

DOI: 10.13376/j.cblls/2018145

文章编号: 1004-0374(2018)11-1202-08



段恩奎, 博士, 中国科学院动物研究所干细胞与生殖生物学国家重点实验室研究员, 中科院百人计划优秀学者, 兼任 *J Biol Chem*、*Curr Zool*、《生命科学》编委和中国妇幼健康研究会副会长, 曾荣获第七届中华人口奖·科技奖、全国人口和计划生育优秀科技成果奖一等奖(第一完成人)、全国妇幼健康科技奖(自然科学奖)一等奖(第一完成人)、中国科学院优秀导师等多项荣誉。主要研究方向为胚胎植入和获得性性状的表现遗传, 先后发表 SCI 论文 130 余篇, 其中在 *Science*、*Nat Rev Genet*、*Nat Cell Biol*、*Cell Res*、*Trends Mol Med*、*Development*、*Mol Aspect Med*、*J Mol Cell Biol*、*J Biol Chem* 等国际重要刊物发表 10 余篇, 获得授权国家发明专利 3 项。他领导的团队发现在成熟精子和血清中高度富集一类 tRNA 来源的新型小 RNA——tsRNAs, 随后与合作者通过高脂饮食小鼠模型证明, 精子 tsRNAs 及其 RNA 修饰能作为表观遗传信息载体介导父代获得性代谢紊乱性状向子代的传递, 并且发现 RNA 甲基转移酶 DNMT2 通过调控精子“RNA 编码指纹”参与了精子 RNA 介导的获得性遗传, 从精子小 RNA、RNA 修饰及 RNA 修饰酶的角度为获得性遗传的研究打开了一个新视角。

精子RNA及RNA修饰在获得性遗传中的研究进展

张云芳^{1,2,3}, 张莹¹, 陈琦^{2*}, 段恩奎^{1*}

(1 中国科学院动物研究所干细胞与生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101; 2 美国内华达大学雷诺医学院, 内华达州 89503; 3 中国人民解放军陆军军医大学新桥医院血液科, 重庆 400037)

摘要: 越来越多的证据表明, 上一代在环境压力下产生的某些获得性性状可以“记忆”在配子中, 并以一种不依赖 DNA 序列的方式传递给下一代, 这种现象被称为获得性遗传。然而, 关于精子中介导获得性遗传现象的分子机制尚不清楚。近年来, 随着精子 RNA 领域的发展, 我们实验室率先发现精子中一类来源于成熟 tRNA 的小 RNA (tRNA-derived small RNAs, tsRNAs) 及其 RNA 修饰可以作为一种新型的表观遗传信息载体, 介导父代获得性代谢紊乱性状向子代传递。此外, 我们进一步发现了调控精子 RNA 介导获得性遗传的关键分子——tRNA 甲基转移酶 DNMT2, 从 RNA 修饰及修饰酶的角度为获得性遗传的机制研究打开了新思路。鉴于该领域的迅速发展, 该文拟从精子 tsRNAs、RNA 修饰以及 DNMT2 的角度综述近年来精子 RNA 及 RNA 修饰介导的获得性遗传机制的研究进展。

关键词: 精子 tsRNA; RNA 修饰; DNMT2; 表观遗传

中图分类号: R697.22; R698.2 **文献标志码:** A

Advance in sperm RNA and RNA modification mediated epigenetic inheritance

ZHANG Yun-Fang^{1,2,3}, ZHANG Ying¹, CHEN Qi^{2*}, DUAN En-Kui^{1*}

收稿日期: 2018-10-09

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFA0500903); 国家自然科学基金项目(31671568, 81490742); 陆军军医大学第五类人才引进启动经费

*通信作者: E-mail: cqj@med.unr.edu(陈琦); duane@ioz.ac.cn(段恩奎)

(1 State Key Laboratory of Stem Cell and Reproduction Biology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China;
2 University of Nevada, Reno School of Medicine, NV 89503, USA;
3 Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Army Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Increasing evidence showed that parental environment exposure can be stored and transmitted to the next generation by germ cells in a DNA-sequence independent manner, which was known as acquired epigenetic inheritance. However, the underlying molecular mechanism is still unclear. Our recent work firstly revealed that sperm tRNA derived small RNAs (tsRNAs), along with their RNA modifications, could act as an ‘epigenetic information carrier’, to deliver paternal acquired metabolic disorders to the offspring. Following this clue, we further found that a tRNA m⁵C methyltransferase, *Dnmt2*, was a key regulator of sperm RNA mediated epigenetic inheritance, which suggested a new direction for future studies of the underlying molecular mechanisms. Due to the rapid development of this hot field, here we provided an overall view on sperm tsRNA and RNA modifications, along with the discovery of *Dnmt2*, in mediating paternally acquired epigenetic inheritance.

Key words: sperm tsRNAs; RNA modifications; DNMT2; epigenetic inheritance.

