

细胞核内小干扰RNA介导的表观遗传和基因表达调控

冯雪竹 and 光寿红

Citation: [中国科学: 生命科学](#); doi: 10.1360/N052016-00335

View online: <http://engine.scichina.com/doi/10.1360/N052016-00335>

Published by the [《中国科学》杂志社](#)

Articles you may be interested in

[从人到线虫的RNAa现象](#)

科学通报 **59**, 2918 (2014);

[表观遗传信息的跨代传递](#)

科学通报 **61**, 3405 (2016);

[肿瘤基因治疗新策略—RNA干扰](#)

科学通报 **51**, 993 (2006);

[植物中病毒来源的小RNA介导的RNA沉默](#)

中国科学: 生命科学 **42**, 29 (2012);

[microRNA对植物生长发育和病毒侵染的调控](#)

科学通报 **51**, 369 (2006);



IBC 2017
18th International Botanical Congress
Shenzhen China

XIX International Botanical Congress

Travel awards
open for application

www.ibc2017.cn

Shenzhen China
23 - 29 July 2017



细胞核内小干扰RNA介导的表观遗传和基因表达调控

冯雪竹, 光寿红*

中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230027

* 联系人, E-mail: sguang@ustc.edu.cn

收稿日期: 2016-10-30; 接受日期: 2016-11-15; 网络版发表日期: 2017-01-18

国家自然科学基金(批准号: 31371323, 31671346, 91640110, 81501329)资助

摘要 RNA干扰(RNAi)是真核生物中一个非常广泛而且保守的基因表达调节机制. 长度为20~30个核苷酸的具有调控作用的小RNA广泛存在于几乎所有的真核细胞中, 这些具有调控作用的小RNA参与和调控许多基本的生命过程, 如异染色质的形成、基因组稳定性的维持、发育的时空调节、细胞命运的决定、DNA的损伤与修复反应, 以及抗病毒反应等. 这些具有调控作用的小RNA的产生和调节的失衡往往会导致一系列重大疾病的发生与发展. RNAi在细胞质里主要是通过抑制翻译和诱导靶标mRNA的降解来进行. 在细胞核中, RNAi则有多种作用方式. 本文将重点阐述小RNA在细胞核里的基因表达调控的分子机制, 包括诱导异染色质形成、介导表观遗传修饰、调控染色体分离, 以及调控转录和选择性剪切等过程.

关键词 siRNA, RNAi, 转录, 组蛋白修饰, 表观遗传

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是一种在植物、真菌、多细胞动物中都存在的保守机制. 自1998年Fire等人^[1]利用模式生物秀丽线虫(*Caenorhabditis elegans*)发现RNAi机制以来, 在许多生命体中都发现了这一调节机制. 在真核生物中, 长的双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)会通过RNAi的机制来抑制基因表达. dsRNA被摄取到细胞内后, 首先被保守的RNase III类似的核酸酶Dicer剪切成21~23个核苷酸长度的小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)^[2~4]. siRNA然后会结合到保守的Argonaute(Ago)蛋白上, 形成RNA诱导的沉默复合物(RNA induced silencing complex, RISC), 最后和RISC因子一起发挥功能.

siRNA通过碱基互补配对的方式将RISC招募到具有同源序列的靶标核酸序列上, 可以通过一系列的机制调控基因表达和影响基因组的稳定性, 如调节转座子活性、抑制蛋白质翻译、降解mRNA、修饰染色质、调控染色体分离、抑制转录延伸和异染色质形成等^[2,4-8]. 真核细胞内主要有3类小RNA可以通过靶向各种序列互补的转录本来调控基因表达, 它们分别为微RNA(microRNAs), siRNA和PIWI结合RNA(PIWI-interacting RNAs, piRNAs). miRNAs来源于转录和加工产生的发夹状结构, 通过与靶标的不完全配对实现抑制翻译. siRNA可以与靶标完全互补来引起转录本降解. piRNA主要靶向动物体内生殖腺的转

引用格式: 冯雪竹, 光寿红. 细胞核内小干扰RNA介导的表观遗传和基因表达调控. 中国科学: 生命科学

Feng X Z, Guang S H. Small-interfering RNA-mediated epigenetics and gene regulation in the nucleus. *Sci Sin Vitae*, doi: [10.1360/N052016-00335](https://doi.org/10.1360/N052016-00335)

座子的转录本。

RNAi机器和小RNA对个体的生殖和发育,以及基因组稳定性维持具有关键的作用。如Dicer参与到多种基础的生物学过程之中,包括细胞分化,保持着丝粒区域的异染色质化和基因沉默等^[9,10]。在小鼠(*Mus musculus*)胚胎干细胞中破坏*dcr-1*基因,得到Dicer缺失胚胎干细胞品系^[11]。这种细胞完全地缺乏RNAi功能并且不能生成内源性的microRNA。其小鼠是可育的,但是其在体内和体外的分化都存在严重的缺陷,其在着丝粒重复区域的表观沉默和与该区域互补的小RNA都显著性地减少。当在这种敲除细胞系中重新表达*dcr-1*时可以恢复正常的表型。在植物中,转基因或者病毒的RNA可以诱导它们的靶标位置发生DNA的甲基化。这一过程依赖于Dicer, Ago蛋白和依赖于RNA的RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRP)^[12]。RNAi机器则可以帮助植物防御病毒感染,保护转座子带来的危害,维持基因组的稳定性以及调节基因表达。

