

纺锤体组装检控点

欧赛英 欧阳高亮* 鲍仕登

(厦门大学生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

摘要 细胞有丝分裂过程中, 纺锤体组装检控点监控着染色体在赤道板的队列和向纺锤体两极的分离, 确保动粒-微管的黏附和有丝分裂器的完整, 使所有的染色体都置于赤道板并双极定向后才进入后期, 保证遗传物质均等地分配给两个子代细胞。纺锤体组装检控点缺陷将导致非整倍体的出现, 并与一些肿瘤的发生密切相关。现就近年来纺锤体组装检控点蛋白以及纺锤体组装检控点功能缺陷与肿瘤的关系方面的研究进展作一简要综述。

关键词 细胞周期检控点; 纺锤体组装检控点; 动粒; 肿瘤

细胞周期是由一系列连续事件按精确的时间顺序进行的动态过程, 受到 DNA 损伤检控点、DNA 复制检控点和纺锤体组装检控点等细胞周期检控点的精密调控^[1]。其中, 纺锤体组装检控点监视着姐妹染色单体黏附到纺锤体微管上, 并确保所有染色体都发生双极黏附后才进入有丝分裂后期, 保证细胞的染色体均等分给两个子代细胞^[2,3]。因此, 纺锤体组装检控点对纺锤体的正确组装以及染色体的准确分离均具有重要作用。另外, 在许多肿瘤中的研究发现, 细胞癌变与纺锤体组装检控点的组分突变密切相关。因此深入研究纺锤体组装检控点的调控机制将有助于揭示细胞癌变的分子机制, 并可为寻找有效的癌症治疗方法提供坚实的理论基础。

1 纺锤体组装检控点蛋白及复合体

在细胞有丝分裂过程中, 刚开始, 染色体上的两个动粒均未与纺锤体发生黏附。很快, 从一个纺锤体极发出的微管连到动粒上, 这时的染色体为单定向染色体。随后, 纺锤体另一极发出的微管连到染色体的另一个姐妹染色单体动粒上, 染色体被带向赤道板, 这时的染色体为双定向染色体。单定向染色体上未黏附的动粒会发出一种“等待进入后期”的信号, 这个信号贯穿整个细胞, 使细胞在所有染色体都发生双极黏附后才进入后期。在这些过程中, 纺锤体组装检控点蛋白及其复合体起着至关重要的检控作用^[2,3]。

纺锤体组装检控点的检控蛋白最先是从小鼠酵母中发现的, 主要包括 Mad 与 Bub 等蛋白质。目前, 这些蛋白质仍被视为纺锤体组装检控点的核心

蛋白, 它们的功能从酵母到人类都相当保守^[4]。近年来, 人们也陆续发现其他纺锤体组装检控点蛋白及其复合体(表 1)。

1.1 Mad2 及其复合体

Mad2 是纺锤体组装检控点中的一个关键组分, 在有丝分裂过程中定位到未黏附的动粒上, 黏附完成后从纺锤体上消失。Mad2 在爪蟾抽提物和培养的哺乳动物细胞中都为检控点活性所必需。体外注射 Mad2 的抗体可导致哺乳动物细胞越过微管解聚剂诱导的细胞周期阻滞提前进入分裂后期^[5-7]。目前发现, Mad2 可与 Mad1 和 Cdc20 分别形成复合物, 这两个复合体在纺锤体组装过程中起相反的作用。Mad1-Mad2 复合体对 Mad2 定位到动粒非常重要。一旦未黏附的染色体发出“等待进入后期”的信号, Mad2 便结合 Cdc20, 抑制后期促进因子复合体(anaphase promoting complex, APC)的活性, 阻止细胞周期向下一个时相演进。

在爪蟾卵抽提物中发现, 大部分 Mad2 结合在 Mad1 上, 当游离的 Mad2 多过与 Mad1 结合的 Mad2 时, 检控点功能就会丧失。免疫删除分析也显示, 游离的 Mad2 不能结合 Cdc20, 表明 Mad2 定位到动粒上有利于 Mad2-Cdc20 复合体的形成。未黏附的染色体也可促进 Mad2-Cdc20 复合体的组装^[8]。在没有辅助因子与共价作用存在的情况下, Mad2 有两种不同的折叠构象, 分别是 N1-Mad2 和 N2-Mad2,

