

领域前沿·中国



刘默芳, 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所研究组长(PI)、研究员、国家杰出青年科学基金获得者(2013)、上海市优秀学术带头人(2016)、科技部国家重点研发计划项目首席科学家(2017)。刘默芳研究员主要从事非编码RNA功能机制研究, 围绕piRNA与精子发生、miRNA与癌症等开展系统性探索, 获得了前沿性进展, 已发表论文50多篇, 包括作为通讯作者的研究论文12篇(Cell, 2017; Cancer Res, 2017; Oncogene, 2016; EMBO J, 2015; Cell Res, 2015; Cancer Res, 2014; Cell Res, 2014a; Cell Res, 2014b; Dev Cell, 2013; EMBO J, 2012; Cell Res, 2012; Cancer Res, 2010)。这些原创性研究成果揭示了小分子非编码RNA的生理和病理功能机制, 可为男性不育症及肿瘤等疾病的诊治研究提供理论依据和相关基础。

人*Piwi*基因突变致男性不育的机制研究

苟兰涛 康俊炎 刘默芳*

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 大量遗传学研究表明, *Piwi*蛋白对于动物生殖系细胞发育具有至关重要的作用, *Piwi*基因敲除致动物不育。人*Piwi*(*Hiwi*)基因特异性地在雄性生殖细胞表达, 但目前对其在人精子发生中的作用及其与男性不育的联系还知之甚少。该研究通过筛查临床男性不育样本发现, 少弱精症患者*Hiwi*基因中存在拮抗泛素化修饰的D-box元件突变; 通过构建基因敲入小鼠模型证实, 该突变导致雄性不育。机制研究表明, 小鼠*Piwi*(*Miwi*)D-box突变致MIWI蛋白异常稳定存在于后期精子细胞中, 导致与其相互作用的组蛋白泛素连接酶RNF8(ring finger protein 8)被扣留于细胞质、不能入核催化组蛋白泛素化修饰, 进而抑制组蛋白被鱼精蛋白替换, 引发精子形成异常、雄性不育。该研究发现了男性不育的一类新型致病基因突变, 并发现了*Piwi*蛋白具有调控组蛋白泛素化修饰的新功能, 揭示了精子形成中调控组蛋白-鱼精蛋白转换的重要机制。

关键词 精子形成; *Piwi*; *Hiwi*; *Miwi*; RNF8; 组蛋白-鱼精蛋白转换

The Study of Human *Piwi* Mutations in Male Infertility

Gou Lantao, Kang Junyan, Liu Mofang*

(Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Science,
Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Genetic studies have elucidated critical roles of *Piwi* proteins in germline development in animals, but whether *Piwi* is an actual disease gene in human infertility remains unknown. We report germline D-box mutations in human *Piwi* (*Hiwi*) in patients with azoospermia. By modeling such mutations in *Piwi* (*Hiwi*) knockin mice, we demonstrate that the genetic defects are directly responsible for male infertility. Mechanistically, we show that D-box mutation caused-MIWI stabilization sequesters ring finger protein 8 (RNF8) in the cytoplasm of late

*通讯作者。Tel: 021-54921146, E-mail: mfliu@sibcb.ac.cn

*Corresponding author. Tel: +86-21-54921146, E-mail: mfliu@sibcb.ac.cn

网络出版时间: 2017-08-15 14:08:24

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170815.1408.002.html>

spermatids, with blocking the ubiquitination and removal of histones. The failure of histone-to-protamine exchange finally leads to deficient spermiogenesis and male infertility. Collectively, our findings identify Piwi as a factor in human infertility and reveal its role in regulating the histone-to-protamine exchange during spermiogenesis.

Keywords spermiogenesis; *Piwi*; *Hiwi*; *Miwi*; RNF8; histone-to-protamine exchange

1 相关研究背景及进展介绍

在真核细胞中,基因组DNA通常与组蛋白八聚体缠绕构成染色质的基本结构;而在哺乳动物的精子细胞核内,组蛋白将被另一类富含精氨酸、高碱性的小分子核蛋白——鱼精蛋白取代^[1-2]。鱼精蛋白携带正电荷,可协助基因组DNA进行高度折叠,将父源遗传物质紧密压缩储存于精子头部^[1]。在减数分裂后的精子形成期,将发生组蛋白-鱼精蛋白转换,伴随一系列其他形变,单倍体精子细胞最终发育为成熟精子^[1,3]。自鱼精蛋白发现至今的100多年间,尽管科研人员通过大量实验证据证实了组蛋白-鱼精蛋白转换故障与雄性不育之间的密切因果关系^[1,3-4],但对于该转换过程如何起始及具体作用机制仍然知之甚少。近期有研究表明,泛素连接酶RNF8(ring finger protein 8)介导的组蛋白H2A、H2B泛素化修饰是上述替换过程起始的关键步骤^[5],但对于该过程如何在精子细胞发育的特定时期被启动仍然一无所知。

