

机制提供了新的手段。

参 考 文 献

- [1] Huxtable R. J., 1992, *Physiol. Rev.*, 72 (1): 101—163.
- [2] Forster R. P. and Goldstein L., 1979, *Yale J. Biol. Med.*, 52: 497—515.
- [3] Rasmusson R. L., et al., 1993, *Am. J. Physiol.*, 264: C136—149.
- [4] Thurston J. H., et al., 1981, *Science*, 214 (18): 1373—1374.
- [5] Takahashi K., et al., 1988, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 20: 397—403.
- [6] Sawamura A., et al., 1990, *Cell Calcium*, 11: 251—259.
- [7] Suleiman M. S. and Chapman R. A., 1993, *Exp. Physiol.*, 78: 503—516.
- [8] 宿燕岗等, 1996, 中国病理生理杂志, 12 (7): 739.
- [9] Chapman R. A., et al., 1993, *Cardiovas. Res.*, 27: 258—263.
- [10] Franconi F., et al., 1981, *Biochem. Pharmacol.*, 30: 77—80.
- [11] Suleiman M. S., et al., 1992, *Cardiovas. Res.*, 26: 897—905.
- [12] Rodrigo G. C. and Chapman R. A., 1991, *J. Physiol (Lond)*, 434: 627—645.
- [13] Bhojanhi I. H. and Chapman R. A., 1990, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 22: 507—522.
- [14] Suleiman M. S. and Chapman R. A., 1990, *Circ. Res.*, 67: 1238—1246.
- [15] Chapman R. A., 1993, *Boston: Kluwer Academic Publishers*, 73—92.
- [16] Earm Y. E., et al., 1993, *Boston: Kluwer Academic Publishers*, 119—138.
- [17] Huxtable R. J., 1993, *Cardiovas. Res.*, 27: 537.
- [18] Atlas M., et al., 1984, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 16: 311—320.
- [19] 宿燕岗等, 1995, 临床心血管病杂志, 11 (增刊): 96—99.
- [20] Schousboe A., et al., 1989, *J. Neurochem.*, 53: 1309—1315.
- [21] Sanchezzolea R., et al., 1990, *Neurochem. Res.*, 15: 535—540.
- [22] Martin D. L., et al., 1990, *J. Neurosci.*, 10: 571—577.
- [23] Philibert R. A., et al., 1989, *Neurochem. Res.*, 14: 43—48.
- [24] Chesney R. W., et al., 1985, *Biochem. Biophys. Acta.*, 812: 702—712.
- [25] Liu Q. R., et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 1215—1219.

果蝇卵子发生的分子生物学*

张宜茂 赵德标

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

生殖细胞是生物机体内一种特殊分化的细胞,是个体发生的基础。个体发育从雌雄配子结合形成受精卵开始,受精卵细胞质的区域分布调控了时间和空间不同的基因表达,并进一步调控以后的基因表达,导致不同组织的逐步决定和分化。受精卵细胞质是在卵细胞发生过程中形成的,因此,卵细胞的发生作为个体发育的准备,吸引了众多科学家的关注。

果蝇作为一种历史悠久的研究材料,遗传背景清楚,可供使用的手段方法多样,具有无可替代的优势。而近几年来,果蝇遗传学和分

子生物学的快速发展,使我们对于果蝇发育的分子机制有了较为深入的了解,果蝇卵子发生的分子机制也在逐步阐明。

雌果蝇的两个卵巢各自包含10—20根卵小管,每根卵小管又分为原卵区和生长区两部分(图1)。在原卵区的顶端包含有2—3个生殖系干细胞,它们通过不对称有丝分裂产生一个新的子干细胞和一个包囊干细胞,包囊干细

* 本文在写作过程中得到庄孝德先生的指导和帮助,谨表深切谢意。

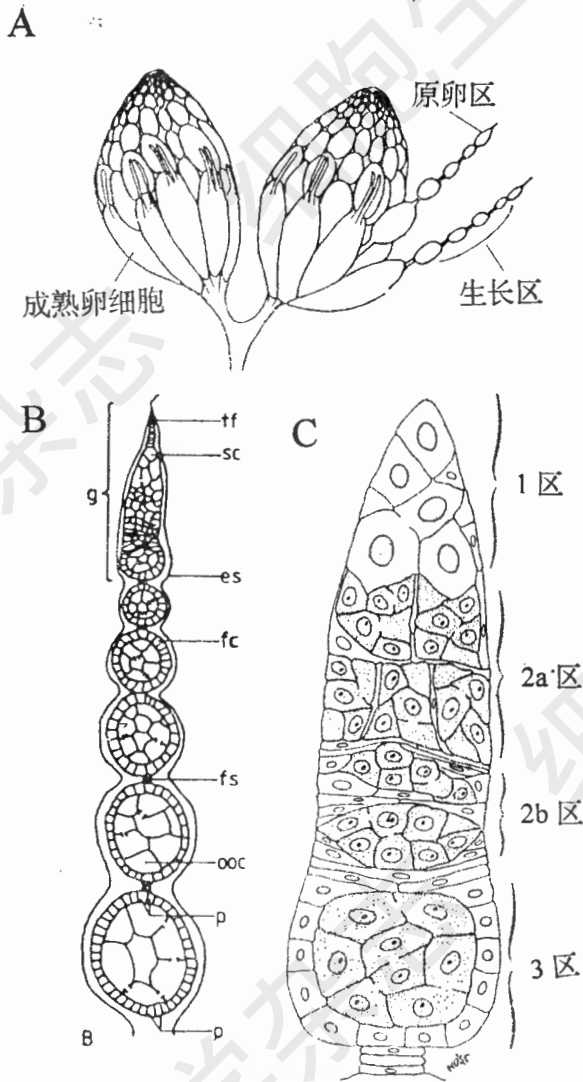


图1 果蝇卵巢结构简图^[1]

