

动点蛋白功能的研究进展

郑宇鹏 姚健晖 姚雪彪

(中国科学技术大学生命科学院细胞动力学实验室 合肥 230027)

细胞周期是一个受严格调控、高度有序的过程。大部分真核细胞不会在上一个有丝分裂完成前开始新一轮的染色体复制;不会在 DNA 复制完成前开始有丝分裂;也不会姐妹染色体于赤道板上排列整齐前就开始分离。

一、细胞周期和细胞周期调节的动点(kinetochores)组装与去组装

有丝分裂过程中染色体的运动是通过纺锤体微管与动点的相互作用来调节的,如图 1 所示,所谓动点是染色体着丝粒(centromere)上一

个三层结构的特化部位。最近研究所发现的许多动点蛋白,在着丝粒结构的构建、动点的组装和姐妹染色体的分离过程中起重要作用^[1,2]。

位于一对动点间的着丝粒异染色质区包含大量的 α -卫星 DNA、centromere-associated protein B(CENP-B, 80kD)和内着丝粒蛋白(INCENP),这些蛋白可能与维系姐妹染色体的粘连有关,并且是支持动点组装的结构基础。还有研究表明该区域可能含 MCAK(mitotic centromere-associated kinesin),MCAK 的非洲爪蟾同源物 XKCM1 在爪蟾卵提取物中是纺锤体形成与维持所必需

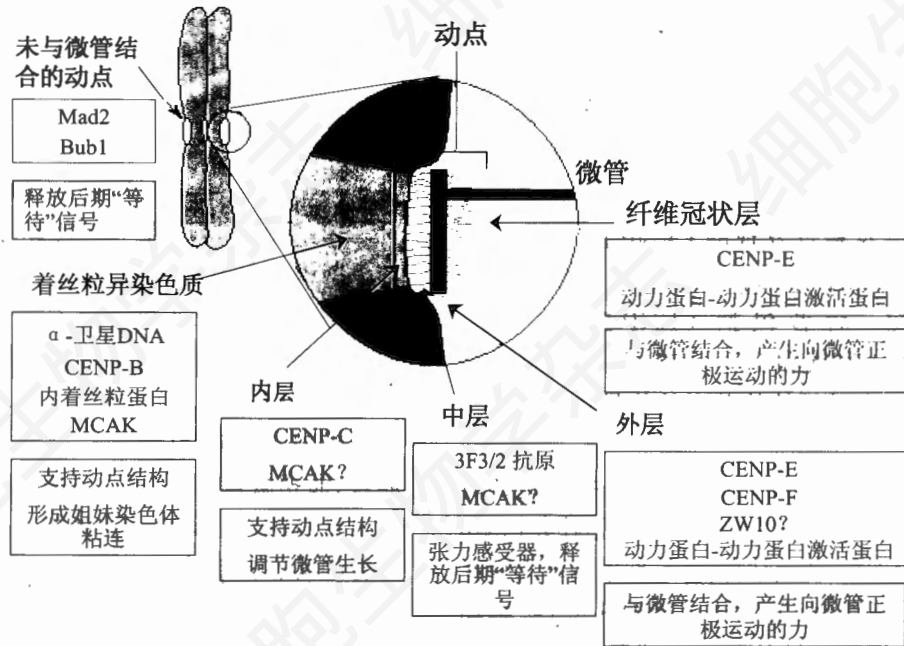


图 1 动点结构示意图(引自 Ref1)

* 联系人
本工作为国家杰出青年基金(课题编号:39925018),
中国科学院创新重大项目(KSCX2-2-01)资助项目。

的^[3]。免疫电镜研究结果表明,动点结构可分为4层:内层、中层、外层和纤维冠状层。内层紧贴着上述的异染色质区,含有 CENP-C(140kD)和 CENP-G,是维持动点功能所必要的。中层含有多个磷酸化的蛋白,这些蛋白的磷酸化位点可被单抗 3F3/2 所识别,它们被认为是中期/后期转位的调控蛋白——通过感受张力的变化来实现纺锤体检验点的调控^[4],此外 MACK 亦有可能位于该层。动点的外层是与微管正端结合的部位,该层含有 CENP-F(又名 mitosin)(350kD)、CENP-E 和 ZW10,还可能含有胞质动力蛋白及其相关的动力蛋白激活蛋白复合物(dyneindyn-actin)。从外层向外延伸的纤维冠状层(纺锤体微管结合点),则含有 CENP-E、ZW10 和胞质动力蛋白,对于那些还未与微管形成稳定结合的动点,则含有 Mad(mitotic arrest defect)家族蛋白和 Bub(budding uninhibited by benzimidazole)家族蛋白,它们被认为在纺锤体检验点中起重要作用^[2]。

