

DOI: 10.13376/j.cblls/2022071

文章编号: 1004-0374(2022)06-0613-11

· 评述与综述 ·

驱动蛋白MCAK的微管解聚机制研究进展

彭 川, 耿轶钊*

(河北工业大学理学院, 生物物理研究所, 天津 300401)

摘 要: 有丝分裂着丝粒相关驱动蛋白 (MCAK) 是驱动蛋白 -13 家族的代表性成员, 在细胞分裂的多个过程中起作用。与传统的驱动蛋白不同, MCAK 蛋白的生物学功能不是通过沿微管轨道的连续行走实现物质运输, 而是从微管末端解聚微管蛋白, 从而实现对微管动力学的调控。因此, MCAK 蛋白是一种微管解聚蛋白, 其沿微管轨道的运动过程以及解聚微管蛋白时的力学 - 化学循环过程都与其他驱动蛋白家族有很大的差异。该文对 MCAK 蛋白微管解聚过程的研究进展进行综述, 尤其对高分辨率分子结构展现的 MCAK 蛋白在解聚微管末端蛋白时的 1:2 复合物模型进行了详细讨论。

关键词: 有丝分裂着丝粒相关驱动蛋白; 驱动蛋白; 微管; 有丝分裂; 微管动力学
中图分类号: Q245 文献标志码: A

Research progress of mitotic centromere-associated kinesin's microtubule-depolymerization mechanism

PENG Chuan, GENG Yi-Zhao*

(Institute of Biophysics, School of Science, Hebei University of Technology, Tianjin 300401, China)

Abstract: Mitotic centromere-associated kinesin (MCAK) is the representative member of the kinesin-13 family and plays multiple roles in cell division. Different from conventional kinesins, the biological function of MCAK is not cargo transportation which is realized through processive movement along microtubule lattice. MCAK can regulate the microtubule dynamics through depolymerizing the microtubule from two ends. Therefore, MCAK is a kind of microtubule regulators. Its walking and mechanochemical processes are different from other kinesin families. In this paper, we reviewed the research progress of the microtubule-depolymerization mechanism of MCAK, especially the 1:2 complex model revealed by the high-resolution crystal and cryo-electron microscope structures.

Key words: MCAK; kinesin; microtubule; mitosis; microtubule dynamics

分子马达蛋白主要可以分为肌球蛋白 (myosin)、驱动蛋白 (kinesin) 和动力蛋白 (dynein) 三类。驱动蛋白是体积最小的一种分子马达, 可以分为 14 个亚家族 (驱动蛋白 -1~14)^[1]。MCAK 蛋白是有丝分裂着丝粒相关驱动蛋白 (mitotic centromere-associated kinesin) 的简称, 属于驱动蛋白 -13 家族。驱动蛋白 -13 家族共有四个成员, 分别为 Kif2A、Kif2B、MCAK (Kif2C) 和 Kif24^[2-3]。与传统的马达类型的驱动蛋白不同, 驱动蛋白 -13 家族成员的马达结构域 (motor domain) 位于蛋白的中部, 属于 M 型驱动蛋白。驱动蛋白 -13 家族的生物学作用是通过消耗

ATP 分子从微管的末端解聚微管蛋白, 从而实现对微管动力学的调控^[4-6]。MCAK 蛋白是驱动蛋白 -13 家族中发现最早也是研究最多的一个成员, 可以从微管的两端对微管进行解聚^[5,7-8]。本文首先对 MCAK 蛋白的功能及其调控机制进行简单介绍, 之后对 MCAK 蛋白及其同家族的 Kif2A 蛋白在微管

收稿日期: 2022-01-14; 修回日期: 2022-03-06

基金项目: 河北自然科学基金项目(A2020202007); 国家自然科学基金项目(11605038)

*通信作者: E-mail: gengyz@hebut.edu.cn

解聚过程中的 1:2 复合物模型进行详细讨论。

1 MCAK蛋白的生物学功能及其调控

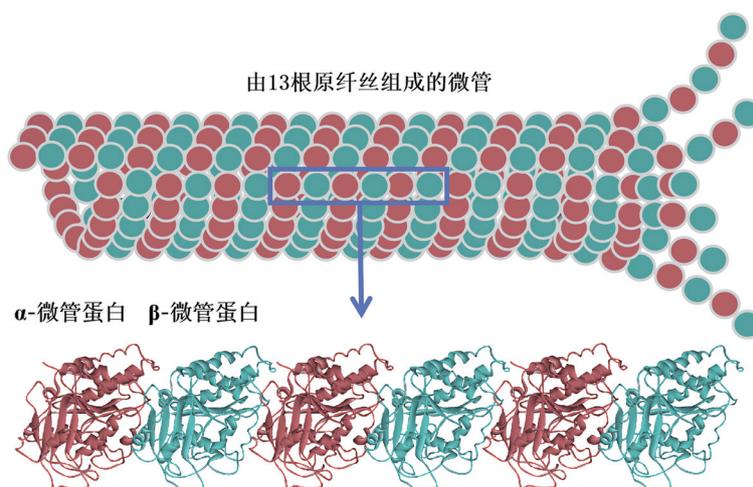
1.1 微管的动力学不稳定性

微管是细胞骨架的一种，也是细胞有丝分裂纺锤体的主要成分。微管是由 α -微管蛋白 (α -tubulin) 和 β -微管蛋白 (β -tubulin) 聚合形成的^[9]，组装微管的基本单元是一个 α -微管蛋白和一个 β -微管蛋白组成的异二聚体。微管蛋白异二聚体首尾相接组成一根原纤丝 (protofilament)，13~15 根原纤丝通过侧向相互作用围成一个中空的管状结构，即为微管 (图 1)。由于微管是通过微管蛋白异二聚体首尾相接形成的，其两端存在差别，分为正极和负极：由 α -微管蛋白组成的一端组装较慢，是微管的负极；由 β -微管蛋白组成的一端组装较快，是微管的正极。微管组装过程需要消耗 GTP 分子，在 α -微管蛋白和 β -微管蛋白上各有一个核苷酸结合位点： α -微管蛋白结合的 GTP 分子位于微管蛋白异二聚体内部，在微管组装过程中不会发生水解； β -微管蛋白结合的 GTP 分子在微管组装时会被水解成 GDP 分子。当微管快速组装时，在末端的几组微管蛋白异二聚体的 GTP 分子水解速度慢于微管组装速度，会在微管末端形成几层结合在 β -微管蛋白上的 GTP 分子未被水解的异二聚体，此结构称为 GTP 帽子 (GTP cap)^[10-11]。微管是一种动态聚合物，具有内在的动力学不稳定性 (dynamic instability)^[4,12]。微管的动力学不稳定性是指微管同时存在生长和收缩两种状