A. 果蝇的两个卵巢以及两个分开的卵小管。每个卵小管分为原卵区和生长区。

B. 卵小管前端放大图，包括原卵区(g)和生长区的一部分。

C. 原卵区示意图，分为1区、2区和3区，2区又分为2a、2b两个区。

sc: 干细胞 fc: 滤泡细胞 fs: 滤泡柄细胞
ooc: 卵母细胞 p: 端细胞

胞又进行连续4次胞质分裂不完全的有丝分裂，产生16个相互连通的包裹细胞，形成包裹，并被体细胞来源的滤泡细胞所包围，形成卵室(图2)。其中1个包裹细胞被决定为卵母细胞，另外15个包裹细胞则成为营养细胞。

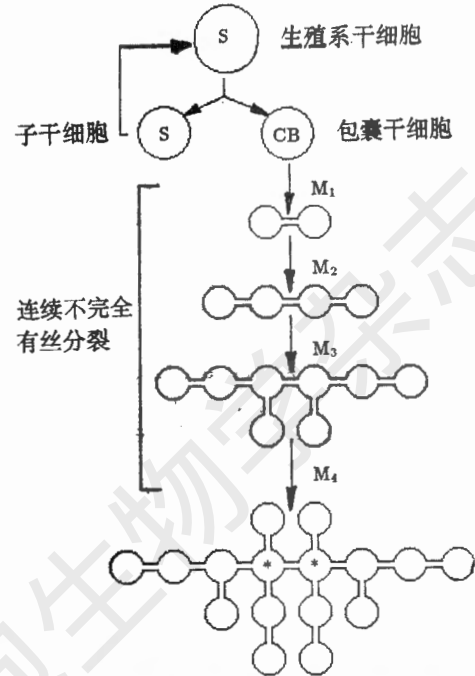


图2 果蝇卵室形成过程中细胞分裂示意图

两个具有4个环形通道的细胞用星号标记
(引自《Genetics Analysis of Animal Development》p. 88)

营养细胞进行高度多倍体化，大量合成RNA、蛋白质、核糖体等营养物质，并运输到卵母细胞，后者最后发育为成熟的卵细胞^[1,2]。

卵子发生作为个体发育的准备阶段，不仅积累了胚胎发育所需的营养物质，而且形成了呈区域分布的卵质。指导胚胎体节基本图式形成的形态发生原物质在卵母细胞内进行区域定位^[3]。在卵后区形成具有特征性的颗粒结构——极小囊(即生殖质)，决定胚胎发育过程中生殖细胞的形成^[4]。在早期卵发生过程中，发生了上述重要的发育事件。对这些发育事件的分子机制的研究，目前已取得一定的进展。我们将就其中某些问题作初步探讨。

一、包裹形成的基因调控

果蝇的卵子发生在蛹中被启动，然后在成体内完成。卵子发生启动后，包裹干细胞连续分裂形成由16个相互连通的包裹细胞的包裹(图2)。卵母细胞的决定就发生在16个包裹细胞中，因此，如果包裹不能适当地形成，

卵母细胞也就不能形成。

包囊干细胞精确的、连续4次胞质分裂不完全的有丝分裂由一些基因所控制,这些基因的突变将破坏包囊干细胞的正常分裂。目前已经发现一些导致包囊干细胞分裂不正常的突变基因,它们的表型可分为两类:一类是分裂失控,结果包囊中充满类似于早期精原细胞的未分化生殖细胞,称为肿瘤化表型;另一类是包囊干细胞不能分裂,或者正常的4次分裂不能完成,导致停留在2-细胞、4-细胞或者8-细胞包囊时期。可能引起包囊干细胞分裂不正常的基因有 *Sxl*、*snf*、*otu*、*bam*、*orb* 等。*bam* 突变可能使包囊停留在2-细胞时期,*Sxl* 突变可能导致其停留在4-细胞期,而*orb* 突变则可能使包囊停留在8-细胞期^[6-11]。

导致包囊干细胞分裂异常的众多的基因是通过怎样的机制起作用的?研究分析表明,它们可以分为两类,一类包括 *Sxl*、*ovo*、*otu*、*snf*,都是果蝇性别决定基因;另一类 *bam*、*orb* 则通过其他机制发挥作用。

性别决定基因是如何影响包囊干细胞的正常分裂的?我们首先要了解这几个基因在性别决定中的作用。

果蝇体细胞和生殖细胞的性别决定机制是有差别的:体细胞的性别决定是细胞自主的,其决定信号是性染色体和常染色体的比例(*X/A*);生殖细胞的性别决定则不完全是细胞自主的,还依赖于体细胞诱导信号,但 *Sxl* 基因都参与其中并扮演了重要角色,在体细胞的性别决定中,*Sxl* 直接对 *X/A* 作出反应;在生殖细胞的性别决定中,*Sxl* 基因则是体细胞诱导信号的靶目标之一^[5,18]。

snf、*ovo*、*otu* 等性别决定基因则都在 *Sxl* 基因的上游调控其表达。*snf* 纯合突变体卵巢内充满像雄性一样的大量细胞(所谓肿瘤化表型),其中 *Sxl* mRNA 前体均以雄性方式剪切,抗 *Sxl* 抗体的检测显示极少或没有 *Sxl* 蛋白存在^[14]。*ovo* 或 *otu* 纯合强突变的雌性果蝇没有生殖细胞,弱突变则引起卵巢肿瘤。

