

胚胎发育合子型基因激活(ZGA)的调控机制

朱新产, 张 涌

(西北农林科技大学分子生物实验室, 陕西杨陵 712100)

Q132.4
Q756

[摘 要] 新受精卵超越早期分裂阶段必需胚胎基因转录(ZGA)的重新启动与续后调控, 在各类动物早期卵裂过程的胚胎基因转录启动精确时间是可变的, 涉及染色质结构成分、调控元件(顺/反式)、RNA 降解、DNA 复制、修饰或加工作用、卵子发生因子、合子钟及天然信号等多种因素, 因此提出哺乳动物胚胎发育期胚胎基因激活表达的调控机制。

[关键词] 合子型基因激活; 胚胎发育; 基因调控; 基因转录; 调控机制

[中图分类号] Q492.5 **[文献标识码]** A

胚胎基因转录的激活, 是胚胎发育从母型调控向胚型调控过渡的启动, 此时胚胎开始合成自己的 mRNA 及蛋白质, 而不再依赖于卵中母性遗传的 mRNA 和蛋白质。然而新受精卵中贮存大量的母性 mRNA (占总贮存量的 10%)、蛋白质、细胞器(母型物质), 支持并指导了早期胚胎的发育直到合子型基因被激活。母型物质的逐步消耗, 必然需要合子型基因的适时表达和完全取代, 以实现由母型向合子型调控的过渡。对哺乳动物小鼠的 ZGA 已有较多研究^[1~9], 其他品种动物胚胎基因转录的研究揭示了 ZGA 与染色质的重建有关, 本文综述当前哺乳动物 ZGA 这一早胚发生事件的分子调控机制及其研究进展。

1 动物胚胎 ZGA 的启动时间

胚胎 ZGA 及其调控的研究中最多的是哺乳动物小鼠(模型), 试验证据^[1~5]揭示, 2-细胞期是母型调控向胚胎型调控过渡的起始期, 最明显的 ZGA 起始发生在胚胎 2-细胞期, 包括: ①在 2-细胞期第 1 次检测到父源的 β_2 -微球蛋白(microglobulin), 高分辨率的双相蛋白电泳显示其蛋白质合成模式发生巨大变化^[1]; ②^[3H]-U 或 Br-UTP 结合到核和核仁的时间与转录抑制剂抑制 ZGA 导致胚胎发育阻断的时期(2-细胞期)^[2]; ③2-细胞期的随机 cDNA 文库中很多片段同卵母细胞期 cDNA 探针杂交无阳性, 且 2-细胞期 cDNA 亚库的 cDNA 克隆显示出 2-细胞期表达的阶段特异性^[3]; ④2-细胞周期之前首次瞬时合成了 1 组蛋白质(至少有 38 个), 该组蛋白敏感于转录抑制剂 α -amanitin, 其中结构相关的蛋白质(68, 70, 73 ku)为 2-细胞所特有, 占 2-细胞期总蛋白合成量的 4%, 并组成 1 个 70 ku 复合物, 称为转录必需复合物, 是检测 ZGA 起始的重要标志^[4]; ⑤在 2-细胞期很易观察到报告基因的表达^[5]。但通过微注射聚合酶依赖启动子质粒的报告基因结构研究推测, 2-细胞期 RNA 聚合酶 I, II, III 激活所介导的胚胎基因转录能力出现在第 1 细胞周

- [收稿日期] 1999-04-05
- [基金项目] 陕西省自然科学基金资助项目(99SM05)
- [作者简介] 朱新产(1959—), 男, 博士

期 G_2 相的发育父本前核中^[6], 在单细胞胚胎 S 相早期, 把依赖于 SP-1 转录因子的报告基因微注射入雄性原核, 在单细胞的 G_2 相表达了报告基因的活性^[5], 在单细胞晚期, 带有 HSP70.1 (热激蛋白) 启动子的报告基因出现表达活性^[7]。这些研究揭示, ZGA 起始可能在单细胞胚胎期已经发生, ZGA 有 2 次转录爆发期, 1 次是在 2-细胞期细胞周期 S 相之前, 很可能在单细胞的 G_2 相就已起始的第 1 次转录爆发期, 称之为次要合子型基因激活期 (minor ZGA), 此期伴随转录许可状态产生而产生, 受母型蛋白的翻译后修饰过程的调控, 即修饰过程直接或间接地调控 RNA 聚合酶活性的开启; 另 1 次转录爆发期是在 2-细胞 S 相之后, 称为主要合子型基因转录期 (major ZGA), 伴随着发生一系列使 RNA 聚合酶选择性地启动基因调控机制, 如基因表达增强子的依赖性 or 阶段特异性等。

