

RNA 干扰与染色质沉默

——生物体内精密的网络调控机制

杜梅君 刘德培* 梁植权

(中国医学科学院 基础医学研究所, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)
(中国协和医科大学)

摘要 基因表达受不同层次的调控。RNA 干扰通过产生双链小 RNA 诱导同源 mRNA 序列降解, 从而在转录后抑制特定基因的表达。最新的研究成果显示: RNA 干扰产生的双链小 RNA 可通过与染色质中的重复序列 DNA 及组蛋白甲基化酶相互作用, 引起组蛋白 H3 Lys9 的甲基化, 进一步与异染色质形成相关蛋白结合, 导致染色质沉默。综述了 RNA 干扰, 小 RNA, 组蛋白修饰, 染色质沉默及基因表达调控之间存在着精密的网络调控机制。

关键词 RNA 干扰, 染色质沉默, 异染色质, 小 RNA

学科分类号 Q74

生物体内存在着复杂的基因失活与激活的调控机制。在特定的组织、细胞分化与个体发育过程中, 只有少数的基因表达。RNA 干扰与染色质沉默是两种不同的抑制基因表达的机制。染色质沉默在表观遗传的水平上通过组蛋白及 DNA 的修饰来抑制特定基因的表达, RNA 干扰通常在基因转录后抑制特定基因的表达。近年来发现, 在某些生物中, RNA 干扰与染色质的失活及异染色质的形成密切相关。本文将重点阐述 RNA 干扰与染色质沉默及异染色质形成的关系, 从而将两种看似不同的机制联系起来, 进一步阐明生物体内精确的网络调控机制。

1 参与 RNA 干扰的因子及干扰机制

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是生物体内存在的一种通过双链 RNA (dsRNA) 来抵御病毒入侵和抑制转座子活动的自然机制。序列特异的双链小 RNA 分子在 mRNA 水平上关闭相应序列基因的表达, 因此又称为转录后基因沉默 (post-transcriptional gene silencing, PTGS)^[1,2]。近年来研究表明, 由 RNAi 产生的小 RNA 也可在染色质水平上介导特异性的基因沉默^[3,4]。

许多因子参与 RNA 干扰实验。体内外的实验分析表明: 小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 的产生需要一个多亚基的蛋白 Dicer (dsRNA-specific endonuclease)。Dicer 家族, 属于 RNase III 蛋白, 其作用是通过降解 dsRNA 而引发 RNA 干扰^[5]。双链 RNA 在 Dicer 的作用下断裂为 21 ~ 23 个核苷酸的 siRNA。这些 siRNA 通过与一

种核酸酶复合物 RISC (RNA-induced silencing complex) 结合介导 siRNA 中的反义链与特异的靶 mRNA 互补, 导致 mRNA 降解^[6]。RISC 由几个不同的亚基组成, 包括约 21 ~ 23 nt 长的 RNA 和蛋白质, 其中一种蛋白质属于 Argonaute 家族^[7]。推测 RISC 复合物中的 Argonaute 蛋白可以吸收 Dicer 到 RISC, 使 siRNA 方便有效地并入到 RISC, 以引发 RNA 干扰^[6]。此外, 在线虫、果蝇、植物中发现 RNAi 现象可以在细胞之间传递, 在植物中甚至可以传递到新生的嫁接幼芽上^[8]。RNA 干扰信号是如何传递的呢? 研究发现: 介导 RNA 干扰的信号可以被细胞质中 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 RdRP (RNA-dependent RNA polymerase) 扩增, 降解特异的 mRNA, 形成大量的 siRNA, 再以此作为引物, 通过 RdRP 合成另外的 dsRNA, 放大 RNA 干扰过程^[9]。

综合以上的分析, RNA 干扰的可能机制为: 以双链形式存在的细胞中合成的 dsRNA, 正在复制的病毒 dsRNA, 或核基因转录的 dsRNA 都可引发 RNA 干扰, 它们被 Dicer 识别并被剪切成 siRNA 片段。这些双链 siRNA 并入到一个蛋白质复合物 RISC 中, 该复合物通过双螺旋的解旋而形成有活性的 RISC 复合物。有活性的 RISC 复合物可在多个水平上调节基因的表达。通常, 这个复合物通过促进 RNA 的降解和转录后抑制起作用。即 RISC 识别并剪切与引发 siRNA 链互补的靶 RNA 链。如此

* 通讯联系人。

Tel: 010-65296415, Fax: 010-65133086

E-mail: liudp@pumc.edu.cn

收稿日期: 2003-08-27, 接受日期: 2003-10-28

周而复始, 被剪切形成的 siRNA 又可引发下一轮的 RNA 干扰^[10]. 此外, 相似的复合物也可能介导染色质重塑或异染色质的形成^[3]. 在植物中, RdRP 可以扩增由引发 dsRNA 产生的信号, 从而放大 RNA 干扰过程.

