

RNA 干扰介导原核细胞适应性免疫

李铁民*

(辽宁大学生命科学院, 沈阳 110036)

摘要 RNA 干扰广泛存在于真核细胞中, 其作用机制已得到比较清楚阐明。虽然在原核细胞中已发现微小RNA(miRNA)参与的基因沉默调节细菌基因表达, 但尚未发现小干扰RNA (siRNA) 参与的基因沉默机制。近年在原核细胞基因组中发现一类新的成簇的规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR) 和与其相关的基因。生物信息学分析和预测表明两者构成的 CRISPR 相关系统介导原核细胞 RNA 干扰, 进而发挥免疫防御功能。这一假说新近得到了实验证实, 与此同时首次揭示了原核细胞的适应性免疫机制。这种防御机制不同于真核细胞适应性免疫机制, 除具特异性外, 还具有遗传性。

关键词 CRISPR; Cas 蛋白; RNA 干扰; 原核细胞; 适应性免疫

真核细胞的 RNA 干扰(RNA interference, RNAi) 是由双链 RNA 所引起的序列特异性基因沉默。也被称为转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)。此过程由双链 RNA (dsRNA) 经 RNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC) 中的 dicer 核酶作用产生 21~22 nt 的小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA)。然后与 RISC 结合使 siRNA 解旋, 产生成熟的 siRNA。RISC-siRNA 复合物结合到靶 mRNA, 通过 slicer 核酶将靶 mRNA 降解。释放的 RISC-siRNA 复合物可循环起到放大效应^[1]。RNAi 系统广泛存在于真核生物中, 是一种非常保守的进化机制, 与真核细胞中的许多重要生物学过程密切相关^[2,3]。

在细菌中已发现 60 多种类似于真核细胞的小 RNA (small RNA, sRNA) 分子。它们大多作为应答环境压力的调节元件^[4]。绝大多数 sRNA 的调控机制是 sRNA 与靶 mRNA 配对, 在结合 RNA 蛋白(RNA-binding protein) (如 Hfq) 的参与下, RNAase E 降解靶 RNA, 从而在转录后水平调节细菌的基因表达, 影响细胞的生理功能^[5,6]。研究表明 RyhB 与 Fe²⁺ 结合蛋白 mRNA 作用降低铁离子利用^[7]; OxyS 与 FhlA mRNA 作用降低细胞氧化损伤^[8]; DsrA 与 RpoS mRNA 作用增强细胞对低温的保护^[9]; RygA 和 RygB (或 OmrA 和 OmrB) 与 *cirA*、*fecA*、*fepA* 和 *ompT* mRNA 作用调节细胞外膜组成^[10]。近年, 利用已测序的原核细胞基因组数据, 通过与真核细胞 RNA 干扰系统相关的蛋白质结构和功能的比对分析, 表明原核细胞存

在有 siRNA 参与的 RNAi 系统, 并在新近得到了实验证实。与此同时, 首次揭示了原核细胞的适应性免疫机制。

1 CRISPR 特性

自 1987 年 Ishino 等^[11]首次在大肠杆菌中发现成簇的规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 后, 相继在古细菌和真细菌中普遍发现了该类序列。不同的研究者曾给出不同的名称, 如 TREPs (tandem repeats)^[12], SRSRs (short regularly spaced repeats)^[13,14], DVRs (direct variant repeats)^[15], LCTRs (large cluster of 20-nt tandem repeat sequences)^[16], SPIDRs (spacers interspaced direct repeats)^[17]。2002 年, Jansen 等^[18]将它们统一定名为 CRISPR。截止到目前的研究表明, CRISPR 已构成了原核细胞的一个特殊的串联序列家族, 在已测序的细菌中发现几乎所有的古细菌和一半细菌中存在有 CRISPR^[19]。

CRISPR 由一类 DNA 重复元件构成, 每个元件由 23~47 bp 组成, 典型呈串联排列, 其间含有 25~40 bp 的非重复的间隔序列, 单一 CRISPR 通常含有 4~100 个以上的重复元件^[19,20]。大多数基因组含有单一的 CRISPR, 其重复序列几乎相同, 表明在同一种内具有

