

病毒微小 RNA 的发现及其功能

贾万忠 李志 伦照荣*

(中山大学生命科学院, 生物防治国家重点实验室, 华南寄生物研究中心, 广州 510275; 中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 甘肃省动物寄生虫病重点实验室, 兰州 730046. * 联系人, E-mail: lsslz@mail.sysu.edu.cn)

摘要 病毒微小RNA (microRNA, miRNA)是新发现的一类miRNA. 它通过诱导mRNA切割降解、翻译抑制或其他机制调节宿主细胞和/或病毒自身靶基因的表达, 改变宿主细胞的生命活动或病毒自身复制, 从而对抗和逃避宿主免疫监视, 达到保护病毒自身的目的. 寻找病毒miRNA分子、作用靶标基因, 以及鉴定其生物学功能已成为研究的新热点. 本文回顾了病毒miRNA的研究历史, 分析了它在基因组中分布特点、生物学功能、作用机制以及病毒miRNA与其他生物miRNA的异同点, 最后展望了病毒miRNA的研究方向和在疾病防治中的应用前景. 随着病毒miRNA的鉴定和功能的深入研究必将促进相关领域的发展, 尤其为病毒病的控制带来新的思路和方法.

关键词 病毒 microRNA 基因调控

早期人们认为, 基因研究中最重要对象是DNA和蛋白质, 而RNA只起到传递DNA信息的作用. 虽然早在1993年Lee等人^[1]就于秀丽(隐杆)线虫(*Caenorhabditis elegans*)中发现第1个miRNA分子(miRNA-*lin-4*), 但直到2000年科学家才在*C. elegans*幼虫体内发现了第2个miRNA分子*let-7*及其在人类和果蝇中发现其同源分子, 随后miRNA的研究才进入快速发展期^[2]. miRNA是一类由约22个核苷酸(nt)组成的非编码单链小RNA (small non-coding RNA, sncRNA), 以mRNA为靶分子, 通过切割降解mRNA或者抑制蛋白质翻译、调节基因的表达来实现生物学功能^[3,4]. 通过miRNA对基因组作用位点的分析, 显示它在生物的生长发育和疾病中起着非常重要的作用. 目前只有一小部分miRNA的生物学功能得到了阐明, 并证实它可以调节发育、增殖、凋亡以及压力反应过程中的基因表达^[5-14], 而miRNA基因突变或者异位表达可能会引发肿瘤或癌症^[15]. 目前, 科学家又发现了病毒的miRNA, 给miRNA研究增加了新内容, 开辟了新的研究领域^[16-19]. 为此, 本文针对病毒miRNA的发现及其功能研究方面的进展和意义作一评述.

1 病毒 miRNA 的发现

迄今为止, 在植物、莱茵衣藻、扁形动物、线虫、节肢动物和脊椎动物中已经发现了4963个成熟的

miRNA分子(根据miRNA数据库<http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/>, 10.0版本, 2007年8月), 与9.1版本(2007年2月)的4274个、7.1版本(2005年10月)的3389个以及7.0版本(2005年6月)的2865个相比, 数量增加很快^[20-22]. RNA干扰(RNA interference, RNAi)现象是植物和昆虫对抗病毒感染最原始的免疫形式, 但它在哺乳动物病毒感染中的作用尚无报道. 为此, Pfeffer等人^[18]研究了RNA干扰在EB病毒(epstein-barr virus, EBV)感染人B淋巴细胞过程中的作用. 他们在实验中意外地发现, 从细胞中克隆到的小分子RNA中有一部分由病毒基因组编码, 属于miRNA分子, 他们将这些miRNA分别命名为miR-BHRF1-1, miR-BHRF1-2, miR-BHRF1-3, miR-BART1和miR-BART2, 这是最早发现的病毒miRNA分子, 该成果发表在2004年4月的*Science*杂志上. Pfeffer等人^[18]和Neilson等人^[19]的发现使病毒miRNA研究成为一新热点, 为病毒miRNA分子调控宿主基因表达和病毒自身基因表达提供了新方向和新内容, 也使病毒与宿主细胞间相互作用新模式的研究迈出了重要的一步.

2 病毒 miRNA

2.1 已发现和确认的疱疹病毒 miRNA

EB病毒(EBV或HHV4)是人疱疹病毒家族的一个成员, 它的miRNA同人或其他生物的miRNA分子相比

不具有同源性。研究人员为了寻找其他致病疱疹病毒的miRNA基因,把基因预测方法与小RNA分子克隆及鉴定技术相结合,在另外3种疱疹病毒中发现了新的miRNA分子:在卡波西肉瘤相关病毒(Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV或HHV8)中克隆出10个成熟miRNA分子,在鼠γ疱疹病毒68(mouse gamma-herpesvirus 68, MHV68)中克隆出9个miRNA分子;在人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV或HHV5)中克隆出9个miRNA分子;它们彼此之间或与已知的人和其他生物的miRNA均没有序列同源性^[18,20,22~26]。在此基础上,Cai等人^[27]又在猕猴淋巴腺病毒(rhesus lymphocryptovirus, rLCV)中发现了16个miRNA,从EB病毒(野生型)中鉴定出至少17个miRNA,其中从病毒BART基因中发现14个新的miRNA(EBV B95-8毒株基因组缺失BART基因,而Pfeffer等人^[24]首先发现的5个miRNA分子的EBV病毒就是B95-8毒株)。Grundhoff等人^[28]和Samols等人^[29]从KSHV中也发现了一些新的miRNA分子。Burnside等人^[30]从鸡马立克氏病毒(Marek's disease virus, MDV)鉴定出16个miRNA,Cui等人^[31,32]从HSV-1中也发现了1个miRNA。近期,Yao等人^[33]从马立克氏病毒-2型(MDV-2)鉴定出17个miRNA,Schäfer等人^[34]从恒河猴疱疹病毒(rhesus monkey rhadinovirus, RRV)发现7个miRNA。这样,疱疹病毒各亚科成员均可编码miRNA^[35],已鉴定和登录的疱疹病毒miRNA分子超过100个,具体数目见表1。

2.2 病毒 miRNA 产生过程

病毒miRNA产生过程类似于宿主细胞miRNA,成熟的miRNA大小和结构也与其他生物的miRNA一样。病毒miRNA基因首先在细胞核内由RNA聚合酶

或 (Pol 或 Pol) 转录为初级转录本 (pri-miRNA), pri-miRNA在核内被RNase 核酸酶Drosha 加工成长约 70 nt的发夹状前体miRNA (pre-miRNA),然后pre-miRNA在核转运因子5 (exportin5, Exp-5)的帮助下从核内转运到细胞质。推测RNA病毒和痘病毒可能在胞质中直接转录出pre-miRNA。胞质中的pre-miRNA在Dicer酶的作用下,被切割成配对的miRNA:miRNA*双螺旋(duplex, 双链)分子,最后成熟的miRNA分子被解链,单链的miRNA进入核糖蛋白复合体miRNP (也叫RNA诱导沉默复合物, RNA-induced silencing complex, RISC), miRNA与靶基因的3'-UTR区或其他区域互补配对,指导miRNP复合体对靶基因mRNA进行切割或者翻译抑制。miRNA*一般是被降解的,但是,有些miRNA*也有较强的表达。一个前体的2个臂有时可分别产生1个miRNA,这种情况下则根据克隆实验结果,确定哪个是主要的成熟产物,次要的在后面加“*”号,*表示量少的;有时可能不易区分两者表达量的多少,如MHV68 miR-M1-7-5p和miR-M1-7-3p之间(12/9)。此外,miRNA*的作用靶标与对应的miRNA是不同的^[16,19,39]。

