

原核生物 mRNA 稳定性的分子机制

钟珍萍*

(中国科学院发育所, 北京 100080)

原核生物通过快速繁殖来适应生存, 这决定了其 mRNA 稳定性通常远远次于真核基因 mRNA, 半衰期仅 0.5—50min。细胞如何在这么短时间内迅速降解大量的 mRNA 分子呢? 通过哪些机制来实现各 mRNA 之间的稳定性有如此精细的差异? 就目前所掌握的资料来看, 这是由 mRNA 自身的序列元件、细胞内核酸酶、核糖体以及结合蛋白共同完成的^[1]。

1、序列元件

调控 mRNA 寿命的大量顺式元件已被鉴定, 可分作稳定子和不稳定子两类, 前者通常具有茎环结构, 而后者常包含核酸内切酶的识别位点。

茎环结构是研究得较为深入的 mRNA 稳定性调控元件, 它一方面可以阻碍核酸外切酶通过而保护 mRNA, 但另一方面又可作为 RNase⁻、RNaseE 的识别位点。而且, 如果它位于 5'UTR, 可能通过干扰核糖体 mRNA 的结合而影响翻译起始, 进而调控 mRNA 稳定性。目前有关 5'UTR 调控 mRNA 稳定性的研究以原核较真核深入^[5]。

原核细胞中 AUUUA 序列对 mRNA 稳定性的调控也有一些报道。Murray 等^[10]发现细菌的杀虫蛋白(Bt 蛋白)基因在植物中表达时其转录本很不稳定, 估计与 mRNA 具有大量 AUUUA 序列有关。

至于 poly(A) 尾, 虽然早在发现真核 mR-

NA 具有 poly(A) 之前 10 年就已经从 *e. coli* 中分离出了一种 poly(A) 聚合酶, 但由于一直未能成功地从中检测到具有 poly(A) 尾的 RNA, 由此认为 poly(A) 只是真核 mRNA 所特有。不过, 这一看法现在必须有所更新。已发现大肠杆菌中广泛存在由 *pcnB* 基因编码的 poly(A) 聚合酶催化的 mRNA poly(A) 化, 而且这 poly(A) 化加速了 mRNA 的降解, 推测 poly(A) 可能有助于 PNRase 等一种或数种核酸外酶靠近转录本 3' 端^[4, 12]。

2、核酸酶

尽管已从 *E. coli* 中鉴定出了许多种不同的核酸酶, 但其中只有少数参与降解 mRNA, 包括内切酶 RNaseE, RNaseK, RNase⁻ 及 3' 5' 外切酶 RNase⁻ 和多核苷酸磷酸化酶 (polynucleotide phosphorylase, PNPase)。

RNase E 和 RNaseK 对 mRNA 的降解是许多 *E. coli* mRNA 降解的限速步骤, 但有关它们的特异性切割位点尚知之不多, 只知道它们可优先切割 RNA 内二级(或三级)结构之间很短的单链 AU 富含序列, 且两种酶活之间有一定关联—它们均受一种跨膜蛋白 hmpI (high molecular-weight protein) 的影响以及细菌生长速度的调节。目前虽然已得到这两种酶的部分纯化产品, 但对它们的生化特性仍不甚了解。

RNase⁻ 的切割位点在 RNA 内的双链区(如茎环结构的茎)内, 但由于 RNase⁻ 的主要

* 中国科学院发育生物研究所植物发育分子生物分子实验室博士毕业生, 现福建农业大学作物科学学院分子遗传学副教授, 福州 350002

作用在于对 RNA 的加工, 因此它对 mRNA 的降解作用则相当有限。

RNase 和 PNPase 作为 3' 5' 外切酶从 mRNA 3' 端开始降解, 当然, 这种降解作用可能被茎环结构所阻碍。E. coli 中 90% 的核酸外切活性是 RNase⁺, 而革兰氏阳性菌枯芽孢杆菌 (Bacillus subtilis) 中却是 PNPase 占绝对优势。

此外, E. coli 中还有其它(包括一些尚未发现的)参与降解 mRNA 的 RNase, 如在一些 Py-A 二核苷酸处切割的 RNase M, 特异切割 RNA 寡核苷酸片段的 RNase^{*} (RNase 在胞质中的形式)^[9]。而且, 在 T4 噬菌体感染的细胞中, 至少有一种由 T4 噬菌体编码的核酸酶(即 Reg B 蛋白)参与降解, 其切割位点为

