论文

睾丸优势表达的Boule蛋白影响果蝇发育

夏文娟, 肖天衡, 黄娟, 徐宇君*

南京医科大学, 生殖医学国家重点实验室, 南京 211166

* 联系人, E-mail: xuyujun@njmu.edu.cn

收稿日期: 2020-01-18; 接受日期: 2020-03-05; 网络版发表日期: 2020-04-08

国家自然科学基金(批准号: 3177652, 31970792)资助

摘要 *boule*基因是屈指可数的高度保守、横跨后生动物的调控多个物种精子发生所不可或缺的基因。在果蝇中, *boule*基因突变体*bol*¹可导致雄性不育, 而*boule*基因的大片段缺失突变体*boule*⁴⁰却表现了致死表型, 提示*boule*可能在胚胎发育过程中也起到一定的作用。为了验证这一假设, 首先, 本团队利用RT-PCR检测了*boule*基因在不同组织中的表达情况, 并构建了GFP敲入突变体检测Boule蛋白在不同组织中的分布, 结果表明*boule* mRNA及Boule蛋白在发育过程及成蝇的头、胸、腹中均存在。其次, 构建了*boule*基因完全缺失突变体, 发现在不同发育阶段均有致死发生。为了探寻这种影响是来自*boule*基因产生的蛋白还是非编码RNA或是内含子产生的未发现的基因, 本团队又构建了*boule*基因单碱基缺失的移码突变体, 发现同样有致死现象。最后, 全身性过表达Boule蛋白也可导致果蝇发育过程中的逐渐死亡。以上结果都说明, 果蝇体细胞中的Boule蛋白在发育过程中起重要作用, 并需要进行精确调控。这一睾丸以外的作用目前只在昆虫中发现。

关键词 *boule*, 果蝇, 睾丸, 精子发生, 体细胞, 发育

Boule是DAZ家族Boule, DAZ, DAZL(DAZ-like)中最古老的成员, 其保守存在于果蝇到人类的几乎所有物种中^[1,2]。在果蝇中, *boule*呈现睾丸优势性表达, *boule*基因突变(*bol*¹)导致雄性不育, 精子发生阻滞在减数分裂阶段^[3]; 在小鼠中, *Boule*呈现睾丸特异性表达, 敲除后导致雄性小鼠不育, 精子发生阻滞在圆形精子阶段^[4,5]。此外, 在*bol*¹突变果蝇中异位表达人源的BOULE蛋白, 可以挽救*bol*¹雄蝇精子发生的减数分裂缺陷^[6], 说明人和果蝇的Boule蛋白不仅在氨基酸序列上, 更在功能上呈现高度保守性; 同时也说明, *Boule*在长期进化过程中维持了睾丸特异的表达和功能。前期

有文章报道了生殖细胞以外的*boule*体细胞转录本的存在及其潜在功能, 大片段敲除*boule*基因(*bol*⁴⁰)后导致多数果蝇不能存活, 致死阶段主要在幼虫阶段之前^[7,8]。这一结果提示*boule*基因除了参与成蝇精子发生功能之外, 也可能在果蝇发育过程中发挥重要作用, 但是具体机制尚不清楚。

本研究中, 本团队通过基因编辑技术构建了Boule蛋白C端GFP标签(Boule-GFP)果蝇, 通过Western Blot以及qPCR等检测方法, 全面地描述了果蝇*boule* mRNA和Boule蛋白在果蝇不同发育阶段的表达分布。通过构建*boule*基因大片段敲除(*boule* KO)以及单碱基

引用格式: 夏文娟, 肖天衡, 黄娟, 等. 睾丸优势表达的Boule蛋白影响果蝇发育. 中国科学: 生命科学, 2020, 50: 438–445

Xia W J, Xiao T H, Huang J, et al. Testis-biased Boule is essential for *Drosophila* development (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2020, 50: 438–445, doi: 10.1360/SSV-2020-0026

缺失(*boule* $\Delta 1$)两种Boule蛋白敲除果蝇, 本团队发现, 缺失Boule蛋白影响果蝇的正常发育, 能发育到成蝇的比例极少; 同时发现, 全身过表达果蝇Boule蛋白也产生类似的发育异常表型. 该研究说明, Boule蛋白精准表达调控对于果蝇正常发育是必需的.

