

神经祖细胞不对称分裂中纺锤体取向与细胞皮层极性的偶联机制

李敏寅 陈晓萍*

(浙江工业大学生物与环境工程学院, 杭州 310014)

摘要 神经祖细胞的不对称分裂是神经发生的必要环节。近年来关于不对称分裂的研究,为果蝇及哺乳动物中枢神经系统发育期间神经祖细胞的分化机制提供了新的理解。在这一分裂模式中,纺锤体作为细胞结构的支架,受到细胞皮层极性信号的引导而改变取向,保证底部细胞命运决定子(cell fate determinants)的不对称分配。G蛋白亚基、各种接头蛋白及微管相关蛋白组成极性蛋白复合体,在纺锤体取向改变中发挥了有序的调节作用。现在细胞和分子水平探讨不对称分裂纺锤体与细胞皮层极性偶联这一标志性事件。

关键词 纺锤体; 细胞皮层极性; G蛋白信号; Pins; Khc-73

不对称分裂是神经祖细胞分化的基本方式之一,通过一次分裂同时实现了祖细胞自我更新和分化。果蝇神经母细胞(neuroblasts, NBs)作为神经祖细胞,在建立顶-底细胞极性的基础上,通过不对称“出芽”形成底部较小且具有分化特性的神经节母细胞(ganglion mother cells, GMCs),而NB总是处于距离上皮最近的顶部,接受来自上皮的信号进行不对称分裂^[1,2]。而对于哺乳动物,担当神经祖细胞角色的主要是发育早期的神经上皮细胞(neuroepithelial cells, NE cells)和放射状胶质细胞(radial glial cells, RGCs),它们在脑室通过不对称分裂形成一个前体细胞和一个神经元;此后,部分前体细胞迁移至脑室下区,再经对称分裂形成一对神经元^[3,4]:神经发生在这种对称与不对称分裂的交替中完成。不对称分裂方式历经祖细胞皮层极性的建立、纺锤体取向的变化及命运决定子的不对称分配等重要环节^[5]。祖细胞皮层极性,也即细胞顶、底两端所含蛋白质在朝向和离向上皮表面皮层所形成的极性差异,是不对称分裂的关键性前提,而纺锤体取向直接决定分裂平面的取向,影响细胞分裂模式^[6]。以下讨论在祖细胞皮层极性建立后,经过一系列相关蛋白质的有序介导,导致纺锤体取向改变的过程。

1 神经祖细胞不对称分裂中纺锤体的取向及其与细胞皮层极性的偶联

纺锤体由微管及微管结合蛋白组成,其装配和取向的建立是一个极为复杂的动态过程。一般的有丝

分裂,在中心体分离后,相关的动力蛋白和驱动蛋白向微管正极或负极运动,通过对微管施予一定的牵拉作用调节纺锤体的装配。而在神经祖细胞的不对称分裂中,位于细胞顶端的极性蛋白以这些动力蛋白、驱动蛋白为作用靶点,调节纺锤体装配过程,同时还借助星体微管将其自身的皮层极性信号传递给中心体,继而引导纺锤体取向的改变^[7]。

神经祖细胞对称分裂的纺锤体取向垂直于顶-底轴(apical-basal axis)。相反,在果蝇NB不对称分裂中,纺锤体取向发生90°的旋转,与顶-底轴保持平行,也即垂直于上皮表面^[8]。胚胎期NB纺锤体可以顺/逆时针方向的旋转易位形成顶-底取向;幼虫期NB的母中心体通过星体微管锚定于顶极并保持微管组织中心(MTOC)活性,而子中心体失去MTOC活性并随机迁移,在分裂中期之前完成在底部的锚定^[9,10],这意味着母/子中心体可能存在本质区别。而哺乳动物NE细胞只需小角度的旋转易位即可实现极性蛋白的不对称分裂,情况比果蝇NB更为复杂,不尽相同(图1)^[11]。

通过纺锤体取向与细胞皮层极性的偶联,祖细胞保证了命运决定子的不对称分配,使子细胞GMC继承Numb、Brat和Prospero等重要命运决定子以进

收稿日期: 2008-04-28 接受日期: 2008-07-08

国家人事部留学择优基金及浙江省新苗人才计划(No.2007R40G2020029)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0571-88320658, Fax: 0571-88320057, E-mail: chxp666@yahoo.com.cn

