

专论与综述

RNA 研究的一些新进展——RNA 生物功能的多样性

刘望夷 王德宝

(中国科学院上海生物化学研究所)

提 要

近几年发现某些 RNA 具有酶 (Ribozyme) 的催化功能。这不仅改变了酶都是蛋白质的传统观念,而且认为在远古时期 RNA 可能就具有自我复制的活力,因而 RNA 是先于 DNA 和蛋白质的最早出现的生物大分子。真核细胞 mRNA 的剪接机制比较复杂,至今还远没有搞清楚。现在知道,必须通过一个由 2', 5' 磷酸二酯键形成的“套环”结构,另外还有一类核蛋白体 (snRNP) 参与反应。反义 RNA 通过其碱基序列与相关的 mRNA 形成互补碱基对的方式影响 mRNA 的翻译。tRNA 是蛋白质生物合成中必不可少的一类 RNA。此外,它还有其它重要的生物功能。

生命现象是一个非常复杂的过程。它需要许多生物大分子,如核酸、蛋白质、多糖和脂类以及大量小分子有机化合物和无机盐类等的协同作用。1970年, Crick 用他修改过的中心法则高度概括了生命现象的根本规律。中心法则不仅指出了遗传信息的流向并且认为 DNA、RNA 和蛋白质是生命规律的核心。DNA 储存遗传信息并决定物种的遗传和变异。RNA 储存和传递遗传信息并在遗传信息的表达过程中表现功能。蛋白质表现遗传性状。由此可见 DNA、RNA 和蛋白质这三种生物大分子都是非常重要的。要深刻认识生命规律必须全面研究三者的结构与功能以及它们之间的相互关系,任何偏废都是不可取的。

1972年 Berg 实验室首创的重组 DNA 技术为人类利用它来大量生产有用的基因产物、治疗遗传疾病、改良动植物品种甚至创造新物种开辟了广阔的道路。重组 DNA 技术是生物工程中的一项重要内容。世界各国正在竞相建立生物工程公司,其趋势正如同雨后春笋,方兴

未艾。这种技术也为深入研究生命现象提供了一种广泛被采用的实验方法。但是,它毕竟是应用科学。生命现象中还有许多新的规律有待人们去研究,去认识。没有对自然的深刻认识就不可能更好地改造自然。如果没有 DNA 双螺旋的发现,人工合成核酸的成功以及对许多核酸工具酶的大量基础研究,就不可能有今天的重组 DNA 技术。“求木之长者,必固其根本;欲流之远者,必浚其泉源;思国之安者,必积其德义。源不深而望流之远,根不固而求木之长,德不厚而思国之安,臣虽下愚,知其不可,而况于明哲乎!”^[1]。

本文介绍近几年来 RNA 研究中几个方面的新进展以及 RNA 生物功能的多样性,以期引起更多的人重视 RNA 的研究。

一、具有酶活性的 RNA

一般认为,细胞内的化学反应都是在生物催化剂——酶的催化下进行的;而所有的酶都是蛋白质或包括辅基的复合蛋白质。近几年发

现一些 RNA 也能催化自身和其它 RNA 分子发生化学反应。因此, RNA 也可以看作是一种酶。美国科罗拉多大学 (Boulder 分校) Cech 实验室首先发现了 RNA 具有酶活性, 并在研究 RNA 酶的催化作用方面做出了很有价值的贡献。Cech 命名具有酶活性的 RNA 为“核酶” (ribozyme)。他们以及其它实验室在这方面的工作改变了酶都是蛋白质的传统观念。

1977 年以来, 发现许多真核细胞 mRNA 前体的拷贝区不是连续的, 而由一至数段居间序列 (intervening sequence, IVS) 分开。这些 IVS 在 mRNA 成熟过程中被除去。以后又发现一些真核细胞的 rRNA 和 tRNA 前体中也有这种 IVS。近年来, 世界上许多实验室对细胞核 mRNA、rRNA 和 tRNA 前体的成熟过程进行了大量深入的研究。在研究中逐步弄清了 RNA 成熟过程的一些反应机制。其中最突出的就是发现某些低等真核生物的细胞核 rRNA 前体以及线粒体 mRNA 前体和 rRNA 前体在成熟过程中的自我剪接 (self-splicing) 反应。换言之, 这些 rRNA 和 mRNA 前体除去自身的 IVS 时是自我催化进行的; 反应过程不需要蛋白质的参加。在这方面研究得最多, 反应机制了解得比较详细的是四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*) 大核 rRNA 前体的自我剪接。

四膜虫是一种鞭毛原生动动物。在它的细胞大核期间, 其 26S rRNA 基因中有一段内含子 (intron)。这个基因转录出的 rRNA 前体中相应于这段内含子的核苷酸序列即 IVS。这段 IVS 在 rRNA 前体成熟过程中被除去, 接着 5' 外显子 (exon) 和 3' 外显子连接为成熟的 rRNA。除去 IVS 和连接外显子的全过程称剪接。四膜虫大核 rRNA 前体在离体条件下的剪接只需要 Mg^{++} 和鸟苷或 5' 鸟苷酸, 不需要蛋白质的催化, 因此称自我剪接^[2]。如图 1 所示, 剪接反应可以分为两步。在这两步反应中仅涉及转磷酸酯作用, 不增加磷酸二酯键的数目。这个反应特点说明了在外显子连接过程中不需要 ATP 或 GTP 等提供外源能量。在第

