

染色体分离的分子机理

丁兆军 邓祝云 陶佳乙 张亮然 王台*

(中国科学院植物研究所光合作用与环境分子生理学重点实验室, 北京 100093. * 联系人, E-mail: twang@ns.ibcas.ac.cn)

摘要 染色体分离是有丝分裂和减数分裂的关键事件, 是保证姊妹(同源)染色体正确分配到子细胞中关键的调控环节之一。近年来, 利用酵母等真核模式生物突变体, 研究人员克隆了一些调控细胞分裂早期姊妹染色体黏着和后期黏着素酶解的关键基因, 初步阐明了染色体分离的分子调控机理。由多亚基蛋白组成的黏着素是保证染色体正确黏着和分离的关键分子。在细胞分裂中后期过渡时, 经过一系列的分子识别和互作导致黏着素蛋白选择性地降解, 使染色体分离。本文在详细地讨论了参与有丝分裂染色体分离调节的关键蛋白质及其作用机制的基础上, 简单介绍了有丝分裂和减数分裂染色体分离过程中分子调节的差异, 并分析了染色体分离分子机制研究中尚待解决的关键问题。

关键词 细胞分裂 染色体分离 黏着素

真核生物生活史的完成依赖于遗传信息从母细胞到子细胞的精确传递, 遗传信息的传递是通过有丝分裂和减数分裂进行的。在有丝分裂过程中, 姊妹染色体在细胞周期由中期向后期转换时发生分离, 从而产生 2 个染色体数目与亲代细胞一样的子细胞。而在减数分裂过程中, 染色体也复制一次, 但进行 2 次连续的核分裂, 分别称为减数分裂 I 和减数分裂 II。减数分裂 I 是同源染色体之间的分离, 两姊妹染色单体通过着丝点相连, 移向细胞的同一极; 减数分裂 II 和普通的有丝分裂一样, 是姊妹染色体单体之间的分离, 最终产生 4 个染色体数目减半的配子体细胞。这样, 在雌雄配子体融合时, 产生的合子的染色体数目恢复到亲代细胞的水平。因此, 分裂期的细胞需要一个精确的机制调控染色体的分离。

早期的细胞学研究已发现, 有丝分裂 S 期由每条染色体复制产生的姊妹染色体在其纵轴方向通过紧密的物理接触, 即黏着(cohesion), 结合在一起。黏着能使姊妹染色体在细胞分裂中期的细胞板位置正确排列, 同时使姊妹染色体的每个染色单体着丝点区的动粒正确定位, 并分别与来源于纺锤体两极的微管蛋白结合(此时的姊妹染色体动粒的定向被称为双向定位, biorientation), 最终在微管的作用下分别移向细胞的两极。黏着是决定姊妹染色体正确分离的关键事件之一。近几年来, 从芽殖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)与裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)等真核模式生物中获得了一系列参与黏着建立的蛋白质, 初步揭示了姊妹染色体黏着的分子基础, 同时对染色体分离相关的染色体凝集和纺锤体检验点的分

子基础有了一定的认识。我们在前文重点讨论了减数分裂的研究成果并简单介绍染色体分离基本机制^[1], 本文着重从姊妹染色体黏着、染色体凝集和纺锤体检验点等几个主要方面, 详细讨论了染色体分离的分子基础和调控机制。

1 姊妹染色体黏着

分子细胞学研究已证明姊妹染色体的黏着是由黏着素(cohesin)介导的^[2]。黏着素是一类多亚基蛋白质复合体, 其从 S 期与姊妹染色体结合, 在中后期过渡时从染色体上解离。在芽殖酵母中, 黏着素至少由 Smc1, Smc3, Scc1/Mcd1(裂殖酵母的同源蛋白是 Rad21)和 Scc3 共 4 个亚基组成^[2~4]。Smc1 和 Smc3 蛋白是染色体结构保持(the structural maintenance of chromosomes-Smc)蛋白家族的成员, 是染色体 ATP 酶的一个分支, 从细菌到人都是高度保守的^[5]。Smc 蛋白大约由 1000 ~ 1400 个氨基酸残基(AA)组成, 包括 5 个保守的结构域(domains), 即高度保守的 N-和 C-端结构域, 中度保守的中央铰链区及其两侧翼的卷曲螺旋结构域。N-和 C-端结构域分别包含了高度保守的核苷酸结合基元(motif)Walker A(GxxGxGKS/T, x 为任一氨基酸)和 Walker B(ΦΦΦΦD, Φ 为任一疏水性氨基酸)。此外, C 端还包括 ABC ATP 酶的 ATP 结合域^[6]。在黏着素中, Smc1 和 Smc3 通过分子间反向平行互作形成杂合二聚体, 其中间是一个铰链, 两端是由一个分子的 N-端和另一个分子的 C-端组成的, 具有与 DNA 和 NTP 结合能力的球形结构域^[7,8](图 1(a))。Scc1 通过其 N-和 C-端结构域分别与 Smc1-Smc3 杂合二聚体两端的球形结构域结合, 形

成大的蛋白质环,由此将姊妹染色体黏着到一起^[9](图1(b)). Scc1的中间区含1个核定位信号序列和分离酶(separase)的识别位点P1与P4, P1的关键氨基酸残基为Arg, P4的关键氨基酸残基是Glu(少数是Asp)^[10]. 当细胞分裂至中后期过渡时,分离酶催化的Scc1酶解导致黏着素的蛋白质环开环,使黏着素从染色体上解离,启动姊妹染色体的分离^[9]. 用Asp取代Arg或用其他氨基酸残基取代Glu构建的单点突变蛋白,仍能被分离酶水解,其突变体的染色体能正常分离. 而2个位点氨基酸的双突变,则完全阻止了Scc1的解体,导致姊妹染色体不能分离,是致死突变. 当Scc1的分离酶酶切识别位点被外源蛋白酶TEV识别位点取代时,利用蛋白酶TEV酶解Scc1,同样能启动姊妹染色体的分离^[10-12]. 因此,在酵母中,Scc1蛋白是目前已知的细胞信号调控中后期过渡时黏着素解离的重要靶分子.