态，两种状态之间可以相互随机转换。对于微管动力学不稳定性的调控是微管动力学的基础。在细胞进入有丝分裂后，微管受到各种因素的调控，动力学不稳定性发生改变，由生长态转变为收缩态 (此过程英文名为 “catastrophe”) 的频率明显增加，相应的由收缩态转变为生长态 (此过程英文名为 “rescue”) 的频率降低，微管动力学不稳定性的这种变化在细胞有丝分裂纺锤体的形成过程中起主导作用。

1.2 MCAK蛋白对微管动力学不稳定性的调控

驱动蛋白 -13 家族成员能够通过调节微管长度参与微管动力学调控，是微管动力学的一种调控因子^[13-15]。MCAK 蛋白是微管的去稳定因子，能够作用于微管末端将微管由生长态转变为解聚态。如前所述，快速生长的微管在其末端存在 GTP 分子未水解的 GTP 帽子。由于 GTP 帽子的稳定作用，微管不会由生长态转变为解聚态。MCAK 蛋白能够与微管末端的 GTP 帽子产生较强的结合，并携带微管蛋白异二聚体从微管脱离，微管的 GTP 帽子被破坏，进而由生长态转变为解聚态。MCAK 蛋白存在于整个细胞周期的细胞质中，在有丝分裂中心体、着丝粒、动粒和纺锤体赤道板附近浓度较高。与其在细胞中的分布一致，MCAK 蛋白通过调控微管的动力学不稳定性影响细胞有丝分裂的许多方面，如纺锤体组装、动粒和微管的正确结合以及染色体整列、中板聚合和分离^[16]。去除或者抑制 MCAK 蛋白的活性能够导致细胞有丝分裂中期和后期纺锤



图中显示的是由13根原纤丝组装成的微管结构。 α -微管蛋白用棕色表示， β -微管蛋白用蓝色表示。由 α -微管蛋白组成的一端 (图中左侧) 为微管的负极，由 β -微管蛋白组成的一端 (图中右侧) 为微管的正极。图中所示的微管正极末端处于弯曲构象，有利于MCAK蛋白的结合。

图1 微管和微管蛋白的结构

体过长和染色体的错误定位^[17]。由于MCAK蛋白在纺锤体形成、微管-动粒的正确结合和染色体分离等过程中发挥重要作用,在肿瘤发生发展过程中可能会伴随MCAK蛋白的功能失常^[18]。现在已经确认,MCAK蛋白在乳腺癌^[19]、胃癌^[20]和结直肠癌^[21]中都呈现高表达,说明MCAK蛋白在这几种癌症细胞中对微管的调控失常。MCAK蛋白表达量与癌症的发展进程、侵袭、转移和不良预后高度相关^[19,22],已有文献对MCAK蛋白与肿瘤发生发展的关系进行了综述^[22-25]。类似于纺锤体驱动蛋白Eg5^[26],MCAK蛋白已被确认为一种新的抗癌药物靶标^[27]。但是,到目前为止还没有以MCAK蛋白为靶标的药物分子进入临床试验。

除了驱动蛋白-13家族成员,驱动蛋白-8和驱动蛋白-14家族的部分成员同样具有解聚微管的作用,但是解聚机制与MCAK蛋白有明显区别。Kar3蛋白是从酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中提取出来的一种驱动蛋白,属于驱动蛋白-14家族,通过与Cik1蛋白形成异二聚体从微管的正极解聚微管^[28]。驱动蛋白-8家族成员是一类利用ATP分子水解供能沿微管正向运动的驱动蛋白,具有一定的微管解聚活性,可以调控动粒微管的动力学行为进而控制有丝分裂中染色体的位置^[29]。裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)中的两种驱动蛋白-8成员在行使功能时相互配合,能够形成异二聚体。实验中还观察到,裂殖酵母的驱动蛋白-8可以携带“货物”随着处于缩短状态的微管正端向负极移动。与向微管正极的移动不同,驱动蛋白-8这种向负极的移动不需要消耗ATP分子。

1.3 对MCAK蛋白活性的调控

MCAK蛋白的定位和微管解聚活性受多种因子的调控。其中,有丝分裂激酶(mitotic kinase)是MCAK蛋白活性的主要调控因子^[8]。研究发现,Aurora A^[30-32]、Aurora B^[33-36]、CDK1(cyclin-dependent kinase 1)^[37]、Plk1(polo-like kinase 1)^[38-40]等激酶可以通过磷酸化MCAK蛋白的多个位点,实现对其定位和活性的精确调控。除了磷酸化调控外,MCAK蛋白在微管正端的定位可以通过其与不同微管正端跟踪蛋白(microtubule plus-end tracking proteins, +TIPs)的直接相互作用得到增强,这些蛋白主要包括EB1(end binding protein-1)^[41-42]、TIP150^[43]、Kif18B^[44](属于驱动蛋白-8家族)等。表1总结了MCAK蛋白活性的直接调控因子。需要注意的是,单个的调控因子对MCAK蛋白的调控可能存在多条路径。例如,

EB1能够将MCAK蛋白定位到微管的正端,TIP150向微管正端的定位也需要与EB1结合;三者又可以形成复合物,而且TIP150与MCAK蛋白的相互结合又有利于MCAK蛋白与EB1的结合^[43]。Aurora A能够直接对MCAK蛋白进行磷酸化调控。而驱动蛋白-8成员Kif18B通过结合EB1定位到微管正端,其本身也能沿微管定向运动到正极末端。Kif18B和MCAK蛋白组成的复合物更有利于二者在微管正端的定位。在此过程中,Aurora A又可以通过磷酸化作用破坏二者之间的结合,进而阻碍Kif18B和MCAK蛋白在微管正端的定位^[44]。

由于本文重点讨论的是MCAK蛋白对微管末端的解聚过程,对于MCAK蛋白的各种调控网络没有进行详细讨论,在表1中仅列出了直接以MCAK蛋白为靶点的调控因子,已有文献对此进行了详细的总结^[23]。到目前为止,虽然通过实验确认了多个MCAK蛋白活性的调控因子和多条调控路径,但是具体的分子机制到目前为止还不十分清楚,需要进一步的研究。