RNAi机制的发现使人们对生物体的生命过程有了更深入的了解。这一发现不仅对基础科学研究作出了重要的贡献,同时也具有重要的应用价值。RNAi是一个可以作用于靶标位置的强大生物医学工具^[13],其序列特异性靶向目的基因的特性对于医药研究和疾病治疗领域有着深远的影响。小RNA分子药物可以直接靶向疾病相关基因,抑制目的基因的表达,解决了某些传统药物无法达到的疗效。同时也因为小RNA作用的特异性,可以减少传统化学药物带来的副作用。目前已经有许多关于抗病毒、肿瘤和罕见疾病治疗的小核酸药物的研发和应用,并且已经进入到不同阶段的临床研究。

RNAi过程在细胞质和细胞核内都可以发生^[2,4,14]。迄今为止,具有调控作用的小RNA在细胞质中的作用机理研究得相对比较清楚,其沉默基因表达的手段主要集中在抑制翻译和降解mRNA上。如microRNA在细胞质中结合mRNA来诱导mRNA的降解或者抑制蛋白质的翻译。外源性的siRNA在进入细胞后也在细胞质内诱导形成RISC复合物,从而造成靶标mRNA的降解。

在细胞核内具有调控作用的小RNA则有多种作用方式,而且存在明显的物种特异性^[8,14-16]。例如,在裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)里,microRNA诱导中性粒区域的异染色质(heterochromatin)形成。在植物中,

一类24 nt的异染色质区域产生的siRNA(hc-siRNAs)可以介导DNA的甲基化。水稻(*Oryza sativa*)中,研究发现一类特殊长度的microRNA(lmiRNA)也可以介导DNA的甲基化。在嗜热型四膜虫(*Tetrahymena thermophile*)内,scanRNA可以诱导具有同源序列的基因组序列的丢失^[17]。在纤毛虫(*Oxytricha trifallax*)中,piRNA通过RNAi的方式保护具有同源序列的基因组,相反不被保护的基因组序列则被清除^[18]。在高等动物中,小RNA在细胞核内的基因表达调控机制研究得还不够透彻^[19]。有研究表明,在哺乳动物细胞内,piRNA可以在生殖细胞的细胞核内诱导H3K9三甲基化和DNA的甲基化,也有报道认为microRNA可以增强或抑制启动子区域表达活性,还有报道认为siRNA可以调控转录过程中转录本的选择性剪切。本文将重点讨论细胞核内RNAi机制的研究进展。

1 RNAi介导的染色质修饰

染色质修饰是调节基因表达和染色体稳定性的基本方式之一。RNAi通路在细胞核内可以通过组蛋白或者DNA的甲基化来表观修饰染色体,从而在转录水平抑制靶标基因^[8,12,20,21]。具有调控作用的小RNA介导的染色质修饰在植物和裂殖酵母中得到广泛研究。在多细胞动物中,异染色质的形成对于维持基因组的完整性具有重要的调节功能。异染色质也必须精确地被调控以防止重要的基因被抑制而不能正常表达,当染色质的修饰发生缺陷时会造成癌症等许多疾病。

在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中,小RNA可以序列特异性地指导基因组上DNA的甲基化(RNA-directed DNA methylation, RdDM)^[22-28]。hc-siRNA主要来源于重复序列和转座子区域,并被招募回基因组上其产生位点或具有同源序列的染色质区域,来诱导DNA甲基化和组蛋白修饰,并最终导致转录抑制。RdDM过程依赖于两个植物专一性的RNA聚合酶,Pol IV和Pol V。RNAP II也在一定程度上参与了建立DNA甲基化和组蛋白修饰的过程。Pol IV转录的lncRNA可以作为hc-siRNA的前体。这些lncRNA首先被RDR2转变成dsRNA,然后被DCL3剪切成24 nt长度的siRNA^[29,30]。Pol IV被SHH1(H3K9me reader)招募到基因组位点,而染色质重塑蛋白CLSY1促进Pol IV的转录。成熟的hc-siRNA的3'端还被HEN1甲基化来帮助其稳定。hc-siRNA被转运到

细胞质后, 结合AGO4, 然后重新被转运回细胞核, 通过序列互补的方式进一步结合Pol V合成的lncRNA靶标. SUVH2和SUVH9帮助Pol V结合到基因组位点. AGO4和转录延伸因子KTF1结合, 帮助招募AGO4-siRNA到Pol V的转录本上, 进一步招募RDM1和RDM2, 造成胞嘧啶的从头甲基化, 来沉默靶基因位点. RdDM同时会诱导染色体对应位置的H3K9甲基化. DNA甲基化和组蛋白H3K9的甲基化具有交叉调控效应, DNA甲基化可以同时募集H3K9的甲基转移酶SUVH4^[31]. DNA甲基化和组蛋白的甲基化造成Pol IV和Pol V转录的沉默, 特别是在转座子和其他重复序列区域. 最近的研究工作还发现了非经典的RDR6-RdDM通路, 这一通路不依赖于Pol IV和DCL3^[32,33]. RDR6把RNAP II的转录本转变成dsRNA, 然后被DCL2和DCL4剪切成21~24 nt长度的siRNA. 这些siRNA可以通过结合AGO1诱导PTGS, 或者通过结合AGO2诱导RdDM过程.

