

- [10] Laufer, E. et al., 1994, *Cell*, 80: 739—746.
- [11] Niswander, L. et al., 1994, *Nature*, 371: 609—612.
- [12] Fallon, J. F. et al., 1994, *Science*, 264: 104—107.
- [13] Riddle, R. D. et al., 1993, *Cell*, 75: 1401—1416.
- [14] Vogel, A. and Tickle, C., 1994, *Development*, 119: 199—206.
- [15] Wilkinson, D. G. et al., 1989, *Development*, 105: 131—136.
- [16] Cohn, M. J. et al., 1995, *Cell*, 80: 739—746.
- [17] Vogel, A. et al., 1995, *Dev Bid.*, 171: 507—520.
- [18] Francis, P. H. et al., 1994, *Development*, 120: 209—218.
- [19] McGinnis, W. and Krumlauf, R., 1992, *Development*, 114: 755—768.
- [20] Charite, J. et al., 1995, *Cell*, 78: 589—601.
- [21] Summebell, D., 1983, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 78: 269—289.
- [22] Tickle, C. et al., 1982, *Nature*, 296: 564—565.
- [23] Wanek, N. et al., 1991, *Nature*, 350: 81—83.
- [24] Blair, S. S., 1995, *Nature*, 373: 656—657.
- [25] Lepage, T. et al., 1995, *Nature*, 373: 711—715.
- [26] Giguere, V. et al., 1987, *Nature*, 330: 624.

## γ-微管蛋白的研究进展

梁 爱 华

(山西大学生命科学系 太原 030006)

微管是构成细胞骨架的主要成分。而组成微管的主要结构成分是由α-、β-微管蛋白构成的异二聚体。各类生物的α-微管蛋白和β-微管蛋白在氨基酸序列上有很高的同源性,均大于62%。α-与β-微管蛋白之间氨基酸的同源性一般在30%—40%之间。长期以来α-、β-微管蛋白被认为是微管蛋白大家族中的两大主要成员,近几年的研究表明这一结论是不确切的,至少是不完善的。人们在微管蛋白家族中又发现了第三个成员——γ-微管蛋白<sup>[1]</sup>。尽管人们对γ-微管蛋白的了解和认识远不如象对α-、β-微管蛋白那么多,但从许多实验结果来看,同α-、β-微管蛋白一样,γ-微管蛋白也存在于所有的真核生物中。它不是构成微管的主要结构成分,但却是微管执行其功能所必不可少的。它位于细胞内微管组织中心(microtubule organizing centers, MTOCs),可能对微管的形成及微管极性的确定起重要作用。

本文介绍γ-微管蛋白的发现、基因的克隆、该蛋白在细胞中的定位及其功能方面的研究进展。

### 一、γ-微管蛋白的发现

1989年, Oakley<sup>[1]</sup>首次从一种线状真

菌——构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中发现了γ-微管蛋白。该实验小组在1985年从这种真菌中分离到了对热敏感的β-微管蛋白的突变体(mutation)-benA33的回复体(revertants)。他们推测benA33蛋白阻止细胞在高温下进行有丝分裂和生长主要是抑制了微管的解聚所造成的<sup>[2]</sup>。在2604个benA33的回复体中,有许多是α-、β-微管蛋白的突变体,还有两种突变体mipA, mipB<sup>[3]</sup>的基因是以前没有研究过的。基于mipA、mipB突变体可以使benA33突变体的功能得以恢复这一事实, Oakley等推测mipA、mipB与微管的功能有关。当他们用基因组步移法(chromosome walking)将mipA基因克隆并测序后, Oakley意外的发现这一基因的产物既不是α-微管蛋白,也不是β-微管蛋白,但它与其它生物的α-微管蛋白及β-微管蛋白的同源性分别为28.9%—31.7%和33.3%—35.2%。而各类生物中的α-与β-微管蛋白之间的同源性为30%—40%。显然这一蛋白与α-及β-微管蛋白同属一个大家族。Oakley将其命名为γ-微管蛋白<sup>[1]</sup>。

### 二、γ-微管蛋白是保守的蛋白质

γ-微管蛋白的发现向人们提出了许多问

题,其中之一就是 $\gamma$ -微管蛋白是广泛存在于真核生物中呢?还是仅限于构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)以及与其相近的有机体中?如果是后者, $\gamma$ -微管蛋白就有可能是生物进化的结果。如果是广泛存在于真核生物界, $\gamma$ -微管蛋白的起源就可能很早,而且在细胞中具重要和普遍的意义。

