

doi:10.3969/j.issn.0253-9608.2012.04.008

DNA 聚合酶 III 全酶的功能和结构的发现

向义和

教授,清华大学物理系,北京 100084

关键词 DNA 聚合酶 III DNA 聚合酶 III* 共聚物酶 III* α 核心聚合酶 ϵ 亚基 β 亚基滑动夹子 γ 复合物

介绍了 DNA 聚合酶 III 和聚合酶 III* 的发现, DNA 聚合酶 III 全酶形式的提出以及全酶亚基的分离。同时,介绍了 DNA 聚合酶 III 全酶的结构和功能,其中包括 α 核心的聚合酶功能, ϵ 亚基的 3'→5' 外切核酸酶活性, β 亚基滑动夹子的功能以及 γ 复合物的结构与功能。

DNA 聚合酶 III 全酶(DNA polymerase III holoenzyme)是 DNA 复制中最主要的酶,是能够进行引物链的延伸并完成 DNA 的前导链和后随链合成的酶。全酶是一个多亚基酶。它具有很快的复制速率和很高的延伸能力,大约每秒合成 750 个核苷酸,与在大肠杆菌中观察到的复制叉运动速率是一致的,比 DNA 聚合酶 I (pol I) 的每秒合成 10~20 个核苷酸的速率快。这样快的速率来自于全酶的高度持续合成能力。

笔者分 4 部分介绍了 DNA 聚合酶 III 全酶的结构和功能发现的历程。第 1 部分介绍了 DNA 聚合酶 III (pol III) 的发现。第 2 部分介绍了 DNA 聚合酶 III* 的发现和全酶形式的分离。第 3 部分介绍了 DNA 聚合酶 III 全酶亚基的分离。第 4 部分介绍了 DNA 聚合酶 III 全酶的结构和功能,其中包括核心 α 的聚合酶功能, ϵ 亚基的 3'→5' 外切核酸酶活性, β 亚基滑动夹子的功能以及 γ 复合物的结构与功能。

1 DNA 聚合酶 III 的发现

在 DNA 聚合酶 I 被分离出来后不久,大量实验事实证明它不适于庞大的 DNA 复制过程。第一,它添加核苷酸的速度(600 个/min)仅为大肠杆菌细胞中复制叉移动速度的 1/100 左右。第二, DNA 聚合酶 I 的连续合成的能力相对较低。第三,对基因的研究表明,许多基因和蛋白质参与了复制过程,显然 DNA 聚合酶 I 不会单独起作用。第四,约翰·凯恩斯(John Cairns)分离出一个因基因突变而不能合成有活性的 DNA 聚合酶 I 的菌株。虽然该菌株对那些可能破坏 DNA 的试剂异常敏感,但确实存在。

1969 年冷泉港实验室的研究员凯恩斯和露西亚

(Paula De Lucia)在编码 pol I 的 *polA* 基因中分离出一种具有缺陷的突变体。这个突变体(*polA I*)缺少 pol I 活性,但它还是有活力的,从而有力地提出 pol I 实在不是 DNA 复制酶,而好像是在 DNA 损害的修复中起着主要的作用。它填充在排除错误碱基后留下的空隙。这年 12 月他们在 *Nature* 第 224 卷上发表题为《受突变影响的大肠杆菌菌株 DNA 聚合酶的分离》的论文。在文章一开始就写道:“科恩伯格关于在试管中能够精确复制 DNA 的酶的发现在分子生物学历史上是关键的一步。因为它牢固地确立了这个事实,对于能够复制全体的机制的编码只需要细胞 DNA 的一小部分。在那时正确地判断在体内负责 DNA 复制的酶是不是这个酶是不太重要的。然而,从那时以来已经累积的间接的证据表明,无论在细菌中这个特殊的酶是用于 DNA 的修复而不是它的复制。在高温下不可能复制它们的 DNA 的大肠杆菌和枯草杆菌的各种各样突变体,已经完全表明在不容许的温度下包含了正常的聚合酶和脱氧核苷三磷酸库,至少其中之一已经表明在高温下进行了修复合成。”^[1]

在凯恩斯文章发表的同时,爱丁堡大学分子生物系教授 J. Gross 和 M. Gross^[2]在 1969 年 *Nature* 第 224 卷上发表题为《具有影响 DNA 聚合酶突变的大肠杆菌菌株的基因分析》的论文。他们在文章一开始就写道:“凯恩斯和露西亚已经报告了分离的大肠杆菌突变株不同于亲代株的 3 大特征:在提取物中极大地减少了 DNA 聚合酶活性,增加了对紫外光辐射的敏感性和增加了对磺化甲烷的敏感性。由凯恩斯和露西亚提出的证据表明,这些性质大致是单个损伤定位在 DNA 聚合酶的结构基因上的结果。我们建议相应的基因座称为 *polA*,而在此研究的特殊突变是 *polA I*。”通过实验他

们证实 *polA* 定位在染色体的 *met B* 区域, *polA I* 是琥珀型突变(amber mutant)^[2]。

1969 年约翰·凯恩斯从大肠杆菌中分离到的一种缺少 DNA 聚合酶仍然以正常的速率生长和繁殖的突变株, 成为了责难 DNA 聚合酶和科恩伯格的有力证据。*pol I* 不是主要复制酶的发现, 激励起了对真实 DNA 复制的重新研究。在 1971 年, 哥伦比亚大学汤姆·科恩伯格(Thomas Kornberg)和马尔科姆·杰夫塔(Malcolm Gefter)发现了两个新的聚合酶活性: DNA 聚合酶 II 和 III (*pol II* 和 *pol III*)。我们将看到 *pol III* 是有效的复制酶。

1970 年在《自然·新生物学》(*Nature: New Biology*)杂志上发表了一系列针对 DNA 聚合酶和科恩伯格的责难性评论。在这个时候, 阿瑟·科恩伯格的儿子汤姆·科恩伯格加入到冲突中。1970 年 5 月汤姆因左手食指上的肿瘤恶化而使他在朱利亚音乐学院的大提琴课程不可能继续下去。其次, 他就读的哥伦比亚大学, 在生物学课程中, DNA 聚合酶受人蔑视, 他为此感到伤心。既然他无法再演奏大提琴, 汤姆想知道他是否能参与在凯恩斯突变株中寻找失踪的聚合酶^[3]。

结果没让人失望。汤姆在哥伦比亚大学生物系的马尔科姆·杰夫塔实验室获得了一席之地, 接着在 3 个星期内, 他就在大肠杆菌细胞中发现了一种 DNA 多聚酶, 这种酶与他父亲已经发现的不一样。1970 年 9 月, 仅仅在他进入实验室 3 个月后, 他向每 3 年一次在瑞典举办的生物化学国际会议提交了他轰动性的发现。在第 2 年, 汤姆以研究生的身份提纯了这种新的多聚酶, 并命名之 DNA 聚合酶 II (*pol II*)。他可以清楚地将它和 DNA 聚合酶 I (*pol I*) 分开。在色谱分析过程中, 他注意到还有一条聚合酶带从 DNA 聚合酶 II 中完全分离出来, 它所在的位置在普通细胞制剂中被 DNA 聚合酶 I 占据, 从而使之隐藏。尽管富有经验的酶学专家提出强烈的反对意见, 认为这个新的染色体带像是技术假象, 汤姆坚持己见, 并证实它是一个不同的实体, 将其命名为 DNA 聚合酶 III (*pol III*)^[3]。

