

动物线粒体 DNA 重组的研究进展

于晓丽 黄原*

(陕西师范大学生命科学学院 西安 710062)

摘要:动物线粒体 DNA 作为遗传标记广泛用于从种内到高级阶元的许多生物学领域,这些应用是建立在线粒体 DNA 的严格母系遗传方式和不发生重组的基础上的。近年来的研究提出了一些能够证明动物 mtDNA 发生重组的直接和间接证据。动物 mtDNA 重组可能主要通过两条途径发生,一条途径是母系 mtDNA 与核基因组中 mtDNA 假基因间发生重组;另一条途径是通过父系渗漏引起的不同单倍型的双亲 mtDNA 间发生重组。父系渗漏是最可能的途径。如果动物界广泛存在线粒体 DNA 重组,将会对以 mtDNA 严格母系遗传为基础的许多应用领域产生重要影响。

关键词:线粒体 DNA;重组;母系遗传;双单亲遗传;父系渗漏

中图分类号:Q951 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2008)02-145-05

Animal Mitochondrial DNA Recombination

YU Xiao-Li HUANG Yuan*

(College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract:Animal mitochondrial DNA as a genetic marker has been used extensively in many biological fields from intraspecific to higher taxonomic categories. Most of these applications are based on the properties of strict maternal inheritance and non-recombination of mtDNA. Recent studies have provided some indirect and direct evidence of animal mtDNA recombination. Animal mtDNA recombination might occur by two main pathways, recombination between the maternal mtDNA and a nuclear encoded pseudogene copy of mtDNA and the combination between paternal and maternal mtDNA haplotypes through paternal leakage. Paternal leakage appears to be the most plausible pathway of mtDNA recombination. If animal mtDNA recombination occurs commonly in animal kingdom, it will have significant influences to many application areas based on strict maternal inheritance.

Key words: Mitochondrial DNA; Recombination; Maternal inheritance; Doubly uniparental inheritance; Paternal leakage

动物线粒体基因组(mtDNA)通常为环形,长15~20 kb,含有37个基因和一个大的非编码区^[1]。动物 mtDNA 广泛用于群体遗传、谱系生物地理(phylogeography)和进化与系统发育研究领域。人们一直认为动物中不会发生 mtDNA 重组,即使发生也是很罕见的。其依据是:在自然群体或动物细胞培养物中观察不到重组 mtDNA 单倍型;mtDNA 被包装成类核体(nucleoid)附着在线粒体内膜上;哺乳动物线粒体内检测不到具有剪切修复活性的酶和交叉产

物^[2]。相比之下,mtDNA 重组普遍发生在原生生物、真菌和植物^[2]。然而,目前已经发现了一些证明动物 mtDNA 发生重组的间接和直接证据,虽然有些间接证据受到了质疑,但越来越多的直接证据显示动物 mtDNA 也能够发生重组。

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 30670279, 30470238);

*通讯作者, E-mail: yuanh@snnu.edu.cn;

第一作者介绍 于晓丽,女,硕士研究生;研究方向:动物分子生物学; E-mail: yuxiaoli52@stu.snnu.edu.cn.

收稿日期:2007-09-10,修回日期:2008-01-06

1 mtDNA 的遗传方式

绝大多数动物 mtDNA 是严格的母系遗传,也就是无性的克隆遗传(clonal inheritance)。有一些机制能够保证子代 mtDNA 只来源于母系线粒体,例如某些小龙虾(crayfish)精子中没有线粒体;一些被囊动物(tunicates)父系线粒体不进入卵细胞;而在哺乳动物中,多达 100 个父系线粒体进入卵细胞,但是受精后几个小时内被降解^[3]。选择性识别和降解哺乳动物父系线粒体,可能是因为这些线粒体发生了泛素化(ubiquitination)。泛素是一个由 76 个氨基酸残基组成的蛋白质单体,在不同物种中高度保守,对被选定降解的蛋白质加以标记。这些被泛素标记的蛋白质在泛素结合酶(ubiquitin-conjugating enzyme, UCDEN)催化下发生降解。父系线粒体在精子发生过程中最可能是在次级精母细胞/圆形精子细胞阶段被泛素标记。精子进入附睾管后,通过二硫键交联将泛素标记的表位隐藏起来。只有受精后卵细胞诱导二硫键减少时,这些表位才会再次暴露出来。在卵细胞质中,父系线粒体外鞘与泛素的结合力增强,父系线粒体进一步泛素化,在胚胎着床前的发育过程中发生蛋白质降解,从而破坏掉父系线粒体^[4]。

