

# 结构特异性核酸酶 FEN-1 的功能和结构\*

石斌山 余应年

(浙江大学医学院病理生理教研室, 杭州 310031)

**摘要** FEN-1 (flap endo/exonuclease) 是一种结构特异性核酸酶, 它能识别特定的 DNA 分叉结构, 并切除含有游离 5' 端的单链核酸。在 DNA 复制过程中, FEN-1 通过其外切酶、内切酶活力去除了冈崎片段前端 RNA 引物的最后一个核糖核苷。在 DNA 修复中, FEN-1 以其内切酶活力参与了损伤碱基的修复过程。FEN-1 基因含有两个保守区和一个 PCNA 结合区。

**关键词** 结构特异性核酸酶, DNA 复制, DNA 修复

**学科分类号** Q785

Lyamichev<sup>[1]</sup>在实验中发现位于 *E. coli* DNA 聚合酶 I 和 Taq 酶 N 端的 5'-核酸酶除了具有外切酶活性外, 还具有独特的内切酶活性, 能切下双链和单链核酸分叉处的 5' 单链 DNA 或 RNA。这种核酸内切酶能识别和结合特定的核酸结构, 即具有游离 5' 末端单链核酸的双链和单链 DNA 的分叉结构, 并切下含游离 5' 末端的单链核酸。这种反应只与 5'-核酸酶所识别的核酸结构有关, 而与其所识别核酸的序列无关。这就是结构特异性核酸酶的概念。由于在细胞 DNA 的复制、修复和重组过程中, 都存在这样的 DNA 分叉结构, 所以这种结构特异性核酸酶对维持细胞的遗传稳定性起着重要的作用。

然而, 在真核细胞中, 所有已知的 DNA 聚合酶都不具有 5'-核酸酶的活性, 这表明真核细胞中 5'-核酸酶的存在形式不同于原核细胞, 为一独立的蛋白质。真核细胞中类似的 5'-核酸酶分别在 HeLa 细胞、小牛胸腺、鼠细胞、酿酒酵母中被分离和鉴定。Harrington (1994 年) 和 Hiraoka (1995 年) 分别克隆和表达了鼠和人的 5'-核酸内切酶, 命名为 FEN-1 (flap endo/exonuclease 1) 和 hFEN-1。学者们在此前后对 FEN-1 的功能和结构进行了一系列的深入研究, 以下就 FEN-1 的生化性质方面的研究作一综述。

## 1 FEN-1 在 DNA 合成过程中的作用

1988 年 Ishimi<sup>[2]</sup>采用 SV40 体外 DNA 复制系统, 以 pSV01ΔEP 为模板进行复制反应, 发现不能得到闭合环状的 DNA。只有在反应系统中加入少

量的 HeLa 细胞抽提物后, 才能得到闭合环状的 DNA。作者从这种细胞抽提物分离到一种 44 ku 的蛋白质, 能代替细胞抽提物完成复制反应并得到闭合环状的 DNA, 分析表明该蛋白质为一种 5' → 3' 核酸外切酶。对缺少 5' → 3' 核酸外切酶或 DNA 连接酶的复制反应产物分析发现其中主要存在约 200 bp 的冈崎片段。Turchi<sup>[3]</sup>从小牛胸腺中提取和纯化 5' → 3' 核酸外切酶, 并在体外构建了一 DNA 合成中后随链的模型。实验表明 RNaseH I 在 RNA 引物上以内切酶的形式切下一段 RNA, 留下只有一个核糖核苷的 RNA-DNA 复合体, 由 5' → 3' 核酸外切酶切下 5' 端的单个核糖核苷, 然后上游引物在 DNA 聚合酶的作用下延伸至下游引物的 5' 端并留下切口, 由 DNA 连接酶完成连接。与此同时, Waga<sup>[4]</sup>采用以前分离到的真核细胞复制相关蛋白构成的 SV40 复制系统, 进一步证实 5' → 3' 核酸外切酶, 即 FEN-1, 在 DNA 复制过程中的重要作用, 并在《Nature》上提出一真核细胞 DNA 复制中后随链合成的模式图 (图 1)。

1996 年, Huang<sup>[5]</sup>通过实验推断冈崎片段前方 RNA 引物的去除可以先行进行, 不必等到下一个冈崎片段延伸至前方并接近该 RNA 引物。如果 5' → 3' 核酸外切酶不能有效地去除下游 DNA 前方的单核糖核苷, 则可通过上游引物在 DNA 聚合酶作用下的延伸并置换下游核酸链, 而形成具有游离