两栖类动物的中囊胚过渡是研究 ZGA 调控过渡建立的模式, 动物胚胎一般是早期的卵裂速度快, 而且同步, 其细胞周期几乎仅包含 S 相 (DNA 合成) 和 M 相 (核分裂), 随后的卵裂周期减慢, 且不同步化, 两栖类动物的胚胎由同步化向非同步化卵裂过渡的时间恰好发生在 MBT 期 (美西螈是第 11 细胞周期、爪蟾是第 12 细胞周期), 试验^[8]表明, MBT 期依赖一定的核质比, 该期出现首批细胞分化, 这一期间合子型基因转录的活力与早期卵裂阶段建立的核质比有直接联系, 然而 MBT 的诱发因子迄今尚未揭示出来, 推测卵母细胞发生过程中, 细胞质中逐步累积 1 种为进入 S 相所必需的细胞因子, 受精后自细胞质逐渐消失, 并选择定位到核内, 经多次卵裂, 细胞质内的该因子耗尽, 卵裂于 MBT 期首次跨入 G 相 (过去的卵裂周期无 G 相), 重新合成该因子, 从而推动 G_1 相细胞进入 S 相, 由此认为细胞核中这种母型细胞质因子的滴度在 MBT 中起着重要作用。试验显示^[9], 在 MBT 阶段首次检测到成批合子型转录活动, 且是胚胎进一步发育所必需的, 因此, MBT 被视为是两栖类胚胎早期发育由母型调控向合子型调控过渡的开关。

不同动物由母型调控向合子型调控过渡所处的胚胎发育阶段不尽相同, 结果见表 1。

表 1 不同种类动物胚胎 ZGA 时期的比较

动物种类		大批合子型基因转录时期	最早转录活动起始期
哺乳动物	小鼠	2 细胞期	1 细胞期
	仓鼠	2 细胞期	2 细胞期
	人	4 细胞期	4 细胞期
	猪	4 细胞期	4 细胞期
	兔	16 细胞期	2 细胞期/1 细胞期
	牛	8 细胞期	2 细胞期
	羊	16 细胞期	8 细胞期
两栖类	美西螈	11 细胞周期	32 细胞期
	爪蟾	12 细胞周期	32 细胞期
线型类	蛔虫	—	4 细胞期
	线虫	9~125 细胞期	8 细胞期
鸟类	鹌鹑	—	50 细胞期
昆虫类	果蝇	14 细胞周期	32 核期
环节动物	水蛭	100~1 000 细胞期	16 细胞期
棘皮动物	海胆	受精不存在转录休止现象	自 1 细胞周期起
鱼类	斑马鱼	10 细胞周期	32 细胞期

由表 1 可见, 稍低等的动物种类中, 母型物质在 ZGA 起始之前可以指导好几轮细胞

分裂周期。而高等动物的母型物质仅支持很少的细胞分裂周期,在此之后转由合子型物质支持。母型物质在哺乳动物中指导的细胞周期数明显少于其他较低等的动物,但在母型物质控制下进行的胚胎发育时间却明显长于其他种类动物。哺乳动物的早胚被阻断于卵裂阶段,而其他动物阻断于原肠胚形成早期,早胚发育阻断发生的时间与母型调控向合子型调控过渡的时间相吻合^[10],因此,正常的调控过渡有可能依赖一些在第 1 次卵裂期间最早产生的合子型转录本。

