

DOI: 10.13376/j.cblls/2014036

文章编号: 1004-0374(2014)03-0234-05



秦燕 研究员

秦燕领导的研究组致力于蛋白质生物合成过程的调控。实验室组建于2006年,初期的研究集中于核糖体的结构和功能,基于前期的重要发现,即核糖体的“逆向运动”,开展了逆向转运酶EF4的新酶学功能研究及其在核糖体上的调控。现在,实验室的工作集中在非编码RNA的功能以及线粒体的蛋白质翻译调控,发现线粒体的翻译与衰老和疾病都有重要关系,特别是与肿瘤发生有直接关系。

核糖体展示技术在非编码核酸研究中的应用

秦燕*, 张玲云, 张德玖

(中国科学院生物物理研究所, 北京100101)

摘要: 非编码RNA (non-coding RNA) 是一类内源性的不具有蛋白质编码功能的RNA分子, 在细胞的生长增殖、发育、核内运输, 甚至在肿瘤的发生中发挥着重要的作用。核糖体展示技术 (ribosome profiling) 是多聚核糖体分离和深度测序技术 (deep sequencing) 相结合的新兴组学技术, 可以精确地测定正在被翻译的转录本并具有组学广度。对非编码RNA研究而言, 这既是一个新的高度又是一门新的技术。系统阐述了核糖体展示技术的实验原理、目前研究取得的进展, 以及在非编码RNA调控机理中的应用。

关键词: 核糖体展示; 非编码RNA; 翻译调控

中图分类号: Q522; Q5-3 **文献标志码:** A

Ribosome profiling and its application in non-coding RNA study

QIN Yan*, ZHANG Ling-Yun, ZHANG De-Jiu

(Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Non-coding RNA (ncRNA) is a class of endogenous RNA molecules playing important roles in diverse biological process, such as cell proliferation, development, nuclear transport, and tumorigenesis. Ribosome profiling is a novel technology combing polyribosome isolation and deep sequencing to determine the cellular transcripts being translated. In this review, we summarized the current state of art of ribosome profiling and discussed the potential application of ribosome profiling in ncRNA research.

Key words: ribosome profiling; non-coding RNA; translation regulation

1 核糖体展示技术的简介

核糖体展示技术 (ribosome profiling) 是2009年由Jonathan Weissman等建立起来的一项新的生物技术, 通过与深度测序 (deep sequencing) 相结合, 研究人员可以从基因组水平监测核糖体的位置和翻译的不同时期, 从而反映蛋白质的翻译状况。重要

的是, 这项技术可以达到单个密码子的分辨率水平^[1]。2010年, David Bartel小组为了鉴定mRNA降解和

收稿日期: 2013-12-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(31322015; 3117-0756, 31270847)

*通信作者: E-mail: qiny@ibp.ac.cn

翻译抑制在介导 miRNA 对靶基因调控过程中的重要性, 创造性地将核糖体展示技术运用于此问题的研究^[2]。他们先用环己酰亚胺处理细胞使核糖体较易结合在对应的 mRNA 上, 接下来对细胞进行核酸酶处理, 没有被核糖体保护的 mRNA 片段将被水解, 而被保护的部分将留下。再用一定方法将这些片段从核糖体内释放, 进行深度测序, 就能获取有关翻译的信息, 从而更准确地预测蛋白质的丰度。将所得结果与同样条件下获取的 mRNA 图谱进行对照, 即可知道蛋白质含量与 mRNA 量的关系。相比较蛋白质组学, 核糖体展示技术具有与 mRNA 图谱分析相媲美的时效性。Bartel 实验室发现 miRNA 主要通过使目标 mRNA 降解来发挥作用 (84% 以上的蛋白质水平下降由这一作用造成), 而不是通过抑制它们的翻译^[2]。这个突破性的研究结果预示着很多以前关于 miRNA 作用机制的结论将面临重新评估。现在, 国际上以该技术研究蛋白质发生、信号通路对细胞整体影响、细胞发育等方面的工作在逐渐被报道出来。

