

2001年诺贝尔科学奖获奖者简介

## 缘何细胞周期调控研究获得新千年第一个诺贝尔奖

王永潮

(北京师范大学细胞增殖及调控生物学教育部重点实验室,北京 100875)

今年是诺贝尔科学奖设立一百周年。这一奖项就象科学皇冠上的一颗璀璨的明珠,是对全世界最高科学成就的奖励。

众所周知,生命科学是自然科学中的重要领域,其中细胞的生命活动越来越受到广泛关注。细胞分裂是一切生物机体生长、发育、生殖和遗传的基础。一个世纪以来,通过无数生物学家的拼搏、奋斗,作为细胞分裂基础的细胞周期调控的神秘面纱终于被揭开了。今年10月,三位有世界声望的科学家因此项研究做出的卓越贡献而共享了诺贝尔生理学或医学奖,这也是意料之中的事。他们是美国西雅图弗莱德·哈钦森(Fred Hutchinson)肿瘤中心的L. Hartwell教授、英国伦敦皇家癌症研究基金会(ICRF)的P. Nurse教授和T. Hunt教授。他们在细胞生物学研究中取得的这一重大突破,不仅对细胞重大生命活动机制的揭示具有重要的价值,而且对癌症发生、发展机理的探讨及其它相关生命科学的发展也都具有深远的意义。

### 1 细胞周期研究的历程及获奖者的主要贡献

细胞周期调控分子基础的研究,经历了百年来的艰苦历程。在这短短一篇文章中难以充分表达获奖工作者的突出贡献,但又必须花费一点笔墨对历史背景及众多科学家的相关研究加以概括的介绍,因为科学总是经历继承、发展、创新和演进过程的。“述往事,思来者”,总结过去,希望能对后来者走向成功之路有所裨益。

细胞是生物体形态结构和生命活动的基本单位。从1889年Flemming发现细胞有丝分裂以来,细胞周期的概念即被认为是分裂期(M期)及间期的周而复始。20世纪二十年代,科学界提出了核质比率对细胞分裂的调节的问题。核质的容量比为一常数,当比率不平衡时即发生细胞分裂。二十到五十年代可称为细胞周期研究的黑暗时期,那时人们几乎将全部注意力都集中于有丝分裂及减数分裂时染色体形态变化的描述,对细胞在间期的变化可谓一无所知。1953年Howard和Pelc用<sup>32</sup>P标记蚕豆根尖的经典工作,确定细胞周期是由G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>、M期组成:S期是DNA合成期,M期为有丝分裂期,M期到S期之间称为G<sub>1</sub>期,S期到M期之间称为G<sub>2</sub>期。这一开创性的工作刺激了细胞周期的深入研究,许多学者用不同的生物材料,在同一领域中进行了不同的生物学实验。例如,1971年Masui提取了成熟非洲爪蟾卵的细胞质,并将其注入未成熟的卵中,结果可诱导生发泡破裂(GVBD),即第一次减数分裂。他将细胞质中发挥诱导作用的活性因子称为促成熟因子(MPF)。另一批以Hartwell为首的学者以芽殖酵母为材料,发现了细胞分裂的起始点(start)为DNA合成前的控制点。他们发现了上百个细胞分裂周期(CELL DIVISION CYCLE, CDC)基因,深入研究了各基因表达产物产生的先

收稿日期:2001-11-14

基金项目:国家自然科学基金(39430080)及国家重点基础研究(G1999053901)资助项目

作者简介:王永潮,教授,电话:62363506, E-mail: wangyc@public.bta.net.cn.

