

Polycomb Group 蛋白复合体与干细胞的发育调控

黄冰洋¹, 潘晓燕¹, 李质馨¹, 王正朝², 于永生³, 窦肇华¹

¹吉林医药学院组织学与胚胎学教研室, 吉林 132013

²福建师范大学生命科学学院发育与神经生物学重点实验室, 福州 350007

³吉林省农业科学院畜禽与细胞工程实验室, 吉林公主岭 136100

通信作者: 潘晓燕 电话: 0432-64560019, 电子邮件: pxy19790105@163.com

摘要: Polycomb group (PcG) 蛋白是表观遗传调控因子中一个非常重要的家族, 参与维持特定基因的沉默, 在调控干细胞增殖与分化的过程中起着非常重要的作用。PcG 蛋白可通过形成不同的蛋白复合物引起不同的染色质修饰来调控干细胞的生命活动, 其复合物主要包括两个重要的表观遗传调控因子: PRC1 (polycomb repressive complex 1) 和 PRC2 (polycomb repressive complex 2)。为了阐明 PcG 蛋白在干细胞增殖与分化中的调控作用, 本文分别从 PcG 蛋白复合体的组成、在靶基因中的定位、募集和在干细胞发育中的调控等方面进行了综述, 旨在为进一步研究干细胞的发育调控机制提供理论依据。

关键词: Polycomb group 蛋白; 干细胞; 基因沉默; 表观遗传修饰

中图分类号: R394.1 文献标志码: A 文章编号: 1000-503X(2012)03-0281-05

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2012.03.019

Polycomb Group Proteins and Their Roles in Regulating Stem Cell Development

HUANG Bing-yang¹, PAN Xiao-yan¹, LI Zhi-xin¹, WANG Zheng-chao²,
YU Yong-sheng³, DOU Zhao-hua¹

¹Department of Histology and Embryology, Jilin Medical College, Jilin 132013, China

²Provincial Key Laboratory for Developmental Biology and Neurobiology, College of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China

³Lab of Animal Molecular Biology and Cell Engineering, Branch of Animal Husbandry, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling, Jilin 136100, China

Corresponding author: PAN Xiao-yan Tel: 0432-64560019, E-mail: pxy19790105@163.com

ABSTRACT: Polycomb group (PcG) proteins are a family of epigenetic regulators responsible for the repression of genes in proliferation and differentiation of stem cells. PcG protein complex consists of two important epigenetic regulators: PRC1 (polycomb repressive complex 1) and PRC2 (polycomb repressive complex 2). In order to further understand the functions of PcG proteins in stem cell growth and differentiation, we review the PcG protein composition, PcG protein localization in the target gene, PcG protein recruitment, and the functions of PcG proteins in the development of stem cells.

Key words: Polycomb group proteins; stem cells; repression of genes; epigenetic modification

Acta Acad Med Sin, 2012, 34(3):281-285

Polycomb group (PcG) 蛋白最早是作为 Hox 基因表达调控因子被发现, 其参与了果蝇体节的分化与发育^[1]。最近研究表明, PcG 蛋白是基因组重编程的主要调控因子之一, 具有维持基因沉默的功能^[2]; 其拮抗蛋白 Trithorax group (TrxG) 则介导基因的转录激活; 二者共同在染色质水平上发挥作用^[3], 从而参与细胞周期的调控、细胞衰老、X 染色体失活和基因印记等一系列染色质活动。干细胞是一类可以自我更新、能定向分化成特定类型的组织细胞, 也是参与受损组织修复等活动的多能性细胞。在干细胞定向分化过程中, 将会发生一系列染色质的修饰活动, 如 DNA 甲基化、组蛋白乙酰化和甲基化等, 引起基因的表达变化, 发育调控因子在此过程中起了非常重要的作用。因此, 探讨与干细胞定向分化密切相关的发育调控因子的作用机制, 将为干细胞体外定向诱导分化和体内移植治疗一些重大疾病提供新的理论依据。

