

## 转录起始于 NTP，还是 nanoRNAs? \*

谢兆辉 \*\*

<sup>(1)</sup> 德州学院生物系, 德州 253023; <sup>(2)</sup> 山东省高校生物技术与生物资源利用重点实验室, 德州 253023;<sup>(3)</sup> 山东功能大分子生物物理重点实验室, 德州 253023)

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00226

20 世纪 80 年代曾经发现, 在体外, 原核生物或真核生物的 RNA 聚合酶都可以不利用三磷酸核苷酸(nucleoside triphosphate, NTP), 而利用寡聚核苷酸起始转录<sup>[1-2]</sup>, 但这种现象一直没有在细胞中发现. 直到 2011 年, Goldman 等<sup>[3]</sup>在革兰氏阴性菌——绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)中发现一种小 RNA——nanoRNAs 可以作为引物取代 NTP 起始转录, 并且在细胞中 nanoRNAs 起始的转录与 NTP 起始的转录之间可能存在一个平衡, 改变这种平衡可以显著影响细胞整体的基因表达水平. 而在质体中, 虽然还没有鉴定出 nanoRNAs 起始转录的具体过程, 但 Zhelyazkova 等<sup>[4]</sup>(2012 年)认为质体自身编码的 RNA 聚合酶可能也具有这种活性. nanoRNAs 在细胞中起始转录现象的发现, 挑战了我们在分子生物学方面的一些传统认识, 如: a. 对转录起始的认识, 传统认为转录只能从 NTP 开始(图 1, ③), 现在发现转录也可以从小 RNA 开始(图 1, ④); b. 对小 RNA 作用机制的认识, 传统认为小 RNA 都是通过碱基配机制发挥作用, 现在发现小 RNA 也可以直接参与转录起始, 通过成为 mRNA 组分的方式发挥作用; c. 对 RNA 降解和转录偶联关系的认识, 传统认为 RNA 降解可以为转录提供单核苷酸原料, 现在发现降解的中间产物——nanoRNAs 还可以直接参与转录, 并可能会改变转录起始的频率.

### 1 nanoRNAs 的命名

nanoRNAs 是在研究细菌 mRNA 降解的过程中命名的. 与真核生物 mRNA 的降解机制研究相比, 细菌 mRNA 降解机制的研究相对较晚, 尤其是革

兰氏阳性菌, 只是近些年才取得了相对较大的进展. 由于革兰氏阴性菌与阳性菌在 10 亿多年前已经分化, 所以两类细菌 mRNA 的降解机制存在较大的差异<sup>[5]</sup>. 通常可以将细菌 mRNA 的降解途径归为两类: 一类是 5'→3' 核酸外切酶介导的降解途径, 这种途径只存在于革兰氏阳性菌, 如枯草杆菌<sup>[6]</sup>. 第二类是内切酶介导的降解途径, 这条途径在两类细菌中都存在, 是细菌 mRNA 降解的主要途径<sup>[7-8]</sup>. 两类细菌的外切核酸酶虽然不同, 但有一个共同特点: 往往不能够彻底降解 mRNA, 结果都会留下 2~5nt 长的寡聚核苷酸片段, 即 nanoRNAs<sup>[9]</sup>. nanoRNAs 最终要通过寡聚核苷酸酶(nanoRNase)彻底降解, 大肠杆菌只有一种 nanoRNase——Orn, 并且是大肠杆菌存活唯一必需的一种外切核酸酶<sup>[10]</sup>. 推测 Orn 突变造成的危害部分可能来自 nanoRNAs 积累, 另一部分可能由于 nanoRNAs 浓度, 改变影响了两类转录起始之间的平衡, 改变了细胞基因表达水平的整体. 枯草杆菌中已经发现了两种 nanoRNase 酶——YtqI (NrnA)和 YngD (NrnB), 但与大肠杆菌 Orn 都没有同源性<sup>[11]</sup>. 最近在一些重要病原微生物中也发现了 nanoRNase 酶, 如肺炎支原体和结核分枝杆菌, 均为 NrnA 的同源物<sup>[12]</sup>. 真核生物, 如人类<sup>[13]</sup>和植物<sup>[14]</sup>也已经发现了 nanoRNase 的同源物.