1971 年 12 月汤姆·科恩伯格等^[4]在《美国国家科学院院报》第 68 卷上发表题为《在大肠杆菌突变体中对 DNA 聚合酶在 DNA 合成中的热敏性的分析》的论文。这篇文章介绍了他们构建了一系列含有 DNA 合成热敏性突变(*dnaA, B, C, D, E, F, G*)和凯恩斯与露西亚的 *polA I* 的双突变体。在每个突变体中他们测量了 DNA 聚合酶 II 和聚合酶 III 的活性。在测试的所有株中 DNA 聚合酶 II 的活性是正常的。在 *dnaE* 基因座上具有热敏性突变的这些株中 DNA 聚合酶 III 的活性是特别热敏

的。从这些结果他们得出结论: DNA 聚合酶 II 和聚合酶 III 是独立的酶, DNA 聚合酶 III 是大肠杆菌中 DNA 复制最主要的酶^[4]。

文章一开始他们写道:“由凯恩斯和露西亚对缺少 DNA 聚合酶 I 活性的大肠杆菌突变体 *polA I* 的分离, 已经促使许多人研究这类菌株的 DNA 合成能力。我们和其他人已经报告了 DNA 聚合酶 II 的提纯和特征。此外, 我们又报告了在大肠杆菌中第 3 种 DNA 聚合酶 (DNA 聚合酶 III) 的存在, 但是还没有测定这些酶的生理学功能。”

他们接着指出:“没有适量 DNA 聚合酶 I 活性的具有生存能力的细胞表明, DNA 聚合酶 I 不是大肠杆菌 DNA 复制机制的必须的组分。为了确定聚合酶 II 和聚合酶 III 是不是复制的主要组分, 我们检验了对 DNA 复制温度敏感的大肠杆菌突变体的 DNA 聚合酶, 试图使试管中的基因突变与改变的 DNA 聚合酶活性建立联系。我们提出的证据表明 DNA 聚合酶 III 是在 *dnaE* 基因座上基因表达的主要产物。”^[4]

文章的最后报告了他和杰夫塔在磷酸纤维素层析的基础上区别 DNA 聚合酶 II 和聚合酶 III (图 1)。其中图 1(a)是从 *polA I* 株的无细胞提取物中分离 DNA 聚合酶, 图 1(b)是来自野生型大肠杆菌细胞中分离 DNA 聚合酶。测定每个组分的 DNA 聚合酶 I 活性, 分别在

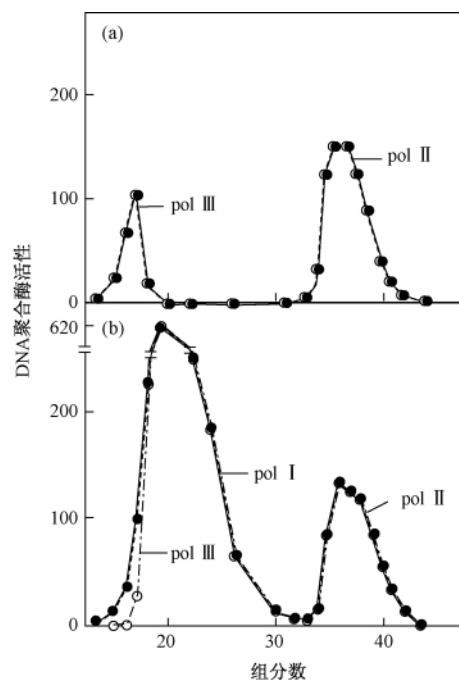


图 1 DNA 聚合酶的磷酸纤维素层析分离(纵坐标为 DNA 聚合酶活性, 横坐标为组分数)
(a) 在 *polA I* 中, (b) 在野生型细胞中

35~45 和 12~19 组分中洗脱聚合酶 II 和聚合酶 III 活性。典型分离的结果如图 1 所示,在图 1(a)中 pol II 与 pol III 和 pol I 分离得很好,但在野生型细胞中 pol III 被 pol I 掩盖,见图 1(b)^[5]。

2 DNA 聚合酶 III* 的发现和全酶形式的分离

1973 年 6 月,科恩伯格和他的同事发现 DNA 聚合酶 III 的新形式 pol III* 和共聚物酶 Copol III*, 提出全酶是由两个 pol III 亚基和两个 Copol III* 亚单位组成的四聚体。1974 年科恩伯格和他的同事进一步研究了 DNA 聚合酶 III 全酶形式(holoenzyme form)的分离和性质。

2.1 DNA 聚合酶 III* 和共聚物酶 III* 的发现

1973 年 6 月,科恩伯格和他在斯坦福大学医学院生物化学系的同事^[6]在《美国国家科学院院报》第 70 卷上发表题为《DNA 聚合酶 III 的新形式和共聚物酶复制长的单链引物模板》的论文。在摘要中介绍了 DNA 聚合酶 III 的新形式和共聚物酶的发现。他们写道:“一种称为 pol III 星(pol III*) 的 DNA 聚合酶 III 的新形式已经从大肠杆菌提纯到均一性。像对 pol III 描述的一样,当从热敏的 *dnaE* 突变株分离时 pol III* 是温度敏感的。pol III* 和 pol III 是通过凝胶过滤分离的。pol III* 利用包含短缺口的双链体模板,具有像 pol III 一样相同的催化性质。然而,如果提供以下物品:亚精胺,引物片段和称为共聚物酶 III* (Copol III*) 的新蛋白质, pol III* 可以复制长的单链模板,如同聚物链, M13 和 Φ X174 的病毒圆环。已提纯到均一性的 Copol III* 没有已知的独立酶的活性,而维持合成是由 pol III* 而不是由 pol I, pol II 或 pol III。”^[6]

文章一开始概括地叙述了 pol III* 和 Copol III* 发现的背景。他们写道:“在大肠杆菌提取物中发现 M13 和 Φ X174 单链圆环 DNA(single-stranded DNA, ssDNA) 转变成双链复制形式(replicating form, RF) 依赖于特殊的热酶系统。M13 复制需要 RNA 聚合酶起始合成,而 Φ X 需要一个新型的 RNA 合成系统,而且也包含 *dnaA*, *dnaB*, *dnaC*—D 和 *dnaG* 基因产物。发现 M13 和 Φ X 两者的复制需要 *dnaE* 基因产物,杰夫塔等人认为是 DNA 聚合酶 III (pol III)。”^[6]

接着又写道:“在提纯复制 M13 和 Φ X DNA 的酶时,我们发现提纯的 pol III 没有活性,而是这种酶的一种新型的,大概更复杂的形式,在此称之为 pol III* 的负责链的生长。一种附加的蛋白质,共聚物酶 III* (Copol

III*) 对于 pol III* 作用是必不可少的。”^[6]

接着叙述了 pol III* 和 Copol III* 复制系统的提纯过程,通过在凝胶电泳中呈现单带,可以判断 pol III* 和 Copol III* 是均一的,相对分子质量分别为 90 和 77 kDa。

关于 Copol III* 对于 pol III* 的特殊性,作者写道:“对于在一条长的单链模板,例如 RNA 引导的 Φ X 单链上 pol III* 的作用, Copol III* 是必不可少的(表 1),但是对于具有短缺口的双链 DNA 的复制不是必须的。像从科恩伯格和杰夫塔的研究中所预期的一样,用单链模板 pol III 是没有活性的,而 Copol III* 没有影响(表 1), Copol III* 既不影响 pol I 的作用,也不影响 pol II 的作用。”^[6]