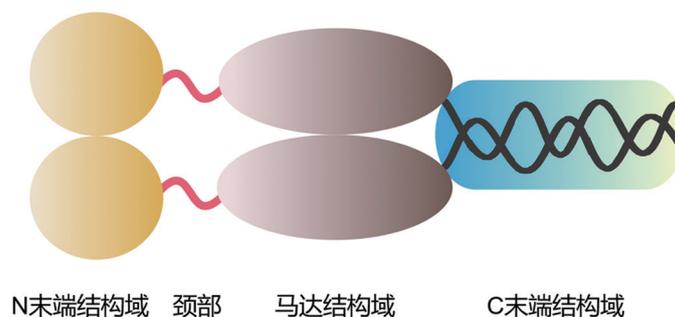
2 MCAK蛋白的结构特征和微管解聚机制

2.1 MCAK蛋白的结构特征

在结构上,MCAK蛋白可以分为四个主要的结构域(图2)^[5]。从蛋白质序列的N端开始,首先是N末端结构域(N-terminal domain),主要起定位作用,是MCAK蛋白定位到着丝粒的关键结构。连接N末端结构域的是带正电荷的颈部结构(neck),颈部是MCAK蛋白微管解聚活性的必需结构。颈部之后是包含微管结合位点和核苷酸结合位点的马达结构域(motor domain),该结构域是MCAK蛋白解聚微管的主要结构。MCAK蛋白序列的最后是C末端二聚化结构域(C-terminal dimerization domain),是MCAK蛋白形成二聚体的部分,并且可以通过与马达结构域的直接相互作用对MCAK蛋白的化学循环进行调控^[48]。虽然MCAK蛋白在体内主要以同源二聚体的形式存在,但是其最小的功能单位是单体,即MCAK蛋白单体就可以实现微管的解聚功能。通过几何结构的比较可以推测,MCAK蛋白形成二聚体时,两个马达结构域可以同时与微管结合,阻止已弯曲的原纤丝重新组合形成微管,提高MCAK蛋白的微管解聚效率^[49]。在驱动蛋白-13家族成员中,马达结构域和颈部是高度保守的,而N末端和C末端结构域差别较大,体现了家族中不同成员功能的差异性。

表1 MCAK蛋白定位和活性的直接调控因子

调控因子	调控方式	作用位点	作用
EB1	直接相互作用	N-末端结构域的SKIP模体	携带MCAK蛋白向微管正端运动 ^[41-42]
TIP150	直接相互作用	N-末端和C-末端结构域	与EB1和MCAK蛋白组成复合物, 促进MCAK蛋白在微管正端的结合 ^[43]
Kif18b	直接相互作用	未知	驱动蛋白-8家族成员, 增强MCAK蛋白与微管正端的结合 ^[44]
SCF ^{Fbxw5}	MCAK蛋白与Fbxw5的直接相互作用	马达结构域	促进MCAK蛋白泛素化, 在G ₂ 期降解MCAK蛋白 ^[45]
Aurora A	磷酸化	S95 S109 S111 S115 S192 S719 (XKCM1: 爪蟾)	S719 (XKCM1)磷酸化将MCAK定位到纺锤体极体 ^[23,30] ; S192 (XKCM1中为S196)磷酸化降低了MCAK蛋白的微管解聚活性 ^[23,30-31]
Aurora B	磷酸化	T95 (XKCM1) S110 (XKCM1) S115 S192 S161 (XKCM1) S177 (XKCM1) T162 (XKCM1) T229 (XKCM1) S253 (XKCM1)	S192 (XKCM1中为S196)的磷酸化将MCAK蛋白定位到着丝粒上并降低其解聚活性, 促进MCAK蛋白从染色体臂的脱离 ^[23,33-36] ; T95磷酸化将MCAK蛋白定位到染色体臂 ^[33] ; S110磷酸化抑制MCAK蛋白在着丝粒上的定位 ^[23,33]
Cdk1	磷酸化	T537	减弱MCAK蛋白的微管解聚活性, 促使MCAK蛋白从着丝粒脱离 ^[37]
TTBK2	磷酸化	未知, Kif2A中为S135	减弱MCAK蛋白的微管解聚活性 ^[46]
PAK1	磷酸化	S111 S192	S111磷酸化阻止MCAK定位到中心体 ^[47] ; S192磷酸化降低MCAK蛋白的微管解聚活性 ^[47]
Plk1	磷酸化	S592 S595 S621 S632 S633 S715	S592、S595、S621、S632、S633和S715的共同磷酸化提高了MCAK蛋白的微管解聚活性 ^[40] ; S715的磷酸化阻碍了MCAK蛋白C末端与马达结构域的结合, 促进了MCAK蛋白向微管的结合 ^[23,48] ; S632和S633的磷酸化提高了MCAK蛋白的微管解聚活性 ^[23,39]



MCAK蛋白具有四个主要的结构域, 分别是N末端结构域、颈部、马达结构域和C末端结构域。其中N末端结构域在MCAK蛋白的定位中发挥重要作用。颈部结构由大量带正电荷的残基组成, 可与微管蛋白结合。马达结构域是MCAK蛋白与微管蛋白结合的主要部分, 能够催化ATP分子的水解反应。C末端结构域是MCAK蛋白形成二聚体的结构, 并能够对MCAK蛋白的化学循环进行调控。

图2 MCAK蛋白二聚体示意图

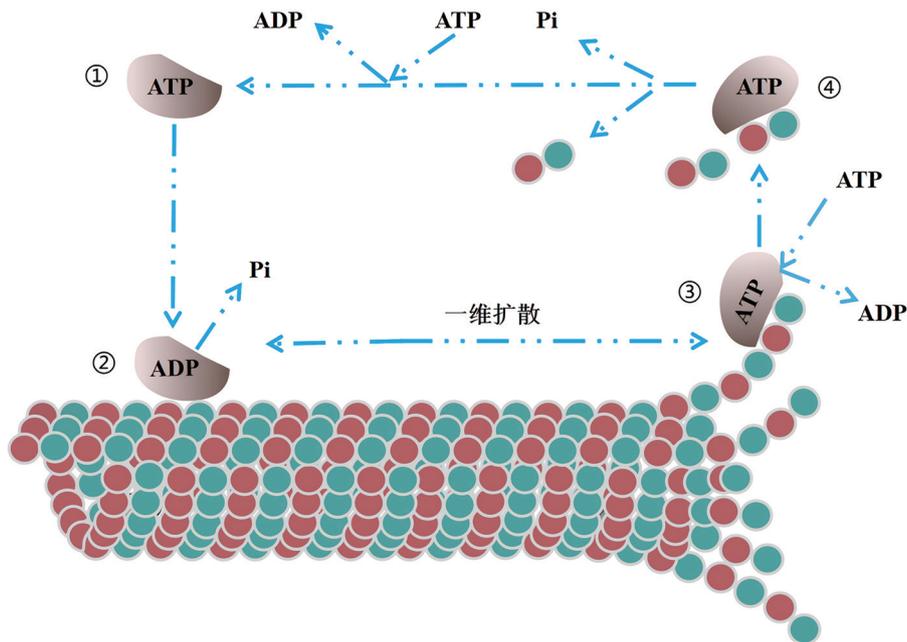
同其他驱动蛋白家族成员一样, MCAK 蛋白的 ATP 结合位点和主要的微管结合位点都位于马达结构域。单独的马达结构域能够结合到微管上, 但是没有微管解聚活性。Maney 等^[50]通过实验证明, MCAK 蛋白的马达结构域加上与其 N 末端连接的颈部区域的 31 个氨基酸残基即可恢复 MCAK 蛋白的微管解聚活性, 在此基础上多保留颈部的 19 个氨基酸残基即可实现与野生型 MCAK 蛋白相当的微管解聚活性。因此, MCAK 蛋白解聚微管的最小结构单元包含马达结构域和与之相连的颈部结构。

