

动物细胞 DNA 聚合酶的研究新进展

蒋 达 和

(武汉大学病毒学及分子生物学系, 武汉 430072)

提 要

本文主要介绍动物细胞中四种依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶 (简称 DNA 聚合酶) 的结构、功能及其在 DNA 复制和修复作用中的研究现状。

关键词 DNA 聚合酶, DNA 复制, DNA 修复

1960 年, 在小牛胸腺细胞中发现了第一个动物细胞 DNA 聚合酶, 即 DNA 聚合酶 α ($\text{pol}\alpha$), 此后的 15 年内, 又陆续发现了另外三种 DNA 聚合酶即 $\text{DNApol}\beta$ 、 γ 和 δ ^[1]。现已了解他们的主要功能: $\text{pol}\alpha$ 和 δ 主要参与染色体 DNA 的复制, $\text{pol}\beta$ 与 DNA 的修复和重组有关, 而 $\text{pol}\gamma$ 则主要用于线粒体 DNA 的复制和修复。

一、DNA 聚合酶 α ($\text{pol}\alpha$)

DNA $\text{pol}\alpha$ 是一种分布于细胞核、含量较丰富的高分子 DNA pol , 由于纯化的 $\text{pol}\alpha$ 全酶都是含有 DNA 引物酶, 所以也称 DNA $\text{pol}\alpha$ -DNA 引物酶复合物。真核细胞的 $\text{pol}\alpha$ 全酶一般都由 4 个多肽组成, 根据多肽的大小和功能, 可将其分为三类: (1) 185—125kD 的大肽具有催化 DNA 聚合的活性, 为 $\text{pol}\alpha$ 的核心酶; (2) 68—77kD 多肽是 $\text{pol}\alpha$ 核心酶与引物酶缔合的固着蛋白; (3) 40—60kD 小肽, 具有 DNA 引物酶活性。

最近, Wong 等^[2]分析了编码人 DNA $\text{pol}\alpha$ 催化亚基的基因, 根据 DNA 序列推算出该亚基由 1462 个氨基酸组成, 分子量为 165kD。分子杂交实验证实该基因位于 X 染色体上的 $X_p21.3$ 至 $X_p22.1$ 之间的区域。现在已知, 从酵母到人的各种真核细胞中 DNA 引物酶都是多亚基 $\text{pol}\alpha$ 全酶中的一个组分。该酶的分子量, 除

了酵母的 65kD 和 HeLa 细胞的 70kD 以外, 通常为 46—59kD。例如小牛胸腺 DNA 引物酶是由 59 和 48kD 两个亚基构成^[3], 48kD 亚基具有合成 RNA 引物的活性, 而 59kD 亚基则是起稳定 48kD 亚基催化功能的作用。

目前已有许多证据表明 $\text{pol}\alpha$ 是染色体 DNA 的复制酶: (1) 细胞核及 SV40 DNA 的体内合成可被 $\text{pol}\alpha$ 的特异抑制剂强烈抑制; (2) $\text{pol}\alpha$ 单克隆抗体可以抑制核 DNA 的复制; (3) 小鼠 DNA $\text{pol}\alpha$ 的温度敏感突变细胞在非允许温度下不能复制其 DNA; (4) $\text{pol}\alpha$ 在 SV40 DNA 的体外复制中起着关键的作用; (5) 人的 $\text{pol}\alpha$ 一级结构与原核及真核 DNA 复制酶 (酵母 DNA polII) 具有广泛的同源性; (6) 在增殖细胞中, $\text{pol}\alpha$ 的活性与 DNA 的合成呈正相关关系。根据 $\text{pol}\alpha$ 通常与引物酶紧密结合, 且合成的产物为岗崎片段的现象, 推测 $\text{pol}\alpha$ 主要参与 DNA 双链复制过程中后续链的不连续合成^[4]。

通常认为高度纯化的 $\text{pol}\alpha$ 全酶缺乏核酸外切酶活性^[1], 但从果蝇 $\text{pol}\alpha$ 中分离出来的 182kD 催化亚基则含有 3'→5' 外切酶活性, 并可有效地切除引物末端的错配碱基^[5]。最近发现从人淋巴细胞中纯化的 DNA $\text{pol}\alpha$ 全酶也含有 3'→5' 核酸外切酶活性, 具有校正功能, 对 DNA 复制的精确性比无外切酶活性的

