

植物 miRNA 在植物生长发育中的作用研究

张云峰, 季勤, 杨清, 邢宇俊

(1. 淮阴师范学院生物系, 江苏淮安 223001; 2. 南京农业大学生命科学院, 江苏南京 210095)

摘要 对植物 miRNA 的特点、生物合成过程、作用机制和发育调控进行了综述。

关键词 植物 miRNA; 基因调控; 植物发育

中图分类号 Q75 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)31-09834-03

Study on Role of Plant MicroRNA in Growth and Development of Plant

ZHANG Yunfeng et al (Department of Biology, Huaiyin Teachers College, Huai'an, Jiangsu 223001)

Abstract The characteristic, biosynthesis process, function mechanisms and developmental regulation of plant miRNA were reviewed.

Key words Plant microRNA; Gene control; Plant development

微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 是一类长度约为 22 个核苷酸的内源单链 RNA, 它自身不含开放阅读框 (ORF), 不具备编码蛋白质的能力。成熟 miRNA 的 5 端为磷酸基团, 3 端为羟基^[1-3]。miRNA 是 Lee 等于 1993 年在线虫中首次发现的, 此后大量的 miRNA 在植物和动物中被发现和克隆。自 2002 年 3 个研究小组分别从模式植物拟南芥中发现 miRNA 以来, 学者们已在拟南芥和水稻等植物中鉴定出了数百种 miRNA, 在这些植物 miRNA 中已有 863 个被登入 miRNA 数据库^[4-5], 并对其中一些 miRNA 进行了深入的研究。为此, 笔者对植物 miRNA 的特点、生物合成过程、调控机制和植物 miRNA 在植物生长发育中的作用进行了综述。

1 植物 miRNA 的特点

植物 miRNA 具有以下几个基本特点: 成熟的 miRNA 是一类 19~25 nt 的小 RNA, 可通过 Northern 印迹检测; miRNA 能够互补配对结合于基因序列的侧翼区域; miRNA 一般来源于染色体非编码蛋白区的一段; 由核酸酶 Dicer 作用于前体的双链部分生成; 成熟的 miRNA 不含开放阅读框 (ORF), 不具备编码蛋白质的能力; 成熟的 miRNA 的 5 端为磷酸基团, 3 端为羟基; miRNA 在不同组织发育的不同时段调节基因表达; miRNA 在各个物种间具有高度的进化保守性, 并且在茎部的保守性更强, 但在环部可以容许更多的突变位点存在^[6]。

植物 miRNA 除了具有以上基本特点外, 与动物 miRNA 相比, 它还具有以下几个方面特点: 植物 miRNA 虽然比较保守, 但仅是成熟的植物 miRNA 才表现出进化上的保守性。动物 miRNA 则无论是其前体还是成熟的 miRNA 都表现出保守的特性; 植物 miRNA 前体的长度变异 (64~303 nt) 也比动物 miRNA (60~70 nt) 明显^[7], 成熟的植物 miRNA 长度多为 21 nt, 而动物 miRNA 长度多为 22~23 nt, 这源于 Drosha 与 Dicer 切割性能的差异^[8]; 植物 miRNA 5 端更优选腺^[7,9], 热力学分析表明, 这种末端不稳态通过 RISC 维持; 植物 miRNA 是其前体在核内由 Dicer 执行两步切割, 以互补双链形式出核并解旋后才可发挥功能, 茎环结构只是短暂存在于核内的中间体, 而动物 miRNA 的前体在核内由 Drosha 仅完成初步切割, 产物以茎环结构形式转移到胞质中, 由 Dicer 完成第 2 步切割^[10]; 植物 miRNA 与靶 mRNA 几乎完全互补配对, 而大多数动物 miRNA 与其靶 mRNA

不完全互补配对^[7,9]; 植物 miRNA 可以与靶 mRNA 的任何区域作用 (主要是蛋白编码区), 通过切割靶 mRNA 或抑制靶 mRNA 翻译实现对基因表达的调控, 而动物 miRNA 则主要针对靶 mRNA 的 3' 非编码区域 (3' UTR), 作用机制为抑制翻译的正常进行^[10]; 植物 miRNA 具有较高的进化保守性, 对植物 miRNA 目标基因的预测相对简单^[11]; 大多数情况下, 植物 miRNA 作用的靶标主要是一些在植物生长发育过程中起作用的转录调控因子, 而动物 miRNA 不但能调控一些转录因子, 还可以对物质代谢、细胞周期、细胞分化和凋亡以及个体发育等一系列生命活动进行调节。这些区别表明动、植物从最后的共同祖先 (通常认为是单细胞个体) 分化后, 各自 miRNA 基因的进化是彼此独立的。某些 miRNA 基因在动、植物中并不都能找到相应的保守序列, 更增大了这种观点的可能性。

