

tRNA 核质动态分布与细胞命运*

李 盛 张嘉宁**

(大连医科大学生物化学教研室, 大连 116044)

摘要 旺盛的细胞核、质间的物质运输(nuclear-cytoplasmic transport)是真核细胞代谢的基础。核质运输不仅将蛋白质运到目的地,还能通过在特定时间、地点结合靶分子,改变其在胞内的局部浓度,调控诸如细胞分裂等重要细胞活动。tRNA是细胞中最重要的生物大分子之一,合成于细胞核,在细胞质中参加蛋白质翻译。一直以来,学术界认为 tRNA 只是蛋白质合成的参与者,tRNA 核质运输是 tRNA 跨越核膜进入细胞质是单向主动运输过程。然而,最近的研究成果在颠覆传统观念,tRNA 不但能被转运出核,还能被逆向转运入核。2008 年,新概念“tRNA 核质动态分布”(tRNA nuclear-cytoplasmic dynamics)被提出,取代 tRNA 核质运输,描述 tRNA 在细胞核、质间的流动。在酿酒酵母中 tRNA 核质动态分布可以调控蛋白质翻译,锁定细胞周期。此领域内的最新研究正在改变着教科书中有关 tRNA 的传统论断。

关键词 tRNA 核质动态分布,蛋白质合成调控,细胞周期,exportin-t

学科分类号 Q2, Q5

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00537

1 穿越核膜——真核细胞中许多蛋白质和所有 RNA 的使命

真核细胞中,细胞核和细胞质之间进行着旺盛的物质运输,其中绝大部分为需要载体蛋白介导的主动运输。细胞质与细胞核之间的屏障为核膜(nuclear envelope),在核膜上散布着核孔复合物(nuclear pore complex),是载体蛋白运输蛋白质和 RNA “货物”出入的通道。真核细胞中负责核质运输的蛋白质有很多种,其中最重要的为 importin β 家族。Importin β 根据家族中的标志性蛋白 importin β 命名(import + 蛋白后缀 in),包括运输靶分子进入细胞核的 importin 和离开细胞核的 exportin。和靶分子、RanGTP/GDP(Ras 类蛋白,24 ku)形成复合物跨越核孔是这一家族成员的共性。迄今为止,在人类细胞中发现超过 20 个成员负责组蛋白,核糖体蛋白,tRNA 等重要分子的运输。不仅仅是将靶分子运达目的地,importin β 家族成员通过精确调节细胞周期蛋白如 cyclin H, cyclin E/Cdc2 等在核、质内的分布与浓度,干预细胞周期进程。Importin β 通过结合微管单体蛋白,抑制微管多聚化,进而抑制核膜融合和纺锤体的形

成,锁定细胞周期^[1]。importin β 家族以及核质运输中不仅决定了细胞内生物大分子的胞内定位,还发挥着重要的调控作用。

2 tRNA 核质运输途径的发现

2.1 高等动物中 tRNA 出核转运蛋白 exportin-t, exportin-5 的发现

tRNA 在细胞核内被转录,需要穿越核膜进入细胞质参与蛋白质的翻译。理论上,小于 40 ku 的蛋白质和 RNA,如 tRNA (25 ku,直径 6 nm),能借助扩散作用自由进出核。1998 年发现专一性负责运送 tRNA 出核的载体蛋白,并命名为 exportin-t,“export”+蛋白质后缀“in”,“t”指靶分子为 tRNA^[2]。Exportin-t 是 importin β 家族的一员,分子质量为 110 ku, pI 为 5.0,这是第一个被发现能直接结合 RNA 的 importin β 家族成员。

* 国家自然科学基金(30670466)和辽宁省教育厅科研(2008S071)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0411-86110150, E-mail: Jianing_zhang@hotmail.com

收稿日期: 2008-07-27, 接受日期: 2008-09-29

mRNA, rRNA 都是和其他蛋白质形成复合物, 被运出核外. exportin-t 的作用机理如下: 在细胞核内富含 RanGTP, exportin-t 和 tRNA 以及 RanGTP 形成复合物, 穿过核孔, 进入细胞质. 细胞质中有 RanGTP 水解酶激活蛋白(RanGAP), 将 RanGTP 水解为 RanGDP, 导致三元复合物解聚, 释放出 tRNA. Exportin-t 最早在哺乳动物细胞中被发现, 随后的序列分析在植物和酵母细胞中找到了 exportin-t 的同源蛋白, 说明了这条途径的保守性. 随后在高等动物中发现的另一条 tRNA 核质运输途径可能由 exportin-5(136 ku)介导. Exportin-5 是 importin β 家族的另一成员, 其主要作用是运输含双螺旋区的 miRNA 出细胞核, 因而也能结合同样含双螺旋区的 tRNA, 亲和能力远小于 miRNA, 因而在高等动物的 tRNA 核质运输途径中的作用很小^[3]. 在爪蟾卵母细胞中, exportin-t 的浓度是 tRNA 转运出核的限速步骤, 说明在高等动物中 exportin-t 转运是 tRNA 出核的主要途径.

