

# 真核生物细胞质 tRNA 生物合成研究的进展

黄鹰

南京师范大学生命科学学院, 南京市微生物工程技术研究中心, 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 南京 210046

E-mail: y\_shang\_hai@126.com

收稿日期: 2008-09-16; 接受日期: 2008-11-28

国家自然科学基金(批准号: 30670446 和 30771178)和南京师范大学人才引进启动基金(批准号: 2007104XGQ0148)资助项目

**摘要** tRNA 是蛋白质翻译机器中的必需成分, 它对细胞的生长和增殖及器官的发育起着决定性作用. tRNA 生物合成包括 tRNA 基因的转录、转录后的加工和修饰. 对 tRNA 生物合成的研究还包括 tRNA 在细胞中的运输、tRNA 生物合成的质量监控及其与其他重要细胞途径(如 mRNA 生物合成、DNA 损伤应答和细胞周期)之间的相互作用, 以及 tRNA 生物合成在生长发育和疾病中的作用. 本文主要介绍了近年来真核生物细胞质 tRNA 生物合成研究的一些重要进展.

**关键词**

tRNA  
tRNA 生物合成  
tRNA 基因转录  
tRNA 加工  
tRNA 修饰

tRNA 分子由 75~95 个核苷酸组成, 其二级结构呈三叶草型, 由 D 臂、反密码子臂、T 臂(也叫 T $\psi$ C 臂)、额外臂和氨基酸受体臂组成(图 1). tRNA 三级结构呈倒 L 型. 在所有的细胞内, tRNA 分子首先以前体形式由 RNA 聚合酶 III 转录而成, 然后必须经过加工(除去 5'前导序列、3'尾巴序列和内含子), 以及广泛的修饰才能成为具有功能性的成熟 tRNA 分子<sup>[1]</sup>. 这个过程需要数量可观的蛋白参与. 例如, 在芽殖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中, 1%的基因组参与 tRNA 前体的加工和修饰.

自 20 世纪 50 年代中后期发现 tRNA 以来<sup>[2]</sup>, tRNA 的研究已有 50 多年的历史. 近几年, 随着基因组学、蛋白质组学、分子生物学和细胞生物学等技术的发展, tRNA 的研究已成为当代分子生物学一个活跃的领域<sup>[3]</sup>. 本文主要介绍了真核生物细胞质 tRNA 生物合成研究的最新进展.

## 1 tRNA 基因的结构和功能

### 1.1 tRNA 基因的数目和定位

所有生物体都含有 20 种天然氨基酸, 而在古细

菌、细菌和动物中还存在第 21 种氨基酸: 硒代半胱氨酸. 大多数氨基酸有两个或两个以上的密码子. tRNA 将密码子翻译成蛋白质中的氨基酸. 目前, 包括芽殖酵母、裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、果蝇(*Drosophila melanogaster*)、马(*Equus caballus*)、小鼠(*Mus musculus*)和人(*Homo sapiens*)等 33 种真核模式生物在内的 tRNA 序列可通过网站获得(<http://lowelab.ucsc.edu/GtRNAdb/>). tRNA 基因成簇排列, 被间隔区分开. 不同生物体中 tRNA 基因数目不同, 并且真核生物比原核生物具有更多的 tRNA 基因. 例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)有 86 个 tRNA 基因, 芽殖酵母有 274 个, 裂殖酵母有 186 个, 果蝇有 298 个, 人有 531 个. 此外, 由于编码同工 tRNA 的基因拷贝数目不同, 同工 tRNA 相对丰度也不同. 在细菌和酵母中, 同工 tRNA 的相对丰度与蛋白质的表达水平一致<sup>[4]</sup>.

芽殖酵母中 tRNA 基因位于核糖体合成场所核小体中<sup>[5]</sup>, 裂殖酵母中的 tRNA 基因定位不确定, 但目前研究提示其也可能位于核小体中<sup>[6]</sup>. 这种定位对

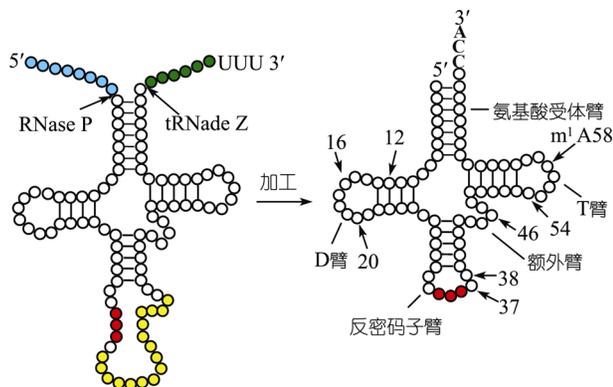


图 1 真核生物细胞质 tRNA 前体的加工

核苷酸由圆圈表示. tRNA 前体显示的是 5 前导序列(天蓝色)、3' 尾巴序列(绿色)、内含子(黄色)、反密码子(红色)和 3 寡聚尿苷酸(U). 产生 3 寡聚尿苷酸的原因是, tRNA 基因转录终止子由寡聚胸苷酸(T)序列组成. 通常寡聚尿苷酸的长度是 3 个 U. 成熟 tRNA 显示的是 D 臂、T 臂、反密码子臂、额外臂、氨基酸受体臂和 3 CCA. 由于部分内含子序列与 tRNA 的反密码子序列互补, 因此它们可能形成一个茎环结构. 图中指出了本文中讨论的一些重要核苷酸在 tRNA 上的位置

基因组在空间上的组装起着重要作用.

### 1.2 tRNA 基因的结构

与 RNA 聚合酶 转录的基因不同, tRNA 基因的转录通常不需要上游的“TATA”盒. tRNA 基因启动子位于基因内部, 由两个分开的保守序列“Box A”和“Box B”组成, 分别编码 tRNA 的 D 臂和 T 臂. tRNA 基因可分为 5'半分子基因和 3'半分子基因, 前者编码 D 臂和大部分反密码子臂, 后者编码小部分反密码子臂和 T 臂. 有些 tRNA 基因是断裂的, 含有内含子. 内含子位于反密码子 3'端相隔一个核苷酸的位置.

最近, 在检测红藻(*Cyanidioschyzon merolae*)全基因组中 tRNA 基因时, 发现一些 tRNA 基因具有独特的结构<sup>[8]</sup>. 红藻是最古老的超小型单细胞真核生物, 已在地球上存在了 20 亿年, 其基因组是第一个被测序的藻类基因组. Soma 等人<sup>[8]</sup>利用常规的 tRNA 基因预测程序 tRNAscan-SE, 在红藻基因组中只能预测 30 个正常结构的 tRNA 基因, 显然这些 tRNA 基因编码的 tRNA 不足以解码全部 61 个密码子. 使用新的 tRNA 基因预测程序 SPLITS 和 SPLITSX, 同时以 T 臂或反密码子臂中的保守序列为检测序列, BLAST

(basic local alignment search tool)搜索核酸序列数据库, 在红藻基因组中发现了另外 11 个核酸序列发生置换的 tRNA 基因. 这些 tRNA 3'半分子基因位于 5'半分子基因的上游, 二者之间有 7~74 bp 间插序列(intervening sequence). 这些基因 3'端上游几乎都存在“TATA”盒, 但不清楚它对 tRNA 基因的转录是否起作用. Soma 等人<sup>[8]</sup>进一步研究提示, 转录后的线性 tRNA 前体的 5'半分子的 3'端序列和 3'半分子的 5'端序列, 可能形成膨泡-螺旋-膨泡模体(bulge-helix-bulge motif, BHB 模体), 类似于正常 tRNA 前体中含子-外显子接合处形成的 BHB. tRNA 剪接机器能识别 BHB, 通过去除 tRNA 前体 5'前导序列和 3'尾巴序列, 将 tRNA 前体 5'半分子和 3'半分子连接成环状 RNA 中间体(图 2). RNase P 和 tRNase Z 除去 tRNA 前体 3'半分子和 5'半分子之间的间插序列, 产生正确的 tRNA 5'端和 3'端.

