

一个新的性别决定基因 *DMY**

刘绪生 张树义** 梁 冰
(中国科学院动物研究所, 北京 100080)

摘要 虽然人们已经鉴定出了线虫、果蝇和哺乳动物的性别决定基因, 但直到最近才首次在非哺乳类脊椎动物中发现了性别决定基因 *DMY*. 介绍了在青鳉中发现 *DMY* 基因的经过, 发现 *DMY* 基因的意义和 *DMY* 基因在其他鱼类中的分布, 最后对未来的研究进行了展望.

关键词 *DMY*, 性别决定, 性别决定基因, 青鳉, 鱼类

学科分类号 Q492

性别是几乎所有后生动物所共有的特性. 性别决定是胚胎发育时期一个尚未分化的胚胎性腺, 确定发育为睾丸或卵巢的过程. 这一过程受一些基因的调控, 这些基因就称为性别决定基因 (sex-determining gene). 目前人们对线虫 (*Caenorhabditis elegans*)、果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 和哺乳动物的性别决定机制已比较了解, 鉴定出了主要的性别决定基因^[1,2] (图 1). 线虫的性别决定基因为 *xol-1*, 果蝇的为 *Sxl*, X 染色体与常染色体的比值决定这两个基因是否被激活, 从而启动一个级联调控

过程, 决定未分化性腺的发育方向^[1,2]. 哺乳动物的性别决定基因为 *Sry*, 位于 Y 染色体上. 在 XY 胚胎中, *Sry* 表达, 启动性腺向精巢分化; 在 XX 胚胎中, 缺乏 *Sry* 的表达, 性腺发育为卵巢^[3]. 从上述结果可知, 性别决定机制缺乏进化保守性, 在不同种类动物中是不一样的. 从进化的观点来看, 人们关于性别决定机制的知识在线虫、果蝇与哺乳动物之间存在一个巨大的缺口, 尤其是至今仍未鉴定出非哺乳类脊椎动物的性别决定基因.

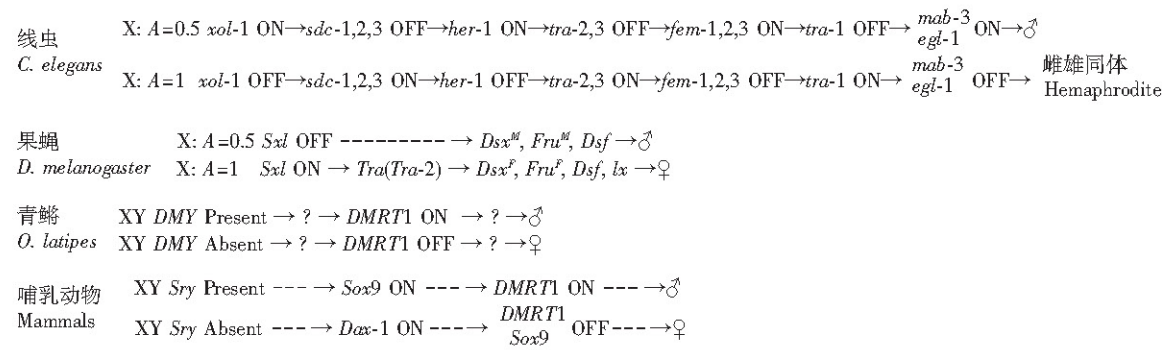


Fig. 1 Mechanisms of sex determination in *C. elegans*, *D. melanogaster*, *O. latipes* and mammals

图1 线虫、果蝇、青鳉和哺乳动物的性别决定机制
虚线箭头表示推测的调控步骤.

鱼类是脊椎动物中分布最广, 种类最多的类群. 在脊椎动物系统进化中, 鱼类处于承前启后的关键地位. 在鱼类中存在从雌雄同体到雌雄异体, 从遗传决定型到环境决定型的各种性别类型^[4], 因此鱼类是一个极好的研究性别决定机制进化的模型. 最近 Matsuda 等^[5] 从青鳉 (*Oryzias latipes*) Y 染色体性别决定区克隆到了一个基因, 功能分析表明该基因可能就是青鳉的性别决定基因. 这是首次

在鱼类, 也是首次在非哺乳类脊椎动物中发现性别决定基因, 具有重大的意义.

