

miRNA的生物合成过程

李 伟 金由辛*

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要 MicroRNA (miRNA) 是一类真核生物内源性的小分子单链 RNA, 通常为 18~25 nt 长, 能够通过与靶 mRNA 特异性的碱基配对引起靶 mRNA 的降解或者抑制其翻译, 从而对基因进行转录后的表达调控. 近几年来, 在动物细胞和植物组织中, 上百种 miRNA 被陆续发现. 这些小分子调控 RNA 是从 60~200 nt 的具有发夹状结构的前体中被切割出来而成熟的, 在动物细胞中, miRNA 基因的转录初产物 (pri-miRNA) 很快被一种核糖核酸酶 III Drosha 加工成为 miRNA 前体 (pre-miRNA), 然后由细胞核转运至细胞质中, 经另一种核糖核酸酶 III Dicer 识别剪切为成熟 miRNA. 对这一过程进行了简要的综述, 并且对植物 miRNA 的成熟过程也进行了探讨. 对 miRNA 的生物合成过程的深入了解, 将有助于研究这一类起重要调控作用的 RNA 是如何行使功能的, 从而进一步研究其在生长发育及各种疾病中所起的重要作用.

关键词 miRNA 的成熟, miRNA, miRNA 初级转录产物, miRNA 前体

学科分类号 Q52

MicroRNA (miRNA) 是近几年在真核生物中发现的一类具有调控功能的非编码 RNA, 它们主要参与基因转录后水平的调控^[1]. miRNA 的调控功能是十分重要的, 近来发现它们在果蝇的细胞增殖、死亡及脂肪代谢, 线虫极性的形成, 哺乳动物的造血干细胞的分化等过程中起了重要的调控作用. 在植物中, miRNA 还参与了叶子与花的发育过程^[2].

动物 (尤其是人) miRNA 的生物合成过程已经初步得到了诠释. 首先, miRNA 基因的初级转录产物 (pri-miRNA) 在细胞核中被 RNase III Drosha 切割成为前体 miRNA (pre-miRNA)^[3]. 在最初的剪切后, pre-miRNA 在转运蛋白 exportin-5 的作用下由核内转到胞质中^[4], 然后由另一种 RNase III Dicer 进一步切割产生成熟的 miRNA^[5]. 这些成熟的 miRNA 与其他蛋白质一起组成 RISC (RNA-induced silencing complex) 复合体, 从而引起靶 mRNA 的降解或者翻译抑制^[2]. 这一过程如图 1a 所示.

1 miRNA 基因的转录与转录初产物的剪接

大多数 miRNA 基因与蛋白质基因距离比较远, 它们可能有自己的启动子可以进行独立的转录. 但是也有相当多的 miRNA 基因, 人有 1/4 的 miRNA 基因是位于蛋白质基因的内含子当中的^[1], 通常 miRNA 基因与内含子的转录方向是一致的, 这就说明这些基因大多是与寄主蛋白基因共转录的, 然后再从这些蛋白质基因的内含子中剪切出

来^[6]. 并且同一类 miRNA 基因在不同生物体中的寄主基因往往是保守的同一类蛋白质基因. 正是由于 miRNA 与其寄主蛋白基因是共表达的, 而使它们的联系在进化过程中也保守地保存下来. 还有一些 miRNA 基因是成簇分布在染色体上, 它们通过一个共同的启动子转录成为多顺反子^[1]. 虽然这种形式在线虫和人的 miRNA 基因中比较少见^[6], 但是果蝇的 miRNA 基因中一半是成簇的. 而且这些成簇的 miRNA 基因经常是彼此相关的^[1]. 例如人的 mir-15a-mir-16 基因簇是位于 13 号染色体上的一个抑癌基因中, 而这一位置在 B 细胞与 T 细胞白血病中均产生了结构的畸变. 经研究发现, 这两个 miRNA 确实与白血病的发生有关^[7].

目前, 我们对 miRNA 基因如何转录成为 pri-miRNA 还知之甚少. 研究发现 RNA 聚合酶 II 和 III 均可以参与 miRNA 的转录^[8,9]. 位于蛋白质基因内含子中的 miRNA 基因毫无疑问是由聚合酶 II 进行转录的. 虽然大多数其他 miRNA 基因缺少加多聚腺苷酸尾的信号^[10], 还有一些间接的证据证明它们也有可能是聚合酶 II 的转录产物^[2]: a. 有些 pri-miRNAs 相当长, 有时超过 1 kb, 这比聚合酶

* 通讯联系人.

