

- 2 Cheung W Y. Biochem Biophys Res Comm, 1970; **38**: 533
- 3 Onek L A, Smith R J. J Gen Microbiol, 1992; **138**: 1039
- 4 Iwasa Y, Yonemitsu K, Matsui K *et al.* Biochem Biophys Res Comm, 1981; **98**: 658
- 5 Fry I J, Villa L, Kuehn G D *et al.* Biochem Biophys Res Comm, 1986; **134**: 212
- 6 Harmon A C, Prasher D, Cormier M J. Biochem Biophys Res Comm, 1985; **127**: 31
- 7 Inouye S, Francheschini T, Inouye M. Proc Natl Acad Sci USA, 1983; **80**: 6829
- 8 Leadlay P F, Roberts G, Walker J E. FEMS Lett, 1984; **178**: 157
- 9 Swan D G, Cortes J, Hale R S *et al.* Nature (London), 1987; **329**: 84
- 10 Shyu Y T, Foegeding P M. J Gen Microbiol, 1991; **137**: 1619
- 11 Falah A M S, Bhatnagar R, Bhatnagar N *et al.* FEMS Microbiol Lett, 1988; **56**: 89
- 12 Kerson G W, Miernyk J A, Budd K. Plant Physiol, 1984; **75**: 222
- 13 Petterson A, Bergman B. FEMS Microbiol Lett, 1990; **60**: 95
- 14 Putkey J A, Vi T S, Tanaka K F *et al.* J Biol Chem, 1983; **258**: 11864
- 15 Bianchini G M, Pastini A C, Muschietti J P *et al.* Biochem Biophys Res Comm, 1990; **1055**: 75
- 16 McColl S M, Evans E H. In: Marsac T D eds. Proceeding of the first european workshop on the molecular biology of cyanobacteria. France: Dourdan, 1990; 60—61
- 17 Norris V, Goldberg C M, Voskuil J *et al.* Mol Microbiol, 1991; **5**: 775
- 18 Caregola S. Mol Microbiol, 1990; **4**: 505

- 19 Smith R J, Hobson S, Ellis I. New Phytologist, 1987; **105**: 531
- 20 England R R, Evans H. Biochem J, 1983; **210**: 473

Calmodulin-Like-Protein in Prokaryotes.

Zhang Weiwen (Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai 200032, China).

Abstract Calmodulin is currently regarded as a central component in a complex regulatory system in the eukaryotic cell and imposes control upon many of the essential metabolic and physiological functions of the cells. But the attempts to find such calmodulin-like-protein in prokaryotes always gave controversial conclusion before. Since the first calmodulin-like-protein was found in *E. coli* in the early 1980s, the protein factors have been detected in many kinds of prokaryotes, and their regulatory functions have been found in sporulation, cell fission of bacteria, heterocyst cyto-differentiation, N_2 fixation and photosynthesis in cyanobacteria etc. The recent research progress in the field was reviewed.

Key words prokaryotes, calmodulin-like-protein, physiological function

细胞周期和调控因子

徐晋麟

(浙江大学生物科学与技术系, 杭州 310027)

徐沁

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 近期对细胞周期调控的研究获得了突破性进展。人们深入地研究了周期蛋白家族和 pp^{34} 蛋白家族在周期调控中的作用及二者之间的相互关系, 同时还发现了很多与之相关的调控因子, 它们彼此相互作用, 形成了极为复杂的级联调控网络。

关键词 细胞周期, MPF, 周期蛋白, CDKs, 生长因子

真核生物细胞有丝分裂周期有两个关键的过程: a. DNA 的复制; b. 姐妹染色单体均衡地分配到子细胞中. 这两个过程的进行要求精确而协调. 细胞怎样控制在 S 期起始和终止 DNA 的复制? 怎样控制染色体在 M 期产生凝聚呢? 显然细胞必须具备控制细胞周期的机制.

