

第一类肽链释放因子研究进展*

张素平 梁爱华**

(山西大学生物工程实验室, 太原 030006)

摘要 第一类释放因子是新生肽链释放所必需的因子, 它能正确地识别终止信号, 水解肽酰-tRNA 酯键, 释放出新合成的多肽链. 它的高级结构与 tRNA 结构相似, 从而解释了它们功能上的相似性, 其氨基酸序列的高度保守区 GGQ motif 和三肽反密码子区在新生肽链的释放中分别执行重要的功能.

关键词 第一类释放因子, tRNA-mimicry, GGQ motif, 三肽反密码子

学科分类号 Q753

早在 70 年代, Goldstein 等就已发现了蛋白质生物合成终止过程, 该过程发生在核糖体的解码位点即 A 位点上, 是对终止密码子而非有义密码子的应答. 在这一过程中, 需要两类多肽释放因子的参与^[1]. 第一类因子为密码子特异性因子 RFs (release factors), 原核生物中是 RF1/2, RF1 识别 UAG/UAA, RF2 识别 UGA/UAA, 真核生物中是 eRF1, 识别三个终止密码子. 这种特异性的识别说明它们必定与密码子直接作用. 近来的计算机辅助分析、晶体结构研究、突变的功能研究和释放因子过量表达的研究等为该假说提供了充分的依据, 并提出了 tRNA-mimicry^[2]; 第二类释放因子为密码子非特异性的 RFs, 原核生物中为 RF3, 真核生物中为 eRF3. 这类因子作为运载蛋白, 除具有 GTPase 活性外, 还能促进第一类因子的生物学活性. 这两类因子协同作用, 共同完成蛋白质合成终止反应, 其中第一类释放因子起着至关重要的作用, 它识别终止信号、促进肽酰-tRNA 酯键的水解, 阻止蛋白质翻译过程中的错误通读, 最终释放出正确的蛋白质. 第一类释放因子以什么样的机制作用于 RNA, 以什么样的方式促进多肽链的释放, 长期以来这一直是个难解的谜, 因为这是“蛋白质-RNA”间的作用, 而非人们比较清楚的“RNA-RNA”之间的作用. 围绕此问题, 本文就近年来第一类释放因子的结构、功能及其终止新生肽链合成的作用机理等几方面的最新进展作一介绍.

1 第一类释放因子的结构——tRNA-mimicry

生物体的 64 个密码子中, 有 61 个有义密码子, 3 个无义密码子, tRNA 通过密码子-反密码子

的相互作用识别这 64 个密码子, 那么第一类释放因子 RF1/2 或 eRF1 又是通过怎样的方式精确地识别终止与非终止信号、进而控制肽链的释放呢? 人们对此问题进行了深入地研究和探讨.

1996 年, Ito 等^[2]对释放因子的结构进行分析, 他们用 BESTFIT/PILEUP 程序分别比较多个原核生物和真核生物的 RF1/2、eRF1 序列的同源性, 结果发现 RF1/2、eRF1 有 7 个氨基酸序列保守区, 其中高度保守的氨基酸与延伸因子 EF-G 的 III、IV 和 V 结构域高度同源, EF-G 的三维结构显示, III、IV 和 V 结构域形成与 tRNA 类似的结构 (图 1). 因此提出第一类释放因子的 tRNA-mimicry 模型, 其中 EF-G 的结构域 III、IV 和 V 相应于 tRNA 分子的反密码子环、氨酰接受臂和 T 臂. 这

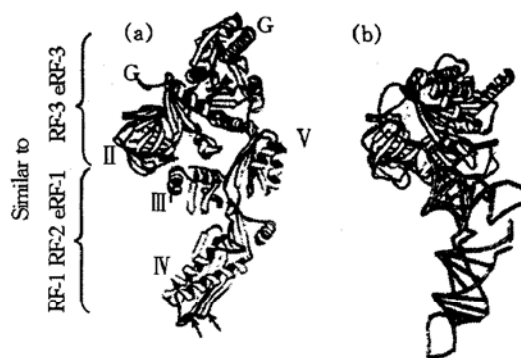


Fig. 1 The structure of EF-G-GDP (a) and EF-Tu-GDPNP-Phe-tRNA^{Phe} (b)

图 1 释放因子 tRNA 相似模型

(a) EF-G-GDP; (b) EF-Tu-GDPNP-Phe-tRNA^{Phe}.

* 国家自然科学基金 (39970416) 和山西省自然科学基金项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0351-7011499, E-mail: aliang@sxu.edu.cn

收稿日期: 2000-12-15, 接受日期: 2001-01-20

种结构上的相似性解释了功能上的相似性, 延伸因子 EF-G 与 tRNA-EF-Tu 复合物结构上相似 (图 1) 的发现进一步充实了这一解释. 近来人类 eRF1 的晶体结构显示^[3], eRF1 的总体形状和空间结构与 tRNA 相似, 该实验数据有力的支持了 tRNA-mimicry 模型.

