

复制酶体的瞻望和疑问

黄胜和* 徐 铃

(解放军第一军医大学生化教研室, 广州 510515)

提 要

由若干酶组成的复合体参与双链 DNA 分子复制过程。这种活性蛋白质复合体称为复制酶体(replisome), 而具有这些酶活性的蛋白质并不能独立起作用。这种复合体在 DNA 复制(S 期)开始时才由其各种成分装配而成, 而在细胞周期的 G1 期则不复存在。在真核细胞的复制酶体中, 参与 dNTP 生物合成的酶和参与 DNA 复制的蛋白质结合在一起。在此复合体被装配前, 细胞内先合成了大量“粘合”蛋白, 以便将这些有关的蛋白质粘合在一起。在真核细胞内是否有这样的复制酶体存在是多年来一个有争论的问题。作者认为真核细胞中的复制酶体可能由细胞核内、外的两个蛋白质复合体所组成, 并由两者协同完成 DNA 复制。如果复制酶体的存在得到证实, 将会对诸如细胞周期、DNA 复制、癌症发生、抗癌化学疗法和抗代谢物的生物学作用等理论, 产生相当大的影响。

关键词 DNA 复制, 抗癌化疗, 复制酶体, 通道转运, 蛋白质复合体

双链 DNA 分子的复制是一个复杂的过程, 由许多酶组成的复合体参与此过程。具有这些酶活性的蛋白质不能独立起作用, 它们都被包含在一个蛋白质复合体内, 称为复制酶体(replisome)^[1] 或复制体(replisome)^[2]。这种复制酶体并不象核糖体那样始终是一个游离的细胞内小体, 而是在 DNA 复制开始时才由其各种成分装配而成。有确切证据表明原核生物中 DNA 复制是通过蛋白质复合体的作用与其前体的合成相协调的^[3]。在噬菌体 T4 的复制中, 10 个或更多的酶组成的复合体催化 UDP 转化为 dTTP 和 5 羟甲基 dCTP。这个复合体还和噬菌体编码的 DNA 聚合酶、拓扑异构酶、基因 32DNA-结合蛋白等相连在一起, 故能将核糖核苷酸有效地转变为 DNA^[4]。这方面的工作已有综述报道^[5], 故本文不详述。本文的目的是讨论一个比较困难的问题, 即真核细胞中的复制酶体。有关复制酶体的概念, 支持者和反

对者均有证据。在真核细胞中, 情况过于复杂, 现在难以作出确切的结论; 然而最近进展很快, 故做一文献综述和指出今后研究的方向似乎是必要的。

参与 dNTP 生物合成的酶和参与 DNA 复制的蛋白质是相关连的。这一学说最早来自 Baril 等^[6]。他们报道, 在肝癌细胞培养或再生大鼠肝中, 发现若干种上述酶和蛋白质存在于高分子量的膜组分中。Pardee 等^[1,7]在中国仓鼠胚胎成纤维细胞和小牛胸腺中证实了上述观察, 并有许多重要的发现: (1) 在 S 期同步化细胞培养中, 这种蛋白质复合体特异地位于细胞核内, 这些参与复制的酶是在细胞进入 S 期时迁徙入细胞核内的。(2) 在这个称为“复制酶体”的蛋白质复合体中, 这些酶能将一些前体彼

* 现地址: Shenghe Huang, Division of Hematology/oncology, Childrens Hospital of Los Angeles, Los Angeles, CA 90027, U.S.A

此转变,而不将游离产物释入细胞内代谢池中。(3) 这种复制酶体含有参与 DNA 前体的全程合成途径和补救合成途径的各种酶类,包括核糖核苷酸还原酶(RNR)、胸苷酸合成酶(TS)、胸苷激酶(TK)、dCMP 激酶和二磷酸核苷激酶;但也包括 DNA 聚合酶、DNA 甲基化酶、引物酶、ATP 依赖性拓扑异构酶、新生 DNA 链和 DNA 模板^[1,7,8]。这个复合体是一个球状颗粒,直径约 24 至 30nm,估计分子量约为 5×10^6 。(4) 复制酶体的装配过程是在细胞周期的限制点(restriction point)被触发的。在此之前,细胞内产生了大量的蛋白质 p68。这种 p68 可催化生成一种能将这个蛋白质复合体“粘合”在一起的成分^[9]。(5)在复制酶体的各个亚基之间存在着变构相互作用(allosteric interaction),这种作用可由完整细胞中的各种活性酶的特异性抑制剂来进行调节^[9]。

