

·综述·

驱动蛋白 Kinesin-14 在双极纺锤体装配中跳跃至极点位置

Janet L. Paluh

Kinesin-14 Leaps to Pole Position in Bipolar Spindle Assembly

[ABSTRACT] Formation of a mitotic spindle occurs almost effortlessly as cells cycle and is essential for chromosome segregation. Early in a cell cycle, the replication of centrosomes or spindle pole bodies at G₁/S leaves mother and daughter poles in close association until forced apart into a bipolar arrangement at mitotic onset. Kinesin-like proteins (Klps) generate a variety of forces that contribute to the timing, formation and maintenance of spindle bipolarity. The ability of two key players, Kinesin-5 and Kinesin-14, to cross-link both parallel and anti-parallel microtubules has led to emphasis on spindle microtubule interactions in the spindle assembly mechanism. Recent identification of a Kinesin-14 binding site on γ -tubulin, a ubiquitous component of microtubule organizing centers (MTOCs) at poles combined with the ability of changes to MTOC complexes to regulate bipolarity, now shifts an inquisitive eye to pole mechanisms and to the complexities evolving around MTOCs.

KEYWORDS: Kinesin-like protein; Tubulin; Binding site; MTOC; Microtubule

【摘要】 在细胞周期中极易形成有丝分裂纺锤体,其对染色体的分离必不可少。在细胞周期初期,中心体复制或纺锤体极体紧密连接,并在 G₁/S 期离开母极和子极。直到有丝分裂开始时,二者才互相分离,从而形成双极排列。驱动蛋白样蛋白(kinesin-like proteins,Klps)能产生各种作用力,该作用力有利于纺锤体双极性的形成时间、组装和维护。驱动蛋白-5 与驱动蛋白-14 是 2 个主要的作用因子,二者具有平行和反向平行于微管互相交联的能力,从而使纺锤体组装机制中纺锤体微管的相互作用倍受重视。最近,驱动蛋白-14 在 γ -微管蛋白的结合位点得到了确认,该位点为微管组织中心(microtubule organizing centers, MTOCs)中位于极点的常见构件,具有转化为微管组织中心复合物的能力,进而调节双极性。该位点的发现也引起了关于极点机制和 MTOCs 复杂性的广泛好奇和关注。

关键词: 驱动蛋白样蛋白; 微管蛋白; 结合位点; 微管组织中心; 微管

中图分类号: Q753 **文献标识码:** A

文章编号: 1000-467X(2008)09-0989-04

Department of Biology;
Center for Biotechnology and
Interdisciplinary Studies;
Rensselaer Polytechnic Institute;
Troy,
New York USA

Correspondence to: Janet L. Paluh
Tel: 1-518-276-4196
Fax: 1-518-276-2851
E-mail: paluhj@rpi.edu

收稿日期:2008-06-16

细胞具有动态改变细胞微管骨架的能力,从而具有高度灵活性。染色体的分离就是利用该暂时的瞬态结构,即有丝分裂纺锤体。Walter Flemming 在 1882 年将丝分裂定义为配对螺旋状染色质的形成。126 年来,有人对丝分裂进行了描绘、拍照、拍摄、建模和铸模。然而,在过去 20 年间,我们才开始认识到其根本的一方面,即纺锤体的组装。或许最令人惊讶的是,尽管在细胞分裂前组装该结构十分重要,却未发现任何重叠机制。该结构的主要组成部分包括中心体或纺锤体极

体,以及它们的微管组织中心(microtubule organizing centers, MTOCs)复合物、微管成核、动力学、组织和附件、微管运动蛋白和集束蛋白以及染色质。在中心体存在的时候,上述组分会控制纺锤体的形成;然而,当中心体缺如的时候,微管则通过微管运动蛋白的交联和滑动作用,在染色质周围的负极集中成核。在后一种情况中,虽然有限参数的数学模型能提供资料供实验检测^[1,2],但是,能有效模拟纺锤体组装所有方面的模型还存在诸多未知^[3]。与此同时,令人振奋的新发现和概念正