早在 19 世纪, Jean Baptiste Lamarck (拉马克) 就曾指出亲代由于环境暴露所产生的一些获得性性状能够经生殖细胞传递给子代, 从而提出了获得性遗传理论^[1]。近年来, 随着表观遗传学领域的迅速发展, 越来越多的证据表明, 上一代的某些获得性性状(如精神紧张、化合物接触、饮食改变导致的代谢性疾病等)能够通过改变生殖细胞的表观遗传信息对下一代的表型产生深远的影响^[2-4], 引起了人们对一直饱受争议的“拉马克学说”的重新认识和思考^[5]。其中, 最受关注的是对介导获得性遗传分子载体的鉴定及其传递机制的研究, 同时这也是该领域的研究难点。

1 介导父代获得性遗传的分子载体

在获得性性状代际/跨代遗传中, 父母双方的环境暴露所产生的表型都可能对子代的性状产生影响, 但由于母体的获得性性状可以通过多个层面(如卵子、妊娠期子宫内环境、胎盘状况以及产后哺乳等)对后代的表型产生影响, 很难对母体环境暴露后产生的表观遗传机理进行清晰的阐述。相反, 由于父亲对子代的影响因素相对单一, 仅为一条精子(尚不能排除精液的影响), 且父代生殖系统不断经历生精周期, 使得精子对环境、饮食因素的影响更加敏感, 因此, 精子成为父源因素导致的获得性遗传中相对清晰的研究对象。目前在父代获得性遗传现象中, 已有证据表明精子中的 DNA 甲基化、组蛋白修饰以及 RNA 等都可能作为表观遗传信息传递的载体, 介导获得性表观遗传信息在精子中的存储及代间传递^[5-7]。然而, 由于在哺乳动物中, DNA 甲基化会在原始生殖细胞以及早期胚胎发育

阶段进行重编程, 而精子中绝大多数的组蛋白会在精子发生后被鱼精蛋白所替代, 降低了 DNA 甲基化和组蛋白修饰作为表观遗传信息载体的可能性。但是, 随着表观遗传学的不断发展, 已有研究表明, 一些 DNA 甲基化位点或者染色质上的组蛋白修饰等印记信息可以逃逸配子生成和胚胎发育过程中的表观遗传信息重编程, 从而被保留下来并介导了子代对上一代获得性性状的遗传及向下传递(注: 组蛋白修饰已经在线虫和酵母中被充分证明能够作为表观遗传信息载体介导特定性状的跨带传递)。与此同时, 另一部分学者则在寻找除了 DNA 甲基化和组蛋白修饰等之外的表观遗传信息载体, 并探究其作用机理。

2 父代获得性遗传的信息载体——精子RNA

近年来, 关于精子非编码小 RNA 的发现及其在生物调控过程中的重要作用, 使得人们开始思考: 由于 RNA 不参与表观遗传信息重编程且能作为反式作用调控因子, 因此, 精子中 RNA 可能作为表观遗传信息的分子载体, 介导上一代获得性性状向子代传递。

2.1 *kit* RNA

法国的 Minoo 实验室最早开展哺乳动物精子 RNA 参与遗传信息传递方面的研究, 也是研究精子 RNA 介导非孟德尔遗传现象的先驱。早在 2006 年, 该实验室在研究 *kit* 基因敲除杂合子小鼠产生的旁突变 (paramutation) 表型时, 发现精子 RNA 可以介导“白尾巴”的旁突变表型向子代的传递。在他们的研究中发现, *kit* 敲除的杂合子小鼠交配所产生的野生型后代也会出现一种杂合子的“白尾巴”

表型, 并且这种“白尾巴”表型向子代的传递并不符合孟德尔遗传定律^[8], 类似于植物中常见的旁突变遗传现象^[9]。进一步研究发现, *kit* 敲除的杂合子雄鼠睾丸和精子中出现了一些异常表达的 *kit* mRNA 片段, 把杂合子小鼠的精子总 RNA 注射到野生型的正常受精卵里导致子代小鼠也出现类似于旁突变的“白尾巴”表型, 提示精子 RNA 可以作为一种遗传信息载体介导父代旁突变表型向子代传递^[8]。这项研究一方面掀起了精子 RNA 功能研究的热潮, 另一方面也为获得性遗传的研究开创了新的研究方向。

2.2 miRNA和piRNA

miRNA 是目前研究得最为广泛和清楚的非编码小 RNA, 在细胞正常的生命活动以及疾病发生等过程中具重要的调控作用^[10]。近年来发现, miRNA 可能也参与了精子 RNA 介导的获得性遗传。Rodgers 等^[11]发现, 长期接受慢性应激的父代小鼠通过交配所产生的后代中下丘脑-垂体-肾上腺应激轴的反应活性降低, 并且这些父代小鼠精子中 9 种 miRNA 的表达出现了显著的上调。研究人员进一步通过显微注射的方式将这 9 种 miRNA 注入到正常受精卵中, 发现所产生的后代小鼠也出现了同样的应激反应失调的表型, 提示精子的 miRNA 可能介导父代获得性应激失调表型向子代的传递^[12]。此外, Minoo 实验室还发现, 通过显微注射的方式, 将 microRNA 注入到正常的受精卵会引起子代产生不同的表型, 注射以 *kit* mRNA 为靶标的 miRNA-221 和 miRNA-222, 能够引起子代小鼠出现 *kit* 旁突变“白尾巴”样表型, 其中以注射 miRNA-221 双链 RNA 组效果最为显著^[8]; 注射 miRNA-124 引起子代小鼠个体体积增大约 30%^[13]; 注射 miRNA-1 引起子代小鼠心脏体积增大^[14]。然而, 以上这些通过受精卵显微注射探索 miRNA 介导的表观遗传研究依然存在一些问题。由于在这些研究中, 受精卵注射所使用的 miRNA 均为化学合成的 RNA, 一方面, 从 RNA 的注射量上很难把握其一致性; 另一方面, 也无法预测这些 RNA 上的 RNA 修饰信息对子代性状所产生的影响, 因此, 很难真正模拟精子中 miRNA 在获得性遗传中的作用和功能意义。此外, 一些研究还发现父代生活方式或饮食变化都能够引起精子中 piRNA 表达水平的显著变化^[15-16], 提示 piRNA 在哺乳动物中可能也具有表观遗传信息储存的能力, 或许在某种程度上也具有介导获得性表型向子代的传递的能力。

