

DNA 复制蛋白与复制体

韩 贻 仁

(山东大学生物系, 济南)

提 要

有许多 DNA 复制蛋白是装配成一定的结构发挥作用, 如引物体和复制体。在复制叉处, 由 DNA pol III 全酶二体、引物体和解螺旋酶装配成复制体, 负责先行链和后行链的同时合成。复制中, 后行链模板绕 DNA pol III 全酶形成折迴环, 随着复制体在复制叉处前移, 后行链以 5'→3' 的方向合成冈崎片段。

一、多种复制蛋白参加 DNA 复制过程

参与 DNA 复制过程的各种蛋白质总称为复制蛋白 (replication proteins)。在大肠杆菌中, 复制蛋白有 16 种之多(表 1)^[1,2]。它们在 DNA 复制过程中各有各的作用^[3-8], 但是它们大多数都是相互组成一定的结构发挥作用。

二、引物酶和多种蛋白构成引物体

后行链的合成是通过合成冈崎片段的方式进行。各种生物引导合成冈崎片段的 RNA 引物长度不同(表 2), 序列也不一样。催化合成 RNA 引物的引物酶能识别 ssDNA 的特定序列, 并以其为模板加工 (processively) 合成互补的 RNA 引物。可是, 引物酶单独存在时无活性, 只有和另外的 6—7 种多肽形成复合物才能发挥作用, 这一复合物称为引物体 (primosome) (表 1)。另外的 6—7 种多肽组成了前引物体 (preprimosome)。

前引物体中的 n' 蛋白可利用 ATP 的能量, 驱动引物体沿后行链模板以 5'→3' 的方向移动, 反复起动引物酶合成冈崎片段。引物体移动的方向与 RNA 引物合成的延伸方向相反^[9]。dna B 蛋白成六聚体, 可和 dna C 蛋白结合成复合物 (dnaB-dna C), 其主要作用是利

用 ATP 的能量改变 DNA 的二级结构, 使之适合于引物酶发挥作用^[1]。

表 1 大肠杆菌复制蛋白的种类和功能

蛋白质种类	质量(kD)	亚基数	功 能
SSB	74	4	结合 DNA 单链, 使展直
i 蛋白	66	3	
n 蛋白	28	2	
n' 蛋白	76	1	装配成引物体发挥作用
n'' 蛋白	17	1	
dnaC	29	1	
dnaB	300	6	
引物酶	60	1	
pol III 全酶	(760)	(2)	
α	140	1	×2 链的延长
ε	25	1	
θ	10	1	
β	37	1	
γ	52	1	
δ	32	1	
τ	83	1	
pol I	102	1	填补空缺, 切除引物
连接酶	74	1	链片段间连接
促旋酶(拓扑异构酶 II)	400	4	形成负超螺旋
gyrA	210	2	
gyrB	190	2	
rep	65	1	解螺旋酶, 打开双链
解螺旋酶 II	75	1	解螺旋酶, 打开双链
dna A	48		起始复制
拓扑异构酶 I	100	4	松解负超螺旋

表2 在不连续 DNA 复制中 RNA 引物的性质

基 因 组	DNA 片断上的 RNA 引物长度	初级产物
T7 噬菌体	1—5	pppApCpC/A(pN) ₁₋₂ (N: A, C 丰富)
T4 噬菌体	1—5	pppApC(pN) ₃
<i>E. coli</i>	1—3	
$\phi \times 174$ 噬菌体	1—5	
海 胆	1—~8	(p)ppA/G(pN) ₇
多瘤病毒, SV40	~10	pppA/G(pN)~9
动物细胞	~9	

三、后行链合成的迴环模型

在 DNA 复制过程中,引物体是和其他许多复制蛋白在复制叉处相互结合,协同作用。A. Kornberg 在 70 年代末提出了复制体 (replisome) 的概念^[1],他认为在复制叉处复制蛋白组成了复合物,即由 1 个或多个解螺旋酶分

