

综述

核糖体蛋白质的翻译特异性 ——遗传密码翻译装置对信使 RNA 的选择性¹⁾

童克忠 陈玲爱 翁曼丽 王 玮 白应林

(中国科学院遗传研究所,北京)

摘 要

分子遗传学泰斗 J. D. Watson 于 1957 年首先对核糖体进行系统的研究。其后经许多科学家的共同努力,核糖体的结构已经基本研究清楚。然而对核糖体蛋白质的确切功能,却仍然一无所知。1979 年以来,本实验室主要从事分离核糖体蛋白质突变体,研究核糖体蛋白质突变对基因表达的影响。发现在 S12 突变体中,碱性蛋白酶活性下降,而中性蛋白酶活性正常。到目前为止,我们分离鉴定了的枯草杆菌核糖体蛋白质突变体总数居世界首位。我们研究了核糖体蛋白质突变对噬菌体基因组表达的影响。发现在 S12 的依赖链霉素突变体中,噬菌体 $\phi 105$ 裂解量下降;蛋白质合成受阻;而 RNA 和 DNA 合成正常。测定了噬菌体 $\phi 29$ 在 27 种共 44 株核糖体蛋白质突变体中的成斑率。在多数突变体中,成斑率下降,最低达 10^{-6} ;少数升高,最高达三倍;还有一些升降都不明显。大肠杆菌 C600 的 S12 发生依赖链霉素突变, λ 噬菌体的成斑率和相对产量大大降低,而 T4 和 T7 的成斑率正常。大肠杆菌 1.1485(λc I857) 的 S12 发生依赖链霉素突变, λc I857 的诱导释放量大大降低,而 T4 的成斑率反有所增加。在大肠杆菌 A19 野生型菌株中, λ 噬菌体的 N 基因表达正常;核糖体蛋白质 S10, S16, S19, S20 和 L3 发生突变,能抑制 N 基因表达;L21 + L25, L24 突变,N 基因不能表达;L27 突变,促进 N 基因表达;S8, L6, L7/L12, L14 和 L23 突变,对 N 基因表达没有明显影响。把 N 基因克隆在质粒上,用功能互补的方法,测定 N 基因表达的程度。结果清楚表明, S12 发生依赖链霉素突变, N 基因不能表达;发生抗链霉素突变,却表达正常。综合以上实验结果,可见不同的核糖体蛋白质突变对同一基因表达的影响不同;同一核糖体蛋白质突变对不同基因表达的影响也不同。还有一些核糖体蛋白质突变,对其他基因表达没有明显的影响。

核糖体作为一切细胞共有成分这一客观实在,充分说明它在生命活动中的重要性。核糖体既然如此重要,其蛋白质的功能将是多方面的、复杂的。本实验室已取得的研究成果,可能只是从一个侧面反映了核糖体蛋白质的功能。而且目前只是观察到一些现象,分子机理还不清楚,值得进一步研究。

一、核糖体的结构

一切生物的遗传信息,都编码、贮存于核酸的核苷酸顺序之中。核酸是惰性的,必须经过转录、翻译,其蕴藏的遗传信息,才能由蛋白质表达为丰富多彩、生意盎然的生物界。

Tong Kezhong et al.: Translational Specificity of Ribosomal Proteins—The Selectivity of Translational Apparatus Towards mRNAs

1) 国家自然科学基金资助项目。

本文于 1987 年 10 月 7 日收到。

一切生物的蛋白质,都在核糖体上合成。J. D. Watson 首先对核糖体进行系统的研究^[15]。其后经过许多科学家的共同努力,对核糖体的结构大体上已经研究清楚。原核生物的核糖体,由大小不等的两个亚基构成,大亚基包含两种 RNA 和三十几种蛋白质。小亚基包含一种 RNA 和二十几种蛋白质。真核生物核糖体的结构与此相似,但比较大。对大肠杆菌的核糖体研究得最为详尽,它的各种 rRNA 和各种蛋白质的基因位置、一级结构,基本上都已经研究清楚;各种 rRNA 和各种核糖体蛋白质在核糖体上所处的位置,以及彼此相互联结的关系,都经过仔细的研究。目前人们能够提取核糖体,在离体条件下将各种 mRNA 翻译成相应的蛋白质。然而,对核糖体上各种组份——包括三种 rRNA 和五十几种核糖体蛋白质的确切功能,却“仍然几乎一无所知”^[16,17]。