收稿日期: 2007-10-11 接受日期: 2008-03-07

辽宁省科技厅计划项目资助(No.2004205004)

* 通讯作者。Tel: 024-62202232, Fax: 024-62202796, E-mail:

tienminli@lnu.edu.cn

明显的保守性^[21]。然而,一些基因组含有多个 CRISPR,但每个 CRISPR 的序列基本不同^[17,20]。不同基因组中 CRISPR 的重复序列相似性较小,但经常含有远缘种(包括古细菌和细菌)共有的不同的保守模体^[12,22]。

CRISPR 中的一些间隔序列与染色体外成分紧密相关^[23-25]。在古细菌中,该序列与微小纺锤形噬菌体(fuselloviruses)和古噬菌体(rudiviruses)以及硫叶菌属(*Sulfolobus*)的接合质粒序列相似^[23];在细菌中,多种嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)的间隔序列与不同的噬菌体或质粒序列相似^[24]。在耶尔森菌属(*Yersinia*)的菌株中,3个小的间隔序列与含有缺陷的类λ噬菌体的染色体区相似^[25]。这些研究结果表明 CRISPR 中的一些序列可能来自于染色体外组分。

2 Cas 蛋白

在研究 CRISPR 的过程中,人们发现一些基因总是定位在 CRISPR 附近。进一步分析研究表明,在一些古细菌和细菌中,大多数含 CRISPR 的基因组中至少含一些这类基因序列^[17,20,26,27]。鉴于这类基因的存在与 CRISPR 有着密切关系,人们将其定名为 CRISPR 相关(CRISPR-associated, *cas*)基因。Jansen 等^[17]在含有 CRISPR 的菌株中首先发现 4 个 *cas* 基因(*cas1*, *cas2*, *cas3*, *cas4*),之后得到了他人证实^[20]。这些 *cas* 基因通常头尾相连,排列顺序依次为 *cas3-cas4-cas1-cas2*,似乎同时转录。通过与真核细胞参与 RNA 干扰蛋白的核心结构、模体的比对分析预测了它们的相应功能。

Dicer 和 RISC 中的 slicer 是真核细胞 RNAi 系统中的重要组分,各种 RISCs 中也包含结合 RNA 蛋白和核酶。通过比对分析原核细胞基因组,在 Cas 蛋白中均找到了 dicer 和 slicer 的功能类似物。COG (clusters of orthologous group)中的 COG1203 家族(Cas3),编码 DNA 解旋酶,常与 HD-核酶功能域融合,此为原核细胞的 dicer (prokaryotic dicer, p-dicer)。由于在原核细胞中预测的核酶具有多样性,很难找到 slicer 的直接对应物——原核细胞 slicer (prokaryotic slicer, p-slicer)。现在已确定的有 RecB 家族中的核酶 COG1468 (Cas4),以及新的尚未鉴定的 COG1857。COG1518 (Cas1)和 COG1343 (Cas2)均编码核酶,可能参与新 DNA 序列的插入^[20,27]。另一类 RAMP (repeat-associated mysterious protein)是 CRISPR 相关系统(CRISPR-associated system, CASS)中最具多样

性的组分,如 COG1688 (Cas5)和 COG1583 (Cas6)。RAMP 很可能特异性地与不同长度的 psiRNA 结合。在功能上类似于真核细胞结构上多样的 RISCs 的结合 RNA 蛋白^[26,27]。

Cas 蛋白由不同家族基因编码。由于每个家族的基因存在有一定的变异,所以,每个家族成员又存在不同亚型^[20]。到目前为止,至少有 6 个 *cas* 基因家族构成核心模块(core module),除此之外,还发现有次级模块(second module),包括具有 RNA 聚合酶活性的 COG1353 (与重复串联簇“松散”相关),以及附属成分(ancillary components)^[27]。看来, CASS 似乎是一个庞大而复杂的系统,要揭示每个家族的功能以及它们在功能上的相互关系可能是个需要时间的过程。