在超耐温寄生虫纳古菌(*Nanoarchaeum equitans*)基因组(已知最小的基因组)中发现了随机分布的、断裂的 tRNA 基因<sup>[9]</sup>. Randau 等人<sup>[9]</sup>最初使用常规的 tRNA 基因预测程序 tRNAscan-SE, 无法在这种耐温寄生虫的基因组中找到 tRNA<sup>His(GUG)</sup>, tRNA<sup>iMet</sup>, tRNA<sup>Trp</sup>和两个 tRNA<sup>Glu</sup>(tRNA<sup>Glu(CUC)</sup>和 tRNA<sup>Glu(UUC)</sup>). 他们设计专门程序去查找 tRNA 半分子基因, 发现纳古菌基因组中随机分布着 9 种 tRNA 半分子基因. 他们通过实验确定这 9 种 tRNA 半分子基因转录形成的 tRNA 半分子能连接形成纳古菌基因组中缺失的 5 种

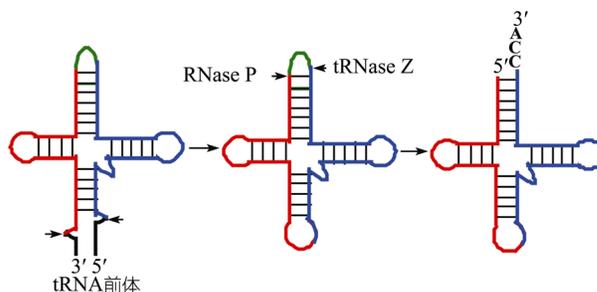


图 2 红藻中特殊 tRNA 前体可能的加工途径

图中显示的是红藻中特殊 tRNA 前体 5 半分子(红色)、3 半分子(蓝色)、间插序列(绿色)、5 前导序列(黑色)和 3 尾巴序列(黑色). tRNA 剪接内切酶的作用位点用箭头表示. 碱基配对用黑线表示. 由文献<sup>[8]</sup>中图 3(C)修改而来

tRNA 分子. 这些 tRNA 半分子间的连接发生在 tRNA 的第 37 位, 即反密码子碱基的后一位. Randau 等人<sup>[9]</sup>提出: 在纳古菌的 tRNA 剪接过程中, 两个 tRNA 半分子之间的间插序列通过序列互补, 能形成一个长 12~14 bp、富含 GC 碱基对的 RNA 双链结构. 这种 RNA 双链结构类似于 BHB 模体, 可能促进两个分开的 tRNA 5'半分子和 3'半分子间的连接. 实验结果提示, tRNA 是通过 tRNA5'半分子和 3'半分子的组合进化而来的<sup>[10]</sup>.

### 1.3 tRNA 基因的功能

tRNA 基因除了主要在蛋白质翻译中起解码作用外, 还具有其他重要的功能.

(1) tRNA 基因作为障碍子(barrier). 真核生物的染色质可分为基因表达活跃的常染色质和基因表达沉默的异染色质<sup>[11,12]</sup>. 常染色质结构域和异染色质结构域通过隔离子(insulator)分开, 将异染色质限制在特定的区域, 防止沉默子使邻近基因启动子失活的隔离子叫障碍子.

tRNA 基因可作为障碍子, 在真核细胞常染色质和异染色质的分隔中起作用, 但并不是所有的 tRNA 基因都具有障碍子的活性. 在裂殖酵母中, tRNA 基因障碍子对防止着丝粒周边区异染色质扩散起着重要作用. 着丝粒中央核心区域以及两侧的内重复序列形成常染色质, 其中内重复序列含有多种 tRNA 基因. 着丝粒周边区域的外重复序列能启动形成异染色质. Scott 等人<sup>[13]</sup>发现位于裂殖酵母 1 号染色体着丝粒(cen1)的丙氨酸 tRNA 基因(tDNA<sup>Ala</sup>)能作为障碍子, 分隔着丝粒常染色质和着丝粒周边区异染色质. tDNA<sup>Ala</sup>障碍子活性需要转录因子 TF<sub>C</sub> 和 RNA 聚合酶 都结合到 tDNA<sup>Ala</sup>. 尽管 tDNA<sup>Ala</sup> 被转录, 但 tDNA<sup>Ala</sup> 障碍子活性与转录方向无关. 这些结果提示 tRNA 基因障碍子的功能需要组装完整的 RNA 聚合酶 转录机器, 但尚不清楚 tRNA 基因障碍子的活力是否需要 RNA 聚合酶 的转录. 在芽殖酵母中, 位于 *HMR*(沉默交配型基因座, 储存 a 交配型信息)右面的苏氨酸 tRNA 基因(tDNA<sup>Thr</sup>)具有障碍子功能<sup>[14]</sup>, 但芽殖酵母和裂殖酵母中 tRNA 基因障碍子的作用机制目前尚不清楚.

tRNA 基因障碍子也可能与其他机制协同作用.

在芽殖酵母中, tDNA<sup>Thr</sup> 障碍子能招募组蛋白乙酰化酶复合物(Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase, SAGA), 并与组蛋白乙酰化酶共同作用, 防止 *HMR* 位点的基因沉默扩散<sup>[14]</sup>. 在裂殖酵母中, tDNA<sup>Ala</sup> 障碍子可能通过招募组蛋白甲基化酶 Lsd1 和 Lsd2, 并与组蛋白甲基化酶协同作用, 防止异染色质扩散到 tDNA<sup>Ala</sup> 障碍子以外<sup>[15]</sup>.

(2) tRNA 基因在连接姐妹染色单体过程中的作用. 在 S 期, 姐妹染色单体通过环状黏连蛋白复合物(cohesin)结合在一起, 这个联结(cohesion)过程与 DNA 复制偶联. 黏连蛋白复合物在 G1 后期加载到染色质的不同位点, 其高密度结合位点环绕着丝粒. 在芽殖酵母中, 黏连蛋白复合物也聚集在异染色质上, 例如芽殖酵母中 *HMR* 能靶向招募黏连蛋白复合物. Dubey 等人<sup>[16]</sup>发现, 姐妹染色单体在 *HMR* 的联接需要其右边的 tDNA<sup>Ala</sup> 障碍子及 RNA 聚合酶 转录机器. 进一步研究发现, 当 tDNA<sup>Ala</sup> 存在时, 黏连蛋白复合物才能有效地结合到 *HMR*, 但障碍子本身并不足以产生 *HMR* 的联接. tDNA<sup>Ala</sup> 参与 *HMR* 的联接过程与 tDNA<sup>Ala</sup> 障碍子功能并不相关. tRNA 基因在联接姐妹染色单体过程中的作用机制尚不清楚. tDNA<sup>Ala</sup> 可能活化一组位于 tRNA 基因附近、不具功能的黏连蛋白复合物. tDNA<sup>Ala</sup> 也可能直接招募具有活性的黏连蛋白复合物, 后者再迁移到附近的异染色质结构域.

