

小型核酶的结构和催化机理

王俊峰 廖祥儒* 付 伟

(河北大学生命科学学院, 保定 071002)

摘要 自然界存在的小型核酶主要有锤头型核酶、发夹型核酶、肝炎 δ 病毒 (HDV) 核酶和 VS 核酶。锤头型核酶由 3 个短螺旋和 1 个广义保守的连接序列组成; 发夹型核酶的催化中心由两个肩并肩挨着的区域构成; HDV 核酶折叠成包含五个螺旋臂 (P1~ P4) 的双结结构; VS 核酶由五个螺旋结构组成, 这些螺旋结构通过两个连接域连接起来。小型核酶的催化机理与其分子结构密切相关。金属离子或特定碱基都可作为催化反应的关键成分。锤头型核酶的催化必须有金属离子 (尤其是二价金属离子) 参与, 而发夹型核酶则完全不需要金属离子。基因组 HDV 核酶进行催化时要有金属离子和特定碱基互相配合。

关键词 小型核酶, 结构, 催化机理

学科分类号 Q 522

核酶是具有催化活性的 RNA 片段。至今, 人们已发现了七大类自然存在的核酶, 即第一类内含子 (group I intron)、第二类内含子 (group II intron)、RNase P 的 RNA 亚基 (RNA subunit of RNase P)、锤头型核酶 (hammerhead ribozyme)、发夹型核酶 (hairpin ribozyme)、肝炎 δ 病毒 (hepatitis delta virus, HDV) 核酶、和 VS 核酶 (*Neurospora* Varkud satellite ribozyme)。它们都通过使磷酸酯水解或磷酸基酯化来切割或剪接 RNA 主链。根据分子大小可将它们分成大型核酶 (包括第一类内含子、第二类内含子和 RNaseP 的 RNA 亚基) 和小型核酶 (锤头型核酶、发夹型核酶、HDV 核酶和 VS 核酶)。本文将近几年对小型核酶的结构和功能研究作一介绍。

1 小型核酶的结构

1.1 锤头型核酶的结构

最小的有功能的锤头型核酶由 3 个短的螺旋和 1 个广义保守的连接序列组成。其中螺旋 I、III 是反义片段 (antisense section), 茎环结构 II (stem-loop II) 是催化核心 (图 1)。3 个螺旋排列成 Y 形, I 螺旋与 II 螺旋成锐角, II、III 两个臂同轴从而使整个结构类似于 A 型双螺旋。由于骨架在 II、III 臂的连接处发生扭曲, 使得 H₁₇ 堆叠在 I 臂上, 同时, 这样也把它置于了三个螺旋的连接处, 此处正是活性中心的所在, 成口袋型^[1]。易切割的 H₁₇ (H 代表 A, U 或 C) 3' 磷酸位于 C₃~ A₆ 序列形成的发夹型转折的上部, 这个 CUGA 转折与 tRNA^{Phe} 的反密码子环的转折酷似, 它可以作为一种金属结合处^[2]。

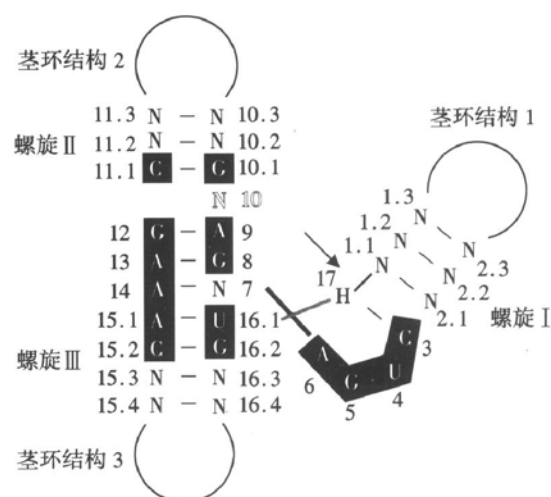


Fig. 1 The model for the secondary structure of hammerhead ribozyme

图 1 锤头型核酶的二级结构

1.2 HDV 核酶的结构

HDV 核酶来源于肝炎 δ 病毒的反义基因组 RNA (antigenomic RNA) 和基因组 RNA (genomic RNA, 图 2, 图 3)。基因组 HDV 核酶折叠成包含 5 个螺旋臂 (P1~ P4) 的双结结构。P1 双螺旋与 P1.1、P4 同轴, 而 P2 堆叠在 P3 上。这两个堆叠基团互相靠近, 通过 5 股如天桥一样的链相连接并且进一步被 P1.1 束缚^[1]。与锤头型核酶不同 (它的活性中心在溶液中是暴露的), HDV 的 5' 羟基游离端是深埋在折叠中, 被有重要功能的 P3 的残余序列和

* 通讯联系人。

Tel: 0312-5052312, E-mail: liao.xr@263.net

收稿日期: 2002-01-16, 接受日期: 2002-02-28

L3, J1/3, J4/2 片段包围着^[2].

