

DOI: 10.13376/j.cbbs/2017054

文章编号: 1004-0374(2017)04-0406-08

植物pri-miRNA转录及加工过程中的重要因子

宋家会^{1#}, 蔡强^{1,2#}, 莫蓓莘^{1*}

(1 深圳大学生命与海洋科学学院广东省表观遗传重点实验室, 深圳 518060;

2 深圳大学光电工程学院, 光电子器件与系统(教育部/广东省)重点实验室, 深圳 518060)

摘要: MicroRNA(miRNA)是真核生物内源的一类长度为20~24 nt的非编码小RNA,它们通过切割靶标基因mRNA或阻止其翻译在转录后水平调控基因的表达。miRNA广泛参与植物的生长发育、代谢及各类胁迫反应过程,在植物基因表达调控网络中发挥重要作用。编码miRNA的MIR基因首先经过DNA依赖的RNA聚合酶Pol II复合体转录形成pri-miRNA,之后pri-miRNA再经过DCL1加工复合体的一系列加工形成成熟的miRNA。现介绍参与植物pri-miRNA转录和加工过程的重要蛋白及其作用方式,并阐述植物miRNA在转录及转录后水平复杂且精密的调控机制。

关键词: 植物miRNA; MIR基因转录; pri-miRNA加工; 蛋白因子

中图分类号: Q942.6; S813 **文献标志码:** A

The important factors involved in plant pri-miRNA transcription and processing

SONG Jia-Hui^{1#}, CAI Qiang^{1,2#}, MO Bei-Xin^{1*}

(1 Guangdong Key Laboratory of Epigenetic Inheritance, College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen 518060, China; 2 Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province, College of Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract: MicroRNAs (miRNAs), which are about 20~24 nucleotides in length, are a group of endogenous non-coding small RNA in eukaryotic. They regulate gene expression through cleaving their target mRNAs or repressing the translation after gene transcription. MiRNAs play an important role in the regulatory networks of plant genes as they are involved in many biological processes such as development, metabolism, and stress responses. Mature miRNAs are processed from their primary transcripts called primary miRNA transcripts (pri-miRNAs) by DCL1 processing complex, while pri-miRNAs are transcribed by DNA-dependent RNA polymerase II (Pol II) transcriptional complex. Here, we described the critical proteins involved in plant pri-miRNAs transcription and processing, and the sophisticated regulatory mechanisms of plant miRNA at the transcriptional and post-transcriptional level.

Key words: plant miRNA; MIR gene transcription; pri-miRNA processing; protein factors

MicroRNA (miRNA)是真核生物中普遍存在的一类长约20~24 nt的内源非编码小RNA。自1993年Lee等^[1]在线虫(*Caenorhabditis elegans*)中发现了第一个miRNA即*lin-4*以来,人们已在线虫、果蝇、植物以及动物中发现了大量的miRNA。miRNA通过切割与其序列互补配对的靶标基因的mRNA或抑制其翻译,在转录后水平调控基因的表达,在生物体内发挥重要作用^[2-5]。

植物miRNA的产生主要经过以下几个步骤,MIR基因(编码miRNA的基因)先由DNA依赖的RNA聚合酶Pol II复合体转录出初级转录本^[6],即primary miRNA (pri-miRNA), pri-miRNA包含非完

收稿日期: 2016-08-26; 修回日期: 2016-10-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(31571332)

[#]共同第一作者

*通信作者: E-mail: bmo@szu.edu.cn

全互补配对的发夹结构。之后 RNase III 型家族中的蛋白酶 DCL1 (DICLER-LIKE1) 识别发夹结构并对其进行切割, 形成前体 miRNA (pre-miRNA), 并进一步加工成双链 miRNA (miRNA/miRNA*)^[7], 其 3' 末端会被 HEN1 甲基化修饰以维持稳定性^[8]。之后双链 miRNA 中 miRNA* 被降解, 形成成熟的 miRNA。最后, 成熟的 miRNA 与 AGO (ARGONAUTE) 蛋白结合形成 RNA 诱导沉默复合体 RISC (RNA-induced silencing complex), RISC 剪切靶标基因 mRNA 或阻止其蛋白翻译从而抑制基因表达^[9]。

在植物中, miRNA 参与调控多种生理过程, 包括植物的生长发育、代谢以及对各类胁迫的反应等^[10-11]。如 Gandikota 等^[12]发现, miR156/157 可以通过与 *SPL3* (SQUAMOSA promoter binding like protein 3) mRNA 的 3' UTR 互补配对来影响植物从幼年期向成熟期的转换。Chen^[13]发现, miR172 靶向同源异型基因 *AP2* (APETALA2), 在植物花器官形态建成中起关键调控作用。Sunkar 等^[14]首先发现, miR398 靶向胁迫耐受基因, 证明 miRNA 参与植物对胁迫的响应, 随后的研究发现大量的 miRNA 与植物的各类胁迫响应相关。

植物 miRNA 可以靶向许多与生长发育、代谢、信号转导以及生物和非生物胁迫相关的转录因子和调控因子^[11, 15], 是植物基因表达调控网络中的重要成员。同时, miRNA 自身也需要在转录水平和转录后水平被精确调控以保证植物生长发育的正常进行。本文将详细介绍在 miRNA 的转录水平和转录后水平调控中发挥作用的重要蛋白, 以及这些蛋白之间的相互作用和调控方式。

