

· 综述 ·

DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2018.07.01

BMP-1 及 BMP 家族在背 - 腹轴图式形成中的作用

张泽成, 张媛媛, 米立志*

(天津大学生命科学学院结构生物学实验室, 天津 300072)

摘要 骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)是一类在发育过程中起重要作用的分子。除 BMP-1 外,其他 BMP 分子均属于转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)/BMP 超家族的发育信号分子。在胚胎发育过程中,这些信号分子通过形成浓度梯度对背—腹轴各向异性分化进行调控。它们借助细胞表面受体的识别进行信号传导,参与调控细胞分化、增殖等活动。而 BMP-1 则属于细胞外基质金属蛋白酶超家族中的 Tolloid 蛋白酶家族。BMP-1 通过水解其他 BMP 的抑制物(如脊索发生素,Chordin),达到促进其他 BMP 信号传导的目的。BMP-1、BMP 和 Chordin 三者通过相互制约与相互促进等一系列作用,在背—腹沿线建立起稳定的 BMP 信号梯度。本文就 BMP 浓度梯度的形成及其稳态维持的机制进行回顾与总结。并在此基础上,对各个物种间 BMP 浓度梯度形成机制的异同,以及可能存在的协同进化进行比较、分析和讨论。

关键词 骨形态发生蛋白;背 - 腹轴图式形成;形态发生素;分化

中图分类号 Q51

The Roles of BMP-1 and BMPs in Dorsal-Ventral Patterning

ZHANG Ze-Cheng, ZHANG Yuan-Yuan, MI Li-Zhi*

(Laboratory of Structural Biology, School of Life Sciences, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract Bone morphogenetic proteins(BMPs), members of the transforming growth factor (TGF- β)/BMP superfamily, are secreted signaling molecules, which play essential roles in early embryonic development. They regulate generation of the Dorsal-Ventral axis (D-V axis) in embryogenesis by establishing concentration- gradients, and are recognized by their cognate cell surface receptors to control cell proliferation, differentiation, and cell fate determination. Although BMP-1 was accidentally named as it was, it is actually a member of the Tolloid family of extracellular matrix metalloproteinases. BMP-1 could liberate BMPs from their inhibitory complexes by digesting the BMP antagonist-Chordin, thus regulating BMP signaling. Interactions among BMP-1, BMP, and Chordin results in a stable BMP gradient along the D-V axis. Herein, we review the literatures on the formation and maintenance of BMP gradient in pattern formation.

Key words bone morphogenetic proteins(BMPs); Dorsal-Ventral patterning; morphogen; differentiation

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMP)是一类分布于大多数组织中的特异性生长因子。它们结构上高度保守,是最为古老的一类发育信号分子。它们参与了细胞增长与分化的调控,及多个组织、器官的形成和发育。1965 年, Urist 研究发现,骨基质提取物具有特殊的骨诱导活性,能够使间充质细胞定向分化成为骨细胞,因此将之命名为骨形态发生蛋白^[1]。随后的研究发现,除 BMP-1 外,其它的 BMP 分子均属于转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)超家族的发育信号分子。BMP 家族蛋白参与了胚胎发育中的绝

大多数步骤;包括早期胚胎发育中的头—尾轴、背—

收稿日期: 2018-01-19; 修回日期: 2018-03-04; 接受日期: 2018-03-29

国家自然科学基金项目(No. 31670738)

* 通讯作者 Tel: 022-27403902; E-mail: lizhi.mi@tju.edu.cn

Received: January 19, 2018; Revised: March 4, 2018; Accepted: March 29, 2018

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 31670738)

* Corresponding author Tel: 022-27403902; E-mail: lizhi.mi@tju.edu.cn

腹轴的建立,以及后期骨骼、肌肉、心血管等组织的形成与稳态维持。特别是在胚胎发育早期的胚轴建立与胚层分化过程中,BMP 发挥了重要作用^[2,3]。

在胚胎原肠期,胚胎逐渐分化成外胚层、中胚层和内胚层。BMP 通过与细胞外基质金属蛋白酶 BMP-1、拮抗剂脊索发生素(Chordin,CHRD)等分泌蛋白质作用,在细胞间建立稳定的浓度梯度,使背—腹两侧细胞感受到不同的发育信号强度,并调控相应细胞分化、增殖与分裂等基因的表达^[4],进而诱导中胚层及外胚层进行不同程度的分化,使胚胎发育有序进行。但是,对于这些持续分化的胚胎细胞来说,BMP 的浓度梯度是如何建立与维持的?造成 BMP 不均一分布的机制又是什么?该机制的广泛存在是否具有进化上的共性与特异性?这一系列关键生物学问题的阐释对于理解多细胞生物的发育、物种的进化及发育异常均有较为重要的意义。本文将着重讨论 BMP 以及 BMP-1 在背—腹轴图式形成中起到的作用。

1 胚胎发育中的骨形态发生蛋白

1.1 图式形成与形态发生素

发育是有机体从生命开始到成熟的变化过程。而对于有性生殖的生物体来说,其发育的起始点是受精卵的形成。多细胞生物从受精卵到胚胎,经一系列复杂的分化作用形成具有不同空间结构、分布及功能的组织、器官的过程称为图式形成。

对于多细胞生物来说,不同位置的细胞能够在空间上严格地按照其定位有序地分化,离不开特定时空信号的调控。这些通过其不同空间浓度分布调控细胞分化的特殊信号因子,称为形态发生素^[5]。形态发生素通过扩散建立浓度梯度,进而确立机体内在的“时空坐标”,而不同空间位置的细胞由于感受到的形态发生素的浓度不同,其基因的转录和表达水平以及细胞的命运也就各不相同^[6]。目前,已知的形态发生素包括 BMP/TGF- β 、Wnt、Hedgehog、Hippo 等家族的重要发育信号分子。

