

催 化 活 性 RNA

马 凤 森

(浙江医科大学,杭州)

提 要

近年来发现,某些原核生物 RNaseP 的 RNA 亚基具有催化活性。它们能在无任何蛋白质存在的条件下催化前体转运 RNA 5' 端的成熟反应。催化活性 RNA 以及自我切接(割) RNA 的发现,给传统的酶概念和生命起源的研究带来了新内容。

核糖核酸酶 P(EC3.1.26.5) 是一种核酸内切酶,负责前体转运核糖核酸 (p-tRNA) 5' 末端的成熟(图 1)。迄今已在细菌、酵母菌、家蚕、蟾蜍、鸡和哺乳动物等中确认它的存在^[1,2]。所有已知的原核生物的核糖核酸酶 P(RNaseP) 都是由 RNA (称为 RNaseP-RNA) 和蛋白质 (RNaseP-蛋白质) 两部分构成,大肠杆菌 (*E. coli*) RNaseP 的核酸亚基为 MIRNA,蛋白质亚基为 C5 蛋白。Altman 及其合作者研究证明, MIRNA 就是酶的催化活性部分。它可以不依靠蛋白质的帮助自身催化 p-tRNA 5' 端的成熟反应。这一工作说明核酸也是酶。下文就以 *E. coli* 的 MIRNA 为例对核酸的催化作用作一论述。

一、MIRNA 的结构

E. coli 的 MIRNA 由 377 个核苷酸 (nt)

组成。图 2 是它的二级结构模型。提出这一模型是基于用多种核糖核酸酶对 MIRNA 的消化实验,比较不同生物的 rnpB 基因(编码 MIRNA)的核苷酸顺序,对 rnpB 基因的人工突变研究,以及理论上的推导^[3,4]。目前还没有其他方面的证据证明它的正确性,更不知道 MIRNA 具有怎样的三级结构。但显然,关于 MIRNA 高级结构的模型应该能够说明 MIRNA 与底物分子 (p-tRNA)、C5 蛋白相互作用以及催化反应的许多特点。除 *E. coli* 的 MIRNA 外,鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*)、团集欧文氏菌 (*Erwinia agglomerans*) 和粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)^[5] RNaseP-RNA 的基因结构和 RNA 的核苷酸序列也都已测定。鼠伤寒沙门氏菌的 RNaseP-RNA 长 375nt,枯草杆菌 (*B. subtilis*) 的约 400nt,酵母菌的约 250nt,哺乳动物的可能短些。