DNA pol α 提高 10—20 倍,但未确定其核酸外切酶活性到底位于哪个亚基上^[6]。

关于 DNA pol α 的活化机制, Sylvia 等^[7]发现低催化活性的小鼠肉瘤 DNA pol A₁ 被磷酸化后可提高其特异催化活性,与高催化活性的 DNA pol A₂ 相同,表明酶的磷酸化是 pol α 活化的一种潜在机制。以中和反应试验表明,该酶 49kD 小亚基的单克隆抗体可以抑制 DNA pol A₁ 的活化及其与 DNA 模板结合的亲和力,由于酶的催化活性增加与酶和模板/引物的亲和力有关,结果暗示, pol A₁ 的 49kD 亚基可能具有决定酶与模板/引物结合的功能。

二、DNA 聚合酶 β (pol β)

DNA pol β 是四种动物 DNA pol 中最简单的,其全酶为一条单一的多肽链,就其大小来说,各种真核细胞中的 pol β 是有差异的,哺乳动物为 35—40kD,而果蝇、植物和真菌是 70—110kD。最近已克隆了人和大鼠的 pol β 基因,并在大肠杆菌中高效表达^[8,9],证明 pol β 是由 318—335 个氨基酸组成的多肽,其二级结构为具有较多 α -螺旋的球状结构。利用体细胞杂交和分子杂交技术确定人的 pol β 基因是一个约 35kb 的单拷贝基因,位于第 8 染色体的短臂上。人和鼠的 pol β 基因结构基本相似,都是断裂基因,且都由三个外显子和两个内含子组成^[10]。

哺乳动物的 pol β 活性水平较低,在静止和分裂细胞中酶活水平均较稳定,说明 pol β 是一种组成型酶。目前一般认为该酶的主要功能是进行 DNA 修复和重组过程中的 DNA 合成, pol β 的前行率 (Processivity, 指聚合酶每一次与 DNA 模板结合至分离所掺入的核苷酸平均数) 很低 (约 5 个核苷酸)。纯化的 DNA pol β 无核酸外切酶活性,缺乏校正功能,使用天然 DNA 模板进行 DNA 合成时,核苷酸错误掺入频率为 1/1000—1/6600^[10],在 pol α 、 β 、 γ 和 δ 四种酶进行的 DNA 复制试验中, pol β 的移框突变频率最高。

既然 DNA pol β 缺乏核酸酶活性,那么它

在体内如何对受损伤的 DNA 进行修复呢? 人们发现 DNA pol β 常与一种具有双链 DNA 双向外切酶 (5'→3' 和 3'→5') 的 DNase V 以等克分子复合物一起分离出来,因而推测 DNase V 的活性与 DNA pol β 在体内的作用可能是偶联的, DNase V 将受损伤的核苷酸切除后,就由 DNA pol β 进行修复合成^[11],但其修复的详细机制和调控过程还不清楚。

三、DNA 聚合酶 γ (pol γ)

动物细胞 DNA pol γ 主要是从线粒体(mt)中分离而获得,也在细胞溶质和核中发现,其活性仅占细胞 DNA 聚合酶总活力的 1—5%。目前虽然从各种不同来源细胞和组织中分离出 DNA pol γ ,但高度纯化的只有鸡胚、小鼠骨髓瘤、果蝇和四膜虫细胞 mt 的 DNA pol。鸡胚和小鼠骨髓瘤细胞 mt DNA pol 是由相同的 47kD 亚基组成的四聚体,分子量约 180kD;果蝇 mt DNA pol 则是由 125kD 和 35kD 组成的二聚体;而四膜虫 pol γ 是 47kD 和 52kD 以等分子比例纯化,但用 pol γ 单克隆抗体中和反应分析表明, 52kD 多肽不产生中和沉淀,由于全酶分子量为 100kD,所以还不能确定该酶是同源还是杂合二聚体。从人的 kB 细胞和大鼠肝细胞中部分纯化的 pol γ 都具有 DNA 引物酶活性,但此活性可由甘油梯度离心或层析法除去,暗示在体内, DNA pol γ 在复制 DNA 时,可能与 DNA 引物酶有生理性或功能上的结合。

