

# SRp38 基因研究进展

彭正羽 张薇<sup>1</sup> 陈献华 徐平\*(复旦大学医学院医学神经生物学国家重点实验室, 上海 200032; <sup>1</sup>浙江大学城市学院药理学系, 杭州 310015)

**摘要** SR 蛋白在前体 mRNA 可变剪接调控中发挥重要作用。可变剪接调节因子 SRp38 作为一种新近发现的具有神经及生殖组织特异性的 SR 蛋白, 有典型的 SR 蛋白结构特征并能够调控 GluR-B、TRK-C 以及 NCAML1 等基因的可变剪接, 但与其他 SR 蛋白不一致的是, SRp38 可以在一定条件下(有丝分裂 M 期, 热休克)抑制前体 mRNA 剪接, 从而防止错误剪接的出现。SRp38 的 RRM 结构域可以识别特殊的 RNA 序列并跟 U1snRNP 结合, 而其 RS 结构域则参与调控前体 mRNA 剪接。SRp38 的磷酸化状态可以影响其调控功能的发挥, 在有丝分裂 M 期及热休克时, 该蛋白质均呈去磷酸化状态。SRp38 在爪蟾胚胎神经发育过程中发挥作用并且可以同 TLS(translocation liposarcoma)蛋白相互作用, 提示其可能通过调节前体 mRNA 可变剪接在神经系统的发育分化以及在肿瘤的发生中扮演角色。

**关键词** SRp38; 前体 mRNA 可变剪接; 磷酸化; 调控

随着人类全基因组研究的深入, 研究者们发现约 70% 的人类基因都存在前体 mRNA 可变剪接。通过可变剪接过程可以将前体 mRNA 的外显子选择性地组合、联接在一起, 并最终表达出功能各异的、甚至完全相反的蛋白质亚型<sup>[1,2]</sup>。前体 mRNA 的剪接是在“剪接复合体”中进行的, 剪接复合体包含 snRNPs(small nuclear ribonucleoproteins)、hnRNPs(heterogeneous nuclear ribonucleo proteins)和 SR (serine/arginine-rich)蛋白及其相关蛋白, 剪接复合体始终处于动态之中, 在不同的时期吸纳不同的组分进行 RNA-RNA、RNA-蛋白质、蛋白质-蛋白质之间的作用<sup>[3]</sup>。调控可变剪接的因素包括顺式元件和反式调节因子。顺式元件指前体 mRNA 上特定的序列, 包括剪接增强子和抑制子。顺式元件为 RNA 结合蛋白提供结合位点, 通过 RNA-蛋白质的相互作用来调节附近剪接位点的使用。反式调节因子主要包括 HnRNP 蛋白家族, SR 蛋白和 SR 相关蛋白家族, 它们可以通过同前体 mRNA 上的剪接增强子和抑制子结合并影响 snRNP 和其他剪接因子与 RNA 的相互作用, 从而促进或抑制剪接位点的利用, 最终产生不同的 mRNA 亚型以及蛋白质亚型<sup>[4,5]</sup>。

SR 蛋白在前体 mRNA 剪接过程中发挥重要作用, 它参与前体 mRNA 剪接过程中剪接复合体的形成, 进而调节前体 mRNA 剪接<sup>[6]</sup>。目前发现的 SR 蛋白已达 30 余种<sup>[7]</sup>, 它们都有一些共同的特征, 即 N 端有 1~2 个 RBD(RNA binding domain), C 端有数个包含

Ser-Arg 重复序列的 RS 结构域, RBD 可以识别 mRNA 序列而 RS 结构域可以进行蛋白质-蛋白质作用, 在剪接过程中加入 SR 蛋白可以促进前体 mRNA 剪接的进行, 如 TRA2(transformer 2), ASF/SF2(alternative splicing factor/splicing factor 2)等<sup>[8,9]</sup>。SRp38 是一种新近发现的 SR 蛋白, 它具有典型的 SR 蛋白的结构特征, 但与大多数 SR 蛋白的作用不一致的是, 它可以在一定条件下抑制前体 mRNA 剪接, 从而可能具有非常重要的生理功能, 又因为该蛋白质的表达具有神经及生殖组织特异性, 而前体 mRNA 可变剪接在神经系统及生殖系统的发育及功能中具有重要作用, 鉴于该基因的重要性, 近年来, 我们基因生理学课题组在 SRp38 方面积累了一些初步的研究结果。在本文中, 我们就国内外对 SRp38 的研究近况作扼要综述。

