

转录后基因沉默的机制及其应用

刘 杨 蒋 彦 乔代蓉 曹 毅*

(四川大学草原生物工程国家实验室 成都 610064)

摘 要 确定导致转录后基因沉默的原因,探索在转基因植物研究中避免基因沉默的对策。方法是将转基因沉默分为转录水平的沉默和转录后水平的沉默,分别对 RNA 阈值模型、异位配对和异常 RNA 模型、双连 RNA 模型等几种导致转录后基因沉默模型的分析。结果确定了转基因沉默抑制现象和转录后基因沉默的形成机制,以及转录后基因沉默理论和实践意义。提出了利用 RNAi 等技术进行基因功能鉴定和利用基因沉默进行病毒防治的策略。

关键词 转录后基因沉默,基因沉默,aRNA,RdRp,异位配对,沉默抑制因子, RNAi

中图分类号 Q753.Q756 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2002)02-0140-04

基因沉默(Gene silencing)现象广泛存在于生物界中。由于转基因技术的兴起,人们对转基因沉默进行了更深入的研究。转基因沉默最初被认为是一种不幸的偶然事件,因为当人们将外源基因转入受体以后,总是希望外源基因能高效表达,产生新的性状。然而事与愿违的是,在高等植物中大约 30% 的转基因实验都导致了基因沉默,而且实验还发现这种现象广泛地存在于植物、真菌和动物中^[1]。这表明转基因沉默并非偶然现象,而是一种普遍存在的基因调控机制。

1 转录水平的沉默和转录后水平的沉默

转基因沉默主要分为两种类型:一是转录水平上的基因沉默(Transcriptional gene silencing, TGS),二是转录后水平上的基因沉默(Posttranscriptional gene silencing, PTGS)。前者是发生在核内的事件,而后者发生在细胞质中。两者都与超甲基化(Hypermethylated)有关,TGS 现象中甲基化主要发生在启动子区域,基因的转录受到抑制;而 PTGS 中,甲基化主要发生在基因的编码区,基因能够转录,产生 mRNA,但 mRNA 在细胞质中被特异性地降解。二者在时间上并非简单的前后关系,在空间上也不因为核膜的存在而相互隔离。因为研究发现 PTGS 可能以 RNA 的方式影响 TGS^[2],而且越来越多的研究表明 TGS 可能与 PTGS 有着相似的机制。所以,在以下的论述中,我们将着重讨论近年来在 PTGS 研究方面的进展。

2 转录后基因沉默的机制

转录后基因沉默表现为一种序列特异性的 RNA 降解过程,主要作用于同源性较高的转录产物,包括具有同源性的内源基因的转录产物。它广泛存在于各种生物中,直到最近人们才发现在植物中被称为共抑制(Cosuppression),真菌中

被称为抑制(Quelling),动物中称为 RNA 干扰(RNA interference)的现象可能具有很大的相似性,都与 PTGS 现象有关^[3]。对这些现象的深入研究发现,PTGS 还与病毒侵染细胞所引起的反应机制十分相似,所以现在普遍认为 PTGS 并非一种偶然现象,而是生物在长期进化过程中所形成的对病毒、转座因子和其它可转移核酸的防御系统。因为这些外源核酸的引入很可能使宿主细胞内的平衡机制遭到致命破坏。而转基因沉默,无非是宿主将外源基因视为对自身有害的序列而将其抑制。细胞对外源核酸的这种抑制作用具有序列特异性的特点,所以一旦细胞内转录后沉默机制被启动,细胞对转入核酸的同源序列就具有了“免疫”能力。

细胞的这种抑制能力还能在细胞与细胞之间通过胞间连丝传递,甚至可以通过植物的维管组织在整个植物体中传递。嫁接实验表明^[5],将有共抑制现象的植物作为砧木,没有抑制现象的植物作为接穗,一段时间以后在接穗中产生了共抑制现象,这被称为系统获得性沉默(Systemic acquired silencing),类似于病原体引起的系统获得性抵抗(Systemic acquired resistance)。说明有某种信号分子通过植物的维管系统进行传递,由于这种系统获得性沉默具有序列特异性的特点,于是认为这种信号分子很可能是一种 RNA 与蛋白质的复合体,这与类病毒的传递方式很相似。

