

γ -微管蛋白研究进展

董辉 李越中* 胡玮

(山东大学生命科学院微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

摘要 概述了近年来对 γ -微管蛋白复合体结构、分子机制以及功能的研究进展。 γ -微管蛋白是真核生物体内一种重要的保守性功能蛋白, 以 γ -微管蛋白小复合体和 γ -微管蛋白环式复合体两种形式存在。通过 γ -微管蛋白复合体结合蛋白定位于微管组织中心, 参与微管的晶核起始以及有丝分裂纺锤体的组装等细胞功能。

关键词 γ -微管蛋白, γ -微管蛋白复合体, 微管组织中心

学科分类号 Q51

微管蛋白最初是在精子鞭毛中发现的, 含有 α 和 β -微管蛋白两种组分。其后的研究表明, α 和 β -微管蛋白在真核生物细胞中普遍存在并且高度保守, 是所有微管结构的主要组成。作为细胞骨架的重要组分, 微管不仅在维持细胞形态、保持细胞内部结构的有序性中起重要作用, 而且与细胞内的物质运输、细胞运动、细胞的分化发育以及细胞分裂繁殖等生命活动密切相关。因此, 对于微管蛋白的研究一直是细胞生物学的热点之一。但是, 由于分析手段的限制, 在发现 α 和 β -微管蛋白之后长达 20 年的时间里, 人们对于微管蛋白家族的认识始终没有超出 α 和 β -微管蛋白的范围。1989 年, Oakley 等^[1]在构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 中发现了 γ -微管蛋白的编码基因 *mipA*, 一个全新的未知领域才展现到人们面前。

目前, 在真核生物中已经确认的微管蛋白有 7 种, 分别称为 α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η -微管蛋白^[2]。其中 δ -微管蛋白发现于绿藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*), 由 *uni3* 基因编码。该基因突变会导致基体的三联体微管的 C 亚纤维缺失。 η -微管蛋白发现于草履虫 (*Paramecium*), 由 *sm19* 基因编码。该基因的温度敏感突变在限制性温度条件下会阻止基体的复制^[3]。而 ϵ , ζ -微管蛋白的发现则是数据库序列分析的结果, 其胞内功能现在还不清楚。

δ , ϵ , ζ , η -微管蛋白在真核生物体内的存在并不普遍, 各物种同源蛋白序列比较的相似性也不高。而在几乎所有真核生物细胞中均发现了 γ -微管蛋白家族的成员, 人、果蝇 (*Drosophila*)、衣藻 (*Chlamydomonas*) 以及锥虫 (*Trypanosoma*) 中 γ -微管蛋白序列相似性在 72% ~ 94% 之间^[2],

与 α , β -微管蛋白也有 29% ~ 35% 的相似性^[1]。 γ -微管蛋白在真核生物体细胞内具有重要的细胞功能, 它起始胞内微管的晶核形成, 控制有丝分裂纺锤体的复制等, 并进而影响微管以及其他细胞结构的生物功能。研究 γ -微管蛋白有助于进一步阐明真核生物细胞分化发育以及某些生理疾病的发生机理, 特别是对于研究肿瘤细胞无限繁殖行为具有重要意义。

1 γ -微管蛋白的胞内形式及定位

1.1 γ -微管蛋白复合体

在真核生物体内, γ -微管蛋白主要以 γ -微管蛋白环式复合体 (γ -tubulin ring complex, γ TuRC) 和 γ -微管蛋白小复合体 (γ -tubulin small complex, γ TuSC) 两种形式存在^[4,5]。 γ TuRC 最先是非洲爪蟾 (*Xenopus*) 卵中提取获得的, 含有大约 10~14 个 γ -微管蛋白分子以及至少 6 种其他相关蛋白。电子显微观察表明, γ TuRC 具有弹性的开放环式结构^[6], 该环式结构直径 25 nm, 沉降系数在 25 S 和 32 S 之间^[7]。 γ TuSC 含有 2 个 γ -微管蛋白分子, 每个分子上结合 2 种相关的保守蛋白, 形成 6 S 的小复合体。 γ TuSC 中与 γ -微管蛋白结合的两种保守性蛋白因生物体而异, 在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中为 Spc97p 和 Spc98p, 果蝇中为 Dgrip91 和 Dgrip84, 人体中为 hGCP2 和 hGCP3, 非洲爪蟾中为 Xgrip109 和 Xgrip110^[6]。人们还在不断地致力于发现新的 γ -微管蛋白复合体的构成成分^[8]。

