

DOI: 10.13376/j.cblls/2014056

文章编号: 1004-0374(2014)04-0384-08

RdDM途径中的重要蛋白质

徐 驰^{1#}, 田 静^{2#}, 莫蓓莘^{1*}

(1 深圳大学生命科学学院, 深圳市微生物基因工程重点实验室, 深圳 518060;
2 深圳大学生命科学学院, 深圳市海洋生物技术与生态环境重点实验室, 深圳 518060)

摘 要:异染色质 siRNAs 通过 RNA 指导的 DNA 甲基化 (RdDM) 途径在胞嘧啶甲基化过程中扮演重要角色。RdDM 是沉默转座子和重复序列的重要表观遗传修饰。RdDM 主要包括 4 个过程: 24-nt siRNAs 的产生、支架 RNA(scaffold RNA) 的合成、沉默复合体到沉默位点的募集和 DNA 甲基化。在拟南芥中已经发现了一系列参与这 4 个过程的蛋白质。通过介绍 RdDM 途径中的重要蛋白质, 说明 RdDM 途径及其在植物体内的主要功能, 重点论述了最新报道的作用机制和新 RdDM 组分在该途径中的作用。

关键词: 表观遗传; 24-nt siRNAs; RdDM; DNA 甲基化

中图分类号: Q75 **文献标志码:** A

The important proteins of RNA-directed DNA methylation pathways

XU Chi^{1#}, TIAN Jing^{2#}, MO Bei-Xin^{1*}

(1 College of Life Science, Shenzhen Key Laboratory of Microbial Genetic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China; 2 College of Life Science, Shenzhen Key Laboratory of Marine Biological Resources and Ecological Environment, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract: Heterochromatic siRNAs play a major role in directing cytosine methylation through the process of RNA-directed DNA methylation (RdDM). RdDM is an important epigenetic mechanism for silencing transposons and other repetitive elements, which includes mainly four phases: 24-nt siRNA production, scaffold RNA production, recruitment of the silencing complex to genomic targets, and DNA methylation. Various proteins involved in these four phases have been identified in *Arabidopsis thaliana*. This paper described the RdDM pathway and its functions in plants based on the important proteins of the RdDM pathway, and then mainly discussed the latest reports on the mechanisms of the RdDM pathway and the role of some new RdDM components.

Key words: epigenetic; 24-nt siRNAs; RdDM; DNA methylation

甲基化是指在甲基转移酶的催化作用下, S-腺苷酰-L-甲硫氨酸 (SAM) 上的甲基基团连接到 DNA 分子中的胞嘧啶第五位碳原子上, 形成 5-甲基胞嘧啶的过程。DNA 甲基化广泛存在于生物体中, 从原核生物到高等动植物的基因组 DNA 中都存在不同程度的甲基化修饰。在脊椎动物中, DNA 甲基化发生的主要位点是 CG 序列^[1], 只有胚胎干细胞中存在非 CG 位点的甲基化^[2]。植物基因组中, 胞嘧啶甲基化发生的位点包括所有序列 [CG、CHG 和 CHH(H 代表 A、C 或 T)]^[3]。在高等动植物中, DNA 甲基化修饰主要发生在异染色质区, 起维持

染色质稳定的作用^[4-5]; DNA 甲基化也发生在常染色质基因富集区域, 调控基因的表达^[5-6]。

DNA 甲基化在植物基因组防御和植物生长发育的调控中起重要作用。几乎所有的转基因沉默现象都与转基因及其启动子的甲基化有关。在高等植物中, DNA 甲基化对于转座子沉默 (transposon

收稿日期: 2013-08-18; 修回日期: 2013-10-09
基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30970265)
#并列第一作者
*通信作者: E-mail: bmo@szu.edu.cn

silencing)^[7]、基因组印迹 (imprinting)^[8] 和副突变 (paramutation)^[9] 都具有重要意义。1998 年, 在从秀丽隐杆线虫中发现 RNA 干扰现象之前, 植物学家就注意到同源 DNA 和同源 RNA 能通过序列间的相互作用而引发基因沉默^[10]。依赖于同源序列的基因沉默不仅发生在转录后水平 (PTGS), 也发生在转录水平 (TGS)。Wassenegger 等^[10] 在研究类病毒对烟草的感染过程中, 发现 RNA 指导的 DNA 甲基化 (RdDM) 现象。当植物感染类病毒后, 通过转基因整合到植物基因组中的类病毒 cDNA 会发生甲基化。在 RdDM 发现后的 4~5 年内, 人们普遍认为 RdDM 只发生在类病毒等低等生物中, 直到在大量的非致病性的转基因植物中发现了 RdDM 现象, RdDM 才得到重视和广泛研究。RdDM 是指由 24-nt siRNAs 介导的同源 DNA 甲基化。在拟南芥中至少有三分之一的 DNA 甲基化与 siRNAs 有关^[11]。植物中含有大量的内源 siRNAs, 它们大致可以分为 3 类: trans-acting siRNAs (ta-siRNAs)、natural antisense siRNAs (nat-siRNAs) 和 heterochromatic siRNAs。ta-siRNA 和 nat-siRNA 通过降解 mRNA 或者抑制翻译在转录后水平调节基因表达; 而 24-nt heterochromatic siRNA 则通过指导 DNA 甲基化在转录水平调节基因表达。本文将详细介绍 24-nt siRNA 指导的 DNA 甲基化途径, 该途径中几个关键酶, 以及最新发现的几个重要组分在 RdDM 途径中的作用。

