

知識天地

表觀遺傳重置 – 胚胎如何抹除父母的記憶並保留細胞的全能性？

陳柏仰助研究員、徐翊曼小姐 (植物暨微生物學研究所)

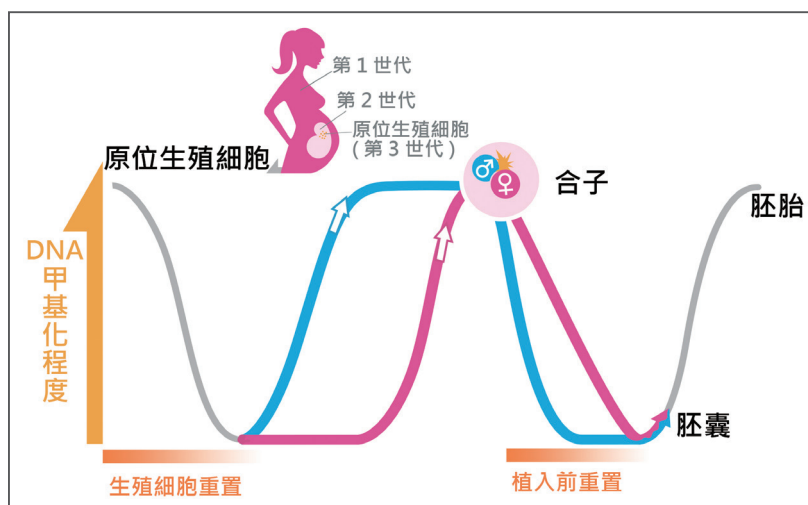
親代的遺傳訊息隨著精、卵結合遺傳到子代，開啟了胚胎發育時期。親代的表觀遺傳訊息也隨著DNA一同傳遞到子代，在傳遞的過程中這些表觀遺傳修飾如DNA上的甲基被廣泛移除而後重新建立，稱為表觀遺傳重置 (見圖一)。

第一波表觀遺傳重置發生於合子著床前 (pre-implantation reprogramming)，目的在移除親代遺留下來的表觀遺傳標記，除了印痕基因的甲基化仍被保留外，其餘被廣泛移除，至胚囊時期 (孕期第5天) 甲基化程度到達低點後才開始重新建立，於孕期第8天開始著床發育成胚胎，甲基化程度升至高點。印痕基因受甲基化的調控，僅表現親代中其中一方的遺傳訊息，因此印痕作用被認為是親代控制子代基因體的重要機制。印痕基因的表現與胚胎發育息息相關，於胚胎中著床前重置若發生問題，例如印痕基因被去甲基化，可能導致該基因表現過量，胚胎無法正常發育。

第二波的重置發生於生殖細胞 (germ cell reprogramming)，目的在賦予生殖細胞具有分化至下個世代不同細胞的全能性。生殖細胞是唯一能將親代的遺傳訊息傳遞給子代的細胞，所以相當重要。人類的生殖細胞發育起始於原腸化的開端 (孕期第2週)，原位生殖細胞 (primordial germ cell) 在後外胚層被決定，並在第3至5週間經後腸移行到生殖脊，聚集，並在第9週時進行性別分化。表觀遺傳訊息雖隨著DNA一同傳遞到子代，但生殖細胞會進行去甲基化，此時印痕基因的甲基化也被移除，直到性別分化後甲基化才逐漸開始回復。原位生殖細胞為母體內的第三世代，他的表觀遺傳模式充分表現出環境對於繁衍下一代的影響，若生殖細胞表觀遺傳重置發生問題，可能導致不孕以及其他幼兒發育疾病。

表觀遺傳調控係指在不改變DNA序列 (A、T、C、G) 的情況下透過外加修飾以調控基因的表現。在胞嘧啶 (C) 的第五碳上添加一個甲基團稱為DNA甲基化，這些甲基不僅能影響基因表現，也可遺傳到下一代，是目前被研究最廣泛的表觀遺傳調控機制之一。絕大部份的動、植物亦或是微生物中都有DNA甲基化，但隨著物種的不同，甲基化程度也有所改變，例如人類與小鼠的基因體具有高度甲基化，果蠅與蜜蜂僅有低度甲基化，而線蟲與酵母菌則被認為沒有甲基化的存在。

最新的實驗技術利用亞硫酸鹽進行全基因體甲基化定序，不僅可偵測甲基化程度，甚至可辨識甲基化發生位置的序列特异性：DNA甲基化可以發生於對稱的CG與CHG以及不對稱的CHH上 (H代表A、T、C)。哺乳動物的CG多為高度甲基化，僅約10%的CG為低度甲基化，位於啟動子序列上形成CpG島，透過甲基轉移酶添附甲基團進而調控基因表現。植物具有獨特的染色甲基酶以及RNA導引DNA甲基化作用機制，使CHG與CHH的甲基



圖一、表觀遺傳重置。原位生殖細胞進行表觀遺傳重置 (去甲基化) 後，在發育成精卵時再度獲得甲基化，精卵結合時合子的甲基化為高點，爾後進行植入前重置，甲基化程度下降，至胚囊時期為最低，並開始回復甲基化，調控基因表現發育成完整胚胎 (郭虹苙繪圖)。

化角色更為重要。真菌的甲基化具有特別的功能，多發生於跳躍基因上，一般被認為是抑制跳躍基因的活性以維持基因體的安定。

高效能液相層析 (HPLC) 是過去最廣泛用於測定DNA甲基化含量的實驗方式。首先使用核酸水解酵素將DNA拆解成含氮鹼基，在通過液相層析管柱時，各種鹼基與固定相膠體的作用力不同，在不同的時間離開管柱，透過檢測器測得不同鹼基的波峰信號，與控制組的成分比對後便可判定待測物的鹼基為何，以及各個鹼基的含量。

