

研究报告

结肠腺瘤性息肉病蛋白通过与 SMAP/ KAP3
相互作用与微管结合*

王 成 郑 多 钟向阳 夏 昆 黄亮群 戴和平 陈玉祥 夏家辉**

(中南大学湘雅医学院, 中国医学遗传学国家重点实验室, 长沙 410078)

摘要 结肠腺瘤性息肉病基因 (adenomatous polyposis coli, APC) 的突变导致家族性结肠息肉腺瘤病和散发性结肠癌, APC 基因编码一个具有多个结构域、多种磷酸化状态的大分子蛋白质。APC 蛋白可通过 C 段直接或间接与微管结合, 同时还可以通过中段与微管结合, 但其结合的机制目前还不清楚。为进一步研究 APC 与其他蛋白质的相互作用, 利用酵母双杂交技术运用 APC 中段 (1 500 bp~ 4 800 bp) 构建诱饵质粒, 筛选人胎脑 cDNA 文库, 得到一个与 APC 相互作用的蛋白 SMAP/ KAP3, SMAP/ KAP3 是驱动蛋白 KIF3A/ 3B 的相关蛋白。通过免疫共沉淀和双色免疫荧光共定位的方法, 证实了 APC 与 SMAP/ KAP3 在体内的相互作用, 提示 APC 可能通过 SMAP/ KAP3- KIF3A/ B 参与沿微管的运动。

关键词 结肠腺瘤性息肉病基因 (APC), SMAP/ KAP3, 酵母双杂交, 相互作用, 微管

学科分类号 Q7

结肠腺瘤性息肉病基因 (adenomatous polyposis coli, APC) 的突变可以导致家族性结肠息肉腺瘤病和散发性结肠癌^[1]。APC 基因定位于 5q21~ 22, 全长 8 535 bp, 含 21 个外显子, 编码 2 843 个氨基酸、310 ku 的大分子质量蛋白质^[2]。APC 蛋白具有多个功能结构域: N 端含有一个可形成平行二聚体的 α 螺旋^[3]; 6~ 57 个氨基酸残基之间是一个 7 次重复的 armadillo 序列, 可与 Asef 蛋白结合^[4]; APC 中段分别含有一 15 个氨基酸 (第 1 020~ 1 169 氨基酸之间) 和 20 个氨基酸 (第 1 262~ 2 033 氨基酸之间) 的重复序列, 分别能与 β -catenin、Axin 以及 GSK-3 β 相互作用^[5]; 羧基端第 2 200~ 2 400 氨基酸之间的区域可与微管直接结合^[6], 第 2 559~ 2 771 氨基酸之间可与 EB1 蛋白相互作用, 而 EB1 是一个与微管结合的蛋白质, 从而使 APC 可通过 EB1 间接与微管相互作用^[7]。APC 在胞质中与 GSK-3 β 、Axin 可形成调控复合物, 维持 β -catenin 在胞质中的低浓度。当 APC 突变后, 丧失了对 β -catenin 的调控作用, 从而使 β -catenin 在胞质中堆积并进入核内, 与转录因子 TCF/LEF 结合, 导致细胞内 β -catenin 下游效应物, 如 c-myc、cyclin D1 的转录增强, 引起细胞的癌变^[8]。因此, APC 基因被认为是一个重要的抑癌基因。

APC 蛋白与其他蛋白质的相互作用集中在它的羧基端和中段, 而中段是 APC 基因突变的集中区域^[9], APC 可通过羧基端直接或间接与微管结

合, 但是在缺乏以上两个微管结合区域的 APC 截短蛋白仍然能与微管结合, 并沿微管以依赖 ATP 提供能量的方式向微管的“+”端运动, 成簇地聚集在细胞的突起部位, 参与细胞的迁移, 但是 APC 的这一功能的分子机制目前还不清楚^[10]。

