

# 核内小 RNA 与反义 RNA

朱 圣 庚

(北京大学生物化学教研室)

长期以来,人们认为 RNA 只是 DNA 性状表达过程中的中间环节, RNA 的功能在于控制蛋白质的生物合成,因此,研究主要限于参与蛋白质生物合成的 tRNA、rRNA 和 mRNA。然而,近年已经证明 RNA 具有生物催化活性,可以控制 DNA 的复制,还是染色体的结构成分。由于 RNA 分子的种类很多,可能具有多种生物功能。极为引人注目的是,它们对基因表达可能有重要的调节作用。目前这方面的研究仅属开始,现就以下几方面作一简单介绍。

## 核内小 RNA 的种类和功能

真核细胞核内 RNA 的种类,除通常熟知的 tRNA、rRNA 和 mRNA 的前体及其加工产物外,还有一类分子量较小的 RNA (low molecular weight nuclear RNA, LMWN RNA),或称为核内小 RNA (small nuclear RNA, snRNA)。实际上,原核生物和真核生物以及某些病毒都有小 RNA,只是对真核生物的核内小 RNA 研究得较多,更受人们重视而已。

自 1968 年 Weinberg 和 Penman 以及 Prestayko 和 Busch 详细报道核内小 RNA 以来,许多实验室对核内小 RNA 进行了广泛的研究。他们从肿瘤细胞和正常细胞的核中分离出 RNA,经蔗糖密度梯度离心,分出 4—8S 的小 RNA 部分,再经聚丙烯酰胺凝胶电泳将各种核内小 RNA 分开,4—8S 小 RNA 的链长相当于 80—400 个核苷酸。Benecke 和 Penman 还从核的基质 (matrix) 中分离出 6—10S 的小 RNA。

聚丙烯酰胺凝胶电泳可将核内小 RNA 分成十几条明显的区带,其中以 U1—U6 snRNA 较易鉴别和制备,大部分研究工作集中在这类 RNA 上。它们的尿嘧啶核苷酸含量相对比较高,因此称为 U-snRNA。平均每一细胞中的拷贝数以 U1 为最高,可达  $1 \times 10^6$ ; 其余为  $1 \times 10^4$  至  $5 \times 10^5$ 。U-snRNA 很稳定,半寿期 (half-lives) 相当于整个细胞周期。这些分子的 5' 端都有“帽子”结构, U1 到 U5 含有三甲基鸟苷的“帽子”, U6 的“帽子”则不同。U3 RNA 存在于核仁中,并与 rRNA 前体相联结,其余则在核质中与 mRNA 前体 (hnRNA) 相联结,从而推测它们的功能可能与这些前体 RNA 的加工有关。

核内小 RNA 通常与蛋白质 (多肽) 结合,形成核糖核蛋白 (snRNP)。Lerner 和 Steitz 报道,全身性红斑狼疮患者具有抗核成分抗体,可以和各种 snRNP 核抗原反应。他们证明,抗 Sm 核抗原的抗血清能选择性地沉淀 U1、U2、U4、U5 和 U6 snRNP; 而抗 RNP 核抗原的抗血清只特异地沉淀 U1 snRNP 的两种异构体, U1A 和 U1B。各种 U-snRNP 可被自身免疫病的抗核抗体所沉淀,说明这些免疫沉淀的核糖核蛋白颗粒中含有共同的蛋白质成分。

除 U-snRNA 外,还有种类繁多的其它 snRNA。抗 La 抗体可沉淀一些 snRNP, 它们显著不同于 U-snRNP。已分出两类 La RNA, 即 La4.5 和 La4.5 I。La4.5 RNA 是一类链长为

Zhu Shengeng: snRNA and Antisense RNA

90—100个核苷酸的RNA,可通过氢键与细胞核和细胞质中含 polyA 的 RNA 相联结。这类 RNA 结合于核内 RNA 相应于基因组高度重复的 Alu 序列部分。结构分析表明, La4.5 RNA 有部分序列(14个核苷酸)与 Alu 家族 DNA 和 hnRNA 相同。La4.5 I 的序列与 La 4.5 十分相似。

