

M 期启动调节的普遍机制

Paul Nurse

细胞周期内发生的事件是细胞正常繁殖所必需的。对于所有的细胞周期来说，有两个事件是主要的，S期和M期。前者是染色体复制时期，后者是复制了的染色体分离并进入两个子细胞的时期。本文讨论细胞周期中M期启动的调控。据现在所知，所有的真核细胞存在一个共同的调控机制，其中心是蛋白激酶 $P34^{cdc2}$ ，它在有丝分裂及减数分裂的M期都被活化。在活化时，该激酶的磷酸化状态需要发生改变，并要和周期素(cyclin)相互作用。周期素是一类在细胞周期过程中水平发生变化的蛋白质。 $P34^{cdc2}$ 被认为可以使一些关键的蛋白质磷酸化，从而引起包括染色体凝集、细胞骨架重排，核膜崩解和细胞形态改变在内的M期主要事件的发生。

一、酵母调节基因

裂殖酵母有丝分裂启动的调控至少涉及到四种基因在一个网络中的协同作用。(图1)该网络包含两种独立的途径，通过 $cdc2^+$ 基因产物 $P34^{cdc2}$ 起作用。 $P34^{cdc2}$ 抗体免疫沉淀表明 34 k 蛋白质具有蛋白激酶活性。 $cdc2^+$ 基因，正如它在芽殖酵母中的等价体 $CDC28$ 一样，早在细胞周期的S期启动时也是必需的，但这方面的工作超出了本综述的范围。调节网络的一种途径是抑制有丝分裂，包含 $nim1^+$ 和 $wee1^+$ 的基因产物，两者可能都是苏/丝氨酸蛋白激酶。而另一种途径是促进有丝分裂，包含 $cdc25^+$ 的基因产物。两种途径对 $P34^{cdc2}$ 的功能调节起平衡作用，从而提前或推迟有丝分裂的启动。

两种不同的突变被用于确定该调控网络是如何工作的。首先在芽殖酵母中描述过各种 cdc 突变株可以推迟有丝分裂的启动，导致细胞周期受阻断，或使细胞长到更大时才分裂；与之相反，各种 wee 突变株可以提前进入有丝分裂，使细胞在较小体积即分裂。调节网络中这四种基因发生突变或过量表达时可以产生 wee 表型。活化物 $cdc25^+$ 和 $nim1^+$ 的过量表达或抑制物 $wee1^+$ 的缺失，都能使细胞提前进入有丝分裂。 $cdc2^+$ 突变表现 wee 表型，其效果比较不容易引



图1 裂殖酵母的调节基因

$cdc2^+$ 、 $cdc25^+$ 、 $wee1^+$ 和 $nim1^+$ 在一个决定细胞周期内M期启动时间的基因调节网络中起作用。 $cdc13^+$ 对于M期启动是必需的，而且和 $cdc2^+$ 一道，为随后的有丝分裂期所必不可少。 $suc1^+$ 和 $dis2^+$ ($dis2^+$ 与 $bws1^+$ 等位)为M期结束所需。 $cdc2^+$ 、 $wee1^+$ 和 $nim1^+$ 的产物是蛋白激酶， $dis2^+$ 的产物是一种磷酸酶， $cdc13^+$ 的产物是一种周期素。

起注意，因为M期启动的提前不是由 $cdc2^+$ 过量表达，而是由它的一些显性错义突变引起的，它们产生的 $P34^{cdc2}$ 的调控特性发生了突变。总之，这四种基因产物中的任何一种都能影响有丝分裂的启动时间。

上述两种途径发挥作用在 $P34^{cdc2}$ 总的功能的上游，是可以由许多 $P34^{cdc2}$ 突变株对 $cdc25^+$ 、 $wee1^+$ 或 $nim1^+$ 基因产物活性的变化大都不敏感而得到证明。这两种途径是相互独立作用的，因为影响到两种不同途径上的基因(如 $wee1^+$ 和 $cdc2^+$)的突变，其效应都显示累积性的。例如，如果细胞在 $wee1^+$ 和 $cdc2^+$ 基因都发生 wee 突变，则有丝分裂将发展为致死性早熟。这些结果与图1所示在有丝分裂启动时调控 $P34^{cdc2}$ 活性的简要途径是一致的。图中也包括了 win 和 cdr 基因的作用，但它们与这个网络相互作用的方式还未完全确定。

与 $P34^{cdc2}$ 也有关联的另外两种基因产物是 $P56^{cdc13}$ (也称为 $P63^{cdc13}$) 和 $P19^{mql}$ 。 $cdc2$ 和 $cdc13$

