

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00315

植物 miRNA 的进化

魏强, 梁永宏, 李广林

陕西师范大学生命科学学院, 西安 710062

摘要: 鉴于 miRNA 在植物基因表达调控中的重要作用, 人们已经开展对植物 miRNA 的预测、鉴定、功能和进化等方面的研究。随着许多模式植物基因组测序的完成, miRNA 的基因组学和进化信息的整合为 miRNA 的起源和进化研究提供了越来越多的证据和假说, 然而尚未见关于植物 miRNA 进化方面的系统报道。文章从 miRNA 的起源以及相应的几种假说、miRNA 的产生和消亡、miRNA 的功能进化等几方面来分析和综述植物 miRNA 进化的研究进展。

关键词: miRNA; 进化; 产生和消亡; 起源假说

Evolution of miRNA in plants

WEI Qiang, LIANG Yong-Hong, LI Guang-Lin

College of Life Science, Shanxi Normal University, Xi'an 710062, China

Abstract: Due to the important role of miRNA in regulation of plant gene expression, researchers have focused on the prediction, identification, functional and evolutionary analysis of miRNA. As genome sequencing has been completed in many species, the integration of genomic sequences with evolutionary data of miRNA provides more and more evidence and hypotheses for the origin and evolution of miRNA. However, the evolution of miRNA in plants has not been extensively reviewed. In this article, we reviewed several aspects of the evolution of miRNA in plants, including the origin hypothesis of miRNA, the birth and death of miRNA, and the functional evolution of miRNA, which provides a reference for future research.

Keywords: miRNA; evolution; birth and death; origin hypothesis

microRNA (miRNA) 是一类长度为 19~24nt 的非编码小分子 RNA, 其作为一种转录后调控因子在真核生物的基因表达调控中有着非常重要的作用。miRNA 在转录后水平通过与 mRNAs 的序列互补识别靶基因, 并引起靶基因的降解或抑制其翻译, 最

终达到抑制特定基因表达的目的^[1]。自 1993 年 Lee 等^[2]从线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中发现 miRNA 以来, miRNA 便开始受到人们的关注, 目前在 DNA 病毒、单细胞生物和动植物中均有发现 (<http://www.mirbase.org/>)。最早发现的 miRNA 是运用正向遗传学

收稿日期: 2012-07-03; 修回日期: 2012-08-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31070256)和中央高校基本科研业务费项目(编号: GK200902036)资助

作者简介: 魏强, 硕士研究生, 专业方向: 植物功能基因组学与生物信息学。Tel: 15829355548; E-mail: lq102021@126.com

通讯作者: 李广林, 博士, 副教授, 研究方向: 植物功能基因组学与生物信息学。E-mail: gli@snnu.edu.cn

网络出版时间: 2012-12-19 10:06:31

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20121219.1006.003.html>

的方法从线虫中通过克隆发现的 *lin-4*^[2], 后来在植物中利用突变体分析以及直接克隆和测序分析发现 miRNA^[3]。现在主要用生物信息学和实验相结合的方法来识别植物 miRNA。生物信息学预测主要是根据 miRNA 前体的二级结构来预测。miRNA 验证一般利用的是核酸杂交或扩增的原理, 如 Northern 杂交、芯片、原位杂交、实时 PCR、滚环扩增和基于共轭聚合物的检测方法等^[4]。目前在 miRBase (Release 18) 中储存有 168 个物种的 18 226 条发夹前体序列和 21 643 条成熟 miRNA 序列及其前体序列, 这为 miRNA 的进化分析提供了可靠的资源 (<ftp://mirbase.org/pub/mirbase/CURRENT/README>)。

大多数古老的植物 miRNA 在物种间是高度保守的, 这暗示了其功能的重要性^[5,6]。然而, 非保守的 miRNA 可能对物种特有新功能的产生有重要的意义。研究发现植物年轻 miRNA 的出现是由靶基因的反向复制产生的^[7]。miRNA 不断进化并形成基因家族, 那么 miRNA 基因究竟是怎样进化并成大家族的? 本文结合作者的研究就植物基因组中 miRNA 基因家族进化研究的最新进展作一综述。

1 植物 miRNA 基因的物种分布与保守性

1.1 植物 miRNA 基因的产生

miRNA 基因在细胞核中转录后, 形成初级转录本 pri-miRNA, 随后被剪切为前体 miRNA (pre-miRNA), 进而在 DCL1 (Dicer-like 1) 作用下被剪切为 50~500nt 的茎环结构。在 HLY1 (Hyponastic Leavas 1) 和 SE (Serrate) 的作用下将茎环结构加工成 miRNA/miRNA* 复合体。该复合体在 S-腺苷甲硫氨酸依赖的甲基转移酶 HEN 1 (Hua enhancer 1) 的作用下在 3' 端进行甲基化修饰, 然后在植物外运蛋白直系同源物 5 (HASTY) 的作用下由核输出到胞质中。在胞质中 miRNA 的一条链被降解, 另一条链进入 RNA 诱导的基因沉默复合体 (RISC 蛋白复合体) 中, 该复合体结合到靶 mRNA 上诱导 mRNA 裂解^[8]。植物 miRNA 前体在长度和二级结构上变化较大, 但这种变化在物种间和物种内都有一定的规律, 如 miR164 和 miR408。这种变化似乎反映出 miRNA 前体识别和剪切的不同分子机制。然而这种变化不是绝对的, 在一些家族中, 所有成员的大小都是统一的, 如

