

果蝇原生殖细胞特化的分子机制

郭忠海 康现江* 穆淑梅

(河北大学生命科学学院, 保定 071002)

摘要 原生殖细胞在许多有性生殖动物的胚胎发育早期就已特化出来, 并进一步分化为生殖细胞以产生新的子代。动物原生殖细胞的特化主要有生殖质决定和诱导两种模式, 果蝇原生殖细胞的特化模式属于前者。研究表明, 果蝇原生殖细胞特化过程中生殖质组装的关键基因是 *osk*, 其调控下游基因转录产物的定位和翻译, 如 *vas* 和 *tud*。此外, 基因转录沉默是原生殖细胞特化过程的一个重要特征, 其与生殖质中的成分如基因 *nos*、*gcl*、*pgc* 的表达产物密切相关。现对果蝇原生殖细胞特化分子机制进行综述。

关键词 原生殖细胞; 生殖质; 特化

原生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)是许多有性生殖动物胚胎发育早期特化形成的一种细胞, 是所有生殖细胞的“祖先”。它通常会经历一个复杂的迁移过程进入生殖腺原基, 在那里进一步分化为生殖细胞。在几种模式动物的研究中, PGCs 的特化显示出两种不同的模式^[1]。其中一种被认为是生殖质决定模式, 即由母型因子形成特殊的细胞质区域——生殖质(germ plasm), 卵裂时进入特定细胞而形成 PGCs。线虫(*Caenorhabditis elegant*)、果蝇(*Drosophila*)、斑马鱼(*Danio rerio*)和爪蟾(*Xenopus*) PGCs 的特化都利用这种模式。另一种是诱导模式, 即原生殖细胞受到胞外信号的诱导而特化形成。哺乳动物和鸟类可能利用这种模式。在小鼠胚胎发育中, 已发现一些由滋养层或胚外外胚层分泌的胞外信号分子, 如骨形态发生蛋白 4 (bone morphogenetic proteins4, BMP4)、

BMP8b 和 BMP2, 可以诱导小鼠 PGCs 特化, 目前正在深入地研究。由于果蝇具有良好的遗传学研究背景, 人们利用它对前一种模式做了较为系统和深入的研究, 许多与 PGCs 特化相关的基因被揭示出来, 为了解其他生物生殖质决定的 PGCs 的特化过程提供了很好的借鉴, 也为阐明这种模式打下了基础。

1 生殖质与 PGCs 特化的相关基因

在线虫、果蝇、斑马鱼和爪蟾等动物中, PGCs 的特化与生殖质密切相关。生殖质是这些动物卵母细胞胞质中的一个特殊区域, 在果蝇中, 生殖质位于后极, 又称极质(polar plasm)。这个区域

通常含有许多高电子密度的颗粒和纤维结构, 其中的颗粒结构主要是由 RNA 和蛋白质构成的核蛋白体, 由于其富含 RNA, 因此可以被嗜碱性染料染色。

果蝇 PGCs 的特化过程主要涉及母型 RNA 的定位与翻译、生殖质的组装(germ plasm assembly)、合胞体核的细胞化(cellularization), 以及转录沉默(transcriptional silencing)机制的形成等。这些过程, 甚至包括 PGCs 形成之后的迁移都是与生殖质成分的功能分不开的。因此深入了解生殖质成分及其相对应的基因是搞清果蝇 PGCs 特化机制的关键问题。近十几年来, 科学家通过母体效应突变筛选(screens for maternal-effect mutations)方法, 已经分离出果蝇 PGCs 形成所需的大部分基因。

目前已经了解到, 在果蝇中涉及生殖质组装和 PGCs 形成的基因有 *oskar(osk)*, *vasa(vas)*, *aubergine(aub)*, *tudor(tud)*, *germ cell-less(gcl)*, *mitochondrial large ribosomal RNA(mtlrRNA)*, *torso(tor)*等, 而涉及 PGCs 转录行为的基因有 *nanos(nos)*, *pumilio(pum)*, *polar granule component(pgc)*等^[2], 它们的具体功能将在下面进行叙述。

