

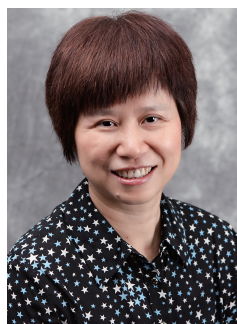
创刊四十周年专栏·细胞骨架

编者按

特约编委: 朱学良

(中国科学院分子细胞科学卓越创新中心/上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所教授、研究员)

微管、微丝和中间纤维等细胞骨架通过与各种结合蛋白的相互作用产生形态多样的网络结构, 不仅负责真核细胞及其亚结构的形态发生与维持, 也是细胞迁移、分裂和胞内物质运输等活动的执行和参与者。微管不仅作为长距离胞内运输的轨道, 而且是中心粒、纺锤体、纤毛等细胞器的核心组分。微丝与微管一样具有极性、高度动态性和多样化的功能, 为细胞收缩、铺展能力以及微绒毛等亚结构所必需, 也是短距离胞内运输的轨道或推进器。中间纤维种类繁多、结构稳定, 具有明显的组织特异性。因此, 对细胞骨架的结构形成、功能和调节机理的研究一直是细胞生物学的重要内容。胞外基质在细胞外部起支撑、黏附作用, 虽不属细胞骨架, 但也是网络状结构, 且与细胞骨架的功能密切相关。鉴于这些内容丰富而多样, 我们邀请了国内十一位从事相关研究的教授, 其中包括两位从事植物细胞骨架研究的专家, 各有侧重地撰写了这套系列综述。



鲍岚博士, 中国科学院生物化学与细胞生物学研究所研究员、博士生导师, 国家杰出青年基金和中国科学院“百人计划”获得者。从事神经元内蛋白质运输机制及功能的研究, 近年来的主要工作包括微管蛋白翻译后修饰和微管蛋白亚型在神经系统发育中的功能和机制研究。在*Neuron*、*Cell Research*、*PNAS*、*Cell Reports*、*Journal of Neuroscience*、*Cerebral Cortex*、*Traffic* 和 *Journal of Cell Science* 等国际学术期刊上发表了研究成果。

<http://www.sibcb.ac.cn/PI.asp?id=30>

微管蛋白亚型及其功能

刁磊¹ 刘明一² 鲍岚^{1,2*}

(¹中国科学院分子细胞科学卓越创新中心/上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 细胞生物学国家重点实验室, 上海 200031; ²上海科技大学生命科学与技术学院, 上海 201210)

国家自然科学基金(批准号: 31330046)和中国科学院B类战略先导研究项目(批准号: XDB19000000)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021- 54921369, E-mail: baolan@sibcb.ac.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31330046) and Strategic Priority Research Program of Chinese Academy of Sciences (Grant No.XDB19000000)

*Corresponding author. Tel: +86-21-54921369, E-mail: baolan@sibcb.ac.cn

网络出版时间: 2019-04-02 13:37:20

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190402.1337.016.html>

摘要 微管是真核细胞构成细胞骨架的主要成分,由 α/β 微管蛋白组装而成。微管在细胞多种活动中发挥着重要的作用,其功能主要受微管结合蛋白、微管蛋白的翻译后修饰以及微管蛋白亚型的调控。已有研究发现, α/β 微管蛋白存在多种亚型,微管蛋白亚型在不同组织以及发育过程中的表达模式差异较大。多种微管蛋白亚型基因的突变可以引起神经系统疾病。该文综述了微管蛋白亚型的研究进展,尤其在微管功能调控、神经系统发育及其相关疾病中的作用。

关键词 微管;微管蛋白亚型;微管动态性;神经元

Tubulin Isotype and Its Function

Diao Lei¹, Liu Mingyi², Bao Lan^{1,2*}

¹State Key Laboratory of Cell Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology,

CAS Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;

²School of Life Science and Technology, ShanghaiTech University, Shanghai 201210, China)

Abstract Microtubules are the main cytoskeleton in almost all eukaryotic cells and composed of α/β tubulin. They play critical roles in various cellular processes. The functions of microtubules are regulated by microtubule-interacting proteins, tubulin post-translational modifications and tubulin isotypes. Previous studies have reported several isotypes of α/β -tubulin. The expression patterns of tubulin isotypes vary widely among different tissues and during development stages. Mutations in a variety of tubulin isotypes are able to cause nervous system diseases. Here, we review the research progress on tubulin isotypes, especially their roles in the regulation of microtubule function, the development of nervous system and related diseases.

Keywords microtubule; tubulin isotype; microtubule dynamics; neuron

微管是构成细胞骨架重要的组分之一,存在于几乎所有的真核细胞中。微管主要是由 α/β 微管蛋白异二聚体组装成的一种细长、中空且有一定刚性和弹性的圆柱管状结构,其平均外径为24 nm,内径为15 nm^[1]。细胞内的微管可以快速聚合和解聚,这种特性称为微管的动态性或动态不稳定性。微管在一系列细胞关键生物学过程中发挥重要作用,包括细胞形态维持、迁移、有丝分裂、胞内物质的输送及信号传导等^[2]。微管的动态性及其发挥的功能主要是通过微管结合蛋白、微管蛋白翻译后修饰和微管蛋白亚型来调节。人类至少存在8种 α 微管蛋白和9种 β 微管蛋白亚型基因,尽管不同微管蛋白亚型的氨基酸序列具有高度的同源性,但它们在不同组织中的时空表达模式差异提示,不同微管蛋白亚型在功能上的特异性。已有报道表明, β 微管蛋白TUBB3在神经元中高表达,其多个点突变可以引起神经系统发育障碍相关疾病。本文主要回顾微管蛋白亚型的研究进展,重点关注其在微管功能调控、神经系统发育及相关疾病中的作用。

1 微管的组成及动态性

1.1 微管的组成

微管的组装经历了一系列过程。在合适的条件下, α/β 微管蛋白二聚体首尾相接组装成为原纤维,几根原纤维经过侧面接合形成片层。随着片层不断加宽最终闭合成相对稳定的短管,即成核。接着,在此基础上各原纤维长度不断增加,最终形成中空管状的微管结构。微管具有“极性”, α 微管蛋白朝向的一侧为“负端”, β 微管蛋白朝向的一侧为“正端”。在大多数细胞中微管的组装起始于微管组织中心,中心体便是常见的微管组织中心,由中心体发出的微管也被称为中心体微管。 γ 微管蛋白通常定位于微管负端,是微管组织中心的组成成分,在微管的成核和细胞极性中起着重要作用^[3]。细胞中也存在很多非中心体微管,微管负端结合蛋白如CAMSAP1-3等常常结合在这些微管负端,并保护负端不被解聚,这些微管起到一个“种子”的作用,在此基础上形成新的非中心体微管^[4]。