Tel: 021-54921222, Fax: 021-54921011

E-mail: yxjin@sunm.shnc.ac.cn

收稿日期: 2005-03-11, 接受日期: 2005-04-29

Ⅲ的转录产物长很多. b. 大多数 pri-miRNAs 最后一个碱基为尿嘧啶, 而这通常被认为是聚合酶Ⅲ提前中止的转录产物. c. 许多 miRNA 基因的表达在发育过程中是变化的, 这种表达变化通常在聚合酶Ⅱ的转录产物中比较常见. d. 将某些 miRNA 基因的 5' 区域与报告基因的开放阅读框相融合, 可以使报告基因得到表达, 说明这种 miRNA 基因是可以通过聚合酶Ⅱ转录的^[11]. e. 对于线虫 *let-7* miRNA 的研究表明, *let-7* pri-miRNA 有多聚腺苷酸尾, 确实是由聚合酶Ⅱ的转录产生^[12]. 另外, 聚合酶Ⅲ也可以参与 miRNA 基因的转录. 例如, 给 miRNA 基因加上聚合酶Ⅲ的启动子由聚合酶Ⅲ进行表达, 在体内不仅可以有效地表达出这些 miRNA, 同时它们还可以行使其功能^[8], 这就说明, miRNA 的加工及其功能的行使与由何种聚合酶参与其基因的转录并没有必然的联系.

对于 pri-miRNA 转录后加工的研究十分有限, 只有对线虫 *let-7* miRNA 的研究比较完整^[12]. Bracht 等发现了两种长的 5' 端加帽, 3' 端加多聚腺苷酸尾的 *let-7* pri-miRNA, 是由聚合酶Ⅱ转录产生的. 这些转录产物在 5' 端有剪接引导序列, 它们可以作为反式剪接的底物. 实验证明, 初级转录产物的反式剪接对于成熟的 *let-7* RNA 的产生十分重要, 其序列和结构的变化对于接下来的剪切反应影响很大, 含有成熟的 *let-7* RNA 发夹结构前体, 其附近序列的二级结构在剪接前后发生了变化, 这一变化延长了 *let-7* RNA 的发夹结构前体末端的茎区, 这一结构也是 RNase Ⅲ Drosha 的底物类似物. 同时, 初级转录产物的反式剪接也去掉了下一步剪切造成空间阻抑的序列. 因此, 对 miRNA 初级转录产物的剪接可以显著改变发夹结构前体周围的序列及结构, 从而有利于对 miRNA 前体的进一步剪切.

Pri-miRNA 的第一步剪切是由核糖核酸酶Ⅲ Drosha 完成^[9]. 其产物是 ~70 nt 的发夹结构前体 (pre-miRNA). 这一切割反应不仅切出了成熟的 miRNA 的 3' 末端, 而且使 3' 末端有 2 nt 的突出, 这正是由核糖核酸酶Ⅲ进行切割的特征. 而且, 切割反应并不是发生在发夹结构前体的基部, 而是基部上的几个碱基处. Drosha 进行切割的特异性序列还没有找到, 但是前体基部的螺旋结构对于切割是十分重要的, 因为在前体的茎区插入和删除序列将导致切割位点的改变^[9]. 最新的研究发现, 参与这一切割过程的是一个多蛋白质复合体, Drosha 是其中的重要成分, 起到切割的作用. 在这一复合体中,

还存在一种双链 RNA 结合蛋白 Pasha (partner of Drosha). 在果蝇细胞和线虫中抑制 Pasha 的表达, 干扰了 pri-miRNA 的剪切, 使细胞内 pri-miRNA 的积累增多, 成熟 miRNA 的量减少. Pasha 在复合体中的具体功能还不清楚, 但是它可能参与识别 miRNA 的初级转录产物, 将它们集中到复合体中, 有利于其被 Drosha 切割. 另外, Pasha 可能对 pri-miRNA 在复合体中的定向有帮助, 从而有利于 Drosha 在特定位点的切割^[13].

