



植物核小RNA研究进展*

胡亮¹⁾ 程捷¹⁾ 王义华²⁾ 吕孟薇³⁾ 宋剑波^{1)**}

(¹⁾ 江西农业大学生物科学与工程学院, 南昌 330045; (²⁾ 江西农业大学理学院, 南昌 330045;

(³⁾ 江西农业大学国土资源与环境学院, 南昌 330045)

摘要 核小RNA (small nuclear RNA, snRNA) 是一类长度为60~300 nt的非编码RNA, 是真核生物RNA剪接体的主要成分. snRNA在各种生物中具有较高的保守性和同源性, 主要参与了mRNA和rRNA前体的加工过程. 本文对当前植物中snRNA领域的研究成果进行简要概述, 介绍了植物snRNA的分类、基因结构、合成机制及生物学功能, 同时总结了植物snRNA的化学修饰以及在科研生产中的应用, 并对将来snRNA的研究方向进行了展望.

关键词 植物snRNA, 剪接体, 修饰, 基因调控

中图分类号 Q522, Q74, Q946

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0276

植物体细胞内存在种类丰富的RNA, 其中核小RNA (small nuclear RNA, snRNA) 是真核生物基因组中一类长度为60~300 nt的小分子RNA, 在真核细胞中总量较少. snRNA存在于细胞核内 (U3 snRNA存在于核仁区, 其他snRNA存在于核质区), 狭义上snRNA是指存在于核质中的snRNA^[1]. 已知真核生物细胞中共有15种snRNA, 且U1~U7七种snRNAs富含尿嘧啶核苷酸. snRNA与结合蛋白结合形成snRNPs复合体, 从而发挥其生物学功能^[2].

snRNA具有较强的保守性. 研究发现, 植物U1~U6 snRNA的基因结构与噬热四膜虫非常相似^[3]. 拟南芥U4 snRNA由3种基因编码, 其中编码U4 snRNA的*AtU4.1*和*AtU4.2*基因与大豆和豌豆中编码U4 snRNA的基因同源性达到85%~89%, 而与哺乳动物的同源性为60%~65%^[4]. 通过DNA印迹 (Southern blot) 分析, 发现拟南芥基因组中含有8~9个U5 snRNA拷贝且这些拷贝具有严格保守的上游序列^[5]. 水稻、玉米、豌豆以及拟南芥两两之间U2 snRNA基因的同源性均大于80%. 以上研究表明, 在不同的物种中, snRNA具有高度的保守性, 这些snRNA在植物细胞内行使的生物学功能仍需要进一步研究. 但已知大部分富含尿嘧啶核苷酸的snRNA参与RNA剪接体的形成^[6]. 本文

介绍了近年来植物snRNA的分类、基因结构、合成机制、生物学功能和化学修饰等最新研究进展, 同时进一步展望了今后植物snRNA领域研究的主要发展方向.

1 snRNA的种类、结构与合成

1.1 snRNA的种类

snRNA参与构成RNA剪接体, 目前已知的snRNA有15种, 其中U1~U6、U12在多个物种中研究较为清楚 (表1)^[7]. U1、U2、U4~U6、U12 snRNA参与构建剪接体的框架结构 (表2)^[8-10]. 除了已知功能的snRNA, 在动植物基因组中均发现了一些缺失调控元件或者基因片段的snRNA基因, 称为假基因. 例如, 在番茄的基因组中发现的U1^[11]、U3^[12] snRNA假基因, 在马铃薯基因组中发现的U1、U2 snRNA^[13]假基因. 这些假基因的功能有待确定. 研究发现还有两种snRNA亚类^[14], 一类是能对Pre-rRNA起修饰作用的scaRNAs (small Cajal body-specific RNAs)^[15], 由于rRNA参与核糖体的形成, 因此可以猜测snRNA参与蛋

* 江西省教育厅科学基金(GJJ170276)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 18579059335, E-mail: thinks kier@163.com

收稿日期: 2020-07-31, 接受日期: 2020-10-14

白质翻译调控; 另一类是能够调节其他 snRNA 结构的 snoRNAs (small nucleolar RNAs), 目前在水稻中发现有 120 种^[16], 且主要存在于核仁区^[1]. 综上所述, snRNA 家族种类丰富, 包含: a. 剪接 Pre-mRNA 的 snRNA^[17]; b. 基因片段缺失的 snRNA 假基因^[13]; c. 对 Pre-rRNA 修饰的 scaRNAs 亚类^[18]; d. 调控 snRNA 结构的 snoRNAs^[15].

Table 1 The number of snRNA has been determined in some plants

表1 部分植物中已确定的snRNA数量

	拟南芥	大豆	西红柿	马铃薯	烟草	玉米
U1 snRNA	14	30	48	15	12	49
U2 snRNA	23	38	42	13	12	143
U3 snRNA	3	—	1	—	2	2
U4 snRNA	12	13	8	9	7	8
U5 snRNA	14	30	27	11	14	23
U6 snRNA	17	22	73	47	11	11
U11 snRNA	—	1	2	1	1	—
U12 snRNA	—	2	1	2	1	1

数据来源于NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Table 2 Major snRNA characteristics

表2 主要snRNA的特征

snRNA 种类	长度 范围	合成 场所	作用 底物	聚合酶 种类	结合 位点
U1 snRNA*	60~300 nt	核仁区	Pre-mRNA (U2型)	PolIII	内含子5'端
U2 snRNA*	60~300 nt	核仁区	Pre-mRNA (U2型)	PolIII	特异位点A
U4 snRNA*	60~300 nt	核仁区	Pre-mRNA (U2型)	PolIII	连接U1
U5 snRNA*	60~300 nt	核仁区	Pre-mRNA (U2型)	PolIII	连接U4/U6
U6 snRNA*	60~300 nt	核仁区	Pre-mRNA (U2型)	Pol III	连接U2
U3 snRNA	60~300 nt	核质区	Pre-28S rRNA	Pol III	
U12 snRNA	60~300 nt	核仁区	Pre-mRNA (U12型)	PolIII	

snRNA主要由PolII /III合成. *表示主要剪接体的snRNA成分, 剪接U2型内含子.

