

DOI: 10.13376/j.cblls/2017134

文章编号: 1004-0374(2017)10-1007-09



王强, 中国科学院动物研究所研究员, 膜生物学国家重点实验室发育信号转导研究组组长, 中国科学院大学存济医学院岗位教授, 博士生导师, 国家优秀青年科学基金获得者。现任《中国实验动物学报》及《中国比较医学杂志》副主编、中国细胞生物学会发育生物学会副会长、中国动物学会斑马鱼分会理事、北京生物化学与分子生物学会青年委员会副主任委员、中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会基础与转化学组委员。主要研究方向是 TGF- β 、Wnt 等重要信号通路在胚胎中内胚层诱导、背腹体轴建立和咽部的咽囊、软骨等相关组织器官形成中的功能及分子机制。研究组的主要研究工作包括: (1) TGF- β /Nodal 信号在胚胎早期发育中的调控机制; (2) 咽囊的形成及其在咽区组织器官发育中的功能机制。在 *Dev Cell*、*Nat Commun*、*PLoS Biol*、*Cell Res*、*Blood*、*J Neurosci*、*Mol Cell Biol*、*J Biol Chem* 等主流杂志发表多篇研究论文, 部分研究成果入选《北京市自然科学基金“十二五”期间优秀成果选编》, 并被 Faculty 1000 推荐。

Nodal/Smad2靶基因的系统鉴定及其在早期胚胎发育中的功能机制

宁国柱¹, 孟安明², 王 强^{1*}

(1 中国科学院动物研究所膜生物学国家重点实验室, 北京 100101; 2 清华大学生命科学学院膜生物学国家重点实验室/清华大学-北京大学生命科学联合中心, 北京 100084)

摘要: Nodal/Smad2 信号通路在脊椎动物胚胎中内胚层诱导及其背腹分化中发挥着主导作用, 但是在胚胎早期发育中, Nodal/Smad2 信号调控哪些靶基因表达, 这些靶基因如何在 Nodal/Smad2 信号下游发挥作用, 人们仍然所知甚少。以国家自然科学基金委员会“细胞编程与重编程的表观遗传机制”重大研究计划为依托, 王强实验室在全基因组水平上对斑马鱼胚胎原肠早期 Nodal/Smad2 信号通路的靶基因进行了系统鉴定, 并通过分析 Smad2 结合区域的其他转录因子保守的结合序列的出现频率, 鉴定了一批潜在的 Smad2 的协同转录因子。研究发现, Nodal/Smad2 的靶基因主要由转录因子、发育相关基因及重要信号通路的调控因子组成, 其中 F-actin 捆绑蛋白 Fascin1a 和鸟核苷酸交换因子 Net1 分别通过调控受体内吞与 Smad2 转录活性反馈调控 Nodal 信号转导和中内胚层形成, 而 BPTF 做为 Smad2 协同转录因子, 通过调节核小体滑动来调控 *wnt8a* 表达, 在中枢神经系统后部化过程中发挥重要作用。相关研究工作构建了 Nodal/Smad2 信号在斑马鱼中内胚层诱导及体轴建立中的分子网络, 为理解脊椎动物早期胚胎发育过程中的基因表达调控机制提供了有意义的线索。

关键词: 斑马鱼; Nodal/Smad2; 靶基因; 中内胚层诱导

中图分类号: Q132.4; Q959.3 **文献标志码:** A

收稿日期: 2017-09-05

基金项目: 国家自然科学基金委员会“细胞编程与重编程的表观遗传机制”重大研究计划 (90919058, 90919011, 91519329)

*通信作者: E-mail: qiangwang@ioz.ac.cn; Tel: 010-64807895

Global identification of Nodal/Smad2 target genes and their regulatory functions in early embryogenesis

NING Guo-Zhu¹, MENG An-Ming², WANG Qiang^{1*}

(1 State Key Laboratory of Membrane Biology, CAS Center for Excellence in Molecular Cell Science, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2 State Key Laboratory of Membrane Biology, Tsinghua-Peking Center for Life Sciences, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Nodal/Smad2 signaling pathway plays pivotal roles in mesendoderm induction and axis determination during late blastulation and early gastrulation in vertebrate embryos. However, Nodal/Smad2 direct target genes and their regulatory functions during those critical developmental stages have not been systematically identified. Supported by grants from the major research project of “Epigenetic Mechanisms of Cell Programming and Reprogramming” of National Natural Science Foundation of China, our lab systemically uncovers a large number of Nodal/Smad2 targets in early gastrulas and suggests cooperative roles of Smad2 and other transcription factors in controlling target gene transcription. We find that Nodal/Smad2 target genes are mainly composed of transcription factors, signaling molecules, and developmental regulators. Among these identified Nodal/Smad2 target genes, the actin-bundling protein Fascin1a is found to promote the trafficking of internalized receptors from clathrin-coated vesicles to early endosomes, and the guanine nucleotide exchange factor Net1 associates with Smad2 in the nucleus to increase Smad2 transcriptional activity. These positive feedback loops are required for Nodal/Smad2 signal transduction and mesendoderm formation. In addition, bromodomain and PHD finger-containing transcription factor BPTF, the largest subunit of the nucleosome remodeling factor complex, physically interacts with Smad2 to mediate nucleosome remodeling and hence *wnt8a* expression and neural posteriorization. These findings will be valuable for studying the regulatory cascades during germ layer formation and patterning of vertebrate embryos.

