

文章编号: 1004-0374(2010)07-0710-07

## SR 蛋白家族在 RNA 剪接中的调控作用

邵 伟, 樊玉杰, 徐永镇\*

(中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态学研究所,  
中国科学院昆虫发育与进化生物学重点实验室, 上海 200032)

**摘 要:** SR 蛋白家族成员都具有一个富含丝氨酸/精氨酸(S/R)重复序列的 RS 结构域, 在 RNA 剪接体的组装和选择性剪接的调控过程中具有重要的作用。绝大多数 SR 蛋白是生存的必需因子, 通过其 RS 结构域和特有的其他结构域, 实现与前体 mRNA 的特异性序列或其他剪接因子的相互作用, 协同完成剪接位点的正确选择或促进剪接体的形成。深入研究 SR 蛋白家族在 RNA 选择性剪接中的调控机制, 可以促进以疾病治疗或害虫防治为目的的应用研究。该文总结了 SR 蛋白家族在基础研究和应用方面的进展。

**关键词:** SR 蛋白家族; RNA 剪接; 选择性剪接

**中图分类号:** Q52    **文献标识码:** A

## Function of SR protein family in pre-mRNA splicing

SHAO Wei, FAN Yu-jie, XU Yong-zhen\*

(Laboratory of Insect Development and Evolution Biology, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

**Abstract:** Members of SR protein family, consist of at least one RS domain that enriched with serine/arginine repeats, have been demonstrated to play important roles in both assembly of spliceosome and regulation of alternative splicing. Most of them are essential for high eukaryotes. They interact with specific RNA regions of pre-mRNA or other splicing factors through their RNA binding domain and RS domain, contributing to intron selection and facilitating spliceosome assembly. Address functions of SR proteins in the regulation of alternative splicing will benefit many studies, such as disease therapy and pest control.

**Key words:** SR protein family; RNA splicing; alternative splicing

### 1 RNA 剪接

1977年, Richard J. Roberts 和 Phillip A. Sharp 各自报道了“断裂基因”的存在, 即基因是由外显子(exon)和内含子(intron)组成的, 其中的内含子不编码入最终的蛋白质<sup>[1,2]</sup>。在真核生物基因的表达过程中, 通过转录形成包含所有外显子和内含子的前体 mRNA (pre-mRNA)。前体 mRNA 再通过剪接体(spliceosome)促进的两步酯交换反应, 切除内含子和连接相邻的两个外显子。该过程被称为 RNA 剪接(RNA splicing), 是真核生物生长发育的必需调控步骤<sup>[3]</sup>。

剪接体的沉降系数大约为 60 S, 它的形成需要五种富含尿嘧啶核苷的小核糖核酸(U1、U2、U4、

U5和U6 small nuclear Ribonucleic acid, snRNA)和超过150种蛋白因子的协同参与(本文只讨论参与绝大多数基因剪接的major spliceosome)。每种snRNA都结合有多种蛋白, 形成稳定的 snRNP, 在其他剪接因子协助下, 经过一系列复杂的 RNA-蛋白质重排和构象变化, 组装成具有催化活力的剪接体<sup>[4]</sup>。

RNA 剪接对于真核生物的基因表达具有重要的意义, 不编码的内含子需要通过 RNA 剪接被精确而高效的去除, 才能最终形成具有正常功能的蛋白

收稿日期: 2009-11-03; 修回日期: 2010-04-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(30873366)

\*通讯作者 E-mail: yz xu@sippe.ac.cn

质。越是高等的生物, 含有内含子的基因以及每个基因包含的内含子数目越多。另外更为重要的是, 高等生物中普遍存在着RNA选择性剪接(alternative splicing)现象, 即一个基因转录的前体 mRNA 可以被剪接成多种产物(isoforms)。通过选择性剪接, 同一个基因在上游调控元件不同的情况下可以产生功能有差异的多种蛋白质, 有的甚至多达上万种, 如人类中的 *Dscam* 基因<sup>[5,6]</sup>。哺乳动物中的代谢和发育等过程无论在种类和复杂程度上都要远远超过低等的真核生物, 但是目前的研究表明人类基因组中的基因数量只有大约2.5万个, 线虫(*C. elegans*)的基因数约为2.2万个, 连低等的单细胞真核生物芽殖酵母(*S. cerevisiae*)基因也有6 000个左右<sup>[7]</sup>。最近的转录组高通量测序结果分析显示, 在人类基因组中, 约95%的基因都会发生选择性剪接<sup>[8,9]</sup>。这从某种程度上解释了为什么生物中编码蛋白质的基因数量并没有因为物种的进化而显著加大。RNA 选择性剪接增加了高等生物的基因表达复杂程度, 对于高等生物的细胞分化和器官发育等复杂的生物学过程具有重要调控作用。