为进一步研究 APC 与其他蛋白质的相互作用, 本文运用 APC 基因中段 1 500~ 4 800 bp 片段 (对应 500~ 1 600 个氨基酸) 构建诱饵质粒, 利用酵母双杂交技术筛选人胎脑 cDNA 文库, 得到一个与 APC 相互作用的蛋白质——小 G 蛋白鸟苷酸释放抑制因子的相关蛋白 (small G guanine dissociation inhibitor associated protein, SMAP), SMAP 是小鼠驱动蛋白相关蛋白 3 (kinesin associated protein 3, KAP3) 在人类中的同源物。然后分别利用免疫共沉淀, 双色免疫荧光共定位等方法证实了 APC 与 SMAP/ KAP3 的相互作用。

1 材料和方法

1.1 材料

酵母双杂交采用 Clontech 公司 MATCHMAKER Two-Hybrid System 2 (K1604-1), 包括质粒 pAS2-1、

* 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (G1998051002), 国家自然科学基金资助项目 (39970372) 和国家杰出青年科学基金 (39928016)。

** 通讯联系人。

Tel: 0731-4805319, E-mail: dnahelix@163.net

收稿日期: 2002-06-05, 接受日期: 2002-06-20

pACT2、pVA3、pTD1-1、pCL1、pLAM5-1 和菌种 Y190、Y187; Human Fetal Brain MATCHMAKER 文库 (HL4028AH) 及各种酵母培养基购自 Clontech 公司; 质粒 pCMV-N10-wAPC 由美国加州大学张灼华教授惠赠; 质粒 pEGX-4T-2 和谷胱甘肽 S-转移酶 (GST)-Sepharose 4B 购自 Pharmacia 公司; APC 单克隆抗体 (ab1、ab5) 购自 Oncogene 公司; Sepharose 4B、Protein A-Sepharose 4B、加强化学发光检测试剂盒购自 Pharmacia 公司, Cy2 标记的山羊抗小鼠 IgG、Cy3 标记的山羊抗兔 IgG 购自 KPL 公司, α -tubulin 单克隆抗体购自 Santa 公司。

1.2 方法

1.2.1 酵母双杂交 APC 中段诱饵质粒的构建: 设计引物 APCF 序列为 5'-aag tcg acc tat gct gga atg ctt t-3', APCR 序列为 5'-at gag ctc tta ctt tga agc agt ctg-3'。用质粒 pCMV-N10-wAPC 为模板, PCR 扩增 APC 中段 1 500~4 800 bp 共 3.3 kb 的目的片段。扩增条件: 引物 APCF、APCR 各 2 μ l (0.1 g/L), 10 $\times$ 缓冲液 5 μ l, 50 $\times$ dNTP 1 μ l, Taq 酶 1 μ l, H₂O 39 μ l, 模板 0.1 μ l, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s 后, 用 94 $^{\circ}$ C 变性 7 s, 68 $^{\circ}$ C 退火 3 min, 68 $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 循环 30 次。低熔点胶回收目的片段后, 将目的片段克隆到 TA 载体上, 然后用 Sal I 和 Sac I 双酶切, 再将目的片段按正确的方向和阅读框亚克隆入质粒 pAS2-1, 并测序证实, 得到诱饵质粒 pAS2-1-APC。

1.2.2 文库转化筛选阳性克隆: Clontech 公司的酵母双杂交胎脑文库 HL4028AH, 构建于 pACT2 (AD 质粒) Xoh I 和 EcoR I 酶切位点, 文库质粒转化至 *E. coli* BNN132。首先将文库菌种扩增, 采用 Qiagen 公司 Tip2500 大量抽提文库质粒。pAS2-1-APC 诱饵质粒和抽提的文库质粒先后转化酵母菌株 Y190, 转化子铺于 SD-LTH + 50 mmol/L 3AT (人工合成缺陷型极限培养基, 缺陷亮氨酸、色氨酸和组氨酸, 补加 50 mmol/L 3-氨基 1, 2, 4-三唑) 的培养皿上, 3~7 天后, 挑选阳性转化菌落, 划线于 SD-LTH + 50 mmol/L 3AT 培养皿上, 分离单克隆, 驱除多个文库质粒。检测报告基因组氨酸 (His3) 和 β -半乳糖苷酶 (LacZ) 的活性。阳性克隆消除诱饵质粒, 保留文库质粒。从酵母菌中抽提出文库质粒, 转化大肠杆菌 DH5 α , 扩增后抽提质粒, 进行序列分析。