2 染色质沉默的特征及相关蛋白

染色质沉默在表观遗传水平上抑制特定基因的表达. 近年来发现一些特定的生物化学修饰对于染色质沉默及异染色质形成极其重要. 这些修饰包括: 共价结合的组蛋白修饰、DNA 的共价修饰、与特定的非组蛋白结合等.

组蛋白的修饰 (又称组蛋白密码) 影响核小体之间以及核小体与其他染色质蛋白之间的相互作用, 进而影响染色质活性的变化^[11]. 核心组蛋白 H3, H4 N 端尾巴的修饰 (乙酰化, 甲基化, 磷酸化, 泛素化等) 直接影响染色质的状态, 其中赖氨酸残基的高度去乙酰化与异染色质的形成及基因失活密切相关. 早期的研究表明: 去乙酰化与异染色质区相关, 而乙酰化与常染色质区相关. 除此之外, 最近的研究表明: 组蛋白 H3 Lys 9 的甲基化是异染色质形成的重要特征之一^[12]. 异染色质形成的第三个标志是半胱氨酸的甲基化, 增加的半胱氨酸的甲基化水平在异染色质的形成及常染色质的失活中起重要的作用^[13].

组蛋白的去乙酰化, 尤其是 H3 和 H4 的去乙酰化与组蛋白去乙酰化酶 (HDACs) 密切相关. 在酵母的研究中发现组蛋白的去乙酰化由多种蛋白质参与 (Sir1 ~ 4), 其中, Sir2 具有 NAD 依赖的蛋白去乙酰化酶的活力, 能有效地在体内完成组蛋白的去乙酰化, Sir3 和 Sir4 相互作用维持 H3, H4 组蛋白的去乙酰化状态^[14]. 组蛋白的甲基化是另一种组蛋白修饰方式, 最近的研究表明: 果蝇中哺乳动物的类似物 Su (var) 3 ~ 9, 包括人的 Suv39h₁ 和鼠的 Suv39h₁, 编码特异地甲基化 H3 Lys9 的酶^[15]. *S. pombe* 中的类似物 clr4 也是一种特异的 H3 Lys9 甲基转移酶^[16]. 与特定的非组蛋白结合是异染色质形成的另一特征, Swi6/HP1 是一种主要的异染色质结合蛋白, 免疫荧光染色表明, HP1 (heterochromatin protein 1) 主要集中在异染色质区. 果蝇中的 HP1 蛋白 N 端有一个保守的 chromodomain (CD), 一个可变的绞链区与一个 C 端 chromo shadow domain (CSD), CD 与 Polycomb 相似 (一种在发育过程中与基因沉默相关的蛋白

质). HP1 的 CD 特异地结合在组蛋白 H3 N 端尾部乙酰化的 Lys9 上, CSD 与其他的相关蛋白结合. HP1 在异染色质上的结合依赖于 H3-mLys9, 而且对于 H3 Lys9 甲基化的传播和维持是必需的^[17].

3 RNA 干扰与染色质沉默的关系

尽管 RNAi 是在 RNA 水平上进行基因失活, 染色质沉默是在 DNA 水平上抑制基因的表达, 最近越来越多的证据表明, RNAi 可能参与异染色质的形成及常染色质的失活.

