

pRNA 的结构、功能及其研究近况

周辉, 卢向阳, 田云, 黄成江

(湖南农业大学生化与发酵工程实验室, 长沙 410128)

摘要: 在噬菌体 phi29 中, 基因组 DNA 的包装需要由病毒基因组编码的 pRNA 参与, 6 个 pRNA 分子通过由 pRNA 分子间相互作用形成的六聚体来启动 DNA 转运马达, 这个过程由 ATP 提供能量。RNA 纳米技术将 pRNA 与 siRNA、核酶、反义 RNA 等分子稳定结合, pRNA 作为一种载体把它们准确运输到癌细胞和病毒感染细胞的作用靶点, 从而发挥它们各自的功能。作为一种非编码 RNA, 对 pRNA 的深入研究将有助于我们了解生命起源问题, 并有着广阔的应用前景。

关键词: pRNA; 六聚体; DNA 转运; 纳米粒子

中图分类号: Q52; Q74

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2006)09-1180-05

The Structure, Function and Recent Reseach of pRNA

ZHOU Hui, LU Xiang-Yang, TIAN Yun, HUANG Cheng-Jiang

(Laboratory of Biochemistry & Fermentation Engineering, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: In the bacteriophage phi29, a virus-encoded RNA(pRNA) is required for the packaging of its genomic DNA. Six pRNAs form a hexamer through pRNA/pRNA interaction to drive the DNA translocation motor, and ATP as the energy resource. Chimeric pRNAs can steadily combine with siRNA, ribozymes and anti-sense RNA, and then be transferred into the cancer cells and viral-infected cells by RNA nanotechnology. The continued study of pRNA will help us to understand the origin of the life and explore its possible applications.

Key words: pRNA; hexamer; DNA translocation; nanoparticles

在双链DNA病毒增殖和成熟的过程中, 需要将相当长的子代DNA装入一个空间极为有限的新生病毒衣壳中。早在 1987 年, Guo P X等^[1]在对噬菌体 phi29 DNA的转运进行研究时发现了一种具有转运功能的RNA分子, 该RNA分子在噬菌体phi29 的DNA包装中有着重要的作用, 这种RNA分子被称为 pRNA(packaging RNA)。2003 年 2 月, Shu D等^[2]报道了噬菌体phi29 DNA转运马达中的pRNA分子能结合 ATP, 并能做机械运动, 这是第一次揭示了RNA与 ATP之间的关系。近年来, 科学家对pRNA分子的结构、功能和应用研究不断深入, 取得不少研究成果。本文就近年来有关 pRNA 的结构、功能和

应用研究作一简单综述。

1 pRNA 的结构与功能

病毒 phi29 是感染革兰氏阳性枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)的噬菌体。它的基因组为 19 285 bp 的线状双链 DNA 分子。在成熟的噬菌体 phi29 中基因组并不表达出 pRNA, 而在 phi29 基因组 DNA 衣壳化过程中需要有一段由 phi29 基因组编码的 174 nt(nucleotide)组成的 pRNA 参与。不同来源的 pRNA 分子具有较低的序列同源性, 几乎不存在保守碱基, 然而它们都具有相似的高级结构^[3]。其他病毒的 pRNAs 不具备包装 phi29 基因组 DNA 的功能, 且噬

收稿日期: 2005-10-02; 修回日期: 2006-01-13

作者简介: 周辉(1980—), 男, 湖南人, 硕士生。研究方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: paradise917@163.com

通讯作者: 卢向阳(1962—), 男, 浏阳人, 教授。研究方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: xiangyangcn@163.com

田云(1979—), 男, 湖南沅江人, 博士生。研究方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: tianyun79616@163.com

菌体自身 pRNA 中单个碱基的突变也会导致其包装活性的丧失。

噬菌体 phi29 基因组编码的 pRNA 分子由 174 个核苷酸组成,但只需要 C 端的 120 个核苷酸就具有了整个 pRNA 分子具有的功能。pRNA 的二级结构有高度螺旋区域,包括 7 个突起和 3 个环(图 1)。在对 pRNA 的多种变异型进行研究后发现 pRNA 至少具有两个功能区,一个功能区与头颈连接器(connector)结合,另一个负责 DNA 的移位。pRNA 含有的这两个功能区具有很强的二级和三级结构,能够自我折叠而不受 3' 和 5' 末端碱基的影响。