## 1 SRp38 的发现

Yang 等<sup>[10]</sup>在对 TLS(translocated in liposarcoma)蛋白的研究中, 通过酵母双杂实验率先发现了一个具有多个 Ser-Arg 重复序列的蛋白质, 命名为 TLS 相关的 SR 蛋白, 简称 TASR(TLS-associated SR)。Komatsu 等<sup>[11]</sup>用消减 PCR(degenerate PCR)的方法从分化的 P19 细胞也克隆得到了该基因, 命名为 NSSR(neural salient SR), 即神经系统显著表达的 SR 基因。Cowper

收稿日期: 2007-4-20 接受日期: 2007-08-07

上海市卫生局科研基金资助项目(No.2006003)

\*通讯作者。Tel/Fax: 021-54237075, E-mail: matibuck@yahoo.com

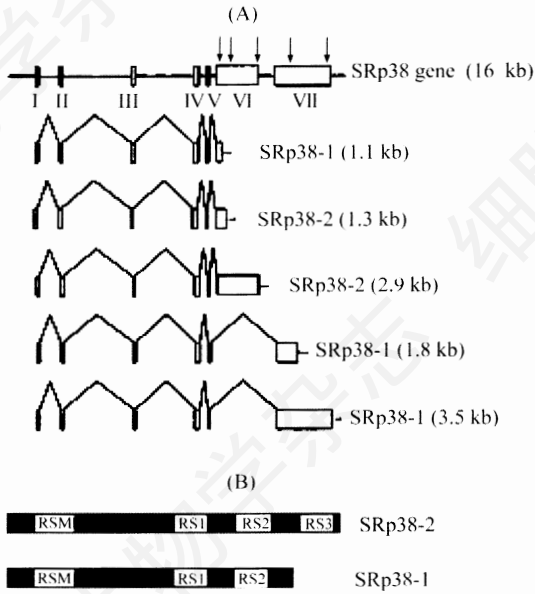


图1 SRp38的基因及蛋白质结构简图<sup>[14]</sup>

A: 基因以及 mRNA; B: 蛋白质。

等<sup>[12]</sup>通过对EST数据库的DNA序列检索查找符合SR蛋白特点的基因时,发现了一类具有典型SR蛋白特点的基因,根据其蛋白质产物分子量的大小命名为SRrp40,另一亚型为SRrp35。而Shin等<sup>[13]</sup>用另一种SR蛋白TRA2做诱饵,分离得到了两种未知的SR蛋白,根据其分子量的大小分别命名为SRp38和SRp38-2。通过基因序列的比较发现经过上述四种不同途径发现的SR蛋白是同一基因的产物,目前统称为SRp38。SRp38基因总长16 kb,该基因的蛋白质产物有两个经可变剪接产生的亚型,即SRp38和SRp38-2。两个亚型都具有经典的SR蛋白结构特点,即N端有1个RBD,C端有2或3个RS结构域(图1)。

## 2 SRp38基因的定位及结构

Clinton等<sup>[14]</sup>发现SRp38基因定位于人类的第一号染色体上,完整的SRp38基因序列包括七个外显子,经过pre-mRNA可变剪接分别产生SRp38和SRp38-2两类mRNA。其中SRp38不含6号外显子,而SRp38-2则不含7号外显子。进一步的研究发现,SRp38 mRNA由于所含7号外显子的长度不同而产生分别长为1.8 kb和3.5 kb的两种mRNA,SRp38-2 mRNA由于所含6号外显子的长度不同而产生三种mRNA(分别为1.1 kb、1.3 kb和2.9 kb)。SRp38作为调控前体mRNA可变剪接蛋白的基因,其本身前体mRNA的剪接也受其他的调控因子所调控,此一现象也佐证了前体mRNA可变剪接调控机制在基因功

能多样性中的重要性。调控SRp38前体mRNA可变剪接的机制还有待于进一步的研究。另外,SRp38基因还存在三个假基因,分别位于人类的第9、12、20号染色体上,假基因不具有转录功能,可能是由SRp38的一条长约1.8 kb的核苷酸序列插入造成的。Clinton等<sup>[14]</sup>还对SRp38基因的转录起始位点进行了研究,发现其转录起始位点位于基因的第997或998 bp处,该基因的启动子位置缺乏传统的真核启动子TATA框或CAAT框,而是富含GC碱基。它的这一特点可能与其在不同组织中的特异表达有关。

