

DOI: 10.13376/j.cbls/2014104

文章编号: 1004-0374(2014)07-0745-06

tRNA来源的小片段RNA——新的基因表达调控因子

方志鹏^{1,2}, 周小龙^{1*}, 王恩多^{1,3*}

(1 中国科学院上海生命科学研究院, 生物化学与细胞生物学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031; 2 中国科学院大学, 北京 100049; 3 上海科技大学, 上海 200031)

摘要: 转移核糖核酸 (tRNA) 是蛋白质合成的关键接头分子, 特异性识别信使 RNA (mRNA) 的密码子信息, 将其接载的氨基酸基团掺入到新生多肽链中。最新研究表明, 在很多物种中, 在某些特定情况下, tRNA 或其前体被特异性剪切产生 tRNA 来源的小片段 RNA (tRNA-derived fragment, tRF)。这类 tRF 是一类新的基因表达调控因子, 其发挥作用的机制多样, 如某些 tRF 以 microRNA 方式抑制 mRNA 翻译; 某些 tRF 作为逆转录病毒 RNA 基因组的逆转录引物; 而某些 tRF 参与了前体 rRNA 剪切复合物的组装。此外, 细胞受胁迫产生的带有多聚鸟苷酸模块的 tRF 则会竞争性抑制延伸因子 eIF4G 与 mRNA 的结合, 从而抑制蛋白质翻译。随着研究的继续深入, 对 tRF 的发生发展、作用机制以及在疾病中的潜在作用将会进一步丰富。拟从 tRF 作为新的基因表达调控分子的角度, 简要介绍 tRF 发挥作用的分子机制。

关键词: tRNA; tRNA 来源的小片段 RNA; 基因表达; 调控

中图分类号: Q522^{+.1}; Q74 文献标志码: A

tRNA-derived fragments: the new regulators of gene expression

FANG Zhi-Peng^{1,2}, ZHOU Xiao-Long^{1*}, WANG En-Duo^{1,3,*}

(1 State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; 2 University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China; 3 ShanghaiTech University, Shanghai 200031, China)

Abstract: Transfer RNAs (tRNAs) are the key adaptors that specifically recognize the codon on the mRNA and transfer their charged amino acids into newly synthesized peptide during protein translation. Recent studies have shown that the tRNA fragments (tRFs), which are derived from specific cleavage of tRNA, are present in many species under some specific conditions. tRFs are a class of new regulators of gene expression, which function in many ways. Some tRFs function in the microRNA-like way to inhibit the protein translation; while some tRFs serve as the primers of reverse transcription of the viral RNA genome. Other tRFs are members of a nucleoprotein complex which specifically cleaves pre-rRNA. Moreover, the stress-induced tRFs from the 5' terminus of tRNA with specific terminal oligo-guanine motif are able to obviously inhibit the protein translation by interfering with interaction between eIF4G and mRNA. The continuous investigations will provide us a more detailed understanding of mechanism of generation, regulation and possible roles of tRFs in specific diseases.

Key words: tRNA; tRF; gene expression; regulation

非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA) 是不具有翻译为蛋白质能力的 RNA。ncRNA 广泛存在于细胞中, 种类繁多, 在生物体发挥多种功能^[1]。转移 RNA (transfer RNA, tRNA) 是经典的 ncRNA, 负责将信使 RNA (message RNA, mRNA) 上的密码子信息转化为新生蛋白质上的氨基酸序列信息。而另

一个经典的核糖体 RNA (ribosome RNA, rRNA) 则参与核糖体的组装, 并催化蛋白质翻译过程中肽键

收稿日期: 2014-07-02

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (31130064)

*通信作者: E-mail: edwang@sibcb.ac.cn(王恩多);
xlzhou@sibcb.ac.cn(周小龙)