1.2 snRNA的基因结构

对小麦、豌豆、玉米和拟南芥的 U2 snRNA 进行序列分析, 发现这些物种 U2 snRNA 中都含有 4 个茎-环结构 (stem-loop). 值得注意的是单子叶植物和双子叶植物的茎-环结构相差较大, 说明二者

的剪接机制存在差异. Vankan 等^[19]发现 U2 snRNA 基因上游非编码区含有 3 个高度保守的序列: GTCCCACATCG、GTAGTATAAATA、CAANTC. 同时, Vankan 等^[5]通过序列比对发现几乎所有植物 snRNA 基因的 RTCCCACATCG 序列和 TATA box 序列 100% 保守. 成熟的 snRNA 一般包含 5'端帽子结构、3'端茎环结构、中间的 Sm 或 Lsm 结合位点三个结构^[20]. 拟南芥 U2 和 U5 snRNA 的二级结构如图 1a, b 所示. 从图中可以看出, snRNA 的结构中含有较多的茎-环结构 (包括 U2 snRNA 的 4 个茎-环结构) 及突起, 并且含有 snRNA 常见的 5'端帽子结构和 3'端茎-环结构, 其中 Sm/Lsm 结合位点未标出^[21-22]. U1 和 U4 的结构与 U2/U5 类似. U3 与 U6 是由 pol III 转录, 因此不带有 poly(A) 结构 (图 1c, d)^[23-24].

1.3 snRNA的合成

在 snRNA 的合成过程中, 首先在 RNA 聚合酶作用下以 snRNA 基因为模板转录产生 snRNA, 随后 snRNA 与核内的转运蛋白结合, 跨核膜转运出细胞核^[25]. 转运过程中由 snRNA 5'端帽子结构识别 CBC 蛋白转运出细胞核^[26]. snRNA 在细胞质中与 snRNA 结合蛋白结合成为小核核糖核蛋白 (small nuclear ribonucleoprotein, snRNP)^[27], 再次穿过核孔进入细胞核. 整个过程中, snRNA 经过两次跨膜转运形成成熟的 snRNP, 进入细胞核发挥剪接作用 (图 2). 研究表明, 植物 snRNA 主要是由 RNA 聚合酶 II 和 RNA 聚合酶 III 合成, 其中 U3 和 U6 snRNA 由 RNA 聚合酶 III 合成^[12, 28-29]. 其他 snRNA 由 RNA 聚合酶 II 合成.

snRNA 会转录形成类似于 mRNA 的 3'末端结构. 该过程中, Poly A 添加位点上游的高度保守序列 AAUAAA 和保守程度较低的 G-U-或者富含 U 的序列起信号作用^[30]. 虽然并没有在高等植物和酵母中发现 AAUAAA 序列^[31], 但是 mRNA 3'末端结构的形成与动物细胞相似^[32]. 然而不同于 mRNA, snRNA 的 3'末端是通过共转录形成的^[33]. 研究发现, 植物 snRNA 3'末端的形成是由 3' box 这一调控元件标记产生的^[34]. 同时 snRNA 启动子区也参与 snRNA 的 3'末端形成^[35].

植物 snRNA 基因的启动子区含有与脊椎动物不同的 TATA-like box 和 USE 元件^[24]. 并且拟南芥 TATA-like box 结合蛋白具有两种亚型^[36]. Heard 等^[36]对拟南芥的 TBP 蛋白 (TATA binding protein) 进行突变, 发现 snRNA 基因对 RNA 聚合酶具有不

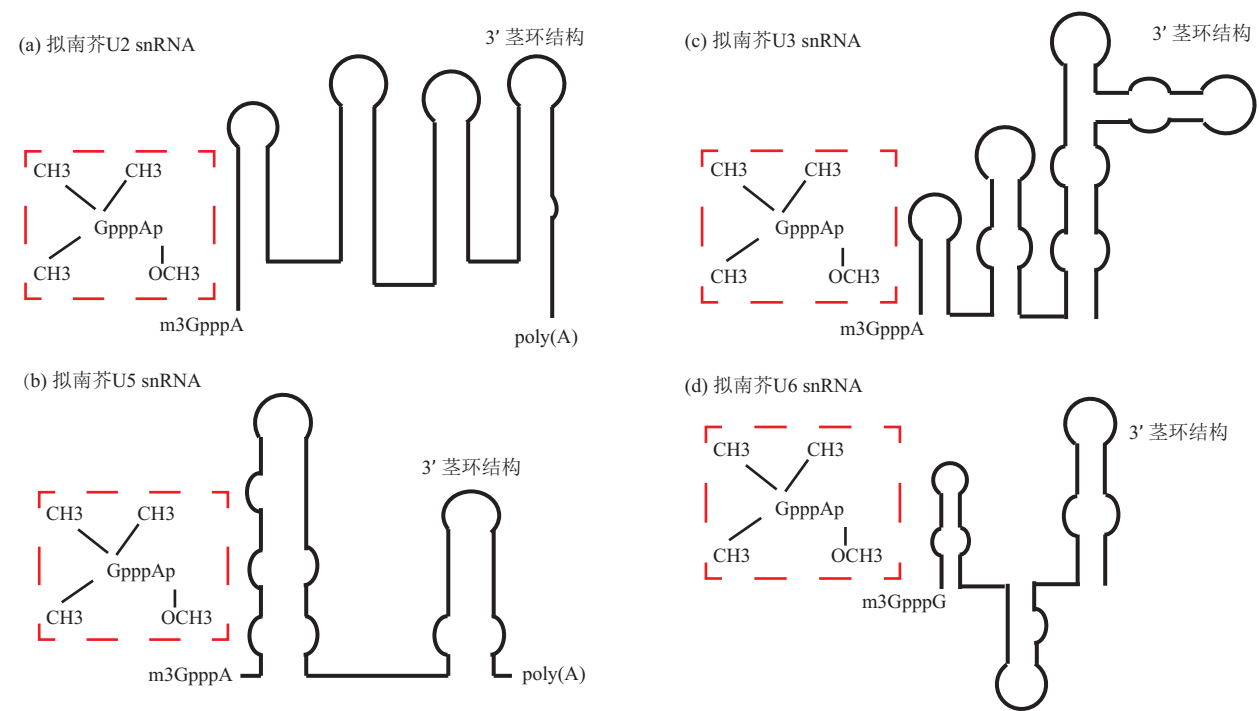


Fig. 1 Schematic diagram of Arabidopsis U2/U5/U3/U6 snRNA structure

图1 拟南芥U2/U5/U3/U6 snRNA结构示意图

图中为拟南芥snRNA的二级结构示意图, (a)、(b)、(c)、(d) 分别为U2、U5、U3、U6snRNA. 红色虚线框为snRNA 5'端帽子结构.