20 世纪 90 年代末的研究发现 1~117 nt 是 pRNA 包装全基因组 DNA 所需最少序列;6~113 nt 是 pRNA 与头颈连接器完全结合所需的最少序列;37~91 nt 是 pRNA 与头颈连接器特异结合所需的最少序列。有科学家运用光亲和探针对 pRNA 单体和二聚体 3D (Three-dimension) 结构进行研究,发现左臂上 75~81 nt 位于头环的对面,并与邻近的 26~31 nt 处于平行的位置上。Mat-Arip 等^[4]运用化学修饰技术发现,45~71 nt 和 82~91 nt 参与了 pRNA 二聚体的形成。PRNA 分子二级结构中具有两个环状结构,分别称为 L 环与 R 环,其中 L 环中 82~85 nt(UUGG)与 R 环中 45~48 nt(AACC)可以进行碱基配对,从而形成 pRNA 二聚体。

Shu D 等^[5]的研究发现在没有蛋白质存在的条件下, pRNA 单体几乎可以全部聚合成稳定的二聚体、

三聚体以及六聚体。6 个 pRNA 分子依次通过碱基配对可以形成闭合的六聚体, pRNA 中 5' 和 3' 端朝向外周,可能参与与转运 DNA 的识别,如图 2 所示。pRNA 分子中只要有一个环中的碱基发生突变都将导致无活性的 pRNA 分子,但是混合 2 个、3 个和 6 个无活性突变的 pRNA 分子又会恢复 DNA 转运能力,因为独立的 RNA 分子中的突变环能通过碱基配对形成闭合的六聚体环。这些结果显示 6 个 pRNA 分子通过两个环间分子间作用力形成一个六聚体环来作为 DNA 转运机器。

Chen C 等^[6]通过研究得出结论: pRNA 二聚体是六聚体的构件单元,其六聚体构建的途径为:二聚体→四聚体→六聚体。他们发现当 4 个碱基配对时,其中至少需要一对 G/C 配对,这样 pRNA 才会具有 DNA 包装功能。他们还发现一个 75 ntRNA 片段(23~97 nt)可以形成 pRNA 二聚体及闭合的六聚体,而且可以竞争全长 pRNA 与原衣壳(procapsid)的结合。23~97 nt 这一 RNA 片段是自我折叠的,在与衣壳的结合和 pRNA 二聚体、六聚体形成时 pRNA 分子间的相互作用中作为一个独立的区域。因此这一 75 ntRNA 可以作为 RNA 二聚体化结构研究中的一个模型。

Shu D 等^[7]发现 pRNA 六聚体在 DNA 转运中是作为 DNA 转运马达的中间组分, DNA 转运过程中需要一个 pRNA 六聚体以及多拷贝的 ATP 酶(gp16)参与。pRNA 的衣壳结合区域具有两个自主组件,这两

