

有丝分裂期 MPM-2 磷蛋白家族及其调控因子

李宏^{1,2} 刘进¹ 马香¹ 劳芳¹ 曾长青^{1,3} 何大澄^{1*}

(¹北京师范大学细胞生物学研究所, 北京 100875; ²河北科技大学生物科学与工程学院, 石家庄 050018;

³中国科学院北京基因组研究所, 北京 101200)

摘要 由于有丝分裂磷蛋白单克隆抗体(mitotic phosphoprotein monoclonal antibody-2, MPM-2)识别很大一组在 M 期特异磷酸化的蛋白质, 因而引起研究者的极大兴趣。该抗体亦成为研究 M 期功能性磷蛋白的重要工具。多个 MPM-2 磷蛋白已经定位在各种有丝分裂装置上, 如中心体、着丝粒、纺锤体、染色体骨架及中体等, 显示 MPM-2 磷蛋白在调控有丝分裂进程方面所扮演的重要角色。结合作者的工作和这一领域的相关研究, 概述了 MPM-2 磷蛋白的细胞周期分布特点及其在细胞有丝分裂期进程中的重要功能, 重点介绍 MPM-2 磷酸化位点的研究状况以及到目前为止已鉴定的 MPM-2 磷蛋白家族成员的基本情况, 并总结了 MPM-2 磷蛋白相关调控因子的研究进展。

关键词 有丝分裂磷蛋白单克隆抗体; MPM-2 磷蛋白; 有丝分裂

20 世纪 80 年代初期, Davis 等^[1]建立的一株单克隆抗体引起了细胞生物学的广泛注意。他们使用 HeLa 有丝分裂期细胞提取物免疫小鼠, 并通过杂交瘤筛选获得一株特异识别有丝分裂细胞的单克隆抗体。因为在免疫印迹中识别多个在有丝分裂期被特异磷酸化了的蛋白质, 这一抗体被命名为有丝分裂磷蛋白单克隆抗体-2(mitotic phosphoprotein monoclonal antibody-2, MPM-2)。这株单抗, 因其对有丝分裂细胞的强反应性很快便成为在荧光染色中识别间期和分裂细胞的有效工具。特别是, MPM-2 在免疫印迹中不但可辨认分裂细胞蛋白样品中的多个条带, 表明其特异识别一组与细胞分裂相关的蛋白质, 而且还发现这一抗体所识别的抗原决定簇是磷酸化的。MPM-2 特异结合一大类只在有丝分裂期被磷酸化了的蛋白质这一重大发现给了细胞生物学家极大鼓舞, 因为它无疑地提供了一个可能分离出人们寻找已久的“有丝分裂因子”的方向。以后的很多研究便是围绕确认 MPM-2 抗原决定簇的氨基酸一级结构以及鉴定研究被 MPM-2 特异识别的单个蛋白质以及在有丝分裂中的作用而进行。

1 MPM-2 特异识别一组在有丝分裂期磷酸化的蛋白质

通常情况下, 单克隆抗体只识别一种或少数几种蛋白质, MPM-2 识别的蛋白质却超过 50 种, 这些蛋白质拥有共同的抗原决定簇, 含有一个磷酸化

的丝氨酸或苏氨酸。拥有该抗原决定簇的蛋白质称 MPM-2 磷蛋白(MPM-2 phosphoprotein)或 MPM-2 抗原(MPM-2 antigen), 所有 MPM-2 磷蛋白共同组成 MPM-2 磷蛋白家族(MPM-2 phosphoprotein family)。

MPM-2 抗原在有丝分裂期磷酸化的特点已在许多真核生物中得到了证实, 包括人类、啮齿类、禽类、蛙、昆虫、线虫^[1]、果蝇^[2]、曲霉属^[3]等, 表明 MPM-2 抗原决定簇表位在物种进化过程中的高度保守性及其功能上的重要性。

对细胞 4 个周期时相的间接免疫荧光结果表明 MPM-2 磷蛋白主要存在于有丝分裂期细胞中(图 1, 本实验室未发表资料)。某些 MPM-2 磷蛋白还存在于如中心体、着丝粒、纺锤体及中体等有丝分裂装置上^[4]。另外, 细胞在核辐射作用下脱离有丝分裂期进入间期的同时, 前期细胞核上能被 MPM-2 识别的、与有丝分裂相关的磷酸化决定簇位点会随之消失^[5]。因此, MPM-2 磷蛋白特异性地存在于有丝分裂期细胞的事实表明该磷酸蛋白家族与有丝分裂进程相关。

免疫印迹结果也显示 MPM-2 抗原存在于有丝分裂期^[1]。在最初的免疫印迹结果中, Davis 等^[1]得到了 16 个分子量不连续的 40 至大于 200 kDa 范围的