## 2 tRNA 的加工

### 2.1 酵母 La 蛋白影响 tRNA 前体的加工模式

酵母中 tRNA 前体 3'-末端的加工受到酵母 La 蛋白的影响. La 蛋白是最初在红斑狼疮病人的血清中发现的一种自主抗原. La 蛋白主要与 RNA 聚合酶 的转录产物结合. 作为第一个与 tRNA 前体作用的蛋白, La 蛋白识别新近合成的 tRNA 前体 3'-寡聚尿苷酸尾巴. tRNA 3'-末端至少需要 3 个尿苷酸残基才能与 La 蛋白结合<sup>[17]</sup>. Yoo 等人<sup>[18]</sup>发现芽殖酵母中 La 蛋白(Lhp1)能影响 tRNA 前体 3'-末端加工模式. Lhp1 促进核酸内切酶 tRNase Z 介导的 tRNA 前体 3'-末端的加工, 同时保护 3'-末端, 防止核酸外切酶的切割. 目前裂殖酵母中 tRNase Z 尚未被鉴定. 本实验室正在鉴定裂殖酵母中的 tRNase Z. 此外, Lhp1 促使 5'-末端

的加工先于 3'-末端的加工, 产生 5'-成熟、3'-末端未加工的 tRNA 前体. 在缺乏 *lhp1<sup>+</sup>*(*lhp1Δ*)时, tRNA 前体 3'-末端由核酸外切酶加工. 此外, tRNA 前体 5'-和 3'-末端加工是随机的, 因此, 缺乏 5'-成熟、3'-末端未加工的 tRNA 前体由于受到核酸外切酶的降解作用, 其 3'-末端的长度明显缩短, 并且不均匀<sup>[18]</sup>.

最近, Copela 等人<sup>[19]</sup>发现缺失外切酶 Rex1 时, 在 *lhp1Δ*细胞中 tRNA 前体 3'-末端的长度不变, 提示 Rex1 是降解 tRNA 前体 3'-末端的主要外切酶. 同时缺失 Rex1 和 Rrp6(细胞核外切酶复合体的亚基)时, 在 *lhp1Δ*细胞中, 除了 tRNA 前体 3'-末端的长度不变, 还恢复了 5'-成熟、3'-末端未加工的 tRNA 前体, 提示 Rex1 和 Rrp6 共同参与 *lhp1Δ*细胞中 tRNA 前体 3'-末端的加工. 令人意外的是, 在 *lhp1<sup>+</sup>*细胞中, Rex1 也能切割一些 tRNA 前体的 3'-末端, 并介导一些 tRNA 前体 3'-末端的加工, 提示 Rex1 和 Lhp1 竞争结合 tRNA 前体的 3'-末端. 那些没有与 Lhp1 结合的 tRNA 前体则被 Rex1 切割. 经 Rex1 切割后的 tRNA 前体(5'-和 3'-末端成熟、含内含子)被细胞核外切酶复合体降解(见下文).

与单细胞真核生物芽殖酵母和裂殖酵母中 La 蛋白不同, 哺乳动物中 La 蛋白是必需的. La 蛋白缺失会导致小鼠胚胎的囊胚期内细胞团(能分裂产生胚胎干细胞)丢失<sup>[20]</sup>, 说明 La 蛋白对囊胚期内细胞团的发育是必需的, 但其作用机制不清楚. 此外, 在哺乳动物中 La 蛋白是否影响 tRNA 前体加工的模式还有待研究.

## 2.2 酵母 La 蛋白能稳定 tRNA 前体的正确结构

结构不稳定的 tRNA, 需要与 La 蛋白结合才能被加工成熟. 例如, 在芽殖酵母中, 破坏反密码子茎中碱基对的 G→A 突变, 能使 tRNA<sup>Ser(CGA)</sup>的结构变得不稳定, 导致其加工成熟需要 Lhp1<sup>[18]</sup>. 由于 tRNA<sup>Ser(CGA)</sup>是芽殖酵母细胞中唯一必需的 tRNA, 含有 G→A 突变的 tRNA<sup>Ser(CGA)</sup>的细胞需要 Lhp1 才能生长<sup>[18]</sup>. 又如, 削弱反密码子茎稳定性的 C→U 突变使 tRNA<sup>Arg(CCG)</sup>需要 Lhp1 才能有效地被加工. Lhp1 可能通过与反密码子臂结合, 稳定其正确的反密码子臂结构, 帮助这些 tRNA 折叠成正确的结构<sup>[18,21]</sup>. 在裂殖酵母中, 破坏校正 tRNA<sup>Ser(UGA)</sup>额外臂中的碱基对, 导致其加工

成熟依赖裂殖酵母 La 蛋白 Sla1<sup>[22]</sup>. 酵母 La 蛋白具有稳定 tRNA 前体的正确结构和保护 tRNA 前体被核酸外切酶切割的功能, 这两个功能分别定位于酵母 La 蛋白的不同结构域<sup>[22]</sup>.

## 3 tRNA 的修饰

在所有的 RNA 修饰中, tRNA 修饰最广泛. 在已发现的近 100 种 RNA 修饰中, tRNA 修饰有 81 种, 其中 50 种是真核生物 tRNA 修饰. 有关 tRNA 修饰可在 RNA 修饰网站上查询(<http://library.med.utah.edu/RNAmods/>). 大多数 tRNA 修饰是甲基化修饰. 芽殖酵母中有 20 种 tRNA 甲基化修饰, 由 16 种 tRNA 甲基化酶(Trm)催化形成. 最常见的修饰是假尿嘧啶核苷(pseudouridine,  $\psi$ ), 主要发生在反密码子臂, 其次是二氢尿嘧啶(D). 通常, tRNA 中氨基酸受体臂的修饰不足, 而反密码子区域超修饰. tRNA 第 34 位(反密码子的第 1 位)和 37 位(紧靠反密码子 3'端)的核苷酸具有较高的修饰频率和许多不同种类的修饰. tRNA 修饰可发生在细胞核或细胞质中, 发生在 tRNA 加工之前、同步或之后.

tRNA 修饰在进化上是保守的, 提示 tRNA 修饰具有重要的作用. 已发现反密码子区域的修饰能增加翻译的效率和保真性, 因此对细胞生长起着重要的作用. 但是, 由于多数反密码子区域外的修饰单独缺失对细胞生存没有影响, 也不产生表型, 所以一直认为在反密码子区域外的修饰作用是微小的. 但近期研究发现反密码子区域外的修饰也具有重要的功能.