1 RdDM途径

高等植物基因组含有大量的重复序列和转座子, DNA 甲基化等表观遗传修饰使这些重复序列和转座子处于沉默状态, 维持基因组的稳定。24-nt siRNAs 介导的 RdDM 在染色质的沉默过程中起重要作用。RdDM 途径主要由 24-nt siRNAs 的形成、支架 RNA (scaffold RNA) 的产生、RISC 的募集和染色质沉默等 4 个主要事件构成, 每个事件需要多个相关蛋白质的参与 (表 1)。24-nt siRNAs 的形成由植物特有的依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶 Pol IV 启动, 该酶在沉默位点转录出长非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA)^[12-14]。依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 RDR2 将该单链长非编码 RNA 复制成双链 siRNA 前体^[15]。拟南芥基因组编码 6 种 RNA 指导的 RNA 聚合酶 RDR1~RDR6, 它们分别在不同的 siRNA 途径中发挥作用^[15-16], 其中 RDR2 参与致使染色质沉默的 24-nt siRNA 的生物合成。RDR2 将 Pol IV 转录的 RNA 单链复制成双链 siRNA 前体,

ATP 酶 CLSY1 在它们之间发挥功能^[17]。RDR2 的产物被 DICER-LIKE 3 (DCL3) 切割成 24-nt siRNAs^[15-16]。DCL3 加工产生的 24-nt siRNA 双链体随后被甲基转移酶 HUA ENHANCER1 (HEN 1) 识别, 该甲基转移酶往双链 siRNA 3' 末端核糖的 2'-OH 上各转移一个甲基基团, 使双链体发生 2'-O-甲基化^[18]。2'-O-甲基化可防止小 RNAs 的 3' 端被加上非模板指导的核苷酸序列, 尤其是尿苷酸, 以及被 3'→5' 方向核酸外切酶降解。在动物研究中发现, 尿苷化 siRNA 随后被降解^[19], 但植物尿苷化 siRNA 的降解机制尚不清楚。因此, 2'-O-甲基化是保护小 RNAs 使之处于稳定状态的重要方式。甲基化后的双链 24-nt siRNAs 中的一条被 AGO4 或 AGO6 选择包装成沉默复合体 RISC (RNA-induced silencing complex)^[20-22]。最新研究发现, 24-nt siRNA 主要存在于细胞质, AGO4 在 HSP90 蛋白的帮助下, 结合双链 siRNA, 然后通过其核酸内切酶活性切割并降解其中一条链, 形成成熟的 RISC, 后被转运到细胞核内^[23]。

支架 RNA 由另一个植物特有的依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶 Pol V 或由依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶 Pol II 在一系列转录因子的帮助下, 从沉默位点附近转录产生^[24-26]。以下两个机制确保 RISC 被准确募集到 Pol V 或 Pol II 转录的沉默位点: AGO4 通过其包裹的 siRNA 与支架 RNA 配对募集 RISC^[27]; AGO4 还能与 Pol V 的 CTD (C-terminal domain) 尾巴上的 WG/GW-rich 结构域相互作用, 从而募集 RISC^[28]。一旦 RISC 被募集到沉默位点, 染色质修饰蛋白随后也被募集到沉默位点对染色质进行共价修饰, 如 DNA 甲基转移酶 DRM2 被 RdDM 募集到沉默位点后会进行 DNA 甲基化修饰^[29], 组蛋白修饰酶会对组蛋白进行去乙酰化、甲基化等修饰从而沉默染色质^[30-31]。目前从头甲基化酶 DRM2 是如何被募集到 RdDM 位点的不是特别清楚, 但普遍认为与 RISC 和 DDR 复合体有关, 因为研究发现 DDR 复合体的成分之一——RDM1 既能与 AGO4 相互作用, 也能与 DRM2 相互作用^[32]。

2 RdDM在植物体内的主要功能

植物基因组中含有大量的 TE 原件和重复序列, RdDM 除了能沉默 TE 原件和重复序列从而维持了染色质的结构和基因组的稳定外, 还能调节 TE 原件和重复序列附近的基因表达, 如拟南芥中 *FWA* 是一个开花抑制基因, RdDM 使 *FWA* 启动子区重复序列高甲基化, 从而抑制了 *FWA* 的表达^[33], 因此,

表1 参与RdDM途径的主要蛋白质

相关事件	蛋白质	功能
24-nt siRNAs的产生	Pol IV	依赖DNA的RNA聚合酶
	CLASSY1	染色质重塑蛋白
	SHH1/DTF1	染色质重塑蛋白
	RDR2	依赖RNA的RNA聚合酶
	RDR6	依赖RNA的RNA聚合酶
	DCL3	RNase III-like dsRNase
	HEN1	RNA甲基转移酶
	AGO4/ AGO6	siRNAs结合蛋白
支架RNA的产生	Pol V	依赖DNA的RNA聚合酶
	Pol II	依赖DNA的RNA聚合酶
	DRD1	染色质重塑蛋白
	DMS3	染色质支架蛋白
	DMS11	染色质重塑蛋白
	DMS4	转录因子
	RDM1	单链甲基化DNA结合蛋白
RISC募集	Pol V	依赖DNA的RNA聚合酶
	IDN2	双链RNA结合蛋白
	KTF1	转录因子
	RDM1	单链甲基化DNA结合蛋白
染色质修饰	DRM2	DNA甲基转移酶
	SWI3B	染色质重塑蛋白
	ROS1	DNA糖基化酶