PCR 实验显示 *ovo* 或 *otu* 突变的雌性果蝇卵巢内,*Sxl* 的转录剪切产物为雄性专一的,且很少或没有 *Sxl* 蛋白。*otu* 弱突变的雌性卵巢中,还可检测到雄性生殖细胞专一性表达的标记性产物^[15,16]。

可见,当 *Sxl*、*snf*、*ovo*、*otu* 突变时,雌性生殖细胞适当的性别决定被破坏,产生转性或两性的细胞。当转为雄性时,就进入雄性生殖细胞的正常分化途径。包囊中产生大量类似于未分化的精原细胞的细胞,形成所谓的肿瘤化表型,而包囊中干细胞正常的4次有丝分裂为何不能完成?可能是由于雌性生殖细胞变成转性或两性的细胞,破坏了正常的生殖细胞和体细胞之间的相互联系,导致包囊中生殖细胞的分裂失去控制。

bam 基因可能直接控制包囊干细胞的连续有丝分裂。*bam* 突变在很早阶段就破坏了雌性配子发生,阻断包囊的形成。因此产生的畸形包囊,其中包含过多的、不能继续分化的细胞^[10]。卵巢中包囊干细胞的分裂不同于在这之前的生殖系干细胞的分裂。后者可以无限次地分裂下去,而包囊干细胞精确地分裂四次,这四次分裂是胞质分裂不完全的,而且分裂产生的子细胞小于母细胞。这种细胞分裂周期的性质的变化和包囊干细胞细胞分裂的性质、次数很可能都是由 *bam* 产物所决定的。卵巢中发现有 2.0 kb 的 *bam* mRNA,在干细胞产生包囊干细胞后不久它们呈短暂出现。*bam* 蛋白的序列表明它是一个易迅速降解的不稳定蛋白,说明 *bam* 很可能编码了作为包囊干细胞分裂计数因子的蛋白^[10]。

orb 基因在包囊形成中的作用可能发生在包囊干细胞的第三次和第四次有丝分裂之间^[18]。在 *orb^{dco}* 和 *orb³⁴³* 两种丧失功能的突变型果蝇中,包囊的发育从干细胞到8-细胞期看来都是正常的,但是在16-细胞包囊形成之前或形成过程中其发育被中止。已知 *orb* 基因编码了一个胞质 RNA-结合蛋白,因此可能是通过 *Orb* 蛋白和其他某些 RNA 之间相

互作用而阻止了16-细胞包裹的形成。这些RNA编码的蛋白可能起了控制细胞分裂周期、协调最后一次有丝分裂(8-细胞到16-细胞包裹)的作用,或者启动了原卵细胞向减数分裂的转化。

二、卵母细胞的决定

果蝇的卵子发生在12天内完成。产生成熟的卵细胞。每个卵细胞包含了启动和维持早期代谢及发育进行的全部物质和信息。由于在发生过程中,卵母细胞相对地转录静止,所以其胞质成分几乎都是由营养细胞合成后通过胞质桥运输过来的。营养细胞染色体高度多倍体化,转录合成活跃,保证了卵母细胞的迅速成熟^[2-3]。

包裹形成以后,16个来源于同一包裹干细胞、并通过胞质桥相互连通的包裹细胞产生了差异,导致卵母细胞进入不同于营养细胞的分化途径,卵母细胞是如何被决定而进入了不同于营养细胞的分化途径?有两种可能,一种是最初的包裹干细胞中已经包含了控制卵母细胞分化的决定因子,这些决定因子在连续的有丝分裂中并不平均分配到各包裹细胞中;另一种是包裹细胞中合成的决定因子通过胞质流进入位于包裹中央,具有4个环形通道的一个细胞,并进行定位^[10]。

原卵区是卵母细胞决定的地方,又可分为三个区:1区是有丝分裂活跃的地方,包含干细胞、干细胞分裂的产物—包裹干细胞,和包裹干细胞连续分裂产生的2-细胞、4-细胞、8-细胞包裹;2区是中胚层体细胞内陷包围一个个16-细胞群的地方,包含8—10个16-细胞包裹,又可分为2a和2b两部分;3区则代表了已完全为滤泡细胞包围的16-细胞包裹的位置(图1c)。16-细胞包裹形成时,16个包裹细胞间通过一至四个胞质桥相连通,中间的两个包裹细胞具有4个胞质桥,称为原卵细胞,都具有联会复合体,处在减数分裂状态。但其中一个原卵细胞继续保留联会复合体,保

持双倍体状态,并被决定为卵母细胞,迁移到卵室的后端。另一个原卵细胞的联会复合体消失,和其他14个包裹细胞一起高度多倍体化,成为营养细胞^[2]。目前发现,微管细胞骨架和Bic-D、egl、orb等基因参与卵母细胞的决定。

