

外切体研究进展

王树启 王金发*

(中山大学生命科学院, 广州 510275)

摘要 外切体是酿酒酵母中鉴定的一个保守复合体, 具有 3' 外切核酸酶的活性. 10 个核心亚基, 除 Csl4p/Ski4p 外, 在体外都具有 3' 外切核酸酶的活性. 外切体在多种 RNA 的代谢中起重要作用. 外切体普遍存在于真核生物中, 并与真核基因的表达调控密切相关.

关键词 外切体, 3' 外切核酸酶, RNA 的代谢

学科分类号 Q556+.5

3' → 5' 外切核酸酶是真核生物中重要的一类酶. 各种 RNA 的代谢均需要 3' → 5' 外切核酸酶的活性. 令人惊讶的是, 一个具有 3' → 5' 外切核酸酶活性的复合物, 参与了多条 RNA 的代谢途径, 包括 mRNA 和 pre-mRNA 的周转, 5.8 S rRNA 的加工, 多种 snRNA 及 snoRNA 的加工等. 在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中, 此复合物被命名为“外切体复合物” (exosome complex)^[1], 简称“外切体”.

1 外切体及其组成

外切体的大小为 300~400 ku, 结构复杂. 共沉淀分析表明它有 11 个单拷贝的亚基 (Rrp4p、Rrp6p、Rrp40p、Rrp41p/Ski6p、Rrp42p、Rrp43p、Rrp44p/Dis3p、Rrp45p、Rrp46p、Mtr3p、Csl4p/Ski4p). 但是, Rrp6p 仅是外切体在细胞核中的组分, 对外切体的装配并非必要. 因此, 把除 Rrp6p 外的 10 个亚基称为外切体的“核心亚基” (core subunit)^[1].

外切体的亚基有一个引人注目的特性, 即除 Csl4p/Ski4p 外, 外切体的诸亚基在体外都有 3' → 5' 外切核酸酶的活性, 并且这些亚基的活性及结构对应大肠杆菌的几个外切核酸酶^[1].

2 外切体的功能

外切体参与多种 RNA 的降解和加工, 在各种 RNA 的代谢中起重要作用. 下面将对外切体的功能作一概述.

酿酒酵母 5.8S rRNA 的加工是研究的最早也是最详尽的加工过程. 已经确知外切体的全部亚基都参与此过程, 其中 Rrp6p 所起的作用比较特殊.

缺失突变分析表明 6S rRNA 前体的产生需要 Rrp6p 的单独作用, 其余的加工过程则由外切体的核心亚基完成 (图 1).

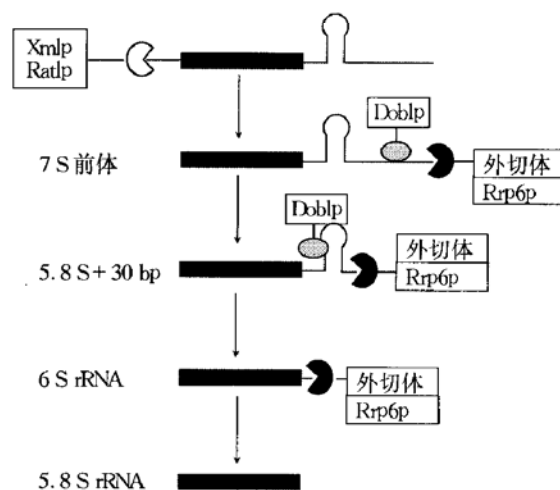


Fig. 1 Processing 5.8S rRNA by exosome

图 1 外切体对 5.8S rRNA 的加工

真核生物的 mRNA 和 pre-mRNA 的周转发生部位不同, 但过程相似, 而且都需要外切体来完成 3' → 5' 的降解^[2]. 对于这些 RNA 的周转, 还有一条 5' → 3' 降解途径与之并存. 这在进化上的意义可能是为了保证这些 RNA 周转的发生. pre-mRNA 的降解则以 3' → 5' 途径为主, 并且这条由外切体作用的途径同 pre-mRNA 的加工存在竞争关系.

