

领域前沿 · 中国



吴立刚, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心研究员。1996年毕业于上海交大学生物科学与技术系获学士学位; 2001年毕业于中国科学院上海植物生理研究所遗传学专业获博士学位; 2001年至2008年在美国纽约大学(NYU)医学院从事博士后研究; 2008年10月起任中科院上海生科院生化与细胞所(现中国科学院分子细胞科学卓越创新中心)研究员; 是中国科学院“百人”引进人才。吴立刚研究组主要研究mRNA的稳定性调控、小RNA介导的基因沉默, mRNA和siRNA药物的设计开发, 以及单细胞小RNA高通量测序技术。代表性工作发表在*Nature Cell Biology*、*Science Advances*、*Nature Communications*等期刊上, 发表论文40余篇, 单篇引用超1 000次, 研究成果获得*Nature Reviews Molecular Biology*、*Nature Cell Biology*、*PNAS*、*eLife*等国际期刊的专评。

http://cemcs.cas.cn/sourcedb_cemcs_cas/zw/pi/202008/t20200823_5670123.html

piRNA通路在哺乳动物雌性生殖中具有不可或缺的功能

张宏道 张英 吕小龙 吴立刚*

(分子生物学国家重点实验室, 上海市分子男科学重点实验室, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心/中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所, 中国科学院大学, 上海 200031)

摘要 piRNA是一类非编码小RNA, 它在生殖细胞中针对基因组行使“免疫系统”的功能, 抑制转座元件, 维持基因组的稳定性。已有的研究表明, piRNA在模式动物果蝇和斑马鱼的两性生殖, 以及小鼠的雄性生殖中都是必需的, 但对小鼠的雌性生殖却是非必需的, 因此形成了piRNA对哺乳动物的雌性生殖不重要的默认共识。该团队通过建立单细胞小RNA测序技术, 描绘了多种哺乳动物卵细胞中小RNA的表达谱, 发现了小鼠卵细胞中无论是*Piwi*基因还是piRNA的组成类型和表达特征在哺乳动物中均不具有代表性。该团队以piRNA表达情况更接近人类的金黄地鼠为模型, 重新研究了piRNA通路在哺乳动物中的功能, 发现了piRNA通路关键基因被敲除后雄性和雌性的生殖都受到了严重的影响, 与非哺乳动物中的表型一致。上述发现不仅为深入研究piRNA通路在高等动物卵细胞发生和早期胚胎发育中的功能和机制提供了新的切入点, 更重要的是为研究piRNA通路相关基因突变与女性生殖障碍的关联, 并针对性地开发新的治疗方法提供了重要的动物模型。

关键词 PIWI; piRNA; 卵细胞; 转座子; 金黄地鼠

The piRNA Pathway is Essential for Mammalian Female Fertility

ZHANG Hongdao, ZHANG Ying, LÜ Xiaolong, WU Ligang*

(State Key Laboratory of Molecular Biology, Shanghai Key Laboratory of Molecular Andrology, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

*通讯作者。Tel: 021-54921321, E-mail: lgwu@sibcb.ac.cn

*Corresponding author. Tel: +86-21-54921321, E-mail: lgwu@sibcb.ac.cn

Abstract piRNAs (piwi-interacting RNAs) are sncRNAs (small non-coding RNAs) and function as an adaptive immune system to safeguard genome integrity in the germ cells. Despite its essential role for both female and male reproduction in flies and zebrafish, piRNA pathway appears to be dispensable for female fertility in the mouse, leading to the assumption that piRNA pathway is not required for female fertility in mammals. Here, this group developed a single cell sequencing method for sncRNAs, and profiled the sncRNAs in oocytes of various mammals. Intriguingly, this group found that the profile of both *Piwis* and piRNAs expressed in mouse oocytes are not representative in other mammals. Thus, this group reexamined the function of piRNA pathway using genetic-modified golden hamsters. Notably, this group found that piRNA pathway is essential for both male and female fertility in golden hamsters. Such an indispensable function of piRNA pathway for oogenesis is probably common in most mammalian species, including humans. Therefore, current study opens an avenue for understanding the aetiology of female infertility and provides an informative animal model for developing medicine and cure.

