

第 15 章 mRNA 加工 II：加帽和多聚腺苷酸化

本章主要介绍了真核生物 mRNA 转录后加工的两个关键步骤：加帽（Capping）和多聚腺苷酸化（Polyadenylation），以及这些过程如何与转录和剪接协同进行。

知识点及逻辑关系

1. 加帽 (Capping)

- **是什么？** 在 mRNA 分子的 5' 端加上一个特殊的结构，称为“帽子”（Cap）。
 - **结构：** 帽子是一个甲基化的鸟嘌呤（7-甲基鸟苷，m7G），通过一个特殊的 **5'-5' 三磷酸键** 与 RNA 转录本连接。
 - **合成：** 加帽过程涉及多个酶的催化，包括 RNA 三磷酸酯酶（RNA triphosphatase）、鸟苷转移酶（guanylyl transferase）和甲基转移酶（methyl transferase）。
 - **何时何地？** 加帽通常在真核细胞中发生得很早，常常在 pre-mRNA 长度达到 **30nt** 之前。在一些病毒中，如胞质多角体病毒（CPV），转录甚至依赖于加帽，加帽在第一个磷酸二酯键形成后就发生了。在腺病毒（adenovirus）中，主要的晚期 pre-mRNA 帽子在链长约 70nt 之前添加。加帽发生在细胞核内，与转录偶联。

小荷才露尖尖角，早有蜻蜓立上头。刚出聚合酶被加帽~
- **功能 (Functions of Caps):**
 - 保护 mRNA 免受降解 (protect mRNAs from degradation)。帽子结构可以保护 mRNA 免受从 5' 端开始降解的核糖核酸酶（RNases）的作用。
 - 增强 mRNA 的可译性 (enhance mRNAs translatability)。帽子结构与 poly(A) 尾协同作用，提高翻译效率。

- 促进 mRNA 向细胞质的运输 (enhance the transport of mRNAs into the cytoplasm)。加帽对于 RNA 离开细胞核很重要。
- 促进第一个内含子 (first intron) 的剪接 (Facilitate the splicing of first intron)。体外实验表明, pre-mRNA 中第一个内含子的切除依赖于帽子。

2. 多聚腺苷酸化 (Polyadenylation) 加尾

- 是什么? 在 hnRNA (异质核 RNA) 的 3' 端加上一段由腺嘌呤核苷酸组成的尾巴, 称为 poly(A) 尾 (Poly-A tail)。这一过程由多聚腺苷酸聚合酶 (PAP) 催化。
 - 何时何地? 多聚腺苷酸化通常在基因转录完成或终止时开始。pre-mRNA 新合成的 3' 片段首先被一组蛋白质切下, 然后在 RNA 的 3' 端合成 poly(A) 尾。该过程发生在细胞核内。
 - 多聚腺苷酸化信号 (Polyadenylation Signals):
 - 最常见和最有效的信号是 AAUAAA。
 - 最常见的变体是 AUUAAA, 其效率约为 AAUAAA 的 80%。
 - 哺乳动物的 AAUAAA 通常位于 poly(A) 位点上游约 20nt 处。
 - 仅有 AAUAAA 不足以作为信号, 最小的有效多聚腺苷酸化信号是 AAUAAA 后跟约 20bp 的 GU- 或 U-rich 序列。
 - 酵母基因缺乏 AAUAAA, 而是在多聚腺苷酸化位点上游有一个 AU-rich 区域。
 - 植物基因可能有 AAUAAA, 但植物和动物的多聚腺苷酸化信号不同。
 - 机制 (Basic Mechanism of Polyadenylation):

- 涉及剪切 pre-mRNA 前体，即使转录尚未终止，然后在新暴露的 3' 端添加 poly(A)。
- 参与因子：CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor) 结合 AAUAAA 信号，CstF (cleavage stimulation factor) 结合 G/U 区域，剪切因子 I 和 II (CFI & CFII)，多聚腺苷酸聚合酶 (PAP)，以及 RNA 聚合酶 II (特别是 CTD)。这些因子协同作用导致 RNA 剪切。
- 两阶段过程：起始阶段 (Initiation) 是缓慢添加至少 10 个 A，依赖于 AAUAAA 信号。延伸阶段 (Elongation) 与 AAUAAA 无关，快速添加 200 个或更多 A，依赖于起始阶段添加的寡聚 (A) 以及 poly(A) 结合蛋白 II (PAB II)。