2 miRNA 前体的转运出核

由于动物的 pre-miRNA 需要胞质中的 Dicer 酶进行进一步加工, 转运出核就成为 miRNA 成熟过程中必需的一步. 这一过程是通过依赖 RanGTP/exportin 5 的转运机制来完成的^[14]. 在细胞核中, RanGTP 的浓度较高, Exportin 5 (Exp5) 就可以促进 pre-miRNA 从 Drosha 复合体中释放, 并且与之结合, 将其带到核外. 由于胞质中 RanGTP 的浓度较低, Exp5 就释放 pre-miRNA, 使之与 Dicer 结合进行下一步的切割. 在运输过程中, miRNA 前体的 3' 突出将有利于其进入运出核的途径^[15].

3 Pre-miRNA 的剪切与 miRNA 的成熟

在动物细胞核中, Drosha 的切割产生了成熟 miRNA 的一端 (3' 端). 另一端的切割成熟是由胞质中另一类核糖核酸酶Ⅲ Dicer 切割产生的^[9]. Dicer 首先是在研究小干扰 RNA (siRNA) 引起的基因沉默中被发现的^[9], 后来发现它在 miRNA 的成熟过程中也起着重要的作用^[14]. Dicer 参与 miRNA 的成熟过程与 RNA 干扰中产生双链 RNA 的过程很相似: 首先 Dicer 识别 pre-miRNA 的双链部分, 其与茎环基部的 5' 端被磷酸化、3' 端有突出的结构有很高的亲和力. 然后, 茎环基部的两圈螺旋解开, Dicer 对两条链都进行切割, 将前体的其余部分切掉, 生成 5' 端磷酸化、3' 端有 2 nt 突出的类似于 siRNA 的不完全配对的双链. 这条 RNA 双链是由成熟 miRNA 与 miRNA* 组成的 (见图 1a 中的第 4 步). miRNA* 是 pre-miRNA 上的一段 RNA, 其位置恰好与成熟的 miRNA 相对^[9]. 虽然 Dicer 在对 pre-miRNA 的加工过程中能够产生 RNA 双链中间体, 但是这种中间体通常寿命比较短暂而不易被探测. 不过, 如果大量的前体均可产生并只产生一种 miRNA, 则其双链中的星号链也可以成为成熟的 miRNA^[9].

就现有的动物 miRNA 成熟的模型来看,最初由 Drosha 介导的切割特异性决定了 miRNA 前体中 Dicer 的切割位点,从而决定了成熟 miRNA 的两端^[3]. 由 Drosha 而不是 Dicer 决定这一特异性是由于研究表明 Drosha 对非特异性双链 RNA 的切割效

率很差,而 Dicer 可以没有序列依赖性地切割任何 RNA 双链^[9]. 并且 Drosha 的切割还依赖于 pri-miRNA 茎环基部的二级结构,以及茎环基部外侧 125 nt 范围内的序列^[3,8].

