

单细胞真核生物的 miRNA 系统及其进化意义

张燕琼^{1,2}, 文建凡^{1,*}

(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, 云南 昆明 650223; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: miRNA 系统在高等多细胞真核生物中得到了广泛深入的研究。近年来, 人们在单细胞真核生物上的 miRNA 研究也取得了重要进展。这不仅丰富了人们对 miRNA 在整个生物界中的认识, 更重要的是对于揭示 miRNA 这一表达调节系统是如何在生物界中起源进化的问题具有重要意义。该文结合作者在最低等单细胞真核生物——贾第虫上的研究结果, 对该领域的研究进展作一概述, 并对有关 miRNA 这一系统的起源进化问题进行了探讨。

关键词: 单细胞真核生物; miRNA; 贾第虫; 进化
中图分类号: Q349; Q959.113.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2010)01-0039-04

miRNA System in Unicellular Eukaryotes and Its Evolutionary Implications

ZHANG Yan-Qiong^{1,2}, WEN Jian-Fan^{1,*}

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

Abstract: microRNAs (miRNAs) in higher multicellular eukaryotes have been extensively studied in recent years. Great progresses have also been achieved for miRNAs in unicellular eukaryotes. All these studies not only enrich our knowledge about the complex expression regulation system in diverse organisms, but also have evolutionary significance for understanding the origin of this system. In this review, Authors summarize the recent advance in the studies of miRNA in unicellular eukaryotes, including that on the most primitive unicellular eukaryote—*Giardia*. The origin and evolution of miRNA system is also discussed.

Key words: Unicellular eukaryotes; miRNA; *Giardia*; Evolution

MicroRNA (miRNA) 是一类广泛存在于真核生物中的、长约 21~25 nt 的非编码小分子 RNA。它通过与靶基因的 mRNA 序列互补性结合来介导 mRNA 的降解或抑制 mRNA 的翻译, 从而调节基因的表达。典型的 miRNA 基因在细胞核内转录出长约 2 kb 的初级 miRNA (primary microRNA, pri-miRNA), 随后被细胞核内的 III 型 RNA 酶——Drosha 加工成较短的、长约 70 nt 的、具有茎环结构的前体 miRNA (pre-miRNA)(Lee et al, 2003; He & Hannon, 2004)。Pre-miRNA 被核转运体 Exportin 5 转运出核后(Yi et al, 2003; Bohnsack et al, 2004; Lund et al, 2004)被另一种 III 型 RNA 酶——Dicer 进

一步切割加工为成熟的 miRNA 分子。成熟的 miRNA 与 RNP (ribonucleoprotein complex) 整合为 miRNA 介导的沉默复合体 (miRNP)(Mourelatos et al, 2002; Tang, 2005)。Argonaute (AGO) 蛋白就是该复合体中的重要成分之一。之后该复合体通过 miRNA 与靶 mRNA 之间的碱基互补, 从而介导靶基因沉默。自 Lee et al (1993)首次在线虫中发现第一个 miRNA 分子 lin4 之后, 人们又用实验的方法在许多高等多细胞动物, 如人、果蝇、线虫和植物中鉴定出数量上百的 miRNA (Kim et al, 2004; Sunkar et al, 2005)。miRNA 在细胞增殖分化、个体生长发育、疾病发生过程等方面具有重要作用。近

收稿日期: 2009-05-27; 接受日期: 2009-09-23

基金项目: 科技部“973”项目(2007CB815705); 国家基金委创新群体项目(30021004)

*通讯作者(Corresponding author), E-mail: wenjf@mail.kiz.ac.cn

年来运用计算机预测的方法也从已知的基因组中鉴定出大量新的 miRNA (Lindow & Krogh, 2005; Xie et al, 2007; Zhou et al, 2008)。随着研究的深入,除了 miRNA 的产生机制及其调节基因表达功能外,对于 miRNA 进化的研究也引起研究者的极大兴趣,人们想知道对于这样一种重要的基因表达调控机制在生物界是怎样起源和进化的。