Key words: zebrafish; Nodal/Smad2; target genes; mesendoderm induction

胚胎早期发育是一个复杂的过程, 包括细胞分裂、细胞运动、胚层形成、体轴建立以及神经图式形成等多个方面。在这些发育过程中, Nodal、FGF、Wnt 等众多信号通路相互协调, 共同作用, 形成一个复杂的调控网络来协调这些发育进程。其中, Nodal 信号通路在中内胚层诱导及其背腹分化中发挥关键作用^[1]。Nodal 信号主要通过激活 Smad2 直接调控靶基因转录。在胚胎早期发育中, Nodal/Smad2 调控的靶基因有哪些, 它们的表达如何随时空变化, 其表达的时空特异性与 TGF- β /Nodal 信号调控的关系等问题, 是发育生物学领域所关注的国际前沿问题, 但迄今所知甚少。本实验室在斑马鱼原肠期胚胎中系统鉴定了 Nodal/Smad2 的靶基因, 并深入探讨了重要靶基因的发育功能及其对 Nodal/Smad2 信号通路的反馈调控机制。

1 Nodal信号通路

Nodal 是转化生长因子 β (Transforming growth factor β , TGF- β) 超家族的成员之一。Nodal 配体与 I 型受体 ALK4 (ActRIB) 或者 ALK7, 以及 II 型受体 ActRIIA 或者 ActRIIB 结合形成复合物, 使得 I 型

受体被激活的 II 型受体磷酸化。活化的 I 型受体进而又募集并磷酸化下游的 Smad2 和 Smad3 蛋白, 从而导致其与 Smad4 结合形成复合物。随后, Smads 蛋白复合物进入细胞核, 与其他转录因子协同调控下游基因的转录^[2]。Nodal 基因首先是在小鼠中被发现, 敲除 Nodal 基因的小鼠胚胎原肠运动受损, 缺失中内胚层^[3]。Nodal 信号通路的配体蛋白主要有 Cyclops (Cyc) 和 Squint (Sqt)。在 Nodal 与 I 型、II 型受体形成复合物的过程中, 有一类非常关键的辅助受体 EGF-CFC 家族蛋白 Oep (One-eyed pinhead), 其母源合子突变体 (MZoep) 胚胎的表型和 *cyc/sqt* 双突变体完全一致, 内胚层来源的组织几乎完全缺失, 而中胚层的组织部分缺失^[4]。Nodal 信号的胞内效应蛋白是 Smad2 和 Smad3。研究表明, Smad2 基因敲除小鼠中内胚层形成有严重缺陷, 而 Smad3 缺失的胚胎早期发育正常^[5-8]。在斑马鱼中, 将编码显性抑制突变体 DN-Smad2 的 mRNA 注射到胚胎当中, 会阻断 Nodal 信号的转导, 进而导致胚胎缺失许多中内胚层组织, 其表型类似于缺少 Nodal 信号的 MZoep 突变体^[9]。因此, 在脊椎动物早期胚胎发育过程中, Nodal 信号主要通过 Smad2 调控

靶基因表达行使其功能。

2 Nodal信号通路的调控

Nodal/Smad2 信号在胚胎发育过程中除了诱导中内胚层的形成, 还参与了左右轴不对称的决定、神经外胚层的诱导和神经后部化^[10-11]。Nodal/Smad2 虽然在胚胎早期发育中作用广泛, 但其经典信号转导通路却相对简单。因此, 胚胎细胞必须通过多种方式精密调控 Nodal 信号通路。近年来, 一系列的研究工作表明, 从配体与受体结合、受体内吞、受体对 Smad 蛋白的磷酸化以及 Smad 蛋白与协同转录因子的结合等方面, Nodal 信号的活性受到了严格的调控。Nodal 信号在斑马鱼胚胎胚盘边缘形成背腹分布的活性梯度, 背侧活性最高而腹侧活性较低。调控 Nodal 信号活性的关键性分子是一种分泌型的多肽 Lefty。在斑马鱼胚胎中, 过表达 Lefty 会导致胚胎头部、躯干的中胚层和内胚层组织缺失^[12]。Lefty 可以与 EGF-CFC 相互作用, 阻止 Nodal 信号的过度激活, 形成正常的活性梯度^[13]。Dapper2 能够与 Nodal 的 I 型受体 ALK4 结合, 促进 I 型受体通过溶酶体途径降解^[14]。Dapper2 的结合蛋白 Rock2 (Rho-associated serine/threonine kinase 2) 也能够加剧 ALK4 受体降解过程, 抑制 Nodal 信号对于中胚层的诱导^[15]。此外, Araf 激酶结合和磷酸化 Smad2 的连接区域 (linker region) 加速 Smad2 降解, 从而抑制 Nodal/Smad2 信号转导和中内胚层诱导^[16]。另外, 转录因子, 如 FoxH1、Mixer 和 p53 可以和磷酸化的 Smad2 形成复合体, 协同促进 Smad2 的转录活性^[17]。

3 Nodal/Smad2靶基因的系统鉴定

鉴于 Nodal 信号在早期胚胎发育中的重要作用, 已有一些研究者尝试鉴定表达受到 Nodal 调控的基因。有文献报道, 过表达 *sqt* 后, 在 30% 外包时期可检测到 300 多个基因的表达水平发生变化; 同样在该时期, 突变体 *MZoep* 中共有 2 045 个基因的表达水平发生改变^[18]。在斑马鱼胚盾期, 共鉴定到了 72 个受 Nodal 信号调控的基因特异表达在胚盘边缘的中内胚层区域^[19]。但是, 只有 *sqt*、*lefty1*、*pitx2a*、*foxa2*、*lhx1* 等基因的启动子或增强子可以结合 Smad2/4, 受到 Nodal 信号直接调控, 是 Nodal/Smad2 信号通路的靶基因^[1]。因此, 系统鉴定 Nodal/Smad2 的靶基因成为研究中内胚层诱导及体轴建立的关键。