2 合子型基因激活(ZGA)的转录调节

兔和小鼠的报告基因表达的分析研究^[11~19]表明,胚胎基因转录的起动与转录抑制环境的形成相联,抑制环境来自于转录抑制因子的重新合成,一些源自母型物质的激活,第 2 轮 DNA 复制、染色质结构的重组。抑制环境由必需的增强子序列元件、启动子序列所决定,它们促进装配 1 个激活的转录起始复合物,启动子序列特异确定转录的起始位点,增强子序列调节选择基因转录的时间和特异性^[11]。无论适宜或不适宜的阶段特异性基因表达,都代表了 ZGA 的一种特性,那些发育必需的基因,可能具有非常强的启动子或调控元件(如增强子),从而使这些基因幸免于被抑制,在 ZGA 中证实增强子消减转录抑制作用,从而导致形成特殊的染色质结构成分^[12]。小鼠和兔的增强子出现在 2-细胞期,强烈刺激弱启动子所表达,并且随着分裂持续作用^[13],这些具强启动子基因的继续表达构成了呈组型表达的基因家族,与之相对的是转录抑制状态抑制了那些不适当表达基因的继续转录,使这些基因呈阶段特异性表达,而同时又使那些在胚胎发育后期表达的基因直到适当时段才表达,胚胎若不抑制不适当的基因转录,则导致不正常的胚胎发育。

小鼠 ZGA 的内源标记物分析支持染色质介导调节胚胎基因转录的起动,标记物(在 2-细胞期瞬时表达)包括:①转录必需复合物(TRC),由 1 组结构相关的蛋白质(分子质量为 68,70,73 ku)构成,在细胞内的分布同细胞核结构相连^[4];②HSP 70.1 热激蛋白 70 家族成员^[7];③eIF-4C(人转录起始因子 eIF-4C 基因的同源基因)转录起始因子^[10]。ZGA 中这些标记物的瞬时表达在体内体外发育胚胎都可以观察到,研究也证实这些标记物的 mRNA 和蛋白质的瞬时累积是依赖于 DNA 复制的前后连续循环,它改变染色质的结构和这些基因的转录^[14]。试验证明^[1],在 S 相之前加入 aphidicolin(蚜栖霉素 DNA 聚合酶抑制剂)抑制胚胎的第 1 次 DNA 复制,则明显影响 TRC 和 eIF-4C 的合成,这个提示受精卵的第 1 次 DNA 复制对于 ZGA 的起始具正调节作用,因此 1-cell DNA 复制同 ZGA 是紧密相关的。1-cell 中的 DNA 复制可以破坏染色质中完全装配好的核小体,使被紧密包装的 DNA 有机会结合源自母型的转录因子,转录因子能同自由 DNA 或正在装配的核小体,也能同核小体核心(H₃/H₄)结合,但不能同完全装配好的核小体八聚体结合,因此 1-cell 中可能已有 RNA 聚合酶 II、转录因子等转录条件,而第 1 轮 DNA 复制提供了一个转录复合物去结合基因顺式调控元件的机会,有助于 ZGA 的起动。然而胚胎的第 2 轮 DNA 复制抑制 TRC 和 eIF-4C 的表达。HSP 70.1 也类似^[7],对此推测的解释是 2-cell 期,一旦增强子同其作用的启动子共同引起转录,转录复合物将一直保持活性,而第 2 轮复制破坏了转录复合物同 DNA 的结合,又一次提供了组蛋白同 DNA 结合的机会,最终导致呈转录抑制态的染色质的形成或伴随 2-cell 胚胎的形成,产生一种反式作用的转录

抑制因子。第2轮DNA复制提供了抑制因子同DNA结合的机会,从而进一步加深了2-cell期的转录抑制环境。相反,对胞质分裂的干扰却不抑制TRC或eIF-4C的表达。在1-cell起始期使用组蛋白脱乙酰化酶抑制剂(超乙酰化核心组蛋白(H₄)),可增加TRC合成的相对比率,而在2-cell起始期使用时则阻止TRC或eIF-4C的表达。因此,在基因中或染色体区组蛋白乙酰化水平的增强是与转录的激活或潜势相联的^[15]。

在小鼠的前核形成期,核重建出现组蛋白替代包裹精子染色质的鱼精蛋白,解释了前核转录激活上的差异,蛋白质的交换为母性衍生的转录因子结合进入父性衍生的DNA提供了可乘之机。同这一致的是激光扫描共聚焦显微镜检测的转录因子SP-1和TATA-box结合蛋白(TBP),在雄性前核中比母性前核中有较大的浓度^[16],更引人的是在小鼠2-cell期瞬时转录的另一个已知基因是母性特征基因编码的U2afbp-rs(人U2af 35 ku剪切因子基因的同源基因),一种RNA加工蛋白^[17]。基因组DNA甲基化作用(另一种形式的染色质介导调节)影响该特征基因在早期胚胎中的表达程度,其表达强度的次序为:雄性胚胎>双亲合子>雌性胚胎。

