核开关：一个新的基因调控元件，一类潜在的药物靶点

骆迎峰[1,2] 陈跃磊[1,3]*
（[1]浙江大学生命科学学院，杭州 310029；[2]浙江大学沃森基因组科学研究院，杭州 310008；
[3]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，上海 200031）

摘要 核开关是一类通过结合小分子代谢物调控基因表达的 mRNA 元件．它位于特定的 mRNA 区域，可以不依赖任何蛋白质因子而直接结合小分子代谢物，继而发生构象重排，影响该 mRNA 的活动．核开关在特定细菌中，参与调控包括维生素 B_{12} 和甲硫氨酸生物合成等在内的代谢途径．核开关的发现，尤其是其可以特异性紧密结合特定配体，从而精确调控生物基本代谢途径的特征，使人们开始关注它在科研和医学上的应用潜力．核开关的研究进展、主要特点和作用机制已经引起了人们的关注和思考．

关键词 核开关，构象重排，基因调控，基本代谢途径
学科分类号 Q522

基因表达调控中的反式作用因子是起调控作用的蛋白质因子，然而最近 Breaker 领导的研究小组发现，大肠杆菌（*Escherichia coli*）维生素 B_{12} 转运蛋白 BtuB mRNA 的 5′-UTR，可以直接结合维生素 B_{12} 的辅酶 5′-脱氧腺苷钴胺素（5′-deoxyadenosylcobalamin，Ado-Cbl），进而抑制 BtuB 蛋白的翻译[1]．于是，这类参与调节基因活动的 mRNA 元件（序列）被称为“riboswitch”[2]，其变构调节剂或效应剂是一类小分子化合物，如 Ado-Cbl 等，而不是通常所认为的蛋白质因子．考虑到生化本质同为 RNA 且具有酶活性的“ribozyme”被译为核酶，我们将“riboswitch”暂且译成“核开关”．近来，有关核开关的研究成果突飞猛进，迄今已经在细菌、真菌和植物中发现 7 种不同的天然核开关，它们参与了多种重要的生命活动[3~8]．下面我们将分别介绍核开关的特点、作用机制以及它们的应用前景．

1 核开关的特点

1.1 核开关的结构

目前发现的 7 种天然核开关分别是：B_{12} 核开关、TPP（硫胺素焦磷酸）核开关、FMN（黄素单核苷酸）核开关、SAM（S-甲腺甲硫氨酸）核开关、赖氨酸核开关、鸟嘌呤核开关和腺嘌呤核开关[3]．核开关可以位于 mRNA 的 5′-UTR，也可以位于前体 mRNA 的 3′-UTR 和内含子区域[4, 5]．它由两个重要的功能域组成，沿着转录方向，分别是可以与小分子配体结合的适体或适配子（aptamer）和通过变构方式控制基因活动的“表达模块”（expression platform 或 expression module）[3, 6, 9]．核开关含有大量的碱基互补区域，可以形成多个茎环结构[10]．比较分布在不同细菌中的同一类型核开关发现，适体区的部分序列高度保守，并形成相近的二级结构，如在枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）和其他 14 种细菌中都有适体 G box，它们位于编码嘌呤合成转运相关酶 mRNA 的 5′-UTR．相对适体而言，“表达模块”的变异性较大，没有相对保守的一级结构和二级结构．适体的保守性来源于配体在进化历程中的结构一致性，这样可以保证适体始终高效地结合特定配体，而基因活动调控区的多样性可能是进化选择的结果[3, 6]．

1.2 与核开关结合的配体

与核开关适体部位结合的配体是一类小分子化合物．其中包括很多酶类的辅酶或辅基，参与重要的生化反应，如 TPP 核开关中的 THI box 特异结合维生素 B_1 的活性形式 TPP[2, 4, 11]，而 TPP 本身参与了糖代谢中醛和酮类的合成和裂解反应；有的配体是酶的代谢产物，能够调控该酶的基因表达，如编码天冬氨酸激酶Ⅱ的 mRNA 就存在赖氨酸核开关，该核开关的适体部分 L box 可以专一性结合 L 型赖氨酸，从而终止该 mRNA 的转录，而该酶的

* 通讯联系人．
Tel：0571-86021419，E-mail：yuelion@163.com
收稿日期：2004-01-14，接受日期：2004-04-29

作用正是将L型天冬氨酸转化为L型赖氨酸[6].

