

人线粒体 tRNA 修饰碱基与遗传性脑肌病*

郝睿^{1,2)} 王恩多^{1)**}

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;

²⁾中国科学院研究生院, 上海 200031)

摘要 人的多种遗传疾病与线粒体 tRNA 基因突变有关, 这些突变导致疾病发生的分子机理是当前研究的热点. 通过研究线粒体 tRNA 分子上的碱基修饰情况, 人们发现了一类特殊的带有牛磺酸衍生物基团的修饰, 这类修饰主要位于线粒体 tRNA^{Lys} 和线粒体 tRNA^{Leu} (UUR) 反密码子第一位摆动 (wobble) 位点的碱基上. 最近的研究表明, 位于这两种线粒体 tRNA 基因上的多种突变与遗传性脑肌病相关, 包括 A8344G, A3243G, T3271C 等等, 它们可以导致 tRNA 上相应摆动位点的碱基修饰缺失. 无论是在体外培养的带有相应突变的细胞内, 还是在来源于脑肌病病人的组织中, 科学家都发现了相同的线粒体 tRNA 碱基修饰缺陷. 通过分子手术证实, 此类碱基修饰对于维持这两种 tRNA 的反密码子与 mRNA 上相应密码子的相互识别至关重要, 缺失了这种修饰的 tRNA 将无法识别一些对应的密码子. 通过进一步的实验, 人们还鉴定出负责催化此类碱基修饰的酶. 这些研究不但揭示了线粒体遗传性脑肌病相关突变的致病机理, 也将为研究基因治疗提供可能的新手段.

关键词 线粒体 tRNA, 摆动位点, 碱基修饰, 脑肌病, 分子机理

学科分类号 Q71

线粒体是真核细胞中负责能量转换的重要细胞器, 它含有独立于核基因组之外的少量遗传物质. 人线粒体基因组是由 16 569 个碱基对构成的双链环状 DNA 分子, 负责编码 37 个基因, 其中包括 13 条氧化呼吸链相关多肽, 2 种 rRNA 以及 22 种 tRNA^[1]. 大量的临床统计研究表明, 人线粒体 DNA 突变可导致疾病. 到目前为止, 已经有 200 多种人线粒体 DNA 突变被证明与以运动或神经系统疾病为主的多种人类疾病相关 (www.mitomap.org). 值得注意的是, 这些疾病相关的突变在线粒体 tRNA 基因中高度集中, 大约一半的突变都发生在编码线粒体 tRNA 的基因中, 而这些 DNA 片段的总长度还不到线粒体基因组长度的 1/10. 人线粒体 tRNA 基因突变与疾病相关的发现, 是最早的一批 RNA 功能与疾病相关的例子, 对于这些 tRNA 突变体的研究, 使人们有机会揭示 tRNA 功能与生理变化之间的联系^[2].

人线粒体脑肌病 (mitochondrial encephalomyopathies) 是一组遗传异质性的慢性进行性疾病, 主要累及神经肌肉系统, 在细胞水平主要表现为氧化磷酸化缺陷导致能量供给不足. 由于人们对造成这种症状的分子机理不了解, 到目前为

止, 该病尚无确定的治疗方案. 20 世纪 90 年代初, 研究者发现一系列与遗传性脑肌病发生相关的突变位于线粒体 tRNA 的基因内 (A8344G, A3243G, T3271C 等)^[3~5]. 最近的研究结果表明, 这些突变可以导致相应 tRNA 分子的反密码子摆动位点上缺失一类特殊的牛磺酸修饰, 进而破坏 tRNA 在蛋白质翻译过程中的解码功能. 如果抑制正常细胞中负责催化这种修饰的酶活性, 细胞会表现一系列和脑肌病病人细胞相似的症状. 这项研究从分子水平定性地揭示了人类线粒体遗传性脑肌病发生的机理, 为开发治疗疾病的新手段创造了条件.