2.3 存在丰富 miRNA 所属疱疹病毒的特征

目前已发现编码 miRNA 的病毒多属于疱疹病毒 (Herpesviruses), 已报道的有 100 多种。本科病毒在自然界广泛存在,主要侵袭人和动物的皮肤、黏膜以及神经组织,引起急性或慢性感染。此外,某些种类具有在体内致癌和在体外转化细胞的能力。根据其理化性质,疱疹病毒可分为α,β,γ三个亚科。α疱疹病毒(如单纯疱疹病毒、带状疱疹病毒)增殖速度快,引起细胞病变;β疱疹病毒(如 HCMV)复制周期长,

表 1 最新确认的病毒 miRNA 数量(来自 <http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/>, 经实验数据证明)

病毒名称	数量	大小/nt	Pre-miRNA 大小/nt	参考文献
EB 病毒(EBV)(包括野生型 EB 病毒)	23	21~24	62~119(平均 85)	[18,24,27,28]
卡波西肉瘤相关病毒(KSHV)	13	21~23	62~91(平均 71)	[23,24,27~29]
人巨细胞病毒(HCMV)	11	20~23	65~90(平均 71)	[24~26]
鼠 γ 疱疹病毒 68(MHV68)	9	21~22	60~94(平均 67)	[24]
单纯疱疹病毒 1 型(HSV-1)	1	21	86	[31,32]
恒河猴疱疹病毒(RRV)	7	19~24	72~104(平均 85)	[34]
马立克氏病毒(MDV)	8	20~25	66~120	[30]
马立克氏病毒 2 型(MDV-2)	17	21~25	59~75(平均约 70)	[33]
猕猴淋巴腺病毒 (rLCV)	16	20~24	76~96(平均 85)	[27]
人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)	2	20~24	70~81	[36,37]
猴病毒 40(SV40)	1	22	88	[38]

感染的细胞巨细胞化; γ 疱疹病毒(如 EBV)感染淋巴细胞, 可引起淋巴增生. 引起人类致病的疱疹病毒有 7 种, 它们主要侵犯外胚层来源的组织, 包括皮肤、黏膜和神经组织, 严重威胁人类健康^[40-42]. EBV 虽然在体外可致 B 淋巴细胞增生和肿瘤转化, 但是大多数患者并无明显临床症状, 呈隐性感染. 90% 以上的成年人是 EBV 的隐性感染者. 当隐性感染者免疫功能下降或者呈免疫抑制状态时, 可导致感染细胞向肿瘤细胞转化. HCMV 是一组感染人、猴、啮齿动物的具有高度宿主特异性的疱疹病毒, 可产生具有核内包涵体特征的巨型细胞, 能导致宿主临床综合征. 大多数患者呈较轻的亚临床症状, 如巨细胞性视网膜炎等. KSHV 与 B 细胞淋巴瘤密切相关, 引起一种多病灶恶性新生血管增殖症, 主要发生在皮肤, 也可波及肠道等部位, 临床表现为红蓝色或紫黑色皮肤结节^[40,41]. 另外, KSHV 最初是在与 AIDS 相关的卡波西肉瘤中发现的, 现已证明它在 AIDS 中起关键性作用, 是免疫抑制病人和 HIV-1 感染者肿瘤发生的最重要的因素^[42]. α 、 β 和 γ 三个亚科的疱疹病毒均可产生 miRNA, 这些病毒的共同特征之一是可导致细胞病变或者肿瘤发生.

2.4 病毒 miRNA 基因的组成和表达

其他生物的 miRNA 基因以单拷贝、多拷贝或基因簇等多种形式存在于基因组中, 而且绝大部分定位于基因间隔区, 其转录过程独立于其他基因. miRNA 不被翻译成蛋白质, 而是在体内代谢过程中起多种调控作用. 总体上看, 病毒 miRNA 在基因组成和表达等方面也与其他生物的 miRNA 相似.

() 病毒 miRNA 基因的组成. 目前已鉴定确认的疱疹病毒 miRNA 大部分集中在一定的区域内, 成簇排列(表 2), 如 KSHV, MHV68 和 EBV 的 miRNA, 但是 HCMV 的 miRNA 则分散于整个基因组内. 病毒

miRNA 基因大部分位于编码基因的间隔区, 但也有相当数量的 miRNA 基因位于编码区内含子内, 如 EBV miR-BART1~miR-BART14 位于 BART 基因的 2 个内含子上^[18,24,27], 也有个别病毒 miRNA 位于 mRNA 非翻译区(UTR), 如 EBV miR-BHRF1-1 位于 5'-UTR, 而 miR-BHRF1-2 和 miR-BHRF1-3 则位于 3'-UTR^[18]. 病毒 miRNA 可来自 pre-miRNA 双链体的一条链(如 KSHV 的 miR-K1 及 miRNA-K2 等)或者两条链上(如 KSHV 的 miR-K4-5p 和 miR-K4-3p, HCMV 的 miR-UL23-5p 和 miR-UL23-3p)^[25,26]. 病毒 miRNA 如果来自两条链时, 那么通常其中一种 miRNA 数量可能占优势, 如 KSHV 的 miR-K6-3p 数量显著高于 miR-K6-5p 的数量(35:1), EBV miR-BHRF1-2 和 miR-BHRF1-2* 数量之比为 50:3^[23,24,29].

病毒的成熟 miRNA 分子, 大多位于 pre-miRNA 结构的茎部, 但也有少数 miRNA 分子来自茎环处, 如马立克氏病毒的 mdv-mir-M6, M7 和 M8^[30].

