

# Ca<sup>2+</sup>/CaM 依赖的有丝分裂进程可能的分子机理

KP Lu and AR Means

## 有丝分裂的调控

近几年来, 对于细胞增殖调控的理解有了相当大的进展, 这要归因于一种主要的真核细胞周期调节因子的鉴定, 它是一种苏/丝氨酸蛋白激酶, 称之为 P 34<sup>cdc2</sup>。这种蛋白首先在啤酒酵母 (*S. cerevisiae*) 中确定为 CDC 28 基因的产物, 后来在粟酒裂殖酵母 (*S. pombe*) 中确定为 cdc 2 基因的产物。在其他种类中也发现有 P 34<sup>cdc2</sup> 蛋白激酶, 表明在功能上的高度保守。促成成熟因子(MPF)是一种多蛋白的复合物, 其中包含 P 34<sup>cdc2</sup> 和周期素 B (图 1)。P 34<sup>cdc2</sup> 蛋白激酶是 MPF 的催化亚基, 被认为调控着所有真核细胞的有丝分裂和减数分裂。P 34<sup>cdc2</sup> 蛋白激酶的活性是在转录后水平上, 由其酪氨酸和苏氨酸残基的磷酸化与去磷酸化, 以及由它和各种周期素蛋白质相互作用所调节。在整个细胞周期中有丝分裂周期素的浓度发生变化, 当细胞进入增殖周期时升高, 在晚 G<sub>2</sub> 期达到与 P 34<sup>cdc2</sup> 结合的临界浓度, 而在有丝分裂中期时则急剧地降解。P 34<sup>cdc2</sup> 与周期素结合后, 即成为酪氨酸磷酸化的底物 (在裂殖酵母是 Tyr 15)。研究表明两种细胞周期调节的蛋白激酶, Wee 1 和 mik 1, 参与了 P 34<sup>cdc2</sup> 的酪氨酸磷酸化, 从而产生无活性的 P 34<sup>cdc2</sup>。在 G<sub>2</sub>/M 转变期间, 粟酒裂殖酵母 cdc 25 基因 (其他系统中存在同源基因) 编码的磷酸酪氨酸磷酸酶, 通过与 B 型周期素结合和/或蛋白质磷酸化而被激活。活化的 cdc 25 蛋白特异地去除 P 34<sup>cdc2</sup> 的酪氨酸残基上的磷酸基团, 从而使 P 34<sup>cdc2</sup> 蛋白激酶活化。脊椎动物中 P 34<sup>cdc2</sup> 的另一种重要的抑制性修饰是第 14 位苏氨酸磷酸化。此苏氨酸在 G<sub>2</sub> 期磷酸化, 而在 M 期则去磷酸化。由于 Wee 1 激酶和 cdc 25 磷酸酶在体外分别使丝/苏氨酸和酪氨酸残基磷酸化和去磷酸化, 似乎这些酶也可能负责调节 P 34<sup>cdc2</sup> 的 Thr 14 的磷酸化状态。

最近证实, cdc 25 在构巢曲霉 (*A. nidulans*) 中的同源物是 nimT cdc 25 基因的产物。这两种蛋白在氨基酸序列水平上具有 50% 的一致性。温度敏感株

