

真核细胞中无义介导的 mRNA 降解

徐飞虎* 许宝青¹(杭州九源基因工程有限公司, 杭州 310018; ¹ 杭州市农业科学研究院, 杭州 310024)

摘要 无义介导的 mRNA 降解(NMD)作为一种有效的细胞监控机制, 主要监测细胞转录产物的提前终止密码子(PTC), 并使得含有 PTC 的 mRNA 被迅速降解, 从而防止其被翻译成为缺陷性的蛋白质。尽管 NMD 具有一定的保守性, 但在酵母、哺乳动物以及后来的果蝇细胞中都发现有所不同。目前对于 NMD 的研究已进入了结构领域并发现它与端粒调控和 RNAi 等机制相互关联。

关键词 RNA 监控机制; 无义介导的 mRNA 降解; 外显子连接蛋白复合体; 提前终止密码子

在真核细胞的转录与翻译过程中, mRNA 经常会出现一些突变, 这种突变会在 mRNA 中产生提前终止密码子(pre-mature termination codon, PTC), 从而破坏了基因的内容或者完整性。但事实上细胞并不会随之翻译产生具有缺陷性的蛋白质, 其原因就在于细胞中存在的无义介导的 mRNA 降解(nonsense-mediated mRNA decay, NMD)的监控过程使得这一类异常 RNA 被迅速识别并降解, 从而可以防止缺陷性蛋白质对细胞可能带来的致命性的损害。

NMD 广泛存在于所有已检测的真核生物中, 如酵母、线虫、植物和哺乳动物细胞等^[1,2]。作为真核细胞广泛存在的高度保守的 mRNA 监控机制, NMD 是转录后新生 mRNA 质量控制的重要环节, 无论是对于细胞有效的合成功能蛋白还是对于自身的防护都是非常有益的。此外, 还有假说认为 NMD 途径参与一种更为广泛的基因表达的调控, 即调节转录产物的稳定性^[3], 从而控制转录产物在细胞内的丰度, 这说明 NMD 在细胞中具有既监控蛋白表达的准确性又控制蛋白质的表达总量的作用。

基因的变化与一些疾病的产生具有密切的关系。据估计, 由各种突变所导致的人类疾病中, 无义突变约占 33%。所以 NMD 的基因监控途径备受关注, 人们试图利用 NMD 来探索一些疾病的病理过程并设计出相应的治疗方案^[4]。本文拟就当前 NMD 的研究进展作一综述。

1 NMD 的调控机制

NMD 机制中的一个关键步骤是如何将一个终止密码子识别为 PTC 还是正常终止子? 研究发现, NMD 作用的启动与终止密码子在 mRNA 中的位置和终止

密码子下游的 RNA 序列元件及相关蛋白具有密切关系^[1,5]。酵母细胞和哺乳动物细胞内有两种不同的 NMD 机制^[2,6], 近年来科学家又在果蝇中发现了有别于以上两种的新机制, 这为 NMD 的进化提供了新的依据。

1.1 酵母细胞中的 NMD

在酿酒酵母中, 比较成功的 NMD 模型由 Gonzalez 等^[7]提出。这种模型认为: mRNA 降解主要发生在细胞质中并且与翻译过程密切相关。首先, 核糖体沿 mRNA 扫描, 当其遭遇终止密码子后中断扫描过程, 停留在终止密码子所在的位置; 随后发出信号招募一个监控复合体前体, 其中含有释放因子 eRF1 和 eRF3 以及 Upf1p^[8]; eRF3 水解 GTP 提供能量使得释放因子 eRF1 从整个复合体中释放出来, 使得 Upf2p 或 Upf3p 通过 eRF3 的结合加入监控复合体前体中, 随后 eRF3 也被释放出去, Upf2p 或 Upf3p 则结合与监控复合体前体中, 从而形成至少包括 Upf1p、Upf2p 和 Upf3p 的监控复合体。Upf1p 具有 RNA 解旋酶活性^[9], 使得监控复合体扫描终止密码子下游序列元件(downstream sequence element, DSE), 如果 DSE 位于距离终止密码子 200 个核苷酸范围内, 则该终止密码子可以认为是提前终止密码子 PTC, 从而 mRNA 做出相应的构型改变, 随后被脱帽酶 Dcp1p 脱帽和核酸外切酶 Xrn1p 沿 5' → 3' 方向水解。这一过程还可参考 Frischmeyer 等^[13]所作的 NMD 机制示意图(图 1)。

