

RNA 的催化功能和类病毒的自我切割

陈 炜

(中国科学院微生物研究所,北京)

几年前人们还认为起催化作用的酶一定是蛋白质,细胞内起催化作用的分子和携带遗传信息的分子是分工的。近年来陆续发现一些 RNA 分子能起催化作用,改变了这一观念。由于 RNA 分子具有携带信息和催化作用双重功能,实验室的研究亦表明,在原始地球的条件下能产生 ATP, 锌离子等催化则可产生 RNA 片段, 无酶存在下 RNA 能复制, 但 DNA 原料在无酶促条件下不能连接成 DNA 片段, 因此原始的核酸应为 RNA。

类病毒 (Viroid) 为已知的最小的致病因子, 是只含有 300 多个核苷酸的环状 RNA (亦有线状分子存在), 这样小的 RNA 分子却具有生命的某些性质——引入到适当的寄主细胞中能侵染, 致病和自我复制。一些研究表明类病毒 RNA 分子是多基因组的, 其不同的 RNA 区域在类病毒的复制和致病中起不同的作用^[1]。体外研究发现了类病毒的自我催化切割, 类病毒与内含子组 I 和组 II 有某些序列的相关性等。这些现象使人们有理由考虑是否类病毒代表了最原始的具有生命特征的分子, 是一种既能携带信息, 又能起催化作用的侵染性 RNA。比较类病毒和一些起催化作用的 RNA (ribozyme) 对研究 RNA 的催化作用及探讨类病毒的起源和进化等都有一定的意义。

(一) RNA 的催化作用

已陆续发现了一些 RNA 分子的催化作用。Cech 等在研究单细胞真核生物四膜虫时发现, rRNA 前体能自动切除 413 个核苷酸的插入序列(内含子), 然后相邻的外显子就自动拼接起来, 反应需要 Mg^{2+} 和鸟苷。但这个自我拼接反应只是四膜虫前 rRNA 作用自身的一连串反应的第一步。400 多个核苷酸的内含子自行切除后又自行成环, 这个过程中丧失 15 个核苷酸。随后环状分子又自行伸展为线状, 以后再第二次自行成环, 又丧失四个核苷酸。这个环形分子再次伸展为线形, 称为 L-19 IVS, 意为缺少 19 个核苷酸的线形插入序列, 即这个 rRNA 前体经自我拼接切下的 RNA 序列经历了一系列的环化反应和位点专一的水解反应后生成的最终产物为 L-19 IVS, 表明在 L-19 IVS 内所有可能的活性位点都已用尽^[2]。这些

反应都是分子内催化反应, 反应是高度专一性的。

内含子自行拼接的几个基本方面和真正的蛋白质的酶作用相似, 都与其空间结构相关。如将 RNA 分子放入到阻止其折迭的溶液中就丧失了自我拼接的能力, 说明拼接活性需要 RNA 的三维结构, 就像酶需要氨基酸的特异折迭。

L-19 IVS 在体外有多种催化作用, 能催化一系列的分子间反应^[3,4], 是一个真正的酶。例如可催化寡核苷酸底物的切割和连接, 用五胞苷酸 pC5 作底物, L-19 IVS 能将其转变为比原来长的或比原来短的寡核苷酸, 这里 L-19 IVS 起 RNA 聚合酶的作用。L-19 IVS 的作用有底物的专一性, 如果用五脱氧胞核苷酸 (d-pC5) 或五脱氧腺苷酸作底物则完全没有反应, 用除胞苷以外的其它寡核苷酸, 如 pU6 或 pA6 则几乎没有反应。像其它酶反应一样, L-19 IVS 可以再生。除上述 RNA 聚合酶活性外, L-19 IVS 亦具有 RNA 的限制内切作用等。

