

形态发生的分子机制

——基因表达的调控与信号传导

陈江野

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

[摘要] 在基因水平和细胞水平研究形态发生的机理,是当今生物学的重大课题之一。研究果蝇的胚胎发育发现了同源异型基因(*HOX* 基因),现在已从各种生物中分离了多个同源异型基因,编码产物大多数是转录调控因子,在形态发生中起重要的调控作用。细胞通过信号传导系统把外界刺激传递到细胞内,从而作出应答反应。促分裂原活化蛋白激酶级联(MAPKs Cascade)在信号传导过程中起重要的作用。把基因表达的调控与信号传导途径联系起来,将为真核生物形态发生的分子机制研究提供理论基础。

[关键词] 形态发生, 基因表达调控, 信号传导

O. B. Hardenson 曾写道:自然界所有的形态都是其他形态的结合,并以一定次序向两个方向延伸。Webster 定义:形态发生(Morphogenesis)是形态和结构的产生与进化。不列颠大百科全书中详细描述道,形态发生是指生物在细胞分化、组织发生、器官发生与发育等胚胎学过程中的成形(Shaping),这种生物的成形有赖于生物体内的遗传蓝本以及环境条件。生物的生长、发育直到死亡,无不与形态发生紧密相连。例如人体发生,细胞从单个受精卵开始,不断分化,这些细胞都具有相同的基因却能发育成不同的细胞、组织和器官,可见外界因素对个体发育的影响。在细胞分裂时,如果把某种特殊的细胞质或表面区域分配至不同的细胞中,它们的子代就会不同。细胞与邻近细胞的相互作用以及细胞间的诱导反应,在引起细胞与组织分化方面起重要作用。不同生物的形态发生各不相同,因此为我们提供了从不同角度研究生物体形态发生的材料。例如,两栖动物的形态发生可用于描述从卵到形成复杂生物体的成形过程;水螅则包括了环境因素对形态发生的影响;禽类胚胎的发育可用于观察在胚胎分化过程某一区域细胞与邻近细胞协同作用以产生协调的结构。用不同的材料来研究不同方面和不同时间形态发生的机制,将能够得出普遍规律。

现代生物技术的发展,使我们能够在基因水平研究形态发生的机理。生物的正常发育需要某种和谐的方式来协调数以千计结构基因的表达,这些调节基因有系统地配置并形成准确的空间格局。以果蝇为例,控制果蝇胚胎发育的基因有节段化基因(Segmentation gene)和同源异型基因(Homeotic),这些基因的缺陷常引起果蝇肢体的缺损或重复,甚至一种肢体被另一种肢体替代。节段化基因常编码蛋白激酶、细胞骨架元件、分泌型蛋白以及膜受体;同源异型基因编码的大多数是转录调控因子。实验证明,同源异型基因在果蝇的节段化调节和

本文于1996年12月10日收到。

脊椎动物的极化 (Polarization) 与图式形成 (Pattening) 的调节中起关键作用。

HOX 基因, 是研究果蝇的发育时首先发现的。这类基因都含有 180 bp 的同形异位框 (Homeobox), 编码 60 个氨基酸的多肽, 称为同源域 (Homeo domain), 含这一功能域的蛋白称为同源域蛋白 (Homeoprotein), 许多真核生物都有这类蛋白, 大都是转录调控因子。同源域具有 DNA 结合功能, 结合于靶 DNA 位点, 调控靶基因的表达。例如鼠 *HOX* 基因之一 *CDX-1*, 在胚胎发生晚期以及成年鼠中都能检测到 *CDX-1* 的表达。在大肠肠绒毛的形成过程和成年鼠连续增殖与分化中, *CDX-1* 只在肠的上皮表达, 可见 *CDX-1* 在鼠的胚胎发育与细胞分化中起重要作用。另一 *HOX* 基因 *EN-2* 基因, 在新生鼠和成年鼠小脑与脑桥的颗粒层有大量表达, 该蛋白产物不仅在神经管和脑的特定区域有定位作用, 在细胞分化过程中也起重要作用。最近 Muragaki 报道, *HOXD13* 基因的缺损是引起人多手指和多脚趾的原因之一, 这种突变具有遗传性。*HOX* 基因在进化上相当保守, 在染色体上排成簇, 排列顺序与它们所控制的胚胎发育密切相联, 称之为共线性规则。即在基因组中越是靠近 3'-端的 *HOX* 基因, 在胚胎发育过程中越早表达。果蝇、鼠和人以及其他一些真核生物都有这个现象。Lewis, Nusslen-Volhard 和 Wieschaus 三位科学家, 因为发现能调控果蝇胚胎发育的基因而荣获 1995 年度诺贝尔生理学医学奖, 他们最先分离到的就是 *HOX* 基因。

