

细胞粘菌的发育调控

胡明

(江苏教育学院生物系)

细胞粘菌以细菌为食,在食物枯竭时大量独立存在的阿米巴向聚集中心聚集,相互粘连形成多细胞生物体。其生活史分为生长期和发育期。聚集标志着发育开始,大量基因打开,经过由前孢子和前柄细胞组成的蛭体阶段,形成了有孢子和柄细胞分化的子实体。发育全过程在24小时内完成。其分化过程易于观察,两类细胞分布及比例恒定,遗传操作方便,常用作研究分化发育、信号跨膜传导的材料。

一、第二信使系统和第二信使级联

饥饿诱发的过程是细胞间通讯的结果^[7]。以盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)为例,cAMP作为趋化剂、细胞间信号分子和分化诱导物在发育中起了重要作用。饥饿诱发的过程可用cAMP人工地诱导。

发育基因受第二信使系统的调控,第二信使系统直接或通过效应物激活各种蛋白激酶,调控基因的表达。细胞粘菌第二信使系统可与哺乳类相比,两者许多成分同源。它可能是脊椎动物信使系统的祖先,或两者共祖先^[6]。第二信使级联(second messenger cascades)包括趋化运动等快速反应和基因调控等慢速反应^[5,10]。第二信使系统包括内源性cAMP,cGMP,分化诱导因子, Ca^{2+} , Ca^{2+} -钙调蛋白, Ca^{2+} -磷脂,蛭体调节因子,孢子诱导因子等。G蛋白在信号传导途径中起关键作用^[12]。

当外源性cAMP与细胞表面cAMP受体结合后,通过G蛋白的介导激活腺苷酸环化酶、鸟苷酸环化酶,第二信使迅速积累,几秒钟后内源性cAMP、cGMP、环核苷酸磷酸二

酯酶便合成,肌醇三磷酸酯升高, Ca^{2+} 流入,细胞骨架肌动蛋白升高,肌球蛋白磷酸化,磷脂甲基化^[6],肌动蛋白促使肌球蛋白自我装配成双极粗丝^[26]。磷脂酰肌醇途径参与鸟苷酸环化酶的激活。肌醇三磷酸酯可调控基因14-E6表达,促进10-C3、2H-6的表达^[25],并调节肌动蛋白结合蛋白、肌球蛋白I等蛋白^[21]。内源性cAMP在聚集前后均起基因调控作用^[5],对磷酸二酯酶的调控是靠cAMP含量高低而实现的^[20]。

分化诱导因子是一种亲脂性化合物,它降低cAMP与受体的亲和性,抑制cAMP波的扩布,但不抑制诱导的cGMP cAMP应答^[13]。

二、发育调控蛋白

1. cAMP受体 cAMP受体与G蛋白等组成了cAMP震荡器,产生间歇cAMP信号(图)。受体-G蛋白-效应物之间的偶联与肌球蛋白IC-端SH3区的作用有关,该区含12%Ala,21%Pro^[21]。受体有非磷酸化和磷酸化两种互变形式,磷酸化所需要的激酶与Tyr无关。盘基网柄菌cAMP受体动力学数据见表1^[9,10]。cAMP与受体结合使G蛋白上结合的鸟苷酸与ATP互换。鸟苷酸与受体-G蛋白复合物的结合改变了不同性质受体间的动态平衡。鸟苷酸能激活腺苷酸环化酶,激活时质膜蛋白、细胞骨架发生位移^[13]。受体对环化酶诱导有适应现象,对磷酸二酯酶诱导则无适应现象,可能受体连接两个不同的信号系统^[9]。

cAMP受体具有G蛋白连接受体所共有的特征,即有七个疏水性跨膜区。位于胞内富含

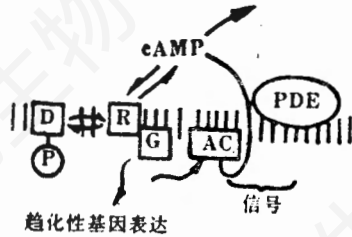


图 cAMP 信号系统(仿 Klein 等)D、R: cAMP 受体两种形式; G: G 蛋白; AC: 腺苷酸环化酶; PDE: 磷酸二酯酶。

表 1 cAMP 受体动力学数据

受体类型	表观 K_D (μM)	解离常数	每细胞位点数	鸟苷酸对分布量的影响
H ^c	60	4×10^{-1}	77,000	减少
L ^c	450	10×10^{-1}		增加
S	6—13	4.3×10^{-2}	23,000	减少
sS	6—13	4.7×10^{-3}	1,100	减少

