

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

小鼠卵母細胞及早期胚發生時母源性及胚源性基因之表現
及其扮演之生物功能(2/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-002-374-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學畜產學系暨研究所

計畫主持人：鄭登貴

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 6 月 3 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告 期中進度報告

中進度
報告

小鼠卵母細胞及早期胚發生時
母源性及胚源性基因之表現及其扮演之生物功能
(2/3)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫
計畫編號：NSC 91-2313-002-374-
執行期間：91年8月1日至92年7月31日

計畫主持人：鄭登貴
共同主持人：
計畫參與人員：蔡佩君、張虹書

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開
查詢

執行單位：國立台灣大學 畜產學系

中 華 民 國 92 年 5 月 30 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫期中報告

小鼠卵母細胞及早期胚發生時母源性及胚源性基因之表現及其扮演之生物功能
(2/3)

計畫編號: NSC91-2313-B-002-374

91年8月1日至92年7月31日

主持人: 鄭登貴 國立台灣大學 畜產學系

一、中文摘要

本研究配合 DNA 序列網羅策略與表現性序列標株之聯合應用，針對處於埋殖前發育階段之小鼠胚，嘗試篩選彼等表現具有發育階段特異性之胚源性鋅指蛋白轉錄因子。試驗結果除成功獲得一個名為 *mZFG-1* 之基因外，進一步針對該基因選殖、定序及其表現模式之鑑定結果，更證明該基因有兩種長度不同之轉錄物，分別為 *mZFG-1L* (1,338 bp) 及 *mZFG-1S* (865 bp)；其中 *mZFG-1S* 之表現始於 2-細胞階段，隨後則隨著發育與分化，而呈現有組織特異性之表現行為。俟胎小鼠發育迄懷孕第 12~16 日之際，*mZFG-1S* 之轉錄物僅於胸線、心臟及生殖壻等處被測得。此外試驗結果亦發現，*mZG-1S* 基因在成年雌性及雄性小鼠中之表現，分別均僅侷限於生殖系統可被見及；而 *mZFG-1L* 基因之轉錄物則更僅於僅雄性小鼠睪丸中有所表現，顯示 *mZFG-1L* 之表現具有雄性特異性。

關鍵詞： 小鼠胚、母源性及胚源性基因、差異性表現。

二、英文摘要

The *mZFG-1* gene (mouse zinc finger gene-1; Gene bank accession number: AF204776) that was first identified from early mouse embryos using the DNA sequencing shotgun strategy coupled with *in silico* mining of mouse EST database. Using the mouse EST sequence-based primer sets for RT-PCR, the *mZFG-1* mRNA was confirmed to be expressed in mouse pre-implantation embryo and in reproductive organs of adult mice including uterus, ovary and testis. By further library screening using this cDNA fragment as a probe and 5'-RACE techniques, two (short and long)

forms of the *mZFG-1* cDNAs were obtained. Since both mRNAs encode proteins with interspersed zinc finger motifs, we refer to the short and long *mZFG-1* transcripts as *mZFG-1S* and *mZFG-1L*, respectively. RT-PCR and Northern blotting analyses demonstrated the *mZFG-1L* mRNA was expressed only in adult testis. The short form cDNA was ubiquitously found in male and female organs and early pre-implantation embryos. Localization of these transcripts using *in situ* hybridization further confirmed that expression of *mZFG-1L* occurred only in Sertoli cells; However, mRNA of *mZFG-1S* was found in Sertoli and Leydig's cells of testis and in Granulosa cells of ovary.

Key words: mouse embryo, maternal and zygotic gene, differential expression.

三、緣由與目的

相關研究指出，哺乳動物卵母細胞於受精作用後，母源性效應(maternal effect)及胚源性效應(zygote effect)間基因表現的轉換成功與否，均與早期胚之順利發育成為緻密化桑椹胚、囊胚，乃至細胞之早期分化作用及器官之正常形成等，有極密切之關係(Levey *et al.*, 1978; Zernicka-Goetz, 1994; Nothias *et al.*, 1995; Almeida and Bolton, 1996; Tong *et al.*, 2002)。胚於埋植前、後之基因調節控制與表現量，已知隨著發育階段之進展，具有極顯著之發育階段特異性 (Casacio and Wassarman, 1982; Bolton *et al.*, 1984; Wiley *et al.*, 1992; Kanka, 2003)。發育中小鼠卵母細胞通常自生發泡瓦解(germinal vesicle breakdown)以迄第二次減數分裂停頓(first meiotic arrest)其間，已知有眾多特定基因開始大量進行其轉錄及轉譯活動，俾確保成熟卵母細胞有足夠之訊息核糖核酸及蛋白質，可支持受精卵早期卵裂發育之所需。惟停頓於第二次減數分裂中期 (metaphase)之成熟卵母細胞已知並不再有新的轉錄活動進行，而其先前大量表現之母源性轉錄及轉譯物，且以極快速度降解；一般而言，小鼠受精卵於發育達到1-細胞稍後階段之接合子期(syngamy stage)進入2-細胞階段前夕，高達90%之母源性轉錄及轉譯物業遭降解消失(Bachvarova, 1992)，並開始由胚源性基因之轉錄、轉譯物逐漸取代。設若此一傳承交替未能順利完成，則胚之早期發育即告失敗，是為胚早期發育之障阻期。胚早期發育障阻期之發生，因物種不同而略有差異；小鼠胚者已如前述常發生在2-細胞期，豬胚者發生在4-細胞期，而牛胚、山羊胚、綿羊胚及人胚者分別均發生在4-細胞期，顯示不同物種之胚源性基因轉錄及轉譯活動能否適時順利啟動，深與胚之能否克服其發育障阻有密切關係。本研究旨在以小鼠為模式，探討哺乳動物母源性與胚源性基因對於早期胚胎發育之分子調控機制。