1 miRNA转录水平的调控

1.1 MIR基因的特征

miRNA 编码基因 (MIR) 位于基因间 (intergenic) 或基因内 (intragenic)^[16-18]。基因间的 MIR 是一个独立的转录单位, 有单独的转录启动子, 并且不与其他基因重叠^[16-18]。与编码蛋白质的基因相同, MIR 基因通常也有内含子和外显子, 只有极少数没有内含子^[16-18]。MIR 启动子序列具有 TATA box^[5] 以及至少 21 个顺式作用基序 (cis-regulatory motifs)^[19], 说明 MIR 基因转录会受到许多反式作用因子的调控。基因内 MIR 和管家基因 (host genes) 共转录^[20], 因此不具有独立的转录单位, 需要依靠管家基因的启动子启动转录, 这些管家基因主要编码蛋白质。基因内 MIR 转录出来的 pri-miRNA 普遍位于管家

基因的内含子区域, 有的也位于外显子区域^[20]。

1.2 参与MIR基因转录调控的主要蛋白质

MIR 基因被 DNA 依赖的 RNA 聚合酶 Pol II 复合体转录形成 pri-miRNA (图 1), pri-miRNA 和 mRNA 一样都有 5' 帽子和 3' PolyA 尾巴^[5]。MIR 基因的转录不仅需要 Pol II, 还需要许多与 Pol II 相互作用的转录调控因子的参与, 这些因子与 Pol II 形成转录复合体调控 MIR 基因的转录, 其中 MED20A (Mediator 20A)、MED17 (Mediator 17)、MED18 (Mediator 18)、Cell CDC5 (Division Cycle 5) 以及 Not2a/2b (Negative on TATA less2) 是正调控因子, 它们的功能缺失突变体 *med20a*、*med17* 和 *med18*、*not2a/2b* 以及 *cdc5* 中 pri-miRNA 水平和 miRNA 水平都明显降低^[21-23]。MED20A、MED17 和 MED18 是保守的转录调控复合体 (mediator complex) 中的亚基, 调控复合体可以促进 Pol II 转录蛋白质编码基因。Kim 等^[21]研究发现, 调控复合体也参与 miRNA 的转录调控, MED20A、MED17 和 MED18 主要通过 Pol II 相互作用来调控 MIR 基因的转录, 它们协同作用将 Pol II 招募到 MIR 基因的启动子位置, 帮助 Pol II 准确定位。DNA 结合蛋白 CDC5 是一个含有 MYB 结构域 (MYB domain-containing) 的转录因子^[24]。Zhang 等^[22]利用 CHIP 实验发现 CDC5 和 MIR 基因启动子之间存在互作关系, 并通过 Co-IP 结果进一步验证了 CDC5 与 Pol II 的互作。此外, CDC5 还影响 MIR 基因启动子招募 Pol II。因此, CDC5 既可以影响 MIR 基因启动子的功能, 也会影响 Pol II 在 MIR 基因上的定位^[22]。NOT2a/2b 是 CARBON CATABOLITE REPRESSION4 (CCR4)-NOT 复合体亚基。Wang 等^[23]利用酵母双杂交实验发现 OsNOT2 与 OsDCL1 之间存在互作关系, 由于水稻 *not2* 突变体具有致死性, 难以进行后续实验, 因此, 进一步在拟南芥中发现 NOT2 不仅与 miRNA 合成过程中的多个蛋白互作, 并且与 Pol II 互作, 从而影响 MIR 基因的转录。以上这些结果表明, MED20A、MED17、MED18、CDC5 以及 NOT2a/2b 是 MIR 基因转录过程中的正调控因子; 但是这些转录因子是共同调控转录还是单独起作用仍需进一步研究, 因为它们都与 Pol II 相互作用, 可能还参与蛋白质编码基因转录的调控, 如 *med20a* 和 *not2a* 两个突变体中都发现部分 mRNA 的水平降低^[21, 23]。

和其他依赖于 Pol II 转录的基因一样, MIR 基因还受表观遗传的调控。组蛋白乙酰基转移酶 GCN5 (general control non-repressed protein 5) 可使一