Keywords PIWI; piRNA; oocytes; transposon; golden hamster

1 piRNA通路对哺乳动物雌性生殖无足轻重?

piRNA是一类长度为18~31 nt的非编码小RNA (small non-coding RNA), 特异性表达于动物的生殖细胞中, 与PIWI蛋白结合形成piRNA介导的沉默复合体(piRNA-induced silencing complexes, piRISC), 在配子发生过程中行使重要的功能^[1-8]。在动物中, piRNA最基本和最保守的功能是沉默转座子(transposable element, TE)。这一功能通过转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)和转录基因沉默(transcriptional gene silencing, TGS)两种机制来实现^[9]。其中, 转录后基因沉默依赖于piRNA介导的沉默复合体识别并切割靶标转座子RNA, 而转录基因沉默则是通过改变转座子所在染色质区域内DNA甲基化或组蛋白修饰来抑制转座子的转录的^[10]。除了上述功能之外, 越来越多的研究表明, piRNA还参与对mRNA和长非编码RNA的表达调控^[11-13], 在组织再生、肿瘤的发生发展和胚胎发育等生物学过程中扮演着重要的角色^[14-19]。

PIWI家族蛋白是协助piRNA产生并与其结合发挥功能的重要因子, 广泛存在于线虫、昆虫、鱼类和哺乳动物等动物类群的生殖细胞中, 与生殖细胞的发生和成熟过程有着紧密的联系^[20]。果蝇中存在3种PIWI家族蛋白, 分别是Piwi、Aub(Aubergine)和Ago3(Argonaute3), 它们对生殖干细胞(germline stem cell, GSCs)和雌雄育性的维持都是必需的^[21]。斑马鱼中存在ZILI和ZIWI两种PIWI蛋白, 任何一种蛋白发生缺失都会造成雄性和雌性生殖能力的丧失^[22-23]。在哺乳动物中, 以小鼠为模型对piRNA

通路进行了大量研究。小鼠表达3种不同的PIWI家族蛋白, 分别是PIWIL1(MIWI)、PIWIL2(MILI)和PIWIL4(MIWI2)。任意一种*Piwi*基因的缺失均会导致雄性小鼠生精细胞发育异常, 进而造成不育。但令人意外的是, 对雌性小鼠的育性却没有观察到任何影响^[24-26]。其他piRNA通路中关键蛋白, 如PLD6和MOV10L1等的缺失, 同样只影响到雄性小鼠, 而非雌性小鼠的生殖能力^[27-30]。基于上述研究结果, piRNA研究领域内形成了一种被广泛接受的观点: piRNA通路对哺乳动物的雌性生殖不是必需的。

2 小鼠动物模型的一叶障目

与哺乳动物雄性生殖领域不同的是, 对雌性生殖领域的研究长期受制于取材方面的困难——相比于精子, 卵细胞稀少且珍贵。由于微量样品小RNA高通量测序方法的匮乏, 前人在对卵细胞小RNA进行表达谱研究时, 动辄需要用到几百甚至上千个卵细胞, 这成为制约卵细胞小RNA研究的瓶颈之一。目前对除小鼠以外其他哺乳动物雌性生殖细胞发育过程中小RNA的组成和*Piwi*基因表达情况, 以及piRNA通路的功能都知之甚少。前期的研究显示小鼠卵细胞中表达一种特殊结构的Dicer蛋白, 可以高效产生endo-siRNAs(endogenous siRNAs)^[31], 而endo-siRNAs具有抑制转座子活性的功能, 很可能与piRNA存在功能上的冗余^[32], 削弱了卵细胞发育对piRNA的依赖性。此外, 在小鼠基因组中缺少了一种广泛存在于包括人类在内的大部分哺乳动物基因组中的*Piwi*家族基因——*Piwil3*^[33]。以牛为动物模型的研究表明, *Piwil3*基因特异性表达于卵细胞和胚

胎中^[34]。由于*Piwi*家族蛋白与piRNA的产生及功能发挥有着极为紧密的联系,上述观察提示,在雌性生殖细胞中小鼠piRNA通路的组成和功能可能与大部分哺乳动物存在较大差异。

