

植物丝氨酸/精氨酸丰富(SR)蛋白的结构和功能及其在植物发育中的作用

那海燕, 邓祖湖, 张木清*, 陈如凯

福建农林大学农业部甘蔗生理生态与遗传改良重点实验室, 福州 350002

Structure and Function of Plant Serine/Arginine-Rich (SR) Proteins and Roles in Plant Development

NA Hai-Yan, DENG Zu-Hu, ZHANG Mu-Qing*, CHEN Ru-Kai

Key Laboratory of Eco-Physiology, Genetic Improvement for Sugarcane, Ministry of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

摘要: 丝氨酸/精氨酸丰富(SR)蛋白家族是真核生物中的一类剪接因子, 在前体mRNA的组成性和选择性剪接中起作用。本文就近十几年来SR蛋白结构和功能及其在植物发育中的作用的研究进展作以介绍。

关键词: SR蛋白; 前体 mRNA 剪接; 植物发育

在真核生物中, 前体mRNA的剪接(pre-mRNA splicing)是基因表达调控的重要机制。同一个前体mRNA经过一系列的加工过程可以形成不同的成熟mRNA, 从而翻译出很多功能不同的蛋白质。因此, 前体mRNA的剪接也是生物多样性产生的关键机制之一。mRNA的剪接主要通过剪接复合体来完成。除催化核心部分外, 剪接复合体主要包括小分子核RNA结合蛋白(small nuclear ribonucleoprotein, snRNP)和非小分子核RNA结合蛋白(non-snRNP)。而在non-snRNP中, 丝氨酸-精氨酸丰富蛋白(serine/arginine-rich proteins, SR protein)是人们近年来研究最为广泛和深入的一类剪接因子。

20世纪90年代, 研究者们就已开始关注SR蛋白, 第一个SR蛋白是在研究哺乳动物的剪接机制时发现的, 即选择性剪接因子/剪接因子2(alternative splicing factor/splicing factor 2, ASF/SF2)(Kraimer和Maniatis 1985)。现已证明SR蛋白是一个成员多且进化保守的家族, 其成员主要包括ASF/SF2、35kD的剪接体成分(spliceosome component of 35 kD, SC35)、SRp20、SRp40、SRp55、9G8等。本文就SR蛋白结构和功能的研究进展作简要评述。

1 SR蛋白家族成员及其分类

在SR蛋白家族成员中, 每一个成员至少含有一个或两个位于N端的RNA识别基元(RNA recognition motif, RRM)、也称RNA结合结构域(RNA binding domain, RBD)和位于C端的丝氨酸(S)和精

氨酸(R)二肽富集结构域(RS domain)。但也有一些SR蛋白包含特殊的结构, 如Zn-knuckles、RG盒、两个RS结构域等。如人类SR蛋白剪接因子9G8有CCHC型的Zn-knuckles结构; 大鼠SR蛋白剪接因子SRp86含有一个RNA识别结构域和二一个RS结构域, 且在两个RS结构域之间有一个谷氨酸/赖氨酸丰富(glutamic acid-lysine-rich, EK)区域(Barnard和Patton 2000); 植物特有的SR蛋白剪接因子SR45的RRM区域两端各有一个RS结构域(Golovkin和Reddy 1999; Ali和Reddy 2006)。目前, 所有已知的SR蛋白的分子量都在20~75kD之间, 并且大部分SR蛋白家族成员都是以其分子量大小命名的。而在分子量相同的情况下, 则加一个字母代表这一成员的名字, 如ASF/SF2和SC35, 分别称为SRp30a和SRp30b。

迄今为止, 人们采用蛋白质纯化、酵母双杂交筛选和简并PCR等方法已克隆得到许多SR蛋白家族成员。克隆出的人类SR蛋白有: SRp20、9G8、ASF/SF2 (SRp30a)、SC35 (SRp30b)、SRp30c、SRp40、SRp46、p54、SRp55、SRp75和SRp508等至少11个。通过筛选, 发现植物中也存在SR蛋白, 如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中分离出19个SR蛋白; 水稻(*Oryza sativa*)中鉴定出

收稿 2008-06-13 修定 2008-09-17

资助 国家自然科学基金(CO2020508)。

* 通讯作者(E-mail: zmuqing@hotmail.com; Tel: 0591-83768242)。

24个SR蛋白,其中20个已得到分离并命名(Iida和Go 2006; Isshiki等2006)。一些植物SR蛋白与动物SR蛋白具有同源性,如植物atSRp34/SR1和atSRp30与人类ASF/SF2具有相似的结构特点(Lazar等1995; Lopato等1996),有些SR蛋白成员只在植物中发现。目前已发现的19个拟南芥SR蛋白中有7个在动物中没有发现(Reddy 2004; Kalyna和Barta 2004; Longman等2000),24个水稻SR蛋白中有14个是动物中没有发现的。