与有丝分裂黏着素的亚基组成相似,酵母减数分裂黏着素的4个亚基中,3个(Scc3, Smc1和Smc3)与有丝分裂的相同,惟一的区别是Scc1被减数分裂特异的黏着素蛋白亚基Rec8取代,Rec8是减数分裂染色体分离必需的黏着素蛋白^[4,14],目前尚不清楚Scc1/Rad21和Rec8功能差异的分子与结构基础. 在高等真核生物果蝇(*Drosophila melanogaster*)、线虫(*Caenorhabditis elegans*)、鼠(*Mus musculus*)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)、人(*Homo sapiens*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中,已克隆了酵母黏着素不同亚基的同源性蛋白质^[15-19]. 与酵母类似,人、鼠和线虫细胞也包含2个Scc1同源蛋白,其中一个在有丝分裂中起作用,另一个是减数分裂特异的^[18]. 果蝇基因组中仅有一个编码Scc1同源蛋白的基因^[19],而高等植物拟南芥基因组有3个编码Scc1同源蛋白的基因^[19,20]. 多重氨基酸序列比较显示,Scc1和Rec8及其高等真核生物的同源蛋白具有高度保守的N-和C-端结构域,其中间区域没有严格的保守性,但包含保守的核定位信号和分离酶的识别位点. 基于序列的相似性,这些蛋白能被组织成一个蛋白质家族,鉴于Rad21是第一个被分离的该家族成员^[21,22],目前习惯上将这个蛋白质家族称Rad21/Rec8家族(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/cdd/>). 这些结果初步表明姊妹染色体黏着与黏着素解离的基本机制在进化过程中是保守的.

姊妹染色体黏着的建立是一个连续的分子互动与组装过程,但可相对地划分为黏着素蛋白装载

(loading)与活化(activating)2个阶段^[23,24]. 除黏着素蛋白外,黏着过程还需要多个其他蛋白的参与. 装载起始于G₁至S早期,是黏着素蛋白与染色质结合的过程,需要Scc2和Scc4的参与. 有证据表明,SCC2或SCC4基因突变大大降低了结合到染色体上的黏着素蛋白的数量^[25]. 由于Scc2/Scc4与黏着素蛋白在染色质上的结合位点不同,一般认为其与染色质结合后可能诱导染色质产生有利于黏着素蛋白与之结合的构象变化,确切的机制尚待证实. 黏着素的活化是从S期复制叉处开始的,在复制叉处与染色质结合的黏着素蛋白被一些蛋白因子激活,使新产生的姊妹染色体间形成黏着. 酵母Ctf7/Eco1能与复制叉处催化DNA复制的蛋白复合体互作,是调节黏着起始的关键蛋白^[26]. 有实验证明ctf7/eco1缺失突变体的黏着素蛋白装载正常,但S期的姊妹染色体黏着不能建立. 近期的离体实验显示Ctf7/Eco1有乙酰转移酶活性,能催化自身和黏着素蛋白的乙酰化,暗示该蛋白可能通过乙酰化作用启动姊妹染色体的黏着^[27].

2 分离酶与黏着素的解离

S期姊妹染色体的黏着建立后,一直维持到中期着丝点区动粒的定向完成. 在中后期过渡时,黏着素解离,启动染色体分离. 研究结果表明分离酶是调控黏着素适时解体的关键因子^[28,29]. 因分离酶的来源不同,目前的命名不一致,裂殖酵母的分离酶被命名为Cut1,而芽殖酵母的被称为Esp1^[30-32]. 在线虫、果蝇、非洲爪蟾和人等高等真核生物细胞中也存在分离酶^[33]. 分离酶是一类高分子量的多肽(180~200 kD),有一个保守的C-端结构域,其中保守的His和Cys残基是酶活性位点的关键氨基酸,任何一个残基的突变均导致酶活性的丧失^[11,34]. 当酵母细胞分裂进入中后期过渡时,分离酶选择性地酶解Scc1/Rad21,后者的水解导致黏着素从染色体臂和着丝点区完全解离^[11,29,35,36]. Esp1失活或Scc1过量表达的酵母突变体,不能适时降解Scc1,其姊妹染色不能分离^[33].

与酵母姊妹染色体上黏着素在中后期过渡时完全解离的方式不同,脊椎动物细胞姊妹染色体黏着素从染色体臂和着丝点区解离的时间是不一致的^[29,37,38],可能通过2种不同的机制调节:(i)姊妹染色体臂间的黏着素在有丝分裂早期或早中期时解离,该解离过程不需要分离酶的参与^[16,23,37,38];(ii)着丝点区的黏着素一直维持到中期,在中后期过渡

时的解离受分离酶的调节^[16,29,38,39]。目前,尚不清楚有丝分裂早期或早中期时黏着素解离的调控机制,比较一致的解释是此时黏着素亚基蛋白 Scc1 或 Scc3 同源蛋白的磷酸化降低或阻止了其 DNA 或其他亚基的结合,导致黏着素的解离。已发现细胞周期蛋白激酶,如 Cdk1, Plk 和 Aurora 可能是调节黏着素磷酸化的主要酶类。非洲爪蟾的研究结果也支持该假设,在 *plk* 突变体中,黏着素不能从染色体臂上解离^[15,29,37,38]。