### 3.1 反密码子区域外的 tRNA 修饰与 tRNA 的稳定性

反密码子区域外的、对细胞生存必需的 tRNA 修饰对 tRNA 的稳定起着重要的作用. tRNA<sup>m<sup>1</sup>A<sub>58</sub></sup>甲基化酶由两个亚基 Trm6 和 Trm61 组成, 催化 5'-和 3'-端尚未加工 tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>前体的 m<sup>1</sup>A<sub>58</sub>修饰. m<sup>1</sup>A<sub>58</sub>修饰是一种必需修饰, 缺乏这种修饰的细胞不能存活. 这种修饰对 tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>前体的稳定性至关重要. 缺乏 m<sup>1</sup>A<sub>58</sub>修饰的 tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>前体不稳定, 被细胞核 RNA 检测系统检测并降解(见下文). m<sup>1</sup>A<sub>58</sub>修饰只影响起始 tRNA<sup>Met</sup>(tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>)前体的稳定性, 而不影响延伸

tRNA<sup>Met</sup>(tRNA<sub>e</sub><sup>Met</sup>)前体的稳定性<sup>[23,24]</sup>. 这可能是由于真核生物细胞质 tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> 具有独特结构: tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> 的 54 位是 A, 它与 m<sup>1</sup>A<sub>58</sub> 形成对 D 与 T 臂相互作用非常重要的碱基配对. m<sup>1</sup>A<sub>58</sub> 修饰对形成这个碱基配对至关重要. 而延伸 tRNA 的第 54 位是 rT<sub>54</sub>. rT<sub>54</sub> 与 m<sup>1</sup>A<sub>58</sub> 形成反向 Hoogsteen 碱基配对, 这个碱基配对不受 m<sup>1</sup>A<sub>58</sub> 修饰的影响. 人的 tRNA m<sup>1</sup>A<sub>58</sub> 甲基化酶也由两个亚基 hTrm6 和 hTrm61 组成, 能在芽殖酵母中甲基化 A<sub>58</sub>(m<sup>1</sup>A<sub>58</sub>). 同时高表达 *hTRM6* 和 *hTRM61* 能在非允许温度下救活 *trm6* 或 *trm61* 温度敏感型突变体. 说明人的 tRNA m<sup>1</sup>A<sub>58</sub> 甲基化酶与芽殖酵母的 tRNA m<sup>1</sup>A<sub>58</sub> 甲基化酶有功能上的同源性<sup>[25]</sup>.

反密码子区域外的、对细胞生存非必需的 tRNA 修饰也对 tRNA 稳定性起着重要的作用. Alexandrov 等人<sup>[26]</sup>发现, 在缺失 tRNA m<sup>7</sup>G 甲基化酶(由 Trm8 和 Trm82 两个亚基组成)的同时, 缺失 tRNA m<sup>5</sup>C<sub>34, 40, 48, 49</sub> 甲基化酶(Trm4)、 $\Psi_{13,35}$  假尿苷酸酶 7(Pus7)、D<sub>16,17</sub> 双氢尿嘧啶合成酶(Dus1)、D<sub>20</sub> 双氢尿嘧啶合成酶(Dus2) 或 D<sub>47</sub> 双氢尿嘧啶合成酶(Dus3), 能产生温度敏感型突变体, 说明非必需的 tRNA m<sup>7</sup>G 甲基化酶能作为一个中心与一些非必需的 tRNA 修饰酶有遗传上的相互作用. 运用 DNA 芯片技术对非编码 RNA 稳态水平的分析发现, 在这些 tRNA 修饰酶缺失的双突变体中, 受这些 tRNA 修饰酶作用的成熟 tRNA<sup>Val(AAC)</sup> 快速衰减. Northern 实验进一步确定在这些双突变体中, 成熟 tRNA<sup>Val(AAC)</sup> 稳态含量减少, 并且减少的速度非常快. 高表达 tRNA<sup>Val(AAC)</sup> 能抑制 *trm8Δ trm4Δ* 双突变体的生长缺陷. 这些实验揭示 *trm8Δ trm4Δ* 的生长缺陷是由于 tRNA<sup>Val(AAC)</sup> 的丢失, 说明反密码子区域外的 tRNA 修饰对维持成熟 tRNA 的稳定至关重要. 如果缺乏这些非必需修饰, 成熟 tRNA 会不稳定, 并成为快速 tRNA 衰减途径靶向作用的目标(见下文). 这些实验现象说明, 反密码子区域外的、不同的 tRNA 修饰对 tRNA 稳定的作用有累积效应. 虽然缺少一种 tRNA 修饰时, 对 tRNA 稳定性的作用不明显, 但缺少多种 tRNA 修饰时, 可能导致 tRNA 稳定性明显的降低, 并产生温度敏感型.

### 3.2 tRNA 修饰与 DNA 损伤应答的关系

芽殖酵母 tRNA U<sub>34</sub> 甲基化酶 Trm9 最初是作为

DNA 损伤应答增强因子被发现的<sup>[27,28]</sup>. 例如, 缺失 TRM9 能增加细胞对 DNA 烷基化试剂甲基磺酸甲酯(methyl methanesulphonate, MMS, DNA 诱变剂)和 $\gamma$ 辐射的敏感性. Trm9 参与 DNA 损伤应答, 但 Trm9 如何增强 DNA 损伤应答的分子机制并不清楚. 最近, Begley 等人<sup>[29]</sup>初步揭示了 Trm9 促进 DNA 损伤应答的机制. tRNA<sup>Arg(UUC)</sup>(识别 AGA 密码子)和 tRNA<sup>Glu(UUC)</sup>(识别 GGA 密码子)中反密码子第 1 位碱基尿嘧啶被 Trm9 甲基化, 形成 mcm<sup>5</sup>U. 这个修饰能调节 tRNA-mRNA 的碱基配对和增加 tRNA<sup>Arg(UUC)</sup> 与 AGA 密码子的结合, 提示 Trm9 催化的甲基化修饰可能通过调节特定密码子与反密码子的相互作用, 从而提高特定密码子的翻译水平. Begley 等人假设, Trm9 特异性的 tRNA 甲基化修饰可能提高富含 AGA(精氨酸)和 GAA(谷氨酸)密码子的基因转录产物的翻译水平. 他们比较分析了芽殖酵母基因组中所有的 5783 个基因序列中密码子的使用频率, 发现有 425 个转录产物富含 AGA(精氨酸)和 GAA(谷氨酸)密码子的基因. 这些基因包含编码翻译延伸因子 3(YEF3)和编码核糖核苷酸还原酶的亚基(Rnr1, Rnr2, Rnr3 和 Rnr4), 其中 Rnr1~Rnr4 是 DNA 损伤应答途径中的重要蛋白. 在 *trm9Δ* 细胞中, Yef3, Rnr1 和 Rnr3 蛋白水平显著降低, 而转录不受影响. 这些实验结果表明, Trm9 可能通过调节翻译延伸过程从而促进翻译, 但其确切机制尚不清楚. *trm9Δ* 细胞的 DNA 损伤表型是由于 Rnr1 和 Rnr3 蛋白水平的减少造成的, 而 Trm9 能提高这些蛋白的翻译水平, 提示 Trm9 在 DNA 损伤应答中作用可能是通过提高 DNA 损伤蛋白的翻译水平从而防止细胞死亡.

### 3.3 tRNA 修饰与发育

人的 DNA 甲基转移酶-2(DNMT2)最初被认为是 DNA 甲基化酶, 后来被确定为 tRNA<sup>Asp</sup> 专一性的 tRNA 甲基转移酶. DNMT2 能甲基化 tRNA<sup>Asp</sup> 反密码子环中的 C<sub>38</sub><sup>[30]</sup>. 在 小鼠、拟南芥或果蝇中删除 DNMT2 的同源基因(*dnmt2*)不产生任何表型, 但在斑马鱼胚胎中删除 *dnmt2*, 将导致视网膜、肝和脑等器官的分化缺陷<sup>[31]</sup>, 说明 *dnmt2* 介导的 tRNA 甲基化影响斑马鱼的发育, 但其作用机制尚不清楚. DNMT2 的同源蛋白在芽殖酵母中不存在, 但在裂殖酵母中

存在. 含有 DNMT2 的生物体同时含有相同的 tRNA<sup>Asp</sup> 反密码子环序列, 而不含有 DNMT2 的生物体含有分化的、缺乏 C<sub>38</sub> 的 tRNA<sup>Asp</sup> 反密码子环序列. 这些实验结果提示, DNMT2 与 tRNA<sup>Asp</sup> 反密码子环序列可能具有协同进化(coevolution)关系.

