

动物细胞核内 miRNA 的加工过程

王 芳 汤 华*

(天津医科大学生命科学中心实验室, 天津 300070)

摘要 microRNA (miRNA)是存在于真核生物中的一类大的基因家族, 与其靶 mRNA 分子一起形成了生物体内复杂的调控网络。miRNA 在基因表达调节过程中的关键性作用涉及到发育时序的控制、造血细胞的分化、细胞凋亡、细胞增殖以及器官的形成等方面。其中最值得探讨的问题是 miRNA 的生物发生过程及其调控机制。近年来, miRNA 在动物细胞核中加工机制的研究取得了较大的进展。在细胞核中, RNA 多聚酶 II 指导的 miRNA 基因的转录, 微处理器作用下的 pri-miRNA 的剪切及 exportin-5 协助下的 pre-miRNA 的输出过程彼此协调, 共同而有序的完成 miRNA 在细胞核中的加工过程。

关键词 microRNA; RNA 多聚酶 II; 微处理器; exportin-5

microRNA (miRNA)是存在于真核生物中的一类大的基因家族, 由内源性发夹状转录产物衍生而来, 长为 19~25 碱基(nt), 为单链 RNA, 其编码基因约占基因组的 1%^[1-3]。在每种高等生物中, 均存在 200 种以上的 miRNA。随着研究的进展, 发现的可以编码 miRNA 的生物种类, 以及各种生物中已发现的 miRNA 的种类都在不断的增加中, 而且最新的研究还发现, 部分双链 DNA 病毒如 Epstein-Barr (EB)病毒, 卡波氏肉瘤相关疱疹病毒(Kaposi sarcoma-associated herpesvirus, KSHV)等都可以编码产生 miRNA^[4, 5]。成熟的 miRNA 可以作为一种引导性分子, 依据碱基配对原则, 与靶 mRNA 结合而在转录后水平引起靶 mRNA 的剪切或翻译的抑制, 从而发挥对基因表达的调控作用。研究发现, miRNA 对基因表达的调控作用涉及到生物体生长发育的诸多过程, 包括发育时序的控制、造血细胞的分化、脂肪代谢、细胞凋亡、细胞增殖以及器官的形成等。此外, 推测病毒的 miRNA 可能在病毒的致病性及病毒与宿主之间的相互作用方面发挥一定的作用。可见, miRNA 和它的靶 mRNA 分子一起形成了一个复杂的调控性网络, 在生物体生长发育的不同阶段、不同层面进行调控。

目前最新的研究进展大部分都来源于 miRNA 生物发生过程的研究。miRNA 的加工有两种方式, 即动物模式和植物模式, 后者不仅无 Droscha 存在, 而且它的加工、成熟过程全在细胞核内完成。从目前的研究报道来看, 动物细胞核中的 miRNA 加工途径

基本上已经形成了一个相对完整的体系, 从最初的编码 miRNA 的基因在细胞核中进行转录, 到最后 miRNA 的前体输出细胞核, 形成一个协调作用的加工体系。本文仅综述动物细胞核内 miRNA 加工过程的一些研究新进展。

1 miRNA 生物发生的基本概况

成熟的 miRNA 是一种长约 19~25 nt 大小的单链 RNA, 而编码 miRNA 的基因则位于基因间区或基因的内含子中。miRNA 的形成需要经历如下阶段: 基因的转录、原始转录本(primary miRNA, pri-miRNA)的加工、miRNA 前体分子(miRNA precursor, pre-miRNA)转运、pre-miRNA 的剪切及 miRNA 链的选择共 5 步, 最后形成具有生物学功能的成熟单链 miRNA。它可以组合进入 RNA 诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)中, 进而引起靶 mRNA 的降解或翻译的抑制。而 miRNA 究竟发挥哪种作用, 是由 miRNA 与靶 mRNA 之间的互补程度决定的。当二者完全匹配时, 引起靶 mRNA 的降解, 二者不完全匹配时, 则引起靶 mRNA 翻译的抑制^[6]。

在 miRNA 的生物发生过程中, miRNA 基因的转录是由 RNA 多聚酶 II (pol II)催化完成的, 形成 pri-miRNA^[7]; 然后, pri-miRNA 在细胞核中的一种