研究发现,包裹中微管和细胞骨架对卵母细胞的决定起十分重要的作用。对微管和actin重组的细胞学分析表明,早在原卵发生区微管结构就已产生不对称性。当两个具有4个环形通道的原卵细胞都具有联会复合体时,只有预定卵母细胞含一个MTOC(微管组织中心),起源于MTOC的微管组织穿过环形通道,将其余15个包裹细胞与预定卵母细胞相连,从而使预定卵母细胞处于一种非常独特的位置。MTOC的形成发生在卵母细胞特化之前,预示卵母细胞将特化^[20]。以微管解聚剂秋水仙素处理雌果蝇,会导致产生具有16个营养细胞而没有卵母细胞分化的包裹^[21],由此证明微管对于卵母细胞分化的重要性。很可能是由MTOC形成不对称的微管组织,介导卵母细胞决定因子的定向运输和定位。

Bic-D基因突变也产生没有卵母细胞分化的表型。Bic-D是目前所知最早的卵母细胞的标志物。原位杂交和抗体染色表明,Bic-D RNA和蛋白质在原卵区1区的包裹细胞群中均一表达,在2区Bic-D RNA和蛋白质逐渐定位于16细胞包裹中的一个细胞中,这个细胞随后定位到包裹后区,显示出卵母细胞的所有特征。因此,Bic-D蛋白是引起了预定卵母细胞和15个营养细胞之间差异的已知的第一个分子,而这时,甚至在电镜水平上也观察不到任何卵母细胞特异的形态学特征。野生型Bic-D RNA积累的时间说明16-细胞包裹一形成就需要Bic-D蛋白的功能。Bic-D蛋白的磷酸化对其定位是必需的。隐性突变Bic-D^{PA66}和Bic-D^{R26}中,Bic-D RNA同样很早出现在原卵区包裹细胞中,但是看不到RNA在某一个包裹细胞中明显积累,结果在生殖细胞分化的早期阶段,虽然干细胞和包裹干细胞的分裂都

不受影响,但是卵母细胞不能分化,16个包裹细胞都变成多倍体营养细胞。因此,Bic-D基因很可能在卵母细胞的决定过程中起了关键的作用。

某些种类RNA在卵母细胞中的特异积累也依赖Bic-D的活性^[19]。显性Bic-D突变引起oskar RNA在卵母细胞中定位错误^[22],隐性突变Bic-D^{PA66}和Bic-D^{R26}使k10 RNA^[23]不能在卵母细胞中特异定位。由于Bic-D编码了一个螺旋管状多肽,与肌球蛋白重链尾端、微管发动机驱动蛋白(motor kinesin)和中等纤维蛋白序列相似,因此可能是细胞骨架运输和(或)定位系统的一个成分,而卵母细胞决定因子和减数分裂诱导因子很可能一开始就存在于不止一个包裹细胞中,由于包括Bic-D基因参与的、不对称的细胞骨架所介导的定向运输,使其逐渐定位到卵母细胞中去,减数分裂诱导因子从所有包裹细胞中逐渐定位到卵母细胞中去,这也能解释为什么在原卵区中有2个细胞启动了减数分裂、具有联会复合体,但只有一个能保留联会复合体,继续减数分裂^[19]。

egl基因突变引起的表型类似于Bic-D突变,也产生16个营养细胞。egl突变卵巢中,已极化的微管组织的极性不能维持,Bic-D的表达在原卵区2b区之前不受影响,但在随后的原卵区和生长区阶段Bic-D RNA和蛋白质的定位被破坏。这说明egl在维持分化状态中起作用^[19]。

orb基因不仅参与16-细胞包裹形成,而且在16-细胞包裹中的营养细胞和卵母细胞的分化中起作用。在野生型果蝇中,Orb蛋白最早在8-细胞到16-细胞包裹时期开始积累在胞质中,到原卵区2区16-细胞包裹形成时,每个细胞中都有Orb蛋白,但在某一小群细胞中更为集中。随着包裹的发育,细胞发生三维重组,卵母细胞迁移到包裹后区,Orb蛋白和其RNA一样^[18],开始主要集中在其中一个细胞——预定卵母细胞中^[11]。

在orb³⁰³突变株中,16细胞包裹形成,

其中营养细胞和卵母细胞的分化也被启动,营养细胞形成其特征性的多倍体核,预定卵母细胞开始积累好几种卵母细胞特有的RNA(orb RNA、oskar RNA)和蛋白质(如Bic-D)。但是,卵母细胞的分化并不能完成。其他一些卵母细胞的标记物,如Bic-D RNA并不积累在预定卵母细胞中,突变卵室的三维重组也不正常,预定卵母细胞保持在卵室的近中心处^[11]。

Bic-D、egl这两个基因对于早期卵室中orb RNA和蛋白质适当定位到预定卵母细胞中去是必需的,突变引起其分布异常。但是在Bic-D突变卵巢中,预定卵母细胞能恰当地重组到包裹后区,但随后背离了卵母细胞的发育途径而分化为营养细胞。因此,orb³⁰³突变株中Bic-D RNA分布错误不大可能是造成orb³⁰³突变株中所有缺陷的唯一原因。由于orb编码了一个RNA结合蛋白,而很多影响重要发育过程的基因都编码了定位的RNA,因此很可能Orb蛋白在定位某些RNA中起中心作用,这些RNA编码的蛋白质在介导营养细胞-卵母细胞复合物的三维重组,和/或卵母细胞的进一步分化中起了关键作用^[11,18]。