2 植物 miRNA 的生物合成过程

植物 miRNA 的生物合成过程包括转录、加工成熟及功能复合体装配 3 个主要步骤。植物 miRNA 由非编码的核基因转录而来, 其基因通常以单拷贝形式存在, 多定位于基因之间的间隔区, 也有一些处于已知基因的内含子区域。miRNA 基因首先转录成较长的初级 miRNA, 称为 pri-miRNA, 再在具有 RNase 活性的 DCL1 (Dicer-like protein) 结合其他成分, 如 HYL1 蛋白, 切割成 miRNA 前体 (pre-miRNA)^[7,12], 此时 miRNA 的一端已经确定。pre-miRNA 很不稳定, 在核内直接由 DCL1 在另外一端进行第 2 步切割, 即形成由成熟 miRNA 和源于 pre-miRNA 且与成熟 miRNA 互补片段组成的双链 miRNA:miRNA'^[7]。经 HEN1 甲基转移酶对 miRNA:miRNA' 双链体 3 端的尿嘧啶进行甲基化后, 互补 miRNA:miRNA' 双链在 Exportin5 的同源物 HASTY (HST) 的作用下出核^[13-14], 进而转移到含有 Argonaute 和 RNA 解旋酶的蛋白功能复合体 RISC 中^[6]。miRNA:miRNA' 互补双链其中一条单链可以选择性结合到 RISC 上成为成熟 miRNA, 而另一条单链则被立即降解。由于 miRNA:miRNA' 的两条链是不完全配对的, miRNA 链上靠近 5' 端有一个不与 miRNA' 链相应位置配对的小突起。这个小突起显著地减弱了 miRNA 链 5' 端的稳定性。成熟 miRNA 的产生总是趋向于选择 5' 端更不稳定的 miRNA^[15], 因此, miRNA 链被选中的机会要大大高于 miRNA' 链 (约高 100 倍)。结果是解旋酶将双链解开后, miRNA 链结合到 RISC 内识别目标基因从而发挥作用, 而 miRNA' 链则迅速被降解。

在植物 miRNA 的成熟和 RISC 的装配过程中, RNase 家

族的 Dicer 同源物 DCL1 和 Argonaute 家族的 PPD 蛋白发挥了重要作用^[9,16], 另外, HEN1 和 HYL1 也与 miRNA:miRNA' 互补双链的形成有关^[12,17]。

3 植物 miRNA 的调控机制

植物 miRNA 介导的靶 mRNA 调控机制可以是对靶 mRNA 的剪切或对靶 mRNA 翻译的阻遏, 这主要取决于植物 miRNA 与其靶 mRNA 的序列互补的程度。若植物 miRNA 与靶 mRNA 近乎完全互补, 则切割 mRNA; 若植物 miRNA 与靶 mRNA 不完全互补, 则抑制它的翻译^[5,7,11-12,18-19]。在 miRNA 切割过程中, miRNA 5 端的 2~8 位残基是与靶 mRNA 互补的核心元件, 而切割位点位于 miRNA 10~11 位核苷酸残基配对的靶 mRNA 的 ORF 区^[5,18]。切割后, miRNA 继续识别和切割其他目标 mRNA^[11]。而在 miRNA 抑制翻译中, miRNA 主要作用位点为靶 mRNA 的 3' UTR 区, 通过改变靶 mRNA 上核糖体密度或特异降解新合成的多肽链来达到抑制 mRNA 翻译的目的。miRNA 还有可能作用于靶 mRNA 的 5' UTR 区^[20]。

与动物 miRNA 相比, 植物 miRNA 与靶 mRNA 的转录区互补程度更高, 在作用方式上与 siRNA 更为接近, 即主要造成靶 mRNA 的降解。但也有例外, 如植物中的 miR172 与其靶序列 AP2 mRNA 高度互补, 却引起 AP2 蛋白表达受抑, 而没有检测到 AP2 mRNA 水平的降低^[21]。进而有证据表明, 切割与抑制机制大都协同进行^[10]。

miRNA 也可能存在其他的调控机制。可以调控靶 mRNA 的定位或稳定性, 或作用于 mRNA 以外的靶分子^[22]。此外, 还发现 miRNA 通过目标染色体位点的甲基化, 在转录水平上发挥作用^[23]。