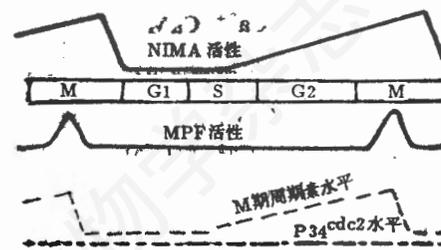


图 1 MPF 和 NIMA 活性的细胞周期依赖性调节

nimT 23 存在一个突变的 nimT cdc 25, 并在限制性温度下阻断在 G<sub>2</sub> 期, 其 P 34<sup>cdc2</sup> 的酪氨酸处于磷酸化状态。阻断解除后, P 34<sup>cdc2</sup> 激酶的酪氨酸去磷酸化而被激活, 导致细胞进入有丝分裂。然而, 在构巢曲霉中, P 34<sup>cdc2</sup> 激酶的活化对于引发有丝分裂是必需的, 但不是足够的, 还需要 nimA 基因编码的 NIMA 蛋白激酶的激活。NIMA 激酶是一种细胞周期依赖性蛋白激酶, 能磷酸化  $\beta$ -酪蛋白, 但不能磷酸化 H 1 组蛋白, 它在 M 期活性比在 S 期高 20 倍 (图 1)。细胞染色体凝集的起点和纺锤体极体微管的核聚化, 通常都需要 NIMA 活化。nimA 的温度敏感突变在限制温度下导致细胞阻断在 G<sub>2</sub> 期。阻断期间, P 34<sup>cdc2</sup> 激酶的酪氨酸去磷酸化并完全活化, 表明 P 34<sup>cdc2</sup> 的活化并不需要 NIMA。当返回允许温度后, 阻断的细胞迅速且同步地进入有丝分裂, 证明 NIMA 激酶活性对于进入有丝分裂是必需的。这些结果揭示, P 34<sup>cdc2</sup> 和 NIMA 蛋白激酶两者的活化都为构巢曲霉有丝分裂的起动力所需。

有丝分裂的结束需要 MPF 的失活, 即需要有丝分裂周期素的降解。有丝分裂中期末周期素发生急剧降解。在体外, 加入有活性的 P 34<sup>cdc2</sup> 蛋白激酶, 可以诱发间期非洲爪蟾卵细胞的周期素降解, 说明 MPF 活化对终止中期可能起着负反馈作用。周期素的降解伴随周期素-泛素结合物 (Cyclin-ubiquitin conj-

ugates)的形成。此外,所有有丝分裂周期素均含一个“毁灭盒”(destruction box),它是周期素N末端的一段氨基酸序列。该区的点突变抑制了泛素结合,同时也阻止了突变的周期素蛋白水解和细胞退出有丝分裂。如此看来,周期素可能是由泛素依赖的蛋白水解系统破坏的,尽管所涉及的机制尚不清楚。

### p 34<sup>cdc2</sup> 和NIMA两者的活化需要 Ca<sup>2+</sup>/CaM

nim T 23 突变体脱离限制性温度后,如果细胞外 Ca<sup>2+</sup> 或细胞内钙调素(CaM)水平下降,细胞就不再进入有丝分裂。这提示, Ca<sup>2+</sup> 和 CaM 可能参与调节 P 34<sup>cdc2</sup> 和/或 NIMA 的活化。所以, Alc CaM/T 23 和 nim T 23 株的分生孢子在限制温度下阻断在 G<sub>2</sub> 期,当回到允许温度而有苯菌灵(benomyl)存在时细胞随即又进入有丝分裂。对照的 nimT 23 细胞或生长在诱导培养基的 AlcCaM/T 23 细胞,在限制温度下 P 34<sup>cdc2</sup> 的酪氨酸部位发生磷酸化; nimT 23 突变株转到允许温度后又出现去磷酸化。但是,当 AlcCaM/T 23 细胞中 CaM 水平下降时,在 nimT 23 从 G<sub>2</sub> 期释放后, P 34<sup>cdc2</sup> 酪氨酸化水平保持不变,表明降低 CaM 水平阻止了 P 34<sup>cdc2</sup> 酪氨酸去磷酸化。再则,不管是阻断在 G<sub>2</sub> 期还是释放后进入有丝分裂, nimT 23 细胞中 NIMA 活性均很高。如果 nimT 23 细胞得以从 G<sub>2</sub> 期阻断点通过有丝分裂,进入下一个细胞周期,则升高的 NIMA 活性水平显著降低。这是因为经过有丝分裂的进程能导致有丝分裂期 NIMA 激酶高水平活性的下降。相反,当 AlcCaM 株中 CaM 处于低水平时,在 nimT 23 阻断点 NIMA 就不再活化,而诱导 alcCaM 基因表达则可恢复 NIMA 的活性。这些结果证明,与 G<sub>2</sub>/M 期相关的 NIMA 激酶活性的升高是需要 CaM 的。因此,细胞内 CaM 水平对于有丝分裂期 P 34<sup>cdc2</sup> 和 NIMA 两种蛋白激酶的活化似乎都是很关键的。

