Biophysics 生物物理学, 2021, 9(1), 10-21
Published Online February 2021 in Hans. http://www.hanspub.org/journal/biphy
https://doi.org/10.12677/biphy.2021.91002

Hans汉斯

tRNA修饰酶TiaS蛋白结构与功能研究及其锌指的潜在应用

董建树[1,2,3,4,5]

[1]郑州大学药学院，河南 郑州
[2]郑州大学药物研究院，河南 郑州
[3]郑州大学药物关键制备技术教育部重点实验室，河南 郑州
[4]河南省药品质量控制与评价重点实验室，河南 郑州
[5]中国科学院大学，北京
Email: jdong@zzu.edu.cn, dongjianshu08@mails.ucas.ac.cn

收稿日期：2020年11月11日；录用日期：2020年12月4日；发布日期：2021年2月26日

摘 要

含有锌指的TiaS (tRNA^{Ile2} agmatidine synthetase)蛋白是来自古菌的酶，具有四个结构域，功能是利用ATP水解释放的能量在tRNA^{Ile2}反密码子CAU的简并碱基胞嘧啶Cyt34的2'碳原子上面加上胍基丁胺Agmatine修饰，从而让tRNA^{Ile2}成熟不识别AUG，而正确识别AUA密码子。单独TiaS蛋白，TiaS蛋白与tRNA复合物结构已经解析，酶催化修饰的分子机制获得了较深入解读。生化实验表明，TiaS蛋白N端三个结构域具有催化活性，TiaS为焦磷酸酶，可以水解ATP。并且TiaS蛋白的N端结构域可以起到激酶的作用，自磷酸化Thr18氨基酸残基。C端锌指距离酶核心较远，对于识别结合底物具有重要作用。本文总结TiaS蛋白研究进展。对于TiaS蛋白的深入研究，将为深入理解酶催化机制，为酶的工程改造，为锌指的工程改造开辟思路。包括锌指与CRISPR/Cas在内的靶向核酸元件在生命医药和研究领域有广泛应用，TiaS蛋白锌指结构新特性的研究也为基于锌指的靶向核酸组件设计打下基础。

关键词

锌指，tRNA修饰，TiaS蛋白，酶催化，核酸靶向

Research on the Structure and Function of tRNA-Modifying Enzyme TiaS and Potential Applications of Its Zinc Ribbon

Jianshu Dong[1,2,3,4,5]

[1]School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou Henan
[2]Institute of Drug Discovery and Development, Zhengzhou University, Zhengzhou Henan

文章引用: 董建树. tRNA 修饰酶 TiaS 蛋白结构与功能研究及其锌指的潜在应用[J]. 生物物理学, 2021, 9(1): 10-21.
DOI: 10.12677/biphy.2021.91002

[3]Key Laboratory of Advanced Drug Preparation Technologies, Ministry of Education of China, Zhengzhou University, Zhengzhou Henan
[4]Key Laboratory of Henan Province for Drug Quality Control and Evaluation, Zhengzhou Henan
[5]University of Chinese Academy of Sciences, Beijing
Email: jdong@zzu.edu.cn, dongjianshu08@mails.ucas.ac.cn

Received: Nov. 11th, 2020; accepted: Dec. 4th, 2020; published: Feb. 26th, 2021

Abstract

Archaeal TiaS (tRNA^{Ile2} agmatidine synthetase) protein is a zinc-ribbon containing four-domain tRNA^{Ile2} modifying enzyme, which is able to hydrolyze ATP and modify the 2'carbon of the wobble position cytosine 34 with Agmatine (Agm). The modification is essential for tRNA^{Ile2} maturation and thus for accurate deciphering of AUA codon. The enzyme core consisting of the N-terminal three domains is responsible for the catalytic activity. The C-terminal zinc ribbon domain (ZRD) is far away from the enzyme core, and plays important role in substrate tRNA recognition and discrimination. Further research of TiaS will provide significant insight into the mechanism of enzyme catalysis and pave ways for enzyme engineering. Zinc finger engineering and targetable nucleases (by using zinc fingers or CRISPR/Cas) engineering have wide applications ranging from research to medicine. New characteristics about zinc ribbon and zinc ribbon-nucleic acid interaction may help future designs of targetable proteins for applications in genetic modulation, genome manipulation or therapeutics research.

Keywords

Zinc Ribbon, tRNA Modification, TiaS Protein, Enzymatic Catalysis, Nucleic Acid Targeting

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).
http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Open Access

1. RNA 修饰与 tRNA^{Ile} 反密码子胞嘧啶 Cyt34 的修饰

目前已经发现自然界中有百余种 RNA 的修饰，在三界生物系统中均有存在。其中 tRNA 的修饰种类最多样[1] [2]，对于正常生命活动过程有很重要的作用。有些 tRNA 的修饰，改变了 tRNA 的性状，使其更加稳定不易被 RNA 酶降解。有一些修饰改变了 tRNA 的身份，使其可以被其它的氨酰 tRNA 合成酶识别，携带另一种氨基酸。真核生物用 tRNA^{Ile} 第 34 位的假尿嘧啶(pseudouridine)或者肌苷酸碱基(inosine)，来识别 AUA 密码子的腺嘌呤碱基[3]。tRNA^{Ile} 反密码子中第 34 位胞嘧啶 Cyt34 上的修饰对于细菌和古菌 AUA 密码子的解码都是必需的。细菌中 TilS 蛋白使用赖氨酸来修饰 tRNA^{Ile} 前体的 Cyt34，从而改变了 tRNA^{Ile} 对于氨酰 tRNA 合成酶以及密码子的特异性识别[4]-[9]。

细菌的 TilS 蛋白催化 tRNA^{Ile} 前体的 Cyt34 修饰后，形成包含新碱基 Lysidine34 的新型反密码子 LAU，可以识别 AUA 密码子，而不修饰的此 tRNA^{Ile} 前体可以被甲硫氨酰 tRNA 合成酶(MetRS)加上甲硫氨酸，并识别 AUG 密码子[4] [10]。TilS 识别 tRNA 的接受臂位置，包括核苷酸 Cyt29-Gua41，还识别反密码子环附近的 Ade35、Ura36 和 Ade37 等核苷酸[8]。更有趣的是，如果将 tRNA^{Met} 的接受臂替换成为 tRNA^{Ile} 的接受臂，此 tRNA 可以被 TilS 进行修饰，生成可以与 Ade 配对的 Lysidine 碱基。所以通过逻辑推理可以想象，细菌内必然有一定的机制来保证 TilS 对 tRNA^{Ile} 前体的修饰及时快速的进行，以避免 MetRS 错

误的将甲硫氨酸连接到未修饰的 $tRNA^{Ile}$ 前体上面，造成遗传信息表达的错误。将大肠杆菌的 RNaseE 敲除掉，抽提其中的 tRNA，分离纯化出来其中的 $tRNA^{Ile}$，使用 RNaseT1 进行水解，质谱分析，发现所有成熟的 $tRNA^{Ile}$ 都已经被修饰成 Lysidine34，而未成熟的 $tRNA^{Ile}$ 多数也已经被 lysine 修饰，只有少量的尚未被修饰(第 34 位仍然以胞嘧啶 Cyt34 的形式存在) [8]。所以推测，细菌内对于 $tRNA^{Ile}$ 的修饰是在其刚被转录出来的前体时期就开始进行的，在其成熟时保证被修饰，从而保证遗传信息的高保真表达[8]。

