

## 微型述评

## 核糖体结构研究中的里程碑

明镇寰<sup>1)</sup>

(浙江大学生命科学学院, 杭州 310012)

**摘要** 核糖体是一个以 RNA 和蛋白质为基础的合成蛋白质的分子机器。其复杂的结构使它长期被结晶学家视为该研究领域中的喜马拉雅山。最近在核糖体结构研究中的突破性进展, 首次在核糖体及其亚基高度复杂的电子密度图上定位了几种已知三维结构的蛋白质和许多双链 rRNA 区, 并揭示了亚基界面的精细结构和 tRNA、mRNA 和核糖体间复杂的相互作用。

**关键词** 核糖体, X 射线衍射, 结构

**学科分类号** Q71

核糖体作为蛋白质生物合成的场所, 在生物体的细胞代谢中具有举足轻重的地位。其复杂的结构, 更是人们了解生物大分子及其复合物结构与功能关系一个非常好的范例。因此, 自从确定核糖体的生物学功能以来, 生物学家就对其发挥功能的结构基础非常关注, 希望解开核糖体的结构之谜。几十年的努力终于有了结果。最近, 《Nature》和《Science》连续刊登了美国耶鲁大学分子生物物理学和生物化学系 Moore<sup>[1]</sup>、英国剑桥医学研究中心分子生物学实验室 Ramakrishnan<sup>[2]</sup> 和美国加州大学 RNA 分子生物学中心 Noller<sup>[3]</sup> 等三个研究小组的论文, 报道了他们分别以 0.55 nm、0.5 nm 和 0.78 nm 分辨率对核糖体 30S 亚基、50S 亚基和 70S 核糖体结构的研究结果。

## 1 核糖体结构研究中几个关键性进展

X 射线衍射分析是对核糖体结构进行精细分析的必要手段, 要进行这种分析, 首要的问题是能得到一定量适于进行 X 射线分析的核糖体晶体。由于核糖体太大、太复杂, 所以直至 70 年代许多结晶学家对其能否被结晶仍表示怀疑。正是在这种背景下, 以色列 Weizmann 研究所 Yonath 在 70 年代后期开始了其艰难的核糖体的结晶研究, 做了许多开创性的工作<sup>[4~6]</sup>。首先, 她摸索了不同的溶液条件和不同的结晶程序对核糖体晶体形成的影响, 得到了第一张枯草杆菌核糖体晶体的 X 衍射图。其次, 她采用了死海中的微生物 *Haloarcula*

*marismortui* 作为材料, 得到了在 X 射线处理中更稳定的核糖体。她还将超冷技术应用于核糖体的晶体, 使其能在 X 射线持续更久。为了适合核糖体结构复杂的特点, 她使用了一连串的重原子代替一般晶体分析中使用的单个重原子作为 X 射线衍射图中的标志物。Yonath 的艰苦努力为核糖体的晶体结构研究铺平了道路, 但在很长时间内她未能获得核糖体清晰的 X 射线衍射图谱, 对核糖体的结构早就感兴趣的其他几个研究小组就跃跃欲试了<sup>[1,7]</sup>。

Noller 研究小组改进了纯化程序并获得了含有 tRNA 或 mRNA 碎片的核糖体晶体, 这种晶体比单纯的核糖体晶体更稳定。他们在对衍射图谱的解释上不断努力, 首先使用从冷冻电子显微镜得到的图象重建的较低分辨率的结构, 然后使用一种被称为多重波长异常色散 (multiwavelength anomalous dispersion) 的技术, 即通过用不同波长的 X 射线衍射含有一串重原子的核糖体晶体, 而使那些图谱精细化。Moore 研究小组解决了造成混淆衍射图谱的“孪生”问题。在孪生的情况下, 在看来是单种的晶体中形成了两种镜象晶体结构形式。Banakrisnan 小组不仅加快了在电子密度图上挑选关键标志物的速度, 而且还能追踪 RNA 在亚基中的状况。

<sup>1)</sup> 浙江大学 (西溪校区) 生命科学学院, 杭州 310012.

