

成果与应用

氨基酰-tRNA 合成酶及其与相关 tRNA 的相互作用研究^{*}

王恩多

(生物化学与细胞生物研究所 上海 200031)

摘要 氨基酰 tRNA 合成酶是生物体蛋白质合成过程中的一类关键酶,对它的研究具有重要的生物学意义和应用前景。该项目系统研究了大肠杆菌亮氨酰-和精氨酰-tRNA 合成酶及其与相关 tRNA 的相互作用。用酶和 tRNA 的基因克隆和高表达, tRNA 体外转录,基因定点突变,酶片段的体外重组等手段研究了酶与 tRNA 的相互作用的结构基础,得到一系列重要结果。

关键词 大肠杆菌,亮氨酰-tRNA 合成酶,精氨酰-tRNA 合成酶,tRNA,相互作用

1 项目的背景和重要意义

氨基酰-tRNA 合成酶(AARS)为蛋白质生物合成过程中的一类关键酶。AARS 的底物为氨基酸、tRNA 和三磷酸腺苷(ATP)。通常细胞中含有 20 种 AARS,每一种 AARS 对应于一种氨基酸和相应的 tRNA。AARS 催化相应 tRNA 的氨基酰化,氨基酰化的 tRNA 通过 tRNA 的反密码子与 mRNA 上的密码子配对在核糖体上将氨基酸依次连接,合成蛋白质。如果 AARS 对氨基酸和 tRNA 的识别发生错误,生物体则会产生混乱,所以 AARS 对氨基酸和 tRNA 识别的专一性及精确性对从基因翻译为蛋白质的忠实性是十分重要的。人类许多疾病的发生与蛋白质生物合成精确性的失控有关。通过抑制 AARS 的活力,还可以抑制某些病原菌的蛋白质生物合成而抑制病原菌的生长,为人类设计新型药物提供新

思路。因此,研究 AARS 不仅具有重要的生物学意义,而且随着研究的深入还可以应用于人类疾病的防止,服务于人类的健康和改善人类生存环境。

该研究的总体构思是以大肠杆菌亮氨酰-tRNA 合成酶(LeuRS)和精氨酰-tRNA 合成酶(ArgRS)为代表,对 AARS 进行系统和全面的研究,探讨它们在蛋白质生物合成过程中对相关 tRNA 的精确识别的分子基础和催化功能的结构基础,最终为人类疾病的防止和人类的健康服务。

该项目得到中国科学院和国家自然科学基金委的重点支持,包括中国科学院重大项目 2 项、重点项目 1 项、特别支持 1 项,国家自然科学基金重点项目 2 项、面上项目 4 项。