一、核苷酸的通道转运

核苷酸区域化作用(compartmentation)是和各亚细胞实体(例如各种细胞器),或和各种大分子颗粒(例如蛋白质复合体)联系在一起的。在理论上,这种区域化作用(或称通道转运)也是最便于进行实验研究的。如果这种细胞器或蛋白质复合体能快速地被分离出来,则其在核苷酸浓度上的差别及其特异活性均可被直接测出。

Pardee 等^[7]报道,当 DTT 存在时,所提取的复制酶体中, [^3H]CDP 能比 [^3H]dTTP 更迅速地参入 DNA 中,显然 dTTP 是更为直接的前体。这种参入作用可用通透化(permeabilized)细胞来进一步证明: [^{14}C]CDP 参入 DNA 的速率并不能被过量非放射性 dCTP 的存在所抑制^[10]。此外,在含有复制酶体的提取液中 CDP 参入 DNA 显然发生于脱氧胞苷酸释放入培养介质内之前^[7]。

如果 DNA 前体的这种特异通道转运(channeling)确实存在,可能对了解各种生物学现象有重要意义,包括对 DNA 复制的细胞周期控制,对自发和诱发的突变频率的控制, dNTP

代谢池不平衡所产生的遗传后果,以及阻碍 dNTP 生物合成的抗代谢物的生物学作用等。所以复制酶体对核苷酸的特异通道转运作用已引起人们的注意和热烈的争论^[3,11-13]。Spyrou 和 Reichard^[11]挑起了这场争论,其根据是他们发现 rODP(二磷酸核糖乳清酸苷)参入作用的绝大多数产物是 RNA。但是,Reddy, Klinge 和 Pardee^[12]却证明,胞苷酸的参入有 60% 是在 DNA 中成为 dCMP,而其余 40% 则成为 rCMP。这就部分地批驳了 Spyrou 和 Reichard 的观点。最近 Wawra^[13]报道,不论将放射性前体注入到细胞核中还是细胞浆中,对 DNA 的标记没有区别,这就说明脱氧核苷酸可以自由弥散,并能从不论那个方向透过细胞核的被膜。这些资料不支持在活体内存在着核苷酸的特异转运作用。

Nicander 和 Reichard 的研究^[14]被认为能证明核糖核苷酸转变为 DNA。他们报道,胞苷参入 DNA 的速率要比脱氧胞苷快 2—4 倍。目前认为这种差别是由于不同的代谢池(pool),但是代谢池的不同可能就是 Pardee 所提出的“特异转运作用”的结果。

Chiba, Bacon 和 Cory^[15]曾描述过一个实验,看上去似乎是在活体内的 Reddy-Pardee 实验的复本。他们将非标记的脱氧胞苷加入到 L₁₂₁₀ 细胞中即可以稀释标记的胞苷参入 DNA 中。这说明在活体内,通过补救合成途径生成的脱氧胞苷酸可以和全程合成的核苷酸在通向 DNA 复制的途径中混合起来。

为了解真核细胞 DNA 合成中核苷酸的特异转运作用,还需要更加完整的资料,包括建立起一个理想的模型系统,鉴定出参与的每一种蛋白质,和检查被转运的各种核苷酸的命运。

二、亚细胞定位

复制酶体中蛋白质的亚细胞定位是另一重要问题。Reddy 和 Pardee^[11]报道,参与 DNA 合成的酶类在细胞生长的不同时期有不同的定位。在增殖细胞中这些酶大部分定位于细胞核中。此外,当细胞进入 S 期时它们的特异活性

在细胞核中会增高,说明当 DNA 复制开始后,这些酶都向细胞核迁徙。相反,在静止细胞中这些酶活性一般在细胞核中不存在,而在细胞浆中却可找到。这个问题很重要,值得注意。Leeds 和 Slabaugh 应用了快速制备未受细胞浆污染的细胞核技术(在仅约 30s 内分离出细胞核)^[46]。用此法制备的中国仓鼠卵巢细胞核在其细胞周期的所有各期内均不能检查出 RNR 的活性,这说明在这些细胞中此酶位于细胞浆中。抗 RNR M1 亚基的单克隆抗体被用来做亚细胞定位的工具,结果说明此蛋白质完全定位于细胞浆内,并显然和内质网相连^[3]。最近用抗 M2 亚基的多克隆抗体进行的实验得到基本相同的结果^[17]。