依据密码子表(附表 1)，AUA 密码子编码异亮氨酸。在以 *Archeoglobus fulgidus* 为代表的很多古菌中，前人通过一系列基因组序列分析与实验只发现了反密码子为 CAU/CAT 的 tRNA 基因，并没有发现反密码子是 UAU/TAT 的 $tRNA^{Ile}$ 基因。以古菌 *Archeoglobus fulgidus* 为例，2009 年以前已确知的唯一的 *Af*-$tRNA^{Ile}$ 是 tRNA 数据库中编号为 tdbD00005900 的 *Af*-$tRNA^{Ile1}$ (http://trna.bioinf.uni-leipzig.de/DataOutput/Search)，反密码子是 GAU，解码 AUC 并编码异亮氨酸。根据已知，存在编码异亮氨酸的 AUA 密码子，可以推测存在解码 AUA 密码子的 *Af*-$tRNA^{Ile}$，在 *A. fulgidus* 基因组里并没有发现包含反密码子 UAU/TAT 的 tRNA 基因，只发现了包含反密码子为 CAU 的 tRNA 基因，推测存在一定的修饰或者编辑等生物学过程使得 Cyt 与 Ade 能够很好的配对，从而解码 AUA 密码子。1984 年科学家在 *Halobacterium volcanii* 古菌中发现了结构未知的 $tRNA^{Ile}$ 胞嘧啶修饰[11]。这是发现新型 tRNA 反密码子修饰的其中一种方法。*Haloarcula marismortui*，*Methanococcus maripaludis*，*Sulfolobus solfataricus*，*Sulfolobus tokodaii*，*Archaeoglobus fulgidus* 等古菌细胞内分离获得转录出来的包含反密码子 CAU 的 tRNA，对其进行质谱分析，发现了新型的 tRNA 修饰[12] [13]，经过质谱等实验鉴定 *Af*-tRNA，这就发现了胞嘧啶的胍基丁胺修饰。这些古菌中没有类似于细菌 TilS 的同源蛋白[4]。

2. $tRNA^{Ile2}$ 修饰酶 TiaS 蛋白

TiaS 蛋白($tRNA^{Ile2}$ agmatidine synthetase)是来自于古菌中的酶，功能是在 $tRNA^{Ile2}$ 前体反密码子 CAU 的 Cyt34 上面加上胍基丁胺 Agmatine 修饰，从而使其不识别 AUG，而识别 AUA 密码子。2010 年 Tsutomu Suzuki 及 Uttam RajBhandary 等，在 *Euryoarchaeota*，*Crenarchaeota* 和 *Thaumarchaeota* 等中，发现了古菌的 AUA 解码系统[12] [13] [14]。该系统使用 Agmatine 这一个在哺乳动物神经系统中也存在的多氨基化

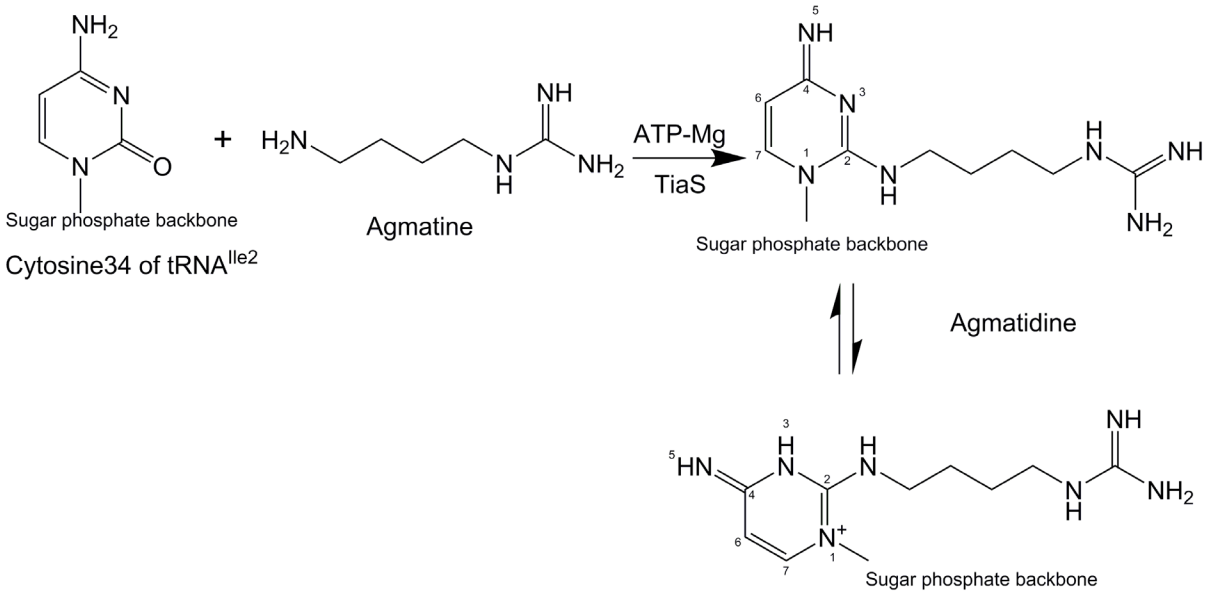

Figure 1. TiaS enzyme catalyzes the Agmatination of Cyt34 of $tRNA^{Ile2}$ with the presence of ATP
图 1. TiaS 酶利用 ATP 催化 Agmatine 修饰到 $tRNA^{Ile2}$ 的 Cyt34

合物[15] [16]来修饰 $tRNA^{Ile2}$ 前体，将 Agmatine 的氨基共价连接到 Cyt34 嘧啶环的 2’碳原子上，生成的碱基被称为 Agmatidine 或者 Agm^2C。此共价修饰使嘧啶环的 3’氮原子发生质子化，这样在碱基配对时就能够与带负电荷的原子形成氢键，而发生质子化前形成氢键的话是通过接受质子来形成的。C4 原子上面连接的氨基转变成为亚氨基，从而改变了氢键配对的形成方式，如图 1。进一步实验发现，此反密码子为 CAU 的 $tRNA^{Ile2}$ 前体经过 TiaS 蛋白的修饰后，生成可以解码 AUA 密码子的成熟 $tRNA^{Ile2}$ [13]。没有修饰的 $tRNA^{Ile2}$ 前体会被连接上甲硫氨酸，而不是异亮氨酸。催化这个反应的酶就被命名为 TiaS。在这些微生物细胞中，刚转录生成的 $tRNA^{Ile2}$ 前体需要迅速被修饰成熟，以保证在合成蛋白质时遗传信息的高保真性传递。确实，TiaS 蛋白可以修饰未经剪切的含有 5’与 3’冗余序列的 $tRNA^{Ile2}$ 前体(precursor $tRNA^{Ile2}$) [13] [17] [18]。TiaS 蛋白的活性存在自然选择压力，会向催化速率更高的方向进化，所以，经过自然界长期的自然选择，野生型的 TiaS 蛋白，在保证底物特异性、蛋白高温稳定性等要求的条件下，应该是朝着其能够达到的最高酶综合活性趋近。在细胞中，酶(TiaS 蛋白)、底物($tRNA^{Ile2}$ 前体、Agm)、酶－底物复合物、辅因子 ATP 等的浓度可能与传统酶学方程中的假设有所不同。TiaS 具有较高的底物选择性[19]，不像 TilS 可以将许多种不同底物类似物分子修饰到 tRNA 上面。