突变株之间的等位基因特异性相互作用以及 $cdc2^+$ 的过量表达可以抑制部分功能突变株的 $cdc13-117$, 提示此两种基因产物可能密切地交互作用, 在免疫共沉淀反应实验中证实, $P34^{cdc2}$ 和 $P56^{cdc13}$ 形成了一种物理复合物。图1表明, $P56^{cdc13}$ 在有丝分裂前及有丝分裂期间都是不可缺少的。

$P13^{suc1}$ 也能和 $P34^{cdc2}$ 形成物理上的结合。 $suc1$ 的特异性突变株或 $suc1^+$ 过量表达可以抑制某些 $cdc2^{ts}$ 等位基因; 细胞提取物通过 $P13^{suc1}$ 抗体亲和层析柱时, 可以将 $P34^{cdc2}$ 和 $P13^{suc1}$ 蛋白同时除去。细胞内总 $P34^{cdc2}$ 的5%左右被认为是与 $P13^{suc1}$ 结合的, 利用结合到琼脂糖小球(sepharose beads)上的 $P13^{suc1}$ 可以富集细胞提取物中的 $P34^{cdc2}$ 。 $P13^{suc1}$ 在有丝分裂中的作用还不清楚, 但它的过量表达导致有丝分裂启动的推迟, 而 $Suc1^+$ 的缺失则使细胞阻断在有丝分裂期中。

二、M期诱导因子

在进行上述遗传学研究的同时, 利用无脊椎和脊椎动物的卵母细胞和卵进行了生物化学的研究。卵母细胞能够被诱导同步进入减数分裂的M期, 卵在早期胚胎发育中则要经过多次同步化有丝分裂的卵裂。利用这些系统所做的M期调控的工作, 是从描述非洲爪蟾中成熟促进因子(MPF)开始的。最初, MPF制备物或是细胞粗提物, 或是它的部分纯化成份。最近, 已从非洲爪蟾中得到高纯的MPF, 其活性与泳动率为32k和45k的两种蛋白质有关。 $P34^{cdc2}$ 抗体的免疫印迹和免疫沉淀实验表明, 较小的蛋白质是 $P34^{cdc2}$ 在爪蟾中的等价体。当 $P13^{suc1}$ 加入到爪蟾提取物中时, 可阻止进入M期; 将提取物通过包被着 $P13^{suc1}$ 小球的亲和柱, 可以耗竭 $P34^{cdc2}$ 的等价体, 同时也使MPF活性丧失, 这些实验也得到相似的结论。海星M期特异性激酶的高纯度制备物也具有MPF活性, 且含有海星的 $P34^{cdc2}$ 等价体。海星制备物的纯化采用了两种程序, 一种程序所得到的只含 $P34^{cdc2}$, 而另一种程序所得到的还含有一种47k的蛋白质。这些结果证明 $P34^{cdc2}$ 是非洲爪蟾和海星两者MPF的组成成份。

MPF中另一种45—47k的蛋白成份是周期素。它们首先在海胆卵中被描述, 是一类在细胞周期内合成, 而在M期结束时降解的蛋白质。它们在各种无脊椎和脊椎动物卵中作为一种主要的母体mRNA(maternal mRNA)的翻译产物而存在, 其中心区域大约200个氨

基酸残基的序列具有30%左右的同一性。由于中心区域稍有差异, 周期素分为两类: 周期素A和B。但是, 这种差异在功能上的意义尚不清楚。

周期素参与M期调节的首次提出, 是将青蛤周期素A的mRNA注射到非洲爪蟾卵母细胞中, 诱导它们进入减数分裂的M期。用非洲爪蟾提取物进行的实验则更加证实了这一点, 爪蟾提取物在体外能直接诱导细胞周期的主要事件, 核在这些提取物中能连续经历S期和M期。在这个系统中, 如果用寡聚核苷酸 $RNase$ 特异地裂解周期素的mRNA, 则M期被阻断; 如果用 $RNase$ 除去所有的信息物, M期也被阻断; 如果随后加入 $RNase$ 抑制剂和周期素信息物, 则此种阻断被逆转。所以, 在提取物的蛋白质合成中, 只有周期素的合成是M期必须的, 说明周期素起着重要的调节作用。青蛤提取物的共沉淀实验表明, $P34^{cdc2}$ 和周期素可以形成物理上的结合。将海星MPF纯化并对其47k成份测序, 发现它就是一种周期素, 这就直接证明了周期素是MPF的一种组份。在裂殖酵母中, 也证明了 $P56^{cdc13}$ 是一种周期素, 从而说明它具有普遍意义。 $cdc13^+$ 基因序列表明它编码一种周期素B的蛋白, 它和其他的周期素一样, 在有丝分裂结束时被降解。然而, 酵母 $P56^{cdc13}$ 与其他生物体的周期素在功能上是否可以相互替换, 还有待阐明。

