

综述与专论

两种具有调节血管生成作用的
氨基酰-tRNA 合成酶*赵明炜 王恩多¹⁾**

(中国科学院上海生命科学研究院, 生物化学与细胞生物学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要 氨基酰-tRNA 合成酶是生物体内蛋白质合成过程中的一类关键酶, 它催化体内 tRNA 的氨基酰化反应。作为一类古老的蛋白质, 氨基酰-tRNA 合成酶在其漫长的进化过程中, 通过其他结构域的插入或融合逐渐演化出许多新的功能。最近的研究结果表明, 人酪氨酰-tRNA 合成酶的片段具有促进血管生成的功能, 而人色氨酰-tRNA 合成酶的片段则具有抑制血管生长的功能。在哺乳动物细胞中, 蛋白质的生物合成途径与细胞信号转导途径紧密相连。今后, 随着对氨基酰-tRNA 合成酶研究的不断深入, 可以通过它们与细胞因子和信号转导相连的功能治疗人类的疾病。

关键词 氨基酰-tRNA 合成酶, 酪氨酰-tRNA 合成酶, 色氨酰-tRNA 合成酶, 细胞因子, 信号转导, 血管生成, 趋化因子

学科分类号 Q71

氨基酰-tRNA 合成酶 (AARS) 催化生物体内蛋白质合成的第一步反应——tRNA 的氨基酰化反应, 在将基因携带的遗传信息精确地转变为功能性蛋白质的过程中, 它至关重要^[1]。随着对 AARS 研究的深入, 人们逐渐认识到, 古老、保守的 AARS 家族在生物体内除了参与蛋白质合成外, 还具有许多其他功能。例如: 某些 AARS 参与了 RNA 的剪切与转运; 另一些 AARS 则参与调控基因的转录和翻译^[2]; 还有一些 AARS 样的蛋白质在 DNA 合成以及调节氨基酸生物合成过程中发挥作用^[3]。

人酪氨酰-tRNA 合成酶 (TyrRS) 为同源二聚体, 最近的研究发现, 它可以特异性地形成两个片段, 分别行使不同的细胞因子功能。其 C 端部分在氨基酸序列及功能上均与已发现的一种血管生成拮抗因子——内皮单核细胞激活肽 II (endothelial monocyte activating polypeptide II, EMAP II) 相类似; 具有 AARS 催化功能的 N 端片段则行使类似于白介素 8 (interleukin-8, IL-8) 的细胞因子功能^[4]。人色氨酰-tRNA 合成酶 (TrpRS) 与 TyrRS 的同源性较高, 也是同源二聚体。它的 N 端也具有细胞因子的功能^[5]。最新的研究结果表明, 来源于 TyrRS 和 TrpRS 的具有细胞因子功能的片段, 在血管发育的信号转导通路中起着非常重要的调节作用^[6,7]。它使蛋白质的生物合成途径与细胞信号转导途径紧密地联系起来。

1 EMAP II 是一种血管发育拮抗因子

早期的研究发现, EMAP II 是一种引发早期炎症反应的细胞因子。在凋亡的细胞中, EMAP II 的前体经剪切形成 22 ku 的成熟形态, 行使其功能^[8]。成熟的 EMAP II 可以诱导单核巨噬细胞 (mononuclear phagocytes, MPs) 以及多形核白细胞 (polymorphonuclear leukocyte, PMNs) 的迁移, 刺激 MPs 产生肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和 PMNs 释放髓过氧化物酶 (myeloperoxidase)^[8]。最近的实验证实, EMAP II 是细胞内蛋白 p43 的一部分。p43 可以在哺乳动物细胞内与至少 9 种 AARS 结合形成多酶复合体, 从而行使调节功能^[9]。

EMAP II 除了作为 PMN 和 MPs 的激活因子外, 它还具有拮抗血管生成的功能。现已发现, 在老鼠细胞外基质复合物 (mouse matrigel) 以及兔角膜两种模型中, EMAP II 均能有效地抑制碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor,

* 中国科学院创新项目 (KSCX2-2-04), 国家高技术“863”计划资助项目 (2001AA235071) 和上海市科学技术委员会资助项目 (02DJ140567)。

** 通讯联系人。

Tel: 021-54921241, Fax: 021-54921011

E-mail: edwang@sibs.ac.cn

收稿日期: 2003-01-27, 接受日期: 2003-02-13

bFGF) 刺激的血管生成^[10]. 同时, 在早期转移性肿瘤生长模型中, EMAP II 还具有显著的抗肿瘤活性. 到目前为止, 还不清楚 EMAP II/p43 在蛋白质翻译中所起的作用和在调节肿瘤血管生长中的功能是如何联系起来的.