前体 mRNA 自身序列中含有一些保守的剪接顺式作用元件, 例如, 剪接位点所在的内含子 5' 端 GU 和 3' 端的 AG 共有序列; 作为 RNA 剪接化学催化反应“启动者”, 位于内含子 3' 端上游约 100 个核苷酸处的剪接支点(branch site, adenosine)及其附近的保守序列; 支点区域与 3' 端之间的多嘧啶区域(polypyrimidine tract, PPT)。此外, 外显子和内含子的内部还有一些促进或抑制剪接的序列(enhancer and silencer), 剪接调控因子与这些序列的识别对于选择性剪接起到重要的调控作用<sup>[3]</sup>(图1)。

剪接体的组装起始于 U1 snRNP 和 5' 端剪接位点的相互作用, 形成 Complex E (early complex)。这时 3' 端剪接位点附近也与一系列蛋白相结合, 其中 SF1 (BBP) 与支点区域结合, U2AF65 与多嘧啶区域结合, U2AF35 与 3' 剪接位点结合。随后, 在一些蛋白因子的协助下, U2 snRNA 通过碱基配对与支点区域相结合, 形成稳定的 Complex A。此后 U4/U5/U6 tri-snRNP 加入, 经过一系列构像变化, U1 和 U4 snRNP 从复合体中解离, 剪接体由 Complex B 过度到具有催化活性的 Complex C<sup>[10,11]</sup>。在剪接体复杂的动态变化过程中, 一类 ATP 水解酶, 同时又是 RNA 解螺旋酶的蛋白因子起到了重要的作用, 它们同属于 DExD/H 蛋白超家族, 利用 ATP 水解产生的能量改变剪接体内部的大分子构像。其中 Prp5 参与预剪接体 Complex A 的形成, 并对 RNA 剪接的保守性和灵活性具有重要的调控作用<sup>[12]</sup>。

## 2 SR 蛋白家族

20 世纪 90 年代初, 在鉴定与剪接体可相互作用的蛋白因子时发现了参与 RNA 剪接的 SR 蛋白<sup>[13,14]</sup>, 它们共同的特征是都具有 1~2 个 RS 结构域和结合 RNA 的结构域, 其中 RS 结构域由富含丝氨酸/精氨酸(S/R)的重复序列组成。目前研究发现, 生物中存在数量繁多的具有 RS 结构域的蛋白, 其中高等生物中参与 RNA 剪接的约有 50 种。根据这些蛋白所含 RS 结构域的特征和其他结构域的功能可分为三类: (1) 经典 SR 蛋白目前发现有 7 种。这一类 SR 蛋白的 RS 结构域在其 C 端, N 端则含有 1~2 个 RRM (RNA-recognition motif)。经典 SR 蛋白都可以被单克隆抗体 mb104 识别, 同时参与组成型和选择性 RNA 剪接。SF2/ASF 是第一个被鉴定出在组成型和

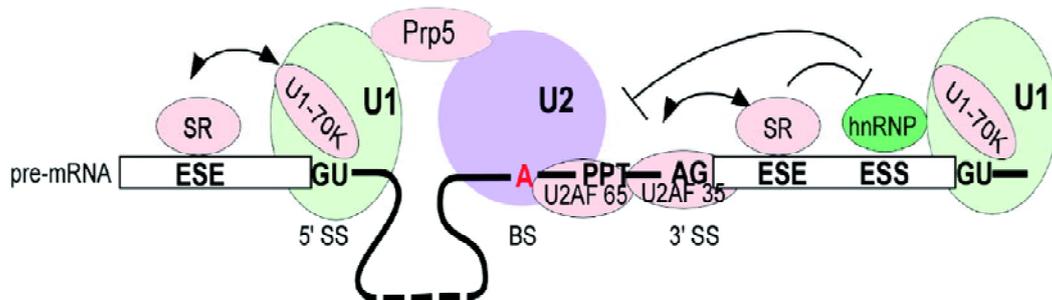


图1 SR 蛋白参与 RNA 剪接位点的识别和剪接体的组装

(淡红色显示的是 SR 蛋白家族成员。ESE: 外显子剪接增强子; ESS: 外显子剪接抑制子; SS: 剪接位点; PPT: 多嘧啶区; BS: 剪接支点区域)