由于减数分裂需要进行两次连续的染色体分离,其黏着素解离方式与有丝分裂存在着明显的差异^[14,40]。当减数分裂 I 由中期向后期过渡时, Rec8 首先从同源染色体两臂和每一个同源染色体的姊妹染色体两臂解离,使同源染色体彼此分开及姊妹染色体两臂分离。但姊妹染色体着丝点区的 Rec8 一直保留到减数分裂后期 II^[1,14,40]。在果蝇 *mei-s332* 及芽殖酵母 *spo13* 和 *slk19* 缺失突变体中观察到减数分裂 I 姊妹染色体提前分离的现象。免疫沉淀实验结果表明, MEI-S332, Spo13 及 Slk19 主要结合在染色体着丝点区,可能具有保护着丝点区 Rec8 在减数分裂 I 不被提前降解的功能^[37,40,41]。除了着丝点区黏着素在减数分裂 I 可能被选择性保护外,最近 Lee 等人^[42]的研究证明,在芽殖酵母的减数分裂过程中, PLK 蛋白激酶 Cdc5 催化的 Rec8 磷酸化是其从减数分裂 I 姊妹染色体臂上被分离酶选择性地有效酶解必需的, Cdc5 是减数分裂 I 的关键调控因子。

3 分离酶活性的调节

Securin 是分离酶的蛋白抑制剂,是分离酶活性的主要调节因子。在细胞分裂早期, Securin 通过其 N-端序列嵌入到分离酶的 C-和 N-端结构域之间,与分离酶结合在一起,抑制后者的水解酶活性;当细胞周期由中期向后期过渡时, APC(或称 cyclosome)介导的泛素化途径选择性的降解 securin, 释放出具有活性的分离酶,后者通过酶解黏着素蛋白 Rad21/Rec8, 使黏着素从染色体上解离,启动染色体分离^[43,44]。裂殖酵母的 Cut2 和芽殖酵母的 Pds1 是功能较清楚的 securin, 它们都有阻止染色体不正常分离的功能^[32,45,46](图 2)。Cut2 和 Pds1 没有序列相似性,目前在 GenBank 数据库中也没有序列相似的蛋白质。但 Cut2 和 Pds1 的共同特征是均有 D-box(the destruction box D: RXLGXXXN, X 为 A 或 V 或 T),在体外能被 APC 泛素化^[45,46]。在果蝇、非洲爪蟾和人等细胞中已发现了与 Cut2 / Pds1 功能类似的蛋白^[47]。在裂殖酵

母中, Cut2 和 Cut1 的结合是一动态过程,受细胞空间结构的调节。Cut1 在细胞间期位于细胞质中,而 Cut2 主要存在于细胞核中;当细胞进入有丝分裂早期, Cut1 转移到有丝分裂纺锤体上。Cut1 与 Cut2 结合形成的异源二聚体,是 Cut1 与染色体结合所必需的^[48]。因此,裂殖酵母的 Cut2 在细胞周期中起双重作用,在有丝分裂起始阶段, Cut2 帮助 Cut1 结合到纺锤体上,起着分离酶活性抑制剂的功能,在后期开始时, APC 催化 Cut2 水解,使 Cut1 转变为活化态。类似的现象也在果蝇的 *securin* 突变体中观察到了^[49]。

由于精确调控分离酶活性的需要, Securin 在分裂细胞中的含量必须适应其功能的需要,在细胞周期的不同阶段受到精细的调节。在细胞周期的大部分时间内, Securin 与分离酶结合在一起。在酵母及动物细胞中, Securin 在 G₁ 晚期开始大量合成,到早 M 期时达到最高值。而细胞周期由中期向后期过渡时, Securin 通过 APC 介导的泛素化途径开始快速降解^[29,44,45,50,51],这一降解过程受细胞周期蛋白 Cdc20 和 Cdh1 的调节。Cdc20 和 Cdh1 通过与 APC 形成 APC-Cdc20 或 APC-Cdh1 复合体,激活 APC。只有在有丝分裂期, Cdc20 的含量才会升高而且有活性,而 Cdh1 只有在有丝分裂结束后的 G₁ 期才有活性^[57,58]。因此, Securin 在 G₁ 期的水解受 APC-Cdh1 调节,而在中后期过渡时的水解受 APC-Cdc20 调节。APC-Cdc20 的活性主要受 Cdc20 含量的调节, Cdc20 在 G₂ 期到 M 期积累,到后期开始时达到其活性的峰值^[52,53]。APC-Cdc20 的活性还受其亚基蛋白磷酸化作用的调节。此外,纺锤体的监控机制及其抑制蛋白 Emi1 也对 APC-Cdc20 起重要调节作用^[54,55]。

4 染色体凝集(chromosome condensation)

染色体凝集是指真核生物的细胞周期中基因组 DNA 在有丝分裂早期高度压缩,并且处于非活化状态,以保证细胞周期由中期向后期过渡时姊妹染色体均等地分向细胞的两极。在基因组比较大的动植物细胞中,如果没有染色体凝集,很难想象它们能在有丝分裂中能被均等的分向细胞的两极。

组蛋白是参与染色体凝集的最基本的蛋白质。在真核生物细胞中,组蛋白 H2A, H2B 及 H3 和 H4 各 2 分子组成核小体的核心,外面缠绕 147 个碱基的 DNA,构成核小体。它是染色体凝集过程中的基本单位。核小体在组蛋白 H1 的存在时,紧密接触形成直径为 10 nm 的线状结构。此结构再进一步折叠、缠

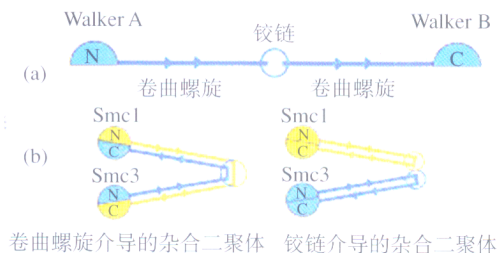


图 1 Smc 蛋白的结构和异源二聚体的组成(引自文献[7])
(a) Smc1 和 Smc3 有 5 个结构域: N-与 C-端结构域, 分别包含 WalkerA 和 WalkerB 基序, 是 Rad21/Rec8 蛋白的结合位点; 中间的铰链结构域以及铰链两侧翼的卷曲螺旋。(b) Smc1 和 Smc3 通过分子间互作以反向平行的方式形成杂合二聚体或以自我折叠的亚单位形成杂合二聚体

