

- 2 Michell P J, Tjian R. *Science*, 1989; **245**: 371
- 3 Jones N. *Cell*, 1990; **61**: 9
- 4 贾弘提. *生理科学进展*, 1993; **24** (4): 298
- 5 Courey A J, Holtzman D A, Jackson S P *et al.* *Cell*, 1989; **59**: 827
- 6 Lamb P, McKnight S L. *TIBS*, 1991; **16**: 417
- 7 Olson E N. *Genes Dev*, 1990; **4**: 1454
- 8 Davis R L, Cheng P F, Lassar A B *et al.* *Cell*, 1990; **60**: 733
- 9 Benezra R, Davis R L, Lockshon D *et al.* *Cell*, 1990; **61**: 49
- 10 Treacy M N, Neilson L I, Turner E E *et al.* *Cell*, 1992; **68**: 491
- 11 Ferre-D' Amare A R, Prendergast G C, Ziff E B *et al.* *Nature*, 1993; **363**: 38
- 12 Ptashne M. *A genetic switch*. Cambridge, Massachusetts: Blackwell Scientific Publications & Cell Press, 1986: 33
- 13 Yokoyama C, Wang X, Briggs M R *et al.* *Cell*, 1993; **75**: 187
- 14 Wechsler D S, Dang C V. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; **89**: 7635
- 15 Fisher D E, Parent L A, Sharp P A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; **89**: 11779
- 16 Dang C V, Dolde C, Gillison M L *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; **89**: 599
- 17 Fisher F, Goding C R. *EMBO J*, 1992; **11**: 4103
- 18 Ayer D E, Kretzner L, Eisenman R N. *Cell*, 1993; **72**: 211

- 19 Blackwood E M, Eisenman R N. *Science*, 1991; **251**: 1211
- 20 Kretzner L, Blackwood E M, Eisenman R N. *Nature*, 1992; **359**: 426

Protein-Protein and Protein-DNA Interactions in the Regulation of Eukaryotic Transcription. Li Mingyi, Jia Hongti (*Department of Biochemistry, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

Abstract Protein-protein and protein-DNA interactions and interaction-mediating structure of both protein and DNA molecules were summarized by combination of structure-function studies on eukaryotic transcription factors and DNA. Coordinate or antagonistic activities occur after protein-protein interactions and DNA binding reactions. Dimerization and competition in these interactions are of an universal importance in the regulation of eukaryotic transcriptions.

Key words protein-protein interaction, protein-DNA interaction, regulation of eukaryotic transcription

线粒体 DNA 和疾病

蒋秉坤

(蚌埠医学院临床生物化学教研室, 蚌埠 233003)

摘要 人线粒体 DNA 是含有 16569 bp 的闭环双链分子. 它为 13 种氧化磷酸作用酶的亚单位、结构 rRNAs 和 tRNAs 编码. 近年来很多引起人类疾病的线粒体 DNA 突变已被确定, 如眼盲、耳聋、心力衰竭和人类退行性疾病等. 线粒体 DNA 疾病可能比先前想象的多.

关键词 线粒体 DNA, 基因突变, OXPHOS 疾病

线粒体 (mitochondrial, mt) 是高等动物细胞内含有 DNA 的细胞器. 植物和某些单细胞真核生物除线粒体外可能还有叶绿体. 线粒体呈卵圆形, 大小为 $0.5\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$ — $0.5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$. 在结构上有外膜、高度折叠的内膜和基

质, 是进行氧化磷酸化反应的部位和为细胞提供能量的主要场所. 食物中有机分子通过三羧酸循环一系列化学反应降解产生 CO_2 和 H_2O ,

收稿日期: 1994-01-22, 修回日期: 1994-05-23

电子沿呼吸链复合物移到线粒体内膜, 趋使 ADP 转变成能量的载体 ATP. 人类线粒体 DNA 的全部核苷酸序列已由剑桥分子生物学研究所的 F. Sanger 实验室完成^[1]. 人们认为线粒体与疾病之间没有关系的概念, 被 mtDNA 突变可引起人类某些疾病的观察所动摇. 本文简要地概述 mtDNA 的分子生物学研究成果及其突变与人类疾病关系的研究进展.

