

与人类疾病相关的几种线粒体 氨基酰-tRNA 合成酶*

周小龙 王恩多**

(中国科学院上海生命科学研究院, 生物化学与细胞生物学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要 氨基酰-tRNA 合成酶是一类古老的蛋白质, 催化蛋白质生物合成中的第一步反应. 已经发现氨基酰-tRNA 合成酶还参与大量的其他生命过程, 如编校、tRNA 的成熟与转运、RNA 的剪切、细胞因子等功能. 最近的研究结果表明, 线粒体氨基酰-tRNA 合成酶与人类的疾病密切相关. 人线粒体精氨酰-tRNA 合成酶基因 2 号内含子中的一个单点突变导致该基因的转录本被异常剪接, 造成脑桥小脑发育不全. 人线粒体天冬氨酰-tRNA 合成酶基因上的一系列突变致使其 mRNA 被快速降解或者蛋白质氨基酸一级结构的改变, 导致脑干脊髓蛋白质病变及乳糖增高症. 人线粒体亮氨酰-tRNA 合成酶基因的一个单核苷酸多态性与 2 型糖尿病密切相关. 这些研究结果进一步增强了我们对于氨基酰-tRNA 合成酶的生物学功能的认识, 并将促进对由线粒体氨基酰-tRNA 合成酶所引起线粒体病的致病机理以及治疗方法的研究.

关键词 线粒体, 氨基酰-tRNA 合成酶, 疾病

学科分类号 Q71

氨基酰-tRNA 合成酶 (aminoacyl-tRNA synthetase, AARS) 是一类古老的蛋白质家族, 催化 tRNA 的氨基酰化反应, 生成氨基酰-tRNA (aminoacyl-tRNA), 为蛋白质生物合成提供原料^[1]. 生物体内一般含有 20 种 AARS, 与 20 种蛋白质氨基酸一一对应, AARS 对氨基酸底物的精确识别保证了蛋白质合成的精确性^[2]. 根据氨基酰化反应活性中心的保守序列和特征性结构花式, AARS 可以被分为两类, 每类包含 10 种, 每一种可以用该种氨基酸的英文三字符号后缀 RS 表示^[3]. 近年的研究发现, 在生物体内, AARS 除了催化经典的 tRNA 氨基酰化反应外, 它们还广泛参与一系列其他重要的生命过程, 例如转录和翻译调控、RNA 的剪切、tRNA 的成熟与转运、氨基酸的生物合成、DNA 结合以及行使细胞因子等功能^[4]. 伴随着人类基因组计划以及其他一系列物种基因组的解析, AARS 的催化机制以及其对底物特别是氨基酸的精确识别是该领域的研究热点^[5].

线粒体(mitochondrion)是真核细胞内一种重要和独特的细胞器, 其主要的生物学功能是进行氧化磷酸化, 合成 ATP, 为细胞生物活动提供直接能

量^[6]. 同时, 线粒体又是细胞内容易受到损伤的一个敏感细胞器, 它的异常影响整个细胞的正常功能, 从而导致病变, 统称为线粒体病(mitochondrial disease, MD)^[6]. 线粒体有自己的基因组, 人的线粒体基因组序列共有 16 569 碱基对, 编码 13 个蛋白质(即细胞色素 b、细胞色素氧化酶的 3 个亚基、ATP 酶的 2 个亚基以及 NADH 脱氢酶的 7 个亚基)、两种 rRNA 以及 22 种 tRNA. 线粒体内的蛋白质翻译机器的组成成分, 譬如 AARS 需要通过从细胞质中转运到线粒体中^[7]. 线粒体 tRNA 表达的异常和 MD 之间的关系已经被广泛报道^[8, 9]. 最近的研究又将线粒体 AARS 与 MD 联系起来.

1 线粒体精氨酰-tRNA 合成酶(ArgRS)与脑桥小脑发育不全

脑桥小脑发育不全(pontocerebellar hypoplasia,

* 国家自然科学基金资助项目(30330180).