1.2.3 cDNA 序列分析: 得到阳性克隆的质粒以 pACT2 载体臂上的引物 Gal4 AD 为测序引物 (t

acc act aca atg gatg), 用 Perkin Elmer ABI377 测序仪测序, 测序结果在 NCBI GenBank 数据库中进行 Blast 比较分析。

1.2.4 SMAP/KAP3 多克隆抗体的制备: Blast 分析发现其中一阳性克隆的序列为人 SMAP 编码序列, SMAP 是小鼠 KAP3 (kinesin associated protein 3) 在人类中的同源物。选取 SMAP 蛋白 C 端 687~793 肽段作为抗原, 设计引物 SF (5' aa ggatcc atg gta gag agt cgt cag atg 3', 斜体为 BamH I 酶切位点), SR (5' cg gaattc tta tca aga tcc ata gcc ata g 3', 斜体为 EcoR I 酶切位点), 从人胎脑 cDNA 文库中用 PCR 扩增出 318 bp 的抗原编码片段, 并克隆到 pEGX-4T-2 原核表达载体上, 测序证实阅读框的正确, 转化 *E. coli* BL21 宿主菌, 用 0.1 mmol/L 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG) 诱导 GST-SMAP 融合蛋白表达, 并经 GST-Sepharose-4B (Pharmacia 公司) 亲和层析法纯化融合蛋白。免疫新西兰兔, 经三次加强免疫后采取抗血清。

1.2.5 蛋白质印迹分析: 取成年昆明种小白鼠的大脑、小脑、心脏、肝脏、肺脏、肾脏、骨骼肌和睾丸等器官的组织匀浆。样品经超声处理并在 100 $^{\circ}$ C 沸水中变性后, 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分离, 电转移至 PVDF 膜 (Pharmacia 公司)。膜在封闭液 (3% BSA、5% 脱脂牛奶粉溶于 TBS) 中封闭 1 h。将一抗 SMAP/KAP3 抗血清用封闭液稀释 (1: 600), 加至 PVDF 膜上, 室温转鼓 1 h, 用含 0.1% Triton X-100 的封闭液洗 3 次, 每次 10 min。二抗过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (Calbiochem 公司) 用含 0.1% Triton X-100 封闭液稀释 (1: 3 000) 加至膜上, 室温转鼓 1 h。用 1 $\times$ TBST (TBS 加入 0.1% Triton X-100) 洗 PVDF 膜 3 次, 每次 15 min。加强化学发光检测试剂 (Pharmacia 公司, A: B= 1: 40) 加于膜上, 作用 5 min 后, 暗室内压片, 显影, 定影。

1.2.6 免疫共沉淀: 取成年昆明种小白鼠小脑皮层区组织, 加入 800 μ l 冰上预冷的裂解缓冲液 (100 mmol/L NaCl; 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5; 0.5% NP-40; 0.5 mg/L leupeptin; 1.0 mg/L pepstatin), 在匀浆器中充分匀浆。匀浆物转移至 1.5 ml 的 EP 管中, 置冰上裂解 30 min。4 $^{\circ}$ C 14 000 g 离心 10 min, 吸取上清, 即为裂解液。加入 250 μ l protein A-Sepharose 4B 和 10 μ g 正常小鼠 IgG, 置冰上, 120 r/min 摇 1 h, 4 $^{\circ}$ C 1 000 g 离心 1 min, 吸上清作为预吸附液。

在预吸附液中加入 2 μ g APC (ab-5) 抗体, 置冰上, 120 r/min 摇 1 h, 然后加入 20 μ l Protein A-Sepharose, 置冰上, 120 r/min 摇过夜. 4 $^{\circ}$ C 1 000 g 离心 1 min, 弃上清. 用预冷的裂解缓冲液 (100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 0.5% NP-40) 洗涤 3 次. 最后加 5 $\times$ Laemmli 样品缓冲液 (1 mol/L Tris-HCl (pH 6.8) 0.6 ml, 50% 甘油 5 ml, 10% SDS 2 ml, 2-巯基乙醇 0.5 ml) 12 μ l 混合, 在 100 $^{\circ}$ C 沸水中变性 10 min, 置冰上冷却. 样品经 12% SDS-PAGE 分离后, 用 SMAP/KAP3 抗血清 (1: 600) 按照 1.1.6 做蛋白质印迹分析.

