拟南芥印迹基因*MEA*

张文伟[1] 江玲[1] 曹少先[2] 万建民[1,*]
[1]南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室，南京210095；[2]南京大学生命科学学院，南京210093

Imprinted *MEA* in *Arabidopsis*

ZHANG Wen-Wei[1], JIANG Ling[1], CAO Shao-Xian[2], WAN Jian-Min[1,*]
[1]State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; [2]School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China

提要 *MEDEA* (*MEA*)是第1个在拟南芥胚乳中发现的印迹基因。*MEA*基因的印迹受甲基转移酶MET1和DNA糖基酶DME之间的拮抗作用调控。*MEA*基因编码polycomb group (PcG)蛋白，并与FIE、MSI1等其他PcG蛋白形成复合物，维持与细胞增殖相关基因的表达抑制状态。*mea*突变会启动未受精状态下中央细胞核的复制，而使种子发生败育。目前已发现I型MADS box基因*PHERES1*是受MEA直接作用的。研究*MEA*基因对种子发育的调控，不仅有助于阐明原胚及胚乳启动的机制，在无融合生殖研究中也有意义。PcG蛋白在动植物中的强保守性说明，PcG基因印迹在个体发育过程中有调控作用。

关键词 *MEA*；印迹；PcG蛋白

遗传学研究表明，来自双亲的同源染色体或等位基因在功能上存在差异。这种同源染色体上基因表达活性不同的遗传现象称之为基因组印迹(genomic imprinting)。基因组印迹与胚胎发育有关，已发现哺乳动物的许多印迹基因控制胚胎的生长，并仅在外胚组织中表达。外胚组织是母体向胚胎输送营养物质的渠道，开花植物种子的胚乳具有与之相似的功能，也是发生基因印迹的重要部位。早在1970年，Kermicle[1]就已发现，调控玉米糊粉层中花青素积累的*R*基因会发生印迹。但是，玉米胚乳中先后鉴定到的印迹基因对种子的形态发生均无明显影响，因此种子发育中印迹基因功能的研究，绝大部分来自种内不同染色体倍性间杂交的结果[2~4]。直到1998年，Grossniklaus等[5]发现，拟南芥*MEDEA* (*MEA*)基因对胚胎发生有母源控制的作用。随后的研究证实*MEA*在胚乳中得到印迹，而且*MEA*编码产物与果蝇和哺乳动物的PcG蛋白同源，后者对同源异型基因的表达及细胞增殖均具有调控作用。至此，基因组印迹对种子发育的影响才取得突破性进展。本文就*MEA*基因的研究进展作介绍。

1 *MEA*基因的结构和功能

*MEA*基因编码一种具有SET结构域的PcG蛋白，由689个氨基酸残基组成。SET这个缩写分别来自于果蝇的3个基因，它们均含有一个编码130个氨基酸的基序：位置效应异质性抑制子[suppressor of position-effect variegation gene, *Su*(*var*)*3~9*]、zeste多冠族基因增强子[enhancer of zeste polycomb group gene, *E*(*z*)]和Trithorax基因*trx-G*。*MEA*基因编码产物与E(z)蛋白相似。*mea*突变导致种子败育，纯合*mea*/*mea*植株有95%~100%的种子发生败育。目前已鉴定到5种*mea*等位基因突变，包括*mea-1*、*2*，*f644* (*mea-3*)，胚缺陷型*173* [*embryo-defective 173*，*emb173*或*mea-4*]和不依赖受精的种子(fertilization-independent seed, *fis1*)(图1)。*mea-1*突变是由于玉米转座子*Ac*/*Ds*插入SET区造成的，*Ds*切除后留下的足迹使得该区出现2个连续的终止密码子，即*mea-2*突变。*f644*、*emb173*和*fis1*突变则均是由于*MEA*编码序列发生单碱基突变，产生提前终止的密码子。这些*mea*突变可能均为隐性的功能丧失性的突变，但目前这只在3种突变基因中证实。

*MEA*的功能在于限制种胚发生中的细胞增

收稿 2005-05-17 **修定** 2005-10-27
资助 国家自然科学基金(30471120)和江苏省自然科学基金创新人才项目(BK2003415)。
*通讯作者(E-mail: wanjm@caas.net.cn, Tel: 025-84396516)。