\* 国家自然科学基金资助项目 (39830210, 39870340)。

Tel: (0571) 7273149-8421, E-mail: ynyu@mail.hz.zj.cn

收稿日期: 1999-03-09, 修回日期: 1999-09-07

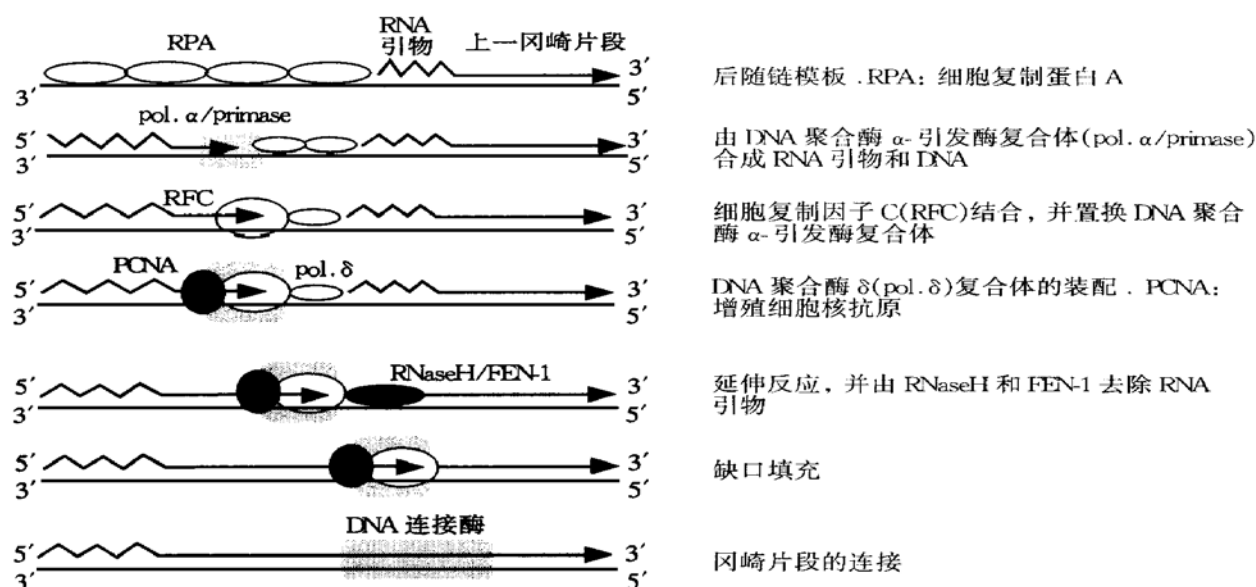


图 1 真核细胞 DNA 复制叉处后随链合成模式图

5' 单链核酸的分叉结构, 后者的游离 5' 单链核酸则可被该酶还具有的内切酶活性切除. 1997 年 Rumbaugh<sup>[6]</sup> 又发现, DNA 连接酶 I 能使带有 5' 单核糖核苷的下游引物与上游引物发生连接, 从而使新合成的 DNA 中嵌入一个核糖核苷残基, 并且这种嵌入的核糖核苷可在 5'  $\rightarrow$  3' 核酸外切酶和 RNaseH I 的作用下清除. 由此, 作者又提出了分别通过 FEN-1 的 5'  $\rightarrow$  3' 核酸外切酶和 5'  $\rightarrow$  3' 核酸内切酶两种途径, 来清除这些嵌入的核糖核苷的模式 (图 2).

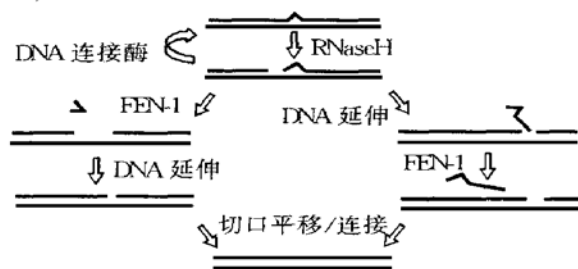


图 2 修复嵌入的单核糖核苷酸并完成冈崎片段连接的模式图

## 2 FEN-1 在 DNA 修复过程中的作用

1994 年, Murante<sup>[7]</sup> 在研究小牛胸腺 5'  $\rightarrow$  3' 核酸外切酶的同时, 发现该酶还具有内切酶活性. 当下游引物 5' 端有一段未复性的单链核酸 (Flap 链), 则可被 5'  $\rightarrow$  3' 核酸内切酶切除. 内切酶活性在上、下游引物间仅为切口时最大, 无上游引物时, 内切酶活性甚小. 内切酶切点位于下游引物与

模板复性区域的第一个核苷处.