进化保守的Piwi(P-element induced wimpy testis)蛋白是Argonaute蛋白家族的亚家族成员,特异性地在动物生殖系细胞表达^[6-7]。Piwi蛋白通过结合一类新近发现的小分子非编码RNA——piRNA(Piwi-interacting RNAs)形成Piwi/piRNA“机器”,抑制基因组中的转座元件,从而保护维持生殖细胞基因组的稳定性及完整性^[6-7]。此外,我们及国际同行的研究均表明,Piwi/piRNA“机器”还参与调控生殖细胞中的蛋白编码基因^[8-11]。在线虫、果蝇、斑马鱼及小鼠等模式生物中的大量遗传学实验显示,Piwi蛋白在动物生殖细胞发育分化中发挥重要功能,为动物配子发生所必需^[6-7]。小鼠基因组编码三种Piwi成员,包括Miwi、Mili及Miwi2,均特异性地在睾丸中表达,并为小鼠雄性生殖细胞发育所必需^[12-14]。在人类基因组中,*Piwi*基因共包含四种成员:*Hiwi*、*Hili*、*Hiwi2*及*Piwi13*^[15]。人源Piwi蛋白主要在睾丸中高度表达,但目前有关其在人生殖细胞发育分化过程中的功能还未见报道。

从结构角度而言,Piwi蛋白包含四个功能结

构域:N-端、PAZ(PIWI-ARGONAUTE-ZWILLE)、MID(middle)及PIWI结构域^[16]。PAZ与MID结构域主要为piRNA的结合区域,PIWI结构域具有RNase H活性^[17-19],而Piwi蛋白N-端结构域的功能尚不清楚。我们在前期的研究中发现,脊椎动物PIWI蛋白(包括MIWI和HIWI)N-端保守地存在一个泛素连接酶APC/C(anaphase-promoting complex/cyclosome)底物特征性元件——D-box元件,并证明MIWI是APC/C的底物^[20]。通过一系列体外及体内实验,我们证实小鼠后期精子细胞中,APC/C通过D-box元件识别MIWI蛋白并对其进行泛素化修饰,最终导致其降解,且MIWI蛋白在后期精子细胞中适时降解、清除,为精子形成所必需^[20]。基于以上研究背景,我们进而探索*Piwi*基因在人精子形成中的功能机制。

2 少弱精症患者携带*Hiwi* D-box突变

为了探究人精子形成中HIWI蛋白代谢调控的生物学意义,我们通过与医院合作,收集了413例少弱精症患者及300例可育男性人群的血液样本。通过基因组DNA测序筛查*Hiwi*基因的D-box元件,我们发现3例病人携带*Hiwi*基因D-box杂合突变,分别为R218A/L221A(病人#1)、L221G/N225H(病人#2)及L221R(病人#3);全长基因测序显示,这3位病人的*Hiwi*基因没有其他的突变。随后,我们跟踪调查了其中两位病人的直系亲属并发现:病人#1的父母均不携带D-box突变,表明该病人是后天自发获得突变;病人#2的母亲携带与患者相同的杂合突变,其父亲与兄弟的*Hiwi*基因为野生型,表明该病人的D-box突变从母亲遗传获得。上述结果表明,*Hiwi*基因突变可通过自发变异或母系遗传的方式获得。

3 小鼠*Miwi* D-box突变导致雄性不育

为了鉴定我们发现的*Hiwi*基因D-box突变是否导致三位男性病人不育的原因,我们将在病人#1中鉴定的突变(R218A/L221A)敲入小鼠Miwi构建了条件型基因敲入小鼠模型。通过与原始生殖细胞(primordial germ cell, PGC)特异表达的TNAP-Cre

转基因工具小鼠杂交, 我们获得了携带*Miwi*基因R218A/L221A杂合突变的基因敲入小鼠。表型鉴定发现, 所有出生的雄性小鼠均不能繁育后代, 而雌性小鼠的生育不受任何影响。以上疾病模型小鼠获得了与临床男性病人一致的不育表型, 证明*Hiwi*基因D-box突变是造成男性不育的原因。

