



谢松波, 山东师范大学生命科学学院讲师。主要研究细胞骨架在细胞运动和细胞分裂中的动态结构与功能, 并分析细胞骨架相关蛋白的异常在肿瘤及免疫相关疾病发生中的作用。



周军, 山东师范大学/南开大学生命科学学院教授。主要研究发育与疾病的细胞骨架基础。先后获得国家杰出青年科学基金、霍英东青年教师奖、泰山学者优势特色学科人才团队领军人才等荣誉。

<http://www.lsc.sdnu.edu.cn/info/1091/2127.htm>

http://sky.nankai.edu.cn/zj_10055/list.htm

翻译后修饰及微管结合蛋白对微管 动态结构与功能的调控

谢松波^{1*} 周军^{1,2*}

(¹山东师范大学生命科学学院, 济南 250014; ²南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要 微管是处于高度动态变化中的细胞结构。微管的动态性对于微管在细胞内许多特定功能的发挥至关重要。细胞内存在许多微管结合蛋白, 对于微管的动态性及微管相关的细胞活动起着重要的调节作用, 而微管结合蛋白与微管的相互作用又受到微管蛋白的翻译后修饰的调控。该综述主要讨论微管蛋白的翻译后修饰和微管结合蛋白如何影响微管动态结构, 进而调控以微管为基础的细胞活动。

关键词 微管; 微管动态性; 微管结合蛋白; 微管蛋白; 翻译后修饰; 细胞活动

Regulation of Microtubule Dynamics and Functions by Post-Translational Modifications and Microtubule-Binding Proteins

Xie Songbo^{1*}, Zhou Jun^{1,2*}

(¹College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan, Shandong 250014, China;

²College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

国家自然科学基金(批准号: 31701216)、山东省自然科学基金(批准号: ZR2017MC008)和中国博士后科学基金(批准号: 2016M600553)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0531-86182518, E-mail: xiesongbo@sdnu.edu.cn; junzhou@sdnu.edu.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31701216), Natural Science Foundation of Shandong Province (Grant No.ZR2017MC008) and China Postdoctoral Science Foundation (Grant No.2016M600553)

*Corresponding authors. Tel: +86-531-86182518, E-mail: xiesongbo@sdnu.edu.cn; junzhou@sdnu.edu.cn

网络出版时间: 2019-04-01 11:02:42

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190401.1102.002.html>

Abstract Microtubules are highly dynamic cellular structures, and the dynamic property of microtubules is essential for various cellular activities. Microtubule-binding proteins play important roles in regulating microtubule dynamics and microtubule-mediated cell activities. The interaction of microtubule-binding proteins with microtubules is regulated by post-translational modifications of tubulin. In this review, we discuss how tubulin post-translational modifications and microtubule-binding proteins affect microtubule dynamics and microtubule-mediated cellular activities.

Keywords microtubule; microtubule dynamics; microtubule-binding protein; tubulin; post-translational modification; cellular activity

微管是由进化上十分保守的 α/β 微管蛋白二聚体首尾相接组成的有极性的中空管状结构。尽管微管蛋白的序列和微管的结构在几乎所有的物种中都很保守。在不同的细胞类型中以及同一细胞的不同时空条件下,微管通过组装形成不同的结构以行使其特定的细胞内功能,例如作为细胞内物质运输的高速通路、形成纺锤体控制染色体的精确分离、维持细胞的极性和形态、形成血小板的边缘带以及构成纤毛或鞭毛中的轴丝骨架等^[1]。微管结构的动态组装是微管功能多样性的物质基础,细胞内的微管在聚合和解聚模式之间不停地转换,即微管的动态不稳定性(dynamic instability)。细胞利用微管的动态不稳定性来为细胞活动提供动力和方向性指引,例如,细胞在有丝分裂中形成纺锤体来驱动染色体的分离,植物细胞中皮层微管的快速重排以调整细胞生长的方向^[2]。

微管的结构十分保守,但微管在细胞内的功能多姿多彩,既需要微管进行高度的动态变化以快速适应细胞形态的变化、捕获细胞皮层、构成有丝分裂染色体和细胞器等动态结构,又需要有相对稳定的结构以支持物质的长距离运输和维持细胞器的分布等。那么,微管的功能多样性是如何受到调控的呢?目前有以下三种原因:(1)微管蛋白的不同亚基类型构成了微管结构的多样性;(2)微管蛋白的翻译后修饰赋予了微管更多的结构多样性;如乙酰化(acetylation)、酪氨酸化/去酪氨酸化(tyrosination/detyrosination)、 $\Delta 2$ 微管蛋白($\Delta 2$ -tubulin)、(多聚)谷氨酰化[(poly)glutamylolation]、(多聚)甘氨酸化(poly)glycylation];(3)诸多的微管结合蛋白为微管结构与功能的调节提供了无限可能,其中包括微管聚合蛋白、解聚蛋白和微管剪切蛋白。更重要的是,这些调节机制之间存在交互作用,共同构成了“微管蛋白密码(tubulin code)”(图1)。最近的一些研究表明,微