1995 年, Murante<sup>[8]</sup> 进一步以实验证明小牛胸腺 5'  $\rightarrow$  3' 核酸内切酶必须从 Flap 链的 5' 端滑入所识别的 Flap 结构, 以进行结构特异性的酶切作用. 并且, 当 Flap 链的 5' 端或中间的碱基带有生物素 (biotin) 标记时, 并不影响小牛胸腺 5'  $\rightarrow$  3' 核酸外切酶的酶活性, 但是如以链霉抗生物素蛋白 (streptavidin) 结合上述生物素时, 则内切酶不能切除 Flap 链. 同时发现如果用单链结合蛋白 (single stranded binding protein, SSB) 结合 Flap 链, 则可使 5'  $\rightarrow$  3' 核酸内切酶的酶活性受到抑制, 并且两者可能为竞争关系. 以上实验表明 5'  $\rightarrow$  3' 核酸内切酶能越过 Flap 链上一定程度的损伤或被修饰部分, 将它从 DNA 上切除. 但如果 Flap 链上结合了大分子的蛋白质, 则会影响 5'  $\rightarrow$  3' 核酸内切酶进入 Flap 链并在其间滑行, 进而影响其与底物的结合和酶切活性. Barnes<sup>[9]</sup> 用微球菌核酸酶足迹分析法表明小牛胸腺 5'  $\rightarrow$  3' 核酸内切酶进入 Flap 链后, 接近分叉处的 25 个核苷酸受到保护, 说明这 25 个核苷酸为 5'  $\rightarrow$  3' 核酸内切酶的结合区域. 当 Flap 链的 5' 端或中间含有碱基加成物顺式-二胺二氯 (cis-diamminedichloroplatinum, CDDP) 时, 不影响酶切活性. 并且 5'  $\rightarrow$  3' 核酸内切酶也能切除磷酸核糖骨架上含有加成物叔丁基甲硅烷 (tert-butylsilyl) 的 5' Flap 链.

DeMott<sup>[10]</sup> 研究了重组表达的 FEN-1 在碱基切除修复过程中的作用, 发现只有当上游引物置换了

下游引物 5' 端的第一个残基无碱基磷酸脱氧核糖 (5'-dRp) 后面的第一个与模板互补的脱氧磷酸核苷时, FEN-1 才能有效地进行内切酶反应, 并且随着下游引物的进一步被置换, Flap 链可被切除. 这种酶切反应的产物均为寡核苷酸. 1998 年 Kim<sup>[11]</sup> 根据在非洲爪蟾卵细胞中已建立的碱基切除修复的两种途径, 即依赖 DNA 聚合酶  $\beta$  途径和依赖 PCNA 途径, 前者主要修复自然的 AP 位点, 后者可修复改变了的 AP 位点, 如以四氢呋喃 (tetrahydrofuran) 代替核糖骨架的 AP 位点类似物. 作者重组表达了 FEN-1 在非洲爪蟾的同源基因 XFEN-1, 发现 XFEN-1 是依赖 PCNA 途径的修复过程所必需的, 并且如果在依赖 DNA 聚合酶  $\beta$  途径中加入 XFEN-1, 则也能修复含有四氢呋喃的 DNA 底物. XFEN-1 均以内切酶的形式参与了这二种碱基修复过程. DeMott<sup>[12]</sup> 在体外构建了长补丁碱基切除修复 (long patch base excision repair) 的反应过程, 发现 FEN-1 在该反应中起着重要作用, 切除了一段含有 5' 端无碱基磷酸脱氧核糖的寡核苷酸.

### 3 FEN-1 与 PCNA 的关系

研究表明 FEN-1 和 PCNA (proliferating cell nuclear antigen) 都是 DNA 复制和修复必需的蛋白质, 并且两者还存在密切的关系. 1996 年 Wu<sup>[13]</sup>

证明 PCNA 能和 FEN-1 相互结合, 提高 FEN-1 的内切酶活性近 10 倍, 在以存在切口的双链 DNA 为底物时, PCNA 能提高 FEN-1 的外切酶活性近 3 倍. 并且, FEN-1 与 PCNA 结合后能大大提高它在高浓度单价盐离子存在时的活性, 说明两者在细胞复制的生理过程中存在密切的相互关系.

1997 年 Gary<sup>[14]</sup> 在体外重组和表达了一系列不同长度 FEN-1 基因片段的重组蛋白, 并使它们分别与 PCNA 作亲和性试验, 发现 FEN-1 的第 328 ~ 355 氨基酸对与 PCNA 的结合起关键作用. 同时还证明 FEN-1、XPG 和 p21 蛋白共同竞争同一 PCNA 结合位点.

