

细胞有丝分裂马达蛋白的化学生物学研究与展望

刘行, 姚雪彪*

中国科学技术大学安徽细胞动力学与化学生物学省级实验室, 合肥 230027

* 联系人, E-mail: yaoxb@ustc.edu.cn

2014-04-10 收稿, 2014-07-17 接受, 2014-09-17 网络版发表

国家自然科学基金(91313303)和国家重点基础研究发展计划(2010CB912103)资助

摘要 微管马达驱动蛋白(kinesin, 简称驱动蛋白)是一类沿着微管的特定方向行走的分子马达蛋白家族, 在胞内运输和细胞分裂中扮演着重要角色. 为了研究驱动蛋白的时空动力学特征, 过去近 15 年的化学生物学研究发掘了一系列特异性的小分子抑制剂, 为解析驱动蛋白的系统功能提供了有效的工具. 由于部分驱动蛋白在实体瘤中活性异常增高, 驱动蛋白小分子抑制剂渐渐发展成为癌症化疗的先导化合物. 事实上, 基于驱动蛋白 Eg5 (也叫 KIF11)和 CENP-E (着丝粒结合蛋白 E)的小分子抑制剂已经进入 I 期和 II 期临床实验. 本文将简介驱动蛋白的小分子抑制剂研究进展及临床转化研究前景.

关键词

细胞有丝分裂
微管驱动蛋白
化学生物学
Syntelin
癌症

有丝分裂纺锤体是已经证实的癌症化疗靶标. 微管是有丝分裂纺锤体的关键蛋白复合物. 为人熟知的紫杉烷类和长春碱类等作用于微管的药物已经作为特定类型癌症的抗癌药物成功应用于临床^[1,2]. 然而, 这些纺锤体毒性的药物有一定的局限性, 比如先天或获得性耐受性^[3]和浓度限制性毒性, 使得人们有必要寻找其他以有丝分裂纺锤体为靶标的药物. 作为又一个有丝分裂重要蛋白家族, 驱动蛋白家族正渐渐成为化疗药物的靶标^[4].

驱动蛋白是一类依靠化学能运输货物的分子马达家族, 在有丝分裂及胞内运输中起到至关重要的作用^[5,6]. 与正常细胞相比, 有丝分裂驱动蛋白在大部分实体瘤中异常活跃, 因此靶向有丝分裂驱动蛋白的小分子抑制剂已经渐渐成为临床肿瘤学中的新一代化疗先导化合物. 本文总结了目前对于参与癌症的人类驱动蛋白的认识, 包括它们在肿瘤发生中的作用以及作为癌症治疗的药物靶标的潜力. 以 EG5 (又叫 KIF11)和 CENP-E (着丝粒相关蛋白 E)这 2 个有丝分裂驱动蛋白为靶标的抑制剂已推进到临床实验. 我们研究了迄今为止的这些抑制剂如何在临

床实验中发挥作用, 并突出强调了从这些研究结果中得出的结论, 评估了其他具有发展成为癌症化疗新药靶标的有丝分裂驱动蛋白, 并且讨论了能否让更多的驱动蛋白成为潜在药物靶标的问题.

1 有丝分裂驱动蛋白

细胞是生命活动的最小单元, 其精确的自我复制是其生活史的重要组成部分. 复制的高保真性在生物及物种的繁衍生息过程中举足轻重. 在细胞复制过程中, 包含在染色体中的父代遗传信息在经历诸多复杂的运动后均匀地、准确无误地传递给 2 个子细胞. 整个细胞分裂过程是通过纺锤体丝与染色体着丝粒的协同作用来完成. 正确的染色体与纺锤体丝相互作用是细胞健康的保证. 同时染色体与纺锤体丝连接异常导致染色体丢失、易位等, 从而使细胞生长失控, 如癌症^[7].

动点(kinetochores)是位于着丝粒上的多组分蛋白质超结构, 它直接维持纺锤体丝与染色体的衔接, 调控染色体运动分离的时空序列性及保真性. 微管马达驱动蛋白(kinesin)是基于微管细胞骨架的运动蛋白

引用格式: 刘行, 姚雪彪. 细胞有丝分裂马达蛋白的化学生物学研究与展望. 科学通报, 2014, 59: 3025–3034

Liu X, Yao X B. Progress and prospects in chemical biology of mitotic kinesins (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2014, 59: 3025–3034. doi: 10.1360/N972014-00300

质超家族^[8]. 它们调控细胞分裂过程中的染色体运动、细胞器动力学以及蛋白质与 RNA 的转运等. 人类基因组包括约 45 种不同的驱动蛋白. 疾病基因组学研究提示驱动蛋白功能变异可改变细胞可塑性并导致疾病的发生与发展^[9]. 至今为止, 根据马达区域的系统发育分析, 驱动蛋白被分为 14 个亚家族 (kinesin-1~14)^[10]. 从功能上讲, 这些驱动蛋白在真核生物中展示 2 个主要的功能作用模式: (i) 在有丝分裂的不同阶段调节纺锤体动力学^[5]; (ii) 在间期细胞中, 调控胞内囊泡和细胞器的运输^[6]. 为了完成它们的多种功能, 驱动蛋白沿着微管特定方向行走并由 ATP 水解提供能量. 现已证实有 16 种马达驱动蛋白参与调控细胞有丝分裂的不同环节(图 1).

微管驱动蛋白包含 3 个结构功能域, 即分子马达结构域、颈部及羧基端的承载物结合域. 研究表明, 驱动蛋白与承载物间的结合特异性由羧基端决定. 基于分子马达结构域的位置, 驱动蛋白可以分为 N 型、I 型及 C 型. 目前对驱动蛋白的研究主要局限于对果蝇及小鼠等模式动物体系中驱动蛋白的 ATP 结合域(约 160 个氨基酸), 而对马达驱动蛋白分子的系

统功能知之甚少. 由于同一马达驱动蛋白在细胞运动的不同环节均有重要的功能, 经典遗传学方法无法解剖其在时空两相较为紧密过程中的功能(如马达蛋白在染色体排列及中心纺锤体微管(central spindle)形成中的功能). 为此, 特异性调控马达驱动蛋白活性的小分子抑制剂是详尽解析马达驱动蛋白系统生物学功能不可或缺的工具.