从果蝇胚胎中提取的 γ TuSC 和 γ TuRC 都含有

* 通讯联系人。

Tel: 0531-8564288, E-mail: lilab@sdu.edu.cn

收稿日期: 2002-04-22, 接受日期: 2002-05-28

γ -微管蛋白以及 Dgrip91 和 Dgrip84, 表明 γ TuSC 和 γ TuRC 具有相关性. 用 500 mmol/L NaCl 高盐溶液处理后只获得 γ TuSC, γ TuRC 完全消失, 表明 γ TuSC 可能是组成 γ TuRC 的亚单位, 而 γ TuSC 的高盐抗性暗示它可能为最小结构单位^[5].

运用电子显微 CT (electron microscopic tomography) 分析果蝇 γ TuRC 的三维结构表明 (图 1)^[6]: 构成 γ TuRC 环壁的亚单位以“U”型或“V”型成对排列, 每对含有 2 个 γ -微管蛋白分子, 每个分子上结合一组 Dgrip91 和 Dgrip84 蛋白. “V”型对顶端聚集, 开口向外构成螺旋环式结构. 在环的顶部存在一个不规则帽子, Dgrip163, 128 和 75s 可能是该帽式结构的组成蛋白. 在 γ TuRC

中部做切割发现该帽式结构并没有深入到环的内腔. 上述实验从结构上有力地证明了 γ TuSC 是构成 γ TuRC 的亚单位, 每个 γ TuRC 环壁含有 6~7 个 γ TuSC. 而帽式结构有可能是 γ -微管蛋白复合体结合蛋白 (γ -tubulin complex binding proteins, GTBPs) 在 γ TuRC 上的作用位点, 通过该结构 γ TuRC 连接到微管组织中心 (microtubule organization center, MTOCs) 上行使细胞功能. 另外, 该帽式结构还可能起到调节 γ TuRC 活性以及稳定环式结构的作用. 事实上, 实验证明从果蝇中纯化分离的 γ TuSC 在体外能够促进微管的晶核起始, 但是活性只有 γ TuRC 的 1/25^[4].

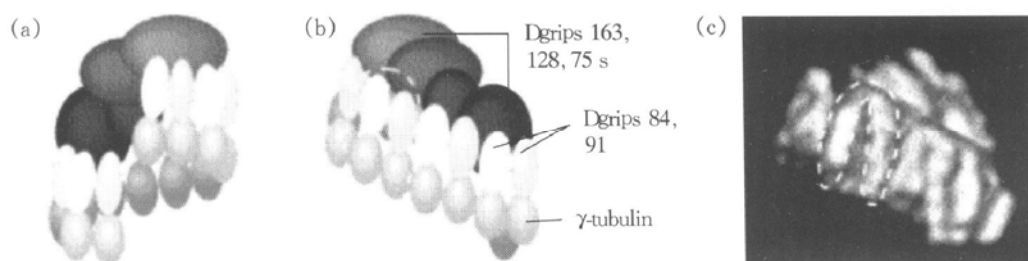


Fig 1 Structure of the *Drosophila* helical γ TuRC^[6]

图 1 果蝇 γ TuRC 的螺旋结构模型^[6]

(a) 开环结构; (b) 复合体的反面结构; (c) 电子显微 CT 重组图.

酿酒酵母的 γ -微管蛋白 Tub4p 与其他生物的 γ -微管蛋白存在很大区别^[5]. 人和构巢曲霉的 γ -微管蛋白有 65%~70% 的序列相似性, 而 Tub4p 与构巢曲霉只有 29%~38% 的相似性. 同时, Tub4p 形成的 6S 复合体在胞质内也不能组装成更大的结构. 与其他真核生物的 γ TuSC 活性相比, Tub4p 复合体促进微管晶核起始的能力非常低. 但是, 该复合体的分子结构分析又表明, 其促微管晶核起始的机制与 γ TuSC 一致. 出现这种矛盾情况的原因可能有两个: a. 尽管 Tub4p 复合体活性较低, 但对于酵母细胞微管晶核的起始已经足够; b. Tub4p 复合体在胞质内虽然不形成大的复合体, 一旦与纺锤极体 (spindle polar body, SPB) 结合, 就可能组装成更高级的有序结构, 进而形成 γ TuRC.