Af-TiaS 蛋白的来源物种古菌 *A. fulgidus* 是嗜热菌，最适生长温度为 83℃，可以生存的温度范围是约 60℃~95℃。*Af*-TiaS 蛋白有 420 个氨基酸残基，理论分子量约 48 kDa，理论等电点 5.7。目前有 *Archeoglobus fulgidus* 物种来源的 TiaS 蛋白的若干个晶体结构得到解析[17]，有力的推动了对于 $tRNA^{Ile2}$ 修饰成熟机制的理解。TiaS 蛋白有 4 个结构域，酶催化功能主要由 N 端 3 个结构域组成的酶核心完成，它们可以结合 $tRNA^{Ile2}$ 的反密码子环。Tsutomu Suzuki 等解析的 TiaS 蛋白结合 $tRNA^{Ile2}$ 的两个晶体结构(3AMT.pdb，TiaS-$tRNA^{Ile2}$-ATP；3AMU.pdb，TiaS-$tRNA^{Ile2}$-AMPCPP-Agmatine)，第 4 个结构域都是无序的，看不到半胱氨酸以及螯合的金属原子[17]。另外一个结构不结合 tRNA (3AU7.pdb)，去除了整个锌指结构域，是只有酶 N 端 3 个结构域的截短体[17]。中国科学家解析了首个自由全长的单独的 TiaS 蛋白结构(3U02.pdb，5XOB.pdb)，首次展示了 TiaS 蛋白完整的第 4 个结构域[19] [20]，如图 2。TiaS 蛋白 C 端的第 4 个结构

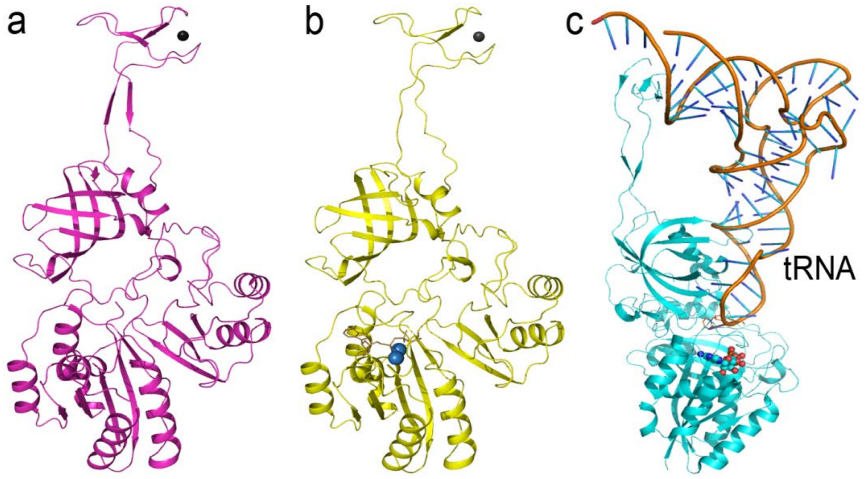

Figure 2. Typical 4 domain TiaS crystal structures solved until now. a. Free full-length TiaS (5XOB.pdb, 2.5Å). b. Crystal structure of TiaS complexed with Agmatine and ATP analogue AMPPCP (6AGG.pdb, 2.7Å). c. Crystal structure of TiaS-$tRNA^{Ile2}$-ATP complex (3AMT.pdb, 2.9Å). Both a and b show intact zinc ribbon, and the major difference between a/b and c is the conformation of zinc ribbon domain. There is minor difference between a, b and c in the conformation of ATP binding P2-loop (Reprinted with permission from ref. 20, Copyright 2018, Elsevier)

图 2. 目前解析的典型的 4 个结构域 TiaS 蛋白的晶体结构，a. 自由单独的 TiaS 蛋白结构(5XOB.pdb，2.5 埃分辨率)，b. 结合了 ATP 类似物 AMPPCP 与 Agmatine 的 TiaS 蛋白结构(6AGG.pdb，2.7 埃分辨率)，c. TiaS-$tRNA^{Ile2}$-ATP 复合物晶体结构(3AMT.pdb，2.9 埃分辨率)。ab 具有完整的锌指结构。a/b 与 c 之间的主要区别在于锌指结构域的构象，abc 之间 P2-loop 的构象也有区别(摘自 ref. 20)

域是锌指结构域(zinc ribbon domain, ZRD)，锌指通过一段长长的反向平行 β 折叠片与酶核心相连接，距离催化中心较远，锌指识别结合底物 $tRNA^{Ile2}$ 的接受臂。不同古菌物种来源的 TiaS 蛋白序列比对发现，TiaS 的锌指序列特征是 CX2CX14CX2C。四个保守的负责螯和锌原子的半胱氨酸残基是 Cys352，Cys355，Cys370，Cys373。TiaS 蛋白的 4 个结构域均可以找到同源结构，比如 TiaS 锌指结构域与 RNA 聚合酶 II 的锌指具有较高的三维结构相似性。但是这四种结构域的组合(TCKD，FLD，OBD，ZRD)是在 TiaS 蛋白家族中首次发现的，如图 2。嗜热菌来源的 TiaS 蛋白有非常大范围的氢键网络和疏水相互作用，可能对于适应高温环境、稳定蛋白结构有重要作用。

