

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2015.02.007

害虫遗传不育技术中致死基因的研究与应用

王玉生¹⁺, 蔡玉音^{1,2+}, 武 强¹, 严 盈^{1,3,4}, 张桂芬¹, 刘桂清^{1,5}, 万方浩^{1,6*}

¹中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193; ²天津市宝坻区大白街道办事处农业办公室, 天津 301802; ³Department of Entomology, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA, 27606; ⁴Genetic Engineering and Society Center and W.M. Keck Center for Behavioral Biology, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA, 27606; ⁵广东省昆虫研究所, 广东 广州 510260; ⁶青岛农业大学农学与植物保护学院, 山东 青岛 266109

摘要: 基于遗传修饰手段的昆虫不育技术(SIT)作为一类物种特异、环境友好、科学高效的新兴策略,在害虫防治中具有广阔的应用前景。释放携带显性致死基因昆虫的技术(RIDL)是改进传统 SIT 的重要手段之一,主要包括四环素调控系统、特异性启动子、性别特异剪接系统和特异性致死基因等重要元件,其中根据不同昆虫的特点选择合适的特异性致死基因对于构建遗传不育品系至关重要。这些致死基因或受到阻遏调控系统的控制、或特异的在雌虫中表达、亦或直接作用于 X 染色体,导致后代在特定发育阶段或特定性别中条件致死。本文综述了 *RHG* 家族(*reapr*、*hid*、*grim*、*melchior*)细胞凋亡基因、转录激活因子 tTA 及 *Nip1Dm*、归巢内切酶基因等在害虫遗传不育技术中的研究和应用,讨论了特定致死基因的效应机理和应用特点,并对其可能的发展方向进行了展望。由于不同效应基因的致死作用和调控机理尚未完全明晰,因此深入研究特异性致死基因的凋亡机制和在不同物种中的兼容作用,将为害虫遗传防控提供更多的研究思路 and 手段。

关键词: 昆虫不育技术; 致死基因; 细胞凋亡基因; 转录激活因子; 归巢内切酶基因

Used of lethal genes in sterile insect technique for pest control: a review

Yu-sheng WANG¹⁺, Yu-yin CAI^{1,2+}, Qiang WU¹, Ying YAN^{1,3,4}, Gui-fen ZHANG¹,
Gui-qing LIU^{1,5}, Fang-hao WAN^{1,6*}

¹ State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; ²Agricultural Office of Dabai Sub-district Administration, Tianjin 301802, China; ³ Department of Entomology, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA, 27606; ⁴ Genetic Engineering and Society Center and W.M. Keck Center for Behavioral Biology, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA, 27606; ⁵ Guangdong Entomological Institute, Guangzhou, Guangdong 510260, China; ⁶ College of Agriculture and Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China

Abstract: The sterile insect technique (SIT) is a species-specific, environment-friendly, and highly effective tool for insect pest control. Currently, release of insects carrying a dominant lethal gene (RIDL) is one of the most studied techniques that were developed to enhance traditional SIT. A standard RIDL system includes a tet-off system, gene specific promoters, components involved in sex determination and the effective lethal genes. Specifically, selecting the proper lethal genes is a very important step that determines both efficiency and stability of RIDL strain. The lethal genes can be repressible, or specifically expressed in females, or directly cut the X chromosome, all of which way lead to repressible/embryo-specific/female-specific lethality of offspring. Here the

收稿日期 (Received): 2015-01-10 **接受日期 (Accepted):** 2015-02-07

基金项目: 环保公益性行业科研专项(201409061); 中德合作科研项目[PPP 项目, 留金欧(2012)6014 和留金欧(2014)6013]; 农业部 2014 年农作物病虫害鼠害疫情监测与防治(外来入侵生物防治)项目; 科技导报社博士生创新研究资助计划(kjdb201001-3)

作者简介: 王玉生, 男, 硕士研究生。研究方向: 入侵昆虫遗传控制。E-mail: yushengwang01@163.com; 蔡玉音, 女, 硕士研究生。研究方向: 昆虫生物化学与分子生物学。E-mail: caiyuyin1990@163.com

* 同等贡献作者(The two authors contributed equally to this work)。

* 通讯作者(Author for correspondence), E-mail: wanfanghao@caas.cn

studies and applications of cell death genes such as *RHG* family (*reapr*, *hid*, *grim*, *michelob_x*), tetracycline transcriptional activator (tTA), *Nipp1Dm* and *homing endonuclease* genes (*HEG*) are reviewed. The function mechanism and application feature of certain lethal genes are discussed. More research on the structural character and regulation pathway of important lethal genes are needed to further understand cell apoptosis, as well as the development of new tools for genetic pest management.

Key words: sterile insect technique; lethal genes; cell death genes; tetracycline transcriptional activator; *homing endonuclease* genes

近年来,昆虫遗传修饰技术的飞速发展为农林害虫和卫生害虫的防治提供了更为新颖有效的思路,特别是与昆虫不育技术(Sterile insect technique, SIT)相结合,具有环境友好、物种特异和防治高效等优点,弥补了传统 SIT 技术的缺点,在害虫防治方面取得了一系列进展,形成了以释放携带显性致死基因昆虫(Release of insects carrying a dominant lethal, RIDL)技术为代表的害虫遗传控制新策略。RIDL 通过向害虫种群中引入携带致死基因纯合子的昆虫,在与野生型昆虫交配后产生的后代中,这些致死基因或受到阻遏调控系统的控制、或特异地在雌虫中表达、亦或直接作用于 X 染色体,导致后代在特定条件/发育阶段/性别中致死,从而引起害虫种群瓦解,达到高效控制重大农林害虫的目的。构建一个成功的 RIDL 品系需要特异的调控元件、特异的致死基因和高效的遗传转化系统等关键因子。

基于四环素系统(tet-off)调控致死基因的表达以实现靶标昆虫的特异性致死,是目前 RIDL 品系构建中最常用的昆虫遗传调控系统。tet-off 依据的原理是:大肠杆菌 *E.coli* 转座子 Tn10 的四环素阻遏因子(Tetracycline repressor, tetR)与四环素结合,导致其不能阻抑四环素抗性操纵子(Tetracycline-resistance operon, tetO),下游转录随即启动(廖伟, 1998)。Gossen & Bujard(1992)将 tetR 的部分序列与单纯疱疹病毒 VP16 的转录活化区域组成四环素转录激活因子(Tetracycline transcriptional activator, tTA),tTA 与特异性启动子构建为 tet-off 驱动载体,将 tetO 与 CMV 启动子构成四环素响应元件(Tetracycline response element, TRE),TRE 与致死基因组合成效应载体,由此便得到了 tet-off 双元件系统。缺乏四环素时,tTA 与 tetO 结合引发致死基因表达;四环素存在时,tTA 与四环素结合而不与 tetO 结合,进而无法激活下游基因的表达。

特异致死基因的筛选对于构建昆虫种群遗传调控系统至关重要,这些基因通常需要满足以下几个特征:能被阻抑调控、能在特异性启动子作用下

在特异性的组织/发育时期/性别中表达、表现为显性致死。目前在害虫遗传调控技术中最常用的致死基因主要包括细胞凋亡基因(如 *reapr*、*hid*、*grim*、*michelob_x* 等 *RHG* 家族基因)、转录激活因子 tTA、*Nipp1Dm* 和归巢内切酶基因等,本文将分别讨论这几类致死基因的特点及其在不同物种中的应用情况(表 1)。