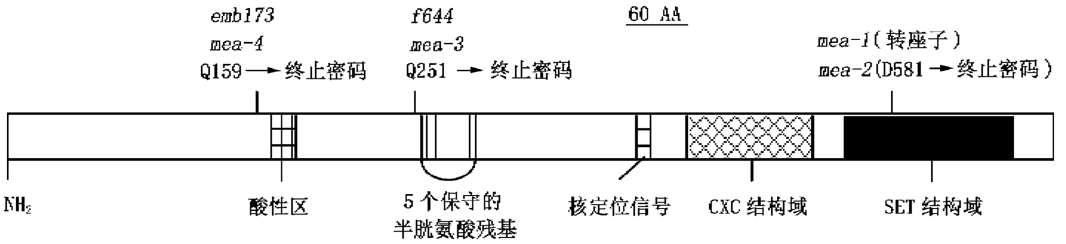

图1　4种突变*mea*等位基因[6]

殖。在种胚发生早期，*mea*突变体的胚和胚乳发育与野生型无异。到球形胚晚期，*mea-1*突变体胚开始出现细胞的过度增殖，分裂周期的增多导致*mea-1*胚的每个形态发生阶段均延长，并在心形期停止发育，形成巨大的心形胚，后者在种子干燥过程中降解。从球形胚期过渡到心形胚期时，野生型胚乳通常开始胞质分裂，而此时*mea-1*胚乳中观察不到胞质分裂，且核分裂变缓，直至心形胚晚期时，珠孔端才发生部分胞质分裂。*mea-2*的表型与*mea-1*相似，*mea-3*则与*mea-4*的表型相似：在未受精状态下能活化中央细胞的核复制，于是种皮开始发育，角果伸长，并形成类似于种子的结构(seed-like structure)；受精后，胚发育晚期的细胞增殖受抑而止于心形期，并发生败育，胚乳则过度增殖，这与*mea-1*、*2*相反。Kiyosue等[6]认为，这可能与*mea-1*、*2*仍具有除SET以外的其他重要的上游结构域有关，而*mea-3*、*4*可能缺少PcG蛋白活性所需的大多数结构域。因此，与*mea-3*、*4*相比，*mea-1*、*2*可能仍残存PcG蛋白的一些活性。*fis1*也能自发形成二倍体胚乳(游离核或胞质分裂阶段)，并偶尔在珠孔端生成类似于合子和胚早期的结构。根据*mea*突变体的表型推断，*MEA*的功能就是阻止未受精状态下中央细胞核的复制，限制受精后胚乳的增殖，并且直接或间接地维持种胚发生的正常细胞增殖水平。胚和胚乳的表型变化是否均为*mea*突变的直接后果，目前还不清楚。

现已证实，PcG蛋白普遍存在于哺乳动物、昆虫和真菌中，它可在基因组的特定区域形成复合物，通过对组蛋白的修饰作用，进行染色质重塑，维持基因表达的抑制状态，抑制特定基因的转录。*mea*突变体的表型说明，*MEA*可能维持与细胞增殖相关基因的表达抑制状态[7]。

2　*MEA*基因的表达

Vielle-Calzada等[8]用原位杂交研究*MEA*基因的时空表达模式的结果表明，受精前的雌配子体和受精后的胚和胚乳中均可检测到*MEA* mRNA，而在其它花器官发育的任何阶段，如花瓣、萼片、雄蕊和心皮中，均未检测到*MEA*表达。处于发育阶段或成熟的花粉粒中也未检测到*MEA*表达。*MEA*在胚中的表达一直延续至心形胚晚期和鱼雷形胚期，在胚乳中主要是在胞质分裂前表达，但在合点胚乳中*MEA*可持续表达。

3　*MEA*基因的印迹

*mea*突变对种子发育的影响具有亲源效应，只有母源*mea*才能产生上述突变表型，即种子的发芽力只决定于母源*MEA*的基因型，父源等位基因是非必需的。Grossniklaus等[5]采用*mea-1*杂合体与野生型四倍体杂交的结果显示，附加的父本野生型*MEA*基因不能拯救这种具有母源效应的致死性，从而排除了胚乳中*MEA*与*mea*基因的剂量差异导致种子败育的可能，并推测受精后*MEA*的表达可能受基因组印迹的调控。

