

研究报告

核仁小分子 RNA^①

屈良鹄

(中山大学生命科学学院生物工程研究中心 广州 510275)

关键词 核仁小分子 RNA(snoRNA) 内含子(intron) 基因(gene) 核糖体(ribosome)
真核生物(eukaryote)

在真核生物细胞中,除了人们所熟悉的 rRNA, mRNA 和 tRNA 之外,还存在着许多小分子 RNA^[1,2],如核小分子 RNA (snRNA),核仁小分子 RNA(snoRNA)以及细胞过程中的调控活动,具有十分重要的生物学意义^[3,4]。核仁小分子 RNA 是一大类 RNA 分子,其大小一般在几十到几百个核苷酸,它们能与特定的蛋白质(如 Fibrillarin 或 Th/To 自身免疫抗原等)

相结合生成 snoRNP,在细胞中稳定存在,并且富集于核仁区,所以被称为核仁小分子 RNA^[5]。snoRNA 与在 mRNA 加工中起作用的 U1, U2 等 snRNA 相比,在结构特征、细胞中定位等方面都有显著的差别,并且执行完全不同的功能,所以是两类不同的小分子 RNA(见表 1)。

表 1

	snoRNA	snRNA
细胞中定位	核仁	核质
功能	核糖体生物合成	mRNA 前体剪接
种类	U3, U8, U13……	U1, U2, U4……

一、snoRNA 命名系统

目前,虽然尚未有系统的 snoRNA 命名方法,但是,在脊椎动物中新发现的 snoRNA 一般都是以 U 系列(如 U14, U15……)来命名^[5]。这是第一个哺乳动物的 snoRNA(U1)被鉴定时给予的编号方式。因为当时认为,在这类 RNA 中,U 核苷酸的含量较高。事实上,U 系列的编号方式与这些新发现的 snoRNA 中 U 的含

量再无任何关系。在 U 系列中,U1、U2、U4、U5、U6、U7、U11、U12 都是核小分子 RNA;而 U3、U8、U13、U14 - U31 都是核仁小分子 RNA。在酵母中,有两种命名方式:1. 按照小分子 RNA 二维聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱来命名(如 snR3、snR4 等)。2. 按小分子 RNA 的核苷酸长度,如 snR128, snR190 等。这一方法已不再使用。在其它生物中,如果发现了与脊椎动物同源的 snoRNA,也采用相同的命名方式。

① 国家杰出青年基金资助

如酵母 snR128 由于与脊椎动物 U14 是同源分子,所以现改名为酵母 U14snoRNA。按照核仁小分子 RNA 的名称,可以很快地在国际分子生物学数据库中查到它们对应的序列,但是也有一些酵母小分子 RNA 的序列迄今尚未公开(如 snR20 等)。由于新的 snoRNA 的数目还在迅速增加,有时,不同的实验室给同一种 snoRNA 不同的名字,或者不同的 snoRNA 被给予相同的名字;此外,上述命名方法不能有效地反映出 snoRNA 的来源和性质,所以已有人建议采用新的 snoRNA 命名方法。

二、snoRNA 的分布

SnoRNA 广泛地存在于从哺乳动物到单细胞酵母等各种真核生物中^[5]。在不同的生物中,snoRNA 的数量或种类都可能有一定的差别。但是,人们已经发现:一部分 snoRNA(如 U3、U14、U18、U24 等,已经被发现存在于各种真核生物中,它们的分子结构在进化过程中具有强烈的保守性^[6]。最近,在一种古细菌(*Sulfolobus acidocaldarius*)中,也发现了与 U3 snoRNA 相类似的小分子 RNA^[7]。但是,在真细菌中尚未有任何类似的报道。