最近的研究表明, 在着丝粒及基因组的其他区域有一些短的 RNA 转录本, 这些短的 RNA 与 siRNA 相似, 通过与染色质重塑及染色质形成相关蛋白的结合, 导致 DNA 序列被删除或形成异染色质. 在裂殖酵母 *S. pombe* 中, 参与 RNAi 蛋白的突变会阻碍异染色质的形成^[18,19]. 同样四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*) 中参与 RNAi 蛋白的突变, 会极大程度地影响小 RNA 的产生及染色质的重排, 进而影响到从无转录活性的小核到有转录活性的大核转变过程中特殊 DNA 序列的删除^[20], 这些惊人的发现表明 RNAi 参与染色质沉默. 短的异染色质 RNA 是一种调节染色质修饰, 把非特异的 DNA 序列转换成不同染色质状态的主要信号. 在许多不同的生物体中异染色质的主要特征之一是组蛋白 H3 第 9 位 Lys 残基的高度甲基化. 这种修饰使得甲基化的 H3 ~ K9 能结合在异染色质蛋白 HP1 的 chromodomain 上. 在真菌 *Neurospora crassa* 中发现: DNA 的甲基化依赖于甲基化的 H3 ~ K9^[21,22]. 在植物中, dsRNA 可能通过 RNAi 产生的小 RNA 引起同源 DNA 序列的甲基化, 从而导致染色质结构的变化^[23]. 最近, Reinhart 和 Bartel^[24] 克隆并鉴定了 12 种小的与裂殖酵母着丝粒重复序列同源的, 约 20 个碱基对长的 dsRNA. 这些 RNA 可在另一位点介导异染色质的沉默. 分析表明: 这些 siRNA 来源于着丝粒区 DNA 重复序列的转录本, 是通过 RNA 干扰产生的. 这些联系促使 Volpe 及其同事去研究 RNAi 与异染色质形成及 H3 ~ K9 甲基化的关系. Volpe 等^[18] 发现在 *S. pombe* 中, 着丝粒异染色质区的转基因在缺乏 Argonaute, Dicer 或 RdRp 的突变体中被激活, 而且这些裂殖酵母的突变体含有与 Reinhart 和 Bartel 分离的 dsRNA 同源的着丝粒 DNA 转录本. 研究表明此现象是由 H3 Lys9 的甲基化消失及不能与 Swi6 结合引起的. 说明 RNAi 参与异染色质的形成可能是小 RNA 通过与 H3 Lys9

甲基化相关的酶以及 Swi6 蛋白相互作用引起的。Hall 等^[19]研究了在酵母 *mat* 区域中的 Swi6 蛋白, H3 Lys9 甲基化与 RNAi 的关系, 发现: 当该区域来自野生型的父本时, RNAi 突变株能维持 *mat* 区域的失活, 但在经过 TSA (组蛋白去乙酰化酶的阻断剂) 处理或缺乏 *clr4* (甲基转移酶) 的背景下, 不能在 *mat* 区域有效地建立沉默, 相应的 H3 Lys9 甲基化及 Swi6 的水平都比 RNAi 未突变的类型低, 表明 RNAi 只参与异染色质形成的起始, 且与 H3 Lys 9 甲基化及 Swi6 蛋白水平相关。所有这些证据都表明: RNAi 与异染色质形成有关。那么, RNAi 是如何介导染色质的沉默呢? 对四膜虫的研究发现: 野生型的四膜虫中含有 26 ~ 31 个核苷酸, 类似于 siRNA 的小 RNA, 与基因组内特殊的被删除的小 DNA 互补。这些小 DNA 序列在四膜虫从无转录活性的小核到有转录活性的大核转变过程中被删除。研究表明, *twil* 基因 (一种 *piwi* 相关的 *argonaute* 家族中的一种) 缺失的突变体严重地影响了这些小 DNA 序列的删除^[20]。在这些突变体中也发现小 RNA 的大量缺失。在另一曾认为阻碍小 DNA 序列删除的突变体 *pdd1* (*programmed DNA degradation*) 中, 发现小 RNA 聚集的延迟。Mochizuki 及其同事认为: 这些短的 RNA 可能通过配对的形式与靶 DNA 结合。在另一报道中, Taverna 等^[25]发现 *pdd1* 与 H3 ~ K9 的结合导致 DNA 程序性的降解, *pdd1* 的突变导致四膜虫中大量 H3 ~ K9 甲基化的丧失。而且这些 *pdd1* 结合在发育中消失的小 DNA 序列上。分析表明: *pdd1* 包含多个 *chromodomain*, 可能是一个通过小 RNA 与靶 DNA 配对而连接 DNA 片段与 DNA 修饰 (如: DNA 甲基化) 的分子。

4 RNA 干扰参与异染色质形成的机理

S. pombe 异染色质的形成过程, 以及四膜虫无转录活性的小核到有转录活性的体细胞核转换过程中, 染色体重排及小 DNA 序列的删除揭示了一个非常相似的机制: 通过 RNAi 产生的小 RNA 可能是促进 H3 ~ K9 甲基化及以后基因组表观遗传修饰的主要信号之一。染色质的沉默可能由两种遗传信号共同起始: 异染色质处大量的 DNA 重复序列和异染色质小 RNA 的浓度。来源于异染色质区的转录本通过 RNA 干扰机制被剪切成小 RNA, 这些产生的小 RNA 通过与 DNA 配对, 及与染色质结合的相关蛋白 *chromodomain* 结构域 (如: 酵母中的