3. TiaS 蛋白的构象

依据锌指结构的差异，目前解析的 TiaS 蛋白晶体结构有两种主要的构象，一种主要构象是不结合底物 tRNA 的 TiaS 蛋白构象，硒代蛋白的结构与 Native 的结构相同，同时结合了 AMPPCP 与胍基丁胺 Agmatine 的 TiaS 蛋白晶体结构与自由的 TiaS 蛋白晶体结构基本相同，结合了另一种不同的 ATP 类似物 AMPCPP 的构象与此锌指构象也基本相同[20]，如图 2。第二种主要构象是结合了底物 $tRNA^{Ile2}$ 与 ATP 的构象(3AMT.pdb)，结合了 Agmatine 形成的 TiaS-$tRNA^{Ile2}$-AMPCPP-Agmatine 四元复合物晶体结构(3AMU.pdb)与这一个三元复合物的结构基本相同[17]。这两种主要构象之间的差别在于锌指结构的差异，如图 3。引起这种锌指构象差异的主要原因是底物 $tRNA^{Ile2}$ 的结合与否。除了这两种主要的构象之外，结合辅因子 ATP 或者 ATP 类似物与否，P2-loop 会呈现不同的构象[20]。不同古菌物种来源的 TiaS 蛋白序列比对发现，负责 ATP 结合的 P2-loop 比较保守。自由的 TiaS 蛋白，解析的结构中没有观察到负责 ATP 结合的 P2-loop 电子密度，表明了其构象的不均一性。结合了辅因子 ATP 或者 ATP 类似物以后，可以观察到 P2-loop 的主链，侧链不清晰[20]。结合了底物 $tRNA^{Ile2}$ 与 ATP 的构象显示，P2-loop 主链侧链均可以清晰的观察到(3AMT.pdb)。$tRNA^{Ile2}$ 的反密码子环从一侧结合 P2-loop，ATP 从另一侧结合 P2-loop。从这几个结构的不同之处，以及 P2-loop 的变化过程可以看出来，自由的 P2-loop 存在柔性，构象不均一，夹在中间的 P2-loop 随着两侧底物、辅因子的结合，构象逐步稳定下来。这几个结构的分辨率较为接近，如图 2，图 3。

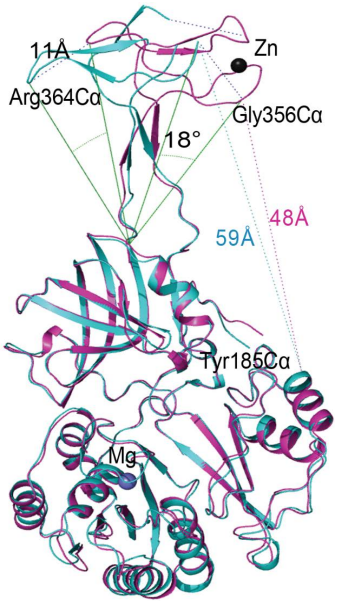

Figure 3. The difference between the two major conformations discovered by crystallography (Reprinted with permission from ref. 20, Copyright 2018, Elsevier)
图 3. 蛋白质晶体学发现的 TiaS 蛋白的两种主要构象的区别(摘自 ref. 20)

4. TiaS 蛋白的分子动态特征

TiaS 蛋白在不同状态下构象的差异，表明了 TiaS 蛋白分子很可能存在结构的动态变化现象。分子动力学模拟(Molecular dynamics simulation)，对于运动轨迹的主成分分析(Principle component analysis)，常规模态分析(Normal mode analysis) [21]等方法都可以用来研究蛋白质分子的动力学特征。

研究表明，三种方法的研究结果基本一致[20]。首先，TiaS 蛋白分子结构动态变化的主要位置均显示是在锌指结构域，这与蛋白质晶体学实验观察到的两种主要不同构象的差异位置是一致的[20]。其次，TiaS 蛋白分子动态变化的模式，三种方法都显示，是 TiaS 蛋白分子锌指结构域与酶核心连接的 linker 扭动或者伸展收缩运动引起的锌指结构域的大幅度构象变化[20]。第三，TiaS 蛋白锌指结构运动的方向，结合底物 $tRNA^{Ile2}$ 的构象显示，锌指结构域比自由的 TiaS 蛋白朝向 OBD 结构域方向摆动了一些，锌指距离酪氨酸 Tyr185 更远，同时，锌指结构域有一定角度的扭动。总体来说，结合底物 $tRNA^{Ile2}$ 的构象其锌指朝向底物结合的方向进行了大幅度的运动，如果以自由的 TiaS 蛋白结构与底物 $tRNA^{Ile2}$ 构建的复合物为起始模型，分子动力学模拟显示，锌指结构域也朝向底物 $tRNA^{Ile2}$ 方向运动[20]。下面总结常规模态分析给出的 TiaS 蛋白分子的运动特征[22] [23]。

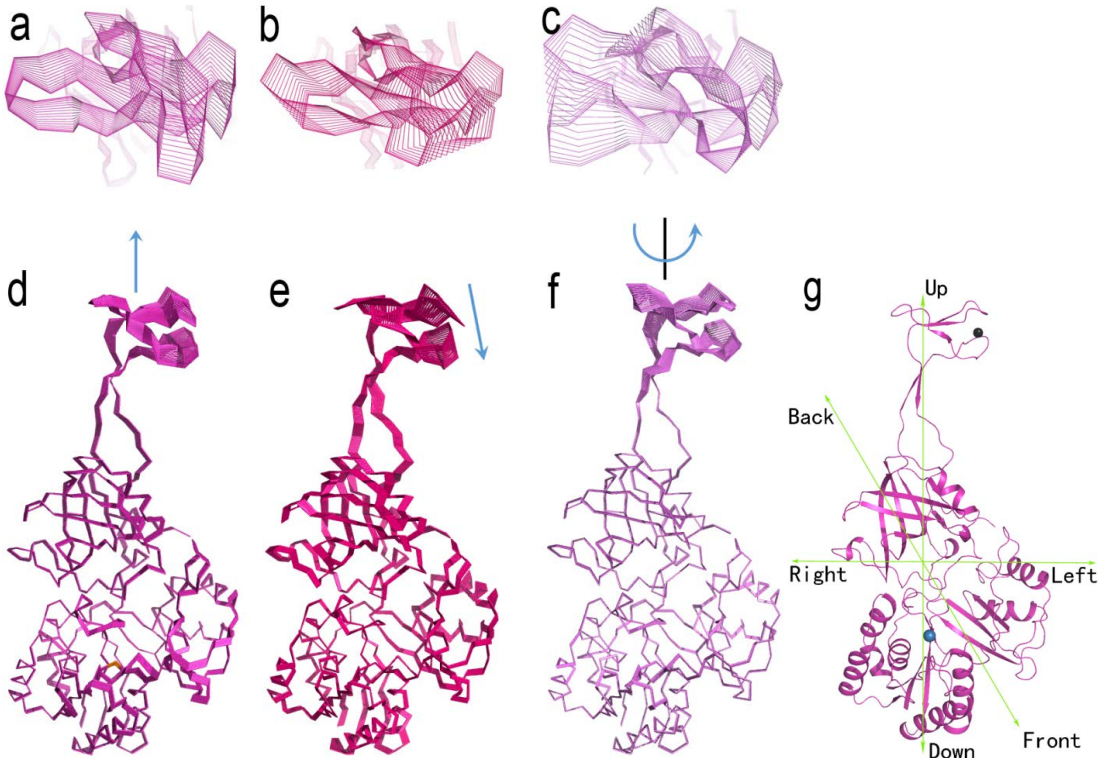

Figure 4. Normal mode analysis of free TiaS molecular dynamics. abc are views from the top of zinc ribbon along the long axis of *Af*-TiaS protein. ad, be, cf are molecular dynamics of the first, the second, and the third slow normal modes, respectively. def, side views of *Af*-TiaS protein, with the catalytic center facing outward. g, the artificially designated directions of *Af*-TiaS protein