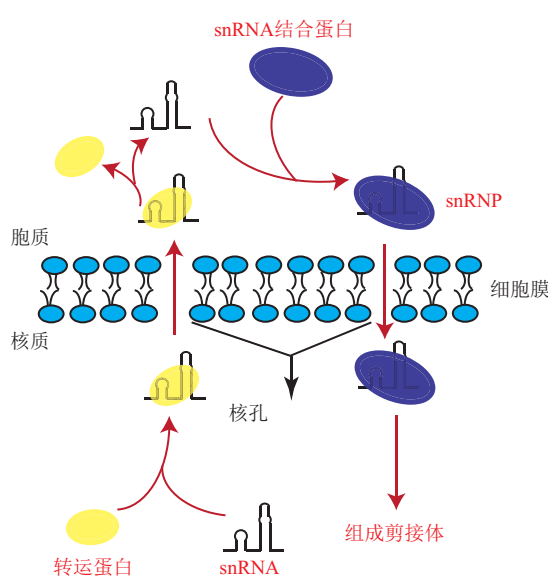


Fig.2 Schematic diagram of snRNA transmembrane transport

图2 snRNA跨膜转运示意图

同的选择性. 在拟南芥中, *SRD2* 基因表达水平的高低影响 snRNA 基因的表达, 对 *SRD2* 基因进行突

变, 发现突变后的植株生长受影响, 推测 snRNA 对植物的生长发育有调控作用^[37]. 拟南芥 *SRD2* 基因编码一种类似人类 SNAP50 蛋白的蛋白质, 该蛋白质与 snRNA 基因的 USE 位点结合^[38], 从而调控 snRNA 的转录^[39], 进而调控植物细胞的生长^[37]. 研究发现, 拟南芥 DSP1 和 DSP4 两个复合体的缺失会影响 Pre-snRNA 的转录及其 3' 端的精确修饰^[40]. 实验发现, 在脊椎动物细胞中, 由 RNA 聚合酶 II 经 snRNA 启动子转录产生的 snRNA 需要经过修饰产生完整的 U snRNA 3' 端, 而植物并不需要修饰便可以转录成为完整的 snRNA^[35]. 综上所述, snRNA 的合成受到多方面的调控.

2 snRNA的生物学功能

2.1 参与RNA剪接

在细胞的生命活动中, 基因表达遵守从 DNA 到 RNA、从 RNA 到蛋白质的中心法则. 目前已知的调控水平包含转录水平、翻译水平以及翻译后水平. 真核生物的基因组为单顺反子, 包括外显子和内含子. 因此, 当 DNA 转录成为 RNA 时, 依然含有内含子, 而这些内含子在 mRNA 翻译为蛋白质

时并不需要,因此在形成成熟的 mRNA 时被剪切. snRNA 通过形成剪接体对 RNA 剪接从而调控基因表达.

snRNA 的主要功能是对细胞内 Pre-mRNA 和非编码转录本 (noncoding transcript) 进行剪接, pre-mRNA 经过剪接产生成熟的 mRNA^[41]. 植物细胞核的周染色质区是 snRNA 与 SR 蛋白的共定位区, 该区域也是 pre-mRNA 的剪接区域^[42]. RNA 的剪接需要完整的剪接体 (spliceosome)^[6]. 研究表明有 5 种 snRNA 及超过 200 种蛋白质参与 RNA 剪接过程^[43], 其中 Sm/Lsm 蛋白家族和 PSF 蛋白研究较清楚.

内含子主要有 U2 型内含子和 U12 型内含子两种 (其中 U12 型内含子占总内含子的含量 <1%), 分别由主要剪接体和次要剪接体进行剪接^[44-46]. 此前发现, 有两种由核酶介导的自剪接类型, 即 I 型自剪接和 II 型自剪接. snRNA 介导的 RNA 剪接过程与 II 型自剪接相似, 并且需要蛋白质的参与. 主要剪接体由 U1、U2、U4、U5、U6 五种 snRNA 形成 (图 3). 内含子剪切遵守 GU-AG 法则, 即内含子的 5'端为 GU, 3'端为 AG, 且中间还有特异性位点 A. 剪接体形成之后, RNA 需要与剪接体完成识别过程, 这一过程依赖剪接体的 Sm 位点以及 snRNA 的 3'茎环结构^[47].

以此为前提, U1 与内含子的 5'端结合, U2 与内含子中间的特异性位点结合. 随后, U4 和 U6 分别连接 U1 和 U2, 从而将内含子的 5'端与 3'端距离拉近. 最后, U5 的加入形成了完整的剪接复合体. U5 使内含子的 5'端与前一外显子的 3'端断开, 有利于内含子的 5'端与内含子中间的特异性位点连接, 随后内含子 3'端与后一外显子的 5'端断开, 有利于前一外显子的 3'端与后一外显子的 5'端连接, 从而完成外显子的拼接. 最后内含子形成套索状被释放出来, 完成剪接过程^[7].

各种 snRNA 在剪接过程中发挥的作用是不同的. 其中, 抗 snRNP 的特异性标志抗体实验表明 U1 snRNA 与内含子的 5'末端互作, 推测 U1 snRNA 会与内含子 5'端配对. 除此之外, 内含子中间的分支位点序列与 U2 snRNA 也存在配对, 这对于 pre-mRNA 的正确剪接至关重要. 科学家发现, 与 U2 snRNP 结合的内含子中间部位分支序列在动植物甚至植物中都存在着较大的差异. 在酵母细胞中, U2 snRNA 的特异性结合位点序列为 UACUAAC box^[48]. 而在人类和其他哺乳动物中, 该位点的序

列为 GUAGUA^[49]. 拟南芥基因组包含 10 个非连续的 U2 snRNA 基因, 在分离出来的 6 个 U2 snRNA 中, 它们的 5'端部分 100% 保守^[50]. 随着对剪接机制的深入研究, 科学家们发现参与剪接过程的其他 snRNA 之间的结合不需要蛋白质介导, 因此猜测这些 snRNA 之间会发生一定程度的碱基互补配对.