1.3 适体与相应配体的结合

核开关的适体部位能特异性紧密结合小分子配体，这种特性对于调节细胞活动来说是必不可少的，它保证了细胞对微环境作出快速、精确应答. 这种特异性甚至可以区分手性异构体，如适体L box只能结合L型赖氨酸，而不能识别D型赖氨酸[6]. 适体和配体结合后形成复合物的解离常数最低可达nmol/L级，如适体RFN box与配体FMN结合后的解离常数小于10 nmol/L[12]. 不过，适体-配体复合物也有相对较高的解离常数，像L型赖氨酸结合适体L box后的解离常数约为1 000 nmol/L[6]. 适体-配体复合物解离常数的不同，可能源于细胞对几种物质不同的需求量.

关于配体的命运，Mironov等[11]发现FMN与适体RFN box结合，引起核开关构象重排并发挥作用后，就不可逆地从配体-适体复合物中解离下来，而解离后的FMN可以被重复利用. 由此可见，配体的存在可能只是引发核开关发生构象重排的一个“扰动”. 而用高分辨率的X射线晶体衍射研究适体-配体复合物可能是探讨配体与核开关作用机制的好方法[13].

2 核开关的作用机制

核开关主要在转录和翻译两大水平上调控基因表达，其初期作用过程大致相同，即适体RNA和小分子配体特异性紧密结合后，发生核开关的构象重排，进而引起适体所在的mRNA转录终止，形成一个没有活性的短转录物，或者构象重排形成的RNA二级结构抑制翻译的起始，从而反馈调节与该配体的合成、代谢和转运相关基因的活动[14, 15]（图1）.

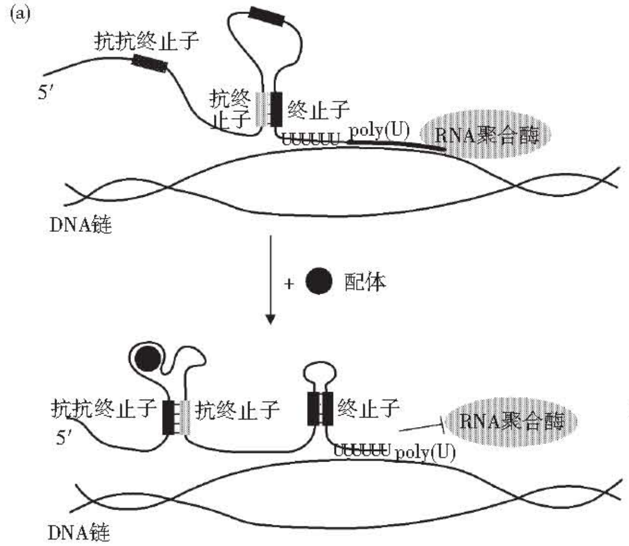

Fig. 1 The mechanism of riboswitches involved in gene regulation[15]

图1 核开关参与基因调控的作用机制[15]

（a）转录终止；（b）翻译抑制.

转录终止：从mRNA的3′到5′方向依次是“终止子”（terminator）序列、“抗终止子”（anti-terminator）序列和“抗抗终止子”（anti-anti-terminator）序列. 其中“终止子”可以形成一个稳定的发夹结构. 转录开始后，先转录的抗终止子和部分终止子序列首先结合，使终止子的发夹结构无法形成，于是转录完全，形成完整的mRNA. 当存在目标配体时，配体与核开关中的适体紧密结合，引起核开关构象重排，诱导抗终止子和抗抗终止子结合，并使终止子形成发夹结构，RNA聚合酶从poly（U）末端脱落，从而形成没有编码功能的mRNA短转录物.