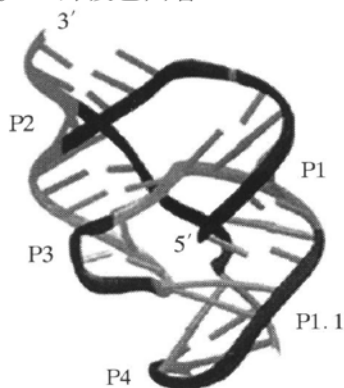


Fig. 2 The model for the tertiary structure of genomic HDV ribozyme

图 2 基因组 HDV 核酶的三级结构

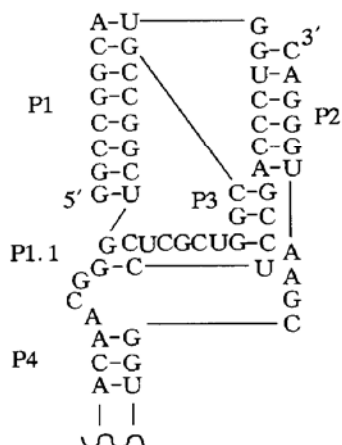


Fig. 3 The model for the secondary structure of genomic HDV ribozyme

图 3 基因组 HDV 核酶的二级结构

1.3 发夹型核酶的结构

发夹型核酶的催化活性位点深埋在两个肩并肩挨着的区域中(图4). 在发夹状核酶中, 螺旋-螺旋

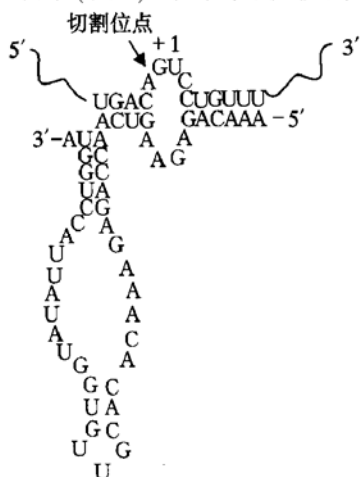


Fig. 4 The model for the secondary structure of hairpin ribozyme

图 4 发夹型核酶的二级结构

旋间的作用是通过区域间的三级作用力(而不是共价键)调节的, 从而使其具有更大的活性^[2].

1.4 VS 核酶

VS 核酶由 5 个螺旋结构组成, 这些螺旋结构通过两个连接域连接起来, 这些连接域对于催化反应很重要^[3]. 在 VS 核酶的某些环状结构之间有吻型作用(kissing interaction), 这种吻型作用与二级结构的组织及催化活性有关^[4,5]. 它的催化对于 pH 值没有依赖性, 但是催化发生前的变构可能掩盖了 pH 的重要性. 这种核酶的催化中心还没有被准确地确定下来.

2 小型核酶的催化机理

2.1 锤头型核酶的催化机理

锤头型核酶对切割位点的识别遵守 NHH 规则(N 代表任意核苷酸, H 代表 A, U 或 C)^[2]. 它的催化过程需要二价金属离子(如镁离子)的参与. 人们提出两种催化机理: 单金属离子催化和双金属离子催化. 前者机理如图 5a, 在这个模型中, 金

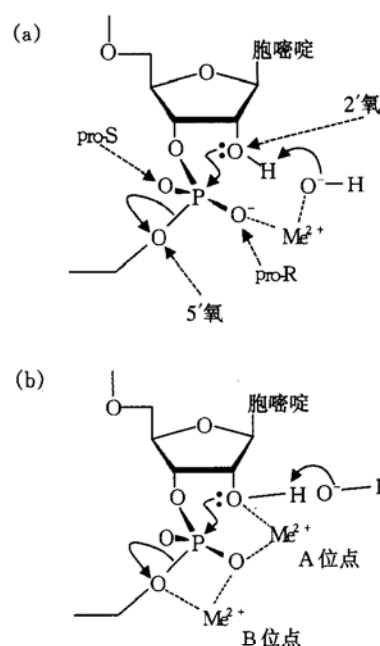


Fig. 5 Two possible models for the catalytic mechanism of hammerhead ribozyme

图 5 锤头型核酶两种可能的催化机理

(a) 单金属离子催化; (b) 双金属离子催化.

