

- 68: 359.
- [18] Wiedermann, C. J. 1986, *Blood*, 68: 1398.
- [19] Wiedermann, C. J., 1987, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 496: 205.
- [20] Lotz, M. et al., 1988, *Science*, 241: 1218.
- [21] Wagner, F. et al., 1987, *Regul. Pept.*, 19: 355.
- [22] Kimball, E. S. et al., 1988, *J. Immunol.* 141 (10): 3564.
- [23] Hart, R. et al., 1988, *Immunol. Letters*, 19: 133.
- [24] Levine, J. D. et al., 1984, *Science*, 226: 547.
- [25] Lotz, M. et al., 1987, *Science*, 235: 893.
- [26] Dinarello, C. A., 1986, *J. Clin. Invest.*, 77: 1734.
- [27] Payan, D. G. et al., 1984, *J. Clin. Invest.*, 74: 1532.
- [28] Payan, D. G. et al., 1986, *J. Biol. Chem.*, 261: 14321.
- [29] Stanisiz, A. M. et al., 1987, *J. Immunol.*, 139 (3): 749.
- [30] Quirion, R. and T. V. Dam, 1988, *Regul. Pept.*, 22: 18.
- [31] Organist, M. L. et al., 1987, *J. Immunol.*, 139 (9): 305.
- [32] Organist, M. L. et al., 1988, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 151 (1): 535.
- [33] Mantyh, P. W. et al., 1984, *Nature*, 309: 795.
- [34] MacDonald, S. G. and N. D. Boyd, 1989, *J. Neurochem.* 53: 264.
- [35] Yokada, Y. et al., 1989, *J. Biol. Chem.*, 264 (30): 17649.
- [36] Andrew, D. et al., 1990, *Science*, 247: 958.

非洲爪蟾 *Xenopus laevis* 卵母细胞中的 Vgl mRNA—— 一种重要的母体 RNA

张遵义 毛铭廷

(西北师范大学生物系)

两栖类卵母细胞, 在其发育过程中积累了大量的 RNA 及蛋白质。这些 RNA 和蛋白质对成熟卵受精后的早期胚胎发育起着相当重要的作用^[1]。由于它们在卵母细胞中的分布各异, 受精后, 通过细胞分裂将它们分配至不同的细胞中, 这些细胞也由此获得了不同的发育潜能。同时, 也开始产生了不同细胞之间的相互作用, 组织乃至器官的形成就基于这些不同发育潜能的细胞以及它们的相互作用。胚胎发育早期, 不同的细胞得到了特异的发育能力, 由此形成形态各异的组织及器官原基。在以后的发育中, 这些细胞仍保持各自的命运安排。这种不同区域细胞的发育差别, 与存在于卵母细胞动、植物半球的母体因子(RNA 及蛋白质)有关。荷兰学者 Nieuwkoop 及其合作者们结果表明, 中胚层的出现是通过囊胚期预定外胚

层和植物半球卵黄团的诱导作用而实现的^[2]。这种诱导作用同样可以追溯到卵母细胞动、植物半球的差异。已有证据说明动物半球的细胞对于中胚层诱导信号有反应能力, 而植物半球的细胞则与产生这类诱导物质有关^[3,4]。因此搞清楚定位于卵母细胞的细胞质中, 决定细胞分化命运的母体因子所具有的分子性质是极有意义的。

1985年, Melton等^[5,6]发现了一类定位于卵母细胞植物半球的母体 mRNA, 称为 Vgl mRNA。这种 mRNA 编码的产物类似于 β -转化生长因子(TGF- β), 后者对细胞分化有多方面的作用^[7]。Vgl mRNA 在卵子发生期间合成并贮存于卵母细胞中, 直到原肠早期发生降解, 因而可认为它与这期间的发育有关。其次, Vgl mRNA 在成熟卵母细胞中以半月形

分布于后来形成内胚层的细胞质区域即植物半球中,因而,它也可能涉及内胚层细胞的决定或赋予内胚层细胞诱导中胚层的能力。本文将集中评述近年来,关于 Vgl mRNA 及其所编码的蛋白的特征及可能的功能。

