

敖世洲 主编

蛋白质可逆磷酸化 对细胞活动的调节

国家高技术研究发展计划生
物技术领域战略研讨会文集



上海科学技术出版社

1
Q51
ASZ

蛋白质可逆磷酸化 对细胞活动的调节

国家高技术研究发展计划生物技术领域战略研讨会文集

敖世洲 主编



A0280833

上海科学技术出版社

**蛋白质可逆磷酸化
对细胞活动的调节**

国家高技术研究发展计划生物技术领域战略研讨会文集

敖世洲 主编

上海科学技术出版社出版、发行

(上海瑞金二路 450 号)

新华书店上海发行所经销 上海商务印刷厂印刷

开本 787×1092 1/16 印张 16.25 字数 388,000

1994 年 11 月第 1 版 1994 年 11 月第 1 次印刷

印数 1—1,500

ISBN7-5323-3668-9/Q·54

定价: 28.00 元

(沪)新登字 108 号

序

细胞与细胞之间信息的沟通与细胞接受外部刺激后的应答是细胞生命活动的主要表现,因此,细胞信号转导系统一直是分子生物学的一个重要研究领域。它大致上包括信号转导的上游、下游和其中间环节三个层次。上游为跨膜信号转导途径,通常,受体分子活化细胞功能的转导途径主要有两个:一是受体本身或受体结合蛋白具有内源性酪氨酸激酶活性,胞内信号通过酪氨酸激酶传递;二是配体结合到细胞表面受体,通过G蛋白介导的效应系统,产生介质活化丝氨酸/苏氨酸激酶或酪氨酸激酶,从而传递信号;下游指核内信使分子,即刺激细胞表面受体产生的瞬时信号,通过信号调控转录因子转变成基因表达的较长期变化,从而介导细胞多种功能的发挥;中游是指上、下游信号转导间的桥梁,如转录因子的易位活化等。在上述细胞信号转导的复杂系统中都涉及蛋白质的磷酸化问题,可见,蛋白质的可逆磷酸化是阐明细胞信号转导系统的核心环节。

本文集包括了与此领域相关的19篇论文,全面反映了当今国际上蛋白质可逆磷酸化对细胞活动调节的研究现状和进展,也概括了当今有关信号转导系统的研究成就,这无疑对制订我国高技术研究发展计划生物技术领域的战略方向起有重要作用。

我国的高技术研究发展计划是一项中、长期的应用研究计划,是为我国国民经济服务的,大部分研究目标要出产品;但是,要出新产品,要有创新,必须同时加强应用基础研究。本文收集的文章涉及细胞信号转导系统这一生命科学的基本命题,在阐明细胞因子、生长因子、激素、病毒、癌基因、神经介质等信号转导的内在作用机制的基础上,就可更新观点,设计新型药物,这无疑将推动我国生物高技术的发展和生物高技术产业的形成。

“863”生物技术领域专家委员会

侯云德

1994年7月25日

前言

蛋白质磷酸化和去磷酸化几乎调节着生命活动的所有过程,包括细胞的增殖、发育和分化,神经活动,肌肉收缩,新陈代谢,肿瘤发生等。尤其在细胞应答外界刺激时,可逆的蛋白质磷酸化是目前所知道的最主要的信号传递方式。1992年美国西雅图华盛顿大学生物化学家 Edwin Krebs 和 Edmon Fisher 因在蛋白质可逆磷酸化研究方面的贡献,而被授予诺贝尔生理学 and 医学奖。诺贝尔奖评奖委员会在授奖时宣称:“我们现在已确定在整个基因组内大约有 1% 基因编码蛋白激酶,这些激酶调节着细胞内成千上万种蛋白质的功能。”当今,蛋白质可逆磷酸化及其相关的第二信使调控,蛋白激酶和磷酸酯酶的研究,已成为现代生物化学、生理学、细胞生物学和分子生物学的一个最活跃最吸引人的研究领域。

细胞内每时每刻进行着多种多样的生物化学反应,生物体能迅速对体内环境和外界刺激产生正确的应答,这些过程都有复杂的调控机制,其中大多数是直接或间接地由蛋白质的变构作用所介导的。蛋白质本身的构象变化是通过变构效应和各种修饰来实现的,如二硫键的配对,蛋白水解酶的加工,糖基化和磷酸化修饰等。蛋白质磷酸化是最常见、最重要的共价修饰方式。蛋白质的磷酸化和去磷酸化常伴随着这一蛋白质生理活性的激活或失活,这是一个动态平衡过程。蛋白质可逆磷酸化需要两种专一的酶来完成,磷酸化需要蛋白激酶,去磷酸化需要磷酸酯酶。

蛋白质可逆磷酸化的研究不仅能全面地揭示生命活动的规律,了解生命的奥秘,而且,基础研究的成果也必将为造福人类的实际应用开辟广阔的前景。用于预防和治疗人类各种疾病的有效药物,将会在这些研究的基础上陆续产生。

本书约请 20 多位专家就蛋白质可逆磷酸化各方面的研究进展,包括细胞周期,DNA 复制,基因转录,蛋白质生物合成,细胞内信号传递,神经传导,脑的活动,肌肉收缩,生长因子及受体,细胞骨架,癌基因,以及蛋白激酶的结构、功能和进化等,进行专题综述,基本上概括了最新研究成果和发展趋势。希望本书的出版对我国生命科学研究能有一定的帮助,并推动这一领域的学术交流。