2 母型 mRNA 的定位与翻译

2.1 母型 mRNA 在细胞质中的定位

在果蝇卵子发生早期, 与 PGCs 特化相关的基

收稿日期: 2004-07-11 接受日期: 2005-08-18

国家自然科学基金资助项目(No.30371115), 河北省自然科学基金资助项目(No.303118)

* 通讯作者。Tel: 0312-5079362, Fax: 0312-5079364, E-mail: xjkang@mail.hbu.edu.cn

因多数在滋养细胞(nurse cell)中转录, 转录出的 mRNA 通常结合一些蛋白质后以无翻译活性的 RNP 形式转运到卵母细胞, 并最终定位于后极。mRNA 的这种胞质定位对特定蛋白质在正确的区域表达是关键的, 而这种蛋白质的区域表达又对身体构建、细胞命运特化十分重要。目前对果蝇 *osk* mRNA 的转运定位机制研究较多, 它是由依赖于微管的胞质流动转运到后极的^[3]。

osk mRNA 由滋养细胞合成, 它定位到后极可分为两步, 第一步是由滋养细胞转运到卵母细胞前极, 第二步再由前极转运到后极。最初微管组织中心(MTOC)形成于卵母细胞后极, 微管组装后, 通过滋养细胞与卵母细胞之间的胞质桥(cytoplasmic bridge)伸入滋养细胞。由负向动力蛋白 dynein 携带 *osk* mRNA (RNP 形式) 沿微管向 MTOC 所在的卵母细胞移动。之后, MTOC 消失, 在卵母细胞的前极, 微管重新开始成核(nucleation)组装, 并向后极延伸, *osk* mRNA 在第二步由正向动力蛋白 Kinesin 转运到后极。这一步可能依赖于 STAU 蛋白(*staufen* 基因产物, 是一种双链 RNA 结合蛋白), 如果 *staufen* 基因发生突变, *osk* mRNA 被停留于前极。*osk* mRNA 自身的定位信息位于 3'-UTR, 如果把它的 3'-UTR 替换为 *bicoid* mRNA(一种定位于前极的 mRNA)的 3'-UTR, 则 *osk* mRNA 就不能定位于后极, 而是定位于前极^[4]。

微丝对 *osk* mRNA 的定位可能也是必需的, 如果原肌球蛋白 II 缺失, 会影响 *osk* mRNA 的定位^[5]。

RNA 的定位也不限于依赖细胞骨架运输的方式, 有的 RNA 是一开始均匀分布于胞质, 但逐渐在胞质的特定区域积累或翻译, 如 *vas* mRNA。目前有人认为 RNA 的定位可能有四种情况^[6]: 第一种, 转录物依赖微管或微丝这些细胞骨架结构从合成位

点直接运输到胞质特定区域; 第二种, 转录物一开始均匀分布于细胞质中, 但逐渐被胞质特定区域捕获, 并最终富集起来; 第三种, 转录物从细胞核一侧被运输出来, 并被该侧特定胞质区域所捕获, 这种方式一开始即具有定向性; 第四种, 转录物一开始均匀分布于细胞质中, 但会在非定位区逐渐被降解而在定位区受到保护。四种机制通常互有联系。

2.2 母型 mRNA 的翻译调控

果蝇许多母型 mRNA 在定位前是不能翻译的, 这种翻译抑制状态通常与 3'-UTR 结合特定抑制因子有关。对于 *osk* mRNA, 它在定位于后极之前即是翻译抑制的, 它的 3'-UTR 某区段结合一 80 kDa 的卵巢组织蛋白 BRUNO, 这段序列称为 BRUNO 应答元件(Bruno response elements, BREs)如果 BREs 发生突变, 将导致 *osk* mRNA 在定位前就开始翻译^[7]。最近还发现一些分子如 p50, APT, Bic-C 也参与翻译抑制。解除这种翻译抑制状态并起始翻译是 *osk* mRNA 定位于后极才发生的事件。这个过程依赖于多种蛋白质因子, 如 AUB, p68, VAS, STAU 以及 ORB。AUB 与 p68 解除 p50 的抑制, VAS 解除 BRU 的抑制, 同时“招募”翻译起始因子 DiF2 与之结合活化翻译。STAU 解除 APT 的抑制, ORB 可以活化胞质 poly(A), 使 poly(A)延长, poly(A)延长对于 mRNA 的高效翻译往往是必须的。它们作用模式见图 1。