Komatsu等<sup>[11]</sup>对SRp38结构进行了研究,发现SRp38的N端有一个RNA识别域,氨基酸序列为RGFAYVQE,C端有SR区,氨基酸序列为RSRSXSX,SRp38的C端有三个SR区,而SRp38-2的C端只有两个SR区。通过比较人类及小鼠的SRp38基因及其蛋白质序列,发现两者在基因序列上几乎完全相同,而其氨基酸序列比对也显示仅有一个氨基酸不一样,说明SRp38基因在进化上是非常保守的。

## 3 SRp38的表达及分布

多位学者分别对SRp38在小鼠及人体组织内的表达情况进行了研究,其中包括日本的Komatsu等<sup>[11]</sup>和本课题组。通过采用Western印迹、Northern印迹等多种方法分析SRp38及mRNA在不同组织中的表达(小鼠的脑、脊髓、肺、肾、心、肝、脾、睾丸、肌肉等),结果发现SRp38及mRNA在小鼠的脑、睾丸、脊髓中均有较强的表达,而在其他组织中无表达或少表达,说明SRp38在小鼠体内的表达存在明显的组织特异性<sup>[11,15]</sup>。Cowper等<sup>[12]</sup>、Clinton等<sup>[14]</sup>曾报道SRp38的mRNA在人体各组织中均有表达,在骨骼肌、睾丸、胸腺、脾脏中的表达尤高。与此相对应,我们发现SRp38只在人体的神经系统以及睾丸中有表达,证明SRp38在人体中也具有神经及生殖系统表达特异性<sup>[12,15]</sup>。结果提示此种特异性可能与SRp38表达过程中的蛋白质翻译调控机制有关。

为了进一步探索SRp38在神经系统中的功能,我们进一步研究了SRp38在脑组织中以及在神经分化过程中的表达、分布。在鼠脑中,发现SRp38 mRNA在大脑皮层的室区、小脑、海马以及嗅球中有表达,而蛋白质主要在小鼠大脑神经元,小脑内的浦肯野氏细胞,海马CA1、CA2、CA3区的锥体神经元以及齿状回里的粒细胞中进行表达<sup>[15]</sup>。此外,Fushimi

等<sup>[16]</sup>也发现在视网膜以及晶状体上皮中有 SRp38 mRNA 的表达。更为重要的是在神经细胞分化过程中 SRp38 的表达呈比较明显的变化,其中,在未分化的 P19 细胞(小鼠胚胎瘤细胞)中 SRp38 的 mRNA 含量较少,而在分化后的神经元中其表达非常强烈,在 P19 分化的胶质细胞中则不表达;而 SRp38-2 的 mRNA 则在未分化的 P19 细胞中较多,在胶质细胞中也较多,在神经元中很少<sup>[11]</sup>。在未分化的神经干细胞中,仅能检测到 SRp38 的 mRNA,但其分化后,则既可以检测到 mRNA,也可以检测到蛋白质<sup>[17]</sup>。这些结果提示了 SRp38 可能在神经干细胞的分化过程中以及分化后的神经细胞功能运作中发挥作用。

我们通过对小鼠睾丸组织的研究还发现 SRp38 的表达主要位于精细胞的细胞质中,且主要以磷酸化的形式存在。在睾丸中 SRp38 的表达随着胚胎发育而不断增加,提示其可能在睾丸特别是精细胞的发育过程中发挥作用<sup>[18]</sup>。

#### 4 SRp38 磷酸化调节机制

SRp38 的磷酸化对其活性有着重要影响,Shin 等<sup>[13]</sup>的结果显示,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 对可变剪接的抑制作用有着重要的生理意义,在有丝分裂期,细胞内基因的转录、翻译、加工、修饰等活动全部停止,而这时 SRp38 以去磷酸化的形式存在,抑制了细胞在有丝分裂期间可能发生的剪接,对防止错误蛋白的产生,保证有丝分裂期的正常进行,甚至细胞周期的调控都有着重要意义。但 SRp38 的这种抑制作用是仅在少数细胞中存在还是在表达 SRp38 基因的细胞中广泛存在,目前还不得而知。