() 病毒 miRNA 分子的保守性. 不同种类病毒之间, miRNAs 一般缺乏同源性, 这与其他生物 miRNA 在各个物种间具有高度的进化保守性不同, 病毒 miRNA 同源性只出现在进化关系极为密切的病毒之间. 不同 HCMV 毒株之间的 miR-UL23 和 miR-UL24 的 pre-miRNA 基因侧翼序列有明显差异, 但是 pre-miRNA 序列高度同源. HCMV 与黑猩猩的 CMV (CCMV) 之间, miRNA-UL23 和 miR-UL24 的基因序列差异明显, 但是成熟后的 miRNA 分子则相对保守^[18,25,26]. 据预测, 病毒 SV40(猴空泡病毒 40), SA12(猴因子 12), BKV(BK 病毒)和 JCV(JC 病毒)一个潜在的 miRNA 编码基因序列之间以及所在位置也相对保守^[38,43]. rLCV 约 1 千 3 百万年前从 EBV 进化而来, 它至少能够表达 16 个不同的 miRNA 分子, 其中有 7 个成熟的 miRNA 分子与 EBV miRNA 分子相同或极

表 2 疱疹病毒 miRNA 分布特点

病毒名称	疱疹病毒亚科	基因组大小/kb	基因组序列登录号	miRNA 分布特点
EBV(野生型)	γ	172	AJ507799(EMBL)	miRNA 集中分布在 BART 区, 其次分布在 BHRF1 区
KSHV	γ	140	NC003409(NCBI)	集中分布于长 6 kb 的区域内
HCMV	β	229	AC146907(NCBI)	miRNA 分散于整个基因组内
MHV68	γ	119	NC001826(NCBI)	miRNA 集中分布于长 5 kb 的区域内
HSV-1	α	152	NC001806(NCBI)	1 个位于 LAT 基因的外显子 1
MDV	α	178	AF243438(NCBI)	集中于 meq 基因侧翼和 LAT 基因编码区
MDV-2	α	164	NC002577(NCBI)	与 MDV miRNA 分布相似
rLCV	γ	171	AY037858(NCBI)	与 EBV miRNA 分布相似
RRV	γ	未知	无	与 KSHV miRNA 分布相似

为相似。因此, rLCV 的这些miRNA分子在正选择压力下保留了下来, 在病毒的复制周期中可能发挥重要的作用^[27]。虽然MDV和MDV-2 之间在进化上关系密切, 基因序列上有高度的同源性, 但是两者的miRNA分子之间无同源性^[33]。

() 病毒miRNA基因表达特点。其他生物体的pre-miRNA通常由聚合酶Pol 转录而来, 但病毒的部分pre-miRNA由Pol 转录, 这在miRNA生物合成中较为特殊。MHV68 miRNA基因分别位于各个tRNA基因之后, MHV68 pre-miRNAs 分别与tRNA作为同一初级转录本, 由Pol 转录而来, 形成融合tRNA样结构。在初级转录本中, 1 或者 2 个MHV68 pre-miRNAs, 呈 20~25 bp的短发夹结构紧随tRNA之后排列, polyA位于第一个或者第二个pre-miRNA末端。EBV miR-BART1 和miR-BART2 则位于BART基因的内含子内, 其转录酶应该是Pol ^[18,24,27]。

HCMV可在多种细胞内复制, miR-UL23 和miR-UL24 也可在多种细胞中表达。但他们在不同感染时间其表达量不同或者不表达, 表现出明显的时序性。miR-UL23 和miR-UL24 基因之间相距约 190 kb, 不可能以相同启动子或者从同一转录本前体形式表达, 推测各自以单独转录本形式表达^[25,26]。同样, EBV miR-BART1 和miR-BART2 在感染的各个时期均有表达, 而miR-BHRF1-1, miR-BHRF1-2 和miR-BHRF1-3 的表达则依赖于EBV潜在感染的不同阶段, 即潜在阶段 时期, 它们在EBV感染的MUTU细胞系内不表达^[24]。

2.5 其他病毒 miRNA 研究

除了对EBV, HCMV, KSHV, MHCV, HSV-1, MDV和隐淋巴病毒等 7 种疱疹病毒的miRNA进行计算机预测和鉴定外, 人们还对其他 25 种人和小鼠的病毒miRNA进行了预测和鉴定^[24]。此外, Sullivan等人^[24,40,41]则对SV40, SA12, BKV和JCV等病毒miRNA进行计算机预测和鉴定, 其中已鉴定出部分病毒miRNA。从他们的研究结果可以看出, 仍有为数众多的病毒miRNA有待今后发现和鉴定。

多瘤病毒中, SV40 主要感染鳞状上皮细胞和黏膜组织, 引起多种疣和纤维肉瘤等, 一般为良性, 但少数可转变成癌。另外, SV40 是实验室常用作研究分子病毒学的重要工具。将SV40 或SV40 DNA注射新生仓鼠可诱发肉瘤。BKV是从肾移植病人的尿液中分离的, 可诱发新生仓鼠产生肿瘤。JCV是从进行性

多发灶脑白质病患者脑组织中分离的, 能使新生仓鼠发生神经胶质瘤。BKV和JCV的致瘤作用在动物实验中已得到充分证明, 但它们与人类肿瘤发生的关系还不清楚^[38]。研究人员分别从多瘤病毒预测也可编码病毒miRNA分子, 并成功从SV40 感染细胞中鉴定到 1 个病毒miRNA分子, 给从其他病毒中寻找新的病毒miRNA分子带来了希望, 这无疑扩大了病毒miRNA分子的范围(表 1)^[18,24,38,44]。有许多DNA病毒与疱疹病毒、多瘤病毒一样, 具有丰富多样性, 它们有可能利用同样的策略编码miRNA。事实上, 计算机软件已预测到腺病毒、痘病毒等双链DNA病毒也可能编码miRNA^[43]。

反转录病毒为有囊膜的小RNA病毒, 通过反转录方式病毒核酸得以复制, 产生的双链DNA可整合到宿主细胞基因组, 形成原病毒。原病毒以整合DNA为模板利用宿主Pol 进行基因转录, 因此反转录病毒可利用宿主细胞miRNA产生相类似的机制表达病毒miRNA的可能性很大。虽然Pfeffer等人^[24]和Sullivan等人^[38]既未预测到HIV-1 编码miRNA, 也未通过分子克隆技术从HIV-1 感染细胞中鉴定到病毒miRNA, 但是Omoto及Fujii^[36]通过克隆和核酸杂交结果证明HIV-1 病毒基因组编码 1 个miRNA——miR-N367, 为反转录病毒编码miRNA提供了有力证据, 他们同时还用计算机软件预测了候选miRNA作用的细胞潜在靶mRNA。Kaul等人^[37]也通过核酸杂交实验发现了另一个HIV-1 miRNA分子(hiv-mir-H1), 充分表明HIV确实也能编码miRNA。

2.6 病毒其他非编码 RNA 研究

病毒的非编码RNA除了miRNA外, 腺病毒非编码RNA VA1 也是很重要的一类。VA1 为结构RNA, 约由 160 nt组成, 在腺病毒感染的细胞里呈高水平表达, 能够抑制由短发夹结构RNA或者人miRNA前体诱导的RNA干扰, 但它并不能够抑制由人工合成的短干扰RNA双链体诱导产生的RNA干扰现象。显然, 抑制作用是通过竞争性结合Exp-5 以及直接与Dicer发生结合而抑制Dicer的功能来实现的。这些结果有力地表明, 腺病毒感染能够抑制细胞RNA干扰作用和miRNA生物合成, 也使VA1 成为新发现的第一个能够抑制人细胞RNA干扰的病毒基因转录产物, 是另一类抑制细胞发生RNA干扰现象的动物病毒分子, 区别于已报道的抑制昆虫细胞RNA干扰的病毒蛋白分子, 如A型流感病毒NS1 蛋白、痘苗病毒E3L蛋白

