

信使核糖核酸 3' 端多聚腺苷酸链的作用

方思明

(中山大学生物系, 广州)

原核生物如细菌, 其原始 RNA 转录物就是信使核糖核酸 (mRNA), 新 RNA 分子一生成就与核糖体结合, 并开始合成蛋白质。真核生物的细胞, 原始转录物并不被直接用作 mRNA, 而是 mRNA 的前身——核不均核糖核酸 (hnRNA), 它要经过一系列的转录后加工, 其中包括 5' 端的“戴帽”——增加一甲基化的低聚核苷酸结构, 以及 3' 端的多聚腺苷酰化作用——接上一条长长的多聚腺苷酸尾链 (以下简称多聚(A)) 才具有 mRNA 作用。近年还有证据表明, 比 mRNA 大的原始转录物要经核酸内切酶裂解后, 其某些片段再连接在一起才成为有功能的 mRNA。本文重点讨论 mRNA 3' 端存在的二种多聚(A)形式(多聚(A)⁺和多聚(A)⁻), 及其可能的生物学功能。

一、多聚(A)⁺和多聚(A)⁻ mRNA

多聚(A)作为 mRNA 的成份最初发现于哺乳动物的细胞, 随后证实它也是其它真核生物 mRNA 的成份。现在已知它也广泛存在于病毒和某些原核生物的 mRNA 中。

Edmonds 等^[1]首先发现多聚(A)在原核生物的大肠杆菌中存在。以后在原核生物——柄细菌 (Caulobacter) 中鉴定多聚(A)在 mRNA 上存在^[2]。原核生物多聚(A)序列的平均大小和稳定性与真核生物明显不同。真核生物的多聚(A)由 50—200 个腺苷酸残基组成, 而细菌的多聚(A)只有 15—50 个核苷酸。分子杂交技术使人们发现, 真核生物的 mRNA 有不少是缺多聚(A)的。多聚核糖体中的 mRNA 能与低聚(dT)-纤维素、多聚(U)-琼脂糖或微孔滤膜结合的那部分具有多聚(A)序列, 其长度在 20—250 个核苷酸之间, 用多聚(A)⁺ mRNA 表

示, 其余是缺多聚(A)的 mRNA, 称多聚(A)⁻ mRNA。多聚(A)⁺与多聚(A)⁻ mRNA 的划分是相对的, 随分离技术的不同而改变。例如多聚(U)-琼脂糖能结合序列大于 10—15 个核苷酸的多聚(A)⁺ mRNA, 少于这一数目的就被列入多聚(A)⁻ mRNA。又如 β -肌动蛋白的 mRNA 有相当部分不能与低聚(dT)-纤维素结合, 但这些不能结合的部分用多聚(U)-琼脂糖再层析时, 又有一部分被分离, 剩余的部分被列入多聚(A)⁻ mRNA, 它们可能是只含 10 个以下核苷酸的多聚(A)段。

测定 3' 端多聚(A)段的长度有多种方法。例如在高离子强度条件下用牛胰 RNA 酶水解 mRNA, 剩下的多聚(A)部分用 DEAE-Sephadex 层析, 或聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 然后与已知长度的多聚(A)标准物比较其迁移率; 或者用多聚(A)片段在聚丙烯酰胺凝胶上的迁移率与平均核苷酸数的对数成直线关系, 求出多聚(A)段的大小^[3]; 另一种方法是用过量的大肠杆菌多核苷酸磷酸化酶使 mRNA 去磷酸化^[4], 多核苷酸磷酸化酶是一种专一的 3' 端外切酶, 只切除 3' 端的多聚(A)段, 不降解 mRNA 分子的其余部分。定量测定释出的磷酸化产物——ADP, 再通过凝胶电泳比较开始时和切除 3' 端多聚(A)段后的 mRNA 分子大小, 即可确定多聚(A)段的长度。此外, 用 [³H]-多聚(U)与 mRNA 杂交, 然后用 RNA 酶水解掉未杂交的单链部分 (杂交部分成为双链不会被水解), 杂交产物用 TCA 沉淀, 玻璃纤维滤膜过滤, 并测定放射性, 也可估计多聚(A)的长度。

通过以上各种方法测定证明多聚(A)⁺ mRNA 是确实存在的, 但究竟多聚(A)⁻ mRNA

是否存在,是否具有指导蛋白质合成的功能,尚不能确定。编码组蛋白的 mRNA 很早就被认为缺少多聚(A),现已证明,组蛋白的 mRNA 有腺苷酰化和非腺苷酰化两类^[5]。除组蛋白外,已发现相当一部分非组蛋白 mRNA 也缺少多聚(A)。海胆胚胎中的 mRNA 约 40% 缺少多聚(A); HeLa 细胞则有 30%。此外,在小白鼠肝、腹水瘤、鸡的肌肉细胞、两栖类卵巢、植物细胞和昆虫细胞等都发现有多聚(A)⁻ mRNA^[6,7]。已鉴定的蛋白质,如鱼精蛋白、卵清蛋白和人的珠蛋白等也由两种形式的 mRNA 编码。

