

DOI: 10.13376/j.cblls/2017075

文章编号: 1004-0374(2017)06-0557-05

母源物质对重编程作用研究进展

廖 辰, 张雨薇, 沈星辉, 黄星卫, 雷 蕾*

(哈尔滨医科大学组织学与胚胎学教研室, 哈尔滨 150081)

摘 要: 卵母细胞发生过程中会积累大量的物质, 即所谓的母源物质 (maternal materials), 自然状态下, 这些母源物质对受精以及之后的发育具有重要的生物学功能。雌雄配子融合后, 精子核与卵母细胞中单倍体染色体组均会发生剧烈的表观遗传修饰变化, 这个过程也同样发生在体细胞核移植到卵母细胞质之后, 这种变化被称之为重编程。重编程奠定了新个体发生发育全部程序的基础, 因此是一个备受重视的生物学过程。重编程包括 DNA 去甲基化、染色质重塑和组蛋白修饰等。受精后, 卵母细胞与精子的基因组均会在一定时间和空间范围内经历相应的重编程过程, 清除各自基因组在配子形成中保留的表观遗传学修饰, 调控基因表达并形成正常发育的全能性胚胎。受精后, 卵母细胞成熟中积累的多种母源物质聚集在雄原核周围, 调控其基因组的重编程。体细胞核移植胚胎中供体细胞核注到去核卵母细胞后也将在卵母细胞中蛋白质、mRNA、酶类等母源物质的作用下进行重编程。现总结了母源物质对雄原核及供体细胞核重编程作用的研究进展, 并探讨了母源物质作用的可能机制。

关键词: 重编程; 母源物质; 体细胞核移植; 雄原核

中图分类号: Q813; R321 **文献标志码:** A

Research progress of the effects of maternal materials on the reprogramming

LIAO Chen, ZHANG Yu-Wei, SHEN Xing-Hui, HUANG Xing-Wei, LEI Lei*

(Department of Histology and Embryology, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

Abstract: Maternal materials, which accumulate during oogenesis, play vital roles throughout development of zygotes. After the fusion of female and male gamete, their genomes experience intense epigenetical modifications, as well for the somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos, which are called as reprogramming. Reprogramming lay the basis for all new individual development programs, consequently it's a crucial biological process, which includes DNA demethylation, chromatin remodelling and histone modification, etc. After fertilization, the genome of gametes experience corresponding reprogramming events temporally and spatially, which eliminate the epigenetic modifications on the genomes and regulate gene expression of embryos, then, lead to formation of totipotent embryos. The maternal materials accumulated during oocyte maturation, surrounding the male pronucleus, affecting its reprogramming upon fertilization. The donor cell nucleus, transferred into enucleated oocyte cytoplasm in the procedure of somatic cell nuclear transfer, undergoes the reprogramming under the action of abundant proteins, mRNA and enzymes. We summarized the reprogramming effects of maternal materials on male pronucleus and donor cell nucleus in recent researches. Moreover, the mechanisms of maternal materials involved in reprogramming were also discussed.

Key words: reprogramming; maternal materials; SCNT; male pronucleus

受精后, 卵母细胞与精子的基因组均会在一定时间和空间范围内经复杂的表观遗传学重编程 (epigenetic reprogramming), 清除各自基因组在配子形成中保留的表观遗传学修饰, 调控基因表达, 并

形成正常发育的全能性胚胎, 经历这些变化的受精

收稿日期: 2016-12-15; 修回日期: 2017-01-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31671545, 31401265)