工欲善其事,必先利其器。为了解答前述问题,我们前期发明了微量小RNA高通量测序方法CAS-seq,发现了人类卵细胞与小鼠卵细胞中小RNA组成有着显著的差别:相比endo-siRNAs在小鼠卵细胞中的大量表达,人类卵细胞中完全不表达endo-siRNAs,却高表达一种长度约为19 nt的新型小RNA。这种小RNA具有piRNA的大部分典型特征:在基因组上成簇分布,序列具有明显的1U/10A偏好性,但长度明显短于已知的piRNA类型,并缺乏已知种类的piRNA通常含有的3'末端2'氧甲基修饰。我们通过免疫共沉淀测序发现这种小RNA与*Piwi*家族的蛋白——PIWIL3直接结合,为了与经典的23–31 nt piRNA相区分,我们称其为卵细胞短piRNA(oocyte short piRNA, os-piRNA)^[8]。我们进一步在CAS-seq基础上建立了单细胞小RNA测序技术eCAS-seq(enhanced CAS-seq),并结合单细胞转录组测序,分析了人类卵细胞发育过程中piRNA、mRNA和转座子RNA的动态改变,发现了piRNA与人类卵细胞发育过程中的转座子沉默现象存在密切关联。但人卵细胞中不表达特殊的Dicer异构体,也不产生endo-siRNA, piRNA的组成也与小鼠卵细胞存在巨大差异。因此,以小鼠为动物模型所得到的关于piRNA功能的研究结论很可能不适用于人类。

那么,哪些物种的雌性生殖细胞中piRNA通路的组成和功能与人类相似,可以作为动物模型来研究piRNA相关的生物学过程呢?为了回答这个问题,我们搜集了9个科共计11种不同哺乳动物的卵细胞,对它们卵细胞中小RNA和转录本的表达谱进行了深度测序,从进化角度分析了物种间小RNA组成的演变,发现了卵细胞中小RNA的组成和表达谱有很强的种属特异性(未发表数据)。11个物种中仅有小鼠卵细胞中大量表达endo-siRNAs,其他物种卵细胞中丰度最高的小RNA类型都是piRNA。而小鼠基因组在进化中缺失了*Piwi3*基因且完全不表达os-piRNA,其他piRNA的表达量也较低。因此,在卵细胞中小RNA的表达与功能方面,小鼠在进化中是一个特殊的物种,无法代表其他哺乳动物。“piRNA在哺乳动物雌性生殖中无足轻重”这一结论很可能是

过度依赖小鼠作为动物模型所导致的“一叶障目,不见泰山”。回顾以往的研究不难发现,这样的例子并不罕见。一个典型的例子是顶体蛋白(Acrosin):顶体蛋白是储存于哺乳动物精子顶体(acrosome)中的一种重要的蛋白酶,它可帮助精子穿透透明带与卵子融合。顶体蛋白缺失的小鼠依然可育^[35],这与在金黄地鼠和人类中观察到的现象完全不同^[36–37]。因此,我们认为想要弄清楚piRNA在哺乳动物雌性生殖中是否具有重要功能,必须选择一个能够代表大部分哺乳动物的模式动物开展研究。

3 金黄地鼠动物模型的拨云见日

金黄地鼠又称叙利亚仓鼠(syrian hamster),属于啮齿目仓鼠科。它易于饲养、生育力强,作为模式动物至今已有近60年的历史,广泛应用于肿瘤、免疫、生理和生殖等研究领域^[38–39]。金黄地鼠有着固定的发情周期(4天),对超排激素响应好,妊娠期短(16天),这些优势使其成为生殖研究中优秀的动物模型。更重要的是,我们通过单细胞小RNA测序发现,金黄地鼠卵细胞中*Piwi*基因和piRNA的组成和表达特征与人和食蟹猴相似,在哺乳动物中更具代表性。因此,我们选择金黄地鼠为模式动物来研究包括人类在内的大多数哺乳动物中piRNA与雌性生殖的关系。*Piwi1*和*Mov10l1*在金黄地鼠的雌性和雄性生殖细胞中均高表达。免疫共沉淀测序(RIP-seq)结果显示,*Piwi1*结合两种不同长度的piRNA,分别是具有3'末端氧化修饰的23 nt和29 nt piRNA。而*Mov10l1*为保守的RNA解旋酶,参与到几乎所有piRNA的加工生成。我们与李建民教授合作,通过CRISPR-Cas9基因敲除技术分别获得了*Piwi1*和*Mov10l1*基因敲除的金黄地鼠,结果发现,*Piwi1*和*Mov10l1*突变的雌性和雄性金黄地鼠均不可育^[40]。有趣的是,虽然*Piwi1*和*Mov10l1*突变与小鼠类似,均造成雄性金黄地鼠的育性丧失,但具体表型却与小鼠突变体有明显的差别。金黄地鼠*Piwi1*突变体无法形成成熟的精子,睾丸和附睾切片结果显示圆形精子和变形精子不能产生,但在睾丸中存在着大量异常的粗线期类似(pachytene-like)精母细胞(spermatocyte)的生精细胞。我们采用染色质铺展技术详细统计了突变体中生精细胞所处的发育时期,结果显示相较于野生型金黄地鼠,突变体中早期粗线期(early pachytene)和晚期双线期(late diplotene)细胞的占比异常增高。

