

氨基酰-tRNA 合成酶与神经退行性疾病*

朱 斌 王恩多**

(中国科学院上海生命科学研究院, 生物化学与细胞生物学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要 氨基酰-tRNA 合成酶催化 tRNA 的氨基酰化反应为生物体内的蛋白质合成提供原料. 这类古老且保守的蛋白质分子在高等生物复杂的细胞分子网络中分化出的新功能是目前人们关注的焦点. 近期在对一些患有神经退行性疾病的病人和小鼠模型的研究中发现, 位于酪氨酰-tRNA 合成酶、甘氨酰-tRNA 合成酶和丙氨酰-tRNA 合成酶上的突变, 可分别导致 DI 腓骨肌萎缩症(Charcot-Marie-Tooth disease, CMT) C 型, 腓骨肌萎缩症 2D 型及小脑浦肯雅(Purkinje)细胞丢失. 初步的致病机理研究表明, 致病突变对这 3 种酶的影响各不相同: 酪氨酰-tRNA 合成酶的氨基酰化催化能力受到影响, 甘氨酰-tRNA 合成酶受影响的可能是一种未知的新功能, 而丙氨酰-tRNA 合成酶受影响的则是它的编校功能. 这些研究结果揭示了氨基酰-tRNA 合成酶涉及神经退行性疾病的广泛性和其机制的复杂性, 并将促进对神经退行性疾病这一类常见疾病的病理和治疗方法的研究.

关键词 氨基酰-tRNA 合成酶, 酪氨酰-tRNA 合成酶, 甘氨酰-tRNA 合成酶, 丙氨酰-tRNA 合成酶, 神经退行性疾病, 腓骨肌萎缩症, 浦肯雅(Purkinje)细胞

学科分类号 Q71

氨基酰-tRNA 合成酶(AARS)催化对应的氨基酸与相应的 tRNA 3'端腺苷酸核糖上的羟基发生酯化反应, 使 tRNA 氨基酰化, 产生的氨基酰-tRNA 是生物体在核糖体合成蛋白质的原料^[1]. 按活性中心的高级结构、保守序列和与氨基酰化在核糖羟基的位置, 20 种氨基酸对应的 20 种 AARS 被分为 2 类, 每类 10 种, 每一种可用氨基酸的三字符后缀 RS 表示. 鉴于这类分子在核酸携带的遗传信息向功能蛋白质转化过程中的重要性及其进化上的保守性, 围绕 AARS 对底物识别的精确性研究和 AARS 催化机制一直是研究的热点. 近年来, 随着生命科学各领域研究的进展, 特别是人类基因组的解析, 人们对高等生物细胞内有限种类的蛋白质分子如何行使如此复杂的细胞功能提出了许多新问题. 经典的生物大分子是否具有新功能成为热点问题之一. AARS 作为细胞分子网络中的重要生物大分子, 其功能早已不是仅限于人们熟知的氨基酰化催化功能, 而是广泛涉及编校^[2]、RNA 剪切与转运、转录与翻译调控^[3]、调节 DNA 和氨基酸的生物合成^[4]乃至细胞因子^[5~8]等功能.

最新的研究结果又将 AARS 与人类的常见疾病——神经退行性疾病联系起来. 腓骨肌萎缩症(Charcot-Marie-Tooth disease, CMT), 又称遗传性

运动及感觉神经疾病, 是一类全世界范围高发病率的周围神经系统退化单基因遗传病, 发病率为 1/2500. 主要为常染色体显性遗传, 也可见常染色体隐性遗传及 X 连锁显性或隐性遗传. CMT 常在儿童期至青少年发病. 临床上根据 CMT 的病理和电生理特点将其分为: 脱髓鞘型(CMT1 型)和轴索型(CMT2 型). CMT 的突出特征是对称性下肢远端肌无力与肌萎缩及上肢大小鱼际肌和骨间肌萎缩. CMT 患者中, 70% 的常染色体显性遗传的 CMT 1 型患者及 90% 的散发病例, 是由位于 17p11.2 的周围髓鞘蛋白 22 基因(PMP22)发生片段大小为 1.5 Mb 的正向串联重复突变, 其余患者的发病由基因点突变引起, 具有高度遗传异质性, 已发现的致病基因包括 PMP22、MPZ、GJB1、EGR2、PRX、MTMR2、NDRG1、NEFL、KIF1B 及 GAN 等^[9]. 最近, 从患有不同亚型的 CMT 病人家族及小鼠模型的基因组分析表明, 有两类致病突变分别位于 TyrRS^[10]和 GlyRS^[11, 12]的基因上. 而在另一类患病小鼠模型中的分析则表明, 位于 AlaRS 基因

*国家自然科学基金资助项目(30330180).

