

“动态不稳定”:微管是这样组装的吗?

孔 原 王先敏

(复旦大学生物工程系,上海)

提 要

真核细胞生命活动离不开微管的组装和拆卸。根据“动态不稳定”模型,微管末端的 tubulin 上连结 GTP 或 GDP 决定微管生长或缩短。该模型能解释一系列细胞基本活动。真核细胞的微管也许是这样组装的。

引 言

当代细胞生物学的目标是用细胞各组分的生化性质来解释整个细胞的结构和行为。其中最具魅力的是对细胞形态发生及与之相关的细胞运动、分裂、分化现象进行生化描述。在哺乳动物血红细胞以外的所有真核细胞中,上述现象均与一种细长而弯曲的细胞器有关。对它的细胞学研究始自上一世纪;1963 年它被正式命名为“微管(microtubule, MT)”^[1]。至六十年代末,大量生化研究表明,所有微管均由微管蛋白(tubulin)二聚体(包括 α 、 β 亚基)聚合而成。那么这些直径约 4nm 的球形蛋白分子是如何组装成长达数微米的微管的?一度有人认为微管可能象烟草花叶病毒那样是自发组装的;但最近三十多年的研究表明:事实并非那样简单!微管组装与微管蛋白生化性质有着颇为复杂的关系。

“动态不稳定”微管组装模型

微管组装的研究经历了“体内—体外—体内”三个阶段:早期只是在偏振显微镜下观察细胞有丝分裂时纺锤体微管的总体行为;以后人们运用生化技术提纯了微管蛋白,在体外研究其组装条件、速度、机制,并提出了一系列微管组装模型;七十年代至今,人们又不断进行体

内实验以检验这些模型。其中获得较多支持的是“动态不稳定(dynamic instability)”模型。

所谓“动态不稳定”是指在同一群体中微管存在独立的生长相和缩短相且很少相互转化的现象^[2]。这个现象是这样发现的:在含纯微管蛋白的组装缓冲液中加入少量微管残片以诱发微管组装,反应一定时间后微管总量趋于稳定(图 1a);但这种稳定状态不是由微管平均长度和数目都恒定来维持,而是靠微管平均长度增加和数目减少维持(图 1b、c)。微管群体稳定的背后隐藏着单个微管的不稳定,这显示出该群体包含两类微管:大多数微管以较慢速度生长,处于生长相;少数则快速拆卸,释放出微管蛋白,处于缩短相^[3]。Schulze 等(1987)报道,每个绿猴肾培养细胞中平均含微管 700 余个,其中约 500 个慢速生长,100 个快速缩短,另 100 个则比较稳定^[4]。Cassimeris 等(1986)^[5]、Mitchison 等(1986)^[6]分别在人单核细胞和 BSC1 成纤维细胞中报道了类似的“动态不稳定”现象。另外早有工作表明,微管组装伴随着 GTP 水解。一个微管蛋白二聚体能在其 β 亚基的 E-位点(“E”表示“可交换”)连结一分子 GDP 或 GTP。GTP 在该位点连结疏松,能与介质交换^[7]。

在上述发现的基础上,Kirschner 和 Mitchison 便构想了“动态不稳定”模型。其要点

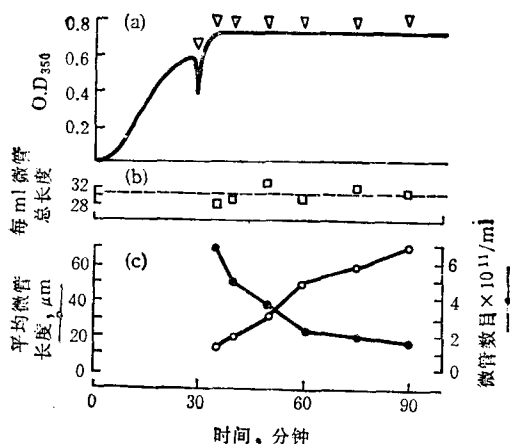
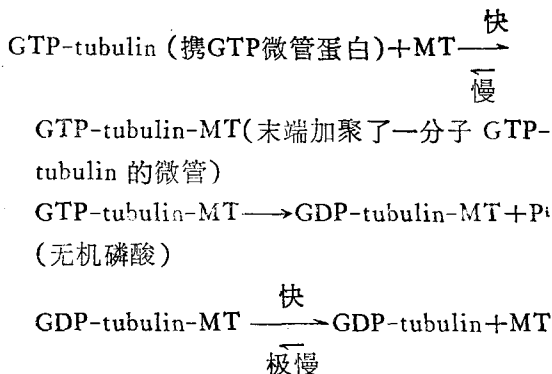