翻译抑制：在起始密码子上游分别有SD（Shine-Dalgarno）序列、抗SD（anti-SD）序列和抗抗SD（anti-anti-SD）序列. 若没有相应的小分子代谢物，抗SD序列和抗抗SD序列首先结合，核糖体能够正确附着在SD-AUG序列上，翻译正常进行. 而目标配体的存在，能促使SD和抗SD序

列结合，核糖体不能附着到 mRNA 上，翻译中止，即成熟 mRNA 的翻译由于配体的存在而被抑制.

Lai[15]通过比较发现，单个基因多由翻译抑制来调节，而含有多个转录单元的操纵子则更可能通过转录终止来调控生物合成，这样可以使细胞活动更加经济有效. 更为复杂的是，一些小分子代谢物可以同时在转录终止和翻译抑制两个水平上调控基因活动. 分析相应的核开关序列发现，终止子发夹结构两侧分别含有 SD 和抗 SD 序列[2, 16].

3 讨论和展望

3.1 古老的调控机制

许多物种都含有这类参与多种重要生命活动的核开关，例如拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）、水稻（*Oryza sativa*）、早熟禾（*Poa secunda*）、粗糙脉孢菌（*Neurospora crassa*）等物种的基因组中都有和大肠杆菌以及枯草芽孢杆菌的 TPP 核开关高度同源的序列[4]，而最近在米曲霉（*Aspergillus oryzae*）中也发现了这种核开关，它参与了内含子的剪接过程[5]. 研究腺嘌呤核开关发现，配体腺嘌呤的结合能激活基因 *ydhL*，进而将多余的嘌呤泵出细胞外，以维持细胞内正常的嘌呤浓度[17]，而不是像先前所认为的那样负反馈抑制基因转录或翻译. 另外有人估计，在枯草芽孢杆菌中大约 2% 基因的调控与核开关有关[3, 8]. 这些发现都暗示着这种高效简洁的调控元件在进化早期就已经出现了，并一直参与了一个古老而又普遍的基因调控系统，发挥着重要的生物学功能. 核开关位于 mRNA 的非编码区，作为“RNA 世界”的一部分，与 miRNA[18]等其他 ncRNA 一样，在基因调控中有着鲜为人知的重要作用. 这使得我们不得不重新开始关注 RNA 的其他功能，而不仅仅局限在基因的开放阅读框（ORF）.

3.2 核开关的应用前景

天然核开关参与特定细菌基本生命代谢的生物合成、代谢和转运途径，这预示着核开关可以作为人工合成配体型药物的作用靶点. 体外实验表明，抗菌药 S-2-氨乙基-L-半胱氨酸（S-（2-aminoethyl）-L-cysteine，AEC）可以和赖氨酸核开关的适体L box 结合，以减少赖氨酸的合成，这表明该抗生素的药理作用一部分来源于它与 L box 的特异性紧密结合[7]. 和其他的新药筛选策略相比，将 mRNA 作为直接的药物靶点，不需要蛋白质的表达、纯化过程. 因此，用核开关筛选高效特异性抗菌药很可能是未来药物开发的最佳策略之一. 另外，天然核开关与配体结合时的特异性，使我们更清楚地看到人工构建的核开关，在调控外源基因表达以及作为生物探测器部件等领域的应用潜力[19, 20].

我们期待今后能有更好的手段，在更大范围内寻找新的天然核开关，而不仅仅依赖于序列比对. 或许基因组 SELEX（systematic evolution of ligands by exponential enrichment，指数富集配基的系统进化）技术会成为筛选核开关的好方法. 而这些核开关可否像蛋白质一样结合重金属离子、探测 pH 值变化，将有待于进一步的研究.

参 考 文 献

1 Nahvi A, Sudarsan N, Ebert M, *et al.* Genetic control by a metabolite binding mRNA. Chem Biol, 2002, **9** (9): 1043 ~ 1049

2 Winkler W, Nahvi A, Breaker R R. Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. Nature, 2002, **419** (6910): 952 ~ 956

3 Mandal M, Boese B, Barrick J E, *et al.* Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. Cell, 2003, **113** (5): 577 ~ 586

4 Sudarsan N, Barrick J E, Breaker R R. Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes. RNA, 2003, **9** (6): 644 ~ 647

