



酶性核酸的机理研究

Studies of Mechanism on Hammerhead Ribozyme

周德敏



高等教育出版社

HIGHER EDUCATION PRESS



酶性核酸的机理研究

Studies of Mechanism on Hammerhead Ribozyme

周德敏



高等教育出版社

HIGHER EDUCATION PRESS

图书在版编目(CIP)数据

酶性核酸的机理研究/周德敏. —北京:高等教育出版社, 2002. 1
优秀博士论文
ISBN 7-04-010340-0

I. 酶... II. 周... III. 核糖核酸—理论研究
IV. Q522

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2001)第 070234 号

酶性核酸的机理研究
周德敏

出版发行 高等教育出版社

社 址 北京市东城区沙滩后街 55 号 邮政编码 100009

电 话 010-64054588 传 真 010-64014048

网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>

经 销 新华书店北京发行所

排 版 高等教育出版社照排中心

印 刷 高等教育出版社印刷厂

开 本 850×1168 1/32 版 次 2002 年 1 月第 1 版

印 张 3.5 印 次 2002 年 1 月第 1 次印刷

字 数 90 000 定 价 6.60 元

插 页 2

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

作者简介



周德敏 (1966 年 6 月 25 日) 男, 汉族, 河北省石家庄人。

简历:

1985, 9—1990, 7 北京医科大学药学院大学本科获学士学位

1990, 9—1996, 7 北京医科大学药学院研究生获理学博士学位

1994, 10—1996, 4 日本筑波大学特别研究生

1996, 9—1999, 1 日本筑波大学应用生物

化学系准研究员

1999, 2—今 美国加州大学伯克利分校化学系博士后研究员、美国 SCRIPPS 研究所博士后研究员

研究工作:

研究方向涉及有机化学, 生物化学, 分子生物学和细胞生物学等几个方面。

硕士研究生期间, 在岳保珍教授和张礼和教授指导下完成了国家自然科学基金课题“传统中药青风藤的有效成分血管紧张素受体 II 的颞颥剂—青藤定碱及其类似物的全合成”。

博士研究生期间, 参与了国家高科技攀登计划, 从事生命科学中的化学问题的子课题的研究, 在张礼和教授和多比良和诚教授的指导下完成了锤头型酶性核酸的机制研究。研究成果包括定量描述了 RNA 水解的动力学过程, 证实了酶性核酸的双金属离子作用机制, 并首次提出酶催化 RNA 断裂的“TRIESTER-LIKE”作用模式。这些研究为揭示酶的本质, 人工开发新酶提供了重要实验依据。相关实验结果分别发表在《美国科学院报》, 《美国化学会志》, 《CHEMICAL REVIEW》等一系列权威杂志上, 在国际上引起了广泛的重视, 三年来论文被引用次数已接近 200 次。

博士后阶段，在 PETER SCHULTZ 教授指导下完成或正在从事以下几个方面的工作：①研究蛋白质与蛋白质的相互作用，构建了一种以小分子为开关调控从荷尔蒙到荷尔蒙受体信号传递的模型，为研究基因族所表达蛋白质的功能，开拓 COMBINATORY 化学的研究方向以及治疗因基因单点突变而导致的分子疾病如镰刀形细胞贫血症等提供了新的依据。此项研究即将发表于世界三大杂志之一的《科学》上。②创制具有自我剪接能力并能够滚动复制的人工类病毒，构建类似质粒的 RNA 载体，为基因药物的发展以及 RNA 免疫疫苗的创制提供新的尝试。③以心脏动脉血管再狭窄为靶点，研制能够定向给药的生物导弹。

获奖情况：

1992 年获北京医科大学特等奖学金

1994 年至 1996 年获日本文部省奖学金

1998 年获国家教委科技进步一等奖

1999 年获首届中国优秀博士论文奖

导师简介



张礼和 男 江苏省扬州市人。生于1937年9月8日(农历),汉族。1958年9月毕业于北京医学院药学系。1964年师从王序教授,攻读有机化学研究生,1967年毕业。1981年至1983年作为国家公派访问学者在美国弗吉尼亚大学化学系从事研究工作,现任北京大学药学院教授,天然药物及仿生药物国家重点实验室主任,国家自然科学基金委化学学部主任。20世纪60年代,在研究1,2,4-三嗪化合物的合成时发现了不正常对甲苯磺酰化反应。在美国工作期间参与并完成了博莱霉素A₂的全合成及其断裂DNA机制的研究。回国后在核酸化学和抗肿瘤和抗病毒药物方面做了系统研究。共发表论文120篇,专著2部和2项专利。1990年被日本星药科大学授予名誉博士学位,1993年被美国密苏里-堪萨斯大学授予第12届埃德加·斯诺教授称号,1995年当选为中国科学院院士。先后获国内各种奖励9项,1999年获何梁何利科技进步奖,2000年获国际药学联盟(FIP)“千年药学科学家奖”。

