

H1oo 在哺乳动物胚胎发育及其基因组重编程中的作用

蒋满喜 杨彩侠 陈大元*

(中国科学院动物研究所, 生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080)

摘要 染色质结构可由转录抑制状态转变为转录激活状态, 从而调节早期胚胎由母型基因控制转变为合子型基因控制。作为一种特殊类型的连接组蛋白——哺乳动物特异性连接组蛋白 H1oo, 其表达方式具有一定的时序性, 但又与其他 7 种连接组蛋白亚型有所不同, H1oo 不但能够在卵母细胞-胚胎发育转换过程中发挥功能, 而且还可能在基因组重编程过程中起到关键性作用。分析研究卵母细胞特异性连接组蛋白, 有助于认识染色质重建、基因组重编程过程以及核移植的分子机制, 而且可能对克隆效率的提高有所补益。

关键词 染色质组装; 卵母细胞特异性连接组蛋白 H1oo; 胚胎发育; 基因组重编程

受精前及受精卵的最初发育阶段, 配子一般受控于卵母细胞内母型物质的转录抑制作用, 只有发育到一定阶段, 转录抑制才能转变为转录激活状态^[1], 胚胎发育才由母型基因控制转变为合子型基因控制^[1], 而染色质组装过程可能是所有后生动物胚胎早期发育过程中, 由母型基因向合子型基因转换的重要原因。

转录状态的转变过程涉及到基因表达活性和表达方式的变化, 如卵母细胞分化基因的降调节、早期胚胎基因表达的激活等, 这些变化统称为“基因组重编程(genomic reprogramming)”。在此过程中, 除特定转录因子的数量、活性外, 染色质结构成分的变化也起着至关重要的作用。

真核动物连接组蛋白 H1 位于相邻核小体之间与连接 DNA 结合, 能够保持染色质高度浓缩的螺旋结构, 而且这些组蛋白还能够特异性调节染色质的组装, 并由此影响生物体中基因表达的调控过程。

1 连接组蛋白的种类及其性质

在哺乳动物卵母细胞及早期胚胎中, 存在多种亚型的连接组蛋白 H1, 它们不同的发育时期能够形成不同的结合模式, 并在特定阶段相互替换。目前, 哺乳动物中已经鉴定的 H1 有 8 种亚型^[2]。其中 5 种为体细胞亚型, 分别为 H1a、H1b、H1c、H1d 和 H1e。5 种体细胞亚型的所有基因及其核心组蛋白基因均串状排列在人的第 6 染色体^[2]及小鼠的第

13 染色体上^[3]。体细胞 H1 的 mRNA 具有一个特异性的 3'-非翻译区, 缺乏多聚腺苷酸化信号, 而且含有一个能够形成茎环结构的特殊序列(H1c 除外)^[4]。第 6 个亚型为替代型突变体 -H1(o) 与体细胞亚型完全不同, 其基因位于小鼠的第 15 染色体上, mRNA 能够多聚腺苷酸化, 而且翻译产物的分子体积较小, 但比体细胞亚型含有更多的赖氨酸^[2]。H1(o) 可在多种终末分化的细胞中表达。第 7 种亚型为 H1t, 仅在精子细胞上表达^[4]。第 8 种即为卵母细胞特异性连接组蛋白 H1oo, 而且最近又发现了 H1oo 的另一种存在形式 H1Foo^[21]。

连接组蛋白 H1 各亚型在小鼠卵子发生及胚胎发育过程中, 依照特定方式相互更替: 处于有丝分裂期的卵原细胞具有一套与体细胞相似的“体细胞亚型”连接组蛋白; 进入减数分裂阶段后, “体细胞亚型”连接组蛋白的合成急剧下降, 而其他类型的连接组蛋白如 H1(o)、H1oo 等, 在 G₂ 或生发泡 (GV) 期卵母细胞中继续合成。卵原细胞有丝分裂的结束激发了连接组蛋白之间发生相互转换。直至受精卵分裂到一定阶段, 胚胎染色质的装配又恢复到有丝分裂状态, 部分或全部 H1(o) 和 H1oo 被“体细胞亚型”连接组蛋白再次替换, 而且连接组蛋白

