

DOI: 10.13376/j.cbbs/2017132

文章编号: 1004-0374(2017)10-0992-08



刘默芳, 中科院上海生化与细胞所研究组长 (PI), 研究员, 国家杰出青年科学基金获得者 (2013), 上海市优秀学术带头人 (2016), 科技部国家重点研发计划项目首席科学家 (2017)。刘默芳研究员主要从事非编码 RNA 功能机制研究, 围绕 piRNA 与精子发生、miRNA 与癌症等开展系统性探索, 获得了前沿性进展, 已发表论文 50 多篇, 包括通讯作者研究论文 12 篇 (*Cell*, 2017; *Cancer Res*, 2017; *Oncogene*, 2016; *EMBO J*, 2015; *Cell Res*, 2015; *Cancer Res*, 2014; *Cell Res*, 2014a; *Cell Res*, 2014b; *Dev Cell*, 2013; *EMBO J*, 2012; *Cell Res*, 2012; *Cancer Res*, 2010)。这些原创性研究成果揭示了小分子非编码 RNA 的生理和病理功能机制, 可为男性不育症及肿瘤等疾病的诊治研究提供理论依据和相关基础。

精子形成中的表观遗传调控

康俊炎¹, 苟兰涛², 刘默芳^{1*}

(1 中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031;

2 加州大学圣地亚哥分校细胞和分子医学系, 美国 CA 92093-0651)

摘要: 精子形成是指单倍体球形精子细胞分化发育成为精子的过程。这一连续进程包含一系列复杂的生化事件和剧烈的形态变化, 涉及顶体和尾部形成、组蛋白-鱼精蛋白转换、细胞核压缩和细胞质丢弃等。近期研究发现, 表观遗传调控在精子形成过程中发挥重要作用, 对确保精子细胞正常发育和精子生成至关重要。现总结近期的相关研究进展, 从 DNA 甲基化和组蛋白修饰两个方面简介精子形成过程中的表观遗传调控功能和机制。

关键词: 精子形成; 表观遗传调控; DNA 甲基化; 组蛋白修饰

中图分类号: R321.1; R698

文献标志码: A

Epigenetic regulation in spermiogenesis

KANG Jun-Yan¹, GOU Lan-Tao², LIU Mo-Fang^{1*}

(1 State Key Laboratory of Molecular Biology, Shanghai Key Laboratory of Molecular Andrology, CAS Center for Excellence in Molecular Cell Science, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;

2 Department of Cellular and Molecular Medicine, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92093-0651, USA)

Abstract: Spermiogenesis refers to the development of post-meiotic male germ cells in animals, in which male germ cells differentiate from haploid round spermatids to mature sperm. This dramatic differentiation process is known as a complex biochemical and morphological process, including acrosome and flagellum formation, histone-protamine transition, nuclear condensation, cytoplasmic exclusion and etc. Recent studies indicate that epigenetic regulation plays important roles in maintaining normal spermatid development and functional sperm production. In

收稿日期: 2017-08-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(91419307, 91219306, 9091906)

*通信作者: E-mail: mliu@sibcb.ac.cn

this review, we summarize the recent progresses of the function and mechanisms of epigenetic regulation during spermiogenesis, including two main aspects, DNA methylation and histone modification.

Key words: spermiogenesis; epigenetic regulation; DNA methylation; histone modification

精子形成是一个复杂的细胞分化和形态变化过程。精母细胞经过减数分裂 I 期 (包含 4 个阶段: 细线期、粗线期、偶线期和双线期) 和减数分裂 II 期后, 产生 4 个单倍体精子细胞。单倍体精子细胞随后发生一系列剧烈的结构和形态变化, 细胞核高度压缩、细胞质丢弃, 最终形成一种高度特化的细胞——精子^[1]。基于精子形成过程中细胞的形态差异, 研究者将小鼠精子形成过程划分为 16 个步骤 (图 1): 1~8 步的精子细胞为球形精子细胞, 其间转录状态比较活跃; 9~11 步的精子细胞处于延长形, 细胞核伸长, 转录机器开始关闭; 12~14 步的精子细胞处于长形, 细胞核高度压缩; 15~16 步精子基本形成, 呈现典型的弯钩状^[2]。

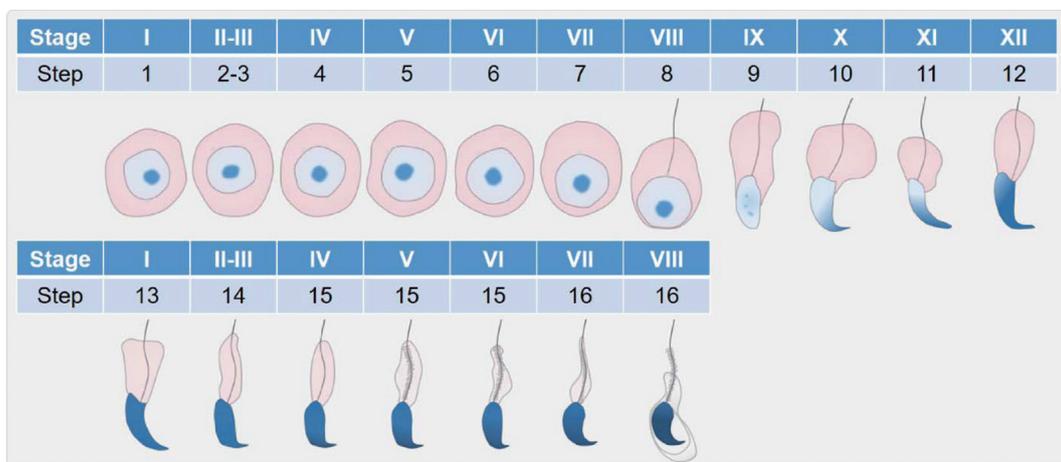
表观遗传指在核苷酸序列不发生变化的情况下, 基因表达发生了可遗传改变。表观遗传学是为记录、传递或维持染色体活性状态所引起的染色体区域结构的改变^[3]。据此, 表观遗传学研究的内容包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、非编码调控 RNA 等一系列涉及染色质重塑的调节机制。因此, 本文将主要从 DNA 甲基化、组蛋白修饰两个方面, 简介表观遗传调控在精子形成过程中的功能和作用机制相关的研究进展。