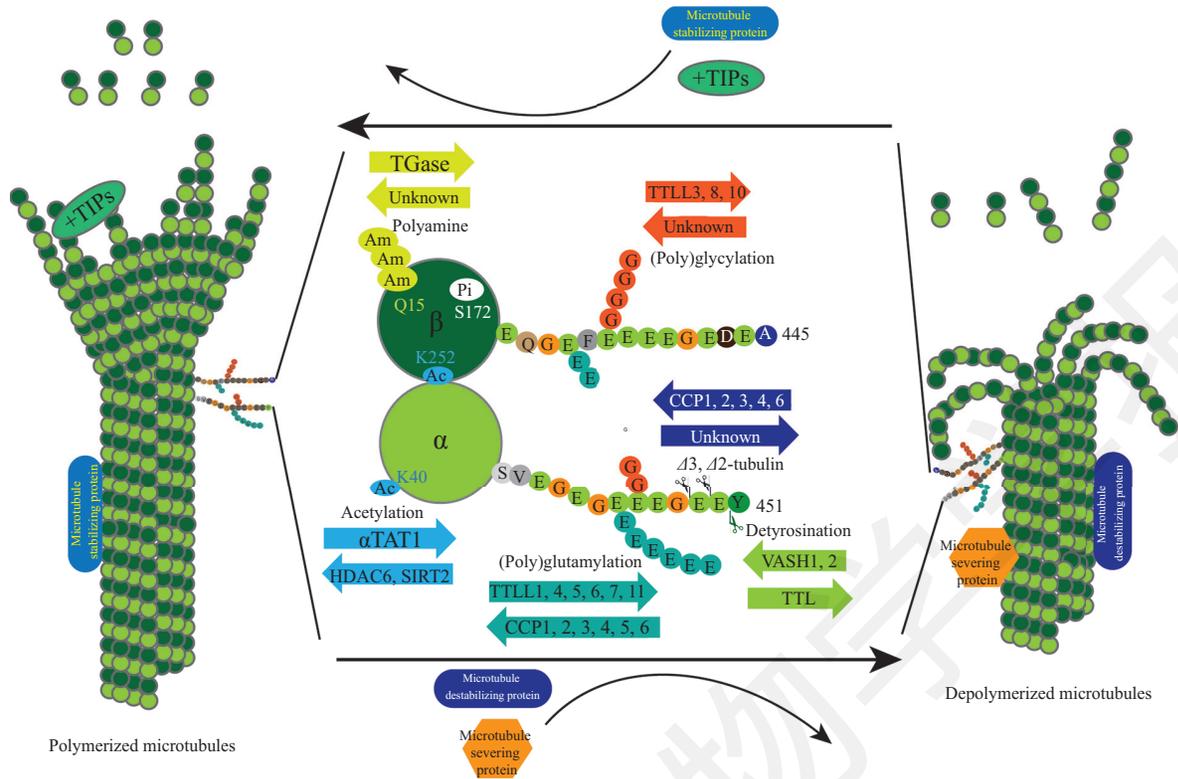
管蛋白的翻译后修饰导致了微管的构象变化,从而调控微管结合蛋白与微管的相互作用,进而影响微管的动态性和微管相关的生物学功能^[3-5]。本综述主要探讨微管蛋白的翻译后修饰和微管结合蛋白对微管结构动态性的调控,以及微管动态结构的生理及病理意义。

1 微管蛋白的翻译后修饰对微管动态结构与功能的调控

尽管几十年前科学家们就发现了微管蛋白存在着丰富的翻译后修饰,大部分蛋白中都存在的乙酰化和磷酸化修饰;还有一些修饰可能是微管蛋白所特有的,例如,酪氨酸化/去酪氨酸化、(多聚)谷氨酰化、(多聚)甘氨酸化,这些修饰很可能是在生物进化过程中形成的特异调节微管相关结构(尤其是纤毛和鞭毛)活性的翻译后修饰^[3],但是这些翻译后修饰功能一直不是很清楚。最近十年里,随着负责这些翻译后修饰反应的酶被鉴定出来,人们对微管蛋白翻译后修饰的功能的了解已逐渐清晰。这些翻译后修饰选择性地调控微管的功能有以下两种途径:一种是直接调控微管的力学性质进而影响微管的稳定性,另一种是调控众多的微管结合蛋白与微管的亲和力。近年来,在不同的动物模型或器官模型中操纵这些微管蛋白修饰酶的活性加深了人们对这些翻译后修饰的生理和病理功能的理解。

1.1 乙酰化

乙酰化最早被发现于衣藻的鞭毛中^[6],几乎所有稳定的微管中都存在这一修饰,尤其是神经元的微管。乙酰化修饰与神经元发育过程中轴突的分支调控密切相关,它控制着皮层神经元的迁移以及形态形成。乙酰化主要发生在 α -微管蛋白的第40位赖氨酸(K40)上,有趣的是,这个位点位于微管的内管腔面,这种微管内部的修饰如何影响微管的动态性



α/β 微管蛋白二聚体上,尤其是其羧基端尾巴上存在着种类繁多的翻译后修饰。这些翻译后修饰通过影响微管蛋白的构象变化调节微管动态性,也可能通过调节微管结合蛋白与微管的结合来调节微管的动态性。

There are various post-translational modifications on α/β tubulin dimers, especially at the C-terminal tails. These post-translational modifications regulate microtubule dynamics by affecting the conformational change of tubulin or the interaction of microtubules with microtubule-binding proteins.

图1 微管蛋白翻译后修饰对微管动态性的调节

Fig.1 Regulation of microtubule dynamics by post-translational modifications of tubulin

及功能一直是个谜。有可能是这种修饰主要影响微管内部蛋白(MT inner proteins, MIPs)和微管结合蛋白与微管网架的结合,从而影响微管的动态性^[7]。最近的研究表明, K40乙酰化能降低原纤维之间的侧向作用力,使微管更耐受机械力,从而增加微管的稳定性^[8]。在许多神经退行性疾病中,如亨廷顿病、进行性神经性腓骨肌萎缩症、肌萎缩症、帕金森症等疾病中,都发现了微管的乙酰化水平降低及轴突运输发生缺陷^[9-11]。在这些疾病的动物模型或病人来源的干细胞中,抑制组蛋白去乙酰化酶6(histone deacetylase 6, HDAC6)的活性足以恢复微管的乙酰化水平以及正常的轴突运输;而在 α 微管蛋白乙酰转移酶1(α tubulin acetyl transferase 1, α TAT1)缺陷的小鼠中,尽管微管不能发生乙酰化,但小鼠仅仅是触觉上有缺陷,并没有神经系统方面缺陷的表型,这提示,乙酰化可能不是调控轴突运输的唯一机制^[12]。最近的研究发现,微管蛋白上也存在着其他的乙酰化位点,如 β 微管蛋白上的K252乙酰化可能与微管