5 Kubodera T, Watanabe M, Yoshiuchi K, *et al.* Thiamine-regulated gene expression of *Aspergillus oryzae* thiA requires splicing of the intron containing a riboswitch-like domain in the 5′-UTR. FEBS Lett, 2003, **555** (3): 516 ~ 520

6 Sudarsan N, Wickiser J K, Nakamura S, *et al.* An mRNA structure in bacteria that controls gene expression by binding lysine. Genes & Dev, 2003, **17** (21): 2688 ~ 2697

7 Epshtein V, Mironov A S, Nudler E. The riboswitch-mediated control of sulfur metabolism in bacteria. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, **100** (9): 5052 ~ 5056

8 Winkler W C, Nahvi A, Sudarsan N, *et al.* An mRNA structure that controls gene expression by binding S-adenoslmethyionine. Nat Struct Biol, 2003, **10** (9): 701 ~ 707

9 Kaempfer R. RNA sensors: novel regulators of gene expression. EMBO Rep, 2003, **4** (11): 1043 ~ 1047

10 Vitreschak A G, Rodionov D A, Mironov A A, *et al.* Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression?. Trends Genet, 2004, **20** (1): 44 ~ 50

11 Mironov A, Gusarov I, Rafikov R, *et al.* Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria. Cell, 2002, **111** (5): 747 ~ 756

12 Winkler W C, Cohen-Chalamish S, Breaker R R. An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, **99** (25): 15908 ~ 15913

13 Nudler E, Mironov A S. The riboswitch control of bacterial metabolism. Trends Biochem Sci, 2004, **29** (1): 11 ~ 17

14 Gusarov I, Nudler E. The mechanism of intrinsic transcription termination. Mol Cell, 1999, **3** (4): 495 ~ 504

15 Lai E C. RNA sensors and riboswitches: self-regulating messages. Curr Biol, 2003, **13** (7): 285 ~ 291

16 Rodionov D A, Vitreschak A G, Mironov A A, *et al.* Comparative genomics of thiamin biosynthesis in procaryotes: new genes and regulatory mechanisms. J Biol Chem, 2002, **277** (50): 48949 ~

48959
17 Mandal M, Breaker R R. Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. Nat Struct Mol Biol, 2004, **11** (1): 29～35
18 叶 茂, 陈跃磊, 明镇寰. miRNA (microRNA) 家族的研究进展. 生物化学与生物物理进展, 2003, **30** (3): 370～374
Ye M, Chen Y L, Ming Z H. Prog Biochem Biophys, 2003, **30** (3): 370～374
19 Suess B, Hanson S, Berens C, *et al.* Conditional gene expression by controlling translation with tetracycline-binding aptamers. Nucleic Acids Res, 2003, **31** (7): 1853～1858
20 Hanson S, Berthelot K, Fink B, *et al.* Tetracycline-aptamer-mediated translational regulation in yeast. Mol Microbiol, 2003, **49** (6): 1627～1637

Riboswitches: a Novel Gene Regulatory Element and a Potential Class of Drug Targets

LUO Ying-Feng[1,2], CHEN Yue-Lei[1,3]*
([1] *College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou* 310029, China;
[2] *James D. Watson Institute of Genome Sciences, Zhejiang University, Hangzhou* 310008, China;
[3] *Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institute for Biological Sciences, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai* 200031, China)

Abstract Riboswitches are metabolite-binding RNA structures that serve as a novel gene regulatory element for mRNAs. Located in certain mRNAs, they can directly bind relevant small metabolites but not protein factors, and subsequently allosteric rearrangements modulate associated mRNA activities. They are believed to regulate in a wide set of fundamental metabolic pathways including vitamin B_{12} and methionine biosynthesis in bacteria. The recent discovery of natural riboswitches, especially its property that precisely controlling basic metabolic pathways via binding to certain ligands with high affinity and specificity, inspires scientists to notice its potential application in medical research. The progress on the riboswitches, its characteristics, the function mechanism as well as the thinking and research trend triggered by its finding were introduced.

Key words riboswitch, allosteric rearrangement, gene regulation, fundamental metabolic pathway

* Corresponding author. Tel: 86-571-86021419, E-mail: yuelion@163.com
Received: January 14, 2004　　Accepted: April 29, 2004