细胞周期的调控与个体发育、分化、生长、再生、衰老以及细胞的癌变都密切相关, 因此细胞周期调控近年来已成为分子生物学的热点之一. 从 70 年代开始, 细胞生物学家, 遗传学家和发育生物学家在各自的领域中以不同的途径同时对细胞周期调控进行了深入细致的研究, 结果是殊途同归, 共同揭示出细胞周期调控的框架和诸多调控因子相互作用所形成的级联调控网络, 其核心因子便是 pp^{34} 和周期蛋白.

1 细胞周期与调节因子

用酵母突变体^[1-4]以及爪蟾早期胚^[5]来研究细胞分裂周期, 结果表明, 在细胞周期中有两个主要的限制点, 第一个称“起始点”

(Start), 位于 G_1 期末 (图 1), 在此刻, DNA 合成起始, 不久就进入 S 期. 第二个是 M 期进入点 (commitment to M phase), 位于 M 期刚开始, 此时染色体开始凝聚, 最终姐妹染色单体发生分离. 这两个限制点的通过关键就在于调节蛋白提供了某种信号.

早在 1970 年 Johnson 等^[7]将分裂期细胞与间期细胞融合, 结果间期细胞出现了早熟染色体凝聚现象, 人们意识到分裂细胞中有一些因子可以诱导间期细胞提前进入分裂期. 卵母细胞中的这种因子被称为成熟促进因子 (maturation promoting factor, MPF)^[5]. 后又称其为 M 期促发因子 (M-phase promoting factor, MPF)^[8]. 现已证实 MPF 的活性普遍存在于从酵母到人体所有真核细胞的 M 期细胞中. 与此同时遗传学家们筛选了大量酵母的突变株, 用以研究细胞周期的调控. 70 年代初 Hartwell 等^[3,4]根据多种温度突变株的遗传分析, 查明了 30 个与细胞周期有关的基因, Nurse 等^[2]长期对裂殖酵母进行遗传分析, 揭示了 *cdc2* 及其它基因产物组成的调控系统, 调节酵母 M 期的启动^[2]. 发育生物学家在 80 年代初进行了一系列出色的研究, 在海胆卵裂的过程中发现了周期蛋白 (cyclin)^[9], 后在海星、爪蟾、果蝇、酵母等生物中也发现了 cyclin.

1988 年 Lohka 等^[10]从成熟非洲爪蟾卵母细胞提取的 MPF 进行了高纯化, 发现它由两种成分组成. 分子量分别为 45 000 和 32 000, 他们立即用抗裂殖酵母 p^{34} 抗体对提纯的 MPF 进行免疫印迹和免疫沉淀实验, 结果证明此 32 000 蛋白是 p^{34} 的同源物^[11]. 对 45 000 蛋白进行测序^[12]发现它就是过去在海胆等生物中发现的 cyclin.

周期蛋白在 G_1 和 G_2 期积累, 在 M 和 $S \rightarrow G_2$ 过程中降解, 其功能是作为 MPF 的调节亚基. pp^{34} (phosphoprotein) 蛋白, 分子量为 34 000, 是一种“Start”限制点和 M 期的特异蛋白磷酸酶, 在肽链特异氨基酸的侧面有磷酸盐基团. 在 *S. pombe* 中是 *cdc2* (cell division cycle) 基因的产物; 在 *S. cerevisial* 中是

