

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.01319

重组激活基因(RAGs)功能机制及其在鱼类早期发育中的作用

毛明光¹, 雷霖霖^{1,2}, 姜志强¹

1. 农业部北方海水增养殖重点实验室 大连海洋大学, 辽宁 大连 116023;
2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071

摘要: 在 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞的发育过程中, BCR 和 TCR 基因座(*Igκ*、*Igλ*、*Igh*、*Tcra*、*Tcrβ*、*Tcrγ*、*Tcrδ*)的可变区(V)、多样区(D)、链接区(J)发生 V(D)J 重排, 该重排过程是在重组激活蛋白(RAG-1 和 RAG-2)的作用下完成的, V(D)J 重排机制使机体拥有庞大的抗体库, 以应对自然界中多元的病原微生物。RAGs 结构分为核心区和非核心区, 核心区域发挥着重要的基因片段酶切功能, 而非核心区域的九聚体序列(nonamer)、锌指等结构具有调节 V(D)J 重排的功能。RAGs 的功能在转录水平、染色体水平以及蛋白水平受到严格的时间和空间调控, 以保证 B/T 细胞的正常发育。随着国内外学者对哺乳动物 RAGs 基因的结构与功能机制的深入研究, RAGs 也在淡水鱼和海水鱼中有了越来越多的报道。由于 RAGs 的功能特点以及在进化过程中的稳定性, 其已成为研究鱼类免疫系统发育过程和系统进化的重要分子标记。本文在赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*) RAGs 研究的基础上探讨了 RAGs 定位鱼类免疫系统的发生过程, 旨在为鱼类人工繁殖技术的突破、鱼类疫苗的开发与研制以及鱼类免疫学研究等提供理论借鉴。

关键词: 重组激活酶; 免疫球蛋白; T 细胞受体; 早期发育; 鱼类特异免疫

中图分类号: Q249; S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)06-1319-09

当前, 学界对脊椎动物特异性免疫高度重视。长期以来一直认为特异性免疫为脊椎动物所特有, 但随着对文昌鱼研究的深入, 这一观点受到了极大的挑战^[1]。机体能够在抗原物质(病毒、菌苗、疫苗等)刺激后形成特异抗体来抵抗同一种微生物的重复感染。特异性免疫反应需要有一套高度复杂而多样的指令系统。这套指令系统是通过 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞表面上的抗原特异受体来发挥作用的。这些多样的抗原特异受体是由多个 *V*(Variable)基因片段、*D*(Diversity)基因片段和 *J*(Joining)基因片段通过基因重组[即 V(D)J 重排]而产生的。在物种进化过程中, 协调 *V*、*D* 和 *J* 基因片段重组的酶指令系统在脊椎动物中变得非常保守。V(D)J 重排过程主要发生在未成熟的

淋巴细胞中(祖 B 淋巴细胞、前 B 淋巴细胞、成熟前 B 淋巴细胞、CD4⁻8⁻ T 细胞、CD25⁺ T 细胞、CD4⁺CD8⁺ T 细胞)^[2]。V(D)J 重排是由重组激活基因 (recombination-activating gene, RAG) 编码的 RAG 蛋白酶参与完成的。RAG 是淋巴样特异性组分, 是 V、D 和 J 基因片段重排所必需的, 也是研究发育过程中特异免疫系统形成的有效分子标记^[3]。目前, 高等脊椎动物的淋巴细胞 V(D)J 重排过程已被初步阐明^[4], 但该过程在时间和空间上的调控机制尚不清楚, 也一直是研究的热点。2013 年, 《Nature》子刊报道了锌指蛋白 Zfp608 和 Zfp609 对胸腺 T 细胞中 RAG 重组酶表达的调控机理^[5]。同年, 《Cell》报道了 T 细胞 α 受体的 3'端通过结构上的改变来调控 RAG 的功能^[6]。

收稿日期: 2013-04-16; 修订日期: 2013-06-27.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31302202); 国家 863 计划项目(2012AA10A413); 辽宁省教育厅计划项目(L2013276); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(nycytx-50).

作者简介: 毛明光(1982-), 男, 博士, 讲师. 从事鱼类免疫学研究. E-mail: mmg@dlou.edu.cn

通信作者: 雷霖霖, 中国工程院院士, 博士生导师. E-mail: lejilin@seacul.com

鱼类作为低等脊椎动物的代表,其先天免疫发达,表现在先天免疫相关分子的种类多、调控网络复杂,如模式识别受体、抗菌肽系统等;然而适应性免疫尚处于稚嫩阶段,参与的细胞亚群、相应的调控机制以及功能机理的复杂程度相对较低,因此对于探讨特异性免疫的起源进化,以及研究特异性免疫相关基因在相对低复杂的调控网络中的功能等问题是一个得天独厚的模型。特异免疫系统的起源问题一直是研究的热点,主要集中在对脊索动物文昌鱼的研究上。2005 年,中山大学的研究人员报道了文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri tsing taunese*) 体内 RAG1 的同源基因,但其与小鼠的 RAG1 同源性很低(40%)^[1],而鱼类与小鼠的 RAG1 同源性可以达到 70%~90%。在文昌鱼的 EST 数据库中没有找到关键分子 TRL、MHC、Ig 等,但与特异免疫反应相关的分子大量存在,如基因重排相关基因、免疫球蛋白超家族 (*IgSF*) 基因、淋巴细胞发育、信号转导、增殖、迁移相关基因、抗原递呈相关基因等^[7],这些结果显示了文昌鱼具备了特异免疫系统的雏形,为特异免疫系统的起源问题提供了依据,具有重要的理论价值。鱼类虽属于脊椎动物中的低等类群,但具备了较完善的特异性免疫系统。鱼类特异性免疫系统的形成机制以及发育特点的研究将对提高种质资源、增强苗期成活率、研发鱼类疫苗等同样具有重要的理论和实际的生产意义。育苗期间仔稚鱼高死亡率的重要原因之一是由免疫力低弱所致,水环境中的仔稚鱼面临多种病害威胁,而化学药物治疗又存在用药过度、药物残留和污染水环境等潜在问题,通过母源免疫提高鱼卵质量以及早期疫苗应用将有助于克服上述问题^[7-8]。由于鱼种类繁多,疫苗应用存在各种困难,故国内的水产疫苗使用至今尚未得到推广。疫苗的作用是借助于机体特异免疫系统而发挥作用,仔稚