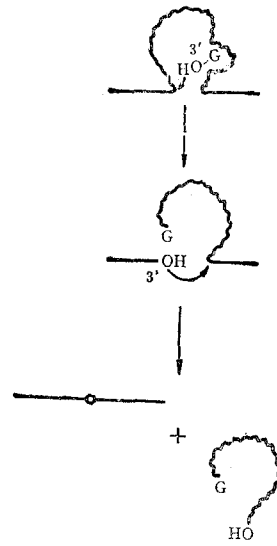


图 1 四膜虫大核 rRNA 前体自我剪接机制

一次转磷酸酯反应中, 鸟苷 (或 GTP、GDP、GMP) 的 3' 羟基作为亲核试剂进攻 IVS 的 5' 剪接点。鸟苷通过自己的 3' 羟基与 IVS 的 5' 磷酸共价连接。这时 3' 外显子仍与 IVS 相连。然后, 5' 外显子中 3' 端的羟基作为亲核试剂参与第二步转磷酸酯反应, 即这个 3' 羟基进攻 IVS 的 3' 剪接点, 通过转磷酸酯反应使 5' 外显子与 3' 外显子相连, 得到成熟的 rRNA。

重组的四膜虫大核 rRNA 基因的一部分片段 (含 IVS), 用大肠杆菌 RNA 聚合酶在细胞外转录出的 rRNA 前体也能发生自我剪接反应。这说明四膜虫 rRNA 前体的自我剪接是它自身固有的特性, 排除了任何蛋白质的催化作用。

四膜虫的 IVS 自身环化反应也是通过转磷酸酯作用进行的。IVS 3' 端鸟苷的 3' 羟基进攻 IVS 5' 端附近的磷酸二酯键, 结果使 IVS 失去 5' 端 15 个核苷酸而形成一个由 3'-5' 磷酸二酯键相连的环状分子。IVS 开环后按上述方式第二次环化, 5' 端又失去 4 个核苷酸形成一个较小的环状分子。最后开环得到一个总共失去 19 个核苷酸的线状 IVS, 简称 L-19 IVS。

四膜虫 rRNA 前体的自我剪接与其自身的天然结构有密切关系。高温、高浓度变性剂以及与 IVS 互补的寡聚脱氧核苷酸等都能使

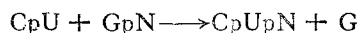
rRNA 前体的自我剪接活力丧失。镁离子对于维持 IVS 的二、三级结构以及它的自我剪接活力都是必需的。目前尚难确定 Mg^{++} 的作用是直接的还是间接的。

四膜虫大核 rRNA 前体中的 IVS 有六段比较保守的核苷酸序列。它们的排列次序为：(5')9R'-A-B-9L-9R-2(3')。这些保守序列是以配对方式存在的，即 A-B 对，9L-2 对以及 9R-9R' 对。这种配对方式将 IVS 折叠成一定的二级和三级结构。用核酸酶部分水解或化学修饰等方法证明这种构型基本上是正确的。在序列 2 中有一个碱基发生变化就会破坏 IVS 的功能。序列 9L 中置换两个碱基也能破坏 IVS 的功能。如果在序列 2 中再置换两个互补碱基，则 IVS 的活力又可以恢复。同样，9R 中两个碱基或 9R' 中两个碱基发生突变，IVS 也丧失了自我剪接的活力。在 9R 和 9R' 中两个碱基再发生一次补偿突变，又可以恢复它的自我剪接功能。这些事实都说明，序列 2 和 9L，序列 9R 和 9R' 必须以碱基配对方式维持 IVS 的特定结构，它才有催化活力。

上述四膜虫 rRNA 前体中 IVS 的自我剪接和自身环化反应都是分子内反应。失去 19 个核苷酸的线状分子 L-19 IVS，由于自身缺少环化点，不再能催化分子内的反应，却能催化其它 RNA 分子的水解和连接反应。例如，以寡聚 C 为底物，L-19 IVS 有核苷酸转移酶（即寡聚 C 聚合酶）和磷酸二酯酶的活力。寡聚 C 的 3' 端有磷酸时，L-19 IVS 有磷酸转移酶和酸性磷酸酯酶的活力。以上四种反应的特点是 L-19 IVS 的 3' 端鸟苷 (G_{414}) 的 3' 羟基与底物首先形成磷酸二酯键。另外，L-19 IVS 还有第五种酶活力，即 RNA 限制性内切酶活力。这种酶反应不需要在酶和底物之间形成共价键。

四膜虫 (*T. thermophila*) 大核 rRNA 前体中 IVS 的核苷酸序列已经测出，含有 413 个核苷酸。自我剪接时，其 5' 端加上一个鸟苷为 414 个核苷酸。四膜虫 (*T. pigmentosa*) 的 rRNA 前体中 IVS 则为 407 个核苷酸。

Kay 和 Inoue 报告，四膜虫的 IVS 5' 端删去 21 个核苷酸，3' 端除去 5 个核苷酸后得到一个更小的片段称 L-21 Scal IVS。这个更小的 IVS 能够催化 GpN (N 为 A, C, G 或 U) 和亲核试剂 CpU 之间的转磷酸酯反应，生成三核苷二磷酸：



与四膜虫大核 rRNA 前体的 IVS 结构相似的还有一些真菌线粒体 rRNA 前体和 mRNA 前体中的 IVS，如粘菌 (*Physarum polycephalum*) 细胞核 rRNA 前体以及玉米和蚕豆叶绿体 tRNA 前体中的 IVS 等。现在还不知道这类 IVS 是否也有自我剪接的活性。