1 细胞凋亡相关基因

细胞凋亡(Apoptosis)即 I 型细胞程序性死亡(Programmed cell death, PCD)是由多层次严格调控的细胞自主有序死亡的过程,在机体的生命活动中具有重要的生物学意义(Bakeeva *et al.*, 2007; Kerr *et al.*, 1972; Wyllie, 1980),与多种疾病的发生密切相关(张金叶, 2011; Vila & Przedborski, 2003)。分子生物学的飞速发展使人们对细胞凋亡有了深入理解,细胞凋亡涉及一系列基因的激活、表达和调控等(Liu *et al.*, 1996; Morizane *et al.*, 2005),迄今其复杂的分子机理尚不完全明晰。

半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(CysteinyI aspartate specific proteinase, Caspase)是细胞凋亡调控网络的核心,分为起始和效应 2 类。死亡受体和线粒体通路是依赖 Caspase 细胞凋亡的主要途径(Juo *et al.*, 1998; Lavrik *et al.*, 2005; Li & Yuan, 2008)。哺乳动物中线粒体释放的细胞色素 C(Cytochrome, CytC)与凋亡蛋白酶活化因子(Apoptosis protease activating factor 1, Apaf-1)结合,形成凋亡体,激活起始 Caspase-9,进而活化效应 Caspase-3 和 Caspase-7,启动 Caspase 级联反应(图 1)(Cashio *et al.*, 2005; Chipuk & Green, 2008; Fritz *et al.*, 2006; Slee *et al.*, 1999)。凋亡蛋白抑制因子(Inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)家族具有抗凋亡作用,能阻断 CytC 释放,其 baculovirus IAP repeat (BIR)结构域与凋亡体小亚基结合从而抑制 Caspase-9 (LaCasse *et al.*, 1998; Ryoo *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2004)。但是当细胞接受凋亡信号时,线粒体释放的 Smac 等引起 IAPs 的泛素化,进而阻抑 IAPs 对 Caspase-9 的活性抑制(Cashio *et al.*, 2005)。模式

生物黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Meigen) 在细胞凋亡时,促凋亡基因 *RHG* 家族转录激活,引起凋亡蛋白抑制因子 DIAP1 的自我泛素化,解除其对 Caspase-9 同源物 Dronc 酶原的抑制作用,释放的 Dronc 则与 Apaf-1 的同源物 Dark (Hawkins *et al.*, 2000; Lee & Baehrecke, 2000) 结合活化,进而激活与 Caspase-3,7 功能相似的 Drice 和 Dcp-1,细胞开始凋亡 (Arama *et al.*, 2006; Salvesen & Duckett, 2002; Schetelig *et al.*, 2011b; Steller, 2008; Tait *et*

al., 2004)。该过程与哺乳动物 Smac 等阻抑 IAPs 对 Caspase-9 的活性抑制类似,与哺乳动物不同的是,果蝇中 Apaf-1 的同源物 Dark 的活化不需要 CytC 参与 (Dorstyn *et al.*, 2002; Jiang & Wang, 2000; Li *et al.*, 1997; Varkey *et al.*, 1999)。*RHG* 家族的 *reaper*、*hid* 和 *grim* 基因分别控制不同的信号通路 (Danial & Korsmeyer, 2004),是果蝇细胞凋亡最主要的调控因子,与凋亡抑制蛋白协调作用共同决定细胞凋亡 (图 1)。

表 1 昆虫遗传控制中的致死基因
Table 1 Lethal genes used in sterile insect technique

致死基因 Lethal genes	表型 Performance	物种 Species	参考资料 References
<i>hid</i>	胚胎致死	黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i> (Meigen)	Horn & Wimmer, 2002
	Embryo-specific lethality	地中海实蝇 <i>Ceratitis capitata</i> (Wiedemann)	Schetelig <i>et al.</i> , 2009a
		加勒比按实蝇 <i>Anastrepha suspensa</i> (Loew)	Schetelig & Handler, 2012a
<i>Nipp1Dm</i>	雌性特异胚胎致死	加勒比按实蝇 <i>Anastrepha suspensa</i>	Schetelig & Handler, 2012b
	Female-specific embryonic lethality	地中海实蝇 <i>Ceratitis capitata</i>	Ogaugwu <i>et al.</i> , 2013
	雌性特异致死	斯氏按蚊 <i>Anopheles stephensi</i> (Liston)	Marinotti <i>et al.</i> , 2013
<i>micelob_x</i>	Female-specific flightless	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i> (L.)	Fu <i>et al.</i> , 2010
	雌性特异致死	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	Fu <i>et al.</i> , 2010
	Female-specific flightless		
<i>tTA</i>	特异致死	地中海实蝇 <i>Ceratitis capitata</i>	Gong <i>et al.</i> , 2005
	Repressible lethality	棉红铃虫 <i>Pectinophora gossypiella</i> (Saunders)	Morrison <i>et al.</i> , 2012
		埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	Phuc <i>et al.</i> , 2007
	雌性特异致死	地中海实蝇 <i>Ceratitis capitata</i>	Fu <i>et al.</i> , 2007
	Female-specific lethality	橄榄实蝇 <i>Bactrocera oleae</i> (Gmelin.)	Ant <i>et al.</i> , 2012
		铜绿蝇 <i>Lucilia cuprina</i> (Wiedemann)	Li <i>et al.</i> , 2014
		小菜蛾 <i>Plutella xylostella</i> L.	Jin <i>et al.</i> , 2013
		棉红铃虫 <i>P. gossypiella</i>	Jin <i>et al.</i> , 2013
		家蚕 <i>Bombyx mori</i> L.	Tan <i>et al.</i> , 2013
<i>HEG</i>	雌性特异致死	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	Fu <i>et al.</i> , 2010; Labbé <i>et al.</i> , 2012
	Female-specific flightless	白纹伊蚊 <i>Aedes albopictus</i> (Skuse)	Labbé <i>et al.</i> , 2012
	雌性特异胚胎致死	冈比亚按蚊 <i>Anopheles gambiae</i> (L.)	Galizi <i>et al.</i> , 2014;
	Female-specific embryonic lethality		Windbichler <i>et al.</i> , 2008

1.1 *hid* 基因

头部退化缺陷基因 (Head involution defective, *hid*), 又称 *wrinkled* (*W*) 基因。果蝇的 *reaper*、*hid*、*grim* 基因均位于其 3 号染色体的 75C11, 2 基因座中 (White *et al.*, 1994)。Grether *et al.* (1995) 通过克隆得到了果蝇 *hid* 基因, 并对 *hid* 的生物信息学及其在细胞凋亡过程中的功能等进行了详细研究。结果表明, 果蝇 *hid* 蛋白由 410 个氨基酸残基组成, 其 N-末端有一段 RHG 家族蛋白相对保守的 IAP-binding-motif (IBM) 结构域, 能够与果蝇凋亡蛋白抑制因子 DIAP1 等中的 BIR 结构域特异结合, 解除其对 Caspase 的阻抑 (Yin & Thummel, 2004; Zachariou

et al., 2003)。Caspase 诱导的细胞开始凋亡, 是 *hid* 特异性诱导凋亡的必要条件 (Schetelig *et al.*, 2011b); 同时 N-末端存在 *grim helix 3* (GH3) 基序, 有助于 *hid* 在线粒体的定位, 使其在细胞凋亡中发挥辅助作用, 与 IBM 协同促进细胞凋亡; IBM 和 GH3 的共同存在使细胞凋亡效果明显提高 (Bryant *et al.*, 2009)。研究证实, 加勒比按实蝇 *Anastrepha suspensa* (Loew) 和果蝇的 IBM、GH3 缺失, 能大幅降低细胞凋亡效果 (Schetelig *et al.*, 2011b)。hid 蛋白还是丝裂原激活的蛋白激酶信号通路 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) 的靶分子, 果蝇和加勒比按实蝇的 *hid* 蛋白有若干个 MAPK 磷酸化活