根据动点蛋白与动点结合的时相关系可将其分为两类:①在整个细胞周期过程中自始至终都与动点结合的动点蛋白;②只是在有丝分裂过程中暂时性地与动点结合。前者包括 CENP-A、CENP-B、CENP-C、CENP-D 和 CENP-G 以及最近发现的 CENP-H^[5],这些蛋白主要是起构建与维系着丝粒-动点复合物结构的功能。后者包括 CENP-E、CENP-F、MCAK、Mad 家族和 Bub 家族,它们在姐妹染色体的分离和纺锤体检验点的信号通路中起重要作用。

依赖于细胞周期的动点蛋白是按一定的时间、空间顺序组装到动点上的^[6]:①拓扑异构酶II α 最早与着丝粒-动点结合,在S期末期就出现在动点上;②接着是 CENP-F, CENP-F 从 G2 早期开始,便从核基质转位到还未成熟的“前动点”上,这个过程一直持续到 G2 晚期染色体凝集明显为止;③到了前期,与核基质结合的 MCAK 重定位到着丝粒-动点复合物上;④当核膜破裂后, hZW10 和马达分子 CENP-E, 以及动力蛋白-动

力蛋白激活蛋白复合物(这些蛋白在间期是位于细胞质中的)开始组装到动点上。这种组装的时间顺序与空间上的移位,显然是受严格调控的。遗憾的是,我们对其中的机理知之甚少。并且在过去我们更注意的是对时间顺序调控的研究,而忽略了对空间调控的研究。要解开细胞周期之谜应从时空的二维观点出发,因为细胞周期的调控其实就是,特定的调控子出现在特定的时间、出现在特定的地点。

此外还有一组与“纺锤体检验点”有关的蛋白组装到动点,包括 hMAD1, hMAD2, MAD3, 鼠 BUB1, BUB3 和 p55cdc, 这些蛋白的组装发生在前期和前中期的某个时刻。动点蛋白在着丝粒-动点复合物上的组装的时间顺序反映了动点的组装过程是多步骤通路,这种依次组装的顺序亦反映了动点蛋白复合物的空间结构^[6]。也正是这个原因,动点的三层结构只有在有丝分裂期才能观察到,但动点的组装却是自着丝粒 DNA 复制时就开始了。

二、染色体的运动机理和纺锤体检验点

可通过“search and capture”模型来描述微管俘获染色体的过程^[7]。微管从纺锤体两极向外伸展的过程中,如果微管恰好遇到构象合适的动点(如图 2. A 动点正面对着微管末端),微管就会被动点俘获,结果就是染色体和纺锤体微管结合(图 2. B)。通常姐妹动点分别与来自两极的微管结合(图 2. C 这要求姐妹动点背靠背、面朝微管末端)这个正确的结合是通过动点上蛋白的作用而进一步维持在稳定状态。而微管的动态自组装过程并不是为了达到稳固的结合,相反的,它的功能有两个方面:①这种聚合与解聚的平衡可以使错误的微管-动点结合释放,而使错误得以修复;②使得微管可以在各个方向伸展,从而为动点俘获微管提供了大量的可能的结合位点。一旦所有的染色体都与纺锤体微管正确结合后,动点上的微管解聚与动

点上的马达分子一起发挥作用,牵拉着染色体向两极运动,同时纺锤体两极也向子细胞运动,这两个过程同时发挥作用使得每个子细胞得到相等数量的染色体。

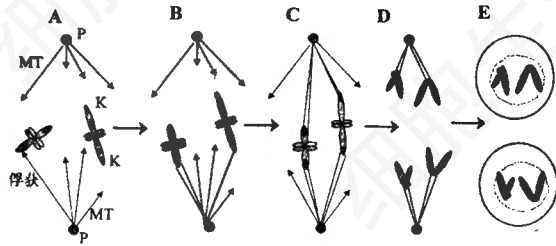


图 2 “search and capture”模型(引自 Ref 7)

