

DNA 连接酶同工酶的研究进展*

张波 孟紫强**

(山西大学环境医学与毒理学研究所, 山西大学生命科学与技术学院, 太原 030006)

摘要 DNA 连接酶是生物体内重要的酶, 其所催化的反应在 DNA 的复制和修复过程中起重要作用. DNA 连接酶分为两大类: 一类是利用 ATP 的能量催化两个核苷酸链之间形成磷酸二酯键的依赖 ATP 的 DNA 连接酶, 另一类是利用 NAD⁺ 的能量催化两个核苷酸链之间形成磷酸二酯键的依赖 NAD⁺ 的 DNA 连接酶. 研究发现, 细菌的 DNA 连接酶都是依赖 NAD⁺ 的, 且有非常相似的序列和相近的分子质量, 其酶分子分为两个功能区: N 端区与 NAD⁺ 结合形成酶-腺苷酸中间物; C 端区催化两条 DNA 链的连接. 所有真核生物的 DNA 连接酶都是利用 ATP 提供能量, 且一种真核生物含有多种 DNA 连接酶, 不同的 DNA 连接酶催化不同的 DNA 修复和复制过程: DNA 连接酶 I 的作用是将岗崎片段连接起来形成完整的 DNA 链以及进行碱基切除修复 (BER); DNA 连接酶 III 主要是在 DNA 修复中起作用, 即催化单核苷酸碱基切除修复. DNA 连接酶 II 可能是 DNA 连接酶 III 的一个片段.

关键词 蛋白质结构, 岗崎片段, DNA 修复, DNA 复制

学科分类号 Q55

自 1967 年发现 DNA 连接酶以来, 已从各种生物中分离纯化出不同的 DNA 连接酶, 运用各种分子生物学技术对不同的 DNA 连接酶进行克隆、测序, 并采用 X 射线晶体学方法测定酶的晶体结构. 同时, 对各种 DNA 连接酶同工酶的具体功能和催化机理的研究也取得了很大进展.

已知的真核生物以及真核生物病毒的 DNA 连接酶都是依赖 ATP 的. 大多数真核细胞都含有一种以上的 DNA 连接酶, 且大量事实证明这些不同的连接酶具有专一性, 分别催化不同的 DNA 修复和复制过程. 虽然这些酶的分子质量和序列不同, 但每种酶都含有 6 个结构域, 且每个结构域之间具有保守的间距, 酶的 N 端和 C 端也通过一段序列与这些结构域相连^[1]. 可能是这些不同的序列使不同的连接酶具有不同的功能.

1 DNA 连接酶 I

DNA 连接酶 I (分子质量 102 ku), 可能是真核生物 DNA 复制过程中的主要连接酶, 其活性受 N 端靠近活性中心的一个特定部位的磷酸化作用调节. 其作用是在复制叉处将岗崎片段连接在一起. 缺乏 DNA 连接酶 I 的小鼠能存活, 表明其他的连接酶能补偿连接酶 I 的作用. 在体外, 此位点不是酶活性所必需的, 但去除此部位则使酶持续保持酶活性. 在体内, 连接酶 I 的 N 端是必不可少的,

因为 N 端除含有调节酶活性的磷酸化位点外, 还含有一些重要的残基将酶与复制位点连在一起^[2,3].

DNA 连接酶 I 在复制过程中不单独起作用, 而是与多个蛋白质因子紧密配合完成复制过程. 真核细胞后随链的合成起始是由 DNA 聚合酶 α 催化的, 此酶先催化合成一个由 RNA 和 DNA 组成的约 40 bp 的起始物, 然后在 DNA 聚合酶 δ 与持续复制因子——增殖细胞核抗原 PCNA^[4] 的共同催化下, 从起始物合成 DNA, 合成开始后, 起始物被降解除去. 在体外, 连接酶 I 能与 PCNA 三聚体结合并抑制聚合酶 δ 催化的 DNA 合成^[5], 在此过程中, 必须有连接酶 I 的前 118 个氨基酸参与.

DNA 连接酶 I 在碱基切除修复 (BER) 过程中也起重要作用. 首先, 从 DNA 双螺旋中除掉损伤的碱基, 留下缺口, 然后切除约 30 bp 的一段 DNA, 以另一条完整的 DNA 链为模板重新合成这段 DNA, 最后连接酶 I 将这段 DNA 与原来的 DNA 链连接起来, 在体外, 连接酶 I 形成三聚体结合三分子 DNA 聚合酶 β , 其结合部位在两种酶的靠近 N 端^[6].