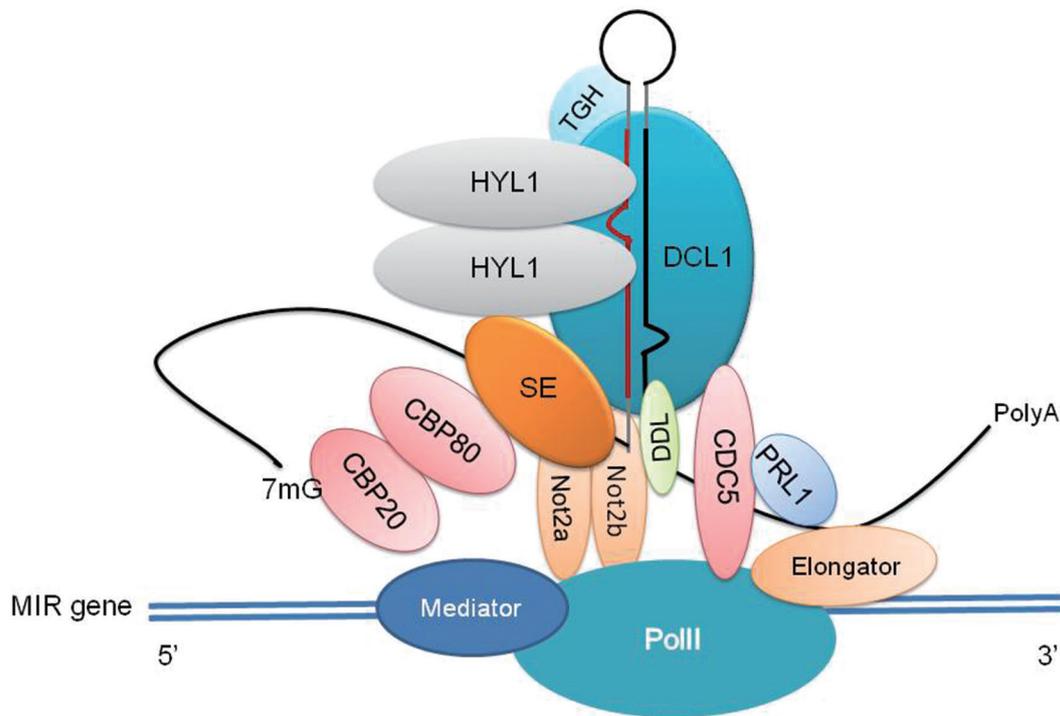


图1 Pol II复合体转录MIR基因以及DCL1复合体加工pri-miRNA的过程

些 MIR 基因位点的组蛋白 H3K14 乙酰化, GCN5 缺失会造成 miRNA 水平降低^[25]。

2015 年, Sun 等^[26]发现了一个新的影响 miRNA 含量的 Dof 型锌指转录因子, 即 CDF2 (cycling DOF transcription factor), CDF2 可直接结合一些 MIR 基因的启动子位点, 从而促进或抑制其转录。

蛋白质编码基因的转录包括转录起始、转录延伸以及转录终止, 但 MIR 基因的转录延伸以及转录终止相关因子鲜有报道, 直到 2015 年, Fang 等^[27]发现延伸因子 (elongator) 参与 miRNA 的转录及加工。他们以表皮毛 (trichome) 集聚表型突变体 (*ema1*) 为材料, 通过基因筛选找出抑制该表型的突变体 (*soe*), 最后发现了两个新的影响 miRNA 合成的因子, 即 ELP2 和 ELP5。两者都是转录延伸因子的亚基, 可影响 Pol II 定位到 MIR 基因的转录位点。

1.3 MIR 基因转录所需的特异因子

一些 miRNA 的转录除了需要上述蛋白参与外, 还需要特异的转录因子参与, 并且受时间、空间和生理的调控。miR156 和 miR172 是控制拟南芥从营养生长 (vegetative) 向生殖生长 (reproductive) 转变的关键因子。miR156 抑制植物由营养生长向生殖生长的转变, 而 miR172 的作用则相反。植物在向生殖生长转变起始之前, MIR156 的转录受到 CCT (MED12) 和 GCT (MED13) 的抑制^[28], miR156 水

平降低。miR156 的靶标是转录因子基因 *SPL9/10* (SQUA-MOSA promoter binding like protein 9 and 10), SPL9/10 促进 *MIR172* 的转录, 诱导植物的时相转换 (phase transition)。miR172 的靶标是 AP2, AP2 也是一个转录因子, 促进 *MIR156* 的转录, 同时, 通过招募另外两个转录抑制因子 LEG (LEUNIG) 和 SEU (SEUSS) 抑制 *MIR172* 的转录^[29]。*MIR156* 和 *MIR172* 的转录除了受以上反馈调节外还受到其他转录因子的影响。MADS 结构域蛋白 (MADS domain containing proteins) AGL15/19 以及 B3 结构域转录因子 FUSCA3 可以促进 miR156 的积累^[30-31]。*MIR172* 的转录需要 SANT 结构域蛋白 PWR (POWER-DRESS) 将 Pol II 招募到其启动子区域来实现^[32]。2015 年, Wang 等^[33]研究发现, 泛素 E3 连接酶 HOS1 (high expression of osmotically responsive genes 1) 可以和 *MIR168B* 启动子结合并促进其转录, miR168 的靶标是 *AGO1*, 而 *AGO1* 是 miRNA 发挥功能所需的一个重要蛋白, 因此, HOS1 通过对 *MIR168B* 的转录调控, 从而对 miRNA 的功能起重要调控作用。*MIR165/MIR166* 在根中的表达受到转录因子 SCR (SCARECROW) 和 SHR (SHORT ROOT) 的调控^[34]。SHR 在维管束 (vascular cylinder) 产生, 并转移到内皮层 (endodermis), 与 SCR 共同促进 *MIR165A* 和 *MIR166B* 的表达^[34]。miRNA 还会受到胁迫的影响。