性位点,MAPK 可能通过 *yan* 和 *pnt* 等转录调节因子抑制 *hid* 的转录,阻断下游细胞凋亡(Bergmann *et al.*, 1998、2002)。将果蝇 *hid* 基因的 5 个磷酸化位点突变后,*Dm hid^{Ala5}* 比没有突变的 *hid* 基因的致死效率高(Horn & Wimmer, 2002)。此外,microRNA 和转录因子 *E2F* 能分别与果蝇 *hid* 的 3'UTR 和 5' 增强子区域结合,调节其活性(Brennecke *et al.*, 2003; Tanaka-Matakatsu *et al.*, 2009)。

Grether *et al.* (1995) 研究发现,*hid* 突变体胚胎中的细胞凋亡明显减少,导致中枢神经系统产生大量额外细胞;用 *hsp70* 的启动子表达 *hid* 时发现,*hid* 能诱导野生型和 *hid* 缺陷的 H99 果蝇的胚胎细胞凋亡,且在胚胎细胞凋亡处能检测到其 mRNA。在眼部特异性启动子的作用下,*pGMR-hid* 在果蝇视网膜处能异位表达并导致眼睛消融,而凋亡抑制蛋

白 p-35 的共表达则抑制 *hid* 基因诱导的凋亡。*hid* 基因表达分析表明,在果蝇幼虫成熟过程中 *hid* 表达上调,使唾液腺等组织细胞迅速凋亡,形态发生变化(Yin & Thummel, 2004);然而,由于细胞凋亡在昆虫生命活动中起重要作用,因此 *hid* 基因在成虫期也会有一定水平的稳定表达;而在高日龄的果蝇成虫中 *hid* 基因表达量的上升,可能与 *hid* 基因在果蝇衰老中发挥作用有关(Zheng *et al.*, 2005)。此外,Bergmann *et al.* (1998) 发现,*hid* 不仅在果蝇注定死亡的细胞中表达,在部分正常存活的细胞中也有表达,而同属 RHG 家族的 *reaper* 和 *grim* 则仅在将要死亡的细胞中表达,这可能与 RHG 家族的不同基因控制不同的信号通路有关(Danial & Korsmeyer, 2004)。

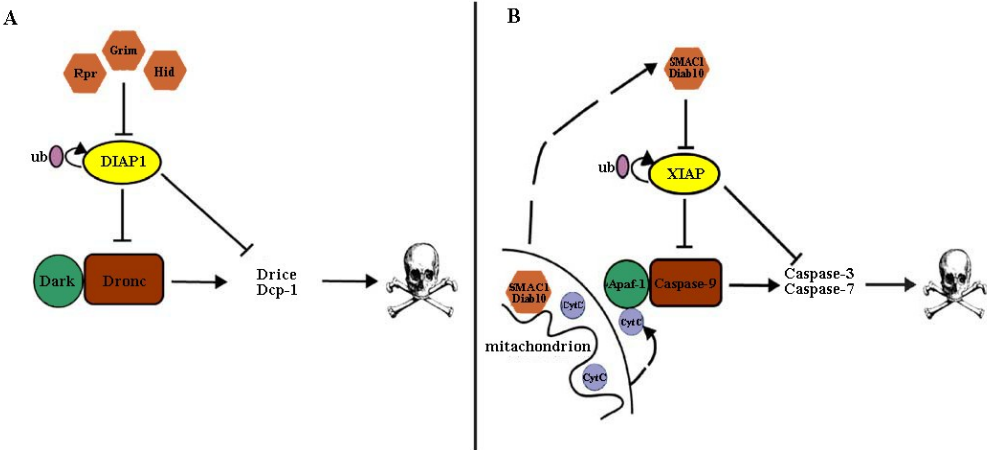


图 1 哺乳动物和果蝇细胞凋亡途径 (Cashio *et al.*, 2005)

Fig.1 Comparison of the cell death pathways in *Drosophila* (A) and mammals (B) (Cashio *et al.*, 2005)

除果蝇外, *hid* 基因已在加勒比按实蝇 (Schetelig *et al.*, 2011b) 和橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* Hendel (蔡玉音等, 2014) 等昆虫中克隆得到, 并进行了生物信息学与表达分析, 推导的氨基酸序列与果蝇 *hid* 蛋白有较高的相似性, 这表明昆虫 *hid* 蛋白存在一定的保守性, 且均具有 RHG 蛋白家族特异的 IBM 和 GH3 结构域。Schetelig *et al.* (2011b) 和蔡玉音等 (2014) 研究发现, 加勒比按实蝇和橘小实蝇幼虫化蛹过程中, 在蜕皮激素诱导下 *hid* 基因的表达迅速上调, 这与果蝇相关研究结果类似, 即在此阶段 *hid* 基因诱导细胞迅速更新, 进而完成“变态”发育。此外, Schetelig *et al.* (2011b) 还验证了加勒比按实蝇 *As-hid* 基因对加勒比按实蝇胚胎 AsE01 和果蝇 S2 细胞系的促凋亡能力, 并发

现, 同物种来源的 *hid* 基因在细胞系水平的致死效果优于异种 *hid* 基因。

目前, 应用 *hid* 基因进行 RIDL 品系的构建已经取得了长足进展。Horn & Wimmer (2002) 基于 tet-off 调控系统和 *piggyBac* 转座子基因驱动系统, 通过驱动载体中细胞囊胚期特异性表达的 *serendipity α* (*sryα*) 及 *nullo* 的启动子/增强子, 调控效应载体中磷酸化位点突变的 *Dm hid^{Ala5}* 基因表达, 得到了果蝇胚胎条件致死品系, 该品系在地中海实蝇 *Ceratitidis capitata* (Wiedenmann) 和加勒比按实蝇上 (Schetelig *et al.*, 2009a; Schetelig & Handler, 2012a) 也成功构建。实验室饲养时, 添加四环素能阻抑致死基因的表达, 释放的不育雄虫与野生雌虫交配后产生的子代由于缺乏四环素, 均在胚胎期死亡。在

此基础上,若将雌性特异剪接的内含子片段插入到效应载体以驱动 *hid* 在雌虫的特异表达,将获得雌性胚胎特异致死品系。目前,已在加勒比按实蝇 (Schetelig & Handler, 2012b) 和地中海实蝇 (Ogugwu *et al.*, 2013) 中获得成功,其中地中海实蝇纯合子品系与野生型交配后的雌性后代全部在卵期死亡,获得的单一雄性 RIDL 品系与 SIT 结合将有助于实现目标害虫的有效防控。

1.2 reaper 基因

果蝇 3 号染色体的 75C11,2 区段为其胚胎凋亡所必需,该区段的缺失将抑制细胞凋亡的产生, *reaper* 基因是在该区段克隆的第一个细胞凋亡调控基因 (White *et al.*, 1994)。目前, *reaper* 基因已在黑腹果蝇 (White *et al.*, 1994)、家蚕 *Bombyx mori* L. (Bryant *et al.*, 2009)、加勒比按实蝇 (Schetelig *et al.*, 2011b) 和铜绿蝇 *Lucilia cuprina* (Gmelin.) (Chen *et al.*, 2004) 等昆虫中克隆得到,并对其进行功能研究。*reaper* 基因缺失的果蝇胚胎与 *hid* 基因缺陷时类似,细胞凋亡明显受抑,中枢神经系统也有大量额外细胞产生, *reaper* 基因表达则恢复细胞凋亡 (White *et al.*, 1994)。在野生型胚胎中, *reaper* 基因在注定死亡的细胞中特异表达,与 *hid* 基因在部分正常细胞中也有所表达不同 (Bergmann *et al.*, 1998)。此外, *reaper* 基因在眼部的异位表达也具有与 *hid* 基因类似的结果,能导致眼睛消融。凋亡抑制蛋白 p-35 蛋白的共表达则抑制 *reaper* 基因的活性 (Chen *et al.*, 1996; Grether *et al.*, 1995)。同时, *reaper* 基因还参与外界因素诱导的细胞凋亡, X 射线、紫外线和蜕皮激素等都能刺激果蝇中 *reaper* 基因的表达 (Liu *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2008)。

reaper 蛋白不仅能阻抑果蝇 DIAP1 等凋亡抑制蛋白对细胞凋亡的抑制能力,还可激活 DIAP1 的泛素化,降解或抑制 DIAP1 的翻译 (Holley *et al.*, 2002),使 DIAP1 不能阻抑 Caspase 凋亡。据报道,果蝇的 Morgue、UbcD1 和 UbcD2 等泛素连接酶与 *reaper* 介导的 DIAP1 等的泛素化有关 (Ryoo *et al.*, 2002; Wing *et al.*, 2002)。也有研究发现,由于物种间的 *reaper* 存在一定保守性,果蝇的 *reaper* 能导致哺乳动物细胞凋亡 (Abrams, 1999),也能与非洲爪蟾属 *Xenopus* 的 Scythe 蛋白作用,而果蝇体内也存在 Scythe 类似物,表明 *reaper* 可能介导 Scythe 参与的 CytC 凋亡途径 (Thress *et al.*, 1998)。

