

专论与综述

果蝇精子发生研究进展

孙晓平

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

一、引言

生殖细胞的发育是一个极为特殊的分化过程,其复杂性比得上甚至超出于任何其他细胞的分化过程。在所有真核细胞生物中,组成精子的基本成份非常相似,因此精子发生(spermatogenesis)中的形态建成过程,甚至分子水平上的变化过程可能具有高度的保守性。果蝇(*Drosophila*)的精子发生正在得到广泛的研究,这对于进一步了解其他生物的精子发生无疑具有十分重要的价值。

细胞学及细胞遗传学的研究已经在果蝇的精子发生研究上提供了大量的信息,但在分子水平的研究上受到了限制。近年来借助于分子生物学方法,并结合以往的研究手段,在果蝇精子发生的研究上,尤其是对Y染色体lampbrush loop的研究上取得了显著的进展,本文就此作一简述。

二、果蝇精子发生概要

通常对精子发生都是从精巢的干细胞开始

描述的。但干细胞并非生殖细胞的初始形式。在多数动物,尤其在果蝇,生殖细胞的决定(determination)是早期胚胎发育中最初发生的事件之一。发育早期形成的极细胞(polar cell)才是生殖细胞的前身。但目前对极细胞的形成及其在胚胎发育过程中向精巢原基的迁移了解不多,而对这些过程的遗传控制几乎一无所知。此外,这些过程的某些方面是精子发生与卵子发生(oogenesis)所共有的。因此,从干细胞开始描述精子发生就显得可以接受了(图1)^[1]。

精原细胞(spermatogonium) 精原细胞由位于精巢尖端的干细胞通过不均等的有丝分裂而形成^[2]。一个干细胞的一次分裂产生两个子细胞,一个是精原细胞,另一个则保持了其亲本细胞的特性:仍然是一个干细胞。在一个精原细胞形成的同时,两个囊细胞(cyst cell)也从各自的囊祖细胞(cyst progenitor cell)不均等地分裂出来,并包绕这一精原细胞而构成一个囊(cyst)。囊内的精原细胞经过有丝分裂形成多

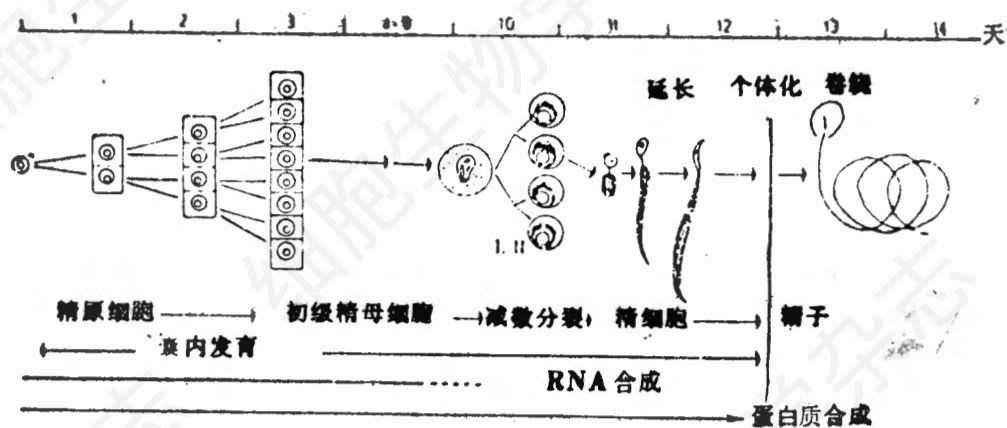


图1 果蝇 *hydei* 精子发生示意图

个精原细胞。这一过程中的有丝分裂次数具有种特异性。在果蝇 *melanogaster*, 经过 4 次有丝分裂形成 16 个精原细胞, 而在果蝇 *hydei*, 三次有丝分裂产生 8 个精原细胞。囊内细胞之间有胞质桥 (cytoplasmic bridge) 相通, 这些细胞的发育与分化是非常同步的。