三、极质和极质的形成

包裹在原卵区形成后,随即进入生长区(图1)。卵细胞中启动和维持代谢以及早期胚胎发育的全部物质和信息几乎都在这里形成和储备,其中包括位于后区的极质。

极质是一种特殊胞质,具有显示其特征的极小囊结构,其中包含生殖细胞决定因子,具有决定生殖细胞形成的能力。去除或破坏极质将导致不育果蝇的产生,这种不育性可以通过移植正常极质而治愈。任何其它部位的胞质都不能改变这种不育性,并且,极质移植到合胞体囊胚的其它部位时将引起异位的生殖细胞形成^[24,25]。

极质从一开始就决定了胚胎发育中生殖细胞不同于体细胞的分化途径,极质中的生殖细胞决定因子是什么?它(们)是如何定位到卵细

测到的时间和已经证明在这一过程中起作用的基因。Cyclin B RNA定位于后区极质,但是Cyclin B蛋白质既不集中于极质,也不集中于极细胞。尚不清楚Cyclin B RNA是否在极质形成中起作用。

胞后区的? [26] 研究表明, 果蝇的极小囊由蛋白质和 RNA 组成。其中成分之一为 *germ cell-less(gcl)* mRNA。 *gcl* 突变雌果蝇产生的卵细胞具有形态正常的极小囊, 但是在胚胎发育过程中极细胞死亡, 因此产生的后代是不育的。野生型 *gcl* 基因在卵巢营养细胞中转录, mRNA 通过胞质桥进入卵细胞, 定位到卵细胞最后区。在卵裂早期, *gcl* mRNA 被翻译, 其蛋白质专一地与进入极芽(*pole bud*)的、将要形成生殖细胞前体的核结合, 直到极细胞形成。将反义 RNA 注射入胚胎, 产生极细胞的能力与 *gcl* 突变一样被破坏。显然, *gcl* 是决定极细胞命运的一个重要成分 [27]。

生殖细胞决定因子的第二个候选者是线粒体大核糖体 RNA(*mitochondrial large ribosomal RNA, mtlrRNA*)。将 *mtlrRNA* 注射入紫外照射过的卵细胞能恢复照射胚胎形成极细胞的能力。而且, 在正常果蝇中, 只有在卵裂期胚胎的极质中, *mtlrRNA* 才位于线粒体外。这说明, *mtlrRNA* 在指导极细胞形成中起作用 [28]。

gcl mRNA 和 *mtlrRNA* 是如何进入卵细胞后区的? 目前已经发现极小囊中还包含相当多数的其他基因的产物, 其中 *cappucino*、*spire*、*staufen*、*oskar*、*vasa*、*valois* 和 *tudor* [28] 七个基因的产物可能构成了一个能结合生殖细胞决定因子的复合体, 正是由这个复合体将 *gcl* mRNA 和 *mtlrRNA* 以及其它可能的生殖细胞决定因子结合在卵细胞的后区。*gcl* mRNA 和 *mtlrRNA* 在卵母细胞后区的定位可以被其中任何一个基因的突变破坏, 就证明了这一点。也就是说, 极小囊既包括生殖细胞决定因子, 又包括将此因子保持在卵和胚胎后区的复合体。

这七个基因都在卵巢中活跃表达, 并且其产物定位于成长中的卵细胞中。*oskar* RNA 定位于后区, *vasa*、*staufen*、*tudor* RNA 虽在卵细胞和胚胎中均一分布, 但它们的蛋白质产物都定位于卵和早期胚胎的后区极质内, 通过

在某一基因缺失的突变体中探测另一基因的 mRNA 或蛋白质的定位, 已经将这些基因功能作用的前后次序确定(图 3)。其中, *staufen* 蛋白的后区定位需要 *cappucino* 和 *spire* 蛋白, *oskar* mRNA 的后区定位需要 *Staufen* 蛋白, *oskar* 蛋白对于 *vasa* 蛋白的后区定位又是必需的。*tudor* 和 *valois* 突变不影响 *Vasa* 的定位, 但对于已经形成的极质的维持则是关键的, *valois* 和 *tudor* 突变体中, 只能看见少量 *gcl* mRNA 在早期卵裂胚胎中定位于后区, 到卵裂后期时, 这种定位则消失。

在这些基因中, *oskar* 基因的作用尤显重要 [29]。在细胞化囊胚期, 只有单拷贝 *oskar* 基因的雌果蝇产生的胚胎只产生 10—15 个极细胞, 而具有两个拷贝 *oskar* 基因雌虫则产生大约 35 个极细胞。如果将 *oskar* 基因提高到四个拷贝, 则产生大约 50 个极细胞。这说明, 在极细胞形成过程中, *oskar* 基因的作用具有剂量效应。同时, *Ephrussi* 和 *Lehmann* 还证明生殖细胞在 *oskar* mRNA 定位处形成。如果 *oskar* mRNA 定位到胚胎前区, 生殖质和生殖细胞就在前区形成。在此之前的步骤似乎仅仅对将 *oskar* mRNA 转到卵细胞后区才是关键的, 因此, *oskar* 蛋白很可能产生极小囊复合体的第一部分。*Vasa* 和 *Tudor* 蛋白则同 *oskar* 结合产生一个更为复杂的、能结合生殖细胞决定因子的复合体。

agametic 基因可能也是极小囊中生殖细胞决定因子的候选者之一。纯合 *agametic* 突变雌果蝇的卵在受精后不久, 合子型基因表达启动之前就出现极小囊超微结构异常, 虽然形成正常数目的极细胞, 这些极细胞也能迁移到生殖腺, 但是在大约 40% 的生殖腺中生殖细胞坏死消失, 交互极细胞移植实验证明这种在生殖腺中死亡是由于突变极细胞自主的缺陷引起的。因此, *agametic*⁺ 在卵子发生过程中的表达是极细胞发育成为生殖细胞所必需的 [30]。虽然 *agametic* 基因尚未被克隆, 目前还无法确定其在卵子发生过程中的表达及其产物