Pol IV: RNA polymerase IV; CASSY1: SNF2 domain-containing protein; SHH1: Sawadec homeodomain homolog 1; DTF1: DNA-binding transcription factor 1; RDR2: RNA-dependent RNA polymerase 2; RDR6: RNA-dependent RNA polymerase 6; DCL3: Dicer like 3; HEN1: HUA-ENHANCER 1; AGO4/AGO6: ARGONAUTE 4/ARGONAUTE 6; Pol V: RNA polymerase V; Pol II: RNA polymerase II; DRD1: defective in RNA directed DNA methylation 1; DMS3: defective in meristem silencing 3; DMS11: defective in meristem silencing 11; DMS4: defective in meristem silencing 4; RDM1: required for DNA methylation 1; KTF1(也称 RDM3或SPT5LIKE): Kow domain-containing transcription factor 1; IDN2: involved in De Novo 2; DRM2: domain rearranged methyltransferase 2; SWI3B: subunit of the SWI/SNF complex; ROS1: repressor of silencing 1

拟南芥正常开花。但当 RdDM 蛋白 DRM2、NRPDI、RDR2 和 DCL3 等突变时, 被抑制的 *FWA* 解抑制, *FWA* 的表达促使拟南芥延迟开花^[34]。

广泛存在于开花植物中的基因印迹现象也受 RdDM 的调控。拟南芥中 DNA 去甲基化酶 DME 在母源的中央细胞和胚乳细胞中特异表达, 使得中央细胞和胚乳细胞中全基因组去甲基化, 因此维持了母源基因和父源基因的不同甲基化模式与表达模式。印迹基因在胚乳细胞中低甲基化高表达, 而在植物其他组织中则高甲基化低表达, 如印迹基因 *FWA*、*MEA*、*FIS2*、*PHERES1* 等在母源细胞胚乳中表达, 而在其他体细胞和父源细胞花粉中则沉默。印迹基因附近的转座子或重复序列被其产生的 24-nt siRNA

通过 RdDM 沉默, 进而影响印迹基因在体细胞和父源细胞花粉中表达, 如 *FWA*^[34]。猜测印迹基因可能是从转座子或重复序列附近的基因进化而来^[35-36]。

RdDM 也参与玉米中副突变现象的调控^[37]。副突变是指同一位点的等位基因发生相互作用, 一个等位基因介导另一个等位基因发生可遗传的表观遗传改变, 如在玉米中 *booster 1 (b1)* 位点编码 bHLH 转录因子, bHLH 转录因子调控花青素的合成^[38]。*b1* 位点有两个等位基因 *B-I* (有转录活性) 和 *B'* (没有转录活性), 它们的序列相同但甲基化模式不同。当 *B-I* 与 *B'* 杂交, 沉默的等位基因 *B'* 能引起本来有转录活性的等位基因 *B-I* 沉默。*b1* 位点的上游 100 kb 处的一个串联重复序列的存在是

b1 基因发生副突变所必需的^[39], 来自于重复序列的 siRNA 通过 RdDM 途径引起 *b1* 基因中串联重复序列的染色质甲基化, 从而诱导了等位基因 *B-1* 的染色质沉默状态。

3 几种依赖DNA的RNA聚合酶在RdDM途径中的作用

真核生物有 3 种依赖 DNA 的 RNA 聚合酶, 它们分别是 Pol I、II 和 III。植物基因组还编码两种植物所特有的依赖 DNA 的 RNA 聚合酶: Pol IV 和 Pol V^[24,40-41], 它们含有与 Pol I、II 和 III 不一样的最大亚基和第二大亚基。许多在 Pol I、II 和 III 催化位点保守的氨基酸残基在 Pol IV 和 Pol V 上没有找到, 但是核心序列 Metal A 和 Metal B 在这 5 个 RNA 聚合酶中都保守。通过定点突变研究发现, Metal A 和 Metal B 对 Pol IV 和 Pol V 的定位以及生物学功能具有非常重要的作用^[42]。Pol IV 和 Pol V 与 Pol II 一样都是多亚基的 RNA 聚合酶, 它们的大亚基分别为 NRPD1 (NRPD1a) 和 NRPE1 (NRPE1), 但 Pol IV 和 Pol V 有一个共同的第二大亚基 NRPD2/NRPE2^[40,43]。Pol IV 和 Pol V 大亚基的 C 端含有 DeCL-like 结构域而 Pol II 没有, 并且 Pol V 的 CTD 还含有 WG/GW 结构域。与突变 Pol II 导致植物死亡不同, 突变 Pol IV 对植物的表型影响不大^[44]。Pol IV 和 Pol V 都是 RdDM 所必需的^[12,45-47]。

3.1 Pol IV

siRNA 的生物合成主要依赖 Pol IV。有证据显示在 Pol IV 突变体中, 24-nt siRNA 的生物合成受阻^[12-13,46]。尽管到目前为止还没找到 Pol IV 的直接转录产物, 但 Pol IV 能转录一些非编码区域, 如高度甲基化的异染色质区^[13]。大部分 siRNA 合成位点的转录依赖于 Pol IV^[48]。最新研究发现, SHH1/DTF1 (Sawadee homeodomain homolog 1, DNA-binding transcription factor 1) 对 Pol IV 的转录发挥重要作用, 能介导 Pol IV 到转录位点且正调控 Pol IV 转录^[14,49]。RdDM 途径中其他一些蛋白 (如 RDR2、DCL3、AGO4) 的正确定位依赖于 Pol IV 或者 Pol IV 的转录活性。在 Pol IV 突变体中, RDR2、DCL3、AGO4 等均发生错误定位, 但 Pol IV 的定位不受这些蛋白的影响^[50]。综上所述, Pol IV 能启动 siRNA 的生物合成, 同时在 RdDM 途径的上游起关键作用。