1.2 γ -微管蛋白复合体的胞内定位

大多数真核生物含有离散的微管组织中心, 例如真菌的纺锤极体以及动物细胞的中心体^[9]. 胞内 γ TuSC 与一些 GTBPs 结合, 锚定在中心体或者其他微管组织中心. 对酿酒酵母的研究表明, GTBPs Spc72p 在 MTOCs 的定位受细胞周期和外

激素应答途径的调控^[10]. 在细胞的营养生长期, Spc72p 结合到纺锤极体的亚结构——半桥 (half bridge) 和外斑 (outer plaque), 这两种纺锤极体亚结构组织了胞质微管的形成. 在 G1 期, 2/3 的 Spc72p 通过与半桥组分 Kar1p 结合定位于半桥, 而在其他生长周期大多数 Spc72p 位于外斑. 不同时期 Spc72p 在纺锤极体的结合位点直接决定 γ TuRC 的定位以及微管的晶核形成.

另外, γ -微管蛋白在许多动物细胞有丝分裂纺锤体上也存在富积现象^[11], 纺锤体 γ -微管蛋白的含量随细胞型而异. 除此以外, 在某些分裂细胞的中间体上也发现了 γ -微管蛋白. 在植物细胞中, 所有胞内微管均发现 γ -微管蛋白的点状分布. 另外, γ -微管蛋白在一些胞质复合体中也有大量分布, 如鸡血红细胞^[12]. 甚至在一些细胞的胞液质中, γ -微管蛋白也可与其他蛋白质形成可溶性复合体而稳定存在^[13].

2 γ TuRC 介导微管晶核起始的分子模型

γ TuRC 介导微管晶核起始的具体机制目前还

不十分明确, 而这一过程对于微管生物功能的发挥着决定性作用, 而且对于细胞周期和其他微管蛋白的合成也起着重要的调节作用^[14]. 根据实验结果, 研究人员提出两种可能的分子模型, 即原丝模型 (protofilament model) 和模板模型 (template model) (图 2). 原丝模型的提出基于早期 γ TuRC 的环式结构是在纯化 α/β 微管蛋白过程中发现的^[6]. 在该模型中, γ TuRC 作为一根部分或者完整的微管原丝, 轴向整合到初生微管的管壁中, 从

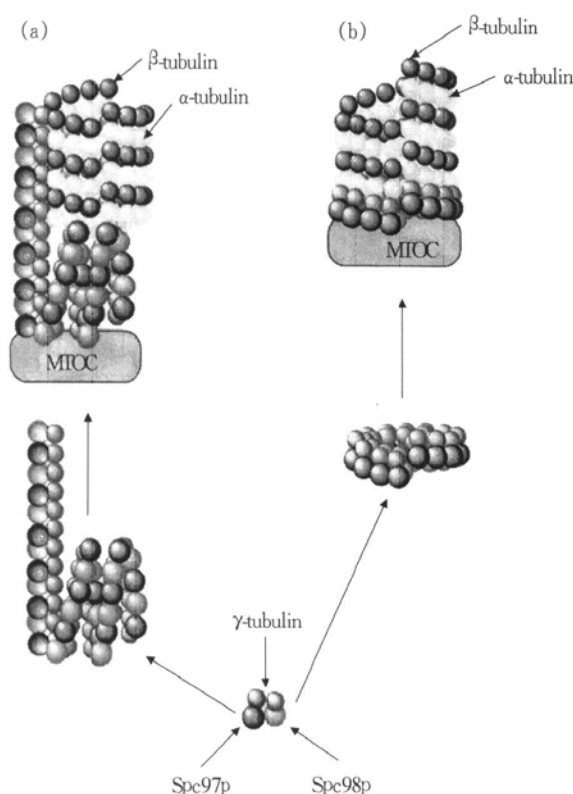


Fig. 2 Model for how γ -tubulin complexes nucleate microtubules^[4]

图 2 γ -微管蛋白复合体介导微管晶核形成模型^[4]

(a) 原丝模型; (b) 模板模型.

