

# 精子尾部发育相关蛋白研究进展

钟亚楠, 牛长敏, 夏蒙蒙, 郑英

扬州大学医学院组织学与胚胎学教研室, 扬州 225001

**摘要:** 精子尾部结构与其运动功能密切相关。精子的运动能力直接决定了精子能否正常运输到输卵管与卵子受精。精子尾部的形成和发育是一个极其复杂的过程, 由多种蛋白质精细调控。研究发现, 多种精子尾部发育相关蛋白的缺陷可导致少、弱、畸形精子症。本文根据精子尾部的超微结构顺序, 对近年来精子尾部发育相关蛋白的研究进展进行综述, 以期对男性不育症的遗传学诊断和治疗提供理论基础和实践的可能。

**关键词:** 精子尾部; 发育; 蛋白; 研究进展

## Research progress of proteins related to sperm tail development

Yanan Zhong, Changmin Niu, Mengmeng Xia, Ying Zheng

Department of Histology and Embryology, School of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China

**Abstract:** The structure of sperm tail is closely related to its motor function, which directly determines whether the sperm can be normally transported to fallopian tube and fertilize the ovum. The formation and development of sperm tail is a very complex process, which is finely regulated by various kinds of proteins. Research finds that defects of various sperm tail development related proteins can lead to oligospermia, asthenozoospermia and teratospermia. Based on the ultrastructure of sperm tail, we summarize the recent research progress of the proteins related to sperm tail development, thereby providing the theoretical basis and practical possibility for the diagnosis and treatment of male infertility.

**Keywords:** sperm tail; development; protein; research progress

精子尾部结构与精子运动功能密切相关, 具有正常尾部结构的精子才能游动。精子尾部分为颈段、中段、主段和末段 4 个部分(图 1), 其中颈段由前端的小头、中间的中心粒、后端的节柱组成。在精子头部细胞核末端形成了植入窝, 基底板紧贴核膜, 小头连着基底板, 节柱向轴丝延伸。人精子颈段含

有近端中心粒和远端中心粒 2 个中心粒, 前者与小头相邻, 后者嵌入在节柱中。中段的中轴为轴丝, 外面依次包绕着外周致密纤维和线粒体鞘; 主段外侧没有线粒体鞘, 代之以纤维鞘; 末段仅有轴丝, 其外侧包裹着细胞膜(图 1)。轴丝贯穿精子尾部全长, 其由“9+2”微管结构组成, 即中心为 2 条中央微管,

收稿日期: 2019-12-25; 修回日期: 2020-04-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81871205)和江苏省自然科学基金项目(编号: BK20131230)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81871205), and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20131230)]

作者简介: 钟亚楠, 在读硕士研究生, 专业方向: 生殖医学。E-mail: 415833840@qq.com

通讯作者: 郑英, 教授, 博士生导师, 研究方向: 生殖医学。E-mail: yzzkl@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.19-309

网络出版时间: 2020/5/11 14:06:09

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20200509.1617.002.html>

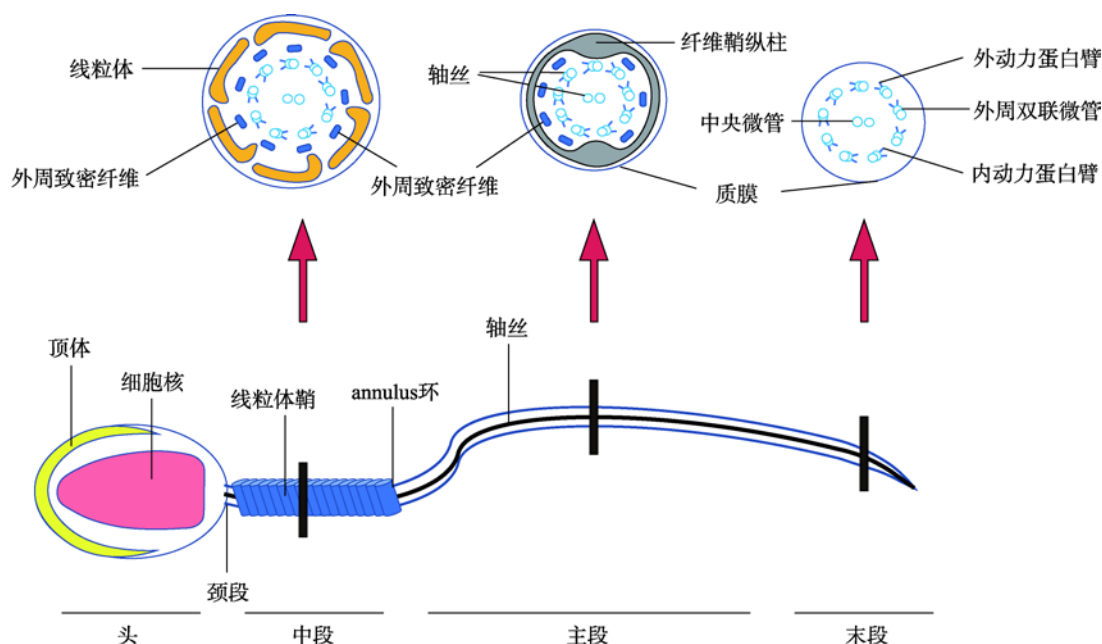


图 1 精子结构模式图

Fig. 1 Schematic of sperm structure

上方分别是精子尾部中段、主段和末段的横断面示意图。

外侧环绕着 9 条外周双联微管。外周双联微管由 A、B 两个亚单位构成, A 亚单位上附有外动力蛋白臂(outer dynein arm, ODA)和内动力蛋白臂(inner dynein arm, IDA), 并发出放射辐(radial spokes, RS)向中央微管呈放射状分布, 将中央微管与外周微管连接起来。在精子尾部中段和主段的轴丝外侧有 9 根外周致密纤维(outer dense fiber, ODF), 它是精子尾部的骨架, 与精子尾部弹性回缩有关。精子的线粒体鞘(mitochondrial sheath, MS)是由线粒体呈螺旋状缠绕而成, 为精子运动提供能量。精子尾部主段 ODF 外侧的纤维鞘(fibrous sheath, FS)是由背侧纵柱、腹侧纵柱和环形肋组成, FS 是调整精子尾部摆动的平面, 为调节鞭毛弯曲和确定鞭毛摆动的形状提供机械支撑, 并作为参与信号转导的蛋白质和产生精子运动所需能量的糖酵解酶的支架<sup>[1]</sup>。在精子尾部中段和主段连接处有一种环状结构称为 annulus, 由丝状物构成, 它与质膜紧密相连, 也称为 Jensen's 环。在轴丝开始从精子细胞延伸时, annulus 就已经形成, 它最初位于鞭毛基部, 在精子的伸长和分化过程中沿着轴丝向中段和主段交界处迁移。Annulus 的完整性是精子运动和精子尾部分化所必需的, annulus 形成了一个蛋白质扩散屏障以建立合适的

细胞区间, 从而对中段-主段连接处进行调节, 防止线粒体末端螺旋发生移位, 确保中段正确组装<sup>[2]</sup>。Annulus 的缺失主要造成精子尾部严重弯曲<sup>[3]</sup>。没有 annulus 的精子常出现线粒体缺陷, 包括线粒体排列异常、大小不等、外观不规则和线粒体膜质减少等<sup>[4]</sup>。研究表明: 精子尾部每一个部分的发育均受到相关基因的精确调控, 如果发生基因缺失或突变会导致其相应的编码蛋白的改变, 从而导致精子尾部结构异常或产生功能障碍。本文按照精子尾部的超微结构顺序, 对近年来精子尾部发育相关蛋白(表 1)的研究进展进行综述, 以期对男性不育症的遗传学诊断和治疗提供理论基础和实践的可能。

## 1 植入窝和基底板发育相关蛋白

哺乳动物中至少有 5 种 SUN (Sad1 and UNC84 domain containing)蛋白, 其中 3 种在小鼠中分别被命名为 Sun1、Sun2 和 Sun3, 另外 2 种 SUN 蛋白被命名为大鼠 SPAG4 (sperm-associated antigen 4)和 SPAG4L (sperm-associated antigen 4-like), 又分别称为 Sun4 和 Sun5。SUN5 是 SUN 家族的新成员, 位于精子颈段<sup>[5]</sup>, 负责将头尾连接体(head-tail coupling