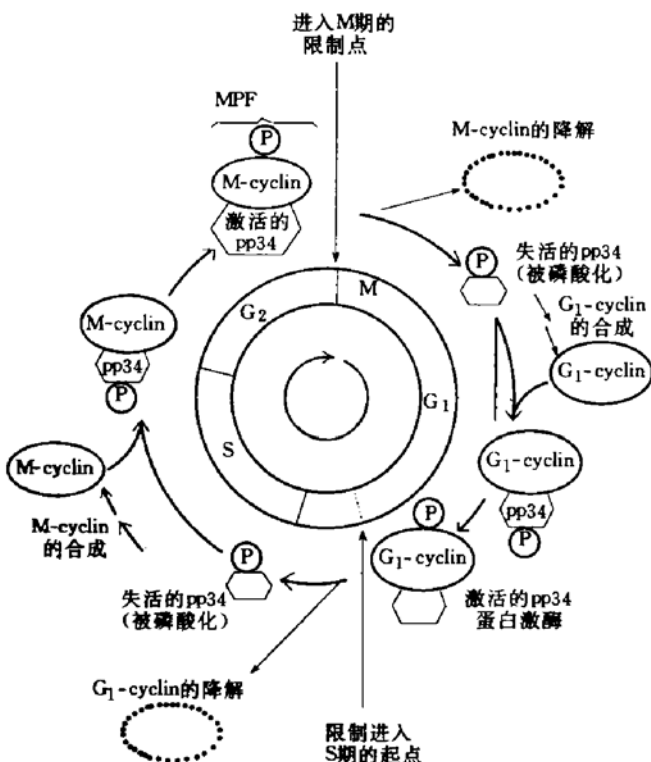


图 1 真核调节因子对有丝分裂细胞周期的调节^[6]

CDC28 基因的产物. 其功能是作为 MPF 的催化亚基, 在细胞周期中含量恒定. pp^{34} 关系到 “Start” 和 M 期的起始, 此是由于 N 端第 15 位氨基酸残基 Tyr 的磷酸化与去磷酸化, 且与 cyclin 相互作用, 直接调节 DNA 的复制起始和 M 期的进入. pp^{34} 激酶作用两种 cyclin, 一种是 M-cyclin (也称 B-型 cyclin), 控制 M 期的进入. 另一种是 G_1 -cyclin 是决定 “Start” 限制点. 显然 cyclin 和 pp^{34} 蛋白激酶是周期调控的关键成分, 它们的同源蛋白已在多种真核生物 (人、蛙、海胆和海星等) 中被发现^[6].

2 细胞周期调控

当细胞周期从 M 期进入 G_1 期后, M-cyclin 降解, pp^{34} 也被磷酸化而失活, 此时 G_1 -cyclin 逐步合成积累, 与 pp^{34} 结合形成复合体, 使其具有丝/苏氨酸蛋白激酶活性^[13], 其时能激活某些转录因子, 使它们与细胞周期盒 (ACGCGTNA) 相结合, 起动与 DNA 复制相关的基因群: cdc6、cdc8、cdc9、cdc21, 它们分别编码 DNA 合成酶、胸苷激酶、DNA 连接酶和胸苷酸合成酶, 使 DNA 得以复制. 同时具有活性的 pp^{34} 还可激活转录因子 oct 1, 使其结合到组蛋白 H₂B 的起动区, 促其表达^[14], 使细胞进入 S 期.

在细胞从 S 期进入 G_2 期的过程中 G_1 -cyclin 降解, pp^{34} 失活. 接着 M-cyclin 又逐步合

成积累, 与被磷酸化的失活态 pp^{34} 结合, 形成 MPF. 在 G_2 期末, 当有丝分裂原存在时, cdc25 基因进行表达, 其产物是一种蛋白磷酸酶, 使 pp^{34} 的 Tyr15 和 Thr14 去磷酸化, 从而恢复活性. 在其作用下使 a. 核纤层蛋白 (lamins) 磷酸化, 导致核膜的解体和再现; b. 组蛋白 H₁ 磷酸化, 导致染色体的凝聚; c. 微管蛋白磷酸化, 导致细胞骨架的重新组合, 使细胞进入 M 期. 接着泛蛋白连接酶系 (ubiquitin ligase system) 也被磷酸化而激活, 又特异性地使 M-cyclin 降解^[15], pp^{34} 被磷酸化而失去活性, 细胞又进入 G_1 期 (图 1).

