

- 5 古练权, 肖 燕, 徐建兴. 有机化学. 1991; 11: 481-487
- 6 Gu Lianquan, Xu Jianxing, Tsao E. Tetrahedron. 1990; 46: 3199-3210
- 7 徐建兴, 肖 燕, 古练权. 生物化学杂志. 1987; 3 (2): 139-145
- 8 徐建兴, 肖 燕, 古练权. 生物化学与生物物理学报. 1991; 23 (6): 513-519
- 9 Lu Chun, Xu Jianxing, Xiao Yan *et al.* Biochem Biophys Acta, 1991; 1057: 373-376
- 10 Xu Jianxing, Xiao Yan, Wang Yihuang *et al.* Biochem Biophys Acta, 1993; 1142: 83-87
- 11 徐建兴. 中国科学 (B 辑), 1991; 615
- 12 Mowery P C, Steenkamp D J, Achrell B A C *et al.* Arch Biochem Biophys, 1977; 178: 495
- 13 Trumpower B L, Zachary S. J Biol Chem 1979; 254: 4608
- 14 李 路, 郑连兴, 徐建兴等. 生物化学杂志. 1992; 8(2): 207-211

核糖体 RNA 拓扑学与 RNA N-糖苷酶研究进展 (上)

张劲松* 刘望夷

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 核糖体 RNA 拓扑学的研究对阐明核糖体 RNA (rRNA) 在蛋白质生物合成中的作用具有重要的意义. RNA N-糖苷酶是一类核糖体失活蛋白, 它只水解 rRNA 特定位置上一个腺苷酸的糖苷键, 释放一个腺嘌呤碱基, 使核糖体失活. Ricin A 链是研究得最早和最详细的 RNA N-糖苷酶. 迄今已发现有二十五种核糖体失活蛋白具有 RNA N-糖苷酶活性. RNA N-糖苷酶作用于 28S rRNA 的 α -sarcin 结构域, 改变核糖体的构象而使其失活.

关键词 核糖体拓扑学, 核糖体失活蛋白, RNA N-糖苷酶, 天花粉蛋白

核糖体失活蛋白 (ribosome-inactivating protein, RIP) 是一类广泛存在于植物细胞中的能抑制真核细胞核糖体功能的毒蛋白^[1]. 其作用的分子机制有两类: a. RNA 水解酶型, 如帚曲毒素 (α -sarcin), 专一水解 28S rRNA 第 4325 与 4326 位之间的磷酸二酯键^[2]; b. RNA N-糖苷酶 (RNA N-glycosidase) 型, 1987 年, 日本科学家 Endo 等在研究蓖麻毒蛋白 A 链 (ricin A 链) 的作用机制时首次阐明了这种酶的作用机制, 它专一水解大鼠 28S rRNA 第 4324 位腺苷酸的 N-C 糖苷键, 释放一个腺嘌呤碱基^[3,4]. 继 ricin A 链之后, 已发现有 25 种 RIP 具有 RNA N-糖苷酶的活性 (表 1). 我们实验室最近证明天花粉蛋白 (trichosanthin) 也是一种 RNA N-糖苷酶^[5-7], 从而阐明了天花粉蛋白失活核糖体的分子机制.

核糖体结构与功能的研究是分子生物学中一个活跃的领域. 核糖体可以看作是一个由多种蛋白质和 rRNA 组成的复杂酶系 (合成蛋白质的聚合酶). 以前, 多数人认为核糖体蛋白质可能发挥催化作用. 近年来, 随着 ribozyme 的发现, 越来越多的人开始转向认为 rRNA 可能是催化蛋白质生物合成的主要物质, 而核糖体蛋白质只不过起着稳定和改变 rRNA 构型的辅助作用. RNA N-糖苷酶作用机制的阐明为后一种观点提供了新的证据. 因为 rRNA 上除去一个腺嘌呤碱基, 从分子量的变化上看, 核糖体的损失可以说微乎其微, 但核糖体却完全丧失了活力. 这个事实强有力地说明, rRNA 在