* 国家自然科学基金资助项目 (30070647).

** 通讯联系人.

Tel: 0351-7011895, E-mail: zqmeng@sxu.edu.cn

收稿日期: 2000-11-06, 接受日期: 2001-01-20

总之, 在核中连接酶 I 至少参与两个不同的过程: 岗崎片段的连接和碱基切除修复 (BER). 类似连接酶 I 的酶蛋白可能存在于所有真核细胞. 如酿酒酵母的 *cdc9* 基因编码的酶蛋白与人 DNA 连接酶 I 非常相似, *cdc9* 基因突变导致酿酒酵母丧失 DNA 复制和修复能力, 从而使岗崎片段积累, 由此认为此蛋白质在酿酒酵母细胞内具有同连接酶 I 相同的功能. 最近报道, 从一种高等植物克隆出类似 DNA 连接酶 I 的 cDNA^[7], 其产物能使 *cdc9* 基因突变体恢复 DNA 复制和修复能力, 这说明不同来源的 DNA 连接酶 I 在结构和功能上具有高度保守性.

2 DNA 连接酶 II

DNA 连接酶 I 是哺乳动物中最早发现的连接酶. 不久又发现了 DNA 连接酶 II. 随后, 通过分子克隆技术又发现了 DNA 连接酶 III. 连接酶 II 的分子质量远小于连接酶 III, 且连接酶 II 中至少有 160 个氨基酸残基序列与连接酶 III 完全一致. 这表明连接酶 II 事实上是连接酶 III 的一个片段. 但目前还不清楚连接酶 II 是连接酶 III 在纯化过程中形成的降解产物还是正常的生理形式. 对此, 有待进一步研究.

3 DNA 连接酶 III

哺乳动物 *lig3* 基因编码两种连接酶——连接酶 III α (103 ku) 和连接酶 III β (96 ku), 这两种酶的区别在 C 端. 在体内连接酶 III α 与 X 射线交叉补体因子 (XRCC1) 形成复合物, 此复合物已被纯化. 而连接酶 III β 不能与 XRCC1 结合^[8,9]. 缺少 XRCC1 的细胞不能进行单核苷酸碱基切除修复. 由此认为连接酶 III α 和 XRCC1 通过存在于酶 C 端和 XRCC1 中的 BRCT 结构域相结合, 催化单核苷酸碱基切除修复. 另外, 发现在细胞周期 DNA 复制期的一些蛋白质因子中也有 BRCT 结构域的存在, 因此认为 BRCT 结构域能部分控制碱基切除修复和 DNA 复制过程^[10]. 缺失突变实验也证明, 连接酶 III α 缺失 C 端 BRCT 结构域则不能进行碱基切除修复和 DNA 复制, 但与 BRCT 结构域折叠有关的关键氨基酸——色氨酸的突变却不影响其结合^[11,12].

在连接酶 III α 和连接酶 III β 的 N 端有一段氨基酸序列与多聚 (ADP-核糖) 聚合酶锌指环结构有约 30% 的一致性, 并且连接酶 III 与多聚 (ADP-核

糖) 聚合酶在结构上也相似, 抗多聚 (ADP-核糖) 聚合酶锌指环结构的抗体也能与连接酶发生交叉反应^[13]. Caldecott 等发现连接酶 III 能抑制多聚 (ADP-核糖) 聚合酶的活性并与 DNA 缺口结合, 去掉 N 端类似锌指环的结构则失去酶活性, 但锌指环结构域却不是连接反应所必需的^[14], 所以他们提出假设, 连接酶 III 中的类似锌指环的顺序起一个“缺口传感蛋白”的作用, 促使其靠近 DNA 缺口并提高 DNA 结合的亲和力.

最近, 从哺乳动物线粒体分离到一种 DNA 连接酶^[15], 其功能可能是催化包括线粒体 DNA 在内的 DNA 修复作用. 此酶是由核基因编码的, 与连接酶 III 在酶学与免疫学方面均很相似.

所有真核生物 DNA 连接酶不是单独起作用的, 而是需要许多蛋白质因子的共同参与. 研究酶蛋白与各种蛋白质因子结合部位的结构将有助于我们搞清楚这些蛋白质因子是如何协助连接酶起 DNA 连接作用的.

综上所述, 目前对 DNA 连接酶同功酶的结构和功能已进行了大量的研究. 通过进一步的综合研究, 将更详细更全面地了解各种 DNA 连接酶在 DNA 复制和修复中的作用.