生物界中不同的物种构成微管的原纤维根数

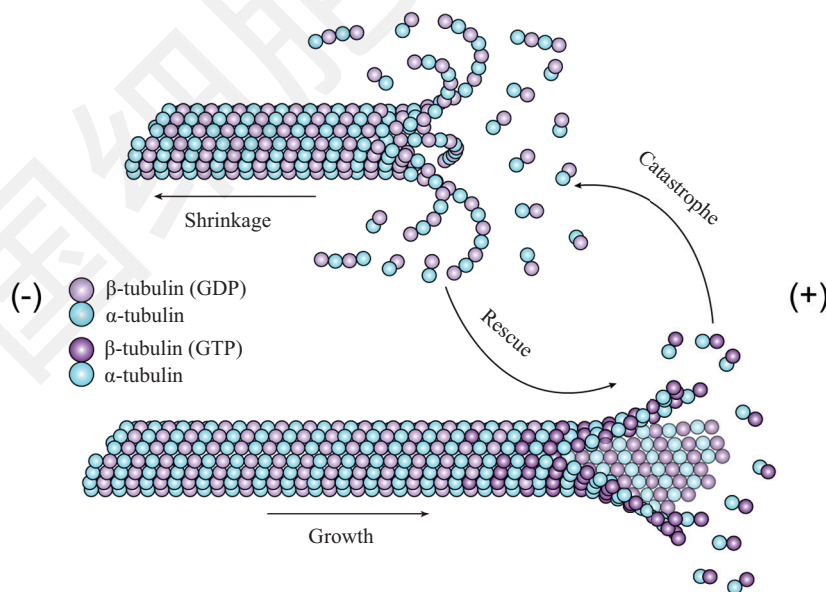
有很大的差异,如突柄杆菌属中的微管由4根原纤维构成,线虫中的微管大部分由11根原纤维构成,许多昆虫细胞中的微管由14~16根原纤维构成,螳螂精子中构成微管的原纤维根数多达40根^[5]。高等生物中的微管主要由13根原纤维构成,当13根原纤维构成微管时,每根原纤维可以与微管中心轴保持平行状态,当多于或少于13根时,每根原纤维则会处于超螺旋状态^[6]。一般细胞内的微管以单管存在,但纤毛和鞭毛中的微管可以形成二联管,在中心粒和基体中微管还可以形成三联管。

1.2 微管的动态性

微管的动态性或动态不稳定性,即微管聚合和解聚的特性(图1)^[7]。微管的主体主要是由二磷酸鸟苷(guanosine diphosphate, GDP)形式的 α/β 微管蛋白二聚体构成,三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate, GTP)形式的 α/β 微管蛋白二聚体主要集中在微管的末端,游离的GTP形式的 α/β 微管蛋白二聚体不断地结合到微管的末端,使得微管聚合生长。新增加的GTP形式的 α/β 微管蛋白二聚体会逐渐水解为GDP形式,当微管末端出现GDP形式的 α/β 微管蛋白二聚体,微管就容易发生快速解聚。微管由缓慢生长到快速解聚这一过程被称为“坍塌(catastrophe)”,由快速解聚到缓慢生长的过程被称为“挽救(rescue)”,挽

救事件多在体外研究中描述。体外研究微管动态性时,通常会在一段GMPCPP稳定的“种子”上加入游离的 α/β 微管蛋白二聚体,让微管在“种子”两端生长,通常生长较快的一段为微管正端,当发生坍塌时微管快速地解聚,如果微管未解聚到“种子”部分便转变为生长状态,这种现象即为挽救,如果解聚到微管“种子”部分再重新生长,该事件也是生长而不是挽救。

在体外微管的聚合实验中,一般通过微管生长速率、解聚速率、坍塌频率和挽救频率4个参数来指示微管的动态性^[8]。微管的生长速率与微管蛋白的浓度呈正相关,但解聚速率与微管蛋白浓度没有太大关系。微管的坍塌会随着微管蛋白浓度的增加而降低,呈负相关关系。坍塌事件发生比较随机,但通常生长时间较长的微管会比新生的微管更易发生坍塌,研究表明,GTP水解的情况与坍塌发生的频率有关^[9]。微管的挽救事件发生概率相对较低,微管解聚到某一部位,刚好此处的微管蛋白处于GTP状态,此时就可能发生挽救,使得微管再聚合起来。此外,微管结合蛋白如CLASP(CLIP-associating protein)等可以结合到微管主体上,阻止微管的解聚或将结合处的GDP形式的微管蛋白置换成GTP形式,最终使得微管在此处发生挽救^[10]。细胞内存在着很多的微



微管通过不断添加GTP形式的微管蛋白以及去除GDP形式的微管蛋白,从而发生聚合和解聚现象。微管由生长转变为缩短称为坍塌,微管由缩短转变为生长称为挽救。

Microtubules undergo polymerization and depolymerization by continuously adding GTP-tubulin dimers and removing GDP-tubulin dimers. The phenomenon of microtubule from growth to shrinkage is called catastrophe. The transition from shrinkage to growth is called rescue.

图1 微管动态不稳定性

Fig.1 Microtubule dynamic instability

管结合蛋白,使得微管在细胞内的生长速率及解聚速率比体外要快很多。

2 微管蛋白的结构和亚型

2.1 微管蛋白的分子结构

微管蛋白是一类含有多个成员的蛋白质家族,现已发现有 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 和 η 等多种微管蛋白^[11]。构成微管的主要成分是 α 微管蛋白和 β 微管蛋白,两者三维结构高度相似。

α/β 微管蛋白根据功能可分为3个结构域,即N-端、中间区和C-端结构域(图2)。N-端结构域(1–250氨基酸)由6个平行的 β 折叠(S1-S6)和6个 α 螺旋(H1-H6)形成Rossmann折叠,该折叠底部可与GTP结合^[12],其中环状区T1、T2、T3和富含甘氨酸的T4与GTP中的磷酸基团相互作用。中间区结构域(206–381氨基酸)由混合的 β 折叠和周围的5个 α 螺旋构成,其中M环就在该区域,M环可以与相邻微管蛋白的H1-S2环和H2-S3环相互作用,使相邻的微管原纤维稳定结合,进而形成闭合的微管。此外,该区域的S9-S10环,在 α 微管蛋白中该位置含有“TVVPGGDL”序列,导致在结构上 α 微管蛋白S9-S10环要比 β 微管蛋白更大一些,也是区分 α/β 微管蛋白的标志之一, β 微管蛋白在此处是结合Taxol的位点^[2,13]。C-端结构域(382–440氨基酸)是由两个反向平行的 α 螺旋(H11和H12)构成,该结构域游离在微管外侧可以与Tau、MAP2(microtubule-associated protein 2)、MAP1A(microtubule-associated protein 1a)、kinesins、dyneins等微管结合蛋白结合。多数 α 微管蛋白C末端有一个保守的酪氨酸,可以进行翻译后的去酪氨酸化。此外,有些 β 微管蛋白如神经特异的TUBB3,其C末端除了富含负电的氨基酸残基外还含有一个带正电的氨基酸残基。

2.2 微管蛋白亚型及其组织分布

微管蛋白由多个基因编码多种亚型,在物种之间具有很高的保守性。低等真核生物,如出芽酵母中有2个编码 α 微管蛋白和1个编码 β 微管蛋白的基因,构巢曲霉、单细胞藻类各有2个编码 α 和 β 微管蛋白的基因^[14],果蝇各有4个编码 α 和 β 微管蛋白的基因^[15],线虫中有9个编码 α 微管蛋白和6个编码 β 微管蛋白的基因^[16]。高等的脊椎动物有更多编码 α 和 β 微管蛋白的基因,如人类至少有8个编码 α 微管蛋白和9个编码 β 微管蛋白的基因^[17]。目前,人类