1 DNA甲基化

DNA 甲基化是表观遗传中非常重要的调控机

制, 在建立和维持基因表达状态的过程中发挥重要作用。哺乳动物中 DNA 甲基化主要发生在位于 5'-CpG-3' 的胞嘧啶 5'-C 上, 形成 5-甲基胞嘧啶 (5mC)。DNA 甲基化包括两种类型: 第一种是维持性甲基化 (maintenance methylation), 发生在 DNA 的母链已被甲基化, 子链未被甲基化的情况下; 第二种是从头甲基化 (*de novo* methylation), 发生在 DNA 两条链均未被甲基化的情况下。

DNA 甲基化由 DNMTs 甲基转移酶家族催化完成。哺乳动物中存在 5 个 DNMTs 成员, 分别是 DNMT1、DNMT2、DNMT3A、DNMT3B 和 DNMT3L。研究发现 DNMT1、DNMT3A 与 DNMT3B 是哺乳动物中主要活跃的 DNA 甲基转移酶, 而 DNMT2 主要为 tRNA 的甲基转移酶, 也有报道称 DNMT2 具有微弱的 DNA 甲基转移酶活性^[4]。DNMT1 是体细胞中主要的 DNA 甲基转移酶, 其对维持性甲基化十分重要。*Dnmt1* 缺失会导致整体的 DNA 甲基化缺失和印记基因异常表达, 引发 X 染色体失活和转座子激活, 从而造成早期胚胎死亡^[5]。另有研究发现, DNMT1 杂合子突变小鼠的成熟精子中 *Snrpn* 区域发生异常甲基化, 表明 DNMT1 可能在雄性生殖细胞发育过程中参与了基因组部分区域的甲基化维持或从头甲基化^[6]。DNMT2 是真核细胞中高度保守的甲基化转移酶家族成员, 在某些物种 (如小鼠) 中, DNMT2 与



小鼠精子形成过程可分为16步, 包含球形精子细胞、延长形精子细胞和长形精子细胞, 对应分布于12个阶段的生精小管。

图1 小鼠精子形成过程示意图

DNMT1 和 DNMT3 共存;在某些物种(如果蝇)中,仅存在 DNMT2 一个甲基转移酶。哺乳动物中, DNMT2 不参与基因组 DNA 的甲基化过程,但可以对某些 tRNA 的 38 位胞嘧啶进行甲基化修饰^[7]。 *Dnmt2* 缺失会对 RNA 介导的染色体上基因交叉置换的建立和维持产生重要影响^[8]。 DNMT3A 和 DNMT3B 在小鼠胚胎干细胞和胚胎发育过程中高表达,主要负责基因组 DNA 的从头甲基化^[4]。在生殖细胞中敲除 *Dnmt3a* 导致精子发生异常,而敲除 *Dnmt3b* 则对配子发生没有产生明显的影响,推测 DNMT3A 与 DNMT3B 可能通过不同的甲基化机制发挥作用^[9]。 DNMT3L 特异性在生殖细胞中表达,在精卵结合后 12.5 d 开始出现,于 15.5 d 达到高峰并一直持续到出生。出生后 DNMT3L 表达水平开始明显降低,在成熟的生殖细胞中表达水平很低,但在生殖细胞中敲除 *Dnmt3l* 导致 LINE1、IAP 转座子异常高表达,引起精子形成异常^[10]。

DNA 去甲基化分为被动去甲基化和主动去甲基化两种。被动去甲基化发生在 DNA 复制过程中,由于 DNMT 活性受到抑制导致新合成 DNA 链上甲基化缺失。主动去甲基化主要由相关酶催化 5mC 转化为 C。研究发现,MBD (methyl-CpG binding domain) 家族蛋白可以催化 5mC 甲基基团直接从胞嘧啶上去除; Tet 家族蛋白可以催化 5mC 氧化为 5-羟甲基胞嘧啶 (5hmC),然后细胞会进一步利用主动或被动去甲基化机制进行 DNA 去甲基化。 MBD 蛋白家族包括 MeCP2、MBD1、MBD2、MBD3 和 MBD4。除 MBD4 外,其他蛋白都参与了由 DNA 甲基化介导的基因沉默。 MBD2 同源基因 MBDL1 特异性在小鼠单倍体精子细胞中表达,但是 *Mbd1l* 敲除的小鼠精子形成无显著异常^[11]。 Ni 等^[12] 研究发现,在人类特定期精子细胞(第 5 步)中可以检测到 5hmC 信号,而在早期和后期的精子细胞(7~8 步)中这一信号则会消失,这表明特定时期的 DNA 去甲基化在人类精子形成过程中具有潜在的生物学功能。与此同时,研究人员检查了 TET 家族蛋白在人精子细胞中的表达定位情况,结果显示 TET2 最早表达于精母细胞粗线期后期,主要定位于细胞质中; TET1 在球形精子细胞开始表达并定位于细胞核,且一直持续到延长形精子细胞; TET3 在球形精子细胞开始出现并定位于细胞核,然后持续表达至延长形精子细胞^[12]。然而, Dai 等^[13] 研究发现,同时在生殖细胞中条件性敲除了 *Tet1*、*Tet2* 及 *Tet3* 的雄性小鼠仍然维持了正常可育性,暗示由 TET