目前的研究已经发现, PcG 蛋白作为一个重要的发育调控因子, 存在于鼠和人胚胎干细胞中, 其能沉默调控干细胞的定向分化基因, 维持干细胞发育的多能性, 在干细胞增殖与分化过程中具有非常重要的调控作用^[4]。为进一步探讨其对干细胞增殖与分化的分子调控机制, 本文分别从 PcG 蛋白复合体的组成、PcG 蛋白在靶基因中的定位、PcG 蛋白的募集和 PcG 蛋白在干细胞增殖与分化中的调控作用等方面展开了阐述。

PcG 蛋白复合体的组成

PcG 蛋白复合体由两个核心复合体 PRC1 (polycomb repressive complex 1) 和 PRC2 (polycomb repressive complex 2) 组成^[5], 这 2 个核心复合体中包含了不同的蛋白亚基。PRC1 核心组分为 Pc (Polycomb)、Psc (Posterior sex combs)、Pho (Polyhomeotic)、Sex combs extra (RING)。PRC2 包含 4 种核心组分, 分别为 Su(z)12 (Suppressor of Zeste 12)、E(z) (Enhancer of Zeste2)、Esc (Extra Sex combs and Extra Sex combs like) 以及核重塑因子 Nurf55 (Caf1)。PRC1 主要是维持抑制状态染色体的稳定性; PRC2 在转录抑制起始阶段起了关键作用。PRC1 中的 RING1B 具有催化活性, 其能催化 H2A 组蛋白第 119 位酪氨酸的泛素化, 参与了基因的转录沉默^[6]; Psc 能协助提高 RING1B 的催化活性。Pc 能直接与发生

甲基化的 H3K27me3 结合, 起到维持基因沉默的作用。Cao 等^[7-8] 研究显示, PRC2 中的催化亚基 EZH2 含有 SET 功能域, 具有甲基转移酶活性, 可催化 H3 组蛋白上的第 27 位酪氨酸发生二重或三重甲基化, H3K27 的甲基化是 PcG 蛋白引起基因沉默的标志; 其他的亚基, 如 Su(z)12、Esc 和 Nurf55 不具有催化功能, Su(z)12 和 Esc 能促进 H3K27 甲基转移酶的功能, Nurf55 参与了与核小体的结合, 促进了核小体的甲基化^[8-9]。

2009 年, 在小鼠胚胎干细胞中的 PRC2 复合体中发现了 3 种新的 Jarid2、Mtf 2 (metal response element binding transcription factor 2) 和 esPRC2p48 蛋白^[10-11]。Jarid2 具有 1 个 ARID DNA 结合域, 能指导 PRC2 的募集, 影响 PRC2 甲基化转移酶的活性。Mtf 2 能使维持多能性基因表达的调控因子基因沉默, 进而调控着多能基因的表达程序。esPRC2p48 是一个支架蛋白, 能提高 PRC2 中 H3K27me3 的活性。因此, 整个 PcG 蛋白复合体通过其不同的蛋白亚基与靶基因的结合, 催化组蛋白的甲基化, 且保持甲基化的组蛋白长久地与靶基因结合在一起, 进而维持着基因的转录沉默。

PcG 蛋白在干细胞中靶基因上的定位

在哺乳动物胚胎干细胞中特定分化基因的启动子区上存在沉默复合体 PRC1 (Phc1、Rnf 2)、PRC2 (Suz12、Eed) 和沉默性组蛋白修饰 H3K27me3^[12], 使得这些靶基因的表达水平都很低。Eed 和 Suz12 突变会导致靶基因失去抑制状态, 细胞快速分化^[12-13]。说明 PcG 蛋白通过介导的分化相关基因的沉默维持干细胞的多能性, 一旦失去 PcG 蛋白的抑制作用, 靶基因就会开始表达, 细胞就进入了分化状态。在细胞分化的过程中, 基因的转录还需要有转录因子的参与, 研究发现胚胎干细胞中许多的转录因子, 如 Oct4、SOX2 和 NANOG 等都与 PRC2 共同定位, 干扰了转录因子与靶基因的结合, 实现了靶基因的沉默^[4]。

