

细胞周期蛋白和细胞周期

陈寒柏 左嘉客

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

细胞周期蛋白 (cyclins, 简称周期蛋白) 是一类随细胞周期变化周而复始出现和消失的蛋白质。1983 年由 T.Hint 实验室首先在海胆卵中发现^[1]。当时发现有两种周期蛋白, 分子量分别为 55 kD 和 42 kD, 分子量较大的称为周期蛋白 A, 较小的称为周期蛋白 B。之后分别

制备了周期蛋白 A 和 B 的单克隆抗体, 并克隆了基因。它们的组成和功能存在有细小的差异。通过分子生物学的方法, 发现在其他许多生物中有各自的周期蛋白 A 和 B^[2,3], 某些生物还有其他的周期蛋白(表)。对于它们的功能已研究得较为详细。

表 周期蛋白的分类和作用

周期蛋白的种类	来源	分子量	作用时期	结合蛋白	作用功能
A	人	60 kD	G ₁ →S, G ₂ →M	cdc 2/p ³³ (CDK 2)/E 2 F	DNA 复制/转录/蛋白水解
	非洲爪蟾	45 kD	G ₂ →M	cdc 2/CDK 2	蛋白水解
	蛤蜊	55 kD	G ₂ →M	cdc 2	蛋白水解
	果蝇	57 kD* 59—61 kD	G ₂ →M	cdc 2	蛋白水解
B	人(B 1, B 2)	62 kD	G ₁ →M	cdc 2	转录/蛋白水解
	非洲爪蟾(B 1, B 2)	45 kD	G ₂ →M	cdc 2	蛋白水解
	海星	60 kD	G ₂ →M	cdc 2	蛋白水解
	蛤蜊	?	G ₂ →M	cdc 2	蛋白水解
	果蝇	61 kD* 64 kD	G ₂ →M	cdc 2	蛋白水解
	裂殖酵母	60 kD*	G ₂ →M	cdc 2	蛋白水解
	芽生酵母	?	G ₂ →M	cdc 28	蛋白水解
C	人	34.5 kD*	G ₁	cdc 2/CDK?	转录
D	人	33.6 kD*	G ₁	CDK?	转录
E	人	45 kD*	G ₁	cdc 2?/CDK 2?	转录
CLN 1	芽生酵母	62 kD*	G ₁	cdc 28	转录
CLN 2	芽生酵母	62 kD*	G ₁	cdc 28	转录
CLN 3	芽生酵母	?	G ₁	cdc 28	转录

* 为以核苷酸序列推得的蛋白质分子量。

在酵母中发现了3个和 $G_1 \rightarrow S$ 期过渡有关的基因——CLN 1、CLN 2 和 CLN 3^[4]。CLN 1-3 基因均突变的酵母不能实现 $G_1 \rightarrow S$ 期的过渡。通过对 CLN 基因突变的酵母挽救的筛选方法从人的基因库中筛得3个基因，它们均与人体细胞 $G_1 \rightarrow S$ 期的过渡有关，其产物被分别命名为周期蛋白 C、D 和 E(表 1)^[5-7]。在其他生物中也找到了上述对应物。由于最早发现的周期蛋白是与 $G_2 \rightarrow M$ 期过渡有关，因此将这些与 $G_2 \rightarrow M$ 期过渡有关的周期蛋白仍称作为周期蛋白，而那些与 $G_1 \rightarrow S$ 期过渡有关的周期蛋白称作为 G_1 周期蛋白。

近来，不少文章已将注意力集中在周期蛋白如何参与细胞周期调控这一令人感兴趣的问题上。就这一问题，本文侧重介绍细胞周期蛋白与细胞周期各阶段过渡的关系。

一、 $G_2 \rightarrow M$ 期的过渡——周期蛋白参与 MPF 的活化

1988年，美国 Maller 实验室从非洲爪蟾的卵母细胞中分离到能使细胞从 G_2 向 M 期过渡的物质 MPF (Maturation Promoting Factor, 亦称 M-phase Promoting Factor)，并证明它是由两个亚单位组成，其催化亚单位是 $p34^{cdc2}$ ，其调节亚单位就是周期蛋白^[8]。