的形成。此外, ncRNA 还包括了主要作用于 mRNA 的 3' 非翻译区 (3'UTR) 抑制基因表达的单链微 RNA (microRNA, miRNA)、通过互补核苷酸序列抑制基因表达的双链小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)、特异性地在生殖细胞中发挥功能的 Piwi 蛋白质相互作用 RNA (Piwi-interacting RNA, piRNA)、引导其他 RNA 进行化学修饰的小核仁 RNA (small nucleolar RNA, snoRNA)、参与细胞核内前体 mRNA 加工的小核内 RNA (small nuclear RNA, snRNA)、在基因表达调控过程中发挥着重要作用的长非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 以及发挥细胞间通讯作用的细胞外 RNA (extracellular RNA, exRNA) 等。

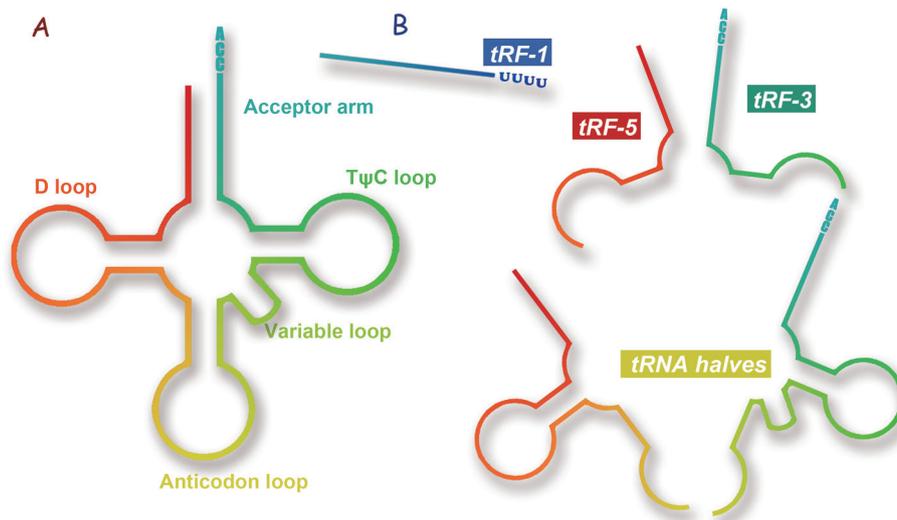
随着高通量测序 (high throughput sequencing) 与微芯片 (microarray) 等技术的发展与应用^[2-3], 人们在从大肠杆菌到哺乳动物等众多物种中都发现了一类新的 ncRNA, 即 tRNA 来源的小片段 RNA (tRNA-derived fragment, tRF)^[4]。成熟的 tRNA 具有三叶草型的二级结构, 可分为接收茎臂 (Acceptor arm)、D 环 (D loop)、T ψ C 环 (T ψ C loop)、反密码子环 (Anticodon loop) 与可变环 (Variable loop) 等 (图 1A)。tRF 即是在特定的细胞或组织中或者在细胞受到胁迫等特定条件下, 由特定的核酸酶 [如 Dicer、血管生成素 (angiogenin, ANG) 等] 在 tRNA 的环上剪切, 产生的特定大小的小片段 RNA^[5-7]。根据 Lee 等^[8] 的分类方法, 来源于前体 tRNA 的 3' 前导序列被称为 tRF-1; 从成熟形式 tRNA 5' 端到 D 环附近

的 tRF 为 tRF-5; 而成熟形式 tRNA T ψ C 环附近到 3' 端的 tRF 为 tRF-3 (图 1B)。此外, 在成熟形式 tRNA 的反密码子环剪切产生的 tRF 被称为 tRNA 半分子 (tRNA halves)。tRNA 半分子一般是在胁迫条件下产生, 所以也称为 tiRNA (tRNA-derived stress-induced fragment)^[7]。tRF-5 与 tRF-3 是由 Dicer 等核酸内切酶剪切产生的; 而 tRNA 半分子可由大肠杆菌中的 Prrc、colicin D 和 E5、酵母中的 Rny1p 与哺乳动物细胞中的 ANG 等核酸酶剪切产生^[4]。之前已有研究表明, 来源于 tRNA 前体的 tRF-1001 能够促进细胞增殖, 敲低其表达则会抑制细胞增殖^[8]。而最新众多的研究表明, tRF 在基因表达与调控等过程中发挥重要的作用。本文将对最新研究中所发现的一些 tRF 的生物学功能进行简要介绍。