家族介导的去甲基化过程可能在精子形成过程中不发挥主导作用。

在雄性生殖细胞发育过程中,基因组 DNA 甲基化经历了去甲基化和重新甲基化的过程。一般认为,睾丸生殖细胞甲基化状态在减数分裂之前就已经建立完成,并在精子形成过程中基本维持不变。然而,也有研究指出,精子形成过程中可能存在更为复杂的 DNA 甲基化调控。早期的一项研究发现,从减数分裂到长形精子细胞的分化过程中, DNA 甲基化水平逐步降低,作者认为体细胞甲基化模式的去除为在精子发生过程中逐步建立父源特异性甲基化模式提供了可能^[14]。另有一项研究发现, *Pgk2*、*ApoA1* 和 *Oct-3/4* 基因在睾丸精原细胞中未被甲基化,而在成熟精子中均被甲基化;鉴于 PGK2 仅在精母细胞和精子细胞中表达,研究人员认为精子形成过程中的重新甲基化可抑制该基因在后续过程中的表达^[15]。此外,与正常精子相比,球形精子细胞中父源 DNA 甲基化状态或者其他表观修饰还未完全建立;将小鼠球形精子细胞注射进入卵细胞后获得正常小鼠的效率低于注射正常精子,这表明精子的表观遗传修饰对其受精能力及后代的正常发育至关重要^[16]。不仅如此,还有研究比较了胚胎干细胞、原始生殖细胞和精子中几万个启动子序列,发现其甲基化状态高度相似。研究人员认为这类甲基化经过了重编程,并达到与小鼠多能干细胞类似的状态^[17]。除此之外,成熟精子的基因组水平甲基化分析显示,成熟精子拥有独特的 DNA 甲基化模式^[18-19]。精子基因组 DNA 除 CpG 岛外,还存在一种独特的 DNA 甲基化模式,如在雄性生殖细胞中,基因的非 5' 区域(如编码区域和 3' 区域)同样存在甲基化现象,但这并不反映其基因的表达情况。此外,生殖细胞特异性 DNA 甲基化模式与染色质结合状态和局部 GC 含量紧密相关^[20]。这些证据表明,雄性生殖细胞中的 DNA 甲基化具有除调控基因表达以外的其他功能。2015 年, Urduingio 等^[21] 研究检查了人类精子的 DNA 甲基化水平,发现少精症患者基因组印记区域存在甲基化缺陷,但具体的致病机制和 DNA 甲基化在其中扮演的角色还不清楚。

2 组蛋白修饰

雄性生殖细胞在经过有丝分裂和减数分裂后,其基因组 DNA 仍然被组蛋白包裹形成核小体。核小体是一个由 H2A、H2B、H3 和 H4 构成的八聚体

结构, 相互之间由 H1 连接。在随后的精子形成过程中, 组蛋白将会逐步被转换蛋白取代, 进而再被鱼精蛋白取代, 使得精子染色质得以被高度压缩。不同于体细胞, 生殖细胞表达许多时空特异性的组蛋白变体 (图 2), 而其中的大部分组蛋白及其变体都会在组蛋白 - 鱼精蛋白转换过程中被去除。一些组蛋白变体的表达从早期精母细胞的减数分裂开始, 并持续到后期的延长形精子细胞, 而某些会在单倍体精子细胞进行组蛋白 - 鱼精蛋白转换前期开始大量表达。Baoh 和 Bedford^[22] 研究发现, 组蛋白变体在精子形成过程中发挥着重要的作用。除此之外, 组蛋白上还存在着多种动态的翻译后修饰 (post-translational modifications, PTMs), 不同 PTM 可能通过改变组蛋白八聚体的稳定性来影响染色质的构象变化^[23], 从而在精子形成过程中发挥特异性的功能。