在裂殖酵母中, RNAi对于具有大量重复序列的着丝粒、端粒、交配位点的异染色质的形成具有重要作用. 着丝粒周边区域的重复序列, 可以通过双向转录形成dsRNA, 然后由Dcr1加工成为siRNA^[34,35]. 小RNA诱导的RISC复合体募集染色质修饰因子, 可以通过使DNA甲基化、组蛋白去乙酰化、组蛋白甲基化, 以及染色质构象改变等多种途径造成异染色质的形成和维持, 从而沉默区域内的基因表达. 转录水平的基因沉默则使得这些区域异染色质化, 高度富集组蛋白H3K9me^[21,36-38]. 在沉默过程中, siRNA与Ago1结合作为主要成分形成RNA诱导的转录沉默复合体RITS, 并指导RITS到达这些重复区域的早期非编码转录本^[39]. RITS复合物包含Chp1, Tas3和Ago1等蛋白因子. Ago1结合siRNA, 而这些siRNA可以和RNAP II的转录本互补配对. Ago1的催化酶切活性对于H3K9me的沉积和传递, 以及结合在Ago1上的dsRNA释放其信使链都是必需的. RITS的招募导致SUV39H1/Clr4复合物定位到染色体上, 这一过程依赖于Stc1^[40]. SUV39H1/Clr4是裂殖酵母中唯一的H3K9甲基转移酶, 进一步甲基化H3K9, 招募HP1, Swi6, Chp2, Clr4-Rik1-Cul4(CLRC)复合体和RITS复合体^[41,42]. 最终会形成异染色质-RITS-CLRC的大聚集体, 通过Ago1/siRNA与其靶标的互补配对, 造成了siRNA生成、RITS定位和H3K9甲基化的一个正反馈调节. 这个正反馈循环同时也需要Rdp1和H3K9me, 通过与Dcr1和Ago1共同作用产生出dsRNA和siRNA, 实

现siRNA的扩增响应. HP1和Tas3的自聚加上H3K9me, 可以导致异染色质从RNAi起始成核区域向染色体的其他部位扩展^[43,44].

起初, RNAi机器介导的异染色质化通路并未在多细胞动物中被发现, 然而近年来的研究指出相似的机制也存在于在一些多细胞动物的生殖腺中.

果蝇(*Drosophila melanogaster*)的染色体中引入多拷贝串联的转基因时, 会导致转基因和其同源的内源基因共同沉默^[45-47]. 这种重复序列导致的基因沉默与植物中RNA介导的转录水平共抑制相类似, 都需要多梳状组蛋白基因(polycomb group protein, PcG)以及包括PIWI和Ago2在内的许多RNAi通路因子^[48,49]. PcG蛋白和PIWI的共同参与, 说明在果蝇及植物细胞中的RNA沉默效应可以在染色质水平发生. RNAi机器对于果蝇的着丝粒周边区域的异染色质化是必需的, 它可以募集HP1来沉默插入到着丝粒周边区域的转基因. 除了HP1和PIWI, 有效的沉默还需要Dcr-2, PIWI, AUB和解旋酶HLS. 而在果蝇的体细胞中, 当突变Dcr2或者Ago2则可以影响着丝粒报告基因的表达和导致H3K9甲基化的减少.

在秀丽线虫中, 导入外源的dsRNA可以诱导对应靶基因H3K9的三甲基化修饰^[39,50,51]. 这一过程依赖于细胞核内RNAi通路和RdRP. 细胞核内RNAi通路包含至少4个细胞核内RNAi缺陷型基因Nrde(nuclear RNAi defective)-1/2/3/4^[51-53]. NRDE-3是一种Ago蛋白可以转运由RdRP生成的siRNA从细胞质进入细胞核. 在细胞核内, siRNA指导NRDE-3靶标到pre-mRNA上进一步募集NRDE-2和NRDE-1. NRDE-1可以与靶标的基因组DNA相结合, 而这一过程依赖于NRDE-4. 通过尚未明确的分子机制, siRNA/NRDE复合物还可以招募set-25来介导靶基因位点的H3K9me和招募PRC2复合物来介导H3K27me^[54,55]. set-25及其产生的H3K9me对RNAi的代际遗传则非常关键^[55]. 其他染色质标记和染色质修饰相关因子也有可能参与到RNAi过程. 例如, 通过RNAi文库的筛选找到了一些在线虫中参与RNAi遗传必需的基因, 包括II类脱乙酰酶had-4, 乙酰转移酶K03D10.3, 染色体重塑ATP酶isw-1, 染色质结构域蛋白mrg-1^[56]. 对线虫进行组蛋白脱乙酰酶曲古抑菌素A(trichostatin A, TSA)处理, 可以改变RNAi沉默, 表明组蛋白的乙酰化也参与RNAi的遗传^[57].

虽然在模式生物中细胞核RNAi的研究取得了长

足的进展,在哺乳动物细胞中细胞核RNAi的功能与机制的研究还相对滞后^[16,19,58]。这里存在4个可能的原因:(i)在哺乳动物细胞核中RNAi因子是否存在或者有活性,早期的研究表明dsRNA不能沉默内含子的表达;(ii)早期实验观测到AGO2主要定位在细胞质的P-body以及内质网^[59];(iii)基于生物化学的细胞核纯化实验很难完全排除细胞质部分的污染;(iv)小RNA是怎样从细胞质转运到细胞核的,一直是未曾回答的关键问题。早期的很多研究往往集中在小RNA靶标到启动子区域时可以通过诱导异染色质的形成来实现转录水平的基因沉默^[60]。RNAi因子AGO1, TRBP2, RNAP II和PcG复合物可能共同调节着基因表达^[61,62]。单革研究组^[63]最近的研究工作揭示了小RNA从细胞质转运到细胞核这一关键问题。通过优化后的染色质纯化实验,在细胞分裂过程中,AGO2可以扩散到细胞核,并在小RNA指导下结合染色体,来调控染色体的正确配对分离。这一发现揭示了RNAi因子和siRNA从细胞质到细胞核的转运途径和细胞核RNAi的新功能。

2 RNAi与染色体分离

染色体上中性粒是一个特殊区域,它对染色体在动粒上的组装和染色体与纺锤体的结合都非常关键^[64-67]。中性粒区域的异染色质可以帮助动粒形成和姊妹染色体的联会、抑制重组和帮助减数分裂过程中的染色体配对。异染色质往往富集H3K9m3修饰,从而引导HP1以及其相关含chromodomain的蛋白质结合在这一区域。异染色质常发生在CENP-A染色质区域,这个区域帮助动粒的组装。CENP-A是组蛋白H3的变体,是中心粒区域染色质的分子标记。