收稿日期: 2005-07-20 接受日期: 2005-11-22

国家自然科学基金资助项目(No.30370307, No.30400239, No.30570935)

* 通讯作者。Tel: 0592-2186091, Fax: 0592-2188101, E-mail: oygldz@yahoo.com.cn

表1 纺锤体组装检控点组分及复合体^[4]

检控蛋白或复合体	功能
Mad1	募集 Mad2 到动粒, 表达水平不受细胞周期调控
Mad2	结合 Mad1 与 Cdc20, 表达水平不受细胞周期调控
Bub1	为丝氨酸/苏氨酸激酶, 底物包括 Bub3、Mad1 与腺瘤息肉病 Coli, 为 Mad1、Mad2、Bub3 定位到动粒所需; 表达水平受细胞周期调控
BubR1(Mad3)	为丝氨酸/苏氨酸激酶, 能结合 Bub3 和 Cdc20, 能够自体磷酸化, 但酵母中 Mad3 缺乏激酶结构域
Bub3	含 7 个 WD40 序列, 与 Bub1 和 BubR1 中的 Bub3 结合区相互作用
Mps1	也称 T 细胞酪氨酸激酶, 募集检控点蛋白到动粒上, 已发现的底物有 Mad1、Spcl10
CENP-E	为 MAPK 激酶的底物, 与微管和 BubR1 相互作用
Ipl1	为 Aurora 激酶, 保证双极定向, 还可能感受动粒处的张力
Zw10	可能与 Rod 形成复合体, 对 dynein 在动粒处的定位非常重要
Rod	可能与 Zw10 形成复合体, 对 dynein 在动粒处的定位非常重要
Mad1-Mad2	在间期可能定位于核孔复合体; 在动粒以外的其他地方则非常稳定
Mad2-Cdc20	阻抑 Cdc20 对 APC 的激活
Bub3-Bub1, Bub3-BubR1/Mad3	Bub3 可分别与 Bub1h 和 BubR1/Mad3 相互作用; Bub3 与 BubR1 一起被纯化, 说明该复合体很稳定
Mad2-Cdc20-BubR1/Mad3-Bub3	已在芽殖酵母和 HeLa 细胞中发现该复合物, 可能在抑制 APC 的活性中起关键作用
BubR1-CENP-E	可能在黏附发生与纺锤体组装检控点活化之间起连接作用
BubR1-Cdc20	抑制 Cdc20 对 APC 的激活
Zw10-Rod	还没发现它们之间直接的作用, 但这两种蛋白质以复合体形式被纯化

其中 N2-Mad2 更具抑制 APC 的作用, Mad2 突变体的过量表达通过阻止 N2-Mad2 构象而部分阻断活细胞内检控点信号传递。也有研究显示, Mad2 在未黏附动粒处的定位可引起 Mad2 的构象改变, 促使其与 Cdc20 的相互作用^[8,9]。

Mad2除了通过构象变化调节纺锤体组装检控点活性外, 其磷酸化水平的变化也是调节纺锤体组装检控点活性的重要方式。Mad2 能在一个或多个丝氨酸残基位点上发生磷酸化。Mad2 的磷酸化水平在整个细胞周期中波动起伏, 在有丝分裂期中达到最高。有研究发现, 用可的松激活纺锤体组装检控点时, Mad2 的磷酸化水平也达到最高。未磷酸化的内源性 Mad2 很容易与 APC 和 Mad1 相互作用, 形成三聚体。因此有人认为 Mad2 与 Mad1 及 APC 的联系是通过磷酸化 - 去磷酸化的循环来调控的^[10]。

另外, Mad2 结合蛋白 CMT2 也可能在 Mad2 活性调节中起重要作用。纺锤体黏附完成后, CMT2-Mad2 复合体的形成伴随着 p55CDC-Mad2 的减少。纺锤体黏附受阻抑的细胞中, CMT2 过量表达, 并引起 securin 的提前降解, 细胞未经分裂便进入下一个细胞周期。剔除 CMT2 基因可在引起短暂的后期抑制后诱导细胞凋亡^[11]。

1.2 Bub1 及其复合体

除了 Mad2 及其复合体在信号转导中起重要作用外, Bub1 也是纺锤体组装检控点一个必不可少的组分。与 Mad1-Mad2 复合体的功能类似, Bub1 对检控点的活化和活性维持都是必不可少的, 并且也