而*Mov10l1*金黄地鼠突变体雄性生殖障碍更加严重, 绝大多数的曲细精管变为空腔, 仅有少部分(5%)依然存在少量异常的生精细胞。而在小鼠中, *Piwill*突变后生精细胞可以发育到圆形精子时期^[26], *Mov10l1*突变后生精细胞产生大量异常的偶线期类似(zygotene-like)的精母细胞^[29-30]。说明piRNA通路在小鼠和金黄地鼠雄性生殖细胞发育中有着相似、但又具有物种特异性的必要功能。

令人意外的是, 我们发现与小鼠不同, *Piwill*和*Mov10l1*突变均影响到了金黄地鼠雌性生殖能力。*Piwill*和*Mov10l1*突变体成熟卵细胞数目和形态正常, 可以正常受精并发育到2细胞时期, 但随后发育停滞。将野生型的胚胎移植到*Piwill*突变体内可以正常的发育并出生; 而母源*Piwill*突变的胚胎移植到野生型金黄地鼠体内, 依旧无法继续发育。以上结果证明了胚胎发育障碍源自于*Piwill*突变卵细胞本身不再具有维持胚胎生长的潜能, 而这种潜能的丧失极有可能与piRNA的缺失相关。我们分析了这些突变体和野生型金黄地鼠不同发育时期的卵细胞或早期胚胎的小RNA和转录组的变化, 发现*Piwill*突变后造成卵细胞中23 nt和29 nt piRNA的缺失, 而*Mov10l1*突变则导致几乎所有长度piRNA的大幅减少, 这与PIWIL1和MOV10L1在piRNA加工中所扮演的角色相吻合^[10,41-42]。

在雄性生殖细胞中, piRNA的缺失通常会造成转座子的异常表达和积累^[20]。我们分析了金黄地鼠卵细胞和胚胎中转座子的表达变化。结果显示, 在*Piwill*突变的GV和MII卵细胞及母源*Piwill*缺失的1细胞胚胎中转座子Line1和ERV异常积累。同时, 突变体中积累的转座子与缺失的对应序列的piRNA之间存在着明显的负向关联, 说明PIWIL1-piRNA参与抑制转座子表达, 进而维持卵细胞的发育潜能。

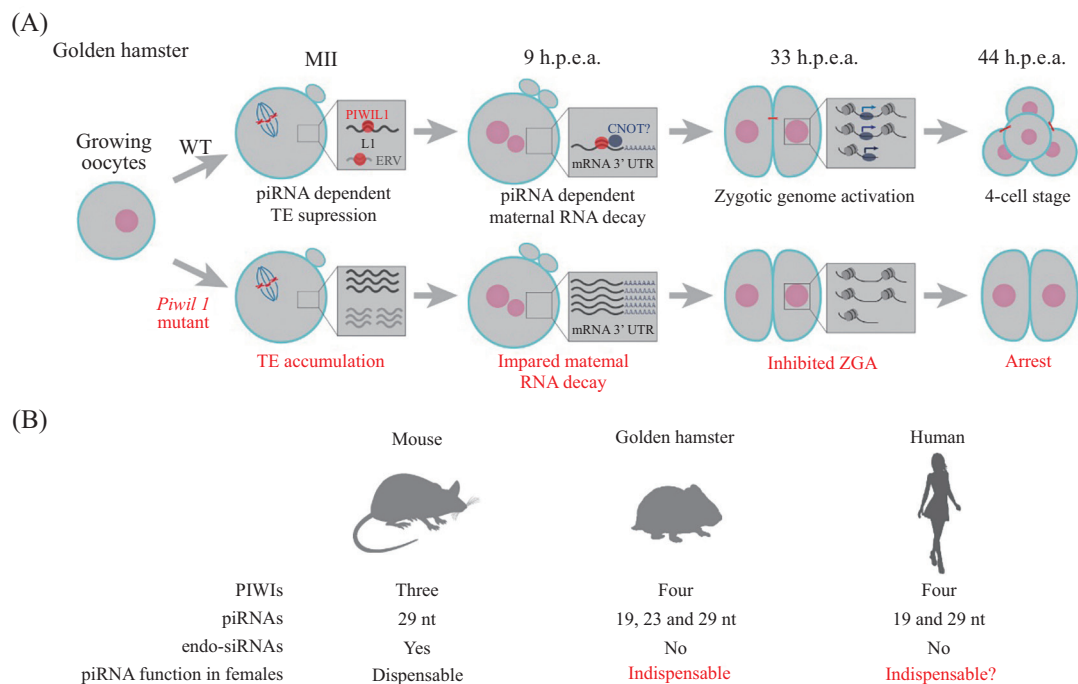
胚胎发育停滞在2细胞时期是一个常见的胚胎发育障碍, 有相当多的母源基因表达异常均会造成这一表型。例如, *Mater*、*Zfp36l2*、*Brg1*、*Floped*、*Filia*、*Sebox*、*BTG4*和*PABP1L*等^[43-51], 此外初级合子基因激活(minor zygotic genome activation)和主要合子基因激活(major zygotic genome activation)的失败也会导致类似发育停滞^[52]。得益于全面的*Piwill*突变体早期胚胎转录组数据, 我们分析了胚胎发育停滞前出现的异常事件, 发现野生型胚胎从卵细胞激活后第9小时(9 hours post egg activation, 9 h.p.e.a.)