子、引物体和 DNA pol III 全酶二体构成了结构实体。在复制过程中 DNA 聚合酶 III 为一二聚体,负责 DNA 双股链的同时协同复制。他的这一设想的依据是: ①根据化学计算,每一复制中心含有 2 个 β 亚基, 2 个 γ 亚基和 2 个 ATP 分子。②存在有特别大的 pol III' 复合物,可能是由 pol III 核心和 τ 亚基构成的二体。③在电镜下显示出, $\phi \times 174$ 的双螺旋复制型具有一定的形态特点, DNA 双螺旋在结合了引物体的部位伸展出 1—2 个小的 DNA 环,这是 DNA 双链同时进行复制的结构反映。④在真核生物中, DNA 聚合酶 α 也同样具有 2 个活性部位。此设想的核心是,在复制叉处后行链模板形成一折返的迴环,以适应双链同时进行复制^[1]。我们把这一设想称为迴环模型。

迴环模型认为,在复制叉处先行链总是比

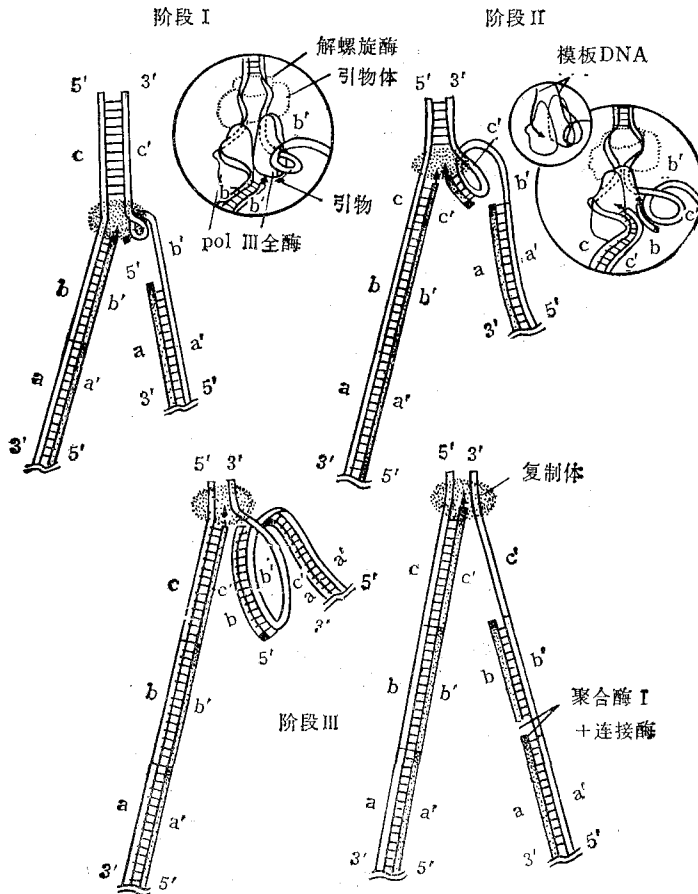


图1 DNA 聚合酶催化先行链和后行链同时复制图解
(自 A. Kornberg, 1982)

后行链领先合成了一新生片段。由于与先行链同时合成的后行链延迟了一个片段，故在同时进行合成的两条亲代模板链片段不互补。在复制叉处，后行链模板绕聚合酶形成 180° 折返环，从而使两条模板链在此处均呈 $3' \rightarrow 5'$ 的走向。随着后行链模板在聚合酶中穿行，DNA聚合酶便以RNA引物为引子合成了子链。当合成的子链到达前一段子链(冈崎片段)的 $5'$ 末端时，后行链模板即脱离DNA聚合酶，迴环解开。与此同时，前移了的复制体中的引物酶又加工转录了一段新的RNA引物，后行链模板又绕DNA聚合酶形成一新的折返环，再次进行下一段冈崎片段的合成。因此，复制体中的DNA聚合酶二体虽同时合成两条子链，可是后行链总是推后了一个冈崎片段(图1)。