3.2 Pol V

Pol V 与 siRNA 量的增加没有直接的关系^[25]。Pol V 虽然不直接参加 siRNA 前体的转录, 但在

RdDM 途径中起重要作用。Pol V 的转录产物通常被称作支架 RNA, 作为支架用于募集染色质修饰蛋白, 对染色质进行 DNA 甲基化等沉默修饰^[51-52]。Pol V 的转录产物覆盖 24-nt siRNA 位点和胞嘧啶甲基化区域, 其 5' 端有一个 7meG 帽子或被三磷酸 (triphosphates) 修饰^[24,52]。支架 RNA 能与 RISC 包裹的 24-nt siRNA 进行互补配对。Pol V 能从不同位点进行起始转录, 不仅能转录常染色质间的非编码区 (*IGN5* 和 *IGN6*), 也能转录异染色质间的非编码区 (*IGN10* 和 *IGN15*)^[24], 说明 RdDM 不仅能维持异染色质的沉默状态, 也能调控常染色质间基因的表达。

Pol V 有效转录非编码 RNA 需要一个名为 DDR 的转录因子复合体^[53]。DDR 复合体由 DRD1 (defective in RNA directed DNA methylation 1)^[54-55]、DMS3 (defective in meristem silencing 3)^[56] 和 RDM1 (required for DNA methylation 1)^[32,53] 等 3 种蛋白组成。免疫共沉淀结果显示, DDR 沉淀中含有 Pol V 成分, 说明 DDR 与 Pol V 能相互作用^[53]。DRD1 是植物所特有的蛋白质, 在突变体 *drd1* 中 RNA 指导的非 CG 甲基化完全消失。DRD1 与 CLASSY1 一样具有 SWI2/SNF2 结构域, 其功能可能是重塑染色质^[55], 从而便于 Pol V 的转录。DMS3 编码和 SMC (structural maintenance of chromosome) 相同的一个 hinge 结构域, 因此, 猜测 DMS3 可能起结合或稳定 siRNA-DNA 或 siRNA-RNA 的作用^[56]。RDM1 也是植物所特有的蛋白质, 其氨基酸序列能折叠成一个特殊的口袋形 (pocket like) 结构, 这个口袋形结构能选择性地结合在甲基化的单链 DNA 上^[32]。RDM1 除了是 DDR 组分之一外, 还能与 AGO4 和 DRM2 相互作用。综上所述, DDR 的功能可能是募集 Pol V 到转录位点, 并且重塑染色质使之有利于转录。KTF1 (Kow domain-containing transcription factor 1) 蛋白也参与 RdDM^[57]。KTF1 也具有 WG/GW-rich 结构域, 能与 AGO4 相互作用。KTF1 不仅能和 Pol V 以及 AGO 蛋白相互作用, 还能结合 Pol V 转录的支架 RNA。因此, KTF1 可能对 Pol V 的转录起正向调控作用, 并且有利于 RISC 的募集^[57-58]。

3.3 Pol II

在 RdDM 中, RNA 聚合酶 Pol IV 和 Pol V 发挥关键作用, 但是 Pol II 也参与 RdDM^[26]。突变 Pol II 第二大亚基时, 某些位点的 DNA 甲基化和 TGS 缺失。拟南芥中依赖 Pol II 的非编码 RNA 与 AGO4

蛋白在生理上相关, 并且依赖 Pol II 的转录产物有助于募集 Pol IV、AGO4 和 Pol V^[26]。Pol II 转录非编码 RNA 时也需要 DRD1, 尽管 Pol II 没有 WG/GW 结构域, 但也能与 AGO4 相互作用, 说明 Pol II 转录出的非编码 RNA 可能作为支架 RNA 参与 RdDM。在裂殖酵母和线虫中没有植物所特有的 Pol IV 和 Pol V, 但也存在 RNA 指导的染色质沉默^[59-60]。在已有的酵母 RNA 指导的染色质修饰论述^[61]中: 酵母只能用 Pol II 合成 siRNA 和支架 RNA, 从而参与 RNA 指导的染色质沉默; 在酵母中, Iwr1 能结合在 Pol II 的活性位点, 调控 Pol II 的组装。拟南芥转录因子 DMS4 与酵母 Pol II 结合蛋白 Iwr1 同源^[62-63]。在植物中, DMS4 不仅能和 Pol II 也能与 Pol IV、Pol V 相互作用, DMS4 的功能可能是调控 Pol II 和 Pol IV、Pol V 的组装。Iwr1 也能和大多数中介体蛋白 (mediator) 相互作用, 而中介体蛋白是 Pol II 转录蛋白质基因所必需的。在拟南芥中, 发现 Pol II 转录 II 型位点 (低拷贝重复序列和基因间序列) 的支架 RNA 需要中介体蛋白^[64]。因此, DMS4 也可能通过调控 Pol II 的转录参与 RdDM。