表 1 精子尾部发育相关蛋白

Table 1 Proteins related to sperm tail development

精子尾部结构	发育相关蛋白
植入窝和基板	SUN5 和 OAZ3
小头和节柱	SPATA6
中心体	SPATC1L、CEP135、CFAP43 和 CFAP44
Manchette	STK33、KIF3A、LRGUK1、SEPT12 和 MEIG1
轴丝	CFAP69、SPEF2、ARMC2、TCTE1、RSPH6A、DNAH1、DNAH2、C11orf70 和 PIH1D3
外周致密纤维	ODF1、ODF2、ODF3、Tssk4 和 MNS1
线粒体鞘	KLC3、MFN2 和 CFAP251
纤维鞘	FSIP2、AKAP4、AKAP3、ROPN1、ROPN1L、FS39、Als2cr12、Mtsga10、ENO4 和 CFAP157

apparatus, HTCA)附着到精子的核膜上,这对精子头尾部的连接至关重要。*Sun5* 基因敲除雄性小鼠精子头尾交界处的植入窝和基板关键成分出现缺失, HTCA 虽然可以在精子形成早期成功组装,但不能附着于核膜,随着精子细胞的伸长, HTCA 连同基板一起从植入窝分离<sup>[6]</sup>。*Sun5* 基因敲除小鼠精子呈现出球形头部精子表型,但实际上是无头精子,所谓的“球形头部”内不含染色质,而是充满了未清除的细胞质和排列杂乱的线粒体,因此又将这种精子表型命名为假球形精子症。

OAZs (ornithine decarboxylase antizymes) 由 *TISP15* 编码,它属于一个保守的基因家族,在脊椎动物中至少有 *OAZ1*、*OAZ2* 及 *OAZ3* 三个成员,其中只有 *OAZ3* 在单倍体生殖细胞中特异性表达。*OAZ3* 是一个影响植入窝和基板的蛋白,它以反馈的方式控制着细胞内多胺的浓度,而多胺会影响精子头尾连接处的构建。*Oaz3* 基因突变小鼠精子头尾容易发生分离,可观察到无植入窝和基板的脱落头部和尾部,虽然脱落的头部和尾部具有活动能力,但大多无头的尾部会笔直地向前运动<sup>[7]</sup>。总之,在精子发生过程中, *OAZ3* 通过调控多胺的局部浓度而在头尾连接的形成中发挥作用。

## 2 小头和节柱发育相关蛋白

颈段负责将精子的头部和尾部相连,不仅起着物理连接作用,还能启动和调节成熟精子的尾部波形和整体运动。小头和节柱是精子颈段的主要结构,在精子形成后期,对精子头部与鞭毛的连接至

关重要。

*SPATA6* (spermatogenesis associated 6)是高度保守的精子发生基因之一,编码一种小头和节柱形成必需的蛋白,仅表达于精子颈段<sup>[8]</sup>。*SPATA6* 对精子颈段的形成起着至关重要的作用。*Spata6* 敲除会造成节柱形成畸形或缺失,颈段形成被完全破坏,导致小鼠出现无头精子。但无头的鞭毛仍具有运动性,其波形来自主段-末段连接处,而不是精子颈段,表明在主段-末段连接处存在第二波形源,其独立于颈段产生的第一波形源<sup>[8]</sup>。

## 3 中心体发育相关蛋白

*Spatc1l* (spermatogenesis and centriole associated 1 like)是一种新的生殖细胞特异性基因,位于小鼠 10 号染色体,大约包含一个 8 kb 区域,它以 *Spatc1* (spermatogenesis and centriole associated 1)基因命名。*Spatc1* 基因编码精子中心体蛋白,与 *Spatc1l* 编码氨基酸具有 50%左右同源性。*Spatc1l* 编码蛋白含 342 个氨基酸,分子量大小为 38 kDa<sup>[9]</sup>,位于精子颈段。*Spatc1l* 敲除小鼠精子头部、尾部在植入窝内的基板与小头之间发生分离,继而产生无头和无尾的精子<sup>[10]</sup>。人类同源基因 *SPATC1L* 位于小鼠和人类之间保守的同源基因组区域(染色体 21q22.3)。在精子形成过程中, *SPATC1L* 可能通过与 R1a 亚基结合而增加 PKA 活性,而 *SPATC1L*-PKA 复合物能维持精子头尾连接的稳定性<sup>[10]</sup>。*SPATC1L* 在植入窝中维持 PKA 活性可能对稳定该区域至关重要。

*CEP135* (the gene encoding the 135 kDa centrosomal protein)也编码一种中心体蛋白,对中心粒的

发生,特别是中央微管的组装至关重要,而中心粒对中心体的形成、轴丝和微管的生长至关重要。*CEP135* 基因突变导致常染色体原发性小头畸形<sup>[11]</sup>,突变的 *CEP135* 蛋白在中心粒附近形成聚集体<sup>[12]</sup>。*CEP135* 表达水平的改变可能导致微管结构紊乱,引起精子鞭毛多发性形态异常(multiple morphological abnormalities of the flagella, MMAF)。

此外, *CFAP43* (cilia and flagella-associated protein43) 和 *CFAP44* (cilia and flagella-associated protein44)也可能参与了中心体的形成。*CFAP43* 和 *CFAP44* 均在睾丸中特异性表达或优先表达, *CFAP43*, 又称 *WDR96*, 位于 10 号染色体上, 含有 38 个外显子, 编码蛋白含 1665 个氨基酸。*CFAP43* 是一种纤毛或鞭毛相关蛋白, 在精子发生中起重要作用<sup>[13]</sup>。*CFAP44*, 又称 *WDR52*, 位于 3 号染色体上, 含有 35 个外显子, 其编码含 1854 个氨基酸。*CFAP44* 全称纤毛和鞭毛相关蛋白 44, 含有 1 个 WD40 功能结构域, 参与细胞骨架的组装, 可能在中心体形成过程中发挥作用<sup>[13]</sup>。*CFAP43* 和 *CFAP44* 缺失均呈现出 MMAF 表型, 且精子活力降低。

## 4 Manchette 发育相关蛋白

Manchette 由  $\alpha$ -微管蛋白和  $\beta$ -微管蛋白组成, 是引导精子尾部延伸的短暂结构, 其从中心体开始形成, 朝着核的方向建立正端, 朝着尾部方向建立负端<sup>[14]</sup>,  $\alpha$ -微管蛋白位于 Manchette 的负端。*STK33* 和 *SEPT12* 能直接与 Manchette 作用, 其中 *STK33* 通过与  $\alpha$ -微管蛋白相互作用来影响 Manchette 发育, 而 *SEPT12* 能同时与  $\alpha$ -微管蛋白及  $\beta$ -微管蛋白相互作用。

*STK33* (serine/threonine kinase) 是一种广泛表达的基因, 位于人染色体 11p15.3 上, 编码一种人鼠同源且高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶, 在睾丸组织中表达量最高。*Stk33* 表达于减数分裂 I 初级精母细胞及其后的生精细胞中。*Stk33* 通过直接与  $\alpha$ -微管蛋白相互作用来调节 Manchette 微管的组织结构和功能<sup>[15]</sup>, *Stk33* 缺失可导致 Manchette 形态异常, 进而引起精子头部和尾部畸形, 因而, *Stk33* 对 Manchette 的形成必不可少。*Kif3a*、*Lrguk1* 和 *Spef2* 基因敲除小鼠与 *Stk33* 基因敲除小鼠具有最为相似的表型。