初级精母细胞 (primary spermatocyte) 囊内的精原细胞一旦进入减数分裂前期, 便成为初级精母细胞。初级精母细胞时期是精子发生的一个重要时期, 也是最长的一个时期, 占精子发生全过程的 1/3。这一时期细胞学上最为显著的特点是 Y 染色体合成活性增加, 形成了特殊的核结构: lampbrush loop^[3]。这些核结构存在于至今研究过的所有各种果蝇中, 但其大小与形态很不一致。在果蝇 *hydei*, lampbrush loop 结构非常明显, 便于对其进行详细的研究。在其他动物有丝分裂前期的一个特征是染色体逐渐浓缩 (condensation)。但在果蝇, 此时的染色体非但没有浓缩, 而且其去浓缩 (decondensation) 状态更为明显, 染色体的浓缩只是在减数分裂中期即将开始时才发生^[4]。在这一时期, RNA 的合成达到高峰, 但与其他动物减数分裂后仍然合成 RNA 不同, 果蝇的初级精母细胞在分裂前便停止合成 RNA。因此, 一方面, 初级精母细胞形成非同寻常的 lampbrush loop 结构, 而且染色体呈现去浓缩状态; 另一方面, 在减数分裂后其基因组停止转录, 处于无活性状态。把这两种状态联系起来考虑, 可以推测, lampbrush loop 的形成及染色体的去浓缩这样的活跃状态可能是为基因组处于无活性状态的减数分裂后的发育过程作准备的, 比如提供调节分子。

减数分裂 减数分裂在数小时内即完成, 其间隔一短暂的次级精母细胞时期。减数分裂的特点是不发生交换 (crossing over), 也没有联会复合体 (synaptonemal complex) 的形成。

精子形成 (spermiogenesis) 通过减数分裂, 一个精母细胞形成四个精细胞 (spermatid)。因此, 在一个囊内便有 64 个 (果蝇 *melanogaster*)

或 32 个 (果蝇 *hydei*) 同步发育的精细胞。精细胞需经过一系列的形态变化才能成为有活力的精子 (spermatozoon)。这一过程称 精子形成。精子形成过程最为显著的特征是精细胞在细胞体积变化不大的情况下高度延长 (elongation)。核的延长也非常明显, 其横截面大大缩小, 染色质也进一步浓缩。此外, 胞浆中的线粒体聚合形成副核 (nebenkern)。在尾部发育过程中, 有两个副核衍生物 (nebenkern derivative) 围绕鞭毛 (flagellum)。囊内精细胞经过分化和延长, 进而个体化 (individualization), 再卷绕 (coil) 成含有 64 或 32 个细胞的细胞束。此时的精子能活动, 转移至精囊, 具备受精能力。

精子发生是一个连续的过程, 在羽化后雄性果蝇的任何时期, 其精巢内都含有处于不同发育时期的生殖细胞。一定发育时期的细胞位于精巢管的一定部位, 即最幼稚的位于顶端, 最成熟的位于末端 (与精囊连续的一端)。因此, 在一个精巢管内可以跟踪雄性生殖细胞的整个发育过程。

三、果蝇精子发生的遗传要求

果蝇精子发生的遗传要求有三个方面^[1], 首先, 需要编码结构成份的基因协同表达; 其次, 需要一套控制上述结构基因表达的基因; 第三, 需要一定的基因组结构 (structural organization of genome), 表现为对染色体重排非常敏感。但目前除了对 Y 染色体有较多了解之外, 对 Y 染色体外的与精子发生有关的遗传位点的了解几乎是一个空白。

就结构基因而言, 目前知道的属于精子发生特异的 (spermatogenesis specific) 只有两个例子: 一是 X 染色体上的 *ste* 基因, 其蛋白质产物在减数分裂中起作用, 而在 x/o 雄性精母细胞中则形成结晶^[5]。二是 3 号染色体的 B 2 t 位点, 该位点编码精巢特异的 β_2 -微管蛋白^[6]。

在遗传实验中, 总会发现数目可观的雄性不育突变。按 Lindsley 等^[2]估计, 有 1250 至 1750 个基因位点对雄性可育是十分重要的。但

这一估计的数字高得出奇,因为象果蝇胚胎发生这样复杂的过程也只需要50个左右的遗传位点来控制^[7]。目前的难题是缺少能从影响雄性可育的所有多向性突变(pleiotropic mutation)中筛选出特异的雄性不育基因(specific male sterile gene)的合适方法,上述 Lindsley 等的估计可能就包含了与一般代谢过程有关的许多遗传位点,而果蝇精子发生对代谢改变是极为敏感的。

