

领域前沿 · 中国



金颖, 中国科学院上海生命科学研究院/上海交通大学健康科学研究所研究员。1983年于中国医科大学获得医学学士学位; 1988年于北京协和医科大学/中国医学科学院基础医学研究所获得理学博士学位; 博士毕业后分别在美国北德克萨斯州医学中心和美国德克萨斯大学西南医学中心进行博士后训练; 1999年底, 金颖博士放弃了国外优越的生活与科研条件, 毅然回到国内出任上海交通大学医学院基础医学院研究员; 2001年起担任健康科学研究所干细胞研究课题组长并于2004年获得中国科学院“百人计划”资格; 2006年起担任中国科学院干细胞生物学重点实验室主任。在此期间, 金颖研究员分别于2011年担任国家科技部重大科学研究计划首席科学家、2016年担任国家科技部重大专项项目负责人。此外, 金颖研究员还出任国际干细胞学会会员、中国细胞生物学会干细胞分会常务委员、上海细胞生物学学会理事。金颖研究员领导的研究团队主要从事多能干细胞自我更新及发育多能性的分子机制和多能干细胞向神经谱系分化的分子调控的研究。该团队建立了多株人ESC系和正常人及疾病患者体细胞来源的诱导性多能干细胞系。利用这些细胞系, 他们回答了干细胞命运决定分子调控机制中的若干重要科学问题; 建立了人早期器官形成期的全基因组表达谱式, 阐明胚胎形态与基因表达谱之间的变化规律; 建立了人胚胎干细胞定向神经分化的技术体系。他们的主要研究成果集中在揭示多能干细胞关键转录因子如何建立自我更新的调控环路和如何抑制诱导多能干细胞分化的信号通路上, 为体外大量扩增和定向诱导多能干细胞的分化奠定了分子基础。最近, 他们通过大规模siRNA筛选, 鉴定出了一批对人胚胎干细胞特性的维持具有重要作用的因子。金颖研究员在Cell Stem Cell(2011和2016)、JCI(2013)、Development Cell(2010)、PNAS(2010)、EMBO R(2014)、Cell Research(2016)等国际著名学术期刊发表了一系列原创性成果。

人胚胎干细胞自我更新特性维持的 表观—代谢调控新机制

朱哲鑫 金颖*

(中国科学院干细胞生物学重点实验室, 中国科学院分子细胞科学卓越中心,
中国科学院上海生命科学研究院/上海交通大学医学院健康科学研究所, 上海 200031)

摘要 染色质地貌和细胞代谢对细胞命运决定有着重要的作用, 但人们对它们之间的相互作用却了解甚少。我们运用基因组范围的siRNA筛选, 发现PHB对于维持人胚胎干细胞的自我更新具有重要的作用。其具体机制如下: PHB可以和H3.3的伴侣蛋白HIRA形成蛋白复合体; 与PHB

中国科技部基金(批准号: 2016YFA0100100、2013CB966801)、国家自然科学基金(批准号: 91419309)和中国科学院战略先导A和B项目(批准号: XDA01010102、XDB19020100)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-54923340, E-mail: yjin@sibs.ac.cn

This work was supported by Grants of the Ministry of Science and Technology of China (Grant No.2016YFA0100100, 2013CB966801), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.91419309) and the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (Grant No.XDA01010102, XDB19020100)

*Corresponding author. Tel: +86-21-54923340, E-mail: yjin@sibs.ac.cn

网络出版时间: 2017-02-16 15:54:42

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170216.1554.002.html>

相似的是, HIRA对人胚胎干细胞特性的维持也起着重要的作用; 特别是PHB和HIRA对异柠檬酸脱氢酶启动子区域染色质结构的调节, 调控着对胚胎干细胞命运有着重要作用的代谢产物—— α -酮戊二酸的产生。我们的研究揭示了在人胚胎干细胞的细胞核中, PHB通过与HIRA复合体相互作用参与维持正常染色质的结构和重要代谢产物的生成, 进而使人胚胎干细胞处于自我更新状态。