收稿日期: 2003-12-14 接受日期: 2004-05-08

科学技术部专项资助项目(95-专-08)和中国科学院知识创新工程项目(KSCX1-05-1)

* 通讯作者。Tel: 010-62560528, E-mail: Chendy@panda.ioz.ac.cn

H1的合成又恢复到与DNA复制同步的状态^[5]。

2 H1oo的表达与胚胎发育

连接组蛋白表达状况的变化似乎是早期胚胎发育的一个显著特征,而且H1oo的表达与胚胎发育过程中某些特殊的转换过程密切相关。海胆中的卵裂期组蛋白(cleavage-stage histone, cs-H1)^[6]与蛙中的H1M(B4)^[7,9],依据蛋白质序列的相似度及其表达方式,被认为是种间同源物质,而且在各自的胚胎发育及相关基因的表达过程中发挥重要作用。免疫荧光及免疫印迹研究表明,哺乳动物卵母细胞及早期胚胎中缺乏体细胞亚型H1^[9,11],只有发育到2细胞阶段才首次出现,而此时胚胎基因组转录活性恰好开始启动^[11]。显而易见,哺乳动物胚胎发育过程中,连接组蛋白可能会对卵母细胞-胚胎发育起到转换开关的作用。Tanaka等^[12]利用消减杂交的方法发现了一种与cs-H1和B4类似的卵母细胞特异性连接组蛋白H1oo。但是与体细胞亚型不同的是,H1oo的mRNA具有多聚腺苷酸化的特性,而且多聚腺苷酸化由信号序列AAUAA启动,AAUAA位于H1oo cDNA的3'-非翻译区。

RT-PCR检测发现^[12],在整个生发泡(GV)均存在有H1oo的mRNA,然而受精后表达水平显著下降。而到了8细胞阶段转录本几乎无法检测到。另外,GV卵母细胞Western印迹分析还检测到一个42 kDa的主带及一个37 kDa的次要带。次要带的检出,表明可能是H1oo的关联蛋白与抗体发生了交叉反应,或者是H1oo本身发生了部分降解。因此H1oo转录本应当为母型起源,而且转录本自身及其编码蛋白质产物在受精以后会发生迅速降解,2细胞以后完全消失。

H1oo位于排卵前卵母细胞的整个GV、MII期卵母细胞的浓缩染色体及其第一极体上。早期的1细胞胚胎(第二极体排出前),其母源中期染色体上也能够表达H1oo免疫反应活性,而精子头部却不存在。然而在第二极体排出之后,膨胀的精子头部及第二极体均可表达H1oo免疫活性,而且在整个胚胎发育阶段,第二极体始终保持强烈荧光。然而与1细胞胚胎相比,2细胞以后胚胎细胞核着色能力有所降低。到4~8细胞阶段,细胞核几乎无法着色,但第二极体却始终保持着强烈的信号。

3 H1oo与基因组重编程

由于所有分化细胞均源于受精卵,因此受精卵的细胞核具有发育全能性。当蛙与哺乳动物的体细

胞克隆成功以后,更加激起了人们对基因组重编程的分子机制进行研究的广泛兴趣^[12]。但是目前体细胞核移植的效率依然很低(0%~3%)。虽然发育过程中细胞核的DNA含量理论上讲应该是不变的,但是实际情况下,特定细胞中基因表达的程度有一定限度,对其进行深入研究有助于对发育建成过程中的后生性影响有更进一步的认识。