4 植物 miRNA 对植物生长发育的影响

植物 miRNA 的靶基因大多是编码参与发育调控与细胞分化的转录因子, 包括 AP2、CUC1、CUC2、PHV、PHB 等。这些由 miRNA 靶基因编码的基因大多参与器官的发育、细胞分裂、器官极性建立等过程, 一小部分则参与 miRNA 的形成与作用, 如 DCL1 的 mRNA 自身是一个 miR162 的靶, 表明植物中 miRNA 途径存在着负反馈调节^[12]。

4.1 对根发育的影响 植物的根冠调节根尖的生长向性并保护其内部细胞。根冠细胞的形成受生长素信号的调控, 由根分生区末端的干细胞分化而来。在拟南芥中, miR160 通过负调控生长素响应因子(Auxin response factors) ARF10 和 ARF16 的表达而控制根冠细胞的形成。miR160 过表达或 ARF10、ARF16 双突变都会造成拟南芥根尖呈瘤状并失去重力感应性, 根分生区末端的干细胞分化受阻遏, 表明 miR160 对 ARF 基因的正常表达和准确定位的调控作用对根冠细胞形成很重要。另外, 失去 miR160 对 ARF16 表达的调控, 即会导致拟南芥呈多向性生长。生长素也对拟南芥 ARF10 和 ARF16 的表达进行调控, 但这与 miR160 的调控作用无关^[24]。

拟南芥侧根生长也受 miRNA 调控。miR164 的靶基因之一是拟南芥 NAM/ATAF/CUC (NAC) 基因家族的 NAC1。在拟南芥中, NAC1 的作用是传递生长素信号, 促进拟南芥侧根生长。miR164 引起 NAC1 mRNA 裂解, 减少 NAC1 蛋白表达量, 从而减弱生长素信号, 抑制其侧根生长。NAC1 mRNA 中与 miR164 配对的碱基发生突变(编码的蛋白序列未改变)或 miR164 表达受阻遏都会导致拟南芥侧根增生^[25]。Guo 等

还发现生长素能诱导 miR164 表达并促进 NAC1 mRNA 裂解, 表明生长素信号诱导与 miR164 调控作用之间存在密切联系。

4.2 对叶和茎发育的影响 玉米幼叶到成熟叶的转变由 APETALA2-like 基因 GLOSSY15 (GL15) 调控。GL15 活性增高不仅使幼年期叶片增多, 而且延缓生殖发育。miR172 对 GL15 mRNA 水平进行负调控, 从而促进玉米幼叶向成熟叶转变^[26]。

miRNA 参与叶形态的调控。转录因子 REVOLUTA (REV) 基因与叶形态建成有关, 其表达受 miR165 负调控。双链 RNA 结合蛋白 HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1) 通过改变 miR165 的水平, 控制拟南芥 REV mRNA 表达量, 维持叶脉和叶片的形态, 拟南芥 hyl1 突变株的叶片表现为背腹轴极性丧失, 叶脉变少且不连续^[27]。控制叶片发育的含 TCP 域的 TCPs 转录因子受到 miRJAW 的调控, 高表达 miRJAW 造成叶片弯曲并呈锯齿状。

维管形成层对叶和茎的维管组织连续生长非常重要, 但维管形成层的生长具有不确定性。在林生烟草中, miR165 通过引起转录因子 PHAVOLUTA (NPHV) mRNA 裂解调控维管形成层的生长。在失去 miR165 调控功能的烟草的半显性 phv 突变株中, 叶和茎维管系统发生异常的径向生长, 茎节点的维管组织不连续^[28]。

4.3 对花发育的影响 miRNA 参与调控开花时间。Aukerman 等^[29] 利用活化标签技术证明拟南芥中 miR172 过表达促进开花提早。miR172 的靶基因包括拟南芥转录因子 APETALA2 (AP2)、基因亚家族的 SCHLAFMUTZE 和 SCHNARCHZAPFEN, 二者编码光周期诱导抑制子。有证据表明, miR172 对二者表达的负调控是通过抑制靶 mRNA 翻译而非引起靶 mRNA 裂解实现的。事实上, 拟南芥的开花时间受多种信号途径控制, 有多个基因将这些途径整合起来, 基因组对光周期诱导的反应也是多方面的^[30]。

miRNA 还参与花的形态调控。如, 拟南芥的转录因子 MYB33 和 MYB65 与花粉囊发育有关, miR159 对 MYB33 和 MYB65 的表达进行负调控, 从而影响花粉囊形态^[31]。控制花发育的 AP2 基因是 miR172 的靶标基因, 过量表达 miR172 造成类似 AP2 缺失突变的花型, 如心皮螺旋状卷曲等^[30]。