1 实验材料与方法

1.1 实验果蝇

本实验中用到的果蝇品系、来源、构建策略或目的请见表1.

1.2 实验试剂与仪器

Real Time PCR扩增仪(Thermo Scientific, 美国); RNA/DNA/Protein定量分析仪(Thermo Scientific); 超声粉碎仪(Sonics & Materials Inc, 美国); 果蝇培养箱(Percival Scientific Inc, 美国); 点扫描激光共聚焦显微镜(ZEISS, 德国). Green Taq Mix(Vazyme, 南京); PrimeScriptTM RT Master Mix(TaKaRa, 日本); PrimeSTAR GXL DNA Polymerase(TaKaRa); 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(中杉金桥); 山羊抗小鼠IgG(中杉金桥, 北京); TRIzol[®] Reagent(Ambion, 美国); FluoroshieldTM with DAPI(Sigma, 美国); 蛋白酶K(Life, 美国); RIPA 裂解液(强)(碧云天, 上海); 其他未具体提及的试剂均为国产.

1.3 实验方法

(1) 果蝇DNA提取及基因型鉴定. 将果蝇放入

1.5 mL EP管中, 冷冻20 min后加入500 μ L裂解液和5 μ L蛋白酶K(浓度10 mg/mL), 破碎果蝇身体, 放置56 $^{\circ}$ C水浴过夜. 12000 $\times$ g离心5 min, 吸取上清至新的EP管, 弃沉淀, 加入500 μ L无水乙醇, 混匀析出DNA沉淀. 12000 $\times$ g离心5 min, 弃上清. 加入500 μ L 70%乙醇漂洗沉淀, 涡旋震荡. 12000 $\times$ g离心5 min, 弃上清. 打开EP管于37 $^{\circ}$ C烤箱中挥发完酒精. 向EP管中加入20 μ L ddH₂O, 涡旋混匀, 12000 $\times$ g离心5 min, 测DNA浓度.

基因型鉴定: PCR扩增条件: (95 $^{\circ}$ C, 5 min), (95 $^{\circ}$ C, 30 s; 60 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 30 s) $\times$ 30 cycle, (72 $^{\circ}$ C, 5 min), (25 $^{\circ}$ C, 保持). PCR引物序列(图1B蓝色箭头): Forward primer: 5'-GGAGTATCGAGGATCTGAGG-3'; Reverse primer: 5'-CATCTCCAGTCCTCGTACCA-3'. PCR产物大小: WT, 209 bp; GFP(Boule-GFP), 959 bp.

(2) RNA提取及qPCR. 解剖约30只果蝇的头、胸、腹(去睾丸)、睾丸或者1000个胚胎、500个幼虫、25个蛹, 放入1.5 mL EP管中, PBS洗一次后去除液体, 加入500 μ L Trizol, 每个样本冰上超声匀浆15 min. 匀浆后, 室温放置5 min使其充分裂解. 12000 $\times$ g离心5 min, 弃沉淀. 加入100 μ L氯仿, 上下翻转混匀后放置室温15 min, 4 $^{\circ}$ C, 12000 $\times$ g离心15 min, 吸取上层水相, 转移至新1.5 mL EP管. 加入250 μ L异丙醇混匀, 室温静置5~10 min后, 4 $^{\circ}$ C, 12000 $\times$ g离心10 min, 白色RNA沉淀沉于EP管底部, 尽量弃上清. 加入500 μ L乙醇洗涤RNA沉淀, 上下翻转EP管悬浮沉淀. 4 $^{\circ}$ C, 8000 $\times$ g离心5 min, 尽量弃上清. 再重复洗涤一次. 超净台中室温晾干或真空干燥5~10 min. 使用Nanodrop2000测RNA样本A值, 定量RNA浓度. 将RNA按照反转录试剂盒(Ta-