绕, 组装成染色体的高级结构。组蛋白的修饰在染色体凝集和姊妹染色体分离的过程发挥重要功能。传统观点认为, 组蛋白 H1 的磷酸化在驱动染色体凝集的过程中起作用^[56]。最近研究结果表明, 芽殖酵母组蛋白 H1 缺失突变体的生长和交配没有受到影响^[57]。在动物研究中, 组蛋白 H1 在没有被磷酸化修饰的条件下, 染色体也能通过诱导发生凝集^[58]。这说明, 组

蛋白 H1 的磷酸化不是调节染色体凝集的必要因素。近年的研究证明, 组蛋白 H3 的磷酸化修饰在染色体凝集和姊妹染色体分离的过程中发挥重要功能, 其磷酸化位点是近 N-端第 10 位的丝氨酸(Ser)。在四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)中, 该氨基酸的磷酸化修饰正好发生在染色体凝集起始期, 如果该 Ser 被 Ala 取代, 则直接影响染色体的凝集和姊妹染色体的分离。

高度凝集的染色体除了包含组蛋白外, 还包含另外 2 种重要的蛋白, 即拓扑 II DNA 聚合酶(Topo II)和凝集素^[59]。Topo II 是一类催化 DNA 双螺旋发生链交换的酶, 参与染色体凝集、姊妹染色体分离及基因组稳定性的维持等重要细胞过程^[60], 主要功能是暂时打开染色体凝集过程中相互缠绕的 2 条 DNA 链, 并修复断裂的 DNA 链。否则, DNA 双链的缠绕会导致分裂期染色体的断裂。凝集素是一类由多个蛋白质亚基组成的复合体。酵母与非洲爪蟾的凝集素均包含 5 个亚基蛋白^[61~63]。染色体体外组装实验证明非洲爪蟾凝集素是其染色体凝集所必需的^[61]。酵母凝集素任何一亚基的突变, 均能引起染色体凝集的缺陷, 最终影响染色体分离^[62~64]。根据亚基功能的差异, 凝集

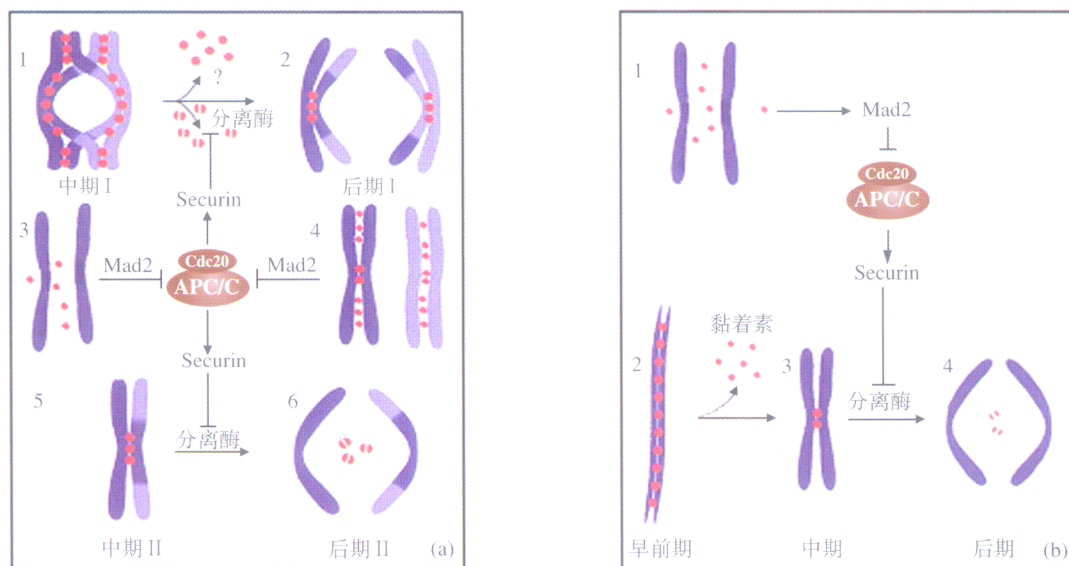


图 2 染色体分离的调节(引自文献[36])

(a) 减数分裂: 1 示 中期 I, 黏着素将姊妹染色体联在一起, 同源染色体间发生重组; 2 示后期 I, 姊妹染色体臂间的黏着素解离, 同源染色体间的交叉消失、重组完成, 同源染色体分离; 3 示染色体复制后, 姊妹染色体间没有建立黏着; 4 示同源染色体没能联会, 此时纺锤体检验点被激活, 通过 Mad2 等蛋白抑制了 APC 的活性, 使分裂不能进入后期; 5 示中期 II, 同源染色体分离后, 姊妹染色体通过着丝点区的黏着联结在一起; 6 示后期 II, 姊妹染色体着丝点区的黏着素解体, 姊妹染色体分离。(b) 有丝分裂: 1 示染色体复制后, 姊妹染色体间没有建立黏着, 此时纺锤体检验点被激活, 通过 Mad2 等蛋白抑制了 APC 的活性, 使分裂不能进入后期; 2 示染色体复制后, 姊妹染色体间建立黏着; 3 示在早前期, 姊妹染色体臂上的黏着素解离, 黏着点区的黏着素一直维持到中后过渡启动为止; 4 示在中后期过渡时, 着丝点区的黏着素解体, 姊妹染色体彼此分离

素可被分成2个亚复合体,其中心复合体由Smc2和Smc4组成.Smc2和Smc4与Smc1和Smc3均是SMC蛋白家族的成员,通过分子间互作形成杂合二聚体.Smc2-Smc4二聚体能与DNA结合,并有ATP酶活性^[59].另3个亚基组成的亚复合体没有催化功能,与中心复合体结合后能会增加后者的DNA结合能力及ATP酶活性,可能是一个起调控作用的亚复合体^[64].染色体的凝集不是一个简单的DNA分子压缩过程,而对染色体分离有一定的调节功能.染色体凝集可能会引起与姊妹染色体结合的黏着素蛋白不稳定,帮助启动黏着素蛋白从染色体臂上解离,从而使染色体臂分离.因此,染色体凝集可以被看作是中后期过渡的一个准备过程.