果蝇 *reaper* 基因编码的蛋白质包括 65 个氨基酸残基 (White *et al.*, 1996),与 *hid* 蛋白的氨基酸序列相似性较低,但其 N-末端也具有 RHG 家族蛋白相对保守的 IBM 结构域,该结构域与 *reaper* 蛋白对 IAP 活性的抑制密切相关 (Yin & Thummel, 2004; Zachariou *et al.*, 2003),果蝇、加勒比按实蝇和铜绿蝇 *reaper* 蛋白 IBM 结构域的缺失能大幅影响 *reaper* 的促凋亡活性 (Chen *et al.*, 2004; Schetelig *et al.*, 2011b; Zhou *et al.*, 2005)。*reaper* 的 GH3 结构域为其在线粒体中定位所必需,在 DIAP1 的泛素化降解中也发挥重要作用 (Olson *et al.*, 2003),保证了 IBM 缺失时对细胞凋亡的诱导,也能诱导 CytC 释放并促使细胞凋亡 (Freel *et al.*, 2008)。此外, Sandu *et al.* (2010) 和 Schetelig *et al.* (2011b) 研究发现,果蝇和加勒比按实蝇的 *reaper* 蛋白均具有一个中央螺旋结构域,该结构域在 *reaper* 与 *hid* 的互作过程中发挥重要作用, *hid* 和 *reaper* 的结合使得 *reaper* 能更稳固于线粒体上,而 *hid* 与 *grim* 则不具有类似结构 (蔡玉音等, 2014; Schetelig *et al.*, 2011b), *reaper* 与 *hid* 的另一区别在于 *reaper* 的活性不受 MAPK 途径的抑制。

reaper 与 *hid* 基因的功能还具有诸多相似之处,在幼虫化蛹时 *reaper* 的表达上调,促使组织细胞迅速更新换代,完成“幼虫—蛹”的变化。*reaper* 基因的表达也能诱导正常细胞的凋亡,如 Schetelig *et al.* (2011b) 研究发现,果蝇和加勒比按实蝇的 *reaper* 基因能诱导加勒比按实蝇胚胎 AsE01 和果蝇 S2 细胞系的凋亡,且与 *hid* 基因作用结果相似,即同源物种来源的 *reaper* 基因的致死效果优于异种 *reaper* 基因。进一步研究还发现, *reaper* 和 *hid* 共表达促凋亡的作用更明显 (Schetelig *et al.*, 2011b; Yoo *et al.*, 2002),表明 *reaper* 可能与 *hid* 控制不同的凋亡途径,二者之间协同作用,共同调控细胞凋亡,进而推测 *reaper* 和 *hid* 的联合应用可能会取得更好的遗传调控效果。

1.3 grim 基因

grim 基因同样位于果蝇 3 号染色体 75C1,2 这一横跨约 300 kb 的区段上, *grim* 位于 *reaper* 和 *hid* 之间。*grim* 基因与 RHG 家族的 *hid*、*reaper* 基因功能类似,其表达也能恢复 H99 缺陷型胚胎细胞凋亡,且凋亡处能明显检测到该基因的表达 (Chen *et al.*, 1996)。*grim* 在果蝇胚胎中的表达模式与 *rea-*

per、*hid* 的表达相似,与果蝇胚胎发育过程中细胞凋亡的进程统一,不过在早期胚胎细胞凋亡时能检测到 *grim* 表达,但 *reaper* 则无;此外,*grim* 与 *reaper* 一样仅在将要死亡的细胞中表达 (Bergmann *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1996)。*grim* 基因在眼部特异性启动子的诱导下的异位表达也能导致果蝇眼睛的消融,在细胞系水平的研究也证实了 *grim* 基因的功能,其对细胞凋亡的诱导不需要 *reaper* 和 *hid* 基因的参与,且对细胞凋亡的诱导受到共表达的 p-35 蛋白的抑制 (Chen *et al.*, 1996; Clem, 2007)。据 Chen *et al.* (1996) 推测,*grim* 同 *hid* 和 *reaper* 基因一样,对凋亡的调控位于 p-35 上游,*grim*、*reaper* 和 *hid* 可能分别参与多个调控途径,以及同一下游凋亡途径,下游途径受到 p-35 蛋白的抑制。

果蝇 *grim* 编码的蛋白质序列有 138 个氨基酸残基,具有 RHG 蛋白家族保守的 IBM 和 GH3 结构域,其 N-末端 IBM 结构域发挥保守的抑制凋亡蛋白抑制因子 DIAP1 等活性的功能。其 GH3 结构域与 *reaper* 蛋白的相似性较高,功能也与 *reaper* 的 GH3 类似:辅助其在线粒体的定位,激活凋亡蛋白抑制因子 DIAP1 等的降解 (Olson *et al.*, 2003),从而解除 DIAP1 对 Drone 等 Caspase 的抑制,导致细胞凋亡。

1.4 *microlob_x* 基因

microlob_x 基因是凋亡抑制蛋白 IAP 的拮抗基因,其推导的氨基酸序列与果蝇 RHG 家族蛋白质整体序列相似度较低,但是已报道的冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (L.) (Zhou *et al.*, 2005)、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (L.) (Zhou *et al.*, 2005)、致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* Say (Liu *et al.*, 2011) 和三带喙库蚊 *Culex tritaeniorhynchus* Giles (徐瑶, 2012) 的 *microlob_x* 编码的蛋白同 RHG 蛋白一样,具有较为保守的 N-端 IBM 结构域并可归入 RHG 家族,为 *reaper* 在蚊虫中的同源基因,不过 *microlob_x* 蛋白不具有 GH3 结构域 (徐瑶, 2012; Liu *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2005)。

冈比亚按蚊、埃及伊蚊、致倦库蚊和三带喙库蚊中的 *microlob_x* 基因在果蝇的 S2 细胞或白纹伊蚊 *Aedes albopictus* (Skuse) 的 C6/36 细胞中的表达都能诱导细胞快速凋亡 (徐瑶, 2012; Liu *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2005)。埃及伊蚊 *microlob_x* 蛋