Y染色体的雄性可育基因(male-fertility gene)对精子发生是特异的,因为Y染色体在所有体细胞都是可以丢弃的,而在雄性生殖细胞发育过程中的初级精母细胞时期却处于活跃状态。缺少Y染色体的x/o雄性果蝇的精子发生受到严重干扰,不能产生成熟的精子。可见Y染色体在精子发生过程中起着关键的作用。

精子发生还需要一定的基因组结构,因为X染色体与常染色体之间的移位(translocation)在果蝇 melanogaster 大多数都是雄性不育的^[2]。这种突变属显性不育(dominant sterile),即断点区域的染色体重复(duplication)不能恢复其可育性。Lindsley 等提出一个模型,认为X染色体在初级精母细胞时期是处于失活状态的,其与常染色体之间的移位改变了这种状态,从而使得精子发生过程受到阻碍。但实验表明^[4], X染色体在减数分裂前期并没有浓缩,而且RNA转录很活跃。因此这一模型缺少足够的实验依据。

四、Y染色体

1. Y染色体与可育性

多年来,对Y染色体的研究主要是分析Y染色体的缺失在形态上造成的影响。早在1916年, Bridges 发现x/o果蝇能正常发育,但却是雄性不育的。这种果蝇产生的精子细胞没有活动能力。1929年 Stern 的实验表明, Y染色体上的两条臂只要有一条缺失就足以导致不育。因此,他认为每一条臂携带着一个可育性基因复合体(complex of fertility gene)。

科学家们用遗传学方法对Y染色体上可育基因的数目进行了研究^[1,8]。结果表明,在果蝇 melanogaster 的Y染色体上存在6个雄性可育基因,其中长臂有4个,短臂有2个。每个可育基因只相当于一个互补群(complementation group)。Y染色体两臂的远端及着丝点附近没有可育基因。这些可育基因没有等位基因位于X染色体上。对果蝇 hydei 的遗传分析也发现有16个基因位于Y染色体上,其中部分可育基因即是(ampbrush loop)。

2. lampbrush loop 与可育基因

1961年, Meyer 等人^[9]首次报道,在果蝇 melanogaster 的初级精母细胞中存在着“时期特异性功能结构”(phase-specific functional structure)。x/o果蝇的精母细胞中不具有这种结构,由此推断它们来自Y染色体。这类结构在形态上类似于两栖类动物卵母细胞中 lampbrush 染色体的loop,而且也处于活跃转录状态,因此被称为 lampbrush loop。果蝇 hydei 的 lampbrush loop 结构较为明显^[10,11],细胞学实验显示其初级精母细胞中存在着5对大的 lampbrush loop。各对 loop 有各自的形态特征,如锤状、带状、线状等,因而被分别命名为 noose(Ns), club(Cl), tubular ribbon(Tr), pseudonucleolus(Ps), 和 thread(Th)(图2)。

Hess 发现^[12],移位造成一个或几个 lampbrush loop 的失活都会引起雄性不育。这一工作得到了 Hackstein 等人的证实^[13-15]。他们发现,诱发果蝇 hydei 雄性不育突变能改变或消灭一个或几个 lampbrush loop,但有的突变对 lampbrush loop 没有影响。这是因为果蝇 hydei Y染色体上有16个互补群,而 lampbrush loop 仅5对,因此有些互补群并不形成可见的 lampbrush loop。对同一互补群来说,雄性不育只表现为一个 lampbrush loop 的改变或消失,当然也可能检测不到变化。因此,一个 lampbrush loop 是一个雄性可育基因,每个 lampbrush loop 仅仅包含一个互补群。

3. lampbrush loop 的结构和组成

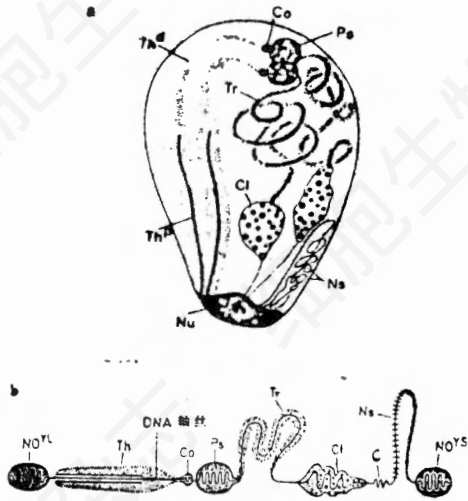


图2 果蝇初级精母细胞核 lampbrush loop 结构示意图

a. 核示意图 b. 各 loop 在 Y 染色单体上的位置
 Ns: noose Cl: club Tr: tubular ribbon
 Ps: pseudonucleolus Th: thread Co: cone
 d: 远端 P: 近端 Nu: 核仁 C: 着丝点
 No^{XL}(No^{YS}): Y 染色体长(短)臂核仁组织者
 DNAaxis: DNA 轴丝

