

DNA 拓 扑 异 构 酶

周 宝 宏

(同济医科大学病理生理学教研室,武汉)

提 要

天然存在的 DNA 是以超螺旋形式存在的, DNA 转录、复制, 基因表达时必须解开超螺旋, DNA 超螺旋的形成和解旋是由一类称为 DNA 拓扑异构酶的蛋白质介导的, 本文对该酶的分类, 各类酶的功能特点、作用机制及其生物学意义作一简要综述。

在体内天然存在的 DNA 不论是线状还是环状, 均为超螺旋结构, 常用连环数 (linking number) 这个参数来描述超螺旋。连环数原是拓扑学术语, 在这里指两股互补的单链看成一条带绕假想的中心轴的匝数, 即两股单链相互缠绕的匝数。它的值等于 DNA 全部碱基对除以每圈 DNA 碱基对数目。在 Watson-Crick 结构中, 连环数等于总碱基对除以 10 或 10.5, DNA 在这一状态下被称为放松态。如果连环数减小, 双链共价闭合环形 DNA 分子结构中的总应力发生变化而导致原来的圆环本身扭曲, 缠绕成麻花状, 这种状态称为负超螺旋。反之, 连环数增加而使环状 DNA 再形成的超螺旋为正超螺旋。在天然状态下的 DNA 均为负超螺旋, 正负超螺旋均可回到放松态^[1,3]。DNA 超螺旋和放松态的相互转变具有拓扑学性质, 由几种蛋白质来执行这一功能, Champoux 综述为: 螺旋降稳蛋白 (helix destabilizing protein, HDP), 转轴酶 (swivelase), 解旋酶 (unwinding enzyme) 和回旋酶 (gyrase)^[2]。现在命名为 DNA 拓扑异构酶 (DNA topoisomerase)^[3]。根据其介导一条链还是二条链的断裂而分为 DNA 拓扑异构酶 I 和 DNA 拓扑异构酶 II, 简称 I 型酶和 II 型酶, 前者介导一条链的断裂, 后者介导两条链的断裂。

曾桂超同志曾对 DNA 拓扑异构酶作过综

述^[4], 作者在此作一补充。

一、I 型拓扑异构酶

(一) 一般特征

I 型酶首先在大肠杆菌中发现的, 称为 ω 蛋白, 随后在许多组织中发现此酶, 有人称之为解链酶 (untwisting enzyme), 解旋酶, DNA 松弛酶 (DNA relaxing enzyme), 切断-缝合酶 (nick-closing enzyme) 此酶松弛负超螺旋, 有自身能量系统, 不需 ATP 等辅助因子供能^[2]。它能催化 DNA 的其它拓扑结构反应, 如催化环状 DNA 打结 (knotting)^[5] 及解结节 (unknotting), 互补单链的连接, 环状双链 DNA 的环连 (catenation) 及解环连 (uncatenation)^[6], 这些反应都与一个机制有关, 即切开-缝合机制: 介导一条链的暂时断裂, 另一条通过此缺口以完成上述功能, 然后再将缺口封闭起来。

I 型酶有两种形式, 在 Hela 细胞中发现分子量为 100,000 及 67,000 两种具有 I 型酶活性的蛋白质。有的报道为 120,000, 30,000, 15,500 和 14,500^[3]。

原核生物和真核生物 I 酶略有区别, 前者由二个亚基构成, 分子量为 111,000, 活性依赖于 Mg^{++} 及 DNA 超螺旋的方向性, 能松弛负超螺旋, 后者由一个亚基构成, 分子量为 67,000—70,000, 活性不依赖于 Mg^{++} 及 DNA 超螺旋的

方向性,能松弛正、负超螺旋^[2,3]。

同时还发现:介导 λ 噬菌体整合重组 (integrative recombination) 的 *int* 蛋白, $\phi\times 174$ 噬菌体顺反子 A 蛋白 (cistron A protein) 及噬菌体 fd 的 II 类基因蛋白 (gene II protein) 都有 I 型酶活性。^[3]

(二) I 型酶作用机理^[6]