定位到动粒上^[12,13]。用纺锤体损伤药物快速处理组织细胞, Bub1 能快速被磷酸化。在爪蟾的研究中也发现 Bub1 能在未黏附的动粒上快速发生高度磷酸化, 这种作用受 MAPK 的调控, 使用 MAPK 抑制剂或者改变 Bub1 上 MAPK 的作用位点可以消除 Bub1 的磷酸化。Bub1 在未黏附染色体动粒处的激活对维持检控点的活化状态具有重要作用^[14,15]。爪蟾 Bub1 的突变可引起染色体的错误分离。Bub1 的激酶区域缺失会部分降低其募集其他组分到动粒的能力并部分抑制纺锤体组装检控点的功能^[16]。Bub1 的免疫删除会导致检控点功能丧失, 并且 Mad1、Mad2、Bub3 和 CENP-E 等检控蛋白也无法定位到动粒。有趣的是, 重新注入野生型 Bub1 可重建检控点功能, 并且恢复这些蛋白质的动粒定位^[17]。对裂殖酵母和果蝇的研究也发现, Bub1 易于定位到未黏附的动粒上并起着核心蛋白的作用^[18]。因此, 目前的研究一般认为, Bub1 主要通过调控 Mad2 和其他检控蛋白定位到动粒, 从而参与纺锤体组装的检控过程。

最近一些研究还发现, Bub1 能直接磷酸化 Cdc20, 从而抑制 APC 的活性^[19]。芽殖酵母中发现, Bub1 能发生自体磷酸化, 也能使它的结合蛋白 Bub3 发生磷酸化。Bub1 与 Bub3 的结合在酵母与人类细胞中都有发现, 并且为纺锤体组装检控点活性所需。而对爪蟾抽提物的研究发现, 抑制 Bub1 并不危及纺锤体检控点功能, 表明在 Bub1 缺失的情况下, 一些其他机制可能代替了 Bub1 的作用^[17,20,21]。

1.3 BubR1 及其复合体

BubR1 (Bub1-related-kinase), 是一种 Bub1 相关激酶, 在酵母中的同源蛋白是 Mad3。BubR1 在有丝分裂早期定位到动粒上, 后期则又从动粒上消失。研究显示, Mad3 的动粒定位依赖于 Bub1、Bub3 和 Mph1, Mad3 在检控点信号效应器末端起着必不可少的作用, 辅助 Mad2 介导的 Slp1/APC 阻抑, 但具体的作用机制目前还不清楚。但爪蟾抽提物中, Mad1/Mad2 和 Bub1/BubR1 首先定位到动粒上。这些检控点蛋白募集到动粒上, 将引发一系列包括 Mph1 激活在内的信号转导, 促进检控点组分的重组, 导致芽殖酵母和哺乳动物细胞中 Mad1/Bub1/Bub3 复合体的形成, Mad3 于是被募集到动粒上。动粒一旦募集到 Mad3, 便能够结合 Mad2, 形成 Mad3/Mad2 复合物, 该复合物可以直接抑制 Slp1/APC。对人骨肉瘤细胞的研究也发现, Bub1 和 BubR1 按顺序募集到动粒上^[22]。当检控点被激活, BubR1 能与 Cdc20 形成稳定的复合物, 这直接抑制了 Cdc20 对 APC 的激活, 并且 BubR1 的这种抑制与 Mad2 对 Cdc20 的抑制协同作用, 它们相互促进与 Cdc20 的结合。只是 Mad2 是因动粒缺乏纺锤体微管黏附而被募集到动粒上, 而 BubR1 是因缺乏拉力被募集到动粒上^[23-25]。鉴于 Mad2 和 BubR1 在监控纺锤体黏附和拉力分别所起的作用, 有研究者进一步提出, Mad2 和 BubR1 分别在正常的有丝分裂的不同时期起作用, 其中 Mad2 在所有动粒还未黏附到微管前起作用, 以确保所有染色体都连到纺锤体上, 而 BubR1 则是确保黏附后所有染色体都排列到赤道板上^[26]。

