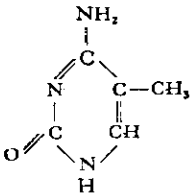


DNA 甲基化作用和基因功能

何 忠 效

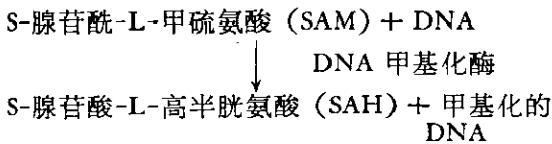
(中国科学院微生物研究所, 北京)

在 DNA 分子中,除含有 A, T, C, G 几种碱基外,还普遍地发现 5-甲基胞嘧啶 (5-mc):



大约在 35 年前,首先从小牛胸腺 DNA 中发现有 5-甲基胞嘧啶,随后发现这种微量的碱基广泛地存在于各种有机体中^[1]。在哺乳动物 DNA 中,有 2—7% 的胞嘧啶残基是以 5-甲基胞嘧啶形式存在(随着种属的不同,其含量亦有所变化)。

DNA 一经合成后,便通过 DNA 甲基化酶的作用,从 S-腺苷酰甲硫氨酸 (SAM) 上转移甲基到 DNA 分子中胞嘧啶环上第 5 位处,从而得到甲基化的 DNA,这个作用便被称为 DNA 甲基化作用。反应式如下:



原核生物 DNA 除含有 5-甲基胞嘧啶 (5-mc) 外,还含有 N⁶-甲基-腺嘌呤 (6-mA)。某些绿藻、原生动物的 DNA 也含有 6-mA; 高等真核生物的 DNA 中,只含有 5-mc。真核生物 DNA 中,5-mc 的含量随种属的不同而有很大的差异:昆虫中仅含有 0.17%;哺乳动物含有 2—7%;而高等植物可高达 50%。下面简介一下 DNA 甲基化作用的基本特性和

生物功能。

一、DNA 甲基化作用的基本特性

1. 序列专一性: 在真核生物中,5-mc 主要出现在 5'-C*pG-3' 序列,但偶尔也出现在 5'-C*pC-3' 和 5'-C*pT-3' 序列处。在这些序列中,胞嘧啶的甲基化程度受很多因素影响,如: 种属、基因种类及发育阶段等。在动物细胞中,CpG 序列有大约 70% 是被甲基化了的^[2]。

2. 组织专一性: Waalwijk 和 Flavell^[3] 首先以令人信服的证据证明了 DNA 甲基化作用的方式是有组织专一性的(图 3)。他们分别用限制性内切酶 ECoRI; ECoRI + HpaII (切割 CCGG 序列,对 m⁵c 敏感)及 ECoRI + MspI

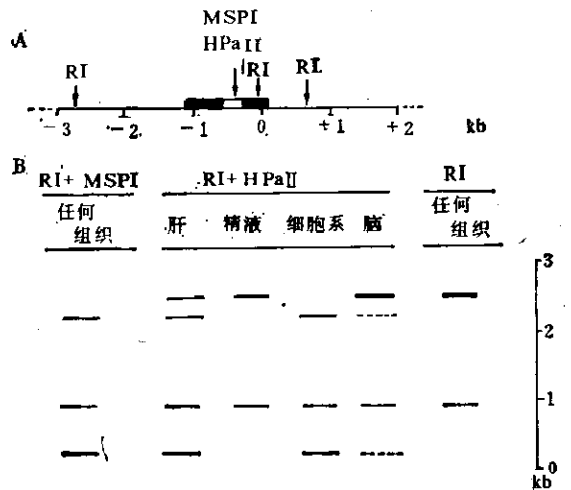


图 2 Waalwijk-Flavell 实验

A. 兔 β -珠蛋白基因区域图,黑色表示编码珠蛋白的区域,白色是内含子,箭头示内切酶的切割部位。
B. 用指出的限制性内切酶处理来自不同组织的未标记 DNA 之后,再用 Agarose 电泳、Southern 印迹法并与 ³²P 标记的珠蛋白探针杂合,所得到的理想的放射自显影图谱。

(切割 CCGG 序列, 对 5-mc 不敏感) 降解来自不同组织的兔 DNA 中的 β -珠蛋白基因, 然后用 Agarose 凝胶电泳检查降解后的碎片, 发现在脑和精液 DNA 的这个部位, 分别有 80% 和 100% 的胞嘧啶被甲基化了; 而兔细胞系 DNA 完全未被甲基化; 而肝 DNA 的这个部位, 有大约 50% 的胞嘧啶被甲基化了。