3 CDKs 和 cyclin 的超家族

在多细胞生物器官形成的过程中, 细胞分裂必须协调一致, 因而需要更多的 “起始” 和 “终止” 信号, 而不同类型的 cdc 2 蛋白可能特异地传导这些信号. 这些 cdc 2 蛋白系列必须和 cyclin 结合才能成为活化的蛋白激酶, 因而被称为依赖 cyclin 型激酶或 CDKs (cyclin-dependent kinases). CDKs 仅是蛋白激酶的功能区, 但大小则是以包含蛋白激酶超家族中所有的保守元件 (conserved elements). CDKs 可用两种途径来分离: a. 构建 cDNA 克隆, 以 PCR 筛选 cdc-2 相关顺序; b. 克隆与 cdc 2 功能互补的 CDC 28 基因^[16].

表 1 用 PCR 检出的 cdc 2 相应 cDNA^[16]

名 称	基 序	与 cdc 2 激酶功能 区的一致性/%	周期蛋白 结合类型
cdc1 (CDK1)	PSTAIRE	100	B-型
CDK2	PSTAIRE	65	A-, D-和 E-型
CDK3	PSTAIRE	66	未知
CDK5 (PSSALRE)	PSSALRE	57	D-型
PICTAIRE (1-3)	PCTAIRE	51-55	未知
CDK4 (PSKJ3)	PV/ISTVRE	44	D-型
PLSTIRE (CDK6)	PLSRIRE	47	D-型
PITAIRE	PITAIRE	42	未知
p58-GTA	PITSLRE	42	未知
p40-Mo15	NRTALRE	40	未知

人类的 pp³⁴ 蛋白能取代缺陷型酵母的 pp³⁴, 它因此而被分离获得, 其主要是和 M-cyclin 结合, 使细胞从 G₂ 进入 M 期. 另一种蛋白激酶 CDK 2 与 cdc-2 有 65% 相似 (表 1), 是调节 DNA 复制超始中的主要激酶. 蛙的 CDK 2 基因已被分离, 用蛙的细胞抽提物实验表明, DNA 复制必须是 CDK 2, 而非 cdc-2 蛋白.

人类的 CDK2 至少和两种 cyclin 结合, 一种是 cyclin A, 以前被认为是一种类似 B-型的 cyclin, 现在认为它也在 DNA 复制中起作用^[17]. 另一种是 cyclin E, 它因可与缺失 G₁-cyclin 的酵母细胞互补而被分离, 它在 DNA 复制起始中起作用^[18]. 它和 cyclin 都可以和 RB (retinoblastoma) 基因相关蛋白 p¹⁰⁷, 以及转录因子 E2F 形成复合物. 在细胞周期中, 当 cyclin E 降解后, cyclin A 可能取代它, 继续作用于底物 (图 2).

中可使细胞 DNA 复制起始, 所以也是哺乳类 G₁-cyclin 的候选者, D-型的相应 CDKs 已经找到.

4 D-型 cyclin

D-型 cyclin 有 3 种: D₁、D₂、D₃ (图 2), 在不同类型细胞中, 它们的含量不同. 还不清楚它们在细胞周期中是否起不同的作用, 还是在不同的细胞中起相同的作用. cyclin D 引起了人们极大的兴趣, 因为它们将细胞周期, 信号传导及癌变三者联系起来. 在 G₀ 期细胞中加入血清可诱导产生出 cyclin D, 且 cyclin D 的诱导和持续合成还依赖于生长因子的存在, 它和细胞癌变的关联也在于此, cyclin D₁ 在一些肿瘤细胞中过度表达, 人们发现有些原癌基因, 如 PRADI 和 bcl-1, 和 cyclin D₁ 基因是相同的.

两个研究小组采用免疫沉淀和免疫印迹法研究发现 D-型 cyclin 和 3 种 cdc 2 蛋白结合^[19,20], 其一是 CDK2 与 cyclin D₁ 结合, 与 D₃ 结合微弱. 另外两种是 CDK4、CDK5 (图 2).

CDK5 也被称为 PSSALRE, 此是根据相应于 cdc 2 蛋白家族保守区 PSTAZRE 氨基酸序列命名的, 它与 D₁、D₃ 都有关. 然而 CDK-4 原称为 PSKJ3, 其 cDNA 是丝/苏蛋白激酶的寡聚核苷酸定向筛选中分离得到的, 在巨噬细胞中它是 D₁ 的主要搭档. cyclin D₁-CDK4 复合体在 G₁ → S 时积累, 在 S 早期 cyclin D₁ 降解, CDK4 在整个周期中水平不变.