高度纯化的 pol γ 具有核酸外切活性,最近从猪肝细胞纯化出 160kD 的 pol γ ^[12],含有 3'→5' 外切酶活性,具有很高的复制精确性,复制 DNA 时错误碱基的取代低于 1/500000,当核酸外切酶活性被抑制时, DNA 复制的精确性也随之下降。目前还未确定 pol γ 的聚合活性与外切酶活性是否处于同一亚基。

关于 DNA pol γ 的功能,由于该酶主要分布在线粒体内,在 pol α 不存在或其活性被特异抑制的条件下都可观察到 mtDNA 的复制,因而认为 pol γ 主要参与 mtDNA 的复制和修

复。Patrick^[43] 利用含有复制起点的人 mt 重链 DNA 与 pol γ 进行体外复制实验,发现 mt 重链 DNA 上有 DNA-RNA 合成,当反应中加入抗 mtDNApol γ 的抗体时,可强烈抑制 TMP 的掺入,此结果为 pol γ 是 mtDNA 的复制酶提供了一个直接的证据。关于 mt 外 DNApol γ 的功能还不清楚,有人提出该酶可能在细小病毒 (Parvovirus) 的复制中起作用,此类病毒只有很小的基因组,很可能需要寄主细胞的 DNA pol 来复制其单链 DNA。

关于 pol γ 对 DNA 的修复作用,Randahl 等^[44] 使用含有小缺口的 PM₂ 双链 DNA 作底物,研究 mt 及 mt 外 pol γ 对 DNA 的修复作用,发现 mt pol γ 在 150mmol/L NaCl 浓度比在较低离子强度时更具有修复活性,可以有效地填补缺口,同时也具有一定的链取代合成能力;mt 外 pol γ 对离子强度不敏感,它也能有效地修复小缺口,但不能催化链取代合成。

四、DNA 聚合酶 δ (pol δ)

目前已从兔骨髓、小牛胸腺、人胎盘和 Hela 细胞中纯化出 pol δ ,分子量约为 220—300kD,就人胎盘 pol δ 来说,其多肽有 170、120 和 72—48kD 的分子,120kD 以下的分子都是纯化过程中蛋白酶解作用的产物^[44]。

DNA pol δ 的聚合活性可被碳酰二磷酸、四环双萜或 NEM 抑制,但对 BuPdGTP 则不敏感,其前行率可因加入一种 pol δ 辅助蛋白即增殖细胞核抗原/周期素 (PCNA/Cyclin) 刺激而增加。pol δ 含有 3'→5' 核酸外切酶活性,起校正作用,因而使该酶复制 DNA 时具有很高的精确性^[5]。由于从人淋巴细胞纯化的 pol α 和从果蝇 pol α 全酶中分离出来的催化大亚基与 pol δ 一样具有 3'→5' 核酸外切酶活性,对 BuPdGTP 不敏感,因而有人提出 pol δ 可能是 pol α 大亚基,但要确定它们之间的关系还需要进行染色体基因定位、克隆以及需要一级结构的证据。

过去对 pol δ 的主要功能不了解,现发现能抑制 pol α 和 δ 的抑制剂四环双萜可抑制通

透性 CV-1 细胞核 DNA 的复制,而只抑制 pol α 不抑制 pol δ 的 BuPdGTP 只能降低细胞核 DNA 复制;pol α 的单克隆抗体可以降低 DNA 复制,但不能完全抑制 DNA 复制;在小牛胸腺细胞中, pol α 和 δ 的活性是平行的;在 S 期的 CHO 细胞中, pol δ 活性占总复制活性的 80%,而 pol α 只占 20%,因而可以推测 pol δ 参与了核 DNA 的复制。最近 Nishida 等^[46] 从紫外线 (UV) 照射的 Hela 细胞中分离出一种 220kD 的 pol δ ,可使经 UV 照射的人成纤维细胞恢复 DNA 修复合成, pol α 和 β 都不能起这种细胞中的 DNA 修复合成,说明 DNA pol δ 也能催化 UV 诱导损伤 DNA 的修复合成。