1.2 哺乳动物细胞中的 NMD

哺乳动物和酵母细胞中的 NMD 有所不同, 哺乳动物细胞 NMD 要求在无义终止密码子下游至少要有

收稿日期: 2007-07-24 接受日期: 2007-10-12

* 通讯作者。Tel: 0571-86879110, E-mail: tigerxfh@hotmail.com

以提供一种对于PTC的识别途径,比如多聚腺苷酸尾巴,它在剪切或腺苷酸多聚反应中可以提供位置信息。基因序列特征强调了一种环境效应的影响,根据这种环境效应,推测在 mRNA 的 3'UTR 序列中可能存在着一系列的蛋白质,它们可能与 mRNA 3'端的形成有关:如果受到 PTC 信号的影响,核糖体能够与 3'-UTR 结合蛋白相互作用而停止,那么很有可能终止整个翻译过程,这样就能随即形成相应的 NMD 复合体,导致这种 mRNA 迅速降解。

2 NMD 的核扫描机制

早在二十世纪八十年代,科学家就在哺乳动物的细胞中发现了 NMD 的细胞核应答^[20]。但随即就产生了一系列的困惑——NMD 作为一种翻译信号引发的应答机制,理应发生在细胞质中;但是在哺乳动物细胞中,PTC 的确定取决于其后的内含子的存在与否,而这应该归于细胞核中发生的转录后加工的范畴,这种矛盾该如何解释呢?

Wilkinson 等^[21]对于细胞核内的 NMD 的扫描机制提出了一个模型:在细胞核中通常在 pre-mRNA 的剪接过程中,包括 UPF3 在内的一些蛋白质组成 EJC,停留在剪接过后的外显子交界处上游 20~24 个核苷酸左右的位置;并且此时 mRNA 的 5' 端由一个帽子结合蛋白复合体(cap binding complex, CBC)所结合。在正常转录过程中,EJC 在核糖体的扫描过程中构型发生改变,并且 CBC 被转录起始因子 4E 所代替,并驱使 mRNA 被运出细胞核而进入细胞质。而存在 PTC 的一些转录产物,核糖体的扫描过程受到终止密码子的阻断,核糖体停止扫描,发出一系列信号招募一些专门的蛋白因子形成监控复合体,其中主要可能有 40S 亚基,UPF1 等蛋白质;当监控复合体与终止密码子下游的 EJC 遭遇后,诱导 NMD 对 mRNA 降解,而此终止密码子由于下游存在 EJC 就是 PTC。这里所谓的核内的翻译过程也只是一个核糖体对 mRNA 的扫描,密码子通读,并没有氨基酸形成多肽的过程,并不是真正意义上的翻译过程。

在细胞核内对转录产物先于翻译而进行的扫描过程具有很多的优点:(1)可以更为有效的阻止一些缺陷性蛋白质的产生;(2)细胞质扫描容易使一些转录产物逃避 NMD 的降解,从而翻译产生危害性很强的缺陷型蛋白;而细胞核内的扫描可以增加一层保护,阻止缺陷性蛋白质的产生,避免这一情况的产生;(3)实验证明 4E 代替 CBC 后,可以提高翻译的效率,进入细胞质后,4E 可以和 PABP 成环连接迅速进行翻译;

另外,4E 还可以协助 mRNA 的出核^[21]。

目前提出的细胞核扫描机制主要还是针对哺乳动物细胞提出的,在酵母等其他低等真核细胞中,还是以细胞质扫描为主。在细胞中同时具有细胞核扫描与细胞质扫描两种机制,会使得细胞内的监控机制更加完善,这也符合进化的目的。