图 4. 常规模态分析自由 TiaS 蛋白的分子动力学特征。abc，从锌指一侧沿着 *Af*-TiaS 蛋白的长轴俯视图；ad，be，cf 分别对应展示第一二三种模态的动力学特性。def，*Af*-TiaS 蛋白侧视图，催化活性中心朝向纸面外。g，为方便讨论，人为给 *Af*-TiaS 蛋白指定的方位图

TiaS 蛋白的第一种运动模态是锌指结构域向远离活性中心方向的摆动。如果以反密码子结合的口袋一面为腹面或前面，以对面为背面或后面，以锌指为头部，锌指运动的方向为上方，类似于抬头运动，

朝上并略朝向后方的抬头运动。如图 4。这个运动方向与结合底物 $tRNA^{Ile2}$ 引起的运动方向是相反的。TiaS 蛋白第二种运动模态是锌指朝向 Tyr185 残基方向的摆动，类似于锌指朝左侧下方的点头运动。自由 TiaS 蛋白锌指朝左下方侧向点头，与结合底物 $tRNA^{Ile2}$ 引起的运动方向相反。第三种运动模态是绕着连接 linker 扭动或者称作转动，参照图 4(g)，扭动方向是向 TiaS 的左侧。这三个方向上的往复运动已经可以为锌指提供多位置多角度灵活定位的可能性。所以，连接 linker 反向平行 β 折叠片的柔性使得锌指具有了多种可选择的构象，来适配结合底物核酸。

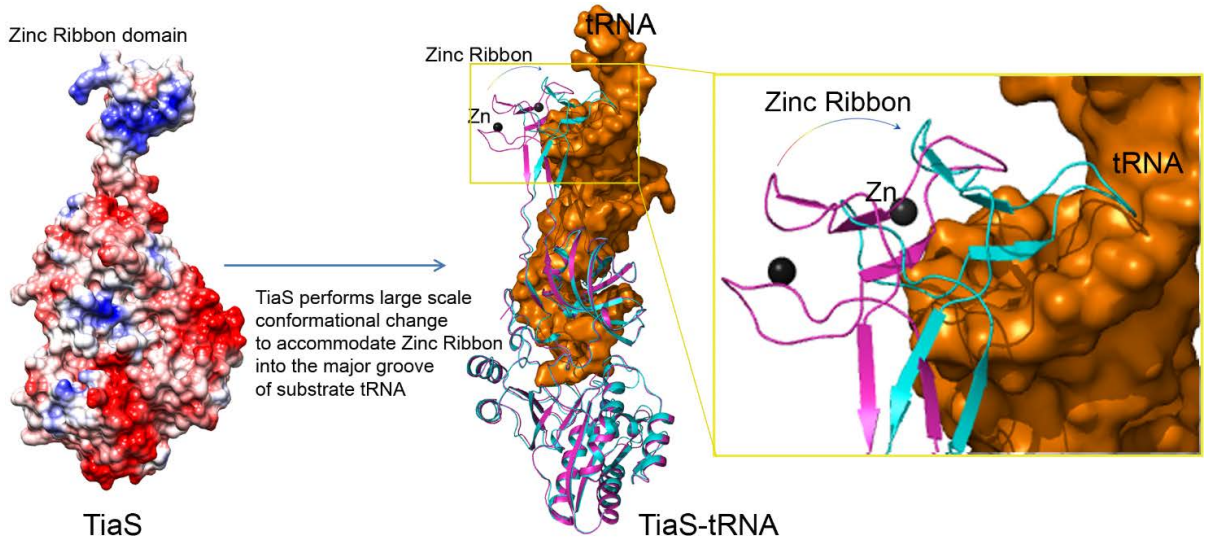

Figure 5. The binding of tRNA induces conformational change of TiaS. Left, the first free full-length 4 domain TiaS protein structure (5XOB.pdb, 2.5Å), large areas of electro-positive region of zinc ribbon domain is responsible for binding to the acceptor stem of substrate $tRNA^{Ile2}$. Right, the proposed models of $tRNA^{Ile2}$-TiaS complex, $tRNA^{Ile2}$ is colored brown, the binding of substrate tRNA probably induces conformational change of TiaS zinc ribbon, and TiaS protein are colored purple and cyan corresponding to configurations before and after conformational change, respectively (Reprinted with permission from ref. 20, Copyright 2018, Elsevier)

图 5. 底物 tRNA 结合引发 TiaS 构象变化模式图。左图，解析的首个自由全长的 4 结构域 TiaS 蛋白结构(5XOB.pdb，2.5Å)，锌指结构域有大面积的正电荷，是与底物 $tRNA^{Ile2}$ 接受臂结合的区域。右图，推测的底物 $tRNA^{Ile2}$ (棕色)与 TiaS 蛋白(紫色，无构象变化)结合的结构模型，底物 tRNA 的结合很可能引发 TiaS 锌指结构域发生构象变化，模拟的发生构象变化后的 TiaS 与 $tRNA^{Ile2}$ 结合模式图中 TiaS 结构标记成了蓝色(摘自 ref. 20)

5. TiaS 蛋白催化 $tRNA^{Ile2}$ 修饰的酶工作机制

Af-TiaS 蛋白在有 ATP-Mg 存在的条件下，催化 ATP 水解，生成磷酸化修饰的 Cyt34。活化的 Cyt34 与 Agmatine 反应生成产物 Agm^2C [18]，TiaS 完成修饰反应。这是生化实验的研究结果。依据解析的 *Af*-TiaS 蛋白全长的晶体结构(5XOB.pdb)、TiaS-AMPPCP-agmatine 结构(6AGG.pdb)、TiaS-$tRNA^{Ile2}$-ATP 结构(3AMT.pdb)等，TiaS 的催化机制从生物物理学角度也得到解读[20]。截至目前为止，人们已知的 TiaS 蛋白修饰 $tRNA^{Ile2}$ 的分子机制，总结在了这两张图中，如图 5、图 6。从图中可以看出，锌指结构域在酶发挥催化修饰活性过程中发挥着重要的作用。

溶液中，通过自由扩散、静电吸引等过程，TiaS 蛋白与底物 $tRNA^{Ile2}$ 前体(precursor $tRNA^{Ile2}$)的距离被拉近，由于酶 N 端 3 个结构域与 $tRNA^{Ile2}$ 结合面积与结合能量巨大，很可能首先与 $tRNA^{Ile2}$ 的反密码子区域接触结合，这时候配体 ATP、Agmatine 可能与二元复合物结合，也可能稍后再与二元复合物结合。由于结合面外形基本互补，通过相互诱导契合等过程，TiaS 酶核心与底物 $tRNA^{Ile2}$ 前体的反密码子区域结合逐渐紧密，然后锌指结构域发生巨大的构象变化，移动达 14Å，扭转达 18°，从而与底物 $tRNA^{Ile2}$