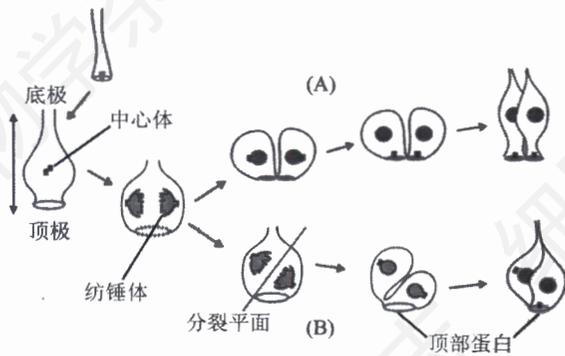


图1 哺乳动物 NE 细胞的分裂模式和纺锤体取向^[11]

A: 纺锤体取向与顶-底轴垂直时, 细胞进行对称分裂; B: 纺锤体取向发生偏转时, 细胞进行不对称分裂。

入分化途径。任一相关极性蛋白基因突变都将可能造成纺锤体取向异常, 甚至是对称分裂^[1]。与正常情况相比, 分配至每个子细胞 Numb 等命运决定子的水平较低, 不足以拮抗 Notch 信号以促进子细胞分化, 因而均继承了祖细胞特性。这将导致神经祖细胞过度性增殖, 可能成为肿瘤和癌症的诱发因素^[6,12]。因此, 不对称分裂纺锤体取向对于协调祖细胞增殖/分化以及整个中枢神经系统的构建至关重要。

2 果蝇 NB 纺锤体取向与皮层极性偶联的分子调节机制

作为果蝇 NB 极性建立的开端, 进化上保守的 Par-3/Par-6/aPKC (Par/aPKC) 复合体通过细胞周期蛋白 Cdc42 介导, 在间期于 NB 顶部建立皮层极性, 为各种纺锤体调控蛋白提供结合平台^[13,14]。而后, Insc/Par 通路引发分裂前期 Pins/G α i 皮层极性的建立, 后者又经由 Pins/G α i/Mud 通路和微管/Khc-73/Dlg 通路, 分别介导了分裂前期和中期纺锤体取向与细胞皮层极性的偶联^[13](图 2)。

2.1 Pins/G α i/Mud 通路

2.1.1 Pins/Gai 皮层极性的建立 Pins (partner of inscuteable) 和 G α i 极性的建立依赖于 Par/aPKC 的皮层极性。在离层的 NB 顶部, 接头蛋白 inscuteable (Insc) 同时结合其伙伴分子 Pins 和 Par-3, 引导 Pins 向顶部皮层聚集, 建立起与 Par/aPKC 和 Pins/G α i 两种复合体的关联^[1]。另外, Lee 等^[15]发现 Pins 也能通过锚定 aPKC 反作用于 Par/aPKC 复合体。

与经典的 G 蛋白信号通路不同的是, 具有皮层极性的 Pins 作为鸟苷酸解离抑制因子 (guanine nucleotide dissociation inhibitor, GDI), 以受体非依赖方式结合 G α i-GDP, 从而在激活 G α i 亚基的同时释放 G β \gamma