miR319。这种现象可能成为影响 miRNA 结构和功能差异及进化的分子基础^[9-11]。

1.2 miRNA 的物种分布及其保守性

不同植物物种中大部分 miRNA 是保守的^[12], 一个物种中的 miRNA 基因在其他物种中有直系同源基因存在^[10]。例如 Zhang 等^[6]在 71 个物种中鉴定了 37 个 miRNA 家族的 481 个 miRNAs, 结果表明至少存在于 10 个不同物种中的 miRNA 家族是高度保守的, 如 miR156/157、miR172、miR170/171、miR165/166、miR159/319、miR396、miR168、miR160、miR390。存在于 5~9 个不同物种中的 miRNA 被认为是中度保守, 如 miR394、miR164、miR169、miR167、miR162、miR398、miR414、miR393、miR397、miR163。存在于 2~4 个不同物种中的 miRNA 家族被认为是低度保守的, 如 miR158、miR395、miR408、miR399、miR403、miR161、miR406、miR173、miR415、miR416、miR417、miR418、miR419、miR420、miR426。存在于 1 个物种中的 miRNA 被认为是非保守的。其他的研究也有类似的结果^[13,14]。通常在植物中鉴定的 miRNA 从 miR156 到 miR408 大部分是相当保守和古老的, 且在植物发育及胁迫响应等方面起着非常关键的作用, 其表达水平也比较高; 然而, miR408 以后的 miRNA 家族被认为是在进化过程中新产生的, 它们通常具有特定的功能, 而且具有种属特异性, 通常弱表达, 一些还需要特殊条件的诱导^[15,16]。我们在黄瓜 (*Cucumis sativus*) miRNA 的研究中也发现有类似的结果, 如图 1 所示。

我们的研究还表明, miR156/157、miR159/319、miR166、miR170/171、miR160、miR167、miR390、miR395、miR408、miR414、miR419、miR529、miR477 和 miR536 存在于有胚植物中。miR396 家族在维管植物中最早出现, miR398 则在种子植物中出现。另外 miR164、miR168、miR169、miR172 和 miR393 等家族在被子植物中均有发现。除了 miR397 家族外, 这个结果和 Cuperus 等^[3]的研究结果相似。值得注意的是, 只有 miR403 家族出现在真双子叶植物中, 推测它可能是真双子叶植物所特有的家族。在动物 miRNA 保守性的研究中也发现具有类似的情况, 然而有研究表明, 在青鳞 (*Oryzias latipes*)、斑马鱼

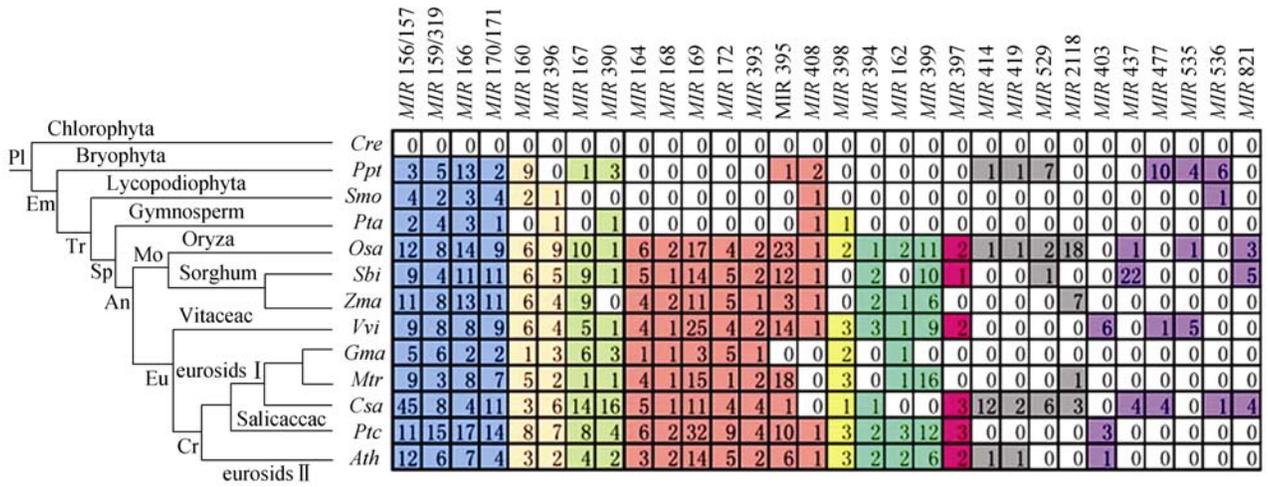


图 1 黄瓜以及其它植物中保守 miRNA 家族

Pl(Plant): 植物; Em(Embryophyta): 有胚植物; Tr(Tracheophyta): 导管植物; Sp(Spermatophyta): 种子植物; Mo(Monocots): 单子叶植物; An(Angiosperms): 被子植物; Eu(Eudicots): 真双子叶植物; Cr(Core rosids): 核心蔷薇; Cre(*Chlamydomonas reinhardtii*): 衣藻; Ppt(*Physcomitrella patens*): 小立碗藓; Smo(*Selaginella moellendorffii*): 江南卷柏; Pta(*Pinus taeda*): 火炬松; Osa(*Oryza sativa*): 水稻; Sbi(*Sorghum bicolor*): 高粱; Zma(*Zea mays*): 玉米; Vvi(*Vitis vinifera*): 葡萄; Gma(*Glycine max*): 大豆; Mtr(*Medicago truncatula*): 蒺藜苜蓿; Csa(*Cucumis sativus*): 黄瓜; Ptc(*Populus trichocarpa*): 杨树; Ath(*Arabidopsis thaliana*): 拟南芥。同一颜色表示对应的miRNA家族存在于相同的物种数中(如miR160和miR396都存在于11个物种中)。表格中的数字表示在每个物种中对应的miRNA家族的成员数(如Ppt中miR166家族的成员是13个,在Smo中是3个)。