的8种 α 微管蛋白亚型,命名为TUBA1A、TUBA1B、TUBA1C、TUBA3C、TUBA3D、TUBA3E、TUBA4A和TUBA8,9种 β 微管蛋白命名为TUBB、TUBB1、TUBB2A、TUBB2B、TUBB3、TUBB4A、TUBB4B、TUBB6和TUBB8。小鼠的7种 α 微管蛋白亚型为TUBA1A、TUBA1B、TUBA1C、TUBA3A、TUBA3B、TUBA4A和TUBA8,8种 β 微管蛋白为TUBB1、TUBB2A、TUBB2B、TUBB3、TUBB4A、TUBB4B、TUBB5和TUBB6。

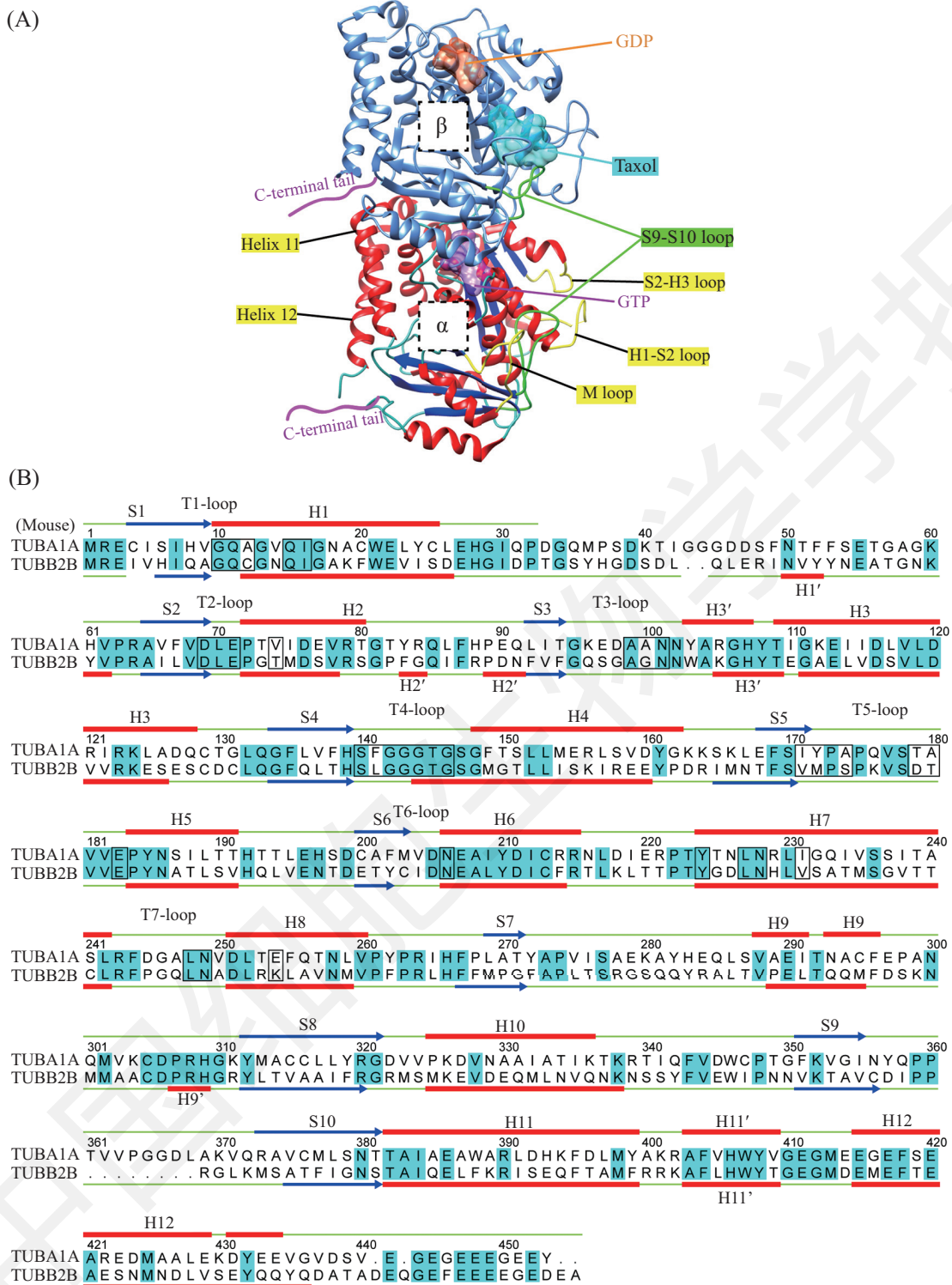
神经细胞、纤毛和鞭毛以及血小板边缘带等特殊的细胞和细胞内结构中均有特异的 β 微管蛋白亚型存在。TUBB3是神经元的一个标记蛋白,对于神经元中微管功能的发挥具有重要的作用^[18]。TUBB4在纤毛和鞭毛的微管中含量丰富,其功能仍不清楚^[19]。TUBB1则相对广泛分布于各组织中^[20],TUBB1对于血小板边缘带的形成也是必需的^[21]。在果蝇中,TBB2是特异表达于睾丸中,而TBB3则表达较广^[22]。

不同亚型之间在序列上也是高度保守的,其序列上的差别主要集中在C末端(图3)^[23]。C末端是微管蛋白发生翻译后修饰的主要位置,并且也是微管结合蛋白、驱动蛋白和动力蛋白结合的位置,因此不同的亚型可能具有不同的翻译后修饰特征,并能通过与其他蛋白的相互作用来调节微管的功能^[24]。

3 微管蛋白亚型对微管结构和功能的影响

3.1 微管蛋白亚型对微管结构的影响

微管蛋白多种亚型对微管复杂功能的调节主要基于对微管结构的影响。有研究利用昆虫细胞蛋白表达系统得到了较为单一的 α/β 微管蛋白亚型组合,如TUBA1A/TUBB3微管蛋白。TUBA1A/TUBB3微管蛋白组装的微管较从脑组织纯化的混合微管蛋白聚合的微管在结构上有明显的偏移。从上述两组微管中各取出1根原纤维,纵向排列并将其底部的 α 微管蛋白比对整齐,发现紧邻的TUBB3较脑组织混合的 β 微管蛋白向M环方向偏移了1.7 Å,向上第二个相邻的TUBA1A/TUBB3微管蛋白二聚体则会有3.4 Å的偏移,再向上的二聚体的偏移程度会更大,最终这些细微的结构差异会影响到微管的动态性。进一步研究还发现,在6.6 $\mu\text{mol/L}$ 的TUBA1A/TUBB3微管蛋白浓度下,以

