

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.01.037

性别决定相关因子的研究进展*

杨莹莹 王浩栋 张艺元 刘培源 严汉池

(天津大学生命科学学院 天津 300072)

摘要: 有性生殖是多细胞生物的一个重要特征,最常见的就是人类的性染色体 X 和 Y。性别决定(Sex determination)系统有着悠久的起源,在高等生物进化的历程中,不同物种采用的性别决定方式大相径庭,而同源转录因子在不同生物体内的功能和调控方式也是有区别的,比如 DMRT 转录因子家族,这说明性别决定机制具有高度多样性。本文介绍了近年来发现的具有代表性的性别决定相关的基因的发现过程,总结了性别决定相关转录调控因子的功能和结构方面的研究成果,从结构生物学视角来展望未来的研究方向,为进一步探索生物体内这一重大进程提供新思路。

关键词: 性别决定; DMRT 家族; FOXL2/FOXL3; Fem piRNA; Nix

中图分类号: Q132.7; Q32; Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2018)01-168-07

The Research Progress of Sex Determination Mechanisms*

YANG Ying-ying, WANG Hao-dong, ZHANG Yi-yuan, LIU Pei-yuan, YAN Han-chi

(School of Life Sciences, Tianjin University, Tianjin, 300072, China)

ABSTRACT: Sexual reproduction is an important character of multicellular organisms, the most common example are the sex chromosome X and Y. Sex determination system has a long history, some transcription factors are highly homologous to the vertebrate, such as the DMRT transcription factors family; while among some various species, the functions and regulatory mechanisms of them are different, which suggests that sex determination mechanism includes high diversity. In this article, we summarized representative researches about genes relating to sex determining and the functions and structures of transcriptional regulators, and also illustrated the feasibility of using means of structural biology to study this vital process in organisms.

Key words: Sex determination; DMRT; FOXL2/FOXL3; Fem piRNA; Nix

Chinese Library Classification(CLC): Q132.7; Q32; Q492 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)01-168-07

前言

性别是指伴随有性生殖的出现,在生物界同种个体之间普遍出现的一种形态和生理上的差异现象。它是减数分裂和配子融合进而基因组重组的结果,对真核生物是普遍的,包含一系列多种多样的系统和机制^[1]。性别决定,指有性繁殖生物中,产生性别分化,并形成种群内雌雄个体差异的机理。在细胞分化与发育过程中,由于性染色体上性别决定基因的活动,胚胎发生了雄性和雌性的性别差异。从遗传学上看,则是在有性生殖生物中决定雌、雄性别分化的机制。动物性别决定机制大致可以分为遗传性别决定(genetic sex determination, GSD)和环境性别决定(environmental sex determination, ESD)^[2]。GSD 一般都是由位于性染色体上的决定基因启动一系列性别相关基因参与的分子信号通路,从而诱导原始性腺发育成雄性(雌性)生殖腺的过程^[3]。

第一个在哺乳动物中发现的性别决定基因是定位于 Y 染色体上的 Sry (sex -determining region of Y-chromosome, Sry),该基因可以调控具有双向潜能的前体细胞分化成睾丸支持细胞或者卵巢颗粒细胞^[4],这一过程最终将会决定整个生物体的

性别^[5]。而随着近些年对脊椎动物和昆虫等多细胞生物的性别决定机制的深入研究,发现了一系列与性别决定和性别分化有关的基因、转录因子以及环境因素,它们各自以不同的机制决定生物体的性别,调节生物体的两性分化、生殖和发育,在生物体重大进程中发挥重要作用。现逐一介绍近期发现的几种性别决定相关因子的功能,总结这些因子构成的两种性别决定通路的模式;同时基于现有的 DMRT-DNA 晶体结构,从结构生物学视角来展望未来的研究方向,做一综述。

1 现有的几种代表性的性别决定系统相关因子

自哺乳动物的性别决定系统 XX/XY 发现以来,人们一直在探寻其他种类生物体的性别决定机制。伴随着越来越多关键因子的发现,我们发现很多模式生物的性别决定机制大相径庭。例如,鸟类(平胸类除外)采用 ZZ/ZW 雌性异配性别决定系统;果蝇的性别是由 X 染色体的量决定的;家蚕的性别是由雌性特异性 piRNA 决定的;爬行类是温度决定性别(temperature sex determination, TSD)的典型代表;在有些种类中性别决定并不是染色体组型单因素决定,而是基因和多种环境因素共同作用的结果。而即使是采用相同的性染色体组型,不同种类生物

* 基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划)(2015AA020101);天津大学自主创新基金项目(2015XRX-0026)

作者简介:杨莹莹(1992-),女,硕士研究生,主要研究方向:结构生物学,E-mail: yyybaby@icloud.com

(收稿日期:2017-05-28 接受日期:2017-06-22)

的性别决定因子也不尽相同。这一部分主要列举几种代表性的性别决定因子的发现历程,并对其功能作初步介绍。

1.1 XX/XY 系统相关的性别决定因子

1.1.1 哺乳动物的性别决定基因 Sry 哺乳动物的性别是由 XY 性染色体决定的(XX 为雌性,XY 为雄性)。这两条染色体包含的基因数目相差甚远,X 染色体上约有 1000 条基因而 Y 染色体上只有几十个。性染色体上的大多数基因并不是直接与性别决定有关,分化为雌性还是雄性只依赖于单一的主要的性别决定基因座 Sry^[1]。Sry 位于 Y 染色体短臂上 pY53.2(2.1 kb) 区段^[6],在胚胎中的表达会活化雄性特异性的调控网络,启动睾丸的分化。当 Sry 不存在时,卵巢发育,生物体表现为雌性。

