

由 tRNA 引导的转录抗终止机制

郭妮妮 王恩多

(中国科学院上海生物化学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要 由 tRNA 引导的转录抗终止机制普遍存在于革兰氏阳性细菌中, 调控氨酰-tRNA 合成酶基因和与氨基酸合成有关的酶基因的表达. 当某种氨基酸缺乏时, 与其相关的 tRNA 增多. tRNA 通过反密码子和 3' 接受末端与前导 mRNA 的特异序列和 T 框作用, 促进前导 mRNA 中的终止子结构转变为抗终止子结构, 使转录复合物能够通读, 从而实现基因的表达.

关键词 转录抗终止, 氨酰-tRNA 合成酶, 氨基酸合成, 革兰氏阳性细菌, 基因调控

氨酰-tRNA 合成酶是蛋白质生物合成过程中的关键酶, 催化氨基酸与相应 tRNA 之间的专一连接. 但是在不同的生长条件下, 细胞对这些酶的需求也不同. 当某种氨基酸缺乏时, 细菌细胞中相关的氨酰-tRNA 合成酶基因会发生诱导表达^[1], 这种表达只被相应氨基酸的缺乏所诱导, 不受其他氨基酸缺乏的影响. 在大肠杆菌 (*E. coli*) 中, 氨酰-tRNA 合成酶基因的表达一般受不同机制的调控^[2]. 而在枯草杆菌 (*B. subtilis*) 中, 情况却完全不同, 大多数氨酰-tRNA 合成酶基因的表达都在一种共同机制的调控下进行. 研究表明, 这种机制是一种由 tRNA 引导的转录抗终止机制^[3~5].

受此机制调控的氨酰-tRNA 合成酶基因编码序列的上游, 存在一段长约 300 bp 的 5' 端非编码区, 转录时产生前导 mRNA. 在前导 mRNA 的 3' 端靠近起始密码子 AUG 处有一个保守的终止子结构. 正常情况下, 终止子形成后, 转录停止. 当氨基酸缺乏时, 这种终止子结构转变为一种抗终止子结构, 使转录复合物能够通读, 继续转录编码基因.

迄今为止, 发现除了枯草杆菌的谷氨酰-tRNA, 甲硫氨酰-tRNA 合成酶基因 (*gltX*, *metS*) 和嗜热脂肪芽孢杆菌 (*B. stearothermophilus*) 的甲硫氨酰-tRNA 合成酶基因 (*metS*) 外^[6,7], 在其他革兰氏阳性细菌的氨

酰-tRNA 合成酶基因以及与氨基酸合成有关的酶基因的前导 mRNA 中, 也存在与这种调控有关的结构元件. 因此, 这一机制可能广泛存在于革兰氏阳性细菌中, 不仅调控氨酰-tRNA 合成酶基因, 而且调控与氨基酸合成有关的酶基因的表达^[8].

1 前导 mRNA 中的保守元件

这些基因的前导 mRNA 在一级和二级结构上存在很强的保守元件^[5,8]. 以枯草杆菌的酪氨酰-tRNA 合成酶基因 (*tyrS*) 为例, 其前导 mRNA 的主要保守元件包括三个茎环结构, 一个 18 bp 序列 (称为 T 框) 和一个不依赖 ρ 因子的转录终止子 (图 1)^[3,4,9]. 三个茎环结构中, 第一个茎环区保守性最强, 含有许多泡状突起. 侧面的一个泡状突起处, 存在一个被称为“特异序列” (specifier sequence) 的三联体碱基, 与相应氨基酸的密码子一致^[5]. 例如, 在枯草杆菌中, 酪氨酰-tRNA 合成酶基因 (*tyrS*) 的前导 mRNA 的特异序列为 UAC, 苯丙氨酰-tRNA 合成酶基因 (*pheS*) 的前导 mRNA 的特异序列为 UUC, 分别与 Tyr 和 Phe 的密码子一致. 特异序列的第三位碱基通常是 C (色氨酰-tRNA 合成酶基因 *trpS* 除外, 其前导 mRNA 的特异序列必须是 UGG), 而且是比较重要的. 将 *tyrS* 前导 mRNA 的特异

序列 UAC 的第三位 C 变为 U, Tyr 缺乏时 *tyrS* 的表达程度会明显下降^[9].

