与 60S 核糖体专一地相互作用, 而防止其与 40S 亚基的重新缔合。

eIF-2 含有 α , β , γ 三个亚基。以前以为 α 亚基能结合 GTP, 现研究表明, 人和大鼠的 α 亚基由 315 个氨基酸组成, 分子中不存在 GTP 结合位点, 也不被 GTP 类似物标记, 但 α 亚基 48 和 51 位的丝氨酸被磷酸化后能形成稳定而又无活性的 eIF-2·GTP·eIF-2B 复合物, 从而阻止 GTP 交换和 eIF-2 的再生。人的 β 亚基由 333 个氨基酸组成, 分子中既含 GTP 结

合位点也具有结合 RNA 的特异结构, 该结构的变化可改变对起始密码的识别。β 亚基的单克隆抗体可抑制三联体的形成, 也抑制 β 亚基与 mRNA 的结合^[2], 表明该亚基在形成三联体中起重要作用, 并且参与对起始密码的识别和选择。γ 亚基可能具有结合 tRNA 和 GTP 的功能。最近发现, eIF-2 是一种帽子结合蛋白, 能刺激 eIF-4B 和 4F 对 mRNA 5' 帽子的识别^[3]。

eIF-2B 由 5 个多肽组成, 能将 eIF-2 上的 GDP 转换成 GTP, 以利对 40S 核糖体有亲和力的三联体形成。目前所知, eIF-2B 中的 β 亚基能结合 GTP, γ 和 δ 亚基结合 ATP, ε 亚基的磷酸化可提高该因子的活性, 脱磷酸则降低其催化 GNP 交换活性。

eIF-2C 是一个 94kD 蛋白, 具有稳定三联体复合物和防止裸露 mRNA 被破坏的功能^[4]。

1.2 48S 预起始复合物的形成

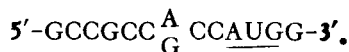
如图 1 所示, 43S 复合物结合 mRNA 形成 48S 预起始复合物需 eIF-4 族 (4A, 4B, 4E 和 4F) 的参与及 ATP 供能, 这是肽链起始过程中最复杂的一步反应。

eIF-4A, 4B 和 4E 都是单亚基蛋白质。小鼠 4A 由 370 或 390 个氨基酸组成, 是一种 ATP 依赖性的单链 RNA 结合蛋白, 具有双向解旋 RNA 二级结构的活性^[5]。人 4B 由 611 个氨基酸组成, 能刺激 4A 和 4F 的 ATPase 和 RNA 解旋活性, 具有结合 mRNA 的能力^[6], 与起始密码 AUG 有较高亲和力, 可能具有识别翻译起始信号的能力。人 4E 由 217 个氨基酸组成, 是识别和结合 mRNA 5' 帽子结构的含磷蛋白, 分子中 53 位的 Ser 突变为 Ala 的 4E 由于不能磷酸化而不能携带 mRNA 掺入 48S 预起始复合物, 说明磷酸化的 4E 对于将 mRNA 转到 48S 复合物中是必要的。4E 主要通过 102 位 Trp 的堆积力和 105 位 Glu 的氢键配对共同识别和结合 mRNA 的 5' 帽子结构^[7]。eIF-4F 是三亚基蛋白质, 由 4A, 4E 和一个 220kD 多肽 (p220) 组成, p220 可能起着 4F 中其它亚基的装配因子作用, 其分子的完

整性对 4F 的功能是必要的, 它在脊髓灰质炎病毒感染的细胞中被降解, 宿主蛋白质的合成便受抑制。兔 4A 由两个相同基因 (4AI 和 4AII) 编码, 游离的 4A 是 4AI 的产物, 4F 中的 4A 为两基因产物的混合物。游离的 4A 和 4E 及 4F 在肽链起始中的作用可能不完全相同, 因为它们的共同存在对于体外最大翻译活性都是必要的^[8]。

关于 mRNA 进入翻译起始的机制, 目前较公认的模型是: 43S 复合物在 eIF-4E 的作用下识别并结合 mRNA 的 5' 帽子结构, 4A 和 4F 使 mRNA 5' 非编码区二级结构解旋, 核糖体沿 mRNA 5'→3' 方向移动扫描, 在 eIF-2 和 4B 及起始 tRNA 的协同作用下, 识别和选择起始信号, 而移动至合适的起始密码 AUG 形成 48S 起始复合物。具有帽子结构的真核 mRNA 都以这种帽子依赖性机制起始翻译。此外, 有少数真核及细小 RNA 病毒的 mRNA 缺乏 5' 帽子结构, 是经帽子非依赖性的所谓内部起始机制进入翻译起始的^[9], 此类 mRNA 的起始密码 5' 上游或非编码区含有起始信号序列, 为核糖体和特异因子所识别和结合。TMV-RNA 5' 先导 68 个核苷酸片段 (称 Q 序列) 介导的翻译就是依赖于 eIF-4A 而非依赖于 eIF-4E, 无 5' 帽子的 β-珠蛋白 mRNA 翻译需显著提高 4F 的浓度。在已知的 eIF 中, 只有 4F 能明显刺激豇豆花叶病毒中等组分 RNA 的内部起始方式的翻译。最近分别在 HeLa, 小鼠和兔细胞中发现一种 52—58kD 的蛋白质因子, 其结构不同于现有已知的起始因子, 它能特异地结合到细小 RNA 病毒 mRNA 5' 非编码区的内部起始位点^[10]。这种内部起始的详细机制以及所需的起始因子等都有待深入研究。