本实验室利用可以特异性识别斑马鱼 Smad2 的抗体, 通过染色体免疫共沉淀和 DNA 芯片技术 (chromatin immunoprecipitation, ChIP-chip), 在全基因组水平上鉴定到了 697 斑马鱼胚胎原肠早期 Nodal/Smad2 信号通路的靶基因。在转录起始位点上游 9 kb 和 3 kb 的范围, 对 Smad2 结合位点在基因组范围上的分布进行分析, 发现 Smad2 结合位点在转录起始位点附近有一定程度富集, 但在其他区域分布较为均匀, 具有类似于增强子的分布模式。进一步的研究表明, 在 Smad2 结合位点附近, 至少有一个 Smad2/4 的 CAGAC 结合基序 (motif)。GO (gene ontology) 分析发现, 这些 Nodal/Smad2 的靶基因主要由转录因子、发育相关基因及重要信号通路的调控因子组成, 与 Nodal 信号在发育中的功能密切相关^[20]。在我们研究工作的基础上, 2014 年 Chiu 等^[21] 用爪蟾原肠胚时期胚胎进行了 Foxh1 和 Smad2/3 的 Chip-seq, 分析出上百个 Nodal 靶基因, 并进一步鉴定到一个可以通过调节 Nodal 靶基因影响人胚胎干细胞多能性的转录因子 PouV。此外, 我们的研究还为德国 Driever Wolfgang 教授提供了相关数据, 帮助其分析了斑马鱼胚胎合子基因激活的调控网络^[22]。

4 Nodal/Smad2靶基因的功能研究

在本实验室前期研究工作鉴定到的数百个 Nodal/Smad2 的靶基因中, 有数十个特异表达在中内胚层区域, 但其功能未知^[20]。因此, 我们对其中可能具有重要发育生物学功能的基因进行了深入分析, 并详细探讨了其对 Nodal/Smad2 信号通路的反馈调控机制。

4.1 Fascin1a

Fascin1 (Fscn1) 为 55 kDa 的蛋白, 属于 F-actin 捆绑蛋白 (F-actin bundling protein) 家族, 在进化上十分保守, 通常定位在与细胞运动、癌细胞转移有密切关系的丝状伪足、张力纤维和细胞膜皱褶边缘^[23]。在果蝇中, Fscn1 的同源基因 *singed* 突变体卵母细胞因 actin 束形结构变得不规则或消失, 导致胞质桥对营养物质的传递产生障碍, 引起雌性果蝇不育^[24]。在斑马鱼中, *fscn1a* 突变体的神经嵴细胞伪足数目和长度降低, 细胞迁移变慢, 导致咽弓软骨发育缺陷^[25]。Fscn1 缺失的成年小鼠中, 腹侧皮毛出现不正常的色素沉积, 黑色小鼠腹侧有不同程度的白色毛发产生, 这是由于 Fscn1 的缺失会引起早期胚胎成黑色素细胞 (melanoblast) 增殖降低, 伪足的数目

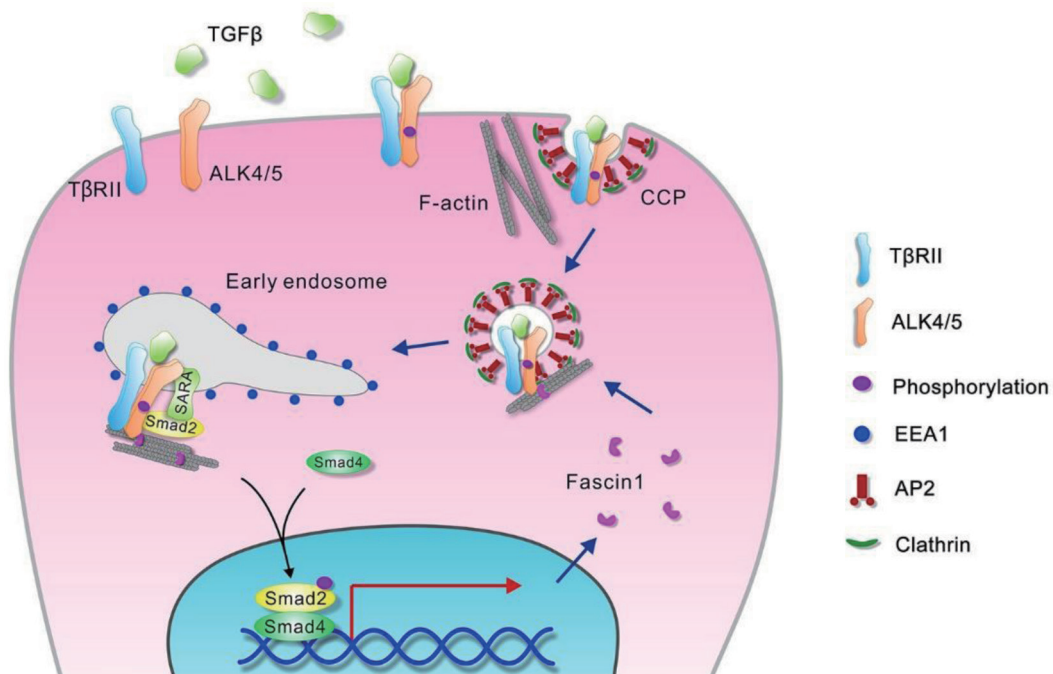
和厚度也有所下降^[26]。Fscn1 在目前所知的大多数肿瘤中高表达,参与了肿瘤细胞伪足及突触的形成,与肿瘤患者的预后不良、生存期短及转移性强密切相关,然而,其在早期胚胎发育中的功能还没有相关报道。

细胞骨架包括微管蛋白 (tubulin)、肌动蛋白 (actin) 和中间丝蛋白 (intermediate filament)。已有研究表明,微管系统参与了 TGF- β 信号通路的调控,然而,肌动蛋白有无调控功能还不清楚^[27]。与此相一致,在斑马鱼早期原肠胚时期, Nodal/Smad2 信号是 Fscn1a 表达所必需的。Fscn1 在 F-actin 骨架功能中的重要作用为研究 F-actin 是否参与了 TGF- β /Nodal 信号转导调控提供了良好的契机。我们的研究发现,在斑马鱼胚胎及哺乳动物细胞中, Fscn1 及其 F-actin 结合活性对于激活 Nodal/Smad2 信号通路和内胚层的形成至关重要。Fscn1 能够特异地与 TGF- β 信号 I 型受体结合,作为一个衔接分子介导了 I 型受体和 F-actin 间的相互作用,并且促进内吞后的 I 型受体从 clathrin 内吞泡转运至早期溶酶体,增强 TGF- β 信号转导,诱导中内胚层形成 (图 1)^[28]。我们的研究首次发现了 TGF- β 受体内吞过程是依赖于肌动蛋白 F-actin 的。鉴于 Fscn1 和 TGF- β 信号在肿瘤形成和发展中的重要作用,我们发现的 Fscn1 和 TGF- β /Nodal 信号之间的这种正反馈调控