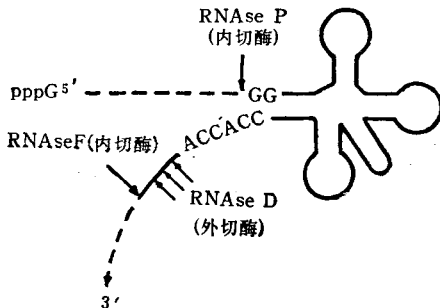


图 1 *E. coli* tRNA^{Phe} 前体的核酸酶切割

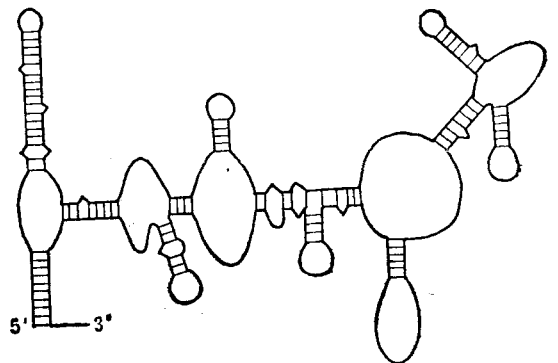


图 2 MIRNA 的二级结构模型

二、M1RNA 的催化活性

E. coli RNaseP 中 M1RNA 的含量高达 77% 以上^[5],并且 RNaseP 能被核糖核酸酶(如核糖核酸酶 A, 小球菌核酸酶)灭活。这些现象引起了人们的注意。有人怀疑 M1RNA 就是 RNaseP 的催化亚基。用 SDS-苯酚抽提法得到含 *E. coli* M1RNA 的提取液,再以聚丙烯酰胺凝胶电泳分离纯化,制备得 *E. coli* 的 M1RNA,证明它确实有催化活性。相反,纯化的 C5 蛋白却没有核酸酶活性。M1RNA 的催化活性可被核糖核酸酶破坏,但不受蛋白酶及 SDS(0.1%) 存在的影响^[6]。当然,这还不能完全排除由蛋白质(比如一种具有核糖核酸酶 P 活性的蛋白质)污染引起的可能。Altman 等^[7]通过体外转录 *E. coli* 的 *rnpB* 基因制备得 M1RNA 的前体,发现它具有与 M1RNA 同样的催化活性,从而排除了蛋白质污染的可能。M1RNA 及其前体在催化反应前后自身都不改变,它们真正是生物催化剂。证明 M1RNA 催化活性所用的体外实验条件是含 60mMMg²⁺,或 10mMMg²⁺ 加 1~5mM 亚精胺(或精胺)的缓冲液。在此条件下,M1RNA 能催化 *E. coli* p-tRNA5' 末端的切割反应而不需要有任何蛋白质的帮助。其催化活性只比 RNaseP 在标准条件(镁离子浓度小于 10mM 的缓冲液)下的稍差。M1RNA 催化 *E. coli* p-tRNA^{tyr}5' 端切割的 K_m 值与 RNaseP 的 ($5 \times 10^{-7}M$) 相同, K_{cat} 值约为 33min⁻¹。

在不含亚精胺的标准条件下,M1RNA 单独不具有催化活性,只有结合 C5 蛋白后才表现出核糖核酸酶活性^[6]。C5 蛋白的这一作用不能被亚精胺替代^[8],可见它不只是作为 M1RNA 的电荷互补组分。已有许多实验证明 C5 蛋白是 RNaseP 在体内表现活性的必需成分。它可能参与体内低镁离子浓度下 M1RNA 活性结构的维持、底物结合和催化反应等过程^[3,6,8],其作用值得进一步探讨。C5 蛋白由 119 个氨基酸组成,分子量为一万四千。用亲和柱层析分析技术测得它跟 M1RNA 相互作用的摩尔比为 2:1。

它跟 M1RNA 在铯盐梯度中的结合常数约为 $10^{11}M^{-1}$ ^[9]。

M1RNA 的活性中心结构

分析 M1RNA 的核苷酸顺序,发现有两个片段(331—335和284—288)能与 tRNA 的不变环 GT ϕ CP ψ 互补,因此推测它们可能在识别与结合底物过程中起重要作用。但后来发现^[4,10],缺失上述两个片段的 M1RNA 变异体仍有催化活性。GGU 是另一种可能参与酶-底物相互作用的 M1RNA 片段。GGU 能与底物分子 3' 末端的 CCA 序列互补,而 CCA 序列是 M1RNA 所要求的。缺失或不具有这一序列的 tRNA 前体(如真核生物的 tRNA 前体)不被切割或只能被低效率地切割^[8]。但奇怪的是,M1RNA 与 C5 蛋白重组成 RNaseP 后对底物分子的这种选择性就不存在了。CCA 序列还在底物抑制作用中起重要作用。大量的 *E. coli* 成熟 tRNA (3' 末端带有 CCA 序列)能抑制 RNaseP 催化的 p-tRNA 成熟反应,抑制剂常数 K_i 比米氏常数 K_m 大两个数量级^[9]。若用蛇毒磷酸二酯酶除去 tRNA 3' 末端的 CCA 序列,底物抑制作用便不再发生。

以质粒 pSP64 为载体,将 *E. coli* 的 *rnpB* 基因在体外表达,Guerrier-Takada 和 Altman^[10]对基因转录产物及其人工变异体的催化比活性进行了研究。实验结果表明,M1RNA 5' 端的核苷酸顺序对催化活性的贡献要比 3' 端核苷酸顺序的大。例如,M1RNA 在 5' 端缺失 70nt

表 1 M1RNA 及其变异体的催化比活性

M1RNA	相对比活性
+1~+377	1.0
+1~+373	1.0
+1~+330	0.03
+1~+300	0.15
+1~+255	0.08
+1~+170	0
+1~+110	0
+5~+369 ^{ab}	0
+20~+377	0.25
+70~+384 ^c	0

a. 5' 末端有外加 11nt, b. 3' 末端有外加 18nt,
c. 5' 末端有外加 14nt.