863 生物技术领域专家委员会对本书的出版给予大力支持和帮助,深表感谢。对本书的疏漏和错误之处,请读者批评指正。

敖世洲

目 录

蛋白质磷酸化与细胞周期·····	左嘉客(1)
磷酸化修饰与细胞 DNA 复制的控制·····	陆长德(10)
组蛋白 H1 的可逆磷酸化与真核基因表达的调节控制·····	郑仲承(19)
磷酸化对基因转录的调节·····	敖世洲(43)
磷酸化对蛋白质合成因子及核糖体蛋白的调控·····	凌 俊 刘望夷(56)
跨膜信息传递·····	林其谁(67)
蛋白质磷酸化与免疫细胞信号传递·····	孙启鸿 沈倍奋(77)
蛋白质磷酸化与神经细胞的信号跨膜转导·····	杜雨苍(83)
生长因子受体、Ras 蛋白与信号传导·····	傅 涛 徐永华(102)
癌基因、抗癌基因与蛋白质磷酸化和去磷酸化·····	顾健人(108)
糖酵解途径中的蛋白质磷酸化作用·····	李 林(115)
脑内可逆蛋白质磷酸化作用·····	魏 群(130)
蛋白质磷酸化作用与肌肉收缩·····	陈 明(143)
红细胞骨架蛋白的磷酸化作用·····	潘华珍(159)
蛋白激酶的结构、功能与进化·····	陈长征 李伯良 夏其昌 王应睐(172)
蛋白激酶 C 结构和生理功能研究进展·····	赵辅昆 许根俊(201)
酪氨酸蛋白磷酸酯酶·····	杨志勇 敖世洲(230)
糖基化和磷酸化·····	王克夷(237)
原核信号系统中的蛋白质磷酸化·····	杨胜利(244)

蛋白质磷酸化与细胞周期

左 嘉 客

(中国科学院上海细胞生物研究所, 200031)

细胞周期(cell cycle)通常被划分为四个相(phases): DNA 复制前的 G1 相, 合成相(S 相), DNA 复制后的 G2 相, 以及有丝分裂相(M 相)。光学显微镜下, 为区别于分裂相, 一直将 G1 相、S 相和 G2 相合称为细胞间期。虽然, 将细胞周期人为地划分为几个期具有一定的意义, 但细胞周期的客观情况远较此复杂。细胞周期中发生的某些事件并不局限在某个相中, 如中心体的整个变化过程往往贯穿所有四个相。

实际上, 细胞增殖(cell reproduction)包含着两个相互依赖的周期, 一为细胞分裂周期 (cell division cycle), 该周期的主要特征是基因组复制并分离; 另一为细胞生长周期 (cell growth cycle), 其主要特征是蛋白质和细胞器数量的倍增。细胞分裂周期通常是在 G1 相中的限制点 (restriction point) 或称 START (起点) 处与细胞生长周期配对。如去除细胞外周环境中的某些必要因素 (营养性物质或生长因子), 细胞的生长受抑制, 导致细胞较长时间地停止在 START 之前的早 G1 相, 或离开细胞周期, 进入静止相(G₀ 相)。当细胞接受到生长所必需的信号刺激, 细胞的周期性变化才向前推进, 跨过 START, 届时即使生长条件变得不利, 细胞仍具备继续进行并完成细胞分裂周期的能力。

Hartwell^[1]根据细胞周期中各事件之间存在相互依赖关系的事实, 在细胞周期的调控中引进了检查点(checkpoints)的新机制。通过这些检查控制机制, 保证了细胞周期各项事件按一定的时空秩序实现和完成, 即通过一些细胞内信号转导途径 (intracellular signal transduction), 使细胞能感受并正确地判断所发生的早先事件是否正常完成, 以作出是否启动续后事件的决定。这种检查机制 (如处在 START 和 S 相开始阶段的) 使细胞能在常态下回避突变, 或不致因突变而导致癌变。因此, DNA 复制、DNA 修复和检查点之间的关系, 以及由 G2 相向 M 相过渡对 S 相完成的依赖性等已成为目前所关注的问题。

目前对由生长因子等激发的早期细胞反应所牵连的一些酶网络和信号发放机制的了解较为清楚, 但对于这些输入调控所构成的复杂阵势是如何进一步促进或限制细胞生长和细胞分裂的机制则了解甚微。幸运的是, 通过最近对酵母和较高等真核细胞周期的分析研究, 开始取得了一些有关这方面的新见识, 它们之中不少均涉及蛋白质的磷酸化反应和去磷酸化反应。

众所周知, 蛋白质磷酸化是翻译后修饰的一种重要形式。蛋白质的净磷酸化程度实为蛋白激酶 (protein kinase) 和蛋白磷酸酯酶 (protein phosphatase) 作用的结果。这些酶调控着细胞周期中所发生的一系列关键事件, 包括那些外源信号诱发的细胞早期反应, 以及通过细胞内信号转导而实现的各类事件间的正常过渡。值得提出的是, 这些关键事件均属细胞周期中的不连续事件 (discontinuous events), 不涉及维持细胞生存所需的连续代谢过程。

鉴于近期涉及细胞周期调控的蛋白质磷酸化反应的研究进展迅猛,给写这方面的综述文章带来了一定的困难。幸好陆长德先生为本书撰写了题为“磷酸化修饰与细胞 DNA 复制的控制”一文,详细地介绍了发生在 G1 相晚期和 G1/S 交界处的关键事件,这正是 躯体细胞细胞周期的最重要事件。本文则借助于 M 相专一的蛋白激酶 $p34^{cdc2}$,分析蛋白质磷酸化与细胞周期的关系。

一、蛋白激酶 $p34^{cdc2}$ 主宰细胞周期的调控

调控细胞周期的 $cdc2$ 基因最先在裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 中被检测到,由于它的突变,细胞周期停顿在 START 或 M 相之前。 $cdc2$ 基因编码一种 34kD 蛋白质,具丝氨酸/苏氨酸激酶活性,进化上高度保守。芽生酵母 (*S. cerevisiae*) CDC28 基因产物是 $cdc2$ 基因产物的同系物。迄今为止,已在爪蟾卵母细胞、海星卵母细胞、海胆卵母细胞和哺乳类细胞等真核细胞中检测到该激酶的同系物。为方便起见,这种激酶及其同系物均称作 $p34^{cdc2}$ 或 $p34$ 。从酵母到人的 $cdc2$ 基因产物,近60%的氨基酸顺序相同,其中一个由14个氨基酸(EGVPSTAIPELLRE)组成的片段在这些 $cdc2$ 产物中均被保存下来,取名为 PSTAIR 序列。

