

RNA 聚合酶沿 DNA 向前移动; 同时进行核苷酸的切除修复, 以确保转录延长准确进行^[7].

参 考 文 献

- 1 Schaeffer L, Roy R, Humbert S *et al.* Science, 1993; **260**: 58
- 2 Michell P J, Tjian R. Science, 1989; **245**: 371
- 3 贾弘提. 生理科学进展, 1993; **24**: 298
- 4 Drapkin R, Reardon J T, Ansari A *et al.* Nature, 1994; **368**: 769
- 5 Gerard M, Fischer L, Moncollin V *et al.* J Biol Chem, 1991; **266**: 20940
- 6 Ohkuma Y, Robert G R. Nature, 1994; **368**: 160
- 7 Weeda G, van Ham R C A, Vermeulen W *et al.* Cell, 1990; **62**: 777
- 8 Wang Z, Svejstrup J Q, Feauer W J *et al.* Nature, 1994; **368**: 74
- 9 Fisher L, Gerard M, Chalut C *et al.* Science, 1992; **257**: 1392
- 10 Feaver W J, Gileadi O, Kornberg R D. Cell, 1991; **67**: 1223
- 11 Chesnut J D, Stephans J H, Dahmus M E. J Biol Chem, 1992; **267**: 10500
- 12 Flores O, Lu H, Reinkerg D. J Biol Chem, 1992; **267**: 2786
- 13 Greenblaff J. Cell, 1991; **66**: 1067
- 14 Lee D K, Horikoshi M, Roeder R G. Cell, 1991; **67**: 1241
- 15 Buratowski S, Hahn S, Guarente L *et al.* Cell, 1989; **56**: 549
- 16 Buratowski S, Sopta M, Greenblaff J *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1991; **88**: 7509

17 Flores O, Lu H, Killeen M *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1991; **88**: 9999

18 Lu H, Zawel L, Fisher L *et al.* Nature, 1992; **358**: 641

The Multiple Functions of BTF2/TFIIH in PolII Transcription. Ni Juhua, Jia Hongti, Zhang Naiheng (*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

Abstract BTF2, also named TFIIH, with multiple subunit complex is believed to have helicase, DNA-dependent ATPase and phosphate kinase activities participated in transcription initiation and transcription-coupled nucleotide-excision repair. During the formation of transcription initiation complex, polymerase II C-terminal domain (CTD), TBP and associated transcription factors are phosphorylated by BTF2/TFIIH in the presence of TFIIIE. These phosphorylation modifications can be expected to have effects on the regulation of transcription initiation through affecting protein-protein interactions. So BTF2/TFIIH is an important transcription factor in eukaryotic cells.

Key words BTF2/TFIIH, PolII CTD phosphorylation, transcription regulation

真核生物蛋白质翻译的内部起始机制

李 彤 王思多

(中国科学院上海生物化学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要 蛋白质翻译过程中, 翻译的起始步骤是非常重要的. 真核生物的翻译起始主要是通过依赖帽子结构的扫描机制进行的. 近几年在翻译的研究工作中发现, 在一些动物病毒中, 蛋白质合成通过一种不同于扫描机制的内部起始机制起始翻译. 用内部起始机制翻译的 mRNA 的 5' 端非翻译区有一个相对保

守的结构,它在内部起始过程中具有重要作用,一些特异的蛋白质因子能够促进在特定位点起始翻译.

关键词 真核生物, 翻译, 内部起始机制

蛋白质合成是通过核糖体忠实翻译遗传信息的过程,是生物中心法则的一个关键步骤.翻译过程对生物体非常重要,也是细胞内能量的主要消耗者之一.蛋白质合成速度影响细胞的整体代谢活动.现在发现在生物体中一些重要的蛋白质的表达是在翻译过程调控的,深入研究翻译过程对研究细胞的活动有重大意义.蛋白质翻译过程比较复杂,真核生物的翻译过程需要大约 200 多种生物大分子的协同作用.在翻译过程中一个非常重要的步骤是翻译的起始,目前已经知道有两种方式起始蛋白质的翻译:依赖帽子结构的翻译起始(cap-dependent initiation)和内部翻译起始(internal initiation).具有帽子结构的 mRNA 通常采用依赖帽子结构的扫描(scanning)机制起始翻译^[1].真核细胞中大部分蛋白质是通过这种机制翻译的.但是有一些 mRNA,如一些动物病毒的 mRNA,5' 端没有帽子结构,5' 非翻译区(untranslational region, UTR)很长,存在多个 AUG 起始密码子,而且存在复杂的结构,这些特点使核糖体难以通过扫描机制起始翻译.研究发现在这些病毒的 mRNA 的 5' UTR 存在一个特定的结构,能够直接结合核糖体,在 mRNA 的内部起始翻译.以下是近几年对内部起始机制研究的一些进展.