表 1 实验果蝇

Table 1 *Drosophila* stocks used in this study

果蝇品系	来源	构建策略或目的
<i>w¹¹¹⁸</i>		野生型对照
Boule-GFP	本实验	GFP原位插入在Boule蛋白C端
<i>boule</i> KO		<i>boule</i> 基因大片段敲除
<i>boule</i> $\Delta 1$		<i>boule</i> 基因编码区缺失第7个碱基A, 导致读码框移位翻译提前终止, 无法产生Boule蛋白
<i>bam</i> -Gal4/TM3	陈大华实验室	工具果蝇, 用于生殖细胞表达Gal4蛋白
<i>tub</i> -Gal4/TM3	BL25138	工具果蝇, 用于全身性表达Gal4蛋白
UAS-BolA	BL25759	果蝇Boule蛋白的过表达品系
UAS-BolA.PM2	BL25761	果蝇Boule蛋白RNA结合功能域突变(Y75A)的过表达品系

图 1 果蝇各组织及发育各阶段中Boule蛋白检测及各种转基因果蝇构建. A: *w¹¹¹⁸*果蝇各组织*boule* mRNA的表达; B: *boule* Δ 1, *boule* KO, Boule-GFP果蝇构建策略; 红色箭头为RT-qPCR引物, 蓝色箭头表示PCR引物, 两个右直角箭头分别显示睾丸特异转录本启动子(前)和体细胞转录本启动子位置(后), *bol¹*为P element插入型突变, 只影响睾丸特异转录本; C: Boule-GFP/TM3果蝇PCR鉴定; D: Boule-GFP/TM3及*w¹¹¹⁸*果蝇睾丸中GFP蛋白检测; E和F: Boule-GFP成年果蝇各组织*boule* mRNA及GFP蛋白的表达; G和H: Boule-GFP果蝇各个发育阶段*boule* mRNA及GFP蛋白的表达

Figure 1 Tissue and development-specific expression of Boule, and construction scheme of various *boule* transgenic/knockout flies used in this study. A: Tissue expression of *boule* mRNA in *w¹¹¹⁸*, red arrows are RT-qPCR primers; B: construction strategy of *boule* Δ 1, *boule* KO, Boule-GFP; blue arrows are PCR primers, two right-angle arrows indicate positions of testis-specific transcript promoter (front) and somatic transcript promoter (back), *bol¹* is a P element insertion mutation that affects testis-specific transcript; C: PCR identification of Boule-GFP/TM3 fly; D: GFP protein detection in Boule-GFP/TM3 and *w¹¹¹⁸* testis; E and F: tissue expression of *boule* mRNA and GFP protein in Boule-GFP *Drosophila*; G and H: developmental expression of *boule* mRNA and GFP protein in Boule-GFP *Drosophila*

KaRa)步骤进行反转录 0.5~1 μ g RNA, 反转后按5倍或者10倍进行稀释, 再进行RT-PCR或RT-qPCR. RT-qPCR引物(图1B红色箭头): Forward primer: 5'-ATC-GAGCAGGTGTGAGCAAG-3'; Reverse primer: 5'-GGCCACAATTGACTGCAGAG-3'.

(3) 蛋白提取及Western Blot. 组织样品加入RIPA裂解液后超声匀浆5~10 min, 冰上裂解30 min, 4℃最大转速离心30 min, 吸出蛋白上清, 加入蛋白上样缓冲液, 沸水变性5 min, 可冻存于-20℃或直接

进行聚丙烯酰胺凝胶电泳. 蛋白转膜后, 5%牛奶室温封闭1 h, TBS(含0.5%的tween)洗3次, 5min/次. 加入一抗(β -Actin, Sigma, anti-Mouse, 1:10000); GFP (自制, anti-rabbit, 1:5000)4℃孵育过夜. TBS(含0.5%的tween)洗3次, 5 min/次后孵育二抗, 室温1 h.

(4) 胚胎、幼虫、蛹的收集. 将Boule-GFP果蝇按照雌雄60:20比例放在有通气孔的50 mL离心管中, 管盖上覆盖一层涂有酵母的葡萄糖琼脂凝胶, 2 h更换一次盖子, 再隔14 h后用单蒸水冲洗盖子上的胚胎至网纱上,

转移到1.5 mL EP管. 同样的方法收集24 h的幼虫; 交配的培养瓶中挑取3天的蛹, 用于提取蛋白或RNA.