四、結果與討論

本研究於前一(90)年度之計畫中初步發現，小鼠卵源性基因-*Mosg* (mouse oocyte specific gene) 及胚源性基因-*mZFG-1* (mouse zinc finger gene-1) 二者之表現模式，可能分別對於卵的成熟及早期胚胎發育扮演重要之調控角色，因此，於今年研究重點主要在於釐清該二者更深入之表現模式及蛋白質特性，此等研究之完成將有助於瞭解分子調控胚胎發育之機制。其中有關 *Mosg* 基因部份之研究結

果已撰妥學術論文(詳見附件一),並投稿於 Gene Expression Patterns 期刊刻正審稿中;本進度報告則就 *mZFG-1* 基因部份之重要研究結果,扼要舉述如后。本研究為謀更進一步釐清 *mZFG-1* 於早期胚胎發育及成體中如何持續扮演其特定生理功能,於本年度試驗首先以 RT-PCR 探討 *mZFG-1* 基因於全程生命過程之表現模式;試驗結果(圖一)發現,該基因之表現肇始於完成受精作用後之 1-cell 階段,而於發育達性成熟後,其表現則僅侷限在生殖系統(包括:卵巢、子宮及睪丸等)可被見及。進一步試驗應用 RT-PCR 及免疫染色等技術,嘗試探討 *mZFG-1* 在彼等埋殖後較晚期發育階段之胎小鼠各組織器官中之表現分佈情形,結果(圖二)發現 *mZFG-1* 基因於胎小鼠出生前,除於胎小鼠生殖系統諸如卵巢、子宮及睪丸等持續被表現外,且在心臟、胸腺及生殖壻等區域亦有表現。此一結果頗異於前述(圖一)在成年小鼠中之被侷限於生殖系統表現者然;顯示小鼠發育達發身年齡時分,*mZFG-1* 基因之表現模式將有一重大之改變,為此一改變所代表之生理功能意義則迄未有明,誠係未來值得深入探討並予釐清之重要研究課題。鑑於本實驗室研究重點更著重於 *mZFG-1* 基因表現對於動物生殖功能之影響;因此試驗乃更進一步經由組織免疫染色方法之應用,並先針對 *mZFG-1* 基因之於性成熟小鼠睪丸各類型細胞中之細胞特異性表現情形詳加驗證。試驗結果(圖三)證明, *mZFG-1* 基因之表現僅見之於賽透力氏細胞(Sertoli cells)及萊狄吉氏(Ledig's cells)細胞中,而在各不同成熟階段之生殖細胞(germ cells)中,則毫無任何 *mZFG-1* 基因之表現可言;相類似結果亦見之於睪丸中體細胞(testicular somatic cells)及生殖細胞(testicular germ cells)之業經體外進行初代培養者(圖四)。鑑於 *mZFG-1* 基因表現具有生殖系統特異性之事實,目前工作重點在於針對該基因之啟動子(promoter)積極進行選殖及定序,俾提供深入探討其影響雄性與雌性生殖之詳實分子調控機制;此外,未來研究亦擬針對 *mZFG-1* 基因進行缺失設計之轉基因構築,俾能經由產製轉殖動物進行活體內測試策略,釐清 *mZFG-1* 基因與動物生殖功能彼此間之關係性。

五、參考文獻

1. Almeida P. A., and V. N. Bolton. 1996. The relationship between chromosomal abnormality in the human preimplantation embryo and development in vitro. *Reprod. Fertil.* 8: 235-241.
2. Bachvarova, R.F. 1992. A maternal tail of poly(A): the long and the short of it. *Cell* 69(6):895-897.
3. Bolton, V. N., P. J. Oades, and M. H. Johnson. 1984. The relationship between cleavage, DNA replication and gene expression in the mouse 2-cell embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 79: 139-163.
4. Cascio, S. M., and P. M. Wassarman. 1982. Program of early development in mammal: post-transcriptional control of a class of proteins synthesized by mouse oocytes and early embryos. *Dev. Biol.* 89:397.
5. Kanka J. 2003. Gene expression and chromatin structure in the pre-implantation embryo. *Theriogenology* 59: 3-19.
6. Levey I. L., G. B. Stull, and R. L. Brinster. 1978. Poly(A) and synthesis of polyadenylated RNA in the preimplantation mouse embryo. *Dev. Biol.* 64:

140-148.