前导 mRNA 中最引人注目的保守元件是 T 框和转录终止子 5' 端保守序列. 转录抗终止子就是由 T 框的部分序列与终止子 5' 端保守序列通过碱基配对形成的 (图 1). 其中 T 框的核心序列 (5'-UGGNACC-3', N 代表可变碱基) 高度保守, 它形成抗终止子的一个侧环^[3,9]. 由于抗终止子结构的稳定性小于终止子结构的稳定性, 所以需要有其他因子存在, 以促使抗终止子结构的形成^[9].

存在于前导 mRNA 中的其他保守元件还包括 AG 框和 F 框^[9]. 在枯草杆菌中, *tyrS* 前导 mRNA 的 AG 框为 CAGAGA, 位于第一个茎环区内. F 框为 CCGUUA, 位于第二个和第三个茎环区之间 (图 1). AG 框的保守性并不很强, 但其中的 2 或 3 个碱基突变会导致 *tyrS* 被 Tyr 缺乏所诱导的表达量大大下降. F 框中的一个碱基对的改变也会引起 *tyrS* 的表达量比野生型下降 10 倍^[9]. 说明这两个保守元件对转录抗终止子机制是重要的, 但具体功能不清.

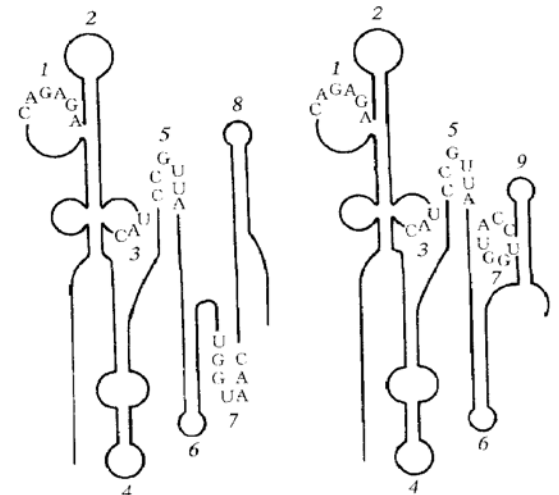


图 1 枯草杆菌酪氨酸-tRNA 合成酶基因 (*tyrS*) 的前导 mRNA 结构
1: AG 框; 2: 茎环 I; 3: 特异序列; 4: 茎环 II; 5: F 框; 6: 茎环 III; 7: T 框核心序列; 8: 终止子; 9: 抗终止子.

2 tRNA 促使抗终止子的形成和稳定

由于抗终止子结构的稳定性较差, 所以需要有其他因子存在促使它的形成和稳定. 已经有直接的实验证据证明, 这一因子是 tRNA. tRNA 通过与前导 mRNA 直接作用来达到这一目的. tRNA 与前导 mRNA 之间有两个作用位点:

第一个作用位点存在于 tRNA 的反密码子与前导 mRNA 的特异序列之间 (图 2). 将 *tyrS* 的 5' 非编码区与 *lacZ* 基因融合后, 转入野生型的枯草杆菌中, 当 Tyr 缺乏时, 会引起 *tyrS-LacZ* 融合基因的表达^[3]. 如果将 *tyrS* 前导 mRNA 的特异序列 UAC 突变为无义密码子 UAG 或 UAA, 则导致基因的表达不再被 Tyr 缺乏所诱导. 当引入琥珀型或赫石型校正 tRNA^{Lys} 时, *tyrS-LacZ* 融合基因的表达又恢复, 并且转变为被 Lys 缺乏所诱导^[5]. 所以特异序列与反密码子的作用不仅对于抗终止子结构的形成是重要的, 而且与诱导的专一性有关.

第二个作用位点存在于 tRNA 3' 接受末端与前导 mRNA 的 T 框之间 (图 2). 这一作用是使抗终止子结构得以稳定的直接原因. tRNA 3' 末端的 CCA, 能够与 T 框的核心序列 5'-UGGNACC-3' 中的 UGG 形成碱基配对^[8]. tRNA 中位于 CCA 上游的是第 73 位碱基, 它是许多 tRNA 的个性元件. 相应的, T 框中 UGG 下游是一个可变碱基. 在所有 tRNA 和其相关的前导 mRNA 中, 这两个位置的碱基总是一起改变. 凡是反密码子能够与特异序列配对的 tRNA, 其 73 位碱基也能与 T 框的可变碱基互补配对. 例如, *tyrS*, *pheS*, *leuS* (亮氨酸-tRNA 合成酶基因), *ilv-leu* (编码 Leu 合成过程中所需酶的基因) 的前导 mRNA 中, T 框的可变位置为 U, tRNA^{Tyr}、tRNA^{Phe}、tRNA^{Leu} 的 73 位碱基为 A; *thrS* (苏氨酸-tRNA 合成酶基因), *cysE-cysS* (丝氨酸乙酰转移酶-半胱氨酸-tRNA 合成酶基因) 的前导 mRNA 中, T 框的可变位置为 A, tRNA^{Thr},