1 线粒体 tRNA 反密码子摆动位点上特殊的牛磺酸修饰

tRNA 是蛋白质翻译系统的重要组成部分, 它们负责将对应的氨基酸载入核糖体并使之参与新生肽链的合成, tRNA 上反密码子与 mRNA 上密码子

*国家自然科学基金资助项目 (30270310, 30330180).

** 通讯联系人.

Tel: 021-54921241, Fax: 021-54921011, E-mail: edwang@sibs.ac.cn

收稿日期: 2005-11-22, 接受日期: 2005-12-28

之间的相互识别是维持这个过程高保真性的重要因素^[6]. 作为较小的 RNA 分子, tRNA 的重要特征之一是其分子内部含有很高比例的修饰碱基^[7]. 2000 年, 科学家在对线粒体 tRNA 的碱基组成进行分析时发现, 哺乳动物线粒体野生型 tRNA^{Leu}(UUR)和 tRNA^{Lys} 分子反密码子摆动位点的尿嘌呤(U)上存在特殊的碱基修饰. 带有这些修饰的碱基在双向薄层层析电泳(2D-TLC)中的迁移行为不同于当时已知的任何一种修饰碱基^[8,9]. 通过进一步的质谱、色谱和核磁共振分析, 证实在该摆动位点上线粒体 tRNA^{Leu}(UUR)的修饰碱基是 5-牛磺酸甲基化尿苷($\tau\text{m}^5\text{U}$), 线粒体 tRNA^{Lys} 的修饰碱基是 5-牛磺酸甲基 2-硫代尿苷($\tau\text{m}^5\text{S}^2\text{U}$), 修饰碱基的结构如图 1 所示^[10].

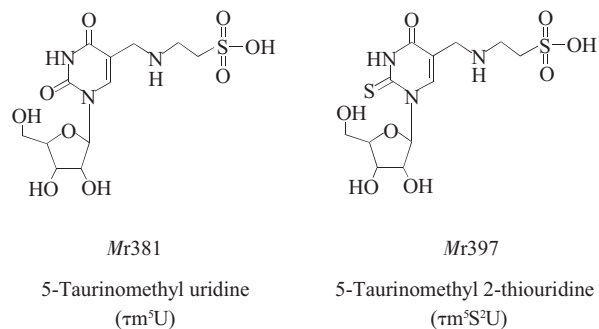


Fig. 1 Chemical structures and molecular masses of $\tau\text{m}^5\text{U}$ and $\tau\text{m}^5\text{S}^2\text{U}$

图 1 5-牛磺酸甲基化尿苷 ($\tau\text{m}^5\text{U}$) 与 5-牛磺酸甲基 2-硫代尿苷 ($\tau\text{m}^5\text{S}^2\text{U}$) 的分子结构和分子质量

人们发现, 当把与遗传性线粒体脑肌病相关的突变(例如: 位于线粒体 tRNA^{Leu}(UUR)基因上的 A3243G、T3271C, 或者位于线粒体 tRNA^{Lys} 基因上的 A8344G) 导入普通的人细胞中时, 线粒体相应 tRNA 上该摆动位点的碱基修饰消失了, 而 tRNA 其他位点的碱基修饰基本不受影响^[8,9,11]. 这种现象暗示该摆动位点的碱基修饰对于维持线粒体 tRNA 的正常功能很重要.

2 缺失摆动位点修饰将影响线粒体 tRNA 的解码功能

2.1 tRNA^{Leu} (UUR) 摆动位点修饰为识别 UUG 密码子所必需

正常的 tRNA^{Leu}(UUR)负责识别 UUA 和 UUG 两种密码子, 其反密码子 UAA 第一位 U 既可以和 A 形成典型的 Watson-Crick 配对, 也可以通过

摆动碱基配对 (wobble base pair) 识别密码子第三位 G. 早期的研究表明, 位于 tRNA 分子上该摆动位点的碱基修饰经常参与密码子的精确解码^[12], 这暗示着该摆动位点碱基修饰的缺失也可能影响它们识别对应三联体密码子的能力.