PcG 介导的基因沉默必须是动态的过程, 以便在细胞分化的过程中能使沉默的靶基因被重新激活。Boyer 等^[4] 观察到当胚胎干细胞分化为神经母细胞时, 结合在神经发育特异基因上的 PcG 蛋白以及 H3K27me3 的数量明显减少; 在胚胎干细胞向肌肉细胞分化时也观察到同样的结果^[13]。人畸胎瘤细胞

NTERA2 中 PcG 蛋白质会和其靶基因（如 OLIG2、NEUROG2、MT1G 和 HOXA7-13 等）结合，使其处于沉默状态，当 H3K27me3 和 PcG 蛋白数量减少时会引起 NTERA2 向神经细胞分化^[13]。这些结果表明，PcG 蛋白通过动态地与靶基因结合和分离调控着细胞的增殖和分化状态。

PcG 蛋白在干细胞中的募集

靶基因上形成 PcG 蛋白复合体是一个 PcG 蛋白亚基逐渐被募集的过程。在果蝇控制体节形成的 HOX 基因中发现 1 种调控元件，该元件具有锌指蛋白结合位点，称 polycomb 应答元件（polycomb responsive element, PRE）^[14]。利用染色质免疫共沉淀（chromatin Immunoprecipitation, ChIP）技术分析 HOX 基因 PRE 元件显示，2 个锌指 DNA 结合蛋白 PHO 和 PHO-L 均能结合到 PRE 元件上，PHO 和 PHO-L 蛋白的缺失将会导致 PRC2 和 PRC1 其他蛋白从 HOX 基因 PRE 元件上丢失，同样破坏 PRE 元件，也会导致 PRC2 和 PRC1 其他蛋白从 PRE 元件上的去除，说明 PHO 介导了 PRC2 和 PRC1 其他蛋白与 PRE 元件的结合，导致了基因沉默^[15]。后来研究发现，在 PHO 介导 PRC2 和 PRC1 其他蛋白与 PRE 元件结合的过程中，需要 SFMBT（scm-like with four MbT domain-containing protein 1）蛋白的参与，PHO 会先和 SFMBT 结合形成两亚基的复合体，称 PHO 沉默复合体（pleiohomeotic repressive complex, PHO-RC）。PcG 蛋白复合体在靶基因上形成的过程中，PHO-RC 会先结合到 PRE 元件上，然后 PRC2 和 PRC1 其他蛋白再分别被募集结合到 PHO-RC，所以 PHO-RC 起了募集和介导基因沉默的作用。

迄今为止，PREs 在果蝇中被广泛研究，而在哺乳动物中尚未见报道。哺乳动物细胞也存在一些 DNA 元件，这些元件对基因启动子处 PcG 蛋白复合体的募集和依赖 PcG 的基因沉默是必须的。目前认为，胚胎干细胞中的 CpG 岛是 PcG 主要的靶点，那么哺乳动物中这些 CpG 岛最有可能就是果蝇中 PREs 元件的一部分^[16]。在哺乳动物干细胞中，YY1（果蝇 Pho 同源蛋白）结合到基因转录因子上后会募集 PRC1 的其他蛋白结合到染色质上^[17]；锌指蛋白 AEBP2 参与了 PRC2 与 DNA 靶序列的结合，且能与 PRC2 一起从 DNA 上被去除^[8]；EZH 蛋白的 SET 功能域具有 PRC2 其他蛋白的募集作用，表明 DNA 特