tRNA^{Cys}的73位碱基为U. 这种碱基配对对有些抗终止子的形成是很重要的^[10]. 在 tyrS-LacZ 融合基因的前导 mRNA 中, 将 T 框的可变位置由 U 变为 A, 使原来位置配对的 U-A 变为不配对的 A-A, 导致诱导表达量下降 10 倍. 如果引入一个突变的 tRNA^{Tyr}, 其 73 位碱基由 A 变为 U (此 tRNA 不能被酪氨酰-tRNA 合成酶所识别), 又形成 A-U 配对, 则即使在 Tyr 充足的条件下, tyrS-LacZ 的诱导表达也能够恢复. 这表明, tRNA^{Tyr}的突变校正了 tyrS-LacZ 前导 mRNA 的突变. 这个结果也证明了 tRNA 是稳定抗终止子的因子^[10].

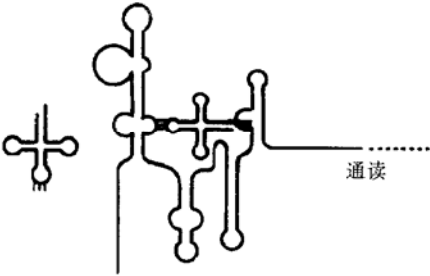


图2 tRNA 与前导 mRNA 的两个作用位点

氨基酸缺乏诱导基因表达是通过调节 tRNA 的水平来实现的^[10]: 某种氨基酸缺乏时, 与其相关的 tRNA 的量增多. tRNA 通过与前导 mRNA 的直接作用, 促使前导 mRNA 的构象由原来的终止子结构转变为抗终止子结构, 使转录复合物能够继续转录基因的编码序列, 从而实现基因的表达.

3 与专一性有关的因素

每一种氨酰-tRNA 合成酶基因的表达, 只能在相关氨基酸缺乏时被诱导, 而不受其他非相关氨基酸缺乏的影响, 说明这种转录抗终止机制中存在着控制专一性的因素. 前导 mRNA 中, 特异序列与相关氨基酸的密码子一致, T 框的可变碱基随着 tRNA 个性元件的不同而发生改变, 说明 tRNA 与前导 mRNA 的两个作用位点与这种专一性有关.

有时只改变前导 mRNA 的特异序列就可

以扭转这种专一性. 例如, 在枯草杆菌 tyrS 的前导 mRNA 中, 将 Tyr 密码子 UAC 突变为 Phe 密码子 UUC 后, tyrS 的表达转变为被 Phe 缺乏所诱导, 而不再受 Tyr 缺乏的影响^[5]. 所以特异序列是决定专一性的重要因素. 如前所述, 在 tyrS 的前导 mRNA 中, 改变 T 框的可变碱基, 引起了 tyrS-lacZ 融合基因表达量的下降, 说明可变碱基也是与专一性有关的因素. 但有些体系, 只改变特异序列或同时也改变 T 框的可变碱基, 却不足以实现专一性的扭转. 例如, 在 thrS 的前导 mRNA 中, 将 Thr 密码子 ACC 同样突变为 Phe 密码子 UUC, 基因表达并不被 Phe 缺乏所诱导. 即使再突变 tRNA^{Phe}的73位碱基, 使其与 thrS 前导 mRNA 中 T 框的可变碱基配对, 还是不能实现专一性的扭转^[11]. 说明除了特异序列和 T 框的可变碱基, 前导 mRNA 中还存在其他与专一性有关的因素. 推测前导 mRNA 的其他部分可能协助形成恰当的三维构象, 使之只适于相应 tRNA 的结合^[10].

4 氨酰-tRNA 和其他蛋白因子的作用

氨酰-tRNA 的 3' 末端已被氨酰化, 不能与前导 mRNA 的 T 框形成相互作用. 但氨酰-tRNA 的反密码子仍能与前导 mRNA 的特异序列形成碱基配对, 因而妨碍了 tRNA 的接近 (图 3), 阻断了抗终止结构的形成. 所以正常情况下, 是氨酰-tRNA 与 tRNA 之间的比例, 而不仅仅是 tRNA 绝对量的变化调控氨酰-