我们将各种杂志上近几年发表的已知具有自我剪接活力的九种 rRNA 和 mRNA 前体的 IVS 总结在表 1 中。从它们的结构特征和催化机制方面看，这些 RNA 可分为两类：第一类与四膜虫大核 rRNA 前体的 IVS 结构相似，催化反应需要 Mg^{++} 和鸟苷或 5' 鸟苷酸，IVS 生成环状中间物。第二类 IVS 的结构与四膜虫的不同而与细胞核 mRNA 前体中的 IVS 相似。它们的催化反应需要 Mg^{++} ，但不需要鸟苷类核苷酸。催化机制是 IVS 中一个腺苷酸的 2' 羟基进攻 IVS 的 5' 剪接点形成 2'-5' 磷酸二酯键，接着 IVS 的 3' 剪接点断开，形成一个套环 (ariat) 结构状的 IVS。值得提出的是，酵母线粒体 rRNA 前体的 IVS 有的形成环状结构，有的则形成套环结构。两种形式都是自我剪接的结果^[8]。近来还不断发现新的具有自我剪接活力的 RNA。例如，Xu 等报告，T4 噬菌体 mRNA 前体中就有另外新的 IVS (全长约 1000 个核苷酸) 也有自我剪接活力。值得注意的是，最近 Hannon 等发现，细胞核 rRNA 前体在没有蛋白质的离体条件下也有自我催化现象。他们没有说明是什么生物的细胞核。

除 rRNA 和 mRNA 前体中 IVS 具有自我剪接的活力外，还有下面一些其它的例子说明 RNA 具有酶的催化活性。

(1) RNase P 中的 RNA: RNase P 是专

表1 具有自我剪接活力的 rRNA 和 mRNA 前体中的 IVS

| 编号 | IVS 来源 | 鸟苷或 5' 鸟苷酸, Mg ⁺⁺ | 环状结构 | 套环结构 (2'-5') | 自我剪接 | 参考文献 |
|-----|---|------------------------------|------|--------------|------|---------|
| 1 | 四膜虫 (<i>Tetrahymena thermophila</i>) 的 26 S rRNA 前体 | + | + | | + | [2] |
| 2 | 红色面包霉菌突变株 (<i>N. crassa</i> , Cyt-18-1) 的线粒体细胞色素 b (Cob) mRNA 前体中第一个 IVS | + | + | | + | [3] |
| 3 | 酵母 (<i>S. cerevisiae</i> , KL-14-4A) 线粒体核糖体大亚基 RNA 前体 | + | + | | + | [4, 5] |
| 4 | 酵母 (<i>S. cerevisiae</i>) 线粒体细胞色素 b mRNA 前体中第五个 IVS | + | +(?) | | + | [6] |
| 5 | 大肠杆菌 T4 噬菌体 (<i>E. coli</i> T4 alc4) 胸腺嘧啶核苷酸合成酶 mRNA 前体中一个 IVS (1017个核苷酸) | + | + | | + | [7] |
| 6 | 酵母 (<i>S. cerevisiae</i> , KL-14-4A) 线粒体核糖体大亚基 RNA 前体 | + | + | + | + | [8] |
| 7 | 酵母 (<i>S. cerevisiae</i> , 777-3A) 线粒体脱辅基 (apo) 细胞色素 b (Cob) mRNA 前体中第一个 IVS | | | + | + | [9] |
| 8 | 酵母 (<i>S. cerevisiae</i> , KL-14-4A) 线粒体细胞色素氧化酶(亚基 I) mRNA 前体中 IVS (at5c) | | | + | + | [10] |
| 9 | 酵母 (<i>S. cerevisiae</i> , D273-10B) 线粒体细胞色素 C 氧化酶(亚基 I) mRNA 前体中第五和第七个 IVS | | | + | + | [11,12] |
| 10* | 细胞核 mRNA 前体中的 IVS | | | + | | [13] |

* 表内列出细胞 mRNA 前体中 IVS 是为了同其它自我剪接的 IVS 作比较。

一水解 tRNA 前体 5' 端部分的酶。大肠杆菌的 RNase P 由蛋白质和 M1 RNA 两部分组成^[4]。在适当条件如较高浓度的镁离子存在下,单独的 M1 RNA 就可以催化 tRNA 前体的成熟,而单独的蛋白质就没有这种作用。RNase P 广泛存在于细菌、酵母、家蚕和哺乳动物组织之中。用纯化的大肠杆菌 RNase P 的蛋白质和 M1 RNA 已经成功地重组成了有活性的同源全酶。最近,Gold 和 Altman 又用大肠杆菌 RNase P 的蛋白质和 M1 RNA 分别同人 Hela 细胞的 RNase P 的 RNA 和蛋白质重组成为有活性的异源 RNase P。

Guerrier-Takada 和 Altman 发现,大肠杆菌 RNase P 的 M1 RNA 有一个活性核心。他们用核酸酶除去 M1 RNA 3' 端 122 个核苷酸,剩余部分虽然比完整的 M1 RNA 的活力低,还是有活力的。5' 端除去 70 个核苷酸则完全丧失了活力。看来 M1 RNA 的完整末端结

构对维持催化活性需要的高级构型是必要的^[15]。

(2) 植物类病毒 RNA: 植物类病毒是一类没有蛋白质外壳的单链环状 RNA 分子,由约 240—370 个核苷酸组成。它侵染寄主植物细胞后,植株的发病率很高,危害很大。自 1967 年 Diener 和 Raymer 发现马铃薯纺锤形块茎类病毒 (PSTV), 1978 年 Gross 等测定了它的核苷酸序列以来,全世界已发现了 17 种类病毒,其中有 13 种类病毒完成了核苷酸序列分析。

关于类病毒的复制机制,有几种不同的看法。一种观点认为,类病毒 RNA 有自我复制和自我剪接的能力。用分子杂交实验法测定的结果指出,无论在健康或染病植株的细胞中都不存在与类病毒 RNA 互补的 DNA 片段。这些结果排除了类病毒 RNA 与反转病毒 (retrovirus) 的 RNA 有相同的复制机制的可能性。