1 小 RNA 病毒翻译的内部起始现象

内部起始现象是在小 RNA 病毒(picornavirus)家族中发现的.这一家族有一些共同的性质,病毒基因组是一个无帽子结构的约 7.5 kb 的单链 RNA,含有一个编码多种蛋白质的很长的开放阅读框架(opening reading frame, ORF),5' UTR 比较长(610~1200nt),可能有复杂的二级结构,在 5' UTR 内有多个不能进行翻译的 AUG 密码子^[2,3].这些结构特点说明病毒 mRNA 很难通过依赖帽子结构的扫描机制起始翻译,可能是用另一种机制起始

翻译的.其根据是:a.无帽子结构的 mRNA 的翻译效率通常比较低,而小 RNA 病毒的基因翻译较快;b.5' 端 UTRs 的二级结构可能阻碍 40S 核糖体亚基的扫描;c.小 RNA 病毒的 5' 端 UTR 含有多个 AUG 密码子引导的小 ORF,但是这些小 ORF 并不翻译,对小 RNA 病毒的主要 ORF 的翻译也没有影响.如果采用扫描机制,核糖体只有翻译了上游的小 ORF 后,再起始翻译下游主要的 ORF,这样一定会影响主要 ORF 的翻译效率.因此,在小 RNA 病毒中可能有不同于扫描机制的翻译起始方式在起作用.

下面一个实验证明了存在翻译的内部起始机制.当用扫描机制翻译一个含有两个 ORF 的 mRNA 时,如果它们编码的蛋白质都比较长,一般下游 ORF 的翻译效率低于上游 ORF.将小 RNA 病毒的 5' UTR 插入两个 ORF 之间时,发现下游基因编码的蛋白质合成的比较早,产量也比较高^[4~6].说明下游 ORF 的翻译并不依赖上游 ORF 的合成,在两个 ORF 之间直接起始翻译下游 ORF,下游 ORF 的翻译与 mRNA 的 5' 端帽子结构无关,40 S 核糖体亚基可以直接识别插入的小 RNA 病毒 UTR 片段起始翻译.通过遗传学和分子生物学研究发现,小 RNA 病毒 mRNA 的 5' 端 UTR 中有一个约 450 nt 的片段与内部起始有关,被称为内部核糖体进入位点(internal ribosome enter site, IRES)^[4,5].

2 小 RNA 病毒的 5' UTR

比较小 RNA 病毒家族各个成员 mRNA 的 5' 端 UTR,发现小 RNA 病毒家族的 IRES 的序列具有一定的同源性.可以根据这种同源性将小 RNA 病毒家族分成 3 类,a. 甲肝病毒(hepatitis A virus, HAV); b. 心脏病毒(cardiovirus)和口疮病毒(aphthovirus); c. 肠道病毒(enterovirus)和鼻病毒(rhinovirus).研

究发现每一类病毒的 IRES 比较保守, 类与类之间没有保守性. 这种序列的保守性说明内部起始机制需要 IRES 具有特定的二级结构和空间结构, 同时还要使结构中间暴露出一定的 RNA 序列特征结构 (motif) 与核糖体和其他起始因子相互作用^[7].