对于人类来说,卵巢和睾丸中最早可观测到的性别分化信号发生在妊娠期的第六周^[7],随后性激素在非性腺的组织和器官中启动进一步的性别分化^[8]。一旦这个发展历程出错,对个体的影响将是毁灭性的,它会导致外生殖器性征不明确或者更加难以诊断的不孕不育^[1]。Sry 基因在小鼠交配后第 10~13 天内于生殖嵴体细胞表达,第 11.5 天时表达量最高,此时正是小鼠性别开始发生明显分化的时期,这种极短时间的表达也表明 Sry 基因启动睾丸的发育,但却不维持睾丸的存在^[9]。与小鼠不同,人的 Sry 基因在生殖腺内会持续表达直到成年,暗示 Sry 可能在人的精子发生过程也起到一定作用^[10]。

Sry 作为雄性发育的总开关基因,其表达的 SRY 蛋白是一个包含 204 个氨基酸的转录因子,其中有一段编码 79 个氨基酸的保守序列,称为 HMG 盒 (high mobility group,HMG),是 SRY 的主要功能区^[11]。该结构域与 DNA 的(A/T)ACAA(T/A)序列结合,使后者产生 60~85 度的弯曲,因此得名。对来自 XY 女性个体的突变 SRY 蛋白进行生物化学分析发现,DNA 结合和弯曲对于 SRY 发挥功能至关重要。而且大多数 XY 女性都具有 HMG 结构域的突变。

SOX 转录因子家族 (SRY-related HMG box) 含有一个与 SRY 同源的 HMG 结构域,其结构高度保守。它们可以作为细胞分化的转换开关,在胚胎发生和许多器官发育中发挥重要作用。目前编码该家族的 sox 基因已经广泛地在哺乳类、鸟类、爬行类、昆虫及鱼类中被发现,在小鼠和人中包含 20 个成员,且在雌雄性别个体的基因组中都存在。SOX4、SOX5、SOX6 和 SOX9 在雄性中的表达与精子发生相关,其中 SOX9 最为重要:sox9 是 SRY 仅有的直接调节目标基因,在 SRY 表达后,SRY 蛋白锚定在 sox9 的 TESCO 区域并激活其表达^[12],而后 SOX9 启动雄性发育的信号通路^[13]。

1.1.2 青鳞鱼的性别决定基因 dmrt1bY 在发现了 Sry 后,一直未找到在脊椎动物中的能够决定性别的同源基因。为了解决这一难题,Masaru 等^[14]运用鸟枪法测序锁定了位于青鳞鱼(*Oryzias latipes*) 性染色体上特定区域的 27 条基因,发现其中的三条 PG17、PG21 和 PG30 在性别分化阶段表达,并且只有 PG17 只与 Y 染色体有关。进化分析显示 PG17 来源于 dmrt1,因此命名为 dmrt1bY。dmrt1bY 定位于 Y 染色体上的性别决定区域,它编码的蛋白命名为 DMY。DMY/dmrt1bY 也是第一个在非哺乳类的脊椎动物中发现的 DMRT 家族蛋白。

为了进一步确认 dmrt1bY 在性别分化中的决定性作用,他们通过大量筛选找到两种 medaka 天然突变体,基因型分别为

XYwAwr 和 XYwSm。其中基因型为 XYwAwr 的突变体在 dmrt1bY 的第三个外显子区包含一个单一核苷酸突变导致 DMY 的翻译提前终止,不能够表达完整的 DMY 蛋白;而基因型为 XYwSm 的突变体存在未知的转录缺陷导致 DMY 不能表达。这两种突变体都表现出雌性的第二性征,表明失去 DMY 蛋白功能导致鱼发生了性别反转。因此,DMY/dmrt1bY 的表达对生殖细胞的性别决定至关重要。在青鳞鱼中,dmrt1bY 的功能与 Sry 是等价的,是性别决定的关键。

1.1.3 埃及伊蚊的性别决定基因 Nix^[15] 早在很多年前,研究者们就发现雄性埃及伊蚊的发育是由被称作 M 因子的 Y 染色体类似区域控制的。但是由于该 M 因子处于高度重复区域,很难将其鉴别出来,使得很长一段时间内,在整个昆虫类中都未能发现决定性别的任何 M 因子^[16,17]。

为了找到这个雄性特有的基因基因,Andrew 和他的同事们^[15]对埃及伊蚊两个不同株 Liverpool 和 khw 的雌蚊和雄蚊的染色体分别测序,接着运用染色体商数法 CQ(chromosome quotient),发现了一个与 transformer-2 有一定的同源关系的新基因。transformer-2 参与黑腹果蝇(*drosophila melanogast*)性别决定的两个关键操纵子 doublesex (dsx)和 fruitless (fru)的剪接作用^[18]。接着采用荧光原位杂交 FISH(Fluorescence in situ hybridization)技术,确定了该基因定位于 M 因子中且验证它只存在于雄蚊体内。它的转录本在产卵 3-4 小时后可被检测出来,这一时间段与性别建立初期相吻合。因此推测它就是埃及伊蚊性别决定的关键基因,命名为 Nix。

他们进一步研究了 nix- 雄蚊雌性化的分子机制。dsx 和 fru 是大多数昆虫性别决定通路中的重要基因,它们分别会经历一个的特异剪接,主导了第二性征的发育进程^[15,19-22]。nix- 的雄蚊产生的 dsx 和 fru 剪接变体,分别是野生型的 0.47 和 1.44 倍。通过 RNA 测序来检测具有性别偏向性的基因在 nix- 雄蚊中的表达,发现有性别偏向性基因的表达总体呈现雌性化趋势,这与观察到的形态学特征是一致的,且符合 dsx 和 fru 的重要调控功能。因此,nix 对于雄性发育的发起至关重要,并行使针对两个性别分化主调节器的上游职能。