4 依赖RNA的RNA聚合酶6在RdDM途径中的作用

TE 元件甲基化除了受 24-nt siRNAs 调控外, 还受 21~22-nt siRNAs 调控^[65-66]。24-nt siRNAs 生物合成主要依赖 Pol IV 和 RDR2, 21~22-nt TE siRNAs 则依赖 RDR6。之前认为依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 6 (RDR6) 主要参与转录后基因沉默 (PTGS) 的调控。在这个途径中, Pol II 的转录产物被 RDR6 复制成双链, 然后经过 DCL2 和 DCL4 加工成 21~22-nt siRNAs, 后被 AGO1 包装成 RISC, 从而降解同源 mRNA^[67]。但是最近发现, 依赖 RDR6 的 TE 21~22-nt siRNAs 也参与 TE 原件的 DNA 甲基化修饰^[65]。在这个新描述的途径中, Pol II 从 TE 元件的转录产物被 RDR6 复制成双链, 然后经过 DCL2 和 DCL4 加工成 21~22-nt siRNAs。与 Pol IV-RdDM 下游途径类似, 21~22-nt siRNAs 被 AGO2 或 AGO2 包装, 然后被 Pol V 转录产物支架 RNA 募集到沉默位点沉默 TE 元件。在 Panda 等^[68]描述的 RDR6-RdDM 中, Pol IV-RdDM 和 RDR6-RdDM 共同调控 TE 元件的从头甲基化, RDR6-RdDM 起始 TE 元件的从头甲基化, Pol IV-RdDM 则增强部分甲基化的 TE 元件的甲基化程度。

5 最新报道的RdDM新组分及其参与机制

5.1 IDN2-IDP1/IDP2蛋白复合体

RNA 结合蛋白 IDN2(也称 DMS10 或 RDM12) 和它的同源蛋白 IDP1 和 IDP2 形成 IDN2-IDP1/IDP2 蛋白复合体, 参与 RdDM^[69]。IDN2 包含一个 XS 结构域, 能结合双链 RNA, 该蛋白可能在 siRNA 与支架 RNA 配对时发挥作用; IDP1 和 IDP2 不能结合双链 RNA, 暗示 IDN2-IDP1/IDP2 蛋白复合体在 RdDM 途径中还扮演其他角色^[69]。2013 年, Zhu 等^[70]研究发现, SWI/SNF 染色质重塑复合体的一个重要亚基 SWI3B 也参加了 RdDM, 它可能通过与 IDN2-IDP1/IDP2 蛋白复合体相互作用而被募集到沉默位点, 然后 SWI3B 通过改变核小体在染色质上的位置, 使染色质包装更为紧密从而沉默染色质。

5.2 DMS3-DMS11蛋白复合体

最近的研究发现, 与 DMS3 相互作用的蛋白 DMS11(MORC6) 也参与 RdDM, DMS3-DMS11 复合体能促进 Pol V 的转录活性^[71-72]。DMS11 具有 ATPase 结构域, 能与 DMS3 形成复合体参与 RdDM。突变 DMS3 的 hinge 结构域与 DMS11 的 ATPase 结构域具有相同的效应, 都能影响 RdDM 下游反应^[56,72]。Bender^[73]提出了 DMS3-DMS11 作用机制的模型: DMS3 的 SMC hinge 结构域能形成 V 形异质二聚体, DMS11 的 ATPase 结构域结合在 V 形异质二聚体末端, ATPase 结构域还能结合一些功能未知的 partner 蛋白, 从而形成一个环状结构。这个环状结构能环绕 DNA, DMS11 的 ATPase 水解作用调节环的开和关。DMS3-DMS11 形成的环状结构或许能抓住模板 DNA 与支架 RNA, 从而促进 Pol V 转录, 或者能帮助小 RNA 复合体寻找靶位点。Pikaard 等^[74]则认为, DMS3-DMS11 复合体在 Pol V 转录过程中的作用与 PCNA(proliferating cell nuclear antigen) 在复制叉中的作用类似。

5.3 剪切体

Ausin 等^[75]最近筛选到一个新的 RdDM 蛋白 SR45 (ARGININE/SERINE-RICH 45), 它是一个剪切体基因, 参与 pre-mRNA 的成熟。将 *FWA* 基因转入 *sr45* 突变体中, 引起植株晚花; 双突变 *dcl3* 和 *sr45* 比单突变 SR45 造成更严重的 DNA 甲基化缺陷^[75]。由于参与 pre-mRNA 加工的核帽结合复合物 (nuclear cap-binding complex) 也参与 DCL1 加工 miRNA 途径, 推测 SR45 可能参与 siRNA 成熟途径^[75-76]。另一个剪切因子 ZOP1 (zinc finger and OCRE

domain-containing protein 1) 也参与 RdDM^[48]。ZOP1 包含两个重要的结构域, 锌指 (ZnF) 和 OCRE 结构域, 能结合双链 RNA。ZOP1 和 AGO4 共定位在 Cajal 小体且 ZOP1 与 Pol II 能相互作用。已知 Pol II 能募集 AGO4 到 RdDM 靶位点, 推测 Pol II 和 ZOP1 的剪切机制可能共同募集 AGO4 到 RdDM 的靶位点^[26,48]。ZOP1 与 Pol V 一样对依赖 Pol IV 的 siRNA 产量的增加影响不大, 因此, ZOP1 在 RdDM 下游发挥功能。STA1 (STABILIZED1) 是一个 PRP6-like 剪切因子, 参与 miRNA 的生物合成, 但不影响依赖 Pol IV siRNA 的生物合成; STA1 有助于依赖 Pol V 的转录产物积累, 被认为参与 RdDM 下游途径^[77-78]。除了 SR45、ZOP1 和 STA1 外, MAC3A、MAC3B、MOS4、MOS12 和 MOS14 等剪切体蛋白也被发现可能参与 RdDM, 说明不是单独的某个剪切体蛋白参与 RdDM, 而是剪切机制参与 RdDM^[48]。