由于 Ca<sup>2+</sup> 对于进入有丝分裂也是必需的,我们研究了 Ca<sup>2+</sup> 浓度对 P 34<sup>cdc2</sup> 酪氨酸去磷酸化和 NIMA 活性的影响。不论是在正常生长条件下还是在 2 μmol/L Ca<sup>2+</sup> 存在时, nimT 23 细胞在 42℃ 时均被阻断在 G<sub>2</sub> 期。不过在 2 μmol/L Ca<sup>2+</sup> 存在下,没有观察到在 nimT 23 阻断点 NIMA 活性的升高。外钙浓度增大到 1 mmol/L 时则引起 NIMA 正常活化。减低外钙浓度基本上能够阻碍 nimT cdc 25 基因产物 P 34<sup>cdc2</sup> 的酪氨酸去磷酸化,尽管其抑制作用不如降低细胞内钙调

素浓度有效。这可能要归因于虽然外钙浓度只有 2 nmol/L,但仍有细胞内钙残存着。因此可以认为,细胞外钙参与了 P 34<sup>cdc2</sup> 和 NIMA 蛋白激酶的活化。

尽管没有实验正式证明,我们推测 Ca<sup>2+</sup> 和 CaM 是协同作用的。在体外所有 CaM 酶活化的功能中, Ca<sup>2+</sup> 都是绝对需要的。对于非肌和平滑肌真核细胞, CaM 是细胞内 Ca<sup>2+</sup> 的初级受体,介导着许多 Ca<sup>2+</sup> 依赖性信号的传递过程。在构巢曲霉中,细胞生长依赖于细胞内 CaM 和细胞外 Ca<sup>2+</sup> 浓度, CaM 的过量表达可以降低生长需要的外 Ca<sup>2+</sup> 浓度。降低细胞外钙或细胞内 CaM 的水平,对 G<sub>2</sub>→M 期的进程有相似的影响。这些结果最清楚的解释是,细胞外钙进入细胞,结合并活化 CaM,形成的 Ca<sup>2+</sup>/CaM 复合物参与活化 NIMA 和 P 34<sup>cdc2</sup> 蛋白激酶(图 2)。

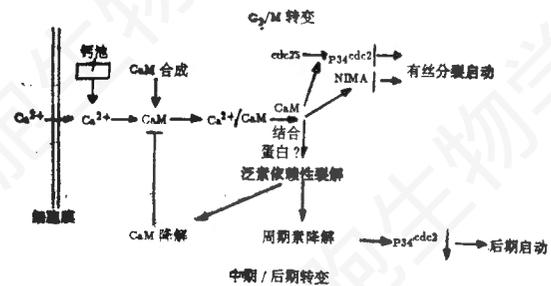


图 2 Ca<sup>2+</sup>/CaM 调节有丝分裂启动和结束可能的分子机制

Ca<sup>2+</sup>/CaM 参与这两种有丝分裂激酶的活化,至少通过两种机制。其一, Ca<sup>2+</sup>/CaM 直接与 NIMA 和 NIMT(由 nimT cdc 25 基因编码)相互作用,并且成为这两种激酶的一个调节亚基。其二,可能通过其他的 Ca<sup>2+</sup>/CaM 依赖性蛋白质作用于 NIMA 和(或) NIMT 而间接起作用。而已有的实验数据提示,在体内 NIMA 激酶的活化和 NIMT 对 P 34 cdc 2 的去磷酸化过程中对 Ca<sup>2+</sup>/CaM 的需求很可能是间接的。由此设想有一种或几种 Ca<sup>2+</sup>/CaM 依赖的蛋白质起中介作用(图 2)。

### 在细胞周期调节中 Ca<sup>2+</sup> 和 CaM 作用的特异性

为了直接查明进入有丝分裂对 Ca<sup>2+</sup> 和 CaM 的特殊需求,根据 nimT 23 和 nimA 5 遗传背景分别构建了一个 CaM 条件株(AlcCaM/T 23 和 AlcCaM/A 5),可以将细胞阻断于 G<sub>2</sub> 期的不同点。降低 CaM 阻止