1.2 骨形态发生蛋白

BMP 隶属于 TGF- β 超家族,该家族的成员都具有相似的结构:新合成的 BMP 以前—前体复合物(pre-proprotein complex)的形式存在^[7],由信号肽、约 250 个氨基酸构成的前体结构域(prodomain)和羧基末端约 110 个氨基酸构成的生长因子(growth factor,GF)组成。BMP 的羧基末端含有 7 个高度保守的半胱氨酸残基^[8],其中 6 个半胱氨酸形成分子内二硫键,而剩下的 1 个则可以形成分子间二硫键。

自内质网上合成后,前体结构域与生长因子经由枯草杆菌蛋白酶样原蛋白转化酶(subtilisin-like proprotein convertases,SPCs)在高尔基体上切割,二者之间的肽键断裂,但二者仍通过非共价方式结合在一起,形成前体复合物(pro-protein complex)^[9]。

前体复合物从细胞内分泌到细胞外,全部或部分沉积在细胞外基质上。其中的生长因子只有从前体复合物中释放出来,即经活化,与感受细胞(responders or receiving cells)表面受体结合,来调控这些细胞的分化与命运。BMP 的受体包括其 I 型与 II 型丝氨酸/苏氨酸激酶受体。二者与 BMP 结合后,将促使下游 R-Smad 转录因子的磷酸化,进而调控目的基因的转录与表达。

BMP 名称的由来是因为这些蛋白质是从牛骨浸出物中分离所得,且具有诱导骨形成的能力。但最初分离出来的 BMP-1 与后续发现的 BMP-2、BMP-3 等并无序列同源性,这表明 BMP-1 同 BMP 家族蛋白分属不同的蛋白质家族,但二者之间可能存在相互作用或功能上的相似性。序列分析发现,BMP-1 与果蝇中参与建立 Dpp(BMP-2/4 的同源蛋白,见 Table 1)梯度的 Tolloid 蛋白同源。果蝇胚胎中,Tolloid 的缺失突变型的表型与 Dpp 缺失突变型的表型较为相似^[10]。而在爪蟾中,BMP-1 基因的敲除导致了抗 BMP 胚胎的发育^[11,12]。因此,BMP-1 和其底物脊索发生素(Chordin)引起了研究人员的关注。

1.3 骨形态发生蛋白的调控因子

BMP-1,隶属于虾红素金属蛋白酶家族,在进化上高度保守,在果蝇、爪蟾等物种中均发现了与人 BMP-1 同源的蛋白(Tolloid,Xolloid)^[10,13]。BMP-1 主要由信号肽、前体结构域(prodomain)、虾红素金属蛋白酶域、数目不等的 CUB 结构域及表皮生长因子样结构域(epidermal growth factor-like,EGF-like)组成。

BMP-1 的前体结构域不同于 TGF- β 超家族的前体结构域,长度仅有 100 个氨基酸左右,经 SPCs 酶切除后使 BMP-1 成熟,发挥生理功能^[14]。金属蛋白酶域作为虾红素家族特有的功能性结构域,含有 Zn^{2+} 结合位点,在其他非催化结构域的辅助下,行使金属蛋白酶活性^[15],并具有较专一的酶切识别位点^[16]。CUB 结构域,因在补体 C1s 及 C1r、海胆胚胎蛋白 Uegf、以及 BMP-1 中发现的同源结构域而得名^[17]。CUB 结构域含有 4 个保守的半胱氨酸残基和保守的疏水、反向平行 β 折叠结构。这一结构域可在蛋白质的折叠、酶的活性、底物的结合等方面

发挥作用^[11, 15, 18]。表皮生长因子样结构域, 含有 Ca^{2+} 结合位点^[14, 19], 因此 BMP-1 在行使其部分功能时具有钙离子依赖性^[20]。

在早期背腹轴形成的研究中发现, 果蝇中的 Tolloid 具有增强 Dpp 活性的能力。当将人源 BMP-1 注射入爪蟾胚胎, 发现其脊索明显缺失, 即神经组织发育受到抑制^[21]。进一步的 cDNA 提取实验表明, BMP-1 的同源蛋白 Xolloid 集中表达于囊胚期以及原肠胚形成时期。在胚胎层面上, BMP-1 的过表达或缺失的表型, 与 BMP 过表达或缺失的表型相似^[22, 23]。此外, BMP-1 家族的其他成员如 mTld, Tll-1 也被发现有水解 BMP 拮抗剂 Chordin 的活性^[24]。BMP-1 及其家族成员在细胞外基质的组装过程中也发挥着重要作用。在脊椎动物的发育过程中, 它们参与了一系列细胞外基质蛋白的生物学合成^[14]。这些细胞外基质蛋白包括胶原蛋白 (collagen), 交联蛋白酶 (crosslink enzymes, 如 lysyl

oxidases (LOX) 和 LOX-like), 基底膜层粘连蛋白 (laminin basement membrane proteins) 和粘多糖。此外, BMP-1/tolloid 还参与了一系列 TGF- β /BMP 家族成员 (如生长分化因子 Growth Differentiation Factor-8, GDF-11 等) 从其潜伏态前体复合物中激活的过程^[14, 25, 26]。

因此, BMP-1 对 BMP 的信号调控是从两个方面实现的: 1) 通过水解 BMP 的前体结构域或 BMP 的拮抗剂来激活或释放被束缚的生长因子; 2) 通过控制细胞外基质的组装来调控 BMP 的扩散与定位, 进而影响 BMP 浓度梯度的建立与维持。

作为 BMP 拮抗剂及酶 BMP-1 的底物, Chordin 最早发现于原肠胚时期爪蟾的背侧。Chordin 由 4 个连续的 CHR domain 及 4 个富含半胱氨酸的结构域 (cysteine-rich, CR domain, 亦作 VWC domain) 构成, 通过 CR 结构域直接结合 BMP-2/4/7, 充当竞争剂或拮抗剂, 阻断或抑制生长因子与其受体的结合。