pol δ 和 α 具有一些相同的特点: 两种酶都是高分子量,都是对 NEM、四环双萜和 are CTP 敏感,而对 ddNTP 具有抗性的酸性蛋白质。但它们也有许多不同的性质: (1) pol δ 含 3'→5' 外切酶活性, pol α 一般无此活性; (2) pol δ 不与引物酶缔合,其活性和前行率均受 PCNA/Cyclin 的明显影响,而 pol α 与引物酶结合,其活性和前行率不受 PCNA/Cyclin 影响。 (3) pol α 对 BuPdGTP 的敏感性比 pol δ 高 100 倍。 (4) pol α 和 δ 各自的单克隆抗体都不能抑制对方的活性。 (5) pol α 的前行率是中等(约 100 个核苷酸),而 pol δ 的前行率在 PCNA/Cyclin 存在时是很高的(大于 1000 个核苷酸)。 (6) pol δ 在复制 DNA 时能进行双链区域的链取代合成, pol α 则不能催化该反应。 (7) pol δ 在二甲亚砜的存在下被激活, pol α 则被抑制。 (8) 最近的肽谱分析证明 pol α 和 δ 无结构同源性^[17]。

根据 DNA pol α 和 δ 的性质和特点,有人认为这两种酶都参与染色体 DNA 的复制,并提出了这两种酶协调地进行 DNA 的先导链和后续链的复制合成假说。Prelich 等^[4] 利用 SV40 DNA 为模板进行体外复制实验,当 pol δ 的刺激因子 PCNA 存在时可合成双链 DNA 分子,而 PCNA 缺乏时只合成岗崎片段,暗示 pol δ 可能是先导链的复制酶。最近 Zuber 等^[48] 使用

表1 动物细胞四种 DNA 聚合酶的功能和性质

DNA 聚合酶		α	β	γ	δ
功能和性质					
细胞内分布		核	核	线粒体	核
占总 DNA 聚合酶活力(%)		50—60	5—10	1—5	20—40
主要功能		DNA 复制	DNA 修复	线粒体 DNA 复制	DNA 复制, 修复
全酶分子量 (kD)		150—600	35—40	100—310	220—290
核心酶分子量 (kD)		130—180	35—40	47—125	120—220
DNA 引物酶活性		+	—	+	—
核酸酶活性		—	—	3'→5' 外切酶	3'→5' 外切酶
最佳 MgCl 浓度 (mmol/L)		2—7	5—25	5—12	5—8
最适 pH		7.2	8—9	8—9	6—8
离子强度影响 (100mmol/L KCl)		强烈抑制	刺激	刺激	抑制
模 板	活性 DNA	+	+	+	+
	天然 RNA 模板-DNA 引物	—	—	—	—
	天然 DNA 模板-RNA 引物	+	—	+	—
	合成 RNA 模板-DNA 引物	—	+	+	—
	合成 DNA 模板-RNA 引物	+	+	+	+
抑 制 剂	NEM	+	—	+	+
	ddTTP	—	+	+	—
	ara-CTP	+	—	—	+
	四环双萜 (aphidicolin)	+	—	—	+
	BuPdGTP	+	—	—	—

未受精的爪蛙卵细胞, 也证实在活细胞中质粒 DNA 和染色体 DNA 的复制都需要 $\text{pol}\alpha$ 和 δ 两种酶催化。

最近, 已从 HeLa 和小牛胸腺细胞中纯化了一类对 PCNA 不敏感的 $\text{pol}\delta$ ^[19,20], 表明在动物细胞中存在对 PCNA 依赖型和非依赖型两种形式的 $\text{pol}\delta$, 前者的酶活性和前行率均受 PCNA 的刺激而增加, 其有效模板为多聚 (dA-dT); 后者不受 PCNA 所影响, 具很高的前行率, 有效模板引物为多聚 (dA)·寡聚 (dT), 对多聚 (dA-dT) 则无活性。免疫学和肽谱分析表明两种形式 $\text{pol}\delta$ 的结构具有许多同源性^[17]。由于酵母的 DNA pol III 对 PCNA 敏感, 而 pol II 则不敏感, 因而也认为它们可能分别为

两种形式 DNA $\text{pol}\delta$ 的类似酶。关于两种形式 $\text{pol}\delta$ 之间在结构、功能和性质上的关系还有待于进一步深入研究。