IRES 中有 450~500 nt 形成复杂的二级结构是内部起始必需的^[7]. 核糖体的进入位点是靠近小 RNA 病毒 IRES 的 3' 端一个多嘧啶的序列特征结构及其下游 20 nt 左右的一个 AUG 密码子. 真核生物的这段序列特征结构可能与原核生物的 Shine-Dalgarno (S-D) 序列作用相同^[8]. 对于脑心肌炎病毒 (encephalomyocarditis virus, EMCV)^[9], 核糖体直接结合的这个特征结构中的 AUG 密码子本身, 就是病毒蛋白质翻译的起始密码子; 在这个密码子上游相距 8 nt 还有一个 AUG 密码子, 但是核糖体无法识别. 如果将起始密码子的上下文序列突变, 使起始密码子不适合于起始, 那么核糖体将在下游的另一个 AUG 密码子处起始翻译. 这种结果说明 EMCV 的翻译起始密码子是核糖体结合所必需的, 核糖体结合 mRNA 后, 可以直接起始翻译; 当这个密码子不适合翻译起始时, 核糖体可以启动扫描, 沿 mRNA 从 5' 到 3' 方向搜寻合适的起始密码子. 对于脊髓灰质炎病毒 (poliovirus) 的 RNA, 核糖体的识别位点也是多嘧啶/AUG 特征结构, 因为在多嘧啶序列下游 20 nt 的一个 AUG 密码子是脊髓灰质炎病毒有效翻译所必需的. 但是, 在这个例子中, 这个 AUG 密码子并不作为起始密码子, 可能是由于它的两侧序列不适合翻译起始, 但是这个位点似乎是核糖体的进入位点. 核糖体在这个位点进入后, 并不立即开始翻译, 而是启动扫描, 翻译的起始密码子就是核糖体进入位点下一个 AUG 密码子.

另一种小 RNA 病毒, 口蹄疫病毒 (foot and mouse disease virus, FMDV) 的翻译机制介于这两种极端现象之间^[10]. 少数核糖体在多嘧啶序列下游 20 nt 的 AUG 密码子直接起始翻译. 大多数核糖体在进入位点的下一个 AUG

密码子起始翻译.

3 起始因子在内部翻译起始中的作用

蛋白质翻译起始过程需要起始因子 (eIF) 的催化作用, 在真核生物中至少有 10 种起始因子的催化翻译起始^[1]. 目前研究的比较清楚的是 eIF-4F、eIF-2 和 eIF-2B. 在哺乳动物中, eIF-4F 是由 eIF-4E、eIF-4 γ (p220) 和 eIF-4A 三个亚基组成的复合物, 能够结合 mRNA 的帽子结构. eIF-4F 结合另一种起始因子 eIF-4B 后具有 RNA 解旋酶的活力, 能够解开 mRNA 的 5' 端的二级结构, 使核糖体掺入 mRNA 分子形成 48 S 起始复合物. 起始因子 eIF-2 由 α 、 β 、 γ 三个亚基组成, 其功能是将 Met-tRNA 携带到核糖体上, eIF-2 是典型的 G 蛋白, 可以结合 GTP, 与 GTP 和 Met-tRNA 形成三元复合物, 然后结合 40 S 核糖体小亚基形成 43 S 起始复合物. 43 S 起始复合物结合 mRNA 的 5' 帽子结构, 扫描寻找起始密码子, 然后 60 S 核糖体亚基掺入. 80 S 核糖体形成后, GTP 被水解, eIF-2-GDP 从核糖体上解离下来. 由于 eIF-2 与 GDP 的亲合力比与 GTP 强 400 倍, eIF-2-GDP 转变为 eIF-2-GTP 的鸟嘌呤交换反应, 需要起始因子 eIF-2B 的催化, 从而使再生的 eIF-2-GTP 开始一个新的起始过程.

对于翻译起始因子在内部起始机制中的作用, 了解得很少. 目前知道内部起始机制中仍需要各种起始因子的作用, 只是帽子结合因子 eIF-4F 中最大的亚基 p220 不是必需的^[11]. 这个蛋白质在脊髓灰质炎病毒侵染后不久, 就被降解, 这可能是宿主细胞中依赖帽子结构的扫描机制翻译起始被终止的原因.

eIF-2 和 eIF-2B 可以刺激脊髓灰质炎病毒的翻译, eIF-2B 可以加快 eIF-2-GDP 变成 eIF-2-GTP 的核苷酸交换反应, 催化 eIF-2 的再生^[1], 提高 eIF-2 和 eIF-2B 的含量可以促进蛋白质的合成. 但是 eIF-2B 在兔网状红细胞溶胞产物 (rabbit reticulocyte lysate, RRL) 中, 对异常蛋白质翻译的促进作用只比对正确蛋白质的促进作用效率稍低^[12], 而 eIF-2 对各种蛋白

质翻译的促进作用没有差别. 因此, 尽管 eIF-2 和 eIF-2B 也可能可以结合脊髓灰质炎病毒 mRNA 的 5' UTR 促进翻译. 但是, 它们可能只是作为翻译必需的因子起作用, 而不是作为脊髓灰质炎病毒正确翻译的专一因子起作用的.