Clr 4 或四膜虫中的 *Pdd1* 等) 相互作用, 介导 H3 ~ K9 的甲基化。然后, Swi6/HP1 结合在染色体上 H3 Lys9 甲基化的位点上, Swi6 一旦结合, 即作为一个异染色质形成的平台, 使邻近的核小体上产生更多的组蛋白修饰, 更多的 Swi6 结合位点, 最终异染色质一步步向外扩张, 从而形成异染色质区或进一步引起 DNA 甲基化使小 DNA 序列删除^[20,25]。那么, DNA 甲基化又是如何与异染色质形成及 RNAi 相联系的呢? Jackson 等^[22]认为, *Arabidosis* 的 HP1 (Swi6 同源物) 与甲基化的 H3 ~ K9 相互作用需要 CpNpG 特异的 DNA 甲基转移酶活力。一旦甲基化, DNA 便与甲基化半胱氨酸结合的蛋白如 MeCP1 和 MeCP2 相结合, 这两种蛋白质为组蛋白去乙酰化酶复合物的组成部分, 从而引起组蛋白的去乙酰化。综上所述, RNAi 介导的异染色质形成的途径见图 1^[4]。

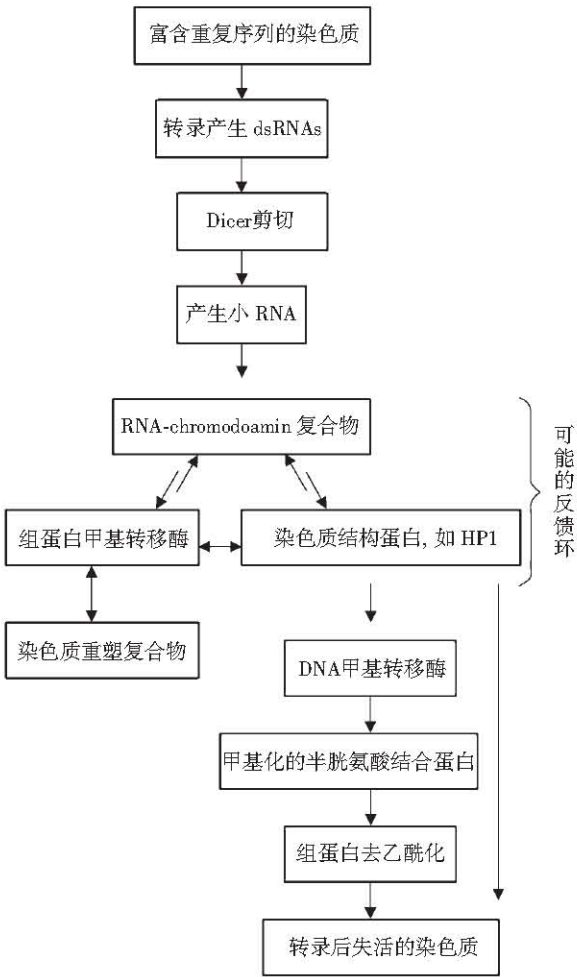


Fig. 1 The route to silencing
图 1 染色质沉默的路径

5 展 望

真核基因的表达受多个层次的调控, 染色质的失活与 RNAi 是两种不同抑制基因表达的机制, 最新的研究发现这两种看似不同的机制有着很大的关系. RNAi 参与异染色质的沉默为探讨异染色质形成的机制提供了新的思路.

除了酵母和四膜虫, 这种引发染色质沉默的机制有可能在复杂的有机体中存在. 证据如下: 在 *C. elegans* 中, Polycomb-group (Pc-G) (基因沉默相关的蛋白) 基因的突变可阻碍 RNAi^[26]. 而且, 在果蝇中小 RNA 直接与剂量补偿相关^[27]. 因此, 在酵母和四膜虫中发现, RNAi 产生的小 RNA 与染色质沉默的关系, 可能揭示了一种在细胞分化过程中普遍存在的诱导染色质结构改变及染色质沉默的机制.

此外, RNAi 介导的异染色质形成把着丝粒 DNA, 小 RNA, 着丝粒结合蛋白 Swi6/HP1 及 DNA 的甲基化联系起来, 进一步证明了生物体内存在着精细的, 整体的网络调控机制. 我们相信, RNAi 与异染色质形成的关系会给其他生物学现象的研究提供新的思路.