另外, 定位于后极的相关 mRNA, 它们的定位与翻译控制往往是通过分级的形式(stepwise fashion)或等级控制系统(hierarchical control system)进行, 即每个分子的定位、翻译依赖于前面分子的定位和翻译: 如 OSK 蛋白翻译后, 它会对 *nos* mRNA 定位到后极以及随后活化翻译起作用。它可以解除结合于 *nos* mRNA 3'-UTR 的、起翻译抑制作用的

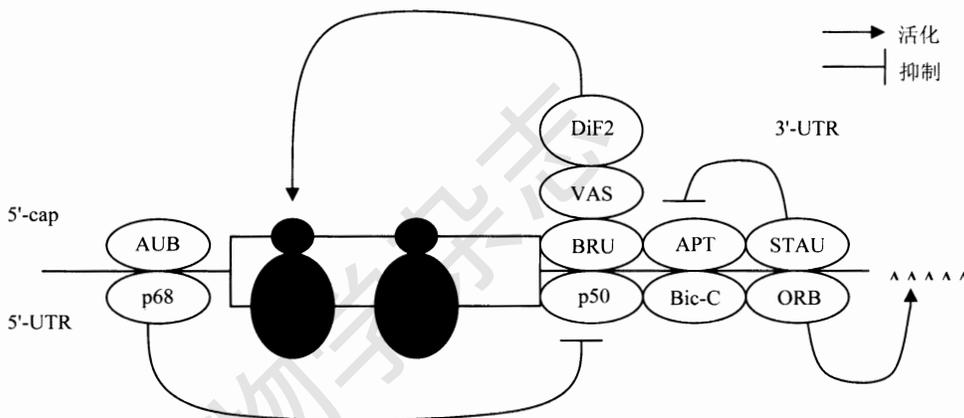


图1 *osk* mRNA 结构与翻译调控示意图^[6]

SMAUG 蛋白^[8]。

2.3 RNA 定位与翻译的关系

随着 RNA 定位与翻译的不断研究,人们逐渐认识到 RNA 的定位与翻译存在密切的联系。母型 mRNA 一般只有正确定位后才能活化翻译;而一种 mRNA 正确的定位也通常依赖其他 mRNA 的翻译;定位于同一区域的 mRNA,翻译调控往往存在等级控制等。这些胞质区域翻译调控特点体现了胚胎发育的程序化。

3 生殖质的组装与 PGCs 的形成

3.1 生殖质的组装

由于分级的形式或等级控制机制的存在,生殖质的组装过程可能仅有少数几个基因是关键。在果蝇极质组装中, *osk* 基因可能扮演了这个关键角色,它对一些下游因子的定位是必要的。现在已知约有 20 个左右的基因在极质组装中与 *osk* mRNA 的定位或翻译有关。*osk* mRNA 的定位和翻译的位置决定着极质组装的位置。如果它错误地定位于前极,则它可以诱导生殖细胞在前极形成^[4]。就目前所知,在极质组装过程,处于 *osk* 下游的基因是 *vas* 和 *tud*, 它们编码生殖质重要的蛋白质成分。这两个基因对于生殖细胞在任何地方形成都是必需的。然而,其他相关的基因对于生殖细胞的异位形成不是必需的^[4]。VAS 和 TUD 依赖于 OSK 定位,同时它们对 OSK 稳定地积累于后极又是必要的^[9],这是生殖质组装的最初事件。

VAS 是一个含有 DEAD 框的 ATP 依赖的解旋酶。在果蝇中, VAS 与起始因子 DiF-2 的同源物相互作用,介导翻译控制^[10]。同时它对于一些 RNA 的转运以及一些特殊蛋白质的翻译是必需的。缺乏 VAS 的胚胎细胞不能组装生殖质,不能形成生殖细胞。

TUD 被发现定位于果蝇极质颗粒和线粒体上,它对生殖细胞形成的作用还不十分清楚,但 *tud* 突变后,线粒体 rRNA 就不能定位到极颗粒。推测它与线粒体 rRNA 输出到细胞质并定位在极颗粒有关,而线粒体成分对 PGCs 的特化确实是必需的^[11]。另外缺失 TUD 的卵母细胞会导致 *gcl* 和 *pgc* 转录物的量在后极严重减少^[12]。