$cdc2$ 产物于细胞周期的不同阶段具不同作用,这些不同的作用似乎是通过与不同的周期蛋白(cyclins)结合并活化而实现的。在酵母中,一些 G1 cyclins 调控着 START 处的 $cdc2$ 产物活性,而一些 cyclin B 调控 M 相 $cdc2$ 产物活性。可是,如此简单的调控方式在多细胞生物体中并不存在。

可能是由于多细胞生物体中细胞生长和分裂的调控远较单细胞酵母的复杂,故在动物细胞中存在一个 $cdc2$ 相关蛋白家族($cdc2$ -related protein family),由它们分别调控着细胞周期的不同部分或阶段。例如,在多细胞生物体发育期间,细胞分裂必须协调进行,故需要有更多的信号,包括刺激性的和抑制性的信号参与。而这些专一的 $cdc2$ 相关蛋白质可能具有转导这类不同信号的作用。这类蛋白质也必须与 cyclins 结合后才成为具活性的蛋白质激酶,故被统称为依赖周期蛋白的激酶(cyclin-dependent kinases),简写成 CDK。事实上,这些 CDK 均是一些所谓被“拆卸”下来的激酶结构域,其分子大小足以包括蛋白激酶总科的所有保守元件(conserved elements)。目前已知的这些 CDK,都是借用以下方法获得的,即采用 PCR 法自 cDNA 库中克隆 $cdc2$ 相关蛋白质,或采用功能补偿法(complementation)补偿芽生酵母中突变的 $cdc2$ 基因,由此克隆到 $cdc2$ 相关蛋白质。业已获得的 CDK 不少,它们分别与不同类型的 cyclin 结合,有的尚与其他具特殊功能的蛋白结合,调控着细胞周期的不同部分或阶段(表1)。

细胞生长与细胞分裂有密切联系。前者的调控通常均涉及一些具有酪氨酸激酶活性的生长因子受体和(或)病毒癌基因的产物,由此推想 $p34^{cdc2}$ 的活性调控有可能是通过其酪氨酸的磷酸化来实现的。在人体子宫颈癌(HeLa)细胞中^[2],在酪氨酸磷酸化的一些蛋白质中, $p34$ 占绝大部分。酪氨酸磷酸化的量于 G1 相向 M 相推进期间增加。体内 $p34$ 磷酸化酪氨酸的位点(Tyr-15)与体外在 $pp60^{c-Src}$ 作用下磷酸化的位点一致。遗憾的是,至今尚不清楚何种酪氨酸激酶在体内是以 $p34$ 作底物的。在 $p34$ 中不仅酪氨酸被磷酸化,苏氨酸和丝氨酸也被磷酸化,而且苏氨酸的磷酸化状态随细胞周期发生改变。所以在这一未转化的

表1 动物细胞 CDK 一览表

CDK 名称	分子量(kD)	PS/TAIRE结构域	与cdc2微酶结构域的一致性(%)	作用时相	-结合的 Cyclin	-结合的 其他蛋白
cdc2(CDK1)	34	PSTAIRE	100	S相末 G2相 M相	-Cyclin B -Cyclin B -Cyclin A -Cyclin B	- ? - ? - ? - ?
CDK2(Eg1)	33	PSTAIRE	65	G1相START G1相末 S相初	-Cyclin D -Cyclin E -Cyclin A	-PCNA -p107*, E2F -p107, E2F
CDK3	36	PSTAIRE	66		-不清楚	
CDK4(PSKJ3)	34	PV/ISTVRE	44	G1相START	-Cyclin D	-PCNA
CDK5(PSSALRE)	31	PSSALRE	57	G1相START	-Cyclin D	-PCNA
CDK6(PLSTIRE)	40	PLSTIRE	47	?相	-Cyclin D	- ?
PICTAIR(1-3)	55	PCTAIRE	51-55		-不清楚	
p58 ^{GTA} **	58	PITSLRE	42		-不清楚	
p40 ^{MO15}	40	NRTALRE	40		-不清楚	
CDK?	?	?	?	G1相早阶段	-Cyclin ?	- ?
CDK?	?	?	?	?相	-Cyclin C, Cyclin F, Cyclin G.	

*p107为Rb相关蛋白

**p58^{GTA} = Galactosyltransferase-associated 58kD protein kinase

细胞系统中,酪氨酸的磷酸化似乎并未直接与细胞周期的调控有联系。

在爪蟾卵母细胞中^[3],p34^{cdc2}的酪氨酸也被磷酸化,该磷酸化反应与p34的H1激酶活性随细胞周期的推进而明显改变。p34酪氨酸于细胞间期磷酸化,于M相发生去磷酸化。显然,卵母细胞成熟过程中MPF的活化是与p34酪氨酸的去磷酸化反应有关。有趣的是,在裂殖酵母*sucl*基因产物p13抑制细胞跨入M相的同时,p34的酪氨酸去磷酸化反应也被阻断。尽管研究已相当深入,但尚无法肯定这类酪氨酸的去磷酸化反应是否足以使p34激酶活化,因为在该激酶中,苏氨酸残基上同时发生去磷酸化反应,且p34与cyclin等的连结也发生变化。

在小鼠3T3成纤维细胞中^[4],与爪蟾卵母细胞相同,p34酪氨酸磷酸化的高潮出现在G2相,随着跨入M相,发生酪氨酸的去磷酸化反应。该激酶的活性于去磷酸化状态下最高。酪氨酸激酶抑制剂钒酸盐具有将该细胞阻滞在G2相的作用。届时,p34的去磷酸化反应(于间期晚阶段)并不能再活化该激酶,由此推测尚有其他调控。

最后还是通过对裂殖酵母p34的Tyr-15点突变(以苯丙氨酸取代)实验^[5],发现点突变后的酵母能早熟地进入M相,且磷酸化苏氨酸/丝氨酸的量不改变,由此获得了p34酪氨酸磷酸化/去磷酸化反应直接调控着其激酶活性的令人信服的证据。