现在已从各种生物中分离了 300 个含有同形异位框的基因, 其中一类称为 *PAX* 基因。*PAX* 基因含有配对框 (Paired box), 编码一种 DNA 结构域, 即配对域 (Paired domain)。大多数 *PAX* 基因除了配对框外还含有同形异位框。从无脊椎动物到脊椎动物已分离到的 *PAX* 基因产物都是转录因子。*PAX* 基因的表达一般在胚胎发生的早期, 主要在中胚层和外胚层有丝分裂旺盛的细胞中表达。*PAX* 基因的缺失或突变, 影响生物的形态发生与发育。例如, 鼠 *PAX-1* 基因配对框保守区中单一核苷酸的改变就导致形成波浪表型, 该突变体影响了轴向骨架结构, 可作为分子模型来研究无脊椎盘和脊椎中枢从生骨节细胞到原基的分化途径。鼠 Sp 突变体是由于 *PAS-3* 基因全部缺失或部分缺失造成斑点表型, *PAX-3* 基因缺失影响了中枢神经系统结构的形成以及由神经脊衍生的结构的形成。鼠 Sp 突变体和人 WS1 综合症都与 *PAX-3* 基因突变有关。Chalepakakis 等人在分子水平上研究这些突变体时发现, *PAX-3* 蛋白的同源域与配对域之间有一个保守的八肽, 此八肽参与了蛋白形成同源二聚体, Sp 突变体与人 WS1 综合症, 都是因为该八肽序列的突变, 影响了 *PAX-3* 蛋白与 DNA 结合的能力和形成二聚体的能力。配对域与 DNA 结合复合物的晶体结构表明配对域以同源二聚体的形式结合于 DNA。二聚体的形成提高了蛋白识别靶 DNA 的能力和结合专一性。

除 *HOX*, *PAX* 基因之外, 真核生物内还有几类含有同形异位框的基因。POU 类: 最早以先克隆到的 *PIT-1*, *OCT-1*, *UNC-86* 基因而命名。POU 蛋白由同源域和 POU 专一的功能域 (80 氨基酸) 两个 DNA 结合区构成。CUT 类: 在同源域上游有三个 80 氨基酸的 CUT 重复序列。锌指 (ZF) 类含有锌指结构和同源域。NK-2 类在同源域下游有一保守肽 CP (Conserved Peptide)。该家族中第一个被克隆的基因是甲状腺转录因子 (TTF-1)。同源域蛋白是一类参与和影响真核生物形态发生与发育的蛋白因子, 它们中的大部分是转录因子。对同源域蛋白的靶基因了解不多。Guazzi 等人曾报道, TTF-1 基因是 *HOX* 基因的靶基因, 在 NIH3T3 或 Hela 细胞中, *HOXB3* 基因产物能诱导 TTF-1 启动子的开放, *HOXB3* 基因在人早期胚胎发生中表达。其它在胚胎发生较后期表达的 *HOX* 蛋白都不能诱导 TTF-1 的表达,

各种 *HOX* 基因之间的同形异位框差别很细微，它们对靶基因调控的专一性却很好。Zapparina 等人认为，*HOX* 蛋白与靶 DNA 结合的专一性不仅依赖于 DNA-蛋白的相互作用，也依赖蛋白与蛋白的相互作用，它们可能形成不同的复合物，共同完成对各个靶基因细致而专一的调控。*PAX-2* 基因在早期肾的形态发生中被激活，在成熟肾上皮中被抑制，而不同肾肿瘤中 *PAX-2* 基因的表达却一直开放。Ryan 等发现，Wilm's 肿瘤抑制蛋白 WT1 是 *PAX-2* 基因调控的阻遏子，WT1 因子结合于 *PAX-2* 基因的启动子区域，抑制 *PAX-2* 的转录。*PAX-6* 为正常眼睛发育所必需，被称为胚胎发生中晶状体形成的主管基因 (Master)。最近的证据表明，zeta-晶状体蛋白是 *PAX-6* 的靶点，把能在晶状体中专一表达的启动子置于豚鼠 zeta-晶状体基因前，*PAX-6* 不仅能结合于该启动子，而且是晶状体蛋白专一表达所必需。尽管对大部分同源域蛋白上游与下游调控机制的了解还不够深入，从已确定的一些靶基因如转录因子、生长因子、细胞粘附分子的基因来看，同源蛋白作为转录因子在各类基因的表达调控中都有重要功能。