类病毒的环状 RNA 分子为滚环式复制机制提供了有利的条件。以环状正链 RNA 分子为模板,可以复制出含有二至多个拷贝的负链 RNA 分子。Robertson 等发现, PSTV 的 RNA 二聚体也能有效地自我剪接为 RNA 单体。在离体条件下加热-冷却处理四膜虫大核的 IVS 也会出现多聚体。类病毒 RNA 与四膜虫大核的 IVS 在这方面非常相似。

关于类病毒的起源,也是说法各有不同。其中一种看法认为,类病毒起源于 IVS。大多数类病毒与 U1 RNA (snRNA 的一种) 5' 端的核苷酸序列同源性很高,似乎支持这种观点。U1 RNA 与 mRNA 的剪接有密切的关系。这种小分子 RNA 也存在于植物细胞核之中。在 mRNA 前体剪接过程中, U1 RNA 与 mRNA 前体的 IVS 的两端相结合。IVS 环化以后形成与类病毒相似的环状 RNA。类病毒很可能就是“逃逸”的 IVS。

Sullivan 和 Uhlenbeck^[46] 用 T7 RNA 聚合酶在人工合成的 DNA 模板上合成了两种寡聚核糖核苷酸片段(19 和 24 核苷酸)。这些片段与植物类病毒等的自我断裂片段处的核苷酸序列相似。两种片段在镁离子存在下于 37°C 保温时, 19 核苷酸催化 24 核苷酸片段迅速断裂为 18 核苷酸片段(3' 端有 2', 3' 环化磷酸)和 6 核苷酸片段(5' 端有羟基)。这个 19 核苷酸片段是目前已知的最小的具有催化活性的核苷酸片段。

Klug 实验室发现,铅离子结合在酵母苯丙氨酸 tRNA 的特殊位置上以后,在适当 pH 条件下能催化这种 tRNA 断裂。Uhlenbeck 进一步报告, tRNA^{Phe} 可以断裂为两个半分子。其中的一个半分子与铅离子结合后催化另一个半分子的断裂。这一类“核酶”具有特殊的意义,因为它是一种金属酶,而金属对增强这种原始的“核酶”的催化活力是很重要的。

(3) 植物病毒的卫星 RNA: 某些植物病毒的线状卫星 RNA 在复制过程中可以由多拷贝的 RNA 分子经自我催化,生成单体卫星 RNA。例如烟草环斑病毒 (STRSV) 卫星 RNA

在没有蛋白质参与的离体情况下可以由二或三聚体 RNA 自我剪接为单体 RNA。另一类环状单链卫星 RNA (亦称拟病毒),例如紫花苜蓿短胫条纹病毒 (vLTSV) 的正链和负链 RNA 都可以在离体情况下自我剪接。

(4) 大肠杆菌 T4 噬菌体侵染细菌以后转录出的某些 mRNA,如胸腺嘧啶核苷酸合成酶的 mRNA 前体也可以进行专一性的自我剪接^[7]。

(5) 核糖体是一种复杂的酶系。它是由几种 RNA 和几十种蛋白质组成的高度复杂的细胞器,是蛋白质生物合成的唯一场所。肽键的生成就是在核糖体上进行的。其个别组分或局部组分都不能催化肽键的生成。由于只有酶(蛋白质)才能催化细胞内化学反应这一传统观念的束缚,过去一直认为催化合成肽键的化学反应的也只能是核糖体上的蛋白质,而 RNA 只不过是构成核糖体的支架而已。近年来越来越多的资料证明,核糖体 RNA 具有高度的保守性;另外,还发现核糖体 RNA 的药物抗性突变等。这些事实迫使人们必须重新评价它的生理功能。16S RNA 和 23S RNA 一起形成的双体复合物辅之以少数核糖体蛋白质似能催化蛋白质合成中的若干化学反应。这些结果说明,核糖体 RNA 本身可能具有酶的活性。

和“先有鸡还是先有蛋”这个长期争论尚无定说的问题一样,在生命起源的初期究竟先有核酸或是先有蛋白质也是多年来争论不休的问题。从分子生物学的观点看,没有核酸的信息(模板)就不可能合成蛋白质;但如果没有蛋白质的催化活性(酶)也就不能合成核酸。发现 RNA 具有催化活性,不但改变了酶都是蛋白质的传统观念,而且打开了人们的眼界,提出 RNA 不但有降解活力,也可能在远古时代具有合成(复制)的活力(L-19 IVS 具有聚合酶活力似乎支持这个看法)。这种 RNA 可以称为“酶化石”。在亿万年的演变下, RNA 的某些酶活力逐渐丧失(为后来的蛋白质所取代),但仍留下一些酶活力。因此, RNA 很有可能是生命起源中首先出现的生物大分子。换句话说,先有核酸

然后才有蛋白质。在生物大分子中，DNA 是遗传信息的载体，蛋白质是表达遗传信息的功能分子，唯有 RNA 具有信息分子和功能分子这样两种作用。因此，在核酸中 RNA 的出现又应该早于 DNA。

二、细胞核 mRNA 前体的剪接

细胞核 mRNA 前体(也称 hnRNA)的剪接是一个很复杂的问题。其反应机制的细节还远没有搞清楚。从十年前发现细胞核 mRNA 前体中有 IVS 以来，人们就着手研究细胞内去除这种 IVS 的机制。到现在虽然积累了一些可靠的资料，对细胞核 mRNA 前体剪接机制的了解还只是一个粗略的轮廓。

与上述某些真菌线粒体 mRNA 前体的剪接相比，细胞核 mRNA 前体的剪接有相同之处，也有明显不同的地方。细胞核 mRNA 前体的剪接反应，现在已经研究过的大多数都是通过 IVS 中腺苷酸的 2' 羟基与 IVS 5' 端剪接点的磷酸形成一个由 2'-5' 磷酸二酯键连接的套环。这个套环的尾部是 IVS 的 3' 端部分