在小鼠腹水瘤细胞中分离到一种分子量也为34000的激酶^[6],专一作用于真核细胞RNA聚合酶II羧基末端区域(CTD)。它实属一个复合物的一个组分,且已被证实是小鼠*cdc2*基因的产物。这种(CTD)激酶不具备p34^{cdc2}所特有的H1激酶作用底物。由此可引出一个值得深思的现象,即在真核细胞中可能存在多种多样的p34样激酶(p34 like kinase)活性,这些p34样激酶活性系*cdc2*基因产物与其他不同亚单位组合的结果,在细胞周期的调控活动中也担负着重要的角色。

此外,在果蝇胚胎发育过程中,Shaggy基因(*Sgg*)编码分子量为56~58kD左右的蛋白质,它是一种与CDC28/*cdc2*亚家族亲缘关系较远的结构相关的丝氨酸/苏氨酸激酶^[7]。*Sgg*蛋白为构建果蝇合胞体胚层(syncytial blastoderm)和进行正常分节(segmentation)所必需。因此,*Sgg*蛋白也被认为在胚胎发育不同阶段的细胞内通讯中可能起着信号转导作用。

根据p34激酶的亚细胞定位(subcellular localization),启示了它的调控作用的复杂性。在裂殖酵母中,p34^{cdc2}的核定位似乎依赖于cyclin。M相周期蛋白一方面可作为p34的底物,另一方面控制着它的外生激酶活性(exogenous kinase activity),引导它向细胞核定位,迁向细胞核内的专一作用底物。

通过分析p34^{cdc2}的系列作用底物,表明它仅能识别由Ser/Thr-Pro等组成的结构域(表2)。

采用抗体的免疫共沉淀法,推测p34不仅是通过与cyclin的“唱双簧法”方式实现其特定作用的,甚至还采纳“四重唱”的方式,与其他一些具不同专一功能的蛋白结合而实现其功能的。最近发现,在正常人体细胞中,CDK主要以多元独立的四重复合体(multiple independent quaternary complexes)形式存在,每组复合体中包含CDK,cyclin,PCNA和p21蛋白。相反,在不少转化细胞中,PCNA和p21蛋白却自上述多元复合体中消失。p21具有抑制cyclin/CDK家族任一成员活性的作用。过量表达p21能阻抑哺乳类动物细胞增殖。这些事实表明p21蛋白很可能是CDKs的通用抑制剂^[9]。在Li-Franconi患者

表2 p34^{cdc2}作用底物^[8]

作用底物	磷酸化位点
组蛋白 H1	KS/TPK
组蛋白 H1	KS/TPXK
RNA聚合酶II的CTD	SPTSPSY
SV40的T抗原	HSTPPKK
p105 ^{Rb}	QRTPPKK
p105 ^{Rb}	LRSPYK
p60 ^{c-Src}	QTPNK
p53	SSSPQK
核仁蛋白(nucleolin)	TPXKK
c-Abl	APDTPEL
c-Abl	PAVSPLL
人核层蛋白 A	TPLSPTRI
人核层蛋白 A	RLSPSPTS
鸡核层蛋白 B2	GTPLSPTR

注: X为极性氨基酸。

p53 缺失的细胞内, CDK 复合体中的 p21 蛋白也消失^[10]。以 DNA 肿瘤病毒 SV40 或它的转化肿瘤抗原 (T) 对双倍体成纤维细胞进行转化, 结果转化细胞中的 cyclin D/p21/CDK/PCNA 复合体解离。CDK4 与 cyclin D, PCNA 和 p21 分离, 而与一种 16kD 的多肽(p16)结合。在转化细胞中, 由 cyclin A 或 B1 与 p21/CDK/PCNA 组成的四重复合体也进行重组。PCNA 和 p21 不再与 cdc2-cyclin B1 二重复合体结合; 而在 cyclin A 组成的复合体中不再含 p21, 以一种 19kD 多肽取代之。这些四重复合体的改组正反映了癌基因在转化后细胞中调控细胞周期的部分机制^[11]。

除了 CDK, 还有不少其他蛋白质激酶参与调控细胞周期, 控制一些关键的事件, 如外源信号的转导, 细胞内信号的转导, 细胞周期各时相间的过渡, 检查点的调控, 有丝分裂的推进, 有丝分裂向减数分裂的过渡, 转录和翻译等过程。就以简单的芽生酵母为例, 经突变体表型的补偿法、分子生物学的筛选法、生化分离和抗体筛选法等分析, 已鉴别出有关的蛋白激酶 30 余种。值得提出的是, 通过外源信号的转导激发的转录活动涉及一些转录因子, 这些转录因子也是蛋白激酶的反应底物, 其中被了解得较为清楚的自然是 cAMP 反应元件结合蛋白(cAMP-response-element binding protein, 简写 CREB)。根据 CREB 的氨基酸顺序, 启示它具备蛋白质激酶 A、蛋白激酶 C 和酪蛋白激酶 II (Casein kinase II) 等所能识别和作用的共有结构域。已知大量的核内癌基因蛋白 (oncoproteins), 包括 Myc, Myb, Fos, Ela 和 SV40 的 T 抗原, 均具有酪蛋白激酶 I 识别的结构域^[12]。此外, 为生物学家们所熟悉的脊椎动物未受精卵 (即成熟的卵球), 均在细胞静止因子 (cytostatic factor, 简写 CSF) 的作用下停滞在第二次减数分裂中期, 而所谓的 CSF 活性, 仍 c-Mos 蛋白和 Ras 蛋白等调控的 MAP 激酶 (mitogen-activated protein kinase, 简写 MAPK) 活性与 CDK2-cyclinE 活性的协调结果^[13]。受精卵的进一步发育, 即由 M 相向 G1 相过渡, 包括通过泛蛋白 (ubiquitin) 实现 cyclins 的降解, 均得借助于依赖 Ca²⁺-钙调蛋白的蛋白质激酶 II (Ca²⁺-Calmodulin dependent protein kinase I) 的作用^[14]。