#### 4 tRNA 在细胞核和细胞质之间的迁移

在脊椎动物中, tRNA 加工和内含子的去除都发生在细胞核中. 但在芽殖酵母中, tRNA 加工发生在细胞核, 内含子的去除发生在细胞质. 在芽殖酵母中, tRNA 修饰也具有时空性: 有些位于细胞核, 有些位于细胞质, 并且可以发生在 tRNA 前体加工之前、同步或之后<sup>[32]</sup>. 此外, 芽殖酵母中成熟 tRNA 的氨基酰化发生在细胞核. 芽殖酵母中发现的这些现象十年来一直无法解释. 最近发现细胞质中 tRNA 能再从细胞质逆行进入细胞核, 提示 tRNA 首先在细胞质中被去除内含子, 然后逆行进入细胞核, 并在细胞核中被氨基酰化. 但 tRNA 如何逆行进入细胞核以及为什么在细胞质中无法检测到含有内含子的 tRNA 前体有待进一步阐明<sup>[33,34]</sup>. 已发现, 在营养胁迫下, tRNA 能从细胞质逆行进入细胞核, 说明 tRNA 逆行进入细胞核可能是在营养胁迫时参与调节基因的表达<sup>[35,36]</sup>.

#### 5 tRNA 生物合成的质量监控

真核生物中 RNA 生物合成受到严格监控, 使有缺陷的 RNA 降解. 目前已发现分别作用于 tRNA 前体和成熟 tRNA 的两种监控体系. 一种是普遍存在于真核生物中的细胞核 RNA 监控体系(nuclear RNA surveillance); 另一种 tRNA 生物合成监控体系是快速 tRNA 衰减(rapid tRNA decay, RTD)途径.

##### 5.1 细胞核 RNA 监控体系

细胞核 RNA 监控体系能大规模检测细胞核中有缺陷的 RNA(mRNA, tRNA, small nucleolar RNA (snoRNA), small nuclear RNA(snRNA)和 rRNA)和基因间 RNA(intergenic RNAs). 它由 TRAMP(Trf4/Air2/Mtr4p polyadenylation complex)和细胞核外切酶复合体构成. TRAMP 由 Trf4, Mtr4 和 Air1/Air2 构成, 能在不稳定的 tRNA 3'-末端添加多聚腺嘌呤核苷酸(A)尾巴, 并促进这些 tRNA 的降解<sup>[37-39]</sup>. 但并不清楚

TRAMP 如何识别有缺陷的 tRNA(例如缺乏修饰或含错配碱基). 目前只有芽殖酵母和人的细胞核外切酶复合体被鉴定. 芽殖酵母和人的细胞核外切酶复合体都含有 11 个亚基, 具有 3'核酸外切酶的活性. Kadaba 等人<sup>[23]</sup>发现, 细胞核 RNA 监控体系能特异地降解缺乏 m<sup>1</sup>A<sub>58</sub> 修饰的 tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> 前体(5'端和 3'端尚未加工). 本研究组<sup>[22]</sup>发现细胞核 RNA 监控体系能特异地降解含有错配碱基的校正 tRNA<sup>Ser(UGA)</sup> 前体. 缺乏 m<sup>1</sup>A<sub>58</sub> 修饰 tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> 前体和含有错配碱基的校正 tRNA<sup>Ser(UGA)</sup> 前体都可能是由于结构不稳定而被降解. Copela 等人<sup>[19]</sup>发现, 外切酶 Rex1 切割 tRNA 前体 3'-端, 导致产生末端成熟但含内含子的 tRNA 前体. 这部分 tRNA 前体能被细胞核 RNA 监控体系识别并降解. 一种可能的解释是由于 Rex1 切割产生的含内含子的 tRNA 前体可能没有与 Lhp1 结合, 易折叠成错误的结构而被降解.

##### 5.2 RTD 途径

RTD 途径能降解有缺陷的成熟 tRNA. Chernyakov 等人<sup>[40]</sup>发现一些缺乏两种非必需 tRNA 修饰的芽殖酵母突变体(如缺乏 m<sup>7</sup>G<sub>46</sub> 和  $\psi_{13,15}$ , m<sup>7</sup>G<sub>46</sub> 和 D<sub>47</sub> 或 Um<sub>44</sub> 和 ac<sup>4</sup>C<sub>12</sub>)具有温度敏感性. 产生温度敏感性的原因是在非允许温度下缺乏修饰的 tRNA 被 RTD 途径降解. RTD 途径的突变能恢复缺乏修饰的 tRNA 水平, 从而抑制 tRNA 修饰突变体的温度敏感性表型. RTD 途径能快速降解缺乏修饰的 tRNA, 使 tRNA 半衰期从几小时缩短到几分钟, 但是 RTD 途径识别与降解有缺陷的成熟 tRNA 的原理目前尚不清楚.

RTD 途径组分包括 Rat1, Xrn1 和 Met22. Rat1 和 Xrn1 都是 5'核酸外切酶. 两者具有相似功能: 除了参与 tRNA 降解, 还参与 rRNA 和 snoRNA 的加工和 mRNA 的降解. Met22 通过 Rat1 和 Xrn1 间接起作用. 这是由于 Met22 是合成甲硫氨酸的硫酸盐同化(sulfate assimilation)途径中的一个磷酸酶, 能催化除去腺嘌呤 3', 5'二磷酸(pAp)的 3'磷酸基团. 由于 pAp 能抑制 Rat1 和 Xrn1 的酶活力, 因此缺失 Met22 能降低 Rat1 和 Xrn1 的酶活力. Rat1 和 Xrn1 分别定位于细胞核和细胞质, 但尚不清楚 RTD 途径发生在何种细胞器中.

## 6 tRNA 生物合成在生长发育和疾病中的作用

细胞中的 tRNA 水平对细胞正常生长和增殖至关重要. tRNA 表达减少或增加都可能导致发育缺陷或肿瘤的产生.

### 6.1 tRNA 的高表达能促进细胞转化和肿瘤形成

由于细胞干重的 80%~90%是蛋白质, 所以蛋白质的合成速度对细胞生长和增殖起着决定性的作用<sup>[41]</sup>. 蛋白质合成依赖蛋白质合成机器中的必需因子 tRNA 和 5S rRNA, 因此 tRNA 和 5S rRNA 的合成水平与细胞生长和增殖密切相关. 高表达 RNA 聚合酶的转录产物一直与癌症相关. 在转化细胞和肿瘤细胞中, 蛋白质以及包括 tRNA 在内的 RNA 聚合酶的转录产物的合成增加. Felton-Edkins 等人<sup>[42,43]</sup>发现, 在正常细胞中, 肿瘤抑制因子 RB 和 p53 与 RNA 聚合酶 特异性转录因子 TF B 结合, 从而阻止 TF B 结合到转录起始位点, 抑制 RNA 聚合酶 的转录. 但在肿瘤细胞中, 由于 RB 和 p53 的功能丧失, TF B 结合到转录起始位点不再受到限制. 根据这些发现, 他们提出 TF B 受到 RB 和 p53 等因子的严格调控, 而在肿瘤细胞中 TF B 调控失活导致包括 tRNA 在内的 RNA 聚合酶 的转录产物合成的增加. 但 tRNA 合成的增加与细胞转化和肿瘤形成之间的关系并不清楚. 最近, Marshall 等人<sup>[44]</sup>证实增加 tRNA 合成能促进细胞转化和肿瘤形成. 这些研究人员首先发现, Brf1 的超量表达能促进蛋白质的合成. 这是由于 Brf1 的高表达能增加 RNA 聚合酶 结合到 tRNA 和 5S rRNA 基因上, 从而特异地增加 tRNA 和 5S rRNA 的水平(后者的增加也提高了蛋白质的合成). Brf1 的高表达能同时促进细胞增殖和肿瘤转化. 相反, 降低 Brf1 的表达能抑制转化. 过表达 tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> 能模拟 Brf1 诱导产生的表型效应, 如刺激细胞增殖并使永生化的成纤维细胞在老鼠体内形成肿瘤, 这说明细胞中 tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> 的水平是整个蛋白质合成速度的限制因素.