$P34^{cdc2}$ 和周期素对哺乳动物细胞的M期调节也是很重要的。用裂殖酵母 $cdc2^{ts}$ 突变株和人细胞的表达型cDNA文库进行互补实验, 已将人的 $cdc2^+$ 同源基因克隆出来。筛选得到的CDC2基因与酵母 $cdc2^+$ 基因具有相似的生物功能, 而且可以完全代替后者, 说明二者的功能具有相当的一致性。人CDC2基因编码一个34K蛋白, 其顺序和酵母相应基因有63%是相同的。因此无论是结构还是功能, 这个基因从酵母到人相当保守。另外, 酵母的和哺乳动物的联系还在于, 裂殖酵母的 $P34^{cdc2}$ 抗体可以特异识别人细胞中的34K蛋白激酶; 将抗 $P34^{cdc2}$ 抗体注入大鼠细胞, 可以阻止它的有丝分裂。人的一种周期素同源基因也被克隆出来, 它编码的蛋白质在有丝分裂期结束时被降解, 而且能与 $P34^{cdc2}$ 免疫共沉淀。由此可知, $P34^{cdc2}$ 和周期素对所有真核细胞的M期诱导都可能起重要作用。

P34^{cdc2} 蛋白激酶的活化

M期诱导的分子机制涉及到 $P34^{cdc2}$ 蛋白激酶的活化。活化的 $P34^{cdc2}$ 蛋白激酶直接作用于苏氨酸和

丝氨酸残基,其底物模式为S/TP(右侧为碱性残基),这一模式在它的体外最适底物组蛋白H₁中最能体现出来。增殖中的酵母和哺乳动物细胞,激酶活性很高,而脱离细胞周期的细胞激酶活性大大降低。在粘菌、海星、非洲爪蟾哺乳动物细胞和裂殖酵母中,其活性在M期最高,而在间期降低到水平。

海星、非洲爪蟾、哺乳动物细胞和裂殖酵母中,该激酶在M期的活化与P34^{cdc2}的去磷酸化有关,即磷酸化的苏氨酸和酪氨酸残基都要去磷酸化。当反应条件有利于磷酸酶活性时,可以加快海星提取物的激酶活化过程;当在非洲爪蟾提取物中加入P13^{suc1}时,激酶活化被抑制,因为P13^{suc1}可阻止磷酸化的酪氨酸的去磷酸化。在裂殖酵母中,磷酸化酪氨酸位于P34^{cdc2}的ATP结合位点,酪氨酸残基突变为苯丙氨酸时,由于磷酸化不能进行,因而激活了P34^{cdc2}的功能,从而使细胞提前进入有丝分裂期。

上述结果为我们提供了一个简单的模型。在间期,当酪氨酸残基被磷酸化时,由于ATP结合或使用被阻断,P34^{cdc2}激酶活性就被抑制;在G₂/M交界处,这个磷酸基因被除去,P34^{cdc2}激酶活性就出现,于是细胞进入M期。对迄今所预期的所有类cdc2⁺蛋白基因的DNA顺序进行分析,发现在它们的ATP结合部位都有一个酪氨酸,因此,这一模型可能适用于所有的真核细胞。曾有报道提示,哺乳动物P34^{cdc2}的酪氨酸残基在体内可被P60^{src}磷酸化,但其生理学关联尚不清楚。wee1⁺也不可能使这个酪氨酸磷酸化,因为据认为它编码的是一个类丝氨酸蛋白激酶。

裂殖酵母P34^{cdc2}的活化需要活化物cdc25⁺。培养在非允许温度下的cdc25⁺突变株,P34^{cdc2}处于磷酸化状态,其激酶活性低。转到允许温度后,几分钟之内P34^{cdc2}即去磷酸化,出现了激酶活性。cdc25⁺基因编码一个80K的磷蛋白,其顺序和任何生化功能已知的蛋白质都没有相似性,因此它作用的分子基础还不清楚。尚若cdc25⁺能使P34^{cdc2}去磷酸化,cdc25⁺可能抑制一种P34^{cdc2}的激酶,或者激活一种作用于P34^{cdc2}的磷酸酶。细胞通过G₂时期,P80^{cdc25}的水平升高,恰好在有丝分裂启动之前达到峰值;P80^{cdc25}水平升高,可以使细胞提前进入有丝分裂,这一观察结果提示,P80^{cdc25}在细胞内积累到一个临界水平,对于P34^{cdc2}激酶的活化和有丝分裂的启动在细胞周期时间的决定起着关键作用。

