

# 微管动力学相关蛋白的研究

李爱群 周建伟

(南京医科大学公共卫生学院分子毒理实验室 南京 210029)

**摘要** 微管是细胞骨架的主要成分之一,通常存在有增长和缩短两个时期,这种不稳定性为微管本身所固有,其动力学特征对于细胞的生物学功能来说极为重要。本文将阐述微管的非稳态动力学模型,以及一组与微管动力学相关蛋白的研究。

**关键词:** 微管 动力学不稳定性 微管相关蛋白 促微管解聚因子

微管是细胞骨架的重要组成成份之一,由  $\alpha$ 、 $\beta$  二聚体头-尾相连聚合而成的中空管状结构,具有一定的机械强度。微管是保持细胞形状、极性的主要因子,并在细胞有丝分裂中对纺锤丝装配、有丝分裂关卡、染色体移动等调节起着重要的作用<sup>[1]</sup>。

关于微管的一个重要问题就是它们如何能够轻而易举地装配成不同的结构,目前一个颇为公认的答案,就是微管具有高度复杂的不稳定性动力学行为,即在一定的体外培养条件下,在临界浓度以上时,微管蛋白亚单位可以自我聚合成所需要的结构;而当低于临界浓度时,微管又解聚为微管蛋白亚单位,且单一微管一直处于增长和缩短两个阶段。微管从细胞间期长长的、稳定的结构重组,构成有丝分裂期的纺锤丝是一富有挑战性和难度很大的课题。目前广泛地认为细胞周期中微管动力学及纺锤丝的装配受到一系列微管稳定-去稳定因素的调节,其中稳定因素包括一大类微管相关蛋白,而不稳定因素则为不断被发现的促微管解聚因子。本文将主要介绍微管的非稳态动力学模型,以及一组与微管相关的蛋白研究。

## 一、微管固有的动力学不稳定性

$\alpha$ 、 $\beta$  微管蛋白二聚体的浓度必须在临界浓度以上,二聚物才能聚合为微管,当浓度低于临界浓度时,微管解聚。加入鞭毛或者微管的碎片,即相当于晶核形成位点,则可以加快微管的初始聚合速率。由于细胞绝大多数的微管以负端结合于微管组织中心,所以可以断定微管不稳定性主要取决于它们的正端。Tseng 等<sup>[2]</sup>研究表明,应用某些药物可以提高或降低微管装配的临界浓度,从而来抑制微管聚合或促进微管蛋白装配。非稳态动力学模型认为决定微管稳定性的一个重要参数是 GTP- $\beta$  微管蛋白

加载到微管正端的速率。Caplow M 等<sup>[3]</sup>研究表明,当微管正端的帽状结构亚单位含有 GDP- $\beta$ -微管蛋白而不是 GTP- $\beta$ -微管蛋白时,微管变得不稳定而很快发生解聚。当微管收缩得很快时,使得微管壁上 GDP- $\beta$ -微管蛋白暴露;或者微管增长比较缓慢时,额外的亚单位加载到微管正端之前,GTP- $\beta$ -微管蛋白已水解为 GDP- $\beta$ -微管蛋白,则解聚趋势将有所增强。

## 二、微管相关蛋白及其对微管动力学的影响

微管蛋白可以从细胞裂解液中分离纯化,降低温度到 4℃ 可以使微管解聚,离心冷的裂解液以除去不溶性的物质,然后再加温至 37℃,可以使得上清中含有的微管蛋白聚合。经过加热聚合和冷却解聚多次循环,可以获得高度纯化的微管蛋白。然而值得注意的是在纯化的  $\alpha\beta$  微管蛋白中仍然含有少量其他的蛋白,并占有稳定的数量比例,提示这些与微管蛋白共纯化蛋白不是非特异性的污染物,而是特异性的与微管相互作用的分子,称之为微管相关蛋白。培养细胞的免疫荧光照片显示微管相关蛋白在细胞内的位置与微管的分布一致。这些发现说明微管相关蛋白具有微管结合活性。基于对这些共纯化蛋白的序列分析,微管相关蛋白可以分为二类:微管相关蛋白 I 型,即 MAP1A 和 MAP1B,含有许多个 Lys-Lys-Glu-X 氨基酸重复序列,这些是带有负电荷微管蛋白的结合位点,因而可以抵制微管内部微管蛋白亚单位之间的电荷排斥力,起到了稳定微管的作用;微管相关蛋白 II 型,包括 MAP2、MAP4 以及 tau。这些蛋白的特征是在微管结合区域含有 3-4