核糖体展示技术的原理如下所述:

- 1) 多聚核糖体的分离技术: 提取不同细胞、组织的多聚核糖体 (图 1, 框 1)^[3];
- 2) 多聚核糖体覆盖的 mRNA 的文库建立: 使用核酸酶消化 mRNA 时, 正在翻译的核糖体结合并保护大约 30 nt 的 mRNA 片段 (图 1, 框 2); 将这些片段构建成 DNA 文库 (图 1, 框 3-7);
- 3) 高通量测序: 利用 illumina GA 测序技术平台测序获取这个 DNA 文库的序列 (图 1, 框 8);
- 4) 数据整合和分析: 将文库中的序列作图 (mapping) 到细胞等的基因组上, 比较不同基因的翻译情况和同一基因不同位点的翻译情况。上述流程的具体技术路线见图 1。

2 核糖体展示技术的进展

核糖体展示技术的高分辨率可以达到对单个 RNA 分子上的核糖体密度进行详细分析。因此, 这项技术广泛应用于真核和原核生物的研究中, 用来研究翻译过程的特定方面。

Lacsina 等^[4]对疟疾寄生虫 (恶性疟原虫) 感

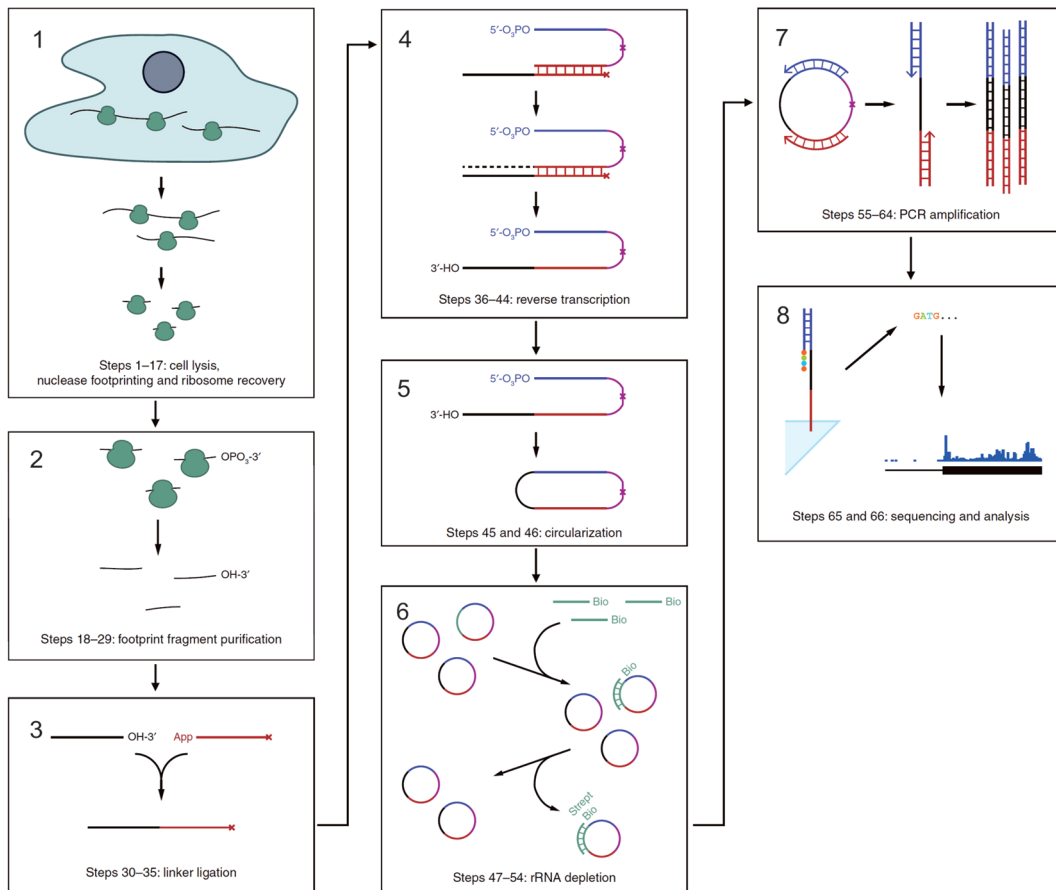


图1 核糖体展示技术的基本策略和方法

染的宿主细胞进行裂解,使得疟原虫中完整的多聚核糖体释放出来,然后利用核糖体展示技术分析反映疟原虫中基因的翻译活性。在收集核糖体时,对不同蔗糖密度的RNA进行提取,用来分析特定mRNA上装载的核糖体量以及密度。这项技术开启了疟疾中基因组范围的翻译调控的研究。在真核细胞中,蛋白质的空间调控是由mRNA的定位以及翻译的位置调控共同行使的。内质网中mRNA的调控就是一个典型的例子,在分泌性和完整的膜蛋白分离中发挥着普遍性的作用。Reid和Nicchitta^[5]利用细胞分级分离和核糖体展示技术结合的方法对mRNA翻译的亚细胞结构进行分析,发现mRNA上装载的核糖体与内质网有违背。明显的是,内质网相关的mRNA(编码胞质和信号相关的蛋白质)表现出相似的核糖体装载密度,这预示着内质网相关的核糖体在mRNA翻译中发挥着普遍的作用。在胞质和内质网中,mRNA及其翻译的分割可能为基因的翻译后调控提供新颖的调控机制。此外,核糖体展示技术在减数分裂细胞的翻译调控中发挥着重要的作用。在酵母中,减数分裂的细胞翻译在非典型的翻译位点,包括在非注释转录本上的短的开放阅读框(ORF)以及已知转录本的上游区域(uORF)。核糖体在uORF上的占位与更多有效的ORF翻译相关;反之,一些起始密码子的uORF可发生竞争性作用。该研究展现了减数分裂细胞的翻译调控,有助于阐明减数分裂细胞重构的分子基础^[6]。