(5) 果蝇睾丸DAPI染色. 解剖获得特定基因型果蝇睾丸约30个, 用4% PFA室温固定20 min; 用含0.1% TritonX-100的1×PBS溶液清洗穿孔果蝇睾丸3次, 每次10 min; 再用1×PBS清洗5 min后, 用尖镊将睾丸移至普通载玻片上, 滴1~2滴含有DAPI封片剂, 盖上盖玻片, 完成制片, 共聚焦显微镜拍摄.

2 结果

2.1 *boule* mRNA及Boule蛋白在成蝇各个部位, 以及不同发育阶段均有表达

为了明确*boule* mRNA在成蝇各个部位表达量, 本团队在*boule*基因编码区域设计了qPCR引物, 分别对 w^{1118} (表1)果蝇的头、胸、腹组织(去睾丸)以及雄蝇的睾丸组织中*boule* mRNA进行了检测, 结果显示*boule* mRNA在睾丸中呈现优势性高表达(图1A), 这与已有的研究报道相符; 同时发现*boule* mRNA在果蝇头、胸、腹部均有不同程度的表达(图1A).

boule mRNA在成蝇各个部位有不同程度的表达, 那么Boule蛋白是否也在果蝇的各部位都有表达呢? 为了明确果蝇Boule蛋白的表达模式, 本团队运用clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-associated protein 9 (CRISPR-Cas9)基因编辑技术, 在果蝇*boule*位点插入GFP基因序列(图1B), 并获得了表达Boule-GFP融合蛋白的转基因果蝇(表1). 首先, 通过PCR引物设计(图1B蓝色箭头), 明确了DNA水平GFP的成功插入, Boule-GFP/TM3果蝇中可以扩增出符合预期的WT和GFP条带(图1C). 在Boule-GFP/TM3果蝇睾丸中, 本团队用Western Blot方法成功检测到Boule-GFP融合蛋白的特异条带(图1D); 同时检测了Boule-GFP/TM3雄蝇不同部位的*boule* mRNA表达(图1E), 其表达模式与 w^{1118} 雄蝇中的表达模式相似. 以上结果说明, Boule-GFP融合蛋白品系果蝇的构建是成功的.

运用Western Blot方法, 本团队发现, Boule蛋白在雄蝇各个部位中有不同程度的表达(图1F), 这与*boule* mRNA表达模式相似. 同时还检测了果蝇的不同发育阶段(胚胎、幼虫和蛹)的*boule* mRNA和蛋白表达, 结果显示*boule* mRNA和Boule蛋白在果蝇的不同发育阶

段也均有不同程度的表达(图1G和1H), 提示Boule蛋白可能在果蝇的发育中也有重要作用.

2.2 果蝇睾丸中Boule蛋白在16细胞时期精母细胞至长形精子中表达

w^{1118} 雄蝇精子发生过程是由未分化的精原细胞经过分化增殖, 减数分裂, 精子变形最终形成成熟的精子(图2A). 为了明确Boule蛋白在睾丸生殖细胞的表达模式, 本团队利用Boule-GFP果蝇自发荧光特性, 以GFP蛋白来示踪Boule蛋白表达. 本团队解剖了Boule-GFP/TM3以及 w^{1118} 果蝇睾丸并通过共聚焦显微镜进行扫描成像, 发现GFP信号特异性在Boule-GFP/TM3睾丸中存在(图2B). 进一步分析发现, GFP在16-cell时期精母细胞、32-cell时期精母细胞、圆形精子及长形精子尾部表达, 且精母细胞中GFP的信号较变形精子中弱(图2C), 图2A绿色部分更为直观地表达了Boule-GFP在精子发生过程中生殖细胞的定位. 这一结果与文献报道Boule蛋白功能及定位一致^[9~11]. 进一步说明Boule-GFP转基因果蝇构建成功.