表 1 模板和 Copol III* 的酶的特殊性

聚合酶	Copol III*		RNA 引导的	活化的胸腺
	/units	/ μ g	Φ X 单链/ μ mol	/pmol
pol I	0.05	0.00	4	35
	0.05	0.08	4	38
pol II	0.01	0.00	0	5
	0.01	0.08	0	5
pol III	0.03	0.00	0	14
	0.03	0.08	0	17
pol III*	0.15	0.00	3	67
	0.15	0.08	32	62

通过凝胶过滤和磷酸纤维素层析,他们从 pol III 分离出 pol III*, 又从 pol III* 与 pol III 的比较中,发现复制带有缺口的双链模板显示了 pol III* 不同于 pol III 的特征。最后在讨论 pol III* 与 pol III 的联系时,他们写道:“我们对酶促 M13 和 Φ X 单链病毒圆环转变到双链复制形式的研究已经把 DNA 聚合酶 III 的新形式显示为这个酶是造成这个复制的主要原因。这个称为 pol III* 的新酶显然是以下面方式与 pol III 相联系的:(a) *dnaE* 基因的产物,(b) 在复制具有短缺口的双链体模板具有相同的特征(用盐抑制,用于脱氧核苷三磷酸的高米氏常数 K_m 的促进),(c) 通过加热 pol III* 转变成 pol III。pol III* 与 pol III 的不同之处是:(a) 当另一个蛋白质 Copol III* 也存在时, pol III* 具有复制长的单链模板的能力,(b) 在琼脂糖凝胶上和磷酸纤维素层析上分离这两种酶的物理特征。”

接着写道:“pol III* 和 Copol III* 也已经分离成接近均一的状态,人们有可能确定一方面是 pol III* 和 pol III 之间物理特性的不同,另一方面是 pol III* 和 Copol III* 的相互作用。pol III* 可能是由包括 pol III 的核心单位、具有同样尺寸的亚单位组成的全酶,或者它可能简单地是 pol III 的多聚的不对称的形式。”^[6]

2.2 DNA 聚合酶 III 全酶形式的分离

1974 年 10 月, 科恩伯格和他在斯坦福大学医学院生物化学系的同事 W. Wickner^[7] 在《生物化学杂志》第 249 卷上发表题为《DNA 聚合酶 III 全酶形式的分离和性质》的论文, 提出了 DNA 聚合酶 III 的全酶形式和全酶的亚基结构。

文章一开始作者就叙述了在 ssDNA 复制成双链复制形式的时候, DNA 聚合酶 III* (pol III*) 和共聚物酶 III* (Copol III*) 是必不可少的。他们写道: “DNA 聚合酶 III (pol III) 是 *dnaE* 基因的产物, 在 Φ X174 和 M13 单链病毒 DNA (ssDNA) 转变成双链复制形式时是没有活性的。然而, 这个酶的一种比较复杂的形式 DNA 聚合酶 III* (pol III*), 在附加的蛋白质共聚物酶 III* (Copol III*) 存在时, 能够催化这个转变。用 RNA 引导的 ssDNA 模板作为开始, 在这个过程中的第一步是由引物模板, 亚精胺 (或 DNA 解链蛋白), ATP 和两个蛋白质 pol III* 和 Copol III* 组成的初始复合物的形成。在这一步, ATP 分裂成 ADP 和无机磷酸。一旦形成这个复合物, ssDNA 复制成双链复制形式, 就既不需要 ATP 也不需要 Copol III*。在这个反应中, pol III 不能代替 pol III*, 在物理性质和催化性质上 pol III* 不同于 pol III, pol III* 好像是 pol III 的多聚形式。”^[7]

在此基础上他们概括出 DNA 聚合酶 III (pol III) 的 3 种形式, 写道: “称为全酶的 DNA 聚合酶 III (pol III) 的新形式已经从慢慢溶解的大肠杆菌提纯到明显的均一性。在它们的不同的物理特征和它们利用主要的单链模板的能力的基础上现在已经辨别出 pol III 的 3 种形式: (a) pol III 是 90 kDa 亚基的二聚体, 在单链环形的 DNA 上没有活性; (b) pol III* 是 pol III 的较高的多聚体, 只有在具有 77 kDa 的多肽, 共聚物酶 III* (Copol III*) 存在时才在 ssDNA 上具有活性; (c) 全酶是具有 330 kDa 的四体, 由两个 pol III 亚基和两个 Copol III* 亚单位组成, 根据在附加的 Copol III* 不存在时在 ssDNA 上它的活性, 把全酶和 pol III 或 pol III* 区分开。通过在磷酸纤维素上层析, 全酶分离成 pol III* 和 Copol III*; 通过加热、稀释或冷却, pol III* 转变成 pol III。像 pol III* 一样, 全酶需要 ATP 以便形成具有引物模板的初始复合物。”^[7]

接着, 他们又补充说明, 现在已经发现 pol III 的第三种形式 pol III 全酶是更天然的形式。用 pol III 全酶复制 ssDNA 模板不需要附加的 Copol III*, 而类似于在全酶对 Copol III* 抗体敏感中和对 ATP 的依赖中由 pol III* 和 Copol III* 的混合物共同催化。通过在磷酸纤维素上层析, 全酶分离成 pol III*, *dnaE* 多肽和 Copol III* 的四

聚体; 当分离 *dnaE* 突变株细胞时, pol III* 是热敏的。通过冷却, 稀释或温和地热处理 pol III* 能够可逆地转变成 pol III。

亚基 (subunit) 是蛋白质的最小共价单位, 它可以由一条多肽链或以共价键连接在一起的几条多肽链组成。作者在全酶的亚基结构一节中写道: “在 1% 十二烷基硫酸钠, 1% β -巯基乙醇中加热全酶 (10 μ g) 并经聚丙烯酰胺凝胶电泳 (图 2)。在 90 kDa 和 77 kDa 处看到两条显著的蛋白质带。给同样的凝胶加上 2, 4 和 6 μ g 提纯的全酶。在用 Coomassie 蓝着色后, 在 580 nm 处扫描凝胶, 切下 90 和 77 kDa 的峰显迹并称量。当对两个峰的重量比作相对分子质量方面的校正时, 观察到了两个多肽相等的克分子数的比率 (表 2)。假定这个 90 kDa 多肽是 pol III 是 *dnaE* 多肽, 而 77 kDa 多肽是 Copol III*。”^[7]

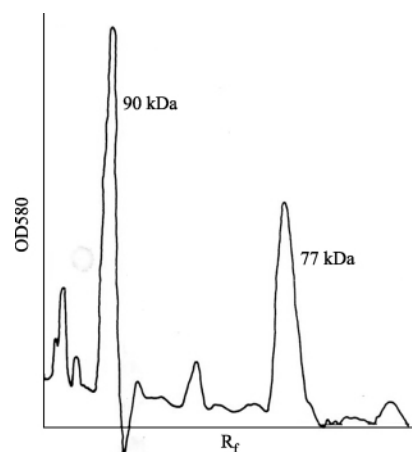


图 2 全酶的凝胶电泳 (R_f 为相对迁移率, OD 580 为 580 nm 时的光密度)

表 2 在全酶中亚基的比率

实验编号	全酶 / μ g	Copol III* : pol III	
		相对分子质量比率	分子数比率
1	2	0.89	1.04
2	4	1.00	1.17
3	6	0.90	1.05