1 tRF以miRNA的方式调控靶标基因的表达

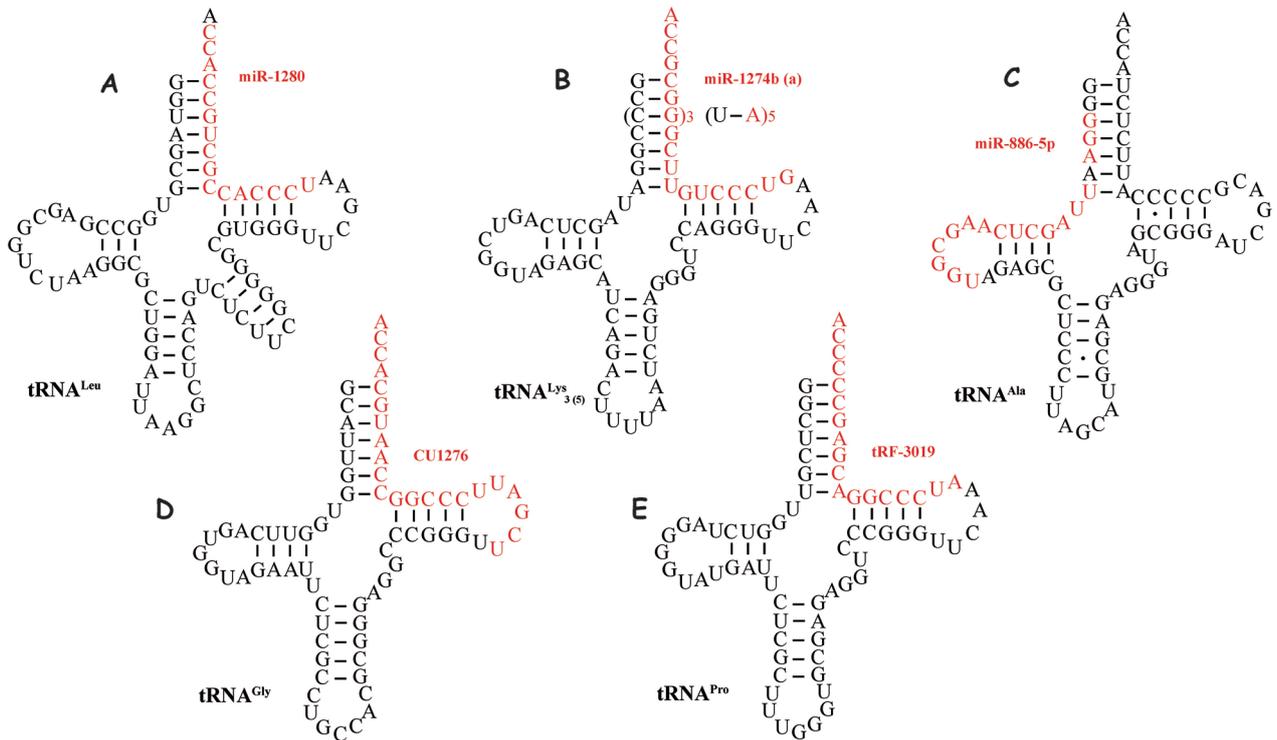
是否存在 tRNA 来源的 miRNA 一直备受争议。核糖核酸内切酶在 tRNA 的 D 环或者 T ψ C 环上的剪切作用产生了大小与 miRNA 相近, 长度约 20 个核苷酸 (nucleotide, nt) 的 tRF。而 miR-1280、miR-1274a (miR-1274b) 和 miR-886-5p 等更被发现在序列上分别与人 tRNA^{Leu} 的 3' 端、tRNA^{Lys} 的 3' 端与 tRNA^{Ala} 的 5' 端等一致 (图 2A~C), 由此引发以上 miRNA 的前体来源与本体存在的问题, 而新版本的 miRNA 数据库——miRbase 已将以上 miRNA 等除名^[9-10]。