关于 PTGS 的产生机制,人们先后提出了一系列假说。在这一系列模型中 RNA 起着非常重要的作用,它不仅是 PTGS 现象的启动因子,同时也是 PTGS 作用的靶分子。

2.1 RNA 阈值模型

在转基因实验中,为了实现外源基因在受体细胞中的高效表达,人们往往会给外源基因带上强启动子,但事实上却常常导致基因沉默。于是 Lindbo 等提出了 RNA 阈值模型

收稿日期 2001-06-18, 修回日期 2001-10-23。

基金项目 国家转基因植物及产业化专项(No. J00-A-008-09)和国家自然科学基金(No. 39780018)资助。

* 通讯作者。 Tel 86-28-5412842, Fax 86-28-5219652, E-mail caoxiyue@川大生物工程研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

(RNA threshold model),认为在细胞质中可能存在 mRNA 的监控系统,当某种 mRNA 超量表达以后,监控系统就起作用,将这种超量表达的 mRNA 降解。然而人们随后发现某些不带有启动子的基因转入细胞后同样也能引起 PTGS 现象,其作用效果与带有启动子的序列相近。Olivier Voinnet^[4]等在研究 PTGS 在植物中的传递时发现,带有和不带有 35S 启动子的 GFP (Green fluorescent protein) 基因都能引起沉默,不带有启动子的 GFP 基因在植物体中不能转录产生 RNA,却也能引起沉默,可见沉默并不一定都是外源基因的过量表达、转录产物的过量积累所造成的。

2.2 异位配对和异常 RNA 模型

这一模型(如图 1)认为 PTGS 现象是生物在长期进化过程中形成的对病毒侵染的一种反应,与基因的表达产物是否过量无关。当病毒或转入的外源基因内部有同源序列,或者外源基因与内源基因之间有同源序列时,往往会导致异位配对(Ectopic pairing)^[6],其结果是转录产生异常 RNA(Aberrant RNA, aRNA),由于 aRNA 内部的重复序列,它可能是双链的。另外,除了异位配对, aRNA 产生的原因还可能是外源基因中存在异常结构,如隐秘的旁侧启动子(Cryptic flanking promoter)或提前终止末端(Premature termination)^[1]。aRNA 一旦产生并进入细胞质后,就会激活依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRps)的活性, RdRps 再以 aRNA 为模板合成大量约 20~25bp 的互补 RNA(Complementary RNA, cRNA)。这些 cRNA 如果与同源的 mRNA 相遇就会结合上去形成部分双链结构——dsRNA,而后被双链特异性的 RNase 识别、降解。在这一过程中,内源基因的同源转录产物也可能被 cRNA 结合,并被同时降解。外源基因的导入最终导致内源和外源基因的表达共同受阻,这种现象在植物中被称为共抑制(Cosuppression)。由于 PTGS 信号在细胞间的传递在转录产物还未被降解前就能检测到,所以也有人认为 aRNA 一方面激活 RdRps,另一方面则开始在细胞之中传递。然而在有的植物中也发现,PTGS 现象不能传递,Palauqui 和 Balzergue 认为,PTGS 信号能否传递依赖于转入基因的量。如果转入基因量越大,信号就能传递到植物中更多的地方,这些信号分子又能启动新的沉默,产生新的信号分子,于是能使整个植物产生免疫反应^[1]。

最近,许多实验为这一模型提供了证据。Hamilton^[7]等在四种发生 PTGS 现象的植物中分别分离到了一种 25bp 左右的反义 RNA,这些 RNA 很可能就是 cRNA,而且由于 25bp 的大小足以传递一定的信息,又可以通过胞间连丝在细胞之间传递,所以认为它很可能是细胞间传递信号的一部分。