Table 1 List of Vertebrate and drosophila homologue in BMP signaling

| In Vertebrate | In Drosophila | Description |
|---------------|---------------------------------------|---|
| BMP-2/4 | Dpp (Decapentaplegic) | <div><div>SP</div><div>Prodomain</div><div>GF</div><div>Pro-BMP complex</div><div>GF</div><div>Mature BMP</div></div> |
| BMP-5/7 | Scw (Screw) | <div><div>SP</div><div>Prodomain</div><div>GF</div><div>GF</div></div> |
| BMP-1 | Tolloid | <div><div>SP</div><div>Pro</div><div>Astacin</div><div>CUB1</div><div>CUB2</div><div>EGF</div><div>CUB3</div><div>EGF</div><div>CUB4</div><div>CUB5</div></div> |
| Chordin | Sog (Short gastrulation) | <div><div>SP</div><div>CR1</div><div>CHRD1</div><div>CHRD2</div><div>CHRD3</div><div>CHRD4</div><div>CR2</div><div>CR3</div><div>CR4</div></div> |
| BMP receptors | Put-Sax (Punt-Saxophone) | Two type I and two type II BMP receptors form a heterotetramer for BMP recognition |
| R-Smad | Mad (Mothers against decapentaplegic) | Receptor-regulated SMAD serving as a transcription factor upon phosphorylation |
| Co-Smad | Medea | A signal mediator by forming complex with phosphorylated R-Smad |

SP, signal peptide; Pro, prodomain; Astacin, the astacin metalloprotease domain; other abbreviations are mentioned in the article

2 骨形态发生蛋白梯度与胚轴形成

在胚胎发育早期的图式形成过程中, 胚轴的建立是重要的一环。在这一过程中, 头—尾轴、背—腹轴、左—右轴按躯体模式依次确立, 这离不开空间定位信号的建立与调控。多种形态发生素, 如 BMP、Wnt、Hedgehog、FGF 等均通过形成浓度梯度, 在早期胚胎发育中调控胚轴的建立^[5, 27]。而对 BMP 信号来说, 其生物学功能在以果蝇与爪蟾为模式生物的研究中获得了较深入的探究。在果蝇中, 原肠胚形成之后, 胚体分化为内胚层、位于腹侧的中胚层和位于背侧的外胚层^[28] (Fig. 1), 而 Dpp 对胚层的继续分化产生不同的影响^[2, 29]。BMP 的作用一方面在于调控有关细胞分化基因的转录与表达, 并和

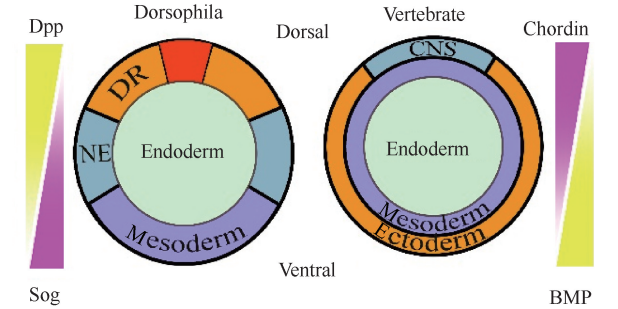


Fig. 1 The embryonic germ layers in gastrulation In the embryo development, the sections of Drosophila (left) and Vertebrate (right) embryo along their dorsal-ventral axis are shown above. The distribution of BMP-Chordin along the Dorsal-Ventral axis in three germ layers of vertebrate was inverted in comparison with their counterparts (Dpp-Sog) in Drosophila. NE, neuroectoderm; DR, dorsal region; CNS, central nervous system. The amnioserosa in the Drosophila embryo was shown in red. The epidermal ectoderm of the Drosophila embryo was different from its dorsal region. This figure was modified from Fig 1 a and Fig 4c of the papers from Eldar A, et al and Lowe CJ, et al^[28, 34]

Dorsal 等转录因子一起,使分化潜能逐步受限的细胞按程序完成定向分化^[5]。另一方面,BMP 同其他形态发生素一样,通过建立浓度梯度,在机体内创立一个内在的“空间坐标系”,使不同位置的细胞通过其感受到的浓度差异,感知自己在机体内的“坐标”,从而和胚层内相邻细胞及胚层外的细胞能够协同分化,使胚胎发育有条不紊地进行^[30]。

BMP 促进外胚层细胞向表皮细胞分化,同时抑制神经组织的发育。爪蟾胚胎的背腹分化实验表明,BMP 在诱导发育方面具有重要性:当胚胎腹侧的 BMP-4 过表达时,原本在背部发育的神经组织区域异常减少,即胚胎腹部化;而 BMP-4 的敲除导致胚胎腹部异常(即背部化,抗 BMP 效果)^[31, 32]。在这些研究中,BMP 信号通路下游的转录因子 R-Smad 的磷酸化是间接检测 BMP 信号强度的一个指标,磷酸化的 R-Smad 的静态分布与 BMP 的分布一致^[33]。这些都说明了背-腹轴沿线胚层的定向分化,以及细胞的命运决定离不开稳定的 BMP 浓度梯度。那么 BMP 的浓度梯度是如何形成并维持的呢?

3 骨形态发生蛋白的浓度梯度与分子调控

浓度梯度的形成是构成形态发生素调控网络的诸多因子,并历经复杂的相互作用后的结果。Spemann 在蝾螈胚胎的移植试验中发现,具有诱导性的背部细胞可以诱导长出次级体轴中的脊索^[35],后来的研究者将这种有“指导”作用的背部边缘区细胞称作 Spemann 组织者。将 Spemann 组织者细胞移植到胚胎腹部,发现其具有抗 BMP 信号的效果^[4]。分子生物学的发展使人们在 Spemann 组织者中发现了大批调控 BMP 信号通路的分泌性抑制因子(拮抗剂/antagonists),如 Chordin、Follistatin (FST)、Noggin 等^[36]。研究发现,它们在背-腹轴形成以及头部及神经发育等方面发挥重要作用^[2, 37]。因此,很多研究人员将它们与 BMP 浓度梯度的形成与维持联系到了一起。

Spemann 组织者通过在背部细胞释放大量调控 BMP 信号的因子来抑制 BMP 的信号,促进神经组织发育^[27, 38]。但是这不足以解释,为何抑制本身无诱导分化能力的 BMP-1 的活性也会造成拮抗 BMP 的效果^[11]。因此,阐明 BMP-1/CHRD/BMP 相互作用的机制,对于理解 BMP-1 参与调控 BMP 信号分布的模式有重要的意义。人们基于实验数据构建了多种数学模型,以表征 BMP 与拮抗剂 Chordin 及 BMP-1 等蛋白的相互作用网络,以期对背-腹轴的