* 中国科学院创新项目 (KSCX 3-10Z-03) 及其重要创新方向项目 (KSCX2-1-03) 和国家自然科学基金资助项目 (30025007, 30270169).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62537132, E-mail: zhangsy@ a-1. net. cn

收稿日期: 2003-05-15, 接受日期: 2003-06-28

1 青鳉中 *DMY* 基因的发现

青鳉是一种研究得较多的小型模式鱼类。青鳉具有 XX/XY 型性别决定系统，雌雄个体间很容易通过一些第二性征区分开。以前的研究已构建了 Y 染色体的遗传连锁图谱，并发现了一些性连锁的分子和表型标记^[6]，因此青鳉很适合用来研究鱼类性别决定的分子机制。

Matsuda 等^[5]以青鳉的几个近亲交配系为材料，利用重组断点分析法（recombinant breakpoint analysis）将青鳉的性别决定区定位于 Y 染色体 530 kb 的区段上。随后他们发现了一个性反转的 XY 雌性个体，分析发现，这一个体的 Y 染色体性别决定区缺乏一段 250 kb 的序列，因而他们将青鳉的性别决定区进一步缩小到这 250 kb 的区段上。对这一区段进行鸟枪法测序，预测得到 27 个基因。表达分析发现只有 3 个基因在胚胎期表达，其中两个基因在 XY，XX 胚胎中均表达，而另外一个基因只在 XY 胚胎中表达，表明该基因是 Y 染色体特异性的。通过 cDNA 末端快速扩增（RACE）法获得了这一基因 cDNA 的全长序列。序列分析发现，这一基因含有 DM 结构域，与青鳉 *DMRT1* 基因序列同源性为 83%，因而将这一基因命名为 *DMY*。

Matsuda 等^[5]分析了 *DMY* 在青鳉胚胎发育期的表达模式。在 XY 胚胎中，在性别决定期即检测到了该基因的表达，表达部位为包围在生殖细胞周围的体细胞（精巢支持细胞的前体）。XX 胚胎中一直未检测到 *DMY* 的表达。这一结果表明，*DMY* 基因在青鳉性别决定中起着重要作用。Matsuda 等还发现了两个 *DMY* 发生突变的 XY 雌性突变体。第一个突变体的 *DMY* 编码区插入了一个碱基，导致蛋白质翻译时提前终止。这一突变体与 XX 雄性（雄激素诱导产生）繁殖产生的后代中，XY 个体全部为雌性。另一突变体 *DMY* 基因的表达受到了严重的抑制，其 60% 的 XY 后代发育为雌性。上述突变体分析表明 *DMY* 基因为青鳉雄性发育所必需。

最后，Matsuda 等^[5]依据 *DMY* 的染色体定位及其在青鳉性别发育中的作用，认为 *DMY* 是青鳉性别决定基因的最佳候选者。在 Matsuda 等^[5]发表这篇文章后不久，Nanda 等^[7]报道他们用类似的方法在青鳉中也克隆到了 *DMY* 基因（文章中命名为 *DMRT1Y*），他们也认为 *DMY* 基因可能就是青鳉的

性别决定基因。

2 发现 *DMY* 基因的意义

青鳉 *DMY* 基因的发现具有重要的意义。首先，这是首次在鱼类，也是首次在非哺乳类脊椎动物中发现性别决定基因，弥补了线虫和果蝇与哺乳动物之间的缺口，有助于研究动物性别决定机制的进化。其次，*DMY* 基因的发现验证了性别决定基因进化速度的假说，即位于性别决定级联调控网络顶端基因的出现都是相对较近的事件，而位于性别决定级联调控网络下游的基因可能很早就出现了，具有一定的进化保守性^[1, 8]。线虫的性别决定基因为 *xol-1*，果蝇的为 *Sxl*，哺乳类的为 *Sry*，现在又发现青鳉的为 *DMY*，这些基因的出现可能都是较近的事件，因而不同类别动物中的性别决定基因是不一样的。相反，一些性别分化基因，如 *DMRT1* 是相当保守的。在线虫、果蝇和脊椎动物中都发现了该基因（在线虫和果蝇中分别称为 *mab-3* 和 *Dsx*），并且均与雄性性腺发育有关^[9-12]（图 1）。最后，*DMY* 在青鳉中的作用类似 *Sry* 在哺乳动物中的作用（图 2），因此在青鳉中研究 *DMY* 的作用机制，不但可以加深人们对鱼类性别决定机制的了解，还对哺乳动物特别是人类性别决定机制的研究具有一定的借鉴作用。青鳉个体小，繁殖快，突变体多，表现型可以通过激素处理发生改变，通过激素诱导、雌核发育等方法可以获得单性种群^[4]，这些研究性别决定机制的优越条件是哺乳动物所不具备的。