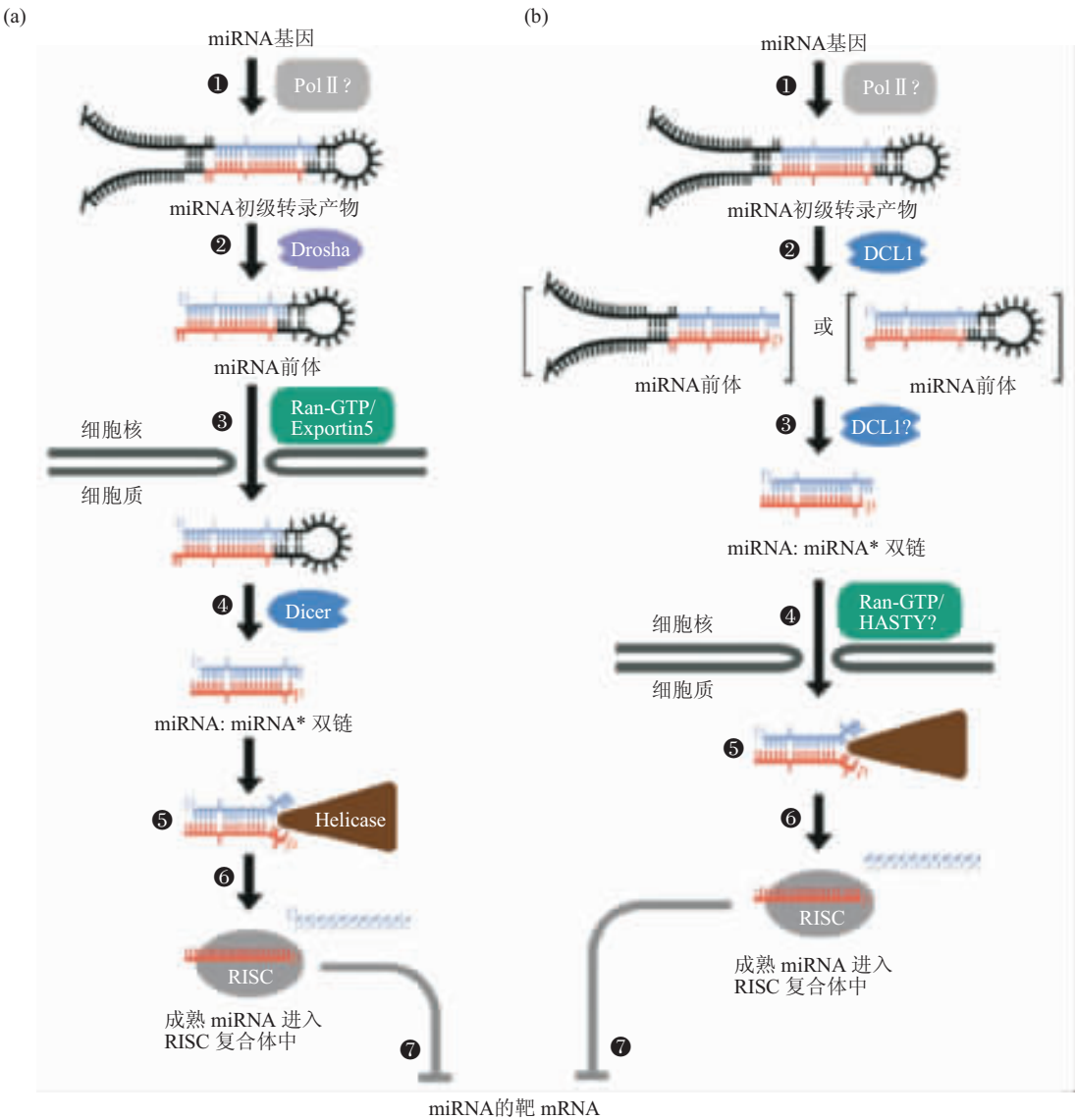


Fig.1 The biogenesis of miRNAs ^[2]
图 1 miRNA 的生物合成过程 ^[2]

(a) 动物 miRNA 的生物合成途径. (b) 植物 miRNA 的生物合成途径. 其中间产物 miRNA 前体的寿命是十分短暂的, 很难从植物中分离出来. 红色的 miRNA 参入 RISC 复合体中, 蓝色的 miRNA* 被降解了(用虚线表示). P 表示 miRNA 的 5'端是被磷酸化的.

4 植物 miRNA 的成熟过程

植物 miRNA 的成熟过程与动物有所不同, 因为植物中没有 Drosha 的同源类似物. 在植物中通常

很难检测到 pre-miRNA, 即使在 DCL1 突变的植物中也很少检测到^[15]. DCL1 是植物 miRNA 成熟过程中类似于 Dicer 的蛋白质, 它是位于核内的. 这就说明在植物中可能有其他酶 (很有可能是 DCL1)

行使了 Droscha 的功能, 对 miRNA 的转录初产物进行第一次切割, 并且决定了成熟的 miRNA 的序列. (如图 1b 中的第 2 步). 在 miRNA 离开细胞核之前, DCL1 (或其他酶) 又进行了第二次切割, 相当于动物细胞中 Dicer 对 pre-miRNA 的切割 (如图 1b 中的第 3 步). 然后, 可能是由 HASTY (Exportin-5 在植物中的同源类似物) 负责将 miRNA:miRNA* 双链转运出细胞核 (图 1b 中的第 4 步). 由于经核内连续两次切割, 在植物中才难以检测到 pre-miRNA 样的 RNA^[2].