收稿日期: 2004-10-25 接受日期: 2004-12-28

国家自然科学基金(No.30170460)和国家自然科学基金重大项目(No.90208020)资助

* 通讯作者。Tel: 010-58808439, Fax: 010-58805042, E-mail: dhe@bnu.edu.cn

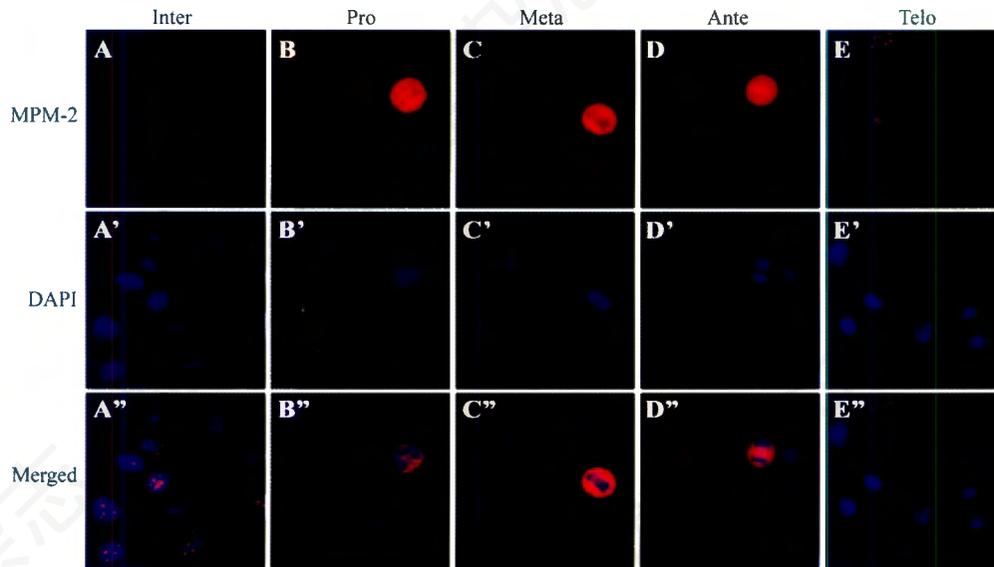


图1 MPM-2 磷蛋白的细胞周期分布

使用 MPM-2 对 HEp-2 细胞进行间接免疫荧光染色。间期细胞(Inter)只有微弱的荧光染色, 前中期(Pro)细胞中染色逐渐增强, 染色在中期细胞(Meta)达到高峰, 后期细胞(Ante)虽染色强度减弱, 仍然保持明亮, 末期细胞(Telo)只显示弱染色。表明 MPM-2 磷蛋白主要存在于有丝分裂期。

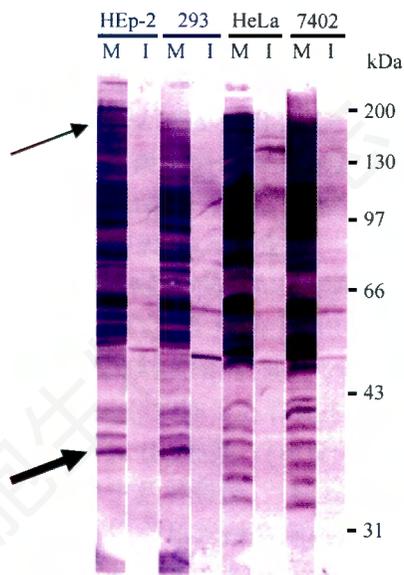


图2 4种细胞株中期(M)和间期(I)细胞提取物MPM-2免疫印迹分析

显示仅有几条免疫条带出现在各间期细胞中, 而大量的免疫条带出现在 M 期。同时, MPM-2 所揭示的有丝分裂期磷酸化蛋白在不同细胞类型中的蛋白质谱有所不同。如某蛋白质条带(粗箭头所示), 在 HEp-2 细胞和 293 细胞的 M 期中存在; 同样位置处, HeLa 细胞和 7402 细胞的 M 期中却没有这一条带出现。此外, 某些蛋白质条带, 虽然存在于 4 种 M 期细胞中, 但蛋白质的表达量显著不同(细箭头所示)。

MPM-2 抗体反应性蛋白质。本实验室使用 4 种不同的细胞提取物、相同的蛋白质上样量、完全平行的

实验条件进行免疫印迹的结果显示, 在 20 至大于 220 kDa 范围内检测到 30 多条免疫印迹条带(图 2, 本实验室未发表资料), 图 2 显示了不同细胞中所获得的免疫条带的数目和蛋白质质量的比较。显然, 仅有几条免疫条带出现在各间期细胞中, 而大量的免疫条带出现在 M 期细胞中。同时, MPM-2 所揭示的有丝分裂期磷酸化蛋白在不同细胞类型中的蛋白质谱有所不同。例如一些低分子量(粗箭头所示)的蛋白质条带, 在 HEp-2 细胞和 293 细胞的 M 期中存在; 同样位置处, HeLa 细胞和 7402 细胞的 M 期中却没有这些条带出现。此外, 一些蛋白质条带, 虽然存在于 4 种 M 期细胞中, 但蛋白质的表达量显著不同(细箭头所示)。由于所用细胞提取物分别取自组织来源不同的单层培养的正常细胞或肿瘤细胞, 这些磷酸化蛋白的表达差异一方面反映了有丝分裂期细胞磷酸化时的组织特异性; 另一方面, 也可能反映了某些肿瘤细胞的特异磷酸化现象。

2 MPM-2 磷蛋白家族

MPM-2 识别一个大的有丝分裂磷蛋白家族, 约有成员 50 多个^[1]。表 1 列举了大部分已知的 MPM-2 磷蛋白。这些蛋白质从其功能上可以分为两大类, 有丝分裂调控因子和与细胞分裂相关的结构蛋白。有丝分裂调控因子又可细分为:

