

GTP 酶 Ran 在细胞核运输、核分裂与重建中的作用

冯冬茹, 王金发*

(中山大学生命科学学院, 教育部基因工程重点实验室, 广州 510275)

摘要: 小分子的单体 G 蛋白 Ran 具有鸟苷三磷酸酶活性, 其结合形式 Ran-GTP 作为区分间期细胞的核质和胞质的一个分子标记, 并参与调控核质运输、指导纺锤体形成以及引导核膜解体与装配。现就 Ran 在真核细胞核质运输、有丝分裂纺锤体组装与核膜动力学中的功能作一综述。

关键词: GTP 酶 Ran; 核质运输; 纺锤体组装; 核膜动力学

中图分类号: Q243 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)02-108-05

真核细胞主要的结构特征是遗传物质被区室化于一个核膜包裹着的核中。核膜控制物质的进出, 在核内建立一个特殊的生化环境, 调节基因的表达、复制和分配。但在细胞分裂过程中, 为了将双倍的基因组分配到子细胞中, 核结构会发生巨大的变化。除某些生物(如酵母)进行封闭的有丝分裂, 大多数生物具有开放的有丝分裂。在开放的有丝分裂的前期、中期, 核膜解体, 染色体凝聚, 纺锤体形成; 在有丝分裂的后期、末期, 纺锤体将姐妹染色单体拉开后消失, 染色体去凝聚, 核膜重新组装使每个子核区室化。近几年的研究^[1,2,3]表明: 一种小 GTP 酶 Ran 在这一系列的变化过程中起重要作用, 控制着真核细胞的核质运输、有丝分裂纺锤体组装以及核膜动力学(图 1)。

1 Ran-GTP 作为核质的分子标记

小分子的鸟苷三磷酸酶 Ran 最初在人类细胞中发现, 属于 GTP 结合调节蛋白家族中的单体 G 蛋白, 分子量为 25kDa, 具有 Ras 相关序列。它可结合到鸟嘌呤核苷酸上, 过量的 Mg^{2+} 和 GDP(鸟苷二磷酸)或 GTP(鸟苷三磷酸)可使之解离下来, 且游离的 Ran 远比结合状态的多^[4]。Ran 是可移动的, 通过一个涉及核运输因子(nuclear transport factor 2, NTF2)的机制输入核中^[5], 并与转运受体(包括输入受体和输出受体)结合而转运到核外。结合状态的 Ran 具有结合 GTP 或 GDP 两种形式, 有与 GTP 结合的活性位点并具有 GTP 酶活性, 可作为设计精巧的分子开关。Ran-GTP 和 Ran-GDP 分别与不同的效应物相互作用, 这两种形式的转变及效应物复合

物的组装或去组装都需要调节蛋白的作用。调节蛋白主要有两类: Ran 核苷酸转换因子(RCC1)与 GTP 酶激活蛋白(RanGAP1)^[6], 两者作用相反, 且位置各异。分裂间期 RCC1 在核中, 通过组蛋白 H2A 和 H2B 与染色质结合。RCC1 与 H2A 或 H2B 的结合会激活 RCC1 的转换活性, 使 Ran-GDP 转换为 Ran-GTP^[7]。而 RanGAP1 在胞质中激活 Ran 使 GTP 水解, 形成 Ran-GDP。Ran 结合蛋白 1(RanBP1)与 Ran-GTP 有高亲和力, 可作为 RanGAP1 的协同因子, 提高 RanGAP1 介导的 Ran-GTP 水解速率。Ran 的核苷酸转换和水解的固有效率较慢, RCC1 和 RanGAP1 可使 Ran 的核苷酸转换和水解的效率大大