鱼自身免疫系统成熟之前使用疫苗不能诱导机体产生相应的抗体,若在自身的免疫系统成熟之后及时使用疫苗将会起到较好保护作用,说明人类需要对鱼类免疫系统发生规律正确认识的基础上,才有可能更准确地采取保护措施。目前对 RAGs 的分子机制及其在鱼类方面的研究已经有了更新的报道。本文聚焦 RAGs 基因及其在 V(D)J 基因重排中的作用机制,并进行研究与评述,展望 RAGs 在鱼类育苗研究与应用中的前景,旨在为鱼类人工繁殖技术的突破、鱼类疫苗的开发与研制以及鱼类免疫学研究等提供理论借鉴。

1 V(D)J 基因结构特征与重组过程

大量的淋巴细胞受体库在抗感染免疫中起着重要的作用。免疫球蛋白基因片段是由位于不同染色体上的 κ 型轻链 (*Ig κ*)、 λ 型轻链 (*Ig λ*) 和重链 (*Ig μ*) 3 个基因座组成,它们含有 *V* 基因片段簇、*J* 基因片段簇和单独的 *C* 基因片段,其中重链基因座中还有一个 *D* 基因片段簇。图 1 所示为人类基因组中免疫球蛋白重链所含有的基因片段簇。与免疫球蛋白重链和轻链非常类似,T 细胞受体的 α 链 (*Tcr α*) 基因座、 β 链 (*Tcr β*) 基因座、 γ 链 (*Tcr γ*) 基因座和 δ 链 (*Tcr δ*) 基因座也是由 *V* 基因片段簇、*J* 基因片段簇和单独的 *C* 基因片段组成,其中 β 链和 δ 链中存在一个 *D* 基因片段簇^[2]。*V*、*D* 和 *J* 基因片段重组的组合多样性和连接多样性决定了抗体库或者抗原受体库的庞大程度,这为生物个体提供了针对自然环境中广泛抗原的应答能力^[9-10]。

V(D)J 重排是由保守的非编码侧翼 DNA 序列所引导的,这些侧翼序列具有保守的核苷酸序列模体结构(七聚体-间隔序列-九聚体结构),即重组信号序列(RSS),且符合 12/23 规则^[11](即:重组仅发生在同一条染色体的基因片段之间,带有 12 bp 间隔序列的 RSS 基因片段只能与带有 23 bp 间

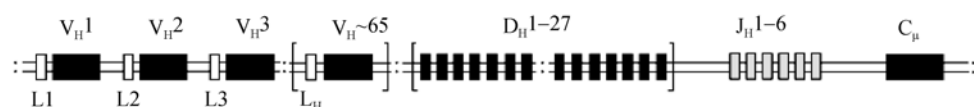


图 1 人类基因组中免疫球蛋白重链基因座结构示意图^[2]

Fig. 1 The germline organization of the immunoglobulin heavy-chain loci in the human genome^[2]

隔序列的 RSS 基因片段连接)。协调 V(D)J 重排的酶复合体是 V(D)J 重组酶, 它是由两个重组活化基因 RAG-1 和 RAG-2 所编码的蛋白构成的复合体^[12]。V(D)J 重组酶识别 RSS 序列并参与多个酶促过程, 连同其他因子(如 DNAPKcs, Ku70/80, Artemis, XRCC4, DNA 连接酶 IV)共同完成对 *V*、*D* 和 *J* 基因片段的重组^[13]。由 RAG 蛋白参与的重组调控机制是近几年研究的热点^[14-16]。

2 RAGs 结构及其重要的功能域

RAG-1/2 基因在染色体上呈不规则排列, 它们紧密相连并一起转录。小鼠 RAG-1 由 1 040 个氨基酸残基构成, RAG-2 由 527 个氨基酸残基构成^[17]。对 RAG-1 和 RAG-2 的研究主要集中在其各自的核心区, 即在体外实验中具有催化 V(D)J 重组功能的最小结构。然而, 近几年对 RAG-1 和 RAG-2 非核心区功能的报道越来越多。对人类 RAG-1 的研究发现, RAG-1 完整蛋白(1 043 个氨基酸)在体外条件下呈不溶状态, 通过对氨基酸 N-端序列的删减, 发现 387~1 008 位的氨基酸序列仍然具有酶活性, 即核心区^[16]。但是被删除的 N-端序列在体内发挥的作用仍然不能忽视, 它可能参与了核酸定位和增强酶活性的作用^[18]。最近, Grazini 等研究表明, N-端非核