在热休克过程研究中进一步发现,SRp38 也趋向去磷酸化并抑制  $\beta$ -珠蛋白前体 mRNA 的剪接<sup>[19]</sup>。Laura 等<sup>[20]</sup>对热休克调控 SRp38 磷酸化的作用机制进行了研究,发现热休克蛋白 Hsp27 可以使 SRp38 恢复磷酸化并恢复其调控前体 mRNA 可变剪接的能力,而磷酸酶抑制剂花萼海绵诱癌素(calyculin) A 则可以在热休克时防止 SRp38 的磷酸化。而我们最近的研究结果也显示,在隐睾动物模型中,SRp38 的去磷酸化形式增加<sup>[18]</sup>。以上结果说明 SRp38 在热休克过程中也具有重要生理意义。

#### 5 SRp38 对前体 mRNA 可变剪接的影响

因为 SRp38 具有典型的 SR 蛋白的特征,许多作者对 SRp38 调节前体 mRNA 可变剪接的作用进行了研究。Yang 等<sup>[21]</sup>通过体外剪接试验发现 SRp38 能够降低 E1A 基因 13S 剪接亚型的表达,同时促进其 11S、10S、9S 三亚型的表达,证明 SRp38 具有调节前体 mRNA 可变剪接的作用。Komatsu 等<sup>[11]</sup>研究了 SRp38 对神经系统特有的可变剪接候选基因的作用,发现它不能调节原癌基因 C-SRC (cellular src) 的 N1 外显子的可变剪接形式,但可以对小鼠神经递质受体 AMPA (alpha amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid) 受体亚单位 GLUR-B (glutamate receptor subunit B) 基因的可变剪接发挥作用。该基因中有一对能被可变剪接的 Flip/Flop 外显子,SRp38 可以促进加入 Flip 外显子的剪接而 SRp38-2 促进不含 Flip 外显子的剪接,提示在 SRp38 及 SRp38-2 之间存在拮抗作用。我们认为这种拮抗作用预示了 SRp38 及 SRp38-2 可能通过结合在相同的 RNA 序列而发挥作用<sup>[11]</sup>。Cowper 等<sup>[12]</sup>也发现在体外 SRp38 可以影响  $\beta$ -珠蛋白、HIV-TAT、IgM 等前体 mRNA 的剪接。我们通过 SRp38 基因过表达以及 RT-PCR 分析,对一系列的在神经元中正常表达的基因的可变剪接情况进行了研究,结果发现 SRp38 可以调控内源的 Trk (tropomyosin-related kinase) 基因以及 NCAML1 (neural cell adhesion molecule L1) 基因剪接,它能够促进 Trk 基因 TrkC-1 亚型的剪接,也可以影响 NCAML1 基因外显子 2 的剪接<sup>[17]</sup>。NCAML1 基因具有促有丝分裂以及刺激神经细胞分化的作用,在神经细胞分化过程中,可以促进神经干细胞向神经元方向分化而减少其向星形细胞分化的可能<sup>[22]</sup>。而 Trk 也是一类与神经元的存活及分化相关的受体基因<sup>[23]</sup>。因此,这一发现说明 SRp38 在体内可能是通过影响特定的神经细胞分化相关的基因的可变剪接从而发挥其生理作用,最终影响神经细胞的分化。在睾丸中 SRp38 可以调节 CREB (cAMP response element-binding) 和 CREM (cyclic AMP-responsive element modulator) 的基因的剪接,并促进 CREB 包含 5 号外显子的剪接亚型的产生以及减少 CREM 包含 C 外显子的亚型的产生<sup>[18]</sup>。CREB 基因在精子的发生中发挥重要作用,其异常表达可以导致精子停止发生,因此 SRp38 在睾丸中也可以通过调节相关基因的剪接从而影响其生理功能的发挥<sup>[24]</sup>。