二、枯草杆菌核糖体蛋白质 突变对基因表达的影响

六十年代初期,本实验室首先由枯草杆菌 ATCC 6633 菌株分离到依赖链霉素突变体 (Str^{DA})^[11]。 Str^{DA} 菌落白色,与野生型或抗链霉素突变体 (Str^{RA}) 的棕色菌落不同^[12]。其后经过进一步研究,证明这种白色 Str^{DA} 都不形成孢子,抗金黄色葡萄球菌的抗生素产量降低,碱性蛋白酶活性降低。在 Str^{RA} 中,上述各项指标都和野生型无异^[3,4]。当时已经证明细菌 Str^A 突变是核糖体蛋白质 S12 结构基因 $rpsL$ 的突变,所以上述实验结果可以解释为突变 S12 影响碱性蛋白酶、抗生素和孢子形成等基因的表达。

由于细菌基因组较大,而且碱性蛋白酶缺陷菌株失去感受态,不易进行深入分析,作者改用噬菌体进行实验。

$\phi 105$ 是枯草杆菌的温和噬菌体。以丝裂霉素 C ($1\mu\text{g/ml}$) 处理 $\phi 105$ 的溶源菌株 61469 ($\phi 105$), $\phi 105$ 进入裂解生长,每个细胞释放出 $\phi 105$ 颗粒。以 ATCC6633 Str^{DA} 作给体,对 61469($\phi 105$) 进行转化,得 61469($\phi 105$) Str^{DA} 转化体。将 61469($\phi 105$) Str^{DA} 涂布在无链霉素的完全培养基上,可分离到不依赖于链霉素的回复突变体 Str^{R1} 。将 61469($\phi 105$) 涂布在含有 250—500 μg 链霉素/ml 的完全培养基上,可分离到抗链霉素的 61469($\phi 105$) Str^{RA} ^[13]。用丝裂霉素 C ($1\mu\text{g/ml}$) 诱导 $\phi 105$, 结果在 Str^{DA} 、 Str^{RA} 、 Str^I 三种突变体和野生型 61469 ($\phi 105$) 中, $\phi 105$ 的裂解量分别为 4、120、108 和 112^[13]。 Str^{DA} 中 $\phi 105$ 裂解量的下降,显然不是由链霉素的生理作用引起的。因为在 Str^{RA} 的培养基中,也加了等量的链霉素。 Str^{DA} 回复突变为 Str^I 后,裂解量恢复正常,也证明 Str^{DA} 中 $\phi 105$ 裂解量的下降是由 Str^{DA} 突变引起的。

用 [³H]-胸腺嘧啶核苷、[³H]-尿嘧啶核苷和 [¹⁴C]-

混合氨基酸标记 DNA、RNA 和蛋白质合成,结果 Str^{RA} 不影响大分子合成;在 Str^{DA} 中, DNA 和 RNA 合成正常,蛋白质合成受到严重抑制; Str^{DA} 回复突变为 Str^I , 蛋白质合成也恢复到野生型的水平^[13]。

上述实验所用 61469($\phi 105$) Str^{DA} , 其 Str^{DA} 是由 ATCC6633 Str^{DA} 转化来的,所以在 61469($\phi 105$) Str^{DA} 中,除 Str^{DA} 外,其遗传背景和野生型几乎完全相同;因此在 61469($\phi 105$) Str^{DA} 中 $\phi 105$ 裂解量的下降和蛋白质合成受阻是 $rpsL$ 突变的结果。由于 DNA 和 RNA 合成都正常,所以可以认为裂解量下降是蛋白质合成受阻的结果,是某些重要 mRNA 翻译受阻的结果。