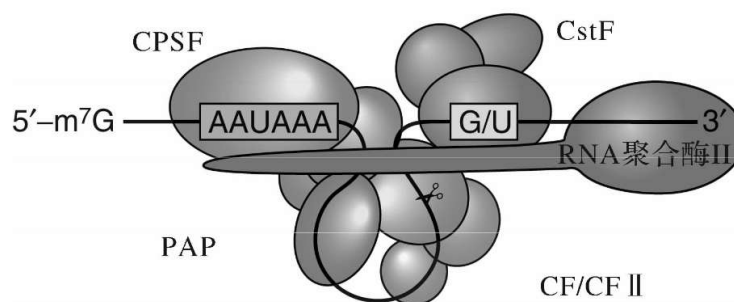


图 15.18 剪切复合体前体模型。模型展示了所有可能参与剪切的蛋白质和多腺苷酸化信号的两个部分（绿色和黄色）的位置。剪刀标示的是 CPSF-73 的活性位点。 [Source: Adapted from Wahle, E. and W. Keller, The biochemistry of polyadenylation, *Trends in Biochemical Sciences* 21 (1996) pp. 247-250, 1996]

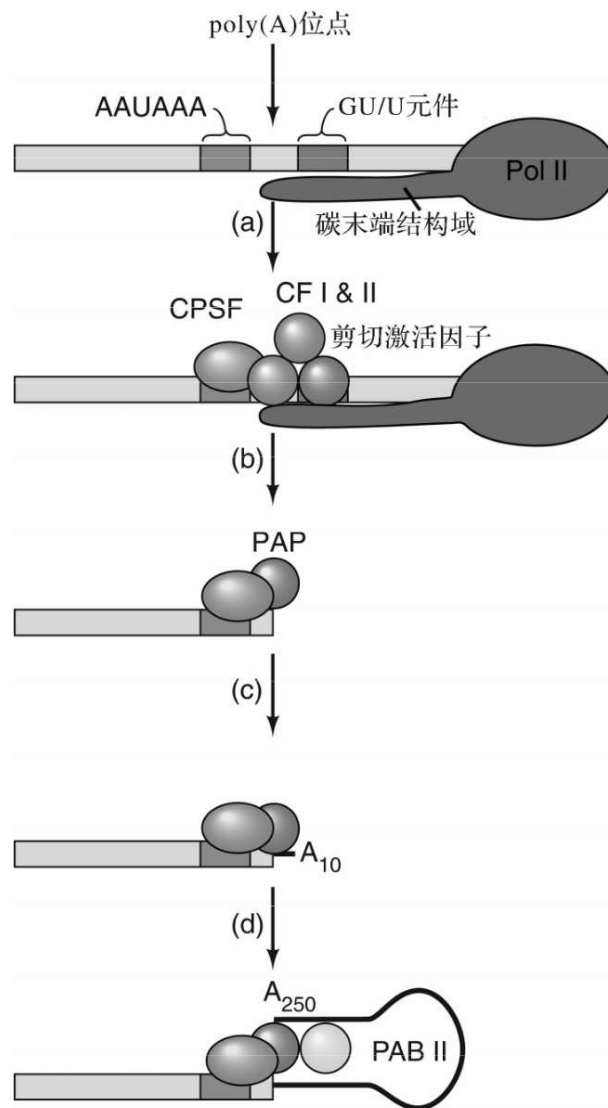


图 15.24 多腺苷酸化反应模型。 (a) CPSF

- 。 **Poly(A) 尾的长度和寿命：** 新合成的 poly(A) 尾在细胞核和细胞质中平均长度约为 **250nt**。细胞质中的 poly(A) 会被削短 (shortening)，当它足够短时，mRNA 会被酶降解。但在某些细胞类型中，带有短 poly(A) 尾的 mRNA 会被储存，然后在细胞质中通过重新多聚腺苷酸化 (re-polyadenylation) 激活。与此相反，在细菌中，多聚腺苷酸化会促进 RNA 降解。
- 。 **功能 (Functions of Poly(A))：** Poly(A) 在真核生物中普遍存在 (组蛋白 mRNA 除外)。

- 帮助保护 mRNA 免受降解 (Helps to protect mRNAs from degradation) 。
带有 poly(A)⁺ 的 RNA 比 poly(A)⁻ 的 RNA 寿命更长 。
- 刺激 mRNA 的翻译 (Stimulates translation of mRNAs) 。 Poly(A) 尾通过结合 poly(A) 结合蛋白 I (PAB I)，并与翻译起始因子相互作用，促使 mRNA 环化，从而更容易被核糖体识别和翻译 。
- 促进 mRNA 转出细胞核 (Facilitate transport of mRNA out of the nucleus) 。 实验证明 poly(A) 信号对于转录物从细胞核运输到细胞质是必需的 。
- 刺激 pre-mRNA 中最后一个内含子 (last intron) 的剪接 (Stimulate removal of the last intron in a pre-mRNA) 。

3. mRNA 加工事件的协同 (Coordination of mRNA Processing Events)