图 1^[3]

(a) 用比浊度法研究微管组装。59 μ mol/L 纯微管蛋白加入含 GTP 再生系统的组装缓冲液,以微管残片引发组装。在▽所示时刻剧烈搅拌溶液。在▽所示时刻等量取样,离心沉降至载片上,用免疫荧光技术观察、拍摄、测量、计数微管。(b) 在每份试样中用每 ml 微管数和微管平均长度相乘得到的每 ml 内微管总长度。(c) 微管平均长度和每 ml 微管数与时间的关系。平均长度每个数据点计数 500 个微管。每 ml 微管数则用 36 个区域的数据平均得到。

如下:^[2,3,8]

微管蛋白只在微管末端掺入或解离。主要反应为:



同一环境下某个微管是生长还是缩短,由其末端决定。在微管中微管蛋白上 GTP 的水解速度与介质中微管蛋白浓度无关,而微管组装速度(即游离微管蛋白掺入微管的速度)则与后者成正比。当组装速度高于水解速度时,掺入的 GTP-tubulin 就在微管末端积累,形成“GTP 帽”(其长度处于随机波动之中)。由于 GTP-tubulin 能形成较强的亚基间键,倾向聚合,游离的 GTP-tubulin 便不断掺入微管,微

管处于生长相。当“GTP 帽”很小以致随机丢失时,微管末端露出 GDP-tubulin;其构象不同于 GTP-tubulin,亚基间键较弱,倾向于解离,溶液中的微管蛋白对其亲合性也很弱,故微管开始拆卸而进入缩短相。因微管内部几乎都是 GDP-tubulin,一旦失去 GTP 帽,微管末端不断暴露的都是 GDP-tubulin,所以微管就会不断拆卸直至消失。只有少数情况(如微管中残留了足够的 GTP-tubulin)才能使微管从缩短相转入生长相:反之亦然。

“动态不稳定”模型能够包容其他的微管组装模型。如具有相当影响的“踏车”模型(微管一端有亚基净加入,另一端有净丢失)^[9],不过是微管受某种条件制约提高了两相间跃变的可能性,使微管长度在某个平均值附近摆动的情形^[3];故“微管‘踏车’行为只是微管非平衡行为的一个有趣的特例。”^[2]

模型的实验依据

Saxton 等(1984)声称体外实验揭示了微管蛋白亚基掺入部位只在微管末端^[10]。Dustin (1984)报道,携不水解的 GTP 类似物的微管蛋白在掺入微管后能使之在某些足以引发微管拆卸的条件(如加秋水仙素、Ca²⁺或大量稀释)下仍保持稳定。这暗示 GTP-tubulin 的构象的确能使微管倾向聚合^[7]。Hill 等(1983)也表示:“很明显, GTP-tubulin 在微管末端及其附近形成一个稳态帽,尽管在微管纵深亚基全部是 GDP-tubulin。”^[11] Mitchison 等(1984)报道在微管生长时突然的强力搅动能使微管骤然拆卸,他们认为这是由于微管断裂并暴露出内部 GDP-tubulin 的缘故^[8]。

许多体内实验也支持该模型。Soltys 等(1985)发现在有丝分裂期,荧光脉冲标记的微管蛋白只在微管两端掺入^[2]。Mitchison(1986)将标记微管蛋白注入 BSC1 细胞后发现,微管未标记部分与已标记部分间存在清晰的界限;可见亚基直接从微管侧面掺入的可能性不大^[6]。Cassimeris(1986)证实:“拆卸一旦开始则十分剧烈。”他声称其实验结果符合“动态不

稳定”模型^[1]。Schulze 等(1987)在论文讨论部分中写到,为使细胞微管动态群体的平均含量恒定,“500 个微管要以 $3.7\mu\text{m}/\text{分钟}$ 生长,100 个微管则以 $18.7\mu\text{m}/\text{分钟}$ 缩短;这与近来体外实验中所测得的值一致。”^[4]