本实验室由枯草杆菌 168 菌株经 EMS 诱变得得到一些核糖体蛋白质突变体(表 1)^[14]和一株依赖链霉素的 SD103^[14]。用 NTG 处理 SD103, 从中分离得到一系列核糖体蛋白质突变体(表 2)^[14]。用表 1、2 中所列 27 种共 44 株突变体为宿主,测定了噬菌体 $\phi 29$ 的成斑率,结果列于表 1 和表 2。从表 1 和表 2 的数据可以看到,除在回复体 62、71、150 和 32 上的成斑率高于 168 的以外,在其他回复突变体和突变体上的成斑率都降低,尤以 $rpsD$ 、 $rpsE$ 和 $rpsH$ 最为显著。

上述各种突变体,都是通过 EMS 或 NTG 诱变得来的,不能排除其他基因也发生突变的可能性。所以一方面通过转导、选择和 cys^+ 、 spe^+ 连锁的转导体,将 $rpsE$ 、 $rpsI$ 连同 $rpsL$ 转入 QB944; 提取这些转导体的核糖体蛋白质,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳,证明这些转导体都带有突变的 S5 或 S9。另一方面,又将 $rpsL^D$ 和自发抗链霉素突变(Str^{RA} 、即 $rpsL^R$) 通过转化、选择 cys^+rpsL^D 或 cys^+rpsL^R 转化体,转给 QB 944。用这些转导体或转化体为宿主,就可以在遗传背景相同的条件下,比较 $rpsL^D$ 、 $rpsL^R$ 、 $rpsL^D/rpsE$ 、 $rpsL^D/rpsI$ 对 $\phi 29$ 噬菌体成斑率的影响。实验结果见表 3^[14]。以 $rpsL^R$ 基因型为宿主,无论培养基中有无链霉素, $\phi 29$ 的成斑率都与以野生型为宿主无明显差异。用 $rpsL^D$ 基因型为宿主,成斑率低至 0.08。 $rpsE$ 突变或 $rpsI$ 突变提高 $rpsL^D$ 的成斑率,但不能回升到野生型核糖体的水平。

三、大肠杆菌核糖体蛋白质 突变对基因表达的影响

$\phi 105$ 和 $\phi 29$ 的基因组虽然比较小,但都没有经过详细的遗传学研究,因此不是最合适研究材料。

Lambda(λ) 噬菌体则不然。其 DNA 顺序已全部分析清楚,它经过详尽的遗传学研究,有丰富的突变体可资利用。在大肠杆菌 C600 (*thr leu thi lac tonA supE*) S12 发生依赖链霉素突变的 $rpsL^D$ 中, λNam 不能成斑; $\lambda c1857$ 成斑率降低, T4 和 T7 的成斑率保持正常;在液体培养基中, λNam 和 $\lambda c1857$ 都不

表1 噬菌体 $\phi 29$ 在不同核糖体蛋白质突变体中的成斑率
(以在 168 $rpsC2$ 中的成斑率为 1)

突变菌株	基因型	突变核糖体蛋白质	成斑率
Ksg-24	<i>rpsC</i>	S3	0.48
Ksg-39	<i>rpsE</i>	S5	0.71
Ksg-36	<i>rpsI</i>	S9	0.22
Ksg-24	<i>rplO</i>	L15	0.24
Gen-21		多一个蛋白质	0.16

表2 噬菌体 $\phi 29$ 在 *B. subtilis* SD 103 (*rpsL^D*) 的不同回复突变体中的成斑率
(以在 168 $rpsC2$ 中的成斑率为 1,测得在 SD103 (*rpsL^D*) 中的成斑率为 0.40)