AlcCaM/T 23 的  $G_2/M$  转变, 但对 AlcCaM/A 5 则无影响, 表明 CaM 减少对细胞功能并不是有普遍的破坏作用。在 AlcCaM/T 23 株中, 由低浓度的细胞外  $Ca^{2+}$  或细胞内 CaM 引起的  $G_2$  期阻断都伴随有 NIMA 和 P 34 cdc 2 两种蛋白激酶的失活。为了检查在低  $Ca^{2+}$  或低 CaM 条件下, 所有细胞过程是否正常发生, 利用与 M 期特定磷蛋白特异结合的单抗 MPM-2 (以下简称 MPM-2——译者) 来测定这种磷蛋白的磷酸化状态。当 nimT 23 细胞在限制性温度下阻断在  $G_2$  期时, 经 Western 法分析检测到与 MPM-2 反应的蛋白质为低水平。与此对照, 当 nimT 23 突变株转到允许温度进入有丝分裂时, MPM-2 的反应蛋白质在数目和含量两者都有明显增加。这提示, 细胞从 nimT 23 阻断点进入有丝分裂时, 许多蛋白质被磷酸化。把 AlcCaM/T 23 细胞用抑制性培养基阻断在  $G_2$  期, 与 MPM-2 反应的蛋白质的水平和对照的 nimT 23 细胞相差不多。解除 nimT 23 突变的限制性条件后, 检测到的主要磷蛋白与解除阻断的 nimT 23 细胞相似, 尽管某些磷蛋白似乎减少了。nimT 23 细胞培养在低细胞外钙时也得到相似的结果。这些数据说明, 降低细胞外钙或细胞内 CaM 水平并不导致蛋白质磷酸化的普遍降低, 而是特异地影响那些与  $G_2/M$  转变有关的特定蛋白质的磷酸化和去磷酸化。在 AlcCaM/T 23 株, 降低 CaM 或  $Ca^{2+}$  浓度阻止了阻断在  $G_2$  期的 nimT 23 细胞进入有丝分裂, 同时也抑制 NIMA 和 P 34<sup>cdc2</sup> 两种蛋白激酶的活化。然而, 同样条件下, 由  $G_2$  期释放后细胞主要的 MPM-2 反应磷蛋白的模式基本上与正常的 CaM 或  $Ca^{2+}$  浓度时相同。如果降低 CaM 或  $Ca^{2+}$  浓度会对细胞过程产生一种普遍效应, 则 nimT 23 解除阻断后磷蛋白的模式就会发生大的改变。由此得出结论,  $Ca^{2+}$  和 CaM 两者只是选择性地参与特异的有丝分裂激酶如 NIMA 和 P 34<sup>cdc2</sup> 的活化。这一令人信服的证据, 说明  $Ca^{2+}/CaM$  在控制细胞周期进程中起着特异的调节作用。 $Ca^{2+}$  和 CaM 可以恰如其分地列入由 Forsbury 和 Nurse 提出的“限速决定子”(rate-limiting determinants)的目录中。

### 对 $G_2/M$ 转变中多功能 $Ca^{2+}/CaM$ 依赖性蛋白激酶的可能作用

介导  $Ca^{2+}/CaM$  影响 NIMA 和/或 NIMT 可能的候选酶之一是 CaM 激酶, 因为它对海胆卵有丝分裂时核膜的破裂和非洲爪蟾卵成熟的起动都是必要的。

最近, 在构巢曲霉中也鉴定到 CaM 激酶, 并且和脊椎动物的酶有相似的特性, 尽管在氨基酸水平只有 29% 的相同性。初步证明, 这种高度纯化的构巢曲霉激酶在体外能以  $Ca^{2+}/CaM$  依赖方式使纯化的 NIMA 磷酸化。