精子尾部轴丝的发育由鞭毛内转运 (intraflagellar transport, IFT) 介导。IFT 由驱动蛋白 II 和动力蛋白 1B 共同负责, 驱动蛋白 II 负责顺向转运, 动力蛋白 1B 负责逆向转运<sup>[16]</sup>。其中, 驱动蛋白 II 是一种异源三聚体蛋白质复合物, 包含 *KIF3A* 和 *KIF3B* 两个运动亚基及一个非运动亚基 *KAP3*。*KIF3A* 位于长形精子细胞 Manchette 和成熟精子基底体及尾部主段, 它在轴丝延伸和转运、细胞极性和基底体定位中起着重要作用。*KIF3A* 是精子发生的重要调节因子, 对精子尾部形成和 Manchette 功能至关重要<sup>[17]</sup>。*KIF3A* 缺失可导致 Manchette 缺陷, 轴丝发育不全, 进而影响精子头部成形和尾部形成。

*LRGUK1* (leucine-rich repeats and guanylate kinase-domain containing isoform 1) 由 LRR (leucine-rich repeat)、GUK-like (guanylate kinase-like) 和 UN (unnamed) 3 个结构域组成。*LRGUK1* 通过 LRR 结构域与 *KLC3* 结合, 并通过 GUK-like 结构域与 *HOOK2* 和 *RIMBP3* 结合<sup>[18]</sup>。实际上, *LRGUK1* 与货物连接蛋白 *HOOK1*、*HOOK2*、*HOOK3* 及货物蛋白 *RIMBP3* 形成了一个多蛋白复合物, 通过顺向转运蛋白 *KLC3* 的作用, 沿着 Manchette 转运到 HTCA, 这对 Manchette 功能以及精子尾部从基底体延伸必不可少。*LRGUK1* 作为多蛋白复合物关键组分, 在单倍体雄性生殖细胞微管动力中发挥重要作用, *LRGUK1* 的缺失破坏了这种复合物, 造成精子头部形态异常、顶体脱离细胞核和基底体无轴丝延伸。

*SEPTIN* 基因属于高度保守的具有 GTP 酶活性的蛋白家族。*SEPTIN* 通过与各种细胞骨架蛋白相互作用来执行细胞骨架重塑、细胞极性、有丝分裂、囊泡运输和扩散屏障等功能<sup>[19]</sup>。*SEPTIN* 家族的蛋白质已被证明定位于 annulus 上, 是其组成成分。哺乳动物 annulus 是由 *SEPTIN* 1、4、6、7 和 12 组成的多蛋白复合体, 精子尾部的形态分化和扩散屏障功能需要稳定的 *SEPTIN* 复合物<sup>[2]</sup>。*SEPT12* 在减数分裂后雄性精子细胞中表达, 在精子形成过程中, *SEPT12* 与  $\alpha$ -微管蛋白和  $\beta$ -微管蛋白相互作用, 形成 *SEPT12*- $\alpha$ -微管蛋白和 *SEPT12*- $\beta$ -微管蛋白复合物, 这两种复合物对精子头部成形和尾部延伸起着重要作用<sup>[19]</sup>。*SEPT12* 缺失会破坏  $\alpha$ -微管蛋白和  $\beta$ -微管蛋白的组织结构和动力, 影响  $\alpha$ -微管蛋白和  $\beta$ -微管蛋白聚合, 从而扰乱精子头部成形和尾部延伸。



*SEPT12* 突变后精子出现头部畸形、尾部弯曲及 annulus 环缺陷。

除了与  $\alpha$ -微管蛋白、 $\beta$ -微管蛋白相互作用之外, 还有一些基因与 Manchette 相关, 如 *MEIG1* (meiosis expressed gene 1) 是一种最初被认为在减数分裂中起作用的蛋白, 但敲除 *Meig1* 基因, 意外地发现雄性小鼠在减数分裂中没有明显异常, 而出现精子核浓缩及尾部延伸缺陷而不育<sup>[20]</sup>。*MEIG1* 是 Manchette 结构和功能以及调控精子形成的关键基因, *MEIG1* 蛋白分子量 10 kDa, 包含丝氨酸和苏氨酸磷酸化的多重一致序列。*Meig1* 缺失小鼠精子细胞中 Manchette 被破坏, 从而损害了 Manchette 内转运 (intramanchette transport, IMT) 系统, 导致精子头部成形和鞭毛形成障碍<sup>[20]</sup>。此外, *PACRG* (the Parkin co-regulated gene) 是一种影响轴丝外周双联微管形成的蛋白, *MEIG1* 可以与 *PACRG* 直接相互作用, 提示两者通过一个共同的机制调节精子形成, *MEIG1* 可能稳定 *PACRG* 或作为 *PACRG* 作用的辅助因子。

## 5 轴丝发育相关蛋白

### 5.1 中央微管发育相关蛋白

*CFAP69* (cilia and flagella-associated protein) 编码蛋白在进化上高度保守, 包含 ARM-repeat 和 AH/BAR 两个结构域。其在睾丸中含量较高, 定位于人类精子鞭毛中段, 在成年小鼠睾丸中, *Cfap69* 开始表达于减数分裂期, 并在随后阶段表达量显著增加。*CFAP69* 对于鞭毛的装配和稳定是必需的, 它的缺失会导致轴丝缺陷<sup>[21]</sup>, 并呈现出 MMAF 表型。*CFAP69* 突变精子中轴丝的中心对复合体 (central pair complex, CPC) 蛋白 SPAG6 和 SPEF2 减少, 表明 *CFAP69* 可能参与了 CPC 的装配, *CFAP69* 可能通过参与 IFT 而参与精子尾部形成和 CPC 组装。此外, 在精子形成过程中, *CFAP69* 对于精子头部的形成也是至关重要的。

SPEF2 (sperm flagellar 2) 是另一种影响中央微管发育的蛋白, 在精子细胞伸长阶段对精子形成至关重要<sup>[22]</sup>。SPEF2 含有 1822 个氨基酸, 其 N-端有 CH 结构域, C-端有 IFT20 结合结构域。SPEF2 能与

IFT20 相互作用, 并定位于高尔基复合体和 Manchette<sup>[23]</sup>。*SPEF2* 突变精子主要的形态学缺陷是鞭毛主段的 CPC 完全缺失, 形成“9+0”构象, 表明 *SPEF2* 在正常轴丝形成中具有重要作用<sup>[22]</sup>。*SPEF2* 在功能上与 *CFAP69* 相互作用, *CFAP69* 突变精子中 *SPEF2* 蛋白水平显著降低或缺失, *SPEF2* 突变精子中 *CFAP69* 也出现减少。*SPEF2* 可能通过特定的机制与 *CFAP69* 一起参与精子鞭毛 CPC 的组装。

此外, *ARMC2* (armadillo repeat containing 2-encoding gene) 也影响中央微管的发育。*ARMC2* 位于 6 号染色体上, 包含 18 个外显子, 编码蛋白含 867 个氨基酸<sup>[24]</sup>, 这是一种 ARM (armadillo) 蛋白, 优先在睾丸中表达, 属于含有 ARM 重复序列蛋白家族, 由 12 个 ARM 重复序列组成, 两侧分别是独特的 C 端和 N 端结构域。*ARMC2* 对人和小鼠精子尾部发育至关重要, *ARMC2* 双等位基因突变呈现出典型的 MMAF 表型。在 *ARMC2* 突变个体和小鼠中, CPC 中 SPAG6 和 SPEF2 蛋白缺失<sup>[25]</sup>, 表明 *ARMC2* 参与了 CPC 的组装和稳定, 其对精子鞭毛的结构和装配是必需的。

### 5.2 外周微管发育相关蛋白

动力蛋白被锚定在外周微管上, 其产生的力使微管彼此滑动, 而连接蛋白将微管固定在适当位置, 通过防止微管滑动, 将动力蛋白产生的力转化为鞭毛的弯曲运动。连接蛋白-动力蛋白调节复合物 (nexin-dynein regulatory complex, N-DRC) 是相邻的外周双联微管之间的细丝, 由多达 11 种蛋白质组成, 除连接相邻外周双联微管以防止微管滑动外, N-DRC 还可以调节动力蛋白的运动活性<sup>[26]</sup>。