* 现在地址: 中国科学院上海细胞生物学研究所, 200031

收稿日期: 1992-08-17, 修回日期: 1992-12-08

蛋白质生物合成中具有重要的生物功能。

表 1 RNA N-糖苷酶

来 源	名 称
异株泻根 (叶子) (<i>Bryonia dioica</i>)	异株泻根毒蛋白 (bryodin)
香石竹 (种子) (<i>Dianthus caryophyllus</i>)	香石竹毒蛋白 30 (dianthin30)
香石竹 (种子) (<i>Dianthus caryophyllus</i>)	香石竹毒蛋白 32 (dianthin32)
多花白树 (种子) (<i>Gelonium multiflorum</i>)	多花白树毒蛋白 (gelonin)
苦瓜 (种子) (<i>Momordica charantia</i>)	苦瓜毒蛋白 (momordin)
商陆 (叶子) (<i>Phytolacca dodecandra</i>)	商陆毒蛋白 (dodecandrin)
美洲商陆 (叶子) (<i>Phytolacca americana</i>)	美洲商陆毒蛋白 (pokeweed antiviral protein, PAP)
美洲商陆 (叶子) (<i>Phytolacca americana</i>)	美洲商陆毒蛋白 I (PAP I)
美洲商陆 (种子) (<i>Phytolacca americana</i>)	美洲商陆毒蛋白 S (PAP S)
培养的美洲商陆细胞	美洲商陆毒蛋白 C (PAP C)
肥皂草 (种子) (<i>Saponaria officinalis</i>)	肥皂草毒蛋白 (saporin)
肥皂草 (种子) (<i>Saponaria officinalis</i>)	肥皂草毒蛋白 6 (saporin 6)
小麦 (种子胚) (<i>Triticum aestivum</i>)	小麦毒蛋白 (tritin)
塑莲根 (<i>Adenia volkensii</i>)	塑莲根毒蛋白 I (volkensin)
塑莲根 (<i>Adenia digitata</i>)	塑莲根毒蛋白 II (modeccin)
蓖麻 (种子) (<i>Ricinus communis</i>)	蓖麻毒蛋白 (ricin)
相思子 (种子) (<i>Abrus precatorius</i>)	相思子毒蛋白 (abrin)
木鳖 (种子) (<i>Momordica cochinensis</i>)	木鳖毒蛋白 S (momorcochin-S)
槲寄生 (叶子) (<i>Viscum album</i>)	槲寄生毒蛋白 (viscumin, mistletoe lectin I)
大麦 (种子) (<i>Hordeum vulgare</i>)	大麦毒蛋白 (barley toxin)
<i>Phoradendron californicum</i>	Phoradendron C. lectin (PCL)
志贺菌 (<i>Shigella dysenteriae</i> 1)	致贺毒蛋白 (shiga toxin)
大肠杆菌 0157: H7) (<i>Escheria coli</i> 0157: H7)	类致贺毒蛋白 (shiga-like toxin)
栝楼 (根) (<i>Trichosanthes kirilowii</i>)	天花粉蛋白 (trichosanthin)
栝楼 (种子) (<i>Trichosanthes kirilowii</i>)	栝楼种子毒蛋白 (trichokirin)

RNA N-糖苷酶的研究具有理论和实际的双重意义。RNA N-糖苷酶的作用底物是真核

细胞的完整核糖体或 60S 亚基, 对自由的 28S rRNA 的活性要低 3 个数量级。但对两者的作用位点相同。因此, RNA N-糖苷酶的研究涉及到 RNA-蛋白质的相互识别和相互作用、核糖体的空间结构 (topography)、蛋白质生物合成的机制等许多方面的内容。继 1989 年 McGrath 等发现天花粉蛋白具有抗艾滋病毒 (HIV-1) 的活性后^[8], 这类蛋白的研究已引起国内外学者的广泛兴趣和重视, 它们对治疗艾滋病和癌症可能有令人鼓舞的应用前景。

1 Ricin A 链的底物专一性和酶学

RNA N-糖苷酶中研究得最多的是 ricin A 链。Endo 等在证明了 ricin A 链是 RNA N-糖苷酶后, 又详细研究了 ricin A 链的底物专一性, 并测出了 ricin A 链作用于不同底物的酶学常数 (表 2)^[9]。他们发现, a. Ricin A 链不能作