后关系,提出前一事件的生化反应产物为后一事件反应的必需底物,像多米诺骨牌一样,前一张倒下才有后面的牌依次倒下,因此称之为多米诺理论。酵母细胞是细胞周期研究的最佳材料,容易诱导及选择温度敏感(*ts*)突变株,即在某种限制温度下培养,某个基因失活不能表达该种蛋白,细胞被阻断在一定的周期阶段,若恢复到允许温度则可逆性地恢复正常。其中最重要的是,发现 *CDC28* 基因在非限制温度下将细胞主要阻断在  $G_1/S$  交界处,少数阻断于  $G_2/M$  期,其表达的蛋白产物为  $P_34^{cdc28}$ 。受此工作的启示,Nurse 于 1987 年用裂殖酵母筛选 *ts* 突变株,发现一株细胞在限制性温度(36℃)下被阻断在  $G_2/M$  期,少数阻断在  $G_1/S$  期,序列测定结果表明两种基因的同源性达 69%,为磷酸化丝氨酸及苏氨酸的激酶。此细胞株被命名为 *cdc2 ts* 突变株。Nurse 进而将人细胞 cDNA 文库和酵母 *cdc2 ts* 细胞株做互补实验,结果可补救 *cdc2 ts* 细胞株的缺陷,由此克隆出裂殖酵母 *cdc2* 的同源物——人的 *cdc2* 基因。此工作提示了 *cdc2* 是调控细胞周期高度保守的因子。同时 Nurse 还发现裂殖酵母 *cdc2* 还可互补芽殖酵母 *CDC28* 的缺陷。裂殖酵母为杆状细胞,生长到一定长度时即横分裂为二个等长细胞,因而可根据细胞长度确定其在周期中的定位,是十分理想的研究材料。他连续发现了几个 *cdc* 基因。1983 年,另一批以 Hunt 为首的研究组以海胆及蛙卵为材料,首先发现海胆卵受精后,在其卵裂过程中有一种蛋白周期性地消长,即间期时不断增加,M 期达到高峰,中期过渡到后期时骤然消失。他通过设计一系列精巧的实验,令人信服地确认此蛋白是调节分裂的重要分子,细胞分裂后,它被特殊蛋白酶水解,将其命名为细胞周期蛋白(cyclin)。以后不同科学家发现,海蛤、非洲爪蟾、海星、果蝇和酵母中均有此类 cyclin,其中又分为 cyclin A、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 等,分子量在 45~60Ku 之间。1988 年,M. J. Lohka 从蛙卵中提取 MPF 并将其纯化,获得了微克级的蛋白,经分析其中的主要成分是两种蛋白——P<sub>32</sub> 及 P<sub>45</sub>,二者结合可使多种底物磷酸化。此工作使人联想到 MPF 是否就是酵母 P<sub>34</sub> 和 P<sub>56</sub> 的同源物。接着 Nurse 和 Matter 研究组合作,证明 P<sub>32</sub> 可被酵母的 P<sub>34</sub> 多肽保守区抗体所识别,而酵母 cyclin B<sub>2</sub> 抗体可识别 MPF 的 P<sub>45</sub>,表明它们之间都有同源性。cyclin 抗体的免疫共沉淀中有 P<sub>34</sub> 的蛋白激酶活性。这一系列划时代的开创性工作揭开了长期以来令人困惑不解的细胞周期调控的核心因子(即 *cdc2* 和 cyclin)的本质。其中 *cdc2* 为催化因子,而 cyclin 为调节因子。1990 年,Nurse 在《Nature》杂志上发表了著名的论文《M 期启动调节的普遍机制》,提出在所有真核生物细胞中,M 期的启动受一个共同机制的调节,该机制的中心为 P<sub>34</sub><sup>cdc2</sup> 蛋白激酶,是亿万年来生物进化的结果。A. W. Murray 说:“从某种意义上来说,细胞周期研究的近期历史使人联想起在美国兴建第一条横跨大陆的铁路时的情景:当时是由两个各干各的工程队分别各建一段,直到 1864 年才在犹他州的普罗蒙特用一根金道钉把两段铁路连接起来”。*cdc2* 便是细胞周期调控中的“金道钉”。这项突破性的工作激发了许多学者寻找新的 *cdcs* 和 cyclins 的热情,在高等真核生物中陆续发现的有 cyclinA、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、P<sub>3</sub>、C、D<sub>1</sub>、D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub>、E、F、G 和 H 等。研究发现,*cdc2* 也是一个大家族,便重新命名为细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase,CDK),其中有 CDK1、2、3、4、5、6 和 7 等。由于 *cdc2* 是首先发现的成员,便被更名为 CDK1。根据 cyclins 在细胞周期不同阶段所发挥的作用,将其归纳为 G<sub>1</sub> cyclin、S cyclin 及 G<sub>2</sub> cyclin。它们分别和不同的 CDKs 结合,在细胞周期的不同阶段起作用。当 MPF 为前 MPF(Pre-MPF)时,*cdc2* 的酪氨酸 15(Y<sub>15</sub>)、苏氨酸 14(T<sub>14</sub>)、苏氨酸 161/167(T<sub>161/167</sub>)必须为蛋白激酶磷酸化;而 Pre-MPF 活化为 MPF 时,Y<sub>15</sub>、T<sub>14</sub> 必须为磷酸酶脱去磷酸,并通过一系列磷酸化/去磷酸化的级联反应引起有丝分裂及减数分裂的变化。CDK -