的组装效率有关联^[13]。

乙酰化在纤毛和鞭毛的轴丝中也普遍存在,抑制HDAC6的活性能恢复纤毛的发生^[14-15];反过来,缺失 α TAT1的小鼠精子的形态和运动能力存在明显的缺陷^[16]。此外,乙酰化修饰在血小板边缘条纹中也普遍存在,乙酰化的异常会影响血小板前体细胞-巨核细胞的成熟,进而影响血小板形成^[17]。乙酰化/去乙酰化的调控对于血小板激活后的铺展也至关重要^[18]。

1.2 酪氨酸化/去酪氨酸化

除了乙酰化、磷酸化外,大部分其他的修饰均发生在微管蛋白的羧基端尾巴上,这些尾巴暴露在聚合的微管外表面,是微管结合蛋白的重要结合位点。因此,这些尾巴上的翻译后修饰很可能以某种选择性的机制调控微管与微管结合蛋白的结合,进而调控特定的微管功能。 α -微管蛋白有不同的亚型,大部分亚型的羧基端的最后三个氨基酸为谷氨酸-谷氨酸-酪氨酸(EET),末尾的酪氨酸可以

被vasohibin家族蛋白VASH1/2酶催化切除后形成“deTyr-tubulin”^[19-20], 被切除的酪氨酸也可以在TTL酶(tubulin tyrosine ligase)的催化下重新连接到去酪氨酸化微管的末端, 形成“Tyr-tubulin”^[21]。与乙酰化一样, 去酪氨酸化在稳定长寿的微管上普遍存在, 尤其是神经元中, 可能的调节机制如下: (1)去酪氨酸化能调节驱动蛋白kinesin-1、kinesin-2和CENP-E与微管的亲和力^[22]; (2)去酪氨酸化可能通过降低KIF2、MCAK等kinesin-13类马达蛋白的微管解聚活性, 从而增加了微管的稳定性^[23]; (3)微管的酪氨酸化状态可调节其与某些含有CAP-Gly(cytoskeleton-associated protein glycine-rich)结构域的微管正末端结合蛋白, 如CLIP-170、p150/glued等的特异性^[24]。

尽管酪氨酸化/去酪氨酸化是一个可逆的过程, 但脑中大约有35%的微管不能重新发生酪氨酸化, 这是因为发生了不可逆的 $\Delta 2$ 微管蛋白修饰, 即去酪氨酸化修饰的 α -微管蛋白的羧基端尾巴在CCPs(cytosolic carboxypeptidases)的催化下再失去一个氨基酸, 此时由于结构的限制TTL不能将Tyr重新连接到 $\Delta 2$ 微管蛋白的末端。去酪氨酸化和 $\Delta 2$ 微管蛋白修饰在分化的神经元微管以及纤毛和鞭毛的轴丝中普遍存在, 常被视为是稳定的微管的一个标志物。对这两种修饰的功能理解主要来源于TTL基因敲除的小鼠, 这些小鼠的脑中去酪氨酸化和 $\Delta 2$ 微管蛋白修饰显著增加, 小鼠因脑结构尤其是皮质丘脑环路区的结构异常, 通常死于围产期^[25]。去酪氨酸化对细胞分裂的精确调控也十分重要。去酪氨酸化有助于动粒相关马达蛋白的结合, 指导有丝分裂过程中的染色体向赤道板的有序排列。去酪氨酸化修饰的异常往往导致染色体的错误排列, 进而导致非整倍性和肿瘤的发生^[22]。在 $\Delta 2$ 微管蛋白修饰的基础上CCPs继续催化, 剪切掉一个氨基酸残基即形成了 $\Delta 3$ 微管蛋白修饰, 但是这种修饰的生物学意义目前还不是很清楚。

1.3 谷氨酰化和甘氨酰化

谷氨酰化修饰最早在脑中的 α/β 微管蛋白上被发现, 在不同物种的纤毛或鞭毛轴丝微管蛋白上也普遍存在^[26]。在谷氨酰酶的催化作用下, 一个或多个谷氨酸残基加入到 α/β 微管蛋白的羧基端尾巴的谷氨酸残基的 γ 羧基集团上, 形成了谷氨酰化; 甘氨酰化修饰则最初是在草履虫(*Paramecium tetraurelia*)中被发现的^[27], 与谷氨酰化较相似的是, 甘氨酰

化是在糖基酶的催化作用下将一个或多个甘氨酸残基加入到 α -微管蛋白或 β -微管蛋白的羧基端尾巴的谷氨酸残基的 γ 羧基集团上。谷氨酰化和甘氨酰化这两种修饰在细胞内互相依赖, 但不同的是, 甘氨酰化目前只在大部分生物的纤毛和鞭毛中有发现。谷氨酰酶和糖基酶都属于TTL样(TTL-like, TTLL)家族成员, 谷氨酰化修饰可以被CCPs可逆性地去除, 但负责去除甘氨酰化修饰的酶目前还不太清楚。

谷氨酰化可以调节微管与各种微管结合蛋白的结合, 例如谷氨酰化选择性地调节神经元中的微管相关蛋白包括tau、MAP2、MAP1A和MAP1B与微管的结合^[28]。最近的研究发现, kinesin-1对(多聚)谷氨酰化的微管非常敏感, 这与(多聚)谷氨酰化调节kinesin-1依赖的神经元突触后膜的物质运输结论一致^[23]。此外, (多聚)谷氨酰化还能调节微管剪切蛋白spastin的活性从而影响微管的动态性^[29]。(多聚)谷氨酰化在动纤毛和鞭毛的摆动中起着重要的调节作用, 小鼠中谷氨酰酶(TTLL1、TTLL9)和去谷氨酰酶(CCP1、CCP5)的突变会引起精子发生和精子运动的异常, 最终导致雄性不育, 这可能与(多聚)谷氨酰化调节鞭毛中的动粒马达蛋白与微管的结合有关^[30]。(多聚)谷氨酰化修饰的改变也影响其他类型的动纤毛摆动, 例如脑室室管膜纤毛、气道纤毛。小鼠中TTLL1的失活引起呼吸系统疾病, 但在人体上暂时还没发现(多聚)谷氨酰化修饰异常与动纤毛和精子鞭毛疾病之间的关联性。(多聚)谷氨酰化在分化的神经元中累积, 因此被认为是一个调节神经元微管的不同功能的重要调控因素。