不断完善着已有的研究成果。

1985 年发现驱动蛋白之前, 纺锤体形成和染色体分离的动力学结果提示微管动力蛋白具有举足轻重的作用。自 1990 年开始, 发现了驱动蛋白样蛋白(kinesin-like proteins, Klps), 该蛋白同时被命名为驱动蛋白相关蛋白(kinesin related proteins, Krps)或驱动蛋白超家族蛋白(KIF)^[8]。目前已知 Klps 分子量大于 300, 存在于各种真核生物中。最具特征的 Klps 被分为 14 个家族以及一个孤立群, 按照一般规则依次命名为驱动蛋白-1, 直至驱动蛋白-14^[9]。2004 年前, 有学者研究了保守性机制, 并对驱动蛋白进行了分类^[10, 11]。2004 年采用一致命名法, 该命名法提示, 该蛋白在不同种群中的功能和定位具有相似性。在每种真核生物中并非包含全部 14 个驱动蛋白家族, 纺锤体功能的实现也并非需要上述所有蛋白的参与。在最初确定的驱动蛋白家族中, 包括 2 个家族即驱动蛋白-5 和驱动蛋白-14, 已知二者均具有调节双极纺锤体组装的作用。在许多有机体中, 驱动蛋白-5 在形成双极性方面至关重要。如果双极性形成失败, 则产生具有并列极点的单极纺锤体。驱动蛋白-14 的作用为对抗纺锤体的双极性及拮抗驱动蛋白-5。上述驱动蛋白家族具有交联微管和在微管上反向运动的能力, 故引起了关于模型中纺锤体双极性维持和形成的关注。驱动蛋白-14 在微管处的交联、滑动和聚集并不是纺锤体组装调节的唯一机制^[12-14], 也无证据显示它是真核生物中的主要机制(当中心体和纺锤体极点存在时)。在多细胞真核生物中, 一种负极引导的微管动力蛋白和动力蛋白在极点聚集方面也具有明显作用^[15]。跨多个物种的广泛遗传证据显示, 驱动蛋白-14 与极点蛋白的功能具有重叠性, 这些功能包括保持中心体的稳定性^[16, 17]、与微管组织中心蛋白(该蛋白可形成成核位点和微管负极的附件)相互作用^[18-21], 或调节微管数量及其距离极点的长度, 这些均与驱动蛋白-5 或动力蛋白相反^[22]。

解读纺锤体组装精确机制面临困难, 其难点部分在于: 目前对有丝分裂

组分(包括动力蛋白和纺锤体大分子的组装)的认识还有差距。中心体在结构和构造方面均比酵母菌纺锤体复杂, 但二者均以微管组织中心为微管成核和附件的位点^[6, 23]。在任一物种中, 尚无微管组织中心蛋白特征的阐述。关于 Klps, 目前已获知了几种 Klps 的动力区域^[24, 25], 但对其非动力作用区域的特征还知之甚少。与其家族相比, Klps 的非动力作用区域存在有限的序列相似性, 该特点被用来确定一些区域, 此区域对蛋白相互作用和细胞调节均具有重要影响。关于 Klps 与微管蛋白的结合、微管蛋白结合位点及动力表面作用区域的认识目前仍处于初级阶段^[4, 26]。通过科学技术的不断进步, 运用 Klps/微管蛋白相互作用的结构分析、电子显微镜和断层摄影术的分辨率成像、体内动态定时拍摄和单分子研究获得了大量有用的资料。与此同时, 遗传分析所揭示的资料常常带来意外的惊喜, 这些成为了科技进步的重要补充。

Rodriguez 等^[4]取得了鼓舞人心的新发现, 该发现挑战了目前的模型中关于驱动蛋白-14 的作用和双极纺锤体组装调节的传统观念。对几种真核生物的遗传分析结果进一步表明, 驱动蛋白-14 和 γ -微管蛋白存在重叠作用。驱动蛋白被发现后不久, 1989 年发现了特殊的微管蛋白, 其位于纺锤体极点的微管负极处^[27]。 γ -微管蛋白是微管组织中心的一部分, 其功能是作为 α/β -微管蛋白异二聚体的衔接蛋白, 以便该异二聚体被装配到纺锤体微管中。 γ -微管蛋白结合蛋白有利于形成微管组织中心的核心, 其首先在芽酵母中被确认, 接着分别在人类、果蝇和裂殖酵母的真核微管组织中心找到了该蛋白, 同时发现该蛋白是 γ -微管蛋白的其分之一^[27, 28]。当分裂间期微管组织中心(iMTOC)和赤道微管组织中心(eMTOC)复合物及其纺锤体极微管组织中心存在时, 可能会发现在所有真核生物中, 裂殖酵母的微管组织中心的利用是最广泛的。上述各微管组织中心需要在有丝分裂的微管组织中心周围被暂时激活。裂殖酵母中存在数个条件等位基因, 并构成微管