图式形成有更好的理解。这些简化的数学模型是基于简化后 BMP-1/CHRD/BMP 形成的三元作用网络,为以下行文方便,称之为三元作用网络模型。

3.1 BMP-1/CHRD/BMP 相互作用网络

BMP 前体复合物或成熟的 BMP 生长因子二聚体从诱导细胞(inducing cells)分泌、扩散,在细胞外基质上富集并与细胞表面受体结合,该过程受到其拮抗剂的调控。Chordin 特异性地结合 BMP,抑制其活性并降低其信号。BMP-1 在结合 Chordin-BMP 复合物后,通过两个酶切位点(CR1-CR2、CR3-CR4)处剪切水解 Chordin^[19],释放 BMP,间接促进了 BMP 信号的传导^[39]。

节肢动物和脊椎动物的背腹发育途径存在着很高的相似性,即均通过原肠发生的 Chordin 抑制 BMP-2/4,使神经组织得以发育。胚胎研究表明,因 BMP 缺失造成的胚胎发育异常可通过补充其他物种的 BMP 部分补救,该特征可跨越多个物种存在,充分说明了 BMP 结构上的保守性^[40]。

BMP-1/CHRD/BMP 相互作用自发现以来一直被认为是背腹轴图式形成的关键。高浓度的 BMP-4 诱导 Sizzled 的转录,而后者具有抑制 BMP-1 的能力^[41]。BMP-1 对 BMP-4 具有正向调控作用,Sizzled 对 BMP-1 具有抑制作用。因此,BMP-1 与 Sizzled 组成了 BMP 的激活剂-抑制剂的二元调控回路,限制了 BMP-1 的活性范围。Lee 等发现,果蝇的 Dpp (BMP) 可以结合 Tolloid (BMP-1) 的 CUB 结构域,对后者产生非竞争性的抑制^[11]。此外,在斑马鱼中,过表达 BMP-1,则发现 BMP-2/4 可以结合未被加工的 pro-BMP-1^[42]。这些来自 BMP 的负向调控均可限制 BMP-1 的作用范围或活性,避免使 BMP 的抑制物过快消耗,造成 BMP-Chordin 梯度失衡,导致胚胎发育异常^[38]。而如果将 BMP-1 的活性区域限制在胚胎的背腹间,则 BMP 能够以复合物的形式在胚胎的中间区域扩散,形成稳定的浓度梯度来控制背腹轴图式的形成。

3.2 BMP (Dpp) 浓度梯度形成

腹背轴的分化及形成过程与头尾轴、左右轴的形成相比则更为复杂,且涉及因子众多,目前仍难给出直观的解释。Eldar 等人以果蝇胚胎为对象建立了数学模型,通过数据拟合,分析比较了观察到的 BMP 梯度形成与稳态建立中涉及到的生物学特性。

Eldar 等人将果蝇胚胎的背部区域(dorsal region, DR)与两侧的神外胚层(neuroectoderm, NE)设为观察面,沿背部区域剖面(Fig. 1 左)为坐

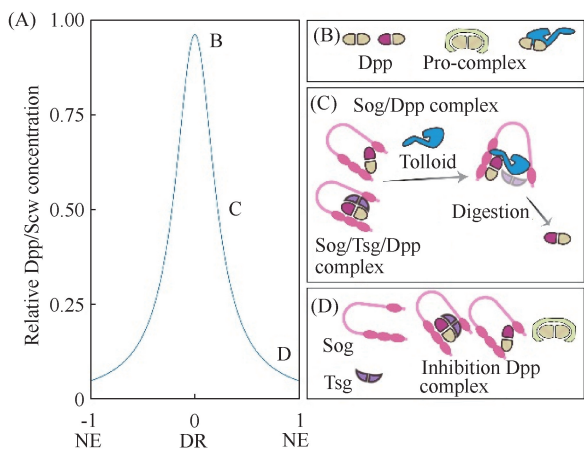


Fig. 2 Robust distribution of Dpp/Scw (A) Distribution of activated Dpp/Scw(BMP ligands) along the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* embryo was shown in the blue line^[34]. As indicated by the symbols of B, C, or D in panel A, the Dpp adopts different conformations or complexes with inhibitors or extracellular matrix proteins. (B) Dpp is secreted from the dorsal region, and reaches its maximum concentration at the Dorsal region(DR). Dpp was presumably in mature, dimeric growth factor form, or in diffusible, pro-complex form. Dpp could induce epidermal development and suppress the enzymatic activity of Tolloid. (C) In the middle zone, Tolloid digests and liberates Dpp from the diffusible inhibitory Sog-Dpp complex, while Tsg could enhance enzymatic processing of Sog by forming theTsg-Sog-Dpp complex. (D) Near the neuroectoderm (NE), various Dpp antagonists, such as Sog and Tsg, are secreted to inhibit Dpp signaling. Fig. 2A was modified from the paper written by Eldar A, *et al* ^[34]

标拟合 Dpp 的梯度^[34] (Fig. 2A)。为简化起见,在他们的模型中,BMP 二聚体 Dpp-Scw 被简化为所有细胞可表达的 Scw (BMP-5/7);与 Chordin 同源并在神经外胚层表达的 Sog 作为抑制剂,同 Scw 形成 Sog-Scw 复合物;在背部区域表达的 Tld 可以降解 Sog-Scw 复合物。在这些设定下,由于 Tld 的作用,背部区域的中心区域解离的 Scw 浓度达到最高值, Sog 浓度达到最低值,但在背部区域与神经外胚层的交界处则相反。