机制对于肿瘤医学方面也具有重要的启示。

4.2 Net1a

鸟苷酸交换因子 Net1 (neuroepithelial cell transforming gene 1) 最初是从神经上皮瘤中分离鉴定出来的, N 端含有一系列的核定位信号,中间为一个 DH-PH 结构域, C 端含有一个保守的 PDZ 结合基序^[29]。其 N 端缺失的突变型可以转化 NIH3T3 细胞,因此被认为是癌基因^[30]。现有的研究表明, Net1 蛋白是 RhoA 蛋白特异性的鸟苷酸交换因子 (GEFs),通过 DH-PH 结构域调节 GTP 与 Rho A 蛋白的结合,调控细胞骨架的形成、细胞的迁移、细胞与细胞之间以及细胞与基质之间的黏附等^[31-32]。野生型的 Net1 由于核定位信号的存在,定位于细胞核,而缺失核定位信号的 Net1 突变体分布于细胞质中,从而活化 Rho A 蛋白^[33-34]。有研究报道, TGF- β 信号可以激活 Net1 的表达,并促使其定位于细胞质,通过调控 Rho A 活性促进人视网膜色素上皮细胞向间充质细胞转化^[35]。在爪蟾中, Net1 与 Dishevelled 相互作用并激活 RhoA,从而调控原肠运动^[36];在小鼠中主要是调控乳腺上皮细胞的增殖和分化^[37]。斑马鱼 *net1a* 是我们鉴定到的 Nodal/Smad2 的另一个靶基因,特异高表达在胚盾,在中内胚层区域也有较低水平的表达,极有可能有着未知的重要的发育生物学功能。



T β R β II: TGF- β type II receptor; CCP: clathrin-coated pit; AP2: assembly polypeptide 2

图1 Fscn1调控TGF- β 受体内吞的分子机制模式图

母源 Wnt/ β -catenin 信号通路是背部组织中心形成的关键因素, 通过激活 Chordin、Follistatin、Noggin 等 BMP 信号抑制因子在背部表达并分泌, 拮抗来自腹部的 BMP 信号, 使其形成一定的浓度梯度来指导胚胎背腹轴的建立^[38]。在斑马鱼胚胎发育至 128 细胞期, β -catenin 已经在背侧胚盘边缘细胞核中积聚, 但是一直到中囊胚转换 (mid-blastula transition, MBT) 时期后才激活下游基因表达^[39-40]。有研究表明, Wnt/ β -catenin 靶基因启动子区 DNA 序列及组蛋白的表观遗传修饰在 MBT 时期的改变是其表达的基础^[41-42], 但对于 β -catenin 自身的转录活性在 MBT 前后是否发生变化, 变化的分子机制是什么却知之甚少。本实验室的研究发现, 斑马鱼 *net1a* 是 MBT 前后最早表达的合子基因之一, 特异表达于预定背部组织中心。抑制 *net1a* 表达, 斑马鱼背部组织中心的形成受到严重的影响, 背部组织明显减少。胚胎和哺乳动物细胞中的实验表明, Net1 及其鸟核苷酸交换因子活性对于 Wnt/ β -catenin 信号转导和背部组织发育不可或缺。进一步的研究发现, Net1 通过激活 RhoA 家族的 G 蛋白, 干扰 PAK1 二聚体的形成, 激活 PAK1 激酶活性, 从而磷酸化 β -catenin 675 位丝氨酸, 抑制 β -catenin 与组蛋白去乙酰化酶 HDAC 结合, 促进 Wnt 靶基因转录, 在胚胎背部组织中心形成和背腹轴建立过程中发挥重要作用^[43]。此项研究揭示了在胚胎发育过程中, Net1 所调控的 β -catenin 675 位丝氨酸的磷酸化修饰, 是 MBT 后 β -catenin 转录活性增强, 激活下游基因表达的必要条件 (图 2)。

net1a 是 Nodal 信号的靶基因, 在胚盾高表达, 中内胚层区域也有表达^[43]。TGF- β /Nodal 的靶基因经常参与信号转导的反馈调节^[44]。因此, 我们推测 Net1 可能也会参与 Nodal 信号的调节, 影响中内胚层的形成。进一步的研究发现, 在胚胎及哺乳动物细胞中敲低 Net1 后, 抑制了 TGF- β /Nodal 信号活性, 致使中内胚层及其衍生器官的形成产生严重缺陷。进一步的研究表明, 这与 Net1 鸟核苷酸交换因子活性无关, 定位于细胞核内的 Net1 通过与 Smad2 结合, 增强 Smad2 招募组蛋白乙酰化酶 p300 的能力, 促进胚胎中内胚层的形成^[45]。因此, 在脊椎动物早期胚胎发育过程中, Net1 分别作为鸟核苷酸交换因子和适配体蛋白, 整合了 Wnt/ β -catenin 和 Nodal/Smad2 两种极为重要的信号通路, 在体轴建立和中内胚层形成过程中扮演了关键的角色。鉴于 TGF- β 、Wnt 及 Net1 在肿瘤细胞增殖、侵袭和转移中的重要作用, 这项研究结果还为了解相关肿瘤发生发展机制及肿瘤诊治开拓了新的思路。