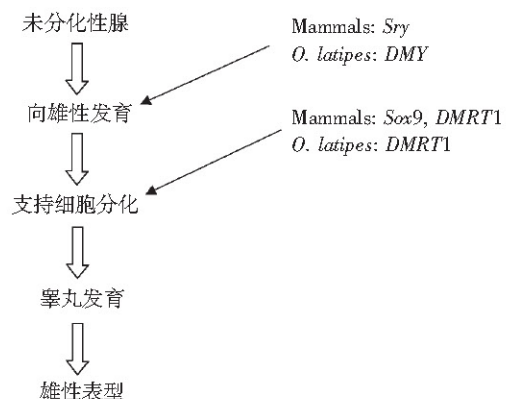


Fig. 2 Switch mechanisms used in testis determination of medaka and mammals

图 2 青鳉和哺乳动物精巢（睾丸）决定和分化的机制

3 *DMY* 在其他鱼类中的分布

自从 Matsuda 等^[5]和 Nanda 等^[7]报道他们的工作后,人们迫切想知道的一个问题就是在其他鱼类中是否存在 *DMY* 基因. 目前有关这方面的研究还比较少,而且不同研究者的结果和观点不一致.

Konda 等^[13]首先以与青鳉同属的西里伯斯青鳉 (*O. celebensis*) 为研究对象,以青鳉 *DMY* 和 *DMRT1* 基因为探针,用 DNA 印迹法研究在这种鱼类中是否存在 *DMY* 基因,结果未能检测出雄性特异性带. 用同样的方法在曼谷青鳉 (*O. mekongensis*)、虹鳉 (*Poecilia reticulata*)、罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)、斑马鱼 (*Danio rerio*) 这 5 种鱼类中也未能检测出雄性特异性带. 此外,在新公布的河鲀 (*Takifugu rubripes*) 基因组中未找到 *DMY* 基因. 据此 Kondo 等推测青鳉的 *DMY* 基因可能由常染色体上的 *DMRT1* 基因复制而来,且这一事件发生在青鳉与其他青鳉科鱼类分开以后,因此 *DMY* 基因为青鳉所独有,在其他鱼类中不存在 *DMY* 基因. 但 Matsuda 等^[14]通过 PCR 方法在弓背青鳉 (*O. curvinotus*) 中克隆到了 *DMY* 基因.

仅仅依靠上述研究,我们目前还无法判定其他不同亲缘关系的鱼类中是否也存在 *DMY* 基因,这还有待于在不同的鱼类中开展更多的研究,并结合使用不同的研究方法.

4 研究展望

虽然 *Sry* 是目前公认的哺乳动物性别决定基因,但在有些哺乳动物 (如有袋类,野鼠类) 中不存在 *Sry* 基因,另一些基因执行 *Sry* 的功能^[15,16]. 鱼类中的情形更复杂. 大部分鱼类没有性染色体,具有性染色体的仅为少数,并且除经典的 XX/XY 型,还有 ZW/ZZ 等其他类型的性染色体. 雌雄同体、环境决定型等性别类型在鱼类中也较普遍^[4]. 因此,希望用 *DMY* 基因来解释所有鱼类的性别决定机制是不大可能的,在鱼类中可能存在多种性别决定基因和性别决定机制. 相信通过在更多的鱼类中开展类似的研究,人们将能判定 *DMY* 作为性别决定基因是在鱼类中普遍分布,还是仅为青鳉科鱼类的特例,并有可能发现新的性别

决定基因,加深人们对鱼类性别决定机制的认识. 此外,在青鳉中寻找 *DMY* 基因直接作用的下游靶基因也是一个重要的研究方向.