选择性剪接中都起着重要作用的经典SR蛋白<sup>[15]</sup>。(2)SR类似蛋白。这一类蛋白数量较多,和经典的SR蛋白非常相似,也具有RS结构域和结合RNA的结构域,但是SR类似蛋白要么不被mb104单克隆抗体识别,要么仅仅参与组成型或选择性剪接中的一种。SR类似蛋白中结合RNA的结构域,除了RRM外还有其他类型,如SRm160在N端的PWI结构域,通常认为PWI的功能是与DNA或者RNA结合<sup>[16]</sup>。(3)其他含有RS结构域的蛋白。这一类蛋白具有RS结构域,同时还含有其他不同功能的结构域,如Prp5有ATPase/helicase结构域,Clk/Sty-1有kinase结构域。

RS结构域的丝氨酸/精氨酸重复序列中的丝氨酸残基是多种蛋白激酶的作用底物,这些位点在体内存在广泛的磷酸化修饰,其磷酸化和去磷酸化形式的转换可以调控SR蛋白与其他蛋白质或RNA之间的相互作用,影响RNA剪接的结果<sup>[17,18]</sup>。例如,在细胞分裂间期SRp38主要以磷酸化的形式存在,而在有丝分裂期SRp38主要以去磷酸化的形式存在。在进行有丝分裂时,去磷酸化的SRp38可以抑制 $\beta$ -珠蛋白等前体mRNA的剪接,而磷酸化的SRp38则不具有该作用。SRp38的磷酸化可以促进其与Tra2a的相互作用并抑制其与U1-70K的相互作用,而SRp38的去磷酸化则抑制其与Tra2a的相互作用并促进其与U1-70K的相互作用<sup>[19]</sup>。另外,RS结构域的磷酸化状态对于SR蛋白在细胞中的定位也具有重要作用<sup>[20]</sup>。

SR蛋白中RRM的主要功能是识别并结合RNA,通常是识别位于外显子中的剪接增强子(exonic splicing enhancer, ESE)。无论在组成型剪接还是选择性剪接中,SR蛋白结合RNA的能力对于SR蛋白行使功能是必需的<sup>[21]</sup>。RS结构域对于组成型剪接似乎是必需的,但对于选择性剪接则可能是非必需的<sup>[22]</sup>。目前的一种可能解释是,在选择性剪接中,缺失RS结构域的SR蛋白依然可以和抑制RNA剪接的蛋白因子竞争性地结合前体mRNA上的剪接信号,对剪接依然起到一定程度的正调控作用<sup>[23]</sup>,但是详细的作用机制还有待进一步的研究。为了找到SR蛋白特异性结合的RNA序列,很多实验室采用SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)方法寻找到很多SR蛋白的特异性结合序列<sup>[24]</sup>,但近年来,紫外交联和免疫共沉淀(cross-linking and immunoprecipitation, CLIP)作为

一种新的研究蛋白质和RNA相互作用方法被广泛采用。通过紫外线照射使目的蛋白与其结合的RNA形成共价交联,然后与目的蛋白质免疫共沉淀的RNA经测序得到具体的RNA序列,这样可以研究活体中目的蛋白与RNA的具体相互作用关系<sup>[25]</sup>。此前的研究表明很多SR蛋白的功能是冗余的,但是随着很多SR蛋白的RNA特异性结合位点的发现,显示出SR蛋白对于RNA剪接的调控也具有特异性。目前已经鉴定出18种SR蛋白可以识别特异的RNA序列<sup>[26]</sup>,在这里不作细致的介绍。

对于SR蛋白的研究也随着生物信息学的发展而逐渐深入。为了寻找脊椎动物神经系统中对基因选择性剪接起重要调控作用的SR蛋白,Calarco等<sup>[27]</sup>首先通过生物信息学,利用RS结构域的共同特征设计程序在基因组水平筛选出112种新的含有RS结构域的基因。根据是否含有结合RNA的结构域,发现其中的40种蛋白可能与RNA剪接相关。然后利用芯片技术,分析这些基因在小鼠的不同细胞和组织中的表达情况,发现有一个基因的表达在时空分布上呈现出非常有意思的特征。该基因在9.5~14.5d的胚胎和富含神经的器官中高量表达,结合其他实验,研究者鉴定出一种在小鼠神经系统组织特异性的RNA选择性剪接调控因子nSR100。nSR100可以激活神经系统中特异的nPTB表达,并和nPTB共同结合到前体mRNA上,调控一系列基因在神经系统中特异性的选择性剪接,对神经细胞的分化起到重要作用<sup>[27]</sup>。这种新方法对于筛选新的SR蛋白,研究其在RNA剪接中的具体功能提供了非常值得借鉴的思路。