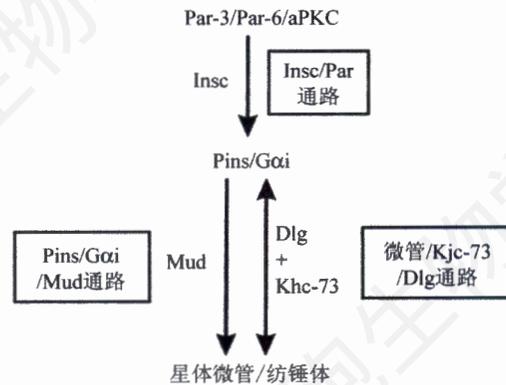


图2 果蝇 NB 细胞皮层极性与纺锤体取向的偶联机制

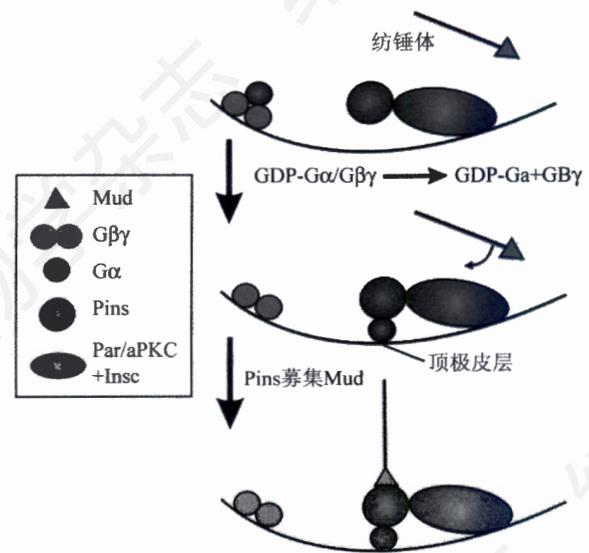


图3 果蝇 NB 不对称分裂中的 Pins/G α i/Mud 通路^[19]
处于 NB 顶部的 Pins 结合异三聚体 G 蛋白, 激活 G α i 而释放 G β \gamma, 并通过改变构象结合 Mud, 调节纺锤体取向。

亚基^[16](图 3)。研究表明, 另一种 *locomotion defects* (*loco*) 基因表达的 Loco 蛋白除了能发挥和 Pins 同样的作用外, 还能作为 GTP 酶活化蛋白 (GTPase activating protein, GAP), 协调 G α i-GDP 和 G α i-GTP 的动态平衡^[17]。因而 Pins 和 Loco 这两种 GoLoco 结构域蛋白在 G α i 的极性建立中缺一不可。被激活的 G 蛋白各亚基在 Par-3/Par-6 复合体极性的维持和分裂中期纺锤体取向的调节中发挥了主要作用^[1], 而 G α i、G β 13F、G γ 1 等亚基因突变均导致纺锤体取向的异常^[5]。G β \gamma 亚基具有维持 G α i 稳定性的作用, G β 13F 及 G γ 1 突变使得 G α i 水平显著降低^[18]。

2.1.2 Pins/Gai/Mud 通路调节纺锤体取向 在 Pins/G α i/Mud 通路调节纺锤体取向过程中, Pins/G α i 通过接头蛋白 Mud (mushroom body defect) 实现对纺锤体

取向的调节(图3)^[20-22]。Pins表现为一个构象开关(conformational switch),在纺锤体取向与皮层极性的偶联中扮演了重要角色。Pins C端的3个GoLoco模体与G α i结合, N端则有7个三十四肽重复序列(TPRs),起结合Mud或Insc作用。G α i的结合实现了时间层次上的先后效应: G α i首先与Pins的一个GoLoco模体结合,将Pins锚定于顶部皮层,在此阶段,Pins分子构象处于“关闭”状态;待G α i结合第二、三个GoLoco模体,Pins通过改变构象,转化成“开启”态,并借助TPRs序列结合Mud^[23]。Pins以此实现构象调节。

然而,作为一种重要的微管和动力蛋白的结合蛋白,Mud又是如何调控纺锤体取向的?一种观点认为,它可能和位于星体微管正端的微管蛋白直接作用,或者与微管正端示踪蛋白(+TIPs)作用而间接发挥效应,后者以动力蛋白/动力蛋白激活蛋白(dynein/dynactin)复合体为代表^[21]。Mud也能通过为星体微管建立“停泊位点”,引导中心体对纺锤体的调节。与pins突变不同,mud突变导致中心体装配的异常,提示Mud能以独立于Pins的方式调节中心体装配。Lis-1被认为联系了着丝粒、微管及皮层极性这三个关键要素,推测Mud可能通过dynein/dynactin/Lis-1复合体调节中心体装配。此外,Mud也可能与Centrosomin相互作用,而后者是中心粒组装过程中的必需蛋白^[22]。

2.2 微管/Khc-73/Dlg通路

在mud突变NB中,纺锤体取向扰乱导致祖细胞的过度增殖,但这一程度较一种命运决定子基因brat突变的后果微弱,其原因是纺锤体取向紊乱可由微管/Khc-73/Dlg通路介导的末期补救(telophase rescue)得到部分矫正,从而保证了不对称胞质分裂^[24]。

微管依赖的Khc-73/Dlg作为一条新的胞内通路,能进行双向信号传递:微管/Khc-73/Dlg引导分裂中期Pins/G α i皮层极性,而后者继而又保证了纺锤体的正确取向。驱动蛋白3家族的驱动蛋白重链73蛋白(kinesin heavy chain 73, Khc-73)位于星体微管正端,通过与膜相关鸟苷酸激酶(membrane-associated guanylate kinase, MAGUK) Discs large (Dlg)的相互作用将已具有皮层分布的Dlg单向募集于NB顶部皮层,它继而通过与Pins作用,确保Pins/G α i的皮层极性^[24]。