** 通讯联系人. Tel: 021-54921241, E-mail: edwang@sibs.ac.cn

收稿日期: 2006-11-21, 接受日期: 2006-12-12

上的致病突变会导致小脑浦肯雅(Purkinje)细胞的丢失^[13, 14], 进而造成共济失调——另一种典型的神经退行性疾病.

1 TyrRS 与 DI-CMTC

显性中间型腓骨肌萎缩症 C 型(DI-CMTC)(dominant intermediate CMT neuropathy type C)是一种非典型性的腓骨肌萎缩症, 其特点是中间神经信号传导速度的下降及其神经轴突和髓鞘的退化. 从

世界不同地区 3 个病人家族的基因组分析中发现, 有 3 个杂合致病突变位于编码 TyrRS 的基因上, 其中 2 个是单点错义突变, 1 个是 4 个氨基酸残基的缺失突变. TyrRS 属于第一类 AARS, 在体内它以同源二聚体形式存在, 其催化结构域位于蛋白质的 N 端, 而发现的致病突变点也全部位于这一结构域^[10]. 其中 G41R 突变位于进化上高度保守的酪氨酸活化区域, 而 E196K 和 V153KQV156 缺失突变则位于与 tRNA 相互作用的区域 (图 1).

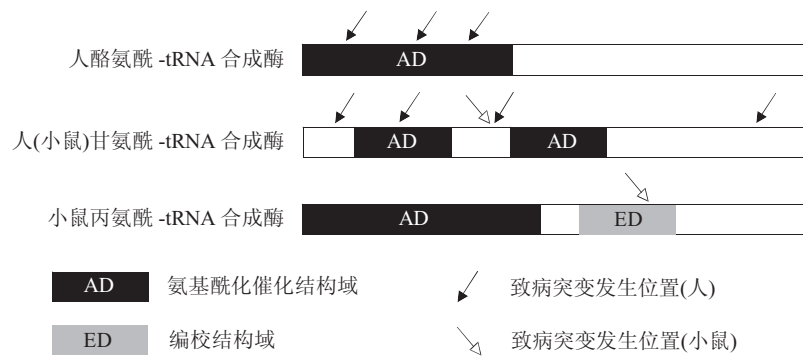


Fig. 1 Distribution of the disease-related mutations in AARSs ^[10-14]

图 1 致病突变在相关 AARS 上的分布 ^[10-14]

致病突变的分布特征暗示它们很可能通过影响 TyrRS 的催化活性而引起疾病. 体外的生化研究证实, G41R 和 E196K 突变确实使 TyrRS 的氨基酸活化活力下降, G41R 的影响尤为明显, 这与其相对应的病人症状较严重相吻合. 进一步体内试验证明, 野生型和带有 E196K 突变的人及酵母 TyrRS 基因都可以拯救 TyrRS 基因缺陷的酿酒酵母, 而携带有 G41R 突变体基因则不能^[10].

同时, 人们在细胞学实验中发现, TyrRS 在正在分化的神经母细胞中呈极性分布, 大多分布于细胞的前沿突起或生长点即将来形成轴突的地方, 而在成纤维细胞中则呈均匀分布. 而这种极性分布类似于突触体素(synaptophysin)等神经轴突标志分子, 而且在 AARS 家族中这种分布似乎是 TyrRS 所特有的, 同时研究的 ArgRS 和 TrpRS 即使在正在分化的神经母细胞中也是均匀分布的. 小鼠免疫组化实验说明, 这种分布在体内也是存在的. 更为奇特的是, 致病突变 G41R 和 E196K 使 TyrRS 在细胞内变为均匀分布, 不仅如此, 转入细胞带有突变的 TyrRS 还使细胞内源野生型 TyrRS 的极性分布能力丧失, 这可能与突变体与野生型酶形成杂合二聚体