### 3 SR蛋白在剪接体组装中的作用

RNA剪接是通过剪接体催化完成的,剪接体是由多种蛋白质和RNA构成的动态复合体,在组装过程中经历了复杂的蛋白质与蛋白质之间,蛋白质与RNA之间的相互作用。组装的起始阶段,U1 snRNP结合到5'端的剪接位点区,U2AF65、U2AF35分别结合到多嘧啶区和3'端剪接位点区。其中U1-70K(U1 snRNP的组成蛋白)以及U2AF65/35都属于SR蛋白(图1),这些蛋白在预剪接体组装中具有重要作用<sup>[28]</sup>。另外,在整个剪接体组装过程中,多数促进大分子构象变化的ATP水解酶/RNA解螺旋酶,如Prp5、Prp16、Prp22和Prp28都含有RS结构域,是SR蛋白家族成员。其他还有很

多保守的SR蛋白对于预剪接体的组装也具有重要作用。例如,人类细胞中的SC35、ASF/SF2和9G8对于起始剪接体的组装是必需的。

#### 4 SR蛋白在剪接位点识别和选择性剪接中的作用

高等真核生物细胞中,很多基因具有多个内含子,且大部分内含子的长度在1 kb以上,而外显子则相对较短(100~300 bp)。RNA剪接过程中对5'端和3'端剪接位点的识别,确定各个外显子和内含子边界(exon and intron definition)是进行精确和高效RNA剪接的前提<sup>[26]</sup>。前体mRNA具有很多RNA剪接所需的保守序列和区域,同时,前体mRNA上还具有很多RNA剪接的调控序列,如外显子和内含子中各自的剪接增强子和抑制子;但是,仅仅具有这些调控元件对于招募和组装剪接体是不够的,这些调控元件必须通过与剪接调控因子相互作用,才能完成剪接位点的识别和确定,最终在该位置引入剪接体进行RNA剪接。这些RNA序列与剪接调控因子间的相互作用是选择性剪接得以发生的前提,剪接调控因子中非常重要的一类就是SR蛋白。通常SR蛋白等可以结合到外显子的剪接增强子(ESE)上,促进剪接,hnRNP蛋白等可以和剪接抑制子(ESS)结合,抑制剪接。有趣的是SR蛋白很少结合到内含子上的剪接调控序列上<sup>[28]</sup>。对此,目前还没有合理的解释。

在高等生物中,前体mRNA上具有多个剪切位点,各个剪接位点自身和上下游RNA序列综合起来表现出的RNA剪接信号强度有着很大的差异,SR蛋白通过与其他蛋白因子相互作用,通过结合特异性的RNA序列可以改变某些剪接位点的剪接信号强度。多数情况下SR蛋白的结合可以提高原本较弱的剪接信号,从而改变剪接位点的选择<sup>[29]</sup>。例如在果蝇性别决定途径中,*double sex*基因在雌雄个体中的表达不同是通过选择性剪接调控实现的,属于SR蛋白家族的TRA在雌果蝇的亚型可以结合和增强*double sex*的第4个外显子附近的剪接信号,从而使第4个外显子进入编码序列;在雄果蝇中的TRA亚型则不能结合第4个外显子附近的剪接信号,使第4个外显子作为内含子的一部分被切除。这样雌雄果蝇中*double sex*基因通过SR蛋白的调控作用,形成不同的选择性剪接产物,并进一步调控下游雌雄相关性状的发育<sup>[30]</sup>。

对于SR蛋白调控RNA剪接目前有两个假说模型。一个模型是:先结合到前体mRNA上的SR蛋白可以招募U1 snRNP到5'剪接位点区域,U2AF复合物到3'剪接位点区域,促进剪接体的组装。另一种模型是:SR蛋白结合到外显子剪接增强子上可以拮抗抑制剪接的蛋白因子(如hnRNP)对剪接的抑制作用。这两种模型也许可以同时起作用<sup>[28]</sup>。