为了验证该摆动位点 U 碱基 C5 位上牛磺酸甲基化修饰(τm^5 -)对于 tRNA^{Leu}(UUR)解码能力的影响, Suzuki 及其同事通过分子手术, 将通过体外转录得到的 tRNA^{Leu}(UUR) 该摆动位点未经修饰的 U 替换为 $\tau\text{m}^5\text{U}$, 然后比较 tRNA 修饰前后识别不同密码子的能力, 发现经过修饰的 tRNA^{Leu}(UUR)能够更好地识别 UUG 密码子^[13]. 另一方面, 他们还从正常人组织中纯化了天然的线粒体 tRNA^{Leu}(UUR), 通过分子手术特异性地剔除了该摆动位点 U 碱基上的修饰基团, 体外翻译实验显示, 这种处理过的线粒体 tRNA^{Leu}(UUR)解码 UUA 密码子的能力基本不受影响, 但识别 UUG 密码子的能力严重受损, 而从转化细胞中得到带有脑肌病相关突变 (A3243G 或 T3271C) 的 tRNA^{Leu}(UUR)突变体, 由于天然缺少该摆动位点修饰, 也表现出相似的解码特性^[14]. 这两方面的结果证实, 人线粒体 tRNA^{Leu}(UUR)反密码子第一位 U 上的 τm^5 - 修饰对于 tRNA 识别 UUG 密码子十分重要, 它能够稳定解码时形成的 U : G 摆动配对, 而位于线粒体 tRNA^{Leu}(UUR)基因上与遗传性脑肌病相关的点突变, 可以导致 tRNA 分子该摆动位点上 τm^5 - 修饰缺失, 从而影响 tRNA 的解码功能.

2.2 摆动位点修饰缺失的 tRNA^{Lys} 突变体不能识别对应的密码子

tRNA^{Lys} 负责解码 AAA 和 AAG 两种密码子. 从体内获得的反密码子摆动位点上碱基修饰缺失的 A8344G 突变体和野生型线粒体 tRNA^{Lys} 相比, 在总量、稳定性、被氨基酰化的能力、与延伸因子 EF-Tu 的结合能力等方面都没有明显变化, 但是, 这种突变使 tRNA^{Lys} 解码其对应的 AAA 密码子的能力丧失了 95%, 并且几乎完全不能解码另一个对应的密码子 AAG. 核糖体结合实验证实, 这种解码能力的丧失是由于密码子 - 反密码子不能稳定匹配造成的, 说明该摆动位点上碱基修饰对 tRNA^{Lys} 的解码功能也是十分重要的^[15].

综上所述, 脑肌病相关的 A3243G 和 T3271C 突变导致线粒体 tRNA^{Leu}(UUR) 反密码子摆动位点上 $\tau\text{m}^5\text{U}$ 碱基修饰缺失, 进而特异性地破坏其解码 UUG 密码子的能力, 脑肌病相关的 A8344G 突变

引起线粒体 tRNA^{Lys} 该摆动位点上 $\tau\text{m}^5\text{S}^2\text{U}$ 碱基修饰缺失, 导致其解码两种对应密码子的能力都被破坏 (图 2).

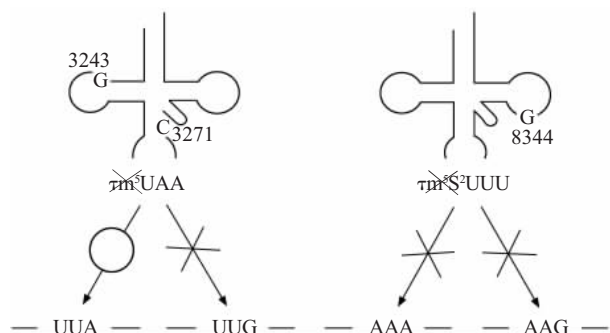


Fig. 2 Translational defects caused by the wobble modification deficiencies of the mutant mitochondrial tRNAs