但仅仅依赖随机的俘获,并不能保证动点-微管结合的正确性。由于在俘获过程中,染色体的排列是随机的,因此有些染色体的动点可能不是面朝两极(图 3. A),在这种情况下,极有可能发生姐妹动点均被来自一极的纺锤体微管俘获,从而形成“单极”(monopolar)结合(图 3. B),这会造成遗传上的灾难——一个子细胞多得到一条或几条染色体,而另一个子细胞少得到一条或几条染色体。幸好,细胞内存在纠正该错误的机制,该机制基于:①动点上存在感受张力的信号通路,不存在张力的微管-动点结合是不稳定的;②微管处于聚合与解聚的平衡状态。由于这两个原因,错误的动点-微管联结由于不存在张力是不稳定的,加上微管本身的动态性,使得其上的微管结合不断地被新的微管结合所取代,直到其中的一个动点与另一极的微管结合进入稳态为止(图 3. E)。

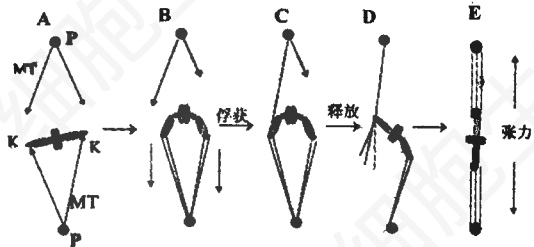


图 3 单极联结及其修正策略(引自 Ref 7)

该观点可由以下实验证实:人为地用 mi-

cro-needle 牵拉“单极”结合的染色体,使其动点上产生张力,则原来因为“单极”结合而被阻断的细胞周期可以继续前进。这是由于细胞存在的“检验点”可以感知动点上的张力,但细胞如何将张力这种机械力转换为信号通路上的生化改变,目前还是个谜。不过可以提出以下两个假设:动点上的张力,不管是纺锤体微管产生的,还是人为用 microneedle 牵拉引起的,都可产生两个效果:①动点蛋白的去磷酸化;②产生“go ahead”的信号。相反的,在缺乏张力条件下,则另有两个效果:①动点蛋白的磷酸化;②产生“wait”的信号。如前所述,目前的研究倾向于支持后者,不过上述的图像还不足以具体地描绘动点是如何俘获微管的。

当核膜破裂,星体微管伸入核内时,CENP-E 已经定位于凝集染色体动点的最外层上^[10],到了前期,可以观察到称为“侧面结合”(lateral attachment)的现象,即染色体姐妹动点中只有一个与来自一极的纺锤体微管的侧壁结合,这种姐妹动点中只有一个与微管结合,称为“单取向”(monooriented),而两个动点分别与来自两极的微管结合则称为“双取向”(bioriented)。这种“侧面结合”的染色体可以 20-50 μ m/min 的速度在微管上向微管负极(即向纺锤体极)迅速滑动(图 4. A)。这在逻辑上是易于理解的,因为动点恰好与微管末端结合的几率太小,而且与微管侧壁结合的几率则要大得多,并且向负极滑动过程中会有更多的与微管结合的机会。但我们仍不清楚,从“侧面结合”到动点与微管末端结合是如何进行的,大概是由于微管处于动态的聚合/解聚过程中,在某个时刻这种“侧面结合”可以变成动点与微管正极端的结合,一旦这种结合发生,染色体可以 ~2 μ m/min 的速度时而向正极运动,时而向负极运动如此交替,每个周期为数分钟(图 4. B、C)。这样的交替运动持续到另一个姐妹动点与来自另一极的微管正极端结合为止(图 3. D)。此时,染色体可以持续地向赤道板移动。通常把该过程中染色体运动方向上居于前面的