(1) 激酶类。如抑制 cdc2 激酶活性的 Myt1 和

表1 已鉴定的 MPM-2 磷蛋白

MPM-2 抗原	来源	可能的功能
促后期复合物(APC)	<i>Xenopus</i>	调控 cyclinB 降解
果蝇微管相关蛋白 Asp	<i>Drosophila</i>	促进中心体微管组织中心活性
基体蛋白	<i>Paramecium</i>	与 MOTCs 活性有关
Cdc25	<i>Xenopus</i>	调控 Cdc2 活性
Cdc25A	Human	调控 G ₁ /S 转换
Cdc25B	Human	调控 S/G ₂ 转换
Cdc25C	Human	调控 cdc2 活性
Cdc2 相关激酶 (CrkRS)	Human	转录与剪切
酪蛋白激酶 II(CKII)	Unknown	蛋白质磷酸化
果蝇微管相关蛋白 (DMP85)	<i>Drosophila</i>	参与微管装配等
DNA 拓扑异构酶 II α	<i>Indian Muntjac</i>	染色质凝聚
真核翻译起始因子(eIF4B)	Human	未知
Golgi 装配蛋白 55	Human	高尔基体去组装
INCEP	Unknown	与染色体配对有关
透明质体蛋白, p62	Human	与人类疾病有关
Ki-67	Human	核的崩解与重建
动粒相关蛋白(KRMP1)	Human	中心体分离等
微管相关蛋白 1(MAP1)	Human	与微管的作用
微管相关蛋白 4(MAP4)	Human,	中心体等成分
微管相关蛋白 1B (MAP1B)	<i>Xenopus</i>	与退化性疾病有关
微管相关蛋白激酶激酶 (MEK)	Mammalian	与 M 期进程有关
有丝分裂促进因子 (150 kDa, 250 kDa)	<i>Xenopus</i>	诱导有丝分裂期
有丝分裂期 H1 激酶	<i>Xenopus</i>	诱导 M 期
M 期磷酸蛋白 1 和 2	HeLa S3	与 M 期进程相关
M 期磷酸蛋白 7	HeLa S3	间期与 DNA 复制有关
M 期磷酸蛋白 9	HeLa S3	高尔基体复合物成分
M 期磷酸蛋白 10	HeLa S3	间期定位核仁中
Myt1	Human	调控 Cdc25 磷酸酶
NIMA 激酶	<i>A.nidulans</i>	调控 M 期进程
NUMA 蛋白(238 kDa)	Human	M 期纺锤体组成
外部致密纤维蛋白(ODF/CP85)	Boar	调控中心体活性
p42mapk	Mammalian	调控 MAP 活性
配对螺旋丝状 tau 蛋白 (PHF-tau)	Human	与退化性疾病有关
RalBP1 伴侣(POB1)和内吞蛋白 Epsin	CHO	调控受体介导的内吞
RNA 聚合酶 II	Human	与转录有关
纺锤体极体蛋白 (SPB)	<i>A.nidulans</i>	与纺锤体运动有关
纺锤体蛋白(205 kDa)	Diatom <i>S.turris</i>	调控 M 期纺锤体功能
Wee1	<i>Xenopus</i>	调控 Cdc25 活性
p55	Human	未知
M 期蛋白 125 kDa	<i>Drosophila</i>	未知
鼠来源卵母细胞蛋白(62 kDa)	Mouse	与中心体活性有关
34 kDa(核)和 90 kDa (鞭毛)	<i>C.reinhardtii</i>	与鞭毛再生有关
90 kDa 皮质蛋白和 70 kDa 纤毛蛋白	<i>T.thermophila</i>	与纤毛组装有关

Wee1^[6-7]、促分裂原活化蛋白(MAP)激酶 p42mapk^[8]、曲霉属的 NIMA 激酶^[9]、此外, 还有 Cdc2 相关激酶 CrkRS, 该激酶含有一段富含精氨酸/丝氨酸(RS)的结构域, 可能参与对转录和剪接的调控^[10]等。

(2) 磷酸酶类。cdc2 激酶调控子 Cdc25 磷酸酶^[11]等。

(3) 其他类蛋白质。如可能参与细胞信号转导途径的泛素结合蛋白 p62^[12]。在所有增殖细胞中都出现的细胞核蛋白 Ki-67, 它在核的崩解与重建中起作用^[13], 以及本实验室鉴定的真核翻译起始因子 eIF4B 等 MPM-2 磷蛋白(未发表资料)等。

与细胞分裂相关的结构蛋白包括着丝粒蛋白 INCEP^[14]、微管相关蛋白^[15]。此外, 还有一些与复制、转录和翻译相关的蛋白质, 例如已发现了几种 M 期磷蛋白(M phosphoprotein, MPP), MPP7 定位在 DNA 的复制中心, MPP9 为高尔基复合体的组成成分, 而 MPP10 及 RNA 聚合酶 II 等则定位在核仁中^[16-18]。

2 MPM-2 磷蛋白在有丝分裂过程中的重要作用

20 世纪 70 年代初期, Rao 等^[19]发现与 M 期细胞融合的间期细胞发生了形态各异的染色体凝聚, 称染色体超前凝聚(premature chromosome condensation, PCC)。随后, Matsui 等^[20]进行的成熟蛙卵细胞质诱导未成熟蛙卵细胞成熟的实验结果证实 M 期细胞中存在一种诱导染色体凝聚的因子, 称成熟促进因子(maturation-promoting factor, MPF)。

20 世纪 80 年代初, MPM-2 问世不久, Yamashita 等^[21]使用小仓鼠肾细胞系 BHK21 的温度敏感突变株 tsBHK21 进行研究发现, 在限定温度的条件下, 与 M 期细胞融合的间期细胞没有早期染色体凝聚现象发生, 表明在该培养条件下 MPF 无活性, 与此同时, 也检测不到 MPM-2 磷蛋白的存在; 当在允许温度下, 早期染色体凝聚现象发生的同时, MPM-2 磷蛋白大量出现, 显示 MPM-2 抗原与成熟促进因子的重要相关性。此外, MPM-2 磷蛋白的出现可以被特异而高效的钙调蛋白抑制剂 W-7 所阻断, 而已知钙调蛋白在有丝分裂期的非组蛋白的磷酸化过程中起作用, 进一步表明非组蛋白在早期染色体凝聚中的调节作用。在线虫的温度敏感突变细胞株中也得到与此相类似的实验结果^[22]。