迴环模型得到了一些实验的支持，Burgers

和 Kornberg (1982) 曾证明，DNA 聚合酶和引发的模板结合所形成的起始复合物具有ATP酶活性，每形成1个起始复合物需水解2个ATP分子，这一数值恰与ATP·全酶复合物中的ATP分子数相等。此外，起始复合物中含有2个 β 亚基单体。这说明，起始复合物中含有2个全酶分子^[10]。还有实验证明，一个快速生长的*E. coli*细胞，在亲代染色体复制完成之前即又起始新一轮复制，结果存在着6个复制叉。在复制叉处两条模板链各结合1个酶分子，由此推算出，1个细胞中应有12个pol III全酶分子在同时作用。通过直接测定表明，每个细胞中有10—20个pol III全酶分子，此数值与6个复制叉处结合的全酶分子数一致^[11]。最近，Hawker 和 McHenry (1987) 证明，在复制叉处DNA聚合酶 III全酶是以二

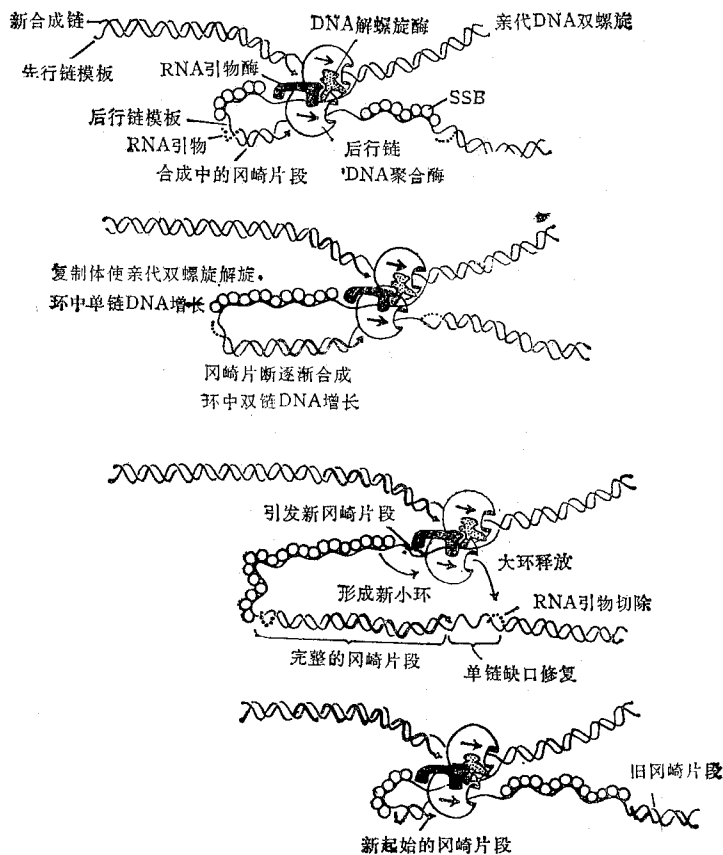


图2 复制体在冈崎片段合成中的作用机制图解
(自 Watson, J. D., 1987)

体存在,催化先行链和后行链同时复制^[12]。

J. D. Watson (1987) 支持 DNA 复制的迴环假说,他认为,由于 DNA pol III 全酶二体、引物体和解螺旋酶组成了一个 DNA 复制蛋白复合物(复制体),引物体和 DNA pol III 全酶在复制叉处的前移速度相同,后行链模板每合成 1 个冈崎片段即形成 1 次迴环^[2](图 2)。

迴环复制机制亦存在于滚环式 DNA 复制中。复制时,先由核酸内切酶在双螺旋环(+)链的专一起始点凿成切口。切口的 5' 末端从 DNA 双螺旋环上脱开,暴露出了 3' 末