Vielle-Calzada等[8]采用原位杂交技术，检测中央细胞的核点时，证实父源*MEA*基因在胚乳发育早期表现为转录沉默。他们认为父源*MEA*基因在胚和胚乳中均被沉默，其原因可能在于受精后整个父本基因组的活化延迟至授粉后80 h。但是Kinoshita等[9]认为，父源和母源*MEA*基因在胚发育的各个时期均是表达的，胚乳中只有*MEA*母源基因表达，营养组织中则为双等位基因表达。Luo等[10]的研究表明，*MEA*在胚乳发育早期被印迹，发育晚期印迹中止(break down)，此时父源*MEA*::*GUS*融合基因不仅在合点胚乳中表达，在胚中也呈低频表达，说明*MEA*的印迹具有时空表

达模式。此外，已确认*MEA*为基因座印迹(locus imprinting)，即已知的来自不同遗传背景的所有等位基因，其表达均受到亲本来源的控制[8]。

根据Haig和Westoby[11,12]的亲本冲突学说(parental conflict theory)，抑制胚乳发育的基因应是母源表达而父源沉默，促进胚乳发育的基因则相反。*MEA*的功能是只限制向胚提供营养的胚乳发育，且母源等位基因表达而父源沉默，与亲本冲突学说相符。另外，*MEA*编码PcG蛋白，可能是一种维持基因表达抑制状态的染色质修饰酶，在促进胚乳增殖的基因中建立印迹。

4 *MEA*基因印迹的机制

DEMETER (*DME*)基因对*MEA*基因的母源专一性表达起至关重要的作用。Choi等[13]认为，*DME*是*MEA*表达的正调控因子，是*MEA*在发育中的花芽、受精前的中央细胞和受精后胚乳中表达所必需的。*DME*编码具有DNA糖基酶结构域的高分子量蛋白。DNA糖基酶在DNA修复中起作用，推测DME可能通过切除5-甲基胞嘧啶而活化*MEA*的表达。*DME*只在受精前雌配子体的极核和助细胞中表达，受精后迅速停止表达。因此，可推测在配子形成后，母源和父源*MEA*均沉默。受精前，DME以其未知的表遗传(epigenetic)功能，在中央细胞中活化母源*MEA*等位基因的表达。由于*DME*不在雄蕊中表达，所以父源基因不能活化。受精后，为DME表遗传“标记”(epigenetically “marked”)的母源基因在整个胚乳发育过程中可持续表达，但由于胚乳中缺乏DME，父源基因仍不能表达。另外，*MEA*在胚中的表达肯定不是受*DME*介导活化的。这说明卵细胞和中央细胞在表遗传上有差异。

最近有报道认为，DNA甲基化在*MEA*的印迹机制中起着重要作用。甲基转移酶1 (methyltransferase 1，*MET1*)是拟南芥中主要的维持性(maintenance)甲基转移酶。Xiao等[14]发现，雌配子体的母源*met1*突变可以抑制*dme*突变介导的种子败育，但需要野生型的母源*MEA*。*MEA*启动子有3个区域被甲基化，*met1*突变种子中甲基化程度降低。*ddm1-2* (*decrease in DNA methylation1*, *DDM*)突变体可引起基因组甲基化程度的下降，但不能抑制*dme*突变。因此，*dme*与*met1*间的遗传作用是特异性的。这些资料表明，*MEA*印迹是受MET1甲基转移酶和DME DNA糖基酶之间的拮抗作用调控的。*FWA*基因的印迹机制与*MEA*相似，说明MET1和DME对印迹的调控是一种普遍的机制。另外，由于胚乳染色体不会传递给子代，在中央细胞内建立及受精后胚乳中所维持的印迹无需在每代中重新设定，而表现为单向控制(one-way control)[15]。

*DDM*编码一种对ATP依赖的属于SWI2/SNF2-like家族的染色质重塑蛋白。*ddm1*突变体中，5-甲基胞嘧啶含量下降了70%。Vielle-Calzada等[8]发现*ddm1*可抑制母源*mea*引起的种子败育，推测DNA低甲基化可能会导致父源*MEA*等位基因的活化，认为*DDM1*可能是维持种子发育过程中*MEA*印迹所需。Luo等[10]对此提出了质疑。他们发现，低甲基化亲本的导入(*MET1*反义植株)可拯救*mea*突变，但并不需要父源*MEA*基因，而且低甲基化并不能激活父源*MEA*基因的表达。因此，低甲基化的作用可能在于改变种子发育早期起作用的其它父源基因的表达。