就导致催化活性的完全丧失,而在 3' 端缺失多达 122nt 后仍具有少量活性。如果在 M1RNA 的两端都去掉一些核苷酸,也会使催化活性完全失去(表 1)。这可能是由于缺失了核苷酸的 M1RNA 不能形成一种适于结合底物和催化反应的高级结构所致。Lawrence 和 Altman^[4]还对 M1RNA 进行了一系列位点特异的突变实验(在分子中间缺失或插入小片段寡核苷酸),以观察突变对催化活性的影响进而了解 M1RNA 结构与功能的关系。这些实验从不同侧面提供了一些关于 M1RNA 活性中心结构的信息,但尚不足以说明这一问题。运用化学修饰、同位素标记,质谱、核磁共振谱技术,和突变实验方法等将有助于阐明 M1RNA 活性中心结构以及 M1RNA 结合底物、催化反应和与 C5 蛋白相互作用的化学机理。

从上述实验分析可以看出,M1RNA 结合底物和催化反应等过程都有赖于酶和底物分子中的一些不变核苷酸(顺序)和分子的立体结构。这一点还得到下列几个实验证据的支持。*E. coli* 的 M1RNA 和 C5 蛋白能分别与 *B. subtilis*、*S. typhimurium* 及 Hela 细胞 RNaseP^[2]的 RNA 和蛋白质重组形成有催化活性的杂合 RNaseP; RNaseP 对底物被切割部位的核苷酸顺序没有严格要求^[3](或说底物被切割部位不存在同一顺序,请参看表 2 注); RNase P 没有种属专一性^[1]以及 *E. coli* RNaseP 能催化约六十种不同的 p-tRNA5' 端的成熟。因此可以认为,底物和酶中某些核苷酸的互补作用以及底物分子和酶分子在空间结构上的“契合”是切割反应准确和高效地进行的重要保证。RNA 催化活性对 RNA 高级结构的依赖性在四膜虫(*Tetrahymena thermophila*) rRNA 的自我切割和 p2Sp1、ASBV(见后)等的自我切割反应中都表现得非常明显。这一特性很可能为所有具有催化活性或自我切割(割)能力的 RNA 分子所拥有。

M1RNA 催化反应的机理

M1RNA 催化反应的一个显著特点是对 Mg^{2+} 有高度需求。M1RNA 催化 p-tRNA5'

末端成熟的活性随反应介质中镁离子浓度的升高(在 10~50mM 范围内)而增加^[6]。因此 Altman 等人^[11]认为 M1RNA 催化反应可能是通过水合镁离子来实现(Mg^{2+} 作为 M1RNA 的活性中心离子)。这一假设的催化反应机理与已知的 RNA 自体切接反应机理有相似之处,但与核糖核酸酶 A 或铅离子(Pb^{2+})催化反应的机理明显不同。四膜虫大核 rRNA 前体等的自我切接被认为也是由水合镁离子中介完成^[12]。自我切接反应也涉及 P-O3' 磷酸键的水解(及形成),它与 M1RNA 催化反应的比较见表 2。核糖核酸酶 A 和 Pb^{2+} 都催化 P-O5' 磷酸键的水解,产生以 5' 羟基、3' 磷酸基为末端的产物,并在反应过程中出现 2', 3'-环磷酸二酯中间物(这一中间物在 M1RNA 催化反应和 RNA 自我切接反应过程中都不存在)。