*TCTE1* (T-complex associated testis expressed 1) 是一种进化上保守的基因, 存在于含有鞭毛的所有真核生物中。*TCTE1* 是衣藻 N-DRC 组分 DRC5 的同源物, 是一种从衣藻 DRC5 到哺乳动物进化上保守的轴丝蛋白, 定位于 N-DRC。*TCTE1* 编码蛋白含 498 个氨基酸, C 端具有富含亮氨酸重复区 (leucine rich repeat, LRR) 结构域, LRR 结构域可以介导蛋白质-蛋白质的相互作用。*Tcte1* 缺失小鼠精子尾部向一侧收缩, 精子形成圆形的运动路径<sup>[27]</sup>。此外, *Tcte1* 敲除精子的 ATP 显著减少, 前向运动减弱, 精子内

的能量代谢降低。

### 5.3 放射辐发育相关蛋白

RS 为轴丝的组分,是一种与鞭毛运动调节有关的 T 形蛋白质复合物,具有一个细长的“茎”与外周双联微管相连,以及一个球状的“头”向中央微管延伸。在衣藻中发现了 5 种 RS 头蛋白: RSP1、RSP4、RSP6、RSP9 和 RSP10,其在小鼠和人类中是保守的,分别对应于 RSPH1、RSPH4A、RSPH6A、RSPH9 和 RSPH10B。

其中, *RSPH6A* (radial spoke head 6 homolog A) 为一种进化上保守的基因,是衣藻 RSP6 的同源物。RSPH6A 对小鼠精子鞭毛装配是必需的。RS 受损,轴丝可变得不稳定并停止伸长,线粒体和纤维鞘形成随即终止。*Rsph6a* 基因敲除小鼠精子短且不动,轴丝可以伸长,但在附属结构形成之前被破坏,并且出现 Manchette 移除障碍,导致核周环异常地收紧细胞核,造成精子棒状头部。此外,RSPH9 在 *Rsph6a* 敲除精子鞭毛中缺失,表明 RSPH6A 与 RSPH9 相互作用对于将 RSPH9 整合到鞭毛中很重要<sup>[28]</sup>。*Rsph1* 敲除小鼠表型与 *Rsph6a* 敲除小鼠相似,具有异常的轴丝结构,如 RS 和中央微管对缺失<sup>[29]</sup>,并且具有畸形的头部和发育不良的鞭毛。

### 5.4 内外动力蛋白臂发育相关蛋白

DNAH1 (dynein axonemal heavy chain 1)是一个编码轴丝 IDA 重链的蛋白,其基因突变可显著降低蛋白表达,并导致 MMAF 表型,虽然 DNAH1 缺失不影响 ODA,但 IDA 完全杂乱、中央微管对缺失、FS 畸形<sup>[30]</sup>。与 DNAH1 相似,DNAH2 也是一种睾丸特异性蛋白,是轴丝内动蛋白臂重链(dynein heavy chains, DHC)的主要组分,是动力蛋白-F 的一个重要亚基。*DNAH2* 突变精子中 DNAH2 水平显著降低,IDA 缺失,MS 也受到破坏,精子丧失活力<sup>[31]</sup>。*DNAH2* 基因突变呈现出 MMAF 表型,表明 DNAH2 是与 MMAF 相关的一种新的候选蛋白。对 DNAH1 和 DNAH2 的研究揭示了 DHC 家族蛋白在维持鞭毛结构完整性方面的重要作用,并提示其他功能不明的 DHC 编码基因也可能参与了精子鞭毛缺陷表型。

与仅影响轴丝 IDA 重链形成的 DNAH1 和

DNAH2 不同,C11orf70 (the chromosome 11 open-reading frame 70)缺陷不仅导致 1 型和 2 型 ODAs 缺失,还造成 I2 组 IDAs 的 DNALI1 缺失和 I3 组 IDAs 的 DNAH6 缺失,这表明 C11orf70 参与了精子鞭毛中细胞质内动力蛋白臂的组装<sup>[32]</sup>,其突变引起了组装的中断,导致 ODAs 和 IDAs 缺失,造成了鞭毛不动。此外,C11orf70 与细胞质 ODA/IDA 装配因子 DNAAF2 直接相互作用,表明 C11orf70 可能是一个细胞质预组装因子,参与了动力蛋白组分向轴丝转运。

与 C11orf70 相似,PIH1D3 (PIH1 domain containing3)也是一种动力蛋白臂细胞质预组装因子,并且 *PIH1D3* 缺失也会导致 ODAs 和 IDAs 同时缺失。*PIH1D3* 含有 PIH1 结构域,它在生精细胞特异性表达并定位于细胞质,其 mRNA 在粗线期精母细胞中含量最高。作为一种具有独特功能的新型轴丝动力蛋白预组装因子(dynein axonemal assembly factor, DNAAF), *PIH1D3* 可以促进轴丝 ODAs 和 IDAs 的 HCs 和 ICs 在小鼠精子细胞质中的稳定和组装。*PIH1D3* 也是第一个发现的 ICs 细胞质预组装以及“9+2”微管结构所需的 DNAAF。*Pih1d3* 敲除小鼠精子不动并且十分脆弱,其轴丝“9+2”微管结构紊乱,ODAs 和 IDAs 缺失<sup>[33]</sup>。由此可见, *PIH1D3* 是通过稳定和促进 ODA 和 IDA 的形成促成了精子细胞中动力蛋白复合物在细胞质中的预组装。

## 6 外周致密纤维发育相关蛋白

ODF 是发现的 2 种主要细胞骨架结构之一,每根 ODF 都与 1 个双联微管(doublets of microtubules, DMTs)对应。已知 *ODF1*、*ODF2* 和 *ODF3* 是现今发现的 3 种编码 ODF 的基因,并且 3 者之间存在着密切的联系。*ODF1* 基因位于人染色体 8q22 上<sup>[34]</sup>,主要编码 27 kDa ODF 蛋白,富含半胱氨酸和脯氨酸。*ODF1* 既可通过 N 端亮氨酸拉链基序自我联合,也可通过该基序与 *ODF2* 亮氨酸拉链相互作用。单倍体精子细胞中 *ODF1* 在减数分裂后期转录,其翻译似乎紧随着转录进行。*ODF2* 基因,又称为 *ODF84*,位于人染色体 9q34 上<sup>[35]</sup>,主要编码 84 kDa ODF 蛋白。人类和大鼠 *ODF2* 外显子在核苷酸水平上有 90%

相同,由该外显子编码的氨基酸序列则 100% 相同<sup>[35]</sup>。ODF2 有两个亮氨酸拉链,在长形精子细胞 ODF 沿着轴丝装配过程中,ODF2 通过上游 C 端亮氨酸拉链与 ODF1 N 端亮氨酸拉链发生强烈特异性相互作用,其第二个亮氨酸拉链可能与其他 ODF 或精子尾部结构蛋白相互作用。因此,ODF2 可能是 ODF 形态发生的关键参与者。ODF3 编码一种约 110 kDa ODF 卷曲螺旋蛋白<sup>[36]</sup>,其中心区域几乎完全由卷曲螺旋组成,而在 N 端和 C 端,卷曲螺旋结构被非螺旋区域打断。ODF3 具有 3 个亮氨酸拉链区域,ODF2 和 ODF3 均可形成纤维支架,最终形成精子尾部外周致密纤维。

上述 ODF1、ODF2 和 ODF3 均是 ODF 的结构蛋白,Tssk4 则是通过与 Odf2 相互作用影响 ODF 的形成。TSSK (testis specific serine/threonine protein kinase)家族在精子发生和精子形成中起重要作用,其由 Tssk1、Tssk2、Tssk3、Tssk4/5 及 Tssk6 5 个成员组成,除 Tssk3 主要在间质细胞表达外,其他成员的表达仅限于减数分裂后生殖细胞,且 Tssk4 与 Tssk5 是同一蛋白<sup>[37]</sup>。Tssk4 属于 TSSK 家族,它是维持精子鞭毛结构完整性所必需的。Tssk4 和 Odf2 位于精子鞭毛主段,通过磷酸化相互调节,这种相互调节可能保持一个正反馈回路,活性的 Tssk4 可以改变 Odf2 磷酸化状态以调节精子的运动和结构。反之,Odf2 可以增强 Tssk4 自身磷酸化活性<sup>[38]</sup>,而 Tssk4 又可以通过自身磷酸化活性维持自身的激酶活性<sup>[37]</sup>。此外,Odf2 可以将 Tssk4 蛋白募集到 ODFs 上。Tssk4 敲除的精子对剪切力更敏感,精子尾部超微结构发生紊乱,在中段-主段连接处出现弯曲,精子运动能力降低。