对于起始密码子的识别和选择, 起始位点附近的序列结构起着重要作用。动物和病毒 mRNA 中常见的起始保守序列为



AUG 下游二级结构也有助于核糖体对起始 AUG 的识别, AUG 与下游发夹结构之间的最

佳距离为 14 个核苷酸,这可能是二级结构减慢核糖体的扫描,从而使核糖体的起始密码识别中心与起始密码充分相互作用。由于目前在真核中发现越来越多的非 AUG 密码起始,甚至同一基因的 mRNA 中也存在 AUG 和非 AUG 起始的现象^[11],该假说有可能解释真核非 AUG 密码的起始机制。

最近的研究发现,含 5'-帽子的 mRNA 类似物能结合 40S 核糖体 18S rRNA 的 975—1055 核苷酸区域,说明 18S rRNA 可能参与起始过程中对 mRNA 的识别。

1.3 80S 起始复合物的形成

在 eIF-5 的存在下,48S 复合物上的 GTP 水解,释放出 eIF-2·GDP 及所有起始因子,与 60S 核糖体亚基缔合形成 80S 起始复合物。纯化的兔 eIF-5 是一个 58—62kD 的单体蛋白,天然态为 150kD,分子中的 Ser 磷酸化后仍保持完全的活性,它并不直接参与 40S 和 60S 亚基的缔合,其主要功能是催化结合在 40S 亚基上的 GTP 水解^[12],导致 eIF 释放,使 40S 亚基变成易于与 60S 亚基缔合的构象。

此外,人的 eIF-5A (也称 eIF-4D) 为一个含有 154—157 个氨基酸的酸性蛋白,分子中含有一种特异氨基酸——高赖氨酸(hypusine),是 50 位 Lys 的 ϵ -氨基经丁氨基修饰形成的,缺此氨基酸的 eIF-5A 前体是无活性的,它主要在翻译起始的后期起作用,能刺激 Met-嘌呤霉素形成,其功能可能是使 Met-tRNA_i 稳定地结合到 60S 亚基的肽基转移酶活性中心,以促进第一个肽键的形成^[13]。

2 肽键的延长

多肽链延伸循环主要经历下列三步^[14]: a. 氨酰-tRNA 的结合; b. 肽键的形成; c. 肽酰-tRNA 移位。

2.1 氨酰-tRNA 的结合

eEF-1 α ·GTP 将对应于核糖体 A 位 mRNA 密码的氨酰-tRNA 携至核糖体空着的 A 位, GTP 水解,释放出的 eEF-1 α ·GDP 在 eEF-1 $\beta\gamma(\delta)$ 的作用下再生,参与下一次循环反应。

目前已知,真核的 eEF-1 都含有 3 个 (α, β, γ) 或 4 个 ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) 亚基。 α 亚基约由 458—463 个氨基酸组成,具有 GTP 和氨酰-tRNA 结合位点,在 GTP 存在下,介导氨酰-tRNA 结合到 80S 核糖体上。该亚基有多方面的功能^[14]: 它可作为动物缙氨酰-tRNA 合成酶的一部分;也能与 mRNP 结合;还与有丝分裂器结合;并能附着在内织网的磷脂酰肌醇;也结合肌动蛋白等。最近发现,酵母 eEF-1 α 是一种核糖体蛋白,在核糖体亚基的缔合中起作用^[15]。卤虫 (*Artemia*) 的 β 亚基由 208 个氨基酸组成, C 端区为催化 GNP 交换反应和结合 eEF-1 α 亚基的部位, N 端区具有与 γ 亚基结合的位点,主要功能是催化 α 亚基的 GNP 交换反应^[16]。 γ 亚基由 429 个氨基酸组成,是一个高度疏水性蛋白,对维管和膜具有特异亲和力,可能是蛋白激酶的催化亚基,通过磷酸化来作用于多肽合成的延伸循环。卤虫 δ 亚基分子的 C 端半部序列与 β 亚基具有高度同源性,也能催化 GNP 交换反应,但 N 端序列则无明显同源性^[16],该亚基的确切作用还有待阐明。