5 纺锤体检验点(spindle checkpoint)

纺锤体的形成是细胞分裂的一个重要特征.纺锤体检验点是阻止染色体发生错误分离的一个质量监控系统,其通过检测纺锤体微管的缺陷、有丝分裂或减数分裂的染色体不正常的配对或黏联以及动粒不正确的定向,阻止染色体分离的启动,从而避免染色体的错误分离及含有非整倍染色体子细胞的形成^[65,66](图2).

纺锤体检验点主要通过探测在染色体分离启动之前因纺锤体微管的牵引在着丝点邻近区染色质产生的张力,检测染色体分离启动之前可能发生的错误.在细胞周期中,细胞内如果存在还没有连接到纺锤体微管的动粒,就会产生激活纺锤体检验点的信号,从而阻止或推迟后期的起始,直到该动粒正确地连接到纺锤体微管上^[67~69].在酵母中,如果染色体没有复制就进入有丝分裂期,尽管纺锤体微管仍能 and 染色体连接,但因为染色体没有发生复制,每条染色体只有一个动粒,不能与来自纺锤体两极的微管结合,结果在着丝点区不能产生张力,这种错误启动了纺锤体检验信号^[70].

有丝分裂和减数分裂中姊妹染色体动粒和纺锤体微管的连接方式是不同的,其调控机理也不一样.在有丝分裂中,姊妹染色体动粒和微管是双向连接,即两姊妹染色单体的动粒分别和来自纺锤体两极的微管连接.目前尚不清楚双向连接建立的分子基础.仅知道黏着素和auora-like激酶Ip参与这一过程^[67,71,72].最近,从芽殖酵母中发现了一个参与这一过程的关键基因SPC34^[67].SPC34不仅是姊妹染色体动粒和微管的双向连接建立和维系所必需的,而且

对维持染色体分离后纺锤体的稳定性也是至关重要的^[67].与有丝分裂不同,减数分裂因其功能的需要,在2次分裂中姊妹染色体的动粒与纺锤体微管的连接方式是不同的,在减数分裂I,一条同源染色体上的两姊妹染色体的动粒共同连接到来自纺锤体一极的微管,这种连接方式称共向连接(co-orientation),以保证减数分裂后期I只发生同源染色体分离,从而使姊妹染色体移向细胞的同一极.而在减数分裂II,姊妹染色体的动粒通过双向连接与纺锤体两极的微管结合.在芽殖酵母*mam1*突变体中,减数分裂I姊妹染色体和纺锤体微管的连接方式和有丝分裂的一样,变成了双向连接,姊妹染色体在减数分裂后期I即发生分离.但*mam1*基因突变不影响Rec8的解离,说明Mam蛋白在减数分裂I可能是通过直接与动粒作用调节姊妹染色体的共向连接,不是通过保护着丝点区Rec8不被降解而间接地发挥作用^[73].这与Spo13,Slk19,Mei-332及Bub1等的功能不同,这些蛋白主要通过保护着丝点区Rec8蛋白不被提前解离,参与减数分裂I和II动粒定向的调节^[37,40,41].Mam1在减数分裂粗线期开始合成,到后期开始时突然消失.因此,Mam1是目前发现的专门调节减数分裂I姊妹染色体动粒共定向的蛋白质.

目前,参与纺锤体检验点的关键蛋白,如Mad1, Mad2, Mad3/BUR1, Bub1, Bub2和Bub3已相继被分离出来^[74~76].当纺锤体检验点启动时,检验点信号诱导Mad1, Mad2, Mad3和Bub3形成蛋白复合体,该复合体与APC激活子Cdc20结合,抑制Cdc20的酶活性,从而抑制APC催化Securin水解的活性,阻止染色体的分离^[76,77].由于Mad2定位于尚未与纺锤体微管结合的动粒上,它可能充当一种可以扩散的信号分子,通过与Cdc20作用,抑制APC的活性.未与纺锤体微管结合的动粒可能是激活Mad2的位点^[76].Mad1和Mad2一样,也能与Cdc20结合,有相同的结合序列,而且与Cdc20结合后,发生相似的空间结构变化.最近的研究结果表明,在纺锤体检验点中,BuR1与Mad2一样,具有抑制APC活性的作用.BuR1抑制APC活性的能力要比Mad2的大得多,它与APC结合后,阻止了Cdc20与APC结合或使Cdc20处于非活化状态,以达到抑制APC活性的目的^[78].

6 问题与展望

自1888年Walter Flemming首次观察到染色体运动现象之后的100多年时间里,对于染色体分离的研

究,主要停留在细胞学观察水平上.近几年,重点利用酵母细胞分裂突变体在对染色体分离相关的基因功能分析的基础上,获得了一些参与染色体分离调节的重要基因,对染色体分离的分子机理有了较为深入的认识,但是仍有许多尚待解决的问题:(i)在复制叉处,哪些信号分子启动了黏着的建立?(ii)当有丝分裂或减数分裂 I 与 II 进入后期时,哪些信号启动了染色体分离的分子进程?这些信号是如何被识别的?(iii)有丝分裂早前期及减数分裂后期 I,哪些分子保护了着丝点区黏着素不被解离?是如何保护的?(iv)染色体凝集和染色体分离是否有直接的联系?(v)分离酶是否是真核生物细胞内调节黏着素解离的唯一分子?(vi)哪些分子参与了动粒定向的调节?纺锤体检验点的分子基础是什么?对这些问题的深入研究,将有助于我们全面认识染色体分离的分子机理.