lampbrush loop 出现在初级精母细胞的双线期^[9,16,17]。如图 2 所示,果蝇 *hgdei* 的初级精母细胞核呈梨形,纵径约 40 μm ,横径约 26 μm ,单一的核仁位于较窄的一端,紧靠核膜。一对 thread 从核仁部位突起,近端致密,远端较为疏松。club 长约 10 μm ,宽约 4 μm ,含有约 1 μm 大小的折光颗粒,在活细胞更为明显。pseudonucleolus 通常位于核仁的另一端,但并不与核膜相接触。一个称为 cone 的结构从 pseudonucleolus 上突起,这一结构近来被认为是一个独立的转录单位^[8]。noose 位于核仁旁,靠近 club,其区域呈颗粒状,有时由纤维结构将颗粒联结在一起。tubular ribbon 在光镜下呈松散结构,其间有致密斑点。

lampbrush loop 含有大量的蛋白质,部分蛋白质以 RNP 颗粒形式存在。借助免疫荧光及 Western blot 等方法, Hulsebos 等人^[4,18]发现有些蛋白质是 loop 特异的。如一个分子量为 80 KD 的蛋白质只存在于 pseudonucleolus

上,另一个 35 KD 的蛋白质则是 noose 特有的。至今尚未发现由 Y 染色体编码的蛋白质,实验提示编码结合在 loop 上的蛋白质的基因位于常染色体或 X 染色体。这些基因位点的突变能使 lampbrush loop 的形态发生改变。

lampbrush loop 处于活跃转录状态^[17,19],含有相当多的 RNA。但与蛋白质相比, RNA 所占的比例较小。Hennig 等^[20-22]用 Miller spreading 方法首次观察到 loop 上的巨大转录产物。这一工作得到 Glätzer 与 Meyer 的证实^[23]。进一步的实验发现, RNA 转录具有 loop 特异性^[24,25]。这种特异性表现为非但转录产物附着点之间的距离及转录产物的大小不同,转录产物的二级结构也是特异的(图 3)。一个 lampbrush loop 作为一个转录单位,产生与其全长相当的转录产物,在最小的 loop 有 250 kb,在其他 loop 约 1500 kb。许多正在合成的 RNA 分子附着于 loop 的 DNA 轴丝上。形成了“Christmas tree”结构。愈是靠近转录起点, RNA 分子愈短。

lampbrush loop 的 DNA 轴丝在 Miller spreading 实验中清楚可辨。DNA 特异性染料 DAPI 也已显示出压片精母细胞核内 loop 结构中的 DNA 轴丝^[4]。Hennig 等人测出各 loop DNA 长度不一,短的为 10 μm ,长的为 60 μm ^[20]。如此长度的 DNA 足以编码上百个多肽。但如上所述,一个 loop 只包含一个互补群,代表一个可育基因,转录出与 loop 长度相当的不编码蛋白质的 RNA 产物。

4. lampbrush loop DNA 的序列特点

多年来,人们在分离 Y 染色体 DNA 上做了许多努力,但都不很成功。重组 DNA 技术给这一工作提供了新的、有效的方法。有四种不同的战略被用来分离 Y 染色体 DNA。战略之一^[26-30],分别用标记上同位素的来自雄性或雌性果蝇的 DNA 对雄性果蝇的基因库进行定量斑点杂交筛选。只与雄性(X/Y)DNA 而不与雌性 DNA 杂交的克隆被认为来自 Y 染色体。与两种 DNA 都杂交的克隆则位于其他染