研究表明：在和周期蛋白结合之前， $p34^{cdc2}$ 是处于一种无活性的去磷酸化状态。结合之后，周期蛋白能诱使 $p34^{cdc2}$ 磷酸化^[9]，但是这个磷酸化状态的维持时间很短暂。不久 $p34^{cdc2}$ 再去磷酸化，成为有活性的 MPF^[10]。为了区别于有活性的 MPF，将任何无活性的周期蛋白- $p34^{cdc2}$ 复合物称为 MPF 前体 (pre-MPF)。

在 MPF 的活化过程中，周期蛋白究竟起了什么作用呢？目前的研究发现， $p34^{cdc2}$ 与周期蛋白结合是形成 MPF 的前提，但 MPF 的活化和周期蛋白的磷酸化并无直接联系^[11]。在爪蟾卵母细胞中， $p34^{cdc2}$ 的含量是周期蛋白的 10—100 倍^[12]，因此周期蛋白似乎是 $G_2 \rightarrow M$

期过渡的一个限速因素。研究还表明，卵母细胞的成熟，即从 $G_2 \rightarrow M$ 期的过渡，并不依赖于新的周期蛋白的合成^[13]。这说明在 G_2 期的卵母细胞中已经存在了一个周期蛋白库。对周期蛋白 A 和周期蛋白 B 的进一步分析表明，在 G_2 后期的卵母细胞中，无周期蛋白 A 的贮存库；但周期蛋白 B₂ 的含量很高，GVBD (germinal vesicle breakdown, 生发泡破裂) 之后含量下降；而周期蛋白 B₁ 在 GVBD 之后含量不下降，周期蛋白 A 的含量变化不大。之后它们各自的含量相对稳定，等待细胞进入第二次减数分裂的 M 期^[12]。这说明，在 $G_2 \rightarrow M$ 期过渡的过程中，主要是周期蛋白 B 在参与作用，而周期蛋白 A 似乎并不参与。

蛙卵母细胞粗提物的 45-55% $(NH_4)_2SO_4$ 沉淀部分含有抑制 pre-MPF 活化的蛋白质，称为 INH (为 inhibitor 的缩写)^[14]。它是一种磷酸酯酶 2A^[15]，能阻止无活性的去磷酸化的 $p34^{cdc2}$ 与周期蛋白结合后的短暂磷酸化，致使 $p34^{cdc2}$ 无法通过再去磷酸化而活化。该去磷酸化的作用位点不专一，底物也不专一，不仅 $p34^{cdc2}$ ，而且周期蛋白也能被去磷酸化。

卵中 INH 和周期蛋白的含量之间也存在着一定的关系。并共同调节 MPF 的活化。具体地说，INH 含量愈高，诱发成熟所需的周期蛋白的量也愈多；反之，如果 INH 含量低，诱发成熟所需的周期蛋白量也低^[9]。

Okadaic Acid (简称 OA) 是 INH 的专一抑制剂。在卵母细胞中注入 OA，能引起 GVBD^[16]，且比孕酮诱导 GVBD 的时间短得多。这说明 INH 的含量减少可能是孕酮诱发 GVBD 的一个中间步骤。在注入 OA 的卵母细胞中，无需周期蛋白等蛋白质的新合成就能产生足量的活性 MPF^[17]。卵母细胞通过 INH 调节着实现成熟所需的周期蛋白量，两者成正比。