2 人 TyrRS 的片段具有细胞因子功能

2.1 EMAP II 样的 C 端结构域

通过序列比较发现, 人 TyrRS 在催化结构域的 C 端有一段 EMAP II 样的蛋白质融合区域, 这段区域在氨基酸序列上与人 EMAP II 具有 48% 的同源性^[11], 而在已知的原核生物以及低等真核生物的 TyrRS 中却从未发现有类似的同源区域 (图 1). 实验证明, 人 TyrRS C 端的 EMAP II 样结构域在体内和体外均没有 TyrRS 的氨基酰化活力^[12]. 然而, 在几乎所有的哺乳动物以及昆虫的 TyrRS 中, 其 C 端 EMAP II 样融合结构域却又相当保守.

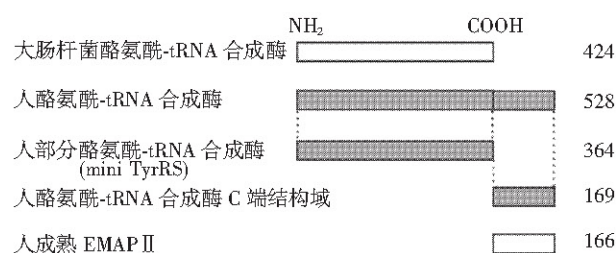


Fig. 1 The scheme of different TyrRS alignment

图 1 不同来源的 TyrRS 序列比较示意图

后续的实验证实, 单独 TyrRS 的 C 端 EMAP II 样结构域具有与成熟 EMAP II 相类似的细胞因子功能^[4]. 它不仅能诱导 MPs 以及 PMNs 的迁移, 并能刺激 MPs 产生肿瘤坏死因子和 PMNs 释放髓过氧化物酶. 但是, 只是单独的 C 端 EMAP II 样结构域才具有细胞因子功能, 全长的 TyrRS 则不具有^[4]. 尽管人成熟 EMAP II 分子还是一种血管生长拮抗因子, 但至今还没有检测人 TyrRS 的 C 端 EMAP II 样结构域是否具有类似的功能.

2.2 具有趋化因子功能的 mini TyrRS

除了 C 端结构域具有细胞因子功能外, 人 TyrRS 的 N 端催化结构域——mini TyrRS (图 1) 也具有独特的细胞因子功能. 早期研究发现, mini TyrRS 类似于 CXC 趋化因子, 可以专一地诱导 PMNs 迁移, 这种诱导作用表现为“钟罩型”的浓度依赖性. 这在人类 AARS 中是独一无二的, 非

常类似于 CXC 趋化因子亚家族的 IL-8^[4].

IL-8 相关家族的趋化因子要行使其化学诱导剂的活性, 必须依赖于一个特定的由 3 个氨基酸组成的模体 (motif)——Glu-Leu-Arg (ELR). 在 CXC 趋化因子亚家族中, ELR 模体被认为与趋化因子激活中性粒细胞^[13] 以及刺激血管发育的功能相关^[14]. 人 mini TyrRS 中也具有 ELR 模体, 而在酵母以及大肠杆菌 TyrRS 中则没有. 实验发现, 人 mini TyrRS 中的 ELR 模体与诱导 PMNs 迁移的功能相关, 点突变 ELR 模体中的氨基酸会导致 mini TyrRS 的诱导功能彻底丧失^[4]. 进一步的研究发现, mini TyrRS 能够与 IL-8 的细胞表面受体——CXCR1 结合. 所以, mini TyrRS 行使的细胞因子功能与 IL-8 非常类似, 其 ELR 元件是发挥功能的关键. 而全长的 TyrRS 则不具有任何 IL-8 样的趋化因子功能.