重复的18个残基序列。

### 1. tau 蛋白( $\tau$ protein)

tau 蛋白是一组热稳定多肽,相对分子量为55-62 kDa,基因定位于人的第19号染色体上,在tau 蛋白结构中,最显著的特征是具有 Pro-Gly-Gly-Gly 的“重复串联”序列。

研究表明,tau 蛋白借助“重复串联”与微管结合,刺激微管组装并维持其结构。tau 蛋白有多个磷酸化位点,正常 tau 蛋白一旦异常磷酸化,不仅不能与微管蛋白相结合,反而抑制了 tau 蛋白本身促进微管组装的能力;如果异常 tau 蛋白被去磷酸化,那么它的功能则得以恢复如初。正常人 tau 蛋白与老年性痴呆病人的 tau 蛋白(PHFs-tau)在聚合、磷酸化、微管结合和装配能力以及糖基化等方面有很大差异,后者为过度磷酸化和糖基化的 tau 蛋白,由于其微管结合区的自我结合导致了其对微管稳定作用的丧失,微管稳定性的丧失则导致其运输功能的障碍,进而逐渐形成双螺旋纤维缠结——AD 患者神经纤维原特征性的变化之一。Illenberge 等人绘制磷酸肽序列示意图,确定有17个磷酸化位点,其中80%-90%含有磷酸盐成分,除了S214和S262以外,大多数存在于SP和TP模体中,同时认为S214是有丝分裂中期主要的磷酸化位点,体外试验表明其残基端被磷酸化后可大大增强 tau 蛋白与微管蛋白之间的交互作用,从而抑制微管的装配。

Shackelford 和 Mailliot 分别用大鼠四室缺血模型和狗的心梗模型来研究短暂性大脑缺血/再灌注对 tau 蛋白磷酸化的影响时,均发现一旦缺血,大脑海马、皮质层以及纹状体的 tau 蛋白很快就去磷酸化,且发生时间比血管闭塞发生早,故可以作为大脑缺血诊断的一个早期指标<sup>[4,5]</sup>。Davis 等人<sup>[6]</sup>研究发现,在PC12细胞凋亡期间,tau 蛋白的磷酸化程度会增高,提示在细胞凋亡发生期间,tau 蛋白可能在使细胞骨架发生变化过程中发挥了重要的作用。

### 2. MAP2

MAP2 分子量很大,SDS-PAGE 分析可分为二条带:MAP2A 和 MAP2B,两者均有一定的热稳定性,分子量为280-300kDa,比 tau 蛋白大得多,其氨基酸序列与 tau 蛋白有很高的同源性。MAP2B 和 MAP2A 抗原性非常相似,但不完全相同。MAP2C 是 MAP2 的小分子变体,可能是由于 MAP2A 基因的不同拼接方式所表达的。用蛋白酶处理结合于微管的 MAP2A 时,在微管上会留下一段分子量为28-39kDa 的碱性多肽,这段肽由

MAP2A 的C端和三个相似的碱性微管结合模块组成,能牢固地结合于微管,具有促进聚合的性质,但被磷酸化修饰后,MAP2A 结合能力和促进聚合能力均降低。Murakami<sup>[7]</sup>认为孕烯醇酮结合 MAP2 可以促进微管的装配,利用离子交换和凝胶过滤可将细胞质分为二部分,其中一部分分子量为40-60kDa,富含孕烯醇酮结合活性,并可用微管蛋白单克隆抗体和 MAP2 单克隆抗体进行蛋白免疫印迹检测。孕烯醇酮和 MAP2 有着很强的亲和力,并具有饱和性,电子显微镜分析显示孕烯醇酮可以提高 MAP2 诱导微管蛋白的装配效率,而黄体酮的作用则相反。