埃及伊蚊是人类健康的一大威胁,因为它们高度适应人类环境,是少部分能够将病原体传给人类的蚊子,而且只有成年雌蚊会携带病原体导致登革热和黄热病的传播^[21,22],因此它的性别决定一直引起生物学家的高度重视。Nix 不仅是人们首次在昆虫中发现的决定性别的基因,它的发现更为我们提供了绝佳的机会通过生物学干预手段作用于 M 因子,使得雌蚊转变为无害的雄蚊,在传病媒介控制策略中利用蚊子的性别差异来对抗传染病。

1.2 ZZ/ZW 系统相关的性别决定因子

采用 ZZ/ZW 这种性染色体组型的最典型动物是鸟类。在这个系统中,雄性有两条 Z 染色体,雌性拥有两条不同的性染色体 Z 和 W,W 染色体担任性别决定的作用。除了鸟类之外,爬行类、两栖类、硬骨鱼类和鳞翅目类中也都有采用这种性别决定系统的物种,但其关键因子和作用通路千差万别。对于爬行类和两栖类动物,环境(主要是温度)的影响甚至可以完全改变基因型性别,使生物体发生性反转。

1.2.1 鸟类的性别决定基因 dmrt1 虽然鸟类采用雌性异配型

性别系统,但目前研究认为位于Z染色体上的dmrt1才是鸟类雄性性别决定候选基因^[2]。dmrt1/DMRT1的表达水平与Z染色体的数量有关,而在基因型为ZW雌性中的过量表达DMRT1可以引起性逆转^[23]。因此当前倾向于认为鸟类的性别决定采用的是Z染色体剂量依赖的性别决定系统^[2]。

Dmrt基因是指与果蝇的性别决定基因Dsx(double-sex)基因和线虫Mab-3基因同源的基因^[24,25],它们构成的基因家族所编码的蛋白质都包含一个高度保守的DM(double-sex and male aberrant-3 relative domain)结构域^[26],因此构成一类高度保守的转录调控因子DMRT(double-sex and mab-3 related transcription factor)。主要参与性别决定和性别分化。编码人类DMRT1蛋白的基因dmrt1位于9号染色体短臂上,缺失该基因会导致人类胎儿的性别反转,即表现为雄性胎儿出生时的雌性化^[5]。此外,有些DMRT对某些器官的发育和功能维持也起着重要作用,参与胚胎的发育^[27]和配子的形成^[28]。

1.2.2 非洲爪蟾的性别决定基因 dmW 两栖动物的性别决定机制比较复杂,是温度、类固醇激素、遗传因素共同作用的结果。主要具有XX/XY和ZZ/ZW两种性别决定系统,也有某些种类的染色体组型为极不寻常的0W雌/00雄^[2]。因此目前仅在采用ZZ/ZW系统的非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)中鉴定出性别决定基因dmW。

Yoshimoto等^[29]分析了Dmrt1基因在非洲爪蟾(*X. laevis*)性别决定时期的表达规律时,发现在W染色体上还存在一个特殊的Dmrt1拷贝,命名为dmW基因。进一步验证其功能发现将dmW转入ZZ个体时,ZZ个体性腺呈现出卵巢的结构特点,并且检测到dmW的表达,相应的cyp19和foxl2基因也表现出与在ZW个体类似的转录和表达水平,表明dmW的导入启动了雌性特异性基因的表达^[30]。dmW基因敲除则使得ZW个体表现出ZZ个体的性腺特征。因此它对光滑爪蟾(*X. laevis*)性别决定和卵巢发育都起到了主导作用。

1.2.3 家蚕的性别决定因子 Fem 与鸟类和一些种类的爬行动物类似,家蚕(*Bombyx mori*)也采用WZ性别决定系统,W染色体上存在一个显性的雌性化基因。但由于W染色体通常几乎完全被转座子占据,研究者们之前并没有发现可以编码功能性蛋白的基因^[31,32]。2014年,来自东京大学的Takashi等^[33]发现一个来源于W染色体的雌性特有的piRNA,它是雌性决定的重要因子,被命名为Fem(Feminizer,GenBank: AB840787.1)。

研究者首先检测了雌性和雄性家蚕胚胎的Bmdsx(a doublesex orthologue of *B. mori*)基因,该基因在家蚕的性别分化中至关重要^[34,35],它可以通过性别特异性的可变剪接产生雌性和雄性的所特有的mRNA,从而决定不同性别分化方向^[36]。结果表明,在产卵21-24h后(post-oviposition, hpo),在雄性胚胎中,可以明显地观察到雄性特异性剪接变体的转录;然而在雌性胚胎中几乎没有,这证明雌性Bmdsx在胚胎发育早期阶段不发生转录。W染色体传输雌性化信号在21hpo之后才开始出现。

研究者们对不同时段的雌雄性胚胎分别进行测序,来鉴定在雌性和雄性胚胎中表达转录本的差异。其中的一个位于W染色体上的非编码序列(comp73859_c0),在雌性胚胎整个发育过程中都持续被检测到,RT-PCR检测表明它的表达水平在18-21 hpo达到顶峰,随后在胚胎形成期逐渐下降。这个序列与

任何已知的序列都没有同源性,也不能编码一个功能性的蛋白。研究者们认为它是一个piRNA前体。通过使用piRNA抑制剂他们发现在雌性胚胎中出现了雄性Bmdsx,而雄性胚胎则没有影响;使用小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)处理piRNA通路的两个核心组件Siwi及Bmago3^[37,38]时,发现在沉默Siwi后,雌性胚胎会产生雄性Bmdsx,但对雄性胚胎没有影响,而沉默Bmago3在两种胚胎中都不会对Bmdsx产生影响。这表明雌性胚胎需要此piRNA才能维持雌性Bmdsx,且Siwi对piRNA的产生是必需的。