二、磷酸酯酶参与细胞周期的调控

与细胞周期调控中蛋白质激酶的情况形成鲜明对照的是,对蛋白质磷酸酯酶的了解甚微。

在 G2 相向 M 相过渡之时,与 cyclin B 复合在一起的 p34^{cdc2} 活化,其 Tyr-15 和 Tyr-14 去磷酸化, Thr-161 仍保持其原有的磷酸化状态,由此实现有丝分裂。Tyr-15 的去磷酸化,或许也包括了 Thr-14 的去磷酸化,均与 cdc25 基因编码的酪氨酸磷酸酯酶活化有关。已知蛋白质磷酸酯酶-1 (protein phosphatase-1, 简写 pp-1) 和蛋白质磷酸酯酶-2A (pp-2A) 也参与细胞进入有丝分裂和离开有丝分裂状态的调控。

尽管不少实验室的分析结果表明,cdc25 的作用与 p34 的去磷酸化有关,但 cdc25 基因的产物原先并不被视为酪氨酸磷酸酯酶,因为它与现有已知的酪氨酸磷酸酯酶家族成员氨基酸顺序的同源性很低。还是在最近,通过对纯化的 cdc25 蛋白的分析,证明它具有酪氨酸磷酸酯酶活性,而且具有一般酪氨酸磷酸酯酶的特征,包括其活性位点中包含有所必需的半胱氨酸残基,任何这方面的点突变均会造成其特征活性消失^[16]。cdc25 蛋白的两个引人注目特点为:对 p34^{cdc2} 具高度专一性;对 Thr-14 和 Thr-15 可能具双重的专一性。从后一点来看,cdc25 蛋白比较更类似牛痘病毒的酪氨酸磷酸酯酶 VH1,但不同于一般其他酪氨酸磷酸酯酶。cdc25 和 VH1 在体外均能使酪氨酸和丝氨酸残基去磷酸化^[16]。

在爪蟾中,cdc25 蛋白的活性是通过磷酸化/去磷酸化反应和蛋白质之间相互作用实现调控的。细胞间期的 cdc25 蛋白为丝氨酸磷酸化的蛋白质,其磷酸酯酶活性处在低下的基态水平。当细胞周期接近 M 相时,cdc25 蛋白的 N 末端区出现多位点丝氨酸和苏氨酸残基磷酸化,致使其磷酸酯酶活性提高 5 倍。cdc25 蛋白质 N 末端区富集 Ser/Thr-Pro 结构域,推测它是 cdc2 或 cdc2 激活的激酶的作用底物。经一种对 okadaic acid 敏感的磷酸酯酶处理后,cdc25 蛋白的酪氨酸磷酸酯酶活性又下降到间期的基态水平。在体外,cdc25 蛋白的磷酸酯酶活性也可被 cyclin B 刺激提高 4~5 倍。cyclin B 含有类同于一般酪氨酸磷酸酯酶所具备的但 cdc2 蛋白所缺的一种潜在反式激活域 (transactivation domain)。cdc25 蛋白具有一种依赖于细胞周期的、并能与 cdc2-cyclin B 复合物结合的特性。这类结合的高潮发生在 M 相,cdc2 激酶活性高峰出现之前^[17]。

通过 cdc2-cyclin B 复合物与 cdc25 蛋白结合,可能足以保证活性处于基态水平的部分 cdc25 蛋白能多多少少地使 p34^{cdc2} 去磷酸化。这样被激活的 p34^{cdc2} 反过来又能直接或间接地使结合在复合物上的 cdc25 蛋白磷酸化,使之进一步活化。如此反复作用,cdc25 蛋白活性不断提高,构成了一幅连锁正反馈调控 cdc25 蛋白的图式。这种快速集聚去磷酸化 p34^{cdc2} 和磷酸化 cdc25 蛋白的方式,无疑有助于驱动有丝分裂起步。

pp-1 和 pp-2A 也卷入调控细胞进入有丝分裂和离开有丝分裂的活动,但具体的机制仍不清楚。由于在体外细胞提取液中加入磷酸酯酶或磷酸酯酶抑制剂的时间不一,又由于可能存在不同的 pp-1 和 pp-2A 同工酶 (Isozymes) 或调节亚单位,而且它们具有不同的时相专一性,致使过去有关细胞周期中 pp-1 和 pp-2A 作用的结论较为混乱。

pp-1 起着调控细胞离开有丝分裂的作用,因为在遗传学分析研究中发现酵母、曲霉菌 (Aspergillus) 和果蝇等的 pp-1 基因 (dis2⁺/bws1⁺, BimG 和 pp1-87B) 突变均导致有丝分

裂紊乱,分裂中期后阶段出现一些缺陷,纺锤体的结构和染色体的分离均异常。细胞内显微注入 pp-1 或抗 pp-1 的抗体,能分别起到推进或延缓分裂中期完成和分裂后期进展的作用。细胞离开有丝分裂依赖于 p34^{cdc2} 失活,不仅包括了 cyclins 的降解,而且包括了随后的 p34 Thr-161 去磷酸化。Okadaic acid 具有阻断 cyclins 降解后 p34^{cdc2} 的失活,但低剂量的 okadaic acid 无阻断爪蟾卵母细胞提取液中 p34 Thr-161 去磷酸化的作用。已知上述低剂量 okadaic acid 具抑制 pp-2A 而不能抑制 pp-1 活性。这些事实,连同遗传学上的一些分析结果,表明 pp-2A 涉及细胞进入有丝分裂的调控,而 pp-1 是调控细胞离开有丝分裂的 Thr-161 磷酸酯酶最佳候选者。pp-1 的潜在作用底物还包括一些在 M 相期间被磷酸化的核蛋白(Nuclear proteins)。