\* 国家自然科学基金资助项目(30901023).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 13969214206, E-mail: xiezh0523@163.com

收稿日期: 2012-05-10, 接受日期: 2012-11-02

nanoRNAs 可以起始转录的发现, 说明很多外切酶不能够完全降解 mRNA 而形成了 nanoRNAs, nanoRNAs 只能通过 nanoRNase 降解可能具有重要的生物学意义. 这就如同 mRNA 的丰度由转录和降解两个分开的过程控制, 这样有利于对 nanoRNAs 浓度进行调节. 同样也说明了 nanoRNAs 可能是一种具有重要功能的小 RNA, 而

非简单的降解中产物. nanoRNAs 参与转录, 在能量上也对细胞具有重要意义. 外切核酸酶的降解通常产生单磷酸核苷酸(NMP), NMP 要重新参与转录需要投入高能键将他们活化成 NTP(图 1, ②), nanoRNAs 参与转录, 很明显可以为细菌节省能量(图 1, ①), 就像细菌 PNPase 降解 RNA 的过程为磷酸解<sup>[15]</sup>.

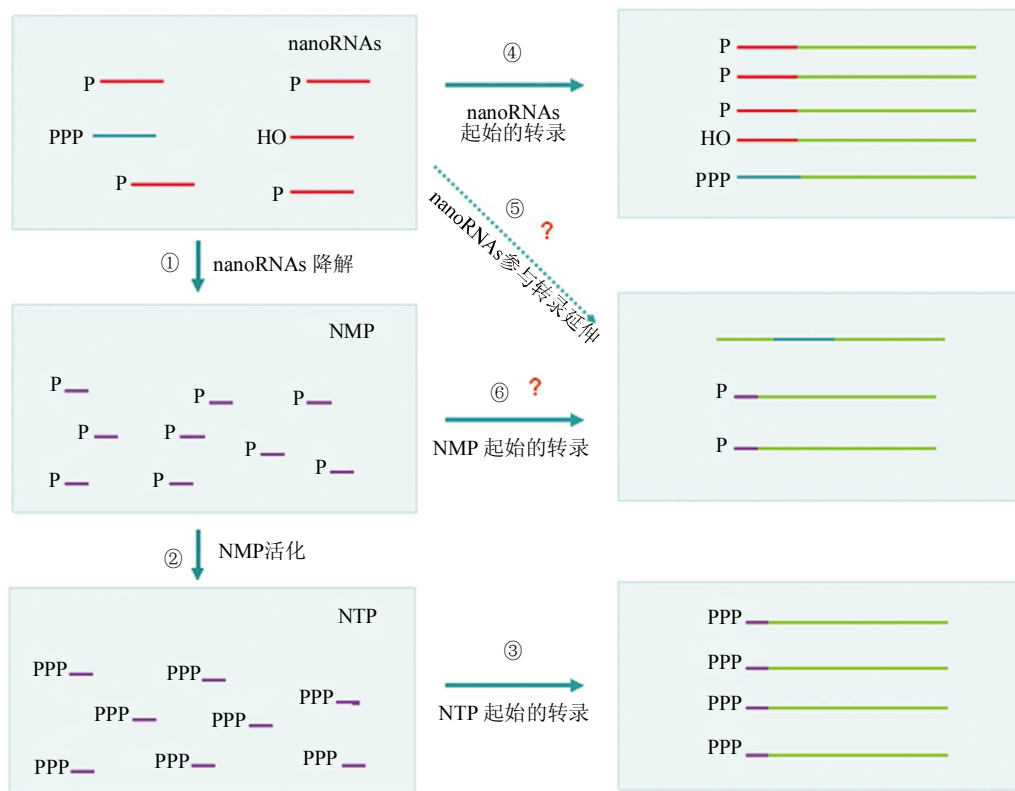


Fig. 1 The mechanisms of transcription initiation

图 1 转录起始的机制

① nanoRNA 降解; ② NMP 活化成 NTP; ③ NTP 起始的转录; ④ nanoRNAs 起始的转录; ⑤ nanoRNAs 参与转录延伸; ⑥ NMP 起始的转录.