3 NMD 与人类疾病的关系

据估计,约有 33% 的遗传性和后天性疾病与 PTC 产生有关^[4]。基因突变产生无义 mRNA 会引发细胞的 NMD 监控机制,但 NMD 的效率并非是 100% 的,仍有约 5%~25% 的 PTC-mRNA 能从 NMD 中逃逸并被翻译成为缺陷性蛋白^[22]。这种缺陷性蛋白并不具备全长蛋白的功能,而且由于细胞中全长功能蛋白的表达水平过低,因此常导致疾病的发生^[23]。鉴于无义突变相关疾病与 NMD 之间的联系,人们已经发展了多种无义突变相关疾病的治疗方法。

某些小分子药物,例如氨基糖甙类抗生素^[24]或正处于临床 I 期的新药 PTC124^[25]能够结合到核糖体翻译位点。这种结合能够促使同源的氨酰 tRNA(near-cognate aminoacylated tRNA)在无义密码子位置引入一个氨基酸,使得翻译能够继续,庆大霉素治疗囊性纤维化(CF)即是依据了这一原理^[26]。此外,还可将包含有校正 tRNA(suppressor tRNA)基因的质粒注入到人体细胞中^[27],校正 tRNA 携带与无义密码子的互补的反义密码子。校正 tRNA 能与真核细胞释放因子(eRF1)竞争性结合,抑制核糖体在无义密码子处的翻译终止,并能在无义密码子处掺入一个氨基酸。但这一技术面临的困难是如何将质粒运送到目标细胞并有效表达,并且校正 tRNA 有可能影响正常终止密码子的作用。

人们还通过反义寡核苷酸来修补含有 PTC 的基因序列,用其他的密码子来替代终止密码子^[28]以形成正常 mRNA;或通过反义寡核苷酸分子来改变 pre-mRNA 的剪切位点,使得含有 PTC 的外含子在 mRNA 加工过程中被剔除,尽管编码的蛋白会缺失一段序列,但相比截短的蛋白质(truncated protein)更能维持全长蛋白的功能,可能对细胞的影响会更小^[29]。这些方法目前正处于动物试验阶段。

4 NMD 的相关研究

NMD 的研究不仅仅局限于它本身,近年来还发现 NMD 参与到端粒调控和 RNAi 机制等重要研究领域^[30,31]。

对于端粒的影响主要是发现了端粒调控相关基

因中存在一种与NMD中的UPF2基因的等位基因 *r1f4*, 它编码的蛋白质 RLF4(Rap1p 定位因子 Rap1p localization factor)可以影响端粒结合蛋白 Rap1p 在端粒上的定位, 并影响端粒的功能, 这主要体现在RLF4 可以对端粒染色质的构建, 以及端粒长度的保持发挥一定的作用。而UPF2在NMD中发挥着重要的作用, 所以通过UPF2/RLF4将端粒和NMD联系在一起^[30]。

将RNAi与NMD联系在一起的也是SMG系列的蛋白。发现线虫中的NMD相关蛋白质SMG2、SMG5、SMG6也参与RNAi, 它们调控RNAi的长时放大功能^[31]。

最近欧洲的一个实验室结晶了人的UPF2和UPF3b的蛋白质复合物, 研究了它们之间的相互作用, 通过突变实验发现了决定相互作用的若干重要的氨基酸, 还证实了它们与mRNA的结合是通过UPF2蛋白的^[32], 这也为NMD的进一步研究开辟了一个新的领域。

5 小结

NMD作为真核细胞广泛存在的高度保守的mRNA监控机制, 除能检测基因表达中新生mRNA发生的差错以保证翻译的准确性外, 还能调节转录后的基因调控。在酵母、线虫、果蝇和哺乳动物细胞中都发现了影响NMD途径的各种因子, 并且发现NMD途径与一些疾病的发生密切相关。这使得人们设想这些影响因子很有可能作为治疗NMD相关疾病的药物作用靶点, 并设计出一些相应的治疗方案。由于NMD与人类疾病具有密切的关系, 相信对NMD机制

