

作用于 RNA 3'末端的甲基转移酶 Hen1 蛋白的研究进展

高媛^{1,2} (1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 10049)

摘要 Hen1 蛋白是一类作用于 RNA 3'末端的甲基转移酶, 研究表明其同源物在植物、动物和细菌中均存在。不同来源的 Hen1 蛋白在结构和功能上存在差异。文中就不同来源 Hen1 蛋白的结构、功能及研究进展进行了综述。

关键词 RNA; Hen1; 甲基转移酶

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)09-03783-03

Research Progress of Hen1, A Methyltransferase Acting On the 3' Terminal Nucleotide of RNA

GAO Yuan (National Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academic of Sciences, Wuhan, Hubei 430072)

Abstract Hen1 is a methyltransferase acting on 3' terminal nucleotide of RNA. The research showed that Hen1 homologous are found in plants, animals and some bacteria. Hen1 from different origin possess some divergence in protein architecture and biological functions. The structure, function and recent research progress in Hen1 from different origin were summarized.

Key words RNA; Hen1; Methyltransferase

过去 10 年里, 在真核生物中鉴定了许多调控基因表达的大小为 20~30 nt 的小 RNA^[1]。根据小 RNA 的来源、生成过程和涉及到的蛋白, 可将其分为 3 大类: miRNA、siRNA 和 piRNA^[2-3]。这些小 RNA 会与一类被称为 Argonaute 的蛋白家族成员结合, 在一系列相关蛋白的作用下形成依赖于 RNA 的沉默复合体(RISC)^[4-6]。利用碱基互补配对原则, RISC 中的小 RNA 指导 RISC 与靶 RNA 结合, 继而调节细胞内靶基因的表达。研究表明这些小 RNA 几乎涉及真核生物中所有的生物学过程, 包括抗病毒防御、细胞增殖和死亡、细胞分化、发育调控、转座子抑制和干细胞维持等^[7]。

这些小 RNA 的产生和成熟通常涉及 2 步反应。第 1 步, 长的 RNA 前体被内切核糖核酸酶切割, 产生 20~30 nt (nucleotide) 的 RNA 产物。该步中涉及到的核酸酶可能是 Dicer (产生 siRNA、miRNA), 也可能是 Piwi 蛋白 (产生 piRNA); 第 2 步, 植物中的小 RNA 和动物中一部分小 RNA 的 3' 末端核苷酸被甲基化。该过程是由依赖于 S-腺苷甲硫氨酸的 RNA 甲基转移酶 Hen1 来催化完成的^[8-11]。

研究发现 Hen1 蛋白是一类作用于 RNA 3'末端的甲基转移酶, 包含一个典型的 MTase 结构域。Hen1 蛋白同源物在植物、动物和一部分细菌中均存在^[12]。笔者在文中分别对不同来源 Hen1 蛋白的结构和功能进行综述。

1 植物中的 Hen1 蛋白

Hen1 蛋白是作为一个植物花发育相关的基因首次被发现的, 它在雄蕊和心皮发育过程中发挥着重要作用^[13]。之后在对拟南芥的研究中发现 *hen1* 突变株中 miRNA 的丰度明显减少, 说明 *hen1* 对 miRNA 的积累十分关键^[14]。水稻中 Hen1 的同源物 WAVY LEAF1 (WAF1) 对于小 RNA 的稳定性也十分重要。在 *waf1* 突变株中, miRNA 的量也明显减少^[15]。体外活性试验表明, 重构的拟南芥 Hen1 蛋白能作用

于 21~24 nt 的双链 RNA(dsRNA), 在每条链的 3'末端核苷酸的 2'-OH 位点添加一个甲基基团^[16]。随后, Hen1 被鉴定为植物中 miRNA 和 siRNA 的甲基转移酶^[8]。Hen1 蛋白对 miRNA 和 siRNA 的甲基化有助于增强小 RNA 的稳定性。甲基化能够保护 miRNA 避免 3'末端的尿苷化, 从而避免 3'-5' 核酸外切酶介导的降解^[8,16]。