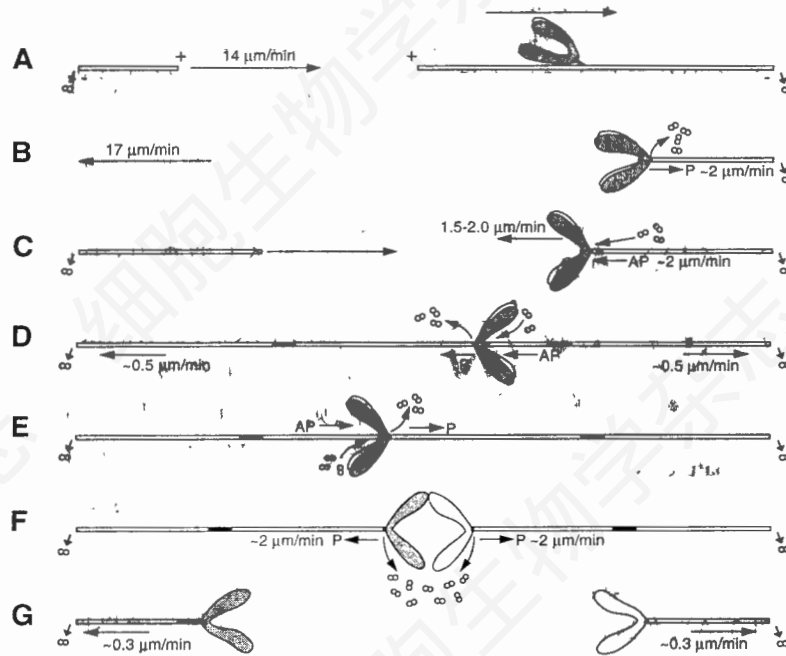


图4 脊椎动物体细胞动力学性质和微管聚合/解聚合过程 (引自 Ref 8) P, poleward; AP, anti-poleward.

动点称为“前导动点”(leading kinetochore),把位于运动方向上后面的动点称为“后随动点”(lagging kinetochore)。已经发现前导动点上的CENP-E分布要比后随动点上的多,这可能暗示了染色体向赤道挺进的原因。当染色体接近赤道板后,姐妹染色体又在离极(AP)与向极(P)间来回摆动(图4.E),一直持续到后期启动,连接姐妹染色体的物质(cohesin)在恰当的时候降解(这中间亦有一套复杂、严格的调控系统,而且cohesin的降解并不需要微管结合在动点上——用秋水仙素使微管解聚的细胞中,姐妹染色体间的cohesin仍可降解^[9],姐妹染色体仍可分开,当然无法准确分配到两个子细胞中)从而使其可以顺利分开。目前认为驱动染色体运动的力有两个来源:①微管聚合/解聚,推动或牵拉染色体离极(AP)或向极(P)运动;②CENP-E一类的马达分子产生的正极或负极方向上的力。

一个多世纪以来,细胞生物学家一直在探索有丝分裂过程中细胞如何将遗传物质均匀地、准确地传递给两个子细胞。近年来,人们将目光集

集中在动点上,认为动点不只是纺锤体微管的锚定点,而且在有丝分裂动力学过程中起着重要的控制作用。动点通过信号转导途径可以感知染色体是否完整地排列在赤道板上,哪怕只有一条染色体没有排列好,细胞都无法进行有丝分裂,从而避免了遗传物质不均匀地传递给两个子细胞,这个过程就称为“纺锤体检验点”。

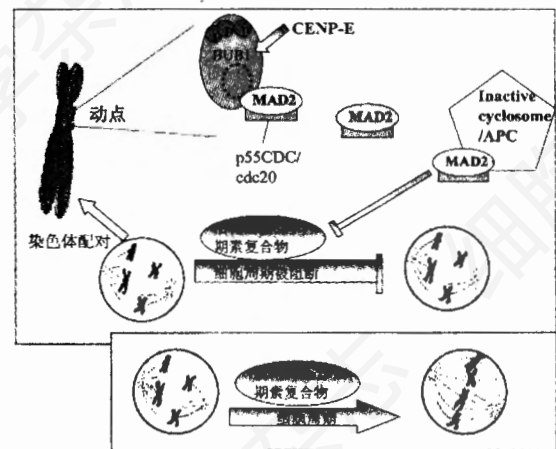


图5 纺锤体检验点示意图(引自 Ref 10)