为了探讨 miRNA 系统的起源进化问题,人们开始在不同进化地位的生物中调查该系统的存在情况。很长时间以来,人们只在高等多细胞真核生物中能找到 miRNA,而在低等的单细胞真核生物,如酵母中却没有发现 miRNA。因此,miRNA 曾一度被认为是发展到多细胞真核生物才具有的、为增加生物复杂度而产生的一种基因表达调控系统 (Carthew, 2006; Kloosterman & Plasterk, 2006; Ambros & Chen, 2007; Niwa & Slack, 2007)。然而,近年来在低等的单细胞真核生物(如衣藻、贾第虫)也相继发现了 miRNA 调节系统的存在。下面就这些研究工作作一综述,并结合这些研究结果对有关 miRNA 这一系统的起源进化问题进行探讨。

1 单细胞绿藻——衣藻中 miRNA 系统的研究

衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)是一种单细胞绿藻。之前的研究发现在衣藻中具有发挥功能的 RNA 干扰现象(Schroda, 2006)。通过生物信息学分析衣藻基因组发现其具有与 RNAi 功能相关的 3 个 Dicer-like 蛋白和至少两个 Argonautes 蛋白(Schroda, 2006; Zhao et al, 2007)。然而,在衣藻中是否也存在内源性的小 RNA 并发挥调节基因表达的功能呢?

新近的研究报道,通过大规模测序分析,两个独立的研究小组先后在衣藻中鉴别出大量 miRNA (Molnar et al, 2007; Zhao et al, 2007)。他们也发现,与植物 miRNA 类似,衣藻的 miRNA 也可以介导靶基因的 mRNA 被切断降解。进一步的实验结果发现衣藻的某些 miRNA 在配子细胞中的表达呈现升高或是降低,表明这些 miRNA 可能与配子形成相关。衣藻中 miRNA 的发现,说明并不像以前人们认为的那样,miRNA 只存在于多细胞生物中,而是在单细胞真核生物中就已存在,并很可能发挥一定的生物学功能。

2 最原始单细胞真核生物——贾第虫中 miRNA 系统的研究

贾第虫(*Giardia lamblia*)除了是一种世界范围内广泛流行的人类肠道寄生虫而受到研究者的关注外,其倍受研究者关注的另一个重要原因是由于它特殊的进化地位。尽管贾第虫进化地位仍具争议,但很多研究结果表明其是一类处于真核生物基部的原始真核生物 (Leipe et al, 1993; Hashimoto et al, 1995; Hilario & Gogarten, 1998)。因此,该生物对于进化生物学的研究有着非常重要的价值。

有研究利用生物信息学方法对贾第虫基因组进行分析,结果没有发现 Droscha 或者 Exportin5 的同源蛋白,但发现存在有 siRNA 及 miRNA 通路中起重要作用的 Dicer 酶 (Macrae et al, 2006a; Macrae et al, 2006b) 和 Argonaute 蛋白类似物 (*Giardia* Argonaute-like protein, GIAGO)。从一级序列结构域分析来看,贾第虫的 Dicer 酶类似物在结构上比其他高等真核生物的 Dicer 酶要简单(图 1)。Macrae et al (2006b) 用 X-ray 晶体衍射的方法对贾第虫的 Dicer 酶类似物进行了三维结构分析。同时他们对贾第虫 Dicer 酶类似物也进行了功能验证:体外实验表明,它具有切割 DNA 双链的功能;体内实验中,他们将贾第虫 Dicer 酶类似物导入裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 的 Dicer 酶缺失突变株中,发现前者能够发挥 RNAi 作用 (Macrae et al, 2006b)。这些研究结果说明,虽然贾第虫的 Dicer 酶类似物较高等真核生物典型的 Dicer 酶结构组成要简单,但仍具有发挥功能的保守结构域,是一种具有 Dicer 酶功能的蛋白。贾第虫的 Argonaute 蛋白 (GIAGO) 的功能在很大程度上还是未知的,但也有实验证据表明下调该基因引起贾第虫生长缓慢;纯化的重组 GIAGO 可特异地与 m⁷G-cap-Sepharose 结合 (Saraiya & Wang, 2008)。最近的研究表明,贾第虫中一类与逃避宿主免疫应答相关的存在于细胞表面的蛋白 VSP (variant-specific surface protein) 的表达调控涉及了包括 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RdRP)、Dicer 酶和 Argonaute 蛋白这些 RNA 干扰机制中已知的成员 (Prucca et al, 2008)。上面这些种种迹象提示贾第虫很有可能存在 miRNA 调控系统。那么在这种最低等的单细胞真核生物之中到底是否存在有 miRNA 并起到调节基因表达的功能呢?我们采用生物信息学从头预测 (*de novo*) 的方法在贾