在小鼠胚胎干细胞中,Ingolia等^[7]利用三尖杉酯碱(可以引起核糖体在起始密码子位置的聚集)并结合机器学习算法(machine learning algorithm)来定义翻译起始的位置。通过此技术,发现一些新的或者发生改变的ORF,包括一些在基因间的长非编码RNA(large intergenic non-coding RNA, lincRNA)上的高度翻译的短ORF。这些非典型的编码蛋白质的转录本被认为是短的多顺反子特征的核糖体相关RNA(short, polycistronic ribosome-associated RNAs, sprcRNAs)。此外,应用核糖体展示技术发现了上千的翻译终止区域,这些区域可以作为翻译调控的关键位点。这项技术也可以用于其他细胞和生物,检测蛋白质的产生速率以及探索翻译调控的分子机制。此外,利用核糖体展示技术可以对延伸核糖体进行分析,用来检测不同基因在翻译水平的表达情况以及对蛋白质编码基因和核糖体终止的鉴定^[8]。另外,核糖体展示技术还可以提供数据用来发展翻译的定量模型。虽然只有少量的核糖体展示数据被

发表,但是这项技术改变了我们对翻译调节的认识,从而将我们带向新的研究领域,即蛋白质编码基因的起源。除了翻译水平的调控,目前对于翻译后水平基因的调控机制研究甚少。2014年,McManus等^[9]报道,利用核糖体展示技术对比较相近的两种酵母细胞进行转录水平和翻译效率的对比。结果发现转录本以及密码子的偏差促进同一mRNA在非常相近物种间翻译的差异,但翻译调控的差异可以缓冲物种间在mRNA水平的差异,如核糖体占位相对于转录本来说是比较保守的。他们利用等位基因特异性的核糖体展示技术,在物种间对顺式与反式调控因子的差异在mRNA水平和翻译效率的差异中的作用进行比较。研究结果表明,物种间翻译效率的差异促进了基因表达的演变。核糖体展示技术除了可以检测翻译调控外,还可以用来研究一些分子伴侣和调控因子与新生的肽链和核糖体之间的相互作用^[3]。