根据 $\alpha$ -、 $\beta$ -微管蛋白在各类真核生物中序列非常保守<sup>[4]</sup>的特点,Zheng等人<sup>[5]</sup>推测 $\gamma$ -微管蛋白也可能是保守的蛋白质。因此他们利用已克隆的*A. nidulans*  $\gamma$ -微管蛋白的cDNA基因作为探针,成功地从果蝇(*Drosophila melanogaster*)中克隆出了 $\gamma$ -微管蛋白基因,又用果蝇的 $\gamma$ -微管蛋白基因为探针克隆了人的 $\gamma$ -微管蛋白基因。随后,在酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)中也发现并克隆了 $\gamma$ -微管蛋白基因<sup>[6]</sup>。比较由真菌、果蝇、人及酵母的 $\gamma$ -微管蛋白基因导出的氨基酸序列发现其同源性在60%以上。选择其保守区域设计引物,Stearns等<sup>[6]</sup>利用PCR的方法从爪蟾(*Xenopus laevis*)的基因组中扩增出了 $\gamma$ -微管蛋白基因片断,以此作为探针又筛选出了含 $\gamma$ -微管蛋白基因全长序列的cDNA克隆。1993年Liang等<sup>[7]</sup>又利用PCR技术从原生动物游仆虫(*Euplotes octocarinatus*)的基因组DNA中扩增并分析了 $\gamma$ -微管蛋白基因的全序列。同年,德国的另一科研小组从植物中也克隆到了 $\gamma$ -微管蛋白基因<sup>[8]</sup>。

既然 $\gamma$ -微管蛋白基因存在于真菌、昆虫、哺乳动物、藻类、原生动物及高等植物中,因此可以推测,同 $\alpha$ -、 $\beta$ -微管蛋白一样, $\gamma$ -微管蛋白也广泛存在于所有真核生物中。

### 三、 $\gamma$ -微管蛋白的定位

$\gamma$ -微管蛋白的分子量约50 KDa,由455个左右的氨基酸组成。与 $\alpha$ -、 $\beta$ -微管蛋白相比, $\gamma$ -微管蛋白在细胞内的含量较低,在爪蟾中,大约为细胞总蛋白含量的0.005%,占总微管蛋白含量的不足1%<sup>[6]</sup>。1990年,Oka-

Jey<sup>[9]</sup>用自制的 $\gamma$ -微管蛋白抗体首次研究了 $\gamma$ -微管蛋白在*A. nidulans*中的定位。利用免疫荧光显微技术他们发现 $\gamma$ -微管蛋白存在于纺锤体的极体(Spindle pole body, SPB),而SPB是真菌的微管组织中心(MTOC)。随后,在许多动物中,如在人、果蝇、老鼠中的研究表明, $\gamma$ -微管蛋白定位于中心体(centrosome),中心体是这类生物的MTOC<sup>[10]</sup>。原生动物纤毛虫缺乏典型的中心体,那么在这类生物中 $\gamma$ -微管蛋白的分布如何呢?Liang等<sup>[11]</sup>1995年的研究表明, $\gamma$ -微管蛋白存在于游仆虫的所有的基体中。基体是纤毛、鞭毛基部的结构,在结构上非常类似于中心粒。基体是纤毛、鞭毛的MTOC。此外还发现 $\gamma$ -微管蛋白存在于游仆虫间期细胞的小核中。在高等植物中,同样缺乏典型的中心体,这类生物中微管的形成非常复杂,在其生活周期中微管的形成与皮层微管射线(cortical microtubule arrays),有丝分裂纺锤体(mitotic spindle)及成膜体(phragmoplast)等5种不同的结构有关<sup>[11]</sup>。Lui等<sup>[12]</sup>的研究表明,皮层微管射线以及成膜体均有 $\gamma$ -微管蛋白的存在,并发现随着细胞周期的变化 $\gamma$ -微管蛋白的位置和含量也在变化,从而说明 $\gamma$ -微管蛋白在植物中也与MTOC功能有关。综上所述,可以认为 $\gamma$ -微管蛋白在细胞中定位于各种MTOC。

### 四、 $\gamma$ -微管蛋白的功能

既然 $\gamma$ -微管蛋白存在于所有真核生物中,而且在细胞内定位于MTOC。那么它在细胞中的功能是什么呢?在真菌的研究中发现,如果人为地破坏 $\gamma$ -微管蛋白基因,则使细胞核分裂受到抑制,而且对核的迁移也有抑制作用<sup>[9]</sup>,从而影响细胞分裂。用免疫荧光显微技术检测此时的细胞发现,细胞内没有纺锤体的形成并且细胞质中的微管的长度与数量明显减少。在酵母中,Horio等<sup>[13]</sup>也证明了 $\gamma$ -微管蛋白的缺乏会抑制细胞的分裂。在培养的哺乳动物细胞中注入 $\gamma$ -微管蛋白特异抗体的研究也表明