我们可以描绘这样的一幅称之为“wait signal”的图像^[10]:①当动点未与纺锤体微管结合时,动点上的 MAD2-p55CDC/cdc20 复合物可以不断地释放到细胞质中,与 cyclosome/APC (anaphase promoting complex)结合而使后者失活,从而使 cyclosome/APC 不能降解阻遏细胞周期前进的 kinase/cyclin 复合物,最终使细胞周期停滞。实际上这里的 MAD2-p55CDC/cdc20 复合物就相当于一个“wait signal”它通过广播的形式,提示细胞:染色体还未排列好,不能进入细胞周期的下一步。②而当微管结合到动点上时,由于这种结合是通过马达蛋白分子 CENP-E 等与微管相互作用完成的,因此微管与动点的结合可能改变的是 CENP-E 的构象,这种改变可以影响了 BUB1、BUBR1 的活性(如水解 BUB1、BUBR1 上的磷酸基团),从而使 MAD2 失活,使其无法再抑制 APC。这相当于,细胞里不断广播的“wait signal”静止了,细胞获准进行染色体的分离。

此外还有人提出“go ahead”的模型,认为纺锤体检验点是通过微管与动点结合成功后释放的信号提示染色体准备分离。这个模型首先在逻辑上就遇到困难,我们无法想象:那么多染色体,如果每个动点与微管结合成功都释放一个染色体获准分离的信号,那么细胞究竟服从谁的指示——这显然是一团混乱。其次,以下的实验更有利地证实了“wait signal”模型,对于因为只剩一个动点未与微管结合细胞周期不能前行的细胞,只要用激光摧毁最后那个尚未与微管结合的动点,使“等待”信号的广播停止,细胞便可像染色体完全排列整齐似的进入分裂期。

当然,目前的“wait signal”模型还不够完整,因为我们仍然不清楚到底有多少种蛋白参与了“纺锤体调控点”,甚至对那些已知的参与这个调控点的蛋白,我们也不知道它们之间是如何相互作用的,因此整个动点蛋白功能与调节示意图的详细描述还有赖于对动点蛋白的深入研究。

三、动点蛋白: CENP-E、CENP-F、ZW10、dynein/dynactin 和 MACK 的性质及功能

1. CENP-E 是联结纺锤体微管与动点的联系蛋白

通过对 CENP-E 超微结构的研究^[11],可以证实:CENP-E 最早出现在凝集中的染色体的发育中的动点上,它与动点结合是与核膜破裂后星体微管进入核内这一事件同步或更早些时候发生的。在与微管结合前、向赤道挺进、分裂期及后期 A 过程中,CENP-E 是动点冠状纤维的一个成分,从成熟动点的外层向外延伸至少 50nm。以上事实再结合 CENP-E 的结构特征(图 6. CENP-E 包含一个 N-端的驱动蛋白-类似的马达域和一个 2,069 个氨基酸的 coiled-coil 结构域,根据计算这个结构域可以向外扩展至少 300nm),我们不难推论 CENP-E 是一个主要的微管-动点联系蛋白(linker protein),它的功能包括:调节动点-微管相互作用、发动染色体的向极/离极运动。由于,CENP-E 的 N-端是一个驱动蛋白类似的马达域,而 C-端包含一个动点结合域,因此可以合理地认为:CENP-E 以其 C-端结合动点,其 N-端则可以自由地向外延伸,与纺锤体微管相互作用,发挥其马达结构域的功能。但实际上 CENP-E 的两端都有与微管结合的能力,因此我们目前仍然无法判断 CENP-E 通过哪一端与微管结合,不过可以肯定的是:CENP-E 不依赖于 ATP 的微管结合域是在 C-端,并且一直到中后期仍然保持在无活性状态。因此,我们倾向于前一种可能。

通过反义核苷酸来抑制 CENP-E 蛋白的合成,可以使细胞阻断在有丝分裂分裂期的最新研究结果表明,马达分子 CENP-E 不仅是微管-动点联系蛋白,它还参与了纺锤体检验点的调控^[14]。