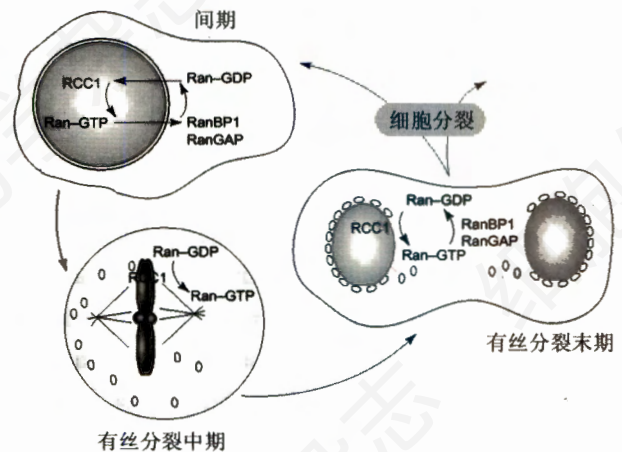


图 1 Ran 在细胞周期不同时期中的作用^[2]

RCC1: Ran 核苷酸转换因子; RanGAP: GTP 酶激活蛋白; RanBP1: Ran 结合蛋白 1。

收稿日期: 2003-07-14; 修回日期: 2003-09-30

* 通讯作者, E-mail: ls19@zsu.edu.cn

加快^[8]。核苷酸转换和水解所需调节蛋白的不对称分布导致核中 Ran 显著地结合 GTP, 而胞质中的 Ran 显著地结合 GDP。核内大多数 Ran 是通过 RCC1 结合到染色质上, 一部分 Ran 则不依赖 RCC1 直接通过组蛋白 H3 和 H4 结合到染色质上^[9]。Ran 直接或间接定位到染色质上, 通过其调节物的区室化, 可促进间期 Ran-GTP 梯度的形成, 在核中产生一个相对较高的 Ran-GTP 浓度。用基于荧光能量共振转移的生物传感器研究, 显示整个细胞周期中 Ran-GTP 都在染色体附近高度富集, 且在 M 期提取液中染色体周围的 Ran-GTP 浓度梯度落差较大^[10]。因此, Ran-GTP 可作为区分间期细胞的核质和胞质的一个分子标记。

2 Ran 调控核质运输

核膜内外的 Ran-GTP 浓度梯度对于决定许多生物大分子跨膜转运的方向是至关重要的。Ran-GTP 结合蛋白家族具有 Ran-GTP 结合结构域(RanBD), 与输入蛋白 β (importin β) 相关, 是核输入和输出的受体。Ran 与受体结合可调节这些受体在核膜两侧装载和卸载货物^[11,12]。在胞质中, Ran-GTP 浓度很低, 缺乏可供输入蛋白 β 结合的 Ran-GTP, 输入货物与输入蛋白 α (importin α) 和输入蛋白 β 形成异三聚体的输入复合物, 输入蛋白 α 主要识别并结合输入货物中赖氨酸丰富的核定位信号(nuclear-localization signal)^[12], 输入蛋白 β 则与核孔复合物作用, 将输入复合物转位到细胞核中。在转运穿过核孔时, 转运货物与核孔复合物相互作用, 这种短暂的相互作用受 Ran 控制^[13]。在核质中, 高浓度的 Ran-GTP 结合与之有高亲和力的输入蛋白 β , 而排斥输入蛋白 α 和货物, 通过解离输入复合物而将货物卸载^[2]。Ran-GTP 还可与具有 RanBD 的输出受体结合, 增强它们对富含亮氨酸的核输出信号(nuclear-export signal)的蛋白质的亲和性, 在核中形成输出复合物。Ran-GTP 可结合输入受体或输出受体离开核, 运转到核外后, 由胞质中对 Ran-GTP 有更高亲和力的 Ran-GTP 结合蛋白(RanBP1)促进 Ran-GTP 从转运受体和输出货物上解离, 并协同 RanGAP1 激活 Ran-GTP 水解成 Ran-GDP; Ran-GDP 则依赖 NTF2 被摄入核内, 由 RCC1 介导核苷酸转换而再生 Ran-GTP, 如此循环反复(图 2)。

