

学术讨论

从分子进化角度探讨 p21 高级结构变异与癌变的关系*

吕宝忠 陈捷 顾健人

(上海市肿瘤研究所, 200032)

本文从分子进化角度,对 Kim 等提出的 p21 立体结构模型与癌变关系进行了探讨;并对不同种类的 p21 进行数据分析,以检验分子进化的各种机制。研究表明:(1) p21 的两个活性区,即第 10—15 位以及第 59—68 位多肽段是高度保守的;(2)在人癌中,保守的第 12 位和 61 位氨基酸发生了替代,由于这些替代影响了 p21 与 GDP (或 GTP) 的结合,最终导致了癌变;(3) v-ras 的 p21 在第 12 位氨基酸也发生了替代,为癌变的病毒病因提供依据;(4)分子进化的机制是相当复杂的。

关键词: 分子进化, p21, ras, 癌变

应用 2.7 Å 分辨力的 X 光衍射技术, de Vos 和 Kim 等^[1]于 1988 年第一次确定了正常人的 c-H-ras 1 产物 p21 晶体的几乎全顺序的立体结构。翌年, Tong 和 Kim 等^[13]应用 2.2 Å 分辨力的 X 光衍射技术,又作了一些小的修正。Kim 等的研究为阐明 p21 的生理活性和癌变机制提供了坚实的结构基础,且为今后研究指明了方向。Kim 等的 p21 立体模型(简称 Kim 模型)证实,活性区主要位于包括第 12 位氨基酸的 N 端多肽段和包括第 61 位氨基酸的中央端多肽段。分子进化研究表明,上述两片段相当保守,因而其变异似有重要意义。本文从分子进化角度出发,运用数据分析手段,剖析该两片段变异与癌变关系,并对分子进化中不同学派观点作一检验。

材料与方 法

本研究收集粘菌 (Dictyostelium discoideum)、酵母、果蝇、人和病毒的正常 p21 以及 c-K-ras 1 假基因推测的 p21 顺序计 11 个^[2,7,9,11,14]。并收集已确证点突变的几种人癌的 p21 顺序 6 个^[13]。由于 p21 活性区主要表现在两个多肽段,本文于是截取了 p21 第 10—15 位的 N 端多肽和第 59—68 位的中央端多肽两个片段,以作进一步的比较分析(见图 1)。

采用 Kim 模型对 N 端多肽和中央端多肽两个片段进行研究,对中央端多肽片段来说还参照了 Pincus 等 ECEPP (多肽经验性构象的能量程序) 推导的结构^[10]。

以获得的数据检验分子进化中的分子驱动说^[6], 选择说和中性突变说的价值^[1]。

结 果

根据分子进化原理,第 10—15 位多肽的演化如图 2 所示。业已查明,酵母与哺乳类祖先的分化约在 1200MY (百万年)前,而果蝇与哺乳类祖先的分化约在 600MY 前^[8]。在漫长的进化历程中,该段的主要变化表现在第 11 位氨基酸的替代上。病毒癌基因是病毒通过感染真核类由转导作用而获得的基因^[2,11]。有研究表明, v-ras (包括 v-his 和 v-Kis) 似来自哺乳类^[2,14],它们不仅保留了从 c-ras 转导获得的 p21 第 11 位的丙氨酸,且在第 12 位上也发生了替代(图 2 以 X 表示,意为除甘氨酸外某氨基酸)。在图 1 中也可看到,某些人癌在 p21 第 12 位上也发生了替代。

根据 Kim 等的模型, p21 由 6 个板块(称为 β), 9 个环(L)和 4 个 α 螺旋(α) 组成,从 N 端(氨基端)到 C 端(羧基端)的排列为 β₁L₁α₁L₂β₂L₃β₃L₄β₄L₅α₂L₆β₅L₇α₃L₈β₆L₉α₄ (见图 3)。其中, N 端多肽片段(第 10—15 位氨基酸)位于 L₁, 第 12 位甘氨酸同 GDP 中磷酸根相结合(即 p21-GDP 复合物结构的 Kim 模型),因而似具有 GTP 酶催化活性。当第 12 位的甘氨酸被除脯氨酸外的氨基酸替代后(如在某些人癌中所观察