#### 5 SR蛋白的其他功能

##### 5.1 SR蛋白在基因转录和RNA剪接偶联中的作用

基因的转录和RNA的剪接在真核生物基因表达中都是非常关键的步骤。目前研究发现RNA剪接和转录在空间和时间上是紧密偶联在一起的,一些重要的剪接因子,如SR蛋白就可以率先识别并结合刚刚转录出的前体mRNA上暴露出来的剪接信号,同其他的RNA结合蛋白竞争,使RNA剪接得以顺利地进行,因此这种偶联具有非常重要的意义。

研究发现SR蛋白可以和RNA聚合酶II(Pol II)的C端结构域(CTD)相互作用。加州大学圣地亚哥分校的傅向东实验室发现SR蛋白SC35是重要的剪接因子,同时也在某些基因的转录延伸中起着重要的作用,从而将基因转录与RNA剪接偶联起来。他们将小鼠胚胎纤维原细胞中的SC35敲除,可以观察到Pol II聚集在基因上,再加入体外表达的SC35可以使Pol II恢复正常。他们还发现敲除SC35导致的Pol II聚集这一现象是由于蛋白激酶P-TEFb无法被募集到CTD上,进而减弱了CTD相应位置上的丝氨酸磷酸化,而该丝氨酸磷酸化的作用是促进转录的延伸。所以,SC35在剪接体组装和转录延伸中都具有重要作用,在时间和空间上偶联基因转录和RNA剪接<sup>[31]</sup>。

哈佛大学医学院的Robin Reed实验室用质谱分析人类RNA聚合酶II免疫共沉淀的蛋白,发现很多的SR蛋白都可以和RNA聚合酶II结合,其中包括剪接因子SF2/ASF、9G8、Tra2 $\alpha$ 、Tra2 $\beta$ 和U1 snRNP中的一些SR蛋白等。这些SR蛋白剪接因子结合到RNA聚合酶II上,从而可以高效的结合新转录的前体mRNA,增强5'剪接位点的识别效率和提高剪接速度<sup>[32]</sup>。

在选择性剪接过程中,SR蛋白介导的基因转录和RNA剪接的偶联同样重要。根据动力学模型,5'非翻译区(5'-UTR)中不同的启动子可以影响转录延伸的速度,从而使强度不同的剪接位点暴露的时间

长短不同, 影响到 SR 蛋白对各个剪接位点信号的识别, 最终导致在选择性剪接水平上的差异。因此, 转录延伸的速度可以调控 SR 蛋白和剪接体对剪接信号的识别进而决定特定外显子是否被选择性剪接<sup>[33]</sup>。

## 5.2 SR 蛋白在发育和疾病中的作用

作为基因表达调控的重要元件, 已经发现 SR 蛋白与人类多种疾病的产生相关联。SR 蛋白是一些疾病发生的关键因素, 如原癌基因和抑癌基因的调控因子。最近的研究表明, 经典的 SR 蛋白 SF2/ASF 可以调控原癌基因 *Ron* 的选择性剪接, 而 *Ron* 的不同选择性剪接产物和肿瘤细胞的迁移有着直接的关系<sup>[34]</sup>。另外, 通过基因敲除实验, 发现 SF2/ASF 对小鼠的心脏发育有着重要的影响, 并证明 SF2/ASF 对于心脏发育的重要基因 *CaMKII $\delta$*  的选择性剪接起到调控作用<sup>[35]</sup>。由于 SR 蛋白在选择性剪接中主要是以剂量依赖的形式发挥作用, 因此如果改变 SR 蛋白的表达水平, 或改变 SR 蛋白的修饰水平, 就可能改变 SR 蛋白特异性调控的基因, 进而影响到细胞的增殖和分化。实验证明, 在多种肿瘤细胞中已经发现 SR 蛋白或者磷酸化 SR 蛋白的激酶表达水平发生了显著变化<sup>[28]</sup>。

致病基因的点突变或片段缺失等会导致 RNA 选择性剪接信号发生变化, 从而缺失或增加某种 SR 蛋白, 进一步使该致病基因的选择性剪接产物发生变化, 导致疾病的发生。比如脊髓型肌萎缩 (spinal muscular atrophy, SMA) 主要是由 *SMN* 基因的突变导致的, 虽然这种突变没有改变氨基酸的编码, 但是最终影响了 *SMN* 基因的选择性剪接<sup>[36]</sup>。

因此, 虽然没有证据表明 SR 蛋白家族成员是直接的致病因素, 但是 SR 蛋白在多种疾病相关基因的表达中具有重要的调控作用。由于 SR 蛋白在调控基因表达中的特异性, 因此对于 SR 蛋白的研究, 可能会为研究疾病的产生和治疗提供新的思路<sup>[28]</sup>。