在前体 mRNA 可变剪接过程中,SR 蛋白不能单

独发挥调节的作用,需要通过同包括其他SR蛋白在内的蛋白质相互作用才能完成可变剪接过程。Yang等<sup>[10, 21]</sup>发现发现TLS可以通过其C端同SRp38蛋白相互作用并调节E1A (adenoviral early region 1A)前体mRNA的剪接。他们的研究还发现SRp38可以同EWS/FLI-1 (Ewing sarcoma protein/Friend leukemia integration site 1)作用,而TLS、EWS等都是肿瘤相关蛋白,其N端可以同RNA Pol II (RNA polymerase II)相作用,也从一个侧面反映了SRp38可能在肿瘤的发生及发展中扮演角色<sup>[25, 26]</sup>。Liu等<sup>[27]</sup>还发现SRp38可以同28S rRNA的肽转移酶中心作用,提示其有可能参与调节核糖体的生物发生及功能。SRp38同其他SR蛋白的作用也非常关键,研究发现SRp38可以拮抗由ASF/SF2、SC35 (spliceosome component of 35 kDa)等SR蛋白引起的可变剪接作用<sup>[12]</sup>。Shin等<sup>[13]</sup>也发现它可以与SR蛋白及剪接相关蛋白TRA2相互作用。进一步的研究还发现在有丝分裂期以及热休克过程中,SRp38都与snRNP复合物共定位<sup>[28]</sup>。Fushimi等<sup>[16]</sup>则发现SRp38的RRM结构域可以同U1snRNP的亚基U1-70K相结合,而其RS结构域则可以调控网格蛋白轻链小基因的可变剪接,明确了SRp38参与剪接复合体的形成。Shin等<sup>[28]</sup>通过构建缺失突变及嵌合蛋白,发现SRp38的RS1结构域参与调节前体mRNA可变剪接反应,而RS2结构域则在去磷酸化和抑制前体mRNA可变剪接中发挥作用。

现有的研究显示SRp38的各结构域都可以分别与不同的蛋白质以及RNA进行复杂的相互作用,它们之间的这种作用可能正是SRp38在不同的动物及组织中发挥不同的生理功能的基础。基于SRp38在调控前体mRNA的剪接中的特殊功能,其与各种反式因子尤其是SR蛋白的作用的研究目前显得还很欠缺,机制也有待进一步研究。

## 6 SRp38生理作用的研究

Yang等<sup>[21]</sup>发现在K562细胞中,TLS可以通过C端同SRp38蛋白作用并影响细胞表面受体CD44的不同剪接亚型的表达。CD44编码产物为一细胞黏附分子,该分子通常在一些肿瘤及淋巴瘤中异常表达,而CD44可变剪接的变化同哺乳类癌症的发展阶段有关联<sup>[29]</sup>,进一步揭示了SRp38同哺乳类癌症的发生以及发展之间的可能的相关性。

另外,Liu等<sup>[27]</sup>发现SRp38在爪蟾胚胎发育的神经板期开始表达,其表达与Neuro D的诱导有关,去

除SRp38的活性则会直接导致神经发生的失调。通过将mRNA注射到非洲爪蟾的胚胎中,他们还发现SRp38可以阻止爪蟾NRP-1 (neuropilin)蛋白(神经系统标志蛋白)的表达,同时阻断由noggin基因引起的神经系统分化以及由neurogenin基因引起的微管蛋白和Neuro D的蛋白表达。而在爪蟾的外胚层中异位表达SRp38可以促进delta基因以及ID3 (inhibitor of DNA binding 3)基因的表达。因为这两者都是Notch基因的作用靶点,因此作者推测SRp38基因很可能是通过作用于Notch基因从而将信号传递下去并最终发挥生理功能<sup>[30]</sup>。后生动物Notch受体信号在神经分化中可以决定细胞的命运,调控发育中轴的形成,其调节障碍会导致发育缺陷甚至癌症的发生<sup>[31]</sup>,所以,开展对SRp38作用机制的信号转导途径的研究,也将从分子水平上加深人们对SRp38的作用机制的了解。

## 7 展望

作为一个新发现的基因,对SRp38的研究正不断深入中,从目前的资料看,SRp38是一个作用广泛的SR蛋白。它不仅可以象传统的SR蛋白一样调节前体mRNA的可变剪接,也可以拮抗其他SR蛋白的作用,更加引人注目的是它还可以直接同一些肿瘤相关蛋白相互作用,预示它可能与肿瘤的发生以及发展相关联。SRp38可以在细胞有丝分裂期抑制RNA的剪接,也印证了该预测,因为如果在有丝分裂期间发生剪接甚至错误剪接,则会影响到细胞周期的正常调控甚至导致细胞发生转化。SRp38可以通过Notch受体传递信号,而Notch受体信号传递障碍也与肿瘤的发生相关,同样与该预测一致。鉴于神经系统的重要地位,SRp38在神经系统发育及分化中的作用也引人关注,进一步的寻找SRp38调控的神经特异性可变剪接基因,研究SRp38与神经系统中各主要核团发育分化之间的联系以及SRp38与各类神经细胞分化之间的关联,将有助于人们深入了解SR蛋白在神经系统中所发挥的重要生理功能及分子机制。