三、snoRNA 的基因与表达

snoRNA 的基因有两种类型:1. 完全独立的基因(由 RNA 聚合酶 II 或 III 转录),它们编码 U3、U8、U13 等 snoRNA;2. 特殊的内含子序列。大部分新发现的 snoRNA(如 U14 - U31)都是由某些基因中的一段特殊的内含子编码的。于是,这些基因被称为 snoRNA 的宿主基因(host gene)。snoRNA 的宿主基因多为细胞中高效表达的看家基因(如核糖体蛋白质基因)。但是,一些宿主基因并不编码蛋白质,仅编码一些功能尚不清楚的 RNA。内含子序列编码的 snoRNA 的发现,是 90 年代初真核生物分子生物学的一个重大进展^[8]。虽然,过去已在内含子中发现了一些蛋白质的编码区(如成熟酶);但是,这些蛋白质仅仅与内含子本身活动有关,对细胞的生长繁殖并没有什么意义。

由内含子编码的一些 snoRNA(如 U14 等),已被发现具有重要的生物学功能(如参与 rRNA 的加工等)。内含子序列编码 snoRNA 的现象并不是偶然的,它已被发现广泛地存在各种不同的生物中。即使象基因组中内含子较少的单细胞生物酵母,也存在许多内含子核仁小分子 RNA^[6,9]。

长期以来,内含子 DNA 被认为是“无用 DNA”^[10],内含子编码的 snoRNA 发现,指出了这种观点的片面性。同时,这也导致了人们对真核生物基因的结构和表达更加深入地研究。由于内含子编码的 snoRNA 没有自身的启动子,它们的表达完全依赖于宿主基因的转录,然后再进一步加工成熟,这是一种新的基因表达方式。snoRNA 与宿主基因表达的关系尚不清楚,国际上已提出两个模型^[11,12]。模型 1(核酸内切酶模型)认为,内含子 snoRNA 转录后加工与宿主基因的 mRNA 前体剪接有密切关系,甚至是相互抑制的;而模型 2(核酸外切酶模型)则认为,内含子 snoRNA 的加工仅仅与内含子 RNA 的套索结构(lariat)的分解有关,而与 mRNA 前体的剪接并没有什么直接关系。目前,模型 2 已获得更多的实验证据的支持。按照模型 2, mRNA 前体中的内含子 snoRNA 能够很快地与特异的蛋白质结合,在内含子以套索结构方式加工以后, snoRNA 位于套索结构之内,必须等到套索结构分解后, snoRNA 前体才能够被特定的核酸外切酶进一步加工修饰,生成成熟的 snoRNA,并趋向和定位于核仁。

snoRNA 的基因组织在生物进化过程中并不稳定。已经发现,在不同的生物物种中,一种 snoRNA(如 U21)可以由同一种宿主基因的不同内含子编码^[13];甚至还可以有完全不同的宿主基因^[14]。这意味着 snoRNA 基因的移动或转座性。

在哺乳动物中,大部分新发现的 snoRNA 都是由内含子编码的;但是,在酵母中却存在大量独立基因编码的 snoRNA。尤其是一种在脊椎动物中是由内含子编码的 U14 snoRNA^[15],在酵母中却是由独立基因编码的^[16]。这一现

象,反映出 snoRNA 基因组织在进化过程中丰富的多样性。这一多样性对于研究真核生物基因的起源和结构进化具有重要意义。

四、snoRNA 的数目及分类

迄今为止,新发现的 snoRNA 已达 40 余种(1995 年底^[5]),主要是来自脊椎动物和酵母(见表 2)。在一种生物细胞中,究竟有多少种 snoRNA? 目前尚未有准确的数字。根据各种方法推算,大约在 50-100 余种,大大超出过去估计的数目。采用各种方法来发现和鉴定新的 snoRNA 是当前该领域中国际竞争激烈的一个前沿。

按照结构的特点, snoRNA 可以被分成两

大类:1. 序列中包含 boxC 和 boxD 类型,如 U3、U8、U13、U14 等。该类 snoRNA 具有一个共同特征,在它们的序列中包含 UGAUGA(boxC)和 CUGA(boxD)这两个保守的结构元素,因此能与一种核仁蛋白 fibrillarin 相结合^[17]。除此之外,大部分该类 snoRNA 都有一段与 rRNA 互补的序列(长度在 10-21 个核苷酸)和 5'-3'端碱基配对区(能形成一个较为稳定的二级结构)。2. 序列中不包含 boxC 和 boxD 类型,如 E1(U17)、E2、E3、U19、U23、snR30-37 等,大部分这类 snoRNA 的 3'端都有 ACA 三核苷酸,并且能够形成相似的二级结构。但是,这类 snoRNA 在序列上的相互差异很大,因此有可能包含多种类型的 snoRNA。