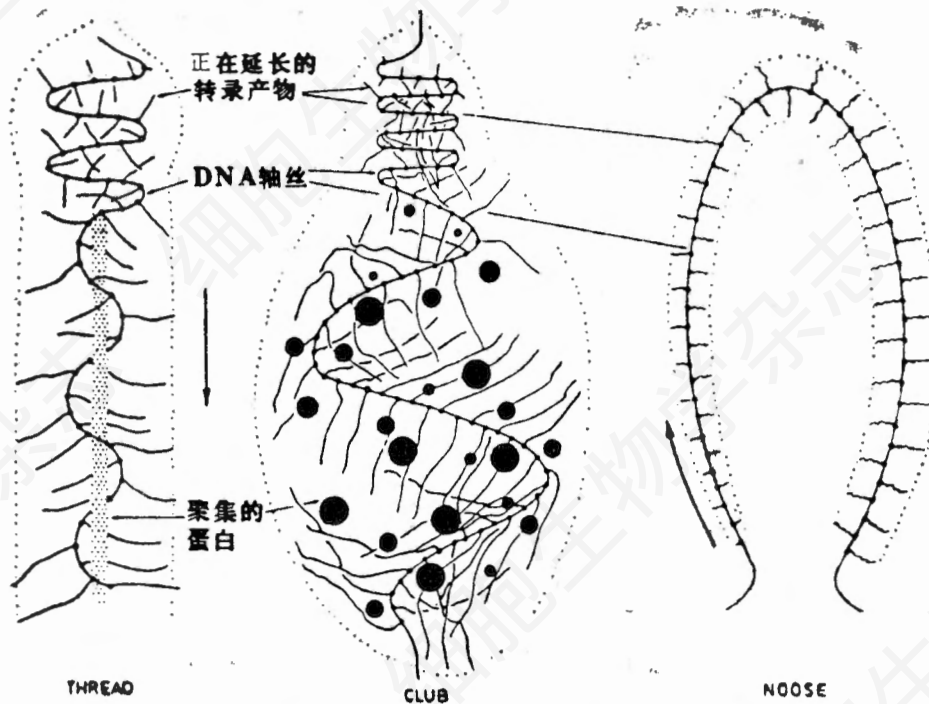


图3 果蝇 *hydei* lampbrush loop thread(左)、club(中)和 noose(右)的结构示意图
大箭头示转录方向。转录产物的二级结构在各 loop 都是特异的, 本图未予详细显示。

染色体,但也可能同时位于Y染色体。如是后一种情况,则在杂交信号的强弱上有所反映。战略之二^[1],用标记的精巢RNA与蝇体RNA分别对果蝇CDNA库进行杂交,继而以精巢RNA特异的克隆为探针,通过Southern Blot检测精巢特异性的、转录的Y染色体DNA序列。战略之三^[31],用Microcloning的方法从初级精母细胞中分离Y染色体的lampbrush loop DNA。战略之四^[32,33],将雌性DNA结合于层析柱内的多孔支持物中,借此来富集Y染色体DNA。

上述各种方法对Y染色体的分析表明,其DNA序列分为两种类型。一种称为Y-specific序列,只存在于Y染色体;另一种称为Y-associated序列,既存在于Y染色体,也出现在常染色体或X染色体上。Y-specific序列由拷贝数为200—2000的重复序列家族组成,一个家族只出现在一个loop上。这些序列以400 bp左右的片段为基本单位,串联成簇,散布于整个

loop(图4)。对lampbrush loop noose的序列分析表明,它不具有编码蛋白质的特性,但因含有同向及反向重复序列,因而能形成复杂的二级结构。此类序列在loop上的聚集并非偶然,而是与其功能相关的。可以推测,在进化过程中,基因放大(gene amplification)可能对此起了重要作用。Y-associated序列也是重复序列,拷贝数较Y-specific序列少,每个基因组约50个,但其长度变化较大,可达数kb。这类序列的一个家族只有部分拷贝位于Y染色体上,其余的位于常染色体或X染色体。由于在常染色体或X染色体上的位点变异很大,提示这类序列可能属可转位因子(transposable element)。从进化角度看,它们可能是新近整合到Y染色体上的。上述Y-specific与Y-associated序列一起被转录成一个RNA分子。

