

文章编号: 1007-7847(1999)04-0286-06

# 真核生物 mRNA 的帽结构与帽结合蛋白\*

李颖, 冯建生

(暨南大学医学院生化教研室, 中国广东广州 510632)

**摘要:** 帽结构是所有 RNA 聚合酶 II 转录产物的特征性结构, 它在 mRNA 的功能和代谢的很多方面起作用. 在这些过程中还离不开相关蛋白质对它的识别和粘附, 作为它行使功能的媒介, 这些蛋白质就称为帽结合蛋白 (Cap-Binding Protein, CBP). 该文主要讨论了帽结构与胞质中的 CBP-eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E, 真核起始因子 4E) 的相互作用在 mRNA 指导的翻译起始中的作用机制, 以及帽结构与核内发现的另一种 CBP 复合体相互作用在 mRNA 加工中的作用.

**关键词:** 帽结构; 帽结合蛋白; RNA 剪接; 真核生物

中图分类号: Q513 文献标识码: A

## The Cap Structure and Cap-Binding Protein of mRNA in Eukaryotes

LI Ying, FENG Jian-sheng

(Biochemical Department of Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China)

**Abstract:** Cap structure is the characteristic of all RNA polymerase II transcripts. It can affect many aspects of the function and metabolism of mRNA. In these processes, being recognized and bound by associated proteins is needed to mediate the functions of the Cap. These proteins are termed Cap-Binding Protein (CBP). The mechanism of action performed by the interaction between Cap and CBP-eIF4E in the initiation of mRNA-directed translation and the role of another newly-found CBP complex played in intranuclear mRNA processing are discussed.

**Key words:** cap structure; cap-binding protein; RNA splicing; eukaryote

### 1 真核生物 mRNA 的帽结构和帽结合蛋白

#### 1.1 帽结构的特征与功能

帽结构是所有 RNA 聚合酶 II 转录产物的特征性结构, 它是由倒转的 7-甲基化鸟苷通过 5'-5' 三磷酸盐桥与转录产物的第一位核苷酸残基连接而成, 表示为  $m^7G(5')ppp(5')$

\* 收稿日期: 1998-09-14; 修回日期: 1999-09-14

作者简介: 李颖(1973-), 女, 湖南长沙人, 硕士研究生; 冯建生(略).

$x^{[1]}$ . mRNA 的加帽反应是与转录同时进行的,是 mRNA 修饰进行得最早的一步,在长约 20 ~ 30 个核苷酸残基的新生转录产物上就可以发现它的存在<sup>[2]</sup>.

帽结构的功能是多方面的.早就证实它可以防止 5' -3' 核酸外切酶对核苷酸链的切割;参加对 mRNA 前体的剪接<sup>[3]</sup>;参与 mRNA 3' 末端多聚腺苷酸化<sup>[4]</sup>;mRNA 从核中输出到胞质中<sup>[5]</sup>;最近又发现帽结构通过 CBP 与 PABP(Poly(A)-Binding protein, Poly(A) 结合蛋白)的相互作用与 Poly(A) 尾形成一个环状结构,通过加强帽结构与 CBP 的亲亲和性和加快核糖体循环而使翻译的效率大幅度提高<sup>[6]</sup>.

## 1.2 CBP 的组成和结构特点

至今已发现了两种 CBP:一种存在于胞质中,即 eIF4E,它的结构和功能已被人们认识了;另一种是最近才被人们发现的一种存在于细胞核内的蛋白质复合体,它的结构和功能还有待深入的研究,被称为帽结合蛋白复合体(Cap-Binding Protein complex, CBC).