在拟南芥基因组中发现的19个SR蛋白分布在五条染色体上(表1)。根据它们的结构特点拟南芥和水稻的SR蛋白分成七个亚家族(图1): ASF/SF2、SC35、一个锌结构的9G8 (one-Zn-knuckles-type 9G8)、二个锌结构的9G8 (two-Zn-knuckles-type 9G8)、SCL、植物新SR (plant-novel-SR)蛋白和SR45。其中,ASF/SF2、SC35和一个锌结构的9G8三个亚家族是在植物界和动物界中普遍存在的剪接因子(Graveley 2000),而其他四个亚家族则是植物所特有的(Kalyna和Barta 2004)。

2 SR蛋白的结构特点和亚细胞定位

2 SR蛋白的结构特点和亚细胞定位

SR蛋白是一个结构高度保守的家族。SR蛋白中结构域功能的研究已很多,虽然试验设计各有不同,但大多数都用了基本相同的实验手段,即基因位点突变或缺失。

2.1 RRM的功能 RNA识别基元(RNA recognition motif, RRM)也称RNA结合结构域(RNA binding domain, RBD),是可以特异地识别前体mRNA并与之结合而发挥作用的调节序列。SR蛋白家族多数成员含有一个RRM,如9G8和SC35。而有些SR蛋白则有2个RRM,如ASF/SF2和RSp29。含有2个RRM的SR蛋白,是否能协同完成剪接任务? Isshiki等(2006)研究了植物特有SR蛋白RSp29中的RRM2功能,结果表明RRM2特异缺失的 Δ RRM2型中的RSp29依然具有同样的活性,由此说明RRM2对于RSp29并非是必需的。 Δ RRM2型的RSp29的5'剪接位点没有改变,表明RRM2没有参与5'剪接位点的选择;而RSp29的RRM1缺失,则导致RSp29不能正确寻找5'剪接位点。由此说明RSp29中的RRM1在提高剪接效率和剪接位点选择中是重要的。相反,也有研究发现,ASF/SF2的2个RRM如果缺失一个就会影响其在剪接中的特异性作用(Jumaa和Nielsen 2000)。总之,在SR蛋白中RRM结构域是决定剪接位点选择的关键因素。

2.2 RS结构域的功能 RS结构域是由交替排列的精氨酸和丝氨酸组成。RS结构域主要介导蛋白与蛋白之间,蛋白与RNA之间的相互作用。通过蛋白与蛋白相互作用,SR蛋白和其他剪接因子结合,然后剪接因子聚集到前体mRNA的剪接位点附近,对前体mRNA进行剪接。

2.2.1 RS结构域的特异性 RS结构域是启动前体mRNA剪接的必要条件,RS结构域本身也具有一些特有的功能。Isshiki等(2006)在研究水稻SR蛋白的结构时进行了相关的实验,将水稻RSp29特异地缺失RS结构域,缺失RS结构域的RSp29并没有改变5'剪接位点的选择,但使得GUS (β -glucuronidase)活性降低或剪接的功能完全丧失,由此说明RS结

表1 拟南芥SR基因在染色体上的分布

拟南芥染色体	编码SR蛋白的基因
I	<i>atSRp34</i> , <i>atSRp30</i> , <i>atSR45</i> , <i>atRSZ21</i> , <i>atSCL33</i>
II	<i>atRSZ22a</i> , <i>atRSZ33</i> , <i>atRSp31a</i>
III	<i>atSCL30a</i> , <i>atSRp34a</i> , <i>atRSZ32</i> , <i>atSCL30</i> , <i>atRSp31</i>
IV	<i>atSRp34b</i> , <i>atRSp40</i> , <i>atRSZp22</i>
V	<i>atSCL28</i> , <i>atRSp41</i> , <i>atSC35</i>