真核生物的 snRNA 及 snoRNA 的加工情况复杂, 因为转录物有单顺反子、多顺反子或内含子中等多种形式, 这些各色底物 3' 端的加工大部分也

* 通讯联系人.

Tel: 020-84039179, E-mail: ls19@zsu.edu.cn

收稿日期: 2001-07-19, 接受日期: 2001-11-26

是由外切体完成的. 除转录在内含子中的情况, 外切体的加工似乎都依赖内切酶 Rnt1p 的作用. Rnt1p 在转录物的下游切点作用, 提供外切体 3' 端加工的作用位点. 多顺反子的加工也类似, 同样需要 Rnt1p. Rnt1p 识别一对 13bp 的反向重复序列, 这种结构在各种 sRNA 的前体中很普遍. 这两段序列可以不相连, 但一定要通过互补作用形成特定的二级结构 (图 2). 有些小分子 RNA 存在于内含子中, 剪切后就形成一个袢环 (loop) 结构, 由特定的内切酶去掉分支, 得到线形的 sRNA 前体分子, 再由外切体 (3' 端加工) 和 5'-外切酶 Rat1p (5' 端加工) 共同作用完成加工. U18 snRNA 和 U24 snRNA 的加工属于这种情况.

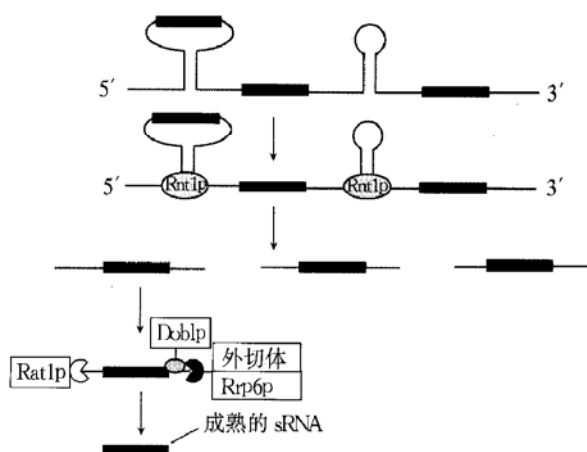


Fig. 2 Processing model of sRNA in multicistron

图 2 多顺反子 sRNA 的加工模式

以上介绍了外切体的主要功能, 其实它的全部功能不止于此, 并推测仍有未知的功能有待发现. 目前已发现的外切体的其他功能包括: 间接促进 35S rRNA 前体的加工, 负责不能被正确加工的 rRNA 和 sRNA 的降解, 参与降解 mRNA 的 poly (A) 尾等. 并且推测外切体可能在端粒酶 RNA 的去腺苷反应以及被切断或去分支的 RNA 分子的降解中发挥作用.

3 外切体的作用机制

讨论到外切体的作用机制有两个值得注意的问题: 一个是外切体是如何完成对底物的识别? 另外一个外切体是如何完成其功能的?

回答第一个问题, 就是要阐明外切体对底物的识别机制. 根据目前的研究进展, 可大致把外切体对底物的识别归纳为三个方面: a. 其他蛋白质的协助作用; b. 底物水平的特征结构; c. 外切体自

身的相关结构.

外切体自身没有解螺旋酶的功能, 要克服 RNA 高级结构对其功能的影响就需要解螺旋酶 Ski2p (胞质) 或 Dob1p/Mtr4p (核内) 协助. 解螺旋酶不仅消除 RNA 的高级结构、去掉 RNA 的结合蛋白, 还负责把失去保护的 RNA 呈递给外切体. 据此有人提出外切体对底物的识别是通过 Ski2p 或 Dob1p/Mtr4p 间接完成的, 因为一些没有明显高级结构的 RNA 在被外切体作用时, 也必需这些解螺旋酶的协助. Dob1p/Mtr4p 直接与外切体作用, Ski2p 则通过 Ski3p 和 Ski8p 间接与外切体发生作用. 由于 Dob1p/Mtr4p 和 Ski2p 在各自参与的途径中不能相互代替, 推测它们也协助外切体的功能选择.