另外,与 PTGS 过程有关的一些蛋白质也相继从各种生物的突变体中分离到。Carlo Cogoni 等^[8]从粗糙链胞霉中分离到了 *qde-1* (Quelling defective) 基因,它可能编码一个含 1402 个氨基酸的蛋白质。同源性比较表明它是一种 RdRp。另外 *Caenorhabditis elegans* 中的 *Ego-1*^[9],拟南芥中的 *Sgs-2*^[10,11] 都可能是一种 RdRp,这些蛋白质具有同源性,说明它们在进化上是保守的,而在同一物种中这些蛋白质同一家族中的成员

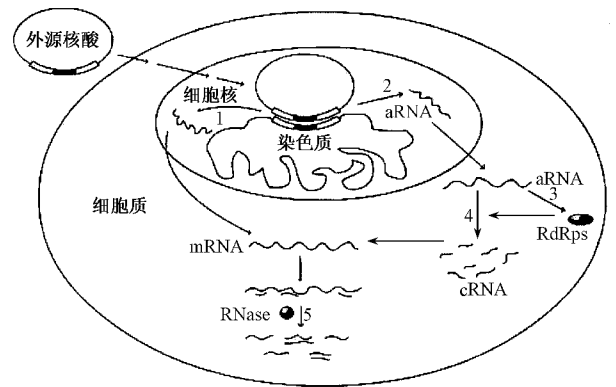


图 1 异位配对和异常 RNA 模型

Fig.1 Model for ectopic pairing and aberrant RNA

1. Transgenes or endogenes transcribe into mRNA 2. The ectopic pairing of transgenes and endogenes results in transcription of aberrant RNA (aRNA) 3. The aRNA enters the cytoplasm and activates an RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) 4. The RdRp can make short antisense copies of aRNA-complementary RNA (cRNA) 5. The cRNA bind to functional transcript making it target for degradation by double-strand-specific RNase

之间又有明显差异,表明同一家族的成员在细胞中可能具有不同功能。Carlo Cogoni^[12]还在粗糙链胞霉中发现了 *qde-3* 基因,将 *Qde-3* 与蛋白质库中的其它蛋白质比较表明它属于 RecQ DNA 螺旋酶,其功能是解开双链 DNA,参与 DNA 结构的改变和 aRNA 的转录。这表明 RecQ 蛋白家族不仅与 DNA 的重组和修复有关,还有其它功能。最近, Wu, Scharf D.^[13,14] 从衣藻中又分离到了 *mut-6* 基因,它编码的蛋白质与 DEAH-box 家族的 RNA 螺旋酶高度同源,它可能是一种参与 aRNA 降解的螺旋酶。

这些蛋白质的发现为异常 RNA 模型提供了部分证据,然而,也有实验表明如果将单拷贝的外源基因转入无同源性基因的单倍体植物中以后,也会导致 PTGS 现象。这表明,同源序列之间的异位配对,也不是导致 PTGS 现象的唯一原因。

2.3 双链 RNA 模型

关于 PTGS 的启动, Waterhouse 提出了双链 RNA 模型(如图 2)^[6]。他们将有义 RNA 和反义 RNA 导入植物后,发现有义 RNA 与反义 RNA 共转录比二者单独作用更易引起沉默。于是他们认为异位配对并不是导致 PTGS 的根本原因,根本原因在于外源基因插入受体基因组中的方向不同,这将导致有义 RNA 和反义 RNA 的合成。这些转录产物将形成 dsRNA, dsRNA 在细胞质中被螺旋酶、RdRps 和类似于 RNase L 的核酸内切酶形成的复合体所识别。螺旋酶使双链解旋, RdRps 以其中一条链为模板合成 cRNA,类似于 RNase L 的核酸内切酶结合于 cRNA 的两端,当 cRNA 与具有同源序列的 mRNA 结合以后, RNase L 的作用是在单链处切开 mRNA 分子。单链 RNA 分子由于没有 5'帽子和 poly(A)尾巴,很快被其它 RNase 降解。这一模型还有待更进一步的证实。