小鼠脑室中的动室管膜纤毛的成熟需要单甘氨酰化, 接着发生(多聚)甘氨酰化, 但其只存在短短的几周时间。微管蛋白的甘氨酰化修饰对于维持小鼠室管膜的动纤毛完整性以及控制精子鞭毛和原纤毛的长度非常重要。在小鼠、斑马鱼或果蝇中敲除或缺失糖基酶基因会引起纤毛的解聚或严重的纤毛缺陷疾病。小鼠的视网膜感光细胞中甘氨酰化的缺失导致这些细胞中连接纤毛的变短, 以及视网膜退行性疾病的发生。甘氨酰化的缺失导致轴丝微管在聚合后迅速地解聚, 提示这种修饰可能在稳定轴丝微管中发挥着主要的作用^[4]。甘氨酰化与结肠癌的关系也有一定的关系, 小鼠中敲除糖基酶基因TTLL3导致结肠原纤毛的缺失以及癌细胞的增殖加快。

1.4 其他类型的微管蛋白翻译后修饰

除了以上提到的一些常见微管蛋白翻译后修饰, 微管蛋白上还存在许多其他的翻译后修饰, 比如磷酸化修饰、聚胺化、棕榈酰化、精氨酰化、甲基化、泛素化、糖基化和SUMO化^[31]。但是, 大部分这些修饰还需要进行深入的研究, 目前较为清楚的修饰是CDK1激酶催化的 β -微管蛋白的172位点丝氨酸磷酸化对微管的聚合有明显的影^[32-33]。聚胺化是一种新发现的多聚修饰, 由于其导致微管蛋白低溶解性, 不易被检测, 因而被忽视了许多年。它在微管蛋白的谷氨酸残基上添加带正电荷的分枝链, β -微管蛋白的Q15位点是聚胺化的主要位点, 转谷氨酰胺酶以一种不可逆的方式催化游离的微管蛋白或聚合的微管发生聚胺化, 这种修饰会增加微管的稳定性^[33]。最近发现的K40甲基化是一种很有意思的修饰, 它能够与乙酰化竞争K40这个位点^[34]。其他的翻译后修饰, 包括棕榈酰化、精氨酰化、泛素化、糖基化和SUMO化等, 只在特定的细胞类型、或组织、或某些特定的代谢条件下被检测到过, 关于这些修饰的功能以及负责这些修饰的酶目前还不太清楚。

2 微管结合蛋白对微管动态结构与功能的调控

微管的解聚和聚合主要发生于微管的末端, 因此, 微管的动态不稳定性主要指的是微管末端的解聚和生长变化情况。微管末端的动态性变化对于微管的捕获、稳定以及锚定其他的细胞结构十分重要。微管的末端受到一系列微管结合蛋白的调节, 其中包括微管聚合酶、微管解聚酶、 γ -微管蛋白等帽子蛋白(capping factors)、调节性的马达蛋白kinesins以及CAMSAPs/Patronin家族蛋白等。

GTP水解是调控微管的动态不稳定性的能量来源。微管聚合时, GTP-微管蛋白二聚体插入到生长的微管末端, 随后微管亚末端的 β -微管蛋白上结合的GTP发生水解。稳定的微管末端通常包含一个或一系列GTP- β -微管蛋白的“帽子”, 即GTP帽, 而微管的轴体则是由不稳定的GDP- β -微管蛋白组成的。GTP帽对于微管的稳定性至关重要, GTP水解导致了 α 微管蛋白亚基的构象变化, 微管末端向外弯曲翻转, 降低微管蛋白亚基之间的侧向连接, 微管迅速地从生长状态转变为解聚状态^[35]。GTP水解驱动的微管末端的构象变化为各种微管结合蛋白精确调节微管动

态不稳定性提供了一个理想的结构平台, 这些蛋白协同竞争地结合在微管的末端, 共同决定微管的动态不稳定性, 其中最重要的一类蛋白是微管正末端示踪蛋白(plus-end tracking proteins, +TIPs)(图2)。

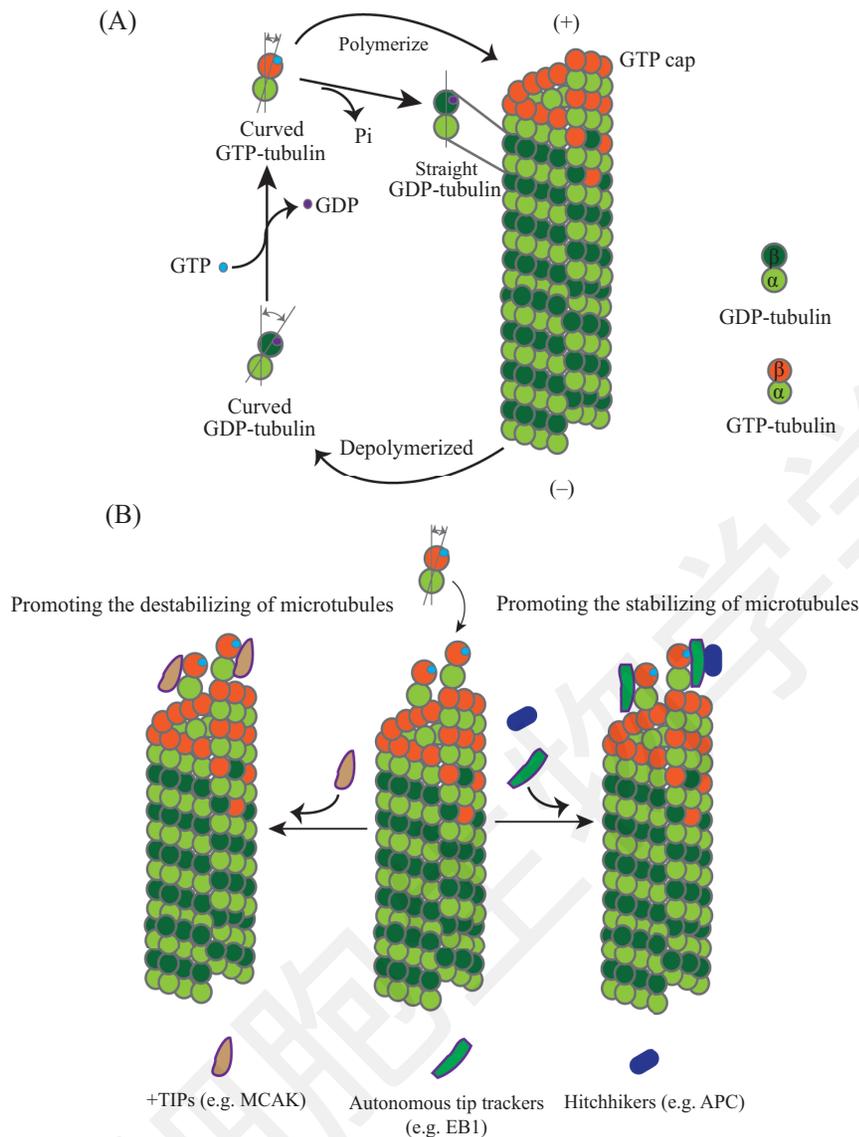
2.1 微管正末端示踪蛋白(+TIPs)