最近的一些研究表明, 以上的 miRNA 或者



A: tRNA的三叶草二级结构示意图; B: tRF可分为tRF-1、tRF-3、tRF-5和tRNA半分子(tRNA halves)

图1 tRNA的三叶草结构与tRF的分类



A~C: miR-1280、miR-1274b(a)与miR-886-5p可能分别来源于人成熟形式 tRNA^{Leu}、tRNA^{Lys₃₍₅₎}与tRNA^{Ala}; D: miRNA “CU1276”来源于人成熟形式tRNA^{Gly}; E: tRF-3019来源于人成熟形式tRNA^{Pro}

图2 已被报道的人tRNA来源的tRF

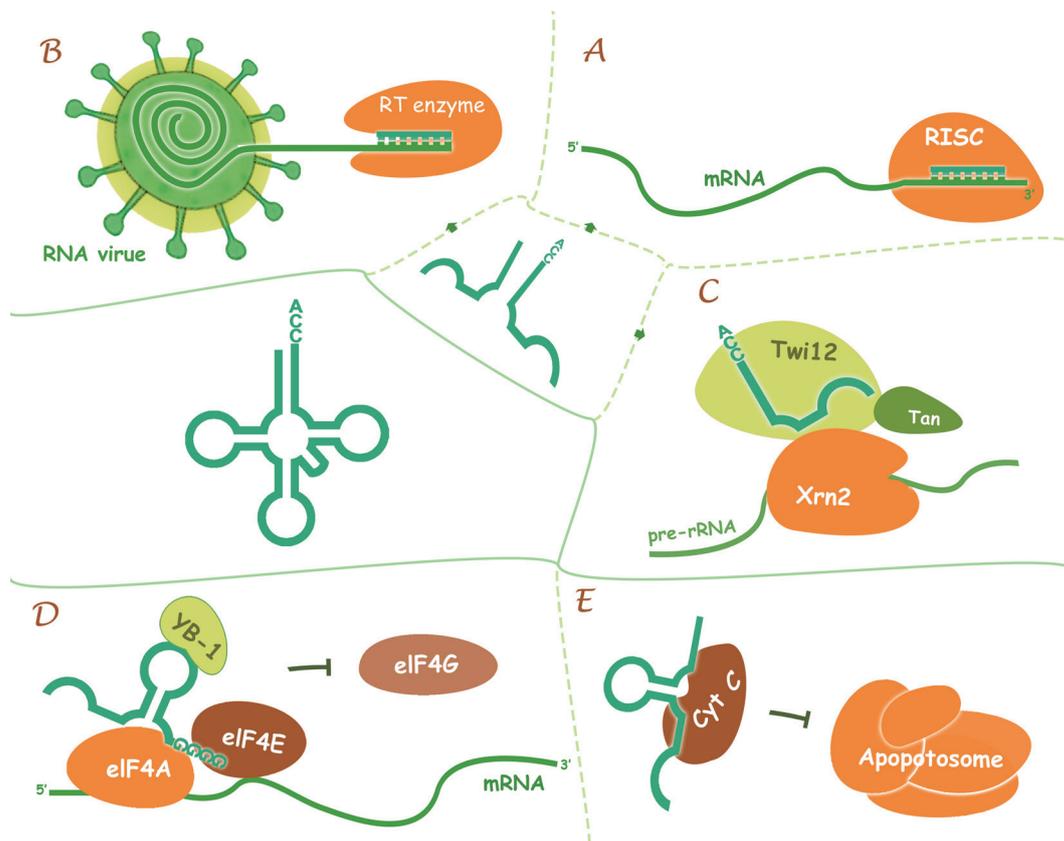
tRNA小片段确实能以miRNA的方式在细胞中发挥生物学功能(图3A)。研究发现,与正常细胞相比,miR-1280在膀胱癌细胞系J82、T24和患者肿瘤样品中的表达量均显著下调;而实验证实miR-1280能够抑制原癌基因ROCK1在J82、T24细胞系中的表达^[11]。在J82或T24细胞系中异位高表达miR-1280导致了G2/M的细胞周期停滞,促进细胞凋亡,表现出抑癌因子的作用。此外,在人宫颈癌细胞系SiHa中miRNA表达谱筛选表明,miR-886-5p的表达量较正常细胞显著降低;而异位高表达miR-886-5p抑制了促凋亡因子Bax的表达,促进细胞增殖;相反地,在SiHa细胞系中敲除miR-886-5p,则提高了Bax的表达量,促进细胞凋亡^[12]。以上研究证实了miR-1280和miR-886-5p都是具有生物学功能的miRNA,能抑制靶标蛋白质的翻译,但它们是来源于tRNA还是pre-miRNA的剪切有待进一步的实验证实。

