

# Pax-6 基因在发育中的表达与动物眼的进化<sup>\*</sup>

乌日琴 徐永立 张培军<sup>\*\*</sup>

(中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放实验室 青岛 266071)

**摘要:**近年在脊椎动物和无脊椎动物中分离出 Pax-6 基因及其同源基因,这些基因都与动物的眼与神经系统的发育和形态发生有关。本文着重比较了无脊椎动物果蝇、文昌鱼、哺乳动物小鼠和人的 Pax-6 基因编码蛋白, Pax-6 基因在发育过程中的表达, Pax-6 与眼进化的关系等几个方面,并介绍 Pax-6 基因为靶基因的转基因果蝇的上游制作技术和原理。探讨了 Pax-6 基因作为眼发育的主导基因的作用和时空表达模式的保守性。

**关键词:** Pax-6 基因; Small eye 基因; eyeless 基因; 文昌鱼; 眼; 发育

**中图分类号:** Q951 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2002)01-86-04

## Developmental Expression of Pax-6 Gene and Eye Evolution

WU Ri-Qin XU Yong-Li ZHANG Pei-Jun

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science Qingdao 266071, China)

**Abstract:** Pax-6 genes have been identified from a broad range of invertebrate and vertebrate animals and have been shown to be always involved in the development of early eyes and neural system. In this review we emphasize on the comparison of Pax-6 gene encoding transcription factors, and its expression in the developing nervous system and in the eye during morphogenesis, and the relationship between eye evolution and Pax-6 gene in different animals. We have also discussed the upstream technique for producing transgenic drosophila with ectopic eyes by targeted expression of eyeless gene, and conservation of the temporal and spatial expression patterns of Pax-6 gene.

**Key words:** Pax-6; Small eye; Eyeless; Amphioxus; Eye; Development

首次报道的 Pax-6 基因是果蝇的 eyeless(ey)基因突变,其特殊的表型是果蝇复眼的部分或全部缺失。ey 基因与后来发现的小鼠的 Small eye(Sey = Pax-6)基因和人类的 Aniridia 基因是同源基因。这些基因核苷酸序列和它们所编码的蛋白质的氨基酸序列的高度同源性引起了研究人员的极大兴趣,接着又相继在海鞘、头足纲和纽形动物中发现 Pax-6 基因,因此有人认为 Pax-6 的功能可能在后生动物门中是普遍存在的。目前的研究证明 Pax-6 基因与脊椎动物眼的发育及无脊椎动物的神经系统发育有关<sup>[1-3]</sup>,并可能处于眼发生的级联调控系统最高级,因此有人认为各种类型的眼实际上都是由 Pax-6 基因调控的同一个眼的模型进化而来<sup>[4,5]</sup>。

因子组成,这些转录因子都含有由 6 个  $\alpha$ -螺旋构成的 DNA 结合区域,即所谓的配对域(paired domain),此外包括 Pax-6 基因在内的一些 Pax 基因还含有一个保守的同源框。Pax-6 基因因为其在动物眼和神经系统发育中的重要作用以及这种基因序列和功能的高度保守性,目前是 Pax 基因家族中被研究最为广泛的。序列分析的结果表明,果蝇 ey 基因编码的转译因子包含一配对域和一同源域。ey 基因与小鼠的 Sey 基因和人类的 Aniridia 基因是同源基因。这些基因编码的蛋白质在配

<sup>\*</sup> 中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放室基金资助;

<sup>\*\*</sup> 通讯作者;

第一作者介绍 乌日琴,女,27岁,博士生,助教;研究方向:海洋动物发育生物学和基因工程。

收稿日期:2000-12-28,修回日期:2001-06-15

### 1 Pax-6 基因编码蛋白

Pax 基因家族是由一系列组织特异性的转录调控

对域有 94 % 的序列相同,在同源域有 90% 序列相同,并且都含有相似的侧面序列。果蝇 *eye* 基因与哺乳动物有三分之二的配对框及二分之一的同源框的剪切位点是保守的,表明这些基因高度同源。