表 2 Ricin A 链的底物专一性及酶学常数

底 物	K_m / ($\mu\text{mol/L}$)	K_{cat} /(核糖 体/min)	作用位点及 二级结构特征
原核细胞核糖体	不结合	—	—
大鼠肝 80S 核糖体	2.6	1777	A4324, 茎环结构
大鼠肝 28S rRNA	5.8	0.02	A4324, 茎环结构
大肠杆菌 23S rRNA	3.3	0.03	A2660, 茎环结构
大肠杆菌 16S rRNA	未测定	未测定	A1014, 茎环结构
酵母 25S rRNA	未测定	未测定	A3024, 茎环结构

用于原核细胞核糖体。高浓度的 ricin A 链不能使原核细胞核糖体失活。这与 Hedblom^[10]曾报告 ricin 不能结合大肠杆菌核糖体的结果是一致的。但 ricin A 链能作用于大肠杆菌的自由 rRNA (表 2), 说明大肠杆菌核糖体中的蛋白质以某种方式阻止了 ricin A 链与核糖体的结合, 对核糖体起了保护作用。b. Ricin A 链能作用于真核细胞核糖体。ricin A 链对大鼠 80S 核糖体和自由的 28S rRNA 有相似的 K_m , 但 K_{cat} 值相差 5 个数量级 (表 2)。这说明与原核细胞核糖体蛋白质相反, 真核细胞核糖体蛋白质不但

不影响 ricin A 链与 28S rRNA 的结合, 反而能大大提高酶-底物复合物中 ricin A 链的糖苷酶活力. c. Ricin A 链作用于自由的 28S rRNA 和 23S rRNA 时有相似的 K_m 值和 K_{cat} 值, 说明 28S rRNA 和 23S rRNA 在 ricin A 链水解位点的结构域附近有相同的结构特征. Endo 等认为 ricin A 链能识别一个特殊的茎环结构 (图 1), 茎由 6—7 个碱基对组成, 环内包含相同的 GAGA 序列. Ricin A 链水解其中第一个腺苷酸的 N-C 糖苷键. Montfort 等^[11]通过晶体结构分析提出了 ricin 分子的三级结构模型. 他们发现 ricin A 链中有一个裂隙, 在植物毒蛋白中一些保守的氨基酸正好聚集在这个裂隙中. 由此推测这可能就是 ricin A 链的活性中心. Ricin A 链分子中的这个裂隙可能与其底物 RNA 分子作用位点处的二级结构特征相适应.

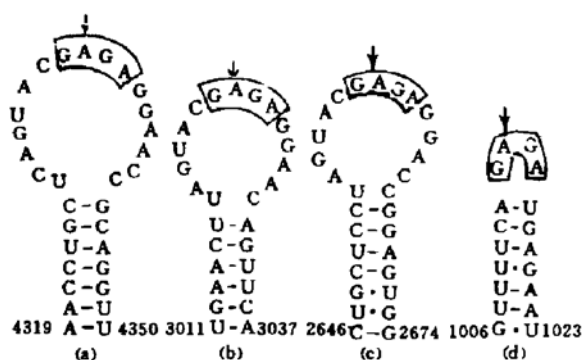


图 1 ricin A 链识别的底物结构

箭头表示 ricin A 链在四核苷酸保守序列 (GAGA) 中的作用位点. (a) 大鼠 28S rRNA; (b) 酵母 25S rRNA; (c) 大肠杆菌 23S rRNA; (d) 大肠杆菌 16S rRNA

α -sarcin 和 ricin A 链在大鼠肝核糖体上的作用位点仅一个核苷酸之差. 这两个相邻的核苷酸位于富含嘌呤的高度保守的 14 核苷酸序列中 (图 2). Endo 等称该区域为 α -sarcin 结构域 (α -sarcin domain). 该区域具有独特的茎环结构. 他们用体外转录的方法合成了 35 聚体的寡核糖核苷酸^[12], 其序列与 α -sarcin 结构域相同. Ricin A 链能水解这个 35 聚体, 并保持它对核糖体所具有的专一性. 这说明单单 α -

sarcin 区域本身就具备了 ricin A 链专一性识别并水解糖苷键的全部结构信息. 这个特殊的 35 聚体是迄今为止能被 ricin A 链专一水解的最小底物. 两者相互识别和相互作用的细节还不清楚.



