

PLOD3 基因 3'调控区的人类特异突变改变 miR-124a 对 PLOD3 的调控

黄琳^{1,2,3}, 张锐^{1,2,3}, 宿兵^{1,2,*}

(1. 中国科学院昆明动物研究所 遗传资源与进化国家重点实验室, 昆明 650223; 2. 中国科学院昆明灵长类研究中心, 昆明 650223;
3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: microRNAs(miRNAs)是一类在转录后水平调控基因表达的不编码蛋白质的小 RNA(长度 20—24 个碱基)。其中, miR-124a 是一个在哺乳动物中枢神经系统高度表达的 miRNA, 在神经前体细胞向神经元分化的过程中起着举足轻重的作用。由于 miRNAs 特异性地识别靶基因的 3'端调控区(3'UTR)的靶序列, 因此, 在人类起源过程中基因 3'UTR 的单核苷酸序列变异有可能导致 miRNA 调控的改变。通过靶基因预测和 3'UTR 区在哺乳动物代表物种间的同源序列比较, 我们发现 miR-124a 的靶基因中有一个基因(PLOD3) 3'UTR 的靶位点中存在人类特异突变位点。利用体外报告基因系统, 发现 PLOD3 基因 3'UTR 靶位点中所含的一个人类特异的突变导致 miR-124a 对 PLOD3 的调控效率降低。研究表明, miRNAs 靶基因 3'UTR 的序列变异具有功能效应, 它有可能是人类中枢神经系统在起源和演化中发挥关键作用的重要遗传机制之一。

关键词: miRNA; 靶位点; 人类特异突变; 人类大脑进化

中图分类号: Q344; Q522 文献标识码: A 文章编号: 0254-5853-(2008)04-0363-05

A Human-specific Mutation Leads to Reduced Interaction Between miR-124a and One of Its Target Genes, PLOD3

HUANG Lin^{1,2,3}, ZHANG Rui^{1,2,3}, SU Bing^{1,2,*}

(1. State Key Laboratory of Genetic Resources and Evolution, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;
2. Kunming Primate Research Center, the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;
3. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are a class of noncoding RNAs (20-24nt) that can post-transcriptionally regulate the expression of protein coding genes in metazoans. Among them, miR-124a, which is preferentially expressed in the brain, controls the neuronal differentiation in mammals. As miRNAs recognize sequences in the 3' untranslated region (UTR) of the target genes, during human origin, mutations located in the 3'UTRs of the target genes may lead to changes in miRNA regulation. Through target gene prediction and comparative sequence analysis in representative mammalian species, we identified a target gene (PLOD3) of miR-124a, which has a human-specific mutation in the 3'UTR target sequence. Using the *in vitro* reporter gene system, we discovered that the human specific mutation in the target site of PLOD3 leads to reduced interaction between miR-124a and PLOD3. This result implies that sequence changes located in the 3'UTR segment of the target genes may have functional consequence and eventually contribute to the origin and evolution of human cognition.

Key words: miRNA; Target site; Human specific mutation; Human brain evolution

人类区别于其他动物的最本质特征是其高级的认知能力。即使与其近亲—非人灵长类相比, 人也拥有比非人灵长类大好几倍的脑容量和较高的认知能力。但是目前为止, 对人类起源过程中大

脑容量增大及认知能力提高的遗传学机制却知之甚少。一般认为, 人类大脑的增大是达尔文正选择的结果。前人的研究也表明几个与大脑发育相关的蛋白质编码基因在人这一支受到了正向选择

收稿日期: 2008-05-14; 接受日期: 2008-06-05

基金项目: 科技部 973 项目(2007CB947701, 2007CB815705); 中科院重要方向项目(KSCX1-YW-R-34); 国家自然科学基金(30525028, 30630013, 30623007); 云南省自然科学基金