此外,MNS1 (meiosis-specific nuclear structural protein 1)缺失也会导致 ODF 形成障碍。MNS1 是一种约 60 kDa 的卷曲螺旋蛋白,在晚期粗线期精母细胞、双线期精母细胞和精子细胞中大量表达<sup>[39]</sup>,对精子形成至关重要。MNS1 是精子鞭毛必不可少的组分,精子鞭毛的装配需要 MNS1。MNS1 单体彼此相互作用并且在异位表达时能够形成纤维聚合物,在鞭毛中 MNS1 组装成丝状结构。MNS1 缺失的精子鞭毛中,特征性的“9+2”微管排列和 ODF 被完全破坏。此外,缺失 MNS1,精子的产量显著降低,产生不动的精子,且有异常的短尾。

## 7 线粒体鞘发育相关蛋白

驱动蛋白是主要的正端导向微管马达,它负责将细胞器、蛋白质复合物以及 mRNAs 转运到细胞内特定区域<sup>[40]</sup>。驱动蛋白 I 马达分子由两条驱动蛋白重链(kinesin heavy chains, KHCs)和两条驱动蛋白轻链(kinesin light chain, KLCs)组成。其中,KLC3 是目前唯一已知的驱动蛋白轻链,它在雄性生殖细胞减数分裂后表达并在精子尾部中段聚积。KLC3 位于 ODF 和线粒体之间,并具有典型的 KLC 结构域特征,包括保守的 7 肽重复序列(heptad repeat, HR)和 34 肽重复序列(tetratricopeptide repeats, TPRs)<sup>[41]</sup>,其 HR 区与 ODF1 的亮氨酸拉链结构域相互作用<sup>[42]</sup>,而 TPR 区可能直接或通过衔接分子 Caytaxin 与线粒体外膜蛋白 VDAC2 结合<sup>[43]</sup>,因此 KLC3 作为锚定蛋白将 ODF 和线粒体结合在一起。KLC3 与线粒体结合正值线粒体从精子细胞边缘移动到正在发育的中段,并且 KLC3 能以微管依赖的方式引起线粒体聚集形成聚集体,这些表明 KLC3 在中段形成中起着重要作用,其可能通过协助精子中段 MS 的形成参与了精子发生。

与 KLC3 不同,在线粒体中 MFN2 (mitofusin 2)本身就是一种外膜蛋白。MFN2 影响 MS 的形成,它不仅参与线粒体网络的融合、维持和运转,同时也参与调节线粒体与亚细胞细胞器之间的联系。MFN2 和 MNS1 均是精子鞭毛的一个组分,它们在鞭毛的生物发生和功能中起作用。研究发现,在精子发生过程中,MFN2 与 MNS1 通过相互作用形成了一种蛋白质复合物,并共定位于精子鞭毛<sup>[44]</sup>。在生精细胞中,MFN2 位于线粒体内,与精子鞭毛中段的发育相关。

此外,CFAP251 (cilia and flagella-associated protein 251)也可影响 MS 的发育。CFAP251 又称 WDR66,它在睾丸中特异性表达,其编码蛋白含 1149 个氨基酸,有 9 个 WD 重复序列,N 端有富含 Glu 的酸性结构域,C 端有钙结合 EF-hand 结构域。CFAP251 是钙调蛋白和 RS 相关复合体的组分,位于轴丝外周双联微管内表面,与 DNAH1 相邻。DNAH1 与 CFAP251 可相互作用,两者相互作用受损可以破坏 RS3 与 IDA3 之间的连接<sup>[45]</sup>。尽管位于



轴丝外周双联微管上, 但 CFAP251 可以影响 IFT, 而 IFT 通常在线粒体募集之前会立即将 annulus 环移动并使其远离细胞核, IFT 通过轴丝和辅助鞘间的一系列相互作用、通过对轴丝刚性的机械作用、或在装配过程中将特定蛋白导向轴丝的外表面来限定 MS 的末端。CFAP251 缺失呈现出 MMAF 表型<sup>[45]</sup>, 其突变精子的线粒体被募集到中段, 但不能沿轴丝扩展, 造成 MS 发育不良, 可见到线粒体密度非常低的短 MS。CFAP251 是 MS 沿着精子鞭毛中段延伸所必需的, 它可能通过启用特定的 IFT 而参与 MS-FS 连接的定位。

## 8 纤维鞘发育相关蛋白

FSIP2 (fibrous sheath-interacting protein 2) 在精子鞭毛形成过程中起着重要作用。FSIP2 突变精子超微结构异常, 精子中段较厚, 有多余的残余体, 并且 DMTs 和 ODFs 解体<sup>[46]</sup>。FSIP2 突变精子的活力明显受损, 并可以引起 MMAF 表型, FSIP2 可能是 MMAF 相关的弱畸精子症的一个新的蛋白。FSIP2 和激酶 A 锚定蛋白 4 (A-kinase anchor protein 4, AKAP4) 之间存在相互作用, 而 AKAP4 和激酶 A 锚定蛋白 3 (A-kinase anchor protein 3, AKAP3) 是 FS 中最丰富的结构蛋白, 因此 FSIP2 可能与 AKAP3 和 AKAP4 一起参与了 FS 的形成。

PKA 全酶由两个调控亚基(RI $\alpha$  和 RII $\alpha$ )和两个催化亚基(C $\alpha$  和 C $\alpha$ 2)组成。PKA 的 R 亚基还包含 1 个 RII 二聚/对接(RII dimerization/docking, R2D2)结构域, 此结构域可与激酶 A 锚定蛋白(A-kinase anchoring proteins, AKAPs)上的短肽区相互作用。ROPN1 (Ropporin 1)、ROPN1L (ROPN1-like)是包含 R2D2 结构域的 R2D2 蛋白质<sup>[47]</sup>, 两者在功能上存在相互补偿。AKAP 可能具有双重信号传导功能, 除与 PKA 相互作用外, 还通过两性螺旋结构域与 ROPN1 和 ROPN1L 结合<sup>[48]</sup>, 以调节精子活力。R2D2 蛋白 ROPN1 和 ROPN1L 通过依赖 PKA 的信号通路参与精子活力调控<sup>[47]</sup>。ROPN1 和 ROPN1L 突变可导致 FS 完整性、精子活力和 PKA 依赖性信号传导通路的缺陷。ROPN1 和 ROPN1L 对于正常的 FS 结构和功能是必需的。上述 FSIP2、ROPN1 和 ROPN1L 都是通过与 FS 中的结构蛋白相互作用而发挥作用,

而 FS39、Als2cr12 和 Mtsga10 3 种蛋白则是 FS 的组成成分。

FS39 (fibrous sheath)是一种 39 kDa 的 FS 中间丝相关蛋白, 仅表达于睾丸单倍体生殖细胞<sup>[49]</sup>。FS39 mRNA 具有生殖细胞特异性, 在精子形成第 3~14 步表达, 在顶体期(第 8~12 步)达到高峰, FS39 mRNA 受翻译调控, 在成熟期(第 13~14 步)首次检测到该蛋白。FS39 具有纤维鞘蛋白的特点: 高不溶性、富含天冬氨酸和谷氨酸, 并含有有可能在 FS 组装和功能中起关键作用的特定磷酸化位点。FS39 位于 FS 的纵柱中, 其分布模式与 AKAP82 相同。AKAP82 是将 PKA 锚定在 FS 上, 在 cAMP 作用下, 激酶的催化亚基被释放并自由磷酸化其底物。AKAP82 被合成为细胞质中不活跃的前体, 通过轴丝向下运输到装配位点, 随后被切割为成熟蛋白, FS39 在氨基酸 11 处含有 1 个特定的酰胺化位点, 而酰胺化位点存在于前体蛋白的切割位点上, 因此 FS39 可能经过 AKAP82 类似的处理转运到 FS 位点上。