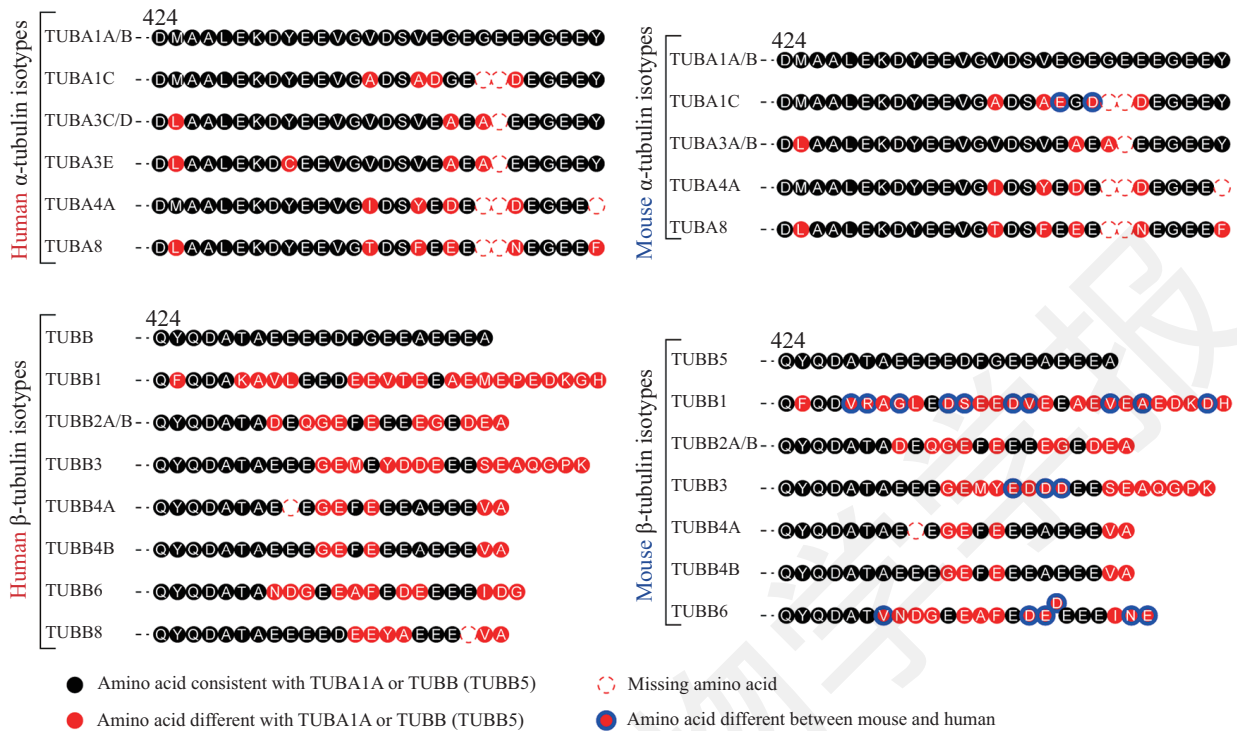


A: 在 α 微管蛋白上标记了一些重要的功能区域。H1-S2及H2-S3环位于微管蛋白N-端, M及S9-S10环位于中间区域, H11和H12螺旋位于C-端。 α/β 微管蛋白的C-端用粉色表示。B: α/β 微管蛋白的二级结构模式图, 两者的保守氨基酸为蓝绿色标记, 黑色矩形框标记的是直接与GTP/GDP和镁离子相互作用的氨基酸残基。

A: several important functional regions are highlighted in the α -tubulin. Loops H1-S2 and H2-S3 located in N-terminal domain, loop M and S9-S10 located in intermediate-domain, and the helices H11, H12 located in the C-terminal domain. The C-terminal tails of α/β -tubulin are schematically drawn in pink. B: secondary structure for α/β -tubulin. Conserved amino acids are highlighted in cyan. Boxed residues make direct contact with GTP/GDP and the magnesium ion.

图2 微管蛋白的异二聚体的晶体结构及二级结构

Fig.2 The heterodimer crystal structure and secondary structure of tubulin



从TUBA1A和TUBB(TUBB5)的第424个氨基酸开始, 比对了人类和小鼠中发现的所有微管蛋白亚型的氨基酸序列。

The amino acid sequences of all tubulins found in the human and mouse are indicated, starting at the 424th amino acid of TUBA1A and TUBB (TUBB5).

图3 微管蛋白亚型C-端的差异

Fig.3 Heterogeneity of C-terminal tails among tubulin isotypes

TUBA1A/TUBB3微管蛋白作为成核“种子”, 92%的“种子”可以继续聚合形成微管, 而以脑组织微管蛋白作为成核“种子”, 仅有33%的“种子”可以继续聚合形成微管, 这也表明两者结构上的细微不同可以影响微管的形成^[25]。

研究发现, 从主要表达TUBA1B和TUBB1、TUBB4微管蛋白亚型的tsA201细胞中纯化出微管蛋白, 组装的微管与从脑组织纯化的微管蛋白组装的微管在结构上很相似。在4.2 Å的分辨率下, 微管蛋白二聚体横向接触面和纵向接触面均没有显著差异。TUBA1B和TUBB1、TUBB4所组成的微管, 其微管蛋白二聚体长度为(83.4±0.1) Å, 比从脑组织中纯化的微管蛋白亚型组装的微管蛋白二聚体(83.1±0.0) Å略微长一点。电镜下观察微管的动态末端, 发现TUBA1B和TUBB1、TUBB4所组成的微管末端未闭合微管原纤维长度较脑微管的末端更短。动态的微管在解聚时, 微管原纤维会分散开, 并发生弯曲, 随后微管蛋白二聚体会从这些弯曲的微管原纤维末端解离下来。紧靠这些弯曲微管原纤维端的闭合微管被称为微管蛋白环。TUBA1B和

TUBB1、TUBB4所组成微管的微管蛋白环直径为(41.0±0.2) nm, 显著大于脑微管(36.4±0.3) nm^[26]。

体外聚合形成的微管原纤维根数为9~16根不等, 其中大多数由14根原纤维组成^[27]。近期有研究纯化了线虫中的微管蛋白, 在体外进行聚合形成的微管中, 发现更多的由11根原纤维构成^[28]。Ti等^[29]通过从昆虫细胞中表达和纯化人源的TUBA1B/TUBB2B和TUBA1B/TUBB3, 发现在体外TUBA1B/TUBB2B形成的微管主要由14根原纤维构成, 而TUBA1B/TUBB3形成的微管则主要由13根原纤维构成。这也进一步表明, 不同的微管蛋白亚型所形成的微管结构有所不同。

3.2 微管蛋白亚型对微管功能的影响

微管功能的发挥主要基于微管的动态性。微管体外组装实验表明, 不同的微管蛋白亚型组装成微管的动态性存在差异, 其中神经系统特异性分布的TUBB3较TUBB2、TUBB4或混合的微管坍塌频率更快, 即微管动态性更高^[30]。近年来, 随着蛋白纯化技术的发展, 研究人员可以得到较纯的α/β微管蛋白亚型组合, 再次证明由TUBB3形成的