2012年,科学家们利用核糖体展示技术揭示了隐藏在遗传密码中过去未发现的信息层,即密码子包含蛋白质合成速度信息。Li等^[10]采用核糖体展示技术对活细胞内的基因活性进行测定,包括基因所编码的蛋白质翻译的速度。通过在细菌中检测蛋白质合成速率,他们发现轻微的遗传改变都可能产生巨大的影响。过去科学家们认为“沉默突变”(silent mutations)只是发生了单个DNA碱基的置换而并不会改变最终的基因产物。然而,在新研究中研究人员吃惊地发现,这些看似微不足道的遗传变化却能将蛋白质合成的速率减慢到正常速度的1/10,甚至更慢。这一发现有可能将帮助加速蛋白质的工业生产,对于制造生物燃料和生物医药用于治疗糖尿病、癌症等大量常见疾病具有至关重要的意义。

核糖体展示技术除了在细胞水平的应用外,在细胞内结构以及整个生物体的应用现在已经有研究。目前,Rooijers等^[11]首次利用核糖体展示技术对野生型和疾病相关的线粒体进行分析,从而发现是由于哪些核苷酸的改变引起了氨基酸的突变。Dunn等^[12]在果蝇体内利用核糖体可以终止密码子这一特点,通过核糖体展示技术发现连读(read-through)这一现象广泛存在于人类和酵母中,并且提供了基因表达以及功能研究的普遍机制。

3 核糖体展示技术在非编码核酸研究中的应用

在基因组的转录产物中,仅有2%的基因编码蛋白质,而基因组转录的大部分产物是非编码

RNA^[13-14]。非编码 RNA 主要包括两大类 RNA, 即微小 RNA (microRNA 或者 miRNA) 和长非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)。miRNA 是一类内源性的, ~22 个核苷酸的单链非编码小 RNA 分子, 主要通过和靶基因 mRNA 3' UTR 上的结合位点互补结合, 从而在转录后水平调控基因的表达^[15-16]。对于 miRNA 是采取哪种机制对靶基因行使功能, mRNA 的降解与翻译抑制的哪种功能先行使这些方面研究甚少。除了 2010 年, Bartel 实验室^[2]利用核糖体展示技术鉴定 mRNA 降解和翻译抑制在介导 miRNA 对靶基因调控过程中的重要性外, Bazzini 等^[17]在斑马鱼中利用核糖体展示技术监测 miR-430 对靶 mRNA 上核糖体占位的影响, 发现 miR-430 降低靶 mRNA 上核糖体的数量, 翻译的抑制发生在脱腺苷化之前。在整个 mRNA 上核糖体是连续的, 这表明翻译的抑制是由于降低翻译起始的速率而不是影响延伸或者是核糖体的脱落。这些结果显示, miR-430 在斑马鱼中对靶 mRNA 是先影响翻译起始, 然后再导致 mRNA 降解的。

lncRNA 是一类长达 200 个核苷酸以上的转录本^[18], 与编码蛋白质的 mRNA 类似, lncRNA 可以与核糖体结合, 但是并不编码多肽或者蛋白质^[13-14,19]。Ingolia 等^[7]研究发现, 在 lincRNA 上的核糖体占位与编码蛋白质的 mRNA 上的核糖体类似, 这使得人们推测 lincRNA 可能具有蛋白质编码的功能。为了验证这一猜测, Guttman 等^[20]利用核糖体展示技术比较不同区域 RNA 上核糖体占位情况, 用核糖体释放分数表示 (RRS)。他们发现 lincRNA 的 RRS 与典型的 ncRNA 以及编码蛋白 mRNA 的 5'UTR 的 RRS 类似, 而后者都是不编码蛋白质的。具有蛋白质编码功能的 mRNA 上的核糖体遇到终止密码子时, 核糖体的大小亚基分离并重新进入蛋白质合成过程中, 而 lincRNA 上结合的核糖体不会分离 (图 2)。这些结果均说明 lincRNA 是不编码蛋白质的^[20]。类似的结果在 Chew 等^[21]的研究中也得到证实。