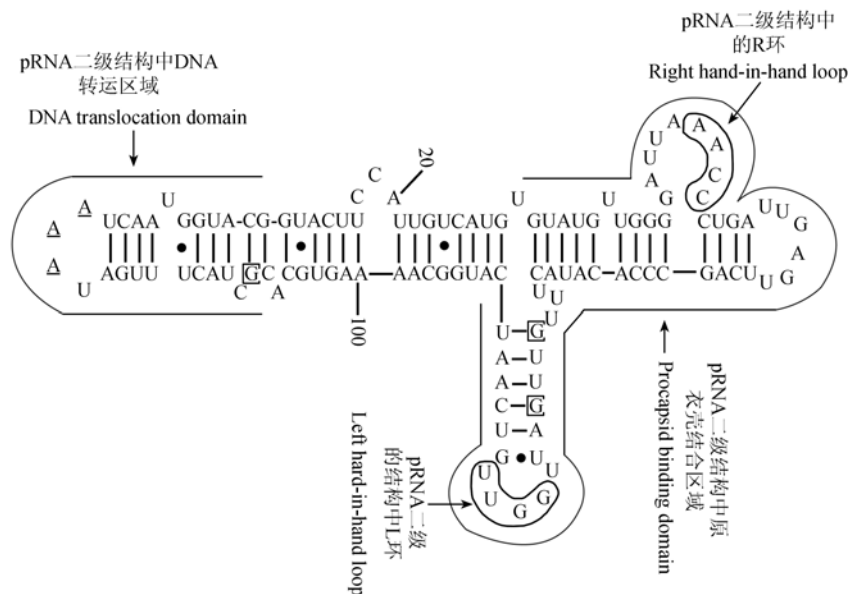


图 1 pRNA 的二级结构^[4]

Fig.1 The secondary structure of pRNA^[4]

个组件可以进行非共价作用,这种非共价作用是 pRNA 分子互作中一种新的方式,而且需要 pRNA 分子中核苷酸 2' 羟基的参与^[8]。pRNA 向内与头颈连接器结合,头颈连接器是一个由 12 个拷贝的门蛋白(portal protein)组成的中空、截短的圆锥体,门蛋白通过 N 端 14 个氨基酸序列区域与 pRNA 结合^[9](图 2)。

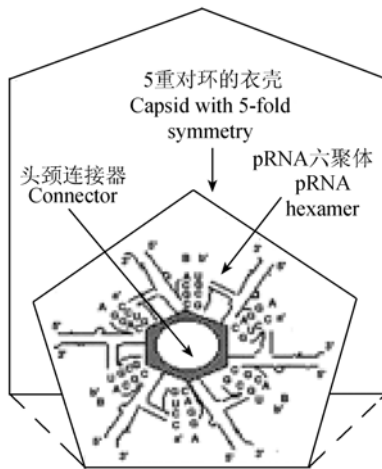


图 2 pRNA 六聚体环在 DNA 转运马达中的位置^[10]
Fig.2 The location of pRNA hexamer ring in the DNA translocation motor^[10]

Chen C 和 Guo P^[3]发现 Mg^{2+} 可以诱导 pRNA 的构象发生变化,导致 pRNA 与原衣壳的结合。结果显示,在没有 Mg^{2+} 时, pRNA 序列的两个臂能被补骨脂素(psoralen)有效的交联;而在有 Mg^{2+} 存在时则不能被交联。对补骨脂素交联、引物延伸及酶部分降解等的研究,揭示其至少具有两个构象。其中一个能结合到原衣壳上,另一个却不能。在有 Mg^{2+} 存在时, Mg^{2+} 引发 pRNA 发生构象变化,通过促进原衣壳结合区域的两条链再折叠而暴露出门蛋白的结合位点,从而形成 pRNA-原衣壳复合物。能够检测到 pRNA 交联时的 Mg^{2+} 浓度为 1 mmol/L,这一浓度与 pRNA-原衣壳复合物的形成以及 phi29 DNA 包装时所需的 Mg^{2+} 浓度相同,同时也与正常宿主细胞中的 Mg^{2+} 浓度相近。

2 pRNA 在 DNA 转运中的作用机制

pRNA 仅在噬菌体 phi29 DNA 转运时才会被表达出来,作为 DNA 转运马达重要的组成部分来参与 DNA 的转运。pRNA 具有独特新颖的高级结构,这种

高级结构是怎样在 DNA 的转运中起作用的呢?根据 Hendrix R W^[11]提出的有关 DNA 包装机理的模型,五重对称的原衣壳的外壳与六重对称的头颈连接器之间的对称配合失当,这种对称错配(mismatch)可以减少旋转中潜在的能量障碍,头颈连接器的旋转能产生一个使 DNA 移位的牵引力。6 个拷贝的 pRNA (六聚体)附着在头颈连接器的顶角上,每一个 pRNA 都是 DNA 移位所必须的。而 pRNAs 的有序连续作用,能使两个对称配合失当的环状结构转动起来。通过有序连续作用,每个 pRNA 轮流发挥作用。pRNA 的有序连续作用机制有力地支持了 Hendrix 提出的 DNA 包装的对称错配模型(the symmetry mismatch model)。