回复体编号	基因型 ^{a)}	蛋白质 ^{b)}	成斑率	回复体编号	基因型 ^{a)}	蛋白质 ^{b)}	成斑率
167	<i>rpsC</i>	S3	0.10	44	<i>rpsS</i>	S19	0.40
41	<i>rpsD</i>	S4	8.5×10^{-3}	23	<i>rpl A, C</i>	L1, L3	0.75
5	<i>rpsD</i>	S4	0.04	111	<i>rplB</i>	L2	0.07
82	<i>rpsD</i>	S4	1.1×10^{-3}	63	<i>rplD</i>	L4	0.26
58	<i>rpsD</i>	S4	0.06	106	<i>rplF</i>	L6	0.63
165	<i>rpsD</i>	S4	0.9×10^{-3}	80	<i>rplF</i>	L6	0.76
143	<i>rpsE</i>	S5	0.28	114	<i>rplF</i>	L6	0.01
94	<i>rpsE</i>	S5	5.5×10^{-3}	48	<i>rplH</i>	L8	0.27
70	<i>rpsE</i>	S5	5.0×10^{-3}	99	<i>rplN</i>	L14	0.80
27	<i>rpsE</i>	S5	0.03	69	<i>rplP</i>	L16	0.20
51	<i>rpsE</i>	S5	0.10	159	<i>rplP</i>	L16	0.02
83	<i>rpsE</i>	S5	1.4×10^{-6}	71	<i>rplQ</i>	L17	1.40
91	<i>rpsE</i>	S5	0.20	127	<i>rplR</i>	L18	0.17
13	<i>rpsH</i>	S8	1.0×10^{-3}	151	<i>rplR</i>	L18	0.25
62	<i>rpsI</i>	S9	3.02	157	<i>rplT</i>	L20	0.40
35	<i>rpsI</i>	S9	0.01	55	<i>rplV</i>	L22	0.28
76	<i>rpsM</i>	S13	0.57	4	<i>rplV</i>	L22	0.02
112	<i>rpsO</i>	S15	0.31	150	<i>rplW</i>	L23	2.00
26	<i>rpsR</i>	S18	0.45	32	$\eta^c)$	多一斑点	1.23
151	<i>rpsR</i>	S18	0.25				

- a) 因为全部回复突变体由 SD103 (*rpsL^D*) 发生基因间抑制突变而来,所以全部回复体都携带另一突变基因 *rpsL^D*;
 b) 基于和 a) 同样的理由,都含有另一突变蛋白质 S12^D;
 c) 电泳图谱上多出一个蛋白质斑点,其基因未经鉴定。

能增殖。大肠杆菌 λ 溶源菌株 1.1485 ($\lambda c1857$) 突变成 *rpsL^D* 后, $\lambda c1857$ 的诱导释放大降低; 而 T4 的成斑率反有所增加^[8]。由于 $\lambda Nam7$ 和 $\lambda Nam7 Nam53$ 也含有 *c1857* 突变, 所以 $\lambda c1857$ 和 λNam 只有一个 *N* 基因不同; $\lambda c1857$ 在 C600 *rpsL^D* 上成斑率降低, 在液体培养基中不能增殖, 就是由于 *N* 基因的表达受到抑制之故。

大肠杆菌 T83 菌株 (*mu118 lacZU118 thi*) 无 *supE*, $\lambda Nam7$ 的 *N* 基因有 amber 无义突变, 所以在 T83 中, $\lambda Nam7$ 不能生长。在质粒 pEMBL1 的 *SmaI* 位点, 插入含有 *N* 基因的 446bp *HaeIII* 片段, 得 pN101。pN101 的 *N* 基因可由一未知的启动子启动表达,

产生足量的 *N* 蛋白质, 供 $\lambda Nam7$ 生长之用 (Naomi R. Franklin, 私人通讯)。质粒 pKC101 携有 *cl* 和 *N* 基因^[14]。只要诱导 *N* 基因表达, 就可支持 $\lambda Nam7$ 生长。

按常规方法^[12]提取 pN101, pKC101 质粒 DNA, 转化 T83 及其 *rpsL* 突变体, 得表 7 中所列各种携带质粒的菌株。按前已报道的方法^[8]分别测定 $\lambda Nam7$ 的成斑率和每个细胞中 $\lambda Nam7$ 颗粒的平均产量, 结果证明 S12 的依赖链霉素突变抑制 pN101 和 pKC101 上 *N* 基因的表达^[10]。

T83(pN101) 和 T83(pKC101) 只能提供 *N* 蛋白质, 所以不能支持 λO 或 λQ 的生产。以 $\lambda Oam29$ 和 $\lambda Qam117$ 进行实验, 证明两者都不能生长。