4.3 MicroRNAs

MicroRNA 是真核生物中一类长度为 20~24 nt 的非编码小分子 RNA, 种属间高度保守, 其表达具有组织特异性, 参与了胚胎发育和组织分化等重要的生命活动^[46]。MicroRNAs 对脊椎动物发育非常重要。缺失母源和合子 Dicer 基因的斑马鱼突变体 (MZdicer) 不能产生成熟的 microRNAs, 在胚层细胞分化、体节形成等过程中出现发育缺陷^[47]。Dicer 缺失的小鼠在原肠胚形成中就会死亡, 而且缺少多能干细胞^[48]。我们鉴定到的 Nodal/Smad2 的靶基因中

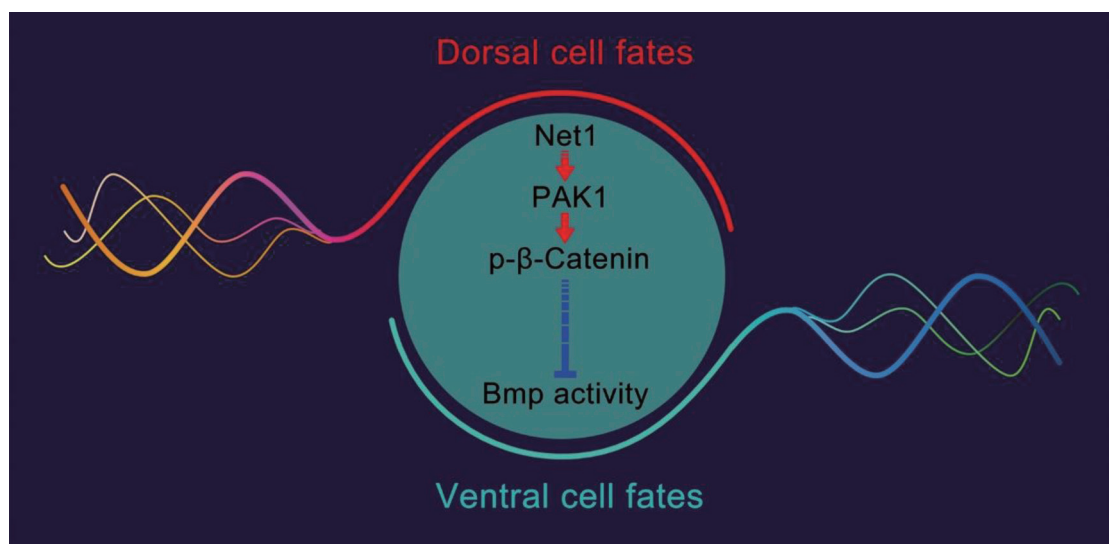


图2 Net1调控的 β -catenin S675磷酸化促进背腹轴建立模式图

也有 microRNAs, 其中包括 *mir-206* 和 *mir-92*。因此, 我们对这两个 microRNAs 的发育生物学功能进行了研究。

脊椎动物胚胎在原肠期进行大规模的、协调一致的形态发生运动, 发生细胞重排, 形成胚胎的雏形, 称为原肠运动。原肠运动是形成胚胎早期发育蓝图的一个关键动力。其中, 同时又独立进行的汇聚 (convergence) 和延伸 (extension) 运动对于胚胎的形态发生起着核心作用。多项研究表明, TGF- β 作为生长因子, 起着促使肿瘤浸润转移的作用。然而, TGF- β /Nodal 信号是否调控胚胎原肠期的细胞运动还未可知。我们的研究发现, 作为新鉴定的 TGF- β /Nodal/Smad2 直接靶基因, *mir-206* 的表达受到 Nodal 信号调控, 并且在原肠作用时期表达水平逐渐上升。在斑马鱼胚胎中过量表达或敲低 *mir-206*, 都会特异性地导致胚胎前后轴变短、左右轴变宽, 表明汇聚延伸运动出现严重缺陷^[49]。*mir-206* 通过细胞自主性和细胞非自主性的方式影响细胞汇聚延伸运动。干扰 *mir-206* 的表达, 导致细胞突触的形成和 F-actin 的聚集显著下降。*mir-206* 靶向 *prickle1a*, 调节 JNK2 的磷酸化, 从而影响斑马鱼胚胎的汇聚延伸运动^[50]。*mir-92* 的表达也同样受到 Nodal 信号调控^[49]。有研究表明, 过表达 *mir-92a* 会使斑马鱼胚胎的内胚层减少, 而缺失 *mir-92a* 会使内胚层增加和 Kupffer's vesicle (KV 囊泡) 发育异常, 从而导致左右不对称发育缺陷。*mir-92a* 可

以直接靶向 Nodal 下游转录因子 *gata5*, 从而影响内胚层的发育^[51]。我们的研究发现 *mir-92a* 在斑马鱼咽区软骨有明显的表达, 而且敲低 *mir-92a* 会引起咽区软骨缺失。我们发现 *mir-92a* 靶向 Bmp 信号拮抗因子 *noggin3* mRNA 的编码区。敲低 *mir-92*, *noggin3* 的 mRNA 稳定性增高, 致使 Bmp 信号不足, 导致软骨前体细胞不能正常增殖、分化, 引起严重的咽软骨缺失。相反, 过表达 *mir-92a* 可促进 *noggin3* 的 mRNA 的降解, 使得 Bmp 信号在咽软骨区域活性过高, 触发细胞凋亡^[52]。该研究不仅阐明了 *mir-92a* 在软骨发育中的重要作用, 还进一步说明 Bmp 信号在咽部软骨形成过程中必须受到严格的调控, 其活性高于或低于生理水平, 都会导致严重的发育缺陷 (图 3)。