1.2.7 双色免疫荧光共定位: 取刚出生 1 天的昆明种小白鼠小脑, 在含 10% 胎牛血清和 10 μ mol/L 胞嘧啶阿拉伯糖苷的 DMEM 培养基中筛选培养 2 周, 得到较为单纯的神经元细胞. 神经元细胞用 4% 多聚甲醛固定 1 h, 用含 10% 正常山羊血清和 5% BSA 的 PBS 封闭液, 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜. 吸去封闭液, 加一抗: 将 APC (ab-1) 单克隆抗体 (1: 200) 分别和 SMAP/KAP3 抗血清 (1: 600)、 α -tubulin 单克隆抗体 (1: 500) 稀释到封闭液中, 分别加至细胞中, 4 $^{\circ}$ C 下过夜. 然后加二抗: 分别用山羊抗兔 IgG-Cy3 (1: 500) 和山羊抗小鼠 IgG-Cy2 (1: 500) 稀释到封闭液中, 室温下孵育 1 h, 其中 SMAP/KAP3 与 α -tubulin 共染色的细胞用细胞核特异性染料 DAPI 染色 10 min. 以上每步反应之前用 PBS-0.1% Triton X-100 洗涤 4 次, 每次 15 min, 水溶性封片剂封片. 在荧光显微镜 (ZEISS 公司) 下照相.

2 结 果

2.1 酵母双杂交

运用酵母双杂交以 APC 基因中段 1 500~4 800 bp 为诱饵, 在人胎脑 cDNA 文库中筛选到的一个阳性克隆, 经序列分析为人 SMAP, 并通过同源比较分析发现, SMAP 是小鼠 KAP3 在人类中的同源蛋白.

2.2 SMAP/KAP3 在各组织中表达

以 GST-SMAP 融合蛋白为抗原, 免疫新西兰兔, 得到抗血清. 并取成年昆明种小白鼠的大脑、小脑、心脏、肝脏、肺脏、肾脏、骨骼肌和睾丸等组织匀浆, 做蛋白质印迹分析检测抗血清, 结果显示 SMAP/KAP3 在成年小白鼠的大脑、小脑、辜

丸中有特异性表达, 在心脏、肝脏、肺脏、肾脏和骨骼肌中无特异性表达. 其中在大脑可见一条约 70 ku 蛋白质带型, 可能为 SMAP/KAP3 在大脑中存在另一剪接型 (图 1).

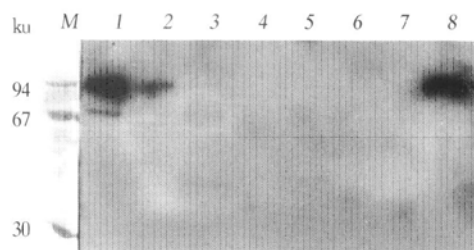


Fig. 1 Analysis of SMAP/KAP3 expression in organs of adult mouse by Western blot

M: protein molecular mass marker; 1: main brain; 2: cerebellum; 3: heart; 4: liver; 5: lung; 6: kidney; 7: skeleton muscle; 8: testis.

2.3 免疫共沉淀

为证实 APC 与 SMAP/KAP3 的相互作用, 取成年小鼠小脑皮质区神经组织的裂解液, 用抗 APC 单克隆抗体行免疫沉淀, 并用 SMAP/KAP3 抗血清通过蛋白质印迹检测, 结果发现 SMAP/KAP3 能够与 APC 共沉淀 (图 2).

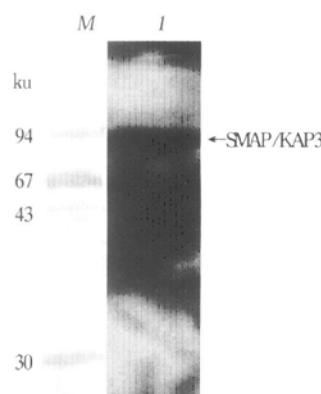


Fig. 2 Analysis of coimmunoprecipitation of SMAP/KAP3 with APC by Western blot

M: protein molecular mass marker; I: An arrow indicates the coimmunoprecipitation of SMAP/KAP3 with APC.