除上述各种 snRNA 参与剪接过程外, 剪接体中蛋白质的作用也是不可忽略的. Sm/Lsm 家族蛋白十分庞大, 在剪接过程中与 snRNA 的 Sm/Lsm 位点结合^[51]. PTB (phosphotyrosine-binding) 结合因子 (PSF) 在 U5 snRNA 加入剪接体时起重要作用^[52]. Peng 等^[53]发现, U5 snRNA 与 PSF 和 p54nrb 结合成为复合体, 但是 PSF 蛋白与 p54nrb 蛋白只有小部分片段与复合体结合. 由此可知, 剪接体是一个结构复杂的复合体, 其正确组装对于细胞内生化反应有条不紊地进行有重要作用, 因此能够调控植物生长发育.

2.2 snRNA 的其他功能

对于非编码转录本 rRNA, snRNA 也会参与其成熟过程, 其中 U3 snRNA 参与 28S rRNA 形成^[54]. 植物的 U3 snRNA 与小鼠的二级结构相似, 并且参与 32S rRNA 的加工^[29, 55]. 此外, 有研究表明 snRNA 也可能参与植物对胁迫的响应.

SRD2 基因编码的 snRNA 激活复合家族蛋白与 snRNA 基因的上游序列元件 USE 结合, 调控 snRNA 基因的表达, 从而影响拟南芥侧根的生长^[56]. 研究发现, 相比于拟南芥幼苗正常发育, 拟南芥体外去分化和器官发育的 snRNA 表达水平更高^[57]; 另外发现, 在豌豆不同生长阶段, snRNA 的表达量有所差异^[41].

snRNA 表达量具有时空上的特异性, 这一特异性类似激素对植物生长的作用. snRNA 表达量的高低对植物细胞中 mRNA 和非编码转录本的含量有很大的影响. 这说明, snRNA 在植物细胞的生长及植物体的发育中具有重要作用.

3 snRNA 的化学修饰

经过多年的研究, 科学家们发现细胞存在许多对 RNA 的化学修饰, 这些修饰都有其特定的生物学意义^[7]. 随着小 RNA 的发现及其功能的阐释, 人们对这些非编码 RNA 末端修饰也有了进一步的研究. 最早于植物中发现小 RNA 3'端的尿苷化修饰^[58]. 有研究表明, DNA 甲基化会影响 DNA 的转录活性, 蛋白质甲基化会影响其下游功能, 组蛋白

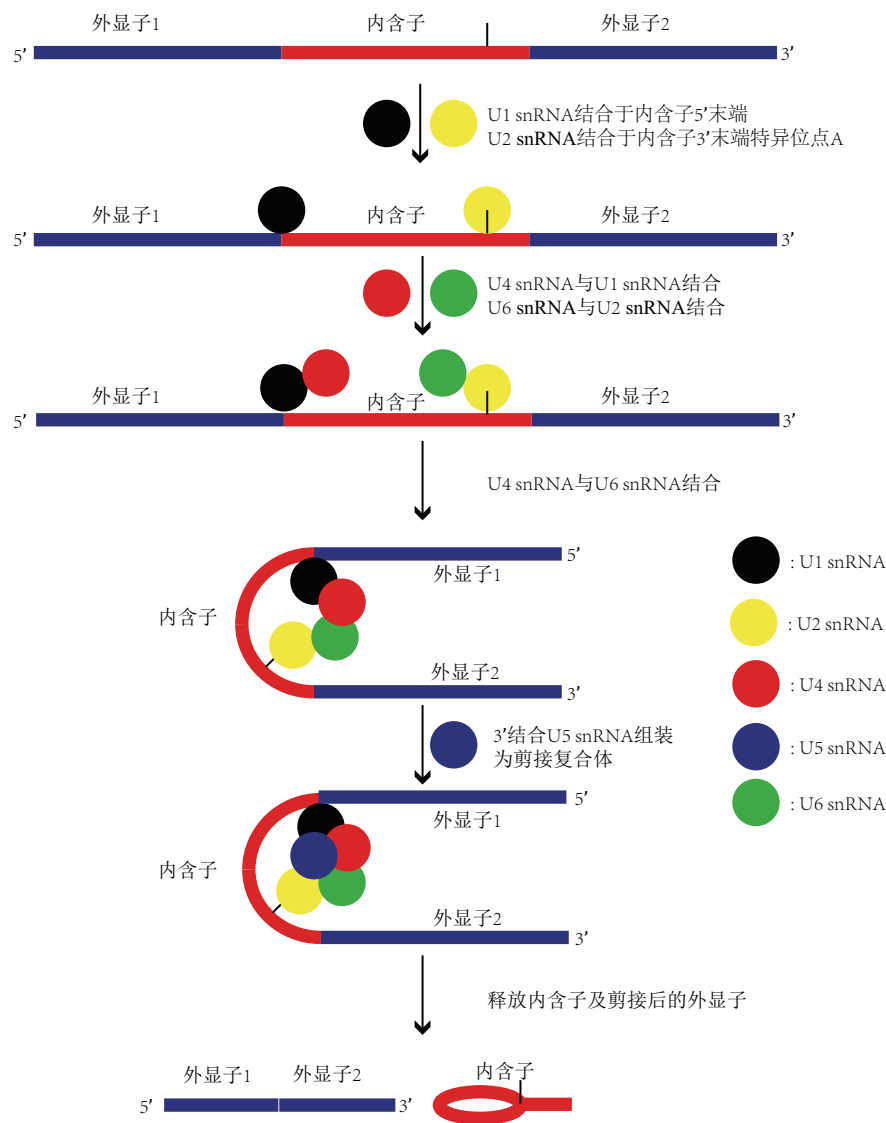


Fig. 3 The process that snRNA participates in the formation of spliceosomes and splicing RNA

图3 snRNA参与剪接体形成并对RNA剪接的过程

图中的圆圈分别表示5种U snRNA, 蓝色线条表示2个外显子, 红色线条表示内含子. 左边为5'端, 右边为3'端. 内含子靠近3'端有一个特异性位点, 由黑色柱标记. 剪接产生套索状和拼接的外显子.