合子染色质的变化时间和续后的ZGA受母性遗传蛋白质的迟后转译磷酸化修饰作用机制的调节,依赖PKA(蛋白激酶)的cAMP抑制剂阻断TRC的合成,但却不阻断1-cell胚胎向2-cell期分裂的事实支持这个机制^[19]。相反Ca²⁺调素依赖蛋白激酶抑制剂不能抑制ZGA^[18],最近,在ZGA后早期的小鼠胚胎中,取得了染色质介导合子基因转录调节的证据^[15,20]。

3 卵子发生因子对ZGA迟后发育影响

一般认为卵母细胞合成的RNA和蛋白质贡献于ZGA之前合子的早期发育,由母型调控向合子型调控的过渡总是伴随着母型mRNA的降解及合子型基因转录的活化,但对胚胎基因转录启动后母型遗传因子给予发育的支持作用一无所知,孤雌生殖的鼠胚胎不能成功地发育,提示父性与母性间互相作用衍生的基因组很重要,小鼠生长卵子完全的成熟减数分裂,伴随着mRNA以特殊的转录方式腺苷化或脱腺苷化,并且mRNA和rRNA降解。rRNA丰度测定^[13]发现,牛和小鼠类似,发育的前3d母性RNA丢失。虽然小鼠的母性mRNA丢失,但在胚泡期的滋养外胚层和内细胞团中30%的母性RNA仍然可检测出^[19],类似的胚胎基因转录激活前合成的某些蛋白质直到桑椹期都可检测到。

DDK品系突变小鼠研究提供的有力证据是卵子发生因子支持ZGA迟后的植入前发育,当这个品系的母性和其他品系的雄性杂交时,表现出低的可育性(因不能达到胚泡期),而相互间杂交,就象同一品系杂交一样完全可育,这种现象(称之为DDK综合症)是细胞质因子(在超排DDK小鼠卵子中以1种mRNA出现)和胚胎基因组的父本成分之间的不相溶性所致,因此,卵细胞质影响蛋白质合成模式和核移植诱导产生的雄性发育率^[21]。

果蝇String基因表达的过渡调控研究^[22]获得了有一定价值的结果(图1),String是裂殖酵母cdc25的同源基因,促使P^{34cdc2}激酶去磷酸化,在果蝇早胚第14细胞周期,String转录模式发生了由母型向合子型过渡的变化。在早先的13个细胞周期中,母型String mRNA很稳定,到了第14细胞周期S相起始阶段,母型String mRNA迅速降解,而合子

型 String 基因在 G_2 相开始转录,在第 14 细胞周期微注射 α -amanitin 随后的分裂就被抑制,这与 String 突变体胚胎发育在第 14 细胞周期 M 相之前停顿相同。因此第 14 细胞周期 G_2 相的合子型 String 基因转录是胚胎进一步发育所必需的。而在更早期(第 9 细胞周期)注入 α -amanitin,胚胎发育是在完成第 14 细胞周期 M 相之后才停止发育^[21],这是母型 String mRNA 未被降解或早期合子型转录产物控制特定母型 mRNA 降解的缘故。

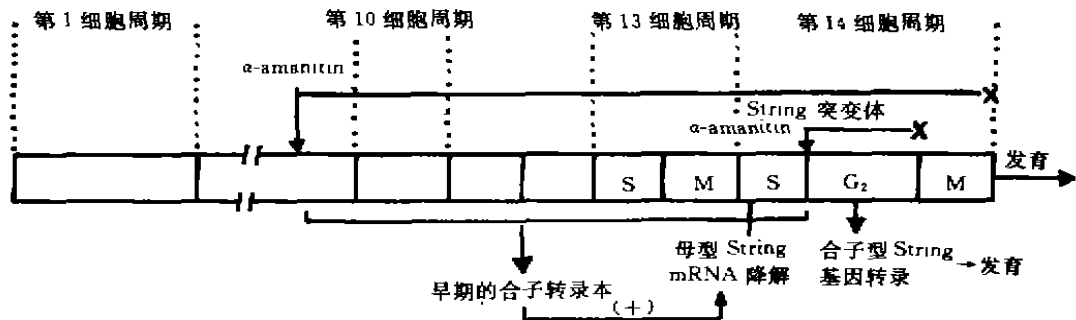


图1 果蝇早胚发育中母型 String mRNA 降解与合子型基因转录过渡图

试验也表明,实现特定阶段胚胎发育调控过渡及续后正常发育时需要卵细胞质因子(母性蛋白/mRNA)及合子型基因表达。少量早期合子型基因表达的产物,选择性地降解一些特定的母型 mRNA,促进了过渡的完成,这种选择性降解母性转录本是调控过渡过程中的必要环节,而卵细胞质因子是促进 ZGA 前后胚胎发育所必需的。