2.2 MCAK蛋白解聚微管的工作循环

MCAK 蛋白对微管的解聚过程可以用图 3 概括, 大致分为四个状态。当 MCAK 蛋白处于游离态时 (状态 1), 其马达结构域结合 ATP 分子 (传统驱动蛋白在此状态下结合 ADP 分子)^[51]。游离态 MCAK 蛋白马达结构域与微管的结合能够催化 ATP 分子水解成 ADP 分子, 与微管结合的马达结构域变成 ADP 结合态构象 (状态 2)。结合 ADP 分子的 MCAK 蛋白无法稳定地与微管结合, 会在微管上向正极或负极随机做一维扩散运动 (方向不确定, 运动方式与传统驱动蛋白明显不同)。当 MCAK 蛋白移动到微管末端时, 由于微管末端原纤丝处于弯曲构象, 因此能够与 MCAK 蛋白稳定结合。同时,

弯曲的微管原纤丝可以催化马达结构域释放结合的 ADP 分子, 并结合一个新的 ATP 分子, 马达结构域重新变为 ATP 结合态 (状态 3)。ATP 结合态的马达结构域能够携带结合的微管末端微管蛋白从微管脱离 (状态 4)^[49,52]。微管蛋白异二聚体也可以催化马达结构域结合的 ATP 水解, 使马达结构域变为 ADP 结合态构象。ADP 结合态马达结构域与微管蛋白异二聚体的相互作用变弱, MCAK 蛋白从异二聚体脱离, 二者变为游离态。结合 ADP 分子的游离态马达结构域可以自发释放结合的 ADP 分子, 并结合一个新的 ATP 分子 (传统驱动蛋白在游离态时无法自发释放结合的 ADP 分子), 从而回到状态 1。至此, MCAK 蛋白完成了一个工作循环。

通过对 MCAK 蛋白工作循环的描述可以发现, MCAK 蛋白在沿微管的运动方式、力学-化学循环调控等多个过程中与一般的驱动蛋白 (如驱动蛋白-1) 有较大差别, 主要表现在以下几个方面: (1) MCAK 蛋白与微管的相互作用和对微管末端的识别; (2) MCAK 蛋白沿微管的一维扩散运动方式; (3) MCAK 蛋白独特的力学-化学循环调控机制; (4) MCAK 蛋白从末端解聚微管蛋白的过程。到目前为止, 对于 MCAK 蛋白的微管末端识别和从微管末端解聚微管蛋白的机制研究较多, 下面主要对



棕色圆球: α -微管蛋白; 蓝色圆球: β -微管蛋白。MCAK蛋白的核苷酸结合状态在示意图中进行了标注。在一个完整的工作循环中, MCAK蛋白共经历了四个主要的状态。在MCAK携带微管蛋白从末端脱离时, 由于颈部和马达结构域的第二个环(L2)与次末端微管蛋白异二聚体之间的相互作用, MCAK会携带两个微管蛋白异二聚体从微管脱离(1:2复合物模型)。

图3 MCAK蛋白的力学-化学循环

这两个问题的研究进展进行讨论。

2.3 MCAK蛋白对微管末端的识别

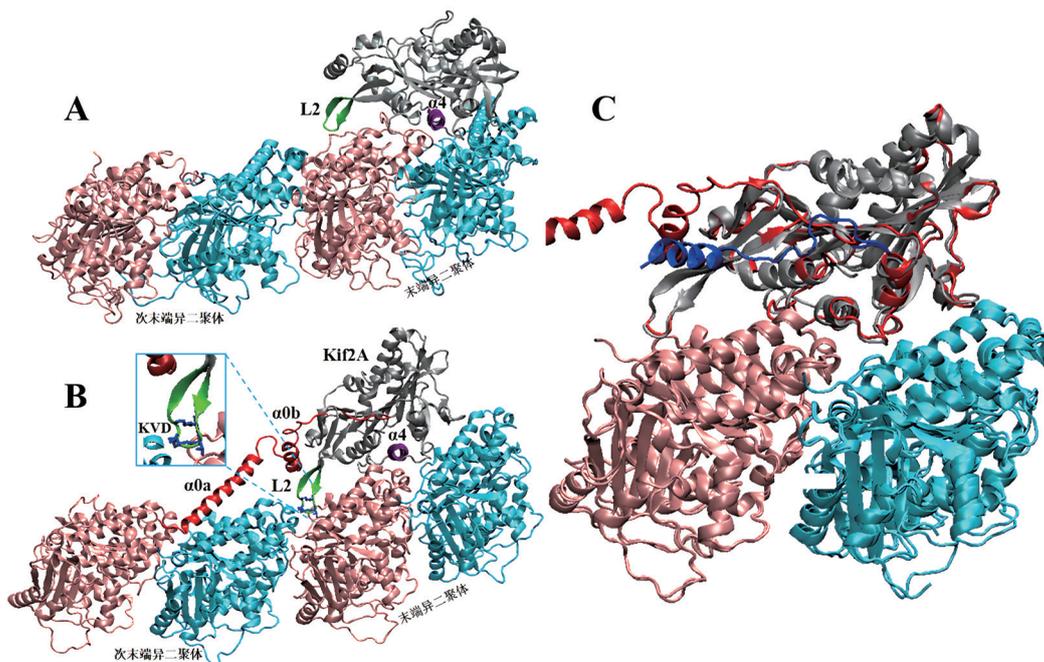
MCAK蛋白与传统驱动蛋白的一个明显区别是MCAK蛋白无法与正常的微管产生稳定结合,但是能够识别微管末端并与其产生较强的结合。微管末端与正常微管的主要区别在于其纵向曲率的不同(图1和图3)。由于有侧向原纤丝之间的相互作用,正常的微管在纵向处于平直的构象,是一种高能状态。在微管的末端,由于缺少了原纤丝之间的侧向束缚,原纤丝在纵向处于能量较低的弯曲构象。因此,MCAK蛋白对微管末端的识别应该是通过微管蛋白二聚体不同的弯曲程度实现的。

Friel课题组^[53]确定了决定MCAK蛋白在微管末端驻留时间的关键二级结构是马达结构域的 $\alpha 4$ 螺旋(图4):通过对不同氨基酸残基的突变,他们提出MCAK蛋白 $\alpha 4$ 螺旋上的三个氨基酸残基(Lys524、Glu525和Arg528)在微管末端识别中起关键作用。本课题组也对驱动蛋白的 $\alpha 4$ 螺旋进行过系统的研究:在与微管结合时,驱动蛋白的 $\alpha 4$