1 线粒体 DNA 的结构

人类线粒体 DNA 有 16569 bp, 每个线粒体内有 1—10 个基因组. 每个细胞内线粒体数目不等, 多者可达 800 个, 占核 DNA 量的 1% 左右. 线粒体 DNA 2 条链的碱基组成显著不同. 重链 (H) 含有较多的鸟苷酸 (G) 残基, 是 12S 和 16S rRNA, 14 种 tRNA 和 12 种多肽的模板. 轻链 (L) 含较多胞苷酸 (C) 残基, 为 8 种 tRNA 和 1 种多肽编码^[2]. (图 1)

线粒体 DNA 基因的排列非常紧凑, 没有内含子, 某些基因可相互重叠, 几乎每个碱基都用于组建基因^[3], D-袢 (displacement-loop, D-loop) 的 87bp 处于操纵子之间区域是例外. D-袢区域内有 2 个线粒体 DNA 启动基因 (P_H : np 545—567; P_L : np 392—445)、3 个保守序列区域 (conserved sequence blocks, CSB, CSB I: np 213—235, CSB II: np 299—315, CSB III: np 346—363) 和 1 个终止相关序列 (termination-associated sequence, TAS, np 16147—16172).

大部分线粒体 DNA 没有 5' 和 3' 末端不翻译序列, 从起始码开始直到终止码停止,

表 1 线粒体 DNA 基因结构^[2]

tRNA 基因:	rRNA 基因:
F=tRNA ^{Phe}	12S rRNA
V=tRNA ^{Val}	16S rRNA
L=tRNA ^{Leu-1}	mRNA 基因:
I=tRNA ^{Ile}	ND1 NADH 脱氢酶 1
Q=tRNA ^{Gln}	ND2
M=tRNA ^{Met}	CO I 细胞色素氧化酶 I
A=tRNA ^{Ala}	COII
W=tRNA ^{Tyr}	COIII
N=tRNA ^{Asn}	ATPase 8
C=tRNA ^{Cys}	ATPase 6
Y=tRNA ^{Tyr}	ND3
K=tRNA ^{Lys}	ND4L
S=tRNA ^{Ser-1}	ND4
D=tRNA ^{Asp}	ND5
G=tRNA ^{Gly}	ND6
R=tRNA ^{Arg}	cyt b 细胞色素 c 氧化还原酶
H=tRNA ^{His}	
S=tRNA ^{Ser-2}	
L=tRNA ^{Leu-2}	
E=tRNA ^{Glu}	
T=tRNA ^{Thr}	
P=tRNA ^{Pro}	

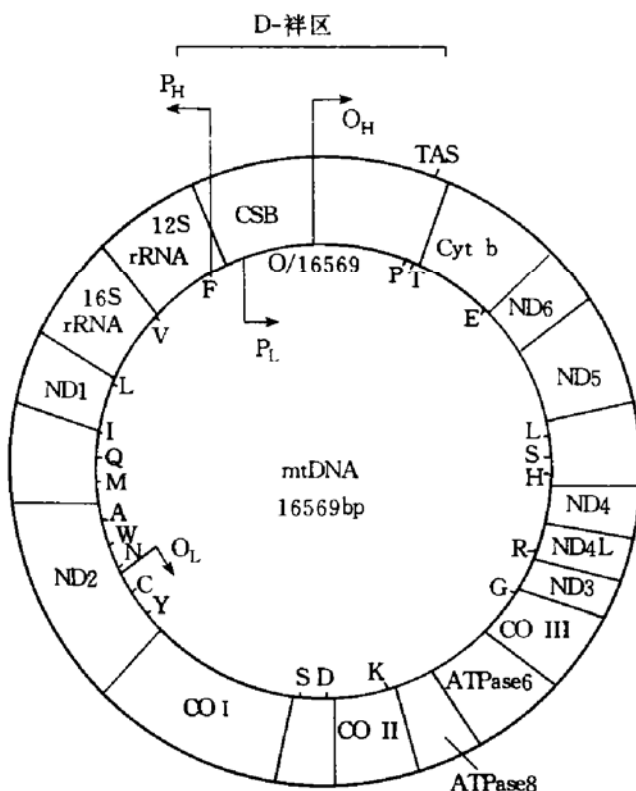


图 1 人线粒体基因组图

从 H 链开始 (O_H) 编号 (0/16569), 逆时针绕环定位, 每个基因的功能已经确定. O_H : 重链复制起始点; O_L : 轻链复制起始点; P_H : 重链启动基因; P_L : 轻链启动基因; TAS: 终止相关顺序; CSB: 保守序列区. 其它 37 种基因参见表 1.