四、周期素在活化过程中的作用

P34^{cdc2}激酶的活化需要周期素。裂殖酵母cdc13⁺

缺失,可以阻止有丝分裂时激酶活化,破坏非洲爪蟾提取物中的周期素mRNA,可以阻止MPF活性出现。周期素活化后在M期中继续起作用。裂殖酵母的部分功能突变株cdc13-117中,P34^{cdc2}激酶虽被活化,却只有部分的有丝分裂事件发生,即染色体变成凝集状态,而间期微管骨架并不重新组装成为有丝分裂的纺锤体。

非洲爪蟾周期素基因的部分缺失产生一种突变蛋白质,在卵母细胞提取物中,它使之能进入M期却不能完全分裂。如前所述,P34^{cdc2}和周期素可以形成物理性的结合。这些数据表明,体内MPF中有活性的激酶是这两种蛋白质的复合物,对M期的启动和继续都是必需的。体外高纯度的P34^{cdc2}不和周期素结合也有激酶活性,这可能是由于在纯化过程中,周期素被降解或分离,而所得到的物质并不能完全反映体内P34^{cdc2}的活性。对周期素所提出的其他作用是,也可以修饰P34^{cdc2}激酶的特异性,以及促进P34^{cdc2}转移到核内。

五、M期启动和结束的机制

一旦P34^{cdc2}激酶被活化,它就要引起各种有丝分裂事件发生,包括染色体凝集,细胞骨架重排,核膜崩解和细胞形状改变等,但不是一切真核细胞都要发生所转事件。要了解这些事件的发生机制,就必须鉴定P34^{cdc2}激酶的体内底物。在体外,P34^{cdc2}能使多种蛋白质磷酸化,包括H₁组蛋白、P40、P60^{src}、RNA聚合酶II、T抗原、延伸因子,周期素和核层蛋白、以及含有和P34^{cdc2}底物模式S/TP(右侧为碱性残基)相似序列的多种蛋白质。这些蛋白质在体内未必全是P34^{cdc2}的底物,因为P34^{cdc2}实质上是一种蛋白激酶的催化中心蛋白,它在体外的行为可能是不加选择的,而且,有些其他基因的大小和顺序都与cdc2⁺很相似,因此P34^{cdc2}制备物可能含有其他与之密切相关的蛋白激酶。尽管存在上述困难,还是能够对这些可能的底物在M期启动机制中的作用作些论述。

有人提出,P60^{src}的有丝分裂特异性位点的磷酸化可能影响细胞骨架,引起有丝分裂期内细胞形态改变,而H₁组蛋白的磷酸化则对染色体凝集十分重要。值得注意的是,上述多种可能的底物是染色质结合蛋白,该底物模式可能是一个DNA结合蛋白。情况很可能是,要使染色体凝集,就必须让这些蛋白质从染色质上分离下来,这种分离是由它们被磷酸化引起的。已报道核层蛋白可以被纯化的海星P34^{cdc2}磷酸化,

考虑到核层蛋白磷酸化可以使核层解聚，并在M期引起核膜崩解，因而引起人们很大兴趣。

研究 $P 34^{cdc2}$ 在细胞内的定位，也有助于了解它在M期启动中的作用。一项哺乳动物细胞的免疫荧光与细胞组分的研究表明， $P 34^{cdc2}$ 同时存在于细胞核和细胞质中。其他一些免疫荧光研究则显示， $P 34^{cdc2}$ 或者只存在于核中，或者主要存在于细胞质中。和底物问题更相关的是，观察到一些 $P 34^{cdc2}$ 和中心体相结合，其着色在 G_2 期和M期启动时增强，可能由 $P 34^{cdc2}$ 激酶催化的中心体蛋白的磷酸化对有丝分裂期微管细胞骨架的重组起一定的作用。