属氢氧化物作为广义碱从 2' OH 接受质子. 活化的 2' 氧作为亲核试剂进攻切割位点的磷酸. 双金属离子机理如图 5b. A 位点的金属离子作为路易斯酸

(Lewis acid) 接受 2' 氧的电子, 使 2' OH 去质子更容易. B 位点的金属离子也作为路易斯酸接受 5' 氧的电子, 使 O—P 键极化且键合力减弱, 从而使氧原子更容易游离出来. 大多数实验结果都倾向于支持双金属离子催化观点. 在极端条件下 (如 1~4 mol/L Li^+ , Na^+ , NH_4^+ 等一价离子环境), 此类核酶的催化可以不需要二价金属离子的参与. 锤头型核酶的结构在催化反应发生前必须经过构型变化, 但三螺旋连接的构造并没有因为骨架在切割位点处的旋转而受到大的扰动, 这显示了锤头型核酶活性位点的高度流动性.

2.2 HDV 核酶的催化机理 (以基因组 HDV 核酶为例)

现已证实, a. 低浓度的二价阳离子对于 HDV 核酶的功能是必需的, 但是这种必需性主要体现在稳定三级结构方面. 高浓度一价金属离子替代二价金属离子不影响反应活性. b. 自切割速率在 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 中是相同的, 且在 Mn^{2+} 和 Sr^{2+} 中也有活性, 这一结果表明核酶的活性位点结合有一个金属离子且这个金属离子结合于一个几何学不稳定的位点上. c. HDV 核酶的一个碱基 (C_{75}) 在反应机理中起关键作用. C_{75} (在反义基因组合 HDV 中是 C_{76}) 碱基在晶体结构中 5' 羟基游离基团非常接近. 这个碱基被从溶液中排斥到一个低电势的区域, 被几个负电荷化的磷酸基团包围, 这样可以提高 C_{75} 的 pK_a 值, 这一值大约为 4 (对于 N_3 亚氨基来说). C_{75} (作为广义酸) 和金属离子 (作为广义碱) 配合完成催化^[6]. 现在被普遍接受的催化机理如图 6 所示. 在基态时金属离子结合于切割位

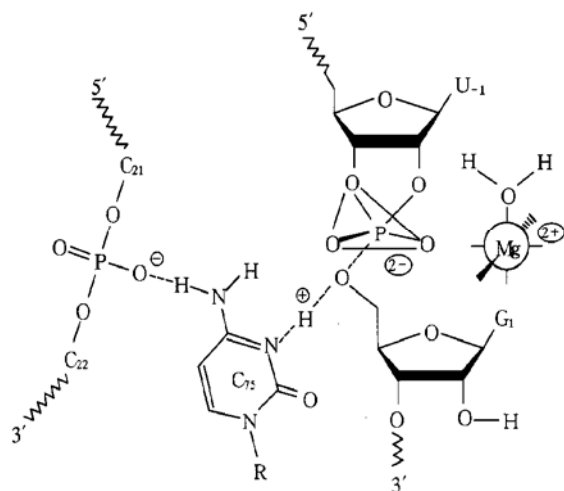


Fig. 6 The possible model for the catalytic mechanism of HDV ribozyme

图 6 HDV 核酶可能的催化机理

点处未成桥的氧原子上, 但是在自切割过程中金属离子脱离了与氧原子的直接联系, 转而通过一种远距离的作用力与之作用. 另外, 底物的 5' 端序列对切割反应有一定影响^[7].

2.3 发夹状核酶的催化机理

与锤头型核酶相反 (它催化自切割的活性比催化连接反应的活性高 100 倍), 发夹型核酶催化连接反应的活性比催化切割反应的活性要高近 10 倍. 这种现象可以通过熵值的比较得到解释. 在连接反应中, 发夹型核酶的熵值减少量比锤头型核酶的熵值减少量要小, 表明发夹型核酶的结构刚性比锤头型核酶高, 在反应中发生的构象变化较小^[2]. 核酶本身提供了催化所需的全部条件, 二价阳离子在发夹状核酶的催化中不起中心作用. 底物 G_{+1} 的 2' 氨基对于催化反应很关键. 某些碱基在催化中可能起重要作用, 人们正在努力寻找这些碱基.