(*Danio rerio*)、鸡(*Gallus gallus domesticus*)和小鼠(*Mus musculus* L.)中保守的miRNA在时间和位置上不是严格保守的^[17]。虽然研究表明一些动物miRNA在不同的动物之间是保守的,一些植物miRNA在不同的陆生植物之间也是保守的,然而还没有证据表明任何一个miRNA在动物和植物之间也保守(目前的研究发现只有来源于LTR逆转录转座子的miR854和miR855在动物和植物中都存在^[13],但进一步的研究发现它们是转座子相关的siRNA产生位点,被错误注释为miRNA)。

2 植物 miRNA 进化起源的假说

年轻的 miRNA 基因是如何形成的呢?目前对此问题的研究结果不统一,没能提出所有植物 miRNA 起源的合理解释,总结近年来关于 miRNA 起源的研究进展,我们发现共有 3 种假说,其中每一种假说都不能单独解释所有植物 miRNA 的进化起源问题,但它们可以互为补充。

2.1 反向重复假说

植物 miRNA 基因家族比动物的更庞大,因此关于植物基因组中 miRNA 的起源问题,证据非常有

限。植物miRNA通常是分散在基因组上,在几千个碱基的范围内很少有miRNA家族成员聚集簇^[18]。Voinnet等^[8]认为许多保守的植物miRNA基因是由大规模的基因组复制和基因重排产生,所以通常会有多个位点。目前较为公认的是由Allen等^[7]提出的反向重复假说,该假说认为新miRNA基因的产生与它们的靶基因有关,miRNA的进化来自它们的靶基因的反向重复。这些反向重复能直接在基因组序列中发生。已知的靶基因反向重复形成“头对头”或“尾对尾”的全部或部分基因序列,当它们转录时,这些来自靶基因复制的mRNAs形成长的、自身互补的发卡,然后被Dicer-like蛋白裂解为siRNAs。这些siRNAs一方面引起源基因的沉默,另一方面引起与其有序列配对关系的基因的沉默。随着时间的推移,突变在反向重复中积累,除产生miRNA和miRNA*序列的一些小的区域外,这种突变使它们与其靶基因的序列差异越来越大。随着基因的进化,mRNA发卡具有的结构越来越像miRNA前体,于是miRNA形成。刚形成的miRNA仍然与它们的靶基因保持着显著的序列相似性。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中有几个物种特异的miRNAs,不仅是成熟的miRNA,前体的邻近区域也与它们的靶基因互补(例如拟南

芥的miR161和miR163)。然而对于古老的miRNA基因仅仅在miRNA和miRNA*序列内与靶基因同源,详见图2A。Zhang等^[19]认为与转座子(TE)相关和假基因相关的miRNA其起源也是经历了反向重复事件,如miR812和miR846等,详见图2B和2C。尽管反向重复模型对于植物中与靶基因完全配对的miRNA的进化是一个很有吸引力的解释,但它似乎仅仅适合于非保守的植物miRNA基因,因为在保守的miRNA基因和它们的靶基因之间没有发现这样的相似性^[17]。另外,拟南芥中通过小RNA深度测序^[9,10]也表明许多miRNAs的进化也不能用反向重复假说来解释。

2.2 串联重复和片段重复假说

Maher等^[20]首先在同一个基因内或相邻的基因间区寻找邻近的miRNA,并且在miRNA基因家族中发现了串联重复。他们进一步总结了每一个miRNA家族的串联重复和片段重复的数量,发现22个miRNA基因家族中有18个是通过串联重复或片段重复,甚至是二者的组合产生。这18个miRNA家族中,6个miRNA基因家族的23个miRNA基因涉及到串联重复,其中最长的串联重复由6个miRNA基因组成,其余的miRNA基因以2个或3个为一组串联产生。在23个串联重复的miRNA基因中,如果每一个miRNA与下游最近的串联重复miRNA配对,其2/3是在同一条链上,串联重复的miRNA之间的平均距离是1987nt。Wang等^[21]研究表明串联重复和全基因组复制是水稻(*Oryza sativa*)miR156家族扩增的驱动力,并通过进化分析表明miR156b或miR156c是通过串联重复产生,而且发生在全基因组复制之前。同时他们在高粱(*Sorghum bicolor*)和玉米(*Zea mays*)中也发现串联的miR156b/156c,在这些禾本科中含有miR156b/156c的基因组区域是高度保守的,表明串联重复发生在禾本科植物物种分化之前。Guddeti等^[22]在研究水稻miR395基因家族的进化时,发现水稻miR395基因家族的24个基因能独特的形成4个小簇,其中三簇是通过片段重复形成的。这些研究表明miRNA家族成员是由该家族miRNA基因的共同祖先通过基因复制或者大片段重复产生,详见图2D。

2.3 随机起源假说

然而,很多年轻miRNA基因的进化起源并不能

全部用前面提到的两种假说去解释,因此,Felippes等^[23]提出一些miRNA也许通过随机序列产生或从折叠序列自发形成。他们认为随机序列仅仅在最近的进化上才出现,随机折叠能引起新miRNA的产生,并通过拟南芥特异的一些miRNA的全基因组分析发现,一些进化上年轻的拟南芥miRNA与拟南芥基因组的其它区域没有相似性,这表明它们是由偶然自身互补的序列产生。全基因组分析也表明年轻miRNA直接从一个自身互补或者包含某些特征的miRNA折叠序列进化而来,并产生一个像发卡结构的RNA。随后通过与原始的靶标共进化稳定下来,并可能形成这些原始miRNA基因的一个小亚类。Svoboda等^[24]已经推断出动物miRNA也能通过随机序列产生,他们通过果蝇属3个种之间miRNA随机起源的比较,发现在这个属中大量的miRNA有很高的产生和消亡速率。而且Axtell^[25]推测随机折叠的杂散的转录本可能是植物年轻miRNA进化的第一步。随后,也有人发现miRNA基因可能由自身互补区域或者具有自身互补特性的其他结构随机形成,而且,由这些随机自身互补的区域形成miRNA不需要复制事件,而是通过这些起源位点随机突变来获得miRNA的特征^[23,26],如miR843、miR849、miR850和miR863等^[27]。详见图2E。