Tel: (0571) 8273604, E-mail: zhming@mail.hz.zj.cn

收稿日期: 1999-12-24, 修回日期: 2000-02-24

## 2 0.55 nm 分辨率的 30S 亚基结构

核糖体 30S 亚基提供了遗传密码翻译的场所, 在蛋白质生物合成中能与 mRNA、tRNA 的反密码子茎环结合, 涉及 tRNA 反密码子和 mRNA 密码子间的匹配, 还具有复杂的校正机制, 使翻译发生的错误减少到最低程度。

Ramakrishnan 等<sup>[2]</sup>在 0.55 nm 分辨率电子密度图的基础上对细菌 *Thermus thermophilus* 的核糖体 30S 亚基结构进行了分析, 其结构轮廓显示了特征性的头 (head)、平台 (platform)、肩 (shoulder) 和主体 (body) 四个部分。在这种分辨率下能区分 rRNA 中的磷酸骨架和核糖体蛋白质的  $\alpha$  螺旋, 使得有可能在整个亚基中鉴别 rRNA 的双链螺旋区。他们对所有七种已知晶体结构的 30S 亚基蛋白质 (S4、S5、S6、S7、S8、S15 和 S17) 在电子密度图中进行了定位, 并确定了 16S rRNA 的整个中心域 (central domain) 的折叠状况。

16S rRNA 中心域处于一种延伸、弯曲的构象, 其部分地缠绕 30S 亚基的主体, 该区域含有许多堆积在一起的短的 RNA 螺旋, 这种 RNA-RNA 的堆积作用通常涉及磷酸酯骨架插入相邻的螺旋的小沟。16S rRNA 中心域及与其相连的蛋白质形成了亚基的平台和主体的结构。

平台是 30S 亚基结构中很具特色的部分, 由前、后两部分组成, 其间隔大体上与这一区域所包含的蛋白质的程度相符合。而且该间隔是一个电子密度较低的区域, 大体上与亚基间界面平行。平台也是 30S 亚基中构象能灵活变化的部分, 在翻译进行时两部分间可发生相对独立的移动。

## 3 0.5 nm 分辨率的 50S 亚基结构

Moore 等<sup>[1]</sup>在 0.5 nm 分辨率电子密度图的基础上对嗜盐菌 *Haloarcula marismortui* 进行了分析。将 A 型 RNA 双链的 300 多个碱基对, 以及非 A 型的双链区、单链区段和四环 (tetraloop) 结构在图中进行了匹配。由短的、彼此分离的双链螺旋区堆积产生的长棒状 RNA 结构在 50S 亚基中交错纵横, 并与蛋白质产生广泛的交联。通过在电子密度图上匹配核糖体蛋白 L6、L11、L14, Sarcin-ricin 环 RNA 和与 L11 结合的 RNA 序列的晶体结构, 他们确定了因子结合中心 (factor-binding centre) 的结构并在因子结合中心定位了延伸因子 G 或 Tu 与氨酰 tRNA 和 GTP 的复合物。

50S 亚基一个很主要的特点是具有一个非常深而宽的裂隙, 形成了肽酰转移酶活性位点的入口。该裂隙周边很大部分由一系列源于 23S rRNA 序列几个不同区域的双链螺旋堆积成的长棒状 RNA 双链组成, 裂隙是 50S 亚基的活性部位, 其底部是一个直贯亚基的通道。

## 4 0.78 nm 分辨率的 70S 核糖体结构

在含有 mRNA 和 tRNA 或 tRNA 类似物的 70S 核糖体复合物 0.78 nm 分辨率电子密度图中, 可以观察到许多 tRNA 和核糖体的相互作用以及在核糖体亚基中和亚基间 rRNA 螺旋堆积排布的详情<sup>[3]</sup>。在 30S 亚基和 P-tRNA 反密码子茎环间有许多接触, 相反地, A-tRNA 的反密码子区更多是暴露的。处于亚基界面的 16S rRNA 的倒数第二个长茎附近是亚基间复杂的分子相互作用发生的一个重要部位。

亚基界面是核糖体发挥功能非常重要的部位。在界面所形成的空腔内含有 tRNA 和延伸因子 EF-Tu、EF-G 的结合位点。在亚基间有许多彼此的接触, 它们在低分辨率的电镜重组图中看起来象一座座桥 (bridges), 但在 0.78 nm 分辨率下可分辨为两个亚基的单个分子组分间的不连续的接触。多方面的证据表明, 亚基界面是富含 RNA 的。所谓的桥包含 RNA-RNA 和 RNA-蛋白质的相互作用。界面中心核区的桥主要在大亚基和小亚基的 RNA 成分间形成, 比如桥 B2a 涉及 16S rRNA 倒数第二个茎的顶部和 23S rRNA IV 区的 1910 螺旋间的相互作用。而在界面边缘区的桥几乎全部涉及蛋白质-RNA 相互作用, 比如桥 B4 就涉及 23S rRNA 区域 II I715 螺旋和小亚基平台基部 S15 间的相互作用。相对于核糖体的大小而言, 亚基间的接触面还是比较小的, 这符合亚基间发生相连和解离的精确平衡的要求。