白的促凋亡活性依赖其 N-末端的 IBM 结构域,IBM 结构域的功能及促凋亡机制类似于果蝇 RHG 蛋白家族 (Bryant *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2008), 能够移除凋亡抑制蛋白 AeIAP1 对 Caspase-9 同源的 AeDrone 的阻抑,活化的 AeDrone 与 AeArk 结合,激活 Caspase-16,引发凋亡 (图 2A; Ocampo *et al.*, 2013)。当 IBM 缺失时, *microlob_x* 蛋白的促凋亡活性也丧失,这可能与 *microlob_x* 蛋白不具有 GH3 结构域的凋亡辅助作用有关 (徐瑶, 2012; Liu *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2005)。此外, *microlob_x* 在蚊虫发育和紫外照射 (Zhou *et al.*, 2005)、病毒感染 (Liu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2008) 等外因导致的细胞凋亡中起中枢调节作用。将含有埃及伊蚊 *microlob_x* 的重组 SINVs 病毒感染埃及伊蚊 C6/36 细胞系时, *microlob_x* 能引起细胞大量凋亡,阻抑病毒持续性裂解导致的感染 (Wang *et al.*, 2008)。*microlob_x* 在杆状病毒 CuniNPV 引起的致倦库蚊和埃及伊蚊细胞凋亡中也发挥重要作用,其表达与病毒感染导致的细胞凋亡进程协调 (Liu *et al.*, 2011)。*microlob_x* 参与蚊虫病毒感染诱导的免疫反应,与凋亡抑制蛋白 p-35 或 IAP 的共表达则抑制 *microlob_x* 引起的 Caspase 反应 (Liu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2005)。

细胞凋亡过程涉及一系列机理尚未完全明晰的基因的相互作用,并与其他代谢途径交互作用形成复杂的代谢调控网络,以维持机体组织稳态及正常生命活动。研究发现,细胞凋亡在昆虫防御病毒等病原体感染过程中发挥重要作用 (Clarke & Clem, 2003; Zhou *et al.*, 2005)。除 *microlob_x* 外,昆虫体内的另外一种起始 Caspase Dredd 也参与此过程 (图 2B; Ocampo *et al.*, 2013),果蝇和埃及伊蚊的 Dredd 均具有 2 个死亡结构域 (Death domain, DD),当接受死亡信号后与其配体 FADD (Fas associated death domain containing protein) 通过 DD 结构域结合,多聚化形成死亡诱导信号复合体 (Death-inducing signaling complexes, DISCs),活化 Dredd,进而开启下游细胞的凋亡。虽然果蝇和埃及伊蚊的 Dredd 均因诱导细胞凋亡作用而被发现,但近年来的研究表明, Dredd 主要在机体免疫途径发挥作用,但其机理尚未完全明晰。

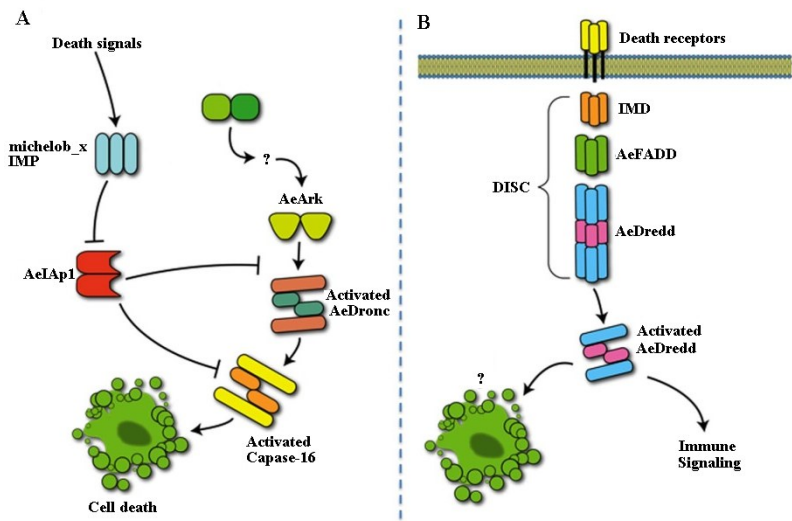


图 2 埃及伊蚊细胞凋亡途径及其参与免疫反应 (Ocampo et al., 2013)

Fig.2 Schematic of cell death and immune signaling pathways in *Aedes aegypti*(Ocampo et al., 2013)

A: *michelob_x*; B: Caspase Dredd.

michelob_x 基因在登革热的主要媒介昆虫埃及伊蚊的遗传控制研究中已经取得了显著进展。Fu et al. (2010) 采用基于 tet-off 调控系统的昆虫遗传控制技术,利用在雌蚊间接飞行肌特异性表达的肌动蛋白 *AeAct-4* 基因的启动子调控促凋亡基因 *michelob_x* 的表达,获得了无翅型不育雌蚊,后代雌蚊中 65.8%~98.3% 的个体为无翅型,雄蚊则无该表型,这一研究为医学媒介蚊虫的遗传控制提供了新思路。

2 转录激活因子 tTA 的致死效应

研究表明,低水平表达的 tTA 蛋白对细胞无害,高水平表达的 tTA 对细胞则有毒害作用,该毒害作用可能是由于高水平的 tTA 干扰依赖泛素的蛋白质降解所致。Gong et al. (2005) 利用高表达的 tTA 对细胞的毒性作用,将 tet-off 简化为单元件系统,tTA 除发挥转录激活因子功能外,还发挥致死基因功能:存在四环素时,tTA 的表达被抑制,低水平的 tTA 对昆虫无害;不存在四环素时,tTA 与 tetO 结合,进一步促进 tTA 的表达,高水平累积的 tTA 导致昆虫死亡。利用该单元件系统,目前已构建了地中海实蝇 *Ceratitis capitata* (Wiedenmann) (Gong et al., 2005)、埃及伊蚊 (Phuc et al., 2007) 和棉红铃虫 *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Morrison et al., 2012) 等害虫的胚胎条件致死品系。其中 Phuc et al. (2007) 构建的埃及伊蚊 RIDL 品系 OX513A 已经实现了田间开放条件的释放研究 (Harris et al., 2011、2012)。Fu et al. (2007) 基于 tet-off 单元件系

统,将地中海实蝇雌性特异内含子片段插入 tTA 编码区,构建了雌性特异致死品系。不含四环素时,选择性剪切内含子在雌虫体内调控下游 tTA 蛋白高表达,雄虫则不表达,从而导致雌虫死亡,由此获得的雄虫可以与 SIT 技术相结合,并进行野外释放。*transformer* 和 *doublesex* 等雌性特异剪切基因的深入研究,使得雌性特异致死品系取得了广泛成功,目前,小菜蛾 *Plutella xylostella* L.、棉红铃虫 (Jin et al., 2013)、橄榄实蝇 *Bactrocera oleae* (Gmelin.) (Ant et al., 2012)、家蚕 (Tan et al., 2013) 和铜绿蝇 (Li et al., 2014) 的相关品系已被成功构建。此外, Fu et al. (2010) 和 Labbé et al. (2012) 分别用雌蚊飞行肌特异性启动子 *Act-4* 驱动单元件系统中 tTA 的高表达,得到了埃及伊蚊和白纹伊蚊的雌蚊无翅型品系。

3 其他致死基因

3.1 *Nipp1Dm* 基因

Nipp1 (Nuclear inhibitor of protein phosphatase type 1) 是细胞核内 I 型 (丝氨酸/苏氨酸型) 蛋白磷酸酶 (Protein phosphatase type 1, PP1) 的抑制剂 (Parker et al., 2002)。PP1 能与许多蛋白质形成复合体辅助其进行亚细胞定位,调控蛋白在特异性部位发挥功能,而且与细胞周期、糖原代谢和 RNA 合成等功能密切相关 (Lin et al., 1999)。果蝇 *Nipp1Dm* 基因位于果蝇 2 号染色体 53F4-5 区段, *Nipp1Dm* 蛋白具有多个功能性结构域,其保守的中心 RVXF 结构域能专一性地结合 PP1,抑制 PP1 的

活性,导致细胞死亡,C-端结构域有 RNA 结合功能,且 Nipp1 定位于核小点 (Nuclear speckles) (Parker *et al.*, 2002)。