+TIPs可以分为两类, 一类是不依赖其他蛋白就能识别并结合微管末端的自主性正末端示踪蛋白(autonomous tip trackers), 例如EBs(end binding proteins)、CLIP-170、p150^{glued}等; 另一类是通过自主性正末端示踪蛋白才能识别并结合微管末端的被动性正末端蛋白(hitchhikers), 例如APC、Kar9p、dynein等。

CLIP-170是首个被发现的+TIPs, Waterman-Storer等^[36]通过FSM(fluorescent speckle microscopy)显微技术在活细胞中示踪GFP-CLIP-170融合蛋白, 发现CLIP-170就像“踏车(treadmilling)”一样, 先是结合在生长的微管正末端, 但很快在新生的微管区后部解离。理论上来说, 踏车现象是因为+TIPs对微管末端的亲和力高于微管壁, 因而结合于微管的末端并快速地从微管壁解离。一种可能的机制是+TIPs的磷酸化修饰调控其与微管的结合, 另一种可能是这些+TIPs对GTP帽以及生长的微管末端的特定构象具有很高的亲和力。

EBs(end binding proteins)是微管末端网络的主要调控因子, EBs可以自主性地结合在生长的微管的正末端和负末端, 并招募其他的微管结合蛋白来共同调控微管末端的动态性。EBs的N-端含有一个CH(calponin homology)结构域, 接着是连接区域(linker region)和coiled-coil结构域, C-端是EBH(EB homolog)结构域和以EEY/F基序结尾的不规则尾巴。Coiled-coil结构域负责EBs单体的二聚化, 而EBs的二聚化对EBs与GTP的直接结合至关重要^[37]。尽管EBs的C-端负责介导EBs与各种其他末端微管蛋白结合, 而N-端CH-linker结构域则介导EBs与生长的微管末端结合, 但EBs与微管末端的特异性结合需要N-端与C-端的共同作用。通过冷冻电镜分析GTP γ S微管蛋白组装形成的微管与EB之间的相互作用发现, EBs的CH结构域结合于原纤维间的四个微管蛋白二聚体的转角处, 负责感应GTP水解导致的微管网架的构象变化, 因此, EBs彗星的长度通常代表着微管上GTP帽的多少^[38]。

XMAP215家族成员的微管聚合酶是另一大类自主性末端示踪蛋白, 这类蛋白包括多个微管结合



A: 游离的GTP-tubulin和GDP-tubulin都呈弯曲的构象, GTP-tubulin的弯曲度稍小。GTP-tubulin插入到生长的微管末端后其构象由弯曲转变为伸直的状态, 导致微管网架应变能的形成。随后GTP帽区域下方的GTP-tubulin水解成为GDP-tubulin, 这一过程产生的生物化学能释放了微管网架应变能。这种机械化学转变循环是微管动态结构调控的基础。B: 微管正末端结合蛋白可以识别并改变微管末端的构象, 进而导致微管的解聚或聚合。

A: unpolymerized GDP-tubulin is curved, and GTP exchange slightly straightens its curved conformation. The integration of GTP-tubulin into the growing microtubule ends induces its conformational change from the curved state to the straightened state, introducing strain energy into the microtubule lattice. Following GTP hydrolysis at remote sites in the stabilizing cap, biochemical energy is generated to release strain energy. This mechanochemical cycle underlies the regulation of microtubule dynamics. B: microtubule plus-end tracking proteins are able to bind and change the specific conformation of microtubule ends, thereby regulating microtubule assembly or disassembly.

图2 微管蛋白的构象变化及微管正末端示踪蛋白对微管动态性的调节

Fig.2 Regulation of microtubule dynamics by conformational changes of tubulin and microtubule plus-end tracking proteins

TOG结构域。人类的ch-TOG蛋白及其在爪蟾中的同源蛋白XMAP215是这类+TIPs蛋白家族的单体形式。结构解析发现, 这些蛋白的TOG结构域结合于微管蛋白二聚体的弯曲构象处, 因此推测, 这类蛋白很可能识别向外弯曲的微管蛋白片层或生长的微管末端的原纤维构象^[39]。XMAP215家族还包括一

个对微管网架外表面亲和力弱的不规则的碱性区域 (disordered basic region), 这个区域允许XMAP215沿着微管扩散到其末端。基于XMAP215的以上数据提出了这样一个模型: 自主性正末端微管结合蛋白特异性地结合于微管的正末端, 催化微管的聚合, 并沿着微管末端扩散而持续性地追踪结合于微管的正末端^[39]。