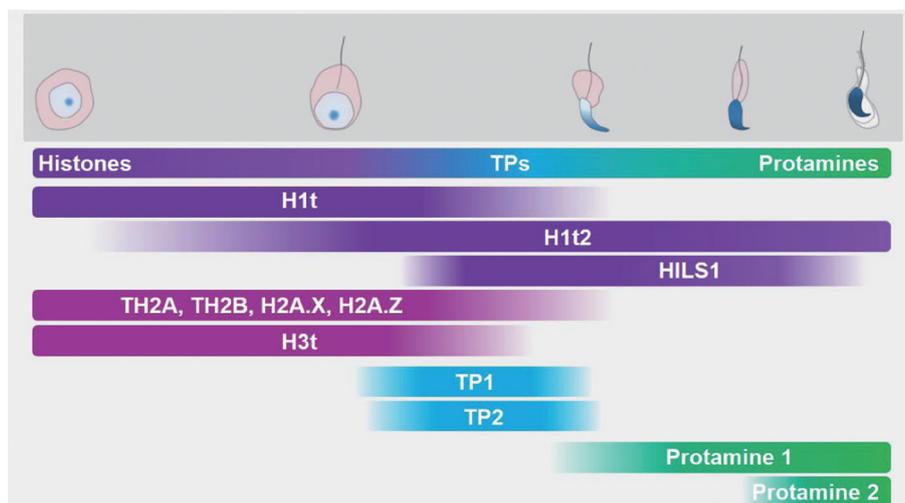
2.1 组蛋白变体

睾丸特异性的 H1 变体 (H1T) 在精母细胞粗线期中晚期就可以被大量检测到, 其高表达状态一直持续到延长形精子细胞中^[24]。另外一个睾丸特异性的 H1 变体 H1T2 主要在单倍体精子细胞中表达: H1T2 在 2~4 步的精子细胞中有较弱的表达, 在 5~12 步的精子细胞中表达上升^[25]。第三个 H1 变体 HILS1 特异性地在 9~15 步精子细胞中大量表达, 占据小鼠精子细胞染色质结合蛋白总量的 10% 左右^[26]。H1t 敲除小鼠精子发生没有明显异常, 而

H1t2 的敲除导致精子形态异常、生育力下降^[27]。目前还未见建立 Hils1 敲除小鼠模型, 不过基于其表达时空特异性和高丰度, 推测其很可能是组蛋白替换过程中的一个重要作用因子。

哺乳动物中存在多种 H2A 变体, 包括 H2A.X、H2A.Z 和睾丸特异性的 H2A 变体 TH2A, 其中 H2A.X 参与双链断裂事件 (DSBs), H2A.Z 参与基因转录水平的调控^[28]。TH2B 是在小鼠睾丸中最主要的一种 H2B 变体, 其在出生后 10 d 的细线期精母细胞开始表达, 并在此后一直维持高表达^[29]。与之相反, H2B 的表达水平在出生后 16 d 即开始明显降低^[30]。H2B 和 TH2B 这种相反的表达关系暗示, TH2B 而非 H2B 可能在减数分裂和减数分裂后的生殖细胞中发挥着重要作用。Th2a 与 Th2b 均位于小鼠基因组 17 号染色体上, 并共享位于两个基因间的同一个启动子, 暗示 TH2A 和 TH2B 在生殖细胞中协同发挥作用^[31]。Th2b 敲除小鼠是可育的, 但其睾丸中 H2B 的表达量明显上调, 这意味着睾丸中可能存在着一种补偿机制回复 TH2B 的缺失。Th2a 与 Th2b 双敲致小鼠雄性不育, 其 10~16 步的精子细胞形态异常, 染色质结合 TNP1 和 PRM2 明显下调, 推测 TH2A/TH2B 很可能在启动转换蛋白和鱼精蛋白装配基因组的过程中发挥作用。

除组蛋白 H3.1 和 H3.2 外, 哺乳动物中还存在另外 3 种 H3 变体, 即 H3.3、H3T 和 CENP-A。H3.3 存在两个旁系同源基因 (paralogs) H3f3a 和 H3f3b,



多种组蛋白变体 (histone variants) 在精子形成过程中呈时空特异性表达, 且大部分组蛋白会依次被转换蛋白 (transition proteins, TPs)、鱼精蛋白 (protamines) 替换。H1t、H1t2 和 HILS1: H1 变体组蛋白; TH2A: 睾丸特异性 H2A 变体组蛋白; TH2B: 睾丸特异性 H2B 变体组蛋白; H2A.X 和 H2A.Z: H2A 变体蛋白; H3t: H3 变体组蛋白; TP1: 转换蛋白 1; TP2: 转换蛋白 2。

图2 部分组蛋白变体表达图谱

两者拥有不同的调控元件、5'UTR 和 3'UTR, 但却编码了同样的蛋白质序列^[32]。H3.1 与 H3.3 的序列差异并不明显, 但 H3.3 的结合会使染色质的构象更为开放。CHIP 的结果表明, H3.3 通常位于转录活跃区域, 存在 H3K4me3 修饰, 而 H3.1 则多处于转录抑制区域^[33]。在小鼠睾丸中, *H3f3a* 转录本可在精原细胞、精母细胞和精子细胞等所有类型的雄性生殖细胞中较低水平表达, *H3f3b* 则主要在减数分裂时期的精母细胞表达^[34]。*H3f3b* 敲除会导致雄性不育^[35], 提示 *H3f3a* 并不能补偿 *H3f3b* 的功能。H3T, 也被称为 H3.4, 最开始发现在哺乳动物睾丸中大量表达, 后来发现在其他体细胞中也存在低水平表达^[36]。生化分析表明, H3T 参与形成的核小体的稳定性显著弱于 H3.1, 所以 H3T 被认为在精母细胞减数分裂时染色体重构、精子细胞染色质压缩过程中的组蛋白 - 鱼精蛋白转换中发挥作用^[37]。