poly (A) 尾是以后加上去的, 和细菌合成蛋白质一样以甲酰蛋氨酸开始. 通常一个基因的最后 1 个碱基与下一个基因的第 1 个碱基相邻, 或有时为下一个基因的第 1 个碱基. 有 5 个读码框没有终止码, 仅为 U 或 UA, 通过转录多腺苷酸化作用建立终止码 UAA. 有 3 种情况 AGA 和 AGG 作为终止码而不是精氨酸的密码子. 线粒体 DNA 转录从 D-袂内的 2 个启动基因 (P_H 和 P_L) 开始逆向读码. 例如 H 链在 12S rRNA 基因前 tRNA^{Phe} 之前开始转录并循着环达 D-袂的终止码. 转录体中的 22 种 tRNA 因其空间折叠构象被 RNase P 裂解释放, 同时产生 rRNAs 和 mRNAs (图 1 和表 1). 除 ATPase 6 和 CO III 基因是连续性的仅有例子外, 其余至少有 1 个 tRNA 基因将相邻基因分开. 大的 H 链转录体未能被检出, 提示它在转录之后即受到加工. 检出 L 链转录体的存在, 表明它的加工在其后晚些时间进行.

线粒体 DNA 基因编码氧化磷酸化酶的亚单位有 13 种. 五种呼吸链复合物分布在线粒体的内膜上. 复合物 I 即 NADH-CoQ-氧化还原酶有 39 种多肽, 其中 7 个 (ND1、ND2、ND3、ND4L、ND4、ND5 和 ND6) 多肽亚基由线粒体 DNA 编码. 复合物 II 即 CoQ-细胞色素 c 氧化还原酶 (cyt b) 的 10 个多肽中有 1 个由线粒体 DNA 编码. 复合物 III 即琥珀酸-CoQ-氧化还原酶的 4 个多肽全部由核 DNA 作为模板. 复合物 IV 即细胞色素 c 氧化酶的 13 个多肽中有 3 个 (CO I, CO II 和 CO III) 由线粒体 DNA 编码. 复合物 V 即 ATP 合成酶共 12 个多肽, 其中 2 个 (ATPase 6 和 ATPase 8) 是线粒体编码的.

2 线粒体 DNA 突变与人类疾病

线粒体 DNA 与细胞核 DNA 有某些不同特点. a. mtDNA 是母系遗传, 它的基因均来自母亲, 男性线粒体基因在每个世代中被排斥. b. mtDNA 碱基顺序进化率比核 DNA 高 10—20 倍, 任何 2 个人 mtDNA 平均每 1000 个碱基中可有 4 个不同, 高者可达 3%. c. mtDNA

突变引起病人表型与氧化磷酸化作用缺陷所致的一系列症状相关.

2.1 线粒体 DNA 突变引起的疾病

线粒体 DNA 突变可分为 4 类, 即错义突变、生物发生突变、插入-缺失突变^[4-6]和拷贝数突变^[2]. 各种突变所引起的临床表型不同, 现举几例.

遗传性视神经病 (Leber's hereditary optic neuropathy, LHON)^[6] 是一种母系遗传性疾病. 成年人因视神经坏死引起急性或亚急性眼盲. 两眼中心视力迅速丧失, 但周边视力存在. 发病年龄在 6—60 岁 (平均 27 岁). 有明显的性别差异, 男性与女性比例为 4:1. 患者还有心传导缺陷和行为异常. ND4 蛋白质的第 340 氨基酸残基由精氨酸变为组氨酸, mtDNA 突变发生在 np 11778. 这种突变约在半数病例中存在, 507 例对照未检出突变. 由于基因组失去 SfaNI 和出现 Mae I 限制性核酸内切酶点而易于检测. 其它引起眼盲的 3 种突变分别发生在 np 3460, 4160 和 15257. 3460 残基的突变使 ND1 的丙氨酸变成苏氨酸, 有 9 个家系中存在此突变, 而 107 个对照均为阴性. np 4160 突变导致 ND1 的亮氨酸被脯氨酸取代已在一个家庭中检出, 18 个对照均无此突变. np 15257 突变使 cyt b 的天冬氨酸变为天冬酰胺的情况见于 4 个家庭, 在 362 个对照中仅有 1 例^[2].

Howell 等^[7] 报告一种遗传性视神经病的极端类型, 有严重的神经异常和婴儿脑病.