各种 I 型酶共同特点是: ① 仅切断 DNA 双链中的一条链, ② 不需要高能辅助因子, 因而不能催化需能的超螺旋结构。Brown 等提出 ω 蛋白反应模型 (如图 1 所示): ω 蛋白呈 C 形, 其一臂上有切断和缝合 DNA 的活性部位, 该部位与断端 5'-磷酸基相结合, 另一臂上亦有同 3' 断端结合部位。原核生物 I 型酶共价连接于断端 5' 磷酸基上, 同时作共价连接于另一断端的 3'-OH 基上。真核生物 I 型酶仅与 5' 磷酸基共价连接, 另一断端却呈游离。现在还不知道这种连接法有什么生理意义。

1. 形成环连或打结

i. 此酶作用部位处需要一个缺口 (nick), ω 蛋白的臂同双链 DNA 中无缺口的链结合, 此结合部位与缺口部位相对应, 而另一双链 DNA 位于 C 形结构外面。

ii. 被结合的链被切开, 在 C 形结构外边的双链 DNA 通过切口进入 C 形结构内。

iii. 被暂时切断的及原来存在缺口的部位重新缝合起来, 如果通过被切开的裂口的双链 DNA 是该 DNA 的另一部分, 则形成一个结节

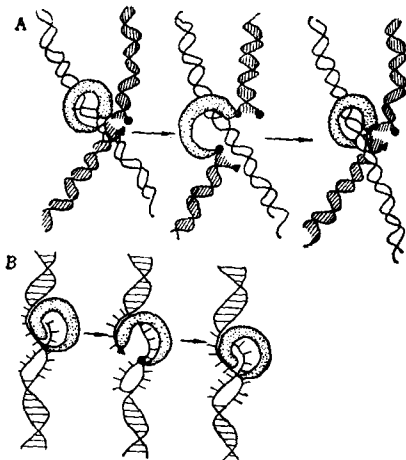


图 1 I 型酶的作用机理

即打结。若通过裂口的是另一个双链 DNA, 则形成环连 (打结和环连见后有图表说明)。

2. 松弛 (relaxation)

i. 同负超螺旋 DNA 结合, ω 蛋白局部分开 DNA 链, 诱导一个左手螺旋。

ii. 结合的链被切开, 另一条链通过切口进入 C 形结构内。

iii. 断端愈合起来, ω 蛋白脱落下来。此松弛作用与环连、打结机理相同, 只是通过裂口的 DNA 链从裂口出来, 这样就解开结节, 解开环连。同样亦起松弛超螺旋作用。

二、II 型拓扑异构酶—回旋酶 (gyrase)

(一) 回旋酶的功能

回旋酶含有两个 A 亚基, 二个 B 亚基, 分别称为 *gyrA*、*gyrB* 亚基, 编码 A、B 亚基的基因称为 *gyrA*、*gyrB* 基因。II 型酶的共同特点为: ① 同时切断两条链, 不需要缺口的存在, 因而每一步改变二个连环数, ② 需要高能辅助因子。回旋酶有多种活性, 现分述如下^[3,7]:

1. 回旋活性: 催化松弛的 DNA 形成负超螺旋, 此活性需 ATP 供能, 是回旋酶的主要功能。

2. 同 DNA 结合: 此结合与上述的结合不同, 为非共价结合, 具有较高的特异性。

3. 松弛 DNA 活性: 回旋酶在无 ATP 时能自发地松弛负超螺旋, 但不能松弛正超螺旋, 回旋酶 *gyrA* 亚基具有此活性。

4. oxo-依赖性切断 (cleavage) 活性: 当 oxalidic acid 与 DNA 和回旋酶共温育时, 加入 NaDodSO₄ 后就切断 DNA 双链, 形成一个游离羟基的 3' 末端和同 *gyrA* 亚基共价结合的 5' 末端, 这些末端为 RNA 多聚酶提供了一个模板引物。