** 通讯联系人.

Tel: 021-54921241, Fax: 021-54921011, E-mail: edwang@sibs.ac.cn

收稿日期: 2008-03-03, 接受日期: 2008-04-25

PCH) 是一组不同种类的脑部疾病, 通常表现为异常小的小脑和脑干. 目前已经发现了 5 种非综合征性常染色体隐性遗传的 PCH (nonsyndromic, autosomal recessive PCH)^[10]. 此异常还与一系列已知疾病有关, 例如先天性肌营养不良 (congenital muscular dystrophies)、平脑症 (lissencephaly syndromes)、染色体异常 (chromosomal abnormalities)、有机酸代谢病 (organic acid disorders)、线粒体呼吸链功能缺陷 (mitochondrial respiratory-chain defects) 等^[10].

一个犹太人的近亲婚姻家庭中有 5 个子女. 其中, 第 2(II-2)、4(II-4) 和 5 个 (II-5) 孩子都因为天生的 PCH, 表现为严重的张力减退 (hypotonia), 在出生后不久死亡^[10]. 通过病理分析发现, 这 3 个患者的线粒体呼吸链的复合物 I, III, IV 的活性都有显著的下降, 而复合物 II 的活性相对正常. 由于复合物 I, III, IV 的亚基部分由线粒体基因组编码, 而复合物 II 的所有亚基全部由核基因组编码, 这暗示了患者可能是具有 MD^[10]. 进一步抽取了 II-2 和 II-4 的成纤维细胞、II-5 的血液细胞的基因组 DNA, 通过测序将致病基因定位在第 6 号染色体的一段含有 103 个开放阅读框的区域内. 此区域只

有一个编码线粒体蛋白质 ArgRS 的基因——*RARS*L, 具有 20 个外显子. 和健康对照的测序结果进行比较发现, 在 3 个患者的 *RARS*L 有 3 个单点突变即 K568K(aaa→aag)、R291K(aga→aaa) 以及 IVS2+5(a→g) (表示编码 568 位和 291 位赖氨酸和精氨酸的密码子 aaa 和 aga 分别突变为编码赖氨酸的密码子 aag 和 aaa, 而第二号内含子内发生了一个 a 到 g 的单点突变). 通过 ESEfinder^[11] 和 SIFT 软件分析, K568K 和 R291K 都不具有致病性. 反转录 PCR (RT-PCR) 确定患者的绝大多数转录本都没有第二号外显子, 而患者母亲同时具备带有和不带有第二号外显子的两种转录本 (健康对照只具有带有第二号外显子的转录本)^[10]. 进一步的定量 RNA 印迹 (quantitative northern hybridization) 发现, 在患者的线粒体中, tRNA^{Arg} 的量急剧下降且全部被精氨酰化 (是由痕量的正常转录本产生的野生型的 ArgRS 所催化), 该结果揭示了在该种疾病中, 未被精氨酰化的 tRNA^{Arg} 非常不稳定^[10]. 至此, IVS2+5(a→g) 突变的致病机理是它导致 ArgRS 的移码突变 (frameshift mutation), 从而导致编码的 ArgRS 完全丧失催化活力, 使线粒体功能受损 (图 1).

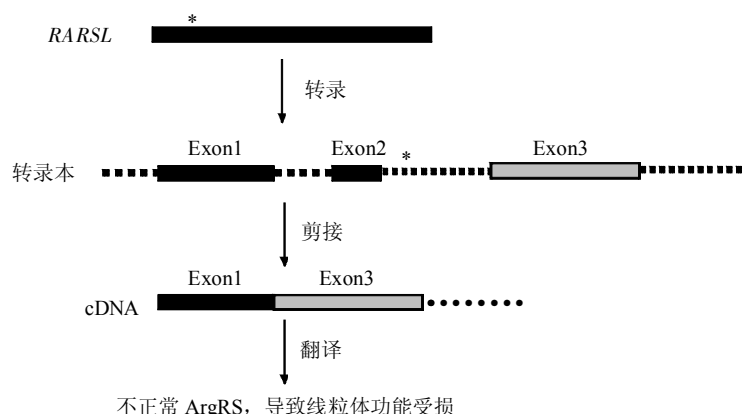


Fig. 1 Pathogenesis of *RARS*L mutation(*)^[10]

图 1 *RARS*L 突变(*)的致病机理^[10]

2 线粒体天冬氨酰-tRNA 合成酶(AspRS)与脑干脊髓白质病变及乳糖增高症

脑干脊髓白质病变及乳糖增高症 (leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation, LBSL) 通过磁共振成像 (magnetic resonance imaging) 和磁共振谱

(magnetic resonance spectroscopy) 观测到的一组高度特征性的病变得以确定^[12], 是常染色体隐性疾病, 主要在儿童期发作. 患者一般有渐进性的小脑共济失调、痉挛、以及脊柱功能紊乱 (dorsal column dysfunction)^[12].