*通信作者: E-mail: lei086@ems.hrbmu.edu.cn

卵将获得全能性。重编程,包括雌雄原核 DNA 的甲基化与去甲基化,以及组蛋白末端的甲基化、乙酰化、泛素化、磷酸化等翻译后修饰 (post-translational modifications, PTM), 染色质重组 (chromatin recombination) 和微小 RNA (microRNA, miRNA) 调控等。在卵子形成过程中, 卵子体积明显变大, 并且积累母源效应基因编码的物质, 来满足减数分裂成熟、排卵及早期发育过程中的需要。精子形成过程中精子细胞经历了一系列形态变化, 包括细胞核染色质高度浓缩和大部分细胞质以残余体的方式脱落。因此, 在胚胎基因组活化之前, 早期胚胎的生存几乎依赖于卵母细胞胞质中的母源物质。染色质重编程主要发生在受精时, 并且是在母源物质的控制下进行的。受精后, 来源于卵母细胞中的母源物质进入雄原核中, 母源物质对父源基因组进行加工, 这有利于胚胎基因组的激活以及胚胎的形成和发育。在核移植胚胎中, 已分化的细胞核在去核的卵母细胞中能够进行重编程, 获得全能性, 并能够完成个体的发育, 也是卵母细胞胞质中的母源物质发挥了重要的作用。

本文主要探讨卵母细胞中母源物质对父源基因组和体细胞重编程的影响。

1 母源物质含量动态变化及母源效应基因

小鼠卵巢的卵母细胞发生过程中, 源于母系基因组的母源 RNA (转录本) 和蛋白质在卵母细胞中积累^[1]。大部分转录本翻译成蛋白质, 而有些则保持沉默状态, 在卵子发生之后通过多聚腺苷酸化才开始活化^[2]。小鼠胚胎发育的早期阶段, 母源物质完成它们的使命后 (为产生胚胎大分子物质提供起始原材料) 将迅速降解, 该循环过程是由卵母细胞中的母源物质及信号通路来调控的^[1]。受精之后, 染色质进行重构, 胚胎基因组开始活化, 来源于胚胎基因组的转录本开始控制胚胎发育, 此时, 胚胎正式从母源控制转向胚胎控制。

近年来, 研究者利用基因修饰小鼠模型, 确定了许多由母系效应基因编码的关键母源蛋白质。这些蛋白质涉及到早期胚胎发育的多个方面, 包括母源 mRNA 的降解、表观遗传重编程、信号转导和蛋白质翻译以及胚胎基因组活化等^[3]。基于小鼠胚胎着床前发育中的母系效应基因在特定过程中发挥的作用, 可以将其分为 4 类。(1) 母源物质降解相关基因。如 *Dicer1* 是一种限制性内切酶基因, 可将小 RNA 前体切割为成熟 miRNAs 和 siRNAs, 它的

缺失会破坏小鼠卵母细胞减数分裂。该类基因还有 *Ago2*、*Zfp3612* 和 *Atg5*^[2]。(2) 染色质重构相关基因。如 *H3f3a*, 可编码组蛋白 H3 变体 H3.3, 它参与染色质重构, 对保持染色质解聚状态起到重要作用, 还与转录活化相关; *Brg1* 编码 SWI/SNF 重构复合物中的一种内容物, 且它对胚胎基因组的活化是必需的, 它的缺失会导致胚胎发育停滞在 2~4 细胞阶段; *HIRA* 是一种保守的组蛋白 H3-H4 分子伴侣, 在胚胎发育、血管发生和细胞衰老等过程中起到重要作用^[4], 能介导组蛋白的装配^[5]。另外, *Npm2*、*Hr6a*、*Tif1 α* 、*Brwd1* 也会参与到染色质重构过程中。(3) 胚胎基因组活化相关基因。多潜能转录基因 *Oct4* 不仅可以促进胚胎基因组活化, 还能增强母源 RNA 的降解^[6], 若在 1 细胞阶段去除 *Oct4* mRNA 会导致发育的停滞; 小鼠中敲除 *CTCF* 基因会导致广泛的母源转录缺失, 并影响着床前发育^[7]; 其他转录因子, 还包括 *Hsf1*、*Bnc1*、*Ctcf* 和 *Sox2*。(4) 表观遗传修饰相关基因。在卵子发生过程中, DNA 重新甲基化是由 DNA 甲基转移酶 3A (DNMT3A) 来介导的, 它与 DNMT3L 结合形成复合物, 该复合物靶向组蛋白 H3 的 N 端, 对差异性甲基区域的形成是必要的^[8-9]; 母源物质在着床前发育阶段能维持 DNA 印迹, DNMT1 对印迹基因的单等位基因表达是必需的。此外, *Dppa3* 和 *Zfp57* 也能维持 DNA 的甲基化状态^[10]; *TET3* 是 DNA 双加氧酶, 属于 TET 基因家族, 它介导 5-甲基胞嘧啶转化形成 5-羟甲基胞嘧啶, 对 DNA 主动去甲基化起到重要作用。小鼠中 TET 家族基因失活会导致原肠胚形成缺陷^[11]。