2 第一类释放因子的重要功能

2.1 GGQ motif

1999 年, Frolova 等^[4]对已知的第一类释放因子的氨基酸序列进行了比较, 发现在这些序列中普遍存在着一个严格的保守区 GGQ motif. 使用定点突变的方法, 突变掉人 eRF1 的 GGQ motif 中两个甘氨酸 G (183)、G (184), 结果导致 eRF1 作为释放因子功能的丧失, 而其相邻的 G (181)、R (182) 突变则无任何影响, 这意味着 GGQ motif 在第一类释放因子中执行重要的功能.

最近, Song 等^[3]得到了分辨率为 0.28 nm 的人 eRF1 的晶体结构 (图 2), GGQ motif 位于结构域 2 远离 N 端的延伸的 β 转角 α 螺旋小结构域的顶端, 它离该分子其余部分最远, tRNA 的氨酰基位于 CCA-3' 接受臂上; 第一类释放因子与水分子协同作用, 作用位点在核糖体的肽酰转移酶中心, 与 A 位点氨酰 tRNA 的氨基位于同一位置, 两个基团相似而特别的位置使它们与肽酰转移酶中心具有平等的作用机会, 这说明第一类释放因子中的 GGQ motif 很可能是肽酰-tRNA 酯键水解的中心^[3].

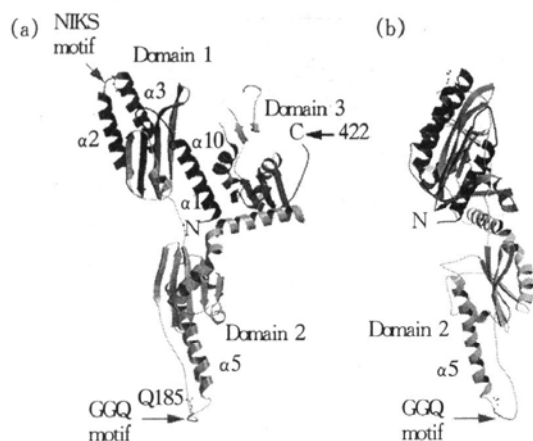


Fig. 2 The crystal structure of human eRF1a

图 2 人 eRF1a 的晶体结构

(a) 正面观; (b) 侧面观.

2.2 三肽反密码子结构 (tripeptide anticodon)

既然第一类释放因子与 tRNA 结构和功能相

似, 那么, RF1/2 或 eRF1 中是否也有一个肽反密码子结构来识别密码子呢? 最近的研究成果证实了这一推测.

利用蛋白质的定点突变和体内互补实验^[5,6], 人们发现, RF1 中的三肽 Pro-Ala-Thr 和 RF2 中的三肽 Ser-Pro-Phe 决定了 RF 的性质. 第一个和第三个氨基酸分别独立地识别终止密码子中的第二和第三个嘌呤碱基, 这样, 在第一位上, RF1 的 Pro 严格限制于 A, 而 RF2 的 Ser 则可识别 A 和 G; 在第三位上, RF1 的 Thr 可识别 A 和 G, 而 RF2 的 Phe 则限制于 A, RF2 中的三肽变为 Pro-Pro-Phe, 只识别 UAA, 而变为 Ser-Pro-Thr 不仅识别三个终止密码子, 也识别 UGG, 由此可知, 这两种识别开关是独立起作用的, 它们是两种不同的肽反密码子^[7].

有研究显示, 真核生物 eRF1 的结构域 1 的突变可以造成特异地识别密码子功能的缺陷^[4], 由此可知, eRF1 的肽反密码子结构位于或接近 N 端区域的结构域顶端, 接近于螺旋发夹结构的 Thr-Ala-Ser, 可能是全能识别的“肽反密码子”结构最主要部分, 真核生物 Thr-Ala-Ser 的高度保守性支持这一假说.