2 取得的主要研究成果

(1) 80 年代的工作:从大肠杆菌中纯化了 LeuRS

^{*} 收稿日期:2001 年 8 月 5 日

和 ArgRS 研究了它们的基本性质^[1,2]。(2) 酶和 tRNA 基因克隆和高表达: 用基因重组方法得到了多个大肠杆菌高产菌株, 在大肠杆菌中高产 ArgRS2 500 倍, LeuRS135 倍, tRNAArg240 倍, tRNALeu120 倍和 tRNALeu260 倍。大大简化了酶和相应 tRNA 的分离纯化步骤, 为基因定点突变研究酶分子上的重要残基对酶功能的贡献打下基础^[3-6]。(3) tRNA 体外转录: 改进了 T7RNA 聚合酶的纯化方法, 一次可得到大量的、高质量的价值 20 万美元的纯 T7RNA 聚合酶, 大大降低了转录成本, 提高体外转录效率超过文献值 10 倍以上, 可方便地进行 tRNA 的定点突变研究^[7,8]。(4) ArgRS 和 LeuRS 基因定点突变和变种酶的研究: 进行了 ArgRS 部分赖氨酸残基、全部色氨酸和半胱氨酸残基的定点突变以及 LeuRS 的定点突变, 得到近 30 个变种, 研究了它们的功能和结构基础^[9-12]。(5) 不同来源的 ArgRS 与 tRNAArg 的交叉识别研究: 研究了大肠杆菌和酵母 ArgRS 与 tRNAArg 的交叉识别, 首次发现大肠杆菌 tRNAArg2 分子上的 A20 是大肠杆菌 ArgRS 识别 tRNA 的重要元件^[13]。(6) ArgRS 的结晶学研究: 首次结晶了大肠杆菌 ArgRS, 解出晶胞参数, 对晶体进行了初步研究^[14]。(7) LeuRS 结构域的体内重组及重要肽键的研究: 发现并证明酶的 CP1 结构域内的 292E 和 293A 间的肽键对酶活力至关重要^[15]。(8) 对 LeuRS 插入突变变种 LeuRS-A 和 LeuRS-B 的研究: 发现在 292E—293A 肽键间插入 253—292 之间 40 个氨基酸残基的插入突变变种 LeuRS-A 催化 tRNALeu2 亮氨酸化的速度为 tRNALeu1 的 3 倍, 证明了 LeuRS-A 对 tRNALeu 等受体的识别是对接受茎上第一对碱基对是否为摆动碱基对的识别^[16], 发现在 368—369 肽键间插入 326—368 之间 40 个氨基酸残基的插入突变变种 LeuRS-B 丧失该酶的校读功能^[17]。

3 发现、发明及创新性

已完成的所有研究工作都是前人从未进行的属于完全创新的成果。使人们对自然的认识上有新的深入了解。

研究手段上的创新包括: (1) 纯化研究对象方

法的简单和多样化。(2) T7RNA 聚合酶纯化及体外转录新方法和产率的提高。(3) 肽段的体内重组技术的发明。(4) 产生一系列的 LeuRS 的点突变、缺失突变和插入突变体的高效率、低成本的方法。

4 与国内外同类研究及技术的综合比较

国内仅此一家实验室进行氨基酰-tRNA 合成酶及其与相关 tRNA 相互作用的研究, 研究水平在国内一直处于领先地位。在中国科学院“九五”期间生物口研究所承担的重大课题 1999 年中期评估中, 该课题在 19 个课题中评为第二名, 列为 A 级, 受到中国科学院生物局通报表扬, 认为“王恩多课题组在‘氨基酰-tRNA 合成酶与 tRNA 相互作用研究’中取得重要进展。在 SCI 收录的 13 篇论文中, IF>4 的有 6 篇。首次发现一种插入变种 LeuRS-A 能够识别亮氨酸 tRNA 的两种等受体。该研究论文向 *Biochemistry* 投稿, 仅 45 天就被接受。”

与国外同类研究工作相比, 从发表研究论文的质量和数量来看, 至今尚未见到与该课题研究成果同样的工作发表。该课题组 1999 年在美国著名生物化学杂志 *Biochemistry* 上连续发表 3 篇研究论文, 每篇都得到审稿专家的好评。他们说:“报告相当有趣, 开辟了一条洞察酶和 tRNA 相互识别的非常好的研究途径, 这些观察对鉴定这个第一类氨基酰-tRNA 合成酶和它的 tRNA 的等受体间的专一的相互作用的重要元件的鉴定是有价值的贡献……; 描述了令人信服的实验, 论点清楚, 实验支持结论建议发表……; 整个工作是多方面的扎实的, 我认为它给出了许多重要的研究要点, 完全赞成在 *Biochemistry* 上发表它。”研究论文发表后, 多次被他人引用、来函索要单行本和菌种。他们在来函中都赞扬了该课题组的研究工作。美国耶鲁大学的美国科学院院士 Thomas A. Steitz 教授来函索要菌种说, “我们试图产生大量的氨基酰-tRNA 合成酶以便进行涉及到与 70S 核糖体的共……结晶研究。可惜, 我们打算从大肠杆菌直接纯化亮氨酸-tRNA 合成酶的努力至今只产生没有活性的酶。如果你能寄给我们你们构建的高表达接有组氨酸标签的亮氨酸-tRNA 合成酶的克隆, 将大大有助于我们的研究。”表