甲基化会影响基因的表达效率. mRNA 5'端加帽和3'端加Poly (A) 尾是最常见的RNA修饰. 其末端的poly (A) 尾是由多聚腺苷酸聚合酶PAP合成^[59]. Lim等^[60]发现动物细胞中的mRNA末端除了加poly (A) 还有鸟苷化修饰的现象. 研究表明, 末端加尾现象是由聚合酶 β 型核苷酸转移酶实现的^[29].

目前已有一些关于snRNA的化学修饰的报道. 完整的U6 snRNA具有5'SL (stem loop)、ISL (internal stem loop) 以及3'尾结构^[7]. snRNA 5'端的帽子结构对snRNA (U6 snRNA除外) 合成过程

中的跨膜识别有重要作用^[61]. 研究表明, 帽子结构与snRNA的稳定性有关^[61]. RNA修饰除5'端加帽外, 还存在3'末端修饰. U6 snRNA经Pol III转录后, 在末端尿嘧啶转移酶 (terminal uridylyl transferases, TUTs) 的作用下产生多聚U尾^[62]. 有研究表明, microRNA由TUT酶在末端加上不同长度的多聚尿嘧啶U, 3'末端含有不同长度poly (U) 的microRNA稳定性不同^[63]. 研究发现U6 snRNA的3'末端存在腺苷化修饰^[64]. 而腺苷化会抑制尿苷化进程, 同时加速U6 snRNA的降解, 多聚尿苷化尾会引导U6 snRNA转移至核外体发挥

作用^[7]。

除了尿苷化和腺苷化修饰外, 甲基转移酶 METTL16 也会修饰 U6 snRNA^[65]。METTL16 是 U6 snRNA 的保守甲基转移酶, 该酶在转录后水平调节 SAM 合成酶的含量, 从而调节 U6 snRNA 的甲基化水平。但是 U6 snRNA 甲基化对于 RNA 剪接的影响还有待研究。S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 是几乎所有细胞甲基化进程的甲基供体, SAM 在细胞体内的正常水平对细胞体内 DNA、RNA、蛋白质的正常甲基化至关重要。Wang 等^[66]发现, 细菌 SAM 合成酶以甲基和 ATP 为底物合成 SAM。对 U6 snRNA 进行结构分析, 发现完整的 U6 snRNA 相对于前体 U6 snRNA 多了甲基化修饰步骤^[67]。Brow 等^[68]发现, U6 snRNA 的甲基化位点是剪接功能的核心区域, 并且高度保守。

另外, 研究发现 U2 snRNA 也存在甲基化修饰, 这个进程是由 snoRNA 和 scaRNA 介导的^[69-70]。除了甲基化, U2 snRNA 也存在假尿嘧啶化修饰^[71]。而假尿嘧啶化修饰部位位于 U2 snRNA 的 5'端, 从而使其 5'端与 U6 snRNA 相互作用产生螺旋体, 该螺旋体与 pre-mRNA 结合, 进而构建完整剪接体行使剪接功能^[72-73]。

4 snRNA的应用

研究发现, 改造后的 snRNA 启动子可以提高基因的转录效率, 有利于促进基因生物功能的研究。有人将 PCR 方法扩增出来的 U3 snRNA 转染到烟草中, 发现 U3 snRNA 依然可以发挥生物学功能, 并能够在植物体内检测到稳定的二级结构^[12]。将 U3 snRNA 或者 U6 snRNA 启动子改造后可提高单子叶植物 (比如水稻) 的 CRISPR/Cas 基因编辑效率^[74], 运用于苹果基因组 CRISPR/Cas 基因编辑系统中的 U6 snRNA 启动子是该基因编辑系统的重要元件, 该启动子序列较短并且含有较高的转录活性。科学家们利用 CRISPR/Cas 基因编辑系统, 完成了对拟南芥^[75]、水稻^[76]、大豆^[77]等植物特定基因的敲除, CRISPR/Cas 基因编辑系统采用这些植物自身的 U6snRNA 启动子来驱动 sgRNA (small guide RNA) 转录。Nishitani 等^[78]利用拟南芥 *AtU6-1* 启动子、sgRNA、*AtU6* 的 3'末端构建 CRISPR/Cas 载体, 完成了对苹果 *PDS* 基因的突变。但是由于 U6 启动子具有物种特异性^[79], 并不适合用于亲缘关系较远的物种构建基因编辑系统。序列长度、组织结构不同的启动子, 转录活性也不同。

此外, Krause 等^[80]通过体外转录实验, 发现 snRNA 可以增加基因的转录活性。

5 展 望

snRNA 作为真核生物细胞中保守性强且含量不多的一类小分子 RNA, 参与内含子的剪接, 从而产生具有功能的 mRNA 及 rRNA, 调控蛋白质的合成, 对植物生命活动调控具有重要的意义^[81]。

snRNA 的化学修饰对 snRNA 结构和功能受到科研人员的关注。但是, 目前 snRNA 化学修饰对其结构产生的影响还未得到系统的研究, 除了已知的调节稳定性、调控剪接体的组装之外, 是否参与细胞内其他生理过程还不是很清楚。在动物细胞中, 组蛋白 pre-mRNA 的 3'端是由 U7 snRNA 参与修饰的^[82]。因此, 植物组蛋白 mRNA 的产生与 U7 snRNA 是否存在关联也值得研究。

通过对 snRNA 启动子的改造可以提高原有实验方法的效率^[8]。比如, 利用启动子构建一些基因表达载体, 从而实现基因在体内的过表达或者敲除某些基因, 探讨这些基因在生物体内的作用。有科学家发现, 传统的构建基因表达载体所使用的启动子, 表达效率并不高, 但是将其替换为 snRNA 基因的启动子, 转录效率可以得到明显的提高, 可以达到 100~1 000 倍, 但是该研究只停留在一些特定的物种中, 是否适用于其他物种还需要进行进一步的探索。另外, 有相关研究证实 snRNA 启动子还能够参与 CRISPR/Cas 基因编辑系统的构建, 实现对基因的敲除, 若将该项技术运用于农业或者医学, 前景将非常广阔。

在植物中, 目前只有少数 snRNA 的结构和功能得到验证, 其中对 U6 snRNA 的研究是最多的^[83], 其他 snRNA 在植物中的作用还有待探索。snRNA 在各种生物中具有较高的保守性和同源性, 通过对植物 snRNA 的进一步研究, 将有助于加深其对 RNA 的剪切加工机制的认识和理解。