2 重编程机制及其相关蛋白

重编程的机制, 主要包括 DNA 的去甲基化, 以及组蛋白末端的甲基化、乙酰化、泛素化、磷酸化等翻译后修饰 (PTM), 染色质重构 (chromatin remodelling) 等。

2.1 染色质重构相关母源蛋白

2.1.1 组蛋白替换鱼精蛋白

精子发生过程中, 精原细胞经历了一系列染色质重塑过程。首先, 精原细胞中典型的核小体被组蛋白变体替换, 伴随着组蛋白高度乙酰化, 导致了核小体结构的不稳定性; 其次, 过渡蛋白 TP1 (transition protein 1)、TP2 并入核小体, 并替代组蛋白变体; 最后, 过渡蛋白被鱼精蛋白替换。成熟的精子由鱼精蛋白组成, 且有少量散在的转录因子、

mRNA 和残余组蛋白^[12]。受精后, 精子基因组迅速解聚, 其中鱼精蛋白迅速被移除, 并由母源组蛋白进行重新组装, 之后父源基因组又经历了重新凝集、重新解聚等过程, 最终形成雄原核^[13]。而体细胞核移植过程中, 由于体细胞不含有鱼精蛋白, 组蛋白替换、染色质重组可能更加困难, 会导致一些基因不正常表达, 如供体细胞来源于肌肉的爪蟾核移植胚胎(表达 MyoD 基因)会持续不正常地表达 MyoD 基因^[12]。

2.1.2 组蛋白变体H3.3的作用

组蛋白 H3.3 是组蛋白 H3 的变体, 母源 H3.3 在生殖细胞的发育、表观遗传记忆和染色质重塑等方面发挥重要作用。当精子与卵子结合时, 母源 H3.3 迅速替换精子头部 DNA 中的鱼精蛋白, 精子基因组解聚并重新组装, 而替换后的组蛋白 H3.3 与雌性生殖细胞中的组蛋白相似, 因此, 雌雄原核的结合就会更加容易。H3.3 通常被认为与活跃的核染色质有关, 最近研究表明, 在小鼠胚胎卵裂期, H3.3 对维持染色质的解聚状态是必需的^[14]。研究发现, 成熟过程中的卵母细胞的染色质是不断变化的, 缺乏持续的 H3.3/H4 掺入会使核染色质结构改变, 增加脱氧核糖核酸酶 I (deoxyribonuclease I, DNase I) 的敏感性, 使 DNA 损伤不断累积, 最终出现不育表型; 在分子水平上, 异常的核染色质结构会导致基因表达水平急剧下降、转录错误的出现和无效的 DNA 从头甲基化^[15]。因此, 敲除卵母细胞中的 H3.3 时会损害雄原核形成、DNA 复制和 rRNA 转录^[16]。除此之外, 在核移植胚胎重编程过程中, 核心组蛋白 H3 的替换对胚胎发育也会起到重要作用。组蛋白替换可以帮助核移植胚胎快速建立新的表观遗传标记^[17]。因此, H3.3 是一种重要的母源重编程物质, 且对核移植胚胎的发育和多种多潜能因子的活化起重要作用。

在小鼠受精卵中, HIRA 介导的 H3.3 替换对于 DNA 复制和核糖体 RNA 转录是必需的, 并且它是父源染色质解聚的基础。敲除 HIRA 后, 由于缺乏精子基因组中核小体装配, 雄原核的形成受到抑制; 父源和母源基因组中 DNA 复制和转录水平严重降低; 核糖体蛋白质含量和定位受到损害^[16]。以上结果证明, HIRA 介导的 H3.3 替换对亲本基因组重编程是必需的。同样, 母源 HIRA 对卵子发生过程和发育潜能的获得也很重要。HIRA 敲除的卵母细胞孤雌激活后, 发育到 2 细胞之后胚胎不能继续进行分裂, 证明了 HIRA 在母源基因组中的作用^[15-16]。