基于一些其他证据,推测 pp-1 也调控细胞进入有丝分裂。裂殖酵母 pp-1 基因(dis2⁺/bws1⁺)产物调控细胞有丝分裂的起动,但似乎并未通过 weel(mitotic inhibitor)或cdc25(Mitotic activator)影响 p34 激酶活性。加入 pp-1 的专一蛋白抑制因子-2(Inhibitor-2),能使爪蟾卵母细胞提取液中的 cdc2 激酶提早活化,并使细胞跨入有丝分裂。加入 pp-1 起延缓有丝分裂的作用。由于 pp-1 的活性于细胞间期高,有丝分裂之前才降低,表明 pp-1 是通过一些未知的间期底物去磷酸化以拖延有丝分裂起步。待到某些涉及有丝分裂起步的准备工作就绪时,pp-1 活性就必须抑制住,以保证有丝分裂能驱动。

一些依赖细胞周期的 pp-1 的定位和活性改变,与该磷酸酯酶具有控制细胞进入有丝分裂和离开有丝分裂双重功能的特征是一致的。pp-1 的活性于细胞间期达高峰,临近 M 相时下降,而在 M 相 p34 激酶活性最高时又上升。pp-1 定位的变更可能起着调控其活性和其底物专一性的作用。在哺乳动物细胞中,G1 相和 S 相期间的 pp-1 分布在细胞质内,到了 G2 相和 M 相聚集在核内,有丝分裂期间则与浓缩的染色体紧密结合。

pp-1 的两种专一蛋白抑制剂即抑制因子-1(Inhibitor-1)和抑制因子-2,也可能按照一种依赖细胞周期的方式调整 pp-1 的活性。抑制因子-2 的水平随细胞周期而波动,当细胞欲离开有丝分裂而需要 pp-1 活性时,抑制因子-2 的水平却达高峰。然而 cdc2 激酶可能具有催化灭活抑制因子-2 的作用,因为在体外 cdc2 激酶能磷酸化并灭活抑制因子-2 从而达到活化 pp-1 的结局。

裂殖酵母中 pp-2A 基因(ppa2⁺)的突变导致细胞早熟有丝分裂,发生了类同于爪蟾卵母细胞提取液中 okadaic acid 抑制 pp-2A 后引出现象。pp-2A 是 INH 的一个组分,而 INH 具有阻断 p34^{cdc2} 活化的作用^[18]。因此 pp-2A 和 pp-1 似乎具有调控细胞有丝分裂起动时间的作用。pp-1 调控有丝分裂起动时间的一条途径是:按照一种依赖细胞周期的方式维持 p34Thr-161 于去磷酸化状态,达到阻止 cyclin 与 p34 结合的目的。事实上,必须有一定量的 cyclin 才能克服 INH 的活性,但 okadaic acid 并不能增加 cyclin 与 cdc2 结合,由此估计不论是 pp-2A 或是 pp-1 均未调控细胞间期 p34Thr-161 的磷酸化反应。可能存在一种间接调控机制,即 pp-2A 通过维持 cdc25 蛋白于去磷酸化的无活性状态,避免了 p34 Tyr-15/Thr-14 的去磷酸化,致使阻止 p34^{cdc2} 活化。鉴于 pp-2A 水平于细胞周期无变化,pp-2A 的活性就必须严格调控,使它就在有丝分裂起步之前降低。这些关于 pp-2A 活性于细胞周期无变化的报道,只是反映一些以人工合成底物作为材料的测试结果。pp-2A 的酪氨酸磷酸化具抑制其磷酸酯酶的功效^[19],不少 pp-2A 调节亚单位也能调整它的磷酸酯酶活性和专一性。

最近在裂殖酵母中还发现三种蛋白质酪氨酸磷酸酯酶 (protein tyrosine phosphatases, 简写PTPases), 分别为 pyp1, pyp2 和 pyp3^[20,21,22]。这些 PTPase 均无疏水的跨膜结构域, 故推测它们均定位在细胞质中。以 pNPP (para-nitrophenyl phosphate) 或诸如 Raytide 之类的 ³²P-多肽作为底物进行磷酸酯酶活性测定, 证明它们均具备固有的酪氨酸磷酸酯酶活性, 属 PTPases 家族的正宗成员。

初步的分析结果表明, weel 蛋白激酶和 cdc25 蛋白磷酸酯酶是细胞周期调控网络中的主要角色, 而 mik1 蛋白激酶和 pyp3 磷酸酯酶的作用较小。令人感兴趣的是, mik1 和 pyp3 在一些生理性变化(如在某些营养条件下诱发的变化)的调控中具有较重要的作用。

pyp3 为通过遗传学筛选法得到的 PTPase, 而 pyp1 和 pyp2 则是根据哺乳类动物 PTPase 催化域中高度保守区设计的寡聚核苷酸作引物, 并借助于 PCR 法从裂殖酵母 cDNA 库中筛选到的。遗传学分析显示, 在调控网络中 pyp1⁺ 和 pyp2⁺ 是按剂量依赖关系负调控 mik1⁺ 和 weel⁺ 上游的有丝分裂进程, 但它们在细胞内的作用底物仍未被发现。

三、展 望

在酵母遗传学背景较为清楚的基础上, 利用遗传学、生物化学、分子生物学和免疫学等方面的技术, 已开始揭示多细胞生物体细胞周期的调控机制。由于酵母的细胞周期相对较简单, 无法全面反映较高等真核细胞分裂和生长周期的实际情况。只有通过研究不同层次的生物, 诸如酵母、海胆、两栖类和哺乳类动物等的细胞周期, 从中寻找共同点后, 才有助于掌握该生物学现象的通性。

蛋白质磷酸化/去磷酸化反应是细胞周期的主要调控机制。今后有关这方面的研究将越来越复杂, 因为有更多的 cyclins 和 cdc2 相关蛋白将被相继发现, 更多的其它有丝分裂激酶或磷酸酯酶被揭示, 更多的其他活性蛋白将被证实参与 cyclin/CDK 复合体的功能组成。所以, 对由 CDK 作为细胞内信号动员其他激酶或磷酸酯酶构成的细胞周期调控的网络、及其生物学意义的研究, 无疑也是今后的主要课题。