磷酸盐胁迫下, 转录因子 MYB2 会促进 *MIR399F* 的转录^[35]; 铜缺失条件下, SPL7 会促进 *MIR398B/C* 的表达^[36]。

2 pri-miRNA转录后水平调控

2.1 pri-miRNA转录后修饰

和 mRNA 一样, pri-miRNA 也需要通过修饰来维持其稳定性。细胞周期依赖性蛋白激酶 F;1 (cyclin-dependent kinase F;1, CDKF;1) 是一个调控 Pol II C 端磷酸化的保守蛋白^[37]。Hajheidari 等^[37]发现, 缺失 CDKF;1 之后, pri-miRNA 失去 5' 帽子结构, miRNA 和 pri-miRNA 的量都减少, 说明 CDKF;1 参与 pri-miRNA 的加帽并促进其稳定性。另外, 还有一些蛋白通过和 pri-miRNA 结合促进其稳定性。PRL1 是一个进化上保守的含 WD40 结构域的 RNA 结合蛋白^[38]。Zhang 等^[39]通过体内实验发现, PRL1 可以和 pri-miRNA 结合, 并且 *prl1* 突变体中 pri-miRNA 水平下降, MIR 基因的转录却没有受到影响, 表明 PRL1 是影响 pri-miRNA 稳定性的因子。RNA 结合蛋白 DDL (DAWDLE) 包含 FHA 结构域 (forkhead-associated domain), 该结构域与 DNA 损伤修复、蛋白质降解以及信号转导相关。Yu 等^[40]研究发现, DDL 还参与 miRNA 的合成过程。与 PRL1 一样, DDL 也可以和部分 pri-miRNA 结合并促进其稳定性, 但 DDL 不作用于所有 pri-miRNA。在 *prl1* 和 *ddl* 突变体中, pri-miRNA 量减少, 但 MIR 基因的转录不受影响, 说明 PRL1 和 DDL 都不影响 MIR 基因启动子的功能^[39-40]。

2.2 pri-miRNA转录后加工

2.2.1 pri-miRNA结构对其加工的影响

pri-miRNA 的发夹结构有多种形式, 长度在 50~900 bp^[41-42], 发夹结构的不同会影响 pri-miRNA 加工的模式和效率。根据切割方向和切割次数的不同, pri-miRNA 的加工主要有 4 种机制^[43]。第一种称为 base to loop, pri-miRNA 首先在距离单链 RNA 15 bp 的位置切割产生 pre-miRNA, 然后在靠近环的方向切割产生双链 miRNA^[41, 44-45]。一些长的发夹结构也是通过 base to loop 的方式切割, 只是会在靠近单链的方向切割两次^[43]。第二种称为 loop to base, 即先切割靠近环的方向, 再切割靠近单链 RNA 的方向^[43]。还有一种 loop to base 的方式, 会在 pri-miRNA 的双链区域切割多次, 最后切割靠近单链 RNA 的方向以产生双链 miRNA^[42]。最后一种切割方式是双向切割。Zhu 等^[46]发现, pri-miR166c 有多个分支的环

形结构, 可以从两个方向对 pri-miRNA 进行切割, 但是只有 base to loop 的切割产生 miR166。虽然 pri-miRNA 的二级结构对 miRNA 的成熟有重要作用, 但是还不清楚这些切割机制中是否有蛋白因子起决定作用。

2.2.2 DCL1加工复合体

pri-miRNA 从 MIR 基因转录出后会被 DCL1 复合体加工成 miRNA^[7] (图 1)。DCL1 复合体除了 DCL1 自身以外, 还包含其他许多的蛋白因子。这些蛋白因子和 DCL1 相互作用影响 DCL1 的活性或者促进 pri-miRNA 结合到 DCL1 复合体上。

DCL1 复合体中除了 DCL1 以外的 3 个最主要的蛋白是: G-patch 结构域蛋白 TGH (TOUGH)^[47]、锌指结构蛋白 SE (SERRATE)^[48-49] 和双链 RNA 结合蛋白 HYL1/DRB1 (HYPONASTIC LEAVES 1)^[50]。这 3 个蛋白都可以和 RNA 结合, 参与 pri-miRNA 的切割。TGH 和单链 RNA 结合, 是新发现的 DCL1 复合体中的蛋白成分。2012 年, Ren 等^[47]发现, TGH 可以结合 pri-miRNA 并和 HYL1 互作, 通过影响 DCL1 活性和 pri-miRNA 对 DCL1 的招募来影响切割效率, 但是不影响 miRNA 加工的精确性。SE 是一个含锌指结构域的蛋白, 其 N 端结合在 pri-miRNA 单链区域和双链区域连接的部位, 该蛋白通过 N 端及锌指结构域与 DCL1 结合^[51]。SE 起支架蛋白的作用, 可将多种蛋白以及 pri-miRNA 结合在 DCL1 的催化位点^[52]。Iwata 等^[51]的研究还发现, SE 对 DCL1 切割效率的影响依赖于离子强度, 盐浓度高时细胞内会积累更多的小 RNA。HYL1 是最早发现的协助 DCL1 功能的蛋白^[50]。Yang 等^[53]发现, HYL1 的 N 端有两个结合 RNA 的结构域, 是其发挥功能的部位; 当 HYL1 结合在 pri-miRNA 双链 RNA 部位时会形成二聚体, 如果二聚体结构被破坏, 会导致 pri-miRNA 切割位点发生错误, 但是不会影响 HYL1 与 DCL1 之间的互作。TGH、SE 和 HYL1 这 3 个 RNA 结合蛋白通过与 pri-miRNA 相互作用, 招募 DCL1 到 pri-miRNA 所在位置并维持 pri-miRNA 的特定结构, 以便 DCL1 行使切割功能。HYL1 和 SE 可以促进 DCL1 加工的精确性^[51, 53], 而 TGH 不影响加工的精确性, 但可以促进 DCL1 的活性^[47]。