2.2 Exportin-t 介导 tRNA 核质运输调控蛋白质合成

2.2.1 Exportin-t 只识别和转运成熟的 tRNA 进入细胞质, 保证蛋白质合成效率. 发现 exportin-t 后, 德国研究小组深入研究 exportin-t 和 tRNA 的结合特性. 在细胞核内, tRNA 的产物由 RNA 聚合酶 III 转录. 最初的转录产物 3'、5'端有多余的核苷酸, 一些 tRNA 序列中间有内含子的存在. 由前体 tRNA 转变为具有精确的 5'端和 3'CCA 尾以及正确的空间结构的 tRNA, 需要对前体 tRNA 进行剪切, 连接, 修饰和 3'端加 CCA. 显然, 在核内存在着 tRNA 前体、tRNA 中间体和成熟 tRNA 等多种 tRNA 分子. Exportin-t 对具有正确三级结构成熟 tRNA 的结合能力远远大于其他 tRNA 中间体和前体 tRNA, 故能优先结合和转运成熟的 tRNA 出核. 体外结合实验表明, 和成熟 tRNA 相比, 未修饰的 tRNA、5'端有 10 个多余核苷酸的 tRNA、3'端有 10 个多余核苷酸的 tRNA 以及 5'和 3'端各有 10 个多余核苷酸的 tRNA, 结合 exportin-t 的能力分别是成熟 tRNA 的 18%, 2.4%, 7.2%, 0.8%^[4]. 正常生理条件下, 有限的 exportin-t 在核内只能结合成熟的 tRNA, 保证了 tRNA 参与蛋白质翻译 tRNA 的效率. 值得注意的是, 在体外结合实验中, 具有正确的 5'和 3'端, 但有内含子的 tRNA 显示了与成熟 tRNA 相近的结合能力. 在哺乳动物细胞核内, tRNA 的内含子剪切步骤发生在 tRNA 末

端成熟之前, 在正常的环境中, 带内含子的 tRNA 因没有正确的 3'CCA 末尾不能被运出核^[5].

2.2.2 Exportin-t 优先运出蛋白质合成体系中最稀缺的 tRNA. Exportin-t 能区分成熟 tRNA 和 tRNA 中间体的不同. 但对于一个真核动物细胞而言, 其中存在着 40~50 种的 tRNA 分子, 转运 21 种氨基酸进入核蛋白体. Exportin-t 对这些不同成熟 tRNA 分子的亲和能力是否一致? Exportin-t 介导的 tRNA 出核是一个简单的识别运输过程, 还是一个可以调控蛋白质合成的途径? Li 等^[6]用亲和层析方法研究了 exportin-t 对胎牛肝细胞中所有的 tRNA 分子的结合能力, 实验表明, exportin-t 对成熟 tRNA 分子的结合能力相近, 但确实存在差异. 某些 tRNA 分子结合能力强于其他. 核蛋白体对不同的 tRNA 需求强度不同(需求强度可近似为 tRNA 的浓度与基因组密码子频率的比值), 需求强度大的 tRNA 可能被优先运出. 哺乳动物细胞中 exportin-t 介导的 tRNA 核质运输途径可能是细胞内调控蛋白质合成的步骤.

2.3 酵母细胞中的 tRNA 核质运输

对 tRNA 核质运输研究最初集中在爪蟾卵母细胞和哺乳动物细胞. 因为酵母体系易于遗传学研究操作, 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisia*)很快成为研究 tRNA 出核转运的重要模式生物. 在酵母细胞中, 发现了两种转运 tRNA 出核的途径, 一种是氨酰化依赖型的 tRNA 出核转运途径, tRNA 必需结合氨基酸, 才能被运出细胞核, 这是酵母中主要的转运途径^[7]; 另一种氨酰化非依赖型的 tRNA 出核转运途径, 成熟的 tRNA 无需结合氨基酸, 被运进细胞质, 这条途径由 exportin-t 同源蛋白 Los1p 介导, 在酵母中敲除 los1 基因, 细胞仍能存活. 酵母细胞和高等动物中的 tRNA 核质运输途径既有共同之处, 也存在显著不同. 酵母遗传学分析指出, 多种蛋白质, 包括 Cca1p(向 tRNA3'端加 CCA 尾的蛋白质)和 Cex1p、Utp8p(目前功能未知)等都参与酵母 tRNA 核质运输.

3 tRNA 核质动态分布的提出

长期以来, 人们认为 tRNA 核质运输是从细胞核到细胞质的单向运动. tRNA 只是遗传信息由 mRNA 向蛋白质传递过程中的中间体. 然而, 近年来, tRNA 核质运输领域内的最新研究结果颠覆了这两个传统的观念.