4 特异蛋白因子对内部起始翻译作用

最近发现一系列细胞蛋白质, 如 La (p52)、eIF-2、p57、p38、p48 和 p52 等可以与小 RNA 病毒的 IRES 结合^[13~15]. 目前知道与脊髓灰质炎病毒翻译有关的反式作用因子有 La 蛋白和 p57 蛋白两种^[12,16,17]. 有趣的是 La 和 p57 都参与细胞核内的功能, La 参与依赖于 RNA 聚合酶 III 的转录的终止^[18], p57 类似于一个多嘧啶结合蛋白 (polypyrimidin tract-binding protein, PTB)^[19], 是参与前 mRNA 剪切的多亚基复合物中的一个亚基. 虽然 La 蛋白在细胞核内被发现, 用抗体检测证明 La 也存在于细胞质中, 当脊髓灰质炎病毒感染细胞时, La 可以从核内转移到核外^[17], 说明 La 是一种多功能蛋白, 即可以参与细胞核中的某些生物过程. 又可以在细胞质中发挥作用.

脊髓灰质炎病毒是一个单链 RNA 病毒, 从单一的 AUG 起始密码子起始翻译, 合成的 247 000 的前体蛋白质 P1, 经加工后产物形成成熟的病毒蛋白质. 脊髓灰质炎病毒在 RRL 中, P1 的合成效率很低, 能够合成一系列异常蛋白质, 这些异常蛋白质不是兔网状红细胞基因组编码的蛋白质, 是由于核糖体没有从 mRNA 的正确起始位点起始翻译, 而是在病毒基因组中间的一些错误的 AUG 密码子起始翻译的. La 在 RRL 中的含量很少^[17], 将细胞抽提物加入 RRL 后, 可以促进正确的前体蛋白 P1 的合成, 抑制异常蛋白的翻译, 纯化的 La 蛋白也有相似的作用. 说明 La 能有效地指导核糖体进入正确的起始位点, 减少无效翻译, 促进 P1 蛋白的正确合成.

La 蛋白在脊髓灰质炎病毒的 5' UTR 中存在高亲和力的结合位点, 这个结合位点在

IRES 内的碱基 559~591 附近, 该区域含有很保守的多嘧啶/AUG 特征结构^[20]. La 是多功能蛋白质, 可能有几个功能不同的结构域, 将 La 的 C 端一半除去后, La 失去促进翻译的作用, 但并不影响其结合 RNA 的活力. 说明 La 蛋白至少含有两个具有不同功能的结构域, 一个与 mRNA 的结合有关, 另一个可能有结合其他起始因子的功能. 说明 La 蛋白可能是作为 IRES 和核糖体之间相互结合的桥梁, 起到与帽子结合蛋白类似的作用. 推测 La 结合脊髓灰质炎病毒 mRNA 的 5' UTR 后, 能够促进起始因子 eIF-4A (或 eIF-4F) 和 eIF-4B 结合 mRNA 形成前起始复合物, 这些因子具有 RNA 解旋酶的活力, 能够破坏 RNA 的二级结构, 使核糖体可以与 RNA 结合起始翻译. La 和 eIF-2B-eIF-2 是否对其他病毒的翻译也有促进作用现在还不清楚, 现在知道在 RRL 中 La 对 EMCV 的翻译没有作用. 对于这个问题还需要进一步研究.

现在发现内部翻译起始机制并不局限于病毒 RNA, 一些细胞基因组编码的基因, 也是采用内部起始方式进行翻译的. 例如, 免疫球蛋白重链结合蛋白和果蝇 *Antennapedia* 蛋白的翻译也是内部起始的^[21,22]. 内部起始机制在真核生物中的作用可能在于, 当细胞内依赖帽子结构的蛋白质翻译被暂时关闭时, 该机制可以提供一种维持细胞基本功能的翻译方式. IRES 序列已被重组表达在质粒中^[23], 希望可以用它来翻译真核细胞中的没有帽子结构的 mRNA 和含有两个顺反子的 mRNA.