论文摘要

酶性核酸(Ribozyme)的发现是酶学研究的一场革命,它突破了“酶仅是由蛋白组成”的传统观念。本论文系统研究了金属离子在酶性核酸中的作用机制。我们以研究“硫效应”为出发点,用具体实验数据定量描述了RNA水解的动力学过程,证实了5'-氧离去是RNA断裂的速度控制步;以此为基础用实验方法证实了锤头型酶性核酸催化RNA水解采用“双金属离子机制”即二价金属离子作为“LEWIS酸”结合在2'-氧和5'-氧上,促进前者对磷的进攻和后者从磷上离去。通过探讨诱发“硫效应”的原因,我们修正了文献中关于金属离子直接作用于非桥氧键氧参与RNA水解的结论,提出了“TRILESTER-LIKE”的作用模式。我们还以简单的滴定方法估算出维持酶性核酸的活性构象所必需的金属离子数目,与后来发表的晶体结构数据相吻合。

一九九六年五月卅一日

药物化学博士生

叶蕴华

周德敏

王中良

论文答辩会

张致平刘士基

王中良和誠

杨福愉

王中良

张礼和

摘 要

Ribozyme 一词由 Ribonucleic acid 核酸和 Enzyme 酶组合而成,特指具有催化功能的 RNA 分子。Ribozyme 是一种金属酶,虽然 X 射线衍射已经在 Hammerhead Ribozyme 的晶体结构中找到一个潜在的功能性金属离子,但是 Hammerhead Ribozyme 催化 RNA 水解所需金属离子的精确数目以及金属离子在该催化反应中的作用仍是一待解之谜。为深入探讨 Ribozyme 的催化机制,我们在国际上首次合成了 Hammerhead Ribozyme 的 5'-硫代底物,并研究了该底物酶催化作用下的动力学过程。实验结果表明:(1) 对于正常 RNA,不论是酶催化水解还是自然水解,5'-氧的离去永远控制着 RNA 水解的速度;但是当用硫原子代替 5'-氧,使 5'-离去基团成为极好的离去基团时,2'-羟基对磷的亲核进攻就构成 RNA 水解的速度控制步。(2) Hammerhead Ribozyme 催化水解 RNA 时,采用双金属离子机制,即在 RNA 水解过程中,金属离子直接结合在进攻基团和离去基团的氧上,来稳定水解反应所生成的三角双锥过渡态或中间体。这是发现 Ribozyme 催化水解 RNA 采用双金属离子的第一次直接证据。(3) 借助于 R11O/R11S 的动力学数据,第一次定量描述了 RNA 水解的能量图谱以及 Hammerhead Ribozyme 对降低 TS1 和 TS2 过渡态活化能的作用。

疏效应是评价金属离子在 Ribozyme 反应中作用的重要方法。Uhlenbeck 等根据 Hammerhead Ribozyme 底物的 *Pro*-Rp 氧硫代后所表现出的显著疏效应可被离子所解除的现象得出结论:Hammerhead Ribozyme 催化水解 RNA,需要借助于金属镁离子直接结合于底物的 *Pro*-Rp 氧来稳定过渡态。该结论因构成 Ribozyme 是金属酶的一个重要证据而格外引人注目。我们合成并研究了

RpS 及异构体 SpS(*Pro* - Sp 氧被硫取代)的酶解动力学过程,发现正如前人所说,RpS 底物在镁离子或锰离子存在的情况下,酶解速率远远低于 SpS 的酶解速率,表现出比较强的硫效应;而且锰离子在 RpS 的硫效应中存在一定的复活效应。对照锰离子在 RpS 和 SpS 中表现出的复活值,虽然 SpS 表现出较弱的硫效应,但锰离子的复活值等同于 RpS 内复活值。该实验结果对前人得出的 Hammerhead Ribozyme 催化水解 RNA 及金属镁离子直接结合于 *Pro* - Rp 氧来稳定过渡这一结论提出质疑。