*通讯作者 (Corresponding author), 博士生导师, Email: sub@mail.kiz.ac.cn

(Zhang, 2003; Wang & Su, 2004; Wang et al, 2005)。同样也有证据表明人类大脑的进化可能是基因表达调控变化的结果(King & Wilson, 1975; Hughes, 2007)。因此寻找人与非人灵长类大脑表达基因的调控差异或许能够进一步为人与非人灵长类为何有如此巨大的差异提供分子生物学水平上的解释。

microRNAs (或称作 miRNAs) 是近十几年来发现的一类内源小 RNA 分子(Lee et al, 1993; Reinhart et al, 2000)。它长约 20—24 碱基, 广泛地存在于动植物机体中。在动物中, miRNAs 基因最初的转录本(pri-miRNAs)在核内由 Rnase III Droscha 酶处理后成为大约 70 碱基的带有茎环结构的 miRNAs 前体(Pre-miRNAs), 而 pre-miRNAs 在核膜上一种转运蛋白 Exportin-5 的帮助下转运到细胞核外, 之后再由胞质 RNaseIII Dicer 酶进行处理, 酶切后成为成熟的 miRNAs。成熟的 miRNAs 与 miRNP 核蛋白体复合物结合, 通过与 mRNA 的 3' 端序列互补识别靶 mRNAs, 从而调控靶基因的表达(Bartel, 2004)。根据 miRNAs 与靶位点的互补程度的不同(完全互补或部分互补), miRNAs 可以通过部分降解靶 mRNA 或者抑制靶 mRNA 的翻译来调控基因的表达(Wightman et al, 1993; Bartel, 2004; Yekta et al, 2004; Lim et al, 2005)。目前的研究表明 miRNAs 在胚胎早期发育、细胞代谢、细胞分化和生长、调亡和免疫反应等过程中, 都起着举足轻重的作用(Ambros, 2003; Carrington & Ambros; 2003; Xu et al, 2003; Johnson et al, 2005)。近年来, 几个不同的研究小组用克隆的方法分离出大量大脑表达的 miRNAs, 并发现不同 miRNAs 的表达量在大脑发育过程中有显著的变化, 这暗示 miRNAs 可能参与大脑的发育调控(Lagos-Quintana et al, 2002; Dostie et al, 2003; Krichevsky et al, 2003)。Berezikov et al (2006)利用小 RNA 文库测序的方法比较人和黑猩猩中大脑表达的 miRNAs, 他们发现即使和人的近亲相比, 也存在人特有的 miRNAs, 这个结果暗示 miRNAs 可能参与人类大脑的进化。

miR-124a 是一个在大脑高度表达的 miRNA, 在大脑的神经发生过程中表达量大幅度上升(Krichevsky et al, 2003)。研究表明 miR-124a 可以促进神经前体细胞向神经元分化(Conaco et al, 2006)。这些结果表明 miR-124a 在大脑的发育过程中发挥很重要的作用。Lim et al (2005)的研究结果表明, 在 HeLa 细胞中过量表达 miR-124a 可以使数百个基因的表达量降低。通过生物信息学手段的分

析, 大部分下调的基因都含有潜在的 miR-124a 的靶位点, 并且这些基因在大脑都是低表达的。这提示 miR-124a 可能在体内也能够下调这些基因的表达。所以, 如果 miR-124a 与其靶基因的调控模式在人类进化中发生了变化, 可能会影响人类大脑的进化。因为与大部分的 miRNAs 一样, miR-124a 在种间非常保守, 从啮齿类到灵长类, 成熟的 miR-124a 没有发生任何改变(Kim, 2005)。因此, 本研究主要关注其靶基因的靶位点是否发生人类特异的变异, 从而可能导致不同灵长类物种基因表达水平的差异, 并进一步引起表型变化。运用生物信息学的方法, 我们分析了 miR-124a 的一个靶基因: PLOD3。分析结果表明, PLOD3 的靶位点存在人特异的突变。进一步的体外实验证明, 此位点的突变可导致 miR-124a 对 PLOD3 的调控效率降低。

1 材料和方法

1.1 靶位点及人类特有突变基因的寻找

利用 Miranda 软件预测 Lim 报道的表达受 miR-124a 调控的基因是否拥有对应的靶位点(Enright et al, 2003; Lim et al, 2005)。对应基因的 3'UTR 序列从 Ensemble 的 Biomart 中下载。miranda 的几个参数设定为: score 80, energy-17, shuffle。利用 UCSC 两物种全基因组比对文件, 将预测到的靶位点在黑猩猩、猕猴、小鼠和狗的基因组的直系同源区域截取相应序列进行比对, 最后选取靶位点中含有人特异突变位点的基因为候选基因。