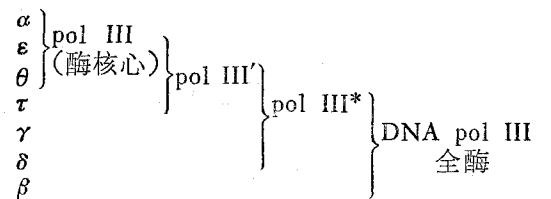
一复制结构称为滚环。(一)链环和 5' 末端尾的复制是在同一复制体的作用下同时进行的。在复制体的后方,冈崎片段模板链亦形成一折返环,每当合成完一个冈崎片段,折返链即脱离聚合酶一次(图 3)。有时,5' 端尾伸出的长度可达滚环的几倍(如 λ 噬菌体),随后由专一性内切酶切成与滚环等长的线性片段,再依靠互补的 5' 粘性末端形成若干环状的 DNA 双螺旋。

四、全酶中辅助蛋白的作用

近几年学者们的注意力主要集中在 DNA pol III 全酶各亚基在复制叉处的作用和全酶循环合成冈崎片段的机制。

DNA pol III 全酶至少由 7 个不同的亚基组成,即 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 θ 和 τ 亚基^[13]。其中 α 、 ϵ 和 θ 3 个亚基构成了酶核心 (pol III core),而 β 、 γ 、 δ 和 τ 4 个亚基为辅助蛋白。为 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 τ 诸亚基编码的基因分别定名为 dnaE、dnaN、dnaZ、dnaX、dnaQ 和 dnaZ-dnaX。

DNA pol III 全酶可分离出 3 种稳定的亚装配体(subassembly),即 pol III、pol III' 和 pol III*:



其中, pol III 为酶核心。酶核心中的 α 亚基含有合成活性部位,为实际的 DNA 聚合酶,亦具有 5'→3' 外切酶活性。 ϵ 亚基为 3'→5' 外切酶。辅助蛋白中的 τ 亚基可导致 pol III 在复制叉处的先行链和后行链上形成不对称的二体^[14,15],并在形成起始复合物之后提高全酶的加工速率。 γ 、 δ 复合物可催化 β 亚基转移到模板链上^[16]。

迄今研究得最详细的辅助蛋白是 β 亚基^[14],其主要作用如下:

1. 识别引发的 DNA 模板。引导聚合酶同模板结合,此点类似于 RNA 聚合酶的 σ 亚基^[9]。

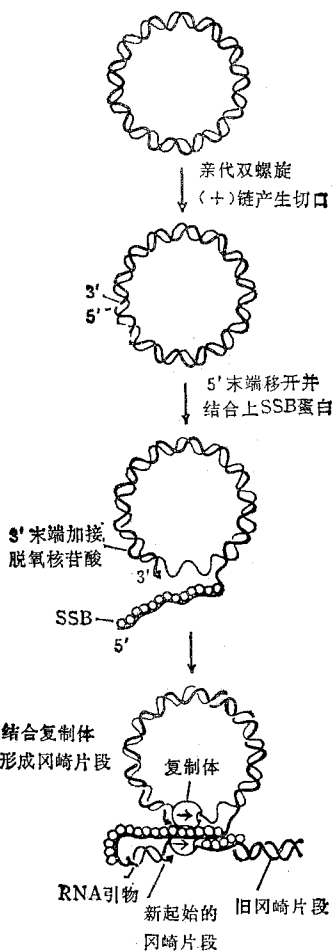


图 3 复制体在 dsDNA 环滚环式复制中的作用机制 (自 Watson 等)

端-OH 基,于是以(-)链环为模板合成了新的(+)链。与此同时,5' 末端游离尾逐渐伸长,并随即结合上了 SSB 蛋白,合成了互补链。这

2. 参加起始复合物的形成。起始全酶的催化反应, 促进在引发模板上形成 ATP 依赖起始复合物。用抗 β 亚基抗体与 β 亚基作用, 可阻断反应的起始^[17]。无 β 亚基的全酶 (pol III*) 对单链模板的活性很低, 不能形成起始复合物。

