

# 知識天地

## 微型核糖核酸 (microRNA) 在植物體內所扮演的調控性角色

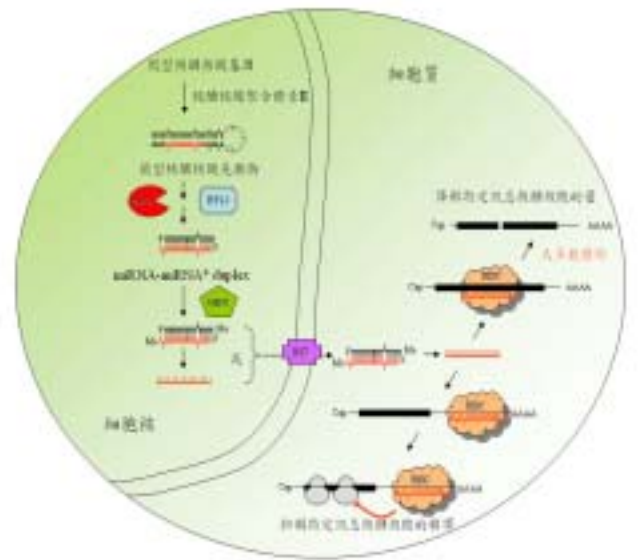
林淑怡、邱子珍 (農業生物科技研究中心博士生、助研究員)

植物藉由調控特定基因的表現來調節其生長與發育，以及對付外界突來的逆境。近年來在生物體內發現有內生的小分子核糖核酸，其長度大約是 21 個鹼基，稱為微型核糖核酸 (microRNA)，具有副調控基因表現的功能。大約在 4 年前植物學家開始探討植物中的 microRNA，研究其如何調控特定基因的表現。目前已知其在生長發育的不同階段扮演重要角色，除此 microRNA 也調控植物對逆境的適應性。本文針對目前我們所瞭解 microRNA 在植物的生合成路徑、作用方式及所扮演的角色作一簡介，最後並以我們實驗室最近研究的一個 microRNA (miR399)，其對植物體內磷酸恆定之調控作為例子來說明 microRNA 的重要性。

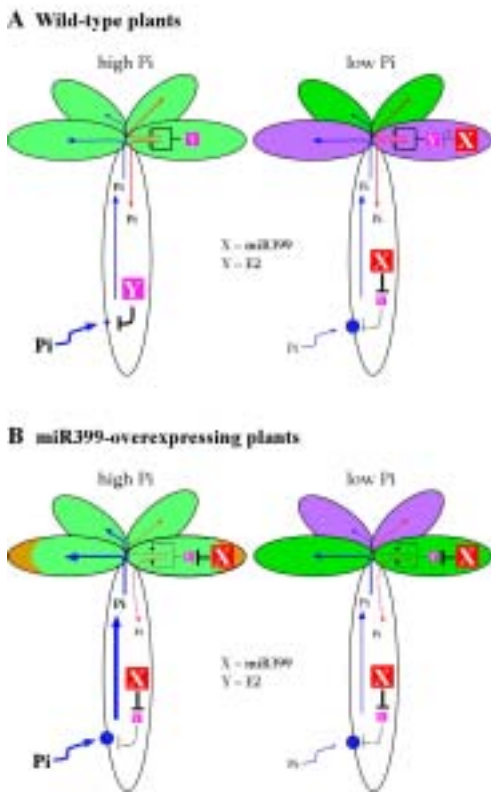
最早的一個 microRNA—*Lin-4* 是在線蟲 (*Caenorhabditis elegans*) 中被發現，其具有調控線蟲幼蟲特定發育階段的功用。之後陸續在動植物發現一系列的 microRNA，目前也漸漸清楚其所扮演的調控性功能。microRNA 在植物細胞中的生合成路徑及作用模式如圖一所示。microRNA 是由一個較長的 microRNA 先驅物產生而來，這樣的先驅物具有特殊的莖-環 (stem-loop) 二級結構。此先驅物乃由 microRNA 基因經由 RNA polymerase II 轉錄而來，microRNA 的基因是不轉譯成蛋白質的，一般座落於轉譯蛋白質基因之間 (intergenic region)。microRNA 生合成需要一系列的酵素作用，經由一種核糖核酸酵素 (ribonuclease)，稱切割酵素 (Dicer-like 1, DCL1)，在 microRNA 先驅物二次切割後，形成成熟 microRNA (mature miRNA) 與其互補的另一股 (miRNA\*) 的雙股複合物，

