

miRNA —— 一类新的调控微小 RNA^{*}

孙亚兰, 袁葵洲, 吴秀山

(湖南师范大学 生命科学学院 蛋白质化学与发育生物学教育部重点实验室 中国湖南 长沙 410081)

摘要: 在线虫 *C. elegans* 的发育过程中, 时序调节微小 RNA 起着很重要的作用. 其中有两种关键基因 *lin-4* 和 *let-7* 长约 22 个核苷酸, 不编码蛋白质, 参与基因表达的负调节, 这可能是翻译水平上的调节与发生在转录后的 RNA 干涉不同. 研究表明它们在大小、结构和功能上具有保守性. 主要从 miRNA 的发现、分布、形成、作用 4 个方面进行了综述.

关键词: 微小 RNA; 时序调节微小 RNA; 异时表型

中图分类号: Q756

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2002)S1-0106-04

miRNA — A New Group of Small Temporally Regulated RNAs

SUN Ya-lan, YUAN Wu-zhou, WU Xi-t-shan

(College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China)

Abstract: During the development of the nematode *C. elegans*, two small temporally regulated RNAs (stRNA) regulate timing of gene expression. Two of the stRNAs, *lin-4* and *let-7* are of about 22 nucleotides, noding protein, and are very important during the downregulation of gene expression. This regulation occurs at a posttranscriptional, presumably translational level and is distinct from RNA interference. Researches suggested that they are conserved in size, structure and function. The discovery, distributing, form and function of miRNA are mainly reviewed.

Key words: miRNA; stRNA; heterochronic phenotypes

(Life Science Research, 2002, 6(Suppl): 106~ 109)

1 miRNA 的发现

在线虫的发育过程中, 基因时序表达是由两种 miRNA —— 时序调节微小 RNA (stRNA) 调节的. 它长约 22 个核苷酸, 不编码蛋白质, 与 RNA 干涉 (RNAi) 不同, 这种可能是翻译水平上的调节发生在转录后. 其中的一种 stRNA —— *let-7* 和它的靶基因 *lin-41*, 甚至在人类中也是高度保守的. 它们

在线虫发育时序中的调控作用已被证实.

计算机序列分析表明有些 miRNA 在一些物种中是高度保守的^[1]. 基因组序列比较和表达分析已证明 *let-7* 在许多物种中保守. 与核糖体 RNA 及核内小 RNA 的保守性相似, *Let-7* 序列在进化关系较远的物种中具有显著的保守性. *let-7* stRNA 的表达在发育时序的调控上, 它的靶基因 *lin-41* 的序列在果蝇、斑马鱼和老鼠中也很保守.

* 收稿日期: 2002-10-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170479); 湖南省特聘教授基金资助项目(25000613); 教育部重点课题项目

作者简介: 孙亚兰(1982), 女, 湖南常德人, 湖南师范大学生命科学学院学生, 从事分子发育遗传学研究; 袁葵洲(1966), 女, 湖南衡阳人, 湖南师范大学副教授, 博士生导师, 主要从事分子发育遗传学研究; 吴秀山(1952), 男, 湖南衡阳人, 湖南师范大学特聘教授, 博士生导师, 通讯作者, 从事分子发育遗传学研究, E-mail: xiushanwu@yahoo.com.

值得注意的是, stRNA 在发育时序调控途径保守性方面还有一个空白, 不论是在序列分析还是在表达分析方面, 目前都只在与线虫相关的物种中找到 *lin-4* 和它的靶基因 *lin-14* 的同源基因^[2-3]. *lin-4* 同源型基因的缺失可能表明线虫的 *lin-4* stRNA 很独特, 但同时也有可能线虫与其它物种的 *lin-4* 在分子水平上存在着分支, 或者是通过一个保守的二级结构而导致它在功能上的保守. 每种 miRNA 可能与它控制的一种或多种基因的表达相联系. 它们在发育调控中的作用是不容忽视的. 它们有以下共同特点: 1) 约长 22 个核苷酸; 2) 可能只在一些特殊细胞中表达; 3) 这些细胞是特定分化阶段中的一些特殊的细胞; 4) 在许多物种中广泛存在; 5) 不编码蛋白质; 6) 干扰合成蛋白质的 mRNA, 但与 RNA 干扰 (RNAi) 不同. RNA 干扰是转录后基因沉默 (PTGS) 的一种形式, 形成的双链 RNA 可以造成特定序列的沉默; 7) 在大小、结构和功能方面存在着保守性.