RNase P 是一种 tRNA 的 5' 端成熟酶, 在 tRNA 的生物合成中是很重要的。该酶是由 RNA 和蛋白质构成的核蛋白 (ribonucleoprotein), 能在大肠杆菌中切割多种 tRNA 前体, 都是在特定的磷酸二酯键上, 产生成熟的 5' 端 tRNA, 而这些切割位点的周围并无序列的同源性。构成该酶的 RNA 和蛋白质两者中 RNA 组份是酶活性所必需的。从 RNase P 中分离的 RNA 组份具有全酶的功能, 这个 RNA 的前体也单独具有 RNase P 全酶的功能^[5]。

α -1, 4-葡聚糖分枝酶是由 RNA 和蛋白质构成的稳定的复合物, 其 RNA 只有 2.5S 大小。提纯的酶用酚去蛋白再与蛋白酶一起孵育, 测定酶的活性表明单独的 RNA 能催化分枝反应, 起全酶的作用。在对天然的分枝酶最适的反应条件下, 单独 RNA 较天然酶催化反应慢, 而在 5-10mM Mg^{2+} 存在和 pH 8.0 的碳酸盐缓冲液中单独 RNA 的催化活性明显提高^[6]。这一发现说明 RNA 催化作用的底物不仅限于 RNA。

以上几个例子说明 RNA 作为酶的催化作用已得到了多方面的证实。

(二) 类病毒的自我催化切割

在类病毒的提取和研究的过程中,人们发现环状的类病毒分子常缓慢地转变为单一刻口的线状分子。Sanger 等研究了五种类病毒在 Mg^{2+} 的作用下环状分子转变为线状分子^[1]。实验的五种类病毒均属马铃薯纺锤块茎类病毒 (PSTV) 组,有广泛的序列同源性和中心保守区。提纯的类病毒在 Mg^{2+} 作用下磷酸键发生断裂,产生的线状分子 5' 端为羟基,3' 端为 2',3' 环化磷酸基,与共价闭合的环状类病毒分子大小相同。在 25mM 甘氨酸-NaOH pH9.0 缓冲液,5mM Mg^{2+} 条件下,孵育环状类病毒分子,在 60°C,50°C,37°C 和 25°C,约有 50% 的环状类病毒分子转变为线状分子所需的时间分别为 25,50,150 和 360 分钟,延长孵育时间则增加线状分子比例,继续延长时间则可产生较短的片段,这些片段在电泳上是可区分的。五种 PSTV 组的类病毒在 Mg^{2+} 存在下自我切割的程度几乎相同。

分子克隆技术已广泛用于类病毒的研究中,从含类病毒 cDNA 的重组质粒,体外转录得到类病毒 RNA,以此 RNA 为材料研究类病毒自我切割。鸚梨日斑类病毒 (ASBV) 是只有 247 个核苷酸的 RNA,将头尾相接的 ASBV cDNA 二聚体引入到含 SP6 启动子的载体系统中,体外转录合成 ASBV 的二聚体正链和二聚体负链(即与类病毒 RNA 互补的链),研究二聚体转录产物的自我切割表明,正链和负链的二聚体都在两个特定的位点发生切割,切下的中间部份相当于 ASBV 的单体。自我切割发生在转录中和转录后。在 37°C,pH8.0, Mg^{2+} 存在时,非酶催化的反应产物为 5' 端羟基,3' 端 2',3' 环化磷酸基。反应要求二价阳离子^[2]。

ASBV 二聚体的自我切割有些方面不同于已报道的其它 RNA 的自我切割,如四膜虫前 rRNA, Neurospora 细胞色素 b RNA 和其它几个线粒体的插入序列的自我切割需要鸟苷或 GTP,产生 5' 磷酸基和 3' 端羟基,而 ASBV RNA 的自我切割只需要二价阳离子,不需要鸟苷或 GTP。但内含子组 I 的自我切割即使在无鸟苷的情况下,也能缓慢的进行,这时羟基起鸟苷的作用。噬菌体 T₄ 前 RNA p2Sp1 的自我切割尽管产生的是 5' 羟基和 3' 端磷酸基,但二价阳离子不是必需的。上述这些 RNA 的自我切割位点周围未发现明显的序列同源性。