7. Nothias J. Y., S. Majumder, K. J. Kaneko, M. L. DePamphilis. 1995. Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. *J. Biol. Chem.* 270: 22077-22080
8. Tong Z. B., C. A. Bondy, J. Zhou, and L. M. Nelson. 2002. A human homologue of mouse Mater, a maternal effect gene essential for early embryonic development. *Hum. Reprod.* 17: 903-911.
9. Wassarman, P.M. and R.A. Kinloch. 1992. Gene expression during oogenesis in mice. *Mutat. Res.* 296:3-15.
10. Wiley L. M., J. X. Wu, I. Harari, and E. D. Adamson. 1992. Epidermal growth factor receptor mRNA and protein increase after the four-cell preimplantation stage in murine development. *Dev. Biol.* 149: 247-260.
11. Zernicka-Goetz, M. 1994. Activation of embryonic genes during preimplantation rat development. *Mol. Reprod. Dev.* 38: 30-35.

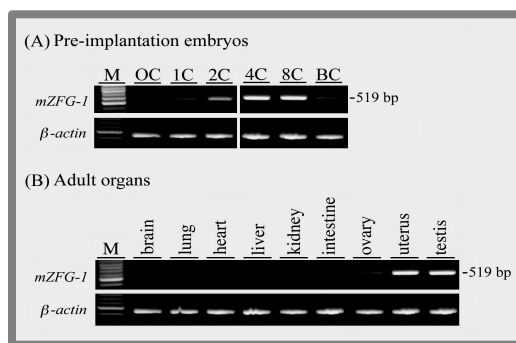


Fig. 1. Temporal expression patterns of *mZFG-1* mRNA in pre-implantation embryos (A) and normal mice tissues (B).

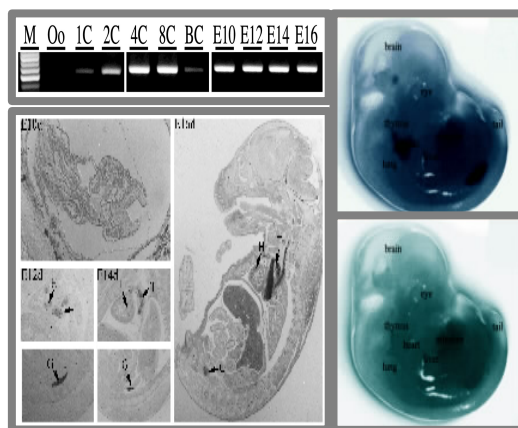


Fig. 2. Detection of *mZFG-1S* mRNA during embryonic development by RT-PCR, section *in situ* hybridization and whole mount *in situ* hybridization.

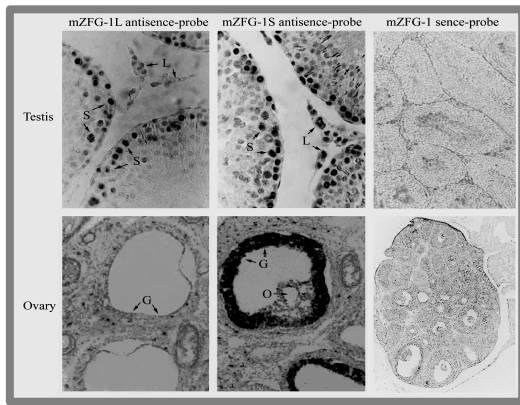


Fig. 3. Localization of *mZFG-1L* and *mZFG-1S* mRNA expressed in the testis and ovary of the mature ICR mouse (4 wks old) assessed by *in situ* hybridization. The sections were allowed to hybridize with an antisense and sense specific probes of *mZFG-1L* and *mZFG-1S*, respectively. At a higher magnification, the sections that had been allowed to hybridize with antisense probes revealed expression of the genes in the Sertoli (S), Leydig (L), and Granulosa (G) cells.

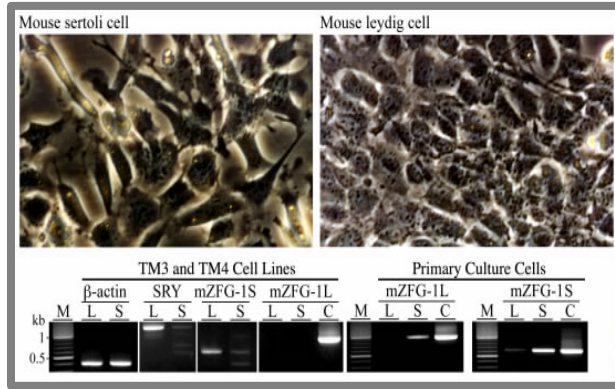


Fig. 4. Alternative expression of *mZFG-1L* and *mZFG-1S* in lineal and primary culture cells. All the cells were cultured in the culture medium of Ham's F12 with 5 % FBS at 37°C. The RT-PCR analysis was performed on cDNAs synthesized from RNA isolated from TM3, TM4 and primary culture cells. Patterns of *mZFG-1L* and *mZFG-1S* mRNA were detected using specific primers like as figure 3-5. Housekeeping (β -actin) and male-specific genes (SRY: sex determining region Y gene) were used as an internal control.