而诱导微管的晶核起始. 而模板模型认为 γ TuRC 作为螺旋模板与微管原丝的负极端连接, 为微管的形成提供生长平台, γ TuRC 的分子直径直接决定了微管外径为 25 nm, γ TuRC 的其他组成蛋白构成微管的帽子结构, 由 GTBPs 介导定位于微管组织中心. 但是, 由于 γ TuRC 是由偶数个 γ -微管蛋白 (12 或者 14) 组成, 与 13 个微管原丝的数目不符, 研究人员又对该模型进行了修正. 如果 γ TuRC 含有 14 个 γ -微管蛋白, 其中两个在微管的形成中可能发生叠加; 如果 γ TuRC 含有 12 个 γ -微管蛋白, 所形成的螺旋环式结构的一部分由缺口代

替. 也有可能微管的晶核形成在开始的时候为 12 或者 14 根微管原丝, 在后面的延长过程中逐渐转变成 13 根. 通过荧光和电子显微镜观察非洲爪蟾 γ TuRC 的形态, 大多数研究结果与模板模型保持一致^[15].

γ TuRC 锚接中心体的结合蛋白 GTBPs 首先是从酿酒酵母中鉴别获得. 酵母 γ TuRC 通过 Spc97p 和 Spc98p 与 MTOCs 上的 GTBPs Spc72 和 Spc110p 结合, 锚定于纺锤极体的亚结构上. Spc72 和 Spc110p 与 Spc97p 和 Spc98p 结合的氨基端结构域没有明显的序列相似性, 但是功能可以互换. 果蝇的 Asp 蛋白可能就是 GTBPs, 因为用碘化钾抽提得到的果蝇中心体, 在体外与 γ TuRC 混合前加入 Asp 蛋白, 即可恢复起始微管晶核形成活性^[4]. 其他生物体内 GTBPs 的状况不是很清楚, Spc72 和 Spc110p 的其他同源蛋白是否具有相同的功能仍有待于进一步的研究.

2000 年, Leguy 等^[16]依据他们的研究结果提出了新的晶核起始机制. 在其研究中, 从网状细胞胞溶物中分离获得部分纯化的 γ -微管蛋白单体, 以高亲和性与 α , β -微管蛋白二聚体的负极端结合形成一个帽式结构, 每个单体 γ -微管蛋白足以阻遏微管负极端的生长, 证明 γ -微管蛋白定位于微管的负极端, 是微管负极的帽化子 (capper). 同时, 在 0.8 nmol/L γ -微管蛋白存在的情况下, 微管蛋白聚合浓度降到 12~17 μ mol/L, 表明 γ -微管蛋白可有效降低微管组装的临界浓度. 重叠杂交实验 (blot-overlay) 则表明, γ -微管蛋白与 β -微管蛋白具有更强的亲和性. 根据上述结果, Leguy 等认为: 在微管形成之初, 三个 α , β -微管蛋白二聚体首先聚合形成一个低聚物, γ -微管蛋白与该低聚物上的一个 β -微管蛋白亚基侧面连接, 阻止初生微管负极端的纵向生长, 同时, 由于 γ -微管蛋白与 β -微管蛋白亚基的侧面相连, 占用了相邻微管原丝的 β -微管蛋白位点, 干扰 α , β -微管蛋白二聚体与相邻微管原丝之间的横向连接, 从而在负极端彻底形成一个死末端复合体 (dead-end complex).

3 γ -微管蛋白的生物功能

作为真核生物的细胞骨架, 微管在细胞内具有重要的生物学功能. 在细胞分裂间期, 微管以负极端与微管组织中心连接向外辐射成网状结构, 微管的这种极化控制对细胞分裂具有重要的意义. 而 γ -微管蛋白被认为在微管的晶核起始, 即微管在

MTOCs 的形成中起关键的作用。研究表明, 中心体经过盐处理清除 γ -微管蛋白后会失去形成微管晶核的能力, 分子筛收集的 γ TuRC 组分的加入可以使该能力获得恢复。另外, γ -微管蛋白基因的过表达则会导致微管的非正常聚集。微管的生长停滞以及错误组装都可能导致与微管相关的许多生物功能丧失, 包括细胞内的物质运输、细胞运动、细胞的分化发育以及细胞分裂繁殖等与细胞生存密切相关的生命活动缺失。例如, 在鸡血红细胞的发育过程中, γ -微管蛋白的亚细胞定位 (subcellular localization) 会发生很大的变化, 并且在发育事件中改变其结合特征和复合体形式, 从而成为一个转译后修饰的发育调节底物^[12]。一旦在该过程中 γ -微管蛋白的表达发生异常, 就会给鸡血红细胞的发育带来严重的负面影响。