表 3 噬菌体 $\phi 29$ 在突变 S12、S5S12、S9S12 宿主中的成斑率

菌 株	基 因 型	突变蛋白质	成 斑 率
QB944 × <i>cys⁻ssr⁺</i>	野生型核糖体	(野生型)	1
QB944 <i>cys⁺ssr⁺</i>	野生型核糖体	(野生型)	1
QB914 <i>cys⁺rpsL^D(+Sm^a)</i>	<i>rpsL^D</i>	S12 ^D	0.08
QB944 <i>cys⁺rpsL^R(+Sm)</i>	<i>rpsL^R</i>	S12 ^R	1.03
QB944 <i>cys⁺rpsL^R</i>	<i>rpsL^R</i>	S12 ^R	1.09
QB944 × 27 ^b	<i>rpsE, rpsL^D</i>	S5, S12 ^D	0.55
QB944 × 70	(同上)	(同上)	0.71
QB944 × 51	(同上)	(同上)	0.46
QB944 × 83	(同上)	(同上)	0.61
QB944 × 91	(同上)	(同上)	0.88
QB944 × 94	(同上)	(同上)	0.27
QB944 × 143	(同上)	(同上)	0.83
QB944 × 62	<i>rpsI, rpsL^D</i>	S9, S12 ^D	0.67
QB944 × 35	(同上)	(同上)	0.69

a. 培养基中含 200 μg/ml 链霉素;

b. 表中回复突变体编号, 见表 2, 余类推。

表 4 $\lambda cl 857$ 在 A19 及其突变体中的成斑率和单细胞噬菌体产量

细菌菌株	改变的核糖体蛋白质	成 斑 率	单细胞噬菌体产量
A19	野生型 wild type	1.0	108
VT	S8 ⁶¹	0.89	61
VT206	L6	0.64	50
VT265	L7+L12	0.74	未测
VT420	S20	0.74	未测
VT442	S21+L25	$<10^{-4}$	0
VT493	L33	0.72	未测
VT517	L14	0.63	未测
VT549	L24	$<10^{-4}$	0
VT567	L27	3.56	315
VT593	L3	0.43	未测
VT594	S19	0.27	14
VT597	S16	0.28	未测
VT600	S10	0.74	未测
VT611	S5	0.84	68
VT601	S5+L24	0.40	44
VT616	S4	0.95	82
VT614	S4+L24	0.39	未测
VT617	S4+L24	0.42	40
VT711	S4+L6+L24	6.0×10^{-7}	未测
VT715	S4+L6+L24	2.0×10^{-7}	0
VT716	S4+L6+L24	$<10^{-6}$	0
VT978	无 L1 no L1	$<10^{-8}$	0
VT914	无 S3 no S3	$<10^{-8}$	0
VT990	S3+L22	$<10^{-8}$	0
VT982	S3+S18+L19+L24	0.16	未测
VT977	S3+S18+L6+L24+L27	6.02	441
VT613	S5+S18+L24	0.64	未测

噬菌体 T3、T4 的生长,无需N功能。实验结果说明 S12 的依赖链霉素突变对 T3 和 T4 的成斑率都没有影响。

大肠杆菌 A19 菌株 (*met thi his-95 rna-19*) 也没有 *supE*, 所以不能支持 λ Nam7 生长。 λ cI857 的 N 基因是野生型, 所以能在 A19 上生长。 λ cI857 在 A19 及其核糖体蛋白质突变体上增殖的优劣, 可以作为判断 λ cI857 的 N 基因表达高低的标准。以 A19 及其 24 种共 27 株突变体为宿主, 测定 λ cI857 的成斑率。结果 S3 + L22、S4 + L16 + L24、S21 + L25、L24、缺 L1、缺 S3 等突变体中, 成斑率降到 10^{-6} — 10^{-8} ; 在 S3 + S18 + L6 + L24 + L27 和 L27 突变体中, 成斑率分别提高到 6.02 和 3.56 倍(表 4)^[9]。以上结果说明在大肠杆菌中, 就和在枯草杆菌中一样, 影响基因表达的核糖体蛋白质突变, 并不限于 S12。