表 2a:脊椎动物 snoRNAs

snoRNA	大小	TMG 帽	Box 元素	rRNA 互补	内含子编码
U3	206—228	+	A.B.C.D.	-	-
U8	136—140	+	C.D.	-	-
U13	105	+	C.D.	+	-
U14	86—96	-	C.D.	+	+
U15	145—150	-	C.D.	+	+
U16	106	-	C.D.	+	+
U17(E1)	205—221	-	-	-	+
E2	154	-	-	-	-
E3	135	-	-	-	-
MRP	260—280	-	-	-	-
U18	67—70	-	C.D.	+	+
U19	200	-	-	-	+
U20	80	-	C.D.	+	+
U21	93	-	C.D.	+	+
U22	125	-	C.D.	-	+
U23	147	-	-	-	+
U24	77	-	C.D.	+	+
U25		-	C.D.	+	+
U26		-	C.D.	+	+
U27		-	C.D.	+	+
U28		-	C.D.	+	+
U29		-	C.D.	+	+
U30		-	C.D.	+	+
U31		-	C.D.	+	+

TMG:trimethylguanosine,参考文献^[5,20]

表 2b: 酵母 snoRNAs

snoRNA	大小	TMG 帽	Box 元素	rRNA 互补	内含子编码
U3	333	+	A. B. C. D.	-	-
U14	125—128	-	C. D.	+	-
U18	102	-	C. D.	+	+
MRP	340	-	-	-	-
snR3	194	+	-	-	-
snR4	192	+	-	-	-
snR5	198	+	-	-	-
snR8	189	+	-	-	-
snR9	187	+	-	-	-
snR10	245	+	-	-	-
snR11	258	+	-	-	-
snR13	124	+	C. D.	-	-
snR30	605	+	-	-	-
snR31	222	+	-	-	-
snR32	188	+	-	-	-
snR33	183	+	-	-	-
snR34	203	+	-	-	-
snR35	204	+	-	-	-
snR36	182	-	-	-	-
snR37	386	+	-	-	-
snR38	~93	-	C. D.	+	+
snR39	~85	-	C. D.	+	+
snR40	95	-	C. D.	+	+
snR41	110	-	C. D.	+	+
snR39b	96	-	C. D.	+	-
snR189	192	+	-	-	-
snR190	191—194	-	C. D.	-	-

TMG: trimethylguanosine, 参考文献^[5]

五、snoRNA 的结构与功能

鉴于许多 snoRNA 能与核糖体 RNA 或核糖体亚基相结合以及核仁定位等特点, 一般认为它们在核糖体生物合成中起作用, 是一类核酸调控分子, 但是, 除了 U3 等少数几种 snoRNA 外, 大部分新发现的 snoRNA 的确切功能还有待进一步研究。目前, 对 snoRNA 的功能研究和推测主要在以下三个方面:

1. 参与 rRNA 的加工: 最近已有实验证据

证明^[5], 至少有以下 6 种 snoRNA 直接参与大分子 rRNA 的加工。U3 参与了 rRNA 前体的 ETS 5' 端早期切割; U8 和 RNase MRP 在 28S rRNA 3' 端和 5.8S rRNA 的加工中起作用; U14、U22 和 snR30 则是 18S rRNA 5' 和 3' 端形成的必要因子。毫无疑问, 一些 snoRNA 是 rRNA 加工体系的必要组成, 这对于认识 rRNA 的加工机制来说, 是一个突破性的进展。进一步的研究可能会揭示出更多的 snoRNA 在