4 合子钟与天然信号的调节作用

低等动物(果蝇)ZGA 的发生同胚胎细胞的核质比相关,哺乳动物(小鼠)ZGA 的起始似乎同受精后的时间进程更相关,而同细胞周期进程的相关性则明显少些。因此提出 ZGA 似乎受胚胎细胞内的一种“时钟”——合子钟的调控,合子钟调控机制涉及蛋白质的翻译后修饰、被修饰底物的产生、对反式作用因子的调节、DNA 的复制等正负调控因素。它指导的是受精后的时间进程而非胚胎细胞的分裂数目,证据试验^[23]是用松胞素 D 或 PKC 的刺激物抑制 1-cell 胚胎的胞质分裂,则 TRC 出现的时间在分裂停顿的 1-cell 胚胎中与对照组中的 2-cell 胚胎相同。类似的,用 DNA 聚合酶抑制剂——aphidicolin(蚜栖霉素)抑制 1-cell 胚胎中的 DNA 复制,则 TRC 的发生时间也同对照组相同。关于合子钟的机制,目前了解的甚少。

哺乳动物受精卵离体培养普遍存在发育阻断现象,而且其发生的时间与早胚发育由母型向合子型调控过渡的时间相吻合,然而受精卵置于输卵管的管液中培养,或与输卵管上皮细胞共同培养,均可克服发育阻断现象而继续正常发育。由此推测,输卵管分泌某些参与克服发育阻断作用的因子,从而确保早胚正常发育的调控过渡,在缺乏源自输卵管上皮细胞的外源“信号”条件下,发生早胚发育阻断。因而提出体内早胚全面的正常发育必须依赖源自驱体细胞合成和分泌的固有天然“信号”。试验证实^[24],依赖 cAMP 的 PKA 催化

的蛋白质磷酸化反应参与小鼠 2-cell 期早胚合子型基因活化的调控机制。还证实在具完整细胞核的卵母细胞中,佛波酯(TPA)不能刺激 TPA 反应元件(TRE)驱动的 β -半乳糖苷酶报告基因的表达,却能刺激经 aphidicolin 处理而被阻遏在 1-cell 期早胚中的报告基因的表达,这些提示有不同的信号转录系统参与合子型基因的活化,然而迄今只有该类天然信号或因子可能存在的相关证据报道^[3,24],其进一步的确证、分离纯化、克隆以及对早胚发育直接、间接促进作用尚待全面研究。

[参考文献]

