

成熟促进因子对克隆重构胚核重编程的调控

蒋晓明, 王锋*

(南京农业大学动物胚胎工程技术中心, 南京卫岗 210095)

摘要: 成熟促进因子 (maturation promoting factor, MPF) 由催化亚单位 P34^{cdc2} 和调节亚单位 cyclin 组成, 对细胞周期的调控起着重要作用。日前, 在核移植研究中发现: 供体核在 MPF 的作用下发生核膜破裂 (nuclear envelop breakdown, NEBD) 和早熟染色体凝集 (premature chromosome condensation, PCC), 促进了核、质蛋白质因子的交换, 有利于核重编程的进行。PCC 还会对供体核的倍性及形态产生影响。

关键词: 成熟促进因子; 重构胚; 后成修饰; 重编程; NEBD; PCC

中图分类号: Q813 文献标识码: A 文章编号: 1000-7083 (2004) 04-0397-04

Promotion of Reprogramming by MPF on Donor Nuclei of Cloned Embryos

JIANG Xiao-ming, WANG Feng

(Center of Animal Embryo Engineering & Technology, Nanjing Agricultural University, Jiangsu Nanjing 210095)

Abstract: MPF (maturation of promoting factor), which is consisted of catalytic domain P34^{cdc2} and regulative domain cyclin, plays a crucial role on the regulation of cell cycle. In cloned embryos, MPF induces NEBD (nuclear envelop breakdown) and PCC (premature chromosome condensation), which promote the exchange of protein factors between donor nuclei and enucleated oocytes, that favor the reprogramming of donor nuclei. PCC also affects the ploidy and karyotype.

Key words: MPF; cloned embryo; epigenetic modification; reprogramming; NEBD; PCC

收稿日期: 2004-03-15 修回日期: 2004-05-10 基金项目: 江苏省自然科学基金资助 (BK2003075)

作者简介: 蒋晓明 (1980~), 男, 动物遗传育种与繁殖硕士研究生; 从事动物体细胞核移植研究。

* 通讯作者, 博士, 教授。Tel: 025-84395381; E-mail: f.wang2001@sina.com.cn

-
- [27] 卢欣. 草兔繁殖生物学的初步研究[J]. 兽类学报, 1995, 15 (2): 122~127.
- [28] 孙少祥. 野兔的生活习性、活动规律及狩猎[J]. 动物学杂志, 1984, (4): 26~29
- [29] 邓其祥. 高原兔 (*Lepus oiostolus*) 的生活习性及其防治[J]. 动物学杂志, 1960, 4 (3): 136~139.
- [30] 中国科学院青海甘肃综合考察队. 青海甘肃兽类调查报告[M]. 北京: 科学出版社, 1964: 1~80.
- [31] 罗泽珣, 冯祚建. 兔形动物的进化与分类工作述评[J]. 动物学杂志, 1981, (2): 74~77.
- [32] 罗泽珣. 我国草兔的分类研究[J]. 兽类学报, 1981, 1 (2): 149~157.
- [33] 李振赢, 罗泽珣. 我国野兔一新种——东北黑兔[J]. 东北林学院学报, 1979, (2): 71~81.
- [34] Анников АГ. Определитель Млекопитающих Монгольской Народной Республики [M]. Москва: Изд. АН. СССР, 1953: 72~77.
- [35] Sowerby A D C. The rodents and lagomorphs of China [J]. China Jour, 1933, 19: 189~207.
- [36] Tate G H H. Mammals of Eastern Asia[M]. New York: MacMillan, 1947: 201~207.
- [37] Angermann R. Beiträge zur Kenntnis der Gattung *Lepus* (Lagomorpha, Leporidae). IV. *Lepus xarkandensis* Günt-her, 1875 und *Lepus oiostolus* Hodgson, 1840 zwei endemische Hasenarten Zentralasiens[J]. Mitt Zool Mus Berlin 1967, 43 (2): 189~203.
- [38] Sowerby A D C. The Naturalist in Manchuria [M]. Tientsin Press, Limited, 1923.
- [39] Гуреев А А. Фауна СССР, Млекопитающие [M], 3 (10). Зайцеобразные (Lagomorpha). Москва: Изд. «Наука», 1964.
- [40] Corbet G B. The Mammals of the Palaeartic Region [M]. Brit Mus (Nat Hist). London and Ithaca: Cornell Univ Press, 1978: 70~74.