CDK4 和 CDK5 的一级结构有较大差异, CDK5 在 ATP 结合位点既有 Tyr, 又有 Thr, 而 CDK4 只有 Tyr 残基. 在 cdc 2 和 CDK2 中, Tyr 和 Thr 残基等当量磷酸化将降低其蛋白激酶活性^[21]. cdc 2 Tyr 的残基磷酸化与去磷酸化与 Thr 残基是分开进行的. 如果 CDK4 和 CDK5 都是在 ATP 结合位点上以磷酸化形式来进行调节的话, 那么 CDK4 应只受 Tyr 激酶和磷酸化酶调节^[16].

D₁、D₃ cyclin 及相应的 CDKs 可与增殖核

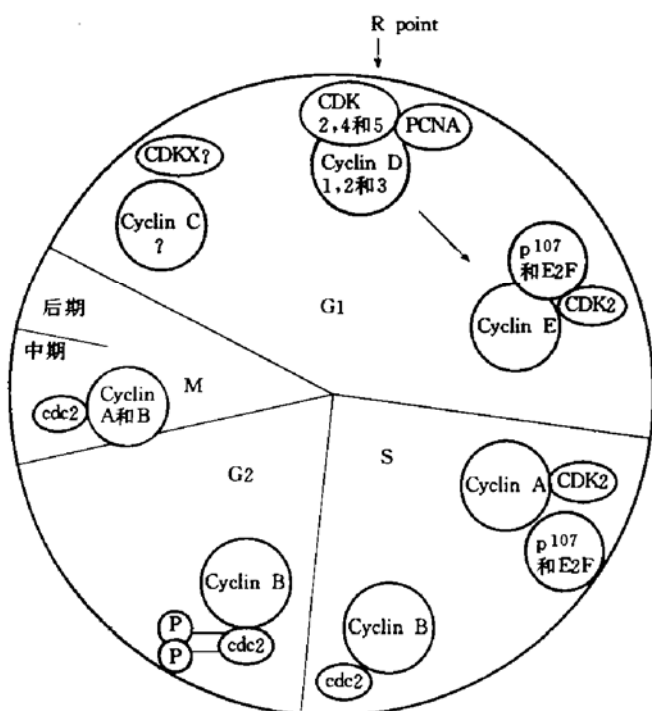


图 2 在细胞周期中各类 cyclin 与相应 CDKs 结合^[16]

人类的 cyclin A、B、E 都有一定程度的同源性, 因而它们能与相似或相同的蛋白结合也是顺理成章的事. 此外还发现 cyclin C、D、F, 它们的相关性较小, C-, D-与 E-相似, 在酵母

抗原 (PCNA proliferating cell nucleus antigen, DNA 多聚酶 δ 亚基的辅助因子) 产生共免疫沉淀, 因而 D 型也和 A、E 型一样成为 DNA 复制调控因子的候选者. 尽管 CDK4 或 CDK5 作为 D 型的“搭档”以共沉淀而被检出, 但这些免疫复合物没有任何酶活性, 只有在体外, *baculovirus* 产生的 D 型 cyclin 和体外表达系统产生的 CDK4 形成复合物才表现出蛋白激酶活性, 实验证明 p^{Rb} 可能是 D 型 cyclin 的体内底物. cyclin D_3 与 p^{Rb} 结合得很紧密, 这也是个有力证据.