Lü Baoshong et al.: Probing into the Relationship between p21 Higher Structure and Carcinogenesis from Molecular Evolution View

* 本工作由国家癌基因中心实验室资助。
1) 简而言之,所谓分子驱动说指的是,在群体中的相同变异性的出现,系通过基因转移或转位等机制所介导,它与自然选择可以不发生关系。
本文于 1989 年 9 月 27 日收到。

DD-	GGGGVG	DD*	AGQEEYSAMR
Ye-1	-----	Ye-1	-----
Ye-2	-----	Ye-2	-----
D-1	-P-----	D-1	-----
c-H-1	-A-----	c-H-1	-----
c-K-2	-A-----	c-K-2	-----
c-N	-A-----	c-N	-----
c-K-1	-A-S-S	c-K-1	T-----D---
v-Has	-AR----	v-Has	T-----
v-Kis	-AS----	v-Kis	T-----
D-2	CASAAD	D-2	--H---F----
c-H-1b	-AV----	c-H-1l	--L-----
c-H-1s	-AD----	c-Nn	--K-----
c-K-2l	-AC----		
c-K-2c	-AV----		

(a) (b)

图1 (a) 为各种 p21N 端第 10—15 位氨基酸顺序; (b) 为各种 p21 中央端第 59—68 位氨基酸顺序。(a) 和 (b) 的左半部指出了不同种类的 p21, 其中 DD (*Dicyostelium discoideum*) 为粘菌, Ye 为酵母, D 为果蝇, c 为包括人类的哺乳类和 v 为病毒。连字符后面的数字表示同种内不同类型的 rasp21, 连字符后的文字表示同种内不同类别的 ras (如 H.K 和 N 分别为哺乳类不同类别的 ras) 而再一个连字符后的数字则表示该类别中不同类型的 ras), 紧接着数字后面的文字中, b 为膀胱癌, s 为自发性激活, I 为肺癌和 c 为结肠癌, 而 Nn 则表示神经母细胞瘤。(a) 和 (b) 的右半部分中, G, V, P, A, S, R, D, C, Q, E, Y, M, T, H, F, L 和 K 分别表示甘氨酸、缬氨酸、脯氨酸、丙氨酸、丝氨酸、精氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸和赖氨酸。“-”表示与第一个氨基酸顺序中相同的氨基酸(对同一位置来说)。

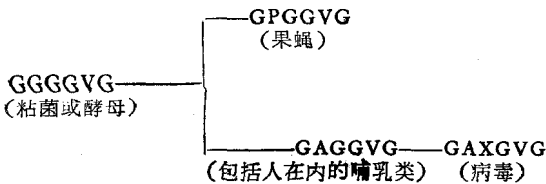


图2 N端多肽片段(第10—15位氨基酸)的分子进化

到的), 由于 GAP 的刺激或 GAP 作为靶分别诱使上游或下游调节的变化, 导致了癌变 (详见本文“讨论”^[1,2])。

从图3中得知, 第59—68位多肽的中央端片段位于 Kim 模型的 L_4 和 β_4 区。人癌中第61位氨基酸发生了替代, 正常 p21 该位为亲水性的谷氨酰胺, 替代后的氨基酸均为疏水性的。从模型中可以看到, L_4 区虽并不直接同 GDP 结合, 但它与 L_1 直接相邻, 似可认为疏水性氨基酸的替代使其更强烈的影响 $3L_1$, 从而间接诱导了癌变。Pincus 等通过 ECEPP 的研究认为, 在人癌中第61位氨基酸的替代, 导致了 L_4 发生转