模型的细胞学意义

微管拆卸主要取决于缩短相 GDP-tubulin 的解离速度。按实验值, $20\mu\text{m}$ 长的微管只要 1 分钟就能全部解离^[3]。这就使细胞能快速应答细胞内、外环境发生的急剧变化。

体内实验表明,活细胞中的微管总是集结在微管组成中心(MTOC)并向外呈放射状排列。在间期它们形成“胞质微管复合物(CMTC)”^[5],在有丝分裂期则是纺锤体或星体;游离微管甚少。这也可以用“动态不稳定”模型来解释:

MTOC 可以稳定微管之一端,所以集结在 MTOC 的微管比两端均自由的游离微管更稳定。一旦另一端有 GTP 帽,集结微管就持续增长,随即胞质自由微管蛋白浓度不断降低并持续至低于稳态水平。于是 GTP 帽普遍变小,单个微管更不稳定;而单个微管消失后再要自发组装几乎不可能,最终所有的微管都集结在中心体等 MTOC 周围了^[3]。除此以外,这种两相并存的设想给有丝分裂后期星体、中区微管不断伸长而着丝点微管不断缩短提供了一个动力学基础^[2]。

根据“动态不稳定”模型,稳定微管末端就可以稳定整个微管。对微管的选择性稳定就能决定细胞形态发生。若细胞某一区域含有“微管末端稳定因子”,向该区域生长的微管比其他方向的微管更为稳定。当后者消失或缩短时,细胞就沿含有稳定因子的区域矢向延伸了。这似乎能解释神经元树突、轴突的形式以及太阳虫运动中触手的伸缩。另外,外源信号也可以从细胞边缘通过控制微管末端来迅速控制整个细胞的微管分布。这可以认为是细胞对外源信号作出迅速反应的一个可能的机制。

“动态不稳定”模型对有丝分裂后期染色体

极向移动、纺锤体微管极性的起源等问题也作出了较为合理、仔细的阐述^[3,6]。

结 语

“动态不稳定”模型未臻完美。如 Salmon (1984)指出,即使用体内实验估计的最大微管蛋白浓度和最大末端加聚反应速度常数,按此模型仍算不出他在实验中测得的很大的微管组装速度^[12]。此外,该模型对微管组装的热力学实验数据(见[7])也未充分考虑。模型创建者自己也认为,生长相微管存在GTP帽“尚无直接证据,目前只能是一个假说”;即使被证明,其模型亦“只是微管动力学行为控制机制的一个重要部分。”^[2] Rothwell 等(1986)就发现除单个微管蛋白在微管末端依次加上外,还可能存在微管首尾粘连合二而一的生长方式。这种粘连可能在纺锤体、神经流中起某种修补作用^[13]。

Raff 等(1984)说过,微管功能多样性既可以用不同一级结构的微管蛋白构成不同的微管来解释,也可以用同种微管蛋白形成的微管受不同调节物控制来解释。大量实验显示,这两种情况都客观存在,只是在不同的细胞活动中起作用的程度有所不同^[14]。“动态不稳定”微管组装模型显然是从后一个角度阐明微管如何完成其繁复的真核细胞内功能的一种尝试。它能在多大程度上解决这个现代细胞生物学的难题目前虽然还无法预言,但这毕竟意味着当今微管功能的研究已从细胞器层次深入到了分子层次。人们对真核细胞神奇诱人的生命活动的认识,也随之更上了一层楼。

参 考 文 献

- [1] Dustin, P.: *Sci. Amer.*, 1986, 102, 2167.
- [2] Kirschner, M. et al.: *Cell*, 1986, 45, 329.
- [3] Mitchison, T. et al: *Molecular Biology of the Cytoskeleton*, 1st ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 1984, Section 1, 27—44.
- [4] Schulze, E. et al: *J. Cell Biol.*, 1987, 104, 227.
- [5] Cassimeris, L. U. et al: *J. Cell Biol.*, 1986, 102, 2167.
- [6] Mitchison, T. et al: *Cell*, 1986, 45, 515.
- [7] Dustin, P.: *Microtubules*, 2nd ed., Springer-Verlag, Berlin, 1984, 39, 57—58, 64—65.
- [8] Mitchison, T. et al: *Nature (Lond.)*, 1984, 312, 237.