接着研究者们鉴定出一个可与Fem互补的序列Masculinizer(Masc),通过5'RACE(modified 5'rapid amplification of cDNA ends)实验^[39],发现Masc mRNA是Fem piRNA的剪切靶点,PIWI-piRNA复合物在他们互补区域的第10和第11位之间剪切^[40,41];同时,PIWI-Masc piRNA复合体也可以剪切Fem RNA。

Masc基因(GenBank: AB840788.1)位于Z染色体一个不典型基因的第九个外显子上,编码了一个新的CCCH型锌指蛋白。进化分析显示该蛋白形成了一个新的鳞翅目特异的蛋白家族,通过在全Z染色体上抑制基因表达,在胚胎时期控制剂量补偿和雄性化^[33]。

1.3 参与性腺发育的转录因子 FOXL2 和 FOXL3

叉头转录因子2(Forkhead transcriptional factor 2, FOXL2)是Forkhead/HNF-3相关转录因子家族中的一员,是由位于常染色体上的foxl2基因编码的一类重要的转录因子,通过它的叉头结构与类固醇调控因子1(steroidogenic factor-1, SF1)的配体结合区域相结合成为异源二聚体,强化和促进cyp19a1a的转录表达,促进雄激素激素转化^[42]。

在雌性哺乳动物体内,性别决定过程是最主要的一环但不是最终的一步:这一过程中若FOXL2转录因子缺失,会直接导致已成熟的卵巢颗粒细胞重调为睾丸支持细胞^[43]。而且在哺乳动物的整个成年期,需要FOXL2连同雌激素受体强烈抑制睾丸支持细胞促进基因Sox9以维持雌性动物卵巢的形态和功能。

foxl3是foxl2的一个古老的复制本,在硬骨鱼类的生殖腺中表达^[44-46]。在生殖腺开始性别分化的阶段,foxl3在生殖细胞中转录并表达FOXL3蛋白,基因型XX和XY的胚胎中都可检测到^[47,48]。

Nishimura^[49]等培育了两种突变体青鳉鱼来检测foxl3在生殖腺性别分化中的作用,这两种突变体都只能表达FOXL3的N端一小段氨基酸因而丧失了FOXL3的功能。在孵化的一周后即卵母细胞的形成时期,突变体foxl3⁻XX生殖腺内并未产生卵母细胞,而是充满了雄性的囊性生殖细胞。所有突变品系生殖腺的边缘区域有类精细胞出现,并且检测到这些细胞能够表达鱼精蛋白。最重要的是,一些精子发生的标志基因都在foxl3⁻XX的生殖细胞中表达,说明突变体青鳉鱼的生殖腺发生性反转。另一方面,foxl3⁻XY的生殖腺在形态上完全正常,且能够产生具有活性的精细胞,表明foxl3对雄性的发育不是必要的。而在雌性生殖细胞中foxl3对精子形成的抑制是硬骨鱼类雌性性别维持网络的重要组成部分,缺乏foxl3的雌性青鳉鱼将会发生生殖腺性反转。

综上所述我们得知FOXL2和FOXL3是与生殖细胞性别分化

相关的生殖细胞内在因子,参与雌性性腺的发育、卵母细胞的分化以及性腺功能的维持,是性别维持机制的重要因子。

1.4 温度覆写性别的机制^[50]

很多爬行动物有着温度依赖性的性别决定机制(temperature-dependent sex determination, TSD),温度在一定程度上影响着后代的性别。广泛分布的澳洲中部的松狮蜥 (*Pogona vitticeps*)是第一个被观察到的温度可以完全覆写性别的爬行动物,并且从遗传学角度得到证实。

松狮蜥采用雌性异配型性别系统,ZZ 为雄性(ZZm),ZW 为雌性(ZWf)。但是实验条件下高的孵化温度会导致染色体为雄性的动物变成性反转的雌性(ZZf)。Holleley 等^[50]应用性染色体标记物对 131 个野外捕获的个体进行 PCR,鉴定出 11 个性反转的 ZZ 雌性,与正常雄性在实验室条件下交配获得的受精卵在较低的孵化温度(28℃)下全部产生基因型为 ZZ 的雄性幼体(ZZm× ZZf)。接着他们比较了一系列温度变化范围内性反转雌性(ZZf)和正常雌性(ZWf)后代的性别比例。发现在 22℃ 到 32℃,染色体是决定性别的主要因素;当温度超过 32℃时,温度开始影响甚至推翻性染色体对性别的决定作用,引起性反转;在 36℃时,雌性的性别比例达到 0.96。而性反转雌性的后代比例完全遵循了温度决定性别(TSD)物种的规律,性染色体组型完全不影响性别。因此,性反转的母系在低温时只能产生雄性后代,在 33℃产生的后代里雌性与雄性比例为 3:1,在 34 摄氏度时,孵化出的后代中雌性占了大多数(0.75)。然而,与正常的雌性(ZWf)比较起来,性反转的雌性(ZZf)的子代自身具有更高的温度敏感性,它们子代发生性反转的孵化温度要更低。

整个研究过程中,野生型的 ZZ 性反转雌性个体的比例逐年上升,从 2003 年的 6.7%,到 2004 年的 13.6%,到 2011 年的 22.2%,暗示了一个可能但不显著的增长趋势。在实验室条件下实现的基因型到温度依赖性的性别决定的快速转变,客观上只是加速了自然条件下的演化进程。这种短时间内创造出的温度敏感 ZZ 种系动物向我们揭示了一个新奇的,温度诱导的进化通路,展现了物种对极端的温度条件做出快速应答且迅速进化的过程,会更适应全球气候快速变暖。归根结底,性别决定模式转变的关键诱因是物种的生存与繁衍。