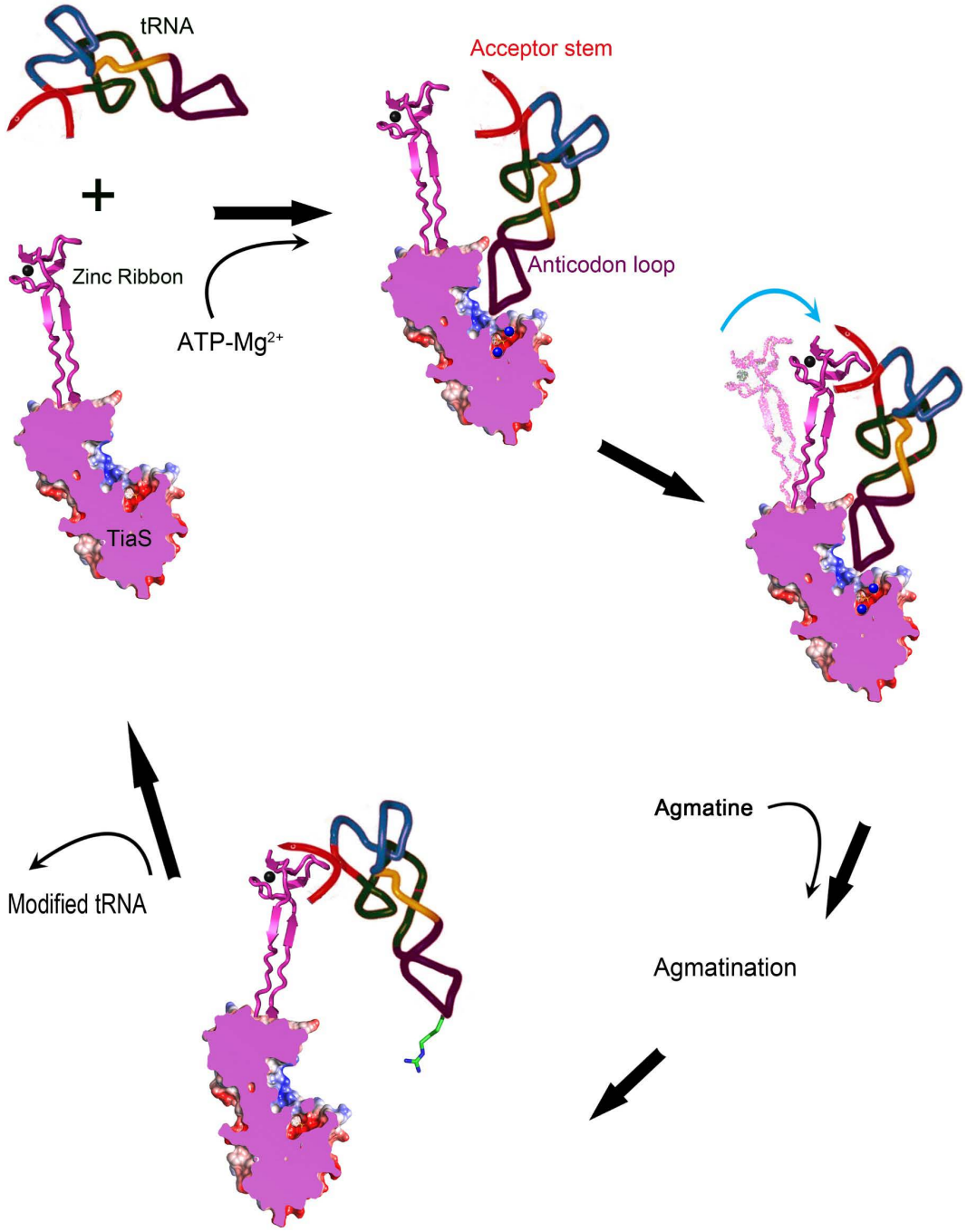

Figure 6. The molecular mechanism of $tRNA^{Ile2}$ modification by TiaS enzyme (Reprinted with permission from ref. 20, Copyright 2018, Elsevier)
图 6. TiaS 修饰 $tRNA^{Ile2}$ 的分子机制(摘自 ref. 20)

的接受臂建立起相互作用。至此，TiaS 蛋白与底物 $tRNA^{Ile2}$ 的识别结合过程完成，进入催化修饰过程。在镁离子存在条件下 TiaS 酶水解 ATP，发挥针对 Cyt34 的 Agmatine 修饰活性。修饰后的 $tRNA^{Ile2}$ 由于化学结构的改变，改变了反密码子区域的物理化学性质，与 TiaS 的亲和力低于未修饰的 $tRNA^{Ile2}$ 前体，因此，未修饰的 $tRNA^{Ile2}$ 前体的反密码子区域会首先竞争占据酶 N 端 3 个结构域。由于 TiaS 蛋白与底物 $tRNA^{Ile2}$ 的结合能量与结合面积主要由酶与反密码子区域提供，所占总的结和能量与总的结合面积比例均

约 2/3，因此 $tRNA^{Ile2}$ 前体占据酶 N 端 3 个结构域以后，会把修饰后的成熟 $tRNA^{Ile2}$ 竞争走。每一次催化反应都会进行一轮这样的结合－催化修饰－解离的循环[20]。

6. 远离催化中心的 TiaS 锌指结构域与酶的催化功能

TiaS 锌指结构域影响酶催化活性的已有研究结果总结如下。去除锌指结构域的 TiaS 截短体，以及置换掉 $tRNA^{Ile2}$ 接受臂的底物突变体，均不能够完成正常的催化修饰过程[18]。锌指结构域的 Cys352Ala-Cys355Ala 双突变体酶催化修饰底物的活性显著下降[18]，这些结果都表明了锌指结构域对于酶修饰功能的重要性。实际上，从解析的结构可以清晰看到，Cys352、Cys355 对于维持锌指结构域的三维空间结构非常重要[20]。实验发现 TiaS 蛋白催化 ATP 水解活性可以不依赖于 $tRNA^{Ile2}$ 修饰反应发生。只包含酶 N 端 3 个结构域的截短体仍然具有 ATP 水解酶活性，不具有 $tRNA^{Ile2}$ 修饰活性[18]。

锌指结构域远离催化活性中心，两者距离超过 60Å (5XOB.pdb)。可以推测锌指结构域可能对于识别结合底物过程，在薅住底物放置于正确位置上发挥作用。TiaS 蛋白使用酶催化核心和锌指结构域识别结合底物 $tRNA^{Ile2}$。从静态的三维结构上看，锌指结构域结合底物 $tRNA^{Ile2}$ 的接受臂。晶体结构(3AMT.pdb)中可以观察到 TiaS 蛋白的 Glu360 侧链羧基与 $tRNA^{Ile2}$ 的 Cyt70 的 N4 原子存在氢键相互作用。

7. TiaS 锌指与核酸相互作用的研究

锌指是典型的蛋白质结构单元之一，可以介导蛋白与蛋白，蛋白与核酸的相互作用。含有锌指结构的蛋白质参与了多种重要的生命过程，是全球酶学、生物化学等领域的典型研究对象[24] [25] [26]。CRISPR/Cas 系统和锌指都是靶向核酸的重要工具，靶向核酸酶在基因矫正、基因组编辑、基因治疗等新兴生命医药以及研究领域具有巨大的应用前景。核酸靶向蛋白的改造是其中的热点之一。设计改造锌指结构单元一直是核酸靶向蛋白组件研究的前沿阵地[27]。与 CRISPR/Cas 系统相比，使用锌指作为核酸序列特异性结合元件的挑战之一，是锌指组件数目的增加并不一定达到预期的亲和力增加，因为存在空间位阻[27]。也由于存在这样的难点，使用锌指靶向核酸的应用受到限制，将其成功利用仍需大量研究。