为解决这些实验室之间的矛盾,必须进一步对细胞周期内涉及 DNA 合成的各种蛋白质的亚细胞分布问题或迁徙问题进行研究。免疫化学和某些其他生物标记的方法可能对这方面的研究有帮助。

三、在复制酶体中究竟有多少酶或蛋白质分子

假定上述两个决定性论点是正确的,则可以进行下列讨论。要问的第三个问题是在复制酶体中究竟有多少酶或蛋白质分子。DNA 复制所需要的主要蛋白质或酶可分为两类:(1)一些酶是脱氧核糖核苷酸的全程合成和补救合成途径所需要的,例如 RNR、TS、TK、dCMP 激酶和二磷酸核苷激酶均包括在复制酶体中;(2)另一些酶是直接为 DNA 合成所需要的,例如 DNA 聚合酶、DNA 甲基化酶、引物酶和拓朴异构酶,此类酶亦存在于复制酶体中^[1,7,8]。还有多其他蛋白质也与 DNA 复制有关,但未包括在复制酶体中,例如脱氧胞苷激酶^[18]、脱氧胞苷脱氨酶、尿苷激酶和 DNA 连接酶^[2]。

Reddy 和 Pardee 在其原始报道^[1]之后,又发表过一篇描述企图纯化复制酶体的文章。有几种酶活性,主要是 DNA 聚合酶和 TK,仍然在四个步骤中均和表观分子量约为 5×10^6 的聚集体相关连。从培养的细胞中获得的粗制复

制酶体组分表现出动力学偶联作用(kinetic coupling),亦即能够催化多步骤(multistep)的反应序列(在本例中是 $rCDP \rightarrow \rightarrow \rightarrow DNA$),而几乎没有任何中间产物的堆积,文章中还有一张出色的小牛胸腺复制酶体组分的电子显微镜图,但在此图中尚不能确定这些球状颗粒的确切本质。Noguchi 和 Pardee^[7,8] 曾 10 次企图纯化这样一个蛋白质复合体,尽管它很不稳定。然而为了进一步鉴定此蛋白质复合体的各种组成成分及其性质,重要的是要有高纯度的复制酶体。

四、复制酶体的装配和调控

Reddy 和 Pardee 发现,复制酶体存在于细胞的 S 期,而在 G1 期不存在^[1],在 G1 期中各种复制酶体中的酶可以存在,亦可以不存在;另外,存在的酶亦多半是在细胞浆中。Pardee 提出复制酶体的装配是在从限制点到 S 期的开始之间的 2h 期间发生的,一旦装配好后,这个复合体即能合成 DNA^[8]。按照 Pardee 的假说,这个装配过程是在限制点细胞合成大量蛋白质 p68 后被触发的。p68 则可能催化合成“粘合”蛋白质复合体的成分。p68 是分子量为 68000 的蛋白质^[19],它可能是具有下列三个主要性质的调节蛋白:(1)是在细胞周期的 G1 期合成的;(2)在正常细胞中很不稳定,其半寿期仅为 2—3h;(3)在转化细胞中,会发生改变使其稳定性提高。Pardee 近来的研究^[20]认为,复制酶体的组成成分之一,TS 的激活发生在 S 期开始之前约 1h,并且不需要有蛋白质合成。这个结果是和此酶的激活与其被装配进入复合体的说法相符合的。

复制酶体可在转录、翻译和活化的水平上受到调节。复制酶体中所含的 S 期特异的酶类又可根据其被诱导的程度不同而分为两类^[21]。一类是例如 DNA 聚合酶 α 和拓朴异构酶 I 之类的酶,它们在 S 期仅受到很小幅度的诱导。这些酶的活性始终维持不变直到 G1/S 过渡期,然后在细胞分裂之前增高 2—4 倍。另一类乃是大幅度诱导的酶,它们之中的某些酶在 DNA

合成开始时的活性 [TK、TS、RNR 和 DHFR (二氢叶酸还原酶)] 在 G1/S 过渡期之后能增高 10—20 倍^[19]。这些酶活性始终维持很高,直到细胞分裂时才迅速下降。TK 活性是标志哺乳动物细胞中 S 期开始的很有用的标记。Kelly^[21] 和 Pardee^[22,23] 的实验室均证明 S 期内 TK 活性的增高是由于: (1) TK mRNA 的稳定性和翻译效率增高; (2) 转录的速率增高。