参 考 文 献

- [1] Misato O, Taku D, Munetaka S, *et al.* Differential requirement for the function of SRD2, an snRNA transcription activator, in various stages of plant development. *Plant Molecular Biology*, 2008, 66(3):303-314
- [2] Livio P, Jeongsik Y, Gideon D, *et al.* Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly. *Science (New York, NY)*, 2002, 5599(298):1775-1779
- [3] Ørum H, Nielsen H, Engberg J, *et al.* Structural organization of the

- genes encoding the small nuclear RNAs U1 to U6 of *Tetrahymena thermophila* is very similar to that of plant small nuclear RNA genes. *Journal of Molecular Biology*, 1992, **227**(1): 114-121
- [4] Hofmann C J B, Marshallsay C, Waibel F, *et al.* Characterization of the genes encoding U4 small nuclear RNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology Reports*, 1992, **17**(1): 21-28
- [5] Vankan P, Edoh D, Filipowicz W. Structure and expression of the U5 snRNA gene of *Arabidopsis thaliana*. Conserved upstream sequence elements in plant U-RNA genes. *Nucleic Acids Research*, 1988, **16**(22):10425-10440
- [6] Galej W P, Oubridge C, Newman A J, *et al.* Crystal structure of Prp8 reveals active site cavity of the spliceosome. *Nature*, 2013, **493**(7434): 638-643
- [7] Allison D, Samuel B, David B, *et al.* The life of U6 small nuclear RNA, from cradle to grave. *RNA*, 2018, **24**(4): 437-460
- [8] Hernandez N, Weiner A M. Formation of the 3' end of U1 snRNA requires compatible snRNA promoter elements. *Cell*, 1986, **47**(2): 249-258
- [9] Nottrott S. Functional interaction of a novel 15.5kD[U4/U6-U5] tri-snRNP protein with the 5' stem-loop of U4 snRNA. *Embo Journal*, 1999, **18**(21): 6119-6133
- [10] Hall S L, Padgett R A. Requirement of U12 snRNA for in vivo splicing of a minor class of eukaryotic nuclear pre-mRNA introns. *Science*, 1996, **271**(5256): 1716-1718
- [11] Kiss T, Abel S, Solymosy F, *et al.* A plant pseudogene for U1 RNA. *Plant Molecular Biology*, 1989, **12**(6): 709-711.
- [12] Marshallsay C, Kiss T, Filipowicz W, *et al.* Amplification of plant U3 and U6 snRNA gene sequences using primers specific for an upstream promoter element and conserved intragenic regions. *Nucleic Acids Research*, 1990, **18**(12):3459-3466
- [13] Clark G, Brown J W S, Waugh R, *et al.* Sequence variation and linkage of potato U2snRNA-encoding genes established by PCR. *Gene*, 1991, **107**(2): 197-204
- [14] Brant E J, Hikmet B. Plant small non-coding RNAs and their roles in biotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 2018, **9**: 1038-1047
- [15] Kim S H, Spensley M, Choi S K, *et al.* Plant U13 orthologues and orphan snoRNAs identified by RNomics of RNA from *Arabidopsis nucleoli*. *Nucleic Acids Research*, 2010, **38**(9): 3054-3067
- [16] Chen C L, Dan L, Hui Z, *et al.* The high diversity of snoRNAs in plants: identification and comparative study of 120 snoRNA genes from *Oryza sativa*. *Nucleic Acids Research*, 2003, **31**(10): 2601-2613
- [17] Hanley B A, Schuler M A. Developmental expression of plant snRNAs. *Nucleic Acids Research*, 1991, **19**(22): 6319-6325
- [18] Bassett, Carole L. Cajal bodies and plant RNA metabolism. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2012, **31**(3): 258-270
- [19] Vankan P, Filipowicz W. Structure of U2 snRNA genes of *Arabidopsis thaliana* and their expression in electroporated plant protoplasts. *EMBO J*, 1988, **7**(3):791-799
- [20] Ohtani M. Transcriptional regulation of snRNAs and its significance for plant development. *Journal of Plant Research*, 2017, **130**(1): 57-66
- [21] Brett M C, Stephen J H, Geoffrey D K, *et al.* Crystal structure of a heptameric Sm-like protein complex from archaea: implications for the structure and evolution of snRNPs. *Journal of Molecular Biology*, 2001, **309**(4): 915-923
- [22] Azzouz T N, Pillai R S, Däpp C, *et al.* Toward an assembly line for U7 snRNPs: interactions of U7-specific Lsm proteins with PRMT5 and SMN complexes. *The Journal of biological chemistry*, 2005, **280**(41): 34435-34440
- [23] Shukla G C, Padgett R A. Conservation of functional features of U6atac and U12 snRNAs between vertebrates and higher plants. *RNA*, 1999, **5**(4): 525-538
- [24] Marshallsay C, Kiss T, Filipowicz W, *et al.* Amplification of plant U3 and U6 snRNA gene sequences using primers specific for an upstream promoter element and conserved intragenic regions. *Nucleic Acids Research*, 1990, **18**(12): 3459-3466
- [25] Hervé V. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes & Development*, 2006, **20**(7): 759-771
- [26] Izaurralde E, Lewis J, Gamberi C, *et al.* A cap-binding protein complex mediating U snRNA export. *Nature*, 1995, **376**(6542): 709-712
- [27] Matera A G, Wang Z. A day in the life of the spliceosome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, **15**(2): 108-121
- [28] Kiss T, Marshallsay C, Filipowicz W, *et al.* Alteration of the RNA polymerase specificity of U3 snRNA genes during evolution and *in vitro*. *Cell*, 1991, **65**(3): 517-526
- [29] Aravind L, Koonin E V. DNA polymerase beta-like nucleotidyltransferase superfamily: identification of three new families, classification and evolutionary history. *Nucleic Acids Research*, 1999, **27**(7): 1609-1618
- [30] Wahle E, Keller W. The biochemistry of 3-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors. *Annual Review of Biochemistry*, 1992, **61**(1): 419-438
- [31] Mogen B D, MacDonald M H, Leggewie G, *et al.* Several distinct types of sequence elements are required for efficient mRNA 3' end formation in a pea rbcS gene. *Molecular and Cellular Biology*, 1992, **12**(12): 5406-5414
- [32] Butler J S, Platt T. RNA processing generates the mature 3' end of yeast CYC1 messenger RNA *in vitro*. *Science*, 1989, **242**(4883): 1270-1274
- [33] Dahlberg J E, Lund E. The genes and transcription of the major small nuclear RNAs. *Structure and Function of Major and Minor Small Nuclear Ribonucleoprotein Particles*, 1998, **1**: 38-70
- [34] Hernandez N. Formation of the 3' end of U1 snRNA is directed by a conserved sequence located downstream of the coding region. *Embo Journal*, 1985, **4**(7): 1827-1837
- [35] Connelly S, Filipowicz W. Activity of chimeric U small nuclear RNA (snRNA)/mRNA genes in transfected protoplasts of *Nicotiana plumbaginifolia*: U snRNA 3'-end formation and transcription initiation can occur independently in plants. *Molecular and Cellular Biology*, 1993, **13**(10): 6403-6415