明我们在亮氨酸-tRNA 合成酶研究中的领先地位。

课题组获奖项目中共有 8 项研究结果在国际上属于首创和首次发现。四年来发表了 18 篇 *SCI* 研究论文, 其中 6 篇的影响因子在 4.4 以上, 发表研究论文的总影响因子为 50, 所有的研究结果都是在国内自己的实验室里完成的。发表在美国 *Biochemistry* 上。题为“Discrimination of tRNA^{Leu} Isoacceptors by Insertion Mutant of Escherichia coli Leucyl-tRNA Synthetase”一文的主要内容和结果在 2000 年被美国著名杂志 *Cell* 引用。题为“遗传密码的早期进化(The Early Evolution of the Genetic Code)”首次从实验上证明了遗传密码进化过程中的一个重要阶段。2000 年美国《生化年鉴》综述文章“氨基酰-tRNA 合成(Aminoacyl-tRNA Synthesis)”中也引用了这一研究结果。发表在荷兰 *Biochimica et Biophysica Acta* 上。题为“A single base substitution in the variable pocket of yeast tRNA^{Arg} eliminates species-specific aminoacylation”, 2000 年被 Delagout B, Moras D, Cavarelli J 的文章“tRNA aminoacylation by arginyl-tRNA synthetase: induced conformation during substrate binding”引用, 发表在 *EMBO J.* 上。

5 应用情况

该研究为阶段性成果。参加该课题研究的博士生获得各类奖项 16 人次。至今已发表研究论文共 33 篇, 其中在 *SCI* 收录的杂志上发表研究论文 17 篇(11 篇发表在国外杂志上, 6 篇为影响因子 4.5 以上的杂志), 在国内被 *SCIE* 收录的核心刊物上发表研究论文 16 篇。24 人次来信索取论文单行本(未统计通过国际互联网得到单行本的人数)。2 位美国科学家(其中 1 人为美国科学院院士)来函索取菌株, 国内 2 个实验室使用我们的工具酶得到很好的研究结果。发表论文被国外论文引用 18 次。1999 年在美国著名杂志 *Biochemistry* 发表的研究论文受到审稿专家的好评, 一致同意在该杂志上尽快发表。课题组长多次被邀请去欧美实验室访问交流。为世界了解我国的科学研究工作做出贡献。

参考文献

1 Lin S X, Shi J P, Cheng X D et al. Arginyl-tRNA synthase

from *E. coli*: purification by affinity chromatography, properties and steady-state kinetics. *Biochemistry*, 1988, 27, 6 343—6 352.