以及兽棚病毒(flock house virus) B2 蛋白。有趣的是, HIV-1 病毒也能够表达一种与 VA1 RNA 相类似的 RNA 分子即 TAR RNA, 推测它可能通过与细胞 TRBP(TAR RNA-binding protein, TAR RNA 结合蛋白) 结合和阻止 TRBP 形成有活性的 RISC, 从而抑制细胞 RNA 干扰作用^[45]。

3 病毒 miRNA 鉴定方法

3.1 计算机预测方法

已鉴定的病毒 miRNA 基因之间序列往往不保守, 与动物宿主 miRNA 基因序列也无同源性。而且, 病毒 miRNA 在基因组中的位置也不保守, 这给病毒 miRNA 的发现增加了难度^[18,24]。由于病毒 miRNA 基因缺乏保守性, 在不同的病毒中难以发现同源 miRNA 分子, 也难以从大多数真核生物中发现病毒 miRNA 的同源分子, 因此病毒 miRNA 的计算机鉴定不能用现有鉴定真核生物 miRNA 的软件来实现, 必须开发病毒 miRNA 计算机专用预测软件。病毒 miRNA 计算机预测是建立在 miRNA 前体需要不同阶段加工酶识别和处理的特殊二级折叠结构和特异序列基础之上的。Pfeffer 等人^[24]所开发的支持向量机(support vector machine, SVM)可用于特异性病毒 pre-miRNA 的预测。Dunn 等人^[25]利用网上免费计算机软件 MFOLD 3.1 资源对 HCMV 病毒 pre-miRNA 结构进行了预测。除使用网上共享核酸二级结构和杂交预测软件外, Sullivan 等人^[38]开发出一种适用于小基因组 pre-miRNA 预测的算法——病毒 miRNA 预测软件(virMir), 也能成功用于病毒 pre-miRNA 结构的寻找。Grundhoff 等人^[28]应用 virMir 改进版 Vmir 预测软件并结合基因芯片技术和 Northern 杂交方法成功地从 EBV 和 KSHV 病毒中发现了一部分新 miRNA 分子, 显示计算机软件与其他多种方法的有机结合在发现病毒 miRNA 分子上的巨大潜力。

3.2 克隆、测序与鉴定方法

() 利用克隆与测序方法寻找 miRNA。沿用哺乳动物细胞小分子 RNA 克隆的方法^[46]。基本过程是: 将感染细胞裂解, 获得总 RNA; 变性凝胶电泳分级分离法获取大小约为 22 个核苷酸的小 RNA; 利用 RT-PCR 获得 cDNA, 构建小 RNA 的 cDNA 文库; 从文库中筛选克隆进行测序, 获得病毒 miRNA 序列^[17,18,23,24,29]。

() 鉴定方法。Northern 杂交是检测 miRNA 最

常用和直接的方法, 检测的对象和目标是 pre-miRNA 和成熟 miRNA。除此之外, 还有 RT-PCR、RPAs (RNase protection assays, 核酸酶保护实验)、液相杂交、原位杂交、基因芯片等技术, 可参照有关动物细胞 miRNA 表达的检测方法来进行^[24,28,46]。

4 病毒 miRNA 作用靶 mRNA 分子

从基因组数据库获得人、小鼠转录本以及病毒的转录本 3' 端非编码区序列(3'-UTR), 从 miRNA 数据库获得成熟 miRNA 序列, 利用 Enright 等人^[23,47-49]开发的计算机 MiRanda 算法检测病毒 miRNA 结合 3'-UTR 的位点序列, 根据参数评价和预测出候选病毒 miRNA 作用靶 mRNA 分子。

4.1 病毒 miRNA 作用于宿主 mRNA

近来, 人们利用计算机软件, 分析和鉴定 miRNA 作用的靶 mRNA 分子。John 等人^[47-49]已预测出 HCMV miR-UL23 和 miR-UL24 作用的潜在宿主细胞目标 mRNA。这些 miRNA 能识别多种蛋白的 mRNA 分子, 如它们可与白介素 18 受体 1 前体(IL1 receptor-related protein)、组织酶 S 前体(cathepsin S precursor)、联合复合体蛋白 1 (synaptonemal complex protein 1, SCP-1 protein) 等的 mRNA 互补, 来发挥其多种生物功能。Pfeffer 等人^[24,50]参照果蝇(*Drosophila*) miRNA 目标靶 mRNA 预测软件, 预测结果表明, EBV miR-BART1 可与细胞凋亡调节因子 Bcl-2 mRNA 3' 端非编码区结合, 参与调控宿主细胞凋亡和细胞增殖; 与锌指蛋白 177 (zinc finger protein 177) mRNA 3' 端非编码区结合, 参与基因转录的调控; 与基质细胞衍生因子 1 前体(stromal cell derived factor 1) mRNA 3' 端非编码区结合, 参与信号传导。Dunn 等人^[25]利用网上免费计算机软件 MFOLD 3.1 资源预测 HCMV 病毒 pre-miRNA 结构, 利用 BioPerl 应用程序界面以及 miRanda 目标预测算法搜索 NCBI 和 EMBL 数据库来预测病毒 miRNA 潜在宿主细胞靶 mRNA 作用位点。

宾夕法尼亚大学医学院 Fraser 博士领导的研究组发现, 单纯疱疹病毒(HSV-1)能够产生一种 miRNA 分子(由病毒 LAT 编码), 通过 RNA 干扰过程来阻止细胞死亡或凋亡, 结果潜伏性的被感染细胞不会死亡, 潜伏性的病毒感染将持续一生, 从而找出了 HSV-1 引起感冒疮反复发作的部分原因。这项新的研究指出, miRNA 不仅是哺乳动物基因表达的重要调节者, 而且对 HSV-1 也同样重要, 为它在神经元内长

期存活提供一个隐蔽之所。

HSV-1的LAT基因由Fraser和同事于1984年发现^[32],但没有发现它编码什么蛋白质。这种疑惑使得Fraser领导的研究组推测LAT可能通过编码一个miRNA分子来干扰两种细胞死亡所需蛋白质TGF- β (β 转化生长因子)和SMAD-3 (一种信号蛋白)的翻译来起作用,即LAT miRNA与这两个基因的mRNA特定序列结合,并导致它们的降解。因此,TGF- β 和SMAD-3蛋白的量在这种细胞中减少,从而抑制了凋亡的发生。由于这种潜伏性的病毒并不制造任何病毒蛋白,因此被感染个体的免疫系统不能检测到受感染的细胞。

目前HSV-1治疗依赖acyclovir (阿昔洛韦,无环鸟苷)及其衍生物。这类药物靶向病毒的聚合酶并抑制病毒急性感染期间的DNA复制,但是它们不能靶向潜伏性感染的病毒,结果感冒疮仍能在一生反复发作。如果找到能作用于细胞TGF- β 途径的miRNA,则将为战胜潜伏感染提供了一个新靶标,并且为治疗这种疾病给出了一个截然不同的方法。Fraser研究组^[32]正在分析HSV-2 (HSV-1的一个近亲,能导致生殖器疱疹)是否也能编码一种miRNA。