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 作为植物中的一种模式生物, 对其 miRNA 的研究是最多的. 最近, 对拟南芥 miR163 的研究进一步揭示了植物 miRNA 的成熟过程^[16]. 拟南芥的基因组编码 4 种 Dicer 样的酶 (DCL1-DCL4). 其中 DCL1 是与 miRNA 的积累相关的, DCL2 和 DCL3 分别参与了由病毒引起的小干扰 RNA (siRNA) 和内源性 siRNA (例如反转座子 siRNA) 的合成. 拟南芥 miR163 是单独转录的, 由 RNA 聚合酶 II 催化合成, 其转录初产物 pri-miR163 需要经过核糖核酸

酶 III 样的酶切割三次才能成为成熟的 miRNA. 第一步是在 pri-miR163 的茎环结构的根部进行切割, 得到长 miR163 前体 (pre-miR163), 第二步是对长 pre-miR163 中成熟的 miRNA 的 3' 根部进行剪切, 得到短的 pre-miR163, 最后是由短的前体切割出成熟的 5' 端成为成熟的 miRNA (图 2). 有趣的是, 在整个剪切的过程中, 四种小分子都可以被释放出来. 进一步实验证明, 拟南芥的 DCL1 至少可以对第一及第二步切割反应进行催化, 即对 pri- 和 pre-miRNA 都可以切割. 另外, 第三步的切割反应可能也是 DCL1 催化的. 所以拟南芥的 DCL1 蛋白参与了 miRNA 成熟的全过程. 由于拟南芥的 DCL1 蛋白有两个类核定位信号, 因此植物的 miRNA 的成熟是在细胞核中完成的. 同时, 研究表明, 植物 DCL1 蛋白的双链 RNA 结合区在决定第一次和第二次的切割位点时是十分重要的. 在 *dcl1-9_dcl1-9* 的突变体当中仍然有 21 nt 的 RNA 片段产生, 是因为虽然 *dcl1-9* 蛋白在随机位置上剪切 pri-miRNA163, 但是却能准确量出第一次切割的位置到下一次切割的位置为 21 nt.

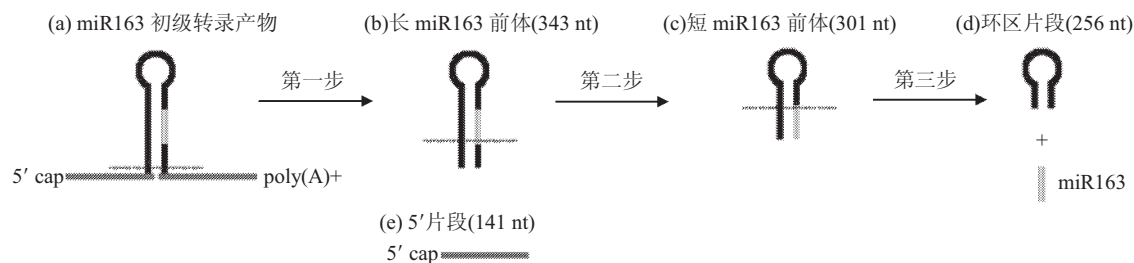


Fig.2 Model of *Arabidopsis* miR163 biogenesis^[16]

图 2 拟南芥 miR163 的成熟过程^[16]

第一步, miR163 初级转录产物(a)在茎环结构的根部被剪切成为长 miR163 前体(b), 并且释放出 5' 端带帽子的片段 (e). 第二步, 长 miR163 前体(b)在成熟 miRNA163 的末端被切割成为短 miR163 前体(c). 第三步, 短 miR163 前体(c)在 miRNA163 的另一端被切割产生了成熟的 miR163(灰色)和环区的片段(d). 每条 RNA 片段的长度均已给出.

5 展 望

MicroRNA 作为一种新近发现的小分子调控 RNA, 其在生物体内起着十分重要的作用. 关于 miRNA 各方面研究也在如火如荼地进行着. 在 miRNA 的生物合成过程中, 还有很多疑问没有被解决, 例如, miRNA 基因在转录水平的调控, 虽然有报道在线虫 miRNA 基因的上游 ~200 nt 的位置找到了一段保守序列 (CTCCGCCC), 但是在其他生物的 miRNA 中却没有找到这段序列^[10]. miRNA