螺旋位于 α -和 β -微管蛋白异二聚体中间的沟槽中,并且在马达头部的化学循环过程中保持稳定^[54]。 $\alpha 4$ 螺旋在面对微管蛋白的一侧主要由极性残基构成,有利于马达结构域和微管蛋白之间的相互作用。 $\alpha 4$ 螺旋面对马达结构域的一侧则主要由疏水残基构成,有利于马达结构域绕 $\alpha 4$ 螺旋的转动。与传统驱动蛋白相比,MCAK蛋白在524、525和528三个位点的残基极性更强。在传统驱动蛋白中,这三个位点分别为甘氨酸(Gly)、天冬酰胺(Asn)和丝氨酸(Ser)。Friel课题组推测,MCAK蛋白 $\alpha 4$ 螺旋上这三个特异性的氨基酸残基不仅增加了 $\alpha 4$ 螺旋的极性,还提高了 $\alpha 4$ 螺旋C末端的螺旋半径,可能更适合与微管弯曲的末端稳定结合。但是,到目前为止,MCAK蛋白与微管和微管末端相互作用的差异性起源尚未系统阐明,本课题组正在对此问题进行研究。

2.4 MCAK蛋白解聚微管的1:2复合物模型

MCAK蛋白在生物体内的功能是从微管末端解聚微管,使微管从聚合态转变为解聚态。MCAK



A: MCAK蛋白与末端和次末端微管蛋白的结合构象。MCAK蛋白结构(2HEH)和微管蛋白结构(1FFX)的结合方式参考了MCAK蛋白马达结构域与微管蛋白二聚体复合物的晶体结构(5MIO)。图中 α -微管蛋白和 β -微管蛋白分别用棕色和蓝色表示,马达结构域用黑色表示。马达结构域的 $\alpha 4$ 螺旋和L2结构在图中用紫色和绿色进行了标注。B: Kif2A蛋白的1:2复合物结构(6BBN)。Kif2A蛋白的颈部结构用红色表示,与次末端微管蛋白异二聚体的 β -微管蛋白有相互作用。KVD模体位于两个微管蛋白异二聚体之间,与次末端的 β -微管蛋白和末端的 α -微管蛋白都有接触。C: MCAK蛋白(5MIO)和Kif2A蛋白(6BBN)的结构对比。两个晶体结构的微管蛋白部分重合较好,但是马达结构域构象有较大差别(有较大构象差异的部分用红色进行了标注)。Kif2A蛋白的颈部(红色螺旋)和MCAK蛋白的颈部(蓝色螺旋)也有较大差别。

图4 驱动蛋白-13解聚微管时的1:2复合物结构

蛋白解聚微管是通过与微管末端 GTP 帽子上的微管蛋白异二聚体结合并携带微管蛋白从微管脱离实现的。失去 GTP 帽子的微管处于不稳定状态, 能够自发进行解聚。

研究结果显示, MCAK 蛋白的颈部结构和特异性的包含 KVD 模体 (在马达结构域第二个环 L2 结构顶端由 Lys-Val-Asp 组成的保守序列) 的 L2 在 MCAK 蛋白解聚微管的过程中起关键作用^[7,52,55]。前文已经提到, MCAK 蛋白的马达结构域加上颈部 C 末端的部分残基即可达到与野生型相当的微管解聚活性, 而单独的马达结构域或颈部结构都不能解聚微管。虽然到目前为止获得的 MCAK 蛋白的晶体结构和电镜结构中颈部区域都处于全部或部分缺失状态, 但同家族的 Kif2A 蛋白的晶体结构^[56] 和 Klp10A 蛋白的高分辨率冷冻电镜结构^[57] 的颈部区域都呈现螺旋构象 (图 4B), 由此推测 MCAK 蛋白的颈部也处于螺旋构象。长的 L2 结构是驱动蛋白 -13 家族的特有结构, 与其他驱动蛋白相比多十几个氨基酸残基, 其中包括驱动蛋白 -13 家族标志性的 KVD 模体 (图 4)。

在 MCAK 蛋白对微管解聚的过程中, 颈部结构和 L2 结构的功能类似, 都可以增强末端两个微管蛋白异二聚体之间的相互作用, 使得一个 MCAK 蛋白可以与两个微管蛋白异二聚体组成复合物, 以 1:2 的比例从微管末端解聚微管。通过分析 MCAK 蛋白的马达结构域与一组微管蛋白异二聚体结合的晶体结构 (PDB 编号: 5MIO^[7]) 可以发现, 其马达结构域与微管蛋白的结合方式类似于驱动蛋白 -1 马达结构域与微管的结合^[7,55]。将此结构扩展到次末端一组微管蛋白异二聚体会发现, MCAK 蛋白的 L2 位于两组异二聚体之间, 其中 KVD 模体与两组异二聚体都有相互作用 (Lys 和 Val 与末端异二聚体的 α -微管蛋白有相互作用; Asp 与次末端异二聚体的 β -微管蛋白有相互作用) (图 4)^[55]。KVD 模体与两组微管蛋白异二聚体的结合有两个作用, 增强两组异二聚体之间结合的同时保持两组异二聚体在纵向的弯曲程度。MCAK 蛋白的颈部也有类似的作用。MCAK 蛋白的颈部由大量带正电荷的氨基酸残基构成, 可以和带相反电荷的微管蛋白 C 末端结合。根据颈部结构的指向, 其也可以同次末端微管蛋白异二聚体结合, 同样有利于 MCAK 蛋白与末端和次末端异二聚体形成复合物^[7,52]。此外, 颈部与次末端异二聚体的结合也保证了此二聚体不会与另外的 MCAK 蛋白结合。在 KVD 模体和颈部的共同作用

下, 处于弯曲构象末端的两组微管蛋白异二聚体和末端异二聚体上结合的 MCAK 蛋白组成的复合物与微管脱离。复合物中的两组微管蛋白异二聚体之后也会脱离, 形成一组游离态异二聚体以及一组异二聚体和 MCAK 蛋白的复合物 (图 3 状态 4), 此即为 MCAK 蛋白解聚微管的 1:2 复合物模型。

虽然目前对 MCAK 蛋白解聚微管过程的研究较为深入, 但是考虑到 MCAK 蛋白完整的工作循环, 还有几个关键的问题需要在后续的研究工作中阐明。MCAK 蛋白在微管上的运动方式与传统双头驱动蛋白的 hand-over-hand 运动模型完全不同^[6,58-59], 是沿单根原纤丝不定向的一维扩散运动 (图 3 状态 2 到状态 3), 运动过程的细节和构象变化机制到目前为止还不清楚。有实验证实, 带正电荷的颈部可能在此过程中也起一定的作用, 其与微管蛋白 C 末端的相互作用增强了 MCAK 蛋白向微管末端的运动^[13]。驱动蛋白研究的另一个关键问题是力学-化学循环的耦合问题。MCAK 蛋白的力学-化学循环与传统双头驱动蛋白也有较大的差别^[6,51], 主要表现在以下几个方面。游离态的 MCAK 蛋白结合的是 ATP 分子 (图 3 状态 1), ATP 分子的水解是整个化学循环的限速步骤。而传统驱动蛋白在游离态时结合 ADP 分子, 相应的化学循环限速步骤是 ADP 分子的释放。微管对驱动蛋白的化学循环有催化作用, 传统的驱动蛋白 ADP 分子的释放需要在微管的催化作用下进行。微管对 MCAK 蛋白化学循环的调控作用更为复杂, 正常的微管可以催化 MCAK 蛋白中 ATP 分子的水解反应 (图 3 状态 2), 但是无法催化 ADP 分子从 MCAK 蛋白马达结构域的释放。弯曲的微管蛋白末端既能催化 MCAK 蛋白 ATP 分子的水解反应, 又能催化 ADP 分子的释放 (图 3 状态 3)。由此可见, MCAK 蛋白具有独特的力学-化学循环耦合机制。但是, 其调控的结构基础还不清楚, 也是 MCAK 蛋白后续研究的一个重要方向。