3 miRNA 基因的进化

目前对于miRNA的产生和消亡(miRNA的进化动力学机制)还没有合理的解释。年轻的miRNA不像高度保守的那些古老的miRNA,其通常是弱表达,加工不严密,分化程度较高,趋向于缺少靶标,这表明年轻的miRNA基因在进化上趋于中性。几个植物物种的基因组分析表明miRNA的折叠、表达、结构、加工效率以及miRNA大小的变化均可导致miRNA基因位点的改变,并且产生年轻的miRNA^[3]。Nozawa等^[28]发现miRNA可以由转座子产生,也可由非转座子类miRNA基因产生。于是他们对非转座子类miRNA基因的产生和消亡进行了研究。研究表明在绿藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)和陆生植物分化之前还没有miRNA基因存在,在绿藻分化之后,miRNA基因的数量在陆生植物家族中开始增加,陆生植物中每个miRNA基因家族中的miRNA平均数是2.7个,而现存的豆科中其平均数达到8.1,说

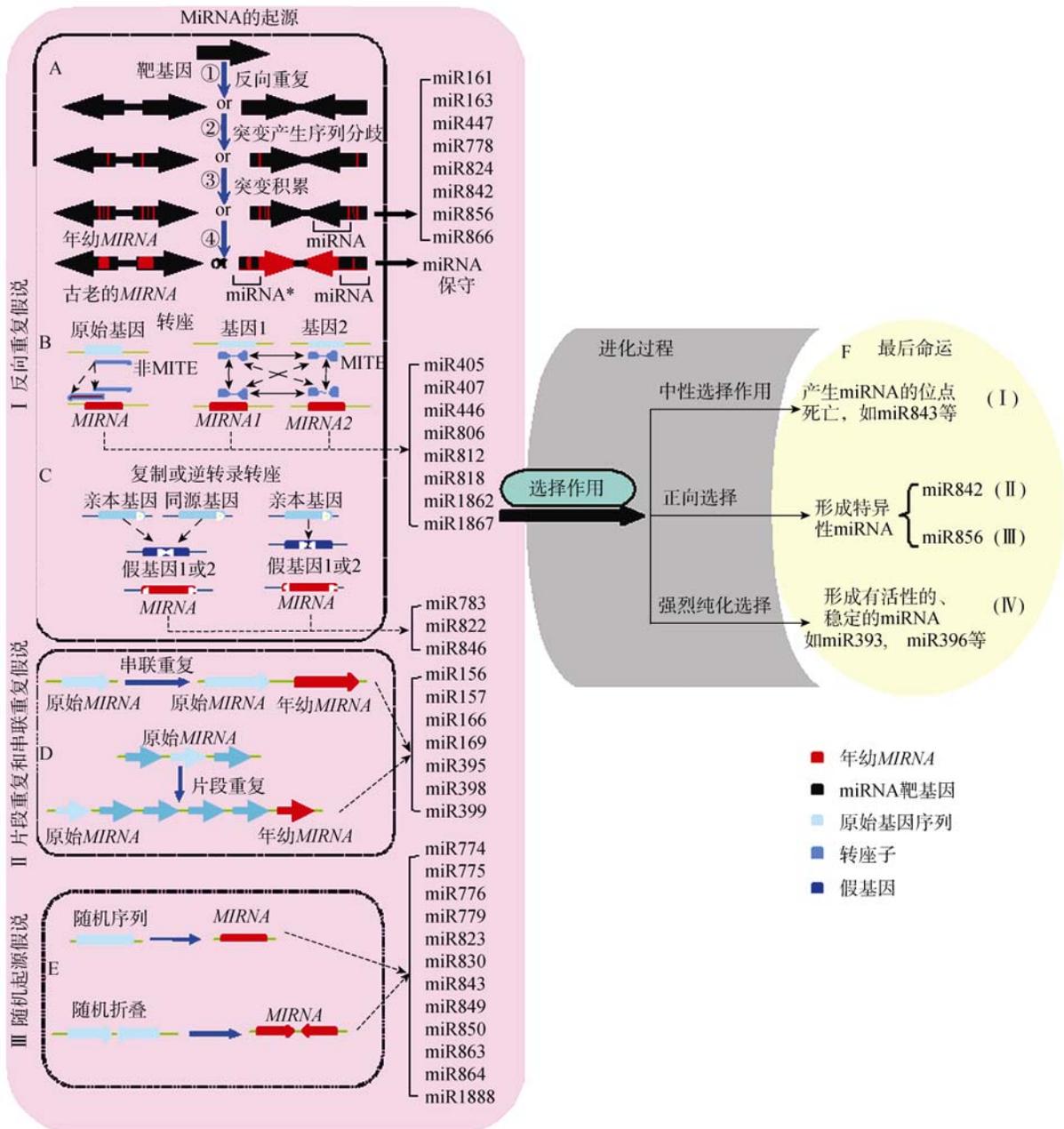


图 2 miRNA 的进化过程

粉色代表 miRNA 的起源, 灰色代表 miRNA 起源后经历的选择作用, 浅黄色的代表 miRNA 经过选择等作用后的结局。A : 靶基因的反向重复产生 miRNA 的过程; B : 转座子产生 miRNA 的过程; C : 假基因产生 miRNA 的过程。D : 串联重复和片段重复产生 miRNA 的过程; E : 由随机折叠和随机序列产生 miRNA 的过程; F : miRNA 经过选择作用后的命运(~ 表示 4 种命运)。