2.2 肽键的形成

在肽基转移酶的作用下,核糖体 P 位 tRNA 上氨基酸的羧基与 A 位 tRNA 上氨基酸的氨基形成肽键。此反应不需延伸因子,60S 核糖体本身具有肽基转移酶活性,但其成分未完全了解,初步研究发现 60S 亚基的核糖体蛋白 L₁₀, L_{13/15}, L₂₁, L₂₃, L₂₄, L₂₆, L₂₇, L₂₈, L₃₁, L_{32/33} 和 L₃₆ 等都参与催化活性中心。肽键的形成也包括 A 位和 P 位两个 tRNA 分子的直接相互作用,能量转移实验表明,两位点上的两个 tRNA 分子的相互间距离不超过 0.2—1nm。最近发现,28S rRNA 中有一 59 核苷酸区段在人和小鼠及 *E. coli* 的 23S rRNA 中都相同,该保守区被抗体结合后可抑制 eEF-1 α 和 eEF-2 结合核糖体及所结合的 GTP 水解,从而阻止蛋白质合成,说明 28S rRNA 的保守区在肽链延伸循环中参与核糖体与延伸因子的相互作用。

2.3 移位

肽键形成后,肽酰-tRNA 在 eEF-2 的作

用下从 A 位移至 P 位,同时核糖体沿 mRNA 5'→3' 方向相应移动 3 个碱基的距离,使下一个密码子进入 A 位,以便新的相应氨酰-tRNA 进入空着的 A 位而进行新一轮循环。鼠类的 eEF-2 由 857 个氨基酸组成,N 端区含有 GTP 结合位点,具有 GTPase 活性,C 端区可与核糖体相互作用,主要功能是催化肽酰-tRNA 的移位反应。因而 eEF-2 也称为氨酰转移酶 II。eEF-2 的磷酸化和 ADP 核糖基化都抑制蛋白质的生物合成,磷酸化的 eEF-2 不影响结合 GTP 和 GTPase 活性,但却能降低其与核糖体的亲和力;ADP 核糖化的 eEF-2 既降低 GTPase 活性,也抑制其与移位前核糖体的结合^[17]。白喉毒素之所以具有很强的毒性,就是因为它能专一地在 eEF-2 的 715 位组氨酸进行 ADP 核糖化,而且修饰的 ADP 核糖基不易除去,从而强烈地抑制蛋白质的生物合成。eEF-2·GDP 从核糖体释放后,不需其它因子的参与,可以自动再生,参与下一次循环反应。

2.4 酵母延伸因子-3 (eEF-3)

高等真核肽链延伸循环仅需两种延伸因子: eEF-1 和 eEF-2。而真菌则需第三种延伸因子: eEF-3。异源核糖体组合翻译实验发现,决定需要 eEF-3 的是酵母 40S 核糖体亚基,这说明,与其它真核核糖体相比,酵母 40S 核糖体亚基肯定缺失了某种类似于 eEF-3 的成分或功能。序列分析表明, eEF-3 由 1044 个氨基酸组成,分子中含有 ATP 结合位点及 ATPase 活性,其 C 端区存在结合 RNA 的序列结构。eEF-3 的确切作用还未完全了解。目前所知,它可以利用 ATP、GTP 或 ITP 作能源,促进 eEF-1α·GTP·氨酰-tRNA 结合核糖体而参与肽链的延伸循环,可能在保持翻译的精确性中也起作用。最近的实验表明,梨形四膜虫 (*Tetrahymena pyriformis*) 的核糖体在酵母 eEF-1 和 eEF-2 存在下具有完全的活性,加入 eEF-3 后其活性并不增加,但 eEF-3 的多克隆抗体能抑制核糖体的 ATPase 活性^[18],由此推测,酵母核糖体缺失的可能就是这种 ATPase 活性。

3 肽链的终止及释放

肽链合成的终止由 UAA, UAG 或 UGA 三种终止密码子编码。当 mRNA 上的终止密码子出现在核糖体的 A 位时,无相应的氨酰-tRNA 与之结合,释放因子 (eRF) 在 GTP 存在下能识别这种无意密码子,并结合到核糖体的 A 位,激活肽基转移酶,催化 P 位上 tRNA 与肽链之间的酯键水解,使多肽从核糖体中释放。

与原核的 3 种 RF 不同,真核只有一种 eRF,却能识别 3 种终止密码子,它具有结合核糖体,结合 GTP,介导肽酰 tRNA 水解以及 GTPase 等活性。序列分析发现,兔 eRF 由 475 个氨基酸组成,与细菌 RF 无明显同源性,但与细菌和线粒体的色氨酸-tRNA 合成酶具有明显的序列同源性^[19],还不清楚它们之间是否有功能上的关系。

eRF 所识别的终止密码子为四核苷酸,例如 UAA(A/G),第四个核苷酸的变化不影响 eRF 的功能,最近的研究已证实,真核蛋白质合成的终止信号使用四核苷酸体系^[20],四核苷酸体系的终止效应可能比三核苷酸体系更精确和有效。但 eRF 对终止密码子的特异识别机制仍待阐明。