這個方法的準確性高，但僅能判斷甲基的含量，無法分析甲基化在基因體上的分佈。甲基免疫沈澱定序則是利用甲基結合抗體蛋白與DNA進行免疫沈澱，帶有甲基化的DNA片段被帶出，定序後可得知甲基化的主要分佈位置。此方法可以獲得全基因體的甲基化模式，但由於解析度不高，無法辨識甲基化的序列特异性。

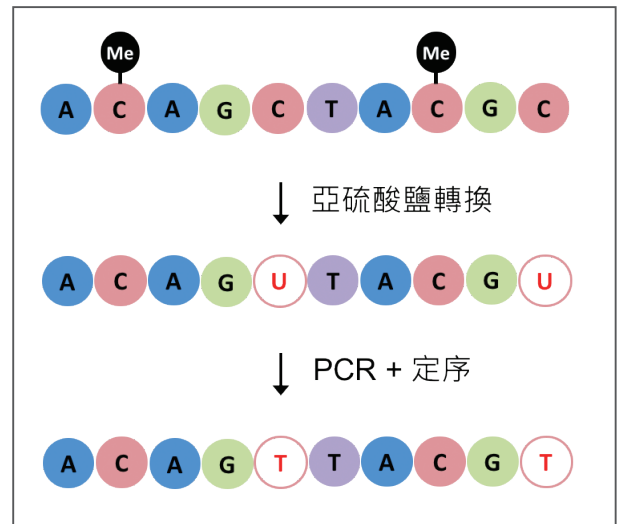
2008年全基因體亞硫酸鹽定序首先被用於解析阿拉伯芥的甲基化基因體，亞硫酸鹽會將不帶有甲基的C轉換為T，帶有甲基的C因為有甲基化的保護而維持不變，比對轉換前後便可得知哪些C帶有甲基哪些則無 (圖二)，配合全基因體高通量定序，我們可以得知全基因體中甲基化的分佈位置以及甲基化程度的強弱。此方法被視為研究甲基化的黃金標準，然而所費不貲，且資料量龐大需要高度的電腦計算分析能力。爾後針對特定位置的亞硫酸鹽定序方法亦被發展於哺乳動物的研究，先利用限制酵素裁切基因體，篩選出CpG島富集片段進行亞硫酸鹽定序，可大幅降低定序成本並獲得重點資訊。

結合全基因體亞硫酸鹽定序以及原位生殖細胞的螢光標記分離技術，我們得以詳細研究生殖細胞表觀遺傳重置的機制。我們收集了第53天至第137天的人類胚胎，以螢光標定原位生殖細胞進行收集。藉由分析基因表現量，我們發現原位生殖細胞在早期會表現細胞命運決定因子SOX17，使原位生殖細胞的身份被確定，而後期原位生殖細胞會因性別不同，基因表現有所差異。

我們建立了第一個人類生殖細胞的全基因體甲基化圖譜，得以完整觀察生殖細胞表觀遺傳重置的過程，證實原位生殖細胞在第7週前會進行大規模的去甲基化，而男性生殖細胞較女性提早開始回復甲基化 (圖一)，且在表觀遺傳重置時期，DNA甲基化與基因表現並不相關，顯示有多個基因調控因子都參與此重要的重置過程。此外，我們發現了約有六百個基因的甲基化受到特別保護，不會被重置，顯示這些基因在生殖細胞發育時期是不可或缺的。DNA甲基化具有保護基因體的功能，高度甲基化可以避免基因體變異。因此，在表觀遺傳重置的過程大規模去甲基化將使得生殖細胞較為脆弱，此時外在環境的變化也可能對基因體造成較大的影響。

在第一波的表觀遺傳重置中，甲基化在合子形成後開始下降，於胚囊時期後開始回復。基因體由父系及母系的基因結合形成，兩方在胚囊內進行甲基化的競爭分配，達成平衡後才能發育成正常的胚胎。在經濟學中，競爭市場內的各方皆有不同的目標與利益，在考量對手的可能策略後，採取對己方最有利的方案，稱為賽局理論。套用在表觀遺傳重置上，父系與母系的基因體透過合作、競爭的相互關係獲得甲基化的調控，成就一個健康的胚胎，不外乎是賽局理論的延伸。擴大來說，第二波的生殖細胞表觀遺傳重置使得第一代 (母體) 與第三代 (原位生殖細胞) 即使是不同性別也得以共存，互相競爭資源，也可用賽局理論加以模擬。

表觀遺傳的調控雖不如遺傳調控顯著，從胚胎發育時期的表觀遺傳重置來看，卻是不可或缺的過程。過去已知的印痕作用告訴我們父系與母系的印痕基因必須被保留，逃過合子植入前的表觀遺傳重置，胚胎才得以健康發育。近期的研究發現生殖細胞會進行第二波大規模的表觀遺傳重置，徹底移除細胞對親代的記憶，同時反映懷孕初期外在環境對子代，甚至是第三世代的重要影響。除了DNA甲基化，核體的修飾、核體位置以及微小RNA皆是表觀遺傳調控機制。隨著研究技術的發展，未來將會有更完整的表觀遺傳圖譜，徹底瞭解表觀遺傳重置的多方重要性。



圖二、利用亞硫酸鹽定序判別DNA甲基化。DNA中的胞嘧啶 (C) 可能帶有甲基團 (Me)。在經過亞硫酸鹽轉換後，帶有甲基團的C維持原樣，而沒有甲基化的C會被轉換成尿嘧啶 (U)，經過PCR定序後讀值為T。