作为微管相关的分子马达(molecular motor),Khc-73含有2个微管结合结构域、1个马达结构域(motor domain)和1个细胞骨架相关蛋白-甘氨酸结构域

(CAP-Gly domain)。一方面,Khc-73与星体微管的联系可能由其CAP-Gly结构域调节。另一方面,尽管其MAGUK结合柄(MAGUK binding stalk, MBS)与Dlg鸟苷酸激酶域(GK domain)直接作用实现了两者的结合,但这一结合触发Dlg聚集的潜在机制并不清楚,目前有两种模型予以解释:(1)Khc-73通过抑制Dlg分子内部的作用,促进Dlg分子间的相互联系;(2)Khc-73也可能沿着微管将Dlg转运至顶极^[24]。此外,Dlg/Pins之间的作用机制也未阐明,尽管两者在体内实验中存在直接结合,但体外测试未能发现两者的免疫共沉淀,暗示两者的相互作用受到高度调控,抑或是一种间接作用^[24,25]。一种基于Dlg也是构象开关的模型认为,其GK结构域和Src同源结构域3(SH3 domain)存在分子内部作用,而Khc-73可能通过与GK结构域结合改变Dlg构象,暴露出的SH3结构域随即结合Pins^[26]。

如上所述,Pins作为动态偶联中的重要构象开关,其与G α i的皮层极性受到Insc/Par与Khc-73/Dlg两条通路的共同调节,但两者在细胞周期中具有井然的分工次序:前者为分裂前期Pins皮层极性的建立所需;而后者在分裂前中期/中期被星体微管激活,并在随后阶段发挥作用——Pins先后受到两者相互独立的调控,以一种“乒乓”方式实现了动态的极性定位^[26,27]。

2.3 细胞周期相关的纺锤体取向调控

NB细胞极性的建立发生在分裂间期,而命运决定子的不对称定位发生在分裂中期之后,在这期间,纺锤体取向受到CDK1/Cdc2、Aurora A、Aurora B及Polo等细胞周期相关蛋白激酶有条不紊的调控^[8,28,29]。Tio等^[30]首先发现Cdc2同样在NB不对称分裂中起到细胞周期调控作用。cdc2突变导致NB顶部蛋白的皮层极性无法维持,Cdc2可能通过间接调节Insc等蛋白质极性的保持,进一步引导了纺锤体取向。另外,Aurora A被证实在中心体的成熟与纺锤体的形成方面发挥至关重要的作用,Aurora B的作用时间段在胞质分裂环节,而Polo除了通过磷酸化Pon (Partner of Numb)促进命运决定子Numb在NB底部的极性定位,还能调节纺锤体检验点等事件^[31]。在polo/aurora a突变NB中,纺锤体取向无法与顶-底极性轴保持平行,Aurora A和Polo可能分别通过磷酸化D-TACC和Asp这两种稳定星体微管的中心体蛋白,以调节纺锤体的顶-底取向^[8]。

3 哺乳动物 NE 细胞纺锤体取向与皮层极性的偶联及相关机制

目前对哺乳动物纺锤体与皮层极性偶联机制的理解远不如果蝇充分。两者虽然具有一定的进化保守性, 都需要 G 蛋白和 Pins 同源分子等参与, 但也存在明显区别: (1) 哺乳动物 Cdc42 可能同时调节了 NE 细胞皮层极性和 INM (interkinetic nuclear migration) 行为^[32]; (2) 哺乳动物 Lgl 同源分子 Lgl1 能通过参与形成和维持黏着连接(adherens junction, AJ), 在维持 NE 细胞极性中发挥重要作用, 而 Lgl2 能与 Pins 同源分子 LGN 直接结合^[33,34], 暗示了 Lgl 两种同源分子在纺锤体与 NE 细胞极性偶联中的独特作用。

哺乳动物 Pins 同源分子是 LGN 和 AGS3 (activator of G-protein signaling-3)。与果蝇 NB 类似, LGN 作为构象开关联系了微管结合蛋白 NuMA (哺乳动物 Mud 同源分子) 与 G α ^[35,36], 且 LGN 与 NuMA 的结合依赖后者与果蝇 Mud 共有的一段 NLM 同源序列。所不同的是, (1) 由于 NuMA 这一结构域与其微管结合结构域存在部分重叠, 因此 LGN 与 NuMA 的结合阻断了后者对微管的稳定^[37]; (2) NuMA 也能反作用于 LGN 以实现两者定位上的相互依赖, 且可能受到 Cdc2 对 NuMA 磷酸化的调节作用, 而 Mud 不为果蝇 Pins 皮层定位所需^[21]。最近的研究又表明, LGN 是 VZ 祖细胞对称分裂纺锤体调节的必需因子^[11]。