四、结 论

细菌核糖体蛋白质的合成, 有其特殊的调节机理^[11]。因此各种核糖体蛋白质基本上保持等分子合成; 在细胞质中, 不会有很多多余的、游离的核糖体蛋白质。上述实验结果虽然涉及两种细菌共 32 种核糖体蛋白质的基因突变, 但突变了蛋白质仍然是作为核糖体的组成部分而起作用的, 不是作为游离的蛋白质而起作用的。

核糖体蛋白质影响某些基因表达的分子机理, 至今仍不明白。枯草杆菌 S12 的依赖链霉素突变不影响 DNA 和 RNA 合成, 而蛋白质合成大大降低。所以作用可能发生在翻译水平, 但所用的分析方法不够精细, 仍需用其他方法进一步确证。

综合上述已有的实验结果, 可见不同的核糖体蛋白质突变对同一基因表达的影响不同; 有的降低, 最低达到 10^{-6} — 10^{-8} , 有的升高, 最高可达 6 倍。与此相仿, 同一核糖体蛋白质突变对不同基因表达的影响, 也不相同。例如 *E. coli* 1.1485(λ cI857)S12 依赖链霉素突变, 使 λ 的基因表达降低, 而 T4 的基因表达上升。还有一些核糖体蛋白质发生突变以后, 对基因表达没有明显的影响。

核糖体作为一切细胞共有成分这一事实, 足以充分说明它在生命活动中的重要性。构成这么重要的分子集体的各种蛋白质, 其功能将是多方面的。以上介绍的这些研究结果, 不过从一个侧面反映了核糖体蛋白质的功能; 而且, 还只是观察到一些现象, 说不清道理。要了解核糖体蛋白质在蛋白质合成过程中的确切功能, 需要更多的人作长期的探索。

本实验室正在进行三方面的工作: (一) 继续分离核糖体蛋白质突变体, 鉴别出更多的对核糖体蛋白质突变敏感的基因; (二) 比较敏感基因与不敏感基因 mRNA 的二级结构, 分析其敏感原因; (三) 运用反求遗传学 (reverse genetics) 的办法, 离体改变敏感基因的结构, 观察其对核糖体蛋白质突变的反应, 其目的是研究核糖体蛋白质表现翻译特异性的分子机理。

参 考 文 献

- [1] 童克忠等: 1963. 科学通报, 10 月号: 53.
- [2] 童克忠等: 1965. 微生物学报, 11: 544—553.
- [3] 童克忠: 1977. 遗传学报, 4(4): 316—319.
- [4] 翁曼丽等: 1980. 遗传学报, 7(4): 312—313.
- [5] 童克忠等: 1986. 科学通报, 31: 301—304.
- [6] 白应林等: 1985. 遗传学报, 12(2): 102—105.
- [7] 陈玲爱等: 1986. 科学通报 31: 544—547.
- [8] 童克忠等: 1986. 中国科学, 12: 1278—1284.
- [9] 雷朝滋, 童克忠: 1987. 遗传学报, 14(4): 318—322.
- [10] 王 玮, 童克忠: 1987. 科学通报, 32: 1118—1119.
- [11] Nomura, Y.: 1984. 科学(中文版), 1: 45—57.
- [12] Dillon, Jo-Anne R. et al. (eds): 1985. *Recombinant DNA Methodology*, John Wiley and Sons.
- [13] Pai Yinglin(白应林) and E.R. Dabbs: 1981. *Mol. Gen. Genet.*, 183:484—489.
- [14] Rao, R. Nagaraja: 1984. *Gene*, 31:247—250.
- [15] Tissieres, A.J. and J.D. Watson: 1958. *Nature*, 182:778—780.
- [16] Watson, J.D. et al.: 1983. *Recombinant DNA, A Short Course*, Freeman and Company, New York, p.42.
- [17] Watson, J.D. et al.: 1987. *Molecular Biology of the Gene*, 4th edition, Vol. 1. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park, California., p.423.