心区的指环结构域可以促进染色体组蛋白 H3 的泛肽化^[19]。靠近 N-端的 4 个基本结构域 a、b、c 和 d(图 2)是核酸转运蛋白 SRP-1 的靶位点, 而指环结构和锌指结构 A 可以结合 4 个锌原子, 主要参与了 RAG-1 二聚化的作用, 这与 *V*、*D*、*J* 基因片段的酶切连接有关。RAG-1 核心区基因序列比较保守, 因此, 常被用做研究脊椎动物免疫系统进化和物种分类的有效分子标记。RAG-1 非核心区 RAG-2 基因序列保守性较低。RAG-1 氨基酸序列 392~448 区域可以识别九聚体序列(nonamer), 是 RAG 蛋白识别结合免疫球蛋白基因和 TCR 受体基因上 RSS 序列的主要功能区^[20]。在 RAG-1 序列 504~526 位的保守序列与原核生物整合酶(integrase, INT)位点特异重组酶家族的催化域类似^[21]。与 RAG-2 相互作用的区域位于 RAG-1 核心区域的 504~1 008 位氨基酸之间。小鼠 RAG-1(含 1 040 个氨基酸)的核心区位于 384~1 008 位, RAG-2(含 527 个氨基酸)核心区位于 1~387 位, 核心区是 V(D)J 重组必不可少的^[17, 21]。另外, 斑马鱼 RAG-1 蛋白(含 1 057 个氨基酸)和虹鳟鱼 RAG-1 蛋白(含 1 073 个氨基酸)的核心结构与人的 RAG-1 蛋白核心区序列类似, 在 N 端也存在一个保守的指环结构, 保守的 C 端具有重组激活功能^[23-24]。

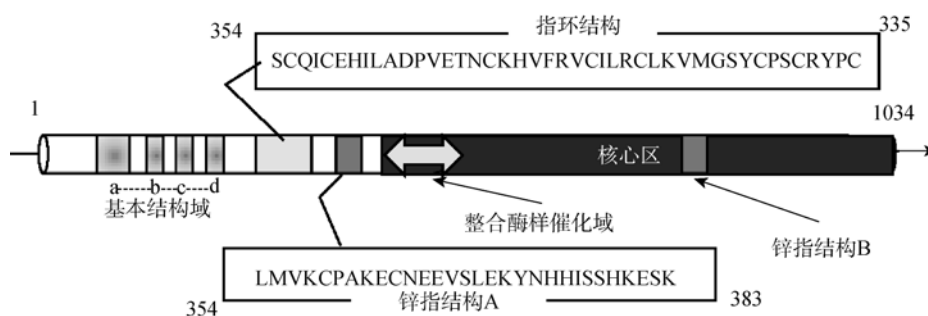


图 2 人类 RAG-1 氨基酸序列图谱^[19]

Fig. 2 The functional structure of human RAG-1 gene^[19]

3 RAG 参与 V(D)J 重排机制

在淋巴细胞发育过程中发生的 V(D)J 重排过程已被初步阐明, 除了几个必要的蛋白(高迁移率染色体蛋白, HMGs)外, RAG-1 和 RAG-2 构成的重组酶在 7 个基因座的重组过程中发挥了主要作

用。该重组酶能够准确、特异地识别目的基因片段侧翼的 RSS 序列^[24-25], 并引起 DNA 双链的断裂和使两个相邻的基因片段连接(图 3)。然而, V(D)J 重排过程只发生在未成熟的淋巴细胞中(祖 B 淋巴细胞、前 B 淋巴细胞、成熟前 B 淋巴细胞、

CD4⁻8⁻ T 细胞、CD25⁺44^{low} T 细胞、CD4⁺CD8⁺ T 细胞)。Ig 由 B 淋巴细胞分泌, TCR 由 T 淋巴细胞表达, 而重组酶受到时间特异性和位点特异性的双重调控并仅发生在一个等位基因上^[2]。重组酶如何在正确的时间和正确的位点准确识别恰当的 RSS 序列, 以及重组酶活性如何在错误的细胞和错误的位点受到抑制, 至今仍是热点研究问题。为确保基因组的完整性和 V(D)J 重排在时间和空间上的严谨性, 该过程的启动和抑制受到严格的调控, 主要发生在 RAGs 基因的表达调控水平和染色体调控水平。

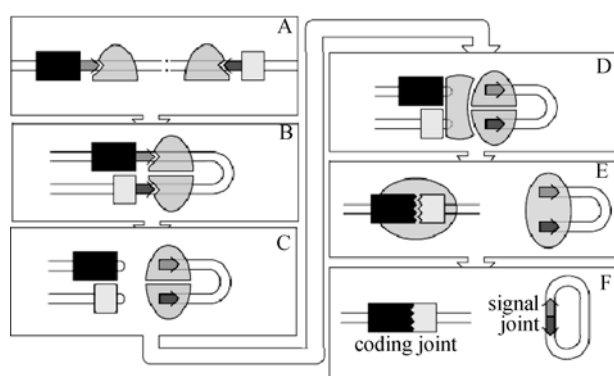


图 3 V(D)J 重排机制示意图^[2]

A: RAG 重组酶复合体结合到重组信号 RSS 上; B: 重组酶的两个亚蛋白相互靠近使得不同片段相接; C: 免疫球蛋白基因被切割后末端形成发夹结构; D: 其他蛋白结合到两个末端; E: DNA 发夹结构随即切割; F: 在 DNA 结合酶 IV 的作用下, 被切割的片段首尾相接, 同时 RSS 信号序列形成末端信号节点。

Fig. 3 The mechanism of V(D)J recombination^[2]

A: RAG protein complexes bind to 12 and 23 bp spaced recombination signal sequences (RSS); B: The protein complexes bind to each other, bringing together the segments to be joined; C: The DNA is cleaved to create hairpin structure at the ends of the immunoglobulin gene sequence; D: Other proteins (Ku70: Ku80, XRCC4, and DNA-dependent protein kinases) bind to the hairpins and the cleaved RSS ends; E: The DNA hairpins are cleaved at random. F: DNA ligases IV joins the end of the gene segments to form the coding joint and the RSS ends to form the signal joint.