目前认为 AGS3 的作用是与 G $\beta\gamma$ 亚基组成 AGS3/G $\beta\gamma$ 通路, 介导纺锤体取向与皮层极性的偶联^[19,38]。新皮层(neocortex)祖细胞的对称分裂依靠星体微管识别细胞侧皮层的相关信号, 确保纺锤体取向与 VZ 皮层平行; 而游离 G $\beta\gamma$ 由 AGS3 激活, 并通过拮抗或减弱星体微管与皮层信号的联系使纺锤体取向发生改变。支持这一假说的实验证据有, G $\beta 1\gamma$ 亚基位于皮层并与星体微管相对, 且 G $\beta\gamma$ 信号缺失导致水平方向的对称分裂, 产生的两个子细胞均继承了神经元命运^[38]。G $\beta\gamma$ 信号下游效应因子的进一步确定将深入解释 AGS3/G $\beta\gamma$ 信号调节纺锤体取向的机制。此外, LGN 和 AGS3 很可能通过一定的相互作用协调了纺锤体的动态取向^[8]。

4 小结

神经祖细胞在建立细胞皮层极性的基础上调节纺锤体取向。从分子水平分析, 多种接头蛋白和构象开关同时与其他极性蛋白作用, 在这一调节中起到有效的胞内信息传递。对于果蝇 NB, 首先是顶部极

性复合蛋白体 Par/aPKC 引导 Pins/G α 皮层极性的建立, 再由其中的 G 蛋白将皮层极性信息传递给定位于顶极的星体微管, 或激活微管上的 Khc-73 等分子马达, 通过星体微管及其马达蛋白对中心体牵拉作用力的不平衡实现纺锤体极性与皮层极性的精密偶联。在哺乳动物, 神经祖细胞纺锤体取向的深入调节机制尚待进一步阐明, G $\beta\gamma$ 亚基确切的下游作用靶点是什么? 纺锤体行为精确的细胞周期调控过程以及 Pins 同源分子 LGN 与 AGS3 的准确作用和相互的潜在关联又如何? 由于神经祖细胞对称/不对称分裂转换是神经干细胞发育分化及神经发生中的关键性环节, 有关纺锤体取向与细胞皮层极性偶联机制的研究具有重要意义。

参考文献(References)

- [1] Betschinger J *et al. Curr Biol*, 2004, **14**: R674
- [2] Siegrist SE *et al. Development*, 2006, **133**: 529
- [3] Noctor SC *et al. Nat Neurosci*, 2004, **7**: 136
- [4] Götz M *et al. Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, **6**: 777
- [5] Wodarz A. *Curr Opin Cell Biol*, 2005, **17**: 475
- [6] Huttner WB *et al. Curr Opin Cell Biol*, 2005, **17**: 648
- [7] Siegrist SE *et al. Genes Dev*, 2007, **21**: 483
- [8] Knoblich JA. *Cell*, 2008, **132**: 583
- [9] Rebollo E *et al. Dev Cell*, 2007, **12**: 467
- [10] Yamashita YM *et al. J Cell Biol*, 2008, **180**: 261
- [11] Konno D *et al. Nat Cell Biol*, 2008, **10**: 93
- [12] Morrison SJ *et al. Nature*, 2006, **441**: 1068
- [13] 边文杰等. *生物技术通讯*, 2007, **18**: 995
- [14] 边文杰等. *生物学杂志*, 2007, **24**: 5
- [15] Lee CY *et al. Nature*, 2006, **439**: 594
- [16] Schaefer M *et al. Cell*, 2001, **107**: 183
- [17] Yu F *et al. Genes Dev*, 2005, **19**: 1341
- [18] Izumi Y *et al. J Cell Biol*, 2004, **164**: 729
- [19] Buchman JJ *et al. Nat Rev Neurosci*, 2007, **8**: 89
- [20] Bowman SK *et al. Dev Cell*, 2006, **10**: 731
- [21] Siller KH *et al. Nat Cell Biol*, 2006, **8**: 594
- [22] Izumi Y *et al. Nat Cell Biol*, 2006, **8**: 586
- [23] Nipper RW *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**: 14306
- [24] Siegrist SE *et al. Cell*, 2005, **123**: 1323
- [25] Albertson R *et al. Nat Cell Biol*, 2003, **5**: 166
- [26] Yu F *et al. Neuron*, 2006, **51**: 13
- [27] Ahringer J. *Cell*, 2005, **123**: 1184
- [28] Wang H *et al. Nature*, 2007, **449**: 96
- [29] Barr FA *et al. Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, **5**: 429
- [30] Tio M *et al. Nature*, 2001, **409**: 1063
- [31] Chia W *et al. J Cell Biol*, 2008, **180**: 267
- [32] Cappello S *et al. Nat Neurosci*, 2006, **9**: 1099
- [33] Plant PJ *et al. Nat Cell Biol*, 2003, **5**: 301
- [34] Yasumi M *et al. J Biol Chem*, 2005, **280**: 6761
- [35] Du Q *et al. Nat Cell Biol*, 2001, **3**: 1069
- [36] Du Q *et al. Cell*, 2004, **119**: 503
- [37] Du Q *et al. Curr Biol*, 2002, **12**: 1928
- [38] Sanada K *et al. Cell*, 2005, **122**: 119