选择性剪接因子/剪接因子2亚家族



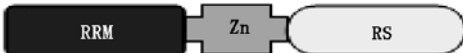
35 kDa剪接体成分亚家族



SCL亚家族



一个锌结构9G8亚家族



两个锌结构9G8亚家族



植物新SR亚家族



SR45亚家族



图1 拟南芥SR蛋白亚家族

构域对于SR蛋白的剪接活性是必不可少的,与剪接位点的选择没有关系。

2.2.2 RS结构域的可替代性 在SR蛋白家族中,各个成员之间的RS结构域可以相互替代,各RS结构域均具有启动剪接前体 mRNA 中相应内含子的功能。将 RSp29 中的 RS 结构域以 SCL26 的 RS 结构域代替后, Wxb-GUS 融合蛋白的 GUS 活性提高; SCL26 的 RS 结构域以 RSp29 的 RS 区域替换后不能提高 GUS 的活性,但能促进 Wxb 内含子 1 的剪接。动物中也有相关的试验证据, Wang 等(1998)用一株鸡的 B 细胞系(DT40-ASF)进行试验时发现,如果 ASF/SF2 的 RS 结构域缺失,则 ASF/SF2 的功能丧失,而用其他 SR 蛋白的 RS 结构域替换 ASF/SF2 的 RS 结构域后 ASF/SF2 功能正常。据此推测,SR 蛋白家族成员之间的 RS 结构域可以相互替代,且功能不会丧失,甚至作用效率可以增加。

由此可见,在前体 mRNA 剪接中,SR 蛋白的 RS 结构域既有功能的特异性,也有可替代性。此外,RS 结构域的亚细胞定位和 RS 结构域的磷酸化作用将在后面阐述。

2.3 SR 蛋白的亚细胞定位和移动性 在细胞核中,SR 蛋白主要聚集为核内形状不规则的颗粒状,成为核内一个典型的结构,称为“散斑”。一般认为,每个细胞核内都有一定数量的散斑,这些散斑可能与 SR 蛋白和其他剪接因子的储存和循环有关。散斑也被认为是组装或是招募剪接因子到剪接位点完成前体 mRNA 剪接的修饰位点。目前,大多用免疫荧光显微镜和绿色荧光融合蛋白研究 SR 蛋白的定位和动力学功能。

2.3.1 SR 蛋白的亚细胞定位 SR 蛋白主要定位在细胞核中,其中 RS 结构域对于散斑的形成和亚细胞定位非常重要。拟南芥 RSZp22 的亚细胞定位,可能涉及到不同结构域的相互作用,不是依赖单一的定位信号(Tillemans 等 2006)。Ali 和 Reddy (2006)用绿色荧光蛋白(GFP)和 SR45 缺失突变体构成融合蛋白,并在拟南芥叶肉原生质中表达,采用共焦显微镜检测观察到 GFP-SR45 在细胞核中以散斑状分布,与在转基因拟南芥植物中观察到的结果一致,但与缺失突变体中的结果有明显差异。RS1 主要定位于细胞核中且信号很微弱,也出现在细胞质中;RRM 和绿色荧光蛋白构成的融合蛋白(GFP-RRM)分散在细胞质和细胞核中,没有任何的亚细胞定位

信号;RS2 单独和绿色荧光蛋白(GFP-RS2)或 RS2、RRM 和绿色荧光蛋白(GFP-RRM-RS2)构成的融合蛋白完全出现在细胞核,表明核定位的信号是在 RS2 结构域;由 RS1 和 RRM 构成的缺失 RS2 的突变体大多出现在细胞核中,但相当一部分也出现在细胞质中。这些结果表明,RS1 和 RS2 结构域都包含核定位信号,但有其各自的功能,互不依赖。核内散斑定位或散斑-维持信号完全在 RS2 结构域,RS2 结构域对于散斑定位是必要的。此外,去除 RS 结构域后的 GFP-SR 突变体在核内不能表现出典型的散斑模式(Tillemans 等 2005),也说明 RS 结构域对散斑的形成起重要的作用,RS 结构域影响 SR 蛋白的定位。

2.3.2 SR 蛋白的移动性 SR 蛋白聚集在细胞核的散斑中,当前体 mRNA 进行加工处理时,SR 蛋白就从散斑中移动出来,与 mRNA 特异结合,发挥自己的功能。SR 蛋白的移动性主要依赖 RS 结构域,其实质是依赖 RS 结构域的磷酸化。有研究表明,在 SR45 中,含有 RS1 或 RS1-RRM 的突变体完全正常,可以从散斑中移动出来,具有移动性;而含有 RRM-RS2(缺失 RS1)的突变体中则含有大量的不移动部分(69%),说明 RS1 在调控 SR45 的移动性中起作用(Ali 和 Reddy 2006)。

ATP、磷酸化和转录都能调控植物 SR 蛋白的移动性。在动物细胞中,SR 蛋白(如 ASF/SF2 和 SC35)的移动性是不依赖 ATP 的(Kruhlik 等 2000; Phair 和 Misteli 2000),但大多数 SR 蛋白的移动性需要依赖磷酸化,如拟南芥 RSZp22 的移动性是依赖磷酸化和 ATP 的(Tillemans 等 2006)。Ali 和 Reddy (2006)用光漂白后的荧光恢复(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)和光漂白中的荧光损失(fluorescence loss in photobleaching, FLIP)试验分析的结果表明,在 ATP 耗尽的情况下,植物 SR 蛋白(SR45 和 SR1/SRp34)出现了不移动部分,说明植物 SR 蛋白(SR45 和 SR1/SRp34)的移动性是依赖 ATP 的。同样,在转录和磷酸化受到抑制时,SR45 和 SR1/SRp34 的移动会减弱,并且转录受抑制可导致其他的 SR 蛋白成员改变其定位(Tillemans 等 2005; Fang 等 2004)。