含有 ELR 模体的 CXC 趋化因子亚家族通常都具有促血管发育的功能, 实验证明, 与 IL-8 类似的 mini TyrRS 也具有促血管生成的细胞因子功能. 在老鼠细胞外基质复合物 (mouse matrigel) 以及鸡胚尿囊膜 (chick chorioallantoic membrane, CAM) 两种模型中, mini TyrRS 均能特异性地促进血管的生成, 其促进作用可以被 IP-10 等血管生成拮抗因子特异性地抑制^[7]. mini TyrRS 促血管生成的功能也依赖于 ELR 模体, 将 ELR 模体突变为 ELQ 会完全破坏其功能^[7], 且全长的 TyrRS 不具有该功能.

最近, 随着 mini TyrRS 同源二聚体 0.118 nm 晶体结构的解出, 人们发现关键的 ELR 模体位于催化结构域内部的 α 螺旋中, 非常接近于第一类 AARS 特征序列“HIGH”结尾的环状结构. ELR 模体中 R 的胍基侧链, 参与 TyrRS 分子上从反密码子识别结构域到催化位点氢键网络的形成. 只有该氢键形成后, mini TyrRS 才能发挥出类似于趋化因子的独特功能. ELR 突变成 ELQ 则破坏了 R 参与形成的氢键, 从而使 mini TyrRS 彻底丧失了趋化因子的功能^[4]. 在全长的 TyrRS 中, 由于存在 EMAP II 样结构域, 它掩盖了 ELR, 使 R 的侧链与 TyrRS 的主链无法形成氢键. 这正是 mini TyrRS 具有趋化因子功能而全酶不具有的原因^[15].

3 人 TrpRS 的片段也具有细胞因子功能

尽管在一级结构上人 TrpRS 与人 TyrRS 不同, 但是它们都是同源二聚体, 它们的三级结构类似, 且催化结构域具有很高的同源性^[16]. 正如人

TyrRS, 在人 TrpRS 的 N 端也发现了只在哺乳动物 TrpRS 中才存在的附加结构域 (图 2). 早期的研究认为, 这个附加结构域的作用类似于在高等生物某些 AARS 中发现的、帮助 tRNA 与酶结合的一种特定的肽段^[16]. 但后来的研究证实, TrpRS 的 N 端附加结构域对于酶的氨基酰化反应并不必需^[5]. 在正常细胞中, 人 TrpRS 以两种不同的形态存在, 一种是全长的 TrpRS, 另外一种则是缺失 N 端 47 个氨基酸残基缩短了的 TrpRS, 称为 mini TrpRS 变种, 它是由随机剪切 TrpRS 的 mRNA 而产生的^[17]. 在对 TrpRS 的早期研究中还发现, 人 TrpRS 基因的表达是受抗增殖细胞因子—— γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 调节的, IFN- γ 的调节作用在 AARS 基因表达中是唯一的^[18]. 更有趣的是, 不仅 TrpRS 基因的表达受 IFN- γ 的调节, TrpRS 变体 mini TrpRS 的表达也受 IFN- γ 调节, 随着细胞内 IFN- γ 水平的增高, mini TrpRS 的表达将被大幅度激活^[19]. 并且, 细胞内 IFN- γ 水平的增高也会刺激 IP10 以及 MIG 等血管生成拮抗因子表达水平的升高^[20,21], 同时减弱 IL-8 等血管生成因子的表达^[22]. 实验已证实, 人 TyrRS 的 N 端片段能行使血管生成因子的功能, 而人 TrpRS 的 N 端与人 TyrRS 具有很高的同源性, 这暗示人 TrpRS 的某些片段很可能也具有相类似的功能.