4.2 病毒 miRNA 作用于病毒自身 mRNA

据预测,EB病毒miR-BART2来自其DNA聚合酶——BALF5转录本反义链,具有与BALF5 3'端UTR完全互补的序列,因此可能指导BALF5 mRNA降解和调控BALF5基因表达^[24]。研究表明,全长5.0 kb BALF5 mRNA的加工降解产物3.7 kb片段,其3'端序列与Pfeffer等人预测的miR-BART2指导的裂解位点非常吻合。此外,miR-BART2可与BMLF1 (EB2) mRNA 3'端结合,miR-BART1可与BBLF4和LMP2A mRNA 3'端结合,从而达到调节病毒自身基因表达的目的^[51]。

5 病毒 miRNA 的作用

5.1 在病毒感染和复制中的作用

在人、植物以及线虫体内,只要有数百个小分子RNA就能够通过干扰相应的mRNA来使特定的基因保持沉默,而且这种干扰会使mRNA无法产生蛋白质。科学家正在寻找这种小分子RNA究竟能够沉默哪些基因。新的研究成果提供的越来越多的证据表明,这种小分子不仅对细胞产生重要作用,而且对个体的生长发育等也产生重要影响^[2-4,52-55]。当科学家发现

RNA干扰可能是一种基本而普遍的基因调控机制时,那么有一个事实很明显,那就是这样一种基本调节途径难免会被病毒所盗用。来自洛克菲勒大学的Tuschl是前任霍华德休斯研究所(HHMI)的研究员,之前他已经发现了由EB病毒编译成的几种miRNA分子,但是并没有发现它们的具体功能^[24]。Sullivan等人^[38]的研究显示,SV40病毒能够通过适应并巧妙利用这一系统来躲避免疫系统的攻击。虽然SV40是科学家研究最多的病毒之一,T抗原是科学家在对这种病毒研究中接触最多的分子,但是发现它的合成是由病毒自身产生的miRNA来控制的,这还是新近发现的研究成果。宿主miRNA的干扰机制长期以来都被认为是由抗病毒机制的形式进化而来的,而病毒显然能够利用这种机制产生小分子RNA来达到自身生存的目的。

SV40病毒基因组分为早期、晚期两大区域,之间为复制起始点。晚期转录区编码的基因产物为VP1,VP2和VP3,是SV40的外壳结构蛋白;早期转录区编码的基因产物为大T抗原与小T抗原。基因复制区有大T,中T和小T三种重叠的基因序列,分别编码大中和小T三种抗原。大T抗原分子定位于细胞核内,分子内存在的核苷酸结合部位具有与细胞核DNA结合的特性。大T基因在细胞转化过程中主要功能是导致细胞获得永生即促使细胞发生癌变^[56-59]。SV40病毒miRNA基因位于SV40相关小分子RNA (SV40-associated small RNA, SAS)末端,且5'端有20 nt的重叠,pre-miRNA约80 nt(位于基因组第2782~2861位区域),成熟miRNA长为15~31 nt。

霍华德休斯研究所的研究者Sullivan等人^[38]的研究报告说明,在病原体与宿主相互斗争的过程中,病毒似乎能在一种基因沉默机制的掩护下躲避免疫细胞的监视和攻击,达到感染宿主的目的。SV40病毒编码猴子细胞感染后期所涉及的miRNA,通过减少多余的T抗原来维持病毒复制效率,降低宿主对T抗原的免疫反应,从而达到免疫逃避的目的^[39]。有人曾提出,虽然哺乳动物体内RNA干扰系统是为了防卫病毒,但是该例子却表明病毒为了自身生存的需要可通过病毒miRNA破坏宿主抗病毒RNA干扰途径。

SV40病毒miRNA的作用机理是:SV40病毒miRNA通过作用于编码T抗原的mRNA靶标并使其降解。当SV40病毒感染细胞时会产生T抗原,激发病毒DNA复殖。受感染细胞成为宿主T淋巴细胞的攻击对

象,也就是说,免疫细胞通过摧毁受感染细胞来防止病毒进一步扩散,当然这对于病毒是不利的。miRNA在感染周期的最后阶段才会产生,而这时T抗原已经不再是病毒复殖的必需条件。这样毒性T淋巴细胞更容易攻击那些无法产生miRNA的病毒变体,例如SV40的突变型SM毒株T抗原mRNA作用位点发生突变,不能被病毒miRNA识别而发生基因表达沉默或者翻译抑制,T抗原表达量不会减少,结果诱发宿主细胞正常的免疫应答反应,病毒受到毒性T淋巴细胞攻击而被宿主清除。因此,野生型SV40病毒miRNA引发T抗原表达减少,从而使病毒避免受到抗病毒T细胞的攻击,并且得以维持持续感染^[38,58-61]。

EB病毒miR-BART2通过与病毒聚合酶mRNA结合,指导其mRNA降解,关闭聚合酶的翻译,使病毒DNA停止复制,导致宿主处于隐性感染状态^[24]。HIV miR-N367在人T细胞内通过作用于5'-LTR(long terminal repeat,长末端重复)U3区负向反应元件(negative response element),降低5'-LTR启动子活性,抑制病毒转录,以达到维持持续感染状态的目的^[36,44,62-65]。Couturier等人^[64]根据预测和分析,认为HIV可能产生抑制性病毒miRNA分子,阻止T细胞CD28, CD4和其他细胞因子的产生,从而导致人免疫功能下降和产生病理作用。

5.2 致肿瘤作用

宿主细胞可以编码miRNA来对抗病毒的感染,但是病毒本身的基因组也可以编码自己的miRNA分子来攻击宿主细胞的防御系统。最近发现,宿主细胞miR-32可抑制灵长类泡沫病毒1型(PFV-1)感染。如果通过反义核酸技术敲除miR-32编码基因以阻止其表达或者缺失miR-32作用的病毒基因靶序列,则病毒在细胞内的复制将显著增加。这是宿主细胞可能利用自身miRNA分子作为抗病毒感染武器的第一个例子^[38,66]。相反,意外的例子也有报道,肝特异性miR-122可以结合丙型(C)肝炎病毒(HCV)5'-UTR,从而正调控(帮助)病毒RNA复制,这值得引起人们的关注^[67]。

HCV为RNA病毒,易发生基因变异,逃避免疫系统监视,并对抗病毒药物产生抗药性。最近,斯坦福大学医学院的Sarnow教授领导的研究组发现了HCV新的复制机制,这项研究也是首次发现特定miRNA与传染性疾病间的关联性。当miR-122失去活性时,丙型肝炎病毒的RNA复制降低约80%。

miR-122由宿主编码和控制,病毒无法将其改变,并需要miR-122来进行复制,因此病毒无法发展对抗宿主miR-122失活的策略。miRNA与其靶标间的作用方式与目前已知的模式完全不同,这项新发现可能给出了不直接攻击病毒的新抗病毒靶标。研究人员推测,如果能降低肝脏内miRNA含量而不影响肝脏功能,则可能有助于降低病毒数量。最近洛克菲勒大学的研究人员已经发现,老鼠肝脏内miR-122失去活性后并未破坏肝脏功能。这意味着miR-122是抗丙肝病毒的一个潜力巨大的新靶标^[67]。