真核生物的中性粒区域往往有很长的物种特异的DNA重复序列,而且这些重复序列可以被转录出来^[65,66]。RNAi机器和小RNA则可以通过调控这些转录本,在染色体配合分离中起着重要作用。在裂殖酵母中, RNAi导致的动粒周边区域的异染色质化,并促进CENP-A(Cnp1)和动粒的组装。这一过程依赖于H3K9甲基转移酶clr4(suv39), Dicer, Chp1, Swi6(HP1), Ago和RdRP^[68,69]。有意思的是,当CENP-A(Cnp1)已经组装好以后,就不再需要异染色质了。

在果蝇中,生殖细胞特异的DEAD-box RNA解旋酶Vasa通过帮助condensin I相关因子Barren在染色体

上的定位来促进有丝分裂中染色体的分离^[70]。这一过程依赖于Aubergine和Spindel-E,而这两个因子都是生殖细胞中piRNA通路的参与蛋白。在果蝇的体细胞中,Vasa的旁系蛋白RNA解旋酶belle和RNAi通路也调控染色体的正确分离^[71]。在有丝分裂过程中,Belle促进Barren的染色体定位,而Belle定位到浓缩的染色体上又依赖于Dcr2和Ago2。Belle在染色体上的定位主要位于内源性小RNA的产生位点。

在人类细胞中, RNAi机器和小RNA在有丝分裂后期染色体的分离中也起着关键作用^[63]。中心粒区域的重复序列会表达一个非编码RNA,称为 α -satellite RNA,在Dicer的剪切下产生ASAT siRNAs。而ASAT siRNAs则通过结合AGO2,反馈调控 α -satellite RNA的表达。 α -satellite RNA对中心粒结合蛋白,如CENPC1(centromere protein C1),在染色体上的定位非常关键。RNAi机器的缺陷,如敲低Dicer或者AGO2,会导致染色体分离的滞后现象。

秀丽线虫缺乏类似人类细胞的单一中心粒结构,而采取一种holocentromere模式。RNAi机器也在秀丽线虫的染色体配对分离中起重要作用。CSR-1是一个次级Ago蛋白^[72,73]。CSR-1和其辅助因子EGO-1(生殖细胞特异的RdRP),DRH-3(Dicer相关的解旋酶)和EKL-1(Tudor结构域蛋白)都位于生殖细胞的染色体上。其在染色体上的结合位点依赖于CSR-1结合的内源性siRNA。这些siRNA/CSR-1复合物结合到染色体上后,并不抑制靶基因的表达。这些位点也不结合CENP-A。因而推测siRNA/CSR-1可能通过标记染色质的不同区域来监控染色体分离。当CSR-1缺失的时候,染色体不能正确排列在赤道板上,动粒也不能正确定位到纺锤体的相反方向。CDE-1是一个生殖细胞特异表达的核苷转移酶,对线虫中染色体的正确分离也是必需的^[74]。CDE-1特异结合在有丝分裂的染色体上,这一结合依赖于EGO-1和CSR-1。CDE-1主要作用可能在于尿嘧啶化CSR-1结合的siRNA,从而避免这一类siRNA的量无限增加。

3 RNAi与H3K27me3

在真核生物中,甲基化的H3K27是PcG介导转录水平基因沉默的重要标志。H3K27me是由含有SET结构域的组蛋白甲基转移酶催化,同时被组蛋白修饰reader

蛋白识别以调控基因表达或者基因组完整性维持. 然而H3K27me3是否参与RNAi过程, 以及它怎样参与小RNA介导的基因沉默, 这一方面的研究还相对缺乏.

在果蝇中, PcG复合物和RNAi机器可以一起发挥作用使基因沉默, 同时调节靶染色体的组装、影响转录水平和转录后水平的转基因沉默^[75]. 转录水平的基因沉默是PcG蛋白依赖的, 转录后水平基因沉默与基因高拷贝数相关. 果蝇的PcG蛋白可以通过结合PcG响应元件PRE来抑制同源异性基因的表达^[76]. 通常情况下, RNAi机器的突变不会影响PcG蛋白的募集, 但是RNAi机器对PcG蛋白在靶标位置的维持是必需的. Dcr2, PIWI和Ago1这三个RNAi关键因子会与PcG蛋白共定位, 它们的突变会显著性地减少PcG蛋白与内源同源异型基因的结合.

在秀丽线虫中, H3K27的甲基化修饰可以介导代际之间表观遗传信息的传递. H3K27me和PRC2可以在代际之间通过发育来传递抑制性记忆^[77]. 本研究组发现, siRNA可以介导H3K27me3的获得和遗传^[54], 这一过程依赖于Nrde通路. 外源和内源性的siRNA都可以通过Nrde通路实现基因靶向位点的H3K27的甲基化修饰, 而且这一修饰可以在线虫体内多代遗传. 有意思的是, siRNA诱导的H3K9me3和H3K27me3形成所需要的遗传通路是不同的, 二者在细胞核内RNAi过程中可能具有不同的分子机制. 例如, *set-25*和*met-2*对于H3K9的甲基化是必需的, 而*mes-2*对于H3K27的甲基化是必需的, 但它们都依赖于上游的Nrde通路.

RNAi介导的H3K27me不仅对基因表达起到调控作用, 也参与染色体完整性的维持. 例如, piRNA介导的H3K27甲基化在四膜虫基因组的程序性消除中起着关键作用^[17]. 一个特异性结合H3K27甲基化的组蛋白甲基转移酶EZL1可以介导H3K27的甲基化, 这一甲基化依赖于RNAi过程和piRNA, 并且这个甲基转移酶对于发育相关调节的DNA消除和RNAi沉默也是必需的^[78]. H3K27甲基化的同时也导致H3K9甲基化, 从而进一步诱导程序性的DNA消除.