2.2.3 其他影响DCL1加工复合体功能的因子

研究发现, 许多蛋白质通过和 DCL1 加工复合体的主要成分相互作用间接参与 miRNA 加工过程的调控。HYL1 是一个磷酸化蛋白, Manavella 等^[54]利用快速正向基因筛选法发现类 C 端结构域磷酸酶

1 (C-terminal domain phosphatase-like 1, CPL1) 影响 miRNA 的合成, 进一步的研究发现, CPL1 可以维持 HYL1 的去磷酸化状态, 从而保证 miRNA 加工的精确性, 而 CPL1 本身不影响 DCL1 的活性。CPL1 还可以和 SE 相互作用, 当缺失 SE 时, CPL1 不能和 HYL1 互作, 因此, SE 可能起到招募 CPL1 到 DCL1 加工复合体的作用^[54]。相反, 类分裂酶原蛋白激酶 3 (mitogen-activated protein kinase, MPK3) 可促进 HYL1 的磷酸化, 从而抑制 HYL1 的功能, 在 *mpk3* 突变体中, miRNA 的含量上升^[55]。Cho 等^[56]发现, HYL1 在黑暗处理后会由一个未知的酶降解, 而 E3 泛素连接酶 (E3 ubiquitin ligase)、COP1 (constitutive photomorphogenic 1) 会抑制 HYL1 在光照中被泛素化降解; 在 *cop1* 突变体中, miRNA 含量会由于 COP1 缺失导致 HYL1 被降解而降低, 这很可能是 miRNA 响应光照和黑暗转变的机制。除此之外, Zhan 等^[57]发现, 脯氨酸富集蛋白 (proline-rich protein) SIC (SICKLE) 在亚细胞水平和 HYL1 共定位, *sic* 突变体中 miRNA 含量减少, 说明 SIC 可能影响 HYL1 的功能。帽子结合蛋白 20 (cap binding protein 20, CBP20) 和 CBP80 影响 pri-miRNA 拼接, 可以通过和 SE 互作从而影响 pri-miRNA 的加工^[58-59]。激活性蛋白激酶 C 受体 1 (receptor for activated C kinase 1, RACK1) 的功能是作为蛋白与蛋白之间相互作用的支架, 协助 SE 调控 pri-miRNA 的加工^[60]。

DCL1 作为 pri-miRNA 加工过程中起直接作用的蛋白, 其活性或表达量同样也受许多因子的影响。FHA 结构域蛋白 DDL 具有一个保守的结合磷酸苏氨酸 (phosphothreonine) 的结构域, 可以和 DCL1 的磷酸化苏氨酸 (phosphorylated threonine) 部位相互作用, 使 DCL1 维持磷酸化状态^[61]。缺失 FHA 结构域影响 DDL 与 DCL1 的结合, 从而影响 DCL1 活性, 导致 pri-miRNA 的加工受到抑制。MAC 复合体的主要成分是 CDC5 和 PRL1 这两个蛋白质, 它们都可以通过和 DCL1 以及 SE 互作来调控 miRNA 的成熟过程。Zhang 等^[22]发现 CDC5 通过和 DCL1 的 PAZ 结构域及双链 RNA 结合结构域 (dsRNA binding domains) 的相互作用影响 DCL1 的加工活性, 而 PRL1 的作用主要是协助 CDC5 发挥作用^[39]。另外, 还有 STA1 蛋白, 它是一个拼接因子, 不与 DCL1 互作, 但正调控 DCL1 的表达, 从而促进 pri-miRNA 的加工^[62]。还有研究发现, DCL1 加工复合体的形成也需要转录因子 NOT2 和 MOS2 (MODIFIER OF SNC2) 的参与。Wang 等^[23]发现, NOT2 可与 DCL1

的 PAZ 结构域互作, 作为转录因子, 可能起招募 DCL1 到 pri-miRNA 的作用。双分子荧光互补 (bimolecular fluorescence complementation) 实验证明了 NOT2 与 CBP20/80、SE 等的互作, 这些蛋白都与 pri-miRNA 的加工相关。而 MOS2 不与 DCL1 加工复合体中的蛋白结合, 它通过招募 pri-miRNA 到 DCL1 复合体中的 HYL1 蛋白来影响 pri-miRNA 的加工^[63]。

Elongator 复合物亚基 ELP2、ELP5 和影响转录的 CDF2 也被证实和 DCL1 互作, 从而影响 pri-miRNA 的加工^[26-27]。缺失 Elongator 之后, DCL1 不能准确定位到 DCL1 加工复合体^[27]。

以上这些因子都是通过蛋白质之间相互作用来影响 pri-miRNA 的加工。Francisco-Mangilet 等^[64]发现了一个新的参与 pri-miRNA 加工的蛋白 THO2, 它是 THO/TREX 复合物 (THO/TREX complex) 的核心成员, 但 THO2 并不与参与 miRNA 形成过程的蛋白互作。RNA 免疫共沉淀 (RNA immunoprecipitation) 实验表明 THO2 可结合 pre-miRNA, 在 *tho2* 突变体中, pre-miRNA 不能被招募到 DCL1 加工复合体, 因此 miRNA 含量下降^[64]。

