

假 结 结 构

蒋 秉 坤

(蚌埠医学院, 蚌埠 233000)

提 要

某些植物病毒 RNA 的 3' 末端具有氨酰化作用的 tRNA-样结构。氨基酸接受臂由三个短的双螺旋片段在空间呈准连续堆砌的双螺旋组成的假结结构。假结结构也见于 RNA 的其它部位, 它可能是复杂 RNA 分子的一种结构成分。

关键词 tRNA-样结构, 假结结构, 准连续双螺旋

要了解生物大分子的生理功能必需详细地研究它们的一级结构和空间结构。继 Pauling (1951) 提出 α -螺旋是蛋白质分子结构的基本成分之后, Watson-Crick (1953) 发表了 DNA 分子的双螺旋结构模型。直到 1965 年 Holley 等报道 tRNA^{Ala} 77 个碱基的排列顺序和三叶草样的二级结构。在过去的 10 年里有关 RNA 分子或其片段结构与功能的研究虽已起步, 但所取得的成就远不能与 DNA 相提并论。本文拟就某些植物病毒 RNA 分子内的假结结构(pseudoknotted structure) 研究进展作一概述。

一、tRNA-样结构

Pinck 等(1970)和 Yot 等(1970)首先证实了芜菁黄花叶病毒(turnip yellow mosaic virus, TYMV), 芜菁黄花叶病毒组(tymoviruses)的典型成员, RNA 的 3' 末端能够接受缬氨酸, 提示它具有 tRNA-样结构(tRNA-like structure)和性质^[1,2]。Rietveld 等(1982)^[3]根据化学修饰和酶消化方法研究的结果提出 TYMV RNA 3' 末端片段 86 个核苷酸的二级结构, 即 tRNA-样结构的模型(图 1)。

Van Belkum 等(1987)^[4]证明芜菁黄花叶病毒组的另外 5 个成员: 肯尼迪黄花叶病毒(kennedya yellow mosaic virus, KYMV)、蝶豆

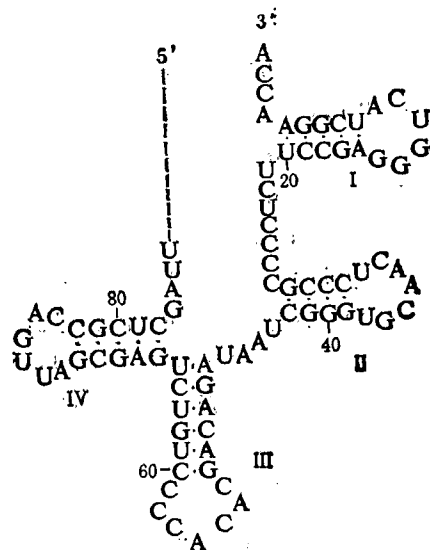


图 1 TYMV RNA 3' 末端片段的 tRNA-样结构

黄脉病毒(clitoria yellow vein virus, CYVV)、
 芒柄花黄花叶病毒(ononis yellow mosaic virus, OYMV)、安第斯马铃薯隐潜病毒(andeian potato latent virus, APLV)和茄子斑纹病毒(eggplant mosaic virus, EMV), 和烟草花叶病毒组的豇豆株(cowpea strain of TMV, CcTMV) RNA 的 3' 末端也有类似的二级结构。

tRNA-样结构有五个明显的结构区域, 即氨基酸接受臂和四个发夹区域(I、II、III 和 IV)。发夹 II、III 和 IV 分别相当于典型 tRNA 的

T Ψ C、反密码和双氢尿嘧啶干-袢。TYMV RNA 的 tRNA-样结构的反密码袢内有 CAC 碱基顺序,正好它也是缬氨酸的反密码子。和典型 tRNA 不同之处是多出一个发夹 I 区域,5' 末端不参与组成氨基酸接受臂,也没有 tRNA 中的许多稀有碱基。已经研究的几种芜菁黄花叶病毒组成员 RNA 的 tRNA-样结构虽然相似和有许多保留碱基,但仍然存在很多碱基的替换或改变。

tRNA-样结构在空间进一步折叠成与典型 tRNA 相似的 L 形结构。三个短的双螺旋片段共轴堆砌成 12 个碱基对的准连续 (quasi-continuous) 双螺旋的氨基酸接受臂^[3]。Pleij 等^[4]对此结构模型的建造已有详细阐述。