自切割小 RNA 的组织存在两个趋势——柔性堆叠, 刚性堆叠. 前者如锤头型核酶. 由于自切割反应很简单, 故有一个暴露在溶液中的有活性位点的小 RNA 就可能有催化活性, 锤头型核酶正是这样的. 它有较强的韧性, 易于在反应时产生构象变化. 它的大多数活性构象都是热力学不稳定状态, 但由于其自切割产生的三螺旋比基底状态有更大的柔韧性, 从而使熵值驱动反应进行, 避免了产物的重新联合. 这个酶的三个螺旋除了连接区外, 其他部分并不紧密地堆叠在一起, 连接区通过一些广泛保守的碱基堆积和三级作用使这个三螺旋正确定位. HDV 核酶是刚性堆叠的代表. 它的活性位点深埋在两个肩并肩靠在一起的螺旋的紧密堆叠中, 这一堆叠由两个螺旋间的共价键稳定. 这种结构上的刚性可能限制了某些磷酸原子的位置, 进而使催化活性提高. 发夹型核酶与 HDV 核酶在组织上相近. 但是, 发夹型核酶中稳定集团的作用力是三级引力, 而不是共价键, 故它的结构有更大的流动性.

许多核酶的催化反应都需要二价金属离子的参与, 但是发夹型核酶的催化可以完全不借助二价金属离子. 有人认为, 一定密度的正电荷而非二价金属离子本身对于核酶的催化才是必需的. 在典型的金属核酶——锤头型核酶中, 二价金属离子的作用可以被高浓度的一价阳离子取代, 一价阳离子可以像二价金属离子一样通过形成高密度的正电荷来稳定转化态, 但是这种机制至少在生理条件下对于核酶来说不是高效率的. 一价阳离子与二价金属离子

的区别不仅在于正电荷密度的不同, 还在于它们的水合几何学 (geometry of hydration) 的不同. 根据原子价理论, 二价金属离子 (如 Mg^{2+}) 形成一种八面体的水合分子, 而一价金属离子却形成四面体的水合分子, 这个特点使一价金属离子在几何学上不适合充当稳定正确催化结构的角色. 所以即使在体外模拟生理条件, 锤头型核酶也不能以一价阳离子作为有效的催化辅助因子. 核苷酸可以作为广义酸碱来参与催化反应, 这种现象在 HDV 核酶中有论及.

参 考 文 献

- 1 Doherty E A, Doudna J A. Ribozyme structures and mechanisms. *Annu Rev Biochem*, 2000, **69**: 597~ 615
- 2 Takagi Y, Warashina M, Wojciech J S, *et al.* Recent advances in the elucidation of the mechanisms of action of ribozymes. *Nucleic Acids Research*, 2001, **29** (9): 1815~ 1834
- 3 Lafontaine D A, Norman D G, Lilley D M J. Structure, folding and activity of the VS ribozyme: importance of the 2-3-6 helical junction. *EMBO J*, 2001, **20** (6): 1415~ 1424
- 4 Andersen A A, Collins R A. Intramolecular secondary structure rearrangement by the kissing interaction of the *Neurospora* VS ribozyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (14): 7730~ 7735
- 5 Hiley S L, Collins R A. Rapid formation of a solvent-inaccessible core in the *Neurospora* Varkud satellite ribozyme. *EMBO J*, 2001, **20** (19): 5461~ 5469
- 6 Shih F-H, Been M D. Involvement of a cytosine side chain in proton transfer in the rate-determining step of ribozyme self-cleavage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (4): 1489~ 1494
- 7 Shih F-H, Been M D. Energetic contribution of non-essential 5' sequence to catalysis in a hepatitis delta virus ribozyme. *EMBO J*, 2001, **20** (17): 4884~ 4891

Structures and Catalytic Mechanisms of Small Ribozymes

WANG Jun-Feng, LIAO Xiang-Ru*, FU Wei

(College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract Naturally existing small catalytic RNAs include hammerhead, hairpin, hepatitis delta virus (HDV) and Varkud satellite (VS) ribozymes. The structures of small ribozymes are simple but diversified. Hammerhead ribozyme consists of 3 short helices and a conserved joint chain. Hairpin ribozyme's deeply buried active region is made up of two side-by-side helices. HDV ribozyme folds to a double-knot structure which contains 5 helix arms. VS ribozyme is made up of 5 helix regions and two joint regions. These ribozymes appear to exploit different cleavage mechanisms which depend upon their individual architectures. Metal ions and nucleobases might be candidates for participants in acid/base catalysis. Hammerhead ribozyme has a basic requirement for divalent metal ions, such as Mg^{2+} ions, to complete its function. However, hairpin ribozyme can be considered as a distinct one that does not require metal ions as cofactors. In the genomic HDV ribozyme, a metal ion functions as a general base and a cytosine residue functions as a general acid.

Key words small ribozyme, structure, catalytic mechanism

* Corresponding author. Tel: 86-312-5052312, E-mail: liao.xr@263.net

Received: January 16, 2002 Accepted: February 28, 2002