- **加工与转录偶联：** 加帽、多聚腺苷酸化和剪接这三个 mRNA 加工事件都发生在转录过程中 。
 - 加帽发生在 mRNA 链长约 20-30nt 时，即 RNA 的 5' 端刚从 RNAP 中伸出时 。
 - 多聚腺苷酸化发生在仍在延伸的 mRNA 在 poly(A) 位点被剪切时 。
 - 剪接在转录仍在进行时就已经开始 。
- **帽子和 Poly(A) 对剪接的影响：** 帽子对于切除第一个内含子是必需的 。 Poly(A) 对于切除最后一个内含子是必需的 。
- **RNAP II Rpb1 的 CTD 的作用：** RNA 聚合酶 II 最大亚基 Rpb1 的 C-末端结构域 (CTD) 是连接所有这些加工活动的关键元件 。
 - CTD 为这三个加工活动提供了一个平台 。 参与这些活动的酶直接结合到 CTD 。

- 与 CTD 结合的加工蛋白的状态与 CTD 的磷酸化状态相关。CTD 磷酸化状态的变化与转录过程中的任务需求相关，不同的加工蛋白会根据需要结合或离开 CTD。例如，磷酸化的 CTD (CTDp) 在刺激多聚腺苷酸化的剪切反应中效果更好。
- 加帽酶（鸟苷酸转移酶）与靠近启动子的 CTD 结合，而甲基转移酶和多聚腺苷酸化因子无论 CTD 与启动子的距离远近都可以结合。
- **转录终止与 mRNA 3'-end 加工的偶联 (Coupling Transcription Termination with mRNA 3'-end Processing):**
 - 成熟的 3' 端与转录终止位点不同，pre-mRNA 必须在 poly(A) 位点被剪切，然后进行多聚腺苷酸化。
 - **终止机制：**研究表明，poly(A) 位点下游区域对于终止至关重要。poly(A) 位点下游多个位点的剪切是终止所必需的。这种剪切是共转录的，并且可能早于 poly(A) 位点的剪切。
 - **共转录剪切元件 (cotranscriptional cleavage element, CoTC 元件)：**在人 β -珠蛋白基因中发现，其下游区域包含 CoTC 元件，该元件具有自剪切活性，可以剪切合成中的 RNA 分子，这对于转录终止是必需的。
 - **鱼雷模型 (torpedo model)：**CoTC 位点的剪切可能不足以引起转录终止。鱼雷模型提出，当 RNA 聚合酶延伸到 poly(A) 位点之后，外切核酸酶（如人中的 Xrn2 或酵母中的 Rat1）结合到被剪切下来的 RNA 的 5' 末端，并开始降解 RNA，追赶仍在合成的 RNAP。当追上聚合酶时，对其进行“鱼雷式攻击”，使其脱离模板，从而终止转录。

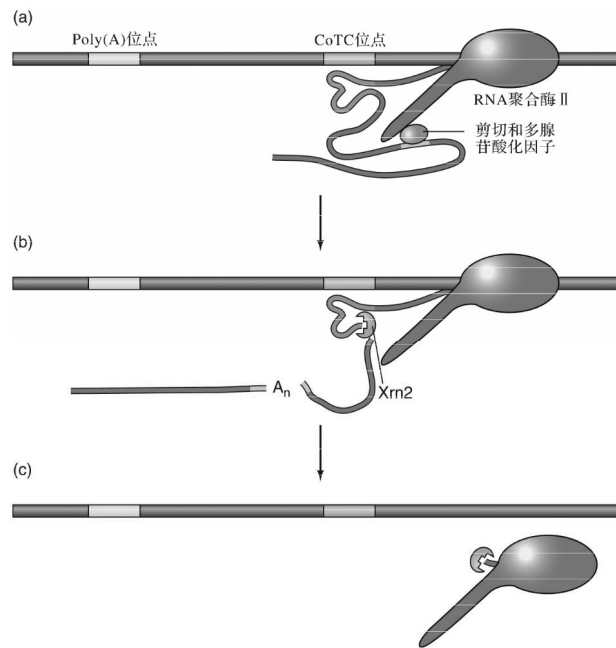


图 15.36 人 β -珠蛋白基因转录终止的鱼雷模型。(a) RNA 聚合酶 II (红色) 转录 poly(A) 位点 (黄色) 和 CoTC 位

理解方式

理解本章内容的关键在于认识到真核生物 mRNA 的加工是一个复杂且高度协调的过程，它与转录过程紧密偶联。

1. 将加帽和多聚腺苷酸化视为对 mRNA 两端的“修饰”：帽子加在 5' 端，poly(A) 尾加在 3' 端，这些修饰赋予 mRNA 特定的功能。
2. 理解这些修饰的功能：思考为什么 mRNA 需要帽子和 poly(A) 尾？它们在 mRNA 的生命周期中扮演什么角色？（保护、翻译、运输、剪接）。通过实验证据来理解这些功能（例如，加帽和 poly(A) 对 mRNA 稳定性和翻译效率的影响实验）。
3. 理解加工过程的机制和参与因子：熟悉加帽和多聚腺苷酸化涉及的关键酶和蛋白质因子，以及它们如何识别信号序列并进行催化。记忆关键的信号序列（如 AAUAAA）。
4. 关注加工过程的协同性：理解为什么这些加工过程会与转录偶联，以及 RNAP II 的 CTD 在其中扮演的核心角色。CTD 如何通过磷酸化状态的变化来招募不同的加工因子？