肌阵挛羊痫风和参差不齐红纤维病 (myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease, MERRF) 是一种母系遗传性疾病. 主要表现为肌阵挛性癫痫和线粒体病、神经性听力丧失、呼吸衰竭、扩张性心肌病和肾功能不全等. 该病与线粒体复合物 I 和 IV 受损害引起氧化磷酸化作用 (oxidative phosphorylation, OXPHOS) 酶缺陷有关. 大多数由 mtDNA 的 np 8344 突变, 导致 tRNA^{Lys} 的 TΨC 袂的腺苷酸变成鸟苷酸残基 (图 2), 引起 mtATP 产生能力的降低和蛋白质合成减少^[8], 引起中枢神经系统、肌肉

和心脏等器官的进行性损害. 20 岁以下年轻人须达到 95% mtDNA 突变才呈现 MERRF 表型, 一般人 mtDNA 的突变即使达 85%, 在临床上仍属正常表型. 60 至 70 岁的老年人 mtDNA 突变达 85% 时便表现严重损害, 63% mtDNA 突变引起中等程度损害. 这就是为什么 mtDNA 突变在早年仍是正常表达, 随着年龄增长后才有症状而且逐渐加重.

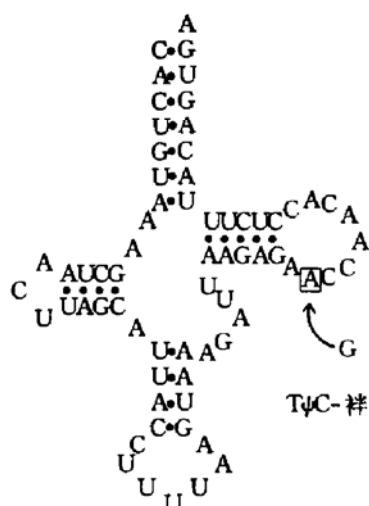


图 2 线粒体 tRNA^{Leu}

分子 TΨC-样中的 A → G, 相当于
mtDNA np 8344 突变^[9].

慢性眼外肌麻痹附加综合征 (chronic external ophthalmoplegia plus syndrome) 是由于呼吸链复合物 I 活性完全缺陷、复合物 IV 和 V 的部分缺陷所致. 应用 CoQ 10 和琥珀酸盐治疗能部分改善呼吸功能. 限制性核酸内切酶分析 mtDNA 缺失 4.9 kbp, 造成复合物 I 的 4 个基因、复合物 IV 的 1 个基因和复合物 V 的 2 个基因及 5 个 tRNA 基因的缺失^[8].

2.2 OXPHOS 疾病发展与年龄关系

大部分 mtDNA 疾病的症状直到晚年才出现, 且以后逐渐加重. 对肌阵挛羊痫风和参差红纤维病 (MERRF) 研究提示这是由于氧化磷酸化作用随着年龄增长而逐渐下降的缘故^[8,9]. 近年来已从形态、生化和分子研究证实正常人骨骼肌和肝脏的呼吸速率和复合物 I 及 IV 的酶活性减低与 OXPHOS 随年龄增长而下降的现象一致, 而且与 mtDNA 损伤的增加相

关. 超氧化物阴离子和 H₂O₂ (羟基) 的氧化作用可能是引起 mtDNA 损伤与年龄增长有关的原因. 人体每秒钟受到 7×10^{12} 氧化作用的撞击, 线粒体 DNA 受损伤程度大于核 DNA 10 倍左右. 线粒体 DNA 对氧化作用的损伤极为敏感, 进而可导致细胞死亡.

2.3 退行性疾病与 OXPHOS 缺陷

对线粒体突变研究表明氧化磷酸化作用有下列共同特点: a. 临床受累及病人与 OXPHOS 缺陷有关, b. 受到损害组织如中枢神经系统、肌肉、心脏、胰岛、肝脏和肾脏等是线粒体供能较多的部位, c. 遗传学关系较复杂, mtDNA 和核 DNA 突变可有相似的表现, d. 通常到晚年才表达, 且随着年龄增长病情逐渐加重.