Als2cr12 (amyotrophic lateral sclerosis 2 chromosome region candidate 12)是一种新的生精细胞特异性蛋白。Als2cr12 产生短 Als2cr12 (Als2cr12-S)和长 Als2cr12 (Als2cr12-L)两种转录物<sup>[50]</sup>, 其中 Als2cr12-S 编码蛋白含 245 个氨基酸, 分子量 28 kDa, 在睾丸体细胞表达或在体细胞和生殖细胞中均有表达; 而 Als2cr12-L 编码蛋白含 383 个氨基酸、预计分子量为 45 kDa, 在雄性生殖细胞特异性表达, 是精子鞭毛主段 FS 的组分, Als2cr12-L 在 FS 发育中起着重要作用。

Mtsga10 (mus testis-specific gene antigen 10)位于小鼠 1 号染色体 B 带, 在不同物种中高度保守, 基因序列在小鼠与人之间同源性为 89%, 氨基酸序列同源性为 94%<sup>[51]</sup>。Mtsga10 含有一种特定的 ERM 结构域(又称为 FERM 结构域, 其命名源于最初在该结构域发现的 4 种蛋白: 条带 4.1 (F)、Ezrin (E)、Radixin (R)和 Moesin (M), 即肌球蛋白、埃兹蛋白、根蛋白和膜突蛋白<sup>[52]</sup>), Mtsga10 的肌球蛋白结构域是形成细丝所必需的, 在 FS 形成中发挥作用。Mtsga10 mRNA 最早在精子发生减数分裂后期检测到, 被翻译成 65 kDa 的精子细胞蛋白, 随后在成熟精子中被加工成 27 kDa 的 FS 结构蛋白, 并保存于精子尾部主段<sup>[51]</sup>。人 TSGA10 (testis-specific



gene antigen 10) 是小鼠 *Mtsga10* 的同源基因, 位于人染色体 2q11.2 上。

除上述蛋白外, 还发现通过其他机制影响 FS 形成的蛋白, 如 ENO4 (enolase 4)。众所周知, 糖酵解是精子中 ATP 的主要来源, 精子中的糖酵解酶主要位于精子鞭毛的主段。在糖酵解的倒数第 3 步, 烯醇化酶催化 2-磷酸甘油酸转化为磷酸烯醇式丙酮酸。随后在丙酮酸激酶的催化作用下, 磷酸烯醇式丙酮酸转化为丙酮酸, 并伴有 ATP 生成。而 ENO4 是小鼠精子中发现的一种新型精子特异性烯醇化酶, 位于精子鞭毛的主段, 也是小鼠精子中主要的烯醇化酶。ENO4 在精子中提供了大部分的烯醇化酶活性, 它是 FS 正常装配所必需的<sup>[53]</sup>。Eno4 敲除小鼠精子活力、ATP 水平和烯醇化酶活性显著降低, FS 组分无序聚集, 常出现 1 个或 3 个纵柱, 且环形肋组织结构和厚度不规则<sup>[53]</sup>, 说明 ENO4 对 FS 的形成具有重要的影响。此外, 位于中段-主段连接处的 annulus 环也出现缺失、退化或错位。

最后, CFAP157 (cilia and flagella-associated protein 157) 是一种基底体蛋白, 定位于基底体, 可以与微管蛋白以及中心体蛋白 CAP350 相互作用<sup>[54]</sup>。CFAP157 仅在男性生殖细胞中具有关键功能, 它在精子运动和鞭毛形态发生中起作用。CFAP157 作用于哺乳动物发育中的精子, 以确保形成一个超微结构正常的轴丝以及一个具有功能性的中段<sup>[55]</sup>。Cfap157 敲除精子的中段有多余的细胞质和聚集的线粒体, 造成中段异常扩张和有序, 并出现轴丝环<sup>[55]</sup>。Cfap157 缺失精子的头部相对于鞭毛轴弯曲成较小的角度, 因此, 鞭毛摆动不能将精子打入卵细胞内, 而是沿着卵细胞表面, 远离卵。CFAP157 确切的作用机制目前尚不清楚, 但 CFAP157 对于 FS 的形成具有重要影响。

## 9 结语与展望

据统计, 我国不孕不育人口已超过 500 万, 约占育龄人口比例的 12.5%, 但其治愈率却不到 30%。在不孕不育的育龄夫妇中, 由男方因素引起的不育占了 50%。男性不育是一种具有高度异质性表型的多因素复杂疾病, 其中, 遗传因素占了至少 15%, 包括染色体和单基因改变<sup>[56]</sup>, 其常见的临床表现之

一是少、弱、畸形精子症 (oligo-astheno-teratozoospermia, OAT)。目前, 辅助生殖技术 (assisted reproductive technologies, ART) 是治疗男性不育最有效的手段之一, 包括试管婴儿 (*in vitro* fertilization, IVF) 和卵胞浆内单精子注射 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 等, 但同时存在诸多的弊端, 例如通过 IVF 和 ICSI 出生的婴儿遗传缺陷几率有显著增加<sup>[57]</sup>。生殖系基因治疗 (germ line gene therapy) 是一种十分具有前景的治疗方法, 揭示生育相关基因、蛋白的功能与特性是生殖系基因治疗的前提。在导致男性不育的基因突变中, 有很多是影响精子发育的基因, 尤其是影响尾部发育的基因, 其突变对精子的结构和功能产生了严重的影响。目前已鉴定出了很多影响精子尾部发育的蛋白, 但这些蛋白缺失所引起的精子形态和功能异常仅能解释 30%~60% 的临床男性不育病例, 还有很多遗传学病因及致病机制尚不清楚, 需要更深入的研究。揭示男性不育的遗传病因十分重要, 这不仅可以在分子水平上更准确地阐明不育症的发病机制, 还可以为今后的基因诊断和基因治疗奠定基础。本文根据精子尾部的超微结构, 对影响精子尾部各个部分发育的蛋白近年来的研究进展进行综述, 希望有助于读者对影响精子尾部发育相关的蛋白有一个系统性认识。随着生殖医学的快速发展, 越来越多的男性不育患者有望能够解决生育难题。

## 参考文献 (References):

- [1] Eddy EM. The scaffold role of the fibrous sheath. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 2007, 65: 45–62. [DOI]
- [2] Toure A, Rode B, Hunnicutt GR, Escalier D, Gacon G. Septins at the annulus of mammalian sperm. *Biol Chem*, 2011, 392(8–9): 799–803. [DOI]
- [3] Kissel H, Georgescu MM, Larisch S, Manova K, Hunnicutt GR, Steller H. The Sept4 septin locus is required for sperm terminal differentiation in mice. *Dev Cell*, 2005, 8(3): 353–364. [DOI]
- [4] Lin YH, Lin YM, Wang YY, Yu IS, Lin YW, Wang YH, Wu CM, Pan HA, Chao SC, Yen PH, Lin SW, Kuo PL. The expression level of septin12 is critical for spermiogenesis. *Am J Pathol*, 2009, 174(5): 1857–1868. [DOI]
- [5] Yassine S, Escoffier J, Abi Nahed R, Pierre V, Karaouzene