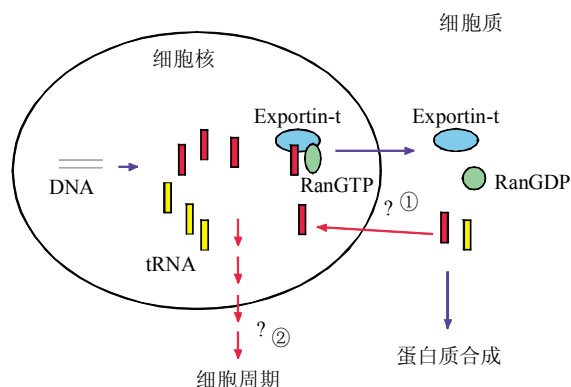


Fig. 1 The two latest discoveries that overturn the traditional opinions in tRNA biology

图1 颠覆 tRNA 生物学传统观念的两个新发现

过去认为 tRNA 在核内产生, 经转运蛋白 exportin-t 携带出核, 进入细胞质, 参与蛋白质合成, 途径用蓝色标识. 新发现(红色)① tRNA 能被反向运回细胞核, 机制尚不明; ② tRNA 核内累积可以调控细胞周期, 机制尚不完全清楚.

3.1 tRNA 不是从细胞核到细胞质的单向运动, 而是穿梭往来于核膜内外

2005 年, 加拿大和日本的研究小组分别报道了一个令人震惊的发现, 在酵母细胞中, tRNA 不但被运出细胞核, 还以主动运输的方式被运入细胞核内. 酵母 tRNA 剪切去除内含子的步骤发生在细胞质中, 而剪切过的成熟 tRNA 出现在细胞核内. 酵母异核体(两个不同的细胞核存在一个细胞中)实验表明, 这些 tRNA 是从细胞质中被逆向运进细胞核. 被运回细胞核的 tRNA 可以是缺陷的 tRNA, 比如没有 3' CCA 尾, 说明对 tRNA 的三级结构没有严苛要求. tRNA 逆向入核 (tRNA retrograde transport) 不需要 Ran, 说明它和 tRNA 转运出核为两条不同的途径. 进一步的实验表明, tRNA 逆向入核是一个需要能量的过程.

高等动物和酵母不同, tRNA 内含子的剪切发生在细胞核内, 似乎没有必要将 tRNA 从细胞质逆向运回核内. 2007 年, Shaheen 等^[8]在大鼠肝细胞中发现了 tRNA 的逆向转运入核途径. 尤其是当氨基酸缺乏时, tRNA 被转运入核的现象尤其明显. 在高等动物细胞中, 营养条件不足以保证正常的蛋白质合成, 为了防止错误的翻译, 将 tRNA 转运入核, 是细胞调控蛋白质合成的一种手段. 保证 tRNA 分子在适宜的条件下出现在细胞质中参与蛋白质翻译, 是一个受到 exportin-t 及未知 tRNA 转运入核蛋白精细调控的过程.

3.2 tRNA 核质浓度变化可以影响细胞周期

2007 年 11 月, 加拿大学者 Ghavidel 等^[9]在《细胞》杂志(Cell)上发表文章, 第一次将酵母细胞中的 tRNA 核质运输和细胞周期联系在一起. 核内 DNA 损伤后, 激活的信号通路蛋白 Mec1、Rad53 阻止 Los1 蛋白(酵母中的 exportin-t 同源蛋白)进入细胞核, 导致未剪切的 tRNA 在核内累积. 核内 tRNA 中间体浓度的上升通过信号传导途径下调细胞周期调控蛋白 Gln4, 将细胞锁定在 G1 期. 已知 G1 期是细胞蛋白质合成最活跃的时期, 为细胞进入 S 期开始有丝分裂作准备, G1 期的长短与蛋白质合成速率密切偶联. tRNA 核内累积下调蛋白质合成速率, 延长 G1 期, 避免过早启动有丝分裂.

这是一个再次震惊学术界的发现, 虽然目前 tRNA 的核质浓度变化与细胞周期的关系只在酵母细胞中发现, 且具体分子机制不明, 但其中蕴含的意义极为重要: tRNA 在细胞内可能不只是蛋白质合成的参与者, 还是细胞命运的调控者.