3 介导获得性遗传的信息载体——精子tsRNAs

我们实验室于 2012 年在哺乳动物成熟精子中首次发现了一类来源于成熟 tRNA 5' 端, 序列长度富集在 30~34 nt 的新型小 RNA, 我们将这一类小 RNA 命名为 tRNA 来源的小 RNA——tsRNAs (tRNA-derived small RNAs, tsRNAs)。该类小 RNA 在不同物种精子中高度保守且大量富集, 并且可以作为一种父源信息在受精时进入卵子^[17]。通过对小鼠不同组织中 tsRNAs 表达水平探索研究, 我们发现除了精子, tsRNAs 在脊椎动物血清中同样保守且大量存在, 并且在机体炎症应激等情况下呈现敏感的动态变化^[18]。我们推测 tsRNAs 或许能感知机体所受的环境刺激, 并将之整合成一种环境信息存储在精子中, 作为表观遗传信息载体, 将环境诱导的获得性性状传递给子代。进而, 我们以高脂饮食诱导的父代代代谢紊乱小鼠为模型, 开展了精子 tsRNAs 介导获得性表观遗传的研究。通过精子 RNA 胚胎显微注射并对其后代糖代谢表型进行分析, 我们发现, 高脂饮食小鼠的精子 RNA 具有储存并传递父代获得性性状的表观遗传信息的能力, 并进一步确认了精子 tsRNAs (30~40 nt) 是精子 RNA 介导获得性性状代际传递的有效信息载体成分^[19]。此外, 美国 Oliver Rando 实验组在低蛋白饮食模型中同样发现, 父代营养水平的变化可以引起精子中 tsRNAs 表达水平的改变, 这种变化了的精子 tsRNAs, 通过显微注射入正常的受精卵, 能够影响早期胚胎中基因的表达水平, 提示父代低蛋白饮食也可通过精子 tsRNAs 进行代际遗传^[20]。此外, 在一项人类肥胖表型研究中, 发现肥胖男性精子中 tsRNAs 的表达水平同样呈现出敏感的动态变化, 并且经过切胃手术减肥后, 肥胖男性精子中 tsRNAs 的表达水平恢复到了正常男性水平, 提示环境因素引起的精子表观遗传信息的可逆塑性^[15]。

3.1 精子tsRNAs对早期胚胎的调控

tsRNAs 作为成熟精子中含量最为丰富的小 RNA, 研究其在早期胚胎中的作用机制对于阐明精子小 RNA 介导的表观遗传信息是如何在早期胚胎发育过程中被解读, 最终影响子代表型, 使之具有父代由于环境影响所产生的获得性表型, 具有重要的研究意义。前期关于 tsRNAs 功能的研究中, 人们一度认为 tsRNAs 只是 tRNA 的代谢产物, 是机体为了清除多余损伤的 tRNA 而产生的一种随机降解产物^[21]。然而, 越来越多的证据表明, tsRNAs

是具有调控功能的小 RNAs^[5,22-24]。随着对其功能研究, 发现这类 tsRNAs 具有重要的生物学调控功能, 参与了核糖体生物合成途径、机体 DNA 损伤应答、癌症发生, 调控细胞增殖、凋亡以及精子 RNA 介导的表观遗传信息传递等^[5,22-24]。其作用机理具有高度的多样性, tsRNA 既可以像 miRNA 一样, 通过与 AGO 类蛋白结合^[25], 对其靶基因进行转录后沉默的调控; 同时, tsRNAs 还可以竞争性地与翻译起始复合物结合^[26], 抑制蛋白质的翻译, 并促进应激颗粒的装配^[27]。2017年, Schorn 等^[22]的研究表明, tsRNAs 在小鼠 ES 细胞中参与转座子 (transposon element) 活性的调控。他们发现, 在 setdb-1 (组蛋白 H3K9me3 的甲基转移酶, 抑制 TE 活性) 敲除的小鼠 ES 细胞中, 成熟 tRNA 3' 末端来源的 18 nt 和 22 nt 的小 RNA 表达量上升, 这类 tsRNAs 能够与一些年轻及活动性的 ERV 序列互补, 抑制具有长末端重复序列的逆转录转座子。其中, 18 nt 的 tsRNAs 通过与 tRNA 竞争性地结合 ERV 的引物结合位点区序列 (PBS), 使得 ERV 转座子 RNA 没有正确的引物 (正常情况下, tRNA 作为引物介导 ERV 的逆转录过程), 其反转录过程受阻, 从而抑制转座。有趣的是, 序列相同而长度不同的 22-nt 3' tsRNA 能够通过完全不同的作用机制抑制 TE 活性^[28]。22-nt 3' tsRNA 通过非严格序列互补配对方式, 以类似于 microRNA 调控转录后基因沉默的方式调控逆转录转座子转录本的翻译过程, 从而抑制转座活性^[28]。之前有研究提示, 精子 tsRNAs 能够在受精卵中参与逆转录转座子调控的一系列基因表达^[20], 从而有可能影响子代代谢相关基因的表达。此外, 还有研究表明, tsRNAs 还参与调控核糖体蛋白的生成以及 mRNA 的翻译过程, 进而影响细胞整体的蛋白质翻译进程^[25,29-30]。