1.4 CENP-E 及其复合物

着丝粒相关蛋白(centromere-associated protein E, CENP-E)是一种驱动蛋白样蛋白, 为 kinesin 蛋白超家族成员, 也是动粒必不可少的组分。CENP-E 能直接与 BubR1 结合, 使 BubR1 在早期连接到动粒上^[27]。从哺乳动物细胞动粒上剔除 CENP-E 将阻碍有丝分裂的进行。免疫荧光和电镜观察发现, 注射 CENP-E 抗体将造成 CENP-E 从动粒上缺失, 继而造成动粒-微管结合率降低, 而纺锤体极碎裂的发生率也相应提高, 导致单定位的染色体不正常地接近纺锤体极, 表明 CENP-E 在将动粒处的组分传递给纺锤极的过程中起重要作用^[28]。但 CENP-E 从动粒上的缺失既不影响 Mad1、Mad2、BubR1 和 Bub1 的动粒定位, 也不影响它们从动粒处的释放, 并且染色体的分离、快速向极运动和摆动运动都正常,

说明 CENP-E 对这些过程并不是至关重要的, 而是在动粒与微管的结合上起重要作用。

综上所述, 纺锤体组装检控点检控蛋白参与的信号转导通路可简要概括为: 刚开始, Aurora B/IN-CENP 诱导 CENP-E 定位到动粒, CENP-E 再与 BubR1 结合, 随后 Mad2 与 Bub1 及 Mad1 等相关蛋白被募集到动粒上, 在未黏附的动粒处则发生一系列检控蛋白动态交换事件, 形成的 Mad2-Cdc20-BubR1-Bub3 复合物可抑制 APC 的作用, 防止 securin 的降解, 使得 separase 被 securin 结合而无法降解 cohesin, 从而阻止染色体在进入赤道板前分离。当有效的双极黏附完成后, 部分检控蛋白通过微管游离到纺锤体极上, 然后再被释放, 其中 Rod、Zw10 和 CENP-E 等检控蛋白参与了该过程^[4]。

2 纺锤体组装检控点与肿瘤

由于目前 ATM、ATR、p53 等 DNA 损伤检控点基因在肿瘤发生中的作用已比较清楚^[3,29], 而肿瘤细胞中高度非整倍体的存在, 使得许多人认为纺锤体组装检控点功能缺陷造成的遗传不稳定可能也是肿瘤发生的一个重要原因^[30,31]。

目前有研究发现, APC 的突变在散发性直肠癌的发生中是早期事件, 大概有高于 85% 的直肠癌中存在 APC 的体细胞突变^[32]。在一些肺癌中可检测到 Mad1 的点突变。BubR1 突变的小鼠会出现肺腺瘤和肠内腺瘤。在原发性肺癌中, 发现一种 Bub1 的突变: 在一小部分含染色体不稳定的直肠癌中可检测到 Bub1 的杂合突变, 并且这些突变是显性的^[33]。不仅如此, 在许多癌细胞中也发现纺锤体检控点功能受损。在将近一半的带有高水平染色体不稳定的肺癌细胞株和肺腺癌、肝癌及胸腺癌中发现, 细胞无法对微管抑制剂作出反应, 因而无法引起细胞周期阻滞。这些肿瘤细胞中的纺锤体组装检控点失活的分子机制还不清楚, 一些研究结果显示, 这可能同纺锤体组装检控点蛋白的表达水平变化有关。在鼻咽癌、胸腺癌和卵巢癌细胞中发现, Mad2 的低表达与纺锤体组装检控点的缺陷有关^[34]; Mad2 在人癌细胞或小鼠胚胎成纤维细胞中的一个基因等位删除可导致纺锤体组装检控点的功能缺陷; Mad2^{-/-} 鼠患肺癌的几率很高^[35]; Mad2 的高表达与胃癌细胞的转移能力密切相关; Bub1 的异常表达则会削弱胃癌细胞纺锤体组装检控点功能, 从而导致非整倍体的产生^[36]。

尽管如此,也有许多研究显示,在包括肺癌、结肠癌、乳腺癌等在内的许多肿瘤细胞株和病理样品中,无法找到纺锤体组装检控点基因的突变。因此纺锤体组装检控点功能缺陷与肿瘤发生的关系十分复杂,目前的认识还很不全面,还有待进一步的深入研究。

3 展望

近年来,对细胞有丝分裂过程中基因组稳定性维持机制的研究已经取得很大的进展,纺锤体组装检控点在这个过程中重要作用也得到广泛认知,但其具体分子机制尤其是动粒作为微管黏附位点和纺锤体组装检控点的主要信号检控位点的分子机制还有待进一步深入研究。另外,由于高等真核生物中纺锤体组装检控点的基因突变通常是致死的并常导致细胞凋亡^[37],因此,研究纺锤体组装检控点功能有缺陷的癌细胞如何继续生长,以及如何针对纺锤体组装检控点进行肿瘤治疗将是未来该研究领域的重要目标。