3 原核 RNAi 机制

原核细胞 RNAi 系统不同于真核细胞的 RNAi 系统。虽然对其了解不如真核细胞的 RNAi 系统那样清楚,但已表明了初步框架。其参与成分大体上主要由 CRISPR 和 Cas 蛋白两部分构成 CASS。

3.1 假说的建立

推测原核细胞存在有 RNAi 系统的线索主要来自以下三方面证据:(1)越来越多的证据表明至少 CRISPR 中一些插入序列是来自噬菌体或质粒基因^[21,28];(2)在两株古细菌(*Archaeoglobus fulgidus* 和 *Sulfolobus solfataricus*)中已实验证实 CRISPR 位点转录小 RNA,并得到加工,推测可能来自 CRISPR 的一个富含 AT 的引导区,具有启动子作用^[22,28];(3)原核细胞含有丰富的 CASS 组分,明显暗示了其降解、加工核酸和可能的重组功能^[27,28]。

Makarova 等^[27]采用比较基因组学,利用计算机手段详尽分析了已测序的古细菌和细菌基因组中 CRISPR 和 *cas* 基因数据,分析了原核细胞中类似真核细胞 siRNA 系统的蛋白质,预测了其结构和相关的酶学机制。

位于富含 AT 的 CRISPR 引导区的启动子转录 CRISPR 区域, Cas 蛋白可能参与转录调节,也会被应激物(如噬菌体感染)刺激。转录产物被 p-dicer (COG1203)切割,产生 70~100 nt psiRNA 前体,经缓慢加工过程,产生 25~45 nt 成熟 psiRNA。psiRNA 以大小特异方式与 RAMPs 结合,并与靶 mRNA 退火。产生的复合物募集 p-slicer (COG1468, COG4343, COG1857),形成原核细胞 RISC 类似物(pRISC)。

pRISC 切割靶 mRNA, 并能循环攻击下个靶分子, 以此沉默相应基因^[27]。

3.2 实验证实

原核细胞中存在有RNAi系统的预测最近得到了直接的实验证实。Barrangou 等^[29]分析了嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)被两种不同噬菌体感染后的 CRISPR 位点的变化。实验发现得到的 9 株噬菌体抗性突变株, 每株中有 1~4 处新的插入序列。测序分析揭示这些插入序列与挑战的噬菌体序列相似。这些结果表明噬菌体的抗性获得是由噬菌体 DNA 的整合所介导。他们通过加入和缺失插入序列, 评价相应的抗性, 进一步探究了这一过程, 证实了插入成分与噬菌体抗性之间存在密切关系。最后他们在嗜热链球菌突变株中灭活了两个 cas 基因(cas5 和 cas7), 实验发现缺失 cas5 的突变株失去了抗性, 而 cas7 缺失的突变株仍保留其抗性。基于 Cas5 和 Cas7 的氨基酸序列, 他们推测 Cas5 可能是一种核酶, Cas7 可能参与新插入序列的合成和(或)插入。

这项研究至少在两方面证实了原核细胞存在有 RNAi 系统: 一方面抗性菌株的防御功能源于染色体外的噬菌体序列; 另一方面是 Cas5 参与噬菌体抗性。

4 展望

原核细胞 RNAi 机制的发现进一步阐明了细菌的进化机制以及细菌与噬菌体的共存机制。该机制表明 RNAi 介导的免疫除具特异性外, 还具有可遗传性, 这显然不同于真核细胞的适应性免疫。

报道表明, CRISPR 和(或)cas 参与基因调节^[20], 染色体分离^[12]和重排^[30]。Makarova 等^[31]也曾报道 Cas 蛋白是一种新的 DNA 修复系统。直到近年发现 CRISPR 中插有侵入的外源序列^[23,25]才揭示了它们参与宿主的免疫功能。但是, CRISPR 具有的 RNAi 功

能与其他几种功能是何种关系仍不清楚, 参与 RNAi 的组分究竟有哪些均需进一步阐明。随着对原核细胞 RNAi 机制的广泛证实和相关细节的不断完善, 将有助于阐明 CRISPR 和 cas 基因的功能本质及其与其他几种功能的相互关系, 而且更有助于在整体上全面认识生物界的 RNAi 机制。