虽然在细胞学上,细胞分裂可被分为几个特定的时期,实际上其是一个在较短时间内发生的连续过程.染色体分离的相关事件与其他事件是互作.例如:(i)S期DNA复制是黏着起始必需的,其中的复制酶可能参与了黏着的起始;(ii)姊妹染色体的黏着有助于细胞分裂过程中DNA的修复,裂殖酵母黏着素关键亚基蛋白Rad21最初即是被作为DNA修复蛋白分离的^[20,21,79],Rec8参与了减数分裂的同源重组^[85];(iii)在减数分裂中,黏着素蛋白本身就是联会复合体(SC)轴向元件的组成成分^[1],而SC的重要蛋白Dmc1参与了黏着的建立^[87].鉴于此,仅仅对某一独立事件的研究很难全面认识染色体分离的机制,因此,在这些研究结果的基础上,根据酵母等真核生物基因组全序列提供的信息,利用蛋白质组学的技术手段,建立参与细胞分裂所有基因产物的互作关系,对于完善我们对染色体分离机制的认识是非常必要的.

目前,我们对姊妹染色体分离分子机制的认识主要来源于酵母细胞分裂的研究.近几年,在高等真核生物果蝇、线虫、非洲爪蟾、鼠、人、拟南芥和水稻中克隆了涉及黏着、黏着素解离、染色体凝集等姊妹染色体分离关键环节的基因^[11,18,19,82~85](GenBank登录号:AY288943,资料未显示),说明酵母染色体分离的基本机制是保守的.但是,由于多细胞真核生物有着复杂的器官发生与发育,具有分裂能力的细胞存在于一个特定的细胞环境(分生组织或生殖器官)

中,细胞分裂是在一个细胞互作的环境下进行的,因此细胞分裂与染色体分离的调控机制与酵母存在一定的差异,精细调控机制可能有一定的多样性.这一推论已得到现有研究结果的支持:(i)果蝇基因组中只有一个编码Rad21/Rec8家族蛋白的基因^[19];(ii)高等植物基因组至少有3个编码这类蛋白的基因,它们没有严格的、在减数分裂细胞中特异性表达的特性,已克隆的拟南芥的3个基因在有丝分裂和减数分裂的细胞中均表达^[19,20],我们已证明水稻基因组中也有3个该类蛋白的编码基因,对其中一个(AY288943)表达的细胞位点分析证明其在减数分裂的性母细胞和处于分裂期的营养细胞中均表达(数据未显示);(iii)Dmc1在酵母中是一个减数分裂特异的、调节同源染色体联会的关键蛋白,也参与姊妹染色体的黏着,而我们分析从水稻克隆的Dmc1同源蛋白的编码基因OsDMC1证明其在生殖细胞和体细胞中均表达,这完全不同于酵母DMC1在减数分裂细胞特异表达的特性^[85].因此,进一步研究高等真核生物染色体分离机制是对由酵母获得的染色体分离机制的重要补充.此外,由于已克隆的许多高等真核生物细胞分裂基因在有丝分裂和减数分裂的细胞中均表达,这些基因可能是深入分析有丝分裂与减数分裂协调关系的重要入手点.

致谢 本工作为国家高技术研究发展计划资助项目(批准号:2002AA224151和2002AA221001).

参 考 文 献

- 1 王台,丁兆军.减数分裂及其基因研究进展.科学通报,2002,47:241~248
- 2 Michaelis C, Ciosk R, Nasmyth K. Cohesions: Chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. Cell, 1997, 91: 35~45
- 3 Guacci V, Koshland D, Strunnikov A. A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. Cell, 1997, 91: 47~57
- 4 Toth A, Ciosk R, Uhlmann F, et al. Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p(Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication. Genes Dev, 1999, 13: 320~333
- 5 Hirano T. SMC protein complexes and higher-order chromosome dynamics. Curr Opin Cell Biol, 1998, 10: 317~322
- 6 Harvey S H, Krien M J, O'Connell M J. Structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins, a family of conserved ATPases. Genome Biol, 2002, 3(2): reviews 3003.1~reviews 3003.5
- 7 Hirano T. The ABCs of SMC proteins: Two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion and repair. Genes Dev, 2002, 16: 399~414