表 2 cAMP 对基因的效应

cAMP 形式	基 因			
	磷酸二酯酶	抑制物	csA cAMP 受体	M 4-1 K-5
恒量	诱导	抑制	抑制	诱导
脉冲	诱导	抑制	诱导	抑制

Ser 的尾是配位体诱导磷酸化反应的位点。七个跨膜区围成桶形,中间吊着配位体结合中心,受体的亲核残基与 cAMP 磷酸基形成共价键而被激活^[10]。

发育早期基因的表达及形态发生需要 cAMP 震荡,晚期基因表达则需要持续的胞外 cAMP 刺激。cAMP 对基因调控的类型有非适应性诱导和抑制以及适应性诱导和抑制 4 种(表 2)。适应的原因是受体持续磷酸化。去除胞外 cAMP 适应即解除。不饱和脂肪酸、 Ca^{2+} 、 NH_4^+ 等影响受体的数目及其与 cAMP 间的亲和性。

2. 环核苷酸 磷酸二酯酶 cAMP 磷酸二酯酶的含量影响聚集,酶过少则不能聚集。磷酸二酯酶基因编码一个膜结合酶和一个胞外酶。酶基因在生长期、发育期都转录一种 1.8

kb mRNA,在发育期还转录一种 2.2 kb mRNA。后者的表达受内源性 cAMP 含量高低的调控。cAMP 含量高时,磷酸二酯酶产量减少,孢子的分化增多;反之,酶产量增多,柄细胞分化增多。调控的机理是 cAMP 依赖性磷酸化作用。第二信使系统某成分能识别酶基因^[20]。酶的作用是防止胞外 cAMP 积累并参与细胞分化的调控,其细节尚不清。细胞质磷酸二酯酶则对 cGMP 有特异性^[5]。

3. 鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(G 蛋白) G 蛋白是 cAMP 信号途径的主要传导者。cAMP 受体-G 蛋白-效应物偶联是调控发育基因表达的重要方式,它可将短暂刺激整合到长期变化中去。网柄菌 G 蛋白与哺乳类 G 蛋白很类似^[10,17]。cGMP 受体和 G 蛋白调节着磷脂酰肌醇循环,后者促使鸟苷酸环化酶激活和肌动蛋白聚合。实际上鸟苷酸环化酶的直接激活者是 Ca^{2+} ,肌醇磷酸酯促进 Ca^{2+} 释放^[18]。

G 蛋白在催化过程中也要变构。兴奋的 cAMP 受体使 GDP 脱离无活性的 G 蛋白三聚体,然后 α 亚基结合 GTP,同时三聚体解离成活性 α 亚基和 $\beta\gamma$ 二聚体。活性 α 亚基与效应物起反应, GTP 水解,三亚基重新聚合。 α 亚基的激活伴有迅速、短暂、可逆的磷酸化反应^[22]。 α 亚基 cDNA 的顺序分析发现有两种不同的 α 亚基 G_{α_1} 和 G_{α_2} ,两者有 45% 氨基酸相同,但表达方式不同,可能控制着不同的信号系统。两者都能与多种发育期表达的 mRNA 互补^[17]。

除 ras 外发现还有一种 G 蛋白也能激活腺苷酸环化酶,可能存在一族 G 蛋白。第二种 G 蛋白可能介导非适应性反应。后证实确有两种 ras 基因,两者编码的蛋白很相似,但其中一个仅在生长期和发育早期表达,另一个仅在多细胞阶段传导信号^[5,17]。

4. 酪蛋白激酶和糖元磷酸化酶 紫多节菌(*Polysphondylium violaceum*)生长期出现酪蛋白激酶 A 和 B,它们都受发育调控,随发育渐减,可能起控制细胞周期的作用。A 酶活性