明miRNA在家族中的拷贝数随着植物由低等到高等的进化而逐渐增加。进一步研究有花植物祖先中的miRNA和miRNA基因家族的数量时发现miRNA基因家族增加的数量远远小于miRNA增加的数量, 表明许多miRNA基因是由基因加倍产生的。同时在研究中还发现多达 90%的保守miRNA家族为多基因家

族, 却只有 23%的物种特异的miRNA基因形成多基因家族。这进一步说明基因加倍在增加miRNA基因的数量中扮演着重要的角色。Wang等^[21]的研究也表明基因加倍以及拷贝的丢失可能是植物miRNA产生和消亡的主要进化途径之一。此外, 在有花植物的研究中发现, 水稻获得了 126 个miRNA基因却只丢

失了一个, 在同一时期番木瓜(*Carica papaya*)获得了 8 个 miRNA 基因, 却丢失了 25 个, 而且在 miRNA 基因家族的数目变化上也有这样的趋势。说明 miRNA 的产生和消亡以很高的频率发生^[9]。目前的研究表明并不只是年轻的 miRNA 基因和其基因家族不断的产生和消亡, 在植物长期进化的过程中, 古老的 miRNA 基因同样也会消亡。如陆生植物祖先的 10 个 miRNA 基因家族中的 5 个和有花植物祖先的 25 个 miRNA 基因家族中的 13 个在起源后就消亡^[28]。

miRNA 基因是以产生和消亡的方式动态进化的, 但是在 miRNA 的产生和消亡的过程是否存在选择呢? 目前已有的研究发现这个过程确实存在选择作用。于是我们按照选择作用将 miRNA 最后的命运分为四种结局, 详见图 2。第一种, 也是最普遍的一种, 就是 DCL1 对于完全配对的 dsRNA 的催化活性是有限的, 并且不显著。DCL1 依赖性的获得以及随后来自折叠前体的零散的小 RNA 产物的形成, 需要能够导致折叠错配的漂变的积累。经过漂变的序列继续漂移, 靶向能力和启动子序列都衰退了, 最终这些位点消亡^[9]。推测中性选择作用下年轻的 miRNA 基因符合这条命运, 如 miR843 等, 见图 2F。第二种命运是随着原始基因、原始家族的序列特异化, 产生 miRNA 的序列也趋于稳定化。如果在 miRNA 负调控下产生一个靶基因或基因的可利条件实现了, 这种命运就可能发生, 且可能引起 miRNA 序列的选择^[9]。miR824-AGL16 的调控组合是这种命运的一个例证, 如图 2F 所示。第三种命运是一个新的靶基因或家族偶然获得靶向特异性, 然后通过有利的选择事件稳定下来。尽管没有直接的数据支持 miR856 扮演一个有功能的角色, 但它靶向来自原始基因 *ZATI* 和一个新基因 *CHX18* 的转录本^[9], miR856 的命运可能属于这一类, 如图 2F 所示。我们推测正向选择作用下产生的 miRNA 符合这两种命运。第四种, 植物 miRNA 还受到强烈的纯化选择作用, 如 miR393 和 miR396 等, 如图 2F 所示。研究发现在拟南芥和琴叶拟南芥 (*Arabidopsis lyrata*) 的同源 miRNA 基因之间的核苷酸分化模型与中性进化是一致的。对于非十字花科物种中存在的拟南芥 miRNA 基因家族, 在环和环末端的茎区分化程度最高, 但在 miRNA 和 miRNA* 区域分化程度最低^[16,27,29,30]。这说明成熟 miRNA 和靶 RNA 之间互补性的维持受到强烈纯化选择的作用。

4 miRNA 功能的进化

古老的 miRNA 大多数在植物的生长、发育、胁迫响应等方面发挥重要的调控作用。随着进化, 个别物种中逐渐出现了高度特异的年轻 miRNA 基因, 高度保守的 miRNA 基因家族也开始扩增, 并且通过复制、亚功能化或新功能化而进一步特异化。保守的 miRNA 在大多数物种中会形成复杂的调控网络, 其功能也多样化。从 miRNA 由保守到不保守, 古老到年轻的进化轨迹来看, 年轻的 miRNA 也会在植物生长发育的特定阶段发挥一定的作用。同时一些 miRNA 会随着靶标的进化而进化, 即共进化。miRNA 在与靶标的共进化过程中形成复杂的调控网络, 而且导致了 miRNA 的功能在进化过程中越来越多样化和特异化。

4.1 miRNA 与靶标的共进化及其调控网络

miRNA 在进化的过程中与其靶标共同进化, 即共进化。古老的 miRNA 是由它们的一个靶基因的复制而产生, 复制的序列通过反向或变异形成 miRNA。这些古老的 miRNA 保留了结合靶基因转录本的能力, 但除与它们的靶基因结合位点外几乎再没有保留相同的序列。相反, 年轻的 miRNA 与它们的靶基因在序列上更相似。根据这些讨论, miRNA 基因, 包括启动子、转录区域、末端可能从靶基因进化而来^[15], 例如拟南芥的 *SPL* 基因家族成员的加倍产生了发卡转录本, 然后被 Dicer-like 蛋白剪切为 siRNA。随着进化的进行, 在复制基因中序列发生变化, 产生了 miR156/157。一些 *SPL* 家族成员, 如 *SPL10* 和 *SPL11*、*SPL13A* 和 *SPL13B*, 是在后来产生并与基因配对紧密联系。进化分析表明 miR156/157 基因家族早期是由 *SPL* 基因家族进化而来。后来 miR156/157 基因和靶基因家族成员继续通过加倍扩增, 但并不是所有的 *SPL* 基因进化为 miR156/157 的靶基因, 也很难说 miR156/157 是由哪一个 *SPL* 进化而来, 但 *SPL7*、*SPL13A* 和 *SPL13B* 与 miR156/157 家族的同源性更高。尽管如此, *SPL13A* 和 *SPL13B* 是 miR156/157 的直接靶标, *SPL7* 却不是。不过其他的一些成员如 miR398 和 miR408 受到 *SPL7* 的调控^[15]。在共进化程中 miRNA 家族的种类和数量增多, 对应的 miRNA 的靶标数量和种类也增