### 1.2.1 eIF4E 的结构及其与帽结合的方式

eIF4E 与  $M^7GGDP$  结合的构像已在  $2.2\text{\AA}$  分辨率  $x\text{-ray}$  下被鉴定出来. eIF4E 的  $\alpha, \beta$  亚基组装成一个凹陷的臂,此臂由 8 个弯曲的  $\beta$  片层结构在 3 个长的  $\alpha$  螺旋的基础上组成.它的基底面为凹面,其中有一条长窄的帽结合槽.在槽中有两个具有保守性的色氨酸侧链可以识别  $M^7G$ , 并将其夹在中间.鸟嘌呤可以通过 3 个氢键与槽中一个保守性的谷氨酸的主链和侧链识别、结合,还可以与另一个保守性的色氨酸以范德华力结合<sup>[7]</sup>.这种结构可以解释 eIF4E 与 mRNA 5' 端帽结构在翻译起始时怎样相互识别,也可以证明这种蛋白质分子具有一种系统发育保守性的表面.

### 1.2.2 核内 CBC 的组成

最近发现帽结构在核中的功能都是通过一种 CBC 作为媒介.这种 CBC 最初是在 HELA 细胞核提取物中发现的,它被认为与 mRNA 前体在体外剪接以及 U 系核小核糖核蛋白(U snRNA)出核作用有关.对提纯出来的 CBC 进行同质性分析,发现它是由一个异源二聚体组成的复合物,包括一个  $80 \times 10^3 u$  的 CBP 和一个  $20 \times 10^3 u$  的 CBP 组成.将 CBP80 进行氨基酸序列分析,发现在蛋白质的氨基端存在一个公认的二重核定位信号(NLS).此信号是从胞浆中摄取异源二聚体复合物入核所必需的. CBP20 是通过与 CBP80 共同转运进入核中,如果缺少了 CBP80, CBP20 就无法扩散入核质中<sup>[8]</sup>. CBP20 的基本结构中有一个 RNA 结合域(RNA-binding domain),两种亚基都是与帽结合所必需的,任何一个亚基在其独立存在时都不表现对帽或 RNA 链的亲亲和性.这一发现提示,核内这种 CBC 和 eIF4E 是以不同的方式与帽结构识别、结合的.两种亚基的氨基酸序列在从酵母到哺乳动物中都具有保守性,与 RNA 结合同时对两个亚基的依赖性,使得对 CBC 与帽之间相互作用的结构的研究变得复杂.

## 2 eIF4E 与帽结构在翻译起始中的作用

### 2.1 eIF4E 与帽结构的作用机制

在大多数情况下(帽依赖性翻译),蛋白质的合成是以 eIF4E 与帽结构的相互识别开始的. eIF4E 是 eIF4F 复合体的组成部分, eIF4F 还包括 eIF4G 和 eIF4A(一种依赖 ATP 的解旋酶).帽结构与 eIF4E 结合, eIF4E 与 eIF4G 结合, eIF4G 又与 eIF3 结合,而 eIF3 可以与 40 S 小亚基结合,使其与起始密码子相互识别.见图 1.

eIF4A 可以在 eIF4B 激活下通过 ATP 供能解开帽与 AUG 之间的一段发夹结构, 使起始密码子能被核糖体结合<sup>[9]</sup>. 因为在低等的真核生物中, eIF4A 不能与 eIF4E 共纯化, 我们就不把 eIF4A 当成完整的 eIF4F 复合体的组成部分, 因此不在图上表示出来. 总之, eIF4E 与帽结构的结合提供了一种稳定的蛋白质- mRNA 结合的基础, 在此基础上组装成有功能的起始复合物. 此外, 有资料显示, 通过 eIF4E 与 eIF4G 的结合还可以抑制无帽的 mRNA 的翻译<sup>[10]</sup>.

