

清华大学在 Cell 杂志发表冷冻电镜相关新成果

Tsinghua University Has Published the New Results Related to Cryoelectron Microscopy in Cell



王宏伟教授

【Cell 系列】2018 年 5 月 17 日，清华大学生命学院、清华-北大生命科学联合中心、北京市结构生物学高精尖创新中心王宏伟教授研究组在 Cell 期刊发表了题为《人源核酸内切酶 Dicer 蛋白与 Dicer-pre-miRNA 复合体的冷冻电镜结构》的研究论文，首次报道了人源核酸内切酶 Dicer 蛋白的全长高分辨率结构，同时还报道了人源核酸内切酶 Dicer 蛋白结合一种小 RNA 前体 pre-let-7 底物的两种不同结构状态。

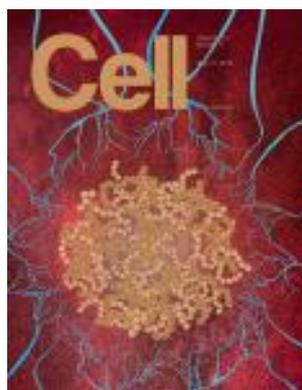
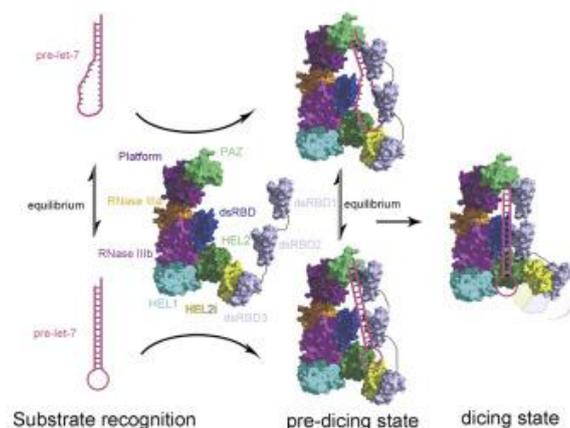
过去十年的时间里，王宏伟以及其他课题组都尝试运用单颗粒电镜的方法去解析人源核酸内切酶 Dicer 蛋白的三维结构。经过不断地摸索，研究组解决了蛋白质样本准备、冷冻样本制备、数据收集及处理等多方面的技术难题，最终采用从哺乳动物 293F 细胞系中共表达蛋白复合物，亲和层析分离纯化蛋白质，采用纯金或者镀金载网制备出了分布较为均一、优势取向相对较少的冷冻电镜样品，并获得了人源 Dicer 及其辅因子蛋白 TRBP 复合体的高分辨率三维结构（4.4 埃），首次解析了人源核酸内切酶 Dicer 蛋白的高分辨率整体结构，看到了核酸内切酶 Dicer 蛋白中各结构域的精确三维分布及结构域之间的空间关系。

为了更进一步了解人源核酸内切酶 Dicer 蛋白是怎样加工微小 RNA 前体的过程，王宏伟研究组通过体外重组的方法获得了人源 Dicer-TRBP 复合物与一种微小 RNA 的前体 pre-let-7 所形成的三元复合物，并解析了该复合物的两种三维结构状态。一种是 pre-let-7 的茎部呈完全互补结构（hDicer-TRBP-pre-let-7 complex class I），另一种是 pre-let-7 的茎部呈部分解离的状态（hDicer-TRBP-pre-let-7 complex class II）。

王宏伟研究组与清华大学张强锋研究组合作，通过化学修饰测序（icSHAPE）、核糖核酸酶酶切、测序胶电泳等技术，发现 pre-let-7 在溶液中呈动态的构象平衡，一部分 pre-let-7 的茎部是完全配对的双链螺旋结构，也有一部分 pre-let-7 的茎部是呈部分解离的状态。深入的研究表明人源 Dicer 蛋白与 TRBP 形成的复合物与 pre-let-7 结合可以促进该 RNA 向茎部完全配对的双链螺旋结构转换，确保其茎部在被 Dicer 蛋白切割前的构象均一性，从而保证微小 RNA

产物的精确长度。正是这个机制有可能保证了人源 Dicer 蛋白精确地将众多结构特征不同的微小 RNA 前体切割成具有共同的 22nt 长度的产物。这项工作为进一步解析微小 RNA 的成熟机制奠定了基础。

Human Dicer-TRBP complex recognizes and processes pre-miRNAs with variant structures into products with uniform features.



Cryo-EM Structure of Human Dicer and Its Complexes with a Pre-miRNA Substrate

人源核酸内切酶 Dicer 蛋白与 Dicer-pre-miRNA 复合体的冷冻电镜结构

清华大学 王宏伟

5 月 17 日

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.080>

Human Dicer (hDicer) is a multi-domain protein belonging to the RNase III family. It plays pivotal roles in small RNA biogenesis during the RNA interference (RNAi) pathway by processing a diverse range of double-stranded RNA (dsRNA) precursors to generate ~22 nt microRNA (miRNA) or small interfering RNA (siRNA) products for sequence-directed gene silencing. In this work, we solved the cryoelectron microscopy (cryo-EM) structure of hDicer in complex with its cofactor protein TRBP and revealed the precise spatial arrangement of hDicer's multiple domains. We further solved structures of the hDicer-TRBP complex bound with pre-let-7 RNA in two distinct conformations. In combination with biochemical analysis, these structures reveal a property of the hDicer-TRBP complex to promote the stability of pre-miRNA's stem duplex in a pre-dicing state. These results provide insights into the mechanism of RNA processing by hDicer and illustrate the regulatory role of hDicer's N-terminal helicase domain.