收稿日期: 2005-07-18 接受日期: 2005-11-29

* 通讯作者。Tel: 022-23542603, Fax: 022-23542503, E-mail:

htang2002@yahoo.com

“微处理器(microprocessor)”蛋白质复合体的作用下,产生具有特征性的大约 70 nt 大小的发夹状 pre-miRNA。生成的 pre-miRNA 在核转运受体 exportin-5 (Exp-5)的作用下,转运到细胞浆中。细胞浆中的 pre-miRNA 在 Dicer 的作用下,剪切产生大约 22 nt 大小的双链 miRNA。其中只有一条单链可以选择性结合到 RISC 中去而成为成熟 miRNA。一般而言,成熟的 miRNA 多为具有 5' 端小突起的那条链。

2 miRNA 加工的核内过程

miRNA 在细胞核中经历了从最初的 miRNA 基因到大约 70 nt 大小的 miRNA 前体阶段。在这个过程中,有多种不同的细胞核内蛋白质的参与,这些蛋白质相互协调作用,保证 miRNA 在细胞核内的正常加工。

2.1 RNA pol II 作用下的 miRNA 基因的转录

研究已经发现 miRNA 的基因绝大部分定位于基因间区,也有一部分位于基因中的非编码区域,即内含子中^[7,8]。这些 miRNA 的基因一般由 RNA pol II 进行转录^[9],生成的 pri-miRNA 长达几千个碱基,有帽子结构(cap structure)和 polyA 尾^[10,11],同时具有一个或几个局部的发夹状结构^[7],以多顺反子形式存在。最近的研究还发现大约 50% 的 miRNA 基因彼此相邻,簇集存在,带有自己独立的转录启动子^[9,12]。可见,miRNA 的基因也类似于其他的基因,在不同的发育阶段及不同的组织类型中,处在 pol II 的精确调控之下^[13,14]。目前,推测由 RNA pol II 指导的转录可能具有如下的优点:① miRNA 基因的转录可以被不同的 pol II 调节因子所控制,从而使得在不同的发育阶段,不同的细胞类型中表达特异的 miRNA;② miRNA 和编码蛋白质的基因表达可能存在彼此协调的作用,尤其是二者同时位于一个转录本时更为明显。Rodriguez 等^[10]通过分析 miRNA 基因组定位与已知的转录单元之间的关系,发现大约 70% (232 个中有 161 个)的哺乳动物的 miRNA 基因定位于确定的转录单元上。其中,117 种 miRNA 基因存在于内含子的有义链方向上,30 种 miRNA 与非编码 RNA 的外显子重叠,而 14 种 miRNA 依据剪接形式的不同而可以与外显子或内含子重叠(称之为混合的 miRNA)。在这 117 种内含子的 miRNA 中,90 种 miRNA 位于编码蛋白质的基因内含子中,而另外的 27 种 miRNA 位于非编码 RNA 的内含子中。因此,根据基因定位的不同,miRNA

基因可以分为如下几类^[15]:第一,非编码转录单元的外显子 miRNA,如 miR-155;第二,非编码转录单元的内含子 miRNA,如 miR-15a,位于非编码 RNA 基因 *DLEU2* 的内含子区;第三,编码蛋白质转录单元的内含子 miRNA,如 miR-25,位于编码 DNA 复制允许因子 *MCM7* 转录本的第 13 个内含子中。混合的 miRNA 基因根据其剪接形式的不同而可以归为上述三类中的任一类。

2.2 微处理器对 pri-miRNA 的加工

从 pri-miRNA 到 pre-miRNA 的加工,需要细胞核中一种叫做微处理器的复合体的作用。在其作用下,pri-miRNA 被加工成为 pre-miRNA,这一过程在细胞核中完成。细胞核中的微处理器在不同的生物体中,所包含的成分不尽相同。在线虫、果蝇及哺乳动物体内,该复合体至少包含有两种蛋白质成分,分别为 Drosha 和 Pasha (Partner of Drosha)。在人类,Pasha 又称为 DiGeorge 综合征关键区域基因 8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8, DGCR8)^[16~18]。