现把四种动物细胞 DNA 聚合酶的主要性质列于表 1。

参 考 文 献

- 1 Fry M, Loeb L A. *Animal cell DNA polymerases*, Inc Boca Raton, FL, CRC Press, 1986
- 2 Wong S W *et al.* *EMBO J*, 1988; 7: 37
- 3 Nasheuer H -P *et al.* *J Biol Chem*, 1988; 263: 8981
- 4 Prelich G *et al.* *Cell*, 1988; 53: 117
- 5 Reyland M E *et al.* *J Biol Chem*, 1988; 263: 6518
- 6 Bialek G *et al.* *EMBO J*, 1989; 8: 1833
- 7 Sylvia V I *et al.* *Int J Biochem*, 1989; 21: 347
- 8 Abbotts J *et al.* *Biochemistry*, 1988; 27: 901
- 9 Date T *et al.* *Biochemistry*, 1988; 27: 2983

蛋白分子的变构作用是学习过程的基本机制

沈 政

(北京大学心理系, 北京 100871)

提 要

本文综述了近年在学习记忆神经机制研究中的新进展, 分析了腺苷酸环化酶、NMDA 受体蛋白和 S_{100} 酸性蛋白等分子发生变构作用的条件及其与学习记忆过程的关系。这些蛋白分子的变构作用既制约于条件刺激又决定于非条件刺激, 两种刺激的结合就会实现较大的生物效应。这一规律表明, 这些蛋白分子的变构作用是学习过程的基本机制。

关键词 腺苷酸环化酶, NMDA 受体, 蛋白变构作用, 学习记忆机制

学习行为的神经机制, 一直是脑科学的热门研究课题。本世纪 30—50 年代, 经典神经生理学认为学习过程的神经基础是大脑皮质参与下暂时联系的形成, 即非条件刺激引起的强兴奋灶, 吸引了条件刺激引起的弱兴奋灶, 并使自身得到加强的过程。60 年代以来, 许多科学事实表明, 暂时联系的形成并不是大脑皮质的特殊功能, 而是中枢神经系统的一般特性。换言之, 在脊髓水平上也能完成学习行为的基本过程。暂时联系形成有其细胞学基础, 即一个神经元可与许多不同类型神经元发出的神经末梢形成大量突触, 称之为异源性突触。神经元异源性突触易化 (heterosynaptic facilitation), 则是学习过程的神经基础^[1]。80 年代以来, 一些实验室发现, 小脑深部结构是简单运动条件反射最基本最必须的成分^[2,3]。

尽管对学习过程神经机制的生理学研究,

取得了如此重大的进展; 可是近几年分子生物学的深入研究, 却引伸出具有更大突破性的新概念: 神经细胞膜上的一个特殊蛋白质大分子, 通过其自身的变构作用就能完成学习机制的基本过程。也就是说, 蛋白分子的变构作用是学习过程的基本机制^[4]; 神经网络和复杂脑结构并不是最必须的前提, 只是使学习过程多样化和对外界精确适应性得以实现的条件。那么, 哪些蛋白分子可能成为学习过程最基本的物质基础呢? 细胞膜上的酶蛋白、受体蛋白、离子通道蛋白都具有变构特性, 都可能成为学习过程的物质基础。

一、腺苷酸环化酶与无脊椎动物的学习过程

海兔体内仅有 25 个感觉神经元接受其虹管皮肤所受到的条件刺激(如轻触), 并将神经

- 10 Wilson S *et al.* *Biochem Biophys Acta*, 1988; 949: 149
- 11 Randahl H *et al.* *J Biol Chem*, 1988; 263: 12228
- 12 Kunkel T A *et al.* *Biochemistry*, 1989; 28: 988
- 13 Patrick L. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987; 146: 1146
- 14 Lee M Y W T *et al.* *Biochemistry*, 1988; 27: 5188
- 15 Roberts J D *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988;

- 85: 7064
- 16 Nishida C *et al.* *J Biol Chem*, 1988; 263: 501
- 17 Wong S W *et al.* *J Biol Chem*, 1989; 264: 5924
- 18 Zuber M *et al.* *Mol Cell Biol*, 1989; 9: 57
- 19 Syvaaja J *et al.* *J Biol Chem*, 1989; 264: 2489
- 20 Focher F *et al.* *Nucl Acids Res*, 1989; 17: 1805

[本文于 1989 年 9 月 25 日收到]