rRNA 加工中的作用。

2. 指导 rRNA 中甲基化位点的形成:在许多包含 boxC 和 boxD 的 snoRNA 中,都有一段与大分子 rRNA 互补的序列(长度为 10—20 核苷酸)。通过比较分析,人们注意到,与 snoRNA 互补的大分子 rRNA 序列有两个显著的特点。1. 它们都是 rRNA 的核心序列,在进化中较为保守。2. 在这些序列中常常包含一些甲基化的核苷酸(主要是 2'-氧-核糖甲基化)。于是,便推测 snoRNA 与 rRNA 中核苷酸的甲基化形成的密切的联系。目前,这一推测已经获得了结构分析的证据和遗传实验结果的支持^[18,19]。snoRNA 指导 rRNA 中核苷酸甲基化位点的形成,这是新发现的 snoRNA 功能,它的机制和意义及其应用前景引起人们的广泛注意。

3. rRNA Chaperon^[9,20]:许多包含 boxC 和 boxD 的 snoRNA,由于具有一段与大分子 rRNA 互补的核苷酸序列,能够在确定的位置上与 rRNA 结合,这种结合有可能影响 rRNA 及其前体的高级结构的形成以及与核糖体蛋白质的结合等。现在已经发现数量众多的包含 boxC 和 boxD 序列的 snoRNA,它们与大分子 rRNA 互补的核苷酸序列以相当密集的方式覆盖了大分子 rRNA 大部分高度保守的核心序列。推测这类 snoRNA 不仅在 rRNA 甲基化方面起作用,而且对于指导大分子 rRNA 及其前体正确的构象形成也可能具有重要意义(即 RNA chaperon 的概念)。这一推测还有待理论和实验的进一步证明。

酵母是一种良好的遗传材料。采用同源重组的方法,可以十分准确地失活酵母中某一个 snoRNA 基因,考察其对酵母生长的影响。用这一方法,已发现许多 snoRNA 并不是酵母生存必需的基因。目前已知的酵母生存必须 snoRNA 只有 U3、U14、MRP 和 snR30,它们都参与 rRNA 的切割加工。

六、前景

目前,snoRNA 研究是分子生物学中一个正在迅速发展的领域。继续发现和鉴定新的

snoRNA,研究内含子编码的 snoRNA 的表达机制以及 snoRNA 结构与功能的关系是该领域中的前沿。我国已开展 snoRNA 的研究,并已在植物(水稻)和酵母 snoRNA 新基因的发现方面取得重要进展^[21,22]。尤其是在水稻热激蛋白(Hsp 70)基因第一个内含子中发现多个 snoRNA 的现象,为研究内含子 snoRNA 表达提供了一个新的系统^[23]。

正如 snRNA 的发现及研究为 mRNA 前体内含子的加工机制奠定了基础相类似,一系列 snoRNA 的发现及在核糖体生物合成过程中作用的确定正在为阐明真核生物 rRNA 的加工机制开辟道路。人们期待通过对 snoRNA 全面和深入的研究将能解决 rRNA 复杂的加工体系,甲基化形成,构型转变等一系列重大难题。snoRNA 基因在生物进化过程中的丰富的多样性,促使人们从新的角度更加全面地认识真核生物基因的结构,组织及基因表达的新的机制。同时,由于 snoRNA 是一类新的核酸调控分子,它们的结构与功能关系的阐明,不仅对认识核糖体生物合成这一复杂体系有重大意义;而且还为人工合成具有新功能的重组 snoRNA 奠定基础。新的重组 snoRNA 将可能作为一种新的工具,在基因调控和基因治疗中有重要的应用前景。