2 miRNA 的分布

在 miRNA 中, stRNA 占有相当的比例. 目前, 在线虫、果蝇及人类细胞培养物中已鉴定出 90 种 stRNA, 其中有 9 种不止存在于一个门中. 已在脊椎动物和无脊椎动物中鉴定出了与 *let-7* 定向进化同源的靶基因——*lin-41*. 同时, 在果蝇、斑马鱼、人类等生物体中发现了与 *let-7* 高度同源的序列, 在其中一些生物体中也观察到 *let-7* 在特定阶段中的表达^[4]. 总之, 这些数据表明在脊椎动物和无脊椎动物中, 广泛存在着 stRNA 的基因表达转录后调节机制.

3 miRNA 的形成

前体 miRNA 中大量的茎环结构及其主要的保守区域可能是 miRNA 成熟并可能是其执行功能的先决条件. 目前有一种普遍获得人们认可的假说声称前体的转录可能赋予 miRNA 在调节水平上的活性. 它很好的解释了 *let-7* 在海胆中的发育情况^[4]. 外运可能涉及到前 miRNA 的特定的识别过程, 目前正尝试证实前 miRNA 的结构是专一性 tRNA 外运因子 Xpo-t 的底物^[5]. 前 miRNA 的最初转录产物可能被外运机制识别, 并在后来的外运过程中送入胞质中加工^[5-7]. 目前这一模型没有直接的证据支持, 但它解释清楚了为什么 mRNA 表现得如此稳定, 它同时也承认若干调节水平

可能参与调节调控途径这一机制.

lin-4 和 *let-7* 在大小, 并可能在作用模式上相似, 并且它们都能合成一种剪接过程中的前体物质, 这种前体能折叠形成茎环结构^[8]. 成熟的加工过程涉及到 RNase III 中的 Dicer 家族^[9] 和 AGO1/rde-1 家族成员中的 *ago-1* 和 *ago-2*^[10-12], 这与 RNAi 相似, 因为 siRNA 的生物起源同样也需要 Dicer 和 AGO1/rde-1 家族的不同成员. Dicer 作用下的 siRNA 加工产物有对称的双螺旋结构, 但仅有一个 stRNA 前体的茎仍保持稳定. *Lin-4* 和 *let-7* 5' 端双螺旋在加工过程中的保留说明成熟 miRNA 的 3' 端可能部分被溶解. 已鉴定大部分的初生成成熟 miRNA 是由 3' 端茎环衍生而来的, 在某些情况下已从两端鉴定出成熟 miRNA. 因此, 很有可能存在着一些因子协助 Dicer 判断茎环的哪端应该保留^[10]. 对数目庞大的 rde-1 家族的进一步实验研究将验证这一假设是否正确. 一般的前体 RNA 经加工后是对称的, 产生 24-23 核苷酸的双链 RNA; 而 stRNA 加工后, 双链 RNA 只有一条链稳定而形成单链, 如抗感性 *let-7*. siRNA 可以与成熟 mRNA 上任意与之互补的序列相结合, 而 stRNA 只与它们的靶基因转录物质的 3' 端 UTR 的特殊位点相结合.

4 miRNA 的作用

未翻译的 miRNA 在细胞中执行相当的功能. 例如, mRNA 剪接体中的核内小 RNA (small nuclear RNA), 翻译过程中的转运 RNA (tRNA), 与核糖体 RNA 修饰相关的核仁小 RNA (small nucleolar RNA), 以及参与基因表达负调节的干扰小 RNA (siRNA) 和发育时序调节小 RNA (stRNA) 等等^[13]. 其中 siRNA 与 stRNA 近年来受到人们的广泛重视. 它们与其它 RNA 的作用模式有着明显的区别. 它们干扰合成蛋白质的 mRNA, 每种小 RNA 都有与之对应的靶基因, miRNA 与靶基因结合, 使它不能利用携带的信息翻译成蛋白质 siRNA 在目标 mRNA 降解加工过程中调节 RNAi^[14, 15], 而 stRNA 通过与它的靶基因 3' 端非翻译区的互补序列相结合, 对翻译起始后目标 RNA 的表达起着负调控的作用^[16-20].