微管较其他 β 微管蛋白亚型所组成的微管坍塌频率更高, TUBA1B/TUBB3形成的微管较TUBA1B/TUBB2B形成的微管动态性更高; 进一步研究表明, TUBB3和TUBB2B控制微管性质的结构域是其核心部分, 而并非其同源性最低的C末端^[31]。从主要表达TUBA1B、TUBB1和TUBB4微管蛋白亚型的tsA 201细胞中纯化得到的微管蛋白, 其形成的微管生长速率和解聚速率均较包含更多微管蛋白亚型形成的微管快, 而其坍塌频率更低^[26]。从线虫中纯化的微管蛋白组装的微管较从脑组织纯化的微管蛋白形成的微管生长速率更快, 且坍塌频率更高^[28]。

与 β 微管蛋白相比, α 微管蛋白亚型序列更加保守, 其对微管功能的研究也较少。有研究发现, 线虫中TBA6对雄性头部神经元(cephalic male neuron, CEM)中的二联管分开为A、B单管是必需的^[32]。也有研究报道, 线虫中TBA1和TBA2对微管的动态性贡献不同, 相比于TBA1和TBB1组成的微管, TBA2和TBB1组成的微管生长速度更快, 而TBB1形成的微管比TBB2动态性更高^[33]。这些研究都表明, 不同的微管蛋白亚型组装的微管在功能上是有差异的。

4 微管蛋白亚型在神经系统发育及相关疾病中的作用

4.1 微管蛋白亚型在神经系统发育中的作用

神经元富含微管, 微管在神经元发育过程中具有重要的作用, 如神经元极性的建立、形态形成、迁移等。微管在神经元中有特异的排列分布。研究发现, 低等动物(如果蝇和线虫)神经元轴突中微管呈平行排列且正端在轴突远端, 树突中微管呈平行排列且正端在近胞体端^[34]。在高等的哺乳动物神经元轴突中, 微管呈平行排列且正端在轴突远端, 而近胞体端的树突中微管的排列顺序则是混合的, 微管在神经元中的这种分布与细胞中的物质运输及信号传递密切相关^[35]。

在斑马鱼胚胎发育过程中, 下调基因*Tubala*的表达会严重影响其发育, 尤其是脑和视网膜前端结构的发育, 而下调基因*Tubalb*则不会出现这种情况^[36]。*Tubb2b*在胚胎时期高表达, 出生后则表达量显著下降。研究发现, 利用胚胎电转敲减胚胎大鼠脑中的*Tubb2b*表达, 会影响皮层神经元的迁移^[37]。对于神经元特异表达的*Tubb3*, 胎鼠脑中下调*Tubb3*会抑制神经元的迁移, 并且这种作用不能被其他的 β 微管蛋

白亚型如*Tubb1*、*Tubb2b*和*Tubb4a*所挽救^[38]。也有研究报道, 在胎鼠脑中敲减*Tubb5*会抑制皮层神经元的迁移, 影响神经元的形态, 会导致树突分枝增多^[39]。各种微管蛋白亚型的协同表达对神经系统的正常发育至关重要。

4.2 微管蛋白亚型突变在神经系统发育相关疾病中的作用及机制

一些研究发现, 多种微管蛋白亚型的突变可导致神经系统发育及神经退行性疾病, 这些疾病被统称为“微管蛋白疾病”, 这些疾病的发生也突出了微管在神经系统中的重要作用。根据微管蛋白的结构图谱, 微管蛋白亚型的突变位点可以发生在微管蛋白的多个部位, 一方面影响微管本身的动态性, 另一方面影响微管与微管结合蛋白的相互作用。研究发现, TUBA1A、TUBA4A、TUBB2B、TUBB3、TUBB2A、TUBB5、TUBB4A和TUBB8突变(表1)可以导致多种疾病的发生, 且主要集中在神经系统发育异常^[2]。

TUBA1A是存在最广泛的 α 微管蛋白, 且丰度较高, 目前发现的微管蛋白疾病中有42.5%与TUBA1A的突变相关。TUBA1A中的一些点突变会引起无脑回、脑回增厚、多小脑回以及其他一些皮层发育异常的疾病^[73]。研究发现, TUBA1A突变体N102D对运动神经元轴突的生长、神经肌肉连接和突触的功能均有影响。高通量测序研究发现, 在脊髓侧索硬化症(amytrophic lateral sclerosis, ALS)患者中*TUBA4A*基因存在多个点突变, 这些突变的TUBA4A整合到微管中会使微管网络不稳定, 并且会阻碍微管的重新聚合, 这也提示, *TUBA4A*可能是ALS的一个致病基因^[53]。

TUBB中的点突变会造成环形皮肤褶皱, 同时患者常常伴有智力障碍, 可能是由于TUBB1突变造成神经系统功能缺陷所致^[56]。TUBB2B的点突变会引起多小脑回畸形, TUBB3的部分点突变也可引起多小脑回畸形^[23]。有研究发现, TUBB2B突变可引起神经元过度迁移和放射状胶质细胞形态出现异常^[37]。也有研究报道, TUBB5在神经前体细胞中有表达, 在小鼠中下调该分子会阻碍神经前体细胞周期, 并影响神经元的迁移。在小头畸形的病人中发现了TUBB5的一些点突变(M299V、V353I、E401K), 这些突变会影响分子伴侣介导的微管蛋白异二聚体的形成, 从而影响神经元的迁移等^[55]。

TUBB3作为神经元特异表达的微管蛋白亚型, 其突变会影响微管的动态性和轴突的发育, 引

表1 人类微管蛋白亚型的致病突变位点
Table 1 Pathogenic mutations of human tubulin isotypes

微管蛋白亚型 Tubulin isotype	疾病 Disease	突变位点 Mutation	参考文献 Reference
TUBA1A	Lissencephaly, olivomicrogyria	I5L, E55K, T56M, L70S, P72S, L92V, N101S, E113K, R123C, V137D, S158L, Y161H, I188L, C200Y, Y210C, R214H, D218Y, I219V, V235L, I238V, P263T, R264C/H, A270T, L286F, V303G, R320H, K326N, N329S, A333V, V353I, G366R, A369T, V371E, M377V, R390C/H, D396Y, L397P, R402C/H/L, V409A/I, S419L, R422C/H, M425K, E429Q, G436R	[40-51]
TUBA3E	Microisencephaly, global developmental delay	R215C	[52]
TUBA4A	Amyotrophic lateral sclerosis	T145P, R215C, R320C, R320H, A383T, W407X	[53]
TUBA8	Polymicrogyria with optic nerve hypoplasia	14 base pair deletion	[54]
TUBB	Circumferential skin creases Kunze type, microcephaly	E15K, Y222F, M299V, V353I, E401K	[55-56]
TUBB1	Macrothrombocytopenia	R318W, F260S	[57-58]
TUBB2A	Cortical dysplasia, epilepsy	N247K, A248V	[59]
TUBB2B	Polymicrogyria, microlissencephaly	G98R, L117P, G140A, S172P, L207P, I210T, L228P, C239F, A248V, N256S, F265L, T312M, R380C/S/L, D417N, E421K	[37,40,60-63]
TUBB3	Malformations of cortical development, congenital fibrosis of extraocular muscle type 3	G82R, F178M, E205K, A302V, M323V, M388V, E288K, P357L, R62Q, R262C/H, A302T, R380C, E410K, D417N/H, G71R, G98S	[23,49,64-65]
TUBB4A	Dystonia, leukoencephalopathy	R2G, A271T, D249N	[66-68]
TUBB4B	Leber congenital amaurosis	R391C, R391H	[69]
TUBB6	Facial palsy	F394S	[70]
TUBB8	Oocyte maturation defect	R2K, S176L, I210V, V229A, T238M, R262Q, M300I, M363T, D417N	[71-72]