- 2 Lin S X, Wang Q, Wang Y L. Interaction between *E. coli* arginyl-tRNA synthetase and its substrates. *Biochemistry*, 1988, 27, 6 353—6 359.
- 3 Chen J F, Wang E D, Wang Y L. High-level expression and single-step purification of leucyl-tRNA synthetase. *Protein Expression and Purification*, 1999, 15(1): 115—120.
- 4 Wu J F, Wang E D, Wang Y L. Gene cloning, overproduction and purification of Escherichia coli tRNA^{Arg}. *生物化学与生物物理学报*, 1999, 31(3): 226—232.
- 5 Liu W, Wang E D, Wang Y L. A novel system for hyper expression and rapid purification of arginyl-tRNA synthetase from Escherichia coli. *生物化学与生物物理学报*, 1999, 31(5): 494—498.
- 6 Li Y, Wang E D, Wang Y L. Overproduction and purification of Escherichia coli tRNA^{Leu}. *Science in China (series C)*, 1998, 41(3): 225—231.
- 7 Li Y, Wang E D, Wang Y L. A modified procedure for fast purification of T7 RNA polymerase. *Protein Expression and Purification*, 1999, 16(2): 355—358.
- 8 Li Y, Chen J F, Wang E D, Wang Y L. T7 RNA polymerase transcription of Escherichia coli isoacceptors tRNA^{Leu}. *Science in China (series C)*, 1999, 42(2): 185—190.
- 9 Liu M F, Huang Y W, Wu J F et al. Effect of the cysteine residues on the activity of arginyl-tRNA synthetase from Escherichia coli. *Biochemistry (US)*, 1999, 38(34): 11 006—11 011.
- 10 Zhang Q S, Wang E D, Wang Y L. The role of tryptophan residues in *E. coli* arginyl-tRNA synthetase. *BBA Biochimica et Biophysica Acta (Netherlands)*, 1998, 1387, 136—142.
- 11 Chen J F, Li T, Wang E D et al. The effect of alanine-293 replacement on the activity, ATP-binding, and editing of Escherichia coli leucyl-tRNA synthetase. *Biochemistry (US)*, 2001, 40(5): 1 144—1 149.
- 12 Zhang Q S, Shen L, Wang E D et al. Biosynthesis and characterization of 4-fluorotryptophan-labeled Escherichia coli arginyl-tRNA synthetase. *Journal of Protein Chemistry*, 1999,

- 18(2): 187—192.
- 13 Liu W, Huang Y W, Gilbert Eriani et al. A single base substitute in the variable pocket of yeast tRNA^{Arg} eliminates species-specific aminoacylation. *Biochimica et Biophysica Acta* (Netherlands), 1999, 1473: 2—3, 356—362.
- 14 Zhou M, Wang E D, Campbell RC et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of arginyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*. *Protein Science*, 1997, (6): 2 636—2 638.
- 15 Li T, Guo N N, Xia X et al. The peptide bond between E292—A293 of *Escherichia coli* leucyl-tRNA synthetase is essential for aminoacylation activity. *Biochemistry(US)*, 1999, 38(40): 13 063—13 069.
- 16 Chen J F, Guo N N, Tong Li T et al. CP1 domain in *Escherichia coli* leucyl-tRNA synthetase is crucial for its editing function. *Biochemistry(US)*, 2000, 39(22): 6 726—6 731.
- 17 Li T, Li Y, Guo N N et al. Discrimination of tRNA^{Leu} isoacceptors by insertion mutant of *Escherichia coli* leucyl-tRNA synthetase. *Biochemistry(US)*, 1999, 38(28): 9 084—9 088.

Interaction of Aminoacyl-tRNA Synthetases with their Cognate tRNAs

Wang Enduo

(Shanghai Institutes of Biochemistry and Cell Biology, CAS, 200031 Shanghai)

Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRSs) are a class of essential enzymes in protein biosynthesis. Study on aaRSs is very important to understand the high fidelity during translation and design new antibiotics. In the present research, leucyl- and arginyl-tRNA synthetases from *Escherichia coli* have been investigated by cloning, over-expression and site-directed mutagenesis of the genes encoding these enzymes and their cognate tRNAs, in vitro transcription, and recombination of peptide fragments. The results from this research work showed many important points to understand the structure basis of accurate interaction between aaRSs and their cognate tRNAs.

王恩多 女, 上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所研究员, 博士生导师。主要研究领域为“酶与核酸的相互作用”, 近年来以氨基酰 tRNA 合成酶及其相关的 tRNA 为对象进行研究。进行的“氨基酰-tRNA 合成酶及其与相关 tRNA 的相互作用”研究, 获 2000 年上海市科学技术进步奖(自然科学类)一等奖(第一完成人); 发表研究论文 70 篇, 会议论文 33 篇, 其中在国外杂志发表研究论文 23 篇; 研究论文被美国著名杂志《生物化学年鉴》和《细胞》中的综述文章评论性地引用。