从以上模型分析和实验结果可以发现,至今没有一种模型可完全解释所有的实验事实。这一方面可能是对 PTGS 机制的了解仍不是十分清楚,各个模型都只是从不同

角度对 PTGS 现象某一部分进行了描述,好似“瞎子摸象”。而另一方面则可能是由于长期的进化,生物防御外源基因侵入的机制本身具有多样性,以致于难以用一种模型来解释。

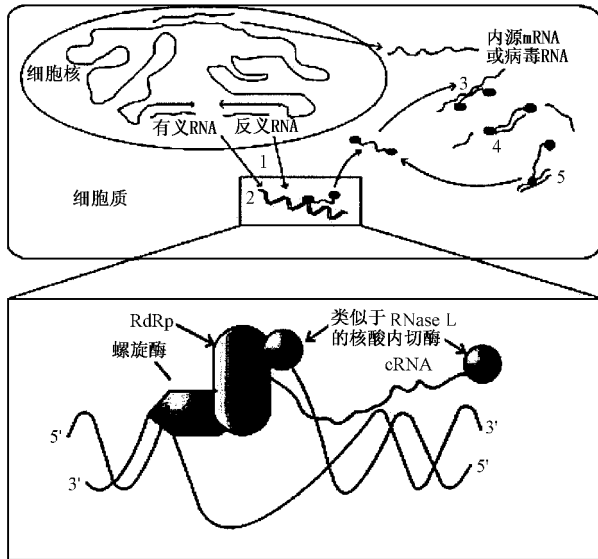


图2 双链 RNA 模型

Fig.2 Model for dsRNA-induced PTGS

1. The transgenes transcribe both sense and antisense mRNA 2. They enter the cytoplasm and hybridize to form a duplex. The duplex is recognized and bound by a complex of RdRp helicase and RNase L-like endonuclease. The RdRp makes cRNA which attaches to RNase L-like endonuclease 3. The cRNA-RNase hybridize to the target endogene or virus RNAs 4. The endonuclease cleaves the single-stranded regions adjacent to the hybrids 5. The double-stranded cRNA act as a template for synthesis of new cRNA-RNase molecules

3 转基因沉默抑制现象

进化犹如一场战争,对手之间势均力敌更易使战争持续下去。为了生存和繁衍,一些病毒在进化中形成了抑制 PTGS 的能力。这一现象首先是在病毒的协同感染中发现的^[15],当马铃薯 Y 病毒与其它病毒协同作用时将导致更严重的症状。原来它编码一种辅助蛋白酶(Helper component-protease, Hc-protease),可以使宿主的防御系统受到抑制,后来认为 Hc-protease 是一种沉默抑制因子(Suppressor of gene silencing)。当 Hc-protease 与另一种病毒蛋白 P1 相连时,P1/Hc-pro 同样具有抑制作用^[16]。Radhamani^[17]用 Hc-pro 作为诱饵,利用酵母双杂交系统分离到了一种与钙调蛋白有关的蛋白质:rgs-CaM(Regulation of gene silencing calmodulin like protein),说明 PTGS 的抑制可能与钙离子介导的信号通路有关。而另一种从黄瓜花叶病毒 CMV 中得到的 2b 蛋白也有沉默抑制因子的作用^[18],最近发现,它有一个富含精氨酸的核定位信号,22KRRRRR27,在烟草中这一信号是 PTGS 抑制所必需的,这表明 PTGS 可能是在核中被阻断的^[19]。以上两种抑制物中,Hc-protease 作用于已发生沉默的组织,而 2b 蛋白则

影响沉默的起始,二者在序列上并无相似性。随后人们还发现,抑制因子在许多病毒中都存在,如非洲木薯花叶病毒的 AC2、水稻黄斑病毒的 P2、西红柿矮化病毒的 19K 等^[18]。可见,病毒对沉默的抑制是一种在进化中逐渐形成的机制,具有普遍性。PTGS 抑制因子发现的意义不仅在于这种现象广泛存在于一些病毒之中,而且,它可以用来研究 PTGS 在植物生长发育中的作用,研究宿主细胞中与 Hc-protease 相互作用成分,进一步阐明 PTGS 机制,减少基因沉默。