5. ATP 酶活性: 回旋酶具有水解 ATP 的活性, 有很高的特异性, 对双链 DNA 的作用为单链的 10 倍, *gyrB* 亚基具有此活性。

6. 环连和解环连: 此活性通过切断-缝合机制介导的 (如图 2 所示)。如果底物是两个双链 DNA, 则形成环连; 如果底物是同一个双链

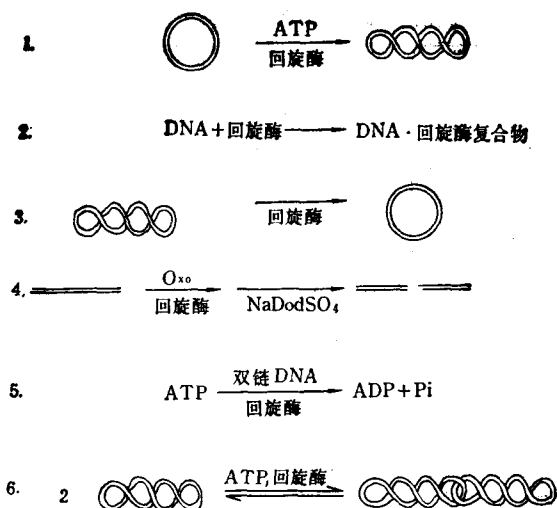


图2 回旋酶的多功能性

DNA, 在酶的作用下, 形成结节。同时此酶亦能解结节和解环连。

(二) 一种新的 II 型酶 (II' 酶)

经研究发现还有一种与回旋酶有关的 DNA 松弛酶, 它含有 *gyrA* 产物和称为 ν 的分子量为 50,000 道尔顿的蛋白质, ν 与 *gyrB* 亚基很相似, 可能是 *gyrB* 基因的部分转录产物, 此酶不含有 ATP 位点, 此酶被称为 II' 酶。它不使 DNA 超螺旋化, 相反却使超螺旋 DNA 松弛, 一般无方向性, 可松弛正、负超螺旋, 不受 ATP 限制, 不被新霉素所抑制, 其它方面同回旋酶相似。

(三) 回旋酶作用机理

1. 负超螺旋化

回旋酶选择性地作用于环状双链 DNA 的某些部位, 在局部形成一个十字结, 诱导一个左手螺旋, 这是一个正超螺旋 (B), 然后 ATP 结合上去, 暂时切断 DNA 双链, 使回旋酶前面的断裂 DNA 转运到另一条链的后面, 然后重新缝合起来 (C), 这样就翻转了信号, 称之为信号翻转模型 (sign inversion model), 为下面进一步负超螺旋化 (D → G) 作好准备。双链 DNA 翻转信号后, 在 ATP 作用下继续负超螺旋化。

2. 松弛 DNA

在负超螺旋过程中, DNA 双链围绕酶形

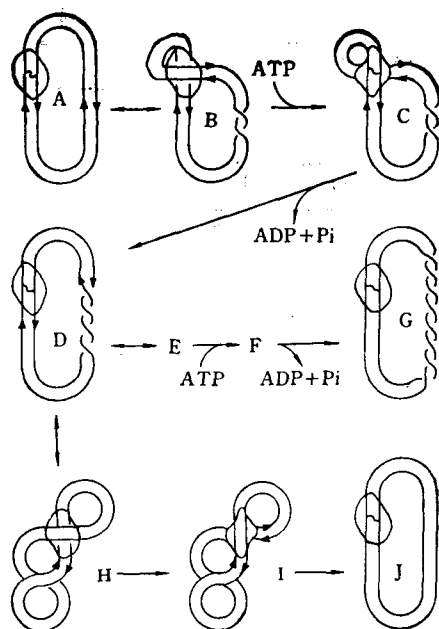


图3 回旋酶作用机理

成右手螺旋, 产生一系列环 (H), 通过信号翻转机制, 但这次信号翻转方向与负超螺旋方向相反, 介导双链的暂时断裂, 即松弛 DNA 超螺旋^[3]。这一机制与 I 型酶相似, 只不过 I 型酶是介导一条链的断裂, 而 II 型酶则是介导二条链的断裂。如图 3 所示。

三、拓扑异构酶 III

最近, 在大肠杆菌中发现一种新酶, 称为拓扑异构酶 III, 简称 III 酶, 它属于 I 型酶, 它通过切断-缝合一条多肽链来改变 DNA 的连环数, 它能松弛负超螺旋, 不能松弛正超螺旋, 分子量为 74,000, 一条多肽链, 这种酶只存在于 *topA* 基因 (I 型酶的结构基因) 缺失的链上, 它与 ω 蛋白显著不同: ① 在 K^+ 、 Mg^{++} 离子协同下才表现出理想活性。② 与新霉素有亲和力, 无 ATP 酶活性, 纯化的 III 酶没有使 DNA 超螺旋化的活性, 且不受 oxalidic acid 和新霉素的影响, 单链 DNA 和亚精胺强烈抑制它的活性。I 型酶、II 型酶、II' 酶、III 酶的部分生物学特征如表 1 所示^[3]。