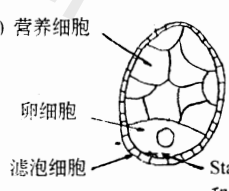
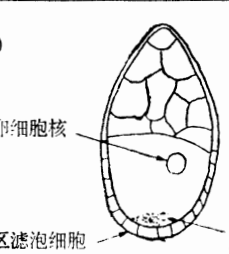
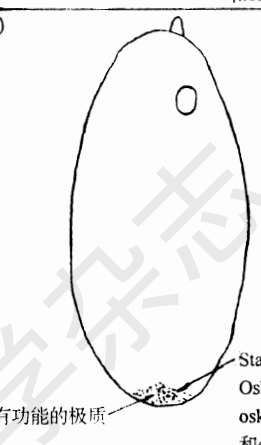
极质形成的步骤		需要的基因
<p>(a) 干细胞</p>  <p>未来的卵细胞</p>	卵细胞的决定	egalitarian和Bicaudal-D
<p>(b) 营养细胞</p>  <p>卵细胞</p> <p>滤泡细胞</p> <p>Staufen蛋白和oskar RNA</p>	<p>Staufen蛋白定位的起始</p> <p>oskar RNA定位的起始</p>	<p>spire, cappuccino</p> <p>staufen, spire和cappuccino</p> <p>滤泡细胞中的Notch和Delta</p>
<p>(c)</p>  <p>卵细胞核</p> <p>后区滤泡细胞</p> <p>Staufen和Vasa蛋白, oskar RNA和oskar蛋白</p>	<p>Staufen蛋白和Oskar RNA定位的维持</p> <p>Oskar 编码的蛋白在后极翻译</p> <p>Vasa蛋白定位</p>	<p>spire, cappuccino, staufen和oskar</p>
<p>(d)</p>  <p>有功能的极质</p> <p>Staufen, Vasa和Oskar蛋白, 以及oskar, nanos, pumilio和cyclinB RNA</p>	<p>nanos, pumilio和cyclin-B RNA定位</p>	<p>spire, cappuccino</p> <p>Staufen, oskar和vasa</p>

图 3 卵发生过程中极质成分的有步骤装配

果蝇卵细胞发生分为原卵区 3 个阶段和生长区 14 个阶段。(a) 在原卵区, 干细胞分裂产生包囊干细胞, 包囊干细胞分裂 4 次产生一群 16 个细胞。(b) 在生长区, 其中 15 个细胞分化为营养细胞, 位于最后端的一个细胞成为未来的卵细胞。(c) 在卵发生过程中, 营养细胞和卵细胞体积增大, 最后营养细胞降解。极质成分在营养细胞中合成, 通过大的胞质桥运输到卵细胞中去。(d) 此图概括了生殖质成分定位第一次被检测到的时间和已经证明在这一过程中起作用的基因。Cyclin B RNA 定位于后区极质, 但是 Cyclin B 蛋白质既不集中于极质, 也不集中于极细胞。尚不清楚 Cyclin B RNA 是否在极质形成中起作用。

(mRNA 或蛋白质)的分布情况,但是,由于它在胚胎发育中直接影响极小囊的结构和生殖细胞的存活,因此很可能同 *gcl* 一样, *agametic* 的产物也是极小囊的成分之一,并且是生殖细胞决定因子的候选者。

四、卵发生过程中极性的建立

卵细胞的极性是在卵发生过程中建立起来的,它不仅是胚胎极性的基础,而且对于卵子发生的顺利完成也起着重要作用。早在原卵区卵母细胞的决定过程中,首先就需要建立极性的运输和定位系统,卵母细胞决定以后,它的发育成熟需要从营养细胞向卵母细胞运输大量物质,这种运输也是极性的。卵母细胞从它在原卵区 3 区刚刚被决定时,就总是位于后区,而 15 个营养细胞总是位于前区,营养细胞合成的 RNA 和蛋白质都是从卵母细胞的前端运输进入卵母细胞,并在其中进行定位的。在 *orb³⁰³* 突变株中,预定卵母细胞保持在卵室的近中心处不能迁移到后区,其分化为卵母细胞的过程也不能完成。4 种母体形态发生原物质和在胚胎发育中特化生殖细胞分化命运的极性的成分,也都是在卵发生过程中由营养细胞合成后运输到卵母细胞中,并在其中进行定位或区域激活的。这种运输、区域定位或激活也需要建立正确的卵细胞极性。

研究卵细胞前后极性的建立发现, *Notch* 和 *Delta* 突变使卵细胞前后极性异常,后端极质成分 *oskar* RNA 不能正确定位到卵细胞后区。嵌合体研究表明,这种前后极性的异常是由体细胞来源的滤泡细胞中 *Notch* 或 *Delta* 功能突变引起的,因此,卵细胞前后极性的建立需要卵母细胞和滤泡细胞间的相互作用^[12]。

从滤泡细胞传来的信号是如何影响卵细胞前后极性的建立呢?果蝇的卵子发生不仅包括生殖细胞的特化,也包括滤泡细胞的特化。当 16 细胞包囊形成时,一层体细胞来源的滤泡细胞内陷将其包围,形成卵室^[2]。位于卵室不同位置的滤泡细胞显示不同的特征。在原卵