2013年,来自美国的研究人员在人成熟B细胞中的研究证实了tRNA来源的miRNA的存在^[5]。高通量测序结果发现,成熟B细胞中存在大量的tRNA小片段,而含量最高的片段来源于tRNA^{Gly}

(GCC)的3'末端,被命名为CU1276(图2D)。进一步研究发现,CU1276由Dicer剪切成熟形式的tRNA^{Gly}(GCC)产生,能与Ago蛋白家族的4个成员(Ago1、Ago2、Ago3、Ago4)结合,并能抑制在3'UTR包含了互补序列的荧光素酶mRNA的翻译(图3A)。CU1276特异性地只在生发中心B细胞存在,而不存在于其他衍生的淋巴细胞系中。通过对生发中心B细胞表达谱的筛选,结合生物信息学的作用靶标预测,他们确定了CU1276的一个作用靶标,即在DNA代谢过程中发挥重要作用的RPA1基因。实验证实CU1276能够抑制RPA1基因的表达,从而对细胞增殖和DNA损伤起调节作用。这一发现也证实了在人细胞中存在来源于成熟tRNA的miRNA。

2 tRF作为逆转录病毒基因组复制的引物

tRNA在病毒感染宿主细胞的过程中发挥着重要作用。噬菌体等大DNA病毒在感染细胞时,表达大量自身tRNA调节宿主细胞中基因的表达^[13]。此外,众多的逆转录病毒以宿主细胞中的专一tRNA作为引物,使之结合于病毒RNA基因组的引



A: 某些tRF以miRNA方式结合于mRNA 3'UTR区抑制靶标基因表达; B: 某些tRF作为RNA病毒基因组逆转录引物; C: 四膜虫中的tRF-3参与前体rRNA剪切复合物(TXT)的组装; D: 带寡聚鸟苷酸模块(TOG)的5'端tRNA替代延伸因子eIF4G与mRNA的结合, 抑制蛋白质翻译; E: tRNA半分子通过结合细胞色素C(Cyt C)抑制细胞凋亡

图3 已鉴定的tRF生物学功能

物结合位点 (primer binding site, PBS), 启动逆转录过程。1型人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus type 1, HIV-1) 能以人胞质中的 $tRNA_3^{Lys}$ 作为引物 (图 2B)^[14], 而鼠白血病病毒 (moloney murine leukemia virus) 和劳氏肉瘤病毒 (rous sarcoma virus) 分别以鼠 $tRNA^{Pro}$ 与鸡 $tRNA^{Trp}$ 作为逆转录引物^[15-16]。此外, 人胞质 $tRNA_3^{Lys}$ 还能包被于 HIV-1 病毒中, 且这一过程并不依赖于 PBS 位点, 暗示该 tRNA 与病毒存在着更多的相互作用^[17]。