到33 h.p.e.a.和从33 h.p.e.a.到44 h.p.e.a.时期均出现了大量基因表达的上升, 指示胚胎中合子基因的激活^[52-53]。而在*Piwill*突变体中没有观察到明显的基因转录激活, 表明合子基因激活失败。已有研究证明, 胚胎合子基因激活与母源RNA降解相偶联^[53], 而且在果蝇和埃及伊蚊中已有报道显示, piRNA参与了母源RNA降解^[19,54]。因此, 我们分析了*Piwill*突变体中母源RNA降解情况, 结果显示分别存在着106和158个母源RNA在MII卵细胞到9 h.p.e.a.和9 h.p.e.a.到33 h.p.e.a.时期降解速率减缓。以上降解异常的母源RNA在突变体中积累的倍数与其含有piRNA靶标序列的数目成正比, 提示着这些母源RNA的非正常降解与piRNA的缺失相关。

总之, 使用金黄地鼠开展piRNA在生殖发育中的功能研究, 证明了piRNA对金黄地鼠雌性和雄性生殖都是必要的, piRNA在抑制转座子表达和维持合子基因激活中具有关键的作用(图1A)。由于金黄地鼠与人和其他大部分哺乳动物具有类似的*Piwi*基因表达和小RNA组成, 该结果也强烈暗示了piRNA可能在人类及其他大部分哺乳动物雌性生殖中有着不可替代的重要功能(图1B)。值得一提的是, 在同期的*Nature Cell Biology*上, 另外两个实验室也同时利用金黄地鼠作为模式动物报道了这一重要结论^[40,55-56]。

4 总结与展望

piRNA是在生殖细胞中抵抗转座子表达以保护基因组稳定的一种免疫机制, 在物种间具有相当保守的特征和功能机制^[9,57-58]。基于小鼠动物模型的研究结论认为piRNA对哺乳动物雌性生殖过程可有可无, 看似符合逻辑, 但以金黄地鼠作为模式动物的实验结果却证明这个推论是错误的。毫无疑问, 小鼠作为优秀的动物模型, 为我们理解基因功能以及其他基本生物学问题上作出了巨大贡献。但以小鼠为动物模型的研究结论并不总是放之四海而皆准的, 一些基于小鼠模型研究被认为功能冗余或者没有功能的基因, 很可能在其他哺乳动物中具有重要的功能。事实上, 越来越多的研究表明, 一些已经被遗传学确认与人类疾病发生发展密切相关的基因, 在小鼠中敲除或突变后并不能观察到相应的表型^[35-37]。因此, 我们需要破除已有观念的局限性, 在开展基因功能研究前, 特别是与人类生殖、发育和疾病相关的基因, 首先应该进行基因的进化保守性和表达谱