4 RNAi与转录调控

细胞核是RNA合成、加工和调控的中心, 转录和剪切都在细胞核中发生. 由于转录和剪切都涉及RNA, 那么任何能够识别RNA的分子机制都有可能影

响RNA的产生. RNAi提供了一个选择性识别RNA靶标的方式. 在调控RNA的过程中, 转录因子的选择性相对较低, 而且在进化上很难进一步演化以产生新的识别选择性. 而小RNA通过碱基配对的方式则很容易通过突变的方式在进化上产生新的选择性. 然而目前小RNA和RNAi机器直接调控转录过程的研究还相对缺乏^[8,16,39,79]. nascent RNA的转录本可以募集RNAi复合物到达靶标基因, 促进染色质水平的转录沉默, 同时抑制RNAP II在DNA上的延伸. 有证据表明, Dcr1可以直接与常染色质基因结合, 具有一种不依赖组蛋白修饰的调节基因表达的功能. 核内的Dcr1还可以通过“热转换”开关来调节热响应基因. 在非热激细胞中, Dcr1定位在核内负调控热响应基因, 当热激处理后, 它会出核从而导致该基因激活.

在动物细胞中, RNAi通路在细胞核内调控转录过程的机制还不明确并存在很大争议^[16,19]. 有研究表明, 针对启动子区域的小RNA可以抑制基因表达^[80-82]. SETDB1作为H3K9特异性的甲基转移酶可以和AGO2相结合, 在小RNA介导的转录水平基因沉默起着重要作用^[83]. 染色质免疫共沉淀表明, 小RNA诱导的AGO2首先靶标到雄性激素受体(androgen receptor, AR)的启动子上, 然后SETDB1, SIN3A和HDAC1/2等SIN3-HDAC复合物的组分和SETDB1免疫共沉淀在小RNA靶标的启动子位置, 同时出现H3K9的三甲甲基化. EZH2和H3K27的三甲甲基化也出现在了这些靶标位置上.

在秀丽线虫中, 细胞核Ago蛋白NRDE-3转运由RdRP生成的siRNA从细胞质进入细胞核. 在细胞核内, siRNA指导NRDE-3靶标到pre-mRNA上进一步募集NRDE-2和NRDE-1. NRDE-1可以与互补的基因组DNA相结合. 然后, 通过尚不清楚的机理, 核内RNAi会终止RNAP II, 抑制转录的延伸, 造成转录的提前终止. 同时还会在siRNA靶标的基因组位置促进产生H3K9和H3K27的三甲甲基化修饰^[51-54]. NRDE-3主要在体细胞中发挥作用, 与NRDE-3不同, 另一个细胞核内Ago蛋白HRDE-1可以在生殖腺中介导细胞核内RNAi通路^[84]. 有意思的是, 另外一个线虫专一的Ago蛋白CSR-1结合22G RNA, 靶标到基因组序列上, 同时直接募集RNAP II, 反而促进基因的表达, 而且并不能够改变H3K9甲基化的状态. 这样CSR-1通路可以拮抗表观遗传沉默来促进生殖腺基因的表达. 当CSR-1功能缺

失时会导致全局的反义链转录增加和沉默的染色体修饰异位表达, 导致染色体与着丝粒特异性的组蛋白H3的结合减少. 因此, CSR-1通路可以帮助维持激活的转录本, 促进区分转录激活和沉默的基因组区域^[85].

5 RNAi与选择性剪切

选择性剪切给基因组的功能多样性提供了重要的物质基础, 大于90%的人类基因存在选择性剪切^[86]. 选择性剪切的缺陷会导致众多的人类疾病. 选择性剪切通常通过pre-mRNA中的一些结构域来调控, 包括剪切增强子和沉默子. RNAP II的转录速率的改变以及染色质的局部结构也可能参与这一调控^[87].

尽管siRNA在哺乳动物细胞中是抑制还是激活基因表达还存在广泛争议, 近来的很多实验表明siRNA可以调控转录过程中转录本的选择性剪切^[8,15]. siRNA可以把Ago2招募到pre-mRNA上, 改变pre-mRNA的剪切方式, 却并不造成pre-mRNA的降解. 在CD44基因中, Ago1和Ago2可以被招募到pre-mRNA上, 这一过程依赖于Dicer^[88]. Ago1和Ago2的招募会进一步招募剪切复合体和降低RNAP II的延伸速率, 从而影响选择性剪切. 同时, 招募Ago1和Ago2还依赖于组蛋白修饰因子, 在CD44可变外显子的基因组区域存在H3K9甲基化水

平的增加. 在另外一个研究中, dsRNA可以招募Ago2到SMN2和dystrophin的pre-mRNA上, 诱导选择性剪切, 但并不改变转录过程以及染色体修饰^[89]. fibronectin基因存在一个可被选择性剪切的外显子EDI, 外源性的siRNA可以造成EDI的选择性剪切, 这一过程依赖于Ago1, Dicer, 组蛋白的修饰和DNA甲基化^[90]. 去除Ago1或Dicer可以改变基因组里很多基因的选择性剪切方式. 染色质免疫沉淀实验还发现Ago1可以结合eRNA(enhancer RNA)的转录区域, 从而改变临近基因的选择性剪切方式^[91]. 有意思的是, Ago2介导的选择性剪切在果蝇里也有类似的报道^[92].