但转运受体在 Ran-GTP 的调控下装卸货物的机制可能多种多样, 例如, 可单向或双向转运货物^[15],

也不一定都需衔接蛋白(如输入蛋白 α)介导底物与其受体结合^[12], 还可能由辅助蛋白(accessory protein)调节转运受体负载货物^[16]。

另外, 核孔复合物(nuclear pore complex, NPC)在核质运输中也有重要作用。核孔复合物由 30~50 种不同的核孔蛋白组成, 每种核孔蛋白均有若干个, 且一般都具有多个成簇的苯丙氨酸-甘氨酸(FG)缩二氨基酸重复。当货物转运穿过核孔时, 转运货物的信号分子与核孔复合物的 FG 缩二氨基酸重复相互作用, 核孔复合物可对货物进行识别、修饰, 决定货物在细胞内的位置及半衰期, 并调节基因表达^[17]。Ran-GTP 在核孔复合物两侧建立浓度梯度, 指导运输的方向, 提供能量, 还影响核孔复合物的开闭与形状^[13]。

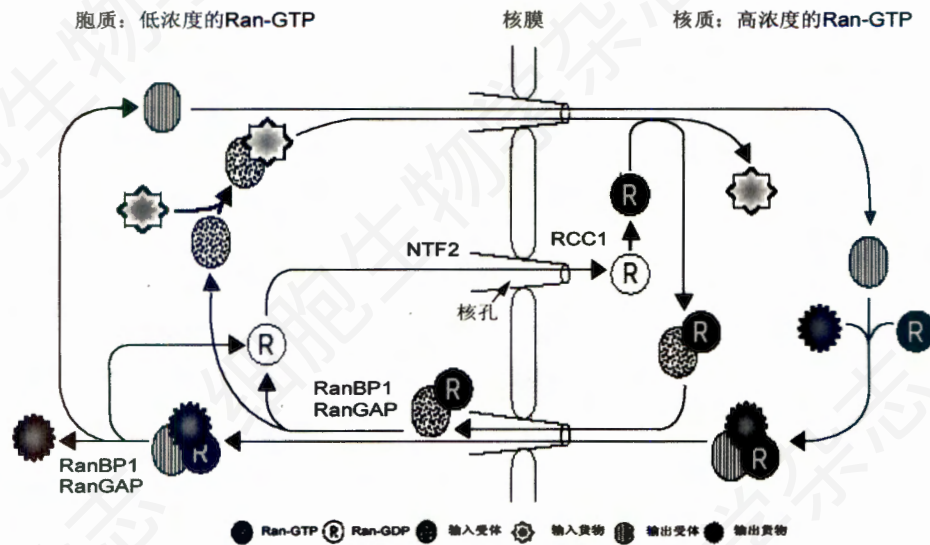
最近还采用计算机建模与完整 BHK(baby hamster kidney)细胞的荧光活体成像分析相结合的方法推算核运输的参数。

3 Ran 指导纺锤体形成

最初通过非洲爪蟾卵母细胞来直接研究 Ran 在有丝分裂中的功能。有几个研究小组发现在无染色体和中心体的情况下 Ran-GTP 在细胞减数分裂期的非洲爪蟾卵提取物中足以装配完整的类纺锤体结构, 且结合染色体的 RCC1 催化 Ran-GTP 的产生对于染色体诱导纺锤体形成是必需的^[18], 推测在染色质周围局部的高浓度的 Ran-GTP 可作为纺锤体最初在染色质附近组装所需的定位信息, 指导纺锤体的形成。

在作用机制上, Ran-GTP 增强微管成核作用、改变微管动力学而引起微管重排形成纺锤体。首先, 协助确立纺锤体的两极。当中心体存在时, 它提供了一个显著的成核位点, Ran-GTP 可增强微管的成核能力^[19], 优先按依赖中心体途径确立和维持纺锤体两极。但中心体不是必需的。在某些无中心体的细胞(如植物细胞)中, 纺锤体两极可在 Ran-GTP 指导下、按非依赖中心体途径、由微管发动机蛋白等协助进行自组装^[20]。然后, 通过降低微管解聚的频率而增强微管的稳定性^[19], 使动态变化的微管生长快于解聚, 促进星体微管生长; 并引起初形成的短小星型微管向染色体方向(+ 端)移动增多, 指导微管生长的方向, 逐渐形成极微管。