图 2 突变引起的线粒体 tRNA 反密码摆动位点修饰缺陷对解码功能的影响

A3243G 和 T3271C 突变导致线粒体 tRNA^{Lys}(UUR) 该摆动位点上 $\tau\text{m}^5\text{U}$ 修饰缺失, 进而特异地破坏其解码 UUG 密码子的能力. A8344G 突变线粒体引起 tRNA^{Lys} 该摆动位点上 $\tau\text{m}^5\text{S}^2\text{U}$ 修饰缺失, 导致其解码两种对应密码子的能力都被破坏.

最近, 科学家还从多份遗传性脑肌病病人的组织样品中纯化了线粒体 tRNA^{Lys}(UUR), 虽然存在于这些 tRNA 分子上的与脑肌病相关的碱基突变各不相同 (包括 A3243G, G3244A, T3258C, T3271C, T3291C 等), 但这些 tRNA^{Lys}(UUR) 突变体都存在反密码子摆动位点修饰碱基缺失的现象, 而在其他类型的线粒体遗传病病人的组织样品中却找不到这种修饰缺陷的线粒体 tRNA^{Lys} [16]. 这些发现再次证实, 线粒体 tRNA^{Lys}(UUR) 和线粒体 tRNA^{Lys} 分子上该摆动位点碱基修饰的缺失与遗传性脑肌病的发生有直接的联系: 缺失修饰导致 tRNA 解码能力受损, 阻碍了线粒体中与氧化磷酸化相关的肽链合成, 影响了细胞的正常能量供应, 促发脑肌病的相关症状.

3 催化线粒体 tRNA^{Lys} 反密码摆动位点 $\tau\text{m}^5\text{S}^2\text{U}$ 修饰的酶

对于线粒体 tRNA^{Lys} 反密码子上摆动位点 $\tau\text{m}^5\text{S}^2\text{U}$ 碱基修饰影响解码的具体原因, 曾有两种说法: 一种认为, 修饰碱基上的 2-硫代基团对解码很重要, 因为在研究大肠杆菌 tRNA^{Lys} 上同样位

点的类似修饰 (5-甲氨基甲基 2-硫代腺苷 $\text{mnm}^5\text{S}^2\text{U}$) 时发现, 2-硫代基团修饰能够稳定密码子-反密码子之间的相互作用 [17]. 但也有人认为, 这种稳定配对的功能主要是依赖于 C5 位的牛磺酸修饰基团 [18,19].

Umeda 等 [20] 最近的研究证实, 虽然 2-硫代基团和 C5 位的牛磺酸甲基化基团在摆动位 U 碱基上的加载是彼此独立的过程, 但是这两种基团在 tRNA 的解码过程中是协同作用的, 两者对线粒体 tRNA^{Lys} 识别相应密码子都有贡献. 他们还找到了在人细胞中负责加载这两种修饰的酶: 负责催化形成 2-硫代基团修饰的 MTU1 (mitochondrial tRNA specific 2-thiouridylase, 线粒体 tRNA 专一的 2-硫代尿苷酶 1) 和可能参与加载 C5 位牛磺酸修饰的 MSS1 与 MTO1 (这两种酶最初随机命名, 无具体含义), 这两种酶加载牛磺酸修饰的过程比较复杂, 目前还不清楚. 分别敲除酵母细胞中这两类酶的同源酶, 线粒体 tRNA^{Lys} 在该摆动位的碱基会缺失相应的修饰基团. 如果用 siRNA 等方法抑制人类细胞中 MTU1 的活力, 细胞还表现出一系列与脑肌病病人细胞相似的状态, 包括耗氧量减少、线粒体蛋白质合成变慢, 线粒体膜电位降低等. 这一发现再次证实了线粒体 tRNA 该摆动位点修饰缺陷是在分子水平导致遗传性脑肌病的原因.