加。

在miRNA和其靶标的共进化过程中, miRNA与其靶标可构成复杂的调控网络, 目前的研究发现有以下两种调控网络。第一种是miRNA与靶基因构成的调控网络。对大量已有文献的挖掘, 发现miRNA的靶基因主要为转录因子(TF)^[31~34]。其与靶标可以构成miRNA-TFs调控网络。例如, 在拟南芥中预测的PHR1-miR399-PHO2 调控途径, 在这里, PHR1的功能是作为调控miR399 转录的一个转录因子^[35]。miRNA介导的一种调控网络是在特异miRNA和下游TFs之间形成反馈回路。越来越多的实验证据指出这类调控在平衡有机体内TFs和miRNA之间的平衡中有重要作用^[36,37]。因此通过上游和下游分析或者文献挖掘, 在miRNA和TFs之间整合更多的反馈环能增加miRNA参与调控网络的复杂性, 有利于挖掘miRNA参与调控的生物学意义。除了miRNA和TFs之外, 在miRNA和其他的特异性靶标之间也能形成类似的反馈调控网络。例如DCL1和miR162之间^[38]以及AGO1和miR168之间^[39]形成的调控网络。第二种是miRNA形成的自身调控网络。根据最近的植物降解组测序结果, Meng等^[40]提出miRNA基因的一个自身调控机制。成熟的miRNA和miRNA*在它们的前体序列上都有它们的识别区域。例如分别编码miRNA和miRNA*的区域。因此包括前体miRNA和初级转录本miRNA在内的miRNA前体都能被相应的miRNA和miRNA*识别, 并作为体内的靶标而被降解。从这一点可以看出: 自身调控是miRNA基因在表达调节中作为一个缓冲体系而发挥作用的一个机制。另外我们认为miRNA和miRNA*之间可能有协同作用, 共同发挥某一特定的功能, 而且这种协同作用可能成为促进miRNA基因不断产生和消亡的一种动力, 从而进一步推动miRNA调控网络的升级和复杂化。

4.2 miRNA 功能进化的多样化

除了对靶mRNAs的降解和抑制外, 有一些miRNA有其他特定的功能或者赋予miRNA-AGO复合物独特的性质^[3]。除了在miRNA介导的调控网络中具有调控功能外, miRNA还可以引起21nt siRNA (ta-siRNAs)的产生。在RNA干扰途径中, 反式作用siRNA (ta-siRNAs)是依赖于RDR6和DCL4的产物,

它们具有抑制其靶mRNAs的功能^[41]。由miR173-AGO1、miR390-AGO7和miR828-AGO1复合物分别介导TAS1/TAS2、TAS3和TAS4(TAS为产生ta-siRNA的转录本)的裂解, 然后导致tasiRNAs的产生。因此miR173、miR390和miR828的功能是作为siRNA途径中的一个激活剂而不是抑制剂^[42,43]。另外, ta-siRNA来自非编码位点, 一些miRNA靶向的mRNAs产生次级siRNAs。这些mRNAs中的一些依赖于RDR6/DCL4产生类TAS转录本的21nt siRNAs。在某些情况下, miRNA在多个位点靶向转录本或者与tasiRNAs结合, 可能引发次级siRNAs的形成^[44]。此外, miRNA还可以介导DNA的甲基化^[45]。类似的, 起源于miRNA折叠的23nt或27nt的DCL3依赖型小RNA倾向于与AGO4结合并直接甲基化^[46]。在*P.patens*中研究发现突变体和miRNA靶向RNA双链的水平增加, 显示出在靶向位点DNA甲基化水平的提高, 根据这一点将miRNA与经过DNA甲基化的转录后基因沉默联系在一起^[47]。因此miRNA和miRNA-AGO复合体已经有了功能的进化, 这些功能不同于典型的mRNA抑制, miRNA能够在转录和转录后途径中发挥作用。

5 结语与展望

植物miRNA大部分分散在植物基因组上, 形成一个独立的转录单元。而不同的miRNA在进化过程中形成了不同的家族。大规模的加倍事件在这些miRNA基因家族的进化过程中扮演着重要的角色。miRNA增加的方式与编码基因相同, 从而维持和参与基因调控系统的剂量平衡。然而它们之间也有不一致的方面, 当考虑到基因加倍发生时靶基因家族也扩增, 这些miRNA的靶标数量可能相对较大。但我们的观察结果与先前的研究表明这些miRNA的靶基因的数量相对较少。这可能解释为靶位点在基因加倍后的新功能化和亚功能化过程中丢失了^[48,49]。虽然有关miRNA起源的各种假说都能部分的解释miRNA的起源问题, 但起源机制目前尚未研究清楚。如果能将具体的起源机制研究清楚, 则miRNA的产生和消亡机制也可以很快被认识, 对于物种特异miRNA的功能研究也可以更深入。目前发现在miRNA起源中, 有RNAi作用, 特别是siRNA对miRNA的合成有明显的影 响。在miRNA的进化过程