2.2 马达蛋白

Kinesin-4和kinesin-8家族的成员依赖于ATP水解产生的能量聚集于微管的末端, 这些驱动蛋白的尾巴含有基本的微管结合区域, 确保驱动蛋白头部的马达蛋白持续性地沿着微管末端移动。一些微管蛋白的翻译后修饰, 如 α 微管蛋白乙酰化和去酪氨酸化修饰能调节驱动蛋白kinesin-1与微管的结合^[40]。非运动型的kinesin-13家族蛋白, 例如MCAK也能够聚集于微管的末端。Kinesin-13家族蛋白依靠ATP水解的能量促进微管末端的微管蛋白二聚体处于弯曲的构象, 进而促进微管的解聚^[41]。

2.3 +TIPs网络调节微管的动态性和细胞活动

细胞内存在着种类繁多的+TIPs蛋白, 这些蛋白是如何有序地结合在生长的微管正末端并调控微管的动态性的呢? EBs蛋白作为细胞内的主要调控因子能招募许多结构和功能各异的+TIPs到生长的微管的末端。EBs招募+TIPs蛋白有两种方式, 一种是通过其尾巴上的EEY基序招募含有CAP-GLY结构域的蛋白, 例如CLIP-170和p150^{glued}是主要通过这种方式结合到微管末端的; 另一种是通过EBH结构域招募含SxIP(x代表任意氨基酸)基序的蛋白^[42]。SxIP基序足以靶向+TIPs与生长的微管末端, 是一种主要的微管末端定位信号。许多微管结合蛋白包含一个不规则的碱性区域, 这个区域可调节+TIPs与带负电的微管以及与EBs的羧基端结构域的结合, 这也为激酶在时间和空间上通过调控SxIP基序附近的丝氨酸残基磷酸化来调控+TIPs的末端示踪活性打开了方便之门。

众多的+TIPs通过小的结构域、线性基序或碱性区域相互作用形成了一个复杂的+TIPs调控网络, 这些+TIPs之间的相互作用很可能是瞬时的, 随着微管末端的延长处于不断的动态重塑中。这些数目繁多的+TIPs依靠分层次的和非分层次的以及相互竞争的方式构成了+TIPs调控网络^[42]。例如, EB1、CLIP-170和p150^{glued}与微管末端的高亲和力优先结合为招募dynein马达蛋白复合物提供了良好的平台; 含有SxIP基序和含有CAP-GLY结构域的蛋白之间会竞争性地结合EBs蛋白。Kinesin-8家族成员KIF18B和kinesin-13家族成员MCAK形成的复合物通过SxIP基序依赖的相互作用与EB1结合, 进而定位于微管的末端; Aurora A激酶可以负调节EB1-KIF18B-MCAK复合物, 进而调控有丝分裂期微管

正末端的动态性^[43]。

+TIPs调控的微管末端动态性对许多细胞生命活动至关重要。例如, 生长的微管与更稳定的细胞成分(如微丝束或其他微管等)的相互作用能引导微管生长的方向, 决定细胞内微管的排列结构。包含微丝结合结构域的一些+TIPs(例如spectraplakins)指导微管沿着微丝束的方向生长, 形成微管和微丝共排列的结构^[44]。微管与其他细胞结构(如有丝分裂着丝粒、细胞皮层)的相互作用通常需要多个微管结合蛋白的共同参与。在染色体列队和分离过程中, NDC80和DAM1复合体以及微管末端稳定因子或去稳定因子(如CLASPs和MACK)组成的复合体共同调节着丝粒对与动态的微管末端的连接^[45]。微管正末端还可以作为一个浓缩装置富集信号分子并传达信号, 例如由EB1、NAV1(navigator 1)和TRIO(RHO-specific GEF triple functional domain protein)组成的微管末端相关复合体活化GTPase RAC1后引发微丝骨架重塑从而促进神经元细胞中的神经突起的延伸^[46]。

2.4 微管负末端结合蛋白(minus-end tracking proteins, -TIPs)

γ -微管蛋白环状复合物(γ -tubulin ring complex, γ -TuRC)是微管的成核中心, 它像一个“帽子(cap)”一样结合于微管负末端, 使微管负末端处于相对稳定的状态, 因此微管负末端的调控机制及生物学功能长期以来被忽视。近年来, 人们在哺乳动物中发现了微管负末端调控因子CAMSAPs(calmodulin-regulated spectrin-associated proteins)家族蛋白成员: CAMSAP1、CAMSAP2和CAMSAP3(又称为Nezha)。CAMSAPs家族蛋白通过其保守的CKK(CAMSAP1、KIAA1078和KIAA1543)结构域特异性地结合于负末端的微管网架侧壁上, 其结合位点位于 α/β 微管蛋白二聚体的中间, 不受GTP-微管蛋白的影响。在分化的细胞(如神经细胞)中, 存在着大量的非中心体微管, CAMSAPs家族蛋白结合在这些非中心体微管的负末端并稳定其结构。CAMSAPs家族蛋白的作用方式并不完全相同, 其中CAMSAP1只是瞬时性地结合于生长的微管负末端, 而CAMSAP2/3则稳定地结合于聚合的微管负末端并形成延伸状结构, 阻止微管从两端解聚并形成非中心体微管的生长点。此外, CAMSAPs家族蛋白还能抑制微管负末端的聚合, 这也能解释为什么在细

胞中很少观察到微管负末端的生长^[47]。

CAMSAPs家族蛋白在间期细胞中的主要功能是稳定非中心体微管(主要是高尔基体微管)的末端,为非中心体微管的形成提供“种子(seed)”,但它们在有丝分裂期的功能目前仍不太清楚。在哺乳动物有丝分裂期的细胞中,CAMSAP2/3受到磷酸化修饰后从微管上解离下来,而CAMSAP1似乎对纺锤体长度有一定的调节作用^[48]。在脊椎动物中,有丝分裂期的微管负末端动态性主要受到KANS1/3的调节,KANS1/3可能通过招募MCRS1和TPX2等微管结合蛋白来拮抗kinesin-13解聚酶MCAK的作用,从而起到稳定丝粒纤维(kinetochore fiber)的作用^[48]。此外,负向马达蛋白,如dynein和kinesin-14s,也可能通过招募一些蛋白聚集于微管负末端,从而调控负末端的动态不稳定性^[48]。