2 两种分子机制模型

随着研究的深入,越来越多性别分化和生殖发育相关基因和转录因子被发现,通过对它们进行一系列功能验证实验,人们逐渐地完善了性别调控网络,并提出了两种主要的性别决定通路的模式。

2.1 调控家蚕性别的 ping-pong 机制^[33]

piRNA 的生物起源是一种涉及到两个不同的 PIWI 蛋白的乒乓机制(ping-pong mechanism)。正义与反义 piRNA 有十个核苷酸的重叠,称为 ping-pong 信号,是 PIWI 蛋白催化裂解反应的特点^[40,41]。研究者们^[33]通过发现 Fem piRNA 和它的 ping-pong 伴侣,从而总结完善出了 Fem piRNA 的乒乓模型。该模型由 Fem piRNA 及 Masc piRNA 作为伙伴,配合 Siwi 及 BmAgO3 两种蛋白共同组成。Fem piRNA 优先与 Siwi 结合,形成 PIWI-Fem piRNA 复合物剪切 Masc mRNA,产生 Masc piRNA,同时产生雌性 Bmdsx,且 Fem piRNA 对于雌性保持是必

须的;Masc piRNA 可以与 BmAgO3 结合,形成 PIWI-Masc piRNA 复合物,也可以剪切 Fem RNA。

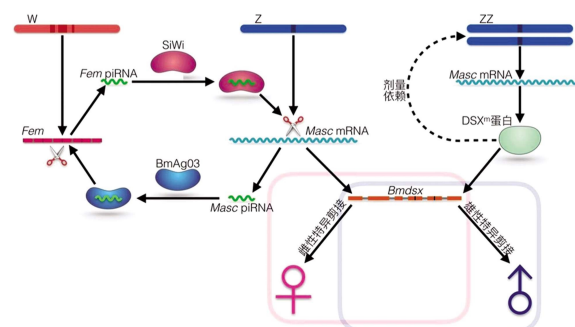


图 1 家蚕(*B. mori*)性别决定通路模式图^[33]

Fig. 1 A proposed model for the sex determination pathway in *B. mori*

这一发现阐明了一个困扰昆虫遗传学界将近一个世纪的问题,解释了 W 染色体决定家蚕雌性特征的机制,不仅鉴定出鳞翅目中一个主要性别决定因子 -Fem piRNA,也确定了一个新的 Fem piRNA / Masc / Bmdsx 性别决定通路。

2.2 哺乳动物转录调控因子在性别决定和性别维持中的作用

在小鼠的生殖细胞和睾丸支持细胞中,DMRT1 蛋白都会表达^[51-53]。Matson 等^[5]发现,在正常情况下,雄性胚胎的睾丸支持细胞中,DMRT1 会抑制 FOXL2 的表达,维持 SOX9 的正常水平;而当 *dmrt1* 被敲除时,FOXL2 蛋白的表达水平大大提高,同时 SOX9 的表达受到抑制,最终导致雄性小鼠性腺畸形。即使是成年小鼠,其睾丸支持细胞在缺乏 DMRT1 转录因子时,激活 FOXL2 也会使支持细胞重调为卵巢颗粒细胞。

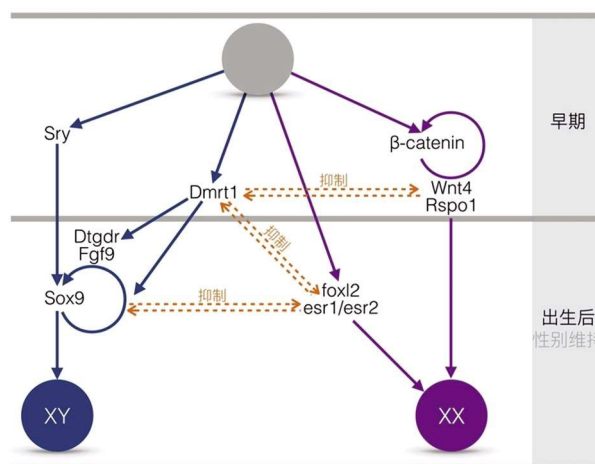


图 2 哺乳动物的性别决定和性别维持分子机制示意图^[5]

Fig. 2 A proposed model for the sex determination and postnatal sex maintenance pathways in mammals

由此他们推测了一个 DMRT1 主导的性别维持机制:在哺乳动物性别决定的早期,SRY 上调 *sox9* 的表达随后 *sox9* 的表达水平维持在一个自调节的状态,与成纤维细胞生长因子(Fibroblast growth factor 9, FGF9) 和前列腺素 D2 信号(prostaglandin D receptor, Ptgdr)一起进入活化的自调节循环,刺激和维持 *sox9* 基因在雄性性腺中的表达,形成雄性基因调节网络,*sox8* 作为 *sox9* 的候选基因也参与调控;同时在不成熟的

雌性性腺中, WNT4 和 RSPO1 信号维持 β -连环蛋白的表达水平,抑制 SOX9 的表达。成年雌性卵巢中, β -连环蛋白活性会衰减,之后 FOXL2 和雌激素受体(Estrogen receptors,ESR1/2)活化抑制 sox9 的表达来确保卵巢细胞的性征。并且对于雌性来说,这种对 sox9 转录抑制需要始终持续以阻止卵巢向睾丸的分化转移。因此在这个机制中,性别决定可以看做 Sry 激活 Sox9 的雄性基因调节网络与 WNT/ β -catenin 相关的雌性基因调控网络在胚胎性腺中的斗争。