目前所鉴定的miRNA所属病毒绝大多数属致肿瘤病毒。因此,可以推测病毒miRNA与肿瘤关系密切。病毒致癌新学说认为,病毒miRNA分子的序列恰好是针对宿主细胞中肿瘤抑制基因,如EB病毒miR-BHRF1-1具有与肿瘤抑制基因P53结合的潜在位点,与细胞凋亡调节因子Bcl-2 mRNA 3'端非编码区的结合位点,从而参与调控宿主细胞凋亡和细胞增殖,这可能会导致宿主抑癌基因功能的丧失和免疫监视功能的失常,最终引起肿瘤的发生^[24]。

6 未来研究方向

() 鉴定新的病毒miRNA分子。自Tuschl和同事们^[50]首次报道病毒miRNA以来,在随后短短的3年多时间里,研究人员又从人和小鼠的大型DNA病毒及HIV-1中发现了miRNA。尽管如此,所发现的miRNA只是冰山一角^[24,38],因此鉴定病毒miRNA分子仍是今后的研究热点和发展方向之一。

() 鉴定病毒miRNA作用的靶mRNA。目前,miRNA作用靶点或靶分子预测还很不成熟,有待今后新型计算机软件的开发和生物信息学的发展来实现^[28,66-68]。

() 病毒miRNA表达谱分析。利用芯片技术研究病毒在感染不同细胞系和感染时期等条件下病毒miRNA及其作用靶mRNA表达谱的变化规律,为病毒致病机理、疾病诊断等提供科学依据^[28,69-74]。

() 病毒miRNA在生物合成、功能、进化等方面的意义和启示。对病毒miRNA的深入研究将给生物miRNA合成和功能研究带来新的意义和重要启示,如病毒不仅利用自身的miRNA而且还可利用宿主的miRNA来调节病毒或/和宿主的基因表达。

() 病毒miRNA的应用研究。miRNA在基因调控中的作用大多尚不清楚。就病毒miRNA而言,目前仅对SV40病毒miRNA的功能有初步的了解和

认识, 其他病毒 miRNA 的具体功能有待于今后进一步鉴定和研究. 病毒 miRNA 灭活宿主细胞肿瘤抑制基因致癌新学说给人以新的启迪, 从应用的角度出发可不必仅拘泥于研究怎样抑制病毒在细胞内的复制, 只要能够抑制病毒中真正对宿主有威胁的 miRNA 编码基因, 也可以有效防止病毒的致癌作用. 这指明了抗病毒治疗的一种新方向, 给今后以 miRNA 为靶点或者以 miRNA 作为治疗疾病的手段带来广阔的应用前景.

7 结束语

综上所述, 病毒 miRNA 与已发现的其他生物 miRNA 相比较, 在生物合成、进化等方面有其自身的一些特点. 虽然病毒 miRNA 的鉴定及其功能研究尚处于开始阶段, 但已引起科学家的极大兴趣, 新发现的病毒 miRNA 数量正在迅速增加. 病毒 miRNA 分子作用机制及其功能研究将成为生命科学领域面临的新课题, 研究成果将有助于揭示病毒致病机理, 为疾病的控制提供新的思路和方法. 相信随着这方面研究的深入, 将对人类疑难性传染病起因分析和有效防治等产生深远影响.

致谢 向对撰写本文提出建设性意见的中山大学生命科学学院生物工程研究中心的屈良鹤教授表示衷心的感谢.

参 考 文 献

- Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75: 843—854, doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-Y
- Reinhart B J, Slack F J, Basson M, et al. The 21 nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000, 403: 901—906, doi: 10.1038/35002607
- Yin J Q, Wang Y. siRNA-mediated gene regulation system: Now and the future. *Int J Mol Med*, 2002, 10: 355—365
- Tan F L, Yin J Q. Application of RNAi to cancer research and therapy. *Front Biosci*, 2005, 10: 1946—1960, doi: 10.2741/1670
- van Rooij E, Sutherland L B, Liu N, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 18255—18260, doi: 10.1073/pnas.0608791103
- Alvarez-Garcia I, Miska E A. microRNA functions in animal development and human disease. *Development*, 2005, 132: 4653—4662[DOI]
- 何晨, 谭军, 陈薇, 等. microRNA 研究进展. *生物技术通报*, 2006, 17: 18—25
- Kloosterman W P, Plasterk R H. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell*, 2006, 11: 441—450[DOI]
- Jeyaseelan K, Herath W B, Armugam A. MicroRNAs as therapeutic targets in human diseases. *Exp Opin Ther Targets*, 2007, 11: 1119—1129[DOI]
- Mao T K, Chen C Z. Dissecting microRNA-mediated gene regulation and function in T-Cell development. *Methods Enzymol*, 2007, 427: 171—189[DOI]
- Giannakakis A, Coukos G, Hatzigeorgiou A, et al. miRNA genetic alterations in human cancers. *Exp Opin Biol Ther*, 2007, 7: 1375—1386[DOI]
- Bartel D P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116: 281—297, doi: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5
- Suh M R, Lee Y, Kim J Y, et al. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol*, 2004, 270: 488—498, doi: 10.1016/j.ydbio.2004.02.019
- Cheng A M, Byrom M W, Shelton J, et al. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: 1290—1297, doi: 10.1093/nar/gki200
- Croce C M, Calin G A. miRNAs, cancer, and stem cell division. *Cell*, 2005, 122: 6—7, doi: 10.1016/j.cell.2005.06.036
- Sullivan C S, Ganem D. microRNAs and viral infection. *Mol Cell*, 2005, 20: 3—7, doi: 10.1016/j.molcel.2005.09.012
- Berezikov E, Plasterk R H A. Camels and zebrafish, viruses and cancer: A microRNA update. *Human Mol Genetics*, 2005, 14(Review Issue 2): R183—R190, doi: 10.1093/hmg/ddi271
- Pfeffer S, Zavolan M, Grässer F A, et al. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*, 2004, 304: 734—736, doi: 10.1126/science.1096781
- Neilson J R, Sharp P A. Herpesviruses throw a curve ball: New insights into microRNA biogenesis and evolution. *Nat Methods*, 2005, 2: 252—254, doi: 10.1038/nmeth0405-252
- Ghosh Z, Chakrabarti J, Mallick B. miRNomics—The bioinformatics of microRNA genes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 363: 6—11, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.08.030
- Griffiths-Jones S. The microRNA registry. *Nucl Acids Res*, 2004, 32: D109—D111, doi: 10.1093/nar/gkh023
- Griffiths-Jones S, Grocock R J, Dongen van S, et al. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acid Res*, 2006, 34: D140—D144, doi: 10.1093/nar/gkj112
- Cai X Z, Lu S H, Zhang Z H, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus expresses an array of viral microRNAs in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 5570—5575, doi: 10.1073/pnas.0408192102
- Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, et al. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods*, 2005, 2: 269—276, doi: 10.1038/nmeth746
- Dunn W, Trang P, Zhong Q, et al. Human cytomegalovirus express novel microRNAs during productive viral infection. *Cell Microbiol*, 2005, 7: 1684—1695, doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00598.x
- Grey F, Antoniewicz A, Allen E. Identification and characterization