OSK、VAS 和 TUD 按照等级控制方式形成生殖质雏形后,一些其他的相关母型 mRNA,如 *nos* mRNA 逐渐定位于后极,或者一些 mRNA 被诱导开始翻译,产生出功能蛋白质。生殖质的功能逐渐体现出来。

生殖质中虽含有许多物质,但它是一个紧密的结构体。有报道认为在果蝇极质组装中,是微丝而

不是微管维持了这些极质成分的稳定联系^[13]。

3.2 PGCs 的形成

果蝇卵裂(初期为连续的核分裂)形成合胞体(syncytium),那些到达后极的细胞核很快被新形成的核膜所包裹,以出芽(budding)的方式形成极细胞。它们是果蝇生殖细胞的“祖先”,即 PGCs。在这个 PGCs 的形成过程中,生殖质的成分 *mtlrRNA* 以及 GCL 蛋白发挥重要作用^[14,15]。*gcl* 基因是整个胚胎发育中都合子表达的基因, GCL 蛋白被定位于极质细胞核周围,形成细胞后位于向核质一侧的核膜,尤其集中于核孔附近。该基因发生突变,极细胞不能形成。它可能与核膜重建有关。*mtlrRNA* 为线粒体大核糖体 RNA,它是生殖质成份之一。当用紫外线照射果蝇胚胎后会导致极细胞缺失,然而,如果注射 *mtlrRNA* 则又可以恢复极细胞的形成,表明它是极细胞形成时不可缺少的因子。

4 PGCs 的转录行为

PGCs 相对于体细胞具有潜在的发育全能性,这是它的一个重要特点。正因为此,通过 PGCs 来获取干细胞成为当前生物技术中一个热点。果蝇 PGCs 是如何防止自身发生不可逆分化的?近年来的研究显示,这仍与生殖质的某些成分相关。

4.1 转录沉默

在果蝇中,极细胞一旦形成,它就处于转录抑制状态。而体细胞中转录早在卵孵化出(after egg laying, AEL) 1 h 就开始了,在生殖细胞里只有在 AEL 3.5 h 才能探测到少量合子转录产物,转录的基因主要是 *vas* 和 *tailless(tll)*。生殖细胞中的转录沉默与 RNA 聚合酶 II 转录活性的丧失有关。这主要是由于 RNA 聚合酶 II 的 C 末端区(carboxy-terminal domain, CTD)第 2 位丝氨酸未被磷酸化(这是在转录时延伸以及转录物加工时期 RNA 聚合酶 II 的一种必要修饰),并且生殖细胞染色体中的组蛋白缺乏甲基化修饰^[16,17]。

研究发现 3 个基因,即 *nos*、*gcl* 和 *pgc* 参与了生殖细胞的转录沉默。NOS 对阻止极细胞表达某些基因是必需的^[18],对生殖细胞特定的染色体结构组建也有重要影响^[17],但对于 PGCs 整个转录沉默的贡献可能有限。在果蝇中,*nos* 基因突变并不能改变 RNA 聚合酶 II 的 CTD 第 2 位丝氨酸去磷酸化的状态。相反,若缺失 GCL,在极细胞中可以探测到 RNA 聚合酶 II 的 CTD 第 2 位丝氨酸被高度磷酸化,最终导致这些细胞不能进一步分化为生殖细胞^[19]。

pgc 最近也被证实对于生殖细胞的转录沉默是必需的。*pgc* RNA 由母型合成,广泛分布于胞质但

富集于后极。它不编码蛋白质。*pgc* RNA 的缺失会明显地影响生殖细胞的基因表达。如正常情况下在后极体细胞中表达的基因,如 *tll*、*zen* 和 *slam* 会因此而在生殖细胞中表达,同时这些生殖细胞也表现出 RNA 聚合酶活性和组蛋白甲基化模式^[16]。正是由于 *pgc* RNA 在早期生殖细胞的出现,才使转录受到抑制。*pgc* RNA 可能直接抑制 RNA 聚合酶 II 的 CTD 磷酸化的激酶,但目前仍缺乏直接的证据。