考虑到生物系统均具有稳健性(robustness),即在环境突然变化后,细胞及生化参数的改变(如:表达水平)不应显著影响系统的稳定,Eldar 等对参数进行了优化。优化后发现解离的 Scw 并不扩散,而是形成 Sog-Scw 复合物后开始扩散,并且 Sog 不会直接在 Tld 的作用下降解^[43]。根据这一模型,Scw 与背部区域 - 神经外胚层边界上的 Sog 结合形成 Sog-Scw 复合物,并向两侧扩散,而扩散至背部区域的复合物被 Tolloid 降解,释放 Scw 导致背部区域 Scw 的富集;因 Tolloid 难以直接作用于 Sog,故而避免了 Sog 的缺失以及高水平 Scw 信号带来的发育异常。

根据模型预测的这些特性,均在实验中得以验证。Wartlick 等人的荧光漂白恢复(fluorescence

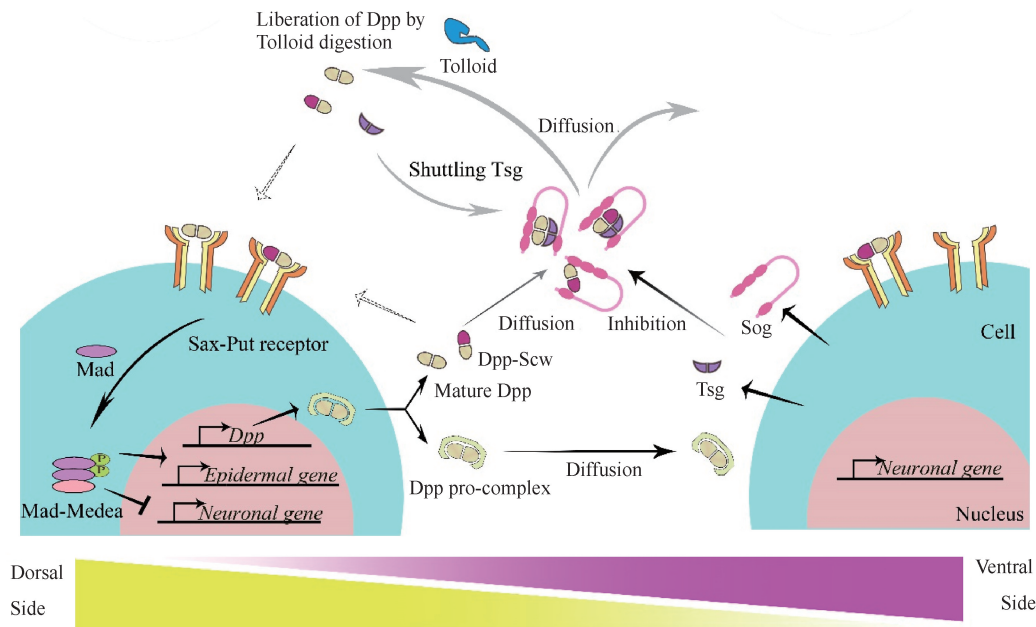


Fig. 3 Regulation of Dpp in embryo development After translation and modification, Dpp is secreted from the dorsal side in two different forms: the mature Dpp growth factor dimer (or Dpp-Scw heterodimer) and the Dpp pro-complex. The latter one could diffuse for a longer distance, and thus has a capacity for long-range signaling. Those Dpps, in the middle zone, are inhibited by ventrally secreted antagonists, Sog and Tsg, through forming inhibitory complexes. The diffusible, inhibitory Tsg-Sog-Dpp (Sog-Dpp) complexes are digested by Tolloid to release Dpp at the Dorsal side. Liberated Dpp could activate downstream Dpp signaling via the Sax-Put receptor complex through phosphorylation of the transcription factor Mad. Phosphorylated Mad, complexed with its cofactor Medea activates epidermal gene expression and inhibits neuronal gene expression at the dorsal side but not the ventral side

recovery after photobleaching, FRAP)实验证实,解离的 Dpp 具有很短的半衰期^[44],也证明了 Dpp 的自由扩散距离有限^[45];背部区域 Dpp 的表达促进了 Dpp-Scw 信号峰值的形成;Tolloid 对 Sog 的酶切作用需要借助 Dpp-Scw 的结合,有时还需要 Twisted Gastrulation (Tsg)的结合 (Fig. 2 C; Fig. 3)^[46, 47]。

BMP-Chordin 复合物自形成至裂解,促进了 BMP 的长程扩散。由于成熟的 BMP 自身的溶解度与稳定性,它难以在细胞外进行长程的信号传导,需要借助其前体结构域或 Noggin、Chordin 等拮抗剂协助扩散^[48],果蝇中的 CV-2、IV 型胶原、Tsg 等也都对复合物的运输起到了辅助作用^[15, 49, 50]。部分 TGF- β 家族成员还通过前体结构域与生长因子形成潜伏态前体复合物,抑制生长因子的信号。细胞外基质中也存在诸如原纤维蛋白 (fibrillin) 等稳定 BMP 前体复合物的因子,来调控生长因子的活度 (bioavailability),正是如此,BMP 才能跨越多个细胞在不同胚层内形成稳定的梯度。

4 胚胎的分化模式

背—腹轴分化过程中,BMP 信号主要是对神经组织及表皮组织的分化进行调控。这一机制虽在多个物种中有不同表现,但涉及到的形态发生素、信号通路的激活方式、BMP 的扩散和运输机制等均有较高的保守性。这些机制是如何影响胚层分化的?保守性是怎样在物种演化过程中体现的?这诸多问题都有待讨论。

4.1 三胚层的分化

在果蝇中,Dpp-Scw 结合位于细胞表面的 Put-Sax 受体后,受体经磷酸化激活 Mad,后者与其转录因子 Medea 结合进入细胞核 (Fig. 3)。由于 Dpp 浓度的不同,转录的基因及其水平也大相径庭。高 Dpp 信号会激活表皮因子的转录,抑制神经因子转录;而低 Dpp 信号则不影响神经组织的发育。此外,Dpp 信号能促进自身转录,这种正反馈调控的方式也是造成背腹较高浓度差的原因之一。

远离分泌源的 Dpp 受 Sog、Tsg 的抑制,形成 Tsg-Sog-Dpp 复合物并扩散至高浓度的背中轴处,经 Tolloid 的裂解作用释放 (Fig. 3)。最终 4 种蛋白质的相互作用使得背部的 Dpp 浓度维持在较高水平。外胚层在信号的持续影响下分化为两侧的神经外胚层 (低 Dpp 浓度) 与背中轴的表皮外胚层 (高 Dpp 浓度)。