## 6 SR 蛋白与生物进化的关系

同一种 SR 蛋白在不同生物中尽管同源性很高, 但也存在一些差异, 其中一个表现是 RS 结构域的长短和复杂性上不一致。例如: 参与预剪接体组装的 Prp5, 它的人类同源蛋白含有较长的 RS/RD 结构域, 在裂殖酵母 (*S. pombe*) 中的 RS 结构域则较短, 而在芽殖酵母 (*S. cerevisiae*) 中则根本不含 RS 结构域 (图 2)。

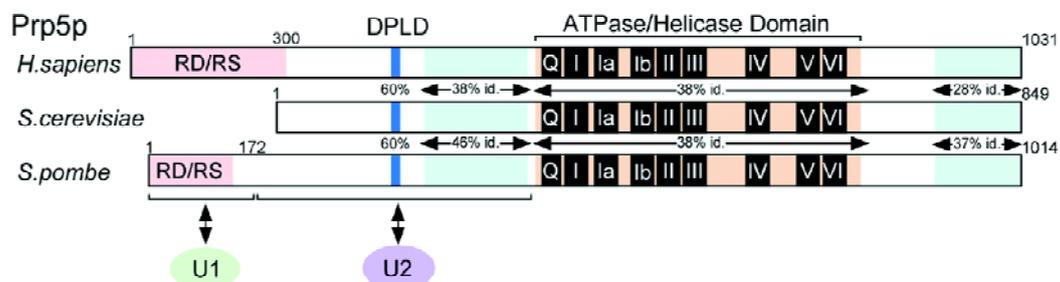


图2 三个物种中的Prp5的结构域比较示意图

研究发现人类和裂殖酵母 Prp5 的 N 端 RS 结构域和 U1 snRNP 相互作用, 中部的 DPLD motif 与 U2 SnRNP 相互作用, C 端则是 ATPase/helicase 结构域<sup>[37]</sup>。这一特点与各个物种的内含子数量和调控程度强弱相吻合。人类约有 20 万个内含子, 95% 的基因存在选择性剪接; 裂殖酵母中约有 5 000 个内含子, 屈指可数的基因存在选择性剪接, 而芽殖酵母中只有 300 个左右的内含子, 几乎不存在选择性剪接 (表 1)。目前的解释是越高等的生物, 需要调控的 RNA 剪接事件越多, 相对应需要越多的调控因子, 如 SR 蛋白, 并且 SR 蛋白的 RS 结构域越复

表1 三个物种中的内含子数量比较

	芽殖酵母 <i>S. cerevisiae</i>	裂殖酵母 <i>S. pombe</i>	人类 <i>H. sapiens</i>
总基因数	~6 000	~6 000	~25 000
具有内含子的基因数	~250	~2 252	~19 475
总内含子数	~322	~4 766	~190 159
内含子数/基因	~0.05	~0.8	~7.6

杂。其他的 SR 蛋白家族成员, 如 Prp16、Prp22、U2AF、SF2/ASF 等也存在类似的现象。

## 7 SR蛋白调控RNA剪接的应用

### 7.1 在疾病治疗研究中的应用

目前针对RNA选择性剪接调控因子的研究相对比较清楚的主要分为两类,一类是SR蛋白家族,大多数起着正调控的作用;另一类是与SR相拮抗的hnRNP蛋白,主要起着负调控作用。SR蛋白行使功能通常是通过其RRM结合到特异性的RNA序列上,通过RS结构域与蛋白质或者RNA相互作用,但是RRM与RNA的结合并不紧密,而且其结合特异性并不高。最近美国北卡大学的Wang Zefeng实验室报道了利用与RNA紧密特异性结合的PUF结构域(pumilio and fem-3结合因子)和SR蛋白或hnRNP的相关结构域构建出人工的RNA剪接调控因子,导入癌细胞中,可以人为控制*Bcl-x*基因的选择性剪接。*Bcl-x*基因的两种选择性剪接产物在细胞凋亡过程中起到的作用不同,较长的剪接产物抑制细胞凋亡,而较短的剪接产物促进细胞凋亡。他们发现人工构建的RNA剪接调控因子能够特异性增加*Bcl-x*基因较短剪接产物的生成,加快癌细胞的凋亡速度,并可以有效地提高药物杀死癌细胞的效率<sup>[38]</sup>。