2.4 免疫荧光共定位

为进一步证实 APC 与 SMAP/KAP3 以及微管的相互关系, 培养了小鼠小脑的神经元细胞, 并分别用 SMAP/KAP3 抗血清和 APC、 α -tubulin 抗体做免疫荧光染色, 结果发现 SMAP/KAP3 分别能和 APC (图 3) 以及 α -tubulin (图 4) 在同一神经元细胞中共定位.

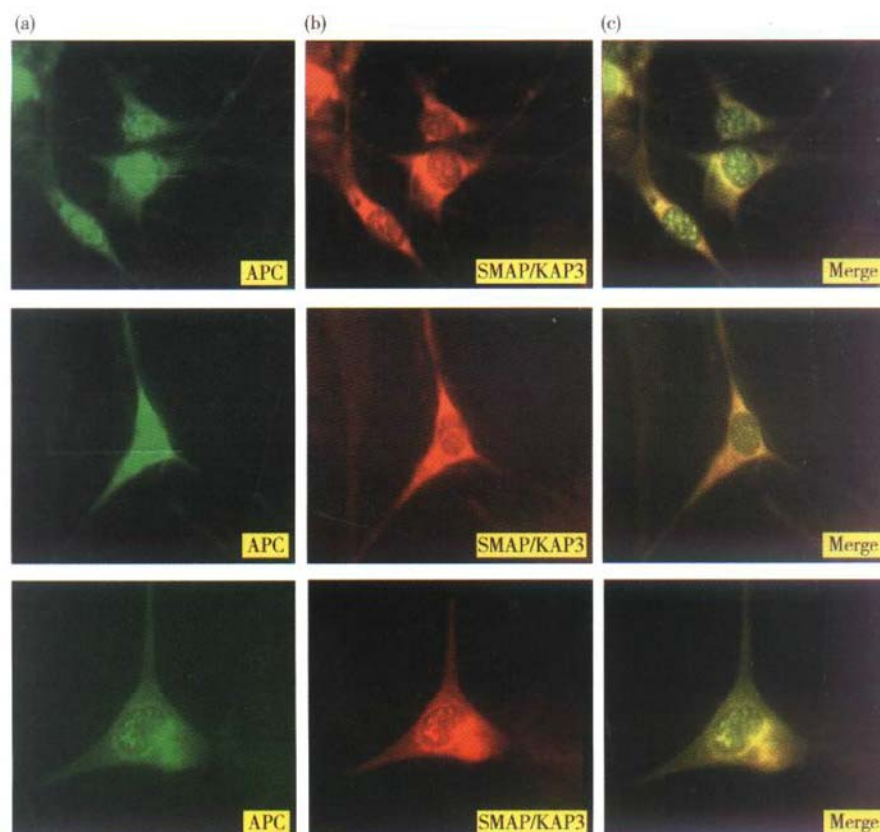


Fig 3 Coimmunostaining of APC with SMAP/ KAP3 in mouse neuron

(a) neurons stained with anti-APC antibody and visualized with Cy2-conjugated goat anti-mouse IgG (green); (b) neurons stained with SMAP/ KAP3 antiserum and visualized with Cy3-conjugated goat anti-rabbit IgG (red); (c) overlap of (a) and (b) (yellow). Magnifications are 20×100 .