在脊椎动物中,两类形态发生素有着相反的分

布 (Fig. 1)^[28]:以爪蟾为例,表达自腹部中胚层的 BMP-4/7 与背部 Spemann 组织者处表达的 Chordin 环绕胚胎外侧,在 BMP-1/CHRD/BMP 三元相互作用中,BMP 与 Chordin 在 BMP-1 酶的作用下表现出相互拮抗和制衡的效果^[12, 51],形成 BMP 浓度梯度。腹侧 BMP 信号强度较高,而背侧 BMP 信号较弱,并转录少量的 *Bmp-2* 以及抗背化形态发生蛋白 (anti-dorsalizing morphogenetic protein, ADMP) 作为补充^[38, 51]。

狭长的 Brachet's 裂缝把外胚层和中胚层分隔开。在外胚层,BMP 信号受抑制的细胞中,转录因子神经原素 (neurogenin) 可诱发中枢神经系统的分化,而高 BMP 信号则在诱导表皮形成的同时,抑制神经信号;介于二者之间的细胞则逐步形成了神经嵴。沿中胚层,低 BMP 信号处形成了脊索。随着 BMP 信号的增强,肾、侧板中胚层和骨骼肌依次出现^[28, 52]。

4.2 进化中的模式

形态发生素通过形成浓度梯度调控发育,包含 BMP 在内的 TGF- β 家族诸多成员均在发育中发挥重要作用:BMP 在动物的背腹图式形成中起到重要的作用,激活素 (activin) 可诱导产生不同类型的中胚层组织,而结节 (nodal) 在脊椎动物左—右轴的建立、中胚层的图式形成中都具有关键作用。

TGF- β 家族是胱氨酸结生长因子 (cystine-knot growth factor, CKGF) 超家族的一支,这个超家族在原生动物中并未出现^[8]。无独有偶,同样具有体轴诱导作用的 Wnt 家族也是如此。从进化的角度来说,CKGF 最早发现于早期后生动物中,此时的生物大多为栉水母动物、海绵动物、扁盘动物 (丝盘虫) 等尚未存在多个体轴的动物,丝盘虫甚至没有神经细胞。BMP 的信号影响着背腹轴的建立,但是 BMP 的出现是否与体轴的存在相呼应,尚未有进化层面的证据。

BMP 与 Chordin 等拮抗物在胚胎形成背腹轴的时期,共同决定表皮层与神经层的细胞命运,该机制是较为保守的,在节肢动物、冠轮动物和后口动物中都有存在。从拮抗蛋白质的角度来看,尽管 TGF- β 家族出现于早期两侧对称动物中,但是 TGF- β 本身出现于较晚的后口动物中,其拮抗蛋白质数目很少^[53]。与此相反,到目前为止所发现的针对其他 TGF- β 家族成员的拮抗蛋白质数目较多。从蛋白质结构上看,TGF- β 的前体复合物处于闭合的潜伏态构象,而已解析的 BMP-9 和激活素 A 前体复合物则

处于张开的激活构象^[7, 54, 55], 进化上处于 TGF- β 与 BMP-9 之间的肌生成抑制蛋白 (myostatin, GDF-8), 其潜伏态前体复合物同样处于张开的构象^[56]。这从侧面印证了 TGF- β 家族的演化可能是伴随着拮抗蛋白的进化, 即: 二者可能存在协同进化作用。因此, BMP 与拮抗剂在胚胎发育中形成浓度梯度的机制, 可以追溯到有相同分化模式的两侧对称动物的共同祖先 urbilateria^[11, 57]。

除了 BMP 与 Chordin, BMP-1 在梯度形成中的作用也有很强的保守性^[4, 51]。BMP-1 所属的虾红素金属蛋白酶家族, 包含多个参与图式形成与胚胎发育的蛋白质, 如 HMP1、SpAN、BP10 等, 它们均发现于水螅和海胆等生物中^[25]。如 SpAN 可通过与在海胆中发现的 TGF- β 家族成员 univin 作用, 调节其空间分布, 正如 BMP-1 之于 BMP。

5 问题与展望

在胚胎发育过程中, BMP 通过与拮抗剂 Chordin、拮抗剂水解酶 BMP-1 等多个因子形成作用网络, 参与背-腹轴图式形成, 并调控胚层发育与定向分化。这个机制在两侧对称动物中广泛存在。BMP 与负调控因子相互作用, 行使信号作用的机制, 随着物种的进化变得越来越复杂。

目前, 关于 BMP 信号分布的动力学模型, 主流的有 Source-Sink 模型、Tsg 穿梭模型^[4, 58], 而 Chordin 的梯度分布也间接受到 Sizzled 的调控^[59]。但由于观测 BMP 浓度梯度形成的难度较大, 一直没有较为统一且令人信服的解释。例如, 近期 Pomreinke 等运用荧光漂白减弱技术、荧光漂白恢复技术测定斑马鱼的 BMP-2b (即 BMP-4) 浓度梯度, 并分析相关的动力学数据, 对穿梭模型的适用范围提出了质疑^[60]。

针对 BMP 的两个结构域——前体结构域和生长因子的进化树分析表明, 这两个结构域在进化上的保守性并不完全一致^[53]。前体结构域拥有明显的分化性, 且超过了与生长因子协同进化的受体家族。这表明前体结构域在调控生长因子的活性、分布、释放等方面的机制随着进化也变得复杂起来。与前体结构域一致, 在细胞外 Chordin、Noggin 等拮抗剂对于生长因子的抑制, 也是调控这些生长因子浓度梯度形成的关键步骤。对这些蛋白质抑制机制的深入研究, 可以使人们更好的从进化层面上理解 BMP 在发育调节中的作用。

参考文献 (References)