生物细胞内进行着错综复杂的新陈代谢过程，细胞的信号系统在代谢调节控制上起重要作用。所有细胞都有对外界刺激作出反应的能力。外界刺激因子可通过两种途径把信号传递到细胞内，一是通过膜蛋白传递，另一是胞外的分子或大分子直接从胞外转运进入胞内引起信号应答。在膜蛋白传递信号系统中，外界配体 (Ligand) 结合于细胞膜上受体，通过一系列磷酸化与去磷酸化作用，把信号一级级传到细胞核内，产生信号应答。膜上受体可以是一次跨膜的穿膜蛋白，配体结合于它的胞外部位而影响其细胞内功能域的活性。例如，酪氨酸蛋白激酶 (PTK) 通过胞外配体结合激活，使自身分子的胞浆功能域磷酸化，磷酸化的受体进一步激活靶蛋白从而诱导磷酸化级联 (Phosphorylation cascades)。表皮生长因子 EGF、血小板生长因子 PDGF、胰岛素等引起的应答反应都属于这种传递方式。膜上的受体也可以是几次跨膜的穿膜蛋白，典型的例子是七次跨膜受体。许多配体如视紫红质、多巴胺、阿片样物质都是通过这条途径激活它们各自的受体，活化的受体又激活异源三聚体 G-蛋白 ($G\alpha\beta\gamma$)，然后把信号传到靶点。G-蛋白的研究是当今的热点之一，Rodbell 和 Gilman 因为对 G-蛋白研究的贡献而荣获 1994 年度诺贝尔生理学或医学奖。最近视杆细胞 G-蛋白的晶体结构已被解出。Clapham 根据这些研究结果提出了 G-蛋白在传递信号过程中的作用模型，整个信号复合物在传递过程中并不是像以前推测的一系列双分子反应，而更像由杠杆 (受体)、开关 ($G\alpha$) 和螺旋桨 ($G\beta\gamma$) 组成的纳米机器，这个纳米机器激活各自的效应器把信号传递下去。在信号传导途径中，促分裂原活化蛋白激酶级联 MAPKs Cascade (Mitogen-activated protein Kinases Cascade) 起非常重要的作用。MAPKs 途径中受 G 蛋白或 G 蛋白类似物的激活，MAPKKK (Mitogen-activated protein Kinase Kinase Kinase) 被磷酸化并进一步激活 MAPKK (MAP Kinase Kinase)，MAPKK 再激活 MAPK (MAP Kinase)，MAPK 以某种方式激活核内转录因子，从而使信号从胞浆传到细胞核，产生基因表达调控应答。尽管 MAPKs 途径并不是细胞内唯一的信号传递途径，却代表了几类外界刺激信号应答传递的共同机制。现在发现细胞内常有多种 MAPK，MAPKK 和 MAPKKK 存在，这些蛋白激酶既有底物专一性应答着不同的外界刺激信号，在功能上又有一定的互补性，说明 MAPKs 途径可能以某种方式与其它传递途径相联结。

正常的胚胎发育受遗传物质和胚胎整体性的调控，基因按一定的时间和空间顺序表达，细

胞进行分裂增殖并分化成不同类型的细胞,形成不同的组织和器官。这些细胞、组织和器官表达特异分化产物,出现可测的功能和形态特征。有证据表明,信号传导级联中的成分直接影响了个体的发育。表皮生长因子 EGF 和肝细胞生长因子 HGF 是上皮、内皮和肝细胞的促细胞分裂原,通过由原癌基因 MET 编码的酪氨酸蛋白激酶受体,把信号从胞外传递到胞内靶蛋白,磷酸化许多细胞骨架蛋白,直接影响了细胞的形态发生、分裂增殖、运动和粘附。用转基因小鼠研究生长因子受体突变体对小鼠生长的影响,发现突变后的生长因子受体能阻断两个生长因子的刺激作用,直接影响角质形成细胞的结构和分化。把半截的 FGF 受体 mRNA 注射到非洲爪蟾胚胎,能抑制中胚层衍生的平滑肌 α -肌动蛋白的表达,重新注射野生 FGF 受体 mRNA 能使表型变化逆转为正常情况。Meno 等人最近从小鼠体内分离了一个被称为“left-y”的基因,属于 TGF- β 家族,该基因可能是决定左右不对称的形态发生素,它在小鼠原肠胚的形成过程中只在左边表达;在 iv 和 inv 突变体中,表达发生逆转。Ras 相关蛋白的研究也表明信号传导途径与形态发生直接相连。通过转基因技术使果蝇 GTPase 家族基因之一 Rho1 在视网膜细胞中过量表达,引起眼睛晚期发育的缺损,表现为重度粗糙表型眼睛,第二和第三色素细胞丢失,感光细胞大量减少,感杆形态也变成不正常。果蝇神经系统 GTPase 相关蛋白 Rac1 和 Cdc42 的缺失引起形态变化,Rac1 主要影响轴突和肌肉的形态发生;Cdc42 影响神经元的生长。转基因小鼠也有类似的情况,Rac1 的持续表达引起小鼠的行为异常。