在 MPF 的活性过程中还涉及其它调节因子，例如负调控因子 wee 1^[18]，正调控因子 cdc 25 等^[10,19]。总之，MPF 的活化过程是一个

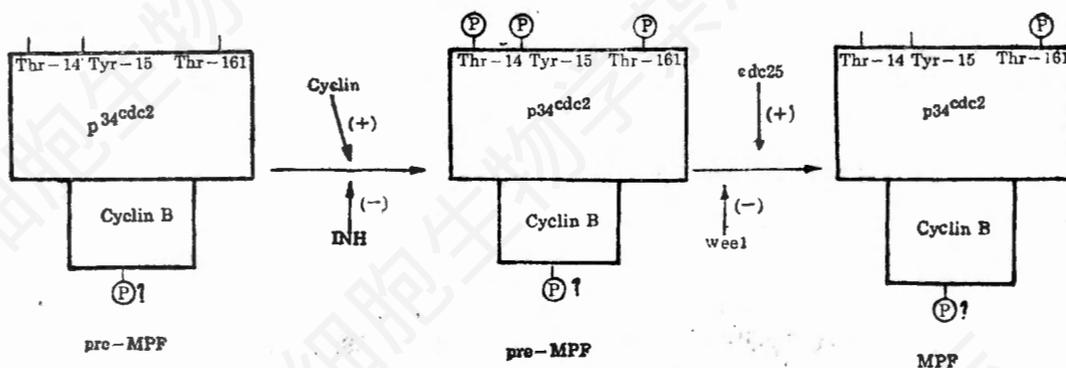


图1 MPF的活化过程

多步反应(图1),所谓无活性的去磷酸化 p^{34cdc2} 是指它的 Thr-14、Tyr-15 和 Thr-161 均处于去磷酸化状态;无活性的磷酸化 $p34^{cdc2}$ 是指它在上述3个位点均被磷酸化;有活性的去磷酸化 $p34^{cdc2}$ 是指 Thr-14 和 Tyr-15 两个位点被去磷酸化^[10],而 Thr-161 仍保持磷酸化状态^[9,16]。其间的精细调控机制较为复杂,有待进一步研究。

二、M→G₁期的过渡——周期蛋白的降解

成熟的卵球停留在第二次减数分裂的中期,即: M II 中期,这时卵中 CSF(Cytostatic Factor, 细胞静止因子)的含量很高。CSF 是原癌基因 *c-mos* 的产物,具有阻止周期蛋白降解的作用。以维持 MPF 的活性,导致细胞持续停留在 M 期^[20]。一旦卵受精,细胞内 Ca^{2+} 浓度迅速上升,致使 CSF 活性消失,从而周期蛋白降解,MPF 活性消失,由此实现 M→G₁ 期的过渡^[21,22]。迄今,对 CSF 活性消失与周期蛋白降解,以及周期蛋白降解与 MPF 失活的具体关系仍不清楚。

三、G₁→S 期的过渡——G₁周期蛋白的调控

在整个细胞周期中, $p34^{cdc2}$ 的含量基本保持不变。在前述的 G₂→M 期的过渡中,它和周期蛋白结合,经历一系列的变化,形成了有活性的 MPF,使细胞进入 M 期;在 M→G₁ 过渡期,周期蛋白和 $p34^{cdc2}$ 分离并降解,MPF 失活,使细胞离开 M 期;而在 G₁→S 期的过

渡期,它又和 G₁ 周期蛋白结合,使细胞进入 S 期。

G₁ 周期蛋白的种类很多,在芽生酵母中则为3个基因的产物: CLN 1、CLN 2 和 CLN 3。这3个基因产物的功能彼此重叠^[23-25],只有3个基因全部突变才能使细胞停顿在 G₁ 期,其中一个或两个基因突变,均不能阻止细胞进入 S 期^[4]。在 G₁ 后期,CLN 1—3 产物含量增加,并和 *cdc 28* 结合。结合后的具体作用不详,仅知道它们的结合能使细胞从 G₁ 期进入 S 期。

据酵母遗传学的研究表明, α 因子是一个由 α 细胞分泌的13个氨基酸组成的小肽,为靶细胞 a 细胞的负调控因子^[26,27]。在 α 因子的刺激下, a 细胞停滞在 G₁ 期,等待从有丝分裂的无性生活史进入减数分裂的有性生活史^[28,29]。进一步研究发现 FAR 1 基因是 CLN 2 的抑制基因^[30], FUS 3 基因是 CLN 3 的抑制基因^[31]。目前尚不了解由什么基因调控着 CLN 1 基因。 α 因子则通过一系列的信号传递激活 FAR 1、FUS 3 和 X 基因(CLN 1 的未知抑制基因),从而抑制 CLN 1—3 的活动,使细胞停留在 G₁ 期。STE 基因家族有可能参与这一系列的信号传递过程^[32],其中以 STE 5 和 STE 12 的可能性最大。STE 12 是一个转录因子(transcription factor),可以激活 FAR 1 和 FUS 3 的活动^[33,34]。但总的来说,在 G₁→S 期的过渡调控问题远不如我们对 G₂→M 期