5 系统鉴定 Nodal/Smad2 协同转录因子

Smad2 需要与协同转录因子, 如 FoxH1 和 β -catenin 等一起调控靶基因的表达。通过分析 Smad2 结合区域的其他转录因子保守的结合序列的出现频率, 我们鉴定了一批潜在的 Smad2 的协同转录因子, 如 Oct1 和 Gata6。我们的研究表明, Oct1 与 Gata6 都可以与 Smad2 直接结合, Oct1 促进 Nodal 信号, 和 Smad2 一起协同增强 Nodal/Smad2 对中内胚层的诱导, 而 Gata6 对 Nodal 信号及中内胚层的形成有抑制作用^[20]。

染色质重塑蛋白 BPTF (bromodomain PHD finger

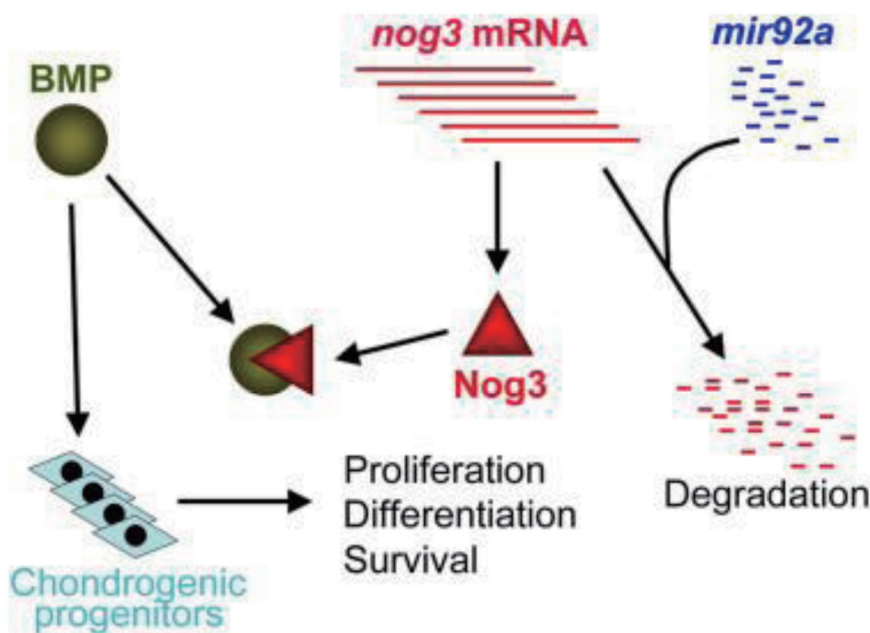


图3 *mir-92a*、*noggin3*和BMP信号通路遗传互作调节斑马鱼咽部软骨发育的模式图

transcription factor) 是核小体重塑因子复合体 (nucleosome remodeling factor complex nucleosome remodeling factor complex, NURF) 最大的亚基, 通过与其他转录因子结合, 将 NURF 招募到启动子区, 调控核小体定位, 促进基因表达。NURF 的发育生物学功能包括在果蝇中促进幼虫向成虫变态发育^[53] 和生殖干细胞的发生^[54]。在 小鼠中, 缺失 *Bptf* 会抑制外胚层、中胚层以及内胚层的形成^[55]。我们发现 BPTF 的结合序列在 *Smad2* 结合区域出现频率最高, 意味着 BPTF 是潜在的 *Smad2* 协同转录因子^[20]。以斑马鱼作为模式动物, 我们发现 *bptf* 是一个母源表达的基因, 早期广泛存在于所有胚胎组织中。敲低 *bptf* 明显地抑制了斑马鱼后部神经图式的形成。BPTF 在功能上和结构上与 *Smad2* 相互作用。BPTF 及 *Smad2* 可以独立与 *wnt8a* 启动子结合, 由于结合位点邻近, 增强了 BPTF 对其他亚基, 如 *Smarca1* 的招募。更为重要的是, 我们发现, BPTF/*Smad2* 在 TGF- β 信号通路下游通过调控 *wnt8a* 的表达, 促进神经外胚层后部化。因此, BPTF 与 *Smad2* 协同调节所结合的染色体区域的核小体滑动来调控基因表达, 从而在中枢神经系统发育过程中发挥作用 (图

4)。本研究鉴定到的 Nodal/*Smad2* 的靶基因和转录协同因子, 为后续研究 Nodal 信号在胚胎发育过程中的功能机制提供了更多理论支持。

6 结语

以“细胞编程和重编程的表观遗传机制”重大研究计划为依托, 本实验室在基因组水平上系统鉴定了原肠期 Nodal/*Smad2* 信号的靶基因和协同转录因子, 深入探讨了 *Fscn1a*、*Net1a*、*mir-206* 及 *mir-92a* 等靶基因的发育生物学功能及其反馈调控 TGF- β /*Nodal* 信号通路的分子机制。我们的研究回答了两个关键的科学问题: 第一, Nodal/*Smad2* 信号通路通过激活或抑制哪些直接的靶基因去实现其各种功能; 第二, Nodal/*Smad2* 靶基因的表达是怎样受表观遗传调控的, 与发育进程存在什么样的相关性。这些研究成果丰富了胚胎发育机理研究成果, 加深了对脊椎动物组织器官发育机制的认识, 为以后的相关领域的研究奠定了基础。未来的相关研究, 应该在多个重要的胚胎发育时期鉴定 Nodal/*Smad2* 的靶基因, 确定靶基因谱的动态变化与发育进程和特定发育过程的关系, 并进一步探讨重要靶基因的