有关^[10]. 这些结果表明, TyrRS 相关的致病突变很可能通过单倍体剂量不足(haplo-insufficient)或显负性(dominant negative)机制导致疾病. 然而, 由于 TyrRS 潜在的细胞因子功能^[5, 15, 16], 不能排除突变影响 TyrRS 催化性质以外其他功能的可能性. 另外, 尽管神经生长点活跃的蛋白质合成需要大量的 AARS, TyrRS 特异性的极性分布机制仍不清楚, 对其进行进一步研究将有助于人们理解 TyrRS 与神经生长的关系.

2 GlyRS 与 CMT-2D

AARS 家族中已知的与神经退行性疾病关系最密切的是 GlyRS, 从病人基因组中已鉴定出很多 GlyRS 基因突变与 CMT-2D(CMT neuropathy type 2D)型神经退行性疾病相关(图 1). 其症状是周围神经传导速度下降和神经轴突退化. 最近, 在小鼠模型中较详细地研究了 GlyRS 突变体的致病机理.

GlyRS 属于第二类 AARS, 具有不连续的催化结构域. 位于其基因编码催化结构域附近区域的 P278KY(脯氨酸被置换为赖氨酸和酪氨酸)突变,

使小鼠体重和寿命严重下降, 并表现出 CMT-2D 的症状^[12]. 免疫荧光研究显示, 患病小鼠的神经肌肉连接点(neuromuscular junction, NMJ)形状严重异常, 许多 NMJ 出现了部分缺少神经支配或完全去神经支配. 神经电生理实验的结果表明, 患病小鼠下肢主要神经的神经信号传导速度下降, 反应延滞时间增长, 肌肉收缩力度下降. 而电镜结果显示, 导致这些症状的主要原因是相应神经元轴突, 尤其是大直径轴突的丢失或退化^[12].

关于 GlyRS 的突变如何导致神经元轴突丢失, 人们很容易联想到其氨基酰化催化功能受损. 但是, 与 TyrRS 不同, GlyRS 已知致病突变的分布遍布整个蛋白质^[11, 12] (图 1), 这就不能支持突变体通过功能缺失(loss of function)而致病. 对纯化的人 GlyRS(P234KY)同源突变酶的体外酶促反应动力学研究表明, 突变没有损害酶的催化活性. 对从小鼠模型中鉴定出的另一个 GlyRS 插入突变 XM256^[17] 的研究, 支持了 GlyRS 基因突变不是通过催化功能缺失而致病. 与 P234KY 不同, XM256 突变具有典型的功能缺失特征, 其基因表达水平下降了约 64%, 但是携带这一突变的小鼠却没有显现出任何 CMT-2D 特征, 包括 NMJ 形状异常, 神经信号传导速度下降及大直径轴突丢失等^[12]. 这些结果均表明, GlyRS 在周围神经细胞中必然存在着其经典氨基酰化功能以外的新功能, 而致病突变则通过影响这种未知功能而导致疾病^[12].

目前又有报道, 在 GlyRS 基因发现了与 CMT-2D 相关的新的突变^[18], 使已知的相关致病达到 8 种之多. 但是人们对于 GlyRS 与周围神经细胞疾病的相关功能却仍一无所知. 这方面的研究已成为 AARS 与神经疾病学科的共同热门课题.

3 AlaRS 与浦肯雅细胞的丢失

与前 2 种病例中 AARS 影响周围神经系统不同, 第二类 AARS 中的 AlaRS 突变导致模型小鼠的小脑浦肯雅细胞丢失. 可以观察到, 突变小鼠生长到 6 周有明显的浦肯雅细胞丢失并发生共济失调, 一年后几乎所有浦肯雅细胞都消失^[13]. 而人类小脑浦肯雅细胞病变则会导致癫痫等疾病. 基因分析显示致病突变(A734E)位于 AlaRS 编校结构域重要区段(图 1).