### 2.2 帽与 eIF4E 结合的调控

eIF4E 在翻译中的关键性作用, 使它成为对基因表达进行调节的极其重要的环节. 转录激活因子 C-MYC 通过与 eIF4E 基因的启动子 E-box 相互作用, 在转录水平调节 eIF4E 的表达<sup>[11]</sup>; eIF4E 的活性还受到翻译后修饰的调控, 其自身的磷酸化可增强它与帽结构和 eIF4G 的结合能力, 从而加速翻译的进程. 在给予细胞以生长因子、激素、有丝分裂原的刺激下, eIF4E 常常在 ser-209 处被磷酸化<sup>[12]</sup>; 在真核生物体内还有一些负调节因子能调节 eIF4E 的活性. 如我们研究得比较多的 4E-BPS(4E-Binding Protein) 家族. 4E-BPS 与 eIF4G 的 N 末端区域有相同的氨基酸序列, 而这一段序列是 eIF4G 和 eIF4E 的结合位点, 所以 4E-BPS 成为了 eIF4G 与 eIF4E 结合的竞争性抑制物. 4E-BPS 对 eIF4E 与帽的结合没有影响, 而且阻止 eIF4F 复合体的组装, 从而抑制帽依赖性翻译. 当 4E-BPS 被磷酸化后, 它就不能与 eIF4E 结合, 使 eIF4E 重新与 eIF4G 组装成有功能的翻译起始复合物<sup>[13]</sup>.

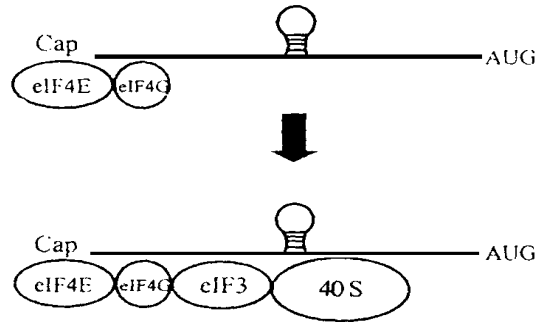


图 1 帽结构激发的翻译起始

EIF4E 通过蛋白质网络之间的相互作用, 指导 40 s 核糖体小亚基组装. 注意图上表示的各蛋白质亚基之大小并未按真实比例画出.

Fig. 1 Cap stimulated translation initiation

eIF4E recruits the 40 s subunit to the mRNA via a network of protein interactions. Note that the relative sizes of the proteins are not drawn to scale.

## 3 核内 CBP 与帽结构在 mRNA 加工中的作用

### 3.1 帽结构与 CBC 在 mRNA 前体剪接中的作用

切除内含子的过程发生在剪接体的核蛋白体复合物中. 在剪接体内发生两个转酯作用使相邻的外显子连接在一起产生成熟的 mRNA, 内含子则形成套索. 剪接体由 5 种 USnRNP(核小核糖核蛋白)和大量的非 USnRNP 剪接因子组成. 内含的位置和长度是由 5' 切割位点、分枝位点、多聚嘧啶片段、3' 切割位点等决定的. 我们对 USnRNP 在内含子的剪接中所起作用了解较多.

很多实验证明, M<sup>7</sup>G 帽对外哺乳动物细胞提取物中进行的 mRNA 前体的有效剪接是必需的<sup>[14, 15]</sup>. 在体外只有单个内含子的 mRNA 前体的剪接可以被加入帽结构类似物而抑制, 这种帽结构的类似物同样可以抑制体外 CBC 与帽的结合. 这就可以说明帽结构及其与 CBC 的结合是 mRNA 前体剪接所必须的. 如果用抗 CBP80 的特异性抗体对 CBC 剪接提纯物进行免疫耗竭, 在此提取物中进行的 mRNA 前体剪接的效率比对照提取物要低 90%, 如果在反应体系中加入细菌中提取的重组 CBC, 剪接的功能可以被保留.

CBC 可以促进  $U_1$ SnRNP 与 5' 供体位点的结合和组装. 由于鉴定技术的发展, 我们可以观察到在剪接体组装过程中产生的一系列中间复合物. 第一个被观察到的复合物称为 E (early) 复合物, 它是由  $U_1$ SnRNP 与 5' 端供体位点进行碱基配对形成的, 它的组成还依赖于分枝位点和多聚嘧啶片段及一些非 SnRNP 蛋白因子. 在这个复合物的基础上又可以加入  $U_2$ SnRNP,  $U_2$ SnRNP 与分枝点序列配对又形成 A 复合物. 成熟的剪接体还须加入  $U_4/U_6$  和  $U_5$  种 SnRNP, 然后释放出  $U_4$ , 在它的内部就可以发生剪接反应了<sup>[16]</sup>. 那么 CBC 是怎样影响剪接复合体的形成的呢? 实验证明, 在 CBC 被免疫耗竭的细胞提取物中,  $U_1$ SnRNP 与 5' 端供体位点的碱基配对连接明显地比对照提取物中减少, 而且即使是与 5' 端供体位点上的  $U_1$ SnRNP 也不能被有效地组装, 从而不能继续加入  $U_2$ SnRNP, 使 A 复合物无法形成<sup>[17]</sup>. 但加入 *E. coli* 中提纯出来的重组 CBC 后, 这些效应都可以被逆转. 以上证据说明 CBC 在  $U_1$ SnRNP 与 5' 端供体位点的缔和中产生了关键性的作用.