Ruggero 等^[18] 通过高通量测序发现, 在感染了 1 型人类 T 细胞白血病病毒 (human T-cell leukemia virus type 1, HTLV-1) 的人 T 细胞中存在大量的 tRF。tRF-3019 是丰度最高的 tRF 之一, 来源于人胞质中 $tRNA^{Pro}$ 3' 末端 (图 2E), 而 tRF-3019 在序列上与 HTLV-1 基因组 RNA 的 PBS 位点完全配对。在受感染细胞中分离的病毒颗粒中还发现了 $tRNA^{Pro}$ 和 tRF-3019 的存在, 提示两者都能发挥逆转录引物的功能, 而这一结果也在体外逆转录实验中证实 (图

3B)。这一发现暗示细胞感染病毒时, 特定 tRNA 可能被特异性剪切, 产生不带冗余序列的、去除空间阻碍的完美逆转录引物, 相比整个 tRNA 分子, 可能会明显提高病毒的侵染效率。此外, 来源于 $tRNA^{Lys}$ 3' 末端的 miR-1274b 也有可能行使逆转录引物的功能 (图 2B)。

3 tRF-3作为pre-rRNA剪切复合物(TXT)的成员^[19]

Twi12 是四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*) 生长所必需的 Ago/Piwi 家族蛋白质, 主要分布于细胞核内。研究发现 Twi12 特异性地结合来源于成熟形式 tRNA 3' 端 18~22 nt 的 tRF-3; 结合 tRF-3 的情况下, Twi12 能与 Tan1 蛋白 (Twi-associated novel 1) 和核酸外切酶 Xrn2 形成在细胞核内定位的 TXT 复合物, 该复合物能够加工 rRNA 前体 (pre-rRNA) 为成熟的 rRNA (图 3C)。此外, tRF-3 与 Twi12 的结合是后者进入细胞核发挥功能的必要条件; Twi12

的 RNA 结合结构域的单点突变 Y524E 突变体丧失了结合 tRF-3 的能力后, 就无法入核。tRF-3 作为 pre-rRNA 剪切复合物的骨架调节 rRNA 的剪切成熟, 可能是细胞内蛋白质合成的一种调节途径。当细胞内蛋白质合成水平偏低时, 部分未负载氨基酸的成熟形式 tRNA 被剪切, 产生 tRF-3, 促使 TXT 复合物的组装与入核, 进而加工产生更多的成熟 rRNA 提高蛋白质翻译效率。

4 带有多聚鸟核苷酸模块的tiRNA抑制蛋白质翻译^[20]

细胞受到胁迫时, 会分泌 ANG (人) 和 Rny1 (酵母) 等核酸内切酶, 特异性地在成熟形式 tRNA 的反密码环上进行剪切, 产生 tiRNA。Yamasaki 等^[7]将天然产生的 5' 端 tiRNA (5'-tiRNA) 转染进入骨肉瘤细胞 U2OS 发现, 抑制了蛋白质的翻译水平, 而 3' 端 tiRNA (3'-tiRNA) 则不起作用。体外翻译系统中的进一步实验, 发现只有 5'-tiRNA^{Ala} 和 5'-tiRNA^{Cys} 等能明显地抑制蛋白质的表达^[20], 而并非所有的 5'-tiRNA。为了探索相关机制, 他们使用生物素标记的 mRNA 进行亲和素“拉下”(pull down) 实验, 发现 5'-tiRNA^{Ala} 等特异性地替代了原本结合在 mRNA 5' 端上的延伸因子 eIF4G (图 3D)。序列结构分析表明, 5'-tiRNA 的 5' 末端 4 个或 4 个以上偶联的多聚鸟苷酸模块 (terminal oligoguanine motif, TOG) 是起抑制作用的关键元件; TOG 模块的加入能特异性地赋予 5'-tiRNA^{Met} 原本并不具有的抑制蛋白质翻译的功能。此外, YB-1 蛋白与 5'-tiRNA^{Ala} 的结合增强了对蛋白质翻译的抑制作用。细胞在不利条件下产生 5'-tiRNA 抑制蛋白的翻译, 是细胞降低能量消耗, 提高生存机会的有效的调节机制。