5. lampbrush loop的功能

如上所述,作为可育基因,Y染色体上的lampbrush loop是果蝇精子发生不可缺少的。

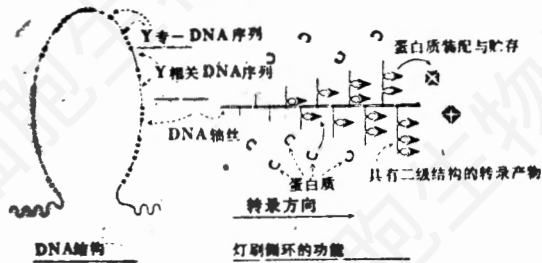


图4 灯刷侧环的结构和功能模型

但是在进一步研究 loop 的作用机制上却遇到了困难。原因不单是方法学上的问题，而且还有概念上的问题。与通常所说的真核细胞基因比较，lampbrush loop 有其独特之处。首先，虽然在初级精母细胞中它们的转录活性很高，但其终产物不是蛋白质，而是 RNA 分子。其次，其转录产物 RNA 分子相当大，可达 1500 kb。因包含 Y-specific 及 Y-associated 两种重复序列，因此能形成复杂的二级结构。再者，虽然尚未发现 Y 染色体具有编码蛋白质的功能，但 lampbrush loop 能富集大量蛋白质。因此，lampbrush loop 这种可育基因是比较特殊的基因。

早在 60 年代人们就提出，Y 染色体上的基因在精子发生过程中可能起着调节作用。Hulsebos 等^[34]首先提供了这方面的实验依据。他们发现，在 X/O 雄性果蝇的精巢中，有三个蛋白质组份，包括微管蛋白的量明显下降，而这些蛋白质都不是由 Y 染色体编码的，提示 Y 染色体对这些蛋白质的表达起着调节作用。近来研究表明，微管蛋白的 mRNA 在 X/O 雄性精巢中的量并不减少，因此这一调节作用可能发生在翻译水平上。另一个例子是 X 染色体上 Stellate 位点编码的一个 17 KD 的蛋白质。在缺少 Y 染色体的 X/O 雄性果蝇的精母细胞内，该蛋白质过多合成而形成结晶^[9]。虽然 Y 染色体上起这一调节作用的位点不位于 lampbrush loop 上，而位于可育位点 (fertility locus) K 12 与 K 13 之间，但也说明 Y 染色体对其他染色体编码的精巢蛋白质能起调控作用。

原位杂交发现 Y 染色体上转录的 RNA 分子并不局限在核内，有一部分存在于细胞质中^[35]。有些 RNA 分子在精子细胞 (spermatid) 时期仍然存在^[36]，表明在减数分裂后期的精子发育中可能起调节作用。另外，因这些 RNA 分子与其他染色体的一些 DNA 序列同源，如果后者编码蛋白质并转录成 mRNA，那么 loop RNA 分子就有可能通过碱基互补与这些 mRNA 分子相互作用，从而影响蛋白质的合成。

但是，上述关于 Y 染色体可育基因的作用并不能完全解释 lampbrush loop 所具有的明显特征，如大量蛋白质的聚集，巨大的 RNA 分子，复杂的 RNA 二级结构等等。为此，Hennig 等提出了一种假设(图 4)^[1,3,7]认为 loop 的主要功能是通过 RNA 分子结合 loop 特异的蛋白质，而 loop 特异的 RNA 二级结构是这种结合所需要的。Kremer^[4]等观察到，在减数分裂之后，雄性生殖细胞的染色体要经历复杂的浓缩及去浓缩过程。此外，减数分裂后的精子形成也是一个极为复杂的过程。lampbrush loop 上聚集的蛋白质可能就是这些过程所需要的。上述假设解释了 loop 的许多特性，但要完全证实这一假设，尚需对 loop 的结构与功能，尤其是 loop 蛋白质的来龙去脉做更深入的研究。

五、展 望

精子发生是一个十分复杂的发育过程，目前对其了解还是非常局限与粗浅的。本文介绍的对 Y 染色体可育基因在分子水平上的研究进展为目前这一研究领域提供了极为重要的信息，但仍然未能解决可育基因的作用机制这一基本问题。有两方面的工作将会成为这一领域的研究重点：一是对可育基因本身的研究，如人工诱变这些基因，观察其对生殖细胞发育的影响。二是对精子发生过程中特异表达的蛋白质的研究：这包括对这些蛋白质本身功能的研究及对编码这些蛋白质的基因的研究。由于方法学的进步与成熟，可以期望，不久的将来我们便可以在分子水平上认识精子发生过程的本