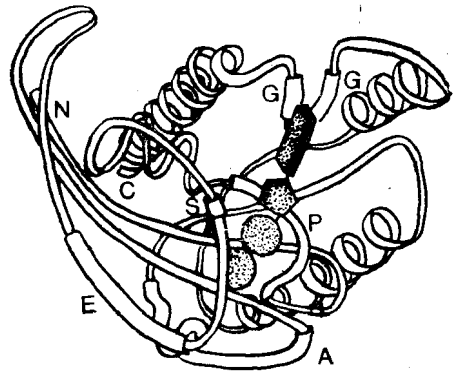
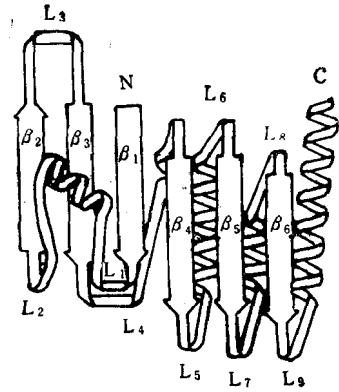


图3 (a) 人的正常 c-H-ras1 p21 高级结构的拓朴图; (b) 人的正常 c-H-ras1 p21 高级结构的示意图, 其中 N 为氨基端, C 为羧基端, G 表示鸟嘌呤结合部位, S 表示核糖结合部位, P 表示磷酸结合部位, A 表示识别抗体 Y13-259 位置, E 表示效应区(除两端外, 各功能部位都用“套管”标志)。

位 (Pincus 原文中说的是 α 螺旋, 根据 Kim 等模型应将其改为 L_4), 这与我们的上述分析是一致的。

图1(a) 中 v-Has 和 v-Kis 的 p21 N 端多肽段数据分析表明, 由于两者在第12位氨基酸都不是甘氨酸(或脯氨酸), 因而一旦在病毒的 v-Has 或 v-Kis 整合到真核类染色体合适位点后, 有可能表达异常 p21 而诱致癌变。v-Has 和 v-Kis 的 p21 中央端数据分析则表明, 其第59位氨基酸已由正常的丙氨酸突变成苏氨酸, 苏氨酸具自身磷酸化作用, 但与癌变似无关, 其意义将在“讨论”中阐明。

讨 论

在悠长的进化历程中(至少已达1200MY), ras 基因族不仅通过基因重复分化出哺乳类的 c-H-ras1 和 c-K-ras2, 在人类中还出现了 c-N-ras, 至少还出现了 c-H-ras2 和 c-K-ras1 两种假基因, 并从 c-H-ras1 和 c-K-ras2 分别演化出 v-Has 和 v-Kis。ras 产物 p21 的两个主要活性区在进化中是相当保守的。以 N 端多肽段来说, 仅在第11位发生替代, 仅当 v-ras 分化形成时才在第12位也发生了替代。本文“结果”曾表

明,第12位甘氨酸的固定至少在1200MY前。由于该位点与磷酸根有作用,而甘氨酸又是分子量最小的氨基酸,因而其替代与癌变有关联。在漫长历程中该位点的甘氨酸显然受到自然选择保护,这同中性突变说主张的负选择作用是一致的。*v-ras*为逆转录病毒的基因,已知逆转录病毒具有比真核类高得多的突变率,因此其第12位非甘氨酸的固定似与高突变率有关。

p21中央端多肽段的保守性更大,从粘菌、酵母直至人类几乎不发生变化,仅在*v-ras*出现时在其第59位上发生了氨基酸替代。令人感兴趣的是,不论是*v-Has*,*v-Kis*还是假基因*c-K-ras1*,它们的p21第59位上编码(或可能编码)的都是苏氨酸,看来这与中性突变说不一致,而与选择说或分子驱动说较为一致,从而说明分子水平上的进化也是异常复杂,还不宜过早统一使用一种学说^[1]。Kim等还发现,可抑制p21活化作用的单克隆抗体Y13-259的识别位置在中央端第63-73位多肽的六个位点上,再次表明p21中央端具有重要意义。

Kim模型为p21作为一种新的调节蛋白(G蛋白)提供了结构基础。目前公认,p21有两类结合型:p21-GTP和p21-GDP,并认为前者有活性而后者无活性。McCormick等^[12]实验表明,GAP能使p21-GTP转化为p21-GDP,但当GAP由于生长因子受体等作用发生磷酸化时,便无上述功能了。这说明GAP具有负调控作用。当p21第12位或61位氨基酸发生替代后,尽管仍有GAP的供应,但GAP已不能使p21-GTP转化成p21-GDP,这样便导致了癌性转化。以上是“上游调节”假说。Calés等^[12]根据自己实验则认