在 DNA 移位过程中, pRNA 是与原衣壳连结在一起的,并在移位过程中起着至关重要的作用。pRNA 与包装过程中的每一个参与成分,如 Mg^{2+} 、ATP、DNA 包装蛋白 gp16、DNA-gp3 及与原衣壳的相互作用均可导致构象的变化。而所有这些构象变化首先是由 ATP 酶引发的,ATP 的水解为驱动 DNA 的包装提供能量,ATP 的水解导致与 ATP 酶结合的 pRNA 分子的构象发生变化, pRNA 分子构象的变化会马上导致与其逆时针方向相邻的 pRNA 分子构象发生变化(图 3):

在 6 个转动步骤的每一步中,头颈连接器转动 12° [$360^\circ/(5 \times 6)$]。六重对称的头颈连接器的 6 个突出部分代表 pRNA 或 pRNA-gp16 复合体的 6 个拷贝。突出部分存在于伸展和收缩两个构象状态中。收缩的构象允许其与五重对称的蛋白外壳的 5 个边的中间部分发生相互作用;而伸展的构象允许其与蛋白外壳的 5 个顶点发生相互作用。有 ATP 水解酶引发的构象变化可产生使五面环与六面环之间发生转动的物理力。在 DNA 包装的一个特定时间点,突出部分与环上的一个特定位置发生相互作用致使 ATP 水解,突出部分在五重对称的蛋白外壳中有序的相互作用可导致连接器连续的转动。从 A 到 G,每个突出部分经历一次构象变化。比如 pRNA1 从 5 重对称的 1 个顶部,经历 6 次过渡和连接器的转动 $72^\circ(360^\circ/5)$ 到达 5 重结构的下一个顶部。因而连接器转动 72° 需要 6 个不同的突出部分共发生 6 个构象变化。每一个构象变化至少需要一个 ATP,因而 6 个 ATPs 可使头颈连接器转动 72° , 30 个 ATPs 可使头颈连接器转动一圈 (360°)^[12]。

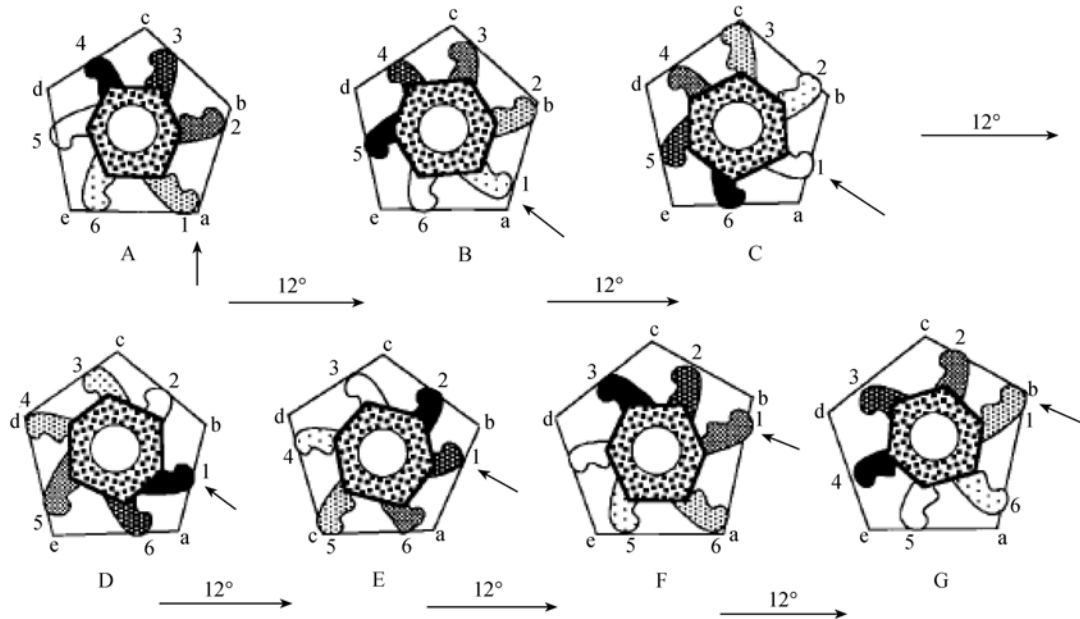


图 3 pRNA在 $\Phi 29$ DNA转运中连续的运动^[12]