参考文献

- [1] Birstiel M L, 1988. Small nuclear ribonucleoprotein particles. Springer Verlag, Berlin
- [2] Baserga S J, J. A. Steitz. 1995. The diverse world of small ribonucleoproteins. In The RNA world (ed. Gesteland, R. and J. F. Atkins) 359-381. Cold Spring Harbor, New York, CSP press
- [3] Guthrie C., B Patterson. 1988. Annu. Rev. Genet. 22: 387-419
- [4] Barbars S. W. Cell. 1993, 75(5):403-405.
- [5] Maxwell E S, Fournier M. J. Ann Rev Biochem 1995, 35:897-934
- [6] Qu LH, et al. Nucleic Acids Res 1995, 23:2669-2676
- [7] Potter, S., P. Durovic, P. P. Dennis. 1995. Science, 268:1056-1060
- [8] Mount S, Current Biol., 1993, 3(6):372-374

- [9] Bachelier J P, et al. 1995 TIBS, 20:261-264
- [10] Nowas R, Science, 1994. 263:608-620
- [11] Caffarelli E., et al. Mol. Cell. Biol., 1994. 14:2966-2974
- [12] Kiss T, Filipowicz W. Gene & Dev 1995. 9:1411-1424
- [13] Qu LH, et al. Nucleic Acids Res, 1994, 22:4037-4081
- [14] Renalier, M. L. et al. FEBS Lett. 1996. 379:212-216
- [15] Liu J, Nucleic Acids Res. 1990. 18:6565-6571
- [16] Zagorsky, J., et al. Mol. Cell. Biol 1998. 8:3282-3290
- [17] Baserga, S. J., EMBO J. 1991. 10:2645-2651
- [18] J. P. Bachelier, et al. J. Mol. Biol. 1996. 260(in press)
- [19] T Kiss, et al. 1996. Cell (in press)
- [20] Tycowski K T, et al. Science, 1995, 270:1626-1627
- [21] 屈良鹤, 钟翎, 施苏华, 陆勇军, 周惠, 中山大学学报 (自然科学版), 1996. 35(3):1-6
- [22] 屈良鹤, 陆勇军, 钟翎, 周惠. 施苏华, 1996, 27snoRNA. 酵母中一种新的核仁小分子 RNA. 第六次全国基因结构, 表达与调控学术讨论会论文集 D-4
- [23] 屈良鹤, 钟翎, 施苏华, 陆勇军, 周惠, 方荣祥, 王群, 1996, 水稻 Hsp70 基因的第一号内含子编码 2 种核仁小分子 RNA. 第六次全国基因结构, 表达与调控学术讨论会论文集 D-5

Delta 着眼于公司的 rDNA 的蛋白大市场

美国 Ohmeda Health Care 的 Delta Biotechnology Unit 的测试并上市公司的用基因工程酵母制造的重组人白蛋白(rHA)的计划正在迅速向前。目前,白蛋白只来源于人血清,并存在污染的可能,作为天然产物,其供应受供血源波动的影响。

近来,Delta 完成 I 期 rHA 研究,以高达 50g 的剂量给予健康的志愿者。研究的一组为:静脉注射,每周注入 25 g,共 4 周。Delta 公司指出,即使在这样大的剂量下,也未见毒性及其他问题。通常,人血清蛋白(HSA)用于外伤病人的剂量为 12 g,因而 Delta 公司确信,rHA 在人中,可安全地高于治疗用量而不会有严重的副作用。

Delta 也是首家投资于重组人血蛋白的公司。这家以前属于 Bass pLc(美国)和 Storoh 啤酒公司的公司,用 rDNA 酵母生产白蛋白和人血球蛋白。

Delta 计划与几家大保健品公司共同开发他的产品,尤其是把血球蛋白作为携带氧的代血制剂,但包括 Bass 在内的大多数啤酒厂决定放弃 生物技术分部时,这项计划就此中止。于是以 4100 万美元的价格,把 Delta 出售给拥有 Ohmeda 的 BOC 集团,使这一最先进的白蛋白计划得以保留,但中断了血球蛋白技术的开发。

Ohmeda 公司在英国诺丁汉的生产设施正在生产人白蛋白。这些设施的结构与生产 HSA 的相同。但纯化上有所不同,终产物不需化学处理或改性。所用纯化系统所得到的产品中只有不到十亿分之二的酵母蛋白。虽说计划寻求 rHA 的一切可能用途,但尚未有列入排名榜首的治疗用途。