在蟾蜍的克隆胚胎中, 研究证明 H3.3 通过 HIRA 的替换对重编程是必要的, 而且发现 HIRA 介导的 H3.3 替换和克隆胚胎的转录是相互依赖的^[18]。

2.2 DNA去甲基化相关蛋白

TET 蛋白属于 2- 酮戊二酸和 Fe^{2+} 依赖性双加氧酶家族。TET 蛋白分为 TET1、TET2 和 TET3 三种类型。三种 TET 蛋白都具有将 5- 甲基胞嘧啶 (5-methylcytosine, 5-mC) 转化为 5- 羟甲基胞嘧啶 (5-hydroxymethylcytosine, 5-hmC) 的能力。5-hmC 是 5-mC 去甲基化过程中的一个重要中间体, 因此, TET 蛋白是 DNA 去甲基化过程中的重要酶, 对于维持干细胞的多能性有重要意义。此外, 在 TET 蛋白催化下, 5-hmC 可继续被氧化成 5- 甲酰基胞嘧啶 (5-fC) 和 5- 羧基胞嘧啶 (5-caC)。在 DNA 甲基转移酶 (DNMT) 修饰作用下, 可以实现 DNA 上同一位点的 C、5-mC 和 5-hmC 之间的动态平衡^[19]。受精后, TET3 介导的 5-mC 氧化及依赖 DNA 复制的稀释作用, 促使受精卵中父源基因组进行去甲基化。研究显示, TET3 蛋白不仅能重编程精子和体细胞的遗传物质, 同样也能参与雌原核 DNA 的主动去甲基化^[20]。与此同时, 母源基因组则通过 DNA 复制这一途径以较慢的速度经历被动去甲基化过程, 全基因组的甲基化水平在胚胎着床前达到最低水平^[21]。着床以后, 随着各个组织的细胞分化, 基因组的甲基化模式根据其所在细胞类型而重新建立起来^[2]。

研究发现, TET3 不存在于原始生殖细胞, 而是在受精卵中高水平表达; 在成熟卵巢中发现有 TET3 mRNA, 而在新生小鼠的卵巢中没有发现。同样, 在原始卵泡中, 卵母细胞里不存在 TET3, 但在初级卵泡及后续的卵泡中, 卵母细胞内 TET3 的含量是逐渐增加的, TET3 的逐渐增加一直持续到卵子形成^[22]。受精卵表观遗传重编程包括广泛的 DNA 去甲基化, 由 TET3 催化的受精卵父源基因的 5mC 氧化启动了 DNA 去甲基化, 并促进了早期胚胎父源基因组的活化。而在体细胞核移植胚胎中, 来源于卵母细胞胞质的 TET3 集中在由体细胞核转变的类原核中。卵母细胞中 TET3 的敲除会减弱或延迟核移植胚胎中多潜能因子 OCT4 的活化^[22]。这表明 TET3 介导的 5mC 氧化会对核移植胚胎中的供体细胞核重编程起到重要作用。体细胞核 DNA 重编程可能与受精卵父源基因重编程机制相同, 都会受到 TET3 的影响。

2.3 组蛋白乙酰化相关蛋白

组蛋白乙酰化是一种染色质的表观遗传修饰,

它通常发生在核心组蛋白 H3、H4 的赖氨酸残基。乙酰化使染色质的结构打开, 来募集各种转录因子和蛋白, 它对基因转录的活化非常重要^[23]。受精后, 精子中的鱼精蛋白被母源组蛋白迅速替换, 形成解聚的父系染色质, 这个过程伴随着 H3K9、H3K27、H4K8 和 H4K12 等位点的乙酰化。雄原核中表现出更加快速的乙酰化位点的积累^[24-26], 相比而言, 母源染色质中组蛋白在早期分裂阶段保持着稳定的甲基化模式(母源基因组甲基化状态由母源物质 PGC7/Stella 维持), 这就导致了父源和母源基因组之间不对称的表观遗传修饰^[13,27]。另外, 组蛋白乙酰化水平的提高可以改善克隆胚胎的发育。小鼠体细胞核移植后, 去乙酰化酶抑制剂曲古抑菌素 A(trichostatin A) 的处理会提高克隆胚胎的发育率、胚胎干细胞建立效率, 而且对胚胎干细胞的组蛋白修饰有重要作用^[28]。