5 MEA与其它蛋白的相互作用

在研究无融合生殖(apomixis)的过程中，先后鉴定到了3种拟南芥*fis*突变基因，即*FIS1/MEDEA*、*FIS2*、*FIS3/FIE* (不依赖受精的胚乳，fertilization-independent endosperm)[10,16,17]。*FIS2*和*FIE*突变体的表型与*mea*非常相似，且具有亲源效应。这3个基因的编码产物均与果蝇PcG蛋白相关：FIS1/MEDEA与E(z)相关；FIS2是一种含C_2H_2锌指结构的转录因子，与Zeste抑制因子12 [sup-pressor of zeste12, Su(z)12]同源 FIS3/FIE则与额外性毛状物(extra sex combs, Esc)同源。E(z)、Su(z)12和Esc在同一个复合体中作用，抑制基因的转录。FIE和MEA与E(z)/Esc相似，在体外也可相互作用，形成约600 kD的复合物。此外，哺乳动物中与FIE和MEA同源的ENX1和EED也相互作用，说明PcG蛋白以及它们之间相互作用的强保守性。

Köhler等[18]报道，具有WD-40结构域的MSI1蛋白也是FIE/MEA复合物的组分之一，可与FIE

直接作用。*msi1*突变也会导致种子败育，且具有母源效应，并能以高外显率(>80%)启动未受精状态下的胚乳发育，而*mea*突变体只有15%~20%的外显率。Kiyosue等[6]推测，这可能与遗传冗余有关，具有SET结构域的其他PcG蛋白如CURLY LEAF(CLF)能取代MEA的功能。其它4个MSI1-like蛋白——MSI2~5均不能取代MSI1的功能，因此*msi1*突变具有比*mea*高得多的外显率。*msi1*突变还减弱了双受精过程，胚乳核多数来自于二倍体中央细胞核。这一现象在*fis*突变体中也有报道。MEA、FIE和MSI1的总分子量只有169 kD，说明复合物中还有其它蛋白，如FIS2。此外，由于在单子叶植物如玉米中均可找到同源基因，所以MEA-FIE-MSI1复合物在单子叶和双子叶植物中可能是非常保守的[18]。

6　MEA复合物的靶基因

*MEA*基因是以希腊神话中的女祭司Medea命名的。Medea为报复其夫的不忠，杀死了自己的儿子Pheres和Meidos。目前已发现的MEA复合物的两个靶基因就分别命名为*PHERES1* (*PHE1*)和*MEIDOS* (*MEO*)。PHE1属于I型MADS-box 蛋白。MADS-box蛋白在发育过程中具有同源异型功能。MEO可能是S期的一种与激酶相关的蛋白1 (S-phase kinase-associated protein 1, Skp1),是SCF泛素连接酶复合物的核心组分，标记需要降解的细胞周期调控因子和转录因子。

Köhler等[19]报道，MEA复合物直接作用于*PHE1*启动子，以致*PHE1*的表达受MEA、FIS2和FIE的紧密调控。在野生型植株中，*PHE1*只在受精后的胚和胚乳中瞬时表达；而*mea*和*fie*突变体中，*PHE1*和*MEO*转录水平均上升，其中*PHE1*的高水平表达持续到种子败育。此外，在未受精*fie*突变体自发形成胚乳之前，*PHE1*的表达抑制早已被解除。这均与*FIS*基因具有转录抑制功能的推论一致。如采用反义抑制降低*mea*突变体中*PHE1*表达水平，可抑制种子败育，表明*PHE1*在*MEA*调控途径中起关键作用，是决定*fis*突变体致死表型的主要因素。但是，反义抑制*PHE1*所拯救的*mea*种子在干燥后出现发育缺陷和萌发率降低，表明仅削弱*PHE1*表达并不足以完全恢复种子的正常发育。

研究表明，纯合的*ddm1*突变拯救*mea*种子败育并不需要父源*MEA*基因。结合Luo等[10]的结果，可推测，在*mea*突变体中的MEA下游靶基因的野生型表达模式可能是通过DNA甲基化和染色质结构的改变而得以重建。Köhler等[19]发现纯合的*ddm1 mea*双突变体中，*PHE1*的表达水平较之*mea*突变体发生显著下降，说明*ddm1*和*mea*间的遗传互作影响了*PHE1*的表达，而*mea*突变体的种子败育在很大程度上是由*PHE1*的表达失控所介导的。