1.2 荧光素酶报告基因载体的构建

利用 PCR 方法扩增候选基因的人和黑猩猩的 3'UTR 序列(序列长度: CHSY1: 1383bp; PLOD3: 298bp)。引物序列如下: CHSY1: TTAAGATCTACT-CCTTTAAGATTGAGC/GTATCTAGATGGCAAGTCTATCACTGTTT; PLOD3: CACAGATCTACTCT-GCCAAACCTGCC/CTTTCTAGATGTCCTTTATT CAGAGTGAGG。正向引物添加 BglIII (AGATCT) 酶切位点和 3 个保护碱基, 反向引物添加 XbaI (TCTAGA) 酶切位点和 3 个保护碱基。扩增产物用华舜 DNA 纯化试剂盒纯化, 纯化产物进行 BglIII 和 XbaI 双酶切。纯化后的酶切产物连接 pCS-Firefly 荧光报告载体, 4℃连接过夜, 转化感受态细胞并涂板。挑取单克隆进行 PCR 及测序鉴定。阳性克隆用 QIAgen 小量质粒抽提试剂盒抽提质粒以备转染。

1.3 miRNA 的化学合成

我们根据成熟 miR-124a 的序列设计 miR-124a 双链(Lim et al, 2005), 再向上海吉玛生物有限公司订购。设计的原则是 miR-124a 双链的正义链 5'端的碱基对结合率要比 3'端低, 这样才能保证 miR-124a 而非互补链进入 RISC 复合物发生作用(Schwarz et al, 2003)。对照小 RNA 是由公司提供的对基因表达没有影响的小 RNA。

miR-124a 双链为:

UAAGGCACGCGGUGAAUGCCA/GCAUUC
ACCGCGUGCCUUAUU

对照小 RNA 双链:

UUCUCCGAACGU GUCACG UTT/ACGUG-
ACACGUUCGGAGAATT

1.4 细胞培养及细胞转染

选取 293T 细胞系进行培养及细胞转染实验。细胞培养于含有 10%胎牛血清 (FBS) 的合成培养基 (DMEM) 中, 并在 5% CO₂ 以及 37°C 培养箱中培养。

细胞长势良好时可进行转染。转染前一天将细胞传代于 24 孔板中, 控制细胞密度在 30%—40% 左右。转染时胞密度达到 70%—80%。使用 lipofectamine 2000 试剂盒并按照其说明进行转染。简而言之, 我们将含有 miR-124a, 带有对应 3'UTR 的 Firefly 质粒和 pTK-Renilla (Promega) 质粒共转细胞系。每孔按 siRNA 20 μmol, Firefly 质粒 100ng, Renilla 200ng 进行转染。每个转染实验至少做 3 次重复。

1.5 细胞收集及双荧光素酶活性的检测

转染细胞后 36—48 h 内收集细胞。使用 Promega 公司的双荧光素酶检测试剂盒进行双荧光检测。Firefly 的荧光读数和 Renilla 的荧光读数的比

值作为最终荧光素酶的相对活性。

2 结果和讨论

利用 Miranda 软件(Enright et al, 2003), 我们预测到 6 个表达下调的基因含有 miR-124a 的靶位点。进一步序列分析发现其中两个基因(CHSY1 和 PLOD3)的靶位点含有人类特异的突变(图 1)。所以我们选择这两个基因进行后续的实验分析。首先我们用双荧光报告系统验证 CHSY1 和 PLOD3 是否是 miR-124a 的真实靶基因。将两个基因人的 3'UTR 接入荧光素酶质粒中并分别与 miR-124a 共同转染 293T 细胞系。我们的结果显示与 miR-124a 共转时, 含有 PLOD3 基因 3'UTR 的荧光素酶的相对表达活性显著的低于与对照 siRNA 共转时的荧光素酶相对表达活性 ($P=0.001$, t 检验)。但 CHSY1 的结果不显著 ($P=0.1$, t 检验)(图 2)。此结果表明, PLOD3 是 miR-124a 的靶基因。