体外试验表明 Hen1 蛋白能够作用于各种序列的 miRNA/miRNA* 二聚体, 但对双链 DNA、单链 miRNA、miRNA 前体和 tRNA 均没有活性, 表明 Hen1 蛋白更倾向于以 dsRNA 为底物^[8]。另外还发现 dsRNA 底物 3'端 2 个碱基的突出和 3'末端核苷酸 2'-OH 和 3'-OH 是拟南芥 Hen1 蛋白作用底物 2 个非常重要的特征^[16]。底物 RNA 上 3'末端核苷酸的 2'-OH 和 3'-OH 对于 Hen1 蛋白的甲基化活性十分重要, 这 2 个位点很可能在底物识别过程中发挥重要作用。2'-OH 集团是常见的甲基化位点, 而 3'-甲基化的核糖核酸到目前还未发现^[17]。

对拟南芥 Hen1 蛋白的晶体结构研究表明, Hen1 蛋白以单体的形式与小 RNA 底物结合^[18]。小 RNA 底物在其三级结构上形成一个 A 折叠构象, 每条链的末端都能被 Hen1 蛋白特异识别。植物 Hen1 蛋白有 5 个功能结构域: dsRBD1、LCD、dsRBD2、PLD 和 MTase, 其中 4 个直接与小 RNA 亚基相互作用, 而另一个类似 PPIase 的结构域(PLD)与 FK506 结合蛋白在结构上有高度的相似性。在 N 端的 LCD 包含一个 La 结构域, La 结构域通过与 La 蛋白的 RNA 识别结构域相互作用特异的结合在 RNA 的 3'末端。Hen1 的多个 RNA 结合结构域(dsRBD)和甲基转移酶结构域(MTase)共同作用确定了底物 RNA 的长度及特异性。植物 Hen1 蛋白虽然依赖于 Mg²⁺ 的存在发挥作用, 但动力学研究表明在没有其他辅助蛋白存在的条件下, Hen1 蛋白也具有高效的催化活性^[19]。

2 动物中的 Hen1 蛋白

与植物中所有的小 RNA 3'末端都会被甲基化不同的是, 动物中只有一小部分小 RNA 的 3'末端存在甲基化。而到目前为止在脊椎动物中没有发现任何与 Ago 蛋白相关的

基金项目 国家自然科学基金。

作者简介 高媛(1985-), 女, 河北藁城人, 博士研究生, 研究方向: 藻类遗传, E-mail: sun_shine0@163.com。

收稿日期 2013-03-21

miRNA 存在甲基化修饰^[20-22]。在果蝇中,与 Ago2 相关的小 RNA (主要是 siRNA) 的 3' 末端存在甲基化修饰,而与 Ago1 相关的小 RNA (主要是 miRNA) 大部分都没有甲基化修饰^[11,23]。有趣的是动物中目前已知的大部分与 Piwi 相关的小 RNA (piRNA) 的 3' 末端都存在甲基化修饰^[10,11,20-22,24]。动物中小 RNA 的甲基化修饰也是由 Hen1 同源蛋白催化的。

虽然 RNA 干扰 (RNAi) 机制中涉及到的 Dicer 和 Argonaute 蛋白的氨基酸序列和结构在所有的真核生物中是非常保守的, Hen1 蛋白在植物和动物中却存在很大的差异。动物中的 Hen1 蛋白一般比植物的 Hen1 蛋白小很多 (约为 390 个氨基酸), 另外其 MTase 结构域一般定位在 Hen1 蛋白的 N 端, 它们缺少植物特异的 N 端结构域。动物的 Hen1 蛋白是以 ssRNA 为底物, 而不是 dsRNA^[24]。大部分动物的 Hen1 蛋白表达方式与 Piwi 蛋白相似, 如老鼠的 Hen1 与 piRNA 和 Piwi 蛋白一样特异地在睾丸中表达^[25-26], 因此推测动物中甲基化修饰发生在特定的小 RNA 上, 调控特定的 RNAi 途径。