为了确定全酶的相对分子质量, 通过生物凝胶 A-5 m 柱过滤它并在甘油梯度中沉降, 凝胶过滤和甘油梯度沉降两者表明, 全酶相对分子质量大于过氧化氢酶 (247 kDa), 但是小于 RNA 聚合酶 (490 kDa)。在这些数据和 90 与 77 kDa 多肽的等克分子数比率 (表 2) 的基础上, 假定全酶是大于二体 (167 kDa) 而小于六体 (501 kDa), 因此最可能是具有 334 kDa 相对分子质量由两个 pol III 多肽和两个 Copol III* 多肽组成的四体。

关于 pol III* 和 Copol III* 的结构, 作者叙述道: “已

经显示 pol III* 是由 90 kDa 的亚基组成和它在具有 β-半乳糖苷酶的凝胶过滤上的混合色谱分析。这个 pol III* 凝胶过滤图像的未预料到的宽度可能反映从 2 个到 6 个或更多个亚基范围的寡聚体的存在。甘油梯度沉降对于 pol III* 给出了一个 7.25 S 的沉降系数。这些数据对于球形蛋白质给出了完全不同的相对分子质量；它们是与相对分子质量为 360 kDa 的不对称分子一致的，表明 pol III* 是由 4 个 90 kDa 多肽组成的四体。Copol III* 大约有 77 kDa 的相对分子质量，是由一个 77 kDa 的多肽组成的。”^[7]

关于 pol III* 转变到 pol III，作者写道：“根据复制长的单链区域模板能力局部的损失和根据它的凝胶过滤图像移动到 pol III 判断，通过温和热处理 pol III* 能够转变到 pol III。来自凝胶过滤和甘油梯度沉降的数据表明，pol III 的相对分子质量是与 90 kDa dnaE 多肽的二聚体一致的。”

最后，作者讨论了全酶的组成，提出了全酶的假想形式。他们写道：“通过研究单链 M13 和 ΦX174 病毒 DNA 的复制，我们已经观察到 DNA 聚合酶 III 的两种新形式，它们在物理上和功能上与以前描述的 pol III 是有区别的。这个新形式具有 pol III 利用带有间隙的双链模板的能力，但是又能够复制一个延伸的单链 DNA。在这个报告中叙述的形式，大概是接近于在体内起作用的聚合酶形式。它表示在细胞的平缓的溶胞产物中辨认的所有 pol III，它是由两个 90 kDa 聚合酶组成的多肽和两个 77 kDa 共聚物酶的多肽组成的四聚体蛋白质(图 3)。通过在磷酸纤维素上的层析 (phosphocellulose chromatography) 能够把全酶分解成这些组分。这个“核心”聚合酶活性以前被分解成称为聚合酶 III* 的 pol

III 多肽一个寡聚体(大概是四聚体)；这个称为共聚物酶 III* 的共聚物酶对于在单链上 pol III* 的活性是必不可少的。对于 pol III* 和共聚物酶 III* 的复合物，我们使用全酶的术语是基于它与核心聚合酶和组成 RNA 聚合酶的 σ 亚基的复合物类似。像 σ 亚基一样，共聚物酶 III* 适用于形成具有模板的复合物的初始阶段，但是在复制自己的过程中好像是不必要的。”^[7]

最后，作者提出了全酶的催化机制问题。他们写道：“在大肠杆菌染色体的复制中，pol III 的几种形式的催化活性还没有弄清楚。我们对在催化中这些酶的结构的研究中发现，聚合酶和共聚物酶单位开始在引物模板上形成一个复合物。仍然不确定的是蛋白质的化学计量法和在这个复合物中它们的空间排列，它们或者起着全酶的作用，或者以 pol III* -Copol III* 对某种其他的形式起作用。即使在和缓的溶胞产物中所有聚合酶 III 好像是 pol III 全酶，这个复合物仍然可能与细胞中附加的复制成分有联系。”^[7]

3 DNA 聚合酶 III 全酶亚基的分离

1977 年科恩伯格等人从大肠杆菌提纯出 DNA 聚合酶 III 全酶，并分离出 α, β, γ 和 δ 亚基。全酶中包含的 γ 和 δ 亚基是以前没有观察到的。1979 年德克萨斯医科大学生物化学和分子生物系 C. Mchenry 和 W. Crow 从提纯的 DNA 聚合酶 III 全酶分离出 ε 和 θ 亚基。于是，DNA 聚合酶 III 全酶至少包含了 6 个不同的亚基。1982 年 C. Mchenry 从提纯的 DNA 聚合酶 III 全酶分离出 τ 亚基。1988 年科恩伯格和他的同事确立了 DNA 聚合酶 III 全酶是由 10 个亚基组成，除前面谈到的 7 个亚基外，其他 3 个亚基是 δ', χ 和 ψ。

3.1 DNA 聚合酶全酶 α, β, γ 和 δ 亚基的分离

1977 年科恩伯格和德克萨斯医科大学生物化学和分子生物系 C. Mchenry^[8] 在《生物化学杂志》第 252 卷上发表题为《大肠杆菌 DNA 聚合酶 III 全酶的提纯和分离成亚基》的论文。报告了他们从大肠杆菌 HMS-83 中已经提纯出 DNA 聚合酶 III 全酶，用于试验时，把大肠杆菌噬菌体 G4 单链 DNA 转变成双链复制形式。通过磷酸纤维素层析从全酶分离出相对分子质量分别为 140, 40, 52 和 32 kDa 的 α, β, γ 和 δ 亚基，并指出这个 α 亚基是 DNA 聚合酶 III，dnaE 基因的产物，而亚基 β 类似于共聚物酶 III* (Copol III*)。这个全酶与以前从大肠杆菌 H560 中分离的，在磷酸纤维素层析上能够分离成包含 pol III 亚基和 Copol III* 的共聚物类似。但是，全酶中包

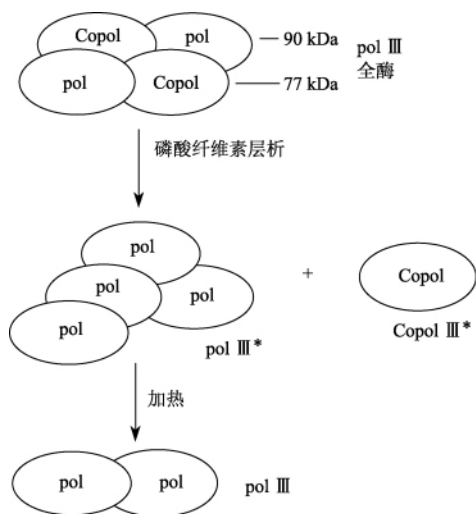


图 3 聚合酶 III 的假设形式

含的 γ 和 δ 亚基是以前没有观察到的。^[8]