cyclin 分子被称为细胞周期引擎分子,推动细胞周期的运转。在芽殖酵母的研究中,Hartwell 提出了细胞周期检验点(checkpoint)的概念,发现了许多检验点及其调节基因,这是一项重大的发现。高等真核生物中的检验点主要有 R 检验点(相当于酵母的 start)、G<sub>2</sub>/M 检验点及纺锤体检验点等。检验点主要通过反馈调节来发挥作用。反馈调节单元主要由感受器、信号传导器及反应器三个部分组成。R 点的功能为监测前次分裂后 DNA 是否完整、有无 DNA 损伤。在 P53 介导的 R 点通路中,DNA 损伤使 P53 蛋白激活,由此诱导 P21<sup>Cip1</sup> 基因大量表达,P21<sup>Cip1</sup> 蛋白对 CyclinD、E 酶复合物活性的抑制使控制进入 S 期的关键因子 pRb 蛋白家族成员不能被过磷酸化,从而使其结合的转录因子 E<sub>2</sub>Fs 不能释放,S 期的必需基因不能转录,细胞即阻断于 G<sub>1</sub>/S 处。有人认为 pRb 也是 R 点的组成成员,直至损伤修复完毕后才能通过 R 点。G<sub>2</sub>/M 点也是检测 DNA 的损伤的检验点。纺锤体装置是由着丝粒/动粒、中心体和以中心体为两极向赤道板方向组装的纺锤体所组成。中心体和动粒均为微管组织中心(MTOC)。前中期时每条染色体上的动粒均在捕捉对面向一极伸出的纺锤丝微管的正端,直到染色体两侧动粒均捕捉到相当量的微管并最终排列到赤道板上,这时两侧达到力的平衡。着丝粒/动粒由 CENP-A、B、C、D、E、F、G 和 H 等着丝粒蛋白及染色质 DNA 组成。检测点蛋白包括有 Mad1、Mad2、Mad3、Bub1、Bub2、Bub3、MPS 和 ZW10 等,位于动粒上。此外 3F3/2 抗原决定簇也被认为参与张力的感受。纺锤体检验点的主要功能为感受及监督双极染色体粘结对动粒的张力、动粒蛋白的变化、染色体在赤道板上是否集中排列、纺锤体同动粒的连接和纺锤体及驱动蛋白缺陷等。若这些环节发生异常或有缺陷,检验点就被激活,传导及放大信号到反应器 APC/C,即泛素连接酶 E3 复合物,抑制其活性,令细胞阻断于后期之前,使细胞周期中的差错有机会修复。修复完毕后,APC/C 即可通过蛋白水解酶复合体水解 Cyclin B 和染色单体间的粘着素组分 Sec1、Med1 等。结果,各染色体的两姐妹染色单体得以分离,细胞进入后期,完成细胞分裂。因此,动粒不像过去所认为的那样,其功能仅是结合纺锤体微管正端而向两极拉动染色体,而是一个精密的细胞周期检验点机构。中心体为细胞中最后一个未充分阐明功能的细胞器。研究表明,CDK、P53 等基因的异常表达均可产生多个中心体而造成细胞多极分裂。

## 2 细胞周期调控研究成果获大奖的几点启示

综上所述,细胞周期的研究是生物生长、发育、遗传以及医学等相关领域中的重大问题研究的基础。推动细胞周期运转的分子基础为 CDK - Cyclin。多年来的研究揭示了这一分子调控机制是高度保守的,两亿年来漫长年代演化过程中,cdc 像一根红线一样贯穿始终,只不过高等真核生物调控机制更精密、更复杂。细胞周期运转最根本的功能在于保证 DNA 忠实的复制和精确无误地将两套染色体分配到两个子细胞中。由于多重检验点的监视,有错误或损伤轻者,其运转被阻断,使错误或损伤得以修复;重者或启动凋亡线路将其引爆杀死,或逃脱监督而发生癌化。由于细胞周期调控研究工作的突破性进展,癌症被认为是一种细胞周期性疾病,也为癌的诊断和治疗打开大门。细胞周期基因受损、形成异倍体、原癌基因活化,以及基因突变或缺失等,都可造成细胞无节制地疯狂增殖。P53 是 R 检验点的重要成分,几乎 1/2 的癌症患者都有 P53 的突变。现在很多生物科学领域的问题与细胞周期有关,如神经元几乎是不再分裂的细胞,对于脑出血或栓塞及老年性痴呆等神经元死亡性疾病、再生障碍性贫血等细胞增殖相关疾病,若能启动其增殖,将有望恢复细胞和治愈疾病;动物体细胞克隆效率也与细胞周期有关。