2.2 组蛋白修饰

组蛋白甲基化存在于赖氨酸和精氨酸残基, 由甲基转移酶催化甲基基团从原始甲基供体转移到底物蛋白残基上。组蛋白甲基化代表一类研究最为广泛的 PTM, 在细胞增殖、分化和变形过程中的染色质动态方面发挥了重要的作用。在生殖细胞发育过程中, 赖氨酸甲基转移酶 (PKMTs) 成员呈高度动态表达。然而, 它们在精子形成过程中的生理学功能尚未得到充分认识。组蛋白 H3 或 H4 赖氨酸残基是常见的甲基化位点, 可介导基因的激活和 / 或抑制。在精子发生过程中, H3K9 的单甲基化、二甲基化和三甲基化修饰, 以及 H3K27 的二甲基化和三甲基化修饰均受到严格的调控^[38-39]; H3K4 甲基化水平在精原干细胞阶段最高, 在精母细胞中明显减少; H3K9 和 H3K27 甲基化水平在精原干细胞中较低, 在减数分裂过程中增加, 并持续到减数分裂完成。甲基化标记的建立和擦除时间对于精子形成非常重要, 如在秀丽线虫减数分裂的中期到末期敲除 LSD1/KDMI (H3K4 的去甲基化酶) 会导致生殖细胞的凋亡和不育^[40], 而在小鼠中 JHDM2A (H3K9 去甲基化酶) 的功能丧失则会导致转换蛋白 1 (TNPI) 和鱼精蛋白 1 (PRM1) 表达的下降, 染色质压缩异常和不育^[41]。与赖氨酸甲基化相类似, 由精氨酸甲基转移酶 (PRMTs) 催化的精氨酸甲基化也是一种比较常见的 PTM, 已被证明可以参与多种细胞进程^[42]。PRMT 家族有 9 个成员, 可分为 3 类: I 型负责催化非对称双甲基化的形成, 包括 PRMT1、PRMT3、CARM1 (PRMT4)、PRMT6 和 PRMT8; II

型负责催化对称双甲基化的形成, 包括 PRMT5 和 PRMT9; III 型催化单甲基化的形成, 包括 PRMT7。有趣的是, *Prmt1*、*Prmt4* 和 *Prmt5* 的转录本水平在精子发生初期会显著升高, 其蛋白水平高峰则出现在单倍体精子细胞, 预示这些酶可能在精子形成中发挥作用。2014 年, Brunner 等^[43]通过串联质谱研究发现, 小鼠精子中残存的组蛋白存在多种翻译后修饰。其中, H2B 的 K117 和 K121 位点存在三甲基化修饰, 而该位点甲基化被认为可能是单倍体精子细胞发育过程中 TH2B 替换 H2B 的标记^[29]。H3 的 K9、K27 位点存在单甲基化、二甲基化和三甲基化修饰, K36 存在单甲基化和二甲基化修饰, R83 位点存在单甲基化修饰, 且 K36 甲基化多出现于 K27 位点已被甲基化的 H3 上, 这暗示两者在功能发挥上可能存在一定的相关性^[44]。H4 的 R19 位点存在二甲基化修饰, K20、R23 位点具有单甲基化、二甲基化和三甲基化修饰, K20 位点的甲基化之前被报道与染色质压缩和转录抑制相关, 而 R19 和 R23 位点的甲基化则被报道可以调控 H4K20me 与其结合蛋白的相互作用^[45]。

组蛋白磷酸化修饰通常发生在四种核心组蛋白的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基。组蛋白的磷酸化修饰在整个精子发生过程中极具动态性。H1t 磷酸化最早出现在早期精子细胞, 并持续至后期精子细胞, 且其磷酸化修饰进程与组蛋白 - 鱼精蛋白替换事件相关^[46]。H4S1 的磷酸化从果蝇到哺乳动物高度保守。小鼠中 H2A 的磷酸化主要发生在 H2A.1 和 H2A.X 两种变体上, 且在 N 端与 C 端皆存在磷酸化位点^[47]。果蝇中 H4S1 磷酸化 (H4S1ph) 可在减数分裂的精母细胞中检测到, 其丰度在染色质浓缩的精子细胞中显著提高, 因此, 该修饰被认为是后期精子细胞成功进行组蛋白替换的先决条件。在小鼠成熟精子中的一项研究发现, H2B 在 T9、T120 位点存在磷酸化修饰, 但具体功能还未得到阐释^[43]。

组蛋白赖氨酸残基的乙酰化受到组蛋白乙酰基转移酶 (HATs) 和组蛋白去乙酰化酶 (HDACs) 的调控。两者所催化的组蛋白乙酰化和去乙酰化在精子形成过程中发挥着重要的调控作用。整体而言, 伴随着精母细胞减数分裂的进行, 组蛋白乙酰化的程度呈现缓慢下降趋势, 但精子细胞由球形向长形转变的过程中, 组蛋白 H3 和 H4 会出现明显的超乙酰化状态。在延长形精子细胞中, H3 乙酰化依赖于 Pygopus 蛋白, 该蛋白与三甲基化的 H3K4 结合

有助于 H3 发生乙酰化^[48]。在延长形精子细胞阶段, H4 的 K5、K8 和 K16 位点均被高度乙酰化, 并且在包括哺乳动物和果蝇等多个物种中保守, 这提示 H4 高乙酰化与组蛋白替换及染色质压缩之间可能存在联系^[49]。与之一致的是, 在某些精子组蛋白不被鱼精蛋白取代的物种(如鲤鱼、比目鱼)中, 精子细胞的 H4 则不会出现高乙酰化修饰。