目前,体细胞核移植的研究方兴未艾,新的克隆动物相继问世。然而动物克隆效率依然很低,即使获得的克隆动物也常常出现一些异常表型。造成这些现象发生的原因很多,而核基因组在重新程序化过程中的错误可能是其中非常重要的原因。许多研究表明,成熟促进因子在促进基因组重新编程中起着重要作用。

1 MPF 的化学本质及其主要生理功能

1971 年, Masui 和 Markert^[1] 将用孕酮诱导成熟的非洲爪蟾卵母细胞质显微注射到另一个未成熟卵母细胞中, 导致后者发生减数分裂, 他们将成熟蛙卵中能促使卵母细胞成熟的成分称为成熟促进因子 (maturation promoting factor, MPF)。随后的研究证明, MPF 的活性几乎存在于从酵母到人体细胞的所有有核细胞中, 并在进化上高度保守, 对几乎所有真核细胞 M 期启动的调节起着关键作用。

MPF 由催化亚单位 ($P34^{cdc2}$) 和调节亚单位 (cyclinB) 组成, $P34^{cdc2}$ 和 cyclin 的复合物执行 MPF 的功能^[2]。

1.1 催化亚单位 $P34^{cdc2}$

与细胞分裂和细胞周期调控有关的基因被称为 cdc (cell division cycle) 基因, Hartwell^[3,4] 等发现了约 30 个与细胞周期调节有关的基因, 其中最重要的是 cdc2 和 cdc28, 它们是等效基因, 其基因表达产物为一种相对分子量为 34kDa 的蛋白激酶, 被称为 $P34^{cdc2}$ ^[5], 主要表现丝氨酸/苏氨酸 (Ser/Thr) 蛋白激酶活性。在细胞周期中, $P34^{cdc2}$ 的失活可以造成细胞停留在 M 期, 而且 $P34^{cdc2}$ 没有量的变化, 只是通过酪氨酸的磷酸化和去磷酸化状态的改变而发生活性的变化。G2 期前, $P34^{cdc2}$ 的酪氨酸残基被磷酸化, $P34^{cdc2}$ 处于失活状态, 到 G2 期末开始发生去磷酸化, 激酶活性出现, 靶蛋白被 $P34^{cdc2}$ 磷酸化, 细胞进入 M 期。当 $P34^{cdc2}$ 酪氨酸残基再次被磷酸化时, 激酶活性则又消失, M 期结束进入 G1 期。 $P34^{cdc2}$ 本身并不具有激酶活性, 只有与细胞周期蛋白结合后才能表现出活性。所以, $P34^{cdc2}$ 是一种周期蛋白依赖激酶 (cyclin-dependent kinase, Cdk)。

1.2 调节亚单位 cyclin

周期蛋白是 cdc13⁺ 基因的产物, 也是诱导细胞进入 M 期所必须的。在高等真核生物中, 已被鉴定出的 cyclin 家族成员有: cyclinA、B、C、D、

E、F、G、H 等, 每一种又包括数个亚种, 如 cyclinB 包括 cyclinB1 和 cyclinB2。它们在细胞间期表达和积累, 但只有到 M 期与 Cdk 结合才能表现出调节功能。所以常被称为 M 期周期蛋白。