组蛋白乙酰化的水平主要由组蛋白乙酰转移酶(histone acetylase, HATs) 和组蛋白去乙酰酶(histone deacetylase, HDACs) 调控。很多转录相关的蛋白具有乙酰转移酶的活性, 它们可分为四类: GNAT、MYST、p300/CBP 和 HAT1^[23]。组蛋白去乙酰酶 HDAC1 在小鼠早期胚胎发育过程中, 对细胞周期的连续性和转录抑制状态的维持有关键性作用, 而正常的转录抑制状态对基因表达的正确模式的建立是必要的^[29-31]。

3 结语

早期胚胎的染色质重编程主要发生在受精时, 并且是在母源物质的控制下进行的。有研究发现, 只有去除雌原核的小鼠受精卵可以重编程体细胞(受精卵于原核时期去除雌原核, 并在核膜破裂后进行核移植), 并支持克隆胚胎的发育; 而去除雄原核的受精卵不能支持体细胞重编程。此外, 该研究进一步表明, 一个额外的雄原核融入到受精卵极大地提高了重编程效率^[32]。这些结果证明了亲本原核有不同的重编程能力, 并且关键的重编程物质主要存在于雄原核中。因此, 雄原核和雌原核中富集的母源物质具有不同的重编程能力。在哺乳动物早期发育中, 储存于卵母细胞内的母源物质对发育是必需的。母源效应基因编码的物质在卵子形成过程中累积, 受精后, 来源于卵母细胞中的母源物质进入雄原核中, 并对父源基因组进行加工, 这有利于胚胎基因组的激活以及胚胎的形成和发育, 但是其中的关键物质及其作用机制还不清楚。

本文讨论的一些母源物质在重编程过程中的作用机制还有待于深入研究。但是我们猜测, 这些蛋白质可能会优先进入雄原核中, 并且对重编程起关键作用。未来针对这些物质的研究也会有利于进一步探讨体细胞克隆胚胎和孤雄胚胎的发育相关问题。

[参 考 文 献]

- [1] Zheng W, Liu K. Maternal control of mouse preimplantation development. *Results Probl Cell Differ*, 2012, 55: 115-39
- [2] Li L, Zheng P, Dean J. Maternal control of early mouse development. *Development*, 2010, 137: 859-70
- [3] Zhang K, Smith GW. Maternal control of early embryogenesis in mammals. *Reprod Fertil Dev*, 2015, 27: 880-96
- [4] Amin AD, Vishnoi N, Prochasson P. A global requirement for the HIR complex in the assembly of chromatin. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1819: 264-76
- [5] Gal C, Moore KM, Paszkiewicz K, et al. The impact of the HIRA histone chaperone upon global nucleosome architecture. *Cell Cycle*, 2015, 14: 123-34
- [6] Foygel K, Choi B, Jun S, et al. A novel and critical role for Oct4 as a regulator of the maternal-embryonic transition. *PLoS One*, 2008, 3: e4109
- [7] Wan LB, Pan H, Hannehalli S, et al. Maternal depletion of CTCF reveals multiple functions during oocyte and preimplantation embryo development. *Development*, 2008, 135: 2729-38
- [8] Kaneda M, Okano M, Hata K, et al. Essential role for *de novo* DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature*, 2004, 429: 900-3
- [9] Okano M, Bell DW, Haber DA, et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development. *Cell*, 1999, 99: 247-57
- [10] Hirasawa R, Chiba H, Kaneda M, et al. Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development. *Genes Dev*, 2008, 22: 1607-16
- [11] Dai HQ, Wang BA, Yang L, et al. TET-mediated DNA demethylation controls gastrulation by regulating Lefty-Nodal signalling. *Nature*, 2016, 538: 528-32
- [12] Teperek M, Miyamoto K. Nuclear reprogramming of sperm and somatic nuclei in eggs and oocytes. *Reprod Med Biol*, 2013, 12: 133-49
- [13] Zhou LQ, Dean J. Reprogramming the genome to totipotency in mouse embryos. *Trends Cell Biol*, 2015, 25: 82-91
- [14] Lin CJ, Conti M, Ramalho-Santos M. Histone variant H3.3 maintains a decondensed chromatin state essential for mouse preimplantation development. *Development*, 2013, 140: 3624-34
- [15] Nashun B, Hill PW, Smallwood SA, et al. Continuous histone replacement by Hira is essential for normal transcriptional regulation and *de novo* DNA methylation during mouse oogenesis. *Mol Cell*, 2015, 60: 611-25