参 考 文 献

- 1 Martin I, Baker B S. The evolutionary dynamics of sex determination. *Science*, 1998, **281** (5385): 1990 ~ 1994
- 2 Koopman P, Loffler K A. Sex determination: the fishy table of *DMRT1*. *Current Biol*, 2003, **13** (5): 177 ~ 179
- 3 Sinclair A H, Berta P, Palmer M S, *et al.* A gene from the human sex-determination region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 1990, **346** (6281): 240 ~ 244
- 4 Devlin R H, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 2002, **208** (3 ~ 4): 191 ~ 364
- 5 Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, *et al.* *DMY* is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, 2002, **417** (6888): 559 ~ 563
- 6 Kondo M, Nagao E, Mitani H, *et al.* Differences in recombination frequencies during female and male meioses of the sex chromosomes of the medaka, *Oryzias latipes*. *Genet Res*, 2001, **78** (1): 23 ~ 30
- 7 Nanda M, Konda M, Hornung V, *et al.* A duplicated copy of *DMRT1* in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (18): 11778 ~ 11783
- 8 Wilkins A S. Moving up the hierarchy: a hypothesis on the evolution of a genetic sex determination pathway. *Bioessays*, 1995, **17** (1): 71 ~ 77
- 9 Raymond C S, Shamu C E, Shen M M, *et al.* Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature*, 1998, **391** (6668): 691 ~ 695
- 10 Brunner B, Hornung U, Shan Z, *et al.* Genomic organization and expression of the Doublesex-related gene cluster in vertebrates and detection of putative regulatory regions for *DMRT1*. *Genomics*, 2001, **77** (1 ~ 2): 8 ~ 17
- 11 Nanda I, Shan Z, Schartl M, *et al.* 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9. *Nat Genet*, 1999, **21** (3): 258 ~ 259
- 12 Kettlewell J, Raymond C, Zarkower D. Temperature-dependent expression of turtle *DMRT1* prior to sexual differentiation. *Genesis*, 2000, **26** (3): 174 ~ 178
- 13 Konda M, Nanda I, Hornung U, *et al.* Absence of the candidate male sex-determining gene *dmrt1b* (Y) of medaka from other fish species. *Current Biol*, 2003, **13** (5): 416 ~ 420
- 14 Matsuda M, Sato T, Toyazaki Y, *et al.* *Oryzias curvinotus* has *DMY*, a gene that is required for male development in the medaka, *O. latipes*. *Zoolog Sci*, 2003, **20** (2): 159 ~ 161
- 15 Pask A, Graves J A. Sex chromosomes and sex-determining genes: insights from marsupials and monotremes. *EXS*, 2001, **91**: 71 ~ 95
- 16 Just W, Rau W, Vogel W, *et al.* Absence of *Sry* in species of the vole *Ellobius*. *Nat Genet*, 1995, **11** (2): 117 ~ 118

DMY: a New Sex-determining Gene*

LIU Xu-Sheng, ZHANG Shu-Yi**, LIANG Bing

(Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract Sex-determining genes have been identified in flies, worms and mammals but not, until recently, in nonmammalian vertebrates. The characterization of *DMY* gene in medaka is introduced and the significance of this affair is discussed. Studies about the existence of this gene in other fish species are also been introduced. Finally, direction for future research is suggested.