文昌鱼 Pax-6 (AmphiPax-6) 基因编码的蛋白质,同样也包含一个配对域和一个结构域,其 80% ~ 100% 序列都显示与另外一些脊椎和无脊椎动物的一致性,以及与这些保守的 DNA 结合域之外的较高的序列一致性,尤其是在 C 末端<sup>[6]</sup>。在 Pax-6 蛋白配对域,其中有些 AmphiPax-6 基因缺少氨基酸残基 CVSKILGR (位点 49 ~ 56),即 N 末端的 DNA 结合域全部的  $\alpha$ -螺旋 3 区域。上述突变删节的部分可能会改变 DNA 结合部分特异性,改变配对域或同源域的 C 末端 DNA 结合域的结合活性。这样比较严格的配对域 DNA 序列的特异性也存在于其它的脊索动物 Pax 基因,如:人 Pax-8 基因剪切的变化在 R56 和 Y57 之间引入了额外丝氨酸残基,又在 Pax-6 的配对域 Q44 和 V45<sup>[7,8]</sup> 中引入了 14 个氨基酸,这种在配对域含有 14 个氨基酸插入部分的同工型,在脊椎动物鱼类中已被分离<sup>[9]</sup>,但文昌鱼中并不存在。AmphiPax-6 基因有时含有 17 个碱基的插入序列导致一个蛋白缺少 C 末端保守序列。Pax 基因中如果含有可变的 C 末端会产生不同的转录特性,同工型基因含有特异的 C 末端可能会导致蛋白功能的变化,如前述的人 Pax-8 和 Pax-2 基因。同样比较被囊类与文昌鱼 Pax-6 蛋白,配对域和同源域相同氨基酸序列则相对较低 (87% 和 95%),未发现保守的 C 末端序列。

## 2 Pax-6 基因在发育过程中的表达

果蝇的 *ey* 基因首先是在胚胎的腹神经索和脑的特定区域表达<sup>[6]</sup>,胚胎发生的后期一旦出现原始胚胎眼原基,*ey* 基因即开始在此转录,幼虫时期 *ey* 基因被转录为眼成虫盘,第三个时期,*ey* 基因的表达区域在很大的程度上局限于眼盘发生前的形态发生嵴内,包含在一些未分化细胞,反而另一些晚于形态发生嵴的正在分化的小眼细胞已出现。*ey* 基因最先表达并控制一系列次级控制基因,包括 *sine oculis* 基因,也是含同源异型框基因。结果,基因的表达影响细胞相互作用、规范信号的转导,影响最后结构基因如视紫红质、晶状体蛋白和转录因子表达。

文昌鱼不同于其它动物,它有 4 种视觉感受器:前眼、片层体、Joseph 细胞和 Hesse 器。这 4 种视觉感受器的多样性可能更有利于研究眼的进化及其依赖 Pax-6 基因引发的遗传途径。此外,文昌鱼可能是无脊椎动物中惟一有脊椎动物垂体前叶和胰腺  $\alpha$  细胞和  $\beta$  细胞

同源器官的动物。Gardon<sup>[10]</sup> 的实验资料表明,Pax-6 在文昌鱼的嗅上皮和垂体前叶的发生起重要作用,但不参与胰腺细胞和脊索的发育。在视觉感受器的发育过程中,Pax-6 基因只在松果体和片层体表达,分别是脊椎动物松果眼和对眼的同源器官。相反,Joseph 细胞和 Hesse 体的发育显然是由一个不包括 Pax-6 基因的级联系统指导。因此,可以认为所有动物的视觉感受器都是同一来源,并以 Pax-6 引发的级联系统为特征的,神经节眼则是极少数的例外。文昌鱼的中肠一些内皮细胞含有内分泌肽,与脊椎动物的胰岛细胞同源<sup>[6]</sup>。Gardon 在文昌鱼中肠内分泌肽细胞并未发现 AmphiPax-6 基因的表达。文昌鱼 Pax-6 同源基因的表达区域与脊椎动物垂体前叶的雏形很相象。AmphiPax-6 基因的表达局限于口前刺毛点的中胚层细胞,而脊椎动物 Pax-6 基因的表达则在 Rathke 氏囊的上皮细胞。进一步研究文昌鱼发育中垂体前叶的特异性制造者,将有助于弄清楚这种分歧的意义。

小鼠的 *Sey* 基因在脊髓,大脑的分离区和发育中的眼都有表达。小鼠眼的形态发生从头至尾都伴随 *Sey* 基因的表达:首先是在视杯,然后是在眼原基,在晶状体,在正在分化的视网膜,最后是在角膜<sup>[11]</sup>。