另一个与识别机制有关的蛋白质是内切核酸酶 Rnt1p, 同上述的解螺旋酶一样, 它也是细胞生存所必需的. Rnt1p 对外切体的协助作用在上文已经阐述, 而它在帮助外切体识别底物方面可能是给外切体提供一个直接进入的位点. 由于 Rnt1p 作用是特异的, 因此 Rnt1p 作用可能会留下能被外切体或解螺旋酶的特征结构或特征序列.

底物水平的识别机制是最为基本的, 除了 Rnt1p 作用后留下的特定结构外, poly (A) 尾可能也起着不可忽视的作用. poly (A) 尾在叶绿体和原核生物中都有促进 RNA 降解的作用. 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中发现了一个与酿酒酵母外切体的亚基 Rrp41p/Ski6p 高度同源的蛋白质, 命名为 AtRrp41p, 它是拟南芥“外切体”的亚基. AtRrp41p 在体外有依赖于 poly (A) 尾的外切核酸酶性质^[3]. 这直接反映了 poly (A) 尾与外切体某些亚基的关系.

外切体自身跟识别相关的结构还可能集中在 Rrp4p、Rrp40p、Csl4p/Ski4p 等三个亚基上, 它们的共同特点是都含有与 S1 RNA 结合位点同源的结构, 推测这个特征结构对底物的识别很重要. CSL4 的一个等位基因 ski4-1 上的一个点突变导致 Csl4p 上的 S1 RNA 结合位点的同源结构中出现一个氨基酸的变化, 结果导致突变体的外切体不能降解 mRNA, 但不对外切体的其他功能产生影响, 也没有致死效应. 而 CSL4 的另一个等位基因 csl4-1 造成的后果则完全相反, 它阻碍外切体在细胞核中的加工作用, 但胞质中的 mRNA 仍可通过外切体降解^[4]. 这些事实表明 Csl4p/Ski4p 对外切体功能的选择有重要影响, 并且推测识别作用关键

在于其上的 S1 RNA 结合位点的同源结构。

现在讨论与外切体作用机制有关的第二个问题, 即外切体是如何作用的?

外切体作为协同作用的复合物, 亚基之间也有功能上的分工。比如直接对 mRNA 的降解产生作用的亚基只有 4 个: Rrp4p、Rrp41p/Ski6p、Mtr3p 和 Rrp44p/Dis3p; 而类似的 pre-mRNA 的降解途径中, 作用的亚基为: Rrp41p/Ski6p、Mtr3p、Rrp44p/Dis3p 和 Rrp6p, 略有不同^[2]。还有 Rrp6p, 它不但在 5.8 S rRNA 的加工过程中表现很特异, 还能与 Pap1p 及能稳定 poly (A) 的蛋白质 Npl3p 发生相互作用, 从而促进 poly (A) 尾的降解。这些事实初步表明外切体作为一个完整的复合物, 其有不同的活性位点, 这些活性位点由一个或几个亚基组成, 它们各自作用或彼此协作, 使外切体表现出不同的功能。