随后的研究发现, 与对照小鼠相比, 突变小鼠睾丸中的支持细胞、精母细胞、球型精子细胞及早期延长型精子细胞的形态及数量均无明显异常, 而后期延长型精子细胞(steps 14-16)的数量急剧减少, 表明D-box突变致精子发育后期障碍。进一步对附睾中精子检测发现, 突变小鼠精子数量显著降低、精子活力严重不足, 且精子头部形态及染色质凝集异常, 提示突变小鼠在精子发生中的染色质压缩出现故障。

4 *Miwi* D-box突变小鼠精子细胞中组蛋白-鱼精蛋白转换障碍

为了从分子水平寻找导致突变小鼠精子染色质压缩异常的原因, 我们通过质谱分析了突变小鼠精子的蛋白谱。我们发现, 在突变小鼠精子中, 组蛋白H2A、H2B、H3、H4及其变体的表达水平都剧烈升高; 免疫染色及免疫印迹实验确认了组蛋白在突变小鼠精子中大量积累, 且鱼精蛋白水平有一定程度的降低。这些实验结果表明, *Miwi*基因D-box突变小鼠的精子形成出现了问题, 即组蛋白-鱼精蛋白转换步骤发生严重障碍, 造成组蛋白未被鱼精蛋白充分转换, 最终导致其精子生成缺陷。

5 *Miwi* D-box突变体扣留RNF8于细胞核外

近期的一项研究表明, 小鼠延长型精子细胞中泛素连接酶RNF8介导的组蛋白H2A、H2B泛素化修饰是起始组蛋白-鱼精蛋白转换的早期关键事件^[5], 但该过程如何在精子细胞发育中被精准调控并不清楚。通过免疫染色和免疫印迹实验, 我们发现, 突变小鼠后期精子细胞中H2A与H2B的单泛素化水平明显降低。鉴于MIWI蛋白在突变小鼠后期精子细胞中异常滞留, 我们推测, MIWI蛋白有可能通过某种方式影响了RNF8对组蛋白的泛素化修饰。我们首先检测了MIWI蛋白是否能够调控RNF8的泛素连接酶催化活性。利用体外反应系统, 我们发现, MIWI

蛋白能够抑制RNF8对组蛋白H2B的泛素化修饰。我们进一步利用免疫染色分析发现, 在小鼠球形精子细胞内, MIWI大量存在, 并与RNF8共定位于核外; 而在后期精子细胞中, 野生型对照小鼠的MIWI蛋白被降解清除、RNF8蛋白入核, 而突变小鼠的MIWI蛋白异常稳定, RNF8蛋白被继续扣留于核外, 使其不能入核启动组蛋白修饰及随后的组蛋白-鱼精蛋白转换。

6 RNF8-N短肽拯救突变小鼠的精子形成缺陷、恢复精子活性

我们在解析MIWI与RNF8相互作用时发现, 位于RNF8蛋白N-端的⁶⁸QNPEG⁷²保守序列是其与MIWI相互作用的关键结合区域。RNF8蛋白的N-端截短形式RNF8-N(1~210 AA)能够与全长RNF8蛋白有效竞争结合MIWI; 而将⁶⁸QNPEG⁷²突变为⁶⁸AAAAA⁷²后, 此N-端截短形式的突变体(RNF8-N^{mut})丧失与MIWI的结合能力。利用体外反应系统, 我们发现, RNF8-N短肽可显著削弱MIWI对RNF8催化活性的抑制作用; 相反, RNF8-N^{mut}因其丧失竞争结合MIWI的能力而无明显效果。

基于上述发现, 我们通过慢病毒睾丸转导在D-box突变小鼠精子细胞中外源表达了RNF8-N短肽, 同时, 利用共表达的可线粒体定位的EGFP(enhanced green fluorescence protein)追踪被感染的精子细胞及其衍生的精子。令人兴奋的是, 在被转导表达了RNF8-N短肽的后期精子细胞中, 内源RNF8蛋白能够得以逃离MIWI蛋白的扣留、从胞质中释放并转运入核; 同时, 组蛋白H2B再次获得泛素化修饰。同样, 由附睾中分离获得的成熟精子也被成功拯救: 精子头部形态恢复正常、组蛋白异常积累现象消失、精子重新获得游动能力。