利用来自 30 个家庭的 38 个患者, 人们首先根据微卫星标记 (microsatellite marker) 构建了这一群

体的遗传图谱, 在 1 号染色体的一段特定区域发现了潜在的致病基因. 对这一区域进行 DNA 测序, 发现了致病基因 *DARS2*^[12]. 该基因编码线粒体 AspRS, 负责线粒体基因组遗传密码的解析. 在这些患者的 *DARS2* 中发现了一系列不同的点突变, 但是健康个体的对照组(400~420 个)的 *DARS2* 中却没有任何突变, 证实了该基因的致病性. 这些点突变包括: a. 无义突变, 导致多肽链合成提前终止, 同时也造成 mRNA 被快速降解; b. 错义突变, 导致 AspRS 中几个高度保守的氨基酸被其他氨基酸所置换(图 2a); c. 内含子序列突变, 导致 3 号外显子被错误地剪切掉, 由此产生的 mRNA 也被快速降解(图 2b). 研究者进一步在原核表达系统中表达了野生型 AspRS 及其由错义突变所产生的 AspRS 突变体, 通过体外实验发现, 这些突变体的

氨基酰化活力都严重下降(17~400 倍), 但是根据 *E. coli* AspRS 及其与 tRNA^{Asp} 的共晶, 这些突变并不影响 AspRS 与 tRNA^{Asp} 的结合, 活力的下降主要是由催化活力下降造成^[13]. 令人倍感意外的是, 通过 Blue-native PAGE 以及光谱光度测量 (spectrophotometric measurement) 发现, 来自患者的成纤维细胞以及淋巴细胞的 4 个线粒体复合物的活性都没有明显的变化, 细胞色素 c 氧化酶亚基 1 的表达也很正常^[12], 同时也没有发现 AspRS 具有任何组织特异性表达. 因此, 该基因突变导致 LBSL 的详细机理目前还不清楚, 推测可能是由在脑部高表达的 tRNA 协同引起, 也有可能是由 AspRS 参与的其他生物学功能受损所引起(虽然 AspRS 在脑中所参与的其他功能还不是很清楚)^[12].

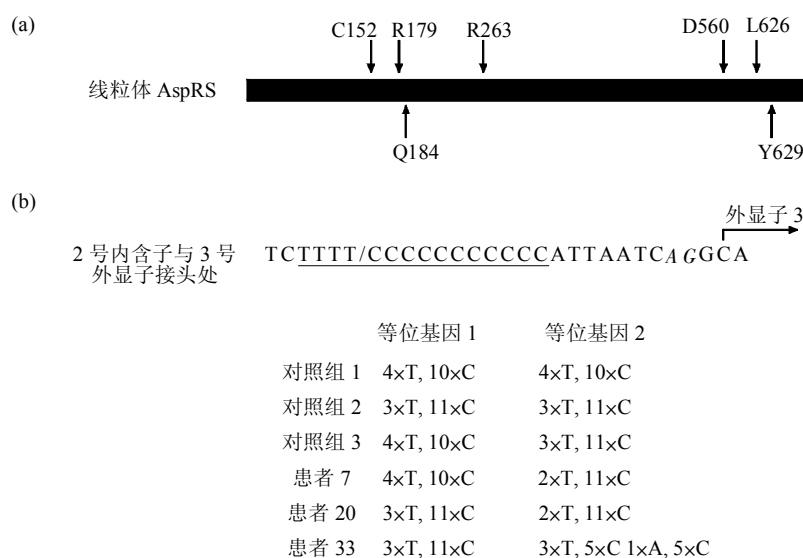


Fig. 2 Distribution of LBSL-related mutations in AspRS and IVS2^[12]

图 2 LBSL 致病突变在 AspRS 及 2 号内含子上的分布^[12]

3 线粒体亮氨酰-tRNA 合成酶 (LeuRS) 与 2 型糖尿病

糖尿病是严重危害我国人类生命与健康的一种代谢性疾病^[14]. 目前, 我国糖尿病的构成以 2 型糖尿病(type 2 diabetes)为主, 占糖尿病人群的 90% 以上. 2 型糖尿病的病因非常复杂, 涉及到各种遗传因素和环境因素以及它们间的相互作用^[14].