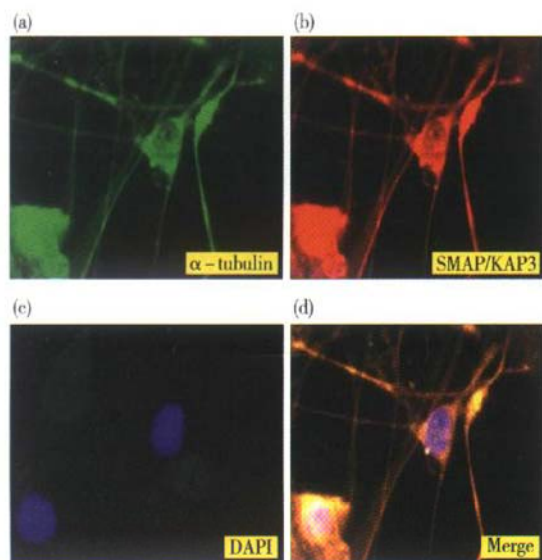


Fig 4 Coimmunostaining of α -tubulin with SMAP/ KAP3 in mouse neuron

(a) neurons stained with α -tubulin antibody and visualized with Cy2-conjugated goat anti-mouse IgG (green); (b) neurons stained with SMAP/ KAP3 antiserum and visualized with Cy3-conjugated goat anti-rabbit IgG (red); (c) neurons stained with DAPI (blue); (d) overlap of (a), (b) and (c). Magnifications are 20×100 .

3 讨 论

APC 基因是结肠癌的主要致病基因, 种系突变可以导致家族性腺瘤息肉病, 其癌变率相当高, 而体细胞突变可以在大多数散发性结肠癌中发现^[11]. APC 基因被克隆近 10 年以来, 人们对该基因的功能研究主要集中在 Wnt 信号通道中, 但近来发现 APC 的突变可以导致染色体不稳定 (chromosomal instability, CIN)^[12, 13], 从而使人们更注意到 APC 与微管的关系. 目前发现 APC 至少可以以三种方式与微管结合^[6, 7, 10], APC 的 C 端 2 200~ 2 400 个氨基酸为 APC 的基本结构域 (basic domain), 可直接与微管结合. 在此区域临近处的第 2 559~ 2 771 氨基酸残基之间, APC 通过 EB1 介导间接地与微管结合. 但是即使在缺少 C 端这两个微管结合结构域的截短 APC 蛋白, 仍然能够和微管结合, 并以一种依赖于 ATP 提供动力的方式沿微管向微管的生长端运动, 这一机制目前并不清楚^[10].

我们利用 APC 中段 (500~ 1 600 个氨基酸) 构建 bait 质粒, 利用酵母双杂交技术在人胎脑 cDNA 文库中筛选到一个与 APC 结合的蛋白 SMAP 在人类中的同源物. KAP3 与 KIF3A/3B 共同组成小鼠的驱动蛋白 II (kinesin II)^[14]. KIF3A/3B 是具有 ATP 酶活性, 能够水解 ATP 提供能量, 并沿微管从近中心体端 (“-”端) 向远中心体端 (“+”端) 做快速正向轴浆运动的动力蛋白 (motor protein), 而 KAP3 结合于 KIF3A/3B 的尾部, 能选择性识别和结合细胞内膜性细胞器、蛋白质复合物、mRNA 等, 并以微管为轨道将结合的各种物质运输到各自的目的地, 从而达到选择性运输的目的, 特别是在神经元中 KIF3A/B-KAP3 可参与神经元内快速正向轴浆运动, 对神经递质的传递有十分重要的作用^[15, 16].

我们分别利用 APC 与 SMAP/KAP3 的免疫共沉淀和神经元细胞中的双色免疫荧光染色的方法, 证明了 APC 与 SMAP/KAP3 的相互作用. 另外通过 SMAP/KAP3 与微管亚单位 α -tubulin 在神经元细胞中的双色免疫荧光共定位, 提示了 SMAP/KAP3-KIF3A/3B 是介导 APC 中段 (500~ 1 600 个氨基酸) 与微管结合的驱动蛋白复合物, 也说明 APC 可能参与了神经元的轴浆运输以及神经元的形态维持, 同时这也很好地解释了在细胞内, APC 依赖 ATP 提供能量, 沿微管向微管伸长端 (“+”端) 运动, 并在细胞突起处聚集的现象^[10, 17, 18].