3.1 RAGs 基因的表达调控

RAGs 基因表达调控主要发生在转录起始过程, 在人和小鼠中已有深入研究。RAG-1 的启动子区序列缺少 TATA 功能框, 该区域内高丰度的 A/T 序列可能在其转录起始中发挥重要的作用, 研究还发现 RAG-1 启动子区含有可以识别和结合转录因子的位点。在 RAG-1 基因中陆续发现了

转录因子 PEPB2/CBF 和 Y-box/CCAAT 序列。转录激活子 Y (Nuclear factor Y, NF-Y) 可以结合到 RAG-1 Y-box 基序上, 删除 Y-box 可以阻断 RAG-1 与 NF-Y 转录因子的结合, 从而抑制 RAG-1 启动子的活性, NF-Y 还能够影响蛋白结合 cAMP 反应元件^[26]。由于 RAG-1 基因的表达是受 cAMP 信号调控, 因此 NF-Y 可以通过 cAMP 元件而影响 RAG-1 启动子作用^[26]。顺式作用元件 Cis-acting 序列可能作为增强子来调节 RAGs 组织特异表达和发育不同阶段的表达^[27], 其作用机制仍需进一步研究。Hsu 等在 RAG 基因座中发现了比较保守的增强子 (Erag), 它在 RAG 启动子驱动的染色体报告基因的表达中是必须的, Erag 的缺失会引起 B 淋巴细胞发育受阻, 但却不影响 T 淋巴细胞的发育^[28]。

造血干细胞经祖 B 淋巴细胞 (pro-B Cell)、前 B 淋巴细胞 (pre-B cell)、未成熟 B 淋巴细胞 (immature B cell) 发育到成熟的 B 淋巴细胞, 各阶段在受外源信号的刺激下, 发生着不同的基因重排过程。例如, 重链的重排发生在祖 B 细胞期, 轻链的重排发生在前祖 B 细胞和未成熟 B 细胞期。Papavasiliou 等^[29]报道, 经脂多糖和白介素 4 (IL-4) 的诱导, 成熟的 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞中会出现 RAG 的再表达, 并发生免疫球蛋白或 TCR 的第二次重排, 该结果为研究体外条件下 B/T 细胞中 V(D)J 重排机制提供了依据。未成熟的 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞的双阳性 (CD4/CD8) 阶段 V(D)J 重排也会受到一定程度的抑制, 该抑制过程是受外源刺激物激活的信号转导途径引起的。外源信号激活磷脂酰肌醇激酶 PI(3)K 和丝氨酸/苏氨酸激酶 Akt, 进而引发转录因子 Foxo 蛋白的磷酸化和泛肽化^[30]。IL-7 可抑制 RAG 的表达, 因为 IL-7 信号通路也需要 PI(3)K 和 Foxo 蛋白的参与^[31]。然而, 在 B 淋巴细胞早期发育过程中 IL-7 是一个潜在的细胞增殖信号。在祖 B 淋巴细胞阶段, RAG 的转录受到调节蛋白 (stress-regulated protein, GADD45α) 的调控, GADD45α 路径的调控过程依赖于 MEKK4 和 p38 的活性, 但 GADD45α 通路在初级淋巴细胞阶段中并没有影

响 RAG 的转录^[30]。

造血干细胞经双阴性 T 细胞(CD4⁻CD8⁻ T cell), 双阳性 T 细胞(CD4⁺CD8⁺ T cell)发育到 CD4⁺CD8⁻ T 淋巴细胞或 CD4⁻CD8⁺ T 淋巴细胞, 同样受外源信号激活的过程, 外源物质刺激的信号需维持在一个稳定状态。在初级胸腺细胞中大部分都是双阳性细胞, RAGs 表达的抑制受到低水平的酪氨酸激酶(Abl)和胞外信号调节激酶(Erk)的定向调控, Abl 和 Erk 激酶受到接头分子(adapter molecules)T 细胞活化连接蛋白(LAT)和 SLP-76 的调节, 而导致 RAGs 转录的失活^[32-33]。

3.2 染色体水平调控

染色体水平上调控的研究主要集中在 RAG 重组酶如何准确识别染色体上 V、D、J 基因片段的 RSS 特异序列。已经证明 RAG-1 而非 RAG-2 识别染色体上的 RSS^[34], RAG-1 蛋白中的不同结构位点又发挥着独自的功能^[35]。最近的研究发现 RAG-2 C-端存在一个 PHD 结构域(plant homeodomain), 它能够特异结合组蛋白 H3 的特异结构区, 而且只有当组蛋白 H3 序列第 4 个赖氨酸被甲基化修饰(H3K4me3)之后才能被识别与结合^[36-37]。体外研究发现, PHD 结构的突变会抑制重组酶与 H3K4me3 的结合, 进而使机体无法完成 V(D)J 重排反应而导致免疫疾病。然而, 对于重组酶如何识别染色体上特异结构还存在争议, 有待于进一步研究。