5. 理解转录终止与 3' 端加工的关系：认识到真核生物的转录终止不是简单地在编码区末端停止，而是与 3' 端的剪切和多聚腺苷酸化偶联。理解 CoTC 元件和鱼雷模型等假说。

原理和逻辑链复盘整合笔记

将上述知识点、逻辑关系和理解方式整合到笔记中，可以按照以下逻辑链进行组织：

主题：mRNA 加工 II：加帽与多聚腺苷酸化

1. 前言：真核生物 mRNA 转录后需经历加帽、剪接、多聚腺苷酸化等加工过程才能成为成熟的 mRNA 并输出细胞核进行翻译。

2. 加帽 (Capping):

- 。 定义：在 5' 端添加 m7G 帽。
- 。 结构与合成：m7G、5'-5' 键、三磷酸。酶：RNA 三磷酸酯酶、鸟苷转移酶、甲基转移酶。
- 。 时间与地点：转录早期、细胞核内、与转录偶联。
- 。 功能：保护 (免降解) → 增强翻译 → 促进出核 → 促进第一个内含子剪接。

3. 多聚腺苷酸化 (Polyadenylation):

- 。 定义：在 3' 端添加 poly(A) 尾。
- 。 酶：PAP。
- 。 时间与地点：转录完成或终止时、细胞核内、与转录偶联。
- 。 信号：AAUAAA + GU/U-rich (哺乳动物)。
- 。 机制：剪切 pre-mRNA → 添加 poly(A)。因子：CPSF, CstF, CFI, CFII, PAP, PAB II, CTD (刺激剪切)。两阶段：起始 (AAUAAA 依赖) → 延伸 (PAB II 依赖)。

- 。 长度与寿命：约 250nt，细胞质中削短导致降解。
- 。 功能：保护 (免降解) → 增强翻译 (通过 PAB I 环化) → 促进出核 → 促进最后一个内含子剪接。

4. mRNA 加工的协同与偶联：

- 。 加帽、剪接、多聚腺苷酸化均在转录时发生。
- 。 RNAP II CTD 是协调中心：通过结合加工蛋白，根据 CTD 磷酸化状态变化招募不同因子。
- 。 转录终止与 3' 端加工偶联：成熟 3' 端由剪切产生。
- 。 终止机制：poly(A) 下游区域重要。CoTC 元件 (自剪切)。鱼雷模型 (Xrn2/Rat1 外切核酸酶追赶并终止 RNAP)。

5. 总结：真核生物 mRNA 的加工是一个高度协调的分子机器过程，由 RNAP II 的 CTD 整合，确保转录、加工和输出的效率和准确性。

关键英文缩略词 (Key English Abbreviations):

- m7G: 7-methylguanosine (7-甲基鸟苷)
- PAP: Poly(A) polymerase (多聚腺苷酸聚合酶)
- hnRNA: heterogeneous nuclear RNA (异质核 RNA)
- UTR: Untranslated Region (非翻译区)
- CDS: Coding Sequence (编码序列)
- RBS: Ribosome Binding Site (核糖体结合位点 - 在细菌中提及)
- AAUAAA: 典型的多聚腺苷酸化信号序列
- GU/U: 富含 G/U 的序列，多聚腺苷酸化信号的组成部分

- CPSF: Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor (剪切和多聚腺苷酸化特异性因子)
- CstF: Cleavage Stimulation Factor (剪切激活因子)
- CFI & CFII: Cleavage Factors I and II (剪切因子 I 和 II)
- PAB I & PAB II: Poly(A)-binding protein I & II (Poly(A) 结合蛋白 I 和 II)
- CTD: C-terminal Domain (C-末端结构域)
- **RNAP II**: RNA Polymerase II (RNA 聚合酶 II)
- Rpb1: RNA Polymerase II subunit B1 (RNA 聚合酶 II 亚基 B1)
- CPV: Cytoplasmic Polyhedrosis Virus (胞质多角体病毒)
- CoTC: Cotranscriptional Cleavage Element (共转录剪切元件)
- Xrn2: 一种核酸外切酶
- Rat1: 酵母中的一种核酸外切酶