定序列与 SET 功能域的结合可能对 PRC2 的靶定是必须的^[18]。体外实验发现，AEBP2 并没有直接和 EZH2 相接触^[8]，说明在此过程中可能还有其他的蛋白参与了 PRC2 的募集。Herranz 等^[19]研究发现，转录因子 SNAIL1 可分别与 EZH2 和 SU12 相互作用，募集 PRC2 的其他蛋白，使钙黏连蛋白 1（E-cadherin）基因沉默。Barna 等^[20]通过 PLZF 蛋白与 BMI1 蛋白免疫共沉淀实验发现，PLZF 与 BMI1 存在于同一个核小体上，通过二者的相互作用募集 PcG 蛋白以沉默 HoxD 基因。如果将胚胎干细胞的转录因子 Oct4 基因敲除，将会减少结合到目的基因上 PcG 蛋白的量，进而影响胚胎干细胞多能性的维持^[4]，Oct4 对于 PcG 蛋白的募集是必须的。另外发现，一些非编码 RNA（ncRNAs）也可以与 PRC2 相互作用，参与了 PcG 蛋白的募集。不同的 PcG 靶点具有不同模式的 PRE，需要不同蛋白结合因子的参与，说明 PcG 蛋白通过多种募集机制，调控着靶基因的表达。

PcG 蛋白无论在胚胎干细胞还是成体干细胞的发育中都扮演了重要的角色，其可通过沉默转录因子基因抑制干细胞的分化^[12]。在胚胎干细胞以及成体干细胞中都富含 PcG 蛋白，随着干细胞的分化，PcG 蛋白的表达水平开始下降。Ezh2 在胚胎干细胞中高表达，当胚胎干细胞分化时，Ezh2 和 Eed 的表达水平下降而 Suz12 的表达水平保持不变^[21]，表明干细胞的分化过程可能需要特定组分的 PRC 参与。研究发现，Suz12 是胚胎干细胞分化过程中特异性基因表达所必需的，Suz12 敲除的胚胎干细胞其分化能力受到显著影响^[22]。Eed 也是维持干细胞多能性的重要蛋白，Eed 双突变的胚胎干细胞更容易发生分化，但其并不能分化为所有的细胞^[4]，这就表明胚胎干细胞的多能性需要 PcG 蛋白的精确调控。Ezh2 和 RING1B 蛋白在成体干细胞的增殖和分化中起了重要的调控作用。Ezh2 过表达能激活造血干细胞的增殖潜能^[23]；胚胎神经干细胞中 RING1B 失活将会影响其自我增殖的能力，导致神经元的过早分化发育^[24]。PcG 蛋白复合体调控着胚胎干细胞和成体干细胞的增殖和分化。

PcG 蛋白复合体调控干细胞的增殖和分化是通过改变基因的表达引起的，其作用机制可能有以下两种：（1）PcG 蛋白具有组蛋白甲基化酶和泛素化转移酶活性，能使组蛋白发生甲基化和泛素化，调控着靶基因的表达。PRC2 复合体中 EZH1/EZH2、