一、Vgl mRNA 的发现及其存在证据

哈佛大学的 Weeks 和 Melton 等研究者,从 1985 年开始利用 cDNA 克隆技术分离爪蟾卵母细胞动、植物半球中的 RNA^[8]。未受精卵的动、植物极间存在着不同的发育潜能,寻找沿着这个动、植物极轴分布的母体 RNA 很有意义。利用 cDNA 克隆技术,以爪蟾卵母细胞中分离出的 poly(A)⁺RNA 为模板合成 cDNA,并在 λ gt 10 中建立了这个 cDNA 文库。又以从未受精卵的动、植物极不同区域分离的 poly(A)⁺RNA 合成相应的 cDNA 作为探针,筛选了所构建的 cDNA 文库(图 1)。从而鉴定出并分离了 4 个克隆,其中 3 个代表定位于动物极的 RNA,另一个克隆,Weeks 等人称为

Vgl, 此种 RNA 表示定位于植物极半球的 RNA。将 Vgl cDNA 亚克隆在 pSP 65 质粒载体上,以合成具有高度特异性的 mRNA 探针^[9]。通过 RNA 印迹分析,鉴定出 Vgl RNA 为 2.7 kb 的转录本。这样得到的 Vgl RNA 是 mRNA 吗?答案是肯定的。首先,cDNA 文库及用来筛选这个文库的探针,都是由 poly(A)⁺RNA 构成的,这些 RNA 可能是多腺苷酸化的;其次,已证明这些 RNA 与核糖体 RNA 及线粒体 RNA 没有同源性,已经从 RNA-蛋白质复合物上分离出游离的 RNA,并利用印迹杂交测定出在游离及与蛋白质复合的 RNA 中都有 Vgl RNA。由此可见,Vgl RNA 的确是编码蛋白质的 mRNA^[8]。此外,通过注射人工合成的 Vgl mRNA 反义链可以降解并阻断卵母细胞及早期胚胎中 Vgl mRNA 的翻译活动,同样说明了这一点^[5,10,11]。

二、Vgl cDNA 的序列特征及 Vgl mRNA 肽链产物与 TGP- β 因子间的序列同源性

将从未受精卵中提出的总量 RNA 在变性琼脂糖凝胶上电泳并进行 RNA 印迹分析。由此获得一个 1.6 kb 的 Vgl cDNA 片段,为得到一个完整的克隆,又利用这个 1.6 kb cDNA 为探针重新筛选同样的 cDNA 文库,进一步得到一个 2.3 kb 的 cDNA 克隆^[12],这样得到的 cDNA 克隆在 5' 末端有缺失的序列,以从 2.3 kb cDNA 的 5' 末端得到的限制酶消化片段进行引物延伸反应来测定从 5' 末端缺乏序列的长度,结果显示 Vgl mRNA 的实际 5' 末端仅超出最长的 cDNA 克隆片段 47 个碱基。分离基因组中的 Vgl 克隆得到了这些缺失的 5' 序列。引物延伸分析预测,Vgl 转录本的 5' 末端有一个从第 29 碱基开始的 TATAA 片段及一个从第 68 位开始的 GCTAATTA 片段,进一步证实这就是 Vgl 转录本的 5' 末端^[12]。初步推断 Vgl cDNA 的序列,首先是一个约 27 个碱基组成的 5' 端非转录引导序列,其后是

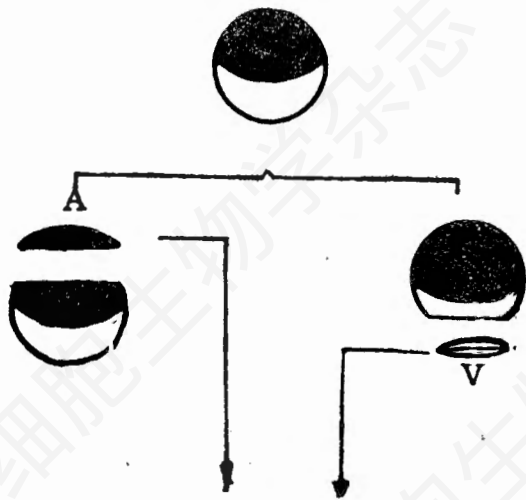


图 1 利用鉴别杂交法筛选爪蟾卵母细胞 cDNA 文库中植物极半球定位的 mRNA

按图中所示切面将冰冻后的卵子切成动物极(A, 深色)及植物极(V, 浅色)卵块。分离这些卵块中的 poly(A)⁺RNA 并制备 cDNA 探针,利用这些探针筛选卵母细胞 cDNA 文库的复制滤膜^[8]。

一个由1080个碱基构成的编码41.8 kD·蛋白质的转录框架，接下来在转译终止码之后，有一个至少由1240个碱基组成的3'端非转译尾部序列，其中包含3个潜在的3'末端加工部位(AATAAA)。