很多常见的退行性疾病具有上述 1 个或多个特点, 例如癫痫、心脏病、帕金森病、阿尔茨海默 (Alzheimer) 病和成年人发病的糖尿病等. 癫痫及其发作是 mtDNA 突变的常见临床表现已在 MERRF 中得到证实. 慢性退行性心脏病、缺血性心脏病和多种心力衰竭等^[10,11] 均与 mtDNA 突变相伴随, 这些情况与 OXPHOS 基因受到损害有关. 线粒体 DNA 的突变所引起的人类某些疾病之间关系的认识仅刚开始, 许多问题均有待于进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Anderson S, Bankier A T, Borel B G *et al.* Nature, 1981; **290**: 457
- 2 Wallace D C. Annu Rev Biochem, 1992; **61**: 1175
- 3 Grivell L A. Sci Amer, 1983; **248** (3): 60
- 4 Holt I J, Harding A E, Morgan-Hughes J A. Nature, 1988; **331**: 717
- 5 Rotig A, Colma M, Blanche S *et al.* Lancet, 1988; **2**: 567
- 6 McShane M A, Hammans M, Sweeney I *et al.* Am J Hum Genet, 1991; **48**: 39
- 7 Howell N, Kubacka I, Xu M *et al.* Am J Hum Genet, 1991; **48**: 935
- 8 Shoffner J M, Lott M T, Voljavec A S. Proc Natl Acad Sci USA, 1989; **86**: 795
- 9 Shoffner J M, Lott M T, Lezza A M *et al.* Cell, 1990;

61: 931

10 Corral-Debrinski M, Stępien G, Shoffner L M. J Am Med Assoc. 1991; 266: 1812

11 Muller-Hocker J. Am J Pathol. 1989; 134: 1167

Mitochondrial DNA and Diseases. Jiang Bingkun (Bengbu Medical College, Bengbu 233003, China).

Abstract The human mitochondrial DNA (mtDNA) is a 16569 bp closed circular double helix molecule. It codes for 13 subunits of oxi-

dative phosphorylation (OXPHOS) enzyme plus the structural rRNAs and tRNAs. Over the past years, a number of mtDNA mutations that cause human diseases have been identified, such as blindness, deafness, cardiac failure, and human degenerative diseases. Mitochondrial DNA diseases may be much more common than previously thought.

Key words mitochondrial DNA, genetic mutation, OXPHOS disease

吡咯喹啉醌 (PQQ) 的研究进展*

张经纬 赵永芳**

(武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

摘要 吡咯喹啉醌是一种与烟酰胺核苷酸、黄素核苷酸不同的新型辅基。近年来, 荷兰、日本等学者对它进行了初步研究, 而国内研究起步较晚。文章综述了吡咯喹啉醌的发现、分离纯化、鉴定、理化性质以及生理功能, 这有利于进一步研究吡咯喹啉醌的分布、产生机理、生物学性质、生理功能及其应用。这将对促进酶学学科的发展具有重要的理论和实践意义。

关键词 吡咯喹啉醌, 辅基, 分离纯化

众所周知, 脱氢酶 (dehydrogenase) 的辅基有烟酰胺核苷酸 (NAD^+ 和 NADP^+)、黄素核苷酸 (FMN 和 FAD)、辅酶 A、辅酶 Q 等, 迄今为止, 对它们的结构、理化性质、生理功能已经进行了较深入的研究。在 60 年代还发现了另一类脱氢酶, 它们并不依赖于烟酰胺核苷酸、黄素核苷酸等, 能氧化很多一级醇, 并以甲基吩嗪硫酸甲酯为最初受氢体, 直到 70 年代末才清楚它们含有一种新型的辅基——吡咯喹啉醌 (pyrroloquinoline quinone, PQQ), 后来在氨氧化酶、硝基链烷氧化酶、腈水解酶等氧化还原酶中也发现有辅基吡咯喹啉醌, 并将这一类以吡咯喹啉醌为辅基的酶统称为醌蛋白 (quinoproteins), 目前发现主要分布于原核生物以及部分植物和哺乳动物之中, 人们对它的结构、理化性质和生理功能做了一定研究, 认

为吡咯喹啉醌不仅是醌蛋白的辅基, 而且作为一种生长因子, 促进微生物和植物的生长, 刺激植物花粉的萌发等。

1 吡咯喹啉醌 (PQQ) 的发现

在脱氢酶的研究过程中, 人们从荧光极毛杆菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 的膜上纯化得到了与电子传递链相连的 D-葡萄糖脱氢酶, 发现此酶的辅基与 NAD (P) 和黄素辅基不同^[1]。而且从亚氧化葡萄糖细菌 (*Gluconobacter suboxydans*) 中分离出的醇脱氢酶^[2]、醛脱氢酶^[3]、D-葡萄糖脱氢酶^[4]以及从细菌 W3A1 分

* 国家自然科学基金资助项目。

** 通讯联系人。

收稿日期: 1994-01-25, 修回日期: 1994-05-21