- [36] Heard D J, Kiss T, Filipowicz W, *et al.* Both *Arabidopsis* TATA binding protein (TBP) isoforms are functionally identical in RNA polymerase II and III transcription in plant cells: evidence for gene-specific changes in DNA binding specificity of TBP. *Embo Journal*, 1993, **12**(9): 3519-3528
- [37] Ohtani M, Demura T, Sugiyama M, *et al.* Differential requirement for the function of SRD2, an snRNA transcription activator, in various stages of plant development. *Plant Molecular Biology*, 2008, **66**(3): 303-314
- [38] Vankan P, Filipowicz W. A U-snRNA gene-specific upstream element and a -30 'TATA box' are required for transcription of the U2 snRNA gene of *Arabidopsis thaliana*. *Embo Journal*, 1989, **8**(12): 3875-3882
- [39] Ohtani M, Sugiyama M. Involvement of SRD2-mediated activation of snRNA transcription in the control of cell proliferation competence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 2005, **43**(4): 479-490
- [40] Pu X, Meng C, Wang W, *et al.* DSP1 and DSP4 act synergistically in snRNA 3' end maturation and pollen growth. *Plant Physiology*, 2019, **180**(4): 2142-2151
- [41] Hanley B A, Schuler M A. Developmental expression of plant snRNAs. *Nucleic Acids Research*, 1991, **19**(22): 6319-6325
- [42] Niedojadlo J, Mikulski Z, Deleńko K, *et al.* The perichromatin region of the plant cell nucleus is the area with the strongest co-localisation of snRNA and SR proteins. *Planta*, 2012, **236**(2): 715-726
- [43] Veretnik S, Wills C, Youkharibache P, *et al.* Sm/Lsm genes provide a glimpse into the early evolution of the spliceosome. *Plos Computational Biology*, 2009, **5**(3): e1000315
- [44] Maniatis T, Reed R. The role of small nuclear ribonucleoprotein particles in pre-mRNA splicing. *Nature*, 1987, **325**(6106): 673-678
- [45] Will C L, Lührmann R. Splicing of a rare class of introns by the U12-dependent spliceosome. *Biological Chemistry*, 2005, **386**(8): 713-724
- [46] Park S J, Jung H J, Nguyen D S, *et al.* Structural features important for the U12 snRNA binding and minor spliceosome assembly of *Arabidopsis* U11/U12-small nuclear ribonucleoproteins. *RNA Biology*, 2016, **13**(7): 670-679
- [47] Jin W, Wang Y, Liu C P, *et al.* Structural basis for snRNA recognition by the double-WD40 repeat domain of Gemin5. *Genes & Development*, 2016, **30**(21): 2391-2403
- [48] Parker R, Siliciano P G, Guthrie C, *et al.* Recognition of the TACTAAC box during mRNA splicing in yeast involves base pairing to the U2-like snRNA. *Cell*, 1987, **49**(2): 229-239
- [49] Wu J, Manley J L. Mammalian pre-mRNA branch site selection by U2 snRNP involves base pairing. *Genes Dev*, 1989, **3**(10): 1553-1561
- [50] Toroney R, Nielsen K H, Staley J P. Termination of pre-mRNA splicing requires that the ATPase and RNA unwindase Prp43p acts on the catalytic snRNA U6. *Genes & Development*, 2019, **33**(21-22): 1555-1574
- [51] Zarić B L, Bukorović M V, Stojanović S D, *et al.* Strong and weak hydrogen bonds in Sm/LSm oligomeric assemblies: a comparison of intra- and interchain interaction. *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures*, 2013, **8**(2): 639-654
- [52] Hiroto I, Asako M, Kaori S, *et al.* p54nrb/NonO and PSF promote U snRNA nuclear export by accelerating its export complex assembly. *Nucleic Acids Research*, 2014, **42**(6): 3998-4007
- [53] Peng R, Dye B T, Pérez I, *et al.* PSF and p54nrb bind a conserved stem in U5 snRNA. *RNA*, 2002, **8**(10): 1334-1347
- [54] Bachellerie J P, Michot B, Raynal F. Recognition signals for mouse pre-rRNA processing. A potential role for U3 nucleolar RNA. *Mol Biol Rep*, 1983, **9**(1-2): 79-86
- [55] Kiss T, Tóth M, Solymosy F, *et al.* Plant small nuclear RNAs. Nucleolar U3 snRNA is present in plants: partial characterization. *European Journal of Biochemistry*, 1985, **152**(2): 259-266
- [56] Ohtani M, Demura T, Sugiyama M, *et al.* Particular significance of SRD2-dependent snRNA accumulation in polarized pattern generation during lateral root development of *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 2010, **51**(12): 2002-2012
- [57] Ohtani M, Takebayashi A, Hiroyama R, *et al.* Cell dedifferentiation and organogenesis *in vitro* require more snRNA than does seedling development in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*, 2015, **128**(3): 371-380
- [58] Song J B, Wang X Y, Song B, *et al.* Prevalent cytidylation and uridylation of precursor miRNAs in *Arabidopsis*. *Nature Plants*, 2019, **5**(12): 1260-1272
- [59] Kim D, Lee Y S, Jung S J, *et al.* Viral hijacking of the TENT4 - ZCCHC14 complex protects viral RNAs via mixed tailing. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2020, **27**(6): 581-588
- [60] Lim J, Kim D, Lee Y S, *et al.* Mixed tailing by TENT4A and TENT4B shields mRNA from rapid deadenylation. *Science*, 2018, **361**(6403): 701-704
- [61] Gleb S, David W, Ram R, *et al.* Methylphosphate cap structure increases the stability of 7SK, B2 and U6 small RNAs in *Xenopus* oocytes. *Nucleic Acids Research*, 1993, **21**(20): 4756-4761
- [62] Trippé R, Guschina E, Hossbach M, *et al.* Identification, cloning, and functional analysis of the human U6 snRNA-specific terminal uridylyl transferase. *RNA*, 2006, **12**(8): 1494-1504
- [63] Boseon K, Minju H, Luuk L, *et al.* TUT7 controls the fate of precursor microRNAs by using three different uridylation mechanisms. *The EMBO Journal*, 2015, **34**(13): 1801-1815
- [64] Chen Y, Sinha K, Perumal K, *et al.* Effect of 3' terminal adenylic acid residue on the uridylation of human small RNAs *in vitro* and in frog oocytes. *RNA*, 2000, **6**(9): 1277-1288
- [65] Pendleton K E, Chen B, Liu K, *et al.* The U6 snRNA m6A methyltransferase METTL16 regulates SAM synthetase intron retention. *Cell*, 2017, **169**(5): 824-835.e14
- [66] Wang J X, Breaker R R. Riboswitches that sense S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Biochemistry & Cell Biology*, 2008, **86**(2): 157-168
- [67] Epstein P, Reddy R, Henning D, *et al.* The nucleotide sequence of nuclear U6 (4.7 S) RNA. *Journal of Biological Chemistry*, 1980, **255**(18): 8901-8906

