

核糖体的结构与功能研究 ——2009 年诺贝尔化学奖简介

胡永林*

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 一系列高分辨率的核糖体及其 30 S、50 S 亚基的晶体结构揭示了这个极其复杂的蛋白质翻译机器的重要作用机理, 对在分子水平上了解生命机体产生和形成的一个基本环节(蛋白质合成)具有重大意义, 同时为新型抗生素的设计与研发开辟了新方向新途径, 对人类健康与生命保障具有重要作用.

关键词 核糖体, 结晶, 结构, 功能

学科分类号 Q71

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00607

2009 年 10 月 7 日, 瑞典皇家科学院宣布将今年的诺贝尔化学奖授予英国剑桥大学 MRC 分子生物学实验室科学家文卡特拉曼·拉马克里希南(Venkatraman Ramakrishnan), 美国耶鲁大学科学家托马斯·施泰茨(Thomas A. Steitz)和以色列魏茨曼科学研究所科学家阿达·约纳特(Ada E. Yonath), 以表彰他们在核糖体结构和功能的研究方面所做的贡献. 这三位科学家都是用 X 射线晶体学技术测定核糖体的高分辨率分子结构并研究其结构-功能关系而获此殊荣, 并平分奖金.

核糖体是细胞内最重要的细胞器之一. 在生物体将 DNA 所包含的基因信息翻译为蛋白质的过程中, RNA 聚合酶 II 以 DNA 为模板合成 mRNA(这一过程称为转录), 而核糖体在 mRNA 的指导下合成相应的蛋白质(这一过程称为翻译). 在翻译过程中, 核糖体需要解读 mRNA 的密码子, 招募相应的氨酰 tRNA, 并催化肽链的生成. 2006 年, 美国斯坦福大学科学家科恩伯格因为对 RNA 聚合酶 II 的晶体结构和功能的研究做出重要贡献而荣获诺贝尔化学奖, 而今年诺贝尔化学奖颁发给三位研究核糖体的结构生物学家, 彰显了人们对这一领域的重视.

1 核糖体结构研究的历史

从 20 世纪 80 年代探索核糖体亚基的结晶开始, 到 2000 年获得原子水平的精细三维结构, 经历了大约 20 年的艰苦历程. 在这期间, Yonath,

Steitz 和 Ramakrishnan 各自领导研究组独立地解析了核糖体 30 S 和 50 S 亚基的精细结构, 阐释了其作为蛋白质翻译机器的工作机理, 发现核糖体作为核糖酶的新功能. 这些研究成果不仅对在分子水平了解生命机体产生与形成过程中一个基本环节的分子机理具有重大意义, 而且为设计和研发新型抗生素提供了新方向新途径, 对人类的健康与生命保障具有重要价值.

核糖体是细胞中最复杂的分子机器之一. 原核生物的核糖体的分子质量约为 2.6 Mu, 而真核生物核糖体的分子质量可高达 4.5 Mu. 原核生物的核糖体的沉降系数为 70 S, 它们含有两个亚基, 其沉降系数分别为 50 S 和 30 S. 其中, 30 S 亚基的功能主要是介导 mRNA 的密码子与 tRNA 的反密码子之间的作用以确保翻译过程的高保真度, 而 50 S 亚基的功能包括蛋白质合成的起始、肽链的延长与终止. 30 S 亚基包含约 20 个蛋白质分子和一个 1 600 碱基的 rRNA; 50 S 亚基包含约 33 个蛋白质分子和 2 个 rRNA 分子, 分别为 2 900 和 120 碱基. 核糖体的化学性质很不稳定, 即使在细胞内正常生理条件下也会很快降解. 所以人们一直认为它们不可能被纯化、结晶.

Yonath 首先开展对核糖体的晶体学研究, 是

* 通讯联系人.

Tel: 010-64888548, E-mail: yonglin@ibp.ac.cn

收稿日期: 2009-10-15, 接受日期: 2009-10-16

这一重要大分子复合物结构研究的开拓者。她选作研究对象的是从嗜热菌中纯化得到的核糖体。

1980年, Yonath 研究组^[1]报道了 *Bacillus stearothermophilus* (现称为 *Geobacillus stearothermophilus*, 嗜热脂肪地芽孢杆菌) 核糖体 50 S 亚基的结晶。1987年他们又报道了可以衍射到 6 Å 分辨率的 50 S 亚基晶体^[2]。同年, 另一个研究组报道了 30 S 和 70 S 的 *Thermus thermophilus* 核糖体的结晶^[3], 而 Yonath 研究组也大约在同时报道了 *T. thermophilus* 核糖体的结晶^[4]。1991年, Yonath 研究组首先得到了高分辨率的核糖体晶体——3.0 Å 分辨率的 *Haloarcula marismortui* 核糖体 50 S 亚基晶体^[5]。其后的高分辨率晶体结构研究大多集中在 *T. thermophilus* 和 *H. marismortui* 核糖体。