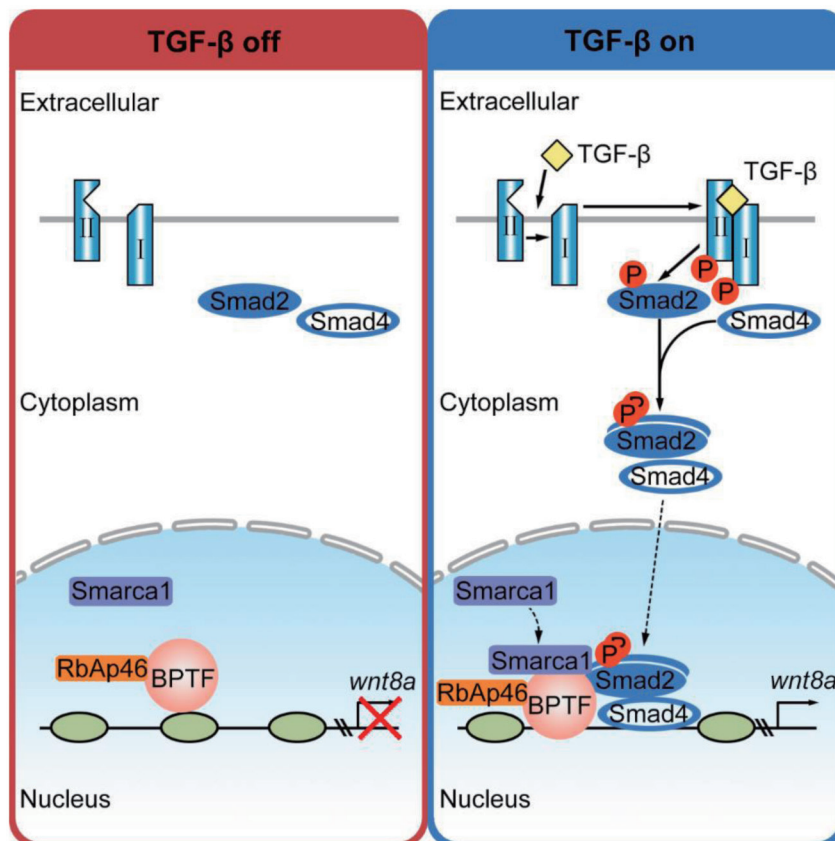


图4 在神经后部化过程中BPTF与TGF- β /*Smad2*协同调节核小体滑动

Smad2/4 结合序列在不同发育阶段的甲基化和染色体组蛋白乙酰化及甲基化的变化, 阐明这些变化与其表达谱变化的协调关系。

[参 考 文 献]

- [1] Shen MM. Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development*, 2007, 134: 1023-34
- [2] Schier AF. Nodal morphogens. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, 1: a003459
- [3] Zhou X, Sasaki H, Lowe L, et al. Nodal is a novel TGF- β -like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature*, 1993, 361: 543-7
- [4] Gritsman K, Zhang J, Cheng S, et al. The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling. *Cell*, 1999, 97: 121-32
- [5] Zhu Y, Richardson JA, Parada LF, et al. *Smad3* mutant mice develop metastatic colorectal cancer. *Cell*, 1998, 94: 703-14
- [6] Yang X, Letterio JJ, Lechleider RJ, et al. Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF- β . *EMBO J*, 1999, 18: 1280-91
- [7] Weinstein M, Yang X, Li C, et al. Failure of egg cylinder elongation and mesoderm induction in mouse embryos lacking the tumor suppressor *smad2*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 9378-83
- [8] Nomura M, Li E. *Smad2* role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development. *Nature*, 1998, 393: 786-90
- [9] Jia S, Ren Z, Li X, et al. *Smad2* and *smad3* are required for mesoderm induction by transforming growth factor- β /nodal signals in zebrafish. *J Biol Chem*, 2008, 283: 2418-26
- [10] Rebagliati MR, Toyama R, Fricke C, et al. Zebrafish nodal-related genes are implicated in axial patterning and establishing left-right asymmetry. *Dev Biol*, 1998, 199: 261-72
- [11] Feldman B, Gates MA, Egan ES, et al. Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals. *Nature*, 1998, 395: 181-5
- [12] Thisse B, Wright CV, Thisse C. Activin- and Nodal-related factors control antero-posterior patterning of the zebrafish embryo. *Nature*, 2000, 403: 425-8
- [13] Chen C, Shen MM. Two modes by which Lefty proteins inhibit nodal signaling. *Curr Biol*, 2004, 14: 618-24
- [14] Zhang L, Zhou H, Su Y, et al. Zebrafish *Dpr2* inhibits mesoderm induction by promoting degradation of nodal receptors. *Science*, 2004, 306: 114-7
- [15] Zhang Y, Li X, Qi J, et al. *Rock2* controls TGF β signaling and inhibits mesoderm induction in zebrafish embryos. *J Cell Sci*, 2009, 122: 2197-207
- [16] Liu X, Xiong C, Jia S, et al. Araf kinase antagonizes Nodal-Smad2 activity in mesoderm development by directly phosphorylating the Smad2 linker region. *Nat Commun*, 2013, 4: 1728
- [17] Ross S, Hill CS. How the Smads regulate transcription. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40: 383-408
- [18] Sun ZH, Meng AM. Identification of Nodal-regulated genes in zebrafish embryos. *Prog Biochem Biophys*, 2007, 34: 595-603
- [19] Bennett JT, Joubin K, Cheng S, et al. Nodal signaling activates differentiation genes during zebrafish gastrulation. *Dev Biol*, 2007, 304: 525-4
- [20] Liu Z, Lin X, Cai Z, et al. Global identification of SMAD2 target genes reveals a role for multiple co-regulatory factors in zebrafish early gastrulas. *J Biol Chem*, 2011, 286: 28520-32
- [21] Chiu WT, Charney Le R, Blitz IL, et al. Genome-wide view of TGF β /Foxh1 regulation of the early mesendoderm program. *Development*, 2014, 141: 4537-47
- [22] Leichsenring M, Maes J, Mossner R, et al. *Pou5f1* transcription factor controls zygotic gene activation in vertebrates. *Science*, 2013, 341: 1005-9
- [23] Kureishy N, Sapountzi V, Prag S, et al. Fascins, and their roles in cell structure and function. *Bioessays*, 2002, 24: 350-61
- [24] Cant K, Knowles BA, Mooseker MS, et al. *Drosophila* *singed*, a fascin homolog, is required for actin bundle formation during oogenesis and bristle extension. *J Cell Biol*, 1994, 125: 369-80
- [25] Boer EF, Howell ED, Schilling TF, et al. *Fascin1*-dependent filopodia are required for directional migration of a subset of neural crest cells. *PLoS Genet*, 2015, 11: e1004946
- [26] Ma Y, Li A, Faller WJ, et al. *Fascin 1* is transiently expressed in mouse melanoblasts during development and promotes migration and proliferation. *Development*, 2013, 140: 2203-11
- [27] Moustakas A, Heldin CH. Dynamic control of TGF- β signaling and its links to the cytoskeleton. *FEBS Lett*, 2008, 582: 2051-65
- [28] Liu Z, Ning G, Xu R, et al. *Fscn1* is required for the trafficking of TGF- β family type I receptors during endoderm formation. *Nat Commun*, 2016, 7: 12603
- [29] Garcia-Mata R, Dubash AD, Sharek L, et al. The nuclear RhoA exchange factor *Net1* interacts with proteins of the *Dlg* family, affects their localization, and influences their tumor suppressor activity. *Mol Cell Biol*, 2007, 27: 8683-97
- [30] Chan AM, Takai S, Yamada K, et al. Isolation of a novel oncogene, *NET1*, from neuroepithelioma cells by expression cDNA cloning. *Oncogene*, 1996, 12: 1259-66
- [31] Symons M, Rusk N. Control of vesicular trafficking by Rho GTPases. *Curr Biol*, 2003, 13: R409-18
- [32] Rossman KL, Der CJ, Sondek J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6: 167-80
- [33] Schmidt A, Hall A. The Rho exchange factor *Net1* is regulated by nuclear sequestration. *J Biol Chem*, 2002, 277: 14581-8
- [34] Alberts AS, Treisman R. Activation of RhoA and SAPK/JNK signalling pathways by the RhoA-specific exchange factor *mNET1*. *EMBO J*, 1998, 17: 4075-85