2. CENP-E 在染色体运动中的模型

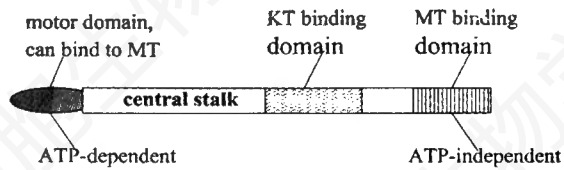


图6 CENP-E分子结构(KT: kinetochore, MT: microtubule)

已经有许多实验证实:CENP-E可以影响染色体的运动,如果将CENP-E的抗体显微注射(microinject)到细胞内,可使细胞阻断在有丝分裂期。以下的两个实验说明CENP-E具有两个不同方向的运动能力:①有人在细菌内表达了一个包含马达结构域的CENP-E片段,并证实其是一个具有ATP酶活性的蛋白,该蛋白可以沿着微管以 $5\mu\text{m}/\text{min}$ 的速度向正极运动;②更早的一个实验,采用的是从利用微管毒素阻断在前中期的HeLa细胞中部分提纯的CENP-E复合物,显示的却是向负极运动的能力,并且这种运动能力可以被CENP-E抗体的免疫耗竭所消除。那么,CENP-E分子马达的运动能力究竟是正极方向,还是负极方向呢?正极方向运动能力显然是有的,因为在最初的前中期,CENP-E复合物沿星体微管向正极运动,就是CENP-E蛋白所调控的,而且驱动蛋白的运动能力的确是正极方向的——CENP-E是驱动蛋白类似物,因而正极方向的运动能力是合理的。为了解释CENP-E分子向负极运动的能力,有人提出这是CENP-E分子通过与微管的解聚偶联,利用微管晶格释放的能量来驱动染色体的运动。目前认为,二者对染色体的运动都有贡献。

3. CENP-F

CENP-F^[12]是一种核基质蛋白,它在M期暂时地与动点和纺锤体结合,超微结构研究表明它位于动点的最外层,并且最早与CENP-E结合,这是否暗示着CENP-F是CENP-E定位于动点所必须的,目前还不清楚,它的细胞学功能也所知甚少。但酵母双杂交实验^[6]和免疫沉淀实验^[13]已经证明CENP-F与CENP-E有

相互作用,并且基因芯片的研究证实其是“差示基因”——CENP-F表达水平的变化是肿瘤产生的表型,因而CENP-F对有丝分裂的动力学过程应该有重要作用。

4. MACK和动力蛋白/动力蛋白激活蛋白(dynein/dynactin)

到目前为止,着丝粒/动点上发现的马达蛋白只有CENP-E、胞质动力蛋白和MACK三种。动力蛋白/动力蛋白激活蛋白复合物的功能包括纺锤体组装、前中期染色体在微管上向负极运动和后期启动。CENP-E的功能则包括建立稳固的双极联结和染色体在赤道板上的凝集。令人感兴趣的是,动力蛋白/动力蛋白激活蛋白在中期完成后就离开动点,CENP-E则是从后期A开始离开动点,但MACK却是一直到末期都结合在动点上。因此有人认为,MACK对前中期事件没有什么贡献,主要是启动后期的染色体运动^[14]。此外,MACK在爪蟾中的类似物XKCM1在纺锤体组装和催化微管正极解聚中有作用。

5. ZW10

ZW10的细胞内分布是依赖于细胞周期的:在前中期到中期的过程中,它不断地从着丝粒/动点移动到动点微管上,而到了后期它又回到着丝粒/动点上。这暗示:ZW10可能是纺锤体检验点后期启动的张力感受器。此外还有许多研究表明,ZW10可以协助动力蛋白/动力蛋白激活蛋白定位到动点上,比如在酵母双杂交实验中,ZW10和dynamitin(dynactin复合物的p50亚单位)有相互作用。由于zw10基因的突变株在后期启动前的染色体运动没有任何缺陷,因此有人认为,动点上动力蛋白的功能不是使染色体俘获微管或染色体凝集在赤道板上,而是协调染色体的分离和后期启动时的向极运动^[15]。