- [1] Urist MR. Bone: formation by autoinduction [J]. *Science*, 1965, **150**(3698): 893-899
- [2] Jones CM, Smith JC. Establishment of a BMP-4 morphogen gradient by long-range inhibition [J]. *Dev Biol*, 1998, **194**(1): 12-17
- [3] De Robertis EM, Kuroda H. Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, **20**: 285-308
- [4] Bier E, De Robertis EM. EMBRYO DEVELOPMENT. BMP gradients: A paradigm for morphogen-mediated developmental patterning [J]. *Science*, 2015, **348**(6242): aaa5838
- [5] Ashe HL, Briscoe J. The interpretation of morphogen gradients [J]. *Development*, 2006, **133**(3): 385-394
- [6] Hamaratoglu F, Affolter M, Pyrowolakis G. Dpp/BMP signaling in flies: from molecules to biology [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, **32**: 128-136
- [7] Shi M, Zhu J, Wang R, *et al.* Latent TGF-beta structure and activation [J]. *Nature*, 2011, **474**(7351): 343-349
- [8] Roch GJ, Sherwood NM. Glycoprotein hormones and their receptors emerged at the origin of metazoans [J]. *Genome Biol Evol*, 2014, **6**(6): 1466-1479
- [9] Degnin C, Jean F, Thomas G, *et al.* Cleavages within the prodomain direct intracellular trafficking and degradation of mature bone morphogenetic protein-4 [J]. *Mol Biol Cell*, 2004, **15**(11): 5012-5020
- [10] Shimell MJ, Ferguson EL, Childs SR, *et al.* The *Drosophila* dorsal-ventral patterning gene *tolloid* is related to human bone morphogenetic protein 1 [J]. *Cell*, 1991, **67**(3): 469-481
- [11] Lee HX, Mendes FA, Plouhinec JL, *et al.* Enzymatic regulation of pattern: BMP4 binds CUB domains of Tollid and inhibits proteinase activity [J]. *Genes Dev*, 2009, **23**(21): 2551-2562
- [12] Blitz IL, Shimmi O, Wunnenberg-Stapleton K, *et al.* Is chordin a long-range- or short-range-acting factor? Roles for BMP1-related metalloproteinases in chordin and BMP4 autocrine feedback loop regulation [J]. *Dev Biol*, 2000, **223**(1): 120-138
- [13] Bond JS, Beynon RJ. The astacin family of metalloendopeptidases [J]. *Protein Sci*, 1995, **4**(7): 1247-1261
- [14] Hopkins DR, Keles S, Greenspan DS. The bone morphogenetic protein 1/Tolloid-like metalloproteinases [J]. *Matrix Biol*, 2007, **26**(7): 508-523
- [15] Winstanley J, Sawala A, Baldock C, *et al.* Synthetic enzyme-substrate tethering obviates the Tolloid-ECM interaction during *Drosophila* BMP gradient formation [J]. *Elife*, 2015, **4**. doi: 10.7554/eLife.05508
- [16] Mac Sweeney A, Gil-Parrado S, Vincenz D, *et al.* Structural basis for the substrate specificity of bone morphogenetic protein 1/tolloid-like metalloproteinases [J]. *J Mol Biol*, 2008, **384**(1): 228-239
- [17] Bork P, Beckmann G. The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins [J]. *J Mol Biol*, 1993, **231**(2): 539-545
- [18] Canty EG, Garrigue-Antar L, Kadler KE. A complete domain structure of *Drosophila* *tolloid* is required for cleavage of short gastrulation [J]. *J Biol Chem*, 2006, **281**(19): 13258-13267
- [19] Garrigue-Antar L, Francois V, Kadler KE. Deletion of epidermal growth factor-like domains converts mammalian *tolloid* into a chordinase and effective procollagen C-proteinase [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279**(48): 49835-49841
- [20] Schneppenheim J, Scharfenberg F, Lucius R, *et al.* Meprin beta and BMP-1 are differentially regulated by CaCl_2 [J]. *Cell Calcium*, 2017, **65**: 8-13
- [21] Dale L, Howes G, Price BMJ, *et al.* Bone morphogenetic protein 4: a ventralizing factor in early *Xenopus* development [J]. *Development*, 1992, **115**(2): 573-585
- [22] Goodman SA, Albano R, Wardle FC, *et al.* BMP1-related