## 2 nanoRNAs 的来源和作用机制

细胞中, nanoRNAs 的主要来源可能是 RNA 降解, 这种方式来源的 nanoRNAs, 其 5'端多为单磷酸形式或羟基<sup>[3]</sup>. 其次还可能来源于流产的转录起始或转录过程中 RNA 聚合酶的校对<sup>[16]</sup>, 这两个过程中释放的 RNA 片段多属于 nanoRNAs<sup>[17-18]</sup>. nanoRNAs 调节基因表达的机制可能有 3 种<sup>[3]</sup>: a. 通过改变原始转录物 5'端的磷酸形式, 来改变转录物的稳定性. 因为 NTP 起始的转录, 其产物的

5'端磷酸为三磷酸形式, nanoRNAs 起始的转录物则多为单磷酸, 稳定性远低于前者. b. 通过改变转录物转录起点的序列, 来影响转录物稳定性. c. 通过改变转录的起始效率来发挥作用. nanoRNAs 可能对一些转录起始起激活作用, 尤其对那些需要高浓度 NTP 才能有效起始转录的启动子<sup>[3]</sup>, 如在一些实验中, nanoRNAs 起始转录的频率比 NTP 起始转录的频率高出 10 倍<sup>[19]</sup>, 推测 nanoRNAs 可能主要通过第 1 种方式发挥作用.

### 3 nanoRNAs 起始转录引发的思考

现在还不清楚 nanoRNAs 是如何参与转录起始的. 在掺入时间上, nanoRNAs 可能是在转录起始过程中, 在形成开放的转录起始复合物时掺入的. 因为有实验发现, 这时没有 3'-OH 的寡聚核苷酸片段可以与模板 DNA 结合, 并抑制转录的起始<sup>[20]</sup>. 一个重要的问题是: 这时 nanoRNAs 为什么不会被清除呢? 也许这与 RNA 聚合酶选择底物的机制有关. 因为无论 RNA 聚合酶还是 DNA 聚合酶选择底物的机制都是通过识别碱基对的构象<sup>[21]</sup>, 像 DNA 复制中一些非天然碱基由于可以与模板形成天然碱基对的构象也能掺入到 DNA 链中<sup>[22]</sup>. 那么这些与模板互补的 nanoRNAs 能够结合模板并起始转录, 可能就是因为它们可以与模板形成正确的天然构象. 如果原因是这样, 可能会引发我们产生很多思考: a. nanoRNAs 能够参与延伸吗? 推测这种现象即使存在, 细胞内的几率一定非常低, 很难被检测到. 因为不像转录起始, 参与转录延伸的 nanoRNAs, 其 5'端需要是三磷酸形式, 但细胞中, 这种 nanoRNAs 极少. 这种丰度影响 nanoRNAs 掺入几率的现象, 在其参与的转录起始中已经表现出来<sup>[9]</sup>. 另外, 如果 nanoRNAs 可以参与延伸, 这时 RNA 聚合酶表现出的是连接酶活性. 在 DNA 复制过程中, 聚合酶和连接酶活性是由两个不同的酶承担的. 所以 nanoRNAs 能否参与延伸还要考虑到 RNA 聚合酶是否具有连接酶活性, 或小的 nanoRNAs 能否起到 NTP 类似物的形式, 连接反应可以通过聚合酶活性催化完成. b. 转录可以从 NTP 或 nanoRNAs 起始, 是否也能够从 NMP 或二磷酸核苷酸(NDP)开始呢? RNA 聚合酶选择底物, 多基于核苷酸的碱基和核糖部分, 磷酸对于选择的影响不大<sup>[23]</sup>. 转录延伸过程需要能量, 所以需要利用 NTP, 那么转录起始不需要能量, 就没有理由不能利用 NMP 或 NDP. Goldman 等的实验结果也证明了这一点, 因为参与转录起始 nanoRNAs 的 5'端多为单磷酸形式或羟基, 那说明可能核苷酸或 nanoRNAs 的 5'端磷酸的形式对转录起始并不非常重要. 另外, Goldman 等的实验中, nanoRNAs 起始的转录物中, 是否有一些实际上起始于 NMP 呢? 这也值得思考. 由于生物细胞一般处于高能荷状态, NMP 或 NDP 比 NTP 的量少得多, 所以 NMP 或 NDP 参与起始的现象, 虽然可能性很大, 但几率一定很低. 还有, 由于无论细菌, 还是真核

生物, 5'端为单磷酸形式的转录物很容易被降解<sup>[24]</sup>, 这也会大大增加检测这种现象的难度. c. nanoRNAs 在革兰氏阴性菌中发现, 由于两类细菌进化差异较大, 这种现象是否也存在于革兰氏阳性菌, 或者是与其分化更大的真核生物中呢? 这也需要进一步研究. nanoRNAs 能够起始转录是一种非常令人惊奇的现象, 或可以此为契机, 进一步深化我们在分子生物学方面的研究和认识.