有的实验证明,海胆的两类 mRNA 能编码不同的蛋白质,但也有人报道两类 mRNA 可以编码同一功能的蛋白质,如酵母的多聚(A)⁺和多聚(A)⁻ mRNA 都编码核糖体的蛋白质^[8]; 鳟鱼的鱼精蛋白也由两类 mRNA 编码^[9],这就是 mRNA 的“二型现象”(bimorphism)。这种现象一种可能是由不同的基因转录而来,另一种可能是一种基因的某些已经多腺苷酰化的转录产物减少并丧失其多聚(A)片段。也有人认为多聚(A)⁻ mRNA 可能就是多聚(A)⁺ mRNA,本来完整的多聚(A)片段,后来在胞质中丧失或缩短;两类 mRNA 也可能是刚合成的分子和已到了代谢末期的分子。有人用凝胶双向电泳分析 HeLa 细胞多聚(A)⁺和多聚(A)⁻ mRNA 的离体转译产物,发现其中有三类多肽:一类(约 40 种多肽)只由多聚(A)⁺ mRNA 合成;另一类(约 10 种多肽)只由多聚(A)⁻ mRNA 合成;第三类(约 10 种多肽)两类 mRNA 都可编码^[10]。其它如从小鼠脑,海胆胚胎分离的多聚(A)⁺和多聚(A)⁻ mRNA 也有类似的情况。在无细胞蛋白质合成系统中合成的这些多肽其大部分与在活体标记所得的一样,说明多聚(A)⁻ mRNA 在活体内也有功能。核苷酸序列分析也表明,多聚(A)⁻ mRNA 确与多聚(A)⁺ mRNA 不同,例如海胆胚胎多聚(A)⁻ mRNA 中尿苷酸的比例比多聚(A)⁺ mRNA 高; Friend 白血病细胞也有类似情况^[11],因此,有人利用多聚(A)与尿苷酸亲和的特点,

用多聚(A)-琼脂糖亲和层析分离出多聚(A)⁻ mRNA,再用 cDNA 杂交分析,可以看出两类 mRNA 没有明显的同源性。在 HeLa 细胞中能与多聚(A)⁺ mRNA 杂交的 cDNA 只有 10% 可与多聚(A)⁻ mRNA 杂交,而 L-细胞多聚(A)⁻ mRNA 分子的平均大小比多聚(A)⁺ mRNA 还大,两者根本没有前体与产物的关系。

组蛋白基因研究发现,两类 mRNA 是由两类基因转录的^[12]。组蛋白的“早期”和“晚期”基因编码初级结构和大小不同的二种 mRNA。海胆胚胎发育过程,“早期”与“晚期”基因的表达就很不同,发育早期,组蛋白 mRNA 的可转译活性有 50% 在多聚(A)⁻ mRNA 部分,但到桑椹期只有 30%,原肠期只有 10%。这都表明多聚(A)⁻ mRNA 是有功能的,也是独立存在的。

当然,因多聚(A)片段的逐渐缩短,不能排除某些多聚(A)⁺和多聚(A)⁻ mRNA 都来自同样的转录单位。已有证据说明某些蛋白质是由具有不同长度多聚(A)片段(20—150 个核苷酸)的 mRNA 合成的,如果多聚(A)段少于 8 个核苷酸,亲和层析不可能把它吸附,就被列入多聚(A)⁻ mRNA。也有证据表明,小鼠 Friend 细胞多聚(A)⁻ mRNA 富含的顺序与多聚(A)⁺ mRNA 是同源的,只有个别的序列不一样。

二、多聚(A)能将 mRNA 从核运至细胞质

至今尚未证明原核生物或真核生物有游离的多聚(A)同聚体存在,所有多聚(A)都共价地结合在 RNA 的 3' 端。多聚(A)这种专一性结合对 mRNA 的作用如何,即其生物学上具有何种功能,人们尚未得出一致的意见。七十年代初,有人认为多聚(A)与 mRNA 的转译能力有关,但多聚(A)并不是转译蛋白质所必需的。组蛋白 mRNA 缺少多聚(A)仍能活跃地转译蛋白质;去腺苷酰化了的兔珠蛋白 mRNA 在麦胚, Hrcbs 腹水和大白鼠肝抽提物