2.3 Boule蛋白是维持果蝇正常发育所必需的

虽然成功构建了Boule-GFP转基因果蝇, 却不能获得Boule-GFP纯合的成蝇, 因此本团队猜测, 果蝇Boule蛋白的正常表达与否可能与果蝇的存活有关. 同时本团队检测到Boule蛋白在果蝇不同发育阶段(胚胎、幼虫和蛹)中均有表达, 并且已有文献报道*boule*基因大片段缺失(*bol^{Δ0}*)果蝇呈现一定的致死现象^[7], 这均提示Boule蛋白在果蝇发育中可能发挥重要生理功能. 为了明确Boule是否会影响果蝇的发育, 本团队构建了*boule*基因大片段敲除(*boule* KO)果蝇(表1, 图1B), 发现获得的纯合*boule* KO成蝇极少, 于是利用*boule* KO/TM3果蝇(该TM3上有自发荧光)自交来研究统计*boule* KO纯合(不带荧光的胚胎或幼虫)果蝇的主要死亡阶段及比例. 结果表明, 在*boule* KO纯合的159个胚胎中69%发育到了幼虫阶段, 47%发育成蛹, 但只有2%发育为成蝇(表2, *boule* KO与 w^{1118} 相比, $P<0.001$), 说明缺失*boule*基因后果蝇不同发育阶段均有不同程度的致死现象.

为了进一步明确这种致死现象是Boule蛋白缺失所致还是*boule*基因位点其他因素所致, 本团队另外构建了*boule*基因编码区第7个碱基A缺失的果蝇(*boule*

图 2 Boule蛋白在果蝇生殖细胞中的表达. A: 果蝇睾丸精子发生示意图; B: Boule-GFP转基因果蝇及 w^{1118} 果蝇睾丸中GFP蛋白表达, 绿色表示GFP, 蓝色表示细胞核(DAPI), 标尺20 μm ; C: GFP蛋白在睾丸不同生殖细胞中的表达定位, 白色虚线圈出的为相应的生殖细胞, 标尺50 μm

Figure 2 Expression of Boule protein during *Drosophila* sperm development. A: Diagram of *Drosophila* spermatogenesis; B: expression of GFP protein in Boule-GFP transgenic fly and w^{1118} testis, green indicates GFP, blue indicates cell nuclei (DAPI), scale bar, 20 μm ; C: the localization of GFP protein in spermatogenic cells, the white dotted circles mark intact cysts of spermatocytes or spermatids, scale bar, 50 μm

表 2 野生型、*boule*敲除及全身过表达Boule蛋白果蝇发育各阶段存活率比较

Table 2 Comparisons of survival rates of w^{1118} , *boule* KO and ubiquitous overexpression of Boule at different development stages

基因型	胚胎	幼虫	蛹	成蝇
w^{1118}	300	267(89%)	232(77%)	219(73%)
<i>boule</i> KO	159	109(69%)	74(47%)	3(2%)
<i>tub</i> -Gal4/ <i>UAS</i> - <i>BolA</i>	190	117(62%)	49(26%)	0(0%)

$\Delta 1$), 这使*boule*读码框移码导致翻译提前终止, 从而不能产生Boule蛋白, 同时又不改变*boule*基因结构(表1, 图1B). 本团队统计了*boule* $\Delta 1$ /TM3自交产生的180只后代成蝇, 未能得到*boule* $\Delta 1$ 纯合的成蝇. 这也证实了Boule蛋白对果蝇的发育和存活起重要作用, 并非*boule*位点所产生的转录本或者未知基因所致.

2.4 全身性过表达Boule蛋白对果蝇发育是有害的

为了进一步研究Boule蛋白在果蝇发育中的功能, 本团队通过GAL4-UAS系统在果蝇不同类型细胞中过表达Boule蛋白, 来研究异常表达Boule蛋白对果蝇发育的影响. 首先, 本团队运用*tub*-Gal4启动Boule蛋白的全身性过表达, 将*tub*-Gal4/TM3雌蝇(表1, 该TM3上

图 3 获得全身过表达Boule蛋白果蝇的杂交策略图
Figure 3 Mating strategy to obtain flies with ubiquitous overexpression of Boule

有自发荧光)与UAS-BolA雄蝇(表1)杂交(具体基因型及杂交策略见图3), 观察全身过表达Boule蛋白(*tub-Gal4/UAS-BolA*, 表1)对果蝇发育的影响. 对其各发育阶段存活数的统计结果显示, *tub-Gal4/UAS-BolA*(无GFP荧光)的190个胚胎中有62%发育为幼虫, 有26%发育到蛹, 但未见到孵化出来的成蝇(表2, *tub-Gal4/UAS-BolA*与 w^{1118} 相比, $P<0.001$). 这一结果说明, 全身过表达Boule蛋白导致发育中的果蝇渐进性死亡, 且表型比Boule蛋白缺失的果蝇更为严重.