(下转第 432 页)

分钟。如果色谱柱无 Zn^{2+} 存在,则所有蛋白质将在柱空体积流出(图 3)。由此可见蛋白质在 Zn-5PW 柱上的保留,是由于蛋白质与载体上亚氨基二乙酸- Zn^{2+} 螯合物作用的结果。

KaTo 等还用 Zn-5PW 柱纯化了脂肪氧化酶粗样,通过活性试验,酶的回收率达 90%,比活性提高 7.5 倍。进一步用不同进样量的脂肪氧化酶粗样研究了 Zn-5PW 吸附剂的柱容量,给出在最大分辨率时,最大负荷约为 2 毫克样品。当用该柱分离商品苹果酸脱氢酶时,酶的回收率为 95%,比活性提高 3.9 倍。

由此可见,利用各种蛋白质对重金属亲和力不同这一性质,可以选择性的分离许多酶。由于 TSK-螯合-5PW 载体有几千 Å 的孔径,因此有可能用来纯化分子量很大的蛋白质。此外,它的化学性质很稳定,25℃ 在 0.5mol/L NaOH 或 20% 醋酸中悬浮 10 天,亚氨基二乙酸的含量无明显变化。因此,可望金属螯合亲和色谱法将成为分离蛋白质的一项重要技术。

三、结 束 语

HPLAC 问世至今已有八、九年历史,由于该法具有高效,快速,选择性和分辨率高的特点,引起许多生物化学家和色谱学家的极大兴

趣^[16]。可以想象这一新的分离技术,在大规模地分离纯化生物大分子,研究其结构和功能方面将发挥更大的作用。进一步研究配体的亲和理论,开发新的选择性高,柱容量大的吸附剂和洗脱技术,仍是今后研究工作关注的问题。

参 考 文 献

- [1] Ohlson, S. et al.: *FEBS Lett.*, 1978, **93**, 5.
- [2] Dean, P. D. C. et al.: *Biochemical Society Transactions*, 1985, **13**(6), 1055.
- [3] Larsson, P. O. et al.: *Adv. Chromatog.*, 1982, **21**, 41.
- [4] Glad, M. et al.: *J. Chromatog.*, 1980, **200**, 254.
- [5] Elving, P. J.: *Affinity Chromatography, Bioselective Adsorption on Inert Matrices*, 1981, 30.
- [6] 李勇等:《生物化学与生物物理进展》,1986,(3),54。
- [7] Lowe, C. R. et al.: *J. Chromatog.*, 1981, **215**, 303.
- [8] Small, D. A. P. et al.: *J. Chromatog.*, 1981, **216**, 175.
- [9] Small, D. A. P. et al.: *J. Chromatog.*, 1983, **266**, 151.
- [10] Borchert, A. et al.: *J. Chromatog.*, 1982, **244**, 49.
- [11] Kasche, V. et al.: *J. Chromatog.*, 1981, **216**, 169.
- [12] Walters, R. R.: *Anal. Chem.*, 1983, **55**, 1395.
- [13] Gribnau, J. C. J. et al. (Editors): *Affinity Chromatography and Related Techniques*, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1982, 513—529.
- [14] Porath, J. et al.: *Nature*, 1975, **258**, 598.
- [15] Kato, Y. et al.: *J. Chromatog.*, 1986, **354**, 511.
- [16] 姚志建,《生物化学与生物物理进展》,1985,(4),60。

[本文于 1987 年 9 月 28 日收到]

(上接第421页)

- [9] Margolis, R. L. et al.: *Nature (Lond.)*, 1981, **293**, 705.
- [10] Saxton, W. M. et al.: *J. Cell Biol.*, 1984, **99**, 2175.
- [11] Hill, T. L. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1983, **80**, 7234.
- [12] Salmon, E. D.: *Molecular Biology of the Cytoskeleton*, 1st ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 1984,

Section 1, 99—109.

- [13] Rothwell, S. W. et al.: *J. Cell Biol.*, 1986, **102**, 619.
- [14] Raff, E. C. et al.: *Molecular Biology of the Cytoskeleton*, 1st ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 1984, Section 2, 293.

[本文于 1987 年 8 月 20 日收到]