组织中心的组件, 同时能被再分类归为一组。同时发现, 几者在微管构造和动力学方面具有相似效应^[19, 21, 29]。该组中, 对裂殖酵母的双极纺锤体组装及非有丝分裂的微管组织中心(可提供情报)作用显著。Rodriguez 等学者发现, 当所选全部核心微管组织中心蛋白、Alp4、Alp6 和 γ -微管蛋白的等位基因分别结合到 Kinesin-5 Cut7 和 cut7-22ts 的让步等位基因上时, 能复苏纺锤体双极性。当其中 2 个等位基因 Kinesin-5 Cut7 和 cut7-22t 结合时, 二者的微管表型等位基因则被共抑制^[29]。若发生上述情况, 其复苏双极性的能力则因为结合效率下降而降低。因此 Alp4 与 γ -微管蛋白的相互作用会改变微管的稳定性和构造, 进而影响纺锤体的双极性。上述由极点引发的效应能超越驱动蛋白-14 和 Pkl1 在 cut7-22ts 菌株相反双极性的拮抗机制。

在芽酵母和裂殖酵母中, 已显示驱动蛋白-14 Klps 具有调节微管构造和微管动力学的作用, 但无微管成核能力。在裂殖酵母中, 驱动蛋白-14 Pkl1 基因与所有微管组织中心蛋白的成因联系显示, 二者具有紧密联系。 γ -微管蛋白的等位基因 gtb1-PL302 最初在综合性致死筛选突变时被确定, 该筛选的目的是比较非必须驱动蛋白-14 Pkl1 基因的依赖性, 从而判断其存活活力^[19]。Niwa 和 Toda 的研究揭示了令人振奋的发现, 即微管组织中心蛋白 Alp4 和 Alp6 以及驱动蛋白-14PK11 的另外的联系^[29]。该遗传联系的发现引人注目, 提示需要深入研究。驱动蛋白-14 能直接结合到 γ -微管蛋白上吗? 如果能结合, 其影响是什么? 该相互作用会引起微管构造和微管动力学(可调节双极纺锤体组装)的改变吗? 在裂殖酵母中, 发现在体内驱动蛋白-14 PK11 与 γ -微管蛋白及微管组织中心蛋白有联系, 同时还发现, 在酵母双杂交中, Pkl1p 能通过其动力区域直接结合到 γ -微管蛋白上。为了检测裂殖酵母中该作用对双极纺锤体组装调节的贡献, 除了微管之间的相互作用, Rodriguez 等按需要选择性破坏驱动蛋白-14 Pkl1 与 γ -微管蛋白的结合, 同时保证驱动蛋白-14/微管联合的完整性。

因为尚未确定驱动蛋白与微管蛋白的结合位点,故需首先在微管蛋白上确定该区域的位置。为达到上述要求,需假设驱动蛋白与微管的微管蛋白结合的机制具有保守性。

驱动蛋白与微管对接的结构特点在于,其基础为 α/β -微管蛋白异源二聚体和传统驱动蛋白以及 Klp 的高分辨结构,并提供了一些最有用的实验资料(关于动力蛋白与微管蛋白相互作用)^[24,25]。不同真核 Klp 二聚物与微管对接的晶体成像显示,其与哺乳动物微管蛋白的作用相似。因此,在真核生物中,微管蛋白表面的可识别的保守特性处处可见。观察显示,真核 Klp 二聚物与原丝在成对单环附近对接,其编号分别为 11 和 12,连接在 β -微管蛋白上,而不是连接在邻近 α -微管蛋白的相同位置的单环上。Rodriguez 等学者的分析提示,当比较物种 β -微管蛋白与 α -微管蛋白(符合 Klp 二聚物与微管对接的晶体成像)时,其 11 螺旋的序列变异小,且相似性少。在 γ -微管蛋白内, β -微管蛋白 11 螺旋的残基亚型被保留,并产生了 LFK/Er 至 LFK/Q。结构模拟显示,赖氨酸和(K)谷氨酰胺(Q)侧链最易影响蛋白-蛋白的相互作用,同时发现二者是驱动蛋白-14 Pkl1 在 γ -微管蛋白结合位点的组分。如果赖氨酸和(K)谷氨酰胺(Q)其中之一相对于丙氨酸受损的驱动蛋白-14 Pkl1(连接到 γ -微管蛋白)位点发生改变,任一改变都能解除驱动蛋白-14 Pkl1 对纺锤体双极性的拮抗作用。因此,尽管微管的 β -微管蛋白持续存在驱动蛋白-14 Pkl1,通过改变 Alp4/ γ -微管蛋白相互作用或驱动蛋白-14 Pkl1/ β -微管蛋白相互作用均可使微管组织中心复合物发生变化,从而克服纺锤体双极性的拮抗作用。