Vgl mRNA的翻译产物显示了与β-抑制素^[13]具有同源性的序列。β-抑制素是TGF-β大家族中的成员之一。经比较，两种肽链间有40%的相似，涉及羧基端120个氨基酸，尤为明显的是半胱残基的位置与数量，这些残基涉及抑制素及其它相关生长因子中二聚体的形成过程。转化生长因子通过一个在蛋白质疏水性氨基酸残基的牵张作用进入内质网，在靠近羧基端的一个加工部位发生断裂，这些部位常包含一系列正电荷氨基酸(Arg-Arg)，加工的肽链通过半胱残基间相互作用在运出细胞前形成二聚体^[14]。Vgl蛋白质的氨基末端有一个潜在的信号序列(图2)，用以嵌入内质网。进一步推定Vgl mRNA的翻译产物是一个360个氨

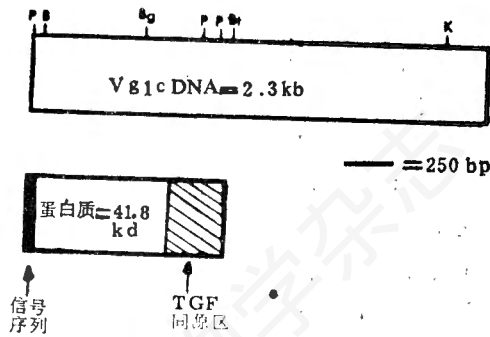


图2 Vgl cDNA结构(上)及Vgl mRNA蛋白质产物的结构(下)示意图^[12]

基酸的蛋白质，它进入内质网后断裂释放出一个113个氨基酸的肽链。这个肽链除了与β-抑制素有同源性外，与TGF-β-1^[15]有38%的同源序列，亦从第一个保守性半胱残基开始。此外，与果蝇的dpp位点因子^[16]也有48%的序列同源性并且有共同的糖基化部位(见图3)。目前广泛认为TGF-β是通过细胞外基质的调控作用而影响细胞分化的^[17-19]。Vgl mRNA编码与TGF-β相类似的因子，从其肽链

| | |
|----------|---|
| Vgl 蛋白 | RPFRKDSYSKLPPTASNIQCKRHLKVEPK DVGWQWVIA |
| TGFβ蛋白 | RFRRLDITNYCFSSTEKNCQVRQLYDFRDLGWK QLES |
| β-抑制素 | RFRRRRRRLGLECDGKVIQCKKQFFVSP KDIGWWDWIIA |
| Dpp 蛋白 | RNKRHARLPTRKKNHDDTCRRBSLYVDF DVGWDDWIVA |
| | PQGYMANYCYGRCPYPLTRILNLSNHAILLQTLVHSIEPED |
| | PKGYHANFCLGFCFYIWS LL DTQYSKVLALYNQHNPCG |
| | PSGKHANYCEGECPSHLIAGTSGSSLSFHSIVIMHYRMRGH |
| | PLGYDAYCYGHKCFPLADHFNSTHAAVVGTLVNNRERK |
| IP | LPCCVPTDMSPISEMLFYDNDNVDVLRHYEEMAVD |
| SA | APCCVFPALRPLFIVYV GRPKVEGLSNMIVR |
| SPPANLKS | CCVFTKLRPMSMLYDDGQNIKKDIQNMIVS |
| VP | KACCVFTQLDSVAMLLYLDNQS TVLVLLNYQEMTVV |
| | SCGCR |
| | SCKCS |
| | SCGCS |
| | CGGCR |

图3 Vgl 蛋白质与一些TGF-β基因产物的氨基酸序列比较

细杠示可能的加工部位；星号示保守的半胱残基；粗杠示Vgl和Dpp之间的糖基化部位^[12]

序列的相似程度上，间接的说明其基因产物对于细胞分化可能具有类似于TGF-β因子的作用。

三、Vgl mRNA的形成及定位

RNA印迹分析表明，在爪蟾卵母细胞植物半球或称为卵子预定内胚层中，Vgl mRNA的分布比动物半球高出20—25倍^[6]。为确切探明它们的分布位置及定位机制，利用Vgl反义链RNA为探针，采用原位杂交技术分析了处于卵黄形成后期(V—VI)的爪蟾卵母细胞，结果显示，Vgl mRNA定位于植物半球的皮层中，呈半月形，约厚10 μm。连续切片上的杂交信号表明，Vgl mRNA定位的半月形在卵母细胞中是辐射对称分布的^[20,21]。Vgl mRNA仅限于极薄的皮层下，并非从植物极以梯度形式分布。说明Vgl mRNA在长足的卵母细胞中的分布不同于卵子内其它多数种类的mRNA的分布形式^[6,22]。