4 研究转录后基因沉默的意义

4.1 理论意义

转基因沉默的研究首先是为了阐明基因沉默的机理。这一机制的阐明对于提高转化效率和外源基因的表达活性具有指导意义,对于研究病毒与宿主在长期进化过程中的相互关系具有参考价值。

另外,近年来 RNA 领域的研究日益受到关注,研究表明 RNA 具有蛋白质和 DNA 的全部生物功能,不仅能传递遗传信息还能通过各种 RNA 的剪接、编辑和 RNA 再编码来控制遗传信息的表达。在 PTGS 现象的研究中,RNA 的核心作用已逐渐引起人们的重视,PTGS 还可以以 RNA 的形式影响到 DNA 的甲基化程度和结构,从而影响到其转录,这种从 RNA 到 DNA 的信息流是令人惊叹的^[2,21]。近来还有报道 PTGS 中的某些蛋白质,如一些与 RdRps 有关的蛋白质可能在发育中具有一些作用^[10]。Eleanor Maine^[22]发现 *C. elegans* 胚胎发育所需要的 Ego-1 蛋白也参与了 PTGS,这些基因的缺失将导致发育上的缺陷,表明基因沉默与发育之间可能存在某种微妙的联系。

4.2 实践意义

植物基因工程的兴起,使人们的许多愿望有可能成为现实,但转基因的转化效率较低、稳定性不高、表达水平难以预料,这些缺点限制了基因工程的发展。转基因沉默机制研究的实践意义首先在于提高转基因的表达活性,减少基因沉默。尤其是最近基因沉默抑制因子的发现将对转基因技术的发展起到促进作用。

另外,基因沉默还可用于研究基因功能,基因的表达调控。在动物的转化实验中发现,双链 RNA 的导入往往会诱导同源基因的沉默,这种现象被称为 RNA 干扰(RNA interference, RNAi),RNAi 正日益成为功能基因组研究的有力工具。与经典遗传学方法不同的是它把变异性状和具体的序列信息联系在了一起,RNAi 用于基因功能的研究主要集中在模式生物 *C. elegans* 中。由于 PTGS 是一种广泛存在于各种生物中的基因调控机制,所以 RNAi 将会很快用于其他模式生物基因功能的研究^[20]。但基因沉默的遗传稳定性问题是需要首先解决的,Kennerdelf^[22]发现如果将发夹结构的 RNA 引入受体,则可以稳定遗传。同时,将反式重复的外源基因转入受体中使其形成具有发夹结构的转录产物也能实现基因沉默的稳定遗传^[23]。

毒 RYMV 在非洲广泛流行,自然的预防机制为隐性、多基因性状。于是采用转基因沉默的方法,首先将该病毒复制所需要的某种酶的基因转入水稻,诱导 PTGS,从而使植物具有 RYMV 病毒的抗性,这种抗性能稳定遗传 3 代^[24]。PTGS 真正用于病毒防治首先要面对的就是其遗传稳定性的问题。在有性繁殖生物中,减数分裂的结果是沉默现象在后代中的遗传很不稳定,从 2% ~ 100% 不等,难以控制^[25],但在无性繁殖生物中,PTGS 可以保持下去。所以 PTGS 用于病毒防治很有可能在一些无性繁殖的生物中首先取得进展,如果要将其应用于大多数作物还有一定过程。

转基因沉默由于它与基因表达调控、细胞信号传导的密切关系,逐渐引起了人们的重视。近年来,各种突变体的分离以及沉默抑制因子的发现,为揭示 PTGS 的作用机理提供了新的证据和研究手段。对 PTGS 现象的深入研究无疑将对提高转基因的表达水平有积极作用。

REFERENCES (参考文献)

[1] Grant S R. Dissecting the Mechanisms of posttranscriptional gene silencing: divide and conquer. *Cell*, 1999, **96** :303 ~ 306