Rodriguez 等学者的研究引发了富有争议的问题,即驱动蛋白-14 纺锤体双极性调节机制的作用。驱动蛋白-14 Pkl1 除了与 γ -微管蛋白相互作用,还直接与微管组织中心蛋白 Alp4 和 Alp6 相互作用(酵母双杂交分析,结果尚未发表)。上述相互作用是如何影响所有微管组织中心亚型功能,目前尚

不知晓。Alp4 与 γ -微管蛋白在微管组织中心结合的细微改变则能导致等位基因 gtb1-PL302 的显著改变,进而加强这种相互作用。结构分析将继续发挥在认识蛋白相互作用方面的卓越影响,单个或多个微管组织中心蛋白的结晶能帮助蛋白质复合体显影,已成为认识其机制的里程碑^[30]。 β -微管蛋白与 γ -微管蛋白相同之处在于,只有其螺旋 11 残基的一个亚型具有保守性,该发现提示一种可能性,即在极点处,Klp 的一个亚型的相互作用存在选择性。我们正着手研究 Klp/微管结合位点,通过改变微管上的 β -微管蛋白螺旋 11,在 β -微管蛋白与 γ -微管蛋白交换该区域,并测量该区域功能的相容性。我们同时也在致力于探索各物种中驱动蛋白-14 功能的相容性,通过利用熟知的果蝇和裂殖酵母中的 HSET 驱动蛋白-14 Klp 来判断其能否部分或全部置换驱动蛋白-14 Klp 的功能。关于纺锤体组装的完整视图应与微管组织中心机制的认识相整合^[6,23,28]。关于裂殖酵母细胞微管组织中心的研究正面临挑战。

致谢: 本研究的资金来自美国国家自然科学基金会 MCB-0710938。

参考文献

- [1] Burbank K S, Mitchison T J, Fisher D S. Slide-and-cluster models for spindle assembly [J]. *Curr Biol*, 2007,17(16):1373-1383.
- [2] Surrey T, Nedelec F, Leibler S, et al. Physical properties determining self-organization of motors and microtubules [J]. *Science*, 2001,292(5519):1167-1171.
- [3] Mogilner A, Wollman R, Civelekoglu-Scholey G, et al. Modeling mitosis [J]. *Trends Cell Biol*, 2006,16(2):88-96.
- [4] Rodriguez A S, Batac J, Killilea A N, et al. Protein complexes at the microtubule organizing center regulate bipolar spindle assembly [J]. *Cell Cycle*, 2008. (In press)
- [5] Janson M E, Loughlin R, Loiodice I, et al. Crosslinkers and motors organize dynamic microtubules to form stable

- bipolar arrays in fission yeast [J]. *Cell*, 2008,128(2):357-368.
- [6] Luders J, Stearns T. Microtubule organizing centers a re-evaluation [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007,8(2):161-167.
- [7] O'Connell C B, Khodjakov A L. Cooperative mechanisms of mitotic spindle formation [J]. *J Cell Sci*, 2007,120(10):1717-1722.
- [8] Vale R D, Fletterick R J. The design plan of kinesin motors [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1997,13:745-777.
- [9] Lawrence C J, Dawe R K, Christie K R, et al. A standardized kinesin nomenclature [J]. *J Cell Biol*, 2004,167(1):19-22.
- [10] Kim A J, Endow S A. A kinesin family tree [J]. *J. Cell Sci*, 2000,113(21):3681-3682.
- [11] Miki H, Setou, M, Kaneshiro K, et al. All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2001,98(13):7004-7011.
- [12] Sharp D J, Yu K R, Sisson J C, et al. Antagonistic microtubule-sliding motors position mitotic centrosomes in *Drosophila* early embryos [J]. *Nat Cell Biol*, 1999,1(1):51-54.
- [13] Heald R. Motor function in the mitotic spindle [J]. *Cell*, 2000,102(4):399-402.
- [14] Walczak C E, Vernos I, Mitchison T J, et al. A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity [J]. *Curr Biol*, 1998,8(16):903-913.
- [15] Gaglio T, Dionne M A, Compton D A. Mitotic spindle poles are organized by structural and motor proteins in addition to centrosomes [J]. *J Cell Biol*, 1997,138(5):1055-1066.
- [16] Endow S A, Chandra R, Komma D J, et al. Mutants of the *Drosophila* ned microtubule motor protein cause centrosomal and spindle pole defects in mitosis [J]. *J Cell Sci*, 1994,107(4):859-867.
- [17] Endow S A, Komma D J. Centrosome and spindle function of the *Drosophila*