已用鸡的球蛋白基因, 人的球蛋白基因、卵白蛋白基因完成了类似的实验。相反, 如果测

定脊椎动物 DNA 总甲基化水平的平均数, 则几乎难以发现任何区别^[4]。

3. 对称性和遗传性: 细菌限制性核酸内切酶和 DNA 甲基化酶, 可识别对称性部位, 并可对称性地甲基化两个螺旋^[5]。因此这些部位可以以三种状态存在: 未甲基化的、半甲基化的和全部甲基化的。DNA 复制后, 半甲基化部位很快地转化为全部甲基化部位。体外实验表明: 从头甲基化作用可能出现的很少; 大部分甲基化作

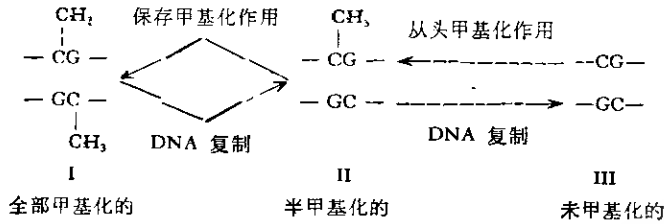


图 3 三种可能的甲基化作用状态

用是伴随着 DNA 复制的保存甲基化作用 DNA 甲基化酶作用于半甲基化部位要比作用于非甲基化部位快得多。两个螺旋的对称甲基化作用, 是与一种保存甲基化酶 (Maintenance methylase) 有关。此酶只作用于半甲基化部位^[6], 而全部甲基化部位和非甲基化部位则保持不变, 从而将有一种甲基化方式的可克隆遗传。有实验指出: 用 HpaII 将 PBR 322 及 ϕ X 174 DNA 甲基化, 再通过基因转移技术将甲基化了的 DNA 插入鼠细胞, 结果表明: 未甲基化的 DNA 序列仍保持未甲基化; 而在体外甲基化了的 DNA 序列, 甚至经过 50 代的再培养仍能保持其甲基化部位。这表明甲基化方式的遗传性是相当保守的。

二、DNA 甲基化作用的生物功能

1. 蛋白质和核酸的相互作用: DNA 分子被甲基化后, 由于甲基基团被引入 DNA 分子而改变了 DNA 大分子的构象。由于甲基被引入 DNA 双螺旋分子主要沟迥中的暴露在外的位置, 从而影响了蛋白质分子与 DNA 分子的结合。已知组蛋白和激素受体与 DNA 的结合, 便受这种变化的影响^[7]: 若把乳糖操纵子 13 位上的胸腺嘧啶转变为尿嘧啶或胞嘧啶, 则大大减少阻遏物对于操纵基因的亲和力; 若把

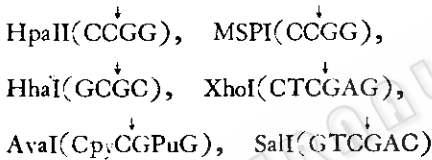
13 位变为 $m^5\text{cyt}$, 则阻遏物对操纵基因的亲和力又恢复正常。又如: 细菌限制性核酸内切酶对未甲基化的限制性部位有很强的亲合性^[5]; 但对甲基化后的同样部位则只有很小的亲合性或根本无亲合性。大量事实证明: 甲基基团在 DNA 分子上的存在与否, 可强烈地影响其与蛋白质分子的结合。问题是: 真核生物细胞是否利用了这个机制来进行基因活力的调控? 答案是肯定的^[8]。例如, 细菌 DNA 分子中的限制性部位被甲基化后, 使得细菌限制性核酸内切酶不能再切割其自体 DNA。而哺乳动物 DNA 分子中的限制性部位未完全被甲基化, 从而可用特定的限制性核酸内切酶对其进行切割。如: 在兔的 DNA 分子中, HpaII 部位的 50% 未被甲基化, 从而可用 HpaII 对未甲基化的限制性部位进行切割。

2. 影响 DNA 复制: 已发现 ϕ X174 噬菌体 DNA 的合成, 需要专一性部位上的甲基化作用。如果中止这个甲基化作用, 则 DNA 的复制亦被中止^[9]。若抑制大肠杆菌 DNA 的甲基化作用, 则一周后, 大肠杆菌染色体的复制也将停止。已知大肠杆菌 DNA 复制的起始序列 GATC 处, 在正常状态下总是被甲基化了的; 若此序列未被甲基化, 则无法起始这种

DNA 复制。上述观察表明：DNA 甲基化作用在原核生物中是与 DNA 复制相关联的；至于真核生物，由于它们有很多双向复制的起点，所以至今尚未能得到有力的实验证据。