3 驱动蛋白-13家族成员的结构和功能异同

3.1 N末端和C末端结构域的差异决定了驱动蛋白-13家族成员的功能差异

驱动蛋白 -13 家族共有四个成员, 分别为 Kif2A、Kif2B、Kif2C/MCAK 和 Kif24。在结构上, 这四个成员都具有保守的马达结构域 (>80%) 和颈部结构域 (>70%)^[5]。由于 MCAK 蛋白的马达结构域和颈部结构域具有完全的微管解聚活性, 可以推测, 驱动蛋白 -13 的其他三个成员也都具有微管解聚活性。

驱动蛋白-13的四个成员的主要序列差异出现在N末端和C末端结构域上。这两个结构域与蛋白质的亚细胞定位和与其他蛋白的物理结合有关。这些结构差异性决定了驱动蛋白-13四个成员在细胞定位和功能上的差别^[60-61]。MCAK蛋白主要分布在纺锤体极体、纺锤体微管和着丝粒上,在纺锤体微管与动粒-着丝粒正确结合、染色体整列和分离等过程中起作用。Kif2A蛋白主要定位在中心体和纺锤体极体上^[60-63],对于神经系统的建立起关键作用^[64]。到目前为止,对于Kif2B和Kif24的了解还比较少。Kif24是一种中心粒驱动蛋白,主要定位于母中心粒,与CP110和Cep97之间存在特异性相互作用,能够有效地解聚中心粒微管蛋白,在纤毛形成过程中起作用^[4,65]。研究显示,MCAK、Kif2A和Kif2B也是泛素连接酶SCF^{Fbxw5}的底物,同样在纤毛形成过程中起作用^[45]。而Kif2B主要定位在纺锤体、中心体和动粒上,调控微管与动粒之间结合的稳定性^[4,60]。

3.2 Kif2A和Klp10A的1:2复合物微管解聚模型

驱动蛋白-13家族成员都具有一定程度的微管解聚活性。Trofimova等^[56]和Benoit等^[57]分别得到了Kif2A蛋白及其果蝇同源类似物Klp10A蛋白与微管结合的高分辨率结构。这些结构数据表明,与MCAK蛋白相同,在解聚微管的过程中,这两个蛋白的L2和颈部结构域与末端和次末端微管蛋白二聚体都有接触,进一步支持了驱动蛋白-13的1:2复合物微管解聚模型。

与MCAK蛋白的高分辨率结构相比,Trofimova等^[56]获得的Kif2A蛋白与两个处于弯曲构象的微管蛋白异二聚体结合的晶体结构(PDB编号:6BBN)明确表明,Kif2A蛋白颈部为两段 α -螺旋结构,其中一段螺旋与次末端微管蛋白二聚体的 β -微管蛋白的H12结构有多组氢键和盐键相互作用(图4B和参考文献[56]的图2a、图3b)。由于驱动蛋白-13家族成员颈部的保守性较高,在Kif2A晶体结构中颈部与微管产生相互作用的位点应该也存在于MCAK的颈部结构中^[56]。由此可以推测,MCAK蛋白颈部与次末端 β -微管蛋白H12之间也应该有较强的相互作用。此外,与MCAK蛋白一致,Kif2A蛋白的L2位于两个微管蛋白二聚体之间,与次末端二聚体的 β -微管蛋白和末端二聚体的 α -微管蛋白都有相互作用,同样有利于1:2复合物的形成(图4B)。

值得注意的是,在Trofimova等^[56]得到的晶体

结构中,两组微管蛋白在纵向的弯曲幅度非常大(约15°),而且他们首次观察到了对于微管蛋白之间相互作用非常关键的T7-H8的构象变化。因此,作者推测,由于Kif2A马达结构域/颈部与末端和次末端微管蛋白二聚体的结合,微管蛋白T7-H8的构象发生变化,使得微管蛋白在纵向上产生很大的弯曲,而晶体结构显示的弯曲程度可能已经足够Kif2A以1:2复合物的模式从微管脱离。

Klp10A蛋白是Kif2A蛋白在果蝇中的同源蛋白,Benoit等^[57]利用冷冻电镜的方法获得了不同核苷酸结合状态下(化学空态和ATP结合态)Klp10A与正常微管和弯曲微管蛋白复合物的高分辨率结构(PDB编号:6B0C、6B0I和6B0L)。与Kif2A蛋白一致,Klp10A蛋白的颈部结构也主要是结合到次末端微管蛋白上,支持微管解聚时的1:2复合物模型。更进一步的研究发现,Klp10A蛋白马达结构域的核苷酸结合位点的构象不只受核苷酸结合状态的调控,还受微管构象的调控。只有当核苷酸结合位点结合ATP分子且与微管末端结合时,核苷酸结合位点的switch-I和switch-II才能关闭。核苷酸结合位点的构象变化又通过L2引起微管末端纵向曲率变大,进而引起末端微管蛋白的脱离。

Klp10A蛋白和Kif2A蛋白高分辨率结构提供的信息对于理解MCAK蛋白在微管末端解聚过程中的作用有重要的启发意义。但需要注意的是,由于存在序列差异,三种蛋白的工作机制并不完全相同。例如,在1:2复合物结构中,MCAK蛋白与微管蛋白结合的构象与Kif2A蛋白的相应构象并不能完全重合(图4C)^[56],说明MCAK蛋白与Kif2A蛋白同微管的结合构象有差别。而颈部结构的作用在三者之间也有差别。缺少颈部时,MCAK蛋白和Kif2A蛋白都没有微管解聚活性,而Klp10A蛋白却有部分微管解聚活性。因此,为了彻底阐明MCAK蛋白的解聚过程,有必要获得不同核苷酸结合状态的MCAK蛋白马达结构域和颈部与不同微管构象结合的高分辨率结构。

4 展望

MCAK蛋白是驱动蛋白-13家族中发现最早、研究最深入的一个成员。由于MCAK蛋白主要在细胞分裂中起作用,而细胞分裂是一个复杂的过程,涉及到多个因素的协同作用和相互调节,因此MCAK蛋白的工作环境比传统驱动蛋白更复杂。到目前为止,对MCAK蛋白的结构-功能关系的研