细胞周期各时期表达不同的 cyclin。在哺乳动物中, cyclin A 在 G1 期的早期即开始表达, 并逐渐积累, 到达 G1/S 交界处, 其含量达到最大值并一直维持到 G2/M 期。cyclinB 则从 G1 期的晚期开始表达, 并逐渐积累, 到 G2 期的后期阶段达到最大值并一直维持到 M 期的中期阶段, 然后迅速降解。在绝大多数动物的卵母细胞中, MPF 的调节亚基是 Cyclin B, 其结构分为 N-末端区和 C-末端区两部分。N-末端区含有一段由 9 个氨基酸残基组成的特殊序列, 称为破坏框, 参与泛素介导的周期蛋白的降解^[6]。C-末端区的保守氨基酸序列称为周期蛋白识别框 (cyclin box), 作用是与 $P34^{cdc2}$ 结合并使其激活^[7]。

1.3 MPF 的生理功能

MPF 在 M 期可以磷酸化一系列底物, 包括染色质凝集、细胞核解体、细胞骨架崩解等^[8]。MPF 可使组蛋白 H1 上的、与有丝分裂有关的特殊位点磷酸化, 这些位点的磷酸化多发生在早、中期的染色体凝集时期, 可能与染色体凝集及有丝分裂的启动有关。催化核仁素 (nucleolin) 磷酸化, 可能导致 M 期核仁分解以及染色体凝集。催化一些原癌基因蛋白产物磷酸化, 可能降低这些蛋白在 M 期与 DNA 的结合能力, 利于染色体凝集。MPF 还能催化核纤层蛋白 (lamin) 磷酸化, 使核纤层 (lamina) 结构解体。

2 MPF 与核移植重构胚核重编程的调控

雌雄配子基因组在受精前及受精卵合子基因组在最初发育时期均处于转录抑制状态, 胚胎的早期发育受控于预先贮存在卵子里的母型物质, 只有发育到一定阶段才由转录抑制态变活化状态。通过这种延迟转录, “合子钟” (zygotic clock) 提供了一种瞬时无基因表达的状态, 为母型基因调控过渡到合子型基因调控创造了条件^[9]。此时, 基因组发生一系列后成修饰 (epigenetic modification)^[10], 使分化基因下调、早期胚胎发育所需基因被激活, 即“基因组重新编程 (reprogramming)”。特定转录因子的数量、活性以及染色质结构、成分的变化等在这一过程中均起着积极的作用。

2.1 体细胞的后成修饰

在哺乳动物个体发育过程中,不同的组织细胞根据其功能的需要,只有特定类型的基因表达。基因表达与否以及表达程度受到严格控制。决定基因何时、何地表达以及表达程度的调控机制叫作“后成修饰”(epigenetic modification)。这一现象是通过染色体结构的改变以及 DNA 甲基化模式的改变来实现的。“后成修饰”一旦形成后将随 DNA 的复制和细胞的分裂而稳定地遗传下去。

在染色体结构修饰上,体细胞在分化过程中已完成了特殊形式的抑制性染色质调集装配,如连接组蛋白、多梳蛋白及甲基-CpG 结合蛋白装配到染色质上,这些结构将染色质分割为不同的功能区并使其在细胞分裂过程中维持分化状态的稳定性。近来研究发现,组蛋白次乙酰化(hypoacetylation)和组蛋白 H3-Lys9 的甲基化也同样可以诱发染色质结构的改变,从而引起遗传外基因调控以及染色体特殊亚结构域的形成。

另一种主要的基因组后生遗传修饰是 DNA 甲基化,它调节着基因组功能的主要方面^[11]。研究表明:基因表达与 CG 甲基化程度呈负相关^[12,13], CpG 的甲基化程度控制着基因的转录表达。通过甲基化,可能会加强阻遏蛋白与 DNA 的结合或降低激活蛋白与 DNA 的结合;或者通过甲基化改变 DNA 的结构和构相,从而影响转录因子的识别。这样 DNA 的甲基化就起到了对基因表达的调控作用。