细胞维持在M期可能是由于 $P 34^{cdc2}$ 激酶的高活性。M期内蛋白磷酸化普遍加强，可能是由 $P 34^{cdc2}$ 激酶直接引起的，或者由 $P 34^{cdc2}$ 活化其他的蛋白激酶间接引起。重新进入间期会需要这些蛋白质去磷酸化，与 $P 34^{cdc2}$ 激酶失活和磷酸酶的作用有关。在裂殖酵母和无冠构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 中，编码有丝分裂晚期所需的蛋白磷酸酶的基因业经确定，它们是酵母的 $dis 2^+ / bws 1^+$ 和曲霉的 $bimG$ 基因，这些基因均可通过从 $P 34^{cdc2}$ 的底物上去除磷酸基因而

发挥其功能。 $P 34^{cdc2}$ 激酶在M期结束时的失活过程还不清楚，大体上讲可能是由ATP结合位点重新磷酸化所造成的。但是，哺乳动物细胞激酶的失活远在 $P 34^{cdc2}$ 酪氨酸残基重新磷酸化之前就已发生。所以，发生于细胞有丝分裂结束时的周期素降解，也许是使 $P 34^{cdc2}$ 激酶失活的更恰当的首选原因，因为破坏了 $P 34^{cdc2}$ 和周期素的复合物可更为有效地使之失活。另一种可能性要涉及到与 $P 34^{cdc2}$ 形成物理上的结合的 $P 13^{suc1}$ ，后者在裂殖酵母中缺失时，细胞脱离M期受到阻断，而 $P 34^{cdc2}$ 激酶也不失活。然而，这种设想易于引起争议，因为 $P 13^{suc1}$ 已被认为具有多种不同的作用，其中包括M期启动时对激酶活化的正、负效应。最后，由哺乳动物细胞的免疫荧光研究发现， $P 34^{cdc2}$ 在有丝分裂结束时和膜泡结合，所以细胞区域间的漂移也可能在激酶失活中起某种作用。

六、普遍的调控机制

所有上述的研究支持这样的观点，即调节M期启动的调控机理在所有真核细胞中都是相同的，其很可能共同特征简列于后及图2。

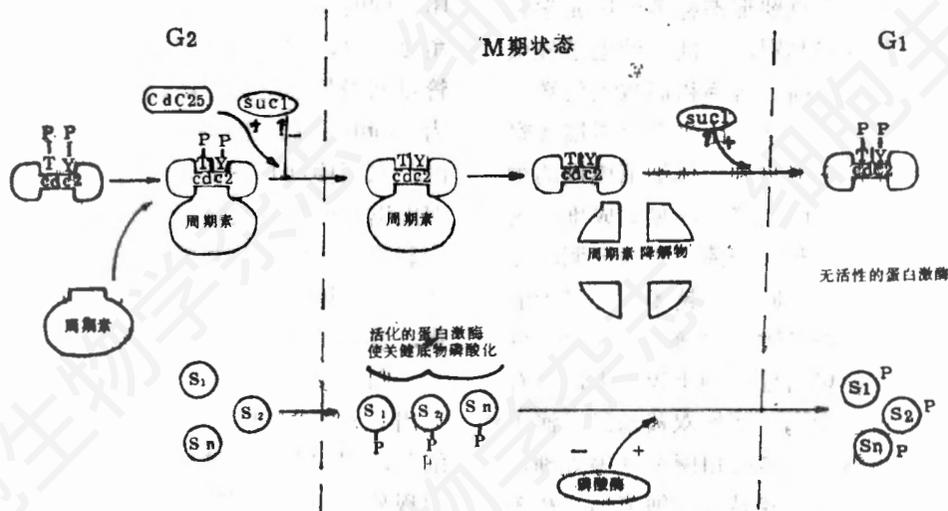


图 2 M期调控的普遍机制

其中某些事件的准确次序和发生时间目前还不清楚(如 $P 34^{cdc2}$ 磷酸化改变和周期素, $cdc 25^+$ 和 $suc1^+$ 功能之间的关系)。关键底物包括 H_1 组蛋白、 $P 60^{src}$ 、核层蛋白和其他需从染色质上置换下来以使染色体凝集的蛋白(详见文中)。

1. 该机制的核心是 $P 34^{cdc2}$ 蛋白激酶，其活化诱导M期启动。据认为，这种激酶使一些关键蛋白质磷酸化，从而导致M期主要事件的发生。 $P 34^{cdc2}$ 的高

活性使细胞维持在M期状态，而脱离M期则需要激酶的失活和磷酸酶的作用。

2. $P 34^{cdc2}$ 和该机制中第二个普遍存在的成份

—周期素形成复合物。周期素为 P 34^{cdc2} 激酶活化所必需, 在细胞脱离 M 期时则被降解, 可能因此使 P 34^{cdc2} 激酶失活。周期素有多种不同的形式, 但其功能上的意义尚不清楚。