第虫中寻找是否存在潜在的miRNA及其作用的靶基因 (Zhang et al, 2009)。结果共寻找到了 58 个 miRNA 基因, 它们可编码 50 种 miRNA, 经 EST 库搜索以及 RT-PCR 实验验证了其中的一些具有转录活性; 这 50 种 miRNA 中的 37 个在基因组中均找到了它们作用的靶基因, 特别有意思的是发现其中不少 (至少 7 个) 调控的靶基因是 VSP 蛋白, VSP 是贾第虫细胞表面的可变蛋白, 对于逃逸宿主的免疫

系统而成功适应寄生生活非常重要 (Zhang et al, 2009)。我们的这些研究结果表明, 在单细胞绿藻中发现 miRNA 并不是个特例, 在别的单细胞真核生物, 甚至像在贾第虫这样的非常原始的单细胞真核生物中, miRNA 调控系统同样存在。

近来 Saraiya & Wang (2008) 还在贾第虫上发现了一类以 snoRNA 为前体的 miRNA。他们通过提取、分离、克隆和测序得到一系列贾第虫滋养体细

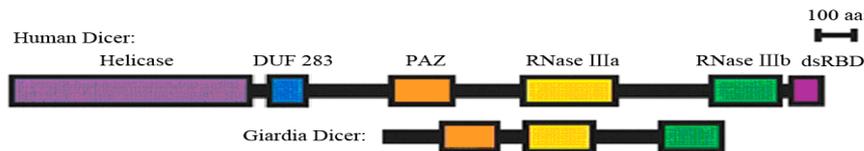


图 1 人(Human)和贾第虫(*Giardia*) Dicer 酶一级结构比较示意图 (引自 Macrae et al, 2006b)

Fig. 1 Schematic representation of the primary sequence of human and *Giardia* Dicers (Cited from Macrae et al, 2006b)

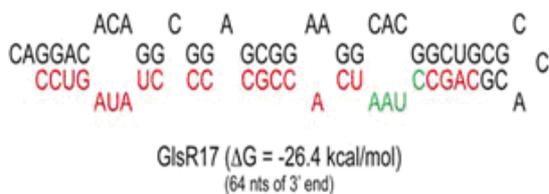


图 2 snoRNAs GlsR17 的 MFOLD 分析 (引自 Saraiya & Wang, 2008)

Fig. 2 MFOLD analysis of snoRNAs GlsR17 (Cited from Saraiya & Wang, 2008)

红色字体表示 miR2 在 GlsR17 中的位置; D 框 (Box D) 结构用绿色表示
The red letters represent miR2 in GlsR17. The Box C (blue) and Box D (green) motifs are indicated.

胞的小 RNA (small RNA), 从中鉴定出了一些已知的 snoRNA 序列, 如 miR2 被鉴定是由 GlsR17 经过 Dicer 酶解而来的, 而 GlsR17 是一个先前已经被鉴定的含有 C/D 框 (C/D box) 结构的 snoRNA。除此之外, 他们还发现了其他 3 个小 RNA 也是 snoRNA 的产物。这些提示在贾第虫中 snoRNA 可能是一类新的 miRNA 前体。预测结果显示 miR2 可能的调控靶基因位点作用于很多 VSP 蛋白的 3'UTR 区。这与我们上述研究结果类似, 均表明贾第虫 VSP 蛋白很可能受到 miRNA 系统的调控。进一步对 miR2 的功能分析实验表明: miR2 确实很明显地抑制了报告基因的表达而不影响其 mRNA 水平, 且这种抑制作用依赖于 Argonaute 蛋白, 而降低 Dicer 酶的表达, miR2 的产生则受到影响。这些正与其他高等真核生物 miRNA 系统中的这两个蛋白的功能是吻合的。