研究报道, 果蝇Boule蛋白通过调控下游靶标mRNA的翻译发挥重要的生理功能, Boule蛋白有两个重要的RNA结合功能域RRM1, RRM2^[1]. 将RRM1区域第75号氨基酸酪氨酸(tyrosine, Y)突变为丙氨酸(alanine, A)后会导致Boule蛋白功能的丧失(UAS-BolA.PM2果蝇)^[7]. 有趣的是, 全身性过表达突变型Boule蛋白(*tub-Gal4/UAS-BolA.PM2*, 表1)果蝇发育到成蝇的比例近乎正常(表3), 且能产生成熟精子和后代. 但如果在分化的精原细胞中过表达Boule蛋白(*bam-Gal4/UAS-BolA*, 表1)则对果蝇发育无明显影响(表3), 精子发生也无明显异常. 在生殖细胞表达突变型的Boule蛋白(*bam-Gal4/UAS-BolA.PM2*, 表3)也对果蝇发育和生殖系统无影响. 利用另外一个生殖细胞特异的*nanos-Gal4*过表达Boule或Boule突变蛋白也不影响发育和精子的发生(未发表数据). 以上结果说明, 全身性体细胞过表达Boule蛋白对果蝇发育是有害的, 且这一致死现象可能是由于Boule蛋白异常结合靶标mRNA发挥作

用的, 而生殖细胞过表达Boule无明显影响.

3 讨论与结论

本文系统地揭示了高度保守的生殖基因*boule*在果蝇发育中的重要作用, Boule蛋白对果蝇正常发育是必不可少的. 通过构建Boule-GFP融合蛋白果蝇品系, 本团队首次明确了Boule蛋白在果蝇不同发育阶段和成蝇不同部位的表达模式. Boule在果蝇睾丸中优势表达, 而体细胞中的*boule*是果蝇发育所必需的. *boule*基因位点存在多个体细胞转录本, 本团队发现, *boule*全基因敲除后果蝇存活率大大下降, 但已有报道的敲除睾丸*boule*转录本(*bol*¹, 见图1B)却并不影响果蝇的存活^[7], 这说明体细胞中的*boule*才是果蝇发育所必需的.

Boule蛋白缺失和Boule蛋白全身性过表达果蝇的发育均受到严重影响, 几乎无法获得纯合成蝇, 说明Boule的正常表达对于果蝇发育是必需的. 那么Boule蛋白在果蝇不同阶段(胚胎、幼虫和蛹)的哪些细胞中表达, 以及*tub-Gal4*启动的全身性Boule蛋白的过表达, 其表达模式与正常生理情况下Boule蛋白的表达模式是值得关注的. 果蝇是目前Boule直系同源基因研究中唯一一个体细胞中存在Boule蛋白的物种, 过表达的Boule蛋白会影响果蝇生存, 而其他后生动物*boule*基因表达仅限于生殖腺内, 暗示动物体细胞中Boule存在可能会影响个体的生存. 另外本团队发现, 全身性过表达RNA结合功能域突变的Boule蛋白对于果蝇发育无明显影响, 说明异常过表达的Boule蛋白可能通过结合某些靶标mRNA进而对果蝇的发育发挥重要作用. 因此全身过表达Boule蛋白具体结合和调控哪些下游靶标mRNA有待进一步研究.