Saito 等^[10]发现果蝇中 Hen1 蛋白同源物 Pimet 的缺失会导致 piRNA 末端甲基化修饰的消失。重构的 Pimet 蛋白能够在体外甲基化单链 RNA, 并且与 Piwi 蛋白存在相互作用。果蝇中与 Ago2 相关的 siRNA 甲基化能保护 siRNA 避免 3' 修饰和 3' 加尾^[27]。Hen1 的同源物在有纤毛的原生动物四膜虫中也存在^[28-29]。在有性生殖过程中, 细胞中产生的 28 ~ 29 nt 的 scnRNA 会特异地与 Ago 蛋白 Twilp 结合^[30]。scnRNA 会被四膜虫 Hen1 蛋白同源物 Hen1p 甲基化, Hen1p 蛋白与 Twilp 蛋白在体内共同表达, 体外试验发现它们存在相互作用^[28]。Hen1p 蛋白的失活导致 scnRNA 数量的减少和长度的缩短, 无法有效的诱导转座子样 DNA 序列的降解, 最终导致异常生殖细胞的产生^[28]。斑马鱼中 Hen1 蛋白特异地在生殖细胞中表达, 对于卵母细胞的形成十分重要。Hen1 蛋白利用其 C 端结构域主要集中在胚质中, 但对于胚质的形成不是必需的。在 *hen1* 突变体中, 来源于逆转录转座子的 piRNA 更加尿苷化, 其含量也明显减少^[31]。

3 细菌中的 Hen1 蛋白

Hen1 的同源物在细菌中也存在。通过蛋白大小比较发现, 细菌的 Hen1 更加类似于动物的 Hen1, 而不是植物的 Hen1。但氨基酸序列比对发现, 除 MTase 结构域, 细菌的 Hen1 与动物和植物的 Hen1 蛋白没有任何相似性, 因此 Hen1 蛋白可分为 3 个亚家族: 植物 Hen1 蛋白、动物 Hen1 蛋白和细菌 Hen1 蛋白^[12]。

体外纯化热纤梭菌 *Clostridium thermocellum* 的 Hen1 蛋白是由 465 个氨基酸组成的多肽, 以二聚体的结构发挥作用。纯化的 Hen1 蛋白能催化甲基从甲基供体上转移到 RNA 的 3' 末端的核苷酸上, 但不能催化同义的 DNA 或 3' 末端是脱氧核糖的 RNA, 说明 Hen1 蛋白作用底物偏好于 RNA。研究表明 Hen1 蛋白最佳的活性条件是碱性条件 (pH 8.0 ~ 8.5), 并且依赖于 Mn^{2+} 发挥作用。对细菌、植物和动物的 Hen1 蛋白序列进行比对, 发现它们都包括一个明显的

AdoMet 结合位点, 该位点由 2 个多肽基序组成: ²⁸⁹VIDL-GCG²⁹⁵ 和 ³¹³TGVD³¹⁶ (热纤梭菌的 Hen1 蛋白)。将其中 291 位的 D 突变为 A, 或 316 位的 D 突变为 A 均会使 Hen1 蛋白丧失甲基转移酶活性, 说明细菌的 Hen1 活性依赖于 AdoMet 结合位点。分别纯化细菌 Hen1 的 N 端区域和 C 端区域, 研究表明单独的 C 端区域具有甲基转移酶活性, 而以二聚体形式存在的 Hen1 N 端区域能够与纯化的 Pnkp 同源二聚体结合形成一个高度有序的复合体^[12]。