那么，在卵子发生中，何时产生了Vgl mRNA？是否在其形成后立刻积累在植物极了呢？如果Vgl mRNA总是以半月形见于卵母细胞的植物半球，则可能意味着它的定位与合成及运输有内在的联系。利用RNase保护实验测定^[9]从前卵黄形成期到长足的卵黄形成后期卵母细胞中总量RNA而寻找Vgl mRNA在卵子形成中的合成时间。结果表明，Vgl mRNA存在于实验选定的最幼小的卵母细胞中(I

期),而且,其水平在整个卵子形成过程中是恒定的。说明 Vgl mRNA 在卵子形成前期的 I 期卵母细胞中合成,并恒定地贮存着,直到卵子成熟。另一组原位杂交结果还显示,在卵黄形成期, Vgl mRNA 开始定位,第一个迹象是 Vgl mRNA 开始在卵母细胞的一端集中,但并不不同于卵黄小板的定位, Vgl mRNA 的定位远早于卵黄小板。至于 Vgl mRNA 的来源,实验已证明是由卵母细胞本身合成的^[12],而且在定位过程中并不改变其结构。RNA 印迹结果显示了在各期卵母细胞中 Vgl mRNA 是以多腺苷酸化的形式存在的,其定位是通过一种活跃的转位过程进行的^[23]。利用一个离体培养系统证实了将外源 Vgl mRNA 注入处于卵子形成中期阶段的卵母细胞后,其定位的形式与内源 Vgl mRNA 相同。在离体培养的卵母细胞中,培养六天后可见到 Vgl mRNA 定位的半月形状。内源和外源 Vgl mRNA,其定位都是首先集中于一极,然后开始在皮层积累^[23]。值得注意的是在蛋白质的细胞内转位过程中蛋白质的 N-端新生的信号多肽是重要的一步,由于 Vgl mRNA 编码的因子在与 TGF- β 同源的一端具有一个潜在的信号序列及一个肽链酶断裂部位,因而必须了解是否外源 Vgl mRNA 的定位需要被翻译成蛋白质产物后才进行。不过将由 Vgl mRNA 5' 端删去 62 个核苷酸而构建的缺少核糖体结合部位及起始密码的 Vgl 转录本注入 II 期卵母细胞中的结果表明,其定位模式与完整的 Vgl mRNA 相同,可见,定位过程是由 mRNA(或 mRNA-蛋白质复合物)本身完成的^[23]。

另一方面,定位过程与卵母细胞的结构组成,尤其是皮层区结构有关^[24]。有结果表明 Vgl mRNA 集中在卵母细胞植物半球中富含角蛋白的成份中^[25]。

四、Vgl mRNA 在成熟卵子及早期发育中的定位及表达

利用 ³²P 标记的 Vgl, 组蛋白 H 4, 以及

Vgl 反义 RNA 为探针,与白化爪蟾的卵子切片杂交,结果表明未受精卵中 Vgl mRNA 不仅见于皮层内,而且向动物极扩展,但仍偏于植物半球^[23]。卵裂中, Vgl mRNA 分布到多数植物极细胞中,很可能预定中胚层细胞中也含有 Vgl 转录本。而组蛋白 H 4 mRNA 多集中于动物极细胞中^[7,12]。早期囊胚中, Vgl mRNA 仍定位于植物半球,并不随卵子受精后的细胞质运动而重新排列或混合在一起^[9]。原肠期后 Vgl mRNA 突然降解并消失^[6],这一点与大鼠中存在的类似分子 Vgr-1 RNA 不同,后者存在于各期胚胎及成体组织中^[20]。