Boule作为DAZ家族最古老的一员, 已经保守存在6亿年^[6]. 在其他物种中, *boule*的同源基因特异性地表达在平面虫、线虫和扁虫等无脊椎动物的雌雄生殖性

表 3 全身和生殖细胞特异性过表达Boule和突变的Boule蛋白果蝇预期以及实际存活比例情况比较

Table 3 Expected and observed survival rates of flies with ubiquitous and germ cell-specific overexpression of Boule and mutant Boule protein

基因型	预期存活率	实际存活率
<i>tub-Gal4/UAS-BolA.PM2</i>	50%	65/112(58%)
<i>bam-Gal4/UAS-BolA</i>	50%	124/234(53%)
<i>bam-Gal4/UAS-BolA.PM2</i>	50%	38/64(59%)

表 4 已报道*boule*直系同源基因的表达定位、研究方法以及功能

Table 4 Expression and function of *boule* orthologs

物种	<i>boule</i> 同源基因	表达部位	研究方法/文献	表型和功能
扁虫	<i>macbol1macbol2macbol3</i>	<i>macbol1</i> 和 <i>macbol2</i> 在睾丸表达; <i>macbol3</i> 在卵巢表达	敲减[13]	精母细胞阻滞; 调控卵的发育成熟
平面虫	<i>boule1boule2</i>	雌雄生殖腺	敲减[12]	雄性减数分裂和维持早期生殖细胞
线虫	<i>daz-1</i>	雌雄生殖腺	敲除[14]	雌雄同体的线虫不育
虹鳟鱼	<i>boule</i>	雌雄生殖腺	RNA表达定位[15]	
青鳉鱼	<i>boule</i>	胚胎、生殖细胞	RNA表达定位[16]	
鲈鱼	<i>boule</i>	雌雄生殖腺	RNA表达定位[17]	
果蝇	<i>boule</i>	头、胸、腹、睾丸	敲除[3,7]	减数分裂阻滞、成蝇成活率下降
小鼠	<i>Boule</i>	睾丸	敲除[5]	减数分裂阻滞
人	<i>BOULE</i>	睾丸	[6]	挽救 <i>boule</i> 敲除果蝇生殖缺陷

腺中^[12~14]，在脊椎动物青鳉鱼、虹鳟鱼以及鲈鱼中，其mRNA也均只在生殖系统表达^[15~17]，小鼠和人也只特异性的存在于雄性睾丸中^[5](表4)。这些模式动物中，敲除或敲减*boule*同源基因并未发现对其个体本身的生存造成影响。根据UCSC(University of California-Santa Cruz)Genome Browser中基因序列，对这些已有功能报道的物种进行分析(图4)，可见果蝇体细胞中*boule*转录本的存在及其发育的功能似乎只是这个分支进化过程中的一个特例，因此Boule对个体发育中的作用，可能只局限于果蝇或昆虫类动物，并不具备物种的普遍性。体细胞*boule*转录本在果蝇的进化历史上何时产生，为何果蝇在发育过程中需要Boule的表达还有待进一步研究。

图 4 已报道的物种中*boule*直系同源基因的功能进化关系模式图。“+”表示必需的，“-”表示不必需的，“?”表示未有研究，功能尚不明确

Figure 4 Evolutionary relationships of functions of *boule* orthologs. “+”, essential; “-”, dispensable; “?”, unknown

致谢 感谢中国科学院动物研究所陈大华教授提供*bam-Gal4/TM3*工具果蝇，以及斯坦福大学神经科学研究所骆利群教授构建的Boule蛋白过表达和突变蛋白过表达果蝇。感谢南京医科大学邵留泽博士在实验过程中的支持与帮助，感谢南京医科大学基础医学院平台在转基因果蝇品系构建中的大力支持。

参考文献

- 1 Xu E Y, Moore F L, Pera R A R. A gene family required for human germ cell development evolved from an ancient meiotic gene conserved in metazoans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 7414–7419
- 2 Vangompel M J W, Xu E Y. The roles of the *DAZ* family in spermatogenesis: More than just translation? *Spermatogenesis*, 2011, 1: 36–46
- 3 Eberhart C G, Maines J Z, Wasserman S A. Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human deleted in Azoospermia. *Nature*, 1996, 381: 783–785
- 4 Shah C, Vangompel M J W, Naeem V, et al. Widespread presence of human Boule homologs among animals and conservation of their ancient reproductive function. *PLoS Genet*, 2010, 6: e1001022