提高 tRNA 合成水平如何促进细胞生长和增殖? 一种解释是 tRNA 合成的增加促进蛋白质合成. 大规模增加蛋白质合成可能足以促进细胞生长和增殖. 另一种解释是大规模增加蛋白质合成可能选择性地诱导一些蛋白的翻译. 已经发现, 提高蛋白质的

合成能力能优先增加对细胞生长和增殖起关键作用的生长因子、细胞周期促进因子和癌蛋白(如人的血管内皮生长因子 VEGF、细胞周期蛋白 D1 和转录调节因子 c-Myc)的合成. 这可能是由于这些蛋白的 mRNA 的 5'端高度结构化, 影响了翻译的效率. 提高蛋白质的合成能力, 能有效地增加此类蛋白质的合成. Marshall 等人<sup>[44]</sup>证明通过 Brf1 的高表达和提高 tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> 的表达, 能特异地促进细胞周期蛋白 D1 和 c-Myc 的翻译.

### 6.2 tRNA 表达不足导致斑马鱼消化系统发育缺陷

Yee 等人<sup>[45]</sup>根据肠形态变化从大量的斑马鱼突变体中筛选出一种叫 *slim jim(sli)* 的突变体. *sli* 突变延迟 G1→S 期转变, 导致 *sli* 胚胎消化系统内高度增殖的祖细胞(progenitor cells)的生长和增殖减慢, 从而影响消化器官的发育. *sli* 突变也影响其他组织中快速增殖的祖细胞(如视网膜、肝和终端鳃拱)的生长和发育. *sli* 突变对活跃增殖的细胞的影响明显强于对静止的、有丝分裂后的细胞(如骨骼肌、心脏、胰岛)的影响.

*sli* 突变是如何影响消化系统发育的呢? Yee 等人<sup>[45]</sup>进一步研究发现, 在 *sli* 突变体中, RNA 聚合酶 中的第 2 大亚基 Rpc2 由于拼接点突变导致缺失一段由 41 个氨基酸组成的片段. Rpc2 的突变导致 *sli* 突变体中 tRNA 转录水平降低, 而另一种 RNA 聚合酶 的转录产物(5S rRNA)的表达水平不受影响. 在裂殖酵母的跨物种研究中发现, *sli* 突变体中 tRNA 转录水平降低的原因可能是 Rpc2 的突变影响 Rpc2 与 RNA 聚合酶 另一亚基 Rpc11 的相互作用, 导致 Rpc11 从 RNA 聚合酶 复合体解离. 高表达斑马鱼 *RPC11* 能抑制 *sli* 突变体的表型, 提示 Rpc11 的解离可以通过 *RPC11* 的高表达来弥补<sup>[45]</sup>. 这些实验结果说明, 斑马鱼发育过程中组织特异性缺陷是由于 RNA 聚合酶 活力降低, 从而导致 tRNA 和其他 RNA 聚合酶 转录产物合成不足引起的. 由于 tRNA 对必需的细胞生命活动(如蛋白质合成和细胞周期进程)起着至关重要的作用, tRNA 水平的降低能影响细胞生长和增殖. 例如, 芽殖酵母细胞中 tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> 水平减少一半能使细胞的倍增时间增加 3 倍<sup>[46]</sup>. *sli* 突变特

异地影响那些依赖于细胞高度增殖的斑马鱼幼虫组织的生长和发育, 这可能是由于蛋白质翻译水平的降低对分裂细胞的生长和细胞周期进程的影响比静止细胞的影响更大。

## 7 tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> 介导 RNA 聚合酶 转录和 RNA 聚合酶 转录之间的交互作用(crosstalk)

Gcn4 是营养或遗传毒性胁迫下全基因组中 RNA 聚合酶 基因表达重编程(reprogramming)的关键调控蛋白, 这种应答机制从酵母到哺乳动物都是保守的。当芽殖酵母细胞缺乏氨基酸、嘌呤或葡萄糖, 或高盐培养细胞, 或用 DNA 损伤剂 UV, MMS 和抗增殖剂雷帕霉素(rapamycin)处理细胞时, GCN4 mRNA 翻译得到诱导, Gcn4 的激活能降低大多数蛋白质合成的速度, 同时激活 500 多种基因的表达<sup>[47]</sup>。这些激活的基因编码在饥饿或遗传毒性胁迫下细胞生存所需要的蛋白。这些蛋白主要参与氨基酸和辅因子的合成、线粒体的转运和糖原的体内平衡。已有的研究发现应激作用(如缺乏营养、分泌缺陷或 DNA 损伤剂处理)能大幅度下调芽殖酵母中 RNA 聚合酶 转录产物的水平, 导致 tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> 水平降低。因此, Gcn4 在应激反应时的基因诱导作用可能是通过 tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> 的介导实现的。

Conesa 等人<sup>[48]</sup>分析芽殖酵母全基因组范围的表达后, 发现芽殖酵母 RNA 聚合酶 转录突变体中, 那些受到 GCN4 诱导的、RNA 聚合酶 转录的基因表达增加, 但是这些基因的表达在删除 GCN4 后不再增加。这些基因中相当一部分是编码参与氨基酸代谢的蛋白质。RNA 聚合酶 转录突变体中 GCN4 的转录不受影响, 但其翻译被诱导。由于 tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> 表达水平降低或成熟过程有缺陷能影响 GCN4 翻译, 导致 GCN4 表达降低<sup>[49,50]</sup>。因此, Conesa 等人<sup>[48]</sup>对 RNA 聚合酶 转录突变体中 tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> 表达水平是否降低进行检测, 结果发现 tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> 表达水平降低 2 倍。此外, 在 RNA 聚合酶 转录突变体中高表达 tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> 时, 受 GCN4 诱导的基因的表达不再增加。这些实验结果提示, tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> 表达的降低触发 RNA 聚合酶 转录突变体中依赖 GCN4 的基因组的重编程。这些实验结果也提示, tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> 可能是协调 RNA 聚合酶 转录与

RNA 聚合酶 转录的关键因子。在 RNA 聚合酶 转录机器缺陷导致的全基因组重编程中, 只有 20% 基因表达的改变依赖于 GCN4 活化, 说明除了 GCN4 外, 还有其他调控途径介导 RNA 聚合酶 和 转录之间的交互作用。

## 8 tRNA 生物合成与细胞周期的调控

哺乳动物细胞周期 G1 期有个检测点, 通过该点后, 细胞才能致力于 DNA 合成和细胞有丝分裂。在芽殖酵母的细胞周期中此点称为起始点(START)。当细胞周期蛋白 Cln1 和 Cln2 处于最低表达水平时, 细胞才能通过起始点。当发生 DNA 损伤时, 则不能通过 G1 检测点, 细胞周期停滞。由于细胞能否通过 G1 检测点是细胞能否增殖的关键, 所以 G1 检测点的重要性显而易见。而且, G1 检测点的异常与肿瘤的发生密切相关。由于 tRNA 在蛋白质翻译中起着至关重要的作用, 而细胞通过 G1 期与蛋白质合成紧密偶联, 因此成熟 tRNA 的合成对细胞通过 G1 期起着至关重要的作用。