- [35] Lee J, Moon HJ, Lee JM, et al. Smad3 regulates Rho signaling via NET1 in the transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition of human retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem*, 2010, 285: 26618-27
- [36] Miyakoshi A, Ueno N, Kinoshita N. Rho guanine nucleotide exchange factor xNET1 implicated in gastrulation movements during *Xenopus* development. *Differentiation*, 2004, 72: 48-55
- [37] Zuo Y, Berdeaux R, Frost JA. The RhoGEF Net1 is required for normal mammary gland development. *Mol Endocrinol*, 2014, 28: 1948-60
- [38] Schier AF, Talbot WS. Molecular genetics of axis formation in zebrafish. *Annu Rev Genet*, 2005, 39: 561-613
- [39] Yang J, Tan C, Darken RS, et al. β -catenin/Tcf-regulated transcription prior to the midblastula transition. *Development*, 2002, 129: 5743-52
- [40] Dosch R, Wagner DS, Mintzer KA, et al. Maternal control of vertebrate development before the midblastula transition: mutants from the zebrafish I. *Dev Cell*, 2004, 6: 771-80
- [41] Vastenhouw NL, Zhang Y, Woods IG, et al. Chromatin signature of embryonic pluripotency is established during genome activation. *Nature*, 2010, 464: 922-6
- [42] Lindeman LC, Andersen IS, Reiner AH, et al. Prepatterning of developmental gene expression by modified histones before zygotic genome activation. *Dev Cell*, 2011, 21: 993-1004
- [43] Wei S, Dai M, Liu Z, et al. The guanine nucleotide exchange factor Net1 facilitates the specification of dorsal cell fates in zebrafish embryos by promoting maternal β -catenin activation. *Cell Res*, 2017, 27: 202-25
- [44] Nicklas D, Saiz L. Characterization of negative feedback network motifs in the TGF- β signaling pathway. *PLoS One*, 2013, 8: e83531
- [45] Wei S, Ning G, Li L, et al. A GEF activity-independent function for nuclear Net1 in Nodal/Smad2 signal transduction and mesendoderm formation. *J Cell Sci*, 2017, 130: 3072-82
- [46] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*, 2002, 12: 735-9
- [47] Giraldez AJ, Cinalli RM, Glasner ME, et al. MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science*, 2005, 308: 833-8
- [48] Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, et al. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*, 2003, 35: 215-7
- [49] Liu X, Ma Y, Zhang C, et al. Nodal promotes *mir206* expression to control convergence and extension movements during zebrafish gastrulation. *J Genet Genomics*, 2013, 40: 515-21
- [50] Liu X, Ning G, Meng A, et al. MicroRNA-206 regulates cell movements during zebrafish gastrulation by targeting *prickle1a* and regulating c-Jun N-terminal kinase 2 phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 2012, 32: 2934-4
- [51] Li N, Wei C, Olena AF, et al. Regulation of endoderm formation and left-right asymmetry by miR-92 during early zebrafish development. *Development*, 2011, 138: 1817-26
- [52] Ning G, Liu X, Dai M, et al. *MicroRNA-92a* upholds Bmp signaling by targeting *noggin3* during pharyngeal cartilage formation. *Dev Cell*, 2013, 24: 283-95
- [53] Badenhorst P, Xiao H, Cherbas L, et al. The *Drosophila* nucleosome remodeling factor NURF is required for Ecdysteroid signaling and metamorphosis. *Genes Dev*, 2005, 19: 2540-5
- [54] Ables ET, Drummond-Barbosa D. The steroid hormone ecdysone functions with intrinsic chromatin remodeling factors to control female germline stem cells in *Drosophila*. *Cell Stem Cell*, 2010, 7: 581-92
- [55] Landry J, Sharov AA, Piao Y, et al. Essential role of chromatin remodeling protein Bptf in early mouse embryos and embryonic stem cells. *PLoS Genet*, 2008, 4: e1000241