3.3 tRNA 核质动态分布概念的提出

曾被认为是简单地运送 tRNA 进入细胞质的 tRNA 核质运输(tRNA nuclear-cytoplasmic transport)已经不能描述 tRNA 核质浓度变化在细胞中所起的作用. 2008 年, 美国 Hopper 等^[10]在《tRNA 核质动态分布研究之十年惊奇》综述文章中第一次提出了 tRNA 核质动态分布 (tRNA nuclear-cytoplasmic dynamics)的概念, 即 “In the past decade, there have been many paradigm-shifting discoveries regarding tRNA nuclear-cytoplasmic dynamics, which have overturned long-held models”. 虽然 tRNA 的生物合成与 tRNA 的工作地点被分隔在细胞核、细胞质两个区域, 但这种分区化并不是死板的, tRNA 在细胞核、质间的流动主动地调控蛋白质合成, 影响细胞周期, 以帮助细胞应对不同的环境压力.

4 tRNA 核质动态分布研究的展望

tRNA 核质运输领域已有许多重大的发现, 但彻底阐明 tRNA 在细胞内的生活史, 有待于进一步地研究回答目前仍悬而未决的问题. a. tRNA 逆向转运入核途径的载体蛋白是什么, 逆向转运入核在 tRNA 核质动态分布中所起的作用是否和 tRNA 转运出核同等重要, 还是仅是一条次要的途径? b. 高等动物中是否也存在着 tRNA 核内累积锁定细胞周期的现象, tRNA 分子又是如何、和哪种蛋白质或其他分子互作, 参与细胞信号传导途径, 影响细胞

周期? c. 为什么 tRNA 核质运输存在强烈的种属特异性, 这种特异性又能说明什么? 目前的研究只不过是展露出了这个复杂途径的冰山一角, 更多的努力与实验可能会带来更加令人震惊的发现.

参 考 文 献

- 1 Delmar V A, Chan R C, Forbes D J. Xenopus importin beta validates human importin beta as a cell cycle negative regulator. *BMC Cell Biol*, 2008, **9**(3): 9~14
- 2 Arts G J, Fornerod M, Mattaj J W. Identification of a nuclear export receptor for tRNA. *Curr Biol*, 1998, **8**(6): 305~314
- 3 Shibata S, Sasaki M, Miki T, *et al.* Exportin-5 orthologues are functionally divergent among species. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34**(17): 4711~4721
- 4 Lipowsky G, Bischoff F R, Izaurralde E, *et al.* Coordination of tRNA nuclear export with processing of tRNA. *RNA*, 1999, **5**(4): 539~549
- 5 Lund E, Dahlberg J E. Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus. *Science*, 1998, **282**(5396): 2082~2085
- 6 Li S, Sprinzl M. Interaction of immobilized human exportin-t with calf liver tRNA. *RNA Biol*, 2006, **3**(4): 145~149
- 7 Grosshans H, Hurt E, Simos G. An aminoacylation-dependent nuclear tRNA export pathway in yeast. *Genes Dev*, 2000, **14**(7): 830~840
- 8 Shaheen H H, Horetsky R L, Kimball S R, *et al.* Retrograde nuclear accumulation of cytoplasmic tRNA in rat hepatoma cells in response to amino acid deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **18**(10): 3845~3859
- 9 Ghavidel A, Kislinger T, Pogoutse O, *et al.* Impaired tRNA nuclear export links DNA damage and cell-cycle checkpoint. *Cell*, 2007, **131**(5): 915~926
- 10 Hopper A K, Shaheen H H. A decade of surprises for tRNA nuclear-cytoplasmic dynamics. *Trends Cell Biol*, 2008, **18**(3): 98~104

tRNA Nuclear-cytoplasmic Dynamics and Cell Fate*

LI Sheng, ZHANG Jia-Ning**

(Department of Biochemistry, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

Abstract The robust nuclear-cytoplasmic transport is vital for eukaryotes' life cycle. Not only proteins and RNAs are transferred to their destination by this system, the important cellular activities such as mitosis are also regulated by the transport pathways *via* adjusting the local concentrations of some critical cargoes. tRNA is one of the most important biomacromolecules in the cell, synthesized in nucleus, and taking part in protein synthesis in cytoplasm. It is a long-held belief that tRNA functions only as a key player in protein synthesis, and tRNA nuclear-cytoplasmic transport is a unidirectional movement from nucleus to cytoplasm. However, the recent discoveries are overturning the traditional opinions. Nuclear-born tRNA can be exported out of nucleus, while cytoplasmic-residing tRNA can also be retrogradely transport into nucleus. The new concept tRNA nuclear-cytoplasmic dynamics was coined in 2008 to describe the tRNA communication between nucleus and cytoplasm, which was found able to regulate protein synthesis and cell cycle in *S. cerevisiae*. The latest results in this field are going to change the landscape of eukaryotic tRNA biology.

Key words tRNA nuclear-cytoplasmic dynamics, protein synthesis, cell cycle, exportin-t

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00537

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30670466) and Education Department of Lianoning Province(2008S071).

**Corresponding author.

Tel: 86-411-86110150, E-mail: Jianing_zhang@hotmail.com

Received: July 27, 2008 Accepted: September 29, 2008