4.2 合子转录的启动

尽管生殖质“塑造”了一群特殊的细胞 PGCs,但它是母源性的,其中的一些成分在细胞的代谢过程中需要获得新的来源,这必然需要及时启动某些基因的合子转录。在果蝇中,*vas* 是合子表达较早(AEL 3.5 h)的一个基因,*VAS* 也是在生殖细胞谱系中始终表达的蛋白质。一些实验使包围 PGCs 的中肠、后肠以及某些中胚层区域发生缺失突变,发现 *vas* 基因的合子表达并未受到影响,表明这个过程并不是因为外部因子的诱导而发生。离体培养的 PGCs 可以正常活化合子基因表达,也证明了这一点。这暗示,在果蝇生殖系中,合子型表达启动的原因仍然在内部^[20]。

5 展望

由生殖质决定的 PGCs 特化机制,是一种典型的由胞质特定区域决定细胞命运的例子。利用大规

模突变筛选和加强绿色荧光蛋白(EGFP)跟踪技术等手段,人们已对果蝇 PGCs 特化的分子机制有了日渐深入的认识。大量基因的发现有助于在其他动物中寻找同源基因,进而阐明其他动物 PGCs 特化的机制。另外,这方面的研究接触到了生命科学的前沿领域,如 RNA 的转运、定位与翻译,亚细胞成分的组装及细胞全能性维持等,这些领域不断深入的研究将会有力地推动生命科学的发展。

参考文献 (References)

- [1] Extavour CG *et al. Development*, 2003, **130**: 5869
- [2] Santos AC *et al. Curr Biol*, 2004, **14**: R578
- [3] Glotzer JB *et al. Curr Biol*, 1997, **7**: 326
- [4] Ephrussi A *et al. Nature*, 1992, **358**: 387
- [5] Erdelyi M *et al. Nature*, 1995, **377**: 524
- [6] Lipshitz HD *et al. Curr Opin Genet Dev*, 2000, **10**: 476
- [7] Webster PJ *et al. Genes Dev*, 1997, **11**: 2510
- [8] Gavis ER *et al. Nature*, 1994, **369**: 315
- [9] Breitwieser W *et al. Genes Dev*, 1996, **10**: 2179
- [10] Johnstone O *et al. Development*, 2004, **131**: 4167
- [11] Amikura R *et al. Mech Dev*, 2001, **107**: 97
- [12] Thomson T *et al. Genesis*, 2004, **40**: 164
- [13] Lantz VA *et al. Mech Dev*, 1999, **85**: 111
- [14] Iida T *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 11274
- [15] Robertson SE *et al. Dev Biol*, 1999, **215**: 288
- [16] Martinho RG *et al. Curr Biol*, 2004, **14**: 159
- [17] Schancer CE *et al. Dev Cell*, 2003, **5**: 747
- [18] Asaoka M *et al. Mech Dev*, 1998, **78**: 153
- [19] Leatherman JL *et al. Curr Biol*, 2002, **12**: 1681
- [20] Van Doren M *et al. Curr Biol*, 1998, **8**: 243

Molecular Mechanisms of Primordial Germ Cells Specilization in *Drosophila*

Zhong-Hai Guo, Xian-Jiang Kang*, Shu-Mei Mu

(The College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract In most sexually reproducing animals, primordial germ cells (PGCs) are set aside from cells in early embryo development. They will give rise to gametes that are responsible for the development of a new organism. There are two kinds of models for specilization of PGCs in animal kingdom, germ plasm decision and induction. The former is taken in *Drosophila*. The *osk* gene, which has been proved to play a crucial role in germ plasm assembly, can regulate the location and translation of its downstream genes' transcripts, such as *vas* and *tud*. Besides, transcriptional silencing, as an important feature during the specilization of PGCs, is closely relative to some components of the germ plasm in *Drosophila*, mainly including expression product of *nos*, *gcl* and *pgc*. This paper simply summarizes the research progress of PGCs' specilization in *Drosophila*.

Key words primordial germ cells; germ plasm; specilization

Received: July 11, 2005 Accepted: August 18, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30371115) and Natural Science Foundation of Hebei Province (No.303118)

*Corresponding author. Tel: 86-312-5079362, Fax: 86-312-5079364, E-mail: xjkang@mail.hbu.edu.cn