参 考 文 献

- [1] Hartwell L H, Weinert T A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events, *Science*, 1989, 246: 629—246
- [2] Draetta G, Pownica-Worms H, Morrison D, Druker B, Roberts T, Beach D. Human cdc2 protein kinase is a major cell-cycle regulated tyrosine kinase substrate, *Nature*, 1988, 336: 738—744
- [3] Dunphy W G, Newport J W. Fission yeast p13 blocks mitotic activation and tyrosine dephosphorylation of the *Xenopus* cdc2 protein kinase, *Cell*, 1989, 58: 181—191
- [4] Moria A O, Draetta G, Beach D, Wang J Y J. Reversible tyrosine phosphorylation of cdc2: dephosphorylation accompanies activation during entry into mitosis, *Cell*, 1989, 58: 193—203
- [5] Gould K L, Nurse P. Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2⁺ protein kinase regulates entry into mitosis, *Nature*, 1989, 342: 39—44
- [6] Cisek L J, Corden J L. Phosphorylation of RNA polymerase by the murine homologue of the cell-cycle control protein cdc2. *Nature*, 1989, 339: 679—684
- [7] Bourouis M, Moore P, Ruel L, Grau Y, Heitzler P, Simpson P. An early embryonic product of the gene shaggy encodes a serine/threonine protein kinase related to CDC28, cdc2⁺ subfamily, *EMBO J*, 1990, 9: 2877—2884
- [8] Draetta G. Cell cycle control in eukaryotes: molecular mechanism of cdc2 activation, *TIBS*,

1990, 15: 378-383

- [9] Xiong Y, Hannon G J, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin-kinases, *Nature*, 1993, 366: 701-704
- [10] Xiong Y, Zhang H, Beach D. Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation, *Genes & Develop*, 1993, 7: 1572-1583
- [11] Yin Y, Tainsky M A, Bischoff F Z, Strong L C, Wahl G M. Wild-Type p53 restore cell cycle control and inhibits gene amplification in cell with mutant p53 alleles, *Cell*, 1992, 70: 937-948
- [12] Luscher B, Kuenzel E A, Krebs E G, Eisenman R N. Myc oncoproteins are phosphorylated by casein kinase II, *EMBO J.*, 1989, 8: 1111-1119
- [13] Haccard O, Sarcevic B, Lewellyn A, Hartley R, Roy L, Isumi T, Erikson E, Maller J L. Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by MAP kinase, *Science*, 1993, 262: 1262-1265
- [14] Lorca T, Cruzalegui F H, Fesquet D, Cavadore J C, Mery J, Means A, Doree M. Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs, *Nature*, 1993, 366: 270-273
- [15] Lee M S, Ogg S, Xu M, Parker L L, Donoghue D J, Maller J L, Piwnicka-Worms H. Cdc25 encodes a protein phosphatase that dephosphorylates p34^{cdc2}, *Mol Biol Cell*, 1992, 3: 73-84
- [16] Guan K, Broyles S S, Dixon J E. A Tyr/Ser protein phosphatase encoded by vaccinia virus, *Nature*, 1991, 350: 359-362
- [17] Jessus C, Beach D. Oscillation of MPF is accompanied by periodic association between cdc25 and cdc2-cyclin B, *Cell*, 1992, 63: 323-332
- [18] Lee T H, Solomon M J, Mumby M C, Kirschner M W. INH, a negative regulator of MPF, is a form of protein phosphatase 2A, *Cell*, 1991, 64: 415-423
- [19] Chen J, Martin B L, Brautigan D L. Regulation of protein serine-threonine phosphatase type -2A by tyrosine phosphorylation, *Science*, 1992, 257: 1261-1264
- [20] Millar J B A, Lenaers G, Russell P. Pyp3 PTPase acts as a mitotic inducer in fission yeast, *EMBO J.*, 1992, 11: 4933-4941
- [21] Otilie S, Chernoff J, Hannig G, Hoffman C S, Erikson R L. The fission yeast genes pyp1 and pyp2⁺ encode protein tyrosine phosphatases that negatively regulate mitosis, *Mol Cell Biol*, 1992, 12: 5571-5580
- [22] Millar J B A, Russell P, Dixon J E, Guan K L. Negative regulation of mitosis by two functionally overlapping PTPases in fission yeast, *EMBO J*, 1992, 11: 4943-4952

磷酸化修饰与细胞 DNA 复制的控制

陆 长 德

(中国科学院上海生物化学研究所, 200031)

真核细胞区别于原核细胞的一个特点是真核细胞有细胞周期, 真核细胞 DNA 复制发生在细胞周期的 S 期, 而且在一个细胞周期中细胞染色体 DNA 只复制一次, 而原核细胞可以在细胞完成分裂前, 甚至在第一轮 DNA 复制还没有完成时又开始新一轮 DNA 复制。真核细胞 DNA 复制与细胞周期有着密切的联系, 这种联系表现为 DNA 复制的起始与细胞周期的协同控制, 参与 DNA 复制的酶和蛋白质因子的基因表达调控与细胞周期的协同控制, 以及 DNA 复制及细胞周期对于外界环境影响作出的协同反应。