核移植以后会出现明显的卵胞质蛋白进入体细胞核的运动,这种运动经常伴随核膨胀及体细胞核中异染色质的减少,因此核移植后的染色质成分会发生巨大变化。研究表明,GV中储备大量能够加速体细胞核重构的物质,包括分子伴侣如核精蛋白和N1/N2等,它们能够调节核内组蛋白向DNA转运以及核小体的组装过程^[12]。如果卵母细胞的GV首先发生破裂,其内容与胞质混合,有利于细胞核的重新构建。两栖动物幼体中,当合子开始转录时,如果将其细胞核去除,然后将囊胚细胞核移植到去核的卵母细胞中,能够支持胚胎发育,但是较高层次的胚胎细胞核的基因组潜能疾速降低^[8]。在中期囊胚转换期,卵母细胞特异性组蛋白B4消失,而体细胞亚型的连接组蛋白出现^[9]。小鼠中,合子转录活性起始于1~2细胞期。令人感兴趣的是,H1oo与体细胞亚型连接组蛋白表达之间的转换恰好发生在合子基因开始启动之时^[12]。系统性分析表明,供体核发育潜能的大幅度降低发生在1细胞到2细胞之间,因此核移植成功率也相差甚远,分别为90%和12.6%^[7]。

有研究表明,当核移植进入去核的卵母细胞时,胚胎细胞可能需要极低甚至不需要基因组的重编程,而终末分化的细胞核似乎需要高度而有效的染色质的重建过程,正确的染色质重建有利于着床后胚胎的发育。实际情况下,胚胎干细胞核可能与合子核发育潜能相差不大^[14,15]。然而胚胎干细胞产生的克隆个体也会象体细胞核移植一样,出现发育异常如胎盘或胎儿体重过大的情况^[14]。必须着重强调的是,分别将细胞核移植进入去核的卵母细胞或者合子,可能会产生迥然不同的结果。McGrath等^[16]以合子为受体胞质与卵母细胞为受体相比较,合子受体得到的克隆效果更差。而且研究表明,体细胞核中的连接组蛋白H1的减少有助于基因重排^[17]。而缺失转录器的爪蟾红细胞的异染色质DNA可以在卵母细胞抽提物中发生重排并激活转录^[18]。Wangh等^[19]也证明爪蟾红细胞核在与卵母细胞抽提物接触后可以重新获得复制能力,而且将体细胞连接组蛋白H1加入重构核将会再次阻碍其转录与复制。众所周知,细胞核的发育潜能限制性的逐

步获得, 与细胞核的状态及其功能密不可分。而且转录活性的启动时间恰恰为核移植效率迅速降低的时间段, 表明 H1oo 在重构卵子(或者细胞)中向体细胞连接组蛋白 H1 的过早转变可能是影响核移植效率的重要因素之一。这与大鼠克隆研究中^[20]提出的通过化学方法适当延长 MII 期的观点具有一定的相似之处。如果 H1oo 过早消失或者水平显著降低可能意味着卵母细胞已经退出 MII 期, 至于二者之间是否存在某种关联, 还有待于进一步深入研究, 因此 H1oo 可能在哺乳动物卵母细胞基因组重编程过程中发挥相当重要的作用。最近, Gao 等^[21]和 Teranishi 等^[22]发现, 核移植后供体细胞核表面的体细胞 H1 被卵母细胞特异性连接组蛋白 H1Foo 替换。然后 H1Foo 逐渐丢失, 而体细胞 H1 重新装配到供体核的染色质上。表明将核移植操作过程与卵子激活之间的时间适当延长可能有利于核的重编程以及克隆效率的提高。另外, 卵母细胞特异性连接组蛋白的丢失可能会导致细胞核多能性甚至全能性的丧失, 然而核移植卵子获得重编程的重要指标之一即为体细胞核重新获得全能性, 因此我们认为 H1oo 对于体细胞核的正确重编程过程是必不可少的。