3 现有蛋白结构的意义

人类 DMRT1 包含 373 个氨基酸残基^[54],72~118aa 构成高度保守的 DNA 结合域^[55,56]。Murphy^[57]等通过在大肠杆菌中表达融合 SUMO 标签的 hDMRT167-136,并与靶基因(5'-CGA-GATTGATACATTGTTGCTCGA-3')以摩尔比 2:1 混合,在 20℃ 条件下得到了蛋白质-DNA 混合物的晶体,通过 X 射线晶体衍射技术解析了该复合物的晶体结构。

DM 结构域与 DNA 的结合方式揭示了一种独特的蛋白质-DNA 相互作用。在这个晶体结构中,DMRT1 以三聚体的方式与 DNA 结合,每个亚基的锌指结构都跨越了 DNA 双股螺旋的小凹槽,与磷脂骨架接触。同时负责识别的 α 螺旋嵌入 DNA 大沟槽,构成特异性结合的基础。有趣的是,亚基 A 和 B 的识别螺旋是以反向平行的方式位于 DNA 大沟槽同一边,第三个亚基 C 位于 DNA 大沟槽的另一边。在这个结构中,亚基 A 和 B 分别与 DNA 结合,它们的锌指元件和识别螺旋形成的角度不同。它们与 DNA 的三个结合位点分别是第 111 位的 R,第 119 位的 V 和第 123 位的 R(R111, V119 和 R123)。在大沟槽的另一边,亚基 C 也是通过这三个位点与 DNA 结合。亚基 B 和 C 锌指结构最 N 端的第 72 位的 R(R72)和 DNA 碱基对之间形成氢键。这三个单体都尽可能大面积地接触 DNA 骨架,使得结构稳定。同时,它们之间也产生相互作用:亚基 A 和 B 之间通过疏水作用互作,亚基 B 和 C 之间形成氢键。整体结构兼具保守性和稳定性。

此外,Murphy^[57]等推测 DMRT1 与 DNA 结合方式是由靶基因的序列和形状决定的。根据凝胶迁移实验(EMSA)的结果,DMRT1 可能形成二聚体、三聚体和四聚体与 DNA 结合形

成三种独特的复合物以发挥不同的功能。

不同于功能上发现的模糊性,解析出结构能够更直观地展现目的基因的特异性,帮助我们更快筛选出该性别决定通路上的 DMRT 直接调控基因,更精确地说明这个通路上的上下游关系,从分子水平上解释性别决定的机理,为完善整个分子作用机制提供了有力论据和可靠的理论支持。

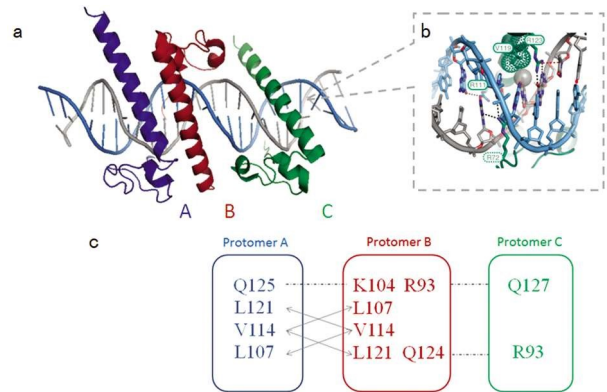


图 4 DMRT1 与 DNA 复合物结构图^[57]

(a)hDMRT1-DNA 复合物结构概览 亚基 A 和 B 分别为蓝色和红色,亚基 C 为绿色(b)单个亚基与 DNA 结合的主要位点(R111, V119 和 R123)(c)亚基之间的相互作用位点示意图,其中亚基 A 和 B 之间疏水作用(箭头表示),亚基 A 与亚基 B/亚基 B 与亚基 C 之间的氢键(虚线)

Fig.4 The structure of DMRT1-DNA complexes^[57]

4 小结与展望

性别决定是生命历程中最重要的进程之一,关于性别决定的研究一直在进行,也不断的丰富我们对新的性别系统的认识。通过对不同物种的性别决定机制研究的总结(表 1),我们发现性别决定系统是多种多样的,这是基因组和自然环境演化共同的结果。从果蝇到人,分子机制只保持了最低限制的保守,在分子水平上,不同生物体通过不同的信号通路来决定个体的性别。通过对比,我们也可以发现一些主要决定基因的保守性,比如脊椎动物有一套共同的转录调节机制,涉及到 DMRT1, SOX9, FOXL2 和一些信号分子。

表 1 已知的主要的性别决定相关因子^[1]

Table 1 Known master sex-determining genes

Species	Master sex determining gene	Sex-determining mechanisms	Gene paralog	Function	Reference
mammals	Sry	XY	Sox3	transcription factor	[58]
medaka	dmrt1Y	XY	dmrt1	transcription factor	[14]
Aedes aegypti	nix	XY	transformer-2	mRNA splicing	[15]
Xenopus laevis	dmW	ZW	dmrt1	transcription factor	[29]
Pogona vitticeps	Temperature	ZW	-	-	[50]
Bombyx mori	Fem	ZW		piRNA	[33]
chicken	dmrt1	dose-dependent Z	dmrt1	transcription factor	[1]

虽然大量功能性实验能够证明这些基因和转录因子之间的相互作用,但是这只是表观上的影响,只能解释部分原因,

是片面的且存在争议的。如何从根本上客观直接地展现它们之间的相互作用和调控关系需要我们从结构上入手,在分子水平

上说明问题。基于这些分子间的影响和联系是多变的且大多数是未知的,而目前只解析出 DMRT1 的结构,我们仍需要进行大量研究,尤其是在各个转录因子结构领域进行突破。寻找这些关键基因和转录调控因子并解析它们的结构,可以让我们对它们的功能有更好的认知,也为我们解决多方面的生态问题和遗传因素的疾病提供坚实的理论依据。