Ribozyme 是一种金属酶,我们通过滴定法确定了金属离子在 Hammerhead Ribozyme 反应中结构方面的作用。滴定结果表明:2 价金属离子不仅作为 RNA 水解的真正催化剂参与 Hammerhead Ribozyme 反应,而且在诱导 Hammerhead Ribozyme 的空间结构呈活性构象方面起着特别重要的作用。滴定结果还表明,诱导 Hammerhead Ribozyme 发生催化反应需要 8 个以上的金属离子。

总之,我们的实验结果得出以下结论:Hammerhead Ribozyme 催化水解 RNA,需要 8 个以上的金属离子,其中一些金属离子在使 Hammerhead Ribozyme 折叠成特定的三级结构方面起作用,另一些金属离子结合在进攻基团和离去的氧上,从而表现出功能方面的作用。Hammerhead Ribozyme 是一种金属酶。

Abstract

The word Ribozyme derived from the words ribonucleic acid (RNA) and enzyme, and it denotes an RNA molecule with catalytic property. Ribozymes are recognized as metalloenzymes. Although X-ray analysis of a Hammerhead Ribozyme identified one potential catalytic metal ion, the exact number of metal ions required for catalysis and their roles in catalytic reaction remain obscure. In order to examine the number of metal ions required for catalysis in reactions catalyzed by Hammerhead Ribozyme, we synthesized, for the first time, a natural all-RNA substrate that contains a 5' - thio - leaving group at the cleavage site and performed detailed kinetic analysis. Our results powerfully demonstrated that the attack by the 2' - oxygen at C17 on the phosphorus atom in the hydrolysis of RNA is the rate-limiting step only when the substrate contains a good 5' - leaving group; the departure of the 5' - leaving group is always the rate-limiting step for normal RNA no matter in enzymatic or non-enzymatic system. Moreover, our kinetic analysis revealed that Hammerhead Ribozymes exploit the general double - metal - ion mechanism of catalysis, where the metal ions are coordinated directly to the attacking and leaving oxygen. This is the first demonstration of double - metal - ion catalysis in reactions catalyzed by Ribozymes, and a similar mechanism may be operative in other Ribozyme - catalyzed reactions. In apart from above conclusion we have quantitatively described for the first time, the relative energies of RNA hydrolysis and estimated the effect of Ribozyme to make active hydrolysis.

This effect is an effective way to elucidate the role of divalent metals in Ribozyme reaction. This substitution at the *Pro* - Rp oxygen of the cleavage site of a Hammerhead Ribozyme substrate resulted in a large thio effect that was relieved by replacement of Mg^{2+} by Mn^{2+} , which has a higher affinity for sulfur than Mg^{2+} . This observation lead to the general conclusion that a Mg^{2+} is directly coordinating with the *Pro* - Rp oxygen. In this arrangement, the bound metal ion act as an electrophilic catalysis and the proposed mechanism is very attractive for metalloenzymes. In the course of quantitation of the rescue capability of Mn^{2+} in thio effects, we examined two epimeric thio substrates, RpS and SpS, in that either *Pro* - R or *Pro* - S oxygen at the cleavage site had been replaced by sulfur. In agreement with the previous observation, RpS was cleaved much more slowly than SpS in a solution that contained either Mg^{2+} or Mn^{2+} , and Mn^{2+} could rescue the lower activity of the thio substrates. However, the magnitude of the rescue provided by Mn^{2+} , and Mn^{2+} could rescue the lower activity of the thio substrates. However, the magnitude of the rescue provided by Mn^{2+} was identical for the two thio substrates, RpS and SpS. This observation strongly argues against the generally accepted mechanism of the direct coordination of a metal ion with the *Pro* - Rp oxygen of the cleavage site of a Hammerhead Ribozyme. It is, thus possible that all Ribozyme cleaves RNA without the assistant of divalent metal ion by way of binding to the negatively charged nonbridging oxygen.

Hammerhead Ribozymes are divalent metal - dependent enzymes and the roles of metal ions were evaluated by titration studies. The titration results showed that the divalent metal ions are not only important as the true catalysts to cleave RNA but also specific to in-

duce Hammerhead Ribozyme to promote a proper folding – its active conformation. Monovalent ions could not display structure role instead of divalent metal ions on Hammerhead Ribozyme, but they could competitively bind RNA and change the structure of Hammerhead Ribozyme into its inactive conformation. Detail kinetic analysis revealed that more than 8 metal ions are required to initiate Hammerhead Ribozyme – catalyzed reaction.