关键词 人胚胎干细胞; PHB; HIRA; α -酮戊二酸

The Mechanism of Epigenetic-Metabolic Circuit in Maintaining hESCs Identity

Zhu Zhixin, Jin Ying*

(Key Laboratory of Stem Cell Lab, CAS Center for Excellence in Molecular Cell Science, Institute of Health Sciences, Chinese Academy of Sciences/Shanghai JiaoTong University School of Medicine, Shanghai 200032, China)

Abstract The chromatin landscape and cellular metabolism both contribute to cell fate determination, but their interplay remains poorly understood. Using genome-wide siRNA screening, we have identified prohibitin (PHB) as an essential factor in self-renewal of human embryonic stem cells (hESCs). Mechanistically, PHB forms protein complexes with HIRA, a histone H3.3 chaperone, and stabilizes the protein levels of HIRA complex components. Like PHB, HIRA is required for hESCs self-renewal. PHB and HIRA act together to control global deposition of histone H3.3 and gene expression in hESCs. Of particular note, PHB and HIRA regulate the chromatin architecture at the promoters of isocitrate dehydrogenase genes to promote transcription and, thus, production of α -ketoglutarate, a key metabolite in the regulation of ESC fate. Our study shows that PHB has an unexpected nuclear role in hESCs that is required for self-renewal and that it acts with HIRA in chromatin organization to link epigenetic organization to a metabolic circuit.

Keywords human embryonic stem cells; PHB; HIRA; α -ketoglutarate

1 相关研究背景及进展介绍

人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)分离自人胚胎内细胞团, 具有无限的自我更新和多向分化的潜能。因此, hESCs是研究人类早期胚胎发育的优良工具, 也是未来临床器官修复治疗的重要细胞来源^[1-2]。为了更好地认识hESCs的潜能, 我们有必要对hESCs特性的建立和维持进行全面的研究。维持细胞命运所需要的表观遗传调控体现在不同的染色质层次上——组蛋白修饰^[3]、DNA甲基化修饰、ATP依赖的染色质重塑子以及组蛋白变体。比如H3.3极其特异性的分子伴侣, 相对于DNA复制依赖型的经典组蛋白H3.1和H3.2, 非经典的组蛋白变体H3.3A和H3.3B在整个细胞周期中泛表达, 起初它们在染色质上的富集被认为是一种活化的染色质修饰^[4], 但随后的研究表明, 这些变体也存在于基因组的转录沉默位点^[5]。在小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells, mESCs)中, 通过对全基因组的H3.3进行ChIP-seq(chromatin

immunoprecipitation-sequencing)分析发现, HIRA(组蛋白分子伴侣, 能将H3.3以细胞周期非依赖性的方式掺入到染色质中)依赖的H3.3不仅置入到活跃表达基因的启动子区域, 而且也存在于发育相关基因的启动子区域^[6]。考虑到hESCs和mESCs存在着巨大的不同, 因此, 我们十分有必要对HIRA依赖的H3.3置入在hESCs自我更新中的作用进行研究。

除了表观遗传修饰之外, 细胞代谢状态对于细胞的命运决定也发挥着重要的作用^[7-8]。比如, α -酮戊二酸(α -ketoglutarate, α -KG), 双加氧酶的重要辅因子, 三羧酸循环的中间产物, 也是Jumonji family组蛋白去甲基化酶和ten-eleven translocation family DNA羟化酶等双加氧酶的辅因子^[9-10]。最近的研究还显示, α -KG能够维持mESCs的多能性^[11]; 但在hESCs分化过程中, 往分化诱导培养液中添加 α -KG能够促进细胞的分化^[12]。但是, α -KG在hESCs自我更新中的作用还没有被报道; 此外, 对产生 α -KG的异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase,