在“全酶的组分”一节中叙述了全酶的分离和全酶组分亚基的识别。他们使用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离聚合酶并测定其相对分子质量。他们在“全酶的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳”一段中写道：“用重氮化的^[35S]磷酸标记全酶(0.2 μg), 变性后, 在聚丙烯酰胺凝胶上电泳显示出 4 条蛋白质带。已经证明它们是为引导 G4 模板延伸所需要的组分。这个 140 kDa 蛋白质(α)大概是 pol III, *dnaE* 基因的产物。其他人已经提纯 pol III, 发现它基本上是包含了这个量值的组分。第 2 个 40 kDa 的亚基 β 可能是以前分离的 Copol III*, 被认为是 77 kDa 的多肽。两个组分 γ 和 δ (相对分子质量分别为 52 和 32 kDa) 已经提纯为一个 α 和 β 作用所需要的复合物。基于对 α -, β -, γ - 和 δ - 带的光密度扫描, 这个全酶制剂至少 60% 的提纯是这 4 个亚基的含量。还存在 83 和 25 kDa 两个附加的蛋白质, 在提纯到这个程度的整个过程中它们仍然与全酶牢固地联系在一起, 在甘油梯度中带着全酶活性沉降。”^[8]

最后, 他们指出: “DNA 聚合酶 III 全酶不是一个物理上的整体, 它的活性来源于 4 个分离的蛋白质的混合物。”^[6]

3.2 DNA 聚合酶全酶 ϵ , θ , τ 亚基的分离

1979 年德克萨斯医科大学生物化学和分子生物系 C. Mchenry 等^[9] 在《生物化学杂志》第 254 卷上发表题为《大肠杆菌 DNA 聚合酶 III 亚基的提纯和识别》的论文。文章指出, 这个 DNA 聚合酶 III 全酶的核心已经从大肠杆菌 HMS-83 中提纯 28 000 倍到 97% 的均一性。这个酶包含相对分子质量分别为 140, 25 和 10 kDa 的 α , ϵ 和 θ 亚基。这个 α 亚基以前已经表示为 DNA 聚合酶 III 和更为复杂的 DNA 聚合酶 III 全酶两者的组分。在此证实 ϵ 和 θ 亚基也是 DNA 聚合酶 III 全酶的亚基。于是, DNA 聚合酶 III 全酶至少包含了 6 个不同的亚基。在这篇论文中作者报告了 DNA 聚合酶 III 提纯到均一性和 DNA 聚合酶 III 和 DNA 聚合酶 III 全酶两者的两个补充亚基的识别。^[9]

1982 年 C. Mchenry^[10] 在《生物化学杂志》上发表题为《DNA 聚合酶 III' 的提纯和特征与 DNA 聚合酶 III 全酶的 τ 亚基的识别》的论文。在这篇论文中作者指出: “DNA 聚合酶 III' 是 DNA 聚合酶 III 的新形式, 已经从大肠杆菌 K12 株提纯 15 000 倍到 90% 的均一性。DNA 聚合酶 III' 是 DNA 聚合酶 III 全酶 4 个亚基的组件, 它具有在核心 DNA 聚合酶 III 和全酶之间的功能和物理性质。在变性条件下完成的聚丙烯酰胺凝胶电泳表明 DNA 聚合酶 III' 是 DNA 聚合酶 III 的 α , ϵ 和 θ 亚基和新

测定的 DNA 聚合酶全酶的 τ 亚基($M_r=83$ kDa) 的复合物。通过凝胶过滤和磷酸纤维素层析从 DNA 聚合酶 III' 分离 DNA 聚合酶 III。所有酶形式能够利用包含短间隙的双链体模板。DNA 聚合酶 III' 像 DNA 聚合酶 III 全酶一样, 在存在 5 mM(毫摩尔)亚精胺时能够在长的单链模板上合成 DNA; 而 DNA 聚合酶 III 不能够。在 G4 自然复制系统中 DNA 聚合酶 III' 没有作用, 而 DNA 聚合酶 III 全酶是有活性的。相对分子质量和亚基的化学计量法确定 DNA 聚合酶 III' 包含两个单位的核心 DNA 聚合酶 III 和两个 τ 亚基。”^[10]

作者又指出: “在这篇论文中, 我报告了一种同样定义的, 其功能和结构介于 DNA 聚合酶 III 和 DNA 聚合酶 III* 之间的聚合酶形式的提纯和特征。它的提纯已经导致新的全酶亚基 τ 的测定和这个亚基对全酶反应的贡献部分的理解。”^[10]

在介绍了 DNA 聚合酶 III' 的提纯后, 作者叙述了新的全酶亚基 τ 的测定。他写道: “变性 DNA 聚合酶 III' 的级分 VI(10 μg), 并在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 出现为 140, 83, 25 和 10 kDa 的 4 条主要的蛋白质带(图 4)。最大的和两个最小的组分是核心 DNA 聚合酶 III 的亚基, 称为 τ 的第 4 个组分(83 kDa) 不是核心聚合酶的一部分。光密度扫描表明 α : τ 的比率是 1: 1.1, 在不同的制剂中两个较小的亚基 ϵ 和 θ 的比率在 1 和 2 之间改变。由于结合到很不同的相对分子质量的蛋白质的染料的变化, 我将不测定 ϵ 和 θ 的化学计量。光密度扫描也表明 DNA 聚合酶 III 制剂提纯到 90%”^[10]

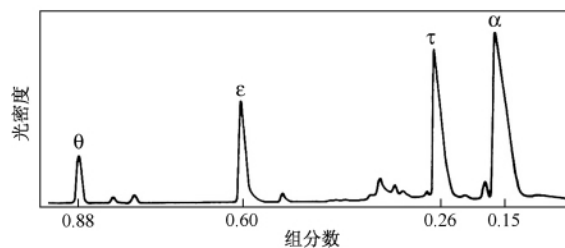


图 4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的光密度扫描(纵坐标为光密度, 横坐标为组分数)

接着作者叙述了在 DNA 聚合酶 III 全酶中 τ 亚基的存在, 他写道: “DNA 聚合酶 III' 的 τ 亚基存在于高度提纯的 DNA 聚合酶 III 全酶中(图 4)。 τ 与存在于所有全酶制剂中的 83 kDa 组分一起迁移。使用的全酶级分是可能得到的高度提纯的制剂。它用的提纯程序显然不同于 DNA 聚合酶 III' 使用的提纯程序。基于这个信息和下面要指出的功能信息, τ 被确定为 DNA 聚合酶 III 全酶的亚基。于是, DNA 聚合酶 III' 是 4 个全酶亚基的组件。”^[10]

3.3 DNA 聚合酶 III 全酶的组成

1988年,科恩伯格和他在斯坦福大学医学院生物化学系的同事 H. Maki 等^[11]在《生物化学杂志》第 249 卷上发表题为《大肠杆菌 DNA 聚合酶 III 全酶 IV:全酶是一个具有成对活性部位的不对称的二聚体》的论文。一开始他们概述了 DNA 聚合酶 III 全酶的组成。他们指出: pol III* 是只缺少辅助的 β 亚基的大肠杆菌 DNA 聚合酶 III 全酶的组件,已经通过改进的程序提纯到均一。这个组件是由 9 个不同的多肽组成的。在凝胶过滤上这个组件相当于大约为 800 kDa 的粒子,表示每种亚基含有两个。保留 β 亚基(37 kDa)以及在 pol III* 中的所有亚基;全酶的相对分子质量估计是 900 kDa。基于这些数据,断定 pol III 全酶是具有成对的 pol III 核心活性部位和两个不同组的辅助亚基的一个不对称的二聚体,以使用来达到前导链和后续链二者基本上并行复制。