令人深思的是,这三位诺贝尔生理学或医学奖的得主都在肿瘤研究机构从事工作,而他们都是用酵母、海胆及非洲爪蟾卵等低等生物材料,研究其细胞周期调控机制。当初,他们的研究令很多人感到费解。然而,他们甘坐冷板凳,锲而不舍,坚持不懈地一干就是二十多年。起初,许多学者之间也沟通很少,然而,MPF的提纯和功能的确定,终于使人们恍然大悟,大家发现原来追求的目标都是同一种调控分子,只不过是材料和方法不同而已。因而尊重科学家的独立思考、研究材料的选择、技术线路的确定,都是十分重要的。要允许他们多年不出重大成果,也不一定要组织起来攻关。科研成果就是导向,吸引不同领域工作的学者参与其中。如果没有酵母ts细胞的研究,就不可能克隆出cdc基因;若没有大量的当时看来无重大意义的科研积累,也不可能有今天重大的突破。这项诺贝尔奖公布后,日本京都大学的Mitsuhiko Yanagida教授赞誉Hartwell为细胞分裂之父,Nurse为细胞分裂的伟大的“传教士”,Hunt为细胞分裂的艺术家。这一评论十分耐人寻味,非常中肯,他是针对获奖者的特点而讲的。科学研究首要的是选题要高瞻远瞩,要有进化的观点、发育的观点、辩证唯物主义的观点。同时,科学研究也是一种艺术,设计要巧妙,滴水不漏,结果颠扑不破,令人信服,才能做出原始创新的工作。科学家也要为发现的科学真理呼号呐喊,以唤起公众关心科学与了解科学。宣传也必将推进科学的发展,提高全民的科学素质。诺贝尔科学奖被公认是科学成就的最高奖,因为它的高标准、严选择,每一奖项最多只限三人,有人对人数限制颇有非议。如MPF的研究,Masui等花了十几年时间,进行了大量功能的研究,因此他和Hartwell、Nurse三人共获1989年的Lasker奖,但他却与诺贝尔奖无缘。尽管如此,全世界本领域研究者均为此项目获此大奖而受到鼓舞。

### 3 展 望

诺贝尔奖的颁布不等于工作的结束,而是开辟了一个重要研究领域。现在,仍有许多问题有待解决,如CDKs的亚细胞定位和其功能的关系以及CDKs的底物还远未阐明。检验点为何能够如此灵敏地监测极纤细的误差而发出信号,这是目前细胞增殖调控中的一个核心问题。其机理的阐明可能开辟一个新的研究领域,以检测细胞内环境的变化、一个信号如何从细胞的一点传到另一点;对由于检验点的缺陷而导致细胞癌化的疾病,我们能否针对相关的靶分子设计治疗方案而不伤及正常细胞;能否掌握有丝分裂-减数分裂的转换开关而人工迫使二倍体细胞减数分裂为配子,通过融合形成“合子”,以便更容易地进行高效的重组基因置换等,都是需要探讨的领域。

总之,细胞周期调控机制的揭示,使人类对生命活动规律的认识向前跨了一大步。我们热切地期待它正像50年前DNA双螺旋结构的揭示一样,引起生命科学中的另一场革命。

#### 参考文献:

- [1] Murray A, Hunt T. The cell cycle[M]. New York. W H Freeman and Company, 1993
- [2] Nurse P. A Long Twentieth Century of the Cell Cycle and Beyond[J]. *Cell*, 2000, 100: 71 - 78.
- [3] Nurse P. Universal Control Mechanism Regulating Onset of M Phase[J]. *Nature*, 1990, 344: 503 - 508.
- [4] Sherr CJ. Cancer Cell Cycles[J]. *Science*, 1996, 274(6): 1672 - 1677.
- [5] Hardwick KG. The Spindle Checkpoint[J]. *TIG January*, 1998, 14(1) 1 - 4.
- [6] 王永潮. 细胞周期[A]. 见·邹承鲁. 当代生物学 [C]. 北京: 中国致公出版社, 2000, 500 - 503.
- [7] 陈晓波, 王永潮. 细胞周期检验点调控研究进展[J]. 科学通报, 1998, 43(7): 682 - 687.