IDH)是如何受到表观调控的也没被很好地阐释过。因此,我们很有必要对维持hESCs自我更新机制,表观-代谢环路进行深入研究。

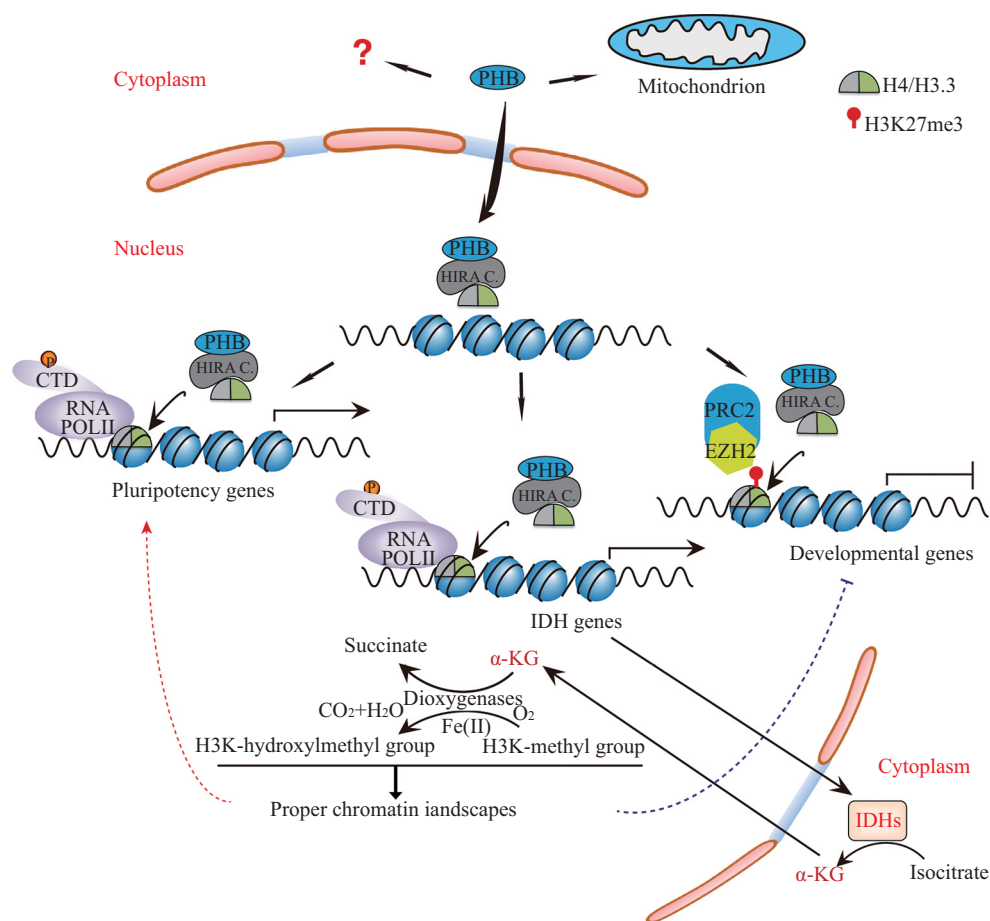
2 在全基因组范围内利用siRNA对维持hESCs特性具有重要作用的转录因子进行筛选

为了系统地鉴定维持hESCs自我更新的重要因素,我们首先建立了1株无动物源成分的SHhES8 hESCs细胞系,并构建了OCT4启动子驱动的EGFP报告系^[13]。借助此报告系,我们利用Human siGENOME siRNA Library-Transcription Factors-SMARTpool进行了高通量结合肉眼观测细胞形态的双重筛选手段,一共得到了25个候选基因,其中包括OCT4^[14]、RUVBL2^[15]、SFRS2^[16]等已知对ESCs自我更新具有重

要作用的因子。这些实验充分说明了我们的筛选系统具有有效性和可靠性。

3 PHB在维持hESCs表观-代谢环路中的重要作用

我们课题组对上述筛选出的25个基因进行了研究,我们的研究主要集中在抗增殖蛋白(prohibitin, PHB)上。PHB是一个32 kDa大小的泛表达的蛋白,参与细胞能量代谢、细胞增殖、转录调控和肿瘤发生等过程^[17-20]。我们的研究发现,PHB对维持hESCs自我更新特性具有非常重要的作用(图1)。特异性地敲低PHB后,hESCs会出现明显的分化表型;更重要的是,敲低PHB后,hESCs会出现组蛋白甲基化修饰的异常。我们借助于IP/MS技术手段,发现PHB能和HIRA发生特异性的相互作用。进一步借助染色质



基于全基因组范围的siRNA筛选,金颖研究组发现,PHB是一个维持人胚胎干细胞自我更新的关键基因。PHB通过参与到HIRA复合物从而调控组蛋白H3.3的置入和一系列相关基因的表达(特别是对代谢通路相关基因的调控)。CTD:羧基端功能域。

Based on a genome-wide siRNA screen, Jin and colleagues identify PHB as a key factor in hESCs self-renewal. PHB forms a complex with HIRA to regulate histone H3.3 deposition and expression of a range of genes, including some related to metabolic circuitry. CTD: C terminal domain.