### 7.2 在害虫防治研究中的应用

昆虫的性别决定途径是由多步骤的RNA选择性剪接级联反应调控的,果蝇中的研究清晰的证明了这一点。研究人员一直希望通过控制昆虫的性别来达到防治害虫的目的。“携带显性致死基因昆虫释放(RIDL)”策略是在实验室中培养携带性别关联致死基因的转基因害虫,释放到自然界中与野生害虫交配,产生的后代中某一种性别的害虫全部致死,从而达到控制害虫种群密度的目的。例如,2009年,Fu等报道将四环素诱导的转录激活因子(tTAV)置于其自身结合位点tetO控制的启动子下游,形成了一个负调控的致死系统。在缺乏四环素的情况下,tTAV与tetO结合表达高浓度的具有毒性的tTAV;相反在有四环素的情况下,竞争性抑制tTAV与tetO的结合,限制了毒性蛋白的表达。同时利用地中海实蝇(*Ceratitiscapitata*)性别决定途径中的选择性剪接信号达到性别筛选的目的,即在tTAV的编码阅读框内加入了地中海实蝇*Tra*的雌特异性内含子片段,该片段在雌性个体中被当作内含子切除,使tTAV在雌性中正常表达,最终导致雌性个体死亡;相反,在雄性个体中,RNA剪接信号不被识别,该内含子片段被保留导致翻译提前终止,无正常的具有毒性的tTAV表达,雄性个体生

存正常。该方法已成功制备出了地中海实蝇的性别特异性致死系统<sup>[39]</sup>。

## 8 展望

关于SR蛋白的研究存在三个层次上的科学问题:(1)如何筛选和鉴定SR蛋白。随着新技术的发展和成熟,针对各个物种的转录本高通量测序和不同组织的蛋白质组研究深入,全基因组范围筛选SR蛋白成为可能,预计不久的将来会鉴定出大量的SR蛋白。(2)如何研究和确定SR蛋白在RNA剪接中的作用机制。一方面可以利用紫外交联和免疫共沉淀技术鉴定SR蛋白结合的RNA序列特异性,寻找某个生命代谢或调控途径中该SR蛋白可能作用的下游靶基因;另一方面通过对SR蛋白磷酸化等修饰作用的研究或其他上游调控因子的研究,有利于阐明某个生命代谢途径的整个调控机制。当然,关于SR蛋白作用机制的具体研究将会有助于丰富和理解RNA剪接的整个过程,以及回答RNA剪接和基因的转录是怎样偶联的等科学问题。(3)如何利用该机制进行更多的诸如疾病治疗和害虫防治等方面的应用研究。SR蛋白是RNA剪接,特别是选择性剪接的重要调控因子,许多重要基因的表达需要RNA选择性剪接调控,同时很多疾病的产生是由于RNA剪接发生紊乱导致的。因此,在各种SR蛋白作用机制的深入研究基础上,通过基因工程的手段,改变SR蛋白或它的作用底物,将可以进行更多方面的应用研究。

### [参 考 文 献]

- [1] Chow LT, Gelin RE, Broker TR, et al. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell*, 1977, 12: 1-8
- [2] Berget SM, Moore C, Sharp PA. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74: 3171-5
- [3] Black DL. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem*, 2003, 72: 291-336
- [4] Staley JP, Guthrie C. Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell*, 1998, 92: 315-26
- [5] Schmucker D, Clemens JC, Shu H, et al. *Drosophila* Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell*, 2000, 101: 671-84
- [6] Wojtowicz WM, Flanagan JJ, Millard SS, et al. Alternative splicing of *Drosophila* Dscam generates axon guidance receptors that exhibit isoform-specific homophilic binding. *Cell*, 2004, 118: 619-33
- [7] Blencowe BJ. Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell*, 2006, 126: 37-47