化学生物学是一门交叉性的前沿学科, 最早由美国加州大学伯克利分校的 Peter Schultz 及哈佛大学的 Stuart Schreiber 所倡导. 它是运用化学的方法及手段去研究及辅助解决生物学中的问题, 并通过生物学分子机理的研究, 优化化学小分子化合物探针的结构及功能, 使之最终成为安全有效的先导化合物及药物以用于转化医学研究.

细胞分裂是由多个马达驱动蛋白质调控通路构成的复杂生命活动, 各个驱动蛋白的功能、作用方式及相互作用模式及调控关系错综复杂. 它们的分子功能的阐明不仅需要单个蛋白水平的研究, 而且还需同时研究多个驱动蛋白在实时细胞分裂过程的作用. 由于多基因操纵的复杂性及局限性, 化学

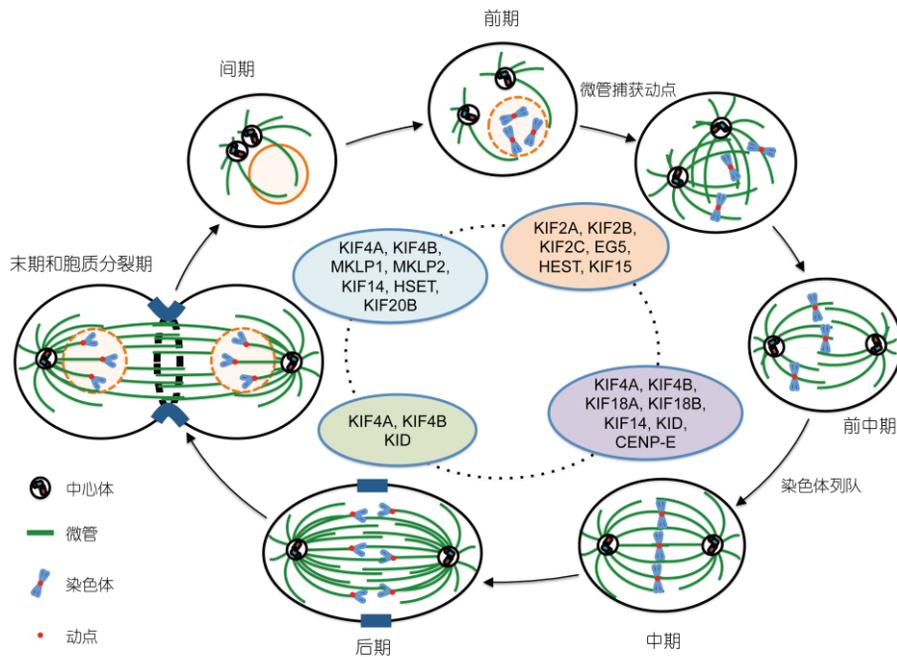


图 1 马达驱动蛋白在有丝分裂不同时期的分子功能示意图

不同的驱动蛋白在有丝分裂的不同阶段履行其功能. 有些驱动蛋白目前被认为具有单一功能, 如 Eg5 和 CENP-E. 有些驱动蛋白则在有丝分裂的不同时期都扮演着重要角色, 如 KIF4 家族已被证明在染色体排列、后期和胞质分裂过程中都发挥功能. 更为复杂的是, 有几个有丝分裂驱动蛋白在神经元发育中也有重要作用, 如 KIF2A, KIF4A, KIF4B, Eg5, KIF15, MKLP1 和 KIF20B

小分子探针为研究多个驱动蛋白调控细胞增殖活动中涉及到的各种信号转导途径的作用机制提供了有效手段及技术平台。

根据有丝分裂过程中剧烈的细胞形态学变化, 哈佛大学的 Stuart Schreiber 与 Tim Mitchison 课题组紧密合作创建了基于表型的小分子化合物高通量筛选法, 并发现了微管马达驱动蛋白 Eg5 的小分子化学探针 Monastrol^[11] 及肌球蛋白抑制剂 blebbistatin^[12]. 利用基于细胞表型筛选方法, CENP-E 驱动蛋白抑制剂 GSK923295^[13] 及 Syntelin^[14] 相继问世. 除驱动蛋白 Eg5 与 CENP-E 之外, 驱动蛋白 MCAK, KIF4, MKLP1 等亦参与细胞有丝分裂的纺锤体组装及染色体动力学过程。

2 驱动蛋白 Eg5 功能与化学生物学

Eg5 是一个 N 型马达蛋白, 参与双极纺锤体形成但可能不参与其维持^[15]. 目前的结构模型表明, 功能性 Eg5 由 2 个反平行的二聚体组成的反式(trans)四聚体. 在二聚体中, 一对马达区域分布在棒状结构的两端. 这种结构组成使得 Eg5 产生搭桥并通过正端移动的能力推进反平行纺锤体微管的分离. Eg5 是人类的细胞进入有丝分裂建立双极纺锤体必不可少的重要蛋白. 在特定的(肿瘤)细胞系中, 通过 RNA 干扰(RNAi)敲低 Eg5 蛋白或抗体注射干扰 EG5 的功能均导致纺锤体检验点的激活、有丝分裂阻抑及随后的细胞死亡^[11]. Eg5 功能受到抑制所导致的有丝分裂阻断在典型的单极纺锤体状态^[11,15], 这种表型可在培养的细胞观察到^[16,17].