Yoshihisa 等人<sup>[51]</sup>发现 tRNA 生物合成和 tRNA 运输是连接 DNA 损伤和细胞周期检测点的环节。芽殖酵母 tRNA 内含子的剪接发生在细胞质。用 MMS 或 UV 辐射处理芽殖酵母细胞, 不影响 tRNA 前体的 5'-和 3'-末端的加工, 但影响 tRNA 前体内含子的剪接, 导致细胞核内积累含有内含子的、末端已加工的 tRNA 前体<sup>[52]</sup>。并且, 这种 tRNA 前体在细胞核中的积累依赖 DNA 损伤信号通路中的重要因子: DNA 损伤感受器 Mec1 和信号传感器 Rad53。这说明 tRNA 剪接的下调受细胞周期检测点诱导。他们进一步发现, Rad53 调节 tRNA 核输出蛋白 Los1 的亚细胞定位。DNA 损伤导致 Los1 从细胞核迁移到细胞质, 从而不能将 tRNA 运输到细胞质。但 DNA 损伤不影响无内含子的 tRNA 和 mRNA 从细胞核输出, 说明 DNA 损伤导致 Los1 定位于细胞质。由于 Gcn4 能抑制细胞周期蛋白 Cln2 的翻译, 他们推测, 没有剪接的 tRNA 通过活化 Gcn4 转录因子的翻译, 使细胞在 G1 期停滞。

Yoshihisa 等人的研究结果揭示了 tRNA 生物合成和 tRNA 运输与 DNA 损伤、细胞周期检测蛋白和细胞周期机器之间的关联, 但还有许多问题需要解答。例如, Rad53 如何使 Los1 停留在细胞质中? 细胞

核中含有内含子的 tRNA 前体是否是 DNA 损伤信号通路的中间体? 先前的研究<sup>[53]</sup>发现, tRNA 加工的缺陷或从细胞核输出到细胞质的缺陷都能触发 Gcn4 翻译的去抑制, 那么, tRNA 加工的缺陷是否也能像 tRNA 剪接缺陷一样通过相同的机制使细胞在 G1 期停滞? Gcn4 如何抑制 Cln2 翻译?

## 9 总结

近几年来, 真核生物 tRNA 生物合成的研究取得了一些重要进展, 形成了一些新的热点. 其中一个热点是 tRNA 基因转录的调控. 例如, 研究各种各样的环境胁迫如何通过信号传导途径作用于 tRNA 基因的

转录. 又如, 研究 tRNA 基因转录的失控与疾病的关系. 这些研究对认识与治疗包括癌症在内的疾病具有重要的意义. 在后基因组时代, tRNA 基因转录调控的研究还扩展到研究 tRNA 基因转录与其他 RNA 基因转录之间的协调机制, 以及 tRNA 生物合成途径与其他重要细胞途径(如 DNA 损伤应答和细胞周期)之间的相互作用. 在 tRNA 加工和修饰方面, 真核生物特别是多细胞真核生物中许多编码参与 tRNA 加工和修饰的蛋白质的基因有待进一步鉴定, tRNA 加工的具体机制有待进一步阐明, tRNA 修饰的重要生理学作用也有待进一步研究. 此外, 有关 tRNA 生物合成的质量控制途径和 tRNA 的运输也是 tRNA 研究的热点.

**致谢** 感谢本实验室冯振华、谷文娟、甘旭华、杨景、于莹莹和李军对本文的贡献.

## 参考文献

- 1 杨景, 于莹莹, 黄鹰. tRNA 核酸内切酶的研究进展. 生命科学, 2008, 20(2): 190—195
- 2 Hoagland M B, Stephenson M L, Scott J F, et al. A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. J Biol Chem, 1958, 231(1): 241—257
- 3 Hopper A K, Phizicky E M. tRNA transfers to the limelight. Genes Dev, 2003, 17(2): 162—180
- 4 Goodenbour J M, Pan T. Diversity of tRNA genes in eukaryotes. Nucleic Acids Res, 2006, 34(21): 6137—6146 [\[DOI\]](#)
- 5 Thompson M, Haeusler R A, Good P D, et al. Nucleolar clustering of dispersed tRNA genes. Science, 2003, 302(5649): 1399—1401 [\[DOI\]](#)
- 6 Noma K, Cam H P, Maraia R J, et al. A role for TFIIC transcription factor complex in genome organization. Cell, 2006, 125(5): 859—872 [\[DOI\]](#)
- 7 Geiduschek E P, Kassavetis G A. The RNA polymerase transcription apparatus. J Mol Biol, 2001, 310(1): 1—26 [\[DOI\]](#)
- 8 Soma A, Onodera A, Sugahara J, et al. Permuted tRNA genes expressed via a circular RNA intermediate in *Cyanidioschyzon merolae*. Science, 2007, 318(5849): 450—453 [\[DOI\]](#)
- 9 Randau L, Munch R, Hohn M J, et al. *Nanoarchaeum equitans* creates functional tRNAs from separate genes for their 5'- and 3'-halves. Nature, 2005, 433(7025): 537—541 [\[DOI\]](#)
- 10 Fujishima K, Sugahara J, Tomita M, et al. Sequence evidence in the archaeal genomes that tRNAs emerged through the combination of ancestral genes as 5' and 3' tRNA halves. PLoS ONE, 2008, 3(2): e1622 [\[DOI\]](#)
- 11 于莹莹, 杨景, 黄鹰. 芽殖酵母和裂殖酵母中异染色质形成机制. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, 24(8): 692—697
- 12 Goldberg A D, Allis C D, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. Cell, 2007, 128(4): 635—638 [\[DOI\]](#)
- 13 Scott K C, White C V, Willard H F. An RNA polymerase II-dependent heterochromatin barrier at fission yeast centromere 1. PLoS ONE, 2007, 2(10): e1099 [\[DOI\]](#)
- 14 Oki M, Kamakaka R T. Barrier function at HMR. Mol Cell, 2005, 19(5): 707—716 [\[DOI\]](#)
- 15 Lan F, Zaratiegui M, Villen J, et al. *S. pombe* LSD1 homologs regulate heterochromatin propagation and euchromatic gene transcription. Mol Cell, 2007, 26: 89—101 [\[DOI\]](#)
- 16 Dubey R N, Gartenberg M R. A tDNA establishes cohesion of a neighboring silent chromatin domain. Genes Dev, 2007, 21(17): 2150—2160 [\[DOI\]](#)
- 17 Huang Y, Intine R V, Mozlin A, et al. Mutations in the RNA polymerase subunit Rpc11p that decrease RNA 3' cleavage activity increase 3'-terminal oligo(U) length and La-dependent tRNA processing. Mol Cell Biol, 2005, 25(2): 621—636 [\[DOI\]](#)