参 考 文 献

- 1 Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, **411** (6836): 494 ~ 498
- 2 Paddison P J, Hannon G J. siRNAs and shRNAs: skeleton keys to the human genome. *Curr Opin Mol Ther*, 2003, **5** (3): 217 ~ 224
- 3 Denli A M, Hannon G J. RNAi: an ever-growing puzzle. *Trends Biochem Sci*, 2003, **28** (4): 196 ~ 201
- 4 Stevenson D S, Jarvis P. Chromatin silencing: RNA in the driving seat. *Curr Biol*, 2003, **13** (1): R13 ~ 5
- 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): 363 ~ 366
- 6 Bernstein E, Denli A M, Hannon G J. The rest is silence. *RNA*, 2001, **7** (11): 1509 ~ 1521
- 7 Hammond S M, Boettcher S, Caudy A A, *et al.* Argonaute 2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, 2001, **293** (5532): 1146 ~ 1150
- 8 Palauqui J C, Elmayan T, Pollien J M, *et al.* Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions.

- EMBO J, 1997, **16** (15): 4738 ~ 4745
- 9 Nishikura K. A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst. *Cell*, 2001, **107** (4): 415 ~ 418
- 10 Hannon G J. RNA interference. *Nature*, 2002, **418** (6894): 244 ~ 251
- 11 Rice J C, Allis C D. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, **13** (3): 263 ~ 273
- 12 Jacobs S A, Taverna S D, Zhang Y, *et al.* Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *EMBO J*, 2001, **20** (18): 5232 ~ 5241
- 13 Martienssen R A, Colot V. DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science*, 2001, **293** (5532): 1070 ~ 1074
- 14 Moazed D. Common themes in mechanisms of gene silencing. *Mol Cell*, 2001, **8** (3): 489 ~ 498
- 15 Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, *et al.* Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, 2000, **406** (6796): 593 ~ 599
- 16 Nakayama J, Rice J C, Strahl B D, *et al.* Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*, 2001, **292** (5514): 110 ~ 113
- 17 Nonaka N, Kitajima T, Yokobayashi S, *et al.* Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. *Nat Cell Biol*, 2002, **4** (1): 89 ~ 93
- 18 Volpe T A, Kidner C, Hall I M, *et al.* Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*, 2002, **297** (5588): 1833 ~ 1837
- 19 Hall I M, Shankaranarayana G D, Noma K, *et al.* Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science*, 2002, **297** (5590): 2232 ~ 2237
- 20 Mochizuki K, Fine N A, Fujisawa T, *et al.* Analysis of a piwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in tetrahymena. *Cell*, 2002, **110** (6): 689 ~ 699
- 21 Tamaru H, Selker E U. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature*, 2001, **414** (6861): 277 ~ 283
- 22 Jackson J P, Lindroth A M, Cao X, *et al.* Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, 2002, **416** (6880): 556 ~ 560
- 23 Mette M F, Aufsatz W, van der Winden J, *et al.* Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J*, 2000, **19** (19): 5194 ~ 5201
- 24 Reinhart B J, Bartel D P. Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science*, 2002, **297** (5588): 1831
- 25 Taverna S D, Coyne R S, Allis C D. Methylation of histone H₃ at lysine 9 targets programmed DNA elimination in tetrahymena. *Cell*, 2002, **110** (6): 701 ~ 711
- 26 Dudley N R, Labbe J C, Goldstein B. Using RNA interference to identify genes required for RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (7): 4191 ~ 4196
- 27 Brodsky M H, Nordstrom W, Tsang G, *et al.* *Drosophila* p53 binds a damage response element at the reaper locus. *Cell*, 2000, **101** (1): 103 ~ 113

RNA Interference and Chromatin Silencing: a Regulation Network Existed in Biological Organisms

DU Mei-Jun, LIU De-Pei^{*}, LIANG Chih-Chuan

(*National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences,
Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100005, China*)

Abstract Gene expression is regulated at different levels. RNA interference is the mechanism through which double-stranded short RNAs silence cognate genes. Recent research work demonstrates that double short RNAs can not only repress the gene expression at post-transcriptional level, but also have a close relationship with chromatin silencing by directed H3 Lys9 methylation, DNA methylation and combining with other heterochromatin proteins. The mechanism existed in RNA interference, short RNAs, chromatin modification and chromatin silencing has been disclosed.

Key words RNA interference, chromatin silencing, heterochromatin, short RNAs

^{*} Corresponding author. Tel: 86-10-65296415, Fax: 86-10-65133086, E-mail: liudp@pumc.edu.cn

Received: August 27, 2003 Accepted: October 28, 2003