的深入了解将有助于人类了解及治疗自身的疾病。

参考文献(Reference)

- [1] Conti E *et al.* *Curr Opin Cell Biol*, 2005, 17: 316
- [2] Marquat LE *et al.* *Nonsense-Mediated mRNA Decay*, Georgetown, TX: Landes Biosci/Eurekah, 2006, 3
- [3] Frischmeyer PA *et al.* *Hum Mol Genet*, 1999, 8: 1893
- [4] Kuzmiak HA *et al.* *Trends Mol Med*, 2006, 12: 306
- [5] Lejeune F *et al.* *Curr Opin Cell Biol*, 2005, 17: 309
- [6] Chang YF *et al.* *Annu Rev Biochem*, 2007, 76: 51
- [7] Gonzalez CI *et al.* *Gene*, 2001, 274: 15
- [8] Czapinski K *et al.* *Genes Dev*, 1998, 12: 1665
- [9] Kashima I *et al.* *Genes Dev*, 2006, 10: 355
- [10] Baker KE. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16: 293
- [11] Li ZY *et al.* *Curr Med Chem*, 2006, 13: 1693
- [12] Hillman RT *et al.* *Genome Biology*, 2004, 5: R8
- [13] Wagner E *et al.* *J Cell Sci*, 2002, 115: 3033
- [14] Usuki F *et al.* *Mol Ther*, 2006, 14: 351
- [15] Chiu SY *et al.* *RNA*, 2003, 9: 77
- [16] Gatfield D *et al.* *EMBO J*, 2003, 22: 3960
- [17] Zhang J *et al.* *RNA*, 1998, 4: 801
- [18] Zhang J *et al.* *Mol Cell Biol*, 1998, 18: 5272
- [19] Hilleren P *et al.* *RNA*, 1999, 5: 711
- [20] Urlaub G *et al.* *Mol Cell Biol*, 1989, 9: 2868
- [21] Wilkinson MF *et al.* *Nat Cell Biol*, 2002, 4: 144
- [22] Stephenson LS *et al.* *Biochimie*, 1996, 78: 1043
- [23] Khajavi M *et al.* *Eur J Hum Genet*, 2006, 14: 1074
- [24] Rospert S *et al.* *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 2005, 155: 1
- [25] Ainsworth C. *Nature*, 2005, 438: 726
- [26] Kerem E. *Curr Opin Pulm Med*, 2004, 10: 547
- [27] Keeling KM *et al.* In: Maquat LE ed., *Nonsense-mediated mRNA Decay*, Austin, TX: Landes Bioscience, 2006, 121
- [28] Parekh-Olmedo H *et al.* *Gene Ther*, 2005, 12: 639
- [29] Aartsma-Rus A *et al.* *Oligonucleotides*, 2005, 15: 284
- [30] Lew JE *et al.* *Mol Cell Biol*, 1998, 10: 6121
- [31] Mihavet O *et al.* *Pharmacol Rev*, 2003, 55: 629
- [32] Kadlec J *et al.* *Nat Struct Mol Biol*, 2004, 11: 330

Nonsense-mediated mRNA Decay in Eukaryotic Cells

Fei-Hu Xu*, Bao-Qing Xu¹

(Hangzhou Jiuyuan Gene Engineering Co. Ltd, Hangzhou 310018, China;

¹Hangzhou Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310024, China)

Abstract Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) as a mechanism of RNA surveillance, detects mRNAs with premature termination codons (PTC), induces them to be eliminated quickly, and thus protects cells from the potentially deleterious effects of truncated proteins. Although NMD is conserved in eukaryotic cells, there are some slight differences among yeast, mammalian and fruitfly. Structure survey of NMD is ongoing, and the adding results show that NMD involved in some important functions such as telomere regulatory and RNAi.

Key words RNA surveillance; nonsense-mediated mRNA decay; exon-junction protein complex; prematured termination codons

Received: July 24, 2007 Accepted: October 12, 2007

*Corresponding author. Tel: 86-571-86879110, E-mail: tigerxfh@hotmail.com