- Ncd microtubule motor visualized in live embryos using Ncd-CFP fusion proteins [J]. *J Cell Sci*, 1996,109 (10):2429-2442.
- [18] Endow S A, Komma D J. Assembly and dynamics of an anastral:astral spindle: the meiosis II spindle of *Drosophila* oocytes [J]. *J Cell Sci*, 1998,111(17):2487-2495.
- [19] Paluh J L, Nogales E, Oakley B R, et al. A mutation in gamma-tubulin alters microtubule dynamics and organization and is synthetically lethal with the klp Pkl1p [J]. *Mol Biol Cell*, 2000,11(4):1225-1239.
- [20] Prigozhina N L, Walker R A, Oakley C E, et al. Gamma-tubulin and the C-terminal motor domain kinesin-like protein, KLPA, function in the establishment of spindle bipolarity in *Aspergillus nidulans* [J]. *Mol Biol Cell*, 2001,12(10):3161-3174.
- [21] Tange Y, Fujita A, Toda T, et al. Functional dissection of the gamma-tubulin complex by suppressor analysis of gtb1 and alp4 mutations in *Schizosaccharomyces pombe* [J]. *Genetics*, 2004,167(3):1095-1107.
- [22] Saunders W, Hornack D, Lengyel V, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* kinesin-related motor Kar3p acts at preanaphase spindle poles to limit the number and length of cytoplasmic microtubules [J]. *J Cell Biol*, 1997,137(2):417-431.
- [23] Cushieri L, Nguyen T, Vogel J. Control at the cell center: the role of spindle poles in cytoskeletal organization and cell cycle regulation [J]. *Cell Cycle*, 2007,6(22):2788-2794.
- [24] Marx A, Muller J, Mandelkow E. The structure of microtubule motor domains [J]. *Adv Prot Chem*, 2005,71:299-344.
- [25] Marx A, Muller J, Mandelkow E M, et al. Interaction of kinesin motors, microtubules, and MAPs [J]. *J Muscle Res Cell Motil*, 2006,27(2):125-137.
- [26] Woehlke G, Ruby A K, Hart C L, et al. Microtubule interaction site of the kinesin motor [J]. *Cell*, 1997,90(2):207-216.
- [27] Oakley B R. g-tubulin. The centrosome in cell replication and early development [J]. *Curr Topics Develop Biol*, 1999,49:27-54.
- [28] Wiese C, Zheng Y. Microtubule nucleation: g-tubulin and beyond [J]. *J Cell Sci*, 2006,119 (20):4143-4153.
- [29] Vardy L, Toda T. The fission yeast gamma-tubulin complex is required in G1 phase and is a component of the spindle assembly checkpoint [J]. *EMBO J*, 2000,19(22):6098-6111.
- [30] Nogales E, Grigorieff N. Molecular machines: Putting the pieces together [J]. *J Cell Biol*, 2001,152(1):F1-F10.

[编辑:何 华;校对:甘可建]

欢迎订阅《实用肿瘤杂志》

《实用肿瘤杂志》是由中华人民共和国教育部主管,浙江大学主办的肿瘤专业学术性期刊。本刊为中国抗癌协会系列期刊,中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,中国科学引文数据库来源期刊,并被《中国期刊全文数据库》、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中文生物医学期刊文献数据库-CMCC》、《中国生物医学期刊引文数据库-CMCI》、《中文科技期刊数据库》等多家数据库收录;并被国际著名检索系统:俄罗斯《文摘杂志》(AJ,VINITI)、美国《化学文摘》(Chemical Abstracts)、美国《乌利希国际期刊指南》(Ulrich's International Periodicals Directory)和波兰《哥白尼索引》(IC)收录。2005~2006年度本刊又被评为浙江省优秀科技期刊一等奖,并入选2006年首届浙江期刊方阵工程期刊。本刊突出实用性,主要栏目有专家论坛,专题讨论,基础与临床研究,技术与经验,药物与临床,流行病学调查,综述与讲座,误诊分析,短篇报道与个案。适合于广大中、高级医务人员及从事肿瘤科研与教学工作阅读、参考。

《实用肿瘤杂志》为双月刊,大16开,92页,每逢双月10日出版。每期定价8.00元,全年48.00元。本刊刊号ISSN 1001-1692,CN 33-1074/R,邮发代号32-87,国外发行代号4816BM,全国各地邮局均可订阅。如邮局订阅延误,可汇款至浙江省杭州市解放路88号,浙江大学医学院附属第二医院《实用肿瘤杂志》编辑部补订。

电话(传真):(0571)87783654 邮编:310009 E-mail:shyzhl@zju.edu.cn