参考文献(References)

- [1] Mello CC *et al.* *Nature*, 2004, **431**: 338
- [2] Agrawal N *et al.* *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, **67**: 657
- [3] Sen GL *et al.* *FASEB J*, 2006, **20**: 1293
- [4] Gottesman S. *Trends Genet*, 2005, **21**: 399
- [5] Majdalani N *et al.* *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2005, **40**: 93
- [6] Gottesman S. *Annu Rev Microbiol*, 2004, **58**: 303
- [7] Massé E *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 4620
- [8] Altuvia S *et al.* *EMBO J*, 1998, **17**: 6069
- [9] Kandror O *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 9727
- [10] Vogel J *et al.* *Curr Opin Microbiol*, 2006, **9**: 605
- [11] Ishino Y *et al.* *J Bacteriol*, 1987, **169**: 5429
- [12] Mojica FJ *et al.* *Mol Microbiol*, 1995, **17**: 85
- [13] Mojica FJ *et al.* *Mol Microbiol*, 2000, **36**: 244
- [14] Peng X *et al.* *J Bacteriol*, 2003, **185**: 2410
- [15] van Embden JD *et al.* *J Bacteriol*, 2000, **182**: 2393
- [16] She Q *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 7835
- [17] Jansen R *et al.* *OMICS*, 2002, **6**: 23
- [18] Jansen R *et al.* *Mol Microbiol*, 2002, **43**: 1565
- [19] Grissa I *et al.* *Nucleic Acids Res*, 2007, **35**: W52
- [20] Haft DH *et al.* *PLoS Comput Biol*, 2005, **1**: e60
- [21] Kunin V *et al.* *Genome Biol*, 2007, **8**: R61
- [22] Tang TH *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 7536
- [23] Mojica FJ *et al.* *J Mol Evol*, 2005, **60**: 174
- [24] Bolotin A *et al.* *Microbiology*, 2005, **151**: 2551
- [25] Pourcel C *et al.* *Microbiolgy*, 2005, **151**: 653
- [26] Makarova KS *et al.* *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**: 482
- [27] Makarova KS *et al.* *Biol Direct*, 2006, **1**: 7
- [28] Lillestøl R *et al.* *Archaea*, 2006, **2**: 59
- [29] Barrangou RK *et al.* *Science*, 2007, **315**: 1709
- [30] DeBoy RT *et al.* *J Bacteriol*, 2006, **188**: 2364
- [31] Makarova KS *et al.* *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**: 482

Prokaryotic Adaptive Immunity Mediated by RNA Interference System

Tie-Min Li*

(College of Life Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China)

Abstract RNA interference (RNAi) system exists in a wide range of eukaryote and its mechanism has been understood well. Although it has been found that gene silencing which is mediated by prokaryotic micro RNA (miRNA) regulates bacteria gene expression, the gene silencing mechanism mediated by small interference RNA (siRNA) has not been proposed in prokaryote. Recent years, clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) and CRISPR-associated (*cas*) gene are increasingly discovered in prokaryotic genomes. The analysis and prediction by *in silico* indicated that CASS, which is composed of CRISPR and *cas*, triggered prokaryotic RNAi. A hypothesis was put forward proposing roles of CRISPR and *cas*, functioning on immune defense. More recently, experimental evidence supported the hypothesis. Meanwhile, the mechanism of prokaryotic adaptive immunity is revealed firstly. Prokaryotic RNAi system confers host immune defense with heritage by contrast to eukaryotic adaptive immunity in addition to specificity. This paper reviewed a variety of components associated with prokaryotic RNAi system and the mechanism of prokaryotic adaptive immunity via RNAi system.

Key words CRISPR; Cas protein; RNA interference; prokaryote; adaptive immunity

Received: October 11, 2007 Accepted: March 7, 2008

This work was supported by the Program for Science and Technology Innovation of Liaoning Province (No.2004205004)

*Corresponding author: Tel: 86-24-62202232, Fax: 86-24-62202796, E-mail: tieminli@lnu.edu.cn