3. P 34^{cdc2} 激酶的活化与该蛋白的磷酸酪氨酸和磷酸苏氨酸残基的去磷酸化有关。磷酸酪氨酸位于 ATP 结合位点, 表明激活机制部分涉及这一位点的改变, 以使激酶利用 ATP。

4. 裂殖酵母细胞周期中 M 期的启动时间决定于一些基因构成的调节网络, 包括编码其他两种预期的蛋白质激酶的基因和 cdc 25⁺ 基因。P 80^{cdc25} 对 P 34^{cdc2} 去磷酸化和激酶活化是必需的。在芽殖酵母

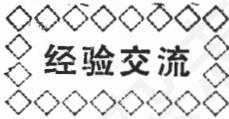
和果蝇中都已发现和 cdc 25⁺ 基因享有部分相似序列的基因(分别是 MIH 和 String), 并在有丝分裂调控中起作用, 表明 cdc 25⁺ 也可能具有普遍意义。

5. P 13^{suc1} 和 P 34^{cdc2} 有密切的相互作用, 可能对抑制激酶活化或促进激酶失活有一定作用。P 13^{suc1} 在包括酵母和人细胞在内的一系列真核细胞内均存在。

[附加证据]: 据最近报道, 在藻类和更高等的植物细胞中也存在 P 34^{cdc2} 的同源物。

杨新林摘译自 Nature, 344:503—507, 1990。

(王永潮, 姚曾序审校)



经验交流

一种简易保持细菌鞭毛的电镜制样法

徐敏源

(浙江省医科院电镜室)

随着医学生物学的发展, 新的菌种不断被发现。细菌的鞭毛长短、数目和生长位置已成为鉴别新菌种的一个重要形态标准, 用光学显微镜(光镜)很难确切判别, 只能借助电子显微镜(电镜)。电镜虽有高分辨率和高放大倍数, 但它必须制样后才能观察, 比光学显微镜观察复杂, 往往在光镜下能见到活体细菌模糊的鞭毛, 而通过制样处理后电镜下能见到成堆的鞭毛, 很难找到鞭毛完整的细菌。实践证明, 样品处理过程愈多, 鞭毛断脱也越多。一般为浓缩和纯化细菌, 常规电镜术要通过低速离心处理而造成上述不理想结果。80年代以来, 也有些改进方法的报道^[1,2], 例如双蒸水悬浮滴加法, 该法有时也需通过离心和圈套法等处理, 又未进行固定。因此, 容易出现细菌形变和鞭毛断脱。

作者通过多年实践, 探索了一种简便既能保持细菌鞭毛完整又无形变的制样方法, 概括如下:(1) 直接用 0.01 mol/L 磷酸缓冲液配制的 2.5% 戊二醛固定液 (pH 7.2) 倒入长有细菌的琼脂培养基皿或试管内, 倒入量一般培养基为 5 ml, 试管为 1—2 ml。然后, 轻轻摇晃几下

培养皿或试管, 使琼脂表面培养的菌落部分脱落, 将有足够的细菌和芽孢悬浮到戊二醛液中, 同时还进行固定。(2) 把培养皿或试管小角度倾斜, 室温下静置 15—20 分钟, 用无菌滴管吸取微量中层悬浮液, 滴入无菌蜡盘, 成直径为 5 mm 液珠。用镊子夹住带膜铜网浸入液珠内, 来回移动几下使悬液均匀浸湿铜网。(3) 取出铜网后, 从其边缘用滤纸片吸去剩余液, 接着用 1—2% 磷钨酸 (pH 6.6—7.0) 负染色 3—5 分钟。干燥后, 用 H-500 透射电镜观察, 多次试验表明, 结果满意(图版图 1, 2)。

归纳该方法的主要优点:(1) 简便有效, 只用 2.5% 戊二醛液直接从琼脂中脱落和固定细菌, 使细菌在悬液中保持自然状态, 鞭毛断脱现象少, 观察效果好。(2) 经济省时, 不需任何辅助的试剂和仪器, 从制样到电镜观察, 约 45 分钟便可获得满意结果。

参 考 文 献

- [1] 洪涛主编, 1980, 生物医学超微结构与电子显微镜术, 科学出版社, P 178—182。
- [2] 林钧安主编, 1988, 实用电子显微镜术, 辽宁科学技术出版社, P 68—69。