表 1 I 型酶, II 型酶, II' 酶, III 酶部分生物化学特性比较

特 性	I 型酶 (ω 蛋白)	II 型酶(回旋酶)	II' 酶	III 酶
亚基, 分子量	单体, 110KD	gyrA 105KD gyrB 95KD	gyrA 105KD gyrB 片段 50KD	单体 75KD
分 型	I 型	II 型	II 型	I 型
清除正超螺旋的能力	无	只有在 β 、 r -亚氨基 ATP 存在时才有	有	无
下列各项消除负超螺旋效应				
① 最理想的离子介质	2—3mmol/L Mg^{2+} , 0mmol/L KCl; 2—3mmol/L Mg^{2+} , 50mmol/L KCl	7.5mmol/L Mg^{2+} , 25mmol/L KCl 2mmol/L 亚精胺(?)	与 II 型酶相似	4mmol/L Mg^{2+} , 80mmol/L KCl
② ATP	无效应	抑制	无效应	无效应
③ 新霉素	无效应	强烈刺激	无效应	无效应
④ Oxolidic acid	无效应	抑制	抑制	无效应
⑤ 单链 DNA	抑制	无效应	无效应	抑制
⑥ 亚精胺	抑制	刺激	刺激	抑制
⑦ N-乙酰马来酰亚胺	无效应	抑制	抑制	无效应

四、拓扑异构酶的生物学意义

(一) 拓扑异构酶的基因突变

起初是研究沙门氏菌上亮氨酸(Leu)操纵子的结构基因,在第 500 位亮氨酸(Leu-500)发生突变,使与 Leu 密码相连锁的四个基因失活。距此点突变数百个基因处,亦有突变,称为 SupX 突变,它使 Leu-500 突变了的操纵子重新表达。在大肠杆菌中 I 型酶的结构基因为 topA 基因,在酵母中 I 型酶的结构基因为 top1 基因^[9]。SupX 基因和 topA 基因相类似。不论是 SupX, topA 或 top1 突变,都使 I 型酶的活性显著降低,影响许多蛋白质的合成,是致死性突变。

topA 基因位于 trp 基因和 cysB 基因之间。近来研究,发生 topA 突变时,大肠杆菌菌株并未死,而在 II 型酶的 gyrA 或 gyrB 基因上面或附近发生补偿突变。使这些突变链能够表达并利用 β -糖苷(β -glycosides),而未发生补偿突变的 II 型酶无此功能,这一突变称为 Bgl 突变。Miller 发现一种能抑制噬菌体 Mu 生长的突变,称为 himB 突变。Bgl 和 himB 突变均使回旋酶活性降低。在大肠杆菌质粒上

亦有 top10 突变,它发生在 II 型酶的 B 链上,此突变使 DNA 更加超螺旋化,由于它的超螺旋化影响基因表达和蛋白质合成,因而 top10 突变是有害的,其它 II 型酶突变还不能证实是否有害^[11]。

(二) 拓扑异构酶的调节

在体内 DNA 超螺旋结构的拓扑学变化,由具有松弛作用的 I 型酶和具有回旋作用的回旋酶的动态平衡来控制。

1. DNA 构象调节: 当超螺旋松弛时,诱导 II 型酶合成而使 DNA 超螺旋化,当 DNA 超螺旋化时诱导 I 型酶合成而使 DNA 松弛。用回旋酶抑制剂可使 DNA 松弛而诱导回旋酶合成^[12]。

2. I 型酶和 II 型酶相互作用: 有人用大肠杆菌 I 型酶刺激,可以促进 II 型酶的合成^[10,12]。

3. 突变调节: 上已述及, I 型酶突变, I 型酶活性降低,便伴随 II 型酶的补偿突变,当 I 型酶过度增加,亦有突变来使 DNA 更加超螺旋化。

4. 磷酸化调节: 有人发现果蝇 II 型酶被酪蛋白激酶 II 磷酸化。II 型酶被 cAMP 非依赖性蛋白激酶磷酸化。这两种蛋白激酶使 II

型酶上的丝氨酸和苏氨酸磷酸化,前一种活性比后一种活性大1000倍。有人从Novikoff肝癌细胞中提取的I型酶亦以磷酸化形式存在,它被人体核蛋白激酶NII磷酸化。磷酸化可以刺激DNA松弛^[13]。