La 蛋白(抗原)除与 La4.5 和 La4.5 I 相结合外,还存在于病毒感染后出现的核糖核蛋白颗粒 VA-RNP 和 EBV-RNP 中。VA-RNA 和 EBV-RNA 分别由腺病毒 2 和 EB 病毒基因组所编码。

在细胞质中发现有 Y RNP,可被抗 Ro 抗体所沉淀。小鼠含有两种 Y RNA (Y1 和 Y2)。人含有 5 种 Y RNA (Y1—Y5)。Novikoff 肝癌细胞含有 3 种 Y RNA (Y1—Y3)。所有这些 Y RNA 同 La RNA 一样,有较大结构差异,而 U RNA 在不同种属之间差异极小,进化上是极其保守的。

7S RNA 最初发现在 RNA 病毒中,它是由宿主编码的;现在知道它广泛存在于正常真核细胞和肿瘤细胞中,在进化上高度保守。7S RNA 可与 Alu 家族 DNA 序列杂交,并且与 La4.5 RNA 有高度同源性。

除了上述小 RNA 外,还发现其它许多小 RNA,其中包括 7-1、7-2、7-3、8S 以及某些酶(如 RNase P)含有的 RNA。它们的含量均较低。小 RNA 在细胞中的拷贝数少于 10,000 时,检测会很困难。在组织发育的某些阶段还可分析到一些特异的小 RNA。利用克隆的 Alu DNA 片段在体外以 RNA 聚合酶 III 进行转录,可以产生一些特殊的小 RNA,有证据表明这些 RNA 亦存在于体内。随着研究的深入,必将会有更多种类的小 RNA 被发现。

现将目前已知的各类小分子 RNA 列于表 1。各实验室对小 RNA 的命名上不太一致,常易造成混乱。Busch 等人以小 RNA 的沉降系数和性质(如核苷酸含量、抗原性等)来命名; Pennman 等人按凝胶电泳区带的先后次序分别以英文字母来表示;也有直接以数字来表示的。

从已经测定的几种 snRNA 基因来看,它们都是多拷贝基因,此外还存在数量甚多的假基因。U-snRNA 是由 RNA 聚合酶 II 转录的;其余 snRNA 由 RNA 聚合酶 III 所转录。有人认为某些 snRNA 可能与 5S 和 5.8S rRNA 一样,由 RNA 聚合酶 I 转录,但缺乏实验证据。

现已测定了大部分已知 snRNA 的序列,

表 1 小分子 RNA 的命名和性质

RNA	细胞内分布	5' 末端结构	链长	别名
U snRNA				
U1	核质	m <sub>3</sub> GpppAmUmA	165	D
U2	核质	m <sub>3</sub> GpppAmUmC	188—189	C
U3	核仁	m <sub>3</sub> GpppAmG	210—214	A, D <sub>2</sub>
U4	核质	m <sub>3</sub> GpppAmGmC	142—146	F
U5	核质	m <sub>3</sub> GpppAmUmA	116—118	G', 5SIII
U6	核质	XpppGUG	107—108	H1, 4.5III
其它小分子 RNA				
La 4.5	核质	pppG	90—94	
La4.5I	核质	pppG	98—99	H2
7S	核质和细胞质	pppG	294—295	L
VA I, II	核质	pppG	157—160	
7-1	核仁	pppN	~260	M
7-2	核仁	pppN	~290	M
7-3	核质	pppN	~300	K
8S (与 5.8 S 结合)	核仁	pppN	273—274	
Y1—Y3	细胞质	pppN	~100	