究还不像传统驱动蛋白那样深入。对于MCAK蛋白的认识还需要从两个方面进行深入探讨。首先是对MCAK蛋白活性调控网络的研究。到目前为止,已经发现了多种蛋白或者激酶通过不同的方式对MCAK蛋白进行调控。后面除了继续寻找MCAK蛋白活性的调控因素外,还应该深入研究不同因素对MCAK蛋白的调控机制。其次,通过生化研究已经能够完整地描述MCAK蛋白的工作循环,但是此过程中具体的分子机制还不十分清楚。微管和微管末端显然对MCAK蛋白的力学-化学循环过程有不同的催化作用,但是具体的催化机制尚未阐明。这些问题的解决有助于明确MCAK蛋白等驱动蛋白-13家族成员在癌症发生和发展中的作用从而制定相应的治疗策略,对结构的深入研究也将进一步推进以MCAK蛋白为靶标的药物分子设计。

[参 考 文 献]

- [1] Lawrence CJ, Dawe RK, Christie KR, et al. A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol*, 2004, 167: 19-22
- [2] Miki H, Setou M, Kaneshiro K, et al. All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98: 7004-11
- [3] Kobayashi T, Tsang WY, Li J, et al. Centriolar kinesin Kif24 interacts with CP110 to remodel microtubules and regulate ciliogenesis. *Cell*, 2011, 145: 914-25
- [4] Walczak CE, Gayek S, Ohi R. Microtubule-depolymerizing kinesins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2013, 29: 417-41
- [5] Friel CT, Welburn JP. Parts list for a microtubule depolymerizing kinesin. *Biochem Soc T*, 2018, 46: 1665-72
- [6] Qin J, Zhang H, Geng Y, et al. How kinesin-1 utilize the energy of nucleotide: the conformational changes and mechanochemical coupling in the unidirectional motion of kinesin-1. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 6977
- [7] Wang W, Cantos-Fernandes S, Lv Y, et al. Insight into microtubule disassembly by kinesin-13s from the structure of Kif2C bound to tubulin. *Nat Commun*, 2017, 8: 70
- [8] 王亮, 杨丰源, 陈慧怡, 等. 微管解聚驱动蛋白Kinesin-13的研究进展与展望. *科学通报*, 2015, 60: 1896-905
- [9] Alushin GM, Lander GC, Kellogg EH, et al. High-resolution microtubule structures reveal the structural transitions in $\alpha\beta$ -tubulin upon GTP hydrolysis. *Cell*, 2014, 157: 1117-29
- [10] Roostalu J, Thomas C, Cade NI, et al. The speed of GTP hydrolysis determines GTP cap size and controls microtubule stability. *eLife*, 2020, 9: e51992
- [11] LaFrance BJ, Roostalu J, Henkin G, et al. Structural transitions in the GTP visualized by cryo-electron microscopy of catalytically inactive microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119: e2114994119
- [12] Arpağ G, Lawrence EJ, Farmer VJ, et al. Collective effects of XMAP215, EB1, CLASP2, and MCAK lead to robust microtubule treadmilling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117: 12847-55
- [13] Cooper JR, Wagenbach M, Asbury CL, et al. Catalysis of the microtubule on-rate is the major parameter regulating the depolymerase activity of MCAK. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17: 77-82
- [14] Ferreira LT, Orr B, Rajendraprasad G, et al. α -Tubulin detyrosination impairs mitotic error correction by suppressing MCAK centromeric activity. *J Cell Biol*, 2020, 219: e201910064
- [15] Zong H, Hazelbaker M, Moe C, et al. Spatial regulation of MCAK promotes cell polarization and focal adhesion turnover to drive robust cell migration. *Mol Biol Cell*, 2021, 32: 590-604
- [16] Ems-McClung SC, Walczak CE. Kinesin-13s in mitosis: key players in the spatial and temporal organization of spindle microtubules. *Semin Cell Dev Biol*, 2010, 21: 276-82
- [17] Walczak CE, Gan EC, Desai A, et al. The microtubule-destabilizing kinesin XKCM1 is required for chromosome positioning during spindle assembly. *Curr Biol*, 2002, 12: 1885-9
- [18] Sanhaji M, Friel CT, Wordeman L, et al. Mitotic centromere-associated kinesin (MCAK): a potential cancer drug target. *Oncotarget*, 2011, 2: 935-47
- [19] Shimo A, Tanikawa C, Nishidate T, et al. Involvement of kinesin family member 2C/mitotic centromere-associated kinesin overexpression in mammary carcinogenesis. *Cancer Sci*, 2008, 99: 62-70
- [20] Nakamura Y, Tanaka F, Haraguchi N, et al. Clinicopathological and biological significance of mitotic centromere-associated kinesin overexpression in human gastric cancer. *Br J Cancer*, 2007, 97: 543-9
- [21] Gnjatic S, Cao Y, Reichelt U, et al. NY-CO-58/KIF2C is overexpressed in a variety of solid tumors and induces frequent T cell responses in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer*, 2010, 127: 381-93
- [22] Ishikawa K, Kamohara Y, Tanaka F, et al. Mitotic centromere-associated kinesin is a novel marker for prognosis and lymph node metastasis in colorectal cancer. *Br J Cancer*, 2008, 98: 1824-9
- [23] Ritter A, Kreis N, Louwen F, et al. Molecular insight into the regulation and function of MCAK. *Crit Rev Biochem Mol*, 2016, 51: 228-45
- [24] Huo D, Yang H, Huang JD, et al. Roles of kinesin superfamily proteins in colorectal cancer carcinogenesis. *Oncol Rep*, 2021, 46: 121
- [25] Lucanus AJ, Yip GW. Kinesin superfamily: roles in breast cancer, patient prognosis and therapeutics. *Oncogene*, 2018, 37: 833-8
- [26] Pandey H, Popov M, Goldstein-Levitin A, et al. Mechanisms by which kinesin-5 motors perform their multiple intracellular functions. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 6420
- [27] Rankin KE, Wordeman L. Long astral microtubules uncouple mitotic spindles from the cytokinetic furrow. *J Cell Biol*, 2010, 190: 35-43