TiaS 锌指以柔性来适配与核酸的结合。对于 TiaS 蛋白的研究发现，锌指与 N 端 3 个结构域的连接部位细长，可以通过伸缩扭动使锌指结构域空间位置与取向发生变化，具有较大的柔性和多种可选择的构象(4)，来适配底物核酸。这是 TiaS 蛋白新型锌指的第一个优点。

TiaS 锌指以序列特异性识别核酸。对于核酸靶向锌指的改造来说，实现靶向性的一个关键要求是，对于核酸碱基的识别是序列特异的。研究发现，TiaS 锌指的若干氨基酸残基通过碱基特异性方式识别底物 $tRNA^{Ile2}$。TiaS 锌指的 Glu360，Ser361，Ala362，Gln366，Arg369 氨基酸残基识别底物 $tRNA^{Ile2}$ 的一段特定碱基序列 Cyt70Cyt71Cyt72Ade73 (其中 Cyt71-Gua2，Cyt72-Gua1 部分识别的是双链碱基)，6 对氢键是与 4 个连续的碱基一一形成的，不是与糖磷酸骨架形成的。晶体结构 3AMT.pdb 中，也观察到了 Glu360、Ser361、Arg369 与碱基的氢键，是相互吻合的。这是 TiaS 蛋白新型锌指的第二个优点。目前发现的锌指的这些开创性的新特征，有可能会拓展锌指作为靶向核酸工具的科学前沿。进一步探索 TiaS 蛋白识别结合底物 $tRNA^{Ile2}$ 过程中锌指结构域的作用，深入发掘以前未知的锌指及其连接部位的新功能特性，将为锌指的工程改造提供依据。

目前，利用 TiaS 特异性识别结合核酸的特性，科研工作者进行了应用研究的开发。让 TiaS 使用具有点击反应活性的化合物对 RNA 进行靶向定点修饰，利用点击反应在体外和哺乳动物细胞中实现了目标 RNA 的特异性共价荧光标记[19]，这是一种进行 RNA 标记的新方法，而目前科学领域诸多重要的 RNA

研究依赖于优越的新型标记方法[28]。

8. 结论

目前，对于 TiaS 蛋白的工作机制已经有了较多的实验证据和较为充分的理解，TiaS 蛋白的新型锌指的新特性值得进一步研究，针对 TiaS 蛋白锌指关键氨基酸残基与核酸相互作用的深入研究，将为靶向核酸锌指的改造设计以及应用研究打下基础，也将拓宽加深人们对于酶催化机制的理解。近年来，锌指的一些新特性被发掘出来，包括通过人工设计与实验室进化获得的以锌指为核心的具有催化活性的小分子量的生物酶，该酶可以特异性水解酯键[29]。另使用沙利多安及其类似物(Thalidomide，lenalidomide，pomalidomide)联合其它分子来靶向结合包含锌指的蛋白(很多是细胞内的转录因子)，从而对一些以前认为是不可成药的蛋白质靶点通过其锌指进行了特异性的靶向降解[30]。这些研究进展，使得锌指的应用范围被拓展的更加广阔。

基金项目

本研究得到国家自然科学基金青年项目资助，项目编号 31900913；以及科技部重大专项 2016YFA 0501800。

缩略词

Cyt34, cytosine 34; TiaS, $tRNA^{Ile2}$ agmatidine synthetase; ZRD, zinc ribbon domain; PCA, principal component analysis; NMA, normal mode analysis; tRNA, transfer RNA; RNA, ribonucleic acid; TilS, $tRNA^{Ile2}$ lysidine synthetase; Ade, adenine; Ura, uracil; Cyt, cytosine; Gua, guanine; MetRS, Methionyl-tRNA synthetase; TCKD, Thr18-Cyt34 kinase domain; FLD, ferredoxin-like fold domain; OBD, oligonucleotide binding domain.

参考文献

[1] Cantara, W.A., Crain, P.F., Rozenski, J., McCloskey, J.A., Harris, K.A., Zhang, X., *et al*. (2011) The RNA Modification Database, RNAMDB: 2011 Update. *Nucleic Acids Research*, **39**, D195-D201. https://doi.org/10.1093/nar/gkq1028

[2] Machnicka, M.A., Milanowska, K., Osman Oglou, O., Purta, E., Kurkowska, M., Olchowik, A., *et al*. (2013) MODOMICS: A Database of RNA Modification Pathways—2013 Update. *Nucleic Acids Research*, **41**, D262-D267. https://doi.org/10.1093/nar/gks1007

[3] Marcus, J.O. and Bystro, A.S. (2005) Transfer RNA Modifications and Modifying Enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Grosjean, H., Ed., *Fine-Tuning of RNA Functions by Modification and Editing*, Vol. 12, Springer, New York, 87-119. https://doi.org/10.1007/b105814

[4] Soma, A., Ikeuchi, Y., Kanemasa, S., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Ote, T., *et al*. (2003) An RNA-Modifying Enzyme That Governs both the Codon and Amino Acid Specificities of Isoleucine tRNA. *Molecular Cell*, **12**, 689-698. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00346-0

[5] Ikeuchi, Y., Soma, A., Ote, T., Kato, J., Sekine, Y. and Suzuki, T. (2005) Molecular Mechanism of Lysidine Synthesis That Determines tRNA Identity and Codon Recognition. *Molecular Cell*, **19**, 235-246. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.06.007

[6] Nakanishi, K., Fukai, S., Ikeuchi, Y., Soma, A., Sekine, Y., Suzuki, T., *et al*. (2005) Structural Basis for Lysidine Formation by ATP Pyrophosphatase Accompanied by a Lysine-Specific Loop and a tRNA-Recognition Domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 7487-7492. https://doi.org/10.1073/pnas.0501003102

[7] Grosjean, H. and Bjork, G.R. (2004) Enzymatic Conversion of Cytidine to Lysidine in Anticodon of Bacterial Isoleucyl-tRNA—An Alternative Way of RNA Editing. *Trends in Biochemical Sciences*, **29**, 165-168. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.02.009

[8] Nakanishi, K., Bonnefond, L., Kimura, S., Suzuki, T., Ishitani, R. and Nureki, O. (2009) Structural Basis for Translational Fidelity Ensured by Transfer RNA Lysidine Synthetase. *Nature*, **461**, 1144-1148. https://doi.org/10.1038/nature08474

[9] Kuratani, M., Yoshikawa, Y., Bessho, Y., Higashijima, K., Ishii, T., Shibata, R., *et al*. (2007) Structural Basis of the Initial Binding of tRNA(Ile) Lysidine Synthetase TilS with ATP and L-Lysine. *Structure*, **15**, 1642-1653. https://doi.org/10.1016/j.str.2007.09.020