三、核酸的催化作用

证明 M1RNA 的催化活性(1983 年)和四膜虫 rRNA 插入顺序(IVS)的催化活性(1986 年)彻底动摇了保持在人们头脑中几十年之久的关于生物催化剂的概念(认为生物催化剂就是一类特殊的称为酶的蛋白质)。T. Cech 及其合作者最早发现 RNA 自我切接现象(1982 年),现在他们已经证明,四膜虫大核 rRNA 的插入顺序是催化剂^[13]。IVS RNA 不仅催化 rRNA 前体的自我切接反应,而且具有核苷酸基转移酶(poly(C) 聚合酶),磷酸二酯酶(核糖核酸酶),RNA 限制性内切酶、磷酸转移酶和磷酸酯酶等多种酶活性。已知能进行自我切接的 RNA 分子还有脉孢菌(*Neurospora*)线粒体的前体 mRNA 和酵母菌线粒体的前体 rRNA 和前体 mRNA 等^[14]。在体外实验条件下这些 RNA 分子的自我切接都不需有任何蛋白质的帮助。发现另一类核酸自催化作用——RNA 的自我切割(self-cleavage),只是最近(1986 年)的事件。所以现在还无从得知这类反应的化学机理。自我切割(表 2)与自我切接有所不同(后者包含两个步骤:切割和连接)。已经证明马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTV) RNA,鳄梨日

表 2 MIRNA 催化反应与自体切接(割)反应的比较

RNA	反应类型	作用的键	反应机理	必需因子	反应促进剂(+)或抑制剂(-)	底物	切割(接)部位的核苷酸顺序
四膜虫大核 rRNA 前体	自我切接 (self-splicing)	切接 P-O3' 键(产生 5'-⑤, 3'-OH 末端并连接这两种末端)	鸟苷或 RCU-CUCU _{OH} (5' 外显子)亲核进攻的 S _N 2 反应	Mg ²⁺ , 鸟苷或鸟苷酸	Ca ²⁺ (-) 多胺(-)	自体	5' 切点 5'...CUCUCU'AAA...3' 3' 切点, 5'...UCG'UAAGGUAG...3'
<i>E. coli</i> MIRNA	异体催化	切割 P-O3' 键, 产生 5'-⑤, 3'-OH 末端	H ₂ O 分子亲核进攻的 S _N 2 反应	Mg ²⁺	PEG(+), NH ₄ ⁺ (+), 多胺(+), Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺ (-)	P-tRNA	5'..... ¹ G _A ...3'*
<i>B. subtilis</i> RNaseP 的 RNA	同上	同上	未知	Mg ²⁺	高 [SO ₄ ²⁻](-) 多胺(无作用)	同上	同 上
ASBV**	自我切割 (self-cleavage)	切割 P-O5' 键, 产生 5'-羟基和 2'; 3'-环磷酸二酯末端	未知	Mg ²⁺ 或 Ca ²⁺	***	自体	(+) 链 5'...CCAGGUC'UGU...3' (-) 链 5'...UCAGAGUC'GGA...3'
StobRV RNA	同上	同上	未知	***	Mg ²⁺ , Ca ²⁺ 等 二价阳离子(+) 多胺(+)	自体	(+) RNA 5'...CCCUGUC'ACC...3' (-) RNA 5'...CCUGACA'GUC...3'
p2Spl	同上	切割 P-O5' 键产生 5'-OH, 3'-⑥ 末端	未知	NH ₄ ⁺ Cl ⁻	[Mg ²⁺] > 10mM (-) 非离子型 变性剂如 Brij58 等(+)	自体	5'...UUUCGUAC'AAA...3'

* 根据 Sprinzl, M., et al.: Nucl. Acids Res., 13, Supplement, 51, 1985, 但 RNase P 对切点左侧寡核苷酸的顺序和长度都无严格要求^[3];

** 说明见正文; *** 文献中未说明或尚未明确。

斑病类病毒 (ASBV) RNA^[15], p2Sp1 (*E. coli* 受 T₂ 噬菌体感染后产生的一种前体 RNA 分子), 烟草环斑病毒卫星 RNA (StobRV RNA) 以及紫花苜蓿瞬变线条病毒 (LTSV) 的一种卫星 RNA 都能在体外条件下实现自我切割。自我切割产生的两个末端(5' 羟基和 2', 3'-环磷酸二酯)能在一定条件(但无蛋白质存在)下准确地自我连接(self-ligation)而回复为原来的分子,如 StobRV(±) RNA^[16]。跟 M1RNA 催化的 p-tRNA 切割反应和 rRNA 的自我切割一样,自我切割作用也是在特定的位点上进行。从表 2 可以看出,自我切割 RNA 切割部位的核苷酸顺序有某些相似性,但更引人注意的是这些切割顺序的二级结构似乎都呈茎-环状,切点就在茎-环交界处或茎的另一端。