为了进一步证明 PLOD3 靶位点上的人类特异突变位点是否能够影响 miR-124a 对其调控的效率。我们将人和黑猩猩 PLOD3 基因的 3'UTR 分别接入荧光素酶质粒中并分别与 miR-124a 共转。另一方面, 因为在用荧光报告系统检测 CHSY1 是否为 miR-124a 的真实靶基因时, 我们只检测了包含人 3'UTR 的荧光素酶质粒, 为了排除因为人类特异突变而使得 miR-124a 失去了对人 CHSY1 基因的表达调控作用的可能性。我们对人和黑猩猩 CHSY1 基因的 3'UTR 进行了与 PLOD3 基因相同的处理。转染结果表明: 对于 PLOD3 基因, 含有人 3'UTR 的荧光素酶相对表达活性明显高于含有黑猩猩 3'UTR 荧光素酶的相对表达活性(图 3)。这表明 miR-124a 对人和黑猩猩 PLOD3 的表达调控效率不同。而对

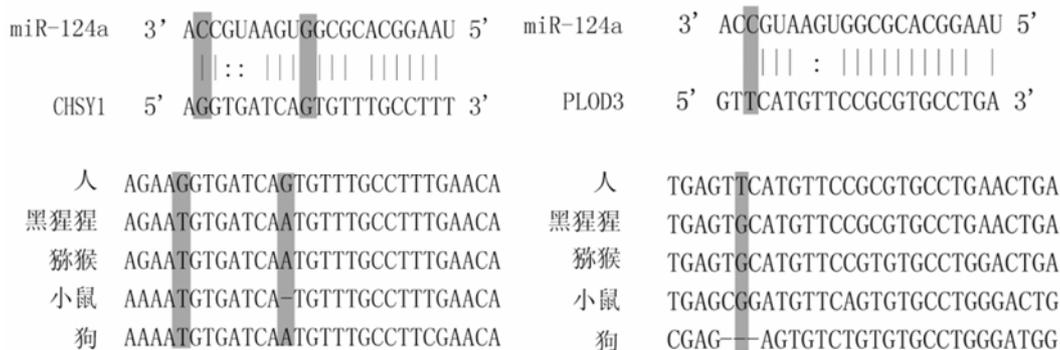


图 1 CHSY1 和 PLOD3 基因中可能的 miR-124a 靶位点区域不同物种的比较

Fig. 1 Alignment of the potential miR-124a target site regions in PLOD3 and CHSY1 genes among representative mammalian species

人特异突变在图中用阴影标明(the human specific mutations are highlighted)。

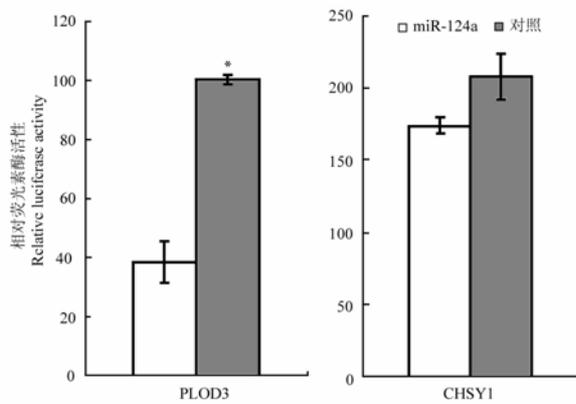


图 2 miR-124a 可显著抑制携带人 PLOD3 基因 3'UTR 的报告基因的表达 ($P=0.001$, t 检验), 而对携带 CHSY1 基因 3'UTR 的报告基因的抑制作用不明显 ($P=0.1$, t 检验)

Fig. 2 miR-124a repressed the expression of the reporter gene bearing the 3'UTR of PLOD3 ($P=0.001$, t test) but not CHSY1 ($P=0.1$, t test)

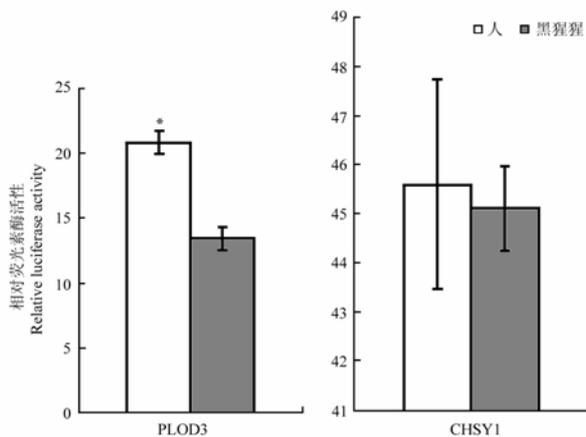


图 3 miR-124a 对含有人和黑猩猩的 PLOD3 基因 (A) 和 CHSY1 基因 (B) 3'UTR 的报告基因抑制作用的比较

Fig. 3 Comparison of the inhibitory effect of miR-124a on the expression of the reporter genes bearing the 3'UTR segment from human or chimpanzee PLOD3 (A) and CHSY1 (B) genes

*, 差异显著 ($P=0.001$, t 检验)。

Asterisk denotes significant difference ($P=0.001$, t test).