5. 其它形式的调节: 拓扑异构酶还可使ADP核糖化(ADP-ribosylation),酪氨酸磷酸化。这两种修饰使I型酶失活^[13]。一些化学制剂亦可影响拓扑异构酶的活性,如表1所示。

(三) 在DNA复制转录和基因表达中的作用

I型酶主要集中在转录活性区域,同转录有关^[14]。果蝇II型酶主要集中在染色体上含有染色质素较多的部位,但它的分布是不规则的,在有丝分裂时分布于整个细胞,因而II型酶同有丝分裂有关^[12]。I型酶作用部位含有较多的dGMP,而II型酶主要作用于dAMP, dTMP较多的部位。II型酶切断部位在基因的5'、3'端的边缘^[15]。

噬菌体T4 DNA拓扑异构酶在DNA复制起始中的作用已报道过^[3]。在体外对大肠杆菌oriC质粒进行研究表明,oriC质粒染色体复制必需gyrA、gyrB亚基,且回旋酶同dnaA蛋白、dnaB蛋白、dnaC蛋白和RNA多聚酶与DNA形成一个中间功能体来协助DNA多聚酶III介导的DNA复制。II型酶使新复制的子代DNA双链碱基对解开。复制时,拓扑异构酶亦使亲本DNA双链解开,这样加速了DNA复制的速度^[12]。

用回旋酶抑制剂可以使大肠杆菌麦芽糖和乳糖操纵子表达降低5—10倍,而对苏氨酸、色氨酸及色氨酸酶的表达无影响,因而拓扑异构酶在基因表达方面有较复杂的作用^[3,12]。

(四) 在重组、修复及其它方面的作用

拓扑异构酶能催化部位特异性重组^[16]。有三个特点表明:(1)拓扑异构酶使补偿进来的DNA发生缠绕。(2)通过切断-缝合作用携带补偿DNA分子重组到DNA分子中。(3)能

维持一定的超螺旋状态来影响某些重组方式如 λ 噬菌体的int蛋白催化部位特异性整合作用^[12]。当DNA链上某一处出现突变或损伤时,拓扑异构酶将此片段切下,然后携带补偿链到切下的部位缝合起来,起到修复作用。

拓扑异构酶还有其它作用。如用抑制剂处理大肠杆菌可以诱发SOS修复功能^[17]。拓扑异构酶在有丝分裂时介导姐妹染色体交换^[12]。它同热休克反应有关,在酵母中,热休克基因在hsp70基因处,此处是染色体疏松部分,I型酶同热休克基因结合激发热休克反应^[11,18]。同时拓扑异构酶诱导recA蛋白(此蛋白同重组有关)的合成,亦与dnaA、dnaB、dnaC蛋白合成有关。现在发现有的抗肿瘤药物能干扰拓扑异构酶的活性,因而这对研究肿瘤的治疗方面有极其重要的意义^[19]。

参 考 文 献

- [1] 马楚平:《生命的化学—生物化学通讯》,1983,3,46.
- [2] Champoux, J.: *Ann. Rev. Biochem.*, 1978, 47, 449.
- [3] Geller, M.: *Ann. Rev. Biochem.*, 1981, 50, 879.
- [4] 曾桂超:《生物化学杂志》,1986,2,1.
- [5] Frank, B. D. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 4975.
- [6] Cozzarelli, R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78, 843.
- [7] Cozzarelli, R. et al.: *Science*, 1980, 207, 953.
- [8] Kalkunte, S. S. et al.: *Biochemistry*, 1984, 23, 1899.
- [9] Marget, K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, 82, 7178.
- [10] Kalkunte, S. S. et al.: *Biochemistry*, 1985, 24, 4766.
- [11] DiNardo, S. et al.: *Cell*, 1982, 31, 43.
- [12] Wang, C. J. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, 1985, 54, 665.
- [13] Ackerman, P. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, 82, 3164.
- [14] David, S. G. et al.: *Cell*, 1986, 44, 401.
- [15] Udvardy, A. et al.: *Cell*, 1985, 40, 933.
- [16] Vetter, D. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80, 7284.
- [17] Gottesman, S. et al.: *Cell*, 1981, 23, 1.
- [18] Jeffrey, A. et al.: *Cell*, 1985, 40, 805.
- [19] Nalson, E. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 1361.
- [20] Fisher, L. M. et al.: *Biochemical Society Transactions*, 1986, 14, 493.

[本文于1987年5月13日收到]