- [68] Brow D A, Guthrie C. Spliceosomal RNA U6 is remarkably conserved from yeast to mammals. *Nature*, 1988, **334**(6179): 213-218
- [69] Jädly B E, Kiss T. A small nucleolar guide RNA functions both in 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of the U5 spliceosomal RNA. *Embo Journal*, 2001, **20**(3): 541-551
- [70] Darzacq X, Jädly B E, Verheggen C, *et al.* Cajal body-specific small nuclear RNAs: a novel class of 2-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs. *Embo Journal*, 2002, **21**(11): 2746-2756
- [71] Huang Z P, Zhou H, Qu L H, *et al.* Maintaining a conserved methylation in plant and insect U2 snRNA through compensatory mutation by nucleotide insertion. *Iubmb Life*, 2005, **57**(10): 693-699
- [72] Madhani H D, Guthrie C. Novel base-pairing interaction between U2 and U6 snRNAs suggests a mechanism for the catalytic activation of the spliceosome. *Cell*, 1992, **71**(5): 803-817
- [73] Madhani H D, Guthrie C. Randomization-selection analysis of snRNAs *in vivo*: evidence for a tertiary interaction in the spliceosome. *Genes Dev*, 1994, **8**(9): 1071-1086
- [74] Hao Y, Zong W, Zeng D, *et al.* Shortened snRNA promoters for efficient CRISPR/Cas-based multiplex genome editing in monocot plants. *Science China Life Sciences*, 2020, **63**(6): 933-935
- [75] Li J F, Norville J E, Aach J, *et al.* Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology*, 2013, **31**(8): 688-691
- [76] Jacobs T B, Lafayette P R, Schmitz R J, *et al.* Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *BMC Biotechnology*, 2015, **15**(1): 1-10
- [77] Jiang W, Zhou H, Bi H, *et al.* Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Research*, 2013, **41**(20): e188
- [78] Nishitani C, Hirai N, Komori S, *et al.* Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports*, 2016, **6**: 31481
- [79] Das G, Henning D, Reddy R, *et al.* Structure, organization, and transcription of *Drosophila* U6 small nuclear RNA genes. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, **262**(3): 1187-1193
- [80] Krause M O, Ringuette M. Low molecular weight nuclear RNA from SV40-transformed WI38 cells; effect on transcription of WI38 chromatin *in vitro*. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 1977, **76**(3): 796-803
- [81] Allmang C, Kufel J, Chanfreau G, *et al.* Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *Embo Journal*, 1999, **18**(19): 5399-5410
- [82] Buchholz K, Aik W S, Yang X C, *et al.* Composition and processing activity of a semi-recombinant holo U7 snRNP. *Nucleic Acids Research*, 2020, **48**(3): 1508-1530
- [83] Kandels-Lewis S, Seraphin B. Involvement of U6 snRNA in 5' splice site selection. *Science*, 1993, **262**(5142): 2035-2039

Advances in Plant Small Nuclear RNA Research*

HU Liang¹⁾, CHENG Jie¹⁾, WANG Yi-Hua²⁾, LÜ Meng-Wei³⁾, SONG Jian-Bo¹⁾**

¹⁾College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;

²⁾College of Science, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;

³⁾College of Land Resources and Environment, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract snRNA (small nuclear RNA) is a type of non-coding RNA with a length of 60 to 300 nt. Among the 15 known snRNAs, U1, U2, U4, U5, and U6 are the main components of eukaryotic RNA spliceosomes. The structure of snRNA is relatively conservative, with a cap structure and sm/Lsm structure at the 5' end, and a stem-loop structure at the 3' end. The main function of snRNA is to splice pre-mRNA and rRNA to produce corresponding mature mRNA and other non-coding RNA. In plants, snRNA can also participate in plant physiology and growth regulation. In recent years, it has been discovered that snRNA ends contain many modifications, including methylation, uridylation and adenylation, etc. These modifications have an important impact on the processing and degradation of snRNA. Here, this paper briefly summarizes the current research results in the field of snRNA, including classification, gene structure, synthesis mechanism and biological function in plants. In addition, it also introduces the chemical modification of plant snRNA and its application in scientific research, and looks forward to the future research direction of snRNA.

Key words plant snRNA, spliceosome, modification, gene regulation

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0276

* This work was supported by a grant from Science Foundation of Jiangxi Provincial Department of Education (GJJ170276).

** Corresponding author.

Tel: 86-18579059335, E-mail: thinkskier@163.com

Received: July 31, 2020 Accepted: October 14, 2020