6 RdDM与DNA去甲基化

植物的甲基化水平主要由 DNA 甲基转移酶和 DNA 去甲基化酶共同维持。拟南芥主动去甲基化涉及到 4 种去 DNA 糖基化酶: ROS1 (repressor of silencing 1)、DME (demeter)、DML2 (DME-like 2)、DML3 (DME-like 3)^[79]。ROS1 参与维持转基因的表达^[80], DME 与胚乳发育的全基因组去甲基化和基因印迹有关^[35-36]。ROS1 与 RdDM 相关, 当单突变 RdDM 组成蛋白时, ROS1 蛋白表达水平显著下降^[81-82], 这说明 ROS1 蛋白介导的去甲基化与 RdDM 是一种既合作、又竞争的关系, 并且 ROS1 的表达受到甲基化水平的调节。

7 结论与展望

在 RdDM 途径中, 非编码 RNA 在转录水平上调节基因表达通过两个相对独立又相互依赖的过程实现: Pol IV 转录出的长非编码 RNA 作为 siRNA 前体, 用于产生 24-nt siRNA; Pol V 转录出的长非编码 RNA 作为支架 RNA, 帮助 24-nt siRNA 识别沉默位点。Pol IV 和 Pol V 在 RdDM 途径中占据着关键位置, Pol IV 的转录起始了 RdDM 途径, 而 Pol V 的转录产物则为 RISC 提供支架和识别沉默位点。已有的研究结果已经鉴定了一系列的 RdDM 蛋白, 如 24-nt siRNA 产生过程中的 RDR2、DCL3、HEN1 等, Pol IV 和 Pol V 转录过程中的转录因子和染色质重塑蛋白 CLASY1、SHH、DRD1、DMS3、RDM、KTF1、DMS4 等。但是还有更多新的 RdDM

蛋白有待于发现, 还有很多问题有待于进一步的研究作出回答, 如 Pol IV 和 Pol V 如何识别转录目标; Pol IV 和 Pol V 启动子的鉴定, 及还有哪些蛋白参与了 Pol IV 和 Pol V 的转录起始; RdDM 具体调控那些位点; RdDM 途径中是否还存在更多的染色质表观遗传修饰 (组蛋白修饰、核小体移位); 剪切体蛋白是否参与 RdDM 的具体机制; RDR6-RdDM 是否参与转座子沉默的具体机制; 是否存在 RNA 指导的去甲基化等。对以上问题的回答将完善人们对 RdDM 途径的深入理解。

[参 考 文 献]

- [1] Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 2009, 462(7271): 315-22
- [2] Ramsahoye BH, Biniszkiwicz D, Lyko F, et al. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(10): 5237-42
- [3] Cokus SJ, Feng S, Zhang X, et al. Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. *Nature*, 2008, 452(7184): 215-9
- [4] Lippman Z, Gendrel AV, Black M, et al. Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature*, 2004, 430(6998): 471-6
- [5] Zilberman D, Henikoff S. Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. *Development*, 2007, 134(22): 3959-65
- [6] Tran RK, Henikoff JG, Zilberman D, et al. DNA methylation profiling identifies CG methylation clusters in *Arabidopsis* genes. *Curr Biol*, 2005, 15(2): 154-9
- [7] Matzke M, Kanno T, Huettel B, et al. Targets of RNA-directed DNA methylation. *Curr Opin Plant Biol*, 2007, 10(5): 512-9
- [8] Zilberman D. The evolving functions of DNA methylation. *Curr Opin Plant Biol*, 2008, 11(5): 554-9
- [9] Hollick JB. Paramutation and development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2010, 26: 557-79
- [10] Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, et al. RNA-directed *de novo* methylation of genomic sequences in plants. *Cell*, 1994, 76(3): 567-76
- [11] Lister R, O'Malley RC, Tonti-Filippini J, et al. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis*. *Cell*, 2008, 133(3): 523-36
- [12] Herr AJ, Jensen MB, Dalmay T, et al. RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science*, 2005, 308(5718): 118-20
- [13] Zhang X, Henderson IR, Lu C, et al. Role of RNA polymerase IV in plant small RNA metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(11): 4536-41
- [14] Law JA, Du J, Hale CJ, et al. Polymerase IV occupancy at RNA-directed DNA methylation sites requires SHH1. *Nature*, 2013, 498(7454): 385-9