如前文所述, *E. coli* 的 M1RNA 是一种真正的酶。这不仅因为它符合作为催化剂的条件: 在体外条件下单独就能催化别的分子(p-tRNA)的切割反应;自身在反应前后不改变;少量的 M1RNA 就能使切割反应大大加快,而且因为它与 C5 蛋白结合后是作为细胞的一种重要的功能分子(RNase P)而存在。除 M1RNA 外,还证明了另外两种细菌(*B. subtilis* 和 *S. typhimurium*) RNase P 的 RNA 亚基也具有催化 p-tRNA 5' 端成熟的活性^[3]。其中对 *B. subtilis* RNase P-RNA 的空间结构和催化作用都已有深入的了解(Pace, N. R. et al.: Cold Spring Harbor RNA 会议摘要, 1987 年 5 月)。限于篇幅,在此就不多作介绍。在真核生物方面,目前还未发现有与原核细胞 RNase P-RNA 相应的催化活性 RNA。从已有的实验证据看来,真核细胞中负责 p-tRNA 5' 端成熟的酶可能在组成和结构上都与原核生物的 RNase P 有所不同(是否普遍这样尚待继续验证)。例如非洲爪蟾 (*X. laevis*) 卵母细胞的 tRNA 5' 端成熟酶(5' pre-tRNase)就不含有作为结构和功能必需组分的 RNA^[17]。

由于 M1RNA 是以核糖核蛋白(ribonucleoprotein)形式存在于细胞中,所以有人猜测其他的一些核酸蛋白质复合物中的核酸可能也具

有催化功能。这些复合物包括家兔的直链淀粉异构酶(一种分枝酶)^[9], 核小分子核糖核蛋白(small nuclear ribonucleoprotein, snRNP)和核糖体^[18]等, Petrova 等的最新实验结果(北京国际生化会议摘要, 1987 年 8 月)表明,兔肌直链淀粉异构酶是一种由蛋白质和 RNA(2.5SRNA)构成的稳定复合物。2.5 SRNA 决定分枝反应的主要步骤,它也能单独催化分枝反应,尽管其活性不如天然酶。2.5 SRNA 是在真核生物中第一个发现的具有催化活性的 RNA,也是已知的第一个参与除核酸代谢以外的代谢过程(糖分子的异构反应)的 RNA。此外,海胆卵中有一种称为硫-二硫化物交换蛋白的蛋白质,催化的是一种电子交换反应。它含有约 20% 的 RNA。如果用磷酸二酯酶除去 RNA,酶的活性就完全丧失,而在一定条件下重新加入时,酶的活性可大部分恢复^[19]。snRNP 存在于细胞核中,在核中有丰富的拷贝数。它们都是由核小分子 RNA(snRNA, 长约 90—400nt)和多种蛋白质构成。已经证明 U1snRNP, U2snRNP, U4snRNP, U6snRNP 和 U7snRNP 等都参与 RNA 分子的转录后加工(如切接等)过程^[20]。

催化活性 RNA 的发现给生命起源的裸基因说(认为先有核酸(RNA)后有蛋白质)提供了有力的证据,也引起了人们对前生物进化的许多新的推测^[18, 21, 22]。RNA 分子能集信息编码功能和催化功能于一身,看来是比蛋白质更有可能作为最原始的能自我复制的生命形式。表现有多种酶活性的四膜虫 rRNA 的 IVS, 容易使人联想到生命起源时期可能也出现过类似的 RNA 分子。它们通过 RNA 催化作用(自我催化或由别的 RNA 催化)实现信息的遗传复制^[21]、转录和翻译等。另一方面, C5 蛋白与 M1RNA 在结构和功能上的关系或许可以告诉我们,催化活性 RNA 后来是怎样与蛋白质发生了协作。对核酸催化作用的进一步研究无疑有助于我们深入理解生命的起源、酶进化(包括组成、结构和功能)、蛋白质与核酸的相互关系及其演变等问题。