参 考 文 献

- 1 Milburn S C *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1990; 276: 6
- 2 Harary R *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1990; 1050: 129
- 3 van Heugten H A A *et al.* *J Biol Chem*, 1991; 266: 7279
- 4 Hershey J W B. *Annu Rev Biochem*, 1991; 60: 717
- 5 Rozen F *et al.* *Mol Cell Biol*, 1990; 10: 1135
- 6 Milburn S C *et al.* *EMBO J*, 1990; 9: 2783
- 7 Ueda H *et al.* *FEBS Lett*, 1991; 280: 207
- 8 Conroy S C *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1990; 282: 363
- 9 Jackson R T *et al.* *TIBS*, 1990; 15: 477
- 10 Luz N, Beck E. *FEBS Lett*, 1990; 269: 311
- 11 Saris C J M *et al.* *EMBO J*, 1991; 10: 655
- 12 Chakrabarti A *et al.* *J Biol Chem*, 1991; 266: 14039
- 13 Hershey J W B *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1990; 1050: 160
- 14 Riis B *et al.* *TIBS*, 1990; 15: 420
- 15 Herrera F *et al.* *Eur J Biochem*, 1991; 200: 321
- 16 Van Damme H T F *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1990;

- 1050: 241
 17 Nygard O, Nilsson L. *J Biol Chem*, 1990; 265: 6030
 18 Miyazaki M *et al. J Biochem*, 1990; 108: 1001

- 19 Lee C C *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87: 3508
 20 Brown C M *et al. Nucleic Acids Res*, 1990; 18: 6393

钙调素拮抗剂的研究动态

胡卓逸

(中国药科大学生化研究室, 南京 210009)

提 要

从钙、钙调素的功能论及钙拮抗剂和钙调素拮抗剂的概念。并着重叙述了国内外钙调素拮抗剂研究中的问题和开发动态。

关键词 钙调素拮抗剂, 钙调素, 钙

钙离子有 4 种主要的生物学作用: a. 结构作用; b. 电作用; c. 细胞内酶和蛋白质的辅助因子; d. 作为细胞内的调节剂。钙信号通过钙调素 (CaM) 调节。

1 钙调素 (CaM) 是 Ca^{2+} 信号的重要的调节蛋白

CaM 是第二信使 Ca^{2+} 信号的普遍的调节剂, 其作用类似于 cAMP 依赖的蛋白激酶中 cAMP 结合亚基的作用。如图 1 所示^[1], 这两

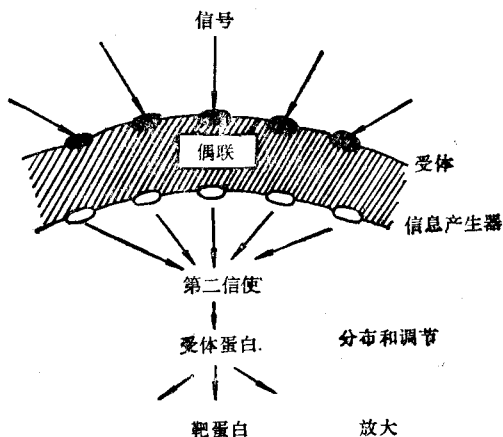
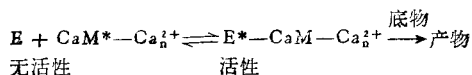
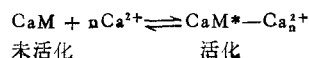


图 1 刺激-反应偶联的第二信使模式

使的浓度变化, 并在这些信号的控制下传递信息给细胞内蛋白质。由 CaM 介导的刺激-反应偶联包括下列步骤: a. Ca^{2+} 浓度瞬时升高, 从 10^{-7}mol/L 至 10^{-3}mol/L ; b. Ca^{2+} 与 CaM 相互作用, 伴随着因 Ca^{2+} 诱导的 CaM 结构变迁; c. CaM 使许多受其调节的酶活化并与受协调的蛋白质相互作用, 其作用通式可表示为:



2 钙拮抗剂 (CA) 和钙调素拮抗剂 (CaMA)

由上列反应式可见, 凡能与 Ca^{2+} 结合的物质都有可能影响 Ca^{2+} 对 CaM 的活化; 凡能与 CaM 结合的物质可能影响 CaM 对酶的活化, 这两类物质最终都有可能影响到受 CaM 调控的酶的活力。

CA 亦有称为“钙内流阻断剂”或“钙通道阻断剂”, 是一类能选择性地阻断细胞膜钙通