## 3 Pax-6 基因与眼的进化

Eakin<sup>[12]</sup> 提出睫状体视觉感受器在动物进化中先出现,在一些世系中则产生视轴感受器。与此相反,Chiselin<sup>[13]</sup> 认为首先出现的是视轴。这两种假说都认为动物眼是单一起源的。相反,Salivini-Plawen 和 Mayr<sup>[14]</sup> 却认为视轴和睫状体感受器分别从许多分化族系的未分化上皮细胞发育而来,他们承认神经节视觉感受器是较稀少的一种。最近,在多种门类动物中发现了 Pax-6 基因引导视轴和睫状体视觉感受器同时发育的现象,使 Salivini-Plawen 和 Mayr 提出的极端多源学说受到挑战,这种均由 Pax-6 基因为主导基因调控眼发育的特性已被作为动物单一眼系统发生的证据。

*ey* 基因可能是脊椎动物和无脊椎动物所共有的眼形态发生的主导基因。为了证实小鼠的 *Sey* 基因是否能代替果蝇的 *ey* 基因,用小鼠的 *Sey* 基因做目的基因在果蝇成虫盘表达,小鼠的 *Sey* 基因同样可以诱导异位眼的结构,同样异位眼的结构组成包含果蝇形态的小眼,而不是小鼠眼的形态。对已各自进化了 5 亿年的哺乳动物和昆虫的观察发现,他们有共同的眼形态发生的主控基因,这表明发育的基因调控机制,较预想的更具通用性。

在文昌鱼,头部视觉感受器(前眼和层状器)遵循

以上规律,但较靠后的视觉感受器(Joseph 细胞和 Hesse 体)的发育过程似乎由一个非 Pax-6 基因引导的基因组调控。Joseph 细胞和 Hesse 体的异常性质是 Joseph<sup>[15]</sup> 首先发现的,他认为 Joseph 细胞和 Hesse 体区别于文昌鱼其它的视觉感受器是新性发生。构成神经节视觉感受器的细胞来源于已分化的神经细胞重新组装为“神经节”视觉感受器<sup>[14]</sup>,但目前几乎没有对哪种视觉感受器进行分子基因水平的研究,如果看一下其它动物的神经节视觉感受器的发育过程是不是也缺乏 Pax-6 基因表达,存在不依赖 Pax-6 基因引导的发育路径,对于动物眼的进化过程将有更深入的了解。如果这些视觉感受器真是所谓的新性发生,那么它们的发育由非 Pax-6 基因引导的基因级联系统控制就不奇怪了。

#### 4 ey 基因作为目的基因的转基因果蝇

Gehring 等人将 ey cDNA 表达质粒导入转基因果蝇的卵中,得到了有 14 个复眼的果蝇,腿、翅膀和触角上都有形态结构正常而体积较小的异位眼。作为实验背景,首先利用 GAL4 系统,GAL4 是一种酵母转座子可以激活导入果蝇体内的任何其上游含有 GAL4 启动子 UAS 的基因。GAL4 转座子目前被广泛用于增强子检测,将含有报告基因与一个弱启动子的转座子引入基因组的随机位点,如果转座子插入位点与增强子很近,报告基因异常表达。通过分离大量的增强子检测系,可以获得一个多种增强子不同的时空表达模式的图谱。如果 GAL4 基因用作报告基因,这些增强子检测系可以被用于目的基因的表达:增强子驱动 GAL4 基因的表达,这又会进一步激活目的基因,ey 基因的上游启动子是 UAS。GAL4 转座子与重组的 UAS+ ey 基因连锁产生转基因杂合子果蝇在所有表达 GAL4 的细胞中表达 ey 基因,在挑选的接近 20 个 GAL4 转座子检测系,其中只有 3 个发育为有用的成虫可供进一步分析检测。其中 E132 与重组体含有 UAZ+ lacZ 结构, $\beta$ -半乳糖苷酶杂交斑点揭示了被 GAL4 基因激活的报告基因 lacZ 及 GAL4 基因在成虫盘的表达方式。E132 表达的 GAL4 基因在翅的分散位点和平衡器盘、三对腿盘、触角成虫盘,即成虫相应结构的原基。当 GAL4 表达系 E132 与含有与 GAL4-UAS 连锁的 ey 胚胎 cDNA 的重组体杂交,可以产生杂合子果蝇<sup>[4,16]</sup>,ey 基因可以定点在以上所述的成虫盘表达。而野生型控制 ey 基因只在眼盘表达。最近分离的一些低等动物的 Pax-6 基因也通过上述途径在果蝇体内诱导产生了异位眼,有趣的是,不论是小鼠还是海鞘 Pax-6 基因,它们诱导产生的都是果蝇的小眼,这些现象更加有力的证明 Pax-6 基因处于调控系统