图 2 α -sarcin 作用位点处的大鼠 28S rRNA 序列与其它核糖体中 RNA 同源区序列的比较

粗体字表示相同的碱基; 箭头表示 α -sarcin 的作用位点

Sperti 等^[13]最近报告了一个有趣的现象. 在多聚尿苷酸的体外翻译系统中, ricin A 链能强烈抑制卤虫 (*Artemia salina*) 核糖体和兔核糖体的活性, 而多花白树毒蛋白 (gelonin) 则不能. 但多花白树毒蛋白在 ATP 和一个高分子量蛋白因子同时存在时则有抑制作用, 达到几乎和 ricin A 链相同的水平. 这个高分子量蛋白因子存在于兔网织红细胞裂解液沉淀出核糖体后的上清液 "S-140" 中, 很可能是一种磷酸激酶. 将 "S-140" 和核糖体预先保温, 则保温时间越长, 加入多花白树毒蛋白后抑制作用越强. 同时他们还发现在 "S-140" 和 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 存在时, 多花白树毒蛋白未被磷酸化, 这些结果说明存在于 "S-140" 中的某种高分子量磷酸激酶磷酸化了核糖体蛋白质, 从而大大提高了这两种核糖体对多花白树毒蛋白的敏感性. Stirpe 等在这之前曾报告不同种类细胞的核糖体对同一种 RIP 的敏感性有很大的差别. 他们当时用的就是多聚尿苷酸系统. 上述结果说明若在多聚尿苷酸系统中加入某些辅助因子, 则不同细胞核糖体敏感性的差别可能会大大缩

小;同时也说明核糖体本身的结构特征(包括空间拓扑结构)是决定核糖体对RIP敏感性的的重要因素。

2 构象变化导致核糖体活性丧失

有证据表明 ricin A 链和 α -sarcin 处理的核糖体发生了构象的改变. Cawley 等^[14]报道高浓度的 Mg^{2+} 能部分恢复经 ricin A 链处理的核糖体的活性. Paleologue 等^[15]发现 ricin 处理使 60S 亚基的热变性曲线向低温方向偏移. 这些结果表明 RNA N-糖苷酶导致的 60S 亚基的失活伴随着因 28S rRNA 的 A4324 位脱嘌呤而产生的构象变化. Cawley 等认为 ricin A 链与核糖体的反应符合 Michaelis-Menten 方程:



其中 Rs 是活性态核糖体 (ricin A 链的底物), Rp 是抑制态核糖体(产物). 没有理由认为第二步反应中 ricin A 链对核糖体的损害是可逆的. 提高 Mg^{2+} 浓度可能是通过第四步反应部分恢复了核糖体的活性:



其中 Rp^* 是一种具有部分活性的核糖体新的构象态.

Terao 等^[16]报告 α -sarcin 和 ricin A 链对 28S rRNA 相邻位点的修饰使核糖体大亚基中相邻区域的 3 个蛋白质发生了构象的变化. α -sarcin 改变了 L3 (核糖体大亚基第 3 号蛋白质,下同)、L4 两个区域的构象. Ricin A 链则改变了 L14 区域的构象. 这三个区域在核糖体的拓扑结构中是相邻的(图 3). Terao 等的研究还表明,两种毒蛋白的协同作用能增强 α -sarcin 引起的 L3 区域的构象变化,这与 ricin A 链能增加 α -sarcin 的水解活力相一致. 越来越多的证据表明 rRNA 在蛋白质的生物合成中具有重要的作用,因此这两种毒蛋白对 28S rRNA 的裂解可能直接降低了蛋白质生物合成的水平. 构象变化使核糖体丧失活性也是一个

重要的因素,前面已经提到,因为高浓度的 Mg^{2+} 能部分恢复核糖体的活性.