为,GAP是活化的p21-GTP的靶,中靶后使细胞生长并同时使p21-GTP转化为p21-GDP。一旦第12或61位氨基酸发生替代,由于p21-GTP结合型变得稳定,致使与靶GAP的作用时间延长,终于诱发细胞癌性转化。这是“下游调节”假说。p21与癌变关系确实是一个饶有兴趣的问题,但当今积累的资料还不能判断上述两个假说何者是正确的。Kim模型建立在p21-GDP结合型的分析上,因此亟待确立p21-GTP的新的立体模型。

参 考 文 献

- [1] 吕宝忠: 1987. 自然杂志, 11: 846-850.
- [2] Bishop, J.M.: 1982. *Adv. Cancer Res.*, 37: 1-32.
- [3] Bishop, J.M.: 1983. *Annu. Rev. Biochem.*, 52: 301-354.
- [4] de Vos, A.M. et al: 1988. *Science*, 239: 888-893.
- [5] Dhar, R. et al: 1982. *Science*, 217: 934-937.
- [6] Dover, G.: 1982. *Nature*, 299: 111-117.
- [7] McGrath, J.P. et al: 1983. *Nature*, 304: 501-506.
- [8] Nei, M.: 1987. In: *Molecular Evolutionary Genetics*, Columbia Univ. Press, P12.
- [9] Neuman-Silberberg, F.S. et al: 1984. *Cell*, 37: 1027-1033.
- [10] Pincus, M.R. et al: 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 8375-8379.
- [11] Reymond, C.D. et al: 1984. *Cell*, 39: 141-148.
- [12] Sigal, I.S.: 1988. *Nature*, 332: 485-486.
- [13] Tong, L. et al: 1989. *Science*, 245: 244.
- [14] Tsuchida, N. et al: 1982. *Science*, 217: 937-939.
- [15] Willecke, K. et al: 1984. *Hum. Genet.*, 66: 132.

利用 Sp 途径克服 K 型不育系产生单倍体

卢良峰 张保君 杜红 路红卫

(河南省中牟农业学校, 451450)

小麦K型细胞质雄性不育性主要受位于1B染色体短臂上的*rfv1*隐性基因控制, Spelta小麦存在着该基因; 1B/1R类小麦由于*Rfv1*恢复基因的染色体片断1R片断被代换, 所以也可产生*rfv1*的遗传效应。但后者产生一定频率的单倍体。

我们1986年以王培田提供的K/Spelta A作为细胞质源, 从不同生态类型的小麦品种(系)中筛选出一批保持不育性彻底、稳定的保持系。对BC2或BC3群体在开花初期进行植株形态及花粉粒碘-碘化钾溶液染色鉴定, 结果表明:

1. 在已有的不育系中, 35.7%的系不产生单倍体,
2. B系花粉粒饱满、圆球形、碘染为深蓝色; 正常的A系植株的花粉粒也为圆球形, 但直径略小, 均为B系花粉粒直径的4/5左右, 属典型型; 单倍体的花粉粒空秕, 皱缩为碎小的不规则形, 其直径均为B系的

1/3左右, 属典型型。

3. 含有1B/1R亲缘的不育系产生频率不等的单倍体。如K/冀麦23, 单倍体频率为15.46%; K/(双6/山前//多抗791)单倍体频率为1.48%; K/(烟台122/73(36)-9-1-9), 单倍体频率为13.0%。

4. 不含有1B/1R亲缘的不育系不产生单倍体。如K/克81-72, K/D1-260, K/冀麦84-5418均未产生单倍体。

我们认为: 用碘-碘化钾溶液染色镜检花粉粒可以准确鉴定K型不育系中的单倍体植株, 而且比根尖染色体鉴定简便、快速。筛选K型保持系不应把注意力仅仅集中于1B/1R类小麦上, 为了克服单倍体的出现, Sp途径比1B/1R途径较为优越。

本文于1990年12月10日收到。