4.4 对器官极性和器官分化的影响 miRNA 对拟南芥器官极性产生影响。叶和花等器官从茎顶端分生组织(SAM) 或花分生组织侧面的原基中产生, 因此称为侧生器官。侧生器官具有背腹轴极性。在拟南芥中, class III HD ZIP 基因家族和 KANADI 基因家族组成控制 SAM 产生的侧生器官的背腹轴极性的遗传学系统, PHABULOSA (PHB) 和 PHAVOLUTA (PHV) 的功能获得性突变或 KANADI 的功能缺失性突变均导致拟南芥的叶片丧失背腹轴极性^[32]。

Emery 等将拟南芥 REVOLUTA 进行突变, 使 REV mRNA 中与 miR165 互补的序列发生改变, 而它编码的蛋白质序列不发生变化, 结果得到与 PHB 和 PHV 功能获得性突变类似的表型, 从而推测 miR165 参与调控 SAM 产生的侧生器官的背腹轴极性^[32]。Kdner 等随后发现 PHB 和 PHV 在拟南芥叶原基的表达亦受到 miR165 的负调控, 进一步证明 miR165 的靶基因是 class III HD ZIP 基因家族成员 (REV, PHB 和 PHV 等), miR165 通过抑制这些基因的表达参与调控拟南芥 SAM 产生的侧生器官的背腹轴极性^[33]。另外, miR166 对

class III HD-ZIP 基因家族拟南芥 ATHB15 表达的负调控也被认为与 SAM 产生的侧生器官的背腹轴极性建成有关^[34]。

拟南芥 NAC 基因家族的 CUP-SHAPEDCOTYLEDON (CUC1) 和 CUC2 与分生组织发育和地上器官的分化有关, miR164 对它们的表达进行负调控。如果失去 miR164 的调控, CUC1 和 CUC2 的表达会导致拟南芥胚胎发育异常、子叶生长趋向性受到破坏、莲座叶减少或呈畸形、花瓣增生、花萼减少等。miR164 过表达会造成拟南芥的叶与茎融合^[35]。

5 结语

植物 miRNA 是细胞分化的重要决定因子, 它不仅具有器官特异性, 而且可以在器官的特定组织中表达。miRNA 作为一种新型的调控小 RNA, 在植物生长发育的调控中发挥着极其重要的生物学作用^[36-37]。miRNA 介导的基因沉默调控路径的发现是生命科学的一大突破, 它拓展和丰富了真核生物基因表达调控系统, 同时使人们对 miRNA 的生物学功能产生了浓厚的兴趣与探索欲望。

虽然对于植物 miRNA 的研究取得了很大进展, 但仍存在着许多问题。如, miRNA 调控基因的数量; miRNA 基因如何自身调节; 影响 miRNA 在 UTR 位点的易接近和效率; 不同的 miRNA 结合在相同的目标物上如何起作用; 植物中 miRNA 如何在切割 mRNA 和抑制翻译之间选择; 除了切割和抑制之外其作用机制等。这些问题都将成为今后 miRNA 研究领域的热点。另一方面, 随着越来越多植物 miRNA 的发现, 不仅可以继续研究它们在植物生长发育中的生物学意义和分子水平上的调节机制, 而且还可以有目的、有计划地利用它们进行植物生长发育的调控和生理结构的改造, 使植物更大限度地表现出对人类有利的性状, 从而为人类生产和生活服务。