为了研究驱动蛋白 Eg5 的系统功能, Tim Mitchison 课题组利用化学生物学方法筛选能够抑制 Eg5 的小分子化合物. 鉴于 Eg5 功能受到抑制呈现典型的单极纺锤体表型^[11], 他们第一轮筛选关注导致单极纺锤体表型的小分子化合物. 在第二轮的筛选主要是针对 Eg5 的体外马达功能. 通过两轮筛选, 他们发掘了首个 Eg5 的小分子化学探针 Monastrol^[11]. Monastrol 的发现大大加快了人们对细胞有丝分裂双极纺锤体组装分子机制研究的步伐, 并提供了研究细胞纠正错误连接染色体的分子机制. 利用 Monastrol 作为有效调控工具, 人们已清晰地了解 Eg5 马达驱动蛋白的单分子行为特征^[18,19], 为基于 Eg5 马达驱动蛋白的疾病干预提供了契机。

3 Eg5 抑制剂的转化医学

微管是有丝分裂纺锤体构建的关键蛋白复合物. 改变微管动态性的化学小分子(如紫杉烷类和长春碱类)已经作为特定肿瘤的首选化疗药物广泛用于临床治疗^[1,2]. 然而, 紫杉烷类和长春碱类的生物利用度及肿瘤细胞产生的耐受性^[3]促使人们寻找其他作用于有丝分裂纺锤体的新型化疗药物. 作为有丝分裂重要调控分子驱动蛋白家族引起了人们的极大关注^[4].

以 Eg5 为靶标的转化医学研究展现了很高的潜力, 目前, 共有 38 种基于 Eg5 的靶向药物(图 2)在进行或已完成 I 期或 II 期临床实验(表 1), 其中 17 个实验结果已经被发表^[20-22]. 值得一提的是, Ispinesib 对乳腺癌患者的治疗中得到了令人满意的初步结果^[22], 虽然最终的临床实验还未见报道. 第二代 Ispinesib 类似物 SB-743921 的作用效果令人鼓舞, 我们期待基于 Eg5 的靶向治疗能够不断优化并与个体化评估相结合成功地用于临床肿瘤学治疗。

4 动粒马达蛋白 CENP-E 的功能

CENP-E 是 Cleveland 课题组在寻求新的动粒蛋白过程中利用表达克隆法发掘的一个重要的功能蛋白^[23,24]. CENP-E 蛋白在进化过程相对保守, 普遍存在于后生代的真核细胞^[25,26]. CENP-E 是一个分子量大约为 312 kD 的蛋白, 其 N 端有一个马达区域, 具有结合微管的能力, 其蛋白 C 末端还有一个具有微管结合能力的区域. CENP-E 马达蛋白的 N 端与 C 端之间有一个很长的卷曲螺旋(coiled coil), 在细胞中 CENP-E 会形成同源二聚体. 作为最大的驱动蛋白, CENP-E 在细胞有丝分裂中期向后期的转换过程中必不可少^[23]. 在细胞水平, CENP-E 展现出剧烈的细胞周期依赖性动态定位^[24]. 利用免疫胶体金技术, 我们早期研究发现, CENP-E 分子在细胞核膜破裂的有丝分裂早期沿微管正端向正在组装的动粒移动^[27], 此时染色体仍处单向连接状态, CENP-E 可能参与单极定向的染色体转变成双极定向的染色体. 众多研究表明, 在多种类型细胞和组织中敲除或是抑制 CENP-E 蛋白会影响有丝分裂中期的染色体排列这一过程, 使得小部分染色体上的动粒没有被微管正确捕获而聚集在靠近纺锤体极的附近^[25,28]. Kapoor 研究组结合 Aurora B 小分子抑制剂与 CENP-E 敲低实验