- of human cytomegalovirus-encoded microRNAs. *J Virol*, 2005, 79: 12095—12099, doi: 10.1128/JVI.79.18.12095-12099.2005
- 27 Cai X Z, Schäfer A, Lu S H, et al. Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed. *PLoS Pathog*, 2006, 2: 0236—0247, doi: 10.1371/journal.ppat.0020023
- 28 Grundhoff A, Sullivan C S, Ganem D. A combined computational and microarray-based approach identifies novel microRNAs encoded by human gamma-herpesviruses. *RNA*, 2006, 12: 733—750, doi: 10.1261/rna.2326106
- 29 Samols M A, Hu J H, Skalsky R L, et al. Cloning and identification of a microRNA cluster within the latency-associated region of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol*, 2005, 79: 9301—9305, doi: 10.1128/JVI.79.14.9301-9305.2005
- 30 Burnside J, Bernberg E, Anderson A. Marek's disease virus encodes microRNAs that map to meq and the latency-associated transcript. *J Virol*, 2006, 80: 8778—8786, doi: 10.1128/JVI.00831-06
- 31 Cui C, Griffiths A, Li G L, et al. Prediction and identification of herpes simplex virus 1-encoded microRNAs. *J Virol*, 2006, 80: 5499—5508, doi: 10.1128/JVI.00200-06
- 32 Gupta A, Gartner J J, Sethupathy P, et al. Anti-apoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript. *Nature*, 2006, 442: 82—85, doi: 10.1038/nature04836
- 33 Yao Y, Zhao Y, Xu H, et al. Marek's disease virus type 2 (MDV-2)-encoded microRNAs show no sequence conservation with those encoded by MDV-1. *J Virol*, 2007, 81: 7164—7170[DOI]
- 34 Schäfer A, Cai X, Bilello J P, et al. Cloning and analysis of microRNAs encoded by the primate γ -herpesvirus rhesus monkey rhadinovirus. *J Virol*, 2007, 364: 21—27, doi: 10.1016/j.virol.2007.03.029
- 35 Samols M A, Skalsky R L, Maldonado A M, et al. Identification of cellular genes targeted by KSHV-encoded microRNAs. *PLoS Pathog*, 2007, 3: e65, doi: 10.1371/journal.ppat.0030065
- 36 Omoto S, Fujii Y R. Regulation of human immunodeficiency virus 1 transcription by nef microRNA. *J Gen Virol*, 2005, 86: 751—755, doi: 10.1099/vir.0.80449-0
- 37 Kaul D, Khanna A, Suman. Evidence and nature of a novel miRNA encoded by HIV-1. *Proc Indian Natn Sci Acad*, 2006, 72: 91—95
- 38 Sullivan C S, Grundhoff A T, Tevethia S, et al. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature*, 2005, 435: 682—686, doi: 10.1038/nature03576
- 39 姚成果, 金由辛. miRNA 的生物合成过程. *生命的化学*, 2004, 24: 284—286
- 40 吴玉清, 于琦, 赵林, 等. 疱疹病毒 6, 7, 8 型感染的研究进展. *中国输血杂志*, 2005, 18: 70—73
- 41 康晓静, 沈大为, 普雄明. 人疱疹病毒 8 型 Kaposi 肉瘤相关疱疹病毒及其相关疾病的研究进展. *国外医学皮肤病学分册*, 2004, 22: 221—225
- 42 程立. 致瘤性人类疱疹病毒(HHV)的研究进展. *中国病理生理杂志*, 2000, 16: 1037
- 43 Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 3406—3415, doi: 10.1093/nar/gkg595
- 44 Yeung M L, Bennisser Y, Le S Y, et al. siRNA, miRNA and HIV: Promises and challenges. *Cell Res*, 2005, 15: 935—946[DOI]
- 45 Lu S H, Cullen B R. Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and microRNA biogenesis. *J Virol*, 2004, 78: 12868—12876, doi: 10.1128/JVI.78.23.12868-12876.2004
- 46 陈芳, 殷勤伟. 调控基因表达的 miRNA. *科学通报*, 2005, 50: 1289—1299
- 47 Enright A J, John B, Gaul U, et al. MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol*, 2003, 5: R1, doi: 10.1186/gb-2003-5-1-r1
- 48 John B, Enright A J, Aravin A, et al. Erratum: Human microRNA targets. *PLoS Biol*, 2005, 3: e264, doi: 10.1371/journal.pbio.0030264
- 49 John B, Enright A J, Aravin A, et al. Human microRNA targets. *PLoS Biol*, 2004, 2: e363, doi: 10.1371/journal.pbio.0020363
- 50 Aravin A, Tuschl T. Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing. *FEBS Lett*, 2005, 579: 5830—5840, doi: 10.1016/j.febslet.2005.08.009
- 51 Furnari F B, Adams M D, Pagano J S. Unconventional processing of the 3' termini of the Epstein-Barr virus DNA polymerase mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 378—382[DOI]
- 52 Li H W, Ding S W. RNAi: Antiviral silencing in animals. *FEBS Lett*, 2005, 579: 5965—5973, doi: 10.1016/j.febslet.2005.08.034
- 53 Nakayashiki H. RNA silencing in fungi: Mechanisms and applications. *FEBS Lett*, 2005, 579: 5950—5957, doi: 10.1016/j.febslet.2005.08.016
- 54 Grishok A. RNAi mechanisms in *C. elegans*. *FEBS Lett*, 2005, 579: 5932—5939, doi: 10.1016/j.febslet.2005.08.001
- 55 Kavi H H, Fernandez H, Xie W, et al. RNA silencing in *Drosophila*. *FEBS Lett*, 2005, 579: 5940—5949, doi: 10.1016/j.febslet.2005.08.069
- 56 Alwine J C, Khoury G. Simian virus 40-associated small RNA: Mapping on the simian virus 40 genome and characterization of its synthesis. *J Virol*, 1980, 36: 701—708
- 57 Jasenchakova Z, Meister A, Walter J, et al. Histone H4 acetylation of euchromatin and heterochromatin is cell cycle dependent and correlated with replication rather than with transcription. *Plant Cell*, 2000, 12: 2087—2100 [DOI]
- 58 Hermansen R, Sierra M A, Johnson J, et al. Identification of simian virus 40 promoter DNA sequences capable of conferring restriction endonuclease hypersensitivity. *J Virol*, 1996, 70: 3416—3422
- 59 Balakrishnan L, Milavetz B. Programmed remodeling of hyperacetylated histone H4 and H3 organization on the SV40 genome during lytic infection. *Virol*, 2005, 334: 111—123, doi: 10.1016/j.virol.2005.01.025
- 60 Cantalupo P, Doering A, Sullivan C S, et al. Complete nucleotide sequence of polyomavirus SA12. *J Virol*, 2005, 79: 13094—13104, doi: 10.1128/JVI.79.20.13094-13104.2005
- 61 Mylin L M, Schell T D, Roberts D, et al. Quantitation of CD8⁺ T-lymphocyte responses to multiple epitopes from simian virus 40 (SV40) large T antigen in C57BL/6 mice immunized with SV40, SV40 T-antigen-transformed cells, or vaccinia virus recombinants expressing full-length T antigen or epitope minigenes. *J Virol*,