参考文献 (References)

- [1] Hartwell LH *et al.* *Science*, 1989, **246**: 629
- [2] Lopes CS *et al.* *Arch Med Res*, 2003, **34**: 155
- [3] 蔡秋凤等. *细胞生物学杂志*, 2005, **27**: 479
- [4] Musacchio A *et al.* *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, **3**: 731
- [5] Chen RH *et al.* *Science*, 1996, **274**: 242
- [6] Gorbsky GJ *et al.* *J Cell Biol*, 1998, **141**: 1193
- [7] Waters JC *et al.* *J Cell Biol*, 1998, **141**: 1181
- [8] Sironi L *et al.* *EMBO J*, 2001, **20**: 6371
- [9] Luo X *et al.* *Nat Struct Mol Biol*, 2004, **11**: 338
- [10] Wassmann K *et al.* *EMBO J*, 2003, **22**: 797
- [11] Habu T *et al.* *EMBO J*, 2002, **21**: 6419
- [12] Basu J *et al.* *J Cell Biol*, 1999, **146**: 13
- [13] Jablonski SA *et al.* *Chromosoma*, 1998, **107**: 386
- [14] Chen RH. *EMBO J*, 2004, **23**: 3113
- [15] Brunet S *et al.* *Reproduction*, 2003, **126**: 443
- [16] Johnson VL *et al.* *J Cell Sci*, 2004, **117**: 1577
- [17] Sharp-Baker H *et al.* *J Cell Biol*, 2001, **153**: 1239
- [18] Taylor SS *et al.* *J Cell Sci*, 2001, **114**: 4385
- [19] Yu H *et al.* *Cell Cycle*, 2005, **4**: 262
- [20] Roberts BT *et al.* *Mol Cell Biol*, 1994, **14**: 8282
- [21] Brady DM *et al.* *Curr Biol*, 2000, **10**: 675
- [22] Millband DN *et al.* *Mol Cell Biol*, 2002, **22**: 2728
- [23] Tang Z *et al.* *Dev Cell*, 2001, **1**: 227
- [24] Skoufias DA *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 4492
- [25] Zhou J *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 17200
- [26] Skoufias DA *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 4492
- [27] Mao Y *et al.* *J Cell Biol*, 2005, **170**: 873
- [28] McEwen BF *et al.* *Mol Biol Cell*, 2001, **12**: 2776
- [29] 江瑞胜等. *细胞生物学杂志*, 2004, **26**: 209
- [30] Draviam VM *et al.* *Curr Opin Genet Dev*, 2004, **14**: 120
- [31] Rajagopalan H *et al.* *Nature*, 2004, **432**: 338
- [32] Sieber OM *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 16910
- [33] Nowak MA *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 16226
- [34] Wang X *et al.* *Cancer Res*, 2002, **62**: 1662
- [35] Michel LS *et al.* *Nature*, 2001, **409**: 355
- [36] Grabsch HI *et al.* *J Pathol*, 2004, **202**: 208
- [37] Dobles M *et al.* *Cell*, 2000, **101**: 635

Spindle Assembly Checkpoint

Sai-Ying Ou, Gao-Liang Ouyang*, Shi-Deng Bao

(The Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,
School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract Chromosomes aligned to the metaphase plate and segregated to the mitotic spindle are regulated by the spindle assembly checkpoint. This surveillance mechanism monitors kinetochore-microtubule attachment and the integrity of the mitotic apparatus, and is able to delay the metaphase-anaphase transition until all chromosomes are properly aligned at the metaphase plate and established a bipolar orientation, ensuring equal segregation of genomic material among daughter cells. Functional defects in spindle assembly checkpoint can generate gross aneuploidy and are associated with tumorigenesis. In this review, we will focus on the molecular components of spindle assembly checkpoint pathway and the relationship between the function defects of this checkpoint and tumorigenesis.

Key words cell cycle checkpoint; spindle assembly checkpoint; kinetochore; tumor

Received: July 20, 2005 Accepted: November 22, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30370307, No.30400239, No.30570935)

*Corresponding author. Tel: 86-592-2186091, Fax: 86-592-2188101, E-mail: oyglz@yahoo.com.cn