施一公发表三小核核糖核蛋白复合物 3.8 埃结构

Yigong Shi Reported the 3.8 Å Structure of tri-snRNP

2016 年 1 月 29 日，清华大学生命学院施一公教授研究组在《科学》（Science）就剪接体的结构与机理研究再发长文（Research Article），题为《U4/U6.U5 三小核核糖核蛋白复合物 3.8 埃的结构：对剪接体组装及催化的理解》（The 3.8 A Structure of the U4/U6.U5 tri-snRNP: Insights into Spliceosome Assembly and Catalysis），报道了酿酒酵母（Saccharomyces cerevisiae）剪接体组装过程中的一个关键复合物 U4/U6.U5 tri-snRNP 高达 3.8 埃分辨率的冷冻电镜结构，并在此基础上分析了剪接体的组装机制，为进一步理解剪接体的激活及前体信使 RNA（pre-mRNA）剪接反应的催化机制提供了重要分子基础。该结构与 2015 年 8 月施一公研究组报道的分辨率为 3.6 埃的裂殖酵母（Schizosaccharomycs pombe）剪接体结构的对比揭示了剪接体在 pre-mRNA 剪接反应过程中作为核酶（ribozyme）的催化本质，是 RNA 剪接研究领域的又一重大进展。

剪接体作为真核细胞中催化 pre-mRNA 剪接过程的执行者，是真核生物最基本的分子机器之一，对于正常生命活动具有至关重要的作用。基因的错误剪接或剪接体的错误调控与许多疾病相关。在剪接反应过程中，组成剪接体的大量蛋白质和核酸分子按照高度精确的顺序进行结合和解聚，在此过程中伴随大规模的结构重组，依次组装成命名为 E、A、B、Bact、B*、C、P、ILS 等等的一系列大分子复合物，从而实现对内含子与外显子交界位点的识别，以及内含子的切除和外显子的拼接。在近二百种剪接体组分中，U6 小核 RNA（snRNA）包含对于剪接反应具有直接催化活性的尿嘧啶核糖核苷酸（Uridine）。该核苷酸是如何在起始时被保护从而处于失活构象、又如何在适当时机被释放激活从而行使催化功能，是揭示剪接体工作机理的核心问题之一。剪接体成分复杂多变、构象高度动态，所以对于剪接体组装及催化过程中各复合物的结构生物学研究是最基础也是最富挑战性的生物学难题之一。

U4/U6.U5 tri-snRNP 是剪接体组装过程中最大也是最保守的预组装复合物，它由 U5 小核核糖核蛋白（snRNP），U4、U6 snRNA 和其他蛋白因子组成。在该复合物中，U6 snRNA 呈现失活构象。U4/U6.U5 tri-snRNP 与 A 复合物结合形成 B 复合物，再经过一系列成分、构象重组后，U1、U4 snRNP 解离，剪接体形成，U6 snRNA 从而被激活。所以，tri-snRNP 的加入是组装成具有催化活性的剪接体这个过程中不可或缺的一步，其高分辨率结构的解析对于揭示 pre-mRNA 剪接反应的分子机理至关重要。早期对于该复合物的结构研究分辨率较低，仅有 2 纳米，除了显示一个三角形的外观之外基本不能提供更多信息。2015 年 6 月，英国分子生物学实验室 Nagai 研究组利用冷冻电镜将其分辨率提高至 5.9 埃，定位出多个组分，显示了一些二级结构，但由于分辨率所限，仍不足以搭建原子模型。

在施一公研究组最新发表的《科学》论文中，他们探索并优化了蛋白提纯方案，获得了性质良好的酿酒酵母 U4/U6.U5 tri-snRNP 复合物的蛋白样品，并利用单颗粒冷冻电镜技术重构出了总体分辨率为 3.8 埃的三维结构，核心区域分辨率更是高达 3.0-3.5 埃，从而首次将该复合物分辨率推进至近原子分辨率，并搭建了该复合物的原子模型。该结构清晰显示由于 U6 与 U4 snRNA 的碱基互补配对作用和蛋白因子 Prp3 的保护作用，U6 snRNA 中的催化核苷酸 Uridine 80 被稳定在失活构象。

在此高分辨率的结构中，一个出人意料的发现是 U4/U6.U5 tri-snRNP 复合物中存在着与之结合的 pre-mRNA。该 pre-mRNA 通过与 U5 snRNA 和 U6 snRNA 碱基互补配对被识别，其 5’剪接位点中高度保守的鸟嘌呤核糖核苷酸（Guanine）被关键蛋白 Prp8 特异性识别。这一发现为剪接体的组装和剪接反应的催化提供了新的见解。

The 3.8 Å structure of the U4/U6.U5 tri-snRNP: Insights into spliceosome assembly and catalysis

U4/U6.U5 三小核核糖核蛋白复合物 3.8 埃的结构：对剪接体组装及催化的理解

清华大学 施一公

2016 年 1 月 29 日

DOI: 10.1126/science.aad6466

http://science.sciencemag.org/content/351/6272/466

Splicing of precursor messenger RNA is accomplished by a dynamic megacomplex known as the spliceosome. Assembly of a functional spliceosome requires a preassembled U4/U6.U5 tri-snRNP complex, which comprises the U5 small nuclear ribonucleoprotein (snRNP), the U4 and U6 small nuclear RNA (snRNA) duplex, and a number of protein factors. Here we report the three-dimensional structure of a Saccharomyces cerevisiae U4/U6.U5 tri-snRNP at an overall resolution of 3.8 angstroms by single-particle electron cryomicroscopy. The local resolution for the core regions of the tri-snRNP reaches 3.0 to 3.5 angstroms, allowing construction of a refined atomic model. Our structure contains U5 snRNA, the extensively base-paired U4/U6 snRNA, and 30 proteins including Prp8 and Snu114, which amount to 8495 amino acids and 263 nucleotides with a combined molecular mass of ~1 megadalton. The catalytic nucleotide U80 from U6 snRNA exists in an inactive conformation, stabilized by its base-pairing interactions with U4 snRNA and protected by Prp3. Pre-messenger RNA is bound in the tri-snRNP through base-pairing interactions with U6 snRNA and loop I of U5 snRNA. This structure, together with that of the spliceosome, reveals the molecular choreography of the snRNAs in the activation process of the spliceosomal ribozyme.