随后对细菌 Hen1 蛋白的活性位点和底物特异性进行进一步研究。经过突变分析确定了热纤梭菌的 Hen1 蛋白活性位点上 8 个保守的氨基酸残基, 分别是用于结合 RNA 甲基受体的 3' 核苷酸的 Arg273、Arg414; 作为 Mn^{2+} 辅因子的 Glu366、Glu369、His370、His418; 及与 AdoMet 甲基供体作用的 Asp291、Asp316^[32]。研究表明 Hen1 蛋白更偏爱末端最后一个碱基是 G 的 RNA 底物。底物 RNA 大小在 12 ~ 24 nt 变化时 Hen1 蛋白活性差异不大, 而当底物小于 12 nt 时 Hen1 活性明显减弱。Hen1 蛋白能够甲基化由 23 个脱氧核苷酸和一个 3' 末端核苷酸组成的多核苷酸, 说明细菌的 Hen1 蛋白除对 3' 末端的核苷酸有要求外, 对其他的序列并无严格要求。Hen1 蛋白通过识别底物的二级结构作用于 RNA 底物的 3' 末端。

研究发现, 在许多细菌中 *hen1* 和它下游的基因形成一个操纵子, 下游的基因编码一个约 850 个氨基酸的蛋白。在热纤梭菌中, 该蛋白称为 Pnkp, Pnkp 具有激酶、磷酸酶和腺苷酰转移酶活性, 这些都是 RNA 修复的特征^[33]。Shuman 等通过序列比对发现 Hen1-Pnkp 串联结构在 40 种不同细菌的基因组中都普遍存在^[12]。除极少数几个细菌中 *hen1* 和 *pnpk* 基因被一个与它们同向的 ORF (open reading frame) 分隔开外, 在大多数细菌中 *hen1* 和 *pnpk* 基因都是以串联的双因子结构存在的。这个保守的结构有可能在细菌的 RNA 末端修饰和 RNA 修复过程中发挥作用。Chan 等发现 *Anabaena variabilis* 中的 Pnkp 和 Hen1 蛋白在体外形成一个稳定的四聚体, 该四聚体不仅能修复被核糖体毒素切割的 tRNA, 还能在切割位点处添加一个甲基基团, 从而避免被修复的 tRNA 被再次切割。Pnkp/Hen1 复合体构成了细菌的 RNA 修复和修饰系统^[34]。

4 展望

研究表明来源于植物、动物和细菌中的 Hen1 蛋白都能甲基化 RNA 3' 末端核苷酸的 2'-OH 基团。但是, 不同来源的 Hen1 蛋白的生物学功能各异: 真核生物的 Hen1 蛋白涉及到 RNAi 过程, 而细菌的 Hen1 蛋白参与 RNA 修复^[34]。Hen1 蛋白表现出同样的甲基转移酶活性对应完全不同的生物学功能使研究人员开始关注 Hen1 蛋白可能的进化来源。除 MTase 结构域外, 植物、动物和细菌中的 Hen1 蛋白在蛋白大小和结构域组成上没有任何相似性。考虑到 RNAi 过程中 Dicer 和 Ago 蛋白在真核细胞中的高度保守性, 植物和动物中 Hen1 蛋白巨大的差异可能暗示着 Hen1 蛋白在 RNAi 机制中的作用是进化上发展到近期阶段新获得的功能。小

RNA 的甲基化过程可能是从包含 Hen1 祖先的其他物种中通过水平基因转移得到的,而含有 Pnkp/Hen1 修复机制的细菌有可能是其来源,也有可能真核细胞中的 Hen1 和细菌中的 Hen1 来源于同样的更加古老的祖先。Hen1 蛋白的起源需要进一步的研究。