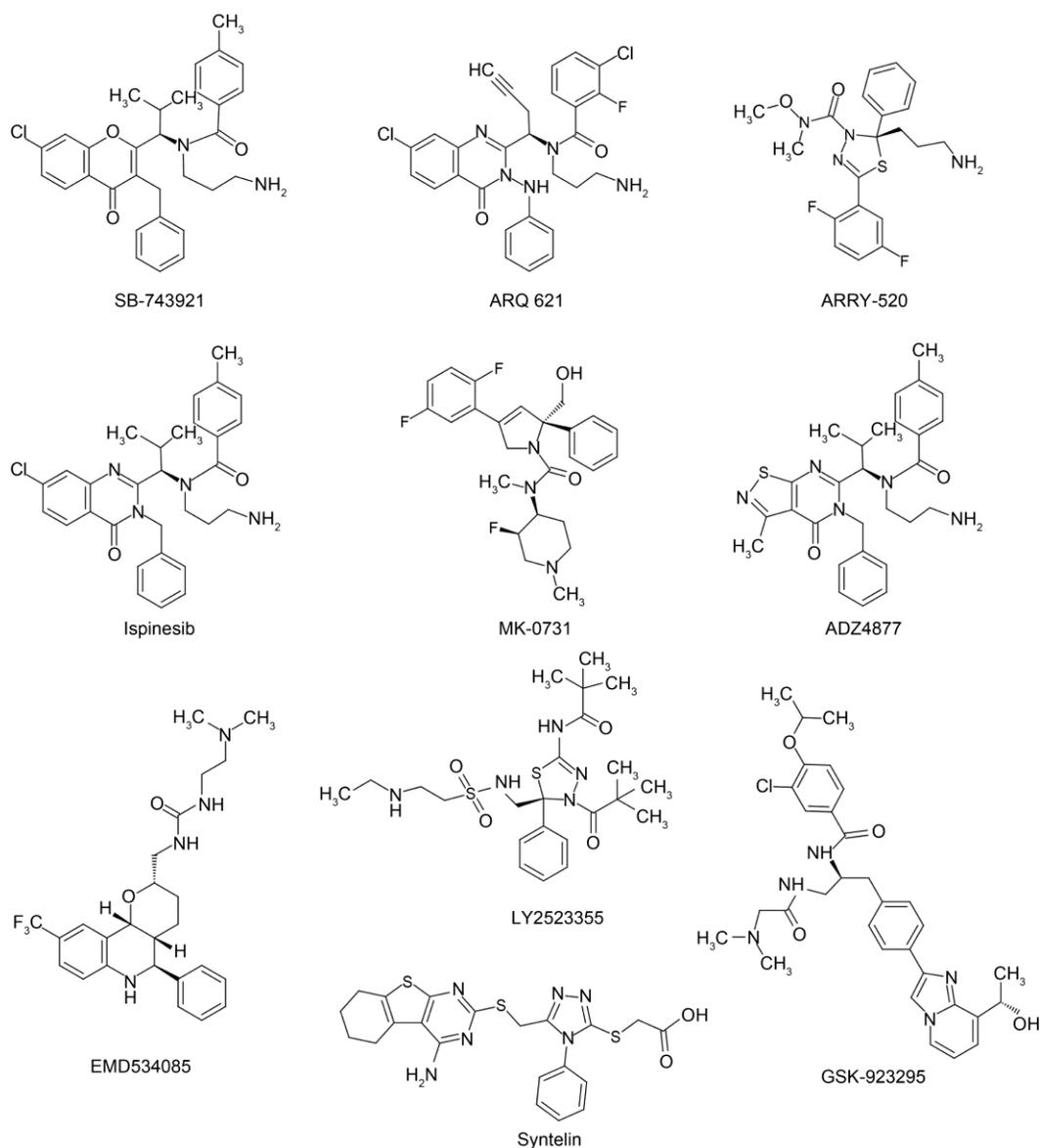


图 2 正在临床转化医学研究阶段的马达驱动蛋白的小分子抑制剂的化学结构

表 1 正在临床研究阶段的驱动蛋白抑制剂

驱动蛋白(靶标)	抑制剂	临床阶段
EG5	Ispinesib	II
	AZD4877	II
	ARRY-520	II
	SB-743921	I/II
	ARQ 621	I
	LY2523355	II
	MK-0731	I
	4SC-205	I
	EMD534085	I
	GSK923295	I
	Syntelin	0/I

证实, 通过与动粒微管的直接结合及沿着动粒微管移动 CENP-E 可以帮助单极定向的染色体朝向纺锤体赤道板运动, 从而促进染色体列队。CENP-E 在微管动点捕获过程中的功能促进了染色体的聚集和队列^[29]。Aurora B 和蛋白磷酸酶 1(PP1)介导的磷酸化-去磷酸化开关控制着 CENP-E 的活性, 而这对于染色体向赤道板聚集非常关键。CENP-E 将 PP1 运输到动点外层促进了稳定的微管捕获^[30]。在正常的细胞中, 有丝分裂检验点激酶 BubR1 的其中一个功能便是监控 CENP-E 在动点上的活性^[31]。此外, CENP-E 通过与微管正端追踪蛋白 SKAP 协同作用来调控着丝粒

与动态微管的有机衔接从而维系有丝分裂过程的染色体稳定性^[32,33]。在整体动物水平,敲除 CENP-E 会导致染色体不稳定性(chromosome instability, CIN)^[34]。非常有趣的是, CENP-E 可根据动物的遗传学背景履行肿瘤的抑制剂与肿瘤发生的促进剂的作用^[35,36]。系统研究 CENP-E 在不同遗传学及表观遗传学环境下的功能及调控机制无疑对全面解析肿瘤生物学及引导相关的转化医学研究具有重要的启示作用。

5 驱动蛋白 CENP-E 的化学生物学与转化医学

细胞生命活动的调控在分子水平表现为蛋白质-蛋白质的动态作用,蛋白质在不同时间与空间因其结合不同蛋白质而扮演不同角色^[37]。CENP-E 分子在细胞有丝分裂过程中的时空动态性,提示 CENP-E 在有丝分裂的几个环节可能扮演重要角色。事实上,早期抗体注射实验提示, CENP-E 在有丝分裂中后期(anaphase)起作用^[24]。为了系统研究 CENP-E 的分子功能,我们利用表型筛选法与 CENP-E 马达活性评估相结合发掘了一个 CENP-E 小分子抑制剂 Syntelin^[14]。Syntelin 是一个特异性 CENP-E 小分子抑制剂,其通过抑制 CENP-E ADP 从微管的游离而抑制 CENP-E 马达的动态性。Syntelin 在体外抑制 CENP-E 马达的半数有效浓度(IC₅₀)是 0.16 μmol L⁻¹,但即使在 10 μmol L⁻¹的高浓度, Syntelin 对所有测试的其他有丝分裂马达蛋白无任何抑制作用,展示了 Syntelin 的作用高度选择性。像 Monastrol 一样, Syntelin 的抑制作用可以被洗脱^[14],此特性使 Syntelin 成为有效的有丝分裂染色体动力学研究工具。利用 Syntelin 作为工具,初步研究提示 CENP-E 的马达驱动活性在有丝分裂后期的重要作用。

通过与 Cytokinetics 公司合作,葛兰素史克公司

利用高通量筛选发掘了一个 CENP-E 酶活性变构抑制剂 GSK923295^[13]。利用单分子微管正端动力学追踪、光镊与小分子抑制剂 GSK923295 相结合, Cleveland 与合作者最新研究提示, CENP-E 的马达驱动域与其尾部的微管结合域含有追踪动态微管末端的活性^[38]。由于 CENP-E 尾部的微管结合域富含丝分裂激酶磷酸化位点,下一步的研究将会聚焦在不同激酶与位点修饰对 CENP-E 追踪动态微管末端的活性调控。

值得一提的是,虽然 Syntelin 与 GSK923295 抑制 CENP-E 马达活性的分子机制各异,但其导致的有丝分裂前期染色体运动障碍表型一致^[14](图 3)。为此, Syntelin 与 GSK923295 在细胞生物学研究中的平行使用可排除小分子抑制剂的脱靶(off-target)作用。

鉴于 CENP-E 酶活性在实体瘤组织中的高活性,动物与 I 期临床实验结果证实, GSK923295 能够抑制多种人类肿瘤的生长^[13,39]。通过对人类常见实体瘤近 400 例病人组织的全蛋白质组学定量分析,美国基因泰克公司 Jackson 团队发现 CENP-E, KIF2C 等马达蛋白的蛋白质水平及活性在大部分实体瘤中显著性上调^[40],为基于 CENP-E 活性的肿瘤靶向化学治疗奠定了理论基础。可以相信,基于 CENP-E 酶活性抑制的肿瘤化学治疗在未来的几年里将会有较大的发展。