从得到核糖体晶体到收集到可用的衍射数据, 数个研究组花费了十余年时间。核糖体晶体有诸多不适合结构研究的性质, 例如: 极其脆弱, 难以处理; 对 X 射线损伤非常敏感; 晶体之间的同晶性低; 晶体经常长成薄片状, 厚度只有几个微米; 以及孪晶。除此之外, 核糖体结构解析中的相位问题也很突出。现在最常见的获得实验相位的方法是用硒代甲硫氨酸引入重原子(硒)以获得反常散射信号并不适合于核糖体的结构解析, 因为核糖体分子太大, 而硒原子的反常散射信号很弱。因为同样的原因, 用常见的重原子化合物制备的衍生物也不足以提供可用的相位信息而必须使用重原子簇合物制备的衍生物。成功地用于核糖体结构解析的簇合物主要是钨(如 $[P_2W_{18}O_{62}]^{6-}$)和钽(如 Ta_6Br_{14})^[6]。这些多原

子的簇合物作用如同一个“超级”重原子, 提供比同样数量的单个重原子强得多的相位信息。

20世纪90代以来一系列大分子晶体学技术方面的进展为核糖体结构解析提供了重要的基础。例如, 在液氮温度下收集衍射数据极大地提高了核糖体抗辐射性能, 而核糖体也是最早应用这一技术的晶体^[7]。

1991年, Yonath 研究组报道了在 3 Å 分辨率下对 *H. marismortui* 核糖体 50 S 亚基的结构尝试性初步分析, 这是这个领域里的一个重要突破^[5]。但相位问题的完全解决是由 Steitz 研究组完成的。他们用核糖体的电镜结构计算出低分辨率相位, 结合 MIRAS 相位信息, 得到了 *H. marismortui* 核糖体 30S 亚基的 9 Å 分辨率电子密度图, 这个密度图显示了可辨认的 RNA 密度特征, 这表明他们的实验方法可以最终解析核糖体的结构^[8]。次年, Ramakrishnan 研究组和 Yonath 研究组分别独立报道了 *T. thermophilus* 核糖体 30 S 亚基的 5.5 Å 和 4.5 Å 分辨率结构^[8, 9]。

2000年, 一系列高分辨率核糖体晶体结构被发表(图 1)。Steitz 研究组^[10]报道了 *H. marismortui* 核糖体 50 S 亚基的 2.4 Å 分辨率结构, Ramakrishnan 研究组报道了 *T. thermophilus* 核糖体 30 S 亚基的 3.0 Å 分辨率结构^[11], 而 Yonath 研究组^[12]也报道了同一个分子的 3.3 Å 分辨率结构。2005年, 美国加州大学的一个研究组报道了大肠杆菌核糖体全分子 (70 S) 的 3.5 Å 分辨率结构^[13]。这些高分辨率的晶体结构为核糖体酶学机理的研究提供了坚实的基础。

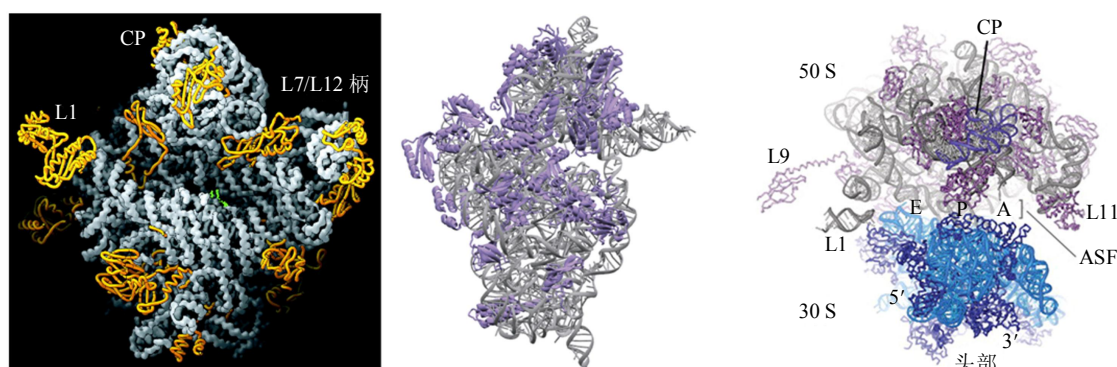


Fig. 1 The 50 S and 30 S ribosomal subunits structures and the 70 S ribosome structure