5 渗透胁迫下ANG诱导产生的tRNA半分子通过结合细胞色素C(Cyt C)抑制细胞凋亡^[21]

细胞凋亡是机体发育过程中清除受损细胞, 维持细胞稳态的重要过程, 由胱天蛋白酶 (Caspases) 行使专一性的蛋白质降解功能^[22]。在哺乳动物的细胞中, 细胞凋亡的刺激信号促使 Cyt C 从线粒体释放到细胞质中, 活化胱天蛋白酶激活因子 Apaf-1 (apoptotic-protease-activating factor-1), 继而促进凋亡复合物的组装, 诱导细胞凋亡。之前有研究发现, 不论是细胞质还是线粒体中的 tRNA, 都能与 Cyt C 特异性结合, 抑制 Cyt C 与 Apaf-1 的相互作用, 从而阻止后者的寡聚化和细胞凋亡的启动^[23]。

急剧或者缓慢的超渗透压压力都能诱发上述细胞凋亡途径。Saikia 等^[21]最新的研究发现, 在超渗透压胁迫下, 加入了 ANG 的鼠胚胎成纤维细胞相比未经处理的细胞, 存活率明显提高。深入的研究发现, ANG 可诱导产生 tRNA 半分子, 而其中的 20 种 tRNA 半分子能够竞争性地与释放到细胞质中的 Cyt C 结合, 形成核蛋白复合物, 进而抑制凋亡复合物的形成, 阻止细胞凋亡 (图 3E)。ANG 诱导产生的 tRNA 半分子不仅能够抑制蛋白质翻译, 降低细胞能量消耗, 而且还保留了成熟形式 tRNA 结合 Cyt C 的非经典功能, 阻止细胞凋亡, 这是细胞在不利条件下的自我精细调控, 以细胞内大量的成熟形式 tRNA 和以此来源的 tRNA 半分子库做为细胞压力的缓冲池, 以提高细胞的存活能力。

6 总结与展望

tRNA 的剪切产物能够作为具有生物学功能的新 RNA 分子, 这进一步促进了我们对细胞内基因表达调控作用网络的认识。已有的研究发现, 除了经典的 pre-miRNA 来源的 miRNA, 还存在基因内含子序列来源、snoRNA 来源、shRNA 来源以及 tRNA 前体 3' 序列来源的 miRNA^[24]。而在特定的组织细胞, 甚至是肿瘤细胞中, 越来越多的成熟形式 tRNA 被发现同样可以作为 miRNA 的前体来源。另一方面, 不论是在四膜虫中作为 pre-rRNA 剪切复合物的成员参与 rRNA 的水平调控, 还是在细胞受胁迫等条件下抑制蛋白质的合成, 调控翻译水平, tRF 均表现出了蛋白质翻译过程中新的调控因子的功能, 这拓展了 tRNA 作为遗传信息传递接头分子的角色。此外, tRF 依托细胞内大量的 tRNA, 并继承成熟形式 tRNA 结合 Cyt C 阻止细胞凋亡的能力, 参与了细胞的信号通路调控。在病毒感染过程中, tRF 还参与调节基因组 RNA 的逆转录过程, 暗示着 tRF 具有开发成为病毒感染, 乃至肿瘤等疾病检测指标的潜质, 甚至可以作为药物作用靶点进行药物开发。

细胞内含有大量的 tRNA 分子, 并具有氨基酸和密码子的特异性, 是丰富的核酸序列库。tRNA 的 D 环、T ψ C 环和反密码子环等位点都能被特异性的剪切, 产生序列多样性的 tRF。在特定的组织细胞中, tRF 被特异性地剪切产生, 发挥多重多样的生物学功能。随着研究的更加深入, 我们对 tRF 这一新的调控因子的认识与理解将会得到进一步地加强。