A: *Piwill*基因突变引起转座子异常积累、母源RNA降解异常和合子基因激活失败,最终导致胚胎发育停滞在2细胞时期。B: 小鼠、金满地鼠和人类的卵细胞中PIWI蛋白和piRNA的种类、是否含有endo-siRNA以及piRNA通路是否具有功能的比较。金满地鼠和人类具有相似的piRNA通路,提示piRNA通路在人类卵细胞中很可能同样具有重要的生物学功能。

A: the disruption of *Piwill* leads to abnormal accumulation of transposon elements, aberrant degradation of maternal RNA, and inhibited zygotic genome activation. Finally, the embryos are arrested at 2-cell stage. B: the comparison of the species of PIWI proteins and piRNAs, the presence of endo-siRNAs, and the function of piRNA pathway in the oocytes of mouse, golden hamster, and human. The similar characters of piRNA pathway in golden hamsters and humans suggest that piRNA pathway is also essential for human female fertility.

图1 piRNA通路对哺乳动物雌性生殖是必需的

Fig.1 piRNA pathway is essential for mammalian female fertility

分析, 理性选择不同的模式动物, 再构建合适的动物模型开展功能和机制的研究, 达到事半功倍的效果。

对于piRNA在哺乳动物雌性生殖中所扮演的角色及其机制, 我们所知仍然有限。但通过以金满地鼠动物模型的研究工作, piRNA在雌性生殖中的神秘面纱正被逐步揭开。今后, 针对临床卵细胞发育和功能异常, 以及早期胚胎发育阻滞患者的piRNA表达情况、piRNA通路相关基因的突变进行检测, 并在金满地鼠模型中解析其功能和机制, 将有助于揭示piRNA通路与女性生殖障碍的关联, 为开发精准的诊疗方法提供新的思路 and 重要途径。

参考文献 (References)

- [1] WATANABE T, TAKEDA A, TSUKIYAMA T, et al. Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes [J]. *Gene Dev*, 2006, 20(13): 1732-43.
- [2] VAGIN V V, SIGOVA A, LI C J, et al. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline [J]. *Science*, 2006, 313(5785): 320-4.
- [3] LAU N C, SETO A G, KIM J, et al. Characterization of the piRNA complex from rat testes [J]. *Science*, 2006, 313(5785): 363-7.
- [4] GRIVNA S T, BEYRET E, WANG Z, et al. A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells [J]. *Gene Dev*, 2006, 20(13): 1709-14.
- [5] GIRARD A, SACHIDANANDAM R, HANNON G J, et al. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins [J]. *Nature*, 2006, 442(7099): 199-202.
- [6] ARAVIN A, GAIDATZIS D, PFEFFER S, et al. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes [J]. *Nature*, 2006, 442(7099): 203-7.
- [7] ISHINO K, HASUWA H, YOSHIMURA J, et al. Hamster PIWI proteins bind to piRNAs with stage-specific size variations during oocyte maturation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(5): 2700-20.
- [8] YANG Q, LI R, LYU Q, et al. Single-cell CAS-seq reveals a class of short PIWI-interacting RNAs in human oocytes [J]. *Nat Comm*, 2019, 10(1): 3389.
- [9] CZECH B, MUNAFO M, CIABRELLI F, et al. piRNA-guided genome defense: from biogenesis to silencing [J]. *Annual Rev Genet*, 2018, 52: 131-57.