泛素是一种由 76 个氨基酸组成的小分子蛋白, 最初发现其共价结合到靶蛋白后指导靶蛋白通过 26S 蛋白酶体降解(泛素-蛋白酶体途径)。泛素化通常是一种由 3 种酶催化的连续反应: 泛素激活酶(E1)激活泛素后呈递给泛素结合酶(E2); 被泛素激活的 E2 和底物蛋白被特异性泛素连接酶(E3)识别, 并催化 E2 上的泛素基团向底物蛋白转移^[50]。一般情况下, 多轮的泛素化反应会在靶蛋白上产生多泛素链。然而, 底物蛋白也可以被单泛素化, 如 H2A 或者 H2B。单泛素化的 H2A 和 H2B 在粗线期精母细胞的 XY body (sex body) 和延长形精子细胞中高度富集^[51]。Sin 等^[52]研究发现, E3 泛素连接酶 RNF8 可以对 H2A 和 H2B 进行泛素化修饰, 但 *Rnf8* 敲除既不会导致 MSCI 所在的 XY body 处泛素化 H2A

的消失, 也不会引起精母细胞减数分裂的异常, 却造成了严重的后期精子细胞发育缺陷^[51]。RNF8 缺失的睾丸中只有少量的长形精子细胞和精子, DNA 压缩不完全, 精子头部和尾部形态异常, 大部分经典组蛋白异常地滞留在 RNF8 缺失的精子中, 这意味着 RNF8 介导的 H2A/H2B 泛素化反应对于精子形成十分重要^[51]。PIWI 蛋白是动物生殖系细胞特异性 AGO 家族成员, 通过与一类生殖细胞特异性小分子非编码 RNA piRNA 结合形成 PIWI/piRNA 调控复合物, 介导动物生殖细胞基因组中转座元件的沉默并参与调控生殖细胞中编码基因的表达, 对动物生殖细胞发育分化及配子形成至关重要^[53]。我们之前的一项研究发现, 小鼠 PIWI(MIWI) 蛋白在精子形成后期将通过泛素连接酶 APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome) 介导的泛素化途径降解清除^[54]; 而我们最新的后续研究发现, MIWI 蛋白在后期精子细胞中的清除对于 RNF8 的入核至关重要(图 3)^[55]。我们通过筛查临床男性不育样本发现, 少弱精症患者的 *Hiwi* (人 *Piwi*) 基因中存在拮抗 HIWI 蛋白泛素化修饰的 D-box 元件突变; 通过构建基因敲入小鼠模型证实, 该突变导致雄性不育;

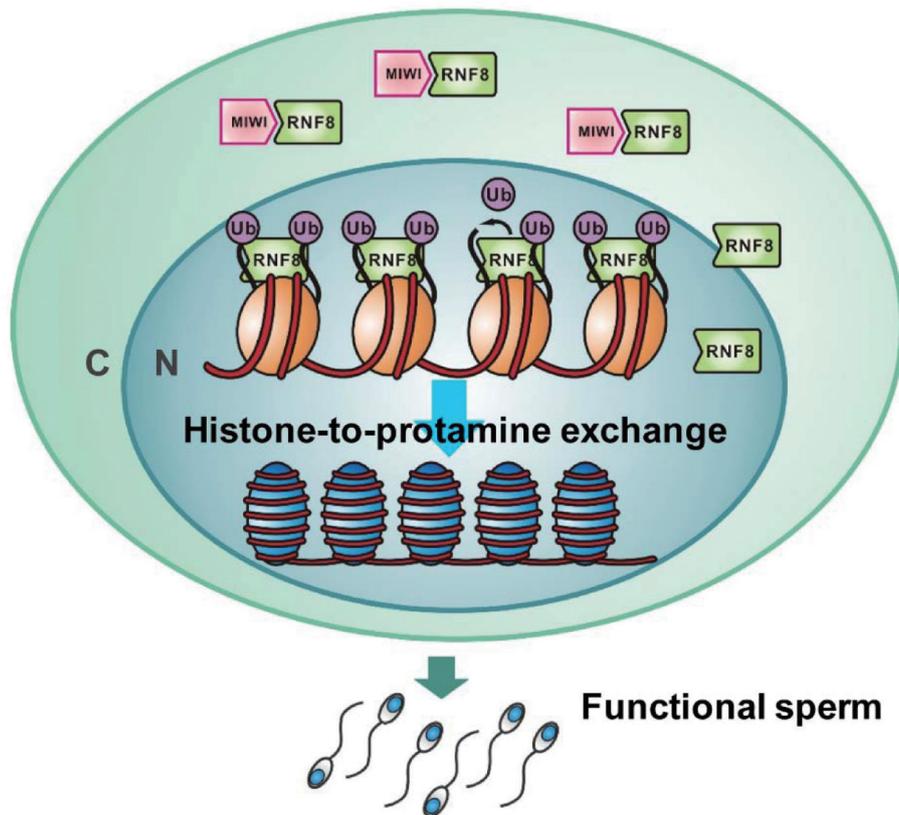


图3 MIWI蛋白在后期精子细胞中的适时清除保障组蛋白-鱼精蛋白替换正常进行

进一步研究发现, 小鼠 *Piwi* (*Miwi*) D-box 突变致 MIWI 蛋白异常稳定存在于后期精子细胞中, 导致与其相互作用的 RNF8 被扣留于细胞质, 不能入核催化组蛋白泛素化修饰, 进而抑制组蛋白被鱼精蛋白替换, 引发精子形成异常, 雄性不育。该研究发现了男性不育的一类新型致病基因突变, 并发现了 PIWI 蛋白具有调控组蛋白泛素化修饰的新功能, 揭示了精子形成中调控组蛋白 - 鱼精蛋白转换的重要机制^[55]。