### 3. MAP4

Aizawa 于1990年在NCBI登录了牛 MAP4 基因,编码1129个氨基酸,分子量为190kDa。MAP4 包被在微管外部时,微管蛋白亚单位不能脱离微管的末端,从而起到了稳定微管的作用。MAP4 在结构上与 MAP2 有类似之处,但是它们结合微管的机制不同。在转染的中国苍鼠卵巢细胞内,MARK 激酶在微管结合位点可以磷酸化 MAP4,因此 MARK2 过度表达会导致微管解聚,使细胞从基底层脱落,继而死亡,在此过程中还伴有中间丝的崩解而动力纤维不受任何影响<sup>[8]</sup>。MAP4 同样也受第二种酶——cdc2 激酶来磷酸化,它在细胞分裂后期中对染色体的移动起着重要作用。

### 4. MAP1

Tokuraku 为比较 MAPs 结合微管的机制,进行定量竞争分析时发现,当加入过量的 MAP4 微管结合区域片段(PA4T)到含有牛的 MAP1、MAP2、MAP4 和 tau 的双环微管蛋白部分中,MAP4 和 tau 蛋白将完全从微管上释放出来,MAP2 部分释放,而 MAP1 依旧保留。

MAP1A 的分子量也很大,其氨基酸序列与 MAP2 有很大的同源性,它也能促进微管聚合。与微管结合后,MAP1A 突起部分为20nm。MAP1A 和 MAP2A 最大的不同是前者加热可以灭活而后者则不然。应用免疫抗体标记技术发现,神经元胞质部分和许多其他细胞均有标记。但也有人发现只标记神经元,此种差异可能是 MAP1A 有不同亚型,有的亚型广泛分布,有的亚型局部分布。Vecino<sup>[9]</sup>应用 Western blot 和免疫组化证明磷酸化 MAP1B 参与丁鲷鱼视神经中心细胞轴突的再生和生长,与中枢神经系统生长修复的过程密切相关。

### 5. 其他 MAP

用 SDS-PAGE 分析成年脊椎动物大脑微管抑制作用时,在 MAP1A 下常常看到有两条小带,一度被认为是 MAP1B 和 MAP1C,与其他 MAP 的主要区别是比较耐受蛋白酶的作用。MAP1C 目前经鉴定被认为是细胞质动力蛋白(dynein),MAP1B 有时也称为 MAP5,没有 tau 蛋白和 MAP2 分子中出现的重复模块。还有一个 MAP3,存在于脑组织中,但数量少于 MAP1 或 MAP2,是较小的多肽,它出现在胶质细胞和神经细胞,在神经细胞中存在于神经丝丰富的轴突。还有一些更小的 MAP 称为 chairtins,也是热稳定的。

MAP30 是一种分子量为 30kDa 的热稳定蛋白,特异性定位于神经元内,轴突和树突内未见分布。新生小鼠神经元的胞质有较强的 MAP30 免疫反应,可能与新生鼠神经元代谢旺盛、蛋白质大量合成有关,而在成年鼠和人的神经元中反应非常弱,可能由于蛋白质合成相对减少所致。MAP30 与 AD 海马结构的神经元有较强的免疫反应性,Western blot 分析 MAP30 以高分子量存在于神经元纤维缠结(NFT)中。

### 三、促微管解聚因子

与纯化的微管蛋白比较,有时细胞内微管解聚的发生机率高提示体内存在促微管解聚因子,这些因子可以抑制 MAPs 的活性而导致微管解聚,从而减少微管网络的装配,增加了其扭转性。细胞在从间期到有丝分裂期转变的过程中,促微管解聚因子的活性调控可能在体内微管动力学的过程中发生了很重要的变化。对这些因子的研究,除了可以了解它们潜在调节微管动力学的重要性,还有助于阐明微管解聚的机制。近来证明有三类促微管解聚因子,但是它们的机制却各不相同,分述如下:

#### 1. Op18

Op18 是一类小的热稳定蛋白,因其在一些肿瘤细胞中可大量、高度被诱导,同时也是许多蛋白激酶的底物,而首次被发现。Op18 可能普遍存在于脊椎动物细胞中,但在出芽酵母中却不能表达出我们所熟知的序列结构。用微管聚合抑制实验,可以从牛的胸腺中纯化出作为促微管解聚因子的 Op18。通过在非洲爪蟾提取物中免疫去除则会增加微管的聚合能力,以及在人组织培养细胞中过表达则会出现微管蛋白聚合结构部分减少,从而可以证明 Op18 具有解聚微管的能力。有趣的是,Op18 受到磷酸化的负调控,在有丝分裂细胞中它呈高度磷酸化而不

具活性,提示在细胞分裂过程中其功能更为重要。另外令人兴奋的是 Op18 在微管细胞骨架的信号传导中也起着非常重要的作用,但 Op18 使微管解聚的精确机制尚不清楚。Op18 主要结合在  $\alpha\beta$  微管蛋白二聚体上(结合的亲和力有待进一步阐明),预试验提示 Op18 主要增加了微管解聚的频率<sup>[10]</sup>。

#### 2. Kar3

近来第二类促微管解聚的蛋白是一类超家族的微管动力蛋白相关激酶。第一个被阐明影响微管稳定性的激酶是 Kar3——直接作用于微管负端的一个激酶<sup>[11]</sup>。在体外 Kar3 优先解聚的紫杉醇稳定的微管负端。这种特性在核融合过程中有着重要作用,在此期间,处于一个纺锤丝体上 Kar3 卷曲,使从第二个纺锤体辐射延伸的微管发生解聚,从而更进一步地提示该动力蛋白可以影响到微管的动力学,可能主要是通过嵌合的非能动性的动力蛋白结合到小梁上而增加了微管的解聚速率。

#### 3. XKCM1

肌动蛋白影响微管动力学最为典型的例子是源于 XKCM1 的研究,实验证明这种肌动蛋白存在于非洲爪蟾卵中,属于肌动蛋白超家族中重要的一类动力蛋白<sup>[12]</sup>。通过免疫去除或者加入阻滞性抗体可以抑制体外纺锤丝装配,从而使得微管长度显著性增加,结果导致有丝分裂纺锤丝的装配被完全破坏。在动力蛋白超家族中,XKCM1 同质于另一肌动蛋白 XKIF2——一种正端引导囊泡的动力蛋白,其被证明存在于小鼠脑中。尽管缺乏直接的根据,但是这种同源性提示 XKCM1 同样也应是一种正端引导的动力蛋白。XKCM1 可能沿行于微管的正端,通过影响末端特异性稳定结构或者其他的化学特性而表现促微管解聚的特征。XKCM1 及其哺乳动物同源的 MCAK 在着丝粒富集,在此作为动力蛋白或者促微管解聚因子,它们对于染色体的移动发挥着重要的作用。

此外还有使微管解聚的一类新的蛋白质,即为微管切断蛋白(MT severing protein),它们均有在体外从紫杉醇稳定的微管分离出来的基本特性,其中三种蛋白已得到了纯化。当然,最重要的一种是剑蛋白(Katanin),一种从海洋海胆卵中分离出杂合有 ATPase 的二聚体。剑蛋白富集于中心粒以及海洋海胆胚胎中的纺锤丝上,显示其对有丝分裂纺锤丝的装配或动力学起着重要的作用。但是目前,这种切断蛋白的生理作用及其对微管动力学的影响还不甚清楚<sup>[13]</sup>。