- [10] ARAVIN A A, SACHIDANANDAM R, BOURC'HIS D, et al. A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice [J]. *Mol Cell*, 2008, 31(6): 785-99.
- [11] DAI P, WANG X, GOU L T, et al. A translation-activating function of MIWI/piRNA during mouse spermiogenesis [J]. *Cell*, 2019, 179(7): 1566.
- [12] WATANABE T, CHENG E C, ZHONG M, et al. Retrotransposons and pseudogenes regulate mRNAs and lncRNAs via the piRNA pathway in the germline [J]. *Genome Res*, 2015, 25(3): 368-80.
- [13] SYTNIKOVA Y A, RAHMAN R, CHIRN G W, et al. Transposable element dynamics and PIWI regulation impacts lncRNA and gene expression diversity in *Drosophila* ovarian cell cultures [J]. *Genome Res*, 2014, 24(12): 1977-90.
- [14] RIZZO F, HASHIM A, MARCHESE G, et al. Timed regulation of P-element-induced wimpy testis-interacting RNA expression during rat liver regeneration [J]. *Hepatology*, 2014, 60(3): 798-806.
- [15] SHI S, YANG Z Z, LIU S H, et al. PIWIL1 promotes gastric cancer via a piRNA-independent mechanism [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(36): 22390-401.
- [16] LI F, YUAN P, RAO M, et al. piRNA-independent function of PIWIL1 as a co-activator for anaphase promoting complex/cyclosome to drive pancreatic cancer metastasis [J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(6): 751.
- [17] MANI S R, MEGOSH H, LIN H F. PIWI proteins are essential for early *Drosophila* embryogenesis [J]. *Dev Biol*, 2014, 385(2): 340-9.
- [18] SUN H Q, LI D, CHEN S, et al. Zili inhibits transforming growth factor-beta signaling by interacting with Smad4 [J]. *J Biol Chem* 2010, 285(6): 4243-50.
- [19] ROUGET C, PAPIN C, BOUREUX A, et al. Maternal mRNA deadenylation and decay by the piRNA pathway in the early *Drosophila* embryo [J]. *Nature*, 2010, 467(7319): 1128-32.
- [20] ARAVIN A A, HANNON G J, BRENNER J. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race [J]. *Science*, 2007, 318(5851): 761-4.
- [21] COX D N, CHAO A, BAKER J, et al. A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal [J]. *Gene Dev*, 1998, 12(23): 3715-27.
- [22] HOUWING S, BEREZIKOV E, KETTING R F. Zili is required for germ cell differentiation and meiosis in zebrafish [J]. *EMBO J*, 2008, 27(20): 2702-11.
- [23] HOUWING 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.
- [24] CARMELL M A, GIRARD A, VAN DE KANT H J G, et al. MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline [J]. *Dev Cell*, 2007, 12(4): 503-14.
- [25] KURAMOCHI-MIYAGAWA S, KIMURA T, IJIRI T W, et al. Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis [J]. *Development*, 2004, 131(4): 839-49.
- [26] DENG W, LIN H F. miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis [J]. *Dev Cell*, 2002, 2(6): 819-30.
- [27] WATANABE T, CHUMA S, YAMAMOTO Y, et al. MITOPLD is a mitochondrial protein essential for nuage formation and piRNA biogenesis in the mouse germline [J]. *Dev Cell*, 2011, 20(3): 364-75.
- [28] HUANG H Y, GAO Q, PENG X X, et al. piRNA-associated germline nuage formation and spermatogenesis require mitoPLD profusogenic mitochondrial-surface lipid signaling [J]. *Dev Cell*, 2011, 20(3): 376-87.
- [29] ZHENG K, XIOL J, REUTER M, et al. Mouse MOV10L1 associates with Piwi proteins and is an essential component of the Piwi-interacting RNA (piRNA) pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(26): 11841-6.
- [30] FROST R J A, HAMRA F K, RICHARDSON J A, et al. MOV10L1 is necessary for protection of spermatocytes against retrotransposons by Piwi-interacting RNAs [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(26): 11847-52.
- [31] FLEMR M, MALIK R, FRANKE V, et al. A retrotransposon-driven dicer isoform directs endogenous small interfering RNA production in mouse oocytes [J]. *Cell*, 2013, 155(4): 807-16.
- [32] TABORSKA E, PASULKA J, MALIK R, et al. Restricted and non-essential redundancy of RNAi and piRNA pathways in mouse oocytes [J]. *PLoS Genet*, 2019, 15(12): e1008261.
- [33] GU A H, JI G X, SHI X G, et al. Genetic variants in Piwi-interacting RNA pathway genes confer susceptibility to spermatogenic failure in a Chinese population [J]. *Hum Reprod*, 2010, 25(12): 2955-61.
- [34] ROOVERS E F, ROSENKRANZ D, MAHDIPOUR M, et al. Piwi proteins and piRNAs in mammalian oocytes and early embryos [J]. *Cell Rep*, 2015, 10(12): 2069-82.
- [35] BABA T, AZUMA S, KASHIWABARA S, et al. Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona-pellucida and effect fertilization [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(50): 31845-9.
- [36] MOROZUMI K, YANAGIMACHI R. Incorporation of the acrosome into the oocyte during intracytoplasmic sperm injection could be potentially hazardous to embryo development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(40): 14209-14.
- [37] TAKANO H, YANAGIMACHI R, URCH U A. Evidence that acrosin activity is important for the development of fusibility of mammalian spermatozoa with the oolemma: inhibitor studies using the golden hamster [J]. *Zygote*, 1993, 1(1): 79-91.
- [38] HIROSE M, OGURA A. The golden (Syrian) hamster as a model for the study of reproductive biology: past, present, and future [J]. *Reprod Med Biol*, 2019, 18(1): 34-9.
- [39] YANAGIMACHI R, CHANG M C. Fertilization of hamster eggs *in vitro* [J]. *Nature*, 1963, 200(4903): 281-2.
- [40] ZHANG H D, ZHANG F J, CHEN Q H, et al. The piRNA pathway is essential for generating functional oocytes in golden hamsters [J]. *Nat Cell Biol*, 2021, 23(9): 1013-22.
- [41] VOUREKAS A, ZHENG K, FU Q, et al. The RNA helicase MOV10L1 binds piRNA precursors to initiate piRNA processing [J]. *Gene Dev*, 2015, 29(6): 617-29.
- [42] ZHENG K, WANG P J. Blockade of pachytene piRNA biogenesis reveals a novel requirement for maintaining post-meiotic germline genome integrity [J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(11): e1003038.
- [43] TONG Z B, GOLD L, PFEIFER K E, et al. Mater, a maternal