不能正常地形成纺锤体、 $\gamma$ -微管蛋白与体内微管的形成有关。当用冷处理或抗微管药物处理使微管解聚后,再去除冷处理或抗微管药物后微管组装的恢复可以被 $\gamma$ -微管蛋白抗体所抑制,这与在体外这种抗体能抑制微管蛋白在中心体上组装成微管的结果相对应。不过在体外微管的聚合(不存在中心体的情况下)可以不需 $\gamma$ -微管蛋白的参与<sup>[6]</sup>。

上述研究表明, $\gamma$ -微管蛋白虽然不是组成微管的主要成分,但对微管在体内(in vivo)的组装(microtubule assembly)是必需的。1994年<sup>[14]</sup>,Oakley提出了一个 $\gamma$ -微管蛋白在体内

的作用模型(图1)。 $\gamma$ -微管蛋白以一种环状形式聚集在MTOC上作为微管聚合的组织部位。 $\beta$ -微管蛋白结合到 $\gamma$ -微管蛋白上,这就确定了微管延伸的方向。 $\alpha$ -和 $\beta$ -微管蛋白异二聚体逐渐加上去使微管延长。如果由于基因被破坏而缺少了 $\gamma$ -微管蛋白或由于 $\gamma$ -微管蛋白抗体结合了 $\gamma$ -微管蛋白,那么仅有少数甚至没有这样的组织位点供 $\alpha$ -、 $\beta$ -微管蛋白异二聚体的附着。从而抑制了微管的聚合。因此 $\gamma$ -微管蛋白被认为在体内是微管聚合时微管负极的组织者(nucleator)。

1995年,两个研究小组的生化实验结果

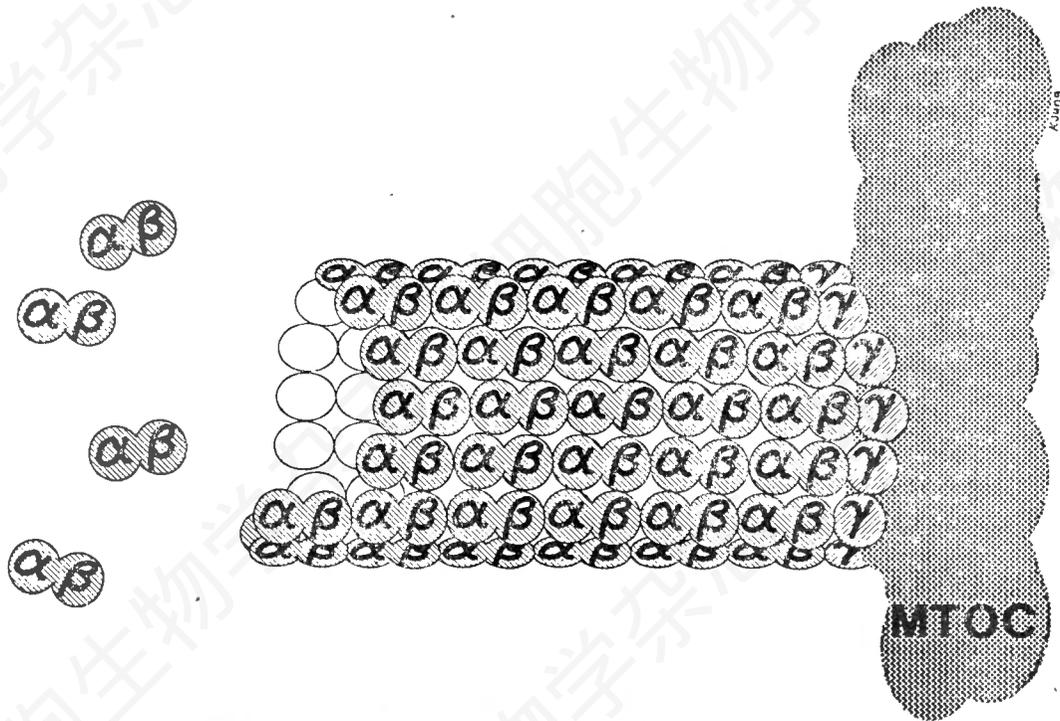


图1  $\gamma$ -微管蛋白在体内的作用模型

(引自 Oakley, B. R. Microtubules, 1994, 4)

有力支持了Oakley的这一模型。Zheng等人<sup>[15]</sup>成功地从爪蟾中分离出了具有活性的 $\gamma$ -微管蛋白复合体,每一复合体含10—13个 $\gamma$ -微管蛋白分子及几种其它蛋白质。这种 $\gamma$ -微管蛋白复合体在体外可以组织微管的聚合。微管组装时, $\gamma$ -微管蛋白定位于负极。Moritz等人<sup>[16]</sup>也证实了 $\gamma$ -微管蛋白以一种环状结构存