- T, Ray PF, Arnoult C. Dynamics of Sun5 localization during spermatogenesis in wild type and Dpy19l2 knock-out mice indicates that Sun5 is not involved in acrosome attachment to the nuclear envelope. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0118698. [DOI]
- [6] Shang YL, Zhu FX, Wang LN, Ouyang YC, Dong MZ, Liu C, Zhao HC, Cui XH, Ma DY, Zhang ZG, Yang XY, Guo YS, Liu F, Yuan L, Gao F, Guo XJ, Sun QY, Cao YX, Li W. Essential role for SUN5 in anchoring sperm head to the tail. *eLife*, 2017, 6: e28199. [DOI]
- [7] Tokuhito K, Isotani A, Yokota S, Yano Y, Oshio S, Hirose M, Wada M, Fujita K, Ogawa Y, Okabe M, Nishimune Y, Tanaka H. OAZ-t/OAZ3 is essential for rigid connection of sperm tails to heads in mouse. *PLoS Genet*, 2009, 5(11): e1000712. [DOI]
- [8] Yuan SQ, Stratton CJ, Bao JQ, Zheng HL, Bhetwal BP, Yanagimachi R, Yan W. Spata6 is required for normal assembly of the sperm connecting piece and tight head-tail conjunction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(5): E430–E439. [DOI]
- [9] Baek N, Woo JM, Han C, Choi E, Park I, Kim DH, Eddy EM, Cho C. Characterization of eight novel proteins with male germ cell-specific expression in mouse. *Reprod Biol Endocrinol*, 2008, 6: 32. [DOI]
- [10] Kim J, Kwon JT, Jeong J, Kim J, Hong SH, Kim J, Park ZY, Chung KH, Eddy EM, Cho C. SPATC1L maintains the integrity of the sperm head-tail junction. *EMBO Rep*, 2018, 19(9): e45991. [DOI]
- [11] Hussain MS, Baig SM, Neumann S, Nurnberg G, Farooq M, Ahmad I, Alef T, Hennies HC, Technau M, Altmüller J, Frommolt P, Thiele H, Noegel AA, Nurnberg P. A truncating mutation of CEP135 causes primary microcephaly and disturbed centrosomal function. *Am J Hum Genet*, 2012, 90(5): 871–878. [DOI]
- [12] Sha YW, Xu XH, Mei LB, Li P, Su ZY, He XQ, Li L. A homozygous CEP135 mutation is associated with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella (MMAF). *Gene*, 2017, 633: 48–53. [DOI]
- [13] Sha YW, Wang X, Xu X, Su ZY, Cui Y, Mei LB, Huang XJ, Chen J, He XM, Ji ZY, Bao H, Yang X, Li P, Li L. Novel mutations in CFAP44 and CFAP43 cause multiple morphological abnormalities of the sperm flagella (MMAF). *Reprod Sci*, 2019, 26(1): 26–34. [DOI]
- [14] Lehti MS, Sironen A. Formation and function of the manchette and flagellum during spermatogenesis. *Reproduction*, 2016, 151(4): R43–R54. [DOI]
- [15] Martins LR, Bung RK, Koch S, Richter K, Schwarzmüller L, Terhardt D, Kurtulmus B, Niehrs C, Rouhi A, Lohmann I, Pereira G, Frohling S, Glimm H, Scholl C. Stk33 is required for spermatid differentiation and male fertility in mice. *Dev Biol*, 2018, 433(1): 84–93. [DOI]
- [16] Rosenbaum JL, Witman GB. Intraflagellar transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(11): 813–25. [DOI]
- [17] Lehti MS, Kotaja N, Sironen A. KIF3A is essential for sperm tail formation and manchette function. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 377(1–2): 44–55. [DOI]
- [18] Okuda H, DeBoer K, O'Connor AE, Merriner DJ, Jamsai D, O'Bryan MK. LRUG1 is part of a multiprotein complex required for manchette function and male fertility. *FASEB J*, 2017, 31(3): 1141–1152. [DOI]
- [19] Kuo PL, Chiang HS, Wang YY, Kuo YC, Chen MF, Yu IS, Teng YN, Lin SW, Lin YH. SEPT12-microtubule complexes are required for sperm head and tail formation. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(11): 22102–22116. [DOI]
- [20] Zhang Z, Shen X, Gude DR, Wilkinson BM, Justice MJ, Flickinger CJ, Herr JC, Eddy EM, Strauss JF. MEIG1 is essential for spermiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(40): 17055–17060. [DOI]
- [21] Dong FN, Amiri-Yekta A, Martinez G, Saut A, Tek J, Stouvenel L, Lores P, Karaouzene T, Thierry-Mieg N, Satre V, Brouillet S, Daneshpour A, Hosseini SH, Bonhivers M, Gourabi H, Dulioust E, Arnoult C, Toure A, Ray PF, Zhao H, Coutton C. Absence of CFAP69 causes male infertility due to multiple morphological abnormalities of the flagella in human and mouse. *Am J Hum Genet*, 2018, 102(4): 636–648. [DOI]
- [22] Liu CY, Lv MR, He XJ, Zhu Y, Amiri-Yekta A, Li WY, Wu H, Kherraf ZE, Liu WJ, Zhang JJ, Tan Q, Tang SY, Zhu YJ, Zhong YD, Li CH, Tian SX, Zhang ZG, Jin L, Ray P, Zhang F, Cao YX. Homozygous mutations in SPEF2 induce multiple morphological abnormalities of the sperm flagella and male infertility. *J Med Genet*, 2020, 57(1): 31–37. [DOI]
- [23] Sironen A, Hansen J, Thomsen B, Andersson M, Vilkkilä J, Toppari J, Kotaja N. Expression of SPEF2 during mouse spermatogenesis and identification of IFT20 as an interacting protein. *Biol Reprod*, 2010, 82(3): 580–590. [DOI]
- [24] Coutton C, Martinez G, Kherraf ZE, Amiri-Yekta A, Boguenet M, Saut A, He X, Zhang F, Cristou-Kent M, Escoffier J, Bidart M, Satre V, Conne B, Fourati Ben Mustapha S, Halouani L, Marrakchi O, Makni M, Latrous H, Kharouf M, Pernet-Gallay K, Bonhivers M, Hennebicq S, Rives N, Dulioust E, Toure A, Gourabi H, Cao Y,