(下转第 44 页)

血有保护作用^[6]。推测高脂血症患者的有关血浆脂蛋白水平较高,因而与红细胞相互作用的机会要大于血脂正常的人。这一相互作用的结果可使膜蛋白的巯基受到保护,因而高脂血症患者红细胞对 PCMB 溶血作用的敏感性降低。为了证实这种可能性,我们测定了高甘油三酯血症患者红细胞表面巯基数,看与正常人有无差异。结果表明,高甘油三酯血症患者红细胞膜表面巯基数低于正常人,说明高脂血症患者红细胞表面巯基有相当一部分被掩蔽而不能测

出,这很可能是血浆脂蛋白与红细胞相互作用的结果。

参 考 文 献

- [1] Jacob, H. S. et al.: *J. Clin. Invest.*, **41**, 779, 1962.
- [2] 刘孝全、刘心明:《宜昌医学专科学校学报》, **1**, 4, 1985.
- [3] Parekh, A. C. et al.: *Anal. Chem.*, **42** 1423, 1970.
- [4] Ellman, G. L.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70, 1959.
- [5] 周凤兰:《生理科学》, **2**, 23, 1982.
- [6] Lovrien, R. et al.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 3136, 1975.

[本文于 1987 年 2 月 2 日收到]

(上接第22页)

承蒙中国科学院上海生化所祁国荣研究员惠赠资料并审阅全文,谨此表示衷心感谢。

参 考 文 献

- [1] 祁国荣等:《生物化学杂志》, 1986 年, 第二卷, 第 4 期, 第 4 页.
- [2] Gold, H. A. and Altman, S.: *Cell*, **44**, 243, 1986.
- [3] Altman S. et al.: *TIBS*, **11**, 515, 1986.
- [4] Lawrence, N. P. and Altman, S.: *J. Mol. Biol.*, **191**, 163, 1986.
- [5] Guthrie, C. and Atchison, R.: in *Transfer RNA: Biological Aspects* (Söll, D. et al. eds), Cold Spring Harbor Laboratory, p. 71—82, 1980.
- [6] Guerrier-Takada, C. et al.: *Cell*, **35**, 849, 1983.
- [7] Guerrier-Takada, C. and Altman, S.: *Science*, **223**, 285, 1984.
- [8] Guerrier-Takada, C. et al.: *Cell*, **38**, 219, 1984.
- [9] Altman, S. et al.: in *Gene Regulation* (O'Malley, B. W. eds), New York, p. 207—217, 1982.

- [10] Guerrier-Takada, C. and Altman, S.: *Cell*, **45**, 177, 1986.
- [11] Guerrier-Takada, C. et al.: *Biochemistry*, **25**, 1509, 1986.
- [12] 文重, 乔英:《生物化学与生物物理进展》, 1986 年, 第 2 期, 第 7 页.
- [13] Zaug, A. J. et al.: *Nature*, **324**, 429, 1986.
- [14] Inoue, T. et al.: *J. Mol. Biol.*, **189**, 143, 1986.
- [15] Hutchins, C. J. et al.: *Nucl. Acids Res.*, **14**, 3627, 1986.
- [16] Buzayan, J. M. et al.: *Nature*, **323**, 346, 1986.
- [17] Castaño, J. G. et al.: *Cell*, **46**, 377, 1986.
- [18] Westheimer, F. H.: *Nature*, **319**, 534, 1986.
- [19] Elbein, A. D.: in *Advances in Enzymology*, **40**, 44—50, 1974.
- [20] Berget, S. M. and Robberson, B. L.: *Cell*, **46**, 691, 1986.
- [21] Cech, T. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4360, 1986.
- [22] Gilbert, W.: *Nature*, **319**, 618, 1986.

[本文于 1986 年 11 月 19 日收到]

预 告

为了广泛征求意见,下期将刊出生物物理学名词共 356 条。