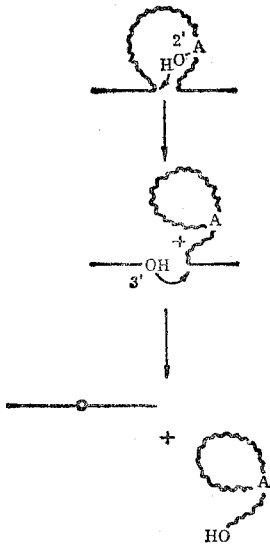


图2 细胞核 mRNA 前体剪接机制

(图2)。5' 外显子与 3' 外显子连接为成熟的 mRNA^[13]。这与上述真菌线粒体 mRNA 前体的第二类 IVS 的剪接反应相同。但是，一个明显的不同是细胞核 mRNA 前体不能进行自我剪

接。它的剪接反应必须由一类细胞核的核蛋白体 (snRNP) 参与反应^[17]。

snRNP 中有一类稳定的小分子 RNA (snRNA)，其大小约 60—200 个核苷酸。snRNA 的核苷酸序列相当保守，其 5' 端有一种独特的帽子结构，即含有一个稀有核苷(2, 2, 7-三甲基鸟苷)，由这种稀有核苷可以制备专一的抗体。每一种 snRNA 与约 10 种不同的蛋白质组成一种 snRNP。目前已知与 mRNA 前体剪接有关的 snRNP 有许多种，如 U1, U2, U3, U4, U5, U6, U7, U8, U9, U10。在 mRNA 前体剪接反应中，它们分别与 IVS 的 5' 剪接点，腺苷酸支链点和 3' 剪接点相结合。

最早观察到 snRNP 在 mRNA 前体剪接反应中起重要作用的是抗体抑制实验。snRNP 抗体可以抑制细胞核和细胞抽提液的剪接反应。后来用小球菌核酸酶降解 snRNA 使 snRNP 在剪接反应中丧失活力，直接证明了 snRNA 在 mRNA 前体剪接反应中发挥重要作用。

除 snRNP 外，剪接反应还需要另一类细胞核蛋白质——hnRNP 蛋白质。snRNP 结合 mRNA 前体的特定部位时，需要另外两个蛋白质因子。其中一个可以增强 U1 snRNP 与 5' 剪接点的结合力；另一个因子则专一地与 3' 剪接点相结合。高浓度镁离子可以使这些蛋白质因子与 snRNP 解聚。上述这些蛋白质因子、snRNP 和 mRNA 前体似乎是剪接体 (spliceosome) 的主要组分。剪接体在细胞内呈动态结构。它的形成过程大致如下：首先 U1 和 U5 snRNP 分别与 mRNA 前体的有关位点结合，hnRNP 蛋白质与 IVS 的中间区非专一性结合。这样就形成了一个包括 mRNA 前体在内的初始复合物 (35—40S)。第二步，5' 剪接点断裂后形成套环结构。U4 和 U6 snRNP 与套环结构结合形成更大的复合物 (50—60S)。从抽提液中除去 hnRNP 或使 snRNP 失活，就不能再形成这个大的复合物。

与核糖体相似，剪接体也有自己的核心结构 (snRNP) 以及其它与功能有关的活性因

子。不少实验室想分离纯化完整的剪接体，都还没有成功。因为它常与细胞抽提液中的蛋白质和 RNA 结合在一起。采用非常温和的处理手段也往往导致剪接体的解离。

在剪接体中有重要功能的 snRNP 的作用机制的细节现在还很不清楚。一些实验结果表明，snRNP 中的 snRNA 催化 mRNA 前体的剪接，而其中的蛋白质仅起着维持 RNA 特定二级和三级结构的作用。这里，snRNA 的功能似乎与 RNase P 中的 RNA 相同。但是，RNase P 中的 RNA 可以单独催化水解 tRNA 前体，snRNA 则不能单独催化 mRNA 前体的剪接反应。有一种观点认为，snRNP 的功能象一付网架，它只能把 mRNA 前体中有关的核苷酸序列安置在适当的二级和三级结构之中，mRNA 前体的剪接也是自我催化进行的。snRNP 中的蛋白质和 RNA 都没有催化活性。果真如此的话，则 RNA 的自我剪接更具有普遍的意义。

细胞核 mRNA 前体的剪接也有不是通过 IVS 中腺苷酸的 2' 羟基形成支链的。人的生长激素 (hGH) mRNA 前体的剪接就是这种情况。hGH 的 mRNA 前体中共有四个 IVS。在第一个 IVS 的 3' 剪接点以左 56 个核苷酸中并没有腺苷酸。它的剪接是通过 -28 (3' 剪接点以左称负) 的胞苷酸 2' 羟基与 5' 剪接点的磷酸形成 2'-5' 磷酸二酯键支链。在少数情况下，-22 和 -36 位的尿苷酸也可以形成 2'-5' 支链。这些事实说明，腺苷酸不是形成支链绝对必需的，而距 3' 剪接点的距离却是形成支链的重要因素^[18]。

对于细胞核 mRNA 前体的剪接反应研究得比较多的是酵母和哺乳类动物。两者有许多相似之处，也有很多不同的特点。第一，酵母的 5' 剪接点和支链区域的核苷酸序列的保守性较强，而动物的相应区域则变化较大。第二，酵母类的剪接点和支链点区域发生突变导致剪接失活，而哺乳动物的相应区域发生突变后仍能形成套环结构。在这种情况下，哺乳动物就改用其它隐蔽的剪接点。第三，与多细胞动物不