某些学者还指出,脱氧胞苷激酶 (dCK, EC 2.7.1.74) 属于象 TK 这样一类的酶^[18]。dCK 活性的增高见于用 PHA 刺激的淋巴细胞、异丙肾上腺素刺激的小鼠唾液腺、照射后的大鼠胸腺和在 DNA 合成期的同步化 HeLa 细胞^[24,25]。这个酶亦能有效地磷酸化脱氧腺苷和脱氧鸟苷^[24]。dCK 象 TK 一样,亦能在转录和翻译的水平上被调控。最近已将人 dCK 的 cDNA 克隆出来^[26,27],并在大肠杆菌和 NIH3T3 细胞中得到表达。这样即可研究在细胞中 dCK 的调控。

1983 年 Reddy 和 Pardee 又报道了复制酶体中酶活性之一——TS 和几种其他酶活性有功能上联系的证据^[9]。羟基脲、新生霉素和阿非迪霉素 (分别是 RNR、拓扑异构酶和 DNA 聚合酶 α 的抑制剂) 都能抑制完整的 CHEF/18 细胞 S 期的 TS,但却不能抑制可溶性形式的 TS。这个结果证明,复制酶体的各个亚基之间存在着变构相互作用,故在完整细胞中各个酶的特异性抑制剂可以对复制酶体起调节作用。

五、复制酶体和癌的化学疗法

如上所述的复制酶体,如果确实存在,可能会对细胞周期、DNA 复制、癌发生、抗癌化学疗法和新的抗代谢物的生物学作用等的理论产生相当大的冲击作用。对于大多数抗癌剂,其靶是与 DNA 的合成或功用有关的酶或底物。因此,这些药物似乎主要是施加其毒性或抗肿瘤作用于生命周期某一阶段正进行 DNA 合成的细胞,对其产生抑制作用。若现代抗癌药的选择性细胞毒性作用就是直接与复制酶体中的

酶有关的;例如 DHFR、TS、RNR 和 DNA 聚合酶 α 分别是氨甲蝶呤 (MTX)、FdUMP (FU 的活化形态)、羟基脲和 araCTP (araC 的活化形态) 的靶酶。更好地了解复制酶体的变构调节作用可为设计综合性化疗的最佳方案提供新的指导。所谓最佳方案目前可按其生化途径分为三类^[28]: 序贯抑制、趋合抑制和互补抑制。根据 Reddy 和 Pardee 的发现^[9],还可在综合性化疗中创制出一个新项目“变构抑制”(图 1)。

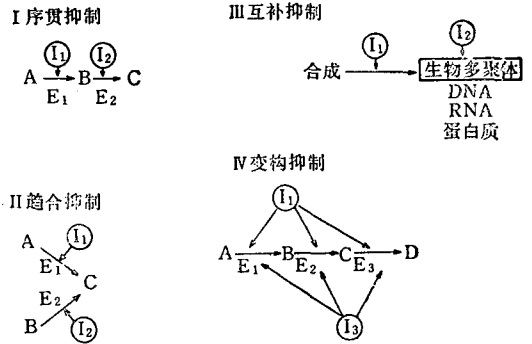


图 1 综合性化疗的生物化学分类

E_1 、 E_2 和 E_3 是催化 A 转变为 B、C 和 D (I 、 III 和 IV) 的酶,或者是 A 和 B 转变为 C (II) 的酶; I_1 、 I_2 和 I_3 是相应酶反应的抑制剂。

由于在 S 期复制酶体中的各种酶之间有变构相互作用,故抑制剂 I_1 能抑制 E_1 、 E_2 和 E_3 , 而 I_3 也能抑制 E_1 、 E_2 和 E_3 。当复制酶体消失时, I_1 和 I_3 则不能抑制可溶性形式的 E_2 。如果上述“粘合”蛋白质确实存在,则它将是癌的一个极好的靶蛋白。

有必要进行进一步研究以阐明 DNA 生物合成途径的抑制剂是如何影响复制酶体中的各个酶的,并将完整正常细胞和肿瘤或转化细胞的酶活性之间的不同进行比较。这种研究是非常重要的,不仅是为了解涉及 DNA 生物合成的酶类之间的变构相互作用,而且对于寻找新的抗癌药或对于已有的药物在癌症化疗中具体应用设计也是很有价值的。

六、结 语

在真核细胞中证实用于 DNA 生物合成的复制酶体的存在是多年来一个富有挑战性的问

题。有关这个复合体的几个重要性质方面,在很大程度上还缺乏一致的意见。主要问题是:(1)细胞浆中 DNA 前体的生物合成所需的酶是否在细胞进入 S 期时会迁移到细胞核中去;(2)某些 DNA 前体是否能通过复制酶体而被特异性地转变;(3)在体外已证实的复制酶体的变构相互作用是否也是完整细胞中的真实机制;(4)复制酶体的装配过程是否由一种“粘合”蛋白质所触发。