图 1 核糖体 50 S 亚基 (左)、30 S 亚基 (中) 以及全核糖体 (右) 的结构

2 核糖体结构与酶学机理——核糖体新功能

2.1 翻译过程的高保真性和密码子第三位碱基的摇摆性

通过对 DNA 双螺旋结构的测定以及对生命的遗传过程的研究,人们早已经认识到合成蛋白质的过程具有非常高的保真度,但是核糖体又在保证不发生氨基酸替换的前提下容忍密码子的第三位碱基有“摇摆性”。Ramakrishnan 研究组对核糖体 30 S 亚基的结构分析揭示了这一重要性质的结构基础。

这个研究组获得了 30 S 核糖体与一段 mRNA 以及相应的 tRNA^{Pro} 反密码子的复合物结构,他们发现,在这个复合物中,核糖体 16 S rRNA 的三个完全保守的碱基——G530, A1492 和 A1493 的位置发生改变,并且分别与第一和第二个密码子 - 反密码子对形成氢键。这些氢键起到了监视 mRNA 的密码子是否与正确的反密码子配对的作用。而第三个密码子 - 反密码子对却没有受到类似的监视(图 2)。这个结构特征完满地解释了核糖体翻译过程中的高保真性和第三位碱基的摇摆性。

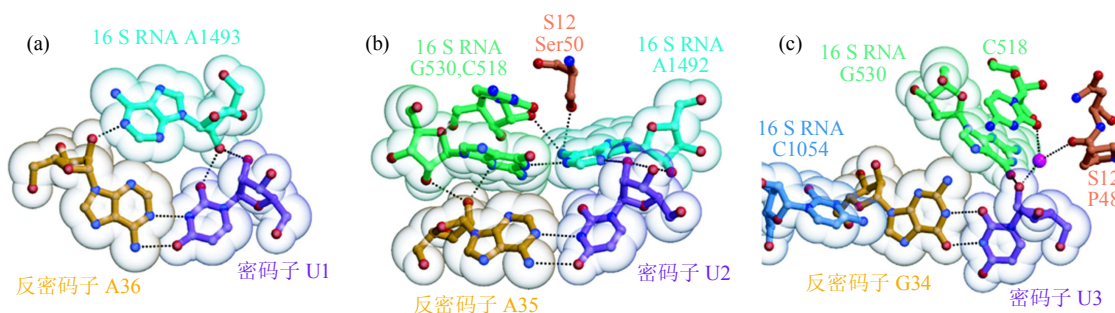


Fig. 2 The geometry of the first and the second codon-anticodon pairings is monitored by bases from 16 S rRNA, while the third such pairing was not monitored, explaining the wobble hypothesis

(From www.nobelprize.org)

图 2 翻译过程的高保真性及密码子第三位碱基摇摆性的结构基础

(a)第一个密码子 - 反密码子对由密码子 U1 和反密码子 A36 形成,这个对子的几何形状被 16 S rRNA 的碱基 A1493 监视。(b)第二个密码子 - 反密码子对被 G530 和 A1492 监视。(c)第三个密码子 - 反密码子对没有受到类似的监视(图片摘自 www.nobelprize.org)。

Ramakrishnan 研究组的研究结果还表明,在正确的氨酰 tRNA 以氨酰 tRNA/EF-Tu/GTP 三元复合物形式与带有 mRNA 的核糖体结合时,伴随着 16 S rRNA 上 G530、A1492、A1493 碱基的位移,30 S 亚基也由开放构象变为闭合构象,同时 GTP 被 EF-Tu 水解。而反密码子不正确的氨酰 tRNA 结合时,上述的核糖体构象变化和 GTP 水解不会发生。而且,在氨酰 tRNA 与核糖体的结合 / 解离的平衡中,不正确的氨酰 tRNA 有更大的解离速度。所以,核糖体可以依靠氨酰 tRNA 解离速度的差别和 GTP 是否水解所带来的自由能变化的差别,双重保证翻译过程的保真性(图 3)。