为了更好地解释帽结构和 CBC 在 mRNA 剪接中的功能, 我们先介绍一种被普遍接受的外显子限定的模式: 这个模式指出, 外显子的位置和长度的确定, 是靠结合到内含子 3' 末端保守序列的各种因子和穿过与其相邻的外显子下游的另一个内含子 5' 端保守序列上结合的各种剪接因子之间进行协同性相互作用而实现的<sup>[18]</sup> (见图 2A). 至今为止, 已积累了很多证据证明这种模式的正确性. 但是这种模式没有回答处于结构基因两端的外显子是怎样被剪接的. 5' 端第一个外显子有帽结构而没有 3' 端受体位点序列, 最后一个外显子有多聚腺苷酸尾巴而没有 5' 端供体位点序列. 实验发现, 在 HELA 和非洲爪蟾两种细胞提取物中含有两个外显子的 mRNA 前体的剪接只有帽状结构近侧内含子的剪接需要帽结构的存在, 而远侧的那个内含子的剪接显示出不依赖于帽结构的特性<sup>[19,20]</sup>. 以此可以推断帽结构的确是近邻内含子正确剪接所必需, 那么远侧内含子剪接时应该也有一段以上顺式作用序列, 能够代替帽结构的功能. 实验证明, 远离帽结构的内含子 3' 端上游有一段多聚嘧啶序列, 当它发生突变以后, 内含子的剪接不能正确进行. 而为大家所熟知的是内含子 3' 受体位点的突变导致剪接不能正确进行. 由此证明 3' 端受体位点序列和其上游的多聚嘧啶序列代替了帽结构的功能. 反之, 我们也可以推出 5' 端第一个内含子缺少的 3' 端受体位点的功能是帽结构来行使的.

以上分析说明了 CBC 和帽结构在 mRNA 前体剪接中的作用. 下面以图 2 作进一步说明.

此图中帽近端内含子的剪接都是在 CBC 介导下进行的, 图中未将 CBC 表示出来. 外显子以 ■ 表示. 依赖帽结构的剪接以粗黑线表示在 mRNA 之下; 不依赖于帽结构的剪接以细黑线表示于 mRNA 前体之下; X 表示突变; 各保守序列结合因子之间相互作用以识别外显子的作用以虚线标于 mRNA 前体之上; + 表示这种积极作用是有证据证实其存在的. A: 一条有两个内含子的 mRNA,