- 18 Yoo C J, Wolin S L. The yeast La protein is required for the 3' endonucleolytic cleavage that matures tRNA precursors. *Cell*, 1997, 89(3): 393—402
- 19 Copela L A, Fernandez C F, Sherrer R L, et al. Competition between the Rex1 exonuclease and the La protein affects both Trf4p-mediated RNA quality control and pre-tRNA maturation. *RNA*, 2008, 14(6): 1214—1227 [\[DOI\]](#)
- 20 Park J M, Kohn M J, Bruinsma M W, et al. The multifunctional RNA-binding protein La is required for mouse development and for the establishment of embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(4): 1445—1451 [\[DOI\]](#)
- 21 Chakshumathi G, Kim S D, Rubinson D A, et al. A La protein requirement for efficient pre-tRNA folding. *EMBO J*, 2003, 22(24): 6562—6572 [\[DOI\]](#)
- 22 Huang Y, Bayfield M A, Intine R V, et al. Separate RNA-binding surfaces on the multifunctional La protein mediate distinguishable activities in tRNA maturation. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13(7): 611—618 [\[DOI\]](#)
- 23 Kadaba S, Wang X, Anderson J T. Nuclear RNA surveillance in *Saccharomyces cerevisiae*: Trf4p-dependent polyadenylation of nascent hypomethylated tRNA and an aberrant form of 5S rRNA. *RNA*, 2006, 12: 508—521 [\[DOI\]](#)
- 24 Kadaba S, Krueger A, Trice T, et al. Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator tRNA<sup>Met</sup> in *S. cerevisiae*. *Genes Dev*, 2004, 18(11): 1227—1240 [\[DOI\]](#)
- 25 Ozanick S, Krecic A, Andersland J, et al. The bipartite structure of the tRNA m1A58 methyltransferase from *S. cerevisiae* is conserved in humans. *RNA*, 2005, 11(8): 1281—1290 [\[DOI\]](#)
- 26 Alexandrov A, Chernyakov I, Gu W, et al. Rapid tRNA decay can result from lack of nonessential modifications. *Mol Cell*, 2006, 21(1): 87—96 [\[DOI\]](#)
- 27 Begley T J, Rosenbach A S, Ideker T, et al. Hot spots for modulating toxicity identified by genomic phenotyping and localization mapping. *Mol Cell*, 2004, 16(1): 117—125 [\[DOI\]](#)
- 28 Begley T J, Rosenbach A S, Ideker T, et al. Damage recovery pathways in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic phenotyping and interactome mapping. *Mol Cancer Res*, 2002, 1(2): 103—112
- 29 Begley U, Dyavaiah M, Patil A, et al. Trm9-catalyzed tRNA modifications link translation to the DNA damage response. *Mol Cell*, 2007, 28(5): 860—870 [\[DOI\]](#)
- 30 Goll M G, Kirpekar F, Maggert K A, et al. Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, 2006, 311(5759): 395—398 [\[DOI\]](#)
- 31 Rai K, Chidester S, Zavala C V, et al. Dnmt2 functions in the cytoplasm to promote liver, brain, and retina development in zebrafish. *Genes Dev*, 2007, 21(3): 261—266 [\[DOI\]](#)
- 32 Grosjean H, Szwedkowska-Kulinska Z, Motorin Y, et al. Intron-dependent enzymatic formation of modified nucleosides in eukaryotic tRNAs: a review. *Biochimie*, 1997, 79(5): 293—302 [\[DOI\]](#)
- 33 Shaheen H H, Hopper A K. Retrograde movement of tRNAs from the cytoplasm to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(32): 11290—11295 [\[DOI\]](#)
- 34 Takano A, Endo T, Yoshihisa T. tRNA actively shuttles between the nucleus and cytosol in yeast. *Science*, 2005, 309(5731): 140—142 [\[DOI\]](#)
- 35 Hurto R L, Tong A H, Boone C, et al. Inorganic phosphate deprivation causes tRNA nuclear accumulation via retrograde transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 2007, 176(2): 841—852 [\[DOI\]](#)
- 36 Whitney M L, Hurto R L, Shaheen H H, et al. Rapid and reversible nuclear accumulation of cytoplasmic tRNA in response to nutrient availability. *Mol Biol Cell*, 2007, 18(7): 2678—2686 [\[DOI\]](#)
- 37 LaCava J, Houseley J, Saveanu C, et al. RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell*, 2005, 121(5): 713—724 [\[DOI\]](#)
- 38 Vanacova S, Wolf J, Martin G, et al. A new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control. *PLoS Biol*, 2005, 3(6): 986—997
- 39 Wyers F, Rougemaille M, Badis G, et al. Cryptic pol transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase. *Cell*, 2005, 121(5): 725—737 [\[DOI\]](#)
- 40 Chernyakov I, Whipple J M, Kotelawala L, et al. Degradation of several hypomodified mature tRNA species in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by Met22 and the 5'-3' exonucleases Rat1 and Xrn1. *Genes Dev*, 2008, 22(10): 1369—1380 [\[DOI\]](#)
- 41 Zetterberg A, Killander D. Quantitative cytophotometric and autoradiographic studies on the rate of protein synthesis during interphase in mouse fibroblasts *in vitro*. *Exp Cell Res*, 1965, 40(1): 1—11 [\[DOI\]](#)

- 42 Felton-Edkins Z A, Kenneth N S, Brown T R, et al. Direct regulation of RNA polymerase transcription by RB, p53 and c-Myc. *Cell Cycle*, 2003, 2(3): 181—184
- 43 White R J. RNA polymerases I and II, growth control and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(1): 69—78 [\[DOI\]](#)
- 44 Marshall L, Kenneth N S, White R J. Elevated tRNA(iMet) synthesis can drive cell proliferation and oncogenic transformation. *Cell*, 2008, 133(1): 78—89 [\[DOI\]](#)
- 45 Yee N S, Goog W, Huang Y, et al. Mutation of RNA Pol II subunit *rpc2/polr3b* Leads to Deficiency of Subunit Rpc11 and disrupts zebrafish digestive development. *PLoS Biol*, 2007, 5(11): e312 [\[DOI\]](#)
- 46 Francis M A, Rajbhandary U L. Expression and function of a human initiator tRNA gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 1990, 10(9): 4486—4494
- 47 Hinnebusch A G, Natarajan K. Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. *Eukaryot Cell*, 2002, 1: 22—32 [\[DOI\]](#)
- 48 Conesa C, Ruotolo R, Soularue P, et al. Modulation of yeast genome expression in response to defective RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(19): 8631—8642 [\[DOI\]](#)
- 49 Dever T E, Yang W, Astrom S, et al. Modulation of tRNA(iMet), eIF-2, and eIF-2B expression shows that GCN4 translation is inversely coupled to the level of eIF-2.GTP.Met-tRNA(iMet) ternary complexes. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(11): 6351—6363
- 50 Calvo O, Cuesta R, Anderson J, et al. GCD14p, a repressor of GCN4 translation, cooperates with Gcd10p and Lhp1p in the maturation of initiator methionyl-tRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(6): 4167—4181
- 51 Yoshihisa T, Yunoki-Esaki K, Ohshima C, et al. Possibility of cytoplasmic pre-tRNA splicing: the yeast tRNA splicing endonuclease mainly localizes on the mitochondria. *Mol Biol Cell*, 2003, 14(8): 3266—3279 [\[DOI\]](#)
- 52 Ghavidel A, Kislinger T, Pogoutse O, et al. Impaired tRNA nuclear export links DNA damage and cell-cycle checkpoint. *Cell*, 2007, 131(5): 915—926 [\[DOI\]](#)
- 53 Qiu H, Hu C, Anderson J, et al. Defects in tRNA processing and nuclear export induce GCN4 translation independently of phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(7): 2505—2516 [\[DOI\]](#)