γ -微管蛋白基因突变试验表明, γ -微管蛋白亦与有丝分裂纺锤体的形成以及细胞周期调控有关^[17]。细胞在进入有丝分裂之前会受到严密监控以保证 DNA 的正确复制, 这种检查点 (checkpoint) 包括纺锤体组装检查点和有丝分裂退出点。Hendrickson 等^[18]利用丙氨酸系统搜寻技术 (systematic alanine scanning) 从非洲粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 中获得 12 个冷敏感 *TUBG1* 突变株。这些突变株微管组装紊乱, 纺锤体有丢失现象。其中某些显性突变株不发生胞质分裂, 这种现象类似于细胞周期调控基因 *CDC16* 发生突变, 表明 γ -微管蛋白有可能参与纺锤体组装检查点的功能, 与细胞周期的监控有关。还有一部分隐性突变株尽管形成非正常纺锤体, 细胞分裂并没有停止在 M 期, 而是经过分裂后期产生非正常胞质分裂。这表明 γ -微管蛋白不仅具有促微管晶核起始的能力, 对协调细胞分裂后期姊妹染色体的分离以及随后的胞质分裂也是必需的。某些受到破坏的 γ -微管蛋白不影响细胞的有丝分裂, 允许正在分裂的细胞退出分裂周期。 γ -微管蛋白的这种性质对于维持细胞的生存具有积极的作用。

4 γ TuRC 的活性调节

Vogel 等^[19]发现, 酿酒酵母 Tub4p 的磷酸化与其 C 端的保守性氨基酸 Tyr445 有关。Tyr445 的定点突变导致细胞生长停止在早后期, 新生微管在纺锤极体的出现几率以及数目大幅度提高, 表明 γ -微管蛋白的磷酸化可能控制微管的数目。另外, 果蝇 γ TuSC 中的 γ -微管蛋白上存在鸟嘌呤核苷的

可交换位点, 而 GTP/GDP 对 γ TuRC 是否具有调控作用尚有待于进一步研究。

5 展 望

γ -微管蛋白的发现及其在起始微管晶核和组装纺锤体中关键作用的鉴定是微管研究和中心体研究的重大突破。但是许多重要的相关过程和功能还尚未揭示, 如 γ TuRC 其他组分的性质, γ TuRC 的组装及其与中心体的定位结合, GTBPs 以及 γ -微管蛋白的各种调控因子在微管的形成过程中扮演的角色, γ -微管蛋白与其他微管蛋白的相互作用和功能协同等。此外, γ -微管蛋白在高等植物细胞中成核机制的研究也远远落后于动物和真核微生物^[20]。因此, 有关 γ -微管蛋白的结构功能阐明还有待进一步的深入。

另一方面, 有关 γ -微管蛋白在生物整体发育以及生理疾病方面, 特别是在肿瘤细胞的形成和发展过程方面的研究尚少。某些癌变是否与 γ -微管蛋白的过表达有关尚有待于进一步研究。如果这种关系存在, γ -微管蛋白则可能成为一种高效而特异性的抗肿瘤药物筛选靶位模型。通过寻找作用于 γ -微管蛋白的活性化合物, 控制肿瘤细胞的恶性增殖, 恢复正常有序的细胞行为。

致谢 本文所引用的附图分别得到了美国 California University 的 Moritz 博士和英国 Beatson Institute for Cancer Research 的 Schiebel 博士的许可, 在此表示感谢。同时感谢美国 Kent State University 的宋波博士为本文提供了大量的参考文献。

参 考 文 献

- 1 Oakley C E, Oakley B R. Identification of γ -tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature*, 1989, **338** (6217): 662~ 664
- 2 Susan K D. The tubulin fraternity: alpha to eta. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, **13** (1): 49~ 54
- 3 Ruiz F, Krzywicka A, Klotz C, *et al.* The SM19 gene, required for duplication of basal bodies in *Paramecium*, encodes a novel tubulin, η -tubulin. *Curr Biol*, 2000, **10** (22): 1451~ 1454
- 4 Schiebel E. γ -Tubulin complexes: binding to the centrosome, regulation and microtubule nucleation. *Curr Opin Cell Biol*, 2000, **12** (1): 113~ 118
- 5 Wiese C, Zheng Y. γ -tubulin complexes and their interaction with microtubule organizing centers. *Curr Opin Stru Biol*, 1999, **9** (2): 250~ 259
- 6 Moritz M, Agard D A. γ -tubulin complexes and microtubule nucleation. *Curr Opin Stru Biol*, 2001, **11** (2): 174~ 181
- 7 Zheng Y, Wong M L, Alberts B M, *et al.* Nucleation of microtubule assembly by a γ -tubulin-containing ring complex.