## 四、结 语

微管的聚合和解聚是细胞分裂中的一个重要环节,其动态平衡状态时常发生变化。微管动力学不稳定性通常是用微管正端(末端)聚合、解聚的速率以及从增长到缩短(灾变)、从缩短到增长(拯救)的转换频率四个参数来衡量的。对于活细胞来说,影响其微管动力学的因素不仅包括诸多的物理、化学、生物方面因素,此外还有物种的差异,以及包括细胞培养温度、荧光蛋白标记物、图像和软件配置的选择等因素,这些均可能对微管动力学研究有较大的影响,因此在研究过程中应兼顾多方面。目前随着微管相关蛋白的不断发现,这些相关蛋白的结构和功能在许多方面亟待进一步研究,特别是 MAPs 磷酸化、乙酰化后对微管动力学的影响,以及与某些疾病如恶性肿瘤、老年性痴呆综合征、短暂性大脑缺血等之间的相关性,均是当前研究者须关心的问题。1998年本课题组克隆的一个新基因 JWA (AF070523),初步研究结果显示其表达蛋白可能也是一种新的微管相关蛋白,参与细胞分化、氧化应激及细胞内氨基酸平衡调节等,目前还正在不断地进行深入研究。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Gundersen GG. 2002, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **3**(4):296-304.
- [ 2 ] Tseng HC et al., 1999, *Proc-Natl-Acad-Sci.*, **96**(17): 9503-9508.
- [ 3 ] Caplow M et al., 1998, *Biochemistry.*, **37**(37):12994-13002.
- [ 4 ] Shackelford DA et al., 1998, *Mol Chem Neuropathol.*, **34**(2-3):103-120.
- [ 5 ] Mailliot C et al., 2000, *J Cereb Blood Flow Metab.*, **20**(3):543-549.
- [ 6 ] Davis PK et al., 1999, *J Biol Chem.*, **274**(50):35686-35692.
- [ 7 ] Murakami K et al., 2000, *Proc Natl Acad Sci.*, **97**(7): 3579-3584.
- [ 8 ] Ebneith A et al., 1999, *Cell Motil Cytoskeleton.*, **44**(3): 209-224.
- [ 9 ] Vecino E et al., 1998, *Neurosci Lett.*, **245**(2):93-96.
- [ 10 ] Charbaut E et al., 2001, *J Biol Chem.*, **276**(19):16146-16154.
- [ 11 ] Troxell CL et al., 2001, *Mol Biol Cell.*, **12**(11):3476-3488.
- [ 12 ] Kline Smith SL et al., 2002, *Mol Biol Cell.*, **13**(8):2718-2731.
- [ 13 ] Arshad D et al., 1997, *Annu Rev Cell Dev Biol.*, **13**:83-117.

## NKT 细 胞 亚 群\*

张 勇 王福庆

(上海第二医科大学 上海市免疫学研究所 上海 200025)

经典的 NKT 细胞是一类表面既具有 T 细胞又具有 NK 细胞标志的 T 细胞亚群。与普通 T 细胞相比,1. NKT 细胞不受经典 MHC I 类分子限制,而受非经典 MHC I 类分子、CD1d 分子限制,不识别蛋白质抗原,而是识别脂类抗原;2. NKT 细胞的 TCR 库非常局限,一个物种的 NKT 细胞只有一种 TCR $\alpha$  链和 3-4 种 TCR $\beta$  链;3. 受刺激后, NKT 细胞能迅速产生大量的细胞因子,如 IFN- $\gamma$  和/或 IL-4<sup>[1,2]</sup>。关于 NKT 细胞的功能、调控以及与免疫系统其他细胞的关系尚不十分明确。随着对 NKT 细胞研究的深入,不同实验常得到不相一致、甚至是完全相反的结果,这可能与 NKT 细胞具有不同的亚群有关。

## 一、NKT 细胞的分类

NKT 细胞是一群高度异质性的细胞,可根据不

同的表型和功能特征加以分类:

## 1. 根据 NK1.1 的表达分类

1987年, Fowlkes 等在 C57BL/6 小鼠胸腺中发现一群 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> 的 T 细胞,其表面表达 NK 细胞标志 NK1.1<sup>[3]</sup>,因此将这种 NK1.1<sup>+</sup> T 细胞称为 NKT 细胞。但 NK1.1 只表达在 C57BL/6、NZB 和 CE 等小鼠品系中,而 Balb/c、NOD 以及 DBA 等其他许多小鼠品系均不表达该分子<sup>[4]</sup>。同时利用 CD1d- $\alpha$ -GalCer 四聚体技术(见下)发现,即使在 NK1.1 小鼠品系中也有不表达 NK1.1、但能识别 CD1d 分子递呈的脂类抗原的 NKT 细胞亚群。因此, NKT 细胞可分为 NK1.1<sup>+</sup> 和 NK1.1<sup>-</sup> 两种。

\* 国家自然科学基金资助项目(批准号:30070709)。

E-mail: zhangy@shsmu.edu.cn