3.2 RNA修饰对tsRNAs调控功能的影响

tRNA 作为连接 mRNA 和蛋白质之间的纽带, 正确的 RNA 三级结构折叠对其功能的发挥具有重要的作用。成熟的 tRNA 上含有数十种 RNA 修饰^[31], 这些 RNA 修饰直接调控了 tRNA 对 mRNA 上密码子的识别^[32-33]。此外, RNA 修饰对 tRNA 自身结构的折叠及二级结构形成具有至关重要的作用, 如 tRNA 58A 位的 m¹A 修饰缺失会导致 tRNA 不能正常折叠形成倒 L 形结构^[33], 从而无法发挥作用。我们发现, RNA 修饰同样对 tsRNAs 的结构和功能具有重要的调控作用。通过对 3' tsRNA^{Gly} 不同位点 m⁵C 修饰的研究发现, 在保持序列不变, 单个 m⁵C

修饰的差异能够直接影响 3' tsRNA^{Gly} 二级结构并影响其对核酸酶抵抗的能力^[34]。进一步发现这种 RNA 修饰对 tsRNAs 稳定性的调控并不依赖于 tsRNAs 序列上 m⁵C 修饰的数量, 而是与该修饰的位置有关。因此, 我们推测特定位点的 m⁵C 对调控 tsRNAs 的二级结构以及 RNA 稳定性的维持具有更重要的影响, 这也提示 RNA 结构对 tsRNAs (以及其他种类的小 RNA) 在细胞中稳定性可能具有重要的调控作用^[34]。我们还发现, 序列相同、RNA 修饰不同所造成 RNA 二级结构不同的 tsRNAs 在细胞不同信号通路中表现出调控差异。例如, 带有不同 m⁵C 修饰的 3' tsRNA^{Gly} 在细胞中对核糖体生成信号通路具有截然不同的调控作用, 而在三羧酸循环信号通路中却与此 RNA 修饰无显著相关性, 进一步提示 tsRNAs 介导细胞生物学功能调控的复杂性^[34]。RNA 修饰影响 tsRNAs 功能的作用机理很有可能是由于 tsRNAs 上某些 RNA 修饰的变化可以影响 tsRNA 二级结构的折叠, 而 tsRNA 二级结构的改变, 在某些信号通路中一方面直接影响了某些 RNA、DNA 和蛋白质对 tsRNAs 的识别和靶定作用, 从而改变了其生物学调控能力^[5,35]; 另一方面, tsRNAs 上 RNA 修饰和结构的变化可能直接影响了其对细胞核酸酶降解的抵抗能力, 导致 tsRNAs 在细胞中的半衰期延长, 从而改变了其作用时间或者延长了对某一生物学过程的调控, 导致了不同的调控结果。近期的一项研究表明, tsRNAs 第 8 位假尿嘧啶修饰的存在与否, 调控了相关结合蛋白对 tsRNAs 的识别和结合能力, 进而影响了 tsRNAs 调控的翻译抑制功能发挥^[26]。其中, 带有第 8 位假尿嘧啶修饰的 tsRNAs 更倾向于与 PABPC1 蛋白结合, 而第 8 位是尿嘧啶的 tsRNAs 则更倾向于与 YBX1 蛋白结合。研究还发现在人胚胎干细胞中通过敲除假尿嘧啶合成酶 PUS7 改变 tsRNAs 上假尿嘧啶修饰, 调控了干细胞中蛋白质的合成, 进而影响了干细胞在自我更新和细胞分化之间的平衡。具体的作用机制如下: 研究人员发现 PUS7 能够结合不同种类的 tRNA, 尤其是具有 5' TOG (Terminal Oligo Guanine) 序列的 tRNA, 并且能够对这些 tRNA 第 8 位尿嘧啶进行假尿嘧啶修饰, 带有 U8 假尿嘧啶修饰的 5' TOG-tsRNAs 能够被翻译起始因子 eIF4A/F 识别并结合, 从而抑制翻译起始; 而不带有 U8 假尿嘧啶修饰的 5' TOG-tsRNAs 却不能被翻译起始因子 eIF4A/F 识别, 从而无法发挥功能。在 PUS7 敲除的细胞中, 富含 5' TOG 的 tsRNAs 大量减少, 并且

tsRNAs 对蛋白质合成起始的抑制降低, 从而导致了细胞整体翻译水平升高, 对干细胞自我更新与分化之间的平衡产生影响^[26]。

4 tRNA甲基转移酶DNMT2在获得性遗传中的研究

近年来, RNA 修饰作为一个新兴研究热点, 在机体不同的生理病理状态下呈现可逆动态变化, 参与调控机体多种代谢活动, 具有重要的研究价值^[36-38]。我们最新的研究表明, 精子 RNA 上 m⁵C 修饰对于 tsRNAs 介导的获得性遗传信息向子代的传递具有重要的作用^[34]。目前广泛研究的 tRNA 上 m⁵C 的修饰酶有两种, 一种是 NSUN2, 另一种是 DNMT2。其中, *Nsun2* 敲除会导致小鼠雄性不育^[39], 不利于进行精子 RNA 介导的获得性遗传的研究, 而 *Dnmt2* 敲除小鼠则没有明显表型^[40]。作为一个 tRNA 甲基转移酶, DNMT2 是一个属于 DNA 甲基转移酶 (DNMT) 家族的 RNA 修饰酶^[41]。关于 DNMT2 催化功能的发现颇具传奇色彩, 由于该酶具有典型的 DNA 甲基转移酶的催化结构域, 但其在甲基化 DNA 方面的能力微弱, 因此关于 DNMT2 是否具有甲基化 DNA 的能力在过去一直颇有争议^[42-43]。