3 影响第一类肽链释放因子作用的因素及其释放新生肽链的过程

影响第一类肽链释放因子作用的因素有 RF3、终止信号、核糖体的解码位点 (A 位点) 及 GTP 的水解作用等. 首先, 实验表明, RF3 不直接参与终止密码子的识别和肽酰-tRNA 的水解, 它携带 RF1/2 或 eRF1 到达核糖体 A 位点, 使其与附近的关联 tRNA 竞争识别终止密码子^[8] (图 3). RF3 的存在可以提高第一类释放因子的终止效率^[9]. 其次, 终止密码子下游第一个碱基对于第一类释放因子的识别和终止效率不同^[10]. UGA (N) 中, 终止效率 A > C, U > G, 而 UAA (N) 中 A > G > U > C. 因此, 有人提出终止信号不仅仅只是终止密码子, 而是由终止密码子及其后的第一个碱基构成, 即四核苷酸的终止信号. 还有研究表明, 除终止密码子下游的碱基外, 其上游六个核苷酸对第一类释放因子的识别终止作用影响也较大^[8]. 第三, 第一类释放因子并不只是作用于 mRNA, 事实上它作用于一个 mRNA:rRNA 复合物, 这个复合物的暴露速率也会影响终止的正确率^[11]. 第四, RF1/2 或 eRF1 正确识别 mRNA:

rRNA 复合物后, 水解肽酰-tRNA 酯键, 释放出新生肽链, 然后, GTP 水解, 使肽链释放因子从核糖体上解离下来, 继续参与下一个肽链的终止反

应。同时, 在 RRF (ribosome recycling factor) 因子的协助下, 核糖体解离、空载 tRNA 释放^[11], 到此为止, 完整的新生肽链便产生了。

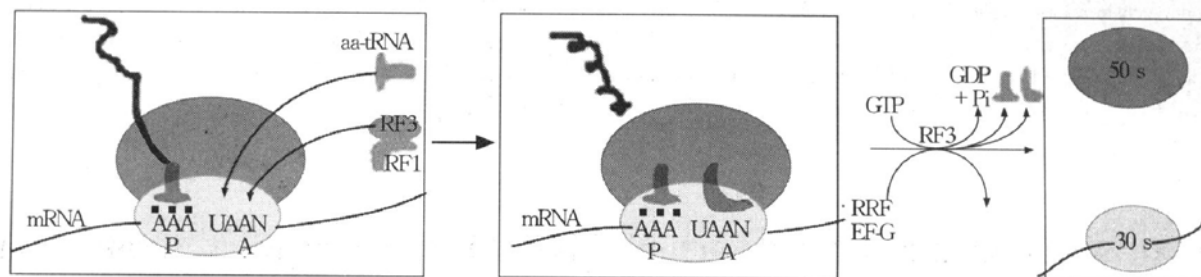


Fig 3 Model for the termination cycle in protein synthesis

图3 第一类释放因子的作用过程

4 其 他

4.1 第一类释放因子家族

比较已报道的肽链合成释放因子 1 的序列发现, 真核生物和古细菌第一类释放因子间的序列一致性可达 30%; 而细菌 RF 和线粒体 eRFs 之间的结构, 不存在明显的相似性。这意味着存在两类不同的释放因子蛋白质家族, 这两类蛋白质将形成不同的蛋白质结构^[12], 进而推测它们将以不同的方式执行着相同的功能。另外, 真核生物的 eRF1 的结构和功能研究表明, 它的具肽链释放活性的结构域和与 eRF3 结合的结构域是独立的, 是否意味着它是基因融合的产物^[13]? 目前, 还没有更多的证据来支持这些观点。

原核生物的第一类释放因子为 RF1/2 两种, 多数真核生物中到目前为止仅发现有一种 eRF1, 近来, Liang 等^[14]在原生动物游仆虫 (*Euplotes*) 中发现其 eRF1 也有两种, 分别为 eRF1a 和 eRF1b。我们推测, 生物中第一类释放因子的种类可能与生物进化有关。更有趣的是纤毛虫 (*Ciliates*) 遗传密码表达的特殊性, 如一些游仆虫基因中的终止密码子 UGA 被翻译成半胱氨酸, 四膜虫 (*Tetrahymena*) 许多基因中的 UAG 和 UAA 被翻译成谷氨酰胺^[15], 那么, 是否它们的第一类释放因子以一种特殊的方式作用于核糖体和 mRNA 呢? 还是存在另外的因素造成这种特殊现象的出现, 有待于进一步研究。

4.2 “核酸-蛋白质”之间的相互作用

更让人感兴趣的是, 第一类释放因子的作用涉及的是蛋白质-核酸间的相互作用, 而不是核酸-核酸、蛋白质-蛋白质之间的相互作用。迄今为止,

已发现的运载蛋白 EF-Tu、延伸因子 EF-1 α 、EF-G、释放因子 RFs 均具有类 tRNA 结构区域, 这些蛋白质都识别并作用于 RNA, 那么, 是否所有特异性识别 RNA 的蛋白质均需模拟 tRNA 结构呢? 这仍需大量科学工作者的进一步研究来证明。