- [16] Lin CJ, Koh FM, Wong P, et al. Hira-mediated H3.3 incorporation is required for DNA replication and ribosomal RNA transcription in the mouse zygote. *Dev Cell*, 2014, 30: 268-79
- [17] Nashun B, Akiyama T, Suzuki MG, et al. Dramatic replacement of histone variants during genome remodeling in nuclear-transferred embryos. *Epigenetics*, 2011, 6: 1489-97
- [18] Jullien J, Astrand C, Szenker E, et al. HIRA dependent H3.3 deposition is required for transcriptional reprogramming following nuclear transfer to *Xenopus* oocytes. *Epigenetics Chromatin*, 2012, 5: 17
- [19] Amouroux R, Nashun B, Shirane K, et al. *De novo* DNA methylation drives 5hmC accumulation in mouse zygotes. *Nat Cell Biol*, 2016, 18: 225-33
- [20] Shen L, Inoue A, He J, et al. Tet3 and DNA replication mediate demethylation of both the maternal and paternal genomes in mouse zygotes. *Cell Stem Cell*, 2014, 15: 459-70
- [21] Seisenberger S, Peat JR, Hore TA, et al. Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. *Philos Trans R Soc Lond B: Biol Sci*, 2013, 368: 20110330
- [22] Gu TP, Guo F, Yang H, et al. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature*, 2011, 477: 606-10
- [23] Wang F, Kou Z, Zhang Y, et al. Dynamic reprogramming of histone acetylation and methylation in the first cell cycle of cloned mouse embryos. *Biol Reprod*, 2007, 77: 1007-16
- [24] Adenot PG, Mercier Y, Renard JP, et al. Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development*, 1997, 124: 4615-25
- [25] Santenard A, Ziegler-Birling C, Koch M, et al. Heterochromatin formation in the mouse embryo requires critical residues of the histone variant H3.3. *Nat Cell Biol*, 2010, 12: 853-62
- [26] van der Heijden GW, Dieker JW, Derijck AA, et al. Asymmetry in histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. *Mech Dev*, 2005, 122: 1008-22
- [27] Rybouchkin A, Kato Y, Tsunoda Y. Role of histone acetylation in reprogramming of somatic nuclei following nuclear transfer. *Biol Reprod*, 2006, 74: 1083-9
- [28] Farifteh F, Salehi M, Bandehpour M, et al. Histone modification of embryonic stem cells produced by somatic cell nuclear transfer and fertilized blastocysts. *Cell J*, 2014, 15: 316-23
- [29] Ma P, Schultz RM. Histone deacetylase 1 (HDAC1) regulates histone acetylation, development, and gene expression in preimplantation mouse embryos. *Dev Biol*, 2008, 319: 110-20
- [30] Ma P, Schultz RM. HDAC1 and HDAC2 in mouse oocytes and preimplantation embryos: specificity versus compensation. *Cell Death Differ*, 2016, 23: 1119-27
- [31] Schultz RM. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum Reprod Update*, 2002, 8: 323-31
- [32] Liu W, Yin J, Kou X, et al. Asymmetric reprogramming capacity of parental pronuclei in mouse zygotes. *Cell Rep*, 2014, 6: 1008-16