有确切的证据说明原核细胞中的 DNA 复制是由蛋白质复合体,而不是由游离酶所催化的。按照进化理论,在真核细胞中 DNA 生物合成应当有更高级的多蛋白质系统。复制酶体是否确实存在还有若干重要问题尚未解决,作者在真核生物 DNA 合成过程中存在着两个多蛋白质系统:一个在细胞浆内,其功能是通过全程合成途径和补救合成途径来合成 DNA 前体;另一个是细胞核蛋白质复合体,负责 DNA 复制。当 S 期开始时,两种蛋白质复合体分别向核膜内和核膜外移动以进行 DNA 合成。很可能 Pardee 的复制酶体是由这两种蛋白质复合体组成的。如果这个设想得到证实,则上述重要问题就会迎刃而解。

参 考 文 献

- 1 Reddy G P V, Pardee A B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980; 77: 3312
- 2 Lewin B. *Genes*, 3rd edition, New York: John Wiley and Sons Inc, 1987
- 3 Mathews C K, Slabaugh M B. *Exp Cell Res*, 1986; 162: 285
- 4 Chiu C-S, Cook K S *et al.* *J Biol Chem*, 1982; 257:

- 15087
- 5 Mathews C K. In: Serres F ed. *Genetic Consequences of nucleotide pool imbalance*, New York: Plenum Press, 1985
 - 6 Baril E, Baril B *et al.* In: Kollber A R *et al* ed. *Mechanism and regulation of DNA replication*, New York: Plenum Press, 1973
 - 7 Noguchi H, Reddy G P *et al.* *Cell*, 1983; 32: 443
 - 8 Pardee A. B. *Cancer Res*, 1987; 47: 1488
 - 9 Reddy G P V, Pardee A B. *Nature*, 1983; 304: 86
 - 10 Reddy G P V, Pardee A B. *J Biol Chem*, 1982; 251: 12526
 - 11 Spyrou G, Reichard P. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983; 115: 1022
 - 12 Reddy G P V, Klinge E M *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1986; 135: 340
 - 13 Wawar E J. *Biol Chem*, 1988; 263: 9908
 - 14 Nicander B, Reichard P. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983; 80: 1347
 - 15 Chiba P, Bacon P E *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1984; 123: 656
 - 16 Leeds T M, Slabaugh M B *et al.* *Mol Cell Biol*, 1985; 5: 3443
 - 17 Engstroom Y, Rozell B *et al.* *EMBO J*, 1984; 3: 863
 - 18 Arner E S J, Flygar M *et al.* *Exp Cell Res*, 1988; 178: 335
 - 19 Croy R G, Pardee A B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983; 80: 4699
 - 20 Yang H C, Pardee A B. *J Cell Physiol*, 1986; 127: 410
 - 21 Sherley J, Kelly T J. *J Biol Chem*, 1988; 263: 8350
 - 22 Coppock D L, Pardee A B. *Mol Cell Biol*, 1987; 7: 2925
 - 23 Gugas J M, Knight G B *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 4705
 - 24 Kitt S. *Mol Cell Biochem*, 1976; 11: 161
 - 25 Bohman C, Eriksson S. *Biochemistry*, 1988; 27: 4258
 - 26 Huang S H, Macdonald R *et al.* *blood*, 1987; 70: 259a
 - 27 Huang S H, Tomich J M *et al.* *J Biol Chem*, 1989; 264: 14762
 - 28 Capizzi R L, Keiser L W *et al.* *Semin Oncol*, 1977; 4: 227

[本文于1989年10月4日收到]

(上接第415页)

H-75 稻壳制复合肥技术培训班 面授400元,函授100元。

H-76 稻壳制饲料技术培训班 面授400,函授150元。

H-78 禽畜饲料添加剂生产技术培训班 面授400元,函授180元。

H-81 氨化桔杆制饲料、肥料技术培训班 面授500元,函授100元。

H-95 仿瓷涂料制作技术培训班 面授350元,函授150元。

H-97 冷烫液配制技术培训班 面授500元,函授100元。

以上技术培训班常年招生,包教包会。函授不会可面授,面授时减去函授费。

[北京市星火技术研究所,北京 867 信箱 20816 组李群,邮政编码: 100024,电话: 5762194,5762127]