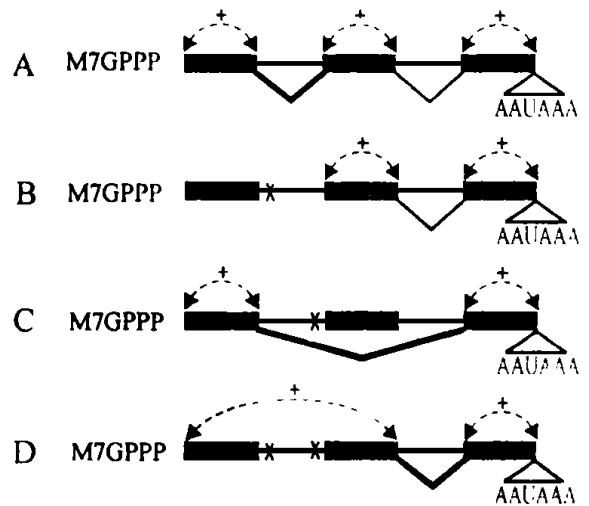


图 2 hnRNA 的不同剪接机制

CBC 使  $U_1SnRNP$  结合于帽近侧 5' 端供位, 对外显子的限定由 3' 受点和下游另一内含子的 5' 供点之间蛋白因子相互协同作用决定. 有证据显示 3' 受点和其上游的嘧啶序列具有激活作用; B: 帽近侧 5' 供点的突变使帽近侧的内含子得不到剪接, 而不影响另一个内含子的剪接; C: 多聚嘧啶序列或 3' 受点的突变, 使剪接跳过中间一个外显子进行. 这种情况下, 发现最近端 5' 供点和最远端的 3' 受点剪接都有 CBC 依赖性, 这更加证明了 CBC 对限定帽近端外显子的关键作用; D: 帽近端内含子 5' 供点和 3' 受点同时突变, 使远端另一个内含子的剪接显示出依赖帽的特性. 这更加证实 CBC 促进  $U_1SnRNP$  与第一个有功能的 5' 供点结合, 而多聚嘧啶序列代替了帽结构的这种功能.

### 3.2 帽结构和 CBC 在 mRNA 3' 端加工中的作用

大部分 mRNA 3' 末端都有 200~250 个核苷酸残基组成的多聚腺苷酸尾. 加尾过程可分为两步: 首先是在 RNA 尾部特定位点发生断裂, 然后是在断裂点多聚腺苷酸化. 两个步骤是紧密偶联的, 而且都对断裂点上游约 10~20 个核苷酸处的 AAUAAA 六聚核苷酸保守序列有不同程度的依赖性.

帽结构和 CBC 的相互作用对加尾的第一步过程, 即 mRNA 尾部的断裂起作用. 这个结论得到以下事实的支持: 用抗 CBP 抗体来耗竭 HELA 细胞提取物中的 CBC, 使具有  $M^7G$  帽结构的 mRNA 前体的裂解被降低到对照提取物的 80%; 而在 HELA 细胞提取物中加入能与帽结构竞争性与 CBC 结合的帽类似物, mRNA 尾部的裂解也被部分地限制, 但两者都不能完全阻止 mRNA 前体的裂解. 如果在这两种系统中加入事先被裂解好的 mRNA 前体, 则它的多聚腺苷酸化可以完全不受影响<sup>[1]</sup>.

此外, 体外合成的 3' 末端加工复合物(即 mRNA 与蛋白因子组成的复合物)在未耗竭 CBC 的提取物中半衰期约为 20 min, 而在耗竭了 CBC 的提取物中的半衰期约为 4 min. 这有力地证明了帽结构与 CBC 加强了 3' 末端加工机制的稳定性.

外显子限定假说认为 3' 末端多聚腺苷酸尾参与了对最末端外显子的限定. 与之相对的是, 最后一个内含子的 3' 受点也可以增加 3' 末端加尾的效率. 这说明最后一个内含子的剪接与 3' 末端加尾是偶联在一起的. 因此我们可以这样理解帽结构和 CBC 的功能: 在没有内含子的 mRNA 前体中, 加尾的过程中依赖帽结构的指导; 在有内含子的 mRNA 前体中, 内含子的多聚嘧啶序列和 3' 受体位点序列代替了帽结构的功能<sup>[1]</sup>.

## 4 结语

CBP 与帽结构的结合的意义在于它能起始一系列有序的蛋白质的结合, 而组成核糖核蛋白纤维作为底物, 以供以后加工、处理的进行. CBC 及其它蛋白因子行使功能的方式很可能是通过一种蛋白质相互作用的网络系统使 mRNA 的各段在空间上相互靠近, 从而有效地进行剪接, 有效地发动翻译的起始. 不过, 由于蛋白质-蛋白质、蛋白质-RNA 之间相互作用的复杂性, 使我们并不能直接明确地得出证据来证明这些作用具体的机制, 给我们的研究带来了相当大的困难. 但目前利用 CBP 的一些突变体进行的研究正在取得突破性的进展, 相信不久的将来, 帽结构与帽结合蛋白的作用机制会得到有效的验证.