Drosha 大约 160 kDa 大小,全长大约 1300 个氨基酸,是 RNA 酶 III (RNase III) 家族成员之一,包含有一个脯氨酸富集区,精氨酸-丝氨酸富集区、两个 RNA 酶 III 结构域和 C 端的一个双链 RNA 结合结构域(double-stranded RNA-binding domain, dsRBD)^[18]。Drosha 在线虫、果蝇以及人类中具有保守性。Drosha 在果蝇体内形成一种大约 500 kDa 大小的复合体^[16],而在人类体内形成的复合体大约 650 kDa 大小^[17,18]。这一复合体即微处理器。Drosha 的主要作用是剪切 pri-miRNA 形成具有 3' 端 2 nt 悬垂的 pre-miRNA,此为 RNase III 作用的主要特征。生成的 pre-miRNA 的具有 3' 端 2 nt 悬垂的末端即为成熟 miRNA 的一端,而 miRNA 另一端是由 Dicer 在距离已知末端大约 22 nt 的位点上剪切而成的。可见,Drosha 的加工决定着 miRNA 的真正序列,其加工的特异性是 miRNA 的整个生物发生过程中特异性最高的。研究发现,pri-miRNA 的三维结构是底物特异性的主要决定因素^[19~21]。剪切位点附近双链的茎部结构^[19,20]和末端的环状结构(>10 nt)^[20,21]也是非常关键的。而且,Drosha 复合体可以测量茎部的长度,一般在距离末端的环状结构约 2 个螺旋转角(helical turn)(大约 22 nt)的地方进行剪切^[21]。此外,研究还发现 Drosha 间接地参与了前核糖体 RNA 的加工^[22]。

微处理器的另一个关键成分是 Pasha。Pasha 为 dsRNA 结合蛋白, 参与 Drosha 对底物的识别^[16-18,23]。抑制该基因的表达可以使 pri-miRNA 在细胞核中的堆积增加。DGCR8 是第一个被鉴定出来的参与体内 miRNA 加工过程的 Pasha, 进化上具有保守性, 约 120 kDa 大小, 包含有两个 dsRNA 结合结构域和一个已知的可以与脯氨酸富集的多肽相互作用的 WW 结构域, DGCR8 的 WW 结构域很可能是与 Drosha 的 N 端脯氨酸富集区发生相互作用的部位。DGCR8 是染色体的 22q11.2 的预测的 30 个基因中的一个, 在人类最常见的遗传综合征——DiGeorge 综合征中非等位性缺失^[23,24]。所以, 有人推测 DiGeorge 综合征的发病可能与人类 miRNA 的加工和表达过程的紊乱有关^[23]。

2.3 微处理器对 pri-miRNA 的剪切机制

Drosha 对 pri-miRNA 转录本进行特异性识别的机制尚未完全明了。研究发现 Drosha 对发夹状茎环结构有一定的亲和力, 而且 Drosha 也通过一些可以特异识别 pri-miRNA 的中介因子而招募 pri-miRNA 到其剪切位点上进行剪切。Pasha 即为一种已经发现的有助于 Drosha 进行底物特异性识别的蛋白质。Han 等^[18]提出了关于 pri-miRNA 剪切机制的“一个加工中心”的模型。该模型认为 Drosha 与 Pasha 形成异二聚体, 对 pri-miRNA 的茎环状结构部分进行剪切。其中, Drosha 结合在远离末端环的双链 RNA 上, 两个 RNase III 结构域(RIIDA 和 RIIDb)形成分子内二聚体, 构成一个加工中心, 加工中心中的两个活性位点紧密相邻, 在距离末端环约两个螺旋转角的地方, 在相反方向上剪切 RNA 链上邻近的磷酸二酯键。RIIDA 一侧的催化位点催化 3' 链的剪切, 而 RIIDb 一侧的催化位点则催化 5' 链的剪切。活性中心位点由对应于超耐热菌 *Aquifex aeolicus* 的 RNase III 中谷氨酸 E40、天冬氨酸 D44、D107 和 E110。而 Pasha 则结合在靠近末端环状结构的部分, 有助于 pri-miRNA 的识别及微处理器在底物分子上的定向。

3 pre-miRNA 的细胞核输出

Drosha 对 pri-miRNA 加工完毕之后, 产生的 pre-miRNA 需要输出到细胞浆中, 才可以在 Dicer 作用下生成大约 22 nt 大小的 miRNA 双链。这一输出过程需要 pre-miRNA 在核孔转运受体的作用下穿过位于核膜上的核孔复合体, 而进入细胞浆中。现在

已经确定进行 pre-miRNA 输出的主要核孔转运受体为 Exp-5。除此之外, Exp-5 可以少量地输出 tRNA 和腺病毒 RNA VA^[25,26]。Exp-5 对底物进行识别的特异性是由底物所具有的特征性“微小螺旋”所决定的, 与序列无关。该螺旋中包含有大于 14 bp (碱基对)的茎部和 3~8 nt 的 3' 端悬垂^[26], 而 pre-miRNA 所具有的类似的茎部结构和大约 2 nt 的 3' 端悬垂使得 Exp-5 对其的亲和力远远高于其他两种底物, 而且 pre-miRNA 在细胞中的含量相当高, 所以很可能 pre-miRNA 就是 Exp-5 进行输出的主要底物^[27]。Exp5 与 Ran-GTP 以及 pre-miRNA 形成异三聚体, 通过核孔到达胞浆后, Ran-GTP 转变为 Ran-GDP, 释放出 pre-miRNA^[28,29]。此外, 还发现 pre-miRNA 与 Exp-5 结合之后还可以稳定 pre-miRNA^[28]。