过渡调控问题了解得那样清楚。

CLN 1—3 基因仅在芽生酵母中被发现。近来在哺乳类等其他生物中发现了一些和 $G_1 \rightarrow S$ 期过渡有关的 G_1 周期蛋白, 定名为周期蛋白 C、D 和 E^[6-7]。这 3 个基因是在人的基因库中筛选到的, 并在小鼠、果蝇等中找到了类似物。从序列分析比较来看, 它们和 CLN 1—3 的同源性较小, 相反和周期蛋白 A 和 B 则有相当程度的同源性。但是从其功能来看, 周期蛋白 C、D 和 E 与 CLN 1—3 相类似, 在 $G_1 \rightarrow S$ 期的过渡过程中, 其 mRNA 含量增加, 本身的含量也增加, 与 CDK (cyclin-dependent kinase) 有结合, 参与 $G_1 \rightarrow S$ 过渡期的调控。这些事实说明, 蛋白质氨基酸序列的相似性和其功能的相似性并无直接的联系。最新发现, 周期蛋白 A 和 $G_1 \rightarrow S$ 期过渡也有关, 它和 p33^{CDK2} 结合, 类似于周期蛋白 B 和 p34^{cdc2} 的结合。此外该周期蛋白 A-p33^{CDK2} 复合物进入核内, 参与 DNA 复制的调控。所以, 周期蛋白 A 对 $G_1 \rightarrow S$ 期过渡有重要的作用^[35]。

四、S → G₂ 期的过渡调控——似乎与周期蛋白无关

在哺乳类的早期胚胎发育中, 涉及到一个受精后发育怎样从母型调控向合子型调控的过渡问题, 即合子型基因组如何开放的问题。这实际上涉及细胞由 S → G₂ 过渡期的调控问题。早期胚胎的这一过渡似乎与周期蛋白无关, 而是依赖于源自输卵管上皮细胞分泌因子的刺激。目前仅了解该因子对早期胚胎的进一步发育有作用, 能使停留在 S 期末的胚胎细胞进入 G₂ 期, 但其具体作用机理仍不详。

结 语

细胞周期是当前细胞生物学和分子生物学的热门研究课题之一。细胞生物学家、分子生物学家和遗传学家们运用了不同的材料对细胞周期 $G_1 \rightarrow S$ 、 $S \rightarrow G_2$ 、 $G_2 \rightarrow M$ 和 $M \rightarrow G_1$ 等过渡的调控问题进行了研究, 其中以周期蛋白和 p34^{cdc2} 相互作用的研究最为引人注目。在

$G_2 \rightarrow M$ 过渡期, p34^{cdc2} 和周期蛋白 B 结合, 经历一系列的磷酸化和去磷酸化过程, 形成有活性的 MPF, 实现 $G_2 \rightarrow M$ 期的过渡; 在 M 期中/后期, 周期蛋白 B 降解, 致使 MPF 失活, 细胞离开 M 期; 在 $G_1 \rightarrow S$ 期过渡时, p34^{cdc2} 和 G_1 周期蛋白结合, 引起 DNA 的复制, 使细胞进入 S 期。此外还发现不少 cdc 2 的类似物在细胞周期各过渡期也有作用^[36]。因此, 不同的周期蛋白和不同的 cdc 2 产物, 参与细胞周期的方式不同。细胞周期的调控是多途径的和多层次的, 这已成为进一步揭示细胞周期调控活动所必需研究的问题。

参 考 文 献

- [1] Evans T. & Hint T. et al., 1983, *Cell*, 33: p 389—396.
- [2] Gautier J. & Maller J., 1991, *EMBO J.*, 10: p 177—182.
- [3] Lehner C. F. & O'Farrell P. H., 1990, *Cell*, 61: p 535—547.
- [4] Richardson H. E. et al., 1989, *Cell*, 59: p 1127—1133.
- [5] Lew D. J. et al., 1991, *Cell*, 66: p 1197—1206.
- [6] Leopold P. & O'Farrell P. H., 1991, *Cell*, 66: p 1207—1216.
- [7] Koff A. et al., 1991, *Cell*, 66: p 1217—1228.
- [8] Lohka M. J. & Maller J. L. et al., 1988, *Pro.Natl.Aca.Sci.USA* 85: p 3009—3013.
- [9] Solomon M. J. et al., 1990, *Cell*, 63: p 1013—1024.
- [10] Gautier J. et al., 1991, *Cell*, 67: p 197—211.
- [11] Izumi T. & Maller J. L., 1991, *Mol. Cell Bio.*, 11: p 3860—3867.
- [12] Kobayashi H. et al., 1991, *J. Cell Bio.*, 114: p 755—765.
- [13] Minshull J. et al., 1991, *J. Cell Bio.*, 114: p 767—772.
- [14] Cyert M. S. & Kirschner M. W. 1988, *Cell*, 53: p 185—195.
- [15] Lee T. H. et al., 1991, *Cell*, 64: p 415—423.
- [16] Goris J. et al., 1989, *FEBS Letters*, 245: p 91—94.
- [17] Rime H. & Ozon R. 1990, *Dev. Bio.*, 141: p 115—122.