4 小结

随着核糖体展示技术的不断发展, 这一技术的应用范围越来越广泛, 但是在亚细胞器, 如线粒体中的研究还比较少, 尤其是非编码 RNA 在线粒体功能调控方面, 我们致力于这方面的研究。在核糖体蛋白质翻译方面, 我们具有成熟的实验体系, 尤其是在翻译因子对核糖体翻译蛋白质的影响方

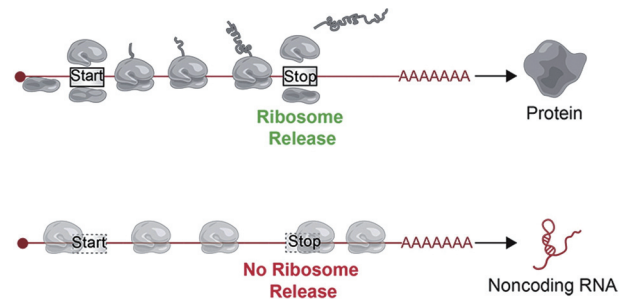


图2 mRNA的翻译过程

面^[22-24]。在此基础上, 我们又掌握了 RNA 高通量测序技术和核糖体图谱技术, 利用深度测序技术我们研究 GUF1 (GTPase of unknown function 1) 上下游受调控的非编码 RNA, 并对筛选出的非编码 RNA 进行功能研究。目前我们已经对 GUF1 蛋白在高等真核细胞中和小鼠中的功能以及机制进行了系统的研究, 并开始寻找与 GUF1 相关的非编码 RNA。利用已经建立好的核糖体展示技术平台, 在原核生物中研究 LepA 对蛋白质翻译的影响; 在真核生物中研究与 GUF1 相关的非编码 RNA 对细胞质和线粒体翻译的影响。后续的实验可以进一步研究非编码 RNA 对细胞中 mRNA 二级结构的影响^[25]。通过这些方法可以系统地研究非编码 RNA 对线粒体功能的影响, 阐明非编码 RNA 对线粒体的作用机制, 以及 GUF1 在线粒体中的作用。

[参 考 文 献]

- [1] Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JR, et al. Genome-wide analysis *in vivo* of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science*, 2009, 324(5924): 218-23
- [2] Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 2010, 466(7308): 835-40
- [3] Becker AH, Oh E, Weissman JS, et al. Selective ribosome profiling as a tool for studying the interaction of chaperones and targeting factors with nascent polypeptide chains and ribosomes. *Nat Protoc*, 2013, 8(11): 2212-39
- [4] Lacsina JR, LaMonte G, Nicchitta CV, et al. Polysome profiling of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 2011, 179(1): 42-6
- [5] Reid DW, Nicchitta CV. Primary role for endoplasmic reticulum-bound ribosomes in cellular translation identified by ribosome profiling. *J Biol Chem*, 2012, 287(8): 5518-27
- [6] Brar GA, Yassour M, Friedman N, et al. High-resolution view of the yeast meiotic program revealed by ribosome profiling. *Science*, 2012, 335(6068): 552-7
- [7] Ingolia NT, Lareau LF, Weissman JS. Ribosome profiling