- Nature, 1995, **378** (6557): 78583
- 8 Murphy S M, Preble A M, Patel U K, *et al.* GCP5 and GCP6: two new members of the human γ -tubulin complex. *Mol Biol Cell*, 2001, **12** (11): 3340~ 3352
 - 9 Oakley B R. γ -Tubulin. *Curr Top Dev Biol*, 2000, **49** (1): 27~ 54
 - 10 Pereira G, Grueneberg U, Knop M, *et al.* Interaction of the yeast γ -tubulin complex binding protein Spc72p with Kar1p is essential for microtubule function during karyogamy. *EMBO J*, 1999, **18** (15): 4180~ 4196
 - 11 Khodjakov A, Rieder C L. The sudden recruitment of γ -tubulin to the centrosome at the onset of mitosis and its dynamic exchange throughout the cell cycle does not require microtubules. *J Cell Biol*, 1999, **146** (3): 585~ 596
 - 12 Linhartova I, Novotna B, Sulimenko V, *et al.* Gamma-tubulin in chicken erythrocytes: changes in localization during cell differentiation and characterization of cytoplasmic complexes. *Dev Dyn*, 2002, **223** (2): 229~ 240
 - 13 Daunderer C, Graf R O. Molecular analysis of the cytosolic dictyostelium gamma-tubulin complex. *Eur J Cell Biol*, 2002, **81** (4): 175~ 184
 - 14 Zhou J, Shu H B, Joshi H C. Regulation of tubulin synthesis and cell cycle progression in mammalian cells by gamma-tubulin mediated microtubule nucleation. *J Cell Biochem*, 2002, **84** (3): 472~ 483
 - 15 Wiese C, Zheng Y. A new function for the gamma-tubulin ring complex as a microtubule minus end cap. *Nat Cell Biol*, 2000, **2** (6): E93~ E96
 - 16 Leguy R, Mellki R, Pantaloni D, *et al.* Monomeric γ -tubulin nucleates microtubules. *J Biol Chem*, 2000, **275** (29): 21975~ 21980
 - 17 Oakley B R. An abundance of tubulins. *Tren Cell Biol*, 2000, **10** (12): 537~ 542
 - 18 Hendrickson T W, Yao J, Bhadury S, *et al.* Conditional mutations in γ -tubulin reveal its involvement in chromosome segregation and cytokinesis. *Mol Biol Cell*, 2001, **12** (8): 2469~ 2481
 - 19 Vogel J, Drapkin B, Oomen J, *et al.* Phosphorylation of gamma-tubulin regulates microtubule organization in budding yeast. *Dev Cell*, 2001, **1** (5): 621~ 631
 - 20 Erhardt M, Stoppir-Mellet V, Campagne S, *et al.* The plant Spc98p homologue colocalizes with gamma-tubulin at microtubule nucleation sites and is required for microtubule nucleation. *J Cell Sci*, 2002, **115** (11): 2423~ 2431

Progress in Gamma-tubulin

DONG Hui, LI Yue-Zhong*, HU Wei

(State Key Laboratory of Microbial Technology, College of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract γ -tubulin, which is usually in the form of γ -tubulin small complex (γ TuSC) and γ -tubulin ring complex (γ TuRC), targeting to microtubule organizing centers (MTOCs) via a set of γ -tubulin complex binding proteins (GTBPs), is an ubiquitous protein in eukaryotes and plays an important role in the microtubule nucleation and assembly of mitosis spindle. Recent progress in the structure, molecule models and functions of γ -tubulin complexes is reviewed.

Key words γ -tubulin, γ -tubulin complexes, microtubule organizing centers

* Corresponding author. Tel: 86-531-8564288, E-mail: lilab@sdu.edu.cn

Received: April 22, 2002 Accepted: May 28, 2002