最新的实验结果证实, 人 mini TrpRS 确实具有血管生成拮抗因子的细胞因子功能, 而全长 TrpRS 则不具有. mini TrpRS 可以专一地阻断由血管内皮生长因子 (VEGF) 诱导产生的人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 的迁移^[5]. 进一步的体内实验发现, 在老鼠细胞外基质复合物 (mouse matrigel) 以及鸡胚尿囊膜 (chick chorioallantoic membrane, CAM) 两种模型中, mini TrpRS 均可抑制由 VEGF 刺激的血管生成, 直接证明了 mini TrpRS 具有血管生成拮抗因子的功能, 而全长 TrpRS 则不具有该功能^[5]. 利用白细胞弹性蛋白酶处理全长的 TrpRS 后, 可以专一地产生 2 个不同于 mini TrpRS 的 N 端缺失的变体 TrpRS: 缺失了 N 端 70 个氨基酸残基的 T1-TrpRS 和缺失了 N 端 93 个氨基酸残基的 T2-TrpRS. T1-TrpRS 和 T2-TrpRS 几乎失去了整个 N 端附加结构域, 但实验结果表明: T1-TrpRS 和 T2-TrpRS 均具有抑制血管生成的能力. 其中最短的 T2-TrpRS 表现出最强的抑制血管生成功能^[5,6]. 荧光标记实验显示 T2-TrpRS 可以直接作用于正在形成的血管,

从而阻止进一步的血管发育^[6]. 人的器官以及细胞株数据库分析结果表明, TrpRS 在人的肺、脾脏以及胎盘 3 种组织器官中具有不同于其他 AARS 的高表达. 通过分析其他 27 种也在同样组织器官中特异性高表达的基因发现, 有 15 种基因表达的产物参与了信号转导途径或者细胞黏附途径^[23]. 这进一步说明在体内诸如血管生成等信号转导途径中, 人 TrpRS 确实发挥着重要作用.

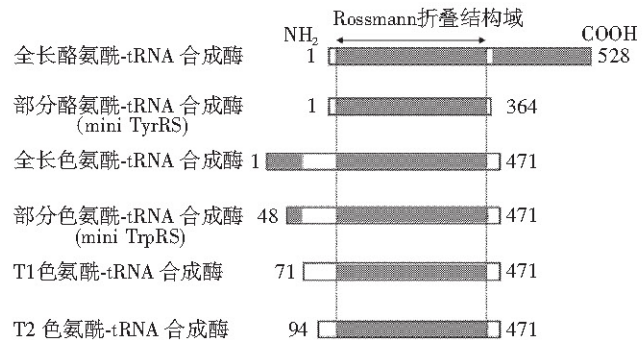


Fig. 2 The scheme of human TyrRS and variant truncate TrpRS alignment

图 2 人 TyrRS 和人 TrpRS 各种变种的序列比较示意图

4 小结与展望

人 TyrRS 和 TrpRS 的片段均具有调节细胞信号转导的细胞因子功能, 尤其是可以调节血管生成的信号通路. 可是, 这些细胞因子功能的发挥, 必须经过蛋白酶剪切释放或者 mRNA 剪切表达出特定的肽段, 从而行使该功能. 这与现在已发现的许多细胞因子的成熟过程非常相似. 经过加工成熟后, mini TyrRS 可以刺激血管生成, 而 mini TrpRS 以及 T1-TrpRS 和 T2-TrpRS 则可以阻断血管的进一步发育. 因此, 这两种 AARS 片段行使的是截然相反的却又紧密相关的功能, 从而共同调节了血管的发育.

现已发现的一类血管生成调节因子——CXC 趋化因子, 其功能的发挥决定于是否具有 ELR 模体. 具有 ELR 的 CXC 趋化因子能够促进血管生成, 而不具有 ELR 的 CXC 趋化因子则行使血管生成拮抗因子的功能. 这与人 mini TyrRS 和 T2-TrpRS 的情况完全相同. mini TyrRS 具有 ELR 模体, 而 T2-TrpRS 则不具有. 但是, ELR 模体仅仅是高等生物 TyrRS 所特有的, 在没有血管的低等真核生物或酵母的 TyrRS 中则没有 ELR 模体. 将酵

母的 TyrRS 中与 ELR 模体相对应的 NYR 突变为 ELR 时, 惊人地发现酵母的 TyrRS (ELR) 变种竟然也具有了细胞因子的活力! 这种模拟的“人工进化”实验说明: 在生物进化过程中很可能由于特异的突变使 TyrRS 具有了新的细胞因子功能^[24].