参考文献

- [1] FIRE A, XU S, MONTGOMERY M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806–881.
- [2] AMBROS V, CHEN X. The regulation of genes and genomes by small RNAs [J]. *Development*, 2007, 134: 1635–1641.
- [3] KIM V N, HAN J, SIOMO M C. Biogenesis of small RNAs in animals [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10: 126–139.
- [4] HAMMOND S M, BERNSTEIN E, BEACH D, et al. An RNA-directed nuclease mediates posttranscriptional gene silencing in *Drosophila* cells [J]. *Nature*, 2000, 404(16): 293–296.
- [5] HAMMOND S M, BOETTCHER S, CAUDY A A, et al. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi [J]. *Science*, 2001, 293(5532): 1146–1150.
- [6] NYKANEN A, HALEY B, ZAMORE P D. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway [J]. *Cell*, 2001, 107(3): 309–321.
- [7] CHAN C M, ZHOU C, BRUNZELLE J S, et al. Structural and biochemical insights into 2'-O-methylation at the 3'-terminal nucleotide of RNA by Hen1 [J]. *PNAS*, 2009, 106(42): 17699–17704.
- [8] YU B, YANG Z, LI J, et al. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis [J]. *Science*, 2005, 307(5711): 932–935.
- [9] VAGIN V V, SIGOVA A, LI C J, et al. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germ line [J]. *Science*, 2006, 313(5785): 320–324.
- [10] SAITO K, SAKAGUCHI Y, SUZUKI T, et al. Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3' ends [J]. *Genes Dev*, 2007, 21: 1603–1608.
- [11] HORWICH M D, LI C, MATRANGE C, et al. The *Drosophila* RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germ-line piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC [J]. *Curr Biol*, 2007, 17(14): 1265–1272.
- [12] JAIN R, SHUMAN S. Bacterial Hen1 is a 3' terminal RNA ribose 2'-O-methyltransferase component of a bacterial RNA repair cassette [J]. *RNA*, 2010, 16: 316–323.
- [13] CHEN X, LIU J, CHENG Y, et al. HEN1 functions pleiotropically in *Arabidopsis* development and acts in C function in the flower [J]. *Development*, 2002, 129: 1085–1094.
- [14] PARK W, LI J, SONG R, et al. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Curr Biol*, 2002, 12: 1484–1495.
- [15] ABE M, YOSHIKAWA T, NOSAKA M, et al. WAVY LEAF1, an ortholog of *Arabidopsis* HEN1, regulates shoot development by maintaining MicroRNA and trans-acting small interfering RNA accumulation in rice [J]. *Plant Physiol*, 2010, 154(3): 1335–1346.
- [16] YANG Z, EBRIGHT Y W, YU B, et al. HEN1 recognizes 21–24nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2'-OH of the 3'-terminal nucleotide [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(2): 667–675.
- [17] DUNIN-HORKAWICZ S, CZERWONIEC A, GAJDA M J, et al. MODO-MICS: a database of RNA modification pathways [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: 145–149.
- [18] HUANG Y, JI L, HUANG Q, et al. Structural insights into mechanisms of the small RNA methyltransferase HEN1 [J]. *Nature*, 2009, 461: 823–827.
- [19] VILKAITIS G, PLOTNIKOVA A, KLIMAŠAUSKAS. Kinetic and functional analysis of the small RNA methyltransferase HEN1: The catalytic domain is essential for preferential modification of duplex RNA [J]. *RNA*, 2010, 16: 1935–1942.
- [20] HOUWIN S, KAMMINGA L M, BEREZIKOV E, et al. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in *Zebrafish* [J]. *Cell*, 2007, 129(1): 69–82.
- [21] KIRINO Y, MOURELATOS Z. Mouse Piwi-interacting RNAs are 2'-O-methylated at their 3' termini [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14: 347–348.
- [22] OHARA T, SAKAGUCHI Y, SUZUKI T, et al. The 3' termini of mouse Piwi-interacting RNAs are 2'-O-methylated [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14: 349–350.
- [23] KAWAMURA Y, SAITO K, KIN T, et al. *Drosophila* endogenous small RNAs bind to Argonaute 2 in somatic cells [J]. *Nature*, 2008, 453: 793–797.
- [24] JI L J, CHEN X M. Regulation of small RNA stability: methylation and beyond [J]. *Cell Research*, 2012, 22(4): 624–636.
- [25] KIRINO Y, MOURELATOS Z. 2'-O-methyl modification in mouse piRNAs and its methylase [J]. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 2007, 51(1): 417–418.
- [26] KIRINO Y, MOURELATOS Z. The mouse homolog of HEN1 is a potential methylase for Piwi-interacting RNAs [J]. *RNA*, 2007, 13: 1397–1401.
- [27] AMERES S L, HORWICH M D, HUNG J H, et al. Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs [J]. *Science*, 2010, 328(5985): 1534–1539.
- [28] KURTH H M, MOCHIZUKI K. 2'-O-methylation stabilizes Piwi-associated small RNAs and ensures DNA elimination in *Tetrahymena* [J]. *RNA*, 2009, 15: 675–685.
- [29] LEE S R, COLLINS K. Two classes of endogenous small RNAs in *Tetrahymena thermophila* [J]. *Genes Dev*, 2006, 20: 28–33.
- [30] MOCHIZUKI K, GOROVSKY M A. Conjugation-specific small RNAs in *Tetrahymena* have predicted properties of scan (scn) RNAs involved in genome rearrangement [J]. *Genes Dev*, 2004, 18: 2068–2073.
- [31] KAMMINGA L M, LUTELIJN M J, den BROEDER M J, et al. Hen1 is required for oocyte development and piRNA stability in *zebrafish* [J]. *EMBO*, 2010, 29: 3688–3700.
- [32] JAIN R, SHUMAN S. Active site mapping and substrate specificity of bacterial Hen1, a manganese-dependent 3' terminal RNA ribose 2'-O-methyltransferase [J]. *RNA*, 2011, 17: 429–438.
- [33] MARTINS A, SHUMAN S. An end-healing enzyme from *Clostridium thermocellum* with 5' kinase, 2', 3' phosphatase, and adenylyltransferase activities [J]. *RNA*, 2005, 11: 1271–1280.
- [34] CHAN C M, ZHOU C, HUANG R H. Reconstituting a bacterial RNA repair and modification system in vitro [J]. *Science*, 2009, 326(5950): 247.