稱為 miRNA-miRNA\* duplex。目前關於 DCL1 如何辨識其位置及執行其功用仍不是很清楚，但可能是與 *HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1)* 一同作用來執行這樣的功能。之後 *HUA ENHANCER1 (HEN1)* 會在 miRNA-miRNA\* duplex 的 3' 端進行甲基化作用 (methylation)，此與 microRNA 的穩定性可能有關。miRNA\* 被水解後產生成熟的 microRNA，此即為最後作用的 microRNA，其為短的、內生的單股核糖核酸。藉由 *HASTY (HST)* 轉運蛋白 (transporter) 的幫助，可將 miRNA-miRNA\* duplex 或是將 mature miRNA 送入細胞質中。無論以何種形式，最後只有 mature microRNA 會結合到靜默複合體 (RNA induced silencing complex, RISC) 中，之後藉由 RISC 中 Argonaute (AGO1) 蛋白質的幫助，而發揮其作用。microRNA 會與其序列互補 (complementary) 的特定訊息核糖核酸 (mRNA) 作用，因此該基因若是具有與 microRNA 互補關係的序列，即可能為 microRNA 的標的基因 (target gene)。雖然在動物或植物中，microRNA 與標的基因的辨識方式都是藉由序列的互補性來決定，也都是扮演靜默 (silencing) 基因表現的功用，但在作用機制上還是有些差異性存在。在動物細胞內 microRNA 主要是抑制特定 mRNA 蛋白質的轉譯，而在植物細胞內主要是降解特定 mRNA 的量。造成此種差異可能是因為動物的 microRNA 與其標的基因的互補性不像在植物中那麼高所致。但目前在植物也發現抑制 mRNA 轉譯的例子。

植物 microRNA 具有與其標的基因高度互補的特性，使得在植物中標的基因的預測較容易，因而 microRNA 在植物的研究雖然起步較晚，但有關標的基因的確認卻進展迅速。加上阿拉伯芥整個基因組序列都已解碼，且又極易進行轉殖，因此目前常藉由兩種方式來進行研究，一是大量表達 (overexpress) microRNA，二是藉由改變標的基因序列但不改變其氨基酸序列使得 microRNA 無法辨識。藉由觀察所得轉殖植物之外表型 (phenotype) 與基



圖一、microRNA 在植物細胞內的生合成路徑及其調控機制



圖二、microRNA (miR399)及泛素接合酵素對調控植物體內磷酸平衡之假說模式 A 圖代表野生植株, B 圖代表 miR399 大量表現之轉殖植株。圖中藍色實心圓的部份代表根部磷酸的吸收系統, 藍色線條代表磷酸在地上部及地下部間的運移, 紅色線條代表磷酸由老葉運送至其它部位的情形。B 圖中虛線代表著在轉殖植物磷酸運移出現損害。在根部吸收系統, 愈大的磷酸吸收能力以愈大的圓圈代表, 而愈強的運輸能力則以愈粗的線條代表。植物缺乏磷酸時會累積花青素, 因此紫色葉片代表最初出現磷酸缺乏的地方; 磷酸過多時則會造成葉片的黃化, 因此 B 圖中葉緣黃色區域代表出現磷酸毒害。