参 考 文 献

- 1 Tomkinson A E, Levin D S. Mammalian DNA ligases. *BioEssays*, 1997, **19** (4): 893~ 901
- 2 Cardoso M C, Joseph C, Rahn H P, *et al.* Mapping and use of a sequence that targets DNA ligase I to sites of DNA replication *in vivo*. *J Cell Biol*, 1997, **139** (3): 579~ 587
- 3 Cardoso M C, Leonhardt H. Protein targeting to subnuclear higher order structures: a new level of regulation and coordination of nuclear processes. *J Cell Biochem*, 1998, **70** (2): 222~ 230
- 4 Waga S, Stillman B. The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem*, 1998, **67** (4): 721~ 751
- 5 Levin D S, Bai W, Yao N, *et al.* An interaction between DNA ligase I and proliferating cell nuclear antigen: implications for Okazaki fragment synthesis and joining. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (18): 12863~ 12868
- 6 Dimitriadis E K, Prasad R, Vaske M K, *et al.* Thermodynamics of human DNA ligase I trimerization and association with DNA polymerase beta. *J Biol Chem*, 1998, **273** (32): 20540~ 20550
- 7 Taylor R M, Hamer M J, Rosamond J, *et al.* Molecular cloning and functional analysis of the Arabidopsis thaliana DNA ligase I homologue. *Plant Journal*, 1998, **14** (1): 75~ 81
- 8 Mackey Z B, Ramos W, Levin D S, *et al.* An alternative splicing event which occurs in mouse pachytene spermatocytes a form of DNA ligase III with distinct biochemical properties that may function in meiotic recombination. *Mol Cell Biol*, 1997, **17** (5): 989~ 998
- 9 Nash R A, Caldecott K W D, Barnes E, *et al.* XRCC1 protein interacts with one of two distinct forms of DNA ligase III. *Biochemistry*, 1997, **36** (17): 5207~ 5211

- 10 Bork P, Hofmann K, Bucher P, *et al.* A superfamily of conserved domains in DNA damage responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEB J*, 1997, **11** (1): 68~ 76
- 11 Taylor R M, Wickstead B, Cronin S, *et al.* Role of a BRCT domain in the interaction of DNA ligase III α with the DNA repair protein XRCC1. *Curr Biol*, 1998, **8** (4): 877~ 880
- 12 Zhang X D, Morera S, Bates P A, *et al.* Structure of an XRCC1 BRCT domain: a new protein-protein interaction module. *EMBO J*, 1998, **17** (48): 6404~ 6411
- 13 Mackey Z B, Niedergang C, Murcia J M, *et al.* DNA ligase III is recruited to DNA strand breaks by a zinc finger motif homologous to that of poly (ADP-ribose) polymerase. Identification of two functionally distinct DNA binding regions within DNA ligase III. *J Biol Chem*, 1999, **274** (31): 21679~ 21687
- 14 Taylor R M, Whitehouse J, Cappelli E, *et al.* Role of the DNA ligase III zinc finger in polynucleotide binding and ligation. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26** (21): 4804~ 4810
- 15 Pinz K G, Bogenhage D F. Efficient repair of abasic sites in DNA by mitochondrial enzymes. *Mol Cell Biol*, 1998, **18** (7): 1257 ~ 1265

Recent Advances in DNA Ligase Isozymes*

ZHANG Bo, MENG Zi Qiang**

(*Institute of Environmental Medicine and Toxicology, Life Science and Technology College, Shanxi University, Taiyuan 030006, China*)

Abstract DNA ligases are important enzymes of DNA metabolism. The reaction of nicked DNA joining catalyzed by the DNA ligase is required in DNA replication and in DNA repair pathways that require the re-synthesis of DNA. The recent advances in isozyme DNA ligase are summarized: bacteria DNA ligases are all NAD⁺-dependent and their sequences show a considerable degree of similarity and all are approximately the same size (~ 75 ku). All known eukaryotic DNA ligases are powered by ATP. DNA ligase I is required for Okazaki fragment joining and some repair pathways; DNA ligase II appears to be a degradation product of ligase III; DNA ligase III has several isoforms, which are involved in repair and recombination of DNA.

Key words protein structure, Okazaki fragment, DNA repair, DNA replication

* This work was supported by a grant from National Natural Sciences Foundation of China (30070647).

** Corresponding author. Tel: 86-351-7011895, E-mail: zqmeng@sxu.edu.cn

Received: November 6, 2000 Accepted: January 20, 2001