图1 工作模式图

Fig.1 Work model

免疫共沉淀(ChIP)技术,我们发现,PHB/HIRA共同调控了一系列基因,包括多能性相关基因、发育相关基因的转录调控,特别是对异柠檬酸脱氢酶(IDH)的调控,进一步控制了 α -KG的产生,从而影响了双加氧酶的活性,塑造着染色质构象,进一步决定着hESCs的特性。

4 本研究的意义

hESCs拥有分化为机体内所有细胞类型和在合适的培养条件下无限自我更新的潜能,在再生医学领域是非常珍贵的细胞来源,而且对于在体外研究人胚胎发育也是不可或缺的工具^[1-2]。我们的研究不仅发现了一个新的hESCs自我更新调控的基因,更重要的是,揭示了表观通路对一个维持hESCs染色质地貌和特性的关键代谢产物的调控。

虽然在众多细胞系中,关于PHB多方面的功能已经有很多研究,然而它在hESCs中的作用是未知的。我们的研究表明,PHB通过与HIRA复合体相互作用,对维持hESCs未分化的状态起到重要作用。我们的多方面实验数据表明,PHB是HIRA复合物的新组分:(1)PHB和HIRA复合物的每个已知组分都有相互作用;(2)hESCs全细胞裂解液通过体积排阻色谱时,PHB存在于对应复合物分子量的洗脱组分里;(3)PHB siRNA导致复合物的每个组分蛋白水平下降,提示其可能作为支架蛋白稳定整个复合物;(4)PHB缺失的hESCs和HIRA缺失的hESCs有相似的表型,包括细胞形态、标记基因表达谱、组蛋白甲基化、 α -KG水平和基因组水平H3.3的置入谱(deposition profile)变化。因此,PHB很可能是调控的H3.3置入染色质的HIRA复合物的重要新组分。

我们的研究中另一个亮点是,揭示了HIRA复合物以及H3.3置入对异柠檬酸脱氢酶(IDH)转录的调控,阐释了表观遗传修饰对于代谢通路的调控。最近有很多研究关注代谢产物对表观状态的调控,如乙酰辅酶A的前体醋酸酯可以阻断早期的组蛋白去乙酰化,并延迟多能性细胞的分化^[21]。但是,表观遗传对代谢通路的作用和机制还有待研究。我们的数据表明,PHB-HIRA复合物通过调控H3.3在异柠檬酸脱氢酶启动子区域的置入与其他表观调控因子相互协同,来维持异柠檬酸脱氢酶的基因表达和 α -KG的产生。反之,此代谢产物也能调节维持表观修饰的关键酶。

综上所述,我们的研究揭示了一个表观遗传和代谢通路相互作用的环路。我们发现, α -KG维持hESCs特性的重要作用 and 最近报道的其在mESCs中的作用一致^[22],证明 α -KG对于哺乳动物细胞多能性的维持具有保守的功能。PHB参与了多个信号通路以及细胞生存、代谢、肿瘤形成和炎症等生物学过程。重要的是,靶向PHB的药物研发进入了临床实验阶段^[20],揭示了其在疾病和健康中的潜在作用。我们的研究首次发现了PHB的全新功能,包括在hESCs中对染色质地貌和代谢产物的表观调控,阐释了其在细胞命运决定中的重要作用。针对PHB-HIRA复合物非依赖的功能的深入研究将更全面地了解PHB的特性和功能。

参考文献 (References)