需要 Mg^{2+} , 不受 cAMP 影响, 肝素抑制其活性, 精胺增加其活性。它能催化酪蛋白、卵黄高磷蛋白及与其一起提取出的内源性蛋白磷酸化。B 酶活性也需要 Mg^{2+} 。B 酶的人工抑制物能抑制 cAMP 依赖性蛋白激酶。低浓度肝素、精胺均使其激活, 高浓度精胺则抑制之。其底物似只有酪蛋白一种^[12]。

网柄菌发育较晚期细胞内糖元降解, 产生葡萄糖单位合成柄和孢子壁, 这是发育预定的环节之一。糖元磷酸化酶有 a、b 两种。b 酶无活性, 为 5'-AMP 依赖型, 出现于发育早期。在 Mn^{2+} 存在下 b 酶磷酸化变为活性的非 5'-AMP 依赖性 a 酶, 故其出现时间稍晚。有关的蛋白激酶理化特征、出现时间及活性高峰特征均与酪蛋白激酶相似, 故可能是同一激酶^[11]。

5. 其他发育调控蛋白

(1) 盘基蛋白是类似于纤维结合素的外源性凝集素, 它参与细胞在基质上的固着, 以进一步发育。

(2) 粘连蛋白: 盘基网柄菌有 3 种相继表达的粘连糖蛋白。第一种, gp 24 由两个串联重复而转录方向相反的基因编码, 它在发育开始几小时内表达, 第 12 小时达峰值, 并持续到形态建成开始。第二种, gp 80 为第二阶段的粘连蛋白, 由单拷贝基因 csA 编码, 受 cAMP 诱导。在其含量渐减时, 第三种粘连蛋白逐渐积累。后两种糖蛋白相继增强 gp 24 的粘连作用。糖蛋白抗原是在聚集期以可溶状态从细胞释放的^[10, 23]。

发育调控蛋白还有糖苷酶(包括 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶, α -甘露糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶)、肌动蛋白关联蛋白、 α -辅肌动蛋白、分离蛋白(severin)、肌球蛋白等。它们均受饥饿诱导, 在饥饿后很快得以表达。

三、发育调控基因

1. 基因结构特征与调控 受饥饿诱导的基因一般内含子少而短, 基因间 DNA 平均含

85%AT, 这种顺序能抑制核小体包装, 增加尖锐折迭和 Z-构象, 它是否与发育调控有关引人注目。许多基因有不同程度的重复, 盘基蛋白基因含 4 个紧密串联的拷贝, 肌动蛋白基因则含 20 个。发育早期表达的许多基因在转录起始点附近都有相似的结构 TGGGGG/T, 称作 G 盒(表 3)。G 盒是转录水平调控所必需的, 是最大表达所必需的顺式活动信号(cis-acting signal)。G 盒与普通的转录因子结合而起增强子的作用, Spl 等哺乳类转录因子能识别 G 盒顺序。编码粘连蛋白 gp 24 的两个串联重复基因的拼接处附近也有类似的一对反转重复顺序 GTGGGNNNNGGGTG(N=A, T, G, C), 其后各有一个 TATA 盒, 转录起始点在 TATA 盒之后 30 bp 处。实验证明基因 CP 2 G 盒区段的点突变或小段缺失都阻止基因的表达^[5, 23]。

表 3 部分基因 5'端序列

基 因	与帽距离	顺 序
磷酸二酯酶组成型启动子	- 180	TGTGGG
Cys 蛋白酶 I	- 210	AGGGGT
EB 4	- 150	TGGGTT
D 11	- 170	TGGGGG

2. 磷酸二酯酶基因 其结构基因位于第三连锁群, 含一启动子, 转录 1.8 kb mRNA。在 5' 端还有几个外显子, 发育期被拼接产生 2.2 kb mRNA, 它们可能有另一启动子。在这些外显子的 5' 端又有一额外的外显子。两种 mRNA 表达时间不同。细胞分化时仅前柄细胞含酶 mRNA。酶过量会影响分化和子实体形成^[6]。该基因是最复杂的大范围拼接的发育调控基因^[5]。

3. ras 基因 ras 基因是哺乳类的单拷贝原致癌基因, 在网柄菌普遍存在, 且与哺乳类同源。其产物就是 G 蛋白的 α 亚基。在人类 ras 基因族中原致癌基因和致癌基因的区别是第 12 或 61 位碱基或二者附近发生了点突变, 很可能与 ras 蛋白结构处于“开”或“关”不同状