大量报道已表明了转化生长因子在中胚层形成及分化中的作用^[27,28]。Vgl mRNA 编码的蛋白质与 TGF- β 十分相似,尽管目前对其作用尚无定论,但已有人从其结构、在卵子中的分布特点及在原肠期后突然消失等几方面,认为它在中胚层形成中可能具有某种作用^[12,26,27]。Vgl mRNA 的主要蛋白产物是两个分子量分别为 43.5 KD 及 45 KD 的糖蛋白^[30],它们的差别仅在于它们的 N-连接寡糖基糖的数量。在胚胎发生中,这两种蛋白质的量有所不同,主要表现在胚胎对于 Vgl 肽链中三个潜在的 N-连接糖基化部位的利用上。在卵子及早期囊胚中,3 个部位都被利用,但在囊胚中期后仅有两个部位被利用。在囊胚中期前, Vgl 蛋白仅在植物半球合成,这与 Vgl mRNA 的定位一致。但在卵母细胞中,两种 Vgl 蛋白都可以扩散到动物半球。由于 45 KD 蛋白较为稳定,它在两半球的积累对其功能尤为重要^[30]。

总之, Vgl 与 TGF- β 间的序列同源性以及在早期胚胎中的定位说明了它在早期发育中的可能作用。有理由推想 Vgl 可能是爪蟾自身的中胚层诱导因子之一^[19,29]。但要证明这一点显然还有许多工作要做。

摘 要

爪蟾 Vgl mRNA, 为一种由卵母细胞产生并集中分布于成熟卵母细胞植物半球的母体

mRNA, 它编码类似于 TGF- β 的蛋白, 受精后, Vgl mRNA 分布于胚胎预定内胚层细胞中, 它在中胚层的形成中, 可能具有一定的作用。

参 考 文 献

- [1] Davidson E. H., 1986, *Gene Activity in early Development* 3rd. Academic press. New York.
- [2] Boterenbrood E. C and Nieuwkoop P. D., 1973, *Roux's Arch. Entwicll Mech. Org.*, 162: 341—373.
- [3] Dale, L., et al., 1985, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 89: 289—312.
- [4] Gurdon, J. B., et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82: 139.
- [5] Melton. D. A., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82: 144.
- [6] Rebagliati. M. R., et al., 1985, *Cell*, 42: 769.
- [7] Rizzino. A., 1988, *Develop. Biol.*, 130: 411.
- [8] Weeks. D. L., et al., 1985, *Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol.*, 1: 21.
- [9] Melton. D. A., et al., 1984, *Nucle. Aci. Rea.*, 12: 7035.
- [10] Shuttleworth. J. and Colman. A., 1988, *EMBO. J.*, 7: 427.
- [11] Shuttleworth. J., et al., 1988, *Gene*, 72: 267.
- [12] Weeks. D. L. and Melton. D. A., 1987, *Cell*, 51: 861.
- [13] Mason. A. J., et al., 1985, *Nature*, 318: 659.
- [14] Sporn. M. B., et al., 1987, *J. Cell. Biol.*, 105: 1039.
- [15] Derynck. R., et al., 1986, *J. Biol. Chem.*, 261: 4377.
- [16] Padgett. R. W., et al., 1987, *Nature*, 325: 81.
- [17] Rossi. F., et al., 1988 *Cell*, 52: 405.
- [18] Rosen. D. M., et al., 1988, *J. Cell. Physiol.*, 134: 337.
- [19] Kimelman. D. and Kirschner. M., 1987, *Cell*, 51: 869.
- [20] Melton. D. A., 1987, *Nature*, 328: 80.
- [21] Kintner. C. R. and Melton. D. A., 1987, *Development*, 99: 311.
- [22] King. M. L. and Barklis. E., 1985, *Develop. Biol.*, 112: 203.
- [23] Yisraeli. J. Y. and Melton. D. A., 1988, *Nature*, 336: 592.
- [24] Neff. A., et. al., 1983, *Develop. Biol.*, 97: 103.
- [25] Pondel. M. D and King. M. L., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85: 7612.
- [26] Lyons. K., et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86: 4554.
- [27] Harland. R., 1988., *TIG*, March, 4: 3, 62.
- [28] Knochel. W. and Tiedemann., 1989, *Cell. Diff. Develop.*, 26: 163.
- [29] Rosa. F. et al., 1988, *Science*, 239: 783.
- [30] Dale. L. et al., 1989, *EMBO. J.*, 8: 1057.

名词讨论

也谈 Gap junction

Gap junction 的命名, 是当时根据在浸钼的超薄切片上观察到的, 在并列质膜间具有钼能渗入的间隙。后来知道, 在间隙的一定位点钼不能通过, 有颗粒状结

构自两膜突出相互连接, 中间有通道。目前对它的结构和功能已有更多的了解。将 Gap junction 译为间隙连接还是合适的, 因为, 间隙说明这种结构所处的部位是在两细胞之间, 连接说明当时对它作用的理解。

(中科院上海细胞所 曾弥白)