已表明体外表达的 cdc 25 编码的蛋白质能起到磷酸酪氨酸磷酸酶的作用, 使 P 34 cdc 2 和一种称为 pNPP 的多肽底物去磷酸化。然而, 不管在何种条件下, cdc 25 蛋白的磷酸酶活性总是远低于其它大多数的磷酸酪氨酸磷酸酶。这提示 cdc 25 蛋白可能需要调节因子。Galaktionov 和 Beach 的工作表明, B 型周期素在体内与人 cdc 25 A 蛋白相结合, 在体外则可以活化 cdc 25 A 和 cdc 25 B 蛋白磷酸酶。此外, Kumagai 和 Dunphy 也曾报道非洲爪蟾 cdc 25 蛋白 N 末端在  $G_2/M$  转变时发生高度磷酸化, 而这种磷酸化对其酪氨酸磷酸酶活性相当重要。所以, 为了在细胞内达到最大活性, cdc 25 蛋白可能需要某些外加调节因子, 如 B 型周期素以及/或翻译后修饰, 诸如蛋白质的磷酸化。构巢曲霉的 NIMT 和粟酒裂殖酵母的周期素 B 都能被 CaM 激酶以  $Ca^{2+}/CaM$  依赖方式磷酸化, 但对 NIMT 的磷酸酶活性是否有影响还有待确定。

为了了解  $Ca^{2+}/CaM$  依赖性蛋白激酶 II 在哺乳动物细胞周期调控中的作用, Planas-Silva 和 Means 通过平切(truncation)手段构建了该酶不依赖  $Ca^{2+}/CaM$  的形式。在兔网织红细胞裂解物中表达时, 这种平切酶是有活性的结构, 与活化的天然酶有类似的特异性。利用糖皮质激素诱导的小鼠乳腺肿瘤病毒长末端重复序列, 把该酶稳定地导入 C 127 小鼠细胞系, 并建立了称为 CT 11.1 的克隆株。地塞米松诱导 CT 11.1 细胞中这种平切酶的 mRNA 水平、蛋白质水平和酶活性水平都有短暂性的升高, 而对对照细胞则无作用。这种酶的短暂性表达在 5—6 小时达最高值, 9 小时后导致细胞有丝分裂完全终止, 有丝分裂图象也随之消失。由流式荧光光度术进一步分析这种阻断的细胞, 发现其中 85% 的细胞处于  $G_2/M$  期。利用微管蛋白的抗体和 MPM-2 单抗进行免疫细胞化学分析, 证明细胞是阻断在  $G_2$  期。令人惊异的是这些阻断在  $G_2$  细胞的 H 1 激酶活性与有丝分裂期细胞一样高, 提示  $G_2$  期的阻断可能不应归因于 P 34<sup>cdc2</sup> 活化的受阻。

CaM 激酶结构性形式的表达引起  $G_2$  期阻断的实验结果, 与前面有关  $Ca^{2+}/CaM$  和 CaM 激酶在  $G_2/M$

期转变中起一定作用的讨论似乎相互矛盾。一种解释是, CaM 激酶依赖性磷酸化事件对 G<sub>2</sub> 期 进程是必需的, 但随后必不可少的是为 G<sub>2</sub>/M 转变所需的去磷酸化。激活型 CaM 激酶的持续存在可能阻止一些对有丝分裂启动至关重要的蛋白质的去磷酸化, 以致细胞不能进入有丝分裂。这一系统会涉及到 CaM 激酶在 G<sub>2</sub>/M 转变期间需要暂时性激活, 跟游离 Ca<sup>2+</sup> 和 CaM 的暂时性升高伴随细胞进入有丝分裂的结果是一致的。这些资料说明, 在有丝分裂启动前, 必须实现多种苏/丝氨酸蛋白质磷酸化与去磷酸化的精确调节。