6 其他有丝分裂驱动蛋白的功能与化学生物学

在前期,染色质凝集、核膜破裂,2 个复制的中心体开始分开,进而形成双极纺锤体。几个马达驱动蛋白参与了这一过程(图 1)。HSET (也叫 KIFC1)是 kinesin-14 家族的 C-型驱动蛋白^[41]。纯化的全长 HSET 在体外运动性实验中是一个负向行走的马达

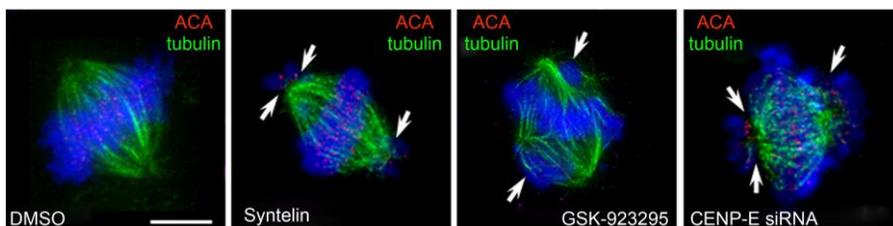


图 3 马达驱动蛋白 CENP-E 功能缺失导致染色体排列异常

HeLa 细胞经 DMSO, Syntelin, GSK-923295 或 CENP-E 特异的 siRNA 处理后,固定、打孔并染色^[14]。箭头标注后滞单向双连接(syntelic attachment)染色体。标尺: 10 μm; ACA: Anti-Centromere Antibodies

蛋白^[42]. HSET 另外一个重要的功能,是参与纺锤体中央区的微管成束,该功能对于正确的胞质分裂是必需的^[43].

为了将遗传信息同等地分配给子细胞,哺乳动物细胞严格地拥有 2 个中心体. 2 个以上的中心体的形成可导致多极分裂进而产生染色体错误分离、非整倍体并最终导致细胞死亡. Kwon 和他的同事发现,人类 HSET 是中心体扩增类癌症的一个新的潜在的治疗靶标^[44]. 为此,基于 HSET 马达活性的抑制剂在细胞生物学研究与肿瘤化学治疗均有较大的作为. 目前,虽然已经有几家公司开展了对 HSET 的化学生物学研究,但至今为止尚未出现有关 HSET 抑制剂的报道.

KIF2A, KIF2B, KIF2C(也叫 MCAK)是 kinesin-13 家族的成员. 它们是 Kin I 型不可运动的微管解聚酶,负责在有丝分裂进程中调节微管动力学^[45]. Kinesin-13 家族成员的解聚酶的活性是受到有丝分裂激酶调控的,比如 polo-like kinase 1(PLK1), Aurora A 或 Aurora B, 提示驱动蛋白与细胞周期调控机制间的有机协调^[45]. KIF2B 和 KIF2C 是被广泛研究的 kinesin-13 成员,其基本功能是通过调节动点-微管动态有机连接维持基因组稳定性. 研究表明, KIF2B 和 KIF2C 在动点上有效调控与校正有丝分裂期发生的错误的微管-动点连接如单侧衔接染色体(mono-orientated chromosomes)与单侧双向衔接染色体(merotelic attachment)^[46]. KIF2C 在肿瘤组织中的高表达现象提示 KIF2C 的小分子抑制剂是一个潜在的抗癌先导化合物^[40], 虽然已有 KIF2C 抑制剂的初步报道^[47], 但后续的构-效关系的研究及其在转化医学研究中的功效仍有待于进一步深入.

KIF4A 和 KIF4B (也称为染色体驱动蛋白, chromokinesin)是 2 个密切相关却又不同的驱动蛋白^[48], 它们在调节后期纺锤体动力学和胞质分裂的完成上起着必不可少的作用^[49]. 缺乏 KIF4 的小鼠胚胎干细胞会在小鼠异种移植中形成肿瘤^[50]. 总之,这些结果表明, KIF4A 和 KIF4B 是 2 个非常密切相关的驱动蛋白, 它们在有丝分裂期具有多重的、可能是相同的或者至少是冗余的功能. 为此,详尽解析 KIF4A 和 KIF4B 有赖于 KIF4A 和 KIF4B 特异性化学小分子抑制剂的发掘.

Kid (也称为 KIF22)是第 3 个染色体驱动蛋白, 其以单体的形式向微管的正端移动^[51]. Kid 的尾部结

构域中包括一个 DNA 结合基序和 ATP 非依赖性微管结合区. 在有丝分裂期, Kid 结合在染色体臂和纺锤体微管上提供了一个极性的推力,使染色体远离纺锤体极并朝向纺锤体赤道板运动^[52]. 虽然 Kid 的敲除会导致中期到后期转变的显著延迟,但细胞分裂仍最终完成,提示驱动蛋白之间存在一些冗余的功能.

在中期, 两极定向的染色体远离纺锤体极朝向纺锤体赤道板并同时做振荡运动, 这个过程被称为染色体聚集. KIF18A, KIF18B 和 Kid 这 3 个驱动蛋白已被证明在此过程中起重要作用. KIF18A 和 KIF18B 是 kinesin-8 家族的 2 个相关的驱动蛋白. KIF18A 被认为通过影响动点微管正末端动态性来控制正确的染色体定位^[53]. KIF18A 的敲除会导致纺锤体变长、染色体错误队列和有丝分裂检验点激活, 其过表达则导致多极纺锤体的形成. 鉴于 KIF18A 重要功能, 化学生物学研究已发掘了第 1 个 KIF18A 抑制剂^[54]. 相信随着 KIF18A 抑制剂的发掘与优化, 我们将能更有效地解析 KIF18A 和 KIF18B 的功能特异性及其分子动力学特征.