The Coupling Mechanisms of Spindle Orientation and Cell Cortical Polarity in Asymmetric Cell Divisions of Neural Progenitors

Min-Yin Li, Xiao-Ping Chen*

(College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

Abstract Asymmetric cell division of neural progenitor cells functions as a prerequisite for neurogenesis. Elegant studies in this field over recent years have shed new light on the pathways whereby neural progenitor cells differentiate during the development of *Drosophila* and mammalian central nervous system. The orientation of mitotic spindle, a key cellular scaffold, is induced by cell cortical polarity, and therefore ensures preferential distributions of cell fate determinants in the basal part. This process is sequentially regulated by polarized protein complexes consisting of G-protein subunits, distinct adaptor proteins and microtubule-associated proteins. Here we discuss the coupling of spindle orientation and cell cortical polarity, a hallmark of this unique pattern of cell division, on both cellular and molecular levels.

Key words spindle; cell cortical polarity; G-protein signaling; Pins; Khc-73

Received: April 28, 2008 Accepted: July 8, 2008

This work was supported by the Foundation of Ministry of Personnel of China and the Zhejiang Xinmiao Program (No. 2007R40G2020029)

*Corresponding author. Tel: 86-571-88320658, Fax: 86-571-88320057, E-mail: chxp666@yahoo.com.cn

The Anatomical Record 征稿简则

被美国《科学引文索引》(Science Citation Index, SCI)收录的 *The Anatomical Record* (AR) 是一本具有百年历史的、在美国本土出版的老牌生物医学月刊杂志。

近年来, AR 开始关注中国学者的投稿, 并欢迎来自中国高水平的论文。为此, AR 主编、犹他大学教授 Kurt H. Albertine 博士专程访华, 聘请浙江大学基础医学院李继承教授为 AR 副主编, 负责中国区的征稿、组稿、审稿、指定稿件评审人和稿件录用等。

AR 优先发表细胞和分子生物学论著, 尤其欢迎: (1) 细胞和分子生物学在形态学和功能学方面的新发现; (2) 由于基因缺损、活化、过度表达等对于细胞、组织和器官结构造成的形态学的新发现和功能改变; (3) 通过影像模式做出的新发现、新进展等稿件。

AR 不收版面费及彩版费, 稿件刊出率为 30%~45%, 编辑部从收到作者来稿到决定录用或退稿最快时间为一个月。来稿具体要求请参阅 *The Anatomical Record* 网页: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/117927936/grouphome/ForAuthors.html>。

来稿请以网上投稿的方式提交。首先请在以下网页免费建立个人账号: <http://mc.manuscriptcentral.com/ar-wiley>

鉴于部分中国作者英语写作水平有限, 不能及时将科研成果发表于国际期刊, AR 中国区办公室决定, 组织精通中英双语的留美专家、学者, 帮助英语写作困难的作者将论文整理并翻译成适合发表的英文论文, 推荐给 AR 发表。

The Anatomical Record 中国区办公室地址: 浙江大学医学院 56 号信箱, 邮编 310058; 电话: 0571-88208153; 传真: 0571-88208094; E-mail: anatomicalrecord@zju.edu.cn。

The Anatomical Record 中国区办公室

2008 年 6 月