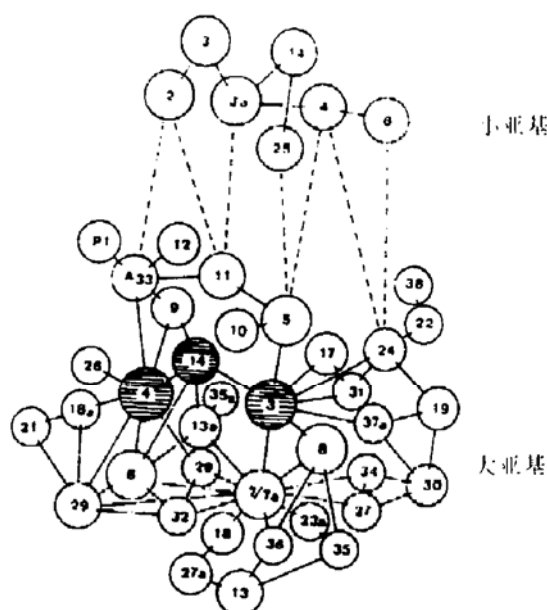


图 3 ricin 和 α -sarcin 影响的大鼠肝核糖体蛋白质的拓扑结构

L3 和 L4 在蛋白质生物合成中可能具有重要的作用. L4 位于核糖体的 A 位, L3 位于核糖体的 P 位. L3, L4 都能用化学法与 EF2 交联. 它们都位于 60S 与 40S 亚基的接触面上,与 mRNA 有直接的相互作用. 因此,有理由认为 ricin A 链和 α -sarcin 在这些区域引起的构象变化能够解释它们对核糖体参与蛋白质合成的抑制效应. (待续)

参 考 文 献

- 董 焱, 刘望夷. 细胞生物学杂志, 1990; 12: 58
- Endo Y, Wool I G. J Biol Chem, 1982; 257: 9054
- Endo Y, Mitsui K, Motizuki M *et al.* J Biol Chem, 1987; 262: 5908
- Endo Y, Tsurugi K. J Biol Chem, 1987; 262: 8128
- 张劲松, 刘望夷. 生物化学与生物物理进展, 1991; 18: 51
- 张劲松, 刘望夷. 生物化学与生物物理进展, 1992; 19: 131
- Zhang J S, Liu W Y. Nucleic Acids Res, 1992; 17: 1271
- McGrath M S, Hwang K M, Caldwell S E *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1989; 86: 2844
- Endo Y, Tsurugi K. J Biol Chem, 1988; 263: 8735
- Hedblom M L, Cawley D B, Houston L L. Arch Biochem

- Biophys. 1976; 177: 46
- 11 Montfort W, Villafranca J E, Monzingo A F *et al.* J Biol Chem, 1987; 262: 5398
- 12 Endo Y, Chan Y L, Lin A *et al.* J Biol Chem, 1988; 263: 7917
- 13 Sperti S, Brigotti M, Zamboni M *et al.* Biochem J, 1991; 277: 281
- 14 Cawley D B, Hedblom M L, Houston L L. Biochemistry, 1979; 18: 2648
- 15 Paleologue A, Reboud J P, Reboud A M. FEBS letter, 1986; 208: 373
- 16 Terao K, Uchiumi T, Endo Y *et al.* Eur J Biochem, 1988; 174: 459

潜活形式的转化生长因子 β 的结构与功能

龙建银 王会信

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 TGF β 是一类多功能的细胞增殖调控因子, 具有广泛的临床应用前景. 天然情况下分泌及重组表达出来的 TGF β 都以无活性的潜活复合物的形式存在, TGF β 潜活复合物的活化是控制 TGF β 生物功能的重要方式. 文章旨在对天然、重组形式的 TGF β 潜活复合物的分子结构及其生理条件下可能的活化机理作一综述.

关键词 转化生长因子, 潜活复合物, 活化机理

1 TGF β 及其潜活形式

1.1 TGF β 简介

转化生长因子 β 是一大类多功能的细胞生长、分化的调节蛋白, 该家族现包括至少 5 种 TGF β (β_1 — β_5) 和其他类似物质^[1]. 它几乎存在于所有正常、癌变的细胞及组织中. 现已证明, 几乎所有细胞都能合成 TGF β 家族中这种或那种成员, 几乎所有正常细胞都有该家族成员的膜结合受体, TGF β 几乎参与了哺乳动物各种细胞的病理生理过程. 依靶细胞不同, TGF β 可执行促进/抑制增殖分化作用; 它在创伤愈合、胚胎发育、细胞外基质形成、骨的重建等方面也有重要作用. 此外, 它还参与免疫调节、神经系统的发育及营养等过程. 有专家估计, 该家族的主要成员 TGF β_1 有可能在五年内开始临床应用于创伤愈合、免疫抑制、骨髓保护、肿瘤抑制等方面.