4 小结与展望

与疾病相关的线粒体 tRNA 是当前研究的热点, 很多实验室都试图通过分析线粒体 tRNA 功能的变化来解释相关疾病发生的原因. 根据研究方法的不同, 目前绝大多数研究可以归为两类: 通过体外转录带有特定突变的线粒体 tRNA 进行体外分子水平的研究, 或者以导入了特定线粒体 tRNA 基因突变的细胞为对象进行细胞水平的研究. 这两种方法都存在一定的局限性: 体外转录的 tRNA 由于缺乏碱基修饰, 不能反映天然 tRNA 的真实状态, 而转化了 tRNA 突变基因细胞的线粒体会受所用受体细胞的细胞核类型影响, 不能体现病人体内的具体情况. 这种研究手段上的缺陷导致目前研究中出现一些互相矛盾的结果, 绝大多数线粒体遗传疾病的发生原因还缺乏可靠的解释.

这里介绍的脑肌病相关突变导致线粒体 tRNA 反密码子摆动位点修饰缺陷的发现, 不但有来自体外转录和转化细胞两方面的证据, 还在病人的组织样本中分离到了缺失相应碱基修饰的线粒体

tRNA, 证实了这种修饰缺陷与脑肌病之间的联系. 科学家还进一步证明, 该摆动位点修饰对于线粒体 tRNA 的解码很重要, 显示带有脑肌病相关突变的 tRNA 会导致线粒体蛋白质翻译受损, 尽管线粒体蛋白质翻译体系受损如何导致遗传性脑肌病的相关症状还不完全清楚, 但这一发现至少提示了脑肌病人细胞中氧化磷酸化缺陷的可能根源.

我们推测, 位于线粒体 tRNA 上与脑肌病相关的点突变 (如 A3243G, A8344G 等) 可以作为负调控因素影响 tRNA 与相应的该摆动位点修饰酶的作用. 由于这些突变点位于 tRNA 分子三级结构的不同区域, 并且与该摆动位点都有一定距离, 负责加载修饰基团的酶很可能通过识别线粒体 tRNA 的三级结构来行使功能. 如果人们能进一步揭示这些修饰酶识别 tRNA 的具体机制, 就有可能设计突变体来改变修饰酶的分子结构, 使其能够识别和催化与脑肌病相关的线粒体 tRNA 突变体. 通过向病人细胞内导入带有这种突变酶基因的质粒, 就有可能在分子水平上治疗遗传性线粒体脑肌病.