2.2 MPF 在重构胚核重编程中的促进作用

体细胞核移入去核的卵母细胞后,如果卵母细胞处于 MⅡ期,这时卵胞质中 MPF 活性很高,在 MPF 作用下供体核很快便发生一系列的形态变化,主要包括核膜破裂(nuclear envelop breakdown, NEBD)和早熟染色体凝集(premature chromosome condensation, PCC)。

2.2.1 核膜破裂 由于去核的 MⅡ期卵母细胞的 MPF 活性很高,供体细胞核移入后在 MPF 的催化作用下,核纤层蛋白被磷酸化,使得核纤层解体,进而造成了核膜发生破裂。移入核的染色体暴露在卵胞质中,使卵母细胞质因子更易于或更快地与染色质接近,而出现大量的蛋白质移动现象。供体体细胞核上的连接组蛋白 H1、核仁素以及通用转录因子 TFⅡB 等蛋白因子减少,连接组蛋白 B4、核质素(nucleoplasmin)、核小体 ATP 酶 ISW I 以及

转录因子 TFⅡF α 等结合到核上。通过染色质上蛋白质组分的大量交换使染色质的抑制性结构得以解除^[14]并抑制移入核的转录活性,使其按胞质信息开始活动^[15]。将非洲爪蟾红细胞移入卵子胞浆中,在分子伴侣核质素(neucleoplasmin)介导下,体细胞连接组蛋白 H1/H1⁰ 被卵子特异性 H1 组蛋白类似物 B4 和结构蛋白 HMG1 所替代^[16]。体细胞核中组蛋白 H1/H1⁰ 的减少将有利于基因再程序化的进行^[15];非洲爪蟾处于异染色质状态的红细胞 DNA 移入卵胞质后将发生重排并发生转录激活^[16],而在重构的核中重新加入组蛋白 H1,核的转录和复制又被阻碍^[17]。同时,核小体 ATP 酶 ISW I (SWI2/SNF2 超家族成员之一)利用 ATP 水解产生的能量刺激 TATA-结合蛋白(TATA binding protein, TBP)选择性的从染色质上释放,从而促进了体细胞核相关蛋白与胞浆蛋白互换的过程^[18]。

基因组的去甲基化有两种形式:一种是被动去甲基化(passive demethylation),即是在缺乏维持甲基化酶的情况下,随着细胞的分裂,基因组去甲基化;另一种是主动去甲基化(active demethylation),利用去甲基化酶直接将甲基从 DNA 中去除。对克隆牛桑葚胚和囊胚基因组的一些重复序列和单一序列的研究发现,其甲基化水平稍有减少与供体细胞基因组相似,比正常胚胎要高^[19]。供体核导入去核的卵母细胞会发生类似于主动的去甲基化的过程,失去一部分甲基化。但研究发现进一步的去甲基化并没有出现,相反出现了过早的再甲基化过程,说明克隆胚胎去修饰是不完全的。可以推测供体体细胞核中存在的 DNA 甲基化转移酶维持其甲基化水平。而 MPF 引起的胞质与核质蛋白质因子的交换,有可能带入去甲基化因子,从而使基因修饰能部分被去除,一定程度上有利于重构胚的发育。但其具体的去甲基化机理还不是很清楚。

2.2.2 早熟染色体凝集 对培养的体细胞研究发现,当染色质发生凝集时,转录因子等染色质结合蛋白会被排出。Campbell^[20]认为,染色质的凝集将加速核与胞质中与核重编程相关蛋白因子的交换,促进基因组重新编程的进行。

另一方面,PCC 也会对处于细胞周期不同时期的供体核倍性及形态产生影响。处于 G1/G0 期的细胞,因为 DNA 未开始复制,其核为二倍体,在 PCC 过程中,中期染色体和纺锤丝在大多数情