发眼外肌硬化和胼胝体以及皮层的发育不全等多种神经系统疾病^[2]。具有E410K、D417H及D417N点突变的TUBB3可以整合到微管网络中,进而会影响微管与一些驱动蛋白如KIF21A的结合,从而导致一些蛋白“货物”的运输受阻,最终导致疾病的发生^[23,75]。

体外实验发现, TUBB3的突变体D417H和R262H会导致微管的“坍塌”频率降低,且微管正负端的存活时间更长,致使微管本身的性质发生了变化^[76]。也有研究报道, TUBB3的突变体R262H及R262A会影响驱动蛋白的活动能力和ATP酶活性,通过表达突变的驱动蛋白可以挽救TUBB3突变体所造成的表型^[77]。这些都提示,微管蛋白亚型突变体一方面影响微管的动态性,另一方面影响微管与结合蛋白的结合,最终导致疾病的发生。

5 总结与展望

微管蛋白亚型对微管功能的发挥具有重要的

调控作用,主要体现在对微管的动态性及功能的影响。然而,微管蛋白亚型对微管功能的调控作用及机制尚不完全清楚。体外纯化不同的微管蛋白亚型,结合微管的体外组装实验,可以检测不同的微管蛋白亚型对微管结构和功能的影响。同时,不同微管蛋白亚型在细胞、组织和个体水平的功能还需要进一步探讨。利用CRISPR/Cas9等基因编辑的方法,再结合超高分辨实时显微成像技术,可以在细胞内观察不同微管蛋白亚型的分布和组装微管的功能。此外,结合体外和体内的检测技术,解析不同的微管蛋白亚型致病突变体对微管和细胞功能的影响,将进一步揭示“微管蛋白疾病”致病机理,为诊断和治疗提供一定的理论基础。

参考文献 (Reference)

- 1 Nogales E. Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 277-302.
- 2 Chakraborti S, Natarajan K, Curiel J, Janke C, Liu J. The emerging role of the tubulin code: From the tubulin molecule to neuro-

- nal function and disease. *Cytoskeleton* (Hoboken) 2016; 73(10): 521-50.
- 3 Paluh JL, Nogales E, Oakley BR, McDonald K, Pidoux AL, Cande WZ. A mutation in gamma-tubulin alters microtubule dynamics and organization and is synthetically lethal with the kinesin-like protein pkl1p. *Mol Biol Cell* 2000; 11(4): 1225-39.
 - 4 Pongrakhananon V, Saito H, Hiver S, Abe T, Shioi G, Meng W, *et al.* CAMSAP3 maintains neuronal polarity through regulation of microtubule stability. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018; 115(39): 9750-5.
 - 5 Chaaban S, Brouhard GJ. A microtubule bestiary: structural diversity in tubulin polymers. *Mol Biol Cell* 2017; 28(22): 2924-31.
 - 6 Amos LA, Schlieper D. Microtubules and maps. *Adv Protein Chem* 2005; 71: 257-98.
 - 7 Zwetsloot AJ, Tut G, Straube A. Measuring microtubule dynamics. *Essays Biochem* 2018; 62(6): 725-35.
 - 8 Bowne-Anderson H, Zanic M, Kauer M, Howard J. Microtubule dynamic instability: a new model with coupled GTP hydrolysis and multistep catastrophe. *Bioessays* 2013; 35(5): 452-61.
 - 9 Hyman AA, Salsler S, Drechsel DN, Unwin N, Mitchison TJ. Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *Mol Biol Cell* 1992; 3(10): 1155-67.
 - 10 Aher A, Kok M, Sharma A, Rai A, Olieric N, Rodriguez-Garcia R, *et al.* CLASP suppresses microtubule catastrophes through a single TOG domain. *Dev Cell* 2018; 46: 40-58.e8.
 - 11 Luduena RF. A hypothesis on the origin and evolution of tubulin. *Int Rev Cell Mol Biol* 2013; 302: 41-185.
 - 12 Nogales E, Wolf SG, Downing KH. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 1998; 391(6663): 199-203.
 - 13 Lowe J, Li H, Downing KH, Nogales E. Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution. *J Mol Biol* 2001; 313(5): 1045-57.
 - 14 Minoura I. Towards an understanding of the isotype-specific functions of tubulin in neurons: Technical advances in tubulin expression and purification. *Neurosci Res* 2017; 122: 1-8.
 - 15 Fackenthal JD, Turner FR, Raff EC. Tissue-specific microtubule functions in *Drosophila* spermatogenesis require the beta 2-tubulin isotype-specific carboxy terminus. *Dev Biol* 1993; 158(1): 213-27.
 - 16 Gogonea CB, Gogonea V, Ali YM, Merz KM, Jr., Siddiqui SS. Computational prediction of the three-dimensional structures for the *Caenorhabditis elegans* tubulin family. *J Mol Graph Model* 1999; 17(2): 90-100, 26-30.
 - 17 Breuss M, Keays DA. Microtubules and neurodevelopmental disease: the movers and the makers. *Adv Exp Med Biol* 2014; 800: 75-96.
 - 18 Lewis SA, Lee MG, Cowan NJ. Five mouse tubulin isotypes and their regulated expression during development. *J Cell Biol* 1985; 101(3): 852-61.
 - 19 Renthall R, Schneider BG, Miller MM, Luduena RF. Beta IV is the major beta-tubulin isotype in bovine cilia. *Cell Motil Cytoskeleton* 1993; 25(1): 19-29.
 - 20 Leandro-Garcia LJ, Leskela S, Landa I, Montero-Conde C, Lopez-Jimenez E, Leton R, *et al.* Tumoral and tissue-specific expression of the major human beta-tubulin isotypes. *Cytoskeleton* (Hoboken) 2010; 67(4): 214-23.
 - 21 Lecine P, Italiano JE, Jr., Kim SW, Villeval JL, Shivdasani RA. Hematopoietic-specific beta 1 tubulin participates in a pathway of platelet biogenesis dependent on the transcription factor NF-E2. *Blood* 2000; 96(4): 1366-73.
 - 22 Hoyle HD, Raff EC. Two *Drosophila* beta tubulin isoforms are not functionally equivalent. *J Cell Biol* 1990; 111(3): 1009-26.
 - 23 Tischfield MA, Baris HN, Wu C, Rudolph G, Van Maldergem L, He W, *et al.* Human TUBB3 mutations perturb microtubule dynamics, kinesin interactions, and axon guidance. *Cell* 2010; 140(1): 74-87.
 - 24 Janke C, Bulinski JC. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12(12): 773-86.
 - 25 Vemu A, Atherton J, Spector JO, Szyk A, Moores CA, Roll-Mecak A. Structure and dynamics of single-isoform recombinant neuronal human tubulin. *J Biol Chem* 2016; 291(25): 12907-15.
 - 26 Vemu A, Atherton J, Spector JO, Moores CA, Roll-Mecak A. Tubulin isoform composition tunes microtubule dynamics. *Mol Biol Cell* 2017; 28(25): 3564-72.
 - 27 Pierson GB, Burton PR, Himes RH. Alterations in number of protofilaments in microtubules assembled *in vitro*. *J Cell Biol* 1978; 76(1): 223-8.
 - 28 Chaaban S, Jariwala S, Hsu CT, Redemann S, Kollman JM, Muller-Reichert T, *et al.* The structure and dynamics of *C. elegans* tubulin reveals the mechanistic basis of microtubule growth. *Dev Cell* 2018; 47: 191-204.e8.
 - 29 Ti SC, Alushin GM, Kapoor TM. Human beta-tubulin isotypes can regulate microtubule protofilament number and stability. *Dev Cell* 2018; 47: 175-90.e5.
 - 30 Banerjee A, Roach MC, Trcka P, Luduena RF. Preparation of a monoclonal antibody specific for the class IV isotype of beta-tubulin. purification and assembly of alpha beta II, alpha beta III, and alpha beta IV tubulin dimers from bovine brain. *J Biol Chem* 1992; 267(8): 5625-30.
 - 31 Pamula MC, Ti SC, Kapoor TM. The structured core of human beta tubulin confers isotype-specific polymerization properties. *J Cell Biol* 2016; 213: 425-33.
 - 32 Silva M, Morsci N, Nguyen KC, Rizvi A, Rongo C, Hall DH, *et al.* Cell-specific alpha-tubulin isotype regulates ciliary microtubule ultrastructure, intraflagellar transport, and extracellular vesicle biology. *Curr Biol* 2017; 27(7): 968-80.
 - 33 Honda Y, Tsuchiya K, Sumiyoshi E, Haruta N, Sugimoto A. Tubulin isotype substitution revealed that isotype combination modulates microtubule dynamics in *C. elegans* embryos. *J Cell Sci* 2017; 130(9): 1652-61.
 - 34 Kapitein LC, Hoogenraad CC. Building the neuronal microtubule cytoskeleton. *Neuron* 2015; 87(3): 492-506.
 - 35 Maeder CI, Shen K, Hoogenraad CC. Axon and dendritic trafficking. *Curr Opin Neurobiol* 2014; 27: 165-70.
 - 36 Veldman MB, Bemben MA, Goldman D. Tuba1a gene expression is regulated by KLF6/7 and is necessary for CNS development and regeneration in zebrafish. *Mol Cell Neurosci* 2010; 43(4): 370-83.
 - 37 Jaglin XH, Poirier K, Saillour Y, Buhler E, Tian G, Bahi-Buisson N, *et al.* Mutations in the beta-tubulin gene *TUBB2B* result in