核糖体结构和密码子 - 反密码子作用机理的确定也可以解释为什么某些突变会增加核糖体翻译错误。这些被称为 ribosomal ambiguity mutations (ram)的突变通常发生在 S4 和 S5 蛋白上,它们稳定 30 S 亚基的闭合构象,从而降低了翻译过程的保真性。而 S12 蛋白上的突变通常使 30 S 亚基开放构象更稳定,增强了翻译的保真度。

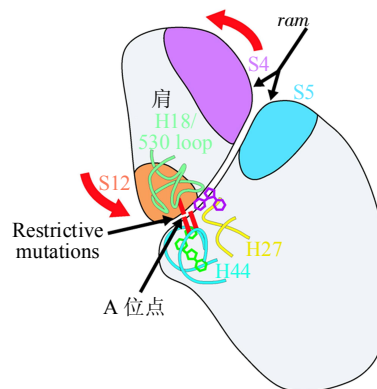


Fig. 3 The closing of the 30 S subunit upon the binding of cognate aminoacyl-tRNAs

(From www.nobelprize.org).

图 3 正确的氨酰 tRNA 的结合伴随着 30 S 亚基的闭合和 GTP 的水解

S4 和 S5 蛋白上的突变稳定 30 S 亚基的闭合构象从而降低翻译过程的保真性; S12 蛋白上的突变稳定 30 S 亚基的开放构象从而增强翻译过程的保真性(图片摘自 www.nobelprize.org)。

2.2 肽键的合成与核糖体的核糖酶性质

自从核糖酶(ribozyme)被发现后,一直有人建议,并且设计多种实验验证,核糖体是作为核糖酶催化肽键的生成.在低分辨率的50 S亚基结构中已经可以看出,在催化肽键形成的酶活位点并没有蛋白质存在,而只有RNA.核糖体50 S亚基高分辨率结构的解析为ribozyme假设提供了直接的证据^[14].为了确定核糖体催化肽键形成的酶学机制,Steitz 研究组解析了50 S亚基与不同底物类似物的复合物结构.与此同时,其他研究组也进行了很多的突变以及计算化学的研究.这些研究的结果表

明,肽酰 tRNA 的76位腺嘌呤,更准确地说,这个腺嘌呤的核糖部分,提供主要的催化功能.在A76的2'-OH基团的活化下,氨酰 tRNA 的氨基进攻肽酰 tRNA 的酯键,A76的3'-OH基团从2'-OH基团接受一个质子后,A76离去,肽酰 tRNA 的酯键断裂而一个新的肽键形成,肽酰 tRNA 增长了一个氨基酸残基(图4).在这个过程中,23 S rRNA 的A2451和周围的水分子也参与了质子的传递.

3 核糖体结构与新抗生素的研发

致病菌的抗药性已经成为一个全球性的公共健康问题.近年来,每年被细菌感染夺去生命的人数逐年上升,而可用于治疗多种抗药性感染的抗生素种类已近枯竭.现在已知的抗菌素约有一半是以细菌的核糖体作为作用靶标.细菌核糖体高分辨率的晶体结构的解析又重新燃起了人们开发全新抗生素的热情.三个获奖人之中的Steitz 已经成立了一个药物开发公司,设计和开发以细菌核糖体为靶标的抗生素,并已取得初步进展.

目前,在蛋白质结构数据库(PDB)中,已有超过50个核糖体和小分子化合物的复合物结构.这些化合物大多结合在50 S亚基中的肽键合成位点附近(图5),都有一定的潜力被发展成为能够抑制细菌核糖体功能的抑制剂甚至药物前体.在另外一方面,部分抗菌素能够改变细菌抗菌素对 tRNA 的识别和结合,所以它们也是核糖体结晶和结构-功

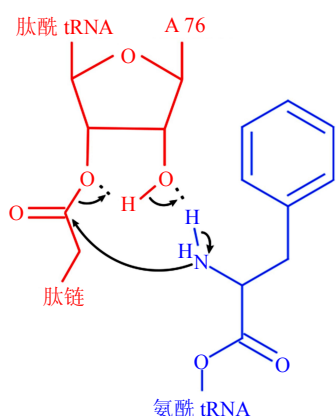


Fig. 4 The mechanism of peptide formation on ribosome 50S subunit (From www.nobelprize.org).

图4 肽键形成的酶学机制

红色部分为肽酰 tRNA,蓝色部分为氨酰 tRNA(图片摘自 www.nobelprize.org).