- [15] Kasschau KD, Fahlgren N, Chapman EJ, et al. Genome-wide profiling and analysis of *Arabidopsis* siRNAs. *PLoS Biol*, 2007, 5(3): e57
- [16] Xie Z, Johansen LK, Gustafson AM, et al. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol*, 2004, 2(5): E104
- [17] Smith LM, Pontes O, Searle I, et al. An SNF2 protein associated with nuclear RNA silencing and the spread of a silencing signal between cells in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2007, 19(5): 1507-21
- [18] Yu B, Yang Z, Li J, et al. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*, 2005, 307(5711): 932-5
- [19] Baccarini A, Chauhan H, Gardner TJ, et al. Kinetic analysis reveals the fate of a microRNA following target regulation in mammalian cells. *Curr Biol*, 2011, 21(5): 369-76
- [20] Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, et al. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, 2004, 305(5689): 1434-7
- [21] Xie Z, Khanna K, Ruan S. Expression of microRNAs and its regulation in plants. *Semin Cell Dev Biol*, 2010, 21(8): 790-7
- [22] Zheng X, Zhu J, Kapoor A, et al. Role of *Arabidopsis* AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *EMBO J*, 2007, 26(6): 1691-701
- [23] Ye R, Wang W, Iki T, et al. Cytoplasmic assembly and selective nuclear import of *Arabidopsis* Argonaute 4/siRNA complexes. *Mol Cell*, 2012, 46(6): 859-70
- [24] Wierzbicki AT, Haag JR, Pikaard CS. Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. *Cell*, 2008, 135(4): 635-48
- [25] Mosher RA, Schwach F, Studholme D, et al. PolIVb influences RNA-directed DNA methylation independently of its role in siRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(8): 3145-50
- [26] Zheng B, Wang Z, Li S, et al. Intergenic transcription by RNA polymerase II coordinates Pol IV and Pol V in siRNA-directed transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 2009, 23(24): 2850-60
- [27] Wierzbicki AT, Ream TS, Haag JR, et al. RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE 4 to chromatin. *Nat Genet*, 2009, 41(5): 630-4
- [28] El-Shami M, Pontier D, Lahmy S, et al. Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev*, 2007, 21(20): 2539-44
- [29] Law JA, Jacobsen SE. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(3): 204-20
- [30] Johnson LM, Law JA, Khattar A, et al. SRA-domain proteins required for DRM2-mediated *de novo* DNA methylation. *PLoS Genet*, 2008, 4(11): e1000280
- [31] Aufsatz W, Mette MF, van der Winden J, et al. HDA6, a putative histone deacetylase needed to enhance DNA methylation induced by double-stranded RNA. *EMBO J*, 2002, 21(24): 6832-41
- [32] Gao Z, Liu HL, Daxinger L, et al. An RNA polymerase II- and AGO4-associated protein acts in RNA-directed DNA methylation. *Nature*, 2010, 465(7294): 106-9
- [33] Soppe WJ, Jacobsen SE, Alonso-Blanco C, et al. The late flowering phenotype of *fwa* mutants is caused by gain-of-function epigenetic alleles of a homeodomain gene. *Mol Cell*, 2000, 6(4): 791-802
- [34] Chan SW, Zhang X, Bernatavichute YV, et al. Two-step recruitment of RNA-directed DNA methylation to tandem repeats. *PLoS Biol*, 2006, 4(11): e363
- [35] Gehring M, Bubb KL, Henikoff S. Extensive demethylation of repetitive elements during seed development underlies gene imprinting. *Science*, 2009, 324(5933): 1447-51
- [36] Hsieh TF, Ibarra CA, Silva P, et al. Genome-wide demethylation of *Arabidopsis* endosperm. *Science*, 2009, 324(5933): 1451-4
- [37] Erhard KF Jr, Stonaker JL, Parkinson SE, et al. RNA polymerase IV functions in paramutation in *Zea mays*. *Science*, 2009, 323(5918): 1201-5
- [38] Chandler VL, Stam M. Chromatin conversations: mechanisms and implications of paramutation. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(7): 532-44
- [39] Stam M, Belele C, Dorweiler JE, et al. Differential chromatin structure within a tandem array 100 kb upstream of the maize *b1* locus is associated with paramutation. *Genes Dev*, 2002, 16(15): 1906-18
- [40] Ream TS, Haag JR, Wierzbicki AT, et al. Subunit compositions of the RNA-silencing enzymes Pol IV and Pol V reveal their origins as specialized forms of RNA polymerase II. *Mol Cell*, 2009, 33(2): 192-203
- [41] Huang L, Jones AM, Searle I, et al. An atypical RNA polymerase involved in RNA silencing shares small subunits with RNA polymerase II. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16(1): 91-3
- [42] Haag JR, Pontes O, Pikaard CS. Metal A and metal B sites of nuclear RNA polymerases Pol IV and Pol V are required for siRNA-dependent DNA methylation and gene silencing. *PLoS One*, 2009, 4(1): e4110
- [43] Lahmy S, Bies-Etheve N, Lagrange T. Plant-specific multisubunit RNA polymerase in gene silencing. *Epigenetics*, 2010, 5(1): 4-8
- [44] Pikaard CS, Haag JR, Ream T, et al. Roles of RNA polymerase IV in gene silencing. *Trends Plant Sci*, 2008, 13(7): 390-7
- [45] Kanno T, Huettel B, Mette MF, et al. Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation. *Nat Genet*, 2005, 37(7): 761-5
- [46] Onodera Y, Haag JR, Ream T, et al. Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell*, 2005, 120(5): 613-22
- [47] Pontier D, Yahubyan G, Vega D, et al. Reinforcement of silencing at transposons and highly repeated sequences requires the concerted action of two distinct RNA polymerases IV in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 2005, 19(17): 2030-40
- [48] Zhang CJ, Zhou JX, Liu J, et al. The splicing machinery promotes RNA-directed DNA methylation and transcri-