3. 重组和突变：最近用原核生物获得的研究结果表明：在缺乏 DNA 甲基化酶的大肠杆菌突变株中经常出现自发突变率增高；增加对 λ 噬菌体的自发诱导；增加对诱变剂的敏感性；并增加了重组的频率^[10]。Coulondre 等^[11]指出：胞嘧啶的脱氨作用产生尿嘧啶，它易被识别并校正；而 5-甲基胞嘧啶的脱氨作用产生胸腺嘧啶，它不易被识别并校正。Scarano^[12]指出：特定部位 5-甲基胞嘧啶的脱氨作用，将在 DNA 分子中导致一种可遗传的变化 (GC 向 AT 的跃迁)，而这必将影响到分化作用。

4. 限制作用和修饰作用：大部分真核生物 DNA 中的 5-mc 残基 (大约 90%) 被发现于二核苷酸序列 5'-CpG-3' 中。而能切割 5'-CpG-3' 部位的限制性核酸内切酶有：



和



如果 CpG 序列中的 C 被甲基化，则这些酶中的大部分便不再能识别同样的部位^[13]。因此，这些酶可被用来检查甲基化作用：Hpa II (来自 *Hemophilus parainfluenzae*) 和 MspI (来自 *Moraxella species*) 都能切割 5'-CCGG-3' 部位，但若序列内部的 C 残基被甲基化为 5'-CC*GG-3' 时，则 HpaII 不能切割它，而 MspI 却仍能切割这个部位；相反，若外部 C 残基被甲基化为 5'-C*CGG-3' 时，(*表示甲基化后的残基，下同)则 HpaII 能切割它，而 MspI 却不能切割它。这一对限制性核酸内切酶对甲基化部位有互补的识别作用，因此可作为探查甲基化作用的一个方便而有效的手段^[14]。

同样，Sau 3A (识别 5'-GATC-3') 和

Taq I (识别 5'-TCGA-3') 可用来识别特殊的序列群 5'-GATCGA-3'，它构成两个部位的重叠。一个甲基化的 Taq I 部位 (5'-GATC*GA-3') 仍可被切割，而甲基化的 Sau 3A 部位 (5'-GATC*GA-3') 却不再被切割。若检定原核生物 DNA 中的 6-mA，可用一对限制性核酸内切酶 Dpn I 和 Dpn II，Dpn I 只切割 (5'-GA*TC-3')，而 Dpn II 只切割 (5'-GATC-3')。还有另外一些限制性核酸内切酶，它们对 5'-C*pG-3' 部位敏感 (表 1)^[15]。这类限制性核酸内切酶的使用，使得我们可以更详尽地分析 DNA 中 5-mc 的存在部位。

表 1 5'-CpG-3' 部位的 DNA 甲基化作用对限制性核酸内切酶的影响

限制性核酸内切酶	识别部位
FnuDII (<i>Fusobacterium nucleatum</i> D)	5'-C*GC*G-3'
HhaI (<i>Hemophilus haemolyticus</i>)	5'-GC*GC-3'
HpaII (<i>Hemophilus parainfluenzae</i>)	5'-CC*GG-3'
MspI (<i>Moraxella species</i>)	5'-C*CGG-3'
Sau 3A (<i>Streptomyces aureofaciens</i>)	5'-GATC*-3'
AvaI (<i>Anabaena variabilis</i>)	5'-CPyC*GPuG-3'
SacII (<i>Streptomyces achromogenes</i>)	5'-CC*GC*GG-3'
SalI (<i>Streptomyces albus</i> G)	5'-GTC*GAC-3'
SmaI (<i>Serratia marcescens</i>)	5'-CCC*GGG-3'
XhoI (<i>Xanthomonas holcicola</i>)	5'-CTC*GAG-3'
XmaI (<i>Xanthomonas malvacearum</i>)	5'-CCCGG-3'

5. 基因表达的调控：至今已有大量研究表明：DNA 甲基化作用可影响基因的调节和分化。Mondel 和 Chambon^[16]发现：鸡卵白蛋白基因通过不同程度的甲基化作用 (Undermethylation) 来调节基因的活力。该基因在不同组织中被甲基化的程度亦不同。在卵白蛋白基因活

表2 真核生物 DNA 甲基化酶^[22]

酶 来 源	分 子 量	甲 基 化 的 序 列
鼠肝(正常及再生的)	115000	X-N-C*-N-Y
Krebs II 鼠腹水癌细胞系	184000	X-N-C*-N-Y
Novikoff 鼠肝癌细胞系	未 分 析	X-N-C*-N-Y
HeLa 细胞	120000	X-(G/C)-C*-G-Y
Chlamydomonas reinhardi	55000-58000	X-T-C*-(Pu/C)-Y
Tetrahymena thermophila	未 分 析	X-N-A*-T-Y
鼠肝(正常)	未 分 析	X-N-C*-N-Y

力高的组织(如卵巢)中,该基因较少地被甲基化。从兔的 α -珠蛋白基因的研究也得到了相似的结论^[13]。一般来说,活力高的基因被甲基化的较少。Christman^[17]等指出:DNA的不充分甲基化作用(Undermethylation)可诱发球蛋白的产生。虽然尚难很清楚地解释这个实验,但他们首先指出了DNA未充分甲基化作用可以影响基因活力。