参考文献

- [1] LAGOS-QUINTANA M, RAUHUT R, LENDECKEL W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs[J]. *Science*, 2001, 294(5543): 853-858.
- [2] 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.
- [3] LEE R C, AMBROS V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Science*, 2001, 294: 862-864.
- [4] GRIFFITHS-JONES S, GROCOCK R J, VANDONGENS, et al. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: 140-144.
- [5] ZHANG B H, PAN X P, ANDERSON T A. Identification of 188 conserved maize microRNAs and their targets[J]. *FEBS Lett*, 2006, 580: 3752-3762.
- [6] MOURELATOS Z, DOSIJEJ, PAUSHKINS, et al. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs[J]. *Genes Dev*, 2002, 16(6): 720-728.
- [7] REINHART B J, WEINSTEIN E G, RHOADES M W, et al. MicroRNAs in plants[J]. *Genes Dev*, 2002, 16(13): 1616-1626.
- [8] CHEN X M. microRNA biogenesis and function in plants[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(8): 5923-5931.
- [9] BARTHEL B, BARTHEL D P. MicroRNAs: at the root of plant development[J]. *Hart Physiol*, 2003, 132(2): 709-717.
- [10] MILLAR A A, WATERHOUSE P M. Hart and animal microRNAs: similarities and differences[J]. *Funct Integr Genomics*, 2005, 5: 129-135.
- [11] TANG G L, REINHART B J, BARTHEL D P, et al. A biochemical framework for RNA silencing in plants[J]. *Genes Dev*, 2003, 17(1): 49-63.
- [12] PARK W, LI J J, SONG R T, et al. Carpel factory, a dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Curr Biol*, 2002, 12(17): 1484-1495.
- [13] PARK M Y, WU G, GONZALEZ-SULSER A, et al. Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(10): 3691-3696.
- [14] BOLLMAN K M, AUKERMAN M J, PARK M Y, et al. HASTY, the *Arabidopsis* ortholog of exportin 5/ Msn5, regulates phase change and morphogenesis[J]. *Development*, 2003, 130(8): 1493-1504.
- [15] KHVOROVA A, REYNOLDS A, JAYASENA S D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias[J]. *Cell*, 2003, 115: 209-216.
- [16] KURIHARA Y, WATANABE Y. *Arabidopsis* microRNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(34): 12753-12758.
- [17] HAN M H, GOUD S, SONG L, et al. The *Arabidopsis* double-stranded RNA binding protein HYL1 plays a role in microRNA mediated gene regulation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(4): 1093-1098.
- [18] LLAVE C, XIE Z X, KASSCHAU K D, et al. Cleavage of scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA[J]. *Science*, 2002, 297(5589): 2053-2056.
- [19] HUIVAGNER G, ZAMORE P D. A microRNA in a multiple-turnover RNA enzyme complex[J]. *Science*, 2002, 297(5589): 2056-2060.
- [20] VALENCIA MA, LIU J, HANNON, et al. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs[J]. *Ceres and Development*, 2006, 20: 515-524.
- [21] CHEN X M. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development[J]. *Science*, 2004, 303(5666): 2022-2025.
- [22] AMBROS V. miRNAs: tiny regulators with great potential[J]. *Cell*, 2001, 107(7): 823-826.
- [23] JOVER G, CANDELA H, PONCE M R. Hart microRNAs and development[J]. *Int J Dev Biol*, 2005, 49(5/6): 733-744.
- [24] WANG J W, WANG L J, MAO Y B, et al. Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*[J]. *Hart Cell*, 2005, 17: 2204-2216.
- [25] GUO H S, XIE Q, FEI J F, et al. MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for *Arabidopsis* lateral root development[J]. *Hart Cell*, 2005, 17: 1376-1386.
- [26] LAUTER N, KAMPAN A, CARLSON S, et al. microRNA172 down-regulates *glossy15* to promote vegetative phase change in maize[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 9412-9417.
- [27] YUI, YUX, SHEN R, et al. HYL1 gene maintains venation and polarity of leaves[J]. *Harts*, 2005, 221: 231-242.
- [28] MCHALE N A, KONING R E. MicroRNA directed cleavage of *Nicotiana sylvestris* PHAVOLUTA mRNA regulates the vascular cambium structure of apical meristems[J]. *Plant Cell*, 2004, 16: 1730-1740.
- [29] AUKERMAN M L, SAKAI H. Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes[J]. *Hart Cell*, 2003, 15: 2730-2741.
- [30] SCHMID M, UHLENHAUT N H, GODARD F, et al. Dissection of floral induction pathways using global expression analysis[J]. *Development*, 2003, 130: 6001-6012.
- [31] MILLAR A A, GUBLER F. The *Arabidopsis* CAMYB-like genes, MYB33 and MYB65 are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development[J]. *Hart Cell*, 2005, 17: 705-721.
- [32] EMERY J F, FLOYD S K, ALVAREZ J, et al. Radial patterning of *Arabidopsis* shoot by class II HD-ZIP and KANADI genes[J]. *Curr Biol*, 2003, 13: 1768-1774.
- [33] KIDNER C A, MARIENSEN R A. Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1[J]. *Nature*, 2004, 42: 881-884.
- [34] KIM J, JUNG J H, REYES J L, et al. microRNA-directed cleavage of ATHB15 mRNA regulates vascular development in *Arabidopsis* inflorescence stems[J]. *Hart J*, 2005, 42: 84-94.
- [35] MALLORY A C, DUGAS D U, BARTHEL D P, et al. MicroRNA regulation of NAC domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic vegetative, and floral organs[J]. *Curr Biol*, 2004, 14: 1035-1046.
- [36] DUAN C, WANG C, GUO H. Regulation of microRNA on plant development and viral infection[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2006, 51(3): 269-278.
- [37] CHUT J, AUNG K, LINSI, et al. Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in *Arabidopsis*[J]. *Hart Cell*, 2006, 18: 412-421.