在纺锤体装配过程中, Ran-GTP 还通过多种下游作用物起作用。在爪蟾中, 具两性的趋动蛋白 Eg5(kinesin Eg5)可能是 Ran 的直接作用对象。当存

图2 Ran 调控核质运输示意图^[14]

在 Ran-GTP 时, Eg5 能定位到微管的 + 端, Eg5 形成同型四聚体和使反平行微管交联^[21], 这有利于形成纺锤体结构中心的微管重叠区。另外, 微管结合蛋白对纺锤体的形成必不可少, 也可作为 Ran-GTP 的下游作用物。微管结合蛋白 TPX2 可引导动力蛋白 XKlp2 靶定到微管, 协助 Ran-GTP 和染色质诱导微管装配。另一种微管结合蛋白 NuMA 可独立于动力蛋白和动力肌动蛋白而结合到微管, 通过稳定微管纤维的交联而决定纺锤体的极性。然而, 当缺乏 Ran-GTP 时, 它会被输入蛋白结合而失去作用, 纺锤体组装也就受到抑制。在有丝分裂期, Ran-GTP 在染色体附近将微管结合蛋白从输入受体中释放出来, 解除输入蛋白对微管结合蛋白的抑制作用, 促进纺锤体形成^[22]。巧妙的是, 在间期, 具有核定位信号的微管结合蛋白在胞质中结合输入蛋白而失活; 经核孔复合物进入细胞核, 在 Ran-GTP 的作用下解离下来虽具有活力, 但核膜使微管结合蛋白与细胞质微管蛋白隔离开来, 只有在 M 期, 核膜解体时才可能在染色体附近介导纺锤体形成, 确保了纺锤体于合适的时候在正确的地方组装。

有研究^[23]表明在分裂中期和后期 Ran 定位于染色体的着丝粒区域, 在末期和整个间期定位于核膜, 由此推测分裂末期 Ran 指导核膜装配后, 间期就附着在核纤层, 进入分裂期, 随着染色体凝缩, 着丝粒区域的 Ran 牵引微管形成着丝粒微管并连接到染色体, 并通过着丝粒微管与染色体的相互作用, 协助染色体准确配对与分离。其中, Ran 的

核苷酸转换和水解对于引导着丝粒微管连接到染色体而正确组装纺锤体具有重要作用^[3]。

虽然微管结合蛋白在脊椎动物中高度保守, 但在其它真核生物 (例如酵母或线虫) 中没有发现它们的类似物。推测在进化过程中 Ran 的调节对象一定发生改变; 在真核生物中 Ran 也可能有不同的作用机制^[1]。

4 Ran 在核膜动力学中的作用

4.1 Ran-GTP 活化中心体并促进核膜解体

在 G₂/M 期转变过程中, 中心体微管增加的现象普遍存在于许多类型的真核生物细胞中^[24]。在非洲爪蟾 M 期提取物中观察到 Ran 能在体外活化中心体, 增强微管的成核能力^[19], 在体内 Ran 也可能以某种方式活化核膜外侧的中心体, 另外在海星卵母细胞中核膜分解以前已检测到有功能核孔复合物的解体^[25], 还有闭合的有丝分裂也提示核膜没有分裂时可能会发生微管蛋白被动进入核内的过程, 据此推测在核膜解体以前, 细胞核与细胞质的成分已开始混合, 有核内 Ran-GTP 渗出并发生作用, 可能以 -TURC 复合物的蛋白及 Polo 激酶、aurora 激酶或 Nek2 激酶等^[19] 为中介物促使中心体成熟, 某些激酶的活化可能还可引起核纤层解聚。