在正常成年人中, 血管发育主要发生在伤口愈合、怀孕以及月经等特定的情况下, 并受到严格地调控. 任何非正常的血管发生均会导致疾病的产生, 如肿瘤组织中的血管生成以及造成失明的眼部黄斑变性疾病中的血管生成等. 人们一直想利用血管生成的调节因子来治愈因非正常血管发育所造成的疾病. 而人 TyrRS 以及 TrpRS 具有调节血管生成功能片段的发现, 无疑为疾病的治疗带来了新的曙光. 尤其是 T2-TrpRS, 它不仅具有很强的抑制血管生长的功能, 同时, 由于它来源于人, 无免疫反应, 具有巨大的临床治疗潜力.

在患有多肌炎疾病病人的血清中, 通常的 AARS 成为自身抗原. 大多数病人体内, 自身抗原主要是组氨酰-tRNA 合成酶 (HisRS), 在少数的病人体内, 自身抗原还包括丙氨酰-、天冬氨酰-、异亮氨酰-、甘氨酰-tRNA 合成酶等^[25,26]. 最近的实验表明, 人 HisRS 可以刺激激活的单核细胞和未成熟的树突状细胞 (dendritic cells, DC) 的化学趋化性. HisRS 与免疫细胞直接作用的能力暗示了其在治疗多肌炎疾病方面的潜力^[27]. 随着人 TyrRS 和 TrpRS 片段细胞因子功能的阐明, 其他的 AARS, 包括 HisRS, 在细胞信号转导途径中可能具有的功能将成为今后研究的目标与重点, 使古老的 AARS 成为人们深入了解生物功能、生物进化过程以及疾病治疗的新手段.

参 考 文 献

- Ibba M, Söll D. Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu Rev Biochem*, 2000, **69**: 617 ~ 650
- Martinis S A, Plateau P, Cavarelli J, *et al.* Aminoacyl-tRNA synthetases: a family of expanding functions. *EMBO J*, 1999, **18** (17): 4591 ~ 4596
- Schimmel P, Ribas de Pouplana L. Footprints of aminoacyl-tRNA synthetases are everywhere. *Trends Biochem Sci*, 2000, **25** (5): 207 ~ 209
- Wakasugi K, Schimmel P. Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. *Science*, 1999, **284** (2): 147 ~ 151
- Wakasugi K, Slike B M, Hood J, *et al.* A human aminoacyl-tRNA synthetase as a regulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (1): 173 ~ 177
- Otani A, Slike B M, Dorrell M, *et al.* A fragment of human TrpRS as a potent antagonist of ocular angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (1): 178 ~ 183
- Wakasugi K, Slike B M, Hood J, *et al.* Introduction of angiogenesis by a fragment of human tyrosyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem*, 2002, **277** (23): 20124 ~ 20126
- Kao J, Ryan J, Brett G, *et al.* Endothelial monocyte-activating polypeptide II: a novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms. *J Biol Chem*, 1992, **267** (28): 20239 ~ 20247
- Quevillon S, Agou F, Robinson J C, *et al.* The p43 component of the mammalian multi-synthetase complex is likely to be the precursor of the endothelial monocyte-activating polypeptide II cytokine. *J Biol Chem*, 1997, **272** (51): 32573 ~ 32579
- Schwarz M A, Kandel J L, Brett J L, *et al.* Endothelial-monocyte activating polypeptide II, a novel antitumor cytokine that suppresses primary and metastatic tumor growth and induces apoptosis in growing endothelial cells. *J Exp Med*, 1999, **190** (3): 341 ~ 345
- Kleeman T A, Wei D, Simpson K L, *et al.* Human tyrosyl-tRNA synthetase shares amino acid sequence homology with a putative cytokine. *J Biol Chem*, 1997, **272** (22): 14420 ~ 14425
- Wakasugi K, Quinn C L, Tao N, *et al.* Genetic code in evolution: switching species-specific aminoacylation with a peptide transplant. *EMBO J*, 1998, **17** (1): 297 ~ 305
- Clark-Lewis I, Dewald B, Geiser T, *et al.* Platelet factor 4 binds to interleukin 8 receptors and activates neutrophils when its N terminus is modified with Glu-Leu-Arg. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (8): 3574 ~ 3577
- Strieter R M, Polverini P J, Kunkel S L, *et al.* The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem*, 1995, **270** (45): 27348 ~ 27357
- Yang X L, Skene R J, McRee D E, *et al.* Crystal structure of a human aminoacyl-tRNA synthetase cytokine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (24): 15369 ~ 15374
- Jeong E J, Hwang G S, Kim K H, *et al.* Structural analysis of multi-functional peptide motifs present in human bifunctional tRNA synthetase: identification of RNA-binding residues and functional implications for tandem repeats. *Biochemistry*, 2000, **39** (51): 15775 ~ 15782
- Tolstrup A B, Bejder A, Fleckner J, *et al.* Transcriptional regulation of the interferon- γ inducible tryptophanyl-tRNA synthetase includes alternative splicing. *J Biol Chem*, 1995, **270** (1): 397 ~ 403
- Fleckner J, Rasmussen H H, Justesen J. Human interferon gamma potently induces the synthesis of a 55-kDa protein (Gamma 2) highly homologous to rabbit peptide chain release factor and bovine tryptophan. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88** (24): 11520 ~ 11524
- Shaw A C, Rossel L M, Roepstorff P, *et al.* Mapping and identification of interferon gamma-regulated HeLa cell proteins separated by immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 1999, **20** (4 ~ 5): 984 ~ 993
- Kaplan G, Luster A D, Hancock G, *et al.* The expression of gamma interferon-induced protein (IP10) in delayed immune responses in human skin. *J Exp Med*, 1987, **166** (4): 1098 ~ 1108
- Farber J M. HuMig: a new human member of the chemokine family of cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, **192** (1): 223 ~ 230
- Gusella G L, Musso T, Bosco M C, *et al.* IL-2 up-regulates but IFN- γ suppresses IL-8 expression in human monocytes. *J Immunol*, 1993, **151** (5): 2725 ~ 2732
- Su A I, Cooke M P, Ching K A, *et al.* Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (7): 4465 ~ 4470
- Liu J M, Yang X L, Ewalt K L, *et al.* Mutational switching of a