总之, miRNA 基因从开始在细胞核中进行转录到最后输出到胞浆中所涉及的几步加工过程彼此前后呼应, 协调发挥作用。但是, RNA pol II 转录过程究竟受到怎样的调控才可以保证 miRNA 表达的阶段特异性和组织特异性, Drosha 对 miRNA 进行剪切的过程中是否有其他因子的协助等都需要进行进一步的研究。细胞核中 miRNA 加工过程中是否有新的蛋白质参与, 这些新的蛋白质对 Drosha 剪切究竟有何作用等将是未来研究的重要方面。

参考文献 (References)

- [1] Ambros V *et al.* *RNA*, 2003, **9**: 277
- [2] Bartel DP. *Cell*, 2004, **116**: 281
- [3] Cullen BR. *Mol Cell*, 2004, **16**: 861
- [4] Pfeffer S *et al.* *Science*, 2004, **304**: 734
- [5] Cai X *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**: 5570
- [6] Hutvagner G *et al.* *Science*, 2002, **297**: 2056
- [7] Lagos-Quintana M *et al.* *Science*, 2001, **294**: 853
- [8] Lau NC *et al.* *Science*, 2001, **294**: 858
- [9] Lee Y *et al.* *EMBO J*, 2004, **23**: 4051
- [10] Rodriguez A *et al.* *Genome Res*, 2004, **14**: 1902
- [11] Bracht J *et al.* *RNA*, 2004, **10**: 1586
- [12] Cai X *et al.* *RNA*, 2004, **10**: 1957
- [13] Sempere LF *et al.* *Genome Biol*, 2004, **5**: R13
- [14] Liu CG *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 9740
- [15] Kim VN. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, **6**: 376
- [16] Denli AM *et al.* *Nature*, 2004, **432**: 231
- [17] Gregory RI *et al.* *Nature*, 2004, **432**: 235
- [18] Han J *et al.* *Genes Dev*, 2004, **18**: 3016
- [19] Lee Y *et al.* *Nature*, 2003, **425**: 415
- [20] Zeng Y *et al.* *RNA*, 2003, **9**: 112
- [21] Zeng Y *et al.* *EMBO J*, 2005, **24**: 138
- [22] Wu H *et al.* *J Biol Chem*, 2000, **275**: 36957
- [23] Landthaler M *et al.* *Curr Biol*, 2004, **14**: 2162
- [24] Shiohama A *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **304**:

- 184
[25] Bohnsack MT *et al. EMBO J*, 2002, **21**: 6205
[26] Gwizdek C *et al. J Biol Chem*, 2003, **278**: 5505

- [27] Lim LP *et al. Genes Dev*, 2003, **17**: 991
[28] Yi R *et al. Genes Dev*, 2003, **17**: 3011
[29] Lund E *et al. Science*, 2004, **303**: 95

The Progress of MicroRNA Processing in Animal Nucleus

Fang Wang, Hua Tang*

(Tianjin Life Science Research Center, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract MicroRNAs (miRNAs) are one of the largest gene families in higher eukaryotes. With their mRNA targets, miRNAs seem to form complex regulatory networks. miRNAs have key roles in diverse regulatory pathways, including control of developmental timing, haematopoietic cell differentiation, apoptosis, cell proliferation and organ development. The most pressing questions regarding this unusual class of regulatory miRNA are how miRNAs are produced in cells and how the genes themselves are controlled by various regulatory networks. The study on miRNA biogenesis in animal nucleus has made great advances in recent years. The pathways in the nucleus include three steps: the transcription of miRNA gene directed by RNA polymerase II, the processing by Drosha and the export by exportin-5. These biogenesis factors coordinate and control the pathways of miRNA biogenesis.

Key words microRNA; RNA polymerase II; microprocessor; exportin-5

Received: July 18, 2005 Accepted: November 29, 2005

*Corresponding author. Tel: 86-22-23542603, Fax: 86-22-23542503, E-mail: htang2002@yahoo.com