于 CHSY1 基因, 人和黑猩猩两个荧光素酶质粒的相对表达活性没有明显的区别 (图 3)。结合前面的试验结果 (图 2), 我们认为 CHSY1 不是 miR-124a 真正的靶基因 (图 2)。在 PLOD3 基因的靶位点中, 从黑猩猩到人类有一个从 G 到 T 的突变, 从而使靶位点与 miR-124a 的结合中的 CG 结合变成了 CU 结合 (图 1), 因此降低了 miR-124a 与靶位点的结合

稳定性, 进而降低了 miR-124a 对基因表达的抑制作用, 因而含有人 3'UTR 的荧光素酶相对表达活性高于含有黑猩猩 3'UTR 荧光素酶的相对表达活性。而在 CHSY1 基因的靶位点中虽然有两个人特异突变, 一个是从 T 到 G 的突变, 使得原来的 CU 结合变成了 CG 结合; 另一个是从 A 到 G 的突变, 使得原来的 GA 结合变成了 GG 结合 (图 1)。但是我们的实验结果表明 miR-124a 对 CHSY1 的表达并没有调控作用, 也就是说 CHSY1 并不是 miR-124a 的真实靶基因。因而所预测的靶位点也不是真实的靶位点, 所以即使有人特异的突变并不会带来表达调控的改变。Lim et al (2005) 的研究表明 miR-124a 对 CHSY1 的表达有调控作用, 这可能是因为 CHSY1 是 miR-124a 靶基因的一个下游基因, miR-124a 通过调控靶基因的表达而调控 CHSY1 的表达。

PLOD3, 也称为 LH3, 是赖氨酸羟化酶的三个异构体之一, 能够催化胶原蛋白中的赖氨酸残基进行羟基化; 此外, 研究表明 PLOD3 还具有半乳糖羟赖氨酸葡基转移酶活性, 能够将葡萄糖基加到胶原蛋白的半乳糖羟赖氨酸残基上。由此可知 PLOD3 对胶原蛋白的合成及修饰有着极为重要的作用 (Heikkinen et al, 1994; Valtavaara et al, 1998)。胶原蛋白参与了众多生理过程: 首先它能够做为脚架蛋白支撑固定细胞, 促进细胞间的连接及细胞的迁移等。也有证据表明胶原蛋白能够直接作为酪氨酸蛋白激酶受体的配体, 从而介导一系列蛋白的磷酸化 (Shrivastava et al, 1997; Vogel et al, 1997)。作为参与胶原蛋白合成和修饰的蛋白, PLOD3 也间接参与了这些生理过程。PLOD3 是一个广泛表达的基因, 在体内的分布极广 (Valtavaara et al, 1998; Mercer et al, 2003)。原位杂交的结果表明 PLOD3 在大脑中也是广泛表达的, 尤其是在大脑皮层和海马中表达量较高 (Visel et al, 2004)。值得关注的是, miR-124a 也被观察到在大脑皮层表达。这表明 miR-124a 在大脑内确实调控 PLOD3 的表达。

虽然 PLOD3 在大脑发育过程中的功能和作用需要进一步的研究。我们的结果表明 PLOD3 靶位点上一个人特异的突变能够使 miR-124a 对 PLOD3 基因的表达调控效率发生改变。该表达调控效率的改变可能对人类大脑进化产生影响。当然, 在 PLOD3 基因的整个 3'UTR 序列中, 人与黑猩猩相比总共有三个突变位点。因为我们没有做靶位点的回复突变, 所以不能完全排除表达差异是由于其他

两个突变位点引起的可能性, 尽管理论上这样的可能性很小, 因为整个 PLOD3 的 3'UTR 只含有一个预测的靶位点, 而另外两个突变位点不在靶序列区。此外, 体内的表达调控是否真的发生了改变以及改变怎样影响大脑的进化尚需进一步的工作来

验证。

致谢: 感谢本实验室实验员张慧提供的技术支持。

参考文献:

- Ambros V. 2003. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing[J]. *Cell*, **113**(6): 673-676.
- Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, **116**(2): 281-297.
- Berezikov E, Cuppen E, Plasterk RH. 2006. Approaches to microRNA discovery[J]. *Nat Genet*, **38** Suppl: S2-7.
- Carrington JC, Ambros V. 2003. Role of microRNAs in plant and animal development[J]. *Science*, **301**(5631): 336-338.
- Conaco C, Otto S, Han JJ, Mandel G. 2006. Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**(7): 2422-2427.
- Dostie J, Mourelatos Z, Yang M, Sharma A, Dreyfuss G. 2003. Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs[J]. *Rna*, **9**(2): 180-186.
- Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS. 2003. MicroRNA targets in *Drosophila*[J]. *Genome Biol*, **5**(1): R1.
- Heikkinen J, Hautala T, Kivirikko KI, Myllylä R. 1994. Structure and expression of the human lysyl hydroxylase gene (PLOD): introns 9 and 16 contain Alu sequences at the sites of recombination in Ehlers-Danlos syndrome type VI patients[J]. *Genomics*, **24**(3): 464-471.
- Hughes AL. 2007. Looking for Darwin in all the wrong places: the misguided quest for positive selection at the nucleotide sequence level[J]. *Heredity*, **99**(4): 364-373.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. 2005. RAS is regulated by the let-7 microRNA family[J]. *Cell*, **120**(5): 635-647.
- Kim VN. 2005. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**(5): 376-385.
- King MC, Wilson AC. 1975. Evolution at two levels in humans and chimpanzees[J]. *Science*, **188**(4184): 107-116.
- Krichevsky AM, King KS, Donahue CP, Khrapko K, Kosik KS. 2003. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development[J]. *Rna*, **9**(10): 1274-1281.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. 2002. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse[J]. *Curr Biol*, **12**(9): 735-739.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. *Cell*, **75**(5): 843-854.
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs[J]. *Nature*, **433**(7027): 769-773.
- Mercer DK, Nicol PF, Kimbembe C, Robins SP. 2003. Identification, expression, and tissue distribution of the three rat lysyl hydroxylase isoforms[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **307**(4): 803-809.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, **403**(6772): 901-906.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex[J]. *Cell*, **115**(2): 199-208.
- Shrivastava A, Radziejewski C, Campbell E, Kovac L, McGlynn M, Ryan TE, Davis S, Goldfarb MP, Glass DJ, Lemke G, Yancopoulos GD. 1997. An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors[J]. *Mol Cell*, **1**(1): 25-34.
- Valtavaara M, Szpirer C, Szpirer J, Myllylä R. 1998. Primary structure, tissue distribution, and chromosomal localization of a novel isoform of lysyl hydroxylase (lysyl hydroxylase 3) [J]. *J Biol Chem*, **273**(21): 12881-12886.
- Visel A, Thaller C, Eichele G. 2004. GenePaint.org: an atlas of gene expression patterns in the mouse embryo[J]. *Nucleic Acids Res*, **32**(Database issue): D552-556.
- Vogel W, Gish GD, Alves F, Pawson T. 1997. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen[J]. *Mol Cell*, **1**(1): 13-23.
- Wang YQ, Qian YP, Yang S, Shi H, Liao CH, Zheng HK, Wang J, Lin AA, Cavalli-Sforza LL, Underhill PA, Chakraborty R, Jin L, Su B. 2005. Accelerated evolution of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide precursor gene during human origin[J]. *Genetics*, **170**(2): 801-806.
- Wang YQ, Su B. 2004. Molecular evolution of microcephalin, a gene determining human brain size[J]. *Hum Mol Genet*, **13**(11): 1131-1137.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G. 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*[J]. *Cell*, **75**(5): 855-862.
- Xu P, Vernoooy SY, Guo M, Hay BA. 2003. The *Drosophila* microRNA *Mir-14* suppresses cell death and is required for normal fat metabolism[J]. *Curr Biol*, **13**(9): 790-795.
- Yekta S, Shih IH, Bartel DP. 2004. MicroRNA-directed cleavage of *HOXB8* mRNA[J]. *Science*, **304**(5670): 594-596.
- Zhang J. 2003. Evolution of the human *ASPM* gene, a major determinant of brain size[J]. *Genetics*, **165**(4): 2063-2070.