解這群在低磷逆境下之特有基因族群的功能, 探討植物感應外在磷肥的多寡、訊息之傳遞以及如何維持細胞中磷酸濃度恆定的相關機制。我們最近的研究顯示 miR399 參與在植物體內磷酸恆定的調控 (圖二)。大量表現 miR399 的轉殖植物抑制了其標的基因—泛素接合酵素的表現, 此時轉殖植物葉部過度累積磷酸, 甚至出現磷酸毒害之性狀。葉部磷酸的過度累積乃由於根部增加對磷酸吸收和磷酸從根部至葉部的轉運能力提高所致。磷酸在植物體內是可以移動的, 一般在老化過程或缺磷逆境下會從老葉運移至幼葉, 以提供新生組織生長所需。大量表現 miR399 的轉殖植物因為磷酸從老葉至幼葉的轉運受到干擾, 因而更加重老葉磷酸毒害的現象。然而對於野生植株而言, 在缺磷逆境下會誘導 miR399 的表現, 進而抑制了泛素接合酵素的表現, 因而提高磷肥的吸收能力及改變磷酸在葉片間的分配, 此點有益於植物在缺磷逆境下的適應性。基因表達定位研究的結果顯示, miR399 和泛素接合酵素皆表現於維管束組織內, 此結果不僅提供 miR399 和泛素接合酵素在細胞內相互作用的證據, 並且支持 miR399 和泛素接合酵素對磷酸在植物體內系統性的轉運與分配所扮演的角色。我們亦發現前一磷酸過度累積的突變株—*pho2*, 其實是突變於泛素接合酵素基因而導致其功能喪失所致, 因而與大量表現 miR399 的轉殖植物性狀類似。綜合以上結果, 我們認為 miR399 和接合酵素基因的功能在以下三個層次來調控植物體內磷酸之恆定性: (1)

因的表現, 可讓我們得知 microRNA 與其標的基因之間的關係, 並得知其在生理上的重要性。有趣的是, 目前確認的標的基因約有 6 成左右都是轉錄因子 (transcription factor), 而這些轉錄因子參與在植物生長發育相關的調控上, 且某些調控路徑需由多個 microRNA 來進行。像是 miR156 調控 SPL 轉錄因子; miR159 調控 MYB 轉錄因子; miR319 調控 TCP 轉錄因子; miR172 調控 AP2-like 轉錄因子, 而這些轉錄因子皆會影響開花時間的早晚。其中 MYB 轉錄因子及 TCP 轉錄因子又與葉片的發育有關。另外像是 miR160、miR167、miR390 會調控 ARF 轉錄因子, 因而與植物賀爾蒙 Auxin 的調控有關。這些例子說明 microRNA 在整個基因調控的網路上不僅扮演著重要角色, 且是核心位置。除了轉錄因子外, microRNA 的標的基因也包含 F-box 的蛋白質或是泛素接合酵素 (ubiquitin-conjugating E2 enzyme), 這說明 microRNA 與調控蛋白質的穩定性也有關係。另外, microRNA 對一逆境誘導基因—SOD 的調控

也被報導。有趣的是 microRNA 生合成路徑上的酵素—DCL1 及 AGO1, 本身也是 miR162 及 miR168 的標的基因, 說明植物中 microRNA 在調控其本身生合成及功能上的重要性。

磷 (phosphorous, P), 是植物的必要營養元素之一, 也是構成細胞膜、遺傳物質去氧核糖核酸 (DNA) 和核糖核酸 (RNA) 以及細胞內能源 ATP 的重要組成。除此, 細胞內蛋白質的磷酸化對外界訊息之傳遞亦扮演重要的角色。磷酸鹽 ( $\text{HPO}_4^{2-}$ , Pi) 是植物體主要吸收利用的磷肥型式, 然而, 其在土壤中易流失且易與其他陽離子 (如鈣、鎂、鐵、鋁等離子) 形成不溶物或被土壤中之微生物轉換成有機磷, 這些在土壤中被固定的磷肥型式是無法被植物吸收的, 導致缺磷對植物而言是一非常普遍的問題。為了克服土壤中低磷的環境, 植物本身已發展出一些形態上、生理上、生化上以及分子上的應變措施來加強對磷酸的吸收利用。在這些反應中, 快速及獨特基因表現的改變扮演著相當重要的角色。我們實驗室著重於了

根部對磷酸之吸收；(2)磷酸在根部與地上部之分配狀況；(3)在老化或缺磷時，磷酸於不同葉片間的轉運。這項發現顯示 microRNA 對於維持植物體內磷酸恆定之重要性，並提供進一步瞭解調控植物體內磷酸恆定的重要線索與新的研究方向。此外，我們亦發現在演化過程中，此 miR399 和泛素接合酵素對磷酸恆定之維持在不同植物物種間是被保留的，可見此調控系統之重要性。