总而言之, H1oo 为蛙 B4 及海胆 cs-H1 连接组蛋白的一种新型同源物质; 存在于 GV 期、MII 期卵母细胞、第一极体以及 2 细胞胚胎中, 而到了 4~8 细胞完全消失; 在卵母细胞及早期胚胎发育过程中通过阻碍染色质结构的形成而控制基因的表达, 在

染色质包装过程中参与染色质的重组, 影响胚胎的早期发育, 而且还可能在细胞核的重编程过程中发挥相当重要的功能。因此对 H1oo 的性质及其功能进行分析研究, 有助于对染色质重建、细胞核重编程以及核移植的分子机制有更加深入的认识, 而且可能会对动物克隆某些技术环节的改进及克隆效率的提高有所帮助。

参考文献 (References)

- [1] Juan LJ *et al.* *EMBO J*, 1994, **13**: 6031
- [2] Doenecke D *et al.* *J Cell Biochem*, 1994, **54**:423
- [3] Wang ZF *et al.* *Gemone Res*, 1996, **6**: 688
- [4] Wang ZF *et al.* *J Mol Biol*, 1997, **271**: 124
- [5] Dimitrov S *et al.* *Dev Biol*, 1993, **160**: 214
- [6] Mandl B *et al.* *Mol Cell Biol*, 1997, **17**: 1189
- [7] Ohsumi K *et al.* *Dev Biol*, 1991, **147**: 110
- [8] Briggs R. *Int Rev Cytol Suppl*, 1979, **9**:107
- [9] Smith RC *et al.* *Genes Dev*, 1988, **2**: 1284
- [10] Clarke HJ *et al.* *J Cell Sci*, 1997, **110**: 477
- [11] Stein P *et al.* *Mol Reprod Dev*, 2000, **55**: 241
- [12] Tanaka M *et al.* *Development*, 2001, **128**: 655
- [13] Kikyo N *et al.* *J Cell Sci*, 2000, **113**:11
- [14] Eggan K *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 6209
- [15] Hochedlinger K *et al.* *Curr Opin Cell Biol*, 2002, **14**: 741
- [16] McGrath J *et al.* *Science*, 1984, **226**:1317
- [17] Steinbach OC *et al.* *Nature*, 1997, **389**: 395
- [18] Dimitrov S *et al.* *EMBO J*, 1996, **15**: 5897
- [19] Wangh LJ *et al.* *J Cell Sci*, 1995, **108**: 2187
- [20] Zhou Q *et al.* *Science*, 2003, **302**: 1179
- [21] Gao S *et al.* *Dev Biol*, 2004, **266**: 62
- [22] Teranishi T *et al.* *Dev Biol*, 2004, **266**: 76

Roles of Oocyte-specific Linker Histone during Mammalian Embryogenesis and Genomic Reprogramming

Man-Xi Jiang, Cai-Xia Yang, Da-Yuan Chen*

(State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract The changes of higher-order chromatin structure from transcriptional inactivation state to activation state influence the regulation of gene expression in early embryos which transit from maternal gene activity (MGA) to zygotic gene activity (ZGA). Oocyte-specific linker histone in mammals as a special histone whose sequential expression patterns different from the other seven linker histone subtypes, not only takes part in the oocyte-embryonic switch during mammalian embryogenesis, also plays a critical role in genomic reprogramming. Through investigating oocyte-specific linker histone, the course of chromatin reorganization and genomic reprogramming, and the molecular mechanism of nuclear transfer will be well comprehended, which maybe make for the improvement of cloning efficiency.

Key words chromatin organization; oocyte-specific linker histone H1oo; embryogenesis; genomic reprogramming

Received: October 14, 2003 Accepted: May 8, 2004

This work was supported by the Climbing Project of Ministry Sciences and Technology of China (95-zhuanxiang-08) and the Knowledge Innovation Program of Chinese Academy of Sciences (KSCX1-05-1)

*Corresponding author. Tel: 86-10-62560528, E-mail: Chendy@panda.ioz.ac.cn