GGAG。由于该四聚体常存在核糖体结合位点 SD 序列内, 故此处的切割无疑为 T4 噬菌体灭活宿主 mRNA 铺平了道路^[11]。

3、结合蛋白

根据我们的检索, 目前尚未见到有关原核 mRNA 稳定性调控元件的结合蛋白得以明确鉴定的报道, 大多仍是间接的论据及推测, 大致包括以下几点: ①PNPase 和 RNase 对同一茎环结构有不同的敏感性意味着酶的作用是主动的, 而非完全靠 RNA 的自然解链; ②具有不同的热力学稳定性的茎环结构其阻碍外切酶的作用能力并不一定相同; ③茎环结构在体外对外切酶的阻碍能力比在体内相对较小。

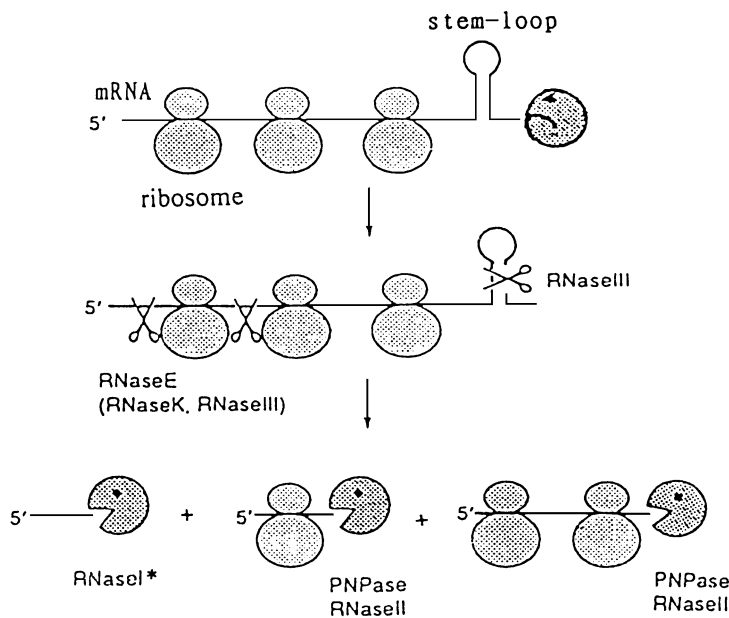


图 1 影响原核 mRNA 稳定的几种机制

4、核糖体

对原核细胞中核糖体调控 mRNA 稳定性的研究较真核细胞相对深入。而且与真核系统不同的是, 原核细胞中极少证据支持核糖体与 mRNA 的偶联促进了 mRNA 降解, 相反, 原核

细胞中的核糖体常起保护 mRNA 的作用。证据是, 无论是阻止翻译起始的春日霉素(kasugamycin)还是促使核糖体提早从 mRNA 释放的嘌呤霉素, 都会导致 mRNA 不稳定; 而导致核糖体滞留进而使肽链延伸受阻的氯霉素或四环素, 则使 mRNA 变得稳定。其原因之一可能是

由于核糖体屏蔽了内切酶的靶位点^[1]。当然,也应考虑到这些翻译抑制子同时可能引起转录提早终止,而提早终止的转录本是极不稳定的,这或许是因为其 3' 末端不具备茎环结构的保护作用^[3]。

综上所述,可用下图简单表示影响原核 mRNA 稳定性的主要机制(图 1)。
综合现有资料看来,检测 mRNA 稳定性的方法大致可归纳为 6 种(参见下表)。

表 2 检测真核 mRNA 稳定性的常见方法一览表(8)

方法	优点	缺点	备注
[5, 6- ³ H] 尿苷脉冲示踪法	所测的半衰期是真实的	灵敏度低; 标记内源 UTP 或 CTP 费时	适于检测丰度高且稳定性好的 mRNA, 如卵黄原蛋白 mRNA
将体外转录的 ³² P-RNA 注射入细胞	同上	体外转录的 RNA 缺乏结内常有 RNA 修饰, 而且 mRNA 非通过正常生理通道进入细胞, 由此可能影响结果准确性; 合适的细胞体系很少; 工作强度大	从技术上考虑, 爪蟾卵最适于作宿主细胞, 但 mRNA 在其中的稳定性可能与在体细胞中不同
运用诱导型启动子	对转录的诱导及关闭相对迅速	需要血清刺激或热激诱导启动子	Hsp40 和 C-fos 启动子常被应用
通过药理作用终止转录	快速终止; 适用于所有基因	细胞代谢受干扰使许多 mRNA 因此明显趋于稳定	常用放线菌素 D 和 DRB
比较转录速率和 mRNA 累积水平	适于所有基因	非直接测定 mRNA 稳定性	RNA 加工或转运过程的变化同样会影响 mRNA 累积水平, 所以必须结合其他实验证据方可定论
用无细胞体系进行体外 RNA 降解分析	容易操作; 降解的中间产物易于鉴定; 可用于纯化核酸酶或其它反式作用因子	这种体系较难建立	该体系的各种生理指标应尽可能与体内一致