然而当受精卵中识别父系线粒体的机制失败时,这些父系 mtDNA 就能够保留在合子中,最终在成熟个体中存活下来,这种 mtDNA 遗传方式称父系渗漏(paternal leakage)。如果来自父系的 mtDNA 与母系的属于不同的单倍型,就形成异质性 mtDNA 的个体。目前,已经证明在果蝇属(*Drosophila*)^[5]、小鼠属(*Mus*)^[6]和人类(*Homo sapiens*)^[7]等许多物种中都存在父系渗漏事件。但是父系 mtDNA 渗漏率还没有系统地研究过,仅是粗略估计每次受精过程中,小鼠父系 mtDNA 渗漏率是 10^{-4} ,果蝇的渗漏率为 10^{-3} ^[8]。研究表明,似乎发生父系渗漏事件在种间杂交比在种内更普遍,贻贝属(*Mytilus*)的 *M. trossulus* 与 *M. edulis* 或 *M. galloprovincialis* 杂交时父系线粒体进入雌性后代中;而近缘种

M. edulis 与 *M. galloprovincialis* 杂交时,并没有发现相似的结果^[9]。

mtDNA 遗传的另一特例是双单亲遗传(doubly uniparental inheritance, DUI)。DUI 存在于少数几种海洋及淡水双壳动物中。这种遗传方式使后代中雌性的 mtDNA 只来自于母系,这与严格的母系遗传相似;而雄性的 mtDNA 来自于双亲,并且在体细胞中以母系 mtDNA 为主,在精巢中以父系 mtDNA 为主,故雄性后代遗传的是父系 mtDNA^[10]。海洋贻贝存在雄性化现象(masculinization),偶尔发生角色逆转,即父系 mtDNA 在进化过程中丢失后,母系 mtDNA 将取而代之,随后这些母系 mtDNA 按照父系 mtDNA 遗传方式传递给后代。雄性化现象使得追溯海洋贻贝起源年代更加困难。但淡水双壳动物中不存在雄性化现象^[11]。

2 mtDNA 重组证据

有关动物 mtDNA 是否发生重组争论最多的是人类 mtDNA 重组^[3]。人类 mtDNA 重组的争论可以分为重组的质和量两个方面^[12]。数量问题是指重组是否对遗传变异模式产生可观测的影响,它的答案似乎是否定的;而质量问题即是否存在重组,这一问题仍未得到解决^[12]。目前,已经发现一些证明动物 mtDNA 发生重组的间接和直接证据。不过,关于人类 mtDNA 重组的间接证据争议很大。1999 年就有三篇文章^[13-15]从群体遗传学角度,使用统计学方法推论人类线粒体发生了重组。但是,这些文章的结论在数据质量和分析方法上受到了质疑^[16]。

动物 mtDNA 重组的第一个直接证据来自一种线虫(*Meloidogyne javanica*)^[17],其 mtDNA 发生了异常分子内重组,mtDNA 上两个不同位点发生双链断裂,丢失一段大的非编码区,这段非编码区的两端重新连接,形成一个微环^[1]。线虫 mtDNA 非编码区含有可变数目串联重复序列(variant number of tandem repeats, VNTRs),这些重复序列能够促进发生分子内重组^[2],因而线虫 mtDNA 重组发生在基因组特定区域内。

另一些证明发生动物 mtDNA 重组的直接

证据来自贻贝属。贻贝的 mtDNA 是双单亲遗传,雄性个体中既含有母系 mtDNA,又含有父系 mtDNA,因此是异质性的,这就为检测重组提供了理想的材料。Ladoukakis 等分析了贻贝 *M. galloprovincialis* 雄性性腺中长 681 bp 的 CO₁ 基因片段,发现 6 个重组子序列,证明 mtDNA 发生了同源重组^[18]。Burzynski 等分析了同属的另外一种贻贝 *M. trossulus* 线粒体基因组上起始于 16S rRNA 基因、终止于细胞色素 b 基因,同时包含一段大的非编码区的序列时,发现了 2 个重组子序列,而且这些重组子序列能够传递到后代中^[19]。Rawson 也发现 *M. trossulus* 双亲线粒体基因组上大的未定区 (large unassigned region, LUR, 即假定的线粒体控制区) 之间发生了非同源重组^[10]。这些证据说明贻贝 mtDNA 重组可以发生在基因组的任何部位。