3. 增强全酶的加工能力 (processivity)。 β 亚基勿需经过其他亚基 (τ 、 γ 、 δ) 即可直接与全酶催化核心相互作用, 增强全酶的催化活性和加工能力。向酶核心溶液中加入饱和水平的 β 亚基, 可使合成活性提高 7 倍^[14]。 β 亚基可增强全酶同 DNA 作用的稳定性, 延长聚合酶从 3'-OH 末端起始合成到从模板终止点解离之间的延续时间, 有利于链的延长^[14, 19]。在室温条件下, 酶· β ·DNA 复合物可稳定存在 20min 以上, 这对 *E. coli* 染色体来说, 全酶毋须与 DNA 解离即足可加工整条先行链。

4. 调节酶循环(见下)。

五、合成冈崎片段的酶循环

DNA pol III 全酶在引物模板上装配成起始复合物的过程可分为两个阶段。首先, β 亚基和 γ · δ 亚基复合物同引发的单链 DNA 结合, 形成前起始复合物 (preinitiation complex)。然后 DNA 聚合酶 III 核心 (pol III) 和 τ 亚基同前起始复合物结合成起始复合物^[16]。加工复制完成后, 全酶即离开模板, 分解成 β 亚基和 pol III*。 pol III 与辅助蛋白解离后, 可再同另一新的前起始复合物结合, 起始新一轮加工。 β 亚基在调节酶循环中起一定的作用, 提高 β 亚基的浓度可促进全酶的形成, 而 β 亚基与全酶分离可促使聚合酶与模板脱离, 二者的分离即反映酶循环中另一个阶段的开始^[18, 20]。

新近 O'Donnell (1987) 提出了复制叉处 DNA 聚合酶 III 全酶在后行链模板上的循环模型, 主张聚合酶转移同引物上的前起始复合物结合可通过 3 种方式。①解离-再结合 (dissociation/reassociation) 方式, 当 DNA pol III 全酶在下游催化合成冈崎片段时, 后行链模板上游(反后行链延长的方向)的引物上即形成了

一前起始复合物, 一旦冈崎片段合成完毕, pol III 或 pol III' 即与模板解离, 转移到上游同前起始复合物结合。② 当冈崎片段合成完毕, DNA pol III 全酶的亚装配体不解离, 而是全酶直接转移, 同上游的前起始复合物结合成三元复合物 (1 个酶核心+2 个前起始复合物)。③ 链间转换 (strand switch), 先行链上的起始复合物中的聚合酶发生解离, 转移到后行链上游同前起始复合物结合^[16](图 4)。 O'Donnell

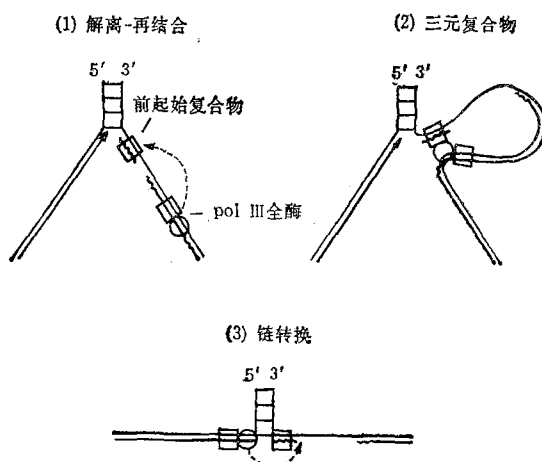


图 4 染色体复制叉处酶循环同前起始复合物结合图解
(自 O'Donnell, M. E., 1987)
示酶的三种循环方式

提出的全酶亚装配体以解离-再结合的方式循环转移, 不断起动合成新冈崎片段的模型是近几年研究成果的综合, 它突出了如下两点: (1) 后行链冈崎片断的合成是通过聚合酶亚装配体的分离与装配, 循环形成起始复合物进行的。(2) 说明了辅助蛋白的作用, 强调了复制体是处于动态变化中的结构。