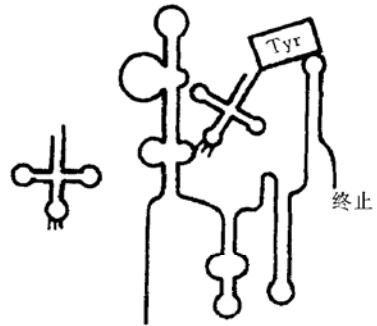


图3 氨酰-tRNA 对 tRNA 与前导 mRNA 结合的抑制作用

tRNA 合成酶基因的表达^[10].

tRNA 作为效应因子是抗终止子形成所必需的, 但尚未知道是否仅有 tRNA 而不需其他蛋白因子, 就足以稳定抗终止子结构. 有些革兰氏阳性细菌中, 已经发现了有蛋白因子参与这一过程^[12~ 14]. 这些蛋白因子可能是转录或翻译系统中的组分, 也可能是抗终止体系特有的组分. 由于前导 mRNA 具有高度的保守性, 推测可能存在一种或几种通用的因子与这些元件作用, 也可能每种基因有其特异的因子. 寻找这些蛋白因子将是以后研究工作的重点^[9].

5 抗终止机制的意义

tRNA 与氨酰-tRNA 合成酶的量在正常情况下是相互平衡的^[15]. 这种平衡对于保持蛋白质合成的高效性和精确性十分重要. 因为无论存在过量的 tRNA 还是过量的氨酰-tRNA 合成酶, 都能够导致 tRNA 被非相关的氨酰-tRNA 合成酶误活化^[16, 17]. tRNA 调控的转录抗终止机制诱导氨酰-tRNA 合成酶基因的表达, 可以保持 tRNA 与氨酰-tRNA 合成酶之间量的平衡, 保证氨酰化的正确性^[18]. 另一方面, 氨基酸缺乏引起相应氨酰-tRNA 合成酶的增多, 可能会使得细胞更有效地利用有限的氨基酸^[5]. 利用同样的机制也能够控制与氨基酸合成有关的酶基因的表达, 协调氨基酸与氨酰-tRNA 合成酶之间量的平衡, 使氨基酸的量适于蛋白质合成的需求^[6].

参 考 文 献

1 Nass G , Neidhardt F C . Regulation of formation of aminoacyl-ribonucleic acid synthetases. *Biochim Biophys Acta*, 1967, **134**: 347~ 359
2 Grunberg - Manago M . Regulation of the expression of aminoacyl-tRNA synthetases and translation factors. In: Neidhardt F C eds. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: molecular and cellular biology. Washington D C: American Society for Microbiology, 1987. 1398~ 1409
3 Henkin T M, Glass B L, Grundy G J. Analysis of the *Bacillus subtilis* tyrS gene: conservation of a regulatory sequence in multiple tRNA synthetase genes. *J Bacteriol*, 1992, **174**: 1299~ 1306
4 Putzer H, Gendron N, Grunberg-Manago M. Coordinate expression of the two threonyl-tRNA synthetase genes in

Bacillus subtilis: control by transcriptional antitermination involving a conserved regulatory sequence. *EMBO J*, 1992, **11**: 3117~ 3127
5 Grundy F J, Henkin T M. tRNA as a positiveregulator of transcription antitermination in *B. subtilis* . *Cell*, 1993, **74**: 475~ 482
6 Gagnon Y, Breton R, Lapointe J *et al.* Clustering and cotranscription of the *Bacillus subtilis* genes encoding the aminoacyl-tRNA synthetases specific for glutamate and for cysteine and the first enzyme for cysteine biosynthesis. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 7473~ 7482
7 Ogasawara N, Nakai S, Yoshikawa H. Systematic sequencing of the 180 kilobase region of the *Bacillus subtilis* chromosome containing the replication origin. *DNA Res*, 1994, **1**: 1~ 14
8 Grundy F J, Henkin T M. Conservation of a transcription antitermination mechanism in aminoacyl-tRNA synthetase and amino acid biosynthesis genes in Gram positive bacteria. *J Mol Biol*, 1994, **235**: 798~ 804
9 Henkin T M. tRNA-directed transcription antitermination. *Mol Microbiol*, 1994, **13** (3): 381~ 387
10 Grundy F J, Rollins S M, Henkin T M. Interaction between the acceptor end of tRNA and the T Box stimulates antitermination in the *Bacillus subtilis* tyrS gene: a new role for the discriminator base. *J Bacteriol*, 1994, **176**: 4518~ 4526
11 Putzer H, Laalami S, Grunberg-Manago M *et al.* Aminoacyl-tRNA synthetase gene regulation in *Bacillus subtilis*: induction, repression and growth-rate regulation. *Mol Microbiol*, 1995, **16** (4): 709~ 718
12 Debarbouille M, Amaud M, Rapoport G. The sacT gene regulating the sacPA operon in *Bacillus subtilis* shares strong homology with transcriptional antiterminators. *J Bacteriol*, 1990, **172**: 3966~ 3973
13 Houman F M, Diaz-Torres M R, Wright A. Transcriptional antitermination in the bgl operon of *E. coli* is modulated by a specific RNA binding protein. *Cell*, 1990, **62**: 1153~ 1163
14 Roberts J W. RNA and protein elements of *E. coli* and λ transcription antitermination complexes. *Cell*, 1993, **72**: 653~ 655
15 Jakubowski H, Goldman E. Quantities of individual aminoacyl-tRNA families and their turnover in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1984, **158**: 769~ 776
16 Sherman J M, Rogers K, Soll D *et al.* Synthetase competition and tRNA context determine the *in vivo* identity of tRNA discriminator mutants. *J Mol Biol*, 1992a, **228**: 1055 ~ 1062
17 Sherman J M, Rogers K, Soll D. Competition of aminoacyl-tRNA synthetases for tRNA ensures the accuracy of aminoacylation. *Nucl Acids Res*, 1992b, **20**: 2847~ 2852
18 Vander Horn P B, Zahler S A. Cloning and nucleotide sequence of the leucyl-tRNA synthetase gene of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 1992, **174**: 3928~ 3935