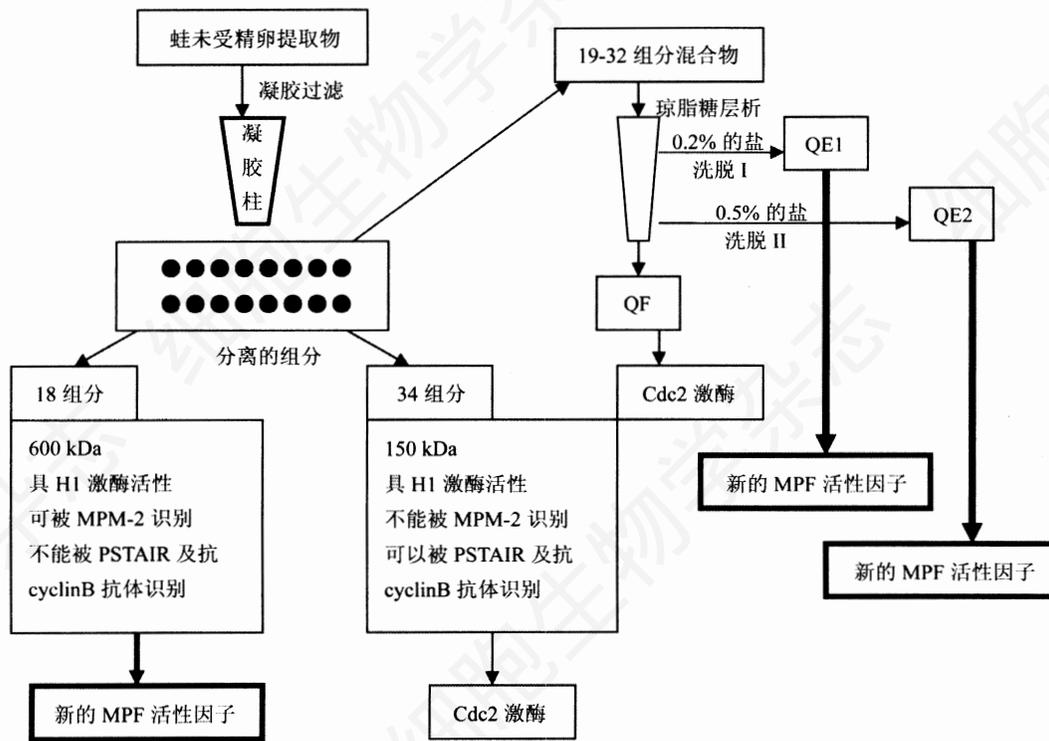


图3 分离纯化非 Cdc2/cyclinB 系统 MPF 活性因子流程图^[24,25]

通过凝胶过滤和琼脂糖柱层析, 分离得到了 3 种非 Cdc2/cyclinB 系统 MPF 活性因子(粗黑框所示)。

20 世纪 90 年代初期, $p34^{cdc2}$ 及其在有丝分裂中的重要作用的发现极大地促进了蛋白质磷酸化对细胞周期作用的研究。Cdc2/cyclinB 的基本代谢调节途径的确立, 使对促有丝分裂因子及其调控机制的研究基本集中在了这一个调控体系上。然而, 制备了 MPM2 的实验室始终坚持对 MPM-2 磷酸蛋白的研究并为之做出重要贡献。Kuang 等^[23]利用孕酮诱导的卵母细胞成熟过程研究有丝分裂中 MPM-2 抗原与 MPF 活性的关系, 发现 MPM-2 抗原的磷酸化与 MPF 的活性的出现相一致。进一步的研究显示至少 3 种 MPM-2 磷酸蛋白具有 MPF 活性, 但不能被特异性抗 $p34^{cdc2}$ 抗体 PSTAIR 和抗 cyclinB 抗体识别, 表明这些 MPM-2 磷酸蛋白为新的、非 Cdc2/cyclinB 系统的 MPF 活性因子^[24,25](图 3)。

对 MPM-2 的研究还进一步发现 MPM-2 的磷酸化体系与 Cdc2/cyclinB 体系的交叉调节作用。成熟促进因子 Cdc2/cyclinB 的正调控子 Cdc25 磷酸酶上具有 MPM-2 抗原决定簇位点, 并且其磷酸化是 Cdc25 磷酸酶活化的重要事件^[11]。此外, 两个 Cdc25 磷酸酶的抑制激酶 Wee1 和 Myt1 已被鉴定为 MPM-2 磷酸蛋白。在其行使抑制 G₂/M 转换功能时, 与催化域相结合所必需的 Myt1 的 C 末端上, 具有能被

MPM-2 识别的有丝分裂特异的磷酸化位点^[6]。因此, MPM-2 磷酸蛋白不仅有可能独立地启动 M 期, 而且还可以参与 Cdc2 激酶活性的调控。

对于 M 期诱导, Cdc2 激酶活性与 MPM-2 抗原磷酸化作用紧密关联, 并非完全独立^[23]。例如: M 期 Cdc2 激酶调控子 Cdc25 磷酸酶^[11]、Wee1/Myt1 激酶为 MPM-2 抗原^[6]; 但将 Cdc2 激酶显微注射到非洲爪蟾的卵母细胞中却诱导了 MPM-2 抗原的磷酸化^[26]。为了说明这些现象, Kuang 等(未发表资料)提出了解释 M 期诱导中 Cdc2 激酶磷酸化与 MPM-2 抗原磷酸化可能的关系模型(图 4)。

对构巢曲霉菌正常细胞、S 期阻断和 G₂ 期阻断的温度突变体纺锤极体的研究显示纺锤极体蛋白的 MPM-2 位点的特异性磷酸化是细胞周期依赖性的^[3]。另外, 分离不同时期的 CHO 细胞 M 期纺锤体并进行免疫学分析, 发现微管相关蛋白 MAP1B 及 MAP4 的磷酸化和去磷酸化与 M 期的进程相关^[27]。另外, 如用 MPM-2 覆盖 MPM-2 决定簇位点, 或用碱性磷酸酶处理使 MPM-2 抗原脱磷酸化, 能消除 M 期中心体的微管成核能力^[28]。综上所述, 针对 MPM-2 磷酸蛋白的功能研究表明, MPM-2 磷酸蛋白不仅可以独立地启动 M 期, 而且还可以调控 M 期的