### 参考文献(References)

- [1] Garcia-Blanco MA *et al.* *J Clin Invest*, 2003, **112**: 474
- [2] Graveley BR *et al.* *Trends Genet*, 2001, **17**: 100
- [3] Nilsen TW *et al.* *Bioessays*, 2003, **25**: 1147
- [4] Jurica MS *et al.* *Mol Cell*, 2003, **12**: 5
- [5] Black DL. *Annu Rev Biochem*, 2003, **72**: 291
- [6] Cáceres JF *et al.* *Trends Genet*, 2002, **18**: 186
- [7] Escobar AJ *et al.* *In Silico Biol*, 2006, **6**: 347

- [8] Philipps D *et al. Nucleic Acids Res*, 2003, **31**: 6502  
[9] Shen H *et al. Genes Dev*, 2006, **20**: 1755  
[10] Yang L *et al. J Biol Chem*, 1998, **273**: 27761  
[11] Komatsu M *et al. Genes Cells*, 1999, **4**: 593  
[12] Cowper AE *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 48908  
[13] Shin C *et al. Cell*, 2002, **111**: 407  
[14] Clinton JM *et al. Gene*, 2002, **284**: 141  
[15] Liu L *et al. Neuroreport*, 2003, **14**: 26  
[16] Fushimi K *et al. Genes Cells*, 2005, **10**: 531  
[17] Liu L *et al. Neuroreport*, 2004, **15**: 823  
[18] Xiao PJ *et al. Mol Rep Dev*, 2007, **74**: 1363  
[19] Shin C *et al. Nature*, 2004, **427**: 553  
[20] Marin-Vinader L *et al. Mol Biol Cell*, 2006, **17**: 886  
[21] Yang L *et al. Mol Cell Biol*, 2000, **20**: 3345  
[22] Hortsch M *et al. Mol Cell Neurosci*, 2000, **15**: 1  
[23] Alejandro F *et al. Trends Neurosci*, 2000, **23**: 639  
[24] Adham IM *et al. Mol Cell Biol*, 2005, **25**: 7657  
[25] Chansky HA *et al. Cancer Res*, 2001, **61**: 3586  
[26] Yang L *et al. J Biol Chem*, 2000, **275**: 37612  
[27] Liu KJ *et al. Development*, **132**: 1511  
[28] Shin C *et al. Mol Cell Biol*, 2005, **25**: 8334  
[29] Stickeler E *et al. Oncogene*, 1999, **18**: 3574  
[30] Shi S *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 5234  
[31] Roy M *et al. Cur Opin Genet Dev*, 2007, **17**: 52

## The Progress in Researches of SRp38 Gene

Zheng-Yu Peng, Wei Zhang<sup>1</sup>, Xian-Hua Chen, Ping Xu\*

(State Key Laboratory of Medical Neurobiology, Fudan University, Shanghai 200032, China; <sup>1</sup>Department of Pharmaceutic, City College of Zhejiang University, Hangzhou 310015, China)

**Abstract** SR proteins play important role in regulating pre-mRNA alternative splicing. As a newly discovered neural and reproductive specific SR protein, SRp38 has typical structure of SR protein and can regulate alternative splicing of several genes such as GLUR-B, TRK-C and NCAML1 etc. But unlike the other SR proteins, during mitosis or stress response, SRp38 can act as splicing inhibitor in order to prevent wrong splicing. The RRM motif of SRp38 can recognize specific mRNAs sequence and the RS domain is responsible for the activity of the modified exon inclusion. The physiological function of SRp38 is regulated by its phosphorylation status. It is dephosphorylated in M phase cells or after heat shock. SRp38 plays important role in neuronal differentiation during early embryogenesis and can also interaction with TLS hint its function as a regulator in neurogenesis as well as carcinogenesis.

**Key words** SRp38; pre-mRNA alternative splicing; phosphorylation; regulation

Received: April 20, 2007 Accepted: August 7, 2007

This work was supported by the Research Program of Shanghai Health Department (No.2006003)

\*Corresponding author. Tel/Fax: 86-21-54237075, E-mail: matibuck@yahoo.com