In conclusion, Hammerhead Ribozyme requires more than 8 divalent metals to initiate its catalytic ability. Among these metals some take the structural role such as folding Hammerhead Ribozyme, some take the functional role as directly binding to the attacking and leaving groups but not the nonbridge oxygen to stabilize the transition state.

责任编辑	张庆波
封面设计	张楠
责任绘图	朱静
版式设计	史新薇
责任校对	夏晔
责任印制	韩刚

目 录

摘要	1
Abstract	1
第 1 章 Hammerhead Ribozyme 的机制研究以及在医学上的应用(综述)	1
第 2 章 5'-氧的离去是 RNA 非酶催化水解和 Hammerhead Ribozyme 催化水解的控制速度步骤	11
第 3 章 Hammerhead Ribozyme 催化水解 RNA 采用双金属离子的直接证据	20
第 4 章 再论金属离子在 Hammerhead Ribozyme 反应过渡态中与非桥氧键的作用	38
第 5 章 金属离子在 Hammerhead Ribozyme 反应中的结构作用	51
第 6 章 异青藤定碱及类似物的全合成	68
文献及附加说明	81
致谢	94
发表及待发表论文	96

第 1 章

Hammerhead Ribozyme 的 机制研究以及在医学上的应用(综述)

摘 要

Hammerhead Ribozyme 是天然存在的一种序列最短的功能性 RNA, 它能特异地催化水解 RNA 分子。通过 Ribozyme 构效关系的研究, 识别出催化反应所必需的功能基团, 并借助底物的结构修饰, 研究 2 价金属离子在酶解反应中的作用。最近, X 射线晶体衍射法的研究已经揭示出 Hammerhead Ribozyme 的三维结构最新的信息, 但仍留下了许多疑问。我们的实验结果很好地阐述了金属离子在结构和功能方面的作用, 弥补了 X 射线晶体衍射法的不足。本章主要论述了 Hammerhead Ribozyme 作用机制, 同时也简单介绍了它作为基因药物, 通过抑制基因表达而治疗病毒所致的癌症, 特别是抑制艾滋病病毒方面的进展。

人类对酶的认识可追溯数世纪以前, 对酶反应的最早研究也可追溯到 19 世纪后期, 到 20 世纪 30 年代才建立起比较完整的酶

动力学和热力学理论体系。在最初的数百年内,人类对酶的认识仅停留在蛋白质水平上,以至于 80 年代以前的教科书,将酶的概念笼统地定义为“有催化活性的蛋白质或多肽分子”。

20 世纪 80 年代初期具有催化功能的 RNA(简称 Ribozyme)的发现,奠定了生命科学的一个里程碑,它不仅打破了所有酶都是蛋白质的传统观念,而且对生命的核酸起源学说提供了关键性证据,更重要的是为治疗癌症、艾滋病等致命性疾病、发展基因药物,开拓了更加广阔的前景。Ribozyme 的发现及其重大意义很快得到科学界的共识,发现者 Cech 和 Altman 在 Ribozyme 发现仅七八年后的 1989 年就荣获了诺贝尔化学奖。

Hammerhead Ribozyme 是至今发现的一段依赖于镁离子特异性地切割(水解)RNA 的最小的功能性核糖核酸序列,多见于植物病毒和卫星 RNA 的滚动复制过程中^[1,2]。Hammerhead Ribozyme 是由三条茎和一个将三条茎连接起来称之为活性中心的单股链所组成(图 1-1)。Hammerhead Ribozyme 催化 RNA 水解反应时需要在水解部位有一个特殊的三联码,而当三联码为 GUC 时,水解活性最高^[4~9]。突变实验表明,Hammerhead Ribozyme 三条茎中,大部分配对碱基的改变并不影响反应活性,而在单股的活性中心区,除 U7 外,碱基的更换将使 Ribozyme 活性丧失殆尽^[4~9]。Hammerhead Ribozyme 较短的序列,加之过去十几年里核酸固相合成的突飞猛进的发展,加快了它结构和功能方面的研究。Uhlenbeck^[10]、Haseloff 和 Gerlach^[11]将天然存在的顺式 Hammerhead Ribozyme 加工成反式来水解 RNA 分子(图 1-1),从而使它成为具有潜在能力的基因治疗药物。本章概述了 Hammerhead Ribozyme 及底物通过结构修饰而揭示出的机制方面的研究进展,同时简单介绍了它在医学方面的应用和未来的研究前景。

Ribozyme 的切割机制和金属镁离子的作用

Hammerhead Ribozyme 催化 RNA 分子水解,切割反应通过磷