6. 动点蛋白研究的展望

过去几十年间我们对动点蛋白结构与功能有了不少的认识,但遗憾的是,目前我们对动点蛋白双分子、三分子的相互作用的研究非常有

限,使我们无法将各个动点蛋白置于具体的细胞学功能环境中去了解其对染色体运动的调节,这大大限制了我们对有丝分裂机理的理解。利用酵母双杂交体系、荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer methods, FRET)等方法,我们将积累更多的动点蛋白分子相互作用的证据,随着人类基因组的完成和功能蛋白质组研究的进一步深入,我们将进一步了解动点的组成及各动点蛋白的功能,从而使我们将对有丝分裂的机理有更好的理解,甚至全面阐述有丝分裂的信号通路,乃至在试管内重组有丝分裂的全过程,那时人类随意调控细胞生长并遏制癌症梦想的实现将指日可待。

参 考 文 献

- [1] Rieder, C. L. and Salmon, E. D., 1998, *Trends Cell Biol.*, **8**:310-337.
[2] Skibbens, R. V. and Hieter, P., 1998, *Annu. Rev.*

Genet., **32**:307-337.

- [3] Walczak, C. E. et al., 1996, *Cell*, **84**:37-47.
[4] Campbell, M. S. and Gorbsky, G. J., 1995, *J. Cell Biol.*, **129**:1195-1204.
[5] Sugata, N. et al., 1999, *J. Biol. Chem.*, **274**(39):27343-27346.
[6] Chan, G. K. T. et al., 1998, *J. Cell Biol.*, **173**:49-63.
[7] Nicklas, R. B., 1997, *Science*, **275**:632-637.
[8] Inoue, S., 1995, *Mol. Cell Biol.*, **6**:1619-1640.
[9] Nasmyth, K. et al., 2000, *Science*, **288**:1379-1384.
[10] Pennisi, E. et al., 1998, *Science*, **279**:477-480.
[11] Yao, X. et al., 1997, *J. Cell Biol.*, **139**(2):435-447.
[12] Zhu, X., 1999, *Mol. Cell Biol.*, **19**:1016-1024.
[13] Yao, X. et al., 2000, *Nature Cell Biol.*, **2**(8):484-491.
[14] Manney, T. et al., 1998, *J. Cell Biol.*, **142**:787-801.
[15] Starr D. A., 1998, *J. Cell Biol.*, **142**:763-774.
[16] Yao, X., K. F. Sullivan, and D. W. Cleveland, 2000, *Cell*, **100**:1.

Fas/FasL 的特性及其与免疫系统和肿瘤细胞的相关性

吴 乔

(厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室 厦门 361005)

研究肿瘤的最大困惑之一就是为什么体内免疫系统几乎不能消灭肿瘤细胞,肿瘤细胞如何逃免疫系统的监测而生存?最新研究表明,肿瘤细胞逃免疫系统攻击的重要机制之一就是由于存在 Fas/FasL 系统^[1,2]。本文就 Fas/FasL 的特性及其与免疫系统和肿瘤细胞的相关性作一综述。

一、Fas/FasL 的特性

Fas(也称为 AP0 或 CD95)为细胞表面的 I 型跨膜蛋白,分子量 45KD,属于 TNF/NGF 受体超家族成员。在 Fas 的胞内区有一段含 8 个氨基酸的片段,称为“死亡区域”,是传导细胞死亡信号所必需的。Fas 基因位于人染色体 10q 24.1 和小鼠第 19 号染色体。分析淋巴细

胞增生性 1pr 鼠和普通性淋巴细胞增生 g1d 鼠的 Fas 基因表明,编码 Fas 的基因发生突变,由此引起 T 细胞堆积,导致自身免疫性疾病,如鼠淋巴细胞综合征^[3]。另外,人淋巴增多综合征及系统性红斑狼疮也是由于编码 Fas 的基因突变,使 Fas 不表达或丧失功能,导致机体淋巴细胞不平衡,外周自身耐受失调^[4]。

FasL(Fas 配体)为细胞表面的 II 型跨膜蛋白,分子量为 40KD,属于 TNF 家族。FasL 的氨基酸序列与 TNF 家族成员高度同源,这些同源区域被限制在 C 端,也就是与 Fas 相互作用的胞外区^[5]。FasL 结构与 TNF α 相似,在其胞外区的两个半胱氨酸通过类似 TNF α 上的二硫键相联接,还有 TNF α 、TNF β 和 FasL 都是通过三聚体的形成发挥功能作用的。尽管如