- yeast tRNA synthetase into a mammalian-like synthetase cytokine. *Biochemistry*, 2002, **41** (48): 14232 ~ 14237
- 25 Targoff I N. Update on myositis-specific and myositis-associated autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol*, 2000, **12** (6): 475 ~ 481
- 26 Hengstman G J, van Engelen B G, Vree Egberts W T, *et al.* Myositis-specific autoantibodies: overview and recent development.

- Curr Opin Rheumatol*, 2001, **13** (6): 476 ~ 482
- 27 Howard O M Z, Dong H F, Yang D, *et al.* Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl-tRNA synthetase, autoantigens in myositis, activate chemokine receptors on T lymphocytes and immature dendritic cells. *J EXP Med*, 2002, **196** (6): 781 ~ 791

Regulation of Angiogenic Signaling Pathway by Two Human Aminoacyl-tRNA Synthetases *

ZHAO Ming-Wei, WANG En-Duo **

(State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology,
Shanghai Institutes for Biological Sciences, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Aminoacyl-tRNA synthetases are key enzymes in protein biosynthesis that catalyze aminoacylation of their cognate tRNA. During their long evolution, these ancient enzymes incorporated new domains by insertions or fusions to the class-defining catalytic core to attend more functions. Recently, fragments of the closely related human tyrosyl- and tryptophanyl-tRNA synthetases were discovered to be active in angiogenesis signaling pathway. One synthetase fragment has proangiogenic activity, while the other is antiangiogenic. These two tRNA synthetases link protein synthesis to a major cell-signaling pathway in the given mammalian cells. The results with animals suggest that therapeutic applications for many human diseases such as neovascular eye disease and tumor are possible with these tRNA synthetases.

Key words aminoacyl-tRNA synthetase, tyrosyl-tRNA synthetase, tryptophanyl-tRNA synthetase, cytokine, signaling pathway, angiogenesis, chemokine

* This work was supported by grants from The Chinese Academy of Sciences (KSCX2-2-04) State 863 High Technology R & D Project of China (2001AA235071) and Shanghai Committee of Science and Technology (02DJ140567).

** Corresponding author. Tel: 86-21-54921241, Fax: 86-21-54921011, E-mail: edwang@sibs.ac.cn

Received: January 27, 2003 Accepted: February 13, 2003