7　结语

*MEA*在植物的营养生长阶段也是表达的，目前还不清楚在雌配子体发生之前，*MEA*的表达是何时及如何被沉默的。此外，*MEA*启动子的甲基化程度是否直接调控*MEA*的表达，而DME又是如何克服MET1所介导的对*MEA*表达的抑制作用，均亟待进一步深入研究。

哺乳动物印迹基因的异常甲基化会导致发育畸形、肿瘤等疾病，而*MEA*基因突变则引起种子败育[20]，这些相似性以及PcG蛋白在动植物间的保守性均说明，深入研究MEA-FIE- MSI1复合物的功能，不仅对阐明启动原胚及胚乳形成的分子机制具有重要意义，而且对整个发育生物学研究的影响也将是深远的。

参考文献

1　Kermicle JL. Dependence of the *R*-mottled aleurone phenotype in maize on mode of sexual transmission. Genetics, 1970, 66(1): 69~85

2　Lin BY. Ploidy barrier to endosperm development in maize. Genetics, 1984, 107(1): 103~115

3　Scott RJ, Spielman M, Bailey J et al. Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana*. Development, 1998, 125(15): 3329~3341

4　Bushell C, Spielman M, Scott RJ. The basis of natural and artificial postzygotic hybridization barriers in *Arabidopsis* species. Plant Cell, 2003, 15(6): 1430~1442

5　Grossniklaus U, Vielle-Calzada JP, Hoeppner MA et al. Maternal control of embryogenesis by MEDEA, a *Polycomb* group gene in *Arabidopsis*. Science, 1998, 280: 446~450

6　Kiyosue T, Ohad N, Yadegari R et al. Control of fertilization-independent endosperm development by the *MEDEA*

polycomb gene in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 4186~4191
7 Gehring M, Choi Y, Fischer RL. Imprinting and seed development. The Plant Cell Preview, www. plantcell. org/ cgi/doi/10.1105/tpc.017988
8 Vielle-Calzada JP, Thomas J, Spillane C et al. Maintenance of genomic imprinting at the *Arabidopsis medea* locus requires zygotic *DDM1* activity. Genes Dev, 1999, 13: 2971~2982
9 Kinoshita T, Yadegari R, Harada JJ et al. Imprinting of the *MEDEA* polycomb gene in the *Arabidopsis* endosperm. Plant Cell, 1999, 11(10): 1945~1952
10 Luo M, Bilodeau P, Dennis ES et al. Expression and parent-of-origin effects for *FIS2*, *MEA*, and *FIE* in the endosperm and embryo of developing *Arabidopsis* seeds. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 10637~10642
11 Haig D, Westoby M. Parent-specific gene expression and the triploid endosperm. Am Nat, 1989, 134: 147~155
12 Haig D, Westoby M. Genomic imprinting in endosperm: Its effect on seed development in crosses between species, and between different ploidies of the same species, and its implications for the evolution of apomixis. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1991, 333(1): 1~13
13 Choi Y, Gehring M, Johnson L et al. DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in *Arabidopsis*. Cell, 2002, 110 (1): 33~42
14 Xiao W, Gehring M, Choi Y et al. Imprinting of the *MEA* polycomb gene is controlled by antagonism between MET1 methyltransferase and DME glycosylase. Dev Cell, 2003, 5 (6): 891~901
15 Kinoshita T, Miura A, Choi Y et al. One-way control of *FWA* imprinting in *Arabidopsis* endosperm by DNA methylation. Science, 2004, 303(5657): 521~523
16 Chaudhury AM, Luo M, Miller C et al. Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 4223~4228
17 Luo M, Bilodeau P, Koltunow A et al. Genes controlling fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 296~301
18 Köhler C, Hennig C, Bouveret R et al. *Arabidopsis* MSI1 is a component of the MEA/FIE Polycomb group complex and required for seed development. EMBO J, 2003, 22(18): 4804~4814
19 Köhler C, Hennig L, Spillane C et al. The *Polycomb*-group protein MEDEA regulates seed development by controlling expression of the MADS-box gene *PHERES1*. Genes Dev, 2003, 17: 1540~1553
20 Frederic B. Imprinting—a green variation. Science, 2004, 303(5657): 483~485