参 考 文 献

- [1] Kornberg, A.: 1982 *Supplement to DNA Replication*, Freeman and Co., San Francisco, 1982.
- [2] Watson, J. D. et al.: *Molecular Biology of the Gene*, Benjamin/Cummings Pub. Co., 1987.
- [3] Wang, J. C.: *Nature*, 1974, 251, 249.
- [4] Kirchhausen, T. et al.: *Cell*, 1985, 41, 933.
- [5] Geider, K. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, 1981, 50, 233.
- [6] Wood, E. R. & Matson, S. W.: *J. Biol. Chem.*, 1987, 262(31), 15269.
- [7] Lahue E. E. & Matson, S. W.: *J. Biol. Chem.*, 1988,

ras P²¹ 蛋白与细胞增殖

陈 禹 保

(北京师范大学生物系, 北京)

提 要

本文论述了 ras P²¹ 蛋白的性质及 ras P²¹ 与细胞增殖调控的关系。ras P²¹ 蛋白可能通过调节细胞增殖信号的传递、周期运行等一系列生化事件来实现其功能。

许多研究表明: 细胞内存在的病毒同源性 DNA 序列对细胞的增殖和分化有调控作用^[1]。其中 ras 基因族是这类基因中引人注目之一, 据不完全统计, 在 42 种肿瘤病变中都发现有 ras 基因族的突变。近年来的研究发现 ras 基因的表达式有细胞周期依赖性, 与细胞增殖调控密切相关^[2,3]。ras 基因及其产物是怎样调控细胞生长、增殖、分化的? 以什么方式发挥作用呢? 这已成为细胞增殖调控和肿瘤发生学的中心问题之一。

ras P²¹ 的性质

哺乳类 ras 基因族至少可分为三类^[4]: Harvey、Kirsten 和 N-ras 基因。Harvey (Ha)、kirsten (ki)-ras 最初从它们相应的小鼠肉瘤病毒中分离出来, N-ras 基因从人的

神经胚胎瘤细胞中分离。由于这三种基因的产物都是 21,000 道尔顿的多肽分子, 故称为 rasP²¹; rasP²¹ 具有许多共同的特点^[5]:

具有与 GTP、GDP 结合的特性。ras P²¹ 象 G 蛋白一样, 能结合 GTP、GDP, 以 1:1 的比例结合成为一个 ras P²¹ · GTP 或 ras P²¹ · GDP 复合物, 且 ras P²¹ 对 GTP 的亲合力大于对 GDP 的亲合力, 因此 GTP 能把 ras P²¹ · GDP 复合物中的 GDP 置换出来, 以 ras P²¹ · GTP 的形式行使生物学功能。

具有弱 GTP 酶活性。象 G 蛋白一样, 能将结合的 GTP 水解, 由原来的 ras P²¹ · GTP 转变为 rasP²¹ · GDP, 并释放出无机磷 (Pi), 一旦发生水解, 其生物学功能随之消失; 若 ras 基因突变, 则 rasP²¹ · GTP 酶活性下降甚至消失, 但不降低对 GTP 的亲合力。

- 263(7), 3208.
- [8] Sancar, A. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1981, 78, 4274.
- [9] Kornberg, A.: *DNA Replication*, Freeman and Co., San Francisco, 1980.
- [10] Burgers, P. M. J. and Kornberg, A.: *J. Biol. Chem.*, 1982, 257(19), 11474.
- [11] Wu, Y. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1984, 259(25), 12117.
- [12] Hawker, J. R. & McHenry, C. S.: *J. Biol. Chem.*, 1987, 262(26), 12722.
- [13] Mok, M. & Marian, K. J.: *J. Biol. Chem.*, 1987, 262(34), 16644.
- [14] LaDuca, R. J. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1986, 261(16), 7550.
- [15] Johnson, K. & McHenry, Y. C.: *J. Biol. Chem.*, 1984, 259(11), 14589.
- [16] O'Donnell, M. E.: *J. Biol. Chem.*, 1987, 262(34), 16558.
- [17] Johnson, K. & McHenry, Y. C.: *J. Biol. Chem.*, 1982, 257(20), 12310.
- [18] Crute, J. J. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1983, 258(18), 11344.
- [19] Johnson, K. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1986, 261(25), 11460.
- [20] Lasken, R. S. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1987, 262(4), 1720.

[本文于 1988 年 2 月 8 日收到]