内部起始机制还有许多问题尚不清楚, 目前的研究重点是核糖体的结合机制, 起始因子和 La 蛋白等蛋白因子的作用, 以及发现在该过程中还可能存在的其他蛋白质因子. 目前还不清楚在真核生物中, 内部起始翻译是否是必需的. 对于这些问题有待于进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Hershey J W B. *Annu Rev Biochem*, 1991; **60**: 717
- 2 Pilipenko E V, Blinov V M, Agol V I *et al.* *Viology*,

- 1989; **168**: 701
- 3 Pilipenko E V, Blinov V M, Agol V I *et al.* *Nucleic Acids Res.* 1989; **17**: 5701
 - 4 Pellelier J, Sonenberg N. *Nature*, 1988; **334**: 320
 - 5 Jang S K, Krausslich H G, Wimmer E *et al.* *J Virol.* 1988; **62**: 2636
 - 6 Jang S K, Davics M V, Wimmer E *et al.* *J Virol.* 1989; **63**: 1651
 - 7 Jackson R J, Howell M T, Kaminski A. *Trends Biochem Sci.* 1990; **15**: 477
 - 8 Pilipenko E V, Gmyl A P, Agol V I *et al.* *Cell*, 1992; **68**: 119
 - 9 Kaminski A, Howell M T, Jackson R J *et al.* *EMBO J.* 1990; **9**: 3753
 - 10 Sanger D V, Newdon S E, Clarke B E *et al.* *Nucleic Acids Res.* 1987; **15**: 3305
 - 11 Sonenberg N. *Curr Topics Micro Immunol.* 1990; **161**: 23
 - 12 Pallon J G, Porro E B, Nadeel-Ginard B *et al.* *Genes Dev.* 1993; **7**: 393
 - 13 Meerovitch K, Pellelier J, Sonenberg N *et al.* *Genes Dev.* 1989; **3**: 1026
 - 14 Pestova T V, Heellen C V T, Wimmer E *et al.* *J Virol.* 1991; **65**: 6194
 - 15 Gebhard J R, Ehrenfeld E. *J Virol.* 1992; **66**: 3101
 - 16 Hellen C U T, Witherell G W, Wimmer E *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; **90**: 7642
 - 17 Meerovitch K, Svitkin Y V, Sonenberg N *et al.* *J Virol.* 1993; **67**: 3798
 - 18 Gottlieb E, Steitz J A. *EMBO J.* 1989; **8**: 841
 - 19 Borman A M, Howell M T, Jackson R J *et al.* *J Gen Virol.* 1993; **74**: 1775

- 20 Svitkin Y V, Meerovitch K, Sonenberg N *et al.* *J Virol.* 1994; **68**: 1544
- 21 Macejak D G, Sarnow P. *Nature*, 1991; **353**: 90
- 22 Oh S K, Scott M P, Sarnow P *et al.* *Genes Dev.* 1992; **6**: 1643
- 23 Elroy-Stein O, Moss B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; **87**: 6743

Internal Initiation of Eukaryotic mRNA Translation. Li Tong, Wang Enduo (*State Key Laboratory of Molecular Biology, Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031, China*).

Abstract The initiation of translation is very important in the process of protein synthesis. On the major eukaryotic mRNAs template, initiation of translation is completed by a cap-dependent mechanism. Recent works demonstrate; a set of animal viruses mRNAs appear to have a different initiation mode based on a cap-independent internal initiation mechanism. These mRNAs contain some conserved secondary structure in 5' untranslated region. Some specific protein factors can stimulate translation through the conserved site.

Key words eukaryote, translation, internal initiation mechanism

真核细胞基因转录抑制的分子机理

屠 郑* 张志文

(北京医科大学生理系, 北京 100083)

梁克珊

(河北省职工医学院生物化学教研室, 保定 074000)

摘要 基因转录水平的调控是个复杂的过程, 该方面的研究多集中于转录激活的机制上, 但转录抑制也

* 现通讯地址: 北京市东单三条5号, 中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005.

收稿日期: 1994-11-29, 修回日期: 1995-04-07