Key words *DMY*, sex determination, sex-determining gene, medaka, fishies

* This work was supported by grants from The Knowledge Innovation Project of The Chinese Academy of Sciences (KSCX3-IOZ-03 and KSCX2-1-03) and The National Natural Science Foundation of China (30025007 and 30270169).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62537132, E-mail: zhangsy@a-l.net.cn

Received: May 15, 2003 Accepted: June 28, 2003

知识与动态

ColE1 型质粒 DNA 载体的复制与调控研究*

王志军** 袁正宏 闻玉梅

(复旦大学教育部卫生部分子病毒重点实验室, 上海 200032)

ColE1 型质粒 DNA 是独立于染色体之外能自主复制的一类双链 DNA 分子, 用 ColE1 型质粒作 DNA 免疫或基因治疗载体, 可以克服如同 pSC101 质粒载体的低拷贝, 低产量的缺点, 是目前最广泛使用的一种 DNA 载体. 预计到 2010 年这方面产品市场的销售额将达到 450 亿美元, 因此研究 ColE1 型质粒 DNA 的复制与调控机理不仅有重要的科学意义也有重要的经济意义.

ColE1 型质粒 DNA 复制起始区是一个约 600 bp 大小的区域, 在这个区间中, DNA 发生单向的复制, 它的复制受到 RNA II、RNA I、Rom 蛋白及非荷载 tRNA 的调控. RNA II 是起复制引物作用的 RNA, 它可以与复制起始区结合, RNA II 与复制起始区结合后, 在 RNase H 剪切作用下释放出 3'OH, 随后在 DNA 聚合酶 I 的作用下发生延长, 而形成 DNA 链, 完成 ColE1 型质粒 DNA 的复制过程. RNA I 对复制起相反的作用, RNA I 是 RNA II 模板的反义 RNA, RNA I 与 RNA II 间结合阻止了 RNA II 与 DNA 模板之间的结合, 并且最终形成了 RNA I - RNA II 稳定复合物, 而抑制了 DNA 的复制. Rom 蛋白是 ColE1 型质粒 DNA 的另一个调节因子, 这种蛋白质能够促使 RNA I 与 RNA II 由原本非常不稳定的结合转变成稳定的结合, 从而抑制 ColE1 型质粒 DNA 的复制, 为了增加拷贝数, 在 pUC19 质粒中已将 Rom 蛋白的基因突变缺失了. 另一个重要调节因子是非荷载 tRNA, 它对 ColE1 型质粒 DNA 复制的机理只是在近几年得到了关注, 主要是基于 tRNA 的 3'端 CCA 序列干扰调节 RNA I 与 RNA II 的结合而引起的, 这种模型可表示为最初 3'端 CCA 序列的羟基发生电荷转移,

而形成带负电荷的 3'CCA-O⁻, 随后被 RNA I 或 RNA II 环上的 (GG)⁺ 电子洞所捕获, 电子洞是由 RNA I 或 RNA II 远端的 G⁺ 通过电荷跳跃的方式传导到环上 (GG)⁺ 而形成的. 随后 3'CCA-O⁻ 序列与 RNA I 或 RNA II 环上的 U (GG)⁺ 发生配对, 而调控 ColE1 型质粒 DNA 的复制过程.

RNA I 与 RNA II 上三个环的序列上对复制有重要的作用. 环的改变对于两种 RNA 的结合率有较大影响. 另外控制 RNA I 或 RNA II 转录的 RNA 多聚酶基因也对 ColE1 型质粒 DNA 的复制有所影响, 对 RNA 多聚酶的基因突变后, 发现可抑制宿主细胞中质粒 DNA 的复制. 另有一些学者研究了 RNA I 环上的 YUNR 单元, 在这里 Y 指的是嘧啶, R 指的是嘌呤, U 指的是尿嘧啶, N 指的是腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶或腺嘌呤, 这种结构可以产生非常有效的弯曲作用, 对 YUNR 结构的突变都将会减弱反义 RNA I 与其配对的 RNA II 的结合可能性, 而影响复制性能.

总之, 对 ColE1 型质粒 DNA 复制与调控的研究有重要生物学意义, 目前还有很多问题还没有解决, 特别是有关非荷载 tRNA 的作用机理问题, 由于基因治疗与 DNA 免疫的发展, 对这种应用最为广泛质粒复制性能如能进一步认识, 很有可能会有产生重要的经济意义.

* 中国博士后科学基金资助项目 (2002032145).

** 通讯联系人.

Tel: 021-54237762, E-mail: zjwang@shmu.edu.cn

收稿日期: 2003-04-21, 接受日期: 2003-06-03