Parker *et al.* (2002) 分析了 *Nipp1Dm* 在果蝇胚胎、幼虫头部和成虫器官芽的表达模式,发现其在各发育阶段均表达,异位表达将导致有丝分裂异常、细胞凋亡、肌肉不能正常发育、翅发育异常和子代不育等 (Bennett *et al.*, 2003; Parker *et al.*, 2002), 上述现象同时也受到了 PP1 共表达的抑制。

Nipp1Dm 基因在蚊媒昆虫的遗传控制中也有一定的应用, Fu *et al.* (2010) 和 Marinotti *et al.* (2013) 分别在埃及伊蚊和斯氏按蚊 *Anopheles stephensi* (Liston) 中用同源的 *AeAct-4* 和 *AsAct-4* 启动子,以 *Nipp1Dm* 为致死基因,获得了雌性后代无翅的 RIDL 品系。

3.2 homing endonuclease genes

对于 XY 染色体决定型的双翅目昆虫,归巢内切酶 (Homing endonuclease genes, HEG) 也是其遗传控制品系构建的一个有应用前景的致死基因。HEG 属于自私基因,能特异地识别染色体上的 2 段特定序列,并定向插入在这 2 段序列之间,当同源染色体中的一条具有 HEG 时,HEG 酶将切割另一条染色体,并以前者为模板进行复制 (Sinkins & Gould, 2006)。由于 homing endonuclease I-Ppo I 能高度特异的靶定与 X 染色体连锁的 28S 核糖体基因的重复序列 (Nolan *et al.*, 2011), 如将 HEG 基因置于雄虫精子发生时特异表达的 $\beta 2$ tubulin 控制下,在精子发生时切割 X 染色体,当其转入胚胎时还能切割母系来源的 X 染色体,导致后代雌虫在胚胎期死亡,产生全为携带 HEG 的雄虫 (Windbichler *et al.*, 2008), 从而大幅度改变后代的性别构成,致使蚊群无法继续繁衍。Windbichler *et al.* (2008) 和 Galizi *et al.* (2014) 利用 HEG 基因分别成功构建了疟疾的蚊媒冈比亚按蚊的 RIDL 不育品系。

4 总结与展望

目前,害虫种群遗传调控研究中,常用的致死基因中促凋亡基因占据了很大比例,但在细胞凋亡过程中,凋亡抑制因子和促凋亡基因协同作用,多层次共同调控细胞凋亡通路,迄今为止其复杂的分子机理尚不完全明晰。因此,需要加大对昆虫特别是非模式物种的细胞凋亡基因研究,解析其细胞凋

亡途径及机理,该研究结果将为条件致死品系的获得奠定基础。此外,近年来归巢内切酶等的发现扩展了对双翅目昆虫遗传控制致死基因的理解,然而其机理尚需透彻剖析,在害虫控制中的效果也需要更多的实践研究。同时,遗传控制品系在工厂大规模饲养时,致死基因效应的阻抑物四环素或阿霉素的添加与否及其添加浓度也是应用遗传控制技术防治害虫需要考虑的重要因素 (Schetelig *et al.*, 2009a; Schetelig & Handler, 2012a)。果蝇等昆虫由于母体传递效应,幼虫期不添加四环素,致死基因也不会发挥致死作用,但地中海实蝇中母体的残余四环素则不起阻抑作用。四环素和阿霉素的浓度对昆虫生长发育等也有重要影响,而且也是饲养成本的重要指标。因此,优化饲养条件对致死基因发挥效应十分重要。

启动子区段的完整与否对 tTA 表达的驱动及致死效率有显著影响,而且同物种来源的启动子驱动效率更高,环境安全性也更高 (Schetelig *et al.*, 2009a; Schetelig & Handler, 2012a)。外源基因在基因组的转化插入位点同样影响致死效率,并且在不同物种表现的作用规律也不相同 (Horn & Wimmer, 2002; Schetelig *et al.*, 2009a)。因此,近年来产生的位点特异的遗传修饰技术的应用可能会收到更好的控制效率,其安全性也更高 (Schetelig *et al.*, 2009b, 2011a)。此外,致死基因的表达及作用发挥受到各因素的多层次调控,仅仅依靠生物信息学的分析和现有研究无法做出完整的判断。一方面,如果蝇、加勒比按实蝇和橘小实蝇的 hid 蛋白均存在若干个 MAPK 磷酸化活性位点,其活性会受到多种转录因子和 microRNA 的调控 (Bergmann *et al.*, 2002; Brennecke *et al.*, 2003; Tanaka-Matakatsumi *et al.*, 2009); 另一方面,高水平表达的 tTA 则可能干扰依赖泛素的蛋白质降解,导致细胞凋亡,也被广泛用作害虫遗传控制的致死基因。但其物种专一性不高,有可能通过载体转移影响其他物种 (曾保胜等, 2013)。所以,确保致死基因的物种特异性是害虫遗传控制必须考虑的前提。由于不同效应基因的致死作用和调控机理尚未完全明晰,因此深入研究特异性致死基因的凋亡机制和在不同物种中的兼容作用,将为害虫遗传防控提供更多的研究思路 and 手段。

参考文献

- 蔡玉音, 武强, 刘桂清, 吕志创, 李建伟, 张桂芬, 万方浩. 2014. 桔小实蝇细胞凋亡基因 *hid* 的克隆及不同发育阶段表达分析. *昆虫学报*, 57(6): 673–680.
- 廖伟. 1998. 一种新型的可诱导性基因表达系统: Tet-off/Tet-on 基因表达系统. *国外医学分子生物学分册*, 20(3): 97–100.
- 徐瑶. 2012. 两种库蚊细胞凋亡抑制蛋白 (*IAP*) 基因及其拮抗因子 (*Mx*) 基因的克隆和功能分析. 武汉: 华中师范大学.
- 曾保胜, 许军, 陈树清, 谭安江, 黄勇平. 2013. 昆虫种群的遗传调控. *中国科学: 生命科学*, 43(12): 1098–1104.
- 张金叶. 2011. 家蚕凋亡相关基因 *BmDronc* 和 *BmBuffy* 的克隆鉴定及功能研究. 重庆: 西南大学.
- Abrams J M. 1999. An emerging blueprint for apoptosis in *Drosophila*. *Trends in Cell Biology*, 9: 435–440.
- Ant T, Koukidou M, Rempoulakis P, Gong H F, Economopoulos A, Vontas J and Alphey L. 2012. Control of the olive fruit fly using genetics-enhanced sterile insect technique. *BMC Biology*, 10: 51.
- Arama E, Bader M, Srivastava M, Bergmann A and Steller H. 2006. The two *Drosophila* cytochrome C proteins can function in both respiration and caspase activation. *EMBO Journal*, 25: 232–243.
- Bakeeva L E, Saprunova V B, Pasyukova E G and Roshchina N V. 2007. Mitoptosis in the flight muscle of *Drosophila melanogaster*. *General Biology*, 413: 417–419.
- Bennett D, Szöör B, Gross S, Vereshchagina N and Alphey L. 2003. Ectopic expression of inhibitors of protein phosphatase type 1 (PP1) can be used to analyze roles of PP1 in *Drosophila* development. *Genetics*, 164: 235–245.
- Bergmann A, Agapite J, McCall K and Steller H. 1998. The *Drosophila* gene *hid* is a direct molecular target of Ras-dependent survival signaling. *Cell*, 95: 331–341.
- Bergmann A, Tugentman M, Shilo B Z and Steller H. 2002. Regulation of cell number by MAPK-dependent control of apoptosis: a mechanism for trophic survival signaling. *Developmental Cell*, 2: 159–170.
- Brennecke J, Hipfner D R, Stark A, Russell R B and Cohen S M. 2003. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the pro-apoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell*, 113: 25–36.
- Bryant B, Blair C D, Olson K E and Clem R J. 2008. Annotation and expression profiling of apoptosis-related genes in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38: 331–345.
- Bryant B, Zhang Y, Zhang C, Santos C, Clem R and Zhou L. 2009. A lepidopteran orthologue of reaper reveals functional conservation and evolution of IAP antagonists. *Insect Molecular Biology*, 18: 341–351.
- Cashio P, Lee T V and Bergmann A. 2005. Genetic control of programmed cell death in *Drosophila melanogaster*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 16: 225–235.
- Chen P, Nordstrom W, Gish B and Abrams J M. 1996. *Grim*, a novel cell death gene in *Drosophila*. *Genes and Development*, 10: 1773–1782.
- Chen P, Ho S I, Shi Z and Abrams J M. 2004. Bifunctional killing activity encoded by conserved reaper proteins. *Cell Death and Differentiation*, 11: 704–713.
- Chipuk J E and Green D R. 2008. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends in Cell Biology*, 18: 157–164.
- Clarke T E and Clem R J. 2003. Insect defenses against virus infection: the role of apoptosis. *International Reviews of Immunology*, 22: 401–424.
- Clem R J. 2007. Baculoviruses and apoptosis: a diversity of genes and response. *Current Drug Targets*, 8: 1069–1074.
- Danial N N and Korsmeyer S J. 2004. Cell death: critical control points. *Cell*, 116: 205–219.
- Dorstyn L, Read S, Cakouros D, Huh J R, Hay B A and Kumar S. 2002. The role of cytochrome c in caspase activation in *Drosophila melanogaster* cells. *The Journal of Cell Biology*, 156: 1089–1098.
- Freel C D, Richardson D A, Thomenius M J, Gan E C, Horn S R, Olson M R and Kornbluth S. 2008. Mitochondrial localization of reaper to promote inhibitors of apoptosis protein degradation conferred by GH3 domain-lipid interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 283: 367–379.
- Fritz J H, Ferrero R L, Philpott D J and Girardin S E. 2006. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nature Immunology*, 7: 1250–1257.
- Fu G L, Condon K C, Epton M J, Gong P, Jin L, Condon G C, Morrison N I, Dafa'alla T H and Alphey L. 2007. Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing. *Nature Biotechnology*, 25: 353–357.
- Fu G L, Lees R S, Nimmo D, Aw D, Jin L, Gray P, Berendonk T U, White-Cooper H, Scaife S, Phuc H K, Marinotti O, Jasinskiene N, James A A and Alphey L. 2010. Female-specific flightless phenotype for mosquito control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107: 4550–4554.
- Galizi R, Doyle L A, Menichelli M, Bernardini F, Deredec A,