最近, Ali 等(2008)采用双分子荧光互补(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)技术和光漂白后的荧光恢复(fluorescence recovery

after photobleaching, FRAP)技术,研究了U1-70k/SR蛋白复合体的移动性。BiFC分析表明,U1-70k和SR45主要是在散斑内互相作用,而且这种互相作用是由SR45中的RS1或RS2结构域介导的。FRAP分析结果显示,SR45/U1-70k复合体比SR45或U1-70k单独恢复的都缓慢,表明SR45/U1-70k复合体停留在散斑的时间更长。此外,FRAP分析表明,磷酸化的抑制剂存在下的SR45/U1-70k复合体,与未受磷酸化抑制剂处理的细胞中的复合体相比没有任何大的改变,这表明复合体的流动性是不受蛋白磷酸化影响的。

由于动物中ASF/SF2和SC35的移动不依赖磷酸化,所以转录受抑制后,它们的移动性会略有增加。与动物SR剪接因子不同,植物SR蛋白的移动性依赖于ATP、磷酸化和转录,并且植物的SR剪接因子的移动性和动物的有明显不同。这些研究对进一步了解植物SR蛋白运动的机制是有益的。

3 SR蛋白的功能

3.1 SR蛋白在前体mRNA剪接中的作用 RNA复合体和多种蛋白参与剪接体的形成,并通过不同的方式影响剪接过程。目前,SR蛋白主要是通过RRM特异性结合前体mRNA,而RS结构域再通过蛋白与蛋白以及蛋白与mRNA的相互合作,使mRNA剪接的功能完成。SR蛋白是剪接体组装和mRNA剪接的关键因子,特别在剪接体形成的早期阶段,作用更为明显。SR蛋白在早期结合mRNA前体并参与剪接体的组装,在选择性剪接中,在跨内含子的复合体形成过程中,SR蛋白可与辅助因子U1snRNP和U2AF结合。促进早期剪接复合体的组装,形成5'和3'剪接位点之间的桥梁。并且,它们之间的结合,是在RNA聚合酶II抑制剂存在的情况下完成的(Ellis等2008)。在外显子决定的复合体中,SR蛋白特异结合到外显子剪接增强子(ESEs)上,通过U2AF结合上游弱的3'剪接位点或U1snRNP结合弱的5'剪接位点(Graveley等2000; Cartegni和Kraimer 2002; Maniatis和Tasic 2002)。如在含有两个内含子的mRNA前体中,高浓度的SR蛋白倾向于选择最近的5'剪接位点,而不会激活隐蔽的5'剪接位点,这种近端效应可能在选择性剪接中发挥重要作用。近年来发现外显子剪接沉默子(ESS)可抑制剪接位点的选择。所以,外显子的ESE或ESS可增强或减弱SR蛋白在选择性剪接

中剪接位点的调控。此外,植物中选择性剪接是调节基因表达的一个重要的转录后调节机制,并最终影响了植物的形态和功能(Reddy 2007)。

Palusa等(2007)等研究拟南芥的19个SR基因时综合分析了拟南芥中不同组织和苗的不同时期SR基因的表达和剪接方式。认为一些SR基因的选择性剪接受制于发育和组织特异性。一些SR基因的选择性剪接受激素(生长素、脱落酸、细胞分裂素)或非生物胁迫(冷、热、盐等)的影响,一些SR基因的选择性剪接在温度胁迫(冷、热)下发生改变,三个SR基因的选择性剪接在激素作用下改变。19个基因中有15个经过选择性剪接后,可产生两个或更多个转录本,即15个SR基因至少产生95个转录本,从而使SR基因家族的转录组的复杂性增加了6倍。这些结果表明,在前体mRNA剪接中,SR基因的选择性剪接受非生物胁迫和激素调控可产生不同异构体的SR蛋白。

SR家族的所有成员具有相同的功能,即每一个SR蛋白均可以和剪接缺失的细胞质提取物S100互补(S100中包含了除SR蛋白以外的其他所有组成性剪接必需因子),恢复剪切的功能,从而可在体外(*in vitro*)剪接试验中剪接前体mRNA,可将前体mRNA加工成为成熟的mRNA(Michel等1991; Lopato等1996; Lopato等1999)。