3.3 其他调控因素

有证据表明, 某些转录调控因子通过信号转导或与配体的互作来调节 RAGs 的表达。例如, 阻断转录因子 E2A、B 淋巴细胞特异激活蛋白(PAX5/BSAP)^[38]、前 B 淋巴细胞转录因子(EBF)等都会引起 RAGs 转录的失活^[39]。但这种转录的失活是直接导致了 RAGs 基因沉默还是在淋巴细胞的发育过程中受到各种阻断而间接导致基因沉默尚不清楚。因此, 要弄清 B 淋巴细胞成熟之前 V(D)J 的重组过程, 还需要对祖 B 淋巴细胞进行更深入的研究。淋巴细胞与基质细胞之间相互联系, 可能会通过信号转导途径激活淋巴细胞内 RAG 基因的表达, 该过程显然需要基质细胞分泌的细胞

因子和基质与淋巴细胞的直接接触而发挥作用。

4 鱼类 RAGs 的研究现状及展望

要解决仔稚鱼发育过程死亡率高这一问题, 需要探索鱼类胚胎、仔稚鱼和幼鱼免疫能力及其免疫系统的成熟机制。近 10 年来, 鱼类胚胎、仔稚鱼和幼鱼的免疫机制的研究受到前所未有的关注, 并取得一些进展^[40]。硬骨鱼类拥有哺乳动物特异性免疫系统的主要特征, 包括由 B 细胞分泌 Ig 过程和 T 细胞表达 TCR 过程^[41-42]。由于 RAGs 在发育的淋巴细胞中表达的独特性, 其常被用来追踪和定位免疫系统的发育过程。

4.1 鱼类 RAGs 基因的研究

为了深入研究鱼类免疫器官的形态发生与发育, 了解硬骨鱼类特异性免疫的分子机制, 1995 年, Hansen 和 Kaattari 首次克隆和分析了虹鳟的 RAG-1 和 RAG-2^[22]。斑马鱼(*Danio rerio*)^[23]、河鲀(*Takifugu rubripes*)^[43]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[3]、黑线鳕(*Melanogrammus aeglefinus*, L.)^[44]等的 RAGs 基因也相继被报道, 国内报道了叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)^[45]、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)^[46]、鲫(*Carassius auratus*)^[47]、牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)^[48]、赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)^[49]、红笛鲷(*Lutjanus sanguineus*)^[50]的 RAG-1 序列。另外, 由于 RAG-1 核心区序列在进化过程中的保守性, 在濒危物种的鉴定及分类中也发挥了重要的作用, RAG-1 核心区序列已在多种濒危鱼类中得到测序。

我们之前的研究结果显示, 赤点石斑鱼 RAG-1 cDNA 编码 925 个氨基酸, 分子量约为 105 kD。根据 RAG-1 蛋白在人和小鼠中的报道, 赤点石斑鱼 RAG-1 氨基酸序列也是由非核心区和核心区组成。非核心区含有一个锌指二聚体结构域 ZDD(氨基酸序列为 142~270); 核心区包括核心区和 C 端区, 核心区包含九聚体结合区 NBR(217~364)和锌指结构域 ZFB^[51]。其中 ZDD 具有保守特征序列 C₂H₂ 和 C₃H₄, 这在其他物种中均存在, 这些功能结构域的存在表明赤点石斑鱼免疫系统早期发育过程中, RAG-1 的功能和分子机制与高等哺乳动物相类似。虹鳟 RAG-1 的

ORF 由 3 222 个碱基构成, 编码 1 073 个氨基酸, 保守区的氨基酸序列(417~1 042)与哺乳动物和其他鱼类的同源性在 70%~90%, 并首次通过 RAG-1 的 RNA 印迹确定了胸腺是鱼类的主要免疫器官^[22]。其 RAG-2(1 602 个碱基)基因和蛋白序列分别与其他物种有 60%和 75%的同源性, 并在 1 龄虹鳟中发现 RAG-2 在胸腺中的表达量极高, 而在头肾中表达量很低; 受精后 10 d 的虹鳟幼鱼开始表达 RAG-1 和 RAG-2^[22, 52]。Danilova 等^[53]克隆了斑马鱼 RAG-1/2 基因并分析了其在体内表达和分布的情况, 结果表明, RAG-1 编码 1 057 个氨基酸, RAG-2 编码 530 个氨基酸, RAG-1/2 核心区域与虹鳟 RAG-1 的同源性达 76%; 在斑马鱼的胸腺、头肾、中肾和卵巢中均检测到 RAG-1 的表达, RAG-1 和 RAG-2 mRNA 出现在胚胎发育的第 4 天, 胸腺原基出现在 54 h, 在 30 h 后明显增大, 并在 1 个月左右发育到成熟。鲤和鲫的 RAG-1 基因表达首先出现在受精后 4 天的胸腺中, 在受精后第 7 天的胸腺和肾脏中均有表达。在 1 龄的鲤鱼胸腺中发现 RAG-1 仍有高表达, 而在肾脏中其表达水平非常低^[3, 47]。牙鲈 RAG-1/2 基因的表达出现在受精后第 8 天^[48]。与上述几种鱼相比, 赤点石斑鱼和黑线鳕的 RAG-1 mRNA 的出现时间比较晚, 分别在孵化后的 15 d 和 21 d^[44-49]。另外, 通过组织学方法对大菱鲈和条斑星鲈的研究发现, 他们的胸腺原基出现在孵化后 12 d 左右, 而鲈鱼

出现在孵化后 4 d^[54-55]。通过上述研究发现, 鱼类 RAG-1 核心区序列保守性较高, 但 RAG-1 蛋白在发育过程中出现的时间差异较大, 海水鱼较淡水鱼免疫系统出现较晚, 免疫器官的发生与发育时间随物种而异。