tRNA-directed Transcription Antitermination.
GUO Nini, WANG Enduo (*State Key Labora-*

tory of Molecular Biology, Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

Abstract A tRNA-directed transcription antitermination mechanism is common in Gram-positive bacteria, regulating the expression of aminoacyl-tRNA synthetase and amino acid biosynthesis genes. When the level of an amino acid decreases, the cognate uncharged-tRNA accumulates. Uncharged-tRNA stimulates the conformation of mRNA leader region to change

from a terminator structure to an antiterminator structure by interaction of two sites: the anticodon and 3' acceptor end of tRNA interact with the specifier sequence and the T-box in mRNA leader, respectively. This procedure promotes the readthrough and the expression of the relative genes.

Key words transcription antitermination, aminoacyl-tRNA synthetase, amino acid biosynthesis, Gram-positive bacteria, gene regulation

蛋白质晶体的优化生长

舒占永 毕汝昌¹⁾

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 蛋白质晶体的优化生长是获得高质量蛋白质晶体, 进而得到高精度晶体结构的有效途径。针对不同的晶体生长方法, 已尝试了不同的优化手段, 这对改善某些蛋白质晶体的质量显示了明显的成效。然而, 鉴于蛋白质晶体生长的多样性与复杂性, 这些方面均未发展成为实用的技术。文章综述了这类研究进展, 分析了各手段的利弊, 并指出了应着重解决的问题。

关键词 蛋白质晶体, 优化生长, 汽相扩散, 温度控制

要获得高分辨率的蛋白质晶体结构, 首先必须生长出高质量的蛋白质晶体。对于常规使用的晶体生长方法, 在很多情况下, 蛋白质晶体的尺寸和衍射能力均难以有较大程度的提高。其中原因之一, 就是因为传统的晶体生长过程中, 一旦开始在某一条件下的晶体生长, 则在晶体生长的全过程中不再人为改变生长的条件, 因而导致的最终结果主要取决于开始设定的生长条件。然而, 不少实验已经证明, 如能在晶体生长的过程中, 根据蛋白质晶体生长的一般规律和具体特性, 适时调节生长条件, 有可能达到不同程度地改善晶体质量的目的, 这样的工作通常被称为晶体生长的优化。作为一种动态调节手段, 无论是在重力条

件下的实验室, 还是在微重力条件下的航天器上, 这类研究都有着广阔的应用前景。

蛋白质晶体生长是一个复杂的物理化学过程, 晶体的质量会受到多种因素的影响。不同的生长方法, 或同一生长方法中不同的生长条件都会直接影响到晶体的生长过程。晶体生长是按照它自身的规律进行的, 不同的生长方法或条件间的区别就在于造成蛋白质溶液过饱和和动力学的异同; 在生长过程中, 控制蛋白质溶液在空间上和时间上形成的过饱和状态是可以有效地改善晶体质量的。尽管晶体生长过程异常复杂, 这种控制是可以通过人为地调节生长

¹⁾ 通讯联系人。

收稿日期: 1996-07-16, 修回日期: 1996-11-27