先前已经报道, 线粒体 tRNA^{Leu}(UUR) 基因突变与 2 型糖尿病有关^[15]. 为了研究 LeuRS (由 *LARS2* 基因编码) 是否也与 2 型糖尿病有关, 人们

首先从荷兰和丹麦两个国家选取了 2 型糖尿病患者作为样本, 抽取白细胞或者胰腺组织的总 RNA, 通过 RT-PCR 获得编码 LeuRS 的 cDNA 序列, 该序列包含 LeuRS 的编码区以及 159 bp 的启动子区^[16]. 通过测定 *LARS2* cDNA 序列, 人们发现了 8 个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP), 单体型分析(haplotype analysis)表明其中两个多态性(-109 g/a 和 H324Q)可能潜在影响基因功能, 所以对这两个多态性进行了深入研究(图 3). 统计学研究结果表明, H324Q 与 2 型糖尿病有显著关系(一般胜算是 1.40, 95% CI 1.12~1.76,

$P = 0.004$), 而-109 g/a 与 2 型糖尿病无关(一般胜算比是 1.13, 95% CI 0.93~1.38, $P > 0.2$)^[16].

AARS 在氨基酰化反应的过程中, 需要精确地识别氨基酸和 tRNA, tRNA 是大分子, 可以提供大量的识别原件, 所以 AARS 对 tRNA 的识别相对容易^[17], 但就小分子氨基酸而言, 由于细胞内有 20 种蛋白质氨基酸以及很多氨基酸的类似物和代谢物, 某些 AARS 要精确地识别对应的氨基酸就比较困难^[9]. 在进化中, 某些 AARS(例如 LeuRS) 进化出了编校结构域(editing domain), 通过“双筛

机制(double-sieve mechanism)”来水解误活化的氨基酸或者误氨基酰化的 tRNA, 从而使遗传信息的传递具有绝对精确性^[18]. 编校功能的缺失会导致错误的氨基酸进入新合成的多肽链, 导致细胞凋亡^[19]. 在本例中, 324 位组氨酸位于 LeuRS 编校结构域的表面, 但体外的氨基酰化以及误氨基酰化实验表明, 野生型 LeuRS 及 LeuRSH324Q 并没有表现出明显差异, 所以该突变体与 2 型糖尿病之间的具体关系还不是很清楚, 需要开展更多的体内及体外实验以探明机理^[16].

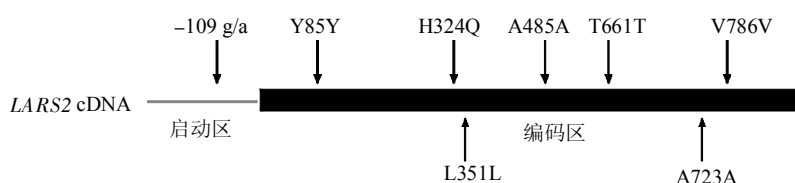


Fig. 3 Distribution of SNPs in LARS2 cDNA^[16]

图 3 SNP 在 LARS2 cDNA 上的分布^[16]

4 总结与展望

作为一类古老的蛋白质分子, AARS 是生命活动中至关重要的酶分子. 对它的研究一直是分子生物学以及进化生物学的热点^[20]. 近几十年来, 对于底物的精确性识别是该领域的热点之一, 因为一旦 AARS 在识别底物时发生了错误, 将会导致新合成的蛋白质一级结构发生变化, 进而导致细胞功能的紊乱^[19]. 近年来, 一系列崭新的报道又将这类古老的蛋白质分子与其他生命活动结合起来. 例如, 人胞质酪氨酸-tRNA 合成酶(TyrRS)^[21]以及色氨酸-tRNA 合成酶(TrpRS)^[22]具有细胞因子功能, 赖氨酰-tRNA 合成酶(LysRS)在 HIV 病毒的组装中被选择性地包装到病毒中^[23], 丙氨酰-tRNA 合成酶(AlaRS)编校结构域的突变导致小脑普肯雅(purkinje)细胞的丢失^[24], TyrRS 中某些位点的突变导致显性中间型腓骨肌萎缩症 C 型(dominant intermediate CMT neuropathy type C, DI-CMTC)^[25], 甘氨酰-tRNA 合成酶(GlyRS)上的很多突变导致腓骨肌萎缩症 2D 型(CMT-2D)^[26], 等等.