- [8] Wang ET, Sandberg R, Luo S, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*, 2008, 456: 470–6
- [9] Pan Q, Shai O, Lee LJ, et al. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet*, 2008, 40: 1413–5
- [10] Moore MJ, Proudfoot NJ. Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell*, 2009, 136: 688–700
- [11] Wahl MC, Will CL, Luhrmann R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*, 2009, 136: 701–18
- [12] Xu YZ, Query CC. Competition between the ATPase Prp5 and branch region-U2 snRNA pairing modulates the fidelity of spliceosome assembly. *Mol Cell*, 2007, 28: 838–49
- [13] Fu XD, Maniatis T. Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. *Nature*, 1990, 343: 437–41
- [14] Fu XD, Maniatis T. Isolation of a complementary DNA that encodes the mammalian splicing factor SC35. *Science*, 1992, 256: 535–8
- [15] Krainer AR, Conway GC, Kozak D. Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells. *Genes Dev*, 1990, 4: 1158–71
- [16] Szymczyna BR, Bowman J, McCracken S, et al. Structure and function of the PWI motif: a novel nucleic acid-binding domain that facilitates pre-mRNA processing. *Genes Dev*, 2003, 17: 461–75
- [17] Sanford JR, Ellis J, Caceres JF. Multiple roles of arginine/serine-rich splicing factors in RNA processing. *Biochem Soc Trans*, 2005, 33: 443–6
- [18] Shen H, Green MR. RS domains contact splicing signals and promote splicing by a common mechanism in yeast through humans. *Genes Dev*, 2006, 20: 1755–65
- [19] Shin C, Feng Y, Manley JL. Dephosphorylated SRp38 acts as a splicing repressor in response to heat shock. *Nature*, 2004, 427: 553–8
- [20] Lin S, Xiao R, Sun P, et al. Dephosphorylation-dependent sorting of SR splicing factors during mRNP maturation. *Mol Cell*, 2005, 20: 413–25
- [21] Caceres JF, Krainer AR. Functional analysis of pre-mRNA splicing factor SF2/ASF structural domains. *EMBO J*, 1993, 12: 4715–26
- [22] Zhu J, Krainer AR. Pre-mRNA splicing in the absence of an SR protein RS domain. *Genes Dev*, 2000, 14: 3166–78
- [23] Zhu J, Mayeda A, Krainer AR. Exon identity established through differential antagonism between exonic splicing silencer-bound hnRNP A1 and enhancer-bound SR proteins. *Mol Cell*, 2001, 8: 1351–61
- [24] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 1990, 249: 505–10
- [25] Ule J, Jensen K, Mele A, et al. CLIP: a method for identifying protein-RNA interaction sites in living cells. *Methods*, 2005, 37: 376–86
- [26] Chen M, Manley JL. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10: 741–54
- [27] Calarco JA, Superina S, O'Hanlon D, et al. Regulation of vertebrate nervous system alternative splicing and development by an SR-related protein. *Cell*, 2009, 138: 898–910
- [28] Lin S, Fu XD. SR proteins and related factors in alternative splicing. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 623: 107–122
- [29] Kornblihtt AR, de la Mata M, Fededa JP, et al. Multiple links between transcription and splicing. *RNA*, 2004, 10: 1489–98
- [30] Cline TW, Meyer BJ. Vive la difference: males vs females in flies vs worms. *Annu Rev Genet*, 1996, 30: 637–702
- [31] Lin S, Coutinho-Mansfield G, Wang D, et al. The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, 15: 819–26
- [32] Das R, Yu J, Zhang Z, et al. SR proteins function in coupling RNAP II transcription to pre-mRNA splicing. *Mol Cell*, 2007, 26: 867–81
- [33] de la Mata M, Alonso CR, Kadener S, et al. A slow RNA polymerase II affects alternative splicing *in vivo*. *Mol Cell*, 2003, 12: 525–32
- [34] Ghigna C, Giordano S, Shen H, et al. Cell motility is controlled by SF2/ASF through alternative splicing of the Ron proto oncogene. *Mol Cell*, 2005, 20: 881–90
- [35] Xu X, Yang D, Ding JH, et al. ASF/SF2-regulated CaMKII $\delta$  alternative splicing temporally reprograms excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Cell*, 2005, 120: 59–72
- [36] Pedrotti S, Bielli P, Paronetto MP, et al. The splicing regulator Sam68 binds to a novel exonic splicing silencer and functions in SMN2 alternative splicing in spinal muscular atrophy. *EMBO J*, 2010, 29: 1235–47
- [37] Xu YZ, Newnham CM, Kameoka S, et al. Prp5 bridges U1 and U2 snRNPs and enables stable U2 snRNP association with intron RNA. *EMBO J*, 2004, 23: 376–85
- [38] Wang Y, Cheong CG, Hall TM, et al. Engineering splicing factors with designed specificities. *Nat Methods*, 2009, 6: 825–30
- [39] Shen HM. Activation-induced cytidine deaminase acts on double-strand breaks *in vitro*. *Mol Immunol*, 2007, 44: 974–83
- [39] Fu G, Fondon KC, Epton MJ, et al. Female specific insect lethality engineered using alternative splicing. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 353–7