- 2000, 74: 6922—6934[DOI]
- 62 Bennasser Y, Le S Y, Benkirane M, et al. Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and a suppressor of RNA silencing. *Immunity*, 2005, 22: 607—619, doi: 10.1016/j.immuni.2005.05.004
- 63 Omoto S, Ito M, Tsutsumi Y, et al. HIV-1 nef suppression by virally encoded microRNA. *Retrovirology*, 2004, 1: 44, doi: 10.1186/1742-4690-1-44
- 64 Couturier J P, Root-Bernstein R S. HIV may produce inhibitory microRNAs (miRNAs) that block production of CD28, CD4 and some interleukins. *J Theoretical Biol*, 2005, 235: 169—184, doi: 10.1016/j.jtbi.2005.01.001
- 65 Bennasseer Y, Le S Y, Yeung M L, et al. HIV-1 encoded candidate micro-RNAs and their cellular targets. *Retrovirology*, 2004, 1: 43, doi: 10.1186/1742-4690-1-43
- 66 Lecellier C H, Dunoyer P, Arar K, et al. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science*, 2005, 308: 557—560, doi: 10.1126/science.1108784
- 67 Jopling C L, Yi M K, Lancaster A M, et al. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science*, 2005, 309: 1577—1581, doi: 10.1126/science.1113329
- 68 张冬宁, 刘阳, 王翼飞. 一个预测与搜寻 miRNA 基因的计算工具 MiRdetector. *上海大学学报(自然科学版)*, 2006, 12(4): 376—382
- 69 Zilberstein C B Z, Ziv-Ukelson M, Pinter R Y, et al. A high-throughput approach for associating microRNAs with their activity conditions. *Lect Notes Bioinformatics (Subser Lect Notes Comp Sci)*, 2005, 3500: 133—151, doi: 10.1007/b135594
- 70 Lim L P, Lau N C, Garrett-Engle P, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 2005, 433: 769—773, doi: 10.1038/nature03315
- 71 Chen P Y, Manninga H, Slanchev K, et al. The developmental miRNA profiles of zebrafish as determined by small RNA cloning. *Genes Dev*, 2005, 19: 1288—1293, doi: 10.1101/gad.1310605
- 72 Barad O, Meiri E, Avniel A, et al. MicroRNAs expression detected by oligonucleotide microarrays: System establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Res*, 2004, 14: 2486—2494, doi: 10.1101/gr.2845604
- 73 Lu J, Getz G, Miska A E, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancer. *Nature*, 2005, 435: 834—838, doi: 10.1038/nature03702
- 74 Shingara J, Keiger K, Shelton J, et al. An optimized isolation and labeling platform for accurate microRNA expression profiling. *RNA*, 2005, 11: 1461—1470, doi: 10.1261/rna.2610405

· 动态 ·

控制水稻分蘖角度的新基因 *TAC1* 的分离和克隆

作为组成水稻株型的关键因子之一, 分蘖角度是一个影响到水稻群体光合效率、植株抗逆性能, 并最终影响到谷物产量和品质的重要农艺性状。目前国内外的相关研究, 除水稻生长素的极性运输负调控因子 *LAZY1* 影响分蘖角度形成方面的研究外, 大多局限在遗传作图和分子定位上, 控制水稻分蘖角度的分子机理还知之甚少。

多个研究小组都在水稻第9染色体长臂上定位到一个控制分蘖角度的主效 QTL。中国农业大学孙传清教授实验室利用一个株型松散的籼稻品种“IR24”为遗传背景, 渗入少量粳稻品种“Asominori”染色体片段的株型紧凑渗入系“IL55”为材料, 通过图位克隆的方法, 分离了一个与该主效 QTL 对应的控制水稻分蘖角度的新基因 *Tiller Angle Controlling (TAC1)*。来自 IR24 的 *TAC1* 由 5 个外显子和 4 个内含子组成, 编码一个由 259 个氨基酸组成的新蛋白。同源性检索表明, 该蛋白可能为禾本科植物所特有。基因结构比较结果显示, 来自 IL55 的 *tac1* 基因在对应于 *TAC1* 第 4 内含子的 3' 拼接点处基因组序列由“agga”突变为“ggga”, 导致该内含子在 mRNA 加工过程中不能正常剪切, poly(A) 加尾提前, 最终导致了 *TAC1* 与 *tac1* cDNA 虽然编码相同的氨基酸序列, 但具有完全不同的 3' 非翻译区。表达比较分析结果, IR24 的 mRNA 水平显著高于 IL55, 说明

tac1 3'-UTR 导致 mRNA 的稳定性降低。对 *TAC1* 过量表达和 RNAi 转基因株系的观察结果显示, *TAC1* 上调表达导致分蘖角度增大, 而下调表达导致分蘖角度减小, 表明 *TAC1* mRNA 水平决定着分蘖角度的大小。*TAC1* 不同组织器官表达谱分析和 GUS 染色结果显示, *TAC1* 除在茎的节部表达外, 主要在分蘖基部不伸长节、节部与叶鞘交接部位的叶鞘枕两处与分蘖角度形成密切相关的部位表达。对 *TAC1* 第 4 内含子的 3' 拼接点序列在不同水稻中进行聚类分析, 88 个株型紧凑的粳稻品种中都表现为 *tac1* 类型, 而 43 个株型松散的籼稻品种和 21 个野生稻材料全部表现为 *TAC1* 类型。粳稻一般分布于高纬度和高海拔等光热条件不利于水稻生长的地区, *tac1* 基因型在粳稻中的广泛分布, 表明这一地区人类在水稻长期驯化和栽培过程中为适应密植, 人工选择并广泛利用了 *tac1* 基因型。该研究结果近日发表在 *Plant J* 上¹⁾。

TAC1 基因的克隆和功能分析, 为诠释水稻分蘖角度控制的分子机制以及水稻演化路线提供了新的实验和理论依据。

1) Yu B S, Lin Z W, Li H X, et al. *TAC1*, a major quantitative trait locus controlling tiller angle in rice. *Plant J*, 2007, OnlineEarly Articles. 10.1111/j.1365-313X.2007.03284.x