最近,有人用疱疹病毒的胸腺嘧啶激酶(TK)基因做了研究^[18],发现缺乏胸腺嘧啶激酶的鼠细胞,其TK基因是高度被甲基化了的。在胞嘧啶类似物-5-氮胞苷的存在下,真核细胞DNA不能被甲基化,从而导致某些基因的活化,甚而导致鼠成纤维细胞的加速分化^[19]。可表达基因对DNase I的降解是敏感的;当某些基因被强烈地甲基化后,则对DNase I的降解是不敏感的,而该基因也随之失去活力。基因调节的决定性步骤是取决于染色体结构中DNA和蛋白质分子间的相互作用。Behe和Felsenfeld^[20]用CD光谱及吸收光谱研究指出:在低盐浓度下,合成聚核苷酸Poly(dG-dC)从通常的右手螺旋B构型转化为左手螺旋的Z构型。而若用甲基化的合成聚核苷酸取代正常的合成聚核苷酸,则可促进Poly(dG-dm³C)的这种B \rightarrow Z过渡,并使其处于稳定的Z构型。若将甲基从DNA分子上脱去,则可导致原来静止的基因在转录上的活化。因此,我们有理由相信:特定基因的甲基化作用与基因的钝化是密切相关的。

有研究指出,肝癌细胞DNA处于未充分甲基化的状态^[21],从而使基因处于异常活跃的状态,而造成癌细胞的恶性转移。因此,DNA甲基化作用是一种很重要的基因活力调节方式。从而使它在分子生物学的研究及癌基本理论的研究中被广为重视。目前,在国际上这是个十分活跃的研究领域。

三、DNA 甲基化酶

DNA甲基化作用的出现及甲基化程度的不同,主要取决于DNA甲基化酶的活力。已有大量关于此酶的研究报告及评论文章发表,包括来自原核生物及真核生物的DNA甲基化酶的研究。这些DNA甲基化酶均为S-腺苷酰甲硫氨酸所依赖。但在真核系统的研究中,大部分是使用部分提纯的DNA甲基化酶或无细胞抽提液。因为此酶十分不稳定,而且往往在细胞核内与核骨架形成复合物。通常,一旦从复合物上将此酶分离出来,往往由于破坏了酶的自然构象,而使其丧失活力。表2列举了一些部分纯化的DNA甲基化酶及其性质。迄今,对DNA甲基化酶的研究报道不多,这是一类有待深入研究的酶类。

参 考 文 献

- [1] Hotchkiss, R. D.: J. Biol. Chem., 175: 315, 1948.
- [2] Doerfler, W.: J. Gen. Virol., 57: 1-20, 1981.
- [3] Waalwijk, C. and R. A. Flavell: Nucleic Acids Res., 5: 4631, 1978.
- [4] Singer, J. et al.: Nucleic Acids Res., 7: 2369, 1979.
- [5] Smith, H. O.: Science, 205:455, 1979.

- [6] Riggs, A. D.: *Cytogenet. Cell Genet*, 14: 9, 1975.
- [7] Lin, S. and A. D. Riggs: *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 69: 2574, 1972.
- [8] Razin, A. and A. D. Riggs: *Science*, 210: 604, 1980.
- [9] Razin, A.: in *The Single-Stranded DNA Phages*, (Cold Spring Harbor), N. Y., 1978.
- [10] Marinus, M. G. and N. R. Morris: *Mutant. Res.*, 28: 15, 1975.
- [11] Coulondre, C. et al.: *Nature*, 274: 775, 1978.
- [12] Scarano, E.: *Adv. Cytopharmacol.*, 1: 13, 1971.
- [13] Van der Ploeg, L. H. T. and R. A. Flavell: *Cell*, 19: 947, 1980.
- [14] Waalwijk, C. and R. A. Flavell: *Nucleic Acids Res.*, 5: 3231, 1978.
- [15] Streeck, R. E.: *Gene.*, 12: 267—275, 1980.
- [16] Mondel, J. L. and P. Chambon: *Nucleic Acids Res.*, 7: 2081, 1979.
- [17] Christman, J. K. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 81: 53, 1977.
- [18] Wigler, M. et al.: *Cell*, 16: 777, 1979.
- [19] Taylor, S. M. and P. A. Jones: *Cell*, 17: 771, 1979.
- [20] Behe, M. and G. Felsenfeld: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 78: 1619—1623, 1981.
- [21] Lapeyre, J. N. and F. F. Becker: *B. B. R. C.*, 87: 698—705, 1979.
- [22] Hattman, S.: *DNA Methylation in the Enzymes*, New York, London, (in press).