看来,胚胎发育过程是以级联(Cascade)方式受控制,一个调控元件联到基因上游时就打开(或关闭)这个基因,这个基因产物又在下一个阶段操纵了其它基因的表达。这种级联反应与嗜菌体和细菌中的基因表达调控很相似,真核生物只是更复杂罢了。啤酒酵母是低等真核生物,由于其易操作性,是一个很好的真核生物模式系统,许多研究结果都已被高等真核生物所借鉴。啤酒酵母体内已发现五种信号传导途径:(1)信息素应答途径。交配因子通过七次穿膜受体与 G-蛋白作用激活效应器 Ste5,然后激活 Ste11(MAPKKK),Ste7(MAPKK),Fus3/Kss1(MAPK)级联,MAPK 进一步激活核转录因子 Ste12,Ste12 再激活许多与交配过程有关的结构基因转录表达,使细胞产生交配应答。(2)假菌丝与菌体侵入生长途径。(3)细胞完整性途径,也称做 PKC 途径。(4)高渗透性甘油应答途径,也称做 HOG 途径。(5)孢子形成途径。尽管第(2)——(5)等途径中磷酸化级联的蛋白激酶尚未研究清楚,但似乎都有与 MAPK 对应的蛋白激酶存在。已深入研究的哺乳动物系统 MAPK 是生长因子应答途径的 ERK。最近 B. Derijard 等人分离到一个能激活原癌基因 c-jun 的 MAPK (JNK1),JNK1 能应答 TNF, IL-1, UV 辐射和渗透压等外界刺激。另一个新近分离的哺乳动物 MAPK 是 p38, p38 能被 IL-1、热休克和高渗透压介质激活。尽管 JNK1 和 p38 的上游与下游激活途径尚不清楚,从它们的外界刺激信号和磷酸化位点看,与酵母 HOG1 途径相类似。

生物体按照一种精确的程序进行发育,发育的信息就储存在 DNA 的核苷酸序列上,DNA 所储存的一维序列信息如何转换成一个胚胎的三维结构,甚至四维结构(如果包括时间在内),发育程序归根到底是维系在结构基因表达的精确时空格局中。分子生物学在发育研究上的任务,就是要了解特定细胞类型基因表达的控制如何与细胞的生长、分裂和运动等过程联系起来。在基因水平上研究形态发生的调控以及与信号传导的内在联系,将为真核生物形态发生的分子机制研究提供理论基础。

参 考 文 献

- [1] Bard J. Morphogenesis: The cellular and molecular processes of developmental anatomy. Cambridge University Press, 1990.
- [2] Rossomando EF, Alexander S. Morphogenesis: An analysis of the development of biological form. New York: Marcel Dekker, Inc., 1992.
- [3] Gruss P, Kessel M. Axial specification in higher vertebrates. *Current opinion in genetics and development*, 1993, **1**:204-210.
- [4] Barinaga M. Looking to development's future. *Science*, 1994, **266**: 561-564.
- [5] Schultz J, Ferguson B, Sprague GF. Signal transduction and growth control in yeast. *Current opinion in genetics and development*, 1995, **5**: 31-37.
- [6] Tautz D. Selector genes, polymorphisms and evolution. *Science*, 1996, **271**: 160-161.
- [7] Clapham DE. The G-protein nanomachine. *Nature*, 1996, **379**: 297-299.

MOLECULAR MECHANISMS OF MORPHOGENESIS REGULATION OF GENE EXPRESSION AND SIGNAL TRANSDUCTION

Chen Jiangye

(Shanghai Institute of Biochemistry, CAS, Shanghai 200031)

Abstract Morphogenesis is defined in the Encyclopedia Britannica as: Morphogenesis is the shaping of an organism by embryological processes of cellular differentiation, histogenesis, organogenesis and development according to the genetic "blueprint" of the potential organism and environmental conditions. The discovery of homeotic genes of *Drosophila melanogaster* set the stage decipher molecular mechanisms underlying vertebrate development in general. The most homeotic genes from eukaryotes encode for transcription factors and play an important role in morphogenesis. Ability to respond to the surrounding environment, and control of the entry and exit of molecules through the plasma membrane, are crucial features of any cell. Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are important mediators of signal transduction from the cell surface to the nucleus. Study on the regulation of gene expression and the signal transduction pathway will provide a molecular basis for morphogenesis.

Key words morphogenesis, regulation of gene expression, signal transduction.