- Zouari R, Hosseini SH, Nef S, Thierry-Mieg N, Arnoult C, Ray PF. Bi-allelic mutations in ARMC2 lead to severe astheno-teratozoospermia due to sperm flagellum malformations in humans and mice. *Am J Hum Genet*, 2019, 104(2): 331–340. [DOI]
- [25] Teves ME, Nagarkatti-Gude DR, Zhang Z, Strauss JF. Mammalian axoneme central pair complex proteins: Broader roles revealed by gene knockout phenotypes. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2016, 73(1): 3–22. [DOI]
- [26] Bower R, Tritschler D, Vanderwaal K, Perrone CA, Mueller J, Fox L, Sale WS, Porter ME. The N-DRC forms a conserved biochemical complex that maintains outer doublet alignment and limits microtubule sliding in motile axonemes. *Mol Biol Cell*, 2013, 24(8): 1134–1152. [DOI]
- [27] Castaneda JM, Hua R, Miyata H, Oji A, Guo YS, Cheng YW, Zhou T, Guo XJ, Cui YQ, Shen B, Wang ZB, Hu ZB, Zhou ZM, Sha JH, Prunskaitė-Hyrylainen R, Yu ZF, Ramirez-Solis R, Ikawa M, Matzuk MM, Liu MX. TCTE1 is a conserved component of the dynein regulatory complex and is required for motility and metabolism in mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(27): E5370–E5378. [DOI]
- [28] Abbasi F, Miyata H, Shimada K, Morohoshi A, Nozawa K, Matsumura T, Xu Z, Pratiwi P, Ikawa M. RSPH6A is required for sperm flagellum formation and male fertility in mice. *J Cell Sci*, 2018, 131(19). [DOI]
- [29] Kott E, Legendre M, Copin B, Papon JF, Dastot-Le Moal F, Montantin G, Duquesnoy P, Piterboth W, Amram D, Bassinet L, Beucher J, Beydon N, Deneuville E, Houdouin V, Journal H, Just J, Nathan N, Tamalet A, Collot N, Jeanson L, Le Gouez M, Vallette B, Vojtek AM, Epauld R, Coste A, Clement A, Housset B, Louis B, Escudier E, Amselem S. Loss-of-function mutations in RSPH1 cause primary ciliary dyskinesia with central-complex and radial-spoke defects. *Am J Hum Genet*, 2013, 93(3): 561–570. [DOI]
- [30] Ben Khelifa M, Coutton C, Zouari R, Karaouzène T, Rendu J, Bidart M, Yassine S, Pierre V, Delaroche J, Hennebicq S, Grunwald D, Escalier D, Pernet-Gallay K, Jouk PS, Thierry-Mieg N, Touré A, Arnoult C, Ray PF. Mutations in DNAH1, which encodes an inner arm heavy chain dynein, lead to male infertility from multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Am J Hum Genet*, 2014, 94(1): 95–104. [DOI]
- [31] Li Y, Sha YW, Wang X, Ding L, Liu WS, Ji ZY, Mei LB, Huang XJ, Lin SB, Kong SB, Lu JH, Qin WB, Zhang XZ, Zhuang JM, Tang YG, Lu ZX. DNAH2 is a novel candidate gene associated with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Clin Genet*, 2019, 95(5): 590–600. [DOI]
- [32] Höben IM, Hjej R, Olbrich H, Dougherty GW, Nothe-Menchen T, Aprea I, Frank D, Pennekamp P, Dworniczak B, Wallmeier J, Raidt J, Nielsen KG, Philipsen MC, Santamaria F, Venditto L, Amirav I, Mussaffi H, Prenzel F, Wu K, Bakey Z, Schmidts M, Loges NT, Omran H. Mutations in C11orf70 cause primary ciliary dyskinesia with randomization of Left/Right body asymmetry due to defects of outer and inner dynein arms. *Am J Hum Genet*, 2018, 102(5): 973–984. [DOI]
- [33] Dong F, Shinohara K, Botilde Y, Nabeshima R, Asai Y, Fukumoto A, Hasegawa T, Matsuo M, Takeda H, Shiratori H, Nakamura T, Hamada H. Pih1d3 is required for cytoplasmic preassembly of axonemal dynein in mouse sperm. *J Cell Biol*, 2014, 204(2): 203–213. [DOI]
- [34] Gastmann O, Burfeind P, Günther E, Hameister H, Szpirer C, Hoyer-Fender S. Sequence, expression, and chromosomal assignment of a human sperm outer dense fiber gene. *Mol Reprod Dev*, 1993, 36(4): 407–418. [DOI]
- [35] Shao X, Murthy S, Demetrick DJ, van der Hoorn FA. Human outer dense fiber gene, ODF2, localizes to chromosome 9q34. *Cytogenet Cell Genet*, 1998, 83(3–4): 221–223. [DOI]
- [36] Petersen C, Aumüller G, Bahrami M, Hoyer-Fender S. Molecular cloning of Odf3 encoding a novel coiled-coil protein of sperm tail outer dense fibers. *Mol Reprod Dev*, 2002, 61(1): 102–112. [DOI]
- [37] Wei Y, Wang X, Fu G, Yu L. Testis specific serine/threonine kinase 4 (Tssk4) maintains its kinase activity by phosphorylating itself at Thr-197. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(1): 439–447. [DOI]
- [38] Wang X, Wei Y, Fu G, Li H, Saiyin H, Lin G, Wang Z, Chen S, Yu L. Tssk4 is essential for maintaining the structural integrity of sperm flagellum. *Mol Hum Reprod*, 2015, 21(2): 136–145. [DOI]
- [39] Zhou J, Yang F, Leu NA, Wang PJ. MNS1 is essential for spermiogenesis and motile ciliary functions in mice. *PLoS Genet*, 2012, 8(3): e1002516. [DOI]
- [40] Hirokawa N, Nitta R, Okada Y. The mechanisms of kinesin motor motility: lessons from the monomeric motor KIF1A. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(12): 877–884. [DOI]
- [41] Zhang Y, Ou Y, Cheng M, Saadi HS, Thundathil JC, van der Hoorn FA. KLC3 is involved in sperm tail midpiece formation and sperm function. *Dev Biol*, 2012, 366(2): 1–11.

- 101–110. [DOI]
- [42] Bhullar B, Zhang Y, Junco A, Oko R, van der Hoorn FA. Association of kinesin light chain with outer dense fibers in a microtubule-independent fashion. *J Biol Chem*, 2003, 278(18): 16159–16168. [DOI]
- [43] Zhang Y, Oko R, van der Hoorn FA. Rat kinesin light chain 3 associates with spermatid mitochondria. *Dev Biol*, 2004, 275(1): 23–33. [DOI]
- [44] Vadnais ML, Lin AM, Gerton GL. Mitochondrial fusion protein MFN2 interacts with the mitostatin-related protein MNS1 required for mouse sperm flagellar structure and function. *Cilia*, 2014, 3: 5. [DOI]
- [45] Li WY, He XJ, Yang SM, Liu CY, Wu H, Liu WJ, Lv MR, Tang DD, Tan J, Tang SY, Chen YJ, Wang JJ, Zhang ZG, Wang HY, Jin L, Zhang F, Cao YX. Biallelic mutations of CFAP251 cause sperm flagellar defects and human male infertility. *J Hum Genet*, 2019, 64(1): 49–54. [DOI]
- [46] Liu W, Wu H, Wang L, Yang X, Liu C, He X, Li W, Wang J, Chen Y, Wang H, Gao Y, Tang S, Yang S, Jin L, Zhang F, Cao Y. Homozygous loss-of-function mutations in FSIP2 cause male infertility with asthenoteratospermia. *J Genet Genomics*, 2019, 46(1): 53–56. [DOI]
- [47] Fiedler SE, Dudiki T, Vijayaraghavan S, Carr DW. Loss of R2D2 proteins ROPN1 and ROPN1L causes defects in murine sperm motility, phosphorylation, and fibrous sheath integrity. *Biol Reprod*, 2013, 88(2): 41. [DOI]
- [48] Newell AE, Fiedler SE, Ruan JM, Pan J, Wang PJ, Deininger J, Corless CL, Carr DW. Protein kinase A RII-like (R2D2) proteins exhibit differential localization and AKAP interaction. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2008, 65(7): 539–552. [DOI]
- [49] Catalano RD, Hillhouse EW, Vlad M. Developmental expression and characterization of FS39, a testis complementary DNA encoding an intermediate filament-related protein of the sperm fibrous sheath. *Biol Reprod*, 2001, 65(1): 277–287. [DOI]
- [50] Choi E, Cho C. Expression of a sperm flagellum component encoded by the Als2cr12 gene. *Gene Expr Patterns*, 2011, 11(5–6): 327–333. [DOI]
- [51] Modarressi MH, Behnam B, Cheng M, Taylor KE, Wolfe J, van der Hoorn FA. Tsga10 encodes a 65-kilodalton protein that is processed to the 27-kilodalton fibrous sheath protein. *Biol Reprod*, 2004, 70(3): 608–615. [DOI]
- [52] Hamada K, Shimizu T, Matsui T, Tsukita S, Hakoshima T. Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. *EMBO J*, 2000, 19(17): 4449–4462. [DOI]
- [53] Nakamura N, Dai QS, Williams J, Goulding EH, Willis WD, Brown PR, Eddy EM. Disruption of a spermatogenic cell-specific mouse enolase 4 (eno4) gene causes sperm structural defects and male infertility. *Biol Reprod*, 2013, 88(4): 90. [DOI]
- [54] Hoppeler-Lebel A, Celati C, Bellett G, Mogensen MM, Klein-Hitpass L, Bornens M, Tassin AM. Centrosomal CAP350 protein stabilises microtubules associated with the Golgi complex. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 18): 3299–3308. [DOI]
- [55] Weidemann M, Schuster-Gossler K, Stauber M, Wrede C, Hegermann J, Ott T, Boldt K, Beyer T, Serth K, Kremmer E, Blum M, Ueffing M, Gossler A. CFAP157 is a murine downstream effector of FOXJ1 that is specifically required for flagellum morphogenesis and sperm motility. *Development*, 2016, 143(24): 4736–4748. [DOI]
- [56] Krausz C, Escamilla AR, Chianese C. Genetics of male infertility: from research to clinic. *Reproduction*, 2015, 150(5): R159–R174. [DOI]
- [57] Ruan J, Du WD. Male infertility and gene defects. *Hereditas(Beijing)*, 2010, 32(5): 411–422.  
阮健, 杜卫东. 男性不育与基因缺陷. 遗传, 2010, 32(5): 411–422. [DOI]

(责任编辑: 苗龙)