参 考 文 献

- 1 Zhouravleva G, Frolova L, Goff L X, *et al.* Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. *EMBO J*, 1995, **14** (16): 4065~ 4072
- 2 Ito K, Ebihara K, Uno M, *et al.* Conserved motifs in prokaryotic and eukaryotic polypeptide release factors: tRNA-protein mimicry hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (11): 5443~ 5448
- 3 Song H, Mugnier P, Kas A K. The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1-mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell*, 2000, **100** (3): 311~ 321
- 4 Frolova L Y, Tsivkovskii R Y, Sivolobova G F, *et al.* Mutations in the highly conserved GGQ motif of class I polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis. *RNA*, 1999, **5** (8): 1014~ 1020
- 5 Ito K, Uno M, Nakamura Y. A tripeptide 'anticodon' deciphers stop codons in messenger RNA. *Nature*, 2000, **403** (6770): 680 ~ 684
- 6 Nakamura Y, Ito K, Ehrenberg M. Mimicry grasps reality in translation termination. *Cell*, 2000, **101** (4): 349~ 352
- 7 Ito K, Uno M, Nakamura Y. Single amino acid substitution in prokaryote polypeptide release factor 2 permits it to terminate translation at all three stop codons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (14): 8165~ 8169
- 8 Nakamura Y, Ito K, Lsaxsson L A. Emerging understanding of translation termination. *Cell*, 1996, **87** (2): 147~ 150
- 9 Goff X L, Philippe M, Jear-Jean L. Overexpression of human release factor 1 alone has an antisuppressor effect in human cells. *Mol Cellu Biol*, 1997, **17** (6): 3164~ 3172
- 10 Manuvakhova M, Keeling K, Bedwell D M. Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system. *RNA*, 2000, **6** (7): 1044~ 1055

- 11 Buckingham R H, Grentzmann G, Kisselev L. Polypeptide chain release factors. *Molecular Microbiology*, 1997, **24** (3): 449~456
- 12 Frolova L Y, Goff X L, Rasmussen A H, *et al.* A highly conserved eukaryotic protein family possessing properties of polypeptide chain release factor. *Nature*, 1994, **372** (6507): 701~703
- 13 Frolova L Y, Merkulova T L, Kisselev L L. Translation termination in eukaryotes: polypeptide release factor eRF1 is composed of functionally and structurally distinct domains. *RNA*, 2000, **6** (3): 381~390
- 14 Liang, A, Br nen-Nieweler C, Muramatsu T, *et al.* The ciliate *Euplotes octocarinatus* expresses two polypeptide release factors of the type eRF1. *Gene*, 2001, **262** (1): 161~168
- 15 梁爱华, 王伟, Heckmann K. 赭纤虫 RNA 聚合酶 I 基因片段的分析. *动物学报*, 1999, **45** (4): 435~439
- Liang A H, Wang W, Heckmann K. *Acta Zoology Sinica*, 1999, **45** (4): 435~439

The Advances on the Release Factor (Class 1) in Translation Termination*

ZHANG Su-Ping, LIANG Ai-Hua**

(Laboratory of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract The class 1 release factor is required in termination of protein synthesis. It could accurately recognize the stop signal and promotes the hydrolysis of the ester bond linking the polypeptide chain with the peptidyl (p) site tRNA. The model of “molecular mimicry between release factor and tRNA” explains the resemblance of function. Its highly conserved, universal GGQ motif and a tripeptide ‘anticodon’ play important roles in translation termination respectively.

Key words the class 1 release factor, tRNA mimicry, GGQ motif, a tripeptide ‘anticodon’

* This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (39970416) and Shanxi Natural Science Foundation.

** Corresponding author. Tel: 86-351-7011499, E-mail: aliang@sxu.edu.cn

Received: December 15, 2000 Accepted: January 20, 2001

欢迎订阅《生物技术通讯》

《生物技术通讯》是军事医学科学院生物工程研究所主办的关于生物技术的中央级专业性学术刊物(国内统一刊号CN11-4226/Q, 国际标准刊号ISSN 1009-0002), 是国家科技部中国科技论文统计与分析源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊。该刊主要报道生物技术(生物工程)及所有相关学科领域的最新科研成果与进展。主要栏目有: 研究报告、技术方法、研究简报、专论、综述、论坛、讲座、经验交流等。读者对象主要为从事生物技术及其在生物医学、工业、农业、环保等领域应用的科研、教学、管理人员, 大专院校相关专业师生及有关工程技术人员, 以及其他对生物技术感兴趣的人员。欢迎订阅、欢迎供稿。

《生物技术通讯》为大16开本, 双月刊, 80页, 每期定价9元, 全年54元。国内外公开发行, 国内邮发代号: 82-196, 国外发行代号: 1433BM。编辑部办理邮购业务。

邮政编码: 100071, 地址: 北京丰台东大街20号

电话: (010) 66948856; 传真: (010) 63895646

电子信箱: biolett@bj163.com