虽然越来越多的导致疾病的 AARS 突变体被发现, 但它们的致病机理都还不是很清楚, 可以预见, 探索 AARS 的其他生物学功能、搜索更多的致病 AARS 突变体以及深入地研究它们的致病机理将是该领域的下一个研究热点^[24]; 同时, AARS

被认为是理想的药物设计的靶点^[27], 因为和其他蛋白质分子相比, 它具有得天独厚的优势: a. 在漫长的进化过程中, AARS 积累了大量的结构多样性, 可以用于设计种属特异性的酶抑制剂(enzyme inhibitor); b. 几乎每种生物都含有 20 种 AARS, 每种 AARS 都可以独立地用于抑制剂靶点的筛选; c. AARS 具有丰富的序列和结构基础用于合理的药物设计, 例如, 作用于 LeuRS 的编校结构域的含硼化合物已用于抑制真菌的生长, 成为外用抗菌素^[28]; d. AARS 的抑制剂不会与其他主要抗生素(antibiotics)产生交互抗性(cross-resistance); e. 有许多天然的 AARS 抑制剂可以用于起始结构去研发更加高效、特异性更强的抑制剂^[27]. 所以, 针对 AARS 进行抑制剂或者药物的筛选和设计一直并将继续是该领域的又一热点. 随着人们对 AARS 的认识越来越深入, AARS 必将会是人们治疗疾病、提高生命质量的有力武器.

参 考 文 献

- 1 Schimmel P. Aminoacyl-tRNA synthetases: general scheme of structure-function relationships in the polypeptides and recognition of transfer RNAs. *Annu Rev Biochem*, 1987, **56**: 125~158
- 2 Ibba M, Söll D. Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu Rev Biochem*, 2000, **69**: 617~650
- 3 Eriani G, Delarue M, Poch O, et al. Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence

- motifs. *Nature*, 1990, **347** (6289): 203~206
- 4 Martinis S A, Plateau P, Caverelli J, *et al.* Aminoacyl-tRNA synthetase: a family of expanding functions. *EMBO J*, 1999, **18** (17): 4591~4596
 - 5 Ataide S F, Ibba M. Small molecules: big players in the evolution of protein synthesis. *ACS Chem Biol*, 2006, **1** (5): 285~297
 - 6 翟中和, 王喜中, 丁明孝, 等. 细胞生物学. 北京: 高等教育出版社, 2000. 211~222
Zhai Z H, Wang X Z, Ding M X, *et al.* *Cell Biology*. Beijing: Higher Education Press, 2000. 211~222
 - 7 Neupert W, Herrmann J M. Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem*, 2007, **76**: 723~749
 - 8 Florentz C, Sohm B, Tryoen-Tóth P, *et al.* Human mitochondrial tRNAs in health and disease. *Cell Mol Life Sci*, 2003, **60** (7): 1356~1375
 - 9 Hao R, Zhao M W, Hao Z X, *et al.* A T-stem slip in human mitochondrial tRNA^{Leu}(CUN) governs its charging capacity. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33** (11): 3606~3613
 - 10 Edvardson S, Shaag A, Kolesnikova O, *et al.* Deleterious mutation in the mitochondrial arginyl-transfer RNA synthetase gene is associated with pontocerebellar hypoplasia. *Am J Hum Genet*, 2007, **81**: 851~862
 - 11 Cartegni L, Wang J, Zhu Z, *et al.* ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31** (13): 3568~3571
 - 12 Scheper G C, van der Klok T, van Andel R J, *et al.* Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation. *Nat Genet*, 2007, **39** (4): 534~539
 - 13 Eiler S, Dock-Bregeon A, Mouliner L, *et al.* Synthesis of aspartyl-tRNA (Asp) in *Escherichia coli* — a snapshot of the second step. *EMBO J*, 1999, **18** (22): 6532~6541
 - 14 Chiasson J L. Prevention of Type 2 diabetes: fact or fiction?. *Expert Opin Pharmacother*, 2007, **8** (18): 3147~3158
 - 15 van den Ouweland J M, Lemkes H H, Ruitenbeek W, *et al.* Mutation in mitochondrial tRNA (Leu)(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nat Genet*, 1992, **1** (5): 368~371
 - 16 't Hart L M, Hansen T, Rietveld I, *et al.* Evidence that the mitochondrial leucyl tRNA synthetase (*LARS2*) gene represents a novel type 2 diabetes susceptibility gene. *Diabetes*, 2005, **54** (6): 1892~1895
 - 17 Giege R, Sissler M, Florentz C. Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26** (22): 5017~5035
 - 18 Fersht A R. Editing mechanisms in protein synthesis. Rejection of valine by the isoleucyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*, 1977, **16** (5): 1025~1030
 - 19 Bacher J M, Schimmel P. An editing-defective aminoacyl-tRNA synthetase in mutagenic in aging bacteria via the SOS response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104** (6): 1907~1912
 - 20 Wolf Y I, Aravind L, Grishin N V, *et al.* Evolution of aminoacyl-tRNA synthetase—analysis of unique domain architectures and phylogenetic trees reveals a complex history of horizontal gene transfer events. *Genome Res*, 1999, **9**(8): 689~710
 - 21 Wakasuqi K, Schimmel P. Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. *Science*, 1999, **284** (5411): 147~151
 - 22 Wakasuqi K, Slike B M, Hood J, *et al.* A human aminoacyl-tRNA synthetase as a regulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(1): 173~177
 - 23 Kovaleski B J, Kennedy R, Hong M K, *et al.* *In vitro* characterization of the interaction between HIV-1 Gag and human lysyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem*, 2006, **281** (28): 19449~19456
 - 24 Lee J W, Beebe K, Nangle L A, *et al.* Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration. *Nature*, 2006, **443** (7107): 41~42
 - 25 Jordanova A, Irobi J, Thomas F P, *et al.* Disrupted function and axonal distribution of mutant tyrosyl-tRNA synthetase in dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Nat Genet*, 2006, **38** (2): 197~202
 - 26 Seburn K L, Nangle L A, Cox G A, *et al.* An active dominant mutation of glycyl-tRNA synthetase causes neuropathy in a Charcot-Marie-Tooth 2D mouse model. *Neuron*, 2006, **51**(6): 715~726
 - 27 Kim S, Lee S W, Choi E C, *et al.* Aminoacyl-tRNA synthetases and their inhibitors as a novel family of antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **61** (4): 278~288
 - 28 Rock F L, Mao W, Yaremchuk A, *et al.* An antifungal agent inhibits an aminoacyl-tRNA synthetase by trapping tRNA in the editing site. *Science*, 2007, **316** (5832): 1759~1761

Mitochondrial Aminoacyl-tRNA Synthetases Related to Human Diseases*

ZHOU Xiao-Long, WANG En-Duo**

(State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences,
The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Aminoacyl-tRNA synthetase is a class of ancient proteins, catalyzing the first reaction of protein biosynthesis. It has been found that they also participate in a lot of other cellular processes such as editing, tRNA maturation and transfer, RNA cleavage and function as cellular factors. Recent studies showed that some mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases are closely related with human diseases. A single point mutation in intervening sequence 2 (IVS2) of human mitochondrial arginyl-tRNA synthetase gene causes abnormal cleavage of its transcript, resulting in pontocerebellar hypoplasia. A series of mutations in human mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase gene cause rapid decay of its mRNA or alteration in protein primary sequence, leading to leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation. A single nucleotide polymorphism in human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase is significantly associated with type 2 diabetes. These results further enhance our understanding about the cellular function of aminoacyl-tRNA synthetase and promote studies toward the mechanism and therapy of aminoacyl-tRNA synthetase-causing mitochondrial diseases.

Key words mitochondrion, aminoacyl-tRNA synthetase, disease

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30330180).

**Corresponding author .

Tel: 86-21-54921241, E-mail: edwang@sibs.ac.cn

Received: March 3, 2008 Accepted: April 25, 2008