4.1 DNMT2的功能研究

Dnmt2 基因在其催化特性以及表观遗传调控方面的功能研究和发现过程几经波折。在过去 20 多年中, 对 DNMT2 的功能研究经历了“困惑期”(认为它是 DNA 甲基化酶)、“顿悟期”(揭示它对 tRNA 特定位点甲基化的功能以及对 tsRNAs 生成的影响), 以及目前正在进行的“扩展期”(对细胞/个体应激的调控, 以及在 RNA 介导的获得性性状代际遗传中的作用)。作为 DNMT 家族中的一员, DNMT2 具有 DNMT 家族成员相似的结构特征以及甲基转移酶作用机制, 并且随着 DNMT 家族在 DNA 甲基化及表观遗传学领域表现出的重要作用, DNMT2 的功能及作用机制的研究成为该领域亟需解决的难题。

4.1.1 *Dnmt2*的发现及催化活性鉴定

在 1998 年, Bestor 实验室和 Li 实验室同时克隆到一个除 *Dnmt1* 之外的 DNMT 的家族成员, 即 *Dnmt2*^[44-45]。*Dnmt2* 具有 DNMT 的家族的 DNA 甲基转移酶的催化结构域, 并且在进化上高度保守, 从酵母到人类均保守表达(线虫除外, 线虫没有任何 DNMT 基因)^[41]。此外, 在许多物种中, *Dnmt2* 是唯一的 DNMT 基因, 如果蝇^[41]。当时的学者认为,

DNMT2 也是一个 DNA 甲基转移酶。但有趣的是, Li 实验室发现 DNMT2 在细胞水平并不具有甲基化 DNA 的功能^[45]。之后, Bestor 实验室构建了 *Dnmt2* 敲除鼠, 然而, *Dnmt2* 敲除并没有出现与 DNMT 家族其他成员敲除相类似的小鼠胚胎致死表型。实际上, *Dnmt2* 敲除小鼠并无任何可见表型, 且雌性和雄性小鼠均可育^[40]。当时研究人员从小鼠各个方面的表型以及 DNA 甲基化层面去寻找 DNMT2 可能的作用机制和功能表型, 但是, DNMT2 对 DNA 甲基化的催化能力极弱, 具体的功能也一直没有找到。因此, 关于 DNMT2 的功能一直困扰着当时的研究人员。直到 2006 年, Bestor 实验室终于发现, DNMT2 真正的作用底物是 RNA, 而并非 DNA, 也就是说 DNMT2 实际上是一个 RNA 甲基转移酶, 并且进一步把 DNMT2 对 RNA 的甲基化功能定位到了 tRNA-Asp 上第 38 位的胸腺嘧啶 (C38), 并证明 DNMT2 在小鼠、果蝇、拟南芥中都具有这一保守的功能^[40]。此外, 他们还发现, DNMT2 对 tRNA C38 位点的甲基化似乎还需要依赖于 tRNA 的特殊高级结构构象, 这种构象的形成基于 tRNA 的特殊序列及丰富的 RNA 修饰^[40]。至此, 这一里程碑式的研究工作让科学界对 DNMT2 的功能有了正确的认识, 从而也打开了 DNMT2 生理功能研究的新篇章。

继 DNMT2 甲基化 tRNA 的功能发现之后, Jeltsch 实验室在 2008 年证明, 人 DNMT2 也具有催化 tRNA-Asp C38 的类似功能, 并且通过大量的 *Dnmt2* 突变体实验, 证明 DNMT2 作用于 tRNA 甲基化的催化结构域与 DNMT 家族其他成员作用于 DNA 甲基化的催化结构域非常相似, 而与其他 RNA 甲基转移酶的催化结构域不同^[46]。其催化机制具体如下: 通过碱基翻转 (base-flipping) 机制将目标碱基胞嘧啶翻转入其催化核心中, 在 DNMT2 催化模体 IV 中, 对胞嘧啶碱基环的 C6 进行亲核攻击反应, 然后将 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 中的甲基供体转移至胞嘧啶的碱基环的 C5 上, 并将 C5 去质子化, 从而对其靶标 RNA 进行 m⁵C 修饰^[41]。为了进一步提高 RNA 上 m⁵C 修饰水平的检测效率, 2008 年, Lyko 实验室优化建立了 RNA Bisulfite Sequencing 方法^[46], 大大促进了高通量定点检测 tRNA 上 m⁵C 的检测效率。通过这个方法, Lyko 实验室在 2010 年进一步对比 *Dnmt2* 野生型与敲除型果蝇中 tRNA 上的 m⁵C 水平后, 发现 DNMT2 还能对除了 tRNA-Asp 之外的其他 tRNA (tRNA-Glu、tRNA-Gly) 的 C38 进行 m⁵C 修饰, 并且发现在小鼠

中, tRNA 在 *Dnmt2* 缺失进而丢失 C38 的 m^5C 情况下, 容易在应激压力下被核酸酶识别并切割, 生成过量的 tRNA 来源的小 RNA-tsRNAs^[47-48]。此外, 他们还证明, *Dnmt2* 缺失导致的 tRNA-C38 m^5C 修饰丢失会降低 tRNA 对于其所携带氨基酸的识别准确性, 容易将 Asp 和 Glu 混淆, 从而对骨髓发育过程中某些蛋白质的合成造成影响^[49]。2018年, 我们还发现, *Dnmt2* 是调控精子 RNA 介导父代获得性遗传的关键基因, 从 RNA 修饰酶的角度为获得性遗传的研究打开了新方向^[34]。