虽然 Northern 杂交分析证实了在表达水平上胚胎与成体有所不同, 但只有少数 miRNA 收率, 如 *lin-4* 和 *let-7*^[17, 21], 标志着发育阶段的过渡中有着明显的正调控或负调控^[22, 23]. 如果不是调节发

育时序, 那它们还在什么方面起着作用呢? 很早就有人提出空间与通常的发育机制两者之间有着显著的相似之处^[13, 24]. Hunchback 和 Kruppel 也发现果蝇中枢神经系统中成神经细胞确有发育调控的同一性^[25]. 虽然乍看之下在一个空间模式调控途径中关键因子不可能丢失, 但若考虑到 stRNA 很小, 则有可能导致它们在进一步的基因筛选中靶位点不明显. 因此, 我们可以推测 miRNA 可能调节组织空间发育和能育性基因, 甚至还可以设想它们有更多其它特殊的作用.

stRNA 介导的基因表达调控模式在近年得到了长足的发展. stRNA 通过与靶基因的 3' 端 UTR 的互补位点相结合来完成转录后阻遏作用. 有趣的是, 这没有影响 mRNA 的稳定性, 聚腺苷酸化水平和翻译起始均正常. 缺乏或过度表达 *lin-4* 和 *let-7* 这两种 stRNA, 都会引起异时表型(异时是指祖先和后代种类在发育事件相应时间上互不相同的情况), 即改变了发育过程中的速度调控过程^[13, 26]. 虽然 *lin-4* 和 *let-7* stRNA 在转录序列或上游序列上没有相似之处, 它们靶基因的互补序列也不同, 但 stRNA 的互补序列都在靶基因 3' 端非转录区域. 那么, 这些在大小和结构方面保守的

miRNA, 在功能上也保守吗? 计算机序列分析及有关果蝇 *C. elegans* 及人类 Hela 细胞的实验事实表明^[1, 22, 23], 有些 miRNA 在生物体中高度保守(见表 1). 我们可以推测出至少一些 miRNA 是保守调控途径的组分, 这些调控途径可能与发育时序的调控相关^[16, 27]. *Lin-4* 和 *let-7* 是线虫的异时调控途径的必需组分. *Lin-4* 控制幼体早期发育阶段(L1 至 L2)的细胞分化, *let-7* 控制 L4 以后的阶段到成体的转换. 它们产生长为 70 个核苷酸的含茎环结构的前体, 然后加工成为约 22 个核苷酸长度的成熟的 stRNA. 这些 stRNA 不再翻译, 分别起着阻遏它们的靶基因——*lin-4* 阻遏 *lin-4* 和 *lin-28*, *let-7* 阻遏 *lin-41* 的作用. 虽然我们已了解到 stRNA 通过与 3' 端 UTR 互补位点结合来抑制它们靶基因的作用, 但确切的阻遏机制还不清楚. 目前认为 stRNA 的调控机制是在翻译水平而不是在于 RNA 的稳定性. 因为 *lin-14* 和 *lin-28* 的蛋白质水平随着 *lin-4* 的增加而逐步下降, 但 mRNA 水平却没有改变. *lin-14* mRNA 与核糖体形成多聚核糖体结构说明调节是发生在翻译开始后. 倘若 stRNA 对目标 mRNA 的修饰方式与核内小 RNA 相似, 也可能导致观察不到 mRNA 的变化.

表 1 各种门中的 miRNA 的保守序列

Table 1 miRNAs conserved across phyla

名称	序 列	同源物种
miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGGAG	线虫、果蝇、人
miR-2	UAUCACAGCCAGCUUGA(G/U)G(U/A)GC ²	线虫、果蝇
miR-7	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGU	果蝇、人
miR-34	AGGCAGUGUGGUAGCUGGUUG	线虫、果蝇、人
miR-60	UAUUAUGCACAUUUUCUAGUUCA	线虫、果蝇、人
miR-79	AUAAAGCUAGGUACCAAGCU	线虫、果蝇
miR-84	UGAGCUAGUAUGUAAUUGUA	线虫、果蝇、人
miR-87	GUGAGCAAAGUUCAGG(U/A)GU	线虫、果蝇、人

注: 1. RNA 序列是从 cDNA 测序中推断出的, 目前没有 RNA 被直接测序; 2. miRNA 序列中括号内的碱基是指同一物种的不同碱基或是不同物种的不同碱基.

Notes: 1. RNA sequence are deduced from cDNA sequencing; no RNA have yet been sequenced; 2. Letters in parentheses indicate variations in otherwise identical miRNAs from different organisms or variant genes within one organism.