在确定了 mRNA 的稳定性之后, 下一步的工作就是鉴定相关的顺式作用元件及反式作用因子鉴定顺式作用元件时, 除了直接利用业已存在的导致 mRNA 稳定性变化的自发突变体外, 还可通过缺失和点突变技术人为创造突变体。为了确证假定的调控元件是否与 mRNA 稳定性直接相关, 可使该调控元件与一作为标记的转录本连接成杂合 mRNA, 而后再检测其稳定性, 这一方法已被成功地运用于多种调控元件的鉴定^[2, 6, 7]。

对 mRNA 反式作用因子的研究虽然已走出沉寂, 但技术上仍没有大的突破。目前普遍采用的仍是凝胶阻滞电泳和紫外交联等技术。无细胞体系的建立^[3]以及 Northern-Western 印迹技术的开发无疑使这一局面有所改善, 但由于这两项技术有其特有的材料、技术要求, 就我

们检索的文献看来, 其在 mRNA 反式作用因子研究方面的应用还有一定局限。

参考文献

[1] Belasco J. G. J., and Brawerman G., 1993. Control of messenger RNA stability. Academic Press, Inc. California, USA: 3- 144.

[2] Blowers A. D., Klein U., Ellmore G. S., et al. 1993. Functional in vivo analysis of the 3' flanking sequences of the Chlamydomonas chloroplast rbcL and psaB genes. Gen Genet 238: 339- 349

[3] Brewer G., 1991. An A+ U-rich element RNA binding factor regulates c-myc mRNA stability in vitro. Mol. Cell Biol 11: 2460- 2466.

[4] Cohen S. N., 1995. Surprises at the 3' end of prokaryotic RNA. Cell, 80: 829- 832.

[5] Emory S. A., Bouvet P., and Belasco J. G., 1992, A 5' (terminal stem-loop structure can stabilize mRNA in E. coli. Genes Dev. 6, 135-148.

- [6] Gallie D. R. , and Young T. E. , 1994. The regulation of gene expression in transformed maize aleurone and endosperm protoplasts. *Plant physiol* 106: 929– 939.
- [7] Hehl A. , Vassella E. , Braum R. , et al. , 1994. A conserved stem-loop structure in the 3' untranslated region of procyclin mRNAs regulates expression in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 370– 374.
- [8] Hentze M. W. , 1991. Determinants and regulation of cytoplasmic mRNA stability in eukaryotic cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1090: 2810– 292.
- [9] Kimelman D. , and kirschner M. W. , 1989. An anti-sense mRNA directs the covalent modification of the transcript encoding fibroblast growth factor in *Xenopus* oocytes. *Cell* 59: 687– 696.
- [10] Murray E. E. , Rocheleau T. , Eberle M. , et al. , 1991. Analysis of unstable RNA transcripts of insecticidal crystal protein genes of *Bacillus thuringiensis* in transgenic plants and electroporated protoplasts. *Plant Mol. Biol.* , 16: 1035– 1050.
- [11] Uzan M. , Favre R. , and Brody E. , 1988. A nuclease that cuts specially in the ribosome binding site of some T4 mRNAs. *Proc. Natl. acad. sci. USA* , 85: 8895– 8899.
- [12] Xu F. , and Cohen S. N. , 1995. RNA degradation in *Escherichia coli* regulated by 3' adenylation and 5' phosphorylation. *Nature* , 374: 180– 183.

Stability of mRNA in protokaryote

Zhong Zhenping

(Institute of Developmental biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract Stability of mRNA in prokaryote is affected by mRNA sequence, nucleases, ribosomes and mRNA binding proteins. Stem loop structure, AUUUA sequence and poly(A) tail regulate the stability of mRNA. Many kinds of nucleases, including RNase E, RNase K, RNase etc, also participate in reducing mRNA's life, but their acting mechanisms are different. Researchers suppose that mRNA binding proteins in prokaryote regulate mRNA's stability. Ribosomes are generally believed to protect mRNA and retard its decomposition. In the end of this paper, we list some methods which used to frequently study the stability of mRNA.

(接第 54 页)

ing and molecular biology, and basis of studying the structure and function of genes. Human genome project compel us to develop high-speed DNA sequencing. Except that classical methods have been improved in detail, a few new DNA sequencing methods arise, such as capillary array electrophoresis , ultrathin slab gel electrophoresis, sequencing by hybridization, mass spectrometry, atomic probe microscopy and single molecule fluorescence detection in flowing sample streams.

Key words DNA Sequencing, Capillary Array Electrophoresis, Mass Spectrometry, Atomic Probe Microscopy, Sequencing by Hybridization.