6 结论与展望

尽管过去几年里本研究组对细胞核内siRNA如何调控基因表达有了些初步的了解, 然而这里面还存在大量的问题有待研究. 例如, 并不清楚细胞核RNAi造成H3K9甲基化、H3K27甲基化和RNAP II的转录延伸暂停具体的分子机制是什么, RNAi如何调控转录的其他过程, 如起始、终止或剪切等. 在细胞核内, 小RNA和RNAi机器在多大程度上参与染色体的配对分离以及是否受生殖发育过程的调控也不清楚. 阐明这些问题不仅会加深对遗传和进化过程的理解, 而且将为真核基因组表观遗传调控的研究带来新的启示.

参考文献

- 1 Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391: 806–811
- 2 Feng X, Guang S. Small RNAs, RNAi and the inheritance of gene silencing in *Caenorhabditis elegans*. *J Genet Genomics*, 2013, 40: 153–160
- 3 Hannon G J, Rivas F V, Murchison E P, et al. The expanding universe of noncoding RNAs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2006, 71: 551–564
- 4 Ketting R F. The many faces of RNAi. *Dev Cell*, 2011, 20: 148–161
- 5 Bernstein E, Allis C D. RNA meets chromatin. *Genes Dev*, 2005, 19: 1635–1655
- 6 Carthew R W, Sontheimer E J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 2009, 136: 642–655
- 7 Czech B, Hannon G J. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet*, 2011, 12: 19–31
- 8 Castel S E, Martienssen R A. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nat Rev Genet*, 2013, 14: 100–112
- 9 Knight S W, Bass B L. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001, 293: 2269–2271
- 10 Ketting R F, Fischer S E, Bernstein E, et al. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev*, 2001, 15: 2654–2659
- 11 Kanellopoulou C, Muljo S A, Kung A L, et al. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev*, 2005, 19: 489–501

- 12 Baulcombe D. RNA silencing in plants. *Nature*, 2004, 431: 356–363
- 13 Vaishnav A K, Gollob J, Gamba-Vitalo C, et al. A status report on RNAi therapeutics. *Silence*, 2010, 1: 14
- 14 Burger K, Gullerova M. Swiss army knives: non-canonical functions of nuclear Drosha and Dicer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16: 417–430
- 15 Matzke M A, Birchler J A. RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat Rev Genet*, 2005, 6: 24–35
- 16 Kalantari R, Chiang C M, Corey D R. Regulation of mammalian transcription and splicing by nuclear RNAi. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: 524–537
- 17 Feng X Z, Guang S H. Non-coding RNAs mediate the rearrangements of genomic DNA in ciliates. *Sci China Life Sci*, 2013, 56: 937–943
- 18 Swart E C, Bracht J R, Magrini V, et al. The *Oxytricha trifallax* macronuclear genome: a complex eukaryotic genome with 16,000 tiny chromosomes. *PLoS Biol*, 2013, 11: e1001473
- 19 Li L C. Chromatin remodeling by the small RNA machinery in mammalian cells. *Epigenetics*, 2014, 9: 45–52
- 20 Moazed D. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature*, 2009, 457: 413–420
- 21 Cam H P. Roles of RNAi in chromatin regulation and epigenetic inheritance. *Epigenomics*, 2010, 2: 613–626
- 22 Zilberman D, Cao X, Jacobsen S E. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science*, 2003, 299: 716–719
- 23 McCue A D, Panda K, Nuthikattu S, et al. ARGONAUTE 6 bridges transposable element mRNA-derived siRNAs to the establishment of DNA methylation. *EMBO J*, 2015, 34: 20–35
- 24 Underwood C J, Martienssen R A. Argonautes team up to silence transposable elements in *Arabidopsis*. *EMBO J*, 2015, 34: 579–580
- 25 Duan C G, Zhang H, Tang K, et al. Specific but interdependent functions for *Arabidopsis* AGO4 and AGO6 in RNA-directed DNA methylation. *EMBO J*, 2015, 34: 581–592
- 26 Zhao Y, Chen X. Non-coding RNAs and DNA methylation in plants. *Natl Sci Rev*, 2014, 1: 219–229
- 27 毛颖波, 薛学义, 陈晓亚. 植物小RNA与RNA干扰: 生物学功能与应用前景. 中国科学C辑: 生命科学, 2009, 39: 31–43
- 28 张新岩, 朱颖, 吴辉辉, 等. 植物转录后水平基因沉默: 调控基因表达的一把双刃剑. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 716–722
- 29 Kasschau K D, Fahlgren N, Chapman E J, et al. Genome-wide profiling and analysis of *Arabidopsis* siRNAs. *PLoS Biol*, 2007, 5: e57
- 30 Zhang X, Henderson I R, Lu C, et al. Role of RNA polymerase IV in plant small RNA metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 4536–4541
- 31 Zhu Y, Rowley M J, Böhmendorfer G, et al. A SWI/SNF chromatin-remodeling complex acts in noncoding RNA-mediated transcriptional silencing. *Mol Cell*, 2013, 49: 298–309
- 32 Matzke M A, Mosher R A. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat Rev Genet*, 2014, 15: 394–408
- 33 Nuthikattu S, McCue A D, Panda K, et al. The initiation of epigenetic silencing of active transposable elements is triggered by RDR6 and 21–22 nucleotide small interfering RNAs. *Plant Physiol*, 2013, 162: 116–131
- 34 Halic M, Moazed D. Dicer-independent primal RNAs trigger RNAi and heterochromatin formation. *Cell*, 2010, 140: 504–516
- 35 Volpe T A, Kidner C, Hall I M, et al. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 Lysine-9 methylation by RNAi. *Science*, 2002, 297: 1833–1837
- 36 Verdel A, Jia S, Gerber S, et al. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science*, 2004, 303: 672–676
- 37 Martienssen R, Moazed D. RNAi and heterochromatin assembly. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015, 7: a019323
- 38 Wu L, Mao L, Qi Y. Roles of dicer-like and argonaute proteins in TAS-derived small interfering RNA-triggered DNA methylation. *Plant Physiol*, 2012, 160: 990–999
- 39 Holoch D, Moazed D. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nat Rev Genet*, 2015, 16: 71–84
- 40 Bayne E H, White S A, Kagansky A, et al. Stc1: a critical link between RNAi and chromatin modification required for heterochromatin integrity. *Cell*, 2010, 140: 666–677
- 41 Jia S, Kobayashi R, Grewal S I S. Ubiquitin ligase component Cul4 associates with Clr4 histone methyltransferase to assemble heterochromatin. *Nat Cell Biol*, 2005, 7: 1007–1013
- 42 Horn P J, Bastie J N, Peterson C L. A Rik1-associated, cullin-dependent E3 ubiquitin ligase is essential for heterochromatin formation. *Genes Dev*, 2005, 19: 1705–1714
- 43 Li H, Motamedi M R, Yip C K, et al. An alpha motif at Tas3 C terminus mediates RITS cis spreading and promotes heterochromatic gene silencing. *Mol Cell*, 2009, 34: 155–167
- 44 Schalch T, Job G, Shanker S, et al. The Chp1-Tas3 core is a multifunctional platform critical for gene silencing by RITS. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 18: 1351–1357
- 45 Lee Y C G. The role of piRNA-mediated epigenetic silencing in the population dynamics of transposable elements in *Drosophila melanogaster*.