3 其他单细胞真核生物中 miRNA 系统研究

除了衣藻和贾第虫外, 在其他单细胞真核生物中, 利用生物信息学预测的方法也发现了一些 miRNA。Mallick et al (2008) 利用同源搜索的办法在布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*) 基因组中鉴定 miRNA 及其靶基因, 结果发现 *T. brucei* 中有一系列 miRNA 预测的靶基因 mRNA 是 variant surface glycoprotein (VSG), 即一类与逃避宿主免疫系统相关的糖蛋白。他们还发现 *T. brucei* 中很多 miRNA 前体发夹结构以多个相同拷贝数串联成簇排列, 其相应的靶基因正是与锥虫致病相关的十分重要的基因。类似的工作还有 De et al (2006) 用计算机预测的方法在溶组织内阿米巴 (*Entamoeba histolytica*) 中鉴定出 17 个可能的 miRNA。虽然这些工作只是用生物信息学的方法对基因组进行预测, 得到的仅仅是一些可能的 miRNA 候选分子, 它们是否真正存在以及确实发挥调控基因表达的功能仍需要进一步实验的验证, 但是这些工作至少提示在 *T. brucei* 和 *E. histolytica* 这些单细胞真核生物中确有可能存在 miRNA 这一调控系统的。

4 miRNA 系统的起源进化问题探讨

较长一段时间以来, 人们普遍认为 miRNA 系统只存在多细胞真核生物当中, 并认为是在多细胞真核生物产生之后才获得的一种调控基因表达的系统。单细胞真核生物中 miRNA 的发现无疑打破了这一观念, 从而拓展和丰富了人们对 miRNA 在

整个生物界中的认识。更重要的是,单细胞真核生物上 miRNA 系统的发现对探讨该系统是如何起源形成和进化发展的具有重要意义。因为现已知原核生物还没有发现存在该系统,该系统只存在于真核生物中。这意味着该系统应该是随着真核生物的起源进化而产生的。而单细胞真核生物正是处在原核生物进化成真核生物的早期阶段,并随后向上进化出多细胞生物。因此,研究该系统在这些单细胞真核生物上的情形是弄清该系统的起源进化问题的重要途径。首先是单细胞绿藻——衣藻中 miRNA 的发现(Zhao et al, 2007),将 miRNA 的起源提前到单细胞真核生物。而我们(Zhang et al, 2009)和 Saraiya & Wang (2008)在目前认为最原始的真核生物——贾第虫上的工作不仅表明了 miRNA 系统在

单细胞真核生物中的普遍存在,且将 miRNA 的起源向前追溯到真核生物进化的最早期阶段,表明了 miRNA 调节系统应该是在真核生物形成之初就已经产生了,它的产生可能也是真核生物之所以从原核生物中进化出来且与后者有着本质区别的重要因素之一。此外,我们还可以发现不同的单细胞真核生物之间,以及它们与多细胞生物之间,以至亲缘关系较远的多细胞生物(如动、植物)之间的 miRNA 相互之间序列相似性很低,不属于同源物。这提示 miRNA 很可能在真核生物进化过程中在不同生物种类分化后分别有着独立的进化机制(Zhang et al, 2009)。但是,要弄清该重要的调节系统的起源进化需在更多不同进化地位的生物种类上进行更广泛深入的研究。

参考文献:

- Ambros V, Chen X. 2007. The regulation of genes and genomes by small RNAs[J]. *Development*, **134**(9): 1635-1641.
- Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. 2004. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs[J]. *RNA*, **10**(2): 185-191.
- Carthew RW. 2006. Gene regulation by microRNAs[J]. *Curr Opin Genet Dev*, **16**(2): 203-208.
- De S, Pal D, Ghosh SK. 2006. *Entamoeba histolytica*: computational identification of putative microRNA candidates[J]. *Exp Parasitol*, **113**(4): 239-243.
- Hashimoto T, Nakamura Y, Kamaishi T, Nakamura F, Adachi J, Okamoto K, Hasegawa M. 1995. Phylogenetic place of mitochondrion-lacking protozoan, *Giardia lamblia*, inferred from amino acid sequences of elongation factor 2[J]. *Mol Biol Evol*, **12**(5): 782-793.
- He L, Hannon GJ. 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation[J]. *Nat Rev Genet*, **5**(7): 522-531.
- Hilario E, Gogarten JP. 1998. The prokaryote-to-eukaryote transition reflected in the evolution of the V/F/A-ATPase catalytic and proteolipid subunits[J]. *J Mol Evol*, **46**(6): 703-715.
- Kim J, Krichevsky A, Grad Y, Hayes GD, Kosik KS, Church GM, Ruvkun G. 2004. Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**(1): 360-365.
- Kloosterman WP, Plasterk RH. 2006. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease[J]. *Dev Cell*, **11**(4): 441-450.
- 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.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing[J]. *Nature*, **425**(6956): 415-419.
- Leipe DD, Gunderson JH, Nerad TA, Sogin ML. 1993. Small subunit ribosomal RNA⁺ of *Hexamita inflata* and the quest for the first branch in the eukaryotic tree[J]. *Mol Biochem Parasitol*, **59**(1): 41-48.
- Lindow M, Krogh A. 2005. Computational evidence for hundreds of non-conserved plant microRNAs[J]. *BMC Genomics*, **6**: 119.
- Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. 2004. Nuclear export of microRNA precursors[J]. *Science*, **303**(5654): 95-98.
- Macrae IJ, Li F, Zhou K, Cande WZ, Doudna JA. 2006a. Structure of dicer and mechanistic implications for RNAi[J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **71**: 73-80.
- Macrae IJ, Zhou K, Li F, Repic A, Brooks AN, Cande WZ, Adams PD, Doudna JA. 2006b. Structural basis for double-stranded RNA processing by dicer[J]. *Science*, **311**(5758): 195-198.
- Mallick B, Ghosh Z, Chakrabarti J. 2008. MicroRNA switches in *Trypanosoma brucei*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **372**(3): 459-463.
- Molnar A, Schwach F, Studholme DJ, Thuenemann EC, Baulcombe DC. 2007. miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Nature*, **447**(7148): 1126-1129.
- Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. 2002. miRNPs: A novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs[J]. *Genes Dev*, **16**(6): 720-728.
- Niwa R, Slack FJ. 2007. The evolution of animal microRNA function[J]. *Curr Opin Genet Dev*, **17**(2): 145-150.
- Prucca CG, Slavin I, Quiroga R, Elias EV, Rivero FD, Saura A, Carranza PG, Lujan HD. 2008. Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference[J]. *Nature*, **456**(7223): 750-754.
- Saraiya AA, Wang CC. 2008. snoRNA, a novel precursor of microRNA in *Giardia lamblia*[J]. *PLoS Pathog*, **4**(11): e1000224.
- Schroda M. 2006. RNA silencing in *Chlamydomonas*: mechanisms and tools[J]. *Curr Genet*, **49**(2): 69-84.
- Sunkar R, Girke T, Jain PK, Zhu JK. 2005. Cloning and characterization of microRNAs from rice[J]. *Plant Cell*, **17**(5): 1397-1411.
- Tang G. 2005. siRNA and miRNA: An insight into RISCs[J]. *Trends Biochem Sci*, **30**(2): 106-114.
- Xie FL, Huang SQ, Guo K, Xiang AL, Zhu YY, Nie L, Yang ZM. 2007. Computational identification of novel microRNAs and targets in *Brassica napus*[J]. *FEBS Lett*, **581**(7): 1464-1474.
- Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs[J]. *Genes Dev*, **17**(24): 3011-3016.
- Zhao T, Li G, Mi S, Li S, Hannon GJ, Wang XJ, Qi Y. 2007. A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Genes Dev*, **21**(10): 1190-1203.
- Zhou D, Li S, Wen J, Gong X, Xu L, Luo Y. 2008. Genome-wide computational analyses of microRNAs and their targets from *Canis familiaris*[J]. *Comput Biol Chem*, **32**(1): 60-65.
- Zhang YQ, Chen DL, Tian HF, Zhang BH, Wen JF. 2009. Genome-wide computational identification of microRNAs and their targets in the deep-branching eukaryote *Giardia lamblia*. [J]. *Comput Biol Chem*, **33**: 319-396.