- effect gene required for early embryonic development in mice [J]. *Nat Genet*, 2000, 26(3): 267-8.
- [44] ZHAO L W, ZHU Y Z, CHEN H, et al. PABPN1L mediates cytoplasmic mRNA decay as a placeholder during the maternal-to-zygotic transition [J]. *EMBO Rep*, 2020, 21(8): e49956.
- [45] YU C, JI S Y, SHA Q Q, et al. BTG4 is a meiotic cell cycle-coupled maternal-zygotic transition licensing factor in oocytes [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2016, 23(5): 387-94.
- [46] PASTERNAK M, PFENDER S, SANTHANAM B, et al. The BTG4 and CAF1 complex prevents the spontaneous activation of eggs by deadenylating maternal mRNAs [J]. *Open Biol*, 2016, 6(9): 160184.
- [47] ZHENG P, DEAN J. Role of Filia, a maternal effect gene, in maintaining euploidy during cleavage-stage mouse embryogenesis [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2009, 106(18): 7473-8.
- [48] LI L, BAIBAKOV B, DEAN J. A subcortical maternal complex essential for preimplantation mouse embryogenesis [J]. *Developmental cell*, 2008, 15(3): 416-25.
- [49] KIM K H, KIM E Y, LEE K A. SEBOX is essential for early embryogenesis at the two-cell stage in the mouse [J]. *Biol Reprod*, 2008, 79(6): 1192-201.
- [50] BULTMAN S J, GEBUHR T C, PAN H, et al. Maternal BRG1 regulates zygotic genome activation in the mouse [J]. *Gene Dev*, 2006, 20(13): 1744-54.
- [51] RAMOS S B, STUMPO D J, KENNINGTON E A, et al. The CCCH tandem zinc-finger protein Zfp3612 is crucial for female fertility and early embryonic development [J]. *Development*, 2004, 131(19): 4883-93.
- [52] ABE K, FUNAYA S, TSUKIOKA D, et al. Minor zygotic gene activation is essential for mouse preimplantation development [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2018, 115(29): E6780-8.
- [53] SCHULZ K N, HARRISON M M. Mechanisms regulating zygotic genome activation [J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(4): 221-34.
- [54] HALBACH R, MIESEN P, JOOSTEN J, et al. A satellite repeat-derived piRNA controls embryonic development of *Aedes* [J]. *Nature*, 2020, 580(7802): 274.
- [55] LOUBALOVA Z, FULKA H, HORVAT F, et al. Formation of spermatogonia and fertile oocytes in golden hamsters requires piRNAs [J]. *Nat Cell Biol*, 2021, 23(9): 992-1001.
- [56] HASUWA H, IWASAKI Y W, YEUNG W K A, et al. Production of functional oocytes requires maternally expressed PIWI genes and piRNAs in golden hamsters [J]. *Nat Cell Biol*, 2021, 23(9): 1002-12.
- [57] OZATA D M, GAINETDINOV I, ZOCH A, et al. PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions [J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(2): 89-108.
- [58] IWASAKI Y W, SIOMI M C, SIOMI H. PIWI-interacting RNA: its biogenesis and functions [J]. *Annu Rev Biochem*, 2015, 84: 405-33.