区,一群滤泡细胞分化为柄细胞或端细胞前体,柄细胞将各卵室分隔开,端细胞前体则围绕第 1 期卵室的前端和较年轻卵室的后端,后端的端细胞前体又产生侧细胞或后端细胞(图 5)。研究发现, *Notch* 和 *Delta* 各自编码了一个 EGF 样膜蛋白,在卵发生过程中,它们在围绕卵室的前后端滤泡细胞中表达, *Notch* 蛋白作为细胞表面受体, *Delta* 蛋白作为配基,相互配合,通过信号传递系统,参与特化滤泡细胞的命运。 *Notch*、 *Delta* 任一基因的突变都导致产生过多的后端细胞,结果卵母细胞的前后极性异常,本应定位于后端的 *oskar* RNA 不能定位到后端,而本应定位于前端的 *bicoid* RNA 则在前后两端都能发现^[12]。

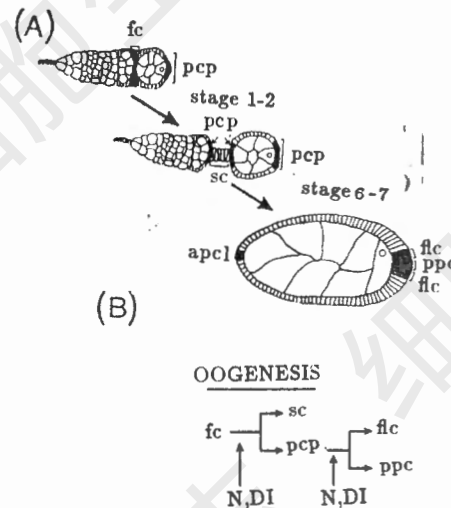


图 4 (A) 卵室的形态学极性和前后极性的建立(左为前)^[12]

在原卵区,一群滤泡细胞(fc)分化为柄细胞(sc)或端细胞前体(pcp),这导致第 1 期卵室与原卵区分离。柄细胞将卵室和围绕 1 期卵室前端和较年轻卵室后端的端细胞前体分开,每个卵室因此有两群端细胞前体,分别在前、后端。到卵子发生 6-7 期时,从后端的端细胞前体产生侧细胞(flac)或后端细胞(ppc)。前端细胞(apc)的分化和功能则尚不清楚。

(B) 滤泡细胞的图式形成需要 Notch (N) 和 Delta (DL)

首先在原卵区滤泡细胞分化为柄细胞或端细胞前体(pcp)时,然后在 1-7 期后端细胞前体(pcp)分化为后端细胞(ppc)或侧细胞(flac)时,都需要 N 和 DL。N 和 DL 突变体中 1-7 期时前端细胞的分化看来是正常的^[12],

已经发现,微管在定位前端、后端成分中起重要作用。很可能位于卵细胞后端的滤泡细胞提供的信号在组织微管中起作用,而在Notch、Delta突变中,后端滤泡细胞的命运被改变,导致信号传导的改变,由此影响了生殖细胞内微管组织的极性,改变了卵细胞的极性。此外,遗传学证据表明cappucino和spir也通过影响细胞骨架和微管极性影响RNA和蛋白质运输,及在卵细胞后区定位的过程^[12]。

五、结 语

果蝇卵细胞发育生物学的研究进展已经使我们对果蝇卵子发生的分子机制有了一定程度的认识,有些方面基本上已经搞清楚,但有些方面仍所知甚少。当卵子发生在原卵区启动之后,生殖系干细胞的不对称有丝分裂是如何受控进行的?我们对此尚一无所知。包裹干细胞的连续有丝分裂是如何精确完成的?其涉及的因素看来相当复杂。在目前已鉴定的影响此过程的众多基因中,可能只有bam基因通过编码包裹干细胞分裂计数因子的蛋白直接参与其调控,而其它的基因,包括性别决定基因Sxl等和orb基因,它们对此过程的影响都是间接的。这些现象提示我们,包裹干细胞的连续4次有丝分裂的精确完成,不仅需要细胞周期的直接调控,而且需要组成原卵区的生殖细胞和体细胞之间保持正常的相互作用,任何破坏细胞的相对数目和位置的突变都会产生广泛的后果。

16细胞包裹形成以后,被体细胞来源的滤泡细胞所包围,形成卵室。其中一个具有4个胞质桥的包裹细胞被决定为卵母细胞,虽然还没有证据表明我们已经找到了卵母细胞决定因子,但是卵母细胞决定的分子机制的轮廓已经呈现。当包裹形成时,16个合胞体包裹细胞中只有一个包含一个MTOC,由此形成连接各包裹细胞的单一细胞骨架,介导了从包裹细胞向预定卵母细胞的定向运输,其中包括假定的减数分裂诱导因子和卵母细胞决定

因子,从而决定了卵母细胞的发育命运。而卵母细胞的决定,并不是一下子完成的,而是在一个持续时期内,通过在预定卵母细胞和预定营养细胞之间逐步产生差异并扩大,最后决定了卵母细胞的特性。目前已经鉴定的影响卵母细胞决定的基因,都表明参与其中某一步骤。但是,卵母细胞决定因子的实质是什么?它是通过怎样的机制作用的?这些问题仍然等待着我们的回答。