- ptional silencing in *Arabidopsis*. EMBO J, 2013, 32(8): 1128-40
- [49] Zhang H, Ma ZY, Zeng L, et al. DTF1 is a core component of RNA-directed DNA methylation and may assist in the recruitment of Pol IV. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(20): 8290-5
- [50] Pontes O, Li CF, Costa Nunes P, et al. The *Arabidopsis* chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center. Cell, 2006, 126(1): 79-92
- [51] Cam HP, Chen ES, Grewal SI. Transcriptional scaffolds for heterochromatin assembly. Cell, 2009, 136(4): 610-4
- [52] Wierzbicki AT, Cocklin R, Mayampurath A, et al. Spatial and functional relationships among Pol V-associated loci, Pol IV-dependent siRNAs, and cytosine methylation in the *Arabidopsis* epigenome. Genes Dev, 2012, 26(16): 1825-36
- [53] Law JA, Ausin I, Johnson LM, et al. A protein complex required for polymerase V transcripts and RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. Curr Biol, 2010, 20(10): 951-6
- [54] Huettel B, Kanno T, Daxinger L, et al. RNA-directed DNA methylation mediated by DRD1 and Pol IVb: a versatile pathway for transcriptional gene silencing in plants. Biochim Biophys Acta, 2007, 1769(5-6): 358-74
- [55] Kanno T, Mette MF, Kreil DP, et al. Involvement of putative SNF2 chromatin remodeling protein DRD1 in RNA-directed DNA methylation. Curr Biol, 2004, 14(9): 801-5
- [56] Kanno T, Bucher E, Daxinger L, et al. A structural-maintenance-of-chromosomes hinge domain-containing protein is required for RNA-directed DNA methylation. Nat Genet, 2008, 40(5): 670-5
- [57] Bies-Etheve N, Pontier D, Lahmy S, et al. RNA-directed DNA methylation requires an AGO4-interacting member of the SPT5 elongation factor family. EMBO Rep, 2009, 10(6): 649-54
- [58] Rowley MJ, Avrutsky MI, Sifuentes CJ, et al. Independent chromatin binding of ARGONAUTE4 and SPT5L/KTF1 mediates transcriptional gene silencing. PLoS Genet, 2011, 7(6): e1002120
- [59] Buhler M, Verdel A, Moazed D. Tethering RITS to a nascent transcript initiates RNAi- and heterochromatin-dependent gene silencing. Cell, 2006, 125(5): 873-86
- [60] Burkhart KB, Guang S, Buckley BA, et al. A pre-mRNA-associating factor links endogenous siRNAs to chromatin regulation. PLoS Genet, 2011, 7(8): e1002249
- [61] Kato H, Goto DB, Martienssen RA, et al. RNA polymerase II is required for RNAi-dependent heterochromatin assembly. Science, 2005, 309(5733): 467-9
- [62] He XJ, Hsu YF, Zhu S, et al. A conserved transcriptional regulator is required for RNA-directed DNA methylation and plant development. Genes Dev, 2009, 23(23): 2717-22
- [63] Kanno T, Bucher E, Daxinger L, et al. RNA-directed DNA methylation and plant development require an IWR1-type transcription factor. EMBO Rep, 2010, 11(1): 65-71
- [64] Kim YJ, Zheng B, Yu Y, et al. The role of Mediator in small and long noncoding RNA production in *Arabidopsis thaliana*. EMBO J, 2011, 30(5): 814-22
- [65] Nuthikattu S, McCue AD, Panda K, et al. The initiation of epigenetic silencing of active transposable elements is triggered by RDR6 and 21-22 nucleotide small interfering RNAs. Plant Physiol, 2013, 162(1): 116-31
- [66] Wu L, Mao L, Qi Y. Roles of dicer-like and argonaute proteins in TAS-derived small interfering RNA-triggered DNA methylation. Plant Physiol, 2012, 160(2): 990-9
- [67] McCue AD, Nuthikattu S, Reeder SH, et al. Gene expression and stress response mediated by the epigenetic regulation of a transposable element small RNA. PLoS Genet, 2012, 8(2): e1002474
- [68] Panda K, Slotkin RK. Proposed mechanism for the initiation of transposable element silencing by the RDR6-directed DNA methylation pathway. Plant Signal Behav, 2013, 8(8): e25206
- [69] Zhang CJ, Ning YQ, Zhang SW, et al. IDN2 and its paralogs form a complex required for RNA-directed DNA methylation. PLoS Genet, 2012, 8(5): e1002693
- [70] Zhu Y, Rowley MJ, Bohmdorfer G, et al. A SWI/SNF chromatin-remodeling complex acts in noncoding RNA-mediated transcriptional silencing. Mol Cell, 2013, 49(2): 298-309
- [71] Brabbs TR, He Z, Hogg K, et al. The stochastic silencing phenotype of *Arabidopsis* morc6 mutants reveals a role in efficient RNA-directed DNA methylation. Plant J, 2013, 75(5): 836-46
- [72] Lorkovic ZJ, Naumann U, Matzke AJ, et al. Involvement of a GHKL ATPase in RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. Curr Biol, 2012, 22(10): 933-8
- [73] Bender J. RNA-directed DNA methylation: getting a grip on mechanism. Curr Biol, 2012, 22(10): R400-1
- [74] Pikaard CS, Haag JR, Pontes OM, et al. A transcription fork model for Pol IV and Pol V-dependent RNA-directed DNA methylation. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2012, 77: 205-12
- [75] Ausin I, Greenberg MV, Li CF, et al. The splicing factor SR45 affects the RNA-directed DNA methylation pathway in *Arabidopsis*. Epigenetics, 2012, 7(1): 29-33
- [76] Laubinger S, Sachsenberg T, Zeller G, et al. Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(25): 8795-800
- [77] Dou K, Huang CF, Ma ZY, et al. The PRP6-like splicing factor STA1 is involved in RNA-directed DNA methylation by facilitating the production of Pol V-dependent scaffold RNAs. Nucleic Acids Res, 2013, 41(18): 8489-502
- [78] Ben Chaabane S, Liu R, Chinnusamy V, et al. STA1, an *Arabidopsis* pre-mRNA processing factor 6 homolog, is a new player involved in miRNA biogenesis. Nucleic Acids Res, 2013, 41(3): 1984-97
- [79] Zhu JK. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. Annu Rev Genet, 2009, 43: 143-66
- [80] Gong Z, Morales-Ruiz T, Ariza RR, et al. ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*, encodes a DNA glycosylase/lyase. Cell, 2002, 111(6): 803-14
- [81] Mathieu O, Reinders J, Caikovski M, et al. Transgenerational stability of the *Arabidopsis* epigenome is coordinated by CG methylation. Cell, 2007, 130(5): 851-62
- [82] Penterman J, Uzawa R, Fischer RL. Genetic interactions between DNA demethylation and methylation in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 2007, 145(4): 1549-57