- 8 Melby T E, Ciampaglio C N, Briscoe G, et al. The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes(SMC) and MukB proteins: Long, antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge. *J Cell Biol*, 1998, 142: 1595~1604
- 9 Nasmyth K. Segregating sister genomes: The molecular biology of chromosome separation. *Science*, 2002, 297: 559~565
- 10 Uhlmann F, Lottspeich F, Nasmyth K. Sister chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1p. *Nature*, 1999, 400: 37~42
- 11 Uhlmann F, Wernic D, Poupart M A. Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell*, 2000, 103: 375~386
- 12 Lemon K P, Grossman A D. Movement of replicating DNA through a stationary replisome. *Mol Cell*, 2000, 6: 1321~1330
- 13 StoopMyer C, Amon N. Meiosis: Rec8 is the the reason for cohesion. *Natl Cell Biol*, 1999, 1:125-127
- 14 Watanabe Y, Nurse P. Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature*, 1999, 400: 461~464
- 15 Losada A, Yokochi T, Kobayashi R, et al. Identification and characterization of SA/Scc3p subunits in the *Xenopus* and human cohesin complexes. *J Cell Biol*, 2000, 150: 405~416
- 16 Sumara I, Vorlaufer E, Gieffers C et al. Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. *J Cell Biol*, 2000, 151: 749~762
- 17 Bhatt A M, Lister C, Franz P, et al. The *DIF1* gene of *Arabidopsis* is required for meiotic chromosome segregation and belongs to the *RAD21/REC8* cohesin gene family. *Plant J*, 1999, 19: 463~472
- 18 Lee J Y, Orr-Weaver T L. The molecular basis of sister-chromatid cohesion. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001, 17: 753~777
- 19 Dong F, Cai X, Makaroff C A. Cloning and characterization of two *Arabidopsis* genes that that belong to the *RAD21/REC8* family of chromosome cohesin protein. *Gene*, 2001, 27: 99~108
- 20 Bai X, Dong F, Cai X, Makaroff C A. Isolation and characterization of *SYN1*, a *RAD21*-like gene essential for meiosis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1999, 11: 417~430
- 21 Birkenbihl R P, Subramani S. Cloning and characterization of rad21 an essential gene of *Schizosaccharomyces pombe* involved in double-strand-break repair. *Nucl Acids Res*, 1992, 20: 6605~6611
- 22 Birkenbihl R P, Subramani S. The *rad21* gene product of *Schizosaccharomyces pombe* is a nuclear, cell cycle-regulated phosphoprotein. *J Biol Chem*, 1995, 270: 7703~7711
- 23 Kosland D E, Guacci V. Sister chromatid cohesion: The beginning of a long and beautiful relationship. *Curr Opin Cell Biol*, 2000, 12: 297~301
- 24 Uhlmann F, Nasmyth K. Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication. *Curr Biol*, 1998, 8: 1095~1101
- 25 Ciosk R, Shirayama M, Shevchenko A, et al. Cohesin's binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins. *Mol Cell*, 2000, 5: 243~254
- 26 Skibbens R V, Corson L B, Koshland D, et al. Ctf7p is essential for sister chromatid cohesion and links mitotic chromosome structure to the DNA replication machinery. *Genes Dev*, 1999, 13: 307~319
- 27 Ivanov D, Schleiffer A, Eisenhaber F, et al. Eco1 is a novel acetyltransferase that can acetylate proteins involved in cohesion. *Curr Biol*, 2002, 12: 323~328
- 28 Tomonaga T, Nagao K, Kawasaki Y, et al. Characterization of fission yeast cohesin: Essential anaphase proteolysis of Rad21 phosphorylated in the S phase. *Genes Dev*, 2000, 14: 2757~2770
- 29 Waizenegger I, Hauf S, Meinke A, et al. Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell*, 2000, 103: 399~410
- 30 Uzawa S, Samejima I, Hirono T. The fission yeast *cut1⁺* gene regulates spindle pole body duplication and has homology to the budding yeast *ESP1* gene. *Cell*, 1990, 62: 913~925
- 31 McGrew J T, Geotsch L, Byers B, et al. Requirement for ESP1 in the nuclear division of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 1992, 3: 1443~1454
- 32 Funabiki H, Kumada K, Yanagida M. Fission yeast Cut1 and Cut2 are essential for metaphase spindle and form large complexes. *EMBO J*, 1996, 15: 6617~6628
- 33 Nasmyth K. Disseminating the genome: Joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu Rev Genet*, 2001, 35: 673~745
- 34 Uhlmann F. Chromosome cohesion and segregation in mitosis and meiosis. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13:754-761
- 35 Kamieniecki R J, Shanks R M Q, Dawson D S. Slk19p is necessary to prevent separation of sister chromatids in meiosis I. *Curr Biol*, 2000, 10: 1182~1190.
- 36 Sullivan S, Lehane C, Uhlmann F. Orchestrating anaphase and mitotic exit: Separase cleavage and localization of Slk19. *Natl Cell Biol*, 2001, 9: 771~777
- 37 Hoque M T, Ishikawa F. Human chromatid cohesin component hRad21 is phosphorylated in M phase and associated with metaphase centromeres. *J Biol Chem*, 2001, 276: 5059~5067
- 38 Warren W D, Steffensen S, Lin E, et al. The *Drosophila* Rad21 cohesin persists at the centromere region in mitosis. *Curr Biol*, 2000, 10: 1463~1466
- 39 Tanaka T, Cosma M P, Wirth K, et al. Identification of cohesin association sites at centromeres and along chromosome arms. *Cell*, 1999, 98: 847~858
- 40 Klein F, Mahr P, Galova M, et al. A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell*, 1999, 98: 91~103
- 41 Tang T T, Bickel S E, Young L M, et al. Maintenance of sister-chromatid cohesion at the centromere by the *Drosophila* Mei-s332 protein. *Genes Dev*, 1998, 12: 3843~3856
- 42 Lee B H, Amon A. Role of Polo-like kinase CDC5 in programming meiosis I chromosome segregation. *Science*, 2003, 300: 482~486
- 43 Hornig N C, Knowles P P, et al. The dual mechanism of separase regulation by securin. *Curr Biol*, 2002, 12: 973~982
- 44 Zachariae W, Nasmyth K. Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev*, 1999, 13: 2039~2058
- 45 Cohen-Fix O, Peters J M, Kirschner M W, et al. Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev*, 1996, 10: 3081~3093
- 46 King R W, Glotzer M, Kirschner M W, et al. Mutagenic analysis of the destruction signal of mitotic cyclins and structural characterization of ubiquitinated intermediates. *Mol Biol Cell*, 1996, 7: 1343~1357