在经由有丝分裂纺锤体装置调控的染色体分离之后, 2 个子细胞进一步通过胞质分裂完成物理分离. 胞质分裂涉及一系列复杂事件, 需要 200 种以上的蛋白质在空间和时间上进行动态且有效的调控, 马达蛋白在此动态调控过程中发挥极其重要的作用^[55]. Kinesin-6 家族属 N 型马达蛋白, 其 3 个成员均在胞质分裂中起重要作用: MKLP1 (mitotic kinesin-like 1, 也称为 KIF23), MKLP2 (也称为 KIF20A)和 KIF20B. Kinesin-6 家族的成员由于其在马达结构域的环状区 L6 有一个 8~10 kD 的插入片段而独特. 以此插入片段为靶标而设计的 kinesin-6 抑制剂可能是高度特异的, 尤其是它们的非冗余的功能会使 kinesin-6 家族的成员成为潜在的癌症药物靶点.

尽管马达结构域位于多肽链的中间, KIF14 仍被归类为 N 型驱动蛋白. 它与 2 个关键的有丝分裂的蛋白质 PRC1 和 citron 激酶有相互作用. 通过 KIF14 siRNA 抑制 KIF14 的表达会导致染色体错误队列并完成核内复制, 促进非整倍体的产生^[22]. 虽然 KIF14 的过表达在胞质分裂中的确切作用尚不清楚, 但 KIF14 在促进肺癌和卵巢癌细胞系的致瘤性上的重要性已经得到确认^[22]. 这些数据为 KIF14 化学生物学研究及靶向药物的研发提供了理论基础^[22].

MKLP1 是异四聚体中央纺锤体复合物的组分, 它们负责在纺锤体中体区捆绑和稳定微管^[56,57]. MKLP1 的敲除会导致不完整的胞质分裂以及双核或多核细胞的形成^[49]. MKLP2 最初是从 Rab6A 的 GTP 结合形式的特异性相互作用蛋白而分离得到的^[58]. RNAi 介导的基因沉默实验也揭示 MKLP2 在胞质分裂早期分裂沟的缢裂中有重要作用. MKLP2 是染色体乘客蛋白复合物(chromosomal passenger complex)从动点定位到中心纺锤体的必要因素, 这个过程还受到 CDK1 激酶的调控^[59]. 鉴于染色体乘客蛋白也是完成胞质分裂的要素, 所以 MKLP2 可能参与调节成功地完成胞质分裂所需经历的各种动态变化. 综上所述, MKLP2 在胞质分裂过程中起到举足轻重的作用, 是一个实施化学生物学研究的极好靶点. 同时, MKLP2 小分子抑制剂的发掘将加速我们对 MKLP2 分子功能的详尽认识^[60].

7 总结和展望

细胞分裂是一个由多个马达驱动蛋白质调控通路构成的复杂生命活动, 各个驱动蛋白的功能、作用方式、相互作用模式及调控关系错综复杂. 它们的分子功能的阐明不仅需要单个蛋白水平的研究, 而且还须同时研究多个驱动蛋白在实时细胞分裂过程的作用. 由于多基因操纵的复杂性及局限性, 化学小分子探针为研究多个驱动蛋白调控细胞增殖活动中涉及到的各种信号转导途径的作用机制提供了有效工具.

同一蛋白质在不同时空状态下与不同蛋白质的结合, 从而形成具有不同生物学效应的功能蛋白质群(Functional Protein Interacting Hub). 化学小分子探针在研究重要调控蛋白质(群)时空效应及细胞可塑性调控信息流传递机制中将扮演更加重要的作用.

例如, CENP-E 驱动蛋白在细胞有丝分裂的中期与后期两个环节均有重要的功能, 经典遗传学方法无法解剖其在时空两相较为紧密过程中的功能. Syntelin 与 GSK923295 的发掘为我们解析 CENP-E 马达蛋白在中心纺锤体微管形成中的功能提供了极佳的工具. 诚然, 小分子探针广泛应用的一个潜在瓶颈是其选择性. 平行使用两种以上作用于同一个靶蛋白但不同位点的小分子探针(如 Syntelin 与 GSK923295)可以较好地排除小分子探针的潜在脱靶(off-target)作用.

鉴于细胞有丝分裂重要调控蛋白质(群)的时空效应, 化学小分子探针与生物光子学技术的有机结合将使我们能够清楚地描绘有丝分裂着丝粒组装动态过程. 未来细胞动力学研究的趋向将从目前关注的动态性逐步转向时空动力学的量化分析. 例如, 人类细胞的 23 对染色体动粒上的 CENP-E 马达蛋白分子数是否均等? 不同染色体在有丝分裂过程中对其动粒上马达蛋白功能及数目的依赖性是否相同? 我们相信: 马达蛋白小分子探针与单分子分析方法^[61]的联合应用将能展现染色体运动过程着丝粒动力学的全息画面.

马达蛋白小分子探针的转化医学研究将是未来 10 年新药研发的重要增长点. 随着更多马达蛋白原子水平结构信息的阐明, 我们可以开展基于结构的高通量马达蛋白计算化学生物学研究. 单分子分析方法将能够指导优化马达蛋白小分子探针的结构、细胞内代谢及稳定性, 加速马达蛋白小分子探针的转化医学研究. 鉴于 CENP-E, KIF2C 等马达蛋白的蛋白质水平及活性在大部分实体瘤中显著性上调^[40], 高活性马达蛋白的肿瘤病例将是 II 期及 III 期临床成功的关键. 可以相信, 对马达蛋白化学生物学研究与单分子机制研究的集成将加速马达蛋白抑制剂从实验台面转向肿瘤患者的病床边.