中合成蛋白质的能力与完整的(未经去腺苷酰化的)珠蛋白 mRNA 无区别。此外, mRNA 的多聚(A)段与多聚(U)形成二联体也不影响 mRNA 的转译。根据以上实验事实推断,更多的人认为多聚(A)可能起 mRNA 在核中的加工和从核运输至细胞质的作用。实验已证明 mRNA 与 hnRNA 有前体-产物的关系,也即细胞质中的 mRNA 是由核内的基因转录产物——hnRNA,经过加工然后运输至细胞质。在许多情况下,多腺苷酰化作用是在 mRNA 的核质运输之前,某些药物如 3' 脱氧腺苷阻碍 mRNA 结合至核糖体,推测是由于 mRNA 的多腺苷酰化受阻,因而未能运输至细胞质。但这种解释不能说明以下问题:(1)多聚(A)⁺mRNA 在原核生物及真核生物的线粒体中也存在^[13],细菌没有核膜,而线粒体中并不存在核质运输问题;(2)没有多聚(A)的多聚(A)⁻mRNA 也一样能迅速进入细胞质,缺少多聚(A)既不妨碍 mRNA 的运输,也不影响其进入速率;(3)在细胞质中有 mRNA 的多聚腺苷酰化作用,表明多聚(A)的原始功能并不是把 mRNA 从核运至细胞质;(4)hnRNA 虽也被多聚腺苷酰化,但却只有部分被运输至细胞质形成 mRNA,故即使已多聚腺苷酰化,也不足以保证 mRNA 从核至细胞质的运输;(5)除了多聚(A)段以外的某些因素可以支配核质运输的速率,加入外源 ATP,色氨酸等化学物质可以提高胞质中 mRNA 的含量。

三、多聚(A)对 mRNA 稳定性的作用

原核生物 mRNA 的半寿期很短,以分钟计,真核生物的则长得多,达几小时以至几天。有人猜测这与 mRNA 中多聚(A)的长短有关。

mRNA 能被 RNA 酶消化,多聚(A)可能对酶的消化起一种抑制剂的作用。把自然的有多聚(A)段和用酶去腺苷酰化的珠蛋白 mRNA 注射入非洲爪蟾卵母细胞后,发现虽然多聚(A)段对 mRNA 的转译并不必需,但对维持转译的时间却是必要的。注射后几小时,缺多聚

(A)的 mRNA 开始降解,56 小时后约降解 85%,而含多聚(A)的 mRNA 仍保留着。注射入 HeLa 细胞的结果也与此类似^[14]。有人发现多聚(A)段的长度也与 mRNA 功能的稳定性有关,要使注射入卵母细胞中的珠蛋白 mRNA 的功能充分稳定至少需有 30 个以上腺苷酸的多聚(A)段。缺少多聚(A)的珠蛋白 mRNA,其转译的半寿期只有几分钟,而自然的珠蛋白 mRNA 则达 5—10 小时。把已去腺苷酰化的 mRNA 再腺苷酰化又可恢复其稳定性;把自然情况下缺多聚(A)的人组蛋白的 mRNA 注射入蛙卵母细胞,其转译的稳定性很差,只有 3—4 小时,但如在离体情况下人为地使它腺苷酰化后再注射入卵母细胞,可以延长半寿期至 48 小时以上^[15]。最近用植物病毒的 mRNA 实验也表明多聚(A)对 mRNA 稳定性有作用^[16]。已知植物病毒 mRNA 的 3' 端有三种不同的结构:一种是有多聚(A)段,另一是有 tRNA 样的结构;再一种是没有特殊的结构存在(即多聚(A)⁻mRNA)。把三类 mRNA 分别注射入蛙卵母细胞,结果是有多聚(A)的 mRNA 最稳定,最初三天蛋白质的转译没有明显减少;没有多聚(A)的也相当稳定,最初二天多合成不减少;带 tRNA 样结构的一类稳定性很差,作者推测可能其 3' 端的二级结构不能保护 mRNA 不被酶作用。对缺多聚(A)的 mRNA(紫花苜蓿花叶病病毒的 mRNA)具有高度的稳定性,他们提出了一种解释,认为这些分子的 3' 端可能有一特殊结构,它在一定程度上可起多聚(A)的作用;这种结构受其细胞质的影响,在卵母细胞中很稳定,但在 HeLa 细胞则极不稳定。此外,有人也证实,呼肠孤病毒的多聚(A)⁻mRNA 在蛙卵母细胞中相当稳定,故认为多聚(A)不是 3' 端能够稳定 mRNA 的唯一结构。

mRNA 的多聚(A)段在细胞质中有随 mRNA 的老化而逐渐缩短的现象,最近实验表明,这种现象与 mRNA 的连续转译有关。蛋氨酸原养型的 *Neurospora* 细胞,在缺蛋氨酸的培养液中,其 mRNA 的多聚(A)段比在完全培养液中的缩短得慢,这可能由于缺少蛋氨酸,使蛋