中, 同样也有其他选择作用, 如纯化选择作用, 研究发现年轻 miRNA 比保守 miRNA 的序列变异更明显, 说明纯化选择主要作用于大部分高度保守的 miRNA。但为什么年轻的 miRNA 序列变异程度更高, 目前还没有合理的解释。此外, 单核苷酸多态性研究发现在 miRNA 区域核苷酸变化比较少见, 但在其靶标区域有多态性存在。说明 miRNA 和靶标之间调控的多样性, 同时也说明在进化过程中它们经历了强烈的选择^[29]。另外还有局部正向选择作用, 正向选择作用于包含 miRNA 的区域, 这种选择靶向 miRNA 顺式调控的可变区域^[50]。目前对于 miRNA 功能的多样性进化的机制和结果并不清楚, 还需要更多的研究。

通常人们认为包括 miRNA 在内的非编码 RNA 是中性进化的, 但越来越多的结果表明, 植物 miRNA 和编码蛋白的基因一样, 也经历着正向选择、中性选择和纯化选择的过程。虽然植物 miRNA 只占植物基因组的一小部分, 但植物 miRNA 的进化研究打开了非编码 RNA 研究的一扇窗户, 开辟了非编码 RNA 进化研究的新领域。我们相信随着植物 miRNA 进化的深入研究, 对全基因组水平的植物 miRNA 进行系统的进化研究必将成为一种趋势, 其结果势必推动很多生命现象的解释。

参考文献(References):

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009, 136(2): 215–233. [DOI](#)
- [2] 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(5): 843–854. [DOI](#)
- [3] Cuperus JT, Fahlgren N, Carrington JC. Evolution and functional diversification of *MIRNA* genes. *Plant Cell*, 2011, 23(2): 431–442. [DOI](#)
- [4] 成永强, 李正平, 王愈聪, 范永山. MicroRNA 分析方法进展. *化学进展*, 2010, 22(8): 1509–1517. [DOI](#)
- [5] Axtell MJ, Bartel DP. Antiquity of microRNAs and their targets in land plants. *Plant Cell*, 2005, 17(6): 1658–1673. [DOI](#)
- [6] Zhang BH, Pan XP, Cannon CH, Cobb GP, Anderson TA. Conservation and divergence of plant microRNA genes. *Plant J*, 2006, 46(2): 243–259. [DOI](#)
- [7] Allen E, Xie ZX, Gustafson AM, Sung GH, Spatafora JW, Carrington JC. Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet*, 2004, 36(12): 1282–1290. [DOI](#)
- [8] Voinnet O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, 2009, 136(4): 669–687. [DOI](#)
- [9] Fahlgren N, Howell MD, Kasschau KD, Chapman EJ, Sullivan CM, Cumbie JS, Givan SA, Law TF, Grant SR, Dangl JL, Carrington JC. High-throughput sequencing of *Arabidopsis* microRNAs: evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *PLoS One*, 2007, 2(2): e219. [DOI](#)
- [10] Rajagopalan R, Vaucheret H, Trejo J, Bartel DP. A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev*, 2006, 20(24): 3407–3425. [DOI](#)
- [11] Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP. MicroRNAs in plants. *Genes Dev*, 2002, 16(13): 1616–1626. [DOI](#)
- [12] Arteaga-Vázquez M, Caballero-Pérez J, Vielle-Calzada JP. A family of microRNAs present in plants and animals. *Plant Cell*, 2006, 18(12): 3355–3369. [DOI](#)
- [13] Ibáñez-Ventoso C, Vora M, Driscoll M. Sequence relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2818. [DOI](#)
- [14] Sunkar R, Jagadeeswaran G. *In silico* identification of conserved microRNAs in large number of diverse plant species. *BMC Plant Biol*, 2008, 8(1): 37. [DOI](#)
- [15] Tang GL. Plant microRNAs: an insight into their gene structures and evolution. *Semin Cell Dev Biol*, 2010, 21(8): 782–789. [DOI](#)
- [16] Ma ZR, Coruh C, Axtell MJ. *Arabidopsis lyrata* small RNAs: transient *MIRNA* and small interfering RNA loci within the *Arabidopsis* genus. *Plant Cell*, 2010, 22(4): 1090–1103. [DOI](#)
- [17] Ason B, Darnell DK, Wittbrodt B, Berezhikov E, Kloosterman WP, Wittbrodt J, Antin PB, Plasterk RHA. Differences in vertebrate microRNA expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(39): 14385–14389. [DOI](#)
- [18] Shabalina SA, Koonin EV. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends Ecol Evol*, 2008, 23(10): 578–587. [DOI](#)
- [19] Zhang Y, Jiang WK, Gao LZ. Evolution of microRNA genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*: an update of the inverted duplication model. *PLoS One*, 2011, 6(12): e28073. [DOI](#)
- [20] Maher C, Stein L, Ware D. Evolution of *Arabidopsis* microRNA families through duplication events. *Genome Res*, 2006, 16(4): 510–519. [DOI](#)
- [21] Wang S, Zhu QH, Guo XY, Gui YJ, Bao JD, Helliwell C, Fan LJ. Molecular evolution and selection of a gene encoding two tandem microRNAs in rice. *FEBS Lett*, 2007, 581(24): 4789–4793. [DOI](#)
- [22] Guddeti S, Zhang DC, Li AL, Leseberg CH, Kang H, Li XG, Zhai WX, Johns MA, Mao L. Molecular evolution of the rice miR395 gene family. *Cell Res*, 2005, 15(8): 631–638. [DOI](#)
- [23] de Felippes FF, Schneeberger K, Dezulian T, Huson DH,