接着,作者介绍了 DNA 聚合酶 III 的三个分离形式,写道:“DNA 聚合酶 III 的三个分离形式很可能是全酶的组合物。由 α,ε 和 θ 亚基组成的核心(pol III)有一个 165 kDa 估计的相对分子质量。它缺少连续合成的能力,但是保持了催化功能;在 α 亚基中聚合酶活性和在 ε 亚基中 3'→5'外切核酸酶活性。第二种形式 pol III',包括核心和 τ 亚基。由于 410 kDa 的反常的量值,对于这个复合物提出二聚体结构。pol III* 是缺少 β 的全酶,这个亚基对于连续性是关键。基于 360 kDa 或 540 kDa 的相对分子质量,pol III* 好像是 pol III'和其他辅助亚基的混合物。解释全酶为何具有与 pol III'一样相同的沉降系数是困难的。由于 β 亚基的低亲和性,甚至在 ATP 稳定的存在中全酶与 pol III* 的联系也是不清楚的。”^[11]

在这篇文章中,他们报告了 pol III* 和全酶的新的提纯程序,并弄清楚两种复合物的一些特征。pol III* 大约具有 800 kDa 的相对分子质量,包含 9 个不同的很可能是相同相对分子质量的多肽。全酶分离为具有两个 β 二聚体的 pol III* 的复合物,具有 900 kDa 的相对分子质量。基于这些量值和从亚基重新构成的复合物的分解,断定 pol III* 和全酶两者是具有辅助亚基非对称分布的二聚型(图 5)。这种结构可能提供在复制叉处具有催化前导链和后续链并行合成的能力。

4 DNA 聚合酶 III 全酶的结构与功能

1995 年康奈尔大学微生物系的 Z. Kelman 教授等^[12]在《生物化学年度评论》中发表题为《DNA 聚合酶 III 全酶:染色体复制机制的结构和功能》的论文,全面评

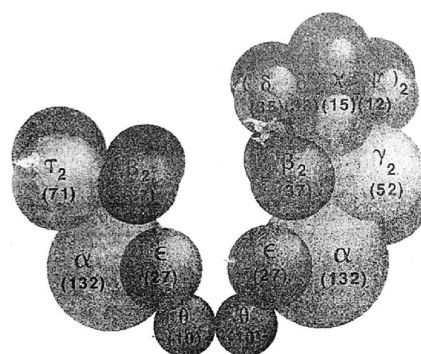


图 5 pol III 全酶假定的结构

述了 DNA 聚合酶 III 全酶的结构与功能。DNA 聚合酶 III 全酶是能够进行引物链的延伸并完成 DNA 的前导链和后续链合成的酶。全酶是一个多亚基酶。他们发现全酶在 DNA 合成上特别迅速,大约每秒合成 750 个核苷酸,与在大肠杆菌中观察到的复制叉运动速率是一致的,比 pol I 的每秒合成 10~20 个核苷酸的速率快。这样快的速率来自于全酶的高度持续的合成能力。

全酶合成 DNA 的高速度和连续性是与它由多亚基组成成分不开的。在“全酶粒子”一节中作者指出:“现在已经完成编码全酶 10 个亚基的所有基因的识别,这些蛋白质的过度表达和提纯,以及从它们重新构成全酶。在表 3 中按顺序列出了 10 个不同的亚基,表明亚基以各种各样全酶的组件形式存在。核心聚合酶由 α,ε 和 θ 亚基组成。pol III' 组件由两个核心酶和一个 τ 二聚体组成。在一个分子结构中两个聚合酶的存在支持这个假设,为了协调一个双链体染色体的双链的复制,复制的聚合酶要成对地起作用。pol III* 组件包含了 9 个不同的亚基,它只缺少 β 亚基。基于把亚精胺,ssDNA 结合蛋白(SSB 蛋白),乙醇加到试验中或者把盐加到实验中能够识别每个组件的聚合酶活性。一般来说,当聚合酶

表 3 DNA 聚合酶 III 全酶的亚基和组件

亚基	相对分子质量 /kDa	功能	组件
α	129.9	DNA 聚合酶	核心
ε	27.5	3'-5'外切核酸酶	
θ	8.6	激励 ε 外切核酸酶	
τ	71.1	依赖 ATP 酶,使核心聚合酶成二体	pol III'
γ	47.5	结合 ATP	
δ	38.7	结合到 β	γ-复合物
δ'	36.9	结合到 γ 和 δ	
χ	16.6	结合到 SSB	
ψ	15.2	跨接在 χ 和 γ 之间	
β	40.6	在 DNA 上的滑动夹子	

亚基的复杂性增加时,聚合酶变得更有连续性,但是全酶很高的速度和连续性绝对需要 β 夹子(clamp)。这5个亚基的 γ 复合物是把水解的ATP结合到引物DNA上的载荷 β 夹子的媒介物。”^[12]

4.1 核心聚合酶

在1995年Kelman文章的“核心聚合酶”一节中介绍了核心聚合酶的构成与功能。他写道:“核心包含DNA聚合酶和校对外切核酸酶活性。在这个细胞中大约有40个核心分子,因此只有一半组装进全酶。核心的3个亚基牢固地联结在一起,缺少变性不能分解。通过基因的使用提供了各个亚基。 α 的研究表明它是DNA聚合酶,具有每秒合成8个核苷酸的速率,但是它缺少外切核酸酶活性。这个分离的 ϵ 亚基是强有力的 $3' \rightarrow 5'$ 外切核酸酶。这个 α 和 ϵ 亚基形成牢固的1:1的复合物,导致聚合酶活性和外切核酸酶活性两者的增加。由 ϵ 水解ssDNA的速率类似于由核心水解ssDNA的速率,但是对于有效的活性由 ϵ 水解双链DNA需要 α 。大概识别 α 位置的引物模板携带着与配对碱基 $3'$ 端接触的 ϵ 。除了在错配T-G碱基对上 ϵ 活性的微小激励外,还发现了 θ 的功能。这个 θ 亚基结合 ϵ 而不是 α ,从而提出在核心中 α - ϵ - θ 的线型排列,而结构分析显示了每个亚基的单个拷贝。”^[12]

接着作者指出了核心酶合成DNA的速率和连续性。他写道:“核心以大约每秒20个核苷酸的速率合成DNA,具有复制11个核苷酸的连续性,类似于pol I。然而在单个ssDNA病毒引物模板上,核心是已知的最微弱的聚合酶。无论怎样加上许多核心或等待多长时间,核心都不能延伸环绕自然模板的独特的完整的引物圆环。大概某些DNA结构阻碍由核心引起的链的延伸。”^[12]

作者又补充写道:“在核心的附属蛋白质存在时,核心成为了最快的聚合酶。在 ϵ 不存在时, α 受附属蛋白质的激励,但是持续合成能力降到500~1500个核苷酸,而实际的速率是核心速率的一半。带有附属蛋白质的这个 $\alpha\epsilon$ 复合物具有像核心一样的复制速率和连续性。因此, ϵ 对全酶的速率和持续作用能力有影响,不只是对精确度有影响。在其他方面, θ 对 $\alpha\epsilon$ 的效率没有影响。”^[12]

4.2 ϵ 亚基的外切核酸酶活性

1984年加利福尼亚大学分子生物系教授R. Scheuermann和H. Echols^[13]在《美国国家科学院院报》上发表题为《DNA复制的一个独立编辑的外切核酸酶:大肠杆菌DNA聚合酶III全酶的 ϵ 亚基》论文。文章一开始就阐述了确保复制精确度的机制。写道:“大肠杆菌基