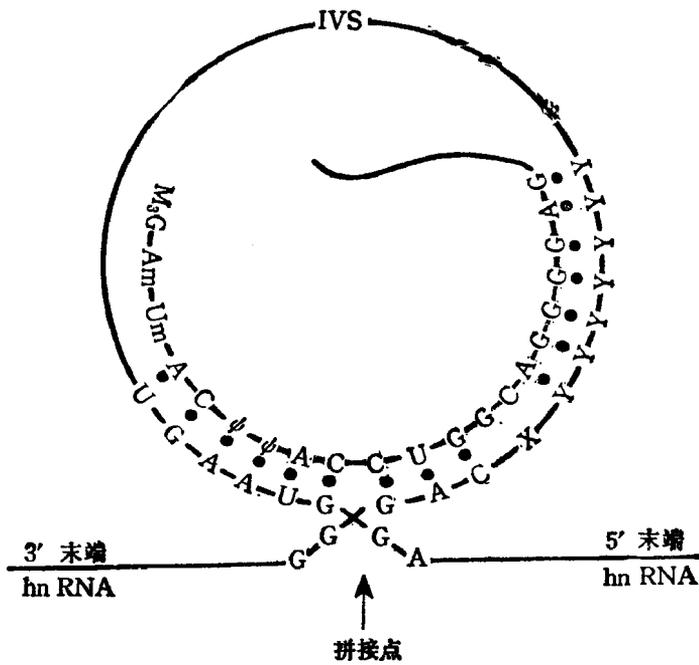


图1 U1 RNA 与 hn RNA 在拼接点附近碱基配对的模式

虽然是对它们的确切功能仍不十分了解，但近年来已取得了一些可喜的进展。Lerner 等与 Roger 和 Wall 同时于 1980 年报道，U1 5' 端有一段核苷酸序列与 mRNA 前体内含子拼接点附近的序列有惊人的互补性，因而推测它可能参与拼接过程，其后的一些实验支持了这个假说，模型如图 1 所示。

将腺病毒 hnRNA 在 HeLa 细胞核中进行拼接，如核预先与抗 Sm 或抗 RNP 的抗体保温，则拼接反应受到抑制。进一步使 hnRNA 的拼接在 HeLa 细胞核提取液中进行，如用蛋白 A-Sepharose 偶联的人自身免疫抗体除去核提取液中的 U-snRNP，将使核提取液完全失去拼接活性；而预先用提纯的 U-snRNA 饱和和偶联的抗体，经处理后核提取液仍有活性。切去拼接系统中 U1 snRNA 5' 端 8 个核苷酸，拼接亦将完全废除。由此可见，U1 snRNA 的完整 5' 端结构对拼接过程是必要的。

U3 与 rRNA 前体的加工有关，U2、U4、U5 和 U6 可能都与 hnRNA 的加工有关。有实验表明，某些 hnRNA 的拼接不需要 U1，而是由 U2 参与作用的。可能不同 hnRNA 的拼接点序列不同，需要不同的 U snRNA 来控制。

U5 可能也是参与 hnRNA 的拼接，它的核苷酸序列与 U1 全然不同，然而它们的高级结构却十分相似，这种高级结构的共同特征，可能与它们具有近似的功能或作用方式有关。

U4 snRNA 具有与 hnRNA 腺苷酸化的信号 AAUAAA 和 CACUG 互补的序列，因此推测可能与 3' 端形成 polyA 结构有关。U6 可与染色质周围的颗粒相结合，因此设想其功能与 U1—U5 不同，而是与这些颗粒的作用有关。

La 与 Y RNA 的功能还不清楚。但肯定它们不参与 hnRNA 的拼接过程。当核用抗 La 或抗 Ro 的抗体处理后，并不抑制拼接。

1982 年 Walter 报道，分泌性蛋白质合成后经内质网转移到胞外需要信号识别颗粒参与作用，而信号识别颗粒是由 7S RNA 和 6 个多肽所组成。已经知道，在分泌性蛋白质合成时，首先合成一段由 15—30 个氨基酸组成的信号肽。信号识别颗粒即与之作用，促使多肽通过内质网到达胞外。7S 与 La RNA 均含有与 Alu 家族 DNA 同源的序列，该序列正好是 DNA 复制的起始点，并且还可能与转位因子有关。因此，它们可能有着多种复杂的调节功能。

7-1、7-2 和 8S 存在于核仁中,可能与 rRNA 前体的加工有关,7-3 存在于核质中,其功能不清楚。某些病毒产生的 VA RNA 可能与抑制宿主 mRNA 的翻译有关。它们的功能均有待进一步研究。