在于分离出的中心体的周围物质(pericentriolar material, PCM)中,并具有组织微管聚合的能力。

## 结 语

目前,国际上对 $\gamma$ -微管蛋白的研究集中

在两个方面。一个是对 $\gamma$ -微管蛋白异构体(isomer)问题的研究,另一个是继续对其在体内的功能进行探讨。

$\alpha$ -、 $\beta$ -微管蛋白基因均属多基因家族(multi-gene-family)。如在果蝇中发现4个 $\alpha$ -微管蛋白基因及4个 $\beta$ -微管蛋白基因。人们不禁要问, $\gamma$ -微管蛋白是否也存在异构体问题。它们是由不同基因转录而来还是由同一基因经转录后修饰而来?关于这一问题,目前除在基因数据库(EMBL databank)中能查到游仆虫(Euplotes)有两个 $\gamma$ -微管蛋白基因序列外(assession No. X71353 and Y09553),尚未见文献报道。

1996年Geissler等人<sup>[17]</sup>在酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中发现,一种被称为类 $\gamma$ -微管蛋白的Tub4p蛋白与纺锤体极体(SPB)中的一种成分Spc98p蛋白在微管附着处相互作用。这一Tub4p蛋白似乎属于微管蛋白家族,但与其它管蛋白同源性较低(25.8%—30.5%),曾被Burns<sup>[18]</sup>认为是管蛋白家族中的新成员(在*S. caenorhabditis*中被命名为 $\delta$ -微管蛋白,而在*S. cerevisiae*中被命名为 $\epsilon$ -微管蛋白)。不过它们究竟是否属于微管蛋白家族中的新成员,尚在争论中<sup>[19]</sup>。

尽管如此,这些新蛋白的发现及进一步研究无疑将对了解MTOC的结构和功能具有重大意义。而MTOC对于在细胞分裂及细胞骨架中微管的组织作用一直是一个难题。 $\gamma$ -微管蛋白及其相关蛋白的深入研究有望对这方面的研究有新的突破。

## 摘 要

$\gamma$ -微管蛋白是微管蛋白超家族(superfamily)中新发现的第三个成员。目前已在各类真核生物体中发现这种蛋白质的存在,并相继克隆了这个蛋白的基因。细胞免疫化学定位研究发现这种蛋白质存在于微管组织中心(MTO-

C)。 $\gamma$ -微管蛋白与微管的形成有关,并确定微管的极性。

关键词:细胞骨架 微管蛋白 微管组织中心(MTOC)

## 参 考 文 献

- [1] Oakley, C. E. *Nature*, 338: 662—664.
- [2] Oakley, B. R. Morris, N. R. 1981, *Cell* 2: 837—845.
- [3] Weil, C. F. Oakley, C. E. Oakley, B. R. 1986, *Mol Cell Biol*, 6: 2963—2968.
- [4] Little, M. Seehaus, T. 1988, *Com Biol Chem Physio*, 190B: 655—670.
- [5] Zheng, Z. X. Jung, M. K. Oakley, B. R. 1991, *Cell*, 65: 817—823.
- [6] Stearns, T. Evans, L. Kirschner, M. 1991, *Cell*, 65: 825—836.
- [7] Liang, A. Heckmann, K. 1993, *Gene*, 136: 319—322.
- [8] Fuchs, U. Moepps, B. Maucher, H. P. et al., 1993, *Plant Mol Biol*, 23: 595—603.
- [9] Oakley, B. R. Oakley, C. E. Yoon, Y. et al., 1990, *Cell*, 61: 1289—1301.
- [10] Oakley, B. R. 1992, *Trends Cell Biol*, 2: 1—5.
- [11] Liang, A. Heckmann, K. 1995, In: Asai et al. ed. *Proceeding of the 4th asian conference on ciliate biology*. Tokyo: Kyoyu Printing Co Ltd. 176—179.
- [12] Lui, B. Joshi, H. C. Wilson, T. J. et al., 1994, *Plant Cell*, 6: 303—314.
- [13] Horio, T. Uzawa, S. Jung, M. K. et al., 1991, *J Cell Sci*, 99: 693—700.
- [14] Oakley, B. R. In "Microtubules", 1994, 33—45. Eds: J. S. Hyams and C. W. Lloyd. Press: Wiley-Liss, Inc, New York.
- [15] Zheng, Y. Wong, M. L. et al., 1995, *Nature*, 378: 578—583.
- [16] Moritz, M. Braunfeld, M. et al., 1995, *Nature*, 378: 638—640.
- [17] Geissler, S. Gislene, P. et al., 1996, *the EMBO Journal*, 15: 3899—3991.
- [18] Burns, R. G. 1995, *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 31: 255—258.
- [19] Keeling, P. J. Logsdon, J. M. 1996 *trends in Cell Biology*, 6: 375—376,