3 结语

在基金委“细胞编程和重编程的表观遗传机制”重大研究计划项目的支持下, 本实验室开展了 PIWI/piRNA 在小鼠精子形成及男性不育中的表观遗传调控研究, 获得了一系列前沿性进展, 发现 PIWI 蛋白可以协同 piRNA 通过不同机制介导精子细胞中 mRNA 的降清除解^[56-57], 并在后期精子细胞中通过 APC/C- 泛素化途径降解^[53], 而 PIWI 蛋白的适时降解对于启动组蛋白 - 鱼精蛋白转换, 保障精子细胞正常发育及功能性精子形成具有重要意义^[55]。这一系列研究成果推进了我们对调控精子形成的分子机制 (尤其是调控组蛋白 - 鱼精蛋白转换分子机制) 认识, 还鉴定 *Piwi* 为一个新的男性不育症致病基因, 并为 *Hiwi* D-box 突变引发的男性不育症提供了潜在的治疗策略。

[参 考 文 献]

- [1] Govin J, Caron C, Lestrat C, et al. The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem*, 2004, 271: 3459-69
- [2] Meistrich ML, Hess RA. Assessment of spermatogenesis through staging of seminiferous tubules. *Methods Mol Biol*, 2013, 927: 299-307
- [3] Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature*, 2007, 447: 396-98
- [4] Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61: 2571-87
- [5] Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 1992, 69: 915-26
- [6] Saferali A, Moussette S, Chan D, et al. DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) mutation affects *Snrpn* imprinting in the mouse male germ line. *Genome*, 2012, 55: 673-82
- [7] Ashapkin VV, Kutueva LI, Vanyushin BF. Dnmt2 is the most evolutionary conserved and enigmatic cytosine DNA methyltransferase in eukaryotes. *Genetika*, 2016, 52: 269-82
- [8] Kiani J, Grandjean V, Liebers R, et al. RNA-mediated epigenetic heredity requires the cytosine methyltransferase Dnmt2. *PLoS Genet*, 2013, 9: e1003498
- [9] Kato Y, Nozaki M. Distinct DNA methylation dynamics of spermatogenic cell-specific intronless genes is associated with CpG content. *PLoS One*, 2012, 7: e43658
- [10] Hata K, Kusumi M, Yokomine T, et al. Meiotic and epigenetic aberrations in Dnmt3L-deficient male germ cells. *Mol Reprod Dev*, 2006, 73: 116-22
- [11] Jin SG, Tsark W, Szabo PE, et al. Haploid male germ cell- and oocyte-specific *Mbd311* and *Mbd312* genes are dispensable for early development, fertility, and zygotic DNA demethylation in the mouse. *Dev Dyn*, 2008, 237: 3435-43
- [12] Ni K, Dansranjav T, Rogenhofer N, et al. TET enzymes are successively expressed during human spermatogenesis and their expression level is pivotal for male fertility. *Hum Reprod*, 2016, 31: 1411-24
- [13] Dai HQ, Wang BA, Yang L, et al. TET-mediated DNA demethylation controls gastrulation by regulating Lefty-Nodal signalling. *Nature*, 2016, 538: 528-32
- [14] Del MJ, Prantera G, Torres M, et al. DNA methylation changes during mouse spermatogenesis. *Chromosome Res*, 1994, 2: 147-52
- [15] Ariel M, Cedar H, McCarrey J. Developmental changes in methylation of spermatogenesis-specific genes include reprogramming in the epididymis. *Nat Genet*, 1994, 7: 59-63
- [16] The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine & Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology. Round spermatid nucleus injection (ROSNI). *Fertil Steril*, 2008, 90: S199-201
- [17] Farthing CR, Ficiz G, Ng RK, et al. Global mapping of DNA methylation in mouse promoters reveals epigenetic reprogramming of pluripotency genes. *PLoS Genet*, 2008, 4: e1000116
- [18] Oakes CC, Kelly TL, Robaire B, et al. Adverse effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on spermatogenesis include reduced sperm function and selective inhibition of *de novo* DNA methylation. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 322: 1171-80
- [19] Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, et al. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat Genet*, 2006, 38: 1378-85
- [20] Oakes CC, La SS, Smiraglia DJ, et al. A unique configuration of genome-wide DNA methylation patterns in the testis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 228-33
- [21] Urdinguio RG, Bayon GF, Dmitrijeva M, et al. Aberrant DNA methylation patterns of spermatozoa in men with unexplained infertility. *Hum Reprod*, 2015, 30: 1014-28
- [22] Bao J, Bedford MT. Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis. *Reproduction*, 2016, 151: R55
- [23] Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 2007, 128: 693-705
- [24] Drabent B, Kardalidou E, Doenecke D. Structure and expression of the human gene encoding testicular H1