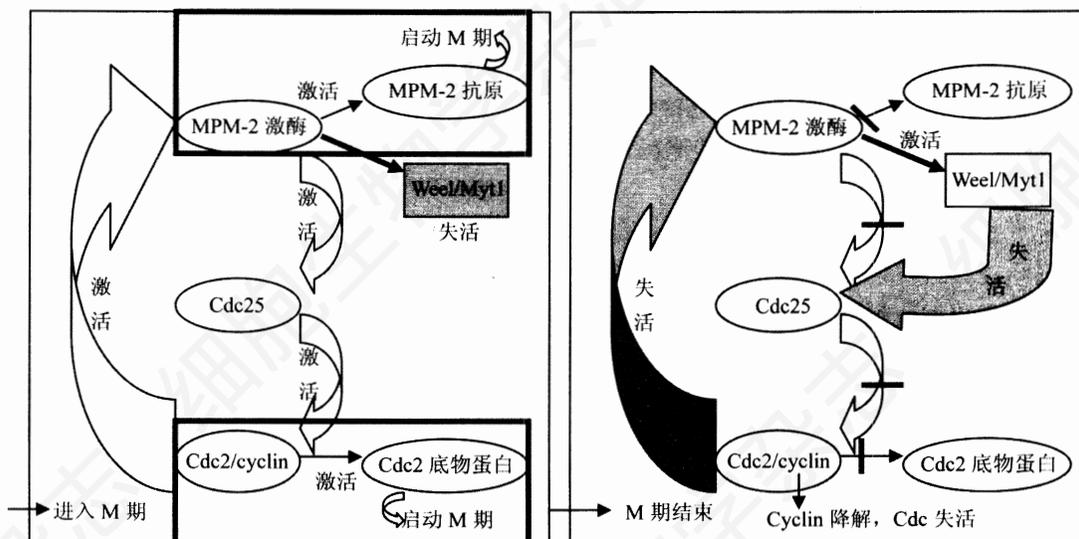


图4 M期Cdc2激酶活性与MPM-2决定簇激酶活性的协调作用模式

在这个模式中,MPM-2激酶和有丝分裂期Cdc2激酶通过磷酸化两个不同的有丝分裂磷酸蛋白家族,从而启动不同的M期事件(左侧图2个黑方框所示)。进入M期时(左侧图),Cdc2激酶与MPM-2决定簇激酶之间存在着一个正反馈环,环中,MPM-2激酶激活Cdc25磷酸酶,失活Wee1/Myt1激酶,同时磷酸化其他的MPM-2抗原,由此造成Cdc2激酶活性的剧增。激活的Cdc2激酶通过一个未知的机制反馈回来激活MPM-2激酶,同时磷酸化其他底物。遵守同样的原则,在M期结束期间(右侧图),周期蛋白失活引起Cdc2激酶失活,从而引起MPM-2激酶的失活,接着引起Wee1/Myt1激酶的激活和Cdc25磷酸酶的失活。在这个环中,任何一种成分都可以作为检验点,控制早成熟M期的诱导。

进程,显示MPM-2磷酸蛋白在有丝分裂期中的重要角色。

3 MPM-2抗原决定簇磷酸位点的研究

最初的结果已经显示MPM-2所识别的抗原决定簇中含有一个磷酸化的氨基酸^[1]。由于MPM-2抗原决定簇的磷酸化对M期诱导的重要性,MPM-2决定簇本身的结构成为人们感兴趣的课题。

Zhao等^[29]在决定簇位点的研究上做出了开创性的研究。他们对MPM-2抗原p55蛋白进行磷酸化氨基酸分析后表明,苏氨酸的磷酸化可能与有丝分裂事件相关。在Zhao等的工作基础之上,Westendorf等^[16]利用噬菌体表达文库法进行决定簇位点的研究。他们首先构建出以噬菌体作为载体的cDNA表达文库,将噬菌斑上表达的多肽转移到硝酸纤维素膜上后用M期激酶将多肽磷酸化,再用MPM-2进行筛选检测。对筛选出的19条多肽进行序列分析的结果表明,出现频率最多的氨基酸序列为L**T**PLK、(F/T)**T**PLQ和SSP(I/S)D,由此鉴定出在MPM-2抗原决定簇上磷酸化的氨基酸或是苏氨酸(T)或是丝氨酸(S),且磷酸化苏氨酸或丝氨酸的C端包含一个脯氨酸(P)残基。Taagepera等^[8]从p42mapk(ERK1)中鉴定出T¹⁸³EY¹⁸⁵(苏氨酸¹⁸³-谷氨酸¹⁸⁵)序列中

的苏氨酸残基被MAP激酶磷酸化,产生MPM-2识别的磷酸化位点。

Ding等^[30]依据已报道的MPM-2抗原决定簇序列信息,设计并合成了一系列多肽,希望通过将各个选定的氨基酸替换成丙氨酸,从而考察在介导MPM-2与抗原决定簇的结合中,各个氨基酸所起的作用。实验结果表明,改变磷酸化苏氨酸残基C末端与之相邻(+1位点)的氨基酸不会影响MPM-2的结合,但是改变-2或+2位点的氨基酸残基就会减弱MPM-2对这一位点的识别。可见,位于-2位点的芳香族氨基酸似乎是影响抗体结合的最关键的氨基酸。一段合成的磷酸化多肽链(RKEWLTpNFMEDRRC),足以被MPM-2识别的事实说明此磷酸化多肽代表了一类典型的MPM-2抗原决定簇特征。并由此推测MPM-2抗原决定簇是由“疏水氨基酸残基-丝氨酸(Ser)/苏氨酸(Thr)-脯氨酸(Pro)-疏水氨基酸残基-中性/碱性残基”组成。其中,存在于磷酸化Ser/Thr-Pro结构域两侧的氨基酸残基对于构建最适的MPM-2识别位点是至关重要的^[16,31]。

Che等^[32]构建了谷胱苷肽S转移酶-19肽融合蛋白,其中19肽中含有两个代表性的MPM-2决定簇序列,并重叠着两个潜在的微管相关蛋白(microtubule-

associated protein, MAP)激酶磷酸化位点。通过对融合蛋白磷酸化的研究表明:ME 激酶对其底物的识别和磷酸化,不仅需要具有推断的MPM-2 抗原决定簇一级序列信息,而且还依赖于其他额外的高级结构信息。

综上所述,MPM-2 的识别过程首先要求有一个磷酸化的抗原决定簇,而且在这一决定簇中包含的磷酸化苏氨酸或磷酸化丝氨酸及其附近的特殊氨基酸是极其必要的。除此之外,识别过程还依赖于额外的结构信息。这说明MPM-2 除了对抗原决定簇中的特定磷酸化氨基酸具有特异性以外,还具有识别额外结构的特异性,这种结构特异性还需进一步的研究证实。