- [18] Parker L. L. et al., 1991, *EMBO J.*, 10: p 1255—1263.
- [19] Dunphy W. G. & Kumagai A., 1991, *Cell*, 67: p 189—196.
- [20] Sagata N. et al., 1989, *Nature*, 342: p 512—518.
- [21] Minshull J. et al., 1990, *EMBO J.*, 9: p 2865—2875.
- [22] Westerndorf J. M. et al., 1989, *J. Cell Bio.*, 108: p 1431—1444.
- [23] Nash R. et al., 1988, *EMBO J.*, 7: p 4335—4346.
- [24] Hadwiger J. A. et al., 1989, *Pro. Natl. Aca. Sci. USA.*, 86: p 6255—6259.
- [25] Wittenberg C. et al., 1990, *Cell*, 62: p 225—237.
- [26] Cross F. R. et al., 1988, *Mol. Cell Bio.*, 8: p 4675—4684.
- [27] Herskowitz I., 1989, *Nature*, 342: p 749—757.
- [28] Nurse P., 1981, In *Fungal Nucleus*, K. Gull & S. Oliver, eds. p 331—345.
- [29] Pringle J. R. & Hartwell L. H., 1981, In the *Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae: Life Cycle and Inheritance*. J. N. Southern, E. W. Jones and J. R. Broach, eds, p 97—142.
- [30] Chang F. & Herskowitz I., 1990, *Cell*, 63: p 999—1011.
- [31] Elion E. A. et al., 1990, *Cell*, 60: p 649—664.
- [32] Whiteway M. et al., 1989, *Cell*, 56: p 467—477.
- [33] Dolan J. W. et al., 1990, *Genes Dev.*, 4: p 492—502.
- [34] Dolan J. W. et al., 1989, *Pro. Natl. Aca. Sci. USA.*, 86: p 5703—5707.
- [35] Girard F. et al., 1991, *Cell*, 67: p 1169—1179.
- [36] Blow J. J. & Nurse P., 1990, *Cell*, 62: p 855—862.

流式计量核型分析和染色体分选

陈汉源

(第一军医大学细胞生物学实验室 广州, 510515)

在经典的静态细胞遗传学基础上, 目前兴起的流式计量细胞遗传学是一大进展^[1,2], 盛行的流式计量核型分析依据 DNA 含量、碱基组成和着丝粒指数(CI)等特性, 检测悬液中染色体组型。进而将悬液中不同类型染色体分选出来^[3], 既便于基因作图, 又可构建染色体专一的重组 DNA 库, 从而推进基因结构、表达和调节的研究。

一、染色体的分离

从中期细胞制备单个染色体悬液是流式计量细胞遗传学的首要条件, 主要步骤如下^[4,5,6]:

1. 对数生长细胞。常用的单层培养细胞有成纤维细胞株和中国仓鼠-人融合细胞株, 还

有肿瘤细胞株。悬浮生长的有成淋巴细胞株。

2. 阻遏中期。适当的秋水仙胺或长春花碱处理, 可使培养细胞停顿于分裂中期。如处理过度会使染色体凝缩^[6]。

3. 收集中期细胞。从贴壁生长单层细胞中摇落接触较少的分裂细胞, 其中中期细胞应达 90% 以上。悬浮的成淋巴细胞分裂指数约 30%, 经差速离心去除间期细胞, 富集中期细胞。

4. 低渗膨胀。75 mmol/L KCl 处理使细胞吸水膨胀, 染色体互相散开。

5. 稳定染色体。交链剂和嵌入剂能减少染色体断裂和粘连^[1,6,7]。如己二醇、propidium iodide (PI)^[8]、硫酸镁、多胺、柠檬酸钠和亚硫酸钠等稳定染色体原位核