参考文献(References)

- [1] Bachtrog D, Mank J E, Peichel C L, et al. Sex determination: why so many ways of doing it?[J]. PLoS Biol, 2014, 12(7): e1001899
- [2] 周林燕, 张修月, 王德寿. 脊椎动物性别决定和分化的分子机制研究进展[J]. 动物学研究, 2004, 25(1): 81-88
Zhou Lin-yan, Zhang Xiu-yue, Wang De-shou. Advances on Molecular Mechanism of Sex Determination and Differentiation of Vertebrates[J]. Zoological Research, 2004, 25(1): 81-88
- [3] 邵长伟, 陈松林. 脊椎动物性别决定基因与性染色体演化机制[J]. 农业生物技术学报, 2012, (12): 1463-1474
Shao Chang-wei, Chen Song-lin. Sex-determining Genes and Its Association with Mechanism of Sex Chromosome Evolution in Vertebrate[J]. Journal of Agriculture Biotechnology, 2012, (12): 1463-1474
- [4] Koopman P, Gubbay J, Vivian N, et al. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry [J]. Nature, 1991, 351(6322): 117-121
- [5] Matson C K, Murphy M W, Sarver A L, et al. DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis [J]. Nature, 2011, 476(7358): 101-104
- [6] Koopman P. The molecular biology of SRY and its role in sex determination in mammals[J]. Reprod Fertil Dev, 1995, 7(4): 713-722
- [7] Eggers S, Sinclair A. Mammalian sex determination-insights from humans and mice[J]. Chromosome Res, 2012, 20(1): 215-238
- [8] Ono M, Harley V R. Disorders of sex development: new genes, new concepts[J]. Nat Rev Endocrinol, 2013, 9(2): 79-91
- [9] Koopman P, Munsterberg A, Capel B, et al. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation [J]. Nature, 1990, 348(6300): 450-452
- [10] Salas-Cortes L, Jaubert F, Bono M R, et al. Expression of the human SRY protein during development in normal male gonadal and sex-reversed tissues[J]. J Exp Zool, 2001, 290(6): 607-615
- [11] Nagai K. Molecular evolution of Sry and Sox gene [J]. Gene, 2001, 270(1-2): 161-169
- [12] Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer[J]. Nature, 2008, 453(7197): 930-934
- [13] Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. Sex determination and gonadal development in mammals[J]. Physiol Rev, 2007, 87(1): 1-28
- [14] Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, et al. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish [J]. Nature, 2002, 417(6888): 559-563
- [15] Hall A B, Basu S, Jiang X, et al. A male-determining factor in the mosquito *Aedes aegypti*[J]. Science, 2015, 348(6240): 1268-1270
- [16] Charlesworth D, Mank J E. The birds and the bees and the flowers and the trees: lessons from genetic mapping of sex determination in plants and animals[J]. Genetics, 2010, 186(1): 9-31
- [17] Tree of Sex: a database of sexual systems [J]. Sci Data, 2014, 1: 140015
- [18] Salz H K, Erickson J W. Sex determination in *Drosophila*: The view from the top[J]. Fly (Austin), 2010, 4(1): 60-70
- [19] Whyard S, Erdelyan C N, Partridge A L, et al. Silencing the buzz: a new approach to population suppression of mosquitoes by feeding larvae double-stranded RNAs[J]. Parasit Vectors, 2015, 8: 96
- [20] Salvemini M, D'Amato R, Petrella V, et al. The orthologue of the fruitfly sex behaviour gene fruitless in the mosquito *Aedes aegypti*: evolution of genomic organisation and alternative splicing[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e48554
- [21] Wise D V M, Nimmo D, Betz J, et al. Genetic elimination of dengue vector mosquitoes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(12): 4772-4775
- [22] Papathanos P A, Bossin H C, Benedict M Q, et al. Sex separation strategies: past experience and new approaches [J]. Malar J, 2009, 8 Suppl 2: S5
- [23] Smith C A, Katz M, Sinclair A H. DMRT1 is upregulated in the gonads during female-to-male sex reversal in ZW chicken embryos[J]. Biol Reprod, 2003, 68(2): 560-570
- [24] Zhu L, Wilken J, Phillips N B, et al. Sexual dimorphism in diverse metazoans is regulated by a novel class of intertwined zinc fingers[J]. Genes Dev, 2000, 14(14): 1750-1764
- [25] Burtis K C, Baker B S. *Drosophila* doublesex gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides [J]. Cell, 1989, 56 (6): 997-1010
- [26] 肖调义, 吴宝林, 葛熹凯, 等. 中国大鲵 *Dmrt* 基因 DM 结构域的克隆及序列分析[J]. 水生生物学报, 2009, (01): 89-93
Xiao Tiao-yi, Wu Bao-lin, Ge Xi-kai, et al. Cloning and Sequencing DM Domain of the *Dmrt* Gene from the Chinese Giant Salamander, *Andrias da vidianus*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2009, (01): 89-93
- [27] Bellefroid E J, Leclerc L, Saulnier A, et al. Expanding roles for the evolutionarily conserved *Dmrt* sex transcriptional regulators during embryogenesis[J]. Cell Mol Life Sci, 2013, 70(20): 3829-3845
- [28] Zarkower D. DMRT genes in vertebrate gametogenesis [J]. Curr Top Dev Biol, 2013, 102: 327-356
- [29] Yoshimoto S, Okada E, Oishi T, et al. Expression and promoter analysis of *Xenopus* DMRT1 and functional characterization of the transactivation property of its protein [J]. Dev Growth Differ, 2006, 48(9): 597-603
- [30] Okada E, Yoshimoto S, Ikeda N, et al. *Xenopus* W-linked DM-W induces *Foxl2* and *Cyp19* expression during ovary formation [J]. Sex Dev, 2009, 3(1): 38-42
- [31] Abe H, Seki M, Ohbayashi F, et al. Partial deletions of the W chromosome due to reciprocal translocation in the silkworm *Bombyx mori*[J]. Insect Mol Biol, 2005, 14(4): 339-352
- [32] Abe H, Mita K, Yasukochi Y, et al. Retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. Cytogenet Genome Res, 2005, 110(1-4): 144-151
- [33] Kiuchi T, Koga H, Kawamoto M, et al. A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm[J]. Nature, 2014, 509(7502): 633-636
- [34] Suzuki M G, Funaguma S, Kanda T, et al. Analysis of the biological