随着染色体的凝聚, Ran-GTP 向核中心移动, 牵引成熟中心体的微管在中心体陷入核膜的地方刺破核膜, 并将核膜碎片拉向中心体^[26], 然后, 核膜碎片在内质网内形成微区, 核膜解体。植物没有

中心体, 推测也是以依赖微管和动力蛋白的方式将核膜拉开。同时, 最初在核膜附近形成的微管也可能启动纺锤体的组装。

4.2 在核膜装配过程中 Ran 指导膜融合

最初在非洲爪蟾卵提取物中证实 Ran 是核膜装配(特别是膜融合过程)的必不可少成分^[27], 但在线虫(*C. elegans*)中则发现 RNA 干涉(RNA interference)导致的 Ran 损耗可引起核膜装配的缺失^[28]。Ran 在核膜融合中直接作用的实验证据是, 结合野生型 Ran 的惰性小珠(inert beads coupled to wild-type Ran)在非洲爪蟾卵或哺乳动物培养细胞的提取物中可装配似乎有功能、含核孔复合物的核膜^[29], 推测结合染色质的 Ran 指导核膜前体吸附到染色质, 并在那里激活它们融合。

核膜装配的分子机制仍不十分清楚, 最新^[1]提出的核膜装配模式认为核膜装配大致分成以下几步: 第一, 染色体去凝聚, 引导核膜小泡前体到染色质表面; 第二, Ran 指导这些膜前体在染色质表面融合并形成管状网络, 可能在核膜装配过程中需要几种不同类型的膜融合事件; 第三, 膜的进一步融合形成闭合的内层和外层核膜; 第四, 核孔复合物亚基和核孔膜区域完整膜蛋白的装配形成单个的核孔复合物; 最后, 核内成分中输入和核膜的扩张。关于核膜装配的详细机制仍需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] HETZER M, GRUSS O J, MATTAJ L W. The Ran GTPase as a marker of chromosome position in spindle formation and nuclear envelope assembly [J]. *Nature Cell Biology*, 2002, 4(7): E177 - E184.
- [2] CLARKE P R, ZHANG C. Ran GTPase: a master regulator of nuclear structure and function during the eukaryotic cell division cycle [J]. *Trends in Cell Biology*, 2001, 11(9): 366 - 371.
- [3] QUIMBY B B, DASSO M. The small GTPase Ran: interpreting the signs [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2003, 15(3): 338 - 344.
- [4] BISCHOFF F R, PONSTINGL H. Mitotic regulator protein RCC1 is complexed with a nuclear ras-related polypeptide [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(23): 10830 - 10834.
- [5] RIBBECK K, LIPOWSKY G, KENT H M, et al. NTF2 mediates nuclear import of Ran [J]. *EMBO J*, 1998, 17: 6587 - 6598.
- [6] KLEBE C, BISCHOFF F R, PONSTINGL H, et al. A. Interaction of the nuclear GTP-binding protein Ran with its regulatory proteins RCC1 and RanGAP1 [J]. *Biochemistry*, 1995, 34: 639 - 647.
- [7] NEMERGUT M E, MIZZEN C A, STUKENBERG T, et al. Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histones H2A and H2B [J]. *Science*, 2001, 292: 1540 - 1543.
- [8] BISCHOFF F R, KLEBE C, KRETSCHMER J, et al. RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 2587 - 2591.
- [9] BILBAO-CORTES D, HETZER M, LAENGST G, et al. Ran binds to chromatin by two distinct mechanisms [J]. *Curr Biol*, 2002, 12(13): 1151 - 1156.
- [10] KALAB P, WEIS K, HEALD R. Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic Xenopus egg extracts [J]. *Science*, 2002, 295: 2452 - 2456.
- [11] GORLICH D, KUTAY U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1999, 15: 607 - 660.
- [12] MACARA I G. Transport into and out of the nucleus [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2001, 65: 570 - 594.
- [13] GOLDBERG M W, RUTHERFORD S A, HUGHES M, et al. Ran Alters Nuclear Pore Complex Conformation [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 300(3): 519 - 529.
- [14] AZUMA Y, DASSO M. The role of Ran in nuclear function [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2000, 12: 302 - 307.
- [15] YOSHIDA K, BLOBEL G. The karyopherin Kap142p/Man5p mediates nuclear import and nuclear export of different cargo proteins [J]. *J Cell Biol*, 2001, 152: 729 - 740.
- [16] LINDSAY M E, HOLASKA J M, WELCH K, et al. Ran-binding protein 3 is a cofactor for Crm1-mediated nuclear protein export [J]. *J Cell Biol*, 2001, 153: 1391 - 1402.
- [17] WOZNIAK R W, LUSK C P. Nuclear pore complexes [J]. *Current Biology*, 2003, 13(5): R169.
- [18] KALAB P, PU R T, DASSO M. The Ran GTPase regulates mitotic spindle assembly [J]. *Curr Biol*, 1999, 9: 481 - 484.
- [19] CARAZO-SALAS R E, GRUSS O J, MATTAJ I W, et al. Ran-GTP coordinates regulation of microtubule nucleation and dynamics during mitotic-spindle assembly [J]. *Nature Cell Biol*, 2001, 3: 228 - 234.
- [20] WITTMANN T, HYMAN A, DESAI A. The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors [J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3: E28 - E34.
- [21] RAY K, PEREZ S E, YANG Z, et al. Kinesin-II is required for axonal transport of choline acetyltransferase in *Drosophila* [J]. *J Cell Biol*, 1999, 147(3): 507 - 518.
- [22] WIESE C, WILDE A, MOORE M S, et al. Role of Importin- β in coupling Ran to downstream targets in microtubule assembly [J]. *Science*, 2001, 291(5504): 653 - 656.
- [23] BAMBA C, BOBINNEC Y, FUKUDA M, NISHIDA E. The GTPase Ran regulates chromosome positioning and nuclear envelope assembly *in vivo* [J]. *Curr Biol*, 2002, 12: 503 - 507.
- [24] LANGE B M. Integration of the centrosome in cell cycle control, stress response and signal transduction pathways [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2002, 14(1): 35 - 43.
- [25] TERASAKI M. Dynamics of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus during early sea urchin development [J]. *Mol Biol Cell*, 2000, 11(3): 897 - 914.
- [26] BEAUDOUIN J, GERLICH D, DAIGLE N, et al. Nuclear envelope breakdown proceeds by microtubule-induced tearing of the lamina [J]. *Cell*, 2002, 108(1): 83 - 96.