[2] Marx J. Interfering with gene expression. *Science*, 2000, **288** :1370 ~ 1372

[3] Ketting R F *et al.* A genetic link between co-suppression and RNA interference in *C. elegans*. *Nature*, 2000, **404** :296 ~ 298

[4] Vionnet O, Vain P, Angell S, Bancombe D C. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ecotopic promoterless DNA. *Cell*, 1998, **95** :177 ~ 187

[5] Jorgense P M, Atkinson R G *et al.* An RNA-based information superhighway in plants. *Science*, 1998, **279** :1486 ~ 1487

[6] Waterhouse P M, Graham M W *et al.* Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** :13959 ~ 13964

[7] Hamilton A J, Baulcombe, D C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 1999, **286** :950 ~ 952

[8] Cogoni C, Macino G. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature*, 1999, **399** :166 ~ 168

[9] Paula A. An interfering Ego? *Science*, 2000, **287** :1713

[10] Mathilde F *et al.* Ago-1, Qde-2 and Rde-1 are related proteins required for posttranscriptional gene silencing in plants, quelling in fungi and RNA interference in animals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** :11650 ~ 11654

[11] Elmayana T. *Arabidopsis* mutants impaired in cosuppression. *Plant Cell*, 1998, **10** :1747 ~ 1758

[12] Cogoni C, Macino G. Posttranscriptional gene silencing in *Neurospora* by a RecQ DNA helicase. *Science*, 1999, **286** :2342 ~ 2344

[13] Scharf D. A helicase for RNA degradation. *Science*, 2000, **290** :1049

[14] Scharf D. Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-box RNA helicase. *Science*, 2000, **290** :1159 ~ 1163

[15] Vionnet O, Pinto Y M *et al.* Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** :14147 ~ 14152

[16] Anandalakshmi R, Pruss G J, Ge X *et al.* A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** :13079 ~ 13084

[17] Anandalakshmi R *et al.* A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 2000, **290** :142 ~ 144

[18] Kasschau K D, Carrington J C *et al.* A counter defensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 1998, **95** :461 ~ 470

[19] Andrew P. Suppression of posttranscriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J*, 2000, **19** :1672 ~ 1680

[20] Barstead R. Genome-wide RNAi. *Curr Opin Chem Biol*, 2001, Feb, **5** (1) :63 ~ 66

[21] Liave C. Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** :13401 ~ 13406

[22] Kennerdell J R, Carthew R W. Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nature Biotechnology*, 2000, **18** :896 ~ 898

[23] Tavernarakis N, Wang S L *et al.* Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nature Genetics*, 2000, **24** :180 ~ 183

[24] Pinto Y M, Kok R A, Bandcombe D C. Resistance to rice yellow mottle virus (RYMV) in cultivated African rice varieties containing RYMV transgenes. *Nature Biotechnology*, **17** :702 ~ 707

[25] Bruening G. Plant gene silencing regularized. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** :13349 ~ 13351

The Mechanism and Application of Posttranscriptional Gene Silencing

LIU Yang JIANG Yan QIAO Dai-Rong CAO Yi*

(National Laboratory for Grassland Biotechnology, College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract The purpose of this review is to confirm the reason resulted the gene silence and explore the countermeasure avoiding the gene silence in transgene plant. The method is to divide the gene silencing into transcriptional gene silencing (TGS) and post-transcriptional gene silencing (PTGS). Several models resulted PTGS were analyzed by RNA threshold model, ectopic pairing and aberrant RNA model and ds-RNA model. The results showed that it was important to decide the phenomena of restraining transgene silencing and the mechanism of PTGS. The strategies of identification of gene function and prevention of virus were presented by RNAi and gene silencing respectively etc.

Key words posttranscriptional gene silencing, aRNA, RdRp, ectopic pairing, suppressor of gene silencing, RNAi

Received: 06-18-2001

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 39780018) and MSIC (The Ministry of Science and Technology) (No. J00-A-008-09).

* Corresponding author. Tel 86-28-5412842; Fax 86-28-5219652; E-mail caoxiyue@mail.sc.cninfo.net