- asymmetrical polymicrogyria. *Nat Genet* 2009; 41(6): 746-52.
- 38 Saillour Y, Broix L, Bruel-Jungerman E, Lebrun N, Muraca G, Rucci J, *et al.* Beta tubulin isoforms are not interchangeable for rescuing impaired radial migration due to *Tubb3* knockdown. *Hum Mol Genet* 2014; 23(6): 1516-26.
- 39 Ngo L, Haas M, Qu Z, Li SS, Zenker J, Teng KS, *et al.* *TUBB5* and its disease-associated mutations influence the terminal differentiation and dendritic spine densities of cerebral cortical neurons. *Hum Mol Genet* 2014; 23(19): 5147-58.
- 40 Cushion TD, Dobyns WB, Mullins JG, Stoodley N, Chung SK, Fry AE, *et al.* Overlapping cortical malformations and mutations in *TUBB2B* and *TUBA1A*. *Brain* 2013; 136(Pt 2): 536-48.
- 41 Fallet-Bianco C, Laquerriere A, Poirier K, Razavi F, Guimiot F, Dias P, *et al.* Mutations in tubulin genes are frequent causes of various foetal malformations of cortical development including microlissencephaly. *Acta Neuropathol Commun* 2014; 2: 69.
- 42 Fallet-Bianco C, Loeuillet L, Poirier K, Loget P, Chapon F, Pasquier L, *et al.* Neuropathological phenotype of a distinct form of lissencephaly associated with mutations in *TUBA1A*. *Brain* 2008(Pt 9); 131: 2304-20.
- 43 Hikita N, Hattori H, Kato M, Sakuma S, Morotomi Y, Ishida H, *et al.* A case of *TUBA1A* mutation presenting with lissencephaly and Hirschsprung disease. *Brain Dev* 2014; 36(2): 159-62.
- 44 Jansen AC, Oostra A, Desprechins B, De Vlaeminck Y, Verhelst H, Regal L, *et al.* *TUBA1A* mutations: from isolated lissencephaly to familial polymicrogyria. *Neurology* 2011; 76(11): 988-92.
- 45 Kumar RA, Pilz DT, Babatz TD, Cushion TD, Harvey K, Topf M, *et al.* *TUBA1A* mutations cause wide spectrum lissencephaly(smooth brain) and suggest that multiple neuronal migration pathways converge on alpha tubulins. *Hum Mol Genet* 2010; 19(14): 2817-27.
- 46 Lecourtois M, Poirier K, Friocourt G, Jaglin X, Goldenberg A, Saugier-Verber P, *et al.* Human lissencephaly with cerebellar hypoplasia due to mutations in *TUBA1A*: expansion of the foetal neuropathological phenotype. *Acta Neuropathol* 2010; 119(6): 779-89.
- 47 Mokanszki A, Korhegyi I, Szabo N, Bereg E, Gergev G, Balogh E, *et al.* Lissencephaly and band heterotopia: *LIS1*, *TUBA1A*, and *DCX* mutations in Hungary. *J Child Neurol* 2012; 27(12): 1534-40.
- 48 Morris-Rosendahl DJ, Najm J, Lachmeijer AM, Sztrihla L, Martins M, Kuechler A, *et al.* Refining the phenotype of alpha-1a Tubulin(*TUBA1A*) mutation in patients with classical lissencephaly. *Clin Genet* 2008; 74(5): 425-33.
- 49 Oegema R, Cushion TD, Phelps IG, Chung SK, Dempsey JC, Collins S, *et al.* Recognizable cerebellar dysplasia associated with mutations in multiple tubulin genes. *Hum Mol Genet* 2015; 24(18): 5313-25.
- 50 Poirier K, Keays DA, Francis F, Saillour Y, Bahi N, Manouvrier S, *et al.* Large spectrum of lissencephaly and pachygyria phenotypes resulting from *de novo* missense mutations in tubulin alpha 1A(*TUBA1A*). *Hum Mutat* 2007; 28(11): 1055-64.
- 51 Poirier K, Saillour Y, Fourniol F, Francis F, Souville I, Valence S, *et al.* Expanding the spectrum of *TUBA1A*-related cortical dysgenesis to polymicrogyria. *Eur J Hum Genet* 2013; 21(4): 381-5.
- 52 Alazami AM, Patel N, Shamseldin HE, Anazi S, Al-Dosari MS, Alzahrani F, *et al.* Accelerating novel candidate gene discovery in neurogenetic disorders via whole-exome sequencing of prescreened multiplex consanguineous families. *Cell Rep* 2015; 10(2): 148-61.
- 53 Smith BN, Ticozzi N, Fallini C, Gkazi AS, Topp S, Kenna KP, *et al.* Exome-wide rare variant analysis identifies *TUBA4A* mutations associated with familial ALS. *Neuron* 2014; 84(2): 324-31.
- 54 Abdollahi MR, Morrison E, Sirey T, Molnar Z, Hayward BE, Carr IM, *et al.* Mutation of the variant alpha-tubulin *TUBA8* results in polymicrogyria with optic nerve hypoplasia. *Am J Hum Genet* 2009; 85(5): 737-44.
- 55 Breuss M, Heng JI, Poirier K, Tian G, Jaglin XH, Qu Z, *et al.* Mutations in the beta-tubulin gene *TUBB5* cause microcephaly with structural brain abnormalities. *Cell Rep* 2012; 2(6): 1554-62.
- 56 Isrie M, Breuss M, Tian G, Hansen AH, Cristofoli F, Morandell J, *et al.* Mutations in Either *TUBB* or *MAPRE2* Cause Circumferential Skin Creases Kunze Type. *Am J Hum Genet* 2015; 97(6): 790-800.
- 57 Kunishima S, Kobayashi R, Itoh TJ, Hamaguchi M, Saito H. Mutation of the beta1-tubulin gene associated with congenital macrothrombocytopenia affecting microtubule assembly. *Blood* 2009; 113(3): 458-61.
- 58 Kunishima S, Nishimura S, Suzuki H, Imaizumi M, Saito H. *TUBB1* mutation disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia. *Eur J Haematol* 2014; 92(4): 276-82.
- 59 Cushion TD, Paciorkowski AR, Pilz DT, Mullins JG, Seltzer LE, Marion RW, *et al.* *De novo* mutations in the beta-tubulin gene *TUBB2A* cause simplified gyral patterning and infantile-onset epilepsy. *Am J Hum Genet* 2014; 94(4): 634-41.
- 60 Cederquist GY, Luchniak A, Tischfield MA, Peeva M, Song Y, Menezes MP, *et al.* An inherited *TUBB2B* mutation alters a kinesin-binding site and causes polymicrogyria, CFEOM and axon dysinnervation. *Hum Mol Genet* 2012; 21(26): 5484-99.
- 61 Guerrini R, Mei D, Cordelli DM, Pucatti D, Franzoni E, Parrini E. Symmetric polymicrogyria and pachygyria associated with *TUBB2B* gene mutations. *Eur J Hum Genet* 2012; 20(9): 995-8.
- 62 Amrom D, Tanyalcin I, Verhelst H, Deconinck N, Brouhard GJ, Decarie JC, *et al.* Polymicrogyria with dysmorphic basal ganglia? Think tubulin! *Clin Genet* 2014; 85(2): 178-83.
- 63 Bahi-Buisson N, Poirier K, Fourniol F, Saillour Y, Valence S, Lebrun N, *et al.* The wide spectrum of tubulinopathies: what are the key features for the diagnosis? *Brain* 2014; 137(Pt 6): 1676-700.
- 64 Poirier K, Saillour Y, Bahi-Buisson N, Jaglin XH, Fallet-Bianco C, Nabbout R, *et al.* Mutations in the neuronal ss-tubulin subunit *TUBB3* result in malformation of cortical development and neuronal migration defects. *Hum Mol Genet* 2010; 19(22): 4462-73.
- 65 Whitman MC, Andrews C, Chan WM, Tischfield MA, Stasheff SF, Brancati F, *et al.* Two unique *TUBB3* mutations cause both CFEOM3 and malformations of cortical development. *Am J Med Genet A* 2016; 170a(2): 297-305.
- 66 Hersheshon J, Mencacci NE, Davis M, MacDonald N, Trabzuni D, Ryten M, *et al.* Mutations in the autoregulatory domain of beta-tubulin 4a cause hereditary dystonia. *Ann Neurol* 2013; 73(4): 546-53.
- 67 Lohmann K, Wilcox RA, Winkler S, Ramirez A, Rakovic A, Park JS, *et al.* Whispering dysphonia (DYT4 dystonia) is caused by a muta-