参 考 文 献

- 1 Oliver M S, Lan P T, Hanan L. The adenomatous polyposis coli (APC) tumour suppressor genetics, function and disease. *Cancer Pharmacology*, 2000, **6** (6): 426~ 468
- 2 Groden J, Andrew T. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*, 1991, **66** (3): 601~ 603
- 3 Joslyn G, Richardson R, Aler T, *et al.* Dimer formation by an N-terminal coiled coil in the APC protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (23): 11109~ 11113
- 4 Kawasaki Y, Senda T, Ishidate T, *et al.* Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling. *Science*, 2000, **289** (5482): 1194~ 1197
- 5 Rubinfeld B, Souza B, Albert I. Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science*, 1993, **262** (5140): 1731~ 1734
- 6 Zumbrunn J, Kinoshita K, Anthony A H, *et al.* Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation. *Current Biology*, 2001, **11** (1): 44~ 49
- 7 Berrueta L, Tirnauer J S. The APC-associated protein EB1 associates with components of the dynactin complex and cytoplasmic dynein intermediate chain. *Current Biology*, 1999, **9** (8): 425~ 428
- 8 Nicola S F, Michael P, Walter F. The ABC of APC. *Human Molecular Genetics*, 2001, **10** (7): 721~ 733
- 9 Lamlum H, Ilyas M, Rowan A, *et al.* The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's two hit hypothesis. *Nature Med*, 1999, **5** (9): 1071~ 1075
- 10 Mimori K Y, Shiina N, Tsukita S. The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Curr Biol*. 2000. **10** (14): 865~ 868
- 11 Kenneth W. Kinzler H, Bert V. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 1996, **87** (2): 159~ 170
- 12 Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nature Rev Cancer*, 2001, **1** (1): 55~ 67
- 13 Kaplan K B, Burds A A, Swedlow J R, *et al.* A role for the adenomatous polyposis coli protein in chromosome segregation. *Nat Cell Biol*, 2001, **3** (3): 429~ 432
- 14 Yamazaki H, Nakata T, Okada Y, *et al.* Cloning and characterization of KAP3: a novel kinesin superfamily associated protein of KIF3A/3B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **16** (1): 8443~ 8448
- 15 Nobutaka H. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science*, 1998, **279** (5350): 519~ 526
- 16 Takeda S, Yamazaki H, Seog D H, *et al.* Kinesin superfamily protein 3 (KIF3) motor transports fodrin-associating vesicles important for neurite building. *J Cell Biol*, 2000, **148** (6): 1255~ 1265
- 17 Mimori K Y, Shiina N, Tsukita S, *et al.* Adenomatous polyposis coli (APC) protein moves along microtubules and concentrates at their growing ends in epithelial cells. *J Cell Biol*, 2000, **148** (3): 505~ 512
- 18 Brooke M, Donald G, Elizabeth G, *et al.* Drosophila APC2 and armadillo participate in tethering mitotic spindles to cortical actin. *Nature Cell Biology*, 2001, **3** (10): 933~ 938

APC Binds to Microtubules Through The Interaction of SMAP/ KAP3*

WANG Cheng, ZHENG Duo, ZHONG Xiang-Yang, XIA Kun,

HUANG Liang-Qun, DAI He-Ping, CHEN Yu-Xiang, XIA Jia-Hui**

(Xiangya Medical School of Center South University, National Laboratory of Medical Genetics of China, Changsha 410078, China)

Abstract Mutations in the adenomatous polyposis coli (APC) gene are responsible for familial adenomatous polyposis coli (FAP) and sporadic colorectal tumours. APC gene encodes a protein with multiple function domains and different phosphorylation states. APC is involved in regulating cell adhesion, migration, proliferation, through its interaction with multiple proteins. APC binds to microtubules with its C terminal region directly and indirectly, but APC middle region could also bind to microtubules, but the mechanism is still unclear. For further studying the interactions of APC and other proteins, using the middle fragment of APC (1 500 bp~ 4 800 bp) as bait, through yeast two-hybrid technology screen the human fetal brain cDNA library, got a novel APC binding protein SMAP/ KAP3, and then generated the SMAP/ KAP3 antiserum and the flowing coimmunoprecipitation and coimmunofluorescence staining identified the interaction of APC and SMAP/ KAP3. This suggested that the APC utilize the SMAP/ KAP3-KIF3A-KIF3B as a motor protein move along the microtubules.

Key words adenomatous polyposis coli (APC), SMAP/ KAP3, yeast two-hybrid, interaction, microtubule

* This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (G1998051002), The National Natural Sciences Foundation of China (39970372) and Youth Fund of National Science Foundation of China (39928016).

** Corresponding author. Tel: 86-731-4472093, E-mail: nlmq@public.cs.hn.cn

Received: June 5, 2002 Accepted: June 20, 2002