对 PSTV 的二聚体的正链和负链的转录产物的自我切割进行的研究,各实验室所得出的结果不尽相同。Robertson 等人报道^[3],孵育 PSTV 的二聚体,所用的条件为 Bass 和 Cech 环化四膜虫内含子所用的条件,39°C,pH 中性,含 Mg^{2+} 和硫酸铵,大约有 1—5% 的 PSTV 二聚体自我切割为 PSTV 单体。但 Tsaris 等人的工作认为 PSTV 多聚体不能进行自我加

工^[10]。

类病毒除自我切割外是否还有其它催化作用,有待进一步研究,目前为止对类病毒 RNA 的催化作用还研究得很少,仅限于少数类病毒自我切割。发现四膜虫内含子序列有多种催化活性首先是从发现其自我切割开始的,进而发现其在体外具有多种催化活性。在所发现的具有自我催化切割能力的小 RNA 分子中,唯类病毒具有独立的侵染复制能力。因此进一步研究类病毒是否具有其它催化活性是很有意义的。

(三) 类病毒与内含子

类病毒与某些内含子大小相似,都有环状结构。可以想象,某些具有广泛的碱基配对和环化了的内含子可以稳定化,逃脱寄主细胞的降解,如含有适当的识别序列,就可以为寄主的酶识别和转录。Dicner 根据 PSTV 序列分析提出类病毒可能起源于逃脱了的内含子^[11]。之后越来越多的证据表明了类病毒与内含子的序列相关性。如内含子组 I 有 16 个核苷酸的连续保守序列,对其拼接是必需的,而这 16 个核苷酸连续序列在几乎所有的类病毒中都存在,在类病毒中心保守区的下部。除了这 16 个连续核苷酸保守区外,内含子组 I 的其它一些保守区亦存在于类病毒中,如 Box 9R 和 9R' 以及富含 GC 碱基对的 A 区和 B 区等,更为有趣的是,这些同源序列的排列,从 5' 端到 3' 端的顺序在内含子组 I 和类病毒中也是相同的^[12]。在 S. Pomb 的线粒体 Cox 1 中有 258 个碱基的内含子,与 S. Cerevisiae 的内含子 a14 和 b14 有相当的同源性,类病毒 PSTV 的中心保守区和这三个内含子的拼接位点有顺序的同源性^[13],这进一步支持了类病毒可能是逃脱了的内含子的观点。

从类病毒与内含子的相似性,特别是具有内含子拼接所必须的序列,推测类病毒除催化自我切割外可能具有其它催化功能是一定道理的。

类病毒只有几百个核苷酸,没有 mRNA 的功能,要求本身携带有必须的信息和识别信号来行使其自我复制的功能。进一步研究类病毒的催化作用,是研究这种小 RNA 分子的结构和功能关系的重要方面,对探索生命的起源和进化有一定的意义。

参 考 文 献

- [1] Keese, J. et al: PNAS, 82: 4582, 1985.
- [2] Cech, T. R. et al: Ann. Rev. Biochem., 55: 599, 1986.
- [3] Zang, A. J. et al: Science, 231: 470, 1986.
- [4] Zang, A. J. et al: Nature, 324: 427, 1986.
- [5] Altman, S. et al: TIBS, 11: 515, 1986.
- [6] Petrova, A. U. et al 国际生物化学会议论文集摘要, 142, 北京, 1987.
- [7] Sanger, H. C. et al: FEBS letter, 99: 117, 1979.
- [8] Hutchins, C. J. et al: Nucleic Acids Res., 14: 3627, 1986.

- [9] Robertson, H. D. et al: *Virology*, **142**: 441, 1985.
- [10] Tsagris, M. et al: *Virology*, **157**: 227, 1987.
- [11] Diener, T. O.: *PNAS*, **78**: 5014, 1981.
- [12] Dieter-Gottlieb G.: *PNAS*, **83**: 6250, 1986.
- [13] Wolf, K.: *Nucleic Acids Res.*, **14**: 10119, 1986..