- Weigel D. Evolution of *Arabidopsis thaliana* microRNAs from random sequences. *RNA*, 2008, 14(12): 2455–2459. [DOI](#)
- [24] Svoboda P, Di Cara A. Hairpin RNA: a secondary structure of primary importance. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63(7–8): 901–908. [DOI](#)
- [25] Axtell MJ. Evolution of microRNAs and their targets: are all microRNAs biologically relevant? *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1779(11): 725–734. [DOI](#)
- [26] Chen K, Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nat Rev Genet*, 2007, 8(2): 93–103. [DOI](#)
- [27] Fahlgren N, Jogdeo S, Kasschau KD, Sullivan CM, Chapman EJ, Laubinger S, Smith LM, Dasenko M, Givan SA, Weigel D, Carrington JC. MicroRNA gene evolution in *Arabidopsis lyrata* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 2010, 22(4): 1074–1089. [DOI](#)
- [28] Nozawa M, Miura S, Nei M. Origins and evolution of microRNA genes in plant species. *Genome Biol Evol*, 2012, 4(3): 230–239. [DOI](#)
- [29] Ehrenreich IM, Purugganan MD. Sequence variation of MicroRNAs and their binding sites in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2008, 146(4): 1974–1982. [DOI](#)
- [30] Warthmann N, Das S, Lanz C, Weigel D. Comparative analysis of the *MIR319a* microRNA locus in *Arabidopsis* and related *Brassicaceae*. *Mol Biol Evol*, 2008, 25(5): 892–902. [DOI](#)
- [31] Meng YJ, Shao CG, Gou LF, Jin YF, Chen M. Construction of microRNA- and microRNA*-mediated regulatory networks in plants. *RNA Biol*, 2011, 8(6): 1124–1148. [DOI](#)
- [32] 李培, 卢向阳, 李昌珠, 方俊, 田云. 植物microRNAs研究进展. *遗传*, 2007, 29(3): 283–288. [DOI](#)
- [33] Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57(1): 19–53. [DOI](#)
- [34] Abrouk M, Zhang RZ, Murat F, Li AL, Pont C, Mao L, Salse J. Grass microRNA gene paleohistory unveils new insights into gene dosage balance in subgenome partitioning after whole-genome duplication. *Plant Cell*, 2012, 24(5): 1776–1792. [DOI](#)
- [35] Bari R, Pant BD, Stütt M, Scheible WR. PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol*, 2006, 141(3): 988–999. [DOI](#)
- [36] Tsang J, Zhu J, van Oudenaarden A. MicroRNA-mediated feedback and feedforward loops are recurrent network motifs in mammals. *Mol Cell*, 2007, 26(5): 753–767. [DOI](#)
- [37] Gutierrez L, Bussell JD, Păcurar DI, Schwambach J, Păcurar M, Bellini C. Phenotypic plasticity of adventitious rooting in *Arabidopsis* is controlled by complex regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR transcripts and microRNA abundance. *Plant Cell*, 2009, 21(10): 3119–3132. [DOI](#)
- [38] Xie ZX, Kasschau KD, Carrington JC. Negative feedback regulation of *Dicer-Like1* in *Arabidopsis* by microRNA-guided mRNA degradation. *Curr Biol*, 2003, 13(9): 784–789. [DOI](#)
- [39] Vaucheret H, Mallory AC, Bartel DP. AGO1 homeostasis entails coexpression of *MIR168* and *AGO1* and preferential stabilization of miR168 by AGO1. *Mol Cell*, 2006, 22(1): 129–136. [DOI](#)
- [40] Meng Y, Shao C, Chen M. Toward microRNA-mediated gene regulatory networks in plants. *Brief Bioinform*, 2011, 12(6): 645–659. [DOI](#)
- [41] Allen E, Howell MD. MiRNAs in the biogenesis of *trans*-acting siRNAs in higher plants. *Semin Cell Dev Biol*, 2010, 21(8): 798–804. [DOI](#)
- [42] Montgomery TA, Howell MD, Cuperus JT, Li DW, Hansen JE, Alexander AL, Chapman EJ, Fahlgren N, Allen E, Carrington JC. Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in *TAS3 trans*-acting siRNA formation. *Cell*, 2008, 133(1): 128–141. [DOI](#)
- [43] Montgomery TA, Yoo SJ, Fahlgren N, Gilbert SD, Howell MD, Sullivan CM, Alexander A, Nguyen G, Allen E, Ahn JH, Carrington JC. AGO1-miR173 complex initiates phased siRNA formation in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(51): 20055–20062. [DOI](#)
- [44] Axtell MJ, Jan C, Rajagopalan R, Bartel DP. A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 2006, 127(3): 565–577. [DOI](#)
- [45] Wu L, Zhou HY, Zhang QQ, Zhang JG, Ni FR, Liu C, Qi YJ. DNA methylation mediated by a microRNA pathway. *Mol Cell*, 2010, 38(3): 465–475. [DOI](#)
- [46] Chellappan P, Xia J, Zhou XF, Gao S, Zhang XM, Coutino G, Vazquez F, Zhang WX, Jin HL. SiRNAs from miRNA sites mediate DNA methylation of target genes. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(20): 6883–6894. [DOI](#)
- [47] Khraiweh B, Arif MA, Seumel GI, Ossowski S, Weigel D, Reski R, Frank W. Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell*, 2010, 140(1): 111–122. [DOI](#)
- [48] Conant GC, Wolfe KH. Turning a hobby into a job: how duplicated genes find new functions. *Nat Rev Genet*, 2008, 9(12): 938–950. [DOI](#)
- [49] Guo XY, Gui YJ, Wang Y, Zhu QH, Helliwell C, Fan LJ. Selection and mutation on microRNA target sequences during rice evolution. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 454. [DOI](#)
- [50] Quach H, Barreiro LB, Laval G, Zidane N, Patin E, Kidd KK, Kidd JR, Bouchier C, Veuille M, Antoniewski C, Quintana-Murci L. Signatures of purifying and local positive selection in human miRNAs. *Am J Hum Genet*, 2009, 84(3): 316–327. [DOI](#)