因组的复制是一个特别精确的过程。每个碱基复制错误的频率一般是 $10^{-9} \sim 10^{-10}$ 。这样高的精确度被认为是通过多级过程出现的:(1)在初始的 $5' \rightarrow 3'$ 结合中互补碱基的选择;(2)在生长点非互补碱基的外切核酸酶溶解的 $3' \rightarrow 5'$ 删除;(3)复制后错配的修复。这些步骤的总和能够达到观察的精确性。DNA聚合酶III(pol III)全酶是在大肠杆菌中链的延伸中包含的主要的酶,因此很可能是精确度的主要决定因素。为了研究在DNA复制中的保真机制和探索控制精确度的可能性,我们一直试图确定pol III亚基对碱基选择和删除的贡献。”^[13]

接着,他们分析了全酶核心的活性,并提出了 $3' \rightarrow 5'$ 外切核酸酶活性定位在哪个亚基上的问题。写道:“pol III全酶至少有7个亚基: $\alpha, \epsilon, \theta, \tau, \gamma, \delta$ 和 β 。以自然形式制备的pol III全酶的最小组件是包含 α, ϵ 和 θ 亚基的pol III核心; α 是dnaE基因的产物,而 ϵ 是dnaQ基因的产物。pol III核心带有pol III全酶的聚合酶和 $3' \rightarrow 5'$ 外切核酸酶活性。具有用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离的亚基的酶测定表明这个大的 α 亚基具有聚合酶活性,也可能带有 $3' \rightarrow 5'$ 外切核酸酶活性。然而,已经从观察到dnaQ基因中增变突变(mutator mutation)使pol III全酶在删除的外切核酸酶中存在缺陷,推断在 $3' \rightarrow 5'$ 外切核酸酶(和复制精确度)中 ϵ 的重要作用。”^[13]

随后,他们叙述了通过 ϵ 亚基的过度表达和提纯,证实 ϵ 亚基具有外切核酸酶活性。写道:“为了确定在由pol III外切核酸酶裂解删除中 ϵ 的作用,我们要从多亚基的pol III全酶的其他亚基分别地研究 ϵ 。为了提供过量的 ϵ 和使它的提纯容易,我们使用了过量的菌株,在强有力启动子,噬菌体 λ 的左侧区域转录启动子和有效的核糖体结合区域的控制下表达dnaQ基因。我们已经把pol III的 ϵ 亚基提纯到均一性。我们发现 ϵ 带有类似于提纯的pol III核心酶特征的 $3' \rightarrow 5'$ 外切核酸酶活性。于是,pol III全酶的删除和聚合作用活性存在于不同的亚基中。”^[13]

4.3 β 亚基滑动夹子的功能

1992年5月,洛克菲勒大学分子生物物理实验室X. Kong等^[14]在Cell第69卷上发表题为《大肠杆菌DNA聚合酶III全酶的 β 亚基的三维结构:滑动的DNA夹子》的论文。说明当把其余的机构夹到模板上时, β 亚基是一个沿着DNA滑动的环形蛋白质,其他亚基共同起着把这个环装配到DNA上的撮合者的作用。在文章的摘要中他们首先概述了这个结构特点,写道:“已经以2.5 Å的分辨距离确定了DNA聚合酶III全酶的 β 亚基的晶体结构。 β 亚基的二聚体($M = 2 \times 40,6$ kDa, $2 \times$

366个氨基酸残基)形成了用12个能环绕双链体DNA的 α 螺旋嵌入的环形结构。这个结构是高度对称的,具有包含三个相同拓扑结构域的每个单体。这些螺旋的电荷分布和定位表明通过形成能够在DNA上滑动的牢固的夹子,这个分子起着生物化学的作用。提出在 β 亚基和增殖细胞核抗原(PCNA,真核生物聚合酶 δ 和 ϵ 持续合成能力因子),和噬菌体T4DNA聚合酶的基因45蛋白质之间可能的结构联系。”^[14]

在文章的“引言”中,概述了pol III全酶各个亚基的作用。写道:“未受损害的pol III全酶至少具有10个不同的蛋白质亚基($\alpha, \epsilon, \theta, \tau, \gamma, \delta, \delta', \chi, \Psi$ 和 β)。这个 α 亚基完成催化的聚合酶功能,而 ϵ 亚基是3'→5'外切核酸酶。这个包含了全酶的 $\alpha, \epsilon,$ 和 θ 的3个亚基核心聚合酶组件,虽然它能够插进短的单链区域,但不可能独自地连续地起作用。按照核心聚合酶与 β 亚基和5个蛋白质的 γ 复合物($\gamma, \delta, \delta', \chi$ 和 Ψ)的混合能够重新构成全酶的高度连续性特征。这个连续性聚合酶的重组是在两个不同的阶段进行的(图6):在第一阶段,这个 γ 复合物水解ATP,以便把 β 亚基转移到引物模板;在第二阶段,具有在DNA上的 β 亚基的核心聚合酶组件形成连续性的聚合酶。于是, β 亚基把值得注意的连续性给予核心聚合酶。对为了组装连续性的聚合酶所需要的最小亚基数的研究表明,为了把 β 从溶液转移到引物模板只需要 γ 复合物的 γ 和 δ 亚基。对于连续的聚合作用需要作为 $\alpha\epsilon$ 复合物的两个亚基 α 和 ϵ 。只要在DNA上的 β 亚基使 $\alpha\epsilon$ 聚合酶具有完整的连续性性能, γ 复合物便接着被排除。”^[14]

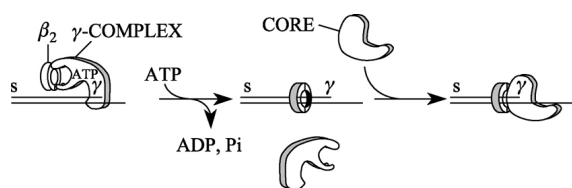


图6 连续性聚合酶的两阶段组合

下面叙述了在DNA复制过程中 β 亚基、 γ 复合物与引物模板之间的相互作用。写道:“一旦 γ 复合物完成把 β 亚基夹紧在DNA上的操作, β 亚基就很牢固地被束缚在那里,它就不能很容易地与圆环DNA分离。然而,已经显示出它沿着双链体DNA自由地滑动,与它把聚合酶核心束缚到模板上,在复制中与聚合酶一道运动,起着夹子的作用是一致的。使用限制性内切核酸酶的实验已经揭示,在 β 亚基被夹紧之后,如果圆环DNA被切割, β 亚基就滑动到断裂位置并跌落下来,完全与DNA分离。这些与在同样的研究中有关的实验所表明

的,与位置特异性结合蛋白,诸如转录因子或核酸酶形成特殊的氢键或其他的与DNA稳定的相互作用不同, β 亚基被束缚到DNA上主要是由于它的拓扑结构而不是稳定的相互作用。已经提出 β 亚基可能形成一个闭合的环, γ 复合物的一种作用可能是打开然后关闭这个环绕DNA的环,有效地把 β 亚基夹在DNA上。”^[14]

接着介绍了 β 亚基的三维结构。写道:“作为朝着pol III全酶连续性质的分子基础的详细理解的一步,我们已经使 β 亚基结晶,通过在2.5 Å分辨距离下的X射线衍射确定了它的三维结构。在与以前的推测一致感到满意时,我们发现这个结构的确是闭合的环,整个形状类似于油煎圈饼或环形线圈的形状(图7)。”^[14]