4.1.2 DNMT2 的独特性

由于 DNMT2 的主要作用底物是 tRNA, 而不是 DNA, 所以, *Dnmt2* 又称为 tRNA-Asp 甲基转移酶 *TRDMT1* (tRNA aspartic acid methyltransferase 1)^[50]。但是, DNMT2 的诸多特性决定了它是一个与众不同 RNA 甲基转移酶, 特别是 DNMT2 执行催化功能的分子机理与传统的 RNA 甲基转移酶不同, 而与 DNMT 家族成员非常类似, 以 SAM 为作用底物发挥甲基转移的作用^[41]; 并且, 随着更多 DNMT2 的底物的发现, tRNA-Asp 甲基转移酶 *TRDMT1* 这个名称并未完全体现 *Dnmt2* 的催化功能。2017年, Helm 实验室发现, 在保证 tRNA 分子构象的基础上, 把 DNMT2 修饰位点 tRNA 第 38 位的核糖核酸胞嘧啶改为脱氧核糖核酸胞嘧啶后, DNMT2 对该位点的甲基化修饰效率显著提高, 并且将该位点附近的 RNA 序列改为 DNA 序列后, DNMT2 依然可以对这些 DNA 序列进行 C38 位甲基化, 而其他的 tRNA 甲基转移酶却无法实现这一催化功能^[51]。该研究提示, 在某些特殊情况下 DNMT2 具有催化 DNA 甲基化的活性, 同时也充分体现了 DNMT2 功能的特殊性与多样性。事实上, 由于 *Dnmt2* 在进化上的高度保守性, 目前的另一种观点认为具有 DNA 甲基转移酶活性的 DNMT 家族成员, 有可能是从 *Dnmt2-like RNA methyltransferase* 演化来的, 而不是从原核生物的 DNA 甲基化酶进化而来的^[52]。因为和后者相比, DNMT 家族在结构和催化特性上具有更加巨大的差别。

4.2 DNMT2 调控精子 RNA 介导的获得性遗传

在 2013 年, Lyko 实验室和 Minoo 实验室合作, 发现 DNMT2 对于精子 RNA 介导的旁突变表型向子代的传递具有重要作用^[53]。DNMT2 缺失的 *kit* 杂合子小鼠的精子 RNA 无法将“白尾巴”的表型传递给子代, 同样把之前异常表达的 *kit* mRNA 片段注射到 DNMT2 敲除的受精卵里, 出生的子代中

这种“白尾巴”表型也消失了^[53], 表明 DNMT2 在 RNA 介导的表型代间传递过程中具有重要作用, 然而, 其具体作用机制尚不清楚。研究人员试图从 DNMT2 影响了 *kit* mRNA 某些 C 位点甲基化的角度来解释这一现象, 但由于 DNMT2 对于 mRNA 的甲基化活性目前没有确切的证据, 导致这个解释的可靠性尚有争议^[53]。但是, 从另一个角度, 该研究提示, DNMT2 调控的 RNA 修饰可能参与了某些遗传信息向子代的传递, 为 DNMT2 的生物学功能研究提出了新方向。在我们的前期研究中, 通过对精子 RNA 进行系统的 RNA 修饰谱定量检测分析, 发现在高脂饮食刺激下, 精子 30~40 nt RNA 区段中, 两种 RNA 修饰 (m^5C 和 m^2G) 水平显著上升^[19]。Tuorto 等^[48] 研究表明, RNA 修饰对于 tRNA 结构和稳定性的维持以及在细胞中的半衰期具有重要作用。我们发现, tsRNA 上所继承的这些 RNA 修饰同样能够维持其在血清及合子裂解液中的稳定性^[18-19]。为了进一步研究 RNA 修饰在表观遗传中的作用, 我们将化学合成不带修饰的 tsRNAs 注射到正常的受精卵中, 发现所产生的后代没有发生糖代谢紊乱的表型^[19], 提示 RNA 修饰以及负责这些 RNA 修饰的甲基转移酶对精子 tsRNAs 介导的获得性遗传具有重要的调控作用。由于 DNMT2 对 tRNA 上 m^5C 修饰水平直接的调控作用, 我们推测 DNMT2 可能参与了精子 tsRNAs 介导的父代高脂饮食代谢紊乱表型向子代的传递。

通过 *Dnmt2* 敲除的高脂饮食小鼠模型, 我们发现, *Dnmt2* 敲除后, 小鼠精子总 RNA 和 30~40 nt RNA 失去了将父代高脂饮食所诱导的获得性代谢紊乱表型传递给子代的能力。进一步研究其作用机制发现, DNMT2 缺失抑制了精子 30~40 nt RNA 中 m^5C 和 m^2G 这两种修饰水平在高脂饮食刺激下的上升, 并且改变了精子小 RNA 的表达谱, 使之恢复到正常饮食条件下的小鼠精子小 RNA 表达谱。精子 RNA 的表达谱和修饰谱共同组成了精子 RNA 介导的具有表观遗传信息储存和传递能力的“编码指纹”, 而 DNMT2 参与塑造了不同饮食条件下精子 RNA 的“指纹特征”。DNMT2 缺失后, 高脂饮食刺激下精子 RNA 特有的“编码指纹”无法形成, 从而无法将父代的获得性代谢紊乱性状通过精子 RNA 传递给子代^[34]。