3 展望

尽管科学家们早就破译了调控微管末端结构的动态性和功能的“微管蛋白密码”,但对这一复杂过程的具体调控机制的理解其实才刚刚开始。随着质谱手段的快速发展,一些新的微管蛋白翻译后修饰被鉴定出来,但微管蛋白上是否还存在其他的未知的翻译后修饰呢?此外,如何检测和解释“微管蛋白密码”所产生的微小的复杂调控事件?微管蛋白翻译后修饰如何调控微管网的构象?如何影响效应蛋白(如分子马达)和细胞的功能(如细胞内物质运输)?在一个复杂的、非化学计量的微管网络中如何理解微管调节因子的总体活性?这需要我们开发一些工具来分辨细胞和组织中的微管蛋白翻译后修饰的分级变化,并在体外重构体系中测量微管行为的微小变化。随着光电融合显微技术和时间分辨的超高分辨荧光显微技术的发展,我们有可能在更高的时空分辨尺度下观察翻译后修饰和微管结合蛋白如何引起微管结构的动态性变化。在复杂的体外重构体系中,结合微流控或脂质体模拟细胞内环境来研究细胞骨架网络的几何学、机械力和动态性调控机制也是细胞骨架研究领域的趋势。

找出催化微管蛋白翻译后修饰的酶是研究翻译后修饰生理病理意义的关键。我们可以利用基因组和蛋白质组学等分析手段鉴定出新的催化微管蛋白翻译后修饰的酶,在动物模型中探讨这些新的微管蛋白翻译后修饰异常和人类疾病之间的相关

性。因为调控翻译后修饰的酶是药物研发的合适靶点,所以开发针对这些翻译后修饰的酶的小分子抑制剂将是治疗微管蛋白翻译后修饰相关疾病的行之有效的策略。

参考文献 (References)

- 1 Magiera MM, Singh P, Gadadhar S, Janke C. Tubulin posttranslational modifications and emerging links to human disease. *Cell* 2018; 173(6): 1323-7.
- 2 Brouhard GJ, Rice LM. Microtubule dynamics: an interplay of biochemistry and mechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; 19(7): 451-63.
- 3 Janke C. The tubulin code: molecular components, readout mechanisms, and functions. *J Cell Biol* 2014; 206(4): 461-72.
- 4 Wloga D, Joachimiak E, Fabczak H. Tubulin post-translational modifications and microtubule dynamics. *Int J Mol Sci* 2017; 18(10): pii: E2207.
- 5 Song Y, Brady ST. Post-translational modifications of tubulin: pathways to functional diversity of microtubules. *Trends Cell Biol* 2015; 25(3): 125-36.
- 6 L'Hernault SW, Rosenbaum JL. Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine. *Biochemistry* 1985; 24(2): 473-8.
- 7 Nicastro D, Fu X, Heuser T, Tso A, Porter ME, Linck RW. Cryo-electron tomography reveals conserved features of doublet microtubules in flagella. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(42): E845-53.
- 8 Portran D, Schaedel L, Xu Z, Thery M, Nachury MV. Tubulin acetylation protects long-lived microtubules against mechanical ageing. *Nat Cell Biol* 2017; 19(4): 391-8.
- 9 Dompierre JP, Godin JD, Charrin BC, Cordelieres FP, King SJ, Humbert S, *et al.* Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci* 2007; 27(13): 3571-83.
- 10 Kim JY, Woo SY, Hong YB, Choi H, Kim J, Choi H, *et al.* HDAC6 inhibitors rescued the defective axonal mitochondrial movement in motor neurons derived from the induced pluripotent stem cells of peripheral neuropathy patients with HSPB1 mutation. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 9475981.
- 11 Godena VK, Brookes-Hocking N, Moller A, Shaw G, Oswald M, Sancho RM, *et al.* Increasing microtubule acetylation rescues axonal transport and locomotor deficits caused by LRRK2 Roc-COR domain mutations. *Nat Commun* 2014; 5: 5245.
- 12 Morley SJ, Qi Y, Iovino L, Andolfi L, Guo D, Kalebic N, *et al.* Acetylated tubulin is essential for touch sensation in mice. *eLife* 2016; 5: pii: e20813.
- 13 Chu CW, Hou F, Zhang J, Phu L, Loktev AV, Kirkpatrick DS, *et al.* A novel acetylation of beta-tubulin by San modulates microtubule polymerization via down-regulating tubulin incorporation. *Mol Biol Cell* 2011; 22(4): 448-56.
- 14 Ran J, Yang Y, Li D, Liu M, Zhou J. Deacetylation of alpha-tubulin and cortactin is required for HDAC6 to trigger ciliary disassembly. *Sci Rep* 2015; 5: 12917.
- 15 Yu F, Ran J, Zhou J. Ciliopathies: Does HDAC6 represent a new therapeutic target? *Trends Pharmacol Sci* 2016; 37(2): 114-9.