7 总结及研究意义

在本研究中, 我们首先通过大规模筛查发现少弱精症患者中存在*Hiwi*基因D-box元件突变, 并通过小鼠模型证实该突变致雄性不育。通过一系列体内、体外实验, 我们揭示了D-box突变致精子形成障碍的病理机制, 也首次发现*Piwi*蛋白可作为分子开关, 调节控制哺乳动物精子发生中组蛋白-鱼精蛋白转换过程的起始。总之, 我们的研究从人类遗传学出发, 利用动物模型探究分子机理, 首次证明*Piwi*基因突

变可导致男性不育, 并为相关男性不育症的诊断及治疗提供了理论依据和方法策略。

参考文献 (References)

- 1 Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 2006; 12(4): 417-35.
- 2 Balhorn R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol* 2007; 8(9): 227.
- 3 Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR, Zhao M. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 2003; 111(8): 483-8.
- 4 Yan W. Male infertility caused by spermiogenic defects: Lessons from gene knockouts. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 306(1/2): 24-32.
- 5 Lu LY, Wu J, Ye L, Gavrilina GB, Saunders TL, Yu X. RNF8-dependent histone modifications regulate nucleosome removal during spermatogenesis. *Dev Cell* 2010; 18(3): 371-84.
- 6 Juliano C, Wang J, Lin H. Uniting germline and stem cells: the function of Piwi proteins and the piRNA pathway in diverse organisms. *Annu Rev Genet* 2011; 45: 447-69.
- 7 Siomi MC, Sato K, Pezic D, Aravin AA. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12(4): 246-58.
- 8 Gou LT, Dai P, Yang JH, Xue Y, Hu YP, Zhou Y, *et al.* Pachytene piRNAs instruct massive mRNA elimination during late spermiogenesis. *Cell Res* 2014; 24(6): 680-700.
- 9 Zhang P, Kang JY, Gou LT, Wang J, Xue Y, Skogerboe G, *et al.* MIWI and piRNA-mediated cleavage of messenger RNAs in mouse testes. *Cell Res* 2015; 25(2): 193-207.
- 10 Barckmann B, Pierson S, Dufourt J, Papin C, Armenise C, Port F, *et al.* Aubergine iCLIP reveals piRNA-dependent decay of mRNAs involved in germ cell development in the early embryo. *Cell Rep* 2015; 12(7): 1205-16.
- 11 Watanabe T, Cheng EC, Zhong M, Lin H. Retrotransposons and pseudogenes regulate mRNAs and lncRNAs via the piRNA pathway in the germline. *Genome Res* 2015; 25(3): 368-80.
- 12 Deng W, Lin H. Miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev Cell* 2002; 2(6): 819-30.
- 13 Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Ijiri TW, Isobe T, Asada N, Fujita Y, *et al.* Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development* 2004; 131(4): 839-49.
- 14 Carmell MA, Girard A, van de Kant HJ, Bourc'his D, Bestor TH, de Rooij DG, *et al.* MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Dev Cell* 2007; 12(4): 503-14.
- 15 Sasaki T, Shiohama A, Minoshima S, Shimizu N. Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome. *Genomics* 2003; 82(3): 323-30.
- 16 Meister G. Argonaute proteins: Functional insights and emerging roles. *Nat Rev Genet* 2013; 14(7): 447-59.
- 17 De Fazio S, Bartonicek N, Di Giacomo M, Abreu-Goodger C, Sankar A, Funaya C, *et al.* The endonuclease activity of Mili fuels piRNA amplification that silences LINE1 elements. *Nature* 2011; 480(7376): 259-63.
- 18 Reuter M, Berninger P, Chuma S, Shah H, Hosokawa M, Funaya C, *et al.* Miwi catalysis is required for piRNA amplification-independent LINE1 transposon silencing. *Nature* 2011; 480(7376): 264-7.
- 19 Cora E, Pandey RR, Xiol J, Taylor J, Sachidanandam R, McCarthy AA, *et al.* The MID-PIWI module of Piwi proteins specifies nucleotide- and strand-biases of piRNAs. *RNA* 2014; 20(6): 773-81.
- 20 Zhao S, Gou LT, Zhang M, Zu LD, Hua MM, Hua Y, *et al.* piRNA-triggered MIWI ubiquitination and removal by APC/C in late spermatogenesis. *Dev Cell* 2013; 24(1): 13-25.