### 参 考 文 献

- [1] Grachev M A, Zaychikov E F, Ivanova E M, *et al.* Oligonucleotides complementary to a promoter over the region -8...+2 as transcription primers for *E. coli* RNA polymerase. *Nucl Acids Res*, 1984, **12**(22): 8509-8524
- [2] Samuels M, Fire A, Sharp P A. Dinucleotide priming of transcription mediated by RNA polymerase II. *J Biol Chem*, 1984, **259**(4): 2517-2525
- [3] Goldman S R, Sharp J S, Vvedenskaya I O, *et al.* NanoRNAs prime transcription initiation *in vivo*. *Mol Cell*, 2011, **42**(6): 817-825
- [4] Zhelyazkova P, Sharma C M, Förstner K U, *et al.* The primary transcriptome of barley chloroplasts: numerous noncoding RNAs and the dominating role of the plastid-encoded RNA polymerase. *Plant Cell*, 2012, **24**(1): 123-136
- [5] Condon C. RNA processing and degradation in *Bacillus subtilis*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, **67**(2): 157-174
- [6] Mathy N, Hébert A, Mervelet P, *et al.* *Bacillus subtilis* ribonucleases J1 and J2 form a complex with altered enzyme behaviour. *Mol Microbiol*, 2010, **75**(2): 489-498
- [7] Bechhofer D H. *Bacillus subtilis* mRNA decay: new parts in the toolkit. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2011, **2**(3): 387-394
- [8] Bouvier M, Carpousis A J. A tale of two mRNA degradation pathways mediated by RNase E. *Mol Microbiol*, 2011, **82**(6): 1305-1310
- [9] Mechold U, Fang G, Ngo S, *et al.* YtqI from *Bacillus subtilis* has both oligoribonuclease and pAp-phosphatase activity. *Nucleic Acids Res*, 2007, **35**(13): 4552-4561
- [10] Picard F, Dressaire C, Girbal L, *et al.* Examination of post-transcriptional regulations in prokaryotes by integrative biology. *C R Biol*, 2009, **332**(11): 958-973
- [11] Fang M, Zeisberg W M, Condon C, *et al.* Degradation of nanoRNA is performed by multiple redundant RNases in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res*, 2009, **37**(15): 5114-5125
- [12] Postic G, Danchin A, Mechold U. Characterization of NrnA homologs from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycoplasma pneumoniae*. *RNA*, 2012, **18**(1): 155-165
- [13] Nguyen L H, Erzberger J P, Root J, *et al.* The human homolog of *Escherichia coli* Orn degrades small single-stranded RNA and DNA oligomers. *J Biol Chem*, 2000, **275**(34): 25900-25906
- [14] Lee S Y, Jung H Y, Kim T O, *et al.* Cloning, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the N-terminal domain of DEAD-box RNA helicase from

- Staphylococcus aureus* strain Mu50. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2010, **66**(Pt 12): 1674-1676
- [15] Slomovic S, Schuster G. Exonucleases and endonucleases involved in polyadenylation-assisted RNA decay. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2011, **2**(1): 106-123
- [16] Sydow J F, Cramer P. RNA polymerase fidelity and transcriptional proofreading. Curr Opin Struct Biol, 2009, **19**(6): 732-739
- [17] Cheung A C, Sainsbury S, Cramer P. Structural basis of initial RNA polymerase II transcription. EMBO J, 2011, **30**(23): 4755-4763
- [18] Sekine S, Tagami S, Yokoyama S. Structural basis of transcription by bacterial and eukaryotic RNA polymerases. Curr Opin Struct Biol, 2012, **22**(1): 110-118
- [19] Ruetsch N, Dennis D. RNA polymerase. Limit cognate primer for initiation and stable ternary complex formation. J Biol Chem, 1987, **262**(4): 1674-1679
- [20] Milne L, Xu Y, Perrin D M, *et al.* An approach to gene-specific transcription inhibition using oligonucleotides complementary to the template strand of the open complex. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, **97**(7): 3136-3141
- [21] Zaher H S, Green R. Fidelity at the molecular level: lessons from protein synthesis. Cell, 2009, **136**(4): 746-762
- [22] Bebenek K, Pedersen L C, Kunkel T A. synthesis infidelity *via* a mismatch with Watson-Crick geometry. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, **108**(5): 1862-1867
- [23] 谢兆辉. RNA 聚合酶维持转录忠实性的机制. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, **27**(6): 505-510  
Xie Z H. Chim J Biochem Mol Biol, 2011, **27**(6): 505-510
- [24] Belasco J G. All things must pass: contrasts and commonalities in eukaryotic and bacterial mRNA decay. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010, **11**(7): 467-478