脊椎动物 mtDNA 发生重组的直接证据来自比目鱼 (*Platichthys flesus*)。与线虫相似,比目鱼 mtDNA 非编码区也含有 VNTRs。Hobaru 等在非编码区检测到两种类型重复序列,分别为 C 型和 T 型,它们仅有两个突变位点的差异。Hobaru 等发现多数个体中含有 C 型和 T 型重复序列,但是有一个个体中含有 C 和 T 混合型重复序列,这说明 mtDNA 发生了重组^[20]。

最令人信服的 mtDNA 重组的直接证据来自人类。Kraytsberg 等在一个病人的肌组织 (此肌组织含有双亲 mtDNA) 中发现了 mtDNA 重组子,约占总 mtDNA 的 0.7%^[21]。

还有一个来自于三倍体湘云鲫 (是雄性异源四倍体鲫鲤与雌性二倍体日本白鲫 *Carassius auratus cuvieri* 的杂交产物) 的直接证据。作者比较其与双亲线粒体基因组上同源位点间的异同,发现它含有来自父系的、长 12 759 bp 的重组 mtDNA 片段,从而证明发生了线粒体重组^[22]。作者认为重组是通过父系渗漏和双亲 mtDNA 间融合发生的,因为双倍体精子和单倍体卵细胞这两种线粒体基因组之间很容易发生融合^[22]。

3 mtDNA 重组的可能途径和重组酶

目前提出动物 mtDNA 重组可能主要通过

两条途径发生,一条途径是母系 mtDNA 与核基因组中 mtDNA 假基因间发生重组,另一条途径是通过父系渗漏,双亲 mtDNA 间发生重组^[9]。

核基因组中含有许多 mtDNA 假基因,它们以 DNA 或 RNA 形式进入线粒体,这就为来自不同谱系的线粒体基因组间发生重组提供了一种可能途径。已经证明许多真核生物,包括人类的线粒体都能够吸收各种 RNA,甚至病毒 RNA^[23];但还没有任何证据能够证明 DNA 可以进入线粒体^[23]。

父系渗漏可能是发生线粒体重组最可能的途径^[16],因为它产生了异质性 mtDNA 后代,这就为双亲 mtDNA 间发生重组创造了条件;而且在常发生父系渗漏的物种中,已经发现了重组子 mtDNA 单倍型^[24]。然而,这条途径要求双亲线粒体具有相互融合的能力,或者母系线粒体具有吸收父系 mtDNA 的能力。但是还没有 DNA 能被线粒体吸收的证据^[25];关于动物线粒体融合是否是线粒体普遍的本质特征这一问题也存在争议^[3]。研究表明,人类线粒体融合是一种罕见的现象;而且融合似乎只发生在发育的某些阶段^[23]。

无论通过哪条途径发生 mtDNA 重组,都需要存在重组酶。已经证明,人类线粒体蛋白提取物能够催化同源重组^[25]和非同源重组^[26];在 DNA 复制、重组和修复过程中发挥主要作用的 DNA 连接酶,不仅位于细胞核内,也位于线粒体内^[27]。

4 动物界是否广泛存在线粒体重组

既然已经发现了证明存在线粒体重组的直接和间接证据,为什么还不能获得动物界广泛存在 mtDNA 重组的结论?这是因为:(1) 目前获得直接证据的生物大都比较特殊,如线虫和比目鱼的 mtDNA 重组仅发生在 VNTRs 所在区域上;贻贝又具有特殊的双单亲遗传系统。(2) 严格的母系遗传方式产生的是同质性个体,不可能检测到重组的发生,而动物 mtDNA 的异质性比较罕见,因而检测到产生新单倍型的重组子要比想象困难得多。(3) 合子中来自精子和