数目庞大的 miRNA 可能是基因调控途径的丰富而重要的组分. 虽然首先发现的 miRNA 是与发育速度调控有关的, 但研究表明在很多发育调控中明显缺少地这些不太为人知的 miRNA, 这表明它们还可能在别的方面起作用. 我们对动物基因组中大量保守的 miRNA 的研究才刚开始, 关于 miRNA 的许多问题仍等待着我们去解决.

参考文献 (References):

- [1] LEE R C, AMBROS V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Science*, 2001, 294: 862-864.
- [2] WIGHTMAN B, BURGLIN T R, GATTO J, *et al.* Negative regulatory sequences in the *lin-14* 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development [J]. *Genes Dev.*, 1991, 5: 1813-1824.

- [3] WIGHTMAN B, HA I, RUVKUN G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*[J]. Cell, 1993, 75: 855-862.
- [4] PASQUINELLI A E, REINHART B J, SLACK F, *et al.* Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA[J]. Nature, 2000, 408: 86-89.
- [5] GROSSHANS H, SIMOS G, HURT E. Review: transport of tRNA out of the nucleus-direct channeling to the ribosome? [J]. Biol, 2000, 129: 288-294.
- [6] WOLIN S L, MATERA A G. The trials and travels of Trna[J]. Genes Dev, 1999, 13: 1-10.
- [7] KNIGHT S W, BASS B L. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*[J]. Science, 2001, 293: 2269-2271.
- [8] WIGHTMAN HAIB, RUVKUN G. A bulged *lin-4/lin-14* RNA duplex is sufficient for *Caenorhabditis elegans lin-14* temporal gradient formation[J]. Genes Dev, 1996, 10: 3041-3050.
- [9] REED R, MAGNIK. A new view of mRNA export: separating the wheat from the chaff[J]. Nat Cell Biol, 2001, 3: 201-204.
- [10] GRISHOK A, PASQUINELLI A E, CONTE DNLI, *et al.* Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing[J]. Cell, 2001, 106: 23-34.
- [11] HUTVAGNER G, MCLACHLAN J, PASQUINELLI A E, *et al.* A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA[J]. Science, 2001, 293: 834-838.
- [12] KETTING R F, FISCHER S E, BERNSTEIN E, *et al.* Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*[J]. 2001, Genes Dev, 15: 2654-2659.
- [13] BANERJEE, SLACK D F. Control of developmental timing by small temporal RNAs: a paradigm for RNA-mediated regulation of gene expression[J]. Bioessays, 2002, in press.
- [14] ELBASHIR J, HARBORTH S M, LENDECKEL W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. Nature, 2001, 411: 494-498.
- [15] SHARP P A. RNA interference 2001[J]. Genes Dev, 2001, 15: 485-490.
- [16] LEE R C, FEINBAUM R L, AMBROS V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. Cell, 1993, 75: 843-854.
- [17] REINHART B J, SLACK F J, BASSON M, *et al.* The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 2000, 403: 901-906.
- [18] MOSS E G, LEE R C, AMBROS V. The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA[J]. Cell, 1997, 88: 637-646.
- [19] OLSEN P H, AMBROS V. The *lin-4* regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation[J]. Dev Biol, 1999, 216: 671-680.
- [20] SLACK F J, BASSON M, LIU Z, *et al.* The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor[J]. Mol Cell, 2000, 5: 659-669.
- [21] FEINBAUM R, AMBROS V. The timing of *lin-4* RNA accumulation controls the timing of postembryonic developmental events in *Caenorhabditis elegans*[J]. Dev Biol, 1999, 210: 87-95.
- [22] LAGOS QUINTANA, RAUHUT M R, LENDECKEL W, *et al.* Identification of novel genes coding for small expressed RNAs[J]. Science, 2001, 294: 853-858.
- [23] LAU N C, LIM L P, WEINSTEIN E G, *et al.* An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*[J]. Science, 2001, 294: 858-862.
- [24] SLACK F, RUVKUN G. Temporal pattern formation by heterochronic genes[J]. Annu Rev Genet, 1997, 31: 611-634.
- [25] ISSHIKI T, PEARSON B, HOLBROOK S, *et al.* *Drosophila* neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny[J]. Cell, 2001, 106: 511-521.
- [26] ROUVIE A E. Control of developmental timing in animals[J]. Nat Rev Genet, 2001, 2: 690-701.
- [27] CHALFIE M, HORVITZ H R, SULSTON J E. Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans*[J]. Cell, 1981, 24: 59-69.