5 展望

随着获得性遗传在哺乳动物中证据的不断增多,

尤其是近期发现精子 RNA 及其 RNA 修饰介导获得性遗传, 人们逐渐认识到 RNA 也具有遗传信息载体的功能, 并且对于环境因素变化导致的生物进化具有重要的推进作用。这也使得人们开始重新认识和思考“拉马克学说”和达尔文的“泛生论”^[54-55]学说。在 DNA 介导的稳定性遗传外, RNA 这个表观遗传载体似乎更具有可塑性, 能够将机体对环境因素所产生的应答反应作为一种信息对子代的表型进行微调, 并可能随着表观遗传信息积累和自然选择, 影响生物进化的方向。tsRNAs 结构的变化可能直接影响了其与 DNA、RNA 和相互作用蛋白的结合能力, 从而进一步影响其功能的发挥。其中, DNMT2 作为一个古老而神秘的 RNA 甲基转移酶, 其催化的 RNA 修饰对塑造精子 RNA 在高脂饮食条件下的表观遗传信息“编码指纹”不可或缺, 直接调控了精子 RNA 介导的父代获得性代谢紊乱表型向子代的传递的能力, 从 RNA 修饰酶的角度进一步强调了精子 RNA 介导的表观遗传印记信息代间传递的复杂调控性。

然而, 在精子 RNA 介导的获得性遗传中, 依然存在许多未解决的科学问题, 值得进一步深入研究。例如, 父代在环境饮食状况改变或应激压力变化下所产生的获得性印记信息, 是如何进入到生殖细胞, 并在精子中形成具有编码“独特性状”的指纹印记信息的; 在其他的获得性遗传模型中, DNMT2 介导的 RNA 修饰是否也具有类似的调控表观遗传印记信息存储及传递的能力; 除了 DNMT2 外, 是否有其他的 RNA 修饰酶也参与了精子 RNA 介导的获得性遗传。此外, 在精卵结合后, 精子中携带了表观遗传信息的 RNA 在早期胚胎中发挥功能的作用机制也是至今尚未解决的科学问题。也就是说, 精子 RNA 所携带的表观遗传信息在早期胚胎中的解码机制是什么, 是如何进一步精确指导了与父代相似的子代表型的发生; 是否存在其他的信息媒介连接了精子 RNA “编码指纹”和子代代谢表型之间的信息传递空白。因此, 阐明获得性遗传信息在精子中的“编码机制”和在早期胚胎中的“解码机制”以及印记信息如何精确指导子代表型形成是该领域亟待解决的重要科学问题。

[参 考 文 献]

- [1] Lamarck JB. Zoological Philosophy[M]. London, UK: Macmillan, 1914
- [2] Boskovic A, Rando OJ. Transgenerational epigenetic inheritance. *Annu Rev Genet*, 2018, [Epub ahead of print]
- [3] Norouzitallab P, Baruah K, Vanrompay D, et al. Can epigenetics translate environmental cues into phenotypes? *Sci Total Environ*, 2018, 647: 1281-93
- [4] Sales VM, Ferguson-Smith AC, Patti ME. Epigenetic mechanisms of transmission of metabolic disease across generations. *Cell Metab*, 2017, 25: 559-71
- [5] Chen Q, Yan W, Duan E. Epigenetic inheritance of acquired traits through sperm RNAs and sperm RNA modifications. *Nat Rev Genet*, 2016, 17: 733-43
- [6] Shi J, Zhang Y, Chen Q. Molecular carriers of acquired inheritance: absence of evidence is not evidence of absence. *Environ Epigenet*, 2016, 2: dvw014
- [7] Miska EA, Ferguson-Smith AC. Transgenerational inheritance: models and mechanisms of non-DNA sequence-based inheritance. *Science*, 2016, 354: 59-63
- [8] Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon P, et al. RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature*, 2006, 441: 469-74
- [9] Hollick JB. Paramutation and related phenomena in diverse species. *Nat Rev Genet*, 2017, 18: 5-23
- [10] Bartel DP. Metazoan microRNAs. *Cell*, 2018, 173: 20-51
- [11] Rodgers AB, Morgan CP, Bronson SL, et al. Paternal stress exposure alters sperm microRNA content and reprograms offspring HPA stress axis regulation. *J Neurosci*, 2013, 33: 9003-12
- [12] Rodgers AB, Morgan CP, Leu NA, et al. Transgenerational epigenetic programming via sperm microRNA recapitulates effects of paternal stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 13699-704
- [13] Grandjean V, Gounon P, Wagner N, et al. The miR-124-Sox9 paramutation: RNA-mediated epigenetic control of embryonic and adult growth. *Development*, 2009, 136: 3647-55
- [14] Wagner KD, Wagner N, Ghanbarian H, et al. RNA induction and inheritance of epigenetic cardiac hypertrophy in the mouse. *Dev Cell*, 2008, 14: 962-9
- [15] Donkin I, Versteyhe S, Ingerslev LR, et al. Obesity and bariatric surgery drive epigenetic variation of spermatozoa in humans. *Cell Metab*, 2016, 23: 369-78
- [16] de Castro Barbosa T, Ingerslev LR, Alm PS, et al. High-fat diet reprograms the epigenome of rat spermatozoa and transgenerationally affects metabolism of the offspring. *Mol Metab*, 2016, 5: 184-97
- [17] Peng H, Shi J, Zhang Y, et al. A novel class of tRNA-derived small RNAs extremely enriched in mature mouse sperm. *Cell Res*, 2012, 22: 1609-12
- [18] Zhang Y, Zhang Y, Shi J, et al. Identification and characterization of an ancient class of small RNAs enriched in serum associating with active infection. *J Mol Cell Biol*, 2014, 6: 172-4
- [19] Chen Q, Yan M, Cao Z, et al. Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science*, 2016, 351: 397-400
- [20] Sharma U, Conine CC, Shea JM, et al. Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science*, 2016, 351: 391-6
- [21] Thompson DM, Parker R, Stressing out over tRNA