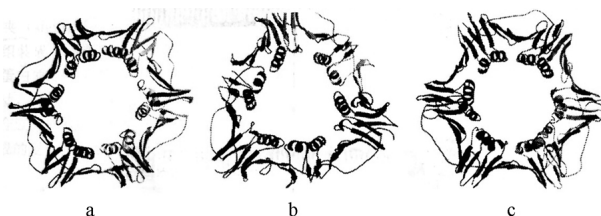


图7 滑动的 β 亚基的三维结构

在“结果和讨论”一节中,作者具体介绍了 β 亚基二聚体的结构。写道:“这个 β 亚基在晶体中形成头-尾二聚体,与以前观察的这个在溶液中分离的蛋白质是二聚体一致的。这个二聚体的多肽主链的图像显示在图7a中。总的结构是直径大约为80 Å的星形环在中央具有一个直径大约为35 Å的孔洞。这个双重的二聚体的轴垂直于环面,环的厚度大约是双链体B-形式DNA一整圈的大小(约34 Å)。”^[14]图7b表示T4噬菌体DNA夹是gp45蛋白的三聚体。1994年X. Kong等^[15]又在Cell第79卷上发表题为《真核生物DNA聚合酶持续合成能力因子细胞周期蛋白(PCNA)的晶体结构》的论文,报告了他们的真核滑动DNA夹子是PCNA蛋白的三聚体(图7c)。

4.4 γ 复合物的结构与功能

在1995年Kelman文章的“作为复制机器的DNA聚合酶III全酶”一节中介绍了 γ 复合物的构成与功能。叙述了 β 圆环从 γ 复合物到核心的转换。写道:“为了持续合成这个 γ 复合物必须把环形 β 亚基结合到引物端上的组件,而核心必须与 β 亚基相互作用。因为核心和 γ 复合物两者都识别引物模板结合处,它们可能与 β 环的同一个面相互作用(图8)。比较来自7种不同的细菌的基因序列编码表明,多数保守的残基只处在一个面上:这个面包含两个C端。”^[10]如图8所示,全酶包含结

合到 τ 二聚体两个核心聚合酶和一个 γ 复合物夹子装载机。这个 γ 复合物与 β 二聚体的 C 端相互作用, 大概 β 的这个面朝着引物位置。像 γ 复合物一样, 核心与 β 上相同的 C 端残基相互作用。因此, 这个 γ 复合物在把 β 装载到 DNA 上之后, 这个核心可能进入带有 β 夹子的位置。在这个全酶中通过与 τ 的相互作用使 γ 复合物抓牢带有核心和 β 的 DNA。^[12]

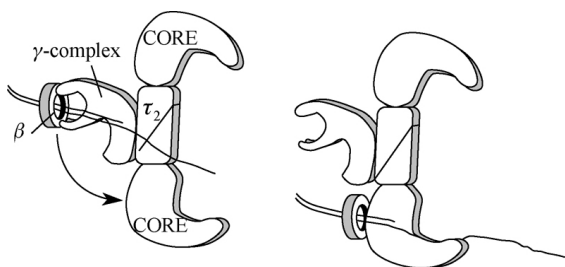


图 8 核心和 γ 复合物与 β 环同一面的相互作用

作者又问道:“为何核心和 γ 复合物在 β 上具有交叠结合位置?”他回答说:“这个 γ 复合物不只是把 β 装载到 DNA 上, 而且也从 DNA 上卸下 β 夹子。因此, 这个双重性的装置能够确保当核心用 β 延伸 DNA 时, 它防止 γ 复合物从 DNA 上卸下 β 。”^[12]

作者接着写道:“使用组件(γ 复合物, 核心和 β)的研究引起了这种想法, 因为 γ 复合物起催化作用, 在链的延伸过程中在 DNA 上只存在核心和 β 。事实上 γ 复合物和核心在 β 二聚体上交叠结合的位置是与这个观点一致的。然而, 使用整个全酶的研究表明, 这个 γ 复合物在 DNA 上仍然具有核心和 β 。在这个全酶中, τ 作为核心和 γ 复合物之间的桥梁, 使它们保持在一起。像图 8 所示, 这种结构可以容许 β 从 γ 复合物位置改变到核心位置。把 γ 复合物的催化夹子装载活性放在复制叉处的适当位置, 通过与全酶不变的联系, 对于在后随链上许多初始事件将是有益的。”^[12]

(2012 年 1 月 3 日收到)

- [1] DE LUCIA P, CAIRNS J. Isolation of an E. coli strain with a mutation affecting DNA polymerase [J]. Nature, 1969, 224(5225):1164-1166.
- [2] GROSS J, GROSS M. Genetic analysis of an E. coli strain with a mutation affecting DNA polymerase [J]. Nature, 1969, 224(5225):1166-1168.
- [3] 阿瑟·科恩伯格著. 酶的情人: 一位生物化学家的奥德赛 [M]. 崔学军, 等, 译. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 245.
- [4] GEFTER M L, HIROTA Y, KORNBERG T, et al. Analysis of DNA polymerases II and III in mutants of *Escherichia coli* thermosensitive for DNA synthesis [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1971, 68(12):3150-3153.
- [5] WEAVER R F. Molecular biology [M]. 3th ed. Boston:

McGraw-Hill, 2004:687-691.

- [6] WICKNER W, SCHEKMAN R, GEIDER K, et al. A new form of DNA polymerase III and a copolymerase replicate a long, single-stranded primer-template [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1973, 70(6):1764-1767.
- [7] WICKNER W, KORNBERG A. A holoenzyme form of deoxyribonucleic acid polymerase III isolation and properties [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1974, 249:6244-6249.
- [8] MCHENRY C, KORNBERG A. DNA polymerase of *Escherichia coli* purification and resolution into subunits [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1977, 252:6478-6484.
- [9] MCHENRY C S, CROW W. DNA polymerase III of *Escherichia coli* purification and identification of subunits [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1979, 254:1748-1753.
- [10] MCHENRY C S. Purification and characterization of DNA polymerase III. Identification of τ as a subunit of the DNA polymerase III holoenzyme [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1982, 257:2657-2663.
- [11] MAKI H, MAKI S, KORNBERG A. DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli* IV. The holoenzyme is an asymmetric dimer with twin active sites [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1988, 263:6570-6578.
- [12] KELMAN Z, O'DONNELL M. DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine [J]. Annu Rev Biochem, 1995, 64:171-200.
- [13] SCHEUERMANN R H, ECHOLS H. A separate editing exonuclease for DNA replication: the ϵ subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1984, 81:7747-7751.
- [14] KONG X, ONRUST R, O'DONNELL M, et al. Three-dimensional structure of the β subunit of E. coli DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp [J]. Cell, 1992, 69(3):425-437.
- [15] KRISHNA T, KONG X, CARY S, et al. Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. 1994, 79(7):1233-1243.

Discovery of Function and Structure of Deoxyribonucleic Acid Polymerase III Holoenzyme

XIANG Yi-he

Professor, Department of Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract The process of finding the structure and the function of DNA polymerase III holoenzyme are introduced. The key events include that the discovery of DNA polymerase III and III*, the proposition of DNA polymerase III holoenzyme, the separation of holoenzyme subunit, the function of core polymerase, the 3 \rightarrow 5 exonuclease activity of ϵ subunit, the function of β subunit sliding clamp and γ complex.

Key words DNA polymerase III, DNA polymerase III*, Copolymerase III*, core polymerase, ϵ subunit, β subunit sliding clamp, γ complex

(编辑: 段艳芳)