3 结论与展望

自 miRNA 被发现以来, 植物中越来越多的蛋白质被证实参与 miRNA 转录和加工的调控 (表 1)。MIR 基因的转录由 RNA 聚合酶 Pol II 起始, MED20A、MED17、MED18、CDC5 以及 NOT2a/b 形成 Pol II 转录复合体共同参与 MIR 基因转录的调控。MIR 基因的转录过程有一些蛋白质编码基因转录过程中通用的转录因子, 并且 MIR 基因的启动子区域有 TATA box 和顺式元件 (cis-elements)。这暗示 MIR 基因的转录起始可能与蛋白质编码基因的转录起始有相似的调控机制。MIR 基因的转录也受表观遗传的调控, 并在时间、空间以及生理上受到一些特异因子的调控。pri-miRNA 的加工由 DCL1 加工复合体完成, DCL1 复合体包括 DCL1、HYL1、SE 以及新发现的 TGH。其他蛋白因子通过影响 DCL1 复合体主要成分的活性或表达量发挥功能, 如 CPL1、MPK3、COP1、HOS1 和 SIC 等影响 HYL1 功能, RACK1 和 CBP20/80 影响 SE 功能, DDL、CDC5、PRL1、STA1、NOT2、MOS2、CDF2 和 Elongator 等影响 DCL1 的功能, 从而调控 pri-miRNA 加工。

目前人们对于 MIR 基因的转录和 pri-miRNA

表1 参与植物pri-miRNA转录和加工过程的主要蛋白因子

蛋白因子	基因号	具体功能	引用文献
Pol II	AT1G06790	DNA依赖的RNA聚合酶, 转录pri-miRNA	[5, 21-23, 28]
MED20A	AT2G28230	调控复合体亚基, 招募Pol II到MIR基因启动子位点	[21]
MED17	AT5G20170		
MED18	AT2G22370		
CDC5	AT1G09770	DNA结合蛋白, 影响MIR基因启动子功能和PolIII的定位以及DCL1活性	[22]
Not2a/Not2b	AT1G07705 AT5G59710	CCR4-NOT复合体亚基, 影响PolIII功能以及DCL1复合体的形成	[23]
ELP2/ELP5	AT1G49540 AT2G18410	延伸因子亚基, 影响PolIII定位到MIR位点以及DCL1定位到D-body	[27]
CDF2	AT5G39660	Dof型锌指转录因子, 和一些miRNA启动子位点结合, 促进或抑制MIR基因转录, 与DCL1互作	[26]
GCN5	AT3G54610	组蛋白乙酰基转移酶, 对MIR位点的H3K14乙酰化	[25]
MED12/MED13	AT4G00450 AT1G55325	调控复合体亚基, 抑制MIR156的转录	[28]
HOS1	AT2G39810	泛素E3连接酶, 促进MIR168b的转录	[33]
CDKF;1	AT4G28980	细胞周期依赖性蛋白激酶F;1, 对pri-miRNA进行加帽修饰促进其稳定性	[37]
PRL1	AT4G15900	WD40蛋白, 与pri-miRNA结合促进其稳定性, 并协助CDC5发挥作用	[23, 38-39]
DDL	AT3G20550	RNA结合蛋白DAWDLE, 影响pri-miRNA稳定性, 并维持DCL1磷酸化状态, 影响DCL1活性	[40, 61]
DCL1	AT1G01040	切割pri-miRNA和pre-miRNA, 与HYL1、SE、TGH形成DCL1加工复合体	[7, 47, 50-52]
HYL1	AT1G09700	双链RNA结合蛋白, 促进DCL1加工的精确性	[50, 53]
SE	AT2G27100	锌指结构蛋白, 起支架蛋白作用促进加工	[51-52]
TGH	AT5G23080	G-patch结构域蛋白TOUGH, 促进DCL1活性	[47]
CPL1	AT4G21670	C端结构域磷酸酶, 维持HYL1的去磷酸化状态	[54]
MPK3	AT3G45640	类分裂酶原蛋白激酶, 促进HYL1磷酸化	[55]
COP1	AT2G32950	E3泛素连接酶, 阻止HYL1在光中被降解	[56]
SIC	AT4G24500	脯氨酸富集蛋白, 影响HYL1功能	[57]
CBP20/CBP80	AT5G44200 AT2G13540	帽子结合蛋白, 影响pri-miRNA拼接和加工	[58-59]
RACK1	AT1G18080	激活C受体激酶1, 蛋白之间相互作用的支架协助SE	[60]
STA1	AT4G03430	拼接因子, 正调控DCL1的表达	[62]
MOS2	AT1G33520	招募pri-miRNA到DCL1复合体	[63]
THO2	AT1G24706	与pre-miRNA互作, 促进其被招募到DCL1复合体	[64]

加工过程有了一定的了解, 但还有很多问题有待于进一步研究, 如除了已知的蛋白质外, 还有哪些蛋白质也参与 miRNA 的转录和加工过程; MIR 基因转录的延伸和终止的调控机制是什么; 参与蛋白质编码基因转录的延伸因子和终止因子是否也参与 MIR 基因的转录延伸和终止; MIR 基因转录和 pri-miRNA 加工的动态过程是如何进行的; CDC5、NOT2a/b、CDF2 和 Elongator 这些参与 MIR 基因转录与 pri-miRNA 加工的蛋白是如何将这两个过程联系起来。以上这些分子机制若得到进一步的阐明, 将有助于加深人们对 miRNA 转录和加工调控机制的认识和理解。