### 4 FEN-1 的结构

FEN-1 基因只含有一个外显子, 无内含子. 基因长 1 144 bp, 编码 380 个氨基酸, 被定位于人类染色体 11q12-13. FEN-1 蛋白分子质量为 42 ku. Shen<sup>[15, 16]</sup> 比较了 18 种结构特异性核酸酶的序列, 发现 FEN-1 存在两个高度保守区, 共有 8 个氨基酸与其他结构特异性核酸酶完全相同 (图 3), 其中 7 个为芳香族氨基酸, 另 1 个为碱性氨基酸, 并分布于这两个高度保守区内. 定点突变实验结果表明其中 7 个氨基酸突变使 FEN-1 丧失底物结合或酶切活性.

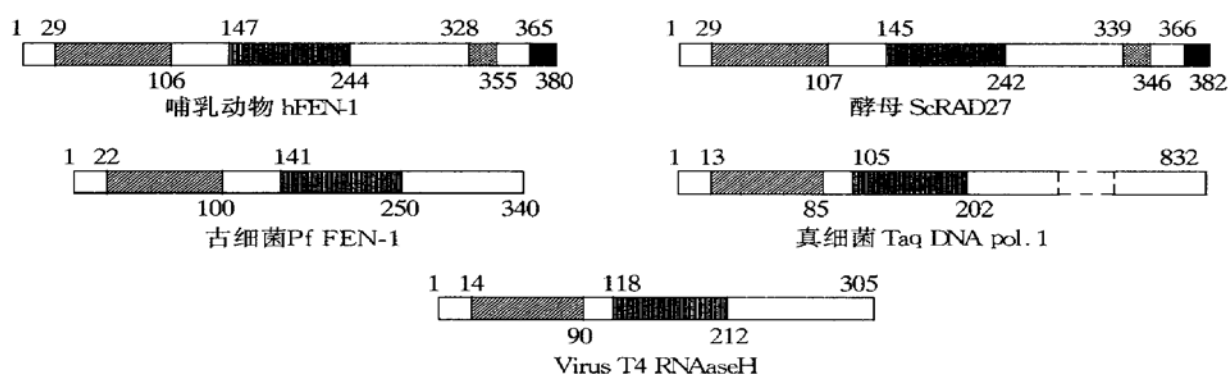


图 3 结构特异性核酸酶一级结构比较

▨: N端保守区; ▤: 中央保守区; ▩: 蛋白质-蛋白质相互作用区; ▦: 核定位信号区.

人类 FEN-1 蛋白的晶体结构尚未见报道, Hosfield (1998 年) 克隆、纯化了古细菌 *Pyrococcus furiosus* 的 FEN-1 蛋白, 并得到了其晶体结构, pFEN-1 与 hFEN-1 有很高的同源性, 且与 hFEN-1 一样为一独立的蛋白质, 其晶体结构表明 pFEN-1 蛋白是一种呈马鞍形的单结构域  $\alpha/\beta$  蛋白 (约 6.0 nm  $\times$  4.5 nm  $\times$  4.0 nm), 由中央 7 股  $\beta$  片

层、一条反向平行  $\beta$  带和两条  $\alpha$  螺旋束在蛋白质一侧形成一条 2.0 nm 的深沟. 其中 pFEN-1 的 H3TH 基元 (helix-3turn-helix motif) 基元与其他 DNA 结合蛋白的 HhH 基元 (helix-hairpin-helix motif) 相似, 可与 DNA 结合. 单链核酸则从可以被打开和关闭的螺旋夹基元 (helical clamp motif) 中间穿过. pFEN-1 的活性位点为分别由二簇酸性

氨基酸残基形成的  $Mg^{2+}$  结合位点构成 (图 4).