- 47 Zou H, McGarry T J, Bernal T, et al. Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science*, 1999, 285: 418~422
- 48 Kumada K, Nakamura T, Nagao K, et al. Cut1 is loaded onto the spindle by binding to Cut2 and promotes anaphase spindle movement upon Cut2 proteolysis. *Curr Biol*, 1998, 8: 633~641
- 49 Stratmann R, Lehner C F. Separation of sister chromatids in mitosis requires the *Drosophila* pimpls product, a protein degraded after the metaphase/anaphase transition. *Cell*, 1996, 84: 25~35
- 50 Dej K J, Orr-Weaver T L. Separation anxiety at the centromere. *Cell Biol*, 2000, 10: 392~399
- 51 Leismann O, Herzig A, Heidmann S, et al. Degradation of *Drosophila* PIM regulates sister chromatid separation during mitosis. *Genes Dev*, 2000, 14: 2192~2205
- 52 Shirayama M, Toth A, Galova M et al. Promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5. *Nature*, 1999, 402: 203~207
- 53 Weinstein J. Cell cycle-regulated expression, phosphorylation and degradation of p55Cdc. A mammalian homolog of CDC20/Fizzy/slp1. *J Biol Chem*, 1997, 272: 28501~28511
- 54 Reimann J D, Freed E, Hsu J Y, et al. Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the Anaphase promoting complex. *Cell*, 2001, 105: 645~655
- 55 Kramer E R, Scheuringer N, Podtelejnikov A V, et al. Mitotic regulation of the APC activator proteins Cdc20 and Cdh1. *Mol Biol Cell*, 2000, 11: 1555~1569
- 56 Bradbury E M. Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle. *Bioessays*, 1992, 14(1): 9~16
- 57 Ushinsky S C, Bussey H, Ahmed A A, et al. Histone H1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1997, 13: 151~161
- 58 Ohsumi K, Katagiri C, Kishimoto T. Chromosome condensation in *Xenopus* mitotic extracts without histone H1. *Science*, 1993, 262: 2033~2035
- 59 Uhlmann F. Chromosome condensation: Packaging the genome. *Curr Biol*, 2001, 11: 384~387
- 60 Woodcock C L, Dimitrov S. Higher-order structure of chromatin and chromosomes. *Curr Opin Gene Dev*, 2001, 11: 130~135
- 61 Hirano T, Koyamashi R, Hirano M. Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP-C, XCAP-E and a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* barren protein. *Cell*, 1997, 89: 511~521
- 62 Sutani T, Yuasa T, Tomonaga T, et al. Fission yeast condensin complex: Essential roles of non-SMC subunits for condensation and Cdc2 phosphorylation of Cut3/SMC4. *Genes Dev*, 1999 13: 2271~2283
- 63 Freeman L, Aragon-Alcaide L, Strunnikov A. The condensing complex governs chromosome condensation and mitotic transmission of rDNA. *J Cell Biol*, 2000, 149: 811~824
- 64 Kimura K and Hirano T. Dual roles of the 11S regulatory subcomplex in condensing functions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 11972~11977
- 65 Shonn M A, McCarroll R, Murray A W. Requirement of the spindle checkpoint for proper chromosome segregation in budding yeast meiosis. *Science*, 2000, 289: 300~303
- 66 Hardwick K G, Weiss E, Luca F C, et al. Activation of the budding yeast spindle assembly checkpoint without mitotic spindle disruption. *Science*, 1996, 273: 953~955
- 67 Janke C, Ortiz J, Tanaka T U, et al. Four new subunits of the Dam1-Duo1 complex reveal novel functions in sister kinetochore biorientation. *EMBO J*, 2002, 21: 181~193
- 68 Li X, Nicklas R B. Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint. *Nature*, 1995, 373: 630~632
- 69 姚健晖, 郑宇鹏, 姚雪彪. 纺锤体检验点的功能与染色体不稳定性. *科学通报*, 2002, 47(2): 81~87
- 70 Stern B M, Murray A W. Lack of tension at kinetochores activates the spindle checkpoint in budding yeast. *Curr Biol*, 2001, 11: 1462~1467
- 71 Biggins S, Severin F F, Bhalla N, et al. The conserved protein kinase Ipl1 regulates microtubule binding to kinetochores in budding yeast. *Genes Dev*, 1999, 13: 532~544
- 72 Tanaka T, Fuchs J, Loidl J, et al. Cohesion ensures bipolar attachment of microtubules to sister centromeres and resists their precocious separation. *Nat Cell Biol*, 2000, 2: 492~499
- 73 Toth A, Rabitsch K P, Galova M, et al. Functional genomics identifies monopolin: a kinetochore protein required for segregation of homologues during meiosis I. *Cell*, 2000, 103: 1155~1168
- 74 Hardwick K G. The spindle checkpoint. *Trends Genet*, 1998, 14: 1~4
- 75 Rudner A D, Murray A W. The spindle assembly checkpoint. *Curr Opin Cell Biol*, 1996, 8: 773~780
- 76 Shah J V, Cleveland D W. Waiting for anaphase: Mad2 and the spindle assembly checkpoint. *Cell*, 2000, 103: 997~1000
- 77 Hwang L H, Lau L F, Smith D L, et al. Budding yeast Cdc20: a target of the spindle checkpoint. *Science*, 1998, 279: 1041~1044
- 78 Tang Z R, Bharadwaj B L, Yu H. Mad2-independent inhibition of APC/Cdc20 by the mitotic checkpoint protein BubR1. *Dev Cell*, 1: 227~237
- 79 Tatebayashi K, Kato J, Ikeda H. Isolation of *Schizosaccharomyces pombe* rad21 mutant that is aberrant in chromosome segregation, microtubule function, DNA repair and sensitive to hydroxyurea: possible involvement of Rad21 in ubiquitin-mediated proteolysis. *Genetics*, 1998, 148: 49~57
- 80 Davis L, Smith G R. Meiotic recombination and chromosome segregation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 8395~8402
- 81 Rockmill B, Roeder G S. The yeast *med1* mutant undergoes both meiotic homolog nondisjunction and precocious separation of sister chromatids. *Genetics*, 1994, 136: 65~74
- 82 Prieto I, Suja J A, Pezzi N, et al. Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms during meiosis I. *Nat Cell Biol*, 2001, 8: 761~766
- 83 Revenkova E, Eijpe M, Heyting C, et al. A novel meiosis-specific isoform of mammalian SMC1. *Mol Cell Biol*, 2001, 21: 6984~6998
- 84 Champion M D, Hawley R S. Playing for half the deck: the molecular biology of meiosis. *Nat Cell Biol*, 2002, 4: 50~56
- 85 Ding Z J, Wang T, Chong K, et al. Isolation and characterization of *OsDMC1*, the rice homologue of the yeast *DMC1* gene essential for meiosis. *Sex Plant Reprod*, 2001, 13: 285~288

(2003-03-13 收稿, 2003-07-31 收修改稿)