- metalloproteinases promote the development of ventral mesoderm in early *Xenopus* embryos [J]. *Dev Biol*, 1998, **195** (2): 144-157
- [23] Lin J-J, Maeda R, Ong RC, *et al.* XBMP - 1B (Xtld), a *Xenopus* homolog of dorso-ventral polarity gene in *Drosophila*, modifies tissue phenotypes of ventral explants [J]. *Dev Growth Differ*, 1997, **39**(1): 43-51
- [24] Bayley CP, Ruiz Nivia HD, Dajani R, *et al.* Diversity between mammalian tolloid proteinases; Oligomerisation and non-catalytic domains influence activity and specificity [J]. *Sci Rep*, 2016, **6**: 21456
- [25] Szlama G, Trexler M, Patthy L. Latent myostatin has significant activity and this activity is controlled more efficiently by WFIKKN1 than by WFIKKN2 [J]. *FEBS J*, 2013, **280** (16): 3822-3839
- [26] Delolme F, Anastasi C, Alcaraz LB, *et al.* Proteolytic control of TGF-beta co-receptor activity by BMP-1/ tolloid-like proteases revealed by quantitative iTRAQ proteomics [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, **72**(5): 1009-1027
- [27] Dixon Fox M, Bruce AE. Short- and long-range functions of Goosecoid in zebrafish axis formation are independent of Chordin, Noggin 1 and Follistatin-like 1b [J]. *Development*, 2009, **136** (10): 1675-1685
- [28] Lowe CJ, Clarke DN, Medeiros DM, *et al.* The deuterostome context of chordate origins [J]. *Nature*, 2015, **520** (7548): 456-465
- [29] Ferguson EL, Anderson KV. Decapentaplegic acts as a morphogen to organize dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* embryo [J]. *Cell*, 1992, **71**(3): 451-461
- [30] Perrimon N, Pitsouli C, Shilo BZ. Signaling mechanisms controlling cell fate and embryonic patterning [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, **4**(8): a005975
- [31] Graff JM. Embryonic patterning; to BMP or not to BMP, that is the question [J]. *Cell*, 1997, **89**(2): 171-174
- [32] Lowe CJ, Terasaki M, Wu M, *et al.* Dorsoventral patterning in hemichordates; insights into early chordate evolution [J]. *PLoS Biol*, 2006, **4**(9): e291
- [33] Plouhinec JL, Zakin L, Moriyama Y, *et al.* Chordin forms a self-organizing morphogen gradient in the extracellular space between ectoderm and mesoderm in the *Xenopus* embryo [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, **110**(51): 20372-20379
- [34] Eldar A, Dorfman R, Weiss D, *et al.* Robustness of the BMP morphogen gradient in *Drosophila* embryonic patterning [J]. *Nature*, 2002, **419**(6904): 304-308
- [35] Spemann H, Mangold H. über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren [J]. *Dev Genes Evol*, 1924, **100**: 599-638
- [36] Ding Y, Colozza G, Zhang K, *et al.* Genome-wide analysis of dorsal and ventral transcriptomes of the *Xenopus laevis* gastrula [J]. *Dev Biol*, 2017, **426**(2): 176-187
- [37] Gao WL, Zhang SQ, Zhang H, *et al.* Chordin-like protein 1 promotes neuronal differentiation by inhibiting bone morphogenetic protein-4 in neural stem cells [J]. *Mol Med Rep*, 2013, **7**(4): 1143-1148
- [38] Ploper D, Lee HX, De Robertis EM. Dorsal-ventral patterning; Crescent is a dorsally secreted Frizzled-related protein that competitively inhibits Tolloid proteases [J]. *Dev Biol*, 2011, **352**(2): 317-328
- [39] Troilo H, Barrett AL, Wohl AP, *et al.* The role of chordin fragments generated by partial tolloid cleavage in regulating BMP activity [J]. *Biochem Soc Trans*, 2015, **43**(5): 795-800
- [40] Katagiri T, Watabe T. Bone Morphogenetic Proteins [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, **8**(6). pii: a021899
- [41] Vadon-Le Goff S, Hulmes DJ, Moali C. BMP-1/tolloid-like proteinases synchronize matrix assembly with growth factor activation to promote morphogenesis and tissue remodeling [J]. *Matrix Biol*, 2015, **44-46**: 14-23
- [42] Jasuja R, Ge G, Voss NG, *et al.* Bone morphogenetic protein 1 prodomain specifically binds and regulates signaling by bone morphogenetic proteins 2 and 4 [J]. *J Biol Chem*, 2007, **282** (12): 9053-9062
- [43] Eldar A, Shilo BZ, Barkai N. Elucidating mechanisms underlying robustness of morphogen gradients [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2004, **14**(4): 435-439
- [44] Wartlick O, Kicheva A, Gonzalez-Gaitan M. Morphogen gradient formation [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, **1** (3): a001255
- [45] Hornung G, Berkowitz B, Barkai N. Morphogen gradient formation in a complex environment; an anomalous diffusion model [J]. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 2005, **72** (4Pt 1): 041916
- [46] Xie J, Fisher S. Twisted gastrulation enhances BMP signaling through chordin dependent and independent mechanisms [J]. *Development*, 2005, **132**(2): 383-391
- [47] Troilo H, Bayley CP, Barrett AL, *et al.* Mammalian tolloid proteinases; role in growth factor signalling [J]. *FEBS Lett*, 2016, **590**(15): 2398-2407
- [48] Troilo H, Zuk AV, Tunncliffe RB, *et al.* Nanoscale structure of the BMP antagonist chordin supports cooperative BMP binding [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, **111**(36): 13063-13068
- [49] Sawala A, Scarcia M, Sutcliffe C, *et al.* Peak BMP responses in the *Drosophila* embryo are dependent on the activation of integrin signaling [J]. *Cell Rep*, 2015, **12**(10): 1584-1593
- [50] Troilo H, Barrett AL, Zuk AV, *et al.* Structural characterization of twisted gastrulation provides insights into opposing functions on the BMP signalling pathway [J]. *Matrix Biol*, 2016, **55**: 49-62
- [51] Xue Y, Zheng X, Huang L, *et al.* Organizer-derived Bmp2 is required for the formation of a correct Bmp activity gradient during embryonic development [J]. *Nat Commun*, 2014, **5**: 3766
- [52] Jeltsch M, Leppanen VM, Saharinen P, *et al.* Receptor tyrosine kinase-mediated angiogenesis [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, **5**(9). pii: a009183
- [53] Hinck AP, Mueller TD, Springer TA. Structural Biology and Evolution of the TGF-beta Family [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, **8**(12). pii: a022103
- [54] Mi LZ, Brown CT, Gao Y, *et al.* Structure of bone morphogenetic protein 9 procomplex [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, **112**(12): 3710-3715
- [55] Wang X, Fischer G, Hyvonen M. Structure and activation of proactivin A [J]. *Nat Commun*, 2016, **7**: 12052
- [56] Cotton TR, Fischer G, Wang X, *et al.* Structure of the human myostatin precursor and determinants of growth factor latency [J]. *EMBO J*, 2018; **37**(3): 367-383
- [57] De Robertis EM, Moriyama Y, Colozza G. Generation of animal form by the Chordin/Tolloid/BMP gradient; 100 years after D'Arcy Thompson [J]. *Dev Growth Differ*, 2017, **59** (7): 580-592
- [58] Srinivasan S, Rashka KE, Bier E. Creation of a Sog Morphogen Gradient in the *Drosophila* Embryo [J]. *Dev Cell*, 2002, **2**(1): 91-101
- [59] Inomata H, Shibata T, Haraguchi T, *et al.* Scaling of dorsal-ventral patterning by embryo size-dependent degradation of Spemann's organizer signals [J]. *Cell*, 2013, **153** (6): 1296-1311
- [60] Pomreinke AP, Soh GH, Rogers KW, *et al.* Dynamics of BMP signaling and distribution during zebrafish dorsal-ventral patterning [J]. *Elife*, 2017, **6**. pii: e25861. doi: 10.7554/eLife.25861