- Burt A, Stoddard B L, Windbichler N and Crisanti A. 2014. A synthetic sex ratio distortion system for the control of the human malaria mosquito. *Nature Communications*, 5: 3977, doi: 10.1038/ncomms4977.
- Gong P, Epton M J, Fu G L, Scaife S, Hiscox A, Condon K C, Condon G C, Morrison N I, Kelly D W, Dafa'alla T, Coleman P G and Alphey L. 2005. A dominant lethal genetic system for autocidal control of the Mediterranean fruitfly. *Nature Biotechnology*, 23: 453–456.
- Gossen M and Bujard H. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 5547–5551.
- Grether M E, Abrams J M, Agapite J, White K and Steller H. 1995. The head involution defective gene of *Drosophila melanogaster* functions in programmed cell death. *Genes and Development*, 9: 1694–1708.
- Harris A F, Nimmo D, McKemey A R, Kelly N, Scaife S, Donnelly C A, Beech C, Petrie W D and Alphey L. 2011. Field performance of engineered male mosquitoes. *Nature Biotechnology*, 29: 1034–1037.
- Harris A F, McKemey A R, Nimmo D, Curtis Z, Black I, Morgan S A, Oviedo M N, Lacroix R, Naish N, Morrison N I, Collado A, Stevenson J, Scaife S, Dafa'alla T, Fu G L, Phillips C, Miles A, Raduan N, Kelly N, Beech C, Donnelly C A, Petrie W D and Alphey L. 2012. Successful suppression of a field mosquito population by sustained release of engineered male mosquitoes. *Nature Biotechnology*, 30: 828–830.
- Hawkins C J, Yoo S J, Peterson E P, Wang S L, Vernooy S Y and Hay B A. 2000. The *Drosophila* caspase DRONC cleaves following glutamate or aspartate and is regulated by DIAP1, HID, and GRIM. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 27084–27093.
- Holley C L, Olson M R, Colón-Ramos D A, Ramos C and Kornbluth S. 2002. Reaper eliminates IAP proteins through stimulated IAP degradation and generalized translational inhibition. *Nature Cell Biology*, 4: 439–444.
- Horn C and Wimmer E A. 2002. A transgene-based, embryo-specific lethality system for insect pest management. *Nature Biotechnology*, 21: 64–70.
- Jiang X and Wang X. 2000. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 31199–31203.
- Jin L, Walker A S, Fu G, Harvey-Samuel T, Dafa'alla T, Miles A, Marubbi T, Granville D, Humphrey-Jones N, O'Connell S, Morrison N I and Alphey L. 2013. Engineered female-specific lethality for control of pest Lepidoptera. *ACS Synthetic Biology*, 2: 160–166.
- Juo P, Kuo C J, Yuan J and Blenis J. 1998. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Current Biology*, 8: 1001–1008.
- Kerr J F R, Wyllie A H and Currie A R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26: 239.
- Labbé G M C, Scaife S, Morgan S A, Curtis Z H and Alphey L. 2012. Female-specific flightless (fsRIDL) phenotype for control of *Aedes albopictus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6: e1724.
- LaCasse E C, Baird S, Korneluk R G and MacKenzie A E. 1998. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*, 17: 3247–3259.
- Lavrik I, Golks A and Krammer P H. 2005. Death receptor signaling. *Journal of Cell Science*, 118: 265–267.
- Lee C and Baehrecke E H. 2000. Genetic regulation of programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Research*, 10: 193–204.
- Li F, Wantuch H A, Linger R J, Belikoff E J and Scott M J. 2014. Transgenic sexing system for genetic control of the Australian sheep blow fly *Lucilia cuprina*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 51: 80–88.
- Li J and Yuan J. 2008. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27: 6194–6206.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula S M, Ahmad M, Alnemri E S and Wang X D. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91: 479–489.
- Lin Q, Buckler I V E S, Muse S V and Walker J C. 1999. Molecular evolution of type 1 serine/threonine protein phosphatases. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 12: 57–66.
- Liu B, Becnel J J, Zhang Y and Zhou L. 2011. Induction of reaper ortholog mx in mosquito midgut cells following baculovirus infection. *Cell Death and Differentiation*, 18: 1337–1345.
- Liu X, Kim C N, Yang J, Jemmerson R and Wang X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86: 147–157.
- Marinotti O, Jasinskiene N, Fazekas A, Scaife S, Fu G L, Mattingly S T, Chow K, Brown D M, Alphey L and James A A. 2013. Development of a population suppression strain of the human malaria vector mosquito, *Anopheles stephensi*. *Malaria Journal*, 12: 142.
- Morizane Y, Honda R, Fukami K and Yasuda H. 2005. X-linked inhibitor of apoptosis functions as ubiquitin ligase to-