在 AARS 的进化过程中, 为了克服对结构相似的氨基酸小分子的识别困难, 许多 AARS 通过

招募和融合新的结构域进化出了编校(editing)功能. 编校结构域能够水解误活化的氨基酸和误氨基酰化的 tRNA, 分别称为转移前编校和转移后编校^[9]. 因为 tRNA 的氨基酰化是从遗传信息到功能蛋白质所有环节中可能出错率最高的环节, 所以编校功能对细胞的正常生长十分重要, 编校功能的缺损会导致错误的氨基酸误掺入新合成的蛋白质, 引起蛋白质错误折叠乃至聚集(图 2). 这在低等生物中已得到证明^[19~21]. 人们预测在高等动物细胞中编校会有类似的重要功能.

在小鼠模型中的一系列实验证明, 编校功能的缺损通过引起蛋白质错误折叠导致浦肯雅细胞丢失^[13, 14]. 首先, 来源于患病小鼠的成纤维细胞在体外培养时对环境中的丝氨酸浓度敏感, 提高丝氨酸的浓度导致细胞大量死亡, 其他氨基酸则没有明显影响. 而丝氨酸是丙氨酸的结构类似物, 也正是 AlaRS 编校功能的靶点. 对死亡细胞的免疫印迹表明, 细胞内蛋白质的泛素化水平升高, 这与胞内存在蛋白质误折叠、聚集以及降解是吻合的. 这就说明 AlaRS 的编校功能在一定条件下即使对其他类型的细胞都是十分重要的. 体外实验显示, 人源和鼠源 AlaRS 的 A734E 突变体的水解使误氨基酰 tRNA 能力下降和误氨基酰化活力升高, 它们的编校功能确实受到影响. 而最后的免疫组化和电镜观察结果显示, 在患病小鼠的小脑浦肯雅细胞中, 泛素化、分子伴侣表达水平以及内质网应激效应等针对于蛋白质误折叠、聚集以及降解的标志都有显著提高, 直接证实了人们对 AlaRS 的编校功能缺损导致浦肯雅细胞丢失致病途径的猜测^[13].

AARS 的编校功能虽然十分重要, 但比它的氨基酰化维持细胞生存的基本功能来说相对次要, 因此, 位于编校结构域的突变往往比氨基酰化催化结构域的突变效果温和(后者理论上大部分是致死的), 也可以遗传, 因此 AARS 编校结构域是人们预测的遗传病位点. 而神经细胞由于高度分化, 不再分裂, 生成的错误蛋白质容易积累(细胞分裂可以稀释错误蛋白质的浓度), 所以理论上更容易受编校功能缺失的影响, 以上的研究证实了这一点. 第一类 AARS 中 3 种 AARS 具有经典的编校结构域, 最近也有关于它们的编校功能与细胞生长关系的报道^[22]. 这些研究为人类的遗传性神经疾病开阔了新的视野.