SUZ12、EED、Jarid2, Mtf 2 和 esPRC2p48 蛋白之间能够协同作用, 促进组蛋白发生甲基化。PRC2 催化的 H3K27me3 修饰和基因沉默密切相关。Bernstein 等^[25]发现, 两个功能相对的组蛋白修饰, 如起沉默作用的 H3K27me3 和起激活作用的 H3K4me3 可共存于同一个核小体上, 这种组蛋白的修饰称二价功能域。研究显示, PcG 蛋白结合的靶基因在分化过程中会发生沉默性组蛋白 H3K27me3 的丢失, 使得靶基因被活化^[26]。在胚胎干细胞分化为神经祖细胞的过程中, PcG 蛋白结合的靶基因开始发生甲基化, 表明 PcG 蛋白与靶基因上新甲基化的形成密切相关。在终末分化的神经细胞中神经元特异性基因被激活, 在胚胎干细胞中这些靶基因没有被 H3K4me3 修饰, 而在祖细胞中这些 PcG 蛋白结合的靶基因上出现了二价功能域, 在终末分化过程中二价功能域发生了 H3K27me3 的丢失^[27]。这些现象说明二价功能域的出现是 PcG 蛋白靶定的结果, 并非胚胎干细胞特有的特点; 在细胞终末分化的过程中, PcG 蛋白为基因沉默或活化提供了指导。在胚胎干细胞中, 分化标记基因被 PcG 蛋白复合体结合沉默, 这些沉默的基因上存在组蛋白 H2AZ 变体和 PRC2 复合体, 这个组蛋白变体是 PRC1 泛素化转移酶的靶点^[26], H2AZ 的泛素化使得 RNA 聚合酶 II 的失活, 抑制了基因的转录。在胚胎干细胞分化的过程中, H2AZ 和 PcG 蛋白复合体解体, H2AZ 转变为 H2A, 脱去了泛素化作用, RNA 聚合酶 II 被激活; 同时靶基因上的二价功能域向 H2K4me3 单价功能域转变, 引起了靶基因的激活^[27]。因此, 在诱导分化的过程中, 通过 H2AZ 和 PcG 蛋白的相互作用, 共同调控着细胞的命运。(2) PcG 蛋白能与转录因子相互作用, 共同调控细胞发育。研究发现, 胚胎干细胞中的重要转录因子 OCT4、SOX2 和 NANOG 大部分都与 PRC2 共同定位, 转录因子 Oct4 能将 PcG 蛋白募集到目的基因的启动子处^[4], 阻止其他转录因子与靶基因的结合, 抑制分化关键基因的表达, 维持着干细胞的多能性发育。另外, 这些转录因子也与 RNA 聚合酶 II 的结合区域有关, 这些区域是人类胚胎干细胞转录激活必须的。因此, 在胚胎干细胞中 Oct4、SOX2 和 NANOG 可能直接指导着 PcG 蛋白或 TrxG 蛋白向目的基因的靶向作用, 也可能还需要其他因子的参与。总之, 干细胞的发育也是干细胞多能性转录因子和 PcG 蛋白共同作用的结果。

综上, PcG 蛋白是一类重要的基因表观遗传修

饰因子, 能调控靶基因的表达状态, 进而决定细胞的发育命运, 在干细胞的增殖和分化过程中发挥至关重要的作用。随着 PcG 蛋白研究的进一步深入, 不断地发现了新的 PcG 蛋白复合体的组成, 参与 PcG 蛋白定位、募集和调控的新分子。但由于 PcG 复合体复杂的蛋白组成, 且其蛋白成分在细胞发育中处于动态的变化过程, 在募集和调控过程中复杂调控蛋白的参与, 使其对干细胞靶基因的转录抑制作用十分复杂, 研究的不是很清楚。如果能通过细胞外信号分子改变干细胞中 PcG 蛋白复合体的形成和调控作用, 将为调控干细胞的增殖和定向诱导分化提供新的研究思路。令人振奋的是, 人们近期发现了细胞外信号分子形态发生素 Shh (sonic hedgehog) 可调节 PcG 基因 Bmi-1 的表达^[28], 这将为研究细胞外信号分子与 PcG 蛋白之间的调控机制奠定基础。因此, 深入研究 PcG 蛋白在干细胞发育中的调控机制以及细胞外信号对 PcG 蛋白的调控, 将为干细胞多能性的维持、定向诱导分化以及临床上干细胞移植治疗一些重大疾病提供新的理论依据。

参 考 文 献

- [1] Lewis EB. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila* [J]. *Nature*, 1978, 276(5688):565-570.
- [2] Schwartz YB, Pirrotta V. Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes [J]. *Nat Rev Genet*, 2007, 8(1):9-22.
- [3] Strübbe G, Popp C, Schmidt A, et al. Polycomb purification by *in vivo* biotinylation tagging reveals cohesin and Trithorax group proteins as interaction partners [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2011, 108(14):5572-5577.
- [4] Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, et al. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells [J]. *Nature*, 2006, 441(7091):349-353.
- [5] Levine SS, King IF, Kingston RE. Division of labor in polycomb group repression [J]. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29(9):478-485.
- [6] Stock JK, Giadrossi S, Casanova M, et al. Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells [J]. *Nature Cell Biol*, 2007, 9(12):1428-1435.
- [7] Cao R, Zhang Y. The functions of E (Z) /EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3 [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2004, 14(2):155-164.
- [8] Cao R, Zhang Y. SUZ12 is required for both the histone

- methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex [J]. *Mol Cell*, 2004, 15(1):57-67.
- [9] Song JJ, Garlick JD, Kingston RE. Structural basis of histone H4 recognition by p55 [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(10):1313-1318.
- [10] Peng JC, Valouev A, Swigut T, et al. Jarid2/Jumonji coordinates control of PRC2 enzymatic activity and target gene occupancy in pluripotent cells [J]. *Cell*, 2009, 139(7):1290-1302.
- [11] Shen X, Kim W, Fujiwara Y, et al. Jumonji modulates polycomb activity and self-renewal versus differentiation of stem cells [J]. *Cell*, 2009, 139(7):1303-1314.
- [12] Gao Y, Hyttel P, Hall VJ. Regulation of H3K27me3 and H3K4me3 during early porcine embryonic development [J]. *Mol Reprod Dev*, 2010, 77(6):540-549.
- [13] Bracken AP, Dietrich N, Pasini D, et al. Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(9):1123-1136.
- [14] Köhler C, Villar CB. Programming of gene expression by polycomb group proteins [J]. *Trend Cell Biol*, 2008, 18(5):236-243.
- [15] Wang L, Brown JL, Cao R, et al. Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes [J]. *Mol Cell*, 2004, 14(5):637-646.
- [16] Kim H, Kang K, Kim J. AEBP2 as a potential targeting protein for Polycomb Repression Complex PRC2 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(9):2940-2950.
- [17] Herranz N, Pasini D, Diaz V, et al. Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail1 transcription factor [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(15):4772-4781.
- [18] Jorgensen HF, Giadrossi S, Casanova M, et al. Stem cells primed for action: Polycomb repressive complexes restrain the expression of lineage-specific regulators in embryonic stem cells [J]. *Cell Cycle*, 2006, 5(13):1411-1414.
- [19] Herranz N, Pasini D, Diaz VM, et al. Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail1 transcription factor [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(15):4772-4781.
- [20] Barna M, Merghoub T, Costoya J, et al. Plzf mediates transcriptional repression of Hox D gene expression through chromatin remodeling [J]. *Dev Cell*, 2002, 3(4):499-510.
- [21] de la Cruz CC, Fang J, Plath K, et al. Developmental regulation of Suz12 localization [J]. *Chromosoma*, 2005, 114(3):183-192.
- [22] Ezhkova E, Lien WH, Stokes N. EZH1 and EZH2 cogovern histone H3K27 trimethylation and are essential for hair follicle homeostasis and wound repair [J]. *Genes Dev*, 2011, 25(5):485-498.
- [23] Roman TM, Mendez GH, Hijikata A, et al. Maintenance of undifferentiated state and self-renewal of embryonic neural stem cells by Polycomb protein Ring1B [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(7):1559-1570.
- [24] Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, et al. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells [J]. *Nature*, 2008, 454(7205):766-770.
- [25] Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, et al. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells [J]. *Cell*, 2006, 125(2):315-326.
- [26] Creyghton MP, Markoulaki S, Levine S, et al. Polycomb group proteins set the stage for early lineage commitment [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(3):288-298.
- [27] Zilberman D, Coleman-Derr D, Ballinger T, et al. Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks [J]. *Nature*, 2008, 456(7218):125-129.
- [28] Leung C, Lingbeek M, Shakhova O, et al. Bmi1 is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas [J]. *Nature*, 2004, 428(6980):337-341.

(收稿日期: 2011-05-25)