- p>functions of a doublesex homologue in
- Bombyx mori*
- [J].
- Dev Genes Evol*
- , 2003, 213(7): 345-354
- [35] Suzuki M G, Funaguma S, Kanda T, et al. Role of the male BmDSX protein in the sexual differentiation of *Bombyx mori* [J]. *Evol Dev*, 2005, 7(1): 58-68
- [36] Ohbayashi F, Suzuki M G, Mita K, et al. A homologue of the *Drosophila* doublesex gene is transcribed into sex-specific mRNA isoforms in the silkworm, *Bombyx mori*[J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2001, 128(1): 145-158
- [37] Kawaoka S, Minami K, Katsuma S, et al. Developmentally synchronized expression of two *Bombyx mori* Piwi subfamily genes, SIWI and BmAGO3 in germ-line cells [J].*Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 367(4): 755-760
- [38] Kawaoka S, Hayashi N, Suzuki Y, et al. The *Bombyx* ovary-derived cell line endogenously expresses PIWI/PIWI-interacting RNA complexes[J]. *RNA*, 2009, 15(7): 1258-1264
- [39] Watanabe T, Tomizawa S, Mitsuya K, et al. Role for piRNAs and noncoding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse *Rasgrfl* locus[J]. *Science*, 2011, 332(6031): 848-852
- [40] Gunawardane L S, Saito K, Nishida K M, et al. A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*[J]. *Science*, 2007, 315(5818): 1587-1590
- [41] Brennecke J, Aravin A A, Stark A, et al. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*[J]. *Cell*, 2007, 128(6): 1089-1103
- [42] Wang D S, Kobayashi T, Zhou L Y, et al. *Foxl2* up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with ad4 binding protein/steroidogenic factor 1[J]. *Mol Endocrinol*, 2007, 21(3): 712-725
- [43] Uhlenhaut N H, Jakob S, Anlag K, et al. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation [J]. *Cell*, 2009, 139(6): 1130-1142
- [44] Baron D, Cocquet J, Xia X, et al. An evolutionary and functional analysis of *FoxL2* in rainbow trout gonad differentiation[J]. *J Mol Endocrinol*, 2004, 33(3): 705-715
- [45] Crespo B, Lan-Chow-Wing O, Rocha A, et al. *foxl2* and *foxl3* are two ancient paralogs that remain fully functional in teleosts[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 194: 81-93
- [46] Geraldo M T, Valente G T, Braz A S, et al. The discovery of *Foxl2* paralogs in chondrichthyan, coelacanth and tetrapod genomes reveals an ancient duplication in vertebrates[J]. *Heredity (Edinb)*, 2013, 111(1): 57-65
- [47] Saito D, Morinaga C, Aoki Y, et al. Proliferation of germ cells during gonadal sex differentiation in medaka: Insights from germ cell-depleted mutant *zenzai*[J]. *Dev Biol*, 2007, 310(2): 280-290
- [48] Nishimura T, Tanaka M. Gonadal development in fish [J]. *Sex Dev*, 2014, 8(5): 252-261
- [49] Nishimura T, Sato T, Yamamoto Y, et al. *foxl3* is a germ cell-intrinsic factor involved in sperm-egg fate decision in medaka [J]. *Science*, 2015, 349(6245): 328-331
- [50] Holleley C E, O'Meally D, Sarre S D, et al. Sex reversal triggers the rapid transition from genetic to temperature-dependent sex[J]. *Nature*, 2015, 523(7558): 79-82
- [51] Matson C K, Murphy M W, Griswold M D, et al. The mammalian doublesex homolog DMRT1 is a transcriptional gatekeeper that controls the mitosis versus meiosis decision in male germ cells [J]. *Dev Cell*, 2010, 19(4): 612-624
- [52] Krentz A D, Murphy M W, Kim S, et al. The DM domain protein DMRT1 is a dose-sensitive regulator of fetal germ cell proliferation and pluripotency [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(52): 22323-22328
- [53] Kim S, Bardwell V J, Zarkower D. Cell type-autonomous and non-autonomous requirements for *Dmrt1* in postnatal testis differentiation [J]. *Dev Biol*, 2007, 307(2): 314-327
- [54] Zhu L, Wilken J, Phillips N B, et al. Sexual dimorphism in diverse metazoans is regulated by a novel class of intertwined zinc fingers[J]. *Genes Dev*, 2000, 14(14): 1750-1764
- [55] Raymond C S, Shamu C E, Shen M M, et al. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes [J]. *Nature*, 1998, 391(6668): 691-695
- [56] Erdman S E, Burtis K C. The *Drosophila* doublesex proteins share a novel zinc finger related DNA binding domain[J]. *EMBO J*, 1993, 12(2): 527-535
- [57] Murphy M W, Lee J K, Rojo S, et al. An ancient protein-DNA interaction underlying metazoan sex determination[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22(6): 442-451
- [58] Foster J W, Graves J A. An SRY-related sequence on the marsupial X chromosome: implications for the evolution of the mammalian testis-determining gene [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(5): 1927-1931