态有关,当结构呈“开”式时引起细胞过渡繁殖^[27]。网柄菌 ras 蛋白的 Gly 12 如被 Thr 替代,蛋白质活性改变,失去对鸟苷酸环化酶的调节作用,影响聚集和发育^[5]。

4. 嘧啶途径的基因 该途径所需的基因相互拼接,头三步骤的酶基因拼接成具有复合区段的一个大基因,再通过一段 1000 bp 的顺序与二氢乳清酸脱氢酶基因相连。最后两步骤的酶基因也拼接成一个大基因^[6]。不知这是否有利于表达的协调?

研究较多的还有 rde、K 5、F 9 等基因。

四、影响发育的因素

1. 纯净培养对细胞周期的影响 纯净培养的盘基网柄菌无 G₁ 期, G₂ 期延长致使细胞周期延长。线粒体在整个细胞周期均复制,其 DNA 占总 DNA 的一半。在细胞周期早期同步化得 55% 前孢子细胞,晚期同步化则得 90%^[18]。

2. 温度对形态建成及细胞分化的影响 5℃ 下营养细胞不能发育, 蛭体细胞则可发育, 形成 90% 孢子和 5% 前孢子, 孢子比例比常温下大为增加。严格温度敏感型突变体出现运动缺陷, 同时, 或产生过量盘基蛋白或发育期缩短。有一种突变型在限定温度下不聚集, 将已聚集细胞移至该温度下又恢复成游离单细胞^[6,14]。

3. 氨对趋光性的影响 用单侧光照射细胞团的一端, 局部细胞会分泌氨, 同时这一部分细胞运动加速, 说明氨与蛭体趋光性有关。但高浓度氨又使蛭体远移^[8]。

摘 要

细胞粘菌 (cellular slime molds) 是研究细胞通讯分化和发育的常用材料。近年从分子生物学、遗传学、生物化学角度对其跨膜信号传导, 第二信使调控分化发育进行了深入研究, 对高等生物的研究有参考价值。本文综述了近年成果。

参 考 文 献

- [1] Robbins, S. M. et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86: 938—943.
- [2] Anschutz, A. et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86: 3665—3668.
- [3] Houle, J. et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86: 3679—3683.
- [4] Mann, S. K. O. et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86: 1924—1928.
- [5] Kessin, R. H., 1988, *Microb. Rev.*, 52: 29—49.
- [6] Faure, M. et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85: 8076—8080.
- [7] Ziska, S. E. & E. J. Henderson, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85: 817—821.
- [8] Bonner, I. T. et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85: 3885—3887.
- [9] Meier, K. & C. Klein, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85: 2181—2185.
- [10] Klein, P. S. et al., 1988, *Science*, 241: 1467—1472.
- [11] Naranan, V. et al., 1988, *Molec. Cellu. Bioc.*, 83: 89—104.
- [12] Flotow, H. & J. F. Wheldrake, 1988, *Molec. Cellu. Bioc.*, 84: 105—116.
- [13] Pin, M. et al., 1987, *Microb. Rev.*, 51: 396—418.
- [14] Maeda, M. et al., 1984, *J. Cell Sci.*, 69: 159—165.
- [15] Weijer, C. J. et al., 1984, *J. Cell Sci.*, 70: 111—131.
- [16] Weijer, C. J. et al., 1984, *J. Cell Sci.*, 70: 133—145.
- [17] Pupillo, M. et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86: 4892—4896.
- [18] McRobbie, S. J. & P. C. Newell, 1984, *J. Cell Sci.*, 68: 139—151.
- [19] Sadeghi, H. et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85: 5512—5515.
- [20] Riley, B. B. & S. L. Barclay, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87: 4746—4750.
- [21] Drubin, D. G. et al., 1990, *Nature*, 343: 288—290.
- [22] Gundersen, R. E. & P. N. Devreotes, 1990, *Science*, 248: 591—593.
- [23] Loomis, W. F., & D. L. Fuller, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87: 886—890.
- [24] Jung, G. et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86: 886—890.

(下转插页 4)