参考文献

- 1 Jordan M A, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4: 253–265
- 2 Orr G A, Verdier-Pinard P, McDaid H, et al. Mechanisms of taxol resistance related to microtubules. *Oncogene*, 2003, 22: 7280–7295
- 3 Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10: 194–204
- 4 Wood K W, Cornwell W D, Jackson J R. Past and future of the mitotic spindle as an oncology target. *Curr Opin Pharmacol*, 2001, 1: 370–377
- 5 Wordeman L. How kinesin motor proteins drive mitotic spindle function: Lessons from molecular assays. *Semin Cell Dev Biol*, 2010, 21: 260–268

- 6 Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, et al. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10: 682–696
- 7 Cleveland D W, Mao Y, Sullivan K F. Centromeres and kinetochores: From epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell*, 2003, 112: 407–421
- 8 薛宇, 刘丹, 符传孩, 等. 哺乳动物驱动蛋白的计算基因组学分析与鉴定. *科学通报*, 2006, 51: 1654–1665
- 9 Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y. Molecular motors in neurons: Transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron*, 2010, 68: 610–638
- 10 Lawrence C J, Dawe R K, Christie K R, et al. A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol*, 2004, 167: 19–22
- 11 Mayer T U, Kapoor T M, Haggarty S J, et al. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science*, 1999, 286: 971–974
- 12 Straight A F, Cheung A, Limouze J, et al. Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor. *Science*, 2003, 299: 1743–1747
- 13 Wood K W, Lad L, Luo L, et al. Antitumor activity of an allosteric inhibitor of centromere-associated protein-E. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 5839–5844
- 14 Ding X, Yan F, Yao P, et al. Probing CENP-E function in chromosome dynamics using small molecule inhibitor syntelin. *Cell Res*, 2010, 20: 1386–1389
- 15 Blangy A, Lane H A, d’Herin P, et al. Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation *in vivo*. *Cell*, 1995, 83: 1159–1169
- 16 Kantarjian H M, Padmanabhan S, Stock W, et al. Phase I/II multicenter study to assess the safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of AZD4877 in patients with refractory acute myeloid leukemia. *Invest New Drugs*, 2012, 30: 1107–1115
- 17 Infante J R, Kurzrock R, Spratlin J, et al. A Phase I study to assess the safety, tolerability, and pharmacokinetics of AZD4877, an intravenous Eg5 inhibitor in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2012, 69: 165–172
- 18 Kwok B H, Kapitein L C, Kim J H, et al. Allosteric inhibition of kinesin-5 modulates its processive directional motility. *Nat Chem Biol*, 2006, 2: 480–485
- 19 Valentine M T, Fordyce P M, Krzysiak T C, et al. Individual dimers of the mitotic kinesin motor Eg5 step processively and support substantial loads *in vitro*. *Nat Cell Biol*, 2006, 8: 470–476
- 20 Burris H A, Jones S F, Williams D D, et al. A phase I study of ispinesib, a kinesin spindle protein inhibitor, administered weekly for three consecutive weeks of a 28-day cycle in patients with solid tumors. *Invest New Drugs*, 2011, 29: 467–472
- 21 Blagden S P, Molife L R, Seebaran A, et al. A phase I trial of ispinesib, a kinesin spindle protein inhibitor, with docetaxel in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer*, 2008, 98: 894–899
- 22 Rath O, Kozielski F. Kinesins and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12: 527–539
- 23 Yen T J, Compton D A, Wise D, et al. CENP-E, a novel human centromere-associated protein required for progression from metaphase to anaphase. *EMBO J*, 1991, 10: 1245–1254
- 24 Yen T J, Li G, Schaar B T, et al. CENP-E is a putative kinetochore motor that accumulates just before mitosis. *Nature*, 1992, 359: 536–539
- 25 Wood K W, Sakowicz R, Goldstein L S, et al. CENP-E is a plus end-directed kinetochore motor required for metaphase chromosome alignment. *Cell*, 1997, 91: 357–366
- 26 Yucel J K, Marszalek J D, McIntosh J R, et al. CENP-meta, an essential kinetochore kinesin required for the maintenance of metaphase chromosome alignment in *Drosophila*. *J Cell Biol*, 2000, 150: 1–11
- 27 Yao X, Anderson K L, Cleveland D W. The microtubule-dependent motor centromere-associated protein E (CENP-E) is an integral component of kinetochore corona fibers that link centromeres to spindle microtubules. *J Cell Biol*, 1997, 139: 435–447
- 28 Yao X, Abrieu A, Zheng Y, et al. CENP-E forms a link between attachment of spindle microtubules to kinetochores and the mitotic checkpoint. *Nat Cell Biol*, 2000, 2: 484–491
- 29 Mao Y, Desai A, Cleveland D W. Microtubule capture by CENP-E silences BubR1-dependent mitotic checkpoint signaling. *J Cell Biol*, 2005, 170: 873–880
- 30 Kim Y, Holland A J, Lan W, et al. Aurora kinases and protein phosphatase 1 mediate chromosome congression through regulation of CENP-E. *Cell*, 2010, 142: 444–455
- 31 Chan G K, Jablonski S A, Sudakin V, et al. Human BUBR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CENP-E functions at kinetochores and binds the cyclosome/APC. *J Cell Biol*, 1999, 146: 941–954
- 32 Huang Y, Wang W, Yao P, et al. CENP-E kinesin interacts with SKAP protein to orchestrate accurate chromosome segregation in mitosis. *J Biol Chem*, 2012, 287: 1500–1509