况下保持完整,当染色质凝集后仍为二倍体,抑制极体排除使重构胚染色体倍性不改变,重构胚可以正常发育。G2 期的细胞作核供体时,由于已经完成 DNA 复制,染色质凝集将导致形成 4 倍体,必须使一半染色体以极体形式排出才能维持染色体的正常倍性,否则重构胚不能正常发育。而处于 S 期的供体核则由于部分 DNA 正处于复制过程中,此时发生 PCC 将使染色质形成“粉末状”形态,造成 DNA 损伤,重构胚不能正常发育。

3 结语

供体核基因组正确的重编程是核移植胚胎能够正常发育所必须的。深入研究核去分化和基因组重编程的机理,了解卵母细胞中存在的重编程因子在核重编程中的功能,对于选择合适的核供体与核受体、提高克隆效率有着非常重要的意义。这也成为当前核移植研究领域的研究热点。

4 参考文献

- [1] Masui Y, Markert C L. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes[J]. J Exp Zool, 1971, 177: 129~146.
- [2] Langan T A. Mammalian growth associated H1 histone kinase a homolog of cdc2⁺/cdc28 protein kinase controlling mitotic entry in yeast and frog cells[J]. Mol Cell Biol, 1989, 9: 3860~3868.
- [3] Hartwell L H, Culotti J, et al. Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I Detection of mutants[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1970, 60: 352~359.
- [4] Hartwell L H. Genetic control of the cell-division cycle in yeast. II Genes controlling DNA replication and its initiation[J]. J Mol Biol, 1971, 59: 183~194.
- [5] Downs S M. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes [J]. Theriogenology, 1993, 39: 65~79.
- [6] Glotzer M, Murray A W, et al. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway[J]. Nature, 1991, 349: 132~138.
- [7] Holloway S L, Glotzer M, et al. Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation promoting factor[J]. Cell, 1993, 73: 1393~1402.
- [8] Smith S D, Soloye, et al. Nucleus remodeling in reconstructed cattle embryos[J]. Theriogenology, 1994, 41: 298~304.
- [9] Kaneko K J, DePamphilis ML. Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development and the TEAD family of transcription factors[J]. Dev Genet, 1998, 22: 43~45.
- [10] William M, Rideout III, et al. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome[J]. Science, 2001, 293: 1093~1098.
- [11] Reik W, Dean W, et al. Epigenetic reprogramming in mammalian development[J]. Science, 2001, 293: 1089~1093.
- [12] Wrenzykic, Wellsd, et al. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts[J]. Biol Reprod, 2001, 65: 309~317.
- [13] Barlow D P. Competition a common motif for the imprinting mechanism? [J]. EMBO J, 1997, 16: 6899~6905.
- [14] Kikyo N, Wolffe A P. Reprogramming nuclei: insights from cloning, nuclear transfer and heterokaryons[J]. J Cell Sci, 2000, 113: 11~20.
- [15] Steinbach O C, Wolffe A P, et al. Somatic linker histones causes loss of mesodermal competence in *Xenopus* [J]. Nature, 1997, 389: 395~399.
- [16] Dimitrov S, Wolffe A P. Remodeling somatic nuclei in *Xenopus laevis* egg extracts: molecular mechanisms for the selective release of histone H1 and H1 (0) from chromatin and the acquisition of transcriptional competence[J]. EMBO J, 1996, 15: 5897~5906.
- [17] Wangh L J, DeGrace D, et al. Efficient reactivation of *Xenopus* erythrocyte nuclei in *Xenopus* egg extracts[J]. Cell Sci, 1995, 108: 2187~2196.
- [18] Kikyo N, Wade P A, et al. Active remodeling of somatic nuclei in egg cytoplasm by the nucleosomal ATPase ISWI[J]. Science, 2000, 289 (5488): 2360~2362.
- [19] Kang Y K, Koo D B, et al. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos[J]. Nat Genet, 2001, 28 (2): 173~177.
- [20] Campbell K H S. Nuclear equivalence, nuclear transfer and the cell cycle[J]. Cloning, 1999, 1 (1): 3~15.