[参 考 文 献]

- [1] Mattick JS, Makunin IV. Non-coding RNA. *Hum Mol Genet*, 2006, 15(1): R17-29
- [2] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(1): 57-63
- [3] Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Townsend M, et al. Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol*, 2004, 5(9): R68
- [4] Thompson DM, Parker R. Stressing out over tRNA cleavage. *Cell*, 2009, 138(2): 215-9
- [5] Maute RL, Schneider C, Sumazin P, et al. tRNA-derived microRNA modulates proliferation and the DNA damage response and is down-regulated in B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(4): 1404-9
- [6] Fu H, Feng J, Liu Q, et al. Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells. *FEBS Lett*, 2009, 583(2): 437-42
- [7] Yamasaki S, Ivanov P, Hu GF, et al. Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. *J Cell Biol*, 2009, 185(1): 35-42
- [8] Lee YS, Shibata Y, Malhotra A, et al. A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). *Gene Dev*, 2009, 23(22): 2639-49
- [9] Schopman NC, Heynen S, Haasnoot J, et al. A miRNA-tRNA mix-up: tRNA origin of proposed miRNA. *RNA Biol*, 2010, 7(5): 573-6
- [10] Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(Database issue): D68-73
- [11] Majid S, Dar AA, Saini S, et al. MicroRNA-1280 inhibits invasion and metastasis by targeting ROCK1 in bladder cancer. *PLoS One*, 2012, 7(10): e46743
- [12] Li JH, Xiao X, Zhang YN, et al. MicroRNA miR-886-5p inhibits apoptosis by down-regulating Bax expression in human cervical carcinoma cells. *Gynecol Oncol*, 2011, 120(1): 145-51
- [13] Miller ES, Kutter E, Mosig G, et al. Bacteriophage T4 genome. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, 67(1): 86-156
- [14] Barat C, Lullien V, Schatz O, et al. HIV-1 reverse transcriptase specifically interacts with the anticodon domain of its cognate primer tRNA. *EMBO J*, 1989, 8(11): 3279-85
- [15] Harada F, Peters GG, Dahlberg JE. The primer tRNA for Moloney murine leukemia virus DNA synthesis. Nucleotide sequence and aminoacylation of tRNA^{Pro}. *J Biol Chem*, 1979, 254(21): 10979-85
- [16] Morris S, Leis J. Changes in Rous sarcoma virus RNA secondary structure near the primer binding site upon tRNA^{Trp} primer annealing. *J Virol*, 1999, 73(8): 6307-18
- [17] Jiang M, Mak J, Ladha A, et al. Identification of tRNAs incorporated into wild-type and mutant human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 1993, 67(6): 3246-53
- [18] Ruggiero K, Guffanti A, Corradin A, et al. Small noncoding RNAs in cells transformed by human T-cell leukemia virus type 1: a role for a tRNA fragment as a primer for reverse transcriptase. *J Virol*, 2014, 88(7): 3612-22
- [19] Couvillion MT, Bounova G, Purdom E, et al. A Tetrahymena Piwi bound to mature tRNA 3' fragments activates the exonuclease Xrn2 for RNA processing in the nucleus. *Mol Cell*, 2012, 48(4): 509-20
- [20] Ivanov P, Emará MM, Villen J, et al. Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation. *Mol Cell*, 2011, 43(4): 613-23
- [21] Saikia M, Jobava R, Parisien M, et al. Angiogenin-cleaved tRNA halves interact with cytochrome c, protecting cells from apoptosis during osmotic stress. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(13): 2450-63
- [22] Jiang X, Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem*, 2004, 73: 87-106
- [23] Mei Y, Yong J, Liu H, et al. tRNA binds to cytochrome c and inhibits caspase activation. *Mol Cell*, 2010, 37(5): 668-78
- [24] Miyoshi K, Miyoshi T, Siomi H. Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production. *Mol Genet Genomics*, 2010, 284(2): 95-103