- 33 Wang X, Zhuang X, Cao D, et al. Mitotic regulator SKAP forms a link between kinetochore core complex KMN and dynamic spindle microtubules. *J Biol Chem*, 2012, 287: 39380–39390
- 34 Putkey F R, Cramer T, Morpew M K, et al. Unstable kinetochore-microtubule capture and chromosomal instability following deletion of CENP-E. *Dev Cell*, 2002, 3: 351–365
- 35 Weaver B A, Cleveland D W. Aneuploidy: Instigator and inhibitor of tumorigenesis. *Cancer Res*, 2007, 67: 10103–10105
- 36 Weaver B A, Silk A D, Montagna C, et al. Aneuploidy acts both oncogenically and as a tumor suppressor. *Cancer Cell*, 2007, 11: 25–36
- 37 Yao X, Fang G. Visualization and orchestration of the dynamic molecular society in cells. *Cell Res*, 2009, 19: 152–155
- 38 Gudimchuk N, Vitre B, Kim Y, et al. Kinetochore kinesin CENP-E is a processive bi-directional tracker of dynamic microtubule tips. *Nat Cell Biol*, 2013, 15: 1079–1088
- 39 Chung V, Heath E I, Schelman W R, et al. First-time-in-human study of GSK923295, a novel antimitotic inhibitor of centromere-associated protein E (CENP-E), in patients with refractory cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2012, 69: 733–741
- 40 Torres J Z, Summers M K, Peterson D, et al. The STARD9/Kif16a kinesin associates with mitotic microtubules and regulates spindle pole assembly. *Cell*, 2011, 147: 1309–1323
- 41 Ando A, Kikuti Y Y, Kawata H, et al. Cloning of a new kinesin-related gene located at the centromeric end of the human MHC region. *Immunogenetics*, 1994, 39: 194–200
- 42 DeLuca J G, Newton C N, Himes R H, et al. Purification and characterization of native conventional kinesin, HSET, and CENP-E from mitotic hela cells. *J Biol Chem*, 2001, 276: 28014–28021
- 43 Cai S, Weaver L N, Ems-McClung S C, et al. Proper organization of microtubule minus ends is needed for midzone stability and cytokinesis. *Curr Biol*, 2010, 20: 880–885
- 44 Kwon M, Godinho S A, Chandhok N S, et al. Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes. *Genes Dev*, 2008, 22: 2189–2203
- 45 Jang C Y, Coppinger J A, Seki A, et al. Plk1 and Aurora A regulate the depolymerase activity and the cellular localization of Kif2a. *J Cell Sci*, 2009, 122: 1334–1341
- 46 Cimini D, Moree B, Canman J C, et al. Merotelic kinetochore orientation occurs frequently during early mitosis in mammalian tissue cells and error correction is achieved by two different mechanisms. *J Cell Sci*, 2003, 116: 4213–4225
- 47 Aoki S, Ohta K, Yamazaki T, et al. Mammalian mitotic centromere-associated kinesin (MCAK): A new molecular target of sulfoquinovosylacylglycerols novel antitumor and immunosuppressive agents. *FEBS J*, 2005, 272: 2132–2140
- 48 Mazumdar M, Misteli T. Chromokinesins: multitasking players in mitosis. *Trends Cell Biol*, 2005, 15: 349–355
- 49 Zhu C, Zhao J, Bibikova M, et al. Functional analysis of human microtubule-based motor proteins, the kinesins and dyneins, in mitosis/cytokinesis using RNA interference. *Mol Biol Cell*, 2005, 16: 3187–3199
- 50 Mazumdar M, Lee J H, Sengupta K, et al. Tumor formation via loss of a molecular motor protein. *Curr Biol*, 2006, 16: 1559–1564
- 51 Tokai N, Fujimoto-Nishiyama A, Toyoshima Y, et al. Kid, a novel kinesin-like DNA binding protein, is localized to chromosomes and the mitotic spindle. *EMBO J*, 1996, 15: 457–467
- 52 Levesque A A, Compton D A. The chromokinesin Kid is necessary for chromosome arm orientation and oscillation, but not congression, on mitotic spindles. *J Cell Biol*, 2001, 154: 1135–1146
- 53 Stumpff J, von Dassow G, Wagenbach M, et al. The kinesin-8 motor Kif18A suppresses kinetochore movements to control mitotic chromosome alignment. *Dev Cell*, 2008, 14: 252–262
- 54 Catarinella M, Gruner T, Strittmatter T, et al. BTB-1: A small molecule inhibitor of the mitotic motor protein Kif18A. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009, 48: 9072–9076
- 55 Eggert U S, Mitchison T J, Field C M. Animal cytokinesis: From parts list to mechanisms. *Annu Rev Biochem*, 2006, 75: 543–566
- 56 Nislow C, Lombillo V A, Kuriyama R, et al. A plus-end-directed motor enzyme that moves antiparallel microtubules *in vitro* localizes to the interzone of mitotic spindles. *Nature*, 1992, 359: 543–547
- 57 Mishima M, Kaitna S, Glotzer M. Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity. *Dev Cell*, 2002, 2: 41–54
- 58 Echard A, Jollivet F, Martinez O, et al. Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science*, 1998, 279: 580–585
- 59 Hummer S, Mayer T U. Cdk1 negatively regulates midzone localization of the mitotic kinesin Mklp2 and the chromosomal passenger complex. *Curr Biol*, 2009, 19: 607–612
- 60 Tcherniuk S, Skoufias D A, Labriere C, et al. Relocation of Aurora B and survivin from centromeres to the central spindle impaired by a kinesin-specific MKLP-2 inhibitor. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2010, 49: 8228–8231
- 61 Ha T. Single-molecule approaches embrace molecular cohorts. *Cell*, 2013, 154: 723–726

Progress and prospects in chemical biology of mitotic kinesins

LIU Xing & YAO XueBiao

Anhui Key Laboratory of Cellular Dynamics & Chemical Biology, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China

Kinesins are a family of molecular motor proteins that power cargo movements on microtubules using ATP. Kinesins exhibit great diversity in their directional movements and have important roles in cellular transport and mitosis. There has been great excitement and progress in chemical biological studies of kinesins over the past 15 years, which have allowed the development of specific chemical inhibitors to probe the precise functions of individual motor proteins in space and time. Because several kinesins exhibit significantly higher levels and activities in solid tumors compared with normal cells, great efforts are currently centered on translational studies in phase I and phase II clinical trials. In this review, we highlight recent progress in chemical biological studies using Eg5 and CENP-E as major examples and elaborate the translational efforts down the line. We also envisage future developments in this exciting avenue of research.

mitosis, kinesin, chemical biology, syntelin, cancer

doi: 10.1360/N972014-00300