- [27] HETZER M, BILBAO-CORTES D, WALTHER T C, *et al.* GTP hydrolysis by Ran is required for nuclear envelope assembly [J]. *Mol Cell*, 2000, 5(6): 1013 – 1024.
- [28] GÖNCZY P, ECHEVERRI C, OEGEMA K, *et al.* Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III [J]. *Nature*, 2000, 408: 331 – 336.
- [29] ZHANG C, CLARKE P R. Roles of Ran-GTP and Ran-GDP in precursor vesicle recruitment and fusion during nuclear envelope assembly in a human cell-free system [J]. *Curr Biol*, 2001, 11(3): 208 – 212.

The Roles of GTPase Ran in Nuclear Processes throughout the Cell Cycle

FENG Dong Ru, WANG Jin Fa*

(The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education, School of Life Sciences, Sun Yat-sen(Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The small monomeric G protein Ran has GTPase activity, its bound conformation Ran-GTP might act as a molecular marker that distinguishes the nucleoplasm from the cytoplasm of interphase cells, and plays different roles in nucleocytoplasmic transport, mitotic spindle assembly and nuclear envelope dynamics. This paper reviewed the roles of GTPase Ran in nucleocytoplasmic transport, nuclear division and reestablishment throughout the cell cycle.

Key words: GTPase Ran; nucleocytoplasmic transport; mitotic spindle assembly; nuclear envelope dynamics

*Corresponding author, E-mail: ls19@zsu.edu.cn