[参 考 文 献]

- [1] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75: 843-54
- [2] Baulcombe D. RNA silencing in plants. *Nature*, 2004, 431: 356-63
- [3] Voinnet O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, 2009, 136: 669-87
- [4] Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, et al. MicroRNAs in plants. *Genes Dev*, 2002, 16: 1616-26
- [5] Xie Z, Allen E, Fahlgren N, et al. Expression of *Arabidopsis* MIRNA genes. *Plant Physiol*, 2005, 138: 2145-54
- [6] Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, 2004, 23: 4051-

- 60
- [7] Kurihara Y, Watanabe Y. *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 12753-8
- [8] Yu B, Yang Z, Li J, et al. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*, 2005, 307: 932-5
- [9] Baumberger N, Baulcombe DC. *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 11928-33
- [10] Jin D, Wang Y, Zhao Y, et al. MicroRNAs and their crosstalks in plant development. *J Genet Genomics*, 2013, 40: 161-70
- [11] Sunkar R, Li YF, Jagadeeswaran G. Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends Plant Sci*, 2012, 17: 196-203
- [12] Gandikota M, Birkenbihl RP, Hhmann S, et al. The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the *Arabidopsis* SBP box gene *SPL3* prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *Plant J*, 2007, 49: 683-93
- [13] Chen X. A MicroRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development. *Science*, 2004, 303: 2022-5
- [14] Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell*, 2006, 18: 2051-65
- [15] Chuck G, Candela H, Hake S. Big impacts by small RNAs in plant development. *Curr Opin Plant Biol*, 2009, 12: 81-6
- [16] Coruh C, Shahid S, Axtell MJ. Seeing the forest for the trees: annotating small RNA producing genes in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2014, 18: 87-95
- [17] Nozawa M, Miura S, Nei M. Origins and evolution of microRNA genes in plant species. *Genome Biol Evol*, 2012, 4: 230-9
- [18] Cuperus JT, Fahlgren N, Carrington JC. Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *Plant Cell*, 2012, 23: 431-42
- [19] Zhao X, Zhang H, Li L. Identification and analysis of the proximal promoters of microRNA genes in *Arabidopsis*. *Genomics*, 2013, 101: 187-94
- [20] Yang GD, Yan K, Wu BJ, et al. Genomewide analysis of intronic microRNAs in rice and *Arabidopsis*. *J Genet*, 2012, 91: 313-24
- [21] 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: 814-22
- [22] Zhang S, Xie M, Ren G, et al. CDC5, a DNA binding protein, positively regulates posttranscriptional processing and/or transcription of primary microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 17588-93
- [23] Wang L, Song X, Gu L, et al. NOT2 proteins promote polymerase II-dependent transcription and interact with multiple microRNA biogenesis factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2013, 25: 715-27
- [24] Hirayama T, Shinozaki K. A cdc5+ homolog of a higher plant, *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 13371-6
- [25] Kim W, Benhamed M, Servet C, et al. Histone acetyltransferase GCN5 interferes with the miRNA pathway in *Arabidopsis*. *Cell Res*, 2009, 19: 899-909
- [26] Sun Z, Guo T, Liu Y, et al. The roles of *Arabidopsis* CDF2 in transcriptional and posttranscriptional regulation of primary microRNAs. *PLoS Genet*, 2015, 11: e1005598
- [27] Fang X, Cui Y, Li Y, et al. Transcription and processing of primary microRNAs are coupled by Elongator complex in *Arabidopsis*. *Nat Plants*, 2015, 1: 15075
- [28] Gillmor CS, Silva-Ortega CO, Willmann MR, et al. The *Arabidopsis* mediator CDK8 module genes CCT (MED12) and GCT (MED13) are global regulators of developmental phase transitions. *Development*, 2014, 141: 4580-9
- [29] Yant L, Mathieu J, Dinh TT, et al. Orchestration of the floral transition and floral development in *Arabidopsis* by the bifunctional transcription factor *APETALA2*. *Plant Cell*, 2010, 22: 2156-70
- [30] Serivichyaswat P, Ryu HS, Kim W, et al. Expression of the floral repressor miRNA156 is positively regulated by the AGAMOUS-like proteins AGL15 and AGL18. *Mol Cells*, 2015, 38: 259-66
- [31] Wang F, Perry SE. Identification of direct targets of FUSCA3, a key regulator of *Arabidopsis* seed development. *Plant Physiol*, 2013, 161: 1251-64
- [32] Yumul RE, Kim YJ, Liu X, et al. Powerdress and diversified expression of the *MIR172* gene family bolster the floral stem cell network. *PLoS Genet*, 2013, 9: e1003218
- [33] Wang B, Duan CG, Wang X, et al. HOS1 regulates Argonaute1 by promoting transcription of the microRNA *gene-MIR168b* in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2015, 81: 861-70
- [34] Carlsbecker A, Lee JY, Roberts CJ, et al. Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature*, 2010, 465: 316-21
- [35] Baek D, Kim MC, Chun HJ, et al. Regulation of miR399f transcription by AtMYB2 affects phosphate starvation responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2013, 161: 362-73
- [36] Yamasaki H, Hayashi M, Fukazawa M, et al. SQUAMOSA promoter binding protein-like 7 is a central regulator for copper homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2009, 21: 347-61
- [37] Hajheidari M, Farrona S, Huettel B, et al. CDKF;1 and CDKD protein kinases regulate phosphorylation of serine residues in the C-terminal domain of *Arabidopsis* RNA polymerase II. *Plant Cell*, 2012, 24: 1626-42
- [38] Nemeth K, Salchert K, Putnoky P, et al. Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 1998, 12: 3059-73
- [39] Zhang S, Liu Y, Yu B. PRL1, an RNA-binding protein, positively regulates the accumulation of miRNAs and siRNAs in *Arabidopsis*. *PLoS Genet*, 2014, 10: e1004841
- [40] Yu B, Bi L, Zheng B, et al. The FHA domain proteins DAWDLE in *Arabidopsis* and SNIP1 in humans act in small RNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008,