同，大多数酵母的 3' 剪接点区域不富含嘧啶核苷酸。其它实验也表明，在酵母类中聚嘧啶核苷酸对 5' 剪接点和套环结构可能也不是主要的。以上事实说明，单细胞真核生物与多细胞生物的剪接点和支链点区域在剪接反应中是不相同的。

综观上述“核酶”RNA 和 mRNA 的一些新鲜事实，RNA 领域中值得深入研究的问题还很多。例如，具有催化活性 RNA 的普遍意义，四膜虫大核的 IVS 的自我复制等。尤其对细胞核 mRNA 前体剪接机制的研究对深刻理解真核细胞的基因表达更显得非常重要。

三、反义 RNA 在基因表达中的调控作用

过去一般认为，无论在原核或真核细胞中结构基因的表达都是通过调节基因产生的蛋白质来调控的(包括正负调控)。近年来，发现一些调节基因产生的 RNA 也可以有效地调控基因的表达。这些调控基因称反义基因。由反义基因转录出的 mRNA 称反义 RNA (antisense RNA)。反义 RNA 以通过其碱基序列与相关 mRNA 的碱基序列形成互补碱基对的方式来影响 mRNA 的翻译，从而调控相应于这种 mRNA 的基因的表达。反义 RNA 对基因表达的调控是非常专一的。

首先是在细菌中发现了天然反义 RNA 基因。这个发现启发人们考虑可否用引入人工反义基因或反义 RNA 的办法控制细胞内肿瘤基因、病毒基因、遗传缺陷基因以及其它有害基因等的表达，进一步达到治疗肿瘤、病毒性和遗传疾病的目的。

用人工反义 RNA 首先成功地抑制了简单疱疹病毒的胸腺嘧啶核苷激酶 (HSV-TK) 基因在小鼠 LTK⁻ 细胞中的表达^[19]。这个成功的实验为用人工反义 RNA 调控真核细胞基因表达展现了美好的前景。此后，这方面的成功例子就越来越多。目前已知有约二十种真核细胞基因可以用人工反义基因 (DNA) 或反义 RNA 不同程度地抑制它们的表达。使用的是

微量注射或细胞转化的方法。

除 Thompson-Jager 和 Domdey 最近报道的酵母肌动蛋白质 mRNA 的反义 RNA 外,至今尚未发现其它的真核细胞的反义基因。但是,从反义 RNA 的定义看,真核细胞中有不少 RNA 表现出反义 RNA 的功能。

某些真核细胞 mRNA 分子内的碱基配对使 mRNA 自我折叠而产生双链区。多数情况下,这种双链区影响 mRNA 中起始密码子 AUG 附近的二级和三级结构,从而控制 mRNA 的翻译。例如,人细胞肿瘤基因 *c-myc* 转录的 mRNA 中有三段外显子。第一段外显子不编码蛋白质。第二段外显子含有第一个起始密码子 AUG。第一段外显子的部分核苷酸序列与第二段外显子的部分序列形成互补的茎环双链区。在正常的生理条件下, mRNA 中的第一个 AUG 由于处于二级、三级结构之中而不能翻译。基因移位后,这个 mRNA 失去了第一段外显子,结果改变了第二段外显子的二级结构,使起始密码子 AUG 容易与核糖体结合而翻译出蛋白质,肿瘤基因就可以表达了。人的其它肿瘤基因也有类似的情况。

细胞核 snRNA 与 mRNA 前体的剪接点区域形成互补双链区,使 mRNA 前体发生剪接反应。例如, U1 RNA 的 3' 端序列与 mRNA 前体中的 IVS 的 5' 端剪接部位结合形成互补双链区,使 mRNA 前体剪接为成熟 mRNA。因此, snRNA 也可以看作反义 RNA。

细胞质中有一类小分子 RNA 可以影响 mRNA 的翻译。例如,鸡胚胎肌肉细胞中有一类富含 U 的小分子 RNA 称为控制翻译 RNA (tcRNA)。有些 tcRNA 通过与肌球蛋白重链 (MHC) mRNA 的聚 A 杂交而控制 MHC 的合成。鸡胚胎肌肉细胞中还有另一类小分子 RNA (70—90 个核苷酸),不富含 U 也不是 snRNA 和 tRNA。这类 RNA 称 iRNA。它们可以同几种不同的蛋白质形成 10S 的核蛋白体 (iRNP)。iRNA 和 iRNP 都可以抑制 mRNA 的翻译。其作用机制可能是通过它们与 mRNA 形成碱基配对的双链区域,因而阻

碍了 mRNA 与核糖体的结合。这类 iRNA 抑制 mRNA 翻译的专一性如何尚待进一步研究。如果把以上这许多小分子 RNA 都看作反义 RNA 的话,则真核细胞中可能存在很多反义 RNA。

四、对 tRNA 功能的新认识

自从二十世纪五十年代发现 tRNA 以来,弄清楚一级结构的 tRNA (各种生物来源和接受各种氨基酸的)已有数百种之多。tRNA 在蛋白质生物合成中起着关键的作用,是翻译核酸遗传信息成蛋白质一级结构的过程中必不可少的一类 RNA。由于它的功能重要,结构相对来说来又比较简单,一直是广大生物化学、生物物理学、分子生物学和分子遗传学工作者重视的课题。从 1967 年在苏联里加举行第一届 tRNA 国际学术讨论会起,每隔 1 或 2 年就举行一次国际性的 tRNA 专题讨论会,到今年在瑞典尤密奥举行的讨论会已有十二次之多,可作为一个佐证。虽然如此,对 tRNA 功能的认识,对它的结构和功能的的了解仍然是不够的。除了在蛋白质生物合成中的重要功能外,它还有其它方面的重要功能。