(上接第 3776 页)

- [4] WU G F, ZHOU X P. Characterization of phosphorus-releasing bacteria in a small eutrophic shallow lake, Eastern China [J]. *Water Research*, 2011, 39: 4623–4632.
- [5] 徐芳, 蔡昭铃, 丛威, 等. 微藻培养生产多不饱和脂肪酸的研究进展 [J]. *重庆工学院学报*, 2009(4): 19–20.
- [6] 白菊萍. 革兰氏染色技术的相关探讨研究 [J]. *甘肃科技纵横*, 2012, 41(1): 125–126.
- [7] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Mol Biol Evol*, 2012, 4(4): 406–425.
- [8] JOHNS R B, PERRY Y. Lipids of manne bacterium *Flexibacter polymorphus* [J]. *Arch Microbiol*, 1977, 114: 267–271.
- [9] 黄建忠, 江贤章, 刘丽霞, 等. 高产 DHA 海洋真菌 *Thraustochytrium* sp. N4-103 脂肪酸组成及其 18S rRNA 基因的克隆与序列分析 [J]. *福建师范大学学报*, 2005(1): 85–88.
- [10] 张秋会, 马蓁. 工业化生产 EPA 和 DHA 藻株的选育 [J]. *中国油脂*, 2009, 29(6): 30–32.
- [11] 徐华顺, 罗玉萍, 李思光. 微生物发酵产油脂的研究进展 [J]. *中国油脂*, 2009, 24(2): 34–36.
- [12] 李烈英. 几种海洋生物高度不饱和脂肪酸的比较研究 [J]. *海洋学报*, 2010, 16(1): 105–108.
- [13] HORROCKS L A, YEO Y K. Health benefits of polyunsaturated fatty acid (PUFA) [J]. *Pharmacol Res*, 2009, 40(3): 211–225.