### 有丝分裂周期素降解对 Ca<sup>2+</sup>/CaM 的需要

曾报道 Ca<sup>2+</sup>/CaM 在中期/后期转变中是必需的, 这一转变同时需要 MPF 的失活, 后者的发生则要归因于周期素的降解。然而直到最近, 尚没有人提出过这两个事件之间的可能联系。由于一种细胞静止因子(Cytostatic factor)的存在, 脊椎动物的未受精卵阻断在第二次减数分裂中期。受精后胞质中游离 Ca<sup>2+</sup> 瞬时升高, 细胞静止因子活性随之消失。有人假设, 这种 Ca<sup>2+</sup> 峰活化了 Ca<sup>2+</sup> 依赖性钙蛋白酶(Calpain), 随后钙蛋白酶使原癌基因 C-mos 的产物 p 39<sup>mos</sup> 降解, 而 p 39<sup>mos</sup> 活性能阻止周期素降解。但是在体外, 当游离 Ca<sup>2+</sup> 浓度为 5 mmol/L 时, 就能观察到 p 39<sup>mos</sup> 被钙蛋白酶降解, 然而在受精后的完整卵中游离 Ca<sup>2+</sup> 浓度从不超过 1.5 μmol/L。Lorca 等发现, 阻断在中期的非洲爪蟾卵的提取物以微摩尔的游离钙, 就能引起周期素 B 降解。在 p 39<sup>mos</sup> 不降解以及钙蛋白酶抑制剂存在时也会发生 Ca<sup>2+</sup> 诱导的周期素降解。因此, 钙蛋白酶和 p 39<sup>mos</sup> 似乎不可能介导 Ca<sup>2+</sup> 对周期素降解的作用。为了研究 Ca<sup>2+</sup>/CaM 复合物是否参与启动周期素的降解, Lorca 等利用了一种能牢固地结合 Ca<sup>2+</sup>/CaM (解离

常数  $K_d = 1 \text{ nmol/L}$ , 从而抑制 Ca<sup>2+</sup>/CaM 依赖性酶活性的肽-鸡砂囊肌球蛋白轻链激酶 MLCK(488-511)。在提高游离 Ca<sup>2+</sup> 浓度之前加入这种肽至终浓度为 100 μmol/L 或更大时, 即可阻止周期素降解和 MPF 失活。相反, 把这种肽与 EGTA 或 CaM 同时加入则不起作用。这些结果表明, 非洲爪蟾中周期素蛋白水解和 MPF 的失活需要 Ca<sup>2+</sup>/CaM 复合物的形成。到目前为止, 尽管只是就减数分裂一种系统检查了 Ca<sup>2+</sup>/CaM 在周期素的降解中的作用, 但研究也将扩展到有丝分裂系统。周期素降解可以解释与中/后期转变相关的胞质游离钙浓度的瞬时性上升的重要性, 以及为什么降低哺乳动物细胞的 CaM 水平能够阻止中期/后期转变(图 2)。在这一过程中 Ca<sup>2+</sup>/CaM 可能的作用靶尚待确定。

有丝分裂结束也与 CaM 浓度降低有关, 尽管其作用机制尚待测定。来源于脊椎动物、植物、酵母和粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)的 CaM 是以 Ca<sup>2+</sup> 依赖性方式, 通过泛素酰钙调素合成酶(ubiquityl-calmodulin synthetase)共价结合到泛素上的。构巢曲霉 CaM 的降解可能像周期素一样, 也是通过泛素依赖性方式蛋白水解的。构巢曲霉 CaM 泛素化(ubiquitination) 时与泛素连接位点为 Lys 115, 因为 Lys 115 三甲基化可阻止 CaM 泛素化和泛素依赖性蛋白水解。在进入有丝分裂时, 新合成的 CaM 必然是不被三甲基化, 或者三甲基化后其三甲基基团能由一种未知酶迅速除去。令人感兴趣的是, 这种 Ca<sup>2+</sup> 依赖的泛素化过程是否也需要 CaM, 同时此过程在有丝分裂结束时是否负责 CaM 的降解。果真如此的话, 那么在进入有丝分裂时起重要作用的 Ca<sup>2+</sup>/CaM, 在有丝分裂结束期间则可促使自身蛋白水解, 并因此逆转其调节功能。

(杨新林译 庄临之审校)

**书讯** 徐承水同志主编的《分子细胞生物学手册》已由北京农业大学出版社出版发行。全书 52 万字, 压膜封面, 定价 11.50 元(含邮挂费)。

该书是一部细胞生物学方面的工具资料书。全书共分为四部分: 第一部分综合汇集了分子细胞生物学所涉及的名词术语 2500 余条, 按词汇英文名称的字母顺序排列, 并作详尽的解释; 第二部分为教学实验; 第三部分为大事年表; 第四部分为国内外本学科领域的主要期刊和参考书目。

本书可作为生物学工作者的工具资料书, 亦是大学本、专科学生和研究生学习参考书, 对研究生入学应试有一定参考价值。欲购者可与山东曲阜师范大学(邮编 273165)生物系细胞室联系。