(1) 作为反转录的引物:反转录病毒在宿主细胞中复制时必须先将它的 RNA 反转录为互补的 DNA 链(由病毒反转录酶催化)。这个过程需要 tRNA 作引物。不同的反转录病毒使用不同种类的 tRNA 作引物^[20]。鸟类的 C 型反转录病毒,如劳氏肉瘤病毒(RSV)、鸡的自发肉瘤病毒(ASV-Y73)、滕浪肉瘤病毒(FSV)、鸟类的成纤维细胞肉瘤病毒(AMC 29)等病毒的反转录酶以 tRNA^{Trp} 为引物。哺乳动物的 C 型反转录病毒,如啮齿类动物白血病毒(MMLV)、肉瘤病毒(MMSV)、Abelson 白血病毒(AbMLV)、FBJ 骨肉瘤病毒(FBJ)、狗的福氏胰脏成焦病毒(FSFPV)、猫的肉瘤病毒(FSV)、狒狒的内源病毒(BaEV)、猿类的肉瘤病毒(SSV)、人类的成人 T 细胞白血病毒(ATLV)和鸟类的胰脏坏死病毒(SNV)的反转录酶以 tRNA^{Pro} 为引物。人类的艾滋

病病毒则以 tRNA^{Lys} 为引物。另外,还有一个鼠类乳腺瘤病毒 (MMTV) 是已知的用 tRNA^{Lys} 为引物的另一类病毒。原因是这三类病毒的 RNA 基因组内有一段核苷酸序列分别和三种 tRNA 中 3' 端的一段核苷酸序列互补。为什么有这种差异,能否利用这种差异作为防治艾滋病病毒感染和发病的一种手段,值得重视和研究。

(2) 在蛋白质的 N 端加上一个氨基酸: 大肠杆菌和哺乳动物组织中有一种酶可以将精氨酰-tRNA^{Arg}、亮氨酰-tRNA^{Leu} 和苯丙氨酰-tRNA^{Phe}[21] 中的精氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸以肽键形式连接到蛋白质的 N 端。反应过程中不需要镁离子,排除了这些氨酰-tRNA 通过核糖体参加蛋白质生物合成的途径来完成上述反应的可能性。

(3) 合成细菌细胞壁: 细菌细胞壁由多糖和短肽 (1—5 个 L 或 D 型氨基酸) 组成。短肽之间又形成支链。凡有 L 型氨基酸出现,它的前体就是氨酰-tRNA。在表面葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*, Texas 26) 细胞壁的短肽中发现有甘氨酸和丝氨酸。这两种氨基酸都有它们的相应 tRNA。它们与细菌的蛋白质生物合成无关,仅参与细菌细胞壁中糖肽的合成。甘氨酸的两个同受体 tRNA^{Gly} 已经完成了核苷酸序列分析[22]。这两个 tRNA^{Gly} 的结构特点是稀有核苷的种类数目都少,具有三叶草结构。它们的反密码子都是 UCC。

(4) 合成氨酰磷酸酯酰甘油: 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 中有一种酶可以催化赖氨酰-tRNA^{Lys} 上的赖氨酸转移到磷酸酯酰甘油上,合成赖氨酰磷酸酯酰甘油。韦氏芽孢梭菌 (*Clostridium welchii*) 的酶则以丙氨酰-tRNA^{Ala} 作为底物合成丙氨酰磷酸酯酰甘油[23]。现在还不知道这些特殊的 tRNA 是否参与蛋白质生物合成。

(5) 依赖泛素的动物蛋白质降解的组分: 动物细胞内蛋白质的降解代谢是非常重要的。已知这种降解代谢有溶菌体和非溶菌体两个途径。在后一途径中,泛素(由保守性很强的含

76 个氨基酸的多肽组成) 首先与蛋白质共价结合,需要 ATP 提供能量。最近有两家实验室分别报告,在这后一途径中需要 tRNA^{His} 和 tRNA^{Arg}[24] 参与反应。

(6) 含硒的 tRNA: 在细菌和培养的动物细胞中,一些 tRNA 分子中的硫可以由硒取代,出现含硒的稀有核苷。这些含硒的 tRNA 在氨酰化、辨别密码子以及促进 mRNA 翻译过程中有重要的功能。这个特点在生物工程中将会有应用价值。高等植物,如野生胡萝卜 (*Daucus carota* L) 细胞中至少存在三种含硒的 tRNA[25]。

(7) 在氨基酸合成中的作用: 巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 等几种细菌中有一种氨酰化酶。在 ATP、Mg⁺⁺ 和 L 谷氨酰胺或 L 天门冬酰胺存在下,这种酶催化谷氨酰-tRNA^{Glu} 变成谷氨酰胺-tRNA^{Gln}[26]。

(8) 脂多糖的合成: 大肠杆菌中还有一种转氨酰酶催化甘氨酰-tRNA^{Gly} 中的甘氨酸转移到脂多糖中生成甘氨酰脂多糖[27]。

(9) 合成叶绿素: 叶绿素和血红素都是卟啉的衍生物。卟啉是由八个 δ -氨基乙酰丙酸分子缩合而成。血红素的 δ -氨基乙酰丙酸的碳原子来自乙酸和甘氨酸;叶绿素的 δ -氨基乙酰丙酸的碳原子则来自酮戊二酸,由谷氨酸提供。当谷氨酸结合在 tRNA^{Glu} 上时,它被还原成谷氨酸半醛,再经专一性转氨酶的作用生成 δ -氨基乙酰丙酸。叶绿素在植物界以及对人类生活的重要性毋庸强调, tRNA^{Glu} 在叶绿素合成中起着重要的作用,则是新近才发现的[28]。