- [1] Conner J C, Temeles G L, Zimmermann J W, et al. Stage-specific expression of a family of proteins that are major products of zygotic gene activation in the mouse embryo[J]. *Dev Biol*, 1991, 144: 392~404.
- [2] Kanka J, Holak P, Heyman Y, et al. Transcriptional activity and nucleolar ultrastructure of embryonic rabbit nuclei after transplantation to enucleated oocytes[J]. *Mol Reprod Dev*, 1996, 43: 135~144.
- [3] Liu M Y, Li Y P. Regulation of zygotic gene activation in mouse[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 1998, 10 (2): 98~102.
- [4] Latham K E, Garrels J I, Chang C, et al. Quantitative analysis of protein synthesis in mouse embryos. I. Extensive reprogramming at the one- and two-cell stages[J]. *Development*, 1991, 112: 921~932.
- [5] Ram R T, Schultz R M. Reporter gene expression in G₂ of the 1-cell mouse embryo[J]. *Dev Biol*, 1993, 156: 552~556.
- [6] Nothias J Y, Miranda M, Depamphilis M L. Uncoupling of transcription and translation during zygotic gene activation in the mouse[J]. *The EMBO Journal*, 1996, 15: 5715~5725.
- [7] Christians E, Michel E, Adenot P, et al. Evidence for the involvement of mouse heat shock factor-1 in the atypical expression of the HSP 70.1 heat shock gene during mouse zygotic genome activation[J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17: 778~788.
- [8] Newport J, Kirschner M. A major developmental transition in *Xenopus* embryos. I. Control of the onset of transcription[J]. *Cell*, 1982, 30: 687~696.
- [9] Schubiger G, Newman S M. Determination in drosophila embryos[J]. *Am Zool*, 1981, 22: 47~55.
- [10] Telford N A, Watson A J, Schultz G A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: A comparison of several species[J]. *Mol Reprod Dev*, 1990, 26: 90~100.
- [11] Sauer F, Tjian R. Mechanisms of transcriptional activation: differences and similarities between yeast drosophila and man[J]. *Curr Opin in Genetics and Develop*, 1997, 7: 176~181.
- [12] Majumder S, Depamphilis M L. A unique role for enhancers is revealed during early mouse development[J]. *Bio Essays*, 1995, 17: 879~889.
- [13] Bevilacqua A, Kinnunen L H, Bevilacqua S, et al. Stage-specific regulation of murine HSP 68 gene promoter in preimplantation mouse embryos[J]. *Dev Biol*, 1995, 170: 467~478.
- [14] Davis W, de Sousa P A, Schultz R M. Transient expression of translation initiation factor eIF-4C during the 2-cell stage of the preimplantation mouse embryo: Identification by mRNA differential display and the role of DNA replication in zygotic gene activation[J]. *Dev Biol*, 1996, 174: 190~201.
- [15] Tsukiyama T, Wu C. Chromatin remodeling and transcription[J]. *Curr Opin Genet and Dev*, 1997, 7: 182~191.
- [16] Worrad D M, Schultz R M. Regulation of gene expression in the preimplantation mouse embryo: Temporal and spatial patterns of expression of the transcription factor SP1[J]. *Mol Reprod Dev*, 1997, 46: 268~277.
- [17] Latham K E, Rambhatla L, Hayashizaki Y, et al. Stage-specific induction and regulation by genomic imprinting of the mouse U2 afbp-rs gene during preimplantation development[J]. *Dev Biol*, 1995, 168: 670~676.
- [18] Van Blerkom J. Structural relationship and post-translational modification of stage-specific proteins synthesized

- during early preimplantation development in the mouse[J]. PNAS (USA), 1981, 78: 7962~7633.
- [19] Bachvarova R, Moy K. Autoradiographic studies on the distribution of labeled maternal RNA in early mouse embryos[J]. J Exp Zool, 1985, 233: 397~403.
- [20] Thompson E M, Legouy E L, Christians E, et al. Progressive maturation of chromatin structure regulates HSP 70.1 gene expression in the preimplantation mouse embryo[J]. Development, 1995, 121: 3425~3437.
- [21] Latham K E, Solter D. Effect of egg composition on the developmental capacity of androgenetic mouse embryos [J]. Development, 1991, 113: 561~568.
- [22] de Sousa P A, Caveny A, Westhusin M E, et al. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence factors[J]. Theriogenology, 1998, 49: 115~128.
- [23] Wiekowski M, Miranda M, Depamphilis M L. Regulation of gene expression of in preimplantation mouse embryos, Effects of zygotic gene expression and the first mitosis on promoter and enhancer activities[J]. Dev Biol, 1991, 147: 403~414.
- [24] Shen H, Gou Z, Zue J K. Mechanism of changeover from maternal to zygotic control of embryonic development [J]. J Cell Biol, 1998, 20(3): 97~102.

Regulating mechanism of zygotic gene activation in embryonic development

ZHU Xin-chan, ZHANG Yong

(Laboratory of Molecular Biology, Northwest Science and Technology University of
Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: General development of a newly fertilized egg beyond early cleavage requires the de novo initiation and subsequent regulation of embryonic gene transcription. The precise timing of the onset of embryonic transcription in variety animals varies during early cleavage divisions. It is related to regulation of more factors, including chromatin structure components, regulating elements (cis-/trnas-), RNA degradation, DNA replication, modification and processing, oogenetic factors, zygotic clock, natural signal etc. There is, therefore, the regulating mechanism on the timing and control of embryonic gene expression during development, and its regulating mechanism.

Key words: zygotic gene activation (ZGA); embryonic development; gene regulation