- 16 Kalebic N, Sorrentino S, Perlas E, Bolasco G, Martinez C, Heppenstall PA. α TAT1 is the major α -tubulin acetyltransferase in mice. *Nat Commun* 2013; 4: 1962.
- 17 Iancu-Rubin C, Gajzer D, Mosoyan G, Feller F, Mascarenhas J, Hoffman R. Panobinostat (LBH589)-induced acetylation of tubulin impairs megakaryocyte maturation and platelet formation. *Exp Hematol* 2012; 40(7): 564-74.
- 18 Sadoul K, Wang J, Diagouraga B, Vitte AL, Buchou T, Rossini T, *et al.* HDAC6 controls the kinetics of platelet activation. *Blood* 2012; 120(20): 4215-8.
- 19 Aillaud C, Bosc C, Peris L, Bosson A, Heemeryck P, Van Dijk J, *et al.* Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidases (TCPs) that regulate neuron differentiation. *Science* 2017; 358(6369): 1448-53.
- 20 Nieuwenhuis J, Adamopoulos A, Bleijerveld OB, Mazouzi A, Stickel E, Celie P, *et al.* Vasohibins encode tubulin detyrosinating activity. *Science* 2017; 358(6369): 1453-6.
- 21 Ersfeld K, Wehland J, Plessmann U, Dodemont H, Gerke V, Weber K. Characterization of the tubulin-tyrosine ligase. *J Cell Biol* 1993; 120(3): 725-32.
- 22 Barisic M, Silva e Sousa R, Tripathy SK, Magiera MM, Zaytsev AV, Pereira AL, *et al.* Mitosis microtubule detyrosination guides chromosomes during mitosis. *Science* 2015; 348(6236): 799-803.
- 23 Sirajuddin M, Rice LM, Vale RD. Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and post-translational modifications. *Nat Cell Biol* 2014; 16(4): 335-44.
- 24 Peris L, Thery M, Faure J, Saoudi Y, Lafanechere L, Chilton JK, *et al.* Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J Cell Biol* 2006; 174(6): 839-49.
- 25 Erck C, Peris L, Andrieux A, Meissirel C, Gruber AD, Vernet M, *et al.* A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(22): 7853-8.
- 26 Edde B, Rossier J, Le Caer JP, Desbruyeres E, Gros F, Denoulet P. Posttranslational glutamylation of α -tubulin. *Science* 1990; 247(4938): 83-5.
- 27 Redeker V, Levilliers N, Schmitter JM, Le Caer JP, Rossier J, Adoutte A, *et al.* Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules. *Science* 1994; 266(5191): 1688-91.
- 28 Bonnet C, Boucher D, Lazereg S, Pedrotti B, Islam K, Denoulet P, *et al.* Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylation. *J Biol Chem* 2001; 276(16): 12839-48.
- 29 Valenstein ML, Roll-Mecak A. Graded control of microtubule severing by tubulin glutamylation. *Cell* 2016; 164(5): 911-21.
- 30 Konno A, Ikegami K, Konishi Y, Yang HJ, Abe M, Yamazaki M, *et al.* *Ttl9*^{-/-} mice sperm flagella show shortening of doublet 7, reduction of doublet 5 polyglutamylation and a stall in beating. *J Cell Sci* 2016; 129(14): 2757-66.
- 31 Janke C, Bulinski JC. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12(12): 773-86.
- 32 Fourest-Lieuvain A, Peris L, Gache V, Garcia-Saez I, Juillan-Binard C, Lantze V, *et al.* Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Mol Biol Cell* 2006; 17(3): 1041-50.
- 33 Song Y, Kirkpatrick LL, Schilling AB, Helseth DL, Chabot N, Keillor JW, *et al.* Transglutaminase and polyamination of tubulin: posttranslational modification for stabilizing axonal microtubules. *Neuron* 2013; 78(1): 109-23.
- 34 Park IY, Powell RT, Tripathi DN, Dere R, Ho TH, Blasius TL, *et al.* Dual chromatin and cytoskeletal remodeling by SETD2. *Cell* 2016; 166(4): 950-62.
- 35 Akhmanova A, Steinmetz MO. Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015; 16(12): 711-26.
- 36 Waterman-Storer CM, Desai A, Bulinski JC, Salmon ED. Fluorescent speckle microscopy, a method to visualize the dynamics of protein assemblies in living cells. *Curr Biol* 1998; 8(22): 1227-30.
- 37 Gireesh KK, Sreeja JS, Chakraborti S, Singh P, Thomas GE, Gupta H, *et al.* Microtubule +TIP protein EB1 binds to GTP and undergoes dissociation from dimer to monomer on binding GTP. *Biochemistry* 2014; 53(34): 5551-7.
- 38 Zhang R, Alushin GM, Brown A, Nogales E. Mechanistic origin of microtubule dynamic instability and its modulation by EB proteins. *Cell* 2015; 162(4): 849-59.
- 39 Widlund PO, Stear JH, Pozniakovskiy A, Zanic M, Reber S, Brouhard GJ, *et al.* XMAP215 polymerase activity is built by combining multiple tubulin-binding TOG domains and a basic lattice-binding region. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(7): 2741-6.
- 40 Kaul N, Soppina V, Verhey KJ. Effects of α -tubulin K40 acetylation and detyrosination on kinesin-1 motility in a purified system. *Biophys J* 2014; 106(12): 2636-43.
- 41 Asenjo AB, Chatterjee C, Tan D, DePaoli V, Rice WJ, Diaz-Avalos R, *et al.* Structural model for tubulin recognition and deformation by kinesin-13 microtubule depolymerases. *Cell Rep* 2013; 3(3): 759-68.
- 42 Duellberg C, Trokter M, Jha R, Sen I, Steinmetz MO, Surrey T. Reconstitution of a hierarchical +TIP interaction network controlling microtubule end tracking of dynein. *Nat Cell Biol* 2014; 16(8): 804-11.
- 43 Tanenbaum ME, Macurek L, van der Vaart B, Galli M, Akhmanova A, Medema RH. A complex of Kif18b and MCAK promotes microtubule depolymerization and is negatively regulated by Aurora kinases. *Curr Biol* 2011; 21(16): 1356-65.
- 44 Alves-Silva J, Sanchez-Soriano N, Beaven R, Klein M, Parkin J, Millard TH, *et al.* Spectraplakins promote microtubule-mediated axonal growth by functioning as structural microtubule-associated proteins and EB1-dependent +TIPs (tip interacting proteins). *J Neurosci* 2012; 32(27): 9143-58.
- 45 Foley EA, Kapoor TM. Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nature reviews. Mol Cell Biol* 2013; 14(1): 25-37.
- 46 van Haren J, Boudeau J, Schmidt S, Basu S, Liu Z, Lammers D, *et al.* Dynamic microtubules catalyze formation of navigator-TRIO complexes to regulate neurite extension. *Curr Biol* 2014; 24(15): 1778-85.
- 47 Akhmanova A, Hoogenraad CC. Microtubule minus-end-targeting proteins. *Curr Biol* 2015; 25(4): R162-71.
- 48 Martin M, Akhmanova A. Coming into focus: mechanisms of microtubule minus-end organization. *Trends Cell Biol* 2018; 28(7): 574-88.