在SR蛋白靶序列研究中,SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)作为一种体外筛选方法被广泛用于筛选与SR蛋白具有高亲和力的RNA序列。SR蛋白家族成员之间也可以相互调节,如SRp86可以正向或负向调控其他SR蛋白的活性(Barnard和Patton 2000; Barnard等2002; Li等2002)。在体内和体外剪接实验中,SRp86提高SRp20活性的同时还会抑制ASF/SF2、SC35、SRp55的活性(Li等2002)。表明SR蛋白家族的一些成员可通过蛋白与蛋白之间相互作用来调节其他SR蛋白的活性。

3.2 SR蛋白的核质穿梭和磷酸化 SR蛋白主要聚集在细胞核内,但其中也有一部分SR蛋白可以在细胞核和细胞质间往来穿梭,SR蛋白的这种往来穿梭能协助已经加工成熟的mRNA到细胞质中。拟南芥中如RSZp22,是一个核质穿梭蛋白(Tillemans等2006)。在哺乳动物细胞中,SR蛋白的成员如ASF/SF2、9G8和SRp20可不断在细胞核和细胞

质之间穿梭。RS结构域在核质穿梭中起作用。如人的SR蛋白ASF/SF2、9G8、SRp20依赖于RS结构域的磷酸化,穿梭于核质之间(Caceres等1998)。

在细胞核中,SR蛋白以磷酸化形式从散斑中释放出来。磷酸化也可增加SR蛋白在前体mRNA剪接机制中的作用。可逆磷酸化有利于剪接体的组装,去磷酸化后SR蛋白再回到核内聚集到散斑中。SR蛋白的磷酸化实质上是RS结构域的磷酸化,RS结构域的丝氨酸被磷酸化后,SR蛋白从散斑中释放出来,通过RRM结构域与前体mRNA特异性结合,与其他剪接因子一起完成剪接任务,然后RS结构域去磷酸化,SR蛋白再回到核内散斑中(Melčák等2000; Misteli 2000)。因此,SR蛋白的磷酸化对于SR蛋白的移动性也是至关重要的。

一些蛋白激酶可以催化SR蛋白磷酸化,因而使SR蛋白具有特定的活性。拟南芥RSzp22以激酶抑制剂处理后,核内往来穿梭即被改变(Tillemans等2005)。目前有关研究表明,SR蛋白的磷酸化状态可在不同程度上影响它们对前体mRNA的识别、剪接复合体的组装和剪接催化中的功能。

3.3 SR蛋白的其他功能 SR蛋白在不同物种中具有进化上的高度保守性,它们通常在核内呈斑点(speckle)状分布,以浓度依赖的方式制约着5'和3'端剪接位点的选择,直接参与剪接体的形成和mRNA加工成熟(Graveley 2000; Hastings和Kraimer 2001)。SR蛋白(如ASF/SF2、9G8和SRp20)不断在细胞核和细胞质之间往返穿梭,SR蛋白对真核生物基因表达的影响可能不仅仅在于其剪接作用,一些SR蛋白在mRNA核内转出、mRNA的稳定性和蛋白质翻译等mRNA代谢中也起作用。在植物中,有的突变体不直接影响剪接效率而是改变mRNA的结构进而影响RNA代谢的其他方面,其具体机制尚不清楚。这方面在动物中研究较为深入,在哺乳动物细胞和爪蟾卵母细胞中,SRp20和9G8促进mRNA从核中转出(Huang和Steitz 2001);一些穿梭SR蛋白可作为mRNA的转出受体;ASF/SF2可调控mRNA的稳定性(Lemaire等2002)并促进其在体内及体外的翻译(Masuyama等2004; Sanford等2004)。Lemaire等(2002)用鸡胚胎cDNA文库筛选鸡B细胞DT40-ASF中不同mRNA的表达时,意外发现一种与*PKCI-1*基因高度相关的基因即*PKCI-r*,*PKCI-r*基因的转录水平在ASF/SF2缺失

的细胞中提高6倍,ASF/SF2的抑制并不影响*PKCI-r*的剪接,但却明显增加*PKCI-r* mRNA的半衰期,说明SR蛋白也可能通过调控mRNA的稳定性来调节真核细胞基因表达。