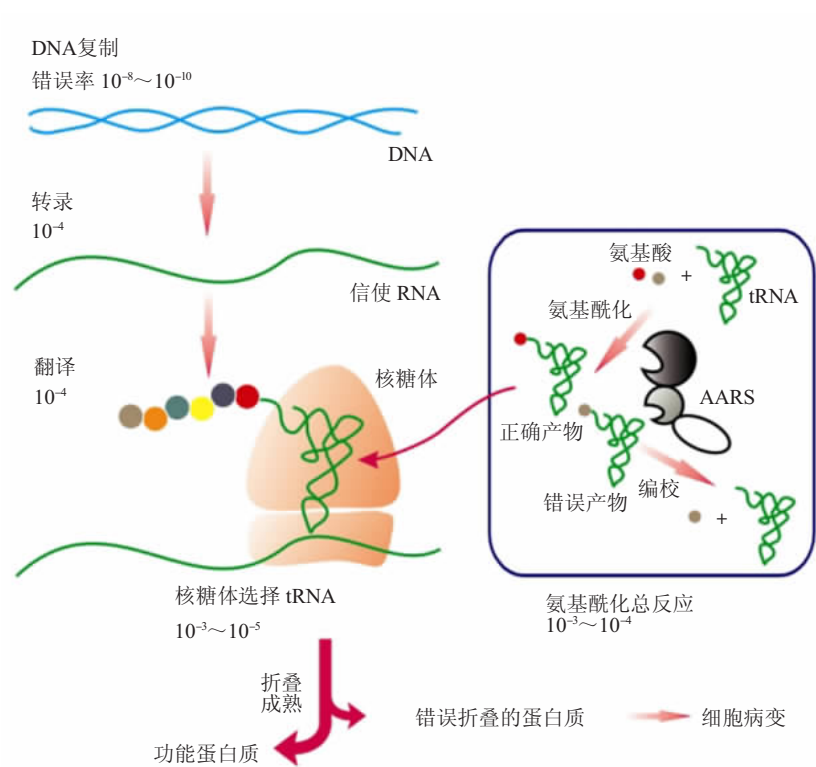


Fig. 2 Accuracy in gene expression and the production of misfolded proteins^[14]

图2 基因表达的精确性与错误折叠蛋白质的产生^[14]

4 小结与展望

近年的报道, 把蛋白质生物合成系统尤其是其中的 AARS 与发病率极高的神经疾病越来越紧密地联系起来. 除了以上提到的 3 种 AARS, LysRS 被报道, 与引起另一种神经退行性疾病的超氧化物歧化酶(SOD1)的突变体有关^[23]; 而参与哺乳动物细胞内 AARS 复合体组装的重要因子 p38, 也被报道是 parkin 蛋白的底物并极有可能参与帕金森综合症的形成^[24]. 另外的报道则突出了蛋白质合成在神经生长过程中的特殊重要性^[25, 26].

AARS 涉及神经退行性疾病的广泛性已引起人们对这一领域研究的高度兴趣. 但已有的研究也显示了其致病机理的复杂性, 几种突变 AARS 引起神经退行性疾病的机理各不相同, 其中还涉及人们尚不清楚的 AARS 新的细胞功能. 为何致病效应只针对特定类型的细胞? 为何症状要在一定年龄显现? 致病过程还涉及细胞功能网络的其他哪些方面? 这些问题都有待进一步研究. 可以预见, 这方面的研究必将会对神经退行性疾病的病理及治疗研究带来曙光.

参考文献

- 1 Ibba M, Söll D. Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu Rev Biochem*, 2000, **69**: 617~650
- 2 Zhu B, Zhao M W, Eriani G, *et al.* A present-day aminoacyl-tRNA synthetase with ancestral editing properties. *RNA*, 2007, **13** (1): 15~21
- 3 Martinis S A, Plateau P, Cavarelli J, *et al.* Aminoacyl-tRNA synthetases: a family of expanding functions. *EMBO J*, 1999, **18** (17): 4591~4596
- 4 Schimmel P, Ribas De Pouplana L. Footprints of aminoacyl-tRNA synthetases are everywhere. *Trends Biochem Sci*, 2000, **25** (5): 207~209
- 5 Wakasugi K, Schimmel P. Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. *Science*, 1999, **284** (5411): 147~151
- 6 Wakasugi K, Slike B M, Hood J, *et al.* A human aminoacyl-tRNA synthetase as a regulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (1): 173~177
- 7 Otani A, Slike B M, Dorrell M I, *et al.* A fragment of human TrpRS as a potent antagonist of ocular angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (1): 178~183
- 8 Wakasugi K, Slike B M, Hood J, *et al.* Induction of angiogenesis by a fragment of human tyrosyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem*, 2002, **277** (23): 20124~20126
- 9 Berger P, Young P, Suter U. *Molecular cell biology of*

- Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurogenetics*, 2002, **4** (1): 1~15
- 10 Jordanova A, Irobi J, Thomas F P, *et al.* Disrupted function and axonal distribution of mutant tyrosyl-tRNA synthetase in dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Nat Genet*, 2006, **38** (2): 197~202
 - 11 Antonellis A, Ellsworth R E, Sambuughin N, *et al.* Glycyl tRNA synthetase mutations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2D and distal spinal muscular atrophy type V. *Am J Hum Genet*, 2003, **72**: 1293~1299
 - 12 Seburn K L, Nangle L A, Cox G A, *et al.* An active dominant mutation of glycyl-tRNA synthetase causes neuropathy in a Charcot-Marie-Tooth 2D mouse model. *Neuron*, 2006, **51**: 715~726
 - 13 Lee J W, Beebe K, Nangle L A, *et al.* Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration. *Nature*, 2006, **443** (7107): 50~55
 - 14 Roy H, Ibba M. Molecular biology: sticky end in protein synthesis. *Nature*, 2006, **443** (7107): 41~42
 - 15 Wakasugi K, Schimmel P. Highly differentiated motifs responsible for two cytokine activities of a split human tRNA synthetase. *J Biol Chem*, 1999, **274** (33): 23155~23159
 - 16 Kleeman T A, Wei D, Simpson K L, *et al.* Human tyrosyl-tRNA synthetase shares amino acid sequence homology with a putative cytokine. *J Biol Chem*, 1997, **272** (22): 14420~14425
 - 17 Skarnes W C, Moss J E, Hurtley S M, *et al.* Capturing genes encoding membrane and secreted proteins important for mouse development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (14): 6592~6596
 - 18 James P A, Cader M Z, Muntoni F, *et al.* Severe childhood SMA and axonal CMT due to anticodon binding domain mutations in the GARS gene. *Neurology*, 2006, **67** (9): 1710~1712
 - 19 Bacher J M, de Crecy-Lagard V, Schimmel P R. Inhibited cell growth and protein functional changes from an editing-defective tRNA synthetase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102** (5): 1697~1701
 - 20 Doring V, Mootz H D, Nangle L A, *et al.* Enlarging the amino acid set of *Escherichia coli* by infiltration of the valine coding pathway. *Science*, 2001, **292** (5516): 501~504
 - 21 Pezo V, Metzgar D, Hendrickson T L, *et al.* Artificially ambiguous genetic code confers growth yield advantage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (23): 8593~8597
 - 22 Nangle L A, Motta C M, Schimmel P. Global effects of mistranslation from an editing defect in mammalian cells. *Chem Biol*, 2006, **13** (10): 1091~1100
 - 23 Kunst C B, Mezey E, Brownstein M J, *et al.* Mutations in SOD1 associated with amyotrophic lateral sclerosis cause novel protein interactions. *Nat Genet*, 1997, **15** (1): 91~94
 - 24 Corti O, Hampe C, Koutnikova H, *et al.* The p38 subunit of the aminoacyl-tRNA synthetase complex is a Parkin substrate: linking protein biosynthesis and neurodegeneration. *Hum Mol Genet*, 2003, **12** (12): 1427~1437
 - 25 Zheng J Q, Kelly T K, Chang B, *et al.* A functional role for intra-axonal protein synthesis during axonal regeneration from adult sensory neurons. *J Neurosci*, 2001, **21** (23): 9291~9303
 - 26 Gaete J, Kameid G, Alvarez J. Regenerating axons of the rat require a local source of proteins. *Neurosci Lett*, 1998, **251** (3): 197~200

Neurodegeneration-related Aminoacyl-tRNA Synthetases*

ZHU Bin, WANG En-Duo**

(State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Aminoacyl-tRNA synthetases (AARSs) catalyze aminoacylation of their tRNAs for protein biosynthesis. As belong to one of the most ancient and conserved enzyme family their additional functions in mammalian cells were focused recently. Mutations in tyrosyl-tRNA synthetase, glycyl-tRNA synthetase and alanyl-tRNA synthetase from patients and mice models were identified to cause two subtypes of Charcot-Marie-Tooth disease and cerebellar Purkinje cell loss, respectively. These mutations affect different functions of the three enzymes including aminoacylation, editing and unknown functions. These results combined AARSs with neurodegeneration and gave new sights into neuropathy.

Key words aminoacyl-tRNA synthetase, tyrosyl-tRNA synthetase, glycyl-tRNA synthetase, alanyl-tRNA synthetase, neurodegeneration, Charcot-Marie-Tooth disease, Purkinje cell

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30330180).

**Corresponding author . Tel: 86-21-54921241, E-mail: edwang@sibs.ac.cn

Received: November 21, 2006 Accepted: December 12, 2006