以上事实说明,就象 tRNA 这类大家所熟悉的化合物,人们还是随着研究的深入才逐渐有所了解。

RNA 的研究是分子生物学的一个重要方面,必须和 DNA 及蛋白质的研究一样给予同样的重视,才能对生命活动的规律有完整和正确的认识。为了迅速改变我国贫穷落后的面貌,提高人民的生活水平,提倡基因工程、蛋白质工程无疑是对的,但不能因此而看不到进行 RNA 基础研究的重要性。因为对 RNA 有更

多的了解,不但有助于阐明生命活动的规律,也将有助于推动基因工程,蛋白质工程的更加蓬勃地发展。党的继续支持和重视基础研究的政策是十分正确的,一定会得到广大科技人员的拥护和认真执行。

参 考 文 献

- [1] 魏征,见“古文观止”[清]吴楚材吴调侯选注,安平秋点校(下),中华书局,1987年,277页。
- [2] Cech, T. R. et al.: *Cell*, 1981, 27, 487.
- [3] Garriga, G. and Lambowitz, A. M., *Cell*, 1984, 39, 631.
- [4] Tabak, H. F. et al.: *Cell*, 1984, 39, 623.
- [5] Horst, G. and Tabak, H. F.: *Cell*, 1985, 40, 759.
- [6] Partono, S. and Lewin, A.: in “*RNA Processing*” (ed. T. R. Cech et al.), Cold Spring Harbor Laboratory New York 1987, 111.
- [7] Chu, F. K. et al.: *Cell*, 1986, 45, 157.
- [8] Arnberg, A. C. et al.: *Cell*, 1986, 44, 235.
- [9] Schmelzer, C. and Schweyen, R. L.: *Cell*, 1986, 46, 557.
- [10] Van der Veen, R. et al.: *Cell*, 1986, 44, 225.
- [11] Peebles, C. L. et al.: *Cell*, 1986, 44, 213.
- [12] Van der Veen, R. et al.: in “*RNA Processing*” (ed. T. R. Cech et al.), Cold Spring Harbor Laboratory New York, 1987, 105.

- [13] Padgett, R. A. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, 1985, 55, 1119.
- [14] Kole, R. et al.: *Cell*, 1980, 19, 881.
- [15] Guerrier-Takada, C. and Altman, S.: *Cell*, 1986, 45, 177.
- [16] Sullivan, F. X. and Uhlenbeck, O. C.: in “*RNA Processing*” (ed. T. R. Cech et al.), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1987, 163.
- [17] Maniatis, T. and Reed, R.: *Nature*, 1987, 325, 673.
- [18] Hartmuth, K. and Barta, A.: in “*RNA Processing*” (ed. T. R. Cech et al.), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1987, 74.
- [19] Izant, J. G. and Weintraub, H.: *Cell*, 1984, 36, 1007.
- [20] Chen, H. R. and Barker, W. C.: *Nucleic Acids Res.*, 1984, 12, 1767.
- [21] Leibowitz, M. J. and Soffer, R. L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1969, 36, 47.
- [22] Roberts, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 4787.
- [23] Gould, R. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1968, 243, 3096.
- [24] Ferber, S. and Ciechanover, A.: *Nature*, 1987, 326, 808.
- [25] Chen, C. S. et al.: *Current Topics in Cellular Regulation*, 1985, 27, 509.
- [26] Wilcox, M. and Nirenberg, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1968, 61, 229.
- [27] Gentner, and Berg, P.: *Fed. Proc.*, 1971, 30, 1218.
- [28] Kannagara, C. G. et al.: *Trends in Biochem. Sci.*, 1988, 13, 139.

[本文于1988年3月24日收到]

会议消息

第一届分子生物物理学术讨论会报道

中国生物物理学会分子生物物理学术讨论会,已于1988年12月15日至18日在福建省厦门市召开。与会代表近百人,其中半数以上具有高级研究技术职称,近三分之一是年轻的研究生,使会议既有较高的学术水准又比较生动活泼。

张龙翔教授等在会上作了综述报告,内容包括“蛋白质工程的进展”、“蛋白质天然态是否稳态”、“胰岛素空间结构与功能的关系”以及“酶活性部位的柔性”。既报道了国内外分子生物物理领域在理论和实践方面的前沿进展,也报道了他们从事这些领域的工作结果,使与会者对国内外的学术发展有了更深刻的了解。

会议的分组论文报告,内容涉及蛋白质、核酸等生物大分子的结构与功能研究;蛋白质工程研究;生物大分子的构象理论、分子设计及动力学研究等分子生物物理学问题。从这些报告反映出,我国对一些生物大分子空间结构的测定及其与生物功能关系的研究又有新的进展;以多种物理化学手段研究生物大分子溶液构象正在深入开展;酶的活力与构象变化关系的研究又取得一批新成果;对某些蛋白质分子的定向设计和改造标志着我国蛋白质工程研究新领域已有了长足的进步;以多种理论生物物理方法研究生物分子的空间结构与功能的关系也取得了可喜的进展。

会议还采取了科学墙报展讲与学术讨论“沙龙”相结合的新颖方式,在大厅四周布置科学墙报并讲解,中间备有桌椅及茶点,使学术交流更充分活跃。既有对科学墙报的讨论,也有对口头宣讲报告的深入探索;既有对新方法、新观点的相互切磋,又有不同观点的热烈争鸣,确实做到了充分的自由讨论,同时又提供了代表们会见老朋友结识新朋友的场所。

会上还由王大成、华庆新就“蛋白质分子的运动和改造”及“蛋白质二级结构的实测与预测”作了专题报告,介绍了国内外的动向,并作出了分析性评述。随后的专题讨论气氛活跃,在学术上达到了取长补短充分交流的目的。

(下转第22页)