### 参考文献:

[1] JOE D, LEWIS J, ELISA I. The role of the cap structure in RNA processing and nuclear export. <http://>

[J]. Eur J Biochem, 1997, 247: 461-469.

- [2] RASMUSSEN E, LIS J. *In vivo* transcriptional pausing and cap formation on three Drosophila heat shock genes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 7923-7927.
- [3] IZAURRALDE E, LEWIS J, McGUIGAN C, *et al.* A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing[J]. Cell, 1994, 78: 657-668.
- [4] COOKE C, ALWING J C. Cap and 3' splice site similarity affect polyadenylation efficiency[J]. Mol Cell Biol, 1996, 16, 2579-2584.
- [5] IZAURRALDE E, LEWIS J, GAMBERI C, *et al.* A cap-binding protein complex mediating USnRNA export[J]. Nature, 1995, 376: 709-712.
- [6] WEI CC, BALASTA M L, REN J, *et al.* Wheat germ poly (A) binding protein enhances the binding affinity of eukaryotic initiation factor 4F and (iso) 4F for cap analogues[J]. Biochemistry, 1998, 37: 1910-1916.
- [7] JOSEPH M, GINGRAS A-C, SONENBERG N, *et al.* Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP[J]. Cell, 1997, 89: 951-961.
- [8] FURUICHI LAFIANDRA A, SHATKIN A J. 5' Terminal structure and mRNA stability[J]. Nature, 1997, 266: 235-239.
- [9] MATHEWS M B, SONENBERG N, HERSHEY J W B. Origins and targets of translation control in translation control[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996. 31-39.
- [10] TARUN S Z, SACHS A B. Binding of eukaryotic translation initiation factor 4E(eIF4E) to eIF4G represses translation of a capped mRNA[J]. Mol Cell Biol, 1997, 17(12): 6876-6886.
- [11] JONES R M, BRANDA J, JOHNSTON K A, *et al.* An essential E box in the promoter of the gene encoding the mRNA cap-binding protein (eIF4E) is a target for activation by c-myc[J]. Mol Cell Biol, 1996, 16: 4754-4764.
- [12] JOSHI B, CAI A L, KEIPER B D, *et al.* Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E at ser-1[J]. J Biol Chem, 1995, 270: 14957-14603.
- [13] HERSHEY J W B, MATHEWS M B, *et al.* mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth[A]. Translation Initiation[M] New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 1996. 245-269.
- [14] KRAINER A, MANIATIS T, RUSKIN B. Normal and mutant human  $\beta$ -globin pre-mRNAs are faithfully and efficiently spliced *in vitro*[J]. Cell, 1984, 36: 993-1005.
- [15] KONARSKA M, PADGETT R, SHORP P. Recognition of cap structure in splicing *in vitro* of mRNA precursors[J], Cell, 1984, 38, 731-736.
- [16] MOOR M, QUERY C, SHARP P. Splicing of precursors to messenger RNAs by the spliceosome in The RNA World[A]. GESTELAND R, ATDINS J. The RNA Word[C]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. 303-347.
- [17] LEWIS J D, IZAURRALDE E, JARMOLOUSKI A, *et al.* A nuclear cap-binding complex facilitates association of USnRNP with the cap proximal 5' splice site[J]. Genes & Dev, 1996, 1683-1698.
- [18] ROBBERTSON B L, COTE G J, BERGET S M. Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons[J]. Mol Cell Biol, 1990, 10: 84-94.
- [19] PATZELT E, TAHLMANN E, HARTMUTH K. Assembly of pre-mRNA splicing complex is cap dependent[J]. Nucleic Acids Res, 1987, 1387-1399.
- [20] INOWE K, OHNO M, SAKAMOTO H, *et al.* Effect of the cap structure on pre-mRNA splicing in xenopus oocyte nuclei[J]. Genes & Dev, 1989, 3: 1472-1479.
- [21] ALAN B SACHS, PETER S, MATTHIAS W. Hentze. Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes[J]. Cell, 1997, 89(13): 831-838.