5 Cyclin C、F 的“搭档”

Harlow 小组用 PCR 在 *cdc 2* 相关 cDNA 中筛选到的 CDKs 是 cyclin C、F “搭档”最有希望的候选者. 现已分离出 10 种, 其中包括 CDK2、4、5, 其蛋白激酶的功能区与 *cdc 2* 有 40% 相同 (表 1), CDK3 还可以代替酵母的 CDC 28, 但未找到与之搭档的 cyclin. 余下的 cDNA 有几个可能不是 CDKs, 例如 p58-GTA 和 PCTAIRE 家族的三个成员, 分子量 (50 000—60 000) 比已知的 CDKs 大得多, 它们可能不需要与 cyclin 结合来获得激酶活性,

这样 PLSTIRE(CDK6) 似乎是 cyclin C 或 F 相关 CDKs 的最佳候选者, 它的顺序与 CDK4 最相似, 且显示了与 D 型 cyclin 结合的能力, 故被称为 CDK6. CDK5 已经被分离纯化, 它是一种脑神经纤维激酶, 不和 cyclin 结合. 可能还有多种未发现的 CDKs 和 cyclin 也和细胞周期调控密切相关^[16].

6 细胞周期和外源信号调控

细胞周期的调控是十分复杂的, 除了 cyclin 和 CDKs 内源调控因子外, 还受到很多外源信号的调控, 最重要的是生长因子. 关键是通过激活生长因子受体, 起动基因表达来控制细胞的增殖. Baserga 等^[22]提出了一个模型来说明生长因子对周期调节的影响. 他们提出, 生长因子, 如 PDGE、EGF 和 IL-2, 诱导某些早期生长调节基因如 *c-myc*、*c-fos* 及 mid G_1 基因, 当然也包括 cyclin 基因的表达. 同时通过促有丝分裂剂的刺激, 使 IGF-1 受体与其配体的反应能力发生改变. 从而加强了 DNA 合成基因 (DNA 聚合酶 α 亚基, 胸苷合成酶, PCNA 基因等) 的表达, 逐步导致染色体复制和有丝分裂的进行. 在细胞周期中肿瘤抑制基

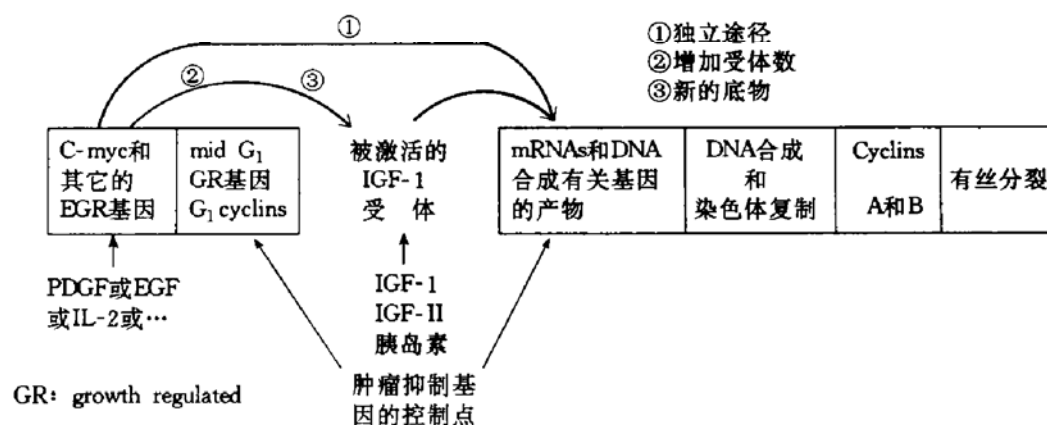


图3 细胞周期和外源信号调控^[22]

因, 如抗癌基因是十分重要的控制因子, 如 RB 基因的产物可以抑制 *cdc 2* 的转录; 而 Wilms 瘤抑制基因 WT1, 可抑制 IGF-1 基因的转录, p^{53} 蛋白在血细胞的 G_1 期似乎可抑制生长调节基因的表达, 如 DNA 多聚酶 α 基因

和 PCNA 基因. 其它的一些基因通过级联效应对细胞周期也具有调控作用, 如 Wee 1 或 mik1 基因的产物, 作为一种蛋白磷酸激酶, 使 p^{34} 上的 Tyr 15 和 Thr 14 磷酸化而失去活性^[15], 但 Nim1 基因可控制 Wee1 基因, 使其

产物磷酸化而失活;相反 BWS 1 和 SDS 21 基因又可使 Wee 1 的产物去磷酸化而活化,这样形成了一个错综复杂的级联调节网络.可能还存在其它的调控因子和途径,正等待着人们进一步去揭示.