- cleavage. *Cell*, 2009, 138: 215-9
- [22] Schorn AJ, Gutbrod MJ, LeBlanc C, et al. LTR-retrotransposon control by tRNA-derived small RNAs. *Cell*, 2017, 170: 61-71.e11
- [23] Anderson P, Ivanov P. tRNA fragments in human health and disease. *FEBS Lett*, 2014, 588: 4297-304
- [24] Schimmel P. The emerging complexity of the tRNA world: mammalian tRNAs beyond protein synthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19: 45-58
- [25] Luo S, He F, Luo J, et al. *Drosophila* tsRNAs preferentially suppress general translation machinery via antisense pairing and participate in cellular starvation response. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46: 5250-68
- [26] Guzzi N, Ciesla M, Ngoc PCT, et al. Pseudouridylation of tRNA-derived fragments steers translational control in stem cells. *Cell*, 2018, 173: 1204-16.e26
- [27] Emara MM, Ivanov P, Hickman T, et al. Angiogenin-induced tRNA-derived stress-induced RNAs promote stress-induced stress granule assembly. *J Biol Chem*, 2010, 285: 10959-68
- [28] Zhang Y, Shi J, Chen Q. tsRNAs: new players in mammalian retrotransposon control. *Cell Res*, 2017, 27: 1307-8
- [29] Kim HK, Fuchs G, Wang S, et al. A transfer-RNA-derived small RNA regulates ribosome biogenesis. *Nature*, 2017, 552: 57-62
- [30] Shi J, Zhang Y, Zhou T, et al. tsRNAs: the Swiss army knife for translational regulation. *Trends Biochem Sci*, 2018, [Epub ahead of print]
- [31] Chou HJ, Donnard E, Gustafsson HT, et al. Transcriptome-wide analysis of roles for tRNA modifications in translational regulation. *Mol Cell*, 2017, 68: 978-92.e4
- [32] Masuda I, Takase R, Matsubara R, et al. Selective terminal methylation of a tRNA wobble base. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46: e37
- [33] Kirchner S, Ignatova Z. Emerging roles of tRNA in adaptive translation, signalling dynamics and disease. *Nat Rev Genet*, 2015, 16: 98-112
- [34] Zhang Y, Zhang X, Shi J, et al. Dnmt2 mediates intergenerational transmission of paternally acquired metabolic disorders through sperm small non-coding RNAs. *Nat Cell Biol*, 2018, 20: 535-40
- [35] Safra M, Nir R, Farouq D, et al. TRUB1 is the predominant pseudouridine synthase acting on mammalian mRNA via a predictable and conserved code. *Genome Res*, 2017, 27: 393-406
- [36] Xiang Y, Laurent B, Hsu CH, et al. RNA m⁶A methylation regulates the ultraviolet-induced DNA damage response. *Nature*, 2017, 543: 573-8
- [37] Zhao BS, Wang X, Beadell AV, et al. m⁶A-dependent maternal mRNA clearance facilitates zebrafish maternal-to-zygotic transition. *Nature*, 2017, 542: 475-8
- [38] Liu N, Dai Q, Zheng G, et al. N⁶-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions. *Nature*, 2015, 518: 560-4
- [39] Hussain S, Tuorto F, Menon S, et al. The mouse cytosine-5 RNA methyltransferase NSun2 is a component of the chromatoid body and required for testis differentiation. *Mol Cell Biol*, 2013, 33: 1561-70
- [40] Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, et al. Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, 2006, 311: 395-8
- [41] Lyko F. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat Rev Genet*, 2018, 19: 81-92
- [42] Kunert N, Marhold J, Stanke J, et al. A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila*. *Development*, 2003, 130: 5083-90
- [43] Lyko F, Brenton JD, Surani MA, et al. An imprinting element from the mouse H19 locus functions as a silencer in *Drosophila*. *Nat Genet*, 1997, 16: 171-3
- [44] Yoder JA, Bestor TH. A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast. *Hum Mol Genet*, 1998, 7: 279-84
- [45] Okano M, Xie S, Li E. Dnmt2 is not required for *de novo* and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26: 2536-40
- [46] Jurkowski TP, Meusburger M, Phalke S, et al. Human DNMT2 methylates tRNA^{Asp} molecules using a DNA methyltransferase-like catalytic mechanism. *RNA*, 2008, 14: 1663-70
- [47] Schaefer M, Pollex T, Hanna K, et al. RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Genes Dev*, 2010, 24: 1590-5
- [48] Tuorto F, Liebers R, Musch T, et al. RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, 19: 900-5
- [49] Tuorto F, Herbst F, Alerasool N, et al. The tRNA methyltransferase Dnmt2 is required for accurate polypeptide synthesis during haematopoiesis. *EMBO J*, 2015, 34: 2350-62
- [50] Gray KA, Yates B, Seal RL, et al. Genenames.org: the HGNC resources in 2015. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: D1079-85
- [51] Kaiser S, Jurkowski TP, Kellner S, et al. The RNA methyltransferase Dnmt2 methylates DNA in the structural context of a tRNA. *RNA Biol*, 2017, 14: 1241-51
- [52] Ashapkin VV, Kutueva LI, Vanyushin BF. Dnmt2 is the most evolutionary conserved and enigmatic cytosine DNA methyltransferase in eukaryotes. *Genetika*, 2016, 52: 269-8
- [53] Kiani J, Grandjean V, Liebers R, et al. RNA-mediated epigenetic heredity requires the cytosine methyltransferase Dnmt2. *PLoS Genet*, 2013, 9: e1003498
- [54] Liu Y. A new perspective on Darwin's pangenes. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2008, 83: 141-9
- [55] Liu Y, Chen Q. 150 years of Darwin's theory of intercellular flow of hereditary information. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19: 749-50