白质合成受阻, mRNA 不用连续转译, 多聚(A) 段缩短的速度减缓^[49]。用吐根碱 (emetine, 一种转译的抑制剂), 抑制蛋白质的合成, 也可使多聚(A) 保持其长度。

近年开始探索 3' 端多聚(A) 段为什么与 mRNA 的衰老有关的问题。已经证实大多数真核生物 mRNA 3' 端的多聚(A) 是与蛋白质结合的^[48], 这种结合可能抑制核酸酶的作用, 使 mRNA 不被降解^[49]。如果这一推测是正确的, 则多聚(A)⁻ mRNA 的稳定性会由 3' 端另一类抗核酸酶的序列起作用。

关于 mRNA 稳定性, 有些问题还无法解释, 如为什么组蛋白 mRNA 在绝大多数细胞的细胞质中象多聚(A)⁺ mRNA 一样是稳定的, 而在蛙的卵母细胞中却象去腺苷酰化的珠蛋白 mRNA 一样不稳定, 为什么在卵母细胞中组蛋白 mRNA 的降解比在其他细胞中快, 而去腺苷酰化的某些病毒 mRNA 在卵母细胞中可以转译, 甚至注射后 60 小时活性也不降低等等。

四、mRNA 缺少多聚(A) 的问题

一般说, 多腺苷酰化增加了某些 mRNA 的稳定性, 既然多聚(A)⁻ mRNA 不如多聚(A)⁺ mRNA 稳定, 为什么在细胞中却有那么多的多聚(A)⁻ mRNA, 它们究竟有什么作用, 关于这个问题有说服力的理由还不多。有人从各个发育阶段的海胆胚胎分离出多聚(A)⁺ 和多聚(A)⁻ mRNA, 并在麦胚无细胞蛋白质合成系统中转译出蛋白质, 发现多聚(A)⁻ mRNA 在发育的早期与后期编码的蛋白质很不相同, 故认为可能在发育早期组织分化形成一定细胞类型时, 需要这种能迅速降解的多聚(A)⁻ mRNA。胚胎发育早期, 组织分化的速度很快, 胚胎的变化也很大, 当细胞在对内外环境的变化起反应时, 一方面要求有大量的 mRNA 来合成所需的各种蛋白质, 另一方面又要把某些已不必要的 mRNA 迅速从细胞质中除去。

多聚(A)⁻ mRNA 可能对细胞的增生也起一定的作用。组织培养的小鼠成纤维细胞会合前多聚核糖体中总 mRNA 核苷酸序列的复杂

性比会合后高, 其中包括多聚(A)⁻ mRNA 的序列, 此外, 病毒的转化可能改变多聚(A)⁻ mRNA 的群体, 被多瘤病毒感染后小鼠成纤维细胞多聚核糖体中总 mRNA 的序列复杂性增加, 这可能是由于多聚(A)⁻ mRNA 序列不同造成的。

参 考 文 献

- [1] Edmonds, M. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 1531, 1970.
- [2] Ohta, N. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **517**, 65, 1978.
- [3] Burness, A. T. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**, 1408, 1975.
- [4] Soreq, H. et al.: *J. Mol. Biol.*, **88**, 233, 1974.
- [5] Ruderman, J. V. et al.: *J. Biol. Chem.*, **253**, 2018, 1978.
- [6] Milcarek, c.: *Eur. J. Biochem.*, **102**, 467, 1979.
- [7] Moffet, R. B. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **652**, 117, 1981.
- [8] Mager, W. H. et al.: *FEBS Lett.*, **58**, 219, 1975.
- [9] Iatrou, K. et al.: *Cell*, **10**, 433, 1977.
- [10] Kaufman, Y. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 4801, 1977.
- [11] Katinakis, P. K. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **653**, 27, 1981.
- [12] Childs, G. et al.: *Dev. Biol.*, **73**, 153, 1979.
- [13] Ojala, D. et al.: *J. Mol. Biol.*, **82**, 151, 1974.
- [14] Huez, G. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **78**, 908, 1981.
- [15] Woodland, H. R. et al.: *Dev. Biol.*, **75**, 214, 1980.
- [16] Huez, G. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **130**, 205, 1983.
- [17] Seidel, B. C. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **654**, 124—128, 1981.
- [18] Rose, K. M. et al.: *Nature*, **279**, 260, 1979.
- [19] Kelly, J. M. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **10**, 4173, 1982.

[本文于1983年10月10日收到]