- 5 VanGompel M J W, Xu E Y. A novel requirement in mammalian spermatid differentiation for the DAZ-family protein Boule. *Hum Mol Genet*, 2010, 19: 2360–2369
- 6 Xu E Y, Lee D F, Klebes A, et al. Human *BOULE* gene rescues meiotic defects in infertile flies. *Hum Mol Genet*, 2003, 12: 169–175
- 7 Hoopfer E D, Penton A, Watts R J, et al. Genomic analysis of *Drosophila* neuronal remodeling: A role for the RNA-binding protein Boule as a negative regulator of axon pruning. *J Neurosci*, 2008, 28: 6092–6103
- 8 Joiner M L A, Wu C F. Nervous system function for the testis RNA-binding protein boule in *Drosophila*. *J Neurogenet*, 2004, 18: 341–363
- 9 Cheng M H, Maines J Z, Wasserman S A. Biphasic subcellular localization of the DAZL-related protein boule in *Drosophila* spermatogenesis. *Dev Biol*, 1998, 204: 567–576
- 10 Maines J Z, Wasserman S A. Post-transcriptional regulation of the meiotic Cdc25 protein Twine by the Dazl orthologue Boule. *Nat Cell Biol*, 1999, 1: 171–174
- 11 Fairchild M J, Islam F, Tanentzapf G. Identification of genetic networks that act in the somatic cells of the testis to mediate the developmental program of spermatogenesis. *PLoS Genet*, 2017, 13: e1007026
- 12 Iyer H, Issigonis M, Sharma P P, et al. A premeiotic function for *boule* in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: E3509–E3518
- 13 Kualess G, De Mulder K, Glashauser J, et al. *Boule*-like genes regulate male and female gametogenesis in the flatworm *Macrostomum lignano*. *Dev Biol*, 2011, 357: 117–132
- 14 Karashima T, Sugimoto A, Yamamoto M. *Caenorhabditis elegans* homologue of the human azoospermia factor DAZ is required for oogenesis but not for spermatogenesis. *Development*, 2000, 127: 1069–1079
- 15 Li M, Shen Q, Xu H, et al. Differential conservation and divergence of fertility genes *boule* and *dazl* in the rainbow trout. *PLoS ONE*, 2011, 6: e15910
- 16 Xu H, Li Z, Li M, et al. Boule is present in fish and bisexually expressed in adult and embryonic germ cells of medaka. *PLoS ONE*, 2009, 4: e6097
- 17 Dwarakanath M, Lim M, Xu H, et al. Differential expression of *boule* and *dazl* in adult germ cells of the Asian seabass. *Gene*, 2014, 549: 237–242

Testis-biased Boule is essential for *Drosophila* development

XIA WenJuan, XIAO TianHeng, HUANG Juan & XU YuJun

State Key Laboratory of Reproductive Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

boule gene is one of the few highly conserved genes necessary to regulate spermatogenesis in multiple species across metazoans. In *Drosophila*, *boule* gene mutant *bol¹* can cause male infertility, but genomic deletion of *boule* gene leads to inviability, suggesting that *boule* may also play a role outside the testis. In order to test this hypothesis, we first examined the expression of *boule* gene in different tissues by RT-PCR, and that of Boule protein in different tissues by constructing a Boule-GFP knock-in transgenic fly. The results showed that *boule* mRNA and Boule protein were indeed present during *Drosophila* development and in the head, thorax and abdomen of adult flies, though at a lower level than its expression in the testis. Secondly, we constructed mutants deleting almost the entire *boule* gene and found that lethality occurred at different developmental stages. Thirdly, we showed that loss of Boule protein, not RNA transcripts or unknown genes from *boule* locus, is responsible for Boule's requirement during development via a frame-shift mutation of single base deletion. Finally, ubiquitous, but not germ cell, overexpression of Boule protein led to lethality during development. These results demonstrate that precise control of somatic Boule expression is critical for development, which has not been found in any other *boule* orthologs outside *Drosophila*.

***boule*, *Drosophila melanogaster*, testis, spermatogenesis, somatic cell, development**

doi: 10.1360/SSV-2020-0026