- PLoS Genet, 2015, 11: e1005269
- 46 Fukaya T, Tomari Y. MicroRNAs mediate gene silencing via multiple different pathways in *Drosophila*. *Mol Cell*, 2012, 48: 825–836
- 47 Wang S H, Elgin S C R. *Drosophila* Piwi functions downstream of piRNA production mediating a chromatin-based transposon silencing mechanism in female germ line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 21164–21169
- 48 Kang H, McElroy K A, Jung Y L, et al. Sex comb on midleg (Scm) is a functional link between PcG-repressive complexes in *Drosophila*. *Genes Dev*, 2015, 29: 1136–1150
- 49 Lo Sardo F, Lanzuolo C, Comoglio F, et al. PcG-mediated higher-order chromatin structures modulate replication programs at the *Drosophila* BX-C. *PLoS Genet*, 2013, 9: e1003283
- 50 Gu S G, Pak J, Guang S, et al. Amplification of siRNA in *Caenorhabditis elegans* generates a transgenerational sequence-targeted histone H3 lysine 9 methylation footprint. *Nat Genet*, 2012, 44: 157–164
- 51 Guang S, Bochner A F, Burkhart K B, et al. Small regulatory RNAs inhibit RNA polymerase II during the elongation phase of transcription. *Nature*, 2010, 465: 1097–1101
- 52 Burkhart K B, Guang S, Buckley B A, et al. A pre-mRNA-associating factor links endogenous siRNAs to chromatin regulation. *PLoS Genet*, 2011, 7: e1002249
- 53 Guang S, Bochner A F, Pavelec D M, et al. An Argonaute transports siRNAs from the cytoplasm to the nucleus. *Science*, 2008, 321: 537–541
- 54 Mao H, Zhu C, Zong D, et al. The Nrde pathway mediates small-RNA-directed histone H3 Lysine 27 trimethylation in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*, 2015, 25: 2398–2403
- 55 Ashe A, Sapetschnig A, Weick E M, et al. piRNAs can trigger a multigenerational epigenetic memory in the germline of *C. elegans*. *Cell*, 2012, 150: 88–99
- 56 Vastenhouw N L, Brunshwig K, Okihara K L, et al. Gene expression: long-term gene silencing by RNAi. *Nature*, 2006, 442: 882–882
- 57 Grishok A, Sinskey J L, Sharp P A. Transcriptional silencing of a transgene by RNAi in the soma of *C. elegans*. *Genes Dev*, 2005, 19: 683–696
- 58 Zeng Y, Cullen B R. RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *RNA*, 2002, 8: 855–860
- 59 Sen G L, Blau H M. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol*, 2005, 7: 633–636
- 60 Kim D H, Villeneuve L M, Morris K V, et al. Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13: 793–797
- 61 Beckedorff F C, Ayupe A C, Crocci-Souza R, et al. The intronic long noncoding RNA *ANRASSFI* recruits PRC2 to the *RASSF1A* promoter, reducing the expression of *RASSF1A* and increasing cell proliferation. *PLoS Genet*, 2013, 9: e1003705
- 62 Lanzuolo C, Lo Sardo F, Diamantini A, et al. PcG complexes set the stage for epigenetic inheritance of gene silencing in early S phase before replication. *PLoS Genet*, 2011, 7: e1002370
- 63 Huang C, Wang X, Liu X, et al. RNAi pathway participates in chromosome segregation in mammalian cells. *Cell Discov*, 2015, 1: 15029
- 64 Westhorpe F G, Straight A F. Functions of the centromere and kinetochore in chromosome segregation. *Curr Opin Cell Biol*, 2013, 25: 334–340
- 65 Chan F L, Wong L H. Transcription in the maintenance of centromere chromatin identity. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 11178–11188
- 66 Gent J I, Dawe R K. RNA as a structural and regulatory component of the centromere. *Annu Rev Genet*, 2012, 46: 443–453
- 67 Nasmyth K. Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science*, 2002, 297: 559–565
- 68 Folco H D, Pidoux A L, Urano T, et al. Heterochromatin and RNAi are required to establish CENP-A chromatin at centromeres. *Science*, 2008, 319: 94–97
- 69 Hall I M, Noma K I, Grewal S I S. RNA interference machinery regulates chromosome dynamics during mitosis and meiosis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 193–198
- 70 Pek J W, Kai T. A role for vasa in regulating mitotic chromosome condensation in *Drosophila*. *Curr Biol*, 2011, 21: 39–44
- 71 Pek J W, Kai T. DEAD-box RNA helicase Belle/DDX3 and the RNA interference pathway promote mitotic chromosome segregation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 12007–12012
- 72 Claycomb J M, Batista P J, Pang K M, et al. The Argonaute CSR-1 and its 22G-RNA cofactors are required for holocentric chromosome segregation. *Cell*, 2009, 139: 123–134
- 73 Yigit E, Batista P J, Bei Y, et al. Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct argonautes act sequentially during RNAi. *Cell*, 2006, 127: 747–757
- 74 van Wolfswinkel J C, Claycomb J M, Batista P J, et al. CDE-1 affects chromosome segregation through uridylation of CSR-1-bound siRNAs. *Cell*, 2009, 139: 135–148
- 75 Pal-Bhadra M, Bhadra U, Birchler J A. RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in