“NAGNAG受体”是在3'端附近的剪接位点,介导了一种特殊类型的选择性剪接。在拟南芥和水稻基因组分别保存有NAGNAG型的选择性剪接,其中包括2组RNA结合的蛋白。研究结果表明,NAGNAG型的选择性剪接很可能是一个共同的机制即调控蛋白质,其作用可能有助于建立复杂的转录组和蛋白质组(Iida等2008)。Schindler等(2008)等在拟南芥的基因组发现6772个内含子上有NAGNAG受体基元,这极大地丰富了编码DNA结合蛋白的基因。这些结果表明,NAGNAG型的剪接可能提供一个机制,即DNA结合蛋白的协调机制。在拟南芥中发现7个基因有NAGNAG受体基元,对其中的EST序列进行比对,发现SR和SR相关基因的36个内含子中有30个是NAGNAG型。选择15个进行试验分析,发现器官特异性剪接在成熟植物和不同阶段的幼苗中均有不同,热休克或冷休克下剪接发生的比例也有很大变化。这些结果说明,在SR和SR相关基因中,NAGNAG型选择性剪接的不同作用结果是组织和条件特异性的,而不是基因特异性的。

SR基因高度重复和相对大量的SR蛋白是基因功能上的进化,还是各成员之间存在功能上的冗余?拟南芥SR蛋白家族的个别成员具有独特的表达方式,因此认为,在一定的条件下它们可能具有特定的功能。水稻每种类型的SR蛋白都有多个成员,推测水稻SR蛋白的功能有一定程度的冗余。一些SR蛋白功能是冗余的,但并没有一个SR蛋白被其他SR蛋白所替代,说明SR蛋白功能也有其专一性(Iida和Go 2006; Isshiki等2006)。多种动物中的SR蛋白分析显示,SR蛋白有独立的和冗余的两种功能(Longman等2000)。

4 SR蛋白在植物发育中的作用

SR蛋白在植物花发育中调控花器官以及花分生组织形成,还能调控植物的营养生长和根分化等发育过程,并在调控植物从营养生长转向生殖生长的过程中起作用。

在拟南芥中,SR基因在不同组织中存在差异表达。其中,SR基因在根和花中表达很高(Kalyana

等 2003)。拟南芥 *RSz33* 主要在侧根及其伸长区、花柱、柱头和成熟花粉中表达。SR 蛋白的组织特异性表达可能调节不同组织中的选择性剪接, *SRp30* 或 *RSz33* 异位表达可导致转基因植株在形态和发育等方面有很大变化(Kalyna 等 2003)。SR45 调节众多植物发育过程, 参与调控了植株的大小、开花的时间和器官的形态学特征。Ali 等(2007)在研究植物特异 SR 蛋白 SR45 中发现, *sr45-1* 型突变体植株的叶片细长和卷曲, 生活周期比野生型植株缩短大约 1/3, 突变体从营养生长期到生殖生长期的过渡延迟, 根生长也比野生型植株缓慢些, *sr45-1* 植株开花晚于野生型, 但 *sr45-1* 型突变体植株的开花时间延迟现象可通过春化作用消除; *sr45-1* 型突变体植株花瓣和雄蕊的数量与野生型植株不同, *sr45-1* 型突变体植株中控制花器官数量相关基因 (*WIGGUM/ERA1*、*ULTRAPETALA*、*PLURIPETALA*、*PIE1* 等)没有明显表达。这些结果表明, 植物特异蛋白 SR45 调节植物开花的机制并不是通过剪接一些与开花相关的基因作用, 而是 SR45 演化成为调节植物开花机制的功能基因。

Lopato 等(1999)的研究表明, 如果转基因拟南芥的 *atSRp30* 蛋白水平增加, 则从营养到生殖期的过渡延迟, 生命周期延长, 并且转基因植株的个体增大。Kalyna 等(2003)研究发现 *atRSz33* 的过量表达引起一系列的变化, 如授精、细胞胚胎和根尖分生组织等发育过程变化; 此外, 在转基因拟南芥中, 过量表达还会影响植物激素的含量和分布。

植物 SR 蛋白的过量表达影响植物的生长发育过程。Lopato 等(1999)研究拟南芥 SR 蛋白中 SR 蛋白过量表达的结果表明, 拟南芥中有一种 SR 蛋白过量表达即可改变编码其他 SR 蛋白基因的剪接方式。如在转基因拟南芥中 *atSRp30* 基因的过量表达, 可导致编码全长 *atSRp34/SR1* 蛋白的基因下调, 改变其特有的表达方式。Kalyna 等(2003)的研究也表明在转基因拟南芥中, *atRSz33* 的过量表达会导致 *atSRp30* 和 *atSRp34/SR1* 剪接方式的改变, 而 *atRSz33* 可通过调节自身的表达, 改变内源性前体 mRNA 的剪接。Lazar 等(2000)认为 *atSRp34/SR1* 的过量表达, 并不影响其自身的剪接。SR 基因的过量表达不影响植物生长, 但仍需要对不同发育阶段的植株进行深入的研究。Isshiki 等(2006)在研究水稻 SR 基因的过量表达时发现, 水稻 SR 基因的