二、假结结构的形成

Rietveld 等(1982)应用化学修饰和酶消化方法研究 TYMV RNA 的 3' 末端片段的空间结构。碱基 C₂₄C₂₅C₂₆ 和 C₂₇ 在非变性条件下(缓冲液中含有 10mmol Mg²⁺)并不被硫酸二甲酯(dimethyl sulphate, DMS)裂解,在半变性条件下(缓冲液不含 Mg²⁺, 含有 1mmol EDTA, 37℃)只受到轻度的攻击,但是在完全变性情况下(缓冲液与半变性相同, 90℃),上述碱基受到 DMS 的裂解产生明显的放射自显影图谱。碱基 G₁₃G₁₄G₁₅ 在二级结构中处于发

夹 I 的袢区,但不被单链特异性酶 RNase S1 所水解,而却能被双链特异性酶 cobra venom 所切割。利用对 G 具有特异性的 RNase T1 对 G₁₃G₁₄G₁₅ 探查,只在变性条件下才表现出带谱,在非变性条件下无消化作用。可以想像 C₂₇C₂₆C₂₅ 分别与 G₁₃G₁₄G₁₅ 进行碱基配对,结果与干 I 和干 II 共轴堆砌成由 12 个碱基对组成的准连续双螺旋的氨基酸接受臂(图 2)。如果这种结构具有足够的稳定性,则 tRNA-样结构中的氨基酸接受臂可能被 tRNA-特异酶所认识。

Rietveld 等^[6]根据同样方法探查雀麦花叶病毒(brome mosaic virus, BMV) RNA2 由 2 个短双螺旋片段 12 个碱基对组成的氨基酸接受臂,其中包括 G₅—G₁₀ 和远离的单链区域碱基 U₁₁₁—C₁₁₆ 配对。烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV) RNA3' 末端也有 tRNA-样结构,由三个双螺旋片段 11 个碱基对共轴形成双螺旋氨基酸接受臂。G₁₁—C₁₃ 与 C₂₂—G₂₄ 碱基配对后再和干 I 及干 II 构成准连续双螺旋^[7]。TMV RNA 的氨酰化作用较其它植物病毒 RNA 低 [Hall T C. Int Review of Cytology, 1979; 60:1—26] 推测可能与氨基酸接

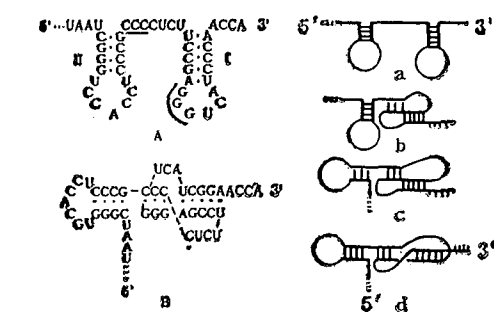


图 2 TYMV RNA 3' 末端 tRNA-样结构的氨基酸接受臂假结结构形成示意图

图左边 A 为发夹 I 和发夹 II 区域,边上画线的碱基为袢 I 和发夹 II 3' 侧的单链区域之间的互补碱基。B 为假结结构,它由三个双螺旋片段的 12 个碱基对共轴堆砌而成的准连续双螺旋的氨基酸接受臂。

图右边 a、b、c 和 d 示意假结形成的过程。

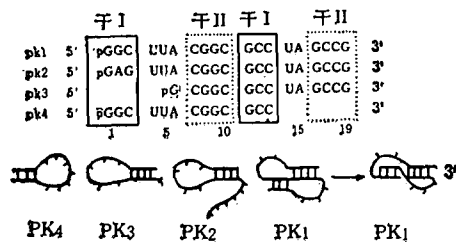


图 3 上部: RNA 寡核苷酸 PK1、PK2、PK3 和 PK4 的一级结构

干 I 和干 II 区域已指出,核苷酸编号以 PK1 为准。下部:根据 RNase S1 和 RNase V1 消化探查的放射自显影图谱分析结果。PK4 只能形成干 I, PK3 只能形成干 II, PK2 也只能形成干 II。PK1 形成干 I 和干 II, 在空间可折迭成准连续的假结结构