4 外切体在真核生物中的普遍性及意义

根据外切体的亚基同大肠杆菌外切核酸酶的同源性, 可以把外切体的亚基归入几个家族。Rrp41p/Ski6p、Rrp42p、Rrp43p、Rrp45p、Rrp46p 和 Mtr3p 属于 PNPase 家族, Rrp6p 属于 RNase D 家族, Rrp44p/Dis3p 属于 RNase II 家族。现已发现上述各家族的成员在其他真核生物中也存在。在人类细胞中最初发现的 9 个酿酒酵母外切体亚基的同系物 (命名时, 在亚基前加“h”, 如 hRrp4p), 确知它们是同一复合物 (PM-Scl 复合物) 的组分, PM-Scl 复合物由 11~16 个亚基组成^[1]。最近, 有人通过 EST 库又筛到 3 个新的外切体亚基的同系物, 分别命名为 hRrp40p、hRrp41p 和 hRrp46p。免疫实验表明它们也是 PM-Scl 复合体的组分^[5]。以上事实说明 PM-Scl 复合体即为人的“外切体”。

除人之外, 在裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、果蝇以及拟南芥中也都发现有“外切体”或“外切体亚基”的存在, 说明外切体在真核生物中存在的普遍性。

在真核生物中, 各种 RNA 的降解和加工不仅

复杂, 而且往往同基因的表达调控密切相关。外切体作为一个装配精密的复合体, 已经超越了亚基本身的功能。外切体涉及的 mRNA 及 pre-mRNA 的周转是真核基因的转录后调控, 核内小分子 RNA 的加工也与基因的表达调控有关。因此装配成为一个严谨的复合体可能更符合真核基因表达调控的内在要求。至今尚未发现体内有外切体的亚基库, 说明外切体亚基的表达的确是受到严格控制的。

5 研究展望

外切体被发现不久, 因其特殊的性质迅速受到瞩目, 深入研究外切体的结构、功能、作用机制及与基因表达调控的关系是非常有意义的。

外切体的功能涉及真核生物大部分 RNA 的代谢过程, 反过来它是否可以作为研究这些 RNA 代谢的工具?

外切体的亚基及其在其他生物中的同系物可以归为几个大的蛋白质家族, 这些蛋白质家族的成员已广泛发现于原核生物和真核生物, 说明这些核酸酶在进化上是相当保守的。进一步研究可能会使人们对生物的进化和发育产生新的认识。另外外切体的作用模式是否反映了真核生物的某些特征, 也是一个让人感兴趣的问题。

参 考 文 献

- 1 Allmang C, Petfalski E, Podtelejnikov A, *et al.* The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes. *Genetics & Development*, 1999, **13** (16): 2148~2158
- 2 Bousquet-Antonelli C, Presutti C, Tollervey D. Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. *Cell*, 2000, **102** (6): 765~775
- 3 Chekanova J A, Shaw R J, Wills M A, *et al.* Belostotsky. poly (A) tail-dependent exonuclease AtRrp41p from *Arabidopsis thaliana* rescues 5.8 S rRNA processing and mRNA decay defects of the yeast *ski6* mutant and is found in an exosome-sized complex in plant and yeast cells. *J Biol Chem*, 2000, **275** (42): 33158~33166
- 4 van Hoof A, Staples R R, Baker R E, *et al.* Function of the Ski4p (Csl4p) and Ski7p proteins in 3'-to-5' degradation of mRNA. *Mol Cell Biol*, 2000, **20** (21): 8230~8243
- 5 Brouwer R, Allmang C, Rajmakers R, *et al.* Three novel components of the human exosome. *J Biol Chem*, 2001, **276** (19): 6177~6184

Advance on Exosome

WANG Shu-Qi, WANG Jir-Fa*

(Bioscience Academy of Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract The exosome is a conserved complex which identified in *Saccharomyces cerevisiae* and has 3' exoribonuclease activity *in vitro*. The exosome contains ten core subunits, and all except Csl4p/Ski4p are 3' exoribonucleases *in vitro*. The exosome acts important role in several pathways of RNA metabolism. The exosome is a universal complex in eukaryote and is related to expression of eukaryotic genes.

Key words exosome, 3' exoribonuclease, RNA metabolism

* Corresponding author. Tel: 86-20-84039179, E-mail: ls19@zsu.edu.cn

Received: July 19, 2001 Accepted: November 26, 2001