4 MPM-2 磷蛋白的调控因子

有机体通过蛋白激酶和磷酸酶介导的级联放大反应而产生的磷酸化和去磷酸化事件调控细胞周期的进程,但是许多蛋白激酶和磷酸酶的作用底物还没有研究清楚。正如上文所述,一系列实验证据足以证明,有丝分裂进程中MPM-2 抗原决定簇的磷酸化和去磷酸化调控着细胞周期的进行。因此,进一步研究MPM-2 磷蛋白的调控因子将有助于人们更好地理解细胞有丝分裂进程的调控过程。

4.1 MPM-2 抗原决定簇激酶(MPM-2 epitope kinase, ME 激酶)

目前,已证明了一些ME 激酶可以在体外使蛋白质磷酸化从而产生MPM-2 能够识别的位点。虽然这些激酶都称ME 激酶,也都是磷酸化丝氨酸和苏氨酸,但并非一类激酶,包括多类激酶,涉及多条不同的磷酸化途径(表2)。

4.1.1 Cdc2(cell division cycle)激酶和NIMA(never-in-mitosis in *Aspergillus nidulans*)激酶 Cdc2 激酶

表2 已鉴定的MPM-2 抗原决定簇激酶

ME 激酶	底物
Cdc2 激酶	微管相关蛋白4和1B NIMA Ki-67
NIMA 激酶	不确定
ME 激酶 H	不确定
p42mapk	微管相关蛋白2 高尔基体装配蛋白55
Polo 类激酶	Cdc25
微管相关蛋白激酶(MAPK)	不确定
CKII 激酶	DNA 拓扑异构酶
微管相关蛋白激酶激酶1和2(MEK1,MEK2)	p42mapk

又称CDK1(cyclin-dependent kinase 1)激酶,是诱导有丝分裂起始的关键因子。将Cdc2 激酶加入非洲爪蟾间期细胞提取物中,会使MPM-2 对中心体相关的MPM-2 磷蛋白的识别增强^[33]。在体外CDK1 直接磷酸化多肽片段^[16]以及许多有丝分裂期蛋白而表现出MPM-2 反应性,包括p42mapk^[26]、NIMA^[9]以及Ki-67,而Ki-67的MPM-2 决定簇位点的磷酸化是M 期两个重要检验点——核崩解与核重建所必需^[13]。

NIMA 激酶是曲霉属细胞有丝分裂起始的决定因子^[34]。细菌表达的曲霉属蛋白NIMA 和超速离心后的有丝分裂期HeLa 细胞提取物,都可以催化动粒上的MPM-2 抗原决定簇的复磷酸化。作为ME 激酶的NIMA 激酶直接或间接调控着许多关键的有丝分裂事件,如染色体凝集的起始、纺锤体极体微管的成核反应^[35]、有丝分裂期动粒的组装以及有丝分裂后期姐妹染色单体的分离^[36]等。

Cdc2 和NIMA 两种激酶都是有丝分裂起始的决定因子。在曲霉属细胞中,G₂ 期的Cdc2 和NIMA 两种激酶是独立地被激活并行使各自的激酶活性,而有丝分裂的起始则需要同时激活Cdc2 和NIMA 两种激酶。G₂ 期超磷酸化的NIMA 中包含着MPM-2 识别位点,有丝分裂起始时Cdc2 将其进一步磷酸化,而磷酸化的NIMA 又可以增强Cdc2 的激酶活性。在Cdc2 无活性时,NIMA 可以促进染色单体的凝集;如果NIMA 未被激活,即使Cdc2 处于活化状态也不能起始有丝分裂。这一研究结果表明,Cdc2 和NIMA 两种激酶通过彼此激活各自的促有丝分裂活性而行使其功能,只有这样才可以保证在所有的间期事件完成之后再启动有丝分裂期^[9]。

4.1.2 Polo类激酶(Polo-like kinase, Plks) Plks 是一个丝/苏氨酸激酶家族,最初被鉴定为果蝇polo 基因的编码产物^[37],并在许多不同的真核生物中都发现了它的同系物。

越来越多的实验证明, polo 类激酶(Plks)也扮演MPM-2 激酶的角色。在细胞周期的不同阶段,将抗Plk1 的抗体显微注射到HeLa 细胞中以后,消除了MPM-2 反应性^[38]。果蝇微管结合蛋白DMAP85 在体外被Plks 磷酸化以后,产生MPM-2 识别位点,并从微管上解离,表明Plks 可能在有丝分裂期调控微管的装配上起作用^[39]。再者,已知Cdc25 磷酸酶激活MPF 活性,Wee1 和Myt1 抑制MPF 活性,激活的MPF 进一步促进Cdc25 活性,抑制Wee1 和Myt1

的活性, MacIver 等^[40]证实 Plks 参与 MPF 活性的反馈控制。

4.1.3 CKII 激酶(casein kinase II) 酪蛋白激酶 CKII 是一种丝/苏氨酸激酶, 本身在有丝分裂的细胞中引人注目地被磷酸化, 而且拥有众多的底物。经研究发现, CKII 介导拓扑异构酶 II 磷酸化, 在 1469 位的 Ser 位点上产生能被 MPM-2 识别的磷酸化位点^[41]。另有研究证实, 定位在染色单体间区域的 MPM-2 磷蛋白 DNA 拓扑异构酶 II α , 在连接中期 I 的二价姐妹染色单体轴时起到染色体铆钉的作用^[42]。

4.1.4 MAPK 和 MAPKK 促分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 首先是作为一个关键的丝/苏氨酸激酶家族被鉴定出来的, 它在许多不同的信号通路中被激活, 进而参与细胞增殖、分化等过程的调控。p42mapk, 又称细胞外信号调控激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK), 是 MAPK 级联反应途径的重要成员之一, 具有 ME 激酶活性, 可能在传递细胞外信号到细胞核, 激活与增殖相关的基因转录方面起重要作用^[26]。其次, 尽管 MPF 是进入 M 期所必需, 一旦进入 M 期后; 就要依赖 p42mapk 途径维持 M 期的进程^[43]。

微管相关蛋白激酶激酶 (MEK1 和 MEK2), 磷酸化 p42mapk 产生 MPM-2 反应性^[8]。MEK 突变的细胞延迟 G₂ 期的进程; 用 MEK 特异性抑制剂 PD98059 处理 S 期细胞, 使细胞阻断在 G₂ 期。表明 MEK 是 G₂/M 转换期以及 Cdc2 激酶激活及进入 M 期所必需^[44]。