转录调控, 在剪接机制中发挥功能; 水稻 SR 基因的表达在根、叶和其他组织中没有明显的变化。

5 结束语

SR 蛋白是一类高度保守的蛋白家族, 具有经典的 RRM 结构域和 RS 结构域。动物和植物中都存在多种 SR 蛋白, 植物中的 SR 蛋白比动物中的发现晚一些, 但植物中的许多 SR 蛋白是植物特有的 SR 蛋白。SR 蛋白在前体 mRNA 的剪接机制中发挥着特有的调控作用。RS 结构域中丝氨酸(S)的磷酸化是 SR 蛋白与 mRNA 结合的必要条件, 即 RS 结构域的磷酸化可调控 SR 蛋白的作用活性, 同时 RS 结构域的磷酸化在不同程度上影响剪接复合体的组装、剪接催化和 SR 蛋白的核质穿梭能力。ATP、磷酸化和转录也调节着植物 SR 蛋白的活性。

今后有关这一领域的研究有以下 3 个方面值得考虑: (1)近年来, 研究者们正在加快对 SR 蛋白的功能和调控机制的研究, 一些问题仍然没有解决。如 SR 蛋白成员间的功能冗余和各成员的独立功能怎样理解, SR 蛋白结构中 RRM 结构域和 RS 结构域的功能已经鉴定, 但其分子机制也有待研究。(2)植物中 SR 蛋白在植物剪接调节中是否有特异性作用, 其他剪接和调控因子与 SR 蛋白之间在剪接过程中的相互作用机制尚不清楚。(3)逆境胁迫应答中, 基因通过选择性剪接产生转录本的相对数量有了大规模的变化。

参考文献

- Ali GS, Reddy AS (2006). ATP, phosphorylation and transcription regulate the mobility of plant splicing factors. *J Cell Sci*, 119 (17): 3527~3538
- Ali GS, Palusa SG, Golovkin M, Prasad J, Manley JL, Reddy AS (2007). Regulation of plant developmental processes by a novel splicing factor. *PLoS ONE*, 2 (5): e471
- Ali GS, Prasad KV, Hanumappa M, Reddy AS (2008). Analyses of *in vivo* interaction and mobility of two spliceosomal proteins using FRAP and BiFC. *PLoS ONE*, 3 (4): e1953
- Barnard DC, Patton JG (2000). Identification and characterization of a novel serine-arginine-rich splicing regulatory protein. *Mol Cell Biol*, 20: 3049~3057
- Barnard DC, Li J, Peng R, Patton JG (2002). Regulation of alternative splicing by SRp86 through coactivation and repression of specific SR proteins. *RNA*, 8: 526~533
- Caceres JF, Sreaton GR, Krainer AR (1998). A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev*, 12: 55~66
- Cartegni L, Krainer AR (2002). Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal

- muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Genet*, 30: 377~384
- Ellis JD, Llères D, Denegri M, Lamond AI, Cáceres JF (2008). Spatial mapping of splicing factor complexes involved in exon and intron definition. *J Cell Biol*, 181 (6): 921~934
- Fang Y, Hearn S, Spector DL (2004). Tissue-specific expression and dynamic organization of SR splicing factors in *Arabidopsis*. *Mol Biol Cell*, 15 (6): 2664~2673
- Golovkin M, Reddy AS (1999). An SC35-like protein and a novel serine/arginine-rich protein interact with *Arabidopsis* U1-70K protein. *J Biol Chem*, 274: 36428~36438
- Graveley BR (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA*, 6: 1197~1211
- Hastings ML, Krainer AR (2001). Pre-mRNA splicing in the new millennium. *Curr Opin Cell Biol*, 13: 302~309
- Huang Y, Steitz JA (2001). Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA. *Mol Cell*, 7: 899~905
- Iida K, Go M (2006). Survey of conserved alternative splicing events of mRNAs encoding SR proteins in land plants. *Mol Biol Evol*, 23: 1085~1094
- Isshiki M, Tsumoto A, Shimamoto K (2006). The serine/arginine-rich protein family in rice plays important roles in constitutive and alternative splicing of pre-mRNA. *Plant Cell*, 18: 146~158
- Iida K, Shionyu M, Suso Y (2008). Alternative splicing at NAGNAG acceptor sites shares common properties in land plants and mammals. *Mol Biol Evol*, 25 (4): 709~718
- Jumaa H, Nielsen PJ (2000). Regulation of SRp20 exon 4 splicing. *Biochim Biophys Acta*, 1494: 137~143
- Kalyna M, Lopato S, Barta A (2003). Ectopic expression of atRSZ33 reveals its function in splicing and causes pleiotropic changes in development. *Mol Biol Cell*, 14: 3565~3577
- Kalyna M, Barta A (2004). A plethora of plant serine/arginine-rich proteins: redundancy or evolution of novel gene functions? *Biochem Soc Trans*, 32: 561~564
- Krainer AR, Maniatis T (1985). Multiple factors including the small nuclear ribonucleoproteins U1 and U2 are necessary for pre-mRNA splicing *in vitro*. *Cell*, 42: 725~736
- Kruhlik MJ, Lever MA, Fischle W, Verdin E, Bazett-Jones DP, Hendzel MJ (2000). Reduced mobility of the alternate splicing factor (ASF) through the nucleoplasm and steady state speckle compartments. *J Cell Biol*, 150: 41~51
- Lazar G, Schaal T, Maniatis T, Goodman HM (1995). Identification of a plant serine-arginine-rich protein similar to the mammalian splicing factor SF2/ASF. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 7672~7676
- Lazar G., Goodman HM (2000). The *Arabidopsis* splicing factor SR1 is regulated by alternative splicing. *Plant Mol Biol*, 42: 571~581
- Lemaire R, Prasad J, Kashima T, Gustafson J, Manley JL, Lafyatis R (2002). Stability of a PKCI-1-related mRNA is controlled by the splicing factor ASF/SF2: a novel function for SR proteins. *Genes Dev*, 16: 594~607
- Li J, Barnard DC, Patton JG (2002). A unique glutamic acid-lysine (EK) domain acts as a splicing inhibitor. *J Biol Chem*, 277: 39485~39492
- Longman D, Johnstone IL, Cáceres JF (2000). Functional characterization of SR and SR-related genes in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J*, 19: 1625~1637
- Lopato S, Mayeda A, Krainer AR, Barta A (1996). Pre-mRNA splicing in plants: characterization of Ser/Arg splicing factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 3074~3079
- Lopato S, Kalyna M, Dorner S, Kobayashi R, Krainer AR, Barta A (1999). atSRp30, one of two SF2/ASF-like proteins from *Arabidopsis thaliana*, regulates splicing of specific plant genes. *Genes Dev*, 13: 987~1001
- Melčák I, Cermanová Š, Jirsová K, Koberna K, Malínský J, Raška I (2000). Nuclear pre-mRNA compartmentalization: trafficking of released transcripts to splicing factor reservoirs. *Mol Biol Cell*, 11: 497~510
- Misteli T (2000). Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *J Cell Sci*, 113: 1841~1849
- Maniatis T, Tasic B (2002). Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature*, 418: 236~243
- Masuyama K, Taniguchi I, Kataoka N, Ohno M (2004). SR proteins preferentially associate with mRNAs in the nucleus and facilitate their export to the cytoplasm. *Genes Cells*, 9: 959~965
- Michel H, Griffin PR, Shabanowitz J, Hunt DF, Bennett J (1991). Tandem mass spectrometry identifies sites of three post-translational modifications of spinach light-harvesting chlorophyll protein II. Proteolytic cleavage, acetylation, and phosphorylation. *J Biol Chem*, 266: 17584~17591
- Phair RD, Misteli T (2000). High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature*, 404: 604~609
- Reddy AS (2004). Plant serine/arginine-rich proteins and their role in pre-mRNA splicing. *Trends Plant Sci*, 9: 541~547
- Palusa SG, Ali GS, Reddy AS (2007). Alternative splicing of pre-mRNAs of *Arabidopsis* serine/arginine-rich proteins: regulation by hormones and stresses. *Plant J*, 49: 1091~1107
- Reddy AS (2007). Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic era. *Annu Rev Plant Biol*, 58: 267~294
- Sanford JR, Gray NK, Beckmann K, Cáceres JF (2004). A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation. *Genes Dev*, 18: 755~768
- Schindler S, Szafranski K, Hiller M, Ali GS, Palusa SG, Backofen R, Platzer M, Reddy AS (2008). Alternative splicing at NAGNAG acceptors in *Arabidopsis thaliana* SR and SR-related protein-coding genes. *BMC Genomics*, 9: 159
- Tillemans V, Dispa L, Remacle C, Collinge M, Motte P (2005). Functional distribution and dynamics of *Arabidopsis* SR splicing factors in living plant cells. *Plant J*, 41: 567~582
- Tillemans V, Leponce I, Rausin G, Dispa L, Motte P (2006). Insights into nuclear organization in plants as revealed by the dynamic distribution of *Arabidopsis* SR splicing factors. *Plant Cell*, 18: 3218~3234
- Wang J, Xiao SH, Manley JL (1998). Genetic analysis of the SR protein ASF/SF2: interchangeability of RS domains and negative control of splicing. *Genes Dev*, 12: 2222~2233