卵子的线粒体数量比值悬殊,使得发生重组和检测重组产物极易受到随机因素的影响。(4)自然群体中,能够用于检测父系遗传的后代太少。(5)现存的检测重组方法都不完善^[3]。

Tsaousis 等认为能够证明广泛发生动物 mtDNA 重组的证据,必须符合下列 4 个条件:一定是同源同组;重组不能限定在基因组的特定区域内;重组能够发生在许多远缘物种中;重组产物能够传递到后代中,而且能够存活下来^[2]。他们已经提出了符合这 4 个条件的统计学证据,所以未来的研究方向应着重在寻找直接证据,探索 mtDNA 重组发生机制和发生频率等问题上。

5 重组对 mtDNA 应用造成的影响

如果动物界广泛存在线粒体重组,将会对以 mtDNA 母系遗传为基础的许多应用领域产生重要的影响。

首先将对我们理解 mtDNA 突变和修复机制以及突变积累速率产生重要影响^[18]。同源重组可能是动物 mtDNA 修复所必需的^[18];单个基因组中突变负荷 (mutation load, 是一个群体中反复发生的突变产生了致死或亚致死基因) 与 mtDNA 库中清除突变的机制将不再遵循严格的母系遗传规律^[2];重组错误可能导致与线粒体疾病 (mitochondrial disease) 相关的短的直接重复序列间发生不等交换和缺失^[18]。

mtDNA 重组也会影响人类线粒体疾病。线粒体疾病是指以线粒体功能异常为主要病因的一大类疾病,根据 mtDNA 突变类型不同将线粒体疾病分为由点突变引起的疾病和由 mtDNA 插入或缺失引起的疾病。已经发现了 100 多种 mtDNA 点突变、上百种 mtDNA 插入或缺失与常见的人类线粒体疾病相关,例如与点突变相关的 Leber 遗传性视神经病 (Leber's hereditary optic neuropathy), 与缺失相关的 KSS 综合症 (Keams-Sayre Syndrome, KSS)。如果发生 mtDNA 重组,重组会清除有害突变,减少与线粒体疾病相关的突变负荷。

在群体遗传、进化和系统发育研究方面,

mtDNA 重组也可能影响关于群体大小变化的推论,因为重组的效果与由群体大小扩张产生的部分模式一致^[28]。mtDNA 重组还会影响系统发育关系构建和分子定时 (molecular dating) 的准确性,因为如果实际发生了重组,而在应用中假设不存在重组,将会高估末端分枝长度和总分枝长度,低估所有分析序列共同祖先的起源时间,以及不正确地拒绝分子钟假说。例如,关于人类最近母系祖先起源问题,“线粒体夏娃” (mitochondrial eve) 假说认为现代人的线粒体 DNA 来自于 10 万年到 20 万年前非洲大陆上一个女性;如果发生了重组,可能现代人并非起源于非洲,而且现代人起源年代也比现在我们认为的要古老^[29]。总之,如果动物界广泛存在线粒体重组,在使用 mtDNA 进行进化研究时,我们不应该仅研究部分线粒体基因组,就得出关于整个基因组进化历史的结论^[22]。

参 考 文 献

- [1] Shao R, Mitani H, Barker S C, et al. Novel mitochondrial gene content and gene arrangement indicate illegitimate inter-mtDNA recombination in the chigger mite, *Leptotrombidium pallidum*. *Journal of Molecular Evolution*, 2005, **60** (6): 764 ~ 773.
- [2] Tsaousis A D, Martin D P, Ladoukakis E D, et al. Widespread recombination in published animal mtDNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 2005, **22** (4): 925 ~ 933.
- [3] Rokas A, Ladoukakis E, Zouros E. Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends in Ecology and Evolution*, 2003, **18** (8): 411 ~ 417.
- [4] Sutovsky P, Moreno R D, Ramalho-Santos J, et al. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biology of Reproduction*, 2000, **63** (2): 582 ~ 590.
- [5] Kondo R, Satta Y, Marsuura E T, et al. Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Genetics*, 1990, **126**: 657 ~ 663.
- [6] Gyllenstein U, Wharton D, Josefsson A, et al. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature*, 1991, **352** (6332): 255 ~ 257.
- [7] Schwartz M, Vissing J. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *New England Journal of Medicine*, 2002, **347** (8): 576 ~ 580.
- [8] Ladoukakis E D, Zouros E. Recombination in animal