7 染色体凝聚调节因子在细胞周期中的作用

在真核细胞周期中,核内 DNA 的复制(S期)和有丝分裂(M期)是有联系的,必须先完成 DNA 的复制,然后细胞分裂才能开始,为了使这两个过程的连结精确而有序,必须存在某种系统,它可以发现未复制的 DNA 并产生抑制信号,阻止有丝分裂因子的激活.近期发现一种 DNA 结合蛋白 RCC 1 (regulator of chromosome condensation) 在其缺失时有丝分裂可在 DNA 合成前起动,这就意味着 RCC 1 可能是一种信号分子,它能发现未复制的 DNA,并产生细胞分裂的抑制信号.然而 RCC 1 的突变体不仅不能调节细胞周期,同时也失去了其它的一些功能,也许 RCC 1 在核中还有其它作用,且在至今尚未探明的细胞内周期调控与细胞内其它过程的关系方面也可能有一定作用^[17].

参 考 文 献

- 1 Rudkin B B. The New Biologist, 1991; **3**: 570
- 2 Nurse P. Nature, 1990; **344**: 503
- 3 Hartwell L H, Culotti J, Reid B J. Proc Natl Acad Sci USA, 1970; **60**: 352
- 4 Hartwell L H. J Mol Biol, 1971; **59**: 183
- 5 Masui Y, Markert L. J Exp Zool, 1971; **177**: 129
- 6 Murray A W. Nature, 1989; **342**: 14
- 7 Johnson R T, Rao P N. Nature, 1970; **226**: 717
- 8 Sunkara P S, Wright D A, Rao P N. Proc Natl Acad Sci USA, 1979; **76**: 2799
- 9 Evans T, Rosenthal E T, Youngblom J *et al.* Cell, 1983; **33**: 389
- 10 Lohka M J, Hayes M K, Maller J L. Proc Natl Acad Sci USA, 1989; **85**: 3009
- 11 Gartier J, Norbury C, Lohka M *et al.* Cell, 1988; **54**: 433
- 12 Labbe J C, Capony J P, Caput D *et al.* EMBO J, 1989; **8**: 3050
- 13 Cross F R, Tinkelenberg A H. Cell, 1991; **65**: 879
- 14 Roberts S B. Science, 1991; **253**: 1022
- 15 Hunt T. Nature, 1991; **349**: 100
- 16 Trust W. TIBS, 1993; **18**: 195
- 17 Pagano M, Pepperkok R, Verde F *et al.* EMBO J, 1992; **11**: 961
- 18 Dulic V, Lees E, Reed S I. Science, 1992; **257**: 1958
- 19 Matsushine H, Eweu M E, Storm D K *et al.* Cell, 1992; **71**: 323
- 20 Xiong Y, Zhang H, Beach D. Cell, 1992; **71**: 504
- 21 Gu Y, Rosenblatt J, Morgan D O. EMBO J, 1992; **11**: 3995
- 22 Baserga R, Rubin R. Eukaryotic Gene Expression, 1993; **3**: 47
- 23 Dasso M. TIBS, 1993; **18**: 96

Cell Cycle and Regulation Factor. Xu Jinlin (Department of Biological Science & Technology of Zhejiang University, Hangzhou 310027, China); Xu Qin (Shanghai Institute of Biochemistry, Academic Sinica, Shanghai 200031, China).

Abstract Recently the research for cell cycle regulation has been made a great progress. People have gone deeply into the cyclin family and p³⁴ family to find out their regulation functions in cell cycle and the relationship between them. Simultaneously, many regulation factors which are related with them have been found. All of these factors interact to form a very complicated cascade regulation network.

Key words cell cycle, MPF, cyclin, CDKs, growth factor