## 反义 RNA 的作用

1983 年 Mizuno 等以及 Simons 和 Kleckner 同时发现反义 RNA (antisense RNA) 可起调节因子的作用,从而揭示了一种新的基因表达调节机制。所谓反义 RNA 是指一类具有与 mRNA 互补序列的小 RNA。这类 RNA 可以通过互补序列与特定的 mRNA 结合,结合位置包括 mRNA 结合核糖体的序列和起始密码 AUG,从而抑制 mRNA 的翻译。因此,他们称这类小 RNA 为干扰 mRNA 的互补 RNA (mRNA-interfering complementary RNA, micRNA)。

Mizuno 等研究了渗透压变化对大肠杆菌外膜蛋白质基因表达的调节,发现有两种外膜蛋白, OmpC 和 OmpF, 它们的合成受渗透压调节。在高渗的条件下, OmpC 的合成增加,而 OmpF 的合成受抑制;反之,低渗使 OmpC 合成抑制,而优先合成 OmpF。两种蛋白质的合成随渗透压的变化而改变,但两种蛋白质的总量保持不变。他们从 *ompC* 基因的启动子前分离到一段 DNA 序列,称为 CX 28 区域。当 *ompC* 基因进行转录时,该区域以相反方向转录出一种 6S RNA (174 个核苷酸),称为 micF。在这个小 RNA 中有很大大一部分序列与 OmpF-mRNA 的 5' 端互补,两者可结合并使 OmpF-mRNA 失去翻译活性。这就解释了为什么高渗时,随着 OmpC 蛋白合成的增加, OmpF 蛋白的合成受到抑制。

Simons 和 Kleckner 在分析 Tn 10 转座子的调控机制时发现一种类似的互补小 RNA 分子。该转座子的两端各有一个插入序列 IS 10, 转位酶是由这一插入序列编码的。转位活性主要存在于右侧插入序列。转位酶的启动部位有两个启动子,其一转录转位酶 mRNA,另一反

方向转录 micRNA,两者 5' 端重叠 40 个碱基,因此可以形成碱基配对(见图 2)。micRNA 与转位酶 mRNA 结合后,即可抑制转位酶的合成,从而控制转位活性。

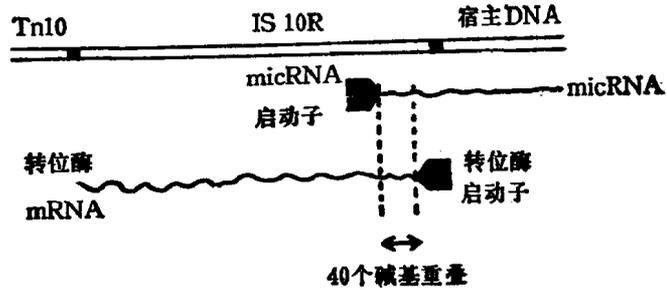


图 2 转位酶 mRNA 和 micRNA 转录的模式

Coleman 等人建议通过基因工程插入特定的 micRNA 基因,特别是在可诱导启动子控制下的 micDNA 片段,可产生 micRNA,以控制有关基因的表达。他们构建了含有 *mic(lpp)* 基因、*mic(ompC)* 基因和 *mic(ompA)* 基因的质粒,用以控制外膜脂蛋白(*lpp*)和渗透调节蛋白 OmpC 与 OmpA,均获得了成功。

尽管迄今所发现的 micRNA 均存在于原核生物,但在高等真核生物细胞内很可能也有类似的调控机制。某些小 RNA 除同 mRNA 结合外,也可能直接与 DNA 结合,调节基因活性。这方面的研究无疑具有广阔的前景。

高等真核生物的发育和组织分化过程中,也有某些小 RNA 起着调控作用。例如,一种沉降系数为 7S 的 CEH-RNA,可诱导胚胎心脏细胞的分化。另一种 BC1-RNA,存在于脑组织中,被认为可能与神经基因的表达控制有关。上述两种小 RNA 有一共同的结构特点,即其 3' 端均有 poly A。

以上例子说明, RNA 在基因表达调控中起着十分重要的作用,但许多细节还需要深入研究。随着研究工作的深入,必将会有许多新的发现,它们将极大地丰富我们对生命本质的认识,为控制生物提供有力的手段。