4.2 鱼类 RAGs 研究展望

在自然条件下, 大部分仔稚鱼有可能被环境中的各种因素, 如温度、盐度、细菌、病毒等所淘汰, 但少部分适应环境压力的个体能够生存下来, 这就验证了达尔文“适者生存”的进化论。但从人类社会对食物不断增长的需求出发, 人们寄希望于人工模拟的环境(工厂化)能够大力提高仔稚鱼的成活率, 以满足人类的生活需求。已有的报道和我们前期的研究结果相符合, 即: 石斑鱼属于较容易携带神经坏死病毒(NNV)的鱼类^[51], 在人工育苗期间会短期出现大量死亡的现象。通过 RAG-1 基因对赤点石斑鱼特异免疫系统发生规律的研究发现, 赤点石斑鱼特异免疫系统出现的时间, 正值 NNV 病毒暴发期(图 4), 亦被称为“危险期”。此时, 如果仔稚鱼自身免疫力在与病原之间的抗衡中占居优势, 免疫力就可以提高, 病毒便会被抑制, 鱼苗就可以存活下来; 反之, 病毒则会暴发, 造成仔稚鱼的大量死亡。这说明仔稚鱼早期死亡率高与个体发育期和病毒暴发期的相关性很大, 生产者必须严密跟踪以便采取免疫措施防止病毒病的暴发。

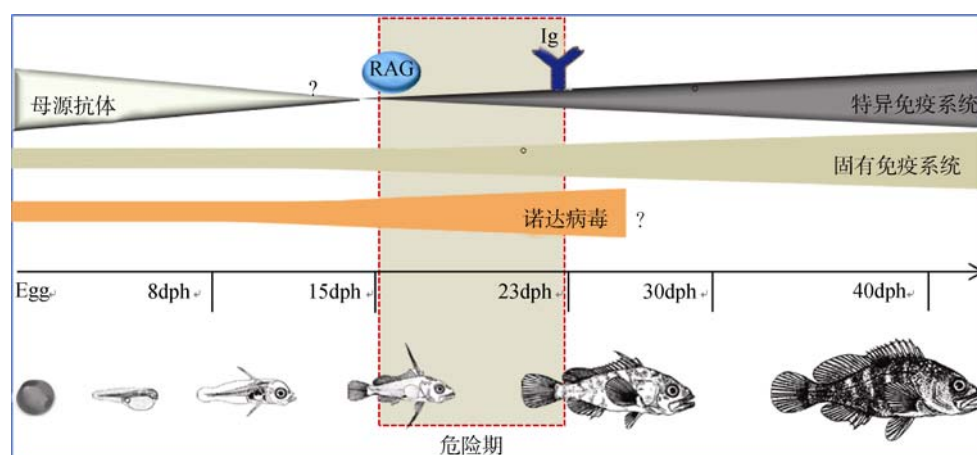


图 4 赤点石斑鱼发育早期自身免疫力与 NNV 的关系^[56]

Fig. 4 Relationship between immunity and NNV in the early stages of red-spotted grouper^[56]

与较高等的脊椎动物比较, 鱼类 RAGs 的研究目前尚不够深入和系统。首先, 鱼种类繁多, 种间差异较大, 而目前研究的对象仅局限于模式动物; 其次, 鱼类免疫细胞的培养技术还不够成熟, 体外实验条件下研究其分子机理受到限制; 第三, 鱼类相关抗体商品化程度不高, 制约了其在蛋白水平上的研究进程。随着人类生活质量的提高, 对海洋渔业资源的需求不断扩大, 海洋生物的开发与保护显得非常重要, 通过对鱼类免疫系统的研究, 以寻求更有效的保护途径十分迫切。而且, 随着全球气候变化不断加剧, 一些濒危物种的生存受到巨大的威胁, 所以研究 RAGs 对加强濒危物种的保护也具有同样重要的意义。

总之, 随着海洋鱼类养殖产业化进程的加快^[57], 深入了解鱼类特异性免疫系统发生的分子机理, 认识鱼类免疫系统的发育规律将有助于控制鱼类疾病, 这对提高繁殖育种效率、水产种业的兴盛和保护濒危物种的生存具有非常重要的指导意义。

参考文献:

- [1] Dong M, Fu Y, Yu C, et al. Identification and characterisation of a homolog of an activation gene for the recombination activating gene 1 (RAG 1) in amphioxus[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2005, 19(2): 165–174.
- [2] Janeway C A. 免疫生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [3] Huttenhuis H, Huising M O, Meulen T, et al. Rag expression identifies B and T cell lymphopoietic tissues during the development of common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Dev Com Immunol*, 2005, 29: 1033–1047.
- [4] Ji Y, Resch W, Corbett E, et al. The in vivo pattern of binding of RAG1 and RAG2 to antigen receptor loci [J]. *Cell*, 2010, 141(3): 419–431.
- [5] Reed N P, Henderson M A, Oltz E M, et al. Reciprocal regulation of Rag expression in thymocytes by the zinc-finger proteins, Zfp608 and Zfp609[J]. *Genes Immun*, 2013, 14(1): 7–12.
- [6] Chaumeil J, Micsinai M, Ntziachristos P, et al. Higher-Order Looping and Nuclear Organization of Tcra Facilitate Targeted RAG Cleavage and Regulated Rearrangement in Recombination Centers[J]. *Cell Rep*, 2013, 3(2): 359–370.
- [7] Yu C, Dong M, Wu X, et al. Genes "waiting" for recruitment by the adaptive immune system: the insights from amphioxus[J]. *J Immunol*, 2005, 174(6): 3493–3500.
- [8] 丁福红, 雷霖霖, 张家松, 等. 鱼类母源免疫研究现状和展望[J]. *中国水产科学*, 2010, 17(2): 369–373.
- [9] Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity [J]. *Nature*, 1983, 302: 575–581.
- [10] Hesselein D G T, Schatz D G. Factors and forces controlling V(D)J recombination [J]. *Adv Immunol*, 2001, 78: 169–232.
- [11] Sakano H, Maki R, Kurosawa Y, et al. Two types of somatic recombination are necessary for the generation of complete immunoglobulin heavy-chain genes [J]. *Nature*, 1980, 286: 676–683.
- [12] Gellert M. V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation [J]. *Annu Rev Biochem*, 2002, 71: 101–132.
- [13] Hiom K, Gellert M. Assembly of a 12/23 paired signal complex: a critical control point in V(D)J recombination [J]. *Mol Cell*, 1998(1): 1011–1019.
- [14] Mark S S. Epigenetics drives RAGs to recombination riches [J]. *Cell*, 2010, 141: 400–402.
- [15] Gabrielle J G, Wei Y, Martin G. Autoinhibition of DNA cleavage mediated by RAG1 and RAG2 is overcome by an epigenetic signal in V(D)J recombination [J]. *PNAS*, 2010, 107: 22487–22492.
- [16] David G, Schatz, Yanhong J. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11: 251–263.
- [17] Cuomo C A, Oettinger M A. Analysis of regions of RAG-2 important for V(D)J recombination [J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22: 1810–1814.
- [18] De P, Rodgers K K. Putting the pieces together: identification and characterization of structural domains in the V(D)J recombination protein RAG1 [J]. *Immunol Rev*, 2004, 200: 70–82.
- [19] Grazini U, Zanardi F, Citterio E, et al. The RING domain of RAG1 ubiquitylates histone H3: a novel activity in chromatin-mediated regulation of V(D)J joining [J]. *Mol Cell*, 2010, 37: 282–293.
- [20] Difilippantonio M J, McMahan C J, Eastman Q M, et al. RAG1 mediates signal sequence recognition and recruitment of RAG2 in V(D)J recombination [J]. *Cell*, 1996, 87(2): 253–262.
- [21] Sadofsky M J, Hesse J E, McBlane J F, et al. Expression and V(D)J recombination activity of mutated RAG-1 proteins [J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21: 5644–5650.
- [22] Hansen J D, Kaattari S L. The recombination activation gene 1 (RAG1) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): cloning, expression, and phylogenetic analysis [J]. *Immunogenetics*,