Fig. 5 Bindings of various compounds at the peptidyl transferase site of 50 S subunit of *H. marismortui* ribosome (From www.nobelprize.org)

图5 *H. marismortui* 核糖体50 S亚基与多种化合物的作用

这些化合物大都结合在肽键合成位点.右上方的圆环内显示这些化合物之间的相对位置,右下方的小圆环显示这些化合物的分子大小(图片摘自 www.nobelprize.org).

能关系分析中不可缺少的工具。

核糖体原子分辨率的晶体结构使我们对蛋白质合成这个最重要的生命过程之一有了分子水平上的了解。这个过程中的一些重要概念,例如翻译的高保真性和第三位密码子的摇摆性,现在都在核糖体结构中得到完美的解释。而刚刚兴起的以核糖体结构为基础开发新的抗生素说明这些研究不仅仅有基础研究方面的意义,它也将对人类的公共健康起到重要的促进作用。三位获奖者通过长期、艰苦的工作,终于完成了核糖体这个到目前为止最为复杂的原子分辨率的结构,已经树起结构生物学这个领域的一个里程碑。

参 考 文 献

- 1 Yonath A E, Mussig J, Tesche B, *et al.* Crystallization of the large ribosomal subunits from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochemistry International*, 1980, **1**(5): 428~435
- 2 Makowski I, Frolov F, Saper M A, *et al.* Single crystals of large ribosomal particles from *Halobacterium marismortui* diffract to 6Å. *Journal of Molecular Biology*, 1987, **193**(4): 819~822
- 3 Trakhanov S D, Yusupov M M, Agalarov S C, *et al.* Crystallization of 70 S ribosomes and 30 S ribosomal subunits from *Thermus thermophilus*. *FEBS Letters*, 1987, **220**(2): 319~322
- 4 Glotz C, Mussig J, Gewitz H S, *et al.* Three-dimensional crystals of ribosomes and their subunits from eu- and archaebacteria. *Biochem Int*, 1987, **15**(5): 953~960
- 5 von Böhlen K, Makowski I, Hansen H A S, *et al.* Characterization and preliminary attempts for derivatization of crystals of large ribosomal subunits from *Haloarcula marismortui* diffracting to 3Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 1991, **222**(1): 11~15
- 6 Ban N, Freeborn B, Nissen P, *et al.* A 9Å resolution X-ray crystallographic map of the large ribosomal subunit. *Cell*, 1998, **93**(7): 1105~1115
- 7 Hope H, Frolov F, von Böhlen K, *et al.* Cryocrystallography of ribosomal particles. *Acta Crystallogr B*, 1989, **45** (Pt 2): 190~199
- 8 Clemons W M, Jr May J L, Wimberly B T, *et al.* Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5Å resolution. *Nature*, 1999, **400**: 833~840
- 9 Tocilj A, Schlunzen F, Janell D, *et al.* The small ribosomal subunit from *Thermus thermophilus* at 4.5Å resolution: pattern fittings and the identification of a functional site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(25): 14252~14257
- 10 Ban N, Nissen P, Hansen J, *et al.* The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4Å resolution. *Science*, 2000, **289**(5481): 905~920
- 11 Wimberly B T, Brodersen D E, Clemons W M, *et al.* Structure of the 30 S ribosomal subunit, *Nature*, 2000, **407**(6802): 327~339
- 12 Schlunzen F, Tocilj A, Zarivach R, *et al.* Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3Å resolution. *Cell*, 2000, **102**(5): 615~623
- 13 Schuwirth B S, Borovinskaya M A, Hau C W, *et al.* Structures of the bacterial ribosome at 3.5Å resolution. *Science*, 2005, **310**: 827~834
- 14 Cech T R. Structural biology - The ribosome is a ribozyme. *Science*, 2000, **289**(5481): 878~879

Studies on Structure and Function of Ribosome: a Brief Introduction to 2009 Nobel Prize in Chemistry

HU Yong-Lin*

(Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract The 2009 Nobel Prize in Chemistry was awarded to Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steitz, and Ada E. Yonath "for studies of the structure and function of the ribosome". The atomic-resolution ribosome structures solved by the laureates revealed the structural basis of the mechanisms of peptide syntheses by ribosome. They demystified several long standing functions of ribosome, such as the high fidelity of the translation process and the wobble effect. Their work also paved ways for the development of new antibiotics, just when public health is faced with increasing threat from drug-resistant pathogenic bacteria.

Key words ribosome, crystallization, structure, function

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00607

*Corresponding author.

Tel: 86-10-64888548, E-mail: yonglin@ibp.ac.cn

Received: October 15, 2009 Accepted: October 16, 2009