4.2 MPM-2 抗原决定簇磷酸酶 (MPM-2 epitope phosphatase, ME 磷酸酶)

蛋白激酶在调节细胞周期进程中起着极其重要的作用。然而, 调节一个特定蛋白质磷酸化水平的稳定状态, 既需要蛋白激酶, 也需要蛋白磷酸酶的参与。真核生物蛋白磷酸酶 (PPs) 根据结构、功能和酶学特性的不同可以划分成 3 大类, 分类依据的是它们在体外对底物的不同作用方式、对特异抑制剂如冈田酸和微囊藻素的敏感性以及金属离子对其活性的影响情况^[45,46]。在这些分类中, PPP 和 PPM 磷酸酶家族作用于丝氨酸和苏氨酸, 而蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTPs) 则负责磷酸化酪氨酸的去磷酸化。真核细胞中含量最多的丝/苏氨酸磷酸酶属于 PPP 磷酸酶家族, 包括 PP1、PP2A、PP2B、PP4、PP5、PP6 以及 PP7; 而 PP2C 和与其相关的丙酮酸脱氢酶磷酸酶则是 PPM 家族的成员。

与 ME 激酶相比, 目前对 ME 磷酸酶的了解还比较有限, 这主要是因为以下 3 个复杂条件的限制: (1) 丝/苏氨酸蛋白磷酸酶作用的底物范围很广; (2) MPM-2 磷蛋白中可能包含一些与 MPM-2 抗原决定簇不相关的磷酸化位点, 从而导致 MPM-2 磷蛋白可以被许多种磷酸酶去磷酸化; (3) 将 MPM-2 磷蛋白中的 MPM-2 抗原决定簇去磷酸化的究竟是一种磷酸酶还是多种相似的磷酸酶尚无定论。尽管如此, 曲霉属的遗传学研究表明, PP1 活性对 MPM-2 磷蛋白的去磷酸化从而使细胞完成有丝分裂所必需^[47]。而且, 另一个研究已经证实, 至少有一种磷酸酶 (PP1 或 PP2A) 参与 MPM-2 磷蛋白的去磷酸化^[48]。

4.3 MPM-2 抗原决定簇异构酶 (MPM-2 epitope isomerase, ME 异构酶)

肽基脯氨酸异构酶 (peptidyl-prolyl isomerases, PPIase) 是一种在原核和真核细胞中都普遍表达的蛋白质, 它最主要的功能是催化肽链的顺反异构化, 从而促进脯氨酸与多肽链 N 末端的结合。近些年来, 有研究发现, PPIase 家族成员之一 Pin1, 优先异构丝氨酸或苏氨酸已磷酸化的有丝分裂期磷蛋白, MPM-2 特异性决定簇位点 S/T-P 的磷酸化, 产生了 Pin1 的结合位点, 通过 Pin1 的结合催化脯氨酸异构化而诱导了蛋白质构象的改变, 并由此改变蛋白质的酶活性, 或蛋白质对磷酸酶去磷酸化作用的敏感性^[31]。

在 HeLa 细胞中过表达 Pin1, 或者将 Pin1 显微注射入两细胞阶段的爪蟾卵中, 都可以抑制细胞进入有丝分裂期, 而去除 Pin1 则抑制 M 期的完成^[49]。Pin1 与一些有丝分裂期的磷酸化蛋白直接相互作用, 如 Myt1、Wee1、Plk1/Plx1、Cdc25 和 CKII 等^[50-53], 这些蛋白质中的 Ser/Thr-Pro 结构域被 Cdc2 激酶磷酸化以后, 就可以被 Pin1 识别。Pin1 和 MPM-2 选择识别相同的磷酸化位点的事实说明, Pin1 介导的、MPM-2 磷蛋白磷酸化作用依赖的构象变化很可能在细胞周期调控中起重要作用^[31,54]。

5 小结

二十余年来, 尽管对 MPM-2 磷蛋白家族的研究已取得很大的进展, 但并没有如预期的那样成为细胞周期研究、特别是对有丝分裂调控因子的探索的主攻方向。主要原因一是当时的研究手段的局限, MPM-2 识别或结合的几十种蛋白质这一特性使鉴定和提纯其中的任何单一成分极为困难。二是随

后对酵母, 继而发现在所有真核生物中具有普遍性的 Cdc2/p34 的确认, 以及进一步确定的 Cdc2/cyclin B 的细胞周期调控系统, 逐渐作为长期以来所谓“有丝分裂因子”的代表而成为这一领域的研究主线。而利用酵母这一极好的遗传-突变体系使之相对较为容易地找出整个调控系统的反应途径, 因而得到极为广泛的研究和应用。同时, 人们也发现, 至少这一调控网络的一些主要或上游蛋白质的磷酸化, 与 MPM-2 的抗原决定簇没有直接关系。因此, MPM-2 的抗原似乎多为周期调控蛋白即传统的有丝分裂因子的靶蛋白而非调控因子自身。

细胞生物学的新进展和蛋白质组学, 特别在细胞水平或细胞内调控系统的蛋白质组学为 MPM-2 的研究带来新的重要意义。首先, 细胞生物学和蛋白质组学的新方法为研究这种共享一种磷酸化的抗原决定簇的蛋白家族提供了有效手段和方法; 再者, 对 MPM-2 的不懈研究^[55-57]也发现了 MPM-2 抗原中不止一个的参与 Cdc2/cyclinB 及调控体系的成分, 使研究不同磷酸化途径在周期调控中的作用及特点成为新的研究热点。最重要的是从真核细胞的调控系统或网络的角度讲, MPM-2 抗原的存在及其被调控, 显然代表着一个尚未被很好揭示的体系, 因而这个并不“年轻”的抗体向细胞生物学家提出了新的挑战, 显示了对其深入研究的重要意义。

参考文献 (References)