质了。

摘 要

果蝇精子发生是一个极为复杂的分化过程,受可育基因的控制。Y染色体上lampbrush loop是一组研究得较为深入的可育基因。在初级精母细胞时期,loop处于活跃转录状态,终产物为具有特异二级结构、大小与loop相当的RNA分子。这些RNA分子不具有编码蛋白质的特性,但却结合有大量的蛋白质分子。推测loop的主要功能是聚集精子发生过程中所需要的特异的蛋白质分子。

参 考 文 献

- [1] Hackstein, J. H. P., 1987, Spermatogenesis in *Drosophila* In: Results and Problems in Cell Differentiation V. 15. Spermatogenesis Genetic Aspects Hennig, W. ed. pp. 63—116.
- [2] Lindsley, D. L. et al., 1980, Spermatogenesis In: The Genetics and Biology of *Drosophila* V. 2 d Ashbuner, M. et al, eds. pp. 225—294.
- [3] Hennig, W. 1987, The Y chromosome lampbrush loops of *Drosophila* In: Results and Function of Eukaryotic Chromosome Hennig, W. ed. pp. 133—146.
- [4] Kremer, H. et al., 1986, *Chromosoma*, 94:147—161.
- [5] Hardy, R. W. et al., 1984, *Genetics*, 107:591—610.
- [6] Kemphues, K. J. et al., 1983, *Genetics*, 105:345—356.
- [7] Hennig, W. 1987, Spermatogenesis in *Drosophila* In: Primers in Developmental Biology V. 3 Developmental Genetics in Animals and Plants Malacinski, G. ed.
- [8] Brosseau, G. L. Jr. 1960, *Genetics*, 45: 257—274.
- [9] Meyer, G. F. et al., 1961, *Chromosoma*, 12:676—716.
- [10] Meyer, G. F. et al., 1963, *Chromosoma*, 14:207—255.
- [11] Hess, O. et al., 1963, *J. Cell. Biol.*, 15: 527—529.
- [12] Hess, O. 1970, *Mol. Gen. Genet.*, 106: 328—346.
- [13] Hackstein, J. N. P. 1982, *Genetics*, 101: 257—277.
- [14] Hackstein, J. H. P. 1985, *Hoppe-Seyler's Z Biol. Chem.*, 306:117.
- [15] Leoncini, O. 1977, *Chromosoma*, 63:329—357.
- [16] Callan, H. G. 1986, Lampbrush Chromosome In: Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics V. 36 pp. 177—212.
- [17] Grond, C. T. et al., 1984, *Chromosoma*, 89:85—95.
- [18] Hulsebos, T. J. M. et al., 1984, *PNAS*, 81:3404—3408.
- [19] Hennig, W. 1967, *Chromosoma*, 22:294—357.
- [20] Hennig, W. et al, 1974, *Cold Spring Harbor Symp Quant. Biol.*, 38:673—683.
- [21] Meyer, G. F. et al., 1974, *Chromosoma*, 46:121—144.
- [22] Meyer, G. F. et al., 1974, Molecular aspects of the fertility factors in *Drosophila* In. The functional anatomy of the spermatozoon Afzelius, B. A. ed. pp. 69—75.
- [23] Glätzer, K. H. et al., 1981, *Biol. Cell*, 41:165—172.
- [24] Grond, C. J., 1983, *Chromosoma*, 88: 50—56.
- [25] Loos, F. de et al., 1984, *EMBO J.*, 3: 2845—2849.
- [26] Lifschytz, E. 1979, *J. Mol. Biol.*, 133: 267—277.
- [27] Lifschytz, E. et al., 1983, *Cell*, 32:191—199.
- [28] Vogt, P. et al., 1982, *PNAS*, 79:5132—5136.
- [29] Vogt, P. et al., 1983, *J. Mol. Biol.*, 167: 37—56.
- [30] Vogt, P. et al., 1986, *Chromosoma*, 94: 449—467.
- [31] Hennig, W. et al., 1983, *EMBO J.*, 2: 1741—1746.
- [32] Bunemann, H. 1982, *Nucl. Acids Res.*, 10:7181—7196.
- [33] Awgulewitsch, A. et al., 1985, *Hoppe-Seyler's Z Biol. Chem.*, 366:113.
- [34] Hulsebos, T. J. M. et al., 1983, *Dev. Biol.*, 100:238—243.
- [35] Hennig, W. 1968, *J. Mol. Biol.*, 38: 227—239.