参 考 文 献

- 1 Anderson S, Bankier A T, Barrell B G, *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 1981, **290** (5806): 457~465
- 2 Wittenhagen L M, Kelley S O. Impact of disease-related mitochondrial mutations on tRNA structure and function. *Trends Biochem Sci*, 2003, **28** (11): 605~611
- 3 Shoffner J M, Lott M T, Lezza A M, *et al.* Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA^{Lys} mutation. *Cell*, 1990, **61**(6): 931~937
- 4 Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA^{Leu}(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature*, 1990, **348** (6302): 651~653
- 5 Kobayashi Y, Momoi M Y, Tominaga K, *et al.* A point mutation in the mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) gene in MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes). *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, **173** (3): 816~822
- 6 Söll D. Transfer RNA: an RNA for all season. In: Gesteland R F, Atkins J F, eds. *The RNA World*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. 157~183
- 7 Crain P F, McCloskey J A. The RNA modification database. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25** (1): 126~127
- 8 Yasukawa T, Suzuki T, Ueda T, *et al.* Modification defect at anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNAs^{Leu}(UUR) with pathogenic mutations of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *J Biol Chem*, 2000, **275**(6): 4251~4257
- 9 Yasukawa T, Suzuki T, Ishii N, *et al.* Defect in modification at the anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNA(Lys) with the MERRF encephalomyopathy pathogenic mutation. *FEBS Lett*, 2000, **467** (2~3): 175~178
- 10 Suzuki T, Suzuki T, Wada T, *et al.* Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: new insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases. *EMBO J*, 2001, **21**(23): 6581~6589
- 11 Yasukawa T, Kirino Y, Ishii N, *et al.* Wobble modification deficiency in mutant tRNAs in patients with mitochondrial diseases. *FEBS Lett*, 2005, **579** (13): 2948~2952
- 12 Söll D, Rajbandary U L. *Modified Nucleosides and Codon Recognition*. Washington D C: ASM Press, 1995. 207~224
- 13 Kurata S, Ohtsuki T, Wada T, *et al.* Decoding property of C5 uridine modification at the wobble position of tRNA anticodon. *Nucleic Acids Res*, 2003, **3** (3): 245~246
- 14 Kirino Y, Yasukawa T, Ohta S, *et al.* Codon-specific translational defect caused by a wobble modification deficiency in mutant tRNA from a human mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (42): 15070~15075
- 15 Yasukawa T, Suzuki T, Ishii N, *et al.* Wobble modification defect in tRNA disturbs codon-anticodon interaction in a mitochondrial disease. *EMBO J*, 2001, **20** (17): 4794~4802
- 16 Kirino Y, Goto Y, Campos Y, *et al.* Specific correlation between the wobble modification deficiency in mutant tRNAs and the clinical features of a human mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102** (20): 7127~7132
- 17 Ashraf S S, Sochacka E, Cain R, *et al.* Single atom modification (O→S) of tRNA confers ribosome binding. *RNA*, 1999, **5** (2): 188~194
- 18 Nakayashiki T, Inokuchi H. Novel temperature-sensitive mutants of *Escherichia coli* that are unable to grow in the absence of wild-type tRNA^{Leu}. *J Bacteriol*, 1998, **180** (11): 2931~2935
- 19 Yarian C, Townsend H, Czestkowski W, *et al.* Accurate translation of the genetic code depends on tRNA modified nucleosides. *J Biol Chem*, 2002, **277** (19): 16391~16395
- 20 Umeda N, Suzuki T, Yukawa M, *et al.* Mitochondria-specific RNA-modifying enzymes responsible for the biosynthesis of the wobble base in mitochondrial tRNAs. Implications for the molecular pathogenesis of human mitochondrial diseases. *J Biol Chem*, 2005, **280** (2): 1613~1624

Human Mitochondrial tRNA Modification and Inherited Encephalomyopathies*

HAO Rui^{1,2)}, WANG En-Duo¹⁾**

⁽¹⁾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;

⁽²⁾Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Mutations in human mitochondrial tRNA genes are responsible for a variety of human inherited diseases. Investigations of the molecular mechanisms of these diseases are of great interest for nowadays scientists. According to the study of post-transcriptional modification patterns of human mitochondrial tRNAs, novel taurine-containing modifications were identified at the anticodon wobble nucleotides of mitochondrial tRNA^{Leu} (UUR) and tRNA^{Lys}. Recently, it was reported that mitochondrial tRNAs harboring one of those encephalomyopathies related mutations, such as A8344G, A3243G, T3271C etc., lacked the normal taurine-containing modification at their anticodon wobble positions. Wobble modification deficiencies of mutant mitochondrial tRNAs were found from cybrid cells, as well as from patient tissues. Molecular surgery experiments showed that the wobble modification is essential for the interaction between the anticodon in tRNA and the codon in mRNA. Furthermore, the enzyme that is responsible for the formation of the modification was identified and characterized. These studies strongly suggested a key molecular factor responsible for the inherited mitochondrial encephalomyopathies and could potentially lead to the development of a gene therapy for these diseases.

Key words mitochondrial tRNA, wobble nucleotide, base modification, encephalomyopathies, molecular mechanism

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30270310 and 30330180).

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

Received: November 22, 2005 Accepted: December 28, 2005