1.2 TGF β 的一级结构

TGF β cDNA (β_1 — β_5) 已被克隆并已在哺

乳动物细胞 COS, CHO 中表达成功. 活性 TGF β_1 是 25kD 的均二聚体, 由 2 个相同的 12.5kD 的肽链借一对二硫键交联起来. 成熟肽单体由 112 个氨基酸组成, 并以 390 个氨基酸的前体分子合成出来, 单体部分位于前体的羧基端^[1,2]. 见图 1.

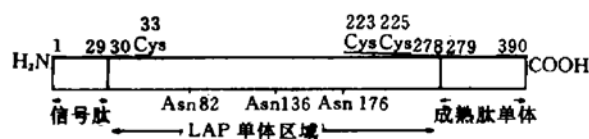


图 1 TGF β_1 前体的一级结构

TGF β_1 分泌之前进行的翻译后加工包括^[3,4]: a. 信号肽酶切除 N 端 29 个氨基酸的信号肽; b. 糖基化 (在 3 个糖基化位点 Asn⁸², Asn¹³⁶, Asn¹⁷⁶ 上添加唾液酸、甘露糖); c. 磷酸化 (在 Asn⁸², Asn¹³⁶ 的糖链中心的甘露糖上合成 Man-6-P (6-磷酸-甘露糖)); d. 蛋白酶水解

Code Domains and Their Potential Functions.

Lao Weide. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (1): 13

Various sequence blocks, due to their specific primary sequence box, and/or a curved helical DNA conformation, and/or a non- β -helical DNA structure, can be organized in the corresponding higher order structures, and behave as functional sequence domains recognized and bound by specific proteins. They may be defined as "code domains". Code domains are genetically instructive for specific molecular interactions or processes, important not only in nucleus during interphase and during cell division, but also in differential gene expression during development and differentiation.

Key words code domain, chromatin superstructure, centromere, telomere, nuclear matrix, homeobox gene, differentiation and development

Structure and Function of Respiratory Chain Enzyme System. Xu Jianxing. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (1): 18

The studies in this lab on the enzyme system of respiratory chain were reviewed briefly. Two inhibitors which affect simultaneously on three Q-related enzymes of complex I, II and III were synthesized. They could be an useful tools in the studies of ubiquinone reactions in respiratory chain. The direct interaction between TTFA inhibitive site of $\text{QH}^+ \rightarrow \text{QH}_2$ of complex I and cytochrome b_{562} of complex III was found. This kind of interactions may play some roles in modulating the electron transfer from complex I to complex III. The maxi-

mum reconstitutive activity of lipid-depleted succinate-cytochrome c reductase with mixed phospholipids PC : CL : PE = 2 : 2 : 1 were obtained, this means not only the lipid but also thier composition were important for regulating the enzyme activiy of respiratory chain.

Key words ubiquinone, inhibitor, interaction

Progress in Topography of Ribosomal RNA and RNA N-Glycosidase Research (I). Zhang Jinsong, Liu Wangyi. (*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (1): 23

Studies on ribosomal RNA topography play an important role toward elucidation of the functional roles of rRNAs in protein synthesis. RNA N-glycosidases are a group of ribosome-inactivating proteins which inactivate ribosomes by hydrolyzing the N—C glycosidic bond of a special adenylic acid in rRNA and releasing the adenine. Ricin A-chain is the first determined RNA N-glycosidase which has been studied in the greatest detail. Up to the present, 25 glycosidases have been characterized. The action site of RNA N-glycosidases lies in the α -sarcin domain of 28S rRNA. Treatment of RNA N-glycosidases induces conformational change of ribosomes and leads to the inactivation.

Key words ribosome topography, ribosome-inactivating protein (RIP), RNA N-glycosidase, trichosanthin

Latent Forms of Transforming Growth Factor- β : Structure and Function. Long Jianyin, Wang Huixin. (*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys.*