- mitochondrial DNA: evidence from published sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 2001, **18** (11): 2 127 ~ 2 131.
- [9] Eyre-Walker A. Do mitochondria recombine in humans? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2000, **355**(1 403): 1 573 ~ 1 580.
- [10] Rawson P D. Nonhomologous recombination between the large unassigned region of the male and female mitochondrial genomes in the mussel, *Mytilus trossulus*. *Journal of Molecular Evolution*, 2005, **61** (6): 717 ~ 732.
- [11] Hoeh W R, Stewart D T, Guttman S I. High fidelity of mitochondrial genome transmission under the doubly uniparental mode of inheritance in freshwater mussels (Bivalvia: Unionoidea). *Evolution*, 2002, **56** (11): 2 252 ~ 2 261.
- [12] Berlin S, Smith N G C, Ellegren H. Do avian mitochondria recombine? *Journal of Molecular Evolution*, 2004, **58** (2): 163 ~ 167.
- [13] Eyre-Walker A, Smith N, Smith J M. How clonal are human mitochondria? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1999, **266**(1 418): 477 ~ 483.
- [14] Hagelberg E, Goldman N, Lio P, et al. Evidence for mitochondrial DNA recombination in a human population of island Melanesia. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1999, **266**(1 418): 485 ~ 492.
- [15] Awadalla P, Eyre-Walker A, Smith J M. Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA. *Science*, 1999, **286**(5 449): 2 524 ~ 2 525.
- [16] McVean G A T. What do patterns of genetic variability reveal about mitochondrial recombination? *Heredity*, 2001, **87**: 613 ~ 620.
- [17] Lunt D H, Hyman B C. Animal mitochondrial DNA recombination. *Nature*, 1997, **387**(6 630): 247.
- [18] Ladoukakis E D, Zouros E. Direct evidence for homologous recombination in mussel mtDNA. *Molecular Biology and Evolution*, 2001, **18**(7): 1 168 ~ 1 175.
- [19] Burzynski A, Zbawicka M, Skibinski D O, et al. Evidence for recombination of mtDNA in the marine mussel *Mytilus trossulus* from the Baltic. *Molecular Biology and Evolution*, 2003, **20**(3): 388 ~ 392.
- [20] Hoarau G, Hølla S, Lescasse R, et al. Heteroplasmy and evidence for recombination in the mitochondrial control region of the flatfish *Platichthys flesus*. *Molecular Biology and Evolution*, 2002, **19**(12): 2 261 ~ 2 264.
- [21] Kravtsov Y, Schwartz M, Brown T A, et al. Recombination of human mitochondrial DNA. *Science*, 2004, **304**(5 673): 981.
- [22] Guo X, Liu S, Liu Y. Evidence for recombination of mitochondrial DNA in triploid crucian carp. *Genetics*, 2006, **172**(3): 1 745 ~ 1 749.
- [23] Eyre-Walker A, Awadalla P. Does human mtDNA recombine? *Journal of Molecular Evolution*, 2001, **53**: 430 ~ 435.
- [24] Ujvari B, Downton M, Madsen T. Mitochondrial DNA recombination in a free-ranging Australian lizard. *Biology Letters*, 2007, **3**(2): 189 ~ 192.
- [25] Thyagarajan B, Padua R A, Campbell C. Mammalian mitochondria possess homologous DNA recombination activity. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, **271** (44): 27 536 ~ 27 543.
- [26] Lakshminpathy U, Campbell C. Double strand break rejoining by mammalian mitochondrial extracts. *Nucleic Acids Research*, 1999, **27**(4): 1 198 ~ 1 204.
- [27] Lakshminpathy U, Campbell C. The human DNA ligase III gene encodes nuclear and mitochondrial proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 1999, **19**(5): 3 869 ~ 3 876.
- [28] Piganeau G, Gardner M, Eyre-Walker A. A broad survey of recombination in animal mitochondria. *Molecular Biology and Evolution*, 2004, **21**(12): 2 319 ~ 2 325.
- [29] Hagelberg E. Recombination or mutation rate heterogeneity? Implications for Mitochondrial Eve. *Trends in Genetics*, 2003, **19**(2): 84 ~ 90.