中间的六边形代表了头颈连接器, 外面的五边形代表了头膜, 形状的变化代表了 pRNA 分子处在不同的能量状态, 从 A 到 G 代表了旋转的 6 个步骤。

Fig. 3 The sequential action of pRNA in DNA packaging of $\Phi 29$ ^[12]

The hexagon represents the connector(portal vertex), and the surrounding pentagon represents the head membrane. The variable shapes and patterns portray the pRNA in serial energetic states, and A to G represent six steps of rotation.

3 研究近况

siRNA(small interfering RNA)、核酶以及反义 RNA(anti-sense RNA)可以下调癌细胞和病毒感染细胞中某些特异基因的表达, 从而从分子水平达到诊断和治疗的目的。但是SiRNA和核酶在癌症和病毒疾病治疗应用时, 必须要解决以下几个问题: (1)分子进入细胞时细胞膜对分子大小的限制; (2)细胞内核酸外切酶的降解作用; (3)能否在细胞间隔中运输; (4)与运输载体结合的分子在细胞内是否能够正确进行折叠。因此, 科学家们试图找到一种安全、高效、无害的纳米材料来作为治疗性RNA分子的载体^[13]。

由于 pRNA 二级结构中 L 环与 R 环可以相互进行碱基配对, 我们可以按照自己的需要, 控制和操纵 pRNA 的大小和形状来形成稳定的二聚体和三聚体。当外源 RNA 分子(例如锤头状核酶)的 3' 和 5' 末端连接于 pRNA 的 3' 和 5' 末端时, 外源性 RNA 分子将被保护而不受细胞内核酸外切酶的降解和错误的折叠。由于环状排列可行, 新生的 RNA 杂合子的 3' 和 5' 末端可找到适当的新末端, 使新末端埋藏于 RNA 分子之内而避免被降解。这些都表明 pRNA 可

以通过重建来作为一种基因靶位的运输载体。

Shu D 研究小组已把 RNA 纳米马达的概念应用在设计人工 RNA 纳米装置中, 他们已经成功地从 RNA 形成的模块中建造出 3D 数组, 并且这些 3D 数组更可以延伸至数个微米(micrometers), 进而搭起纳米制造(nanofabrication)与微米制造(microfabrication)之间的桥梁^[14]。把 3 种治疗性的分子的单链各自连接在 pRNA 分子上, 形成微型三角形的杂交链, 这种结构的分子大小在 25~40 纳米之间, 因此可以通过细胞膜, 并且具有较长的体内滞留时间, 从而可以充分发挥治疗分子的功能。如基于 pRNA 为基础已经把它设计成携带锤头状核酶的载体, 用来切割 hepatitis B virus(乙肝病毒)识别的 polyA^[15]。Guo S 等^[16]又将 pRNA 二聚体一个亚基连接上 SiRNA、核酶及化学分子基团, 将它转移至癌细胞后可导致癌细胞中绿色荧光蛋白、survivin 蛋白以及 BCL-2 家族中细胞凋亡抑制因子基因的沉默。目前他们应用这项技术已经在人类乳腺癌细胞、淋巴白血病模型、前列腺癌细胞中取得了满意的效果。

虽然 pRNA 作为一种纳米粒子比其他 RNA 分子都要稳定, 但是必须考虑到 pRNA 分子在体内的稳

定性, 如何避免体内酶的降解和证明它的安全性, 这还有很多的工作要去做。

4 展 望

以前对 pRNA 的研究已经证实了 RNA 也能与 ATP 相结合, 这为 RNA 是生命起源而且比蛋白质和 DNA 更早的设想提供了强有力的支持。近年来, 基于 pRNA 分子所构建的分子载体在纳米科技和临床医学基础研究上取得了一定的成果, 说明我们对 pRNA 的研究也由认识阶段进入到了改造利用阶段。利用 pRNA 分子独特的结构特征来加工改造成纳米装置如多价基因载体、DNA 测序装置等, 将来必将在更广的领域中得到普遍的应用, 除此之外, pRNA 分子也给我们提供了一个研究自然界 RNA 多聚体的模型, 同时也带给我们更多的关于生命起源的思考。