- Drosophila*. [Mol Cell](#), 2002, 9: 315–327
- 76 Grimaud C, Bantignies F, Pal-Bhadra M, et al. RNAi components are required for nuclear clustering of polycomb group response elements. [Cell](#), 2006, 124: 957–971
- 77 Gaydos L J, Wang W, Strome S. H3K27me and PRC2 transmit a memory of repression across generations and during development. [Science](#), 2014, 345: 1515–1518
- 78 Liu Y, Taverna S D, Muratore T L, et al. RNAi-dependent H3K27 methylation is required for heterochromatin formation and DNA elimination in *Tetrahymena*. [Genes Dev](#), 2007, 21: 1530–1545
- 79 Cecere G, Grishok A. A nuclear perspective on RNAi pathways in metazoans. [Biochim Biophys Acta](#), 2014, 1839: 223–233
- 80 Castanotto D, Tommasi S, Li M, et al. Short hairpin RNA-directed cytosine (CpG) methylation of the gene promoter in HeLa cells. [Mol Therapy](#), 2005, 12: 179–183
- 81 Janowski B A, Kaihatsu K, Huffman K E, et al. Inhibiting transcription of chromosomal DNA with antigene peptide nucleic acids. [Nat Chem Biol](#), 2005, 1: 210–215
- 82 Napoli S, Pastori C, Magistri M, et al. Promoter-specific transcriptional interference and c-myc gene silencing by siRNAs in human cells. [EMBO J](#), 2009, 28: 1708–1719
- 83 Cho S, Park J S, Kang Y K. AGO2 and SETDB1 cooperate in promoter-targeted transcriptional silencing of the androgen receptor gene. [Nucleic Acids Res](#), 2014, 42: 13545–13556
- 84 Buckley B A, Burkhart K B, Gu S G, et al. A nuclear Argonaute promotes multigenerational epigenetic inheritance and germline immortality. [Nature](#), 2012, 489: 447–451
- 85 Cecere G, Hoersch S, O’Keeffe S, et al. Global effects of the CSR-1 RNA interference pathway on the transcriptional landscape. [Nat Struct Mol Biol](#), 2014, 21: 358–365
- 86 Wang E T, Sandberg R, Luo S, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. [Nature](#), 2008, 456: 470–476
- 87 Luco R F, Allo M, Schor I E, et al. Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. [Cell](#), 2011, 144: 16–26
- 88 Ameyar-Zazoua M, Rachez C, Souidi M, et al. Argonaute proteins couple chromatin silencing to alternative splicing. [Nat Struct Mol Biol](#), 2012, 19: 998–1004
- 89 Liu J, Hu J, Corey D R. Expanding the action of duplex RNAs into the nucleus: redirecting alternative splicing. [Nucleic Acids Res](#), 2012, 40: 1240–1250
- 90 Alló M, Buggiano V, Fededa J P, et al. Control of alternative splicing through siRNA-mediated transcriptional gene silencing. [Nat Struct Mol Biol](#), 2009, 16: 717–724
- 91 Alló M, Agirre E, Bessonov S, et al. Argonaute-1 binds transcriptional enhancers and controls constitutive and alternative splicing in human cells. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2014, 111: 15622–15629
- 92 Taliaferro J M, Aspden J L, Bradley T, et al. Two new and distinct roles for *Drosophila* Argonaute-2 in the nucleus: alternative pre-mRNA splicing and transcriptional repression. [Genes Dev](#), 2013, 27: 378–389

Small-interfering RNA-mediated epigenetics and gene regulation in the nucleus

FENG XueZhu & GUANG ShouHong

School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China

RNA interference (RNAi) is a widely conserved gene regulation mechanism in eukaryotes. Small regulatory RNAs (20–30 nt in length) are widely present in nearly all eukaryote cells. These small regulatory RNAs are engaged in many essential biological processes, including but not limited to heterochromatin formation, maintenance of genome integrity, spatiotemporal developmental regulation, cell fate decisions, DNA repair, and antiviral reactions. Dysregulation of the biogenesis and homeostasis of these small regulatory RNAs can often lead to a variety of severe human diseases. In the cytoplasm, RNAi usually act through inhibiting protein translation or inducing mRNA degradation. In the nucleus, RNAi can act via a number of mechanisms. In this review, we will focus on the mechanisms of small RNA-mediated gene regulation in the nucleus, including heterochromatin formation, epigenetic modification, chromosome segregation, transcriptional regulation, and alternative splicing.

siRNA, RNAi, transcription, histone modification, epigenetics

doi: [10.1360/N052016-00335](https://doi.org/10.1360/N052016-00335)