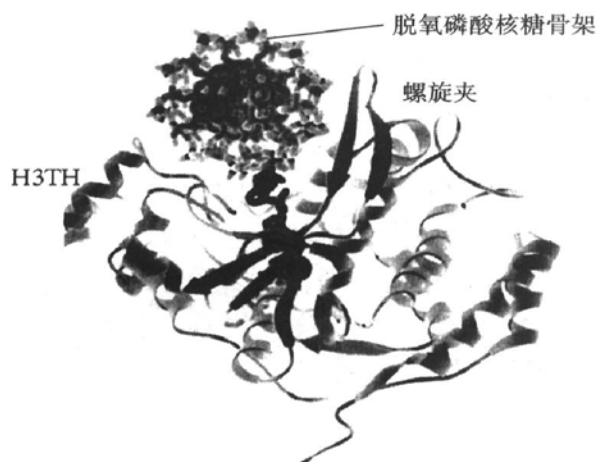


图 4 pFEN-1 三维结构模型

### 参 考 文 献

- Lyamichev V, Brow M A D, Dahlberg J E. Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases. *Science*, 1993, **260** (5109): 778~ 783
- Ishimi Y, Claude A, Bullock P, *et al.* Complete enzymatic synthesis of DNA containing the SV40 origin of replication. *J Biol Chem*, 1988, **263** (36): 19723~ 19732
- Turchi J J, Huang L, Murante R S, *et al.* Enzymatic completion of mammalian lagging-strand DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (21): 9803~ 9807
- Waga S, Bruce S. Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication *in vitro*. *Nature*, 1994, **369** (6477): 207~ 212
- Huang L, Rumbaugh J A, Murante R, *et al.* Role of Calf RTH-1 nuclease in removal of 5'-ribonucleotide during Okazaki fragment processing. *Biochemistry*, 1996, **35** (28): 9266~ 9277
- Rumbaugh J A, Murante R S, Shi S, *et al.* Creation and removal of embedded ribonucleotides in chromosomal DNA during mammalian Okazaki fragment processing. *J Biol Chem*, 1997, **272** (36): 22591~ 22599
- Murante R S, Huang L, Turchi J J, *et al.* The calf 5'- to 3'-exonuclease is also an endonuclease with both activities dependent on primers annealed upstream of the point of cleavage. *J Biol Chem*, 1994, **269** (2): 1191~ 1196
- Murante R S, Rust L, Bambara R A. Calf 5' to 3' -exo/ endonuclease must slide from a 5' end of the substrate to perform structure-specific cleavage. *J Biol Chem*, 1995, **270** (51): 30377 ~ 30383
- Barnes C J, Wahl A F, Shen B, *et al.* Mechanism of tracking and cleavage of adduct-damaged DNA substrates by the mammalian 5'-3'-exonuclease/endonuclease RAD2 homologue 1 or flap endonuclease 1. *J Biol Chem*, 1996, **271** (47): 29624~ 29631
- DeMott M S, Shen B, Park M S, *et al.* Human RAD2 homolog 1 5'-3'-exo/ endonuclease can efficiently excise a displaced DNA fragment containing a 5'-terminal abasic lesion by endonuclease activity. *J Biol Chem*, 1996, **271** (47): 30068~ 30076
- Kim K, Biade S, Matsumoto Y. Involvement of flap endonuclease 1 in base excision DNA repair. *J Biol Chem*, 1998, **273** (15): 8842~ 8848
- DeMott M S, Zigman S, Bambara R A. Replication protein A stimulates long patch DNA base excision repair. *J Biol Chem*, 1998, **273** (42): 27492~ 27498
- Wu X, Li J, Li X, *et al.* Processing of branched DNA intermediates by a complex of human FEN-1 and PCNA. *Nucleic Acids Research*, 1996, **24** (11): 2036~ 2043
- Gary R, Ludwig D L, Cornelius H L, *et al.* The DNA repair endonuclease XPG binds to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and shares sequence elements with the PCNA-binding regions of FEN-1 and cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *J Biol Chem*, 1997, **272** (39): 24522~ 24529
- Shen B, Nolan J P, Sklar L A, *et al.* Essential amino acids for substrate binding and catalysis of human flap endonuclease 1. *J Biol Chem*, 1996, **271** (16): 9173~ 9176
- Shen B, Nolan J P, Sklar L A, *et al.* Functional analysis of point mutations in human flap endonuclease 1 active site. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25** (16): 3332~ 3338
- Hosjield D, Mol C, Shen B, *et al.* Structure of DNA repair and replication endonuclease and exonuclease FEN-1: coupling DNA and PCNA binding to FEN-1 activity. *Cell*, 1998, **95** (1): 135 ~ 146

**The Function and Structure of the Structure-specific Nuclease FEN-1 (flap endo/ exonuclease).** SHI Bir-Shan, YU Ying-Nian ( *Department of Pathophysiology, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China* ).

**Abstract** FEN-1 is a kind of structure-specific nuclease, which could recognize specific DNA bifurcated structure and cleave single-strand DNA with free 5' end. During DNA replication, FEN-1 5' → 3' exonuclease removes the last nucleoside of RNA primer attached to an Okazaki fragment. In DNA repair, FEN-1 5' → 3' endonuclease is involved in the process of removing the damaged nucleotide. *FEN-1* gene contains two conserved regions and one PCNA binding region.

**Key words** structure-specific nuclease, DNA replication, DNA repair