受臂较短或螺旋结构变形有关。van Belkum 等^[8]应用化学修饰和酶消化的方法发现 TMV RNA 3' 末端紧靠 95 个核苷酸的 tRNA-样结构的上游,在 204 个核苷酸长度的非编码区内至少有 6 个双螺旋短片段。烟草斑纹病毒组

的4个成员: TMV(普通株)、TMV-L(番茄株)、CcTMV(豇豆株)和CGTMV(黄瓜绿斑驳花叶病毒株)RNA的6个双螺旋短片共轴堆砌成3个准连续双螺旋假结结构。这样TMV RNA的3'末端非编码区域形成五个假结结构。van Belkum等^[9]应用焦碳酸二乙酯(DEP)、硫酸氢钠(sodium bisulphate)、RNase S1和T1等在广泛温度范围内探查tRNA-样结构解除折叠的行为。准连续双螺旋结构中的三度空间碱基配对区域比于I及于II区域的熔解温度低。

Puglisi等(1988)^[10]人工合成一个可能形成假结结构的含有19个碱基的RNA片段(PK1)。另合成与PK1相应的3个RNA片段(PK2、PK3和PK4)作为对照。PK2也含19个碱基,但5'末端缺少形成假结的互补碱基。PK3和PK4相当于假结内的一个发夹。用单链特异性核酸酶S1和双链特异性核酸酶V1消化探查,证实了PK1能够形成假结结构(图3)。

三、假结结构的可能意义

Pinck等和Yot等(1970)最早提出TYMV RNA具有tRNA-样结构和酯化缬氨酸的性质。其后又陆续证实近20种病毒RNA具有氨酰化作用,因此不难理解使人容易想到tRNA-样结构的氨基酸接受臂在蛋白质生物合成中有运载氨基酸的功能。但是这种推测未能被广泛接受。许多病毒RNA 3'末端并不存在tRNA-样结构,即便有tRNA-样结构,例如TMV RNA,它酯化组氨酸的能力也很弱。此外,GTP与tRNA-样结构结合成复合物的力量很小,不允许有效地占据核糖体上的适当位置。Florentz等(FEBS, 1984; 176:295)认为TYMV RNA 3'末端的tRNA-样结构在基

因表达上是一种调节信号。在细胞内局部条件改变的影响下tRNA-样结构远离基因的起始密码子,使翻译得以进行。Puglisi等(1988)认为假结结构可能是复杂的RNA分子内的一种有意义的结构成分,或许是一种使RNA分子内2个核苷酸片段在三度空间上相互靠近的一种方式,以稳定RNA大分子的结构。Pleij等(1985)分析了大肠杆菌16S rRNA的5'末端结构,提出被称之为螺旋1和螺旋2的一个双螺旋短片可能共轴伸展成含有9个碱基对的双螺旋,甚至螺旋3也可能再累加到其顶部,形成更长的准连续双螺旋的假结结构。如果情况是这样,提示通过RNA分子内部构型的改变来适应另外结构上的需要。真菌线粒体内含子自我剪接过程可能是通过双螺旋片段P1、P2和P3的共轴堆砌,使二个剪接部位在空间上相互靠近之后的方式实现的。

随着核酸酶(ribozyme)的发现,假结结构作为RNA分子空间结构的一种形式受到越来越多人的重视。可以预期生物化学和生物物理结构探查方法的不断改进将促使假结结构及其生物学意义的阐明。

参 考 文 献

- 1 Pinck M *et al.* *Nature*, 1970; 226: 954
- 2 Yot P *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1970; 67: 1345
- 3 Rietveld K *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1982; 10: 1929
- 4 van Belkum *et al.* *Biochemistry*, 1987; 26: 1144
- 5 Pleij C W A *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1985; 13: 1717
- 6 Rietveld K *et al.* *EMBO*, 1983; 2: 1079
- 7 van Belkum A *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1987; 15: 2837
- 8 van Belkum A *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1985; 13: 7673
- 9 van Belkum A *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1988; 16: 1931
- 10 Puglisi L D *et al.* *Nature*, 1988; 331: 283

[本文于1989年8月19日收到]