## 5 tRNA、mRNA 和核糖体的相互作用

在 0.78 nm 电子密度图中能观察到核糖体、mRNA 和 P 位的反密码子茎环 (ASL) 间相互作用的详情。在 P 位, 核糖体用在电子密度图中显示的六个指 (finger) 抓住 tRNA 的反密码子和 mRNA, 其中的三个指形成一个分子夹具定位反密码子茎。指 a 在 29 位和 30 位附近定位 tRNA 骨架, 指 b 与 31 位和 41 位附近 tRNA 通过小沟发生相互作用, 在茎的另一面, 指 c 与 38 位、39 位附

近的 tRNA 骨架接触; 指 d 与 34 位, 即摆动核苷酸附近的反密码子环骨架接触, 指 e 与处于第一个和第二个位置的 P 位密码子的 mRNA 的小沟接触。指 d 和指 e 从相反的方向抓住密码子-反密码子双链体。指 f 可能与摆动核苷酸对发生堆积相互作用。

30S 亚基对 tRNA 的结合有三个后果。首先, 通过用指 a~c 将其反密码子茎夹住固定了 P-tRNA 反密码子端的取向; 其次, 指 d 和指 e 帮助稳定密码子-反密码子配对, 指 f 可能提供进一步的稳定。第三, 指 f 也可能为 A 位密码子的正确定位帮助 mRNA 取向。所有这些相互作用看来都涉及不依赖于序列的与核糖体的接触。与 P 位的情况相反, 30S 亚基 A 位与 tRNA-mRNA 复合物的分子表面仅有微弱的接触, 这与 A 位在翻译中的作用相一致。

## 6 核糖体机器

越来越多的证据表明核糖体不是被动进行翻译的场所, 而是一个以 RNA 和蛋白质为基础的分子机器, 其本身就执行着翻译的基本步骤<sup>[8]</sup>。最引人注目的是它可以在没有延伸因子和 GTP 存在的情况下使 tRNA 发生移位。另外, 从电子密度图分析可知, tRNA 的结合、大亚基的相连和翻译的精确性这三种不同的功能都与 16S rRNA 中包括 A909、A1413、G1487 三个核苷酸的一组位点有关。

对核糖体结构研究的努力还在继续。最近在英国格拉斯哥召开的国际晶体学家联合会第十八次会议上, Yonath 报道了一个更加清晰的、具有标记物的核糖体 30S 亚基 0.45 nm 分辨率的结构, 其甚至能揭示 mRNA 在什么地方与亚基挂钩。核糖体结构研究的最终目的是在原子水平上的分辨, 以揭示核糖体组分间的确切的相互作用。到那时我们就有可能真正理解核糖体这台分子机器是如何进行蛋

白质生物合成的。

## 参 考 文 献

- 1 Ban N, Nissen P, Moore P B, *et al.* Placement of protein and RNA structure into a 5 Å resolution map of the 50S ribosomal subunit. *Nature*, 1999, **400** (6747): 841~847
- 2 Clemons W M, May J L C, Ramakrishnan V, *et al.* Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution. *Nature*, 1999, **400** (6747): 833~840
- 3 Cate J H, Yusupov M M, Noller H F, *et al.* X-ray crystal structure of 70 S ribosome functional complexes. *Science*, 1999, **285** (5436): 2095~2104
- 4 Pennisi E. The race to the ribosome structure. *Science*, 1999, **285** (5436): 2048~2051
- 5 Yonath A. Characterization of crystals of small ribosomal subunits. *J Mol Biol*, 1988, **203** (3): 831~834
- 6 Yonath A. Crystallographic studies on the ribosome, a large macromolecular assembly exhibiting severe nonisomorphism, extreme beam sensitivity and no internal symmetry. *Acta Crystallogr A*, 1998, **54** (4): 945~955
- 7 Pennisi E. Ribosome finally begins to yield its complete structure. *Science*, 1999, **285** (5432): 1343
- 8 Garrett R. Mechanics of the ribosome. *Nature*, 1999, **400** (6747): 811~812

## The Milestone for Ribosome Structure Studies.

MING Zhen-Huan ( College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China).

**Abstract** Ribosome is a molecular machine based on RNA, which provides the workshop and tools to synthesize all of the proteins in cells. Its sophisticated structure enables crystallographers regarding it as the Mount Everest for a long time. Recently, the breakthrough has made for ribosome structure studies. For the first time, several proteins of known three-dimensional structure, and many regions of double-stranded rRNA, have been located in highly complex electron-density maps of ribosomal subunits. And the delicate structure of subunit interface and complicated tRNA, mRNA and ribosome interactions have been revealed.

**Key words** ribosome, X-ray diffraction, structure