卵母细胞决定以后,接受营养细胞合成后运输而来的大量RNA、蛋白质、核糖体等,迅速发育成为成熟的卵细胞,并在其后区形成了极小囊结构。对极小囊的形成和装配过程已经比较清楚,其中决定生殖细胞形成的一些成分也有所了解。就目前获得的进展来看,可能并不存在某个单一的生殖细胞决定因子,而是在生殖细胞形成的不同阶段由不同的因子发挥作用,如gcl突变最早导致极细胞在迁移过程中死亡,agametic突变则导致极细胞在迁移到达生殖腺后死亡,这说明gcl基因和agametic基因都指导生殖细胞的发育,但gcl的作用在agametic之前。因此,我认为,极小囊中决定生殖细胞形成的成分很可能有多个,它们在生殖细胞形成的不同阶段分别发挥主导作用,协调作用,共同配合,决定了生殖细胞的形成。

参 考 文 献

- [1] Mahowald, A. P. and Kambyzellis, M. P., 1980, In *The Genetics and Biology of Drosophila*, vol. 2, M. Ashburner and T. R. F. Wright, eds. (New York: Academic Press), pp. 141—224.
- [2] Anderson, K. V., 1989, In *Genes and Embryos*, D. M. Glover and B. D. Hames, eds. (IRL Press at Oxford University Press), pp. 1—38.
- [3] St Johnston, D., and Nusslein-Volhard, C., 1992, *Cell*, 68: 201—219.
- [4] Lehmann, R., 1992, *Current Opinion in Genetics and Development*, 2: 543—549.
- [5] Cline, T. W., 1993, *TIG*, 9: 385—390.
- [6] Bell, L. R. et al., 1991, *Cell*, 65: 229—240.

- [7] Steinmann-Zwicky, M., 1994, *Dev. Genet.*, 15: 265—274.
- [8] Oliver, B. et al., 1988, *Genetics*, 120: 159—170.
- [9] King, R. C., and Storto, P. D., 1988, *BioEssays*, 8: 18—23.
- [10] Mckearin, D. M., and Spradling, A. C., 1990, *Genes & Development*, 4: 2242—2251.
- [11] Lantz, V. et al., 1994, *Genes & Development*, 8: 598—613.
- [12] Ruohole-Baker, H., 1994, *TIG*, 10, 3: 89—94.
- [13] Steinmann-Zwicky, M. et al., 1989, *Cell*, 57: 157—166.
- [14] Steinmann-Zwicky, M., 1994, *Development*, 120: 707—716.
- [15] Oliver, B. et al., 1993, *Development*, 119: 897—908.
- [16] Pauli, D. et al., 1993, *Development*, 119: 123—134.
- [17] Lindsley, D. L., and Tokuyasu, K. T., 1980, In *The Genetics and Biology of Drosophila*, vol. 2d, M. Ashburner and T. R. F. Wright, eds. (New York: Academic Press), pp. 225—294.
- [18] Lantz, V. et al., 1992, *Development*, 115: 75—88.
- [19] Suter, B., and Steward, R., 1991, *Cell*, 67: 917—926.
- [20] Theurkauf, W. E. et al., 1993, *Development*, 118: 1169—1180.
- [21] Koch, E. A., and Spitzer, R. H., 1983, *Cell Tissue Res.*, 228: 21—32.
- [22] Kim-Ha, J. et al., 1991, *Cell*, 66: 23—35.
- [23] Haenlin, M. et al., 1987, *EMBO J.*, 6: 801—807.
- [24] Illmensee, K., and Mahowald, A. P., 1976, *Exp. Cell. Res.*, 97: 127—140.
- [25] Okada, M. et al., 1974, *Develop. Biol.*, 37: 43—54.
- [26] Scott F. Gilbert, 1994, *Developmental Biology*, Sinauer Associates, Inc., (Sunderland, Massachusetts).
- [27] Jongens, T. A. et al., 1992, *Cell*, 70: 569—584.
- [28] Mahowald, A. P., 1992, *Science*, 255: 1216—1217.
- [29] Ephrussi, A., and Lehmann, R., 1992, *Nature*, 358: 387—369.
- [30] Engstrom, L. et al., 1982, *Development*, 91: 163—170.

转基因油菜应用研究

官春云 李 枸

(湖南农业大学农学系 长沙 410128)

油菜是重要油料作物, 我国60%以上人口食用菜油, 我国油菜面积和总产居世界首位。在油菜育种和品种改良中, 常用的方法是有性杂交的方法, 通过亲本染色体组的分离和重组, 进行多代选择, 以创造新类型。但这种方法有一定的局限性, 受生物分类的限制, 使远缘类型之间不可以进行基因交换。70年代以来, 随着植物基因工程技术的发展, 应用遗传转化的方法, 能够突破物种间的界限, 转移有用的基因, 使远缘类型之间可以进行基因的交流, 为创造新的生命类型开拓了无限广阔的前景。其次, 还可以获得生物的定向变异, 即

需要那种性状, 就可将带有此性状的的目的基因转移到受体细胞, 因而可以定向地获得所需要的变异, 因此, 基因工程为油菜育种和品种改良提供了新的手段。

转基因植物的研究始于70年代末80年代初, 当时仅在少数植物种如烟草、马铃薯上由野生型 Ri 和 Ti 质粒转化的细胞再生出植物。1985年 Horsch^[2]最早在油菜上获得转基因植株以来, 转基因油菜的应用研究如油菜品质改良, 提高油脂量、杂种优势、抗病虫、和抗除草剂等各方面都已取得突破性的进展, 其产品已逐步批准进行田间试验, 某些目标产品已进