细胞 DNA 复制可分为合成前, 起始, 合成后几个阶段。

DNA 复制时有许多有关的酶参加, 包括合成脱氧核糖核苷三磷酸的酶, 如胸苷激酶, 胸苷酸合成酶, 核糖核苷酸还原酶, 二氢叶酸还原酶等; 有直接参加 DNA 复制的酶, 如 DNA 聚合酶 α 、 δ 、 ϵ , 引发酶, 分裂细胞核抗原(PCNA), 单链 DNA 结合蛋白 RPA, 复制因子 RFC, DNA 拓扑异构酶, DNA 连接酶等。实验证明这些酶的活性与细胞的分裂状态正相关, 分裂细胞中这些酶活性高, 终止分裂的细胞中活性很低。酵母和哺乳动物细胞的研究都表明这些酶在 G1 后期与 S 期交界处开始转录, 即它们的表达是依细胞周期调控的。在酵母细胞周期的 G1 期中有一个“START”点, 在这一点上 DNA 合成基因与细胞周期协同调控, 在通过了这一点后, 与 DNA 合成有关的酶才开始表达。在哺乳动物中有相应的一个“限制点”(restriction point) 是细胞周期与 DNA 合成基因表达协调控制的位点。从通过“START”或“限制点”后到 DNA 合成起始为 DNA 合成前阶段。

DNA 合成的起始过程首先由一种或几种起始区识别蛋白与 DNA 复制起始点形成一个起始复合物, 随后这个起始复合物使 DNA 复制起始区双螺旋局部解旋, 然后这一起始复合物与 DNA 复制蛋白(如 DNA 聚合酶 α -引发酶, RPA 等) 结合并开始合成 DNA。真核细胞有一种机制使细胞染色体 DNA 在一个细胞周期中只复制一次, 这个机制对于 DNA 复制的起始实行“开启”和“关闭”双重控制(on, off switch)。

在 S 期, DNA 新链随复制叉前进而延长, 细胞除了合成 DNA 外, 还合成组蛋白, 原有的组蛋白有的从核小体上解离下来, 有的组蛋白并不完全与 DNA 分离, 而是随机地跟从两条 DNA 母链中的一条进入两个子 DNA 中去, 并与其他组蛋白或非组蛋白重新组成核小体。

DNA 合成后细胞周期进入 G2 期, 然后进入 M 期, 在 G2 期和 M 期, DNA 合成基因不再转录, 这些酶和蛋白质因子的活性也应由某种机制进行抑制。

当细胞受到外界影响(如电离辐射)而 DNA 发生损伤时, 细胞会停止在 G1 期, 在 DNA 损伤修复后才开始 DNA 合成。在细胞周期中有一个“检查点”(check point), 是这个机制的控制点。“检查点”在 G1 后期, S 期开始之前。在“检查点”的协同控制中, 某些基

因被活化(可能与 DNA 修复有关或与细胞生长的负调控有关),某些基因被抑制(DNA 合成基因等),这一点上可能还直接抑制了 DNA 的合成。

近来细胞分子生物学,肿瘤研究,蛋白质磷酸化修饰以及真核 DNA 复制研究取得了不少进展,使人们对于这些协调控制的机制的认识大大进了一步,其中很多控制是通过磷酸化修饰实现的。本文就磷酸化修饰与细胞 DNA 复制的控制的关系作一简述。

一、参与 DNA 复制的酶和蛋白质基因的表达调控以及这些基因的启动子特征

DNA 合成基因包括合成 DNA 复制所需的原料的酶和直接参与 DNA 复制的酶与蛋白质因子,都是在细胞周期 G1/S 交界处开始合成的。从现有的结果看,这些酶和蛋白质基因的表达调控可以发生在不同的层次上。

1. 在转录水平上调控

转录一步的控制常是基因表达调控的关键步骤,把 DNA 聚合酶 α 的 5' 上游区装在报告基因萤光素酶的 cDNA 前面,导入 HeLa 细胞中进行表达,先拿走血清使之休止在 G0 期,再加入含小牛血清的培养液,细胞从 G0 进入 G1 期并同步开始细胞分裂,加入血清后 7~8 小时 [^3H]TdR 的参与与萤光素酶活性同步增加,在 13 小时达到高峰,而作为对照用的 RSV 的启动子控制的萤光素酶活性则与细胞周期无关。说明 DNA 聚合酶 α 基因的启动子可依细胞周期而进行调控,这是在转录水平上的控制^[1]。

2. 转录后加工水平上的调控

在年轻人的二倍体成纤维细胞 WI-38 中,PCNA mRNA 受细胞生长调控,在 G0 期 mRNA 含量极低,血清诱导后大大增加。这主要是转录水平上的调控。然而在开始衰老的 WI-38 中无论血清诱导与否,用 RT-PCR 方法能测到 PCNA mRNA 的前体,但无成熟的 PCNA mRNA。这表明在衰老的 WI-38 细胞中 PCNA 的基因仍然能转录,但在转录后加工一步被阻断了^[2]。目前,转录后加工一步对基因表达调控的机制了解得还很少。

3. 蛋白质修饰水平上调控

用同位素 ^{32}P 标记,发现 DNA 聚合酶 α 依细胞周期有磷酸化和去磷酸化的修饰,磷酸化发生在 180kD 和 70kD 二个亚基上^[3]。从 α 可以看到在蛋白质修饰水平上,蛋白质的功能也受到了调节控制。用 Thymidine, Aphidicolin 和 Nocodazole 分别使细胞停止在 G1/S 交界处, S 期以及 M 期,经 ^{32}P 脉冲标记后,用免疫亲和沉淀分离纯化出 DNA 聚合酶 α , 经 SDS 电泳证明, M 期的 DNA 聚合酶 α 磷酸化多,而 G1 期, S 期很少。用单链 DNA 纤维素柱来测定,从 G1/S 期细胞分出的 α 从柱上洗下的盐浓度为 150~200mmol/L 而从 M 期细胞分出的 α 从柱上洗脱盐浓度为 70~130mmol/L,表明磷酸化的 DNA 聚合酶 α 对 DNA 的亲水性降低。用抗 p34^{cdc2} 蛋白激酶的抗体做抑制试验,在体外可抑制 180kD 亚基和 70kD 亚基的磷酸化,表明这二个亚基的磷酸化由 p34^{cdc2} 催化,但 180kD 亚基仍有少量磷酸化,应是由其他蛋白激酶催化修饰的。DNA 聚合酶 α 的磷酸化修饰可能作为在转录水平上调控的补充,通过这种方式对于已合成的 DNA 聚合酶及其他因子的活性加以