[10] Muramatsu, T., Nishikawa, K., Nemoto, F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Miyazawa, T., *et al*. (1988) Codon and Amino-Acid Specificities of a Transfer RNA Are both Converted by a Single Post-Transcriptional Modification. *Nature*, **336**, 179-181. https://doi.org/10.1038/336179a0

[11] Gupta, R. (1984) *Halobacterium volcanii* tRNAs. Identification of 41 tRNAs Covering All Amino Acids, and the Sequences of 33 Class I tRNAs. *Journal of Biological Chemistry*, **259**, 9461-9471. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)42723-2

[12] Mandal, D., Kohrer, C., Su, D., Russell, S.P., Krivos, K., Castleberry, C.M., *et al*. (2010) Agmatidine, a Modified Cytidine in the Anticodon of Archaeal tRNA(Ile), Base Pairs with Adenosine But Not with Guanosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 2872-2877. https://doi.org/10.1073/pnas.0914869107

[13] Ikeuchi, Y., Kimura, S., Numata, T., Nakamura, D., Yokogawa, T., Ogata, T., *et al*. (2010) Agmatine-Conjugated Cytidine in a tRNA Anticodon Is Essential for AUA Decoding in Archaea. *Nature Chemical Biology*, **6**, 277-282. https://doi.org/10.1038/nchembio.323

[14] Kohrer, C., Srinivasan, G., Mandal, D., Mallick, B., Ghosh, Z., Chakrabarti, J., *et al*. (2008) Identification and Characterization of a tRNA Decoding the Rare AUA Codon in *Haloarcula marismortui*. *Rna*, **14**, 117-126. https://doi.org/10.1261/rna.795508

[15] Reis, D.J. and Regunathan, S. (2000) Is Agmatine a Novel Neurotransmitter in Brain? *Trends in Pharmacological Sciences*, **21**, 187-193. https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01460-7

[16] Halaris, A. and Plietz, J. (2007) Agmatine: Metabolic Pathway and Spectrum of Activity in Brain. *CNS Drugs*, **21**, 885-900. https://doi.org/10.2165/00023210-200721110-00002

[17] Osawa, T., Kimura, S., Terasaka, N., Inanaga, H., Suzuki, T. and Numata, T. (2011) Structural Basis of tRNA Agmatinylation Essential for AUA Codon Decoding. *Nature Structural & Molecular Biology*, **18**, 1275-1280. https://doi.org/10.1038/nsmb.2144

[18] Terasaka, N., Kimura, S., Osawa, T., Numata, T. and Suzuki, T. (2011) Biogenesis of 2-Agmatinylcytidine Catalyzed by the Dual Protein and RNA Kinase TiaS. *Nature Structural & Molecular Biology*, **18**, 1268-1274. https://doi.org/10.1038/nsmb.2121

[19] Li, F., Dong, J., Hu, X., Gong, W., Li, J., Shen, J., *et al*. (2015) A Covalent Approach for Site-Specific RNA Labeling in Mammalian Cells. *Angewandte Chemie International Edition in English*, **54**, 4597-4602. https://doi.org/10.1002/anie.201410433

[20] Dong, J., Li, F., Gao, F., Wei, J., Lin, Y., Zhang, Y., *et al*. (2018) Structure of tRNA-Modifying Enzyme TiaS and Motions of Its Substrate Binding Zinc Ribbon. *Journal of Molecular Biology*, **430**, 4183-4194. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.08.015

[21] Bauer, J.A., Pavlovic, J. and Bauerova-Hlinkova, V. (2019) Normal Mode Analysis as a Routine Part of a Structural Investigation. *Molecules*, **24**, 3293. https://doi.org/10.3390/molecules24183293

[22] Eyal, E., Lum, G. and Bahar, I. (2015) The Anisotropic Network Model Web Server at 2015 (ANM 2.0). *Bioinformatics*, **31**, 1487-1489. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu847

[23] Lindahl, E., Azuara, C., Koehl, P. and Delarue, M. (2006) NOMAD-Ref: Visualization, Deformation and Refinement of Macromolecular Structures Based on All-Atom Normal Mode Analysis. *Nucleic Acids Research*, **34**, W52-W56. https://doi.org/10.1093/nar/gkl082

[24] Laity, J.H., Lee, B.M. and Wright, P.E. (2001) Zinc Finger Proteins: New Insights into Structural and Functional Diversity. *Current Opinion in Structural Biology*, **11**, 39-46. https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00167-6

[25] Brown, R.S. (2005) Zinc Finger Proteins: Getting a Grip on RNA. *Current Opinion in Structural Biology*, **15**, 94-98. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.01.006

[26] Krishna, S.S., Majumdar, I. and Grishin, N.V. (2003) Structural Classification of Zinc Fingers: Survey and Summary. *Nucleic Acids Research*, **31**, 532-550. https://doi.org/10.1093/nar/gkg161

[27] Klug, A. (2010) The Discovery of Zinc Fingers and Their Applications in Gene Regulation and Genome Manipulation. *Annual Review of Biochemistry*, **79**, 213-231. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-010909-095056

[28] Rouhanifard, S.H., Mellis, I.A., Dunagin, M., Bayatpour, S., Jiang, C.L., Dardani, I., *et al*. (2018) ClampFISH Detects Individual Nucleic Acid Molecules Using Click Chemistry-Based Amplification. *Nature Biotechnology*, **37**, 84-89. https://doi.org/10.1038/nbt.4286

[29] Studer, S., Hansen, D.A., Pianowski, Z.L., Mittl, P.R.E., Debon, A., Guffy, S.L., *et al*. (2018) Evolution of a Highly

Active and Enantiospecific Metalloenzyme from Short Peptides. *Science*, **362**, 1285-1288. https://doi.org/10.1126/science.aau3744

[30] Sievers, Q.L., Petzold, G., Bunker, R.D., Renneville, A., Slabicki, M., Liddicoat, B.J., *et al*. (2018) Defining the Human C2H2 Zinc Finger Degrome Targeted by Thalidomide Analogs through CRBN. *Science*, **362**, eaat0572. https://doi.org/10.1126/science.aat0572

附　录

Table 1. Amino acid codon table
附表 1. 密码子表

First Position	Second position: U		C		A		G		Third Position
	code	Amino acid	code	Amino acid	code	Amino acid	code	Amino acid	
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC		UCC		UAC		UGC		C
	UUA	Leu	UCA		UAA	Stop	UGA	Stop	A
	UUG		UCG		UAG	Stop	UGG	Trp	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC		CCC		CAC		CGC		C
	CUA		CCA		CAA	Gln	CGA		A
	CUG		CCG		CAG		CGG		G
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC		ACC		AAC		AGC		C
	AUA		ACA		AAA	Lys	AGA	Arg	A
	AUG	Met	ACG		AAG		AGG		G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
	GUC		GCC		GAC		GGC		C
	GUA		GCA		GAA	Glu	GGA		A
	GUG		GCG		GAG		GGG		G