- 1995, 42: 188–195.
- [23] Willett C, Cherry J, Steiner L. Characterization and expression of the recombination activating genes (rag1 and rag2) of zebrafish [J]. Immunogenetics, 1997, 45: 394–404.
- [24] Akamatsu Y, Oettinger M A. Distinct roles of RAG1 and RAG2 in binding the V(D)J recombination signal sequences [J]. Mol Cell Biol, 1998, 18: 4670–4678.
- [25] Rodgers K K, Villey I J, Ptaszek L, et al. A dimer of the lymphoid protein RAG1 recognizes the recombination signal sequence and the complex stably incorporates the high mobility group protein HMG2 [J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27: 2938–2946.
- [26] Brown S T, Miranda G A, Galic Z, et al. Regulation of the RAG-1 promoter by the NF-Y transcription factor [J]. J Immunol, 1997, 158(11): 5071–5074.
- [27] Shimazaki N, Tsai A G, Lieber M R. H3K4me3 Stimulates the V(D)J RAG Complex for Both Nicking and Hairpinning in trans in Addition to Tethering in cis: Implications for Translocations [J]. Mol Cell, 2009, 34: 535–544.
- [28] Hsu L Y, Luring J, Liang H E, et al. A conserved transcriptional enhancer regulates RAG gene expression in developing B cells [J]. Immunity, 2003, 19: 105–117.
- [29] Papavasiliou F, Casellas R, Suh H, et al. Recombination in mature B cells: a Mechanism for altering antibody responses [J]. Science, 1997, 278: 298–301.
- [30] Amin R H, Schlissel M S. Foxo1 directly regulates the transcription of recombination-activating genes during B cell development [J]. Nat Immunol, 2008, 9: 613–622.
- [31] Herzog S, Hug E, Meixlsperger S, et al. SLP-65 regulates immunoglobulin light chain gene recombination through the PI(3)K–PKB–Foxo pathway [J]. Nat Immunol, 2008, 9: 623–631.
- [32] Li Z, Dordai D I, Lee J, et al. A conserved degradation signal regulates RAG-2 accumulation during cell division and links V(D)J recombination to the cell cycle [J]. Immunity, 1996, 5: 575–589.
- [33] Jiang H, Chang F C, Ross A E, et al. Ubiquitylation of RAG-2 by Skp2–SCF links destruction of the V(D)J recombinase to the cell cycle [J]. Mol Cell, 2005, 18: 699–709.
- [34] Schatz D G, Spanopoulou E. Biochemistry of V(D)J recombination. Microbiol [J]. Immunology, 2005, 290: 49–85.
- [35] Schlissel M S, Schulz D, Vettermann C. A Histone code for regulating V(D)J recombination [J]. Mol Cell, 2009, 34: 639–640.
- [36] Liu Y, Subrahmanyam R, Chakraborty T, et al. A plant homeodomain in Rag-2 that binds hypermethylated lysine 4 of histone H3 is necessary for efficient antigen-receptor-gene rearrangement [J]. Immunity, 2007, 27: 561–571.
- [37] Matthews A G, Kuo A J, Ramon-Maiques S, et al. RAG2 PHD finger couples histone H3 lysine 4 trimethylation with V(D)J recombination [J]. Nature, 2007, 450: 1106–1110.
- [38] Horcher M, Abdallah Souabni A, Busslinger M. Pax5/BSAP maintains the identity of B cells in late B lymphopoiesis [J]. Immunity, 2001, 14: 779–790.
- [39] Lin H, Grosschedl R. Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF [J]. Nature, 2002, 376: 263–267.
- [40] 张士瑾, 李欣, 汲广东. 鱼类免疫系统的早期发生[J]. 中国海洋大学学报, 2007, 37(4): 557–562.
- [41] Partula S, Schwager J, Timmusk S, et al. A second immunoglobulin light chain isotype in the rainbow trout [J]. Immunogenetics, 1996, 45: 44–51.
- [42] Warr G W, Magor K E, Higgins D A. IgY: clues to the origins of modern antibodies [J]. Immunol Today, 1995, 16: 392–398.
- [43] Peixoto B R, Mikawa Y, Brenner S. Characterization of the recombinase activating gene-1 and 2 locus in the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes* [J]. Gene, 2000, 246(1-2): 275–283.
- [44] Corripio-Miyar Y, Bird S, Treasurer J W, et al. RAG-1 and IgM genes, markers for early development of the immune system in the gadoid haddock *Melanogrammus aeglefinus* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23: 71–85.
- [45] 公衍文, 张云, 黄庆, 等. 斑点叉尾鮰重组激活基因克隆与鉴定 [J]. 第三军医大学学报, 2004, 8(26): 700–703.
- [46] 张琼宇, 范嗣刚, 罗琛. 草鱼 RAGs 的克隆及不同发育阶段的表达分析[J]. 水生生物学报, 2009, 33(5): 795–802.
- [47] 范嗣刚, 张琼宇, 罗琛. 鲫鱼 *Rag* 基因的克隆及表达分析 [J]. 水生生物学报, 2009, 33(4): 603–612.
- [48] 王先磊. 牙鲈 *Rag* 基因的克隆及表达研究[D]. 中国科学院研究生院, 北京: 2006.
- [49] Mao M G, Lei J L, Alex P M, et al. Characterization of RAG1 and IgM (mu chain) marking development of the immune system in red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 33: 725–735.
- [50] Zhang X L, Lu Y S, Jian J C, et al. Cloning and expression analysis of recombination activating genes (RAG1/2) in red snapper (*Lutjanus sanguineus*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 32: 534–543.
- [51] 毛明光. 赤点石斑鱼重组激活基因 1 与相关免疫因子的克隆分析及其发育早期免疫机制的研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2012.
- [52] Hansen J D, Kaattari S L. The recombination activating gene 2 (RAG2) of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Immunogenetics, 1996, 44(3): 203–211.

- [53] Danilova N, Hohman V S, Sacher F, et al. T cells and the thymus in developing zebrafish[J]. *Dev Comp Immunol*, 2004, 28: 670–755.
- [54] 佟雪红, 徐世宏, 刘清华, 等. 大菱鲆早期发育过程中免疫器官的发生[J]. *海洋科学*, 2011, 35: 62–67.
- [55] 肖志忠, 于道德, 孙真真, 等. 条斑星鲷免疫器官个体发生的组织学观察[J]. *海洋科学*, 2008, 32: 88–92.
- [56] Mao M G, Jiang J-L, Alex P M, et al. Characterization of the Mx and hepcidin genes in *Epinephelus akaara* asymptomatic carriers of the nervous necrosis virus[J]. *Aquaculture*, 2013, 408-409: 175–183.
- [57] 雷霖霖. 我国海水鱼类养殖大产业架构与前景展望[J]. *海洋水产研究*, 2006, 27(2): 1–9.

Functional mechanisms of RAGs and its research progress in fish development

MAO Mingguang¹, LEI Jilin^{1, 2}, JIANG Zhiqiang¹

1. Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;
2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China

Abstract: In the development process of B and T lymphocytes, variable region (V), the diversity region (J) and joining region (D) of BCR and TCR loci (*Igk*, *Igl*, *Igh*, *Tcra*, *Tcrβ*, *Tcrγ* and *Tcrδ*) are target of V(D)J recombination, which is completed under the recombination activating protein (RAG-1 and RAG-2). This rearrangement mechanism endows the body with a huge library of antibodies to resist the multiple pathogenic microorganisms in nature. RAGs structure is divided into a core and a non-core area, while the core area exerts an enzyme cutting function, and the non-core region, such as nonamer and zinc finger, plays a regulation role in V(D)J recombination. The expression of RAGs is regulated at the gene and protein levels with stringent temporal and spatial condition, in order to ensure the normal development of B/T cells. More and more reports of RAGs structure and function are found in freshwater and marine fish. According to the characteristics of RAGs and the stability in the evolution process, RAGs have been considered as wonderful indicators to research on fish immune system and system evolution. Based on the study of red-spotted grouper immune system, the development process of the immune system were discussed when RAGs were used as a marker, which would provide the basis for artificial propagation and fish vaccine.

Key words: recombination activating genes; immunoglobulin; T cell receptor; development; fish adaptive immunity

Corresponding author: LEI Jilin. E-mail: lejilin@seacul.com