- of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell*, 2011, 147(4): 789-802
- [8] Michel AM, Baranov PV. Ribosome profiling: a Hi-Def monitor for protein synthesis at the genome-wide scale. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2013, 4(5): 473-90
- [9] McManus J, May GE, Spealman P, et al. Ribosome profiling reveals post-transcriptional buffering of divergent gene expression in yeast. *Genome Res*, 2014, 24(3): 422-30
- [10] Li GW, Oh E, Weissman JS. The anti-Shine-Dalgarno sequence drives translational pausing and codon choice in bacteria. *Nature*, 2012, 484(7395): 538-41
- [11] Rooijers K, Loayza-Puch F, Nijtmans LG, et al. Ribosome profiling reveals features of normal and disease-associated mitochondrial translation. *Nat Commun*, 2013, 4: 2886
- [12] Dunn JG, Foo CK, Belletier NG, et al. Ribosome profiling reveals pervasive and regulated stop codon readthrough in *Drosophila melanogaster*. *Elife*, 2013, 2: e01179
- [13] Gumireddy K, Li A, Yan J, et al. Identification of a long non-coding RNA-associated RNP complex regulating metastasis at the translational step. *EMBO J*, 2013, 32(20): 2672-84
- [14] Orom UA, Derrien T, Beringer M, et al. Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells. *Cell*, 2010, 143(1): 46-58
- [15] Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, 2004, 23(20): 4051-60
- [16] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281-97
- [17] Bazzini AA, Lee MT, Giraldez AJ. Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science*, 2012, 336(6078): 233-7
- [18] Spizzo R, Almeida MI, Colombatti A, et al. Long non-coding RNAs and cancer: a new frontier of translational research? *Oncogene*, 2012, 31(43): 4577-87
- [19] Banfai B, Jia H, Khatun J, et al. Long noncoding RNAs are rarely translated in two human cell lines. *Genome Res*, 2012, 22(9): 1646-57
- [20] Guttman M, Russell P, Ingolia NT, et al. Ribosome profiling provides evidence that large noncoding RNAs do not encode proteins. *Cell*, 2013, 154(1): 240-51
- [21] Chew GL, Pauli A, Rinn JL, et al. Ribosome profiling reveals resemblance between long non-coding RNAs and 5' leaders of coding RNAs. *Development*, 2013, 140(13): 2828-34
- [22] Wang L, Yang F, Zhang D, et al. A conserved proline switch on the ribosome facilitates the recruitment and binding of trGTPases. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, 19(4): 403-10
- [23] Qin Y, Polacek N, Vesper O, et al. The highly conserved LepA is a ribosomal elongation factor that back-translocates the ribosome. *Cell*, 2006, 127(4): 721-33
- [24] Zhang D, Liu G, Xue J, et al. Common chaperone activity in the G-domain of trGTPase protects L11-L12 interaction on the ribosome. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(21): 10851-65
- [25] Rouskin S, Zubradt M, Washietl S, et al. Genome-wide probing of RNA structure reveals active unfolding of mRNA structures *in vivo*. *Nature*, 2014, 505(7485): 701-5

秦燕报告讨论

付向东 (加州大学圣地亚哥分校)

Q: 你们用的核糖体来源是线粒体的还是细菌的? 只是把线粒体的延长因子放入细菌中?

A: 我们用的核糖体是细菌来源的。是的。

Q: 现在是否有什么 *implication link RNA* 和线粒体的翻译有关?

A: 我们现在还在做一些初步的实验, 主要还是关注在 *translocation* 上, 对于核酸我们试了几个, 有的有效, 有的不明显, 可能是和细胞质里面一些因子有关系。

Q: 线粒体的翻译目前仍不清楚, 我问了一些权威, 他们说没人知道线粒体怎么翻译的, 尤其是怎么起始的。在原核里面翻译起始是通过 *SD* 序列, 就是 mRNA 上和 *ribosome* 配对的区域, 可以把 *ribosome* 给拉过去。真核里面是有一个 *cap*, 通过 *cap* 把 *ribosome* 定位过去。但是线粒体 RNA 既没有 5'UTR, 又没有 3'UTR, 只有一个单独的 ATG 在最前面, 它怎么起始不清楚, 有人说是从中间开始的, 然后到头上在往前来, 但是这是完全不符合逻辑的。细菌的 RNA 是一个接一个的, 中间有很多 *ribosome* 重新进入的位点从而可以起始, 而线粒体编码基因 mRNA 之间的是 tRNA, 可能 tRNA 是线粒体的起始位点, 但是二三十年来没人研究清楚, 很 *make sence*, 要做的话很有意思。

A: 谢谢付老师。