作为一种调控因子, 它本身的表达又由什么来决定呢? 还有, 动物当中 miRNA 末端的决定是由 Droscha 在对初级转录产物进行第一次切割的时候就决定了, 而在植物中这一过程是由 DCL1 决定的, 鉴于 Droscha 切割的特异性, 因此成熟的动物 miRNA 可能要比植物中的 miRNA 更为保守, 从序列上讲更加精确, 这是否与多数动物 miRNA 与靶 mRNA 不完全配对抑制 mRNA 的翻译, 而植物的 miRNA 通常与靶 mRNA 几乎为完美配对从而导致 mRNA 的降解有关呢? 这些问题都有待于进一步

地研究才能得到解决. 对于 miRNA 成熟过程的研究, 不仅可以使生物体的调控网络更加细化, 还可以通过这一过程进行人为的干预, 从而进一步研究在不同物种中 miRNA 的功能及其起源等问题.

参 考 文 献

- 1 Lau N C, Lim L P, Weinstein E G, *et al.* An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. Science, 2001, **294** (5543): 858~862
- 2 Bartel D P. MicroRNAs genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, 2004, **116** (2): 281~297
- 3 Lee Y, Ahn C, Han J, *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature, 2003, **425** (6956): 415~419
- 4 Lund E, Güttinger S, Calado A, *et al.* Nuclear export of microRNA precursors. Science, 2004, **303** (5654): 95~98
- 5 Bernstein E, Caudy A A, Hammond S M, *et al.* Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature, 2001, **409** (6818): 295~296
- 6 Lim L P, Lau N C, Weinstein E G, *et al.* The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. Genes Dev, 2003, **17** (8): 991~1008
- 7 Calin G A, Dumitru C D, Shimizu M, *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, **99** (24): 15524~15529
- 8 Chen C Z, Li L, Lodish H F, *et al.* MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. Science, 2004, **303** (5654): 83~86
- 9 Zeng Y, Wagner E J, Cullen B R. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. Mol Cell, 2002, **9** (6): 1327~1333
- 10 Ohler U, Yekta S, Lim L P, *et al.* Patterns of flanking sequence conservation and a characteristic upstream motif for microRNA gene identification. RNA, 2004, **10** (9): 1309~1322
- 11 Johnston R J, Hobert O. A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 2003, **426** (6968): 845~849
- 12 Bracht J, Hunter S, Eachus R, *et al.* Trans-splicing and polyadenylation of *let-7* microRNA primary transcripts. RNA, 2004, **10** (10): 1586~1594
- 13 Denli A M, Tops B B, Plasterk R H, *et al.* Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. Nature, 2004, **432** (7014): 231~235
- 14 Hutvagner G, Zamore P D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. Science, 2002, **297** (5589): 2056~2060
- 15 Reinhart B J, Weinstein E G, Rhoades M W, *et al.* MicroRNAs in plants. Genes Dev, 2002, **16** (13): 1616~1626
- 16 Yukio K, Yuichiro W. *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, **101** (34): 12753~12758

The Biogenesis of miRNAs

LI Wei, JIN You-Xin*

(State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology,
Shanghai Institutes for Biological Sciences, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract MicroRNAs (miRNAs) are endogenous single-stranded RNAs of 18~25 nt in eukaryotic organisms, which can regulate the complementary mRNAs at the post-transcriptional level through cleavage or translational repression of the mRNA targets. Recent years, several hundred miRNAs from animals and plants have been identified. These small modulatory RNAs are cleaved from a precursor of 60~200 nt RNA hairpin. In animals, the primary transcripts of miRNA genes (pri-miRNAs) are recognized and cleaved into precursor miRNAs (pre-miRNAs) soon by an RNase III family nuclease, Drosha; then, pre-miRNAs are transported from the nucleus to the cytoplasm. Once in the cytoplasm, pre-miRNAs are recognized and processed into their mature form by another RNase III, Dicer. The procedure is briefly summarized, and the biogenesis of plant miRNAs is also discussed. Further research on the pathway of miRNA maturation can help us to know the mechanism of these small RNAs acted as important regulators, and can investigate their critical roles during development and disease.

Key words miRNA maturation, miRNA, pri-miRNA, pre-miRNA

*Corresponding author. Tel: 86-21-54921222, Fax: 86-21-54921011, E-mail: yxjin@sunm.shnc.ac.cn

Received: March 11, 2005 Accepted: April 29, 2005