- histone (H1t). *Gene*, 1991, 103: 263-8
- [25] Catena R, Ronfani L, Sassone-Corsi P, et al. Changes in intranuclear chromatin architecture induce bipolar nuclear localization of histone variant H1T2 in male haploid spermatids. *Dev Biol*, 2006, 296: 231-8
- [26] Iguchi N, Tanaka H, Yamada S, et al. Control of mouse *hils1* gene expression during spermatogenesis: identification of regulatory element by transgenic mouse. *Biol Reprod*, 2004, 70: 1239-45
- [27] Tanaka H, Iguchi N, Isotani A, et al. HANP1/H1T2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 7107-19
- [28] Redon C, Pilch D, Rogakou E, et al. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev*, 2002, 12: 162-9
- [29] Shinagawa T, Huynh LM, Takagi T, et al. Disruption of *Th2a* and *Th2b* genes causes defects in spermatogenesis. *Development*, 2015, 142:1287-92
- [30] Rao BJ, Rao MR. DNase I site mapping and micrococcal nuclease digestion of pachytene chromatin reveal novel structural features. *J Biol Chem*, 1987, 262: 4472-6
- [31] Huh NE, Hwang IW, et al. Presence of a bi-directional S phase-specific transcription regulatory element in the promoter shared by testis-specific TH2A and TH2B histone genes. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19: 93-8
- [32] Szenker E, Ray-Gallet D, Almouzni G. The double face of the histone variant H3.3. *Cell Res*, 2011, 21: 421-34
- [33] Chen P, Zhao J, Wang Y, et al. H3.3 actively marks enhancers and primes gene transcription via opening higher-ordered chromatin. *Genes Dev*, 2013, 27: 2109-24
- [34] Bramlage B, Kosciessa, Doenecke D. Differential expression of the murine histone genes H3.3A and H3.3B. *Differentiation*, 1997, 62: 13-20
- [35] Yuen BT, Bush KM, Barrilleaux BL, et al. Histone H3.3 regulates dynamic chromatin states during spermatogenesis. *Development*, 2014, 141: 3483-94
- [36] Govin J, Caron C, Rousseaux S, et al. Testis-specific histone H3 expression in somatic cells. *Trends Biochem Sci*, 2005, 30: 357-9
- [37] Tachiwana H, Kagawa W, Osakabe A, et al. Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant, human H3T. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 10454-9
- [38] De Vries M, Ramos L, Housein Z, et al. Chromatin remodelling initiation during human spermiogenesis. *Biol Open*, 2012, 1: 446-57
- [39] Rathke C, Baarends WM, Jayaramaiah-Raja S, et al. Transition from a nucleosome-based to a protamine-based chromatin configuration during spermiogenesis in *Drosophila*. *J Cell Sci*, 2007, 120: 1689-700
- [40] Katz DJ, Edwards TM, Reinke V, et al. A *C. elegans* LSD1 demethylase contributes to germline immortality by reprogramming epigenetic memory. *Cell*, 2009, 137: 308-20
- [41] Okada Y, Tateishi K, Zhang Y. Histone demethylase JHDM2A is involved in male infertility and obesity. *J Androl*, 2010, 31: 75-8
- [42] Bedford MT, Richard S. Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol Cell*, 2005, 18: 263-72
- [43] Brunner AM, Nanni P, Mansuy IM. Epigenetic marking of sperm by post-translational modification of histones and protamines. *Epigenet Chromatin*, 2014, 7: 2
- [44] Jung HR, Sidoli S, Haldbo S, et al. Precision mapping of coexisting modifications in histone H3 tails from embryonic stem cells by ETD-MS/MS. *Anal Chem*, 2013, 85: 8232-9
- [45] Hirano Y, Hizume K, Kimura H, et al. Lamin B receptor recognizes specific modifications of histone H4 in heterochromatin formation. *J Biol Chem*, 2012, 287: 42654-63
- [46] Sarg B, Chwatal S, Talasz H, et al. Testis-specific linker histone H1t is multiply phosphorylated during spermatogenesis. *J Biol Chem*, 2009, 284: 3610-8
- [47] Green GR, Patel JC, Hecht NB, et al. A complex pattern of H2A phosphorylation in the mouse testis. *Exp Cell Res*, 1991, 195: 8-12
- [48] Nair M, Nagamori I, Sun P, et al. Nuclear regulator Pygo2 controls spermiogenesis and histone H3 acetylation. *Dev Biol*, 2008, 320: 446-55
- [49] Hazzouri M, Pivot-Pajot C, Faure AK, et al. Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur J Cell Biol*, 2000, 79: 950-60
- [50] Welchman RL, Gordon C, Mayer RJ. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6: 599-609
- [51] Lu LY, Wu J, Ye L, et al. RNF8-dependent histone modifications regulate nucleosome removal during spermatogenesis. *Dev Cell*, 2010, 18: 371-84
- [52] Sin HS, Barski A, Zhang F, et al. RNF8 regulates active epigenetic modifications and escape gene activation from inactive sex chromosomes in post-meiotic spermatids. *Genes Dev*, 2012, 26: 2737-48
- [53] 戴鹏, 荷兰涛, 刘默芳. PIWI/piRNA“机器”与雄性生殖细胞发育. *生命的化学*, 2014, 34: 456-65
- [54] Zhao S, Gou LT, Zhang M, et al. piRNA-triggered MIWI ubiquitination and removal by APC/C in late spermatogenesis. *Dev Cell*, 2013, 24: 13-25
- [55] Gou LT, Kang JY, Dai P, et al. Ubiquitination-deficient mutations in human piwi cause male infertility by impairing histone-to-protamine exchange during spermiogenesis. *Cell*, 2017, 169: 1090-104, e13
- [56] Zhang P, Kang JY, Gou LT, et al. MIWI and piRNA-mediated cleavage of messenger RNAs in mouse testes. *Cell Res*, 2015, 25: 193-207
- [57] Gou LT, Dai P, Yang JH, et al. Pachytene piRNAs instruct massive mRNA elimination during late spermiogenesis. *Cell Res*, 2014, 24: 680-700