- tion in the TUBB4 gene. *Ann Neurol* 2013; 73(4): 537-45.
- 68 Simons C, Wolf NI, McNeil N, Caldovic L, Devaney JM, Takanoashi A, *et al.* A *de novo* mutation in the beta-tubulin gene TUBB4A results in the leukoencephalopathy hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum. *Am J Hum Genet* 2013; 92(5): 767-73.
- 69 Luscan R, Mechaussier S, Paul A, Tian G, Gerard X, Defoort-Dellhemmes S, *et al.* Mutations in TUBB4B Cause a Distinctive Sensorineural Disease. *Am J Hum Genet* 2017; 101(6): 1006-12.
- 70 Fazeli W, Herkenrath P, Stiller B, Neugebauer A, Fricke J, Lang-Roth R, *et al.* A TUBB6 mutation is associated with autosomal dominant non-progressive congenital facial palsy, bilateral ptosis and velopharyngeal dysfunction. *Hum Mol Genet* 2017; 26(20): 4055-66.
- 71 Feng R, Sang Q, Kuang Y, Sun X, Yan Z, Zhang S, *et al.* Mutations in TUBB8 and human oocyte meiotic arrest. *N Engl J Med* 2016; 374(3): 223-32.
- 72 Feng R, Yan Z, Li B, Yu M, Sang Q, Tian G, *et al.* Mutations in TUBB8 cause a multiplicity of phenotypes in human oocytes and early embryos. *J Med Genet* 2016; 53(10): 662-71.
- 73 Minoura I. Towards an understanding of the isotype-specific functions of tubulin in neurons: Technical advances in tubulin expression and purification. *Neurosci Res* 2017.
- 74 Gartz Hanson M, Aiken J, Sietsema DV, Sept D, Bates EA, Niswander L, *et al.* Novel alpha-tubulin mutation disrupts neural development and tubulin proteostasis. *Dev Biol* 2016; 409(2): 406-19.
- 75 Niwa S, Takahashi H, Hirokawa N. beta-Tubulin mutations that cause severe neuropathies disrupt axonal transport. *EMBO J* 2013; 32(10): 1352-64.
- 76 Ti SC, Pamula MC, Howes SC, Duellberg C, Cade NI, Kleiner RE, *et al.* Mutations in human tubulin proximal to the kinesin-binding site alter dynamic instability at microtubule plus- and minus-ends. *Dev Cell* 2016; 37(1): 72-84.
- 77 Minoura I, Takazaki H, Ayukawa R, Saruta C, Hachikubo Y, Uchimura S, *et al.* Reversal of axonal growth defects in an extraocular fibrosis model by engineering the kinesin-microtubule interface. *Nat Commun* 2016; 7: 10058.