- ward mature caspase-9 and cytosolic Smac/DLABLO. *Journal of Biochemistry*, 137: 125–132.
- Morrison N I, Simmons G S, Fu G L, O'Connell S, Walker A S, Dafa'alla T, Walters M, Claus J, Tang G L, Jin L, Marubbi T, Epton M J, Harris C L, Staten R T, Miller E, Miller T A and Alphey L. 2012. Engineered repressible lethality for controlling the pink bollworm, a lepidopteran pest of cotton. *PLoS ONE*, 7: e50922.
- Nolan T, Papathanos P, Windbichler N, Magnusson K, Benton J, Catteruccia F and Crisanti A. 2011. Developing transgenic *Anopheles* mosquitoes for the sterile insect technique. *Genetica*, 139: 33–39.
- Ocampo C B, Caicedo P A, Jaramillo G, Bedoya R U, Baron O, Serrato I M, Cooper D M and Lowenberger C. 2013. Differential expression of apoptosis related genes in selected strains of *Aedes aegypti* with different susceptibilities to dengue virus. *PLoS ONE*, 8: e61187.
- Ogaugwu C E, Schetelig M F and Wimmer E A. 2013. Transgenic sexing system for *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) based on female-specific embryonic lethality. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43: 1–8.
- Olson M R, Holley C L, Gan E C, Colon-Ramos D A, Kaplan B and Kornbluth S. 2003. A GH3-like domain in reaper is required for mitochondrial localization and induction of IAP degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 44758–44768.
- Parker L, Gross S, Beullens M, Bollen M, Bennett D and Alphey L. 2002. Functional interaction between nuclear inhibitor of protein phosphatase type 1 (NIPP1) and protein phosphatase type 1 (PP1) in *Drosophila*: consequences of over-expression of NIPP1 in flies and suppression by co-expression of PP1. *Biochemical Journal*, 368: 789–797.
- Phuc H K, Andreasen M H, Burton R S, Vass C, Epton M J, Pape G, Fu G L, Condon K C, Scaife S, Donnelly C A, Coleman P G, White-Cooper H and Alphey L. 2007. Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC Biology*, 5: 11.
- Ryoo H D, Bergmann A, Gonen H, Ciechanover A and Steller H. 2002. Regulation of *Drosophila* IAP1 degradation and apoptosis by reaper and ubcD1. *Nature Cell Biology*, 4: 432–438.
- Ryoo H D, Gorenc T and Steller H. 2004. Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the wingless signaling pathways. *Developmental Cell*, 7: 491–501.
- Salvesen G S and Duckett C S. 2002. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3: 401–410.
- Sandu C, Ryoo H D and Steller H. 2010. *Drosophila* IAP antagonists form multimeric complexes to promote cell death. *Journal of Cell Biology*, 190: 1039–1052.
- Schetelig M F, Caceres C, Zacharopoulou A, Franz G and Wimmer E A. 2009a. Conditional embryonic lethality to improve the sterile insect technique in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *BMC Biology*, 7: 4.
- Schetelig M F, Götschel F, Viktorinova I, Handler A M and Wimmer E A. 2011a. Recombination technologies for enhanced transgene stability in bioengineered insects. *Genetica*, 139: 71–78.
- Schetelig M F and Handler A M. 2012a. Strategy for enhanced transgenic strain development for embryonic conditional lethality in *Anastrepha suspensa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109: 9348–9353.
- Schetelig M F and Handler A M. 2012b. A transgenic embryonic sexing system for *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42: 790–795.
- Schetelig M F, Nirmala X and Handler A M. 2011b. Pro-apoptotic cell death genes, *hid* and *reaper*, from the tephritid pest species, *Anastrepha suspensa*. *Apoptosis*, 16: 759–768.
- Schetelig M F, Scolari F, Handler A M, Kittelmann S, Gasperi G and Wimmer E A. 2009b. Site-specific recombination for the modification of transgenic strains of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 18171–18176.
- Sinkins S P and Gould F. 2006. Gene drive systems for insect disease vectors. *Nature Reviews Genetics*, 7: 427–435.
- Slee E A, Harte M T, Kluck R M, Wolf B B, Casiano C A, Newmeyer D D, Wang H G, Reed J C, Nicholson D W, Alnemri E S, Green D R and Martin S J. 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *Journal of Cell Biology*, 144: 281–292.
- Steller H. 2008. Regulation of apoptosis in *Drosophila*. *Cell Death and Differentiation*, 15: 1132–1138.
- Tait S W G, Werner A B, Vries E and Borst J. 2004. Mechanism of action of *Drosophila* reaper in mammalian cells: reaper globally inhibits protein synthesis and induces apoptosis independent of mitochondrial permeability. *Cell Death and Differentiation*, 11: 800–811.
- Tan A, Fu G, Jin L, Guo A H, Li Z Q, Niu B L, Meng Z Q, Morrison N I, Alphey L and Huang Y P. 2013. Transgene-

- based, female-specific lethality system for genetic sexing of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110: 6766–6770.
- Tanaka-Mataatsuo M, Xu J, Cheng L and Du W. 2009. Regulation of apoptosis of *rbf* mutant cells during *Drosophila* development. *Developmental Biology*, 326: 347–356.
- Thress K, Henzel W, Shillinglaw W and Kornbluth S. 1998. Scythe: a novel reaper-binding apoptotic regulator. *EMBO Journal*, 17: 6135–6143.
- Varkey J, Chen P, Jemmerson R and Abrams J M. 1999. Altered cytochrome c display precedes apoptotic cell death in *Drosophila*. *The Journal of Cell Biology*, 144: 701–710.
- Vila M and Przedborski S. 2003. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, 4: 365–375.
- Wang H, Blair C D, Olson K E and Clem R J. 2008. Effects of inducing or inhibiting apoptosis on Sindbis virus replication in mosquito cells. *Journal of General Virology*, 89: 2651–2661.
- White K, Grether M E, Abrams J M, Young L, Farrell K and Steller H. 1994. Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science*, 264: 677–683.
- White K, Tahaoglu E and Steller H. 1996. Cell killing by the *Drosophila* gene reaper. *Science*, 271: 805–807.
- Windbichler N, Papathanos P A and Crisanti A. 2008. Targeting the X chromosome during spermatogenesis induces Y chromosome transmission ratio distortion and early dominant embryo lethality in *Anopheles gambiae*. *PLoS Genetics*, 4: e1000291.
- Wing J P, Karres J S, Ogdahl J L, Zhou L, Schwartz L M and Nambu J R. 2002. *Drosophila* sickle is a novel grim-reaper cell death activator. *Current Biology*, 12: 131–135.
- Wyllie A H, Kerr J F R and Currie A R. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology*, 68: 251–306.
- Yan N, Wu J W, Chai J, Li W and Shi Y. 2004. Molecular mechanisms of DrICE inhibition by DIAP1 and removal of inhibition by Reaper, Hid and Grim. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11: 420–428.
- Yin V P and Thummel C S. 2004. A balance between the diap1 death inhibitor and reaper and hid death inducers controls steroid-triggered cell death in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 8022–8027.
- Yoo S J, Huh J R, Muro I, Hong Y H, Wang L J, Wang S L, Feldman R M R, Clem R J, Müller H A J and Hay B A. 2002. Hid, rpr and grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms. *Nature Cell Biology*, 4: 416–424.
- Zachariou A, Tenev T, Goyal L, Agapite J, Steller H and Meier P. 2003. IAP-antagonists exhibit non-redundant modes of action through differential DIAP1 binding. *EMBO Journal*, 22: 6642–6652.
- Zhang Y, Lin N, Carroll P M, Chan G, Guan B, Xiao H, Yao B, Wu S S and Zhou L. 2008. Epigenetic blocking of an enhancer region controls irradiation-induced proapoptotic gene expression in *Drosophila* embryos. *Developmental Cell*, 14: 481–493.
- Zheng J, Edelman S W, Tharmarajah G, Walker D W, Pletcher S D and Seroude L. 2005. Differential patterns of apoptosis in response to aging in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 12083–12088.
- Zhou L, Jiang G H, Chan G, Santos C P, Severson D W and Xiao L. 2005. *Michelob_x* is the missing inhibitor of apoptosis protein antagonist in mosquito genomes. *EMBO Reports*, 6: 769–774.

(责任编辑:郭莹)