参 考 文 献 (Reference):

- [1] Guo P X, Erickson S, Anderson D. A small viral RNA is required for *in vitro* packaging of bacteriophage Φ 29 DNA. *Science*, 1987, 236: 690-694.
- [2] Shu D, Guo P. A Viral RNA that binds ATP and contains a motif similar to an ATP-binding aptamer from SELEX. *Journal of Biological chemistry*, 2003, 278: 7119~7125. [\[DOI\]](#)
- [3] Chen C, Guo P. Magnesium-Induced conformational change of packaging RNA for procapsid recognition and binding during phage Φ 29 DNAencapsidation. *Journal of Virology*, 1997, 71, 495~500.
- [4] Mat-Arip Y, Garver K, Chen C, Sheng S, Shao Z, Guo P. Three-dimensional interaction of phi29 pRNA probed by chemical interference,cryo-AFM,and cross-linking. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(35): 32575~32584. [\[DOI\]](#)
- [5] Shu D, Huang L P, Hoeprich S, Guo P. Construction of phi29 DNA-packaging RNA(pRNA) monomers,dimmers and trimers with variable sizes and shapes as potential parts for nano-devices. *Journal of Nanoscience and .Nanotechnology*, 2003, 3: 295~302. [\[DOI\]](#)
- [6] Chen C, Sheng S,Shao Z, Guo P. A dimer as a building block in assembling RNA. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(23): 17510~17516. [\[DOI\]](#)
- [7] Shu D, Guo P. Only one pRNA hexamer but multiple copies of the DNA-packaging protein gp16 are needed for the motor to package bacterial virus phi29 genomic DNA. *Virology*, 2003, 309, 108~113. [\[DOI\]](#)
- [8] Fang Y, Cai Q, Qin P Z. The procapsid binding domain of Φ 29 packaging RNA has a modular architecture and requires 2'-hydroxyl groups in packaging RNA interaction. *Biochemistry*, 2005, 44: 348~9358.
- [9] Xiao F, Moll W D, Guo S, Guo P. Binding of pRNA to the N-terminal 14 amino acids of connector protein of bacteriophage phi29. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(8): 2640~2649. [\[DOI\]](#)
- [10] Hoeprich S, Guo P. Computer modeling of three-dimensional structure of DNA-packaging RNA (pRNA) monomer, dimer, and hexamer of Phi29 DNA packaging motor. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(23): 20794~20803. [\[DOI\]](#)
- [11] Hendrix R W. Bacteriophage DNA packaging:RNA gears in a DNA transport machine. *Cell*, 1998, 94, 147~150. [\[DOI\]](#)
- [12] Chen C, Guo P. Sequential action of six virus-encoded DNA-packaging RNAs during phage Φ 29 genomic DNA translocation. *Journal of Virol*, 1997, 71(5): 3864~3871.
- [13] Khaled A, Guo S, Li F, Guo P. Controllable self-assembly of nanoparticles for special delivery of multiple therapeutic molecules to cancer cells using RNA nanotechnology. *Nano Letters*, 2005, 5(9): 1797~1808. [\[DOI\]](#)
- [14] Shu D, Moll W, Deng Z, Mao C,Guo P. Bottom-up assembly of RNA arrays and superstructures as potential parts in nanotechnology. *Nano Letters*, 2004, 4(9): 1717~1723. [\[DOI\]](#)
- [15] Hoeprich S, Zhou Q, Guo S, Shu D, Qi G, Wang Y, Guo P. Bacterial virus phi29 pRNA as a hammerhead ribozyme escort to destroy hepatitis B virus. *Gene Therapy*, 2003, 10: 1258~1267. [\[DOI\]](#)
- [16] Guo S, Tschammer N, Mohammed S, Guo P. Special delivery of therapeutic RNAs to cancer cells via the dimerization mechanism of phi29 motor pRNA. *Human Gene Therapy*, 2005, 16, 1097~1109. [\[DOI\]](#)