- 105: 10073-8
- [41] Cuperus JT, Montgomery TA, Fahlgren N, et al. Identification of MIR390a precursor processing-defective mutants in *Arabidopsis* by direct genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 466-71
- [42] Bologna NG, Mateos JL, Bresso EG, et al. A loop-to-base processing mechanism underlies the biogenesis of plant microRNAs miR319 and miR159. *EMBO J*, 2009, 28: 3646-56
- [43] Bologna NG, Schapire AL, Zhai J, et al. Multiple RNA recognition patterns during microRNA biogenesis in plants. *Genome Res*, 2013, 23: 1675-89
- [44] Werner S, Wollmann H, Schneeberger K, et al. Structure determinants for accurate processing of miR172a in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*, 2010, 20: 42-8
- [45] Song L, Axtell MJ, Fedoroff NV. RNA secondary structural determinants of miRNA precursor processing in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2010, 20: 37-41
- [46] Zhu H, Zhou Y, Castillo-González C, et al. Bidirectional processing of pri-miRNAs with branched terminal loops by *Arabidopsis* Dicer-like 1. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20: 1106-15
- [47] Ren G, Xie M, Dou Y, et al. Regulation of miRNA abundance by RNA binding protein TOUGH in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 12817-21
- [48] Lobbes D, Rallapalli G, Schmidt DD, et al. SERRATE: a new player on the plant microRNA scene. *EMBO Rep*, 2006, 7: 1052-8
- [49] Yang L, Liu Z, Lu F, et al. SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2006, 47: 841-50
- [50] Vazquez F, Gascioli V, Crété P, et al. The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. *Curr Biol*, 2004, 14: 346-51
- [51] Iwata Y, Takahashi M, Fedoroff NV, et al. Dissecting the interactions of SERRATE with RNA and DICER-LIKE 1 in *Arabidopsis* microRNA precursor processing. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: 9129-40
- [52] Machida S, Chen HY, Yuan YA. Molecular insights into miRNA processing by *Arabidopsis thaliana* SERRATE. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: 7828-36
- [53] Yang X, Ren W, Zhao Q, et al. Homodimerization of HYL1 ensures the correct selection of cleavage sites in primary miRNA. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 12224-36
- [54] Manavella P, Hagmann J, Ott F, et al. Fast-forward genetics identifies plant CPL phosphatases as regulators of miRNA processing factor HYL1. *Cell*, 2012, 151: 859-70
- [55] Raghuram B, Sheikh AH, Rustagi Y, et al. MicroRNA biogenesis factor DRB1 is a phosphorylation target of mitogen activated protein kinase MPK3 in both rice and *Arabidopsis*. *FEBS J*, 2015, 282: 521-36
- [56] Cho SK, Chaabane SB, Shah P, et al. COP1 E3 ligase protects HYL1 to retain microRNA biogenesis. *Nat Commun*, 2014, 5: 5867
- [57] Zhan X, Wang B, Li H, et al. *Arabidopsis* proline-rich protein important for development and abiotic stress tolerance is involved in microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 18198-203
- [58] Kierzkowski D, Kmiecik M, Piontek P, et al. The *Arabidopsis* CBP20 targets the cap-binding complex to the nucleus, and is stabilized by CBP80. *Plant J*, 2009, 59: 814-25
- [59] Kim S, Yang JY, Xu J, et al. Two cap-binding proteins CBP20 and CBP80 are involved in processing primary microRNAs. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49: 1634-44
- [60] Speth C, Willing EM, Rausch S, et al. RACK1 scaffold proteins influence miRNA abundance in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2013, 76: 433-45
- [61] Engelsberger WR, Schulze WX. Nitrate and ammonium lead to distinct global dynamic phosphorylation patterns when resupplied to nitrogen-starved *Arabidopsis* seedlings. *Plant J*, 2012, 69: 978-95
- [62] 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: 1984-97
- [63] Wu X, Shi Y, Li J, et al. A role for the RNA-binding protein MOS2 in microRNA maturation in *Arabidopsis*. *Cell Res*, 2013, 23: 645-57
- [64] Francisco-Mangilet AG, Karlsson P, Kim MH, et al. THO2, a core member of the THO/TREX complex, is required for microRNA production in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2015, 82: 1018-29