- 1 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391): 1145-7.
- 2 Murry CE, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: Lessons from embryonic development. *Cell* 2008; 132(4): 661-80.
- 3 Lessard JA, Crabtree GR. Chromatin regulatory mechanisms in pluripotency. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2010; 26: 503-32.
- 4 Chow CM, Georgiou A, Szutorisz H, Maia e Silva A, Pombo A, Barahona I, *et al.* Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division. *EMBO Rep* 2005; 6(4): 354-60.
- 5 Szenker E, Ray-Gallet D, Almouzni G. The double face of the histone variant H3.3. *Cell Res* 2011; 21(3): 421-34.
- 6 Banaszynski LA, Wen D, Dewell S, Whitcomb SJ, Lin M, Diaz N, *et al.* Hira-dependent histone H3.3 deposition facilitates PRC2 recruitment at developmental loci in ES cells. *Cell* 2013; 155(1): 107-20.
- 7 Moussaieff A, Kogan NM, Aberdam D. Concise review: Energy metabolites: Key mediators of the epigenetic state of pluripotency. *Stem Cells* 2015; 33(8): 2374-80.
- 8 Teslaa T, Teitell MA. Pluripotent stem cell energy metabolism: An update. *EMBO J* 2015; 34(2): 138-53.
- 9 Cloos PA, Christensen J, Agger K, Helin K. Erasing the methyl mark: Histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *Genes Dev* 2008; 22(9): 1115-40.
- 10 Fan J, Krautkramer KA, Feldman JL, Denu JM. Metabolic regulation of histone post-translational modifications. *ACS Chem Biol* 2015; 10(1): 95-108.
- 11 Carey BW, Finley LW, Cross JR, Allis CD, Thompson CB. Intracellular alpha-ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 2015; 518(7539): 413-6.
- 12 Hwang IY, Kwak S, Lee S, Kim H, Lee SE, Kim JH, *et al.* Psat1-dependent fluctuations in alpha-ketoglutarate affect the timing of ESC differentiation. *Cell Metabolism* 2016; 24(3): 494-501.
- 13 Gerrard L, Zhao D, Clark AJ, Cui W. Stably transfected human

- embryonic stem cell clones express OCT4-specific green fluorescent protein and maintain self-renewal and pluripotency. *Stem Cells* 2005; 23(1): 124-33.
- 14 Wang Z, Oron E, Nelson B, Razis S, Ivanova N. Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2012; 10(4): 440-54.
- 15 Do EK, Cheon HC, Jang IH, Choi EJ, Heo SC, Kang KT, *et al.* Reptin regulates pluripotency of embryonic stem cells and somatic cell reprogramming through Oct4-dependent mechanism. *Stem Cells* 2014; 32(12): 3126-36.
- 16 Lu Y, Loh YH, Li H, Cesana M, Ficarro SB, Parikh JR, *et al.* Alternative splicing of MBD2 supports self-renewal in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2014; 15(1): 92-101.
- 17 Artal-Sanz M, Tavernarakis N. Prohibitin and mitochondrial biology. *Trends Endocrinol Metab* 2009; 20(8): 394-401.
- 18 Dart DA, Brooke GN, Sita-Lumsden A, Waxman J, Bevan CL. Reducing prohibitin increases histone acetylation, and promotes androgen independence in prostate tumours by increasing androgen receptor activation by adrenal androgens. *Oncogene* 2012; 31(43): 4588-98.
- 19 Rajalingam K, Wunder C, Brinkmann V, Churin Y, Hekman M, Sievers C, *et al.* Prohibitin is required for Ras-induced Raf-MEK-ERK activation and epithelial cell migration. *Nat Cell Biol* 2005; 7(8): 837-43.
- 20 Thuaud F, Ribeiro N, Nebigil CG, Desaubry L. Prohibitin ligands in cell death and survival: Mode of action and therapeutic potential. *Chem Biol* 2013; 20(3): 316-31.
- 21 Moussaieff A, Rouleau M, Kitsberg D, Cohen M, Levy G, Barasch D, *et al.* Glycolysis-mediated changes in acetyl-CoA and histone acetylation control the early differentiation of embryonic stem cells. *Cell Metab* 2015; 21(3): 392-402.
- 22 Carey BW, Finley LWS, Cross JR, Allis CD, Thompson CB. Intracellular α -ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 2015; 518(7539): 413-6.