的上游。异位眼的结构正常,但体积略小,目前的研究还不能探明这些异位眼的功能发育情况。

#### 5 结 语

Pax-6 基因编码的转录因子在动物胚胎从区域化到细胞类型分化的不同发育过程中起重要作用。最近的研究重点上升到遗传水平,对其作为指导到眼发育的主导基因的功能进行深入探讨,并提出新的假说,即所有的动物的视觉感受器是单一起源,这些视觉感受器的共同祖先是 Pax-6 基因作为开启基因发育形成的。另外一些参与动物眼发育的保守基因,如 sparkling/Pax, eyes absent/Eya, 和 oculis/Six<sup>[17,18]</sup> 基因的分离、测序和基因功能的研究,有力地支持这个假说,这些基因均参与了果蝇和脊椎动物眼发育,它们的核苷酸序列包含 Pax-6 基因编码蛋白的结合位点。对于脊椎动物和无脊椎动物眼形成的级联调控因子的比较,发现两者的异同,为探明在进化过程中有多少新的基因加入到这些发育途径中提供更多的信息。

#### 参 考 文 献

- [1] Callaerts P, Halder G, Gehring W J. Pax-6 in development and evolution. *Ann Rev Neuroscience*, 1998, **20**: 483 ~ 532.
- [2] Gee H. Before the Backbone. View on the Origin of the Vertebrates. London: Chapman and Hall, 1996. 89 ~ 92.
- [3] Wada H, Satoh N. Details of the evolutionary history from invertebrates to vertebrates, as deduced from the sequences of 18 Sr DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 1 801 ~ 1 804.
- [4] Gehring W J. The master control gene for morphogenesis and evolution of the eye. *Gene to Cells*, 1996b, **1**: 11 ~ 15.
- [5] Halder G, Callaerts P, Gehring W J. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science*, 1995a, **267**: 1 788 ~ 1 792.
- [6] Glardon S, Holland L Z, Gehring W J. Isolation and developmental expression of the amphioxus Pax-6 gene (AmphiPax-6): insights into eye and photoreceptor evolution. *Development*, 1998, **125**: 2 701 ~ 2 710.
- [7] Epstein J A, Glaser T, Cai J. Two independent and interactive DNA binding sub-domains of the Pax-6 paired domain are regulated by alternative splicing. *Gene Dev*, 1994a, **8**: 2 022 ~ 2 078.
- [8] Kozmik Z, Czerny T, Bussling M. Alternatively spliced insertions in the paired domain restrict the DNA sequence specificity of Pax-6 and Pax-8. *EMBO J*, 1997, **16**: 6 793 ~ 6 803.
- [9] Grindley J C, Hargett L K, Hill D R. Disruption of PAX-6 function in mice homozygous for the Pax-6 Sey-1Neu mutation produces abnormalities in the early development and regional-

- ization of the diencephalon. *Mech Develop*, 1997, **64**: 111 ~ 126.
- [10] Glardon S, Callaerts P, Halder G. Conservation of Pax-6 in a lower chordate, the ascidian *Phallusia mammillata*. *Development*, 1997, **121**: 1 433 ~ 1 442.
- [11] Reinecke M. Immunohistochemical localization of polypeptide hormones in endocrine cells of the digestive tract of *Branchiostoma lanceolatum*. *Cell Tissue Res*, 1981, **219**: 445 ~ 456.
- [12] Eakin R M. Evolutionary significance of photoreceptors :in retrospect. *Am Zool*, 1979, **19**: 2 048 ~ 2 061.
- [13] Ghiselin M T. The origin of molluscs in the light of molecular evidence. *Oxford SurvEvol Biol*, 1988, **55**: 66 ~ 95.
- [14] Salvini-Plawen L V, Mayr E. On the evolution of photoreceptors and eyes. *EvolBiol*, 1977, **10**: 207 ~ 263.
- [15] Joseph H. Ueber eigentumliche Zellstrukturen im Zentralnervensystem von Amphioxus. *Verh Anat Ges*, 1904, **18**. 16 ~ 26.
- [16] Gehring W J. The master control gene for morphogenesis and evolution of the eye. II. *Gene to Cells*, 1996b, **1**: 11 ~ 15.
- [17] Fu W, Noll M. The Pax-2 homolog sparkling is required for development of cone and pigment cells in the *Drosophila* eye. *Gene Dev*, 1997, **11**: 2 066 ~ 2 078.
- [18] Oliver G, Gruss P. Current views on eye development. *Trends*, 1997, **9**: 415 ~ 421.