- [28] Sproul LR, Anderson DJ, Mackey AT, et al. Cik1 targets the minus-end kinesin depolymerase Kar3 to microtubule plus ends. *Curr Biol*, 2005, 15: 1420-7
- [29] Grissom PM, Fiedler T, Grishchuk EL, et al. Kinesin-8 from fission yeast: A heterodimeric plus-end-directed motor that can couple microtubule depolymerization to cargo movement. *Mol Biol Cell*, 2009, 20: 963-72
- [30] Zhang X, Ems-McClung SC, Walczak CE. Aurora A phosphorylates MCAK to control ran-dependent spindle bipolarity. *Mol Biol Cell*, 2008, 19: 2752-65
- [31] Braun A, Dang K, Buslig F, et al. Rac1 and Aurora A regulate MCAK to polarize microtubule growth in migrating endothelial cells. *J Cell Biol*, 2014, 206: 97-112
- [32] De Luca M, Brunetto L, Asteriti IA, et al. Aurora-A and ch-TOG act in a common pathway in control of spindle pole integrity. *Oncogene*, 2008, 27: 6539-49
- [33] Zhang X, Lan W, Ems-McClung SC, et al. Aurora B phosphorylates multiple sites on mitotic centromere-associated kinesin to spatially and temporally regulate its function. *Mol Biol Cell*, 2007, 18: 3264-76
- [34] Lan W, Zhang X, Kline-Smith SL, et al. Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. *Curr Biol*, 2004, 14: 273-86
- [35] Ohi R, Sapra T, Howard J, et al. Differentiation of cytoplasmic and meiotic spindle assembly MCAK functions by Aurora B-dependent phosphorylation. *Mol Biol Cell*, 2004, 15: 2895-906
- [36] Ritter A, Sanhaji M, Friemel A, et al. Functional analysis of phosphorylation of the mitotic centromere-associated kinesin by Aurora B kinase in human tumor cells. *Cell Cycle*, 2015, 14: 3755-67
- [37] Sanhaji M, Friel CT, Kreis NN, et al. Functional and spatial regulation of mitotic centromere-associated kinesin by cyclin-dependent kinase 1. *Mol Cell Biol*, 2010, 30: 2594-607
- [38] Rosasco-Nitcher SE, Lan W, Khorasanizadeh S, et al. Centromeric Aurora-B activation requires TD-60, microtubules, and substrate priming phosphorylation. *Science*, 2008, 319: 469-72
- [39] Ritter A, Sanhaji M, Steinhäuser K, et al. The activity regulation of the mitotic centromere-associated kinesin by polo-like kinase 1. *Oncotarget*, 2015, 6: 6641-55
- [40] Zhang L, Shao H, Huang Y, et al. PLK1 phosphorylates MCAK and promotes its depolymerase activity. *J Biol Chem*, 2011, 286: 3033-46
- [41] Moore AT, Rankin KE, Vondassow G, et al. MCAK associates with the tips of polymerizing microtubules. *J Cell Biol*, 2005, 169: 391-7
- [42] Honnappa S, Gouveia SM, Weisbrich A, et al. An EB1-binding motif acts as a microtubule tip localization signals. *Cell*, 2009, 138: 366-76
- [43] Jiang K, Wang J, Liu J, et al. TIP150 interacts with and targets MCAK at the microtubule plus ends. *EMBO Rep*, 2009, 10: 857-65
- [44] Tanenbaum ME, Macurek L, van der Waart B, et al. A complex of Kif18b and MCAK promotes microtubule depolymerization and is negatively regulated by Aurora kinases. *Curr Biol*, 2011, 23: 1356-65
- [45] Schweiggert J, Habeck G, Hess S, et al. SCF^{Fbw5} targets kinesin-13 proteins to facilitate ciliogenesis. *EMBO J*, 2021, 40: e107735
- [46] Watanabe T, Kakeno M, Matsui T, et al. TTBK2 with EB1/3 regulates microtubule dynamics in migrating cells through Kif2A phosphorylation. *J Cell Biol*, 2015, 210: 737-51
- [47] Pakala SB, Nair VS, Reddy SD, et al. Signaling-dependent phosphorylation of mitotic centromere-associated kinesin regulates microtubule depolymerization and its centrosomal localization. *J Biol Chem*, 2012, 287: 40560-9
- [48] Talapatra SK, Harker B, Welburn JP. The C-terminal region of the motor protein MCAK controls its structure and activity through a conformational switch. *eLife*, 2015, 4: e06421
- [49] Mulder AM, Glavis-Bloom A, Moores CA, et al. A new model for binding of kinesin 13 to curved microtubule protofilaments. *J Cell Biol*, 2009, 185: 51-7
- [50] Maney T, Wagenbach M, Wordeman L. Molecular dissection of the microtubule depolymerizing activity of mitotic centromere-associated kinesin. *J Biol Chem*, 2001, 276: 34753-8
- [51] Friel CT, Howard J. The kinesin-13 MCAK has an unconventional ATPase cycle adapted for microtubule depolymerization. *EMBO J*, 2011, 30: 3928-39
- [52] Ogawa T, Saijo S, Shimizu N, et al. Mechanism of catalytic microtubule depolymerization via KIF2-tubulin transitional conformation. *Cell Rep*, 2017, 20: 2626-38
- [53] Belsham H, Friel CT. Identification of key residues that regulate the interaction of kinesins with microtubule ends. *Cytoskeleton*, 2019, 76: 440-6
- [54] Ma YL, Li T, Jin YM, et al. Shaft function of kinesin-1's $\alpha 4$ helix in the processive movement. *Cell Mol Bioeng*, 2019, 12: 345-54
- [55] Wang W, Shen T, Guerois R, et al. New insights into the coupling between microtubule depolymerization and ATP hydrolysis by kinesin-13 protein Kif2C. *J Biol Chem*, 2015, 290: 18721-31
- [56] Trofimova D, Paydar M, Zara A, et al. Ternary complex of Kif2A-bound tandem tubulin heterodimers represents a kinesin-13-mediated microtubule depolymerization reaction intermediate. *Nat Commun*, 2018, 9: 2628
- [57] Benoit M, Asenjo AB, Sosa H. Cryo-EM reveals the structural basis of microtubule depolymerization by kinesin-13s. *Nat Commun*, 2018, 9: 1662
- [58] Ariga T, Tomishige M, Mizuno D. Experimental and theoretical energetics of walking molecular motors under fluctuating environments. *Biophys Rev*, 2020, 12: 503-10
- [59] Xie P. Modeling processive motion of kinesin-13 MCAK and kinesin-14 Cik1-Kar3 molecular motors. *Protein Sci*, 2021, 30: 2092-105
- [60] Welburn JP, Cheeseman IM, Bettencourt-Dias M. The microtubule-binding protein Cep170 promotes the targeting of the kinesin-13 depolymerase Kif2b to the mitotic spindle. *Mol Biol Cell*, 2012, 23: 4786-95

- [61] Manning AL, Ganem NJ, Bakhoun SF, et al. The kinesin-13 proteins Kif2a, Kif2b, and Kif2c/MCAK have distinct roles during mitosis in human cells. *Mol Biol Cell*, 2007, 18: 2970-9
- [62] Liu W, Xu C, Meng Q, et al. The clinical value of kinesin superfamily protein 2A in hepatocellular carcinoma. *Clin Res Hepatol Gas*, 2021, 45: 101527
- [63] Luo R, Chen PW, Wagenbach M, et al. Direct functional interaction of the kinesin-13 family membrane kinesin-like protein 2A (Kif2A) and Arf GAP with GTP-binding protein-like, ankyrin repeats and PH domains1 (AGAP1). *J Biol Chem*, 2016, 291: 21350-62
- [64] Homma N, Takei Y, Tanaka Y, et al. Kinesin superfamily protein 2A (KIF2A) functions in suppression of collateral branch extension. *Cell*, 2003, 114: 229-39
- [65] Kobayashi T, Tsang WY, Li J, et al. Centriolar kinesin Kif24 interacts with CP110 to remodel microtubules and regulate ciliogenesis. *Cell*, 2011, 145: 914-25