- [1] Davis FM *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, **80**: 2926
- [2] Millar SE *et al. J Cell Sci*, 1987, **87**: 95
- [3] Engle DB *et al. Cell Motil Cytoskel*, 1988, **10**: 434
- [4] Logarinho E *et al. J Cell Sci*, 1998, **111**: 2897
- [5] Rieder CL *et al. J Cell Biol*, 1998, **142**: 1013
- [6] Wells NJ *et al. J Cell Sci*, 1999, **112**: 3361
- [7] Mueller PR *et al. Mol Biol Cell*, 1995, **6**: 119
- [8] Taagepera S *et al. Mol Biol Cell*, 1994, **5**: 1243
- [9] Ye XS *et al. EMBO J*, 1995, **14**: 986
- [10] Ko TK *et al. J Cell Sci*, 2001, **114**: 2591
- [11] Kuang J *et al. Mol Biol Cell*, 1994, **5**: 135
- [12] Stumptner C *et al. Am J Pathol*, 1999, **154**: 1701
- [13] Endl E *et al. J Cell Physiol*, 2000, **182**: 371
- [14] Stukenberg PT *et al. Curr Biol*, 1997, **7**: 338
- [15] Vandre DD *et al. Eur J Cell Biol*, 1986, **41**: 72
- [16] Westendorf JM *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 714
- [17] Matsumoto-Taniura N *et al. Mol Biol Cell*, 1996, **7**: 1455
- [18] Albert A *et al. J Cell Sci*, 1999, **112**: 2493
- [19] Rao PN *et al. J Cell Sci*, 1972, **10**: 495
- [20] Matsui SI *et al. J Cell Biol*, 1972, **54**: 120
- [21] Yamashita K *et al. Cell Struct Funct*, 1985, **10**: 259
- [22] Hecht RM *et al. J Cell Sci*, 1987, **87**: 305
- [23] Kuang J *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 4982
- [24] Kuang J *et al. Dev Biol*, 1991, **144**: 54
- [25] Kuang J *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 11530
- [26] Kuang J *et al. J Cell Biol*, 1993, **123**: 859
- [27] Tombes RM *et al. Cell Regul*, 1991, **2**: 861
- [28] Centonze VE *et al. J Cell Sci*, 1990, **95**: 405
- [29] Zhao JY *et al. FEBS Lett*, 1989, **249**: 389
- [30] Ding M *et al. Exp Cell Res*, 1997, **231**: 3
- [31] Yaffe MB *et al. Science*, 1997, **278**: 1957
- [32] Che S *et al. FEBS Lett*, 1997, **413**: 417
- [33] Verde F *et al. Nature*, 1990, **343**: 233
- [34] Oakley BR *et al. J Cell Biol*, 1983, **96**: 1155
- [35] Osmani AH *et al. Cell*, 1991, **67**: 283
- [36] Renzi L *et al. J Cell Sci*, 1997, **110**: 2013
- [37] Sunkel CE *et al. J Cell Sci*, 1988, **89**: 25
- [38] Lane HA *et al. J Cell Biol*, 1996, **135**: 1701
- [39] Cambiazio V *et al. FEBS Lett*, 2000, **483**: 37
- [40] MacIver FH *et al. Genes Dev*, 2003, **17**: 1507
- [41] Escargueil AE *et al. J Biol Chem*, 2000, **275**: 34710
- [42] Rodriguez EM *et al. Chromosoma*, 2001, **110**: 478
- [43] Chau AS *et al. Biol Cell*, 1998, **90**: 565
- [44] Wright JH *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 11335
- [45] Cohen P *et al. Annu Rev Biochem*, 1989, **58**: 453
- [46] Shenolikar S *et al. Annu Rev Cell Biol*, 1994, **10**: 55
- [47] Doonan JH *et al. Cell*, 1989, **57**: 987
- [48] Yamashita K *et al. EMBO J*, 1990, **9**: 4331
- [49] Lu KP *et al. Nature*, 1996, **380**: 544
- [50] Crenshaw DG *et al. EMBO J*, 1998, **17**: 1315
- [51] Shen M *et al. Genes Dev*, 1998, **12**: 706
- [52] Patra D *et al. J Biol Chem*, 1999, **274**: 36839
- [53] Messenger MM *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 23054
- [54] Albert AL *et al. BMC Cell Biol*, 2004, **5**: 22
- [55] Motwani M. *et al. Mol Cancer Ther*, 2003, **2**: 549
- [56] Page J *et al. J Cell Sci*, 2003, **116**: 551
- [57] Conicella C *et al. Cell Biol Int*, 2003, **27**: 183

MPM-2 Phosphoprotein Family and Their Regulators

Hong Li^{1,2}, Jin Liu¹, Xiang MA¹, Fang Lao¹, Chang-Qing Zeng^{1,3}, Da-Cheng He^{1*}

¹*Institute of Cell Biology, Beijing Normal University, Beijing 100875, China;*

²*College of Biology and Engineering, Hebei University of Science and Technology Shijiazhuang 050018, China;*

³*Beijing Genomics Institute, Chinese Academy of Sciences, Beijing 101300, China)*

Abstract Monoclonal antibody MPM-2, which recognizes a large family of mitotic phosphoproteins in a phosphorylation- dependent manner, fully allures our attention. It is suggested that MPM-2 phosphoproteins play an important role in regulating mitotic processes for some of the MPM-2 phosphoproteins being present in components of the mitotic apparatus such as centrosomes, kinetochores, spindle fibers, chromosomes scaffolds and the midbody. In this review, we will integrate our research work with others and summarize the studies on the distribution of MPM-2 phosphoproteins and briefly describe related findings for the functional importance of MPM-2 phosphoprotein in the mitotic progress. We will provide the results of partial characterization of MPM-2 phosphoepitope and the identification and characterization of the MPM-2 phosphoproteins, the studies results on regulators of MPM-2 phosphoproteins as well.

Key words MPM-2; MPM-2 phosphoprotein; mitosis

Received: October 25, 2004 Accepted: December 28, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30170460) and the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (No.90208020)

*Corresponding author. Tel: 86-10-58808439, Fax: 86-10-58805042, E-mail: dhe@bnu.edu.cn